

令和 2 年 6 月 23 日現在

機関番号：32667

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2019

課題番号：15K20612

研究課題名(和文) 歯の色素沈着に關与する唾液ペプチドのプロテオーム解析

研究課題名(英文) Proteomics of salivary peptides involved in Black stain

研究代表者

松田 貴絵(山下貴絵)(MATSUDA, KIE)

日本歯科大学・新潟生命歯学部・非常勤講師

研究者番号：10633646

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文): ブラックステインと歯周病菌との関連と關与の解明を行っていた。歯冠色と歯周病菌と色素沈着の関連として、ブラークよりDNAを抽出し、PCRにて歯周病菌の発現を確認した。歯冠色の有無と歯周病菌の保菌の違いを検討した(J Dent Sci Ther.2016)。色素沈着に關連する唾液ペプチドの検索として、ブラックステインを有する口腔内の唾液の網羅的検索を目的とし、iTRAQ試薬を用いたタンパク質発現・相対定量解析を外注委託した。現在は、解析結果の分析と、その結果を基にして唾液中のヒスタチンを中心としたウェスタンブロッティングを行っている。今後は、研究結果をまとめ、国際誌への論文掲載を目指している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、歯の審美性への要求は強くなっている。食物由来の色素沈着に対しては、原因や歯磨剤などでの対処法が広く周知されているが、細菌由来の色素沈着に対しては、歯科医院で専門的な器具を用いて除去する必要があるため、小児患児においては特に困難なことがある。細菌由来の色素沈着の原因である歯周病菌への対応や食物由来の色素沈着がお口の中の唾液(つば)成分とどのようにかかわっているか解明できれば、患児の負担を減らせる可能性を模索した。

研究成果の概要(英文): This study searches for the association between black stain and periodontopathic bacteria prevalence. The aim of the present study was to clarify the relationship between the periodontopathic bacteria present in tooth discoloration. We found a positive relationship between superficial tooth color and the number of periodontopathic bacterial species(J Dent Sci Ther.2016). We search for salivary peptides related to stain in their tooth, we outsourced a quantification of protein expression using iTRAQ reagents for the purpose of a comprehensive search for saliva in having black stain. Currently, we are analyzing the analysis results and performing Western blotting based on the results, focusing on histatin in saliva. In the future, we aim to compile research results and publish them in international journals.

研究分野：小児歯科

キーワード：ブラックステイン 唾液 歯周病菌 PCR 色素沈着

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

日々の臨床においてステインに対して疑問を抱くようになった。ステインの中には、食事由来の色素沈着や細菌由来のものがあり、細菌由来のものでは、歯頸部に黒色の色素沈着(ブラックステイン)に着目した。ブラックステインは食事由来の色素沈着の様に全歯列に付着するのはもちろんのこと、特に歯頸部の輪郭を縁取る様に沈着し(J Dent Res. 1903)、前歯部唇(頬)側など、開口時に肉眼で確認できる部位に付着することも多く、審美的な不良を訴える人も多い。歯の色素沈着には、カテキンやタンニンに代表されるポリフェノールが関与し、タンニンは唾液成分のヒスタチンと結合することが知られている(Biochemi. J. 1995)。ペリクルの主成分であるプロリン・リッチ・プロテイン(PRP)とヒスタチン 5 との結合も報告されている(Proteomics. 2012)。そこで、歯の色素沈着にヒスタチンや PRPs はもちろんのこと、他の唾液成分も関与している可能性が高いのではないかと考えた。PRPs をはじめとする唾液成分はペリクルの形成に関与し、ペリクルの形成が色素沈着にも関与するため、唾液中のタンパク成分を詳細に検索することは重要で、極めて興味深いことである。ブラックステインの沈着には *Actinomyces* が関与しているという報告があり(J Clin Pediatr Dent. 2006)、黒色になるのはメラニンと *Actinomyces* が生産する硫化鉄や唾液や食事および血液中の鉄である鉄分が沈着するためである(Archives de pédiatrie. 2011)。しかし、ブラックステインは細菌が関与している部分だけがクローズアップされており、沈着の機序は詳細にされていない。

### 2. 研究の目的

色素沈着に関与している唾液ペプチドの確定をすべく、食物性由来の色素沈着とブラックステインとを分けて、実験を行う計画を立てた。まず、食物性由来の色素沈着に重点を置き、歯周病菌との関連や歯冠色の関連を調べた。ブラックステインの方は、ブラックステインを有する口腔内と有しない口腔内の唾液の詳細なペプチド解析を行い、目的の唾液タンパクを検索し、解明を行うことを目的とした。

### 3. 研究の方法

#### (1) 歯の外因性色素沈着に関わる歯周病原菌の解析

##### サンプル採取

日本歯科大学新潟短期大学倫理審査委員会による承認(NDUC-58)のもとで、青年期女性のブラーク提供および口腔内所見(歯冠色の状態)を採取した。

##### シェードガイドを用いた口腔内所見(歯冠色)および茶渋の判定

コンボジットレジンシェードガイド(クラレノリタケデンタル社製)を使用し歯冠色の測定と、歯に付着する茶渋の有無を記録した。

##### ブラーク採取および DNA 抽出

ブラーク採取および DNA 抽出方法は Shimomura-Kuroki らの方法(J Clin Pediatr Dent, 2011.)を基にして行い、抽出した DNA は PCR 分析を行うまで -20℃ で凍結保存し、DNA テンプレートとした。

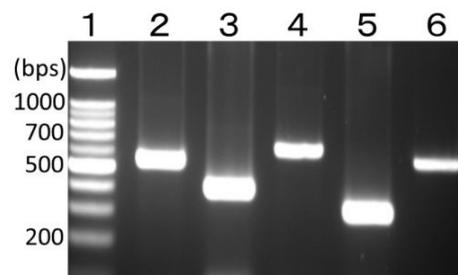
##### Polymerase chain reaction (PCR)および歯周病菌の同定と解析

5種類の各歯周病原菌特異的プライマー(下表)を用いて PCR を行い、ブラーク中の歯周病原菌を同定した。各反応系は DNA テンプレート 1 μl、各プライマー 1 μl および PCR SuperMix (Invitrogen) 22 μl の合計 24 μl とした。サーマルサイクラーを用いて、95℃ 2 分間の初期変性、その後 95℃ 30 秒、55℃ 1 分間、72℃ 1 分間の 45 サイクルで DNA 増幅、72℃ 7 分間の最終伸長により PCR 反応を行った。一方、各標準歯周病原菌 DNA (日本歯科大学新潟生命歯学部微生物学講座 三上正人講師提供)をテンプレートとして PCR 反応を行い、PCR 産物のサイズマーカーとした(下図)。

各ブラーク中の歯周病原菌を同定するため、2% アガロースゲル電気泳動により PCR 産物の DNA を同定した。測定により得られた歯周病原菌数は、Student's t test により歯の着色と茶渋の群別平均保菌種類数の比較を行った。

各歯周病原菌特異的プライマー

プライマー (5'-3')	基本位置 (bp)
<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i> (A.菌)	478-1,034 (557)
AAA CCC ATC TCT GAG TTC TTC TTC	
ATG CCA ACT TGA CGT TAA AT	
<i>Porphyromonas gingivalis</i> (P.菌)	729-1,132 (404)
AGG CAG CTT GCC ATA CTG CG	
ACT GTT AGC AAC TAC CGA TGT	
<i>Tannerella forsythia</i> (T.菌)	120-760 (641)
GCG TAT GTA ACC TGC CCG CA	
TGC TTC AGT GTC AGT TAT ACC T	
<i>Treponema denticola</i> (T.菌)	193-508 (316)
TAA TAC CGA ATG TGC TCA TTT ACA T	
TCA AAG AAG CAT CTC CTC TTC TTC TTA	
<i>Prevotella intermedia</i> (P.菌)	458-1,032 (575)
TTT GTT GGG GAG TAAAGC GGG	
TCAACA TCT CTG TAT CCT GCG T	



Lane 1, 100bp DNA Ladder; lane 2, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*; lane 3, *Porphyromonas gingivalis*; lane 4, *Tannerella forsythia*; lane 5, *Treponema denticola*; lane 6, *Prevotella intermedia*.

#### (2) 唾液のプロテオームによる網羅的解析

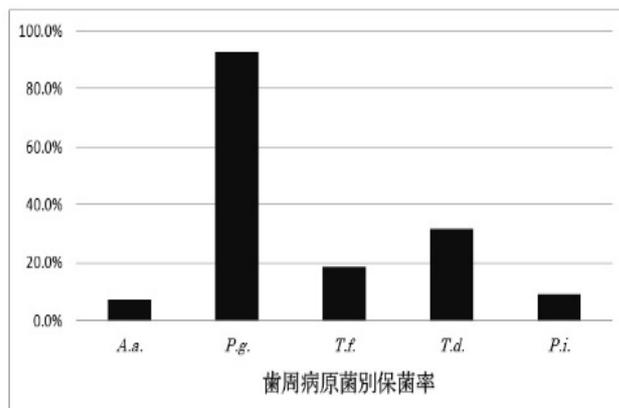
日本歯科大学新潟生命歯学部倫理委員会の承認(ENCNG-H-207)のもとで、4~7歳の小児の唾液を採取した。被検者は、未処置の齲蝕はなく、口腔内清掃状態や専門的な歯面清掃を同時期に同回

数定期的に行い、口腔内条件を可能な限り近づけるよう行った。採取した唾液は、タンパク質発現・相対定量解析のため外注委託(株式会社アプロサイエンス)し、TCA 沈殿法により脱塩・タンパク質濃縮し、タンパク質量(BCA 法)を行った。サンプル調整は TCA 沈殿処理済み溶解サンプルを用いて、iTAQ 試薬を用いて LC-MS/MS 分析を行った。

#### 4. 研究成果

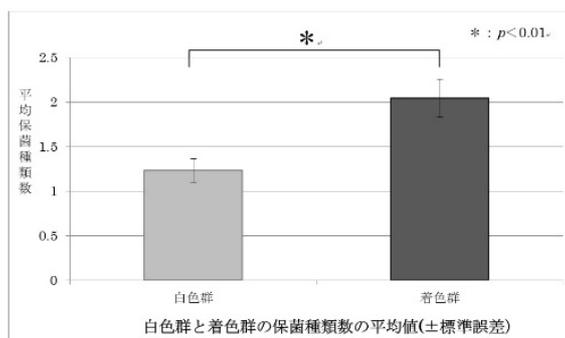
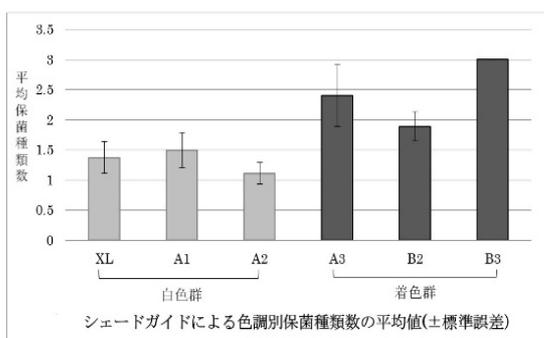
##### (1) 歯の外因性色素沈着に関わる歯周病原菌の解析

歯周病原菌の保菌状況と歯冠色の状況  
被験者 54 名のうち、P.g.菌を保有している者が 50 名(92.6%)、次いで T.d.菌を保有している者が 17 名(31.5%)、T.f.菌を保有している者が 10 名(18.5%)、P.i.菌を保有している者が 5 名(9.3%)、A.a.菌を保有している者が 4 名(7.4%)であった(右図)。また、歯周病原菌を 1 種類以上保有している者が 9 割であった。一方、歯周病原菌を保有していない者が 4 名であった。P.g.菌を保有していると他の歯周病原菌を保有している絶対条件となった。単独で P.g.菌以外の菌を保有している者はいなかった。歯冠色の状況結果は、XL が 8 名、A1 が 4 名、A2 が 18 名、A3 が 5 名、B2 が 18 名、B3 が 1 名であった。



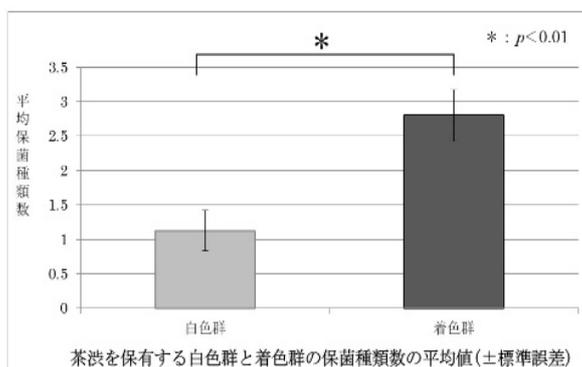
##### 歯の着色と歯周病原菌の関係

歯冠色別の保菌状況を比較するため一人当たりの平均保菌種類数を算出した。XL ののべ種類数が 11(平均 1.4 種類)、A1 が 6(平均 1.5 種類)、A2 が 20(平均 1.1 種類)、A3 が 12(平均 2.4 種類)、B2 が 34(平均 1.9 種類)、B3 が 3(平均 3 種類)の保菌種類数が認められた(下左図)。色の明度により XL、A1、A2 を白色群(30 名)、A3、B2、B3 を着色群(24 名)として 2 群に分け、白色群と着色群の間で平均保菌種類数を算出した。その結果、白色群が 37(一人当たり平均 1.2 種類)、着色群が 47(一人当たり平均 2.0 種類)の保菌種類数が認められた。なお、白色群と着色群の間で t 検定を行った結果、有意差( $p < 0.01$ )が認められた(下右図)。



##### 茶渋の保有状況

茶渋を保有する者は 13 名、茶渋を保有しない者は 41 名であった。茶渋を保有する者のうち、白色群は 8 名、着色群は 5 名となり白色群に茶渋が多く認められた。しかし、群別の平均保菌種類数を比較した結果、白色群は一人当たり平均 1.1 種類、着色群は一人当たり平均 2.8 種類となり、着色群に保菌種類数が多く認められた。なお、白色群と着色群の間で t 検定を行った結果、有意に( $p < 0.01$ )着色群のほうが多かった(右図)。



歯周病原菌の保菌状況と歯の着色の関係では、白色群と着色群の平均保菌種類数の比較を行った結果、着色群のほうが有意に多かったことから、歯の着色と歯周病原菌の保菌種類数に関連があることが示唆された。

(2) 唾液のプロテオームによる網羅的解析

同定したタンパク質の定量データより、ブラックステインを有する群と有しない群で比較を行った。ブラックステインを有する群が特に多かったタンパク質と特に少なかったタンパク質で比較を行っている。比較するタンパクは複数あるが、免疫系のタンパクが多く、現在詳細を追及している。また、当初より予定した唾液中のヒスタチンと PRPs の定量的ウェスタンプロット法を行う研究を行っている。期間中に形にできなかったが、投稿できるよう現在実験および準備を継続している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Kie Matsuda, Natsuki Suwa, Hitomi Kikuchi, Tsuneo Sekimoto and Akane Imai	4. 巻 1(2)
2. 論文標題 An Analysis of the Periodontopathic Bacteria Involved in Extrinsic Discoloration of Teeth	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 Journal of Dental Science and Therapy	6. 最初と最後の頁 1-4
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 今井あかね、松田貴絵
2. 発表標題 歯の着色に影響を及ぼす歯周病原性菌について
3. 学会等名 第58回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 田中 聖至, 松田 貴絵, 小野 幸絵, 加藤 雄一, 鴨田 剛司, 小松崎 明, 関本 恒夫
2. 発表標題 Talk Eye Liteを用いた眼球運動測定
3. 学会等名 日本歯科医学教育学会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 中山寿賀子, 田中聖至, 松田貴絵, 関本恒夫, 本間裕章, 廣岡沙由梨, 島田路征, 三瓶素子
2. 発表標題 当院における小児の舌圧に関する調査
3. 学会等名 第33回日本小児歯科学会北日本地方会
4. 発表年 2015年

1. 発表者名 田中聖至, 松田貴絵, 関本恒夫, 高橋美保子, 岡田康男, 廣岡沙由梨
2. 発表標題 Ghost Teethが疑われた乳臼歯の病理学的考察
3. 学会等名 第34回日本小児歯科学会北日本地方会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考