歯周疾患患者血清中の抗 *Bacteroides* *asaccharolyticus* 抗体について

関 隆

東京医科歯科大学歯学部第2 歯科保存学教室

(指導：木下四郎教授)

(昭和56年12月20日受付)

Serum Antibody Specific for *B. asaccharolyticus* in the Patients with Periodontal Disease

Takasi SEKI

Department of Periodontology, School of Dentistry

Tokyo Medical and Dental University

(Chief and Director : Prof. Shiro KINOSHITA)

Some species of gram-negative anaerobic bacteria have been shown to play an important role in the pathogenesis of inflammatory periodontal disease. In these organisms *Bacteroides asaccharolyticus* has been found predominantly in the subgingival plaque which was obtained from patients with adult or generalized juvenile periodontitis. There are some evidence that this organism might elicit humoral immune response during the course of periodontal disease by passing the capsule through pocket epithelium.

An enzyme-immunoassay, which was sensitive enough to determine low amount of antibody was used for measuring serum antibody titer specific for *B. asaccharolyticus* (strain 381). The serum was obtained from 16 patients with periodontal disease and 14 subjects with healthy periodontal tissue. Various clinical parameters were measured from these patients and subjects at that time. Following results

were obtained.

1. The diseased group showed significantly higher antibody titer specific for *B. asaccharolyticus* than the healthy group. ($P < 0.05$)
2. Concerning the relation between the alveolar bone loss and the antibody titer, it was found that severe bone loss group (more than 40%) had greater antibody titer than minimal bone loss group.
3. A correlation between severity of disease and the increase of antibody titer was also positively observed, but significant difference was not statistically obtained. These results indicate the passage of the bacterial components through pocket epithelium and the production of the specific humoral antibody on the patients with periodontal disease. This specific antibody may play protective role, however destructive effects of the immunological reaction should be also considered.

序 論

炎症性歯周疾患の病理組織学的, 免疫組織学的研究か

本論文の要旨は, 第24回秋季日本歯周病学会総会で発表した。

ら, 炎症歯肉組織中に T リンパ球, B リンパ球, プラズマ細胞などの種々の免疫細胞が出現することが認められている¹⁻⁵⁾。炎症歯肉中や歯肉溝浸出液中には各種免疫グロブリンや, 補体成分がふくまれており⁶⁻¹³⁾, その免疫グロブリンの一部はある種の口腔細菌に対する特異抗体であるといわれている¹⁴⁾。歯肉組織中や歯肉溝より採

集した白血球の表面には抗原と抗体が結合して形成される抗原抗体複合物が存在するという報告もみられている¹⁵⁻¹⁷⁾。これらの所見はいずれも歯肉組織内、あるいは歯肉溝中でプラークを構成する細菌と、その宿主との間で免疫反応が起きており、その過程が歯周疾患の成立に関係していることを示唆している¹⁸⁻²⁰⁾。

最近、歯周ポケットの底部より嫌気的にプラークを採集する方法が開発され^{21,22)}、歯周疾患患者の歯周ポケット内より、いくつかのグラム陰性嫌気性桿菌が高い頻度で分離され、これらの細菌が歯周疾患の成立になんらかの役割をはたしているものと考えられるようになってきた。*Bacteroides asaccharolyticus* は成人の歯周疾患患者の歯周ポケット内より高率に分離される細菌であり²²⁻²⁷⁾、レントゲンの骨吸収の速度が速いと思われる症例で分離されることが多く、臨床的な炎症の程度と、その検出頻度との間には正の相関関係があるとされている²⁵⁾。さらに soft food と silk ligature によりサルに実験的歯周炎を起こした場合に、骨吸収が認められ、臨床症状が悪化する時期に *B. asaccharolyticus* が増加することが報告されている^{26,27)}。ビーグル犬を用いた同様の実験においても実験開始後14日目に、*B. asaccharolyticus* 様のグラム陰性嫌気性桿菌が歯周ポケット内より分離、培養される細菌の34.7%をしめたことが報告された²⁸⁾。

歯周ポケット内で *B. asaccharolyticus* が増殖すれば、細菌の産生物、あるいは菌体成分などがポケット上皮を透過して宿主内に侵入すると考えられる^{29,30)}。ポケット上皮の破壊が高度である場合には菌体自体も歯周組織内に直接侵入することも最近では知られている³¹⁾。細菌産生物、菌体成分、あるいは菌体自体が歯周疾患の際にポケット上皮を通過して生体内に侵入するならば、これら外来異物に対して宿主は免疫反応を起こし、これら外来異物に対する特異抗体を産生する可能性が強い。今回、歯周ポケットより分離された、*B. asaccharolyticus* に対する様々な程度の歯周疾患患者血清中の特異抗体価を従来の沈降反応を利用する方法や、血球凝集反応に比べ、より感度の高い酵素免疫測定法を用い^{32,33)}、測定した。その抗体価と歯周疾患の臨床症状との間の関連性の有無を検索する目的で以下の実験を行なった。

材料と方法

(1) 被検者

被検者として東京医科歯科大学歯学部付属病院第2保存科外来を受診した歯周疾患患者16名(男性5名、女

表1 被検歯と診査項目

	6	1	4
4	1	6	

Gingival Index (Löe & Silness)

Plaque Index (Silness & Löe)

Pocket Depth

Alveolar Bone Loss (Schei et al.)

性11名、年齢16歳から53歳)と、対照群として臨床的に健康な歯周組織をもつ東京医科歯科大学歯学部第2保存科医局員、および歯科衛生士学校学生14名(男性10名、女性4名、年齢19歳から29歳)を選んだ。いずれの被検者も問診により全身的に健康であることを確認した。すべての被検者について歯周組織の状態を分類、記録するために⁶/₄₁¹⁴/₆の6本の歯について以下にあげる項目を診査した(表-1)。診査はすべて同一人が行なった。

① Gingival Index (GI)³⁴⁾

Löe and Silness の Gingival Index を用い各被検歯の唇頬側面のみを評価し、6歯についての値の平均値を算出し、これをその被検者の Gingival Index とした。

② Plaque Index (PI)³⁵⁾

Silness and Löe の Plaque Index を用い各被検歯の唇頬側面のみを評価し、6歯についての値の平均値を算出し、これをその被検者の Plaque Index とした。

③ 歯周ポケットの深さ (PD)

薄型で1mmの目盛のはいつたポケット探針を用い、被検歯の唇頬側、近心、中央、遠心の3点で0.5mmまでポケットの深さを測定し、その最深値をその被検者の歯周ポケットの深さとした。

④ 骨吸収度 (BL)

等長法で撮影した各被検歯のレントゲン写真上で骨吸収メジャーを用い、Schei らの方法³⁶⁾に準じ、近心、遠心、2カ所の歯槽骨の吸収度を百分率で求め、その平均値をその被検者の歯槽骨の吸収度とした。

以上の各項目について診査した後、肘正中静脈より静脈血5mlを採取し、室温にて2時間放置し凝固させた後、4°C、3,000 rpm 10分間遠沈し血清を分離した。血清は使用時まで-70°Cで凍結保存した。

(2) 被検者血清中の抗 *B. asaccharolyticus* 抗体価の測定

抗体価の測定は向島らの酵素免疫測定法を用いて行な

表 2 可溶性 *B. asaccharolyticus* 抗原の作製

Preparation of Bacterial Antigen

表 4 ペルオキシダーゼ標識抗ウサギイムノグロブリン抗体の作製

Preparation of Peroxidase-labeled Antibody

った³⁷⁾。

① 可溶性 *B. asaccharolyticus* 抗原の作製 (表-2)。

東京歯科大学微生物学教室より分与されたヒト口腔由来の *B. asaccharolyticus* 381 株、湿重量 1.5 g を 0.01 M, pH 7.2 のリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) で十分洗浄した後、25 ml の PBS を加え、MSE 社製超音波細胞破壊装置を用いチップ先端の振幅 20 から 24 μ m で 90 分間、氷冷下で超音波処理を行なった。これを 4°C, 15,000 rpm 20 分間遠沈し上清と沈渣を分離し、上清を可溶性 *B. asaccharolyticus* 抗原とした。Lowry らの方法³⁸⁾に準じウシ血清アルブミンを準標としてタンパク量を測定し、

表 3 可溶性 *B. asaccharolyticus* 抗原の不溶化

Conjugation of Antigen with Glass Beads

PBS を用いタンパク量 1 mg/ml となるように調整し、実験に使用した。

② 可溶性 *B. asaccharolyticus* 抗原のガラスビーズへの結合 (可溶性抗原の不溶化)。

三洋化成社製粗面ガラスビーズを 2% γ -アミノプロピルシランアセトン溶液に 30 分間浸潤し、アリルアミンガラスとした。PBS で洗浄した後、12.5% グルタルアルデヒドリン酸緩衝生理食塩水を加え、3 時間反応させ、アルデヒドガラスとした。PBS で洗浄した後、先に調製した可溶性 *B. asaccharolyticus* 抗原を加え、一晩反応させ可溶性抗原をガラスビーズに結合させ、不溶化抗原とした。未反応の抗原を除去し、1% モノエタノールアミンリン酸緩衝生理食塩水で 2 時間処理し、反応を停止させた。使用時まで 0.1% チツ化ナトリウム 1% ウシ血清アルブミンリン酸緩衝生理食塩水溶液中に 4°C で保存した (表-3)。

③ ペルオキシダーゼ標識抗ウサギイムノグロブリン抗体の作製³⁹⁾ (表-4)。

Sigma 社製 horse radish peroxidase (Type VI) 5 mg を 0.3 M 炭酸水素ナトリウム溶液に溶解し、1% 2-4 フルオロジニトロベンゼンエタノール溶液 1 ml を加え、室温で 1 時間反応させ酵素タンパク質中のアミノ基をブロックした。これに 0.06 M メタ過ヨウ素酸ナトリウム溶液 1 ml を加え、1 時間反応させアルデヒド型酵素とした後、0.16 M エチレングリコール溶液 1 ml を加え反応を停止させ、0.01 M 炭酸緩衝液 pH 9.5 に対して一晩透析した。これに DAKO 社製ブタ抗ウサギイムノグロブリン抗体、5 mg を加え、室温で 3 時間反応させ酵素と

図1 可溶性抗原の不溶化の確認と、抗 *B. asaccharolyticus* 抗血清の最適希釈倍率の決定

抗体の結合を行なわせた。硼化水素ナトリウム 5 mg を加え、PBS に対して一晚透析し、ペルオキシダーゼ標識抗体を得た。標識抗体は使用時まで -20°C で保存した。ブタ抗ウサギイムノグロブリン抗体の特異性については免疫電気泳動法で確認し⁴⁰⁾、また標識抗体の希釈倍率は 3,000 倍が最適であった^{33,41)}。

④ ペルオキシダーゼ反応基質溶液。

0-フェニレンジアミン塩酸塩 60 mg, 30% 過酸化水素水 15 μl を 0.1M クエン酸, 0.2M リン酸緩衝液 pH4.8 150 ml に加えたものをペルオキシダーゼ反応の基質溶液とした。

⑤ 可溶性 *B. asaccharolyticus* 抗原の不溶化の確認と、抗 *B. asaccharolyticus* 抗血清の最適希釈倍率の決定。

可溶性 *B. asaccharolyticus* 抗原がガラスビーズに結合し、不溶化したことの確認は間接抗体法を用い次のように行なった。

東京歯科大学微生物学教室より分与されたウサギ抗 *B. asaccharolyticus* 血清を PBS を用い 2 倍希釈系列とした。各希釈血清 100 μl を可溶性 *B. asaccharolyticus*

抗原と反応させた粗面ガラスビーズ (不溶化抗原) 1 個に加え、さらに 10% 正常ウサギ血清 300 μl を加え、 4°C 、2 時間反応させた。PBS で洗浄後、1% ウシ血清アルブミンリン酸緩衝生理食塩水で 3,000 倍希釈したペルオキシダーゼ標識ブタ抗ウサギイムノグロブリン抗体 500 μl を加え、 4°C で 2 時間反応させた。PBS で洗浄し未反応の標識抗体を除去した後、酵素反応基質溶液 2 ml を加え、 37°C で 30 分間酵素反応を行なわせた。6N H_2SO_4 500 μl を加え酵素反応を停止させ、基質溶液の 492 nm における吸光度を日立分光光度計 102 型にて測定した。その結果、図-1 に示すような結果を得た。これにより可溶性 *B. asaccharolyticus* 抗原が粗面ガラスビーズに結合し不溶化したことが確認された。また、最適抗 *B. asaccharolyticus* 血清の希釈倍率は各試験管の吸光度の平均値から OD₄₉₂ で約 1.0 となる希釈倍率、すなわち 2^{10} 倍希釈が適当であることが示された。

⑥ 被検血清中の抗 *B. asaccharolyticus* 抗体価の測定 (図-2)。

上記に述べた方法により調整した各試薬、不溶化抗原、ウサギ抗 *B. asaccharolyticus* 血清、およびペルオキシダーゼ標識抗ウサギイムノグロブリン抗体を用い、競合法により被検血清中の *B. asaccharolyticus* に対する特異抗体の抗体価を測定した。

被検血清 100 μl 、10% 正常ウサギ血清 200 μl および 2^{10} 倍希釈ウサギ抗 *B. asaccharolyticus* 血清 100 μl を可溶性 *B. asaccharolyticus* 抗原を結合させ、不溶化した粗面ガラスビーズ 1 個に加えたものと、被検血清を加えずに 10% 正常ウサギ血清 300 μl 、 2^{10} 倍希釈ウサギ抗 *B. asaccharolyticus* 血清 100 μl を抗原を結合させた粗面ガラスビーズ 1 個に加えたものの、2 つの系を作成した。 4°C で 2 時間反応させた後、PBS で洗浄し、これに 1% ウシ血清アルブミンリン酸緩衝生理食塩水で 3,000 倍に希釈したペルオキシダーゼ標識抗ウサギイムノグロブリン抗体、500 μl を加え、 4°C で 2 時間反応させた。PBS で洗浄後、2 ml の酵素反応基質溶液を加え、 37°C で 30 分間酵素反応を行なわせた。6N H_2SO_4 500 μl で酵素反応を停止し、492 nm における吸光度を測定した。

被検血清中に *B. asaccharolyticus* に対する抗体が存在すれば、これとウサギ抗 *B. asaccharolyticus* 血清中のウサギ抗体と競合する。その結果、ガラスビーズ上の不溶化 *B. asaccharolyticus* 抗原に結合するウサギ抗体の量が減少する。不溶化抗原に結合したウサギ抗体の量はペルオキシダーゼ標識抗ウサギイムノグロブリン抗体を

図 2 抗体価測定原理

加え、ガラスビーズ上のウサギ抗体に結合させた後、酵素反応を行なわせ、ガラスビーズ上に存在する酵素量を 492 nm における吸光度を測定することにより求めることができる。被検血清を加えずにウサギ抗 *B. asaccharolyticus* 血清のみを加えた場合の OD₄₉₂ の値を A、被検血清を加えた場合のそれを B とし、以下の式により、被

検血清中の *B. asaccharolyticus* に対する抗体価を算出した (図-2、表-5)。

$$\text{抗体価} = \frac{A-B}{A} \times 100 (\%)$$

いくつか被検血清について日時をかえて、2 回抗体価を測定したが、2 回の測定結果の間には有意な差は認め

表 5 抗体価の算出方法

$$\text{Antibody Titer} = \frac{A - B}{A} \times 100\%$$

A=OD₄₉₂ (Rabbit Anti *B. asaccharolyticus* Serum)

B=OD₄₉₂ (Patient Serum + Rabbit Anti *B. asaccharolyticus* Serum)

図 3 測定法の再現性。5 人の被検者についての結果を示す

られなかった。(図-3)

結 果

歯周疾患患者 16 名の血清中の, *B. asaccharolyticus* に対する抗体価は $11.92 \pm 2.47\%$ (平均値 $\pm$ 標準誤差) で, 対照群のそれは $5.11 \pm 1.53\%$ であり, 両者の間には 5 % 以下の危険率で有意な差が認められた (図-4)。歯周疾患患者群のうち臨床的に歯周炎と診断された 13 人についての抗体価をみると, $13.38 \pm 2.84\%$ で, 対照群との間に 2 % 以下の危険率で有意な差が認められた。

図 4 歯周疾患患者群, および対照群の血清中の *B. asaccharolyticus* に対する抗体価。図中, 横線は平均値を示す

Gingival Index 0 以上 1 未満, 1 以上 2 未満, 2 以上 3 以下の 3 つのグループの血清中の抗体価はそれぞれ, $5.72 \pm 1.72\%$, $9.82 \pm 2.76\%$, $13.11 \pm 4.62\%$ であった。Gingival Index が値が大きくなるにつれて抗体価も高くなる傾向がみられたが, それぞれの群の間には有意な差は認められなかった (図-5)。

Plaque Index 0 以上 1 未満, 1 以上 2 未満, 2 以上 3 以下の 3 つのグループの血清中の特異抗体価はそれぞれ, $7.02 \pm 2.27\%$, $10.00 \pm 2.55\%$, $11.18 \pm 5.72\%$ であった。ここでも Gingival Index と同様な傾向が認められたが, それぞれのグループの間には有意な差は認められなかった (図-6)。

歯周ポケットの深さ, 0 mm 以上 3 mm 未満, 3 mm 以上 6 mm 未満, 6 mm 以上の 3 つのグループの血清中の特異抗体価はそれぞれ, $5.77 \pm 1.72\%$, $9.93 \pm 3.30\%$, $11.67 \pm 3.46\%$ であった。Gingival Index, Plaque

図 5 Gingival Index 0 以上 1 未満, 1 以上 2 未満, 2 以上 3 以下の各群の血清中の *B. asaccharolyticus* に対する抗体価。図中、横線は平均値、縦線部は標準誤差を示す

Index の場合と同様な傾向がみられたが、それぞれのグループの間には有意な差は認められなかった。(図-7)

歯槽骨の吸収の程度が 0% 以上 20% 未満, 20% 以上 40% 未満, 40% 以上の 3 つのグループの血清中の *B. asaccharolyticus* に対する特異抗体の抗体価は、それぞれ、 $5.22 \pm 1.25\%$, $13.84 \pm 5.53\%$, $14.07 \pm 3.84\%$ であった。0% 以上 20% 未満群と、20% 以上 40% 未満群の間には危険率 5% 以下で、0% 以上 20% 未満群と 40% 以上群の間には 1% 以下の危険率で、有意な差が認められた (図-8)。

年齢 25 歳未満, 25 歳以上 40 歳未満, 40 歳以上の 3 つのグループの血清中の特異抗体価は、それぞれ、 $9.69 \pm 2.89\%$, $5.80 \pm 2.17\%$, $13.97 \pm 3.30\%$ であった。25 歳以上 40 歳未満群の抗体価が、他のグループのそれに比べ、やや低い傾向が認められたが、3 つのグループの抗

図 6 Plaque Index 0 以上 1 未満, 1 以上 2 未満, 2 以上 3 以下の各群の血清中の *B. asaccharolyticus* に対する抗体価

体価に統計的に有意な差は認められなかった (図-9)。

考 察

Bacteroides はグラム陰性嫌気性桿菌で、ヒトの呼吸器、生殖器、腸管内などに常在しており⁴²⁾、ヒトのプラーク中にも認められている⁴³⁾。*B. melaninogenicus* は collagenase^{44,45)} fibronolytic enzyme⁴⁶⁾、内毒素⁴⁷⁻⁴⁹⁾、硫化水素、アンモニア、各種有機酸など組織障害性にはたらく因子をもっている。*B. melaninogenicus* の菌体を超音波により破壊したものの上清は、in vitro で好中球に対して遊走活性をもち、in vivo で血管透過性を増大させる作用をもっている⁵⁰⁾。その内毒素は alternative pathway を介して補体系を活性化し⁵¹⁾、in vitro で骨吸収を引き起こすことが報告されている⁵²⁾。無菌ラットにこの菌を単一感染させると破骨細胞をともなった歯槽

図 2 歯周ポケットの深さ、0 mm 以上 3 mm 未満、3 mm 以上 6 mm 以下 6 mm 以上の各群の血清中の *B. asaccharolyticus* に対する抗体価

図 8 歯槽骨の吸収が 0% 以上 20% 未満、20% 以上 40% 未満、40% 以上の各群の血清中の *B. asaccharolyticus* に対する抗体価

骨の吸収を引き起こし、歯周疾患に類似した病理組織像を示す⁵³⁾。これらの種々の理由から、*B. melaninogenicus* が歯周疾患に密接に関連しているものと、考えられるようになった。Lambe ら⁵⁴⁾は *B. melaninogenicus* が、*B. melaninogenicus* SS. *melaninogenicus*, *B. melaninogenicus* SS. *asaccharolyticus*, *B. melaninogenicus* SS. *intermedius* の 3 つに細分できることを報告した。さらに Finegold らは DNA の塩基組成などから、*B. melaninogenicus* SS. *asaccharolyticus* は *B. melaninogenicus* とは明らかに別種であるとして、*B. asaccharolyticus* とした⁵⁵⁾。最近になって口腔由来の *B. asaccharolyticus* はその免疫血清学的所見、電子顕微鏡の所見⁵⁶⁾ 菌体超音波処理物上清のタンパク組成⁵⁷⁾、あるいは超音波抽出抗原の血清学的性状など、種々の点で非口腔由来の *B. asaccharolyticus* とその性質を異にしており、両者

は別種であると考え、口腔由来の *B. asaccharolyticus* を *B. gingivalis* と呼ぶことが提案されている⁵⁸⁾。

本実験において抗原として使用した *B. asaccharolyticus* 381 株はこの *B. gingivalis* に相当するものである。本実験の結果、歯周疾患患者の血清中には、臨床的に歯周組織が健康なヒトに比べ、口腔由来の *B. asaccharolyticus* より得た可溶性抗原に対する特異抗体がより多く存在することが明らかになった。このことは歯周疾患患者の歯周ポケット内に存在する *B. asaccharolyticus* の菌体、あるいは菌体成分が、ポケット上皮を透過して歯周疾患患者の歯肉組織中に侵入し、その結果、体液性免疫反応が若起され、この菌に対する特異抗体が産生されたことを示すものと思われる。Mouton らも本実験で用いた酵素免疫測定法と同様の原理の ELISA 法を用い、種々の歯周疾患患者血清中の口腔由来の *B. asaccharolyticus* に対する抗体量を測定し、成人の歯周疾患

図 9 年齢 25 歳未満, 25 歳以上 40 歳未満, 40 歳以上の各群の血清中の *B. asaccharolyticus* に対する抗体価

患者 (adult periodontitis) と generalized juvenile periodontitis 患者の血清中に IgG タイプの抗体が, 対照群に比べ有意に多く存在することを報告している⁵⁹⁾。しかし, Mansheim らはやはり ELISA 法を用いて *B. asaccharolyticus* より抽出した capsular antigen に対するヒト血清中の抗体量を測定しているが, 歯周疾患患者群と, 歯周組織が健康な対照群との間には有意な差が認められなかったとしている⁶⁰⁾。このように同一の細菌を用いながら結果が異なった理由としては, 細菌からの抗原の抽出法に差があったためと考えられる。Mansheim らの実験では抗原を capsular antigen というかなり精製した形で使用しているために, 菌体超音波処理物上清を抗原とした本実験の結果と差があらわれたものと思われる。

今回の実験において Gingival Index, 歯周ポケットの深さ, 歯槽骨の吸収の程度などからみて, 歯周組織の臨

床状態が悪化するにつれて, 血清中の *B. asaccharolyticus* に対する抗体価が高くなる傾向がみられたが, この事はこの細菌が歯周疾患患者の深い歯周ポケットより高い頻度で分離され²²⁻²⁴⁾特に歯槽骨吸収の著しい歯周疾患患者の歯周ポケットから高率に分離されていること²⁵⁾と関係するものと思われる。本実験でも血清中の抗体価と歯槽骨吸収の程度との間に有意な相関が認められたが, これは *B. asaccharolyticus* が歯周疾患の病因に深く関与していることを裏づける結果のように思われる。しかしながら, 歯周疾患患者群のなかにも臨床的に高度の歯周組織の破壊が認められたにもかかわらず, 血清中の *B. asaccharolyticus* に対する抗体価が低い例が存在した。同様の結果を Mouton らも報告している⁵⁹⁾。Doty らは酵素免疫測定法を用い歯周疾患患者血清中の *B. melaninogenicus* に対する抗体を検索し, 歯周疾患患者群では対照群に比べ, 抗体量が少なかったことを示している⁶¹⁾。ただし, この *B. melaninogenicus* が *B. asaccharolyticus* と同じものか, どうかは明確にしていない。このように歯周疾患が存在するにもかかわらず, その病因と密接な関係をもつと考えられている *B. asaccharolyticus* に対する血清中の抗体価が低くあらわれる理由として, 抗体価の低い歯周疾患患者の歯周ポケット内では *B. asaccharolyticus* 以外の細菌が優勢で, これらの細菌が歯周疾患の成立に関与していることが考えられる。Zambon らは成人の歯周疾患患者の歯周ポケットから, *B. melaninogenicus* SS. *intermedius* が最も高い頻度で分離され, *B. asaccharolyticus* はそれについて多く検出されたとし, これら 2 種類の細菌がそれぞれ異なった型の歯周疾患, あるいは歯周疾患の別の時期に関与している可能性を示唆している⁶²⁾。Spiegel らも歯周炎が存在する部位から常に *B. asaccharolyticus* が分離されるものではないことを報告している⁶³⁾。今後, 歯周疾患との関係が深いと考えられている, *B. asaccharolyticus* 以外のグラム陰性嫌気性桿菌についても本実験と同様な研究が必要であろう。

最近の免疫遺伝学的研究によれば, ある特定の抗原に対する免疫応答性の強度が遺伝的に決定されていることが示唆されている⁶⁴⁾。このような考えにたつと, 個体により, *B. asaccharolyticus* に対する免疫応答性に差がある可能性も考えられるが, この点に関してはさらに追求することが必要であると思われる。

口腔内の常在菌のうち, ある種の細菌, あるいはプラーク中に存在する細菌内毒素は⁶⁵⁾, adjuvant 活性をもつといわれている⁶⁶⁻⁶⁸⁾。これらのことから, 歯周ポケット

内で *B. asaccharolyticus* と共に存在する細菌の種類や、その組み合わせにより、これらのもつ adjuvant 量変動し、そのため *B. asaccharolyticus* に対する特異抗体の産生量が変化することが考えられる。その結果として血清中の抗体量に差があらわれてくる可能性もある。

上に述べたように高度の歯周疾患をもつにもかかわらず、*B. asaccharolyticus* に対する抗体価が低い例とは逆に、わずかではあるが、歯周組織が臨床的に健康な対照群の中に、血清中の特異抗体価が高い例が認められた。歯周組織が健康なヒトの口腔内からも *Bacteroides* が分離されており^{62,69)}、これらの中に、*B. asaccharolyticus* がふくまれていることも考えられる。また *B. asaccharolyticus* は扁桃にも存在するのではないかとされており⁷⁰⁾、これらの *B. asaccharolyticus* により歯周組織が健康なヒトが感作され、特異抗体を産生した可能性が考えられる。これらの歯周組織が健康なヒトが、これまでに歯頸部にふれるような歯科治療、たとえばくりかえしのスケーリングなどを受けていれば、より *B. asaccharolyticus* に感作される可能性がふえ、高い血清中の抗体価を示す可能性があると思われる。

今回の実験により確認された、歯周疾患患者血清中の *B. asaccharolyticus* に対する特異抗体が、歯周疾患の病因にどのように関与しているかという問題は、生体防御機構、破壊機構の2つの面から考えることが必要であろう。

生体防御機構という面から考えると、血清中の免疫グロブリンは主に歯肉溝を通過して口腔内に達するため⁷¹⁾ 血清中の *B. asaccharolyticus* に対する特異抗体も歯肉溝中で、そこに存在する *B. asaccharolyticus* と抗原抗体反応を起こし、それに続く補体系の活性化などにより、*B. asaccharolyticus* を破壊し、生体の防御に役立っていることも考えられる。Nisengard らは歯周疾患患者の歯肉縁下プラークを構成する細菌の表面に、免疫グロブリンと補体が結合していることを蛍光抗体法を用いて確認している⁷²⁾。

組織障害的な面からみると、*B. asaccharolyticus* と抗体により形成された、抗原抗体複合物による補体系の活性化⁷³⁾、これにより局所に動員された多形核白血球のライソゾーム酵素による組織障害などの機構が考えられる¹⁹⁾。実際に炎症歯肉組織中に抗原抗体複合物が存在すること^{15,16)}、や、ヒト多形核白血球のライソゾーム酵素が、歯周組織に障害を与えることが報告されている⁷⁴⁾。今回の実験においても、抗体価の高いもので高度の歯周疾患を示すものが認められたことから、上に述べたような機構

が歯周疾患の成立に関与しているものと考えられる。

B. asaccharolyticus や、いくつかの歯周疾患に深く関係している種々の細菌に対する、歯周疾患患者血清中の特異抗体^{75)~77)} のはたす役割については今後、明らかにしなければならない問題である。今回の実験は、その一端として実験方法を確立し、問題点を明らかにした。今後さらに多くの症例について検討するとともに、歯周治療前後での抗体価の変動などを追跡する実験などが必要であると思われる。その場合、今回の実験で用いた酵素免疫測定法は手技が容易で、かつ radio-immunoassay に必適する、すぐれた感度をもつなど、多くのすぐれた点をもつことから^{32,33)} 非常に有効な方法であると考えられる。

結 論

ヒト炎症性歯周疾患に深く関与していると考えられている、ヒト口腔由来の *B. asaccharolyticus* 381 株を超音波処理して可溶性抗原を得た。この抗原に対する歯周疾患患者 16 名 (男性 5 名, 女性 11 名, 年齢 16 歳から 53 歳)、および、歯周組織が健康な対照群 14 名 (男性 10 名, 女性 4 名, 年齢 19 歳から 29 歳) の血清中の特異抗体価を、酵素免疫測定法を用い、測定した。これと各種臨床症状との間の関係を検討し、以下のような結果を得た。

① 歯周疾患患者群の *B. asaccharolyticus* に対する血清中の特異抗体価は、 $11.92 \pm 2.47\%$ (平均値 $\pm$ 標準誤差) で、対照群のそれは $5.11 \pm 1.53\%$ であった。両者の間には 5% 以下の危険率で有意な差が認められた。患者群のうちで臨床的に歯周炎と診断された 13 名の血清中の特異抗体価は、 $13.38 \pm 2.84\%$ で、対照群との間に 2% 以下の危険率で有意な差が認められた。

② Gingival Index の値が大きくなると血清中の *B. asaccharolyticus* に対する抗体価が高くなる傾向が認められた。Plaque Index, 歯周ポケットの深さにおいても同様の傾向がみられた。

③ 歯槽骨の吸収度 40% 以上群、および 20% 以上 40% 未満群の血清中の *B. asaccharolyticus* に対する特異抗体価は、0% 以上 20% 未満群のそれよりも有意に高かった。

以上の結果より、歯周疾患の歯周ポケット内に存在する *B. asaccharolyticus* の菌体成分、あるいは菌体自体がポケット上皮を通過して歯周組織内に侵入し、その結果、これに対する免疫反応が若起され、血清中に特異抗体が

産生されてくるものと考えられる。この特異抗体が歯周疾患の病因にはたす役割については、生体防御、および組織障害の2つの面から考えることが必要と思われた。

謝 辞

稿を終わるにあたり、終始、御懇篤な御指導と御校閲を賜った木下四郎教授に謹んで感謝の意を表します。

また、貴重な細菌、および抗血清を分与されました東京歯科大学微生物学教室助教授、奥田克爾先生、ならびに実験に際し懇丁寧な御教示と御鞭撻をいただいた、国立ガンセンター病院臨床検査部細菌免疫室長、向島達博士に心から感謝の意を表します。

さらに実験にあたり終始、御指導、御助言を賜りました石川烈助教授をはじめとする第二歯科保存学教室諸兄に感謝いたします。

文 献

- 1) Page, R.C. and Schroeder, H.E. : Pathogenesis of inflammatory periodontal disease. A summary of current work. *Lab. Invest.*, 33 : 235-249, 1976.
- 2) Seymore, G.J., Powell, R.N. and Davies, W.I. R. : The immunopathogenesis of progressive chronic inflammatory periodontal disease. *J. Oral Pathology*, 8 : 249-265, 1979.
- 3) Seymore, G.J., Powell, R.N. and Daires, W.I.R. : Conversion of a stable T cell lesion to a progressive B cell lesion in the pathogenesis of chronic inflammatory periodontal disease. An hypothesis. *J. Clin. Periodontol.*, 6 : 267-277, 1979.
- 4) Seymore, G.J. and Greenspan, J.S. : The phenotypic characterization of lymphocyte subpopulation in established human periodontal disease. *J. Periodontal Res.*, 4 : 39-46, 1979.
- 5) Pazandak, D.P., Rogers III, R.S. and Reeve, C.M. : T and B lymphocyte distribution in periodontal disease. *J. Periodontol.*, 49 : 625-630, 1978.
- 6) Toto, P.D., Lin-Min Lin and Gargiulo, A.W. : Immunoglobulins and complement in human periodontitis. *J. Periodontol.* 49 : 631-634, 1978.
- 7) Gross, A., Setterstrom, J.A., D'Alessandro, S. M. and Van Swol, R.L. : Immunoglobulins in periodontal tissues. I. Concentration of immunoglobulins in normal and inflamed gingiva. *J. Periodontol.*, 50 : 581-585, 1979.
- 8) Van Swol, R.L., Gross, A., Setterstrom, J.A. and D'Alessandro, S.M. : Immunoglobulins of periodontal tissues. II. Concentration of immunoglobulins in granulation tissue from pockets of periodontosis and periodontitis patients. *J. Periodontol.*, 51 : 20-24, 1980.
- 9) Setterstrom, J.A., Gross, A., D'Alessandro, S. M. and Godat, R.E. : Immunoglobulins in periodontal tissues. III. Concentration of immunoglobulins in Dilantin induced and idiopathic gingival hyperplastic tissues. *J. Periodontol.*, 51 : 25-29, 1980.
- 10) 石津 勉 : 歯周疾患に罹患したヒト歯肉組織中の各種免疫グロブリンの測定. *口病誌*, 41 : 36-47, 1974.
- 11) Schillitoe, E.J. and Lehner, T. : Immunoglobulins and complement in crevicular fluid, serum and saliva in man. *Arch. Oral Biol.*, 17 : 241-247, 1972.
- 12) Attstrom, R., Laurel, A., Lahsson, V. and Sjöholm, A. : Complement factors in gingival crevice material from healthy and inflamed gingiva in humans. *J. Periodontal Res.*, 10 : 19-27, 1975.
- 13) Schenkein, H.A. and Genco, R.J. : Gingival fluid and serum in periodontal disease. II. Evidence for cleavage of complement components C3, C3 proactivator (Factor B) and C4 in gingival fluid. *J. Periodontol.*, 48 : 778-784, 1977.
- 14) Schneider, T.F., Toto, P.D., Gargiulo, A.W. and Pollock, R.J. : Specific bacterial antibody in the inflamed human gingiva. *J. Periodontol.*, 4 : 53-57, 1966.
- 15) 金城 寛 : 歯周組織中の可溶性免疫複合体の定量. *日歯周誌*, 22 : 1-10, 1980.
- 16) Clagett, J.A. and Page, R.C. : Insoluble immune complex and chronic periodontal disease in man and the dog. *Arch. Oral Biol.*, 23 : 153-165, 1978.

- 17) Sonis, S.T., Misando, D.M., Lamster, I.B., Stelos, P. and Wilson, R.E. : Evidence suggesting the presence of antigen-antibody complex on the surface of salivary leukocytes. *J. Periodontal Res.*, 14 : 370-375, 1979.
- 18) Brandtzaeg, P. : Immunology of inflammatory periodontal disease. *Inter. Dent. J.*, 23 : 438-454, 1974.
- 19) Genco, R.J., Mashimo, R.A., Krygier, G. and Ellison, S.A. : Antibody-mediated effects on the periodontium. *J. Periodontol.*, 45 : 330-337, 1974.
- 20) Brandtzaeg, P. : Local factors of resistance in the gingival area. *J. Periodontal Res.*, 1 : 19-42, 1966.
- 21) Newman, M.G. and Socransky, S.S. : Predominant cultivable microbiota in periodontitis. *J. Periodontal Res.*, 12 : 120-128, 1977.
- 22) Slots, J. : The predominant cultivable microflora of advanced periodontitis. *Scand. J. Dent. Res.*, 85 : 114-121, 1977.
- 23) Slots, J. : Subgingival microflora and periodontal disease. *J. Clin. Periodontol.*, 6 : 351-382, 1979.
- 24) White, D. and Mayrand, D. : Association of oral *Bacteroides* with gingivitis and adult periodontitis. *J. Periodontal Res.*, 16 : 259-265, 1981.
- 25) Tanner, A.C.R., Hoffer, C., Bratthall, G.T., Visconti, R.A. and Socransky, S.S. : A study of the bacteria associated with advancing periodontitis in man. *J. Clin. Periodontol.*, 6 : 278-307, 1979.
- 26) Slots, J. and Hausmann, E. : Longitudinal study of experimentally induced periodontal disease in *Macaca arctoides* : relationship between microflora and alveolar bone loss. *Infect. Immun.*, 23 : 260-269, 1979.
- 27) Kornman, K.S., Holt, S.C. and Robertson, P. B. : The microbiology of ligature-induced periodontitis in the cynomolgus monkey. *J. Periodontal Res.*, 16 : 363-371, 1981.
- 28) Kornman, K.S., Siegrist, B., Soskolne, W.A. and Nuki, K. : The predominant cultivable subgingival flora of beagle dogs following ligature placement and metronidazole therapy. *J. Periodontal Res.*, 16 : 251-258, 1981.
- 29) Courant, P.R. and Bader, H. : *Bacteroides melaninogenicus* and its product in the gingiva of man. *Periodontics.*, 4 : 131-136, 1966.
- 30) Ranney, R.R. : Immunofluorescent localization of soluble dental plaque components in human gingiva affected by periodontitis. *J. Periodontal Res.*, 13 : 99-108, 1978.
- 31) Frank, R.M. : Bacterial penetration in the apical pocket wall of advanced human periodontitis. *J. Periodontal Res.*, 16 : 563-573, 1980.
- 32) 石川栄治 : Enzymeimmunoassay の原理と展望. *Medical Technology*, 7 : 745-749, 1979.
- 33) 向島 達 : 微量免疫グロブリンの定量. 免疫と血液, 3 : 322~329, 1981.
- 34) L, H. and Silness, J. : Periodontal disease in pregnancy. I. Prevalence and severity. *Acta Odont. Scand.*, 21 : 533-551, 1963.
- 35) Silness, J. and L, H. : Periodontal disease in pregnancy. II. Correlation between oral hygiene and periodontal condition. *Acta Odont. Scand.* 22 : 121-135, 1964.
- 36) Schei, O., Waerhang, J., Lovdal, A. and Arno, A. : Alveolar bone loss as related to oral hygiene and age. *J. Periodontol.*, 30 : 7-15, 1959.
- 37) 向島 達 : 抗体ならびに免疫複合体. *Medical Technology*, 7 : 751-757, 1979.
- 38) Lowry, O.H., Rosenbrough, N.J., Farr, A.C. and Randall, R.J. : Protein measurement with Folin phenol reagent. *J. Biol. Biochem.*, 193 : 265-275, 1951.
- 39) Nakane, P.K. and Kawaoi, A. : Peroxidase-labelled antibody. A new method of conjugation. *J. Histochem. Cytochem.*, 22 : 1084-1091, 1974.
- 40) 櫻林郁之介 : 免疫電気泳動法. *Medical Technology*, 7 : 1246-1250, 1979.
- 41) 向島 達 : Enzyme-immunoassay 法. 最近医学, 36 : 887-893, 1981.
- 42) 小笠原一夫, 阿多実茂, 波多野基一 : 新版微生物学入門. 朝倉書店, 東京, 1973, 249.
- 43) Newman, H.N. : Dental plaque. The ecology of

- the flora on human teeth. Charles C. Thomas Publisher, Springfield, Illinois, U.S.A., 1980, 8-21.
- 44) Gibbons, R.J. and MacDonard, J.B. : Degradation of collagenase substrates by *Bacteroides melaninogenicus*. J. Bact., 81 : 614-621, 1961.
 - 45) MacDonard, J.B. and Gibbons, R.J. : Hydrolysis of collagen by cultures of *Bacteroides melaninogenicus*. J. Dent. Res., 39 : 655, 1960.
 - 46) Nitzan, D., Sperry, J.F. and Wilkins, T.D. : Fibrinolytic activity of oral anaerobic bacteria. Arch. Oral Biol., 23 : 465-470, 1978.
 - 47) 本間 孝 : *Bacteroides melaninogenicus* の内毒素に関する研究, 歯科学報, 69 : 1506-1521, 1969.
 - 48) Hofstad, T. : Chemical characteristics of *Bacteroides melaninogenicus* endotoxin. Arch. Oral Biol., 13 : 1149-1155, 1968.
 - 49) Hofstad, T. : Biological activities of endotoxin from *Bacteroides melaninogenicus*. Arch. Oral Biol., 15 : 343-348, 1970.
 - 50) Lindhe, J. and Socransky, S.S. : Chemotaxis and vascular permeability produced by human periodontopathic bacteria. J. Periodontal Res., 14 : 138-146, 1979.
 - 51) Okuda, K., Yanagi, K. and Takazoe, I. : Complement activation by *Propionibacterium acnes* and *Bacteroides melaninogenicus*. Arch. Oral Biol., 23 : 911-915, 1976.
 - 52) Hausmann, E., Raisz, L.G. and Miller, W.A. : Endotoxin : stimulation of bone resorption in tissue culture. Science, 168 : 862-864, 1970.
 - 53) Irving, J.T., Socransky, S.S. and Tanner, A.C.R. : Histological changes in experimental periodontal disease in rats monoinfected with gram-negative organisms. J. Periodontal Res., 13 : 326-332, 1978.
 - 54) Lambe, D.W.Jr. and Jerris, R.C. : Description of polyvalent conjugate and new serogroup of *Bacteroides melaninogenicus* by fluorescent antibody staining. J. Clin. Microbiol., 3 : 506-512, 1976.
 - 55) Finegold, S.M. and Barnes, E.M. : Report of the ICSB taxonomic subcommittee on Gram-negative anaerobic rods. Int. J. Syst. Bacteriol., 27 : 388-391, 1977.
 - 56) Mansheim, B.J. and Coleman, S.E. : Immunological difference between oral and nonoral strains of *Bacteroides asaccharolyticus*. Infect. Immun., 27 : 589-596, 1980.
 - 57) Barnett, J.M., Reed, M. and Blakeney, K. : Further analysis of oral and non-oral strains of *Bacteroides*. J. Dent. Res., 60 (Special Issues A) abstract # 332, 1981.
 - 58) Reed, M.J., Slots, J., Mouton, C. and Genco, R.J. : Antigenic studies of oral and nonoral black-pigmented *Bacteroides* strains. Infect. Immun., 29 : 564-574, 1980.
 - 59) Mouton, C., Hammond, P.G., Slots, J. and Genco, R.J. : Serum antibodies to oral *Bacteroides asaccharolyticus* (*Bacteroides gingivalis*). Relationship to age and periodontal disease. Infect. Immun., 31 : 182-192, 1981.
 - 60) Mansheim, B.J., Stenstrom, M.C., Low, S.B. and Clark, W.B. : Measurement of serum and salivary antibodies to the oral pathogen *Bacteroides asaccharolyticus* in human subjects. Arch. Oral Biol., 25 : 553-557, 1980.
 - 61) Doty, S.L., Lopatin, D.E. and Smith, F.N. : Humoral immune response to oral microorganisms in periodontitis. J. Dent. Res., 60 : (Special Issue A) abstract # 497, 1981.
 - 62) Zambon, J.J., Reynolds, H.S. and Slots, J. : Black-pigmented *Bacteroides* spp. in the human oral cavity. Infect. Immun., 32 : 198-203, 1981.
 - 63) Spiegel, C.A., Hayduk, S.E., Minah, G.E. and Krywolap, G.W. : Black-pigmented *Bacteroides* from clinically characterized periodontal site. J. Periodontal Res., 14 : 376-382, 1979.
 - 64) 畔柳武雄, 大高雄一, 松橋 直編 : 新免疫学叢書 3. 免疫と遺伝. 医学書院, 東京, 1979, 141-155.
 - 65) Shapiro, L., Lodato, F.M., Courant, P.R. and Stalland, R.E. : Endotoxin determinations in gingival inflammation. J. Periodontol., 43 : 591-596, 1972.
 - 66) 乾 正明, 川越健一郎, 中田 洋, 佐野 茂, 吉川 容, 福田富男, 岡田 宏 : 口腔細菌のアジュ

- バント効果について. 日歯周誌, 16 : 150-156, 1974.
- 67) 吉江弘正 : 口腔常在菌の免疫調節機構への影響. I. 抗体産生の増強効果について. 日歯周誌, 21 : 134-145, 1979.
- 68) 中野昌康 : LPS の adjuvant 作用. 臨床免疫, 9 : 343-353, 1977.
- 69) Slots, J. : Microflora in the healthy gingival sulcus in man. Scand. J. Dent. Res., 85 : 247-254, 1977.
- 70) Bardon, K.L. : Bacterium melaninogenicum from normal and pathologic tissues. J. Infect. Dis., 49 : 161-171, 1928.
- 71) Challacombe, S.J., Russell, M.W., Hawkes, J. E., Bergmeier, L.A. and Lehner, T. : Passage of immunoglobulins from plasma to the oral cavity in rhesus monkey. Immunology, 35 : 923-931, 1978.
- 72) Nisengard, R. and Jarrett, C. : Coating of subgingival bacteria with immunoglobulin and complement. J. Periodontol., 49 : 518-521, 1976.
- 73) 畔柳武雄, 大高裕一, 松橋 直編 : 新免疫学叢書 5. 免疫の生化学 医学書院, 東京, 1980, 71-87.
- 74) 萩原さつき : ヒト白血球からのライソゾーム酵素が歯周組織に与える影響について. 日歯周誌, 21 : 392-409, 1979.
- 75) Ebersole, J.L., Frey, D.E., Taubman, M.A. and Smith, D.J. : An ELISA for measuring serum antibodies to *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. J. Periodontal Res., 15 : 621-632, 1980.
- 76) Genco, R.J., Taichman, N.A. and Sadowski, C. A. : Precipitating antibodies to *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in localized juvenile periodontitis. J. Dent. Res., 59 : (Special Issue A) abstract # 329, 1980.
- 77) Listgarten, M.A., Lai, C-H and Evian, C.I. : Comparative antibody titers to *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in juvenile periodontitis, chronic periodontitis and periodontally healthy subjects. J. Clin. Periodontol., 8 : 155-164, 1981.
-