

在宅医療における老人性肺炎の早期発見と予防
－唾液を用いた新しい検査法の開発－

神戸大学大学院保健学研究科 白川 卓

公益財団法人 在宅医療助成 勇美記念財団
2012(平成 24)年度後期

平成 26 年 4 月 25 日提出

1. 研究の概要

本研究では以下の項目を明らかにするために研究を実施した。

- 1) 在宅医療に適した唾液採取法の検討
- 2) 老人性肺炎の早期発見と予防に役立つ検査項目の検討と検査法の開発
- 3) 健常人ボランティアならびに在宅患者を対象とした唾液検査の実施
- 4) 在宅医療で用いる簡易検査法の開発

なお、本研究は神戸大学大学院保健学研究倫理委員会で承認を得た上で行った。検体採取はインフォームドコンセントを行い、被験者から同意を得た上で実施した。

2. 研究成果

1) 唾液採取法の検討

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、喀痰引用カテーター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性が高いことから在宅介護の現場で利用できる。(図1)



図1. 吸引式唾液採取用具

また、市販の唾液採取用具についてスワブ (Sarimetrics Oral Swab) の検討を行った。唾液中 CRP はスワブに約 30%吸着されるが、Tween 20 と $MgCl_2$ を含む抽出液を使用すればほぼ 100%回収できることを確認している。

唾液採取に関しては自ら唾液を排出できる被験者では排唾法または吐出法で、寝たきりあるいは意識レベルの低い被験者では吸引法またはスワブ法で採取することが望ましい。

2) 検査項目の検討と検査法の開発

① 唾液中炎症マーカー (CRP) の測定法の高感度検出法の開発

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。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の組成について検討した結果、TBS(Tris-buffer saline)に0.5% Tween20と1mol/L $MgCl_2$ を加えた場合に最も高い値となり、両者の添加が唾液中CRP測定には必

要であることが示された。(図 2)

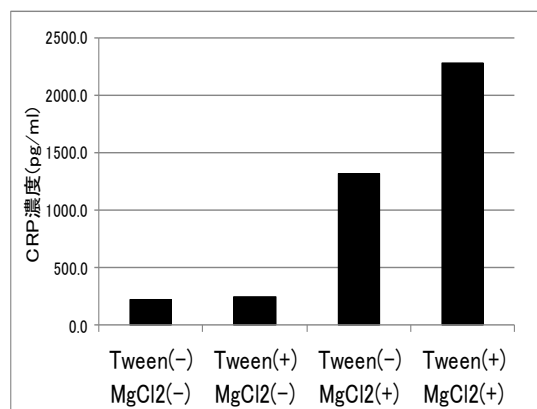


図 2. 反応液組成による CRP 測定値の変化

Tween(-) : Tween20 無添加

Tween(+): 0.5% Tween20

MgCl₂(-): MgCl₂ 無添加

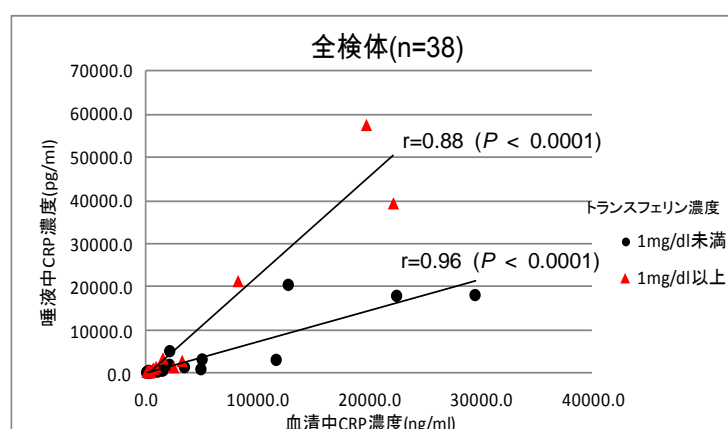
MgCl₂(+): 1mol/L MgCl₂

(バッファーは TBS を使用した)

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 MgCl₂-TBS として測定法の評価を行った。その結果、健常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-30μg/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。

さらに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 3)。さらに、健常人群(n=26)と患者群(n=12)についてもトランスフェリン濃度 1mg/dl をカットオフとして検体を分ければ、CRP の血中濃度と唾液中濃度に強い相関が認められることが明らかとなった(図 3)。

これらの結果から、唾液中 CRP 濃度と血清中 CRP 濃度は高い相関を示すが、口腔内の出血による影響を除くためにはトランスフェリン濃度を同時に測定する必要があることが示された。



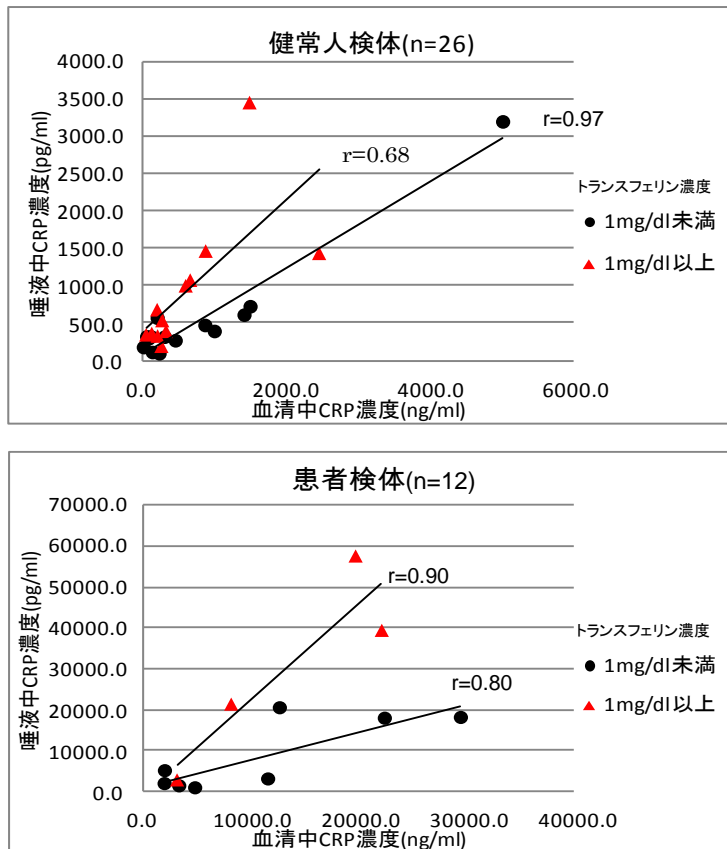


図 3. 唾液中トランスフェリン濃度別の唾液中・血清中 CRP 濃度の相関

② 唾液中抗菌物質 (hBD) 測定法の確立

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。

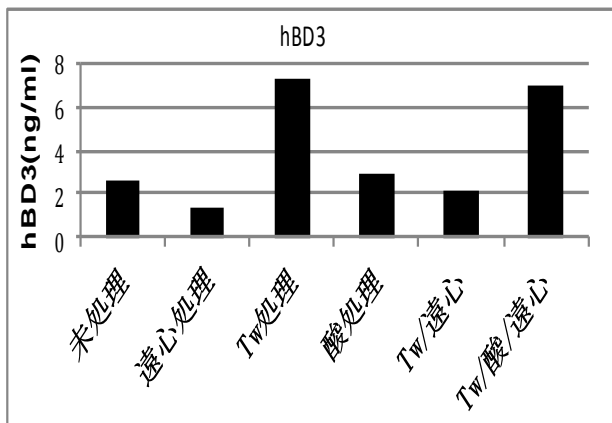


図 4. 唾液前処理法の比較

未処理 : 唾液をそのまま使用
 遠心処理 : 15000G, 10 分間遠心した上清
 Tw 処理 : 0.5% Tween20 添加
 酸処理 : 0.1M 塩酸処理
 Tw/遠心 : 0.5% Tween20 添加し、15000G で 10 分間遠心した上清
 Tw/酸/遠心 : 0.5% Tween20 添加し、0.1M 塩酸処理後 15000G で 10 分間遠心した上清

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。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が、唾液中に 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。(図 4)

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適當であった。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。

	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%

表 1. 同時再現性試験(n=10)

健康人 16 人の唾液について 2 種類の前処理を行い hBD2、hBD3 濃度を測定した結果、遠心処理で hBD2 および hBD3 の平均値はそれぞれ 0.51ng/ml、0.75ng/ml であったが、Tween 20-塩酸処理では 1.23ng/ml、5.67ng/ml となり、前処理の重要性が示された。

次に hBD3 の唾液採取後の保存条件について検討した。室温、4℃およびタンパク分解酵素インヒビター(PI)を添加して保存した唾液について唾液採取直後の測定結果と比較した。その結果、図 5 に示したように PI を添加しない唾液では 24 時間後に hBD3 濃度が若干低下したが、6 時間では低下が認められなかった。この結果から hBD3 は比較的安定なペプチドであり、数時間であれば室温保存でも測定値に大きな影響はないと考えられる。

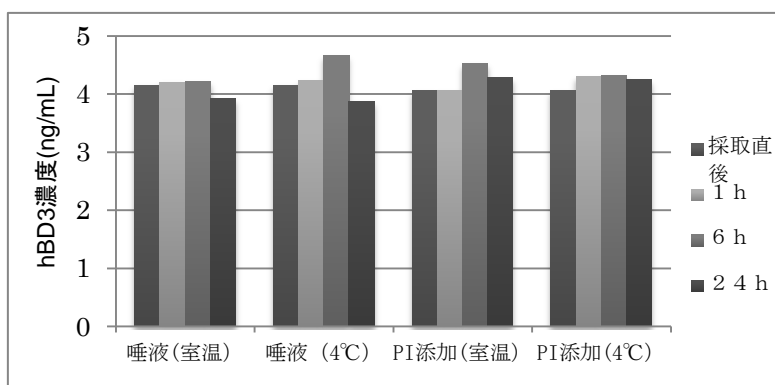


図 5. 唾液中 hBD3 の保存条件の検討

3) 唾液中 CRP の簡易測定法の開発

①イムノクロマトグラフィー法による唾液中 CRP の簡易検出法の開発

これまでの研究結果から唾液中 CRP は血中濃度の約千分の 1 の比率で相関することが明らかになったことから、簡易検出法としてイムノクロマトグラフィー法の開発を行った。ミリポアー社からイムノクロマトグラフィー用の各部材を購入し、検出限界の検討を行った。その結果、イムノクロマトグラフィー法での検出限界は約 10 ng/ml となったが、これは血中濃度に換算すると 10 μ g/ml (1mg/dl) に相当し、強い炎症反応がある場合は検出可能であることを示している(図 6)。

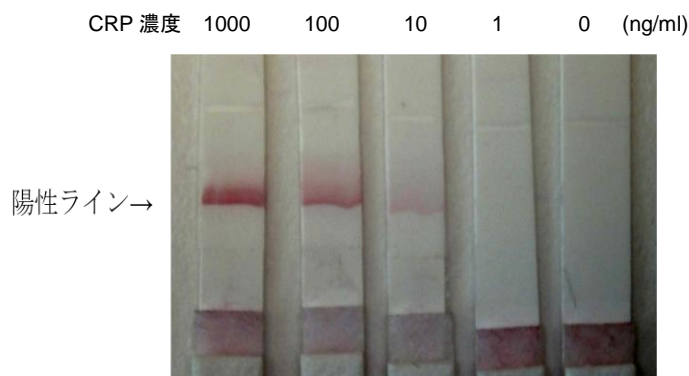


図 6. 唾液中 CRP のイムノクロマトグラフィー法による検出(金コロイド使用)

CRP の血中濃度のカットオフ値は 3 μ g/ml であり、この濃度を反映する唾液中濃度は 3 ng/ml である。検出感度をこのレベルまで高める必要があることから抗体の標識物を金コロイド、白金コロイドおよび蛍光色素を用いて検討したが、図 6 に示した金コロイドの感度を上回ることはできなかった。

②FRET(蛍光共鳴エネルギー移動)法による唾液中 CRP の高感度簡易検出法の開発

蛍光色素を利用した FRET (Fluorescence resonance energy transfer : 蛍光共鳴エネルギー移動) を用いることで抗原抗体反応生成物を洗浄操作なしに定量できる可能性がある。この方法は蛍光測定装置が必要になるが、ベッドサイドで利用可能な定量的簡易検出法としての応用が期待できることから、今回は数種類の抗 CRP 抗体と FRET を生じる数種類の蛍光色素の組み合わせについて検討を行った。各抗体に蛍光色素を標識し、希釈した CRP 標準物質と一定時間反応させて、485nm の励起光を照射し、670nm の蛍光強度を測定した。ブランクの蛍光強度を差し引いて FRET で生じた蛍光強度を求めた。その結果、FRET を生じる蛍光色素の組み合わせとして R-Phycoerythrin (R-PE) と Allophycocyanin (APC) が最も優れていた。また、蛍光標識抗体の添加濃度やバッファー組成が FRET に大きな影響があることが明らかになった。図 7 は反応に用いる蛍光標識抗体の終濃度が 500ng/ml の条件下でバッファー組成を変えて測定した結果である。図 7-1 は 1 \times TBS, 200mM MgCl₂, 0.1% NP-40、図 7-2 は 1 \times TBS, 200mM MgCl₂, 3% ポリエチレングリコール (PEG) のバッファー組成で、0~100ng/ml の CRP 標準液を FRET 法で継時的に測定した結果である。両者とも濃度依存的に蛍光強度が上昇し、CRP の定量が可能であったが、バッファーにポリエチレングリコールを加えることで FRET で生じる蛍光強度が増大することが確認された。

この組成で反応時間を 60 分間にすれば 10ng/ml 以下の濃度の唾液中 CRP を検出することが可能で、肺炎等の早期発見のモニターとして利用できる可能性が示唆された。

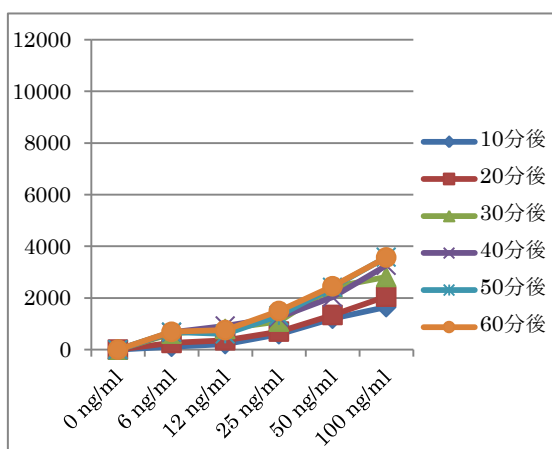


図 7-1 バッファーに 0.1%NP-40 を添加
(1×TBS, 200mM MgCl₂, 0.1%NP-40)

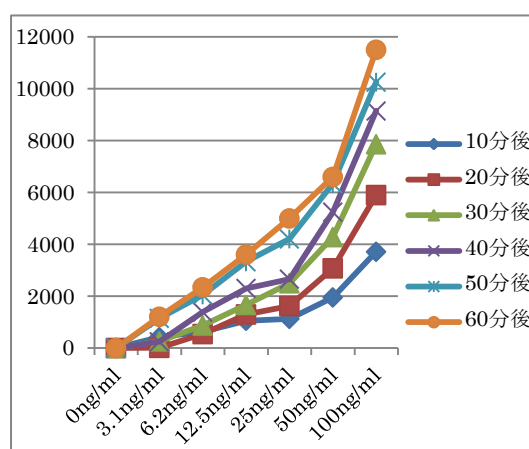


図 7-2 バッファー組成に 3%PEG を添加
(1×TBS, 200mM MgCl₂, 3%PEG)

図 7. バッファー組成の違いによる蛍光強度の変化

3. まとめ

炎症マーカーである CRP ならびに抗菌物質であるディフェンシンについて、唾液を用いた高感度検出法が確立できた。CRP は炎症時に上昇することから肺炎等の早期発見に有用である。ディフェンシンは口腔内の清浄度を保つ上で重要な働きをしており、肺炎等の予防に関係すると考えられている。CRP については健康人および炎症が疑われる患者の血中濃度と唾液中濃度に高い相関があることが確認できたことから、在宅医療に適用するためにイムノクロマトグラフィー法ならびに FRET 法による簡易検出法の開発を行った。イムノクロマトグラフィー法では CRP 濃度 10ng/ml が検出限界であったが、FRET 法では 10ng/ml 以下の濃度の測定が可能であった。今後の課題として、これらの簡易測定法を CRP 濃度 1ng/ml 程度の検出が可能なる方法まで改良し、在宅医療を含めた医療において使用できる測定法として確立したい。

4. 調査研究を終えての感想

当初予定していた内容はある程度達成できたと思いますが、実用化にまで至らなかったことは残念に思っている。在宅医療における検査で重要なことはその場で測定結果が得られるということで、そのためには簡易検査の開発が必須である。今回の研究成果をもとに、CRP とディフェンシンについては早い機会に在宅医療に利用できる簡易な検査法として確立したいと考えている。

* 本研究は公益財団法人 在宅医療助成 勇美記念財団の助成によって行われた。