

機関番号：82602

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：H20～H22

課題番号：20592475

研究課題名（和文） 唾液中石灰化ナノ粒子と歯石沈着の関連性

研究課題名（英文） The relationship between calcification nano particle and dental cariculus

研究代表者

玉置 洋（TAMAKI YOH）

国立保健医療科学院・政策科学部・主任研究官

研究者番号：50386827

研究成果の概要（和文）：

石灰化ナノ粒子(Calcificaton Nano Particle: CNPs)がヒト血液および唾液中に存在することが明らかになった。また、高速液体クロマトグラフィーにウシ血清から分離した CNPs のモノクロナール抗体である 8 D10 と反応するタンパク質はハイドロオキシアパタイトと結合することが電子顕微鏡観察で明らかとなった。これらの事実は CNPs が歯石形成に関与することを示唆するものである。

研究成果の概要（英文）：

We find out that the Calcificaton Nano Particle(CNPs) is existed both in human serum and saliva. The bovine serum protein separated by the high performance liquid chromatography were reacted to the monoclonal antibody for the CNPs. And these proteins were strongly attached to the hydroxyapatite. These results suggested that the CNPs may contribute to the dental calculus formation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
20 年度	2,000,000	0	2,000,000
21 年度	800,000	240,000	1,040,000
22 年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	480,000	4,080,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・社会系歯学

キーワード：歯周病, 歯石, 異所性石灰化, 石灰化ナノ粒子

## 1. 研究開始当初の背景

石灰化ナノ粒子(Calcificaton Nano Particle: CNPs)は当初、直径 0.1-0.5  $\mu\text{m}$  の粒子で、生理的条件下において生体内で石灰化する生命体として発見され、ヒト血清、ウシ胎児血清から分離された。CNPs から遺伝子が分離され、当初は 16SrRNA のシーケンスから  $\alpha$ -2 Subgroup Proteobacteria に属する細菌と考えられ、ナノバクテリアと呼ばれそのモノクロナール抗体も開発された。細胞培養の条件下で前述の抗体による CNP s

陽性者の血清を長期間にわたり培養を行うと、石灰化粒子が形成される。この現象を電子顕微鏡で観察するとナノバクテリアがその細菌壁にリン酸カルシウムを沈着させる現象であり、ナノバクテリアが石灰化の核になる生命体であるとして捉えられていた。特に Rat に CNPs 陽性患者の血清を静注した結果、腎結石を形成したことから、生体内での異所性の石灰化が関与する疾患として腎結石、動脈硬化、尿道結石をはじめ、我々がレビューした限りでは、23 の疾患に関連する物

質であるとされ研究が進められている。その後、CNP<sub>s</sub> からの細菌の遺伝子の分離には再現性がなく培養中におこる細菌のコンタミの可能性が高く、現在では CNP<sub>s</sub> は非生命体であるという結論に落ち着いているものの、CNP<sub>s</sub> の本体がどのような物質であるかという研究はほとんど進歩がみられない。

その一方で CNP<sub>s</sub> の第一人者を主体としてフィンランドで Nanoback 社が設立され CNP<sub>s</sub> のモノクロナール抗体、ELISA キット、CNP<sub>s</sub> を体内から排除する製剤として EDTA を主成分とするサプリメント等が販売されている。このような市販品があるため、近年の世界的な CNP<sub>s</sub> の研究の動向としては臨床研究が主体となっており、前述の疾患の内、腎結石、動脈硬化、尿道結石を持つ患者の血清中の CNP<sub>s</sub> を ELISA で定量したり、CNP<sub>s</sub> を除去するためにキレート療法として EDTA を服用し、臨床経過を追うなどの臨床研究が主体に行われている。このような観点からすると歯周病も異所性の石灰化として歯石形成を伴う疾患である。しかし、CNP<sub>s</sub> と歯周病の関連においてはその関連性を推測した Letter が一編あるのみで、CNP<sub>s</sub> と歯周病の関連を科学的に解明した論文は存在しない。

## 2. 研究の目的

石灰化ナノ粒子を分離精製すべく生体材料をはじめとする様々な物質から CNP<sub>s</sub> の分離を試み、さらに血清および唾液中に CNP<sub>s</sub> が含まれるかを検討し、CNP<sub>s</sub> が歯石形成に関与するかを検討することが目的である。

## 3. 研究の方法

高速液体クロマトグラフィーにより血清をサンプルとし、CNP<sub>s</sub> のモノクロナール抗体である 8D10 に反応するタンパク質を単離する。使用したサンプルはウシ血清である。ウシ血清は実験用として市販されており、比較的安価に大量にサンプルが購入できること、倫理的問題がないことから使用した。高速液体クロマトグラフィーで使用したカラムは CM Sepharose ,DEAE Sepharose, Hydroxyapatite Type I(Bio Rad),脱塩用として Sephadex G25 を使用した。また、精製したタンパク質は SDS PAGE 電気泳動により分離し、ウエスタンブロットを行った。

精製したタンパク質を用いてハイドロオキシアパタイトとの結合を電子顕微鏡により観察し、コロイダルゴールドにより染色したタンパク質の存在を確認した。

ヒトサンプルの血清、および唾液と CNP<sub>s</sub> の関連については Nano Capture ELISA を用いて定量を行った。

## 4. 研究成果

血清中および唾液中の CNP<sub>s</sub> の関連を図 1 に示す。図 1 に示すように血清と唾液中の CNP<sub>s</sub> は必ずしも相関をしめさなかった。

また基準値により CNP<sub>s</sub> 陽性と陰性にわけクロス集計を行ったものを表 1 に示す。

表 1 に示すように血清中で陽性であっても唾液中で必ずしも陽性になるわけではないことが明らかになった。これは口腔内は特殊な環境であり、歯石沈着は尿路結石や腎結石と関連なく生じることを示唆するものである。

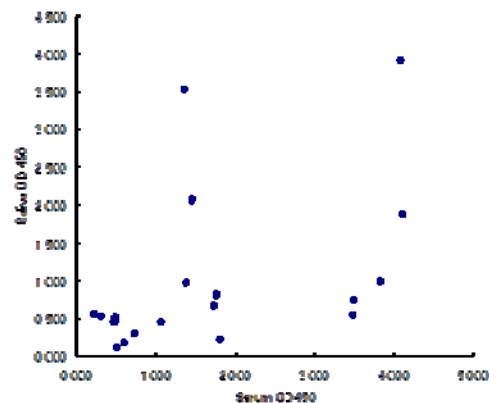


図 1 血清中 CNP<sub>s</sub> と唾液中 CNP<sub>s</sub> との関連

	Saliva		Total
	-	+	
Serum -	7	0	7
Serum +	4	8	12
Total	11	8	19

表 1 血清中 CNP<sub>s</sub> 陽性、陰性と唾液中 CNP<sub>s</sub> 陽性、陰性とのクロス集計表

高速液体クロマトグラフィーにより分離したタンパク質とハイドロオキシアパタイトとの結合を電子顕微鏡で検討した結果を示す。図 2 に示すように CNP<sub>s</sub> のモノクロナール抗体である

8D10 と反応するタンパク質がハイドロオキシアパタイトと結合している状態が観察できる。

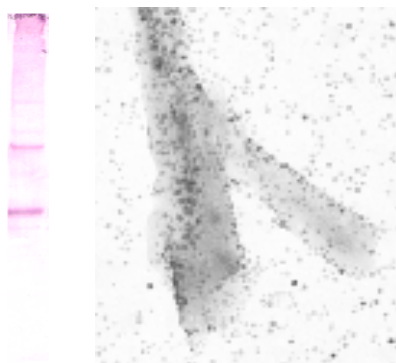


図 2 CNP<sub>s</sub> のモノクロナール抗体に反応するタンパク質 (ウエスタンブロット) およびそのタンパク質とハイドロオキシアパタイトとの結合 (電子顕微鏡像)

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 12 件)

Furuya M, Nomura Y, Tamaki Y, Sato T, Hanada N, Kamoi K, Arakawa H . Community based screening for periodontitis using salivary test : Bulletin of Kanagawa Dental College,36(1), p3-9,2008

Idaira Y, Nomura Y, Tamaki Y, Katsumura S, Kodama S, Kurata K, Asada Y. Factors affecting the oral condition of patients with severe motor and intellectual disabilities. Oral Diseases. 2008; 14: 435-9.

Tamaki Y, Nomura Y, Katsumura S, Okada A, Yamada H, Tsuge S, Kadoma Y, Hanada N. Construction of a dental caries prediction model by data mining. J Oral Sci. 2009 Mar;51(1):61-8.

Kadoma Y and Tamaki Y. Bonding durability against water of a fluorine-containing resin for precious metal alloys. Dent Mater J. 2009.28(5):642-648

Kubota K, Kuroha K, Kawata K, Komiyama E, Tamaki Y, Uematsu M, Arakawa H. Fluoride Intake from Tea in Japanese Infants . Int J Oral Health. 2009;5:7-15

黒羽加寿美, 久保田友嘉, 荒川勇喜, 川田和重, 宋文群, 戸田真司, 川村和章, 木本一成, 玉置 洋, 荒川浩久: 中学生と高校生における歯の摩損に関する研究 口腔衛生学会雑誌, 59(5):577-585, 2009

Yamada T, Ryo K, Tai Y, Tamaki Y, Inoue H, Mishima K, Tsubota K, Saito I. Evaluation of Therapeutic of Astaxanthin on Impairments in Salivary Secretion. J. Clin. Biochem. 47, 130-137, September 2010

Ryo K, Ito A, Takatori R, Tai Y, Arikawa K, Seido T, Yamada T, Shinpo K, Tamaki Y, Fujii K, Yamamoto Y, Saito I. Effects of Coenzyme Q10 on Salivary Secretion. Clinical Biochemistry. Clinical Biochemistry 2011( 44) 669-674

山崎洋治, 湯之上志保, 山口敏子, 細久保和美,

武儀山, 武井, 高田康二, 中安美枝子, 石川昭, 中村宗達, 玉置 洋, 野村義明, 花田信弘. 地域住民を対象とした歯間ブラシの使用に重点をおいた歯周病予防のための健康教育プログラムの効果. 口腔衛生学会誌, 2011.61(1):13-21

Yamashita Y, Nakamura Y, Shimada T, Nomura Y, Hirashita A. Asymmetry of the lips of orthognathic surgery patients. Am J Orthod Dentofacial Orthop. 2009 Oct;136(4):559-63.

Noda K, Nakamura Y, Kogure K, Nomura Y Morphological changes in the rat periodontal ligament and its vascularity after experimental tooth movement using superelastic forces. Eur J Orthod. 2009 Feb;31(1):37-45. Epub 2008 Dec 10.

Arai C, Nomura Y, Ishikawa M, Noda K, Choi JW, Yashiro Y, Hanada N, Nakamura Y. HSPA1A is upregulated in periodontal ligament at early stage of tooth movement in rats. Histochem Cell Biol. 2010 Oct;134(4):337-43. Epub 2010 Sep 1.

[学会発表] (計 7 件)

Nomura Y, Tamaki Y, A Eto, Ogino D, Nakamura Y, N Takahashi, F Hino, Koresawa K, Hanada N, Shimizu K. Improved screening for periodontal diseases using salivary biochemical markers and statistical modering. IADR PAPF/APR/JADR Wuhan China, 2009.10.3

篠原佐知緒, 玉置 洋, 伊平弥生, 栗山千裕, 朝田芳信. 唾液中のクロモグラニンAを指標としたストレス反応のパターン化. 第46回日本小児歯科学会大会, 2008.6.12-13, 埼玉, 抄録集小児歯科学雑誌, 46(2) p214

田島聖士, 海老沢政人, 玉置 洋, 野村義明, 花田信弘  
防衛省海上自衛隊における艦艇勤務者と陸上勤務者のう蝕罹患状況の比較  
第57回日本口腔衛生学会・総会, 2008.10.2-4, 埼玉, 口腔衛生学会雑誌 58(4)p350

勝村聖子, 玉置 洋, 野村義明, 柘植紳平, 花田信弘  
学童期追跡調査における齲蝕リスクファクターの評価  
第57回日本口腔衛生学会・総会, 2008.10.2-4, 埼玉, 口腔衛生学会雑誌 58(4)p445

玉置 洋、勝村聖子、柘植紳平、野村義明、  
花田信弘 ベイジアンネットワークを用いた  
齶蝕リスク評価の試み  
第 58 回日本口腔衛生学会・2009.10.11 岐阜、  
口腔衛生学会雑誌 59(4)p513

海老沢政人、玉置洋、有井丈朗、大小田  
学、五味一博、新井高  
喫煙状況による歯周疾患リスクの解析  
第 53 回 日本歯周病学会秋期学術大会  
2010.9.19 高松、日本歯周病学会会誌 52 秋  
期特別号 p99

海老沢政人、玉置洋、有井丈朗、清水彰一郎  
横須賀地区海上自衛隊員の喫煙状況と歯周  
疾患の関連性  
第 56 回防衛衛生学会 2011.2.3 東  
京 防衛衛生、第 58 巻別冊 Vol. 58. 2  
011. P106

〔図書〕(計 0 件)

なし

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0 件)

なし

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

○取得状況(計◇件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

玉置 洋 (TAMAKI YOH)

国立保健医療科学院 研究情報支援研究  
センター・主任研究官

研究者番号: 50386827

### (2) 研究分担者

野村義明 (NOMURA YOSHIAKI )

鶴見大学 歯学部 探索歯学講座・准教授

研究者番号: 90350587

(3) 連携研究者 ( )

研究者番号: