

平成 30 年 6 月 7 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K11235

研究課題名(和文) 唾液を用いたフローサイトメトリー解析による難治性口腔粘膜疾患の病因解明への挑戦

研究課題名(英文) Determination of leucocyte subsets and measurement of cytokines in human volunteer and candida patients saliva by flow cytometry

研究代表者

山崎 裕 (YAMAZAKI, YUTAKA)

北海道大学・歯学研究院・教授

研究者番号：90250464

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では健常ボランティア、ならびに口腔カンジダ症を有する患者の唾液の中の1)免疫細胞の構成割合と2)種々の炎症性サイトカイン量を、フローサイトメトリーで用いて解析した。唾液サンプルでは、0.7～3.6%のCD45陽性細胞が検出された。さらに、Cytometric beads array法において、健常ボランティアの唾液、血清中の以下のサイトカインの濃度を解析した(IFN- γ 、IL-2、IL-4、IL-6、IL-10、IL-17A、TNF)。唾液中のサイトカイン濃度は血清に比べ、高い傾向であった。

研究成果の概要(英文)：We conducted a set of experiments to verify whether saliva or blood was more effective for the measurement of cytokine levels. We did not freeze the samples for storage and used fresh samples instead. We used the CBA method to measure the seven cytokines immediately after sampling, including Th1 (IFN- γ , TNF- α , IL-2, IL-6), Th2 (IL-4, IL-10), and Th17 (IL-17) cytokines. The levels of Th1, Th2, and Th17 cytokine in saliva obtained from the volunteers were significantly higher than those in the blood samples. Through this preliminary research, we found that it was easier to detect various cytokines in the saliva than in blood, and that the levels of the seven types of cytokines were significantly higher in saliva than in blood.

研究分野：医歯薬学

キーワード：唾液 フローサイトメトリー 難治性口腔粘膜疾患 炎症性サイトカイン 免疫細胞

1. 研究開始当初の背景

近年、超高齢社会に突入した我が国において口腔カンジダ症が増加している。要介護高齢者における誤嚥性肺炎の起炎菌としても重要視されているが、カンジダの口腔粘膜における定着、侵入等の感染が成立する際、また感染が持続している状態での免疫系細胞の障害に関する詳細は不明である。

レーザー光により、細胞を1個ずつ高速に解析できるフローサイトメトリー解析(FACS)は、近年日常的に分子生物学的研究に用いられている。特に、血液系腫瘍の急性白血病、多発性骨髄腫、悪性リンパ腫の診断にFACSによる血球細胞の表面マーカー解析は必須になっている。しかし、従来のFACSは血液を検体に用いるため、非侵襲的に繰り返し測定することは困難であった。そこで、最近、これらの欠点を補う唾液を用いたFACSが試みられ始めた。Vidovicらは、健常ボランティアのパラフィン咀嚼による刺激時唾液10mlを用いてFACSを行い、唾液中の多核白血球は有意に多く、単核白血球(単球、Tcell、Bcell)は0.3%~7.2%にしか認められなかったことを報告した(Arch Ital Bio 2011)。Nagaiらはボランティアから得た唾液サンプルからFACSを行い、細胞成分の99%は好中球であり、その白血球の解析パターンは、血液サンプルとは異なることを報告した(AMCoR 2013)。また、歯科領域においてもOhyamaらは、口腔乾燥症の診断目的にシェーグレン症候群患者(SS)や、薬剤性の口腔乾燥症患者から唾液中のサイトカイン濃度をFACSで測定し、SSはコントロールに比べ有意にTh1とTh2のサイトカイン濃度が高いことを報告した(Oral Disease 2014)。VidovicやNagaiらは健常ボランティアを用いた研究であったが、免疫異常を背景にした難治性口腔粘膜疾患の口腔カンジダ症の患者においては、特異的な免疫の異常が認められることが予想される。

2. 研究の目的

日常臨床では、口腔カンジダ症における難治性症例に遭遇する。つまり抗真菌薬のアドヒアランスが良好にも関わらずに除菌ができない症例である。これらの疾患については免疫系の異常が報告されているが、病因、病態に関しての詳細は分かっていない。このように抗真菌薬を使用しても、容易にカンジダを除菌できないような難治性口腔カンジダ症例では、病態のひとつに、口腔内における局所免疫系の破綻・ゆがみ、つまり構成細胞の構成割合の変化、また唾液中の炎症性サイトカインレベルの変化がおきているのではないかと考えた。

本研究では健常ボランティア、ならびに口腔カンジダ症を有する患者の唾液の中の免疫細胞の構成割合と免疫応答に重要な役割を果たす種々の炎症性サイトカイン量を、フローサイトメトリーを中心に用いて解析し、難治性口腔粘膜

疾患の病態解明の一端を担う基盤的研究を行うことを目的とした。

本研究では、種々の炎症性サイトカイン濃度を測定するのみならず、免疫細胞の構成割合を検索し、血液サンプルのFACSと比較・検討した。難治性口腔カンジダ症を始めとする口腔粘膜疾患は、再燃を繰り返し長期間慢性に経過する。本研究における解析方法を用いれば、患者から唾液を繰り返し採取し測定することが可能のため、疾患特有の細胞成分のパターンが得られることが期待され、病因解明につながると考えた。

3. 研究の方法

(1) 血液と唾液の採取。採血と同一被験者の5分間の安静時唾液を採取した。

(2) 血液の回収(5mlで解析可能。)1200rpmで10分遠心後、血清を回収して一部を凍結保存し、残りを解析に用いた。

(3) 血液、唾液の細胞を測定したいサイトカインに対する蛍光抗体で多重染色し、フローサイトメトリーで解析した。

(4) フローサイトメトリー解析における唾液サンプルの調製。

唾液は粘調でさまざまな不純物の混入がある使用抗体の非特異的結合の可能性細胞の凝集があるなどフローサイトメトリー解析時にさまざまな障害がある。当研究グループは、既に唾液のフローサイトメトリー解析を行っており、これら問題点に対応するため、シヨ糖勾配法による単核球分画の回収や、40 μ mのフィルター濾過により上皮系細胞などを除去し、免疫系細胞を選択的に回収するための工夫を行い、問題なくのフローサイトメトリー解析を行う事が可能であった。

解析の機械としてはBD社製のAria-2を用い、解析キットとして、BD社製のCytometric Beads

Array systemを用いる。当研究グループは健常者の血液において、すでに数個のサイトカインの解析方法を確立しており、現在唾液中のサイトカインにおいて予備的検討を行っている。この方法はELISA法に比べ、安価で少量のサンプルで数種類の項目を同時に測定できる検体処理が簡便であるなど多くの利点を有していると考えられた。

(5) 唾液と血液中の免疫細胞の分画の解析：CD45(汎血液細胞マーカー)と他のマーカーを解析。唾液中の以下の細胞のフローサイトメトリー解析を行った。

CD45抗体、CD3抗体、CD4抗体

・成熟 T cell: CD45+CD3+

・Helper T cell: CD45+CD4+

・細胞傷害性T cell: CD45+CD8。

各症例で血液をコントロールに置き、唾液中の免疫細胞の割合を詳細に解析した。

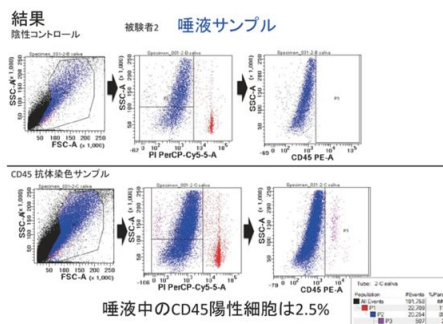
(6) 歯周ポケット4mm以上の歯周炎に罹患しておらず、口腔粘膜疾患を有していない健常者10名における血清と唾液中サンプルの解析を行い、サイトカイン量を測定した。測定にあたっては50μlの唾液から同時に7種類の分子を検索できるBD社製のCytometric bead array kitを使用し、IFN-γ、TNF-α、IL-4、5、6、10、17Aを計測した。サンプルの蛍光強度をフローサイトメーターFACS Aria-2を用いて計測した。濃度既知のstandard希釈液から算出したstandard curveをもとに、FCAP Array softwareにてサイトカインの濃度を算出した。

(7) カンジダ症患者の唾液中のサイトカイン測定がカンジダ症診断や病態把握に有用性であるかどうかを検討するために、CBA法を用いてカンジダ患者と非カンジダ患者において7種類のサイトカイン(IFN-γ、TNF-α、IL-4、5、6、10、17A)の測定を行った。具体的な実験方法は以下にあげる。2015年6月～2017年12月に当科外来を受診した患者のうち、クロモアガー寒天培地によるカンジダ培養検査での、カンジダ陽性患者(n=14)、カンジダ陰性患者(n=19)よりチェアサイドで安静時唾液を5ml採取し、-80°CでCBA測定日まで保管した。極度の口腔乾燥により唾液を一定量回収できない症例、口腔清掃状態不良で歯周ポケット4mm以上の歯周炎に罹患していた症例は検討から除外した。

4. 研究成果

(1) 唾液中の免疫細胞の割合解析

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。少量の唾液サンプルから血液細胞が検出解析可能であることが示唆された。



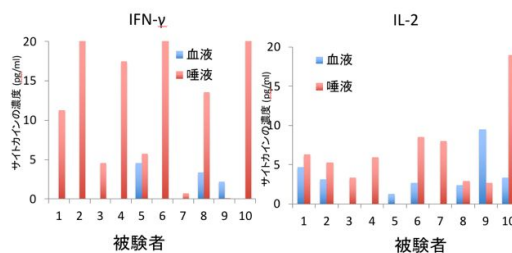
またCD3(+)CD45(+), CD4(+)CD45(+)陽性細胞も数%程度存在することが確認された。今後、詳細に共陽性細胞の割合を検出したい。将来的には、唾液中の免疫細胞の構成割合の変化、局所免疫系の異常・ゆがみが難治性口腔粘膜疾患の病因解明につながるかを詳細に検討予定である。

(2) 健常者の唾液と血液におけるサイトカインの解析

健常ボランティア(10名)のサイトカインの唾液、血清中の検出率は以下の表の通りであった。

	血液	唾液
IFN-γ	30%	100%
IL-2	70%	90%
IL-4	50%	100%
IL-6	30%	60%
IL-10	40%	90%
IL-17A	60%	90%
TNF	20%	80%

IFN-γ、IL-2のサイトカイン濃度 -血液と唾液-



唾液中のサイトカイン濃度は血清に比べ、高い傾向であった。また血液では検出感度以下のサンプルが多く観察された。今回、少量の唾液・血液中からCBA法でサイトカインが検出できることがわかった。今後当研究グループにおいて、口腔粘膜疾患の診断や経時的な病態の把握に利用できる可能性を検討したい。

(3) カンジダ陽性患者とカンジダ陰性患者の唾液中のサイトカイン解析

前述の実験により、サイトカイン測定においては、血液検体よりも唾液検体の方が高濃度に検出されることが判明したため、以後口腔カンジダ症の患者検体では、血液を採取せずに唾液検体をCBA法にて測定することとした。

カンジダ症患者の唾液サンプルにおけるIL-17濃度がカンジダ陰性患者に比べ有意に低下している傾向を示した。その結果、カンジダ陽性患者の唾液検体中のIL-10、IL-17Aの濃度はカンジダ陰性患者で低下傾向を示した。一方、IL-10、TNF-α、IL-4、5、6に関しては両群間で有意差は生じなかった。

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1件)

Morimoto M, Ohga N, et al.: Simultaneous analysis of interleukin levels in saliva and blood by cytometric bead analysis. Oral Science in Japan 2017: 19-22, 2017. 査読無し

〔学会発表〕(計2件)

大賀則孝、山崎 裕、他: フローサイトメトリ解析による唾液中の免疫細胞解析の試み. 日本口腔科学会、2016年4月17日、

福岡

大賀則孝、山崎 裕、他：フローサイトメ
トリーを用いた CBA 法による唾液内のサイ
トカイン測定を試み. 日本口腔科学会、2015
年 5 月 14 日、大阪
〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

[https://www.den.hokudai.ac.jp/koreisha/index.ht
ml](https://www.den.hokudai.ac.jp/koreisha/index.html)

6. 研究組織

(1)研究代表者

山崎 裕 (YAMAZAKI Yutaka)
北海道大学・歯学研究院・教授
研究者番号：90250464

(2)研究分担者

柏崎 晴彦 (KASHIWAZAKI Haruhiko)
九州大学・歯学研究院・教授
研究者番号：10344516

大賀 則孝 (OHGA Noritaka)
北海道大学・歯学研究院・助教
研究者番号：40548202

(3)連携研究者

なし