

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 26 日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670854

研究課題名(和文)唾液中の細胞を標的としたフローサイトメトリーによる新しい口腔内科診断戦略

研究課題名(英文)Cell analysis in saliva by flow cytometry as a new diagnostic target for oral medicine

研究代表者

北川 善政(KITAGAWA, Yoshimasa)

北海道大学・歯学研究科(研究院)・教授

研究者番号：00224957

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文): 日常臨床では、口腔カンジダ症や口腔扁平苔癬などの難治性症例に遭遇する。このような症例では、口腔内における局所免疫系の破綻・ゆがみ、つまり免疫系の構成細胞の割合の変化がおきているのではないかと着想し、唾液中の免疫細胞の構成割合をフローサイトメトリーを用いて重点的に解析した。唾液と血液を蛍光抗体(FITC-CD3、APC-CD4、PE-CD45)で染色し、実際の構成細胞の割合をフローサイトメトリーで解析したFSC-SSC分画のgateにおいてCD45陽性細胞が検出された。そのうち、2重染色により唾液中のCD45(+)/CD3(+), CD45(+)/CD4(+)が検出可能であることがわかった。

研究成果の概要(英文): Objective: Confirmation of a flow cytometry-based method for the determination of major leucocyte subsets such as leukocyte, monocytes, T cells and B cells in stimulated whole human saliva (SWS). Study Design: Salivary leucocyte subsets were determined by three-colour flow cytometry (Aria-) in five healthy volunteers. Comparison of leucocyte subsets between saliva and whole blood was also performed. It was observed that mononuclear cells were the predominant cells in the saliva. Proportions of CD45 positive cells in psWHS. Most of CD45 positive cells belongs to lymphocyte fraction in FSC-SSC plot. When calculated as a percentage of all CD45+ events in saliva, the most frequent were Th cells (CD4+), T cells (CD3+). Flow cytometry can be used as non-invasive and reproducible method for the analysis of leucocyte subsets in human saliva. Further investigation of pathological conditions such as oral candidiasis and lichen planus and other conditions.

研究分野：医歯薬学

キーワード：フローサイトメトリー 口腔内科 唾液 細胞

1. 研究開始当初の背景

唾液は非侵襲的かつ簡単に繰り返し採取が行えるというメリットがある。近年唾液中の物質を口腔粘膜疾患の診断、経時的な病態の把握に用いようとする試みが始まっている。しかし、唾液中のリンパ球、マクロファージ、顆粒球、NKキラー細胞などの免疫細胞の構成割合を解析し、病因解明、診断や治療に活かしている報告は少ない。

日常臨床では、口腔カンジダ症、口腔扁平苔癬、慢性再発性アフタにおける難治性症例に遭遇する。これらの疾患においては免疫系の異常が報告されているが、実際の局所における免疫細胞の構成割合についての詳細は分かっていない。このような症例では、口腔内における局所免疫系の破綻・ゆがみ、つまり免疫系の構成細胞の割合の変化がおきているのではないかと着想し、検討することとした。

2. 研究の目的

まず、健常者の唾液中の免疫細胞の構成割合をフローサイトメトリーを用いて重点的に解析した。さらに、重度口腔カンジダ症患者の唾液を回収し、解析した。

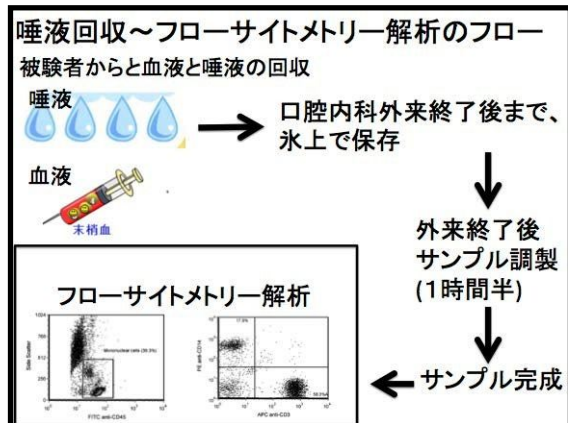
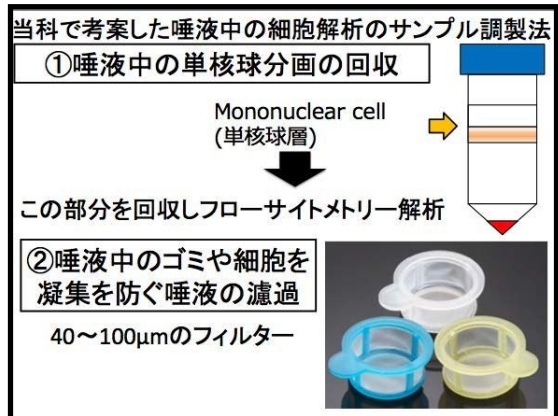
3. 研究の方法

研究方法としてはガムテストを行い、5分間の刺激時唾液を採取した。コントロールとして血液を用いた。

唾液と血液を蛍光抗体(FITC-CD3、APC-CD4、PE-CD45)で染色し、実際の構成細胞の割合をフローサイトメトリーで解析した。

H26年度は、唾液の処理方法と測定にあたっての適正条件設定を行った。唾液はさまざまな不純物が混濁しており、粘稠である。当初、前処理を行わずに、フローサイトメトリー解析を行うと、フローサイトメトリーの流路系で閉塞が起こり正確な測定はできないことがわかった。このような困難を打破し、円滑に解析を行えるように様々な工夫を行った。洗浄液により洗浄を繰り返して、不純物の除去、

100 μmのフィルター濾過し上皮系細胞、口腔内残渣などを除去した。唾液中の免疫系細胞を効率よく回収できたと考えている。これにより、問題なくフローサイトメトリー解析の実験を行うことができるようになった。H26年度後半からH27年度にかけては、フローサイトメトリーを用いて健常者の唾液中の細胞分画からCD3、CD4、CD45陽性細胞が検出・解析可能かを解析した。被験者は歯周ポケットが3mm以下で、口腔粘膜疾患を有していない健常者5名として、各血液と安静時唾液(唾液約3ml)を回収した。



ヒト血液・唾液処理プロトコール
以下にプロトコールを示す。

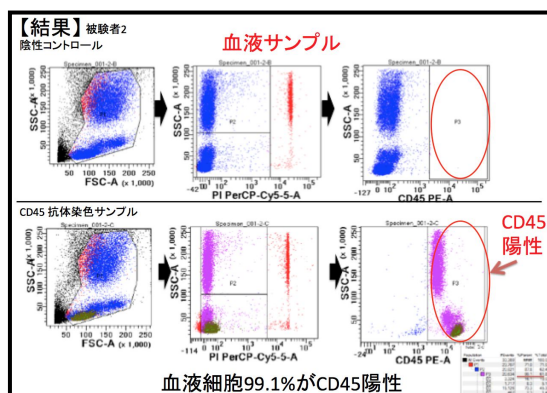
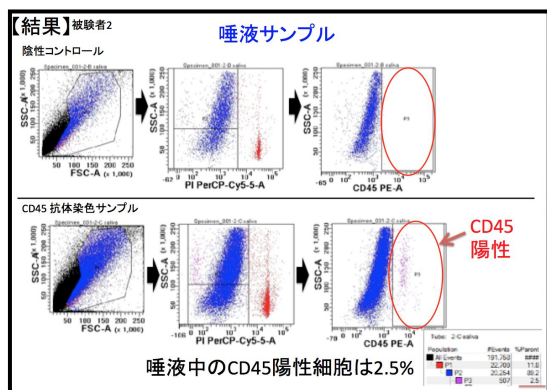
1. 血液、唾液を5ml回収.
2. 100 μmのフィルターを用いて、不純物を除去.
2. 200×g で10分遠心。pelletを乱すことなく、上清を注意深く除去する.
3. 0.5%BSA含有1×HBSSを加える.
4. 200×g で5分間遠心後、上清を吸引.
7. 0.5%BSA含有1×HBSSを5ml添加.

8.各サンプルエッペンに60μlずつ分配.
 9.Human Fcブロッカー(ミルテニー社)を20μlずつエッペンに添加.
 10.10分間冷蔵庫で静置.
 11.900μlの0.5%BSA含有1×HBSSで懸濁し900rpmで5分遠心。上清を吸引.
 12.100μlの0.5%BSA含有1×HBSSで懸濁し抗体(CD3-FITC 5μl、CD4-APC 5μl)、アイソタイプコントロール(Mouse IgG2a、 Mouse IgG2b)を添加して30分間、 on iceで静置.

13.900μlの0.5%BSA含有の1×HBSSで懸濁し900rpmで5分遠心。上清を吸引。
 14.500μlの0.5%BSA含有の1×HBSSで懸濁しフローサイトメトリー解析.

4. 研究成果

唾液サンプルでは、今回設定したFSC-SSC分画のgateにおいて、0.7～3.6%のCD45陽性細胞が検出された。そのうち、2重染色により唾液中のCD45(+)CD3(+), CD45(+)CD4(+)が検出可能であることがわかった。また、検出されたCD45陽性細胞は血液分画中ではリンパ球分画に多く存在していた。少量の唾液サンプルからCD3、CD4、CD45陽性の免疫細胞が検出・解析可能であることが示唆された。今後



は唾液中の免疫細胞の構成割合の変化などが口腔カンジダ症や口腔扁平苔癬といった難治性口腔粘膜疾患の病態解明につながるかについて検討したい。

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 2件)

Oouchi M, Hasebe A, Hata H, Segawa T, Yamazaki Y, Yoshida Y, Kitagawa Y, Shibata KI: Age-related alteration of expression and function of TLRs and NK activity in oral candidiasis. Oral Dis. 21(5): 645-661, 2015. (査読有)
Ohga N, Yamazaki Y, Sato J, Hata H, Murata T, Inoue T, Kitagawa Y: Dose escalation effectiveness and tolerability of paroxetine in patients with burning mouth syndrome and depressive conditions. Journal of Oral and Maxillofacial Surgery, Medicine and Pathology 27(3): 402-406, 2015. (査読有)

〔学会発表〕(計 5件)

Masahiro Morimoto, Noritaka Ohga, et al.: Elimination of oral candidiasis may increase stimulated whole salivary flow rate. 2016 Annual Congress of ROC Association of Oral and Maxillofacial Surgeons, Taiwan, 2016/3/5-6, Conference Center of Asia University(台湾・台中市)

森本真弘、大賀則孝、他：口腔カンジダの除菌により、刺激時唾液量は増加する。第41回公益社団法人日本口腔外科学会北日本支部学術集会、2015/6/27-28、札幌プリンスホテル(北海道・札幌市)

大賀則孝、佐藤 淳、他：フローサイトメトリーを用いたCBA法による唾液中のサイトカイン測定の試み。日本口腔科学会総会、2015/5/13-15、大阪国際会議場(大阪府・大阪市)

大賀則孝、加島裕基、他：フローサイトメトリーによる唾液中の免疫細胞解析。日本口腔科学総会、2015/4/15-17、福岡国際会議場(福岡県・福岡市)

森本真弘、大賀則孝、他：口腔カンジダの除菌により、刺激時唾液量は増加する。北海道口腔内科研究会、2015/4/10、北海道医療大学 札幌サテライトキャンパス(北海道・札幌市)

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕
 出願状況(計 0件)

取得状況(計 0件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

北川 善政(KITAGAWA, Yoshimasa)

北海道大学・大学院歯学研究科・教授

研究者番号：00224957

(2)研究分担者

大賀 則孝(OHGA, Noritaka)

北海道大学・大学院歯学研究科・助教

研究者番号：40548202

佐藤 淳(SATO, Jun)

北海道大学・大学院歯学研究科・講師

研究者番号：60319069

浅香 卓哉(ASAKA, Takuya)

北海道大学・大学院歯学研究科・助教

研究者番号：80637265