

## バイオマーカー測定における唾液の有用性

池田光徳<sup>1)2)3)</sup>、井上正隆<sup>1)</sup>

(2014年9月30日受付, 2014年12月18日受理)

Saliva as a useful biospecimen for biomarkers measurement

Mitsunori IKEDA<sup>1)2)3)</sup>, Masataka F. INOUE<sup>1)</sup>

(Received : September 30, 2014, Accepted : December 18, 2014)

## 要 旨

唾液を用いた免疫アッセイによるバイオマーカーの測定には、酵素（結合）免疫測定法および固相酵素結合免疫測定法がある。唾液採取には疼痛を伴わないため、唾液は有用な検体といえる。市販のキットを使い、唾液中のエイコサノイド、ホルモン、炎症関連物質、外分泌物質、メタボリックシンドローム関連物質、環状ヌクレオチドなどが測定できる。これらのうち、ホルモン、炎症関連物質、メタボリックシンドローム関連物質および精神的ストレスを反映するChromogranin Aのようなバイオマーカーは、患者の病態把握に有用である。フィジカルアセスメントと併せて唾液中バイオマーカーを測定することで患者の生活指導にも活用できるのではないかと考えられる。

キーワード：免疫アッセイ、酵素（結合）免疫測定法、固相酵素結合免疫測定法、唾液、バイオマーカー

## Abstract

The measurement of the biomarkers by the immunoassay using saliva as a sample includes both enzyme-linked immunoassay and enzyme-linked immunosorbent assay. The impregnation method employing the inactive polymer fibers (oral swab) inserted in the oral cavity is a simple and easy saliva collecting method. Since the saliva collection process does not induce any pain, it can be said that saliva might be a useful biospecimen. Eicosanoids, hormones, inflammation-related biomarkers, exocrine substances, metabolic syndrome-related biomarkers, cyclic nucleotides (second messengers in the intracellular signal transduction), etc. in saliva samples can be measured using commercial immunoassay kits. Of these, the biomarkers such as hormones, inflammation-related biomarkers, metabolic syndrome-related biomarkers and chromogranin A, a biomarker reflecting mental stress, are particularly useful for understanding the pathophysiology of patients' condition. Thus, the measurement of biomarkers in saliva may be a useful tool for the screening and counseling of patients with lifestyle-related disorders as well as those exposed to mental stress.

Key words : biomarker, enzyme-linked immunoassay (EIA), enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), immunoassay, saliva

1) 高知県立大学看護学部看護学科 Department of Nursing, Faculty of Nursing, the University of Kochi  
2) 高知県立大学大学院看護学研究科 Graduate School of Nursing, the University of Kochi  
3) 高知県立大学健康長寿センター Wellness and Longevity Center, the University of Kochi

## 1. はじめに

非侵襲的に得られる検体として唾液の利用が進んでいる。得られた唾液をイムノアッセイに供することで、容易に唾液中バイオマーカーを測定することができる。唾液を用いたイムノアッセイによるバイオマーカーの測定方法を概説し、医学および看護学領域での利用の現状を示し、さらに今後の研究での活用を展望したい。

## 2. イムノアッセイ<sup>1)</sup>

従来、医学研究および診断のための臨床検査では、生体からの情報を得る手段として血液（血漿および血清を含む）、排泄物（便および尿）、血液以外の体液（胃液、十二指腸液など）および体腔液（脳脊髄液、関節液、胸水、腹水など）が使用されてきた。これらの検体は、血液学的、生化学的、分子生物学的、免疫・血清学的、細菌学的および病理学的に分析（定量および定性）される。これらの分析方法のうち、免疫・血清学的分析法として対象物質に対する抗体を使用した、いわゆるイムノアッセイが開発された。

イムノアッセイには放射免疫測定法（ラジオイムノアッセイ、Radioimmunoassay、RIA）、酵素（結合）免疫測定法（Enzyme-linked immunoassay、EIA）および固相酵素結合免疫測定法（Enzyme-linked immunosorbent assay、ELISA）が含まれる。RIAは文字通り放射性同位元素を使用する方法である。RIAは感度が高いためホルモンなど微量タンパクの定量に使用される。EIAは抗原抗体反応における酵素の発色を利用して物質を定量する方法であり、直接法、間接法、競合法、サンドイッチ法などの変法がある。EIAのうち抗体をプレートなどに固相化した方法がELISAである。通常96ウェルプレート上で検出したい物質をそれに対応する2種類の抗体（一方はプレートに固相化）で挟み込み定量する方法（サンドイッチ法）が使用される。ELISAは放射性同位元素を使用しないため安全性が高く、安価で簡便でもあるため、微量タンパクや微生物抗原

の定量に汎用されている。

## 3. 唾液分泌の生理学<sup>2)</sup>

唾液は、耳下腺、顎下腺、舌下腺の大唾液腺と口蓋腺、口唇腺などの小唾液腺から分泌される。1日当たりの分泌量は、1.0~1.5 lとされている。水が99.5%を占め、残りは無機質、消化酵素、抗菌物質、成長因子、サイトカインなどを含んでいる。唾液はその性状から漿液性唾液と粘液性唾液分泌に大別され、漿液性唾液は耳下腺および顎下腺から、粘液性唾液は舌下腺および顎下腺から分泌される。唾液分泌のタイミングから、安静時に無刺激のもとに分泌される安静時唾液と食事などの刺激によって分泌される刺激唾液とに分けることもできる。唾液分泌は、交感神経系および副交感神経系の両者により二重に調節されている。すなわち、副交感神経系では、延髄上下唾液核の興奮が、耳神経節および顎下神経節を介して漿液性唾液分泌を促進し、交感神経系では、胸髄側核の興奮は、上頸神経節を介して粘液性唾液分泌を促進する<sup>3)</sup>。

## 4. 唾液検体の長所および短所

これまで、検体検査の検体として唾液は注目されてこなかった。口腔粘膜疾患が唾液と密接に関連しているにもかかわらず、歯学領域でも「唾液学」は存在せず、唾液検査は殆ど実施されていない<sup>4)</sup>。唾液を検体として使用する最大の長所は、唾液採取に疼痛を伴わないことである。臨床検査の手技としては最も非侵襲的な検体採取方法だといえる。検体採取に苦痛を伴わないことは、侵害刺激が影響を与えうる生体物質の定量に有用である。同一個体から頻回に、いつでも、何度でも採取できる。意識のない患者からも、新生児や乳幼児からも採取できる。

一方、唾液検体にはいくつかの短所がある。唾液は粘稠な液体であり、そのままでは測定に使用しづらい。また、液体とはいえ食物残渣などの夾雑物が含まれている。したがって、測定前に濾過

や遠心分離などの検体処理が必要である。さらに、喀痰などの他の体液の混入がありうるし、基本的には感染性検体である。そのため変質・腐敗しやすい。口腔局所からの情報である点に留意しなければならない<sup>5)</sup>。測定値に影響を与える因子として、唾液流量、安静時唾液か刺激唾液かの違い、飲食や喫煙の有無、口腔疾患や口腔処置の有無などが考えられる。唾液量不足のため口腔乾燥症患者からは検体を採取しにくい。採取方法においてもストローによる採取(流涎法)かポリマー線維による吸収採取(含浸法)かによって差が出る。使用する材料による生体物質吸着の可能性もある。基本的に唾液腺は外分泌腺であり、分泌部および導管は腎臓のネフロンに相似する分泌・再吸収を行っている。したがって、検体として唾液を使用することは唾液腺および導管が分泌・再吸収したあとの液体を測定していることを念頭に置かなければならない。

## 5. 唾液の採取方法

流涎法と含浸法と2種類の方法に別けられる。流涎法は口腔内に溜まった唾液をチューブに垂れ流して採取する方法である。自然な方法であり、特別な器具も不要であるため、最も推奨される。通常のプラスチックストローを使用しても良いが、本法のためにSalimetrics社製のCryovialポリプロピレン製専用チューブが販売されている。含浸法は流涎法が実施しづらい場合に利用される。Salimetrics社製のOral Swab (SOS) (図1)が使用できる。SOSは不活性ポリマーであり毒性はないとされるが、6歳未満の乳幼児には誤嚥の恐れがあるため使用できない。SOSが使用できない場合は、Salimetrics社製のChildren's Swab (SCS)を使用する。SCSは誤嚥しにくいように長さが12.5cmに作られている。採取した唾液は、専用の試験管にSOSとともに入れて遠心分離にかける。検体採取者にとっても簡便な検体採取法と言える。

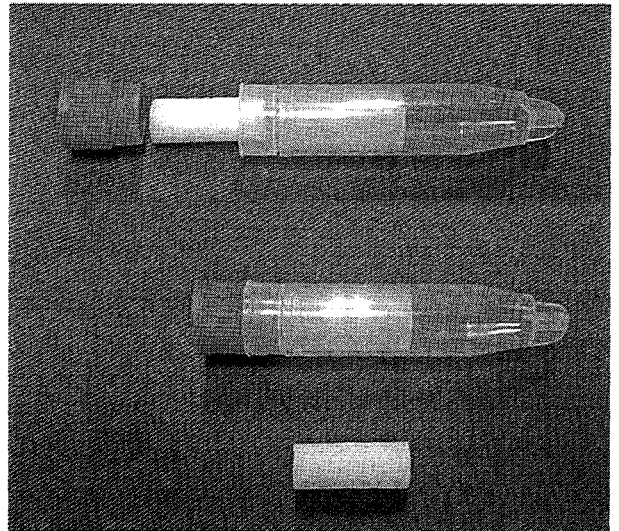


図1 : Salimetrics社製 Oral Swab (SOS)

## 6. 唾液の保存処理

変質・腐敗を防ぐため、採取した唾液は直ちに冷蔵または凍結保存する。冷蔵も数時間程度に留め、なるべく早めに $-20^{\circ}\text{C}$ 以下に凍結する。凍結融解は繰り返さず、解凍後は直ちに測定を行う。唾液の粘稠性を減らし食べカスなどの夾雑物を取り除くため、解凍後ボルテックスにかけて遠心分離(3,000rpm、15分)する。上清をピペットで回収する。唾液の採取方法と保存処理については、メーカーからのマニュアル Saliva Collection and Handling Advice ([http://www.funakoshi.co.jp/download/pdf/SAL\\_handbook3.pdf](http://www.funakoshi.co.jp/download/pdf/SAL_handbook3.pdf))が入手できる。唾液はキットに添付のマニュアルに従って処理する。唾液中バイオマーカーの濃度は吸光マイクロプレートリーダーを使用して測定する。一次抗体をプレートに固相化しているキットであるか否かで測定結果が得られるまでの時間が半日から2日間とまちまちである。2日間かかる検査を時間を要するかと考えるか要さないかと考えるかは研究者の考え方次第である。

## 7. 唾液を用いたバイオマーカーの測定

バイオマーカー (biomarker) とは、ステッドマン医学大辞典 (改訂第6版) によると「ある物質の吸収量、代謝量、または生物学的有効量すな

わち感受性と抵抗性、固有反応といったその物質に対する反応性を測定することができ、その物質への暴露、健康に及ぼす影響、病気になりやすさの指標となる細胞または分子」とされている。バイオマーカーには細胞も含まれていることになるが、イムノアッセイ系を用いた測定では液状の検体が対象となる。ただし、細胞を細胞溶解液の状態では測定することは可能である。

2014年8月28日時点でPubMedにおいてsaliva + biomarkerをキーワードとして検索したところ、2,307の論文がヒットした。このことは、唾液が生体情報を得る検体として医学研究において注目されていることを意味する。唾液は液体検体であるため、バイオマーカーを測定するには従来用いられてきた多くの手技が利用できる。微量物質を測定するためには特にイムノアッセイが有用である。抗体が開発されている物質であれば理論的にはその測定は可能である。しかしながら、各物質のイムノアッセイの条件を確立することは容易ではない。研究室レベルでイムノアッセイ系を確立し、着目した物質を実験的に測定することが行われてきた。本稿では、簡便に使用できる販売用のキットとして確立されたEIAおよびELISAを検索し、今後の非侵襲的な生理学的研究に利用可能かどうかを論じる。

## 8. イムノアッセイキットで測定できるバイオマーカー

現在入手可能なヒト唾液中バイオマーカーの測定キットを表1に示した。情報はメーカーが出すデータシートなどから得た。同じバイオマーカーの測定キットが複数のメーカーから販売されている場合は、代表的なもののみを示した。

### 1) エイコサノイド

6-keto-Prostaglandin-F1 $\alpha$ 、8-iso-Prostaglandin-F2 $\alpha$ 、8-iso-Prostaglandin-F2 $\alpha$  (total)、11 $\beta$ -Prostaglandin-F2 $\alpha$ 、Leukotriene B4、Prostaglandin-E1、Prostaglandin-E2、

Prostaglandin-F2 $\alpha$ およびThromboxane B2が該当する。エイコサン酸(アラキドン酸)を骨格に持つ化合物であり、アラキドン酸から生合成される(アラキドン酸カスケード)。アラキドン酸カスケードにおいてcyclooxygenaseの働きでprostaglandin類およびthromboxane類が生成される。同様に5-lipoxygenaseの働きでleukotriene類が生成される。Prostaglandin-E1には動脈管の開存作用があり、Prostaglandin-E2には平滑筋収縮作用、末梢血管拡張作用、発熱作用および痛覚伝達作用がある。Prostaglandin-F2 $\alpha$ には黄体退行および平滑筋収縮作用がある。Leukotriene B4は好中球走化因子であり、血管収縮作用(血管透過性亢進)や気管支収縮作用も有することから、炎症およびアレルギーを悪化させる。Thromboxane B2は血小板活性化作用や血管収縮作用を示す。

### 2) ホルモン

糖質コルチコイド(Cortisol)、鉱質コルチコイド(Aldosterone)、男性ホルモン(Androstenedione、DHEA(Dehydroepiandrosterone)、DHEA-S(Dehydroepiandrosterone sulfate)、Testosterone)や女性ホルモン(Estradiol、Estrone、Progesterone、17 $\alpha$ -Hydroxyprogesterone)、Activin A、InsulinおよびMelatoninが含まれる。Activin Aには卵巣刺激ホルモンの分泌促進<sup>6)</sup>、赤芽球の分化促進<sup>7)</sup>および骨形成の促進作用<sup>8)</sup>がある。Insulinは膵ランゲルハンス島 $\beta$ 細胞から分泌されるホルモんで、筋肉へのブドウ糖の取り込みを促進したり、肝臓による糖新生を抑制することで血液中ブドウ糖濃度を低下させる。Melatoninは松果体から分泌されるホルモんで、バイオリズムの調節に重要である。

### 3) 炎症関連物質

C-reactive protein (CRP)は肝臓が産生する急性期タンパクの1つである。Interleukin-1 $\beta$ 、

表1：入手可能なバイオマーカーキット

バイオマーカー	関連	メーカー	カタログ番号	血清との相関性	感度	必要唾液量	アッセイ系
6-keto-Prostaglandin-F1α	エイコ	Genzyme	9208	不明	1.4 pg/ml	20 µl	ELISA
8-Hydroxyguanine	酸化ス	日研ザイル株式会社	KOG-HS10	不明	0.125 ng/ml	300 µl	ELISA
8-iso-Prostaglandin-F2α	エイコ	Genzyme	9209	不明	12.3 pg/ml	20 µl	ELISA
8-iso-Prostaglandin-F2α (total)	エイコ	Genzyme	9210	不明	18.8 pg/ml	20 µl	ELISA
11β-Prostaglandin-F2α	エイコ	Genzyme	9213	不明	4.3 pg/ml	20 µl	ELISA
17α-Hydroxyprogesterone	ホルモ	Salimetrics	1-2602	0.64	3 pg/ml	50 µl	EIA
Activin A	ホルモ	Abcam	ab119568	不明	12 pg/ml	150 µl	ELISA
Adiponectin	メタボ	大塚製薬	MSDS652770	不明	23.4pg/ml	100 µl (10倍希釈)	ELISA
Aldosterone	ホルモ	Salimetrics	受託解析	0.75-0.96	35 pg/ml	100 µl	EIA
AmylaseL, salivary (AMY1)	外分泌	USCN Life Science	SEB482Hu	不明	1.17ng/ml	100 µl	ELISA
α-Amylase	外分泌	Salimetrics	1-1902	不明	N/A	10 µl	Kinetic assay
Androstenedione	ホルモ	Salimetrics	1-2902	0.77	5 pg/ml	50 µl	EIA
Apolipoprotein AI	メタボ	Assaypro LLC	EA5301-1	不明	3 ng/ml	6.25 µl	ELISA
Brain-derived neurotrophic factor	歯科	Chemicon	CYT306	不明	7.8 pg/ml	100 µl	ELISA
cAMP	セカソ	Genzyme	9204	不明	0.4 pg/ml	20 µl	ELISA
cAMP (low pH)	セカソ	Genzyme	9203	不明	0.7 pg/ml	20 µl	ELISA
Chromogranin A	ストレ	Salimetrics	受託解析	不明	7 ng/ml	25 µl	EIA
cGMP	セカソ	Genzyme	6206	不明	0.4 pg/ml	20 µl	ELISA
cGMP (low pH)	セカソ	Genzyme	9205	不明	0.6 pg/ml	20 µl	ELISA
Cortisol	ホルモ	Salimetrics	1-3002	0.91	0.007 ug/dL	25 µl	EIA
Cotinine	喫煙	Salimetrics	1-2002	不明	0.15 ng/ml	20 µl	EIA
C-reactive protein (CRP)	炎症	Salimetrics	1-3302	不明	10 pg/ml	15 µl	EIA

DHEA	ホルモ	Salimetrics	1-1202	0.86	5 pg/ml	50 µl	EIA
DHEA-S	ホルモ	Salimetrics	1-1252	不明	43 pg/ml	100 µl	EIA
DNA analysis	その他	Salimetrics	受託解析	不明	N/A	種々	EIA
Endothelin (1-21)	炎症	Biomedica Medizinprodukte	BI-20052	不明	0.02 fmol/ml	50 µl	EIA
Estradiol	ホルモ	Salimetrics	1-3702	0.8	0.1 pg/ml	100 µl	EIA
Estriol	ホルモ	Salimetrics	1-1802	0.87	1 pg/ml	100 µl (2倍希釈)	EIA
Estrone	ホルモ	Salimetrics	1-3202	不明	1 pg/ml	100 µl	EIA
Insulin	ホルモ	Mercodia	10-1132-01	不明	0.075 mU/l	25 µl	ELISA
Interleukin-18	炎症	Salimetrics	1-3902	不明	<0.37 pg/ml	20 µl	EIA
Interleukin-6	炎症	Salimetrics	1-3602	種々	0.07 pg/ml	60 µl	EIA
Lactate (salivary)	歯科	DRG Instruments	DX-SLV-4764	不明	不明	不明	ELISA
Lactoferrin	外分泌	CircuLex	CY-8089	不明	259 pg/ml	100 µl	ELISA
Leukotriene B4	エイコ	Genzyme	9201	不明	30.1 pg/ml	20 µl	ELISA
Matrix metalloproteinase-2	外分泌	富士薬品工業	RPN2617	不明	0.37 ng/ml	100 µl	ELISA
Matrix metalloproteinase-9	外分泌	富士薬品工業	RPN2614	不明	0.6 ng/ml	100 µl	ELISA
Melatonin	ホルモ	Salimetrics	1-3402	0.81	0.58 pg/ml	100 µl	EIA
Neopterin	炎症	Salimetrics	受託解析	不明	0.51 ng/ml	50 µl	EIA
Progesterone	ホルモ	Salimetrics	1-1502	0.87	5 pg/ml	50 µl	EIA
Progranulin (GP-88)	炎症	Booster Biological Technology	EK0973	不明	50 pg/ml	100 µl	ELISA
Prostaglandin-E1	エイコ	Genzyme	9212	不明	5.95 pg/ml	20 µl	ELISA
Prostaglandin-E2	エイコ	Genzyme	9200	不明	36.2 pg/ml	20 µl	ELISA
Prostaglandin-F2α	エイコ	Genzyme	9211	不明	4.62 pg/ml	20 µl	ELISA
S100A7/Psoriasin	炎症	CircuLex	CY-8073	不明	0.12 ng/ml	100 µl	ELISA

Secretory immunoglobulin A	外分泌	Salimetrics	1-1602	不明	2.5 µg/ml	25 µl	EIA
Testosterone	ホルモ	Salimetrics	1-2312	0.96	1 pg/ml	25 µl	EIA
Transferrin (および血液混入)	その他	Salimetrics	1-1302	不明	0.8 µg/ml	20 µl	EIA
Thromboxane B2	エイコ	Genzyme	6207	不明	7.98 pg/ml	20 µl	ELISA
Tumor necrosis factor-α (TNF-α)	炎症	Salimetrics	受託解析	不明	0.106 pg/ml	200 µl	EIA
Uteroglobin	炎症	R&D Systems	DUGB00	不明	0.217 ng/ml	50 µl	ELISA
総タンパク	その他	Salimetrics	受託解析	不明	5 µg/ml	25 µl	EIA

エイコ：エイコサノイド、酸化ス：酸化ストレス、ストレス：ストレス、セカソン：セカソンドメッセジヤナー、ホルモ：ホルモン、メタボ：メタボリックシンドローム  
N/A：該当なし

Interleukin-6 および Tumor necrosis factor-α (TNF-α) は、炎症性サイトカインに属し、炎症カスケードの引き金を引く。Endothelin は血管収縮因子として知られている。Neopterin は免疫系の活性化を起し、悪性腫瘍、移植拒絶反応、ウイルス感染症において上昇する。Progranulin (GP-88) は TNF-α のシグナル伝達を遮断することによって関節炎を抑制し<sup>9)</sup>、Progranulin 血清中濃度と内臓肥満、血糖値上昇および脂質異常症との相関が明らかにされた<sup>10)</sup>。S100A7/Psoriasis は乾癬、アトピー性皮膚炎などの上皮炎症性疾患や菌状息肉腫のマーカーとして知られ、健康な上皮にも存在する物質である。大腸菌に対する生来免疫として防御的に働く。Uteroglobin は炎症誘発作用、リポ蛋白リパーゼA<sub>2</sub>阻害作用、好中球および単球走化作用などを示す。

#### 4) 外分泌物質

α-Amylase、Amylase α1、Lactoferrin、Matrix metalloproteinase-2、Matrix metalloproteinase-9、Secretory immunoglobulin A (sIgA) が含まれる。消化分解作用ないし粘膜局所防御作用(生来免疫)を有する生体物質である。Matrix metalloproteinase-2 および Matrix metalloproteinase-9 はいずれもゼラチナーゼ活性を有し、熱変性コラーゲンの抽出物であるゼラチンを分解する。

#### 5) メタボリックシンドローム関連物質

Adiponectin および Apolipoprotein AI が含まれる。前者は脂肪組織より産生されるアディポカインであり、末梢組織のインスリン感受性を高める。動脈硬化を予防することができるため、いわゆる善玉アディポカインと考えられている。後者は高比重リポ蛋白(いわゆる善玉コレステロール)のタンパク部分を構成するアポ蛋白である。Apolipoprotein AI が低下すると高比重リポ蛋白も低下する。

表2：フィルジェン株式会社から入手できるELISA/EIAのメーカー

供給メーカー名	参考となるフィルジェン株式会社のWeb
Antigenix America	<a href="http://www.filgen.jp/Product/Bioscience4/Antigenix/index.html#elisa">http://www.filgen.jp/Product/Bioscience4/Antigenix/index.html#elisa</a>
BioVendor	<a href="http://www.filgen.jp/Product/Bioscience4/BioVendor/index.html">http://www.filgen.jp/Product/Bioscience4/BioVendor/index.html</a>
Boster Biological Technology	<a href="http://www.filgen.jp/Product/Bioscience4/Boster/index.html#elisa">http://www.filgen.jp/Product/Bioscience4/Boster/index.html#elisa</a>
Calbiotech	<a href="http://www.filgen.jp/Product/Bioscience4/Calbiotech/index.html">http://www.filgen.jp/Product/Bioscience4/Calbiotech/index.html</a>
DiaMetra	<a href="http://www.filgen.jp/Product/Bioscience4/diametra/index.html">http://www.filgen.jp/Product/Bioscience4/diametra/index.html</a>
Exocell	<a href="http://www.filgen.jp/Product/Bioscience4/exocell/index.html">http://www.filgen.jp/Product/Bioscience4/exocell/index.html</a>
GenWay Biotech	<a href="http://www.filgen.jp/Product/Bioscience4/Genway/index.html#elisa">http://www.filgen.jp/Product/Bioscience4/Genway/index.html#elisa</a>
ID Labs	<a href="http://www.filgen.jp/Product/Bioscience4/ID_Labs/index.html#elisa">http://www.filgen.jp/Product/Bioscience4/ID_Labs/index.html#elisa</a>
InBios International	<a href="http://www.filgen.jp/Product/Bioscience4/InBios/index.html#elisa">http://www.filgen.jp/Product/Bioscience4/InBios/index.html#elisa</a>
Kamiya Biomedical Company	<a href="http://www.filgen.jp/Product/Bioscience4/Kamiya/index.html#ELISA">http://www.filgen.jp/Product/Bioscience4/Kamiya/index.html#ELISA</a>
MyBioSource	<a href="http://www.filgen.jp/Product/Bioscience4/MyBiosource/index.html#elisa">http://www.filgen.jp/Product/Bioscience4/MyBiosource/index.html#elisa</a>
Syd Labs	<a href="http://www.filgen.jp/Product/Bioscience4/syd%20labs/index.html#ELISA">http://www.filgen.jp/Product/Bioscience4/syd%20labs/index.html#ELISA</a>
U-CyTech Biosciences	<a href="http://www.filgen.jp/Product/Bioscience4/syd%20labs/index.html#ELISA">http://www.filgen.jp/Product/Bioscience4/syd%20labs/index.html#ELISA</a>
U-CyTech Biosciences	<a href="http://www.filgen.jp/Product/Bioscience4/U-CyTech/index.html">http://www.filgen.jp/Product/Bioscience4/U-CyTech/index.html</a>
Usn Life Science	<a href="http://www.filgen.jp/Product/Bioscience4/Usn/index.html">http://www.filgen.jp/Product/Bioscience4/Usn/index.html</a>
VIDIA	<a href="http://www.filgen.jp/Product/Bioscience4/VIDIA/index.html">http://www.filgen.jp/Product/Bioscience4/VIDIA/index.html</a>
Vircell	<a href="http://www.filgen.jp/Product/Bioscience4/Vircell/index.html#elisa">http://www.filgen.jp/Product/Bioscience4/Vircell/index.html#elisa</a>
Wuhan EIAab Science	<a href="http://www.filgen.jp/Product/Bioscience4/EIAab/index.html#ELISA">http://www.filgen.jp/Product/Bioscience4/EIAab/index.html#ELISA</a>

表3：フィルジェン株式会社でELISA受託解析を行っているバイオメーカーとバイオマーカー

R&D Systems
Pentraxin 3, Flt-1, Cyr61, PDGF-AA, Emmpirin, Amphiregulin, Angiotensin converting enzyme, IFN- $\alpha$ , Cathepsin B, Procathepsin B, E-Cadherin, Lipocalin-2/NGAL, Thrombospondin-1, Activin A, Angiopoietin-2, CXCL10, CXCL13/BLC/BCA-1, Cystatin B, Endostatin, LIGHT/TNFSF14, MIA, TIMP-1, TRAIL/TNFSF10, VEGF-C, Cystatin C, Galectin-1, Kallikrein 5, Galectin-9, Clusterin, Dipeptidyl-peptidase IV (DPPI/CD26), M-CSF, FOLR1, Apolipoprotein E, Myeloperoxidase, MFG-E8, RBP4, Angiopoietin-1, Mesothelin, Cortisol
Enzo Life Sciences (Assay Designs)
PGE2, TXB2, 6-keto PGF1 $\alpha$ , 17 $\beta$ -Estradiol, cGMP, Substance P, Testosterone, cAMP, PGF2 $\alpha$ high sensitivity, Cortisol, DHEA, Corticosterone, cAMP (complete), cGMP (complete), PGE2, DNA damage, PGE1, Progesterone, 15-deoxy- $\delta$ 12,14-PGJ2, LTB4, PGF2 $\alpha$ , Estriol, 13(S)-HODE
BioSource (Invitrogen)
IP-10
Usn Life Science
Amylase $\alpha$ 1, Basic salivary proline rich protein 1, Basic salivary proline rich protein 2



## 6) 環状ヌクレオチド

cAMPおよびcGMPはいずれも細胞内シグナル伝達においてセカンドメッセンジャーとして働く。cAMPの主な作用はタンパク質リン酸化酵素の活性化である。cGMPはプロテインキナーゼを活性化させる。

## 7) その他の物質

活性酸素によってDNAに損傷が生ずる。DNAの損傷は遺伝子変異や発癌を誘発する。活性酸素によるDNA損傷として有名なものが8-Hydroxyguanine (7,8-dihydro-8-oxoguanine, 8-OH-Gu)である。酸化的DNA損傷のバイオマーカーとして用いられる。Chromogranin Aは交感神経系の興奮によりアドレナリンとともに副腎髄質で産生される物質である。精神的ストレスのバイオマーカーとして用いられる。Brain-derived neurotrophic factorは神経細胞の成長を促進する物質として知られているが、歯の関連細胞や血管の増殖、分化を促進することが発見された<sup>11)</sup>。乳酸 (Lactate) は口腔内の細菌によって糖から産生され、齲歯の原因にもなる。Cotinineはニコチンの主代謝産物であるため、喫煙マーカーとして禁煙指導に利用できる。

表1にあげたバイオマーカー以外にも多種類のものが測定できる。フィルジェン株式会社 (<http://www.filgen.jp/>) を通じて、表2にあげた各社からELISAないしEIAキットを入手できる。これらの中にはヒト以外の生体物質や感染症原因菌の検査キットも含まれている。検体として唾液が使用可能かどうかを充分検討した上で、研究室レベルでも利用できる。また同社は、表3にあげた各社が供給するキットを使ったELISAの受託サービスも行っている (<http://www.filgen.jp/Product/Bioscience14-ELISA/index.htm>)。これらのサービスを利用すると、表3にあげた唾液中生体物質の測定が可能である。さらに、唾液が検体として使用可能かどうか不明であるが、フィルジェン株式会社ではRayBiotech、Phoenix

Pharmaceuticals、GE healthcare bioscience、GenWay Biotech、Wuhan EIAab Science、BioVendor、Boster Biotechnology、MyBioSourceおよびKamiya Biomedical Company社などのELISAキットを使用した受託解析も行っている。

フナコシ株式会社 (<http://www.funakoshi.co.jp/contents/4394>) でも唾液試料中バイオマーカーの受託測定サービスを実施しており、新規性には乏しいがAndrostenedione、DNA、Progesterone、Aldosterone、Estradiol、Secretory IgA (sIgA)、Chromogranin A、Estrinol、Serum IGF-1、Corticosterone-releasing hormone、Estrone、Testosterone、Cortisol、IL-1 $\beta$ 、Tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )、Cotinine、Interleukin-6 (IL-6)、総タンパク、C-reactive protein (CRP)、Melatonin、 $\alpha$ -Amylase、Dexamethasone、Neopterin、Transferrin (血液混入)、DHEA、Nerve growth factor (NGF)、DHEA-Sおよび17-hydroxyprogesteroneの測定が可能である。

## 9. 医学および看護学領域での測定例

唾液を検体としたイムノアッセイを用いた研究としては、虐待を受けた新生児でのCortisolの測定<sup>12)</sup>、小児がん患者でのIgAの測定<sup>13)</sup> および救急病棟看護師と病院事務員でのIgAの測定<sup>14)</sup> など、ストレスの程度を非侵襲的に調査したものがほとんどである。喫煙の影響を母児間で比較したCotinineの測定<sup>15)</sup> や化学療法による口内炎患者での炎症の程度をProstaglandin-E2 およびProstaglandin-I2を測定した研究<sup>16)</sup> は新しい着眼点の研究である。

## 10. おわりに

研究者が興味を持っているバイオマーカーを必ずしも測定できるとは限らないが、現在多種類のELISA/EIAキットが入手可能である。ホルモン、炎症関連物質、メタボリックシンドローム関連物

質および精神的ストレスを反映するChromogranin Aのようなバイオマーカーは、患者の病態把握に特に有用であり、フィジカルアセスメントと併せて実施することで患者の生活指導にも活用できるのではないかと考えられる。さらに、患者の病態把握のみならず被災住民の健康管理への応用も期待できる。労を惜しまないのであれば、抗体を入手して、着目したバイオマーカーのアッセイ系を研究者が独自に開発することも可能である。キット1個の価格は3万円から30万円程度と幅が広い。基準線を引き、1検体を3回測定すると考えると、1キットあたり30検体を測定できるため、1検体に要する費用は1,000円から10,000円かかる。

本文中に検査キット販売会社や解析受託会社の名称が含まれているが、これらの会社との利益相反は一切存在しない。本研究の遂行に当たり、災害看護グローバルリーダー養成プログラム(DNGL)学際プロジェクトからの助成を一部受けたことに対し、深謝いたします。

#### 参考文献

- 1) 菊池浩吉, 上出利光, 小野江和則編集: 医科免疫学 改訂第6版, 185-216, 中根明夫, 小熊恵二, 第8章 免疫検査とその原理, 南江堂, 2008.
- 2) 尾崎登喜雄編集: 口腔内科学, 45-50, 松尾龍二, 第1章 基礎-II 発生/遺伝子とその異常/唾液腺/味覚 3. 唾液分泌機構と唾液の組成, 飛鳥出版室, 2008.
- 3) 稲永清敏: 加齢による体液恒常性の変化と口腔乾燥症とのかかわり, 歯界展望, 100(1), 33-38, 2002.
- 4) 兼平 孝: 歯科における唾液検査, 日本口腔検査学会雑誌, 3(1), 13-20, 2011.
- 5) 三橋百合子, 植田伸夫: 唾液の成分(血清との比較), 帝京短期大学紀要, 17, 115-120, 2012.
- 6) Gregory S.J., Kaiser U.B.: Regulation of gonadotropins by inhibin and activin, *Seminars in Reproductive Medicine*, 22(3), 253-267, 2004.
- 7) Shiozaki M., Sakai R., Tabuchi M., Nakamura T., Sugino K., Sugino H., Eto Y.: Evidence for the participation of endogenous activin A/erythroid differentiation factor in the regulation of erythropoiesis, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89(5), 1553-1556, 1992.
- 8) Wozney J.M.: The bone morphogenetic protein family and osteogenesis, *Molecular Reproduction and Development*, 32(2), 160-167, 1992.
- 9) Tang W., Lu Y., Tian Q.Y., Zhang Y., Guo F.J., Liu G.Y., Syed N.M., Lai Y., Lin E.A., Kong L., Su J., Yin F., Ding A.H., Zanin-Zhorov A., Dustin M.L., Tao J., Craft J., Yin Z., Feng J.Q., Abramson S.B., Yu X.P., Liu C.J.: The growth factor progranulin binds to TNF receptors and is therapeutic against inflammatory arthritis in mice, *Science*, 332(6028), 427-428, 2011.
- 10) Youn B.S., Bang S.I., Klötting N., Park J.W., Lee N., Oh J.E., Pi K.B., Lee T.H., Ruschke K., Fasshauer M., Stumvoll M., Blüher M.: Serum progranulin concentrations may be associated with macrophage infiltration into omental adipose tissue, *Diabetes*, 58(3), 627-636, 2009.
- 11) Takeda K., Shiba H., Mizuno N., Hasegawa N., Mouri Y., Hirachi A., Yoshino H., Kawaguchi H., Kurihara H.: Brain-derived neurotrophic factor

- enhances periodontal tissue regeneration, *Tissue Engineering*, 11(9-10), 1618-1629, 2005.
- 12) Rice M.J., Records K.: Comparative analysis of physiological adaptation of neonates of abused and nonabused mothers, *Journal of Forensic Nursing*, 4 (2), 80-90, 2008.
- 13) Dowling J.S., Hockenberry M., Gregory R.L.: Sense of humor, childhood cancer stressors, and outcomes of psychosocial adjustment, immune function, and infection, *Journal of Pediatric Oncology Nursing*, 20(6), 271-292, 2003.
- 14) Golshiri P., Pourabdian S., Najimi A., Zadeh H.M., Hasheminia J.: Job stress and its relationship with the level of secretory IgA in saliva: a comparison between nurses working in emergency wards and hospital clerks, *Journal of the Pakistan Medical Association*, 62 (3 Suppl 2), S26-30, 2012.
- 15) Kubo S., Adachi K., Nagasaka K., Komagata K., Okubo S.: Effect of passive smoking using maternal and neonatal salivary cotinine measurements, *Nursing Research*, 61(2), 140-144, 2012.
- 16) Lalla R.V., Pilbeam C.C., Walsh S.J., Sonis S.T., Keefe D.M., Peterson D.E.: Role of the cyclooxygenase pathway in chemotherapy-induced oral mucositis: a pilot study, *Supportive Care in Cancer*, 18(1), 95-103, 2010.