

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 24 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2012～2014

課題番号：22590548

研究課題名（和文）唾液を用いた新しい在宅検査法の開発と応用-老人性肺炎の予防に向けて-

研究課題名（英文）Development and application of the new clinical laboratory procedure using saliva at home medical care-For the prevention of senile pneumonia-

研究代表者 白川 卓（SHIRAKAWA TAKU）

神戸大学・大学院保健学研究科・准教授

研究者番号：30171044

研究成果の概要（和文）：老人性肺炎の予防や早期発見に唾液検査を活用するための検討を行った。早期発見のための炎症マーカーとして唾液中 CRP、口腔内清浄度の指標として唾液中ヒトβディフェンシン（hBD）の定量法を開発した。唾液中 CRP の測定では炎症性疾患患者の血清中 CRP 濃度と唾液中 CRP 濃度は  $r=0.88$  ( $P < 0.001$ ) の良好な相関を示し、唾液中トランスフェリン濃度が 1mg/ml 未満の検体に限定すると  $r=0.96$  ( $P < 0.001$ ) のさらに強い相関が認められた。また、唾液中 hBD の測定では hBD が強い陽性荷電を持つことから唾液の前処理法の検討を行なった。唾液を界面活性剤（Tween 20）や希塩酸で処理し、ムチン等の陰性荷電物質から hBD を遊離させることで正確な濃度の測定が可能になった。これらの結果から介護等における老人性肺炎等の早期発見や予防に今回検討した唾液検査が役立つ可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：Both CRP and human beta defensin (hBD) concentration in saliva were used for the early detection and prevention of senile pneumonia. CRP was recognized as an inflammatory marker of pneumonia and hBD, as an index of the cleanliness level in oral cavity, respectively. We found a good association between CRP measured in saliva and serum of an inflammatory disorder patients ( $r=0.88, P < 0.001$ ). Furthermore, when the transferrin concentration in saliva was limited to a less than 1 mg/ml sample, the association was become stronger ( $r=0.96, P < 0.001$ ). Moreover, some pretreating methods of saliva were examined for the measurement of hBD with positive charge. Tween 20 and diluted hydrochloric acid were used to release hBD from negative charged matter, such as mucin. Measurement of the exact hBD concentration in saliva was attained by this pretreating method. These results suggested that saliva test would be useful for the early detection and prevention of senile pneumonia.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,900,000	570,000	2,540,000
2011 年度	900,000	270,000	1,170,000
2012 年度	700,000	210,000	910,000
総計	3,500,000	1,050,000	4,620,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：社会医学・衛生学

キーワード：老人性肺炎、抗菌ペプチド、β-ディフェンシン（hBD）、ELISA、C-反応性蛋白（CRP）、唾液、炎症マーカー

## 1. 研究開始当初の背景

唾液は無侵襲性の検査材料として古くから臨床検査の対象として注目されていたが、

検出感度や再現性の問題から現在のところ十分に活用されていない。しかし、近年酵素標識法や蛍光抗体法など高感度の検出法

の開発や分析技術の向上により、これまで検出できなかった微量の物質を検出することが可能となり、唾液が臨床検査の材料として再認識されつつある。また、プロテオーム解析などの手法により唾液中に分泌されるタンパクやペプチドの網羅的検出を行うことで、新規疾患関連物質の同定が可能になり、唾液を用いた新しい診断法が生まれつつある。一方で、ストレスマーカーを中心に唾液を用いた簡易検査法の開発も盛んに行われるようになり、唾液検査をより身近なものにしている。しかし、唾液検査では採取条件、採取用具、保存方法によってデータは大きく変動することから、採取法の標準化に向けての検討も重要である。

このように欧米を中心に全世界で唾液検査が注目を集めるようになってきたが、在宅医療への応用例はまだ少なく、老人性肺炎との関係を調査した報告はこれまで皆無であった。近年、ディフェンシンなどの抗菌ペプチドが自然免疫、特に呼吸器系の感染防御に重要な役割を果たし、唾液中にも分泌されることが報告されており、これらの物質の分泌量の変化と老人性肺炎との関係が明らかになれば発症リスクの軽減につながる可能性がある。また、唾液中に分泌される CRP や IgM などの炎症マーカーは肺炎の早期発見に活用できる可能性がある。在宅医療の質的向上を目指すために、これらの物質の検出法の開発と改良は急務のことである。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は採取が容易な唾液を用いた新しい炎症性疾患の検査法の開発を目指すものである。在宅や介護医療において問題となる老人性肺炎ならびに採血が困難な小児の炎症性疾患の予防や早期発見に非侵襲検査として唾液検査を活用し、医療の質を向上させるためのものである。

本研究で得られる成果により、唾液を用いて非侵襲的に肺炎リスク管理を行うことが可能となり、在宅医療における老人性肺炎の軽減につながる事が期待できる。またこの成果は在宅医療のみならず広く老人介護や小児医療の分野において活用できるものである。

## 3. 研究の方法

炎症性疾患のモニターとしての唾液検査法を確立するために以下の項目について検討を行った。

### (1) 唾液採取法の開発

唾液採取法として排唾法、吐出法、スワブ

法、吸引法などがあるが、寝たきりの老人や小児には利用できないため、老人や小児に適した安全性の高い唾液採取装置の開発を行った。

### (2) 唾液中炎症マーカー測定法の検討

肺炎の早期発見のためのマーカーとして ELISA 法による唾液中 CRP の高感度検出法の開発を行った。基礎的検討として唾液採取法、唾液希釈液および反応液の検討を行った。また、検出用抗体は HRP 標識したものをを用い、高感度化を図るため基質に蛍光酵素基質 (ADHP) を用いた。確立した方法で健常人および炎症性疾患患者の唾液中および血中 CRP 濃度を測定し、唾液中 CRP 濃度が血中濃度を反映するかを検証した。

### (3) 唾液中抗菌物質測定法の検討

口腔内の清浄度の評価に用いるために唾液中抗菌物質の 1 つであるディフェンシン (hBD) の測定法を開発し、正確な唾液中濃度を反映する前処理法について検討した。hBD は強い陽性荷電を持つため、先ず唾液中の陰性荷電物質であるムチンなどとの結合状態について検証した。次に陰性荷電物質との結合状態を解消するための前処理法として界面活性剤の添加や酸処理について検討した。

### (4) 唾液中炎症関連物質の簡易検出法の開発

高感度検出法に加えて簡易検出法の開発を検討した。

## 4. 研究成果

### (1) 唾液採取法の開発

寝たきり老人や小児から安全に唾液を採取できる装置として、小型吸引式の唾液採取器具を開発した。これは電池式の小型吸引ポンプに採取用試験管を取り付け、喀痰引用カテーテルで口腔内の唾液を吸引採取するもので持ち運びが容易で、安全なことから在宅介護や小児医療の現場で利用できる (図 1)。

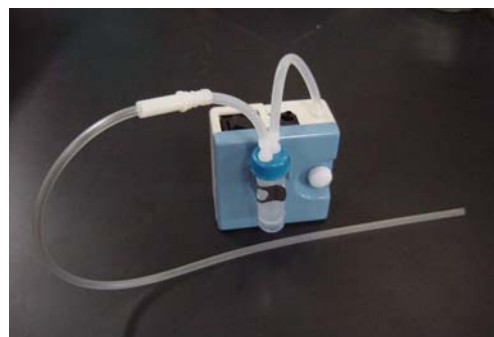


図 1. 吸引式唾液採取用具

### (2) 唾液中炎症マーカー測定法の確立と応用

唾液中 CRP 濃度の測定法を確立するために

唾液希釈時および抗原抗体反応時に使用する反応液について検討した。唾液と反応液は等量混和し、4℃, 3000g で5分間遠心分離を行い、上清を測定に用いた。標準液も同様に処理して測定した。その結果、添加する無機塩類は MgCl<sub>2</sub> を使用したときに最も安定した結果となった。(図2)

また、Tween20 を加えた場合、濃度依存性に値が変化した。(図3)

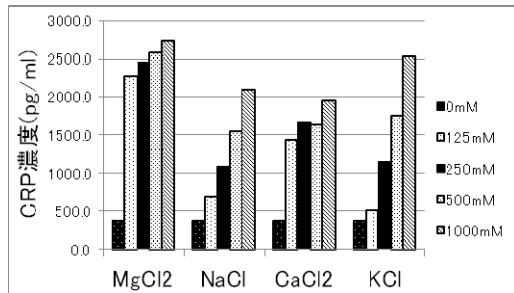


図2. 反応中の無機塩類の種類と濃度による測定値の変化

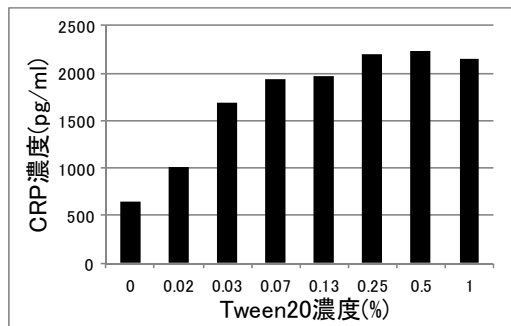


図3. 反応液中の Tween 20 の濃度による測定値の変化

MgCl<sub>2</sub> または Tween20 のどちらか一方しか添加しなかった場合に比べ、両方を添加した場合に、検出される CRP 濃度が大幅に上昇した。また、MgCl<sub>2</sub> が 1mol/l、Tween20 が 0.5% の時に測定値は最大となった。

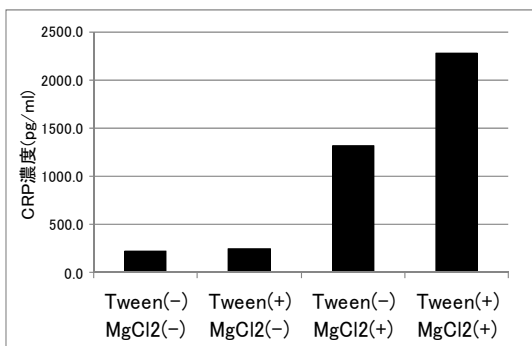


図4. 反応液組成による CRP 測定値の変化

これらの結果をもとに使用する反応液の組成を 0.5% Tween20-1mol/l MgCl<sub>2</sub>-TBS として測定法の評価を行った。その結果、同時再現性は CV 2.4%、添加回収率は 99.8-105.1% となった。唾液採取法の検討では、唾液採取スワブを用いた場合、吐出法と比較して 30% 程度の測定値の低下が見られ、測定に影響を及ぼすことが明らかとなった。健康人および炎症疾患の疑われる患者から吐出法で唾液 (n=42) を採取し、同時に血清検体を採取した。両者を測定した結果、唾液中 CRP 濃度は 84.8pg/ml-86ng/ml、血清中 CRP 濃度は 30.9ng/ml-30 μg/ml となり、両者の間には r=0.88 (P<0.001) の良好な相関が見られた。(図5)

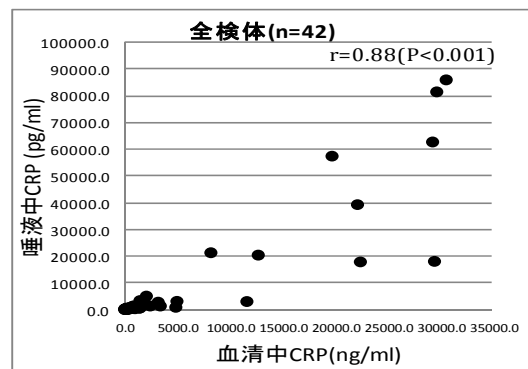


図5. 各検体の血清中および唾液中 CRP 濃度

また、唾液中トランスフェリン濃度の測定が可能であった 38 検体について検討したところトランスフェリン濃度が 1mg/dl 未満である検体群 (n=16) では、両者の相関は r=0.96 (P<0.001) とさらに強くなった。(図6)

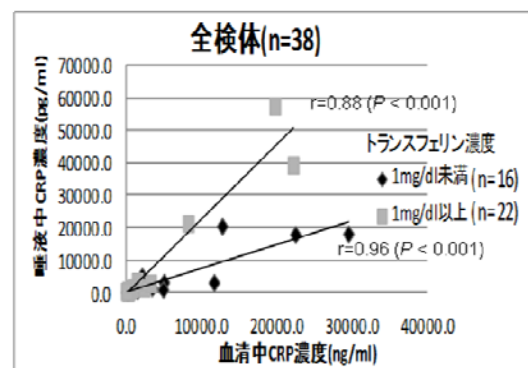


図6. 唾液中トランスフェリン濃度別の唾液中・血清中 CRP 濃度の相関

今回確立した方法によって、唾液中 CRP を

正確に測定することが可能となった。さらにトランスフェリン濃度で補正することで高い精度で血中濃度を反映することが明らかとなった。唾液検査の利点を生かし、在宅医療における肺炎などの全身性炎症の早期発見へと応用するためには、簡易測定法の開発が不可欠である。今後の展開として、本研究で得られた結果を元に唾液中 CRP 値のカットオフ値を定め、簡易測定法における詳細な条件検討を重ねていく必要がある。

### (3) 唾液中抗菌物質 (hBD) 測定法の確立

唾液中におけるムチンと hBD の結合状態を明らかにすると共に唾液中 hBD 測定のための前処理法について検討した。15,000G での唾液の遠心処理では遠心時間に比例して上清の hBD3 濃度は低下し、さらに 100kD の限外濾過膜を用いた濾液中には hBD3 は検出されなかった。このことから hBD3 は唾液中ではほぼ完全にムチンと結合していると考えられる。(図 7)

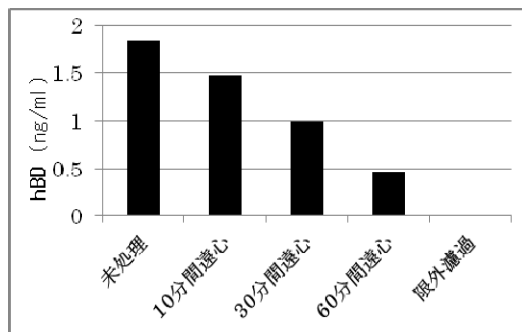


図 7. 遠心分離上清および限外濾過液中の hBD 濃度

hBD の荷電状態が測定に影響を与える可能性があることから、ELISA 反応における反応液の組成や唾液の前処理法について検討を行った。抗原抗体反応時の反応液の組成については、添加する塩の種類や濃度を検討した。その結果、反応液に 300mM  $MgCl_2$  を加えた条件下で最も高い hBD 濃度が得られた。(図 8)

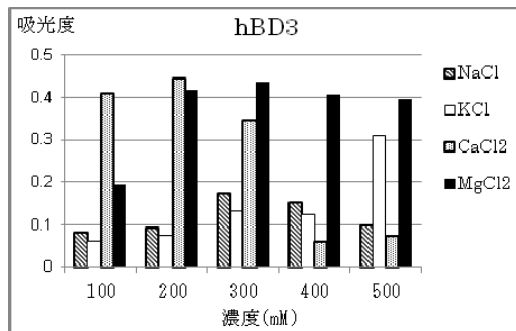
図 8. 反応液に加える塩類の影響

唾液の前処理法については遠心処理および Tween20 や塩酸添加による処理について検討した。その結果、唾液に Tween 20 か 0.5% Tween20-0.1N 塩酸を 1/10 量加えて遠心分離することで高い hBD 濃度が得られたことから、これらの処理により唾液中に含まれる全 hBD 濃度の測定が可能になったと考えられ

る。(図 9)

図 9. 唾液前処理法の比較

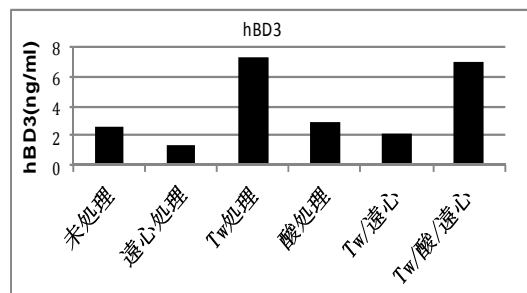
しかし、表 1 に示したように Tween 20 のみの処理では CV が 10.5%~17% と測定精度が



悪く、前処理法としては不相当であった。一方、Tween 20-塩酸処理では CV が 2.9~4.3% と良好な結果になった。また、添加回収試験では、hBD2 で回収率が 92~108%、hBD3 で 96~103%であった。

表 1. 同時再現性試験 (n=10)

hBD のような強い陽性荷電を有するペプチドの測定においては反応液の組成や前処理法の選択が重要であり、測定条件を一定に



することで正確な唾液中濃度の測定が可能になると思われる。

### (4) 唾液中炎症関連物質の簡易検出法の開発

唾液中 CRP 濃度や hBD 濃度のカットオフ値の設定等、簡易検出法として使用するには現時点では多くの課題があった。CRP 濃度についてはトランスフェリン濃度を同時に測定することで血中濃度と強い相関が認められたことから、簡易検出法の実用化は可能と思われる。

	Tw処理	(Tw/酸/遠心)処理
hBD2	0.90±0.30ng/ml	0.96±0.08ng/ml
	CV=17%	CV=4.3%
hBD3	3.18±0.67ng/ml	2.91±0.17ng/ml
	CV=10.5%	CV=2.9%

## 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 Yumi Narita, Taku Shirakawa,  
Development of high-sensitivity assay for C-reactive protein in human saliva、12<sup>th</sup> Meeting of the Asian Society of Clinical Pathology and Laboratory Medicine、2012年11月30日、京都
- ② 成田祐美、白川 卓他、唾液中炎症マーカーおよび抗菌物質測定のための唾液前処理法についての検討 第56回日本唾液腺学会学術大会、2011年12月3日、東京
- ③ 横山香織、白川 卓他、唾液中 human  $\beta$ -defensin2 測定法の検討 第51回近畿医学検査学会、2011年10月29日、滋賀
- ④ 成田祐美、白川 卓他、唾液中CRP高感度測定法開発のための基礎的検討、第51回近畿医学検査学会、2011年10月29日、滋賀

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

白川 卓 (SHIRAKAWA TAKU)  
神戸大学・大学院保健学研究科・准教授  
研究者番号：30171044

### (3) 連携研究者

塩谷 英之 (SHIOTANI HIDEYUKI)  
神戸大学・大学院保健学研究科・教授  
研究者番号：00294231

後神 秀基 (GOKO HIDEKI)  
神戸大学・大学院保健学研究科・助教  
研究者番号：80170447

松田 宣子 (MATUDA NOBUKO)  
神戸大学・大学院保健学研究科・教授  
研究者番号：10157323

渡邊 香織 (WATANABE KAORI)  
滋賀県立大学・人間看護学部・教授  
研究者番号：30281273