

## 食塩水のうがいによって誘導される唾液抗菌性タンパク質の同定

丸山 洋介

名寄市立大学保健福祉学部栄養学科

### 概要

【研究の目的】本研究の目的は、食塩水を用いたうがいによって誘導される唾液中の抗菌性タンパクを明らかにする事である。うがいは上気道感染症を予防する方法として効果がある。簡易的なうがいは飲料水を用いて行われるが、抗菌剤や抗菌作用のある物質を水に加えて行われる事もある。食塩水を水に加えてうがいを行うと、インフルエンザや上気道感染症に対して水うがいよりも効果がある事が示唆されている。食塩水のうがいの効果は抗菌作用や洗浄機能など報告されているが、唾液中のタンパクについてはほとんど報告がない。最近では、食塩の感受性に関する研究で低濃度の食塩水を口に含んだ直後から、IgA や cystatin などの抗菌性タンパクが増加する事が報告されている事から、食塩水のうがいでも唾液中の抗菌性タンパクが誘導されると仮説を立て、仮説を検証する研究を行った。

【方法】名寄市立大学の18歳から22歳の男女20名に対し、食塩水と水道水を用いたうがいを実施した。食塩水は2%の濃度で、コントロールは水道水を使用した。短期効果の検証として、うがい後3時間以内に数回唾液をサンプリングした。中期効果の検証として、1週間にわたり毎朝と毎晩うがいを行い、1日目、3日目、5日目、7日目の昼食前に唾液をサンプリングした。唾液サンプルを用いてプロテオーム解析を行い、食塩水うがいによる唾液タンパク質の変化を同定した。

【結果】食塩水うがい直後1時間で唾液分泌量が有意に増加し、タンパク量は2~3時間後に増加した。水道水うがいではこれらの変化は見られなかった。プロテオーム解析の結果、うがい後1時間のサンプルから全てのサンプルにおいて免疫応答や免疫グロブリンの構成に関与する因子が多数調節されていた。中期的なうがいによっても同様の調節が確認された。さらに、うがい後3時間から7日目までのサンプルで鎮痛作用に関与する因子が増加していた。

【考察】本研究の結果から、食塩水うがいが非特異的な免疫応答を誘導することが示唆された。さらに、食塩水うがいの鎮痛作用に関与する候補因子も同定することができた。今後、分泌唾液を用いた抗菌活性の測定や食塩濃度の検討を行い、食塩水うがいの効果を詳細に検証したい。

### 1. 研究目的

うがいは上気道感染症を予防する方法として効果がある事が報告されている。うがいによる感染症の予防効果は医療システムへの負担も軽減される<sup>(1)</sup>。うがいは、口腔内を洗浄し病原菌、ウイルスやアレルゲンなどの異物を排出し、口腔衛生を向上すると共に口腔内の乾燥を防止する<sup>(2)</sup>。簡易的なうがいは飲料水を用いて行われるが、飲料水に抗菌剤、食用油やラクトフェリンの様な特定のタンパク質の添加、抗菌作用の報告がある紅茶や緑茶が

用いられる事もある<sup>(3,4)</sup>。その中で、食塩水を用いた方法も予防効果を高める事が報告されている<sup>(3)</sup>。鼻腔内の洗浄では水よりも食塩水の方が上気道感染症に対して予防効果がある事が報告されている<sup>(5)</sup>。食塩水が上気道感染症に対して水よりも予防効果が高い原因として、浸透圧の効果、脱水作用やpHの調節作用などが報告されている。しかし、口腔内の唾液タンパク質を調節するという報告はほとんどない。近年の食塩の感受性に関する研究では、低濃度から高濃度の食塩水を口に含んだ後の

唾液を解析すると、免疫グロブリンの構成因子や defensin alpha 3 などの抗菌性のタンパク質が短時間で誘導される事が報告されている<sup>(6)</sup>。この結果から、食塩を用いたうがいでも、これまで報告がある効果の他に食塩に特異的な唾液の抗菌性タンパク質が誘導されていると考えられる。そこで、本研究の目的は、食塩水を用いたうがいによって誘導される唾液の抗菌性タンパク質を明らかにする事とした。

## 2. 研究方法

### 2.1 被験者

食塩水を用いたうがいと水道水を用いたうがいを、名寄市立大学に在学する 18 歳から 22 歳の男女 20 名に依頼した。被験者の食塩水を用いたうがいと水道水を用いたうがいの間は 2 週間以上の期間を空けて行った。本研究については、名寄市立大学の倫理委員会の承認を得て実施した(承認番号 R5-020)。被験者には、研究の目的と手順を説明した。被験者は実験の内容を理解し承諾書に署名して研究に参加した。

### 2.2 うがいとサンプリング方法

食塩水のうがいは 2%の食塩水を用いて行った。2%の食塩水は水道水に市販の食塩を加える事で作成した。コントロールでは水道水を用いてうがいをを行った。うがいは 100 ml 程度の溶液を用いて 1 回あたり 10 秒間溶液を口に含み、2 回行った。唾液のサンプリングは市販のサンプリングキット(SARSTEDT K.K.)を用いた。サンプリングは棒状の脱脂綿を安静時に口に 2 分間含む事で行った。採取したサンプルは解析時まで冷凍保存した。短期的なうがいの効果を検証するために、うがい後から 3 時間の間に唾液のサンプリングを行った。サンプリングのタイミングはうがい 30 分前、30 分後、1 時間後、2 時間後と 3 時間後に行った(Fig. 1)。中期的なうがいの効果を検証するために、起床時と就寝時にうがいを 1 週間継続して行い、うがい 1 日目、3 日目、5 日目、7 日目の昼食前に唾液のサンプリングを行った(Fig. 1)

### 2.3 唾液の分泌量, タンパク質濃度, 総タンパク質量

唾液のサンプリングチューブを、遠心機を用いて 4°C, 1000 g で 1 分間、遠心分離を行った。その後、1.5 ml チューブ(TreffLab)に唾液サンプルを分注し、解析時まで低温冷凍庫で-80°Cで保存した。唾液量は唾液の密度を 1 ml/g と仮定して 1 分に流出する唾液量(ml/min)

を求めた。唾液内に含まれるタンパク質の濃度は Bradford 法で定量した<sup>(7)</sup>。試薬は TaKaRa Bradford Protein Assay Kit(Takara T9310A)を用いて行った。4 µl の唾液を 200 µl の Bradford Dye Reagent とよく混合して、96 well マイクロプレート(Wuxi Nest Biotechnology 514201)に分注した。その後マイクロプレートリーダー(Bio rad iMarK)を用いて 595 nm と 650 nm の吸光度を計測した。650 nm の値はコントロールとして計測し、595 nm はタンパク質濃度の定量に用いた。Total protein(µg/min)は 1 分間に分泌される唾液に含まれる、総タンパク質量を示した。

### 2.4 唾液のプロテオーム解析

食塩水うがい前後の唾液サンプルを用いてプロテオーム解析を行った。各タイムコースにおける 20 名のサンプルから 3 名分のサンプルを用いて、うがい前、うがい後 1 時間、3 時間、1 日目、7 日目のサンプルを解析した。解析では、唾液サンプルを 0.45 µm のスピンフィルター(Merck UFC40HV25)で濾過後、アセトン沈殿を行い、タンパク質濃度の定量を行った。TEAB buffer (50 mM TEAB, 6 M Urea)に溶解したサンプルを 1 µg/µl の濃度に調整した。調整したサンプルを冷凍後に、金沢大学の疾患モデル総合研究センターに解析を委託した。質量分析は Orbitrap QE plus(Thermo Fisher Scientific)とナノ液体クロマトグラフィー(EASY-nLC 1200; Thermo Fisher Scientific)を用いて行われた。結果は Proteome discoverer software(Thermo Fisher Scientific)で解析した<sup>(8)</sup>。

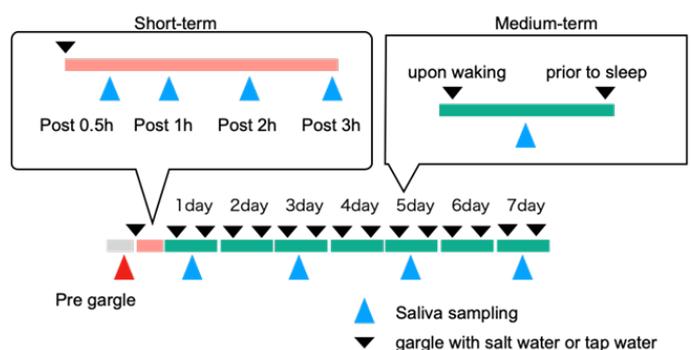


Fig. 1 食塩水うがいより誘導される唾液のサンプリング方法

## 2.5 統計検定

唾液サンプルについて Shapiro-Wilk 検定で正規性の検定を行った。その後、うがい前サンプルとうがい後のサンプルについて t 検定を行った。有意水準は  $p < 0.05$  とした。

## 3. 研究結果

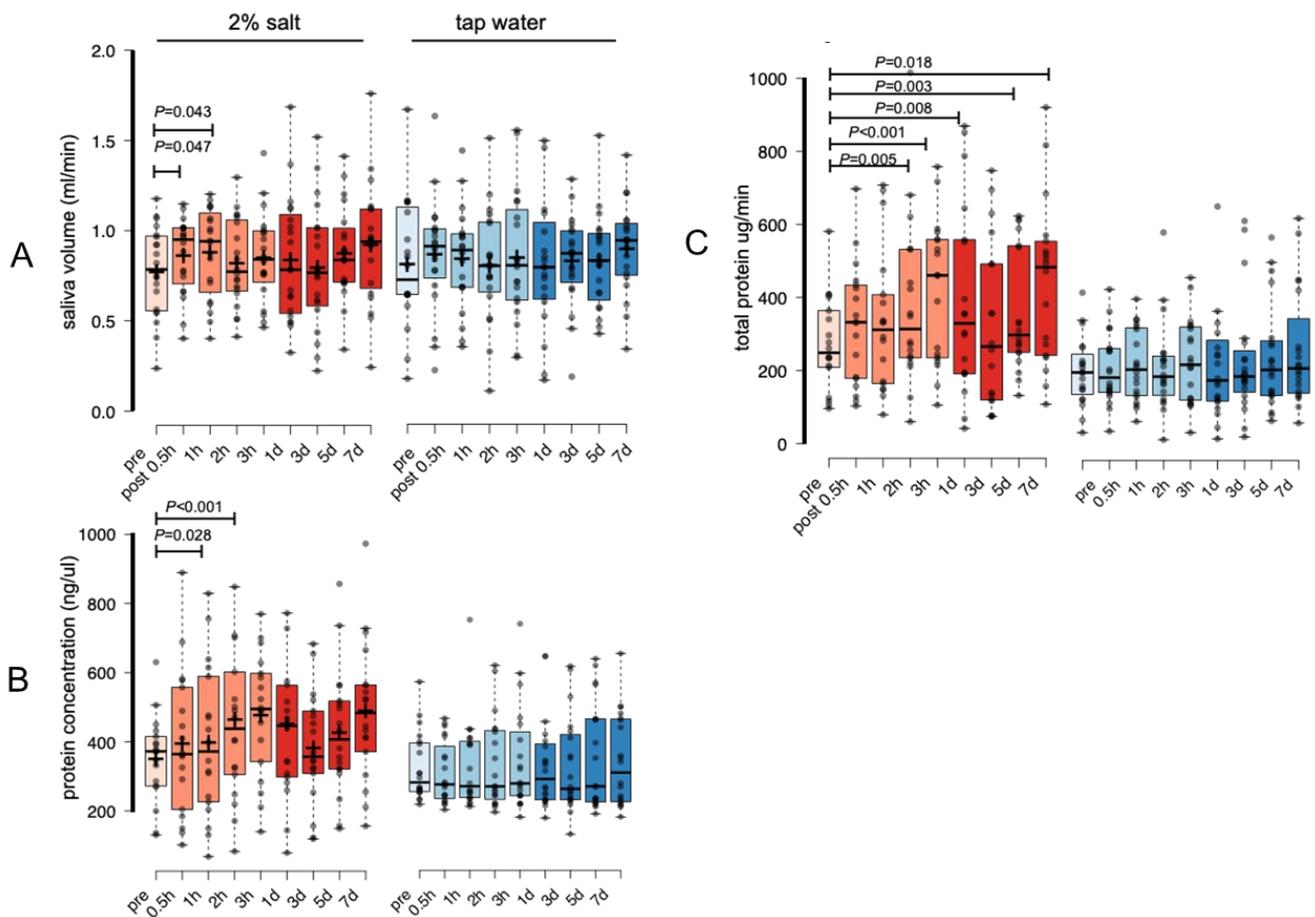
### 3.1 試料採取および参加情報

食塩水を用いたうがいと、水道水を用いたうがい前後の唾液のサンプルを 20 名の被験者から採取した。

被験者の男女比は 5 : 15 であり、被験者の体重、身長、年齢について中央値(最小値-最大値)は、体重 52.1 kg (39.3-67.5)、身長が 160.3 cm (147.8-168.2)、年齢は 20.2 歳 (18.7-21.3)であった。

### 3.2 食塩水のうがいによって調節される唾液量とタンパク質

食塩水でうがいを行うと、うがい後 0.5 時間と 1 時間で唾液の分泌量が増加した (Fig. 2A)。また、唾液のタンパク質濃度については、食塩水でうがい後 1 時間、と 3 時間で増加した (Fig. 2B)。さらに唾液中に含まれる総タンパク質量はうがい後 2 時間、3 時間、継続的なうがいを行った 1 日目、5 日目と 7 日目でうがい前と比較して増加していた (Fig. 2C)。一方、水道水を用いたうがいでは、唾液の分泌量、タンパク質濃度、総タンパク質量に有意差は認められなかった (Fig. 2A, B, C)。



**Fig. 2** 食塩水によって調節される唾液量、タンパク質量、総タンパク質量

(A) 食塩水と水道水のうがい前後の唾液量の変化。

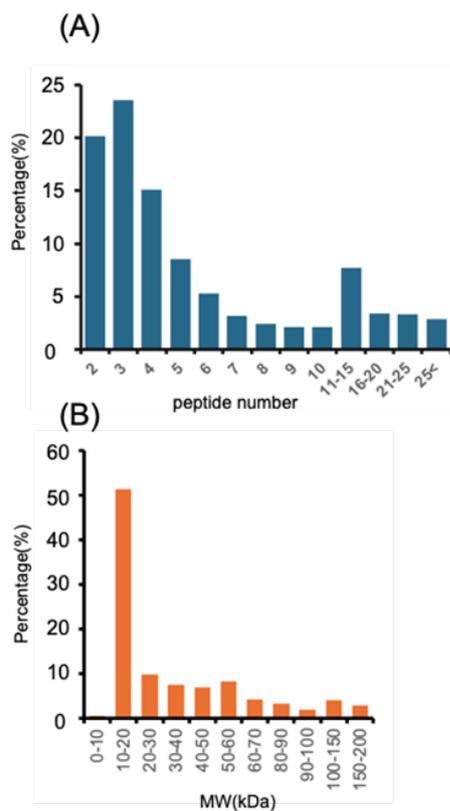
(B) 食塩水と水道水のうがい前後の唾液タンパク質量の変化。

(C) 食塩水と水道水のうがい前後の総タンパク質量の変化。

赤色は2%食塩水によるうがいのサンプルを示し、青色は水道水によるうがいのサンプルを示す。

### 3.3 食塩水のうがいによって誘導される唾液プロテオーム

食塩水のうがい前と、うがい後1時間、3時間、継続的なうがいを行った1日目、7日目の唾液サンプルを質量分析計によって解析した。結果、20908個のタンパク質が検出された。その中で、ペプチド数が2以上の因子は6570個あり、重複するタンパク質を除外すると、2486個のタンパク質が同定された。同定したタンパク質に対するペプチド数の割合はペプチド数が2から6で全体の76%を占めていた(**Fig. 3A**)。また検出されたタンパク質数とその分子量を**Fig. 3B**に示した。30 kDaまでの因子が全体の62%を占めていた。



**Fig. 3** プロテオーム解析により同定された因子のペプチド数と分子量

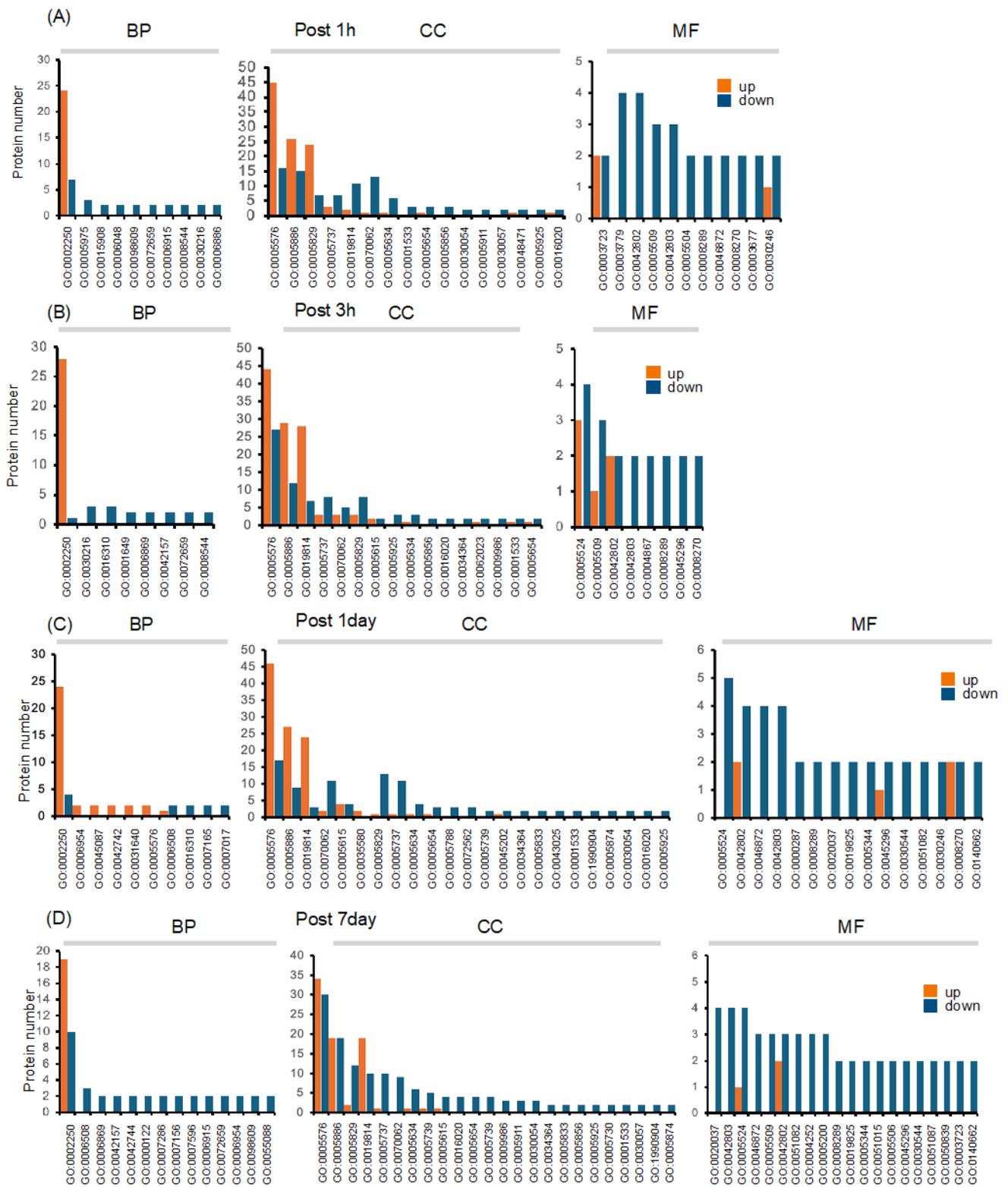
- (A) 検出された唾液タンパク質のペプチド数と全体に占める割合。  
(B) 検出された唾液タンパク質の分子量と全体に占める割合。

### 3.4 食塩水のうがいによって調節される因子の特徴

食塩水のうがいによって変化した因子について Gene Ontology による分類を行った。Biological process annotation (BP) では、うがい後1時間から継続的なうがいを行った7日目のサンプルにおいて、増加した因子は adaptive immune response (GO:0002250) に分類された (**Fig. 4**)。

減少した因子も同様に adaptive immune response に分類されたが、割合は低かった (**Fig. 4**)。Cellular component annotation (CC) では増加した因子はうがい後1時間では、extracellular region (GO:0005576), plasma membrane (GO:0005886), Cytosol (GO:0005829) に多く分類された。

うがい後3時間のサンプルから7日目のサンプルまで extracellular region (GO:0005576), plasma membrane (GO:0005886) に加えて、immunoglobulin complex (GO:0019814) に多く分類された (**Fig. 4A, B, C, D**)。一方、減少した因子では、増加した因子と共通したアノテーションに加えて1時間では immunoglobulin complex (GO:0019814), cytoplasm (GO:0005737), extracellular exosome (GO:0070062) に多くの因子が分類された (**Fig. 4A**)。うがい3時間後と1日目では cytoplasm (GO:0005737) と cytosol (GO:0005829), 7日目では cytoplasm (GO:0005737), extracellular exosome (GO:0070062) が増加した因子よりも多く分類された (**Fig. 4B, C**)。Molecular function annotation (MF) については、ATP binding (GO:0005524), identical protein binding (GO:0042802), metal ion binding (GO:0046872), protein homodimerization activity (GO:0042803) が減少した因子多く分類された (**Fig. 4A, B, C, D**)。



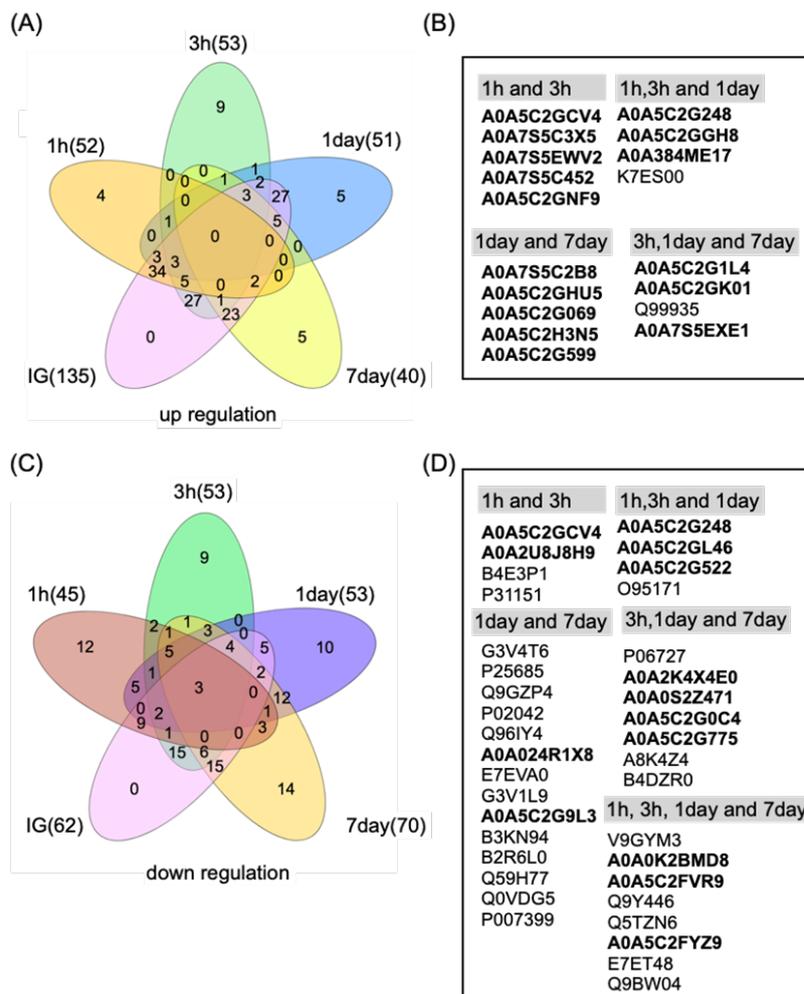
**Fig. 4** 食塩水のうがいによって誘導されたタンパク質の GO アノテーションによる分類

- (A) うがい後 1 時間の GO アノテーション。
- (B) うがい後 3 時間の GO アノテーション。
- (C) うがい継続 1 日目の GO アノテーション。
- (D) うがい継続 3 日目の GO アノテーション。

### 3.5 食塩水のうがいによって非特異的な免疫応答や炎症作用を抑制するタンパク質が調節される

同定した因子についてうがい前と比較して増加した因子、減少した因子、複数サンプリング時間で共通した因子を **Fig. 5** に示した。増加した因子 ( $p < 0.05$ , 1.5 倍以上) ではうがい後 1 時間, 3 時間, 継続的なうがいの 1 日目と 7 日目ではそれぞれ, 52, 53, 51, 40 因子あり, 減少した因子 ( $p < 0.05$ , 0.6 倍以下) ではそれぞれ 45, 53, 53, 70 因子あった (**Fig. 5A, C**)。増加した因子にも減少した因子にも免疫グロブリンの構成因子が多く含まれていた (**Fig. 5B**)。増加した因子の中の複数のサンプリング時間で共通して調節さ

れた因子は, 1 時間と 3 時間で 5 因子, 1 日目と 7 日目では 5 因子あり免疫応答に関与する因子が調節されていた (**Fig. 5**)。またうがい後 3 時間から 7 日目までは 4 因子が含まれ免疫応答に関与する因子に加えて Opiorphin prepropeptide (OPRPN) が調節されていた (**Fig. 5B**)。抑制された因子については, 1 時間と 3 時間では 3 因子あり, 免疫グロブリン可変部位に関する因子と, TROPOMYOSIN BETA CHAIN (B4E3P1) と PROTEIN S100-A7 (P31151) が調節されていた (**Fig. 5C, D**)。うがい後 1 日目と 7 日目では 14 の因子が調節され, 1 時間から 1 日目までは 4 因子, 3 時間から 7 日目までは 7 因子が調節されていた (**Fig. 5C, D**)。



**Fig. 5** プロテオーム解析により同定された因子と同定された免疫グロブリン構成因子のベン図

(A) 食塩水うがいによって増加するタンパク質と検出された免疫グロブリン因子とのオーバーラップ。

(B) 複数のサンプリング時間で共通して増加した因子。

(C) 食塩水うがいによって減少するタンパク質と検出された免疫グロブリン因子とのオーバーラップ。

(D) 複数のサンプリング時間で共通して減少した因子。

太字は免疫グロブリンの構成因子を示す。

#### 4. 考察

研究では食塩水のうがいによって誘導される抗菌性タンパク質を同定するために、唾液のプロテオーム解析を行なった。結果、食塩水を用いたうがいでは唾液タンパク質の分泌が調節され、免疫応答に関わるタンパク質や鎮痛作用のあるタンパク質がうがい直後の1時間以内から誘導される事が明らかになった。また、日常的に継続して食塩水でうがいを行う事で日中に分泌される唾液に抗菌作用や炎症作用を調節する因子が増える事が明らかになった。本研究の結果はこれまで食塩水を用いたうがいを行った際の効果を唾液タンパク質レベルで解明した。

唾液量は食塩水でうがいを行なった30分後から1時間の間に増加した。唾液タンパク質濃度は2時間から3時間で増加していた。総タンパク質量も同様に2時間から増加していた。これまでの知見では100 mMのNaCl溶液(0.58%の食塩水)を口に含んだ後1分後には、唾液の分泌量が、水を口に含んだ際の0.74 ml/minから1.67 ml/min程度に増加する事が報告されている<sup>9)</sup>。本研究の中央値は水道水のコントロールで0.78 ml/minで、有意差のあった30分と1時間では0.95と0.94 ml/minであり、食塩水を口に含んだ後の経過時間を考慮すれば、食塩水によって唾液量が増加する先行研究と結果は合致すると考えられる。唾液内に含まれるタンパク質は唾液腺から分泌される他に、血液由来、口腔内の上皮細胞や上皮細胞の分泌タンパク質が含まれている<sup>10)</sup>。これまでに培養細胞に塩化ナトリウム処理を行った際に遺伝子発現やタンパク質が変化したと報告があり<sup>11, 12)</sup>、タンパク質量の増加については、上皮細胞由来の分泌タンパク質も関与していると考えられた。

うがい後の短期間から中期間で調節された因子には特に免疫グロブリンを構成するタンパク質が多く含まれていた(**Fig. 4, 5**)。これらの結果から、免疫グロブリンに関与する因子の調節は、食塩水のうがいの刺激によって即座に応答する事が示唆された。唾液腺や上皮細胞からIgGやIgAが分泌されている事が報告されている<sup>13, 14)</sup>。モデル動物のラットを用いた研究では、摂食後に耳下腺のタンパク質合成速度は対照群の約2倍になったが、舌下腺は変化しないという報告がある<sup>15)</sup>。これまでの知見から唾液腺におけるタンパク質の分泌

は耳下腺由来であると考察できるが、その他について食塩水のうがいが、上皮細胞に働きかけているのか、または唾液腺と上皮細胞に協働的に作用しているかについては不明である。

唾液は口腔粘膜構造の維持や粘膜病変、創傷、潰瘍の治癒にも重要な役割を果たしている事が報告されている<sup>16)</sup>。食塩水のうがい後3時間から7日目までOPRPNが増加していた。OPRPNは鎮痛作用のあるペプチドとして知られている<sup>17)</sup>。一方で、うがい後1時間と3時間では、Protein S100-A7、1日目から7日目までは、SCRN3 proteinやHaptoglobin-related proteinなどがうがい後に抑制されていた。それぞれ、免疫応答やシグナル伝達に関与する因子であり、食塩水のうがいによって調節される免疫の活性化部位を明確にするにはさらに研究が必要だと考えられた。これまでの結果から、食塩水のうがいによる鎮痛作用はOPRPNが鎮痛作用に関与している事が考えられる。鎮痛作用について、これまでに、塩化カリウムを用いた口腔洗浄剤を用いる事で歯髄知覚過敏を軽減すると報告があり<sup>18)</sup>、ナトリウム塩以外にも同様の効果があるかもしれない。本研究を実施する際に立てた実験仮説について、実験結果から、食塩によるうがいによって非特異的な免疫応答が誘導される事が明らかになった。さらに食塩水のうがいの鎮痛作用に関与する候補因子も同定する事ができた。今後、分泌された唾液を用いた抗菌活性の測定や、食塩濃度の検討を行い食塩水うがいの効果を詳細に検証する事が望まれる。

#### 5. 今後の課題

今後は食塩水うがいによって誘導される唾液タンパク質を*in vitro*で抗菌活性の測定と食塩水の濃度の検討、複数の塩類を用いて誘導される唾液の機能を明らかにする。

#### 6. 文献

1. Sakai, M., Shimbo, T., Omata, K., Takahashi, Y., Satomura, K., Kitamura, T., ... & Great Cold (2008). Cost-effectiveness of gargling for the prevention of upper respiratory tract infections. *BMC Health Services Research*, 8, 1-7.
2. Takahashi, S., Sato, K., Kusaka, Y., & Hagihara, A. (2017). Public preventive awareness and preventive behaviors during a major influenza epidemic in Fukui, Japan. *Journal of Infection and Public Health*, 10(5), 637-643.

3. Ahmad, L. (2021). Impact of gargling on respiratory infections. *All Life*, 14(1), 147-158.
4. Ide, K., Yamada, H., & Kawasaki, Y. (2016). Effect of gargling with tea and ingredients of tea on the prevention of influenza infection: a meta-analysis. *BMC Public Health*, 16, 1-7.
5. Ramalingam, S., Graham, C., Dove, J., Morrice, L., & Sheikh, A. (2019). A pilot, open labelled, randomised controlled trial of hypertonic saline nasal irrigation and gargling for the common cold. *Scientific reports*, 9(1), 1015.
6. Stolle, T., Grondinger, F., Dunkel, A., Meng, C., Médard, G., Kuster, B., & Hofmann, T. (2017). Salivary proteome patterns affecting human salt taste sensitivity. *Journal of agricultural and food chemistry*, 65(42), 9275-9286.
7. Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, 72(1-2), 248-254.
8. Ogura, K., Endo, M., Hase, T., Negami, H., Tsuchiya, K., Nishiuchi, T., ... & Sugama, J. (2023). Potential biomarker proteins for aspiration pneumonia detected by shotgun proteomics using buccal mucosa samples: a cross-sectional case-control study. *Clinical Proteomics*, 20(1), 9.
9. 杉本久美子, 土橋なつみ, 泰羅雅登, & 臼井信男. (2013). 7. 味覚刺激と自律神経・脳活動の関連 (< 総説特集> 味覚 (うま味) と口腔保健: より健康な生活を目指して). *日本味と匂学会誌*, 20(2), 151-160.
10. Denny, P., Hagen, F. K., Hardt, M., Liao, L., Yan, W., Arellano, M., ... & Fisher, S. J. (2008). The proteomes of human parotid and submandibular/sublingual gland salivas collected as the ductal secretions. *Journal of proteome research*, 7(5), 1994-2006.
11. Stubblefield, E., & Mueller, G. (1960). Effects of Sodium Chloride Concentration on Growth, Biochemical Composition, and Metabolism of HeLa Cells. *Cancer Research*, 20, 1646-1655.
12. Walsh-Reitz, M., Toback, F., & Holley, R. (1984). Cell growth and net Na<sup>+</sup> flux are inhibited by a protein produced by kidney epithelial cells in culture.. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 81 3, 793-6.
13. Crawford, J., Taubman, M., & Smith, D. (1975). Minor salivary glands as a major source of secretory immunoglobulin A in the human oral cavity. *Science*, 190, 1206 - 1209.
14. Hurlimann, J., & Zuber, C. (1968). In vitro protein synthesis by human salivary glands. I. Synthesis of salivary IgA and serum proteins.. *Immunology*, 14 6, 809-17.
15. Proctor, G., Shori, D., & Preedy, V. (1993). Protein synthesis in the major salivary glands of the rat and the effects of re-feeding and acute ethanol injection.. *Archives of oral biology*, 38 11, 971-8.
16. Fábíán, T. K., Fejérdy, P., & Csermely, P. (2008). Salivary genomics, transcriptomics and proteomics: the emerging concept of the oral ecosystem and their use in the early diagnosis of cancer and other diseases. *Current genomics*, 9(1), 11-21.
17. Rougeot, C., Robert, F., Menz, L., Bisson, J. F., & Messaoudi, M. (2010). Systemically active human opiorphin is a potent yet non-addictive analgesic without drug tolerance effects. *Journal of physiology and pharmacology*, 61(4), 483.
18. Silva, A., Muniz, R., Lago, M., Junior, E., & Braz, R. (2022). Clinical Efficacy of Mouthwashes with Potassium Salts in the Treatment of Dentinal Hypersensitivity: A Systematic Review and Meta-analysis. *Operative dentistry*.

## Identification of Salivary Antimicrobial Proteins Induced by Gargling with a Saline Solution

Yosuke Maruyama

Nayoro City University

### Summary

[Background] Gargling with salt water has been demonstrated to be an effective method for preventing upper respiratory tract infections. However, the impact of salt water gargling on the composition of saliva secreted in the oral cavity remains poorly understood. In this study, we hypothesized that salt water gargling induces the production of antimicrobial proteins in the oral cavity.

[Methods] Twenty healthy male and female university students participated in this study. Saliva were collected before and after gargling with 2% salt water. The tap water was used for control. To clarify the short-term (within 3 hours) and medium-term (around a week) effects of salt water gargling, sampling points were pre-gargling, post-0.5, post 1, post 2, and 3 hours for the short-term. In the medium-term, sampling was conducted post 1 days gargling, post 3 days, post 5 and post 7 days, sampling was done before lunch. For gargling with salt water samples, we performed shotgun proteomic analysis of pre- and post-gargle saliva to identify salivary proteins that were modulated by salt water gargling.

[Results] We have identified a number of immune response-related factors induced by gargling salt water and several proteins with anti-inflammatory properties. From 1 hour to 7 days after gargling, the increased proteins were components of immunoglobulins, which were classified as adaptive immune response (GO:0002250) by biological process annotation in Gene Ontology. Cellular component annotation showed that most of the proteins were involved in the extracellular region (GO:0005576), plasma membrane (GO:0005886), and immunoglobulin complex (GO:0019814).

[Conclusion] In our study, we identified proteins induced by salt water gargling. The results indicate that salt water gargling modulates numerous proteins involved in immune responses both in the short and medium-term. These findings provide a detailed understanding of the effects of salt water gargling and may have practical applications in daily life.