

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 26 日現在

機関番号：82710  
 研究種目：基盤研究(C) (一般)  
 研究期間：2012～2014  
 課題番号：24593183  
 研究課題名(和文) コモンマーモセットを用いた歯科用アマルガムへの免疫・生体防御系の総合的研究  
  
 研究課題名(英文) Immunological research of dental amalgam using the common marmoset  
  
 研究代表者  
 鈴木 隆二 (Suzuki, Ryuji)  
  
 独立行政法人国立病院機構(相模原病院臨床研究センター)・診断治療研究室・室長  
  
 研究者番号：70373470  
 交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：新世界ザルであるコモン・マーモセットをヒトの外挿モデルとして使用可能か否かを検討し、ヒト歯科治療用のアマルガム含有水銀の生体内影響を免疫学的に解析し、安全な歯科治療の確立への寄与する事を目的とした。初めにマーモセットの免疫学的解析に必要なツールの確立を目的に、サイトカインの定量的PCR系の確立。TCRレパトア解析系の確立。MHCクラスⅡ遺伝子の同定とタイピングの確立を行った。また、マーモセットの歯牙を用いたアマルガム充填モデル形の確立にも着手した。現在、動物実験系を用いた解析を行っている。

研究成果の概要(英文)：This research purposes, the in vivo immunological effects of amalgam containing mercury for human dental treatment, is the establishment of safe dental treatment. The common marmoset is increasingly used for an experimental nonhuman primate model in many research fields. To develop a reliable qPCR method in common marmoset. We analyzed the expression levels of CD antigens (CD3, CD4, CD8 and CD20) and cytokines (IL-1, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-12, IL-13, IFN- and TNF-) in peripheral blood of common marmosets. To develop a reliable qPCR method in common marmoset. We developed a new method for analysis of TCR repertoires in the common marmoset. Phylogenetic analysis suggests segmental duplications of units consisting of basically five (four Caja-G and one Caja-F) MHC class I genes, with subsequent expansion/deletion of genes. In addition, it was also undertaken to establish the amalgam filling model using the teeth of the marmoset.

研究分野：臨床免疫

キーワード：免疫学 実験動物学 TCR 臨床免疫学 マーモセット

1. 研究開始当初の背景

歯科用水銀アマルガム(以下、アマルガム)は、科学的根拠に基づいた安全性が未だ確立されていない歯科治療材料である。アマルガムの影響を動物実験により免疫学的見地から解明し、その安全性を検証する意味は高いと考えられる。

コモンマーモセットは新世界猿に属する小型の霊長類であり、非ヒト霊長類モデルとして生理学、神経学等の研究で利用されている。他の霊長類モデル動物と比べて小型で多産であることから、本動物においてアマルガム充填歯牙モデル系を確立することは有用である。そして充填時から経時的にアマルガムの生体の及ぼす病態を評価するために、免疫学的解析の基盤整備も平行して進めなければならない。しかし現時点において、本動物における免疫学的情報は限定されている。アマルガム充填歯牙モデルの生病態を解明するためには、抗体産生の有無だけでなく、病理組織学的評価、経時的な炎症性サイトカインの変化、主要組織適合遺伝子複合体(MHC)およびT細胞を中心とした細胞性免疫の挙動を評価することは重要である。したがって本研究では、鶴見大学歯学部を中心とした複数の研究分担者および研究施設と連携し、コモンマーモセットを用いた新規モデル系および解析系の確立を目的とした。

2. 研究の目的

本研究では、ヒトにおけるアマルガム含有水銀の生体内で免疫応答を解析しその安全性を検証することが目的である。実験動物として、新世界サルであるコモン・マーモセット(Callithrix jacchus)を用いる為に、マーモセットの免疫学的解析ツールの確立を第一として、アマルガム充填動物モデルを確立し、解析ツールを用いたアマルガムに関わる細胞性免疫誘導の有無を特にT細胞を主眼とした研究を行う。アマルガム充填下での末梢血、リンパ節、脾臓、口腔粘膜および歯周組織中に浸潤したT細胞のT細胞受容体(TCR)を同定するとともに自己抗体の測定、アマルガム特異的T細胞の性状解析と他の金属との交差反応性を明らかにし、自己免疫疾患や金属アレルギーとの相関性を解明する。これらの一連の研究を通してアマルガムに関わる歯科治療の科学的基盤に寄与する事を最終目標とする。

3. 研究の方法

コモン・マーモセットは新世界猿に属する小型霊長類で生理学的にも代謝的にもヒトに近い事が知られている。本研究では、マーモセットを用いたアマルガムの免疫学的影響を検討する為に、

マーモセットの免疫学的解析ツールの確立:具体的には、Real-time PCRによるサイトカイン等の発現解析系、コモンマーモセットMHC解析系、コモンマーモセットTCRレパトア解析系、個体識別系の確立から構成される。T細胞における特異的抗原認識は、T細胞

受容体(TCR)と病原性ウイルス由来ペプチドを提示した抗原提示細胞上のMHC分子との相互作用により開始される(図2左)。マーモセットはマウスのような近交系が確立した動物とは異なるため、MHC分子における遺伝子アレルを正確に同定することで、個体間におけるウイルス感受性の差異について考慮することが可能となる。したがって図2右に示すような手順によりMHCおよびTCRの解析を進める。これら解析系の確立は、感染実験に先立って健常コモンマーモセットより採取された血液および臓器を使用する。

マーモセット歯牙へのアマルガム充填モデル系の確立:マーモセット歯牙へのアマルガム充填は、鶴見医科大学口腔外科で行う。充填する歯牙の選択を検討する。マーモセットへのアマルガム充填及びサンプル採取は、充填後の評価は経時的に行われ、体温、活動評価、皮膚状態、一般血液検査、肝機能検査、腎機能検査、尿検査、血中水銀定量更には自己抗体を評価する。

アマルガム充填後の免疫学的解析:アマルガム充填後に経時的に末梢血を採取し、血液中のリンパ球を分離し、サイトカイン、CD抗原に関しては確立されるReal-time PCRで定量的検討を行う。また、TCRレパトア解析を行いアマルガム特異的免疫応答の惹起の有無を評価する。これらの基礎的検討結果を鑑みて、アマルガム充填マーモセットの免疫学評価を全身臓器で解析を行う際に、自己抗体誘導の有無、抗核抗体の検出は、マーモセット血清を用いてHep-2スライドによる間接蛍光免疫染色で評価する。細胞免疫学的評価としては、末梢T細胞におけるT細胞亜群の頻度に関してFCMを用いた解析を行う。他金属との交差反応性を評価する。

4. 研究成果

本研究を通して、マーモセットの免疫学ツールの確立を行ってきた。

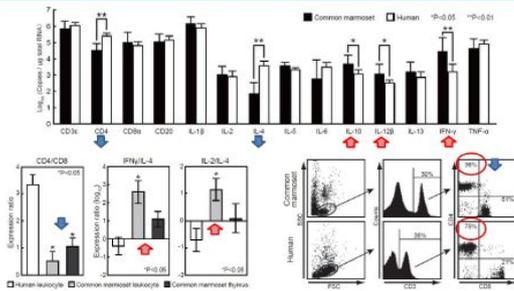
(1) Real-time PCRによるサイトカイン等の発現解析系:炎症性サイトカインの変化を検出するため、免疫関連の細胞表面抗原および炎症性サイトカイン、それらの数値を補正するためのハウスキーピング遺伝子に対する特異的プライマーを設計し、うち4つの遺伝子(CD14、IL-1a、IL-1b、IL-12b)は本実験によって同定したものである。

解析可能な項目一覧まとめ

番号	項目	解析方法	解析可能	備考
1	IL-1a	Real-time PCR	○	
2	IL-1b	Real-time PCR	○	
3	IL-12b	Real-time PCR	○	
4	CD14	Real-time PCR	○	
5	IL-6	Real-time PCR	○	
6	IL-10	Real-time PCR	○	
7	IL-17	Real-time PCR	○	
8	IL-18	Real-time PCR	○	
9	IL-27	Real-time PCR	○	
10	IL-35	Real-time PCR	○	
11	IL-36	Real-time PCR	○	
12	IL-37	Real-time PCR	○	
13	IL-38	Real-time PCR	○	
14	IL-39	Real-time PCR	○	
15	IL-40	Real-time PCR	○	
16	IL-41	Real-time PCR	○	
17	IL-42	Real-time PCR	○	
18	IL-43	Real-time PCR	○	
19	IL-44	Real-time PCR	○	
20	IL-45	Real-time PCR	○	
21	IL-46	Real-time PCR	○	
22	IL-47	Real-time PCR	○	
23	IL-48	Real-time PCR	○	
24	IL-49	Real-time PCR	○	
25	IL-50	Real-time PCR	○	
26	IL-51	Real-time PCR	○	
27	IL-52	Real-time PCR	○	
28	IL-53	Real-time PCR	○	
29	IL-54	Real-time PCR	○	
30	IL-55	Real-time PCR	○	
31	IL-56	Real-time PCR	○	
32	IL-57	Real-time PCR	○	
33	IL-58	Real-time PCR	○	
34	IL-59	Real-time PCR	○	
35	IL-60	Real-time PCR	○	
36	IL-61	Real-time PCR	○	
37	IL-62	Real-time PCR	○	
38	IL-63	Real-time PCR	○	
39	IL-64	Real-time PCR	○	
40	IL-65	Real-time PCR	○	
41	IL-66	Real-time PCR	○	
42	IL-67	Real-time PCR	○	
43	IL-68	Real-time PCR	○	
44	IL-69	Real-time PCR	○	
45	IL-70	Real-time PCR	○	
46	IL-71	Real-time PCR	○	
47	IL-72	Real-time PCR	○	
48	IL-73	Real-time PCR	○	
49	IL-74	Real-time PCR	○	
50	IL-75	Real-time PCR	○	
51	IL-76	Real-time PCR	○	
52	IL-77	Real-time PCR	○	
53	IL-78	Real-time PCR	○	
54	IL-79	Real-time PCR	○	
55	IL-80	Real-time PCR	○	
56	IL-81	Real-time PCR	○	
57	IL-82	Real-time PCR	○	
58	IL-83	Real-time PCR	○	
59	IL-84	Real-time PCR	○	
60	IL-85	Real-time PCR	○	
61	IL-86	Real-time PCR	○	
62	IL-87	Real-time PCR	○	
63	IL-88	Real-time PCR	○	
64	IL-89	Real-time PCR	○	
65	IL-90	Real-time PCR	○	
66	IL-91	Real-time PCR	○	
67	IL-92	Real-time PCR	○	
68	IL-93	Real-time PCR	○	
69	IL-94	Real-time PCR	○	
70	IL-95	Real-time PCR	○	
71	IL-96	Real-time PCR	○	
72	IL-97	Real-time PCR	○	
73	IL-98	Real-time PCR	○	
74	IL-99	Real-time PCR	○	
75	IL-100	Real-time PCR	○	
76	IL-101	Real-time PCR	○	
77	IL-102	Real-time PCR	○	
78	IL-103	Real-time PCR	○	
79	IL-104	Real-time PCR	○	
80	IL-105	Real-time PCR	○	
81	IL-106	Real-time PCR	○	
82	IL-107	Real-time PCR	○	
83	IL-108	Real-time PCR	○	
84	IL-109	Real-time PCR	○	
85	IL-110	Real-time PCR	○	
86	IL-111	Real-time PCR	○	
87	IL-112	Real-time PCR	○	
88	IL-113	Real-time PCR	○	
89	IL-114	Real-time PCR	○	
90	IL-115	Real-time PCR	○	
91	IL-116	Real-time PCR	○	
92	IL-117	Real-time PCR	○	
93	IL-118	Real-time PCR	○	
94	IL-119	Real-time PCR	○	
95	IL-120	Real-time PCR	○	
96	IL-121	Real-time PCR	○	
97	IL-122	Real-time PCR	○	
98	IL-123	Real-time PCR	○	
99	IL-124	Real-time PCR	○	
100	IL-125	Real-time PCR	○	

ハウスキーピング遺伝子: 8項目、免疫関連遺伝子: 25項目  
新規に遺伝子を登録したもの: 8種類

コモンマーマセットにおけるリアルタイムPCR



コモンマーマセットでは、CD4の発現量がヒトよりも低く、サイトカインバランスもTh1に傾いている傾向がわかった。

(2) MHC 解析系の確立：現在 MHC における解析は、図 4 に示すように、30 頭のコモンマーマセットを用いて *Caja-G* 遺伝子の同定が進められている。これらの解析には膨大なゲノムデータのシーケンスおよび解析が必要になるため、次世代シーケンサーおよびそれに対応した専用のソフトウェアにより、コモンマーマセットにおける MHC プロタイプを決定し、最終的に感染実験に供するコモンマーマセットの選別に寄与するものとなる

次世代シーケンサーを用いた方法が最も効率的

**Major histocompatibility complex genotyping with massively parallel pyrosequencing**

Roger W Wiseman<sup>1</sup>, Julie A Karl<sup>1</sup>, Benjamin N Rinker<sup>2</sup>, Claire E O'Leary<sup>3</sup>, Simon M Lam<sup>3</sup>, Jennifer J Tischer<sup>4</sup>, Ann M Detmer<sup>1</sup>, Pascal Bouffard<sup>5</sup>, Natalya Levenkova<sup>5</sup>, Cynthia L Barcotte<sup>5</sup>, Edward Szekeres Jr<sup>5</sup>, Chris Wright<sup>4</sup>, Timothy Harkins<sup>5</sup> & David H O'Connor<sup>1,2</sup>

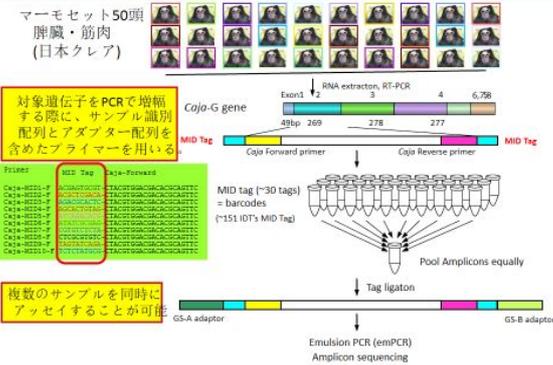
VOLUME 15 | NUMBER 11 | NOVEMBER 2009 | NATURE MEDICINE

**Samples (92 macaques)**  
 68 rhesus macaques (*Macaca mulatta*)  
 12 cynomolgus macaques (*Macaca fascicularis*)  
 12 pig-tailed macaques (*Macaca nemestrina*)

**Methods**  
 Whole blood  
 RNA extraction (Superscript III)  
 cDNA-PCR amplicons  
 (High-fidelity Pfuison polymerase, 12 MID tag primers)  
 Emulsion PCR and pyrosequencing  
 (ES FLX protocol, 70x75 PicoTiterPlates, 4 regions)  
 1/16 region, pooled sample of 12 macaques

~800 reads per macaque  
 20.5 distinct sequences

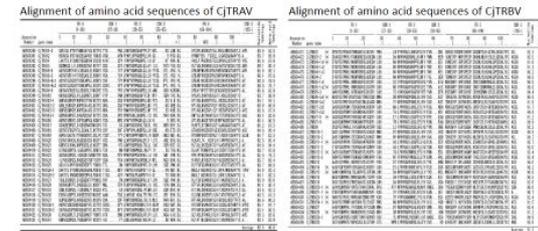
解析手順



(3) TCR レパトア解析系の確立：TCR レパトア解析を確立するために、まずコモンマーマセットにおける TCR 遺伝子を同定する必要があった。これまでに TCR における 鎖および鎖可変領域 (TRAV, TRBV) 遺伝子の同定が完了した。TCR 鎖遺伝子は過去に他のグループで報告された遺伝子群とオーバーラップした TCR ファミリーも含まれたが、

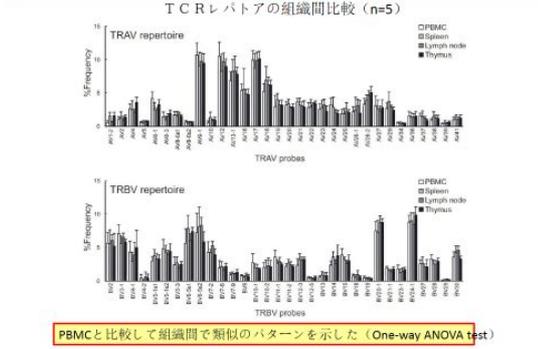
Adaptor-Ligation mediated PCR (AL-PCR) によって増幅された TCR 遺伝子に対して 1000 クローンに及ぶシーケンス解析を実施した結果、最終的に 35 の新規 TRAV 遺伝子、21 の新規 TRBV 遺伝子を同定した。これによりコモンマーマセットでは、各 35 種類の TRAV および TRBV 遺伝子が発現することが確認された (図 5)。現在これらの情報を基に、TCR レパトア解析系を構築するため、既にヒトおよびマウスにおいて確立された TCRV レパトア解析法を参考にしながら、コモンマーマセット TCRV 遺伝子配列に検出用 DNA プロブの選定し、microplate hybridization 法による定量的・網羅的検出系を確立した。

背景と目的

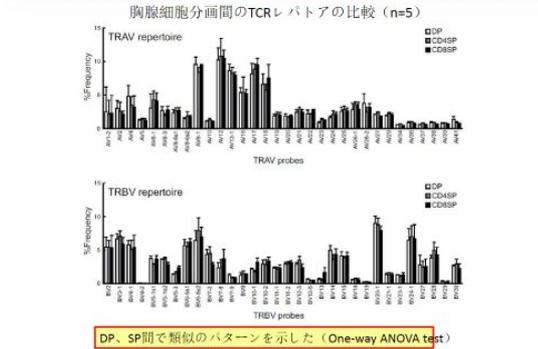


これらの情報を基に、本研究ではコモンマーマセットにおいて TCRレパトア解析法を開発し、免疫学的ツールの充実を図ることを目的とした。

結果



結果



(3) コモンマーマセットにおける標準臓器・組織アトラスの作成：採取された全身の臓器に対して、HE 染色および免疫学的染色手法を用いて、他の動物との差異について現在解析中である。

(4) コモン・マーマセットの歯牙を用いたア

マルガム充填モデルの作成：死亡個体頭部を用いたアマルガム充填法を確立した。充填部位は大臼歯を選択し、歯科用タービンにて象牙質を露出させ、アマルガムを充填した。現在、麻酔下でのアマルガム充填モデルを作成し、経時的に末梢血サンプルを採集している。

#### 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 7 件)

1. Kono A, Braneier M, Roos C, Suzuki S, Shigenari A, Kametani Y, Kitaura K, Matsutani T, Suzuki R., Inoko H, Walter L, Shiina T.:

Genomic sequence analysis of the MHC class I G/F segment in common marmoset (*Callithrix jacchus*).

J Immunol.

2014 Apr 1;192(7):3239-46.

doi: 10.4049/jimmunol.1302745.

2. Fujii Y, Kitaura K, Matsutani T, Shirai K, Suzuki S, Takasaki T, Kumagai K, Kametani Y, Shiina T, Takabayashi S, Katoh H, Hamada Y, Kurane I, Suzuki R. : Immune-related gene expression profile in laboratory common marmosets assessed by an accurate quantitative real-time PCR using selected reference genes.

PLoS One.

2013;8(2):e56296.

doi: 10.1371/journal.pone.0056296.

3. Kitaura K, Fujii Y, Matsutani T, Shirai K, Suzuki S, Takasaki T, Shimada S, Kametani Y, Shiina T, Takabayashi S, Katoh H, Ogasawara K, Kurane I, Suzuki R. : A new method for quantitative analysis of the T cell receptor V region repertoires in healthy common marmosets by microplate hybridization assay.

J Immunol Methods.

2012 Oct 31;384(1-2):81-91.

doi: 10.1016/j.jim.2012.07.012.

4. Shigematsu H, Kumagai K., Kobayashi H, Eguchi T, Kitaura K, Suzuki S, Horikawa T, Matsutani T, Ogasawara K, Hamada Y., Suzuki R. :

Accumulation of metal-specific T cells in inflamed skin in a novel murine model of chromium-induced allergic contact dermatitis.

PLoS One.

2014 Jan 20;9(1):e85983.

doi: 10.1371/journal.pone.0085983

5. Kobayashi H, Kumagai K., Eguchi T, Shigematsu H, Kitaura K, Kawano M, Horikawa T, Suzuki S, Matsutani T, Ogasawara K, Hamada Y., Suzuki R. :

Characterization of T cell receptors of Th1 cells infiltrating inflamed skin of a novel murine model of palladium-induced metal allergy.

PLoS One.

2013 Oct 3;8(10):e76385.

doi: 10.1371/journal.pone.0076385.

6. Eguchi T, Kumagai K., Kobayashi H, Shigematsu H, Kitaura K, Suzuki S, Horikawa T, Hamada Y., Ogasawara K, Suzuki R. :

Accumulation of invariant NKT cells into inflamed skin in a novel murine model of nickel allergy.

Cell Immunol.

2013 Jul-Aug;284(1-2):163-71.

doi: 10.1016/j.cellimm.2013.07.010.

7. Watanabe M, Kudo Y, Kawano M, Nakayama M, Nakamura K, Kameda M, Ebara M, Sato T, Nakamura M, Omine K, Kametani Y, Suzuki R., Ogasawara K.:

NGK2D functions as an activating receptor on natural killer cells in the common marmoset (*Callithrix jacchus*).

Int Immunol.

2014 Nov;26(11):597-606.

doi: 10.1093/intimm/dxu053.

〔学会発表〕(計 0 件)

〔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

なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

鈴木隆二(国病相模原病院・臨床研究セン

ター・室長)

研究者番号：70373470

(2)研究分担者

熊谷賢一(鶴見大学・歯学部・助教)

研究者番号：10518129

濱田良樹(鶴見大学・歯学部・教授)

研究者番号：70247336

(3)連携研究者

( )

研究者番号：