

平成 21 年 3 月 31 日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2006～2008

課題番号：18592072

研究課題名（和文） 誤嚥性肺炎モデルにおける粘膜ワクチンの効果

研究課題名（英文） Effect of Mucosal Vaccine for the Aspiration Pneumonia in the Experimental Model

研究代表者

妻鹿 純一（MEGA JUNICHI）

日本大学・松戸歯学部・教授

研究者番号：40190946

研究成果の概要：口腔細菌 *Candida albicans* (*C. albicans*) によるマウス誤嚥性肺炎モデルを確立するために行った実験では、妥当と思われる感染モデルが見いだされた。また、cholera toxin (CT) とカンジダ抗原を併用し経鼻免疫した結果、抗体価の上昇が認められ、感染モデルの誤嚥性肺炎発症の予防に有効であることが示唆された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	1,200,000	0	1,200,000
2007年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2008年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	630,000	3,930,000

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，炎症，粘膜ワクチン，口腔細菌，誤嚥性肺炎

## 1. 研究開始当初の背景

先進諸国における社会の高齢化にともなって、要介護高齢者や有病高齢者における口腔疾患のリスクについて注目が集まっている。最近では、誤嚥性肺炎の発症について細菌学的検討が加えられ、高齢者の口腔における劣悪な衛生状態が重篤な全身疾患を引き起こすことが示唆されている。このような背景をもとに、高齢者の口腔疾患に対して生物学的観点ならびに予防的な観点から、多角的な検討の必要性があると思われる。

本研究が焦点をあてる免疫学的側面については、これまでに IgG を中心とした全身系に

誘導される免疫応答について検討した報告はあるが、粘膜領域における抗原特異的 IgA 免疫応答について検討した報告は少ない。粘膜領域に抗原特異的 IgA 免疫応答を誘導することができれば、抗原が生体内に侵入する前に防御機構が作用することになる。さらに、経口投与されるため注射による痛みや副作用、さらには薬剤管理に関わる制約などを解消することができるため、従来から実施されているワクチン注射の欠点を補うことができると考えられる。さらに、呼吸器官を主とした粘膜領域での抗原特異的 IgA 免疫応答の様相を明らかに

することができるとともに、誤嚥性肺炎予防のための粘膜ワクチンのデザインに生かすことができる。

誤嚥性肺炎の予防法には、口腔ケア、摂食機能療法などの実施が有効とされているが、免疫生物学的なアプローチの有効性については全く不明である。従って、摂食機能障害がある高齢者のQOLを維持するため、誤嚥性肺炎予防をめざした粘膜ワクチンの有効性について検討する必要がある。

## 2. 研究の目的

我が国では肺炎が死亡原因の第4位に挙げられ、その約95%は65歳以上の高齢者が占めている。特に、高齢者の肺炎では誤嚥性肺炎の占める割合が高いとする報告もあり、口腔細菌が誤嚥性肺炎の起原菌の一つであることが明らかとなつてから、要介護者の医療、介護、および保健に関わる領域からその予防策が注目されている。

現在、口腔ケアや摂食機能療法によって高齢者のQOLをより高いレベルに維持できるよう、歯科領域の臨床および研究において積極的に検討がなされている。本研究はこのような口腔細菌による誤嚥性肺炎の予防策の一つとしての粘膜ワクチンの有効性を検討するものである。さらに、IgA循環帰巣経路におけるIgA誘導部位ならびにIgA実効部位における加齢による免疫応答の変化を検討するものである。すなわち、IgA誘導部位として鼻粘膜リンパ節(Nasal Associated Lymphoid Tissue)、IgA実効部位である唾液腺、気管および肺臓に焦点をあて、以下の課題を検討する。

- (1) 口腔細菌による誤嚥性肺炎モデルの確立
- (2) 口腔細菌感染領域の粘膜組織における免疫組織学的検討
- (3) 粘膜アジュバントを用いた免疫による細胞生物学的検討
- (4) 感染実験における粘膜ワクチンの効果

## 3. 研究の方法

### (1) 感染モデルの確立

本研究では、誤嚥性肺炎の起原菌の一つとされている *Candida albicans* (*C. albicans*)を用いた。これまでのところ、*C. albicans*によって引き起こされるマウスの誤嚥性肺炎について、実験モデルは確立されていない。*C. albicans*はヒト口腔常在菌であり、免疫能力が低下した場合に口腔カンジダ症をはじめ、誤嚥性肺炎

などの全身疾患を発症させることが知られている。感染モデルの確立において、人為的に免疫能力を低下させることは細菌の感染や定着を促進させる手段の一つと考えられているため、実験群には副腎皮質ホルモンである Prednisolone を感染前に投与する群と非投与群の2群を設定した。

### 鼻腔からの感染モデル

Balb/c マウスを用いて、50mg/kg に調整した Prednisolone を皮下注射にて投与した。翌日、麻酔下にて両側鼻腔に  $1 \times 10^8$ CFU に調整した *C. albicans* 全菌を 10 $\mu$ l ずつ投与した。

投与後 *C. albicans* の肺および気管への定着を確認するために、感染から 1, 3, 7 日後に同部位を採取し細菌の検出を行った。

### 口腔カンジダ症モデル

Balb/c マウスを用いて、50mg/kg に調整した Prednisolone を皮下注射にて感染実験前日と3日後に投与した。感染は  $1 \times 10^8$ CFU に調整した *C. albicans* 全菌を 100 $\mu$ l 直径 3cm の綿球に浸し、麻酔下にて2時間舌下に定置させた。感染は Day 0, 3, 6 の計3回行った。初期感染7日後に血清のみ採取し、14日後に一部マウスを血清採取後屠殺し、還流固定を行った後、肺および気管の病理切片を作製し HE 染色ならびに PAS 染色を行った。血清は IgG, IgE, IgA の抗体価の変化を ELISA 法および Western blot 法を用いて解析した。なお、解析までの間 -20 $^{\circ}$  にて保存した。残りのマウスは遺伝子発現の確認をするために屠殺後、組織から RNA を採取した。

### 経肺での感染実験

*C. albicans* の臓器への定着が明確に確立されていない。そのため、肺に直接 *C. albicans* を感染させた場合の感染および定着について検討した。

この実験群にも Prednisolone 投与群と非投与群とにわけて行った。肺への投与は、麻酔下にて tube を用いて各種濃度の菌液を直接、肺へ注入することによって感染させた。

### (2) 免疫法

#### *C. albicans* 全菌による免疫

Balb/c マウスを用いて、50mg/kg に調整した Prednisolone を皮下注射にて投与した翌日、麻酔下にて両側の鼻腔

に  $1 \times 10^8$  CFU に調整した *C. albicans* 全菌を 10 $\mu$ l ずつ感染させた。投与は毎日 1 回 7 日間行い初期感染から 14 日後に一部マウスから血清を回収した後屠殺し、ホルマリンにて還流固定した後、肺および気管を採取した。血清は IgG, IgE, IgA の抗体価の変化を ELISA 法および Western blot 法を用いて解析するため、解析まで -20 にて保存した。

*Candida albicans* secretory aspartic protease (SAP2) による免疫

・Prednisolone 投与群

Balb/c マウスを用いて 50mg/kg に調整した Prednisolone を皮下注射にて投与した翌日、麻酔下にて両側の鼻腔に粘膜アジュバントとして cholera toxin (CT) 0.1 $\mu$ g を併用し、種々の濃度に調整した SAP2 を両側の鼻腔から 10 $\mu$ l ずつ投与した。初回感作から 3 日後に血清を回収した。さらに、初回感作から 7 日後に再度、麻酔下にて両側の鼻腔に CT を併用し SAP2 を投与した。

CT と SAP2 による粘膜免疫と経口感染との併用

Balb/c マウスを用いて 50mg/kg に調整した Prednisolone を皮下注射にて投与した翌日、麻酔下にて両側の鼻腔に粘膜アジュバントとして cholera toxin (CT) を併用し、種々の濃度に調整した SAP2 を両側の鼻腔から 10 $\mu$ l ずつ投与し、さらに、 $1 \times 10^8$  CFU に調整した *C. albicans* 全菌を 100 $\mu$ l 直径 3cm の綿球に浸し、2 時間舌下に定置させた。初回投与後 3 日後 (day 3) に血清を回収した。さらに、初回感作から 7 日後、再度麻酔下にて鼻腔へ CT を併用した SAP2 の感作と口腔内への *C. albicans* の感染を同時に行った。

(3) 組織に定着した *C. albicans* の同定

*C. albicans* を感染させたマウスを屠殺後、気管および肺を摘出し、各臓器をホモジナイズした。ホモジナイズした組織浮遊液を *C. albicans* の選択培地に塗抹し、培養後コロニーを検出することによって *C. albicans* の定着を検討した。

(4) 病理組織学的検討

それぞれの実験群から感作後任意の期間経過後、屠殺した。還流固定を行い、肺および気管の病理切片を作製し、HE 染色ならびに PAS 染色を行った。

(5) 細胞レベルでの実験

ヒト由来肺胞細胞 (A549) を培養して *C. albicans* および歯周病原菌である *Porphyromonas gingivalis* 由来の LPS で刺激し、培養上清中の IL-1 $\beta$  および IL-6 の測定を行うとともに、細胞から RNA を回収し、それらのサイトカインと LPS のレセプターとして知られている TLR2, 4 についての遺伝子発現について検討を加えた。

4. 研究成果

(1) 感染モデル

鼻腔からの感染モデル

*C. albicans* の気管からの検出は可能であったが、経時的に減少していくことが確認された。また Prednisolone を感染前に投与した群は、投与しなかった群と比較して検出率は高く、検出可能な期間も長くなる傾向がみられた。本実験では感染から約 1 週間後に *C. albicans* を検出しているが、それ以降になると検出されないマウスが増加した。本モデルを用い、1 週間という検出期間の範囲でワクチンの効果を解析することも可能であるが、より長期的に検出ができるような感染モデルの設定が望まれる。

口腔カンジダ症モデル

Prednisolone 投与群では口腔カンジダ症の発症を認められたが、非投与群では発症は認められなかった。気管および肺における病理組織学的検討では、炎症症状および PAS 染色による *C. albicans* の存在は、口腔カンジダ症発症から短期間の群には認められなかった。口腔カンジダ症から肺および気管の炎症発症と *C. albicans* の同部位への定着はより長期的な経過観察が必要になってくる。現在、長期経過群について検討中であるが、検出例が認められている。

経肺での感染実験

*C. albicans* の肺へ直接投与は、 $1 \times 10^4$ ,  $1 \times 10^5$ ,  $1 \times 10^6$  としたが、Prednisolone 投与群、非投与群ともにマウスの死亡が認められ、投与群ではより短期間で死亡が確認された。今後 *C. albicans* の臓器への定着、侵入についてのポジティブ・コントロールとして有用な群であるため、投与量および投与期間について十分な検討を加える予定である。

## まとめ

*C. albicans*の誤嚥性肺炎モデルは、確定されていないが、Prednisoloneの使用は有用であり、口腔カンジダ症モデルを応用することによって確立できると思われる。

## (2) 免疫法

### *C. albicans*全菌による免疫

CTを粘膜アジュバンドとして加えた *C. albicans* 全菌を鼻腔に感作した。採取した血清を用いて抗体価を測定するとともに、肺および気管を用いて病理組織学的検討を加えた。血清中のIgG抗体価については、Western blotにて検討したところ免疫群は非免疫群に比べて高い抗体価を示した。今後、IgAおよびIgEについて検討するとともに、ELISA法を用いて定量的な検討を加える予定である。病理組織学的検討では、HE染色により炎症像が強く認められるもののPAS染色では *C. albicans*の組織への侵入は認められなかった。上記の結果はPrednisolone投与群、非投与群ともに同様の結果であった。

### CTおよびSAP2による免疫

CTを粘膜アジュバンドとして加えたSAP2を鼻腔に投与した実験群から血清を採取し、抗体価を測定するとともに、肺および気管を用いて病理組織学的検討を加えた。血清中のSAP2を抗原としたIgG抗体価については、Western blotにて検討したところ非免疫群に比べて高い抗体価を示した。今後IgAおよびIgEの検討を加えるとともにELISA法を用いて定量的な検討を加える予定である。病理組織学的検討では、HE染色により炎症像が強く認められた。SAP2の臓器への影響に関しては免疫染色が必要であると考えられた。また上記の結果はPrednisolone投与群、非投与群ともに同様の結果であった。

### CTおよびSAP2による感作および口腔への *C. albicans* の投与

CTを粘膜アジュバンドとして加えたSAP2を鼻腔に投与すると同時に麻酔下にて *C. albicans* を舌下に2時間定置させ、肺及び気管を用いて病理組織学的検討を加えた。HE染色により明らかな炎症像が認められた。今回の実験では、口腔への感作の影響もあるため、免疫後の *C. albicans* の投与時期、投与量および投与方法について、さらに詳細な検討が必要である。

## まとめ

粘膜免疫に関しては、*C. albicans* 全菌を用いることも一つの手段であるが、Western

blotやELISA法を行う際、抗原として *C. albicans* 全菌を用いることになるため非特異的な応答が含まれる。一方、SAP2を用いた場合、SAP2特異的な免疫応答を解析することができ、より特異的な解析ができると思われるため、今後詳細に検討する。

## (3) 細胞レベルでの検討

培養細胞レベルでの結果は *C. albicans* による感染によって培養上清中のIL-1 $\beta$ およびIL-6の産生量は非感染群に比べて高いことが認められ、回収したRNAによる遺伝子解析において、それらのサイトカインとLPSのレセプターとして知られているTLR4の遺伝子発現が著しく高いことが示された。これらの結果は、*C. albicans* がヒト由来肺胞細胞(A549)に炎症を誘導することを示唆しており、*C. albicans* の呼吸器官への感染が誤嚥性肺炎誘発の一因となることを示している。

## 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4件)

高橋賢晃, 菊谷 武, (その他9名), 妻鹿純一: 口腔ケアに対する歯科医療職関与の必要度に関する研究 介護老人福祉施設における検討, 障歯誌 29: 78-83, 2008. (査読有)

Endoh M, Okada H, Yamamoto H, Mega J: Cytological Diagnosis for the Dependent Elderly by Using Oral Smear For the Method to Evaluate Oral Mucosa, Dentistry in Japan 43: 158-161, 2007. (査読有)

野本たかと, 妻鹿純一: 摂食・嚥下リハビリテーション 臨床の現場から地域連携まで <その1>, 日本歯科医師会雑誌 60(7):649-656, 2007(10月). (査読なし)

野本たかと, 妻鹿純一: 摂食・嚥下リハビリテーション 臨床の現場から地域連携まで <その2>, 日本歯科医師会雑誌 60(8):621-627, 2007. (査読なし)

[学会発表](計 7 件)

ENDOH M, OKADA H, YAMAMOTO H, MEGA J: Cytological Diagnosis for the Patients with Mental Illness by Using Oral Smear Cytology, 19th IADH, Oct 29-31, 2008, Santos.

TANAKA Y, ABIKO Y, MEGA J  
GeneExpression of IL-1 $\cdot$  and TLR2 in Gingival Fibroblasts from Down Syndrome, International Conference of Oral Care for People with Disabilities, Dec.16, 2007, Taipei.

YO TANAKA, T NOMOTO, T FUJITA Y ABIKO, and J MEGA: *Porphyromonas gingivalis* Enhanced IL-1 $\cdot$  and IL-6 in Alveolar Epithelial Cell, 84th IADR General Session & Exhibition, June 30, 2006, Brisbane.

遠藤真美, 岡田裕之, 松本 敬, 山本浩嗣, 妻鹿純一: 高齢者における擦過細胞診を使用した口腔粘膜の評価, 第 17 回日本口腔粘膜学会学術大会, 平成 19 年 7 月 5-6 日, 東京.

ENDOH M, OKADA H, MATSUMOTO T, YAMAMOTO H, MEGA J: Smear Cytology for Oral Mucosa of Dependent Elderly - Effect of Professional Oral Health Care. 18th Congress of the International Association for Disability and Oral Health, August 23-29, 2006, Goteborg.

遠藤真美, 岡田裕之, 林 龍介, 山本浩嗣, 妻鹿純一: 精神科入院患者に対する口腔粘膜の検討 口腔擦過細胞診を使用して, 第 23 回日本障害者歯科学会, 平成 18 年 10 月 20 日, 仙台.

YO TANAKA, T NOMOTO, T FUJITA, Y ABIKO, J MEGA: *Porphyromonas gingivalis* Enhanced IL-1 $\cdot$  and IL-6 in Alveolar Epithelial Cell, 84th IADR General Session & Exhibition, June 30, 2006, Brisbane.

6. 研究組織

(1)研究代表者

妻鹿 純一 (MEGA JUNICHI)  
日本大学・松戸歯学部・教授  
研究者番号: 4 0 1 9 0 9 4 6

(2)研究分担者

田中 陽子 (大塚陽子) (TANAKA YOKO (OTSUKA YOKO))  
日本大学・松戸歯学部・講師  
研究者番号: 5 0 3 4 9 9 7 4

(3)連携研究者

藤橋 幸太郎 (FUJHASHI KOHTARO)  
アラバマ大学・歯学部・教授