

平成21年 3月31日現在

研究種目： 若手研究 (B)
 研究期間： 2007~2008
 課題番号： 19791420
 研究課題名 (和文) 義菌を利用した誤嚥性肺炎治療システムの構築
 研究課題名 (英文) The establishment of treatment system for the aspiration pneumonia with denture
 研究代表者 土谷 昌広
 (TSUCHIYA MASAHIRO)
 東北大学・大学院歯学研究科・助教
 研究者番号： 60372322

研究成果の概要：

誤嚥性肺炎は高齢者医療においては非常に重要な疾病である。簡易かつ効果的なインフュージョンコントロール法の確立が求められており、我々は誤嚥性肺炎に対してプロバイオティクスを応用する事を目的としてマウスを用いた実験を行った。

5-10週齢のオスBalb/cマウスを用い、従来の研究で示されている誤嚥性肺炎モデルを応用した。この過程において死亡が確認されたマウスに関しては、肺組織内における膿瘍形成が認められ、肺炎が死因であることが考察された。術後一週間でマウス肺を摘出し、誤嚥性肺炎群、乳酸菌投与群、併用群、コントロール群 (各5匹) に分けた。肺組織のtotal RNAを抽出してcDNAを作製し、サンプル中の遺伝子発現を定量的に解析し、炎症性サイトカインに関して検討を行った。結果、誤嚥性肺炎群において炎症性サイトカインの発現量が有意に高いことが明らかとなった。加えて、乳酸菌投与がその炎症反応を抑制する可能性が示された。

これらの炎症性サイトカインの濃度、局在に関してさらに検討を行い、免疫機構におけるプロバイオティクスの意義について解析する必要がある。本研究の結果は誤嚥性肺炎に苦しむ要介護者に対して非常に多くの利益をもたらし、歯科医学の発展に大きく貢献するものと予想される。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,800,000 円	0 円	1,800,000 円
2008年度	1,400,000 円	420,000 円	1,820,000 円
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000 円	420,000 円	3,620,000 円

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・補綴系歯学

キーワード：有床義歯、プロバイオティクス、誤嚥性肺炎、高齢者、感染症

1. 研究開始当初の背景

誤嚥性肺炎は高齢者医療においては非常に重要な疾病である。その成因として口腔常在菌の不顕性誤嚥が重要視されており、義歯

清掃を中心とした口腔ケアがその予防に寄与することが実証されている。しかしながら、急速な高齢化に伴う介護福祉の人材資源不足は深刻化しており、簡易かつ効果的なインフュージョン・コントロール法の確立が求め

られている。

2. 研究の目的

誤嚥性肺炎に対するプロバイオティクスの応用法の確立を目的とする。

3. 研究の方法

5-10 週齢のオス Balb/c マウスを用い、従来の研究で示されている誤嚥性肺炎モデルを応用した。肺炎起因菌である *Pg* と *Candida albicans* (それぞれ、 10^6 CFU/30 μ l スキムミルク(1%) $-$ PBS)、乳酸菌の *Lactobacillus casei* (10^8 CFU/1 ml) を使用した。肺炎起因菌はカニューレを用いて下気道へ直接接種を行い、乳酸菌は口腔内への投与とした。

その後、以下の項目に関する検討を行った。

(1) 生存曲線

コントロール群、肺炎起因菌投与群、肺炎起因菌+乳酸菌投与群、乳酸菌投与群 (各群 10 匹ずつ) に対して、肺炎起因菌もしくは乳酸菌接種後 3 週間飼育し、その生存率の比較を行った。

(2) 肺炎の組織学的検討

肺炎起因菌接種、1 週間後に肺組織 (各群 2 匹) を摘出し、4%PFA $-$ 0.1Mリン酸緩衝液による固定後、パラフィン切片を作製してヘマトキシリン $-$ エオジン染色を行い、炎症性細胞の浸潤、線維性組織の形成に関する組織学的な比較検討を行った。

(3) 肺組織からの total RNA の抽出とリ

アルタイム PCR による定量解析

組織学的検討に使用した肺組織の一部より、Trizol を用いて total RNA を抽出し、cDNA を作製した。特異的プライマーを設計し (例: *TNF α* , F5' - TGG CCT CCC TCT CAT CAG-3' ; R5' -ACT TGG TGG TTT GCT ACG AC-3' , *IL1 β* , F5' -GCA CCT TCT TTT CCT TCA TCT TTG-3' ; R5' -GTT GTT CAT CTC GGA GCC TGT AGT-3' , *IL-6*, F5' -AAC CAC GGC CTT CCC TAC TT-3' ; R5' -CCA TTG CAC AAC TCT TTT CTC ATT-3'), iQcycler を用いて定量的解析を行った。

4. 研究成果

(1) 生存曲線

生存率に関して検討を行い、肺炎起因菌投与群では 40%であったのに対し、乳酸菌投与群では 70%と致死率の改善が示された。肺炎起因菌接種群では、4 日後からマウスの

死亡が確認されたが、乳酸菌投与群では接種後 6 日目からであった。加えて、コントロール群及び乳酸菌投与群においては、死亡したマウスは確認されなかった (図 1)。

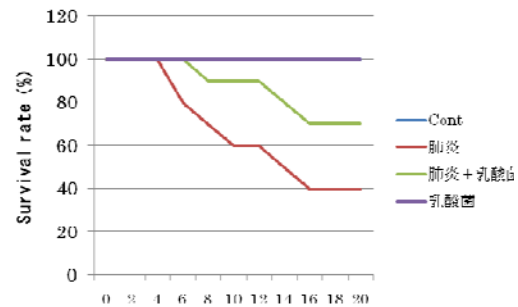


図 1. 菌接種とマウス生存率の関係

死亡したマウスに関しては、その肺組織を摘出し、その組織内における膿瘍形成について確認した (図 2)。

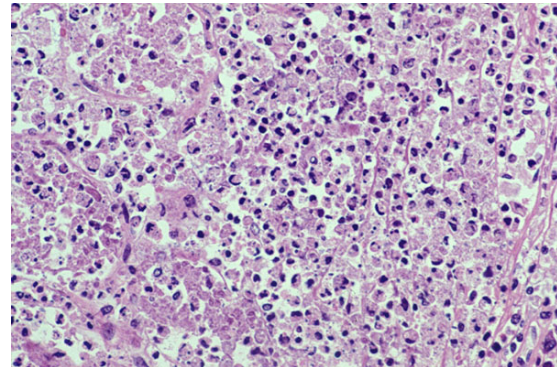


図 2: 肺炎の組織像。Pg の気管内投与によって肺組織内における炎症性細胞の浸潤が認められる。

(2) 肺炎の組織学的検討

接種後 1 週間時点での組織像について比較検討を行ったが、炎症性細胞の浸潤については肺炎起因菌投与群と肺炎起因菌+乳酸菌投与群との間に組織学的に明確な差は認められなかった。

(3) 肺組織からの total RNA の抽出とリ

アルタイム PCR による定量解析

cDNA を用いた定量 RT-PCR 解析の結果、主要な炎症性サイトカインである、TNF α (図 3)、IL-1 β (図 4)、IL-6 (図 5) の発現が乳酸菌投与によって低下する傾向が認められた。しかしながら、肺炎起因菌投与群と比較して、統計学的に有意な差は認められなかった。今後、更にサンプル数を増やす必要があると考えられる。

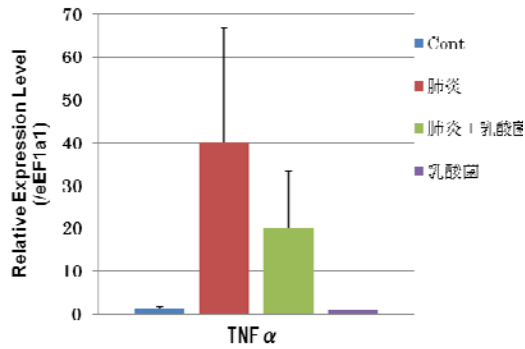


図3. 肺組織における TNF α の発現レベル

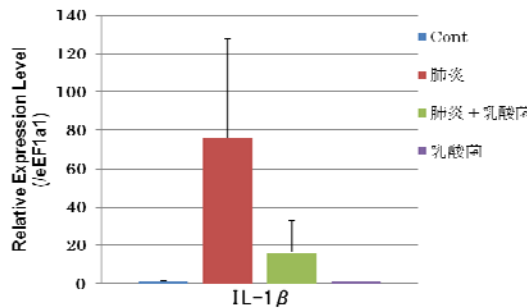


図4. 肺組織における IL-1 β の発現レベル

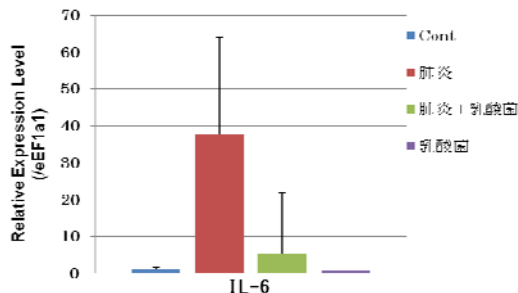


図5. 肺組織における IL-6 の発現レベル

乳酸菌投与によって、実験的肺炎の症状が低下する傾向が認められ、誤嚥性肺炎患者に対しても有効な方法となる可能性が示された。

実験の進行具合は概ね順調ではあるが、臨床応用をゴールとした場合、結果の裏付けがまだまだ必要な段階であり、このあとも更なる追加実験が必要と考えられる。

今後はその他の菌種との比較検討を行い、乳酸菌投与の免疫機構における意義について解明する。その後、抜歯マウスへの実験的な義歯装着について検討していく予定である。

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 5 件)

- ① Tsuchiya M, Tye CE, Sharma R, Smith CE, Bartlett JD. XBP1 may determine the size of the ameloblast endoplasmic reticulum. J Dent Res. 87:1058-1062. 2008. 査読有
- ② Tsuchiya M, Akiba Y, Takahashi I, Sasano Y, Kashiwazaki J, Tsuchiya S, Watanabe M. Comparison of expression patterns of cathepsin K and MMP-9 in odontoclasts and osteoclasts in physiological root resorption in the rat molar. Arch Histol. Cytol. 71:89-100. 2008. 査読有
- ③ Sharma R, Tsuchiya M, Bartlett JD. Fluoride induces endoplasmic reticulum stress and inhibits protein synthesis and secretion. Environ Health Perspect. 116:1142-1146. 2008. 査読有
- ④ 穂積英樹、高津匡樹、大井孝、土谷昌広、渡邊誠. 加齢および臼歯喪失によるマウス海馬の遺伝子発現変化. 老年歯科医学、22 巻、358-370 頁、2008 年、査読有
- ⑤ 富澤康彦、土谷昌広、佐藤繁久、高橋一郎、土谷忍、小牧健一郎、秋葉陽介、楠慎一郎、溝口到、笹野泰之、渡邊誠. ラット骨、象牙質およびセメント質におけるI型コラーゲンC-プロペプチドの局在に関する研究. 東北大学歯学雑誌 26 巻、29-36 頁. 2007 年、査読有

[学会発表] (計 15 件)

- ① Chiba M, Tsuchiya S, Kishimoto K, Nakamura H, Tsuchiya M, Hayashi H. Bone Morphogenetic protein gene transfer into rat periodontium by in vivo electroporation. The 3rd International symposium for Interface Oral Health Science. 2009年1月15日. 仙台
- ② Nemoto E, Koshikawa Y, Kanaya S, Tsuchiya M, Tamura M, Somerman MJ, Shimauchi H. Wnt signaling inhibits cementoblast differentiation and promotes proliferation. The 3rd International Symposium for interface Oral Health Science. 2009年1月15日. 仙台
- ③ 木山朋美, 土谷昌広, 西岡貴志, 菅原俊二, 遠藤康男, 渡辺誠. 咀嚼様運動負荷によるマウス咬筋でのIL-6 発現に関する研究. 第 50 回歯科基礎医学会学術大会. 2008 年 9 月 23 日. 横浜
- ④ Tsuchiya M, Sharma R, Tye CE, Sugiyama T,

- Bartlett JD. Stress-Related Genes are Upregulated in Maturation Stage Ameloblasts. The IADR 86th General Session & Exhibition. 2008年7月5日. Toronto, CAN
- ⑤ Tsuchiya M, Tye CE, Sharma R, Smith CE, Bartlett JD. XBP1 Expression May Determine the Size of the Ameloblast ER. The IADR 86th General Session & Exhibition. 2008年7月5日. Toronto, CAN
- ⑥ Atsumi T, Yokoyama M, Tsuchiya M, Sasaki H, Yamamoto M, Koyama S, Itoh M, Watanabe M, Sasaki K. Bone-remodeling in TMJ induced by unilateral occlusal loss in Rat. The IADR 86th General Session & Exhibition. 2008年7月4日. Toronto, CAN
- ⑦ Nemoto E, Koshikawa Y, Kanaya S, Tsuchiya M, Tamura M, Somerman MJ, Shimauchi H. Wnt/beta-catenin inhibits cementoblast differentiation, in vitro. The IADR 86th General Session & Exhibition. 2008年7月3日. Toronto, CAN
- ⑧ 高津匡樹, 小牧健一朗, 土谷昌広, 飯沼利光, 伊藤智加, 池田貴之, 岩崎洋子, 渡辺誠, 祇園白信仁. 臼歯抜歯に伴うマウス海馬の遺伝子発現変動. 第19回日本老年歯科医学会. 2008年6月19日. 岡山
- ⑨ 大井孝, 服部佳功, 坪井明人, 佐藤智昭, 伊藤進太郎, 小牧健一朗, 土谷昌広, 山口哲史, 水戸祐子, 菊池雅彦, 辻一郎, 渡辺誠, 他10名. 咬合支持・咬合力と転倒骨折発生との関連. 第117回日本補綴歯科学会. 2008年6月7日. 名古屋
- ⑩ 小牧健一朗, 土谷昌広, 坪井明人, 服部佳功, 渡辺誠. ポリメタクリル酸メチル(PMMA)表面に結合するペプチドモチーフの単離. 第117回日本補綴歯科学会. 2008年6月7日. 名古屋
- ⑪ Sharma R, Tsuchiya M and Bartlett JD. Fluoride Exposure Significantly Reduces Protein Secretion in Cultured LS8 Cells. The AADR 37th Annual Meeting and Exhibition. 2008年3月31日. Dallas, USA
- ⑫ 渥美知洋, 横山政宣, 土谷昌広, 佐々木洋人, 小山重人, 伊藤正敏, 渡邊誠. 佐々木啓一. 片側性咬合支持喪失による顎関節部骨リモデリングに関する研究. 第29回東北骨代謝研究会. 2007年11月19日. 仙台
- ⑬ Atsumi T, Yokoyama M, Tsuchiya M, Sasaki H, Koyama S, Ito M, Watanabe M, Sasaki K. Bone remodeling in temporomandibular joint induced by unilateral loss of occlusal. The 12th Meeting of the ICP. 2007年9月6日. 福岡
- ⑭ 木山朋美, 土谷昌広, 西岡貴志, 遠藤康男, 菅原俊二, 渡辺誠. 咀嚼様運動負荷によ

るマウス咬筋でのIL-6発現に関する研究. 第52回東北大学歯学会. 2007年12月12日. 仙台

⑮ 渥美知洋, 横山政宣, 土谷昌広, 佐々木洋人, 小山重人, 伊藤正敏, 渡邊誠. 佐々木啓一. 片側性咬合支持喪失による顎関節部骨リモデリングに関する検討. 第20回日本顎関節学会総会. 2007年7月14日. 仙台

〔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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

土谷 昌広 (TSUCHIYA MASAHIRO)
東北大学・大学院歯学研究科・助教
研究者番号: 60372322

(2) 研究分担者

()
研究者番号:

(3) 連携研究者

()
研究者番号: