

氏名 たかうちあやの 高内綾乃  
学位 博士 (歯学)  
学位記番号 新大院博 (歯) 第 29 号  
学位授与の日付 平成 17 年 3 月 23 日  
学位授与の要件 学位規則第 3 条第 3 項該当  
博士論文名 The trans-chromosomal mouse-derived human monoclonal antibody promotes phagocytosis of *Porphyromonas gingivalis* by neutrophils.  
(トランスクロモマウス由来ヒト特異的抗体は好中球による歯周病原性細菌 *Porphyromonas gingivalis* の貪食を賦活する)

論文審査委員 主査 教授 吉江弘正  
副査 教授 織田公光  
教授 星野悦郎

#### 博士論文の要旨

##### 【目的】

歯周病原性細菌である *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*) は、慢性歯周炎の主要病原細菌であり、歯肉溝内において歯肉の炎症や歯周組織破壊、および歯槽骨の喪失を引き起こす。特に、40-kDa 外膜タンパク (40-kDa OMP) は *P. gingivalis* 菌体間で共通に存在しており、40-kDa OMP に対する特異抗体が *P. gingivalis* のもつ他菌体との共凝集を抑制し、殺菌、オプソニン活性に関与することが報告されている。

この抗体療法は歯周病原性細菌に特異な抗体を歯周ポケット内に投与することで、貪食細胞による効率的な賦活化をはかり、歯周病原性細菌を除去することにある。近年ヒト抗体遺伝子を全て保有するトランスクロモ (TC) マウスが開発され、ヒト特異抗体の効率的な作製が可能となった。そこで本研究では、TC マウスより *P. gingivalis* 40-kDa OMP に対するヒト特異抗体を獲得し、好中球 (PMN) の *P. gingivalis* 貪食能賦活化におけるヒト特異抗体の有効性について検証した。

##### 【方法】

###### 1. ヒト特異抗体の作製

TC マウスを *P. gingivalis* リコンビナント 40-kDa OMP にて免疫し、IL-6 にて B 細胞を活性化後、脾臓を摘出しマウスミエローマ細胞と融合させ、抗 40-kDa OMP 抗体を作製した。獲得した TC マウス由来ヒト特異抗体は、プロテイン A カラムにて精製し、ジニト

ロフェニル(DNP)にて免疫した TC マウス由来ヒト特異抗体をコントロール抗体とした。

## 2. 抗体特異性の評価

抗原とするリコンビナント 40-kDa OMP を用い、一次抗体としてハイブリドーマ上清と培養・洗浄後、二次抗体としてウサギ抗ヒト IgG Fc と培養し発色後、450nm にて ELISA 測定した。また、ヒト特異抗体と *P. gingivalis* 40-kDa OMP 間での CM5 センサーチップ表面における相互作用を BIACORE<sup>®</sup>2000 にて測定した。

## 3. 貪食活性測定

インフォームドコンセントの得られた健常者より採取した末梢血 (PB) を比重遠心法にて PMN を分離後、FITC 標識した *P. gingivalis* (*P. gingivalis* 381、W50、W83、Su 63) 熱処理菌体と培養し、フローサイトメーターにて貪食能を測定した。

ヒト特異抗体群およびコントロール群の抗 40-kDa OMP 抗体間における好中球による貪食活性の差違は、Mann-Whitney *U* 検定にて解析した。

### 【結果】

1. 抗 40-kDa OMP 抗体として、全て IgG タイプ (IgG1:84 クローン、IgG2:11 クローン、IgG4:4 クローン) であり、合計 99 クローンの作製に成功した。
2. ヒト特異抗体濃度での好中球による貪食率は、IgG1 ヒト特異抗体で、有意な貪食能賦活化の増加を認めた ( $P < 0.05$ )。また、IgG1 抗体:1ng/mL で 60 分の至適培養時間となり、IgG1 ヒト特異抗体において 30 分、60 分、120 分の培養時間いずれにおいても有意に高い貪食率が得られた ( $P < 0.05$ )。
3. 4 種の *P. gingivalis* 菌株 (*P. gingivalis* 381、W50、W83、Su 63) に対して、抗 40-kDa OMP 抗体は同程度に高いオプソニン活性を示した。

### 【考察】

歯周炎において、*P. gingivalis* は病原細菌の代表であり、その発症、進行と深くかかわりをもっている。とくに *P. gingivalis* の有するタンパク分解酵素は、免疫グロブリンを分解して病原性を発揮する。*P. gingivalis* の生息する歯肉溝、歯周ポケット内には生体からの好中球が多数浸潤しており、細菌との応答において細菌増殖を抑制している。この細菌抑制効果に特異的抗体は重要な役割を担っている。

本研究で得られた *P. gingivalis* 40-kDa OMP に特異的ヒト型抗体は、好中球による貪食能を著しく促進させ、従来の特異抗体と比較して、100,000 倍の効力を有することが認

められた。 *P. gingivalis* には、免疫グロブリンや補体を溶解する酵素を有しており、これが歯周炎の病因と深くかかわっているが、本研究で作成したヒト型抗体は溶解することなく、*P. gingivalis* を貪食する防御抗体としての機能を示した。歯周病原細菌に対する受動免疫研究は、以前より多く報告されており、マウスの単一感染モデルで *P. gingivalis* の排除ならびに再定着阻止が認められていることから、このヒト型抗体も十分に受動免疫効果で得られると推定される。この細菌排除ならびに再定着阻止には、*P. gingivalis* の凝集ばかりでなく、好中球の貪食能亢進が蜜に関与していると考えられる。

### 【結論】

本研究により、*P. gingivalis* 40-kDa OMP に対する TC マウス由来ヒト特異抗体は、好中球による *P. gingivalis* の貪食能を賦活化させ、歯周ポケット内投与による免疫療法の可能性が示唆された。

### 審査結果の要旨

本論文では、TC マウスより *P. gingivalis* 40-kDa OMP に対するヒト特異抗体を獲得し、好中球 (PMN) の *P. gingivalis* 貪食能賦活化におけるヒト特異抗体の有効性について検証した。TC マウスを *P. gingivalis* リコンビナント 40-kDa OMP にて免疫し、脾臓を摘出しマウスミエローマ細胞と融合させ、ヒト特異抗体、抗 40-kDa OMP 抗体を作製した。抗体特異性の評価は、ヒト特異抗体と *P. gingivalis* 40-kDa OMP 間での CM5 センサーチップ表面における相互作用を BIACORE<sup>®</sup>2000 にて測定した。貪食活性測定は健常者より採取した末梢血 (PB) を比重遠心法にて PMN を分離後、FITC 標識した *P. gingivalis* (*P. gingivalis* 381、W50、W83、Su 63) 熱処理菌体と培養し、フローサイトメーターにて貪食能を測定した。ヒト特異抗体群およびコントロール群の抗 40-kDa OMP 抗体間における好中球による貪食活性の差違は、Mann-Whitney *U* 検定にて解析した。その結果、

ヒト特異抗体濃度での好中球による貪食率は、IgG1 ヒト特異抗体で、有意な貪食能賦活化の増加を認めた。また、IgG1 抗体 : 1ng/mL で 60 分の至適培養時間となり、IgG1 ヒト特異抗体において 30 分、60 分、120 分の培養時間いずれにおいても有意に高い貪食率が得られた。さらに、4 種の *P. gingivalis* 菌株 (*P. gingivalis* 381、W50、W83、Su 63) に対して、抗 40-kDa OMP 抗体は同程度に高いオプソニン活性を示した。本研究により、

*P. gingivalis* 40-kDa OMP に対する TC マウス由来ヒト特異抗体は、好中球による *P. gingivalis* の貪食能を賦活化させ、菌周ポケット内投与による免疫療法の可能性が示唆された。

本研究で得られた *P. gingivalis* 40-kDa OMP に特異的ヒト型抗体は、好中球による貪食能を著しく促進させ、従来の特異抗体と比較して、100,000 倍の効力を有することが認められたことは興味深い。*P. gingivalis* には、免疫グロブリンや補体を溶解する酵素を有しており、これが歯周炎の病因と深くかかわっているが、本研究で作成したヒト型抗体は溶解することなく、*P. gingivalis* を貪食する防御抗体としての機能を示した。このことは、受動免疫として十分効果が得られると推定される。いずれにしても、本研究で作成したヒト型抗体は、極めて有効性の高い、新規性のあるものであり、本研究を学位論文として、価値あるものと認める。