

# Studies on Clinical Application of the Measurement of Salivary Lactoferrin Levels and its Significance I . Evaluation of Parotid Salivary Lactoferrin in Various Diseases

|       |                                                                                             |
|-------|---------------------------------------------------------------------------------------------|
| メタデータ | 言語: jpn<br>出版者:<br>公開日: 2017-10-04<br>キーワード (Ja):<br>キーワード (En):<br>作成者:<br>メールアドレス:<br>所属: |
| URL   | <a href="http://hdl.handle.net/2297/8055">http://hdl.handle.net/2297/8055</a>               |

# 唾液中ラクトフェリン測定の実臨床応用とその意義に関する研究

## I. 各種疾患における耳下腺唾液中ラクトフェリン値の検討

金沢大学医学部内科学第一講座 (主任: 服部 信教授)

竹 森 康 弘

(昭和63年8月9日受付)

唾液中ラクトフェリン (lactoferrin, LF) 測定の意義を明らかにする目的で、シェーグレン症候群 (Sjögren's syndrome, SjS) を主要な検索対象として、塩酸ピロカルピン刺激下に耳下腺唾液を5分毎25分間にわたり分画採取し、各分画の LF 濃度、重炭酸塩濃度、アミラーゼ活性、総蛋白濃度、液量を測定し、その分泌動態を比較検討した。LF 濃度の測定はヒト初乳より精製した LF を用いて開発した酵素免疫測定法にて行った。対照群における唾液中 LF 濃度は第 I 分画でウォッシュアウト効果により最高値をとり、以後分泌相ではほぼプラトーを示した。SjS をはじめ各種疾患群においても同様の分泌パターンを示したが、SjS では対照群に比して全分画を通じて明らかに有意な高値を示した。対照群の平均値 + 2×標準偏差をカットオフ値とすると、SjS では第 I 分画で71%、第III分画で88%もの異常高値がみられた。LF 排出量、LF・総蛋白濃度比および LF・アミラーゼ活性比についてみても、SjS では対照群に比して明らかに有意な高値を示した。したがって、LF 濃度の高値は単なる濃縮結果ではなく、LF それ自体の増加であると考えられた。また、LF 濃度と最高重炭酸塩濃度、液量およびアミラーゼ排出量との間には、それぞれ負の明らかな有意な相関関係が認められ、耳下腺機能が低下するにしたがい LF 濃度は上昇することが示唆された。さらに、SjS における LF 濃度の異常出現率は、最高重炭酸塩濃度、液量のそれに比して有意に高率であった。以上より、唾液中 LF は SjS において高頻度に上昇し、その測定は SjS の診断法として有用であると考えられる。

---

**Kew words** lactoferrin, parotid saliva, Sjögren's syndrome, enzyme immunoassay

---

ラクトフェリン (lactoferrin, LF) は分子量 75,000~80,000 の糖蛋白で、生理的に乳汁、涙液、気管分泌液、鼻汁など各種外分泌液と多核白血球中に含まれている。そして、鉄親和性の性質を有し、ある種の細菌の生存に必要な鉄をキレートすることにより、静菌作用を有することが知られている<sup>12)</sup>。さらに、このような静菌作用のみならず、ハイドロキシルラジカルを介しての細菌作用<sup>30)</sup>、好中球の遊走能阻止作用<sup>3)</sup>、補体系の C<sub>3</sub> 変換酵素抑制作用<sup>9)</sup>などの機序により感染や炎症における生体反応に重要な役割を有することも明らかにされつつある。また、パンクレオザイミン・セクレチン (PS) 試験採取液や経

内視鏡的に採取した純粋唾液中の LF が測定され、慢性膵炎ではしばしば高度な LF の上昇がみられることにより、慢性膵炎の質的診断法として有用なことも報告されている<sup>7-9)</sup>。

ところで、唾液腺は膵臓の姉妹臓器ともいわれているように、形態学的ならびに機能的に膵臓に類似していることが知られている。このような観点より、唾液腺疾患では唾液中 LF がいかなる変動を示すかは興味深ところではあるが、唾液中 LF に関してこのような検討はほとんどなされていない。

本研究では、ヒト初乳より精製した LF を用いて作製した酵素免疫測定法 (enzyme immunoassay,

---

Abbreviations: CP, chronic pancreatitis; EIA, enzyme immunoassay; LF, lactoferrin; PBC, primary biliary cirrhosis; SjS, Sjögren's syndrome; PS 試験, パンクレオザイミン・セクレチン試験

EIA) により、耳下腺唾液中の LF 濃度を測定し、各種疾患で唾液中 LF はいかなる変動を示すかを検討し、その診断的有用性について明らかにしようとした。

### 対象および方法

#### I. 対 象

シェーグレン症候群 (Sjögren's syndrome, SjS) 17例 (男性2例, 女性15例), SjS を合併しない原発性胆汁性肝硬変 (primary biliary cirrhosis, PBC) 7例 (男性1例, 女性6例), 慢性膵炎 (chronic pancreatitis, CP) 8例 (男性5例, 女性3例) を対象とし、臨床生化学的検査に異常を認めない健康人 20例 (男性11例, 女性9例) を比較対照として用いた。SjS は、「厚生省シェーグレン病研究班」の診断基準<sup>10)</sup>により確診とされた症例であった。SjS 診断基準項目のうち、乾燥性角結膜炎のみが認められた涙腺単独障害例は1例のみで、他はいずれも唾液腺管造影あるいは口唇腺生検に異常が認められた。また、sicca complex 単独症例は3例のみで、その他の症例は PBC, 慢性関節リウマチ, 慢性活動性肝炎, 慢性甲状腺炎, 腎尿細管性アシドーシス, 全身性エリテマトーデスあるいは CP を合併していた。また、いずれも初めて SjS と診断され、未治療の症例であった。PBC は肝生検により病理組織学的に診断された。CP は日本消化器病学会の臨床診断基準<sup>11)</sup>により診断され、いずれも慢性膵炎 I 群 (確診) に一致していた。

#### II. 唾液採取法

唾液採取は、Kakizaki ら<sup>12)</sup>の方法に準じて行った。すなわち、12時間絶食、禁煙の状態で、早朝空腹時に患者を仰臥位とし、片側の耳下腺開口部に Lashley cup を吸着させ、1%塩酸ピロカルピン (本学医学部付属病院薬剤部調製) を 0.13mg/kg の量で筋注し、唾液分泌開始後5分毎に25分間にわたり、氷冷した目盛り付き試験管にて採液した。採取された唾液は直ちに、重炭酸塩濃度およびアミラーゼ濃度の測定を行った。一部は、LF 濃度および総蛋白濃度測定用として、測定まで-70℃にて凍結保存し、測定時室温で溶解した。

#### III. LF 濃度の測定

LF は著者ら<sup>13)</sup>が開発したサンドイッチ法による EIA 法にて測定した。

##### 1. LF の精製と抗 LF 抗血清の精製

LF は Bennett ら<sup>14)</sup>の方法に準じてヒト初乳より精製した。

抗 LF 抗血清は市販の抗 LF 家兎抗血清 (DAKO 社, Denmark) を、先に精製した LF をカップリングした BrCN 活性化 Sepharose 4B (Pharmacia 社, Sweden) によるアフィニティークロマトグラフィーにより特異的な IgG 分画に精製した。ついで、精製 IgG を 2%ペプシンで 37℃, 24時間反応させ、その後 Sephadex G 150 (Pharmacia 社) でゲル濾過して F(ab')<sub>2</sub> 分画を得た。

##### 2. 抗体酵素複合体の調製

Avrameas<sup>15)</sup>の方法により、F(ab')<sub>2</sub> 1mg をウシ腸抽出精製結晶アルカリフォスファターゼ (Sigma 社, U.S.A.) 1mg と混和後、2%グルタルアルデヒド 0.75mg を添加し、室温で30分間攪拌、ついで 0.1M トリス塩酸緩衝液 (pH 8.0) で透析し、抗体酵素複合体を得た。

##### 3. 固相の調製

ディスポーザブルマイクロタイタープレート (Dynatech Labo., U.S.A.) の各ウェルに抗 LF 抗体 F(ab')<sub>2</sub> 150μl (0.07mg/ml) を加え、37℃ 1時間、さらに 4℃ 1晩放置し、蒸留水で洗浄後測定に使用した。

##### 4. 測定方法

測定手順を図1に示した。標準 LF または検体唾液 (0.15M NaCl, 0.1%EDTA, 10% 正常家兎血清を含む 0.1M 炭酸緩衝液, pH 9.0 にて適宜希釈) を各ウェルに 100μl 注入し、37℃ 1時間、ついで 4℃ 冷却下に生食で3回洗浄し、抗体酵素複合体液 (0.15M NaCl, 10% 正常家兎血清を含む 0.1M トリス塩酸緩衝液 pH 8.0 で400倍希釈) を 100μl 加え、37℃ 1時間、再度 4℃ 冷却下に生食で3回洗浄後、酵素基質液 (0.1M 炭酸緩衝液 pH 9.6 に溶解したバ

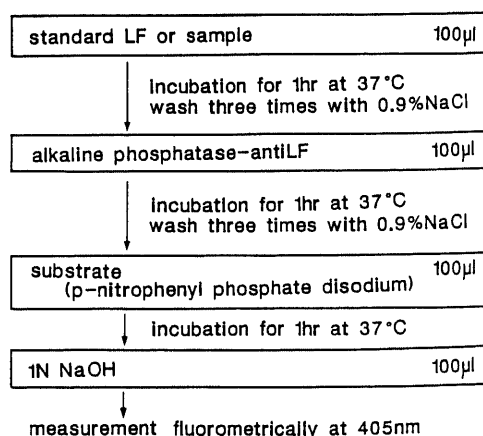


Fig. 1. Procedure of LF enzyme immunoassay.

ラニトロフェニリン酸塩, Sigma 社) を  $100\mu\text{l}$  加え,  $37^\circ\text{C}$  1 時間, ついで反応停止液 (1N NaOH) を  $100\mu\text{l}$  加えた. 吸光度を  $405\text{nm}$  の波長で測定し (日立モデル 100-20 スペクトロフォトメータ, 日立計測器, 東京), 標準曲線より LF 濃度を求めた. 測定はすべてデュプリケートで行った.

#### IV. 重炭酸塩濃度, 総蛋白濃度, アミラーゼ活性の測定

重炭酸塩濃度は Natelson 式超微量ガス分析装置 (萱垣製作所, 東京) を用いて測定した<sup>10)</sup>. 総蛋白濃度は Folin-Lowry 法<sup>11)</sup>で, アミラーゼはアミラーゼヨード法で測定した. また, 唾液分泌量, アミラーゼ排出量は全採液時間に一致する 25 分間における体重  $1\text{kg}$  当りで表現した.

#### V. 推計学的処理

推計学的検討は LF 濃度, LF 排出量, LF・総蛋白

濃度比, LF・アミラーゼ活性比, 最高重炭酸塩濃度, 液量, アミラーゼ排出量において対数変換を行い, 平均値の差の検定は分散分析後, Duncan の多重比較を行った<sup>12)</sup>. 異常率の差の検定は Yates の補正を加えた  $\chi^2$  検定にて, 相関係数の検定は Fisher の  $r$  表にて行った. 危険率 5% 未満をもって有意差ありとした.

### 成 績

#### I. LF 測定系の基礎的検討

測定系の標準曲線を図 2 に示す. 検出感度は  $1\text{ng/ml}$  以上で  $64\text{ng/ml}$  まで測定可能であった. また, ヒトトランスフェリン, フェリチンとの交差反応は  $10\text{mg/ml}$  まで検討したが, 認められなかった. また, ヒト血清, 唾液いずれもこの標準曲線と平行し, 定量性が認められた.

また, 再現性については表 1 に示すごとく, LF 濃度の異なる 3 種の唾液での測定内変動係数は  $4.3\sim 6.4\%$ , また, 5 回の測定間変動係数は  $5.3\sim 6.8\%$  であった. 添加回収試験において, 回収率  $91\sim 123\%$  であった.

#### II. 唾液中 LF 濃度の推移

図 3 に示すごとく, 対照群 20 例における各分画の平均 LF 濃度は,  $4.0\rightarrow 2.2\rightarrow 2.2\rightarrow 2.0\rightarrow 2.1\mu\text{g/ml}$  と推移した. すなわち, 第 I 分画ではウォッシュアウト効果により最も高値を示し, 第 II 分画以後はやや減少し, ほぼプラトーであった. また, 図には示さなかったが, 男女間には有意の差は認められなかった. 各疾患群においても第 I 分画で最高値を示し, 対照群とほぼ同様の分泌パターンを示した. しかし, Sjs においては平均  $23.1\rightarrow 16.9\rightarrow 14.3\rightarrow 12.5\rightarrow 11.3\mu\text{g/ml}$  と推移し, 分泌相において漸減するが, 全分画を通じて対照群に比して明らかに有意な高値を示した. PBC 単独群も全般に高値を示したが, 推

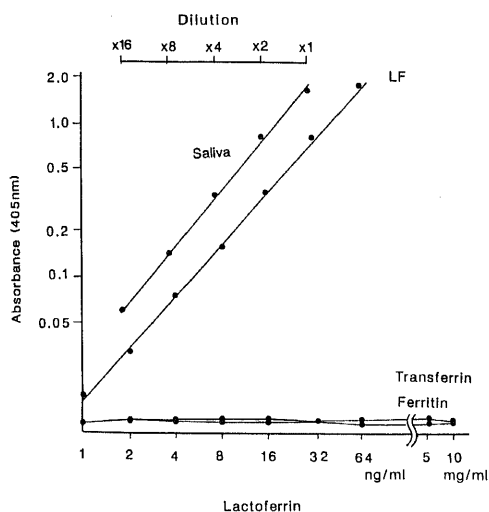


Fig. 2. Standard curve of LF and dilution curves of saliva, transferrin and ferritin.

Table 1. Intra-assay and inter-assay of lactoferrin by EIA.

|             | Number | lactoferrin(ng/ml) |      | Coefficient of variation(%) |
|-------------|--------|--------------------|------|-----------------------------|
|             |        | Mean               | SD   |                             |
| Intra-assay | 96     | 9.8                | 0.63 | 6.4                         |
|             | 96     | 21.2               | 1.19 | 5.6                         |
|             | 96     | 44.3               | 1.90 | 4.3                         |
| Inter-assay | 5      | 8.9                | 0.61 | 6.8                         |
|             | 5      | 20.8               | 1.10 | 5.3                         |
|             | 5      | 43.1               | 2.67 | 6.2                         |

SD, standard deviation.

計学的に有意ではなかった。一方、CP 群においてはいずれの分画でも対照群に比して有意差は認められなかった。

### III. 唾液中 LF 排出量の推移

排出量として比較検討すると、図 4 に示すごとく、濃度の場合と同様に、各疾患群とも第 I 分画で最高値をとり、以後漸減する傾向にあった。全分画を通じて SjS で最も高く、対照群に比して明らかに有意な上昇がみられた。一方、PBC 単独群、CP 群では対照群に比して有意差は認められなかった。

### IV. 第 I 分画（ウォッシュアウト相）における LF 濃度

図 5、左に示すごとく、対照群の平均値 + 2 × 標準偏差 ( $M+2SD$ ) は  $13.3 \mu\text{g/ml}$  となり、それ以上を異常値とすれば、SjS 群 17 例中 12 例 (71%) が異常と判定され、涙腺単独障害例の 1 例を除けば、16 例中 12 例 (75%) とさらに陽性率が高くなった (表 2)。また、PBC 単独群で  $50 \mu\text{g/ml}$  と 1 例に異常高値がみられた。一方、CP 群では異常高値例はみられなかった。

### V. 第 III 分画（分泌相）における LF 濃度

図 5、右に示すごとく、対照群の  $M+2SD$  は  $5.2 \mu\text{g/ml}$  となり、それ以上を異常値とすれば、

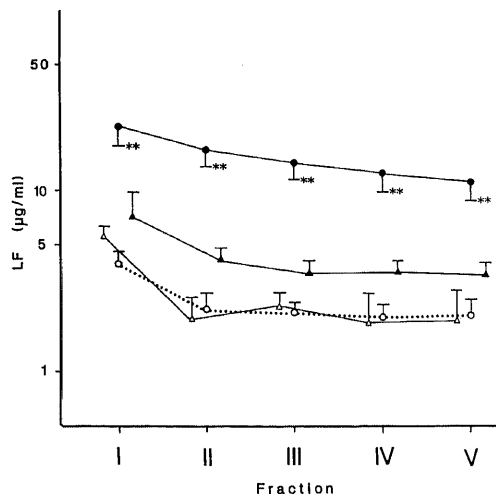


Fig. 3. Secretory profile of LF concentration in saliva.

●—●, Sjögren's syndrome; ▲—▲, primary biliary cirrhosis; △—△, chronic pancreatitis; ○—○, control. Each bar represents mean ± S.E.M.

\*,  $p < 0.05$ ; \*\*,  $p < 0.01$  vs. control by ANOVA followed by Duncan's multiple comparison test.

SjS 群 17 例中 15 例 (88%) に異常がみられた (表 2)。PBC 単独群では 1 例が  $10 \mu\text{g/ml}$  と異常高値を示した。CP 群では 1 例で異常値を示したがカットオフ値を僅かに越えるのみであった。

### VI. LF・総蛋白濃度比

第 I 分画の対照群における平均は  $1.28 \times 10^{-4} \%$  であり、SjS 群では平均  $6.51 \times 10^{-4} \%$  と図 6 に示すごとく対照群に比して明らかに有意な高値を示した。一方、PBC 単独群、CP 群ではそれぞれ平均  $2.37 \times 10^{-4}$ ,  $1.82 \times 10^{-4}$  といずれも対照群に比して有意差は認められなかった。

同様に、第 III 分画についても検討すると、対照群における平均は  $0.41 \times 10^{-4} \%$  であり、SjS 群では平均  $4.28 \times 10^{-4} \%$  と対照群に比して図 6 に示すごとく明らかに有意な上昇がみられた。一方、PBC 単独群、CP 群では対照群に比して有意差は認められなかった。また、第 III 分画では、SjS 群の平均値は対照群の平均値の約 10 倍で、第 I 分画のそれは約 5 倍で、第 III 分画でよりその差は著明であった。

### VII. LF・アミラーゼ活性比

第 I 分画の対照群における平均値は  $2.31 \times 10^{-3} \mu\text{g/IU}$  であり、SjS 群の平均は  $13.1 \times 10^{-3} \mu\text{g/IU}$  と対照群に比して明らかに有意の高値を示した。同様に、

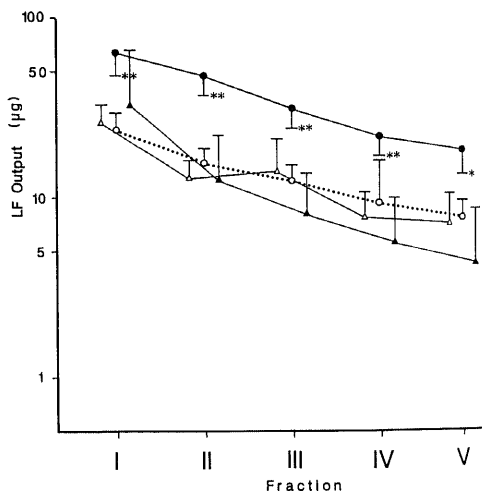


Fig. 4. Secretory profile of LF output in saliva.

●—●, Sjögren's syndrome; ▲—▲, primary biliary cirrhosis; △—△, chronic pancreatitis; ○—○, control. Each bar represents mean ± S.E.M.

\*,  $p < 0.05$ ; \*\*,  $p < 0.01$  vs. control by ANOVA followed by Duncan's multiple comparison test.

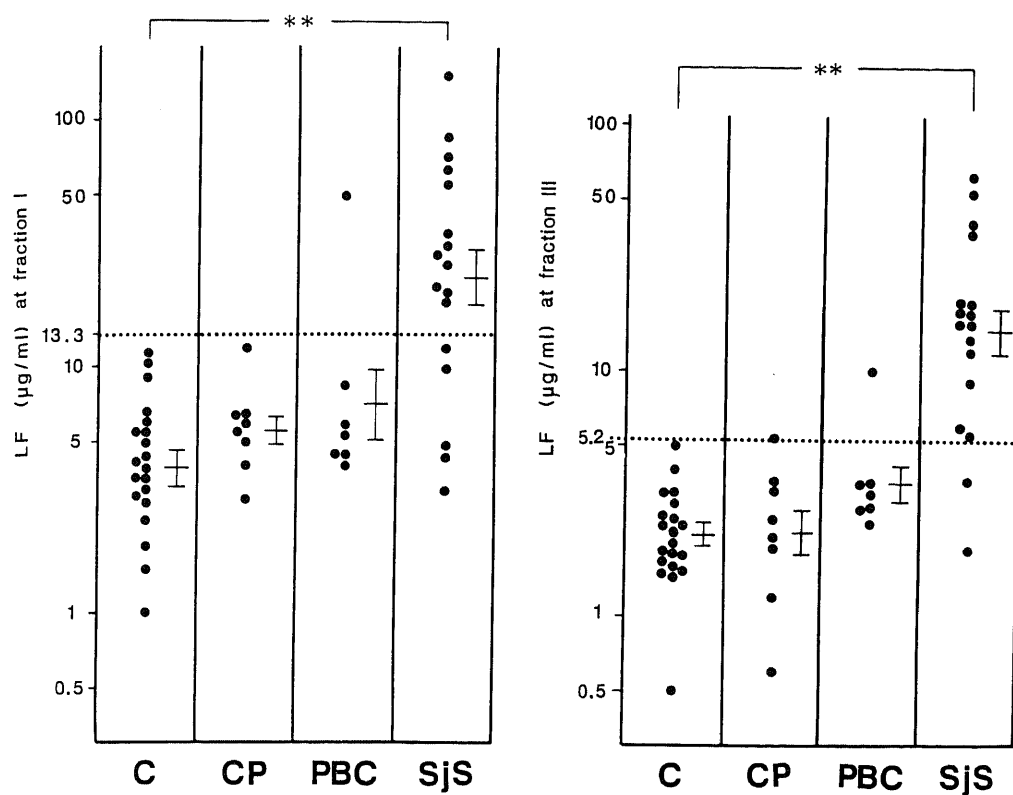


Fig. 5. Distribution of LF concentration at fraction I and III. Dotted line indicates LF level of mean + 2S.D. in controls.

C, control; CP, chronic pancreatitis; PBC, primary biliary cirrhosis; SJS, Sjögren's syndrome.

\*\*,  $p < 0.01$  vs. control by ANOVA followed by Duncan's multiple comparison test.

Table 2. Prevalence of lactoferrin concentration in patients with various diseases.

| Disease                   | No. of cases | Fraction I<br>(LF $\geq 13.3 \mu\text{g/ml}$ ) | Fraction III<br>(LF $\geq 5.2 \mu\text{g/ml}$ ) |
|---------------------------|--------------|------------------------------------------------|-------------------------------------------------|
| Sjögren's syndrome        | 17           | 12 (71%)                                       | 15 (88%)                                        |
| Primary biliary cirrhosis | 7            | 1 (14%)                                        | 1 (14%)                                         |
| Chronic pancreatitis      | 8            | 0                                              | 1 (13%)                                         |
| Control                   | 20           | 0                                              | 0                                               |

第Ⅲ分画の対照群における平均は $0.72 \times 10^{-3} \mu\text{g}/\text{IU}$ であり、SjS 群では平均 $8.9 \times 10^{-3} \mu\text{g}/\text{IU}$ と対照群に比して明らかに有意の高値を示した。また、第Ⅲ分画では、SjS 群の平均値は対照群の平均値の約12倍で、第Ⅰ分画の約6倍に比してより高値であった。このように、LF・アミラーゼ濃度比について検討しても、LF・総蛋白濃度比と同様に、SjS 群で明らかに有意な上昇がみられ、その差は第Ⅲ分画でより著明であった。

#### VIII. 最高重炭酸塩濃度、液量およびアミラーゼ排出量

各疾患群における最高重炭酸塩濃度、液量およびアミラーゼ排出量の分布を図7に示す。SjS 群における各々の平均値は、いずれにおいても対照群に比して明らかに有意の低値を示した。また、対照群の

M-2SD をカットオフ値にとると、SjS 群における異常出現は、最高重炭酸塩濃度で15例中7例(47%)、液量で17例中6例(35%)、アミラーゼ排出量で17例中9例(53%)であった。一方、これらの異常出現率を LF のそれと比較してみると、前述したごとく LF の異常出現率は第Ⅰ分画で71%、第Ⅲ分画で88%であり、特に第Ⅲ分画の LF 異常出現率は最高重炭酸塩濃度 ( $\chi^2=4.6$ ,  $p<0.05$ ) や液量 ( $\chi^2=8.0$ ,  $p<0.01$ ) のそれに比し有意に高値であった。

#### IX. LF 濃度と最高重炭酸塩濃度との関係

重炭酸塩濃度を測定し得た50症例について、5分画のうち最も高い値を最高重炭酸塩濃度として、第Ⅰ分画および第Ⅲ分画の LF 濃度と比較検討した。図8に示すごとく、いずれの分画においても、最高

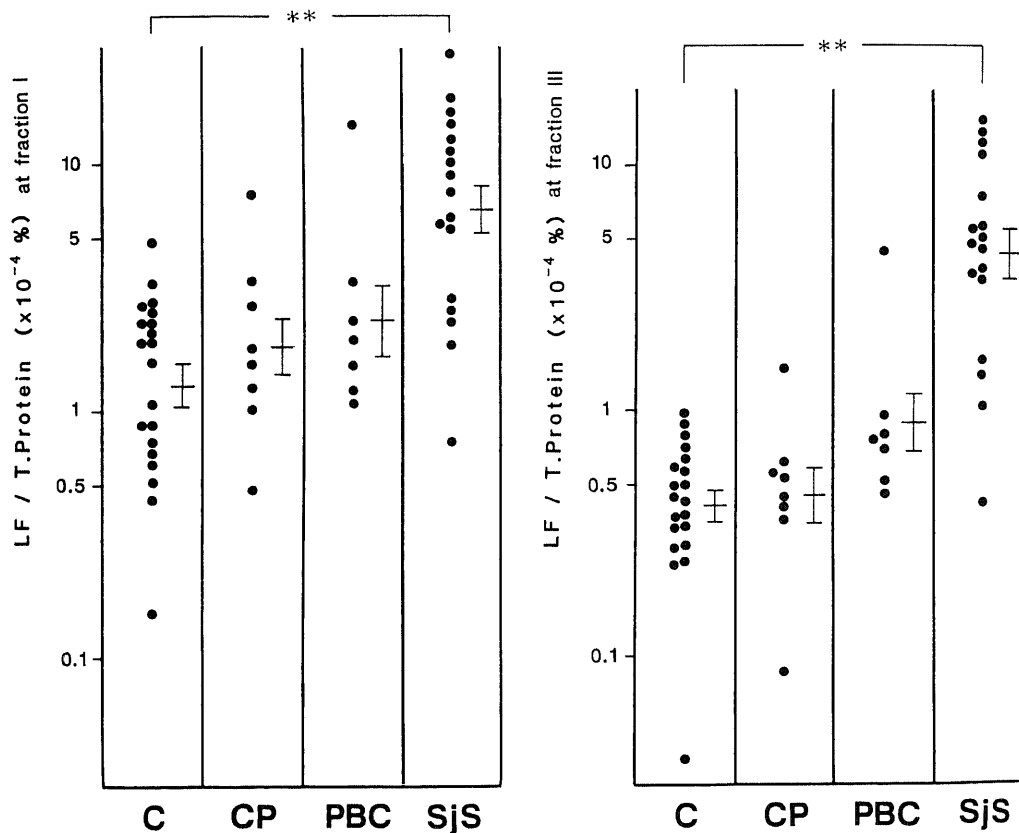


Fig. 6. Distribution of LF to total protein ratio at fraction I and III. Each bar represents mean  $\pm$  S.E.M.

C, control; CP, chronic pancreatitis; PBC, primary biliary cirrhosis; SjS, Sjögren's syndrome.

\*\*,  $p<0.01$  vs. control by ANOVA followed by Duncan's multiple comparison test.

重炭酸塩濃度が低いほど、LF 濃度は高値をとる傾向を示し、両者間には明らかに有意な負の相関関係が認められた。

#### X. LF 濃度と液量との関係

第 I 分画および第 III 分画の LF 濃度と液量との関係を比較検討した。図 9 に示すごとく、いずれの分画においても、液量が少ないほど LF 濃度は高値を

とる傾向を示し、両者間には明らかに有意な負の相関関係が認められた。

#### XI. LF 濃度とアミラーゼ排出量との関係

第 I 分画および第 III 分画の LF 濃度とアミラーゼ排出量との関係を比較検討した。図 10 に示すごとく、いずれの分画においても、アミラーゼ排出量が少ないほど LF 濃度は高値をとる傾向を示し、両者間に

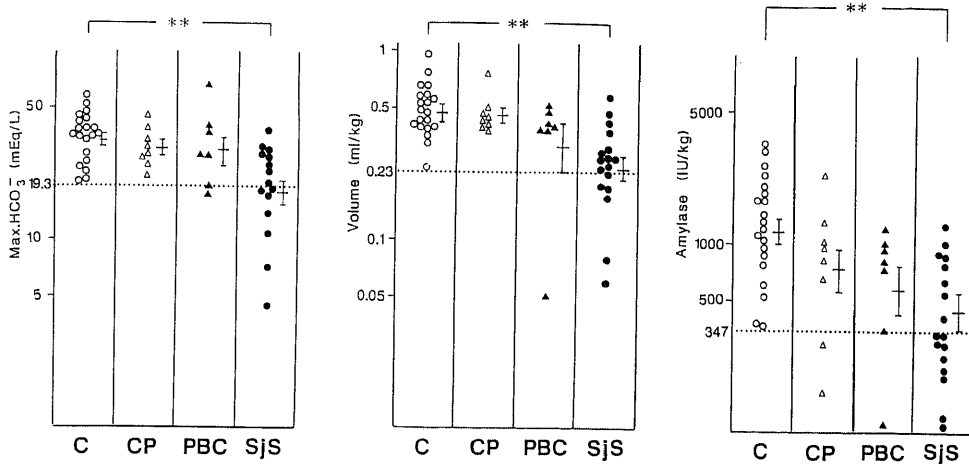


Fig. 7. Distribution of max.  $\text{HCO}_3^-$ , volume and amylase in various groups. Each bar represents mean  $\pm$  S.E.M. Dotted line indicates level of mean  $-2$ S. D. in controls. C, control; CP, chronic pancreatitis; PBC, primary biliary cirrhosis; Sjs, Sjögren's syndrome.

\*\*,  $p < 0.01$  vs. control by ANOVA followed by Duncan's multiple comparison test.

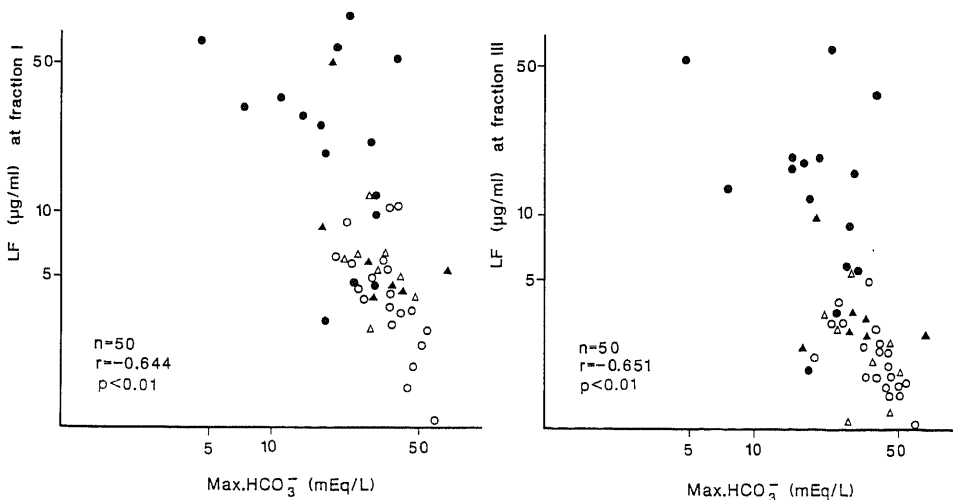


Fig. 8. Correlation between LF concentration and max.  $\text{HCO}_3^-$ .

●, Sjögren's syndrome; ▲, primary biliary cirrhosis; △, chronic pancreatitis; ○, control.



は明らかに有意な負の相関関係が認められた。

### 考 察

SjS は唾液腺あるいは涙腺の乾燥症状を主徴とし、これらの外分泌腺の慢性炎症を特徴とする自己免疫疾患として理解されている。SjS の診断方法として唾液腺では生検組織所見や造影所見による形態学的な検査が最も信頼されているが<sup>10)</sup>、患者にとって侵

襲的であるばかりではなく、検査法としてもかなり面倒である。さらに、唾液腺については有力な機能検査法がないのが現状である。また、涙腺についてはローズベンガル試験やシャーマー試験などの検査が用いられているが、いずれも半定量的であり、実際の判定に際しては微妙な場合もしばしば見られる。

ところで、唾液腺は外分泌腺臓器として唾液中へ

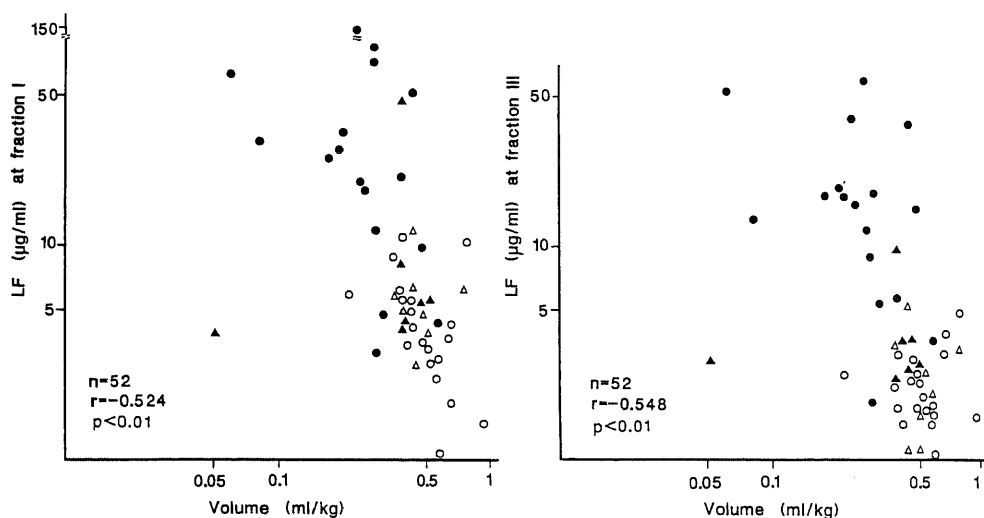


Fig.9. Correlation between LF concentration and volume.

●, Sjögren's syndrome; ▲, primary biliary cirrhosis; △, chronic pancreatitis; ○, control.

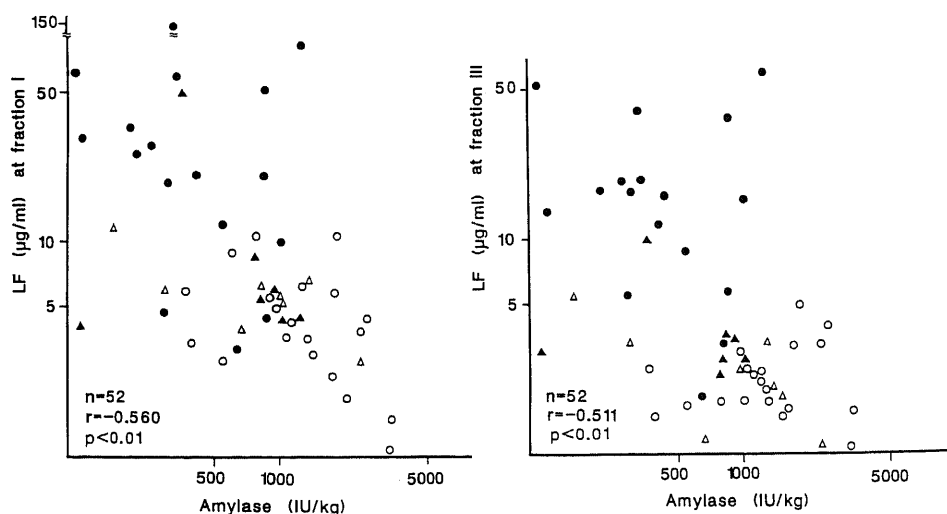


Fig.10. Correlation between LF concentration and amylase output.

●, Sjögren's syndrome; ▲, primary biliary cirrhosis; △, chronic pancreatitis; ○, control.

各種成分を積極的に分泌するため、唾液腺の病的状態では唾液腺の異常を鋭敏に反映して唾液成分中に変化がみられることが予想される。このような観点より、唾液中のリゾチームや $\beta_2$ ミクログロブリンを測定し、SjSの診断への有用性を検討した報告がみられる。耳下腺唾液中のリゾチームを測定した Moutsopoulos ら<sup>19)</sup>は、SjS では対照群に比して有意の上昇を示し、対照群の  $M+2SD$  を正常上限とすると、SjS では17例中10例に高値であり、耳下腺腫大ともよく相関し、SjS の補助診断法として有用であると報告している。また、耳下腺唾液中 $\beta_2$ ミクログロブリンを測定した Michalski ら<sup>20)</sup>の成績では、SjS では有意に高値であり、リンパ球浸潤程度ともよく相関し、局所の炎症の程度を知る簡便で非侵襲的な検査法であるとしている。さらに、Talal ら<sup>21)</sup>の唾液中 $\beta_2$ ミクログロブリンの検討でも、やはり SjS では有意の高値を示し、しかも、大多数の SjS において血中よりも唾液中の方が高値であり、これは局所での $\beta_2$ ミクログロブリンの産生亢進を示唆するものであろうと述べている。しかし、これら唾液中物質の測定は唾液腺疾患の診断法としては普及しておらず、より鋭敏な診断法の開発が期待される現状である。

一方、最近、石灰化慢性膵炎の膵液中で LF の著増することが報告され<sup>7-9)</sup>、慢性膵炎の質的診断法としてだけでなく、その病態生理の面においても注目されている。さらに、耳下腺は組織形態学のみでなく機能的にも膵臓に極めて類似した臓器である。また、ムンプスウイルスが耳下腺のみならず、しばしば好んで膵臓も侵すことなどにより、両者は古来姉妹臓器であるといわれている。このような観点より、外分泌腺における炎症と関連した生理活性物質とも考えられる LF が唾液腺の病変と関連して、どのような変動を示すかは興味深い課題である。しかしながら、唾液中の LF 値を測定したものとしては、Tabak ら<sup>22)</sup>と Kontinen ら<sup>23)</sup>の報告があるにすぎない。Tabak らのキャンディーまたは2%クエン酸刺激による耳下腺唾液中の LF をロケット電気泳動法で測定した成績を見ると、非唾液腺疾患群の LF 値は平均 1.2mg% であるのに対して、SjS では6例中5例に異常高値を示し、平均 22.8mg% であったとしている。さらに、慢性再燃性耳下腺炎において活動期に平均 22.0mg% に対して、回復期に平均 8.7mg% と急激に減少し、唾液中 LF 値の変動は病勢の消長に一致して変動するとしている。また、Kontinen らは非分泌刺激混合唾液中の LF を放射免疫測定

法で測定し、対照群の LF 値は $4.03 \pm 1.48$  (平均値 $\pm$ 標準誤差)  $\mu\text{g/ml}$  であるのに対して、SjS 8例では $48.92 \pm 14.21 \mu\text{g/ml}$  と著明に高値であったとしている。これらの報告はいずれも少数例の検討であり、また、刺激方法がキャンディーまたはクエン酸と恒常性に欠けること、採液方法が口腔底に貯った混合唾液であること、測定方法がロケット電気泳動法と半定量的であることなどに問題があり、唾液中 LF 測定に関する臨床的有用性は未だ明らかではない。

著者は塩酸ピロカルピン刺激下に特殊な採液器具を用いて純粋な耳下腺唾液を分画採取し、それらの LF および各種成分を測定し、その関連性について検討した。その成績では、対照群および各種疾患群いずれにおいても、第I分画ではウォッシュアウト効果により最高値をとり、第II～第III分画以後はほぼプラトーを示す分泌パターンであったが、いずれの分画においても SjS 群で明らかに有意な高値を示した。また、比較対照群の  $M+2SD$  をカットオフ値として検討しても、第1分画で71%、第III分画で88% が異常高値と判定された。この様に、SjS では対照群に比して第I分画、第III分画いずれの分画とも有意の上昇がみられたが、ウォッシュアウト相を反映する第I分画よりも分泌相を反映する第III分画でよりその差は著明であった。このことより、分泌相でその機能異常がより反映されやすいものと思われる。さらに、LF 濃度だけでなく、LF 排出量あるいは LF・総蛋白濃度比や LF・アミラーゼ活性比についても明らかな上昇がみられることより、SjS における LF 濃度の上昇は単なる分泌量の減少に基づく濃縮結果ではなく、LF そのものの特異的な増加であると考えられる。このように、SjS では唾液中 LF しばしば上昇することが明らかであり、その頻度も高いことより診断的有用性が大いに期待できる。

また、PBC 単独群において、LF 異常高値例が1例にみられた。この症例は無症候性 PBC で、肝の組織像は Scheuer の3期であったが、眼科的および耳鼻科的検査では、診断基準上 sicca complex の合併とは診断し得なかった。しかし、PBC では SjS を合併する頻度が高く<sup>24,25)</sup>、本例では早期の sicca complex である可能性もあり、経過観察が必要かと考えられる。今後、疑診例や比較的軽症例の診断、さらにはステロイド治療例のトレースマーカーとしての有用性などについても検討を進める必要があると考えている。

さて、このような唾液中 LF の上昇はいかなる機序に由来するのであろうか。LF は多核白血球の顆粒

中に含まれており<sup>2)</sup>、好中球減少症患者では血清中 LF が低いこと<sup>20)</sup>や、血清中 LF と好中球ブールとの相関が認められること<sup>20)</sup>より、血清中 LF は白血球由来であろうと考えられている。また、骨髓性白血病における血清中 LF 高値<sup>20)</sup>や慢性関節リウマチにおける関節液中 LF 高値も<sup>20)</sup>白血球由来とされている。一方、各種外分泌腺組織についてみると、慢性炎症を呈する気管支腺では正常に比して LF の強く発現していることが伊藤ら<sup>30)</sup>により報告されている。また、Colomb ら<sup>31)</sup>によると正常腺でも腺房細胞と腺腔内に LF が染色されるが、石灰化慢性肺炎ではより多くの腺房細胞で強く染色されるようになることより、その産生と分泌の亢進が示唆されている。

唾液腺についてみると、正常では漿液性腺房細胞と介在部導管に LF が染色され<sup>32)</sup>、炎症性唾液腺組織では、局在は正常と同じであるものの、炎症性変化と相関して陽性細胞の出現頻度と染色性に増強がみられたとされている<sup>33)</sup>。また、Caselitz ら<sup>34)</sup>も炎症部の導管上皮細胞に強い LF の染色が認められたと報告している。このようなことから、SjS においても炎症性変化に平行して唾液腺の腺房細胞や導管上皮細胞での LF の産生が亢進し、その結果、唾液中 LF の上昇がおこるものと考えられる。

さて、LF は溶媒の pH が低下すると、高分子物質とコンプレックスを形成しやすい性質がある<sup>35)</sup>。慢性肺炎の腺液では重炭酸塩が低下し、その結果 pH が低下するので、前述の LF の性状が発現して蛋白栓が形成され、これが慢性肺炎の発生進展機序として関与すると想定されている<sup>36)</sup>。ところで、LF は強い鉄親和性蛋白であり、また、Haber-Weiss 反応 ( $O_2 + H_2O_2 \xrightarrow{LF \cdot Fe^{3+}} \cdot OH + OH^- + O_2$ ) において鉄イオンの触媒としての強さは無機イオンよりも LF に結合した鉄が5000倍も強いとされている<sup>37)</sup>。この結果生じたハイドロキシルラジカル ( $\cdot OH$ ) が強い細胞破壊をもつとされている。このようなことから、SjS においても唾液腺における LF の増加は組織障害をひきおこし、さらに増悪因子として関与している可能性も考えられる。一方、LF は補体系の  $C_3$  変換酵素を抑制することにより炎症を抑えるという合目的作用をも有するとされている<sup>38)</sup>。いずれにしても、これらの作用が絡み合っているものと推察されるが、SjS における唾液中 LF 増加の病態生理学的意義については未だ明らかではない。

唾液腺では腺外分泌腺<sup>39)</sup>と同様に、分泌液中の酵素や蛋白は腺房細胞から、重炭酸塩および水分は導管上皮細胞から主に分泌されると考えられている<sup>39)</sup>。腺

では外分泌腺が障害されれば、これら物質の分泌が低下する。実際、臨床的にも腺外分泌機能低下の評価には、PS 試験で得られた十二指腸液や内視鏡的に採取された純粋腺液の重炭酸塩濃度の低下、酵素量あるいは液量の減少が判定指標として一般に用いられている<sup>10)</sup>。唾液腺の場合には、腺外分泌機能試験のようにこれら物質の測定が唾液腺機能の検査法としては用いられてはいないが、今回の著者の成績では SjS 群ではこれらの因子はいずれも明らかに低下しており、唾液腺機能を反映しているものと思われる。したがって、唾液中 LF 濃度と最高重炭酸塩濃度、液量およびアミラーゼ排出量との間には明らかな負の相関が認められたことより、唾液中 LF 濃度は唾液腺機能が低下するにしたがい上昇するものと考えられる。さらに、SjS における唾液中 LF 濃度の異常出現率は、最高重炭酸塩濃度および液量のそれと比較して有意に高く、より鋭敏なマーカーであることが示唆される。

## 結 論

ヒト初乳より精製した LF を用いて、LF の EIA 法を開発し、SjS における耳下腺唾液中 LF 測定の診断的有用性を検討し、以下の結果を得た。

1. 唾液中 LF 濃度は第 I 分画で最高値を示し、第 II～第 III 分画以後はほぼ一定値を示す分泌パターンであったが、SjS においては対照群に比して全分画を通じて有意に高値であった。

2. 対照群の  $M+2SD$  をカットオフ値とすると、SjS に第 I 分画で71%、第 III 分画で88%が異常高値と判定された。

3. LF 排出量あるいは LF・総蛋白濃度比や LF・アミラーゼ活性比についてみても、SjS においては対照群に比して有意な上昇がみられた。

4. LF 濃度と最高重炭酸塩濃度、LF 濃度と液量および LF 濃度とアミラーゼ排出量との間にはいずれにおいても明らかに有意な負の相関関係が認められた。

5. LF 濃度の異常出現率は最高重炭酸塩濃度や液量のそれと比較して有意に高かった。

以上より、唾液中 LF は SjS で高頻度上昇し、その測定は SjS の診断法として有用であると考えられる。

## 謝 辞

稿を終えるにあたり、御指導、御校閲を賜りました恩師服部信教授に深甚なる謝意を捧げます。また、直接御指導戴い

た本学がん研究所内科澤武紀雄教授および EIA 法開発に御指導いただきました埼玉県立がんセンター臨床検査部長石井勝先生に深謝致します。更に、御協力戴いた国立金沢病院土肥和敏先生、第1内科消化器グループおよびがん研究所内科の諸先生方に深謝致します。

なお、本論文の要旨の一部は、第25回日本消化器病学会大会(1983年、山口)および第83回日本内科学会講演会(1986年、東京)において発表した。

## 文 献

- 1) Masson, P. L., Heremans, J. F. & Dive, CH.: An iron-binding protein common to many external secretions. *Clin. Chim. Acta*, **14**, 735-739 (1966).
- 2) Masson, P. L., Heremans, J. F. & Schonne, E.: Lactoferrin, an iron-binding protein in neutrophilic leukocytes. *J. Exp. Med.*, **130**, 643-658 (1969).
- 3) Ambruso, D. R. & Johnston, R. B. Jr.: Lactoferrin enhances hydroxyl radical production by human neutrophils, neutrophil particulate fractions, and an enzymatic generating system. *J. Clin. Invest.*, **67**, 352-360 (1981).
- 4) Arnold, R. R., Russell, J. E., Champion, W. J., Brewer, M. & Gauthier, J. J.: Bactericidal activity of human lactoferrin. Differentiation from the stasis of iron deprivation. *Infect. Immun.*, **35**, 792-799 (1982).
- 5) Kijlstra, A. & Broersma, L.: Lactoferrin stimulates the production of leucocyte migration inhibitory factor by human peripheral mononuclear leucocytes. *Clin. Exp. Immunol.*, **55**, 459-464 (1984).
- 6) Kijlstra, A. & Jeurissen, S. H. M.: Modulation of classical C3 convertase of complement by tear lactoferrin. *Immunology*, **47**, 263-270 (1982).
- 7) Figarella, C., Estevenon, J. P. & Sarles, H.: Measurement of lactoferrin in pancreatic juice. *Lancet*, **8073**, 1105-1106 (1978).
- 8) Fedail, S. S., Harvey, R. F., Salmon, P. R., Brown, P. & Read, A. E.: Trypsin and lactoferrin levels in pure pancreatic juice in patients with pancreatic disease. *Gut*, **20**, 983-986 (1979).
- 9) 米島正廣: Lactoferrin の膵疾患診断への応用にかんする研究 - RIA 法の開発とその臨床的応用 - . *日消誌*, **79**, 1309-1317 (1982).
- 10) 大藤 真: 昭和52年度研究報告総括. 昭和52年度研究業績 (厚生省特定疾患シェーグレン病調査研究班編), 3-6頁, 厚生省, 東京, 1978.
- 11) 日本消化器病学会慢性膵炎検討委員会: 慢性膵炎の臨床診断基準. 1-4頁, 医学図書出版, 東京, 1983.
- 12) Kakizaki, G., Noto, N., Saito, T., Fujiwara, Y., Ohizumi, T., Soeno, T. & Ishidate T.: Laboratory diagnostic test for pancreatic disorders by examination of parotid saliva. *Tohoku J. Exp. Med.*, **109**, 121-133 (1973).
- 13) 竹森康弘, 赤沢修吾, 神田裕三, 石井 勝, 澤武紀雄, 米島正廣, 登谷大修, 服部 信: 酵素免疫測定法 (enzyme immunoassay) による lactoferrin の測定. *医学のあゆみ*, **133**, 53-55 (1985).
- 14) Bennett, R. & Mohla, C.: A solid-phase radioimmunoassay for the measurement of lactoferrin in human plasma. variations with age, sex, and disease. *J. Lab. Clin. Med.*, **88**, 156-166 (1976).
- 15) Avrameas, S.: Coupling of enzymes to proteins with glutaraldehyde. Use of the conjugates for the detection of antigens and antibodies. *Immunochemistry*, **6**, 43-52 (1969).
- 16) 金井 泉, 金井正光: 臨床検査法提要, 第29版, 562-565頁, 金原出版株式会社, 東京, 1983.
- 17) Lowry, O. H., Rosenbrough, N. J., Farr, A. L. & Randall, R. J.: Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**, 265-275 (1951).
- 18) Duncan, R. C., Knapp, R. G. & Miller III, M. C.: *Introductory Biostatistics for the Health Sciences*, 2nd ed., p151-155, John Wiley & Sons Inc., New York, 1983.
- 19) Moutsopoulos, H. M., Karsh, J., Wolf, R. O., Tarpley, T. M., Tyllenda, A. & Papadopoulos, N. M.: Lysozyme determination in parotid saliva from patients with Sjögren's syndrome. *Am. J. Med.*, **69**, 39-42 (1980).
- 20) Michalski, J. P., Daniels, T. E., Talal, N. & Grey, H. M.: Beta<sub>2</sub>-microglobulin and lymphocytic infiltration in Sjögren's syndrome. *N. Engl. J. Med.*, **293**, 1228-1231 (1975).
- 21) Talal, N., Grey, H. M., Zvaifler, N., Michalski, J. P. & Daniels, T. E.: Elevated salivary and synovial fluid  $\beta_2$ -microglobulin in Sjögren's

syndrome and rheumatoid arthritis. *Science*, **188**, 1196-1198 (1975).

- 22) **Tabak, L., Mandel, I. D., Karlan, D. & Baurmash, H.**: Alterations in lactoferrin in salivary gland disease. *J. Dent. Res.*, **57**, 43-47 (1978).
- 23) **Kontinen, Y. T., Kulomaa, M., Malmström, M., Kilpi, A. & Reitamo, S.**: Lactoferrin in Sjögren's syndrome. *Arthritis Rheum.*, **27**, 462-467 (1984).
- 24) **Sherlock, S.**: Primary biliary cirrhosis. In L. Schiff & E. R. Schiff (eds.), *Diseases of the Liver*, 6th ed., p979-999, J. B. Lippincott Co., Philadelphia, 1987.
- 25) 加登康洋, 宮森弘年, 登谷大修, 鶴浦雅志, 田中延善, 小林健一, 服部 信: 原発性胆汁性肝硬変の他臓器症状について. *肝胆膵*, **7**, 245-250 (1983).
- 26) **Olofsson, T., Olsson, I., Venge, P. & Elgefors, B.**: Serum myeloperoxidase and lactoferrin in neutropenia. *Scand. J. Haematol.*, **18**, 73-80 (1977).
- 27) **Hansen, N. E., Malmquist, J. & Thorell, L.**: Plasma myeloperoxidase and lactoferrin measured by radioimmunoassay. relation to neutrophil kinetics. *Acta Med. Scand.*, **198**, 437-443 (1975).
- 28) **Venge, P., Foucard, T., Henriksen, J., Hakansson, L. & Kreuger, A.**: Serum-levels of lactoferrin, lysozyme and myeloperoxidase in normal, infection-prone and leukemic children. *Clinica. Chimica. Acta*, **136**, 121-130 (1984).
- 29) **Malmquist, J., Thorell, J. I. & Wollheim, F. A.**: Lactoferrin and lysozyme in arthritic exudate. *Acta Med. Scand.*, **202**, 313-318 (1977).
- 30) 伊藤元彦, 玉田二郎, 青木 稔: 気道分泌系の機能と構造—気道の防禦と関連して. *日胸疾会誌*, **19**, 926-931 (1981).
- 31) **Colomb, E., Pianetta, C., Estevenon, J.**

**P., Guy, O., Figarella, C. & Sarles, H.**: Lactoferrin in human pancreas. Immunohistological localization in normal and pathological pancreatic tissues. *Digestion*, **14**, 242-249 (1976).

- 32) **Korsrud, F. R. & Brandtzaeg, P.**: Characterization of epithelial elements in human major salivary glands by functional markers. *J. Histochem. Cytochem.*, **30**, 657-666 (1982).
- 33) 小川郁子, 高田 隆, 小倉睦美, 伊集院直邦, 二階宏昌: 炎症性唾液腺組織における lactoferrin, lysozyme 及び secretory component の免疫組織化学的局在について. *広大歯誌*, **16**, 205-210 (1984).
- 34) **Caseltz, J., Jaup, T. & Seifert, G.**: Lactoferrin and lysozyme in carcinomas of the parotid gland. A comparative immunocytochemical study with the occurrence in normal and inflamed tissue. *Virchows Arch.*, **394**, 61-73 (1981).
- 35) **Hekman, A.**: Association of lactoferrin with other patients as demonstrated by changes in electrophoretic mobility. *Biochim. Biophys. Acta*, **251**, 380-387 (1971).
- 36) **Sarles, H.**: Chronic calcifying pancreatitis - chronic alcoholic pancreatitis. *Gastroenterology*, **66**, 604-616 (1974).
- 37) **Blake, D. R., Hall, N., Bacon, P. A., Dieppe, P. A., Halliwell, B. & Gutteridge, J. M. C.**: The importance of iron in rheumatoid disease. *Lancet*, **8256**, 1142-1144 (1981).
- 38) **Schulz, I.**: Electrolyte and fluid secretion in the exocrine pancreas. In L. R. Johnson (ed.), *Physiology of the Gastrointestinal Tract*, p795-819, Raven Press, New York, 1981.
- 39) **Burgen, A. S. V.**: Secretory processes in salivary glands. Alimentary canal. In C. F. Code (ed.), *Handbook of Physiology*, p561-579, American Physiological Society, Washington, D. C., 1967.

Studies on Clinical Application of the Measurement of Salivary Lactoferrin Levels and its Significance (I) Evaluation of Parotid Salivary Lactoferrin in Various Diseases Yasuhiro Takemori, Department of Internal Medicine (I), School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920—J. Jusen Med. Soc., 97, 789—801 (1988)

Key words: lactoferrin parotid saliva, Sjögren's syndrome, enzyme immunoassay

#### Abstract

The present study was performed to elucidate the significance of measurement of salivary lactoferrin (LF) in patients with various diseases, chiefly Sjögren's syndrome (SjS). Parotid saliva was obtained by using a modified Lashley cup at five minute intervals over a twenty five minute period after pilocarpine hydrochloride stimulation. The LF concentration,  $\text{HCO}_3^-$  concentration, amylase activity, protein concentration and volume of each fraction were assayed to examine their secretory behaviors. The LF concentration was determined by the enzyme immunoassay technique with LF purified from human colostrum. The LF concentration of the control group was the highest at the first fraction, reflecting the washout phase and leveled off thereafter. Various disease groups, including the SjS group, also showed the same secretory patterns as those in the control group, with the mean LF concentrations of SjS patients recording a significantly high level in all fractions compared with those of the control group. When the cut off value was regarded as the mean  $+ 2 \times$  standard deviation in the control group, the abnormal rate in SjS was very high, that is, 71% at the first fraction and 88% at the third fraction. LF output, LF to protein ratio and LF to amylase ratio, as well as the LF concentration, were significantly high in patients with SjS. Therefore, it seemed that the high levels of LF was not a mere result of the concentration effect but the increase of LF itself. Also, there was a significantly negative correlation between the LF concentration and maximum  $\text{HCO}_3^-$ , volume and amylase, suggesting that the LF concentration elevated as the parotid function became impaired. In addition, the rate of abnormal LF concentrations was higher than that of maximum  $\text{HCO}_3^-$  and volume in SjS. It is concluded that the concentration of salivary LF increases frequently in SjS and that its measurement is an useful method for the diagnosis of SjS.