Bacteroides gingivalis 産生 LPS について

田 中 みどり

鹿児島大学歯学部歯科保存学第二講座

(指導: 末田 武教授)

(平成元年 12 月 19 日受付)

A Study of Lipopolysaccharide Derived from *Bacteroides gingivalis*

Midori TANAKA

Department of periodontology, Kagoshima University school of Dentistry

1208-1, Usuki-cho, Kagoshima-shi, Kagoshima 890, Japan

(Director: prof. Takeshi SUEDA)

It has been supposed that lipopolysaccharide (LPS) derived from the gram negative bacteria of subgingival plaque is one of the important etiologic factors in periodontal disease.

The purpose of this study was to detect specifically the LPS from *Bacteroides gingivalis* (*Bg*) and to determine the effects of gram-positive bacteria on LPS in culture supernatant of *Bg*.

Enzyme-linked immunosorbent assay was used for specific detection of LPS from *Bg*. LPS of *Bg* could

be measured in concentrations as low as 4 µg/ml.

LPS of *Bg* was not detected in gingival crevicular fluid from periodontal disease patients.

There were no significant differences in the concentration of LPS between the culture supernatant of *Bg* and co-cultivation of *Bg* and gram-positive bacteria.

In this study, gram-positive bacteria had no effects on release and degradation of LPS in the culture supernatant of *Bg*.

Key words: Lipopolysaccharide, *Bacteroides gingivalis*, Enzyme linked immunosorbent assay

要旨: 歯肉縁下グラム陰性菌の遊離する内毒素-Lipopolysaccharide (LPS)は歯周疾患の重要な病原因子と考えられている。そこで歯周病原菌の一つと考えられている *Bacteroides gingivalis* 381 の LPS を抽出精製、抗体を作製し ELISA 法による培養上清中 LPS の特異的定量を試みた。又、ポケット内で LPS の産生、分解に影響を与える可能性があると考えられるグラム陽性菌についても検討してみた。その結果、ELISA 法により 4 µg/ml まで *Bg* LPS の測定が可能であった。また、歯周疾患患者の歯肉溝浸出液中の LPS の測定をおこなったが、検出できなかった。そして、今回の実験では、グラム陽性菌の LPS の産生、分解への影響は認められなかった。

索引用語: 内毒素, *Bacteroides gingivalis*, 酵素免疫測定法

緒 言

歯周病の進行に伴い歯周ポケット内でグラム陰性嫌気性菌が増加することが指摘されており、これらの細菌が歯周病の病原因子として、重要な役割を果たしていると考え

られている¹⁻⁶⁾。細菌由来の様々な病原因子の一つとしてグラム陰性菌外膜の成分の一つである内毒素-Lipopolysaccharide (以下LPS とする)があげられる。LPS は、1892年 Pfeiffer により *Vibrio cholerae* の培養液中から発熱因子として発見されたもので、その後様々な生物学的活性をもつことが明らかになってきた⁷⁻¹⁰⁾。歯周

疾患においては、このグラム陰性菌の遊離する LPS が直接あるいは間接的に歯周組織への破壊因子として働く可能性をもつことが示唆されている^{11,12)}。歯周疾患患者の口腔内での LPS の局在をしらべた報告¹³⁻¹⁶⁾によれば、唾液、plaque、歯肉溝浸出液はもとより、歯肉、歯石、歯周ポケットに露出しているセメント質表層からも LPS が検出されている。このように口腔内の種々の部位から検出されている LPS が実際に歯周組織に侵入できるかという問題¹⁷⁻¹⁹⁾については、臨床的に健康な歯肉に内毒素が拡散していくことを確認した報告²⁰⁾がある。又炎症をおこした歯肉は、上皮の物質透過性の亢進、潰瘍形成など内毒素の侵入を許していると考えられている²¹⁾。このように歯周組織での活躍の場を与えられた LPS は、ごく微量で歯周疾患に関わる様々な活性を持っている事が *in vitro* の研究において証明されている。補体系では C1, C4, C2 を介することなく C3 を直接活性化し、alternate pathway を成立させる²²⁾。補体の活性化に伴い肥満細胞よりヒスタミン、セロトニンが遊離される²³⁾。また好中球の遊走能を亢進させるとの報告^{24,25)}もある。線維芽細胞については、LPS で処理することによりガラス面への付着能が失われる^{26,27)}。この LPS による付着抑制作用は、歯周疾患部位において歯肉上皮とセメント質との付着を抑制し歯周ポケット形成に関与しているのではないかと考えられている。また、マクロファージに LPS を作用させると培養液中にコラーゲナーゼが遊離されることが確認されている^{28,29)}。これについては、歯周組織のコラーゲン線維破壊との関連が指摘されている。骨吸収と LPS との関係についての研究もおこなわれている。ラット胎仔骨の器官培養をもちいた実験で、LPS の添加により骨から ^{45}Ca ^3H プロリン乳酸の遊離が増加し破骨細胞の分化と増殖がみられ、骨マトリクスの減少が観察されている³⁰⁾。

さて、この LPS の検出には、現在一般的にリムラステスト³¹⁾が利用されている。これは、カプトガニ *Limulus polyphemus* 血液中の変形細胞の抽出液が LPS の存在下でゲル化を起こす現象を利用したものである。しかしこのリムラステストによる検出は、必ずしも LPS に特異的なものではなく³¹⁾、又 LPS の細菌由来も明らかにはできない。そこで、歯周ポケットから多く分離されるグラム陰性嫌気性菌群である黒色色素産生性 *Bacteroides* 属の中でも特に骨吸収の激しい場所から高頻度に分離され^{32,33)}、重要な病原因子³⁴⁻³⁶⁾を有している *Bacteroides gingivalis* の LPS の性状を解明する目的で本研究をおこなった。すなわち、*Bacteroides gingivalis*

の LPS を精製、抗体を作成し ELISA 法による LPS の特異的定量を試みた。又現在のところ細菌から遊離した LPS の代謝については不明であるので、歯周ポケット内でまず第一次的に LPS の産生、分解に影響を及ぼす可能性があると考えられるグラム陽性菌についても検討してみた。

材料と方法

1. 供試菌株とその培養

実験には *Bacteroides gingivalis* 381 (Bg), *Actinomyces viscosus* T14V (AV), *Actinomyces naeslundii* ATCC 12104 (AN), *Streptococcus sanguis* ATCC 10566 (SS), *Streptococcus* MG ATCC 9895 (SM) を使用した。Bg の培養は GAM ブイヨン (ニッスイ) にて嫌気的条件 (N_2 80% H_2 10% CO_2 10%) 下で培養した。

2. LPS の精製

LPS の精製は Westphal ら³⁷⁾の温フェノール水抽出法に準じて行った。まず Bg を GAM ブイヨンにて嫌気培養後集菌し、3回洗浄、凍結乾燥をおこなった。この乾燥菌体 20 g を 65°C 350 ml の熱湯に懸濁し 90% フェノール 350 ml を加え、 65°C を保ちながらマグネチックスターラーで 20 分間攪拌した。これを 4°C に冷却し、5,600×g 15 分間遠心分離を行うと沈澱、フェノール層、中間層、水層にわかれた。水層のみを取り出し保存しておいた。残りの層に再び 60°C 350 ml の熱湯を加え、同様の操作を行い水層をとりだし、予め取り出した水層と合わせ 3 日間蒸留水に透析した後、5,600×g 15 分間遠心分離し沈澱を取り除き凍結乾燥した。これを 1% の割合に精製水に溶かし、100,000×g 3 時間遠心分離し、沈澱を再び精製水に溶かし 100,000×g 3 時間遠心分離した。この沈澱 1 g を精製水 150 ml に溶解し、2% になるようセタブロン (半井) を加え 15 分間攪拌後、5,600×g 20 分間遠心分離して上清を凍結乾燥した。これに 0.5% の割合になるように 0.5 M NaCl に溶解し、10 倍量のエタノール中に注いで 4°C 2 時間放置。5,600×g 20 分間遠心分離後、沈澱を精製水に溶かし、透析後凍結乾燥して精製 LPS とした。精製された LPS のエンドトキシン活性は *Limulus* Lysate Assay Kit (エンドスペシー、生化学工業、東京) により測定した。

3. 抗 Bg LPS 抗体の作製

精製 LPS を pH 7.2 のリン酸緩衝食塩水に溶解。1 mg/ml の濃度に調整し等量の complete Freund's adjuvant と混合しエマージョンとした。体重 3 kg の家兎の背部

を剃毛し、上記エマージョンを抗原として1回につき0.5 ml ずつ皮下注射して免疫をおこなった。免疫スケジュールは、第一回免疫後2週間目、4週間目、と合計して3回行い最終免疫後2週間目に抗体産生を確認後、全採血を行った。血清を分離後56°C 30分加熱し補体を不活化した後、硫酸アンモニウム(33% 飽和)でIgG粗分画を得た。さらにProtein A Sepharose CL-4B(ファルマシア)を使用しIgGの精製を行った。

4. LPS の定量

Bg LPS の定量は、ベクタステイン ABC キット(Vecter 社 U.S.A.) を用いてShenk ら³⁸⁾の方法に準じ下記のとおりELISA法で行った。

抗原を平底96穴マイクロタイタープレート(コーニング)の各ウェルに50 μ l ずつ加え30分間放置し抗原をプレートに吸着させた。Tween 20 を含むPBS(PBST)で3回洗浄した後、非特異的なタンパク質の吸着を抑えるため1% 正常ヤギ血清250 μ l を加え37°C 1時間置いた。PBSTで3回洗浄し、家兎で作成した抗Bg LPS 抗体(1次抗体)を50 μ l ずつ加え37°C で1.5時間作用させた。PBSTで3回洗浄後、ビオチン化ウサギIgG 抗体(2次抗体、ヤギ)を50 μ l ずつ加え37°C 1.5時間反応させた。PBSTで3回洗浄後あらかじめ30分前に調整したアビジン-ビオチン化ペルオキシダーゼ複合体を50 μ l ずつ加え30分間反応させた。PBSで3回洗浄後、基質として、0.03% 過酸化水素水とO-phenylene diamine dihydrochloride 0.4 mg/ml との混合物を100 μ l ずつ加え反応させ、二波長マイクロタイター(ダイナテック社、モデルMR 580 U.S.A.)を用い各ウェルの490 nm における吸収を測定した。この際、630 nm の対照波長を用いた。

5. 歯周疾患患者の歯肉溝浸出液中の Bg LPS 定量

鹿児島大学歯学部第二保存科外来を訪れた歯周疾患患者6名の、5 mm 以上のポケットを有する部位より毛細管をもちいて歯肉溝浸出液を採取し、LPS の定量をおこなった。

6. Bg の増殖と培養上清中 LPS の定量

GAM ブイヨン 5 ml に前培養しておいた log phase のBg 0.1 ml を接種し嫌気培養をおこなった。随時、培養装置より取り出し細菌の増殖を吸光度(660 nm)で測定し、遠沈してLPS 定量のための試料を採取した。尚、試料の採取は、細菌の増殖が対数期を経て静止期にはいり溶菌とともに吸光度が低下しはじめた72時間目まで行った。

7. LPS 産生に及ぼす口腔内グラム陽性菌の影響

GAM ブイヨン 5 ml にあらかじめ前培養しておいた log phase のBg 0.1 ml と前培養しておいたもう一種類の log phase のグラム陽性菌(AV, AN, SM, SS) 0.1 ml を接種し、3日間嫌気的条件下で混合培養をおこない培養上清中のLPS量を測定した。コントロールとしてグラム陽性菌を加えず、Bgのみ培養したものを使用した。又、3日間培養後の菌液を5% 羊血液寒天培地(日水)で嫌気培養した。

8. 口腔内グラム陽性菌の Bg LPS への影響

Bg のLPSを50 μ g/ml 添加したGAM ブイヨンで前培養しておいた log phase のグラム陽性菌 AV, AN, SM, SS それぞれを3日間嫌気的条件下で培養後、培養上清中LPS量の測定をおこなった。細菌を加えずBg LPS 添加培地を同条件においたものをコントロールとした。

9. 細菌の培養上清中 LPS 量の測定

6, 7, 8の実験で細菌の培養上清中のLPS量測定のため培養液を5,600 $\times$ g 10分間遠心分離した後、上清をミリポアフィルター(ポアサイズ、0.22 μ m)で濾過し透析後、試料としてもちいた。

10. 統計処理

統計処理はStudent のt検定により行った。

結 果

1. 精製 LPS

Bg の乾燥菌体10 g より最終的に4 mg の割合でLPSを得ることができた。これをリムラステストしたところ、市販のE. coli 0111:B4 の内毒素の70% 程の活性が得られた。

2. ELISA 法による LPS の定量

LPS の測定にあたり抗原のプレートへの吸着条件の検討をおこなった。精製LPSを20 μ g/ml となるように下の溶液で希釈しそれぞれについてコーティング時の温度を37°C と70°C とで比較してみた。

1. PBS

2. 0.02 M の MgCl₂ を含む PBS (PBS+Mg)

3. 0.1 M の炭酸緩衝液 pH 9.6 (CB)

4. 0.02 M の MgCl₂ を含む

0.1 M 炭酸緩衝液 pH 9.6 (CB+Mg)

(表1, 図1) に示すようにどのバッファーについても70°Cの方が高い値を示しそのなかでもPBS+MgCl₂が最高の値を示した。故に抗原の希釈と試料の透析には

表 1 抗原のコーティング条件 (温度, 希釈バッファー) による ELISA の結果の比較

抗原希釈バッファー	37°C	70°C
PBS	0.078±0.00	0.339±0.08
PBS+Mg	0.280±0.02	0.882±0.11
CB	0.142±0.00	0.510±0.25
CB+Mg	0.166±0.27	0.373±0.00

平均値±標準偏差 OD (490 nm)

表 2 Bg の増殖と培養上清中の LPS 量

時間 (h)	OD (660 nm)	LPS ($\mu\text{g}/\text{ml}$)
0	0	0
11	0.1	3.2
15	0.29	19.8
18	0.34	12.2±8.8
21	0.61	35.6±13.3
24	0.84	53.3±4.4
27	1.31	54.4±11.1
30	1.51	62.2±18.0
34	1.60	80.0±18.9
36	1.72	93.3±4.4
38	1.82	123.0±16.7
48	1.83	142.2±13.3
55	1.74	144.4±13.3
62	1.62	160.0±21.1
70	1.15	220.0±20.0

平均値±標準偏差

PBS+MgCl₂ を用い, 70°C でインキュベートしてコーティングを行った。以上のようにして 2~24 μg に希釈測定した精製 LPS 定量の標準曲線を (図 2) に示す。精製 LPS の検出限界は約 4 μg であった。これにより LPS の定量をおこなった。尚この抗体は *Bacteroides intermedius* ATCC 2567 とは交叉反応しなかった。

3. 歯周疾患患者の歯肉溝浸出液中の Bg LPS 定量

5 μl ずつ採取した歯肉溝浸出液 6 検体のいずれからも Bg LPS は検出できなかった。

4. Bg の成長に伴う培養上清中 LPS 量の変化

(表 2, 図 3-1), に示すように Bg は培養開始後 7 時間目頃より次第に吸光度が上昇し始め対数期を経て 35 時間間には静止期にはいりその後 60 時間目より吸光度が低下し始めた。

(表 2, 図 3-2) は Bg 培養上清中 LPS 量を増殖の各段階で測定したものである。Bg の増殖と同時に LPS も増加し始め対数期を経て細菌の増殖が静止期にはいと

図 1 抗原のコーティング条件 (温度, 希釈バッファー) による ELISA の結果の比較

図 2 Bg LPS の標準曲線

LPS の増加も一次停滞しその後吸光度と共に LPS 量はさらに増加して 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ にまで達した。

5. Bg とグラム陽性菌混合培養時の Bg LPS 産生

3 日間培養後の培養上清中 LPS 量を測定したところ Bg のみ培養では $170 \pm 1.4 \mu\text{g}/\text{ml}$, Bg と AV の混合培養では $171.68 \pm 4.6 \mu\text{g}/\text{ml}$, Bg と AN の混合培養では $171.30 \pm 2.1 \mu\text{g}/\text{ml}$, Bg と SS の混合培養では $171.04 \pm 1.7 \mu\text{g}/\text{ml}$, Bg と SM の混合培養では $169.5 \pm 1.2 \mu\text{g}/\text{ml}$ であった。Bg とグラム陽性菌との混合培養群と, Bg のみ培養との間には, 3 日間培養後の培養上清中 LPS 量について有意差はなかった (表 3, 図 4)。

6. 口腔内グラム陽性菌の Bg LPS への影響

培養後の LPS 量は AV では $39.24 \pm 2.5 \mu\text{g}/\text{ml}$, AN では $42.74 \pm 2.2 \mu\text{g}/\text{ml}$, SS では $40.14 \pm 4.3 \mu\text{g}/\text{ml}$, SM

図 3-1 Bg の増殖曲線

図 3-2 Bg 培養上清中 LPS の経時的変化

図 4 Bg とグラム陽性菌混合培養時の培養上清中 LPS の変化

では $41.14 \pm 3.1 \mu\text{g/ml}$ 、コントロールは $43.58 \pm 2.5 \mu\text{g/ml}$ であった。コントロールも含めて全体的に培養後の LPS 量は減少しているがグラム陽性菌培養後の LPS 量はコントロールと比べて変化は見られなかった (表 4, 図 5)。又、3 日間培養後の菌液を 5% 羊血液寒天培地で培養した結果 Bg とグラム陽性菌どちらも検出された。

表 3 Bg とグラム陽性菌混合培養時の培養上清中 LPS 量の変化

	LPS 濃度 ($\mu\text{g/ml}$)
Bg のみ	170.00 ± 1.4
Bg+AV	171.68 ± 4.6
Bg+AN	171.30 ± 2.1
Bg+SS	171.04 ± 1.7
Bg+SM	169.50 ± 1.2

平均値 $\pm$ 標準偏差

表 4 LPS $50 \mu\text{g/ml}$ 添加培地でグラム陽性菌を培養した後の LPS の変化

	LPS 濃度 ($\mu\text{g/ml}$)
control	43.58 ± 2.5
AV	39.24 ± 3.0
AN	42.74 ± 2.2
SS	40.14 ± 4.3
SM	41.14 ± 3.1

平均値 $\pm$ 標準偏差

図 5 LPS $50 \mu\text{g/ml}$ 添加培地でグラム陽性菌を培養した後の LPS の変化

考 察

黒色色素産生性 *Bacteroides* 菌群は、歯周疾患患者の歯周ポケットから高率に分離されている菌群であり、有力な歯周病原菌^{32,33,39-43)}と考えられている。その病原因子としては、莢膜、リポ多糖体、線毛などの菌体成分⁴⁴⁾、コラーゲナーゼ、フィブリノリジン、ヒアルロニダーゼ、ヘパリナーゼ、リボヌクレアーゼ等の産生酵素^{34,35,45,46)}、インドール、アンモニア、メチルメルカプタン、硫化水素

等の代謝産物等³⁶⁾があげられる。本実験で用いた *Bacteroides gingivalis* は、口腔内細菌のなかではコラーゲナーゼ³⁴⁾トリプシン様酵素⁴⁵⁾を産生する細菌である。そして歯槽骨吸収の激しい場所から高頻度に分離されている^{32,33)}。*Bacteroides* 属の LPS の特徴としてはまず、腸内細菌と異なりコア多糖体にヘプトース 2-ケト-3-デオキシオクタネートをふくんでいないことがあげられる⁴⁷⁾。そして *in vitro* で強い骨吸収活性を示すが^{48,49)}、マウス致死率、ニワトリ胚致死率、発熱源性、リムラスゲル化能等の内毒素活性は弱いとされている^{25,50-52)}。LPS の精製法としては、ブタノール水法、冷トリクロロ酢酸法、フェノール水法などがある^{37,53,54)}。抽出方法により LPS の組成は異なり LPS を使用した実験結果にも影響があると考えられている⁵⁵⁾。本実験では、一般的によく用いられ、タンパク含有量が最も少ない温フェノール水抽出法³¹⁾で精製を行った。今回精製された *Bg* LPS も一般的に言われているように、腸内細菌である *E. coli* に比べリムラスゲル化能は低かった。

LPS の抗体を作成するにあたり、精製 LPS と等量の complete Freund's adjuvant を混合したものを家兎の背部に皮下注射し、5 週目には全採血して抗体を得ることができた。adjuvant を用いずに LPS 単独で免疫を行い抗体を作成した報告^{56,57)}もあるが、いずれの場合も抗体価の上昇は低かった。今回のように温フェノール水抽出法で LPS を抽出精製した場合、タンパク含有量が非常に少なく担体を必要とするハプテンに近い物質であるため抗体の上昇が低いのではないかと述べられている。又 Britton⁵⁸⁾によればマウスに endotoxin を投与した場合一過性の体重減少が起こっているが、今回のウサギにおける実験では認められなかった。磯村⁵⁹⁾らの歯周疾患患者血清中の *Fusobacterium nucleatum* の LPS に対する抗体価を調べた実験では、LPS 特異的な抗体活性は IgG 分画ではなく IgM 分画に存在していた。これより補体活性能が高い IgM の補体を介しての組織破壊やアレルギー反応惹起と歯周疾患との関連が示唆されている。一方、Schenk³⁸⁾らは *Bacteroides gingivalis* の LPS で同様の実験をおこなっているが抗 LPS 活性をもつ IgG IgA は歯周疾患患者において有意に上昇しているが、IgM は健常者と有意差はなかったと述べている。今回の兎での免疫では、Protein A Sepharose CL-4B (ファルマシア)により精製された IgG 分画に *Bg* の LPS 特異活性をもつ抗体をえることができたのでこれを用いて実験をおこなった。

精製された *Bg* LPS を用いて ELISA 法で測定を行っ

た。抗原のプレートへのコーティング条件は 70°C PBS + MgCl₂ の場合が最も感度が高かった。これは 1985 年の Schenk³⁸⁾らの報告とも一致する。作成された標準曲線は、ジグモイドを示し検出限界はほぼ 4 µg/ml であった。これを用いて歯周疾患患者の深いポケットより採取した歯肉溝浸出液中の LPS 量の測定を試みたが、いずれからとも検出できなかった。歯肉溝浸出液中の LPS 量をリムラステストを用いて測定した結果によれば Shapiro¹³⁾ 0~2.05 µg/ml、広松¹⁴⁾ 0.03~15.00 mg/ml と研究者によりかなり差があるが、炎症の程度に比例して増加する傾向にあるとされている。これは *Bg* LPS が存在しなかったのか、あるいは存在していたが検出限界 (4 µg/ml) 以下であったのか、または検出可能な濃度であったが採取された歯肉溝浸出液の量が 5 µl と少ないため検出できなかったのか不明である。今後、歯肉溝浸出液を多量に採取し調べる必要がある。その他、ポケット内ですでに抗体と結合して抗原抗体複合物を形成していた可能性もある。いずれにしても、歯肉溝浸出液中の *Bg* LPS 量と歯周炎の状態との関係を明らかにするためには、より感度の高い測定法が必要であろう。Pfeiffer は *Vivrio cholerae* の対数増殖期の後期の培養液中から LPS をはじめて発見した。LPS は、一般に細菌が溶菌した時に遊離するといわれている。しかし実際に細菌の成長の段階を追って培養液中の LPS 量を測定した報告は *Bg* についてはないようである。今回、*Bg* の培養上清中 LPS を *Bg* の成長を追って測定した結果、溶菌が始まる静止期以降に培養上清中 LPS 量の急増がみられるが、一方 *Bg* の成長が対数期にはいる前の初期の段階からすでに LPS が検出されている。これはおそらく細菌が溶菌を起こす以前に生菌の細胞壁より遊離した LPS-free endotoxin⁶⁰⁾も含まれていると思われる。

前述したように *in vitro* の実験において LPS は、ごく微量で歯周疾患に関わる様々な活性を持っている。しかし *in vivo* の実験において実際にマウス歯槽骨に LPS を注射した実験⁶¹⁾では、一過性の退行変性はみられたが骨吸収は起こらなかった。これは、*in vitro* と異なり、生体ではなんらかの処理機構が働くため LPS が作用しないのではないかと考えられている。細菌より遊離した LPS のその後の代謝については現在のところ不明である。しかし、ポケット内を考えた場合、plaque 内には糖分解脂質分解能を持つ細菌が存在する。この段階でグラム陰性菌より遊離した LPS がなんらかの処理を受けている可能性も考えられる。AV AN SS SM は plaque を構成するグラム陽性菌であり、又、*Bg* LPS

と交叉反応もおこさない。今回の実験結果ではこれら細菌は *Bg* LPS の産生分解に影響をおよぼしていなかった。しかし、厳密に考えればこの結果は今回作成された抗体に対する抗原性が失われていなかっただけで他の部分ではなんらかの影響を受けているのかもしれない。

ひとくちに LPS と言ってもその化学組成は菌株、抽出法により異なり、生物学的活性もまた異なる。その LPS が歯周疾患のどの部分に関わっているのかを解明するうえで LPS の特異的検出は一つの手懸かりとなるであろう。

ただし、LPS の精製法に関してはさまざまな方法が行われており測定結果を単純に比較することはできない。又、Immunoassay はリムラステストに比べ、どの程度生物学的に active な LPS を測定しているのか不明であり、他に cross reactivity の問題もある。今後の研究においては、これらが重要な問題となるであろう。

結 論

Bacteroides gingivalis 381 の LPS を抽出精製、抗体を作製し ELISA 法による LPS の特異的検出を行ったところ以下のような結果を得た。

1. ELISA 法による LPS の検出限界は $4 \mu\text{g/ml}$ であった。
2. 歯周疾患患者の深いポケットから採取した歯肉溝浸出液中からは *Bg* LPS は検出できなかった。
3. *Bg* の成長とそれに伴う培養上清中の LPS 量を測定したところ、*Bg* の成長が対数期にはいる前の初期の段階から LPS が検出されはじめ、その後 *Bg* の成長とともに LPS は増加、*Bg* の溶菌がはじまると LPS は急増し 72 時間目で $200 \mu\text{g/ml}$ まで達した。
4. AV, AN, SS, SM の 4 種類のグラム陽性菌それぞれと *Bg* と混合培養を行い、培養上清中 LPS へのグラム陽性菌の影響を調べたが *Bg* のみ培養の場合と有意差はなかった。
5. *Bg* LPS を添加した GAM 培地で AV, AN, SS, SM を培養しこれらグラム陽性菌の *Bg* LPS への影響を調べたが、グラム陽性菌を培養していないものと有意差は見られなかった。

謝 辞

稿を終えるにあたり、終始懇篤な御指導と御校閲を賜わりました鹿児島大学歯学部歯科保存学第二講座末田 武教授に謹んで感謝致します。また、本研究に際して、御助言と御指導を賜り

ました本学口腔生化学講座大工原恭教授、中村 修助手、大西智和先生ならびに口腔細菌学講座徳永美智子教授、教室各員に対し心より感謝の意を表します。さらに貴重な細菌を提供して頂いた岡山大学歯学部歯科保存学第二講座村山洋二教授に、心より感謝致します。最後に本研究に御協力頂いた歯科保存学第二講座教室員各位に対し、深く感謝いたします。

文 献

- 1) Socransky, S.S. : Relationship of bacteria to the etiology of periodontal disease. J. Dent. Res., 49 : 203-222, 1970.
- 2) Slot, J. : The predominant cultivable microflora of advanced periodontitis. Scand. J. Dent. Res., 85 : 114-121, 1977.
- 3) Williams, B.L., Pantalone, R.M. and Sherris, J.C. : Subgingival microflora and periodontitis. J. periodont. Res., 11 : 1-18, 1976.
- 4) Slots, J. : Subgingival microflora and periodontal disease. J. Clin. Periodontol., 6 : 351-382, 1979.
- 5) Socransky, S.S. : Microbiology of periodontal disease—present status and future considerations. J. Periodontol., 48 : 497-504, 1977.
- 6) Dzink, J.L., Tanner, A.C.R., Haffajee, A.D. and Socransky, S.S. : Gram-negative species associated with active destructive periodontal lesions. J. Clin. Periodontol., 12 : 649-659, 1985.
- 7) Levin, J. and Bang, F. : The role of endotoxin in the extracellular coagulation of *Limulus* Blood. Bull. Johns. Hopkins. Hosp., 115 : 265-273, 1964.
- 8) 玉熊正悦, : 「エンドキシン」医学のあゆみ, 85 (8) : 478-479, 1972.
- 9) 丹羽 充, 原田敏枝, : 内毒素の分子構成と活性. 蛋. 核. 酵. 76 (11) : 188-198, 1976.
- 10) Morrison, D.C. : Bacterial endotoxins and pathogenesis. Rev. Infect. Dis., 5 : S733-S747, 1983.
- 11) Daly, C.G., Seymour, G.J. and Kieser, J.B. : Bacterial endotoxin : a role in chronic inflammatory periodontal disease ? J. Oral pathol., 9 : 1-15, 1980.
- 12) 内田武志, 岡本 莫 : 歯周病における細菌内毒素

- の役割. 広大歯誌, 9 : 1-11, 1977.
- 13) Shapiro, L., Lodato, F.M., Courant, P.R. and Stallard, R.E. : Endotoxin determinations in gingival inflammation. J. periodontol., 43 : 591-596, 1972.
 - 14) 広松知子, 光安信子, 岡田 宏, 青野正男 : 歯周病患者歯肉溝浸出液中の細菌内毒素含有量とその病態像について. 日歯周誌, 19 : 24-30, 1977.
 - 15) Johnson, D.A., Chen-Lo, H., Dombrowski, J.C. and Nowotny, A. : Role of bacterial products in periodontitis. I Endotoxin content and immunogenicity of human plaque. J. Periodont. Res., 11 : 349-359, 1976.
 - 16) Aleo, J.J., De Renzis, F.A., Farber P.A. and Varboncoeur A.P. : The presence and biologic activity of cementum-bound endotoxin. J. Periodontol., 45 : 672-675, 1974.
 - 17) Rizzo, A.A. : Absorption of bacterial endotoxin into Rabbit gingival pocket tissue. Periodontics. : 665-70, 1968.
 - 18) Alfano, M.C., Drummond, J.F. and Miller, S.A. : Localization of rate-limiting barrier to penetration of endotoxin through nonkeratinized oral mucosa in vitro. J. Dent. Res., 54 : 1143-1148, 1975.
 - 19) Kanehisa, J., Takeuchi, H., Hori, Y. and Nami-kawa, I. : Localization of endotoxin and its role. J. Osaka. Dent. Univ., 5 : 22-32, 1981.
 - 20) Schwartz, J., Stinson, F.L. and Parker, R.B. : The passage of tritiated bacterial endotoxin across intact gingival crevicular epithelium. J. Periodontol., 43 : 270-276, 1972.
 - 21) Genco, R.J. and Mergenhagen, S.E. : Host-parasite interactions in periodontal diseases. American Society for Microbiology., Washington USA : 270-282, 1982.
 - 22) Mergenhagen, S.E., Snyderman, R. and Phillips, J.K. : Activation of complement by endotoxin. J. Infec. Dis., 128 : 86-90, 1973.
 - 23) Dias, da, S.W. and Lepow, I.H. : Complement as a mediator of inflammation, II Biological properties of anaphylatoxin prepared with purified components of human complement. J. Exp. Med., 125 : 921-946, 1968.
 - 24) Lindhe, J. and Socransky, S.S. : Chemotaxis and vascular permeability produced by human periodontopathic bacteria. J. Periodont. Res., 14 : 138-146, 1979.
 - 25) Hofstad, T. : Biological activities of endotoxin from *Bacteroides melaninogenicus*. Arch. Oral. Biol., 15 : 343-348, 1970.
 - 26) Neiders, M.E. and Weiss, L. : The effects of endotoxin on cell detachment *in vitro*. Archs. Oral. Biol., 18 : 499-504, 1973.
 - 27) Bergman, S. and Weibull, C. : Effects of endotoxin on tissue culture cells. Acta. Microbiol. Scand. 77 : 698-706, 1969.
 - 28) Wahl, L.M., Wahl, S.M., Mergenhagen, S.E. and Martin, G.R. : Collagenase production by endotoxin-activated macrophages. Proc. Nat. Acad. Sci., U.S.A. 71 : 3598-3601, 1974.
 - 29) 竹内 宏, 同 邦恭, 田中 亨, 芦田欣一, 筒井正弘 : 辺縁性歯周組織疾患と collagenase との関連性に関する病理学的研究 : 第一報 歯周疾患者の歯肉組織における collagenase の局在性について. 歯基礎誌, 14 : 273-278, 1972.
 - 30) Hausmann, E., Luderitz, O., Knox, K. and Weinfeld, N. : Structural requirements for bone resorption by endotoxin and lipoteichoic acid. J. Dent. Res. 54 : B94-B99, 1975.
 - 31) 中村隆範, 森田隆司, 平永万寿代, 宮田敏行, 岩永貞昭 : 細菌内毒素によるカプトガニ血球細胞の活性化とその分子機構. 日細菌誌, 38 : 781-803, 1983.
 - 32) Spiegel, C.A., Hayduk, S.E., Minah, G.E. and Krywopal, G.N. : Black-pigmented *Bacteroides* from clinically characterized periodontal sites. J. Periodont. Res., 14 : 376-382, 1979.
 - 33) Zambon, J.J., Reynolds, H.S. and Slots, J. : Black-pigmented *Bacteroides* spp. in the human oral cavity. Infec. Immun., 32 : 198-203, 1981.
 - 34) Myrand, D.B., McBride, C., Edwards, T. and Jensen, S. : Characterization of *Bacteroides* *asaccharolyticus* and *Bacteroides melaninogenicus* oral isolates. Can. J. Microbiol., 26 : 1178-1183, 1980.
 - 35) Macdonald, J.B., Socransky, S.S. and Gibbons,

- R.J. : Aspects of the pathogenesis of mixed anaerobic infections of mucous membranes. *J. Dent. Res.*, 42 : 529-544, 1963.
- 36) Tonzetich, J. and McBride, B.C. : Characterization of volatile sulphur production by pathogenic and non-pathogenic strains of oral *Bacteroides*. *Arch Oral Biol.*, 26 : 963-967
 - 37) Westphal, O. and Jann, K. : Bacterial lipopolysaccharides extraction with phenol-water and further applications of the procedure. *Methods. Carbohydr. Chem.*, 5 : 83-91, 1965.
 - 38) Schenck, K. : IgG, IgA, and IgM serum antibodies against lipopolysaccharide from *Bacteroides gingivalis* in periodontal health and disease. *J. Periodont. Res.*, 20 : 368-377, 1985.
 - 39) Slots, J. : Importance of black-pigmented *Bacteroides* in human periodontal disease. Genco, R.J. and Mergenhagen, S.E. : Host-parasite interactions in periodontal disease. American Society for Microbiology, Washington DC, 1982, 27-45.
 - 40) Slots, J. and Listgarten, M.A. : *Bacteroides gingivalis*, *Bacteroides intermedius* and *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in human periodontal diseases. *J. Clin. Periodontol.*, 15 : 85-93, 1988.
 - 41) Slots, J. and Genco, R.J. : Black pigmented *Bacteroides* species, *Capnocytophaga* species, and *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in human periodontal disease. : virulence factors in colonization, survival, and tissue destruction. *J. Dent. Res.*, 63 : 412-421, 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) White, D. and Mayrand, D. : Association of oral *Bacteroides* with gingivitis and adult periodontitis. *J. Periodont. Res.* 16 : 259-265, 1981.
 - 44) Okuda, K. and Takazoe, I. : Antiphagocytic effects of the capsular structure of a pathogenic strain of *Bacteroides melaninogenicus*. *Bull. Tokyo. Dent. Coll.*, 14 : 99-104, 1973.
 - 45) Slots, J. : Enzymatic characterization of some oral and nonoral gram-negative bacteria with the API ZYM system. *J. Clin. Microbiol.*, 14 : 288-294, 1981.
 - 46) Nakamura, T., Suginaka, Y. and Takazoe, I. : Heparinase activity in lesion of periodontal disease. *Bull. Tokyo. Dent. Coll.*, 17 : 147-155, 1976.
 - 47) Hofstad, T. : The distribution of heptose and 2-keto-3-deoxy-octonate in *Bacteroidaceae*. *J. Gen. Microbiol.*, 85 : 314-320, 1973.
 - 48) Hausmann, E.L., Raisa, G. and Miller, W.A. : Endotoxin stimulation of bone resorption in tissue culture. *Science.*, 168 : 862-864, 1970.
 - 49) Sveen, K. and Skaug, N. : Bone resorption stimulated by lipopolysaccharides from *Bacteroides*, *Fusobacterium* and *Veillonella*, and by the lipid A and the polysaccharide part of *Fusobacterium* lipopolysaccharide. *Scand. J. Dent. Res.*, 88 : 535-542, 1980.
 - 50) Mansheim, B.J., Onderdonk, A.B. and Kasper, D.L. : Immunochemical and biologic studies of the lipopolysaccharide of *Bacteroides melaninogenicus* subspecies *asaccharolyticus*. *J. Immunol.*, 120 : 72-78, 1978.
 - 51) Sveen, K., Hofstad, T. and Milner, K.C. : Lethality for mice and chick embryos pyrogenicity in rabbits and ability to gelate lysate from amoebocytes of *Limulus polyphemus* by lipopolysaccharides from *Bacteroides*, *Fusobacterium* and *Veillonella*. *Acta. Pathol. Microbiol. Scand. Sect.*, 85 : 388-396, 1977.
 - 52) Sveek, K. : The capacity of lipopolysaccharides from *Bacteroides*, *Fusobacterium* and *Veillonella* to produce skin inflammation and the local and generalized Schwartzman reaction in rabbits. *J. Periodont. Res* 12 : 340-350, 1977.
 - 53) Morrison, D.C. and Leive, L. : Fractions of lipopolysaccharide from *Escherichia coli* 0111; B4 prepared by two extraction procedures. *J. Biol. Chem.*, 250 : 2911-2919, 1975.
 - 54) 古賀敏比古, 浜田茂幸 : 歯周病原性細菌の内幕

- 素-リポ多糖体. 浜田茂幸: う蝕と歯周病-研究の進歩. vol. 3. 日本歯科評論, 175-209, 1985.
- 55) Koga, T., Nisihara, T., Fujiwara, T., Nishizawa, T., Okahasi, N., Noguchi, T. and Hamada, S.: Biochemical and immunobiological properties of lipopolysaccharide (LPS) from *Bacteroides gingivalis* and comparison with LPS from *Escherichia coli*. *Infect. Immun.*, 47: 638-647, 1985.
- 56) 中野昌康: Immunogenicity, Adjuvant. 本間 遜, 河西伸彦, 丹羽 充: 細菌内毒素. サイエンティフィック講談社, 東京, 1976, 306-312.
- 57) 佐々木静治, 飯山正夫, 石川潤一, 遠藤英昭, 神山義信: 無菌飼育および普通飼育ラットを用いた *E. coli* 0111; B4 endotoxin に対する抗体産生. *日歯周誌*, 2: 114-125, 1985.
- 58) Britton, S.: Regulation of antibody synthesis against *Escherichia coli* endotoxin. III induction of immunological paralysis in non-immunized and pre-immunized mice. *Immunology*, 16: 527-536, 1969.
- 59) 磯村公明: *Fusobacterium nucleatum* 由来の細菌内毒素に関する研究. *日歯周誌*, 27: 428-351, 1985.
- 60) Munford, R.S., Hall, C.V. and Rick, P.D.: Size heterogeneity of *Salmonella typhimurium* lipopolysaccharides in outer membranes and culture supernatant membrane fragments. *J. Bacteriol.*, 144: 630-640, 1980.
- 61) 金久純也, 堀 泰典, 竹内 宏, 谷 明, 佐川寛典, 辺縁性歯周炎の免疫病理学的研究, 第4報 その(2) endotoxin 接種によるラット骨組織の反応. *歯基礎誌*, 24: 738-745, 1982.

連絡先:

鹿児島大学歯学部歯科保存学第二講座

〒 890 鹿児島市宇宿町 1208-1