歯周炎患者 (30～35 歳) におけるリンパ球サブセット, 血清抗体価 および多形核白血球機能について

葛 城 啓 彰¹⁾ 鈴 木 安 里¹⁾ 富 井 信 之²⁾
長 谷 川 明²⁾ 斎 藤 和 子¹⁾

¹⁾日本歯科大学新潟歯学部口腔微生物学教室
(主任: 斎藤和子教授)

²⁾日本歯科大学新潟歯学部歯周治療学教室
(主任: 長谷川明教授)
(平成5年9月20日受付)

The Lymphocyte Subsets, Specific Serum Antibodies and the Function of Polymorphonuclear Leukocytes in 30～35 Year Old Periodontal Patients

Hiroaki KATSURAGI¹⁾, Anri SUZUKI¹⁾, Nobuyuki TOMII²⁾,
Akira HASEGAWA²⁾ and Kazuko SAITO¹⁾

¹⁾Department of Oral Microbiology The Nippon Dental University, School of Dentistry at Niigata
1-8, Hamaura-cho, Niigata 951, Japan
(Chief: Prof. Kazuko SAITO)

²⁾Department of Periodontics The Nippon Dental University, School of Dentistry at Niigata
(Chief: Prof. Akira HASEGAWA)

This study was undertaken for the purpose of analyzing immune responses and the functions of polymorphonuclear leukocytes in patients with early-onset periodontitis.

Peripheral blood (PB) lymphocytes, peripheral blood polymorphonuclear leukocytes (PMNs) and gingival crevicular fluid (GCF) PMNs from 20 patients with early onset periodontitis (clinical diagnosis: AP, RPP, PJP) were examined using monoclonal antibodies and flow cytometry for analysis of lymphocyte subsets and complement receptor expression.

Peripheral blood sera from the same patients were examined using ELISA for measurement of specific antibodies to periodontopathic bacteria.

Moreover, peripheral PMNs were examined using chemiluminescence (CL) for measurement of super-

oxide production. The results of examinations were as follows:

The AP group was in the upper T4/T8 ratio, and in the lower T/B ratio. They had high specific IgG antibody titers to *A. actinomycetemcomitans* and *P. intermedia*, and high CL responses. They also had a high specific IgM antibody titer to *P. gingivalis*.

The RPP group had a high specific IgA antibody titer to *P. gingivalis*. They also had high IgG antibody titers to *P. intermedia* and *A. actinomycetemcomitans*, and a low CL response to Lumisphere.

The PJP group had a high specific IgG antibody titer only to *A. actinomycetemcomitans*.

The higher expression of complement receptors (CR) on GCF-PMNs than PB-PMNs was almost the same in the 3 groups, but the RPP group had a higher expression of CR3 than CR1 on the GCF-

PMNs.

Key words : Lymphocyte subsets, Serum antibody, Chemiluminescence, Complement receptor

要旨 : 早期発症型歯周炎患者の免疫応答・多形核白血球機能について明らかにする目的で、臨床 AP, RPP, PJP と診断された 20 名の患者を対象にし、フローサイトメトリー法により末梢血リンパ球サブセット、食細胞補体レセプターを、ELISA 法により特異的血清抗体価を、ケミルミネッセンス法により多形核白血球 (PMN) 活性酸素産生能を検索した。AP 群では、T 4/T 8 比の上昇、T/B 比の低下、*P. intermedia*, *A. actinomycetemcomitans* に対する特異的 IgG 抗体価、*P. gingivalis* に対する特異的 IgM 抗体価の上昇、CL 反応の全般的増加傾向が認められた。RPP 群では、*P. gingivalis* に対する特異的 IgA 抗体価の上昇、*P. intermedia*, *A. actinomycetemcomitans* に対する特異的 IgG 抗体価の上昇、ルミスフェアに対する CL 反応の低下が認められた。PJP 群では、*A. actinomycetemcomitans* に対してのみ特異的 IgG 抗体価の上昇が認められた。

歯肉溝における PMN 膜上の補体レセプターの増加は 3 群とも共通して認められたが、RPP 群において、GCF-PMN CR 3 の増加が著明であった。

これらの各疾患群における特徴ある反応は、臨床病態と関連するものと考えられる。

索引用語 : リンパ球サブセット、血清抗体価、ケミルミネッセンス、補体レセプター

緒 言

30~35 歳で発症する歯周炎の中には、臨床的に成人性歯周炎、急速進行性歯周炎、後期若年性歯周炎など幾つかのカテゴリーが存在するものと考えられる¹⁾。そこで、今回私たちは、臨床的に分類されるこれらの疾患群をその免疫学的観点より、血清抗体価、リンパ球サブセットおよび生体防御の観点から多形核白血球機能に付いて検索を加え、全身および局所的背景について明らかにすることにより、臨床診断および治療方針の一助となることを目的とした。また、成人性歯周炎患者では、通常この時期は臨床的に発症早期と考えられるが今回対象とした患者群では重度な症状を示すものが多く、歯周病の発生と進行における何等かのマイナスファクターを有していることが考えられ、その解明は一般の成人性歯周疾患の発症と進行の理解に関しても寄与すると考えられる。

材料および方法

1. 対象患者

対象患者は、日本歯科大学新潟歯学部附属病院歯周治療科に来院した全身疾患のない初診時年齢 30~35 歳の歯周炎患者 20 名 (男子 15 名、女子 5 名) を対象とした。これらの患者の臨床診断名およびその内訳は、成人性歯周炎 10 名、急速進行性歯周炎 8 名、後期若年性 (限局型) 歯周炎 2 名であった。なお、対照

として全身疾患を認めず、臨床的健康歯肉を有する本学職員 (30~35 歳 : 9 名) および学生 (22~29 歳 : 11 名) の計 20 名を用いた。

2. 検査材料

末梢血は、前腕正中皮静脈よりヘパリン下で採血し、Mono-Poly Resolving Medium (Flow Laboratories Inc, Verginia, USA) にて密度勾配遠心法により 300×g, 30 分間遠心することにより単核球画分および多形核白血球画分を得た。得られた両細胞画分は、Phosphate Buffered Saline (PBS) にて、2 回洗浄し、1% Gelatin-Hanks 液 (GHBSS) にて 1×10⁷/ml の濃度に調整して以下の実験に供した。

また、採血時に一部血液を分取しデカンテーションにより血清を分離し抗体価の測定およびケミルミネッセンス (CL) 反応時に供した。

歯肉溝浸出液は Skapski and Lehner ら²⁾の歯肉溝洗浄法により採取し、200×g, 10 分遠心後、PBS にて、2 回洗浄し細胞数を計測し、GHBSS にて 1×10⁶/ml の濃度に調整して以下の実験に供した。

3. 検査項目

1) リンパ球サブセットの検索

分離した末梢血単核球画分 1×10⁶ 個に対し Leu-2 (CD 8)-PE, Leu-3 (CD 4)-FITC, LEU-4 (CD 3)-PE, Leu-15 (CD 11 b)-PE, HLA-DR-FITC, TcR (αβ)-FITC (Becton Dickinson, California, USA) の各モノクローナル抗体を組み合わせて用い、4℃, 30 分間二重染色および単染色し、PBS で 2 回洗浄後、PBS 1.0 ml に再分散させ FACStar plus (Beck-

ton Dickinson, California, USA) および Lysis II システムにより two-color と singl-color-histogram で情報収集および解析を行った。

2) 歯周病原菌に対する血清抗体価の検索

血清抗体価の測定は以下の4種類の現在主要歯周病原菌として考えられている細菌に対して ELISA 法^{3,4)}により行った。使用菌株としては、① *Fusobacterium nucleatum* ATCC 25586 株 (*F. nucleatum*)、② *Porphyromonas gingivalis* 381 株 (*P. gingivalis*)、③ *Actinobacillus actinomycetemcomitans* Y 4 株 (*A. actinomycetemcomitans*)、④ *Prevotella intermedia* (*P. intermedia*) (臨床分離株) を用い各液体培地で培養後、 $10,000\times g$ 、10 分間遠心、集菌し生理食塩水液に懸濁したものを超音波破砕し、 $12,000\times g$ 、10 分間遠心した。その上清を 0.1 M 炭酸 buffer (0.02% NaN_3 含有, pH 9.6) にてタンパク質が $50\text{ }\mu\text{g/ml}$ になるように調整し、抗原液として使用した。抗体価の測定は、ELISA 法に準じて行いエンドポイント (Optical Density=0.2) 法にて表した。

3) 多形核白血球 CL 反応・食菌能の計測

多形核白血球機能検査として分離した末梢血多形核白血球画分 $1\times 10^7/\text{ml}$ 、0.1 ml に対し以下の5種類の粒子刺激に対するルミノール依存性 CL 反応⁵⁾を行った。

粒子刺激物として用いたのは、① ルミスフェア (ペルトールドジャパン, 大阪)⁶⁾、② *Staphylococcus epidermidis* no.1 株 (*S. epidermidis*)、③ *F. nucleatum*、④ *P. gingivalis*、⑤ *A. actinomycetemcomitans* の5種類である。

粒子刺激物の調整は、①は、GHBSS で10倍希釈し $2\times 10^7/\text{ml}$ の粒子浮遊液とし、②～⑤は、各液体培地で培養後、遠心し、生理食塩水で2回洗浄し GHBSS に分散し分光光度計 Spectronic 20 型を用い Optical Density 0.3 に調整し使用した。

反応系は、①: GHBSS 0.35 ml, PMN 0.1 ml, ルミスフェア 0.1 ml, 10% auto serum 0.1 ml, ②～⑤: GHBSS 0.25 ml, PMN 0.1 ml, 5倍希釈ルミノール 0.1 ml, 10% auto serum 0.1 ml, 菌液 0.1 ml よりなる。

また、CL 反応終了後、塗抹標本作製し、乾燥、メタノール固定後ギムザ染色し、1 標本当たり少なくとも 100 個の細胞をカウントし、食菌率、食菌数、について算定した。

4) 補体レセプターの検索

末梢血多形核白血球・単球および歯肉溝滲出液多形核白血球の補体レセプタータイプ 1 (CR 1) および 3 (CR 3) について、anti-CR 1 (CD 35), Leu-15 (CD 11 b) -PE の各モノクローナル抗体を用いて、 4°C 、30 分間染色し、PBS で2回洗浄後、PBS 0.1 ml に再分散させ、2次抗体として anti-mouse IgG-FITC を用いて 4°C 、30 分間染色し、PBS で2回洗浄後、PBS 1.0 ml に再分散させ、FACStar plus および Lysis II システム (Beckton Dickinson, USA) により two-color および singl-color-histogram で、情報収集・解析を行った。

5) 統計学的解析

群間比較および相関性の解析は、医療統計用パッケージ STAX を用い平均値の差の検定、およびピアソンの相関係数により行った。

結 果

1. 末梢血リンパ球サブセットの検索

図1に各病体群別患者および健常者 (30 代) の末梢血リンパ球サブセットの検索結果を示す。20 代健常者群は、30 代健常者群と同様の結果を示したので図中割愛した。

AP 群では RPP 群、健常者群に比べ B cell の上昇 ($P<0.01$)、健常者群に比べ suppressor/cytotoxic T cell の低下 ($P<0.05$)、NK cell の低下 ($P<0.1$) が有意に認められた。

また、RPP 群でも、健常者群と比較して AP 群と同様に suppressor/cytotoxic T cell の低下、NK cell の低下する傾向が有意に認められたが、有意差は認められなかった。PJP 群では、各サブセットにおいて健常者群とほぼ同様な傾向を示したが、活性化 T cell, NK cell の低下傾向が認められた。

これらの結果を反映して AP 群では、T/B 比の低下、T 4/T 8 比の上昇が認められた (図2)。また、RPP 群では、T/B 比、T 4/T 8 比とも平均値では健常者群と差異を認めないが、高低2群に分かれる傾向を示し T 4/T 8 比では、健常者のレンジを超えるものも2例認められた。

PJP 群は、2例だけではあったが、T/B 比、T 4/T 8 比のいずれも健常者群と同様の値を示していた。

2. 血清抗体価について

図3-1に各病体群別患者および健常者での A.

図 1 各臨床病態群および健常者群における末梢血リンパ球サブセット (百分率)

図 2 各臨床病態群および健常者群における T cell/B cell 比およびヘルパー (T4)/サプレッサー (T8) 比

actinomycetemcomitans に対する特異的血清 IgA, IgM, IgG 抗体価を示す。

AP, RPP, PJP の 3 群いずれも, *A. actinomycetemcomitans* に対する特異的血清 IgG 抗体価が有意に有意に上昇していた。

図 3-2 に各病態群別患者および健常者群の *F. nucleatum* に対する特異的血清 IgA, IgM, IgG 抗体価を示す。*F. nucleatum* に対する血清抗体価は IgA, IgM, IgG のいずれにおいても患者群・健常者群間で差異は認められなかった。

図 3-3 に各病態群別患者および健常者群の *P. gingivalis* に対する特異的血清 IgA, IgM, IgG 抗体価を示す。RPP 群では, *P. gingivalis* に対する特異的 IgA 抗体価が有意に上昇していた。一方, AP 群では, 特異的 IgA, IgM 抗体価が有意に上昇していた。

図 3-4 に各病態群別患者および健常者群の *P. intermedia* に対する特異的 IgA, IgM, IgG 抗体価を示す。RPP, AP 群とも, 特異的 IgA, IgG 抗体価が有意に上昇していた。

3. 多形核白血球の CL 反応・食菌能について

図 4-1 に各病態群別患者および健常者でのルミスフェア, *P. gingivalis* に対する CL 反応積分値を示す。RPP 群では, ルミスフェアに対する CL 反応が 1 例を除き全体的に低く, CL 反応積分値が健常者群, AP 群に比べ, 有意に低下していた。

P. gingivalis に対する CL 反応積分値は, AP, RPP 両群とも高・中・低の 3 群に分かれる傾向をしめした。

PJP 群では, ルミスフェアに対する CL 反応は 2 例とも健常者と同レベルであったが, *P. gingivalis* に対する CL 反応は, 1 例で健常者の 1 S.D. を超えたものが認められた。

図 4-2 に各病態群別患者および健常者での *S. epidermidis*, *F. nucleatum*, *A. actinomycetemcomitans* に対する CL 反応積分値を示す。

AP 群では, 健常者群, RPP に比べ *F. nucleatum* に対する CL 反応積分値が, 有意に上昇していた。

A. actinomycetemcomitans に対する CL 反応は CL 反応積分値を各群において比較しても有意差は見られなかったが, AP, RPP 群では, 高低 2 群に分かれる傾向が認められた。一方, PJP 群では 2 例とも健常者と同レベルであった。また, *S. epidermidis* に対する CL 反応は, 患者群間・健常者群間で差異は認めら

れなかった。

表 1, 2 に各病態群別患者群および健常者群の 5 種類の粒子刺激に対する CL 反応 60 分後の食菌率・食菌数を示す。CL 反応の結果と同様に RPP 群では, 健常者群に比べ, ルミスフェアに対する食菌率・数とも有意に低下していた。また, AP 群・RPP 群では, 健常者群に比べ *F. nucleatum*, *P. gingivalis*, *A. actinomycetemcomitans* に対する食菌率・数とも, 増加する傾向にあった。

4. 補体レセプターについて

図 5 に各病態群別患者群および健常者群での末梢血多形核白血球の CR 1, CR 3 についての検索結果を示す。患者群間および患者群・健常者群間で有意な差は認められなかった。しかし, RPP 群では CR 1 の発現量が高低 2 群に分かれる傾向が示された。また, AP 群において CR 1, CR 3 共に健常者の 1 S.D. を超えるものが認められた。

図 6 に各病態群別患者および健常者での末梢血マクロファージの CR 1, CR 3 についての検索結果を示す。患者群間および患者群・健常者群で有意な差は認められなかった。しかし, 患者群では高低 2 群に分かれる傾向を示し, 特に AP 群において, CR 1, CR 3 いずれも高低 2 群に分かれる傾向が認められた。

図 7 に患者群における末梢血および歯肉溝の多形核白血球 CR 1, CR 3 についての検索結果を示す。いずれの患者群においても末梢血に比べ歯肉溝多形核白血球は, CR 1, CR 3 とも高い発現を示した。患者群間で歯肉溝多形核白血球の CR 1, CR 3 それぞれについて, 比較したが CR 1, CR 3 とも発現量に差異は認められなかった。

さらに, 補体レセプターの発現に関し, 歯肉溝/末梢血 (GCF/PB) の比をとって比較してみると (図 8) 患者群間の比較においては, CR 1, CR 3 とも GCF/PB の比に差異は認められなかった。

しかし, RPP 群においては, CR 1 より CR 3 の GCF/PB 比がより亢進していることが認められた。

5. 臨床指数等との相関

臨床指数と本実験における検索結果との関係を調べた結果, リンパ球サブセット, CL 反応との間には有意な相関は認められなかった。特異的抗体価と臨床指数の間には図 9 に示すごとく, 残存指数と *P. gingivalis* に対する血清抗体価の間にのみ有意な相関が認められた。

末梢血補体レセプターと臨床指数の間には, 表 3 に

図 3-1 各臨床病態群および健常者群における *A. actinomycetemcomitans* に対する特異的血清抗体価

図 3-2 各臨床病態群および健常者群における *F. nucleatum* に対する特異的血清抗体価

図 3-3 各臨床病態群および健常者群における *P. gingivalis* に対する特異的血清抗体価

図 3-4 各臨床病態群および健常者群における *P. intermedia* に対する特異的血清抗体価

図 4-1 各臨床病態群および健常者群におけるルミスフェア, *P. gingivalis* に対する末梢血多形核白血球 CL 反応積分値

示すように, CR 3 と幾つかの臨床指数との間には相関を示す可能性が示唆され, 中でも 4 mm 以上のポケット保有率との間に有意な ($P < 0.05$) 相関関係が認められた。一方, 末梢血多形核白血球 CR 1 では, プラークコントロールレコードとの間にのみ有意な相関が認められた。

今回検索したリンパ球サブセット, 特異的血清抗体価, CL 反応, 食菌指数 (食菌率・食菌数), 補体レセプターの間の相関を検索してみると, 表 4 に示すように *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis* に対する特異的抗体価とリンパ球サブセットとの間に相関関係のある可能性が示唆された。特に, *P. gingivalis* に対する特異的 IgM 抗体価と Th, Ts, T 4/T 8 比との間に, 特異的 IgG 抗体価と B cell, T/B 比などのリンパ球サブセットとの間に有意な相関が認められた。また, *P. gingivalis* に対する特異的 IgA, IgG 抗体価と末梢血多形核白血球の *P. gingivalis* に対する食菌率・数のいずれの間にも有意な相関が認められた。

各菌特異的抗体価を同クラス間および異種クラス間で相関関係を検索したところ, *P. gingivalis* に対する特異的 IgA と IgG のクラス間のみで $r = 0.755$ ($P < 0.01$) と有意な相関が認められた。

図 4-2 各臨床病態群および健常者群における *S. epidermidis*, *F. nucleatum*, *A. actinomycetemcomitans* に対する末梢血多形核白血球 CL 反応積分値

表 1 各臨床病態群および健常者群における 5 種類の粒子刺激物に対する末梢血多形核白血球の食菌率 (%)

	ルミスフェア	<i>S. epidermidis</i>	<i>F. nucleatum</i>	<i>P. gingivalis</i>	<i>A. actinomycetem-comitans</i>
RPP	86.3± 8.0**	67.9±13.7	50.6±16.8	37.9±14.4	48.8±11.7
AP	80.6±10.6*	66.8±13.3	51.2±18.8	40.0±11.3	45.4±13.5
PJP	73.5	70	49	35	39
N 30	90.3± 1.9	59.4± 9.5	48.0± 9.5	36.0± 7.0	38.8± 4.1

*p<0.05, **p<0.01

(mean±S.D.)

表 2 各臨床病態群および健常者群における 5 種類の粒子刺激物に対する末梢血多形核白血球の食菌数の比較

	ルミスフェア	<i>S. epidermidis</i>	<i>F. nucleatum</i>	<i>P. gingivalis</i>	<i>A. actinomycetem-comitans</i>
RPP	519±116*	443±134	91±38	105±63	144±59
AP	450±176*	461±176	82±25	92±33	121±64
PJP	401	432	80	79	113
N 30	608±93	425±114	79±20	86±23	111±34

註) 反応時間 60 分における多形核白血球 100 個内に取り込まれた総菌数

*p<0.05

(mean±S.D.)

図 5 各臨床病態群および健常者群における末梢血多形核白血球補体レセプター発現量

図 6 各臨床病態群および健常者群における末梢血単球補体レセプター発現量

図 7 各臨床病態群での末梢血および歯肉溝多形核白血球補体レセプター発現量

図 8 各臨床病態群での末梢血に対する歯肉溝多形核白血球補体レセプター発現量の増加比率

図 9 *P. gingivalis* に対する特異的 IgG 抗体価と残存歯数との関係

考 察

リンパ球サブセットの検索に関してはこれまでも幾多の報告⁷⁻⁹⁾がなされており、特に T4/T8 比に関して歯周炎患者では上昇あるいは低下するとの報告があり、一定の見解が未だ得られていないように思われる。これは、歯周炎と一口に言っても、その中には幾つかのカテゴリーが含まれていることに起因するのであろうが、歯周炎が基本的に経過の長い慢性疾患であるとともに急性炎症・緩解という弛張熱的パターン

をとる¹⁰⁾ことにより全身の状態も影響されるからだと思われる。

そういった点で今回対象にした患者群は臨床分類的なカテゴリーでは3つに分類されるがPJPを除いては、特にAP群では発症早期と考えられる。また、RPP群では臨床的特徴を示す本群に分類されるべき急性炎症時もしくは発症早期の急性炎症から緩解への移行期とも考えられる。

以上のような観点から今回の結果を見るとAP群におけるB cellの増加に伴うT/B比の低下, suppressor/cytotoxic T cellの低下に伴うT 4/T 8比の上昇

は、T 4/T 8比が、*P. gingivalis* に対する血清IgM抗体価とまた、T/B比が、*A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis* に対する血清IgG抗体価と関連することからも、局所的な抗原刺激により全身的にも免疫系が感作されIgMからIgGへのクラススイッチが行われていることを反映していると考えられる。また、AP群では多形核白血球CL反応増大、補体レセプター特に菌肉溝多形核白血球での増加より炎症状態も強い時期であることがうかがえる。この炎症状態が直接的にリンパ球サブセットに反映されるとは言い難いが、suppressor/cytotoxic T cellの低下¹¹⁾は、免疫反応のエフェクター細胞であるマクロファージ等の活性化を間接的に妨げないことにより炎症状態の増悪を招く事も考えられる。

一方、臨床的カテゴリーによりRPPと分類された患者群では、AP群同様suppressor/cytotoxic T cellの低下に伴うT 4/T 8比の上昇は認められるもののB cellの増加はなくT 4/T 8比の上昇はかつての抗原刺激の結果としてであり現在の免疫反応状態としてはそれほど活発でないとも考えられる。

T 4/T 8, T/B以外のリンパ球サブセットに関しては、AP, RPP群ともNK cellの低下が共通に認められた。本実験系では、NK活性は測定していないので考察の域をでないのではあるが、歯周炎の発症にNK cellが関与している可能性¹²⁾も考えられる。

抗体価に関しては、患者群全体に共通して*A. actinomycetemcomitans*, に対する特異的IgG抗体価

表 3 患者群における臨床指数と末梢血多形核白血球補体レセプター発現量との関係

	PB-PMN CR 3	PB-PMN CR 1
罹患指数	0.440	—
骨吸収度	0.404	—
4 P.D.	0.576*	—
7 P.D.	0.307	—
G.B.I.	0.316	—
P.C.R.	—	0.521*
残存歯数	—	—

4 P.D.: 4 mm 以上のポケット保有率 *p<0.05

7 P.D.: 7 mm 以上のポケット保有率

G.B.I.: Gingival bleeding Index (Loe and Silness)

P.C.R.: Plaque control record (O'leary)

— : |0.165| 以下

註) ピアソンの相関係数

表 4 患者群における特異的抗体価とリンパ球サブセット、多形核白血球の食菌指数との関係

	B cell	T/B	Th ¹	Ts ²	T 4/T 8			
<i>(A. actinomycetemcomitans)</i>						(%)	食菌 ³ (数)	
	IgA	-0.250	0.227	-0.397	—	-0.246	—	—
	IgM	-0.443	0.490	0.455	-0.347	0.511	—	—
	IgG	-0.370	0.545*	-0.352	0.287	-0.410	—	—
<i>(P. gingivalis)</i>						(%)	食菌 ⁴ (数)	
	IgA	-0.242	0.202	0.410	-0.231	0.341	0.546	0.734**
	IgM	0.236	-0.236	0.528*	-0.533*	0.744**	—	—
	IgG	0.632	-0.617	-0.263	0.420	-0.375	0.595	0.786**

1: helper/inducer T cell

2: suppressor/cytotoxic T cell

3: *A. actinomycetemcomitans* に対する末梢血多形核白血球の食菌率・数

4: *P. gingivalis* に対する末梢血多形核白血球の食菌率・数

*: p<0.05, **: p<0.01, —: |0.165| 以下

註) ピアソンの相関係数

が、AP、RPP群で *P. intermedia* に対する特異的 IgA、IgG 抗体価が高いことが認められた。*P. intermedia* に対する特異的抗体価の上昇は、患者病巣局所からの菌の同定結果とも一致する所見ではあった。また、AP群ではそれ以外に特に *P. gingivalis* に対する IgA、M 抗体価が RPP群では *P. gingivalis* に対する IgA 抗体価が上昇していた。

以上のような3群における抗体価の上昇パターンは、いわゆる早期発症型歯周炎と考えられる3群とも感染の初期は、*A. actinomycetemcomitans* 主体であり、その後 *P. intermedia*、*P. gingivalis* と感染の主体が変化し、またそれに対応する宿主の免疫応答性により臨床的に分類される病変の相違として現れる可能性を示唆している。

補体レセプターに関しては、患者・健常者群間で差異は認められなかったが、患者群では、高値あるいは低値を示すものの2群に分かれる傾向が認められた。CR3 (CD11b/CD18) に関しては、インテグリンファミリー¹³⁾でありそのβ鎖はLFA、Mac-1などとも共通であることから1つには、白血球走化性を反映する¹⁴⁾とも考えられ、多形核白血球機能のスクリーニング検査として有用だと考えられる。また、PMN-CR3は、FMLP等の刺激により発現が増強される¹⁵⁾ことが知られているので歯周病の特に局所においては炎症状態を示す指数としても有用であると思われる。また、症例数は少ないが、Palmerら¹⁶⁾により治療前後で変動することが報告されており今後今回対象とした患者のPMN-CR3がどう変動するのかも興味深いところである。

CR1に関しては、多形核白血球のみならず、赤血球、B cellにも発現している¹⁷⁾のでその働きとしても単に食殺菌に関するC3bレセプターとしてのみでなくC3bのコファクターとしてまた、免疫複合体の除去担体として働くことがいわれている。SLE患者では、末梢血赤血球CR3の低下がその増悪因子として報告されている¹⁸⁾。すなわち、多形核白血球CR1ではその増加、赤血球CR1では、その低下が炎症反応を増悪させる因子となると考えられる。

補体レセプターに関し、今回検索した患者群AP、RPP群それぞれに共通に認められた特徴はなかったが、多形核白血球CR1、3の高いグループは、歯周炎炎症の結果として、また、低いグループは発症に関する素因の一つとして捉えることが出来るのではないかと考えている。

また、末梢血補体レセプターと臨床指数との間に幾つかの関連性が示されたことは、歯周炎患者において疾患活動度を計る指標として有用であることを示唆している。

多形核白血球CL反応に関しては、食菌と並行させて考えると①CL反応低下かつ食菌低下、②CL反応低下かつ食菌正常(あるいは亢進)、③CL反応上昇かつ食菌正常④CL反応上昇かつ食菌亢進の4グループに分かれる¹⁹⁾と言える。このうち、歯周炎の発症素因として問題となるのは①②であり①は食作用異常②は活性酸素産成異常ということになる。③④は、炎症反応性に多形核白血球機能が亢進したためと、抗体等によるオプソニン活性の増加が考えられ、歯周炎では誘発・増悪因子として病変を修飾することが考えられる。特に今回反応系に自己血清を加えているので歯周病原菌に対するCL反応の高いものは局所におけるオプソニン活性とあわせて活性酸素産生の増強が組織障害性と関与するものと思われる。

②の活性酸素産成異常にはチトクロームb558系²⁰⁾、ミエロペルオキシダーゼ系²¹⁾等の幾つかの経路が関与しているが、今回の検索ではルミノール依存性活性酸素を測定しているためそれらのトータル量特にH₂O₂-ミエロペルオキシダーゼ系を見ていると考えられるが、ルミスフェアで細胞内活性酸素産生²²⁾を他の4種類の粒子刺激で細胞外活性酸素産生能を測定しているので、活性酸素産生のスクリーニングとしての意義は大きいと考えられる。

RPP群におけるルミスフェアに対するCL反応の低下は①の場合に相当すると考えられ、全身的な活性酸素産生の低下が考えられるが、他の粒子刺激に関しては健常者と差異が認められないので検索時点における状態なのかベーシックなものとしての異常なのかは、経過を追って精査することが必要であると思われる。

AP群では *F. nucleatum*、*A. actinomycetemcomitans* 等に対しCL反応の増加が認められ、抗体価の上昇と伴って炎症反応性に活性酸素産生が増加していることが伺えた。AP群では局所におけるPMN-CR3増加、抗体価の上昇とそれに伴う菌特異的活性酸素産生の増加があいまって、局所炎症反応の増悪が組織破壊性に働いていることが考えられる。

結 論

今回、検索した患者群において以下の事項が認められた。

1. AP 群では、T4/T8 比の上昇、T/B 比の低下、*P. intermedia*, *A. actinomycetemcomitans* に対する特異的 IgG 抗体価、*P. gingivalis* に対する特異的 IgM 抗体価の上昇、CL 反応の上昇傾向が認められた。

2. RPP 群では、*P. gingivalis* に対する特異的 IgA 抗体価の上昇、*P. intermedia*, *A. actinomycetemcomitans* に対する特異的 IgG 抗体価の上昇、ルミスフェアに対する CL 反応の低下が認められた。

3. PJP 群では、*A. actinomycetemcomitans* に対する IgG 抗体価のみが上昇していた。リンパ球サブセット、多形核白血球 CL 反応、末梢血補体レセプターは、健康者と同レベルに位置していた。

4. 歯肉溝における PMN 膜上の補体レセプターの増加は 3 群とも共通して認められたが、RPP 群において、GCF-PMN CR3 の増加が著明であった。

本研究は平成 4 年度 (第 15 回) 博友会研究助成金の補助により行われた。

文 献

- 1) Caton, J.G. : Periodontal diagnosis and diagnostic aids, Myron, N., William, B. and Kenneth, K., Proceedings of the world workshop in clinical periodontitis, The American Academy of Periodontology, Chicago, 1989, 1-41.
- 2) Skapski, H. and Lehner, T. : A crevicular washing method for investigating immune components of crevicular fluid in man. J. Periodont. Res., 11 : 19-24, 1976.
- 3) Darty, S.L., Lopatin, D.E., Syed, S.A. and Smith, F.N. : Humoral immune response to oral microorganisms in periodontitis. Infect. Immun., 37 : 449-505, 1982.
- 4) Vincent, J.S., Suzuki, J.B., Falkler, Jr., 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.
- 5) Dechatelet, L.R., Long, G.D., Shirley, S., Bass, D.A., Thomas, M.J., Henderson, F.W. and Cohen,

- M.S. : Mechanism of the luminol-dependent chemiluminescence of human neutrophils. J. Immunol., 129 : 1589-1594, 1982.
- 6) Uchida, T., Kannno, T. and Hosaka, S. : Direct measurement of phagosomal reactive oxygen by luminol binding microspheres. J. Immunological Method., 77 : 55-61, 1985.
- 7) Kinane, D.F., Johnston, F.A. and Evans C.W. : Depresses helper-to-suppressor T-cell ratios in early onset forms of periodontal disease. J. Periodont. Res., 24 : 161-164, 1989.
- 8) Afar, B., Engel, D. and Clark, E.A. : Activated lymphocyte subsets in adult periodontitis. J. Periodont. Res., 27 : 126-133, 1992.
- 9) Zafilropoulos, G.G.K., Flores, J.B., Schoop, B., Havemann, K. and Heymanns, J. : Flow-cytometric analysis of Lymphocyte subsets in patients with advanced periodontitis. J. Clin. Periodontol., 17 : 636-641, 1990.
- 10) Sokransky, S.S., Haffajee, A.D., Goodson, J.M. and Lindhe, J. : New concept of destructive periodontal disease. J. Clin. Periodontol., 11, 21-32, 1984.
- 11) Cobb, C.M., Singla, O., Feil, P.H., Theisen, F.C. and Schlutz, E. : Comparison of NK-cell (Leu-7+ and Leu-11 b+) populations in clinically healthy gingiva, chronic adult periodontitis. J. Periodont. Res., 24 : 1-7, 1989.
- 12) Takahasi, K., Nakata, M. and Yagita, H., Okumura, K. : CD 4/8 cross-linking regulates IL-2 responses. Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 89 : 5557-61, 1992.
- 13) Hynes, R.O. : Integrins : a family of cell surface receptors. Cell, 48 : 549-554, 1987.
- 14) Van Dyke, T.E., Warbington, M., Gardner, M. and Offenbacher, S. : Neutrophil surface protein markers as indicators of chemotaxis in LJP. J. Periodontol., 61 : 180-184, 1990.
- 15) Watanabe, K., Lambert, L.A., Niederman, L.G., Punwani, I. and Andersen, B.R. : Analysis of neutrophil chemotaxis and CD 11 b expression in pre-pubertal periodontitis. J. Dent. Res., 70 : 102-106, 1991.
- 16) Palmer, R., Carr, T. and Adinolfi, M. : Expression of complement receptors CR 1 and CR 3 in patients with juvenile periodontitis. J. Clin. Lab. Immunol., 32 : 185-188, 1990.
- 17) Fearon, D.R. : The human C3 b receptor. Springer. Semin. Immunopathol., 159-72, 1983.
- 18) Proteu, F., Fischer, A., Latscha, D.B. and Mearcelli, H.L. : Defective complement receptor (CR 1 and CR 3) on erythrocytes and leukocytes of factor I (C3 b-inactivator) deficient patients. Clin. Exp. Immunol., 66 : 463-471, 1986.
- 19) Van Dyke, K. : Luminol - dependent chemiluminescence analysis of cellular and humoral

- defects of phagocytosis using a Chemo-Glo photometer. *J. Microchem.*, 22 : 463-474, 1977.
- 20) Ohmi, S., Tokita, K., Ochiai, H., Nakamura, M. and Kanegasaki, S. : Topology of cytochrome b 558 in neutrophil membrane analyzed by anti-peptide and proteolysis. *Blood*, 75 : 458-461, 1990.
- 21) Klebanoff, S.J. and Hamon, C.B. : Role of myeloperoxidase - mediated antimicrobial systems in intact leukocytes. *J. Reticuloendothel. Sco.*, 12 : 170-196, 1972.
- 22) Matsumoto, S. and Imanishi, H. : Effect of interferon on activated oxygen production in human monocytes in vitro direct measurment of phagosomal activated oxygens by a new method using lumonol - binding microspheres. *Chem. Pharm. Bull.*, 34 : 4775-4781, 1986.

連絡先 :

日本歯科大学新潟歯学部口腔微生物学教室

〒 951 新潟市浜浦町 1-8