

## 口腔内生理活性物質の簡便な測定法の開発

分担協力者 西原 達次 九州歯科大学感染分子生物学分野

研究協力者 磯田 隆聡 北九州市立大学国際環境工学部

主任研究者 柿木 保明 九州歯科大学摂食機能リハビリテーション学分野

## 研究要旨

現在、サイトカインをはじめとする生理活性物質の定量法として ELISA 法が汎用されている。しかし、この方法を臨床応用しようとするときに、採取したサンプル中の物質を検出するまでに様々な工程を必要とし、操作時間の長さや定量に必要なサンプル量の点で課題があるため、歯科におけるチェアサイドでの検査法として適当であるとは言い難い。われわれはこの問題を改善するため、北九州市立大学環境工学科とマイクロチップバイオセンサを共同開発し、臨床応用に向けて基礎的な研究を開始した。この装置はセンサチップ表面に特殊な感応膜を調製し、この感応膜上に免疫物質を固定することで、抗原抗体反応の量を電圧に変換し検出を行うもので、即時性・選択性・定量性が高い次元で実現できる可能性を持っており、さらに、信号の無線化を行い、携帯性の点でも優れている。今回は、その性能向上のためにセンサチップ表面の感応膜の材質の最適化を行い、マウス IgG を定量したところ、濃度に依存した電圧値を検出できたので報告する。今後はこの装置をさらに改良し、唾液中の細菌や抗菌物質の検出にも応用していく予定である。

## A. 研究の目的

口腔乾燥症を考えるうえで、唾液の分泌量の低下とともに、質的な変化も重要な要因になっていると考えられている。これまで、唾液の性状については、曳糸性測定器などが開発され、現在の調査研究に使われている。しかし、唾液中に含まれる成分を検証するための簡便な機器は未だ開発されていない。

一方、8020運動などにも見られるように、高齢者においても、できる限り自分の歯を残そうという動きのなかで、高齢者の残存歯数が多くなっている。しかし、高齢者のみならず、成人においても歯周病が歯の喪失の主たる原因であることは明らかである。

これまで歯周病研究が進み、先端診療の一つとして、歯周再生治療が注目されているが、病態が

明らかにされているにも関わらず、客観的に指標化された診断機器がない。そのような状況になかで、我々は、歯科診療室で使用可能な簡便かつ信頼性の高い歯周病診断キットの開発を進めてきた(図1)。

さらに、歯周病研究の進歩にともない、歯周病と全身疾患との関連が指摘され、調査研究、基礎・臨床研究の結果、両者の因果関係が明らかになリ、今では歯周医学という学際領域の研究が行われている(図2)。この視点に立って考えても、歯周病診断キットが開発されることで得られるものは大きい。例えば、歯周病に罹患した妊婦で早期低体重児が多く見られるという事実が指摘され、歯周病患者の歯肉溝滲出液中のサイトカインや生理活性物質の測定が、早期低体重児出産の予測に有効であることを示唆する実験結果が出

されている (図3)。

今回の研究事業でも大きなテーマの一つとなっている高齢者について考えると、成人の感染症との間に大きな違いがある。例えば、誤嚥性肺炎をはじめとする各種感染症では、高齢者における死亡率が高くなっている (表1)。さらに、要介護高齢者の口腔ケアの重要性が指摘され、現在に至っていることは広く知られている。

そこで、我々の研究グループは、これまで開発を進めてきた歯周病診断キットを進化させ、高齢者の唾液の質的变化を把握し、さらに、そこに含まれる細菌数および細菌種を明確にすることを目指した。

## B. 研究対象および方法

今回の研究における目標を図4に示す。本研究事業における調査研究の検体としては、唾液、歯肉溝滲出液が考えられるが、これらに含まれているサイトカインや細菌が対象となる。

今回の検査機器は、図5に示す要素技術に基づいて開発してきた。本研究事業では、今後、幅広く体液中の成分を測定するという考え、検体として免疫グロブリンを用い、検出系に抗免疫グロブリン抗体を用いて開発を進め、定量的な測定が可能か否かを検証した。

## C. 研究結果

### 1) チップのデザイン

今回、図6の上段左側に示す測定チップを用いたが、これにより、1回に5サンプルを計測することができるようになった。さらに、現在、サンプル処理時間を含めて1時間以内で計測ができるところまで改良が進んだ。電気化学反応を数値化するシステムについては開発が終了している。

### 2) 測定結果

今回、検体として免疫グロブリン、検出系に抗免疫グロブリン抗体を用いて測定したところ、図

6の上段右側に示すように、試験試薬として用いた抗免疫グロブリン抗体の濃度を変化させると、濃度依存的な反応が認められた。

## D. 考察

今回、現在、我々の研究グループで開発している検出機器が、唾液中の成分解析に使用できるか否かを検証した。図5に示した要素技術および図6の下段に記載した本検出キットの長所からもわかるように、今回の検出機器は抗原抗体反応を数値化することを特徴としている。

これまで、抗原抗体反応を数値化するシステムとしては、ELISA法が汎用され、血液中のさまざまな成分の測定が血清検査の一環として行われている。我々が開発したキットは、基本的には抗原抗体反応を検出系に用いているので、この点に関してはELISA法と同じである。したがって、本キットでは、混合物中から特定物質を検出する際に電気化学センサを用いているが、ELISA法と同じく特異的に検出する機能は有している。

一方で、今回、我々が開発したキットは、微量試料(1~10 $\mu$ L)で測定可能であり、数秒~数分で測定可能といった特徴を有している。加えて、前処理は不要で、センサに接触させるだけで反応させることができるので、システム全体の小型化可能で手のひら大にまで小さくすることができる。

今後、これらの利点を活かして、歯科診療室や調査研究で応用可能な検出機器にまで開発を進めていく予定である。

## E. 結論

今年度、ヒトの体液中に存在するサンプルを特異的かつ定量的に測定可能な検出機器の開発を進めたところ、歯肉溝滲出液および唾液中のサイトカインおよび細菌を対象としたサンプルでも使用可能であることを示唆する実験結果が得られた。

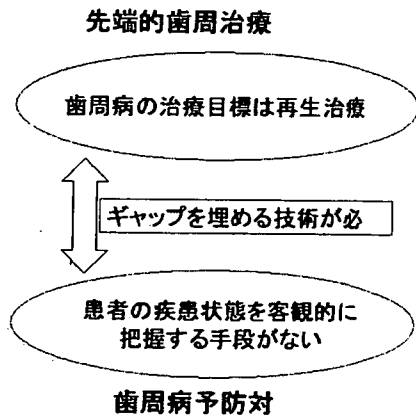
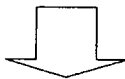


図1

現在、歯周病と全身疾患との関連について基礎および臨床の分野で研究が進み、歯周医学(Periodontal Medicine)という研究領域が形成されている



歯周病診断キットの応用例  
新たな研究プロジェクトの立ち上げ

図2

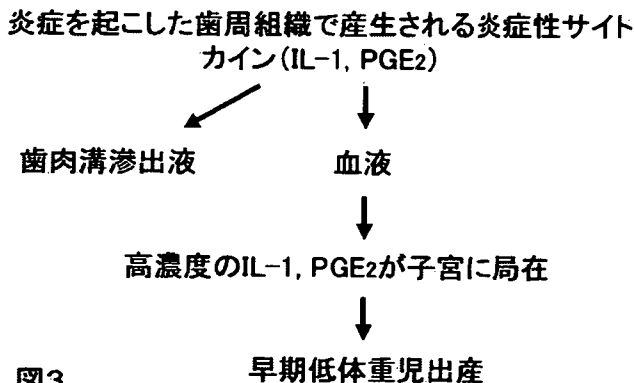


図3

表1 高齢者感染症における致死率

感染症	成人における致死率との比較(倍)
肺炎	3
尿路感染症	5-10
感染性心内膜炎	2-3
細菌性髄膜炎	3
結核	10
敗血症	3
胆嚢炎	2-8
虫垂炎	15-20

開発目標

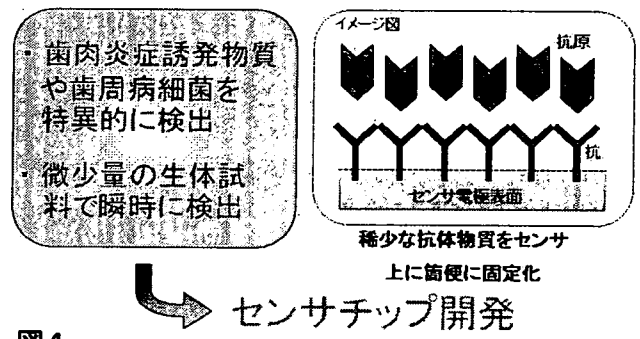


図4

要素技術 <sup>※1</sup>

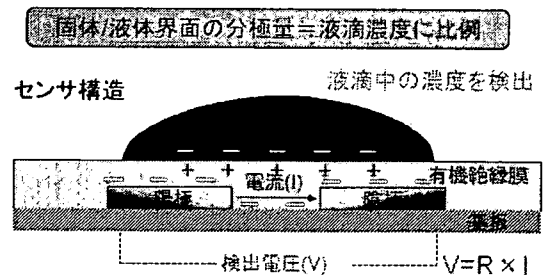
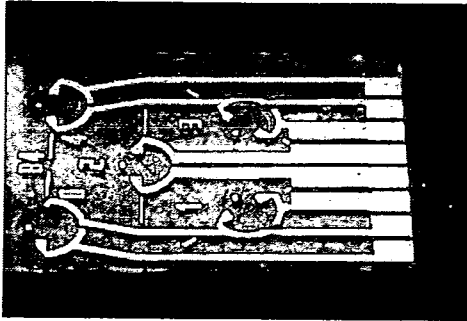


図5

※1 Isoda, T., Makimoto, Y., Imanaga, H., Imamura, R., Pawlat, J., Ueda, T., Development of a Source-Drain Electrode coated with an Insulation Layer for Detecting Concentration Changes in a Nitrate Ion Solution, Sensors & Actuators: B. Chemical, 121 (2006).

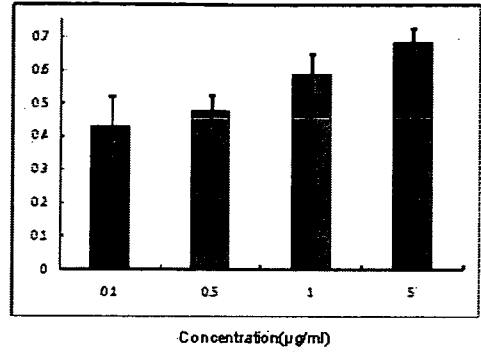
改良したチップ



Immobilized Ag  
: mouse IgG

Test solution  
: anti-mouse IgG  
(0.1~5μg/ml)

改良したセンサチップを用いての測定結果



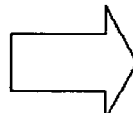
現行の検査法(ELISA)

- ・高い特異性
- ・優れた定量性

<敬遠される理由>

- ・長時間の作業(半日~)
- ・多大なコスト(数万~30万円超)
- ・煩雑な操作
- ・巨大な装置

利点はそのまま



改善

新しい免疫学的センサー

- ・高い特異性
- ・優れた定量性

- ・数分
- ・数百円
- ・試料を滴下するのみ
- ・手のひらサイズ

図6

図7

## 本方法と既存ELISA法の違い

- ・混合物中から特定物質を検出することが可能な、選択的検出機能を有する電気化学センサの提供が可能
- ・微量試料(1~10 μL)で測定可能
- ・数秒~数分で測定可能
- ・前処理は不要(センサに接触させるだけ)
- ・システム全体の小型化可能(手のひら大)

## 口腔内細菌の血栓形成能の測定法の開発

分担協力者 西原 達次 九州歯科大学感染分子生物学分野  
 共同研究者 磯田 隆聡 北九州市立大学国際環境工学部  
 主任研究者 柿木 保明 九州歯科大学摂食機能リハビリテーション学分野

## 研究要旨

歯周病と心筋梗塞の因果関係を示す調査研究に加えて、多くの基礎および臨床研究成果が報告されている。例えば、心筋梗塞患者の剖検例で、梗塞化した部位から歯周病細菌が検出され、血栓形成における歯周病細菌の関与が指摘されている。そこで、我々は微小流路を形成したチップを作製し、その有効性を検証した。まず、突起部を配置したマイクロチップをアクリル樹脂基板で作製し、流路壁はSi ゴム系樹脂でコーティング処理をした。コントロール細胞ならびに LPS 活性化細胞を一定の条件にて微小流路内を流通させた。その後、突起部 100 ヶ所を撮影し、画像解析で付着した細胞量を測定した。次に、流路中の流速を減少させ、血流に類似した流路の作製を目指して、突起部の配置の異なる流路を設計した。今回の実験で、未刺激状態で障害物のない流路では、細胞と親和性の高いと言われているシリコン壁面でも流通細胞は付着しないことを確認した。その上で、検出キットを用いて歯周病細菌の影響を調べたところ、コントロール細胞と比較して、歯周病細菌由来の LPS で活性化した細胞の付着性が亢進することが分かった。今後、様々な条件下にて付着する細胞の動態を観察し、梗塞化のメカニズムを解明していく予定である。

## A. 研究の目的

現在、歯周病と全身疾患との関連が指摘されているが、なかでも、歯周病細菌と虚血性心疾患との関連については、多くに事実が明らかになってきた。例えば、ある種の歯周病細菌が産生するプロテアーゼやリポ多糖 (LPS) が冠状動脈の梗塞化を助長することが報告されている。さらに、心筋梗塞を発症した患者の梗塞化した病巣から歯周病細菌が検出され、両者の因果関係を支持する臨床結果が得られている (図 1)。これまでに、細胞生物学的研究が進み、泡沫化細胞を増加させて梗塞を促進していることが明らかになってきた。

主たる歯周病原細菌 *P. g.*, *A. a.*, *B. f.* はグラム陰性嫌気性菌で、その菌体表層成分である LPS はマクロファージを活性化し、LDL などの

血中コレステロールとともに血栓形成を促進する。このような分子レベルでの病態解析は行われてきたが、歯周病細菌が血栓を形成することを実証する技術の開発は遅れている。

そこで、本研究では、血管をモデル化した微小流路を作成し、*in vitro* で細胞の付着を観察するシステムを開発し、患者血清 LDL を付加したマクロファージなどの食食細胞の付着観察から、患者血清の梗塞リスクを評価するシステムの開発を目指した。

さらに、成人同様に高齢者においても歯周病の罹患率は高く、歯周細菌による血管梗塞の現象を解析し、その状態を観察する検査技術を開発することで得られるものは大きい。

## B. 研究対象および方法

### (1) 微小流路を形成したチップ

今回の研究事業では、作成する微小流路のデザインの決定するためにマイクロチップを試作した(図2)。ここでは、マイクロチップにシリコンゴムをコートして微小流路を作成した。

次に、マイクロチップの全容(図3上段)とマイクロチップに刻み込んだ微小流路のデザイン(図3下段)を示す。

### (2) 観察方法

5% CO<sub>2</sub> 存在下で培養しながら顕微鏡で観察するシステムを構築した(図4)。この流路に流れる細胞をリアルタイムで観察し、マイクロピラー(障害物)周辺に付着・集積する細胞を計測の対象とした。

### (3) 計測方法

図5に示すように、一定の領域(250x500・μm)で形成された梗塞化部位(Sc)の面積を計測した。

## C. 研究結果

まず、未刺激状態で障害物のない流路では、細胞と親和性の高いと言われているシリコン壁面でも流通細胞は付着しないことを確認した。

今回の実験では、LPSで刺激したマクロファージを血清コレステロール(LDL)存在下で流路中を循環させると、マイクロピラー周辺に集積する細胞が多くなり、梗塞化を示唆する観察結果が得られた(図6)。

## D. 考察

歯周病と心筋梗塞は典型的な生活習慣病であり、それぞれの発症の背景には、血液中のコレステロール、なかでもLDLと酸化LDLが梗塞化を引き起こす因子として重要視されている。

我々の研究グループは、これまでの研究で、歯周病が進行すると一過性の菌血症が誘発され、歯周病細菌がマクロファージのアポトーシスを誘導し、血液内の血栓形成を助長することを見出している。この知見をもとに、我々は、血栓形成モデルを開発し、血中のマクロファージが微小血管内で梗塞化する現象を *in vitro* で再現するシステムを構築した。

さらに、本研究事業は、歯周病患者血清中のLDLを観察系に付加して血栓形成リスクを高め、心筋梗塞リスクとの関連を明らかにすることをめざした。

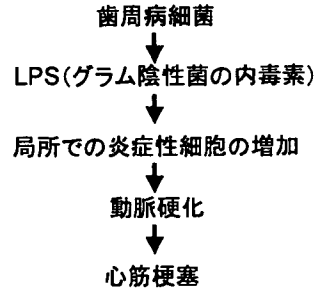
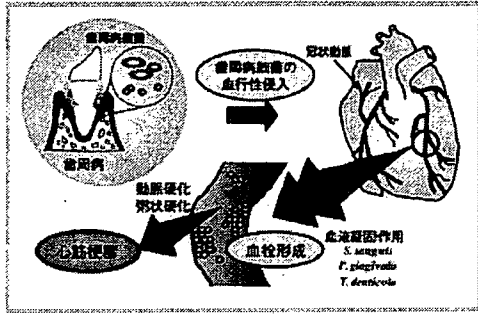
先にも述べたように、我々は、マクロファージの貪食能と泡沫化を亢進させるメカニズムを明らかにしている。その一方で、北九州市立大学磯田隆聡講師との共同研究でマイクロチップを試作し、微小流路のデザインについて検討した。今後、微小流路に応用する活性化物質に応じて、血栓形成をモデル化できる構造(マイクロピラーの位置設定)を絞り込んでいく予定である。さらに、今後の課題として、微小流路の流路幅と溝の深さ、および至適細胞数、用いる培養液と流速の検討などが残された。

## E. 結論

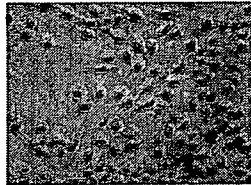
今回の研究で開発した微小流路を用いて、歯周病細菌由来のLPSで刺激したマクロファージが梗塞化を起こすか否かを調べた。その結果、コントロール細胞と比較して、活性化マクロファージで付着性が亢進することが明らかとなった。今後、様々な条件下で付着する細胞の動態を観察し、梗塞化メカニズムの解明を目指す。

図 1

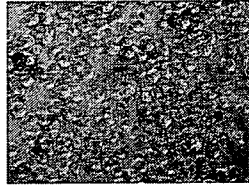
全身疾患と歯周病



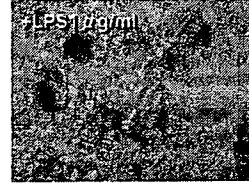
マクロファージの泡沫化



control



LDL100 μg/ml 添加



LDL100 μg/ml 添加

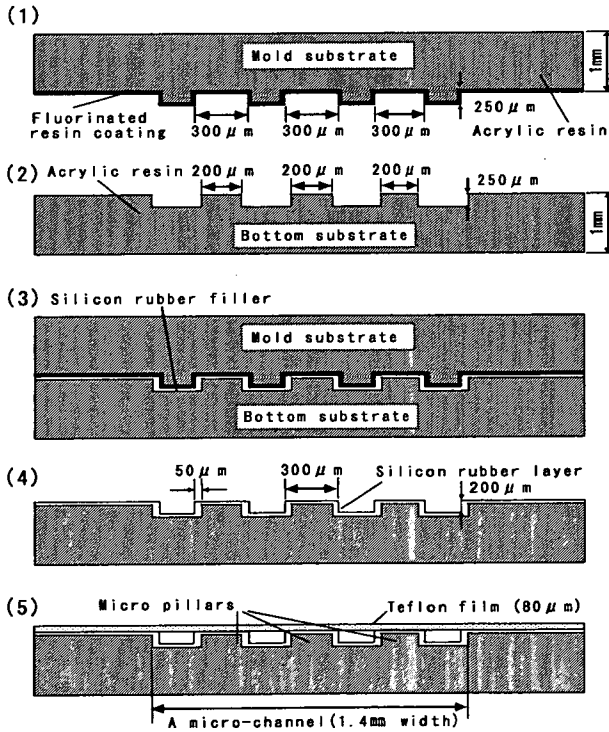


Fig.1 Steps in the fabrication of the micro-channel chip. (Fig.2: cross section A-B)

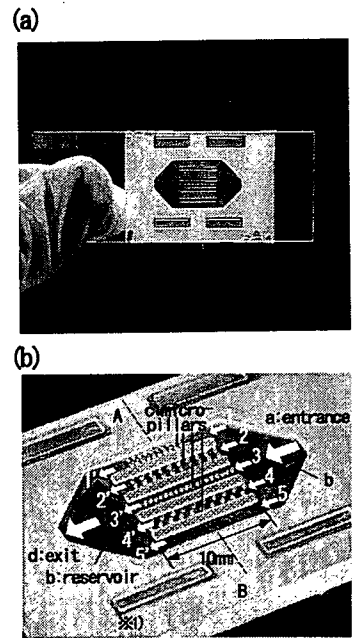


図 2

図 3

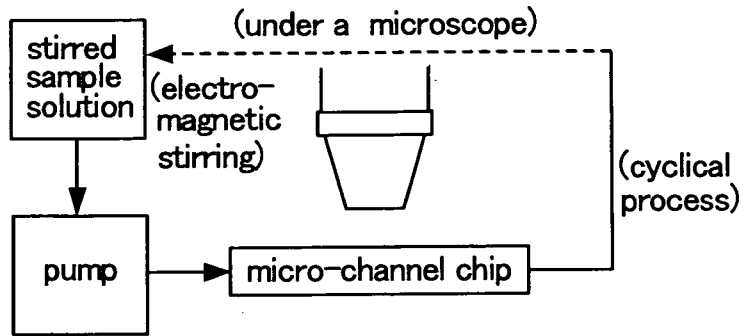


图 4

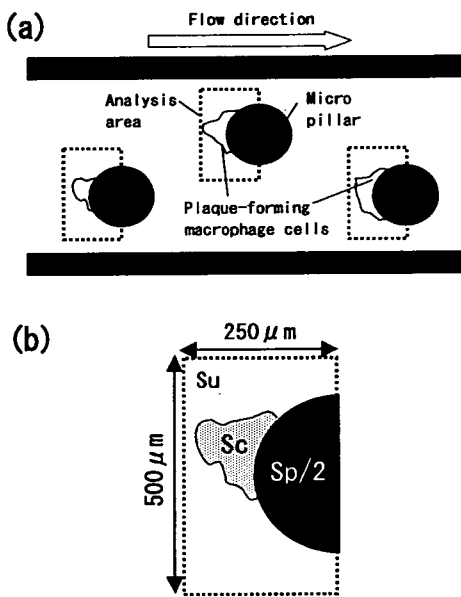


图 5

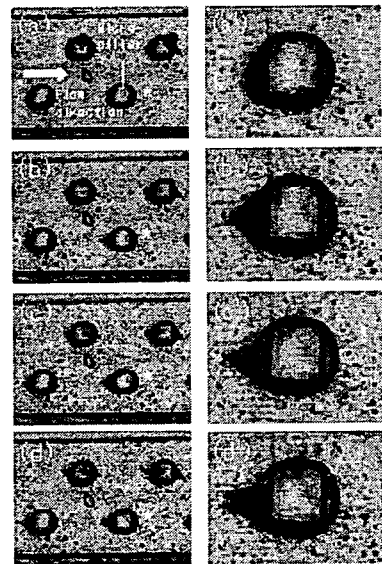


Fig 6 Optical microscope images of a plaque-forming macrophage cell (activated using LPS) attached a micro-pillar in a micro-channel chip. A micro-channel chip (type 3 as shown in Table 3) was used. Time of flow cell: 0 min (a and a'), 20 min (b and b'), 60 min (c and c') and 120 min (d and d'). Magnification: left side photographs:  $\times 10$ , right side photographs:  $\times 27$ .

图 6



## 口腔内疾患の罹患状態と安静時唾液中の生体防御因子の解析

研究協力者 小関 健由 東北大学大学院歯学研究科

口腔保健発育学講座予防歯科学分野

主任研究者 柿木 保明 九州歯科大学摂食機能リハビリテーション学分野

## 研究要旨

安静時唾液は常に口腔内を潤し、口腔内環境を規定する重要な要素であり、円滑な口腔の健康や機能を考えた場合、刺激唾液以上に安静時唾液は重要な役割を担っている。しかしながら、この安静時唾液中の各防御因子の濃度と口腔内疾病との関連はあまり研究がなされていない。本研究では、健常な受診者を含む歯科健診の場で、口腔内診査と安静時唾液採取を同時に行い、診査結果と唾液中の防御因子の相関を検索した。農村地帯の住民健診に併設して歯科健診を実施し、同意を得た受診者を対象に、開発したワッテ法を用いて安静時唾液を採取した。採取した唾液は、IgA・Lactoferrin・遊離ヘモグロビンの濃度を測定した。その結果、安静時唾液分泌量とIgAおよびLactoferrin濃度は逆相関したが、遊離ヘモグロビン濃度には関連性が見あたらなかった。多変量解析の結果と口腔内疾患の関連性では強い相関は見つけれなかったが、安静時唾液分泌量が減少すると抗菌因子の濃度が高まり、口腔内の感染防御を上げるための何らかのメカニズムが働いている可能性が示された。

## A. 研究の目的

安静時唾液は常に口腔内を潤し、口腔内環境を規定する重要な要素であり、円滑な口腔の健康や機能を考えた場合、刺激唾液以上に安静時唾液は重要な役割を担っている。特に高齢の方で全身疾患の投薬を受けられている方は、安静時唾液分泌量が減少して口腔乾燥症になりやすく、口腔内環境が激変して様々な口腔内疾患が起きやすくなると考えられる<sup>1)2)3)</sup>。しかしながら、これまでの口腔内疾患のリスク検査で実施される唾液検査は、ほとんどが刺激唾液を対象としていた。今回我々が提案している簡便に安静時唾液流出量を測定して唾液を採取する改良ワッテ法を用いて、健常人を含む歯科疾患の疫学調査時に安静時唾液を採取し、唾液中の疾病の防御因子の濃度を解析することにより、安静時唾液の口腔内の疾病

予防における役割を検索し、歯科疾患の予防に役立てることを目的とした。

## B. 研究対象および方法

農村地帯の住民健診に併設して歯科健診を実施し、同意を得た受診者を対象に、改良ワッテ法を用いて安静時唾液を採取した。安静時唾液はワッテに吸収されているので、採取後は重量の変化を計測した後直ぐに氷冷下で保存し、2,500rpmで15分遠心して混入物を除去し、-80℃にて保存した。安静時唾液流失量の低い受診者からは十分な安静時唾液量が回収できなかったため、本測定から除外した。IgAおよびLactoferrin量はIgAはSALLIVARY SECRETORY IgA INDIRECT ENZYME IMMUNOASSAY KIT (SALIMETRICS, State College, PA, USA)にて、

Lactoferrin は、BIOXYTECH Lactof ELATM (OxisResearch, Foster City, CA, USA)にて、キットの測定法に従って Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)にて duplicate で測定した<sup>4,5)</sup>。遊離ヘモグロビン量は、宮城県予防医学協会にて、生化学検査用機器を用いて測定した。データ解析には SPSS11.5 を用いた。本実験は東北大学歯学研究科研究倫理専門委員会にて承認されている (承認番号 30-2)。

### C. 研究結果

本研究に同意し、改良ワッテ法にて安静時唾液流出量を測定した 796 名の内、安静時唾液流出量の比較的多かった者 325 名 (19~86 歳; 表 1) の唾液中の IgA・Lactoferrin 濃度を ELISA で測定したところ、IgA 濃度 (対数値) は安静時唾液流出量 ( $R=-0.483$ ,  $p=0.000$ , 図 1)・年齢・現在歯数・DMF 歯数・最大 CPI 値・Lactoferrin 濃度・身長・BMI とで、Lactoferrin 濃度 (対数) は安静時唾液流出量 ( $R=-0.521$ ,  $p=0.000$ , 図 2)・年齢・現在歯数・DMF 歯数・最大 CPI 値・IgA 濃度 (対数値)・身長・BMI とで統計学的に有意の相関がみられた。一方、295 名 (19~86 歳; 表 1) の唾液中の遊離ヘモグロビン濃度は、測定限界の  $1 \mu\text{g/mL}$  より薄い者が 255 名存在した。よって、 $1.2 \mu\text{g/mL}$  より薄い者、 $2.4 \mu\text{g/mL}$  より薄い者、 $4.8 \mu\text{g/mL}$  より薄い者、それ以上の 4 段階に区分して口腔内の他の因子との相関を検索したが、関連する因子は見つからなかった。安静時唾液は、その流出量が多いほど現在歯数が大きくなり、また、流出量が少ないほど、年齢・DMFT・口腔乾燥感・IgA 濃度・Lactoferrin 濃度が上昇することが二変量解析から明らかになっているが、年齢・性別はこれらの因子と密接に関連していることから、安静時唾液流出量の多い半分と少ない半分に分類し、年齢と性別を強制投入したステップワイズ法にてロジスティック解析を行ったところ、統計学的に有意に関連する項目を見いだすことが出来なかった。

### D. 考察

今回の研究の対象者は、全体の四割に当たる安瀨時唾液分泌用の多い受診者のみである。よって、残り六割の疾病の発症に最も関与していると考えられる安静時唾液分泌量の少ない受診者を解析するためには、安静時唾液の収集方法を再検討しなければならない。改良ワッテ法では、三分間で採取した安静時唾液量が  $100 \mu\text{L}$  に満たない者は 117 名で全体の 15% であり、高齢になるほどその割合が増加する。これらの被験者からは、吐唾法は元より改良ワッテ法にても安静時唾液の採取は困難であるので、安静時唾液の構成要素を検索する場合には更なる工夫が必要である。現時点ではワッテからの効果的な構成要素の抽出方法を工夫し、口腔内のワッテの繋留時間を 5 分程度の延長する対策が考えられるか、口腔内の含嗽液を利用することが考えられるが、含嗽の場合は構成要素の希釈の問題が生じる。いずれにせよ、口腔乾燥症の口腔内の疾病に対する生体防御を高める研究には、これらの口腔内防御機能の評価法を新しく構築しなければならない。

また、今回の結果では安静時唾液分泌量と IgA および Lactoferrin 濃度は逆相関したが、これは IgA および Lactoferrin の分泌量は大きな変化は無く、唾液分泌量の増減がこれらの濃度に影響を与えているのかもしれない。IgA は分泌型のみを検出し、歯肉溝滲出液や炎症部位から混入する血清成分の影響を除外できる。この両者は云うまでもなく高濃度で微生物の定着・増殖を抑える抗菌因子であるので、唾液分泌量が低い者により高濃度にこれらの抗菌因子が存在すれば、効果的な感染防御が可能となる。しかしながら、横軸に安静時唾液流出量、縦軸に安静時唾液流出量と IgA もしくは Lactoferrin 濃度を掛けた、いわば各因子の口腔内分泌総量をプロットすると、傾きが水平になることから、生体では口腔内の防御因子の存在量を一定にして生体防御を機能させるべく、安静時唾液流出量が少なくなるとその濃度が上げられていることが考えられた。

E. 結論

安静時唾液は常に口腔内を潤し、口腔内環境を規定する重要な要素であり、口腔内の感染防御の一翼を担う。この唾液内防御因子である IgA・Lactoferrin の濃度を改良ワッテ法で検索したところ、安静時唾液分泌量と IgA および Lactoferrin 濃度は逆相関したが、遊離ヘモグロビン濃度には関連性が見あたらなかった。安静時唾液分泌量が減少すると抗菌因子の濃度が高まり、口腔内の感染防御を上げるための何らかのメカニズムが働いている可能性が示された。

F. 参考文献

1). Edgar WM, O' Mullane DM 編 (河野正司監訳) 唾液 歯と口腔の健康. 医歯薬出版, 東京, 1997  
 2). 柿木保明、他 厚生労働省・厚生労働科学研究

費補助金 長寿科学研究事業 高齢者の口腔乾燥改善と食機能支援に関する研究 平成 17 年度研究報告書 80 (2006)

3). Jorma OT (石川達也、高江洲義矩監訳). 唾液の科学. 一世出版, 東京, 1998  
 4). Eliasson L, Almståhl A, Lingström P, Wikström M, Carlén A. Minor gland saliva flow rate and proteins in subjects with hyposalivation due to Sjögren's syndrome and radiation therapy. Arch Oral Biol. 2005 50: 293-299  
 5). Rudney JD, Hickey KL, Ji Z. Cumulative correlations of lysozyme, lactoferrin, peroxidase, S-IgA, amylase, and total protein concentrations with adherence of oral viridans streptococci to microplates coated with human saliva. J Dent Res 1999; 78: 759-768

表 1 安静時唾液の測定対象者

	計	～20歳代	30歳代	40歳代	50歳代	60歳代	70歳代	80歳代	90歳代
<b>安静時唾液流出量測定対象者</b>									
男性	278	12	13	28	40	63	101	21	0
女性	518	15	31	85	102	133	126	24	2
計	796	27	44	113	142	196	227	45	2
<b>唾液中IgA・Lactoferrin濃度測定対象者</b>									
男性	125	9	3	18	15	37	35	8	0
女性	200	8	16	38	38	57	40	3	0
計	325	17	19	56	53	94	75	11	0
<b>唾液中遊離ヘモグロビン測定対象者</b>									
男性	104	6	2	12	15	31	30	8	0
女性	191	6	20	40	39	49	34	3	0
計	295	12	22	52	54	80	64	11	0

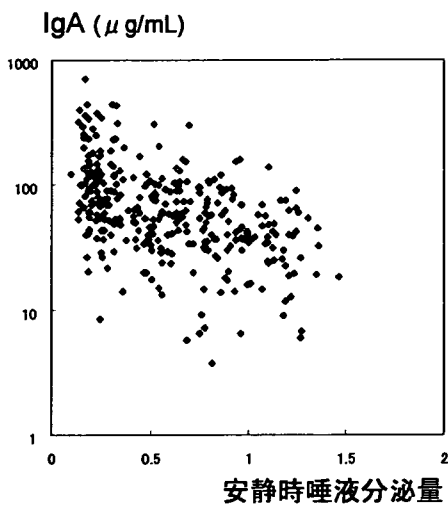


図1 安静時唾液分泌量とIgA濃度の関係

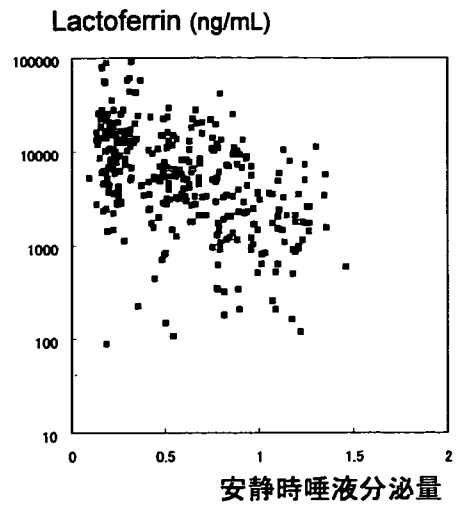


図2 安静時唾液分泌量とLactoferrin濃度の関係

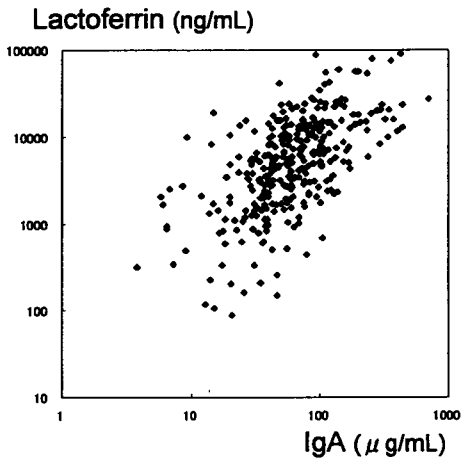


図3 IgAとLactoferrin濃度の関係

## 口腔機能評価のための口腔内圧測定器の開発

研究協力者 小関 健由 東北大学大学院歯学研究科

口腔保健発育学講座予防歯科学分野

主任研究者 柿木 保明 九州歯科大学摂食機能リハビリテーション学分野

## 研究要旨

口腔内に分泌された安静時唾液は無意識の内に嚥下され、口腔内の恒常性が保たれている。この無意識の嚥下は、うまく機能しないと誤嚥の原因となり、特に高齢者の場合は誤嚥性肺炎へ結び付く危険因子とあると考えられる。よって、誤嚥性肺炎の防止を考えるに当たって、唾液の正しい「嚥下」を如何に評価するかが臨床上大きな問題である。そこで、唾液の正しい「嚥下」を評価を簡便にスクリーニング検査する方法として、口腔内圧を測定することを試みた。口腔の閉鎖と筋力によって生成される口腔の陰圧と、口唇閉鎖と呼吸器によって生成される口腔内陽圧を150名の健常人で検索したところ、健康な小児では年齢が上がるにつれ、陽陰圧の双方とも強くなり、さらに陽圧形成がうまく出来る小児は陰圧形成もうまく出来きたが、成人では、年齢が上がるにつれ、陽陰圧の双方とも緩やかに弱くなる傾向にあった。さらに、要介護者での測定では、摂取食物の形態が、きざみ食、もしくは、とろみ食摂取者では陰圧・陽圧を強く生成できる者が極めて少なかった。以上から、嚥下の口腔機能の評価する方法の一つとして、本研究で実施した方法は簡便で短時間に測定できる極めて優れた方法である可能性が示された。

## A. 研究の目的

唾液は成人で1日1リットル以上分泌するといわれ、食事時以外の日常生活では安静時唾液が口腔内を潤している。分泌された安静時唾液は無意識の内に嚥下され、口腔内の恒常性が保たれている。この無意識の嚥下は、うまく機能しないと誤嚥の原因となり、特に高齢者の場合は誤嚥性肺炎へ結び付く危険因子とあると考えられる。よって、誤嚥性肺炎の防止を考えるに当たって、唾液の正しい「嚥下」を如何に評価するかが臨床上大きな問題である。

基本的な摂食機能は「捕食」・「咀嚼」・「嚥下」の各機能から成り立ち、食物が認知されてから口に取り込まれ、咽頭、食道を経て胃に入るまでの過程を「摂食・嚥下」と呼ぶ。Leopold (1983年)はこの過程を5つの期に分類した。食物を食べる

動作は、何をどのようなペースで食べるかを判断する先行期(認知期)、食物を口に取り込み、咀嚼して食塊にする準備期(咀嚼期)、食塊を口腔から咽頭へと送り込む口腔期(嚥下第1期)、食塊を咽頭から食道へと送り込む咽頭期(嚥下第2期)、そして食塊を食道から胃へと送り込む食道期(嚥下第3期)の順に全体が協調して進んでゆく。よって、唾液の誤嚥を考える場合は、咀嚼期の後期から嚥下第2期までの評価が重要である。しかしながら、この期の機能評価法は、誤嚥を誘発する可能性のある水飲み試験や大きな機器が必要となるVideofluorography (VF) を行わないと評価できないのが現状である。

本研究では、この期の機能障害を簡便にスクリーニング検査するための方法として、口腔内圧を測定することを試みた。これは、乳児嚥下から成

人の咀嚼・嚥下に関する口腔機能の指標として、口腔の閉鎖と筋力によって生成される口腔の陰圧と、口唇閉鎖と呼吸器によって生成される口腔内陽圧を計測するもので、身体に負荷がかかる方法ではないので簡便な口腔機能スクリーニング検診に応用できると考えられる。

## B. 研究対象および方法

### 1) 口腔内陰陽圧測定器

口腔内に作られる陰圧と陽圧を簡便に測定する装置を図1に示す。口腔内の圧力は、直径5mmの先折れストローに唾液混入防止用のトラップを接続し、それをシリコンゴムのホースでキーエンス社製連成圧センサ AP-44 に接続して最大値と最小値を記憶させ、測定毎に値を読み出した。この口腔内陽圧と陰圧は、健康人では口唇閉鎖圧と相関することが先行研究で明らかにされている。実際の測定時には、ストローの根元を持たせて、「ストローを出来るだけ強くチューチュー吸ってください。」「ストローをくわえたまま出来るだけ強く吹いてください。」と声かけを行った。

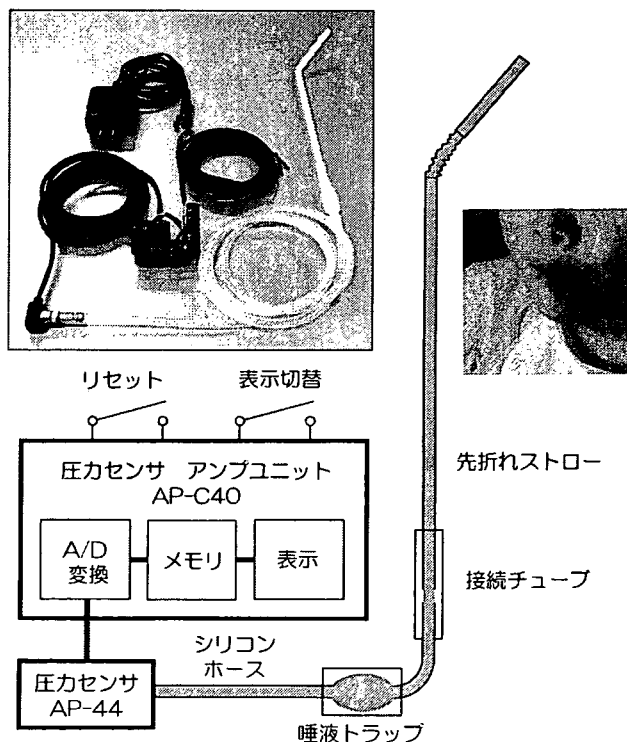


図1 口腔内陰陽圧測定器の構造

### 2) 被験者と口腔内圧の測定

被験者、及び、18歳未満の被験者の場合は被験者の保護者も含めて実験の内容を説明し、書面にてインフォームド・コンセントを得た。本実験は東北大学歯学研究科研究倫理委員会の承認を得て実施した(承認番号 29-2)。さらに、介護施設2施設の入居者を対象として、実験の内容を説明し、書面にてインフォームド・コンセントを得、健康な被験者と同様の口腔内陰陽圧測定を実施した。また、口腔内陰陽圧測定に関しては、ご高齢の方は無理が出来ない方もいらっしゃるの、適宜無理はなさないように伝えた。対象者は、口腔水分計モイスチャーチェッカー・ムーカス(株式会社ヨシダ、東京)を用いた口腔内乾燥度試験、反復唾液嚥下テスト(RSST)を実施した。同時に歯科医師による口腔内診査を実施し、口腔内現症を記録した。

## C. 研究結果

制作した口腔内圧測定器にて、各年齢の健康人の口腔内陰圧と陽圧を測定したところ、健康な小児51名(2~18歳)の場合、年齢が上がるにつれ、陽陰圧の双方とも強くなり(図2)、さらに陽圧形成がうまく出来る小児は陰圧形成もうまく出来ることが観察された。小児の年齢が上がるにつれ、陰圧形成、及び、陽圧形成が強くなるといった相関は両者とも1%水準で有意に見られた。一方、成人の99名(20歳から85歳まで)では、年齢が上がるにつれ、陽陰圧の双方とも緩やかに弱くなる傾向にあった(図2)。

要介護者での測定では、口腔内陰圧と陽圧と口腔内検査では有意な関連を認められなかったものの、摂取食物の形態別群の口腔内陰圧と陽圧の分布では、通常食摂取者は陰圧・陽圧共に生成できる被験者が多いが、きざみ食、もしくは、とろみ食摂取者では陰圧・陽圧を強く生成できる者が極めて少なかった(図3)。

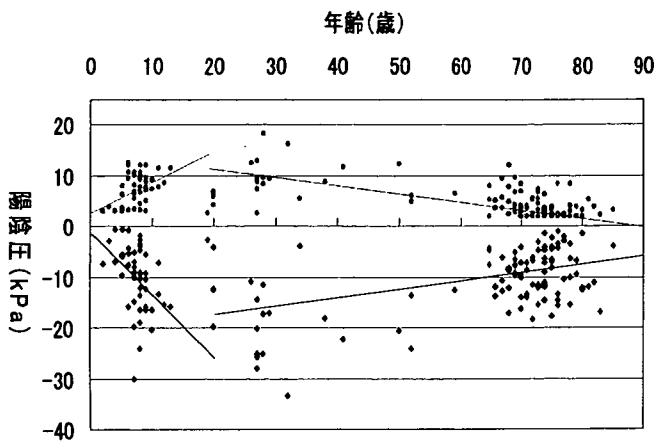
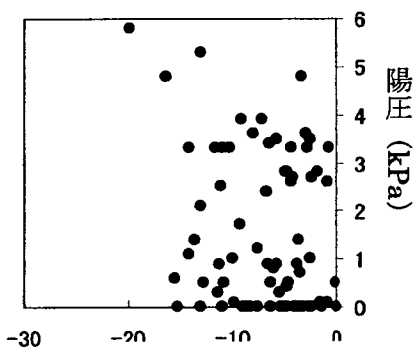
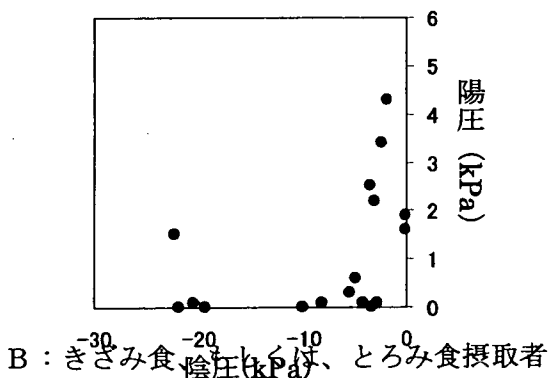


図2 健常者の口腔内陰圧陽圧と年齢との関係



A: 通常食摂取者



B: きざみ食、とろみ食摂取者

図3 摂取食物形態別の口腔内圧の関係

#### D. 考察

実際の摂食・嚥下障害の検査法は、多くの試験を組み合わせて実施している。かみ合わせ試験では、舌圧子を嚙ませて引き抜けるかを確認し、咬合時の筋肉の不調和の有無を確認する。頬の膨らまし試験では、口唇閉鎖を確認すると共に、口峡における軟口蓋と舌の対峙による閉鎖を確認する。さらに、舌の突出試験を行い、舌圧子を用いて舌の感覚の有無や硬さを確認する。発音試験では「アー」と発音してもらい、軟口蓋や口蓋垂、咽頭部の筋肉の動きを観察し、嚙声の状態も確認する。次に「パ・タ・カ・ラ」を発音してもらい、不明瞭な発声から問題のある筋肉の動きを予測する。意識障害のある方には、嘔吐反射を確認する場合もある。これらの試験は、機器を使って測定値を評価する検査ではないので、障害をスクリーニングするためには有効であろうが、その病態の評価やリハビリテーションによる回復の度合いを評価する指標としては精度が不十分であり、客観的な検査値による評価が臨床では切望されている。特に咀嚼期の後期から嚥下第2期までの評価を行う方法は乏しいのが現状である。

口腔機能の計測法としての口腔内陽陰圧の測定は、いくつかの先行研究がある。口腔期での嚥下の際の舌の接触圧(舌圧)は、圧力センサを組み込んだ口蓋床、センサ・シート、小型バルーンを上顎に装着し、硬口蓋部における舌圧を計測する試みがある。さらに、歯列に対向する圧力である舌の側方圧を測定した報告もある。いずれも舌が口蓋や歯を押しつける圧力を直接測定したもので、口蓋床、バルーンにしても異物を口腔内に設置する事には変わらず、たとえ、センサ・シートのような薄いものにして、センサの制御回路を口腔外に引き出す導線が必要となり、実際の嚥下時の舌圧を測定することは大変難しいと考えられる。

一方、口唇圧の測定は、測定器が比較的簡単に

設置できるために、様々な工夫がなされて測定を実施している。カフや板にセンサを貼り付けた測定器を用いて上下唇で挟む力を測定するもの、実際に摂食する時のスプーンの引き抜き時の唇圧を圧力センサ付きスプーンで測定するものがあり、更には口唇を閉鎖した状態で口腔前庭においたタグを引っ張る試験も報告がある。これらの測定法はいずれも口唇閉鎖の力を測定するものであるが、唇圧はある程度の閉鎖力があれば機能的には問題がないと考えられ、介護を必要とする年齢層では、食形態を考える上で重要な指標となる。口腔機能は筋力のみならず、様々な要素からなり、口腔としての機能の評価を考える上では陽圧形成・陰圧形成を合わせた評価は重要である。

本研究で用いた陽圧測定に関しては、ストローを吹く動作にて、口唇閉鎖の力が呼吸器全体で作る気道内の陽圧のいずれか低い方の値が測定できたと考えられる。本研究では陽圧を生成できない被検者が少なからず存在したが、呼吸器で一定の陽圧を作れない場合は呼吸器不全を起こすので、口腔内の問題、特に口唇閉鎖不全が問題であろうと考えられる。このような被検者でも吸引圧が作れるのは、陰圧にて唇や頬が歯列や義歯、舌

に吸着して固定されるためと考えられるので、純粹に口唇閉鎖能を確認するには、本研究で実施した方法は簡便で短時間に測定できる極めて優れた方法であると考えられる。

#### E. 結論

唾液の正しい「嚥下」を評価を簡便にスクリーニング検査する方法として、口腔内圧を測定することを試みた。口腔の閉鎖と筋力によって生成される口腔の陰圧と、口唇閉鎖と呼吸器によって生成される口腔内陽圧を150名の健常人で検索したところ、健康な小児では年齢が上がるにつれ、陽陰圧の双方とも強くなり、さらに陽圧形成がうまく出来る小児は陰圧形成もうまく出来きたが、成人では、年齢が上がるにつれ、陽陰圧の双方とも緩やかに弱くなる傾向にあった。さらに、要介護者での測定では、摂取食物の形態が、きざみ食、もしくは、とろみ食摂取者では陰圧・陽圧を強く生成できる者が極めて少なかった。以上から、嚥下の口腔機能を評価する方法の一つとして、本研究で実施した方法は簡便で短時間に測定できる極めて優れた方法である可能性が考えられた。



### 安静時唾液の物性検索のための新しい超音波粘度計の開発

研究協力者 小関 健由 東北大学大学院歯学研究科

口腔保健発育学講座予防歯科学分野

主任研究者 柿木 保明 九州歯科大学摂食機能リハビリテーション学分野

#### 研究要旨

口腔内を常に満たしている安静時唾液の口腔内保湿作用や潤滑作用は、口腔内粘膜を保護し、口腔機能を発現させる運動のための摩擦をなくす潤滑剤の役目を担う。この作用は、安静時唾液が粘液である特徴から生まれ、物性として粘度と曳糸性の評価が行われている。本研究では、超音波を用いた新しい粘度測定装置の開発のための基礎実験を行った。12名の健常者から採取した安静時唾液では、曳糸性測定値と音響特性計測値は安静時唾液流出量と負の相関傾向を示したが、統計学的に有意ではなかった。曳糸性測定値と音響特性計測値とは正の相関傾向がみられたが、統計学的に有意ではなかった。音響特性計測値は粘度と強い相関があることが報告されているので、ズリ粘度計を用いた詳細な検討が必要である。

#### A. 研究の目的

口腔内を常に満たしている安静時唾液は、口腔内環境を規定し、口腔の機能を高く維持するために重要である。特に安静時唾液の口腔内保湿作用や潤滑作用は、口腔内粘膜を保護し、口腔機能を発現させる運動のための摩擦をなくす潤滑剤の役目を担う。この作用は、安静時唾液が粘液である特徴から生まれ、この安静時唾液の物性には唾液中の巨大糖タンパクであるムチンの性状が大きく影響する。これらの唾液物性は、粘度と曳糸性の評価が行われているが、曳糸性測定器の必要唾液量が 100  $\mu$ L 以下なのに対して、粘度はズリ粘度計で測定するために数 mL が必要となる。口腔乾燥症の患者では、粘度測定が出来るほどの安静時唾液を集めることは不可能である。さらに、このような患者こそ、安静時唾液の保湿作用や潤滑作用が機能していないと考えられるが、その唾液の物性や治療による唾液機能の回復に関しては詳細に検討されていない。本研究では、超音波を用い

た新しい粘度測定装置の開発のための基礎実験を行う。

#### B. 研究対象および方法

超音波測定器として、口腔内超音波診断器として当教室で開発中の歯1号（タウザー社）を実験に使用した。超音波測定子は円筒形圧電セラミック素子（ジルコチタン亜鉛）に先端を半球状に加工したステンレス製接触子を取り付けて作成した超音波共振子（先端直径0.5mm）である（図1）。音響特性測定原理の式から、周波数変化は接触点（接触面積）によって大きく影響があるので、唾液との液面との接触状態を規格化することが重要である。今回は唾液をタイタープレートに 100  $\mu$ L 取り分けて一定の高さから超音波測定子を唾液中に挿入して周波数変化を3回計測した（図1）。唾液は、実験の参加に同意を得た健常人 12名（19～34歳）から吐唾法にて安静時唾液を採取し、直後に室温中で NEVA meter を用いて曳糸性と、超音波測定器を用いて音響特性変化を3回測

定した。

### C. 研究結果

安静時唾液流出量は平均 0.42 mL/min (0.25～0.69 mL/min) であり、曳糸性測定値では NEVA meter で3サイクル目ので平均 3.11(1.84～6.60)であった。安静時唾液流出量と曳糸性測定値の関連は、安静時唾液流出量が増えるほど曳糸性測定値が減少する傾向が見られたが、統計学的に有意な相関ではなかった(図2)。超音波音響特性変化測定値は平均-674 (-951～-291)の値をとり、安静時唾液流出量との関連は、唾液流出量が増えるほど音響特性変化測定値が減少する傾向が見られたが、統計学的に有意な相関ではなかった(図3)。音響特性変化測定値と曳糸性測定値は互いに相関する傾向が見られたが、統計学的に有意な相関ではなかった(図4)。

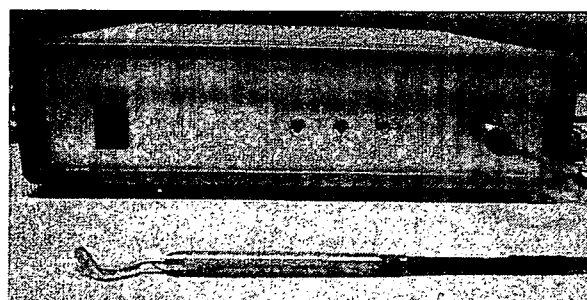
### D. 考察

工業用の超音波粘度計は、液体を載せる部分が平面で、液面と超音波測定器の接触面積が常に一定であるが、今回の実験に用いた超音波音響特性計測装置では液面との接触面積を正確に維持することは難しく、今回の測定値にはこれが起因の測定誤差がかなりの部分含まれていると考えている。今回の結果からは、安静時唾液流出量が多い場合は曳糸性が低く漿液性の唾液性分が多く

なっていると推測されるが、同様に音響特性変化測定値でも測定値の低下が見られているので、安静時唾液の物性を曳糸性同様捉えていることが考えられる。粘度を計る音響特性変化測定値は正確にはズリ粘度計との相関を検索しなければならないが、今回はズリ粘度計と相関があると報告されている曳糸性測定値との関連を検索した。よって、より詳細な検討を行うためには、ズリ粘度計を用いた研究がこれからの課題である。

### E. 結論

口腔内を常に満たしている安静時唾液の保湿作用や潤滑作用の評価のために、唾液物性である粘度の新しい評価法として超音波音響特性計測装置を応用した。12名の健常者から採取した安静時唾液では、曳糸性測定値と音響特性計測値は安静時唾液流出量と負の相関傾向を示したが、統計学的に有意ではなかった。曳糸性測定値と音響特性計測値とでは正の相関傾向がみられたが、統計学的に有意ではなかった。音響特性計測値は粘度と強い相関があることが報告されているので、ズリ粘度計を用いた詳細な検討が必要である。



音響特性測定原理

$$\Delta f = k / (2\pi^2 z) \quad \begin{array}{l} k: \text{剛性} \\ z: \text{音響インピーダンス} \end{array}$$
$$k = 2E(1-\nu^2) \{3(1-\nu^2)/4E\}^{1/3} \cdot N \cdot (M/N)^{1/3} \cdot R^{1/3}$$

$E$ : 材料物性  
 $N$ : 荷重  
 $M$ : 接触点  
 $R$ : 半径

図1 超音波測定器とその測定原理

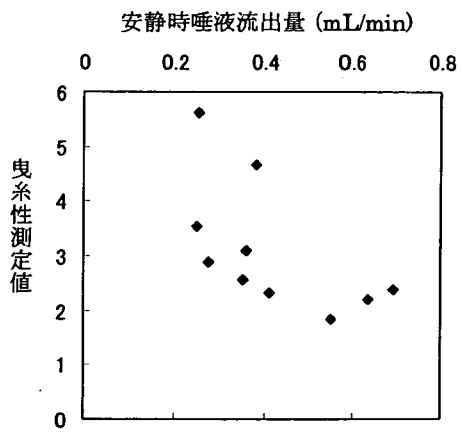


図2  
安静時唾液流出量と曳糸性測定値の関係

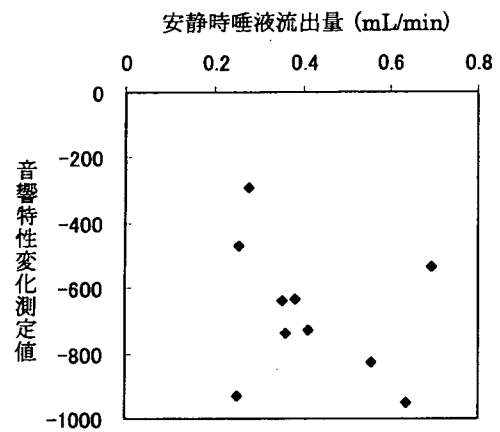


図3  
安静時唾液流出量と音響特性変化測定値の関係

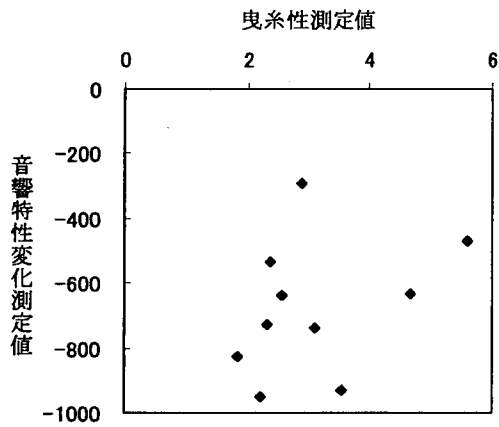


図4  
曳糸性測定値と音響特性変化測定値の関係

## 研究成果の刊行