

称号及び氏名 博士（獣医学） 清水 遥介

学位授与の日付 平成29年3月31日

論文名 pH感受性リポソームを応用した小動物用歯周病  
粘膜ワクチンの開発

論文審査委員 主査 渡来 仁  
副査 大橋 文人  
副査 笹井 和美

## 論文要旨

### 緒言

歯周病は小動物臨床で罹患率が非常に高い口腔内疾患である。歯周病になった場合の治療方法は、麻酔下で行う歯石除去が一般的であるため、罹患動物に対する負担も大きい。そのため負担が軽減できる予防、治療のための歯周病ワクチンが求められている。

歯周病の原因菌として *Porphyromonas gingivalis* が歯周病の動物から高率に検出される。本菌は口腔上皮細胞に接着し、直接細胞を傷害することで炎症を引き起こす。そのため、*P. gingivalis* の感染防御に有効な免疫応答を口腔粘膜局所に誘導できる粘膜ワクチンが歯周病の予防、治療に有効であると考えられるが、これまで小動物の歯周病に対する粘膜ワクチンは開発されていない。

粘膜免疫を誘導するためには、ワクチン抗原が粘膜面を介して取り込まれ、粘膜免疫誘導組織に効率よく送達される必要がある。近年、粘膜免疫誘導組織にワクチン抗原を送達させるシステムとして人工マイクロカプセルであるリポソームが注目されている。リポソームはその膜上に病原体の抗原物質を再構成できるだけでなくカプセル内に封入することもでき、さらには、自身のアジュバント機能により免疫応答の誘導をより有効なものとするように働く。そのためワクチンキャリアーとしての応用研究が多くなされている。

これまで我々の研究グループは、効率の良い免疫誘導能をリポソームに持たせるために pH 感受性膜融合高分子 (MGluPG) を修飾したリポソームを構築した。これは樹状細胞に対して指向性を持ち、高い免疫応答を誘導できることから、小動物の歯周病の予防、治療のための粘膜ワクチンとして応用が可能である。本研究では小動物の歯周病予防、治療のための粘膜ワクチンの開発を目的として、MGluPG 修飾リポソーム (pH 感受性リポソーム) に *P. gingivalis* 破砕抗原を封入した粘膜ワクチンを作成し、粘膜ワクチンとしての評価を試みた。

## 第一章 点眼投与による免疫応答の解析

小動物のワクチン投与のし易さを考慮し、口腔内に粘膜免疫応答を誘導するためには涙道関連リンパ組織を介したワクチン投与 (点眼投与) が適していると考えられる。本章の第一節では、モデル抗原として卵白アルブミン (OVA) を使用し、OVA 封入 pH 感受性リポソームワクチンを犬に対して点眼投与し、ワクチン投与が犬の血清ならびに唾液中に免疫応答を誘導できるかについて調べ、第二節においては、不活化 *P. gingivalis* 破砕抗原封入 pH 感受性リポソームワクチンの点眼投与により、血清ならびに唾液中に抗原特異的免疫応答が誘導されるかについて解析した。

### 第一節 OVA 封入 pH 感受性リポソームワクチンの点眼投与による免疫応答の解析

ビーグル犬に対して、OVA 封入 pH 感受性リポソームワクチンを点眼投与し、血清および唾液中における抗体の誘導について ELISA 法で調べた。その結果、血清中においては抗 OVA-IgG 抗体の有意な誘導が認められなかったが、唾液中においては抗 OVA-IgA 抗体の有意誘導が認められ、抗原を封入した pH 感受性リポソームワクチンの点眼投与により口腔粘膜局所に免疫応答を誘導できることが示された。

### 第二節 不活化 *P. gingivalis* 破砕抗原封入 pH 感受性リポソーム点眼ワクチンによる免疫応答の解析

ビーグル犬に対して、不活化 *P. gingivalis* 破砕抗原封入 pH 感受性リポソームワクチン (歯周病点眼ワクチン) を点眼投与し、血清中および唾液中の抗体価を ELISA 法で調べた。さらに、誘導された抗体が *P. gingivalis* 菌体表面抗原を認識するかについて凝集試験により調べた。その結果、ワクチン投与群では、初回免疫後 4 週目以降の血清ならびに唾液中にそれぞれ抗 *P. gingivalis*-IgG 抗体、抗 *P. gingivalis*-IgA 抗体の有意な上昇が確認された。また、凝集試験では、初回免疫後 4 週目以降の血清と初回免疫後 6 週目の唾液において有意に高い凝集素価を認めた。以上の結果から、歯周病点眼ワクチンは、血清および唾液中に *P. gingivalis* 菌体抗原を認識する抗体を誘導できることが示された。

## 第二章 *In vitro* における感染防御の解析

本章においては唾液中に誘導された抗体が *P. gingivalis* の持つ歯周病発症に関わ

る因子を抑制できるかについて *in vitro* で解析し、感染防御効果を評価した。

#### 第一節 *P. gingivalis* の HeLa 細胞への付着性に対する抑制効果の解析

歯周病は、歯肉上皮細胞への *P. gingivalis* が付着・増殖することにより発症するため、付着を抑制できれば、歯周病の発症抑制につながる。第一節では HeLa 細胞を歯肉上皮細胞のモデルとして使用し、*P. gingivalis* の HeLa 細胞への付着を唾液中に誘導された抗体が抑制できるかについて解析した。その結果、ワクチン投与群由来の唾液は、コントロール群由来の唾液と比べて *P. gingivalis* の HeLa 細胞への付着を有意に抑制し、歯周病点眼ワクチン投与により唾液中に誘導された抗体が、歯肉上皮細胞への *P. gingivalis* の付着を抑制できる可能性が示された。

#### 第二節 *P. gingivalis* と *Actinomyces naeslundii* の共凝集に対する抑制効果の解析

*P. gingivalis* は口腔内細菌の一種である *A. naeslundii* と共凝集することでバイオフィルムを形成し、口腔内環境において薬剤に対する抵抗性を獲得とともに細菌性の因子の刺激によって歯周病を進行させる。そのため、バイオフィルムの抑制は歯周病の進行予防につながる。第二節では *P. gingivalis* と *A. naeslundii* の共凝集を唾液中に誘導された抗体が抑制できるかについて解析した。その結果、ワクチン投与群由来の唾液においては、初回免疫後 4 週目以降の唾液に有意な共凝集抑制抗体価の上昇が認められ、歯周病点眼ワクチン投与により唾液中に誘導された抗体が、*P. gingivalis* と口腔内細菌との共凝集によるバイオフィルム形成を阻害し、歯周病の進行を抑制できる可能性が示された。

#### 第三節 *P. gingivalis* の口腔上皮細胞傷害性に対する抑制効果の解析

歯周病に関連する様々な病態は、*P. gingivalis* が産生するプロテアーゼにより歯肉細胞が傷害されることにより起こる。そのため、歯肉細胞に対する *P. gingivalis* の細胞傷害性の抑制は、歯周病の病態改善に繋がる。第三節では、ヒトの口腔上皮細胞である FaDu 細胞を歯肉細胞のモデルとして使用し、*P. gingivalis* の FaDu 細胞に対する細胞傷害性を唾液中に誘導された抗体が抑制できるかについて解析した。その結果、ワクチン投与群由来の唾液は、コントロール群由来の唾液と比べて *P. gingivalis* の FaDu 細胞に対する細胞傷害性を有意に抑制し細胞生存率を高めることが確認され、歯周病点眼ワクチン投与により唾液中に誘導された抗体が歯肉細胞に対する *P. gingivalis* の細胞傷害性を抑制できる可能性が示された。

### 第三章 歯周病罹患動物に対するワクチン接種による治療効果の評価

本章においては、歯周病点眼ワクチンを歯周病罹患した犬と猫に対して接種し、その治療効果について評価した。

#### 第一節 歯周病罹患犬に対する治療効果の評価

ワクチン接種による治療効果の評価は、歯周病の臨床症状である歯肉充血、歯肉

出血、歯肉腫脹および口臭について、それぞれの臨床スコア判定基準に基づいて個体別に評価するとともに個体別に各臨床スコアを積算した総合臨床スコアについても評価した。その結果、ワクチン投与群で歯肉出血スコアに有意な改善は見られなかったものの、歯肉充血、歯肉腫超、口臭の各スコアが2回免疫後2週目で有意に改善した。一方、コントロール群ではいずれの臨床スコアにおいても改善が見られず、歯肉出血スコアにおいては悪化した。総合臨床スコアでもワクチン投与群では2回免疫後2週目で有意な改善が認められた。これらの結果から、歯周病点眼ワクチンが、犬の歯周病に対して治療効果を持つ可能性が示された。

## 第二節 歯周病罹患猫に対する治療効果の評価

第一節と同様に臨床スコアならびに総合臨床スコアについて評価した。その結果、ワクチン投与群で歯肉腫脹スコアに有意な改善は見られなかったものの、歯肉充血、歯肉出血、口臭の各スコアが2回免疫後2週目で有意に改善した。一方、コントロール群ではいずれの臨床スコアにおいても改善が見られず、口臭スコアにおいては悪化した。総合臨床スコアはワクチン投与群では1回免疫後2週目で有意な改善が認められた。これらの結果から、歯周病点眼ワクチンが、猫の歯周病に対して治療効果を持つ可能性が示された。

## 総括

小動物の歯周病予防、治療のための粘膜ワクチンの開発を目的として、MGluPG修飾リポソームに *P. gingivalis* 破砕抗原を封入した点眼ワクチンを作成し、犬における免疫応答ならびに誘導された唾液抗体による *in vitro* での感染防御効果についての解析と歯周病罹患動物に対する治療効果についての評価により以下の結果を得た。

1. 歯周病点眼ワクチンは、犬において全身および口腔粘膜局所に *P. gingivalis* に対する免疫応答を誘導できることが示された。
2. 歯周病点眼ワクチン投与により、唾液中に誘導された抗体は、*P. gingivalis* の持つ歯周病発症に関わる因子を抑制できることが示された。
3. 歯周病点眼ワクチンは、犬、猫の歯周病に対して治療効果を持つことが示された。

## 審査結果の要旨

歯周病は小動物臨床で罹患率が非常に高い口腔内疾患である。歯周病は主に *Porphyromonas gingivalis* が口腔上皮細胞に接着し、直接細胞を傷害することで引き

起こる。そのため、*P. gingivalis* の感染防御に有効な免疫応答を口腔粘膜局所に誘導できる粘膜ワクチンが歯周病の予防、治療に有効であると考えられる。しかし、これまで小動物の歯周病に対する粘膜ワクチンは開発されていない。

粘膜局所に免疫を誘導するためには、粘膜面を介してワクチン抗原を粘膜免疫誘導組織に効率よく送達させる必要がある。近年、粘膜免疫誘導組織へのワクチン抗原送達システムとして pH 感受性膜融合高分子 (3-methylglutarylated poly(glycidol) (MGLuPG)) を修飾したリポソームが注目されているが、小動物領域への応用研究はない。本研究では、小動物の歯周病予防、治療のための粘膜ワクチン開発の可能性を明らかにするために、犬を用いて *P. gingivalis* 破砕抗原を封入させた MGLuPG 修飾リポソーム (pH 感受性リポソーム) の歯周病に対する粘膜ワクチンとしての評価を行い、以下の結果を得た。

第1章では、犬に対する粘膜ワクチンの点眼投与による免疫応答の解析を行った。第1節では、モデル抗原として卵白アルブミン (OVA) を封入した pH 感受性リポソームワクチンをビーグル犬に対して点眼投与し、血清および唾液中における抗体の誘導について調べた。その結果、血清中においては抗体の有意な誘導が認められなかったが、唾液中では抗 OVA-IgA 抗体の有意誘導が認められ、ワクチンの点眼投与により口腔粘膜局所に免疫応答を誘導できることが示された。第2節では、ビーグル犬に対して、*P. gingivalis* 破砕抗原封入 pH 感受性リポソームワクチンを歯周病ワクチンとして点眼投与し、血清および唾液中の抗原特異的抗体応答を解析するとともに、誘導された抗体が *P. gingivalis* 菌体を認識できるか凝集試験により調べた。その結果、血清ならびに唾液中にそれぞれ *P. gingivalis* に対する IgG 抗体、IgA 抗体の有意な上昇が確認され、また凝集試験においても有意に高い凝集素価を血清と唾液に認めた。以上の結果から、歯周病点眼ワクチンは、血清および唾液中に *P. gingivalis* 菌体抗原を認識する抗体を誘導できることが示された。

第2章では、唾液中に誘導された抗体が *P. gingivalis* の持つ歯周病発症に関わる因子 (歯肉上皮細胞への付着性、口腔内細菌との共凝集性、口腔上皮細胞に対する傷害性) を抑制できるかについて調べ、感染防御効果を *in vitro* で評価した。第1節では、HeLa 細胞を歯肉上皮細胞のモデルとして使用し、*P. gingivalis* の細胞への付着を唾液中に誘導された抗体が抑制できるかについて解析した。その結果、唾液中に誘導された抗体が *P. gingivalis* の HeLa 細胞への付着を有意に抑制したことから、歯肉上皮細胞への *P. gingivalis* の付着を唾液中に誘導された抗体が抑制できる可能性が示された。第2節では、*P. gingivalis* と口腔内細菌の一種である *A. naeslundii* の共凝集を唾液中に誘導された抗体が抑制できるかについて解析した。その結果、唾液中に誘導された抗体が *P. gingivalis* と *A. naeslundii* の共凝集を抑制したことから、歯周病点眼ワクチン投与により唾液中に誘導された抗体が *P. gingivalis* と口腔内細菌との共凝集によるバイオフィーム形成を阻害し、歯周病の進行を抑制できる可能性が示された。第3節では、ヒトの口腔上皮細胞である FaDu 細胞を歯肉細胞のモデルとして使用し、*P. gingivalis* の FaDu 細胞に対する細胞傷害性を唾液中に誘導された抗体が抑制できるかについて解析した。その結果、唾液中に誘導された抗体が、*P. gingivalis* の FaDu 細胞に対する細胞傷害性を有意に抑制したことから、歯周病点眼ワクチン投与により唾液中に誘導された抗体が歯肉細胞に対する *P.*

*gingivalis* の細胞傷害性を抑制できる可能性が示された。

第3章では、歯周病点眼ワクチンを歯周病罹患した犬と猫に対して投与し、歯周病の臨床症状である歯肉充血、歯肉出血、歯肉腫脹および口臭について各臨床スコア判定基準を基にした治療効果と各臨床スコアを積算した総合臨床スコアを基にした治療効果について評価した。第1節では、歯周病罹患犬に対するワクチン投与による治療効果の評価を行った。その結果、ワクチン投与により、歯肉充血、歯肉腫超、口臭の各スコアが有意に改善した。総合臨床スコアもワクチン投与により有意な改善が認められた。これらの結果から、歯周病点眼ワクチンが、犬の歯周病に対して治療効果を持つ可能性が示された。第2節では、歯周病罹患猫に対するワクチン投与による治療効果の評価を行った。その結果、ワクチン投与により、歯肉充血、歯肉出血、口臭の各スコアが有意に改善した。総合臨床スコアもワクチン投与により有意な改善が認められた。これらの結果から、歯周病点眼ワクチンが、猫の歯周病に対して治療効果を持つ可能性が示された。

本研究では、MGluPG 修飾リポソーム (pH 感受性リポソーム) を応用した歯周病点眼ワクチンは、犬において全身および口腔粘膜局所に *P. gingivalis* に対する免疫応答を誘導できること、また、歯周病点眼ワクチン投与により唾液中に誘導された抗体は、*P. gingivalis* の持つ歯周病発症に関わる因子を抑制できること、さらに、歯周病点眼ワクチンは、犬、猫の歯周病に対して治療効果を持つことが示され、小動物の歯周病予防、治療のための粘膜ワクチンの開発の可能性を明らかにした。この研究成果は、臨床獣医学、免疫学の研究分野に大きく貢献し、新たな展開に資するものであり、最終試験の結果と併せて、博士 (獣医学) の学位を授与することを適当と認める。