

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 17 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23593091

研究課題名(和文) ヒト唾液中に含まれるサイトカインの正常範囲の決定

研究課題名(英文) Decision of a normal range of cytokines in human saliva.

研究代表者

福井 誠 (FUKUI, Makoto)

徳島大学・ヘルスバイオサイエンス研究部・助教

研究者番号：50325289

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、唾液を試料に用いる新しい健康診断手法の開発のための基盤を確保するために、全身的に健康な者から採取した唾液中に含まれるサイトカインの存在の有無と、その濃度範囲を把握することを目的とする。

全身的に健康であるとされる者より採取した唾液中の16種類のサイトカイン濃度をBio-Plex suspension array systemにて測定した結果、測定したサイトカインのうち8種は全ての被験者から機器の測定可能範囲の値が計測された。本研究の結果、健常者の唾液中サイトカインの特徴が明らかになり、唾液を試料に用いた新規健康診断手法開発のための基盤となる情報が得られた。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study was to investigate the normal range of salivary cytokines obtained from systemically normal individuals for development of health checkup procedure using saliva.

The saliva was obtained from individuals who were in a systemically good health conditions and the levels of salivary 16 cytokines (IL-1 alpha, IL-1 beta, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12(p40), IL-12(p70), IL-18, I FN-gamma, LIF, M-CSF, MIG, PDGF-bb, TNF-alpha and VEGF) were measured using Bio-Plex suspension array system. Eight cytokines (IL-1 alpha, IL-1 beta, IL-5, IL-8, IL-18, M-CSF, MIG, VEGF) were value of a measurable range at all subjects. In addition, among these cytokine, seven cytokines except IL-5 were significantly high level in male than female ( $p < 0.05$ , Mann-Whitney U test). As a result of this study, the basic information for development of new procedure for health checkup using saliva was obtained.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・社会系歯学

キーワード：唾液 サイトカイン 健常者

1 . 研究開始当初の背景

近年、我が国における急速な高齢化の進展及び疾病構造の変化に伴い、医療サービスも従来までの「早期診断・治療」から「健康の維持・増進・疾病予防」へとパラダイムシフトがなされつつあり、国民の健康の増進の重要性が増大している。こうした背景の下、平成 15 年に健康増進法が施行され、健康維持が国民の義務となっている。以前から労働者や学生、地域住民の健康の保持・増進のため、健康診断が毎年行われ、各個人や集団の健康状態の把握が行われてきたが、平成 20 年からは特定健康診査・特定保健指導が開始されるようになり、国民の健康増進への取り組みや関心が高まっている。

現在の健康診査で使用される臨床検査では、採取の際に侵襲的である血液の検査が中心となっており、その他では血圧・尿などを対象とした検査が行われている。ヒトの唾液中には、消化酵素や分泌型 IgA 等だけでなく、各種のサイトカイン等、様々な生理活性物質が含まれることが近年明らかにされている。また、唾液は血液に比べて採取に際しての侵襲性がなく容易に得ることができるため、臨床検査の検体としての利用が期待されている。

これまでにシェーグレン症候群や潰瘍性大腸炎などの全身疾患患者、あるいは歯周炎や扁平苔癬などの口腔疾患患者を対象として、唾液中のサイトカイン濃度と特定の疾患との関連性を調査した報告などがあるが、いずれの研究も、「特定の疾患状態である者とそうでない者(対照群)」間での比較が行われているに過ぎず、対照群の被験者の健康状態を全身のおよび歯科的の両面から十分に確認した上での結果は報告されておらず、正常値範囲は不明である。また、調査対象とされたサイトカイン種も IL-1 $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6、IL-8、TNF- $\alpha$ 、TGF- $\beta$  など、限定されており、単独あるいは 2~3 種のサイトカイン種についての分析が中心である。本研究により、多種の唾液中サイトカインを測定して正常値を設定し、健常者におけるプロファイルを明らかにすることは、唾液を試料とする非侵襲性の新しい臨床検査法の開発にとって必須の基盤を提供するものである。

2 . 研究の目的

本研究では、全身的に健康な者から採取した唾液中に含まれるサイトカインの存在の有無と濃度範囲を把握し、唾液を試料に用いた健康診断手法の基盤のデータとなる、唾液中サイトカイン濃度の正常値の設定することを目的とする。

3 . 研究の方法

徳島大学教職員で H24 および H25 年度に徳島大学で行われている職員定期健診を受診し、全ての検査項目について正常範囲にあり、特定の疾患状態にない、全身的に健康であるとされる者を対象に、本研究への参加を募り、同意が得られた者 37 名(男性 12 名、女性 25

名、平均年齢が 35.2 歳)を被験者とした。

唾液は被験者に無味のサリベットコットン(Sarstatt 社)を 1 分間口に含ませることにより採取した。なお、唾液は採取前 2 時間以内の飲食、ブラッシング等を中止させた状態で採取した。唾液採取後、サリベットコットンを 3,000rpm、20 分間遠心し、上清を -80 で保管とした。唾液中のサイトカイン(IL-1 $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-5、IL-6、IL-8、IL-10、IL-12(p40)、IL-12(p70)、IL-18、IFN- $\gamma$ 、LIF、M-CSF、MIG、PDGF-bb、TNF- $\alpha$ 、VEGF の 16 種)濃度測定を Bio-Plex Suspension Array System(Bio-rad 社)による多種サイトカインの同時定量測定を行った。唾液を採取後に、歯周組織検査を行い、2012 年の修正版による CDC-AAP による歯周疾患の定義により、「全身的健康であり口腔内も健康である者」と「全身的に健康であるが、歯周疾患に罹患している者」の分別を行い比較した。

4 . 研究成果

対象者の唾液中サイトカインの検出率を表に示す。

各サイトカインの測定範囲は数十 ng/ml から数 pg/ml の範囲であった。なお、機器の測定可能範囲の下限を上回ったもの、すなわち検出可能であったものを陽性とした検出率とし、検出率のパーセントとその検出数を示す。

測定したサイトカインのうち表の上半分を示す IL-1 $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-5、IL-8、IL-18、M-CSF、MIG、VEGF の 8 種は全ての対象者から計測範囲内の値が計測された。

その他のサイトカインの検出率はそれぞれ TNF- $\alpha$  が 45.9%、以下、IL-10 が 43.2%、IL-12(p40)と LIF は 29.7%、IL-12p70 は 27%、IFN- $\gamma$  は 16.2%、PDGF-bb は 13.5%、IL-6 は 10.8%から検出された。なお、PDGF-bb は全て女性から検出されたという結果になった。

表：唾液中サイトカインの検出率

	全体(n=37)	男性(n=12)	女性(n=25)
IL-1 $\alpha$	100(37)*		
IL-1 $\beta$	100(37)		
IL-5	100(37)		
IL-8	100(37)		
IL-18	100(37)		
M-CSF	100(37)		
MIG	100(37)		
VEGF	100(37)		
TNF- $\alpha$	45.9(17)	66.7(8)	36(9)
IL-10	43.2(16)	66.7(8)	32(8)
IL-12 p40	29.7(11)	50(6)	20(5)
LIF	29.7(11)	50(6)	20(5)
IL-12 p70	27.0(10)	41.7(5)	20(5)
IFN- $\gamma$	16.2(6)	33.3(4)	8(2)
PDGF-bb	13.5(5)	0	20(5)
IL-6	10.8(4)	16.7(2)	8(2)

\*:検出率(陽性検出数)

全対象者から検出されたサイトカイン濃度について、IL-5 は数 pg/ml で、IL-1 $\alpha$  が数十 pg/ml、そのほかのサイトカインやケモカインは数百 pg/ml といったレベルで唾液中に存在することが示された。なお、Mann-Whitney U 検定により、これらのサイトカインのうち、IL-5 を除く 7 種のサイトカインは女性よりも男性で有意に高いレベルに

あることが示された(図1)。また、一部の対象者から検出されたサイトカインについて、唾液中では検出されても数 pg/ml から十数 pg/ml といったレベルで存在していることが示された。なお、IL-12(p40)について、検出率は 30% でしたが、検出された者の唾液中レベルは数百 pg/ml といったレベルで存在していることがあることが示された。なお、いずれサイトカインも男女差は見られなかった(図2)。

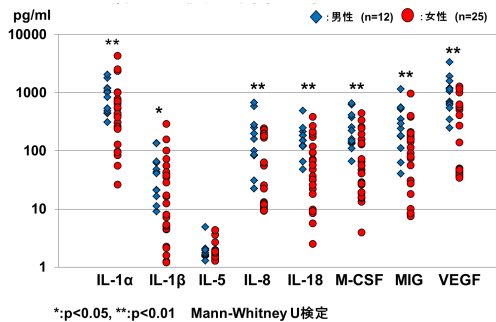


図1. 全身的に健康な者の唾液中サイトカインレベル(全対象者から検出されたもの)

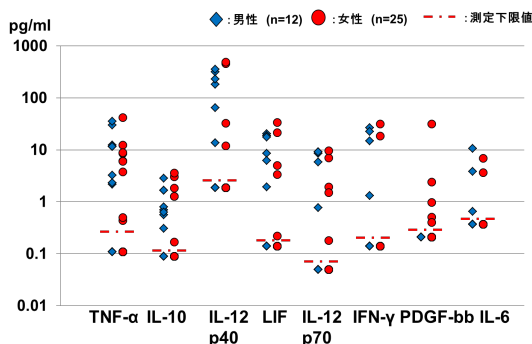


図2. 全身的に健康な者の唾液中サイトカインレベル(一部の対象者から検出されたもの)

全対象者から検出されたサイトカインについて、2012年度の修正版のCDC-AAPによる歯周疾患の定義により、No periodontitisとそれ以外のPeriodontitisの二群に分けての比較を行った。Mann-Whitney U検定これらのサイトカインにおいて有意差は見られなかった。(図3)同じく、一部の対象者から検出されたサイトカインについて、歯周健康状態による比較を行ったところ、こちらでも有意差は見られなかった。(図4)

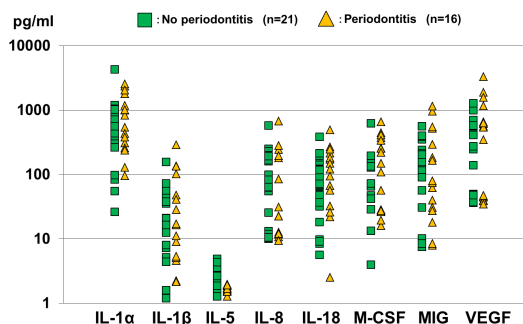


図3. 全身的に健康な者の唾液中サイトカ

インレベル(全対象者から検出されたもの、歯周健康状態による比較)

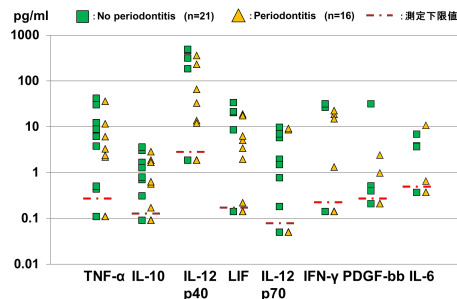


図4. 全身的に健康な者の唾液中サイトカインレベル(一部の対象者から検出されたもの、歯周健康状態による比較)

続いて、全身的にも口腔的にも健康な者、すなわち対象者のうち No periodontitis の者での唾液サイトカインについて、全対象者から検出されたサイトカインについて男女間での比較を行ったところ、これらのサイトカインのうち、M-CSFとVEGFは女性よりも男性で有意に高いレベルにあった(図5)。また、同様に、一部の対象者から検出されたサイトカインについて男女間での比較を行ったところ、いずれサイトカインも男女差は見られなかった(図6)。

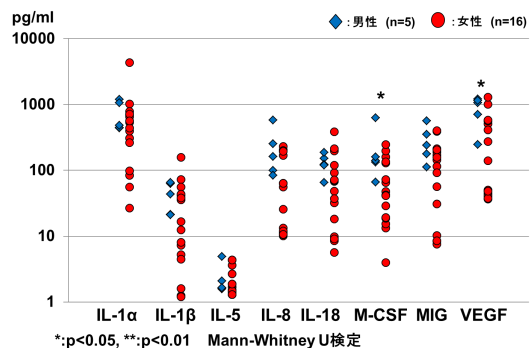


図5. 全身的にも口腔的にも健康な者の唾液中サイトカインレベル(全対象者から検出されたもの)

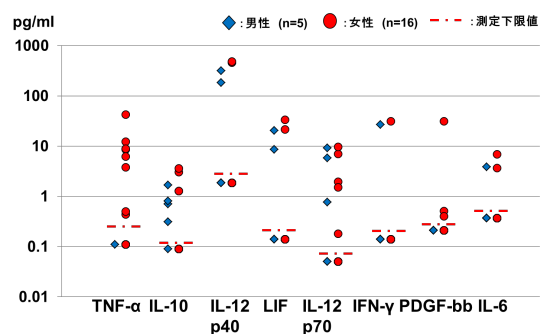


図6. 全身的にも口腔的にも健康な者の唾液中サイトカインレベル(一部の対象者から検出されたもの)

以上の結果より、全身的に問題のない、健康者の、特に口腔内に問題のない健康者の唾液中サイトカインの存在比率や濃度範囲や特徴を把握することができ、唾液を試料に用

いた新規健康診断手法開発のための基盤となる情報が得られた。この結果をもとに、健常者の唾液中サイトカインの正常値範囲を設定すると共に、今後は糖尿病や動脈疾患などの全身疾患罹患者の唾液中サイトカインと比較を行い、唾液を試料に用いた健康診断手法の開発へとつなげたい。

5. 主な発表論文等  
(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 0件)

〔学会発表〕(計 3件)

福井 誠，三木 かなめ，玉木 直文，伊藤 博夫

唾液中サイトカインと口腔健康状態の関連性

第 24 回近畿・中国・四国口腔衛生学会・総会

2013年10月06日

岡山大学創立 50 周年記念会館（岡山県岡山市）

福井 誠，玉木 直文，伊藤 博夫  
唾液を用いた高齢者の口腔健康状態把握のための基盤的研究

第 56 回日本歯周病学会学術大会

2013 年 09 月 22 日

前橋市民文化会館（群馬県前橋市）

福井 誠，三木 かなめ，リタ・オリウエラ，玉木 直文，伊藤 博夫

健常者における唾液中サイトカイン分析

第 62 回日本口腔衛生学会・総会

2013 年 05 月 15 日～17 日

キッセイ文化ホール（長野県松本市）

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年月日：

国内外の別：

取得状況(計 0件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

福井 誠 (FUKUI, Makoto)

徳島大学・ヘルスバイオサイエンス研究部・助教

研究者番号：50325289

(2)研究分担者

伊藤 博夫 (ITO, Hiro-0)

徳島大学・ヘルスバイオサイエンス研究部・教授

研究者番号：40213079

(3)連携研究者

前田 健一 (MAKEDA, Kenichi)

徳島大学・保健管理センター・教授

研究者番号：30238860