

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 11 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26861568

研究課題名(和文) 生体埋入型バクテリアチャンバーを用いた歯性感染症に対する免疫応答評価

研究課題名(英文) Developing a novel biological chamber system for oral bacterial infection.

研究代表者

松井 有恒 (Matsui, Aritsune)

東北大学・大学病院・医員

研究者番号：60547264

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：口腔病原性細菌群に対する免疫応答評価ならびにバイオフィーム構築等の細菌の活動性を評価する際、円筒型のPDMS製チャンバー(Pore size100-200um)が最も効率良く細胞回収、評価ができることを確認した。本デバイスでは特に好中球の挙動観察に有利であった。チャンバー内部のバイオフィームの形成状況を評価すべく、ホルマリン固定の上パラフィン包埋し評価を行ったところ、チャンバー内表面よりバイオフィーム様の構造を確認しそれらは24hの時点で4種の細菌を混合した系においては、コントロール群と比べ肥厚している傾向を呈した。定量化および安定した構造解析にはなんらかの内表面処理が必要なることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：We established an efficient biological design for the bacterial infection model; cylinder shaped chamber made of Poly dimethyl siloxane (PDMS), 100-200 um sized pores were added for immune cells infiltration into the device. Immunological investigation (e.g. Flowcytometry) for the collected cells and histomorphometric examination of biofilm formation which formed inside of the chamber were performed. The device showed an advantage especially for the analysis of neutrophil. Mixture of 4 common oral bacterial species ((*P. intermedia* (ATCC 25611), *F. nucleatum* (ATCC 25586), *P. micros* (ATCC 33270), *S. intermedius* (ATCC 27335)) showed thicker biofilm formation compared with the control species (*Streptococcus mitis*) at 24h time point after the infection. Surface preparation of the PDMS against for the exfoliation of biofilm formation seemed necessary for further structural analyses.

研究分野：免疫学

キーワード：歯性感染症 免疫応答

1. 研究開始当初の背景

顎口腔領域において歯性感染症は最も一般的な疾患の一つであり、軽度なものは各種歯周炎に伴う局所炎症(口腔感染症分類群)から、顎骨炎/顎骨骨髓炎あるいは増悪例では頭頸部蜂窩織炎(同群)や脳膿瘍、感染性心内膜炎(同群)に至る重篤なものなど多岐にわたる。

本疾患の原因として、う蝕、歯周炎、口腔内損傷を介した感染などが挙げられ、栄養状態不良や高齢者、あるいは各種疾患罹患によりそのリスクは増加すると考えられている。抗菌薬が普及した今日でもこれら炎症の治療を難しくする要因として本疾患が単一細菌ではなく口腔内細菌の複合感染によるものであることが挙げられる。しかしながら、これまで報告された歯性感染症に関する検討の多くは症例報告ならびに *in vitro* での単一あるいは2種程度の口腔細菌を用いた基礎研究が主であり、本疾患の本質である複合感染、ならびに *in vivo* での生体反応を見るという意味では十分な検証とは言い難い。さらに本疾患のステージが生検や細胞の回収が困難な硬い顎骨の内部に起因することも、炎症周囲の細胞やその応答のキャラクタリゼーションを難しくする一因となっている。また顎骨炎症は反応性の骨硬化反応により慢性炎症のまま無症状で経過することがあり、外傷などの外的要因にて急性転化しやすいという特徴を有する。したがって、急性期、慢性期の同炎症に対する異なる細胞応答の解明も本疾患の病態を解明する上で必須であると考えられる。

2. 研究の目的

顎骨炎に代表される歯性感染症は顎口腔領域の炎症性疾患の多くを占め、かつ脳や心臓等の主要臓器にまで波及しうる危険な疾患である。その上、複数種の細菌による複合型感染であることから抗菌剤の選択が難しく、再発のリスクも高いという特徴を有

する。これまで本疾患に対する詳細な免疫応答については、*in vitro* での検証が多く生体の免疫応答を忠実に再現しているとは言い難い。特に感染した細菌が局所に留まり、その病原性を発揮するためには足場となるバイオフィーム形成が必要となるが、その評価のためには形態付与性に優れ生体為害性の低いデバイスが必要となる。

本研究では、代表的口腔内常在細菌の複合感染に対する生体の免疫応答を、敗血症を発症させることなく評価可能な新規開発の生体埋入型チャンバーにて評価することで歯性感染症の生体に対する影響解析ならびに新たな治療法開発へ繋がる知見を得ることを目的とする。

3. 研究の方法

・細菌チャンバーの作製と最適化

チャンバー素材には *In vitro* の細胞工学実験等に頻用される Poly dimethyl siloxane (PDMS) を検討した。PDMS の利点としては安価に大量作製可能なため再利用による諸問題(細菌由来の LPS やバイオフィームのチャンバー内への残存)を回避できる。本計画ではまずチャンバーデザインの選定から開始する。チタンを素材として用いていた従来の円筒型チャンバーのデザインを継承するものに加え、チャンバー内部への細胞の侵入をより容易にする pore の付加や、播種した細菌の定着・機能発現への表面構造の与える影響を検証するため微細な凹凸を付加する等の計画を予定した。

・手術操作

チャンバーはマウス背側皮下へ埋入する。手術はガス麻酔および局所麻酔下で行い、1マウスあたり2チャンバーの埋入(片側1チャンバー)を予定する。手術後10日にて埋入されたチャンバーは線維性結合組織により被包化され、播種後の細菌は周囲に拡散することなくチャンバー内にとどまることになる。

・細菌 使用する細菌は根尖病巣を有する歯根の根管から検出される4種の最も一般的な細菌を使用する。グラム陰性細菌の *P. intermedia* (ATCC 25611), *F. nucleatum* (ATCC 25586), グラム陽性細菌の *P. micros* (ATCC 33270), *S. intermedius* (ATCC 27335) を単独あるいは複合で用いる予定としている。培養には血液寒天培地を用い、嫌気性培養器にて4日間培養後回収し使用する。空気下における嫌気性細菌の取り扱い可能な限り短時間で行い、必要に応じ Anaerobically Sterilized (PRAS) Media を使用する。各種細菌を等量混合し、 $1 \times 10^9/100\text{ul}$ (あるいはそれ以下) に調整した後チャンバー内へ播種する。播種する細菌量を調整することで炎症の程度および急性/慢性のステージをチャンバー内へ意図的に再現できると予想される。細菌の播種後、一定期間(2時間, 12時間, 24時間, 72時間, 7日間)でチャンバー内部の細胞と細菌を回収し各種評価のうち本系の最適化を行う。

・回収細胞のキャラクタリゼーションおよび機能評価

細胞および細菌は回収用 buffer (PBS+5%FBS) にて行い、細菌数 (Drop plate technique), 細胞数の生存率 (AO/PI による蛍光測定) を評価する。その後、FACS にて回収細胞のキャラクターやその機能を評価する。機能評価としては好中球やマクロファージの機能評価として一般的な Phagocytosis assay および Reactive Oxygen Species の測定を行う。また好中球をターゲットとする場合は併せて In vitro において Myeloperoxidase の測定を行う。一定数のサンプル回収が終了した時点で回収された細胞および細菌の上澄み(-80度にて保存)を用い Luminex assay によるサイトカイン(ケモカイン)の定量評価を行う。組織学および X 線学的骨内炎症の評価

最適化された本系の細菌播種条件と顎骨内炎症との整合性を確認するため in vivo 顎骨炎症モデルである Periapical lesion model を用いる。Micro-CT の撮影には Scan Xmate-E090 (Comscantechno) を用い撮影後 TRI/three-dimensional-BON (Ratoc System Eng.) にて炎症による骨欠損レベル評価を行う。

4. 研究成果

口腔病原性細菌群に対する免疫応答評価ならびにバイオフィルム構築等の細菌の活動性を評価するため、まず Poly dimethyl siloxane (PDMS) 製チャンバーのデザインに関し円筒型、プレート型について検討を行った。実験動物には C57BL6 マウスを使用し、各デザインのチャンバーをマウス背部皮下に埋入し 10 日後にチャンバー内部に経皮的に 200ul の PBS を注入、24h 後に内部 PBS と凝集した細胞群を回収した (1cc シリンジ/27G 注射針)。結果、円筒型デザインが最も効率良く細胞を回収できることが判明した ($3-5 \times 10^5$ /マウス) チャンバー表面への Pore の付与に関しては、径が大きすぎることで内部に肉芽組織の増生を認めるケースがあり、pore size を 100-200um にて調節したところ、コンスタントな細胞回収率を確認することができた。

チャンバーデザインの形状が決定したことから、実験に用いる細菌群の培養条件調整を併せて開始した。本系ではグラム陰性細菌の *P. intermedia* (ATCC 25611), *F. nucleatum* (ATCC 25586), グラム陽性細菌の *P. micros* (ATCC 33270), *S. intermedius* (ATCC 27335) を用い其々を血液寒天培地・嫌気性培養器にて4日間培養した。*P. intermedia*, *F. nucleatum* に関してはグラム陽性細菌の *P. micros*, *S. intermedius* と比べ 8-10 倍程度の回収効率を確認した (Drop plate technique)。

初めにコントロール群として *Streptococcus*

mitis を使用し、マウス皮下注射モデルにて細胞回収実験を施行した。結果、細菌播種後 24 時間の時点でチャンバーあたり 5×10^5 の細胞を回収することができた。グラム陰性細菌の *P. intermedia* (ATCC 25611), *F. nucleatum* (ATCC 25586), グラム陽性細菌の *P. micros* (ATCC 33270), *S. intermedius* (ATCC 27335) についても、同様に播種を行ったところ播種後 24h の時点で *P. intermedia*, *F. nucleatum* については他 2 種の菌よりも細胞回収量は低い印象であったが、120h の時点では逆転し多量の細胞回収率を確認した。上記に様に最適化した本系の細菌播種条件と顎骨内炎症との整合性を確認するため in vivo 顎骨炎症モデルである Periapical lesion model にて顎骨内の病変形成との関連性を評価したところ *P. intermedia*, *F. nucleatum* において、播種後 120h の段階で根尖病巣の形成を確認した。回収された免疫細胞種を Flowcytometry にて評価した。 1×10^6 /sample の細胞群を好中球の特異的マーカーである Ly6g および細胞の生死に関しては Propidium iodide (PI : 1 $\mu\text{g/ml}$) にて評価した。抗体の好中球 Fc レセプターへの非特異的な結合に関しては TruStain fcX™ (anti-mouse CD16/32) 抗体 (Biolegend, USA) を用いブロックした。結果、本システムを用いた場合、チャンバー内部から回収した細胞のほぼ 9 割が Ly6g 陽性細胞(好中球)であった。細菌播種後早期から 24 時間時点においては、PI 陰性(活性のある好中球)が持続的にチャンバー内へ供給されたのに対し、72 時間以降ではそれら供給は減少し、肉眼的にも組織の炎症が増悪する傾向を確認した。免疫応答としてチャンバー内部へ凝集した好中球の機能評価 (Phagocytosis アッセイ pH-sensitive pHrodo™ Green E. coli BioParticles® Conjugate (Invitrogen/USA)) に関してはコントロール群である *S. mitis* 播

種群においては 72h 経過時点において著しい細菌数の減少を示した(好中球の機能発現による)一方で、*P. intermedia* 感染群においては他播種細菌群に比較して著しく抑制される傾向を確認し、各種細菌の細胞毒性に関し更なる評価が必要であることが示唆された。

サイトカインおよびケモカインの評価においても、*P. intermedia* は他細菌群と比較し最も強く免疫応答に影響を及ぼしていることが示唆され、一部の正常な免疫応答を阻害している可能性が示唆された。これは歯性感染症において生体の免疫機構は菌種毎に異なる反応を見せ、複合感染においては特定の菌種が強く影響することが示唆している。

チャンバー内部のバイオフィルムの形成状況を評価すべく、ホルマリン固定の上パラフィン包埋し評価を行ったところ、チャンバー内表面よりバイオフィルム様の構造を確認し、それらは 24h の時点で 4 種の細菌を混合した系においてはコントロール群と比べ肥厚している傾向を呈した。

定量的評価のためには固定および包埋処理に際し、チャンバー内壁への接着が安定した組織学的評価のために必要と判断し PDMS 表面への細胞接着を高めるため、fibronectin (100 $\mu\text{g/ml}$) および poly-D-lysine を用いたコーティング処理を施した。結果、安定した構造解析が可能となった。

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)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松井 有恒 (MATSUI Aritsune)
東北大学・大学病院・助教
研究者番号：60547264