歯周病原性細菌に対する血清抗体価測定の ための酵素免疫測定法(ELISA)の検討

永井 淳 栗原 英見 木下 正彦 松尾 美千代
清水 秀樹 戸田 洋子 野村 慶雄 村山 洋二
苔口 進* 加藤 慶二郎*

岡山大学歯学部歯科保存学第2講座

(主任：村山洋二教授)

* 岡山大学歯学部口腔細菌学講座

(主任：加藤慶二郎教授)

(昭和59年4月13日受付)

Examination of Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Serum Antibodies against Periodontally Associated Microorganisms

Atsushi NAGAI, Hidemi KURIHARA, Masahiko KINOSHITA,
Michiyo MATSUO, Hideki SHIMIZU, Yoko TODA,
Yoshio NOMURA, Yoji MURAYAMA,
Susumu KOKEGUCHI* and Keijiro KATO*

Department of Periodontology and Endodontology

Okayama University Dental School

(Director : Prof. Yoji MURAYAMA)

* Department of Oral Microbiology

Okayama University Dental School

(Director : Prof. Keijiro KATO)

The aim of this study is to establish a routine clinical diagnostic system using enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for measuring serum antibodies to periodontally associated microorganisms.

Conditions of antigen-antibody reactions in ELISA, possibility of conversion of standard curves to straight lines, and specificities of antigen preparations used in ELISA were exactly examined.

Each dose-response curve (sigmoid curve) which was obtained from serial dilutions of a standard serum was transformed using an equation for log-logit transformation and fitted to linear equation of the regres-

sion with high correlation coefficient more than 96 percent. Use of this standard curve made possible quantitative assay in wide range of antibody contents.

Two antigen specimens were prepared. One Specimen (Sonic-ext) was prepared by extraction with sonic degradation from each of *Bacteroides gingivalis* 381, *Bacteroides asaccharolyticus* ATCC 27067, and *Actinobacillus actinomycetemcomitans* Y4 and ATCC 29523. Another specimen (SDS-reext) was prepared by reextraction with sodium dodecyl sulfate from each insoluble precipitate which was not extracted with above sonication procedure. The availabilities

of the preparations were examined for ELISA. Antibody titers against the two antigen preparations were assayed for serum specimens of patients with a variety of periodontitis. Some serum specimens (31~59%)

showed extremely different antibody titers against each antigen preparation. It suggests that use of only Sonic-ext as antigen is not suited for serodiagnostic application of ELISA.

Key words : Periodontal disease, Serum antibody titers, Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), Periodontally associated microorganisms, Bacterial components.

要旨 : 歯周病原性菌に対する血清抗体価測定のため、酵素免疫測定法 (ELISA) を応用して日常的な臨床検査のシステムを確立することを研究目的とした。Voller ら記載の方法を基準として、抗原抗体反応の各種条件、標準曲線の処理方法、ならびに用いる抗原成分について検討を加えた。

標準血清の段階希釈を用いて作製した標準曲線は、log-logit 変換して直線に回帰でき、広い範囲で抗体含有量を定量することが可能となった。

歯周病原性菌の菌体から、超音波抽出される成分、および、その残渣を界面活性剤で抽出した成分を抗原として、各種歯周病患者血清の抗体価を測定した。いくつかの被検血清は両抗原に対し顕著に異なる抗体価を示し、用いる抗原は超音波抽出抗原だけでは ELISA の応用に適さないことが示唆された。

索引用語 : 歯周病, 血清抗体価, 酵素免疫測定法, 歯周病原性細菌, 菌体成分

結 言

酵素免疫測定法 (Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) は、Engvall と Perlmann¹⁾ によって紹介されて以来、放射性同位元素免疫定量法と同等の感度を持つ微量定量法として、各種ホルモンや蛋白の定量、あるいは各種感染症の血清学的診断に広く応用されている。

歯周病の領域においては、歯周病原性菌と目されるポケット由来のグラム陰性嫌気性桿菌に対する患者血清抗体価が ELISA によって調べられている。歯周病の病型と、特異な菌種に対する血清抗体価との関係についても多くの報告がある^{2~6)}。すなわち、成人性歯周炎患者血清は、*Bacteroides gingivalis* に対して²⁾、限局性若年性歯周炎患者血清は、*Actinobacillus actinomycetemcomitans* に対して³⁾、および急性壊死性潰瘍性歯肉炎患者血清は、*B. melaninogenicus* ssp. *intermedius* に対して⁴⁾それぞれ高い抗体価を示すことが明らかにされている。一方、*Capnocytophaga* は、限局性若年性歯周炎患者ポケット内で優勢であるのに、それに対する抗体価は上昇することはないと報告されている⁵⁾。

Ebersole らの報告⁶⁾によれば、限局性若年性歯周炎と、*A. actinomycetemcomitans* 抗体価上昇との相関は 86.6%、成人性歯周炎患者と *B. gingivalis* 抗体価上昇とのそれは 57.6% であり、歯周病患者の血清抗体価を測定することは、歯周病の診断項目の1つとして重要視され

つつある。

しかし、上述の報告で用いられている方法は、Voller らの方法⁷⁾を原法とする2抗体サンドイッチ法であるが、抗原の調製方法、反応条件、あるいは、抗体価の表現方法などが相互に異なっている。したがって、それぞれの結果も微妙に異なり、同一レベルで評価することを困難にしている。

本研究では、歯周病患者の歯周病原性菌に対する血清抗体価を日常の臨床検査として応用するために、実用的な ELISA システムを確立する検討を行なった。

材料および方法

1. 被検患者および血清

岡山大学歯学部附属病院第二保存科を訪れた各種病型の歯周炎患者 56 名 (男性 37 名, 女性 19 名) および辺縁歯肉に炎症の徴候が認められず、少なくとも3年以上にわたって清掃管理の良好な同病院職員 10 名 (男性 4 名, 女性 6 名) の静脈血を採り、常法に従って血清を分離し、 NaN_3 を 0.05% の濃度になるよう添加した後、4°C で保存した。

なお、後述の Voller ら記載⁷⁾の方法で測定したときに低い 405 nm の吸光度 (0.006~0.096) を示す3名の職員の血清を等量ずつ混合し、標準血清とした。

患者は、Ebersole らの記載⁶⁾、Van Dyke らの記載⁸⁾、および Page らの記載⁹⁾を参考にして、次の4つのカテゴリーに分類した。すなわち、1) 35 歳以下で、全顎的

(14 歯以上)に歯槽骨吸収の著明なものを、進行性破壊性歯周炎 (ADP), 2) 35 歳以上で骨吸収を認めるものを成人性歯周炎 (AP), 3) レントゲ的に歯槽骨吸収は認められないが、辺縁歯肉に炎症を認めるものを歯肉炎 (G), 4) 歯内疾患由来のものを根尖性歯周炎 (PP) とした。それぞれの内訳は, 9, 27, 10 および 4 名であった。なお, 典型的な限局性若年性歯周炎患者は上記患者の中に含まれていない。

2. 供試菌とその培養

供試菌として, *B. gingivalis* 381, *B. asaccharolyticus* ATCC 27067 ならびに *A. actinomycetemcomitans* の Y4 と ATCC 29523 の計 4 株を用いた。各菌をブレインハートインフュージョン (Difco, Michigan, USA) を基礎培地とし, 0.5% 酵母エキストラクト (Oxoid, England), 0.05% 塩酸シスチン (半井化学, 京都), *Bacteroides* 種については, 0.0001% ビタミン K₁ (半井化学, 京都) と 0.0005% ヘミン (東京化成工業, 東京) を余分に加えて補強した液体培地を用い, 嫌気条件下 (N₂: 80%, H₂: 10%, CO₂: 10%) で 37°C で 72 時間培養した。

得られた菌体は, 12,000×g で 20 分間の遠心によって集菌し, 生理的食塩加リン酸緩衝液 (PBS) で 2 回, 蒸留水で 1 回洗浄した後凍結乾燥した。

3. 抗原の調製

得られた菌体の乾燥重量 1.0 g を蒸留水 40.0 ml に懸濁し, ブラウンのガラスビーズ (直径 0.18 mm; B. Braun Apparatebau, Melsungen, West Germany) 5.0 g を加えて, 氷冷下で, ソニックディスラプター (トミー精工, 東京) を用いて出力 200 W で 3 分間の破碎を 5 回行った。その間, 菌液の一部をフクシンで染色し, 99% 以上の菌が破壊されていることを確認した。破壊菌液は, 低速遠心 (480×g, 20 分間) して未破壊菌を除いた後, 上清を超遠心 (100,000×g, 1 時間) し, 上清と沈渣に分別した。この上清を, 精製水に対して透析した後, 凍結乾燥して, 超音波抽出抗原 (Sonic-ext) を得た。一方, 沈渣は, 1% ドデシル硫酸ナトリウム (SDS; 片山化学, 大阪) を含む PBS に懸濁し, 20°C で 24 時間振盪した後, 超遠心 (100,000×g, 1 時間) し, 上清を陰イオン交換樹脂 Dowex 1×8 (室町化学, 東京) を 1.5% の割合に含む精製水に対して 4°C で 5 日間透析して SDS を除去した。SDS 除去後の可溶性上清を, SDS による再抽出抗原 (SDS-reext) とした。各菌株からの両抗原の収量は表 1 に示した。

4. ELISA による血清抗体価測定法

被検血清抗体価の測定は, Voller ら記載⁷⁾の方法に小

表 1 調製した抗原の収量 (全菌体に対する重量パーセント)

供 試 菌	Sonic-ext	SDS-reext
<i>B. gingivalis</i> 381	28.6	23.0
<i>B. asaccharolyticus</i> ATCC 27067	30.5	16.5
<i>A. actinomycetemcomitans</i> Y4	30.8	54.7
<i>A. actinomycetemcomitans</i> ATCC 29523	40.1	40.7

改良を加えたものを基準として, 検討項目のある場合 (後述) にはその項目にのみ各種変動を与えながら行った。

基準とした Voller ら記載⁷⁾の改良法は下述の通りである。10 µg/ml の濃度になるように 0.1 M 炭酸緩衝液, pH 9.6 に溶解した抗原を平底 96 穴マイクロタイタープレート (Flat Bottom Immulon; Dynatech Lab., Plochingen, West Germany) の各ウェルに 150 µl ずつ加えた後, 4°C で一昼夜放置してウェル壁に抗原を吸着させる (コーティング)。使用直前に, 0.05% Tween 20 (和光純薬, 大阪) および 0.02% NaN₃ を含む PBS (PBST) でウェルを 3 回洗浄した後, PBST で 3,200 倍に希釈した被検血清 150 µl を加え, 室温で 2 時間反応させた (第 1 抗体反応)。その後, PBST でウェルを 3 回洗浄し, PBST で 1,000 倍に希釈したアルカリフォスファターゼ標識抗ヒト IgG 抗体 (ヤギ) (Miles-Yeda Ltd., Israel) 150 µl を加え, 室温で 2 時間反応させた (第 2 抗体反応)。なお, 第 1 および第 2 抗体反応はともに種々の反応温度ならびに反応時間で行った (結果の項参照)。洗浄後, 150 µl の酵素基質溶液 (1 mg/ml の濃度になるように 10% ジエタノールアミン緩衝液, pH 9.8 に溶解したパラニトロフェニルリン酸 2 ナトリウム (和光純薬, 大阪)) を加え, 37°C で 30 分間反応させた。反応後, ただちに 3 M NaOH 50 µl を各ウェルに加え, 酵素反応を停止させ, マイクロ ELISA オートリーダー (MR-580; Dynatech Instruments, California, USA) を用いて, 各ウェルの 405 nm における吸光度 (OD₄₀₅) を測定した。

なお, ELISA による測定は, すべての系において少なくともデュプリケートして行い, その平均値をもって測定値とした。

5. ELISA ユニットの算出のための標準曲線

段階希釈した標準血清 (200~12,800 倍) について, Voller の改良法の第 1 および第 2 抗体反応を 37°C で 2

時間行う条件に変更して、 OD_{405} を測定した。得られた数値をプロットしたものは曲線を呈するので、log-logit 変換（後述）して、回帰直線とした。このものを ELISA ユニット算出のための標準曲線とし、供試菌のすべての調製抗原ごとに作製した。

すなわち、標準血清の希釈倍率 d の時の OD_{405} を $B(d)$ として、市原らの記載¹²⁾に従って、

$$x = -\log_{10} d$$

$$y = \log_{10} \left(\frac{B(d) - N}{M - B(d)} \right)$$

(M : 無限大濃度の第 2 抗体を反応させた場合の OD_{405} 値, N : 第 1 抗体濃度 0, すなわち血清を生理食塩水に置き換えた場合の OD_{405} 値)

の log-logit 変換式を用いて換算し、最小二乗法を適用して回帰直線 $y = A + Bx$ を得た。このものを、標準曲線として用いた。

6. ELISA ユニットの算出方法

ELISA ユニットは以下の式によって求めた。標準曲線 $y = A + Bx$ の定まっているある抗原に対し、3,200 倍に希釈した被検血清が、 OD_{405} で P を示した場合、上述の式により、 $y(P)$ と変換して、

$$d(P) = 10^{-[(y(P) - A)/B]}$$

の式から、この被検血清の抗体価と等価な標準血清の希釈倍率 $d(P)$ が得られる。

ELISA ユニット (EU) の計算式は、

$$EU = 3.2 \times 10^5 / d(P)$$

とした。すなわち、 $d(P) = 3,200$ の被検血清の EU を 100 と定めたので、標準血清の K 倍の抗体価 [$d(P) = 3,200/K$] を示すものは、 $K \times 100$ EU となる。

結 果

1. ELISA の反応条件の検討

第 1 および第 2 抗体反応の温度あるいは時間の変動、抗原のプレートへのコーティング時間、あるいは、コーティングしたプレートの保存法などが、被検血清の OD_{405} にどのように影響するか検討した。検定において、抗原には、*B. gingivalis* 381 株の Sonic-ext を、血清には、Voller の方法で測定した時、3,200 倍希釈の OD_{405} が 0.016 から 1.156 までの高低 5 段階の顕著な差を示した 5 種類を用いた。

1) 反応温度ならびに反応時間

- (1) 第 1 および第 2 抗体反応ともに 20°C で 2 時間
- (2) 第 1 および第 2 抗体反応ともに 37°C で 2 時間
- (3) 第 1 および第 2 抗体反応ともに 37°C で 1 時間

図 1 反応時間が OD_{405} に与える影響

抗原として、*B. gingivalis* 381 Sonic-ext (●) および *A. actinomycetemcomitans* Y4 SDS-reext (○) を供試し、被検血清として 5 種の血清を用いて、第 1 および第 2 抗体反応を 37°C で、30 分、60 分、90 分、120 分、および 180 分行って得られた OD_{405} (OD_{405}^t) を、それぞれ反応時間 180 分の OD_{405} (OD_{405}^{180}) で除し、平均をとってプロットした。

(4) 第 1 および第 2 抗体反応ともに 50°C で 1 時間以上 4 つの系につき、 OD_{405} を測定した。

表 2 にその結果を示した。反応時間 2 時間の場合、いずれの被検血清も、反応温度を上げると、 OD_{405} はほぼ 1.6 倍に上昇した。しかし、同じ 37°C の反応でも反応時間が 1 時間の場合は、反応時間 2 時間の場合と比較してそれぞれの被検血清の OD_{405} 比は著明に低かった。この現象は、第 1 および第 2 抗体反応の温度の高低にかかわらず示された。また、血清を含まない PBST を用いたいわゆる陰性対照の反応系では、 OD_{405} は極めて低く、また基準に対する比が 1.06 から 1.33 までの値を示し、反応温度および時間の影響をほとんど受けていなかった。したがって、反応温度は室温より 37°C の方が高感度を示すが、反応時間の影響をより大きく受けることが示唆された。

そこで、上述の反応系で第 1 および第 2 抗体反応の反応温度は、 37°C と設定し、反応時間を、(1) 30 分、(2) 60 分、(3) 90 分、(4) 120 分、および (5) 180 分と変動させ OD_{405} を測定比較した。反応時間の延長とともに OD_{405} は上昇するが、その上昇曲線は S 字状を示した (図 1)。

表 2 から明らかなように、基準とした Voller らの改良法の OD_{405} に対する各検定系の比は、5 種類の被検血清ともほぼ等値を示しており、温度および時間の条件を整えれば、被検血清間で抗体価を比較し得ることにな

表 2 ELISA の第 1 および第 2 抗体反応の反応温度および反応時間が OD₄₀₅ に与える影響

温度 (℃)	時間 (時)	PBST	被 検 血 清					A~Eの平均
			A	B	C	D	E	
20	2	1.00 (0.017)*	1.00 (0.052)*	1.00 (0.096)*	1.00 (0.532)*	1.00 (0.033)*	1.00 (0.358)*	1.00 (0.214)*
37	2	1.15	1.29	1.27	1.86	1.70	1.83	1.59
37	1	1.06	0.38	0.44	0.56	0.38	0.48	0.56
50	1	1.33	0.37	0.20	0.79	0.45	0.68	0.50

数値は、被検血清ないしは血清を含まないPBSTのそれぞれごとに、20℃で2時間の反応によって得られたOD₄₀₅に対する各反応条件におけるOD₄₀₅の比で表わした。
* OD₄₀₅の実測値。

表 3 プレートのコーティング時間が OD₄₀₅ に与える影響

コーティング時間 (日)	PBST	被 検 血 清					A~Eの平均
		A	B	C	D	E	
1	1.00 (0.025)*	1.00 (0.099)*	1.00 (0.165)*	1.00 (1.156)*	1.00 (0.102)*	1.00 (0.842)*	1.00 (0.473)*
2	0.84	0.80	0.96	1.03	0.82	1.02	0.93
7	1.16	1.49	1.73	測定不能	1.66	1.53	>1.56**

数値は、被検血清ないしは血清を含まないPBSTのそれぞれごとに、1日のコーティング時間で得られたOD₄₀₅に対する各コーティング時間におけるOD₄₀₅の比で表わした。
* OD₄₀₅の実測値。 ** Cを除く平均値。

る。結局、この実験の限りでは37℃で2時間の抗体反応条件に設定することが望ましい。

2) 抗原のコーティング時間

コーティング時間が、OD₄₀₅ にどのように影響するか
の検討は、コーティングを基準通り4℃で行い、第1および第2抗体反応を、37℃で2時間の条件に変えて行った。

変動させるコーティング時間は、(1) 1日 (Voller らの原法)、(2) 2日、(3) 8日の3通りとした。コーティング時間1日のときの5被検血清のOD₄₀₅のそれぞれを1として、(2)および(3)のコーティング条件のときのそれらに対する比を表3に示した。

コーティング時間を1日延長してもOD₄₀₅ は、コーティング1日のものとほとんど変わることがなかった。しかし、コーティング時間を8日まで延長すると、OD₄₀₅ は一様に高値を示すが、被検血清間のばらつきが大きくなった。すなわち、コーティング時間を延長して、ELISAの感度を上げて、数値の信頼性を欠くことになる。なお、被検血清のかわりに生理食塩水を用いた系でのOD₄₀₅ は、コーティング時間の影響を受けることはなか

った。

3) コーティングしたプレートの処理方法

Voller らの原法ではコーティングしたプレートはただちに反応に供している。しかし、コーティングしたプレートを抗原の力価を低下させることなく保存することが、臨床検査に応用する場合には要求される。これまでにも、そのための種々の処理方法が報告されており^{2,10,11)}、処理条件の違いは少なからずOD₄₀₅ に影響するとされている。

そこで、コーティングを4℃で1日行った後、下述のような4通りの処理を行ってから4℃で7日間保存した。なお、第1および第2抗体反応は37℃で2時間行

- (1) 抗原を含む炭酸緩衝液を吸引除去したウェルをPBSTで3回洗浄し、PBSTを満たす。
- (2) (1)の操作後に、0.5 mg/mlの濃度になるように、0.1 M 炭酸緩衝液、pH 9.6に溶解したウシ血清アルブミン (Fraction V; 片山化学、大阪)を加える。
- (3) 抗原を含む炭酸緩衝液を吸引除去したウェルを蒸留水で3回洗浄し、熱ドライヤーで乾燥する。

表 4 コーティングしたプレートの保存方法が OD₄₀₅ に与える影響

保存方法	PBST	被 検 血 清					A～Eの平均
		A	B	C	D	E	
直ちに使用	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
	(0.025)*	(0.099)*	(0.165)*	(1.156)*	(0.102)*	(0.842)*	(0.473)*
実験 1	1.10	0.93	0.98	0.79	1.02	0.93	0.93
実験 2	1.00	0.81	1.11	1.10	1.09	1.09	1.04
実験 3	1.05	0.94	0.95	0.87	0.93	0.98	0.93
実験 4	0.95	1.31	1.38	1.22	1.18	1.18	1.25

数値は、被検血清ないしは血清を含まないPBSTのそれぞれごとに、コーティング直後に使用したときのOD₄₀₅に対する各実験におけるOD₄₀₅の比で表わした。
実験1：各ウェルをPBSTで3回洗浄した後、PBSTで満たす。
実験2：実験1におけるPBSTのかわりに、ウシ血清アルブミンを含む炭酸緩衝液で満たす。
実験3：各ウェルを蒸留水で3回洗浄した後、乾燥する。
実験4：実験3における乾燥後、PBSTを満たす。
* OD₄₀₅の実測値。

図 2 標準血清の段階希釈による標準曲線

抗原として、*B. gingivalis* 381 Sonic-ext を用い、標準血清を 200 倍から 12,800 倍まで段階希釈したときの標準曲線。プロットは、クワドルプリケートの平均値、I はその SD を表す。

(4) (3)の操作後に、ウェルに PBST を満たす。

表 4 に、被検血清 5 種ないしは、血清を生理食塩水に置き換えた OD₄₀₅ を、コーティング後直ちに使用したプレートでの値を 1.0 とする比で表わした。

いずれの系のいずれの血清、または、血清を生理食塩水で置き換えたものについても、基準値と比較して大きな変動は認められなかった。したがって、コーティング後の処理による影響は小さいことが示された。

2. 標準曲線の作成

全供試菌のそれぞれの抗原ごとに、段階希釈した標準血清 (200～12,800 倍) を用いて OD₄₀₅ を測定し、希釈倍数の対数に対してプロットして標準曲線を描いた所、すべての抗原において双曲線状を呈した。抗原に、*B.*

図 3 標準曲線の回帰直線

$x = \log_{10}(\text{dil}), y = \text{logit}(\text{OD}_{405}) = \log_{10} \left(\frac{\text{OD}_{405} - N}{M - \text{OD}_{405}} \right)$
の計算式から算出したプロットに基づく回帰直線。
dil；希釈倍数，M；dil を限りなく 0 に近づけたときの OD₄₀₅，N；dil を無限大にしたときの OD₄₀₅。
回帰直線の相関係数は 98.1% であった。

gingivalis 381 の Sonic-ext を用いた場合の例を図 2 に示した。

被検血清のいかなる希釈倍率で得られた OD₄₀₅ からでも一定の抗体価を算出する必要があり、標準曲線を数学的に回帰する方法の検討を行った。

材料および方法に記載した log-logit 変換式を用いて換算した x および y を最小二乗法によって直線回帰した所、すべての抗原において、調べた範囲の希釈倍数の全域を回帰することができた。すべての抗原に対する log-logit 変換の定数 M および N，回帰直線である $y = A + Bx$ の要素 A および B，ならびに回帰直線の相関

表 5 歯周病原性細菌抗原に対する標準血清の反応における回帰直線の係数

抗 原		M	N	A	B	相関係数 (%)
<i>B. gingivalis</i> 381	Sonic-ext	1.494	0.010	3.42	1.26	98.1
	SDS-reext	1.628	0.008	2.87	1.16	99.1
<i>B. asaccharolyticus</i> ATCC 27067	Sonic-ext	1.080	0.005	2.74	1.06	98.3
	SDS-reext	2.351	0.002	1.76	0.91	98.2
<i>A. actinomycetemcomitans</i> Y4	Sonic-ext	4.000	0.007	1.39	0.88	96.6
	SDS-reext	3.939	0.005	1.35	0.80	96.1
<i>A. actinomycetemcomitans</i> ATCC 29523	Sonic-ext	4.000	0.012	2.00	1.03	97.0
	SDS-reext	3.975	0.006	2.08	1.18	96.8

MおよびNは、 logit 変換すなわち、 $y=\text{log}[(\text{OD}_{405}-N)/(M-\text{OD}_{405})]$ の定数。
AおよびBは、回帰直線 $y=A+Bx$ の係数。
相関係数は、回帰直線と測定値の相関性を示す。

係数を算出して表5に示した。*B. gingivalis* 381 の Sonic-ext を抗原として用いた場合の回帰直線を図3に例示した。

3. 被検血清抗体価測定に使用する抗原の検討
全供試菌の Sonic-ext ならびに SDS-reext に対する被検血清の ELISA ユニットを算出した。それらを病型別に分類し、一括して図示した(図4および図5)。口腔由来の供試菌 *B. gingivalis* 381 と *A. actinomycetemcomitans* Y4 とでは、いずれの調製抗原を用いた場合でも ELISA ユニットの平均値で比較する限り、歯肉炎症および根尖性歯周炎を除く各病型において、健常群のものを有意に上まわった。一方、非口腔由来株の抗原に対しては、有意な上昇を示す病型は少なく、*A. actinomycetemcomitans* ATCC 29523 の Sonic-ext と SDS-reext 両抗原に対する成人性歯周炎群のみであった。

供試したそれぞれの抗原に対する健常群の ELISA ユニットの平均値に、その標準偏差値を加えたものより高い ELISA ユニットを示す場合に、抗体価上昇が有意であるとして、以下の検討を行った。

被検血清が、どのような菌種の、いずれの調製抗原に対して高い抗体価を示すかを調べるため、まず供試した4菌のすべての組合せにおいて有意の高抗体価を示す被検血清数を病型別に分類した(表6)。

供試した全抗原に対して、有意の高抗体価を示す被検血清はなく、また、Sonic-ext あるいは SDS-reext のいずれか一方に高抗体価を示すものを拾い上げた場合においても、成人性歯周炎患者で2名(7.3%)であり、少なかった。得られた結果の限りでは、口腔由来株と非口腔由来株のそれぞれに対応する菌種(*B. gingivalis* 381 と

図 4 供試抗原別にみた各種歯周炎における ELISA ユニットの比較

N; 健常者群, ADP; 進行性破壊性歯周炎群, AP; 成人性歯周炎群, G; 歯肉炎症, および PP; 根尖性歯周炎群

●は、Sonic-ext に対する ELISA ユニット、○は、SDS-reext に対する ELISA ユニットを示す。

A. actinomycetemcomitans Y4

A. actinomycetemcomitans ATCC 29523

図5 供試抗原別にみた各種歯周炎における ELISA ユニットの比較

N; 健康者群, ADP; 進行性破壊性歯周炎群, AP; 成人性歯周炎群, G; 歯肉炎群, および PP; 根尖性歯周炎群

●は, Sonic-ext に対する ELISA ユニットの値, ○は, SDS-reext に対する ELISA ユニットの値を示す。

B. asaccharolyticus ATCC 27067, および, *A. actinomycetemcomitans* Y4 と ATCC 29523) の間に, 高抗体価患者数の面からは著明な違いを指摘することはできない。

しかし, *Actinobacillus* 抗原に対する方が, *Bacteroides* 抗原に対するより高抗体価を示すものが多かった。すなわち, 前者は, 全抗原に対して 6 名 (8.7%), Sonic-ext あるいは SDS-reext いずれかの抗原に対して 22 名 (31.9%) であり, 後者は, 全抗原に対して 3 名 (3.9%), いずれかの抗原に対して 6 名 (8.7%) であった。一方, 供試菌のいずれの組合せにおいても全ての抗原に対して高抗体価を示すものと Sonic-ext あるいは SDS-reext のいずれかに高い抗体価を示すものの数との間には, 大きな差があり, Sonic-ext と SDS-reext は同じ抗原性を示

すものではないことが示唆された。

そこで, 供試 4 菌種それぞれについて, Sonic-ext 抗原と SDS-reext 抗原に分けて有意の抗体価上昇を示したものの数を比較した (表 7)。Sonic-ext あるいは SDS-reext いずれか一方の抗原にしか有意の抗体価上昇を示さないものの割合が, *B. gingivalis* 381 では 37.5%, *B. asaccharolyticus* ATCC 27067 では 30.8%, *A. actinomycetemcomitans* Y4 では 32.1%, そして同菌の ATCC 29523 では 58.6% に達した。上記割合の中でも, SDS-reext にのみ有意の高抗体価上昇を示すものが, *B. gingivalis* 381 の 31.3%, *B. asaccharolyticus* ATCC 27067 の 23.1%, そして, Sonic-ext にのみそれが, *A. actinomycetemcomitans* Y4 の 32.1%, 同菌の ATCC 29523 の 44.8% となり, 特に著明であった。

このことは, 歯周病の血清学的診断に ELISA を応用する際に, Sonic-ext のみを抗原として用いるのでは不適当であることを示唆している。特に, *Bacteroides* 種に対する血清抗体価測定に際しては, SDS-reext 抗原を併用することが望まれる。

考 察

病原細菌の血清抗体価を測定する日常の臨床検査として ELISA を応用するためには, その測定システムに高い再現性と鋭敏性が要求される。

このことに影響する要素として, ELISA の反応温度および反応時間について検討した。鋭敏性に関しては, 反応時間依存度が高く, 温度への依存度は極めて低い。Voller の記載⁷⁾にある室温という漠然とした記述でも許容されるほど低いことがわかった。

一方の反応時間は, 厳密に管理しなければ, ELISA の測定値を大きく左右する危険がある。また, 微量の抗体を検出するためには, 第 1 および第 2 抗体反応を少なくとも 2 時間に設定する必要がある。しかし, 反応時間が長くなりすぎると, 検査の簡便性と迅速性を失ってしまうことになる。

結局, 本システムでは, コーティング以外の反応は 37°C で行い, 第 1 および第 2 抗体反応の反応時間を 2 時間と設定した。

被検血清の抗体含有量を, いかなる形で表現するかは, 検査の再現性とも関係する大きな問題である。仮に, OD₄₀₅ の測定値をそのまま抗体価として採用すると, 抗体含有量の少ない被検血清に対して比較的高い抗体価が, 抗体含有量の多いものは比較的低い抗体価として

表 6 抗原の種類と有意の高 ELISA ユニットを示す被検者分布の関係

4 菌種の組合せ	抗原*	歯周病病型**					高 ELISA ユニットを示 した被検者数
		N	ADP	AP	G	PP	
381+27067+Y4+29523	全部	0	0	0	0	0	0
	一部	0	0	2	0	0	2
381+27067+Y4	全部	0	0	0	0	0	0
	一部	0	0	2	0	0	2
381+27067+29523	全部	0	0	0	0	0	0
	一部	0	0	2	0	0	2
381+Y4+29523	全部	0	0	0	1	0	1
	一部	0	1	3	1	0	5
27067+Y4+29523	全部	0	0	1	0	0	1
	一部	0	0	1	4	0	5
381+27067	全部	1	0	1	1	0	3
	一部	1	0	4	1	0	6
381+Y4	全部	0	0	1	0	0	1
	一部	0	2	5	0	0	7
381+29523	全部	0	0	0	0	0	0
	一部	0	1	5	1	0	7
27067+Y4	全部	0	0	1	0	0	1
	一部	0	0	6	0	0	6
27067+29523	全部	0	0	3	1	0	4
	一部	0	0	4	1	1	6
Y4+29523	全部	0	1	4	1	0	6
	一部	0	4	13	5	0	22
381	全部	1	3	4	2	0	10
	一部	1	4	8	3	0	16
27067	全部	1	6	2	1	1	9
	一部	2	9	2	1	2	13
Y4	全部	1	2	11	5	0	19
	一部	1	8	13	6	0	28
29523	全部	0	1	9	2	0	12
	一部	1	5	16	6	1	29
被検血清数		9	9	27	10	4	59

381; *B. gingivalis* 381, 27067; *B. asaccharolyticus* ATCC 27067, Y4; *A. actinomycescomitans* Y4, および, 29523; *A. actinomycescomitans* ATCC 29523

* 全部; 供試した 4 菌種の各組合せにおいて, 供試菌の Sonic-ext および SDS-reext の両者に
対して有意の高 ELISA ユニットを示すもの。
一部; 供試した 4 菌種の各組合せにおいて, 一菌種ごとに Sonic-ext か, SDS-reext のい
れか, または両方に対して有意の高 ELISA ユニットを示すものを算定した場合。

** N; 健常者, ADP; 進行性破壊性歯周炎, AP; 成人性歯周炎, G; 歯肉炎,
PP; 根尖性歯周炎

表現されることが、図 1 より指摘できる。このことを改良するために、Mouton ら²⁾は、x 軸に log (希釈倍率), y 軸に OD₄₀₅をとったグラフで、標準曲線の log-linear な部分について直線回帰を試み成功した。しかし、log-linear の部分に限定して抗体価測定を行うのでは、日常の臨床検査の一環として応用した場合、測定の範囲を逸脱することが頻発し、不都合の生ずることが多い。Mouton らの方法²⁾に準拠している Ebersole ら³⁾,

Chung ら⁴⁾, Taubman ら⁵⁾, および内藤ら¹³⁾の報告についても、同じことが指摘される。われわれの追試によれば、Mouton らの方法²⁾で直線回帰の可能な範囲は、8 ないし 16 倍の希釈倍数であった。

以上のことから、直線からの偏移がいちじるしい部分も忠実に再現できる標準曲線を得ることが望まれる。歯周病領域外では、さまざまな手法により標準曲線を直線または曲線で回帰する方法が報告されている¹²⁾。本研究

表 7 調製した 2 種類の抗原と有意に高 ELISA ユニットを示す被検者分布の関係

供試菌*	抗 原**	歯周病病型***					高 ELISA ユニットを示し た被検者数
		N	ADP	AP	G	PP	
381	Sonic ↑ + SDS →	0	0	1	0	0	1 (6.3%)****
	SDS ↑ + Sonic →	0	1	3	1	0	5 (31.3%)
	Sonic ↑ + SDS ↑	1	3	4	2	0	10 (62.5%)
27067	Sonic ↑ + SDS →	1	0	0	0	0	1 (7.8%)
	SDS ↑ + Sonic →	0	0	3	0	0	3 (23.1%)
	Sonic ↑ + SDS ↑	0	0	6	2	1	9 (69.2%)
Y4	Sonic ↑ + SDS →	0	6	2	1	0	9 (32.1%)
	SDS ↑ + Sonic →	0	0	0	0	0	0 (0.0%)
	Sonic ↑ + SDS ↑	1	2	11	5	0	19 (67.9%)
29523	Sonic ↑ + SDS →	1	4	5	3	0	13 (44.8%)
	SDS ↑ + Sonic →	0	0	2	1	1	4 (13.8%)
	Sonic ↑ + SDS ↑	0	1	9	2	0	12 (41.4%)
被検血清数		9	9	27	10	4	59

* 略語は表 6 の通り。
** Sonic; Sonic-ext, SDS; SDS-reext, ↑; 当該抗原に対して有意の ELISA ユニット上昇, →; 当該抗原に対して有意の ELISA ユニットの上昇がない。なお、 有意の ELISA ユニットの上昇とは、当該抗原に対する健常群の ELISA ユニットの平均値にその標準偏差値を加えたものより高い ELISA ユニットを示すことを言う。
*** 略語は表 6 の通り。
**** () 内の数字は、各供試菌における高 ELISA ユニットを示す被検者の分布を%で表わしたものである。

では、このうちの log-logit 変換を応用して直線回帰する方法を行って、希釈倍率 200~12,800 倍の全域で良い相関係数が示された。

歯周病の病因と関連して細菌の生物学的・免疫学的活性を調べる研究では、多くの場合、全菌を超音波処理した可溶性抽出物が用いられている。この抽出方法では、菌属や菌種の違い、あるいはちょっとした処理条件の違いによっても菌体成分の可溶化の程度は異なる。抽出される菌体成分は質的に一定ではない。歯周病原性細菌に対する血清抗体価を調べる研究においても、用いる抗原標品によってはこの危険性は無視できない。被検血清の抗体価が、どのような菌体構築成分の、どのような分子に対して上昇しているかが判明しない限り、あるいは供試菌に特徴的な成分を抗原として用いない限り、真の意味で歯周病患者の血清抗体価を評価することにはならない。

したがって、本研究では、超音波破碎処理で可溶化されなかった画分を SDS で可溶化して、抗原に用いることを試みた。つまり、菌体構築成分全部をできるだけ網羅して供試するように配慮した。しかし、本研究では、Sonic-ext と SDS-reext のいずれが抗原標品としてより

適当であるかを比較するにとどまり、どのような菌体構築成分が供試菌の特徴を表わす抗原であるかの検討は行っていない。

菌種によってばらつきがあるが、超音波抽出では全菌体の 28.6~40.1% (重量比) が回収され、ほぼ似かよっている。その残りから、*Bacteroides* 種では 20% 前後しか回収できないが、*Actinobacillus* では 41~55% 回収できている (表 1 参照)。本研究で抗原として供試した成分は、重量相当で *B. gingivalis* 381 で 61.6%, *B. asaccharolyticus* ATCC 27067 では 47.0%, *A. actinomycetemcomitans* の Y4 では 85.5%, そして同 ATCC 29523 では 80.8% であり、同菌種に限っては、収量は似かよっていた。

歯肉炎群および根尖性歯周炎群を除いた歯周病の各病型の ELISA ユニットの平均値は、口腔由来株については、健常群のそれと比較して有意に上昇していた。この所見は、これまでに報告された先人の所見^{2,3,5)}と一致している。しかし、一致しない点も多い。すなわち、Ebersole ら⁶⁾の報告では、成人性歯周炎患者血清は、*B. gingivalis* のホルマリン処理した全菌体に対して 57.6%, 限局性若年性歯周炎患者血清はホルマリン処理をし

た *A. actinomycetemcomitans* の全菌体に対して、86.6%の割合で高い抗体価を示している。本研究から得られた結果では、高い抗体価を示す被検血清は高率ではなかった。健常群の範囲の抗体価を示すものも多い（図4および図5）。

さらに、*A. actinomycetemcomitans* Y4 のいずれかの抗原に対し、抗体価上昇を示したものが、成人性歯周炎患者において60%、進行性破壊性歯周炎患者において89%、そして歯肉炎患者においても60%と著明に高かった。これらの問題については、本研究目的から逸脱するので詳しい考察は避けるが、抗原の調製方法につきまとう課題であり、今後、菌構築成分を考慮した抗原調製方法の検討を要することを示唆するものである。

Sonic-ext と SDS-reext に対する被検血清の抗体価は、ほぼ似た傾向を示した。しかしながら、結果の項で述べたように、*Bacteroides* 種において、SDS-reext に対してのみ抗体価の有意な上昇を認めたものが、30%前後存在した。このことは、Sonic-ext のみを抗原として用いていたのでは、抗体価上昇を検出することができない患者が30%存在することを示す。逆に、SDS-reext のみを抗原に用いたのでは、7%前後の見逃しが生ずることになる。したがって、現段階では、両抗原の併用が必要と考えられる。

結 論

酵素免疫測定法（ELISA）の応用によって歯周病原性菌に対する血清抗体価を測定する臨床検査のシステムを確立するため、ELISAにおける抗原抗体反応の反応条件、標準曲線の処理方法、ならびに用いる抗原成分について検討し、以下の結論を得た。

1. Voller ら記載の方法を基準として、ELISA 反応条件を検討した。抗原のコーティングは4°Cで1日、第1および第2抗体反応を37°Cで2時間行う方法に改良した。

2. 標準血清の倍数希釈によって得られた双曲線状の標準曲線を、log-logit 変換することで、直線回帰することができた（相関係数、96~99%）。

3. 歯周病原性菌の菌体から、超音波抽出される成分と、その残渣からドデシル硫酸ナトリウムによって抽出される成分との両抗原を用い、歯周病患者血清の抗体価を比較した。供試菌によって異なるが、両抗原に対して顕著に異なる抗体価を示した被検血清は32~51%存在した。

文 献

- 1) Engvall, E., and Perlmann, P.: Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA. III. Quantitation of specific antibodies by enzyme-labeled anti-immunoglobulin in antigen-coated tubes. *J. Immunol.*, 109: 129-135, 1972.
- 2) 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.
- 3) Ebersole, J.L., Taubman, M.A., Smith, D.J., Genco, R.J., and Frey, D.E.: Human Immune responses to oral micro-organisms. I. Association of localized juvenile periodontitis (LJP) with serum antibody responses to *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Clin. Exp. Immunol.*, 47: 43-52, 1982.
- 4) Chung, C.P., Nisengard, R.J., Slots, J., and Genco, R.J.: Bacterial IgG and IgM antibody titers in acute necrotizing ulcerative gingivitis. *J. Periodontol.*, 54: 557-562, 1983.
- 5) Taubman, M.A., Ebersole, J.L., and Smith, D.J.: Association between systemic and local antibody and periodontal disease, 283-298, 1982. *In* Genco, R.J., and Mergenhausen, S.E. (ed.), *Host-parasite interactions in periodontal disease*, American Society for Microbiology, Washington, D.C.
- 6) Ebersole, J.L., Taubman, M.A., Smith, D.J., and Socransky, S.S.: Humoral immune responses and diagnosis of human periodontal disease. *J. Periodont. Res.*, 17: 478-480, 1982.
- 7) Voller, A., Bidwell, D., and Bartlett, A.: Microplate enzyme immunoassays for the immunodiagnosis of virus infection, 506-512, 1976. *In* Rose, N.R. and Friedman, H. (ed.), *Manual of clinical immunology*, American Society for Microbiology, Washington, D.C.
- 8) Van Dyke, T.E., Horoszewicz, H.U., and Genco, R.J.: The polymorphonuclear leucocyte (PMNL) locomotor defect in juvenile peri-

- odontitis. Study of random migration, chemokinesis and chemotaxis. J. Periodontol., 53 : 682-687, 1982.
- 9) Page, R.C., Altman, L.C., Ebersole, J.L., Vandesteen, G.E., Dahlberg, W.H., Williams, B.L., and Osterberg, S.K. : Rapidly progressive periodontitis. A distinct clinical condition. J. Periodontol., 54 : 197-209, 1983.
 - 10) Skurrie, I.J., and Gilbert, G.L. : Enzyme-linked immunosorbent assay for rubella immunoglobulin G : new method for attachment of antigens to microtiter plates. J. Clin. Microbiol., 17 : 738-743, 1983.
 - 11) Elder, B.L., Boraker, D.K., and Fives-taylor, P.M. : Whole-bacterial cell enzyme-linked immunosorbent assay for *Streptococcus sanguis* fimbrial antigens. J. Clin. Microbiol., 16 : 141-144, 1982.
 - 12) 市原清志, 宮井 潔 : データ処理, 153-164, 1982, 石川榮治, 河合 忠, 宮井 潔 (編), 酵素免疫測定法, 第2版, 医学書院, 東京.
 - 13) 内藤 祐子, 奥田克爾, 高添一郎, 関 隆, 渡辺 久, 長田 豊, 竹蓋 弥, 新居邦男, 萩原さつき, 石川 烈, 木下四郎 : 歯周炎患者血清中の歯肉溝内グラム陰性菌に対する IgG 抗体価とその病変との関連性について. 日歯周誌, 25 : 340-349, 1983.
-