

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 7 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26463153

研究課題名(和文)新しい唾液pH判定キットの開発

研究課題名(英文)A novel colorimetric system using anthocyanins as a clinical pH indicator

研究代表者

兼平 孝 (Kanehira, Takashi)

北海道大学・歯学研究院・准教授

研究者番号：90194935

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：この研究は唾液のpH測定キットとしてアントシアニンの色変化を利用するものである。アントシアニンの安定性を解析したところ、水溶液中では著明に分解が進行することが判明した。綿棒に吸収、乾燥させたものは室温でも60日間室温で保存しても安定していた。綿棒に吸収させたアントシアニンはpH5.5から8.0のリン酸緩衝液に様々な色の変化を呈した。また、110名の被験者から唾液を採取し、本キットでpHを決定し、簡易型pH計による実測値と比較したところ、級内相関係数0.758 ( $p < 0.001$ )と高い一致率が認められた。こうした結果から、本キットは唾液pHの視覚的な測定に臨床上有用であることが示された。

研究成果の概要(英文)：This study was performed to develop a novel colorimetric system using anthocyanins as a pH indicator. Anthocyanins prepared from red wine and red currant extract were characterized by HPLC analysis, alcohol content, and pH. The stability of anthocyanin in aqueous solution and the solid phase was compared. Anthocyanin on a cotton swab was hardly affected by storage for 60 days at room temperature, but the anthocyanin strikingly decreased in aqueous solution. Cotton swabs in which anthocyanin was absorbed displayed a variety of color variations in the pH range from 5.5 to 8.0. Interestingly, it was shown that the color changes correlated with the color component of  $a^*$  (redness), which was quantified using a chromometer. Measurements of pH in saliva were reproducible for the visual color and color component of  $a^*$ . These results show that the assay system can be used as a visual indicator for clinical measurement of pH.

研究分野：予防歯科学

キーワード：安静時唾液 唾液pH アントシアニン 簡易測定キット

## 1. 研究開始当初の背景

予防歯科臨床においては、リスク診断のために唾液検査(サリバテスト)が行われることが多い。検査項目として、唾液の性状や分泌量(安静時、刺激時)に加えて、酸やアルカリを中和する緩衝能、唾液中のう蝕や歯周病を誘発する菌の数、歯周病関連の酵素(LDH:乳酸脱水素酵素など)の定量などが挙げられる。しかし、唾液のpHは、その緩衝能により比較的安定しており変動が少ないことと、様々な口腔疾患、全身疾患との関連は、国内外においてまだまだあまり解明されていないため、唾液検査においてpH検査はほとんど行われていない。

## 2. 研究の目的

一般に唾液のpHは、口腔外に採取した唾液にpHメーターの電極を挿入して測定したり、唾液をリトマス試験紙に垂らした時の呈色反応により評価することが可能である。しかし、重度の口腔乾燥症の者の場合は、唾液の採取そのものが難しく、また、採取した唾液からは二酸化炭素が放出されて、時間の経過とともにpH値が変動するため、採取後、短時間のうちに測定することが求められる。できれば口腔内で直接評価することが望ましいが、発ガン性が指摘されているリトマス紙を直接口腔内には挿入することはできない。

そうしたことから、口腔内で簡便に評価できる唾液pH判定キットに対しては、歯科医院の臨床現場のみならず集団歯科健診などのスクリーニング目的で一定の需要が存在すると考えられる。

アントシアニンは、赤ブドウやブルーベリー、赤キャベツなど植物界に広く存在する色素である。抗酸化作用を有するとともに、酸性が強くなるほど明るくなり(赤色)、塩基性になるほど暗くなる(青色)という特性を有する。

そこでこのアントシアニンを吸収させた綿棒(以下、“**本キット**”と略)を製作し、その特性を利用して唾液のpH判定に応用できるのではないかという着想に至った。

## 3. 研究の方法

### (1) アントシアニンの抽出と定量

#### アントシアニン含有溶液の抽出

アントシアニンは Sakamoto らの報告に従い、赤ブドウとカシスから抽出した。

余市産の赤ぶどう(キャンベル種)10 kg を水洗、粉碎後、プラスチック製発酵ジャーに封入し、室温で2週間アルコール発酵させた後、ガーゼにより種と皮を除去し、さらに2週間室温でアルコール発酵させて、遠心(10分間、2000 rpm)した上清を-20 で保存した。カシスは、札幌市内の家庭菜園で育てられた2 kg を粉碎後、ガーゼでろ過し、抽出物を10日間、4 で保存し、不純物を沈殿させた。その後、遠心(10分間、4000 rpm)した上清を-20 で保存した。

#### アントシアニン量の定量

得られた赤ブドウワインならびにカシスのアントシアニン含有溶液のアントシアニン量の定量は、Durst らの pH Differential 法にて行った。cyanidin-3-glucoside chloride と malvidin-3-glucoside chloride (常磐植物化学研究所)をアントシアニン標準物質として、96穴のマイクロプレート(Corning Incorporated, USA)を用いて、540nmの吸収波長で各アントシアニンの定量を行った。

#### アントシアニン含有溶液のHPLCによる分析

得られた赤ブドウワインならびにカシスのアントシアニン含有溶液の分析を cyanidin-3-glucoside chloride と malvidin-3-glucoside chloride を標準物質として島津 HPLC システム(島津製作所、京都)に逆相カラム(ODS-120T、東洋曹達)を装着して行った。

#### アントシアニンの安定性の分析

##### a. アントシアニンの安定性(水相)

得られた赤ブドウワインのアントシアニン水

溶液は、そのままの状態と pH を 7.0 に調整したものをマイクロチューブに封入し、遮光状態で -20 ℃、4 ℃、室温で保管、60 日間決まった間隔でアントシアニン濃度を定量した。

#### b. アントシアニンの安定性 (固相)

##### (a) アントシアニン含有綿棒の作成

アントシアニン綿棒は、カシス、赤ブドウワインのそれぞれのアントシアニン含有溶液から作成した。作成に先がけて、カシス、赤ぶどうワインのアントシアニン含有溶液の pH を 1M の水酸化ナトリウム溶液にて、7.0 に調整後、遠心 (10 分間、10000 rpm)、0.45 μm の膜フィルター (Acrodisc Syringe Filters, USA) にて濾過滅菌を行った。

カシスのアントシアニン含有溶液 70 μl (6.5 μg アントシアニン含有) を、オートクレーブ滅菌、冷却した綿棒 (直径 4.2 mm、長さ 13mm、サンリツ株式会社、岐阜) に吸収させ、室温で 1 時間乾燥させた。さらに赤ブドウワインのアントシアニン含有溶液 70 μl (20.6 μg アントシアニン含有) を綿棒に吸収させ、室温で 1 時間乾燥させた後、4 ℃ で冷蔵保存した。

##### (b) アントシアニン含有紙ディスクの作成

同様の方法でカシスのアントシアニン含有溶液 70 μl と赤ブドウワインのアントシアニン含有溶液 70 μl を紙ディスク (Advantec, 厚さ 0.7 mm、直径 23 mm) に吸収させた後、室温で 1 時間乾燥させた。

綿棒、紙ディスクのいずれも カシスのアントシアニン、赤ぶどうワインのアントシアニン、カシス + 赤ぶどうワインのアントシアニンを含有するものを作成した。

作成した綿棒、紙ディスクはアルミフォイルに包み、室温と 5 ℃ の冷所で保管、60 日間決まった間隔で中に含まれるアントシアニン濃度を定量した。定量にあたり、室温で 1% の塩酸を含むメタノール中に綿棒、紙ディスクを浸漬して、それぞれに含有されるアントシアニンを抽出した。

統計処理は、IBM SPSS Statistics ver20 を用いて、Spearman の順位相関係数および

Kruskal-Wallis 検定を行った。また、関連の解析には回帰分析を行った ( $p < 0.05$ )。

##### (2) 綿棒発色用リン酸緩衝液の作成

アントシアニンを吸着させた綿棒 (以下、“アントシアニン綿棒” と略) の pH 値による発色の変化を調べるために、0.15M のリン酸二水素ナトリウムおよび同濃度のリン酸水素二ナトリウム (和光純薬、東京) を用いて pH 5.5 から 9.0 までのリン酸緩衝液を作成した。なお、pH の調整はポータブル型 pH メーター (D-71 型、堀場製作所、京都) を用いて行った。

##### (3) アントシアニン綿棒の特性評価

###### アントシアニン綿棒の pH による発色評価

アントシアニン綿棒 (各  $n=3$ ) に、pH 5.5 から 8.0 までのリン酸緩衝液 100 μl を吸収させて発色。1 分後に綿棒の発色状況を、発色の安定している綿棒の先端部から 3~4 ミリまでの部位を分光測色計にて数回測定、評価した。

綿棒の発色の評価は、直径 4 mm センサーを装着した分光測色計 NF333 (日本電色工業、東京) を用いて、Lab 色空間 (L:lightness, a:redness, b:yellowness) にて行った。

統計処理は、IBM SPSS Statistics ver20 を用いて、5.5 から 8.0 までの pH で発色させた各アントシアニン綿棒の Lab 値を one-way ANOVA と多重比較 (Scheffe 法) 解析を行った ( $p < 0.05$ )。

##### (4) アントシアニン綿棒による歯科外来受診者の唾液 pH の測定

###### 被験者

被験者は、本研究の趣旨と内容について十分な説明を行い、研究協力への承諾を得た北海道大学病院歯科診療センターの受診者 110 名 (男 37 名、女 74 名、年齢 13~78 歳) である。なお、本研究は北海道大学病院に設置されている臨床研究開発センター事務局に研究計画を提出して審査を申請、承認を得たものである。

###### 被験者の口腔内診査

#### a . 歯式と歯周組織の検査

歯式および残存歯数、補綴状況（義歯の個数）を確認した。また、歯科用ポケット探針を用いて、1点法にて残存歯全てを診査した。

#### b . 安静時唾液量の測定

被験者に対して、唾液採取2時間前からの歯みがき、飲食および喫煙の禁止を事前に指示、診療室で採取20分前に水で口腔内を含嗽させ、吐唾法により座位にて遠沈管（Corning Incorporated, USA）に唾液を吐かせる（吐唾法、10分間）ことにより安静時唾液を採取、10分後に計量を行い、その被験者の安静時唾液量（mL）とした。

#### c . 目測用標準アントシアニン発色綿棒の作成

目測用のために、pH5.5から8.0までのリン酸緩衝液100 $\mu$ lを吸収させて発色させたアントシアニン含有綿棒を作成した。

#### d . アントシアニン綿棒の発色、採取した安静時唾液の簡易型pH計での測定

b . で排唾開始5分後の遠沈管より安静時唾液100 $\mu$ lを2回採取し、一方はディスク反応板（6穴、マルエム、大阪）上でアントシアニン綿棒に唾液を吸収させて発色させ、1分後に目測用標準アントシアニン発色綿棒を使用して目測によりpHを決定した。なお、発色の変化の大きい6.5-7.0、7.0-7.5の区間では、中間の階調も認め、6.75、7.25も計測値とした。目測はいつも同じ者が行った。発色したアントシアニン綿棒は分光測色計を用いて、Lab色空間（a:redness）の値を測定した。また、もう一方の採取した安静時唾液100 $\mu$ lにより、毎回測定前に校正作業を行った簡易型pH計（コンパクトpHメーターB712型、堀場製作所、京都）でその被験者の安静時唾液のpHを測定した。

110名の被験者のアントシアニン綿棒により目測で決定したpH値と簡易型pH計の値から、IBM SPSS Statistics ver20により級内相関係数を求め、一致率を調べた。また、アントシアニン綿棒により目測で決定したpH値とLab色空間（a:redness）の値の相関を調べた。

## 4 . 研究結果

### （1）アントシアニン含有溶液中のアントシアニン量とHPLCによる分析

赤ぶどうワイン溶液中（pH 3.5 $\pm$ 0.2）には、404 $\pm$ 45 $\mu$ g/mlのアントシアニンが検出され、逆相HPLCによる分析では、8つのピークが認められ、そのうちの2つのピークはcyanidin-3-glucoside chlorideとmalvidin-3-glucoside chlorideのものと認められた。また、カシス溶液中（pH 2.4 $\pm$ 0.1）には、93 $\pm$ 10 $\mu$ g/mlのアントシアニンが検出され、逆相HPLCによる分析では、1つのピークが認められ、cyanidin-3-glucoside chlorideのものと一致した。

### （2）アントシアニンの安定性（水相）

水溶液内のアントシアニンの安定性を60日間調べたところ、そのままの状態では室温で保管したものを除いて比較的安定していたが、pHを7.0に調整したものでは-20 $^{\circ}$ Cで凍結保存したものを除き、アントシアニンの分解が進行していた。

### （3）アントシアニンの安定性（固相）

アントシアニン綿棒中やアントシアニン紙ディスクのアントシアニンは水溶液中に比べていづれも（カシス、赤ぶどうワイン、カシス+赤ぶどうワイン）安定していた（ $p < 0.05$ ）。特にpH7.0のアントシアニン含有溶液で作成したアントシアニン綿棒のアントシアニンは60日間室温で保存してもほとんど変化せず、アントシアニン紙ディスクのアントシアニンに比べて安定していた。このことはpH測定キットの素材として、綿棒の方が紙ディスクよりすぐれていることを示している。

### （4）アントシアニン綿棒のpH変化による発色評価

アントシアニン綿棒は、リン酸緩衝液（pH5.5~9.0）においてLab色空間で色変化を示した。特にa\*（redness）では赤色から青色への明瞭な色

の変化が認められた。しかし、pH8.0 以上ではそれ以上の色の变化は認められなかった。アントシアニン綿棒の色の变化は遮光状態で2か月室温保存したもので安定して認められた。

#### (5) アントシアニン綿棒による歯科外来受診者の唾液 pH

臨床研究として、110名の被験者を対象に唾液を採取し、目測により本キットにより pH を決定し、簡易型 pH 計による実測値と比較したところ、級内相関係数 0.758 ( $p < 0.001$ ) と高い一致率が認められた。また、アントシアニン綿棒により目測で決定した pH 値と Lab 色空間 (a: redness) の値の Spearman の相関係数は 0.713 ( $p < 0.001$ ) と高い相関を示した。

#### (6) 考察

##### 歯科臨床における唾液 pH 測定の意義

医科における日常の医療において、血液の pH は重要な検査項目の1つである。呼吸器疾患や糖尿病など全身疾患の診断に、血液の pH が重要な因子であるからである。しかし、歯科臨床においては、歯科医師が主に診査するのは歯や歯肉、補綴物の状況であり、多くの場合、唾液に関しては口腔乾燥の度合いを把握するための量的検査で、pH 検査などの質的検査はほとんど行われていない。その理由として、唾液の pH はその緩衝能により比較的安定しており変動が少ないこと、様々な口腔疾患、全身疾患との関連がまだあまり解明されていないことが挙げられる。また、唾液中に多量の重炭酸塩が存在し、唾液の弱アルカリ状態を維持しているが、その重炭酸塩は刺激時に分泌された直後の唾液に多く、唾液の採取時間が長引けば、二酸化炭素を放出して、唾液の pH はアルカリ側に上昇するなど、変動しやすいことも挙げられる。

そのため、キット化して被験者の口腔内に直接挿入し、被験者の唾液の pH を短時間に簡単、安全に評価できれば、一般の歯科医療機関のチェアサイドのみならず、集団健診や家庭でも行うこと

が可能となる。

本研究の結果から、唾液 pH の評価は、綿棒を用いた本キットにより安全・簡便にできること。また、そのことから歯科臨床の現場で唾液 pH を測定することが身近となり、その結果から得られる臨床研究により、唾液の pH 値とう蝕、歯周病、口腔乾燥症、口腔粘膜疾患、その他の全身疾患との関係に関する知見がより明らかにあると思われる。また、唾液のリスク診断測定項目に、唾液 pH 測定を入れることで、口腔衛生に関心を持ち、口腔の健康増進を目指して努力する者が増えること、口腔衛生指導の増進を目指す上でも有用である。

#### 今後、解決を要する問題点

##### a. 綿棒の滅菌について

今回の研究では、本法のメリットの一つでもある直接口腔内にアントシアニン綿棒を入れて、発色状況を評価することはしなかった。その理由として、綿棒への唾液の吸収量を一定にして発色量を評価する必要があることと綿棒の滅菌の問題が挙げられる。

*in vitro* の研究では、唾液の吸収量は 100  $\mu$ l 以上であれば、発色状況にあまり差は認められないことが明らかとなったが、問題となるのは綿棒の滅菌である。綿棒を直接口腔内に入れて、綿棒のアントシアニンの色の变化を評価するには、綿棒が滅菌してあることが原則となる。通常の滅菌では、オートクレーブを用いた高温高压滅菌、またはエチレンオキサイドガスを用いたガス滅菌が一般的であるが、アントシアニンは 100 以上の高温高压の環境に置かれることでほぼ脱色したようになり、元には戻らない。また、60~70 のエチレンオキサイドガスで数十分環流するプロセスのあるガス滅菌では、我々の研究ではアントシアニンそのものは 60~70 の温度による変色などの影響はほとんどないが、エチレンオキサイドガスと反応して、綿棒に吸収させたアントシアニンの色が青系に変色してしまうことがわかった。しかし、唾液を吸収させることで、ガス滅

菌しなかった綿棒と発色前とほぼ同じ色調に戻り、発色後の a 値もガス滅菌しなかった綿棒との差がほとんど認められなかったことから、綿棒の滅菌はガス滅菌が望ましいと思われるがもう少し検証実験が必要である。

#### b . 色見本について

今回は、各 pH の緩衝液を吸収、発色させた標準発色綿棒を事前に毎回作成し、外来に持参して、被験者の唾液を吸収、発色させた綿棒とその標準発色綿棒を目測で発色状況を比較することで評価した。同じサイズ、もともとの色彩が同じ綿棒ということもあり、発色状況も比較しやすく、発色させた綿棒と実際に簡易型 pH 計で測定した pH 値との一致率も高かった。しかし、毎回の標準発色綿棒の作製は手間もかかり、臨床的には不合理な方法である。

そこで広く臨床で使用してもらうには、市販の pH 試験紙のように、カラーマネージメントをしっかり管理し、各 pH で発色させ印刷した色見本を作成することが望ましく、今後の課題といえる。

#### c . その他のアントシアニン

今回は、唾液の pH の値に近い pH 値で色調が変化するカシスと赤ぶどうを判定するための色素に用いたが、アントシアニンを含む植物は多い。それゆえ、今回の研究で使用した以外のアントシアニンを含む植物を単体あるいは混合して使用することで、より唾液 pH の変化に鋭敏な発色を示す綿棒が作られる可能性があるが、その検討については今後の課題である。

#### 5 . 主な発表論文等

( 研究代表者、研究分担者および連携研究者には下線 )

[ 雑誌論文 ] ( 計 2 件 )

( 1 ) Sakamoto W, Kanehira T, Hongou H, Matsuda A, Mune M and Asano K ( 2015 ) : Application of Color Changes of Anthocyanins in Red Wine and Red Currant Extract as a Clinical pH Indicator.

Journal of Diagnostic Techniques and Biomedical Analysis, 2:2. <http://dx.doi.org/10.4172/jdtba.1000114> ( 査読 : 有 )

( 2 ) Sakamoto W, Kanehira T, Hongou H and Asano K ( 2015 ) : Polyvinylalcohol Stabilizes Anthocyanins of Red Wine in the Solid Phase but Not in the Aqueous Phase. Advances in Biological Chemistry, 5, 215-223. ( 査読 : 有 )

[ 学会発表 ] ( 計 2 件 )

( 1 ) 高橋睦美、稲垣友理奈、半谷純一、本郷博久、竹原順次、兼平 孝、森田 学 : 新しい唾液 pH 判定キットの開発 ( 第 1 報 )、第 64 回日本口腔衛生学会・総会、2015 年 5 月 29 日、つくば国際会議場 ( つくば市 ) .

( 2 ) 兼平 孝、高橋睦美、竹原順次、本郷博久、松田曙美、森田 学、坂本 亘 : 新しい唾液 pH 判定キットの開発 ( 第 1 報 )、第 59 回日本唾液腺学会学術集会、2014 年 12 月 6 日、文京学院大学 ( 東京 ) .

[ 産業財産権 ]

出願状況 ( 計 0 件 )

取得状況 ( 計 0 件 )

#### 6 . 研究組織

( 1 ) 研究代表者

兼平 孝 ( KANEHIRA Takashi )

北海道大学・大学院歯学研究院・准教授  
研究者番号 : 90194935

( 2 ) 研究分担者

竹原 順次 ( TAKEHARA Junji )

北海道大学・大学院歯学研究院・助教  
研究者番号 : 60216934

森田 学 ( MORITA Manabu )

岡山大学・医歯薬総合研究科・教授  
研究者番号 : 40157904