

平成 23 年 5 月 20 日現在

機関番号：23904

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20592556

研究課題名 (和文) 脳卒中急性期における誤嚥性肺炎予防に関する基礎的研究

研究課題名 (英文) Basic research on prevention of aspiration pneumonia in acute stroke patients

研究代表者

鎌倉 やよい (KAMAKURA YAYOI)

愛知県立大学・看護学部・教授

研究者番号：00177560

研究成果の概要 (和文)：脳卒中急性期には誤嚥性肺炎発症のリスクが高い。肺炎発症と唾液中分泌型免疫グロブリン A (sIgA)・炎症性サイトカイン (IL-6)・上皮成長因子 (EGF)・口腔内細菌との関係を検討した。脳卒中患者 14 名 (79.5±9.0 歳) を対象に、非肺炎群 6 名、肺炎群 8 名に分類した。唾液を第 5～13 病日の隔日 10・14・18 時に採取し、ELISA 法・real-time PCR 法で測定して群間比較した。その結果、唾液中 sIgA (唾液中 sIgA 濃度×唾液量) は肺炎群に有意に高かった (ANOVA;  $p<0.01$ )。IL-6・EGF は群間比較では差を認めず、EGF 濃度は sIgA 濃度と相関を認めた ( $r_s=0.574-0.900$ )。非肺炎群の 2 名に肺炎球菌の増加を認め、肺炎群では抗生物質が投与されて、肺炎球菌・常在細菌とも減退して (6 名)、緑膿菌の増殖 (4 名) を認めた。

研究成果の概要 (英文)：Acute stroke patients have a high risk of aspiration pneumonia. The purpose of this study was to examine the relationship among complication of aspiration pneumonia and salivary secretory immunoglobulin A (sIgA), interleukin 6 (IL-6), epidermal growth factor (EGF), and oral bacteria. Fourteen stroke patients (Age: mean±SD; 79.5±9.0) were classified into a non-pneumonia group (6 people) or a pneumonia group (8 people). Saliva samples were collected three times (10am, 14am, and 18 pm) on days 5, 7, 9, 11 and 13 in the hospital. Samples were measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and real-time polymerase chain reaction (real-time PCR), then compared between the two groups. As a result, there was a significant increase in the salivary sIgA (concentration of sIgA × saliva volume) in the pneumonia group (ANOVA;  $p<0.01$ ). The IL-6 and EGF concentrations did not significantly differ between groups, whereas the concentration of EGF correlated with the sIgA level ( $r_s=0.574\sim0.900$ ). Two people in the non-pneumonia group evidenced in *Streptococcus pneumoniae*. The pneumonia group people were given antibiotics. Six people showed less *Streptococcus pneumoniae* and *Streptococcus mitis*, and 4 people demonstrated increased *Pseudomonas aeruginosa*.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2009 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2010 年度	500,000	150,000	650,000
年度	0	0	0
年度	0	0	0
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：看護学

科研費の分科・細目：看護学・臨床看護学

キーワード：脳卒中急性期、誤嚥性肺炎、唾液中 sIgA、唾液中 IL-6、唾液中 EGF、  
口腔内細菌、ELISA、real-time PCR 法

## 1. 研究開始当初の背景

摂食・嚥下障害を有する患者の原疾患となる第一位は脳卒中である<sup>1)</sup>。摂食・嚥下障害は誤嚥性肺炎や低栄養・脱水といった二次的な合併症を引き起こすリスク因子となりうる。合併症の発生は、回復過程の阻害要因となるうえ、入院期間の延長や医療費の増加、ひいては患者のQOL低下、死亡率の増加までもにも影響を及ぼすものである。

脳卒中の急性期には約35から51%に誤嚥のリスクが認められる<sup>2-4)</sup>と報告されているが、これらの多くは数日から3ヶ月程度で改善がみられ<sup>2)5)</sup>、慢性的な嚥下障害を呈する患者は其中でも1割程度<sup>2)6)</sup>である。脳卒中後の摂食・嚥下機能の経時的な追跡による研究<sup>6)</sup>では、嚥下機能は経時的に改善するものの、急性期には誤嚥のリスクが高い症例が多数認められることが報告された。脳卒中急性期には、患者の嚥下機能が一過性に障害されるため、不顕性誤嚥による肺炎の発生を予防し、回復過程をいかに支援するかが、看護の重要な課題である<sup>7)</sup>。

脳卒中急性期は全身状態の安定を最優先に、発症直後から絶飲食としたうえで静脈栄養や経管栄養による栄養投与経路が選択される。そのため、患者の口腔内は唾液分泌が減少し、自浄作用が低下する。現状では、口腔ケアが実施されているが、その効果を経時的にモニターすることは難しく、結果として、肺炎を発症する患者と発症しない患者が存在する。肺炎の発症には、気管内に流入する細菌の存在と、患者の免疫能の低下が関与する。早発性人工呼吸器関連肺炎も唾液の流入によるものであるが、気管内へ流入する細菌数を減少させるための口腔ケアの効果について、口腔内細菌数や菌種を特定して比較する研究が実施されてきた<sup>8-10)</sup>。

本研究では、口腔内細菌の活性化に影響する免疫能に着目した。口腔などの粘膜組織は粘液層に被覆されており、この粘液層中には、リゾチームやラクトフェリン等の非特異的な抗微生物作用を有する活性物質や、抗原物質を分解する種々の酵素、抗原特異的な生体防御機能を発揮する分泌型免疫グロブリンが含まれている。この分泌型免疫グロブリンとして代表的な物質が分泌型IgA (secretory Immunoglobulin A: sIgA、以下sIgA)であり、これは粘膜固有層に分布している。口腔内の唾液中sIgAは上気道粘膜面での病原菌の不活性化、凝集、粘膜上皮細胞への接着阻止などの作用によって、病原菌の感染性を失活さ

せる役割を担い、口腔内、気道内の免疫を司っている<sup>11)</sup>。

唾液中sIgAは従来からストレスとの関係性が報告されている免疫指標である。身体的・心理的ストレスが唾液中sIgAの分泌量に影響を及ぼすことが示唆されている<sup>12)15)</sup>。唾液中sIgAの減少は口腔粘膜の免疫能を低下させることから、口腔内細菌増加、口腔内汚染状態をモニターする指標となりうると思われる。

加えて、炎症性サイトカイン(Interleukin 6: IL-6)は生体侵襲時や炎症反応初期に増加する炎症性サイトカインであり、免疫制御や細胞分化促進などの作用を有する。上皮成長因子(Epidermal Growth Factor: EGF)は、細胞表面に存在する上皮成長因子受容体(EGFR)に結合し、細胞の成長と増殖の調節に重要な役割をする。これらの物質が口腔内環境と深く関わるため、肺炎発症との関係を検討する。

## 2. 研究の目的

- (1)脳卒中急性期にある患者の嚥下反射の状態と意識・呼吸器系・炎症反応の推移を明らかにする
- (2)脳卒中急性期にある患者の唾液中sIgAの分泌推移を明らかにする
- (3)口腔内環境と深く関連する炎症性サイトカイン(Interleukin 6: IL-6)と上皮成長因子(Epidermal Growth Factor: EGF)の唾液中濃度を明らかにする。
- (4)唾液中sIgA、IL-6、EGF、*Streptococcus mitis*、*Streptococcus pneumoniae*、*Pseudomonas aeruginosa*と誤嚥性肺炎の発症との関係を検討する
- (5)脳卒中急性期患者の唾液中に含まれる*Streptococcus mitis*、*Streptococcus pneumoniae*、*Pseudomonas aeruginosa*のDNA量を、定量的分析により明らかにする

## 3. 研究の方法

### (1)倫理的手続き

愛知県立看護大学及び研究実施施設の研究倫理審査委員会の承認を得た。

研究対象者は意識障害を有する脳卒中患者であるため、研究参加に関する説明は代諾者へ行った。その説明は、患者の生命の確保がなされたと主治医が判断した第2病日以降に行い、基本として主治医が代諾者へ文書によって説明し、代諾者の自由意思を尊重すること、参加を拒否あるいは同意を撤回した場

合でも対象者やその家族が治療や看護に不利益を被らないことを示した。後日に病棟看護師へ提出された同意書によって意思を確認した。

対象者の個人情報には連結可能匿名化を行い、コード表は病院内に保管した。

## (2) 対象

3次救急医療を担う総合病院に、平成20年4月21日～9月12日までの間に脳卒中（脳出血、脳梗塞、くも膜下出血）で緊急入院となった患者であって、以下に示す「研究参加者選定基準」及び「除外基準」を満たす者を対象とした。

### ① 研究参加者選定基準

- a. 入院時に保存的治療を選択されている。
- b. 入院時に意識レベルが Japan Coma Scale (JCS) II～IIIである。

### ② 除外基準

- a. 気管挿管が施行されている。
- b. 入院前から呼吸器感染症を有する。
- c. sIgA 分泌に影響する血球分化の異常や免疫系に異常のある疾患を保有している。
- d. 人工透析を行っている。

### (3) 誤嚥性肺炎に関わる観察

嚥下機能に影響を及ぼす意識状態、嚥下反射回復の指標となる喉頭運動の有無を確認し、不顕性誤嚥を判断するために、頸部の気管呼吸音及び肺野の呼吸音を聴診した。

#### (3-1) 意識レベル・喉頭運動の観察

意識レベルを確認するため、対象者の JCS を入院当日（第1病日）から第14病日まで観察した。また、嚥下反射の回復時期を確認する目的で、喉頭運動の有無を観察した。

#### (3-2) 頸部・肺野の呼吸音聴診

喉頭前庭への唾液の貯留および不顕性誤嚥の有無を判断するために、対象者の気管呼吸音および肺野呼吸音を聴取し、副雑音の有無と呼吸音の左右差を記録した。また、呼吸音聴診の信頼性を確認するため、病棟看護師6名が研究者と共聴用聴診器（Litmann™ SPECIALITY STETHOSCOPE：スリーエムヘルスケア株式会社）を用いて同時に聴診し、独立して記録した。

#### (3-3) 診療録からのデータ収集

基礎データとして対象者の性、年齢、診断名、既往歴を、臨床経過として第14病日までの体温・呼吸回数・血圧・脈拍・経皮的動脈血酸素飽和度（SpO<sub>2</sub>）、酸素療法の適応、水分出納、栄養経路を記録した。

また、第7・14病日前後に実施された胸部X線検査における肺炎像の有無を記録し、血液検査データ（白血球数、CRP）を経時的に記録した。さらに、N-Gチューブ挿入の有無、気道確保の手段を記録し、各病日に実施された処置やケアを記録した。

### (4) 唾液検体の採取

#### (4-1) 採取病日と時間

Hucklebridge ら<sup>16)</sup>や竹内ら<sup>17)</sup>によれば、唾液中 sIgA の分泌には日内変動があることが報告されている。唾液中 sIgA と細菌の DNA 量を測定するために、プレテストに基づき具体的な唾液採取日時を決定した。

プレテストとして、2名に対して、入院第3病日からデータ収集を開始し、1日のうち8・10・12・14・16・18・20時の7点の唾液採取を第14病日まで連続的に行い、唾液中 sIgA を測定した。

この結果、日内の変動では8～12時にかけて、唾液中 sIgA が高い傾向にあることが窺えた。従って、4時間ごとの唾液採取でも日内変動の傾向を読み取れると判断し、採取する時間帯を10・14・18時に設定した。また、唾液中 sIgA 分泌の乱れが1週目後半から2週目に確認されたことから、採取する病日を第5病日以降の第5・7・9・11・13病日と設定した。

#### (4-2) 採取方法

綿頭直径8mmの綿棒を使用し、一定の方法で口腔内の粘膜および舌などを全体的に拭って吸水させる方法をとった。その綿棒は、柄を切断し、メンブレンフィルター（孔径：30μm）を取り付け、2ml チューブの中に入れ、遠心分離器によって唾液を分離した。

唾液検体は変質を防ぐため、-20℃で冷凍保存して管理した。

### (5) 口腔ケアと体位の調整

#### (5-1) 口腔ケアの実施

通常のケアとして、病棟看護師が口腔ケアを2回（6～7時と15～16時）実施し、これに加えて、研究者が13時に施行した。

口腔ケアは、水を使用した器質的口腔ケアを基本とした。吸引器及び吸引チューブを準備し、歯ブラシ・口腔粘膜清掃用ブラシまたはスポンジブラシ・水道水を用いて実施した。

#### (5-2) 体位の調整

病棟看護師によって約2時間ごとに左右の体位変換が実施され、体位が調整されていた。

### (6) 唾液中 sIgA の測定

唾液中 sIgA 濃度の測定には ELISA 法（Enzyme-linked immunosorbant assay）を用いた<sup>18)</sup>。

#### (6-1) 測定用具

唾液中 sIgA 測定の専用であり定量が簡便化された測定キット（SALIVARY SECRETORY IgA INDIRECT ENZYME IMMUNOASSAY KIT：SALIMETRIC 社）を使用した。また、吸光度の測定には（モデル 680 マイクロプレートリーダー：BIO-RAD）を使用した。なお、測定に使用する各溶液の定量には、精密マイクロメーターピペットを用いた。

#### (6-2) 測定手順

唾液中 sIgA の定量は測定キットに添付された説明書<sup>19)</sup>に準じて分析した。

吸光度測定については、反応停止後、プレ

ートを分光光度計によって、450nm における吸光度を測定した。

また、唾液中 sIgA の濃度の算出については、片対数方眼紙を使用し、6 種のスタンダードから検量線（標準曲線）を作成した。

まず、これらの測定した 2 点における光学濃度（吸光度 450nm）の平均値をとり、これを光学濃度平均値（Average OD）とし、この値から NSB ウェルにおける Average OD を減じたものを B とした。さらに、この B を Zero ウェルにおける B (B0) で除したものを算出した。

次に、縦軸を B/B0、横軸を sIgA 濃度 ( $\mu\text{g/ml}$ ) とし、各スタンダードの B/B0 と sIgA 濃度の交点を片対数方眼紙上にとった後、これらの点を結び、検量線とした。この検量線と測定した未知の唾液サンプルの B/B0 値から sIgA 濃度 ( $\mu\text{g/ml}$ ) を読み取り、最終的にこれらの検体の希釈倍数を乗じて、sIgA 濃度 ( $\mu\text{g/ml}$ ) を算出した。

#### (6-3)唾液中 sIgA 濃度の指標化

分析に得られた唾液中 sIgA 濃度は採取された唾液量によって指標化を行った。採取した唾液量は対象者の口腔内の乾燥度合いが反映されたものであると考えられた。従って、「1/唾液量」を口腔内の「乾燥度」とした。これを用い、唾液中 sIgA 濃度に「1/唾液量」を乗じて指標化した。これらは「唾液中 sIgA・乾燥度」として表記し、被験者間・被験者内の比較に用いた。この操作により、乾燥度の高い者は「唾液中 sIgA・乾燥度」が高くなり、乾燥度が低い者は低くなる。

この操作は唾液中 sIgA 濃度の対象者間における差を大きくし、パターンの違いをより明確にすることが目的である。本研究では、この唾液中 sIgA・乾燥度を sIgA の指標として使用することとした。

#### (7) IL-6 と EGF の測定

IL-6 は生体侵襲時や炎症反応初期に増加する炎症性サイトカインであり、免疫制御や細胞分化促進などの生理作用を有する。次に、EGF は細胞表面に存在する上皮成長因子受容体 (EGFR) に結合し、細胞の成長と増殖の調節に重要な役割をする。測定方法は以下のとおりである。

##### ① Interleukin 6 : IL-6 濃度の測定

Enzyme-linked immunosorbent assay 法 (ELISA 法)

##### ② EGF 濃度の測定

ELISA 法

#### (8)唾液中の細菌 DNA 量の測定

唾液中に含有される細菌 DNA の定量には、real-time PCR 法を用いた。温度やサイクル数条件を設定し、機械を駆動させることで、通常 1.5 ~ 2 時間で分析が可能である。

##### (8-1)唾液検体に含有される DNA の精製

唾液に含まれる細菌 DNA 量の定量的分析は、

唾液中 sIgA を測定した同様のサンプルを用いて行った。なお、real-time PCR の template として、唾液そのものの使用では不純物等の妨害物質により正確な分析が困難であった。そのため、採取した唾液に含有されるタンパク質を変性失活させるため、フェノール・クロロホルム抽出を行い、DNA を精製するため、エタノール沈殿を行った。

なお、唾液量が必要量に満たない場合は、蒸留水により希釈し、これらを使用したうえで、最終的に得られた値を、希釈量から補正する処理を行った。

##### (8-2)測定菌種

real-time PCR 法で測定する菌種は、誤嚥性肺炎の起因菌として報告されている代表的な病原菌<sup>21-24)</sup>のうちから検討し、*Streptococcus pneumoniae* (以下、*S. pneumoniae*)、*Pseudomonas aeruginosa* (以下、*P. aeruginosa*) を、また口腔内の常在細菌とされる *Streptococcus mitis* (以下、*S. mitis*) を選定し、各検体について分析した。また、real-time PCR の検出方法には、インターカレーション法 (SYBR<sup>®</sup> Green I) を選択した。

##### (8-3)測定用具

real-time PCR には測定装置 (Thermal Cycler Dice<sup>®</sup> Real Time System : タカラバイオ株式会社) と専用ソフト (Thermal Cycler Dice Real Time System TP800 Software Ver. 2.10B : タカラバイオ株式会社) を用いた。real-time PCR に使用する各溶液は、精密マイクロメーターピペットで量を測定した。溶液は real-time PCR 専用の 8 連チューブに分注した。

##### (8-4)real-time PCR のプライマー設計及びその信頼性の確保

まず、real-time PCR で目的とする菌種の遺伝子を検出させるために、菌種特異的なプライマーの設計について検討した。各々の細菌については、real-time PCR を用いた分析が行われている先行文献を

検索し、これらを基にプライマー (Forward, Reverse) を準備した。*S. mitis* については Morita ら<sup>25)</sup>、*S. pneumoniae* は Kwon ら<sup>26)</sup> と Ogunniyi ら<sup>51)</sup>、*P. aeruginosa* は Qin ら<sup>27)</sup> による先行文献を参考にした。それぞれの菌体の Genom DNA を positive control として real-time PCR を試行し、指数関数的な曲線が立ち上がり、DNA の増幅が確認できるかを確認した。

また、real-time PCR の実施条件は各文献を参考にしたうえで、最終的に最適な反応が得られる条件を決定した。各菌種の real-time PCR 条件は表 1 に示した。

さらに、インターカレーション法では目的産物以外の DNA が増幅される可能性がある。これらの問題に対処し、プライマー設計の信

頼性の確保のため、以下について確認した。

- ①反応後のPCR産物を、電気泳動装置を用いてアガロースゲル電気泳動によって確認した。これにより、目的とした塩基数を持ったDNAのバンドが単独で検出されることを確認した。
- ②real-time PCRのサイクルの最終にdissociationを追加し、dissociation curveがそれぞれの検体において、同一の曲線を描き、固有のT<sub>m</sub>値を保持しているかを確認した。この分析によって複数のT<sub>m</sub>値が観察された場合には複数のPCR増幅産物が存在すると考えられ、PCRプライマーの再設計など条件を再検討する<sup>28)</sup>。

対象菌種	条件	cycle数
<i>Streptococcus mitis</i>	95-60 (°C)	45
	15-60 (sec)	
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	94-60-72 (°C)	45
	30-30-39 (sec)	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	94-68-72 (°C)	40
	30-30-30 (sec)	

表1 対象菌種におけるreal-time PCR条件

#### (8-5)測定手順

real-time PCR用の8連チューブに冷却下で精密マイクロメーターピペットを使用して、それぞれの溶液を混合した。

DNA増幅用の混合液は最終量を25 $\mu$ lとし、以下の配合で番号順に混合した。

- ① distilled H<sub>2</sub>O …8.5 $\mu$ l
- ② SYBR<sup>R</sup> Premix Ex Taq<sup>TM</sup> II (2 $\times$ ) (タカラバイオ株式会社) …12.5 $\mu$ l
- ③ PCR Forward Primer (10 $\mu$ M) …1 $\mu$ l
- ④ PCR Reverse Primer (10 $\mu$ M) …1 $\mu$ l
- ⑤ template …2 $\mu$ l

これらを機械にセットし、PCR条件を設定した後、dissociationを追加し、駆動させた。

#### (8-6)データ処理

real-time PCRによって出されたデータをエクスポートし、それぞれの検体のCt値(Crossing Point法)を確認した。real-time PCRでは、細菌の絶対定量、相対定量が可能であるが、本研究では3種の細菌のGenom DNAを用いることにより、絶対定量を行った。得られた個々の細菌DNA量は、最終的に唾液量で除して分析に用いた。

#### (9)分析方法

該当する患者20名中17名から同意が得られた。そのうち、も膜下出血症例3名は、その病態から脳出血や脳梗塞との比較が困難であると判断されたため、この3名を除く14名を分析対象とした。

研究対象者について、入院当日(第1病日)から第14病日までに肺炎を発症しなかった者を非肺炎群(N群)、肺炎を発症した者を肺炎群(P群)に分類した。なお、肺炎の基準は、嚥下性肺疾患研究会により作成された誤嚥性肺炎の診断基準<sup>29)</sup>に準拠し、以下を満たすものとした。

- ①胸部X線または胸部CT上で肺泡性陰影(浸潤影)を認める
- ②37.5°C以上の発熱、CRPの異常高値、末梢白血球数9,000 $\mu$ L以上の増加、喀痰など気道症例のいずれか2つ以上存在する場合

次に、N群とP群の各細菌DNA量、誤嚥性肺炎の発症を促進および阻害する要因について比較した。年齢、性別、意識レベル、嚥下の病態、栄養経路、来院時・初期治療時・入院直後の嘔吐の有無については、群による差がないかt検定および $\chi^2$ 検定を行った。

さらに、唾液中sIgA濃度と唾液量はSpearmanの順位相関係数を用いて相関関係をみた。各細菌DNA量、唾液量および唾液中sIgA量、唾液中sIgA・乾燥度は、N・P群、採取時間(10・14・18時)、採取日(第5・7・9・11・13病日)による差がないか3元配置分散分析を行った。各々の有意水準は5%とした。統計解析にはSPSS 16.0J for Windows (SPSS Inc)を使用した。

また、N群とP群のIL-6、EGFについて、各病日、時間ごとに、Mann-Whitney検定を用いて比較した。また、EGFとsIgA濃度との相関についてSpearmanの相関係数を用いて検討した。統計的分析にはPASW Statistics 17.0を用い有意水準は5%とした。

#### (10)データの信頼性

喉頭運動の確認について、看護師によって記録された喉頭運動の有無と研究者が確認した喉頭運動の有無の一致率を算出した。結果、くも膜下出血症例含む17名中15名が一致し(一致率88.2%)、信頼性を確認した。

また、頸部と肺野における呼吸音の観察について、研究者1名と看護師6名から得られたデータの評定者間信頼性を確認するためにカッパ係数を求めた。頸部の副雑音の聴取点は計92点であり、 $\kappa=0.754$  ( $p<0.01$ )であった。また、肺野の副雑音の聴取点は計368点であり、 $\kappa=0.732$  ( $p<0.01$ )であった。以上から、頸部、肺野とも有意な一致があり、再現性の高い結果であると判定した。

#### 4. 研究成果

##### (1) 対象者の属性

分析対象者の属性（性、年齢、疾患名、意識レベルの推移、栄養経路の推移）を表3に示した。対象者14名の疾患は脳出血9名、脳梗塞5名であり、男性8名、女性6名であった。全体の平均年齢は79.5±8.95歳で、脳出血は77.44±10.09歳、脳梗塞は83.2±5.50歳であった。また、1名は同意が得られた後に手術が決定し、第5病日に約3時間の内視鏡下血腫除去術（未挿管）が行われた。

##### (2) 非肺炎群(N群)と肺炎群(P群)の比較

肺炎発症別に分けたN群6名とP群8名の2群について、まずこれらの比較可能性を検討した。年齢による要因ではN群は74.67±11.71歳、P群では83.12±3.98歳で統計的有意差は認められなかった(p=0.142)。また、性別の要因ではN群が男性3名、女性3名であり、P群が男性5名、女性3名であった。N群とP群の間に有意な差は認められなかった(p=0.529)。脳出血・脳梗塞の疾患別では、N群が脳出血4名(66.7%)、脳梗塞2名(33.3%)、P群が脳出血5名(62.5%)、脳梗塞3名(37.5%)であり、疾患による群間での有意な差は認められなかった(p=0.657)。嚥下に関わる病態は、N群6名中5名(N2、N3、N4、N5、N6:83.3%)が一側性核上性障害であり、1名(N1:16.7%)が仮性球麻痺であった。また、P群では8名中6名(P1、P3、P4、P5、P6、P8:75%)が一側性核上性障害、1名(P2:12.5%)が仮性球麻痺、1名(P7:12.5%)が核性障害であった。N群とP群では、一側性核上性障害と仮性球麻痺・核性障害の間に有意な差は認められなかった(P=0.615)。

また、N群・P群いずれにおいても唾液中sIgAに影響を及ぼすと考えられる免疫抑制剤やステロイド薬などの使用はなかった。

##### (3) 唾液量と唾液中sIgA濃度の関連

N・P群全体の採取された唾液量と唾液中sIgA濃度の散布図を図1に示した。唾液量と唾液中sIgA濃度それぞれの分布をみると、両者は正規分布していませんため、Spearmanの順位相関係数を用いて相関関係を求めた。

Spearmanの順位相関係数はN群でrs=-0.435(p=0.000)、P群でrs=-0.383(p=0.000)、N・P群全体でrs=-0.485(p=0.000)であった。N・P群全体における唾液量と唾液中sIgAとの間には比較的強い負の相関が認められた。

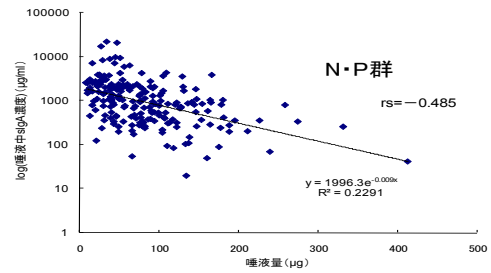


図1 非肺炎群・肺炎群全体における唾液中sIgA濃度と唾液量の散布図

##### (4) 非肺炎(N群)と肺炎(P群)における唾液量の比較

対象者の唾液は同条件で採取しているため、この採取された唾液量は口腔内の状態を反映している。そのため、この唾液量について、群・時間・病日による3元配置分散分析を行った。唾液検体は、第5・7・9・11・13病日、採取時間10、14、18時(計15ポイント)を用いた。その結果、N群・P群間で差が認められ、N群がP群よりも有意に唾液量が多かった(p=0.000)。

また、病日には有意な差は認められず、10時、14時、18時の時間において差が認められた(p=0.014)。

さらに、多重比較(Scheffe)では10時と14時の間に差があり、10時の唾液量は14時より有意に少なかった(p=0.022)。群・時間別による唾液量を図2に示した。

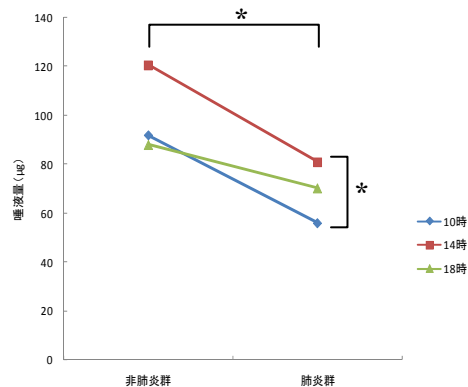


図2 非肺炎群・肺炎群と時間要因別の唾液量

\*\* : p<0.01, \* : p<0.05

##### (5) 非肺炎(N群)と肺炎(P群)における唾液中sIgA量の比較

採取された唾液に含まれるsIgAの全量(唾液中sIgA量)について、群・時間・病日別

による3元配置分散分析を行った。唾液検体は、第5・7・9・11・13病日、採取時間10、14、18時（計15ポイント）を用いた。

結果、N群・P群の間に差が認められ、P群がN群より有意に唾液中sIgA量が多かった（ $p=0.001$ ）。N群とP群における唾液中sIgA量における群別のグラフを図3に示した。

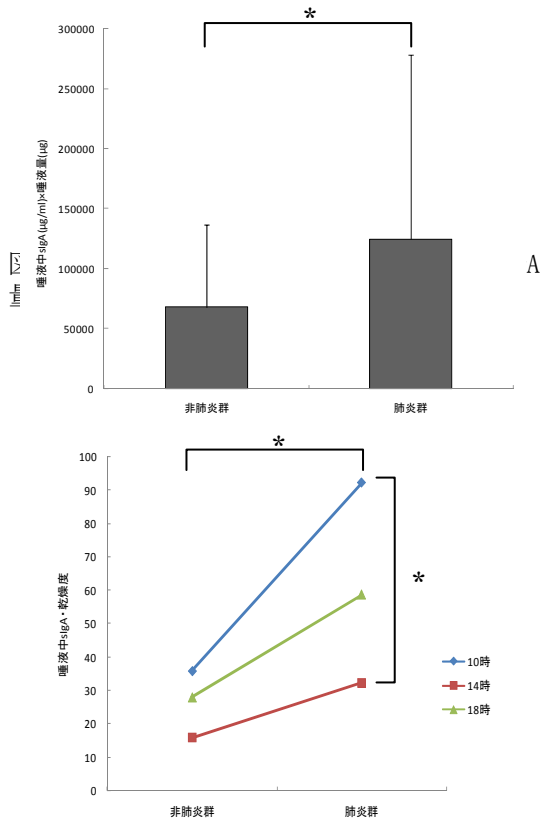


図4 非肺炎群・肺炎群と時間要因別の唾液中sIgA・

乾燥度 \*\* :  $p < 0.01$ , \* :  $p < 0.05$

(6) 非肺炎(N)群と肺炎(P)群における唾液中sIgA・乾燥度の分泌推移の比較

唾液中sIgA濃度の指標化のために、唾液中sIgA量に基づき「唾液中sIgA・乾燥度」を算出し、群・時間・病日別による3元配置分散分析を行った。その結果、N群に比較してP群において有意に高かった（ $p=0.006$ ）。病日別では有意な差は認められなかったが、10時・14時・18時の時間に差が認められた（ $p=0.035$ ）。多重比較（Scheffe）では10時と14時の間に差があり、10時が14時より有意に高かった（ $p=0.020$ ）。群・時間別の唾液中sIgA・乾燥度を図4に示した。

(7) 非肺炎(N)群と肺炎(P)群における唾液中IL-6・EGFの分泌動態

N群6名、P群8名であり、対象者の唾液検体は、第5・7・9病日、採取時間10・14・

18時（計9ポイント）を用いた。

IL-6濃度について病日と時間を組み合わせN・P群を比較した結果（Mann-Whitney検定）、どの時点においても有意な差は認められなかった。個々の分泌推移を比較しても、肺炎による明らかな差は認められなかったが、口腔内出血や汚染が強かった1名（N2）において、IL-6濃度の著明な上昇を認めた。

EGF濃度について病日と時間を組み合わせN・P群を比較した結果、どの時点においても有意な差は認められなかった。対象者別に分泌推移をみると、肺炎発症による明らかな差異を認めなかったものの、P群のEGF濃度は、日内変動の範囲（3000pg/ml）を超える点がN群より多く認められ、P群2名（P3、P8）においては著明な上昇が認められた。

次に、EGF濃度とsIgA濃度は、第5病日18時、第9病日14時の点を除き、有意な強い相関関係を認めた（ $r_s=0.574\sim 0.900$ ）。sIgA濃度は肺炎との関係性が示唆されたことから、EGF濃度が肺炎発症と関連があることが窺えた。一方、IL-6濃度においては口腔内の局所的な炎症がその動態に関与していることが示唆された

表2 EGF濃度とsIgA濃度の相関関係

	病日	時間	EGF		
			10時	14時	18時
sIgA	5	10時	.629*		
		14時		.719**	
		18時			.536
	7	10時	.725**		
		14時		.574*	
		18時			.872**
	9	10時	.742**		
		14時		.524	
		18時			.900**

\* $p < 0.05$  \*\* $p < 0.01$

(8) 非肺炎(N)群と肺炎(P)群における口腔内細菌の動態

N群6名、P群8名であり、P群の全ての対象者は、ペニシリン系の抗生物質が使用されていた。対象者の唾液検体は、第5・7・9・11・13病日、採取時間10、14、18時（計15ポイント）を用いた。real-time PCR法によって、3種類の細菌（*Streptococcus mitis*:

*S. mitis*, *Streptococcus pneumoniae*:  
*S. pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*:  
*P. aeruginosa*) の DNA 量を測定し、肺炎発症との関連を検討した。

N 群では (図 5)、6 名中 2 名 (N1, N4) に *S. pneumoniae* の増加が認められた。N1 は口腔内常在細菌である *S. mitis* の存在が確認されたが、第 13 病日 18 時の唾液検体から *P. aeruginosa* が確認された。N4 は *S. mitis* の減少を認めたが、*P. aeruginosa* は確認されなかった。また、2 名 (N2, N3) に *S. pneumoniae* が確認されたが、N2 は *S. mitis* の存在が確認できたものの、N3 は著明な減少を認めた。

P 群では (図 6) 8 名中 2 名 (P1, P3) に *S. mitis* が確認され、*S. pneumoniae* の増加を認めた。しかし *P. aeruginosa* は認めなかった。

一方、3 名 (P2, P6, P7) に *S. pneumoniae* の少量の増加あるいは一時的な増加を認め、3 名 (P4, P5, P8) は *S. pneumoniae* が確認されなかった。この 6 名について *S. mitis* をみると、5 名 (P2, P4, P5, P7, P8) は全く確認できず、1 名 (P6) は *S. pneumoniae* 消失の時期と同じくして消失した。この 6 名中 4 名 (P4, P5, P6, P7) に *P. aeruginosa* の増殖が認められた。

以上の結果から、N 群では第 13 病日までに肺炎を発症しなかったにもかかわらず *S. pneumoniae* の存在が確認された。P 群では肺炎を発症したが *S. pneumoniae* の増殖が明らかに少なく、口腔内常在細菌である *S. mitis* も消失していた。これは、P 群にペニシリン系抗生剤が使用された影響であると考えられた。逆に、この抗生剤が効かない *P. aeruginosa* が増殖したことが示唆された。

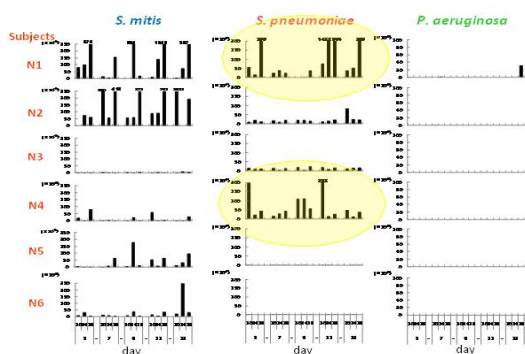


図 5 非肺炎群における細菌 (*S. mitis*, *S. pneumoniae*, *P. aeruginosa*) DNA 量の推移

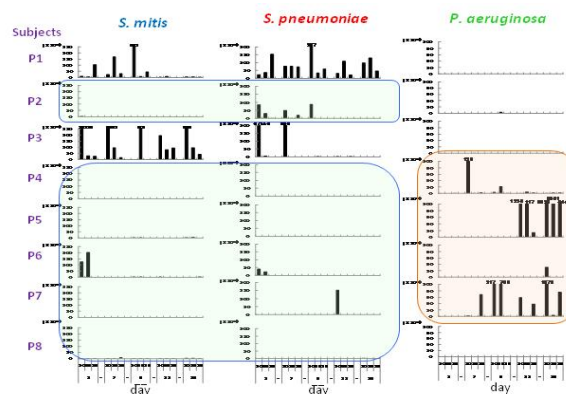


図 6 肺炎群における細菌 (*S. mitis*, *S. pneumoniae*, *P. aeruginosa*) DNA 量の推移

文献

- 1) 元橋康友：脳卒中急性期の摂食・嚥下リハビリテーション, 看護技術 52(9), 32-37, 2006.
- 2) Smithard G, O' Neill AP et al: The Natural History of Dysphagia following a Stroke. *Dysphagia*, 12:188-193, 1997.
- 3) Mann G, Hankey G J, et al: Swallowing Function After Stroke Prognosis and Prognostic Factor at 6 Months. *Stroke*, 30:744-748, 1999.
- 4) Paciaroni M, Mazzotta G, et al: Dysphagia following stroke, *European Neurology*, 51:162-167, 2004.
- 5) 巨島文子：脳梗塞急性期からの嚥下障害：93 症例の臨床経過, 日気食会報, 49(5):423-428, 1998.
- 6) 元橋靖友：脳卒中急性期における摂食・嚥下機能の経時的変化, 障歯誌, 26:17-24, 2005.
- 7) 鎌倉やよい：脳血管障害に伴う嚥下障害に対する看護の技術化の動向と研究課題. *臨床看護研究の進歩*, 2:62-66, 1990.
- 8) Fourrier F, Cau-Pottier E, et al: Effects of dental plaque antiseptic decontamination on bacterial colonization and nosocomial infections in critically ill patients. *Intensive Care Med*, 26: 1239-1247, 2000
- 9) DeRiso AJ, Ladowski JS, Dillon TA, et al: Chlorhexidine gluconate 0.12% oral rinse reduces the incidence of total nosocomial respiratory infection and non-prophylactic systemic antibiotic use in patients undergoing heart surgery. *Chest*109: 1556-1561, 1996.
- 10) 妙中信之, 佐々木繁太, 今中秀光, 他：人工呼吸中の肺炎発症予防のための口腔内 Decontamination, *ICU と CCU*, 17: 533-539, 1993.



- 11) 吉開泰信：粘膜免疫学の最前線，医薬ジャーナル社，2002.
- 12) Deinzer R, Schuller N, : Dynamics of Stress-Related Decrease of Salivary Immunoglobulin A (sIgA) : Relationship to Symptoms of the Common Cold and Studying Behavior, Behavioral Medicine, 23(4), 1998.
- 13) Jemmott J.B.3rd., Borysenko J.Z., Borysenko M., et al: Academic Stress, Power Motivation, and Decrease in Secretion Rate of Salivary Secretory Immunoglobulin A, Lancet, 1 1400-1402, 1983.
- 14) Wilkinson DS, Knox PL, et al.: The Clinical Effectiveness of Healing Touch, The Journal of Alternative and Complementary Medicine, 8(1)33-47, 2002.
- 15) 鈴木絵里, 出口晃, 浜口均, 他：健常陣における温泉浴の唾液分泌と唾液分泌型IgA 分泌に及ぼす影響，日温気物医誌，70(3)127-132, 2007.
- 16) Hucklebridge, Frank., Clow, Angela., Evans, Phil.: The relationship between salivary secretory immunoglobulin A and cortisol: neuroendocrine response to awakening and the diurnal cycle. International journal of psychophysiology, 31:69-76, 1998
- 17) 竹内優子, 渡辺弘子, 加藤保子: 唾液中分泌型 IgA の測定条件の検討と大学生の唾液中 IgA 濃度. 川崎医療福祉学会誌, 7(1):191-198, 1997.
- 18) 高津聖志, 瀧伸介: 免疫研究の基礎技術. 94-96, 羊土社, 1995.
- 18) 高津聖志, 瀧伸介: 免疫研究の基礎技術. 94-96, 羊土社, 1995.
- 19) www.salimetrics.com
- 20) 谷口武利: PCR 実験ノート. 14-17, 羊土社, 2005.
- 21) 山川摩利子, 川口辰彦, 佐藤俊秀: ICU 入室成人患者の口腔内所見. 障齒誌, 21:9-15, 2000.
- 22) 丸川征四郎編著: ICUにおけるオーラルケア 口腔ケアのスタンダード確立をめざして. メディカ出版, 34-43, 2000.
- 23) 金子明寛, 佐々木次郎: 口腔常在菌叢とその意義. 臨床検査, 38(5):533-537, 1994.
- 24) 東匡伸, 小熊恵二: シンプル微生物学. 111-117, 141-142, 200-204, 南江堂, 2006.
- 25) Morita, E., Narikiyo, M., Nishimura, E., Yano, A., et al.: Molecular analysis of age-related changes of *Streptococcus anginosus* group and *Streptococcus mitis* in saliva. Oral Microbiology and

- Immunology, 19:386-389, 2004.
- 26) Hyong-Young Kwon, Seung-Whean Kim, Moo-Hyun Choi, A. David Ogunniyi, James C. Paton, Sin-Hee Park, Suhk-Neung Pyo, Dong-Kwon Rhee: Effect of heat shock and mutations in ClpL and ClpP on virulence gene expression in *Streptococcus pneumoniae*. Infection and Immunity, 71(7):3757-3765, 2003.
- 27) Xuan Qin, Julia Emerson, Jenny Stapp, Lynn Stapp, Patrick Abe, Jane L. Burns: Use of real-time PCR with multiple targets to identify *Pseudomonas aeruginosa* and other nonfermenting gram-negative bacilli from patients with cystic fibrosis. Journal of Clinical Microbiology, 41(9):4312-4317, 2003.
- 28) 北條浩彦: 原理からよくわかるリアルタイムPCR実験ガイド, 20-27, 羊土社, 2008.
- 29) 嚥下性肺疾患研究会: 嚥下性肺炎の診断と治療. 2003

#### 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)

[学会発表] (計4件)

1) Kumazawa, Y., Kamakura, Y., Yoneda, M., Fukada, J.: Aspiration pneumonia complication and change of oral bacteria in acute stroke patients. Dysphagia Research Society 19<sup>th</sup> Annual Meeting (San Antonio, USA), 2011. 3. 3.

2) 熊澤友紀, 鎌倉やよい, 米田雅彦, 深田順子, 片岡笑美子, 波多野範和, 長谷川康博: 脳卒中急性期肺炎合併患者における唾液中のIL-6とEGFの分泌動態. 第16回日本摂食・嚥下リハビリテーション学会学術大会(新潟), 2010. 9. 3.

3) Kumazawa, Y., Kamakura, Y., Yoneda, M., Fukada, J.: Effects of secretion of salivary immunoglobulin A on aspiration pneumonia in elderly acute stroke patients. Dysphagia Research Society 18<sup>th</sup> Annual Meeting (San Diego, USA), 2010. 3. 3.

4) 熊澤友紀, 鎌倉やよい, 米田雅彦, 深田順子, 片岡笑美子, 波多野範和, 長谷川康博: 脳卒中急性期の誤嚥性肺炎予防に関する唾液中sIgAの検討. 第15回日本摂食・嚥下リハビリテーション学会学術大会(愛知), 2009. 8. 28.

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

鎌倉 やよい (KAMAKURA YAYOI)  
愛知県立大学・看護学部・教授  
研究者番号：00177560

### (2) 研究分担者

深田 順子 (FUKADA JUNKO)  
愛知県立大学・看護学部・准教授  
研究者番号：60238441

米田 雅彦 (YONEDA MASAHIKO)  
愛知県立大学・看護学部・教授  
研究者番号：80201086

### (3) 連携研究者

熊澤 友紀 (KUMAZAWA YUKI)  
愛知県立大学・看護学部・助教  
研究者番号：20571730