

DBA マウスにおける血中および唾液中抗 CCP 抗体量の
関連性についての研究坂 口 和歌子 東 雅 啓* 猿 田 樹 理**
清 水 智 子*** 鎌 田 要 平*** 槻 木 恵 一神奈川歯科大学大学院歯学研究科口腔科学講座環境病理学分野
(主任 槻木恵一)

* 神奈川歯科大学大学院歯学研究科口腔科学講座歯科形態学分野

** 神奈川歯科大学大学院歯学研究科口腔科学講座唾液腺健康医学分野

*** 神奈川歯科大学大学院高度先進口腔医学講座

(受付：2017 年 6 月 15 日)

Associations between blood anti-CCP antibody and saliva anti-CCP antibody with DBA mouse

Wakako SAKAGUCHI, Masahiro TO*, Juri SARUTA**,
Tomoko SHIMIZU***, Yohei KAMATA***, Keiichi TSUKINOKIDivision of Environmental Pathology, Department of Oral Science, Graduate School of Dentistry,
Kanagawa Dental University

* Division of Dental Anatomy, Department of Oral Science, Graduate School of Dentistry, Kanagawa Dental University

** Division of Salivary Gland Health Medicine, Department of Oral Science,
Graduate School of Dentistry, Kanagawa Dental University*** Department of Advanced Oral Medicine, Graduate School of Dentistry, Kanagawa Dental University
82 Inaoka-cho, Yokosuka, Kanagawa 238-0003, Japan

Abstract

Rheumatoid arthritis (RA) is known as systemic autoimmune disease, and early diagnosis is important, because early treatment can be suppressed deformation of joint. Anti-CCP antibody (anti-cyclic peptide antibodies) is as an exceed both sensitivity and specificity in diagnosis of RA. Therefore, we investigated whether anti-CCP antibody is secreted in saliva dependent on concentration blood, and saliva test is useful to diagnosis.

This is arthritis-inducing model was used which was administered bovine type II collagen to DBA mice(n=6-9). Blood and saliva aspirated from mice, and was measured antibody amount by ELISA method, statistically analyzed correlation between blood and saliva as used Pearson's correlation. As a result, anti-CCP antibody was detected from both blood and saliva, and correlation was found between both(r=0.981, p=0.002). Therefore, using saliva screening test was suggested possibility for useful diagnosis of RA.

緒 言

関節リウマチ (Rheumatoid Arthritis : RA) はリウマトイド因子をはじめとする種々の自己抗体の産生を特徴とする全身性自己免疫疾患で、有病率は全人口の約 0.5 ~ 1.0%, とされている¹⁾。また、滑膜の炎症と増殖により全身の慢性、持続性、破壊性関節炎を主症状とし、再燃を繰り返しながら関節破壊へと導いていく。さらに、関節外症状としても目の強膜炎、間質性肺炎、血管炎などが生じる²⁾。発症年齢は全年齢にわたるが好発年齢は 40 ~ 60 歳代で女性に多く、シェーグレン症候群や慢性甲状腺炎を合併することがある³⁾。また RA 患者の平均寿命は 10 年短いという統計があり、発症 2 年以内に 70% が関節破壊へ移行するとされ、早期診断、疾患活動性と機能障害の評価、臨床経過の予測が重要とされている。近年、RA の治療は進歩しており、病態に関わる TNF- α や IL-6 などの炎症性サイトカイン活性や免疫細胞機能分子をピンポイントで制御する分子標的薬が続々と開発され骨破壊抑制や寛解導入へ多大な効果を上げている⁴⁾。これらの治療法を早期に導入することで、RA を寛解させ関節破壊を抑制し、機能障害を起こさないようにするために、早期に診断することが重要となる。

RA の診断は、リウマトイド因子 (rheumatoid factor : RF) とともに、抗環状シトルリン化ペプチド抗体 (anti-cyclic peptide antibodies : 抗 CCP 抗体) が重要となる。炎症性滑膜組織からシトルリン化蛋白が検出され、これが抗原として免疫システムに認識され、滑膜液中の形質細胞から抗 CCP 抗体が産生されると報告されており⁵⁾、抗 CCP 抗体は HLA-DRB1 などの特定の遺伝因子を保有するヒトに、喫煙などの環境因子が作用して産生されると言われている。抗 CCP 抗体の感度は 70-80% で RF とほぼ同等である。しかし RF は全身性エリテマトーシスなどの自己免疫疾患や悪性腫瘍、さらに高齢者などでも陽性となることがあるが、抗 CCP 抗体は特異度が高いことを特徴とされているため、診断能に優れている。特に早期診断における有用性が高く、本抗体陽性 RA は陰性 RA より関節破壊の進行が速いことが知られており、さらに発症前でも陽性になる場合があるという報告もされている⁶⁾。また、RA 患者の病期ステージ別における抗 CCP 抗体の陽性率を示した報告では、病期が進行するに従い、抗 CCP 抗体の陽性率が有意に上昇している⁷⁾。これらのことから抗 CCP 抗体は、RA において病態の重症化に伴い上昇し、経過や予後因子になりうるということがわかる。そこで、唾液の成分は血液由来性であることを考慮し、今回、この抗 CCP 抗体

が血中濃度を反映し、唾液への移行するかについてマウスを用いて実験的検討を行った。

方 法

1. 実験動物

実験動物は雌の DBA/1JmsSlc (日本エスエルシー社製、静岡) を用いた。このモデルマウスはウシコラーゲン II 型を投与し関節炎を誘発できる特徴をもち、RA にみられる重篤な関節腫脹、骨膜炎などの慢性炎症の評価に用いられている⁸⁾。6 週齢及び 9 週齢にウシ由来 II 型コラーゲンを各 25 μ l ずつ、2 回、計 50 μ l/匹 (コラーゲン量として 0.2 mg/匹) を 1 回目は耳介基部に、2 回目は尾根部に投与した。control 群は同系統のマウスに同量の生理食塩水を同様の方法で投与した。また、12 週齢にマウスの体重を測定した。マウスの関節の変形を 4 段階で評価し、スコア化し数量化した。全く変化がない場合 0 点、足指に腫脹を認める場合 1 点、足指および足裏の腫脹を認める場合 2 点、足全体の腫脹を認める場合 3 点、重度の腫脹を認める場合 4 点とし、四肢の点数の合計 (16 点満点) を関節炎指数とした⁹⁾。

本実験は、神奈川歯科大学動物倫理委員会の承認 (No.386) を受け、定められた動物実験指針を遵守して行われた。

2. 唾液と血液の採取

2 回の感作から 3 週間後 (12 週齢)、非選択的ムスカリン受容体刺激薬ピロカルピン (サンピロ 1%, 参天製薬社製、大阪) を各マウス腹腔内に 1 mg/kg ずつ投与し、口腔内に流出した唾液をマイクロピペットで採取した。その後、心臓穿刺により採血し血漿成分を分離した。

3. ELISA 方法

採取した血液、唾液中から抗 CCP 抗体が検出されるかを Mouse anti-cyclic citrullinated peptide antibody (anti-CCP-antibody) ELISA kit (CUSABIO BIOTECH 社製、中国) を使用し、ELISA 法で解析した。まず、それぞれの well にスタンダード、サンプルを 100 μ l ずつ入れ、37 $^{\circ}$ C 下で 2 時間保存、次に Biotin-conjugate を 100 μ l ずつ入れ、37 $^{\circ}$ C 下で 1 時間保存し、3 回 wash out した。つぎに、それぞれの well に HRP-avidin を 100 μ l ずつ入れ、37 $^{\circ}$ C 下で 1 時間保存、wash out を 5 回行った。その後 TMB Substrate を 90 μ l ずつ入れ、37 $^{\circ}$ C 下で遮光し 15 分間保存、Stop Solution を 50 μ l ずつ入れ、すぐに 450 nm における吸光度をマイクロプレートリーダー I MarkTM (BIO RAD 社製、東京) で測定した。



図 1-a control 群 12 週齢



図 1-b 実験群 12 週齢

図 1 足肢の状態

12 週齢の control 群と実験群マウスの足肢の比較により，実験群のほうが腫脹を強く認める。

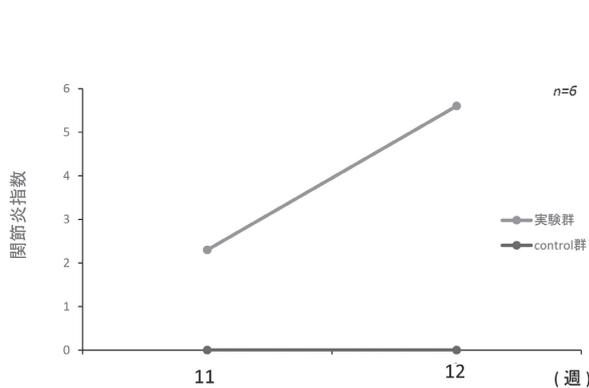


図 2 関節炎指数

control 群の関節炎指数は変化を認めないが，実験群は関節炎指数の増加を認める。

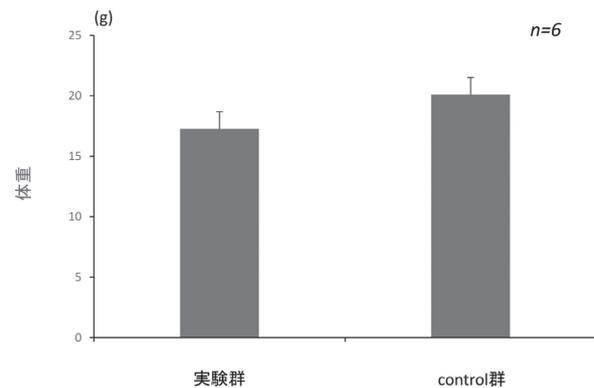


図 3 体重

12 週齢の control 群と実験群マウスの体重を比較すると，有意差は認めない。スチューデント T 検定。

4. 統計学的解析

統計ソフト Statcel4 (4step エクセル統計，オーエムエス出版，埼玉) を用いて解析を行った。実験群，control 群の血液および唾液中の抗 CCP 抗体量の比較をスチューデントの T 検定，実験群における血液および唾液中の抗 CCP 抗体量の相関関係の検討をピアソンの相関係数，両者の比較をスチューデントの T 検定で解析した。P<0.05 で統計学的な有意差があると定義した。

結 果

1. 関節の変化

肉眼的に control 群の足の腫脹は認められなかった

(図 1 a)。一方，実験群のマウスの足指は腫脹しており，1 肢の関節指数最高値である 4 を示した (図 1b)。関節炎指数は control 群では変化がなく，実験群マウスでは 12 週齢で平均 5.6 となり，11 週と比較して変化が認められ，関節炎モデルが成立していた (図 2)。さらに，マウスの平均体重は，12 週齢で control 群 20.10 g，実験群 17.27 g と control 群の方が約 1.2 倍重いが有意差は認められなかった (図 3)。

2. 抗 CCP 抗体量の測定

実験群と control 群において血液あるいは唾液中の抗 CCP 抗体量を比較したところ，実験群の血液が 5.93 ± 2.45 ，唾液が 0.22 ± 0.06 を示したが，control 群においては血液が 3.02 ± 0.81 ，唾液が 0.05 ± 0.01 と実

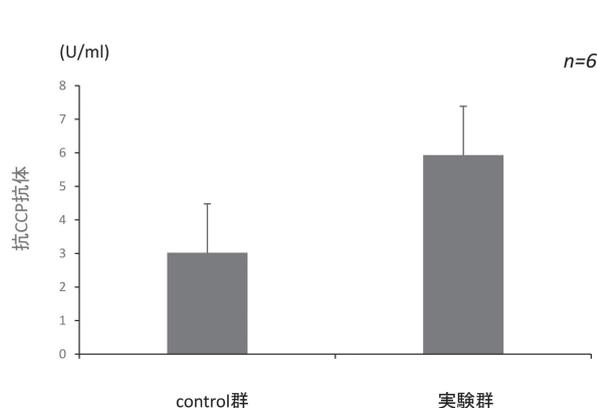


図4 血液中抗CCP抗体の比較

control群と実験群の血液中の抗CCP抗体を比較すると、実験群のほうが増加傾向を示す。スチューデントT検定。

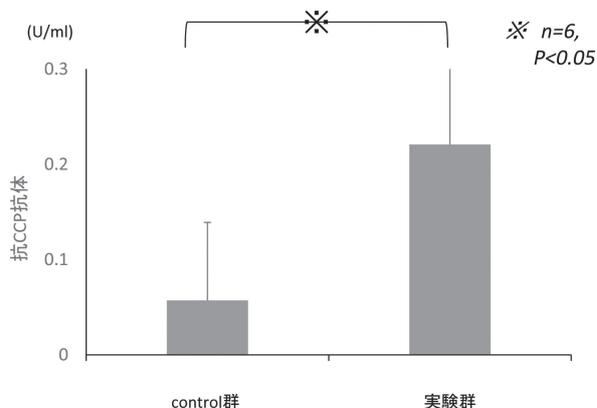


図5 唾液中抗CCP抗体の比較

control群と実験群の唾液中の抗CCP抗体を比較すると有意差を認める ($p < 0.05$)。スチューデントT検定。

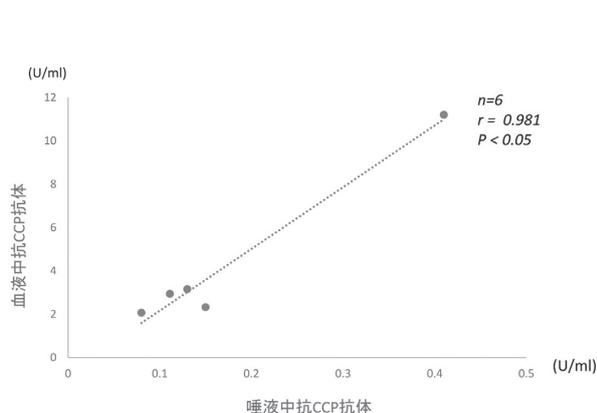


図6 実験群血液、唾液中の抗CCP抗体の相関

実験群の血液中と唾液中の抗CCP抗体は、相関 ($r=0.981$, $p < 0.05$) を認める。ピアソンの順位相関。

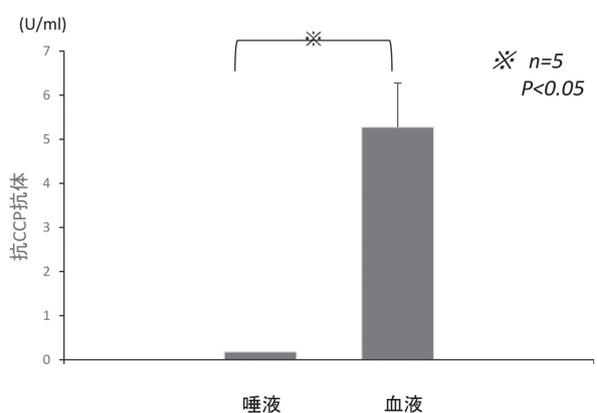


図7 実験群血液、唾液中の抗CCP抗体の比較

実験群の血液中と唾液中の抗CCP抗体を比較すると、血液中の抗CCP抗体のほうが有意に高い ($p < 0.05$)。スチューデントT検定。

験群の方がともに高い値となった。統計解析では、血液は、実験群の方が高い値を示したが有意差が認められなかった (図4)。一方、実験群とcontrol群においては、唾液中の抗CCP抗体量に有意差を認めた ($p=0.036$) (図5)。

また、実験群の血液と唾液には、極めて強い相関が認められた ($r=0.981$, $p=0.002$) (図6)。さらに、唾液と血液間に有意差を認めた ($p=0.037$) (図7)。

考 察

今回の研究では、血液検査の代替えとして、唾液を用いて検査を行うことで、簡便性、非侵襲性にRA発症前に早期診断をし、早期治療へ導くことを目的としており、結果からもRAのモデルマウスの血液中、唾液中からも抗CCP抗体が検出されることがわかった。シェーグレン症候群 (Sjögren's syndrome; SS)

の患者の唾液中からSSの自己抗体である抗SS-A抗体、抗SS-B抗体が検出されたという報告もあることから、唾液中に自己抗体が検出できることが示されており¹⁰⁾、本研究において抗CCP抗体が唾液中に検出できることが明らかになった。唾液成分は唾液腺由来もしくは血漿成分が唾液を介して輸送されたもので構成されており、腺房細胞で作られた原唾液は、導管を通る過程で一部の成分が血液へ再吸収されたり、血中成分が直接導管部へ分泌されたりして唾液成分の修飾がなされ口腔内へ分泌されるが、抗体を産生することはない^{11,12)}。従って、血漿成分中に認められた抗CCP抗体が、唾液中へ浸出し検出されたと考えられ、今回の結果からも、血液および唾液から抗CCP抗体の検出が認められ、唾液中から検出された抗CCP抗体は血液由来であることが示唆された。しかし唾液中から検出された抗CCP抗体は非常に少ないことから、今

後、高感度の検出系の検討が必要と考えられる。

RA の患者の血清にはさまざまなシトルリン化蛋白と反応する自己抗体が検出され、抗シトルリン化蛋白 (anti-cyclic citrullinated peptide antibody : ACPA) と総称される¹³⁾。RA の発症には遺伝因子、環境因子が関与し、近年、歯周病と RA の間には、疫学的な相関が存在することが解明されている¹⁴⁾。喫煙や歯周病などの環境因子により蛋白がシトルリン化され、ACAP が産生され、関節局所の炎症や障害によりシトルリン化蛋白が蓄積し、ACAP の結合によって関節炎が増悪、持続するという仮説が提唱されている¹⁵⁾。疫学研究として、RA 患者では健常者に比べ、歯周病罹患者が多く、重症度にも相関が認められるという報告がある¹⁶⁾。さらに、歯周病に特徴的な病原性細菌である *Porphyromonas gingivalis* はシトルリン化酵素を有することが明らかになっており、RA と歯周病との関連は深いと考えられている^{17,18)}。

現在、抗リウマチ薬 (メトトレキサート) の早期治療が認められ、分子標的薬も開発されてきており、早期に診断し、予後を予測、早期の治療をすることで関節破壊を抑制することが重要となる。今後、簡便で無痛的な唾液によるスクリーニングで RA の早期発見、早期治療を行うための唾液検査は有用と考えられる。また、橋本らのコホート研究では健常人の血液中からも抗 CCP 抗体が検出され、この抗体の有無や力価と歯周病の臨床評価の指数とが有意に相関していたという報告もあり^{19,20)}、歯周病は、抗 CCP 抗体価に影響する可能性が示唆される。今後、RA 患者における歯周病の治療効果の判定における唾液抗 CCP 抗体測定についても臨床的な意義を検討する予定である。

申告すべき利益相反はありません。

文 献

- 金子祐子. 関節リウマチ. 日本内科学会雑誌 **103** : 2423-2430, 2014.
- 熊谷俊一, 辻 剛, 林 伸英. 関節リウマチと抗シトルリン化蛋白抗体. 炎症と免疫 **21** : 352-360, 2013.
- 平林泰彦. 関節リウマチと歯周病. 日本歯科医師会雑誌 **67** : 217-226, 2014.
- 三森経世. 関節リウマチの早期診断と新たな治療戦略. 山梨医学 **42** : 1-5, 2015.
- 土橋浩章. 関節リウマチ患者喀痰中の抗 CCP 抗体. リウマチ科 **52** : 197-200, 2014.
- 井村嘉孝, 三森経世. 関節リウマチ : 抗 CCP 抗体. 分子リウマチ治療 **vol.6** : 91-95, 2013.
- 三森経世. 関節リウマチの早期診断と抗 CCP 抗体. リウマチ科 **34** : 244-249, 2005.
- 松本 功. 関節炎モデル. 日本内科学会雑誌 **101** : 10, 2839-2843, 2012.
- 長谷川節ほか. 薬理と治療. **32** 巻 : 421-427, 2004.
- Pan Wei, Chunlei Li, Lu Qiang, Jing He, Zhanguo Li, Hong Hua. Med Oral Patol Oral Cir Bucal **20**: e156-60, 2015.
- 美島健二. 唾液腺の基礎知識と唾液産生の仕組み, 非侵襲的検体検査の最前線. 38-45, 2015.
- 杉谷博士. 唾液腺と唾液の基礎知識. BIO INDUSTRY **29** : 9-16, 2012.
- 三森経世. 抗 CCP 抗体. 内科 **111** : 1354, 2013.
- 川人 豊. 関節リウマチの環境因子. Medical Practice **30** : 607-610, 2013.
- 關 雅之, 大塚麻由, 沢田哲治, 橋本しをり. 関節リウマチにおけるシトルリン化抗原と歯周病. リウマチ科 **46** : 282-287, 2011.
- 橋本 求, 大村浩一郎. 関節リウマチ発症における歯周病の役割. リウマチ科 **49** : 109-114, 2013.
- 小林哲夫, 伊藤 聡, 島田惇史, 村澤 章, 中園 清, 吉江弘正. 関節リウマチ患者の活動度に及ぼす歯周炎併発の影響. 日本歯科保存学雑誌 **59** : 266-272, 2016.
- 小林哲夫, 吉江弘正. 歯周病と関節リウマチ. 日歯周歯 **54** : 11-17, 2012.
- Hashimoto M, Yamazaki T, Hamaguchi M, Morimoto T, Yamori M, Asai K, Isobe Y, Furu M, Ito H, Fujii T, Terao C, Mori M, Matuo T, Yoshitomi H, Yamamoto K, Yamamoto W, Bessho K, Mimori T. Periodontitis and *Porphyromonas gingivalis* in preclinical stage of arthritis patient. PLOS ONE **10(4)**: e0122121, 2015.
- Terao C, Asai K, Hashimoto M, Yamazaki T, Ohmura K, Yamaguchi A, Takahashi K, Takei N, Ishii T, Kawaguchi T, Tabara Y, Takahashi M, Nakayama T, Kosugi S, Sekine A, Fujii T, Yamada R, Mimori T, Matsuda F, Bessho K. Significant association of periodontal disease with anti-citrullinated peptide antibody in a Japanese healthy population -the Nagahama study. Journal of Autoimmunity **00040-2**, 2015.