ハムスターにおける *Actinomyces viscosus*

経口免疫の口腔内生着抑制

長 畑 哲 二^{1), 2)}¹⁾新潟大学歯学部歯科保存学第2教室

(指導: 原 耕二教授)

²⁾ライオン株式会社第一応用研究所

(主任: 阿部龍二所長)

(昭和63年6月20日受付)

Effects of Oral Immunization on *Actinomyces viscosus* Infection in HamstersTetsuji NAGAHATA^{1), 2)}¹⁾Department of Periodontology, Niigata University School of Dentistry

(Chief and Director: Prof. Kohji HARA)

²⁾Applied Research Laboratories 1, Lion Corporation

(Director: Ryuji ABE)

The purpose of this study was to clarify the effects of oral immunization on the implantation of *Actinomyces viscosus* (*A. viscosus*) in hamsters. *A. viscosus* T14VR (Streptomycin resistant, 1 mg/ml) was used for infection and oral immunization. Golden hamsters were given formalinized *A. viscosus* whole cells by gastric intubation for 16 weeks. Elevated anti-*A. viscosus* IgA and IgG antibody values in saliva were obtained 4 weeks after beginning of immunization. The elevated antibody activities were kept until the

end of experiment (16 weeks). *A. viscosus* T14VR was introduced into hamsters' oral cavities 7 weeks after immunization and implantation of this microorganism was checked 1, 5 and 9 weeks after inoculation. A significant decreased ratio of implantation of *A. viscosus* was observed in orally immunized group.

These findings suggested that oral immunization with periodontopathic bacteria might be useful to prevent implantation of these bacteria in oral cavities.

Key words: Oral immunization, *Actinomyces viscosus*, Saliva, Antibody

要旨: 本研究は *Actinomyces viscosus* (*A. viscosus*) の感染に対する経口免疫の効果をハムスターで検討することを目的とした。経口免疫及び感染細菌としてストレプトマイシン耐性の *A. viscosus* T14VR 株を用いた。ゴールデンハムスターにホルマリン処理した *A. viscosus* の全菌体を16週間にわたりゾンデをもちいて経口投与した。投与開始4週目において唾液中の抗 *A. viscosus* IgA 及び IgG 抗体価の上昇が認められた。この抗体価は経口免疫の継続により実験終了時の16週目まで維持されていた。*A. viscosus* の口腔内接種を唾液中の抗体価が上昇した後に行い、その後1, 5, 9週目に *A. viscosus* の口腔内での生着状態をしらべた。その結果、経口免疫群では *A. viscosus* の検出率が対照群に比較し有意に低かった。これらの実験結果は、経口免疫が歯周病原性細菌の口腔内への付着阻害及び増殖阻害に有効であることを示唆している。

索引用語：経口免疫, *Actinomyces viscosus*, 唾液, 抗体

緒 言

Actinomyces viscosus (以下, *A. viscosus*) はグラム陽性の通性嫌気性菌で, ヒト口腔内常在細菌の1種であり年齢の増加とともに口腔内に検出されてくる¹⁾。*A. viscosus* を小動物に口腔内感染させることにより, 多量のプラークが歯面および歯頸部に形成され, 歯槽骨の吸収を伴う歯周組織の破壊が生じることから, 本菌が歯周疾患の病原性細菌の1つであることが示されている²⁻⁵⁾。臨床の場合においても歯肉炎の発症と共に, *A. viscosus* の菌量が増大することにより, 歯肉炎と *A. viscosus* の関連性が示唆されている⁶⁾。

この菌の病原性は, この菌のホモジネートをマウスの足に注射すると, 著しい多形核白血球の浸潤を伴う急性の炎症が生じること⁷⁾, 歯破壊液を犬の歯肉に滴下することにより同様な炎症が歯肉に生じること⁸⁾ から明らかにされている。また, Hausmannら⁹⁾は, *A. viscosus* の菌体から骨吸収因子を粗精製しており, 本菌が歯槽骨吸収に関与していることを示唆している。さらに, *A. viscosus* の菌体成分は, アジュバント活性や, Bリンパ球にたいする多クローン性のマイトジェン活性があることなどが示されており¹⁰⁻¹⁵⁾, 生体の免疫応答になんらかの影響を及ぼすことにより, 歯周疾患の発現に関与していることが推察されている。

A. viscosus が口腔内で病原性を発揮するには, 口腔内に定着し増殖することが必要である。定着には菌体の表層構造の1つである繊毛が重要な役割を担っており, この繊毛により *A. viscosus* の菌体が歯の表面, あるいは他の口腔内細菌に吸着したのち増殖し, 種々の口腔内細菌とともにプラークを形成し病原性をしめすと考えられている¹⁶⁻²²⁾。

このような病原菌のプラークコントロールには, 従来, 殺菌剤や抗生物質が使用されている²³⁾。一方, これらの化学的なプラークコントロールに加え, 近年, 免疫化学的なプラークコントロールが, う蝕予防の目的で試みられている。即ち, 能動²⁴⁻²⁸⁾あるいは受動免疫²⁹⁻³¹⁾により, う蝕の原因菌の1つである *Streptococcus mutans* (以下, *S. mutans*) の感染あるいはう蝕の発生が効果的に抑制されることが報告されている。

本研究は歯周疾患の原因菌の1つと考えられる *A.*

viscosus の口腔内感染に対し, 同様な免疫学的方法, 即ち, 経口免疫の効果がどのようにあらわれるかをハムスターを用いて検討することにした。

材料と方法

1. 供試菌株及び培養方法

A. viscosus T14V 株のストレプトマイシン耐性株 (1 mg/ml) である T14VR 株を使用した。

ストレプトマイシン耐性株は, ストレプトマイシン含有 (1 mg/ml) 血液平板上に生育したコロニーを分離して得た。経口免疫には *A. viscosus* T14VR 株を Todd Hewitt Broth (Difco, U.S.A.) で3日間嫌気培養した後, 生理食塩水で3回洗浄し, 0.5% ホルマリンで処理した菌をイオン交換水で3回洗浄し, イオン交換水に懸濁したものを用いた。*A. viscosus* の口腔内感染には血液平板上で嫌気的に1晩培養したものを所定の菌量となるように Todd Hewitt Broth に懸濁して用いた。

2. 供試動物

ゴールデンハムスター (雄性, 15週齢) を実験に供した。*A. viscosus* 感染群は経口免疫を開始した後, *A. viscosus* を接種するまでは通常の固形飼料で飼育し, 菌の接種以後は実験終了時まで Keyes の diet #2000³²⁾ で飼育した。但し, *A. viscosus* 非感染群については実験終了時まで固形飼料で飼育した群と diet #2000 で飼育した群を設けた。

3. 実験プロトコル

実験は Fig. 1 に示したように, *A. viscosus* を口腔内感染する以前4週間にわたり, 1日1回, 5回/週の割合でゾンデを用いてホルマリン処理した *A. viscosus* で経口免疫を行った。その後は実験終了時まで1日おきに週3回の割合で経口免疫を行った。実験開始5週後に *A. viscosus* を口腔内に接種した。接種は, 5×10^6 CFU/0.1 ml/匹の菌量で3日間実施した。最終接種の11日後に再び *A. viscosus* を1日1回, 5×10^6 CFU/0.1 ml/匹の菌量で接種した。その6日後に *A. viscosus* の有無をしらべた。2回目の接種後, 9週目に動物を屠殺し, 上下顎を摘出し細菌学的検討を行い, また歯槽骨吸収の程度を測定した。唾液及び血液の採取は経口免疫開始前, 経口免疫開始後4週目, 及び2回目の *A. viscosus* の接種後5週目と9週目に行った。唾液はネブタール麻酔下 (IP,

Fig. 1 Protocol for oral immunization and *A. viscosus* inoculation.

Fig. 2 Ouchterlony immunodiffusion of hamster's and rat's serum. Well 1, anti-rat s-IgA goat serum; Well 2, rat's serum; Well 3, hamster's serum.

0.07 ml/100 g) にてピロカルピン溶液 (0.2%, 0.1ml/100 g) を皮下投与して採取した。血液は眼底静脈叢より採取した。採取した唾液は 10,000 rpm で 10 分間、そして血液は 3,000 rpm で 10 分間遠心分離を行った後、実験に供すまで -70°C にて凍結保存した。

4. 群わけ

以下の 5 群に分けて実験を行った。1: 非免疫及び *A. viscosus* 非接種群。2: 非免疫及び *A. viscosus* 接種群。3: *A. viscosus* 接種及び、低用量免疫群 (10^9 CFU/0.2 ml/日)。4: *A. viscosus* 接種及び、高用量免疫群 (5×10^9 CFU/1 ml/日)。5: 非免疫及び *A. viscosus* 非接種群 (固形飼料で飼育)。第 1 群から第 4 群は diet #2000 で飼育した。

5. 唾液中の抗 *A. viscosus* IgA 抗体価の測定

抗体価の測定は ELISA 法³³⁾にて行った。マイクロプレート抗原の coating には、ホルマリン処理全菌体を用いた (5×10^8 ml)。各 well に 0.05% の Tween 20 を含む生理的リン酸緩衝液 (pH 7.5, 0.01 M) で 2 倍に希

釈したサンプルを加え、室温で 3 時間インキュベーションした。その後、洗浄し、抗ラット s-IgA 山羊血清 (Miles, U.S.A.) を加え、1 晩インキュベーションした。再びプレートを洗浄後、アルカリフォスファターゼ標識抗山羊 IgG 家兔血清 (Miles) を加え、4 時間インキュベーションした後、洗浄し、P-Nitrophenyl Phosphate Disodium (Sigma, U.S.A.) を加え、30 分間インキュベーションした後、1 N NaOH を加え反応を停止させ、405 nm に於ける吸光度を測定した。本実験では 1 次抗体として抗ラット s-IgA 山羊血清を用いたがこれはこの抗血清がハムスター血清と Ouchterlony 法で明瞭な沈降線を示したため (Fig. 2)、抗ハムスター s-IgA 血清の代用として用いた。尚、本実験で用いた抗血清は全てホルマリン処理 *A. viscosus* で吸収操作を行った後、実験に供した。

6. 血清中及び唾液中の抗 *A. viscosus* IgG 抗体価の測定

抗 *A. viscosus* IgG 抗体価の測定も ELISA 法³³⁾にて行った。1 次抗体として抗ハムスター IgG 山羊血清 (Cappel, U.S.A.) を用いた以外は唾液中の IgA 抗体価の測定と同様に行った。血清中の抗体価については、ハムスターを Freund の Complete Adjuvant (三光純薬) と共に、*A. viscosus* を 10^9 CFU/匹の菌量で 1 週間おきに 4 回皮下免疫して得られた抗血清を標準血清として ELISA Units (EU) であらわした。標準血清の EU は 10,000 とした。

7. 接種菌の口腔内からの検出及び菌数の測定

A. viscosus の接種後の口腔内における *A. viscosus* の有無は滅菌綿棒 (メンチップ, 日本綿棒) で口腔内を swabbing した後、ストレプトマイシン含有 (1 mg/ml) 血液平板に塗抹し、4 日間嫌氣的に培養した後コロニー形態で判別した。また数個のコロニーについてはグラム染色及び間接蛍光抗体法³⁴⁾により *A. viscosus* であることを確認した。実験終了時におけるブラーク中の全菌数

Table 1 Changes of anti-*A. viscosus* IgA antibody in saliva (OD405)

Group ^a	n ^b	Time after beginning of immunization		
		4w	12w (5w) ^c	16w (9w) ^c
1	9	0.10±0.03	0.07±0.02	0.05±0.01
2	7	0.08±0.01	0.05±0.01	0.06±0.01
3	7	0.11±0.02	0.10±0.02	0.17±0.07*
4	8	0.37±0.06**	0.45±0.06***	0.48±0.06***
		Mean±S.E.		

a : 1 ; No *A. viscosus* inoculation, no immunization (fed with diet #2000)2 ; *A. viscosus* inoculation, no immunization (fed with diet #2000)3 ; *A. viscosus* inoculation, oral immunization
(10⁹ CFU/day, fed with diet #2000)4 ; *A. viscosus* inoculation, oral immunization
(5×10⁹ CFU/day, fed with diet #2000)

b : Number of animals

c : Time after *A. viscosus* inoculation (week)

* : Significant at p<0.05, compared with group 2

** : Significant at p<0.01, compared with group 2

*** : Significant at p<0.001, compared with group 2

及び *A. viscosus* の測定は以下の方法で行った。即ち、動物を屠殺後、上下顎を摘出し、各々の歯肉縁に付着したプラークを滅菌した、つま楊子にて注意深く採取し、5 ml の THB に懸濁した。このサンプルを超音波で 10 秒間処理し、プラークを分散させたのち同培地で希釈後、血液平板及びストレプトマイシン含有 (1 mg/ml) 血液平板に塗抹した。嫌氣的に 7 日間培養し、血液平板上に生育したコロニーから総菌数を算出した。*A. viscosus* の菌数はストレプトマイシン含有血液平板に生育したコロニーのうち明らかに *A. viscosus* と判別し得るコロニー形態のものを算定して得た。

8. 歯槽骨の吸収の測定

左側の上下顎を 10% ホルマリン中に 1 晩放置後、可及的に歯肉を剥離し、実体顕微鏡下にてセメント・エナメル境から歯槽骨縁までの距離を測定した。測定は上下顎の第一、第二臼歯の各歯根について行った。

9. 統計解析

Swabbing による *A. viscosus* の検出割合については、分散分析 (累積法) にて検定し、他のデータについては Student の t-検定を行った。

結 果

1. 唾液中の抗 *A. viscosus* IgA 及び IgG 抗体価の変化

Table 1 にホルマリン処理菌体で経口免疫開始後、4、

12、及び 16 週目のハムスター唾液中の抗 *A. viscosus* IgA 抗体価の変化を OD 値 (405 nm) で示した。*A. viscosus* 感染のみの群においては、実験期間中を通して *A. viscosus* 非感染群と同様に唾液中の抗体価の上昇はまったく認められなかった。経口免疫群においては高用量群 (5×10⁹ CFU/匹) で、経口免疫開始 4 週目以降において明らかな唾液中の抗 *A. viscosus* IgA 抗体価の上昇が認められた (p<0.01)。その抗体価は 4、12、16 週目で、OD 値でそれぞれ、0.25、0.27、0.29 と実験終了時まで経口免疫の継続によりほぼ一定の値を示した。これらの値は *A. viscosus* 感染のみの群の値と比べていずれも有意に高かった。低用量群 (10⁹ CFU/匹) では IgA 抗体価の上昇は殆ど認められなかった。抗 *A. viscosus* IgG 抗体価の変化についても IgA 抗体価の変化とほぼ同様な結果が得られた (Table 2)。即ち、*A. viscosus* 感染のみの群においては唾液中の抗 *A. viscosus* IgG 抗体価の上昇は認められず、低用量経口免疫群においても実験期間中を通して抗 *A. viscosus* IgG 抗体価の上昇はわずかにしか認められなかった。一方、高用量免疫群では抗 *A. viscosus* IgG 抗体価の上昇は免疫開始 4 週目において明らかに認められ (OD=0.37)、12 週目で OD 値は 0.45、16 週目で OD 値は 0.48 とほぼ一定の抗体価が得られた。これらの値は *A. viscosus* 感染のみの群と比べいずれも有意に高かった (4 週目で p<0.01、12、16 週目で p<0.001)。

Table 2 Changes of anti-*A. viscosus* IgG antibody in saliva (OD405)

Group ^a	n ^b	Time after beginning of immunization		
		4w	12w (5w) ^c	16w (9w) ^c
1	9	0.07±0.02	0.07±0.02	0.05±0.01
2	7	0.07±0.01	0.05±0.02	0.04±0.01
3	7	0.10±0.02	0.07±0.02	0.12±0.02*
4	8	0.25±0.04**	0.27±0.04***	0.29±0.03**
		Mean±S.E.		

a : 1 ; No *A. viscosus* inoculation, no immunization (fed with diet #2000)2 ; *A. viscosus* inoculation, no immunization (fed with diet #2000)3 ; *A. viscosus* inoculation, oral immunization
(10⁹ CFU/day, fed with diet #2000)4 ; *A. viscosus* inoculation, oral immunization
(5×10⁹ CFU/day, fed with diet #2000)

b : Number of animals

c : Time after *A. viscosus* inoculation (week)

* : Significant at p<0.05, compared with group 2

** : Significant at p<0.01, compared with group 2

*** : Significant at p<0.001, compared with group 2

Table 3 Changes of anti-*A. viscosus* IgG antibody in serum
(ELISA UNITS, Standard=10,000)

Group ^a	n ^b	Time after beginning of immunization			
		0w	4w	12w (5w) ^c	16w (9w) ^c
1	9	10.5±1.4	8.4±0.2	9.7± 1.1	10.6± 0.8
2	7	11.1±1.1	9.0±1.2	11.1± 0.9	12.5± 1.1
3	7	12.5±1.1	8.0±0.9	11.1± 1.1	21.5± 3.6*
4	8	8.9±1.1 NS	36.7±7.0**	184.9±60.5*	480.1±188.0*
		Mean±S.E.			

a : 1 ; No *A. viscosus* inoculation, no immunization (fed with diet #2000)2 ; *A. viscosus* inoculation, no immunization (fed with diet #2000)3 ; *A. viscosus* inoculation, oral immunization (10⁹ CFU/day, fed with diet #2000)4 ; *A. viscosus* inoculation, oral immunization
(5×10⁹ CFU/day, fed with diet #2000)

b : Number of animals

c : Time after *A. viscosus* inoculation

* : Significant at p<0.05, compared with group 2

** : Significant at p<0.01, compared with group 2

NS : Not significant at p>0.05, compared with group 2

2. 血清中の抗 *A. viscosus* IgG 抗体価の変化

Table 3 は血清中の抗 *A. viscosus* IgG 抗体価の変化を ELISA Units (EU) で示したものである。高用量免疫群においては免疫開始4週目で EU 値は 36.7, 12週目で 184.9, 16週目では 480.1 と経口免疫の継続とともに有意に上昇した。これらの値は *A. viscosus* 感染のみの群と比べていずれも有意に高かった (4週目で p<0.01, 12, 16週目で p<0.05)。低用量免疫群においては

免疫開始12週目まではその上昇は認められなかったが、16週目においてわずかな上昇を認めた。*A. viscosus* 感染のみの群との比較では有意な差が認められた (p<0.05)。

3. *A. viscosus* の口腔内からの検出率

Table 4 に示すとおり、非経口免疫及び低用量免疫群では、接種1週後に於て、それぞれ7匹中7匹、及び6匹の動物から接種した菌が検出された。高用量免疫群で

Table 4 Recovery of inoculated *A. viscosus* in hamsters after the second inoculation

Group ^a	Time after inoculation									
	1w (8w) ^b					5w (12w)				
	—	+	+	+	r ^d	—	+	+	+	r
1	9 ^e	0	0	0	0/9	9	0	0	0	0/9
2	0	5	0	2	7/7	0	1	3	3	7/7
3	1	2	4	0	6/7	0	0	3	4	7/7
4	5	3	0	0*	3/8	0	4	3	1 NS	8/8

a : 1 ; No *A. viscosus* inoculation, no immunization (fed with diet #2000)
 2 ; *A. viscosus* inoculation, no immunization (fed with diet #2000)
 3 ; *A. viscosus* inoculation, oral immunization (10⁹ CFU/day, fed with diet #2000)
 4 ; *A. viscosus* inoculation, oral immunization (5×10⁹ CFU/day, fed with diet #2000)

b : Time after beginning of oral immunization

c : Degree of recovered *A. viscosus*

— ; 0 CFU/plate

+

+

+

d : Number of animals in which *A. viscosus* was recovered/Total animals

e : Number of animals, * : Significant at p<0.05, compared with group 2

NS : Not significant compared with group 2

Table 5 Number of total bacteria and recovered *A. viscosus* in supragingival plaque (16 weeks)

Group ^a	n	Sites					
		Maxilla			Mandible		
		Total bacteria (×10 ⁶ CFU)	Recovered <i>A. viscosus</i> (×10 ⁴ CFU)	% of <i>A. viscosus</i> %	Total bacteria (×10 ⁶ CFU)	Recovered <i>A. viscosus</i> (×10 ⁴ CFU)	% of <i>A. viscosus</i> %
1	9	31.9±7.6	0	0	243.0±150.1	0	0
2	7	69.1±20.0	43.3±13.1	0.88±0.20 (−23.4±2.8) ^b	385.4±243.0	56.4±16.0	0.60±0.26 (−25.7±2.6)
3	7	65.2±23.8	31.6±13.1	1.70±0.86 (−23.3±2.4)	128.2±33.9	28.7±11.2	0.47±0.21 (−24.9±2.1)
4	8	46.4±22.9	4.1±1.9*	0.15±0.08* (−33.6±2.9)*	116.3±33.7	5.3±4.3*	0.05±0.03NS (−38.9±2.9)**
5	11	2.9±1.0	NT	NT	2.2±0.4	NT	NT

a : 1 ; No *A. viscosus* inoculation, no immunization (fed with diet #2000)

2 ; *A. viscosus* inoculation, no immunization (fed with diet #2000)

3 ; *A. viscosus* inoculation, oral immunization (10⁹ CFU/day, fed with diet #2000)

4 ; *A. viscosus* inoculation, oral immunization (5×10⁹ CFU/day, fed with diet #2000)

5 ; No *A. viscosus* inoculation, no immunization (fed with solid diet)

b : Decibel value (Db) ; % values were transformed into decibel value by omega transformation

Db=−log 10 (100/p−1), p means % value

* : Significant at P<0.05, compared with group 2

** : Significant at P<0.01, compared with group 2

NS : Not significant compared with group 2

NT : Not tested

は8匹中3匹とその検出率は、非経口免疫群及び低用量免疫群に比較して有意に低かった (p<0.05)。菌接種後5週目では *A. viscosus* 非接種群を除く全ての群に於て

接種した菌が検出されたが、高用量免疫群では非免疫群に比較し、口腔内を swabbing して得られる菌数は有意ではないが少ない傾向を示した。次に Table 5 は *A. vis-*

Fig. 3 Correlation between anti-*A. viscosus* IgA antibody titer and ratio of *A. viscosus* in supragingival plaque. Ratio values of *A. viscosus* are transformed by omega transformation and are expressed as decibel.

● : Maxilla n=21 ○ : Mandible n=21

cosus 接種後 9 週目に歯肉縁より採取したプラーク中の総菌数及び接種した *A. viscosus* の菌数及び, *A. viscosus* の総菌数に対する割合とその値をオメガ変換³⁵⁾して得られた値 (デシベル値) を示す。 *A. viscosus* 非感染群で固形飼料飼育群の上下顎の総菌数はそれぞれ, 2.9×10^6 CFU, 2.2×10^6 CFU であるのに対し, diet # 2000 で飼育した群の上下顎の総菌数は 3.2×10^7 及び 2.4×10^8 CFU となり, 10 倍から 100 倍の値を示した。 diet # 2000 で飼育した *A. viscosus* 非感染群と感染群との比較では, *A. viscosus* 感染群の方で約 2 倍の菌数が得られた。 経口免疫群と非経口免疫群の比較では総菌数に関しては有意な差はみられないが, 高用量免疫群の方でやや少ない傾向にあった。 接種した *A. viscosus* の検出数に関しては明瞭な差が高用量免疫群と非経口免疫群間で認められた。

即ち, 上顎においては *A. viscosus* 感染のみの群では, 検出された *A. viscosus* の菌数は 43.3×10^4 CFU であり, 高用量免疫群では 4.1×10^4 CFU と約 1/10 であった。 また, 下顎においても *A. viscosus* 感染のみの群では, 56.4×10^4 CFU であり, 高用量免疫群では 5.3×10^4 CFU とやはり約 1/10 程度であった。 この差はいずれも統計学的に有意であった ($p < 0.05$)。 総菌数に対する *A. viscosus* の比率についても, 上顎において高用量免疫群では 0.15% であり, 非免疫群の 0.88% の値に比較して

有意に小さかった ($p < 0.05$)。 下顎においては有意ではないが高用量免疫群で 0.05%, 非免疫群で 0.6% と同様な傾向が認められた。 またこの比率をオメガ変換して得られた値について検定した場合には, 上下顎において, 非免疫群と高用量免疫群間に有意な差が認められた ($p < 0.05$ 及び $p < 0.01$)。 Fig. 3 に唾液中の抗 *A. viscosus* IgA 抗体価と, 上顎及び下顎の総菌数に対する *A. viscosus* の比率をオメガ変換して得られた値との相関を示した。 相関係数は $r = -0.64$ ($p < 0.001$) であり, この両者間には有意な負の相関が認められた。 抗 *A. viscosus* IgG 抗体価との間にも同様な相関が認められ, 相関係数は $r = -0.66$ ($p < 0.001$) であった。

4. 歯槽骨吸収の程度

Table 6 及び 7 に上顎と下顎の第 1, 第 2 臼歯の歯槽骨吸収の程度を示した。 歯槽骨吸収の程度に最も著明に差が認められたのは, *A. viscosus* 感染, 非免疫群と *A. viscosus* 非感染, 固形飼料飼育群の 2 群間であった。 その骨吸収程度は特に下顎の第 1 臼歯の舌側, 上顎の第 2 臼歯の舌側面のおのおのにおいて前者は後者の約 2 倍の値を示した。 ほぼ同様な差が *A. viscosus* 非感染, diet # 2000 飼育群と *A. viscosus* 非感染, 固形飼料飼育群の 2 群間においても認められた。 diet # 2000 で飼育した群で, *A. viscosus* 非感染群と感染群間の比較ではいずれの部位においても, 有意な差は認められなかった。 *A. vis-*

Table 6 Bone loss at maxilla (mm)

Group ^a	n	Lingual		Buccal	
		M1	M2	M1	M2
1	8	1.89±0.18	1.05±0.06	1.06±0.11	0.60±0.05
2	5	2.18±0.27	1.38±0.22	1.07±0.11	0.76±0.15
3	6	1.94±0.13	1.15±0.08	0.98±0.10	0.47±0.05
4	7	1.84±0.15	1.02±0.07	1.20±0.17	0.58±0.05
5	11	1.58±0.07	0.74±0.06**	1.22±0.10	0.54±0.03
		Mean±S.E.			

a : 1 ; No *A. viscosus* inoculation, no immunization (fed with diet #2000)
 2 ; *A. viscosus* inoculation, no immunization (fed with diet #2000)
 3 ; *A. viscosus* inoculation, oral immunization
 (10⁹ CFU/day, fed with diet #2000)
 4 ; *A. viscosus* inoculation, oral immunization
 (5×10⁹ CFU/day, fed with diet #2000)
 5 ; No *A. viscosus* inoculation, no immunization (fed with solid diet)

** : Significant at p<0.01, compared with group 1 and group 2

Table 7 Bone loss at mandible (mm)

Group ^a	n	Lingual		Buccal	
		M1	M2	M1	M2
1	9	2.38±0.30	1.11±0.08	0.99±0.06	0.55±0.04
2	7	2.55±0.16	1.03±0.10	1.03±0.07	0.58±0.08
3	7	2.01±0.22	0.97±0.10	1.13±0.18	0.50±0.09
4	8	2.15±0.26	0.98±0.07	0.96±0.18	0.57±0.04
5	12	1.11±0.04***	0.85±0.06**	0.89±0.03	0.48±0.06
		Mean±S.E.			

a : 1 ; No *A. viscosus* inoculation, no immunization (fed with diet #2000)
 2 ; *A. viscosus* inoculation, no immunization (fed with diet #2000)
 3 ; *A. viscosus* inoculation, oral immunization
 (10⁹ CFU/day, fed with diet #2000)
 4 ; *A. viscosus* inoculation, oral immunization
 (5×10⁹ CFU/day, fed with diet #2000)
 5 ; No *A. viscosus* inoculation, no immunization (fed with solid diet)

** : Significant at p<0.01, compared with group 1

*** : Significant at p<0.001, compared with group 1 and group 2

cosus 感染群と経口免疫群の比較においてもまた有意な差は認められなかった。

考 察

粘膜部位における分泌型抗体は種々の細菌感染に対する防御機構において重要な役割を担っており³⁶⁾, 口腔内においても唾液中に分泌型 IgA 抗体が存在しており, 細菌感染に対する防御機構における重要性が示唆されている³⁶⁾。経口的に接種された抗原は, 小腸のパイエル氏板に存在するM細胞を経由し³⁷⁾, M細胞下のリンパ球の活性化と唾液腺へのホーミングを促し, 活性化されたリ

ンパ球により抗体が産生され, 唾液中へ分泌されることが示されている³⁸⁾。Michalek ら^{24,39)}はう蝕の原因菌である *S. mutans* の全菌体を用いてラットを経口免疫することにより唾液中の抗 *S. mutans* IgA, IgG 抗体価が上昇することを認めており, これにより *S. mutans* の口腔内定着, 増殖が有意に抑制され, う蝕が予防されることを示している。ヒトにおいても, *S. mutans* の全菌体²⁶⁾あるいはグルコシルトランスフェラーゼ (GTF) の経口投与²⁸⁾により抗 *S. mutans* IgA 抗体, 抗 GTF IgA 抗体が唾液中に分泌され, 口腔内の *S. mutans* の菌数が減少することが示されており, 細菌により惹起される口腔疾患が唾液中の分泌型抗体により予防できることを示

唆している。

本研究では歯肉炎の原因菌と考えられている *A. viscosus* の感染に対して、唾液中の分泌型抗体が *S. mutans* の場合に認められたように有効であるか否かについて検討した。

A. viscosus の経口投与は唾液中の抗 *A. viscosus* IgA, IgG 抗体の産生を促し、その産生は投与菌量に依存しており、 10^9 CFU/匹の用量では 16 週間にわたる経口投与によっても、抗体価の上昇は殆ど認められなかった。 5×10^9 CFU/匹の菌量で経口免疫した群では、抗 *A. viscosus* IgA 及び IgG 抗体価ともに免疫開始後、4 週目において有意に上昇した。*S. mutans* を用いたラットでの分泌型抗体の誘導においても、ほぼ同様な用量依存性が認められており、 4×10^8 CFU/匹の投与では殆ど抗体価の上昇はないが、 4×10^9 CFU/匹の投与により著明に抗体価が上昇することが報告されており³⁹⁾、全菌体を用いて経口免疫により分泌型抗体の産生を誘導するには、かなり多量の抗原を投与する必要があることを示している。経口免疫の中止により唾液中の抗体価は徐々に低下し、2 ヶ月程度で免疫前のレベルにまで減少することが示されている²⁶⁾。本実験では経口免疫を実験終了時まで継続することにより、抗体価の上昇が認められた 4 週目以降 16 週目まで、約 3 ヶ月間上昇した抗体価が維持されていた。長期間にわたり唾液中の高い抗体価を得るには腸間リンパ装置への継続的な抗原刺激が必要とされるようである。しかしながら、一定量の抗原の長期間にわたる経口投与ではより高い抗体価を得ることはできないようである。経口免疫により記憶細胞の出現が示唆されており²⁶⁾、1 次免疫よりも 2 次免疫においてより高い抗体価が得られており、長期間、より高い抗体価を得るには免疫スケジュールの検討やアジュバントの使用²⁷⁾等を検討する必要があると考えられる。

血清中の抗 *A. viscosus* IgG 抗体価は 10^9 CFU/匹の投与量では、経口免疫開始 12 週目までは全く上昇は認められなかったが、16 週目においてわずかにその上昇が認められた。 5×10^9 CFU/匹の投与量では、経口免疫開始 4 週目において、抗 *A. viscosus* IgG 抗体価の上昇が認められ、それ以後は、唾液中の抗体価とは異なり、経口免疫の継続とともに抗体価は上昇する傾向にあった。経口免疫による血清中の抗体価の上昇は抗原の種類に依存しており、抗体価の上昇が認められる場合^{39,40)}と、認められない場合^{24,26)}があることが示されている。特に GTF や *S. mutans* の菌体をホモジナイズした後、ムタノリン処理により得られる可溶性の抗原を投与した場

合は、分泌型の抗体価の上昇とともに血清中の抗体価が上昇することが示されているが^{39,40)}、本実験ではホルマリン処理した全菌体を抗原として用いたことにより、明瞭な血清中の IgG 抗体価の上昇が認められた。これは *A. viscosus* の菌体が消化管内において消化され、可溶性抗原となった可能性も考えられるが、その機構に関しては明らかではない。

A. viscosus のハムスターの口腔内への定着は接種菌量に大きく依存しており、本研究においても、 5×10^9 CFU/匹の菌量では非免疫群においても、*A. viscosus* 接種 1 週後で半数以下 (3/7) の動物にしか接種した菌が検出されなかった。この群において全例から *A. viscosus* が検出されるには、その 10 倍量の菌量が必要であった。この接種菌量での *A. viscosus* の口腔内生着は、高用量の *A. viscosus* の全菌体による経口免疫により有意に抑制された。特に *A. viscosus* 接種 1 週目での swabbing による菌の検出では、非免疫群及び低用量免疫群で *A. viscosus* が検出された動物数が各々 7 匹中 7 匹及び 6 匹であるのに対し、高用量免疫群では 8 匹中 3 匹と半数以下からしか検出されなかった。*A. viscosus* 感染後動物を屠殺した 9 週目では高用量免疫群においても 8 匹中 7 匹から *A. viscosus* が検出されたが、得られた *A. viscosus* の菌数は非免疫群に比較して上下顎においてともに約 1/10 であり、有意にその数は少なかった。

総菌数に対する *A. viscosus* の比率でも非免疫群に対して、高用量免疫群では上下顎ともその差は有意に小さかった。これらの比率と抗 *A. viscosus* IgA 抗体価の間には有意な負の相関が認められている。これらの結果は経口免疫により産生された抗 *A. viscosus* 抗体が唾液中に分泌され、*A. viscosus* の口腔内への付着や増殖の抑制に有効に働いていることを示している。Olsson ら⁴¹⁾は *A. viscosus* の全菌体を用いての全身免疫及び唾液腺近傍への局所免疫による唾液中の抗 *A. viscosus* 抗体価の上昇により、*A. viscosus* の口腔内での増殖が阻害されたと報告しており、本実験の結果はその報告と一致するものである。

今回、経口免疫に用いた抗原は *A. viscosus* の全菌体であり、どのような抗原が有用であったかは明らかではないが、Clark ら⁴²⁾が *in vitro* の実験で、*A. viscosus* の繊維毛に対する抗血清が *A. viscosus* の唾液でコートされたハイドロキシアパタイトへの吸着を阻害することを示しており、また他の報告^{17,19)}にもあるように菌体表面の繊維毛が歯への吸着に重要な役割を担っていることから、おそらく本実験においても繊維毛が重要な抗原として作用し

ているとも考えられる。

ショ糖を多量に含有する飼料でハムスターを飼育することにより、口腔内常在細菌によるプラーク形成で著しい歯槽骨吸収の生じることが報告³²⁾されている。また岡田ら⁴³⁾の報告ではハムスターでの *A. viscosus* 感染実験において、*A. viscosus* の総菌数に対する比率が約 60% の状態では *A. viscosus* 非感染群に比較して著しい歯槽骨の吸収促進が認められている。これらの報告にみられるようにハムスターにおいてはプラークの蓄積により生じる歯周組織の破壊としては歯槽骨吸収が著明であることから本実験に於いても歯周組織の破壊の指標としてこの骨吸収の程度を測定した。今回の実験で diet #2000 で飼育した *A. viscosus* 非感染群と感染群間において歯槽骨吸収に差は認められなかった。これは Keyes ら³²⁾の報告と同様にハムスターの口腔内常在菌の中に強く歯槽骨吸収を惹起する細菌が存在していたためと、接種した *A. viscosus* の総菌数に対する比が上顎で 0.88%、下顎で 0.6% と少なく、*A. viscosus* の病原性が発揮されなかったためと考えられる。それ故、高用量経口免疫群では *A. viscosus* の菌数が非免疫群に比較して 1/10 と有意に少ないにもかかわらず、歯槽骨吸収の程度に差は認められなかったという理由に結びつくものと考えられる。このように今回の条件下では、*A. viscosus* 以外の常在細菌の影響が大きく、経口免疫による歯周組織破壊の抑制は認められなかったが、*A. viscosus* の口腔内への付着、増殖抑制に関しては経口免疫の明かな効果が認められた。これらの結果は *A. viscosus* の経口免疫が、*S. mutans* の経口免疫によるう蝕の予防方法^{26, 28)}と同様に *A. viscosus* による、歯肉炎あるいはそれにひき続き起こる歯周炎に対する予防方法のひとつとしての可能性があることを示唆するものである。

結 論

ハムスターを用い、*A. viscosus* 感染に対する経口免疫の効果を検討した。*A. viscosus* のホルマリン処理菌体を用い、16 週間にわたり連続的に経口免疫を実施し、以下の結果を得た。

1. 唾液中抗 *A. viscosus* 抗体価の上昇は用量依存性であり、 10^9 CFU/匹/日の量での経口免疫では抗 *A. viscosus* の抗体価の上昇は殆どもたらされなかったが、 5×10^9 CFU/匹/日の量の投与により、投与開始 4 週目で明らかな抗 *A. viscosus* IgA, IgG 抗体価の上昇が認められ、経口免疫の継続により 16 週目までその抗体価は維持さ

れた。

2. 血清中の抗 *A. viscosus* IgG 抗体の著明な産生も、 5×10^9 CFU/匹/日の量の免疫群においてのみ認められ、その抗体価は経口免疫の継続により経時的に上昇した。

3. 経口免疫により *A. viscosus* の口腔内への付着阻害及び増殖阻害が認められた。

謝 辞

稿を終えるにあたり、終始御指導、御校閲を頂きました新潟大学歯学部歯科保存学第 2 教室 原 耕二教授に謹んで感謝の意を表します。さらに貴重な御教示と御校閲を頂きました、新潟大学歯学部歯科保存学第 2 教室 吉江弘正助教授に心より深謝致します。また実験に際し、常に御協力と御鞭撻を頂きましたライオン株式会社第 1 応用研究所所長 阿部龍二博士、佐々木修二博士に心から御礼申し上げます。最後に本研究に供した細菌を分与して頂きました Forsyth Dental Center, Sigmund S. Socransky 博士に感謝致します。

文 献

- 1) Ellen, R.P. : Establishment and distribution of *Actinomyces viscosus* and *Actinomyces naeslundii* in the human oral cavity. *Infect. Immun.*, 14: 1119-1124, 1976.
- 2) Jordan, H.V., Keyes, P.H. and Bellack, S. : Periodontal lesions in hamsters and gnotobiotic rats infected with *actinomyces* of human origin. *J. Periodont. Res.*, 7: 21-28, 1972.
- 3) Irving, J.T., Socransky, S.S. and Heeley, J.D. : Histological changes in experimental periodontal disease in gnotobiotic rats and conventional hamsters. *J. Periodont. Res.*, 9: 73-80, 1974.
- 4) Brecher, S.M., Houte, J.V. and Hammond, B. F. : Role of colonization in the virulence of *Actinomyces viscosus* strain T14-Vi and T14-Av. *Infect. Immun.*, 22: 603-614, 1978.
- 5) Crawford, J.M., Taubman, M.A. and Smith, D.J. : The natural history of periodontal bone loss in germfree and gnotobiotic rats infected with periodontopathic microorganisms. *J. Periodont. Res.*, 13: 316-325, 1978.
- 6) Loesche, W.J. and Syed, S.A. : Bacteriology of human experimental gingivitis : Effect of plaque and gingivitis score. *Infect. Immun.*, 21:

- 830-839, 1978.
- 7) Engel, D., Epps, D.V. and Clagett, J. : *In vivo* and *in vitro* studies on possible pathogenic mechanisms of *Actinomyces viscosus*. *Infect. Immun.*, 14 : 548-554, 1976.
 - 8) 山岸 茂 : 菌破壊液滴下により発生したイヌの初期歯肉炎について一主として病理組織学的観察を中心として一. *日歯周誌*, 23 : 69-83, 1981.
 - 9) Hausmann, E., Nair, B.C., Knox, K.W., Broady, K.W., Wicken, A.J., Brown, M., and Dziak, R. : Partial purification and characterization of the bone resorption factor from *Actinomyces viscosus*. *Calcif. Tissue Int.*, 34 : 49-53, 1982.
 - 10) Burckhardt, J.J., Guggenheim, B. and Hefti, A. : Are *Actinomyces viscosus* antigens B cell mitogens? *J. Immunol.*, 118 : 1460-1465, 1977.
 - 11) 山上紘志 : ヒト歯垢ならびに *Actinomyces viscosus* および *Actinomyces naeslundii* 細胞壁の生物学的諸活性. *阪大歯学誌*, 23 : 78-95, 1978.
 - 12) 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.
 - 13) Chen, P., Farrar, J.J. and Genco, R.J. : Immunological properties of *Actinomyces viscosus* : Comparison of blastogenic and adjuvant activities. *Infect. Immun.*, 28 : 212-219, 1980.
 - 14) 吉江弘正 : 口腔内常在菌の免疫調節機構への影響 II. 抗体産生増強の作用機序について. *日歯周誌*, 22 : 175-186, 1980.
 - 15) Harada, Y., Ito, H., Miki, Y., Ebisu, S. and Okada, H. : Polyclonal induction of IgG antibody forming cells by stimulation with *Actinomyces viscosus* T14V. *J. Periodont. Res.*, 23 : 122-126, 1988.
 - 16) Girard, A.E. and Jacius, B.H. : Ultrastructure of *Actinomyces viscosus* and *Actinomyces naeslundii*. *Arch. Oral Biol.*, 19 : 71-79, 1974.
 - 17) Cisar, J.O., Vatter, A.E. and McIntire, F.C. : Identification of the virulence-associated antigen on the surface fibrils of *Actinomyces viscosus* T14. *Infect. Immun.*, 19 : 312-319, 1978.
 - 18) Powell, J.T., Fischlschweiger, W. and Birdsell, D.C. : Modification of surface composition of *Actinomyces viscosus* T14V and T14AV. *Infect. Immun.*, 22 : 934-944, 1978.
 - 19) Wheeler, T.T., Clark, W.B. and Birdsell, D.C. : Adherence of *Actinomyces viscosus* T14V and T14AV to hydroxyapatite surfaces *in vitro* and human teeth *in vivo*. *Infect. Immun.*, 25 : 1066-1074, 1979.
 - 20) Cisar, J.O. and Vatter, A.E. : Surface fibrils (fimbriae) of *Actinomyces viscosus* T14V. *Infect. Immun.*, 24 : 523-531, 1979.
 - 21) Wheeler, T.T. and Clark, W.B. : Fibril-mediated adherence of *Actinomyces viscosus* to saliva-treated hydroxyapatite. *Infect. Immun.*, 28 : 577-584, 1980.
 - 22) Clark, W.B., Webb, E.L., Wheeler, T.T., Fischlschweiger, W., Birdsell, D.C. and Mansheim, B.J. : Role of surface fimbriae (fibrils) in the adsorption of *Actinomyces* species to saliva-treated hydroxyapatite surfaces. *Infect. Immun.*, 33 : 908-917, 1981.
 - 23) Ciancio, S.G. : Pharmacology of oral antimicrobials, Goodman, S.F., Perspectives on oral antimicrobial therapeutics, PSG Publishing Company, Inc., Littleton, Massachusetts, 1987, 25-35.
 - 24) Michalek, S.M., McGhee, J.R. and Babb, J.L. : Effective immunity to dental caries : Dose-dependent studies of secretory immunity by oral administration of *Streptococcus mutans* to rats. *Infect. Immun.*, 19 : 217-224, 1978.
 - 25) Lehner, T., Russell, M.W., Caldwell, J. and Smith, R. : Immunization with purified protein antigens from *Streptococcus mutans* against dental caries in rhesus monkeys. *Infect. Immun.*, 34 : 407-415, 1981.
 - 26) Gregory, R.L. and Fillers, S.J. : Protective secretory immunoglobulin A antibodies in humans following oral immunization with *Streptococcus mutans*. *Infect. Immun.*, 55 : 2409-2415, 1987.
 - 27) Morisaki, I., Michalek, S.M., Harmon, C.C., Torii, M., Hamada, S. and McGhee, J.R. : Effective immunity to dental caries : Enhancement of salivary anti-*Streptococcus mutans* antibody responses with oral adjuvants. *Infect. Immun.*, 40 : 577-591, 1983.

- 28) Smith, D.J. and Taubman, M.A. : Oral immunization of humans with *Streptococcus sobrinus* glucosyltransferase. *Infec. Immun.*, 55 : 2562-2569, 1987.
- 29) Lehner, T., Caldwell, J. and Smith, R. : Local passive immunization by monoclonal antibodies against Streptococcal antigen I/II in the prevention of dental caries. *Infec. Immun.*, 50 : 796-799, 1985.
- 30) Michalek, S.M., Gregory, R.L., Harmon, C.C., Katz, J., Richardson, G.J., Hilton, T., Filler, S. and McGhee, J.R. : Protection of gnotobiotic rats against dental caries by passive immunization with bovine milk antibodies to *Streptococcus mutans*. *Infec. Immun.*, 55 : 2341-2347, 1987.
- 31) Ma, J.K.C., Smith, R. and Lehner, T. : Use of monoclonal antibodies in local passive immunization to prevent colonization of human teeth by *Streptococcus mutans*. *Infec. Immun.*, 55 : 1274-1278, 1987.
- 32) Keyes, P.H. and Jordan, H.V. : Periodontal lesions in the syrian hamster. III Findings related to an infectious and transmissible component. *Arch. Oral Biol.*, 9 : 377-400, 1964.
- 33) Ebersole, J.L., Frey, D.E., Taubman, M.A. and Smith, D.J. : An ELISA for measuring serum antibodies to *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *J. Periodont. Res.*, 15 : 621-632, 1980.
- 34) 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. Periodont. Res.*, 20 : 613-620, 1985.
- 35) 田口玄一 : 実験計画法, 第3版, 丸善株式会社, 東京, 1976, 98-100.
- 36) Tomasi, T.B. : The secretory immune system, Stites, D.P., Stobo, J.D., Fundenberg, H.H., Wells, J.V., Basic & Clinical Immunology, Lange medical publications, Los Atlos, California, 1984, 187-196.
- 37) Owen, R.L. : Sequential uptake of horseradish peroxidase by lymphoid follicle epithelium of Peyer's patches in the normal unobstructed mouse intestine: An ultrastructural study. *Gastroenterology*, 72 : 440-451, 1977.
- 38) McGhee, J.R. and Michalek, S.M. : Immunobiology of dental caries : Microbial aspects and local immunity. *Ann. Rev. Microbiol.*, 35 : 595-638, 1981.
- 39) Michalek, S.M., Morisaki, I., Harmon, C.C., Hamada, S. and McGhee, J.R. : Effective immunity to dental caries : Gastric intubation of *Streptococcus mutans* whole cells or cell walls induces protective immunity in gnotobiotic rats. *Infec. Immun.*, 39 : 645-654, 1983.
- 40) Smith, D.J., Taubman, M.A. and Ebersole, J. L. : Effect of oral administration of glucosyltransferase antigens on experimental dental caries. *Infec. Immun.*, 26 : 82-89, 1979.
- 41) Olsson, J., Hsu, S.D., Kingman, A. and Cole, M.F. : Effect of local and parental immunization on implantation of *Actinomyces viscosus* T6 in rats. *Infec. Immun.*, 47 : 301-305, 1985.
- 42) Clark, W.B., Wheeler, T.T. and Cisar, J.O. : Specific inhibition of adsorption of *Actinomyces viscosus* T14V to saliva-treated hydroxyapatite by antibody against type 1 fimbriae. *Infec. Immun.*, 43 : 497-501, 1984.
- 43) 岡田年以, 中村恒彰, 山崎洋治, 佐々木修二 : *Actinomyces viscosus* のハムスターにおける歯周病原性について. *日歯周誌*, 29 : 253, 1987.