

## 唾液中サイトカイン測定の実験診断への応用に関する研究

ヒトの唾液中には、消化酵素や分泌型 IgA 等だけでなく、各種のサイトカイン等、様々な生理活性物質が含まれることが近年明らかにされてきている。唾液は血液に比べて、侵襲性なく、容易に採取することができるため、臨床検査の検体としての利用が期待されている。本研究では、共同研究者の医院の健康診断受診者のボランティアから同時に採取された唾液と血液の中における、各種のサイトカイン濃度を測定し、唾液中と血中濃度の相関関係について検討した。

### 【研究の対象および方法】

対象者は某医院における健診受診者 12 名の 4 時点において採取された唾液および血漿検体を測定対象とした。徳島大学教員ボランティア 5 名からも唾液と血液を同時に採取して検体とした。血漿は末梢血をヘパリン採血し遠心分離上清を検体とした。唾液はサリベット コットン (Sarstedt, Numbrecht, Germany) を用いて 1 分間唾液をコットンに含ませた。採取したコットンは 3,000 rpm, 20 分間遠心分離を行い、上清を採取し、唾液検体として血漿検体とともに使用まで -80℃ に凍結保存した。

唾液中および血漿中サイトカイン濃度は、Bio-Plex サスペンションアレイシステム (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA) にて、Human Cytokine Group I (8plex: IL-1 $\beta$ , IL-8, IL-10, IL-12 (p70), IFN- $\gamma$ , IP-10, TNF- $\alpha$ , VEGF) および Human Cytokine Group II (6-plex: IL-1 $\alpha$ , IL-18, HGF, MIF, M-CSF, VCAM-1) サイトカインアッセイキット (Bio-Rad) を使用して 14 種のサイトカインの測定を行った。また、唾液中への血液の混入によるサイトカイン濃度への影響を調べるため、Salivay blood contamination EIA kit (Salimetrics LLC., State College, PA, USA) を用いて唾液中トランスフェリン濃度を測定し、トランスフェリン濃度が 1 mg/dL 以上のものを血液混入有りとした。

各検体採取時点間の各サイトカインの唾液中および血中濃度の比較についてボンフェローニの修正によるウィルコクソン検定を、各サイトカインの唾液中および血中濃度の相関関係についてスピアマン順位相関係数検定による相関分析を、ドーム治療開始前の万井医院の被験者と徳島大学予防歯学分野教室員の唾液・血中サイトカインの比較および唾液中への血液混入の有無によるサイトカイン濃度の比較についてマン・ホイットニ検定を行った。統計解析には SPSS 15.0J for windows (SPSS

Inc., Chicago, IL, USA) を用いた。なお, 危険率  $p < 0.05$  を統計学的有意水準とした。...

#### 【結果および考察】

唾液中には多種のサイトカインが存在し, それらの唾液中の濃度は血中濃度と比較しても決して低くはなく, 多くのサイトカインにおいて, 唾液中サイトカイン濃度は血中サイトカイン濃度に比べて同等か高い値を示すものが多いことが示された。また, 唾液中サイトカイン濃度と血中サイトカイン濃度では多くのものが相関関係になく, 唾液中のサイトカインは血中濃度とは異なる制御を受けている可能性が示された。

また, 唾液中のサイトカインレベルは, 歯周病のような口腔内の炎症状態に影響を受ける可能性も考えられた。我々による別の研究において, 徳島大学病院外来患者の唾液中サイトカインを測定したところ, 歯周病の進行状態を示す歯科臨床指数と正の相関関係にあるものが多いことが示唆されている(未発表データ)。今回の測定で, 医院由来の検体では徳島大学の健常者検体に比較して IL-1 $\beta$ , IL-8, IP-10, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , VEGF, M-CSF で唾液中濃度が有意に高い値を示していた。歯周病に罹患していると歯肉の微少出血が見られることが多いので, 唾液中への血液の混入の測定は歯周病のスクリーニングとしても用いられている。そこで今回測定した唾液検体でも血液の混入を測定し, サイトカイン濃度と比較したところ, 血液混入が見られた唾液では IP-10 と MIF を除くサイトカイン濃度が有意に高かった。VCAM-1 のように血中濃度が唾液中濃度に比べて遙かに高い値を示すものでは, 微量の血液混入により唾液中濃度が影響を受けることが考えられるが, その他の多くのサイトカインでは, 唾液中の濃度が元々高く, わずかな血液の混入による影響は受けにくい。したがって, 血液混入が有る唾液検体における一部サイトカイン濃度の上昇は, 血液混入による血中のサイトカインの混入によるものではなく, 血液混入が起こる状況, つまり被験者の口腔内の歯周病等の影響を反映していると考えられる。したがって, 唾液を検体としてサイトカイン濃度を測定しようとする場合には, 被験者の口腔内の状態も考慮する必要があると考えられる。

唾液は採取が簡便で非侵襲的に採取できる一方, 血液よりも採取時間や採取方法などの条件による影響を受けやすい可能性がある。さらに, 口腔内局所の健康状態による影響も考えられるため, 唾液を検体とする場合, その採取条件に十分に注意する必要がある。今後は被験者の口腔内の状況も考慮に入れたさらなる検討の必要性があると考えられる。