

## 口腔感染症への臨床応用を目的とした抗菌ペプチドの 定量系の確立

国立保健医療科学院口腔保健部

江藤亜紀子

### 要旨

唾液中の種々の抗菌ペプチドは生体防御に重要な役割を果たしている。本研究では主にディフェンシンファミリーに着目し、唾液中の抗菌ペプチド分子の定量系の確立を試みている。本研究の成果は、口腔感染症細菌や多薬剤耐性細菌への対策に有用であると考えられる。

### 1. 研究目的

本研究は、口腔感染症、特に齲蝕への臨床応用を目的として、唾液中の抗菌ペプチドの定量系を確立する。齲蝕と歯周病は歯の喪失をもたらす2大疾患であり、その予防は長寿社会においてはますます重要になると思われる。自分の歯を多数、より良い状態で残すことは、栄養摂取状態の向上と、質の高い生活のために必須であり、厚生労働省は80歳時に自分の歯を20本残すこと(8020)を努力目標に設置している。齲蝕はミュータンスレンサ球菌による口腔感染症であり、罹患せずに済む疾患であるにもかかわらず、決定的な齲蝕予防法は未だ確立されず、成人の齲蝕有病者率はほぼ100%である。本研究の成果はほぼ全ての人に還元され、また、医療費の削減にもつながるという点で社会的意義が高いものである。

さらに、臨床応用の可能性の1つとして、唾液診断へ成果をつなげることを考えている。唾液診断は、非侵襲的で容易に行うことができ、安価で個人でも行えるシステムが構築できる。しかし、唾液中の各種、生体成分は非常に微量であるため、主として検出感度の問題で今までは実用が困難だと考えられてきた。しかし、マススペクトロメトリーなどの解析装置の高性能可とともにゲノムプロジェクトの成果を取り入れることにより、実用化の可能性が出てきた。

抗菌ペプチドは自然免疫の重要な担い手であると同時に、臨床応用の可能性が注目されている分子である。唾液中にディフェンシン、キャセディシディン、ヒスタチンなどの抗菌ペプチドが発現しているが、発現調節の詳細や唾液中の濃度などについては不明な点が多い。本研究は、唾液中の抗菌ペプチドの中でもまずディフェンシンファミリー( $\alpha$ -ディフェンシン、 $\beta$ -ディフェンシン)に着目し、さらにヒスタチン、キャセディシディンなども標的として、それらの定量系を確立する。本研究によって確立された系を用いることにより、唾液中のディフェンシンの含有量を特異的かつ簡便に定量することが可能になる。その結果は、抗菌ペプチドの臨床応用に必須の知見を供すると考えられる。

## 2. 研究方法

### 1) ペプチド合成

$\alpha$ -ディフェンシン、 $\beta$ -ディフェンシン、ヒスタチン、キャセディシディンの抗菌ペプチド、及び抗原とするその部分ペプチドは、マルチペプチドシンセサイザーを用いて F-moc 法により合成した。合成したペプチドは脱保護後、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) を用いて精製した。

### 2) 抗菌ペプチドの活性の測定

精製した抗菌ペプチドの活性は、齶蝕病原細菌 *Streptococcus mutans* などの口腔レンサ球菌に対する抗菌活性を Radial diffusion assay によって測定した。方法は Lehrer らの方法 (1991) に従った。

### 3) 抗原の作製、及び、免疫

抗原用のペプチドは精製後、キーホール・リンペット・ヘモシアニン (KLH) を MBS 法により結合させた。ポリクローナル抗体の作製には、ウサギを用い、アジュバントと共に抗原ペプチドを免疫した。

### 4) 抗血清の調製と抗体の精製

ポリクローナル抗体はウサギを2—3ヶ月免疫後、採血を行った。抗血清の一部は抗原ペプチドを固定化したカラムでアフィニティー精製を行った。

### 5) 倫理面への配慮

動物を用いる実験は国立感染症研究所のガイドライン研究所の規定に従って行われた。

### 6) 唾液の採取と保存

混合唾液を採取した。さらに保存法としてアジ化ナトリウム添加、凍結の温度の違いの効果、各種カラムでの前処理の効果を酵素活性とマススペクトロメトリーにより検出の変化によって比較した。

### 7) 抗体を用いた唾液成分の検出法の検討

プロテインチップ (サイファージェン社) を用いた唾液中の抗菌ペプチドの検出法について検討した。

## 3. 研究成果

本年度は主に抗菌ペプチドに対する抗体の作製とその評価、及び、唾液サンプルの採取法、保存法がその後の解析に与える影響、抗体を用いた唾液成分の検出法について検討した。

### 1) 抗菌ペプチドに対する抗体の作製とその評価

唾液中にディフェンシンファミリー、ヒスタチンファミリー、キャセディシディンなどの抗菌ペプチドが発現している。ディフェンシンファミリーは、構造の違いからさらにアルファディフェンシンとベータディフェンシンとに分類される。ごく最近、ベータディフェンシンの新しいメンバーとして hBD-3,5,6 が報告された。初年度において、 $\beta$ -ディフェンシン-1 (hBD-1)、2 (hBD-2) の抗体の作製と評価を行っていたが、この最新の知見を踏まえて、さらに抗体の性質を検討するため、ディフェンシンの合成と精製を行っている。全長の合成ペプチドは口腔レンサ球菌と大腸菌に対する活性を測定した。ディフェンシンのペプチドは長いものは収率、活性ともに低かった。これは F-moc 法でシンセサイザーを用いて合成する上での限界点ではあるが、さらに合成、精製方法を検討する必要がある。

さらに、 $\alpha$ -ディフェンシン、ヒスタチン、キャセディシディンに対する抗体の作製、評価を行っている。これは、抗菌ペプチドの機能を考えた時、違うファミリーの抗菌ペプチドが協調して働いているという報告があること、また、感染症に対する臨床応用や唾液診断への応用という目的を考えた時、複数のペプチドを網羅的に同時に測定できる方が望ましいからである。抗原ペプチドの配列は、ファミリーの分子間のアミノ酸配列を比較し、各々に対して特異的な抗体を誘導するように決定した。抗血清、及び精製抗体の性質は、ウェスタンブロット法などにより解析中である。

## 2) 唾液サンプルの採取法、保存法がその後の解析に与える影響

唾液は血液と同様に全身の健康状態を調べる材料となりうる体液であるが、今まで唾液診断が実用化されなかった主な理由は、(1) 唾液中の各成分（タンパク質など）の含有量が少なく、検出方法の感度との兼ね合いで、定量できる方法がなかった、(2) 唾液成分が保存試薬の添加や温度変化によって容易に変性してしまう、などが挙げられている。このうち(2)は、唾液中のタンパク質分解酵素の活性が高いこと、液の粘性高く温度変化によって凝集、沈澱する成分が多いことなどの原因が考えられる。これらは唾液に関する研究を比較するのに問題となっているばかりでなく、今後、微量成分を測定する上でもクリアすべき問題である。そこでまず、保存試薬（アジ化ナトリウム）の濃度、凍結保存の温度など基本的な点から pH や酵素活性を指標に再検討している。今後さらに唾液の粘性などの項目についても検討が必要だと思われる。

## 3) 抗体を用いた唾液成分の検出方法

抗菌ペプチドの検出は ELISA 法を検討している。最近、プロテインチップと呼ばれるマススペクトロメトリーを応用したシステムが開発されたため、このシステムによる検出法についても合わせて検討を行った。従来、マススペクトロメトリーは生体分子の分子量を測定することにより分子を同定するものである。プロテインチップは検出にあたって標的分子の抗体を用いることができ、結果として、標的分子の分子量と抗原性の両方によって分子を同定できる。ELISA 法は分子の抗原性のみで同定する方法であるので、本研究の目的にはプロテインチップシステムの方が望ましいとも考えられる。ただ、開発されて間もないシステムであるので、技術的な問題もいくつか挙げられ、今年度は予備的な検討を行ったが、来年度以降、本格的な解析を行う予定である。

## 4. 考察

口腔は外界に接しており、呼吸、飲食と共に病原菌を含む多くの微生物が絶えず侵入する。抗菌ペプチドはそのような環境の中で自然免疫の担い手として生体防御の役割を果たしていると考えられる。

抗菌ペプチドの抗菌活性に関してはある程度、研究が進んでいるが、口腔の上皮細胞や唾液腺における発現調節等は不明な点も多く、唾液中での含有量もあまり報告がない。今後、ゲノムプロジェクトの終了によって標的とすべき分子を全て明らかにできる。またプロテオーム研究の進展などとともにマスマスペクトロメトリーなどの測定機器も、感度、性能が著しく向上している。最新の知見と生かしつつ、口腔の抗菌ペプチド、各分子の定量化と発現調節の解析が必要と思われる。

## 5. まとめ

ディフェンシンをはじめとする抗菌ペプチドは臨床応用の期待の高い分子であり、感染症治療や唾液診断への応用などのために、特異的で簡便な定量系の確立が重要である。

## 6. 研究発表

Yoshiaki Nomura, Akiko Eto, Nobuhiro Hanada, Hideaki Senpuku.

Identification of peptide motifs that interact with HLA-DR 8 (*DRB1\*0802*) in *Streptococcus mutans* proteins.

Oral microbiology and Immunology. 17, 209-14 (2002)

Eisaku Nisimura, Akiko Eto, Masatoshi Kato, Shuichi Hashizume, Susumu Imai, Tosiki Nisizawa, and Nobuhiro Hanada. *submitted*.