

唾液の成分（血清との比較）

三橋百合子*、植田 伸夫**
帝京短期大学*、村上記念病院**

Components of saliva (comparison with serum)

Yuriko Mitsuhashi*、Nobuo Ueta**

Saliva was analyzed by the method of clinical chemistry.

Many components were detected in saliva but the component pattern was quite different from that of serum.

Protein level was lower. Albumin was found in amount but IgA was detectable amount in saliva.

Several enzymes were in existence. The activity of LD was almost the same as that of serum LD5 was the highest amount in saliva.

Urea and uric acid was detected but creatinine was not.

As shown in above, serum was not direct roots of saliva.

Saliva was a easy extractable fluid of human body, so we would like to find the useful components in saliva for diagnosis of disease.

唾液を臨床化学の方法で分析した。

唾液には非常に多くの成分が検出されたが、その成分のパターンは血清とは異なっていた。

蛋白量は非常に低い、アルブミンはほとんど見いだせない。しかし IgA はかなりの量検出される。

酵素も各種検出される。LD の活性は血清と同じレベルであったが、アイソザイムパターンは異なっていた。

LD5が一番多かった。

尿素と尿酸も検出された。しかし、クレアチニンは検出できなかった。

上記のように唾液は血清が直接浸み出したものではない。唾液は容易に採取できる体液であり、そこに病気の診断に有用な成分を見いだしてゆきたい。

緒言

今日、尿や血液が病気の診断や治療に広く利用されていることは周知の通りであるが、その他の体液成分については十分に利用されている訳ではない。それは①採取した部位の限定部分の情報に限られてしまう。②平常時に採取できると限らない。③採取が容易ではなく、被験者に負担がかかる場合がある。などの点があるからであろう。

そこで、被験者に苦痛を与えず、常に容易に採取可能である「唾液」についてその成分を分析し、血液と比較することで尿や血液と同様に広範囲な病気の診断や治療のデータとして有用性を検討することを目的として唾液の成分の基礎分析を行った。

今回のスクリーニングから唾液成分と血清成分を比較し、唾液成分の特性を明らかにする。また成分の中で特に乳酸脱水素酵素活性がヒトの血清の活性値より高値を示したことより、乳酸脱水素酵素については詳

細な分析を試みた結果、血清とは異なる知見が得られたので報告する。

材料および方法

1) 材料

唾液は健常人より採取した。

採取法については、唾液は尿や血液と異なり粘性が強いので、今回採取法として、被験者に事前に口の中を水でゆすいだ後、脱脂綿を口に入れてモグモグさせ脱脂綿に唾液を含ませる。その後脱脂綿を口から取り出し、デイスポの注射器の筒に入れ、内筒で押し出した唾液を試験採取する。これにより食物残渣、粘性の一部を取り除くことができる。

唾液の分析検体数は各測定項目で異なるが、10～20検体、ただし乳酸脱水素酵素については92検体である。

被験者は健常人で特に疾患を持たない年齢18歳～60歳（多くは18～21歳）である。

2) 測定法

検出可能な濃度か否かの分析には血清分析用のドライケミストリー法を利用した分析装置（コバス・レディー）で測定した。測定項目は総タンパク質、アルブミン、総カルシウム（Ca）、総ビリルビン（T-Bil）、尿酸（UA）、尿素窒素（BUN）、クレアチニン（CRE）、中性脂質（TG）、総コレステロール（T-Chl）、グルコース、乳酸脱水素酵素（LD）、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ（AST）、アラニンアミノトランスフェラーゼ（ALT）、 γ グルタミルトランスペプチターゼ（ γ GT）である。以下酵素については略称を用いる。

その他の成分、無機リン等について血清および尿分析用の測定法を利用した。

蛋白成分とLDについては電気泳動法で蛋白分画とLDアイソザイム分析を行った。

3) 測定法

1. コバスレディー（ドライケミストリー法）

総蛋白質（ビウレット法）

アルブミン（プロムクレゾールグリーン法）

総カルシウム（0-クレゾールコンプレクソン法）

総ビリルビン（ジアゾ反応）

尿酸（ウリカーゼ酵素法）

尿素窒素（ジアセチルモノオキシム法）

クレアチニン（酵素法）

中性脂質（酵素法）

総コレステロール（酵素法）

グルコース（グルコースオキシダーゼ法）

LD（乳酸基質ジアホラーゼ法）

AST（酵素法）

ALT（酵素法）

γ GT（酵素法）

2. その他の測定法

無機リン（キシリジルブルー法）

微量総蛋白質（クマシーブリリアントブルー法）

3. 電気泳動法（蛋白分画法、LDアイソザイム）

手技に関してはヘレナ研究所の製品を使用したヒト血清の電気泳動法に準じて行った。

1) 蛋白分画 支持体 セルロースアセテート膜

通電 180V、15分

染色 クマシーブリリアントブルー

2) LDアイソザイム 支持体 アガロースゲル膜

通電 90V、20分

染色 乳酸基質法

3) 免疫固定法 支持体 アガロースゲル膜

通電 120V、20分

抗体 抗IgG、A、M、 κ 、 λ

染色 クマシーブリリアントブ

ルー

4. LDについては口腔内細菌のもつLDの影響を確認するために、唾液を採取後細菌培養し、唾液中の細菌の乳酸脱水素酵素の分析を同時に行った。

結果

1. 被測定成分の唾液中の濃度

分析結果を表1に示す。表1については各成分の最低濃度と最高濃度で表示し、参考として血清の基準値¹⁾を添えた。今回測定対象とした成分のうちすべての唾液検体で検出された成分は総カルシウム、無機リン、尿酸、尿素窒素、総蛋白質、LDであった。

AST、ALP、 γ GTについては、検出される検体とそうでない検体があった。（表1は検出された検体での濃度表示である。）それ以外の今回測定対象とした成分は測定感度以下の濃度で検出されなかった。非常に微量な成分であると考えられる。

成分名	測定濃度範囲	血清の基準範囲 ¹⁾
Ca	3.8 ~ 6.6 mg/dℓ	8.5 ~ 10.2 mg/dℓ
IP	11.1 ~ 15.0 mg/dℓ	2.5 ~ 4.5 mg/dℓ
UA	1.0 ~ 3.8 mg/dℓ	2.6 ~ 7.2 mg/dℓ
BUN	7 ~ 37 mg/dℓ	8 ~ 20 mg/dℓ
TP	59 ~ 148 mg/dℓ	6.3 ~ 8.1 g/dℓ
LD	10 ~ 808 IU/ℓ	110 ~ 210 IU/ℓ
AST	11 ~ 77 IU/ℓ	10 ~ 40 IU/ℓ
ALP	1.0 ~ 4.7 KA単位	2.7 ~ 10.0 KA単位
γ GT	10 ~ 20 IU/ℓ	10 ~ 45 IU/ℓ

表1 唾液の成分濃度（血清基準値との対比）

血清濃度と比べ唾液濃度が低い成分は、カルシウム、尿酸、総蛋白、ALP、 γ GTであり、その中でも総蛋白濃度は約1/100も低い濃度を示した。この唾液蛋白濃度はヒトの尿蛋白濃度のレベルである。逆に血清濃度と比べ高い成分は無機リン、尿素窒素、ASTで、無機リンは約3倍の高い濃度を示した。LDについては検出された濃度幅が非常に広く、低濃度の検体では血清の基準値より非常に低く、高濃度の検体では血清の約4倍の値を示した。

血清成分との相関で相関係数が高い成分は尿酸であった（ $r=0.791$ $y=0.74x-1.14$ ）。

2. 唾液蛋白の電気泳動結果

図1に唾液蛋白の蛋白分画（染色）図2にデンシトメトリー（分析パターン）結果を示す。

血清蛋白分画と比較すると、アルブミン分画は血清の68%と比べ唾液中のそれは4%と非常に低く、そ

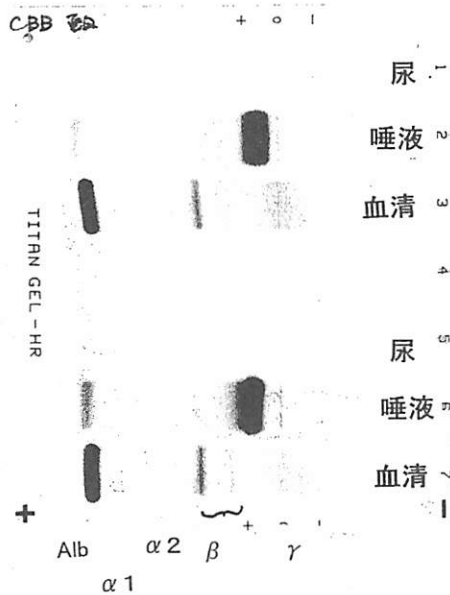


図1 唾液蛋白の蛋白分画 (CBB 染色)

非常に高い値であった。この唾液の大部分を占めるシャープな分画は免疫固定法を実施したところ、抗IgA抗体と抗κ抗体に反応したので、この唾液の分画はIgAと同定された(図3に免疫固定法の結果を示す)。

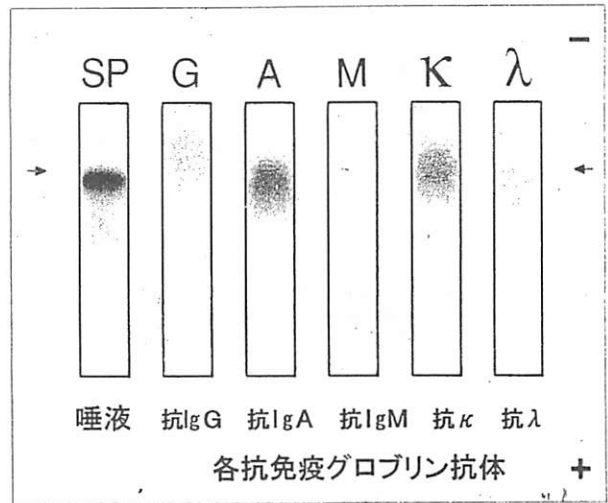


図3 唾液の免疫固定法

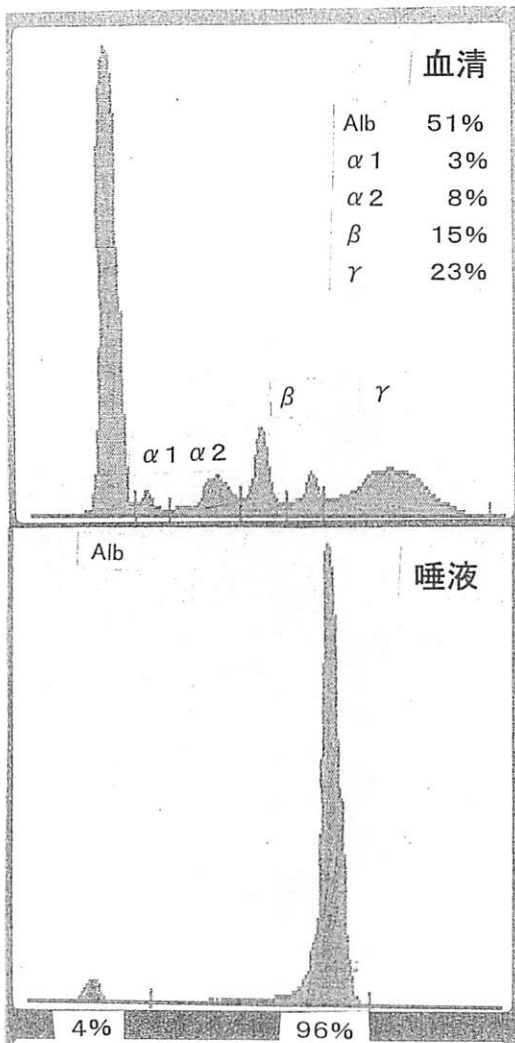


図2 唾液蛋白分画 (%)

の他α1、α2、β分画はほとんど検出されなかった。またγ分画については血清のブロードな分画(13%)ではなく非常にシャープな分画で95%と

3. LD 分析結果

LD 活性はどの検体でも検出されるが、各唾液検体の測定値は結果1で示したとおり10~808IU/lと非常に検出範囲が広い。LD 活性値に関しては溶血の影響を受けるので、ヒトの尿定性検査に使用する試験紙法で潜血反応が陽性を示した検体についてはあらかじめ除外してある。

活性値の分布についてヒストグラムを作成した結果を図4に示す。分布は高値に広がり大きい対数正規分布を示した。LD 活性の平均活性値は247.5IU/l、SDは182.67、95%信頼区間は58~680IU/lであっ

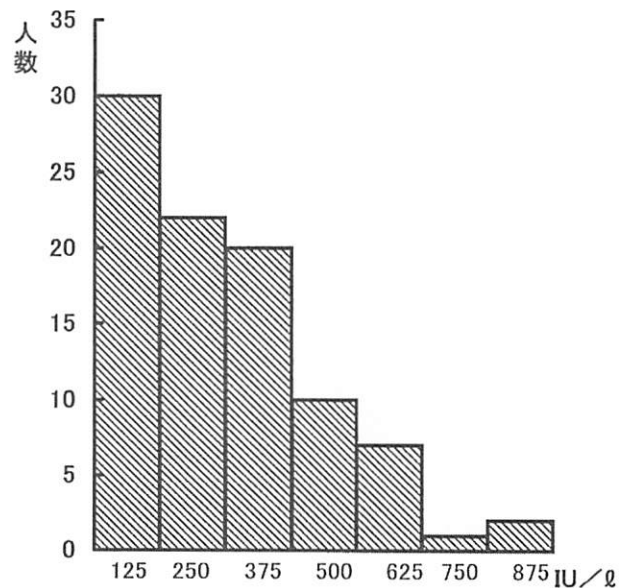


図4 唾液 LD 活性値のヒストグラム

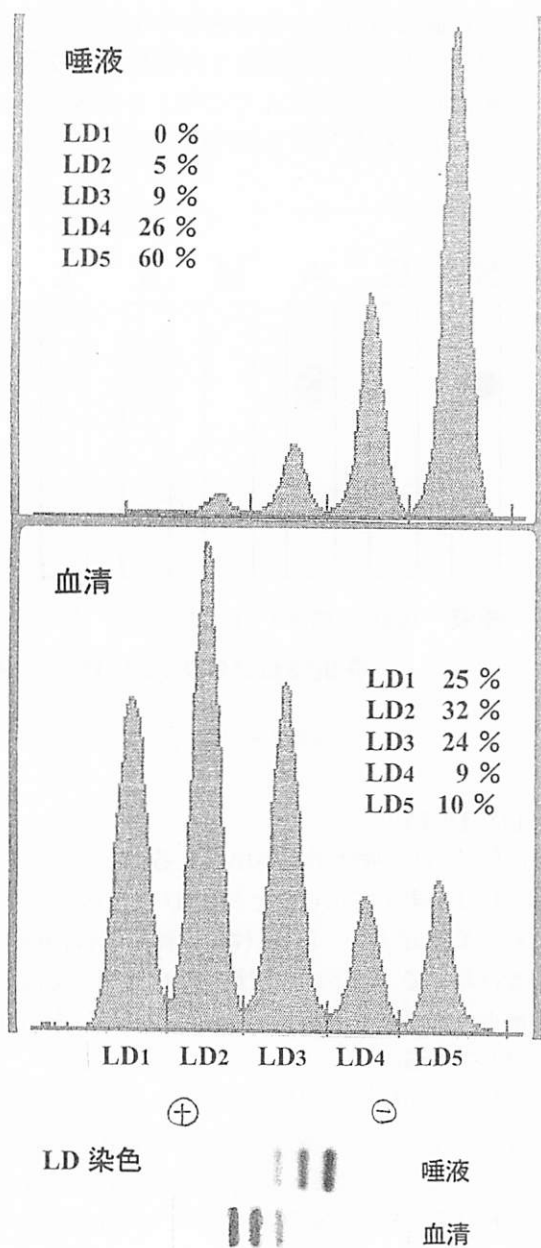


図5 LDアイソザイム分画

た。唾液検体の約8割の活性値は375 IU/l以下であるが、約2割は血清と比較するとかなり活性値が高い。健常人の血清の基準値は110～210IU/lであるので、基準値の下限以下の活性値の割合も多い。

LDアイソザイム分画の結果を図5に示す。

唾液LDアイソザイム分析(20検体)の平均分画%はLD1(0.5%)、LD2(3.5%)、LD3(10.0%)、LD4(26.5%)LD5(59.7%)であった。

血清のLDアイソザイムパターンと比較すると、唾液のパターンは全く異なり、分画%はLD5>4>3>2>1であり、LD5が一番高く順次低下するパターンが得られた。

1例であるがヒトの顎下腺をホモジナイズした溶液でLD分画を分析した結果は唾液の分画パターンと

少し異なりLD4(43%)>LD3(30%)>LD5(21%)>LD2(14%)>LD1(4%)の結果が得られた。

また、若干の検体数であるが疾患を持つヒトの唾液でも分析をおこなった。LD活性値は上記に記述した唾液LDの活性値の範囲内にあり、また唾液LDのアイソザイムの結果もLD5>4>3>2>1の順であった。

疾患に関わらず健常人のそれと同様の結果が得られているが、さらに検討が必要である。

唾液の環境を考えると口腔内細菌の持つLD活性が影響を与えていることが考えられたので、唾液の細菌培養を行い、その菌をホモジナイズした溶液のLDアイソザイム分析結果を図6に示す。図6中にウマ血清とあるのは、細菌を培養した培地の成分にウマ血清が含まれておりその影響を検討するためのものである。

結果として、口腔内細菌のLDアイソザイムはヒトの検出バンドとは全く異なる陽極側に移動度を持つバンドが確認された。またウマ血清はヒトのLDアイソザイムの移動度に近いバンドが4本検出されたが、その分画%は陽極側から14.6%(LD1に相当)、49.0%(LD2に相当)、28.5%(LD3に相当)であり、今回のヒト唾液中のLD分析には影響を及ぼさないことが確認された。細菌やウマのLDはヒトのLDとは物理化学的性状が異なるものと推定される。

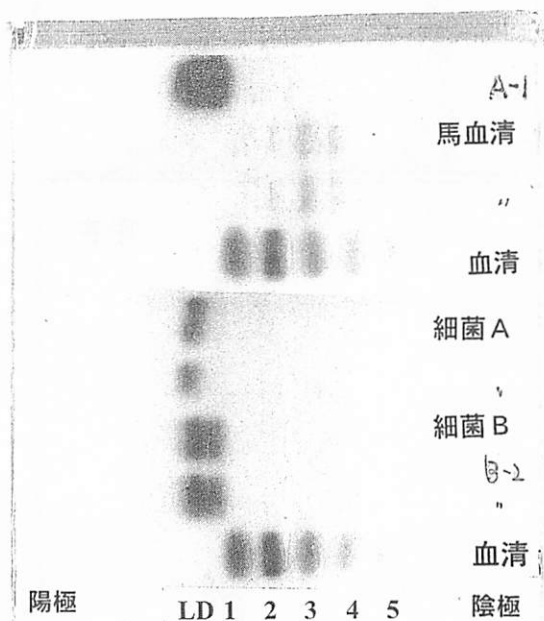


図6 細菌LDアイソザイム分画

考察

唾液は唾液腺から口腔内に分泌される分泌液で、健常人では約1～1.5l/日分泌される。その成分の約

95%は水分である。残りは無機および有機成分である。

今回の結果より唾液中に多様な成分が含まれていることがわかった。

しかし、①その成分種類は血清成分に比べ少ないこと。②唾液の各成分値と血清成分値にほとんど相関がないこと。③検出された唾液成分の濃度は成分により血清より低い濃度から高い濃度のものがあること。④電気泳動上のパターンが血清と唾液とでは大きく異なること。以上から考えると、唾液成分は血清成分を反映した血液由来ではなく、唾液腺由来の独自のものであると言える。

もちろん唾液そのものは、口腔内に開口している耳下腺、顎下腺、舌下腺からの分泌液の混合物であり、さらに口腔粘膜の脱落した細胞成分、舌を構成する細胞成分を含むことも考えられる。また歯牙の溶解成分や口腔内細菌の分泌物などからなる極めて複雑な混合液である。

1) 電解質成分についてはカルシウムやリンが定常成分として比較的高濃度に存在するのは、歯牙の成分維持としての存在が大きいと考える。即ち唾液ではカルシウムとリン酸塩はヒドロキシアパタイトに過飽和であり、歯牙のエナメル質の脱カルシウムを防ぎ、再石灰化作用を促すために必要な成分としての役割からであろう。またカルシウムは、唾液中に分泌される消化酵素のアミラーゼ (AMY) の活性化因子である。

無機リン濃度がカルシウム濃度より高いのは、血液の恒常性を保つために無機リンは尿に排泄されるが、唾液中にも排泄され、血液の恒常性維持に役立っているのであろう。ただ、唾液中に分泌されたものは、消化管から再吸収される可能性がある。

ナトリウム、カリウム、クロールについては検体数が非常に少ないのでその結果が妥当か否かは判断できないが、今回測定した範囲では血清濃度と比較すると、唾液ナトリウムは約1/16、カリウムは約2倍、クロールは約1/6の値であった。

カリウムについては刺激開始直後のカリウム濃度は高いが、2~3分後には低下すると1990年の文献²⁾に報告がある。

唾液腺の腺房部ではイオンチャンネルを介したクロールおよびナトリウムイオン輸送により血漿とほぼ等張のNaCl溶液が原唾液として腺内室に分泌され、続く導管では重炭酸イオンとカリウムイオンの分泌があるが、ナトリウムイオンとクロールイオンの吸収が起って唾液は低張になっている。³⁾ Na、K、Clは血清とは異なり唾液独自の環境の産物と言える。

2) 非蛋白性窒素成分では尿素窒素と尿酸は検出されるが、クレアチニンは検出されないかあってもごく

微量である。尿素窒素の濃度範囲は血清基準値に近い。尿酸値は血清の約半分の値であるが、血清尿酸値との相関係数は高い。

3) 蛋白質は血清に比べると唾液の蛋白濃度は非常に低く、約1/100である。電気泳動分画ではアルブミンは血清では60%前後を占めるのに対し唾液のアルブミンは数%であり、大部分がβとγグロブリンの間に移動度を持つ蛋白であった。この位置には免疫グロブリンのIgAが泳動される。がしかし、この位置には唾液中に高い活性を持つ消化酵素のアミラーゼも泳動される。

免疫グロブリンに関してはヒト血清に比べIgAが非常に多い。IgAは2種類存在するが、ヒトでは外分泌液中には分泌型2量体IgAの存在が知られる。唾液中のIgAは口腔内の生体防御に寄与していると考えられる。口腔内と言う環境を考えると常に細菌が存在しているし、摂取する食物と一緒に各種の細菌が入ってくる。そのような環境ではリゾチームなどの殺菌作用もさることながら、細菌の粘液膜への侵入を防ぐ分泌型IgAの存在が重要であり、血清とは異なり蛋白の中でIgAが高い割合を示していると考えるのは妥当であろう。

4) 乳酸脱水素酵素 (LD) に関しては、非常におもしろい結果が得られた。LDはヒトのあらゆる細胞の可溶性分画に存在し、HとMの2種のサブユニットから成る4量体で、5種類のアイソザイムを形成する。生理的機能としては解糖系の最終段階でピルビン酸と乳酸の酸化還元反応の触媒として働いている。健康人の血清中にも110~210IU/ℓ (乳酸基質法) 含まれるが、臨床では遊出酵素として臓器特異性が認められることから、アイソザイムとともに診断に利用されている。

唾液のLD活性値はどの唾液検体からも検出されたが、血清に比べ10~808IU/ℓと非常に幅が広い。ヒストグラムで傾向を見ると低濃度を示す検体が多く、その平均活性値も247.5U/ℓである。しかしこれは血清LD活性値よりも高く、またなかには血清の4倍の値を示す検体もあった。

LDアイソザイムの結果も血清と全く異なっていた。血清の分画⁴⁾は図5のとおりLD2(35%)>LD1(25%)≥LD3(25%)>LD4(8%)>LD5(7%)であるが、唾液の分画%はLD5>LD4>LD3>LD2>LD1であった。

今回1例ではあるが、顎下腺それ自体のLD分画所見を得たが、LD5が一番多い唾液に対して、顎下腺はLD4>3>5、という結果であった。このことは各唾液腺によりLDアイソザイム分画%が異なることが推察される。そして、その混合物として唾液はLD

5が一番多い結果となったのであろう。また、他の唾液腺が今回の顎下腺と同様な分画%であったとしても、口腔粘膜細胞や口腔粘膜に埋め込まれている小唾液腺、あるいは舌細胞由来のLDも唾液に混入していることで、LD 5 優位の唾液分画%となったのであろう。いずれにせよ唾液はMサブユニット優位の分画パターンを示している。

疾患との関連については、症例数が少ないが肝炎、胃腸炎、直腸癌等の疾患を持つヒトの唾液を調べたが、どの検体も健康人同様の分画%であり変化はなかった。

今回唾液が分泌される口腔内には細菌が存在するので、LD 活性値の高さとアイソザイム分画は細菌由来の影響が考えられるので確認したところ、図6に示すとおりヒトの最も陽極側に移動度を持つLD 1よりさらに陽極側に細菌のLDが検出されている。分画数も1または2分画であり、唾液のLD分画とは全く重ならないので細菌の影響はないと考える。また使用した細菌培養液にはウマ血清が含まれていたため、同様に確認したがヒトLDの移動度と少し異なる分画が検出され、これも唾液の分画に影響ないと確認した。

ヒトではMサブユニット優位の組織は、肝臓、皮膚、骨格筋、肺である⁵⁾。唾液もMサブユニットが非常に豊富であると考えられる。LD 5は一番半減期が短いので高い活性のLD 5が口腔に分泌されていると結論できる。

唾液のLDでMサブユニットが優位であるのは骨格筋のように嫌氣的解糖の際、ピルビン酸を乳酸に還元する場合に解糖系のグリセロール-3-リン酸脱水素酵素で還元されたNADHを再酸化するのに重要である。食物を咀嚼することにより、急激に消化酵素の分泌が行われる際に、唾液腺部分が一過性に虚血になることを考えればMサブユニット優位は妥当であろう。

まとめ

唾液は唾液腺の腺房で産生され、導管から分泌される。唾液腺には小唾液腺と大唾液腺があり、大唾液腺の耳下腺、顎下腺、舌下腺は三大唾液腺と呼ばれ発達した導管を持ち口腔に開口している⁶⁾。

唾液は①口腔粘膜や歯牙の保護、②食物の嚥下機能、③口腔内の清浄作用、④デンプンの消化作用、⑤口腔での生体防御作用、など重要な役割を果たしている。

今回の分析から見えてくるのは、唾液は唾液独自の分泌機構と口腔内という特殊な環境での産物であり、唾液腺や口腔粘膜に分布する血管の血液成分がそのまま反映されている訳ではない。電解質や非蛋白性窒素成分に比べ乳酸脱水素酵素などの酵素は口腔内環境に

特化した状況と考えられる。

最近唾液を利用したストレスマーカーの分析が行われている。唾液分泌は交感神経・副交感神経により調節される。代表的なストレス反応のクロモグラニンやアミラーゼ活性は測定法が確立されストレスの評価法として注目されている。

唾液は非侵襲的に採取でき、採取する場所もどこでも可能であることから、血液に代わり容易に病態情報が得られる可能性を検討した。今回は検出できる成分のスクリーニングを行ったが、今後はその詳細な分析と疾患との関連性を調べる必要がある。

また、唾液の採取法による差や検出成分の日差変動の有無などの分析も成分濃度を評価するうえで必要である。

文献欄

- 1) 菅野剛史他 臨床検査技術学10 臨床化学第3版 医学書院
- 2) 谷岡博昭、長門俊一 検査と技術 Vol.18. No. 6 : 565, 医学書院 (1990年)
- 3) 広野 力、日本薬理学雑誌 Vol.127. No. 4 : 256 ~ 260, (2006年)
- 4) タイタンジェルS-LD 試薬説明書, ヘレナ研究所
- 5) 臨床病理レビュー特集第116号 : 86, 臨床病理刊行会 (2001年)
- 6) 鈴木裕子、東城庸介 臨床検査 Vol.53. No. 7 : 761 ~ 766, 医学書院 (2009年)