

令和 6 年 6 月 14 日現在

機関番号：32689

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2023

課題番号：18K10863

研究課題名（和文）熱中症予防に役立つ唾液を用いた評価方法の検討

研究課題名（英文）Evaluation Methods Using Saliva for Heat Illness Prevention

研究代表者

赤間 高雄（Akama, Takao）

早稲田大学・スポーツ科学学術院・教授

研究者番号：60212411

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、熱中症の予防を目指して身体の脱水状態を評価するために、唾液を用いて体内の水分状態を反映する脱水指標を検討した。その結果、刺激唾液の唾液浸透圧の変動を求めることで脱水の有無を観察できる可能性が示唆された。一方で、唾液流量が多い場合はナトリウムの再吸収の影響で唾液浸透圧が上昇してしまうという問題点が考えられる。そのため、今後は唾液を濃縮させたうえでコペプチンELISAキットを使用し、コペプチンの検出の可否を検討する必要がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年の日本の夏期では熱中症の予防が国民の健康維持において重要な課題である。本研究では、熱中症の予防のために、身体の脱水を評価できる唾液中の指標を検討した。その結果、刺激唾液の唾液浸透圧の変動を測定することで身体の脱水を評価できる可能性が示された。しかし、唾液流量が多いとナトリウムの再吸収の影響で唾液浸透圧が上昇してしまうという問題があった。今後はより適切な唾液中の脱水指標を検討する必要がある。

研究成果の概要（英文）：In this study, we aimed to use saliva to assess the body's hydration status in order to prevent heatstroke. We investigated dehydration markers that reflect the body's hydration status. The results suggested that it might be possible to observe the presence of dehydration by determining the variation in the osmolality of stimulated saliva. However, a potential issue is that when the salivary flow rate is high, the osmolality of the saliva may increase due to the reabsorption of sodium. Therefore, it is necessary to concentrate the saliva and examine the feasibility of detecting copeptin using a copeptin ELISA kit in future research.

研究分野：スポーツ医学

キーワード：脱水 唾液

## 1. 研究開始当初の背景

熱中症が発生する生理的要因には、過度な体温上昇と脱水が挙げられる。運動および暑熱ストレスの組み合わせによって誘発される脱水では、血清浸透圧が段階的に増加するため(Muñoz et al., 2013)、脱水の評価に有益な指標とされている。近年では唾液を用いて脱水状態を評価できる可能性が報告されている(Walsh et al., 2004)。唾液は簡便かつ非侵襲的に自己採取や反復採取が可能な生体試料である。一方で、唾液を用いた脱水指標の確立に向けて、唾液採取方法や唾液脱水指標が確立されておらず不明な点が多い。

採取する唾液は大きく無刺激唾液と刺激唾液に分けることができる。唾液は採取条件によって分泌速度や成分が大きく変化する(Ericsson & Hardwick, 1978; 広野, 2006)。唾液を用いた脱水評価の有用性を検討するためには、各唾液採取方法を用いて、安静時の血液中の脱水指標を反映する唾液指標の検討や、一過性の脱水負荷に連動する唾液指標の検討が必要であると考えられる。

これまでの研究では実験で採取された唾液流量や唾液浸透圧が主に扱われてきたが、唾液流量は個人間でばらつきがあり、脱水状態の範囲を定義づけることは困難とされている(Walsh et al., 2004)。また、導管におけるナトリウムイオンの再吸収能力には上限があるため、腺房部の原唾液分泌速度が大きくなると再吸収が追いつかずに唾液ナトリウム濃度が上昇する(広野, 2006)。そのため、唾液流量が多い場合はナトリウムの再吸収の影響で唾液浸透圧が上昇してしまうという問題点が考えられる。よって、唾液を用いた脱水状態の際には、唾液流量や唾液浸透圧だけでなく、唾液中のバイオマーカーを新たに検討する必要がある。

## 2. 研究の目的

熱中症を予防するためには身体の脱水状態を評価することが重要である。スポーツ現場や非医療機関では血液を採取することは困難であり、唾液採取は簡易に行うことができる。よって、唾液を用いて客観的に脱水状態を把握できる有効な評価方法の検討が望まれている。そこで、本研究では、唾液を用いて体内の水分状態を反映する脱水指標を検討した。この目的を達成するために研究課題を3つ設定した。

研究課題(1)では、安静時において唾液浸透圧が血清浸透圧を反映するかを明らかにするために、唾液を採取し、血液中の脱水指標との関連性を検討することとした。

研究課題(2)では、脱水指標として刺激唾液が有用な試料であるかを明らかにするために、脱水時の唾液流量および浸透圧の変化を検討することとした。

研究課題(3)では、他の唾液中の脱水指標を確立するために、安静時の唾液試料を使用し、脱水の評価に有用な新しいバイオマーカーの測定方法を検討することとした。

## 3. 研究の方法

研究課題(1)：刺激唾液採取方法および無刺激唾液採取方法によって唾液を採取し、血液中の脱水指標との関連性を検討した。健康な成人男性 28 名(年齢：22.8 ± 1.5 歳、身長：174.4 ± 6.2 cm)を対象とした。測定前日 22 時から測定当日 9 時までにはミネラルウォーターのみ自由摂取とした。30 分間の座位安静後、刺激唾液採取もしくは無刺激唾液採取のいずれかをランダムな順番で実施した。その後、すぐに採血を行った。なお、本研究では、刺激唾液を採取した日を刺激唾液試行、無刺激唾液を採取した日を無刺激唾液試行とした。まず、口腔内を洗浄するためにミネラルウォーターで 30 秒間ゆすぐことを 3 回繰り返した。5 分間の座位安静の後、刺激唾液試行では滅菌された綿を 2 本使用し、1 秒に 1 回のペースで 3 分間 180 回咀嚼した。無刺激唾液試行では口腔内へ新たに分泌された唾液を 3 分間チューブへ流し入れ、唾液を回収した。唾液浸透圧は微量浸透圧計(OM-807)を用

いて測定した。各測定値は、平均値 ± 標準偏差で示した。異なる 2 つの測定項目の関係はピアソンの積率相関係数を用いて解析した。統計解析には SPSS Statistics (version 25.0) を用い、有意水準はいずれも危険率 5% 未満とした。

研究課題(2)：健康な成人男性 9 名(年齢：24.6 ± 3.3 歳、身長：173.2 ± 5.0 cm、体重：67.9 ± 8.1 kg)を対象とした。対象者は体重の 2% 減少するまで暑熱環境下(室温：35°C、湿度：30%)で自転車ペダリング運動を行った。運動後は通常環境下(室温：20°C、湿度：30%)で 120 分間の座位で休息した。運動前および運動 120 分後に血液および刺激唾液を採取し、血清浸透圧、唾液流量、唾液浸透圧を測定した。また、体成分分析装置(InBody 770; InBody, Seoul, Korea)を使用して、体重、体水分量(Total body water; TBW)、細胞内水分量(intracellular water; ICW)、細胞外水分量(Extracellular water; ECW)を測定した。対象者は、ランダム化クロスオーバーデザインで、3 つの試行を行った。補水なし試行では運動後 120 分間は補水をしなかった。自由飲水試行では運動後 60 分間かけて対象者の任意の量のイオン飲料を摂取した。120% 補水試行では 60 分間かけて各対象者の体重減少量分の 120% の量のイオン飲料を摂取した。3 つの試行は、少なくとも試行間で 3 日以上空けて同じ時間帯に実施した。また、指定された水分摂取時間外では、試行終了まで食事や飲料は摂取しなかった。同じ測定項目における運動前と運動 120 分後の比較において対応のある t 検定を行った。異なる 2 つの測定項目の関係はピアソンの積率相関係数を用いて解析した。統計解析には SPSS Statistics (version 29.0) を用い、有意水準はいずれも危険率 5% 未満とした。

研究課題(3)：本研究では健常成人 4 名(男性 3 名、女性 1 名)を対象とし、安静時の刺激唾液と無刺激唾液を採取した。刺激唾液は、ミネラルウォーターで 30 秒間、3 回のうがいを行い、5 分間の座位安静の後、SalivaBio Oral Swabs(Salimetrics)を 1 秒に 1 回のペースで 60 回咀嚼することで採取した。無刺激唾液は、ミネラルウォーターで 30 秒間、3 回のうがいを行い、5 分間の座位安静の後、Saliva Collection Aid(Salimetrics)を用いて、2 分間唾液をサンプルチューブに垂れ流す方法で採取した。また、解析時の適正な希釈倍率を検討するために、希釈無し、2 倍、4 倍、8 倍に希釈した唾液を用いて解析を行った。唾液中の脱水評価指標の候補とされるコペプチンを、High sensitivity ELISA kit(ELISA Kit for Copeptin, SEA365Hu, 検出範囲：15.6-1,000pg/mL)を用いて解析した。

#### 4. 研究成果

研究課題(1)：刺激唾液試行における血清浸透圧は  $282.3 \pm 29$  mOsm/kg · H<sub>2</sub>O、無刺激唾液試行における血清浸透圧は  $282.4 \pm 3.7$  mOsm/kg · H<sub>2</sub>O であった。両試行とも血清浸透圧の基準範囲を上回っていなかったことから、本研究の対象者は明らかな脱水状態にない者であったと推察される。刺激唾液試行および無刺激唾液試行ともに、脱水指標とされる血清浸透圧と唾液浸透圧(図 1)、血清ナトリウム濃度と唾液浸透圧、血清尿素窒素と唾液浸透圧の間に有意な相関関係は認められなかった。このことから、安静時において唾液浸透圧は血中の脱水指標を反映しないことが示唆された。また、刺激唾液試行では、唾液浸透圧と唾液ナトリウム濃度において有意な相関が認められた( $r = 0.973$ ,  $p < 0.01$ )。無刺激唾液試行では、唾液浸透圧と唾液ナトリウム濃度において相関は認められなかった( $r = 0.080$ ,  $p = 0.776$ )。刺激唾液では原唾液のナトリウムイオンの量が導管の再吸収能力を上回ったために、口腔内に分泌された唾液ナトリウム濃度が上昇し、それによって唾液浸透圧が上昇したことが示唆された。

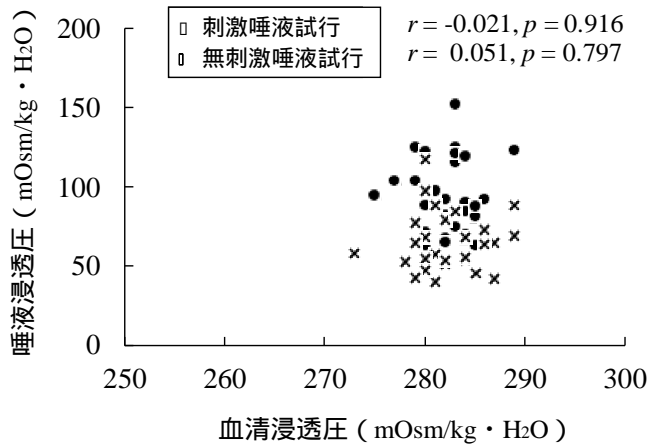


図1. 血清浸透圧と唾液浸透圧の関係

研究課題(2)：補水なし試行において、血清浸透圧は運動前から運動 120 分後にかけて上昇した( $p < 0.01$ , 図 2)。自由飲水試行および 120%補水試行において、血清浸透圧は運動前から運動 120 分後にかけて変化しなかった( $p = 0.771$ ,  $p = 0.146$ )。全ての試行において、唾液流量は運動前から運動 120 分後にかけて有意な変化を示さなかった( $p = 0.768$ ,  $p = 0.193$ ,  $p = 0.925$ )。補水なし試行において、唾液浸透圧は運動前から運動 120 分後にかけて上昇した( $p < 0.05$ )。自由飲水試行および 120%補水試行において、唾液浸透圧は運動前から運動 120 分後にかけて有意な変化を示さなかった( $p = 0.832$ ,  $p = 0.126$ )。唾液浸透圧の変化量は体重( $r = -0.410$ ,  $p < 0.05$ , 図 3)、TBW( $r = -0.418$ ,  $p < 0.05$ )、ICW( $r = -0.399$ ,  $p < 0.05$ )、ECW( $r = -0.394$ ,  $p < 0.05$ )の変化量と有意な相関を示し、唾液浸透圧の変化量は血清ヘマトリック濃度の変化量と相関傾向を示した( $r = 0.359$ ,  $p = 0.066$ )。唾液流量の変化量は血清 AVP 濃度の変化量と有意な相関を示し( $r = 0.386$ ,  $p = 0.046$ )、唾液流量の変化量は血清 Na 濃度( $r = -0.331$ ,  $p = 0.092$ )および血清尿素窒素/クレアチニン濃度( $r = 0.353$ ,  $p = 0.071$ )の変化量と相関傾向を示した。補水なし試行では脱水によって唾液浸透圧が有意に上昇したことから、刺激唾液の唾液浸透圧は脱水状態を反映する指標となる可能性が示唆された。

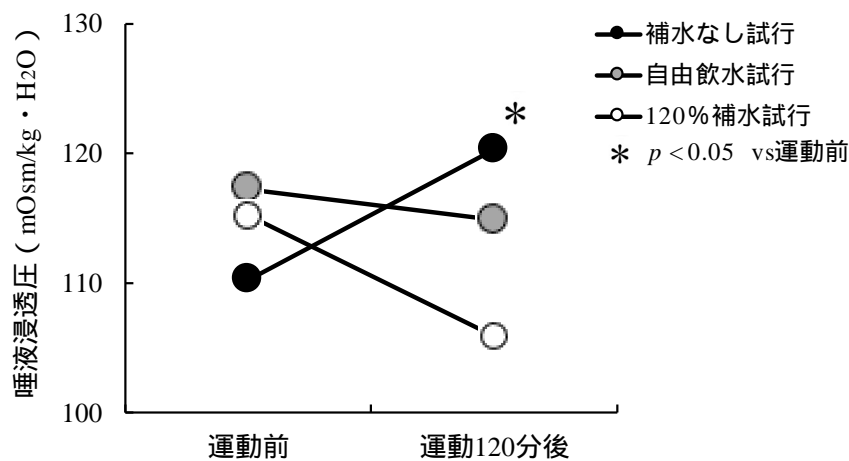


図2. 唾液浸透圧の変化

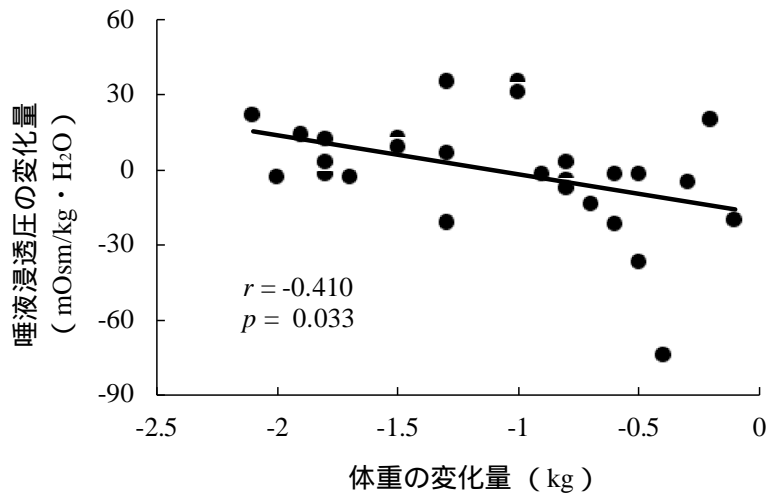


図3. 体重の変化量と唾液浸透圧の変化量との関係

研究課題(3)：唾液中の脱水評価指標の候補とされるコペプチンを、High sensitivity ELISA kit を用いて解析した。その結果、いずれの検体も ELISA の検出下限以下であった。よって、本研究で用いた唾液採取方法や希釈倍率に関係なくコペプチンを検出できなかった。

先行研究では、脱水前後の体重減少率と相関関係のあった唾液流量や唾液浸透圧が脱水状態を評価できる可能性が報告されている(Walsh et al . 2004)。しかし、研究課題 1 では、刺激唾液試行および無刺激唾液試行における唾液浸透圧は血中の脱水指標と相関関係を示さなかった。よって、安静時の一回限りの測定では唾液流量や唾液浸透圧を用いた脱水状態の評価は困難であると考えられる。研究課題 2 では、運動前から運動 120 分後にかけて血清浸透圧が上昇し、それに伴って唾液浸透圧も上昇した。また、唾液浸透圧の変化量は体重、TBW、ICW、ECW の変化量と有意な相関関係を示した。従って、一過性の脱水においては、唾液浸透圧が脱水状態を反映する指標として有用である可能性が示された。

研究課題 3 では、唾液中の脱水評価指標の候補とされるコペプチンを、High sensitivity ELISA kit を用いて解析したが、いずれの検体も ELISA の検出下限以下であった。本方法では唾液採取方法や希釈倍率に関係なくコペプチンを検出できなかった。研究課題 1 の結果より、唾液を用いた脱水評価において、唾液流量や浸透圧だけでは安静時の脱水状態の評価が困難であるため、今後の研究では遠心濃縮機やカラムを用いて唾液試料を濃縮してコペプチンの解析方法を検討する必要があると考えられる。

本研究成果より、安静時の一回限りの測定では唾液浸透圧を用いて体内の水分状態を評価するのは困難であると推察された。一方で、刺激唾液の唾液浸透圧の変動を求めることで、客観的に脱水状態をスクリーニングできる可能性が考えられた。また、従来の ELISA キットでは唾液中のコペプチンを検出することができなかったが、コペプチンは血中で安定性が高く、体水分状態を反映できる指標と考えられているため、安静時の脱水状態の評価のためにも、唾液濃縮など新たな解析方法を検討していく必要がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 稲井勇仁, 孫子曰, 小関恭子, 及川哲志, 花岡裕吉, 枝伸彦, 赤間高雄.	4. 巻 28
2. 論文標題 刺激唾液および無刺激唾液の浸透圧と血清浸透圧との関係	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 日本運動生理学雑誌	6. 最初と最後の頁 37-42
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	稲井 勇仁 (Inai Yuto)  (80973990)	東北文化学園大学・現代社会学部・助教  (31310)	
研究分担者	枝 伸彦 (Eda Nobuhiko)  (50711181)	獨協医科大学・医学部・講師  (32203)	
研究分担者	及川 哲志 (Oikawa Satoshi)  (20844997)	早稲田大学・スポーツ科学学術院・助教  (32689)	2021年9月16日に左記の所属を辞して、アメリカ合衆国に留学した。研究分担は削除（2022年3月15日承認）

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------