原 著

歯周疾患患者血中のスピロヘータ抗体の検出

中 村 義 則 梅 本 利 彦 中 谷 至 宏

野 田 充 宏 並 河 勇

朝日大学歯学部口腔細菌学教室（主任：並河 勇教授）

〔1993 年 9 月 1 日受理〕

Detection of antibodies against spirochetes in sera of periodontal patients

Yoshinori Nakamura, Toshihiko Umemoto, Yoshihiro Nakatani,
Mitsuhiro Noda and Isamu Namikawa

Department of Oral Microbiology, School of Dentistry, Asahi University
(Chief : Prof. Isamu Namikawa)

Hozumi-cho, Motosu-gun, Gifu, 501-02 Japan

〔Accepted for publication : September 1, 1993〕

Key words : Oral spirochetes / serum antibody / periodontal disease / polypeptide antigens

Abstract : Human oral spirochetes found in large numbers in periodontal pockets seem to be a potent immunogen. In order to determine the antibody-producing proteins of spirochetes, sera were collected from 25 subjects between 12 and 45 years of age, including 6 periodontally healthy subjects and 19 periodontal patients, and the serum was reacted with polypeptides from *Treponema denticola*, *T. socranskii*, *T. phagedenis*, *T. pallidum* and a human oral intermediate-sized isolate strain G7201. Immunoblot analyses demonstrated that the 34 kDa, 38 kDa, 52 kDa, 66 kDa and 72 kDa polypeptides from *T. denticola* ATCC 33520 and ATCC 35404, the 34 kDa, 45 kDa, 66 kDa, 78 kDa and 83 kDa polypeptides from *T. socranskii* subsp. *buccale* ATCC 35534, the 34 kDa and 66 kDa polypeptides from the G7201 strain, the 18 kDa, 32 kDa, 34 kDa, 50 kDa, 62 kDa, and the 66 kDa and 84 kDa polypeptides from *T. pallidum* ATCC 27087 and the *T. phagedenis* biotype Kazan 8 reacted with the sera of some periodontal patients. Of the six sera from healthy subjects one reacted with the 18 kDa polypeptide from the *T. pallidum* and *T. phagedenis* biotype Kazan. While the antibody-producing polypeptides with molecular sizes of 41 kDa, 45 kDa, 52 kDa, 62 kDa, 66 kDa, 72 kDa, 83 kDa and 84 kDa were from the outer envelopes or the wall-membrane complexes, the 34 kDa and 38 kDa polypeptides were from the axial flagella. The antibodies against the major polypeptides from the outer envelopes, wall-membrane complexes and axial flagella of oral spirochetes may contribute to progressive inflammation and destruction of periodontal tissues in humans.

抄録：抗体産生に関与するスピロヘータ菌体タンパク質を検討するために、*Treponema denticola* ATCC 33520 株と ATCC 35404 株、*T. socranskii* subsp. *buccale* ATCC 35534 株、*T. phagedenis* Reiter 株と Kazan 8 株、*T. pallidum* ATCC 27087 株およびヒト口腔から分離した中型の G7201 株を含む 5 種 7 菌株の菌体タンパ

ク質と歯周疾患患者血清との反応をイムノブロット法で検討した。19名の歯周疾患患者のうち12名の血中には、口腔スピロヘータ菌体の被膜タンパク質、壁膜複合体タンパク質、軸鞭毛タンパク質あるいは局在未決定のタンパク質抗原に加え、*T. phagedenis* と *T. pallidum* のタンパク質抗原とも反応する抗体が確認された。一方、6名の健常者では口腔スピロヘータの菌体タンパク質抗原との反応は認められなかった。被膜および軸鞭毛タンパク質に対する血中抗体は歯周組織の傷害過程に口腔スピロヘータが関与する可能性を示す。

緒 言

ヒトの歯周ポケットにはらせん状で活発に運動するスピロヘータと総称される一群の微生物が生息し、他の細菌種に対する本菌の相対的な菌量が著しく増加し、ときには30%前後に達するまで増加することはよく知られている¹⁾。このような細菌は宿主に対して免疫原であることが推定される。事実、歯周疾患患者の血中にはスピロヘータ抗原に対する抗体が検出されることがある^{2,3)}。一般的に、スピロヘータの被膜表層あるいは軸鞭毛などの菌体タンパク質は有力な抗原であると考えられ、これらの菌体抗原に対し産生される抗体は、抗原に由来する菌体に対して感染防御的に作用したりあるいは局所で形成される抗原抗体複合体が最終的に炎症反応に関与し、歯周組織の傷害に関与することが推定される^{4,5)}。

Umemoto ら^{6,7)}はヒト口腔スピロヘータ *Treponema denticola* ATCC 33520 由来の分子量 53,000 ダルトン (53 kDa) のタンパク質に関して、菌体内局在、抗原性および歯周疾患の病型との関連について報告した。最近、われわれも *Treponema denticola* を含むスピロヘータの主要な菌体抗原の種類と抗原の菌体内局在、宿主細胞と直接的に接触する菌体表層の微細構造と菌体抗原の分布状況について報告した⁸⁻¹⁰⁾。これら一連の実験結果から、スピロヘータに由来する菌体タンパク質抗原は有効な免疫原であることが示唆された。

そこで、今回、臨床において歯周疾患患者の血中に実際的にどのようなスピロヘータ抗体が検出されるかを健常人のそれと比較検討することを目的として実験を行った。これらの知見は、歯周疾患に発症あるいはその病態におけるスピロヘータそのものの直接的、あるいは間接的な役割について有益な示唆を与えるものと思われる。

材料および方法

1. 供試細菌と培養

供試したスピロヘータはヒト口腔由来の *Treponema denticola* ATCC 33520 株および ATCC 35404 株、梅毒

スピロヘータ *T. pallidum* の細胞壁変異株である ATCC 27087 株、*T. phagedenis* の生物型 Reiter 株と Kazan 8 株、*T. socranskii* subsp. *buccale* ATCC 35534 株およびわれわれが分離した中型サイズの *Treponema* sp. G7201 株の5種7菌株である⁹⁾。

使用した培地は、*T. denticola*, *T. phagedenis* および G7201 株では Trypticase soy-yeast extract-gelatin-volatile fatty acids-serum (以下 TYGVS と略) 培地¹¹⁾ を、*T. pallidum* ATCC 27087 では *Treponema* 培地¹²⁾ を、*T. socranskii* では NOS スピロヘータ培地¹²⁾ をそれぞれ使用した。嫌気性混合気体 (85% N₂ 10% H₂ 5% CO₂) による嫌気培養装置 (平沢、東京) 内で 37°C, 4 日間培養を行った。

2. ポリアクリルアミドゲル電気泳動法

Laemmli の方法¹³⁾によるドデシル硫酸塩ポリアクリルアミドゲル電気泳動法 (SDS-PAGE) で、調製した菌体試料のタンパク質パターンの比較を行った。8 cm×7 cm, 厚さ 1 mm の 10%ポリアクリルアミドゲルのスラブゲルを用いた。一定のタンパク質量の菌体試料と等量の試料緩衝液 [0.125 M トリス塩酸緩衝液, 4%ドデシル硫酸ナトリウム, 20%グリセリン, 10%2-メルカプトエタノールを含む] と混合し、100°C, 5分間の熱処理を行ったものを試料 (タンパク質量 30 μg/レーン) とした。電気泳動装置は Mini-PROTEAN II (Bio-Rad, Richmond, Ca., U.S.A.) を使用し、ゲル当り 20 mA の通電量で電気泳動を行った。終了後、直ちに通法によるクマシーブリリアントブルー G 250 (半井化学、京都) でタンパク質染色を施した。

3. イムノブロット法

Towbin ら¹⁴⁾の方法に準拠した方法で行った。供試細菌試料中の構成タンパク質を、上記の SDS-PAGE でアクリルアミドゲル上で分離した後ニトロセルロース膜へ転写した。次に 1%ウシ血清アルブミン-0.5 M 塩化ナトリウム加 0.02 M トリス塩酸緩衝液 (pH 7.5; TBS と略) 中でニトロセルロース膜を 1 時間浸し、非特異反応に関与するタンパク質を被覆した。健常者あるいは歯周疾患患者から採取した、各血清の 100 倍希釈液にニト

Table 1 Clinical parameters of periodontally healthy and diseased subjects

Subject	Age	Sex	Plaque index ^a	Gingival index ^a	Pocket depth (mm) (Min. -max.) ^b
Healthy subjects :					
HH	30	F	0.8	0.5	1.6 (1-4)
KS	24	F	0.8	0.4	1.9 (1-3)
YT	19	F	0.7	0.2	1.4 (1-3)
JO	27	F	1.1	1.1	1.9 (1-3)
TF	22	M	1.2	0.2	1.8 (1-3)
SK	36	M	1.4	0.9	2.0 (1-3)
			1.00+0.28 ^c	0.57+0.37	1.76+0.21 (1-4)
Periodontal patients :					
JN	18	F	1.3	2.1	2.5 (1-5)
HY	18	M	1.8	1.5	3.1 (1-5)
HS	12	M	2.0	1.6	4.2 (2-5)
YT	16	F	1.3	1.4	2.2 (2-4)
MO	20	F	1.8	2.1	4.5 (2-8)
MN	15	F	2.5	1.6	3.5 (2-6)
MT	21	F	1.3	1.7	2.6 (1-4)
YT	45	M	1.9	1.7	3.2 (2-6)
MK	29	M	2.0	1.8	3.3 (2-5)
TK	39	F	2.3	2.1	4.0 (3-9)
SK	35	M	2.2	2.5	3.8 (3-7)
MO	39	F	2.4	1.8	4.0 (2-8)
AS	24	F	1.4	1.6	3.2 (2-3)
MY	38	F	1.8	1.5	4.2 (2-9)
YS	32	F	2.7	2.0	3.1 (2-5)
YK	31	F	2.2	2.0	4.0 (4-5)
SF	29	F	1.7	1.6	3.1 (2-4)
MF	39	F	1.7	1.8	3.7 (3-6)
NO	31	F	0.9	0.6	2.1 (2-3)
			1.80+0.47	1.73±0.40	3.99+0.69 (1-9)

a : Four sites per tooth (central incisors and first molars).

b : Two sites on tooth (remaining teeth except third molars).

c : Means+standard deviation.

ロセルローズ膜を2時間以上振盪して反応させた。次に同膜を0.05% Tween-20 添加 TBS で3回、合計1時間洗浄を行い、最終的に1,000倍希釈したアフィニティ精製 horseradish peroxidase 標識抗ヒト IgG (H+L) ヤギ血清 (Bio-Rad) と室温で2時間反応させた。同様に Tween-20 添加 TBS で膜を洗浄後、酵素基質溶液 [4-クロル-1-ナフトール (ナカライテスク, 京都) 15 mg, メチルアルコール 15 ml, TBS 25 ml, 30% 過酸化水素 15 μ l] 中で30分間振盪して反応の有無を調べた。反応陽性を示した菌体タンパク質バンドの分子サイズと同定は、同一の菌株についての SDS-PAGE で得た染色タンパク質パターンと比較することにより行った。

4. 歯周疾患患者および健常者の選択

歯周疾患患者および健常人の末梢血中に存在するスピロヘータ抗体を検出するために、次の基準に基づいて被験者を選択した。すなわち、歯周疾患患者は一般歯科開業医院に来院した患者の中から、歯肉炎、若年性歯周炎あるいは成人性歯周炎と診断された患者で、年齢12歳から45歳 (平均年齢27.9歳) の男性5名と女性14名、合計19名を対象とした。患者は採血時に全身性疾患を示さずまた過去3カ月以内に抗生物質の投与を受けていないことを確認した。また、健常者については過去に全身性疾患の既往歴を持たずかつ歯周疾患治療を受けていない19歳から36歳 (平均年齢26.3歳) の男子2名女子4名、合計6名である。口腔内検診では、臨床パラメータとしての発赤、腫脹、出血、plaque index, gingival index, 歯

Fig. 1 Coomassie brilliant blue-stained polypeptide patterns of whole cells (30 μ g of protein per lane) from seven treponemes and thirteen selected polypeptide bands, P2 through P16, on an SDS-10% polyacrylamide gel. A human oral isolate strain G7201 (lane 1), *T. pallidum* ATCC 27087 (lane 2), *T. phagedenis* biotypes Kazan 8 (lane 3) and Reiter (lane 4), *T. denticola* ATCC 35404 (lane 5), *T. socranskii* subsp. *buccale* ATCC 35534 (lane 6) and *Treponema denticola* ATCC 33520 (lane 7). The numbers on the left represent the apparent molecular sizes (in kilodaltons, kDa) of the protein standards.

周ポケットの深さあるいは骨吸収について行った。発赤および腫脹については、被験者の残存歯牙の歯肉部位の一方所以上に確認された場合を陽性とした。出血については歯肉溝あるいは歯周ポケット上皮をプローブで軽く擦過し、数秒以内に出血を示した部位を陽性とした。plaque index および gingival index については Silness and Löe¹⁵⁾ の評価法を準用した。被験者の上下顎左右の中切歯と第1大臼歯について4歯面の plaque index および gingival index を評価しその平均値を算出し、歯周ポケットの深さは第3大臼歯を除く残存歯のおのおのについて2点法により計測すると共にその最浅長と最深長(単位 mm)を測定した(Table 1)。表中の患者 MT 以下の13名は成人性歯周炎と診断された。口腔所見の診査後、被験者の正肘静脈から5~10 mlの血液を採取し室内で1時間以上静置した後、通法により血清を分離し、実

験に供するまで-20℃で凍結保存した。

5. タンパク質量の測定

試料中のタンパク質量の測定は Lowry ら¹⁶⁾の方法によった。標準タンパク質としてウシアルブミン(V分画; ナカライテスク, 京都)を使用した。

結 果

1. SDS-PAGE によるスピロヘータの菌体タンパク質

供試した7菌株についてその菌体タンパク質を、10%ポリアクリルアミドゲルを用いた SDS-PAGE で調べた(Fig. 1)。菌株によってはその構成タンパク質パターンは異なるが、総じて約 10 kDa から 200 kDa に渡る分子

Fig. 2 Immunoblots of polypeptides from whole cells of seven treponemes with sera of four periodontally healthy subjects KS, YT, TF and HH. The separated polypeptides from *T. denticola* ATCC 33520 (lane a), *T. socranskii* subsp. *buccale* ATCC 35534 (lane b), *T. denticola* ATCC 35404 (lane c), *T. phagedenis* biotypes Reiter (lane d) and Kazan 8 (lane e), *T. pallidum* ATCC 27087 (lane f) and a human oral isolate strain G7201 (lane g) were reacted with each serum (1 : 100 dilution) from subjects KS, YT, TF and HH. No specific positive reactions are seen except on the 18 kDa protein of *T. phagedenis* biotype Kazan 8 and *T. pallidum* ATCC 27087 with subject HH serum (lanes e and f).

サイズのタンパク質が検出され、特に 20 kDa から 100 kDa の範囲の分子サイズを有するタンパク質が多かった。*T. phagedenis* の 2 種の生物型のタンパク質パターンは *T. pallidum* ATCC 27087 株のそれらときわめて類似していた (Fig. 1, lanes 2, 3, 4)。これらのタンパク質バンドから比較的タンパク質量が大で、隣接するバンドが少なくかつ分子サイズが異なるものについて注目した。すなわち、G7201 株から分子サイズが 44 kDa の P2 タンパク質と 34 kDa の P3 タンパク質、*T. pallidum* ATCC 27087 株から 84 kDa の P4 タンパク質と 62 kDa の P5 タンパク質、*T. phagedenis* Kazan 8 株から 66 kDa の P6 タンパク質と 41 kDa の P8 タンパク質、*T. denticola* ATCC 35404 株から 72 kDa の P9 タンパク質、52 kDa の P10 タンパク質そして 38 kDa の P11

タンパク質、*T. socranskii* subsp. *buccale* ATCC 35534 株の 83 kDa の P13 タンパク質、48 kDa の P14 タンパク質そして 45 kDa の P15 タンパク質、*T. denticola* ATCC 35520 株から 53 kDa の P16 タンパク質、の 13 種類のタンパク質抗原である。

2. 歯周疾患患者血中のスピロヘータ抗体の検出

Treponema 菌体のタンパク質抗原に対する抗体をイムノブロット法で検討した。6 名の健常者の血清中には、供試した口腔スピロヘータ菌体由来のタンパク質抗原に対する抗体は検出されなかった。しかし、1 名 (患者 HH) の血中に *T. phagedenis* Kazan 8 株 (Fig. 2, lane e) および *T. pallidum* ATCC 27087 株 (Fig. 2, lane f) の 18 kDa タンパク質抗原と反応する抗体が検出され

Fig. 3 Immunoblots of polypeptides from the whole cells of seven treponemes with sera from four periodontal patients JN, HY, MO and MN. Notice relatively thick immunoblots on the 45 kDa P15 antigen of *T. socranskii* subsp. *buccale* ATCC 35534 in patients JN and MN (lane b), the 72 kDa P9 antigen of *T. denticola* in patient MO (lanes a and c), the 66 kDa P6 antigen and the 34 kDa P3 antigen of the strain G7201 in patient MO (lane g), the 52 kDa P10 antigen of *T. denticola* ATCC 35404 (lane c), the 66 kDa P6 antigen, the 50 kDa antigen and the 41 kDa P8 antigens of *T. pallidum* and *T. phagedenis*, and *T. socranskii* in patient HY (lanes d, e and f). See Fig. 2 for the polypeptides applied to each lane.

た。一方、19名の歯周疾患患者のうち12名に7菌株のうち少なくとも1株のタンパク質抗原に対する特異抗体が検出された。すなわち、患者 JN および MN では *T. socranskii* の P15 抗原（分子サイズ 45 kDa）に対する抗体を、患者 HY では P6 抗原（66 kDa）、P10 抗原（52

kDa）に対する抗体の他に、*T. pallidum* ATCC 27087 株由来の 50 kDa タンパク質抗原に対する抗体と *T. phagedenis* Kazan 8 株の P8 抗原（41 kDa）に対する抗体を検出した（Fig. 3）。また、患者 MO では *T. denticola* の P9 抗原（72 kDa）と G7201 株の P6 抗原（66 kDa）

Fig. 4 Immunoblots of polypeptides from the whole cells of seven treponemes with sera from four adult periodontitis patients MT, TK, MF and NO. Note relatively thick immunoblots on the 32 kDa antigen of *T. phagedenis* biotype Reiter (lane d) and the 18 kDa antigen from *T. phagedenis* biotype Kazan 8 (lane e) and *T. pallidum* ATCC 27087 (lane f) in patient MT, the 52 kDa P10 and 38 kDa P11 antigens of *T. denticola* ATCC 35404 in patient TK (lane c), the 78 kDa antigen of *T. socranskii* subsp. *buccale* ATCC 35534 (lane b), the 52 kDa P10 antigen of *T. denticola* (lanes a and c) and the 18 kDa antigen of *T. phagedenis* biotype Kazan 8 (lane e) and *T. pallidum* ATCC 27087 (lane f) in patient MF, and the 84 kDa P4, 62 kDa P5 and 41 kDa P8 antigens of *T. phagedenis* and *T. pallidum* ATCC 27087 in patient NO (lanes e, f and g). See Fig. 2 for the polypeptides applied to each lane.

および P3 抗原 (34 kDa) に対する抗体がそれぞれ検出された (Fig. 3)。患者 HS では *T. socranskii* subsp. *buccale* ATCC 35534 株に対する 78 kDa 抗原に対する抗体を検出した。

患者 MT は *T. pallidum* ATCC 27087 株および *T. phagedenis* Kazan 株に共通な 18 kDa タンパク質抗原に対する抗体と *T. phagedenis* Reiter 株の 32 kDa 抗原に対する抗体を有していた (Fig. 4)。患者 TK では P10

抗原 (52 kDa) および P11 抗原 (38 kDa) に対するそれぞれの抗体が、患者 MF は P10 抗原に対応する抗体、*T. socranskii* subsp. *buccale* ATCC 35534 株の 78 kDa タンパク質抗原に対する抗体、*T. pallidum* ATCC 27087 株および *T. phagedenis* Kazan 株に共通な 18 kDa タンパク質抗体を有していた。また、患者 NO は *T. pallidum* ATCC 27087 株および *T. phagedenis* Kazan 株に由来する P4, P5 および P8 抗原に対する血中抗体

Table 2 Reactivity of treponemal polypeptide antigens with human sera

Subject	<i>T. denticol</i> ATCC 33520	<i>T. denticola</i> ATCC 35404	<i>T. socranskii</i> subsp. <i>buccale</i> ATCC 35534	<i>Treponema</i> sp. G7201	<i>T. pallidum</i> ATCC 27087	<i>T. phagedenis</i> Reiter	<i>T. phagedenis</i> Kazan
Healthy subjects :							
HH					18 kDa		18 kDa
KS							
YT							
JO							
TF							
SK							
Periodontal patients :							
JN			45 kDa				
HY	66 kDa	52/66 kDa	66 kDa		41/50/66 kDa	41/50/66 kDa	41/50/66 kDa
HS			78 kDa				
YT							
MO	72 kDa	72 kDa		34/66 kDa			
MN			45 kDa				
MT					18 kDa	32 kDa	18 kDa
YT							
MK							
TK		38/52 kDa					
SK							
MO	34/52 kDa	34/52 kDa	34 kDa	34 kDa	34 kDa	34 kDa	34 kDa
AS			83 kDa				
MY							
YS	34 kDa	34 kDa	34 kDa	34 kDa	34 kDa	34 kDa	34 kDa
YK							
SF							
MF	52 kDa	52 kDa	78 kDa		18 kDa		18 kDa
NO					41/62/84 kDa	41/62/84 kDa	41/62/84 kDa

を検出した。患者 MO, AS および YS の血中にも P3, P10 あるいは P13 抗原に対する抗体が検出された。

健康者および歯周疾患患者の血清中で、検出し得た抗体と反応するスピロヘータ菌体のタンパク質抗原を Table 2 に示した。

考 察

歯周疾患のある種の病態の進行度と特定の歯周病原性細菌に対する血中抗体価あるいは歯周ポケットの特定の歯周病原性細菌の検出量と血中抗体価の正の相関はよく知られている。たとえば、成人性歯周炎患者では *Porphyromonas gingivalis* の検出率が高く同菌に対する血清抗体価は高い¹⁷⁻¹⁹⁾。また、限局性若年性歯周炎患者においては、*Actinobacillus actinomycetemcomitans* の検出率は健康者と比較して有意に高く、同菌に対する血清抗体価も異なる病態を示す歯周炎患者のそれと比較して有意に高い¹⁹⁻²¹⁾。

ある種の歯周疾患患者の歯肉縁下歯垢には、スピロヘータの菌量は全菌数の数十パーセントを占めることが報告されている^{22,23)}。スピロヘータの相対的菌量が多い歯肉縁下歯垢を有するこのような患者ではスピロヘータ菌体の抗原刺激を歯周ポケット局所で受けているものと推定され、スピロヘータ菌体抗原に対する抗体を患者の血中から検出しようと試みた報告がある。Steinberg と Gershoff²⁴⁾ は重度歯周疾患患者の血中の抗スピロヘータ抗体価を凝集法により測定し、患者の歯垢中に生息するスピロヘータが多量であるにもかかわらず抗体価が低かったという。一方、Mangan ら³⁾は凝集法より鋭敏な測定法である enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) を使用して、病態の異なる歯周疾患患者の血中の *T. denticola* に対する IgA 抗体を検出した。Jacob ら²⁵⁾や Tew ら²⁶⁾も別々に行った実験により、進行性歯周炎患者の血中に *T. denticola* や *T. socranskii* に対する抗体を検出している。一方、Lai ら²⁾によれば、*T. denticola* および *T. vincentii* に対する IgA と IgG 抗体

価を成人性歯周炎患者、限局性若年性歯周炎患者および健康者間で比較検討したところ、相対的なスピロヘータ量と抗体価の間には相関関係は認められないものの、いずれの菌種に対する IgA および IgG について成人性歯周炎患者においては、他の 2 グループと比較して有意に高かったと報告している。上記の研究はいずれも全菌体に対する抗体価を測定したものであり、特定の菌体抗原に対する抗体を検出したものではない。

Umemoto ら⁶⁾は、*T. denticola* を含む口腔スピロヘータをウサギに投与して作製した抗血清中の抗体をイムノブロット法で検討したところ、菌体タンパク質と反応する抗体価の高い抗体は数種に限られ、*T. denticola* ATCC 33520 株の例では 53 kDa タンパク質抗原に対する抗体の産生が顕著であったと報告している。また、安孫子²⁷⁾は *T. denticola* ATCC 33521 株のタンパク質遺伝子のクローニングを行い、その遺伝子産物に対する抗体の有無を歯周疾患患者の血清で検討したところ、急性壊死性潰瘍性歯肉炎と歯周炎に罹患する患者からの血清と反応したと報告している。また、Miyamoto ら²⁸⁾も *T. denticola* Johnson 株から 53 kDa タンパク質抗原遺伝子のクローニングを行い、その産生タンパク質と患者血清との反応を報告している。このように、歯周疾患患者において、歯肉ポケットに生息するスピロヘータに由来する特定の抗原に対する抗体が検出されている。

本研究では、歯周疾患患者の血中に口腔スピロヘータのうち、小型の *T. denticola* ATCC 33520 株と ATCC 35404 株、*T. socranskii* subsp. *buccale* ATCC 35534 株あるいは、菌種未同定で中型の G7201 株の特定のタンパク質抗原に対する抗体が検出されることを示した。われわれは P2 抗原から P16 抗原の各タンパク質に対するポリクローナル抗血清を使用し、スピロヘータの 7 菌種間における抗原分布と菌体内局在を研究し報告した⁹⁾。すなわち、P2 抗原は G7201 株に特異的、P3, P4, P5, P6 抗原は共通、P8 抗原は *T. pallidum* と *T. phagedenis* に共通、P9, P10 および P11 抗原は *T. denticola* に共通、P13 および P15 抗原は *T. socranskii* に特異的、P14 抗原は *T. denticola* と *T. socranskii* に共通であった。免疫電顕法により菌体の被膜タンパク質として P2, P5, P6, P10 および P15 抗原が、被膜あるいは壁膜複合体のいずれかに由来すると推定された P5, P6, P8, P9, P13 および P14 抗原そして軸鞭毛タンパク質として P3 および P11 抗原がそれぞれ区別された。また、P16 抗原は *T. denticola* ATCC 33520 株の被膜に特異的な抗原であることが判っている⁷⁾。

歯周疾患患者の血中に、今回供試した 3 種類の口腔ス

ピロヘータ *T. denticola*, *T. socranskii* ならびに中型スピロヘータ G7201 株に由来するタンパク質に対する抗体が検出された。一方、非口腔由来の *T. phagedenis* と *T. pallidum* ATCC 27087 株に共通の P8 抗原に加えて、菌体内局在の知見が得られていない 18 kDa, 32 kDa あるいは 50 kDa タンパク質に対する抗体が検出される患者がいた (Table 2)。P3, P4, P5 および P6 抗原は、これら *T. pallidum* と *T. phagedenis* に特異的な抗原でないことから、おそらく患者口腔のスピロヘータ、たとえば *T. denticola* などに由来するタンパク質抗原に対応して産生されたものかも知れない。一方、P8, 18 kDa, 32 kDa あるいは 50 kDa 抗原は *T. phagedenis* あるいは *T. pallidum* ATCC 27087 株に由来するタンパク質であることから、由来する菌種の特定に興味を持たれる。ところで、*T. phagedenis* は生殖器に生息するスピロヘータであり、*T. pallidum* と *T. phagedenis* は互に共通する抗原を多く持っていることが知られている²³⁾。今回の実験においても、例外があるものの、患者血清のあるものは両菌種に共通するタンパク質抗原と反応陽性を示すことが示された (Table 2)。これら 2 種の菌体に由来する、少なくとも 18 kDa 抗原あるいは 41 kDa 抗原と反応する血清抗体が検出された被験者 (HH, JN, MN あるいは NO など) では、当該種あるいはその近縁種に過去に感染する機会を得たかまたは現在感染していることを示唆しているかも知れない。

臨床的に成人性歯周炎と診断された 13 名の患者のうち 6 名に *T. denticola* を初め *T. socranskii* および中型の G7201 株の被膜、壁膜複合体あるいは軸鞭毛のタンパク質に対する抗体が検出された (Table 2)。歯周ポケット材料中のスピロヘータの菌種や量も異なり、その菌体抗原の免疫原性も異なると考えられる。他方、宿主の個体差などもあり、同一の抗原に対する免疫応答も一樣ではないと推定される²⁾。口腔の歯周ポケットに生息する *P. gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *A. actinomycetem-comitans* などの病原細菌の存否、あるいは増減により歯周疾患の発症あるいはその進展が影響されることが報告されている^{21,29-31)}。したがって、歯周疾患患者であっても口腔スピロヘータに対する抗体レベルが低いことがあるかも知れない。本実験において、臨床的に歯周疾患と判定された患者でも菌体タンパク質抗原との反応が認められない場合があった (Table 2)。

Ogawa ら³²⁾は歯周疾患患者の炎症歯肉組織中の抗 *P. gingivalis* 線毛抗体 (IgG および IgA) 産生細胞およびその免疫グロブリンについて検討した結果、炎症の進行に伴い抗線毛抗体産生細胞も増加したものの、患者の末

梢血や非炎症組織中にはこれらの抗体産生細胞はほとんど検出できなかったと報告し、歯周組織の炎症に伴う免疫応答では局所免疫の重要性を報告している。口腔スピロヘータの菌体抗原について、宿主の病的歯周組織で上と同様な免疫応答が起きるかどうかは明らかではない。末梢血を用いた今回の実験では、全身の免疫系としての抗スピロヘータ抗体を検討したものであり、*P. gingivalis* 線毛抗原に対する免疫応答とは異なるかも知れない。いずれにしても、結果的に歯周ポケットで異常に増加したスピロヘータに対して産生された抗体は免疫複合体の形成などに関与し、局所の宿主細胞に対して傷害的に作用することが推測される。

今回の実験では、歯周疾患患者の血中に検出される、一部の口腔スピロヘータに対する抗体に注目した。*T. vincentii*, *T. pectinovorum* など他の口腔スピロヘータのタンパク質抗原に対する患者血中の抗体の動態変化については今後に残された検討課題である。

結 論

歯周疾患患者血中のスピロヘータ抗体の有無をイムノブロット法で検討した。患者ではヒト口腔の *T. denticola*, *T. socranskii* および G7201 株の被膜、壁膜複合体あるいは軸鞭毛に由来するタンパク質抗原に対する抗体を検出したが、健常者では同様の抗体を検出できなかった。スピロヘータの菌体タンパク質抗原に対するこれらの血清抗体は、歯周組織の免疫病理学的傷害に関与する可能性を示す。

有益なご助言をいただいた本学歯学部歯周病学教室岩山幸雄教授に感謝いたします。また、本論文の一部は、1992年度東海乳酸菌研究会からの研究費により行われた。本要旨は1993年3月27日第30回レプトスピラシンポジウム（愛知県衛生研究所）および6月3日ニューヨーク州立大学バッファロー校歯学部100周年記念シンポジウム（ハイアットレジェンシーホテル、バッファロー市）で発表した。

文 献

- 1) Stashenko, P., Resmini, M., Haffajee, A. D. and Socransky, S. S. : T cell responses of periodontal disease patients and healthy subjects to oral microorganisms. *J. Periodont. Res.* **18** : 587~606, 1983.
- 2) Lai, C-H., Listgarten, M. A., Evian, C. I. and Dougherty, P. : Serum IgA and IgG antibodies to

- Treponema vincentii* and *Treponema denticola* in adult periodontitis, juvenile periodontitis and periodontally healthy subjects. *J. Clin. Periodontol.* **13** : 752~757, 1986.
- 3) Mangan, D. F., Laughon, B. E., Bower, B. and Lopatin, D. E. : In vitro lymphocyte blastogenic responses and titers of humoral antibodies from periodontitis patients to oral spirochetes isolates. *Infect. Immun.* **37** : 445~451, 1982.
- 4) Barthold, S. W., Persing, D. H., Armstrong, A. L. and Peeples, R. A. : Kinetics of *Borrelia burgdorferi* disseminations and evolution of disease after interdermal inoculation of mice. *Am. J. Pathol.* **139** : 263~273, 1991.
- 5) Ebersole, J. L. : Rheumatoid factor (RF) distribution in periodontal disease. *J. Clin. Immunol.* **11** : 132~142, 1991.
- 6) Umemoto, T., Zambon, J. J., Genco, R. J. and Namikawa, I. : Major antigens of human oral spirochetes associated with periodontal disease. *Adv. Dent. Res.* **2** : 292~296, 1988.
- 7) Umemoto, T., Namikawa, I., Suido, H. and Asai, S. : A major antigen on the outer envelope of a human oral spirochete, *Treponema denticola*. *Infect. Immun.* **57** : 2470~2474, 1989.
- 8) 梅本利彦, 中村義則, 谷 英樹, 並河 勇 : 口腔スピロヘータ *Treponema denticola* の被膜の微細構造, 特に主要抗原との関連. 歯基礎誌 **33** : 156~165, 1991.
- 9) Nakamura, Y., Umemoto, T., Nakatani, Y., Namikawa, I. and Wadood, A. : Common and specific antigens of several treponemes detected by polyclonal antisera against major cellular proteins. *Oral Microbiol. Immunol.* **8** : 288~294, 1993.
- 10) Umemoto, T., Wadood, A., Nakamura, Y., Nakatani, Y. and Namikawa, I. : Antigenic behaviors of two axial flagellar proteins detected in *Treponema denticola*. *Microbiol. Immunol.* **37** : 159~163, 1993.
- 11) Ohta, K., Makinen, K. K. and Loesche, W. L. : Purification and characterization of an enzyme produced by *Treponema denticola* capable of hydrolyzing synthetic trypsin substrates. *Infect. Immun.* **53** : 213~220, 1986.
- 12) Gherna, R., Pienta, P. and Cote, R. eds., In : Catalogue of bacteria and phages, pp. 343 and 347, 17th edn., American Type Culture Collection, Rockville, Md., 1989.

- 13) Laemmli, U. K. : Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227** : 680~685, 1970.
- 14) Towbin, H., Staechelin, S. and Gordon, J. : Electrophoretic transfer of protein from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets. Procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **76** : 4350~4354, 1979.
- 15) Silness, J. and Le, H. : Periodontal disease in pregnancy. II. Correlation between oral hygiene and periodontal condition. *Acta Odontol. Scand.* **22** : 121~135, 1964.
- 16) Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J. : Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193** : 265~275, 1951.
- 17) Mouton, C., Hammond, P. G., Slots, J. and Genco, R. J. : Serum antibodies to oral *Bacteroides assa-charolyticus* (*Bacterioides gingivalis*) : relationship to age and periodontal destruction. *Infect. Immun.* **31** : 182~192, 1981.
- 18) Taubman, M. A., Ebersole, J. L. and Smith, D. J. : Association between systemic and local antibody and periodontal disease. In : Host-parasite interaction in periodontal disease. Genco, R. J. and Mergenhagen, S. E., eds., pp. 283~298, Washington D. C., 1982.
- 19) Ebersole, J. L. : Systemic humoral immune responses in periodontal disease. *Crit. Rev. Oral Biol. Med.* **1** : 283~331, 1990.
- 20) Slots, J., Brag, L., Wikstrm, M. and Hahlen, G. : The occurrence of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Bacteroides gingivalis* and *Bacteroides intermedius* in destructive periodontal disease in adults. *J. Clin. Periodontol.* **13** : 570~577, 1986.
- 21) Zambon, J. J., Umamoto, T., DeNardin, E., Nakazawa, F., Christersson, L. A. and Genco, R. J. : *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in the pathogenesis of human periodontal disease. *Adv. Dent. Res.* **2** : 269~274, 1988.
- 22) Canale-Parola, E. : Bergey's manual of systematic bacteriology 9th ed., pp. 38~70, Krieg, N. R. and Holt, J. G. eds., 1984.
- 23) Lukehart, S. A., Baker-Zander, S. A. and Gubish, Jr. : Identification of *Treponema pallidum* antigens : comparison with a nonpathogenic treponeme. *J. Immunol.* **129** : 833~838, 1982.
- 24) Steinberg, A. I. and Gershoff, S. N. : Quantitative differences in spirochetal antibody observed in periodontal disease. *J. Periodontol.* **39** : 286~289, 1968.
- 25) Jacob, E., Meiller, R. T. and Nauman, R. K. : Detection of elevated serum antibodies to *Treponema denticola* in human with advanced periodontal disease. *J. Dent. Res.* **71** : 145~153, 1992.
- 26) Tew, J. G., Smibert, R. M., Scott, E. A., Burmeister, J. A. and Ranny, R. R. : Serum antibodies in young adult humans reactive with periodontitis-associated treponemes. *J. Periodont. Res.* **2** : 580~590, 1985.
- 27) 安孫子宜光 : 遺伝子工学利用による成人歯周炎の免疫学的診断法の開発. *歯医学誌* **8** : 25~32, 1989.
- 28) Miyamoto, M., Noji, S., Kokeguchi, S., Kato, K., Kurihara, H., Murayama, Y. and Taniguchi, S. : Molecular cloning and sequence analysis of antigen gene *tdpA* of *Treponema denticola*. *Infect. Immun.* **59** : 1941~1947, 1991.
- 29) Zafiroopoulos, G-G. K., Flores-de-Jacoby, L., Hungerer, K-D. and Nisengard, R. J. : Humoral antibody responses in periodontal disease. *J. Periodontol.* **63** : 80~86, 1992.
- 30) 渋谷俊昭, 山村早小百合, 金澤 篤, 森本淳史, 白木雅文, 梅本利彦, 並河 勇, 岩山幸雄 : 成人性歯周炎患者の初期治療に伴う歯周病原細菌の検出率と血清抗体価の変化. *歯周病学誌* **35** : 397~403, 1993.
- 31) Christersson, L. A., Zambon, J. J., Dunford, R. G., Grossi, S. G. and Genco, R. J. : The capability of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Bacteroides gingivalis* and *Bacteroides intermedius* to indicate progressive periodontitis : a retrospective study. *J. Dent. Res.* **68** : 1633~1639, 1989.
- 32) Ogawa, T., Kono, Y., McGhee, M. L., McGhee, J. R., Roberts, J. E., Hamada, S. and Kiyono, H. : *Porphyromonas gingivalis*-specific serum IgG and IgA antibodies originate from immunoglobulin-secreting cells in inflamed gingiva. *Clin. Exp. Immunol.* **83** : 237~244, 1991.