様式　8

主 論 文 要 旨

Evaluation of Association Between Substance P Concentration, Dipeptidyl Peptidase 4 Activity in Saliva and Oropharyngeal Dysphagia: A Pilot Study

（唾液中のサブスタンス P 濃度およびジペプチジルペプチダーゼ 4 活性と口腔咽頭嚥下障害との関係性の評価：パイロット研究)

(岩手医科大学歯学雑誌　第 49 巻、第 1 号、令和 6 年掲載予定)

氏 名　　島田　崇史

Ⅰ．研究目的

口腔咽頭嚥下障害(OD)は、高齢者に多くみられる障害である。Substance P(SP)は神経ペプチドの一つで、嚥下反射と咳反射の誘発に関与していることが示唆されており、OD を有する高齢者は唾液中に存在する Substance P(SP)濃度が減少していたと報告されているものの、OD と唾液中の SP 濃度の関連は未だ明確ではない。これまでの研究では、唾液中の SP 全濃度が測定されており、嚥下反射と咳反射の誘発に関与する活性状態の保たれた(N 末端アミノ酸配列が切断されていない)SP の濃度については検討されていない。SP の N 末端アミノ酸配列を切断し、SP を不活性化する因子には、唾液中や細菌表面などに存在している Dipeptidyl Peptidase 4(DPP4)があるが、これらの OD への関与は明確ではない。

本研究の目的は、唾液中の SP 濃度および DPP4 活性が OD とどのように関係しているのかを明らかにすることである。

Ⅱ．研究方法

平均年齢 78.75±6.18 歳の地域在住高齢者 106 名を被験者とした。被験者の嚥下機能の評価は、反復唾液嚥下テスト(RSST)、改訂水飲みテスト(MWST)、および聖隷式嚥下質問紙を用いて実施した。これらの検査は各々でカットオフ値を設け、Healthy volunteers aged over 65(HV)群と Elders of OD(EOD)群の 2 群に分類した。HV 群は、RSST ≧ 3 回/ 30 秒、MWST ≧ 4 点、聖隷式嚥下質問紙で A の項目に該当しなかった、と全ての項目を満たしていた者とした。EOD 群は、RSST < 2 回/ 30 秒、MWST ≦ 3 点、聖隷式嚥下質問紙で A の項目が 1 つ以上該当した、といずれかの項目を満たしていた者とした。被験者の頬粘膜および口唇粘膜から唾液を採取し、2300 × g、4℃、10 分遠心操作を行い、上清画分と細菌画分に分けた。唾液中の SP 全濃度と活性型 SP 濃度は、酵素結合免疫吸着測定法によって測定した。DPP4 の活性の上昇に、血中、細菌叢、もしくは細菌数のいずれかが関与しているかを検討するため、唾液中の上清中、$OD_{600} = 0.2$（1.0×10^6 CFU/ml）に調整した菌液(調整済み菌液)中、細菌画分を PBS で再懸濁した菌液(無調整菌液)中の DPP4 活性は、合成蛍光基質 Gly-Pro-MCA を用いて、それぞれ蛍光強度を測定した。

Ⅲ．研究成績

1. EOD 群は HV 群と比較し、唾液中の SP 全濃度と活性型 SP 濃度が有意に低下し、また細菌由来の DPP4 活性が有意に上昇していた。
2. 活性型 SP 濃度と上清中の DPP4 活性の間に有意な関係を認めなかった。活性型 SP 濃度と無調整菌液中の DPP4 活性との間には、有意な差はあったが、相関関係は認めなかった。活性型 SP 濃度

と調整済み菌液中の DPP4 活性との間には、有意な弱い負の相関関係を認めた。

3. ロジスティック回帰モデルでは、唾液中の SP 全濃度と無調整細菌液中の DPP4 活性が OD を説明する有意な変数であった。

Ⅳ．考察及び結論

1. OD の者は唾液中の SP 全濃度が低下しており、先行研究を支持する結果となった。活性状態が保たれた SP 濃度の低下、細菌表面に存在する DPP4 活性の上昇も OD に関与することが新たに判明した。
2. 活性型 SP 濃度と細菌由来の DPP4 活性は関与していることが示唆されたが、相関関係は低かった。嚥下障害を有する高齢者介護施設者に口腔ケアを実施したことで、SP 濃度が上昇したと報告があり、口腔ケアによる口腔内の細菌の減少が SP 濃度上昇に関与している可能性が示唆されている。しかし、本研究結果からは唾液中の口腔細菌の減少により、DPP4 活性の上昇を防ぎ、活性型 SP 濃度の上昇につながるということを証明することはできなかった。
3. 本研究の嚥下機能評価では，嚥下反射のタイミングや咽頭部の感覚などについての検討が不十分であった。そのため、活性型 SP 濃度がどのような嚥下機能に関与していたかを見出すことはできなかった。

結論として、OD は、唾液中の SP 全濃度ならびに活性型 SP 濃度の低下、また唾液中の菌体表面に存在する DPP4 活性能の上昇と関連することが判明した。唾液中の SP 濃度と DPP4 活性の測定は、嚥下機能の低下を推測できる可能性を示唆し、また嚥下機能検査において新たなスクリーニング検査の確立につながる可能性も示唆された。

論文審査の結果の要旨

論文審査担当者

主査 岸 光男 教授 （口腔医学講座　予防歯科学分野） 印

副査 1 黒瀬 雅之 教授 （生理学講座　病態生理学分野） 印

副査 2 小林 琢也 教授 （補綴インプラント学講座　摂食嚥下・リハビリテーション学分野） 印

本論文では嚥下障害の要因の 1 つと考えられている、神経ペプチドである Substance P (SP) の濃度低下に注目し、唾液中の同物質濃度と嚥下障害との関連を検討している。加えて、口腔細菌の有する酵素である Dipeptidyl Peptidase 4 (DPP4) が SP を不活化することにより、間接的に嚥下障害の誘因になっているという仮説を検討することを目的とした。地域在住の高齢者を嚥下障害あり (Oropharyngeal Dysphagia: OD) 群、ない場合を健全群として唾液中の総 SP 濃度、SP 中の活性部位のみを測定した活性 SP 濃度ならびに唾液中の菌体成分の DPP4 活性を比較した。

その結果、ヒトを対象とした研究にもかかわらず、OD 群で健全群よりも有意に低い総 SP 濃度を呈するいう、貴重な結果を得ている。先行研究でもある程度示されている結果であるが、それらの多くが施設入所者や入院患者を対象としており、本研究のような地域高齢者において同様の結果が得られたことは、研究方法の妥当性と、それらの関連の強さの普遍性を示すものである。また、活性 SP 濃度が、総 SP 濃度よりも強く OD と関連すると考えた仮説は成立しなかったが、唾液菌体成分の DPP4 活性との間に有意な負の相関がみられた。これら観察された事実に対する解釈は困難なところもあるが、今後の研究課題ととらえれば非常に興味深い。

以上のことから、本論文は学位授与に値する優れた論文であると判断した。

試験・試問結果の要旨

質問：咽頭部の反射経路に唾液中の成分が作用するというのは理解しにくい。
回答：多くの先行研究が、唾液中に含まれる SP が咳反射や嚥下反射を誘引するという仮説でなされている。生理学的な機序については自分が参照した論文には明確に記載されていなかったが、今後勉強したい。

質問：唾液 SP の由来はどこか。
回答：耳下腺や顎下腺由来と考えられている。

質問：老化や嚥下障害による全身不調のために血中の SP が低下し、唾液 SP 濃度に反映されている可能性はないか。
回答：血中と唾液中の SP 両方を測定し、唾液中 SP のみが嚥下障害と関連していたという Parkinson 病患者での報告があり、血中量が反映されているわけではないと考える。

質問：活性 SP と菌液中の DPP4 活性の関連を示した散布図で、プロットが上下２つのクラスターに分かれているように見えるが、どうか。
回答：全体で負の相関が観察されたことが重要と考え、クラスターに分類した分析は行っていない。

質問：矢巾での認知症研究プロジェクトの一環として行われていると記載があるが、当初の登録人数 1,813 人から、調査年の対象者が 346 人と少ないのはなぜか。
回答：2016 年開始時の登録者は 1,813 人だったが、その後ドロップアウトなどがあり、調査年の 2021～2022 年に全身の調査を受けた者が 346 名であった。

質問：口腔診査を受けた 322 名のうち、不適格基準該当者が 216 名と多いのはなぜか。また、不適格基準の中で最も多かったのは何か。
回答：不適格基準で最も多かったのはデータがない場合である。

質問：全身データ等が紛失していたという意味か。
回答：唾液 SP 等を測るキットに量的制限があったため、測定できなかった者の意味である。

質問：確率サンプルを得るならば、どの対象者の唾液を測定するかについてもランダム化抽出すべきである。
回答：今後そのようにしていく。

質問：3 種の嚥下スクリーニング検査を行い、健全群と嚥下障害（OD）群に分けているが、そのような方法をとった先行研究はあるのか。先行研究ではどのような方法で群分けしているのか。
回答：本研究のようなフィールド研究は極めて少なく、医療施設等で行われている研究では嚥下造影検査結果で分けている例が多い。単独もしくは 2 種類の組合せを用いた報告はあるが、3 種類の組合せというのは見ていない。今回、先行研究に比べて嚥下障害群の割合が高かったのは、3 種のいずれかのスクリーニングで陽性となった場合をすべて嚥下障害に分類したためと考えている。

質問：ヒトからのサンプルで、唾液SP濃度が健全群とOD群で明確に差があったのは素晴らしい結果だと思う。だからこそ、2群の分け方についての妥当性が重要である。1種もしくは2種の検査結果の組合せによって群分けをして、結果を再検討してみることも必要かもしれない。

回答：今後、再分析を行ってみたい。