歯槽膿漏症と *Mycoplasma* について

大 橋 泰 子

東京医科歯科大学歯学部口腔細菌学教室 (指導: 堀川高大教授)

(昭和41年7月15日受付)

Studies on oral *Mycoplasma* in relation to periodontal disease

Yasuko Ohashi

Department of Oral Microbiology, School of Dentistry,

Tokyo Medical and Dental University

(Director: Prof. T. Horikawa)

要旨: 人の口腔から分離される *Mycoplasma* は大部分が *M. salivarium* と *M. orale type 1* であるが、これ等 *Mycoplasma* の口腔細菌叢に於ける役割、或は口腔疾患との関係は非常に興味ある問題である。しかしこれ迄余り調べられていない。

歯槽膿漏症と *Mycoplasma* の関係を調べる為、臨床的に正常な歯肉を有する成人13人と歯槽膿漏患者30人に付、常在する *Mycoplasma* の数、菌種の同定並びに被検者血清の *Mycoplasma* に対する抗体価を検索し、両者を比較検討した。

健康人13人の内、10人、歯槽膿漏患者30人の内、26人から *Mycoplasma* が検出された。その colony forming unit (CFU) は健康人 $5.0 \times 10^2 \sim 8.9 \times 10^3$ (対数平均値 3.0453 ± 0.5326)、歯槽膿漏患者 $8.6 \times 10^2 \sim 5.9 \times 10^4$ (対数平均値 3.9070 ± 0.9811) で、CFU に於いて両者の間には危険率5%以下で統計学的に有意の差が認められた。

各被検者から原則として at random に5株を分離して10代継代後菌株の同定を行なった。健康人10人から分離した49株の菌株の内、4株が継代中に bacterial form に変異し、7株が継代不能となった。残り38株の内20株 (53%) が *M. salivarium*, 18株 (47%) が *M. orale type 1* で両者の比は約1:1であった。これに対し歯槽膿漏患者30人から分離した140株の内、10株が継代中に bacterial form に変異し、5株が継代不能となった。残り125株の内、102株 (80%) が *M. salivarium*, 23株 (20%) が *M. orale type 1* でありその比は約4:1で、歯槽膿漏患者では健康人に比べ *M. salivarium* が著明に増加している事が認められた。各被検者から分離した5株の *Mycoplasma* については、全てが *M. salivarium* であった例が健康人で3例 (30%)、歯槽膿漏患者で21例 (81%) であった。又 *M. orale type 1* のみ分離された例は健康人で3例 (30%)、歯槽膿漏患者で4例 (15%) であった。

被検者血清の抗体価は間接血球凝集反応で健康人13人の内6例 (46%)、歯槽膿漏患者30人の内17例 (57%) が *M. salivarium* に対して8~128倍の抗体価で反応した。*M. orale type 1* に対しては健康人では8倍以上の抗体価で反応したものは無かったが、歯槽膿漏患者では3例 (10%) が8倍の抗体価を示した。補体結合反応では健康人では *M. salivarium*, *M. orale type 1* に対して反応した血清はなかった。歯槽膿漏患者では9例 (30%) が *M. salivarium* と反応したが、*M. orale type 1* と反応した血清はなかった。

所謂歯槽膿漏症では健康人に比べ *Mycoplasma* 殊に *M. salivarium* が増加している。一方 *Mycoplasma* に対する血中抗体価については *M. salivarium* に対する抗体価が上昇しているように思われるが、まだ歯槽膿漏症と明らかな関連づけは出来ないように思う。

緒 言

所謂歯槽膿漏症の原因については常に多くの研究がなされて来ているが、明白な原因と思われるものは未だ解決していない。しかし Löe et al¹⁾ の人に於ける歯肉炎の研究や、実験動物に於ける幾つかの研究から、口腔内常在微生物が何等かの役割を果している事はほぼ間違いないものと考えられている。歯周疾患に関係する微生物としては *Bacteroides melanogenicus* およびその他の *Bacteroides*, *Diphtheroid*, *Reptostreptococcus* 等が歯槽膿漏症の場合、数が増加している事や、またその蛋白分解酵素性から重要視されている。一方グラム陰性菌の内毒素、グラム陽性菌の *Mucopolysaccharide* 等の病原性も問題にされている。また之等微生物ないしその成分に対する宿主側の反応が大きな役割を果しているとも考えられ、広義のアレルギー反応も問題とされている (Socransky²⁾, Bahn³⁾, Rizzo⁴⁾, 高添⁵⁾)。

歯周疾患の原因を考える場合、局所の細菌叢すなわち細菌の生態を解明する事が1つの重要な問題と考えられる。その意味で、現在未だ十分に生態が解明されていない *Mycoplasma* の生態的研究も重要な問題と思われる。

口腔内に高頻度に *Mycoplasma* が存在する事を最初に明らかにしたのは Smith and Morton⁶⁾, Morton et al⁷⁾ である。その後 Dienes and Maddoff⁸⁾ は口腔内由来株が尿性器由来株と血清学的に異なる事を示した。人に由来する *Mycoplasma* は Nicol and Edward⁹⁾ によりその生物学的性状から Human type 1~4 に分けられ、口腔由来株は Human type 4 に分類された。Edward and Freundt¹⁰⁾ はこの4つの type をそれぞれ *M. hominis* type I, *M. hominis* type 2, *M. fermentans* および *M. salivarium* を命名した。当時口腔常在株は全て *M. salivarium* と考えられたが、Herderscheê et al¹¹⁾, Lemcke¹²⁾, Clyde¹³⁾ は口腔内 *Mycoplasma* で血清学的に *M. salivarium* と異なるものを見出し、Clyde はこの新しい *Mycoplasma* を Patt strain と呼んだ。この菌種は同

年 Taylor-Robinson et al¹⁴⁾ によっても報告され *M. orale* と命名された。Taylor-Robinson et al¹⁵⁾ はその後更に之等の菌種の血清学的検索を行い *M. orale* type 2 を、Fox et al¹⁶⁾ は *M. orale* type 3 を見出し報告している。

之等の1連の研究の結果、現在口腔ないし咽頭部に見出される *Mycoplasma* はその大部分が *M. salivarium* および *M. orale* type I¹¹⁾ 13)-27) であり、極く稀に *M. orale* type 2 (Taylor-Robinson et al¹⁵⁾, Fox et al¹⁶⁾) *M. orale* type 3 (Fox et al¹⁶⁾, *M. hominis* type I (Clyde¹³⁾, Fox et al¹⁶⁾, Hendley and Jordan²⁰⁾), *M. pneumoniae*¹³⁾ 16) 18) 19) 21), および T-strain (Inglis et al²¹⁾, Hendley and Jordan²⁰⁾) があると考えられている。

Mycoplasma の人に於ける病原性については多くの報告が見られるが、ほぼ確実な病原種としては原発性非定型肺炎 (primary atypical pneumoniae) に於ける *M. pneumoniae* (28) 29) 30) 31) 32) のみとされている。このほかでは非淋菌性尿道炎 (nongonococcal urethritis) (Shepard³³⁾, Shipley et al³⁴⁾, 流産・早産 (Kundsin et al³⁵⁾) との関連に於いて T-strain が注目されているが、未だ確実な病原性は証明されていない。

一方口腔常在性の *Mycoplasma* は非病原性だと考えられているが、慢性呼吸器疾患の患者の喀痰では健康人の約3倍の *Mycoplasma* の分離率を示したという由利等²⁴⁾の報告があり、白血病患者の骨髓より *M. orale* を直接分離した報告 (Hayflick and Koprowski³⁶⁾) もみられる。Mufson et al³⁷⁾ はまた *M. hominis* type I を人の上気道に実験的に感染させ、上気道炎を起さしめた事を報告している。この実験では50人の被検者中25人が発症し、38人に於いて血中抗体価 (間接血球凝集素価) の上昇が見られたと述べている。

口腔内 *Mycoplasma* の口腔細菌叢に於ける役割、口腔疾患—特に歯周病—との関連についてはこれ迄余り報告がみられない。しかし *Mycoplasma* が殆んど歯石ないし歯肉囊中に存在している事 (熊谷・岩淵²⁶⁾, 熊谷等²⁷⁾, 熊谷等³⁸⁾) から歯周病に直接ないし間接に何等かの役割を果している

可能性は十分考えられる。

本実験では所謂歯槽膿漏症と *Mycoplasma* の関係を調べるため、臨床的に正常な歯肉を有する成人と歯槽膿漏患者に付、常在する *Mycoplasma* の数、菌種の同定ならびに被検者血清中の抗体価を検索し、両者を比較検討した。

実験方法

1) 被検者

健康人：18歳から25歳迄の健康な人13人で、内男子6人、女子7人であった。これ等被検者の口腔内所見はほぼ正常な咬合を持ち(Study model), caries は処置されていて、X線写真と pocket の深さから判定して歯周疾患はなく歯肉はほぼ正常であった。

歯槽膿漏患者：口腔清掃指導、歯石除去を行う前の外来患者30人。1歯に付、唇面、舌面、両隣接面の4カ所の pocket を計測し、1口腔内に4mm以上の pocket を4カ所以上を所有した人を対象とした。pocket の深さのみを見、口腔清掃状態、歯石の状態、歯肉の炎症、増殖、退縮、年齢、性別等は考慮しなかった。

2) 材料と方法

イ) 含嗽液

Bovine albumine (Armour) 0.5%
Penicilling G カリウム塩(明治製菓) 500 μ /ml

Trypticase soy broth (BBL) 3g
蒸溜水 100ml

ロ) *Mycoplasma* 用液体培地 (Chanock³⁹⁾
の処方による)

PPLO broth (without crystal violet, Difco) 21g

Yeast extract (Difco) 10g
蒸溜水 1l

非加熱馬血清 20%
Penicillin G 500 μ /ml

酢酸タリウム(和光純薬) $1/3$ mg/ml
pH=7.6 (Shepard and Lunceford⁴⁰⁾)

Mycoplasma 用寒天培地はこれに1.4%の割合

に寒天(和光純薬製寒天1級)を加えたものを用いた。

含嗽液 10ml で1分間、強く、歯をすすぐようにして含嗽させ、この含嗽液を直ちに、遅くとも2~3時間以内に、液体培地で連続10倍希釈し、各希釈液 0.01ml を寒天培地に滴下し、37°C で6~7日間、Steel-wool 法^{41) 42) 43)}で嫌氣的に培養した。colony count 用寒天培地($10^0 \sim 10^{-4}$)5枚の他に、分離培養用の colony を拾うために5枚の寒天培地を用いた。

培養後、colony を数えると同時に、Dienes 染色液⁴⁴⁾等を用い colony の形態を観察し、被検者1人に付原則として5株の菌株を分離培養し、PCと酢酸タリウムを除いた上記培地で液体培地、寒天培地交互に10代継代した。

3) 分離株の同定

タンニン酸(小宗化学)処理血球を用いた間接血球凝集反応(IHA, Dowdle and Robinson⁴⁵⁾, Taylor-Robinson et al¹⁴⁾)により血清学的に *M. salivarium* および *M. orale* type I との関係調べた、分離株の同定のための抗原濃度で IHA で同定できなかった分離株は BBL 社製の Taxo differentiation discs for *Mycoplasmas* (Stanbridge and Hayflick⁴⁶⁾)又は 0.025mlの *M. salivarium*, *M. orale* type I の免疫血清を浸み込ませた 0.5 μ の Pc disc を用いて Clyde¹³⁾の方法による Growth inhibition (GI) により同定した。

BBL Taxo differentiation discs for *Mycoplasmas*

Taxo 1 for *M. pneumoniae* Fh-Liu

Taxo 2 for *M. fermentans* PG-18

Taxo 3 for *M. orale* 1 CH-19299

Taxo 4 for *M. salivarium* PG-20

Taxo 5 for *M. hominis* PG-21

Taxo 6 for *M. arthritidis* PG-27

PC disc は 10^0 , 10^{-1} , 10^{-2} 希釈の *Mycoplasma* 培養液が 10 μ PC disc で発育を阻止されない事を確かめた後で使用した。

4) 被検者血清の *M. salivarium* および *M. orale* type 1 に対する抗体価の測定

被検者より約 10ml の血液を無菌的に採取し、血清分離後、滅菌試験管に 1 ml ずつ分注し、 -20°C の冷凍庫に保存して置いた血清を用い IHA、補体結合反応 (CF)-Kolmer の変法⁴⁷⁾ および GI で *M. salivarium* および *M. orale type 1* に対する被検者血清の抗体価を検索した。IHA では人血清の羊血球に対する正常凝集素を除くために、血清 0.35ml, PBS 0.35ml, 血球 0.28ml で正常凝集素の吸収を行なった。CF では抗原は 8 単位、溶血素は 5 単位、補体は健康な モルモットの新鮮な血清 (2 full unit^{48) 49)}) を用いた。

5) 免疫原および家兎の免疫方法

免疫原には Dr. Chanock より分与され、当教室で継代した *M. salivarium* と *M. orale type 1* の菌株を用いた。抗原の作製と免疫方法は Taylor-Robinson et al⁵⁰⁾ 方法によった。すなわち馬血清等の培地成分に対する反応を除くため、1% proteose peptone No 3 (Difco), 0.5% NaCl を含む兎肉汁培地に コレステロール $20\mu\text{g/ml}$, 非加熱兎血清 20%, PC $500\mu\text{g/ml}$ を加えた培地で 5 代継代した後、12,000r.p.m. で 45 分間遠沈 3 回洗滌し集菌した。集められた菌体を培養原量の $1/20$ の滅菌生理食塩水に再浮遊し免疫原とした。免疫は次のように行なった。すなわち 1 回目は Freundt の complete adjuvant を、第 2 回目は incomplete adjuvant を等量に加えて混合し、3 週間間隔で 2 回、1 ml ずつ皮下に乱刺した後、更に 3 週間後 1 ml の菌体浮遊液のみを腹腔内に注射し、最終免疫後 10 日目に採血し、血清を分離した。免疫血清は 1 ml ずつ滅菌試験管に分注し、 -20°C の冷凍庫に保存した。この免疫血清の抗体価は *M. salivarium*, *M. orale type I* 共に IHA で 5120 倍以上あった。

6) 抗原の作製

菌株を *Mycoplasma* 用液体培地で増菌し、12,000r.p.m. で 45 分間遠沈し、生理食塩水で 3 回洗滌し、沈渣を培養原量 $1/100$ の蒸留水に再浮遊させた。この菌体浮遊液を 10 回凍結融解して菌体を壊した後、12,000r.p.m. で 45 分間遠沈した上澄を抗原とした。この抗原の蛋白量は Folin Ciocalteu⁵¹⁾

の方法で *M. salivarium* 抗原 $365\mu\text{g/ml}$, *M. orale type 1* 抗原 $360\mu\text{g/ml}$ であった。CF 用の抗原は抗補体作用を除くために、 100°C の温浴槽中で 15 分加熱したものをを用いた (Eng⁵²⁾, Klieneberger-Nober⁵³⁾, 荒井・石田⁵⁴⁾)。分離株同定用の抗原は原則として培養原量の $1/20$ の蒸留水に再浮遊させた。

実験結果

1) Colony forming unit (CFU)

臨床的に見てほぼ正常と思われる口腔 13 例の内、10 例 (77%) から *Mycoplasma* が検出された。含嗽液 1 ml 当りの CFU は $5.0 \times 10^2 \sim 8.9 \times 10^3$ で対数平均値 3.0453 ± 0.5326 であった (表 1-a)。

表 1-a Incidence of isolation of mycoplasma (normal)

Subject number	Age	Sex	Colony forming unit
1	21	male	8.9×10^3
2	23	male	2.3×10^3
3	25	male	2.1×10^3
4	18	female	8.5×10^2
5	19	female	8.0×10^2
6	20	female	7.0×10^2
7	21	male	7.0×10^2
8	25	male	7.0×10^2
9	21	female	6.0×10^2
10	21	male	5.0×10^2
11	25	female	0
12	19	female	0
13	19	female	0

歯槽膿漏患者 30 人の被検者の場合、26 人 (87%) から *Mycoplasma* が検出された。CFU は $8.6 \times 10^2 \sim 5.9 \times 10^4$ で対数平均値 3.9070 ± 0.9811 であった。CFU の数に於いて、両者の間には危険率 5% 以下で統計学的に有意差が認められ、歯周病に罹患した場合、*Mycoplasma* が増加する事が認められた (表 1-b)。

2) 分離株の同定

健康人 10 人から 49 株を分離したが、継代中に bacterial form に変異したものが 4 株、継代不能

表 1-b Incidence of isolation of mycoplasma (periodontal disease)

Subject number	Age	Sex	Colony forming unit
1	60	male	5.9×10^4
2	42	male	5.0×10^4
3	37	male	4.9×10^4
4	52	male	3.5×10^4
5	28	female	3.2×10^4
6	55	female	2.4×10^4
7	44	female	2.3×10^4
8	20	male	1.8×10^4
9	42	female	1.7×10^4
10	38	female	1.6×10^4
11	44	female	1.3×10^4
12	27	female	1.1×10^4
13	55	female	8.2×10^3
14	38	male	7.8×10^3
15	36	female	4.5×10^3
16	54	female	4.4×10^3
17	48	female	4.3×10^3
18	51	male	3.5×10^3
19	32	female	3.5×10^3
20	66	male	3.0×10^3
21	24	male	2.6×10^3
22	54	female	2.6×10^3
23	40	female	2.3×10^3
24	60	female	1.9×10^3
25	39	male	1.2×10^3
26	23	female	8.6×10^2
27	48	male	0
28	34	female	0
29	32	female	0
30	65	male	0

表 2-a Isolated strains (normal)

Subject number	Isolated	Number of strains		
		Mycoplasma	Trans-formed	Not subcultured
1	5	5	0	0
2	5	3	2	0
3	4	2	0	2
4	5	4	1	0
5	5	5	0	0
6	5	4	1	0
7	5	3	0	2
8	5	3	0	2
9	5	5	0	0
10	5	4	0	1
Total	49	38	4	7

表 3-a Identification (normal)

Subject number	Number of Mycoplasma strains		
	Isolated	M. salivarium	M. orale 1
1	5	1	4
2	3	0	3
3	2	0	2
4	4	4	0
5	5	4	1
6	4	2	2
7	3	3	0
8	3	0	3
9	5	2	3
10	4	4	0
Total	38	20	18

となったものが7株あり、Mycoplasma として同定を行い得たものは38株であった(表2-a)。IHAにより同定を行なった結果、M. salivarium と同定されたもの20株(53%)、M. orale type 1 と同定されたもの18株(47%)であった(表 3-a)。

歯槽膿漏症の被検者から分離された株は140株であったが、継代中10株が bacterial form に変異し、5株が継代不能となった(表 2-b)。同定を行い得た125株中、M. salivarium は102株(80%)であり、M. orale type 1 は23株(20%)であった(表

3-b)。

歯槽膿漏患者の内、8, 12, 21の被検者から分離された合計15株は IHA では抗 M. salivarium 血清、および抗 M. orale type 1 血清共に反応を示さなかったが、之等血清および GI disc (BBL) による GI を行なった所、何れも抗 M. orale type 1 血清により発育阻止がみられ、この結果、M. orale type 1 と同定された。

Mycoplasma の分離された健康人10人の内、M. salivarium のみが分離されたものは3例(30%)で

表 2-b Isolated strains (periodontal disease)

Subject number	Isolated	Number of strains		
		Mycoplasma	Transformed	Not subcultured
1	5	3	0	2
2	5	5	0	0
3	5	5	0	0
4	5	5	0	0
5	5	5	0	0
6	5	5	0	0
7	5	5	0	0
8	5	5	0	0
9	5	5	0	0
10	5	5	0	0
11	5	5	0	0
12	5	5	0	0
13	5	5	0	0
14	5	5	0	0
15	5	5	0	0
16	5	5	0	0
17	5	3	0	2
18	5	5	0	0
19	5	5	0	0
20	5	5	0	0
21	5	5	0	0
22	5	5	0	0
23	5	5	0	0
24	5	5	0	0
25	5	5	0	0
26	5	4	0	1
27	5	0	5	0
28	5	0	5	0
29	0	0	0	0
30	0	0	0	0
Total	140	125	10	5

あり, M. orale type 1 のみが分離されたものは 3 例(30%)であった。残りの 4 例からは 両菌種が分離された。

一方歯槽膿漏患者 26 人については M. salivarium のみが分離されたもの 21 例(81%), M. orale type 1 のみが 4 例(15%), 両者が混合して分離されたもの 1 例(3.8%)であった。この結果, 歯周病に罹患した場合には M. salivarium が増加する事がみられた。

表 3-b Identification (periodontal disease)

Subject number	Number of Mycoplasma strains		
	Isolated	M. salivarium	M. orale 1
1	3	3	0
2	5	5	0
3	5	0	5
4	5	5	0
5	5	5	0
6	5	5	0
7	5	2	3
8	5	0	5
9	5	5	0
10	5	5	0
11	5	5	0
12	5	0	5
13	5	5	0
14	5	5	0
15	5	5	0
16	5	5	0
17	3	3	0
18	5	5	0
19	5	5	0
20	5	5	0
21	5	0	5
22	5	5	0
23	5	5	0
24	5	5	0
25	5	5	0
26	4	4	0
27	0	0	0
28	0	0	0
29	0	0	0
30	0	0	0
Total	125	102	23

bacterial form に変異した colony は全て同じような形態をしており, 小さな colony は Mycoplasma の colony と殆んど同じ大きさで, Mycoplasma の colony よりも厚みが多少薄く, nipple が明瞭でない所が異なっている程度であった。この colony を PC と酢酸タリウムを入れた液体および寒天培地に接種したら colony および菌の発育は認められなかった。

また本実験の被験者からは M. salivarium およ

び *M. orale* type 1 以外の *Mycoplasma* は1株も分離されなかった。

3) 被検者血清の抗体価

間接血球凝集反応 (IHA) : 健康人では13例中6例(46%)が IHA で *M. salivarium* に対し8倍以上の抗体価を示した。すなわち1例が128倍以上, 1例が64倍, 3例が16倍, 1例が8倍であった。之に対し *M. orale* type 1 抗原と反応したものは13例中1例も認められなかった(表 4-a)。

表 4-a IHA antibody titres against *M. salivarium* and *M. orale* 1 in 13 subjects(normal)

Subject number	Antigen	
	<i>M. salivarium</i>	<i>M. orale</i> 1
3	≥128	< 8
1	64	< 8
2, 4, 5	16	< 8
7	8	< 8
6, 8, 9, 10, 11, 12, 13	< 8	< 8

表 4-b IHA antibody titres against *M. salivarium* and *M. orale* 1 in 30 subjects (periodontal disease)

Subject number	Antigen	
	<i>M. salivarium</i>	<i>M. orale</i> 1
6, 25, 26, 29	≥128	< 8
19, 22	64	< 8
1, 7, 9, 24	32	< 8
2, 3, 10, 28	16	< 8
4, 14, 16	8	< 8
5, 8, 11, 15, 17, 18, 20, 23, 27, 30	< 8	< 8
12, 13, 21	< 8	8

歯槽膿漏患者では *M. salivarium* に対する IHA 抗体を有していたものは30例中17例(57%)であった。この内4例が128倍以上, 2例が64倍, 4例が32倍, 4例が16倍, 3例が8倍であった。一方 *M. orale* type 1 に対する抗体を有した被検者は30例中3例(10%)のみで, 何れも8倍であった。同一人で *M. salivarium* および *M. orale* type 1 の両方に対する抗体を有するものは認められなかつ

表 5-a CF antibody titres against *M. salivarium* and *M. orale* 1 in 13 subjects (normal)

Subject number	Antigen	
	<i>M. salivarium</i>	<i>M. orale</i> 1
I-13	< 8	< 8

表 5-b CF antibody titres against *M. salivarium* and *M. orale* 1 in 30 subjects (periodontal disease)

Subject number	Antigen	
	<i>M. salivarium</i>	<i>M. orale</i> 1
6	64	< 8
25, 26, 29	32	< 8
19, 22	16	< 8
1, 7, 24	8	< 8
2, 3, 4, 5, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 20, 21, 23, 27, 28, 30	< 8	< 8

た(表 4-b)。

補体結合反応 (CF) : 健康人の場合では *M. salivarium*, *M. orale* type 1 の何れとも反応した血清はなかった(表 5-a)。

歯槽膿漏患者では9例(30%)が *M. salivarium* と反応した。すなわち1例が64倍, 3例が32倍, 2例が16倍, 3例が8倍の抗体価を示した。之に対し *M. orale* type 1 対して反応した血清はなかった(表 5-b)。

Growth inhibition (GI) : 歯槽膿漏患者の場合 *M. salivarium* に対し4例に1mm以上の阻止帯が見られ, 1mm以下ではあるが5例に明らかな発育阻止帯が認められたが, *M. orale* type 1 に対しては GI 陽性に反応した血清はなかった(表 6)。

健康人の場合分離された *Mycoplasma species* と血中抗体には関係はみられない様であったが, 歯槽膿漏患者の場合, 分離された菌種と同種の抗体が認められたものが殆んどであった。しかし, 被検者“3”では *M. orale* type 1, “13”では *M. salivarium* のみしか分離されなかったにもか

表 6 Growth inhibition by serum
(periodontal disease)

Subject number	Antigen	
	M. salivarium	M. orale 1
Standard serum (M. sal)	10°	7*
	10 ⁻¹	3.5
	10 ⁻²	2
	10 ⁻³	1.5
(M. oral)	10°	—
	10 ⁻¹	10
	10 ⁻²	7
	10 ⁻³	5
6, 7, 22, 25	—	1.5
3, 4, 5, 19, 29	+	—
1, 2, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 20, 21, 23, 24, 26, 27, 28, 30	±	—

+ Inhibition zone ≥ 1 mm± 0.5 $\leq$ Inhibition zone < 1mm

*: milimeter of inhibition zone

かわらず、被検者血清はそれぞれ M. salivarium, M. orale type 1 のみと反応し、“7”では M. salivarium と M. orale type 1 の両菌種が分離されたが、被検者血清では M. salivarium のみとしか反応しなかった。IHA と CF では約 4:1 と CF の方が抗体価は低い、大体平行して反応が見られ、GI に於いても陽性または凝陽性を示した血清は 1 例を除いて全て IHA で陽性反応を示したものであった。歯槽膿漏患者の場合、被検者 30 人の内、20 人が M. salivarium か M. orale type 1 のどちらか一方に対してのみ抗体価を示したが、両方共反応した血清は 1 例もなかった。また Mycoplasma が分離されなかったり、CFU の低い被検者の血中抗体が 128 倍以上もあったのに反し、CFU が高いにもかかわらず血中抗体の見られなかった例も多かった。

考 察

口腔内正常細菌叢の 1 員であると考えられる Mycoplasma と歯周疾患との関係を考える場合、先ずその数が問題にされて良いと思われる。本実

験に於いては歯槽膿漏患者の含嗽液中の Mycoplasma の CFU は健康人のそれに対し、統計学的に明らかに増加している事が示された。含嗽液を材料として用いた場合は必ずしも歯肉囊部の菌叢を反映しているとは言えないが、同一の菌種に関しては十分比較できるものと考えられる。殊に Mycoplasma の口腔内における存在場所は歯石ないし歯肉囊と言われている(熊谷・岩淵²⁶⁾、熊谷等²⁷⁾) 事からも、歯槽膿漏患者に歯肉囊中の Mycoplasma が増加していると考えて良いと思われる。

Löe et al¹⁾によれば歯肉炎の発症に比例して糸状菌、嫌気性 Vibrio 等の嫌気性菌の増加する事が示されているが、Mycoplasma も之等の菌と同様の変動を示しているものと考えられる。

M. salivarium と M. orale type 1 の口腔よりの分離率については報告により異っている。例へば、渡辺²³⁾によれば唾液を材料とした場合には M. salivarium 25%に対し、M. orale type 1 は 75%であったと言うが、熊谷、岩淵²⁶⁾は歯石、歯肉囊から分離した Mycoplasma は全て M. salivarium であったと、また Razzin et al¹⁷⁾は口腔内各所から分離された Mycoplasma で同定できたものは全て M. salivarium であったと報告している。一方 Oropharynx から M. salivarium の方が高頻度に分離されたと言う報告が多い(Inglis et al²¹⁾、由利等²⁴⁾、Hava Haas et al¹⁹⁾、Bredt et al²²⁾ Guidice et al¹⁸⁾) が、両者がほぼ同率あるいは M. orale type 1 の方が高率に分離されたと言う報告もみられる(Clyde¹³⁾ Fox et al¹⁶⁾ Hendley et al²⁰⁾ Jao et al²⁹⁾)。本実験では分離された Mycoplasma species は健康人に比べ歯槽膿漏患者では M. Salivarium が著明に増加している。すなわち健康人の場合には M. salivarium と M. orale type 1 の分離率は約 1:1 であったのに対し、歯槽膿漏患者では約 4:1 になっている。

各被検者についても M. salivarium のみが分離された例は健康人の場合 30% であったのに対し歯槽膿漏患者では 81% と著明に多く、また同一人で M. salivarium, M. orale type 1 の両菌種

が分離された例が健康人では40%であるのに対し、歯槽膿漏患者では3.8%であった。

口腔内に於ける *Mycoplasma* の棲息場所としては、最近 *M. salivarium* は主として歯石、歯肉嚢等口腔各所、*M. orale type 1* は咽頭部と考えられているが、本実験の結果もそれを裏付けているものと思われる。すなわち歯槽膿漏に罹患した場合、歯肉嚢部の嫌気性菌が増加するのに平行して、歯肉嚢部に常在すると思われる *M. salivarium* が著明に増加するが、之に対し *M. orale type 1* は *M. salivarium* に比べ歯肉嚢部に少いたため、歯槽膿漏症との関連も弱く、相対的に検出率が低下すると考えるのが妥当と思われる。

しかしながら一方歯槽膿漏患者で *M. orale type 1* のみが分離された例が4例みられた。本実験では歯槽膿漏以外の疾患について検査を行わなかったもので、この理由については不明である。含嗽液を材料とした事が関係しているかも知れない。この事は *Mycoplasma* の検出されなかった4名の歯槽膿漏患者についても抗生物質の使用等と共に、考慮する必要があるのかもしれない。

健康人の3例、歯槽膿漏患者の2例から分離された合計14株は継代中に bacterial form に変異した。変異した株はグラム陰性の小桿菌で纖毛を有する通性嫌気性の菌であった。之は Unstable な L-form と考えるのが妥当と思われるが、口腔内で L-form として存在していたのか、ある種の細菌が分離培地の PC、酢酸タリウムの影響で L-form となって検出されたのかは不明である (Robert and Wittler⁵⁵⁾, Robert⁵⁶⁾, Robert⁵⁷⁾)。歯槽膿漏患者の2例では分離された集落が全て bacterial form に変異した事は興味深い事であり、目下検討中である。

M. salivarium および *M. orale type 1* の血中抗体についての報告は余り多くない (由利等²⁴⁾, 荒井, 石田⁵⁴⁾) が熊谷・岩淵²⁶⁾ は *M. salivarium* に対する中和抗体の保有率が健康人では8.4%であるのに対し、歯槽膿漏患者では64%と増加していると報告している。本実験では *M. salivarium* に対する IHA 抗体保有率は健康人で約46%歯槽

膿漏患者で約57%と著しい差はみられなかった。metabolic inhibition (MI) 抗体についてであるが Chanock et al⁵⁸⁾ は18人の Volunteer の血清で15人(83%)に8倍以上の MI 抗体値が保有されていると報告している。

一方 CF では歯槽膿漏患者の場合8倍以上の抗体価を示したものが9例(30%)にみられたのに対し、健康人では0であった。歯槽膿漏患者で、CF で8倍以上の抗体価を示した被検者は IHA では全て32倍以上の抗体価を示し、両者の抗体価は1:4ではほぼ平行していた。しかし健康人の場合 IHA で128倍、64倍の抗体価を有した被検者でも CF 抗体は証明されなかった。この事は IHA 抗体と CF 抗体が必ずしも平行しない事を示すもので、歯槽膿漏症と *Mycoplasma* の関係を考える場合、CF抗体或は中和抗体が IHA 抗体よりも、より強い関係がみられるのかも知れない。

しかし Volunteer を用いての *M. hominis type 1* の上気道の感染実験で50人中38人に IHA 抗体の上昇をみたが、CF 抗体の上昇は殆んどみられなかったという Mufson et al³⁷⁾ の報告や、*M. pneumoniae* に対する抗体が子供では殆んどみられない^{28) 31) 59)} のに対し、成人では20~50%に証明されたという報告^{28) 31) 32) 45) 54) 60) 61)} 等から *M. salivarium* に対する血中抗体の存在、殊にその Titre の問題は更に検討を要するものと思われる。

M. orale type 1 に対する抗体は健康人では IHA, CF 共に証明されなかったが、歯槽膿漏患者の場合 IHA で8倍の抗体価を示した被検者が3例(10%)認められた。この中2例からは *M. orale type 1* のみが分離されていて、また他の1名からは *M. salivarium* のみが分離されている事は興味深い事であるが、今後の検討を必要とする事と思われる。

IHA で8倍以上の抗体価を示した被検者は健康人46%、歯槽膿漏患者67%であったが、之等抗体を保有している被検者と検出された *Mycoplasma* の CFU とは必ずしも平行しなかった。逆に高い抗体価を示した被検者で *Mycoplasma* の検出されない例もみられた。之等の事は歯槽膿漏症と My-

coplasma の関係, および歯槽膿漏症と血中抗体の関係を考える場合重要な意味を持つのではないと思われるが, 現在 *Mycoplasma* に対する抗体の産生が歯肉嚢部に於ける感染に由来するものかどうか明瞭でないことから, 今後の問題であると思われる。

被検者血清の disc による GI は, IHA, CF の結果とほぼ一致したものであったが, 血中抗体価の低い故か必ずしも明瞭な結果は得られなかった。

本実験では *M. salivarium* と *M. orale* type 1 の両種の抗体を有する被検者はみられなかった。之は偶然であるのか, 何か理由があるのかは現在何とも言えない。

所謂歯槽膿漏症では健康人に比べ *Mycoplasma* 殊に *M. salivarium* が増加している事は *M. pneumoniae* が呼吸器患者で, T-strain が泌尿生殖器患者で健康人よりも増加しているという報告と関連して十分検討するに値する問題と考えられる。

先に述べた如く, 歯槽膿漏症に関係すると考えられている細菌の場合, 起因因子としてその酵素活性, 菌体成分 (内毒素, Mucopeptide) および代謝産物 (アンモニア, Peroxide) の組織に対する障害作用が挙げられている。

M. salivarium および *M. orale* type 1 の場合, 組織に対して障害作用を示す可能性のあるものとしてはアンモニアが考えられる。Rizzo⁴⁾ は歯周組織の変性とアンモニア濃度が比例すると述べているが, *Mycoplasma* はアルギニンを分解しアンモニアを産生する事 (Smith⁶³⁾ Smith⁶⁴⁾ Schimke and Barile⁶²⁾), またこの作用により培養細胞に変性を起す事が知られている。しかし之等の代謝産物が歯槽膿漏症を併発せしめるか否かは, 細菌の菌体成分, 酵素ないし代謝産物の場合と同様, 今後検討する必要がある問題と思われる。

歯槽膿漏症と *Mycoplasma* との関係は直接的なもののみでなく, 他の細菌および L-form 等との相互作用等も考慮に入れて検索して行く必要があると思われるので, 今後更に実験を重ねて行く予

定である。

稿を終るにあたり, 終始御懇篤なる御指導と御校閲を賜った口腔細菌学教室堀川高大教授, 実験の御指導をいただいた鷹森健志郎助教授及び渡辺維男博士に深甚なる感謝を捧げます。また本研究に対し御鞭撻を頂いた第2保存学教室木下四郎教授に衷心より感謝致すと共に種々の御助言, 御鞭撻を下さいました口腔細菌学教室員各位にお礼申し上げます。

本論文の要旨の1部は1969年4月8日第42回日本細菌学会総会および1970年11月23日第12回歯科基礎医学会に於いて発表しました。

文 献

- 1) Löe, H., Theilade, E., and Jensen, S. B.: Experimental gingivitis in man, *J. Periodon*, 36: 177, 1965.
- 2) Socransky, S. S.: Relationship of bacteria to etiology of periodontal disease, *J. Dent. Res*, 49: 203, 1970.
- 3) Bahn, A. N.: Microbial potential in the etiology of periodontal disease, *J. Periodon*, 41: 603, 1970.
- 4) Rizzo, A. A.: Rabbit corneal irrigation as a model system for study on the relative toxicity of bacterial products implicated in periodontal disease. The toxicity of neutralized ammonia solutions, *J. Periodon*, 38: 491, 1967.
- 5) 高添一郎: 歯垢と歯石—できたと組成—, 歯界展望, 34: 757, 1969.
- 6) Smith, P. F., and Morton, H. E.: Isolation of Pleuropneumonia-like organisms from the throats of human, *Science*, 113: 623, 1951.
- 7) Morton, H. F., Smith, P. F., Williams, N. B., and Eickenberg, C. F.: Isolation of Pleuropneumonia-like organisms from human saliva: A newly detected member of the oral flora, *J. Dent. Res*, 30: 415, 1951.
- 8) Dienes, L., and Madoff, S.: Differences between oral and genital strains of human Pleuropneumonia-like organisms, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med*, 82: 36, 1953.
- 9) Nicol, C. S., and Edward, D. G.: Role of organisms of the Pleuropneumonia group in human genital infections, *Brit. J. Ven. Dis*, 29: 141, 1953.
- 10) Edward, D. G., and Freundt, E. A.: The classification and nomenclature of organisms of the Pleuropneumonia group, *J. gen. Microbiol*, 14: 197, 1956.

- 11) Herderscheê, D., Ruys, A. R., and Rhijin, G. R.: A new oral Mycoplasma isolated from the tonsils of two patients suffering from scarlatina, *Antonie van Leeuwenhoek*, 29 : 157, 1963.
- 12) Lemcke, R. M.: The relation of a type Mycoplasma isolated from tissue cultures to a new human oral Mycoplasma, *J. Hyg*, 62 : 351, 1964.
- 13) Clyde, W. A.: Mycoplasma species identification based upon growth inhibition by specific antisera, *J. Immunol*, 92 : 958, 1964.
- 14) Taylor-Robinson, D., Canchola, J., Fox, H., and Chanock, R. M.: A newly identified oral Mycoplasma (*M. orale*) and its relationship to other human Mycoplasmas, *Am. J. Hyg*, 80 : 135, 1964.
- 15) Taylor-Robinson, D., Fox, H., and Chanock, R. M.: Characterization of a newly identified Mycoplasma from the human oropharynx, *Am. J. Epidemiol*, 81 : 180, 1965.
- 16) Fox, H., Purcell, R. H., and Chanock, R. M.: Characterization of a newly identified Mycoplasma (*Mycoplasma orale* type 3) from the human oropharynx, *J. Bact*, 93 : 36, 1969.
- 17) Razin, S., Michmann, J., and Shimshoni, z.: The occurrence of Mycoplasma (Pleuropneumonia-like organisms, PPLO) in the oral cavity of dentulous and edentulous subjects, *J. Dent. Res*, 43 : 402, 1964.
- 18) Del Giudice, R. A., Robillard, N. F., and Carski, T. R.: Immunofluorescence identification of Mycoplasma on agar by use of incident illumination, *J. Bact*, 93 : 1205, 1967.
- 19) Hava Haas, Sacks, T. G., and Razin, S.: Identification of Mycoplasmas of human origin, *J. gen. Microbiol*, 52 : 119, 1968.
- 20) Hendley, J. O., and Jordan, W. S.: Mycoplasma pharyngeal flora in civilians, *Am. Rev. Resp. Dis*, 97 : 524, 1968.
- 21) Inglis, J. M., Davies, J., and Andrews, B. E.: On the comparative Mycoplasma flora of the upper and lower respiratory tract of man, *Mycoplasma diseases of man*, Jena, 1969, Fischer, 125.
- 22) Bredt, W., Brunner, H. und Maisch, G.: Vorkommen von Mycoplasmen in Rachenabstrichen, *ZBL. Bakt. I orig*, 210 : 538, 1969.
- 23) Watanabe, T.: Biological and serological studies on oral Mycoplasma, *Bull. Tokyo Med. Dent. Univ*, 14 : 447, 1967.
- 24) 由利恭子, 佐藤征, 菅場忠一郎, 柏崎均, 松本慶蔵, 熊谷勝男, 石田名香雄: ヒト臨床材料からのマイコプラスマの分離同定と血清中和抗体, *医学のあゆみ*, 65 : 67, 1968.
- 25) 北見治, 高野暁: 慢性扁桃炎より分離した Mycoplasma に関する研究, *日本細菌学誌*, 25 : 250, 1970 (抄録).
- 26) 熊谷勝男, 岩淵武介: 口腔微生物としてのマイコプラスマとくに歯槽膿漏との関連において一, *歯界展望*, 33 : 785, 1969.
- 27) 熊谷勝男, 由利恭子, 岩淵武介, 宮本勉, 日沼頼夫, 石田名香雄: 口腔内マイコプラスマの生態, *医学のあゆみ*, 73 : 639, 1970.
- 28) Lind, K.: Isolation of *Mycoplasma pneumoniae* (Eaton agent) from patients with primary atypical pneumonia, *Acta path. et microbiol. scandinav*, 66 : 124, 1966.
- 29) Jao, R. L., Rubenis, M., and Jackson, G. G.: Isolation of *Mycoplasma pneumoniae* from adults with respiratory infections, *Arch Intern Med*, 117 : 520, 1966.
- 30) Chanock, R. M., Mufson, M. A., James, W. D., Fox, H. H., Bloom, H. H., and Forsyth, B.: Recovery of PPLO of atypical pneumonia on artificial agar medium, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med*, 110 : 543, 1962.
- 31) Suhs, R. H., and Feldman, H. A.: Serologic epidemiologic studies with *M. pneumoniae*. 11. Prevalence of antibodies in several populations, *Am. J. Epidemiol*, 83 : 357, 1966.
- 32) Taylor-Robinson, D., Purcell, R. H., Wong, D. C., and Chanock, R. M.: A colour test for the measurement of antibody to certain Mycoplasma species based upon the inhibition of acid production, *J. Hyg*, 64 : 91, 1966.
- 33) Shepard, M. C.: The recovery of Pleuropneumonia-like organisms from Negro men with and without nongonococcal urethritis, *Am. J. Syph. Gonorr. Ven. Dis*, 38 : 113, 1954.
- 34) Shipley, A., Bowman, S. J., and O'connor, J. J.: T-strain Mycoplasma in non-specific urethritis, *MED. J. AUST*, 55 : 794, 1968.
- 35) Kundsins, R. B., Drisoll, S. G. and Praznik, J.: The role of Mykoplasma in spontaneous abortion, *Mycoplasma diseases of man*, Jena, 1969, Fischer, 141.
- 36) Hayflick, L., and Koprowski, H.: Direct agar isolation of Mycoplasmas from human leukaemic bone marrow, *Nature*, 205 : 713, 1965.
- 37) Mufson, M. A., Ludwig, W. M., Purcell, R. H., Cate, T. R., Taylor-Robinson, D., and Chanock, R. M.: Exudative pharyngitis following experimental *Mycoplasma hominis*

- type 1 infection, J. Am. Med. Assoc, 192 : 1146, 1965.
- 38) 熊谷勝男, 西連寺剛, 岩淵武介, 日沼頼夫, 由利恭子, 多田宜文: *M. salivarium* の生態と生物学的性状, 日本細菌学誌, 24 : 654, 1969 (抄録).
 - 39) Chanock, R. M., Hayflick, L., and Barile, M. F. : Growth on artificial medium of an agent associated with atypical pneumonia and its identification as a PPLO, Proc. NA. S. U. S, 48 : 41, 1962.
 - 40) Shepard, M. C., and Lunceford, C. D. : Effect of pH on human Mycoplasma strains, J. Bact, 89 : 265, 1965.
 - 41) 東量三, 扇元敬司, 須藤恒二 : Steel wool を用いる嫌気培養法, 日本細菌学誌, 17 : 802, 1962.
 - 42) Parker, C. A. : Anaerobiosis with iron wool, Austral. J. Exp. Biol. Med. Sci, 33 : 33, 1955.
 - 43) Hungate, R. E. : The anaerobic cellulolytic bacteria, Bact. Rev, 14 : 1, 1950.
 - 44) 小寺健一 : 診断微生物学における Mycoplasma, メディヤ・サークル, 11 : 293, 1966.
 - 45) Dowdle, W. R., and Robinson, R. Q. : An indirect hemagglutination test for diagnosis of Mycoplasma pneumoniae infections, Proc. Soc. Exp. Biol, 116 : 947, 1964.
 - 46) Stanbridge, E., and Hayflick, L. : Growth inhibition test for identification of Mycoplasma species utilizing dried antiserum-impregnated paper discs, J. Bact, 93 : 1392, 1967.
 - 47) 医科学研究所学友会 : 細菌学実習提要, 東京, 1968, 丸善, 260頁.
 - 48) 清水文彦 : 微生物学実習書(下巻), 東京, 1963, 医歯薬出版, 302頁.
 - 49) 緒方富雄 : 理論血清学, 東京, 1968, 東大出版, 167頁.
 - 50) Taylor-Robinson, D., Somerson, N. L., Turner, H. C., and Chanock, R. M. : Serological relationships among human Mycoplasmas as shown by complement-fixation and gel diffusion, J. Bact, 85 : 1261, 1963.
 - 51) 日本化学会 : 実験化学講座, 23 (生物化学1), 東京, 昭34, 丸善, 37頁.
 - 52) Eng, J. : Studies on the complement fixation test with Mycoplasma pneumoniae antigen. 1. Production of antigen, Acta path. et microbiol. scandinav, 71 : 79, 1967.
 - 53) Klieneberger-Nobel. : PPLO. Mycoplasmataceae, London and New York, 1962, Academic Press, p. 115.
 - 54) 荒井澄夫, 石田名香雄 : ヒトマイコプラズマ血清診断の問題点, 臨床検査, 13 : 1101, 1969.
 - 55) Roberts, R. B., and Wittler, R. G. : The L form of Neisseria meningitidis, J. gen. Microbiol, 44 : 139, 1966.
 - 56) Roberts, R. B. : L form of Neisseria gonorrhoeae, J. Bact, 92 : 1609, 1966.
 - 57) Roberts, R. B. : Production of L form of Neisseria meningitidis by antibiotics, Proc. Soc. Exp. Biol. Med, 124 : 611, 1967.
 - 58) Purcell, R. H., Taylor-Robinson, D., Wong, D. C., and Chanock, R. M. : A color test for the measurement of antibody to the non-acid-forming human Mycoplasma species, Am. J. Epidemiol, 84 : 51, 1966.
 - 59) Fritsche, H., Sachdev, K. S., Trojan, I., und Hayek, H. : Über das vorkommen von Antikörpern gegen Mykoplasmen bei Kindern, ZBL. Bact. 1. Abt. Orig, 208 : 289, 1968.
 - 60) Lind, K., : An indirect haemagglutination test for serum antibodies against Mycoplasma pneumoniae using formalinized, tanned sheep erythrocyte, Acta path. microbiol. scandinav, 73 : 459, 1968.
 - 61) Grayston, J. T., Foy, H. M., Kenny, G. E., and McMahan, R. : Incidence of Mycoplasma pneumonia infection in a civilian population, Mycoplasma diseases of man, Jena, 1969, Fischer, p. 205.
 - 62) Schimke, R. T., and Barile, M. F. : Arginine metabolism in Pleuropneumonia-like organisms isolated from mammalian cell culture, J. Bact, 86 : 195, 1963.
 - 63) Smith, P. F. : Amino acid metabolism by pleuropneumonia-like organisms, 1. General catabolism, J. Bact, 70 : 552, 1955.
 - 64) Smith, P. F. : Amino acid metabolism of PPLO, Ann. N. Y. Acad. Sci, 79 : 543, 1959.