

# 唾液アミラーゼモニターの唾液採取方法の違いによる アミラーゼ活性の比較 —唾液の回収が不十分と考えられる例と回収した唾液による活性測定と比較—

棚 橋 浩

九州女子大学 家政学部栄養学科 北九州市八幡西区自由ヶ丘1-1 (〒807-8586)

(2024年6月26日受付、2024年8月6日受理)

## 要 旨

ニプロ社の唾液アミラーゼモニターは、センサーチップを舌下に入れて唾液を採取紙に吸収してモニターに差し込み唾液アミラーゼ活性を1分程度で簡単に測定することができ、多くの臨床・教育現場で使用されている。

基礎生化学・生化学実験実習においてこのモニターを用いて160人の活性を測定したところ、43人(27%)が10 kIU/L未満であった。同時に舌下の唾液を回収して直接チップに乗せてモニターで活性を測定したところ、10 kIU/L未満を示す検体はなく、センサーチップを舌下に入れて唾液を採取する方法より2.0倍活性が高かった。また、両採取方法の間で活性に殆ど相関関係が見られなかった。チップを舌下に入れて唾液を採取する方法では、唾液が十分に採取紙に回収されない可能性があり、集団を対象とした測定には、採取した唾液を用いた活性測定が必要になる場合もあると考えられた。

## 1. 緒言

ヒトは、1日当たりおよそ1,200 mLの唾液を生産する。唾液には消化作用だけでなく以下の様な多くの機能がある<sup>1)</sup>。1)口腔粘膜を湿らせる。2)乾いた食物を加湿することで嚥下を助ける。3)味蕾を化学的に刺激する食物成分を溶解するための溶媒となる。4)血液の約3倍の重炭酸イオンにより口腔内を緩衝する。5)唾液アミラーゼで炭水化物を消化して $\alpha$ -1,4グリコシド結合を切断する。この消化作用は食道、胃で酵素が失活するまで続く。6)歯のエナメル質の損傷を修繕するために必要なカルシウムとリン酸の供給源となる。7)リゾチームによりブドウ球菌のような特定の細菌のムラミン酸を溶解させる酵素によって口腔内の細菌叢をコントロールする。8)唾液免疫グロブリンAにより免疫機能を担う。従って、放射線治療で唾液腺が被爆した患者の多くは、十分な唾液を生産できなくなり多発性齲蝕を発症する。

唾液の大部分は、唾液腺によって生産される。唾液腺には左右で対をなして導管を介して口腔に唾液を送る大唾液腺(舌下腺、顎下腺、耳下腺)と口腔の各所の粘膜下組織にある小唾液腺(舌腺、口唇腺、頬腺、臼歯腺、口蓋腺)がある<sup>1)</sup>。耳下腺は、大唾液腺の中で最も大きく下顎枝と側頭骨茎状突起の間で耳介の前下方にあり、導管は、耳下腺から出た後、上顎第二大臼歯の反対側で頬内側の口腔前庭の耳下腺乳頭に開口し完全に漿液性である。顎下腺は、頸部の顎下三角で口腔底の下方に位置し、導管は、舌小帯の両側の口腔底にある乳頭に開口する漿液腺を主体とする混合腺である。舌下腺は大唾液腺の中では最も小さく、顎下腺の前方の口腔底にある。導管は小さく分岐し、一部は顎下腺管と合流し、一部は直接口腔底に開口する粘液腺を主体とする混合腺である。この様に各唾液腺から分泌される唾液は質的に異なる。

唾液アミラーゼ活性の測定には従来、酵素免疫法(ELISA)<sup>2)</sup>が用いられてきたが、ELISAリーダーの様な特別な設備が必要となり臨床・教育現場で迅速に測定するには不向きであった。2007年、ニプロ株式会社より使用環境に左右されず、簡便に迅速な測定が可能な乾式臨床化学分析装置COCORO METER®(医療機器届け出番号:27B1X00045000073)が開発・販売された<sup>3)</sup>。ニプロ唾液アミラーゼモニターは、専用のセンサーチップを舌下に挿入して30秒かけて舌下腺・顎下腺からの唾液をセンサーチップの唾液採取紙(不織布、飽和する唾液量28  $\mu$ L)に採取する。また、唾液を直接唾液採取紙に乗せて吸収させ測定する事も可能である<sup>3,5)</sup>。次にセンサーチップをモニター本体に差し込み、唾液採取紙の唾液を10秒かけてチップ内のアミラーゼ試験紙(体積4  $\mu$ L)に転写させると試験紙に含浸されている唾液アミラーゼ基質の2-chloro-4-nitrophenyl-4-O- $\beta$ -D-galactopyranosylmaltoside (Gal-G2-CNP)が唾液アミラーゼにより加水

分解して黄色に発色する<sup>4)</sup>。反応開始から20秒後に発色した試験紙の反射率を光学ユニットで測定することで酵素活性 (kIU/L) に換算してモニターに表示させることができる<sup>3)</sup>。ここで1 IUのアミラーゼ活性とは、1分間に1  $\mu$ molのマルトースに相当する還元糖を生成する酵素活性である<sup>3)</sup>。この様に唾液アミラーゼモニターは、唾液アミラーゼ活性を1分程度で簡単に測定することができ<sup>3, 5)</sup>、交感神経活性の尺度、ストレスの評価など<sup>6-12)</sup>多くの臨床・教育現場で使用されている。

本研究では、1、2年生の実験実習において学生に使用説明書通り専用のセンサーチップを舌下に挿入して唾液アミラーゼ活性を測定させたところ、43人(27%)が10 kIU/L未満の低い値であった。これはセンサーチップを30秒間舌下に挿入しただけでは唾液の回収が不十分であると考えられた。そこで舌下や頬内側の耳下腺導管開口部付近からの唾液、咀嚼時の混合唾液を28  $\mu$ L直接チップの採取紙に乗せて活性を測定することで確かめた。

## 2. 方法

### 2-1. 被験者並びに補助者

九州女子大学家政学部栄養学科1年生女性72人(平均年齢18.7 $\pm$ 標準偏差[SD]0.7歳)と2年生女性90人(20.1 $\pm$ 1.1歳)の計162人(19.4 $\pm$ 1.1歳)を被験者とした。

### 2-2. 倫理的配慮

本研究はヘルシンキ宣言の倫理的原則に則り計画され、九州女子大学倫理委員会の許可(九女倫承R5-8号)を得て行った。なお被験者には本実験の趣旨を口頭及び文書で説明し同意書を得た。また本研究において開示すべき利益相反状態はない。

### 2-3. 唾液アミラーゼ活性の測定と唾液の採取

唾液採取と唾液アミラーゼ活性の測定は、温度が24°Cに保たれた実験室で2023年9月中旬の第1回基礎生化学実験(1年生)、第1回生化学実験(2年生)で行った。唾液アミラーゼモニター(形式DM-3.1 ニプロ株式会社)と専用のセンサーチップ(ニプロ株式会社)は取扱説明書に従って操作した。測定前に筆者が唾液アミラーゼモニターと専用のセンサーチップを使って説明を行った。操作を間違った場合や測定値が低い場合、再測定をしても構わないことも説明した。その後、筆者と助手1人、トレーニングを充分受けた筆者のゼミナール学生1人あるいは2人が学生の実験台を巡回し手技を指導した。被験者にうがいをさせ、口腔内を清潔にして会話を禁止し5分間安静座位をとらせた後、センサーチップを舌下に挿入して30秒間静置した。そして、センサーチップをモニター本体に差し込み酵素活性(kIU/L)を測定した。

その後、再度うがいをさせ、会話を禁止して5分間安静座位をとらせた後、被験者の舌下に1つ、上顎第二大臼歯の反対側で両頬内側の口腔前庭の耳下腺乳頭付近に1つずつロールコットン(直径10 mm $\times$ 25 mm長)を入れて10分間唾液を吸収させた後、それぞれの唾液を5 mLシリンジ中口(テルモ)で圧縮し、15 mL蓋つきチューブに抽出した。また食事を反映した唾液アミラーゼ活性を測定するためにカット綿(30 mm $\times$ 30 mm)2枚を口腔内に入れて10分間咀嚼した後、混合唾液を上記の様に採取した。これらの唾液は-80°Cに凍結保存した。唾液を24°Cで融解後、室温24°Cでセンサーチップの唾液採取紙が飽和する唾液28  $\mu$ Lをチップの採取紙に乗せて30秒後、唾液が採取紙に様に吸収されたのを確認してモニター本体に差し込み活性を測定した。

### 2-4. 統計処理

PRISM version 6.0d(GraphPad)ソフトウェアを用いて検定を行った。4群の多重比較はBrown-Forsythe testでnormal distributionを確認後、Tukey-Kramer's post hoc testで $P < 0.05$ を有意差ありとした。全ての値は平均値 $\pm$ SDで表した。2変量間の相関の程度はデータが正規分布を示す場合はPearson's correlation coefficientにより相関係数を求め、正規分布からかけ離れた場合はSpearman's correlation coefficient by rankにより相関係数を求めた。0 $\leq$ 相関係数 $\leq$ 0.20を相関関係は殆どない、 $\pm 0.2 <$ 相関係数

$\leq \pm 0.40$ を弱い相関関係がある、 $\pm 0.40 < \text{相関係数} \leq \pm 0.70$ を相関関係がある、 $\pm 0.70 < \text{相関係数} \leq \pm 0.90$ を強い相関関係がある、 $\pm 0.90 < \text{相関係数} \leq \pm 1.00$ を極めて強い相関関係があるとした。

### 3. 結果

取扱説明書に従ってセンサーチップを舌下に挿入して30秒間静置した後、モニター本体に差し込み酵素活性を測定した結果を提出した162人の被験者の内、2人は測定値が無記入、11人が測定値が低く再度あるいは再々度の測定を行った記述があったが、再測定してもその多くは10 kIU/L未満であった。160人の測定値の内、43人 (27%) が10 kIU/L未満であった (図1)。

同時に回収した舌下腺と顎下腺の混合した舌下の唾液、耳下腺からの唾液、3つの唾液腺からの唾液が混合した咀嚼後の唾液、それぞれをセンサーチップの採取紙が完全に飽和する28  $\mu\text{L}$ を直接採取紙に乗せて活性を測定した。舌下の唾液を直接センサーチップの採取紙に乗せて測定したアミラーゼ活性には10 kIU/L未満を示す検体はなく、舌下にセンサーチップを挿入して唾液を採取して測定した活性 ( $21 \pm 19$  kIU) より2.0倍高かった (図1)。舌下の唾液、耳下腺からの唾液、咀嚼後の混合唾液のアミラーゼ活性を比較すると、舌下の唾液 ( $43 \pm 27$  kIU) より耳下腺 ( $243 \pm 63$  kIU) の唾液のアミラーゼ活性は5.0倍高く、これは既報<sup>9)</sup>とほぼ一致した。また咀嚼後の混合唾液 ( $146 \pm 55$  kIU) は舌下の唾液より3.4倍高かった (図1)。これらの結果は、舌下腺、顎下腺、耳下腺から分泌される唾液の中では耳下腺から分泌される唾液が最も唾液アミラーゼ活性が高いことと一致する<sup>13)</sup>。

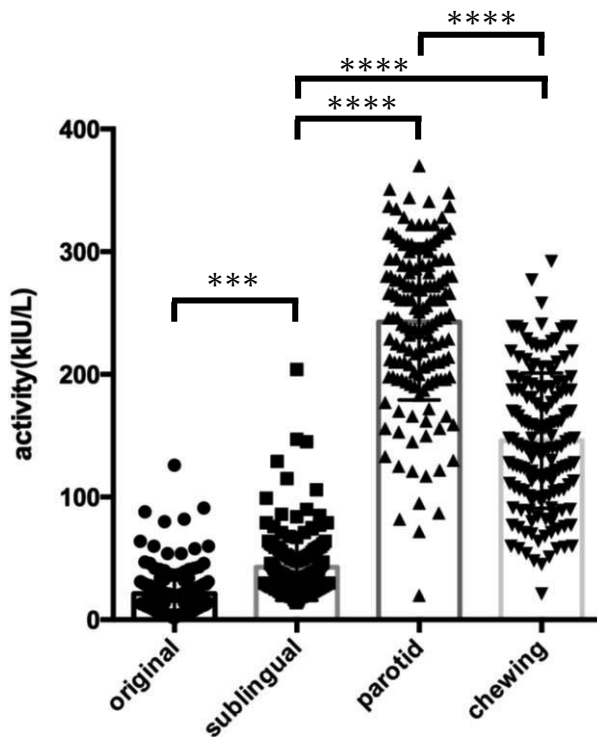


図1. 唾液の採取方法の違いによる唾液アミラーゼ活性の違い original: センサーチップを舌下に置いて30秒、sublingual: 舌下の唾液を回収し28  $\mu\text{L}$ を直接センサーチップに乗せた。parotid: 耳下腺の唾液を回収し28  $\mu\text{L}$ を直接センサーチップに乗せた。chewing: ガーゼを10分間咀嚼した混合唾液を回収し28  $\mu\text{L}$ を直接センサーチップに乗せた。全ての唾液採取方法で活性が測定できた156人の値を多重比較した(2.4方法 統計処理参照)。\*\*\*  $P < 0.001$ , \*\*\*\*  $P < 0.0001$ 。エラーバーはSD。

次にセンサーチップを舌下に挿入して測定したアミラーゼ活性と舌下の唾液を直接センサーチップの採取紙に乗せて測定したアミラーゼ活性の相関関係を調べたところ、相関関係は殆どなかった (図2)。

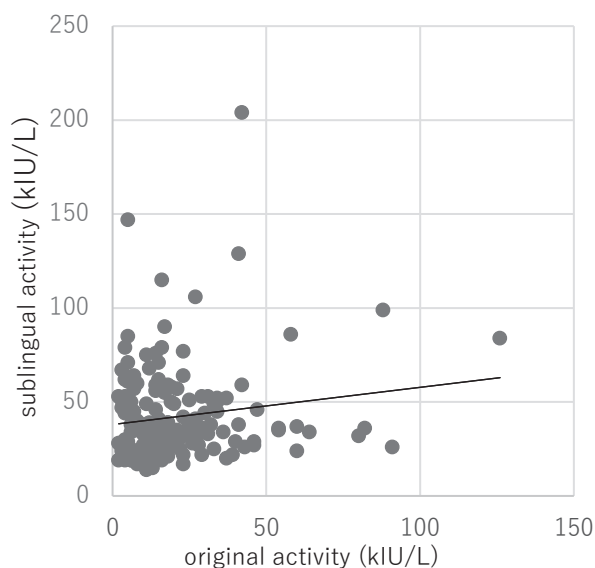


図2. センサーチップを舌下に置いて唾液を採取して測定した活性と舌下の唾液を直接センサーチップに乗せて測定した活性の相関関係 original: センサーチップを舌下に置いて30秒、sublingual: 舌下の唾液を回収し28 $\mu$ Lを直接センサーチップの採取紙に乗せた。2つの唾液採取方法で活性が測定できた159人の値の分散図と線形近似曲線。相関係数=0.156,  $P<0.05$ となり、殆ど相関関係はない(2.4方法 統計処理参照)。

#### 4. 考察

筆者は、取扱説明書に従ってセンサーチップを舌下に挿入して唾液アミラーゼ活性を測定した時、殆どは25 kIU/L以上であったが、体調によっては4あるいは5 kIU/Lの時があった。学生実習で測定した160人の測定値の内、43人(27%)が10 kIU/L未満であり、直接舌下の唾液をセンサーチップの採取紙に乗せた方が2.0倍活性が高いこと、センサーチップを舌下に挿入して唾液を採取した時の活性と舌下の唾液を直接センサーチップの採取紙に乗せた時の活性との間には、相関関係が殆どなかったことなどからセンサーチップを舌下に入れて唾液を採取する方法では、唾液が十分に採取紙に回収されていない場合があり、集団を対象とした測定には採取した唾液を用いた活性測定が必要になる場合もあると考えられた。

本モニターにより測定ができなかった例は、高齢者において報告されている<sup>(11, 12)</sup>。測定直前に唾液分泌を促すため唾液腺マッサージを実施し、2回の測定値を得られるまで最大4回測定しても測定エラーがしばしば見られ、非認知症高齢者では32人中23人(71.9%、年齢平均79.7 $\pm$ 5.0歳、最年少73-最高齢90歳)、認知症高齢者では19人中15人(78.9%、年齢平均86.7 $\pm$ 4.8歳、最低76-最高齢94歳)しか2回の測定値が得られなかった<sup>(11)</sup>。また高齢者34人を測定したところ31人(平均年齢80.5 $\pm$ 4.8歳、最低70-最高齢92歳)は測定ができたが、3人の測定ができなかったと報告されている<sup>(12)</sup>。

唾液の分泌量は、以下に述べる様々な要因によって影響される<sup>(14, 15)</sup>。1) 加齢による唾液分泌量の減少。2) 副交感神経優位による唾液分泌の増加。3) 精神的なストレスがもたらすコルチゾールによる唾液分泌の抑制。4) エストロゲンの減少による唾液分泌量の減少。5) 喫煙やアルコールの摂取、口呼吸などによる唾液分泌の減少。6) 抗ヒスタミン剤、抗うつ剤などの薬剤による唾液分泌の減少。7) シューグレン症候群や糖尿病などの病気による唾液分泌の減少。本学生実習でも唾液分泌を促すため唾液腺マッサージを実施した学生もいたが、改善されなかった。咀嚼は、簡単に唾液分泌を促進させる<sup>(16)</sup>ことができ、より生理学的な条件を反映している。咀嚼時の唾液を用いた測定も有効な方法であると考えられる。

#### 5. 謝辞

本研究において、学生実験の補助に従事した田中優衣助手並びに卒業研究学生の山内菜々香女史、神谷祐莉加女史に深謝する。

## 参考・引用文献

- 1) Ross H. M. and Pawlina W., *Histology: a text and atlas with correlated cell and molecular biology* 5th ed., Lippincott Williams & Wilkins, (2006) pp.496-505
- 2) Granger D. A., Kivlighan K. T., Fortunato C., Harmon A. G., Hibel L. C., Schwartz E. B. and Whembolua G. L., Integration of salivary biomarkers into developmental and behaviorally-oriented research: problems and solutions for collecting specimens, *Physiol. Behav.*, 92(4), (2007) pp.583-590
- 3) 山口昌樹、花輪尚子、吉田博、唾液アミラーゼ式交感神経モニタの基礎的性能、*生体医工学*、45(2)、(2007) pp.161-168
- 4) Morishita Y., Iinuma Y., Nakashima N., Majima K., Mizuguchi K. and Kawamura Y., Total and pancreatic amylase measured with 2-chloro-4-nitrophenyl 4-O- $\beta$ -D-galactopyranosylmaltoside, *Clin. Chem.*, 46(7), (2000) pp.928-933
- 5) 山口昌樹、吉田博、岡部則夫、唾液アミラーゼモニターの検査成績、*ライフサポート*、21(3)、(2009) pp.29-33
- 6) 山口昌樹、唾液マーカでストレスを測る、*日薬理誌*、129、(2007) pp.80-84
- 7) 中野敦行、山口昌樹、唾液アミラーゼによるストレスの評価、*バイオフィールドバック研究*、38(1)、(2011) pp.3-9
- 8) 澤田敦子、林修、遠藤伸子、学校メンタルヘルス、14(2)、(2011) pp.189-198
- 9) 萩野谷浩美、佐伯由香、ストレス評価における唾液 $\alpha$ アミラーゼ活性の有用性、10(3)、(2012) pp.19-28
- 10) 山口昌樹、唾液センサによる予防医療の革新、*人工臓器*、42(1)、(2013) pp.93-98
- 11) 森田聖子、中道淳子、小林宏光、認知症高齢者に対する唾液アミラーゼ活性値測定信頼性の検討、*日本看護技術学会誌*、14(1)、(2015) pp.73-77
- 12) 中道淳子、松本ひかり、山岸日佳里、谷口智美、川畑圭良子、高見幸子、川端祥子、油野聖子、小林宏光、介護予防事業参加者に対する笑いヨガの試み 参加者の生体指標と行動観察における評価、*石川看護雑誌*、10、(2013) pp.19-23
- 13) Jenkins N., *The physiology and biochemistry* 4th ed., Blackwell Scientific Publications, Oxford, (1978) pp.284-359
- 14) Humphrey S. P., Williamson R. T., A review of saliva: normal composition, flow, and function, *J. Prosthet. Dent.*, 85(2), (2001) pp.162-169
- 15) Carpenter G. H., The secretion, components, and properties of saliva, *Annu. Rev. Food Sci. Technol.*, 4, (2013) pp.267-276.
- 16) 西川泰央、吉田洋、咀嚼運動と唾液分泌との関連性について、*歯科医学*、58(2)、(1995) pp.123-132

**Comparison of amylase activity by different saliva collection methods for  
salivary amylase monitor  
— Comparison of measurements using collected whole-cavity saliva with cases where  
saliva collection was insufficient—**

Hiroshi TANAHASHI

Department of Nutrition, Faculty of Home Economics, Kyushu Women's University

1-1 Jiyugaoka, Yahatanishi-ku, Kitakyushu-shi 807-8586, Japan

**Abstract**

Nipro's salivary amylase monitor is used in many clinical and educational settings, and allows the sensor chip to be placed under the tongue, saliva to be absorbed onto a collection paper, and the salivary amylase activity to be measured easily in about one minute.

When activity was measured using this monitor in a basic biochemistry/biochemistry experiment with 160 students from 4 classes, 43 students (27%) had activity below 10 kIU/L. At the same time, when sublingual saliva was collected and placed directly on the chip to measure activity with the monitor, no samples showed activity below 10 kIU/L, and activity was 2.0 times higher than the method of collecting saliva by placing the sensor chip under the tongue. Furthermore, there was almost no correlation in activity between the two collection methods. When collecting saliva by placing the chip under the tongue, there is a possibility that not enough saliva is collected on the collection paper, and it may be necessary to measure activity using collected saliva when measuring in a group setting.

**Keywords:** population study, salivary amylase, salivary amylase monitor