Actinobacillus actinomycetemcomitans (Y 4) の菌体成分の 抗原性タンパク質に関する研究

谷 芳 子 谷 真 彦 加 藤 伊 八

長崎大学歯学部歯科保存学第二講座

(主任：加藤伊八教授)

(平成4年6月15日受付)

Studies on Antigenic Proteins of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* (Y 4)

Yoshiko TANI, Masahiko TANI and Ihachi KATO

Department of Periodontology, Nagasaki University School of Dentistry

7-1, Sakamotomachi, Nagasaki 852, Japan

(Chief : Prof. Ihachi KATO)

Antigenic proteins of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* (Y 4) were studied by two-dimensional electrophoresis and Western blot using IgGs from patients with periodontitis. The cells were ultrasonically disrupted and divided into three fractions by centrifugation: P-25 fraction (precipitates by $25,000\times g$ for 30 min.), ribosomal fraction, and S-100 fraction (supernatants by $100,000\times g$ for 2 hours). Each fraction was analyzed by two-dimensional electrophoresis and Western blot. 218, 44, and 216 protein spots were observed at the P-25, ribosomal, and S-100 fractions by two-dimensional electrophoresis on silver stains. Antigenic characterizations were performed using purified IgGs from 13 healthy subjects and 27 periodontitis

patients. The results of Western blotting assay demonstrated that a 64 kDa protein from the ribosomal fraction reacted with various parts. Edgeways of the lower arch and whole spots of the 64 kDa protein reacted with samples from both healthy subjects and periodontitis patients. But edgeways of the upper arch reacted with 44% of IgGs from patients with periodontitis. Two antigenic substances from the ribosomal fraction which were not spot form but showed large diffuse reactivity on Western blot, reacted only with samples from periodontitis patients at a frequency similar to that of the upper arch 64 kDa protein. There were no specific periodontal disease antigens in either the P-25 or S-100 fraction in this study.

Key words : *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, Antigenic protein, Two-dimensional electrophoresis, Western blot, Ribosomal fraction

要旨：*Actinobacillus actinomycetemcomitans* 菌体の抗原性タンパク質を二次元電気泳動と Western bolt 法を用いて検索した。菌体を超音波破碎後、遠心操作によりメンブレン分画 (P-25)、リボゾーム分画および可溶性分画 (S-100) に分離した。この三分画を O'Farrell の方法に従って二次元電気泳動で展開した。この結果、P-25 分画には 218 個、リボゾーム分画 44 個、S-100 分画 216 個のタンパク質スポットが確認された。この泳動のもとに健常者 13 名、歯周炎患者 27 名の IgG を用いて Western bolt 法を行った。この結果、リボゾーム分画において、健常者と歯周炎患者で発色形態が異なり、歯周炎患者の 44% にスポットの上弧が部分的に強く発色するという特徴的な発色形態を示す 64 kDa のタンパク質が存在した。また、歯周炎患者に特徴的なスメアーな発色を示

す抗原物質が2ヵ所に存在した。P-25分画とS-100分画には、健常者と歯周炎患者に差のある抗原物質は見いだせなかった。

索引用語: *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, 抗原性タンパク質, 二次元電気泳動, Western bolt 法, リボゾーム分画

緒 言

Actinobacillus actinomycetemcomitans (A.a) は限局型若年性歯周炎の病原菌として注目されているが、この菌種は成人性歯周炎、広汎型若年性歯周炎、難治性歯周炎、急速進行性歯周炎などとも関係があるという報告もある^{1,2)}。この菌は歯周治療の機械的処置のみではポケットからの排除が困難であり³⁻⁵⁾、歯周炎罹患歯肉の結合組織内へ侵入すること^{6,7)}、様々な病原物質を産生し⁸⁻¹³⁾宿主の免疫系に抵抗できることなどが知られている。

歯周炎患者の血清 IgG は特定の菌種に対する抗体価が健常者に比べ有意に上昇しているという多数の報告がある。その抗原としては全菌体、超音波抽出物などが用いられている¹⁴⁻¹⁶⁾。著者らは、歯周炎患者に特徴的な歯周病原性菌の抗原物質を調べる目的で、歯周病原性菌とされる *Porphyromonas gingivalis* 381 株 (P.g) と A.a (Y 4) の抗原性タンパク質について SDS-PAGE を用いて検索した。この結果、A.a (Y 4) に関してはリボゾーム分画の 64 kDa と培養上清分画の 35 kDa のタンパク質バンドに、健常者と歯周炎患者で反応に差が見られた¹⁷⁾。しかし、SDS-PAGE のみでは、分子量の近いタンパク質や同分子量の別のタンパク質がうまく分離しないという欠点がある。今回は、単一のタンパク質として分離できる二次元電気泳動を利用して A.a (Y 4) の菌体成分のタンパク質をより詳細に検索することを試みた。

材料および方法

1. 菌の培養および菌体成分の調整法

供試菌株として *Actinobacillus actinomycetemcomitans* (Y 4) を用いた。

10 mg/ml の yeast extract (Difco Laboratories, Detroit, Michigan, USA) 含有 Todd-Hewitt broth (BBL Microbiological Systems, Becton Dickinson and Co., Cockeysville, USA) を用いて 37°C で嫌気培養 (10% H₂, 10% CO₂, 80% N₂) し、

対数増殖期で集菌した。菌体は、10 mM Mg-Acetate, 60 mM NH₄Cl および 0.08% mercaptoethanol 含有の Tris-HCl buffer pH 7.8 を用いて 3 回洗浄した。得られた菌体は、谷らの方法¹⁷⁾でメンブレン分画 (25,000×g 30 分の沈渣 以下 P-25) リボゾーム分画¹⁸⁾、可溶性分画 (100,000×g, 2 時間の上清 以下 S-100) の三分画に分離した。

2. 被検者および臨床診査項目

被検者は、全身疾患の既往がなく、過去 3 ヶ月間に抗生剤等の薬物の服用がない歯周炎患者 27 名と健常者 13 名を対象とした。歯周炎患者は、長崎大学歯学部保存科外来に来院し、レントゲン写真上で少なくとも一歯以上で歯根の 1/2 以上の骨吸収が認められた者で、成人性歯周炎患者 12 名 (男性 9 名, 女性 3 名 平均年齢 51.1 歳) と若年性歯周炎の既往を疑われる 5 名を含む急速進行性歯周炎患者 15 名 (男性 10 名, 女性 5 名, 平均年齢 32.1 歳) であった。診断は Page らの分類¹⁹⁾に従って行った。健常者は、明らかな骨吸収がなく、臨床的に健康な歯周組織を有するもの (男性 11 名, 女性 2 名 平均年齢 30.1 歳) であった。以上の 40 名より末梢血を採取し血清を分離した後、アフィニティークロマトグラフィー (MAb Trap G® Pharmacia LKB, Biotechnology AB Uppsala, Sweden) を用いて IgG を精製した。また、歯周炎患者に対する臨床診査として 6 点法にて残存歯の probing depth (PD) と bleeding on probing (BoP), 欠損歯数を計測した。

3. 二次元電気泳動

二次元電気泳動は O'Farrell²⁰⁾の方法に従って行った。まず、Microdisk gel® (KS-8120, Marysol Co., 東京) を用いて等電点電気泳動を行った。各三分画の試料を等量の可溶化液 (9.5 M urea, 2% nonidet P-40, 2% ampholine mixture, 5% mercaptoethanol) で 37°C, 30 分可溶化した。6.9% acrylamide, 3.4% ampholine mixture (pH 3-10 : pH 5-7 : pH 3-5=4 : 1 : 1, Biolyte® Bio-Rad Laboratories, Richmond, Calif., USA), 3.4% nonidet P-40 および 8 M urea からなるゲルを 200 μ l のアスピレーターチューブに作製し、タンパク質量で約 100 μ g の試料

をチューブの中のゲル上にのせ、陽極側は0.01 M H_3PO_4 、陰極側は0.02 M NaOHを泳動バッファーとして200 V 30分、さらに400 V 3時間、800 V 30分泳動した。泳動後、ゲルをチューブから押し出し、SDS可溶化液(0.0625 M Tris-HCl pH 6.8, 10% glycerol, 5% mercaptoethanol, 2.3% SDS)中で室温10分間振盪した。その後、SDS-PAGEの濃縮ゲル上にSDS可溶化液に浸したゲルをのせ、1% agarose gel (Sea plaque® GTG agarose, FMC bioproducts, ME, USA)で固定し、分離用ゲル12.5%、濃縮ゲル5.9%の条件でSDS-PAGEを行った。

その後、銀染色を行い泳動パターンを観察した。

4. Western bolt 法

抗原性の検索は、谷ら¹⁷⁾の方法に従ってWestern bolt法にて行った。この際一次抗体はヒト精製IgGを130-140 $\mu\text{g/ml}$ (血清100倍希釈中のIgG量に相当)、二次抗体はperoxidase conjugated-anti-human IgG-goat immunoglobulinを500倍となるよう1% BSA, 75 mM NaCl含有30 mM Tris-HCl (pH 7.4)にて希釈して使用した。

5. 統計分析

成人性歯周炎患者と急速進行性歯周炎患者の相異

は、全額のPDの平均値とPD ≥ 4 mmの割合、BoPの割合を各個人で算出し、それらと年齢、欠損歯数および抗原性タンパク質の発色頻度をwilcoxonの検定(順位和による)にて調べた。

結 果

1. 被検者および臨床データ

健常者と歯周炎患者の年齢分布は、歯周炎患者全体と比較すると有意差が見られたが($p < 0.05$)、急速進行性歯周炎患者とは有意差が見られなかった。また成人性歯周炎患者と急速進行性歯周炎患者のPDの平均値、PD ≥ 4 mmの割合、BoPの割合、欠損歯数を比較したが有意差はなかった(表1)。

2. 二次元電気泳動

P-25分画では218個、リボゾーム分画で44個、S-100分画で216個のタンパク質スポットがみられた。P-25では全体としては、各スポットはほぼ同等の大きさでみられ、94 kDaから35 kDaの中性域に比較的大きなスポットが分布していた(図1)。リボゾーム分画では64 kDa付近に特に大きなスポットがみられ、電気泳動の先端付近の16 kDa以下の中性域から酸性域でスメアーな着色領域がみられた(図2)。S

表 1 被験者の臨床状態

		健常者	歯周炎患者		
		n=13	AP n=12	RPP n=15	全体 n=27
平均年齢	(mean $\pm$ SD)	30.1 $\pm$ 5.6	51.1 $\pm$ 10.5	32.1 $\pm$ 8.3	40.6 $\pm$ 13.3
			**		
範 囲		23-38	39-65	19-42	19-65
PD 平均	(mean $\pm$ SD)		3.8 $\pm$ 0.7	4.2 $\pm$ 1.4	4.0 $\pm$ 1.1
範 囲			2.7-5.3	2.3-7.5	2.3-7.5
PD ≥ 4 mm%	(mean $\pm$ SD)		50.3 $\pm$ 15.4	53.1 $\pm$ 24.3	51.7 $\pm$ 20.1
範 囲			26.2-77.1	14.9-95.7	14.9-95.7
BoP%	(mean $\pm$ SD)		43.2 $\pm$ 17.7	49.0 $\pm$ 25.9	46.2 $\pm$ 22.1
範 囲			21.3-81.6	17.9-100	17.9-100
欠損歯数	(mean $\pm$ SD)		6.6 $\pm$ 6.5	3.5 $\pm$ 4.0	5.0 $\pm$ 5.5
範 囲			0-20	0-11	0-20

* $p < 0.05$ で有意差有り

** $p < 0.01$ で有意差有り

図 1 P-25 分画の二次元電気泳動（銀染色像）

図 2 リボゾーム分画の二次元電気泳動（銀染色像）
スポット横に分子量（kDa）を表示

図 3 S-100 分画の二次元電気泳動（銀染色像）

図 4 P-25 分画の Western blot

H: 健常者 IgG (25 歳 男性), P: 急速進行性歯周炎患者 IgG (36 歳 男性)

-100 分画では全領域で小さなスポットと大きなスポットが均等に分布しており, 37, 35, 27, 25 kDa 付近に大きなスポットが集まっている部分がみられた(図 3)。

3. Western bolt 法の結果

三分画ともに全体的には健常者に比べて歯周炎患者の IgG が多くの抗原物質と反応し, 発色も濃い傾

向が見られたが, 健常者でも歯周炎患者と同程度あるいは若干濃く発色するものも見られた。しかし, 今回の実験では, 濃淡を定量化せず抗原性は肉眼的な発色の有無で判断した。

1) P-25 分画

抗原性タンパク質として 37 個観察された。健常者においても歯周炎患者と同程度の数の抗原性タンパク

図 5 S-100 分画の Western blot

H: 健常者 IgG (23 歳 男性), P: 急速進行性歯周炎患者 IgG (24 歳 男性)

図 6 リボソーム分画の Western blot

1: 健常者 IgG (25 歳 男性)

2: 急速進行性歯周炎患者 IgG (36 歳 男性)

3: 急速進行性歯周炎患者 IgG (39 歳 男性)

矢印は 64 kDa のスポットで、1 はスポット全体が薄く発色し、2 はスポットの下弧のみが発色している。1 と 2 は、健常者および歯周炎患者双方に存在する発色形態であり、3 は歯周炎患者にのみ見られる発色形態で、スポットの上弧、A、B が発色している。

表 2 *A. actinomycetemcomitans* (Y 4) リボゾーム分画の Western blot の結果

性別	型	年齢	101	91	64 上弧	64	64 下弧	52	49.5	46	39	32	30	29	16	front	A	B
F	R*	19	+	+	+	+		+	+		+				+	+	+	+
F	R*	19		+			+	+	+	+					+	+	+	+
F	R*	20	+	+	+		+	+	+		+				+	+	+	
M	R*	24	+	+			+	+	+						+	+	+	+
M	R	27	+	+	+	+	+	+	+	+					+	+		+
M	R*	29	+	+		+	+	+	+						+			
M	R	34		+			+	+	+						+	+		
M	R	36	+	+			+	+	+	+	+				+			
M	R	37	+	+			+	+	+	+	+				+	+		+
M	R	38	+	+	+	+		+	+		+				+	+	+	+
M	R	38		+			+	+	+						+	+		
M	R	39	+	+	+		+	+	+						+	+	+	+
M	R	39	+	+			+	+	+						+			
F	R	41	+	+		+		+	+						+	+		+
F	R	42	+	+		+	+	+	+						+	+		+
M	A	39	+	+	+		+	+	+		+	+	+	+	+	+	+	+
F	A	40	+	+	+		+	+	+		+		+	+	+	+	+	+
M	A	40	+	+	+		+	+	+						+	+	+	+
M	A	42	+	+	+		+	+	+		+				+	+	+	+
M	A	42		+			+	+	+	+	+				+	+		
F	A	45	+	+	+		+	+	+	+	+		+	+	+	+	+	+
M	A	57	+	+		+	+	+	+		+				+	+		
M	A	59		+			+	+	+						+	+		
M	A	60					+	+	+	+					+	+		+
M	A	61			+					+	+					+		+
M	A	63		+			+	+	+		+				+	+		
F	A	65	+	+	+		+	+	+						+	+	+	+
M	H	23	+	+		+	+	+	+		+			+	+	+		
F	H	24	+	+		+	+	+	+		+			+	+			
M	H	25	+	+		+	+	+	+	+	+			+	+			
M	H	25	+	+		+	+	+	+						+			
F	H	27					+				+				+			
M	H	27							+									
M	H	28							+									
M	H	31		+				+	+		+				+			
M	H	33	+	+		+	+	+	+	+	+				+			
M	H	34							+									
M	H	38	+	+		+	+	+	+		+			+	+	+		
M	H	38					+	+	+						+			
M	H	38					+	+	+						+			

F：女性， M：男性， +：発色あり， *：若年性歯周炎の既往を疑われる患者

R：急速進行性歯周炎， A：成人性歯周炎， H：健常者

質が認められ，健常者と歯周炎患者において明らかに抗原性に差のあるタンパク質を見いだすことはできなかった（図4）。

2) S-100 分画

抗原性タンパク質として23個観察された。P-25分画と同様に，健常者と歯周炎患者で明らかに抗原性に差のあるタンパク質は見いだせなかった（図5）。

3) リボゾーム分画

16個の抗原性のあるスポットおよび領域が観察された。101, 91, 52, 49.5, 46, 39, 32, 30, 29, 16 kDaのスポットは銀染色ほど鮮明ではないが，ほぼ同様の形態で発色した。しかし64 kDaのスポットは，上弧，下弧，スポット全体が種々の発色形態を示し，このうちスポット全体が薄く発色する型（図6の1）と下弧が線状に発色する型（図6の2）は健常者

表 3 *A. actinomycetemcomitans* (Y 4) リボゾーム分画の Western blot の結果

抗原	健康者		歯周炎患者					
	n=13	%	AP		RPP		全体	
			n=12	%	n=15	%	n=27	%
101	6	46.2	7	58.3	12	80.0	19	70.4
91	7	53.8	10	83.3	15	100.0	25	92.6
64 上弧	0	0	7	58.3	5	33.3	12	44.4
64	6	46.2	1	8.3	6	40.0	7	25.9
64 下弧	9	69.2	11	91.6	12	80.0	23	85.2
52	9	69.2	11	91.6	15	100.0	26	96.3
49.5	13	100.0	11	91.6	15	100.0	26	96.3
46	2	15.3	4	33.3	4	26.2	8	29.6
39	7	53.8	8	66.6	5	33.3	13	48.1
32	0	0	1	8.3	0	0	1	3.7
30	0	0	3	25.0	0	0	3	11.1
29	4	30.7	3	25.0	0	0	3	11.1
16	10	76.9	11	91.6	15	100.0	26	96.3
A ^{a)}	0	0	6	50.0	6	40.0	12	44.4
B ^{b)} *	0	0 *	8	66.7	9	60.0	17	63.0 *
front ^{c)} *	2	15.4 *	12	100.0	12	80.0	24	88.9 *

a) 中性域において高分子量から泳動の先端にかけてでるスメアーな発色

b) 16 kDa 以下の中性域から酸性域にかけてでるスメアーな発色

c) 泳動の先端に一致してでる発色

* 健康者と歯周炎患者における発色頻度が $p < 0.01$ で有意差がみられた抗原

と歯周炎患者とにみられる型であったが、スポットの周辺および上弧が濃く発色しスポットが発色しないかあるいは薄くしか発色しないために、スポットが抜けたように観察される発色（図 6 の 3）は歯周炎患者でのみ観察された。スポット状を呈しない抗原としては、中性域で高分子量から泳動の先端にかけてスメアーに発色する領域 (A) と泳動の先端付近で 16 kDa 以下の中性域から酸性域にかけてスメアーに発色する領域 (B) および泳動の先端 (front) が存在した（図 6）。全被検者の各抗原物質との反応の有無を表 2、被検者のグループ別の発色頻度を表 3 にあらわした。これらの抗原物質のなかで健康者と歯周炎患者で発色頻度が異なるものは、B ($p < 0.01$), front ($p < 0.01$) であった。64 上弧と A は、統計学的に有意差はみられなかったものの健康者では全く発色がみられず、歯周炎患者においては 64 上弧、A とともに 44% の発色頻度であった。また、急速進行性歯周炎と成人性歯周炎との発色頻度を比べた場合、64 kDa のスポットにおいて、急速進行性歯周炎患者ではスポット自体の発色が 15 名中 6 名で観察されたが成人性歯周炎患者では 12 名中 1 名にしか観察されないという違いはあったが全

体の傾向としてほとんど差は見られなかった。また、64 上弧、A、B、front それぞれの発色の有無と臨床状態（年齢、PD 平均、PD ≥ 4 mm%, BoP%, 欠損歯数）との関係を調べたが有意差は認められなかった（表 4）。

考 察

A. actinomycetemcomitans は、限局型若年性歯周炎の原因菌とされてきたが、成人性歯周炎、急速進行性歯周炎、難治性歯周炎でも検出されることが明らかにされている。成人性歯周炎も急速進行性歯周炎も患者間および罹患部位間で炎症や歯周組織破壊の程度が異なるが、全罹患部位の細菌検査を行うことは不可能に近い。そこで、歯周炎患者に特有の病原性細菌の抗原物質を見つけることは、歯周炎の診断ならびに治療において有意義である。これまでに著者らは、歯周病原性細菌のうち至適棲息環境の異なる通性嫌気性の *A. actinomycetemcomitans* と偏性嫌気性の *P. gingivalis* の 2 種をとりあげ、両菌に対する成人性歯周炎と急速進行性歯周炎患者の免疫グロブリンとの反応を

表 4 抗原物質の発色の有無と臨床状態

	64 上弧		front		A		B	
	発色あり	発色なし	発色あり	発色なし	発色あり	発色なし	発色あり	発色なし
	n=12	n=15	n=24	n=3	n=12	n=15	n=17	n=10
	mean±SD	mean±SD	mean±SD	mean±SD	mean±SD	mean±SD	mean±SD	mean±SD
年齢	39.6±13.8	41.3±13.2	41.3±13.8	34.7± 5.1	37.4±13.0	42.8±13.4	39.9±13.3	41.4±13.9
PD 平均	3.9± 1.3	4.1± 0.9	3.3± 0.5	3.3± 0.8	3.9± 1.4	4.1± 1.0	3.8± 1.2	4.2± 1.0
PD≥4 mm %	50.9±21.2	52.5±20.0	52.9±20.4	38.3±15.5	49.0±20.1	53.6±20.4	49.7±19.8	55.4±21.5
Bop%	52.1±25.6	40.8±17.6	47.5±22.5	32.2± 9.5	49.5±25.3	44.0±20.3	47.1±24.6	44.8±18.0
欠損歯数	5.0± 5.7	5.0± 5.6	4.7± 5.6	8.5± 3.5	3.8± 369	5.8± 6.3	4.7± 5.1	5.6± 6.4

調べてきた。今回さらに詳しく、*A.a* (Y 4) の菌体成分に二次元電気泳動を行い抗原物質の検索を行った。

SDS-PAGE に等電点電気泳動を加えた二次元電気泳動を行った結果、すでに著者らが報告した SDS-PAGE 単独にくらべて、分離タンパク質は P-25 分画が 30 から 218, リボゾーム分画が 25 から 44, S-100 分画が 27 から 216 個と著しく増加した。この分離したタンパク質マップは、今後これらの各スポットのタンパク質を精製し、抗原性を詳しく検索する場合や既知のタンパク質との関連性を研究する上で極めて重要な資料となり得ると考えている。

Western bolt 法の結果、抗原性タンパク質は、SDS-PAGE を用いた結果と同様に P-25 分画および S-100 分画に多かったが、歯周炎患者特有の抗原物質は見いだせなかった。この二つの分画においては、健康者 IgG とも反応する抗原が多かったことから *A. actinomycetemcomitans* 以外の菌と共通する抗原性タンパク質を多く含んでいることが考えられる。Zambon らは、*A. actinomycetemcomitans* と *Haemophilus* 属の間に共通抗原が存在することを報告している²¹⁾。Watanabe ら²²⁾は、著者らが用いた菌とは serotype は異なるが、SDS-PAGE と Western bolt 法を用いた実験によって *A. actinomycetemcomitans* NCTC 9710 (serotype C) の外膜タンパク質の 40, 29 kDa のバンドが若年者の重度歯周炎患者に immunodominant であったと報告している。この外膜タンパク質は、15,000×g, 30 分の沈渣から得られているので著者らの試料では P-25 に最も近いと思われる。しかし、P-25 と S-100 の二つの分画は分離されたスポットが多く今回の方法のようなスクリーニングで各スポットの抗原性を詳細に調べることが不可能であった。従って、この分画の抗原物質を詳細に検索するた

めには、今回とは異なった実験方法を検討する必要がある。リボゾーム分画の抽出は Yamada ら¹⁸⁾の方法に基づいて行った。リボゾームは、細胞質内の RNA タンパク粒子でタンパク質合成にあずかっている。*A. actinomycetemcomitans* が leukotoxin をはじめ様々な病原物質を産生することから、今回の実験においてこの分画に歯周炎患者に特徴的な抗原物質が存在することを示唆する結果が得られたことは興味深い。64 kDa のスポットは、スポット自体が大きく、また様々な発色形態を示すユニークなタンパク質であると思われる。スポット自体は発色しないか、発色しても薄い発色であった。そこで、タンパク質量が濃すぎたことを想定し、タンパク質量を 10 分の 1 におとして同様の操作を行ったところ全体の発色が薄くなったのみで発色形態が健康者と歯周炎患者で異なる事実に変化はなかった。また、blotting の状態は PVDF 膜を 0.1% CBB で染色して確認しているのでこのような発色を示すのは 64 kDa タンパク質の特徴と思われる。タンパク質のみに抗原性があるとすればスポット自体が濃く発色するであろうからタンパク質に他の物質が関連していることも考えられる。また、この特徴的な発色が 64 kDa に重って中性域に分子量に関係なくスメアーに発色する抗原 (A) の影響を受けている可能性もある。このことは、64 上弧に発色した歯周炎患者 12 名のうち 10 名 (83.3%) が A に発色していることから示唆される。分子量に関係なくスメアーに発色する抗原として、Califano ら²³⁾は *A. actinomycetemcomitans* (Y 4) から歯周炎患者全員の血清と反応し、Papain 処理、および熱処理に耐性で、SDS-PAGE を用いた Western bolt 法でスメアーに発色する物質をみつけ、この物質が phenol-water 法で抽出し冷エタノールで沈澱する物質とほぼ類似した capsular polysaccharide である可能性を示している。

また Amano ら²⁴⁾は, *A. actinomycetemcomitans* (Y 4) の serotype specific である糖抗原について報告している。これらの抗原物質と著者らの実験結果から得られた歯周炎患者に発色するスポット状を呈していないスメアーな抗原 A, B, front およびタンパク質以外の物質の存在が示唆される 64 kDa の抗原物質との関係については、今後明らかにする必要があると思われる。また今回の研究において、成人性歯周炎患者と急速進行性歯周炎患者との間には、表 1 からわかるように年齢差がみられたが、両群で差のある抗原物質は認められず、抗原に対する反応の有無と臨床状態にも関連は見られなかった。また症例数は少ないが、本実験に用いられたいわゆる後若年性歯周炎患者 5 名についても、同様の検索を行ったが差異は認められなかった。これらの結果は各病型の歯周炎に関わる抗原物質は同一のものである可能性を示唆するものであり、また反応の有無は炎症の程度に関わらず、この菌の存在と関連していることなどが考えられる。一般に成人性歯周炎や急速進行性歯周炎の病原菌としては、*P. gingivalis* 等が考えられている。*A. actinomycetemcomitans* (Y 4) の歯周炎患者特有の抗原物質が、歯周炎患者の 50% 前後の頻度で反応したということは、他菌の抗原物質による反応を含む可能性もあるが成人の歯周炎においてもこの菌が存在することも考えられる。しかし今回培養による菌の存在は確認していない。今後、これらの抗原の性状、この菌に特有のものであるか等の研究を進めて行きたい。

結 論

A. actinomycetemcomitans (Y 4) の菌体成分の中で歯周炎に特有の抗原性タンパク質を検索する目的で、菌体成分を三分画に分けそれぞれに二次元電気泳動を行い、Western bolt 法により歯周炎患者および健常者 IgG との反応を調べ以下の結果を得た。

1. 二次元電気泳動を行った結果、メンブレン (P-25) 分画, S-100 分画, リボゾーム分画ともに SDS-PAGE によるよりも多くのタンパク質に分離することができ、そのタンパク質数は、P-25 分画が 218 個, S-100 分画が 216 個, リボゾーム分画が 44 個であった。

2. Western bolt 法の結果、P-25 分画, S-100 分画では、健常者と歯周炎患者で発色が類似しており歯周炎に特有の抗原を見いだすことはできなかった。

3. リボゾーム分画において、64 kDa のタンパク質が歯周炎患者と健常者で発色形態が異なり、歯周炎患者ではスポットの上弧が発色するというユニークなタンパク質であった。また、歯周炎患者に特有で、中性域に分子量に関係なく存在する抗原 (A), 16 kDa 以下で中性域から酸性域にかけて存在する抗原 (B) と泳動の先端に一致して存在する抗原は、スメアーな発色をし、タンパク質以外の抗原物質の存在が示唆された。

4. これらの抗原は、成人性歯周炎と急速進行性歯周炎患者で発色頻度に差はなく、発色の有無と臨床状態との関連も見られなかった。

謝 辞

本研究の遂行にあたり御教示、ご助言を賜りました本学口腔細菌学講座山田毅教授、青森大学工学部生物工学科小林浩明助教授に感謝します。

本研究の一部は、文部省科学研究費補助金奨励研究 (A) (課題番号 02771354) の援助によって行われた。

文 献

- 1) Slots, J., Bragd, L., Wikstöm, M. and Dahlén, G. : The occurrence of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Bacteroides gingivalis* and *Bacteroides intermedius* in destructive periodontal disease in adults. J. Clin. Periodontol., 13 : 570-577, 1986.
- 2) Rodenburg, J.P., van Winkelhoff, A.J., Winkel, E. G., Goene, R.J., Abbas, F. and de Graaff, J. : Occurrence of *Bacteroides gingivalis*, *Bacteroides intermedius* and *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in severe periodontitis in relation to age and treatment history. J. Clin. Periodontol., 17 : 392-399, 1990.
- 3) Renvert, S., Wikstöm, M., Dahlén, G., Slots, J. and Egelberg, J. : Effect of root debridement on the elimination of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Bacteroides gingivalis* from periodontal pockets. J. Clin. Periodontol., 17 : 345-350, 1990.
- 4) Renvert, S., Wikstöm, M., Dahlén, G., Slots, J. and Egelberg, J. : On the inability of root debridement and periodontal surgery to eliminate *Actinobacillus actinomycetemcomitans* from periodontal pockets. J. Clin. Periodontol., 17 : 351-355, 1990.
- 5) Slots, J. and Rosling, B.G. : Suppression of the periodontopathic microflora in localized juvenile periodontitis by systemic tetracycline. J. Clin. Periodontol., 10 : 465-486, 1983.

- 6) Clistersson, L.A., Wikesjö, M.E., Albini, B., Zambon, J.J. and Genco R.J.: Tissue localization of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in human periodontitis. 1. Light, immuno fluorescence and electromicroscopic studies. J. Periodontol., 58 : 529-539, 1987.
- 7) Saglie, F.R., Marany, A. and Camargo, P.: Intragingival occurrence of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Bacteroides gingivalis* in active destructive periodontal lesions. J. Periodontol., 59 : 259-265, 1988.
- 8) Slots, J. and Genco, R.J.: Blackpigmented bacteroides species, *Campylobacter* species, and *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in human periodontal disease: Virulence factors in colonization, survival, and tissue destruction. J. Dent. Res., 63 : 412-421, 1984.
- 9) Mangan, D.F., Taichman, N.S., Lally, E.T. and Wahl, S.M.: Lethal effects of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* leukotoxin on human T lymphocytes. Infect. Immun., 59 : 3267-3272, 1991.
- 10) Wilson, M.E., Kamin, S. and Harvey, W.: Bone resorbing activity of purified capsular material from *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. J. Periodont. Res., 20 : 484-491, 1985.
- 11) Lindemann, R.A. and Eilber, F.: Activation of human natural killer cells by lipopolysaccharide from *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. Archs oral Biol., 34 : 459-463, 1989.
- 12) Stevens, R.H., Gatewood, C. and Hammond B.F.: Cytotoxicity of the bacterium *Actinobacillus actinomycetemcomitans* extracts in human gingival fibroblasts. Archs oral Biol., 28 : 981-987, 1983.
- 13) Socransky, S.S. and Haffajee, A.D.: Microbial mechanisms in the pathogenesis of destructive periodontal diseases: a critical assessment. J. Periodont. Res., 26 : 195-212, 1991.
- 14) 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.
- 15) 堀野一人: *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. 日歯周誌, 30 : 452-465, 1988.
- 16) Ebersole, J.L., Sandval, M.N., Steffen, M.J. and Cappelli, D.: Serum antibody in *Actinobacillus actinomycetemcomitans* - infected patients with periodontal disease. Infect. Immun., 59 : 1795-1802, 1991.
- 17) 谷 真彦, 谷 芳子, 加藤伊八: 歯周病原性細菌の抗原性タンパク質に関する研究—*Porphyromonas gingivalis* および *Actinobacillus actinomycetemcomitans* の菌体ならびに培養上清と歯周炎患者 IgG との反応について—. 日歯周誌, 34 : 195-203, 1992.
- 18) Yamada, T., Nagata, A., Ono, Y., Suzuki, Y. and Yamanouchi, T.: Alteration of ribosomes and RNA polymerase in drug-resistant clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. Antimicrob. Agents Chemother., 27 : 921-924, 1985.
- 19) Page, R.C. and Schroeder H.E.: Periodontitis in man and other animals. Karger, Basel., 45-57, 1982.
- 20) O'Farrell, P.H.: High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. J. Biological Chemistry, 250 : 4007-4021, 1975.
- 21) Zambom, J.J., Hammond, P., Huber, P.S., Slots, J. and Genco, R.J.: *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Haemophilus*: serology and serum immune response in patients with periodontal disease. J. Dent. Res., 62 : 197, 1983.
- 22) Watanabe, H., Marsh, P.D. and Ivanyi, L.: Antigens of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* identified by immunoblotting with sera from patients with localized human juvenile periodontitis and generalized severe periodontitis. Archs oral Biol., 34 : 649-656, 1989.
- 23) Califano, J.V., Schenkein, H.A. and Tew, J.G.: Immunodominant antigen of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* Y4 in high-responder patients. Infect. Immun., 57 : 1582-1589, 1989.
- 24) Amano, K., Nishihara, T., Shibuya, N., Noguchi T. and Koga, T.: Immunochemical and structural characterization of a serotype-specific polysaccharide antigen from *Actinobacillus actinomycetemcomitans* Y4 (serotype b). Infect. Immun., 57 : 2942-2946, 1989.

連絡先:

長崎大学歯学部歯科保存学第二講座

〒 852 長崎市坂本町 7-1