

運動ストレスに伴う口腔内免疫能の低下と 虫歯菌活性との関連

大阪成蹊短期大学 白井 達矢

The Relationship between Oral Mucosal Immunity and Activity of Dental Caries after Prolonged Strenuous Exercise

by

Tatsuya Usui

*Department of Elementary and Preschool Education,
Osaka Seikei College*

ABSTRACT

The aim of the present study was to demonstrate the effect of prolonged strenuous exercise against oral antimicrobial peptide and to examine relations between oral mucosal immunization and cavity bacterium at the same time. Ten young male volunteers either exercised on ergometer at 75 % $\dot{V}O_2$ max for 60 min (exercise session) or sat quietly (resting session). Saliva samples were obtained at 60 min intervals during sessions for measurements of saliva antimicrobial peptides (HBD-2) and osmolality. Saliva flow rate was decreased and saliva osmolality was increased during the 60min exercise. Saliva HBD-2 concentration was decreased after the exercise (6 hours and 24 hours after exercise). Saliva antimicrobial levels was decreased after the exercise. It is possible that while strenuous exercise in elite athletes could partly enhance oral innate immunity, the physical stress could simultaneously restrict the immunological enhancement due to HPA axis activity.

要 旨

本研究では、抗菌性ペプチド群に対する長時間高強度運動の影響を明らかにするとともに、口腔内粘膜免疫と虫歯菌との関連を検討することを目的とした。

一般健康男性 10 名に対し、長時間高強度運動 (75% $\dot{V}O_2\text{max}$ 60min) を実施させ、運動前、運動終了直後、運動終了 1 時間後、2 時間後、4 時間後、6 時間後、24 時間後に唾液採取を行い、*HBD-2* 濃度を ELISA 法により測定した。次に、採取した唾液を用いて、虫歯菌および大腸菌に対する唾液抗菌レベルを測定した。唾液 *HBD-2* 濃度は、運動終了直後および 1 時間後、2 時間後では有意に増加したが、6 時間後および 24 時間後では安静時と比較して有意に低下した。唾液抗菌レベルにおいては、運動終了 6 時間後および 24 時間後の唾液では、虫歯菌および大腸菌に対する唾液抗菌能力が低下することが示唆された。

緒 言

口腔内は外気にたえず曝露されていることから、細菌やウイルスなどの病原微生物が侵入しやすく、第一線の防御機構として機能する唾液免疫成分の働きが重要となる^{1,2)}。一般的に、高強度や長時間運動などの運動ストレスに伴い、口腔内の免疫機能が低下し、上気道感染症への罹患率が高まることが報告されている^{3,4)}。口腔内免疫機能の代表としては、唾液免疫グロブリン A (IgA) が報告されており、一過性の運動および繰り返し運動や長期間運動により、その分泌が変化することが報告されている⁵⁾。

さらに近年、生体防御システムとして、抗菌性ペプチド群の存在が注目され、それらは自然免疫に属し、感染に対する第一線の防御機構として機能するだけでなく、自然免疫に続く獲得免疫系を活性化させる働きを有していることが報告さ

れている⁶⁾。特に、上気道感染や口腔内免疫機能において重要な役割を担っているのが *Human- β -defensin-2* であり、気道上皮細胞や唾液腺から分泌され、ウイルスや細菌などに対する抗菌活動に貢献していることが報告されている^{6,7)}。

Defensin は、粘膜表層の生体防御機構において重要な役割を担い、低分子塩基性抗菌ペプチドの 1 グループとして分類され、 β -sheet 構造と 2-3 個の分子内ジスルフィドを持つカチオン性のペプチドとして特徴づけられている^{8,9)}。*Defensin* は、抗菌性ペプチドの多型遺伝子族を形成しており、1980 年に最初に発見されてからヒトを含む様々な哺乳動物の気管、唾液、腸、舌、血液、皮膚などからその分泌が発見されている^{8,9)}。さらに *Defensin* は、存在する 6 つのシステイン残基の形成する 3 つのジスルフィド結合の組み合わせの違いから、 α -*defensin* と β -*defensin* とに大別される^{8,9)}。

Human- β -defensin-2 (*HBD-2*) は、グラム陰性菌、陽性菌および真菌に対して抗菌活性をもち、皮膚や唾液、肺などで多く発現している^{10,11)}。*HBD-2* は、生体が細菌や炎症性のサイトカインに暴露された際に著しく誘導的に発現されることが報告されている^{10,11,12,13)}。また、精神的、身体的ストレスに伴う内因性グルココルチコイドの分泌増加に伴い、*HBD-2* の発現が抑制されるグルココルチコイド依存メカニズムが報告されている¹⁴⁾。

HBD-2 は、他の抗菌性ペプチド群よりも約 10 倍の抗菌活性を有しており、さらには、直接的な抗菌活性に加えて、自然免疫と獲得免疫反応との間の伝達においても重要な作用を持つことが認識されてきており、これらの分泌が、口腔内免疫機能にとって非常に重要であるとされている^{12,13)}。特に、口腔内のように細菌が豊富な環境下では、*HBD-2* のような抗菌性ペプチドが生体防御に大きく寄与する。抗菌性ペプチド群は、歯科学や

口腔衛生学などで特に重要とされており、虫歯菌 (*Streptococcus mutans*) の増減や虫歯の発生リスクと抗菌性ペプチド群の分泌濃度とは関連があることが報告されている^{15,16)}。しかしながら、運動による抗菌性ペプチド群の変化と虫歯菌への影響に関して検討した研究はない。抗菌性ペプチド群と運動に関するこれまでの報告では、Davisonらが一過性の中等度長時間運動に伴い、唾液中の抗菌性ペプチド群 (*LL-37, a-defensin*) が有意に増加したこと¹⁷⁾、また我々は、一過性の長時間高強度運動に伴い唾液 *HBD-2* の発現度合いが抑制されることを報告している¹⁸⁾。さらにEdaらは、ヨガストレッチなどのリラクゼーション運動が、*HBD-2* の発現を高めることを報告している¹⁹⁾。このことから、運動刺激において、抗菌性ペプチド群の発現は影響し、口腔内免疫機能が変化する。これまでの運動と免疫に関する多くの研究^{1,20,21)} では、運動刺激に伴い変化した唾液免疫成分の濃度や分泌量などの動態や変化しか検討されておらず、さらに運動により、変化した抗菌性ペプチド群や唾液免疫成分が、実際にどのぐらいの抗菌活動に貢献しているかは明らかにされていない。

そこで、今回は、運動ストレスに伴う口腔内免疫機能の変化と虫歯菌活性との関連について検討した。

1. 方法

1.1 対象

対象者は、一般健康男性10名(年齢 21 ± 3 歳; 身長 174.4 ± 2.4 cm; 体重 65.8 ± 5.8 kg; $\dot{V}O_2\max$ 43.7 ± 4.8 ml/kg/min) である。対象には、実験日の1ヶ月前の期間、上気道感染症の罹患が無いこと、虫歯が無いこと、治療中でないことを事前に確認し、高血圧、心疾患などの循環器疾患、消化器疾患、炎症性疾患、内分泌疾患を有する者は含まれておらず、喫煙習慣を有する者がいないことを予め確認した。また、運動介入に伴う影響を検討するため、対象者は、運動を定期的実施していない者、さらに精神的ストレスが、抗菌性ペプチド群の発現に影響することから実験日から6ヵ月間の間に身内などに不幸がなかった者を対象とした。本研究のプロトコルは、大阪成蹊短期大学倫理規程研究審査会による審査・承諾を得て、各対象者には事前に本研究の主旨を説明し、全員から研究参加への同意を得た。

1.2 実験プロトコル

図1に実験プロトコルを示す。本研究の運動では、自転車エルゴメーター (AEROBIKE75XL III: SAKAImed 社製) を用いた定常負荷運動を採用し、負荷強度は事前に測定した最大酸素摂取

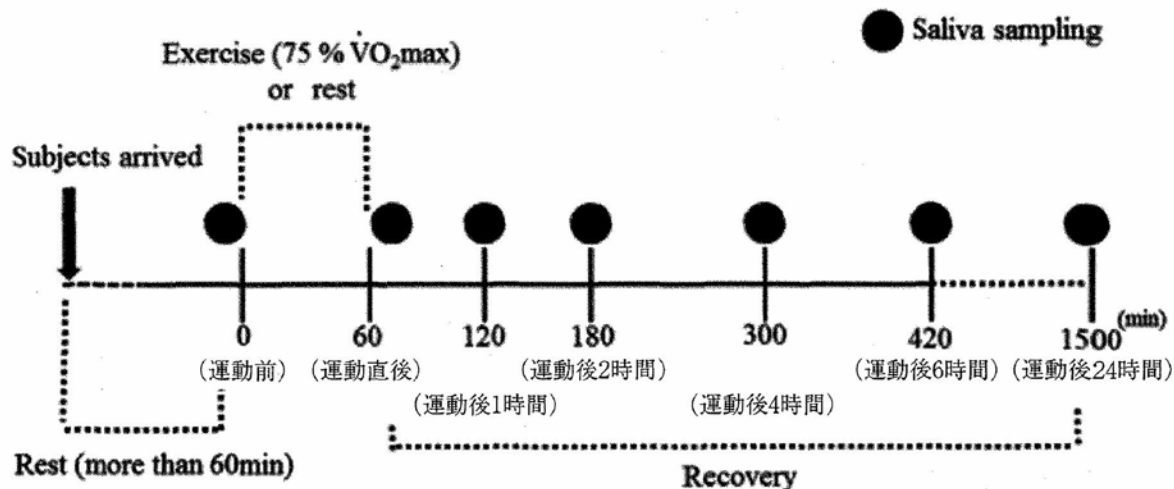


図1 実験プロトコル

量の75%に設定した。

測定当日は、AM11:00に実験室に入室させ、口腔内のうがいと歯磨きを実施する。その後、60分間安静状態を保ち、PM12:00より唾液採取を実施した。

唾液採取に関しては、自然誘発法とコットン法が多く用いられており、今回の長時間高強度運動など激しい運動の場合は、自然誘発法では、一定の唾液量の確保が困難なため、コットン法を用いて行い^{18, 22)}、脱脂綿を1回/秒のペースで1分間咀嚼した後に唾液を採取した。

1.3 唾液分析

採取した唾液は、滅菌ろ過および遠心分離した後、上清成分を採取し、直ちにマイナス80℃凍結保存した。その後HBD-2はELISA法(Human β -Defensin 2 ELISA Kit, Phoenix Pharmaceuticals Inc, Burlingame, CA)にて測定し濃度を算出した。

1.4 虫歯菌および大腸菌に対する唾液抗菌活性

採取した唾液を用いて虫歯菌および大腸菌に対する抗菌活性レベルを測定した。被験株菌の培養には、Difco (Michigan, USA) 製を用い、その他の試薬は、シグマ製を用いた。実験に用いた被験株菌は、Institute for Fermentation Osakaの微生物バンクより入手し、虫歯菌はストレプトコッカス・ミュータンス菌 (*Streptococcus mutans* ATCC35911) を使用し、さらに、菌培養が容易な大腸菌 (*Escherichia coli* IFO15044) も用いて、唾液抗菌活性を測定した。

抗菌活性レベルの測定は、それぞれの菌を採取した唾液と24時間培養(37℃)させ、その後、菌の細胞数をカウントした。

1.5 統計処理

全てのデータは正規分布を示していたため、平

均值 ± 標準偏差で示した。運動試行と安静試行の2試行間の差は、反復測定の一元配置分散分析を用い、有意差が認められた場合には、Tukey-Kramer検定を用いて比較した。なお、有意水準の判定はいずれも $p < 0.05$ とした。

2. 結果

2.1 唾液抗菌性ペプチド (HBD-2) の変化

唾液HBD-2濃度は、安静時 $86.6 \pm 11.4 \text{ pg/ml}$ 、運動終了直後 208.0 ± 106.7 、運動終了1時間後 257.6 ± 68.6 、2時間後 250.8 ± 76.6 、4時間後 150.5 ± 46.6 、6時間後 66.5 ± 26.6 、24時間後 65.5 ± 16.3 を示した (図2)。

安静時と比較して、運動直後および運動終了1時間後、2時間後では有意 ($p < 0.01$) に増加した。また、運動終了6時間後、24時間後では、有意 ($p < 0.01$) に減少した。唾液量および浸透圧においては、運動終了直後のみ、安静時と比較して有意 ($p < 0.01$) に変化した。

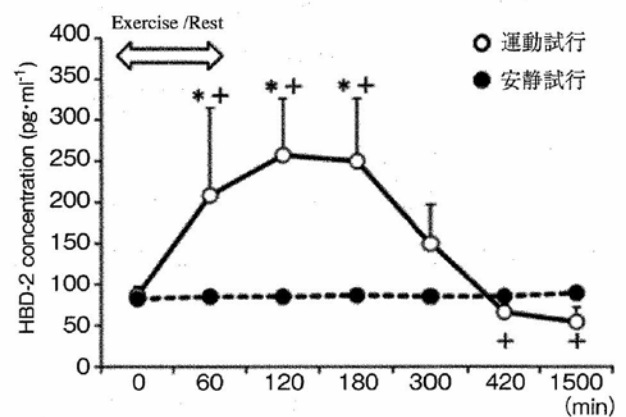


図2 唾液HBD-2の変化

* $P < 0.01$: resting versus exercise session + $P < 0.01$: versus time 0 (t=0)

2.2 虫歯菌に対する唾液抗菌活性の変化

虫歯菌に対する唾液抗菌活性の変化では、安静時と比較して、運動終了6時間後および24時間後では、有意 ($p < 0.01$) な増加がみられた (図3)。しかし、運動直後および運動終了1時間後、2時間後では有意な差はみられなかった。

2.3 大腸菌に対する唾液抗菌活性の変化

大腸菌に対する唾液抗菌活性の変化では、安静時と比較して、運動終了直後、運動終了1時間後、2時間後の唾液において、大腸菌細胞カウント数の有意 ($p < 0.01$) な減少がみられた。また、運動終了6時間後および24時間後では、有意 ($p < 0.01$) な増加がみられた (図4)。

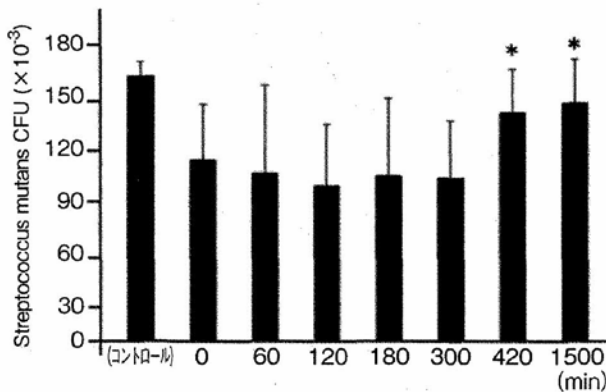


図3 唾液培養中におけるストレプトコッカス・ミュータンス菌の菌数の変化
* $P < 0.01$: versus time 0 (t=0)

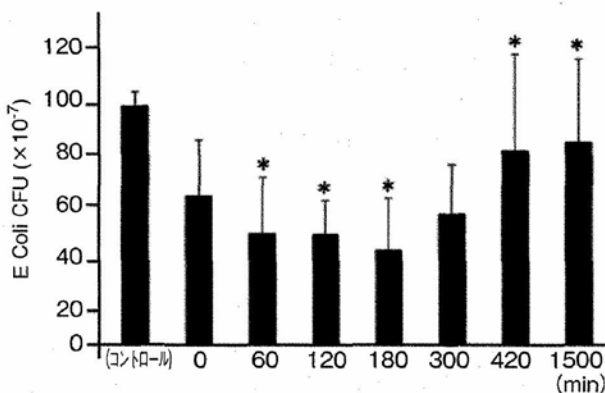


図4 唾液培養中における大腸菌の菌数の変化
* $P < 0.01$: versus time 0 (t=0)

3. 考 察

運動ストレスに伴う唾液 *HBD-2* の変動と唾液抗菌活性レベルを検討した結果、長時間高強度運動に伴い、運動終了直後および1時間後、2時間後において唾液 *HBD-2* 濃度が有意に増加すること、また運動終了6時間後および24時間後においては、安静時と比較して有意に発現が低下することを示した。さらに、虫歯菌および大腸菌に対

する唾液の抗菌活性では、運動終了6時間後、24時間後の唾液において、菌の阻止能力が有意に低下することが示された。

近年、抗菌性ペプチド群に関する報告が多くなされており、なかでも *HBD-2* は、唾液腺や気道上皮細胞から分泌され、口腔内の自然免疫として重要な役割を担っていることが明らかにされている^{2,23)}。しかしながら、抗菌性ペプチド群と運動やスポーツに関する報告は少なく、*Davison* らが一過性の中等度運動により、抗菌性ペプチド群 (*LL-37*, *α -defensin*) が増加したことを報告している¹⁷⁾。また、我々も、運動ストレスに伴い、唾液中の抗菌性ペプチド群 (*HBD-2*, *LL-37*) が運動直後および1時間後、2時間後に有意に増加することを、これまでに報告し、高強度運動(身体的ストレス)に伴う炎症性サイトカインの増加が、抗菌性ペプチド群の産生に貢献しているのではないかと考察している^{17,18)}。

また、*Nijnik* らは、唾液中の *HBD-2* は、口腔内の防御機構として第一線に働き、その分泌量や濃度が高いほど、より強い抗菌活性を示すことを報告している²⁴⁾。今回、一過性の長時間高強度運動に伴い、運動終了直後から運動終了後2時間において、唾液 *HBD-2* が有意に増加し、唾液抗菌活性レベルは、*HBD-2* の有意な増加がみられた運動後の唾液(運動終了直後・運動終了後1時間・2時間)において、安静時と比較して、大腸菌の発育阻止に働くことが示されたが、虫歯菌に対しては、その影響は見られなかった。*Davison* らは、気道や口腔の流体である唾液免疫成分は、運動刺激に伴い、相乗的に分泌されることで、運動直後および数時間にわたり、その殺菌性や抗菌性が高くなることを報告¹⁷⁾ しており、今回の運動終了直後の唾液抗菌活性レベルが高かった本研究と結果が一致している。また、これまでの運動と口腔内免疫に関する研究において、一過性の運動により、リゾチームやラクトフェリンなどの抗

菌性タンパクが増加することや、口腔粘膜免疫の代表とされる免疫グロブリン A (IgA) の低下を、リゾチームやヒスタチンなどの抗菌性タンパクがカバーするために増加することが報告されている (21, 25)。

一般的に、高強度や長時間の運動に伴い、リンパ球などの全身性免疫機能が低下することは知られており、その低下は、運動後から 24 時間は続くと言われている。そうした全身性の免疫機能をカバーするために、一時的に局所免疫 (口腔内) の働きが高まり、抗菌性ペプチド群や抗菌性タンパクの産生増加がみられたと考えられる。しかし、運動終了 6 時間後および 24 時間後では、唾液 *HBD-2* の発現が有意に低下し、虫歯菌および大腸菌に対する唾液抗菌能の低下が見られ、菌の発育阻止能力が低下した。このことから、長時間や高強度の運動を行った場合、口腔内局所免疫機能が低下し、虫歯菌の活性に伴い口腔内の健康が阻害されることが危惧される。今回は、唾液と種々の菌との培養による菌の発育度合いを検討したが、今後は、採取した唾液中の虫歯菌の菌数や、歯茎の炎症度合いなども検討していくことが出来れば、運動ストレスに伴う口腔内の健康への影響を明らかにしていくことができる。さらに、今回は、運動ストレスに伴う影響を検討したが、唾液 *HBD-2* の分泌を高める運動を検討していくことで、虫歯菌の抑制や口腔の健康を高めるための運動処方につなげていくことができる (口腔ケアに対する運動処方)。

4. まとめ

運動ストレスに伴う口腔内免疫機能の変化と虫歯菌活性との関連について検討した。その結果、唾液抗菌性ペプチド群である *HBD-2* 濃度は、運動終了 6 時間後、24 時間後に減少し、虫歯菌および大腸菌に対する唾液抗菌能力が低下することが示唆された。

謝 辞

本研究を遂行するにあたり、多大な研究助成を賜りました財団法人石本記念デサントスポーツ科学振興財団に深く感謝申し上げます。

文 献

- 1) Neville V., Gleeson M., Folland J.P.: Salivary IgA as a risk factor for upper respiratory infection in elite professional athletes. *Med. Sci. Sports Exerc.*, 40(7):1228-1236(2008)
- 2) West N.P., Pyne D.B., Renshaw G., Cripps A.W.: Antimicrobial peptides and proteins, exercise and innate mucosal immunity. *FEMS Immunol Med Microbiol.*, 48:493-304(2006)
- 3) Nieman D.C., Upper respiratory tract infections and exercise. *Thorax*; 50:1229-1231(1995)
- 4) Usui T., Yoshikawa T., Orita K., Ueda S., Katsura Y., Fujimoto S.: Comparison of salivary antimicrobial peptides and upper respiratory tract infections in elite marathon runners and sedentary subjects. *J. phys. Fitness Sports Med.*, 1(1):175-181(2012)
- 5) Gleeson M. Immune function in sport and exercise. *J. Appl. Physiol.*; 103:693-699(2007)
- 6) Doss M., White M.R., Teclé T., Hartshorn K.L.: Human defensins and LL-37 in mucosal immunity. *J. Leuko. Biol.*, 87:79-92(2010)
- 7) Proud D., Sanders S.P., Wiehler S.: Human rhinovirus infection induces airway epithelial cell production of human β -defensin 2 both in vitro and in vivo. *The Journal of Immunology.*, 4637-4645(2004)
- 8) Ganz T. Defensins: antimicrobial peptides of innate immunity. *Nat. Rev. Immunol.*; 3:710-720(2003)
- 9) Duits L.A., Rademaker M., Ravensbergen B., van Sterkenburg M.A., van Strijen E., Hiemstra P.S., Nibbering P.H.: Inhibition of hBD-3, but not hBD-1 and hBD-2, mRNA expression by corticosteroids. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 280:522-525(2001)
- 10) McDermott A.M., Redfern R.L., Zhang B., Pei Y., Huang L., Proske R.J.: Defensin expression by the cornea: multiple signalling pathways mediate IL-1 β stimulation of hBD-2 expression by human corneal epithelial cells. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 44:1859-1865(2003)

- 11) Starner T.D., Agerberth B., Gudmundsson G.H., McCray P.B. Jr.: Expression and activity of beta-defensin and LL-37 in the developing human lung. *J. Immunol.*, 174:1608-1615(2005)
- 12) Terai K., Sano Y., Kawasaki S., Endo K., Adachi W., Hiratsuka T., Ihiboshi H., Nakazato M., Kinoshita S.: Effects of dexamethasone and cyclosporin A on human beta-defensin in corneal epithelial cells. *Exp. Eye. Res.*, 79:175-180(2004)
- 13) Tomita T., Nagase T., Ohga E., Yamaguchi Y., Yoshizumi M., Ouchi Y.: Molecular mechanisms underlying human beta-defensin-2 gene expression in a human airway cell line (LC2/ad). *Respirology.*, 27:305-310(2007)
- 14) Aberg K.M., Radek K.A., Choi E.H., Kim D.K., Demerjian M., Hupe M., Kerbleski J., Gallo R.L., Ganz T., Mauro T., Feingold K.R., Elias P.M.: Psychological stress downregulates epidermal antimicrobial peptide expression and increases severity of cutaneous infections in mice. *J. Clin. Invest.*, 117:3339-49(2007)
- 15) Dale B.A., Tao R., Kimball J.R., Jurevic R.J.: Oral Antimicrobial peptides and biological control of caries. *BMC Oral Health*(2006)
- 16) Tao R., Jurevic R.J., Coulton K.K., Tsutsui M.T., Roberts M.C., Kimball J.R., Wells N., Berndt J., Dale B.A.: Salivary Antimicrobial peptides expression and dental caries experience in children. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 3883-3888 (2005)
- 17) Davison G., Allgrove J., Gleeson M.: Salivary antimicrobial peptides (LL-37 and alpha-defensins HNP1-3), antimicrobial and IgA responses to prolonged exercise. *Eur. J. Appl. Physiol.*, 106:277-84(2009)
- 18) Usui T., Yoshikawa T., Orita K., Ueda S., Katsura Y., Fujimoto S.: Changes in salivary antimicrobial peptides, immunoglobulin A and cortisol after prolonged strenuous exercise. *Eur. J. Appl. Physiol.*, 111:2005-2014(2011)
- 19) Eda N., Shimizu K., Suzuki S., Tanabe Y., Lee E., Akama T.: Effects of yoga exercise on salivary beta-defensin 2. *Eur. J. Appl. Physiol.*, 113(10):2621-7 (2013)
- 20) M.Gleeson: Mucosal immunity and respiratory illness in elite athletes. *Int. J. Sports Med.*, 21:33-43 (2000)
- 21) Nieman D.C.: Exercise, upper respiratory tract infection, and the immune system. *Med. Sci. Sports Exerc.*, 26(2):128-139(1994)
- 22) Akimoto T., Kumai Y., Akama T., Hayashi E., Murakami H., Soma R., Kuno S., Kono I.: Effects of 12 months of exercise training on salivary secretory IgA levels in elderly subjects. *Br. J. Sports Med.*, 37:76-9(2003)
- 23) Diamond G., Beckloff N., Ryan L.K.: Host defense peptides in the oral cavity and the lung: similarities and differences. *J. Dent. Res.*, 915-27(2008)
- 24) Nijnik A., Hancock R.E.: The roles of cathelicidin LL-37 in immune defences and novel clinical applications. *Curr. Opin. Hematol.*, 16:41-7(2009)
- 25) M.Gleeson: Mucosal immunity and respiratory illness in elite athletes. *Int. J. Sports Med.*, 21:33-43 (2000)