

平成 21 年 5 月 15 日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2006-2008

課題番号：18592074

研究課題名（和文）BCG 接種による加齢と細胞性免疫の関係

研究課題名（英文）Relation between aging and cellular immunity after BCG vaccination

研究代表者

加藤 千穂美（KATO CHIHOMI）

日本歯科大学・新潟生命歯学部・講師

研究者番号：00147860

研究成果の概要： 高齢者や術後は日和見感染が多いことから、細胞性免疫の賦活化が重要と考えられる。歯性内因感染源となる *Porphyromonas gingivalis* に対して、BCG接種による細胞性免疫の賦活化が効果があるかどうかを、月齢の異なるマウスの実験により検討した。その結果、若齢では殺菌活性が高まり、ワクチンとしての効果が認められたが、加齢に伴いその効果は弱まり、高齢では追加接種をしても細胞性免疫の賦活化は期待できないものと考えられた。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006 年度	1,600,000	0	1,600,000
2007 年度	900,000	270,000	1,170,000
2008 年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	510,000	3,810,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・病態科学系歯学・歯科放射線学

キーワード：免疫・感染・加齢・BCG

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 日本は超高齢化社会を迎え、高齢人口の増加に伴い要介護人口が増加している。その死因の4位は肺炎であり誤嚥などによる内因感染が原因である。そこで、日和見感染源ともなりうる口腔細菌を減少させることが肺炎の防止に有効なのではないかと考えた。

(2) 我々は、口腔細菌の中で *Porphyromonas gingivalis* (Pg) は宿主に液性免疫を、*Fusobacterium nucleatum* (Fn) は細胞性免疫を誘導することを見出した。更に、これらに対する抗菌力に好中球や抗体は関与しないが、細胞性免疫が優位な状態ではマクロファージの関与により、早期に菌が除去されることを明らかにした。

(3) BCGは結核の生ワクチンであり、その効果は抗原の存続による細胞性免疫の持続であるといわれているにもかかわらず、長期に渡りそれを証明した研究が殆どない。また活性化したマクロファージの抗菌性は非特異的であると言われているが、日和見感染菌との関係を調べている研究も少ない。

(4) 細胞培養系とBCG菌体成分を用いた *in vitro*での実験は広く行なわれているが、生体ならびに生菌を使用した *in vivo*での免疫実験は少ない。

## 2. 研究の目的

歯肉溝の局所感染モデルとして、嫌気的環境で細菌感染による滲出免疫細胞の動態をモニターできるマウス腹腔を使用する。

月齢の異なるマウスにBCGを接種して細胞性免疫を誘導した後、Pg感染に対する防御機能を調べ、加齢との関係を明らかにする。更にBCG投与に関し、細胞性免疫誘導能の差異を調べるために以下の条件を設定した。

- (1) どの位の月齢までBCG接種が効果を上げるのか。(実験1)
- (2) 若齢で接種したBCGによる細胞性免疫効果がいつまで持続するのか。(実験2)
- (3) 若齢で接種したBCGによる細胞性免疫効果は追加免疫をすることで更に増強されるか。(実験3)

## 3. 研究の方法

(1) 実験動物：SPF ICR マウス(日本エスエルシー)を使用した。実験は日本歯科大学動物倫理委員会の許可を得た。

(2) 使用菌：*Porphyromonas gingivalis* (Pg) FDC381 と乾燥 BCG ワクチン(日本BCG サプライ)を使用した。

(3) 免疫方法：

- ① 実験1；6週齢(若齢)、6-8ヶ月齢(中

間齢)、12-14ヶ月(老齢)の各月齢のマウスにBCGを $1 \times 10^7$ 個/マウスを1回皮下注射した。注射3週間後にBCG免疫マウスとして使用した。

② 実験2；6週齢マウスにBCGを $1 \times 10^7$ 個/マウスを1回皮下注射した。注射3週間後(若齢)、6-8ヶ月後(中間齢)、12-14ヶ月後(老齢)に早期免疫マウスとして使用した。

③ 実験3；6週齢マウスにBCGを $1 \times 10^7$ 個/マウスを1回皮下注射した。注射3週間後(若齢)、6-8ヶ月後(中間齢)、12-14ヶ月後(老齢)に再度BCGを $1 \times 10^7$ 個/マウスを1回皮下注射し、3週間後に追加免疫マウスとして使用した。

なおBCG $1 \times 10^7$ 個/マウスという接種用量は、脾臓が肥大化しない最大数である。

(4) 腹腔滲出細胞の動態：各免疫マウスにPgを投与後、経時的にマウス腹腔に2mlのPBSを注入後回収し、総細胞数、細胞分画を顕微鏡下で測定した。

(5) 腹腔内の殺菌活性：Pg投与後に回収した腹腔滲出液のPBS希釈液をアネロコロネビア培地(日本ベクトンディキンソン)に接種し嫌気培養した。発育したコロニー数を測定し、Pg生残率を算出した。

(6) 細胞内Pg菌数の測定：腹腔滲出細胞から調製したDNAを鋳型にしてPgの16SリボソームRNA遺伝子のプライマーを用いて定量的リアルタイムPCR(qRT-PCR)を行い、細胞内に取り込まれたPg数を測定した。

(7) 腹腔滲出液中のサイトカインの測定：マウスELISAキット(ENDOGEN)を使用して、interferon (IFN)- $\gamma$ 、interleukin (IL)-1 $\beta$ 、IL-4、IL-6、IL-12、およびtumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$ を測定

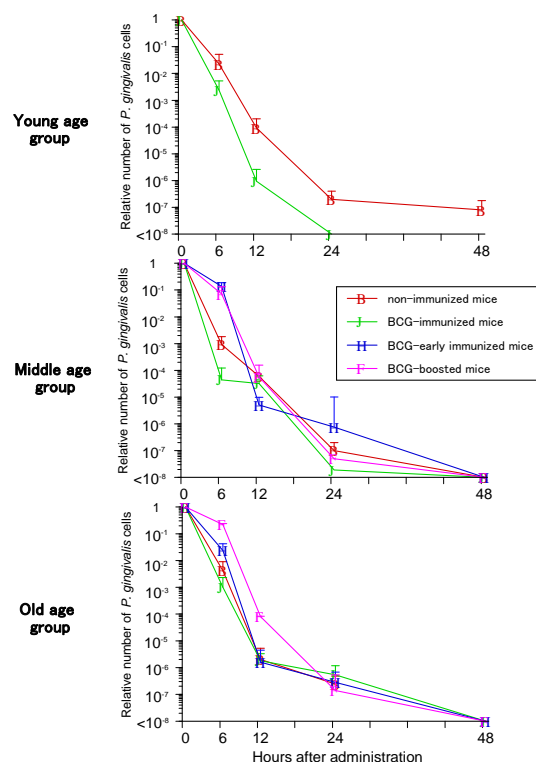
した。

- (8) 腹腔滲出液中の一酸化窒素の測定： Griess 試薬を使用した Green らの方法に従った。
- (9) 腹腔滲出細胞におけるケモカインおよびケモカインレセプターの発現：腹腔滲出細胞から RNA を調製し、ケモカイン (CXCL1, CXCL2, CCL2, CCL3, CCL4) およびそれらのレセプター (CXCR2, CCR1, CCR2, CCR5) の mRNA 発現を qRT-PCR にて調べた。各群の 0 時間の発現量を基準とした。標準化は  $\beta$  アクチン mRNA 発現にて行った。
- (10) リンパ球の増殖能の測定：マウス脾臓細胞を調製し、T 細胞増殖刺激としてコンカナバリン A (Con A)、B 細胞増殖刺激として LPS (*Escherichia coli* 055:B5 由来) を添加して 2 日間培養し、細胞増殖活性を MTT 法にて測定した。
- (11) BCG の検出：BCG を接種したマウスの腹腔滲出細胞、脾臓、リンパ節から調製した DNA を鋳型にして、*Mycobacterium tuberculosis* の 16S リボゾーム RNA 遺伝子のプライマーを用いて PCR を行い、BCG を検出した。

#### 4. 研究成果

- (1) 腹腔滲出細胞の動態：若齢の BCG 免疫群では非免疫群 (対照群) に比べて、48 時間でマクロファージが  $1.36 \pm 0.66 \times 10^7$  と有意に増加した。それに伴い総細胞数も  $2.51 \pm 1.05 \times 10^7$  と有意に増加した。しかし中間齢、老齢では、BCG 免疫群、早期免疫群、更に追加免疫群においても対照群と比べ、総細胞数、好中球数、リンパ球数、マクロファージ数に差が認められなかった。
- (2) 腹腔内の Pg 殺菌活性：若齢においては、非免疫群 (対照群) では Pg 生残率は 48 時

間後に  $10^{-7}$  であったのに対し、BCG 免疫群では 24 時間後に  $10^{-8}$  以下に減少した。しかし中間齢、老齢では、BCG 免疫群、早期免疫群および追加免疫群においても対照群との間に Pg 生残率に差は認められず、 $10^{-8}$  以下に減少するまでに 48 時間を要した。

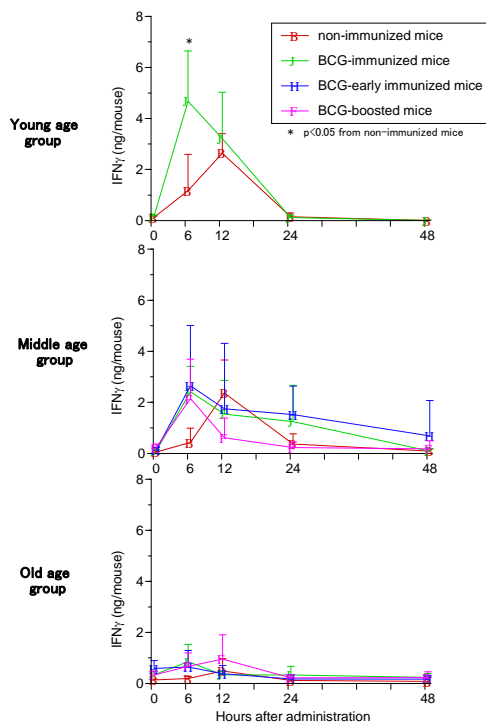


- (3) 腹腔滲出細胞内の Pg 菌数：老齢マウスでは若齢および中間齢マウスに比べて、6 時間後の取り込み菌数が少なかった。同じ月齢内では、免疫の有無に関わらずそれぞれの時間における取り込み菌数に差はなかった。

1個あたりの腹腔滲出細胞が取り込んだPg菌数				
	non-imm.	BCG-imm.	BCG-early imm.	BCG-boost.
<b>Young</b>				
6h	39.7 ± 16.0	22.1 ± 16.7	N. D.	N. D.
12h	5.1 ± 0.8	4.4 ± 1.7	N. D.	N. D.
24h	0.46 ± 0.48	0.59 ± 0.47	N. D.	N. D.
48h	0.075 ± 0.088	0.067 ± 0.060	N. D.	N. D.
<b>Middle</b>				
6h	33.4 ± 21.3	28.6 ± 14.1	35.0 ± 19.2	50.3 ± 16.6
12h	4.5 ± 1.8	3.6 ± 1.6	3.8 ± 2.9	8.2 ± 4.2
24h	0.72 ± 0.36	0.38 ± 0.22	0.41 ± 0.25	0.91 ± 0.36
48h	0.037 ± 0.035	0.032 ± 0.023	0.041 ± 0.038	0.007 ± 0.005
<b>Old</b>				
6h	9.8 ± 7.3	14.1 ± 8.3	14.6 ± 8.3	18.3 ± 5.8
12h	5.0 ± 3.1	3.5 ± 1.8	3.2 ± 2.1	0.8 ± 0.4
24h	0.50 ± 0.22	0.34 ± 0.20	0.41 ± 0.40	0.27 ± 0.35
48h	0.041 ± 0.033	0.021 ± 0.015	0.010 ± 0.017	0.013 ± 0.013

(4) 腹腔滲出液中のサイトカイン：

- ① IFN- $\gamma$ ：若齢のBCG免疫群では6時間後に対照群に比べて有意に高いピークになった。対照群ではどの年齢においても12時間後にピークになった。中間齢ではBCG免疫群、早期免疫群および追加免疫群において6時間後にピークになったが有意差は無かった。老齢では全ての群でIFN- $\gamma$ の産生は低かった。



- ② IL-12：若齢のBCG免疫群では12-24時間後に対照群に比べて有意に高いピークになった。中間齢ではBCG免疫群がやはり12-24時間後にピークになったが有意差は無かった。老齢では全ての群で有意差は無かった。

- ③ IL-4：若齢では、対照群とBCG免疫群では全く差が無かった。中間齢では追加免疫群の産生が高かった。老齢でも追加免疫群の産生が高い傾向が見られたが、有意差は無かった。

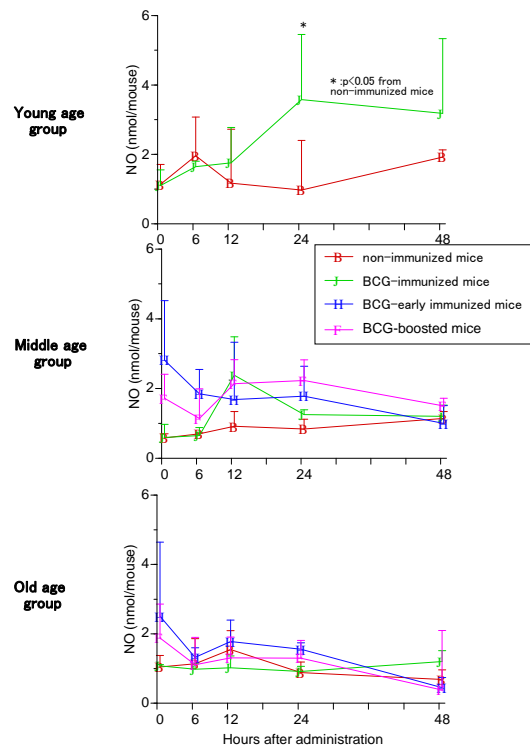
以上の結果からこれらが加齢に伴う細胞性免疫の低下の一因と考えられた。

- ④ IL-1 $\beta$ ：若齢のBCG免疫群では、12-24時間後に対照群に比べて有意に高いピークになった。中間齢では全ての群で6時間後にピークになったが有意差は無かった。老齢では全ての群で産生が低く、有意差は無かった。

- ⑤ IL-6：月齢に関わらず、全ての群で同じレベルの産生が見られ、6時間にピークがあったが有意差は無かった。

- ⑥ TNF- $\alpha$ ：月齢に関わらず、全ての群で同じレベルの産生が見られ有意差は無かった。0時間においても高い産生を示した。

- (5) 腹腔滲出液中の一酸化窒素：全てのマウス群において一酸化窒素は常時産生されていた。若齢のBCG免疫群では12時間後に増加し、24-48時間後にピークになり24時間後には有意差があった。中間齢、老齢では全ての群で有意差は認められず、若齢BCG免疫群のように24-48時間後に産生が増加することは無かった。



(6) 腹腔滲出細胞におけるケモカインおよびケモカインレセプターmRNAの発現：

① CXCケモカイン: CXCL1およびCXCL2は単球が産生するケモカインで、それらのレセプターCXCR2は好中球、CD8<sup>+</sup>T細胞、NK細胞に発現している。これらの発現は、いずれの群においても6時間後にピークとなり、CXCL1、CXCL2は10–200倍、CXCR2は10–1700倍となった。CXCL1とCXCL2の発現は月齢に関わらず対照群で高い傾向が見られた。CXCR2発現は若齢ではBCG免疫群が高いものの、中間齢と老齢ではBCG免疫群、早期免疫群および追加免疫群のいずれも、対照群に比べて顕著に低下した。これらの結果は若齢BCG免疫群において、好中球のリクルートや細胞性免疫が亢進した可能性を示唆している。

② CCLケモカイン: CCL2、CCL3、CCL4は単球、マクロファージ、T細胞、B細胞、好中球が産生するケモカインで、それらのレセプターであるCCR1、CCR2、CCR5は単球やTh1細胞に発現している。CCL2の発現は12–24時間後にピーク(100–500倍)となり、加齢に伴い時間が早まる傾向があったが、免疫による差は認められなかった。CCL3およびCCL4はすべての群において、6時間後にピーク(CCL3: 200–3000倍、CCL4: 200–6000倍)となったが、加齢に伴い発現量が低下する傾向が見られた。またBCG免疫群は対照群の1/3–1/10に低下した。CCR1の発現は6–12時間後にピーク(2–10倍)となったが、月齢や免疫による差は見られなかった。CCR2の発現は24–48時間後に2–6倍に上昇したが、月齢や免疫による差は見られなかった。CCR5の発現も24–48時間後に2–100倍に上昇し、加齢に伴い高くなるが、免疫により低くなる傾向が見られた。以上の結果からは、Pg殺菌活性との関連は認め

られなかった。

- (7) リンパ球の増殖能: Con A刺激、LPS刺激とともに脾臓細胞の増殖活性は、加齢に伴って低下する傾向が認められた。また若齢と中間齢では6時間後に活性が低下し、その傾向はBCG免疫群で顕著だった。
- (8) BCGの検出率: BCGを接種したマウスに関して、腹腔滲出細胞(PEC)、脾臓、リンパ節内のBCGをPCR検出した結果を表に示した。

	PEC	Spleen	Lymph nodes	Total
BCG-immunized group				
Young age	20/29 (69%)	3/29 (10%)	2/29 (7%)	20/29 (69%)
Middle age	18/32 (56%)	0/32 (0%)	5/32 (16%)	21/32 (66%)
Old age	17/27 (63%)	3/27 (11%)	N. D.	17/27 (63%)
BCG-early immunized group				
Middle age	12/33 (36%)	6/33 (18%)	11/33 (33%)	22/33 (67%)
Old age	13/34 (38%)	4/34 (12%)	6/34 (18%)	18/34 (53%)
BCG-boosted group				
Middle age	8/30 (27%)	1/30 (3%)	7/30 (23%)	13/30 (43%)
Old age	4/20 (20%)	1/18 (6%)	5/20 (25%)	10/20 (33%)
Total	92/205 (45%)	18/203 (9%)	36/178 (20%)	111/205 (54%)

いずれの群においてもPECでの検出率が高く、BCG免疫群で約60%、早期免疫群で約40%、追加免疫群では約30%のマウスに検出された。これらは脾臓やリンパ節の検出率に比べて高かった。10<sup>6</sup>細胞あたりの菌数は10–100個と推定された。これまでの動物実験の報告では、投与されたBCGはリンパ節に移行し生残するとされているが、本研究でPECにおいてBCGの検出率が高かった理由や、それらの由来は不明である。

- (9) まとめ: 以上の結果より、若齢マウス群において、BCG免疫群での内因感染の原因菌にもなりうるPgの腹腔内での24時間の減少はIFN- $\gamma$ やIL-12によってマクロファージが活性化され一酸化窒素の産生がおこり、それによって起こったと考えられた。しかし加齢とともにIFN- $\gamma$ やIL-12の産生が減少し、それに伴い一酸化窒素の産生も減少することから、腹腔内でPgの消失が遅れることになることが明らかになった。すなわち若齢期におけるBCG免疫には細胞性免疫の賦活化効果が認められるが、加齢に伴いその効果は期待できないものとなり、追加

免疫をしてもやはりその効果の回復、増強はできないことが明らかとなった。近年BCG自体、成人性の結核ワクチンとしての効果は世界的に見てもエビデンスに今一つ欠け異論が多く、日本でも追加投与が中止になったばかりである。本研究は細胞性免疫の賦活剤としてのBCGは加齢と共にその効果を失い、若年期にしかその効果が無いことを実際に証明した数少ない研究である。疫学的結果を裏付けた貴重な結果となった。ワクチンとしての抗結核作用だけでなく、日和見感染予防効果が期待できる、BCGに代わり得る新しい細胞性免疫性免疫賦活剤の発見が望まれる。今後ともこの開発を続けたいと考えている。

#### 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 3 件)

- ① C. Kato, M. Mikami, T. Natsuno, Macrophages contribute to the elimination of *Porphyromonas gingivalis* more strongly than neutrophils *in vivo*. Journal of Oral Biosciences, 51(印刷中), 2009, 査読有
- ② C. Kato, M. Mikami, T. Natsuno, Participation of glutathione in the elimination of *Porphyromonas gingivalis in vivo*. Oral Microbiology and Immunology, 23, 441-448, 2008, 査読有
- ③ 斎藤和子、三上正人、加藤千穂美、日和見感染に対する細胞性免疫の重要性とBCG免疫の有用性、高崎医学、55、117-123、2005、査読無

[学会発表] (計 4 件)

- ① 加藤千穂美、三上正人、夏野徹也、BCGの

追加免疫による賦活効果に及ぼす加齢の影響、第50回歯科基礎医学会、2008年9月25日、TOC有明コンベンションホール、東京

- ② 三上正人、加藤千穂美、夏野徹也、葛城啓彰、*Fusobacterium nucleatum*表層抗原免疫マウス脾細胞の細胞増殖活性とサイトカイン産生、第50回歯科基礎医学会、2008年9月25日、TOC有明コンベンションホール、東京
- ③ 加藤千穂美、三上正人、夏野徹也、BCGの免疫賦活効果の持続に及ぼす加齢の影響、第49回歯科基礎医学会、2007年8月31日、北海道大学、札幌
- ④ 加藤千穂美、三上正人、夏野徹也、老齢マウスにおける *Porphyromonas gingivalis* の殺菌に及ぼすBCGの効果、第48回歯科基礎医学会、2006年9月23日、鶴見大学、横浜

#### 6. 研究組織

- (1) 研究代表者  
加藤 千穂美 (KATO CHIHOMI)  
日本歯科大学・新潟生命歯学部・講師  
研究者番号：00147860
- (2) 研究分担者  
三上 正人 (MIKAMI MASATO)  
日本歯科大学・新潟生命歯学部・講師  
研究者番号：90173997
- (3) 連携研究者
- (4) 研究協力者  
夏野 徹也 (NATSUNO TETSUYA)  
日本歯科大学・新潟短期大学・准教授  
研究者番号：80105501