

氏名	郭 淑 娟
授与した学位	博 士
専攻分野の名称	歯 学
学位授与番号	博甲第 2014 号
学位授与の日付	平成12年3月25日
学位授与の要件	歯学研究科歯学専攻（学位規則第4条第1項該当）
学位論文題名	Antibody responses against <i>Porphyromonas gingivalis</i> infection in the patients with early-onset periodontitis
論文審査委員	教授 渡邊達夫 教授 福井一博 教授 村山洋二

学位論文内容の要旨

【緒言】

早期発症型歯周炎（EOP）の病態には宿主のリスク因子が関わっている。歯周病細菌に対する体液性免疫応答の異常は、EOP のひとつのリスク因子であり、それに関する研究は多い。それらは、歯周病細菌 *Porphyromonas gingivalis* (Pg) に対する EOP 患者の体液性免疫応答について、全菌体および菌表層抗原（線毛、莢膜、リポ多糖、外膜蛋白抗原など）に対する血清抗体反応を、抗体価や抗原・抗体結合力から調べたものである。その結果、EOP 患者は健常者に比較して概ね血清抗体価が高く、抗体の結合力は低いとされている。しかし、EOP 患者の個々が示す抗体反応は千差万別であり、個体レベルでは、体液性免疫応答の病態が明らかにされているとは言い難い。

本研究は、EOP 患者の Pg に対する血清抗体反応の特性を個体毎に評価できるようにするために、1) Pg 全菌体抗原に対する血清 IgG 抗体価と抗体結合力の関連を調べ、2) 抗体が認識する Pg 外膜抗原を特定し、3) Pg-LPS で刺激したヒト末梢血単核球が産生する炎症性サイトカインであるインターロイキン-1 β (IL-1 β) がどのような患者血清によって抑えられるかを調べようとするものである。

【材料および方法】

1. 被験者と血清： 被験者は臨床症状から分類した EOP 患者 16 名（男性 9 名，女性 7 名，平均年齢 26 才）と成人性歯周炎患者 20 名（AP：男性 5 名，女性 15 名，平均年齢 52 才），および、健常者 18 名（HS：男性 9 名，女性 9 名，平均年齢 25 才）に分類した。なお、患者の歯周ポケットプラークからは Pg を検出できたが、健常者からはひとりしか検出できなかった。被験血清は、常法に従って被験者から採血・分離した。
2. 供試菌株および外膜蛋白抗原とリポ多糖の調製： Pg FDC 381 を供試菌株とし、苔口らの方法に従って培養した。全菌体抗原は全菌体を超音波破碎することによって得た。外膜蛋白抗原 (Pg-OMA) は、Mansheim と Kasper の方法に準じて調製した。リポ多糖 (Pg-LPS) は、神奈川歯科大学の梅本俊夫教授から恵与を受けた。
3. 血清 IgG 抗体価と抗体結合力の測定： Pg 全菌体抗原と Pg-LPS に対する血清 IgG 抗体価は、ELISA 法を用いる Murayama らの方法に従って測定し、ELISA unit (EU) で表した。抗体結合力は、MacDonald らの方法に従って、ELISA 法で得た吸光度 (OD) を 50%減少させる NH₄SCN のモル濃度 (M) で表した。

4. **SDS-PAGE とイムノブロッティング**： SDS-PAGE は、Pg-OMA を還元下で 10%ポリアクリルアミドゲルを用いて行った。 イムノブロッティングは、SDS-PAGE したものを PVDF 膜 (Millipore 社) に転写して、被験血清と室温で 1 時間して、さらにペルオキシダーゼ標識ヤギ抗ヒト IgG 抗体と 37°C で 1 時間反応させることによって行った。 なお、抗原・抗体結合物は 4-メトキシ-1-ナフトールと過酸化水素による発色によって検出した。
5. **ヒト末梢血単核球が産生する IL-1 β 量の測定**： Pg-LPS で刺激したヒト末梢血単核球が産生する IL-1 β の定量は、Bainbridge らの方法に準じて行った。 健康なドナーから分離した末梢血単核球 (4×10^5 cells/well) に各種患者血清に Pg-LPS を前もって反応させたものを加え、37°C で 24 時間刺激した時の培養液上清が含む IL-1 β を、ヒト IL-1 β ELISA キット (ENDOGEN 社) を用いて定量した。 なお、IL-1 β 産生への影響を調べる系で用いた患者血清は、非動化して用いた。

【結果】

1. EOP および AP 患者の血清 IgG 抗体価には高いものや低いものがあり、大きな個体差があった (EOP : $533 \text{ EU} \pm 507$, AP : $509 \text{ EU} \pm 572$)。 患者血清の抗体結合力は HS のものより高かった (EOP : $1.2 \text{ M} \pm 0.4$, AP : $1.3 \text{ M} \pm 0.4$, HS : $0.6 \text{ M} \pm 0.3$)。 抗体価と抗体結合力は、EOP および AP 患者それぞれにおいて、有意な相関を示した (EOP : $r=0.91$, AP : $r=0.72$, $p<0.0005$)。
2. EOP と AP 患者血清は、HS の血清に比較して高頻度に Pg-LPS または 53-kDa の外膜蛋白と反応した ($p<0.05$; χ^2 test)。 しかし、反応を示す抗原の種類は各様であった。
3. Pg-LPS に対する IgG 抗体価は、Pg 全菌体抗原に対する IgG 抗体価に強い相関を示した (EOP : $r=0.81$, $p=0.0002$, AP : $r=0.87$, $p<0.0001$)。
4. Pg-LPS で刺激した末梢血単核球からの IL-1 β 産生量を、HS の血清存在下で反応させた時を基準に比較した。 EOP 患者では Pg-LPS に対する抗体価が低いと IL-1 β 産生量は多く、抗体価が高いと IL-1 β 産生量は少なかった。 一方、AP 患者では EOP 患者のような著明な結果がなかった。

【考察】

EOP 患者における各種 Pg 抗原に対する抗体反応性は平均値で捉える限り、Pg 感染に対して抗体を産生し、抗体の親和性を高め、Pg 外膜の LPS および蛋白抗原を認識するというものであった。しかし、患者血清を抗体価および結合力の高低によって分類した時に血清機能は、EOP と AP 患者で違いを示した。 EOP 患者の Pg-LPS に対する低い抗体価を示すものは、単核球からの Pg-LPS による IL-1 β 産生を抑制しなかった。 これは、そのような患者では単核球の機能を十分に抑制できず、結果として Pg-LPS の免疫・炎症反応を抑制し難くなるものと推察される。 すなわち、Pg 抗原に対する IgG 抗体反応の低い EOP 患者は、抗体産生能力が低く、抗体結合力も弱く、さらに抗体の Pg-LPS が誘導する IL-1 β 産生の抑制力も弱いことになる。これによって EOP 患者にはサブグループがあり、体液免疫反応の多様性のあることが分かった。

【結論】

Pg 外膜の LPS は EOP 患者が認識する重要な抗原であり、そのものに対する抗体反応の低い EOP 患者は、LPS に対する抗原提示あるいは抗体産生系が十分に作動せず、Pg-LPS による炎症反応を増悪すると考えられる。

論文審査結果の要旨

本研究は早期発症型歯周炎（EOP）患者の歯周病原性細菌 *Porphyromonas gingivalis*（Pg）に対する血清抗体反応の特性を個体毎に評価できるようにすることを目指して、1）EOP 患者血清における Pg 全菌体抗原に対する IgG 抗体価と抗体結合力の関連を調べ、2）EOP 患者血清の抗体が認識する Pg 外膜抗原を特定し、そして、3）Pg-リポ多糖（Pg-LPS）で刺激したヒト末梢血単核球が産生する炎症性サイトカインが患者血清によってどのように抑えられるかを調べた。

論文には次の知見が記されている：

- 1) EOP 及び成人性歯周炎患者の血清 IgG 抗体価と結合力には大きな個体差があるが、抗体価と抗体結合力は有意に相関する。
- 2) EOP 及び成人性歯周炎患者の血清は高頻度に Pg-LPS または 53-kDa の外膜蛋白に反応する。
- 3) Pg-LPS に対する IgG 抗体価は、Pg 全菌体抗原に対する IgG 抗体価に強い相関を示す。
- 4) Pg-LPS に対する抗体価の低い EOP 患者は、末梢血単核球からの Pg-LPS による IL-1 β 産生の様態を他の歯周病患者のそれとは異にする。

本研究結果はEOP患者にはPg-LPSに対する抗体反応の低いことによって分類し得るサブグループのあることを示唆したことになる。

したがって、本申請論文は学位論文に値すると認める。