原 著 論 文

混合唾液成分の健常者および糖尿病患者における キャピラリー電気泳動法による分析

椎名 幸恵

Analysis of the Composition of Mixed Saliva in Healthy Subjects and Diabetic Patients by Capillary Electrophoresis

Yukie Shiina

Abstract: The quality of saliva is an important factor in the retention and stability of the denture. Recently, the composition of mixed saliva was analyzed by capillary electrophoresis, which permits various analysis depending on the selection of the electrophoretic condition. First, electrophoretic conditions were evaluated, then properties of mixed saliva were studied according to age, and components that show more notable changes with aging were identified. Differences in the composition of mixed saliva between healthy subjects and diabetic patients aged 60 years and above were also analyzed.

Mixed saliva was sampled from 34 healthy subjects, 8 aged 10 years or less, 10 in their 20s, 10 in their 30s, and 6 aged 60 years and above. Mixed saliva was sampled also from 17 patients with diabetes mellitus, which was insulin dependent in 11 and non-insulin dependent in 6.

Thirty-two peaks were detected in mixed saliva. The frequency of the appearance of peaks showed no male-female difference, but there were some differences according to age. The concentrations of the peaks were lower in the diabetic patients than in the healthy subjects of the same age level. Of the 32 peaks, those of lysozyme and lactoferrin, which are related to the antibacterial activity, and uric acid, whose serum concentration is altered in diabetic patients, were identified.

The lactoferrin did not appear in mixed saliva of 60 years and above healthy subjects using denture, but it appeared in mixed saliva of diabetic patients with low frequency of appearance and low concentration.

The concentration of lysozyme and uric acid were slightly higher in the healthy subjects with age, although the differences were not significant.

Key words: mixed saliva, capillary electrophoresis, lysozyme, lactoferrin, uric acid, diabetes

I. 緒 言

近年、生活環境の大きな変貌により、平均寿命が著しく延長し、それとともに糖尿病人口は急激な増加をもたらす、生活習慣病といわれるようになった。糖尿病患者は血

糖値が高いため、全身の組織の抵抗力の低下に伴い、唾液中の抗菌、殺菌作用も低下するため歯周組織に炎症が生じ、最終的には歯槽骨の吸収、歯の喪失につながる¹⁾。一方、血糖値が高くなると唾液の分泌量が減少し、義歯床の維持安定に影響を与え、また口腔内に自浄作用を低下させ、床下粘膜組織に炎症が生じやすくなる。

当教室では、唾液中に含まれているタンパク質成分と粘度との関係を一次元電気泳動法を用いての分析²⁻¹²⁾および、二次元ポリアクリルアミドゲル電気泳動法による分析¹³⁻¹⁵⁾を行ってきた。近年、泳動液を選択すること

昭和大学歯学部第三歯科補綴学教室 (主任: 芝 燦彦教授)
The Third Department of Prosthodontics, Showa University
School of Dentistry (Chief: Prof. Akihiko Shiba)
平成 11 年 3 月 26 日受付

によって多種多様な分析が可能であるキャピラリー電気泳動が開発された。このキャピラリー電気泳動法は、従来の支持体を用いる電気泳動に比べ、ゲルの調整や泳動後の検出の手順が簡便で、また少量の試料で済み、なおかつ再現性が良く、特に操作性に優れているといわれている¹⁶⁾。特に遺伝子解析等の分野で使われており、また尿タンパクの測定にも用いられている¹⁷⁾。キャピラリー電気泳動で測定に要する時間は15分である。したがって、糖尿病患者が歯科治療に来院した際、まず唾液を採取し、唾液成分から全身状態の把握をすることとともに、口腔内の状態をもデータから解読できれば的確な治療方針を立案できるということを念頭においた。しかしながら、今日まで唾液をキャピラリー電気泳動法で成分分析したという報告は皆無である。そして生化学的見地から検討する目的で、特に抗菌作用を持つリゾチーム、ラクトフェリン^{18,19)}、そして糖尿病患者で変動するといわれている尿酸を同定し、その変動についても分析したので報告する。

II. 材料と方法

1. 材料

<実験1>

検体は10歳以下8名、20歳代10名、30歳代10名、60歳以上6名、計34名の健常者の混合唾液を用いた。採取時間はいずれも昼食前とし、唾液採取前処置として水道水で洗口した後、ディスポーザブルピペットにて吸引する吸引法²⁰⁾により無刺激下で1ml採取した。なお、60歳以上の健常者は義歯装着者である。

<実験2>

リゾチーム、ラクトフェリンはシグマ社製、そして尿酸は和光純薬工業社製を用いた。また同定のための標準液と混ぜた混合唾液は、20歳代1名から実験1と同様な方法で採取した。

<実験3>

昭和大学病院内科を受診し、同意が得られたインスリン依存性糖尿病患者 (IDDM) 10名、非インスリン依存性糖尿病患者 (NIDDM) 8名から実験1と同様な方法で混合唾液を採取した。糖尿病患者における平均年齢は、 61.6 ± 8.75 歳 (41~74歳)、そのうち男性は9名で 64.89 ± 7.42 歳 (52~74歳)、女性は9名で 58.0 ± 8.85 歳 (41~69歳) である。

2. 混合唾液の前処理法

唾液の前処理として1ml採取した混合唾液を直ちに凍結乾燥をし、その後100 μ lの蒸留水で溶解した。溶解後、ウルトラフリーC3CLの孔径0.5 μ mのフィルター (MILLPORE 社製) を用い、5,000回転、20分間遠心濾過した。

3. 電気泳動法

1) 装置および器具

キャピラリー電気泳動装置には、Bio Focus Automated 3000 Capillary 電気泳動システム (Bio Rad 社製) を使用した。得られたエレクトロフェログラムは付属の Bio Focus Software (Bio Rad 社製) にて解析を行った。

混合唾液濾過用として、ウルトラフリーC3CLの孔径0.5 μ mのフィルター (MILLPORE 社製) を用いた。

2) 条件および試薬

キャピラリーは、uncoted capillary (24 cm $\times$ 50 μ m) を用いた。試料の注入は pressure injection 40 psi/sec で行い、泳動は陰極から陽極とした。測定中のカートリッジおよびカローセル温度は20°Cとし、15 kvの定電圧で (電圧18 μ A $\times$ 24 cm)、15分間泳動した。検出波長は220 nmを採用した。キャピラリーの測定開始と各検体間の洗浄法は、0.1 M NaOH で90秒、0.1 M HCl で60秒、CE-SDS Protein Run Buffer (Bio Rad 社製) で120秒、CE-SDS Protein Sample Buffer (Bio Rad 社製) で2回行った。

試薬には ① Run Buffer として Capillary Electrophoresis (CE)-SDS Protein Run Buffer pH 8.4, ② Internal Reference として1 mg/ml benzoic acid, ③ Sample Buffer として1% SDSを含む、100 mM Tris HCl pH 9.2, ④ Protein Size Standard (分子量マーカー) として Capillary Electrophoresis (CE)-SDS Protein Kit を用いた。⑤ 泳動用の分子量マーカーは試薬②を10 μ l, ③を100 μ l, ④の試薬10 μ l に対し蒸留水80 μ lを加え、全量200 μ lに調製した。

各検体および泳動用分子量マーカーはともにキャピラリー専用のマイクロチューブに移し、脱気のためさらに2,500回転、6分間遠心して用いた。

III. 結 果

1. 基礎的検討

1) 試料注入法

試料の注入法には Pressure injection と Electrophoretic injection の2方法がある。そこで Pressure injection について20, 40, 60 psi/sec と3条件、また Electrophoretic injection については10, 15, 20秒の3条件について分子量マーカーを用いて比較検討した。Pressure injection についてみると、20 psi/sec ではピークの出現は認められず、40 psi/sec では9つのピークが明確に出現した。一方、60 psi/sec にするとピークはほとんどみられなかった。Electrophoretic injection については、10秒ではピークがいずれも低かったが、15秒では9つのピークは明確に出現した。20秒でもピークは明確に分画されたが、ピークの高さが低かった。これらのことから、Pressure injection では40 psi/sec、Electrophoretic injection では

図 1

a~f: Effect of electropherograms of Bio-Rad's protein molecular size standard in different sample injection

a~c: Pressure injection; d~f: Electrophoretic injection

注入方法の違いにおける分子量マーカーのエレクトロフェログラム

図 2 Effect of electropherograms of Bio-Rad's protein molecular size standard in different wavelength

波長の違いにおける分子量マーカーのエレクトロフェログラム

15 秒の条件が良いことがわかったが、両者を比べると Pressure injection の 40 psi/sec のほうが分子量マーカーの 2 から 9 つのピークが若干高かったため、試料の注入法には Pressure injection の 40 psi/sec の条件を採用することにした (図 1)。

2) 測定波長

200 から 320 nm の波長範囲で 10 nm ごとに同時に測定し、ピークの検出により至適測定波長を検討した。試料には分子量マーカーを用いた。波長が可視部側に近づくに従ってピークが小さくなり、280 nm ではピークがやっと検出できるほどであった。一方、200 nm の波長が最も感

度良好であったが、ベースラインは最も不安定であった。ベースラインが最も安定し、かつピークの検出感度が良好である波長は 220 nm だったので、この波長を採用した (図 2)。

3) 検量線

試料注入法を pressure injection 40 psi/sec、測定波長を 220 nm を用いて移動時間と分子量との関係をみた (図 3)。分子量マーカー (protein size standard) には 8 種の分子量既知タンパクが含まれているが、図 3 のごとくピーク 2 の分子量 14,400 Da のリゾチームからピーク 9 の分子量 200,000 Da のミオシンまでが鮮明に分離された。また図 3 には、分離時 (Migration time; MT) の再現性も合わせて示した。2 回泳動しても 2 つのパターンの移動度に差異が認められなかったことから、再現性が良好であることがわかった。さらに、再現性を高める目的で分子量マーカーのなかにピーク 1 で示した Benzoic acid が reference internal standard として入れてある。移動度と分子量の関係を求めたところ、図 4 に示したごとくきれいな直線性が得られ、両者の間には 0.993 の良好な相関関係が認められた。

4) 濃縮方法

はじめ混合唾液を未処理のまま試料とすることにしたが、粘性があるため、0.5 μ m のフィルターを通して濾過しても完全に濾過しきれず、極々少量のサンプルしか採

図 3 Electropherograms of Bio-Rad's protein molecular size standard

2 回泳動したときの分子量マーカーによるエレクトロフェログラム

1. Benzoic acid (Reference Standard), 2. Lysozyme (14,400 Da), 3. Trypsin inhibitor (21,500 Da), 4. Carbonic anhydrase (31,000 Da), 5. Ovalbumin (45,000 Da), 6. Serum albumin (66,200 Da), 7. Phosphorylase B (97,000 Da), 8. β -Galactosidase (116,000 Da), 9. Myosin (200,000 Da)

なかった。そのためピークの出現をとらえることが困難であった。また不純物が完全に濾過されないため、キャピラリー管の詰まりや汚れの原因にもなりやすかった。そこで唾液を濃縮し、かつ夾雑物を完全に除去する方法を検索した。濃縮方法として凍結乾燥と遠心エバポレーターによる乾燥とを比較検討した結果、凍結乾燥のほうが唾液のピークおよびベースラインが安定し、鮮明なピークが検出されることがわかった。この方法により唾液は10倍に濃縮することができた。フィルターは、ウルトラフリーC3GVの孔径 $0.22\mu\text{m}$ とウルトラフリーC3CLの孔径 $0.5\mu\text{m}$ を用いて比較したところ、夾雑物の除去にはウルトラフリーC3CLの孔径 $0.5\mu\text{m}$ のフィルターが適していた。

2. 臨床的検討

1) 健常者の混合唾液のエレクトロフェログラム

10歳以下8名、20歳代10名、30歳代10名、60歳以上6名の計34例の混合唾液について泳動を行った。図5に男性および女性で各年代の代表的なエレクトロフェログラムを示した。エレクトロフェログラムのパターンでは性差、年齢差には特に大きな違いは認められず、どのエレクトロフェログラムでも主たるピークが約15前後出現した。その34例の全例について出現したピークを移動時間から分類したところ、32のピークが認められた(表1)。そこで、移動時間の短いものから便宜的に番号を付けた。表1のごとくピーク1は1.45分であり、ピーク32は13.87分であった。既知分子量から分子量を求めたところピーク

図 4 Relationship between molecular weight and migration time

分子量と移動度の相関関係

20が16,700 Daで、ピーク32が264,800 Daであった。ピーク19以下は分子量16,000 Da以下の低分子であった。全症例を合わせると32のピークが出現するが、すべての症例において32のピークが出現するとは限らなかった。そこで、ピークの出現頻度パーセントを算出した(図6)。1から32のピークについて出現頻度を各年代ごとにみると10歳以下、20歳代、30歳代および60歳以上の各年代に共通して100%出現するのは、ピーク1と8の2つのピークであった。20歳代、30歳代では特に大きな差異は認められず、ほぼ同様の出現頻度が認められた。10歳以下では他の年代に対してピーク9、18の出現がみられず、ピーク16またピーク28から32ではいずれも出現頻度が低い傾向にあることが認められた。義歯床使用者60歳以上での特徴をみると、ピーク1と8のほかピーク12、13、14、21、27、32での出現頻度が高いことが注目された。また3~7、17、26のピークは全く出現しなかった。

次に、32のピークのうちどのピークが高濃度に出現するかみた。濃度の求め方には、高さで求める場合と面積で求める場合があり、これらはいずれも相対比でみる方法である。各ピークの高さで求めた場合の濃度パーセントをみたところ、どの年代でも高濃度に出現するピークは1で、次いで8であった。ピーク1はいずれも20%以上を示し、ピーク8は15%前後であった。60歳以上では他の年代と比較してピーク1以外は全体的に低い傾向を示した(図7)。

同様に、面積で求めた場合の濃度パーセントについてみたところ、高濃度に出現するピークは1で、次いで8、25であった。10歳以下ではピーク1よりもピーク27が、また30歳代ではピーク12が高濃度に出現した。60歳以上では32のピークのうちピーク1は25%以上出現し、他のピークはすべて10%前後であった(図8)。60歳以上では

図 5

A, B : Electropherograms of typical mixed saliva in healthy subjects in different generation and sex
年齢と性別の違いによる健常者の代表的な混合唾液のエレクトロフェログラム

表 1 Appeared peak in mixed saliva of healthy subjects
健常者の混合唾液による出現ピーク

peak No.	migration time (min)	peak No.	migration time (min)	presumed molecular weight (KD)
1	1.45	17	6.14	
2	1.46	18	6.21	
3	3.24	19	6.34	
4	3.65	20	6.47	16.7
5	3.79	21	6.64	22.5
6	4.08	22	6.77	26.7
7	4.23	23	6.95	33.0
8	4.59	24	7.14	39.1
9	4.82	25	7.22	41.8
10	5.24	26	7.82	62.1
11	5.41	27	8.19	74.3
12	5.69	28	8.71	91.7
13	5.84	29	9.07	103.9
14	5.91	30	10.59	154.6
15	5.93	31	12.15	207.0
16	6.06	32	13.87	264.8

図 6 The frequency of appearance of each peak in mixed saliva of healthy subjects
健康者の混合唾液における各ピークの頻度パーセント

図 7 The concentration percentage of each peak was calculated from high of peak
各ピークの高さから求めた場合の濃度パーセント

図 8 The concentration percentage of each peak was calculated from area of peak
各ピークの面積から求めた場合の濃度パーセント

図 9

a~b : Electropherograms of lysozyme

a : 95 mg/dl lysozyme standard solution, b : 190 mg/dl lysozyme standard solution, c : mixed saliva,

d : mixed saliva added lysozyme (mixed saliva : 380 mg/dl lysozyme standard solution = 1 : 1)

リゾチームのエレクトロフェログラム

図 10 Relationship between high of peak and concentration of lysozyme

リゾチームの濃度とピークの高さの相関関係

高さおよび面積で求めた場合の濃度パーセントは、いずれの場合においてもピーク 3~7 が全く出現しなかった。したがって、高さでも面積で求めてもほぼ同じ傾向であったので、ピークをとらえやすいということから、高さで求めることにした。

2) 唾液中のリゾチーム、ラクトフェリン、尿酸

(1) 同定

リゾチームについては、リン酸緩衝液 (pH 6.6) を用いて 47.5, 95, 190 そして 380 mg/dl の濃度のものを調製した。3.45 分付近のピークは internal standard として用いた benzoic acid である。リゾチーム標準液のみで泳動すると移動時間 5.09 分にピークが出現した。リゾチームを混合唾液と 1 : 1 に混合したところ移動時間は 5.25 分のピークが高値になった (図 9)。混合唾液の 32 のピーク

のうちリゾチームはピーク 10 に相当した。4 濃度のリゾチームを用いてリゾチーム濃度とピークの高さの相関関係を図 10 に示した。4 濃度のリゾチームとピークの高さの間には 0.998 と良好な相関が得られた。

ラクトフェリンについてリン酸緩衝液 (pH 6.6) を用いて 12.5, 25, 50, 100 そして 200 mg/dl の 5 濃度のものを調製した。標準液のみで泳動すると移動時間 8.46 分にピークが出現し、200 mg/dl 濃度のラクトフェリンを混合唾液と 1 : 1 に混合したところ移動時間は 8.62 分であった (図 11)。混合唾液の 32 のピークのうちラクトフェリンはピーク 28 に相当した。5 濃度のラクトフェリンを用いて、ラクトフェリン濃度とピークの高さの相関関係を図 12 に示した。5 濃度のラクトフェリンとピークの高さの間には 0.993 の良好な相関が得られた。

尿酸について炭酸リチウム液 (60 mg/dl) を用いて、12.5, 25, 50 そして 100 mg/dl の濃度のものを調製した。標準液のみで泳動すると移動時間 4.51 分であった。100 mg/dl の尿酸を混合唾液に 1 : 1 に混合したところ、移動時間は 4.61 分のところにピークがみられた (図 13)。混合唾液の 32 のピークのうち尿酸はピーク 8 に相当した。4 濃度の尿酸を用いて尿酸濃度とピークの高さの相関関係を図 14 に示した。5 濃度の尿酸とピークの高さの間には 0.994 の良好な相関が得られた。

(2) リゾチーム、ラクトフェリン、尿酸濃度の年代による相違

リゾチームではピーク 10、ラクトフェリンはピーク 8、

図 11

a~d: Electropherograms of lactoferrin

a: 50 mg/dl lactoferrin standard solution, b: 100 mg/dl lactoferrin standard solution, c: mixed saliva,

d: mixed saliva added lactoferrin (mixed saliva: 200 mg/dl lactoferrin standard solution=1:1)

ラクトフェリンのエレクトロフェログラム

図 12 Relationship between high of peak and concentration of lactoferrin

ラクトフェリンの濃度とピークの高さの相関関係

尿酸はピーク 28 であることを同定したので、リゾチーム、ラクトフェリン、尿酸濃度について各年代による比較を行った。

リゾチームは、10 歳以下では 39.29 ± 9.51 mg/dl (平均値 $\pm$ 標準偏差)、20 歳代では 144.12 ± 144.72 mg/dl、30 歳代では 88.22 ± 79.13 mg/dl、60 歳以上では 84.99 ± 98.65 mg/dl であり、20 歳代が最も高値で 30 歳代、60 歳以上の順で 10 歳以下が他の年代に比べ低濃度であったが、統計学的には有意差は認められなかった。これは同年代でかなり個人差があると考えられた。

ラクトフェリンは 10 歳以下では 8 名中 1 名、20 歳代および 30 歳代ではそれぞれ 10 名中 3 名にしかピークの出現が認められなかった。また、60 歳以上では全例で各ピークの出現が認められなかった。ラクトフェリン濃度では、

10 歳以下では 1 例で 16.83 mg/dl、20 歳代では 34.93 ± 15.32 mg/dl、30 歳代では 8.83 ± 3.81 mg/dl という結果から、20 歳代と 30 歳代を比較すると >0.05 で有意差が認められた。

尿酸濃度では 20 歳代のほうが高値であることがわかった。10 歳以下では 5.04 ± 4.31 mg/dl、20 歳代では 19.6 ± 8.41 mg/dl、30 歳代では 4.31 ± 5.14 mg/dl、60 歳以上では 6.20 ± 7.31 mg/dl であった。20 歳代での尿酸濃度は著しく、いずれの年代とも >0.05 で有意に高値であった。

(3) 糖尿病患者の唾液の分析

健常人と糖尿病患者のエレクトロフェログラムを図 15 に示した。健常人に関しては糖尿病患者と年齢がマッチした義歯床を装着している 60 歳以上をコントロールとした。糖尿病患者を IDDM と NIDDM に分けて、まず出現頻度をみた (図 16)。コントロールである 60 歳以上と出現頻度を比較してみると、NIDDM では出現するピークが多く、50% の出現頻度を示したピークは 15 本と全体の 46.9% を占めた。一方、IDDM では全体的にばらつきがみられ、50% 以上の出現頻度のピークは 6 本と全体の 18.9% とかなり低かった。糖尿病患者での特徴は、健常者ではみられないピーク 3 から 7 のピークが出現したことであった。IDDM と NIDDM と健常者に共通するのはピーク 1, 8 で健常者および糖尿病患者でも 100% 出現した。

次に、高さから各ピークの濃度についてみた (図 17)。

図 13

a~d : Electropherograms of uric acid

a : 50 mg/dl uric acid standard solution, b : 100 mg/dl uric acid standard solution, c : mixed saliva,

d : mixed saliva added uric acid (mixed saliva : 200 mg/dl uric acid standard solution = 1 : 1)

尿酸のエレクトロフェログラム

図 14 Relationship between high of peak and concentration of uric acid

尿酸の濃度とピークの高さの相関関係

10%以上の濃度を示したのはNIDDMおよびIDDMともに共通するのはピーク1と8で、これは健常者と同じであった。60歳以上の健常者には出現しないピーク3~7は糖尿病患者で出現したが、その濃度は5%以下であった。

次に同定をした3種類の成分の濃度についてみた。ピーク10のリゾチームは、60歳以上では 84.99 ± 98.65 mg/dlに対し、NIDDMでは 93.26 ± 69.66 mg/dl、IDDMでは 52.86 ± 32.04 mg/dlでIDDMが平均値において低値を示したが、統計学的に有意差は認められなかった。ピーク28であるラクトフェリンは、健常者60歳以上ではピークが全く出現しなかったが、IDDMでは75%、NIDDMでは70%に出現した。ラクトフェリン濃度では、IDDMが 39.80 ± 37.57 mg/dl、NIDDMが 34.81 ± 25.84 mg/dlで有意差は認められなかった。

次に、ピーク8の尿酸についてみた。60歳以上を比較すると、60歳以上の健常者は 6.20 ± 7.31 mg/dl、IDDMは 2.76 ± 3.73 mg/dl、NIDDMは 2.54 ± 3.42 mg/dlで健常者に比べ、いずれも低値であった。ただし、統計学的分析には有意差は認められなかった。

IV. 考 察

唾液成分を分析することで加齢による唾液の変化を知ることができ、また唾液と全身疾患を早期に診断することが可能となると考えている。その分析手段として、近年キャピラリー電気泳動法が注目されている。キャピラリー電気泳動法の利点は、支持体を用いる電気泳動法とは異なり、泳動後の染色、脱色、デンストメトリーという操作が一切必要ないこと、そしてさらに大きな特徴は、タンパク分析と同時に低分子物質をも測定できることである。これは他の電気泳動が有していない特徴である。

キャピラリー電気泳動とはきわめて細いガラス管製の細管中で、一定の電場を与えることにより、溶液中の荷電粒子分離する方法であり、Mohammadら²¹⁾は通常分離分析に用いられているSDS-PAGEは、SDSとタンパクの種々のペプチドがコンプレックスを作るため移動度が変化し、正確な分子サイズが得られないとしてキャピラリー電気泳動を推奨している。キャピラリー電気泳動は体液成分として血清や尿タンパクの分析^{22,23)}、血清中の薬剤や内因性の低分子物質の測定^{24,25)}、糖尿病患者の尿中の成分分

図 15

A, B : Comparison of electropherogram of typical mixed saliva of healthy subjects and diabetic patient

A : healthy subjects, B : diabetic patient, (a) uric acid, (b) lysozyme

健康者と糖尿病患者の混合唾液の代表的なエレクトロフェログラム

図 16 The frequency of appearance of each peak in mixed saliva of diabetic patient and healthy subjects
糖尿病患者の混合唾液の頻度パーセント

析¹⁷⁾に用いられているが、唾液成分を分析した報告はない。そこで、本研究では唾液分析のための測定上の条件をまず検討した。

キャピラリー管は内径 50 μm ときわめて細い。唾液のように粘性が強く、各種成分濃度が低濃度で種々の夾雑物が混在しているものを分析する場合には前処理に十分な注意を払わなければならない。

本研究では予備実験の結果、前処理には混合唾液を凍結乾燥をし、1/10 量の蒸留水で溶解したのち濾過用フィルターにはウルトラフリー-C 3 CL の孔系 0.5 μm のフィルターを用いて遠心濾過する方法が一番良いことがわかつ

た。またその操作により 10 倍濃縮が可能となった。キャピラリー電気泳動法におけるピークの移動度は、電場の強さやキャピラリー内壁と泳動間のゼータ電位、泳動液の粘性率、泳動液の誘電率、試料の成分のサイズと形状などによって決められるが、これらの因子はいずれもキャピラリー温度により影響されるので、再現性の良い移動度を得るためにはキャピラリー温度を一定に保つ必要がある。そこで本実験では、20°C に保持した。また、キャピラリー電気泳動ではタンパク質がキャピラリー管の内壁に付着することが問題となる。キャピラリー管の十分な洗浄が重要な課題となる。そこで本研究では 4 つのステップを用いる

図 17 The concentration percentage of each peak was calculated from high peak in mixed saliva of diabetic patient

糖尿病患者と健常者における各ピークの高さから求めた濃度パーセント

洗浄法を確立した。その結果、キャピラリー管における唾液成分の付着に関する問題は解決された。

試料の注入方法には Pressure injection と Electrophoretic injection がある。Pressure injection はキャピラリーの一端を試料溶液につけ、これに陽圧をかけることにより試料を導入することができ、試料の成分を均等に注入するのに適した方法である。一方、Electrophoretic injection はキャピラリーの一端を試料につけ、この試料溶液に電極を挿入して対極との間に高電圧をかけると成分イオンは電気浸透流と電気泳動の両効果によりキャピラリー内に注入される。試料成分の電荷や分子サイズの違いにより注入される成分の量的関係が試料中の成分の関係と異なるという問題点があるが、簡便な注入法として評価されている。分子量マーカーを泳動したところ、Pressure injection 40 psi/sec のほうが Electrophoretic injection 15 秒よりもピークの高さが若干上回っていたので、本実験では Pressure injection 40 psi/sec を採用した。これは混合唾液がキャピラリー管内に均等に注入されたためと考えられる。

唾液の採取時間による変動をみるため朝、昼、夕のいずれも食前に採取した混合唾液を泳動したところ、高いピークを示したのが昼食前の時間帯であった。そこで、この時間帯の混合唾液を用いることにした。また、混合唾液の採取は、10 歳以下、20 歳代、30 歳代と比較して 60 歳以上のほうが要した時間は長かった。このことから、加齢とともに唾液の分泌量が減少しているように観察された。本実験での唾液分泌の減少は、唾液の性状の変化につながる。義歯床の維持安定は当教室一連の研究により、80 万以上の高分子タンパク質が大きく関与していることを報告してきている。この唾液の分泌量の減少により、80 万以上の高分子タンパク質がどのように変化するかは今後の検討課

題となるが、義歯床の維持安定に何らかの影響を及ぼすことが推測される。加齢に伴い顎下腺から唾液分泌量はわずかずながら確実に減少しているという報告²⁶⁾、一方、全唾液量あるいは耳下腺唾液量は減少していないという報告²⁷⁾もある。この点に関しても今後詳細に検討する必要がある。また 60 歳以上では、健常者よりも糖尿病患者のほうが採取時間を必要とした。これは、糖尿病患者の高血糖状態により生じる多尿からの脱水が原因であると考えられた。

筆者が設定した条件で電気泳動したところ、混合唾液では 32 のピークが得られた。10 歳以下、20 歳代、30 歳代、60 歳以上の混合唾液におけるピークの出現頻度と濃度パーセントは 20 歳代、30 歳代ではあまり変化が認められなかったが、60 歳以上では 20 歳代、30 歳代と比較するとその出現頻度、濃度パーセントに差異が認められた。また混合唾液の 32 のピークの分子量はすべて 264,800 Da より低分子で、さらにピーク 19 以下は 16,000 Da 以下の低分子であったが、60 歳以上の高齢者には低分子のピーク 3～7 が検出されなかった。このことは、高齢者において耳下腺での腺房細胞の萎縮、間質での脂肪組織の増殖、また顎下腺での小葉の脂肪組織の出現による漿液性唾液の減少によるものと考えられた。

糖尿病は、糖や脂肪代謝の異常に伴い全身の血管壁と同様に歯周組織の血管壁にも退行性の病変や基底膜の肥厚が生じ、歯周組織への栄養補給、酵素の拡散の低下、代謝老廃物の排出困難を招き、歯周疾患が悪化すると考えられている。またコントロールされていない糖尿病患者では、唾液流出量が著しく減少し、一般的に口腔内感染症に罹患しやすくなる。また、一方可撤性部分床義歯装着後の外傷に対する組織耐性が減少し、粘膜の充血と腫脹口蓋部では灼熱感も生じやすくなる。さらに骨耐性も低下し、急速な骨

吸収が生じるといわれていることから、糖尿病患者に対する補綴処置では義歯床縁の長さ、咬合関係は正常者と比較して特に注意をする必要がある。リゾチームとラクトフェリンは唾液中の重要な抗菌物質であり、歯肉炎、歯周炎の患者では、唾液中のリゾチーム、ラクトフェリンの活性が健常者と比較して低下するといわれている。リゾチームは唾液内の主要な抗菌物質として、細菌細胞壁のペプチドグリカンの β 1-4グリコシド結合の加水分解を触媒し²⁸⁾、細胞壁の損傷をもたらし、過酸化水素とアスコルビン酸もしくは界面活性剤や塩類の存在下で溶菌を起こすとされ、口腔内での感染防御機構に関連しているだけでなく、口腔内の細菌叢の成立にも影響を与える作用をもっている。またラクトフェリンは抗菌活動性をもち²⁸⁾、急性炎症の際には合成量が高まり、リゾチーム、IgA および抗生物質と抗菌作用に関し、相乗作用をもつ。そして唾液中の鉄の結合したタンパク質である好気性菌に鉄を与えないことで口腔内での防御の機構を有している。また尿酸は糖尿病患者が低尿酸血症を示すことが報告されている^{29,30)}。そこで本研究では、3種類の成分であるリゾチーム、ラクトフェリン、尿酸の同定を行った。その結果、リゾチームのピークは10、ラクトフェリンのピークは28、尿酸のピークは8に相当することが判明した。年代による比較ではリゾチームが10歳以下の年代が、他の年代と比較して低値を、尿酸では20歳代が他の年代と比較して高値を示した。これらの結果については今後検討する必要がある。ラクトフェリンは10歳以下では1名、20歳代で3名、30歳代で3名しかピークが出現せず、60歳以上ではすべて認められなかった。これは混合唾液中のラクトフェリンの濃度が低いことに起因していると考えられる。今後、検出濃度を上昇させる必要がある。

リゾチームは健常者が高値で、次いでNIDDM、IDDMの順であった。この結果は、IDDMの口腔内の抗菌作用の低下が生じることが予測される。ラクトフェリンでは60歳以上の健常人では検出できないのに対し、糖尿病患者では濃度がIDDMで 39.80 ± 37.57 mg/dl、NIDDMで 34.81 ± 25.84 mg/dlを示した。ハムスターを用いた糖尿病モデルではラクトフェリン、リゾチームなどの唾液内抗菌作用が減少するとの報告³¹⁾とは異なる結果であった。本研究で協力してくれた糖尿病患者は薬を投与され、常用していることが原因とも考えられるが、今後検討する必要がある。また尿酸ではIDDMとNIDDMと健常者を比較すると、統計学的分析では有意差は認められないが、IDDMとNIDDMのほうが健常者よりも若干低値を示した。このことは、糖尿病が低尿酸血症と相関があることを示している。

今後さらなる同定を行う必要があるが、キャピラリー電気泳動法は混合唾液の成分分析手段としては有用なものであり、糖尿病患者などの全身疾患の病態の診断を行うこと

も可能であることが示唆された。

V. 結 論

キャピラリー電気泳動による健常者と糖尿病患者の混合唾液の性状を調べるために年代に分け、健常者および糖尿病患者の分析と混合唾液に含まれているリゾチーム、ラクトフェリンそして尿酸のピークの同定についての研究を行い、以下の結論を得た。

1. キャピラリー電気泳動法により混合唾液では、移動度の少ないものから便宜上、番号を付け、混合唾液では32のピークが検出された。

2. 10歳以下、20歳代、30歳代、60歳以上の各年代の性差による違いは認められなかった。そこで各ピークの出現頻度パーセントを算出した。その結果、義歯床の維持安定に関しては、対象となる60歳以上での特徴をみるとピーク12、13、14、21、27、32での出現頻度が高いことが注目された。各ピークにおける高さおよび面積で求める場合の濃度パーセントについては、60歳以上では他の年代と比較してピーク1以外は全体的に低い傾向を示した。

3. 同定したリゾチーム、ラクトフェリン、尿酸のピークは混合唾液の32のピークのうちリゾチームはピーク10、ラクトフェリンはピーク28、尿酸はピーク8と同定したリゾチーム、ラクトフェリン、尿酸では濃度と吸光度の間に有意な正の相関が得られた。相関図よりそれぞれの濃度を算出できることが示唆された。

4. 糖尿病患者をIDDMとNIDDMに分け、60歳以上の健常者と比較すると、リゾチームにおいてはIDDMで低値を示したが、統計学的に有意差は認められなかった。またラクトフェリンでは60歳以上の健常者では、全く出現しなかったがIDDMとNIDDMは出現頻度がそれぞれ70%と75%となり、また濃度は約30 mg/dl程度であった。尿酸では、IDDMとNIDDMのほうが60歳以上の健常者よりも低値であったが、有意差は認められなかった。

稿を終えるにあたり、ご協力頂きました被験者の皆様に心から感謝の意を表します。また本研究のご指導、ご校閲を賜りました昭和大学歯学部第三歯科補綴学教室、芝 燾彦教授に深謝いたします。さらに本研究の遂行に際し、終始懇切なるご指導、ご校閲を賜りました東京医科歯科大学医学部保健衛生学教室、芝 紀代子助教授に深謝いたします。また本研究にご理解、ご支援頂きました東京医科歯科大学医学部保健衛生学教室員各位ならびに昭和大学歯学部第三歯科補綴学教室員各位に心からお礼申し上げます。

本論文の要旨の一部は第46回日本電気泳動学会秋季大会(平成8年10月4日、5日、秋田)、第99回日本補綴歯科学会学術大会(平成10年5月29日、30日、仙台)、第43回日本唾液腺学会(平成10年12月5日、東京)において発表した。

文 献

- 1) Jonson RB. Effects of experimental diabetes mellitus on alveolar bone loss in periodontal disease-susceptible mice. *J Periodont Res* 20 : 307-316, 1985.
- 2) 芝 燐彦. 義歯床の維持と口蓋腺唾液に関する研究 第1報 口蓋腺唾液の採集法およびそのタンパク分画. 補綴誌 22 : 644-649, 1978.
- 3) Shiba A, Sano K, Nakao M et al. Electrophoretic analysis of the protein in palatine saliva. *J Prosthet Dent* 43 : 385-391, 1980.
- 4) 芝 燐彦, 吉田二良, 佐野紀代子. 義歯床の維持と口蓋腺唾液に関する研究 第4報 口蓋腺唾液の高分子タンパクの分析. 補綴誌 24 : 406-409, 1980.
- 5) 吉田二良. 上顎全部床義歯の維持に關与する口蓋腺唾液タンパク, および糖タンパク分画の電気泳動による検索. 補綴誌 24 : 603-613, 1980.
- 6) 芝 燐彦, 吉田二良, 五十嵐順正ほか. 義歯床の維持に關与する各種唾液成分の電気泳動的分析. 補綴誌 26 : 50-54, 1982.
- 7) Shiba A, Yoshida J, Nakao M et al. Sodium dodecyl sulfate electrophoretic analysis of the protein in palatine saliva. *J Prosthet Dent* 47 : 246-251, 1982.
- 8) Shiba A, Shiba KS, Suzuki K. Analysis of salivary proteins by thin layer sodium dodecylsulphate polyacrylamide gel electrophoresis. *J Oral Rehabil* 13 : 263-271, 1986.
- 9) 芝 燐彦. 義歯床の維持に關与する唾液タンパクについて 第1報 アガロース等電点電気泳動法による唾液タンパク分析の基礎的検討. 補綴誌 30 : 948-953, 1986.
- 10) 鈴木 満. 義歯床の維持に關与する唾液タンパク質の高速液体クロマトグラフィー分析. 補綴誌 31 : 551-563, 1987.
- 11) 万代倫嗣, 奥山秀樹, 片山繁樹ほか. 義歯床の維持と唾液の粘性 第2報 義歯床の維持力と介在液の粘度の關係. 補綴誌 31 : 837-843, 1987.
- 12) 鈴木 潔, 小池 勝, 二家本晃ほか. グラジエント SDS-PAGE による口蓋腺唾液のタンパクおよび糖タンパクバンドの分析. 補綴誌 31 : 1558-1565, 1987.
- 13) O'Farrell PH. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J Biol Chem* 250 : 4007-4021, 1975.
- 14) 和田 緑, 芝 紀代子, 芝 燐彦. ミクロ2次元電気泳動法による歯肉溝浸出液の蛋白質分析. 生物物理化学 33 : 319-325, 1989.
- 15) 上村正人, 芝 燐彦, 鈴木 潔ほか. 義歯床の維持に關する唾液蛋白質. 補綴誌 41 : 998-1007, 1997.
- 16) Hartmut ML, Rainer L, Angelika EW et al. Capillary electrophoresis, a rapid and sensitive method for routine analysis of apolipoprotein A-I in clinical samples. *J Chromatography A* 717 : 25-31, 1995.
- 17) 酒井敏枝, 芝 紀代子, 平塚信夫ほか. キャピラリー電気泳動による健常人および糖尿病発症初期患者の尿成分分析. 生物物理化学 42 : 123-129, 1998.
- 18) 宇野聖子. 糖尿病の歯周疾患に及ぼす影響 実験的糖尿病マウスによる研究. 鶴見歯学 22 : 129-141, 1996.
- 19) Ezel Y, Omur Y, Tuncay A et al. The alterations of whole saliva constituents in patients with diabetes mellitus. *Aust Dent J* 41 : 193-197, 1996.
- 20) 芝 燐彦, 保崎清人, 佐野紀代子. 唾液. *Medical Technology* 9 : 1047-1061, 1981.
- 21) Mohammad RK, Shinagawa S, Takagi T. Electrophoretic mobilities of the complexes between sodium dodecyl sulfate and various peptides or proteins determined by free solution electrophoresis using coated capillaries. *Electrophoresis* 15 : 1141-1146, 1994.
- 22) Fu-Tai A, Chen JC. Characterization of proteins by capillary electrophoresis in fused-silica columns: review on serum protein analysis and application to immunoassays. *Electrophoresis* 15 : 13-21, 1994.
- 23) Jenkins MA, O'Leary TD, Guerin MD. Identification and quantitation of human urine proteins by capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography B : Biomedical Applications* 662 : 108-112, 1994.
- 24) Schmutz A, Thormann W. Factors affecting the determination of drugs and endogenous low molecular mass compounds in human serum by micellar electrokinetic capillary chromatography with direct sample injection. *Electrophoresis* 15 : 51-61, 1994.
- 25) Schmutz A, Thormann W. Assessment of impact of physico-chemical drug properties on monitoring drug levels by micellar electrokinetic capillary chromatography with direct serum injection. *Electrophoresis* 15 : 1295-1303, 1994.
- 26) Pedersen W, Schubert M, Izutsu K et al. Age dependent decreases in human submandibular gland flow rates as measured under resting and post stimulated conditions. *J Dent Res* 64 : 822-825, 1985.
- 27) Heft MW, Baum BJ. Unstimulated and stimulated salivary flow rate in different age groups. *J Dent Res* 63 : 1182-1185, 1984.
- 28) Louis JB, Robert PR (芝 燐彦). Treatment of partially edentulous patients (可撤性部分床義歯の臨床 100-103, 東京: 医歯薬出版, 1983), 1982.
- 29) Herman JB, Mount FW, Medalie JH et al. Diabetic prevalence and serum uric acid: Observations among 10000 men in a survey of ischemic heart disease in Israel. *Diabetes* 16 : 858-868, 1967.
- 30) Tenovuo JO. Nonimmunoglobulin defense factors in human saliva. *Clin Chem Microbiol* 2 : 55-91, 1989.
- 31) 村津和正. ストレプトソトシン誘発糖尿病ハムスターにおける唾液抗菌因子の動態. 福岡医誌 74 : 642-657, 1983.

著者連絡先: 椎名 幸恵

〒145-8515 東京都大田区北千束 2-1-1

T E L : 03-3787-1151 (内線 295)

F A X : 03-3787-6774