

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 14 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24500584

研究課題名(和文) 新たな呼吸リハビリテーションを展開するために必要な唾液中酸化ストレス指標の確立

研究課題名(英文) Salivary markers of oxidative stress in respiratory patients who have undergone pulmonary rehabilitation

研究代表者

関川 清一 (Sekikawa, Kiyokazu)

広島大学・大学院医歯薬保健学研究院・准教授

研究者番号：30363055

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、安静時および一定負荷運動における唾液中酸化ストレスマーカーの検体分析の有効性について明らかにし、慢性呼吸器疾患患者の安静時唾液中酸化ストレスマーカーの安静時変動ならびに呼吸リハビリテーションの影響を検証することを目的とする。その結果、高齢呼吸器疾患患者の安静時唾液中抗酸化力は、同時再現性は良好の結果を示し、安静時唾液検体データの信頼性が確立された。また、唾液中抗酸化力は、単回の運動療法を中心とした呼吸リハビリテーション実施によりに低値を示すことが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：We aimed to determine the availability of measurements of salivary antioxidant capacity using the biological antioxidant potential (BAP) test and the influence of exercise training on changes in the salivary antioxidant capacity in respiratory patients who have undergone pulmonary rehabilitation (PR). Saliva samples were collected from patients with respiratory failure during pre- and post-PR. The repeatability and reproducibility of salivary BAP test were good in both the pre- [CV%: 1.4-19.1, ICC (1, 3): 0.987] and post-PR period [CV%: 1.34-24.2, ICC (1, 3): 0.986]. We observed significant differences between pre- and post-PR results for salivary antioxidant capacity. The results of this study suggest that the BAP test is useful for measuring the salivary antioxidant capacity, and lower antioxidant status in the saliva is induced by PR.

研究分野：呼吸リハビリテーション

キーワード：呼吸リハビリテーション 唾液 抗酸化力

1. 研究開始当初の背景

慢性呼吸器疾患患者に対するリハビリテーションは、「呼吸リハビリテーションマニュアル」の発刊に伴い、一般的診療現場における導入の機運が高まり、定着しつつある。また、慢性呼吸器疾患の進行に関連する要因として酸化ストレスが挙げられ、疾患重症度は酸化ストレスと関連すると報告されている。病態の進行は、急性呼吸不全をきたし、死にいたるリスクファクターとなり、近年の高齢化、疾患の重症化とともにそのリスクが高まってきている。したがって、これら疾患患者における生活の質や生命予後向上のために、病態進行と関連する酸化ストレス機能といった生体防衛機能を向上させる対策が重要であり、そのための呼吸リハビリテーションを開発することは急務である。

今までの酸化ストレスを示す指標として、血中物質の分析が行われてきた。近年、血液中の酸化ストレス指標のみならず、気管支・肺胞領域を反映する検体である呼気凝縮液中の酸化ストレス指標を用いた検討がなされており、喫煙者や健常者における運動の影響について解明されつつある。また、唾液による局所酸化ストレス機能を検討する報告があるが、唾液検体解析の有用性の検証が不十分である。さらに、慢性呼吸器疾患患者の病態進行と関連のある酸化ストレスについて唾液といった局所の動態を指標にして、解明したものはない。

2. 研究の目的

新たな呼吸リハビリテーションを展開するために必要な唾液中酸化ストレス指標の有用性を確立することを目的とする。

(1) 唾液中酸化ストレスマーカーの基礎的研究として安静時および一定負荷運動における唾液中酸化ストレスマーカーの検体分析の有効性について明らかにする。

(2) 基礎的研究成果をもとに、慢性呼吸器疾患患者の安静時唾液中酸化ストレスマーカーの変動ならびに呼吸リハビリテーションの影響を検証することを目的とする。

本研究の成果により、局所酸化ストレスの検体分析方法の有効性とその影響因子、呼吸リハビリテーションの効果検証がなされれば、新たな呼吸リハビリテーションを展開するために必要な唾液中局所酸化ストレス指標の有用性を確立することとなる。

3. 研究の方法

(1) 唾液中酸化ストレスマーカーの基礎的研究

①健常男性(29.8±4.4歳、身長174.4±3.2cm、体重74.4±8.4kg)を対象とした。唾液は、唾液採取専用ディスプレイチューブを用いて、分泌される唾液を綿に吸収させ採取した。採取した唾液は、遠心分離機にて2000rpmで10分間遠心分離した後に上清を分

注した。単回使用自動ランセット(セーフティプロプラス;ロシュ・ダイアグノスティックス)を用いて指尖を穿刺した後、マイクロキュベット(Microvette CB 300; BIOSEB)を用いて採血を行った。採取した血液は小型遠心分離器を使用し6000rpmの回転数で10分間遠心分離を行い、血漿成分を取り出した。酸化ストレス指標として、血漿中の酸化力の指標であるヒドロペルオキシド濃度および抗酸化力の指標であるBiological antioxidant potential(BAP)を用いた。ヒドロペルオキシド濃度の測定にはderivatives of reactive oxygen metabolites(d-ROMs) test kit(Diacron)を使用し、BAPの測定にはBiological antioxidant potential test kit(Diacron)を使用した。吸光度計(Free Radical Elective Evaluator; Diacron)を使用し、酸化力および抗酸化力の解析を行った。対象者は事前に、唾液検査キットによる潜血テスト(ペリオスクリーン;サンスター)を実施し、口腔内の潜血反応が陰性であることを確認した。すべての対象者に対し朝8:30、昼12:30、夕18:30に唾液採取と血液採取を行った。なお、測定前日から通常通りの生活を送ってもらい、検体採取の2時間前からは飲食および歯磨きを禁止した。

②運動習慣のない健常男性(年齢:22.1±0.9歳、身長:173.2±6.3cm、体重:67.3±8.7kg)9名を対象とした。本研究を行うにあたり、測定に先立ち、呼気中一酸化炭素濃度測定器(PiCO + Smokerlyzer; Bedfont Scientific)を用いて対象者が非喫煙者であることを確認した。また、対象者は採血を行う日の前日は、激しい運動と飲酒を禁止し、当日は採血の2時間前から水以外の飲食を禁止した。酸化ストレスマーカーの日内変動を検討するために、朝8:30、昼12:30、夕18:00に唾液採取と採血を行った。血液は、採血用穿刺器具を使用して指尖の毛細血管からマイクロキュベットを使用し採取した。定量運動負荷における運動強度を決定するために、漸増的多段階運動負荷試験を実施した。負荷装置には、自転車エルゴメータ(ERGOMETER-232CXL; コンビ)を用いた。酸素摂取量は、呼気ガス分析装置(AE-300S; ミナト医科学)を使用し、breath-by-breath法にて連続測定し、心拍数は無線心電計(Dynascope-3140; フクダ電子)を用いて測定した。それぞれのデータは、パーソナルコンピューターに取り込み、専用ソフトウェアを用いて収集した。得られたデータから酸素摂取量-心拍数関係式を算出し、予測最大酸素摂取量を算出した後60%最大酸素摂取量となる目標ワット数を算出した。漸増的多段階運動負荷試験から48時間以上間隔をあけた後、60%最大酸素摂取量の運動強度で、30分間の定量運動を実施した。定量運動前後に1分間のウォーミングアップとクーリングダウンを行った。定量運動前後に採血を指尖より行った。唾液中および血漿中の抗酸化力および血漿中のヒドロペルオキシ

ド濃度の測定は、フリーラジカル専用吸光度計を用いて解析した。

(2) 慢性呼吸器疾患患者の唾液中酸化ストレスマーカー検証ならびに呼吸リハビリテーションの影響

呼吸リハビリテーションが処方された入院期呼吸器疾患患者を対象とし、唾液採取を行った。唾液採取は、唾液採取チューブを用いて付属の綿を1秒間に1回、1分間嘔むことで採取を行った。採取のタイミングは、呼吸リハビリテーション実施前安静時と実施直後の2回とした。採取した唾液は、遠心分離機にて2000rpmで10分間遠心分離した後に上清を分注した。全ての患者において唾液中の潜血反応が陰性であることを、ペリオスクリーン(サンスター)を用いて確認した後、解析した。唾液の解析は、直ちに、フリーラジカル解析装置を使用して唾液中抗酸化力を解析した。呼吸リハビリテーションプログラムは、研究施設の理学療法士によって立案し、実施した。

①唾液中酸化ストレスマーカーの検体解析の信頼性および再現性に関する基礎的検討を行った。

各タイミングで得られた検体は、3分割し連続して唾液中抗酸化力を測定し、同時再現性を確認した。

②運動療法を中心とした呼吸リハビリテーションが唾液中酸化ストレスマーカーに与える影響を検討するために、呼吸リハビリテーション処方初期時と退院時の2回、それぞれの呼吸リハ前後の抗酸化力を解析した。この場合、検体を連続して3回解析し、平均したデータを代表値とした。

③安静時の抗酸化力を基準としたリハビリテーション後の抗酸化力比較のため、変化率を算出し、解析した。

4. 研究の成果

(1) 唾液中酸化ストレスマーカーの基礎的研究

①唾液中および血漿中の抗酸化力、血漿中のヒドロペルオキシド濃度の時間経過の比較は、一元配置分散分析を用いて検討した。その結果、時間経過による唾液中および血漿中の抗酸化力は、変化を認めなかった(唾液 $p=0.26$ 、血漿 $p=0.95$)。また時間経過による過酸化水素濃度は、変化を認めなかった($p=0.88$)。さらに測定時間毎の唾液中の抗酸化力と血漿中の抗酸化力との関連を検討し、各時間において有意な相関を認めなかった(朝 $p=0.54$ 、昼 $p=0.39$ 、夕 $p=0.97$)。

②ヒドロペルオキシド濃度は、運動前 $368.0(433.0)$ U.Carr (中央値(四分位範囲))、運動後 $595.0(426.0)$ U.Carr であり、運動前後で有意な変化を認めた($p<0.05$)。抗酸化力は、運動前 $2.1(4.4)$ $\mu\text{mol/l}$ 、運動後

$2.1(4.4)$ $\mu\text{mol/l}$ であり、運動前後で有意な変化を認めなかった($p=0.100$)。ヒドロペルオキシド濃度の日内変動率は $6.5(7.7)\%$ であり、運動変化率は $9.3(9.1)\%$ であった。ヒドロペルオキシド濃度の日内変動率と運動変化率の間に有意差を認めなかった($p=0.546$) (図1)。抗酸化力の日内変動率は $8.3(8.8)\%$ であり、運動変化率は $3.7(10.8)\%$ であった。抗酸化力の日内変動率と運動変化率の間に有意差を認めなかった($p=0.222$) (図1)。

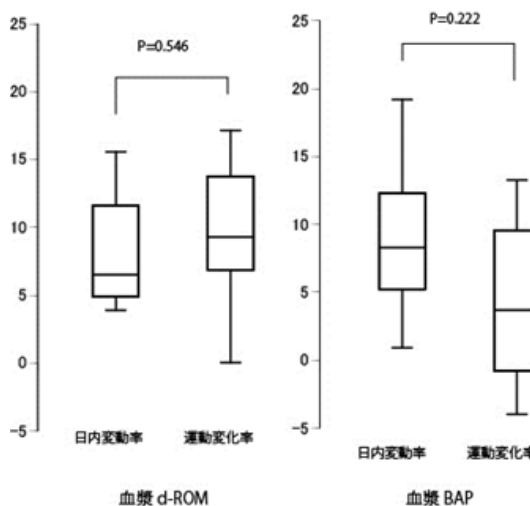


図1. 酸化ストレス指標の日内変動率と運動変化率の比較

以上のことから、健常成人において安静時では酸化ストレスを誘発するイベントがない場合、唾液中の抗酸化能および血漿中ヒドロペルオキシド濃度は変動しないことが明らかとなり、抗酸化力は唾液と血漿との関連が低いことが明らかとなった。さらに健常成人において、30分の中強度定量運動負荷は、運動により生じる酸化ストレスの増加は日内変動内であることが明らかとなった。

(2) 慢性呼吸器疾患患者の唾液中酸化ストレスマーカー検証ならびに呼吸リハビリテーションの影響

①呼吸リハ実施前の検体は、変動係数(CV) $1.4\sim 19.1\%$ 、級内相関係数 $ICC(1,1)=0.962$ 、 $ICC(1,3)=0.987$ であった。実施後の検定は、 $CV1.34\sim 24.2\%$ 、 $ICC(1,1)=0.959$ 、 $ICC(1,3)=0.986$ であった。よって慢性呼吸器疾患患者の唾液中抗酸化力検査実施において、同時再現性は、ばらつきを認められる検体が認められるが、検体内信頼性が高いことが明らかとなった。

②入院初期時におけるリハビリテーション実施前は、 $3782.1(2485.6)$ $\mu\text{mol/L}$ (中央値(四分位範囲))、実施後は、 $3374.0(1828.5)$ $\mu\text{mol/L}$ であり、有意な変化を認めた

($p=0.024$)。退院時のリハビリテーション実施前は、 $4287.2 (1584.0) \mu\text{mol/L}$ 、実施後は、 $3677.3 (1731.7) \mu\text{mol/L}$ であり有意な変化を認めた ($p=0.005$)。本研究により、単回の運動療法を中心とした呼吸リハビリテーションは、唾液中酸化ストレスに影響を及ぼすことが明らかとなった。

③入院初期時におけるリハビリテーション抗酸化力変化率は $-17.7 \pm 26.7\%$ (中央値 (四分位範囲))、退院時における抗酸化力変化率は $-13.8 \pm 18.1\%$ (中央値 (四分位範囲)) であり、2群間に有意な差を認めなかった ($p=0.89$) (図2)。安静時抗酸化力値は入院初期時値と退院時値の間に強い正の相関を認め ($r=0.577, p=0.39$)、さらに安静時 BAP 値とリハビリテーション後 BAP 値の間に強い正の相関を認めた (入院初期時; $r=0.708, p=0.007$ ・退院時; $r=0.942, p=0.001$)。

以上の結果より、唾液中抗酸化力は、呼吸リハビリテーション実施後に低値を示すが、安静値の影響を受けることが明らかとなった。

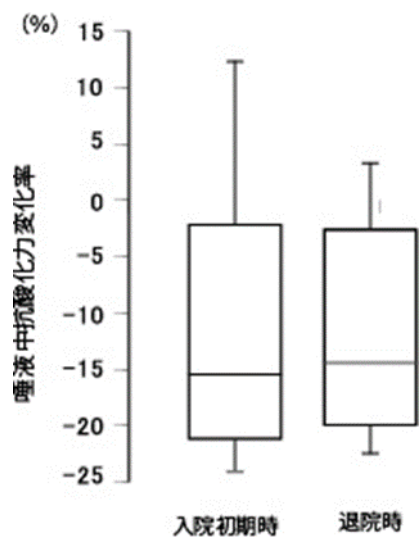


図2. リハビリテーション前後における唾液中抗酸化力変化率

慢性閉塞性肺疾患などの呼吸器疾患の成因や病態進行と酸化ストレスの関連は報告があるが、呼吸リハビリテーションが上気道局所の酸化ストレス機能に与える影響を報告したものはない。本研究は、呼吸器疾患患者における唾液中抗酸化力の検体分析方法の有効性とその影響因子、さらには呼吸リハビリテーションの影響を検証した初めての研究であり、新たな呼吸リハビリテーションを展開するために必要な唾液中局所酸化ストレス指標の有用性を確立するための一定の成果を得た。この成果は、呼吸リハビリテーションにおいて唾液中抗酸化力といった

酸化ストレスという観点に着目すること、さらには入院期から退院後にかけて長期的に呼吸リハビリテーションの影響を検討することの意義を呈示することができた。しかし、唾液中抗酸化機能動態のメカニズム解明に関する成果を得ることができなかった。よって、今後の展望として、唾液中抗酸化力以外の他の酸化ストレスマーカーに着目し、呼吸リハビリテーションの影響を検証する必要がある。

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0件)

[図書] (計0件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

関川 清一 (SEKIKAWA KIYOKAZU)
 広島大学・大学院医歯薬保健学研究院・准教授
 研究者番号：30363055

(2) 連携研究者

高橋 真 (TAKAHASHI MAKOTO)
 広島大学・大学院医歯薬保健学研究院・講師
 研究者番号：50435690

濱田 泰伸 (HAMADA HIRONUBU)
 広島大学・大学院医歯薬保健学研究院・教授
 研究者番号：80314954