

### 図3 頸部聴診法 (Cervical auscultation)<sup>9)</sup>

食物を嚥下する際に咽頭部で生じる嚥下音と嚥下前後の呼吸音を、頸部より聴診する方法である。聴診を行う場所は、喉頭隆起（甲状切痕）の外側（喉頭の側面）、あるいは輪状軟骨直下（気管）がある。接触子は腹型でもよいが、小さなベル型のほうが望ましい。

#### 【手技】

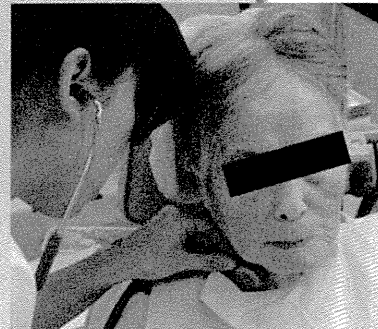
- ・強い咳嗽を数回行わせる（できない時は、吸引管を用いて貯留物を吸引する）。
- ・荒さのない呼吸を数回出させる。
- ・一定の試料（1～5mlの水など）を口腔内に入れ、口腔内に保持させる。
- ・頸部に聴診器を当て、嚥下を指示する。
- ・嚥下後、呼吸を出させ、呼吸音を聴診する。

#### 【判定】

- ・通常、口腔内に保持した5mlの水を、1回の嚥下動作（およそ0.5秒）で飲みきることができる。力強い嚥下音と、直後には澄んだ呼吸音が聴取される。

#### 「異常がある場合」

- ・舌による送り込み障害、咽頭収縮の減弱、喉頭挙上障害、食道入口部の弛緩障害……長い嚥下音、弱い嚥下音、複数回の嚥下音。
- ・誤嚥……泡立ち音（Bubbling sound）やむせに伴う喀出音。
- ・誤嚥、喉頭・咽頭部における液体の貯留……湿性音（Wet sound）、嗽音（Gurgling sound）、液体の振動音。



喉頭隆起の外側に聴診器の接触子を当て、音を聴取する。

### 図4 食物テスト (Food test)<sup>10)</sup>

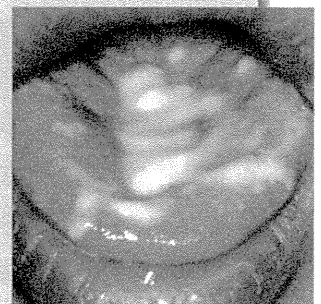
嚥下の口腔相の動きである食塊形成と、咽頭への移送の機能について、テストフードの残留部位と残留量によって評価する。咽頭残留についても、内視鏡を用いて評価する。

#### 【手技】

- ・ティースプーン1杯（約4g）のテストフード（プリン、粥、液状食品）を捕食させる。
- ・その後、口腔内での処理後に嚥下してもらい（嚥下は2回まで）、舌背を中心に口腔内を観察する。
- ・判定基準が4点以上なら、最大1施行（合計2施行）繰り返し、最も悪い状態を評価として記載する。

#### 【判定基準】

- 1点：嚥下なし、むせる and/or 呼吸切迫。
- 2点：嚥下あり、呼吸切迫（Silent aspirationの疑い）。
- 3点：嚥下あり、呼吸良好、むせる and/or 湿声嘔声。
- 4点：嚥下あり、呼吸良好、むせない、2回の嚥下でテストフードがなくなる。
- 5点：嚥下あり、呼吸良好、むせない、1回の嚥下でテストフードがなくなる。



舌の食塊形成・移送機能が不良なため、嚥下後に舌中央部にテストフード（プリン）の残留がみられる。

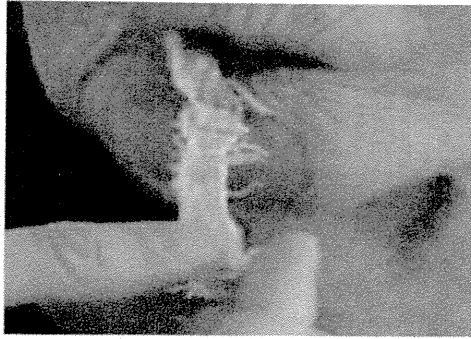


図5 さきイカなどを口腔内に入れて、食べ物を咀嚼側へ移動できるかを評価する。

硬く細かい食べ物は、大き目の食べ物よりも実は咀嚼するのが困難となる。咀嚼は上下の臼歯、あるいは歯槽堤によってすりつぶす動きなので、形が小さければ小さいほど咀嚼に巧みさや力強さが要求される。また、ペースト食やムース食など、咀嚼が必要でない形態の食事を摂取している場合には、咀嚼機能の評価はできない。スルメやドライフルーツなど、噛み切りにくいものを使用し、飲み込ませないよう配慮しながら、舌が咀嚼側へ食物を運ぶ動きを評価するのも有用である（図5）。

## 2) 食環境

### ①姿勢（机や椅子の高さもチェック）

姿勢の評価の際には、頭頸部や上肢、体幹だけでなく、下肢の姿勢も評価する。机と椅子を使用している場合に机が高すぎると、食膳の中がみえなかったり、肘が上がってしまう。あるいは低すぎると上体が屈み（過前屈）、口からの食べこぼしや流涎などの症状にもつながる。また、椅子が高すぎて足が床に届かない、つぶっていたりすると上体が緊張してしまう。ベッド上や車椅子上で食事する場合も、身体の各関節が適度に屈曲したりリラックス姿勢を取るよう配慮する。

### ②介助の状態（介助者への指導）

全介助で食事している患者では、介助者による食

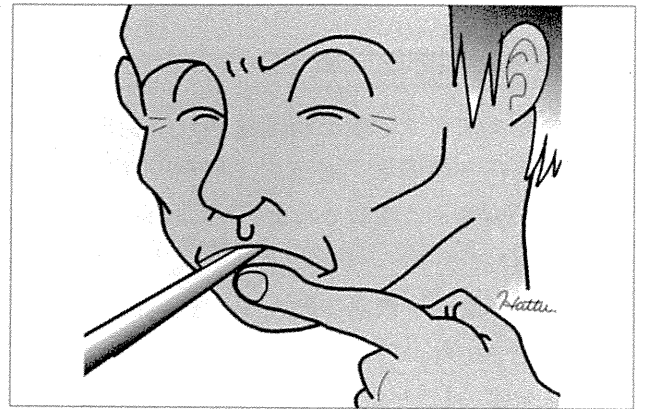


図6 スプーンのさじ部（ボール部）がすべて口の中に入り、介助者によって食べ物を口腔の奥に送り込まれている。

事を与えるテクニックに影響を受ける。介助者によっては、患者の口の奥に食べ物を入れ込んだり（図6）、大量の一口量を詰め込んだり、速いスピードで次の一口を入れ込んだりする場面もみられる。介助方法が不適切であると判断されたら、正しい介助方法を指導し、本来の摂食・嚥下機能の評価を行うようにする。

## 3) 摂食・嚥下障害の症状

摂食・嚥下障害は、食事中にみられるさまざまな症状から判断されることが多い。ここに、その代表的な症状を解説する。

### ①むせる

「むせ」は、摂食・嚥下障害を代表する最も重要な症状の一つである。むせは誤嚥の重要なサインになるが、Silent aspiration（不顕性誤嚥）といって、むせのない誤嚥もある。また、嚥下障害が重度になると、自分の唾液によってむせが頻発する。

### ②タン（痰）がらみ

食事をしているとタンがらみが起こる場合、咽頭内の食物残留や、食物や唾液の喉頭侵入を疑う。また会話時に痰や唾液がからんでがらがら声になることがあり、これを「湿性嘔声<sup>しっせいきせい</sup>」という。また、喀痰の中に食べ物が混ざっている場合には、誤嚥を疑う。

### ③食べこぼし

表3 咀嚼評価における口腔機能の状態

口腔機能の状態	所見
顎がほとんど動かない	食物が口に入ってもほとんど口唇や顎が動かず、いつ嚥下したのかわからない状態では、ペースト食の摂取も困難である。重度の嚥下障害か、あるいは食物の認知ができなくなっている可能性を疑う。
顎の単純な上下運動	食べ物が口に入った後、口角が左右対称に引かれるなどの単純上下運動では、口腔内では食物を舌で後方に送り込むか、舌で口蓋に押し付けてつぶしてから嚥下が行われている。顎が上下に動いていると「咀嚼している」と勘違いされることがあり、その結果、無理に常食や刻み食を食べさせられ、咀嚼困難や嚥下困難を呈する場合も多い。
マンチング	食べ物を処理する際に、歯が「カチカチ」というような、口腔器官の左右対称な単純な上下運動をマンチングという。舌の動きは前後上下が中心で、側方に寄ることはほとんどなく、臼歯でのすり潰しを伴う咀嚼運動ではない。顎運動の際に、口角の引きや頬の動きはほとんどみられず、食物が口腔前庭や舌上に貯留することもある。この状態の時に常食や刻み食を摂取していることがあり、咀嚼不十分でむせている場合もある。
対角の回転咀嚼	咀嚼運動が可能な状態で、咀嚼側の口角が引かれ、頬も歯列のほうに寄るように動くが、食物を十分にすり潰すような臼磨運動ではない。そのため、繊維の強い野菜や肉などは食べにくい。
環状の回転咀嚼	十分に咀嚼運動が可能な状態で、口唇を閉じながら舌や顎、頬は協調し、臼磨運動を行うことができる。その際、外部からみると口角は咀嚼側に引かれ、頬も歯列に寄るように動く。環状の回転咀嚼が可能な状態では、ほとんどの食品を問題なく摂取することができる。

食べこぼしの原因には、口唇機能の不全と、自食の際の手と口の運動の非協調が挙げられる。また一口量が多く、詰め込むように食べる場合にも食べこぼしがみられる。

#### ④食事時間が長い

一口で食べられる量が減少すると、嚥下を頻回に繰り返すため、食事時間が延長する。また、認知機能の問題から、食べる際の注意力と集中力の持続低下が原因となることもある。さらに、食事時間の延長は疲労の原因にもなり、誤嚥や窒息のリスクを高めることにもつながる。

#### 4) 口唇・口角・顎・頬の協調運動の観察評価<sup>11)</sup>

摂食・嚥下の際、口腔諸器官はそれぞれ異なる動きをしながらも精緻に協調運動を行っており、機能が減退、障害されてくると、この協調運動が阻害される。特に、咀嚼の評価は食物形態決定のうえでも重要である(表3)。

ただし、表3に示したのは口腔機能(咀嚼機能)の評価であり、嚥下機能が障害されている場合は、咀嚼が可能でも摂取できる食物形態は制限される。つまりは咀嚼機能と嚥下機能、それぞれを総合的に評価することが大切である<sup>12)</sup>。

## おわりに

リハビリテーションを開始するにあたっては、計画書のプログラミングが必要である。本稿に示した摂食・嚥下機能の評価法をもとに、患者さんへのリハビリテーション計画を立てるにあたって使用する計画書の一例を示したので参考にされたい(図7)。

#### 参考文献

- 1) Linette LC, Peter RJ 著/金子芳洋・土肥敏博 訳: 薬と嚥下障害 作用機序と臨床応用ガイド. 医歯薬出版, 東京, 2007.
- 2) Kikutani T, Tamura F, Nishiwaki K, Kodama M, Suda M, Fukui T, Takahashi N, Yoshida M, Akagawa Y,

**摂食・嚥下リハビリテーション計画書**

外来初月     6ヶ月    評価実施日 **2009**年 **3**月 **27**日

ID	氏名	様 <b>82</b> 歳	<input checked="" type="checkbox"/> 男 <input type="checkbox"/> 女	生年月日	年 月 日
リハ担当医	<b>田村</b>	ST	<b>西脇</b>	DH	<b>西村</b> その他
原因疾患	合併症・コントロール状態    廃用性症候群				
	<b>脳出血</b> <input type="checkbox"/> 高血圧 <input type="checkbox"/> 糖尿病 <input checked="" type="checkbox"/> 軽度 <input type="checkbox"/> 中等度 <input type="checkbox"/> 重度				
	<input type="checkbox"/> 心疾患 <input type="checkbox"/> その他 ( )				
発症	受傷日 <b>2007</b> 年 <b>1</b> 月 <b>10</b> 日				
日常生活自立度	<input type="checkbox"/> J1 <input type="checkbox"/> J2 <input type="checkbox"/> A1 <input type="checkbox"/> A2 <input type="checkbox"/> B1 <input checked="" type="checkbox"/> B2 <input type="checkbox"/> C1 <input type="checkbox"/> C2				
認知症性老人日常生活自立度	<input type="checkbox"/> I <input checked="" type="checkbox"/> IIa <input type="checkbox"/> IIb <input type="checkbox"/> IIIa <input type="checkbox"/> IIIb <input type="checkbox"/> IV <input type="checkbox"/> M				

評価項目・内容								
心身機能・構造 <input type="checkbox"/> 意識障害 <input type="checkbox"/> 失行失認 <input type="checkbox"/> 精神機能障害 <input checked="" type="checkbox"/> 摂食機能障害 <input checked="" type="checkbox"/> 上下肢の運動・感覚障害 <input type="checkbox"/> 禁食 <input type="checkbox"/> 経管 <input checked="" type="checkbox"/> 嚥下食 右上肢・右手指・右下肢 <input type="checkbox"/> 排泄障害 <b>左上肢・左手持・左下肢</b> <input type="checkbox"/> 呼吸・循環機能障害 <input checked="" type="checkbox"/> 頭部・肩甲周辺の運動障害 <input type="checkbox"/> 疼痛 <input checked="" type="checkbox"/> 音声・言語障害 <input type="checkbox"/> その他 ( )	口唇・舌の運動障害あり 残存歯 <table style="margin-left: 20px; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="border: 1px solid black; padding: 2px;">6</td> <td style="border: 1px solid black; padding: 2px;">5</td> <td style="border: 1px solid black; padding: 2px;"> </td> <td style="border: 1px solid black; padding: 2px;">1</td> <td style="border: 1px solid black; padding: 2px;">3</td> <td style="border: 1px solid black; padding: 2px;">5</td> <td style="border: 1px solid black; padding: 2px;">7</td> </tr> </table> 上顎 FD……不適 下顎 PD 舌苔 (++)、口腔乾燥 (+)	6	5		1	3	5	7
6	5		1	3	5	7		

日常生活基本動作の自立度: <input type="checkbox"/> 自立 <input type="checkbox"/> 修正自立 <input checked="" type="checkbox"/> 監視 <input type="checkbox"/> 一部介助 <input type="checkbox"/> 全介助 <input type="checkbox"/> 不可 活動度: 【日中臥床】 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> 有    【日中座位】 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> 有	職業: <input checked="" type="checkbox"/> 無職 <input type="checkbox"/> 病欠中 <input type="checkbox"/> 休職中 <input type="checkbox"/> 発症後退職    社会参加 ( ) 経済状況: <input type="checkbox"/> 支援要 <input type="checkbox"/> 特記なし    余暇活動 (内容・頻度) 同居家族: <input checked="" type="checkbox"/> 有 <input type="checkbox"/> 無    ケアパーソン: <input checked="" type="checkbox"/> 配偶者 <input type="checkbox"/> 嫁 <input type="checkbox"/> 息子 <input type="checkbox"/> その他 介護保険: <input type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> 申請中 <input type="checkbox"/> 要支援 <input type="checkbox"/> 1 <input checked="" type="checkbox"/> 2 <input type="checkbox"/> 3 <input type="checkbox"/> 4 <input type="checkbox"/> 5
心理	気分のムラあり    介護者の状況    健康

基本方針 <b>安全に経口摂取を維持する</b>	本人の希望 <input checked="" type="checkbox"/> 形あるものを食べたい
リスク・疾病管理 <input checked="" type="checkbox"/> 高血圧 <input type="checkbox"/> 心疾患 <input type="checkbox"/> 糖尿病 <input type="checkbox"/> その他	家族の希望 <input checked="" type="checkbox"/> 家族と同じものを食べさせたい
リハ終了目安 <input type="checkbox"/> ヶ月 <input checked="" type="checkbox"/> その他	家族相談 <input checked="" type="checkbox"/> 要 (機能障害の程度の理解) <input type="checkbox"/> 不要

目標	具体的アプローチ
社 復職: <input type="checkbox"/> 現職復帰 <input type="checkbox"/> 休職 <input type="checkbox"/> 転職 <input type="checkbox"/> 不可 会 社会活動 ( <b>デイサービスなどを利用する</b> ) 参 日常生活動作: <input type="checkbox"/> 自立 <input checked="" type="checkbox"/> 監視 <input type="checkbox"/> 一部介助 <input type="checkbox"/> 全介助 加 <input type="checkbox"/> その他	<input checked="" type="checkbox"/> 今後の経過を見て検討
口 咀嚼機能: <input type="checkbox"/> 治療不要 <input checked="" type="checkbox"/> 治療要 腔 口腔衛生: <input type="checkbox"/> 自立 <input checked="" type="checkbox"/> 要指導 機 コミュニケーション機能: <input type="checkbox"/> 支障なし <input checked="" type="checkbox"/> 支障あり	<input type="checkbox"/> 今後の経過を見て検討 <input type="checkbox"/> 歯科治療 <input checked="" type="checkbox"/> 義歯 <input type="checkbox"/> 咬合面板 <input checked="" type="checkbox"/> ST <input type="checkbox"/> 構音補正装置
摂 経口: <input type="checkbox"/> 常食 <input checked="" type="checkbox"/> 食形態変更 ( <b>ソフト食を検討</b> ) 食 一部経口: 食形態 ( ) 嚥 経口不可: <input type="checkbox"/> IOE <input type="checkbox"/> 胃瘻 <input type="checkbox"/> その他	<input type="checkbox"/> 今後の経過を見て検討 <input type="checkbox"/> 嚥下補助装置 <input type="checkbox"/> <b>一口量やペースの調整</b>
保 <input type="checkbox"/> 社会保障サービス: <input checked="" type="checkbox"/> 有 <input type="checkbox"/> 無 ( ) 境 <input type="checkbox"/> 介護保険サービス: <input checked="" type="checkbox"/> 有 <input type="checkbox"/> 無 ( )	<input type="checkbox"/> 今後の経過を見て検討
介 <input type="checkbox"/> 介護者へのフォロー <input checked="" type="checkbox"/> 必要 <input type="checkbox"/> 必要なし 護 者	<input type="checkbox"/> 今後の経過を見て検討 <b>福祉サービスの活用</b> <b>の理解と支援</b>

他機関とのリハビリテーション連携計画	
<input type="checkbox"/> 退院へ紹介 ( ) <input type="checkbox"/> その他 <input checked="" type="checkbox"/> 地域サービスの利用 ( <b>デイサービスでのリハ</b> ) <input type="checkbox"/> 他病院転院	

ご本人・ご家族への説明 説明日 <b>2009</b> 年 <b>3</b> 月 <b>27</b> 日	ご本人・ご家族 サイン	説明者 サイン	<b>田村</b>
---	----------------	------------	-----------

図7 摂食・嚥下リハビリテーション計画書記入例。

Kimura M: Oral motor function and masticatory performance in the community-dwelling elderly. *Odontology*, 97: 38-42, 2009.

3) 菊谷 武: 認知症と食べることの障害. *日本歯科評論*, 70 (5): 121-126, 2010.

4) 金子芳洋: 摂食・嚥下リハビリテーションセミナー/講義録 (1) 正常機能の理解. 医学情報社, 東京, 2001.

5) Kikutani T, Tamura F, Nishiwaki K, Suda M, Kayanaka H, Machida R, Yoshida M, Akagawa Y: Degree of tongue coating reflects lingual motor function in the elderly. *Gerodontology*, 26: 291-296, 2009.

6) 菊谷 武, 西脇恵子: 『うまく食べられない』ことへの対応 運動障害性咀嚼障害, 嚥下障害に対する評価方法. *東京都歯科医師会雑誌*, 49 (6): 339-346, 2001.

7) 小口和代, 才藤栄一, 水野雅康, 皿井正子: 嚥下障害スクリ

ーニング法「反復唾液嚥下テスト」. *治療*, 80 (3): 1405-1408, 1998.

8) 戸原 玄, 才藤栄一, 馬場 尊, 小野木啓子, 植松 宏: Videofluorographyを用いない摂食・嚥下障害評価フローチャート. *日摂食・嚥下リハ会誌*, 6 (2): 196-206, 2002.

9) 高橋浩二: ビデオ版 頸部聴診による嚥下障害診断法 高橋浩二企画監修. 医歯薬出版, 東京, 2002.

10) 石田 瞭, 向井美恵: 段階的フードテスト. *Journal of Clinical Rehabilitation*, 11 (9): 820-824, 2002.

11) 尾本和彦 編, 金子芳洋 監: 障害児者の摂食・嚥下・呼吸リハビリテーション. 医歯薬出版, 東京, 2005.

12) 高橋賢見, 菊谷 武, 田村文誉, 須田牧夫, 福井智子, 片桐陽香, 戸原 雄: 嚥下内視鏡検査を用いた咀嚼時の舌運動機能評価——運動障害性咀嚼障害患者に対する検討. *老年歯科医学*, 24: 20-27, 2009.



# 歯科医師による摂食・嚥下リハビリテーション

## ——摂食・嚥下機能を診るのは歯科医師の責務

### 第3回

## 摂食・嚥下機能療法（1）

### ——食環境，食内容指導

きくたに たけし  
**菊谷 武**

日本歯科大学大学院生命歯学研究科臨床口腔機能学 教授  
日本歯科大学附属病院 口腔介護・リハビリテーションセンター センター長  
〒102-8158 東京都千代田区富士見2-3-16

## はじめに

摂食機能療法の診療報酬請求の要件に、訓練内容や使用した器具等の記載が求められている。そのため、「摂食機能療法＝摂食・嚥下機能訓練」と考えている方が多いのではないだろうか？ 金子らの記した『食べる機能の障害』<sup>1)</sup>によると、摂食・嚥下機能療法を「食環境指導」「食内容指導」「摂食・嚥下機能訓練」の3つに分けて考えている。さらに「十分に医療面接や機能評価を行ったうえで、各患者に適した継続の可能性のある訓練プランをたて、指導を行わねばならない」としている。

そこで本稿では、摂食・嚥下機能療法の一環である「食環境指導」「食内容指導」について述べる。

## 1. 摂食・嚥下障害患者のリハビリテーションと

### 「食環境指導」「食内容指導」

患者は地域の中に暮らし、家族やフォーマル（国

や公的機関が行うもの）またはインフォーマル（近隣住民やボランティアなどが行うもの）なサービスの支援を受けながら生活している。

患者が口から食べることの可否や、どの程度までの食形態が安全に食べられるかということについては、患者本人の摂食機能のみに左右されるものではない（図1）。患者の摂食機能は一つの指標に過ぎず、むしろ、患者を支える“環境因子”こそが、それを決定する際に大きな影響を与えともいえる（図2）。すなわち、患者の咀嚼機能や嚥下機能に大きな障害があっても、その機能に適した食形態を提供できる体制であれば、さらには、食事の介助場面においても適正な食事姿勢をとることができ、十分な見守りのもと介助できる環境であれば、患者は安全に食べることができる。一方、患者の咀嚼機能や嚥下機能がたとえ比較的十分に備わっていたとしても、患者を支えるための十分な体制がとれない環境においては、いつ何時、窒息事故や誤嚥事故が発生してもおかしくはない。

摂食機能の評価者は、患者のもつ摂食機能と同時



図1 患者本人の「食べる機能」と、日常生活において「食事を する」ということは、必ずしも一致しない。

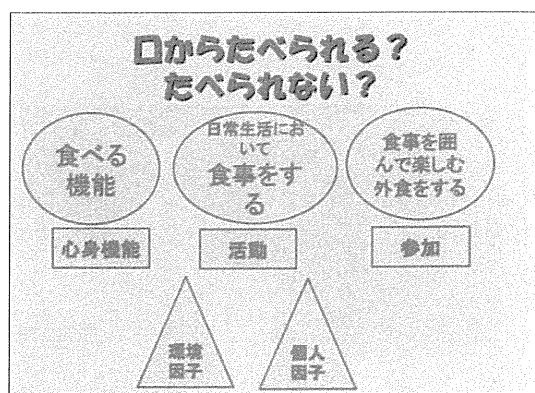


図2 「日常生活において食事を する」ということは、環境因子の強い影響を受ける。よりよい環境因子を作り上げることが、リハビリテーションにおける私たちの役割である。

に、患者を支える環境因子についても十分に評価することが求められる。さらに、それらの充実に向けて「食環境指導」「食内容指導」の実施が求められる。

## II. 摂食機能の評価と

### 食環境整備、食内容整備の考え方

摂食機能の評価を行う際には、評価を「食べ方」「くち」「のど」の3つに分けるとよい。誤嚥や窒息といった出来事は、のど（咽頭や喉頭）で起こっている。ただし「のど」で起こった出来事の原因は、決して「のど」だけにあるのではない。

すなわち、「食べ方」や「くち」の機能が「のど」に負担をかけたために、のどで破綻が起こったとも考えられる。どんなに「のど」の機能が維持されていても、「食べ方」や「くち」の機能が「のど」に負担をかけているのならば、誤嚥や窒息を起こしてしまうのである。逆に、「食べ方」や「くち」の機能によって「のど」への負担を減らすことができれば、「のど」での破綻は防げる。「のど」に対する負担の軽減を目的とした方略が、食環境整備や食内容整備にあたる。

## III. 食環境指導

食環境の整備には、食事姿勢、食具・食器、心理的配慮、食事の雰囲気づくりなどが含まれる。

### 1. 食事の姿勢

食事の姿勢は、摂食・嚥下機能にとって重要である。頸部の位置や角度は、咽頭腔や喉頭周囲の形態に大きく影響を与える。顎を上げた姿勢（頸部伸展位）は、口腔→咽頭→喉頭が一直線に配置されることから誤嚥のリスクが高まる（図3）。顎を引いた姿勢は、嚥下に必要な舌根部の後方移動を助け、嚥下圧を強化する。また、頸部の回旋位は左右の梨状窩のスペースを大きく変える。また、頸部前突位は食道入口部の開大を助ける。これらの姿勢は本来、嚥下造影検査や嚥下内視鏡検査を用いて、効果を確認することでその精度を増すが、一般に顎を引いた姿勢と麻痺側に頸部を回旋した姿勢は、嚥下に有利な場合が多い。

舌による送り込みが不良で口腔内残留を示す症例には、頸部伸展が有効である。しかし、この姿勢は

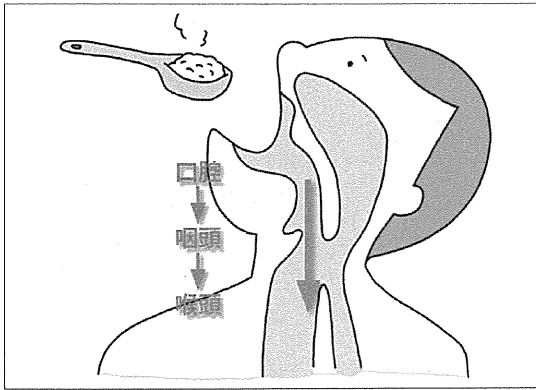


図3 顎を上げた姿勢（頸部伸展位）は、口腔→咽頭→喉頭が一系列に配置されることから誤嚥のリスクが高まる。



図4 掻き込むような食べ方は、誤嚥や窒息のリスクを増す。

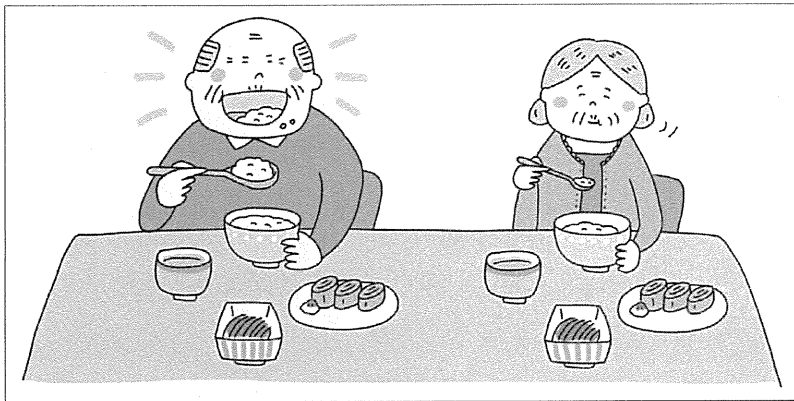


図5 スプーンの皿の部分の大きさも、一口量の調節に有効である。

嚥下反射が遅延している症例などでは誤嚥のリスクが高まる。そのため、咽頭への送り込みを助ける目的で顎を引いてリクライニング位をとる際は、顎が上がる（頸部伸展位）ことのないように注意する。

## 2. 食べ方の指導

摂食・嚥下機能に合った食べ方の指導は、のどに負担をかけない有効な方法である。

一般に、嚥下力の低下によって嚥下後に咽頭内に食物が残留し、誤嚥などを起こす場合が多い。咽頭に残留した食物を数度の嚥下を繰り返すことで飲み込もうという方法を、「複数回嚥下」や「追加嚥下」と呼んでいる。

また、早すぎる食事のペースや一口量が多い場合は、やはり嚥下への負担が増す。飲み込んだことを確認しながら一口ずつ食事を進めること、一口量を少なめに調整することは、誤嚥や窒息を防ぐ有効な対策である（図4・図5）。

摂食・嚥下における先行期や口腔期、咽頭期における障害に対しては、食具や食器を活用することでその機能を代償することができる。たとえば上肢の可動域に制限が認められる患者には、柄の長いスプーンや曲がりスプーンなどが適している（図6）。また握力のない患者には、グリップの太いスプーンや手のひらに巻き付けて用いるスプーンなどが有効である（図6）。舌による送り込みに障害のある患

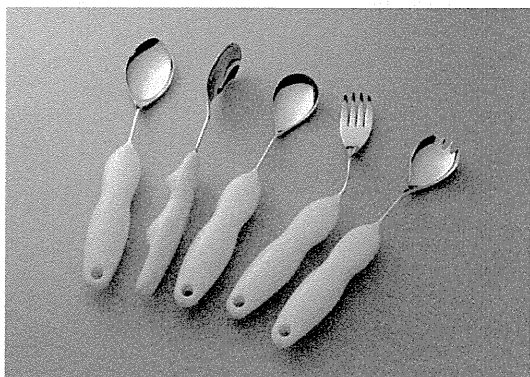


図6 曲がりスプーン ((株) 青芳製作所. <http://www.aoyoshi.co.jp>). 把持部(スプーンの柄)が太くなって、さらに皿の角度を自由に変えることができる。

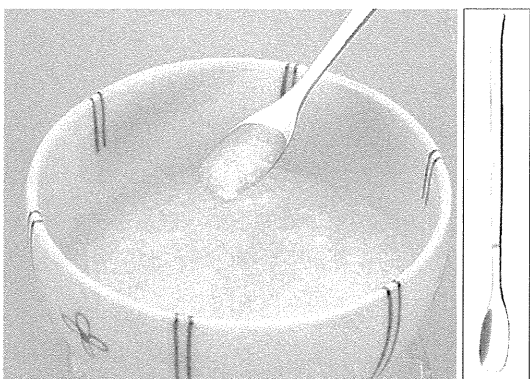
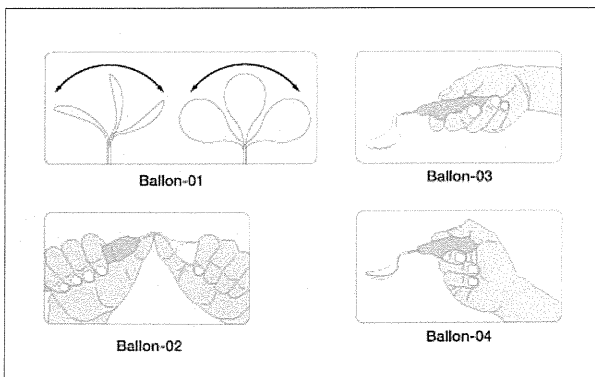


図7 皿の部分が小さなスプーン ((株) 青芳製作所)。

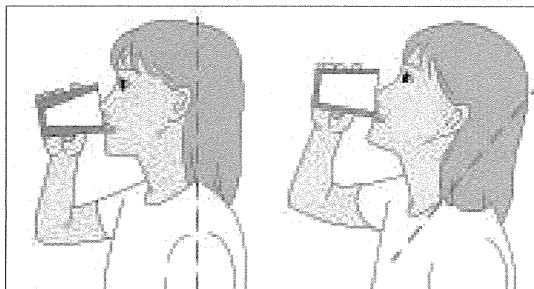
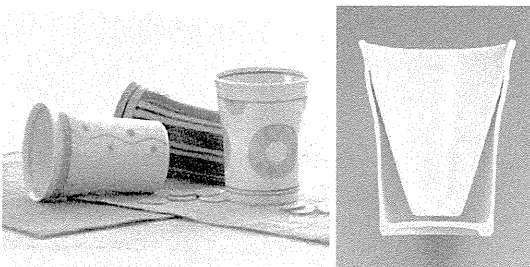


図8 頸を引いた状態で飲むことが可能なコップ ((株) 青芳製作所)。二重構造になっており、頸部を大きく伸展させることなく飲むことができる。

#### 表 とりみ食の使い分け

##### とりみ食(粘度の付与)が適している患者

- ・咽頭反射が低下している患者
- ・喉頭挙上障害のある患者

##### 高粘度の食品が不適な患者

- ・咽頭への送り込みに問題のある患者
- ・咽頭収縮力が低下し、咽頭残留のある患者
- ・咽頭や食道腫瘍などによって通過障害のある患者

者には、奥舌部に回転しながら食物を置くことができる皿部の小さいスプーンが適している(図7)。また、奥舌部に直接食物を注入することを目的とした食器もある。一方、口唇閉鎖力が不十分な患者には、皿部の浅いスプーンが適している。

さらに、水分を摂取する時に前述のような頸部伸展位になると誤嚥のリスクが高まるため、頸を引いた状態で飲めるように二重構造になったコップが推奨される(図8)。

#### IV. 食内容指導

患者の摂食・嚥下機能に応じて、食内容(食形態や高カロリー食の選択など)の変更が必要となる。機能に合わない食形態の摂取や無理な食事摂取は、窒息や誤嚥を引き起こす。また一般に、固形よりも柔らかくした食事、たとえばピューレ状の食事やゼリー状の食事のほうが、嚥下しやすく安全である。しかし、患者自身や患者の家族は、より形のあるものを摂取したい、させたいと望む傾向にあり、十分





図9 しっかり噛むことを促し、たとえ適正な義歯を作製したとしても、認知機能が低下していたり、運動障害があったりする患者は噛むことができない。



図10 私たちは咀嚼の専門家として、食べる機能を適正に評価し、能力に応じた食べ物を安全においしく食べる工夫を提案することが求められている。

な配慮が必要である。

## 1. 食形態の調整

### 1) 増粘剤の使用について

嚥下機能に合わない食形態の提供は、誤嚥や窒息を招く結果となる。サラサラした水様物や、パラパラ・パサパサした食品などはむせやすく、繊維の多い食品なども食べにくい。よく「嚥下障害患者＝とろみ食」という対応を目にするが、病態によっては不適切な患者もいるため、適正な診断のもとに指導が行われるべきである(表)。また、とろみ剤の特性に対する無理解から、高粘度の食品を提供されて嚥下困難になっている場合も頻りに目にする。

## V. 咀嚼機能、嚥下機能に合った食形態の提供

筆者らが行った介護老人福祉施設における窒息事故の調査では<sup>2)</sup>、認知機能の低下と共に、咬合支持領域の不足や義歯の未装着といった口腔機能の低下が、危険因子に挙げられた。この結果は、義歯の装着を促す結果であると同時に、口腔機能の低下が窒息事故の原因になることを示している。義歯を装着できない患者や運動障害による咀嚼障害をもった高齢者が一定数いることを考えれば、固いものを食べ

ることがあたかもすべての健康の源であるような行き過ぎた風潮も問題となる。

しっかり噛むことを促しても、たとえ適正な義歯を作製したとしても、認知機能が低下していたり、運動障害があったりする患者は噛むことができないのである。私たちは咀嚼の専門家として、食べる機能を適正に評価し、能力に応じた食べ物を安全においしく食べる工夫を提案することが求められている(図9・図10)。

## VI. 症状別食形態の提案

### 1. 嚥下後に咽頭残留を起こす

嚥下後、口腔や咽頭に食物の残留が見られた時には、いくつか原因が考えられる。口腔の運動機能の低下、咽頭の収縮力の不足や食道入口部の開大不全、嚥下のタイミングのずれなどの可能性が指摘される。その際には、咽頭通過のより容易な食形態を選ぶべきである。いわゆる普通食やパラパラ・パサパサした食品などから、ムース状やピューレ状といった食品への変更を検討する。

### 2. 口腔内や咽頭内の全体がコーティングされたように食物が残留する(図11)

咽頭全体に、ムース状やピューレ状の食品など

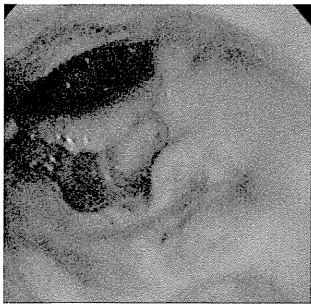


図 11 咽頭全体にムース状やピューレ状の食品などがコーティングされるように残留している時は粘度の調整が必要。

がコーティングされるように残留する時には、食品の粘度に対して十分な咽頭収縮力が備えられていないと考えられ、

粘度の調整を図る必要がある（付着性の低い食品への変更）。

### 3. 口腔内や咽頭内で食物が散らばる

食塊形成が十分にいかず、パラパラの状態での咽頭流入し、結果として喉頭侵入や誤嚥が認められた場合には、まとまりやすい食品に変更するか、とろみ掛けをするなどして口腔内や咽頭内でまとめやすいような工夫をする（凝集性の高い食品への変更、凝集性を高めるような工夫）。

### 4. 水分が一気に流れ落ち、誤嚥を示す

水分を多く含む流動性のよい食品が咽頭内に一気に流入し、誤嚥を示す場合（口に含んだ瞬間にむせるなど）は、口腔内での食塊の保持能力の低下や嚥下反射の遅延が疑われる。口腔内でより保持しやすい、さらには咽頭流入速度を抑えられるような食品に変更する。水分や汁物などの場合にはとろみ剤を付与し、流動性を抑える工夫が望まれる（流動性の低い、粘度の高い食品への変更）。

### 5. いつまでも噛んでいる、丸飲みをする

いつまでも噛んでいる、あるいは丸飲みをする場合などは、咀嚼力または口腔内の保持力の低下が疑われる。歯がないにもかかわらず義歯が入っていない場合や、舌や頬の運動障害によって咀嚼障害が疑われる場合には、噛みやすい食形態に変更する。

舌の動きが前後もしくは上下のみの場合には、舌で容易に押しつぶせるような食品を選択する。一方、舌の動きが乏しい場合や原始反射の発現によって前後の動きが中心になっている場合には、小さくスライス状にしたゼリーまたはムース状、ピューレ状の

食形態への変更を検討する（固さの低い食品への変更、食品を小さくする工夫）。

### 6. 一口に対し、多くの嚥下運動を要する

一口量に対し、複数回の嚥下運動を行っている場合は、全般的な嚥下機能の低下が疑われる。安全に食べてもらうためには一口量を調整し、さらには食介助のペースをゆっくりしなければならない。その結果、必要な栄養量を得るために長い食事時間が必要であると判断された場合には、高カロリー食などの導入を検討する。一般に、医師から処方される高栄養剤（ラコールやエンシュアリキッドなど）は液状で、嚥下障害の患者がそのまま安全に摂取することは難しい。その際には半固形化や粘度の付与などが必要であるが、一般の増粘剤を使用すると必要以上に付着性が増し、かえって嚥下困難な食形態になる場合がある。そのため、高カロリー剤専用の増粘剤を用いるとよい。

## 最後に

摂食・嚥下リハビリテーションというと、多くの人から「どんな訓練が有効なの?」「なにを何回するの?」という質問を受ける。患者の中には、認知機能が低下していたり、長い年月を経て徐々に食べる機能を低下させていたりする人たちもいる。これらの患者に最も効率的かつ即効性のあるリハビリテーションアプローチは、訓練の実施ではなく、環境の整備であることを忘れてはいけない。患者の食べる環境の的確な整備は、その効果を即座に得ることができ、患者の経口摂取やQOLを支えることにつながる。

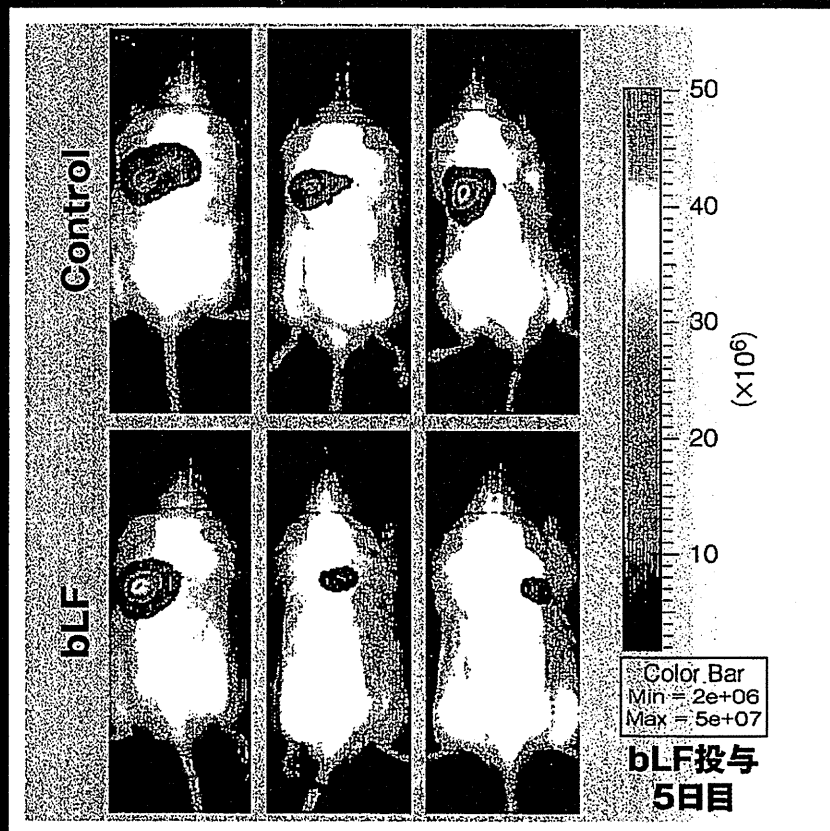
#### 参考文献

- 1) 金子芳洋：食べる機能の障害——その考え方とリハビリテーション。医歯薬出版、東京、1987。
- 2) 菊谷 武：介護老人福祉施設における窒息事故とその要因。平成20年度厚生労働科学特別研究事業「食品による窒息の要因分析報告書」（主任研究者 向井美恵）。2008。

# ラクトフェリン 2011

編集 日本ラクトフェリン学会第4回学術集会実行委員会

ラクトフェリン研究の新たな発展を期して



日本医学館

# ラクトフェリン+ラクトパーオキシダーゼ配合錠薬の 口臭抑制効果と唾液中細菌に対する影響

ラクトフェリン 2011

八重垣 健<sup>1)</sup>、新光一郎<sup>2)</sup>、田中とも子<sup>1)</sup>、  
山内恒治・植田知宏・岩附慧三<sup>2)</sup>

## *Effects of bovine lactoferrin and lactoperoxidase-containing tablets on oral malodor and salivary bacteria*

口臭の主要原因物質は、硫化水素(H<sub>2</sub>S)、メチルメルカプタン(CH<sub>3</sub>SH)などの揮発性硫黄化合物(VSC)である。一方、ラクトフェリン(LF)とラクトパーオキシダーゼ(LPO)は、唾液にも存在し口腔保健向上に寄与すると考えられている。そこで、ウシLF(100 mg/錠)とLPO(1.8 mg/錠)を配合した錠薬(森永乳業製)の口臭抑制効果と唾液中細菌への影響を、ランダム化二重盲検プラセボ対照クロスオーバー臨床試験で検討した。

LF+LPO配合錠薬2錠またはプラセボ2錠を約1時間の間隔で摂取させ、摂取前後の口腔内空気のVSC濃度をガスクロマトグラフィーで測定した。その結果、プラセボ群にくらべて実験(LF+LPO)群では、1錠目摂取直後において、CH<sub>3</sub>SHと総VSC濃度が有意に低下した。また2時間後のH<sub>2</sub>Sの中央値、および1錠目摂取直後から2時間後のCH<sub>3</sub>SH中央値が嗅覚閾値を下回った。唾液中細菌叢のT-RFLP解析では、実験群で有意に低下したフラグメントが1種類検出され、*Prevotella*、*Porphyromonas*、*Treponema*などの歯周病菌の類縁菌と推定された。

以上の結果から、LF+LPO配合錠薬による口臭抑制効果が確認され、口腔内細菌の抑制が示唆された。

Ken Yaegaki\*<sup>1)</sup>, Kouichirou Shin\*<sup>2)</sup>, Tomoko Tanaka\*<sup>1)</sup>,  
Koji Yamauchi・Tomohiro Toida・Keiji Iwatsuki\*<sup>2)</sup>

Key words: ラクトフェリン, ラクトパーオキシダーゼ, 口臭, 唾液, 細菌

口臭の主な原因物質は、揮発性硫化物(VSC: volatile sulfur compounds)である。口臭の原因となるVSCには、硫化水素(H<sub>2</sub>S)、メチルメルカプタン(CH<sub>3</sub>SH)、ジメチルサルファイドがあ

る。ジメチルサルファイドは濃度もきわめて低く、いくつかの全身疾患で上昇する<sup>1)</sup>。また、低濃度では“焼き海苔”の臭いに近く、必ずしも悪臭ではない。そのため、口腔由来の口臭の臨床研究では、H<sub>2</sub>SとCH<sub>3</sub>SHのみの測定が行われている<sup>2)</sup>。以上のVSCは悪臭が強いばかりか、毒性がきわめて強い事実も口臭予防の必要性の大きな

\*<sup>1)</sup> Department of Oral Health, Nippon Dental University 日本歯科大学生命歯学部衛生学講座

\*<sup>2)</sup> Food Science & Technology Institute, Morinaga Milk Industry Co., Ltd. 森永乳業株式会社食品基盤研究所



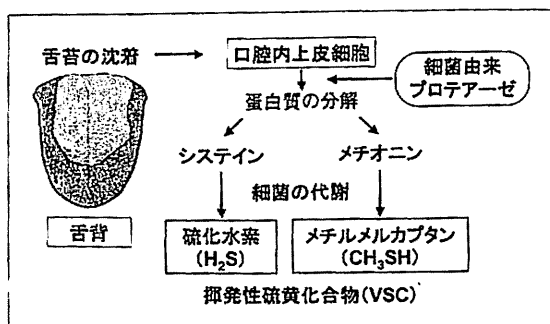


図1 口臭産生経路

VSC産生は細菌由来のプロテアーゼによる舌苔などの蛋白質の分解にはじまる。システインから硫化水素が、メチオニンからメチルメルカプタンが産生される。

根拠となる。

VSCでは、死亡事故が発生し、近年では硫化水素による自殺も起きている。VSCの毒性は青酸ガスの毒性に類似する。すなわち、ミトコンドリア・チトクロームオキシダーゼの $\text{Fe}^{3+}$ に結合し、呼吸鎖を阻害して細胞内窒息を生じる。通常のお臭濃度0.3 ppmでも悪心、呼吸障害などが発生し、口臭の1/5以下の20 ppb程度でも、眼・呼吸器・中枢神経症状があらわれる<sup>3)</sup>。

口腔内では、VSCによる種々の毒性が報告されている。歯周炎(歯槽膿漏)の発生機序について、免疫学、細菌学あるいは生化学の面から種々の病因がある。それらが複雑に関連しあって歯周炎は発生する。

ところが、多くの病因論があっても一致するのは、歯肉上皮のバリアー効果である。このバリアーがいったん損傷を受けると、歯肉上皮の透過性が上がり、上記の病因論に基づく歯周炎病態発生過程が促進することになる。また歯肉粘膜の透過性は発がんにも関わる。

カナダがん協会は口腔がん危険性の自己診断に使用する“自己診断アンケート”のなかで、かなりの比重を持って“アルコールを含む洗口剤を毎日使いますか?”と質問している。アルコールの脱水作用で粘膜の透過性が亢進し、発がん物質の透過が増えDNA損傷が増加し、発がん性が増すとの理由である。

ところがVSCは、口腔粘膜の透過性を大きく亢進させることが判明している<sup>4)</sup>。PGE<sub>2</sub>などの

起炎因子や菌体内毒素が容易に浸透する。一方、歯肉溝(歯と歯肉がつくる溝、歯周炎が発生する部位)には高濃度のVSCが存在し、VSCは歯周炎の原因の一つと考えられるようになった<sup>5)</sup>。筆者らの研究では、歯肉コラーゲン合成の阻害、コラーゲン分解の亢進、骨芽細胞の増殖抑制、歯周組織の各種細胞のアポトーシス増加など、さまざまな歯周病原性が確認されている<sup>6-15)</sup>。

口腔内でのVSC産生機序を図1に示した。脱落上皮細胞からなる舌苔を蛋白源として、含硫アミノ酸から最終的には産生されるが、細菌由来プロテアーゼによる口腔内蛋白質分解によりVSC産生ははじまる。したがって、細菌のコントロールが口臭予防の重要な手段となる。そのため洗口剤や歯磨剤中の殺菌成分によるコントロールが、現在では主体である。消臭効果を期待した食品として、チューインガムや錠菓などがあるが、食品による細菌コントロール製品は、いまだ商品化されていない。食品による口臭抑制は、使用する場所や時間帯の柔軟性にすぐれており、細菌コントロール製品の開発が期待されている。

一方、ラクトフェリン(LF)とラクトパーオキシダーゼ(LPO)は、唾液や乳などの分泌液に含有され、抗菌作用があることから、口腔内では口腔保健の維持に働くことが考えられる<sup>16-18)</sup>。また、歯周炎予防効果も期待されている<sup>19)</sup>。

そこで最近、筆者らはウシLFとLPOを配合した錠菓(LF+LPO配合錠菓、森永乳業製、LF 100 mg+LPO 1.8 mg/錠)を作製し、その口臭抑制効果を判定した<sup>20)</sup>。本稿では、LF+LPO配合錠菓の口臭予防効果について、細菌学的観察を含め概説する。

## VSCの減少

筆者らは、VSCの減少をランダム化二重盲検プラセボ対照クロスオーバー臨床試験で検討した。口臭測定にはガスクロマトグラフィーを使った。すなわち、炎光光度検出器にSフィルターを装着した島津GC8APFpガスクロマトグラフィーを用いた。ガスクロマトグラフィーの試料注

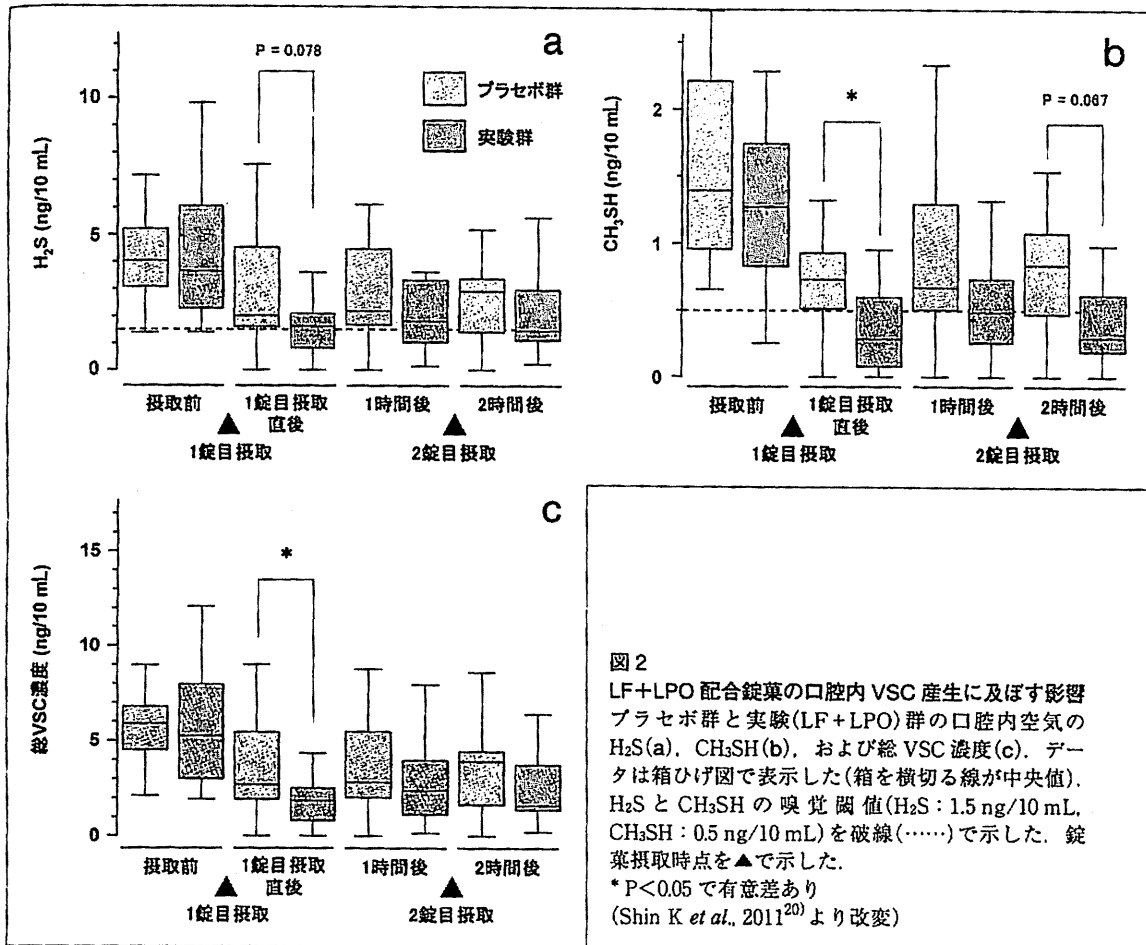


図2  
LF+LPO 配合錠薬の口腔内 VSC 産生に及ぼす影響  
プラセボ群と実験(LF+LPO)群の口腔内空気の  
H<sub>2</sub>S(a), CH<sub>3</sub>SH(b), および総 VSC 濃度(c). デー  
タは箱ひげ図で表示した(箱を横切る線が中央値).  
H<sub>2</sub>S と CH<sub>3</sub>SH の嗅覚閾値(H<sub>2</sub>S : 1.5 ng/10 mL,  
CH<sub>3</sub>SH : 0.5 ng/10 mL)を破線(……)で示した.  
錠薬摂取時点を▲で示した.  
\*P<0.05 で有意差あり  
(Shin K *et al.*, 2011<sup>20)</sup>より改変)

入口に 10 mL の口腔内空気を注入すると、大きな逆圧が発生し、正確な測定が出来ない。そこで、6-portバルブに 10 mL のサンプルループを取り付け、いったんサンプルループ内に採取した 10 mL の試料をバルブ操作でキャリアガスに乗せ、カラムに注入した。カラムには、テフロンカラム 1, 2, 3-TCEP 25% Shimalite 80-100 mesh, AW-DMCS 処理, 3.1 m×3.2 mm (島津製作所)を用いた。口腔内空気の VSC 測定方法は既報に従った<sup>21)</sup>。

対象者はガスクロマトグラフィーで嗅覚閾値(H<sub>2</sub>S>1.5 ng/10 mL または CH<sub>3</sub>SH>0.5 ng/10 mL)を超える口臭のあるボランティア 15 名とし、食品の日常的な摂取を想定して各クロスオーバー期において LF+LPO 配合錠薬 2 錠またはプラセボ錠を約 1 時間の間隔で摂取させた。摂取前、1

錠目摂取直後、1 時間後(2 錠目摂取直前)、2 時間後の時点で口腔内空気の VSC 濃度を測定した。その結果を図 2 に示す<sup>20)</sup>。プラセボ群に比べて実験(LF+LPO)群では、1 錠目摂取直後において、CH<sub>3</sub>SH と総 VSC 濃度が有意に低下した(図 2bc)。プラセボ群では各時点で H<sub>2</sub>S および CH<sub>3</sub>SH の中央値が嗅覚閾値を上回ったのに対し、実験群では 2 時間後の H<sub>2</sub>S の中央値および 1 錠目摂取直後から 2 時間後の CH<sub>3</sub>SH の中央値が嗅覚閾値を下回った(図 2ab)。

これらの結果から、LF+LPO 配合錠薬による摂取開始後 2 時間内での口臭抑制効果が確認された。

表1 唾液中細菌数の培養法および定量 PCR 法による測定

測定項目	群	摂取前	2時間後
培養法(菌叢関連菌数)		生菌数(log <sub>10</sub> CFU/スワブ±SE)	
乳酸桿菌数	プラセボ群	2.76±0.06	2.74±0.04
	実験群	2.77±0.05	2.75±0.04
総レンサ球菌数	プラセボ群	5.75±0.22	5.53±0.20
	実験群	5.79±0.25	5.78±0.21
ミュータンス菌数	プラセボ群	2.97±0.15	2.84±0.09
	実験群	2.86±0.09	2.84±0.09
定量 PCR 法(歯周病関連菌数, 総菌数)		コピー数(log <sub>10</sub> コピー/10 μL±SE)	
<i>A. actinomycetemcomitans</i>	プラセボ群	1.11±0.08	1.16±0.10
	実験群	1.10±0.07	1.16±0.12
<i>P. gingivalis</i>	プラセボ群	1.49±0.27	1.57±0.31
	実験群	1.47±0.25	1.52±0.28
<i>P. intermedia</i>	プラセボ群	1.65±0.28	1.61±0.25
	実験群	1.72±0.30	1.64±0.27
<i>F. nucleatum</i>	プラセボ群	5.13±0.28	5.06±0.27
	実験群	4.96±0.35	4.92±0.28
主な口腔内総菌数	プラセボ群	7.46±0.18	7.31±0.15
	実験群	7.38±0.22	7.25±0.17

平均±SE

(Shin K et al., 2011<sup>20</sup>)より改変)

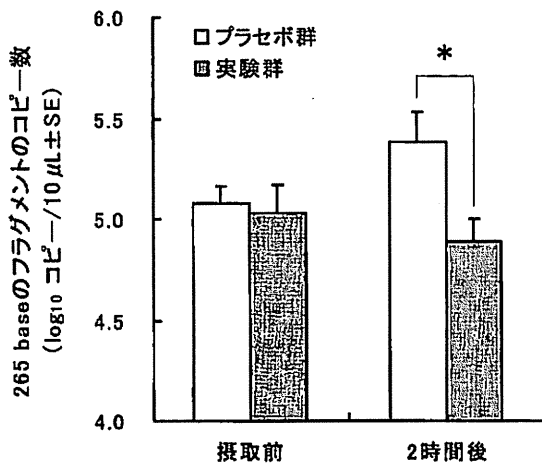


図3 唾液中細菌叢の T-RFLP 解析

唾液サンプルから精製した DNA を鋳型として蛍光ラベルプライマーを用いた PCR を行い、制限酵素(*Hae* III)処理後、DNA シーケンサーで解析した。265 base のフラグメントは、2時間後においてプラセボ群にくらべて実験(LF+LPO)群で有意に低下した。

平均±SE. \*P<0.05 で有意差あり

(Shin K et al., 2011<sup>20</sup>)より改変)

### 唾液細菌叢への影響

錠菓摂取前および2時間後の時点で安静時唾液2 mL を採取し、細菌学的分析を行った。培養法

と定量的 PCR 法で検出・測定した結果を表1に示す。測定したすべての細菌において、実験群とプラセボ群の間で差はなく、摂取前と摂取後2時間の間でも差がみられなかった<sup>20)</sup>。一方、唾液中細菌叢の T-RFLP (terminal restriction fragment length polymorphism) 解析では、2時間後においてプラセボ群にくらべて実験群で有意に低下したフラグメントが1種類検出された(図3)。この265 base のフラグメントは、データベース検索により *Prevotella*, *Porphyromonas*, *Treponema* などの歯周病菌の類縁菌と一致した<sup>20)</sup>。

これら細菌は VSC 産生能の高い歯周病原菌に一致しており、LF+LPO 配合錠菓による摂取開始後2時間以内での VSC 産生細菌の抑制が示唆された。これらの結果は、LF および LPO による歯周病原菌の抑制に関する他の研究結果に近似する<sup>19, 22~24)</sup>。

### 結語

LF+LPO 配合錠菓には口臭抑制効果が確認され、口臭産生菌の抑制が示唆された。すなわち、細菌のコントロールを介した新たな口臭治療法と

しての LF+LPO 配合錠薬の可能性が示唆された。また、口臭臨床研究での細菌学的観察における T-RFLP 解析の有用性が確認された。

#### 文 献

- 1) Yaegaki K : Halitosis. (ed. Johnson LR). Encyclopedia of Gastroenterology, vol. 2. Elsevier, San Diego, 2003, p265-266.
- 2) Yaegaki K, Coil JM, Kamemizu T, Miyazaki H : Tongue brushing and mouth rinsing as basic treatment measures for halitosis. *Int Dent J* 52 : 192-196, 2002.
- 3) 硫化水素—環境汚染物質の生体への影響(15)—. National Research Council・編. 東京化学同人, 1982, p23.
- 4) Ng W, Tonzetich J : Effect of hydrogen sulfide and methyl mercaptan on the permeability of oral mucosa. *J Dent Res* 63 : 994-997, 1984.
- 5) Persson S, Edlund MB, Claesson R, Carlsson J : The formation of hydrogen sulfide and methyl mercaptan by oral bacteria. *Oral Microbiol Immunol* 5 : 195-201, 1990.
- 6) Johnson PW, Yaegaki K, Tonzetich J : Effect of volatile thiol compounds on protein metabolism by human gingival fibroblasts. *J Periodontol Res* 27 : 553-561, 1992.
- 7) Johnson PW, Yaegaki K, Tonzetich J : Effect of methyl mercaptan on synthesis and degradation of collagen. *J Periodontol Res* 31 : 323-329, 1996.
- 8) Imai T, Ii H, Yaegaki K, Murata T, Sato T, Kamoda T : Oral malodorous compound inhibits osteoblast proliferation. *J Periodontol* 80 : 2028-2034, 2009.
- 9) Irie K, Ekuni D, Yamamoto T, Morita M, Yaegaki K et al. : A single application of hydrogen sulfide induces a transient osteoclast differentiation with RANKL expression in the rat model. *Arch Oral Biol* 54 : 723-729, 2009.
- 10) Yaegaki K, Qian W, Murata T, Imai T, Sato T et al. : Oral malodorous compound causes apoptosis and genomic DNA damage in human gingival fibroblasts. *J Periodontol Res* 43 : 391-399, 2008.
- 11) Fujimura M, Calenic B, Yaegaki K, Murata T, Ii H et al. : Oral malodorous compound activates mitochondrial pathway inducing apoptosis in human gingival fibroblasts. *Clin Oral Invest* 14 : 367-373, 2010.
- 12) Calenic B, Yaegaki K, Murata T, Imai T, Aoyama I et al. : Oral malodorous compound triggers mitochondrial-dependent apoptosis and causes genomic DNA damage in human gingival epithelial cells. *J Periodontol Res* 45 : 31-37, 2010.
- 13) Yaegaki K : Unangenehm riechende Substanzen im Mundraum : Gründe für Parodontitis und Krebs. *PROPHYLAXEdialog Sonderausgabe Halitosis* 22-25, 2009.
- 14) Calenic B, Yaegaki K, Kozuharova A, Imai T : Oral malodorous compound causes oxidative stress and p53-mediated programmed cell death in keratinocyte stem cells. *J Periodontol* 81 : 1317-1323, 2010.
- 15) Ii H, Imai T, Yaegaki K, Irie K, Ekuni D et al. : Oral malodorous compound induces osteoclast differentiation without receptor activator of nuclear factor  $\kappa$ B ligand. *J Periodontol* 81 : 1691-1697, 2010.
- 16) Thomas EL, Bozeman PM, Learn DB : Lactoperoxidase : structure and catalytic properties. (eds. Everse J, Everse KE, Grisham MB). *Peroxidases in chemistry and biology*, vol. 1. CRC, Boca Raton, 1991, p123-142.
- 17) Arnold RR, Russell JE, Champion WJ, Brewer M, Gauthier JJ : Bactericidal activity of human lactoferrin : differentiation from the stasis of iron deprivation. *Infect Immun* 35 : 792-799, 1982.
- 18) Thomas EL, Milligan TW, Joyner RE, Jefferson MM : Antibacterial activity of hydrogen peroxide and the lactoperoxidase-hydrogen peroxide-thiocyanate system against oral streptococci. *Infect Immun* 62 : 529-535, 1994.
- 19) Ihalin R, Loimaranta V, Lenander-Lumikari M, Tenovuo J : The sensitivity of *Porphyromonas gingivalis* and *Fusobacterium nucleatum* to different (pseudo)halide-peroxidase combinations compared with mutans streptococci. *J Med Microbiol* 50 : 42-48, 2001.
- 20) Shin K, Yaegaki K, Murata T, Ii H, Tanaka T et al. : Effects of a composition containing lactoferrin and lactoperoxidase on oral malodor and salivary bacteria : a randomized, double-blind, crossover, placebo-controlled clinical trial. *Clin Oral Invest* 15 : 485-493, 2011.
- 21) Murata T, Yamaga T, Iida T, Miyazaki H, Yaegaki K : Classification and examination of halitosis. *Int Dent J* 52 : 181-186, 2002.
- 22) Wakabayashi H, Yamauchi K, Kobayashi T, Yaeshima T, Iwatsuki K, et al. : Inhibitory effects of lactoferrin on growth and biofilm formation of *Porphyromonas gingivalis* and *Prevotella intermedia*. *Antimicrob Agents Chemother* 53 : 3308-3316, 2009.
- 23) Kondo I, Kobayashi T, Wakabayashi H, Yamauchi K, Iwatsuki K et al. : Effects of oral administration of bovine lactoferrin on periodontitis patients. *Jpn J Conserv Dent* 51 : 281-291, 2008.
- 24) Shin K, Horigome A, Wakabayashi H, Yamauchi K, Yaeshima T et al. : *In vitro* and *in vivo* effects of a composition containing lactoperoxidase on oral bacteria and breath odor. *J Breath Res* 2 : 017014 (E-pub), 2008.



Volume 8

M.A. Hayat  
Editor  
Brain Cancer

The 2007 WHO classification is updated. Brain Tumor angiogenesis, grading, heterogeneity, diagnosis, and therapies are explained in detail. Gliomas, especially the glioblastoma, the most common brain cancer, are discussed extensively, including the identification of biomarkers and stem cells. The importance of the role of immunohistochemistry in diagnosing brain tumors is emphasized. Pediatric tumors and classification, symptom, and MRI of spinal cord tumors are explained.

This eighth volume in the series **Methods of Cancer Diagnosis, Therapy, and Prognosis** discusses in detail the classification of the CNS tumors as well as brain tumor imaging in Europe. Scientists and Clinicians have contributed state of the art chapters on their respective areas of expertise, providing the reader a whole field view of the CNS tumors and brain tumor imaging.

This fully illustrated volume

- Explains the genetics of malignant brain tumors and gene amplification using quantitative-PCR
- Presents a large number of standard and new imaging modalities, including magnetic resonance imaging, functional magnetic resonance imaging, diffusion tensor imaging, amide proton transfer imaging, positron emission tomography, single photon emission computed tomography, magnetic resonance single voxel spectroscopy and intraoperative ultrasound imaging, for staging and diagnosing various primary and secondary brain cancers.
- Explains the usefulness of imaging methods for planning and monitoring (assessment) therapy for cancers.
- Discusses diagnosis and treatment of primary CNS lymphomas, CNS atypical teratoid/rhabdoid and CNS Rosai-Dorfman disease.
- Includes the subject of translational medicine.

**Professor Hayat** has summarized the problems associated with the complexities of research publications and has been successful in editing a must-read volume for oncologists, cancer researchers, medical teachers and students of cancer biology.

ISBN 978-90-481-8664-8



springer.com

Hayat (Ed.)

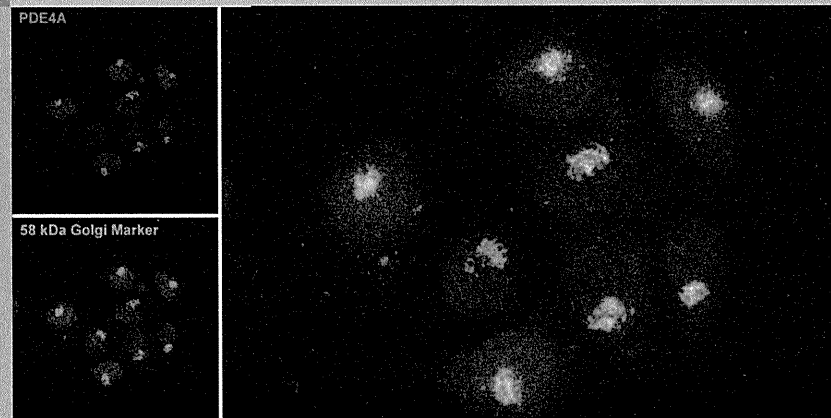
8




Methods of Cancer Diagnosis, Therapy, and Prognosis

# Methods of Cancer Diagnosis, Therapy, and Prognosis

Volume 8  
Brain Cancer



M.A. Hayat  
Editor

 Springer

## Chapter 37

# Induction of Apoptosis in Human Keratinocyte Stem Cells: The Role of Hydrogen Sulfide

Ken Yaegaki, Bogdan Calenic, and Toshio Imai

**Abstract** Apoptosis of epithelial stem cells is currently attracting much attention for the role it could play in cancer development. Because deficiencies in apoptosis mechanisms may be one of the causes of neoplasm formation, targeting cancer stem cells for treatment with keratinocyte stem cells could produce lasting results. However, some aspects of the apoptosis of human keratinocyte stem cells are not well understood. In this chapter, we clarify the relationship between hydrogen sulfide (H<sub>2</sub>S) and keratinocyte stem cells. H<sub>2</sub>S is produced in many human tissues and has been shown to cause apoptosis in the cells of epithelial tissue components. In our studies, the percentage of apoptotic cells in a population of keratinocyte stem cells was significantly increased following H<sub>2</sub>S exposure. The mitochondrial membrane was depolarized, and ROS levels were significantly increased because of both cytochrome c oxidase and superoxide dismutase inhibition by H<sub>2</sub>S. As a result, mitochondrial apoptotic pathways, including cytochrome c and caspase-9 and -3, were activated, while caspase-8 remained inactive. The p53 and BAX levels also were significantly elevated. We concluded that H<sub>2</sub>S induces apoptosis in human keratinocyte stem cells through intrinsic pathways. Further, we developed a novel protocol for separating keratinocyte stem cells from human mucosa using magnetic separation, by means of which we found that the  $\alpha_6\beta_4$ -integrin-positive, CD71-negative fraction was also the keratinocyte stem-cell fraction.

**Keywords** Apoptosis · Keratinocyte stem cells · Hydrogen sulfide · Lethal · Collagen · Carcinogenesis

## Introduction

Hydrogen sulfide (H<sub>2</sub>S) is a malodorous and lethal compound that is produced in the intestine, the oral cavity, and many other tissues at a concentration of 1 to 5  $\mu\text{g/g}$  of tissue (Wiliński et al., 2011). As a transmitter or modulator of many physiologic processes, H<sub>2</sub>S plays an important role in the cardiovascular system, the gastrointestinal tract, and the central nervous system (Zhao and Wang, 2002; Abe and Kimura, 1996; Fiorucci et al., 2006). However, its pathologic activity and toxicity to human tissues deserve greater attention. Low concentrations of H<sub>2</sub>S exhibit several toxicities. H<sub>2</sub>S and methyl mercaptan (CH<sub>3</sub>SH), which is similar to H<sub>2</sub>S, combine with collagen; when they are incorporated directly into peptide chains (Johnson and Tonzetich, 1985; Johnson et al., 1992), the intermolecular cross-linkages of collagen are cleaved (Johnson et al., 1985). Yaegaki et al. (1986) assessed the effect of CH<sub>3</sub>SH on the intra- and extracellular metabolism of collagen in human fibroblasts and found that collagen synthesis was suppressed by approximately 40% and the intracellular degradation of newly synthesized collagen was increased (Johnson et al., 1996). Moreover, the authors have recently reported that H<sub>2</sub>S induces apoptosis, which may be associated with carcinogenesis or its treatment, in several tissues (Yaegaki et al., 2008; Irie et al., 2009; Calenic et al., 2010a, b; Kobayashi et al., 2011).

Keratinocyte stem cells participate in many important functions. One of these is providing a barrier

---

K. Yaegaki (✉)  
Department of Oral Health, Nippon Dental University,  
Chiyoda-ku, Tokyo 102-8159, Japan  
e-mail: Yaegaki-k@tky.ndu.ac.jp

against the environment, especially microorganisms and their products, in human tissues. H<sub>2</sub>S reduces the effectiveness of epithelial tissues in providing a protective barrier against penetration and invasion by environmental chemicals, detrimental compounds, and microorganisms (Ng and Tonzetich, 1984). This malfunction may be due to H<sub>2</sub>S-induced apoptosis. Stem cells have been shown to play an important role in both carcinogenesis and cancer treatment (Wyllie et al., 1994; Wyllie, 1997). Failure of apoptosis in cells containing damaged DNA might be one of the causes of carcinogenesis (Wyllie, 1997) and may be the result of many factors, such as oxidative stress. On the other hand, targeting cancer stem cells – that is, apoptosis – is the only way to achieve lasting cancer-treatment responses (Wyllie et al., 1994). The mechanism of apoptosis in keratinocyte stem cells has never been described. This chapter focuses on the role of H<sub>2</sub>S in apoptosis in human keratinocyte stem cells.

### **General Toxicity and Concentration of H<sub>2</sub>S**

The toxicity of H<sub>2</sub>S is comparable to that of hydrogen cyanide. Like the cyanide ion, H<sub>2</sub>S is recognized as a potent inhibitor of cytochrome c oxidase (COX), which is a key enzyme in the mitochondrial respiratory chain producing adenosine triphosphate (ATP) (Dorman et al., 2002). H<sub>2</sub>S binds the heme iron of COX and inhibits the enzyme. Human exposure to H<sub>2</sub>S, which can occur in accidents or by environmental pollution at concentrations over 500 ppm, result in immediate death (Reiffenstein et al., 1992). Acute exposure of the eye to 25 ppm H<sub>2</sub>S causes injury; with chronic exposure, serious eye damage may occur (Lambert et al., 2006). Chronic exposure to even 300 ppb H<sub>2</sub>S causes nausea in humans. However, this concentration is much smaller than that found in human tissues, (Wiliński et al., 2011). On the other hand, free sulfide was not detected in the serum (Togawa et al., 1992), therefore such small concentration may have an adverse effect on health. H<sub>2</sub>S at 60 ppb (0.6 ppm of sulfide) has been used in experiments examining the adverse effects of H<sub>2</sub>S, because this simulates conditions in human tissues (Johnson and Tonzetich, 1985; Johnson et al., 1985, 1992, 1996; Yaegaki et al., 1986, 1995, 2008).

### **Production of Reactive Oxygen Species by Hydrogen Sulfide**

Yaegaki et al. (2008) reported that H<sub>2</sub>S inhibited the activity of superoxide dismutase (SOD) in human gingival fibroblasts as well as purified Cu, Zn-SOD and Mn-SOD activities. SOD is a critical enzyme responsible for the elimination of superoxide radicals such as O<sup>2-</sup>, one of the reactive oxygen species (ROS). The increased ROS in cells is a cause of cellular oxidative stress. If SOD activity is inhibited, the stress may remain at a high level and lead to damage of the DNA. An increment of ROS was also found in fibroblasts, mucous epithelial cells (keratinocytes), and keratinocyte stem cells derived from human skin (Yaegaki et al., 2008, Calenic et al., 2010a, b). COX inhibition by H<sub>2</sub>S is one of the causes of ROS accumulation, while blocking of the respiratory chain also leads to cell death. However, the most important roles of SOD are in anti-aging and anti-cancer activity; if cells survive under great oxidative stress, H<sub>2</sub>S might be considered carcinogenic (Yaegaki et al., 2008).

### **Carcinogenesis by H<sub>2</sub>S**

There is a strong possibility that H<sub>2</sub>S is carcinogenic in the human intestine. H<sub>2</sub>S exists in the human colon at over 1,000 ppm, larger than the lethal dose; to protect itself, colonic epithelium controls the toxicity by methylation and de-methylation (Kanazawa et al., 1996; Levitt et al., 1999). Thiols form persulfides with sulfhydryl and thus reduce the activity of H<sub>2</sub>S toxification, leading to H<sub>2</sub>S accumulation and the possibility of tissue damage (Levitt et al., 1999). In fact, exposure of colonic mucosa to high concentrations of H<sub>2</sub>S results in considerable damage, including apoptosis (Pitcher and Cummings, 1996). High concentrations of H<sub>2</sub>S were also found in the feces of subjects who were at high risk of developing colon cancer (Kanazawa et al., 1996). Proliferation of colonic mucous cells is accelerated by H<sub>2</sub>S through the Ras subfamily (Christl et al., 1996). Moreover Ki-Ras is activated in colorectal cancers (Bos et al., 1987). The Ras oncogene is implicated in colorectal carcinogenesis by H<sub>2</sub>S (Deplancke and Gaskins, 2003; Picton et al., 2002; Pitcher and Cummings, 1996; Christl et al., 1996; Bos et al., 1987).

Thus, H<sub>2</sub>S has two conflicting effects on cells – apoptosis and cell proliferation – signifying carcinogenicity (Yang and Wang, 2007). There is also an implication that defective apoptosis may permit the survival of mutated cells that could have undergone genomic changes similar or identical to those known to be expanded in cancer (Wyllie et al., 1994; Wyllie, 1997; Federici et al., 2011). In fact, H<sub>2</sub>S also prevent from apoptosis in several tissues under specific conditions: this would be a reason of defecting apoptosis which might lead the process of carcinogenesis (Taniguchi et al., 2011).

After human fibroblasts, oral epithelial cells, and keratinocyte stem cells derived from skin were exposed to 100 ng/mL H<sub>2</sub>S, DNA damage was identified and measured by means of single cell gel electrophoresis (SCGE) assay (CometAssy™, Trevigen, Gaithersburg, MD, USA). The basis of SCGE is the electrophoretic migration of DNA in an agarose gel. Intact DNA remains within the nucleoid whereas damaged DNA migrates away from it. Under a microscope, the nucleus together with the migrated DNA has the appearance of a comet, with a head (the nuclear region) and a tail containing DNA fragments. Evaluation of the comet-tail shape allows for the assessment of DNA damage: measurements include *tail length* (whole length of comet – length of head), *%DNA in the tail* (tail area/[tail area + head area] × 100), and *tail moment* (tail length × %DNA in the tail). When human fibroblasts, oral epithelial cells, and keratinocyte stem cells derived from skin were exposed to H<sub>2</sub>S, a significant increase was found in the test groups compared to the controls in tail length and tail moment as well as in DNA in the tail (Calenic et al., 2010b). Thus, genotoxicity of H<sub>2</sub>S has been demonstrated in the aforementioned cell lines using SCGE, and it is suggested that H<sub>2</sub>S-induced DNA damage might be carcinogenic.

### Hydrogen Sulfide-Induced Apoptosis in Human Keratinocyte Stem Cells

H<sub>2</sub>S-induced apoptosis was demonstrated in clonal human keratinocyte stem cells derived from adult human skin (Celprogen, San Pedro, CA). These cells tested positive for the following stem-cell markers: Keratin 19, CD34, CD133, and Nestin. Although the

manufacturer's instructions allowed up to 12 passages, the cells were used for only 10 passages because of the strong potential for natural differentiation to occur. The cells were incubated with H<sub>2</sub>S at 50 ng/mL; H<sub>2</sub>S in the medium was measured at 18 ng/mL (0.5 μmol/L). Flow cytometry was used to detect the apoptotic cells (Calenic et al., 2010b), and the number of cells was found to increase in a time-dependent manner. After 24 h incubation, early apoptotic cells accounted for approximately 20% of the total cell population; after 48 h, more than 30% were found to be apoptotic. Late apoptosis or necrotic cells remained very low after incubation (Calenic et al., 2010b), and it is suggested that most of the cells were not necrotic.

Since apoptosis has been demonstrated to occur in keratinocyte stem cells at such a low concentration of H<sub>2</sub>S, it is highly likely that the cells of many tissues, such as the esophagus, airway, the lung, the vagina, and the uterus, undergo apoptosis caused by H<sub>2</sub>S. There are two possibilities for the biologic role of the stem cells as described above. If apoptotic function is deficient, H<sub>2</sub>S might be one of the causes of neoplasm formation in these tissues. On the other hand, a possible treatment for tumors might focus on causing apoptosis in the stem cells of these tissues.

### Pathway for Apoptosis Caused by Hydrogen Sulfide

Depolarization of the mitochondrial membrane in keratinocyte stem cells derived from adult human skin (Celprogen) was evaluated by measurement of the uptake of a cationic dye, 5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethyl-benzamidazolocarboyanin iodide, into the mitochondria (Fig. 37.1). Dyed cells were analyzed and counted by a flow cytometer. The percentage of mitochondrial membrane-depolarized cells was significantly increased by H<sub>2</sub>S incubation (Calenic et al., 2010b).

Calenic et al. (2010b) determined the amount of cytochrome c released into cytosol and found that it was significantly increased by H<sub>2</sub>S incubation. Both caspase-9 and -3 activities were significantly increased following H<sub>2</sub>S exposure, but caspase-8 was not activated (Calenic et al., 2010b).

There are two main streams in the causes of apoptosis: the cell-death ligand/receptor pathway, including