

# ヒト歯周炎罹患歯肉における *Porphyromonas gingivalis* 特異的抗体産生細胞の検索

菅 原 昌 子   山 下   薫   吉 江 弘 正   原   耕 二

新潟大学歯学部歯科保存科第2教室

(主任：原 耕二 教授)

Correlation between *Porphyromonas gingivalis*-specific  
antibody-secreting cells  
in inflamed gingival tissue  
and serum antibody levels to *P. gingivalis*

Masako SUGAWARA, Kaoru YAMASHITA, Hiromasa YOSHIE, Kohji HARA

*Department of Periodontology*

*Niigata University School of Dentistry*

(Chief: Prof. Kohji HARA)

**Key words :** *Porphyromonas gingivalis* 特異的抗体産生細胞, ELISPOT法, 血清抗体価

This study was performed to investigate the specificity of immune response to *P. gingivalis* at the site of an inflamed gingival lesion by the ELISOT assay. The relationship between serum antibody levels to *P. gingivalis* and *P. gingivalis*-specific antibody secreting cells present in the local lesion was also examined.

The major isotype of total immunoglobulin spot forming cells (SFC) in the local lesion was IgG, followed by IgM and IgA. Antibody-secreting cells specific for *P. gingivalis* were observed at frequencies of 16.0, 8.4, and 5.4% for total IgG, IgM and IgA, respectively.

According to serum IgG antibody levels to *P. gingivalis*, we divided patients into two groups; high (H group) and low titer groups (L group). In H group, the IgG anti-*P. gingivalis* antibody level was significantly higher than in L group. But other isotypes antibody to *P. gingivalis* and other periodontitis-associated bacteria-specific antibody levels did not differ between two groups. *P. gingivalis* was more frequently detected in H than L group. Total bacterial counts were also much higher in H group. The numbers of IgG *P. gingivalis*-specific SFC in H group showed a significant increment. Furthermore, polyclonal B cell response of IgG isotype in H group was augmented. IgG serum antibody levels to *P. gingivalis* were well-correlated with IgG SFC specific for *P. gingivalis*.

These findings suggested that serum antibody levels to *P. gingivalis* could reflect local immune response. These antigen-specific immune response might be enhanced by polyclonal B cell activators.

## 要 旨

著者らは歯周炎罹患歯肉組織よりリンパ球を抽出し、*Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*) 特異的抗体産生細胞の頻度をELISPOT法を用いて検索し、血清抗体価と併せて検討した。

ヒト歯周炎罹患歯肉組織における免疫グロブリン産生細胞の主たるサブクラスはIgGであり、ついでIgM、IgAであった。このうち*P. gingivalis* 特異抗体産生細胞は各々のサブクラスの免疫グロブリン産生細胞に対して16.0、8.4、5.4%の頻度で検出された。健康歯肉を有するコントロール群の*P. gingivalis* に対する血清IgG抗体価を基準として20人の成人性歯周炎患者について抗体価の高い群(H群:10名)と低い群(L群:10名)に分けて検討をおこなったところ、L群に比較してH群では歯肉中のIgGサブクラスの*P. gingivalis* 特異的抗体産生細胞の有意な増加が認められた。また特異抗体産生細胞のみならず免疫グロブリン産生細胞もIgGサブクラスで増加した。さらに患者血清IgG抗*P. gingivalis* 抗体価と歯肉中のIgG *P. gingivalis* 特異的抗体産生細胞数の間に有意な相関関係が認められた。

以上のことから*P. gingivalis* に対する血清IgG抗体価は歯肉中の特異的抗体産生を反映している。また抗体価の高い患者では歯肉中の特異的抗体産生細胞の増加に併せて、多クローン性にB細胞/形質細胞が活性化している可能性が示唆された。

## 緒 言

近年歯周炎の病型の違いによる特異的なポケット内細菌の分離とそれに対するIgG抗体価の上昇が報告されてきた<sup>1-7)</sup>。特に成人性歯周炎罹患患者では、歯周ポケットから*P. gingivalis* の分離が優勢であり、この細菌に対する血清ならびに歯肉溝滲出液抗体価の上昇が報告されている<sup>8-12)</sup>。一方、初期治療により抗体価の低下が認められることから<sup>11,13-15)</sup>、歯肉局所において免疫担当細胞はポケット上皮を介して*P. gingivalis* に対して免疫応答を起こしていることが考えられる。しかし

ながら歯周疾患の進行に伴って生じる形質細胞の増加は*P. gingivalis* のようなある特異的な細菌に対する反応が深く関わっているのか、あるいは細菌の壁成分などが有する多クローン性の反応が関係するのか未だ明らかではない。また歯周炎関連細菌に特異的な局所の免疫反応と、血清中の抗体とはどのような関わりを持つのか知る必要がある。

本研究では成人性歯周炎罹患患者の歯肉組織より単核細胞を分離し、ELISPOT法によって*P. gingivalis* 特異的抗体産生細胞の頻度を検索し、併せて、血清抗体価並びに歯周ポケット中の*P. gingivalis* の有無を検討し、歯肉局所における*P. gingivalis* 特異的抗体産生と血清抗体価との関係を考察することとした。

## 材料および方法

### 1. 被検者

新潟大学歯学部附属病院保存科を受診した患者のうち成人性歯周炎と診断された患者、20名(男性11名、女性9名、平均年齢52.5歳)を被検対象とした。これらの患者は過去にプラークコントロール、歯肉縁上スケーリング以外の歯周治療を受けておらず、過去6ヵ月以内に抗生物質の投与及び全身的な疾患の既往のないことが確認されている。Table 1は歯肉の採取部位の臨床評価<sup>16,17)</sup>をまとめたものである。これら臨床所見は歯肉組織及び歯肉縁下プラークの採取前に診査を行った。

歯周炎関連細菌に対する歯周炎罹患患者の血清抗体価に対して、健康な歯周組織を有する10名(男性5名、女性5名、平均年齢41.4歳)の血清抗体価をコントロールとした。

コントロール群の血清IgG抗*P. gingivalis* 抗体価を基準とし、平均から2SD(314EU)を超える患者群をH群(10名)、超えない群をL群(10名)とし、患者群を2群に分けた。

### 2. 試料の採取

#### 1) 血清の調整

全ての被検者の前腕部静脈より真空採血管を用いて10ml採血し、室温にて2時間放置後、2000rpm、10分遠心して血清を分離した。その後測定

Table 1. Clinical assessments of sampling sites

|         | age(years)            | GI        | Pd(mm)    | LA(mm)    | BL(%)       |
|---------|-----------------------|-----------|-----------|-----------|-------------|
| H group | 48.4±9.4 <sup>*</sup> | 1.7±0.3   | 4.7±1.1   | 6.5±1.5   | 54.8±16.0   |
| (n=10)  | (35-63) <sup>**</sup> | (1.2-2.0) | (3.1-6.6) | (4.2-8.6) | (37.0-90.0) |
| L group | 55.1±5.8              | 1.8±0.8   | 4.6±0.7   | 5.7±1.3   | 52.8±15.2   |
| (n=10)  | (47-64)               | (1.5-2.0) | (3.7-6.0) | (4.1-8.2) | (25.0-83.5) |

\*: mean±SD: The respective mean value and standard deviation calculated from each subject's mean score of clinical parameters measured on the sampling sites.

\*\* : range (minimum-maximum values) .

GI: Gingival index; Pd: Probing depth; LA: Loss of attachment; BL: Alveolar bone loss on roentgenographs.

H group: subjects with high IgG antibody level specific for *P. gingivalis* in serum (above 314 EU) ,

L group: subjects with low IgG antibody level specific for *P. gingivalis* in serum (below 314 EU) as described in Materials and Methods.

に供するまで-80℃にて保存した。

## 2) 歯肉縁下プラークの採取

歯肉採取部位のうち6mm以上のポケットを有する部位から歯肉縁下プラークを採取した。ロールワッテで簡易防湿後、#40滅菌ペーパーポイントを歯周ポケット底部まで挿入し、30秒間静置させた。その後とりだしたペーパーポイントを直ちに1ml滅菌 Phosphate buffered saline (PBS) 中に入れ、 $10^2$ 倍から $10^5$ 倍に段階希釈したものを duplicate にて培地に100  $\mu$ l づつ接種した。培地は5%羊脱線維血添加 Trypticase soy agar (BBL, TSA) と、5  $\mu$ g/ml Hemin (和光)、0.5  $\mu$ g/ml Menadion (Sigma)、10%ウマ脱線維血添加 TSA (TSHM) の2種類を用いて7日間、37℃でN<sub>2</sub>: 80%、H<sub>2</sub>: 10%、CO<sub>2</sub>: 10%の条件下で嫌気培養した。

## 3) 歯肉リンパ球の調整

炎症性歯肉組織は連続した2~6歯から、歯周手術時に得た。採取後直ちに10%牛胎児血清 (FBS; Sigma, Mo)、100U/ml Penicillin (Gibco)、100  $\mu$ g/ml Streptomycin (Gibco)

を含む4℃のRPMI 1640培地5mlに浮遊し、湿重量を測定した。今回の実験に供した歯肉組織の湿重量は100~530mgであった。歯肉リンパ球の調整はYamashitaら<sup>18)</sup>の方法に準じて行った。すなわちRPMI 1640培地でよく洗浄した後、1~2mm<sup>3</sup>に細切した歯肉片を0.1%コラゲナーゼ (Sigma, type I) を含むRPMI 1640培地に浮遊し、37℃に温度設定した恒温槽中で、1時間酵素処理を行った。ステンレスメッシュ、ナイロンメッシュを通して均一な細胞浮遊液としたものをFicoll-paque (Pharmacia) に重層し密度勾配遠心法によって単核細胞分画を得た。PBSで2回洗浄したのち、RPMI 1640培地に $1 \times 10^5 \sim 10^6$ の程度に浮遊させた。浮遊に先立ってTürk液にて細胞数を、アクリヂン-オレンジ法にて染色し、蛍光顕微鏡にて細胞生存率を確認した<sup>19)</sup>。確認された細胞数は $5.5 \times 10^5$ /歯肉湿重量100mg、細胞生存率は90.0%以上であった。

## 4) 末梢血リンパ球の調整

歯肉採取時にヘパリン加静脈血を採取したのち、比重遠心法を用いて末梢血単核球分画を得た。す

なわち、ヘパリン加静脈血 2 ml を P B S にて 2 倍に希釈し、3 ml の Ficoll-paque に重層し、400Xg、30 分間、室温での遠心分離後、界面の単核球画分を分離し、P B S にて 3 回洗浄後、R P M I 1640 培地培養液に  $1 \times 10^5 \sim 10^6$  の程度に浮遊させた。

### 3. 抗体価の測定

#### 1) 抗原の調整

a) *Porphyromonas gingivalis* 381

(*P. gingivalis*)

b) *Prevotella intermedia* ATCC 33563

(*P. intermedia*)

c) *Prevotella melaninogenica* GAI 5596

(*P. melaninogenica*)

d) *Actinobacillus actinomycetemcomitans*

Y 4 (*A. actinomycetemcomitans*)

T S A 培地を用いて継代培養を続けていた以上の 4 菌株のうち a) ~ c) は Hemin 5 mg/l、Memadion 0.5 mg/ml 添加の T S Broth にて、d) は 0.2%  $\text{NaHCO}_3$  添加の T S Broth にて大量培養し、無菌的に集菌した。これを 0.5% 中性ホルマリンで処理し、0.1M Sodium carbonate buffer (pH=9.6) で希釈し、OD 550=0.3 に調整したものを抗原として用いた。

#### 2) 血清抗体価の測定

血清抗体価の測定は E L I S A 法により Horino らの方法<sup>11)</sup>に準じて行った。マイクロタイタープレート (NUNC) に抗原調整液を  $100 \mu\text{l}/\text{well}$  ずつ入れ 37°C で 3.5 時間インキュベートして抗原を吸着させた。0.05% Tween 20 添加生理的食塩水にて 3 回洗浄後、被検者の血清を加えた。血清は 0.05% Tween 20、1 mM  $\text{MgCl}_2$ 、1% B S A 添加の 0.02M P B S pH=7.25 (P B S T) にて 100 倍から 3200 倍に希釈したものを使用し、測定は duplicate で行った。2 時間、室温にて反応させ、3 回洗浄した後、P B S T にて 10000 倍に希釈したビオチン標識ヤギ抗ヒト IgG、IgM、IgA (TAGO) を  $100 \mu\text{l}/\text{well}$  加え、1.5 時間、室温にてインキュベーションした。洗浄後、P B S T にて 40000 倍に希釈したペルオキシダーゼ標識スト

レプトアビジンを追加して 1.5 時間、室温にて反応させた。最後に基質として 1 mg/ml o-phenylene diamine dihydrochloride (OPD)、 $0.4 \mu\text{l}$  30%  $\text{H}_2\text{O}_2$  添加の 0.1M citrate buffer (pH=4.5) を  $100 \mu\text{l}/\text{well}$  ずつ加えた。室温にて 30 分インキュベーション後、E L I S A analyzer S T L 210 (S T L) にて吸光度を用いて測定した。標準血清としては口腔内が健康で、全身的疾患の既往のない 11 歳の少女の血清を用いた。E L I S A unit の算定は永井らの方法<sup>20)</sup>により行った。

### 4. 細菌の検出

歯肉縁下プラークの嫌気培養後、得られたコロニーの、総菌数、Black pigmented Anaerobes (BpA) 数を数えた。BpA はコロニーの形態、色合い等で識別した後、それぞれの Smear をとって間接蛍光抗体法<sup>21)</sup>によって *P. gingivalis* である否かの判定を行った。まず、歯肉縁下プラークを嫌気培養して得られた BpA の Smear に P B S で 20 倍に希釈したウサギ抗 *P. gingivalis* 血清の  $\gamma$ -fraction を  $20 \mu\text{l}$  滴下し、30 分間、湿箱中でインキュベートした。この  $\gamma$ -fraction はあらかじめホルマリン処理した *P. gingivalis* 菌体を、ウサギに免疫して得た抗血清を 50% 硫酸で塩析、調整したものである。P B S のみにて免疫した Sham 抗血清を標準血清とした際の抗 *P. gingivalis* 抗体価は 45660 E U であった。次に P B S T にて抗血清を洗浄後、P B S T で 40 倍に希釈した F I T C 標識ヤギ抗ウサギ IgG (M I L E S) を  $20 \mu\text{l}$  滴下した。湿箱中で 45 分間インキュベーション後、再度 P B S T で洗浄し蛍光顕微鏡 (V A N O X A H B - L B、オリンパス) を用いて 100 倍にて検鏡した。*P. gingivalis* の判定は全体に緑色のはっきりとした蛍光を発するものを陽性とし、蛍光を発しないものを陰性とした。

### 5. *P. gingivalis* 特異的抗体産生細胞の同定

免疫グロブリンの各サブクラス、及び *P. gingivalis* 特異的抗体産生細胞の同定は ELISPOT 法を用いて行った<sup>22,23)</sup>。まずポリスチレンプレートを *P. gingivalis* ホルマリン処理菌体 (OD 550=0.3) にてコーティングした。またアイソソタイプ別の



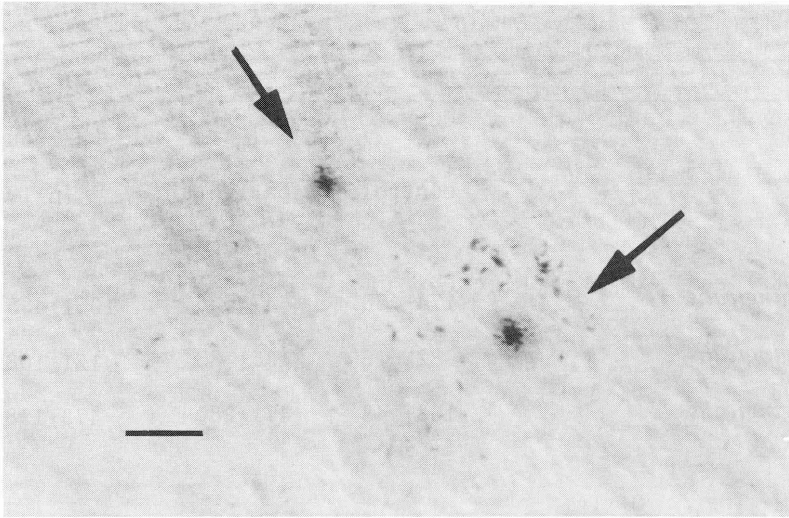


Figure 1. Typical appearance of spots

Typical spots exhibit a granular appearance which consists of precipitates of enzyme—substrate reaction. The color intensity of these reactions varies from light brown to almost black. Their diameter also varies, ranging 0.1–0.5mm. Bar=1mm.

免疫グロブリン産生細胞を同定するために Affinity-purified  $F(ab')_2$  fragments of goat anti-human IgG ( $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ )、-IgM ( $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ )、-IgA ( $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ ) にてコーティングした。5% FCS を含む PBS にてブロッキングを行った後、適当な細胞数に調整した ( $1 \times 10^3 \sim 5 \times 10^4$  に希釈した) 細胞浮遊液を、抗原でコーティングしたプレートに添加し、4～6時間 5% CO<sub>2</sub> 環境内でインキュベーションを行った。0.05% Tween20 を含む PBS (PBST) にて3回洗浄後、ビオチン標識抗ヒト免疫グロブリン; goat anti-human IgG (1:100)、IgM (1:200)、IgA (1:200) を添加して1昼夜、室温にて反応させた。再度 PBST にて3回洗浄後、ペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジン (1:1000) を添加した室温にて2時間反応させ、引き続き PBST にて洗浄した。1% Noble agar を含む寒天溶液を 50℃ まで冷却したものに、最終濃度が 0.5mg/ml になるよう、メタノールに溶解した P-phenylene diamine (PPD) と、過酸化水素水 (最終濃度 0.05%) を添加した。この溶液を直ちにプレートに加え、注意深く寒天を切ると、薄い寒天の皮膜

が生じ、約10分で抗体産生細胞が存在していたところに一致して濃い茶色のスポットが生じる。30分後、このスポットを低倍率の顕微鏡下でカウントした (Figure 1)。

## 6. 統計処理

すべての統計学的解析は Wilcoxon signed-rank test により行った。危険率 5% 未満をもって有意差ありとした。

## 結 果

### 1. 臨床評価

IgG 抗 *P. gingivalis* 抗体価で H 群と L 群とに分けた 2 群についての臨床評価の結果をまとめたものが Table 1 である。H 群の方が L 群よりやや年齢が若かったものの、臨床評価の結果はいずれも両群間で統計学的に有意差は認められなかった。

### 2. *P. gingivalis*、及び他の 3 菌に対する血清抗体価

Table 2 に示すように患者群 (20 名) の血清抗体価をコントロール群 (10 名) と比較してみると、IgG 抗 *P. gingivalis* 抗体価の上昇が認められた。他の 3 菌に対する抗体価は患者群、コントロー

Table 2. Serum antibody levels to *Porphyromonas gingivalis* and other periodontitis-associated bacteria

|                                       | control  | patients | H group<br>(n=10) | L group<br>(n=10) |
|---------------------------------------|----------|----------|-------------------|-------------------|
| IgG ; <i>P. gingivalis</i>            | 174± 70* | 647±536  | 1051±495**        | 225± 98 (EU)      |
| IgM; <i>P. gingivalis</i>             | 82± 16   | 135± 85  | 121±108           | 153± 69           |
| IgA ; <i>P. gingivalis</i>            | 133± 48  | 471±280  | 473±198           | 453±360           |
| IgG ; <i>P. intermedia</i>            | 194± 35  | 157± 76  | 159± 63           | 155± 87           |
| IgG ; <i>P. melaninogenica</i>        | 119± 19  | 88± 51   | 83± 54            | 92± 51            |
| IgG ; <i>A. actinomycetemcomitans</i> | 87± 25   | 159±127  | 214±141           | 104± 75           |

\*: mean±SD; EU: ELISA Unit.

\*\*: significant at  $p<0.01$  vs control.

control: 10 subjects with healthy periodontium.

patients: 20 subjects with periodontitis.

H group: subjects with high IgG antibody level specific for *P. gingivalis* in serum (above 314 EU )

L group: subjects with low IgG antibody level specific for *P. gingivalis* in serum (below 314 EU ) as described in Materials and Methods.

ル群間で有意差は認められなかった。また、H群とL群との比較では、H群においてIgG抗*P. gingivalis*抗体価が有意に高かった(H群: 1051±495EU vs L群: 225±98EU)が、IgM並びにIgA抗*P. gingivalis*抗体価、及び他の歯周病関連細菌に対する抗体価に差は認められなかった。

### 3. 細菌の検出率

*P. gingivalis*の検出率は6/20部位の30%であった。これは先のHorinoらの報告<sup>11)</sup>と一致する。しかしながらH群とL群とを比較すると、H群では5/10部位の50%と、L群の1/10部位の10%に比べて有意に*P. gingivalis*が多く検出された。また、総細菌数もH群がL群よりも2倍多く検出された。

### 4. 炎症歯肉中の*P. gingivalis*特異的抗体産生

#### 細胞(ELISPOT法)

炎症歯肉中での*P. gingivalis*特異的抗体産生細胞を検索するためにELISPOT法を行った。Figure 2に示すように歯肉局所で産生される免疫グロブリンの主たるアイソタイプはIgGであり、次いでIgM、IgAであった。各アイソタイプの免疫グロブリン産生細胞に対して*P. gingivalis*特異的抗体産生細胞はそれぞれ16.0% (IgG)、8.4% (IgM)、5.4% (IgA)の割合で検出された。

H群、L群における*P. gingivalis*特異的抗体産生細胞は、 $10^6$ 単核細胞当り、IgGで453±93 vs 97±31、IgMで111±63 vs 68±23、IgAで33±10 vs 40±22 (H群 vs L群)であった。末梢血から分離した単核細胞におけるIgGの*P. gingivalis*特異的抗体産生細胞は上記の値と比べて1/10の

Table 3. Percentage of *Porphyromonas gingivalis* detectable sites and total bacterial number

|                   | Total bacterial count                          | Proportion of <i>P. gingivalis</i><br>detectable sites |        |
|-------------------|--|--|--------|
|                   | $4.9 \pm 1.5 ( \times 10^5 \text{ CFU / ml} )$ | 6/20 sites   | 30 (%) |
| H group<br>(n=10) | $6.8 \pm 2.9$                                  | 5/10   | 50     |
| L group<br>(n=10) | $3.2 \pm 1.0$                                  | 1/10   | 10     |

H group: subjects with high IgG antibody level specific for *P. gingivalis* in serum (above 314 EU) .  
 L group: subjects with low IgG antibody level specific for *P. gingivalis* in serum (below 314 EU) .

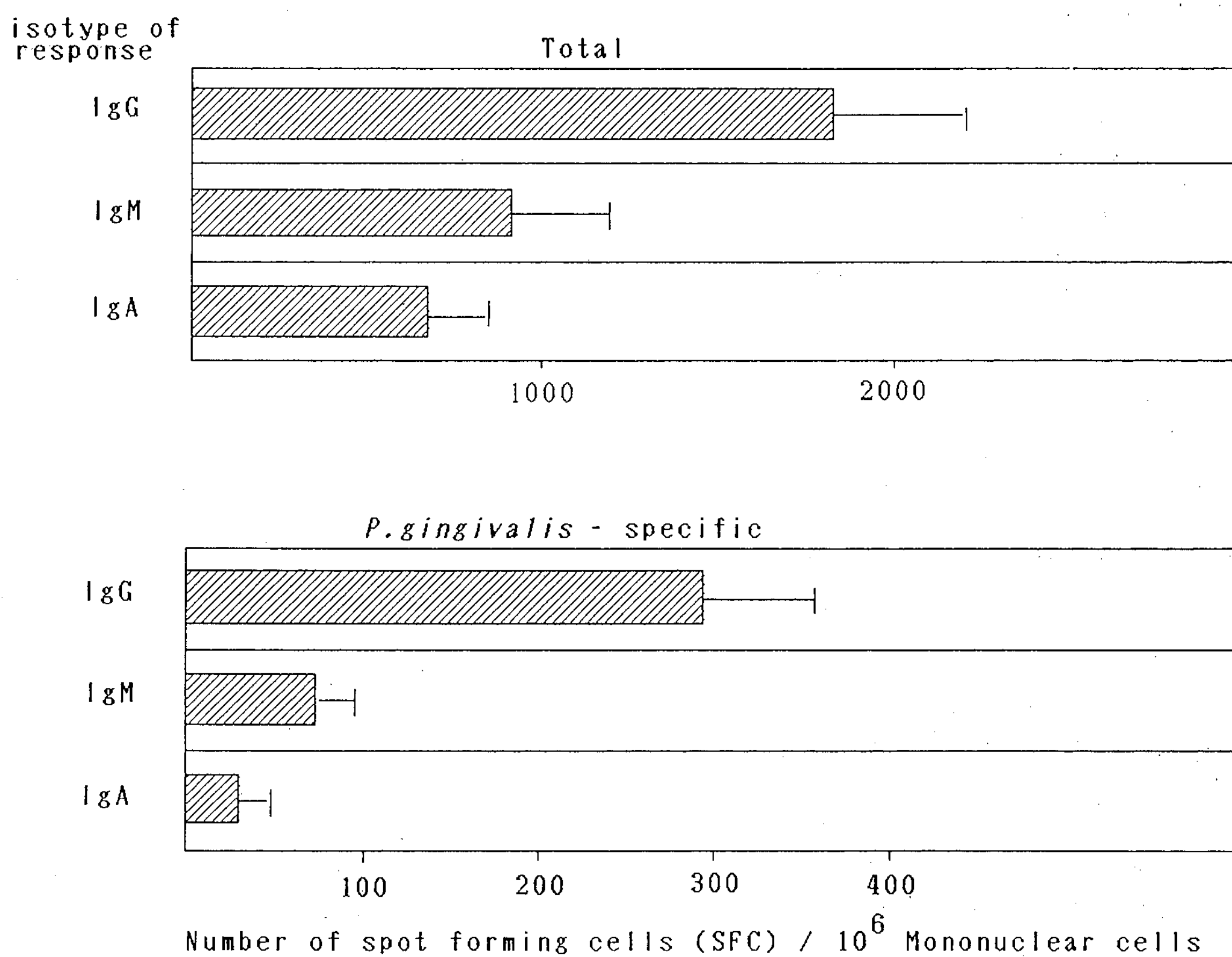


Figure 2. *Porphyromonas gingivalis*-specific, and total IgG, IgM and IgA SFC in mononuclear cells isolated from inflamed gingiva.

Each column and bar represents mean and standard error.

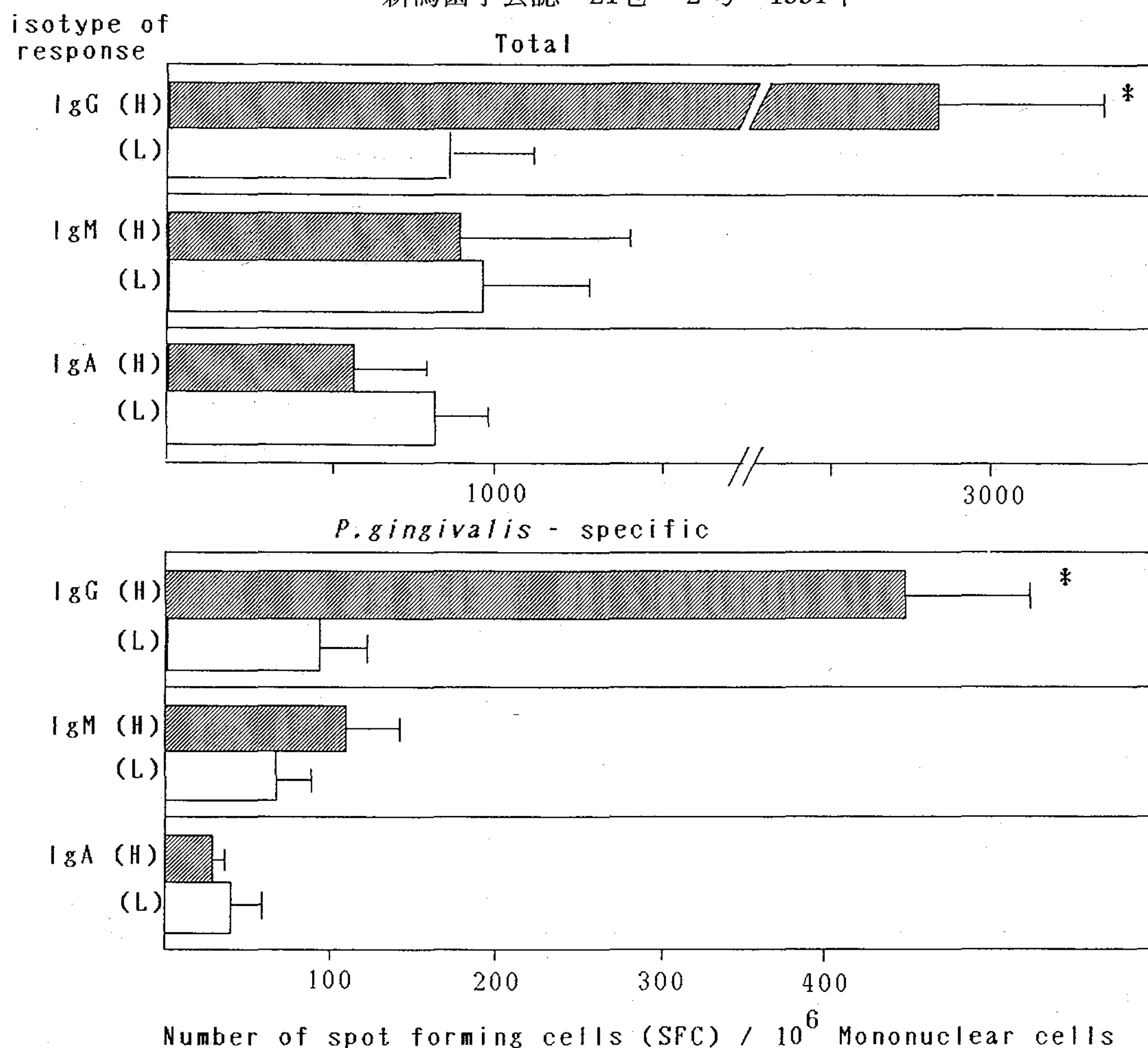


Figure 3. *P. gingivalis*-specific, and total each isotype SFC in mononuclear cells isolated from inflamed gingiva

Each column and bar represents mean and standard error.

\*: significant at  $p < 0.01$ .

H group: subjects with high IgG antibody level specific for *P. gingivalis* in serum (above 314 EU),

L group: subjects with low IgG antibody level specific for *P. gingivalis* in serum (below 314 EU).

頻度であった。これを考え併せるとH群ではIgG抗原特異的抗体産生細胞の増加が著しかったといえる。更にH群ではIgG免疫グロブリン産生細胞も有意に増加していた ( $2871 \pm 498$  vs  $866 \pm 278$ : H群 vs L群)。しかしながら、IgM、IgAについては両群間に差は認められなかった (Figure 3)。

##### 5. 血清抗 *P. gingivalis* 抗体価と歯肉中の *P. gingivalis* 特異的抗体産生細胞との関係

各アイソタイプ毎に歯肉局所における *P. gingivalis* 特異的抗体産生細胞数と血清抗 *P. gingivalis* 抗体価の相関性を検討したところ、Figure 4に示すようにIgGについてのみ有意な相関が認められた。しかしながらIgM、IgAについては相関関係は認められなかった。

## 考 察

歯周炎の発生過程を免疫病理学的にまとめると、歯肉局所に浸潤した活性化B細胞が形質細胞へと分化、増殖し、抗原特異的抗体や多クローン性抗体を多量に産生するという結果を生む一連の免疫応答の現れであるという考え方が広く受け入れられている。成人性歯周炎の歯周ポケットから *P. gingivalis* が優勢に分離されるという多くの報告は、特異細菌が歯周炎の成立に深く関与していることを示唆するものである<sup>1,2,4,11)</sup>。一方、生体側からみると、これら特異細菌に対する血清や歯内溝滲出液中の抗体価が健常者のものと比較して上昇しているということ、スケーリングやルートプレーニングなどの初期治療によって抗原としての



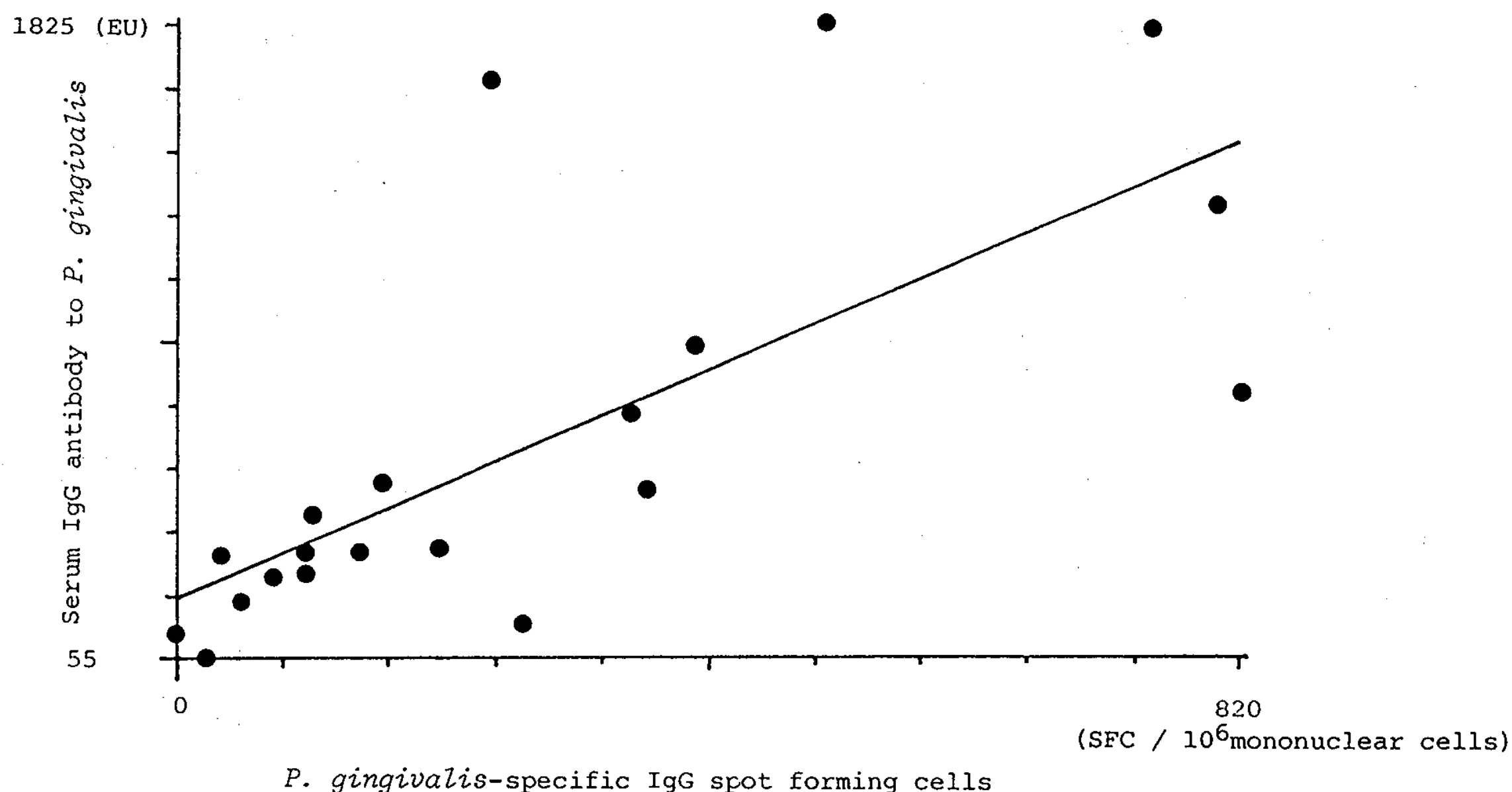


Figure 4. The correlation between IgG spot forming cells against *P. gingivalis* in inflamed gingiva and serum IgG antibody levels to *P. gingivalis*

$r=0.782$ ;  $r$ : coefficient of correlation. significant at  $p<0.001$ .

*P. gingivalis* を歯周ポケット内から除去すると抗体価の低下が認められることは、炎症歯肉局所において一連の免疫応答が惹起されていることを裏付けるものである。IgG 抗 *P. gingivalis* 抗体が炎症歯肉で産生されるということを証明した報告は、1980年、Kagan が蛍光抗体法を使用して歯肉組織中に *P. gingivalis* に対する抗体を保有する形質細胞を見いだしたものがあに過ぎない。炎症の進行に伴い *P. gingivalis* 特異的抗体を保有する形質細胞が増加すると報告した<sup>24)</sup>。

さて1983年、Czerkinsky らによって考案された ELISPOT 法は歯肉の局所におこる抗原抗体反応を *vitro* で測定することを可能にした<sup>22)</sup>。すなわち歯周炎罹患歯肉中に *P. gingivalis* 特異的抗体産生細胞が存在することを直接証明させ得るものである。ELISPOT 法を用いた Ogawa<sup>23)</sup> らは、*P. gingivalis* の線毛抗原特異的抗体産生細胞は歯周炎の進行と共に高頻度に認められ、進行した病変部では、IgG、IgA それぞれの免疫グロブリン産生細胞に対して5%の頻度で認められたと報告している。同じELISPOT 法を用いた本研究の結果の方が、*P. gingivalis* 特異的抗体産生細胞が高頻度に検出されたが、この理由として著者らが抗原としてホルマリン処理

全菌体を用いたために生じた差違と考えられる。すなわち精製された抗原より全菌体のほうがより多くの抗原性を有していたということになる。患者血清中の抗 *P. gingivalis* 抗体価は健康な歯周組織を有するコントロール群に比べてIgGで上昇していたが、炎症歯肉においても同様に *P. gingivalis* に対する特異抗体産生細胞の主たるアイソタイプはIgGであった。抗原に対する抗体反応のサブクラスがIgMではなくIgGとIgAで優勢であるのは、抗原に対する典型的な2次応答と考えられる。マウスでは *P. gingivalis* を経口的に投与し、さらにブースターすることによって血清中のIgG抗体価の上昇が誘導される<sup>25)</sup>。 *Streptococcus mutans* (*S. mutans*) 由来の合成ペプチドを経口的に免疫することによって血清中のIgG抗体と唾液中のIgA抗体の増加が認められるという報告もある<sup>26)</sup>。本研究では *P. gingivalis* の検出率はH群で50%と高かったが、このことにより歯周ポケット内に存在する *P. gingivalis* が持続的な刺激として作用し、ブースター効果を果たし、高い血清抗体価、あるいは炎症局所における高頻度な *P. gingivalis* 特異的抗体産生細胞の存在に結びついたのかもしれない。しかし *P. gingivalis* を検出できなかったにもかかわらず、血清抗体が上

昇していたり、炎症歯肉中に *P. gingivalis* 特異的抗体産生細胞が存在していた理由としていくつか考えられる。まず第一に、*P. gingivalis* の検出限界より低い濃度での感作が長期間にわたって生じていたことが考えられる。第二は *P. gingivalis* による感作はごく短期間のものだった可能性がある。抗原特異的B細胞を誘導したり、メモリー細胞の活性化には特異抗原による刺激が必要となるが、2次応答が誘導されると、活性化した細胞の分化、増殖にはごく低濃度の抗原、あるいは Interleukin-2 (IL-2)、IL-6 等の存在で十分維持できるからである。そして炎症歯肉中のリンパ球はこれらの液性因子を産生することが報告されている<sup>27-29)</sup>。

特異的な抗体産生に対し、多クローン性活性がどの様に作用するのか、特異抗体産生細胞を増強するのか、或は抗体産生系にネガティブなフィードバックとして作用しているかどうかはいまだ不明である。Mallison らは破傷風菌によって免役されたヒト歯肉溝滲出液中に抗破傷風菌抗体の上昇が認められたと報告している<sup>31,32)</sup>。末梢血中で、ある細菌により活性化されたB細胞が歯肉局所へ浸潤し、活性化されて抗体産生細胞へと分化することも考えられる。また、*Fusobacterium nucleatum* はPWMと同様に、多クローン性に破傷風菌や *Actinobacillus actinomycetemcomitans* に対する抗体産生を増強するといわれている<sup>33)</sup>。*P. gingivalis* そのものがアジュバント効果を有するという報告もある<sup>34)</sup>。このように歯周炎関連細菌が多クローン活性を有し、抗体産生を増強する可能性も考えられる<sup>35)</sup>。先にも述べたが、Kono らは歯肉より抽出した単核細胞の培養上清を同一患者の末梢血単核細胞に加えた培養系でIgG、IgM、IgA抗体産生細胞数の増加を認めている。これらの増加は抗IL-6抗体によって抑制される<sup>28)</sup>。これらの報告を総括してみると、歯周病原性細菌に対する特異抗体産生は歯周ポケットに存在する様々な細菌のもつ多クローン性B細胞活性化因子や炎症局所で産生される液性因子によって増強されることが考えられる。H群ではL群に比べて総菌数も2倍と多かったが、これは単に抗原量として多かつ

たことの他に、多くの多クローン活性を有する細菌を含んでいる可能性も考えられる。*P. gingivalis* 特異的抗体産生細胞が末梢血でごく僅かしかみいだせなかったことから、炎症歯肉や所属リンパ節<sup>30)</sup>での抗体産生が血清中のIgG抗*P. gingivalis*抗体価の上昇につながったものと考えられる。さらに多様な液性因子や多クローン性活性によって、*P. gingivalis* 特異的抗体産生細胞増強されているのかもしれない。

著者らは歯周病変部で生じているIgG抗原特異的抗体産生細胞がアイソタイプの一致した血清抗体価と相関性があることを証明した。H群ではL群より年齢がやや若いことを考えると、年齢を一致させた場合、H群では歯周の支持の破壊がやや進んでいると思われる。*P. gingivalis* に対する血清抗体価が上昇している患者では歯周組織の破壊も進んでいるという報告がある<sup>11,15,36)</sup>が、本研究においても血清抗体価の変動が歯周病変部で生じた抗体産生を強く反映していることを示唆している。すなわち炎症局所における抗原特異的免疫反応の imbalance が歯周組織の破壊と結びつく可能性が考えられる。しかし *P. gingivalis*、或は他の歯周炎関連細菌特異的B細胞の果たす役割については未だ不明な点が多く、破壊に関与するのか、または宿主の防御に関与するのかについて論ずるためには更なる研究が必要となろう。

## 結 論

歯周炎罹患者20名から炎症歯肉を採取、単核細胞を分離し、*P. gingivalis* 特異的抗体産生細胞の頻度を検索した。併せて患者血清抗体価との関連性も検討し、以下の結論を得た。

1. 炎症歯肉における免疫グロブリン産生細胞の主たるアイソタイプはIgGであった。IgG、IgM、IgAの免疫グロブリン産生細胞に対する *P. gingivalis* 特異的抗体産生細胞の割合はそれぞれ16.0% (IgG)、8.4% (IgM)、5.4% (IgA) であった。
2. 血清抗 *P. gingivalis* 抗体価の高い患者群では、炎症歯肉中のIgG *P. gingivalis* 特異的抗体産生細胞、及びIgG免疫グロブリン産生細胞

が有意に増加していた。

3. IgG血清抗 *P. gingivalis* 抗体価は炎症歯肉内の *P. gingivalis* 特異的抗体産生細胞と強い相関性がみられた。
4. 本研究から炎症局所における抗原特異的免疫反応の imbalance が歯周組織の破壊に結びつく可能性が強く示唆された。

## 謝 辞

本稿を終えるにあたって本研究の遂行に当り懇切丁寧な御教示並びに御助言を賜りました本学口腔細菌学教室、星野悦郎教授に謹んで感謝の意を表します。

本研究の一部は平成2年度科学研究費補助金(奨励研究A)、課題番号(02771326)の補助を受け手行われたことを付記する。

## 参 考 文 献

- 1) Dzink, J. L., Socransky, S. S., Haffajee, A. D. : The predominant cultivable microbiota of active and inactive lesions of destructive periodontal diseases. *J. Clin. Periodontol.*, **15**: 316—323, 1988.
- 2) Mandell, P. L., Ebersole, E. L., Socransky, S. S. : Clinical immunologic and microbiologic features of active disease sites in juvenile periodontitis. *J. Clin. Periodontol.*, **14**: 334—340, 1987.
- 3) Moore, W. E. C., Holdeman, L. V., Smibert, R. M., Hash, D. E., Burmeister, J. A., Ranney, R. R. : Bacteriology of severe periodontitis in young adult humans. *Infect. Immun.*, **38**: 1137—1148, 1982.
- 4) Moore, W. E. C., Holdeman, L. V., Cato, E. P., Smibert, R. M., Burmeister, J. A., Ranney, R. R. : Bacteriology of moderate (chronic) periodontitis in mature adult humans. *Infect. Immun.*, **42**: 510—515, 1983.
- 5) Moore, W. E. C., Holdeman, L. V., Cato, E. P., Smibert, R. M., Burmeister, J. A., Palcanis, K. G., Ranney, R. R. : Comparative bacteriology of juvenile periodontitis. *Infect. Immun.*, **48**: 507—519, 1985.
- 6) Simonson, L. G., Goodman, C. H., Bial, J. J., Morton, H. E. : Quantitative relationship of *Treponema denticola* to severity of periodontal disease. *Infect. Immun.*, **56**: 726—728, 1988.
- 7) Zambon, J. J., Umemoto, T., Denarden, E., Nakazawa, F., Christersson, L. A., Genco, R. J. : *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in the pathogenesis of human periodontal disease. *Adv. Dent. Res.*, **2**: 269—274, 1988.
- 8) Naito, Y., Okuda, K., Takazoe, I. : Immunoglobulin G response to subgingival gram-negative bacteria in human subjects. *Infect. Immun.*, **45**: 47—51, 1984.
- 9) Ebersole, J. L., Taubman, M. A., Smith, D. J. : Gingival crevicular fluid antibody to oral microorganisms. II. Distribution and specificity of local antibody responses. *J. Periodont. Res.*, **20**: 349—356, 1985.
- 10) Tew, J. G., Marshall, D. R., Burmeister, J. A., Ranney, R. R. : Relationship between gingival crevicular fluid and serum antibody titers in young adults with generalized and localized periodontitis. *Infect. Immun.*, **49**: 487—493, 1985.
- 11) Horino, K., Yoshie, H., Hara, K. : Correlation between serum and gingival crevicular fluid antibodies and periodontal status. *J. Dent. Res.*, **68**. (Sp Iss) : 1688—1690, 1989.
- 12) Lamster, I. B., Celenti, R., Ebersole, J. L. : The relationship of serum IgG antibody titers to periodontal pathogens to indicators of the host response in crevicular fluid. *J. Clin. Periodontol.*, **17**: 419—425, 1990.



- 13) Ebersole, J. L., Taubman, M. A., Smith, D. J., Haffajee, A. D. : Effect of subgingival scaling on systemic antibody response to oral microorganisms. *Infect. Immun.*, **48**: 534-539, 1985.
- 14) Vincent, J. W., Falkler Jr., W. A., Cornett, W. C., Suzuki, J. B. : Effect of periodontal therapy on specific antibody responses to suspected periodontopathgens. *J. Clin. Periodontol.*, **14**: 412-417, 1987.
- 15) Murray, P. A., Burstein, D. A., Winkler, K. R. : Antibodies to *Bacteroides gingivalis* in patients with treated and untreated periodontal disease. *J. Periodontol.*, **60**: 96-103, 1989.
- 16) Schei, O., Waerhaug, J., Lovdal, A., Arno, A. : Alveolar bone loss as related to oral hygiene and age. *J. Periodontol.*, **30**: 7-15, 1959.
- 17) Loe, H. : The gingival index, the plaque index and the retention index systems. *J. Periodontol.*, **38**: 610-616, 1967.
- 18) Yamashita, K., Ohfuji, Y., Yoshie, H., Hara, K. : Blastogenic response and immunoglobulin production by inflamed gingival lymphocytes from dogs. *J. Periodont. Res.*, **23**: 322-327, 1988.
- 19) Lee, S-K., Singh, J., Taylor, R. B. : Subclasses of T cells with different sensitivities to cytotoxic antibody in the presence of anesthetics. *Eur. J. Immunol.*, **5**: 259-262, 1975.
- 20) 永井 淳, 栗原英見, 木下正彦, 松尾美千代, 清水秀樹, 戸田洋子, 野村慶雄, 村山洋二, 苔口 進, 加藤慶二郎: 歯周病原性細菌に対する血清抗体測定のための酵素免疫測定法 (ELISA) の検討. *日歯周誌*, **26**: 317-328, 1984.
- 21) Slots, J., Hafström, C., Rosling, B., Dahlén, G. : Detection of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Bacteroides gingivalis* in subgingival smears by the in direct fluorescent-antibody technique. *J. Periodont. Res.*, **20**: 316-320, 1985.
- 22) Czerkinsky, C. C., Nilsson, L-A., Nygren, H., Ouchtelony O., Tarkowski, A.; A solid-phase enzyme-linked immunospot (ELISPOT) assay for enumeration of specific antibody-secreting cells. *J. Immunol. Methods.*, **65**: 109-121, 1983.
- 23) Ogawa, T., McGhee, M. L., Moldoveanu, Z., Hamada, S., Mestecky, J., McGhee J. R., Kiyono, H. : *Bacteroides*-specific IgG and IgA subclass antibody-secreting cells isolated from chronically inflamed gingival tissues. *Clin. exp. Immunol.*, **76**: 103-110, 1989.
- 24) Kagan, J. M. : Local Immunity to *Bacteroides gingivalis* in periodontal disease. *J. Dent. Res.*, **59**: 1750-1756, 1980.
- 25) Ogawa, T., Shimauchi, H., Hamada, S. : Mucosal and systemic immun responses in BALB/C mice to *Bacteroides gingivalis* fimbriae administered orally. *Infect. Immun.*, **27**: 3466-3471, 1989.
- 26) Lehner, T., Haron, J., Bergmeier, L. A., Mehilert, A., Beard, R., Dodd, M., Mielnik, B., Moore, S. : Local oral immunization with synthetic peptides induces a dual mucosal IgG and salivary IgA antibody response and prevents colonizaton of *Streptococcus mutans*. *Immunol.*, **67**: 419-424, 1989.
- 27) Seymour, G. J., Cole, K. L., Powell, R. N., Lewins, E., Cripps, A. W., Clancy, R. L. : Interleukin-2 production and bone resorption activity in vitro by unstimulated lymphocytes extracted from chronically-inflamed human periodontal tissues. *Archs. Oral. Biol.*, **30**: 481-484, 1985.



- 28) Kono, Y., Beagley, K. W., Fujihashi, K., McGhee, J. R. Taga, T., Hirano, T., Kishimoto, T., Kiyono, H. : Cytokine regulation of localized inflammation, Induction of activated B cells and IL-6-mediated polyclonal IgG and IgA synthesis in inflamed human gingiva. J. Immunol., **146**: 1812-1821, 1991.
- 29) Matsuki, Y., Yamamoto, T., Hara, K. : Detection of inflammatory cytokine mRNA-expressing cells in human inflamed gingiva by combination in situ hybridization and immunohistochemistry. Immunol., in press, 1992.
- 30) Brandtzaeg, P., Tolo, K. : Mucosal penetrability enhanced by serum-derived antibodies. Nature, **266**: 262-263, 1977.
- 31) Mallison III, S. M., Szakal, A. K., Ranney, R. R., Tew, J. G. : Antibody synthesis specific for nonoral antigens in inflamed gingiva. Infect. Immun., **56**: 823-830, 1988.
- 32) Mallison III, S. M., Kaugars, C., Szakal, A. K., Schenkein, H. A., Tew, J. G. : Synthesis of antibody specific for nonoral antigen in the gingiva of periodontitis patients. J. Periodontol. Res., **24**: 214-216, 1989.
- 33) Tew, J., Thomas, S. S., Ranney, R. R. : *Fusobacterium nucleatum*-mediated immunomodulation of the *in vitro* secondary antibody response to *tetanus* toxoid and *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. J. Periodont. Res., **22**: 506-512, 1987.
- 34) Ochiai, K., Kurita, T., Nishimura, K., Ikeda, T. : Immunadjuvant effects of periodontitis-associated bacteria. J. Periodont. Res., **24**: 322-328, 1989.
- 35) Tew, J., Engel, D., Mangan, D. : Polyclonal B-cell activation in periodontitis. J. Periodont. Res., **24**: 225-241, 1989.
- 36) Miyoshi, T., Hanazawa, S., Hirose, K., Saitoh, K., Amano, S., Ohmori, Y., Kitano, S. : Humoral antibody response against *Bacteroides gingivalis*-specific antigen recognized by monoclonal antibody in adult periodontal patients. Infect. Immun., **53**: 366-371, 1986.