Bacteroides, *Actinobacillus* に対する歯周疾患罹患者の 血清及び歯肉溝滲出液抗体価について

堀 野 一 人

新潟大学歯学部歯科保存学第2教室

(指導：原 耕二教授)

(昭和63年3月17日受付)

Correlation between Serum and GCF IgG Titers against *Bacteroides*, *Actinobacillus* and Status of Periodontal Disease

Kazuhito HORINO

Department of Periodontology, Niigata University School of Dentistry

(Chief and Director : Prof. Kohji HARA)

The purpose of this study was to determine serum and GCF IgG titers against *Bacteroides gingivalis* (*Bg*) 381 and *Actinobacillus actinomycetemcomitans* (*Aa*) Y 4, and to examine the association with status of the periodontal disease.

Twenty patients employed (Exp. 1) were diagnosed as moderate or severe adult periodontitis, and 20 healthy subjects were divided into 2 control groups, age-matched to Exp. 1 (Con. 1) and the other younger group (Con. 2). Ten patients of Exp. 1 were subjected to Exp. 2 when they had finished the periodontal initial treatment.

After clinical examination, GCF samples were obtained using Periopaper strips and subgingival plaque was sampled with sterilized paper points in the same sites. IgG antibody titer of serum and GCF samples was determined by ELISA method, and indirect

immuno-fluorescent antibody technique was used for the identification of *Bg*.

The results were as follows.

1. In Exp. 1, serum IgG titer against *Bg* was significantly higher than in Con. 1 and Con. 2, and decreased significantly after the treatment.

2. There were no significant differences in the titers against *Aa*, *B. intermedius*, *B. melaninogenicus*.

3. The antibody ratio (GCF/serum) against *Bg* was 0.28 ± 0.05 in Exp. 1, which was significantly lower than the ratio in Con. 1, Con. 2.

4. *Bg* was detected in Exp. 1 alone, and *Aa* was not detected in all groups.

5. In conclusion, it is suggested that *Bg* and anti-*Bg* specific IgG are associated with the destruction of periodontal disease.

Key words : Adult periodontitis, *Bacteroides gingivalis*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, Serum IgG titer, GCF IgG titer

要旨 : 歯周疾患罹患者における Black pigmented *Bacteroides* (*BpB*) と *Actinobacillus actinomycetemcomitans* (*Aa*) に対する血清及び歯肉溝滲出液 (GCF) の IgG 抗体について検索した。

被検者を歯周組織が健康で平均年齢 41.4 歳のコントロール群 1 (Con. 1), 同じく 24.2 歳のコントロール群 2 (Con. 2), 成人性歯周炎罹患患者である実験群 1 (Exp. 1) 及びその中で歯周初期治療を終えた実験群 2 (Exp. 2) の 4 群に分けた。

Exp. 1 の血清抗 *Bacteroides gingivalis* (Bg) 抗体価は他の 3 群より有意に高かったが GCF 抗 Bg 抗体価には有意差は認められなかった。抗 Bg 抗体比 (GCF/血清) は Exp. 1 で 0.28 ± 0.05 となり, Con. 1, Con. 2 に比較して有意に低い値となった。Bg は Exp. 1 のみについて検出され BpB の 42.9% を占めた。また Aa はいずれの群からも検出されなかった。血清抗 Bg 抗体価の高低と Bg 検出の有無を基準として付着の喪失量及び X 線の骨吸収量をみると, 抗体価が低く, かつ Bg も検出されない群に比較して, 抗体価が高いか, あるいは Bg が検出された群は有意に付着の喪失量及び X 線の骨吸収量が大きかった。以上より, 歯周疾患における組織破壊に Bg 及び抗 Bg 抗体が関与していることが推測された。

索引用語: 成人性歯周炎, *Bacteroides gingivalis*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, 血清 IgG 抗体価, GCF IgG 抗体価

緒 言

近年, 歯周疾患において病型特異的なポケット内細菌とそれに対する IgG 抗体価の上昇, すなわち成人性歯周炎と *Bacteroides gingivalis* (Bg)¹⁻⁶⁾, 限局型若年性歯周炎と *Actinobacillus actinomycetemcomitans* (Aa)⁷⁻¹²⁾ との関係が注目されてきた。しかしながら, いわゆる特異細菌説を否定する報告¹³⁾もあり, 病型と細菌に関する一定した見解は得られていない。これらの研究における IgG 抗体は, その大半が血清抗体を使用しており, 歯周ポケット局所における体液性免疫応答を反映させた研究はいまだ少ないと考えられる。

1958 Brill ら¹⁴⁾が歯肉溝滲出液 (GCF) に関する研究を報告して以来, 局所における組織破壊の indicator になり得るものとして GCF が注目され各種免疫グロブリン¹⁵⁻¹⁸⁾, 補体¹⁶⁻¹⁸⁾, 免疫複合体¹⁹⁾などの動向が報告されている。また, 特定の細菌に対する IgG 抗体価についても血清と GCF とで比較した報告がみられる。Naito ら²⁰⁾は重度歯周炎患者における抗 Bg 抗体について, 血清 IgG よりも GCF IgG の方が高く, 健康人では逆に低いと報告しており, Tew ら²¹⁾も抗 Bg 抗体, 抗 Aa 抗体両方について, IgG 抗体の局所における産生を示唆している。しかし, 逆に局所における IgG 抗体産生が抑制されているという Ebersole ら²²⁾の報告もあり, 一定した見解が得られていない。

本研究は歯周疾患罹患患者において, *Bacteroides*, *Actinobacillus* に対する血清並びに GCF 中の IgG 抗体の動向と歯周ポケットあるいは歯肉溝からのこれら細菌の検出の有無とを検索し, さらに歯周初期治療前後におい

て, それらを比較する事によって歯周疾患の病態と宿主の体液性免疫応答及び細菌がどのようにかかわっているのかを検索したものである。

材料と方法

1. 被 検 者

新潟大学歯学部附属病院保存科を受診した患者 30 名と新潟大学歯学部学生ボランティア 10 名を用い, 以下の 4 群に分けて実験に供した。

1) コントロール群 1 (Con. 1, 10 名)

残存歯が 25 歯以上で, 臨床的には健康か, あるいは一部に限局した歯肉炎を有する患者で, 平均年齢は 41.4 ± 2.6 歳。過去 6 ヶ月以内に抗生物質の投与を受けておらず, 全身的な疾患の既往もない。

2) コントロール群 2 (Con. 2, 10 名)

コントロール群 1 と同一の基準によるが, 平均年齢は 24.2 ± 0.4 歳。

3) 実験群 1 (Exp. 1, 20 名)

6 mm 以上の歯周ポケットを有する歯が 10 歯以上存在し臨床的に中等度から高度の成人性歯周炎と診断された患者である。過去にブラークコントロール, 歯肉縁上スクレーリング以外の歯周治療を受けておらず, 平均年齢は 43.1 ± 2.0 歳でコントロール群と同様, 過去 6 ヶ月以内の抗生物質の服用及び全身的な疾患の既往は認められない。このうち, 歯周初期治療終了後も検索できた 10 名を Exp. 1-a とした。

4) 実験群 2 (Exp. 2, 10 名)

初診時 Exp. 1-a として実験に供した 10 名で大学附属病院保存科において歯周初期治療を終え再評価を行っ

た。平均年齢は 45.9 ± 2.8 歳で歯周初期治療としてはブラークコントロール、スクーリング、ルートプレーニングの他、必要に応じて咬合調整、暫間固定などを行った。

2. 臨床的診査及び試料の採取

1) 臨床的診査

全被検者について、以下の項目について全顎的に診査を行い、臨床的診断を下した。

- (1) Gingival index (GI; 1967 Loe and Silness)²³⁾
- (2) Plaque index (PII; 1964 Silness and Loe)²⁴⁾
- (3) Probing depth (PD)
- (4) Loss of attachment (LA)
- (5) Tooth mobility (TM)
- (6) Roentgenographic bone loss (RBL ; 1958 Schei ら)²⁵⁾

2) 血清の調整

すべての被検者の前腕部静脈より真空採血管を用いて 10 ml 採血し、室温で 2 時間放置後、遠心 (2000 RPM, 10 分) して血清を分離した。その後測定に供するまで -80°C にて保存した。

3) GCF の採取

主として中切歯及び第一大臼歯から、実験群では 6 mm 以上のポケットを有する部位、コントロール群では健康部位を 3 箇所選定した。その部位の縁上ブラークをグレーシースケーラーにて除去後ロールワッテにて簡易防湿を施し、小綿球にて歯面を清掃、エアーにて乾燥させた。まず、最初の Periopaper (HARCO) をポケットの入口に 30 秒間静置させ、貯留 GCF を滲み込ませてこれを除去した。その後新しい Periopaper を同じ部位に 30 秒間静置させて、これをポケット内に流出してくる GCF として採取し、直ちに Periotron HAR-600 (HARCO) にて液量を測定した。この操作を 1 歯につき 10 回ずつ繰り返して行い、試料はその後 200 μl の PBS 中に浸漬し、1 時間後、PBS 中の濾紙片を除去し、遠心 (2000 RPM, 10 分) した上清を測定に供するまで -80°C にて保存した。

4) 歯肉縁下ブラークの採取

GCF を採取後、その同じ部位より歯肉縁下ブラークを採取した。#40 滅菌ペーパーポイントを歯周ポケットあるいは歯肉溝の底部まで挿入し、10 秒間静置させた。その後ただちにペーパーポイントを 1 ml 滅菌 PBS 中に入れ、duplicate にて 10^2 倍から 10^5 倍に段階希釈したものを、培地に 100 μl ずつ接種した。培地は 5% 羊脱線維血添加 Trypticase soy agar (BBL, : TSA), 5 $\mu\text{g/l}$

ml Hemin (和光), 0.5 $\mu\text{g/ml}$ Menadione (SIGMA), 10 % ウマ脱線維血添加 TSA : TSHM²⁶⁾, 75 $\mu\text{g/ml}$ Bacitracin (SIGMA), 5 $\mu\text{g/ml}$ Vancomycin (SIGMA), 1.0 mg/l Yeast extract (DIFCO), 10% ウマ血清添加 TSA : TSBV^{27, 28)} の 3 種を用い 7 日間、 37°C で N_2 : 80%, H_2 : 10%, CO_2 : 10% の条件下で嫌気培養した。

3. 抗体価の測定

1) 抗原の調整

- (1) *Bacteroides gingivalis* 381 (Bg)
- (2) *Bacteroides intermedius* ATCC 33563 (Bi)
- (3) *Bacteroides melaninogenicus* GAI 5596 (Bm)
- (4) *Actinobacillus actinomycetemcomitans* Y 4 (Aa)

TSA 培地を用いて継代を続けていた以上の 4 菌株のうち、(1)~(3) は Hemin 5 mg/l (和光), Menadione 0.5 mg/l (SIGMA) 添加の透析培地²⁹⁾, (4) は 0.2% NaHCO_3 添加の TS broth にて大量培養し、無菌的に集菌した。これを 0.5 % 中性ホルマリンで処理したものを 0.1 M Sodium carbonate buffer (pH=9.6) で希釈し、OD 560=0.3 に調整したものを抗原として用いた。

2) 血清抗体価の測定

血清抗体価の測定は ELISA 法³⁰⁾によって行った。まずマイクロタイタープレート (NUNC) に 4 種の抗原調整液を 100 $\mu\text{l/well}$ ずつ入れ 37°C で 3.5 時間インキュベートして抗原を吸着させた。0.05% Tween-20 添加の生理的食塩水にて 5 回洗浄後、被検者の血清を加えた。血清は 0.05% Tween-20, 1 mM MgCl_2 , 1% BSA 添加の 0.02 M PBS pH=7.25 (PBST) にて 100 倍から 800 倍に希釈したものを使用し、測定は duplicate で行った。2 時間、室温にてインキュベーション後、5 回洗浄し次に PBST にて 5000 倍に希釈したペルオキシダーゼ標識ヤギ抗ヒト IgG 血清 (MILES) を 100 $\mu\text{l/well}$ 加え 1.5 時間、室温にてインキュベートした。再度、5 回洗浄後、基質として 1 mg/ml o-phenylenediamine Dihydrochloride (OPD), 0.4 μl 30% H_2O_2 添加の 0.1 M Citrate buffer (pH=4.5) を 100 $\mu\text{l/well}$ ずつ加えた。室温にて 30 分インキュベーション後、ELISA analyzer SLT 210 (SLT) にて 492 nm の吸光度を測定した。標準血清としては口腔内が健康で、全身的な疾患の既往のない 11 歳の少女の血清を用いた。ELISA unit の算定は永井らの方法³⁰⁾により行った。

3) GCF 抗体価の測定

GCF 抗体価の測定は検体量が微量であるため、抗 Bg, 抗 Aa のみについて monoplicate で行った。GCF は PBST にて 2 倍に希釈し 50 $\mu\text{l/well}$ で分注したが、そ

Table 1 Clinical findings

	Con. 1	Con. 2	Exp. 1	
PD	2.3±0.1	1.9±0.1	7.4±0.3	***, *
LA	2.3±0.1	1.9±0.1	8.7±0.4	***, *
GI	0.6±0.1	0.4±0.1	1.5±0.1	***
TM	0.1±0.1	0.1±0.1	1.4±0.1	***
RBL	11.1±1.6	4.7±1.2	54.5±3.3	***, **
PII	0.4±0.1	0.3±0.1	1.3±0.1	***
GCF	29.1±5.9	36.0±5.6	139.5±9.6	***

*** : Con.1-P<0.001-Exp.1 and Con.2-P<0.001-Exp.1

** : Con.1-P<0.01-Con.2

* : Con.1-P<0.05-Con.2

PD : probing depth (mm)

LA : loss of attachment (mm)

GI : gingival index

TM : tooth mobility

RBL : roentgenographic bone loss (%)

PII : plaque index

GCF : Periotron units

Table 2 Clinical findings

	Exp. 1-a	Exp. 2	
PD	7.3± 0.3	4.1±0.3	***
LA	8.1± 0.5	6.5±0.5	*
GI	1.6± 0.1	0.9±0.1	***
TM	1.2± 0.1	0.9±0.1	NS
RBL	53.6± 4.4	54.3±4.7	NS
PII	1.0± 0.2	1.0±0.1	NS
GCF	140.2±13.8	83.1±8.6	***

*** : significant difference at P<0.001

* : significant difference at P<0.05

NS : no significant difference at P>0.05

PD : probing depth (mm)

LA : loss of attachment (mm)

GI : gingival index

TM : tooth mobility

RBL : roentgenographic bone loss (%)

PII : plaque index

GCF : Periotron units

の他の操作については血清抗体価の測定と全く同じ要領に従った。

4. 細菌の検出

歯肉縁下プラークを嫌気培養後、生じたコロニーについて総菌数、Black pigmented *Bacteroides* (BpB) 数、Aa 数をかぞえ、BpB, Aa の総菌数に対する割合を算定した。BpBはコロニーの形態、色合い等で識別し、それぞれの Smear をとって以下に述べる間接蛍光抗体法³¹⁾により Bg であるか否かの判定を行った。Aa に類似のコロニーはカウント後、再度、TSBV 培地にて純培養し、奥田らの方法³²⁾に従って嫌気性菌簡易同定キット MINI-TEK® (BBL) による生化学的性状、ガスクロマトグラフィーによるグルコースからの終末代謝産物の判定を行い、Aa であるか否かの判定を行った。

5. 間接蛍光抗体法による Bg の判定³¹⁾

歯肉縁下プラークを嫌気培養して得られた BpB の Smear に PBS で 20 倍に希釈したウサギ抗 Bg 血清の γ -fraction を 20 μ l 滴下し、30 分間、湿箱中でインキュベートした。これはあらかじめホルマリン処理した Bg 菌体を、ウサギに免疫して得た抗血清を 50% 硫酸で塩析、調整したもので、PBS のみにて免疫した sham 抗血清を標準血清とした際の抗 Bg 抗体価は 45660 EU であった。次に、PBST にて抗血清を洗浄後、PBST で 40 倍に希釈した F.I.T.C. 標識ヤギ抗ウサギ IgG (MILES)

を 20 μ l 滴下した。湿箱中で 45 分間インキュベーション後、再度、PBST で洗浄し、蛍光顕微鏡 (VANOX AHB-LB, オリンパス) を用いて 100 倍にて検鏡した。Bg の判定は全体に緑色のはっきりとした蛍光を発するものを Bg 陽性とし、蛍光を発しないものを Bg 陰性とした。

結 果

1. 歯周治療前後における臨床的診査項目

臨床的診査の結果を Table 1 に示したが、全ての項目において Exp. 1 が Con. 1, Con. 2 に比較し、有意に高い値を示した。また、年齢の違う Con. 1, Con. 2 間では PD, LA, RBL において Con. 1 が有意に高い値を示した。

Table 2 に示した様に Exp. 1-a, Exp. 2 間で歯周初期治療前後の状態を比較すると、PD, LA, GI, GCF 量において統計的に有意な改善がみられ、歯周初期治療の有効性が確かめられた。しかし、TM, RBL, PII については変化が認められなかった。

2. 4 種の細菌に対する血清 IgG 抗体価

4 種の細菌に対する血清 IgG 抗体価を Fig. 1~Fig. 4 に示す。まず Bg に対しては Exp. 1 の抗 Bg 抗体価は 739.4±97.4 EU となり Con. 1 の 173.9±68.5 EU, Con. 2 の 89.8±29.7 EU に比較して有意に高く、初期

Fig. 1 Serum IgG titer against *Bg*

Each symbol represents the individual serum IgG titers against *Bg*. The symbol (●) represents the titer to the extent of 2 fold standard deviations below and above the mean of control titers (Con. 1 and Con. 2).

The symbol (▲) indicates that is above the mean plus 2 folds of standard deviation. The symbol (■) also indicates that is above the mean plus 3 folds of standard deviation.

***: significant difference at $P < 0.001$

**: significant difference at $P < 0.01$

治療後も有意に減少した (870.6 ± 162.4 EU 治療前: Exp. 1-a $\rightarrow$ 621.1 ± 141.1 EU 治療後: Exp. 2)。(Fig. 1)

これに対し抗 *Aa* 抗体, 抗 *Bi* 抗体, 抗 *Bm* 抗体は Exp. 1 と Con. 1, Con. 2 との間に有意な差は認められなかった。初期治療後においても抗 *Bm* 抗体を除き有意な減少が認められなかった (Fig. 2, 3, 4)。

3. *Bg*, *Aa* に対する GCF 抗体価

Bg 及び *Aa* に対する GCF 抗体価を Fig. 5 に示したが, 抗 *Bg* 抗体価は Exp. 1 が 197.4 ± 27.0 EU であるのに対し, Con. 1 は 242.3 ± 136.2 EU, Con. 2 が 124.6 ± 27.2 EU であり両者の間に有意な差は認められなかった。また, 治療前後においても両者間に有意差は認められなかった。抗 *Aa* 抗体価については Exp. 1 が 10.1 ± 1.7 EU であるのに対し, Con. 1 が 23.1 ± 6.9 EU, Con.

Fig. 2 Serum IgG titer against *Aa*

The symbols (●, ▲, ■) indicate the same meaning as the legend of Fig. 1.

NS: no significant difference at $P > 0.05$

2 が 41.7 ± 8.9 EU であり, 各群間における有意差は認められなかった。また Exp. 1-a が 15.0 ± 3.1 EU であるのに対し, Exp. 2 は 30.6 ± 7.3 EU となり治療前後においても有意差は認められなかった。

4. *Bg* 及び *Aa* に対する血清抗体価と GCF 抗体価の関係

Bg 及び *Aa* に対する血清抗体価と GCF 抗体価との間には抗 *Bg* 抗体, 抗 *Aa* 抗体いずれにおいても有意な正の相関関係が認められた (*Bg* $r = 0.55158$ $n = 118$, *Aa* $r = 0.19647$ $n = 120$)。Fig. 6 に抗体比 (GCF/血清) を示したが, *Bg* 抗体比は Exp. 1 が 0.28 ± 0.05 であるのに対し Con. 1 が 1.22 ± 0.28 , Con. 2 が 1.63 ± 0.28 と有意に高い値を示した。また Exp. 1-a が 0.28 ± 0.05 であるのに対し Exp. 2 は 0.63 ± 0.16 となり初期治療による有意な変化は認められなかった。*Aa* 抗体比はそれぞれ 0.13 ± 0.03 (Exp. 1), 0.26 ± 0.04 (Con. 1), 0.59 ± 0.12 (Con. 2), 0.19 ± 0.05 (Exp. 1-a), 0.27 ± 0.09 (Exp. 2) でありやはり各群間における差は認められなかった。

5. 細菌の検出率

各群における細菌の検出結果を Table 3 に示す。BpB の検出率は Exp. 1 が 66.7% であるのに対し Con. 1 が 10.0%, Con. 2 が 3.4% と低い値を示した。また,

Fig. 3 Serum IgG titer against *Bi*

The symbols (●, ▲, ■) indicate the same meaning as the legend of Fig. 1.

NS : no significant difference at $P > 0.05$

Exp. 2 では 10.7% となり Exp. 1 と比較して初期治療の効果が認められた。総菌数に対する *BpB* の割合は Exp. 1 が $16.2 \pm 2.6\%$ に対し Con. 1 は $8.6 \pm 3.7\%$, Con. 2 が 20.7%, Exp. 2 が $4.8 \pm 1.5\%$ であった。さらに間接蛍光抗体法による *Bg* の判定の結果, *Bg* (+) と判定されたものは, Exp. 1 において 42.9% であったが, 他の 3 群においては認められなかった。

Aa については, 全ての検体から検出されなかった。

6. 抗原の有無, 抗体価の高低と歯周病の病態

Fig. 7 に示す様に, *Bg* が検出された患者: *Bg* (+), *BpB* が検出された患者: *BpB* (+) と検出されなかった患者: *BpB* (-) を比較すると, 血清の抗 *Bg* 抗体価は *Bg* (+) が 632.9 ± 121.1 EU, *BpB* (+) が 567.8 ± 90.0 EU であるのに対し *BpB* (-) では 226.0 ± 72.3 EU と有意に低い値を示した。これに対し GCF の抗 *Bg* 抗体は *Bg* (+) が 138.8 ± 46.1 EU, *BpB* (+) が 136.8 ± 28.1 EU, *BpB* (-) が 192.7 ± 46.7 EU で有意な差は認められなかった。

次に血清の抗 *Bg* 抗体価の高低と細菌の検出結果を Table 4 に示したが, *BpB* 検出の有無に対する一致率は 69.0%, *Bg* 検出の有無に対する一致率は 69.7% であった。GCF 抗 *Bg* 抗体価は全体的に低いため検討を行わなかった。また, *Bg* 検出の有無と血清抗 *Bg* 抗体

Fig. 4 Serum IgG titer against *Bm*

The symbols (●, ▲, ■) indicate the same meaning as the legend of Fig. 1.

* : significant difference at $P < 0.05$

NS : no significant difference at $P > 0.05$

価の高低を検索した 99 部位について抗原 (AG) の有無, 抗体 (AB) 価の高低により 4 群に分けた (Table 5)。これらの組合せと臨床的診査項目のうち, LA 並びに RBL の度合との関係を見ると, LA は 4, 3, 2, 1 群の順, RBL は 4, 3, 1, 2 群の順で高値になった。また, コントロール群と実験群との年齢の違いを考慮にいれ, それぞれの年齢から 10 歳引いた値を第 1 大臼歯と第 2 大臼歯が萌出する時期の平均値とし, これで LA 及び RBL の値を割り, 年単位の進行量を表す補正值とした (LA/Year, RBL/Year)。この補正值で各群の状態を比較すると, LA/Year は 4, 2, 3, 1 群の順, RBL/Year は 4, 3, 2, 1 群の順で高値を示した。AG (-), AB (L) である第 4 群の LA, LA/Year, RBL, RBL/Year を基準にして他の群と比較した場合, LA, RBL, RBL/Year は 1, 2, 3 群で, LA/Year は 1, 3 群でともに有意に高かった。

7. 抗 *Bg* 抗体価と臨床的診査項目

臨床的診査項目と血清及び GCF の抗 *Bg* 抗体価との間の相関関係は Table 6 に示す通りである。血清の抗 *Bg* 抗体価は全ての臨床的診査項目との間に有意な正の相関関係が認められ, 特に LA, PD, GCF 量との間に密な相関関係を有する事が示された。これに対し, GCF の抗 *Bg* 抗体価は全ての項目との間において有意な相関関

係は認められなかった。

考 察

歯周疾患がプラークによって引き起されることは明かであり、プラーク中の様々な抗原要素に対する宿主の生体反応の1つとして、その抗原に対する血清 IgG 抗体価の特異的な上昇があげられる。中でも成人性歯周炎 (AP) における *Bg* の分離¹⁻³⁾ と抗 *Bg* 抗体価の上昇⁴⁻⁶⁾、及び限局型若年性歯周炎 (LJP) における *Aa* の分離^{7,8)}

と抗 *Aa* 抗体価の上昇⁹⁻¹²⁾を示す報告は特に多く、*Bg* 及び *Aa* がそれぞれの病型において病原性な役割を演じている事は明かであると思われる。

本研究において、Exp. 1 の血清抗 *Bg* 抗体価は Con. 1, Con. 2 と比較して有意に上昇した。この抗体価上昇の特異性を確認するため、Ebersole らの方法⁹⁾により、Exp. 1 の血清の一部についてあらかじめ *Bg*, *Bi*, *Bm* にて吸収操作を施した際、非吸収血清に比較して、*Bg* で吸収した血清では 97.8%, *Bi* で 31.6%, *Bm* では 35.1% の活性減少を示し、それぞれの血清の抗 *Bg* 抗体は

Fig. 5 GCF IgG titer against *Bg* and *Aa*

■ : anti-*Bg* IgG titer
▨ : anti-*Aa* IgG titer

NS : no significant difference at $P > 0.05$
mean + S.E.

Fig. 6 IgG titer ratio (GCF/serum)

■ : anti-*Bg* IgG ratio
▨ : anti-*Aa* IgG ratio

*** : significant difference at $P < 0.001$
NS : no significant difference at $P > 0.05$
mean + S.E.

Table 3 Prevalence of *Bacteroides* and *Actinobacillus*

	Con. 1	Con. 2	Exp. 1	Exp. 2
<i>BpB</i> detectable sites	10.0 (30)	3.4 (29)	66.7 (57)	10.7 (28)
Proportion of <i>BpB</i> to total bacteria	8.6 ± 3.7 (3)	20.7 (1)	16.2 ± 2.6 (38)	4.8 ± 1.5 (3)
<i>Bg</i> detectable sites	0.0	0.0	42.9 (28)	0.0
<i>Aa</i> detectable sites	0.0	0.0	0.0	0.0

values are percentages
() : number of sites

Bg に特異的な IgG である事が示唆された。Mouton ら⁴⁾ は *B. asaccharolyticus* (*Bg* 381) に対する健康な成人の血清 IgG 抗体価が 55.7 ± 64.6 EU であるのに対し、AP 患者では 257.5 ± 468.4 EU となり、抗 *Bg* 抗体価が 5 倍も高くなっていると報告している。永井ら⁹⁾ も健康成人の抗 *Bg* 抗体価が 84 ± 68 EU であるのに対し、AP 患者ではその約 4.5 倍の 382 ± 570 EU であると報告しており、本研究の結果と一致した。

Ebersole ら⁹⁾ は、LJP 患者の *Aa* Y4 に対する IgG 抗

Fig. 7 anti-*Bg* IgG titer

■ : anti-*Bg* IgG titer of serum
 ▨ : anti-*Bg* IgG titer of GCF

** : significant difference at $P < 0.01$

NS : no significant difference at $P > 0.05$
 mean + S.E.

体価を測定した結果、抗 *Aa* 抗体価の高い患者は LJP 患者において 89.5% (34/38)、健康成人で 12.5% (3/24) と、LJP 患者において明かに抗 *Aa* 抗体の上昇率の高いことを報告した。しかしながら、AP 患者における抗 *Aa* 抗体価の動向をみると、健康成人と変わらないレベルであるとする Vincent らの報告¹⁰⁾、Listgarten ら¹¹⁾、永井ら⁹⁾による、健康成人よりも有意に高いが、LJP 患者程ではないという報告があり、意見の異なるところである。しかし、前者¹⁰⁾の健康成人群の平均年齢が 32.6 ± 5.9 歳、AP 患者群が 44.2 ± 8.2 歳で比較的 age-match しているのに対し、後者^{5, 11)}では健康成人群が共に 20 歳代であり、AP 患者群との年齢差が大きい。健康人における、年齢と抗 *Aa* 抗体価との関係をみた Chung らの報告¹²⁾によると、混合歯列期を除けば、小児から成人に至るまで抗 *Aa* 抗体は徐々に増加するとされ、このことより前者と後者の結果の違いはおそらく健康成人群の年齢の違いによるものであろうと推測される。

本研究における Exp. 1 の抗 *Aa* 抗体価は Con. 1、Con. 2 に比較して同じような値を示し、Vincent らの報告¹⁰⁾と一致した。

また、本研究における Con. 1、Con. 2 間の比較では、統計学的な有意差はないものの、抗 *Bg* 抗体価は年齢の高い Con. 1 が Con. 2 に比較して 94% の上昇を示した。これは、抗 *Bg* 抗体価と年齢との関係を調べた Mouton ら⁴⁾の結果に一致する。しかし、抗 *Aa* 抗体価については、Con. 1、2 間で、同じ様な値を示し、年齢が高い程抗 *Aa* 抗体価が高いとした Chung らの報告¹²⁾とは異なった。

抗原として、細菌を超音波処理した上清を用いる場合と、本研究の様にホルマリン処理のみ行った場合とでは、その抗原性が異なると考えられるが、Chung ら¹²⁾によると、ホルマリン処理全菌体抗原を用いた場合、その様々な表面抗原に対して親和性を持つ IgG 抗体が結合

Table 4 Correlation between serum anti-*Bg* titer and cultivable bacteria

	anti- <i>Bg</i> IgG titer		Agreement Ratio
	high	low	
BpB detectable sites	22*	17*	69.0% (78/113)
BpB no detectable sites	18*	56*	
<i>Bg</i> detectable sites	9*	3*	69.7% (69/99)
<i>Bg</i> no detectable sites	27*	60*	

* : number of sites

high IgG titer : above the mean plus 2 fold S.D. of control titers

low IgG titer : below the mean plus 2 fold S.D. of control titers

Table 5 Correlation between serum anti-*Bg* IgG titer and antigen (*Bg*)

	LA	LA/Year	RBL	RBL/Year
1. AG(+), AB(H)	9.9±0.8	0.38±0.06	60	2.3±0.4
2. AG(+), AB(L)	8.0±1.2	0.20±0.02	65	1.7±0.3
3. AG(-), AB(H)	6.9±0.6	0.23±0.03	40	1.3±0.2
4. AG(-), AB(L)	2.9±0.2	0.12±0.01	15	0.6±0.1
	1-3 *	1-3 *		1-3 *
	1-4 ***	1-4 ***	1-4 ***	1-4 ***
	2-4 ***		2-4 ***	2-4 **
	3-4 ***	3-4 ***	3-4 ***	3-4 ***

significant difference at * : $P < 0.05$, ** : $P < 0.01$, *** : $P < 0.001$

LA : loss of attachment

RBL : roentgenographic bone loss

AG(+): *Bg* detectable

AG(-): *Bg* no detectable

AB(H) : anti-*Bg* titer is above the mean plus 2 fold S.D. of control titers

AB(L) : anti-*Bg* titer is below the mean plus 2 fold S.D. of control titers

し, IgG 検量線の slope range を増加させるが, 標準血清との対比により, 正確な測定が可能であるとしている。実際, Ebersole ら³³⁾は, *Aa* を超音波処理した上清を抗原として用いた場合と, ホルマリン処理全菌体を抗原として用いた場合とで 9 名の血清抗 *Aa* 抗体価を測定したところ, 前者の ELISA unit が後者に比較して 7.4 % から 79.3 % の幅で減少した。減少率の大小により, 個々の抗体価は若干変動するが, 少なくとも high responder, low responder の群間に影響を及ぼすほどの差となつては表れず, 従って本研究において, ホルマリン処理全菌体を抗原として用いたとしても, そのことが抗体価の高低に大きな影響を与える程のものではないことが示唆された。

GCF 中の *Bg*, *Aa* に対する特異的抗体価を測定する事は, 歯周病における免疫応答を考える際に歯周組織局所における反応を考える必要があるからである。Tew ら²¹⁾は LJP 患者及び重度歯周炎患者の血清抗体価と GCF 抗体価の比 (GCF/血清) を調べ, 抗 *Bg* 抗体比は約 1.4, 抗 *Aa* 抗体比は約 2.5 であると報告している。これを, 血清及び GCF 中に含まれるアルブミン量によって GCF の希釈率を補正すると, 抗体比は抗 *Bg* 抗体比が 7.1, 抗 *Aa* 抗体比が 20.0 にもなるとしている。また Naito ら²⁰⁾は重度歯周炎患者における血清及び GCF の抗 *Bg* 抗体価を測定し, GCF の IgG レベルは血清 IgG レベルよりも高く, 健康人ではその逆に低くなると報告している。このことは局所における特異的 IgG 抗体の産生を示唆するものである。しかし, Ebersole ら²²⁾は

Table 6 Correlation between IgG titers against *Bg* and the clinical parameters

	Serum IgG titer		GCF IgG titer	
PD	0.66225 (148)	**	0.04870 (122)	NS
LA	0.74016 (148)	**	0.13460 (122)	NS
GI	0.53957 (148)	**	0.17839 (122)	NS
TM	0.54598 (141)	**	0.01774 (115)	NS
RBL	0.55115 (144)	**	0.09535 (120)	NS
PII	0.44716 (123)	**	0.11818 (103)	NS
GCF	0.60788 (140)	**	0.10408 (122)	NS

PD : probing depth (mm)

LA : loss of attachment (mm)

GI : gingival index

TM : tooth mobility

RBL : roentgenographic bone loss (%)

PII : plaque index

GCF : Periotron units

values are the coefficients of correlation

() : number of sites

** : significant difference at $P < 0.01$

NS : no significant difference at $P > 0.05$

LJP (n=5), 重度歯周炎 (n=12), AP (n=31) において, GCF の抗 *Aa* 抗体価の方が血清の抗 *Aa* 抗体価よりも高いのは 8.9% の部位にすぎないと報告しており, また Genco ら³⁴⁾は LJP における抗 *Aa* 抗体価は GCF も血清も同じレベルであると報告している。

本研究における血清及び GCF の抗 *Bg* 抗体比は Exp. 1 で 0.28 ± 0.05 となり, Con. 1, 2 と比較して有意に低い値となった。これは過去の多くの報告^{20~22, 34)}と異なる結果である。血清と GCF の抗 *Bg* 抗体価の間には統計学的に有意な正の相関関係が認められているにもかかわらず, この様な結果が得られた理由としては, (1) GCF 中の IgG 抗体が, 既に抗原抗体複合物を形成しており, ELISA 法で測定可能な IgG が減少していること, (2) 局所に存在する IgG プロテアーゼにより IgG が分解され減少していること, (3) 組織液あるいは唾液による希釈がなされていること, (4) 過去の報告とは病期すなわち disease activity が異なること, 等が考えられる。

(1) については, Sonis ら¹⁹⁾は, GCF の細胞成分のうち 83% を占める好中球の Fc receptor のうち 48% が免疫複合物と結合している可能性が大きいと報告している。このことは, 局所における抗原抗体反応がすみやかに起り, 少なくとも歯周ポケット内に存在する free の特異的抗 *Bg* 抗体は, 歯肉結合組織内あるいは血清中に比較してかなり減少していることを示唆するものである。ELISA 法による抗 *Bg* 抗体測定の際, 最初に吸着させた *Bg* 菌体と抗 *Bg* 抗体の Fab フラグメントが結合する。この際, 抗体が既に免疫複合物を形成しているとすれば, 抗体の binding site が失われてしまうので ELISA 法による測定可能な IgG 抗体が減少するという可能性が考えられる。

(2) として, IgG プロテアーゼの問題である。Yamazaki ら³⁵⁾, Ishikawa ら³⁶⁾, Higuchi ら³⁷⁾は好中球の neutral thiol protease を精製し, これが IgG を分解し, リンパ球に対する走化性因子が産生されると報告している。つまり GCF 中の最も predominant な細胞である好中球に IgG プロテアーゼが存在する事, また Kilian の報告³⁸⁾によると *B. asaccharolyticus* 及び *B. melanogenicus subsp. intermedius* は IgG を完全に分解してしまうプロテアーゼ活性を有しているということから, GCF 中の好中球や細菌由来のプロテアーゼの働きにより IgG が分解されてしまう可能性が考えられる。

(3) として, 希釈の問題であるが, 本研究における予備実験として GCF 抽出サンプルの一部 (n=5) と血清を用いて ELISA 法 (サンドウィッチ法³⁹⁾) により非特

異的 IgG 量を測定した。Exp. 1 では, 血清中の IgG は 9.80 ± 0.11 mg/ml, GCF 中の IgG は 1.56 ± 0.35 mg/ml となり, その希釈率は 6.3 倍であった。これに対しコントロール群では血清 IgG が 9.63 ± 0.09 mg/ml, GCF IgG が 10.03 ± 2.52 mg/ml となり, 希釈率は 0.96 倍であった。明かに Exp. 1 における希釈率の方が大きい。Shillitoe ら¹⁷⁾は, GCF 中の IgG は血清 IgG に比較して有意に低く, その希釈率は約 3.7 倍であると報告している。また, Shenkein ら¹⁶⁾は GCF 対血清の IgG 比は 0.854 で, GCF の IgG 量が少ないと報告している。本研究における血清及び GCF の抗 *Bg* 抗体価を単位 IgG 量にて補正すると, 血清の抗 *Bg* 抗体量は 51.3 ± 16.6 EU/mg であるのに対し, GCF の抗 *Bg* 抗体量は 44.5 ± 22.6 EU/mg と少なかった。この場合, 測定に使用したヤギ抗ヒト IgG 血清 (CAPPEL) はヒト IgG の Fab フラグメントに特異的であるため, やはり, IgG の免疫複合物形成による消費, あるいは酵素系による分解, 変性の影響が及ぶことは無視できないとしても, 依然として血清の抗 *Bg* 抗体価の方が高く, 局所における IgG 産生の可能性が弱いことを裏付けるものである。

(4) として病期の問題であるが, Socransky ら^{40, 41)}が提唱した disease activity という概念からすると, 静止期から活動期への移行の引き金になるのは歯肉縁下細菌叢の変化と, 宿主の免疫応答の変化であると報告している。Slots ら⁴²⁾は過去 2~5 年の X 線写真をもとに progressive な部位, nonprogressive な部位からの *Bg*, *Aa* の検出率を検索したところ progressive な部位では *Bg*, *Aa* がそれぞれ 41.5%, 50.0% の検出率を示したのに対し, nonprogressive な部位ではそれぞれ 5.7%, 4.8% の検出率であった。Bragd ら⁴³⁾も同様な結果を報告している。これらの事より, disease activity が異なれば, その時点における歯肉縁下細菌叢の状態やそれに対する免疫応答が異なると考えられ, 本研究と過去の報告のサンプリング時における disease activity の違いが抗 *Bg* 抗体比の違いに反映している可能性が考えられる。

細菌学的に, Spiegel ら¹⁾は AP 患者の部位別の *BpB* の検出率は 100% で, かつ総菌数に対する割合は, 平均 16.4~20.1% であり, その中でも *B. asaccharolyticus* (*Bg*381)の割合は 8.5~12.1% にものぼると報告している。斉藤²⁾も AP 患者の *BpB* の検出率は 100% で, 総菌数に対する割合は平均 26.5~36.7%, *Bg* の比率は 0.2~1.1% であると述べている。White ら³⁾は歯周ポケットが深くなればなる程, *BpB* 及び *Bg* の検出率は高いとし, 6 mm 以上のポケットでは培養可能な総菌数の

35.3% が BpB であり、中でも Bg は 27.0% にもなると報告している。本研究において、Exp. 1 における BpB の検出率は 66.7% となり、Spiegel ら¹⁾、斉藤²⁾の報告に比べると低い値となった。Spiegel ら¹⁾、斉藤²⁾は嫌気ガスを噴射しながら、歯肉縁下プラークがなるべく酸素に触れない状況下でサンプリングしているのに対し、本研究ではサンプリングの段階では嫌気状態を厳密に追求していないこと、培地が異なることなどにより検出率に差がでたものと考えられる。しかしながら、Bg の検出率、総菌数に対する割合は、Spiegel ら¹⁾の報告とほぼ一致した結果であった。また、Slots ら⁷⁾は Aa の分離頻度について、健康成人で 36%、AP 患者で 50%、LJP 患者で 90% と報告しており、Zambon ら⁸⁾も同様に 16.9%、20.8%、96.5% と報告している。しかしながら、Okuda ら²⁹⁾は LJP 患者の Aa 検出率は 0.05~0.3% ときわめて低いと報告している。本研究においても、全ての群において Aa は検出されなかった。

歯周初期治療前後における様々な変化としてまず、Bg に対する血清抗体価が有意に減少した。これは岡村ら⁴⁴⁾、Vincent ら⁴⁵⁾、渡辺ら⁴⁶⁾の報告と一致する。一方、治療により抗体価が上昇したという Ebersole らの報告⁴⁷⁾もある。スケーリング、ルートプレーニングなどの処置後、全体の 96% の患者において BpB, *Eikenella corrodens*, *Campylobacter concisus*, Aa などのグラム陰性桿菌のうち、いずれかの細菌に対する IgG 抗体価が上昇し、それは 2~4 ヶ月でピークに達し、8~12 ヶ月で治療前のレベルにもどったと報告している。このことについて Ebersole ら⁴⁷⁾は歯周治療操作により歯周ポケット内の細菌を結合組織内に侵入させたため抗体価が上昇したと述べている。岡村らの報告⁴⁴⁾の中でもこの治療後の抗体価上昇について触れており、抗体価上昇のピークは 30 日であり、これを過ぎれば有意に減少すると述べている。本研究における Exp. 2 は、歯周初期治療を終了後 40~50 日経過後にサンプリングを行っており、岡村ら⁴⁴⁾の報告しているピークは既に過ぎていると考えられる。また、血清抗 Bg 抗体価が有意な減少を示したのに GCF の抗 Bg 抗体価は減少を示さなかった。そこで、LA に注目し、歯周治療後 2 mm 以上の付着の gain が認められた 15 部位と、不変あるいは loss が認められた 11 部位に分けて GCF 抗体価を比較したところ、gain が認められた部位では、Bg に対する GCF 抗体価の変化率は $34.7 \pm 49.1\%$ 増加、不変あるいは loss が認められた部位は $303.0 \pm 86.7\%$ 増加となり、統計的に有意な差が認められた ($p < 0.01$)。従って、治療前後における

GCF 抗 Bg 抗体価に変化が認められなかったのは付着量において、不変あるいは loss が認められた部位における変化が大きく影響しているものと考えられる。

次に、歯周治療後の Exp. 2 において BpB の検出率及び培養可能な総菌数に対する割合はともに減少し、さらに Bg は検出されなくなった。朴らの報告⁴⁸⁾によると、治療後はグラム陰性桿菌及び糸状菌が有意に減少し、中でも BpB の検出率は初診時が 8.2% であるのに対し、プラークコントロール終了後で 2.7%、スケーリング、ルートプレーニング終了後で 2.0% と順次減少しており、本研究の結果と一致する。

本研究は歯周病の病態を的確にとらえるため直接的原因となる細菌と、それに対する宿主の反応として全身と局所の抗体という両面から検索を加えた。その結果、Aa については細菌学的検索、免疫学的検索ともに negative な結果となったが、Bg については、両者とも歯周病の病態と密接に関係している結果が得られた。すなわち Bg と血清抗体価との関係についてはそのようにいえるが、GCF 抗体価との関係についてはあまり明確な関連性は得られていない。今後はさらに GCF についての検索、及び disease activity を考慮した経時的な検索が必要となろう。

総括並びに結論

歯周疾患の病態と宿主の体液性免疫応答及び細菌がどのようににかかわっているのかを検索した結果、以下の結論を得た。

1. Exp. 1 群の血清抗 Bg 抗体価は Con. 1, Con. 2 群に比較して有意に高く、治療後は有意に減少した。しかし、Aa, Bi, Bm に対する抗体価については有意な差は認められなかった。
2. Bg および Aa に対する GCF 抗体価については各群間で有意差は認められなかった。
3. Exp. 1 群における Bg 抗体比は Con. 1, Con. 2 群に比較して有意に低く、局所における特異的 IgG 産生の可能性は弱いと推測された。
4. Exp. 1 群における BpB 検出率は 66.7% で、そのうち 42.9% が Bg であった。Aa はいずれの群からも検出されなかった。
5. 抗 Bg 抗体価が高いか、あるいは Bg が検出された群においては、抗 Bg 抗体価が低く、かつ Bg が検出されない群に比較して有意に付着の喪失量及び X 線的骨吸収量が大きかった。

6. 血清抗 *Bg* 抗体価は全ての臨床的診査項目との間に有意な正の相関関係を認めたが、GCF 抗 *Bg* 抗体価は、いずれの項目との間においても有意な相関関係が認められなかった。

謝 辞

本稿を終えるにあたり、終始懇篤なる御指導と御校閲を賜りました原 耕二教授に心から感謝申し上げます。また、本研究の遂行に際して懇切丁寧な御教示並びに御助言を賜りました本学歯科保存学第2教室、吉江弘正助教授に謹んで感謝の意を表わすとともに、第2保存学教室員の皆様の御協力に感謝申し上げます。

文 献

- 1) Spiegel, C.A., Hayduk, S.E. and Krywolak, G.E. : Black-pigmented *Bacteroides* from clinically characterized periodontal sites. J. Periodontal Res., 14 : 376-382, 1979.
- 2) 斉藤 正 : 歯周疾患病巣における黒色色素産生 *Bacteroides* の検出率と分離菌種. 日歯周誌, 29 : 1-11, 1987.
- 3) White, D. and Mayrand, D. : Association of oral *Bacteroides* with gingivitis and adult periodontitis. J. Periodontal Res., 16 : 259-265, 1981.
- 4) 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.
- 5) 永井 淳, 岡村和則, 小林充治, 横山雅之, 熊澤寛, 杉山雅昭, 栗原英見, 野村慶雄, 村山洋二 : 歯周病関連細菌に対する血清 IgG 抗体, 第1報 歯周病の病状と IgG 抗体との相関. 日歯周誌, 29 : 132-145, 1987.
- 6) Ebersole, J.L., Taubman, M.A., Smith, D.J. and Frey, D.E. : Human immune responses to oral microorganisms : Patterns of systemic antibody levels to *Bacteroides* Species. Infect. Immun., 51 : 507-513, 1986.
- 7) Slots, J., Reynolds, H.S. and Genco, R.J. : *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in human periodontal disease : a cross-sectional microbiological investigation. Infect. Immun., 29 : 1013-1020, 1980.
- 8) Zambon, J.J., Christersson, L.A. and Slots, J. : *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in human periodontal disease : Prevalence in patient groups and distribution of biotypes and serotypes within families. J. Periodontol., 54 : 707-711, 1983.
- 9) 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.
- 10) Vincent, J.W., Suzuki, J.B., Falkler, W.A. and Cornett, W.C. : Reaction of human sera from juvenile periodontitis, rapidly progressive periodontitis, and adult periodontitis patients with selected periodontopathogens. J. Periodontol., 56 : 464-469, 1985.
- 11) 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.
- 12) Chung, C.P., Lee, Y.K., Choi, S.M. and Nisengard, R.J. : Antibodies to *Actinobacillus* in a Korean population. J. Periodontol., 57 : 510-515, 1986.
- 13) Theilade, E. : The non-specific theory in microbial etiology of inflammatory periodontal diseases. J. Clin. Periodontol., 13 : 905-911, 1986.
- 14) Brill, N. and Krasse, B. : The passage of tissue fluid into the clinically healthy gingival pocket. Acta Odont. Scand., 16 : 233-245, 1958.
- 15) Holmberg, K. and Killander, J. : Quantitative determination of immunoglobuline (IgG, IgA and IgM) and identification of IgA-type in the gingival fluid. J. Periodontal Res., 6 : 1-8, 1971.
- 16) Schenkein, H.A. and Genco, R.J. : Gingival fluid and serum in periodontal disease I. quantitative study of immunoglobulins, complement

- components, and other plasma proteins. J. Periodontol., 48 : 772-777, 1977.
- 17) Shillitoe, E.J. and Lehner, T. : Immunoglobulins and complement in crevicular fluid, serum and saliva in man. Archs. Oral Biol., 17 : 241-247, 1972.
 - 18) Tollefsen, T. and Saltvedt, E. : Comparative analysis of gingival fluid and plasma by crossed immunoelectrophoresis. J. Periodontal Res., 15 : 96-106, 1980.
 - 19) Sonis, S.T., Mirando, D.M., Lamster, I.B., Stelos, P. and Wilson, R.E. : Evidence suggesting the presence of antigen-antibody complexes on the surface of salivary leukocytes. J. Periodontal Res., 14 : 370-375, 1979.
 - 20) Naito, Y., Okuda, K. and Takazoe, I. : Immunoglobulin G response to subgingival gram-negative bacteria in human subjects. Infect. Immun., 45 : 47-51, 1984.
 - 21) Tew, J.G., Marshall, D.R., Burmeister, J.A. and Ranney, R.R. : Relationship between gingival crevicular fluid and serum antibody titers in young adults with generalized and localized periodontitis. Infect. Immun., 49 : 487-493, 1985.
 - 22) Ebersole, J.L., Taubman, M.A. and Smith, D.J. : Gingival crevicular fluid antibody to oral microorganisms II. Distribution and specificity of local antibody responses. J. Periodontal Res., 20 : 349-356, 1985.
 - 23) Loe, H. : The gingival index, the plaque index and the retention index systems. J. Periodontol., 38 : 610-616, 1967.
 - 24) Silness, J. and Loe, H. : Periodontal disease in pregnancy II. correlation between oral hygiene and periodontal condition. Acta Odont. Scand., 22 : 121-135, 1964.
 - 25) Schei, O., Wearhaug, J. and Lovdal, A. : Alveolar bone loss as related to oral hygiene and age. J. Periodontol., 30 : 7-15, 1959.
 - 26) 菊池康夫, 清重達夫, 佐々木修二, 奥田克爾, 加藤哲男, 内藤祐子, 小野美千代, 高添一郎 : 抗 *Bacteroides gingivalis* 血清の防御作用. 日歯周誌, 27 : 106-113, 1985.
 - 27) Slots, J. : Selective medium for isolation of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. J. Clin. Microbiol., 15 : 606-609, 1982.
 - 28) Steenberg, T.J.M., Winkelhoff, A.J., Mispel, L., Velden, U., Abbas, F. and Graaff, J. : Comparison of two selective media for *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. J. Clin. Microbiol., 24 : 636-638, 1986.
 - 29) Okuda, K., Naito, Y., Ohta, K., Fukumoto, Y., Kimura, Y., Ishikawa, I., Kinoshita, S. and Takazoe, I. : Bacteriological study of periodontal lesions in two sisters with juvenile periodontitis and their mother. Infect. Immun., 45 : 118-121, 1984.
 - 30) 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 : 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. 日歯周誌, 26 : 317-328, 1984.
 - 31) Slots, J., Hafstrom, C., Rosling, B. and Dahlen, G. : Detection of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Bacteroides gingivalis* in subgingival smears by the indirect fluorescent-antibody technique. J. Periodontal Res., 20 : 613-620, 1985.
 - 32) 奥田一博 : 排膿と歯周ポケット内細菌との関連について. 日歯周誌, 27 : 757-770, 1985.
 - 33) 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 : 612-632, 1980.
 - 34) Genco, R.J., Zambon, J.J. and Murray, P.A. : Serum and gingival fluid antibodies as adjuncts in the diagnosis of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*-associated periodontal disease. J. Periodontol. Special Issue, 41-50, 1985.
 - 35) Yamazaki, K., Abe, H., Hara, K. and Nohara, H. : Production of chemotactic factor for lymphocyte by digestion of IgG with a highly purified polymorphonuclear leukocyte neutral thiol proteinase. Inflammation, 11 : 323-334, 1987.
 - 36) Ishikawa, I. and Cimasoni, G. : Partial purification of a neutral protease from human poly-

- morphonuclear leukocytes and its proteolytic effect on immunoglobulin G. *Archs. Oral Biol.*, 23 : 933-940, 1978.
- 37) Higuchi, Y., Ishida, M. and Hayashi, H. : A lymphocyte chemotactic peptide released from immunoglobulin G by neutrophil neutral thiol protease. *Cellular Immunol.*, 46 : 297-308, 1979.
 - 38) Kilian, M. : Degradation of immunoglobulins A1, A2, and G by suspected principal periodontal pathogens. *Infect. Immun.*, 34 : 757-765, 1981.
 - 39) Møller, A.M. and Mathiesen, L.R. : Detection of immunoglobulin M antibodies to hepatitis A virus by enzyme-linked immunosorbent assay. *J. Clin. Microbiol.*, 10 : 628-632, 1979.
 - 40) Socransky, S.S., Haffajee, A.D. and Goodson, J.M. : Periodontal disease activity: Patterns of attachment loss. *J. Dent. Res.*, 61 : 220 (Abstract 378), 1982.
 - 41) Socransky, S.S., Haffajee, A.D., Goodson, J.M. and Lindhe, J. : New concepts of destructive periodontal disease. *J. Clin. Periodontol.*, 11 : 21-32, 1984.
 - 42) Slots, J., Bragd, L., Wikstrom, M. and Dahlen, G. : The occurrence of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Bacteroides gingivalis* and *Bacteroides intermedius* in destructive periodontal disease in adults. *J. Clin. Periodontol.*, 13 : 570-577, 1986.
 - 43) Bragd, L., Dahlen, G., Wikstrom, M. and Slots, J. : The capability of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Bacteroides gingivalis* and *Bacteroides intermedius* to indirect progressive periodontitis; a retrospective study. *J. Clin. Periodontol.*, 14 : 95-99, 1987.
 - 44) 岡村和則, 永井 淳, 熊澤 寛, 杉山雅昭, 水島 ゆみ, 光田由可, 高柴正悟, 栗原英見, 野村慶雄, 村山洋二 : 歯周病関連細菌に対する血清 IgG 抗体 第2報 歯周病治療に伴う血清 IgG 抗体の変動. *日歯周誌*, 29 : 146-154, 1987.
 - 45) Vincent, J.W., Falkler, Jr.W.A., Cornett, W.C. and Suzuki, J.B. : Effect of periodontal therapy on specific antibody responses to suspected periodontopathogens. *J. Clin. Periodontol.*, 14 : 412-417, 1987.
 - 46) 渡辺 久, 杉山栄一, 堀部元雄, 石川 烈 : 初期治療の歯周疾患関連菌に対する血清 IgG 抗体価に及ぼす影響について. *日歯周誌*, 28 : 631-638, 1986.
 - 47) Ebersole, J.L., Taubman, M.A., Smith, D.J. and Haffajee, A.D. : Effect of subgingival scaling on systemic antibody responses to oral microorganisms. *Infect. Immun.*, 48 : 534-539, 1985.
 - 48) 朴 秀樹, 神谷洋行, 奥田一博, 江口泰子, 長谷川栄子, 吉江弘正, 原 耕二 : 歯周ポケット内細菌叢からみた歯周初期治療の効果. *日歯周誌*, 26 : 329-338, 1984.