歯周病原性細菌に対する抗体の機能に関する研究

I. Chediak-Higashi 症候群患者血清 IgG により感作された *Bacteroides gingivalis* の多形核白血球刺激作用

山田 久仁子 相田 宜利 谷川 圭介 畠山 民子

戸田 佳子 前田 勝正 青野 正男

九州大学歯学部歯科保存学第1教室

(主任：青野正男教授)

(昭和62年3月20日受付)

Studies on the Functions of Antibodies Reactive with Periodontopathic Bacteria

I. Serum IgG of Chediak-Higashi Syndrome Sensitized *Bacteroides gingivalis* to Augment Superoxide Anion Generation by Polymorphonuclear Leukocytes

Kuniko YAMADA, Yoshitomi AIDA, Keisuke TANIGAWA, Tamiko HATAKEYAMA,
Yoshiko TODA, Katsumasa MAEDA and Masao AONO

Department of Periodontics and Endodontics, Faculty of Dentistry, Kyushu University

(Chief: Prof. Masao AONO)

The effect of the pretreatment of *Bacteroides gingivalis* with serum agglutinin on the *B. gingivalis*-induced superoxide anion (O_2^-) generation by mouse polymorphonuclear leukocytes (PMN) was studied. A serum of a Chediak-Higashi syndrome patient with severe periodontitis involvement contained eight fold agglutinating activity against *B. gingivalis* of age-matched control. *B. gingivalis* induced by itself the O_2^- generation by PMN appreciably. The heat-inactivated patient's serum, IgG fraction of Sepharose

CL-6B fractionation and purified IgG sensitized *B. gingivalis* to augment the O_2^- generation by PMN. However, IgM fraction of patient's serum containing agglutinating activity against *B. gingivalis* did not.

These results demonstrated that the IgG class but not the IgM class of antibody reactive with *B. gingivalis* stimulated O_2^- generation by PMN when bound on the surface of *B. gingivalis*. The role of antibody reactive with *B. gingivalis* in the pathogenesis of this microorganism was discussed.

Key words : *Bacteroides gingivalis*, IgG, Polymorphonuclear leukocyte, Superoxide anion

要旨：重篤な歯周炎を合併した Chediak-Higashi 症候群患者血清は *Bacteroides gingivalis* に対して強い凝集価を示した(対照血清の8倍)。その血清中の凝集素が *B. gingivalis* 刺激による多形核白血球のスーパーオキシドアニオン (O_2^-) 産生に及ぼす影響を検討した。その結果、*B. gingivalis* はそれ自体で O_2^- 産生を誘導できることを認めたが、さらに Chediak-Higashi 症候群患者血清中の IgG が *B. gingivalis* を感作することにより、多形核白血球の O_2^- 産生を増強することを認めた。しかし IgM 画分には凝集活性は含まれていたが、*B. gingivalis* 刺激による O_2^- 産生の増強は示さなかった。

索引用語: *Bacteroides gingivalis*, IgG, 多形核白血球, スーパーオキシドアニオン

緒 言

歯肉炎から辺縁性歯周炎に至る歯周組織疾患において歯肉溝から多形核白血球を主とする細胞の浸出が亢進していることが知られている¹⁾。また歯周組織疾患の病態成立には、炎症局所においてプラーク中の菌体やその構成成分と多形核白血球の相互作用が重要であると考えられている^{2,3)}。この点に関して歯周病原性細菌による多形核白血球からのライソゾーム酵素の放出についての研究が蓄積されてきた³⁻⁶⁾。一方、多形核白血球の重要な機能の一つに活性酸素およびその代謝産物の産生がある⁷⁾。活性酸素およびその代謝産物の生物学的活性の一つに微生物の細胞内殺菌があり、スーパーオキシドアニオン (O_2^-) およびミエロペルオキシダーゼ-過酸化水素-ハロゲン系が中心となった強力な殺菌系を構成している。さらに近年活性酸素およびその代謝産物が炎症反応の増強作用を持つことが明らかにされた⁷⁾。

歯周病原性細菌として *Bacteroides gingivalis* の重要性はすでに確立され⁸⁾、歯周炎患者では *B. gingivalis* に反応性の抗体価の上昇が認められることが報告されている⁹⁻¹²⁾。今回我々は *B. gingivalis* に対して強い凝集価を示す Chediak-Higashi 症候群患者血清を用いて、その血清中の凝集素が *B. gingivalis* 刺激による多形核白血球の O_2^- 産生にどのような影響を及ぼすかについて検討した。その結果、Chediak-Higashi 症候群患者血清中の IgG が *B. gingivalis* を感作して多形核白血球の O_2^- 産生を増強することを認めた。

材料および方法

1. 菌体の調製

B. gingivalis 381 株 (東京歯科大学微生物学教室助教授奥田克爾先生から分与された。)を Hemin 5 mg/l (和光純薬) と、Menadione 0.5 mg/l (和光純薬) を添加した Brain Heart Infusion 培地 (Difco Detroit Mich.) で嫌氣的 (5% CO_2 , 5% H_2 , 90% N_2) に 48 時間培養した。集菌は $10,000 \times g$ で 10 分間遠心で行ない、磷酸緩衝化食塩水 (PBS, 1/60 M, pH 7.4) で 3 回洗浄し、50 mg/ml になるように調製した。なお菌体の量は湿重量で示した。

2. 細胞の調製

カゼインで誘導したマウスの腹腔浸出細胞を多形核白血球として使用した¹³⁾。すなわち、Balb/C 系マウス (成和実験動物) 腹腔に 10% カゼインナトリウム (和光純薬) 1 ml を注射し、5~6 時間後に PBS で腹腔を洗い、 $400 \times g$ で 5 分間遠心により細胞を回収後洗浄して用いた。用いた細胞は、ライトギムザ染色後の検鏡によると多形核白血球の含有率は平均 88% であった。

3. *B. gingivalis* に対する凝集価の測定

B. gingivalis (0.2 mg) と倍数希釈した血清を室温にて 12 時間反応させ凝集の有無を判定した。また血清の Sepharose CL-6B 画分についても同様に凝集反応を行なった。

4. 血清の分画

1) ゲルろ過による血清の分画: 2 倍希釈血清 2.5 ml を Sepharose CL-6B (Pharmacia, Uppsala, Sweden) (カラム容積 128 ml) で分画した。緩衝液は PBS を用い流速は 5.4 ml/h とした。各画分 (1.6 ml) について、ウサギ抗ヒト IgG, およびヤギ抗ヒト IgM を用いた二重拡散法を行い IgG 画分と IgM 画分を得た。

2) IgG の精製: IgG の精製は DEAE セルロースカラムクロマトグラフィーによって行なった。血清の 50% 飽和硫酸アンモニウム沈澱画分を緩衝液 (33 mM Tris-HCl, pH 8.5) で透析し同一緩衝液にて平衡化した DE 52 (Whatman Ltd. England) カラム (5 ml) に負荷した。最初のカラム通過画分を集め、50% 飽和硫酸アンモニウムにより沈澱させて濃縮した。得られた画分はヤギ抗ヒト血清を用いた免疫電気泳動により精製 IgG であることを確認した。

5. *B. gingivalis* 菌体の血清および血清成分による処理

B. gingivalis を血清または血清成分と $37^\circ C$ または $20^\circ C$ で 60 分間インキュベートした後菌体を $10,000 \times g$ 10 分間遠心回収後、PBS で 2 回洗浄し、50 mg/ml になるように調製した。

6. O_2^- 産生の測定

O_2^- の測定はチトクローム C の還元により行った。すなわち細胞 (2×10^6 個/ml), 菌体 (2.5 mg または 5 mg) およびチトクローム C (Sigma chemical Co. St. Louis, Mo) を緩衝液 (ブドウ糖, 2 mM および Ca^{2+} , 0.5 mM を含む PBS) に加え、 $37^\circ C$ で 20 分間インキュベートした後、 $12,000 \times g$ で 2 分間遠心し、上清の 550 nm にお

B. gingivalis (2.5 mg) の前処理は血清 0.125 ml にて行った。

Fig. 1 *B. gingivalis* 刺激による多形核白血球 O₂⁻ 産生に及ぼす血清の影響

B. gingivalis (2.5 mg) の前処理は IgG を約 0.5mg 含む IgG 画分または IgM を約 0.2mg 含む IgM 画分にて行った。

Fig. 2 *B. gingivalis* 刺激による多形核白血球 O₂⁻ 産生に及ぼす血清画分の影響

ける吸光度を測定した。また、O₂⁻ 産生の初速度は二波長分光計（日立 557）を用いて、経時的に 550 nm と 540 nm の吸光度の差を測定した。チトクローム C の還元が O₂⁻ によるものであることはスーパーオキシドジスムターゼ (SOD, Sigma chemical Co.) の添加により完全に消失することで確認した。O₂⁻ の量はチトクローム C の吸光係数を $19.1 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ として算出した。

結 果

Chediak-Higashi 症候群血清は *B. gingivalis* との凝集反応において対照と比較して 8 倍以上の凝集活性を示

した。

つぎに *B. gingivalis* を Chediak-Higashi 症候群血清または対照血清それぞれとインキュベートした後、多形核白血球を刺激して O₂⁻ 産生を測定した。その結果、*B. gingivalis* 菌体単独でも O₂⁻ 産生を誘導できるが、Chediak-Higashi 症候群血清にのみ *B. gingivalis* 刺激による O₂⁻ 産生を上昇させる作用があることがわかった (Fig. 1)。

つぎに Sepharose CL-6B でそれぞれの血清を分画し、IgM 画分と IgG 画分を得て、*B. gingivalis* に対する凝集反応をみたが、どちらの画分も陽性であった。約 1mg の IgG を含むおのおのの血清由来 IgG 画分を *B. gin-*

Table 1 Chediak-Higashi 症候群患者血清 IgG で前処理した *B. gingivalis* 刺激による多形核白血球 O_2^- 産生の増強

Stimulants	O_2^- release* (nmol/20min/ 2×10^6 cells)	Initial rate of O_2^- release** (nmol/min/ 2×10^6 cells)
<i>B. gingivalis</i>	0.760	0.168
<i>B. gingivalis</i> pretreated with CHS IgG	0.968	0.214

**B. gingivalis* (2.5 mg) IgG (0.5 mg)

***B. gingivalis* (5 mg) IgG (1 mg)

B. gingivalis (5 mg) の前処理は IgG 1 mg にて行った。

Fig. 3 Chediak-Higashi 症候群患者血清 IgG で前処理した *B. gingivalis* 刺激による多形核白血球 O_2^- 産生の増強

givalis と反応させた後、同様に多形核白血球を刺激して O_2^- 産生を測定した結果、Chediak-Higashi 症候群血清由来の IgG 画分には増強作用がみられた (Fig. 2)。しかし、患者血清および対照血清の IgM 画分にはともに増強作用は認められなかった。さらに Chediak-Higashi 症候群患者血清から IgG を精製し、*B. gingivalis* とインキュベートした後、多形核白血球を刺激して O_2^- 産生を測定した。その結果、Chediak-Higashi 症候群 IgG と反応させた *B. gingivalis* は単独で刺激するよりも高い O_2^- 産生を誘導した (Table 1)。

つぎに *B. gingivalis* (5 mg) 単独および患者 IgG (1 mg) とインキュベートした *B. gingivalis* で刺激した際の O_2^- 産生を経時的に記録した。Fig. 3 で示すように Chediak-Higashi 症候群 IgG と反応させた *B. gingivalis* で刺激したときの O_2^- 産生の初速度は *B. gingivalis* 単独で刺激したときのそれよりも高い値を示した。

また *B. gingivalis* 単独および患者 IgG とインキュベートした *B. gingivalis* いずれで刺激した場合も、観察されたチトクローム C の還元はスーパーオキシドジスムターゼ (SOD) により完全に阻害された。以上の結果から、*B. gingivalis* に反応性の IgG は菌体に結合した後、多形核白血球を刺激して O_2^- 産生を増強することが明らかになった。

考 察

歯周病患者の歯肉溝からは、多形核白血球を主とする細胞の浸出が亢進しており、それらとプラーク中の菌体成分の相互作用が歯周疾患の成立および進行に深く関わっていると考えられている³⁾。多形核白血球は生体防御の第一線を担う細胞であるが、それとともに組織損傷的に作用する場合もあるという二面性がある。多形核白血

球より放出されたライソゾーム酵素は組織損傷の一端を担っていると考えられており^{3,14)}、これまで多形核白血球の歯周炎における役割は、歯周病原性細菌による多形核白血球からのライソゾーム酵素放出という観点から調べられてきた⁴⁻⁶⁾。一方、多形核白血球の重要な機能の一つに活性酸素およびその代謝産物の産生がある⁷⁾。活性酸素は細胞内殺菌を担う反面、血管内皮細胞の損傷¹⁵⁾、走化性因子の生成¹⁶⁾、また多形核白血球由来の latent collagenase の活性化¹⁷⁾、leukocyte protease の血清中阻害因子の不活性化¹⁸⁾などのような炎症反応の増強作用をもつ。

今回、我々は *B. gingivalis* 菌体および *B. gingivalis* 反応性の抗体が多形核白血球の O_2^- 産生にどのような影響を及ぼすかについて検討した。その結果 *B. gingivalis* 菌体そのものが多形核白血球を刺激して O_2^- 産生を誘導することがわかった (Fig. 1, 2)。Sundqvist ら¹⁹⁾は、*B. melaninogenicus* および *B. gingivalis* は多形核白血球の食作用を受けるとともに chemiluminescence 放出を誘導することを示した。非病原性の *B. gingivalis* ではこれらのことは認められておらず活性酸素誘導能と病原性の関係は興味深い。

一方、歯周病原性細菌に対する抗体についてはその量的検索が主に行われてきたが¹⁰⁻¹²⁾、抗体の機能についての報告は少ない。Tsai ら⁵⁾は *Bacteroides* 様細菌 (Y4) によるヒト多形核白血球のリゾチーム放出が、補体不活性化抗血清の添加により増強されることを報告した。しかし抗血清の濃度および増強効果を担っている抗体のクラスは不明である。McArthur ら²⁰⁾はウサギ多形核白血球からの *Actinomyces viscosus* 刺激によるライソゾーム酵素放出反応が菌体を抗血清および IgG と前処理することにより増強されることを報告している。我々は *B. gingivalis* に反応性の抗体を含むヒト血清 (Fig. 1)、血清中の IgG 画分 (Fig. 2) および精製 IgG (Table 1) と *B. gingivalis* とを反応させた後洗って多形核白血球を刺激するとその O_2^- 産生を増強することを示した。また血清の IgM 画分にはこの作用は認められなかった。これらの結果は *B. gingivalis* 菌体表面に結合した IgG が多形核白血球表面の Fc レセプターを刺激して O_2^- 産生の増強をもたらしたものと考えられる。ヒト多形核白血球は IgG の Fc 部分に対するレセプターを保有しており²¹⁾、Fc レセプター刺激により O_2^- 産生を誘導できること²²⁾が明らかにされている。

B. gingivalis は歯周疾患患者の歯肉溝から高率に分離されており²³⁾、また歯周炎患者血清では、*B. gingivalis*

に対する抗体価の上昇が認められている⁹⁻¹²⁾。これらの事から、歯周炎局所に IgG クラスの抗体が存在するならば、菌体と結合した後、多形核白血球を刺激して細胞外 O_2^- 産生の上昇をもたらし、ひいては炎症反応を増強させる可能性が存在することを示すものと考ええる。

結 論

1. *B. gingivalis* 菌体自体により多形核白血球のスーパーオキシド アニオン (O_2^-) 産生を誘導できることがわかった。
2. *B. gingivalis* に対し凝集活性を有する Chediak-Higashi 症候群患者血清中の IgG は *B. gingivalis* を感作することにより多形核白血球の O_2^- 産生を増強した。
3. IgM 画分には凝集活性は含まれていたが *B. gingivalis* 刺激による O_2^- 産生反応の増強は認められなかった。

謝 辞

稿を終えるにあたり、御協力頂きました九州大学医学部小児科学教室植田浩司教授ならびに石井栄一博士に感謝いたします。

本稿をまとめるにあたり御尽力頂きました松本さえ技官に感謝いたします。

文 献

- 1) Attström, R. : Presence of leukocytes in crevices of healthy and chronically inflamed gingivae. J. Periodont. Res., 5 : 42-47, 1970.
- 2) Page, R.C. and Schroder, H.E. : Current status of the host response in chronic marginal periodontitis. J. Periodontol., 52 : 477-491, 1981.
- 3) Miller, D.R., Lamster, I.B. and Chasens, A.I. : Role of the polymorphonuclear leukocyte in periodontal health and disease. J. Clin. Periodontol., 11 : 1-15, 1984.
- 4) Taichman, N.S. and McArthur, W.P. : Interaction of inflammatory cells and oral bacteria : Release of lysosomal hydrolases from rabbit polymorphonuclear leukocytes exposed to gram-positive plaque bacteria. Archs. oral Biol., 21 : 257-263, 1976.
- 5) Tsai, C.-C., Hammond, B.F., Baehni, P., McArthur, W.P. and Taichman, N.S. : Interaction

- of inflammatory cells and oral microorganisms : VI Exocytosis of PMN lysosomes in response to gram-negative plaque bacteria. *J. Periodontal Res.*, 13 : 504-512, 1978.
- 6) Taichman, N.S., Hammond, B.F., Tsai, C.-C., Baehni, P.C. and McArthur, W.P. : Interaction of inflammatory cells and oral microorganisms VII. In vitro polymorphonuclear responses to viable bacteria and to subcellular components of avirulent and virulent strains of *Actinomyces viscosus*. *Infect. Immun.*, 21 : 594-604, 1978.
 - 7) Fantone, J.C. and Ward, P.A. : Role of oxygen-derived free radicals and metabolites in leukocyte-dependent inflammatory reactions. *American Association of Pathologists*, 107 : 397-418, 1982.
 - 8) Slots, J. : Importance of black-pigmented *Bacteroides* in human periodontal disease, Genco, R.J. and Mergenhagen, S.E., Host-parasite interactions in periodontal diseases, American Society for Microbiology, Washington, D.C., 1982, 27-45.
 - 9) Taubman, M.A., Ebersole, J.L. and Smith, D. J. : Association between systemic and local antibody and periodontal diseases, Genco, R.J. and Mergenhagen, S.E., Host-parasite interactions in periodontal diseases, American Society for Microbiology, Washington, D.C., 1982, 283-298.
 - 10) 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.
 - 11) Tolo, K., Schenck, K. and Johansen, I.R. : Activity of human serum immunoglobulins to seven anaerobic oral bacteria before and after periodontal treatment. *J. Periodontal Res.*, 17 : 481-483, 1982.
 - 12) Naito, Y., Okuda, K. and Takazoe, I. : Immunoglobulin G response to subgingival gram-negative bacteria in human subjects. *Infect. Immun.*, 45 : 47-51, 1984.
 - 13) Tsunawaki, S., Oshima, H., Mizuno, D. and Yamazaki, M. : Induction of polymorphonuclear leukocyte-mediated cytolysis by wheat germ agglutinin and antitumor antibody. *Gann*, 74 : 258-264, 1983.
 - 14) Goldstein, I.M. : Polymorphonuclear leukocyte lysosomes and immune tissue injury. *Prog. Allergy*, 20 : 301-340, 1976.
 - 15) Sacks, T., Moldow, C.F., Craddock, P.R., Bowers, T.K. and Jacob, H.S. : Oxygen radicals mediate endothelial cell damage by complement-stimulated granulocytes. *J. Clin. Invest.*, 61 : 1161-1167, 1978.
 - 16) Petrone, W.F., English, D.K., Wong, K. and McCord, J.M. : Free radicals and inflammation : Superoxide-dependent activation of a neutrophil chemotactic factor in plasma. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 77 : 1159-1163, 1980.
 - 17) Weiss, S.J., Peppin, G., Ortiz, X., Ragsdale, C. and Test, S.T. : Oxidative autoactivation of latent collagenase by human neutrophils. *Science*, 227 : 747-749, 1985.
 - 18) Carp, H. and Janoff, A. : *In vitro* suppression of serum elastase-inhibitory capacity by reactive oxygen species generated by phagocytosing polymorphonuclear leukocytes. *J. Clin. Invest.*, 63 : 793-797, 1979.
 - 19) Sundqvist, G., Bloom, G.D., Enberg, K. and Johansson, E. : Phagocytosis of *Bacteroides melaninogenicus* and *Bacteroides gingivalis* in vitro by human neutrophils. *J. Periodontal Res.*, 17 : 113-121, 1982.
 - 20) McArthur, W.P., Baehni, P. and Taichman, N. S. : Interaction of inflammatory cells and oral microorganisms III. Modulation of rabbit polymorphonuclear leukocyte hydrolase release response to *Actinomyces viscosus* and *Streptococcus mutans* by immunoglobulins and complement. *Infect. Immun.*, 14 : 1315-1321, 1976.
 - 21) Fleit, H.B., Wright, S.D. and Unkeless, J.C. : Human neutrophil Fc γ receptor distribution and structure. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 79 : 3275-3279, 1982.
 - 22) Goldstein, I.M., Roos, D., Kaplan, H.B. and Weissmann, G. : Complement and immunoglo-

bulins stimulate superoxide production by human leukocytes independently of phagocytosis. J. Clin. Invest., 56 : 1155-1163, 1975.

- 23) Socransky, S.S., Tanner, A.C.R., Haffajee, A. D., Hillman, J.D. and Goodson, J.M. : Present

status of studies on the Microbial etiology of periodontal diseases, Genco, R.J. and Mergenhagen, S.E., Host-parasite interactions in periodontal diseases, American Society for Microbiology, Washington, D.C., 1982, 1-12.