

令和 3 年 6 月 28 日現在

機関番号：12602

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K19637

研究課題名(和文)口腔内細菌の持続的血管内注入による発癌および血栓形成惹起モデル確立への挑戦

研究課題名(英文) A challenge to establish a model for inducing carcinogenesis and thrombus formation by continuous endovascular inoculation of oral bacteria.

研究代表者

青木 和広 (AOKI, Kazuhiro)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・教授

研究者番号：40272603

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,900,000円

研究成果の概要(和文)：慢性炎症は、癌化の引き金になることが示されている。口腔内の細菌は様々な要因で血中に入る。我々は口腔内常在菌の一つStreptococcus mutansを12週令雄性BALB/cマウスの血管内接種後、肝臓における組織学的変化を経時的に検索し、慢性炎症を引き起こすか否かを検討した。その結果、菌接種後、1日目では急性炎症を引き起こしたが、徐々に慢性炎症マーカーであるリンパ球の組織内浸潤が増え、血管内接種28日目には、組織浸潤細胞領域内のリンパ球数率が1日目に比べて有意に増加した。これらの結果は、Streptococcus mutans菌が組織の慢性炎症を引き起こす可能性を示唆している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

口腔内細菌叢の乱れが、全身健康を脅かすことが明らかになってきているが、この実験では、一つの菌と全身健康との関連を調べた。

血管を介した口腔内細菌の全身暴露が、癌化の一要因とされる慢性炎症を引き起こしたことは、常在菌であっても、いったん血管を介して体内に入れば、生体組織に生菌が定着し、炎症を引き起こし、慢性化させる可能性があることを示唆している。これらの研究結果は、歯科医療の重要性を社会に示す一つのエビデンスとなる。

研究成果の概要(英文)：Chronic inflammation is shown to be a trigger of malignant transformation. Bacteria in the oral cavity enter the blood due to various causes. Twelve-week-old male BALB/c mice were used to clarify whether the oral bacterium causes chronic inflammation. Time-course studies of histological changes in the liver after endovascular inoculation of Streptococcus mutans were performed.

As a result, acute inflammation was caused on the 1st day after the inoculation of the bacterium. However, the infiltration of lymphocytes, which is a chronic inflammation marker, gradually increased. On the 28th day after the endovascular inoculation, the rate of lymphocytes in the region the infiltrating cells showed a significant increase compared to that on day 1. These results suggest that exposure to Streptococcus mutans may cause chronic inflammation of tissues.

研究分野：口腔基礎工学

キーワード：慢性炎症 Streptococcus mutans 口腔内常在菌 肝臓 腎臓 顎下腺 骨密度 骨形成

1. 研究開始当初の背景

口腔環境は、700種類以上の口腔内常在菌で構成され、それらは病原細菌の定着阻止やIgA産生を誘導して口腔内の恒常性を維持する役割を担っている。しかし、細菌叢が構成異常(dysbiosis)を起こすと、歯肉の血管または口腔内の粘膜や消化器官を介して免疫系に影響を与えると考えられている(Senpuku et al. *Gerontol.*, 2003: 301-309)。近年、口腔内常在菌である *Streptococcus mutans* (*S. mutans*) は、う蝕の原因菌としてだけでなく、腸炎の悪化への関与をはじめ(Kozima et al. *Sci. Rep.*, 2012: 332)、様々な炎症反応と関連している可能性が報告されている(Nakano et al., *Nat. Commun.*, 2011: 485; Tonomura et al., *Sci. Rep.*, 2016: 20074; Ito et al., *Sci. Rep.*, 2019: 20130; Naka et al., *Sci. Rep.*, 2016: 36886)。一方、炎症は、一般に、一過性で治まる急性炎症と、長期間続いた慢性炎症とがある。これらの炎症組織所見として、急性炎症では好中球が血管から組織へ浸潤する細胞の主体である。一方、慢性炎症では、T細胞やB細胞などで構成されるリンパ球が浸潤された組織で増えてくることが知られている。また慢性炎症は、癌抑制遺伝子を不活性化させ、細胞の癌化を引き起こすことも知られている。しかし、これまでに *S. mutans* 接種後、数週間にわたって臓器の生菌数を調べた報告はない。また *S. mutans* が慢性炎症を引き起こしたという報告もない。

2. 研究の目的

本研究では、*S. mutans* の血管内接種によりどのくらいの期間生菌が臓器に存在するのか、また、組織には炎症所見が認められるのか、さらに誘導された炎症は慢性炎症へと移行するのかについて明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) **菌血症マウスモデル** SPF環境下で飼育した12週齢雄性BALB/cCrSlcマウス(Sankyo Labo Service Corporation, Inc., Tokyo, Japan)24匹の尾静脈より 1×10^8 CFUの *S. mutans* を接種する菌接種群とPBSを投与するPBS投与群に分けた。供試菌には、標準株であるMT8148株(National Institute of Infectious Disease, Tokyo)を用いた。実験開始1日、3日、7日、28日後に各群の体重を測定および採血し、屠殺後に摘出した肝臓、腎臓、脾臓、大腸、肺を観察して重量を測定した。なお、本研究は、本学動物実験委員会の承認(承認番号A2019-216C2)を得た上で実施した。

(2) **菌血症マウスモデルコロニー計測** 実験開始1日、3日、7日、28日後の血液および肝臓、腎臓を対象とし、コロニー計測を行った。これらをホモジナイザー(UP100H, DKSH Ltd., Tokyo, Japan)で破碎し、段階希釈した。その懸濁液をスパイラルマシーン(EDDY JET, Central Scientific Commerce, Inc., Tokyo, Japan)で *S* の選択培地であるDifco™ Mitis Salivarius Agar培地に播種した。1シャーレの組織量は腎臓約5.5 mg、肝臓約15 mg。次に37°C 48時間培養し、形成したコロニーを目視で計測した。

(3) 病理標本作製

HE染色した標本の炎症細胞浸潤の有無および炎症細胞の経時の変化を光学顕微鏡で観察した。その後、本学の病理学者に確認をお願いした。

(4) 病理学的分析

実験開始1日、3日、7日、28日後、各群から摘出したすべての臓器を10%中性緩衝ホルマリンで固定した。固定後、アルコール上昇系列による脱水、キシレン処理を経て、パラフィン包埋を行い、厚さ3 μmの連続切片標本作成し、1枚はHE染色用に、次の切片を免疫染色用の

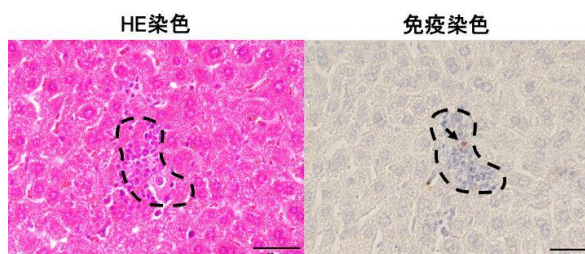


図1 連続切片を用いた2種類の染色による顕微鏡像。矢印はCD3陽性細胞を示す。点線は炎症細胞浸潤叢の範囲を示す。出現率はCD3陽性細胞あるいはCD20陽性細胞の数をこの点線で囲まれた面積で除して算出した。スケールバーは50 μmを示す。

切片として用いた。

(5) 免疫組織化学染色

病理学的分析で炎症が認められた肝臓を主に免疫組織化学染色し、CD3 陽性細胞、CD20 陽性細胞をそれぞれ、T 細胞、B 細胞として扱った。切片を pH6 クエン酸バッファーを用いて熱媒介抗原賦活化処理し、1 次抗体を反応させた。1 次抗体は、ウサギモノクローナル抗体抗 CD3 抗体 (希釈濃度 100 倍, SP7, ab16669, Abcam, Tokyo, Japan)、ウサギモノクローナル抗 CD20 抗体 (希釈濃度 100 倍, SP32, ab64088, Abcam) を使用した。1 次抗体にポリマー試薬を反応させた。ポリマー試薬は、EnVision+ /HRP 標識ウサギ 1 次抗体用ポリマー試薬 (K4003, Dako, Tokyo, Japan) を使用した。その後 DAB 溶液 (DAB バッファータブレット, Merck, Tokyo, Japan) で発色した。

(6) CD3 陽性細胞および CD20 陽性細胞の定量解析

上述のように作製した連続切片を用いて、1 枚目の HE 染色像から炎症細胞浸潤叢を探し、免疫染色した 2 枚目の切片から HE 染色で認められた浸潤巣と同じ部位を探した (図 1 点線範囲)。同部位を対物レンズ 40 倍を用いて撮影し、浸潤巣の面積を FSX100 (Olympus Corp., Tokyo, Japan) で測定した。CD3 陽性細胞および CD20 陽性細胞の出現率は、単位浸潤巣面積あたりの細胞数として算出した。

(7) 透過型電子顕微鏡による肝臓組織内の *S. mutans* 微細構造変化の観察

実験開始 1 日後と 3 日後のマウス 6 匹を観察した。これらのマウスを灌流固定し、肝臓のみ摘出。組織を 2.5% グルタルアルデヒド / 0.1M リン酸緩衝液 (pH7.4) で固定し、通法により EPON812 樹脂包埋まで行い、重合した。重合した試料を厚さ 70 nm の切片にし酢酸ウランとクエン酸鉛で 2 重染色をした。その後、透過型電子顕微鏡 (JEM-1400 Flash, JEOL Ltd., Tokyo, Japan) を用いて観察した。

(8) 統計学的解析

統計分析は、マウスの体重、T 細胞および B 細胞の出現率を計測した。群間の比較は、Shapiro-Wilk 検定後、データが正規分布を示さなかったため、ボンフェローニ補正をした Wilcoxon rank sum 検定また Dunnett の多重比較検定によって分析された。P < 0.05 を有意差ありとし、データは平均値 ± 標準誤差で表した。統計分析は、統計ソフトウェア (SPSS ver. 22.0 for Windows, IBM Corp., Chicago, USA) を使用して実行された。

4. 研究成果

(1) 菌血症マウス体重計測

菌接種したことによる体重の減少は認められなかった (図 2)。

(2) コロニー計測

PBS 投与群の寒天培地には、コロニー形成は認められなかった。菌接種群の寒天培地では、血中では、菌接種 1 日後まで、腎臓および肝臓は 28 日後までコロニー形成が認められた (図 3)。

(3) 病理学的分析

HE 染色の結果、肝臓においては、菌接種 1 日後から 28 日後まで類洞を主体に炎症細胞浸潤巣が認められた。浸潤巣では、菌接種 3 日後までは好中球が優位 (図 4B および図 4C)、7 日後には好中球とリンパ球が同程度となり (図 4F)、28 日後にはリンパ球が優位となる傾向が認められた (図 4H)。肝臓以外の大腸、腎臓、肺、脾臓においては、炎症細胞浸潤巣は認められなかった (図 5)。

(4) 免疫組織化学染色

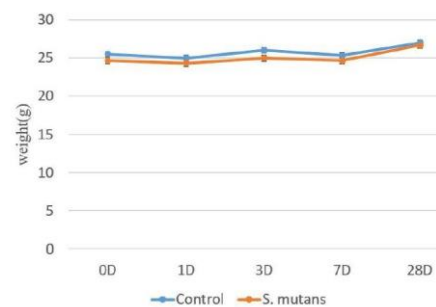


図 2 菌血症マウス体重計測の結果

横軸に示した日数は、実験開始日から屠殺するまでの日数を示す。平均値 ± 標準誤差で示した。

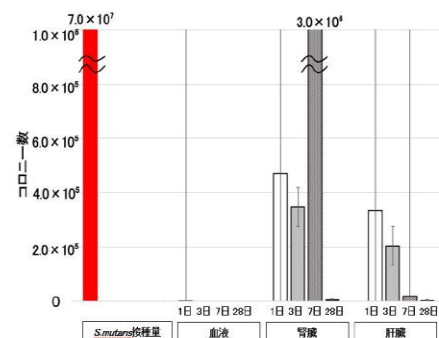


図 3 コロニー計測の結果

左端の赤色の棒グラフは、接種した *S. mutans* の濃度 (CFU/mL)。血液、腎臓、肝臓それぞれの単位は、CFU/mL、CFU/mL/mg、CFU/mL/mg 平均 ± 標準誤差で示した。

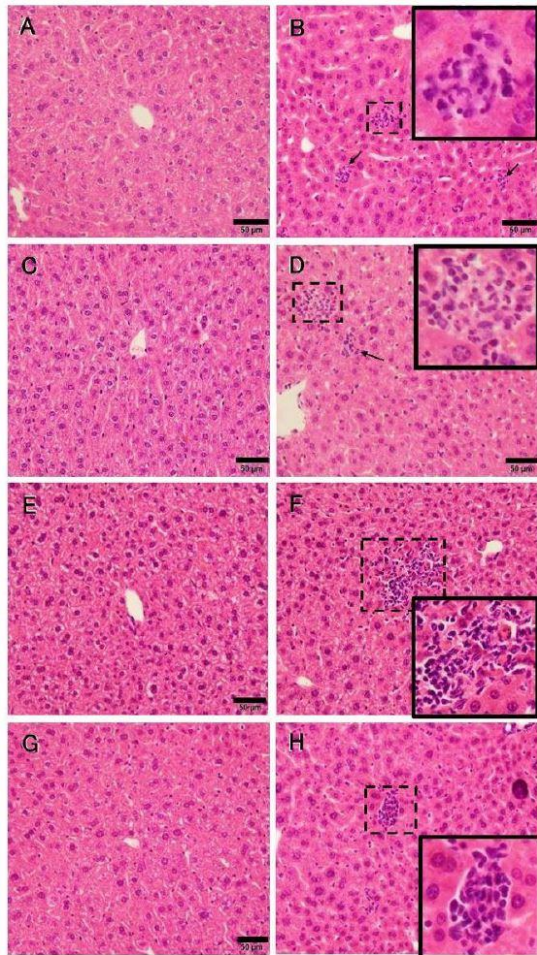


図4 HE染色した肝臓組織の代表的な画像
 AB、CD、EF、GHは実験開始それぞれ、1日後、3日後、7日後、28日後の肝臓組織像。BDFHは菌接種群、ACEGはPBS投与群。実線部は点線部の拡大像。スケールバーは50 μmを示す。

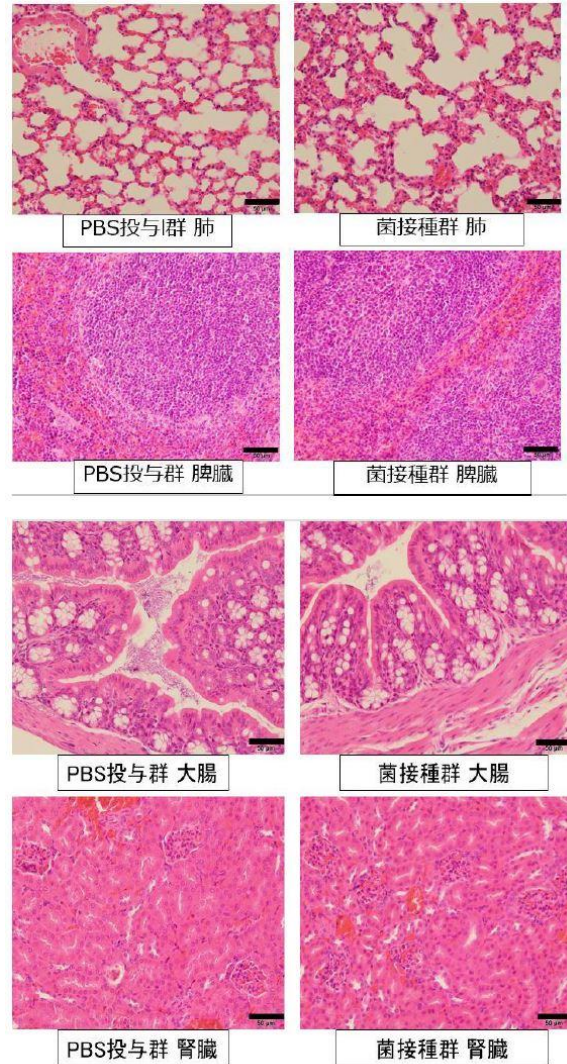


図5 HE染色した肝臓以外の臓器の画像
 実験開始28日後の組織。スケールバーは50 μmを示す。

CD3 陽性細胞および CD20 陽性細胞は、菌接種1日後から28日後までHE染色により観察できた浸潤巣内に認められた。CD3 陽性細胞および CD20 陽性細胞は、菌接種1日後から時間経過とともに浸潤巣内に多く認められた(図6)。

(5) CD3 陽性細胞および CD20 陽性細胞の定量解析

浸潤巣 1 ml に対する CD3 陽性細胞数は、7日までに徐々に増加し、菌接種28日後の出現率は1日後と比べて3.8倍と有意に増加した(図7A, 表1)。CD20 陽性細胞は、CD3 陽性細胞と比べて増え方が遅かったが、28日後には1日後と比べて3.0倍の有意な増加を示した(図7B, 表1)。

(6) 透過型電子顕微鏡による肝臓組織内の *S. mutans* 微細構造変化の観察

大きさが 0.5 μm 程の二重膜構造で覆われた構造物が観察できた。これは、*S. mutans* はじめバクテリアの特徴的な構造と思われる。さらに二重膜構造が崩れているもの認められた(図8)。

なお、上述の実験では、血管内接種した *S. mutans* 菌が実際臓器で定着し繁殖したのかは明らかではない。このため、ルシフェラーゼ遺伝子を *S. mutans* (UA159 株) に導入して同様な血管内接種実験も行った。IVIS を用いると、接種3週間後には、ルシフェリン静注により肝臓よりも腎臓や顎下腺などの部位に、はっきりと発光した *S. mutans* 菌の集積を認めた。この実験により、*S. mutans* が臓器に定着することが明らかになった(投稿準備中)。

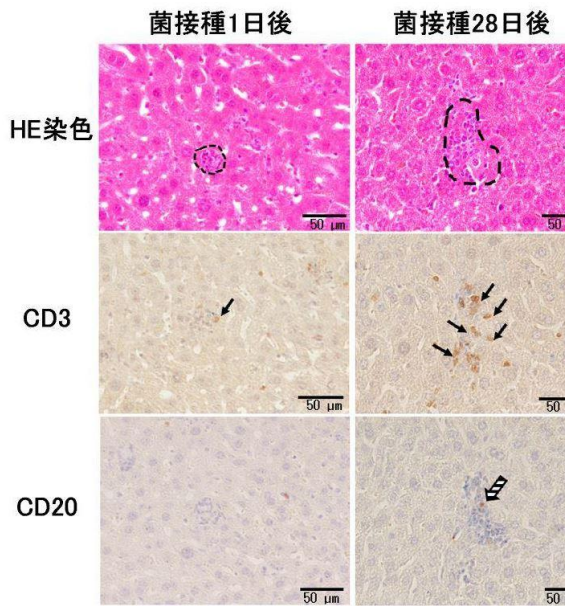


図6 免疫組織化学染色の代表的な画像
実験開始1日後(A)および28日後(B)の肝臓組織。
HE染色により観察された浸潤巣(黒点線)。免疫染色により認識されたCD3陽性細胞(黒矢印)およびCD20陽性細胞(黒矢印)。

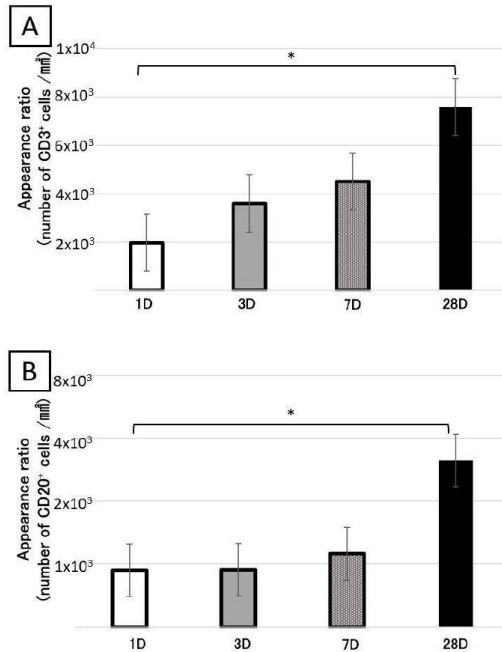


図7 炎症叢内のCD3陽性細胞およびCD20陽性細胞の出現率
図7の*は有意差ありを示す(p<0.05)。Dunnettの多重比較検定を行った。平均±標準誤差で示した。

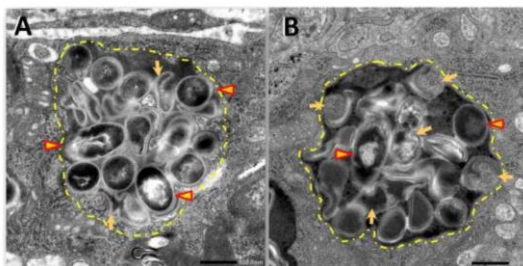
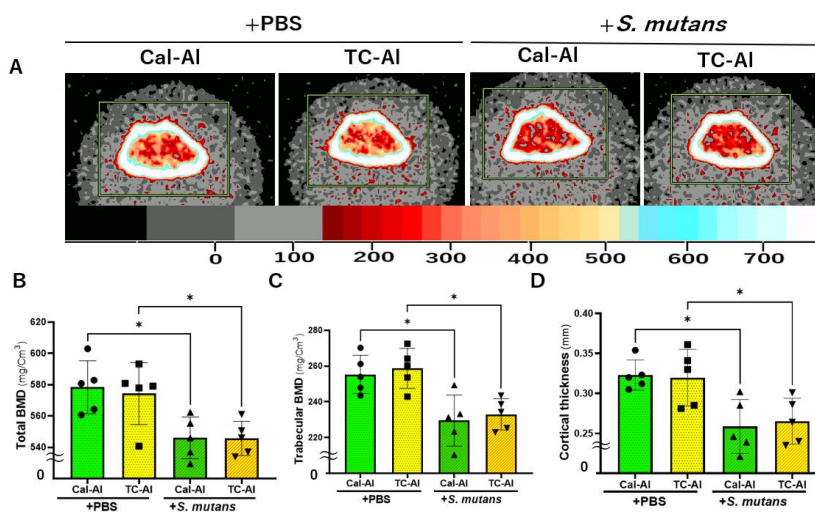


図8 肝臓の透過型電子顕微鏡像
菌接種1日後(A)、3日後(B)の肝臓組織内で観察された*S. mutans*と思われる構造物のコロニー(点線)。矢頭は、*S. mutans*と思われる構造物。矢印は微細構造変化の進んでいる*S. mutans*を示す。左右パネルのスケールバーは、500 nmを示す。

また、*S. mutans*接種1週間後のマウス大腿骨骨密度を計測したところ、PBS投与群と比べて有意な骨密度と骨形成活性の減少を示した(図9)。骨吸収指標には有意な差が認められなかったことから、*S. mutans*接種による骨密度の減少は、骨形成の減少により引き起こされる可能性が示唆された。また、骨形成指標の tetracycline 投与は骨密度の結果に影響を与えなかった(図9)。(投稿準備中)

図9 *S. mutans* 接種7日目に大腿骨骨密度が減少した



(A) 末梢骨用定量的CTによる骨密度測定の代表例。カラーバーは骨密度 (mg/cm³) を表す。大腿骨遠心骨幹端海綿骨部の(B)全体骨密度、(C)海綿骨密度、(D)皮質骨幅。* p<0.05 vs 有意に減少 +*S. mutans* :*S. mutans* 血管内接種群 +PBS :PBS 血管内投与群 TC-AI :tetracycline-alizarin 投与投群 Cal-AI :calcein-alizarin 投与群

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 中村聡俊, Khairul Matin, 青木和広
2. 発表標題 Streptococcus mutans血管内投与後の臓器における組織観察
3. 学会等名 日本歯科技工学会 第41回学術大会 2019.11.02 金沢市
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>http://www.tmd.ac.jp/dept/dentistry/bohe/index.html</p>
--

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	泉福 英信 (SENPUKU Hidenobu) (20250186)	国立感染症研究所・細菌第一部・室長 (82603)	

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 協力者	マチン カイルール (Matin Khairul)		

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	中村 聡倭 (Nakamura Satowa)		
研究協力者	栢森 高 (Kayamori Ko)		
研究協力者	カーン マスード (Khan Masud)		
研究協力者	浦川 絢加 (Urakawa Ayaka)		
研究協力者	廣橋 優奈 (Hirohashi Yuna)		
研究協力者	中村 知世 (Nakamura Tomoyo)		
研究協力者	ラシェッド ファットマ (Rashed Fatma)		

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関			
米国	Justin Merritt	Dept. Microbiology & Immunology	Univ. Oklahoma Health Sciences Center	