

機関番号：14401

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20592137

研究課題名 (和文) 口腔内常在細菌に対する免疫応答の調節とその感染防御への影響の検討

研究課題名 (英文) Evaluation of immune regulation against oral commensal bacteria and its impact on host protection against infection.

研究代表者

磯田 竜太郎 (ISODA RYUTARO)

大阪大学・大学院歯学研究科・特任研究員

研究者番号：40456942

研究成果の概要 (和文)：申請者は「歯周病 (いわゆる歯槽膿漏) を、外来細菌の感染症ではなく、常在細菌による内因感染症である」と考え、同仮説を証明する動物モデルの構築を試みた。

マウスの新生児に他の細菌が棲みついてしまう前に、ヒトの歯周病原菌だけに暴露すれば、その菌が常在菌となったモデルマウスができると考え実験を試みたが、再現性のあるモデルはできなかった。

研究成果の概要 (英文)：We tried to establish a new mouse model of human periodontal disease. The new model is based on the hypothesis that periodontal disease might be caused by commensal bacteria under certain conditions rather than by transient infection of foreign pathogens.

The method we used exposed the fetal mouse to human periodontopathogenic bacteria before other environmental bacteria are incorporated to the commensal bacterial flora of the new born mice.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・形態系基礎歯科学

キーワード：口腔細菌学・歯周炎・動物モデル・常在細菌・粘膜免疫・免疫寛容・歯周病原性細菌

## 1. 研究開始当初の背景

歯周病はう蝕 (いわゆる虫歯) と並ぶヒトの口腔内における2大疾患であり、これまで

に膨大な研究が行われてきた。しかしながら今日までその病気の成り立ちを完全に解明し、歯科医師がその発症、進行をコントロー

ルできるまでには至っていない。その要因の一つとして、ヒトの歯周病を高度に再現する動物モデルが存在しないことが指摘されている。これまで様々な動物モデルが提唱されてはいるが、それらの多くは無菌動物や、常在細菌を抑制した動物に、歯周病原性細菌と目される微生物を感染させるものであった。

歯周病に罹患したヒト由来のサンプルを用いた臨床的な研究からは、従来の「典型的な感染症」の概念に合致するような、歯周病の患者だけから分離される細菌は特定されておらず、現在歯周病原性菌と考えられている菌は健康人の口腔内にも生息している。こうしたことから、近年では歯周病とはある特別な条件下で口腔内に常在する複数の菌が複雑な相互作用を営みながら引き起こす感染症であるとする考え方が主流になってきている。

その一方で、粘膜免疫に対する研究の進歩により、腸管に生息する常在細菌に対する宿主の全身免疫系は免疫寛容の状態になっており、腸管内の常在細菌に対する過剰な免疫応答がおこらないようになってきているとする考え方が主流になっている。そうであるならば腸管と共に消化管の一部を構成する口腔内に生息する常在細菌に対しても同様の免疫調節が行われている可能性は高いと考えられるが、このような考え方に基づく研究は多くなかった。

## 2. 研究の目的

こうした背景をふまえ、本研究ではヒトにおける歯周病原性菌が常在細菌として存在する場合に示す病原性を検討するため、新生児マウスに常在細菌叢が形成される前にヒト歯周病原性菌だけに暴露することによって、その菌を口腔内常在細菌としてもつモデルマウスを作製することを当初の目的とした。

さらに歯周病においては、常在細菌である歯周病原性菌が粘膜免疫におけるバリアー(消化管粘膜や歯肉等)を越え、歯周組織や歯を支える骨などの、全身免疫系によって守られている領域に到達して炎症反応を引き起こすという仮説を立てその検証を試みた。ヒトにおいては、食物の咀嚼時等に口腔内の細菌が血中に移行して弱い菌血症を引き起こしているという報告が数多くなされている。上記の方法で作製したモデルマウスに腹腔内、静脈内、歯肉内等の様々な経路で常在菌化した細菌を投与し、宿主が示す免疫応答を、常在菌化しない場合と比較することによって、歯周病原性菌が常在菌である故に示す病原性を検討することを計画した。

## 3. 研究の方法

妊娠 12-13 日目の Balb/c マウスを購入し、

入荷後すぐ抗生剤を含有する飲料水で 2 日間飼育した。これにより母マウスの常在細菌を抑制し出産時に仔マウスへと移行しないようにした。飼育に用いるケージは滅菌済みのディスポーザブルのものを用い、抗生剤により母マウスの常在菌を抑制した後は、床敷、飲料水、固形飼料等も全て高圧蒸気圧滅菌したものをを用いた。

その後出産前から、飲料水として滅菌蒸留水にヒト歯周病原性菌の一つとされている *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* Y4 株 (以後 Aa と表記する) を懸濁したものを与え、母マウスおよび離乳期以後の仔マウスが自由に摂取することによって Aa に暴露されるようにした。

仔マウスの生後 6 週間目に、母マウスおよび仔マウスから唾液および末梢血を採取した。凍結乾燥処理した Aa 全菌体を固相化した 96 穴 Plate を用いた ELISA 法で Aa 特異的な抗体価を唾液 IgA および血清 IgG について測定した。

滅菌した綿棒でマウスの口腔内を拭う方法、および唾液中に浮遊している細菌を遠心処理によって集める方法で、被験マウスの口腔内細菌を回収し、Aa が検出されるかを Aa の 16S rRNA 特異領域をターゲットとした PCR 法および Real Time PCR 法で検討した。

Aa 特異的唾液 IgA 抗体の上昇がみられたマウス、および Aa に感作されていないマウスから脾臓細胞を採集し Aa 凍結乾燥菌体抗原刺激による増殖反応を調べた。この実験における抗原として、Aa 凍結乾燥菌体および過去に暴露されたことのない細菌の凍結乾燥菌体を用いた。

## 4. 研究成果

(1) 研究開始直後の初年度には Aa の仔マウスへの定着を示唆する有望なデータが得られていたが、2 年目以降この結果を再現することはできなくなった。

すなわち、Aa の常在菌への取り込みについては、Aa 16S rRNA の特異領域を増幅する PCR 法によって、意図したとおりのサイズのバンドが検出されたことから Aa が常在細菌として定着したことが示唆された (図 1 参照)。Aa が常在細菌となったと考えられたマウスをさらに交配に用いたところ、外部から新たに Aa を供給していないにも関わらず、次世代のマウスの口腔内細菌サンプルから PCR 法によって Aa が検出された。このことから Aa は同じケージで飼育する他の動物に伝播する可能性が示された。ところが 2 年目以降は上記のどちらの方法を用いても Aa を検出することができなかった。

(2) Aa に対する特異的な免疫応答を検討したところ、母マウスに関してはこの方法によって唾液中の IgA 抗体価、血清中の IgG 抗

体価ともに顕著に上昇した。(グラフ 1 及び 2 参照)

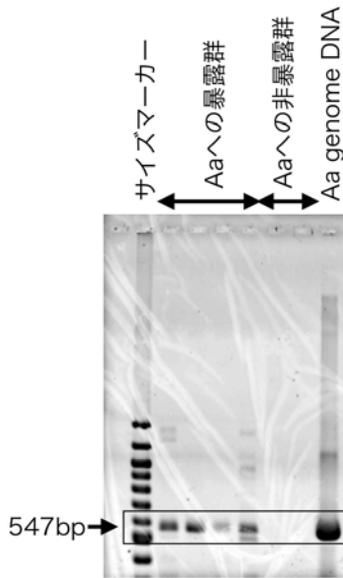


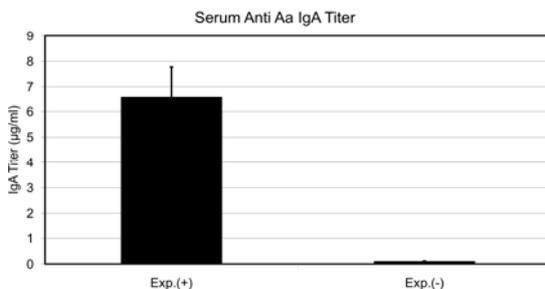
図 1

16s rRNA の菌種特異的配列の増幅による Aa の検出

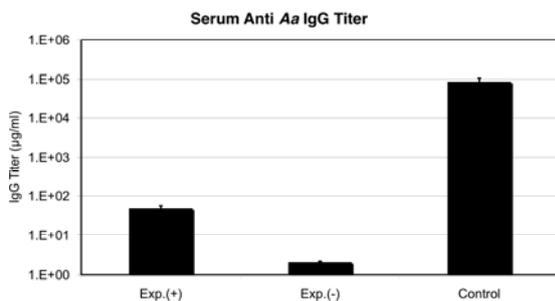
この結果はすべての実験で再現されたことから、本研究における Aa 暴露の方法が母マウスの全身免疫系および粘膜免疫系に確実に作用したといえる。

しかしながら、同じケージで飼育された仔マウスについては、2 年目以降は血清 IgG は上昇するが唾液 IgA は検出レベル以下である場合や、その両者とも検出レベル以下である場合が続いた。

グラフ 1



グラフ 2



(3) 最終年度の終わりになって免疫応答に関する結果が再現された仔マウスの脾臓細胞を用いて、Aa 刺激に対する増殖反応を検討したが、安定した実験系を構築するまでには至らなかった。またこれらのマウスの口腔内細菌サンプルから Aa を検出することはできなかった。

初年度に得られた仔マウスにおける Aa 特異的な唾液 IgA 抗体の上昇は、Aa が常在菌となったことを示唆するものと考えられる。これまでの多くの研究により、腸内細菌に対しては常在細菌特異的な分泌型 IgA が常在菌が腸管粘膜のバリアーを越えて全身免疫系に侵入することを抑制する為に働き、そのことによって全身免疫系では常在細菌に対する過剰な免疫応答が引き起こされるのを防いでいると考えられている。これによって全身免疫系にみられる常在細菌に対する IgG 抗体は検出できないレベルか、検出できても低いレベルであるとされている。本研究では明確な Aa 特異的 IgG 抗体価の上昇が見られたが、未感作のマウスに Aa に腹腔内投与で免疫した場合に比べるとその値は有意に低かった。このことから全身免疫系の IgG 産生についてもある程度の抑制がかかっているのではないかと考えている。

定着については、細菌には宿主トロピズムというもの存在し、そのため競合する相手となる細菌が存在しない場合でも、ヒトの常在菌である菌がマウスの常在菌として定着できるとは限らなかったのではないかと推察している。

今後はモデル動物の作製に拘らず、歯周病原性細菌が常在菌であるという、新たな視点に立った概念をもってヒト由来の臨床サンプルの解析を進めることが、複雑な歯周病の成り立ちを解明する一つの方法ではないかと考える。

### 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 0 件)

[学会発表] (計 1 件)

“Neonatal Exposure Induced Commensal-like Immune-response Against *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* in Mice”  
R. ISODA, Y. TERAOKA, M. NAKATA, T. SUMITOMO, and S. KAWABATA  
 87<sup>th</sup> International Association for Dental Research General Session  
 2009 年 4 月 4 日, Miami, USA

6. 研究組織

(1) 研究代表者

磯田 竜太郎 (ISODA RYUTARO)

大阪大学・大学院歯学研究科・特任研究員

研究者番号：40456942

(2) 研究分担者

川端 重忠 (KAWABATA SHIGETADA)

大阪大学・大学院歯学研究科・教授

研究者番号：50273694

寺尾 豊 (TERAO YUTAKA)

大阪大学・大学院歯学研究科・准教授

研究者番号：50397717