

## 5 全身機能を基盤とする口腔環境の再構築研究班

### <研究成果概要>

#### 5-1 咀嚼・嚥下・唾液腺機能回復に関する介護予防の研究グループ

咀嚼・嚥下・唾液腺機能回復に関する介護予防を目的として各々の研究を実施し、以下の研究成果を得た。人工う蝕マウスに対する肺炎誘発実験を試行し、う蝕に罹患したマウスでは嚥下性肺炎の程度および頻度が高く、口腔衛生状態が劣悪な高齢者では衛生管理を施されている高齢者と比較して、疫学的に肺炎発症例が高いとの報告と合致した。更に剖検材料の嚥下性肺炎において、気管支線毛円柱上皮および周囲平滑筋細胞でのアポトーシス亢進の所見を認め、これは新たな不顕性誤嚥の解明の一助となる発見であった。口腔環境を維持する上で重要な唾液及び唾液腺機能改修の再構築のために、唾液腺腺房細胞におけるNO合成機構ではNO合成酵素の基質となるアルギニン再生産系も唾液腺に備わっている。更にその律速酵素であるアルギニノコハク酸合成酵素の活性が唾液腺の成熟に関与することも明示した。水の分泌に関しては細胞間結合部位、特にタイトジャンクションの動きを示唆した。唾液腺のアクアポリンに関して、AQP5の腺腔膜での局在のみならずAQP6の存在を初めて発見した。ラット耳下腺腺房細胞の初代培養を確立した。

顎関節症等の顎機能障害の顎機能評価に脳波を応用することの有用性が示唆された。口腔顔面の触感覚はHOMOTOPICALな疼痛によって抑制され、交感神経系の興奮によって亢進した。顎の運動方向によって準備される脳活動性が異なり、リズム性顎運動形成において前頭弁蓋部の活動性が不可欠であることを明らかにした。光トポグラフィーの顎口腔領域への応用を難しくしていた側頭筋血流の干渉について主成分分析法を応用し、理論的に除去できた。咬合感覚は顎口腔の疼痛症状と不安・抑うつによって変調し、噛み合わせ違和感は疼痛緩和並びに抗不安抗うつ薬により改善することを臨床的に確認した。デジタル画像評価では、マルチ周波数処理によるパノラマX線写真における顎骨の評価は高周波が優れていたが、含気骨や軟組織の描出評価は中周波で処理した画像の評価が高かった。MRIによる顎骨の性状及び異常像の評価では、脂肪抑制法のSTIR法の最適な条件はTR:1,500~3,000, TE:30, IT:100であった。MRI臨床検討症例にて下顎骨骨髓はT1, T2強調像ともに高信号を、STIR法にて低信号を示し、下顎皮質骨は低信号を、周囲軟組織、リンパ節及び顎下腺は高信号を呈した。

#### 5-2 遺伝子導入法による口腔機能の促進の研究グループ

*S. mutans* が産生するGTF活性を抑制するモノクローナル抗体を、複数のハイブリドーマから得ている。これらのハイブリドーマより全RNAを抽出し、上述した抗体活性を示すscFvをコードするプラスミドを、大腸菌を宿主として定法により作成した。これらのプラスミドより構造遺伝子を抽出し、大腸菌-*B. brevis*の両細菌により保持されるシャトルベクターに導入することにより、当該活性を有するscFvを*B. brevis*を宿主として菌体外産生に成功した。また、効率良い受動免疫系を確立するためには、注目している細菌の病原因子を正確に捉える必要がある。*P. gingivalis*に由来する多くの病原因子の中で、ヘミンとの結合および共凝集に関与する表層タンパク質の1つであるHBP35に着目し、本タンパクの機能をさらに明らかにすることを試みた。その結果、酸素ストレスに対し抵抗性を示す活性を有することが示唆された。一方、唾液は細胞増殖因子や殺菌作用物質などが多種類含まれ、口腔環境の維持に多彩な機能を果たしている。高齢化に伴って、口腔組織の創傷治癒や口腔感染症が増大する

といわれており、唾液腺細胞株を用いて、老化の実験モデルとして、活性酸素で作用させてアポトーシスへの影響を調べた。また、老化によって変動する遺伝子発現をモニターすることで、口腔機能の回復を目的にした唾液腺への遺伝子治療の標的遺伝子を同定することは意義がある。

6,500 遺伝子の GeneChip 解析と重複しない遺伝子を多数含む 8,300 遺伝子の DNA マイクロアレイを用いてマウス顎下腺の老化で発現変化する遺伝子のトランスクリプトーム解析を行った。さらに、骨芽細胞株に老化モデルとして活性酸素を刺激して、GeneChip 解析、プロテオーム解析を行った。HSG 細胞への活性酸素刺激によって TUNEL 検出法でアポトーシス細胞が認められ、caspase 3 の免疫組織染色によっても確認された。GeneChip, cDNA マイクロアレイ UniGEM V を用いて neonatal と aged のラット顎下腺中で発現している遺伝子の mRNA レベルをトランスクリプトーム解析した結果、多数の変動遺伝子が見いだされた。成長因子 12 遺伝子の加齢による遺伝子発現変化では、TGF- $\beta$  遺伝子で 2.1 倍、インスリン様成長因子 1(IGF-I)遺伝子で約 2 倍の低下がみられた。このマイクロアレイ解析の IGF-1 遺伝子の変動は、real-time PCR 法によって確認された。さらに、ラット顎下腺をホモジナイズして IGF-I 量を ELISA 法で測定したところ、タンパク質量あたりの IGF-I は、加齢によって減少していた。GeneChip, DNA マイクロアレイの応用によって、顎下腺組織中で加齢によって遺伝子発現が減少する遺伝子の網羅的同定が可能であることが分かった。とくに老化で TGF- $\beta$ , IGF-I 遺伝子が発現低下することが示唆されたことから、これらの成長因子遺伝子の唾液腺組織への遺伝子導入は、生理機能の回復あるいは改善に意義あるものと考えられる。新たに作成した  $\beta$ -Defensin-2 モノクローナル抗体は、細菌感染など口腔組織の病態変化における  $\beta$ -Defensin-2 の産生量をモニターするのに有用なモノクローナル抗体になると考えられた。

### 5-3 免疫応用とフッ化物応用による宿主強化法の研究グループ

フッ素の適正摂取環境をテーマにした研究において、食品の様々な性状に対応でき、また、低濃度でも安定して測定できるフッ化物( $F^-$ )測定法：換気式微量拡散法を開発した。フッ化物測定法は試料からの  $F^-$ 分離回収と回収液中の  $F^-$ 濃度定量とから成り、新規開発部分は試料からの  $F^-$ 分離回収の機能である。 $F^-$ 濃度定量は電極法と比色法を試みてきたが、現在までのところ実際のデータは電極法を採用している。本方法では、測定試料を灰化せずに直接微量拡散法により  $F^-$ を分離回収するが、独自に工夫した機能により以下の特徴を持つ。①換気機能によって  $F^-$ の分離回収効率が向上し反応時間が短縮、②装置内部が陰圧調整され反応ガスが外部に漏れず、測定精度が向上、③回収液に対する試料量を多くでき、最終測定  $F^-$ 濃度を濃縮できる、④回収槽を独立させ、反応経過を追った時間単位の分離回収が可能、⑤反応槽において消泡装置を組み、種々性状の食品に対応できる、これら 5 つの特徴である。現在まで、標準液、および特に微量拡散が困難とされている乳製品：牛乳や粉ミルクを試料として、本測定法による測定精度の評価を行い、さらなる装置の工夫を繰り返してきた。到達できた成果として、反応時間 30 分、回収液の  $F^-$ 濃度濃縮 20 倍、での測定が可能となり、標準液での回収率は 90%~95%となった。本装置の測定下限値は 0.01ppmF と考えられた。

免疫、ワクチン開発の研究において、粘膜アジュバント作用メカニズムの解析を行った。コレラ毒素と類似の毒素原性大腸菌の易熱性毒素は、粘膜アジュバント効果を有するが、その作用メカニズムが異なることが示されている。そこで、コレラ毒素(CT)と毒素原性大腸菌

の易熱性毒素(LT)のアジュバント誘導メカニズムの違いが何に起因するかを明らかにするために、CT-A サブユニットと LT-B サブユニットのキメラ分子(CT-A/LT-B)および LT-A サブユニットと CT-B サブユニットのキメラ分子(LT-A/CT-B)を作製し、タンパク抗原とともにマウスに経鼻免疫した。その結果、CT および LT はそれぞれの B サブユニットを介するシグナルによって IL-12 レセプターの発現とそれに続く T ヘルパーサイトカイン応答を制御していることが示唆された。次に、無毒化変異型 CT(mCT) E112K の A サブユニットと LT-B サブユニットのキメラ分子(mCT-A/LT-B)を作製することにより、無毒であり、かつ IgE の産生を抑えたアジュバントの開発を試みた。その結果、mCT-A/LT-B はそのアジュバント作用誘導に際して、下痢誘導効果および IgE 産生応答を示さないことが示され、安全で有効な粘膜アジュバントであることが示唆された。さらに、う蝕、歯周病ワクチンの開発を行った。*S. mutans* の PAc を無毒化コレラ毒素とともにマウスに経鼻投与したところ、唾液中に PAc 特異的な IgA 抗体応答が誘導され、*S. mutans* の口腔内定着を顕著に抑制した。また、*P. gingivalis* の 40k-OMP をコレラ毒素とともにマウスに経皮あるいは経鼻投与したところ、血清中ならびに唾液中に抗原特異的抗体応答が誘導された。さらに、特異的抗体は *P. gingivalis* のベシクルと *S. gordonii* の共凝集を顕著に抑制したことより、*S. mutans*, *P. gingivalis* の感染予防における粘膜ワクチンの有効性が示唆された。次に、口腔感染症に対する安全性の高い免疫療法の開発を行った。

病原因子の機能ドメインや主要エピトープを利用したコンポーネントワクチンは安全性が高い。また、抗血清や精製抗体を利用して病原因子を中和する受動免疫は安全性が高く、とくに口腔への投与は危険性が極めて低いとされている。重要な歯周病原菌である

*Porphyromonas gingivalis* の定着に関与する 40-kDa 外膜タンパク質、130-kDa 赤血球凝集因子、200-kDa 膜関連タンパク質の遺伝子をクローニングし、その病原因子のエピトープ部位、機能部位を特定してきた。そして、これら病原因子活性を中和できる安全な受動免疫抗体として組換え単鎖 Fv 抗体、ヒト型抗体の開発を行ってきた Transchromo-mouse ハイブリドーマで得られたヒト型抗体は共凝集活性、ヘミン結合活性を阻害し、また、好中球の貪食作用を活性化した。組換え 40-kDa 外膜タンパク質のポリマーは赤血球凝集活性をもち、組換えタンパク質に対する抗体が赤血球凝集活性を阻害したことから、新しい赤血球凝集因子であること、ヘミン結合タンパク質であることを明らかにした。さらに phage display epitope mapping 法で特定された合成ペプチドを用いた competition assay により、赤血球凝集活性の阻害が証明された。また、200-kDa 膜関連タンパク質は、HagA であることが判明し、作製に成功した組換え 200-kDa タンパク質抗原を量産できる遺伝子クローンは、歯周病ワクチン材料の生産を可能にした。*P. gingivalis* 130-kDa 赤血球凝集因子に加えて、う蝕病原菌 *S. mutans* の病原因子である glucosyltransferase 活性を抑制できる組換え抗体 ScFv を *Bacillus brevis* 宿主を応用して大量生産することに成功した。さらに、中和抗体の量産に有用な鶏卵黄抗体 IgY の作成に着手し、赤血球凝集活性、上皮細胞定着能を抑制できる抗体の作成に成功した。

## <優れた効果があがった点>

### 5-1 咀嚼・嚥下・唾液腺機能回復に関する介護予防の研究グループ

嚥下性肺炎は実験的にはラットマウスに高頻度に出現し、剖検材料で気管支線毛円柱上皮および周囲平滑筋細胞でのアポトーシス亢進が関与していた。唾液腺腺房細胞における NO 合成機構では NO 合成酵素の基質となるアルギニン再生産系も唾液腺に備わっており、その律速酵素であるアルギニノコハク酸合成酵素の活性が唾液腺の成熟に関与していた。顎関節症等の顎機能障害の顎機能評価に脳波の応用の有用性が高く、口腔顔面の触覚は HOMOTOPICAL な疼痛によって抑制され、交感神経系の興奮によって亢進した。マルチ周波数処理によるパノラマ X 線写真を用いたデジタル画像において、顎骨評価は高周波が優れていたが、軟組織や含気骨の抽出評価は中周波が優れていた。MRI による顎骨の評価では脂肪抑制法の STIR 法においては TR:1,500~3,000, TE:30, IT:100 が最適条件であった。

### 5-2 遺伝子導入法による口腔機能の促進の研究グループ

遺伝子組換え技術を用い、口腔機能の促進をテーマとした研究において、構造遺伝子をゲルより抽出し、これをリガーゼを用いた従来法によりシャトルベクターに導入することは、時として不可能な場合がある。この問題点を解決するため新たにヘテロダイマー法を開発し *B. brevis* を宿主とした scFv の菌体外産生に成功した。本法に用いるプラスミドをさらに加工することにより、注目する遺伝子のサブクローニングを容易に行うキットの商品化が可能と思われる。また、口腔環境の改善をテーマとした研究において、口腔組織の健康維持に大きな役割を果たす唾液腺の老化に伴う遺伝子発現変化を半網羅的にトランスクリプトーム解析を行い、遺伝子治療によって機能回復させる遺伝子として TGF- $\beta$ , IGF-I が特定できた。老化機序で重要な活性酸素を基盤にして、唾液腺細胞と骨芽細胞で実験モデルを構築し、唾液腺細胞ではアポトーシスの誘導が明らかとなった。一方、骨芽細胞では老化モデルとして活性酸素を刺激して、GeneChip 解析、プロテオーム解析を行い、ユビキチン系タンパク質やインテグリン結合骨シマトタンパク質など骨芽細胞の機能を抑制し得る分子が特定できた。また、口腔組織の病態変化における  $\beta$ -Defensin-2 の産生量をモニターするのに有用なモノクローナル抗体の作成に成功した。

### 5-3 免疫応用とフッ化物応用による宿主強化法の研究グループ

新規開発の換気式微量拡散装置により、反応ガスの漏出を完全に防ぎ、反応効率の高い F<sup>-</sup> 分離回収が可能となった。また、試料に対する回収液の F 濃度を濃縮することができた。その結果、試料中の F 濃度が 0.01ppm レベルまで測定できる感度が得られ、90%~95%の回収率で、CV 値は 5%程度の測定データを得ることができるようになった。また、対象試料が固形であればミキサーによる前処理が必要となるが、均一化されたゲル状の試料となれば、いかなる食品、生体試料でも対応できることが分かった。既成の拡散法では 12~24 時間を要していた反応時間についてみると、本方法では標準液で 15~30 分、もっとも分解しにくいと思われる乳製品でも 1 時間程度で済む。さらに、反応時間経過を追ったデータから、F<sup>-</sup>の回収速度や反応の終末点を把握できる方法が可能となった。反応の終末点は、試料中フッ化物量の精密定量に重要である。また、食品の性状によって異なる F<sup>-</sup>の回収速度は、胃の中での分解と吸収の代謝速度に対応すると予想されており、今回の方法で時間経過を追った分離回収

データが得られたことは、今後、動物実験や生体実験を行わずに *in vitro* で、各食品中 F の Bioavailability 値を推定する道が開けたと考えられ、この点は特に優れた成果である。

コレラ毒素および類似の大腸菌易熱性毒素のキメラ分子を作製し、分子のアジュバント作用メカニズムの解明から、コレラ毒素はその B サブユニットを解して Th2 型とそれに伴う IgE 抗体応答、易熱性毒素 B サブユニットは Th1 型応答を誘導することを見出した。そこで、無毒化変異コレラ毒素の A サブユニットと易熱性毒素 B サブユニットを用いたキメラ分子を作製することにより、無毒で低い IgE 抗体応答を誘導する安全性の高いアジュバントの作製に成功した。また、*S. mutans* ならびに *P. gingivalis* の表層タンパク抗原を経鼻あるいは経皮免疫することにより、*S. mutans*, *P. gingivalis* の感染を阻止できる可能性が示された。

*P. gingivalis* HagA ワクチンの量産に有用な遺伝子クローンの開発に成功し、実際にリコンビナント抗原に対する抗体が受動免疫療法の開発に有用であることを証明できたことから、また 40kDa 外膜タンパク質が赤血球凝集因子であることから、これらの遺伝子クローン、遺伝子産物は歯周病の免疫療法の開発に貢献できる。安全で実用化が可能な受動免疫抗体として、歯周病原菌 *P. gingivalis* の 40-kDa 外膜タンパク質、200-kDa 膜関連タンパク質 HagA、130-kDa 赤血球凝集因子の機能を中和し、その定着を抑制できる組換え単鎖 Fv 抗体、ヒト型抗体の開発、量産の道を開いた。また、安全性が高く、食品として摂取が可能で、かつ量産が可能な鶏卵黄抗体 IgY の作成に成功している。これらのことから、受動免疫療法に有用で安全性の高い組換え単鎖 Fv 抗体、ヒト型抗体、IgY の開発が飛躍的に進展したといえる。

## <問題点>

### 5-1 咀嚼・嚥下・唾液腺機能回復に関する介護予防の研究グループ

嚥下性肺炎における人工う蝕ラット作製は時間を要し、う蝕罹患本数の統一性がなかった。NOの唾液腺における直接的な効果が確認されておらず、タイトジャンクションにおける水の透過に関与するタンパク質の同定がなされなかった。ヒト顎口腔機能の感覚と運動に関する中枢制御では少数の研究者のみで研究がなされており、テーマが同一施設でしか行われていなかった。マルチ周波数処理によるパノラマ X 線写真で硬組織と軟組織での抽出評価が異なっており、全体的に評価点が高い周波数の検討がなされなかった。

### 5-2 遺伝子導入法による口腔機能の促進の研究グループ

遺伝子組換え技術を用い、口腔機能の促進をテーマとした研究において、現在の日本で、組換え生物由来のタンパク質を食する、あるいは口腔内に投与するという事は社会的要因からほとんど不可能に近く、今後も望めそうにない。実際、う蝕、歯周病の予防に有効と考えている scFv の産生を民間企業に打診したが、前例が無いことで不調に終わっている。また、口腔環境の改善をテーマとした研究においては、これまでの研究で、将来、口腔組織への遺伝子治療に有用な遺伝子が一部特定できたと考えられるが、実際に、遺伝子導入の実用化の研究には至らなかった。その理由としてリポソーム系での遺伝子導入に限定して行ったために導入効率が低かったことが考えられた。今後、レトロウイルス導入系を検討する必要性を感じた。現在、レトロウイルス導入系を構築して老化細胞へのテロメア遺伝子の発現系を実験モデルとして進めている。

### 5-3 免疫応用とフッ化物応用による宿主強化法の研究グループ

Bioavailability を考慮したフッ化物測定法の開発において、食品試料からの  $F^-$  分離・回収は期待した精度に到達していると思われるが、最終的な  $F^-$  濃度測定に採用している電極の再現性に難点が残されている。比色法や液体クロマトフィー法、またそれらとフローインジェクション法との組み合わせなど、検討の余地がある。さらに、微量拡散反応の反応液や、回収液の濃度、反応温度等を検討すれば、現在 90~95% の回収率をさらに 5% 程度向上させることができるかと予想している。各食品中  $F^-$  の Bioavailability 値を推定する課題については、胃中で分解・吸収される反応速度に対応する拡散液の種類と濃度、反応温度についてさらに詳細な研究を進める必要がある。

粘膜免疫を応用したう蝕と歯周病ワクチン開発研究において、無毒化変異型コレラ毒素および無毒化コレラ毒素 A サブユニットと易熱性毒素 B サブユニットのキメラ分子の安全性は、現在のところ *in vitro* での ADP リボシレーション活性, cAMP 量, マウスを用いた ileal loop test で確かめられたものである。したがって、ヒトに対する安全性の確認が今後の課題となる。また、*S.mutans*, *P.gingivalis* のワクチンとともに感染防御は示唆されたが、う蝕、歯周病を予防できるかどうかは明らかとなっていない。

口腔感染症に対する安全性の高い免疫療法の開発研究において、より安全な免疫療法として受動免疫療法の開発を進めてきたが、一般社会は組換え産物に対して強い嫌悪感があり、量産実現のための組換え単鎖 Fv 抗体の社会からの許容に問題が残されている。そのような現況で、鶏卵黄抗体 IgY は将来性が高いと考えられる。う蝕・歯周病の病原菌が明らかになっ

ているにも関わらず、能動免疫によるワクチン療法をヒト対象に実用化することは難しい。ヒトの命を奪う感染症のワクチン療法が法的に実施されているが、周到に準備されたワクチンであっても、ヒトによってアレルギー反応の副作用で稀に死の転帰をとることがあり、能動免疫ワクチン接種の危険は否定できない。現在のところ、動物実験系での受動免疫療法の効果の実証が行われていない。また、副作用の有無についての検証がなされていない。

## <研究期間終了後の展望>

嚥下性肺炎の病態解析実験はう蝕罹患方法を *S.mitans* の接種に変更し、更に SPF の環境下でヌードマウスを使用しての追再試験を行う。唾液及び唾液腺機能の再構築では NO の直接的な効果を検討するために唾液におけるタンパク質のニトロシル化を検索し、またタイトジヤンクションにおけるタンパク質のノックアウトマウスの唾液腺灌流を行い、分泌機能とフリーズフラクチャー法での検討を実施する。光トポグラフィー計測とウイスコンシンカードソーティングテスト、更には咬合・咀嚼機能研究、殊に前頭皮質における脳活動を指標として咬合・咀嚼機能との関わりについて検討する。コンピューターラディオグラフィーのマルチ周波数処理によるパノラマやセファログラムの臨床例の画像評価を行い、更に CT や MRI の各シーケンスによる異常像の評価を実施する。

遺伝子組換え技術を用い、口腔機能の促進をテーマとした研究においては、*P. gingivalis* 表層タンパク質である HBP35 は多彩な活性を有することから、今後の受動免疫による歯周病の予防上重要な標的である。それ故、本タンパクに対する効率よい抗体を調製することは、意義深いと考えられる。また、上述のように、現在の日本では、組換え生物由来のタンパク質の臨床応用は不可能に近いので、口腔内疾患に関連する臨床検査試薬としての用途開発が考えられる。また、う蝕・歯周病に由来する口腔内疾患はヒトだけに限らず、近年では家猫、犬などのペットにも多く見られる。それ故、口腔内疾患を予防する scFv をペットの餌の中に混ぜ、その効果を見るなどの研究が考えられる。また、口腔環境の改善をテーマとした研究においては、腔組織への遺伝子治療に有用な遺伝子が特定できたと考えられるが、実際に、遺伝子導入実験には至っておらず、レトロウイルス導入系を導入した遺伝子治療の基礎実験が進展しており、継続研究を実現したい。

IGF-1 を含む成長因子、Defensin などの抗菌物質の遺伝子をレトロウイルスベクターに導入して、唾液線の機能の回復、改善に役立つ遺伝子の遺伝子治療を試みる。これら一連の研究で期待される結果が得られた場合は、成功した遺伝子について動物実験で gene gun を応用した *in vivo* 実験に発展させる。骨芽細胞の実験系でも同様に、骨形成を促進する遺伝子についてレトロウイルスベクターに導入して、遺伝子治療を試み、骨形成が促進できるか確認する。

免疫応用とフッ化物応用による宿主強化法の研究終了後の展望として、以下のごとく具体的な研究の展開を描いている。① *in vitro* 実験による経時的な拡散率：拡散速度と、*in vivo* 実験による生体利用率(Bioavailability)との関連性を検討すること、② フッ素元素の栄養学的地位の確立。食品に含まれる有機のフッ素化合物も合わせて算出されてきたフッ素摂取量に対して、今後は生体代謝に関与する無機化合物に限定したフッ素摂取量を提案する。③ Biomarker 監視ガイドライン構築のための基本データを提供する。歯のフッ素症など Biomarker を指標とした疫学調査においても、無機 F<sup>-</sup> 摂取量と Bioavailability の要因を用いた分析を行うべきものと考えられる。環境(水・土)・食品・生体試料のデータをモニターし、フッ素摂取環境の適正管理を目指す。

粘膜免疫を応用したう蝕と歯周病ワクチンの開発研究では、*S. mutans*, *P. gingivalis* の表層タンパク抗原と無毒化コレラ毒素、無毒化コレラ毒素 A サブユニットと易熱性毒素 B サブユニットのキメラ分子を組み合わせたう蝕、歯周病ワクチンの開発を進めていく。また、コレラ菌や毒素原性大腸菌の変異毒素を用いたアジュバントは神経細胞への影響が示唆されてい



る。したがって、細菌毒素以外の新たな粘膜アジュバントの開発に着手する。

口腔感染症に対する安全性の高い免疫療法の開発に関する研究では、口腔感染菌において同種の病原菌での病原性が大きく異なり、ヒト歯周炎の真の原因菌は未だに特定されていない。最近、大阪大学の天野博士グループで FimA 遺伝子タイプ II の *P. gingivalis* が歯周炎患者の 75% に棲息していることを明解にしている。これに応答して安孫子研究室では FimA 遺伝子タイプ II *P. gingivalis* の全ゲノムを解析するゲノムプロジェクトを発進し、有用な免疫療法の新しい標的分子の探索を飛躍的に進展させることができる。本研究を継続することで新しい標的分子に対する免疫療法の展開を進めたい。

## ＜研究成果の副次的効果＞

嚥下性肺炎の誘発と関連する高齢者の口腔環境と想定される呼吸器の加齢及び病的変化が解明されればより科学的な根拠に基づいた高齢者を対象とした口腔衛生運動の展開が可能となり得る。唾液腺灌流によるタイトジャンクションの機能解析で唾液分泌速度を考慮すれば唾液中グルコース濃度から血漿中グルコース濃度が推測できることから、唾液による糖尿病診断法が可能となり得るので特許申請を企画している。主成分分析を応用した波形解析法を脳血流成分と側頭筋血流成分を分離し、一次感覚運動皮質の脳血流評価を可能とし、光トポグラフィーを歯科的に臨床応用できる。

遺伝子導入法による口腔機能の促進の研究では、遺伝子組換え技術を用い、口腔機能の促進をテーマとした研究においては、scFvは難容性であり、この点を改良したタンパク質の産生に関し、民間企業との間で共同研究を行う契約が結ばれつつある。

また、口腔環境の改善をテーマとした研究においては、加齢によって遺伝子発現が低下していく唾液腺の細胞成長因子遺伝子としてTGF- $\beta$ 、IGF-Iが特定できた。IGF-Iは口腔粘膜の恒常性の維持に働くほか、骨芽細胞の機能維持にも働いている。今後の研究によって*in vivo*実験でもIGF-Iの効用が実証されれば、遺伝子治療の実用化の重要な標的遺伝子に活用できよう。唾液腺の遺伝子治療研究は大きな進展をみせており、今後の活用計画としては口腔内だけでなく、生体の恒常性にも活用が可能といわれており、口腔組織から全身組織への有用生理活性物質の供給を歯科医学として発展させることが可能と考えられる。

免疫応用とフッ化物応用による宿主強化法の研究成果として、開発された換気式微量拡散法によるフッ化物の定量法は3件の特許申請を済ませ、技術移転契約が成立している。本装置の活用により、今までなしえなかった*in vitro*で行うフッ化物のBioavailability研究が可能になるものと期待される。また、本研究で開発した*P. gingivalis*の外膜タンパクを用いた歯周病予防のための経鼻ワクチン、経皮ワクチンは現在、特許申請中である。本研究で確立された抗原の経鼻ならびに経皮投与方法はう蝕、歯周病に限らず、あらゆる感染症予防ワクチンの開発に応用可能である。さらに、より安全な免疫療法として受動免疫療法の開発を進め有用で安全な受動免疫抗体として組換え単鎖Fv抗体、ヒト型抗体や免疫法の開発を成功させ、特許を申請した。