

学位論文審査の要旨

論文提出者	鶴田 はねみ
論文審査委員	(主査) 朝日大学歯学部 教授 二階堂 徹 (副査) 朝日大学歯学部 教授 近藤 信夫 (副査) 朝日大学歯学部 教授 柏俣 正典
論文題目	ブラジル産グリーンプロポリスおよびその主要成分が 活性化Tリンパ球のサイトカイン産生に及ぼす作用
論文審査の要旨	<p>プロポリスは、ミツバチが生産する天然の樹脂性滲出液として多数の植物抽出物を含み、抗炎症、抗寄生虫、抗真菌、抗腫瘍などの生物学および薬理学的作用を発揮することから、各地で民間治療薬として使用されてきた。歯科領域でも、プロポリスと水酸化カルシウムとの組み合わせが覆髄や根尖性歯周炎に有効である可能性が示されている。また、プロポリスは複雑な免疫調節作用を有し、細胞系や疾患の種類に応じた様々な生理活性を発揮しうることが知られている。実際にワクチンのアジュバントとして免疫増強作用を示す一方、自己免疫疾患の治療にも効果が期待されている。ブラジル産グリーンプロポリス (BGP) とその主要成分であるアルテピリン C (Art-C) は、移植抗原で活性化された T リンパ球を阻害し、炎症性サイトカインの発現を抑制することが報告されているが、実際にどのような機構を介して免疫制御するかの詳細については十分に検討されていない。そこで本研究では、活性化 T リンパ球のサイトカイン産生に対する BGP と Art-C の免疫調節作用を比較し、その調節メカニズムの解明を試みた。</p> <p>BGP は秋田屋本店より供与された。Art-C (富士フイルム和光)、ストア依存性カルシウムチャネル TRPA1 に対する特異的阻害剤 HC030031 (Sigma-Aldrich)、およびカルシウムの細胞内への流入を促進するカルシウムイオノフォア A23187 (富士フイルム和光) を用いた。24 週齢の雄 C3H/HeN マウス (中部科学資材) より、脾細胞を摘出し、400 万個の脾細胞を懸濁した 10% 牛胎児血清含有 RPMI 培地 (Sigma-Aldrich) に様々な希釈倍率または濃度に調製した BGP または Art-C を混合し、抗 CD3 モノクローナル抗体を固相化した 96 ウェルプレートに播種した。5%CO₂ 存在下 37 °C で 48 時間 T リンパ球を特異的に刺激培養した後に上清を回収し、IFN-γ、IL-2、IL-4、IL-6、IL-10、IL-17 の濃度を酵素結合免疫吸着法 (ELISA, R&D Systems または BD Bioscience) にて測定した。Art-C による IL-2 産生促進機構を解明するために、脾細胞を、抗 CD3 モノクローナル抗体を固相化した 12 ウェルプレートに播種し、Art-C 希釈液または A23187、および HC030031 と共培養し、上清中の IL-2 産物を ELISA によって測定するとともに、脾細胞の RNA を抽出して IL-2 mRNA レベルを定量的 PCR で測定した。IL-2 mRNA 発現レベルは、内部コントロールの RPS5 発現によって補正した。</p> <p>本実験は朝日大学動物実験専門委員会の審査、承認を得て行った。(承認番号: 21-018)</p>

本研究から得られた結果は以下の通りである。

1. 刺激脾細胞の生存が十分維持される低濃度域で、BGP および Art-C は共に INF- γ 、IL-6、IL-17 産生を抑制したが、IL-4 や IL-10 の産生は抑制しなかった。一方、それらは IL-2 産生を顕著に促進した。
2. IL-2 mRNA 発現を経時的に観察すると、コントロール群、Art-C 添加群、A23187 添加群において、3 時間から 12 時間後にかけて上昇したが、これら 3 群間でその発現量に有意な差は認められなかった。
3. IL-2 産生量の変化を経時的に観察すると、コントロール群では、24 時間後にピークとなり、48 時間後には顕著に低下したのに対して、Art-C 添加群では、36 時間後にコントロールよりも有意に高いピークに達し、48 時間後にも 1/2 程度が維持され、A23187 添加群では、12 時間から上昇し 36 時間で Art-C 添加群と同等のレベルに達し、48 時間後でも高いレベルを維持していた。一方、HC030031 存在下では、Art-C 群の産生が最大 74 %減少してピークが消失した。

以上の結果より、Art-C は単独で BGP と同様に活性化 T リンパ球のサイトカイン制御を行うことが示され、免疫制御に係る BGP 成分の中で、Art-C が中心的役割を担うことが示唆された。さらに Art-C は IL-2 産生を、mRNA 発現レベルでは促進しないが、翻訳または分泌制御レベルで顕著に促進することが示された。この効果は HC030031 存在下で阻害され、また Art-C と同様の促進効果は A23187 の存在下でも引き起こされたことから、Art-C による IL-2 産生促進機構には、TRPA1 チャネルを介した Ca²⁺流入が関与することが示唆された。

本研究で得られた知見は、新たな歯科材料の開発にもつながる価値の高いものであり、歯科材料学、歯冠修復学の発展に大いに貢献するものと考えられる。よって審査委員は、本論文を博士（歯学）の学位を授与するに値すると判定した。