

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 15 日現在

機関番号：32703

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670821

研究課題名(和文) 関節リウマチにおける唾液抗CCP抗体の診断的意義の解明

研究課題名(英文) Diagnostic significant of saliva anti-CCP antibody in the RA

研究代表者

槻木 恵一 (TSUKINOKI, Keiichi)

神奈川県大学・歯学研究科(研究院)・教授

研究者番号：00298233

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：唾液検査は、血液検査の代替として注目されている。特に病変の早期発見や予防医療に貢献することが期待されている。申請者らは、これまでに、唾液検査の有用性と問題点などを論文として公表してきた。一方、関節リウマチは、早期治療が関節の変形を抑制できる。近年、自己免疫疾患は、早期発見が大きな課題となっている。本研究では、関節リウマチの診断に特異性の高い抗CCP抗体が、血中濃度依存的に唾液中に分泌されるかという定量性について詳細な検証を行った。その結果、抗CCP抗体は、血液量と唾液量で相関した。このことから、唾液中の抗CCP抗体の検出は、自己免疫疾患の診断に有用かもしれない。

研究成果の概要(英文)：The saliva test attracts attention as a substitute of the blood test. It is hoped that I contribute to early detection and the preventive health care of the lesion in particular. The applicants announced usefulness and the problems of the saliva test as an article so far. On the other hand, as for the rheumatoid arthritis, early treatment can control the damages of the joint. In late years, as for the autoimmune disease, early detection becomes an important problem. Specific high anti-CCP antibody was blood concentration-dependent and, in this study, performed detailed inspection about quantify ability whether was secreted in saliva for a diagnosis of the rheumatoid arthritis. As a result, the anti-CCP antibody related to a blood concentration with quantity of saliva. From this, the detection of anti-CCP antibody of saliva may be useful for a diagnosis of the autoimmune disease.

研究分野：環境病理学

キーワード：唾液検査 自己免疫疾患 自己抗体

1. 研究開始当初の背景

唾液検査は検査学としては新しい分野であり、唾液から全身の状態を把握するために実用化した唾液検査はほとんどない。申請者らは、これまでに唾液 PSA が前立腺癌の再発の早期診断に有用であることを報告し注目された (Shiiki N, T et al. Biomarkers. 2011 16(6):498-503.)。唾液検査が血液検査の代替となれば、非侵襲的で採取が簡便であることから、患者の望む「待たない・痛くない・怖くない」という優しい医療の実現に貢献することは疑いなく、歯科関係者以外から近年多くの関心を得ている。特に、関節リウマチは、国内で 70 万人が罹患しており、30 歳以上の人口の 1% を占める。抗サイトカイン療法等の強力な抗リウマチ薬の登場によって早期からの治療が有効となり、早期治療により関節の変形を防げる利点があることから、早期診断の必要性が求められている。唾液検査は、その求めに応えることができる検査法であり、**唾液自己抗体検査の確立に向けて研究が必要である。**

2. 研究の目的

関節リウマチ患者における血中抗 CPP 抗体は診断マーカーとしての特性が高い。また、抗 CCP 抗体の場合、唾液腺自体で産生されない、唾液中に陽性であれば疾患の可能性がある。唾液中には血中より抗 HIV 抗体、抗麻疹抗体、抗インフルエンザ抗体などが分泌されることが示されているだけでなく、膠原病の診断に重要な抗核抗体も唾液中に検出されたという報告が認められ、抗 CCP 抗体が分泌されてくる可能性は高いことから、関節リウマチ患者における血中抗 CPP 抗体と唾液抗 CPP 抗体の相関を明らかにする。

極めて重要な点は、唾液腺で産生していない物質が唾液中に存在する場合、血液か

ら移行してきたものであり、それを検出することで血液と同様のマーカーとしての意義がある点である。

本研究の成功は、他の全ての疾患が前述の考え方で応用可能であり、例えば、関節リウマチ以外の自己免疫疾患の自己抗体や、腫瘍マーカーも唾液腺で産生していない物質であり、**唾液中の非唾液腺産生疾患特異的物質の検出を診断に応用する方法論は、極めて多岐にわたる波及効果を期待**研究である。

3. 研究の方法

(1). 初めに血中抗 CCP 抗体が、唾液中に移行するかについて関節リウマチモデルマウス D1CC を用いた実験的検討を行う。この検討において、抗 CCP 抗体が血中濃度を反映して、唾液中に分泌されることを確認する。

抗 CCP 抗体の移行についての実験的検討

* **抗原感作 血中抗 CPP 抗体 唾液腺 唾液 ELISA 解析**

用いるマウスに抗ヒト CPP 抗体が存在しないことを確認する。

ヒト CCP 抗原の調整 (市販品使用・予備実験を経て複数の濃度を試みる)。

ヒト CCP 抗原をマウスに接種。

血液検査を行い抗ヒト CCP 抗体が産生されたか ELISA で確認。

血中濃度の増加したマウスにピロカルピン投与により唾液を採取する。

以上の実験により、抗原の曝露後で血中抗 CCP 抗体が、唾液中に検出できるかを試みる。また濃度依存性が確認できた場合、診断だけでなく病勢の検討にも応用の可能性が示される。

(2). 唾液中の抗 CCP 抗体がどのような経路で分泌されたかを確認する

* 抗原感作 血中抗 CPP 抗体 **唾液腺 唾液**

ELISA 解析

マウスの唾液腺を摘出し、抗 CCP 抗体の局在を確認するため免疫組織化学的に検討を行う。

これらの検討から抗 CCP 抗体が唾液中の認められることを確定した後に、関節リウマチの診断に有用なその他のマーカーとして、RF・CRP・MMP-3 も血中濃度を反映して唾液中に分泌されるか、関節リウマチモデルマウス D1CC を用いて検討する。さらに、D1CC マウスに抗リウマチ薬を投与すると、病態の改善とともに抗 CCP 抗体が減少する(Kanazawa S et al. *Inflamm Regen*.28: 321-324, 2008.)。そこで、唾液中の抗 CCP 抗体も病態の改善とともに濃度が減少するか検討し、関節リウマチの診断への有用性だけでなく、病態も反映するか実験的に検証する。

(3). 臨床検体を用いた検討

対象：既に関節リウマチと診断され、治療開始時および治療中の継時的経過を観察できる患者とする（診療目的で血液検査をする方）。さらに、インフォームドコンセントにより承諾された方を対象とする。

方法：関節リウマチ患者およびシェーグレン症候群患者より唾液を採取。唾液中に含まれる抗 CCP 抗体・RF・SS-A・SS-B を ELISA で測定する。採取条件は、午前中・排出時間は3分・全唾液・食事前2時間以内・軽い口腔洗口の実施の5条件を前提とする。唾液中の抗 CCP 抗体・RF・SS-A・SS-B の測定量と血中濃度と ELISA で比較し、その相関を統計学的に解析する。

4 . 研究成果

実験的に誘導した自己免疫疾患では、マウス血中に抗 CCP 抗体が出現し、病態の進展とともに抗体量は増加した。また、ピロカルピンを用いた唾液排出実験では、血中濃度と依

存して抗体量は増加したが、その値は約 100 倍少ない量であった。ヒトでも同様に、自己免疫疾患患者と健常人との抗体量の比較を行ったところ、唾液中には健常人には自己抗体は検出できなかった。これらのヒトでの結果は動物モデルと相関した。また、動物モデルの免疫組織科学的な検討でも、抗体陽性所見が得られたが、さらなる検討が必要である。また、その他のマーカーについても、同様の結果が得られた。また、病態の改善に伴い抗体の減少傾向が観察されたことから、さらなる詳細な検討を行う予定である。SS に関する追加検討では、血中と唾液中の自己抗体の量に関しては相関が認められた。

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4件)

- 1) Yamamoto Y, To M, Hayashi T, Shimizu T, Kamata Y, Saruta J, Takahashi T, Tsukinoki K: Intake of indigestible carbohydrates influences IgA response and polymeric Ig receptor expression in the rat submandibular gland. *British Journal of Nutrition* 113(12):1895-1902, 2015. 査読あり
- 2) Maehata Y, Miyamoto C, Tsukinoki K, Takahashi SS, Yoshino F, WadaTakahashi S, Yoshida A, Tanaka A, Adachi T, Igoshi N, Shiba T, Kishikawa N, Imazato T, Suzuki I, Ihara H, Shimomura H, Okabe H, Yanagisawa T, Hosho A, Maehata E : Foresight of physical development indicated by the National Health and Nutrition Survey in Japan: An approach in terms of

biomedical sciences, International Journal of Analytical BioScience, 3(3), 6372, 2015. 査読あり

- 3) 中久木康一, 淵田慎也, 槻木恵一, 田中彰, 大黒英貴, 村岡宣明, 柳田忠廣: 災害時歯科保健医療の研修に求められている内容の検討. 日本歯科医療管理学会雑誌, 50, 4, 2016. 2. 25. 査読あり
- 4) Yamamoto N, Yamamoto T, Kubota M, Hanaoka K, Sugaya A, Yuyama N, Hayashida J, Kimura K, Kumada H, Yi J, Sakai N, Kawakami M, Sakurai T, Tsukinoki K, Hirata Y: Intelligibility of medical among students at the School of Dentistry, Kanagawa Dental University. 神奈川歯学 50, 2 (別冊), 2015. 7. 査読あり

〔学会発表〕(計9件)

- 1) 坂口和歌子, 東雅啓, 猿田樹理, 清水智子, 鎌田要平, 槻木恵一: 抗 CCP 抗体の唾液への移行についての検討. 第 149 回神奈川歯科大学例会, 横須賀, 2016.02.18.
- 2) 東雅啓, 淵田慎也, 槻木恵一: 大規模災害発生時の歯科保健医療に対する歯学部学生の意識調査. 第 34 回日本歯科医学教育学会総会・学術大会, 鹿児島, 2015.7.10-11.
- 3) 山本裕子, 東雅啓, 清水智子, 猿田樹理, 槻木恵一: 難消化性糖類の経時的摂取がラット唾液中 IgA 濃度に与える影響. 第 57 回 歯科基礎医学会学術大会・総会, 新潟, 2015.9.11-13.
- 4) 藤野和弘, 山本裕子, 猿田樹理, 東

雅啓, 林隆司, 清水智子, 井出桃, 中川裕介, 槻木恵一: 高齢者施設におけるヨーグルト摂取と IgA 増加に関する研究. 第 148 回神奈川歯科大学例会, 横須賀, 2015.10.08.

- 5) 井出桃, 山本裕子, 東雅啓, 猿田樹理, 淵田慎也, 横山三菜, 木本茂成, 槻木恵一: 小児における唾液中抗菌物質の特徴についての研究. 第 148 回神奈川歯科大学例会, 横須賀, 2015.10.08.
- 6) 中川裕介, 東雅啓, 猿田樹理, 槻木恵一: 唾液 BDNF と統合失調症の病態との関連性について. 第 148 回神奈川歯科大学例会, 横須賀, 2015.10.08.
- 7) 加藤桃子, 猿田樹理, 五十嵐久佳, 槻木恵一, 河田俊嗣: 片頭痛患者における睡眠時ブラキシズムのパターン解析. 第 74 回日本矯正歯科学会大会, 福岡, 2015.11.18-20.
- 8) 栗本勇輝, 猿田樹理, 東雅啓, 山本裕子, 槻木恵一: ラット唾液腺 IgA への自由運動による影響. 第 50 回神奈川歯科大学総会, 横須賀, 2015.12.5.
- 9) 山本裕子, 東雅啓, 中川裕介, 林隆司, 猿田樹理, 高橋徹, 槻木恵一: フラクトオリゴ糖がラット唾液 IgA 濃度の経時的変化に与える影響. HINDGUT CLUB JAPAN 2015, 東京, 2015.12.5.

〔図書〕(計3件)

- 1) 近藤裕介, 槻木恵一. 腫瘍病理鑑別診断アトラス 頭頸部腫瘍. 上気道・咽頭・口腔腫瘍と歯原性腫瘍. 第 2 部 2. 良性腫瘍 (4) 腺腫様歯原性腫瘍 pp128-131. 文光堂. 2015.

- 2) 槻木恵一 .はじめまして有病者の口腔ケア 歯科衛生士のためのチェックポイント . 1 有病者の口腔ケアの大切さ pp1-5 . 学健書院 . 2015 .
- 3) 東雅啓 , 槻木恵一 . 病理学総論にもとづく口腔病理学 .8 章 遺伝子異常・先天異常・発育異常 . pp159-164 . 永末書店 . 2016 .

〔その他〕

HP: <http://www.graduate.kdu.ac.jp/chair/>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

槻木恵一 (TSUKINOKI Keiichi)

神奈川歯科大学・大学院歯学研究科・教授

研究者番号 : 0 0 2 9 8 2 3 3