原	著
---	---

分泌型 IgA の生物学的活性

——特に唾液中の分泌型 IgA による口腔常在菌に対する凝集活性——

佐藤信義

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）

（1978年10月14日 受付）

Biological Activity of Secretory IgA

——Particularly agglutinating activity of salivary SIgA against oral indigenous microorganisms——

Nobuyoshi Sato

Department of Oral Microbiology, School of Dentistry,
Tokyo Medical and Dental University
(Director: prof. Takahiro Horikawa)

要旨：ヒト耳下腺唾液より、イオン交換法ならびにゲル濾過法によって分泌型 IgA を分離精製し、主要な口腔常在菌15種18株に対する凝集活性を測定した。分泌型 IgA は13株の細菌に対して凝集活性を示した。特に凝集価の高い細菌は、*Lact. fermenti* および *Str. sanguis* であった。一方、*Str. mutans* B13, *Str. salivarius*, *Bact. matruchotii*, *Bact. melaninogenicus* および *Selenomonas* では凝集がみられなかった。

緒言

外分泌液中の主要な免疫グロブリンである分泌型 IgA (SIgA)²⁶⁾ に関しては、近年、多くの報告がなされているが²³⁾、構造面に関する研究が多く、生物学的活性を主体とした基礎的実験についての知見はきわめて乏しい現状である。通常 SIgA の活性として報告されているのは、ウイルス中和反応^{3,7,19)}、細菌凝集反応²⁷⁾、溶菌反応^{1,16)}などのみである。

また、SIgA は唾液中においても主要な免疫グロブリンであり²⁶⁾、ヒトの口腔内において常在菌を凝集し、二次的に何らかの生物学的活性を発揮

するものと考えられている^{12,28)}。しかしながら、唾液より分離した SIgA による主要な口腔常在菌の凝集についての報告は少なく^{9,24,28)}、唾液 SIgA の特異性については不明の点が多い。

今回、ヒト耳下腺唾液 (HPS) より SIgA を分離精製し、主要な口腔常在菌に対する活性を測定し、特異性を検討したので報告する。

材料と方法

1. SIgA の分離精製

刺激耳下腺唾液を採取し、おもに Tomasi の方法²⁶⁾に従ってイオン交換法ならびにゲル濾過法で分離精製した。

約20名より採取した HPS はただちに蒸留水中に一晩透析し、凍結乾燥して使用するまで4°C中に保存した。

DEAE イオン交換クロマトグラフィーは、DE-52 (whatman 社製) を用いて、① pH 7.4, 0.01 M, ② pH 6.2, 0.1 M, ③ pH 4.8, 0.3 M の3種の PBS による stepwise 法で行った。その際、凍結乾燥した HPS は約 100 mg/ml の割合で pH 7.4, 0.01 M PBS に溶解し、PBS 中に一晩透析し、遠沈して使用した。

ゲル濾過は、Sephadex G-200 (Pharmacia 社製) および Bio-Gel A15m (BIO-RAD 社製) を使用して行った。カラムは2.5 cm×100 cm (pharmacia 社製) のものを用い、pH 7.4, 0.14 M PBS 0.2 M NaCl の緩衝液で溶出した。

2. SIgA の同定

免疫電気泳動は通法に従い、Veronal Buffer (pH 8.6, $\mu=0.05$) を用いて 1% agarose gel (Sigma 社製) 平板上で行った。

二元免疫拡散法は、上記と同様の 1% agarose gel 平板上で Ouchterlony 法で行った。

単純放射免疫拡散法 (SRID) は、Tripartigen IgA (Behring 社製) を使用して行った。

抗 HPS および抗 SIgA 抗血清の作製法は、Hurlimann et al.¹⁷⁾ の方法に従って行った。すなわち、HPS および分離精製した SIgA 分画の生食溶液を等量の Freund の Complete adjuvant とともに emulsion とし、ウサギの足蹠と背部皮下に注射し、さらに約4週後に追加免疫した。SIgA 分画で免疫して得られた抗血清は、Cohn Fraction II (Chemical credentials 社製) で吸収して使用した。

抗ヒト IgA 抗血清は Behring 社製を、抗ヒト SC 抗血清は DAKO 社製を使用した。

3. 使用細菌

主要な口腔常在菌のうち、次の15種18株の細菌を使用した。

Str. mutans HS6 (serotype a⁵), Fa-1 (b), B13 (d), LM 7 (e), *Str. salivarius* (ATCC 9758), *Str. sanguis* (E206), *Str. mitis* (ATCC 9811), *Veill.*

alcalescens (ATCC 17746), *Veill. parvula* (ATCC 17743), *Act. viscosus* (ATCC 15987), *Lact. acidophilus* (IAM), *Lact. casei* (IAM), *Lact. fermenti* (IAM), *Bact. matruchotii* (ATCC 14266), *Lept. buccalis* (ATCC 14201), *Fusobacterium*, *Bact. melaninogenicus*, *Selenomonas*²⁵⁾.

このうち、*Fusobacterium* および *Bact. melaninogenicus* は唾液より分離した新鮮分離株である。培養に用いた培地は、*Veillonella* では Rogosa²¹⁾ の培地、*Lactobacillus* では Rogosa の SL 培地、*Fusobacterium* では Falkler, et al.⁸⁾ の記載した modified trypton 培地、*Bact. melaninogenicus* では Heart Infusion (BBL) 培地、他は Brain Heart Infusion (BBL) 培地である。ただし、*Actinomyces*, *Leptotrichia* および *Fusobacterium* の3菌種は弱い自己凝集を示したので、斎藤²²⁾に従って1:250の割合で Tween 80 を培地中に加えた。また *Bact. melaninogenicus* では培地中にヘミンおよび Vitamin K¹⁰⁾ を加えた。

細菌は培養後 9,000 g で10分間遠沈し、PBS で2回洗浄した後0.5%ホルマリンを加えた PBS に再浮遊させ、4°C中に使用するまで保存した。

4. 細菌凝集反応

細菌の PBS 浮遊液は吸光度 550 nm で 1.0 に調整した。

精製 SIgA は、SRID により IgA 換算量で、120 μ g/ml に調整した。HPS 中の IgA 量は 12 μ g/ml であったので、1 ml 当たりの IgA 含量は約10倍となっている。

この SIgA 溶液を試験管に 0.1 ml とり PBS で倍數希釈し、そこに等量の細菌浮遊液を加えて 37°C で2時間反応させ、一晩氷室に放置して翌日凝集価を判定した。凝集価は log₂ で表示した。ただし、*Actinomyces*, *Leptotrichia* および *Fusobacterium* の3菌種の凝集反応は、PBS の代わりに 1:250 の割合で Tween 80 を加えた Brain Heart Infusion 培地を用いて行った。

結 果

1. 分離精製の結果

濃縮した HPS を DE-52 で分画すると、主として、3つのフラクションが得られたが、そのうち、pH 6.2, 0.1M PBS で溶出したピークに抗 IgA 血清と沈降線が生じた。この分画を、さらに Sephadex G-200 でゲル濾過を行うと、void volume 付近で溶出する分画に IgA 活性が認められた。最後に、この分画を Bio-Gel A15m でゲル濾過の精製を繰り返し、2 番目の IgA rich のピークを濃縮して以下の実験に供した。この SIgA 分画を免疫電気泳動して抗 HPS との反応をみると、1 本の明瞭な沈降線を形成した (図 2)。

2. SIgA の同定

IgA rich の分画が SIgA であることを証明するために、ゲル内沈降反応と、免疫電気泳動を行った。

ゲル内沈降反応では、抗 SIgA は HPS との間に 2 本の沈降線を形成するが、抗原側の沈降線は SIgA との 1 本の沈降線と融合がみられた (図 1)。SIgA と正常血清との沈降線はスパーを形成しており、このスパーは SIgA 中の SC 成分によるものと思われる。

次に、免疫電気泳動した SIgA 分画と抗 HPS お

Fig. 1 Ouchterlony analyses of SIgA

SIgA: secretory IgA. HPS: human parotid saliva. NHS: normal human serum. a-SIgA: anti-secretory IgA.

Fig. 2 Immunoelectrophoresis of SIgA against anti-human parotid saliva and anti- α chain. Compare with HPS

HPS: human parotid saliva. SIgA: secretory IgA. a-HPS: anti-human parotid saliva. a-IgA: anti-IgA.

Fig. 3 Immunoelectrophoresis of SIgA against anti-SIgA and anti-sc. HPS is control.

SIgA: secretory IgA. HPS: human parotid saliva. a-SIgA: anti-secretory IgA. a-sc: anti-secretory component. a-HPS: anti-human parotid saliva.

よび抗 IgA 血清との反応では、それぞれ、同一易動度に明瞭な 1 本の沈降線を形成した (図 2)。

同様に、SIgA 分画を免疫電気泳動して、抗 SIgA, 抗 SC との反応をみると、同じ易動度内に沈降線が形成されており、SIgA には SC が結合していることがわかった (図 3)。

以上の結果より、IgA rich の分画は α 鎖と SC の両方の抗原性を持っており、SIgA と同定してもよいことがわかった。

3. SIgA の常在菌に対する凝集活性

SIgA が口腔内でいかなる役割を果たしている

Table 1 Agglutinating activity of SIgA against oral microorganisms

Bacteria	Agglutinating titre (log ₂)
<i>Streptococcus mutans</i> HS6 (a*)	2
<i>mutans</i> Fa1 (b)	1
<i>mutans</i> B13 (d)	—
<i>mutans</i> LM7 (e)	1
<i>salivarius</i> 9758	—
<i>sanguis</i> E206	4
<i>mitis</i> 9811	2
<i>Veillonella alcalescens</i> 17746	1
<i>parvula</i> 17743	±
<i>Actinomyces viscosus</i> 15987	3
<i>Lactobacillus acidophilus</i> (IAM)	3
<i>casei</i> (IAM)	±
<i>fermenti</i> (IAM)	5
<i>Bacterionema matruchotii</i> 14266	—
<i>Leptotrichia buccalis</i> 14201	3
<i>Fusobacterium</i>	2
<i>Bacteroides melaninogenicus</i>	—
<i>Selenomonas</i>	—

*Serotype of *St. mutans*

Initial concentration of SIgA was 120μg/ml

かを知るためには、まず第1に、どのような常在菌と結合するかが問題になる。この結合の特異性を知るために、主要常在菌に対する凝集活性を調べた。表1に示すように18株に対する凝集活性を調べたところ、13株に活性が認められた。特に強い活性が認められたのは、*Lact. fermenti* および *Str. sanguis* などに対してであった。しかし、*Str. mutans* B13, *Str. salivarius*, *Bact. matruchotii*, *Bact. melaninogenicus* および *Selenomonas* に対しては凝集がみられなかった。

考 察

唾液中には主要な免疫グロブリンとして、SIgAが存在することが知られている²⁶⁾。SIgAは *in vitro* で先ず抗原である細菌と結合後、凝集活性^{9, 24, 28)}を発揮しており、その結果引き続いて起こる生物学的反応を起こす引き金となると考えられている^{12, 28)}。一方、唾液中の細菌はSIgAでおおわれていることを Brandtzaeg et al.⁴⁾が蛍光抗体

法で明らかにしており、口腔内においてもSIgAは常在菌を凝集しているものと考えられる。しかしながら、唾液より分離精製したSIgAを用いて、口腔常在菌に対する凝集活性を調べた報告は少なく^{9, 24, 28)}、SIgAが一体、特異的な凝集活性を持つかどうか不明であった。そこで、今回の実験では、HPSよりSIgAを分離精製し、18株の口腔常在菌に対する凝集活性を調べてみた。

Str. mutans B13, *Str. salivarius*, *Bact. matruchotii*, *Bact. melaninogenicus* および *Selenomonas* の5種の細菌に対しては、凝集活性がみられなかった。実験に使用したSIgA濃度は、HPS中に含まれるIgA濃度より十分濃いものであるだけに、それらの菌種に対する凝集活性はかなり低いものと考えられる。逆に凝集価の高いものとしては、*Lact. fermenti*, *Str. sanguis*, *Act. viscosus*, *Lact. casei* および *Lept. buccalis* があげられる。これらの菌は、HPS中に含まれるIgA濃度で十分に凝集されると思われる。

Str. mutans の Bratthal⁵⁾による血清型分類で、それぞれa b d eに属する4種の菌に対する凝集活性を調べたところ、a型で凝集価が最も高く、d型で最も低い結果が得られた。これは、Arnold, et al.²⁾がHPSを用いて5種類の血清型の*Str. mutans*に対する凝集価を調べた成績とほぼ一致する。すなわち、彼らの結果によるとaおよびe型で凝集価が高く、d型で最も低かった。また、Bratthal⁶⁾が報告している*Str. mutans*の各国における血清型別の分布によると、日本ではc型とd型が最も多く分布しており、a, bおよびe型の分布は少ない。おそらく口腔内においては、a型の菌などはSIgAによって凝集されてしまい口腔内に定着しにくいものに対して、d型菌などはSIgAによる凝集を受けにくいために、逆に口腔内に定着しやすいと考えられる。

Gibbons, et al.¹³⁾によると、頬粘膜部には*Str. mitis*が多く常在しており、*Str. sanguis*や*Str. salivarius*もかなり分布していると報告している。しかし、それらの菌種に対して特にHPS中のSIgAの特異性が上昇あるいは減少している結果

は得られず、多菌種にわたって SIgA の凝集活性が認められた。このことは、口腔に常在する菌の間に共通抗原が存在するためとは考えにくく、むしろ、主要常在菌が絶えず弱い抗原刺激を繰り返す結果、多くの菌種に対して凝集活性を示すものと考えられる。すでに、腸管内でも観察されているように¹⁴⁾、口腔内でも正常細菌叢が粘膜局所の IgA 産生に重要なかわり合いを持っていることを示唆している。

SIgA が細菌と結合・凝集し、どのような二次的反応を引き起こすかについての研究は少ないが、Williams, et al.²⁸⁾によれば HPS 中の SIgA がある種の口腔常在菌を凝集し、その菌が口腔粘膜上皮細胞へ付着するのを阻止しているという。同様の活性は、混合唾液中に含まれる糖蛋白^{11, 15, 18, 29)}にも存在すると考えられている。また Ørstavik, et al.²⁰⁾によれば、HPS は *Str. sanguis* や *Str. salivarius* を凝集し、それらの菌がペリクルへ付着するのを抑制していると報告しているが、このような活性が SIgA にも認められるかどうかは興味のある問題である。

このように、SIgA の凝集が口腔内でどのような役割を果たしているかについての報告は少なく、また、非特異的凝集因子である糖蛋白とどのようなかわり合いを持っているかも不明である。今後、これらの問題について研究を進めて行く予定である。

謝 辞

稿を終えるにあたり、ご指導とご校閲を賜りました堀川高大教授に謹んで感謝の意を表します。また終始ご指導ご援助をいただきました斎藤祐一助教授ならびに口腔細菌学教室の諸先生方に心からお礼申し上げます。

文 献

- 1) Adinolfi, M. et al.: Serological properties of γ A antibodies to *escherichia coli* present in human colostrum. *Immunology*, 10: 517-526, 1966.
- 2) Arnold, R. R. et al.: Naturally occurring secretory immunoglobulin a antibodies to *strepto-*

coccus mutans in human colostrum and saliva. *Infect. Immun.*, 14: 355-362, 1976.

- 3) Artenstein, M. S. et al.: Identification of the antiviral substances in nasal secretions. *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, 117: 558-562, 1964.
- 4) Brandtzaeg, P. et al.: Adsorption of immunoglobulin a onto oral bacteria in vivo. *J. of Bact.*, 96: 242-249, 1968.
- 5) Bratthall, D.: Demonstration of five serological groups of streptococcal strains resembling *streptococcus mutans*. *Odonotol. Revy*, 21: 143-152, 1970.
- 6) Bratthall, D.: Demonstration of *streptococcus mutans* strains in some selected areas of the world. *Odont. Revy*, 23: 401-410, 1972.
- 7) Douglas, R. G. et al.: Rhinovirus neutralizing antibody in tears, parotid saliva, nasal secretion and serum. *J. of Immunol.*, 99: 297-303, 1967.
- 8) Falkler, W. A. Jr. & Hawley, C. E.: Hemagglutinating activity of *fusobacterium nucleatum*. *Infect. Immun.*, 15: 230-238, 1977.
- 9) 福田富男: 分泌型 IgA の精製と口腔内細菌に対する抗体活性について. 歯基礎誌, 16: 395-406, 1974.
- 10) Gibbons, R. J. & Macdonald, J. B.: Hemin and vitamin K compounds as required factors for the cultivation of certain strains of bacteroides melaninogenicus. *J. Bact.*, 80: 164-170, 1960.
- 11) Gibbons, R. J. & Spinell, D. M.: Salivary-induced aggregation of plaque bacteria.: in Mac-Hugh Dental plaque. Livingstone, 1970, Edinburgh, pp. 207-215.
- 12) Gibbons, R. J.: Bacterial adherence to mucosal surfaces and its inhibition by secretory antibodies. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 45: 315-325, 1974.
- 13) Gibbons, R. J. & Houde, J. van.: Bacterial adherence in oral microbial ecology. *Annual R. Microbiol.*, 29: 19-44, 1975.
- 14) Grabbé, P. A., et al.: The normal microbial flora as a major stimulus for proliferation of plasm cells synthesizing IgA in the gut. *Int. arch. allergy*, 34: 362-375, 1968.
- 15) Hay, D. I. et al.: Characteristics of some high molecular weight constituents with bacterial aggregating activity from whole saliva and dental plaque. *Caries Res.*, 5: 111-123, 1971.
- 16) Hill, I. R. & Porter, P.: Studies of bactericidal activity to *escherichia coli* of porcine serum and colostrum immunoglobulins and the role of lysozyme with secretory IgA. *Immunology*, 26: 1239-1250, 1974.

- 17) Hurliman, J. & Zuber, C.: In vitro protein synthesis by human salivary glands. 1. Synthesis of salivary IgA and serum proteins. *Immunology*, 14: 809-817, 1968.
- 18) Kondo, W., et al.: Properties of the human salivary aggregating factor for *Leptotrichia buccalis* cells. *Archs oral Biol.*, 23: 453-458, 1978.
- 19) Ogra, P. L.: Antiviral aspects of local immunity. Mergenhagen, S. E. & Scherp, H. W. *Comparative immunology of the oral cavity*. Maryland, 1973, N. I. H., pp. 38-67.
- 20) Ørstavik, D., et al.: In vitro attachment of *Streptococci* to the tooth surface. *Infect. Immun.*, 9: 794-800, 1974.
- 21) Rogosa, M. & Bishop, F. S.: The genus *Veillonella*. 2. Nutritional studies. *J. of Bact.*, 87: 574-580, 1964.
- 22) Saito, Y.: Biological activity of papain digested Streptococcal anti-M antibody. *J. J. Micro.*, 13: 19-28, 1969.
- 23) 齋藤祐一, 他: 分泌型IgAの生物学的活性—特に抗菌免疫を中心として—. *口病誌*, 43: 1-6, 1976.
- 24) Sirisinha, S.: Reaction of human salivary immunoglobulins with indigenous bacteria. *Archs oral Biol.*, 15: 551-554, 1970.
- 25) Toda, H.: Studies on the oral anaerobic motile fusiform bacilli. *Bull. Tokyo Med. Dent. Univ.*, 15: 133-159, 1968.
- 26) Tomasi, T. B., et al.: Characteristic of an immune system common to certain external secretions. *J. Exp. Med.*, 121: 101-124, 1965.
- 27) Tourville, D. T., et al.: Natural antibodies of human serum, saliva and urine reactive with *Escherichia coli*. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, 128: 722-727, 1968.
- 28) Williams, R. C. & Gibbons, R. J.: Inhibition of bacterial adherence by secretory immunoglobulin A: A mechanism of antigen disposal. *Science*, 177: 697-699, 1972.
- 29) Williams, R. C. & Gibbons, R. J.: Inhibition of streptococcal attachment to receptors on human buccal epithelial cells by antigenically similar salivary glycoproteins. *Infect. Immun.*, 11: 711-718, 1975.