

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 3 日現在

機関番号：32703

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23593049

研究課題名(和文) 歯周病予防を目指した唾液抗酸化タンパク質の解明 活性酸素とプロテオームの探索

研究課題名(英文) Elucidation of salivary antioxidant protein for prevention of periodontitis-Analysis of antioxidant property and proteome-

研究代表者

小松 知子 (Komatsu, Tomoko)

神奈川県立歯科大学・歯学研究科(研究院)・講師

研究者番号：20234875

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：唾液成分の抗酸化能を中心とした生理活性を捉えることは、将来の予防的医学に重要な意味を持つと考え、そのエビデンスを獲得することを目的とした。まず、唾液タンパク質であるヒスタチン1、3、5およびPRP1、2、3、4は活性酸素種であるヒドロキシルラジカルに対して抗酸化能を有することを明らかにした。さらに、ダウン症候群患者や加齢において、*C. albicans*の増殖や歯周病の進行に対する唾液中のヒスタチン5の増加や抗酸化能の亢進がみられることが解った。このことは、生体における抗菌、抗酸化システムが歯周病やダウン症候群患者で強くなる適応反応がみられた可能性が考えられた。

研究成果の概要(英文)：The aim of the present study obtain the evidence, which is believed to have important implications for preventive medicine in the future, with physical activity as salivary antioxidant property of reactive oxygen species.

We investigated the antioxidant property of salivary protein, and the relationship among periodontal disease, salivary antioxidant activity and salivary antimicrobial activity for *Candida albicans*. As a result, the salivary proteins such as histatin 1,3,5 and PRP1, 2, 3, 4 would have antioxidant activity against hydroxyl radical. It was shown that the enhancement of antioxidant property and increase of histatin 5 was observed in saliva of aged and Down syndrome (DS) patients. These results suggested that it would be likely that the adaptive response in the biological antibacterial and antioxidant system against the growth of *Candida albicans* and increased histatin 5 with the progression of periodontal disease may be occurred by periodontitis, aging and DS patients.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・矯正・小児系歯学

キーワード：歯周病 唾液タンパク質 活性酸素 プロテオーム Down症候群

## 1. 研究開始当初の背景

唾液は様々な生理活性物質を含んでおり、歯周病のみならず糖尿病、脳卒中などの生活習慣病の発症・進行との関連性も指摘されている。これら生活習慣病の主たる原因の1つに活性酸素・フリーラジカルがあげられることは周知されている。一方で、唾液成分の抗酸化作用と歯周病との関連性については断片的な研究が中心で、生体に有用な唾液成分の臨床応用にかかわる研究は十分にされていない。また医療の急速な発展に伴いダウン症候群 (DS) 患者の平均寿命も延長された。しかし、歯周病易罹患を伴うため、早期に歯を喪失し、精神遅滞のため義歯の適応が困難な症例も多くみられ、本症候群における歯周病の予防は必須である。唾液成分の抗酸化作用を中心とした生理活性を捉えることは、将来の予防医学に重要な意味を持つと考えられる。

申請者の技術的な面についてはこれまでの様々な分子生物学的解析や電子スピン共鳴 (electron spin resonance; ESR) 法などの手法により、*in vitro*, *in vivo* における生物医学的アプリケーションを確立していることから、本研究プロジェクトを進める基盤も形成されている。

## 2. 研究の目的

生活習慣病である歯周病の原因として生理活性物質を含む唾液分泌減少、ミトコンドリア機能不全による活性酸素の産生亢進があげられる。我々は ESR 法を駆使し、まず唾液タンパク質成分の活性酸素消去能 (抗酸化能) を評価する。さらに、早期老化、歯周病易罹患を伴う DS 患者、若年者、高齢者の唾液タンパク質成分の抗酸化活性と歯周病との関連性を検討する。それらの結果を統合させ、DS 患者、老化に伴う歯周病に対する唾液タンパク質成分の抗酸化効果を検討し、歯周病予防につながる唾液抗酸化成分のエビ

デンスを獲得する。唾液成分の抗酸化作用を中心とした生理活性を捉えることは、将来の予防的医学に重要な意味を持つと考える。

## 3. 研究の方法

### (1) ヒト唾液成分の抗酸化能について

研究に同意が得られた健常ボランティアより耳下腺唾液を採取し、逆相 HPLC により唾液タンパク質成分であるヒスタチン 1、3、5、スタセリン、PRP1、2、3、4 および PRP1 の N 末端 30 残基 (30r-PRP1) を抽出・精製した。これら唾液タンパク質の抗酸化能を DMPO (5, 5-dimethyl-1-pyrroline-N-oxide) をスピントラップ剤として用いて、ESR 法により測定した。

### (2) 唾液中のヒスタチン 5 濃度について

インフォームドコンセントを十分に行って、DS 患者および高齢、若年健常人の唾液を採取し、同時に Bleeding On Probing、GI、ポケットの深さを計測し、舌背より菌を採取し、*C. albicans* を分離同定し、コロニー数 (CFU) を記録した。さらに抗菌作用を示すヒスタチン 5 の含有量について ELISA kit を用いて測定した。採取した唾液中のタンパク質濃度については BCA 法により測定を行った。最終的に唾液中の総タンパク量に対するヒスタチン 5 含有量を比較、検討した。

### (3) 唾液中の抗酸化活性について

ESR 法を用いて活性酸素種であるスーパーオキシド ( $O_2^{\cdot -}$ )、ヒドロキシルラジカル ( $HO^{\cdot}$ ) の唾液中の消去活性について検討した。

蓄積されたデータと理論的背景の獲得から、最終的に臨床データと統括することにより、抗酸化能を有する唾液タンパク質成分と歯周病との関連性について評価した。

## 4. 研究成果

### (1) ヒト唾液成分の抗酸化能について

ヒスタチン 1、3、5 および PRP 1、2、3、4 は、活性酸素種である  $O_2^{\cdot -}$  産生系に影響を与えなかったが、 $HO^{\cdot}$  産生系を濃度依存的に有意

に抑制し、30r-PRP1 およびスタセリンにおいては $O_2^{\cdot -}$ 産生系および $HO^{\cdot}$ 産生系ともに、影響を与えないことが解明された。以上の結果から、30r-PRP-1 およびスタセリンは抗酸化能を示さず、一方でヒスタチン1、3、5 およびPRP1、2、3、4は $HO^{\cdot}$ に対して抗酸化能を有することが明らかにされた。

#### 唾液ヒスタチン5濃度について

当初の計画では予定されていなかったが、歯周病、口腔カンジダ症などの口腔疾患とヒト全唾液（安静時）の活性酸素種に対する抗酸化能との関連性を評価することが重要と考え、強力な抗菌作用を示し、今回抗酸化能を有することが初めて明らかとなったヒスタチン5に注目して研究を進展させた。DS患者(DC)群では健常児(NC)群と比較して *C. albicans* の分離頻度が有意に増加していた。さらに40歳以上のDS患者(DA)群ではNA群と比較して *C. albicans* だけではなく、他の *Candida* 菌の分離頻度が有意に増加した。歯周炎に関しては、歯肉炎指数(GI)、を調査したところ、NC群に比較してDC群で高値を示し、歯肉炎が進行していた。NA群に比較してDA群でPD値も有意に増加していたことから歯周炎の進行も認められた。これら臨床データに対して、唾液中のヒスタチン5の含有量については、小児期において有意な差は認めなかった。しかし、DA群ではDC群に比較するとヒスタチン5の含有量が有意に増加していた。さらに唾液中の総タンパク質濃度については、DS群において、小児期より高く、DA群、NA群と比較すると有意な変化はみられなかった。健常者のタンパク質濃度は小児期では低値を示し、40歳以上の者では有意に高値を示した。以上の結果から、DS群では安静時唾液中のタンパク質の含有量が増加しているにも関わらず、小児期ではヒスタチン5の含有量はNC群と差がないことから、相対的な含有量の減少が考えられた。小児期では十分な生体防御機構が働かず、*C.*

*albicans* の分離頻度の増加につながったと考えられた。DA群において、ヒスタチン、総タンパク量の増加を認めたことより、DS患者における慢性的な *Candida* 菌の増加に対して適応した反応が働いている一方で、その抗菌作用は十分な防御作用ではないため、菌の増加が上回ったと考えられた。また、DS患者では、唾液中の有効な生理活性物質の減少や歯肉炎、歯周病などの慢性炎症や全身疾患に関与して発現した変性タンパク質の増加などの可能性が考えられた。

#### (2) 唾液中の抗酸化能について

同年代間の比較では、すべての系による $HO^{\cdot}$ および $O_2^{\cdot -}$ 産生に対する消去活性に有意差を認めなかった。DC群と比較して、DA群の方が、すべての系による $HO^{\cdot}$ および $O_2^{\cdot -}$ 産生に対する消去活性が有意に高まっていた。一方で、NC群とNA群との比較においては、Fenton反応系および $H_2O_2$ -UV系による $HO^{\cdot}$ 産生に対する消去活性がNA群で有意に高まっていたが、Xanthine/Xanthine oxidase系による $O_2^{\cdot -}$ 産生に対する消去活性には差がなかった。以上の結果から、DS群でXanthine/Xanthine oxidase系による $O_2^{\cdot -}$ 産生の亢進は、SOD活性が上昇していることが既に明らかとされており、それに対応した生体反応であると考えられた。

ダウン症候群患者や加齢において、*C. albicans*の増殖や歯周病の進行に対する唾液中のヒスタチン5の増加や抗酸化能の亢進がみられたことは、生体における抗菌、抗酸化システムが強くなる適応反応がみられた可能性が考えられた。しかし、その反応は加齢に伴い発症する様々疾患の悪化に防御機構が十分に対応できない可能性も考えられた。

なお、DSと健常者の唾液を用いた2D-DIGEによるプロテオーム解析もを行い、タンパク発現に違いがあることを確認しつつある。

#### 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)

Hata M, Kobayashi K, Yoshino F, Yoshida A, Sugiyama S, Miyamoto C, Tokutomi F, Maehata Y, Wada-Takahashi S, Takahashi SS, Komatsu T, Yoshida K, Lee MC, Direct assessment of the antioxidant properties of midazolam by electron spin resonance spectroscopy, Journal of Anesthesia, 査読有, vol. 25, 2011, 765-769. doi: 10.1007/s00540-011-1184

Kobayashi K, Maehata Y, Kawamura Y, Kusubata M, Hattori S, Tanaka K, Miyamoto C, Yoshino F, Yoshida A, Wada-Takahashi S, Komatsu T, Takahashi S, Lee M-CL, Direct assessments of the antioxidant effects of the novel collagen peptide on reactive oxygen species using electron spin resonance spectroscopy, Journal of Pharmacological Sciences, 査読有, vol. 116, 2011, 97-106.

Komatsu T, Kurihara T, Ito Y, Lee MC, Miyagi A, Ikeda M, Oral characteristics of a patient with Ekman-Westborg-Julien trait: a case history, Special Care in Dentistry, 査読有, vol. 32, 2012, 70-74. doi: 10.1111/j.1754-4505

小松知子,小菅祥子,宮城 敦,芳賀 定,緒方克也,自閉症患者における歯科診療導入ビデオによる視覚支援の有用性について,障害者歯科,査読有,32巻,2011, 97-103.

高野知子,勝畑妙江子,宮城敦,小松知子,石井 裕美,宮本晴美,池田正一、複合性局所疼痛症候群(下肢)type 1患者の入院歯科治療経験,障害者歯科,査読有, 32巻, 2011, 140-145.

Yoshino F, Yoshida A, Wada-Takahashi S, Sugiyama S, Tokutomi F, Maehata Y, Miyamoto C, Komatsu T, Takahashi S-S,

Kobayashi K, Lee M-C, Assessments of salivary antioxidant activity using electron spin resonance spectroscopy, Archives of Oral Biology, 査読有, vol. 57, 2012, 654-662. doi: 10.1016/j

小松知子,高野知子,岡部愛子,李 昌二,宮城 敦,長期口腔管理を行った関節リウマチ患者の1例—口腔所見,日常生活動作と生活意欲の経年的変化—,老年歯科医学,査読有,27巻,2012,10-17.  
Komatsu T, Duckyoung Y, Ito A, Kurosawa K, Maehata Y, Kubodera T, Ikeda M, Lee MC. Increased oxidative stress biomarkers in the saliva of Down syndrome patients. Archives of Oral Biology. 査読有, vol. 58(9), 2013, 1246-50. doi:10.1016.

Kobayashi K, Maehata Y, Okada Y, Kusubata M, Hattori S, Tanaka K, Miyamoto C, Yoshino F, Yoshida A, Tokutomi F, Wada-Takahashi S, Komatsu T, Otsuka T, Takahashi SS, Lee MC, Medical-grade collagen peptide in injectables provides antioxidant protection, Pharmaceutical Development and Technology. 査読有, Online on Nov. 29, 2013, 1-8. doi:10.3109

高野知子,小松知子,宮城敦,石井裕美,池田正一,ダウン症候群の老化および退行と歯科受診における変化(第一報),老年歯科医学,査読有,28(1)巻,2013, 27-33.

小松知子,100歳まで生きるための本100選「食品の裏側 みんな大好きな食品添加物」,日本抗加齢医学雑誌,査読有,9(4)巻,2013,90-91.

小松知子,唾液タンパク質の口腔疾患に対する抗菌作用について-Down 症候群患者と健常者における比較-,神奈川歯学,査読無,48(1)巻,2013,38-42.

〔学会発表〕(計 20 件)

小松知子, 小林 杏, 吉野文彦, 前畑洋次郎, 宮 本千央, 徳富文彬, 杉山秀太, 吉田彩佳, 高橋聡 子, 高橋俊介, 前谷崇志, 川村陽介, 辻村 傑, 岡 田永三, 岡田康江, 西村成文, 宮城 敦, 李 昌一, 電子スピン共鳴法による唾液タンパク質の抗酸化能評価, 第11回抗加齢医学会, 2011.5.27-29, 京都.

小松知子, 高野知子, 伊藤 愛, 宮城 敦、ヒスタチンのカンジダ菌ミトコンドリアに対する抗真菌作用, 第22回 老年歯科医学会, 2011. 6. 15-17, 東京.

小松知子, 村上訓子, 窪田千晶, 岡部愛子, 赤坂 徹, 小林俊夫, グリーナンせつゑ, 井田侑子, 李 昌一, 宮城 敦、関節リウマチ患者2症例における口腔内所見と日常生活動作の経年的変化, 第28回日本障害者歯科学会, 2011.11.4-5, 福岡.

森田鮎美, 小松知子, 高野知子, 中村ミゲル, 伊藤 愛, 村井朋代, 宮本晴美, 加藤宏美, 宮城 敦、当科歯科診療における行動調整および視覚支援についての実態調査, 第28回日本障害者歯科学会, 2011.11.4-5, 福岡.

小松知子, 唾液タンパク質の抗酸化・抗真菌作用, 第10回国際バイオEXPO, 2011. 6. 29, 東京.

小松知子, 植田郁子, 坂本貴史, 熊田秀文, 鶴谷 俊輔, 伊藤 愛, 高野知子, 岡部愛子, 小林 杏, 前谷崇志, 浜田信城, 宮城 敦, 池田正一, 李昌一, 高齢Down症候群患者のADLと歯科的所見との関連性, 第12回抗加齢歯科医学会, 2012. 6. 22-24, 横浜.

小松知子, 熊田秀文, 伊藤 愛, 高野知子, 浜田 信城, 李昌一, 宮城敦, Down症候群患者の口腔および全身における加齢変化, 第23回老年歯科医学会, 2012. 6. 22~23, つくば.

植田晃弘, 峯岸祐子, 小野弓絵, 小松知子, 李昌一, 嚥下体操による飲み込みやす

さの変化:筋電図による検討 Upper-body exercise changes electromyographic patterns with swallowing, 第35回日本神経科学大会, 2012. 9. 18~21, 名古屋.

小松知子, 植田晃弘, 峯岸祐子, 小野弓絵, 宮城 敦, 李昌一、嚥下体操の嚥下関連筋に対する効果 □ 表面筋電図による検討, 第17回・18回共催 日本摂食・嚥下リハビリテーション学会学術大会, 2012. 8. 31-9. 1, 札幌.

小松知子, 植田郁子, 坂本貴史, 伊藤愛, 中村ミゲル, 村井朋代, 井田侑子, 池田正一, 宮城 敦, 浜田信城, 李昌一, 唾液ヒスタチン5含有量とCandida菌分離頻度および口腔内所見との関連性 若年ダウン症候群患者における検討, 第29回日本障害者歯科学会, 2012. 9. 28-30, 札幌.

伊藤愛, 小松知子, 植田郁子, 坂本貴史, 高瀬幸子, 井田侑子, グリーナンせつゑ, 池田正一, 李 昌一, 宮城 敦, 浜田信城, Down症候群患者の口腔Candida菌の分離頻度と日常生活動作の関連性, 第29回日本障害者歯科学会, 2012. 9. 28-30, 札幌.

Komatsu T, Efficiency of oral care on general health for special needs patients, Taiwan Association for Disabilities and Oral Health. 102 年度台湾心身障害歯科学会, 2013.9. 14-15. Kaohsiung, Taiwan.

Komatsu T, Kumada H, Helmerhorst, E J, Salih E, Oppenheim FG, Hamada N, Lee C-II: Salivary histatin levels and fungal colonisation in Down syndrome, 101th FDI 2013 World Dental congress, 2013. 8. 28-31. Istanbul.

小松知子, 大塚剛郎, 高野知子, 宮城敦, 李昌一, 歯周病における唾液中活性酸素の作用 Down症候群患者における検討, 第24回日本老年歯科医学会学術大会, 2013. 6. 4-6. 大阪.

植田晃弘, 小野弓絵, 小松知子, 李昌一, 嚥下体操は飲水に必要な筋活動を軽減

する, 第 36 回日本神経科学大会, 国立  
京都国際会館, 2013. 6. 20-23.

小松知子, 大塚剛郎, 岡部愛子, 小林杏,  
前谷崇志, 宮城敦, 池田正一, 李昌一,  
Down 症候群患者の唾液中活性酸素消去  
能と歯周病の関連性, 第 13 回日本抗加  
齢医学会学術大会, 横浜, 2013. 6. 28-30.

小松知子, 植田晃弘, 小野弓絵, 宮城敦,  
李昌一: 嚥下体操の嚥下関連筋に対する  
効果 高齢者と若年者との比較 第 19  
回日本摂食・嚥下リハビリテーション学  
会学術大会, 岡山, 2013.9.22-23.

小松知子, 植田郁子, 大塚剛郎, 早野愛,  
坂本貴史, 中村ミゲル, 村井朋代, 井田  
侑子, 池田正一, 宮城敦, 浜田信城, 李  
昌一: Down 症候群患者における口腔内  
*Candida* 菌と唾液中活性酸素種の関連性.  
第 30 回日本障害者歯科学会総会および  
学術大会, 神戸, 2013. 10. 11-113.

高野知子, 森田鮎美, 小松知子, 宮城敦,  
グリーンナンセツ系, 横井敬子, 古賀清美,  
熊坂純雄, 池田正一: 当科における歯科  
恐怖症患者および異常絞扼反射患者の  
歯科実態調査(第1報), 第30回日本障害者  
歯科学会総会および学術大会, 神戸,  
2013. 10. 11-113.

宮本晴美, 小松知子, 村井朋代, 加藤宏  
美, 佐久間悠里, 高瀬幸子, 金井紀乃,  
宮城敦: Down 症候群患者の口腔ケアに  
おける歯科衛生士の役割ー長期に口腔  
衛生管理を行った 2 症例における検討  
ー. 第 30 回日本障害者歯科学会, 神戸,  
2013. 10. 11-113.

#### 〔図書〕(計 2 件)

小松知子(池田正一, 黒木良和 監修), 一  
般社団法人口腔保健協会, 口から診える  
症候群・病気(VIII 皮膚・毛髪・爪の異  
常を主徴とする症候群 表皮水疱症),  
2012, 244.

Komatsu T, Lee MC: Chapter 15; Oxidative  
Stress and Periodontal Disease in Down  
Syndrome. pp 211-214. Ekuni D, Battino M,  
Tomofuji T, Putnins EE: Studies on  
Periodontal Disease Oxidative Stress in  
Applied Basic Research and Clinical  
Practice, Humana Press Springer, New  
York, 2014.

#### 〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

#### 〔その他〕

#### 6. 研究組織

##### (1)研究代表者

小松知子 (KOMATSU Tomoko)

神奈川歯科大学・歯学研究科(研究院)・講  
師

研究者番号: 20234875

##### (2)研究分担者

李 昌一 (LEE Masaichi)

神奈川歯科大学・歯学研究科(研究院)・教  
授

研究者番号: 60220795

##### (3)連携研究者

吉川正信 (YOSHIKAWA Masanobu)

東海大学・医学部・講師

研究者番号: 90276791

(平成 23 年度)