



Methanobrevibacter oralis およびヒトのグループ II シャペロニンに
対する免疫応答の解析

岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 病態制御科学専攻
病態機構学講座 歯周病態学分野

平井公人

Serum antibody response to group II chaperonin from
Methanobrevibacter oralis and human chaperonin CCT

Department of Pathophysiology - Periodontal Science,
Okayama University Graduate School of Medicine, Dentistry and Pharmaceutical Sciences

Kimito HIRAI

(平成 24 年 12 月 14 日受付)

緒言

古細菌は、膜脂質に特徴的な構造を持っており、遺伝子情報をもとにした系統解析の結果から細菌よりも真核生物に類似するとされ、細菌とも真核生物とも異なる第三のドメインとして分類されている¹⁾。その生息範囲は自然界に広く分布しており、高温、高塩濃度、さらに強酸性条件などの極限環境からも分離されている²⁻⁴⁾。ヒトの生体内においては、メタン生成古細菌の一種である *Methanobrevibacter* 属が、口腔内⁵⁾、腸内⁶⁾、さらに膣⁷⁾などから分離、同定されている。

歯周病は歯肉縁下の微生物が形成するバイオフィルムに起因する炎症性疾患であり、*Porphyromonas gingivalis* に代表されるグラム陰性桿菌が病原因子の主体であると考えられてきた⁸⁾。しかし、バイオフィルム細菌叢の分子生物学的な解析によって、病態に関与する微生物は従来考えられていた以上に多岐にわたることが明らかになってきた。歯肉縁下のプラークから検出されるメタン生成古細菌 *Methanobrevibacter oralis* は、新規の病原因子候補のひとつとして注目され、歯周病の重症度に相関して検出率や総菌数に対する割合が高くなる事が報告されている^{9, 10)}。また、水素化合物を利用するために偏性嫌気性菌である *Treponema* 属と拮抗関係にあることが報告されており⁹⁾、プラーク構成細菌群と共生あるいは拮抗関係を成立させ

ることによって細菌叢を変化させ、プラークの病原性に影響を与える可能性が示唆されている。その他にも、偏性嫌気性菌である *Synergistes* 属とメタン産生古細菌が栄養共生の関係にあること¹¹⁾や、重度の歯周炎局所において古細菌と硫酸塩還元細菌とが共生していること¹²⁾が明らかとなってきた。

上記したように、歯周病病原因子としての古細菌の研究は、他の歯周病原細菌との関連性から展開されている。その一方、我々の研究グループでは古細菌に対する宿主の免疫応答性について着目し、研究を行ってきた。これまでに、古細菌の菌体成分の中に歯周病患者血清中の Immunoglobulin G (IgG) 抗体と反応する抗原性の高いタンパクが存在していること¹⁰⁾、そのタンパクのひとつが古細菌のグループ II シャペロニンであること¹³⁾、さらにそのシャペロニンがヒトのグループ II シャペロニンである CCT (Chaperonin containing T-complex polypeptide) とアミノ酸一次配列の類似性から交差反応する可能性があること¹³⁾を明らかにしてきた。

シャペロニン (Cpn) とは、分子量約 60 kDa のタンパク質であり、新しく合成されたポリペプチド鎖や様々なストレスにより損傷を受けたポリペプチド鎖のフォールディングを補助する役割を担っている^{14,15)}。Cpn は大きく二つのグループに分類される^{16,17)}。真核生物は両グループの Cpn を保有し、グループ I には真核生物の熱ショックタンパク (HSP60) や、原核生物 (真正細菌) の Cpn (GroEL) などが分類され、

グループ II には真核生物の CCT や古細菌の Cpn が分類される¹⁸⁾。構造上の特徴としては、真核生物の HSP60 は単一のサブユニットで構成される 7 量体のリングが 2 つ重なった 14 量体であり、真核生物の CCT は 8 種類のサブユニットで構成される 8 量体のリングが 2 つ重なった 16 量体の分子である¹⁹⁾。古細菌の Cpn は 2 種類のサブユニットで構成される 8 量体のリングが 2 つ重なった 16 量体であり、サブユニットの種類に差があるものの立体構造の共通点が多い。また、アミノ酸の一次配列はグループ I とグループ II の Cpn 間では、大きく異なっているものの、同一グループ内でのアミノ酸配列は高く保存されている。このように Cpn は真正細菌からヒトに至るまで、進化の過程でアミノ酸配列や立体構造が大変良く類似した分子である。通常このように種を越えて保存された相同性の高い分子は抗原性を示さないが、細菌の HSP60 は抗原性が高いことが知られており、細菌間の共通抗原あるいはヒト HSP との交差反応抗原として、感染症や自己免疫疾患において標的分子となると考えられている^{20, 21)}。

歯周病においても、歯周病原細菌である *P. gingivalis* が保有する HSP60 はヒトの HSP60 に対する交差反応抗原であり、自己免疫応答の誘導から歯周組織の破壊や動脈硬化の進行に関与していると考えられている²²⁻²⁶⁾。このように、グループ I Cpn に対する報告が大変多い一方で、グループ II Cpn では抗原性に関する研究報告は非常に少ない。唯一あるのは、自己免疫疾患患者の血清中において、CCT に対する自己抗体

の量が健常者と比較して上昇しているという報告のみである²⁷⁾。この研究報告では、アミノ酸配列の類似性が少ない真正細菌のグループ I Cpn との交差反応性から CCT に対する自己免疫応答の発症機序が考察されている。これは、グループ II Cpn を保有する古細菌感染症の概念が未だ定着していなかったためと推察できる。古細菌の Cpn はヒト CCT の交差反応抗原となる可能性を持ち、両者の交差反応が CCT に対する自己免疫応答の誘導、あるいは修飾につながる可能性は高いと考えられる。そこで本研究では、歯周病ならびに自己免疫疾患患者の血清を用いて、*M. oralis* の Cpn ならびに CCT に対する免疫応答性を解析した。

材料と方法

1. 抗原

市販されているヒトのリコンビナン CCT サブユニットである CCT1, CCT5, CCT6 (Abnova Co, Taipei, Taiwan), ならびにヒトのリコンビナント HSP60 (Stressgen, Ann Arbor, MI, USA) を購入し, 患者血清との反応に使用した。市販されていない CCT サブユニットの CCT3, CCT4, CCT8, ならびに *M. oralis* の Cpn は以下に記載する方法でリコンビナントタンパクを合成し, 患者血清との反応に使用した。

2. リコンビナントシャペロンタンパクの構築

ヒトの CCT3, CCT4, CCT8, ならびに *M. oralis* の Cpn の合成は, CellFree Sciences 社に依頼し, コムギ胚芽無細胞タンパク合成技術²⁸⁾ (CellFree Sciences, 愛媛, 日本) を応用して以下の手順で行った。

1) 古細菌ゲノム DNA ならびにヒト相補鎖 DNA (cDNA) の調整

M. oralis DSM 7256 株は Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (Braunschweig, Germany) から購入した。購入した培養液中の菌体を遠心操作で回収し, リン酸緩衝液 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) で 2 回洗浄した。ゲノム DNA の抽出は, キレート作用による InstaGeneTMMATRIX (BIO-RAD Laboratories,

Richmond, CA, USA) を用いて行った²⁹⁾。すなわち回収した菌体に InstaGene™MATRIX を 200 μ l 加え、56°C にて 30 分間反応させ、100°C にて 8 分間熱処理を加えた後、遠心して得た上清をゲノム抽出液とした。

ヒト由来の相補鎖 DNA (cDNA) の調整には、ヒト単球系細胞株 THP-1 (ATCC, Manassas, VA, USA) を用いた。培養は、56 °C で 30 分間非働化した 10 % ウシ胎児血清 (FBS), 1 % L-グルタミン酸, 1 % ペニシリン・ストレプトマイシン, 1 mM ピルビン酸ナトリウム (以上, すべて Invitrogen), および 10 mM HEPES (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) を含む RPMI1640 培地 (Invitrogen) を用いて、37 °C, 5 % 炭酸ガス存在下で行った。全 RNA の抽出には、シリカゲルメンブレンへの吸着を利用した RNeasy Mini Kit (QIAGEN, Hilden, Germany) を使用した。混入したゲノム DNA を分解するため、Ribonuclease inhibitor (Invitrogen) 存在下で、RNA 抽出液にリコンビナント DNase I (TAKARA, 滋賀, 日本) を加えて、常温で 15 分間処理した。次に 25 μ M EDTA (Invitrogen) を添加し、65 °C で 10 分間反応させ、DNase を不活化したものを全 RNA 標品として逆転写反応に使用した。全 RNA の濃度は、吸光度計 (Nano Drop 2000, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MI, USA) を用いて計測した。

cDNA への逆転写には、精製した全 RNA (1 μ g) を鋳型として、0.5 μ M deoxynucleoside-triphosphate (dNTPs) 存在下で、5 nM dithiothreitol (DTT) を混和し、

0.5 μg の oligo(dT)₁₂₋₁₈ primer, および 200 units の逆転写酵素 SuperScript™ III (Invitrogen) を使用した。逆転写反応は, 43 °Cの条件下で 50 分間行った。

2) 標的遺伝子の増幅

標的遺伝子(ヒト CCT3, CCT4, CCT8, および *M. oralis* の Cpn)の増幅は PCR (Nested PCR) 法³⁰⁾によって行った。各標的遺伝子のプライマーの設計は表 1 に記載した。

Nested PCR のプライマーには, *Xho* I および *Spe* I の制限酵素認識部位を付与した。PCR

反応には Ex-Taq® Hot Start Version (Takara) を使用し, 増幅反応には, サーマルサイ

クラー (PROGRAM TEMP CONTROL SYSTEM PC707, ASTEC, 福岡, 日本) を使用

した。反応条件は, DNA 鎖の熱変性を 98 °Cで 60 秒, プライマーのアニーリングは

58 °Cで 30 秒, ポリメラーゼによる相補鎖の合成を 72 °Cで 2.5 分を 35 サイクル行い,

最後に 72 °C で 10 分間の伸長ステップを付加した。1 回目の PCR で増幅した遺伝子

は, 1.2%アガロースゲルを用いた電気泳動法によって分離した [トリス-酢酸-エチレ

ンジアミン四酢酸 (TAE) 泳動緩衝液 100V, 30 分間]。分離した遺伝子断片は, 臭化

エチジウム (0.5 mg/ml) で染色し, 紫外線 (波長: 320 nm) 照射下にて確認しながら

ゲルから切り出した後, DNA のシリカゲルメンブレンへの吸着を利用した QIAEX®II

Gel Extraction Kit (Qiagen) を用いて精製した。精製した遺伝子断片 (50ng) は 2 回

目の PCR 反応 (Nested PCR) の鋳型として使用した。Nested PCR は 1 回目の PCR と同様の条件で行い、増幅した遺伝子断片は TAE 泳動緩衝液を用いたアガロース電気泳動で分離、確認した後に、1 回目 PCR と同様の原理を利用した QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen) を用いて精製した。

3) 発現用プラスミドの構築

増幅した各遺伝子断片 (ヒト CCT3, CCT4, CCT8, および *M. oralis* の Cpn) と、グルタチオン S-トランスフェラーゼ (GST) が付加される発現用ベクター pEU-E01-GST-TEV-MCS (CellFree Sciences) を制限酵素 *Xho* I と *Spe* I (Takara) を用いて切断した。制限酵素処理を行った各遺伝子断片とベクターは、TAE 泳動緩衝液を用いた 1.2 %アガロースゲルの電気泳動法によって分離し、臭化エチジウム (0.5 mg/ml) で染色した後、紫外線 (波長 : 320 nm) 照射下にて確認しながらゲルから切り出した、ゲル中の各遺伝子断片は QIAEX[®]II Gel Extraction Kit (Qiagen) を用いて精製した。精製した遺伝子断片と発現用ベクターとのライゲーション反応には T4 DNA Ligase (Takara) を使用した。得られたライゲーション溶液を用いて、通法に従い One Shot[®] TOP10 Chemically Competent *E. coli* (Invitrogen) を形質転換した。形質転換した大腸菌からシリカゲルメンブレンへの吸着を利用した QIAprep Spin Miniprep Kit

(Qiagen) を使用してプラスミドの精製を行い、インサート DNA のシーケンス解析を Applied Biosystems 3130xl Genetic Analyzer を使用して行った。そして、標的遺伝子が発現ベクターに組み込まれていることを確認した後、タンパク合成に使用する高濃度プラスミドを精製した。すなわち、組み換え大腸菌を 300ml の Luria Bertani (LB) 液体培地で培養し、 QIAGEN Plasmid Midi Kit (Qiagen) を使用してプラスミドの精製を行った。

4) リコンビナントタンパクの合成と精製

CCT3, CCT4, CCT8, および *M. oralis* の Cpn のリコンビナントタンパクの合成は、CellFree Sciences 社に委託し CFS-TRI-1240G kit (CellFree Sciences) と標的遺伝子を挿入して構築した pEU ベクターを使用して、標的遺伝子の転写と翻訳を行った²⁸⁾。以下に合成方法の概要を示す。標的遺伝子を組み込んだ pEU 発現ベクターを用いて、RNase inhibitor および、NTPs を含んだ反応緩衝液中で転写反応を行い、翻訳反応にはクレアチンキナーゼを加えたコムギ胚芽無細胞タンパク質合成用基質 (SUM-AMIX) と転写反応液、そして WEPRO 1240G (コムギ胚芽抽出液) の混合溶液中で行った。合成されたリコンビナントタンパクの精製は Glutathione Sepharose 4B (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) を使用したアフィニティークロマトグラフィーによって行っ

た。

なお、精製過程の各画分のサンプルはラウリル硫酸ナトリウム (SDS) を含む SDS サンプルバッファー [45 mM Tris-HCl, pH 6.8, 15 % グリセロール, 1 % SDS, 144 mM β -メルカプトエタノール] と混合して 5 分間煮沸して還元状態にした後、12.5 % アクリルアミドゲル、そして泳動用緩衝液 (25 mM Tris-HCl, 200 mM グリシン, 35 mM SDS) を使用した SDS-PAGE (SDS-polyacrylamide gel electrophoresis) で分離した。泳動後のゲルの染色にはクマシーブリリアントブルー (CBB R250) を使用した。

3. ドットブロット法

各 Cpn サブユニットを抗原として、患者血清との反応をドットブロット法で解析した。抗原に使用したリコンビナント Cpn は、ヒトの CCT1, CCT3, CCT4, CCT5, CCT6, CCT8, HSP60, ならびに *M. oralis* の Cpn を使用した。ドットブロットは各リコンビナントタンパクを最終濃度が 125 $\mu\text{g/ml}$ となるようにトリス緩衝液 (TBS : 10 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH 7.4) で希釈し、ニトロセルロース膜 (NC : Bio-Rad Laboratories) に 4 μl ずつ滴下し、NC 膜を自然乾燥させて行った。乾燥後の NC 膜は、非特異的な反応を防ぐために、スキムミルク (Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, USA) を 5 % 含む TBS (M-TBS) に浸漬し、4 $^{\circ}\text{C}$ にて 10 時間のブロッキ

ング操作を施した。その後、一次抗体として被験者血清が 1 : 1,000 の希釈率で含まれる M-TBS 中で 4 °C, 12 時間振とうした。さらに、NC 膜を 0.1 % Tween-20 含有 TBS (T-TBS) で洗浄後、二次抗体として horseradish peroxidase (HRP) 標識ゴート抗ヒト IgG 抗体 (Chemicon International, Inc., Temecula, CA, USA) が 1 : 5,000 の希釈率で含まれる TBS 中で室温, 1 時間振とうした。NC 膜は T-TBS で洗浄し、反応タンパクの検出のため 4-メトキシ-1-ナフトールを 20mg, メタノールを 3ml, 過酸化水素を 20 μ l, TBS を 20ml, それぞれを混和した発色液に浸漬した。各タンパクスポットに対する血清反応の発色強度は、画像解析ソフト ImageJ (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>) (version 1.43r, NIH, Bethesda, MD, USA) を使用して数値化した。

4. ウェスタンブロット法

SDS-PAGE とウェスタンブロット法は、Kokeguchi らの記載³¹⁾に従い行った。抗原に使用したリコンビナント Cpn は、ヒトの CCT3, CCT4, CCT8, HSP60, そして *M. oralis* の Cpn を 250 ng/lane となるように TBS で調整して使用した。リコンビナントタンパクは SDS サンプルバッファーと混合して 5 分間煮沸して還元状態にした後、12 %アクリルアミドゲルに展開し、泳動用緩衝液を用いた SDS-PAGE で分離した (室温, 150V 定電圧条件)。その後、分離したタンパク質を、湿式転写装置 (MINI

PROTEAN[®] II : Bio-Rad laboratories) を用い、転写用緩衝液 (1.8 mM Tris-HCl, 190 mM グリシン, 20 %メタノール) 中で 90 分間、ポリビニリデン・ジフルオライド (PVDF 膜 : Millipore Corporation, Billerica, MA, USA) へ転写した (4 °C, 100V 定電圧条件)。

転写後の PVDF 膜は、非特異的な反応を防止するために M-TBS に浸漬し、4 °C で 10 時間のブロッキング操作を施した。その後、PVDF 膜を、一次抗体が含まれる M-TBS 中で 4°C, 12 時間振とうした。その後、PVDF 膜を T-TBS で洗浄し、二次抗体が含まれる T-TBS 中で室温、1 時間振とうした。反応タンパクの検出には 20mg の 4-メトキシ-1-ナフトール, 3ml のメタノール, 20 μ l の過酸化水素, 20ml の TBS を混和した発色液を使用し、各タンパクに対する血清反応の発色強度は、画像解析ソフト ImageJ (NIH) により解析した。なお、一次抗体としては被験者から採取・分離した血清 (1 : 1,000 希釈) を使用した。また、陽性対照とするために、1 : 500 希釈した抗ヒト CCT3, CCT4, CCT8 ラビット由来ポリクローナル抗体 (Proteintech Group Inc., Chicago, IL, USA), ならびに抗ヒト HSP60 マウス由来ポリクローナル抗体 (abcam, Cambridge, UK) をそれぞれの抗原に対する一次抗体として使用した。 *M. oralis* の Cpn に対しては、Yamabe らの報告¹³⁾で交差反応性が確認されている抗ヒト CCT8 抗体を陽性対照のための一次抗体として使用した。二次抗体には一次抗体の種類に応じて、HRP 標識抗ヒト IgG 抗体 (Chemicon), HRP 標識抗マウス IgG 抗体 (GE Healthcare), そし

て HRP 標識抗ラビット IgG 抗体 (GE Healthcare) を使用した。

5. 被験者ならびに血清

ヒト血清は健常者 18 名, 歯周病患者 30 名, 自己免疫疾患患者 31 名の 3 群から採取した。歯周病患者は岡山大学病院歯周科を受診中で, American Academy of Periodontology (AAP) の診断基準³²⁾で重度歯周病患者と診断された 30 名 (男性 11 名, 女性 19 名, 平均年齢±標準偏差: 51.9±12.6 歳) であり, 自己免疫疾患患者は岡山大学病院歯周科に通院歴のある, 同院リウマチ内科加療中の 31 名 (男性 7 名, 女性 24 名, 平均年齢±標準偏差: 54.6±14.5 歳) である。自己免疫疾患の内訳は慢性関節リウマチ 15 名, シェーグレン症候群 3 名, 全身性エリテマトーデス 2 名, 尋常性天疱瘡 2 名, 掌蹠膿疱症 2 名, スティーブンス・ジョンソン症候群 1 名, クローン病 1 名, ベーチェット病 1 名, 成人性スティル病 1 名, 甲状腺機能亢進症 1 名, 原発性マクログロブリン症 1 名, IgA 腎症 1 名である。健常者は歯周病または基礎疾患の無いボランティア 18 名 (男性 10 名, 女性 8 名, 平均年齢±標準偏差: 35.7±7.4 歳) であり, 各被験者から静脈血を採取し, 通法に従い, 遠心分離によって血清を調整した。なお, 採血においては岡山大学大学院医歯薬学総合研究科の倫理委員会の承認を取得し (番号 624), 血液供給者に対して十分なインフォームドコンセントを得た上で行

われた。

6. 統計処理

ドットプロット法とウエスタンブロット法から得られたシグナル値の被験者群間の比較には Student's *t*-test を用いた。また、*M. oralis* の Cpn と CCT 各サブユニットタンパクに対する血清反応の相関性は Pearson's product-moment correlation coefficient を用いて解析した。なお、両検定ともに *p* 値が 0.05 以下をもって有意差ありと判定した。

結果

1. CCT3, CCT4, CCT8 と *M. oralis* の Cpn リコンビナントタンパクの構築

ヒトの CCT3, CCT4, CCT8, ならびに *M. oralis* の Cpn の合成ならびに精製過程における各画分の SDS-PAGE 像を図 1 に示した。各リコンビナントタンパクは、アミノ酸配列より推定される分子量約 60 kDa に GST タグを加えた分子量約 80 kDa の位置に合成されていることが確認できた。精製には Glutathione Sepharose クロマトグラフィーによって各リコンビナントタンパクの精製標品を得ることができた。

2. ドットブロット法による血清反応の解析

ヒトの CCT1, CCT3, CCT4, CCT5, CCT6, CCT8, HSP60, そして *M. oralis* の Cpn に対する各被験者血清（健常者 10 人, 歯周病患者 10 人, 自己免疫疾患患者 15 人）の免疫応答性をドットブロット法で検討した。染色後の NC 膜の一部を代表例として図 2 に示した。CCT3, CCT4, CCT8, そして *M. oralis* の Cpn に対して強く反応している血清が多い傾向にあった。また, CCT6 に対しては 4 人の自己免疫疾患患者が比較的明瞭な反応性を示した。その他の抗原タンパク CCT1, CCT5, HSP60 に対してはほとんどの被験者血清が反応性を示さなかった。

各リコンビナント Cpn に対する血清反応のシグナル強度を数値化し, 被験者群間で

比較した結果を図 3 に示した。歯周病患者群は CCT4 ならびに CCT8 に対して健常者群よりも有意に強い反応性を示し (CCT4 : $p<0.05$, CCT8 : $p<0.01$) , 自己免疫疾患患者群は CCT3 ならびに CCT8 に対して優位に強い反応性を示した (CCT3 : $p<0.01$, CCT8 : $p<0.01$) 。 *M. oralis* の Cpn に対しては全体的に強い反応性がみられたが、健常者患者群と患者群の間には有意な差はなかった。

次に、*M. oralis* の Cpn と各 CCT サブユニットに対する血清反応のシグナル強度の相関性を被験群ごとに解析し、図 4 に示した。歯周病患者群では、*M. oralis* の Cpn に対する血清の反応性と CCT 各サブユニットタンパクに対する血清の反応性に相関がみられる傾向にあった。特に *M. oralis* の Cpn に対する反応性は CCT3 ($p<0.005$) , CCT5 ($p<0.005$) , CCT6 ($p<0.001$) , そして CCT8 ($p<0.05$) に対する血清反応性と相関性が高かった。CCT5 と CCT6 は歯周病患者血清との反応性は全体的に低いものの、相関が非常に強かった。一方で、健常者群、自己免疫疾患患者群では *M. oralis* の Cpn に対する血清反応性と CCT 各サブユニットに対する応答性の間に相関は無かった。

3. ウェスタンブロット法による血清反応の解析

ヒトの CCT3, CCT4, CCT8, HSP60, そして *M. oralis* の Cpn を使用して、各被験

者血清（健常者 18 人，歯周病患者 30 人，自己免疫疾患患者 31 人）の免疫応答性をウエスタンブロット法で検討した。図 5 に染色後の PVDF 膜の一部を代表例として示した。*M. oralis* の Cpn に対しては，健常者群，両患者群ともに強く反応性を示す血清が多かった。これとは対照的に，HSP60 に対してはすべての被験者血清において反応性が確認できなかった。この傾向はドットブロットの結果と一致するものであった。一方，CCT3，CCT4，および CCT8 に対する反応では，数名の患者において血清と反応する比較的明瞭なバンドを確認する事ができた。

ウエスタンブロットにおいて検出された各バンドのシグナル強度を数値化し，被験者間で比較した結果を図 6 に示した。歯周病患者と自己免疫疾患患者群は，ともに CCT4 に対して健常者よりも有意に強い反応性 ($p<0.05$) を示した。*M. oralis* の Cpn に対しては多くの血清が強い反応性を示したが，被験者群間での反応性に有意な差はなかった。なお，HSP60 に対する血清反応はバンドとして目視検出ができなかった。

次に，*M. oralis* の Cpn と各 CCT サブユニットに対する血清反応のシグナル強度の相関性を被験者群ごとに解析し，図 7 に示した。健常者群，患者群ともに *M. oralis* の Cpn に対する血清反応性と CCT 各サブユニットに対する応答性の間に相関は確認できなかった。

考察

歯周病関連古細菌である *M. oralis* については、これまでの研究から、歯肉縁下細菌群と共生あるいは拮抗関係を示し、細菌叢の構成に影響を与えること^{9,11,12)}、そして宿主に対し免疫応答を誘導することが明らかとなっている¹⁰⁾。さらに *M. oralis* が保有するグループ II Cpn は抗原性の高い分子であり、ヒトが保有するグループ II Cpn である CCT に対する交差反応抗原であることが示唆されている¹³⁾。よって、歯周炎局所において *M. oralis* の Cpn に感作された場合、その免疫応答は交差反応性からヒトの CCT に対する自己免疫応答となり、歯周病や自己免疫疾患の病態を修飾する可能性があると考えられる。CCT に対する自己免疫応答が自己免疫疾患患者で誘導されている事を示唆する研究はあるが²⁷⁾、その数は極めて少ない。そこで、本研究では歯周病患者ならびに自己免疫疾患患者を対象として CCT ならびに *M. oralis* の Cpn に対する免疫応答性を解析した。

今回の研究結果の概要は以下の 5 点である。1) ドットブロット法において、歯周病患者群は CCT4 ならびに CCT8 に対して健常者群よりも強い反応性を示し、自己免疫疾患患者群は CCT3 ならびに CCT8 に対して強い反応性を示した。2) 歯周病患者群において、*M. oralis* の Cpn に対する血清の反応性は各 CCT サブユニットに対す

る血清反応性と相関性を示した。特に CCT3, CCT5, CCT6, そして CCT8 に対する反応性は *M. oralis* の Cpn に対する反応性と強い相関性を示した。3) ウェスタンブロット法において、歯周病患者群ならびに自己免疫疾患患者群は CCT4 に対して健常者群よりも強い反応性を示した。4) *M. oralis* の Cpn に対しては健常者群、患者群ともに強い反応性を示したが、両群の間に反応性の違いは無かった。5) HSP60 に対しては、患者ならびに健常者群ともにほとんど反応性を示さなかった。

ドットブロット法とウェスタンブロット法の両結果において、仮説とは異なり、健常者群と歯周病患者群ともに *M. oralis* の Cpn に対して非常に強い反応性を示したが、被験者群間を比較するとその反応性に有意差はなかった。これまでの報告では、健常者の口腔内から *M. oralis* はほとんど検出されておらず^{9, 10)}、健常者の口腔内に *M. oralis* が定着する環境は少ないと推測できるわけであるが、健常者においても、腸内や膣には古細菌が多く生息している⁵⁻⁷⁾。特に結腸下部では古細菌が総菌数に占める割合は約 12% にいたる事が報告されている^{33, 34)}。これらの事実と *M. oralis* の Cpn が他の古細菌の Cpn とアミノ酸配列の相同性が非常に高い (40-90%) こと¹³⁾を考え合わせると、古細菌間で Cpn が交差反応抗原 (共通抗原) となっている可能性が考えられる。特に腸内から高頻度に検出される *M. smithii* の Cpn と *M. oralis* の Cpn は 91% のアミノ酸相同性があるために¹³⁾、*M. smithii* の Cpn が交差反応抗原のである可能性

が高いと考えられる。一方で、真正細菌の保有するグループ I Cpn である GroEL との アミノ酸配列の相同性は約 20% であり¹³⁾、*M. oralis* の Cpn と交差反応を起こす可能性は低いと考える。

CCT に対する自己抗体と疾患との関連性については、唯一 Yokota ら²⁷⁾の研究報告があるのみである。Yokota らはリウマチ疾患を中心とする自己免疫疾患患者の血清中に CCT に対する IgG 抗体価が上昇している事を報告している。今回の結果においても、自己免疫疾患患者においては CCT に対する反応性が高くなっており、CCT に対する自己免疫応答が疾患の病態に関与している可能性が示唆された。また、自己免疫疾患のみならず、歯周病患者においても CCT に対する応答性が高くなっていることから、本研究結果は CCT に対する自己免疫応答が歯周病の病態にも関与していることを示唆するものである。さらに、CCT を構成するサブユニットタンパクの中で、CCT3、CCT4、さらに CCT8 に対する血清の反応性が健常者群よりも歯周病患者群あるいは自己免疫疾患患者群で有意に高いことから、CCT3、CCT4、そして CCT8 が自己免疫応答の標的分子となっている可能性が新たに示唆された。

CCT に対する自己抗体が歯周病患者ならびに自己免疫疾患患者において確認されたのに対して、HSP60 に対する血清反応性は健常者群も患者群ともにほとんど確認できなかった。HSP60 に関しては、古くから、自己抗体の上昇が歯周病や自己免疫疾患、

あるいは動脈硬化の病態に関連すると報告されている²²⁻²⁶⁾。しかしながら、依然として統一された見解は無く、HSP60 に対する自己抗体は自然抗体として存在しており、疾患特異的なものではないとする懐疑的な報告もある^{35, 36)}。Yokota ら²⁷⁾は自己免疫疾患患者において HSP60 と CCT の両方に対して自己抗体が産生されていることを報告しているが、健常者と比較した場合の抗体価の上昇は、抗 HSP60 抗体に比べ、抗 CCT 抗体の方がよりその差が大きいと述べている。今回の研究結果は、抗 HSP60 抗体よりも抗 CCT 抗体の方が疾患との関連性が高い事を示唆するものであり、この点で Yokota らの見解と一致するものであった。

M. oralis の Cpn に対する抗体産生性と CCT に対する自己抗体の産生性の関連を調べた結果では、歯周病患者群において、相関性を認める結果を得た。特に CCT3 ($p<0.005$), CCT5 ($p<0.005$), CCT6 ($p<0.001$), そして CCT8 ($p<0.05$) に対する反応は *M. oralis* の Cpn に対する反応性と強い相関性のあることが分かった。今回は被験者数が少なく、結論を出すことは困難であるが、本結果は CCT に対する自己抗体の産生機序と抗 *M. oralis* の Cpn 抗体の産生機序が関連している可能性を示唆するものである。すなわち、*M. oralis* の Cpn に対する免疫応答が CCT に交差反応することを示唆するものかもしれない。一方これに対して、健常者群と自己免疫疾患患者群においては、*M. oralis* の Cpn と CCT に対する血清反応に相関性は見出せなかった。自

自己免疫疾患患者では免疫学的寛容に破綻があると考えられ、抗 CCT 自己抗体の産生機序は *M. oralis* 感染や Cpn との交差反応に起因するものではなく、宿主因子を含めた他の要因から解析を行う必要があると考える。

ウエスタンブロット法ではドットブロット法の結果からヒトの CCT3, CCT4, CCT8, HSP60, そして *M.oralis* の Cpn に焦点を絞って、被験者数を増やして実験を行った。その結果, *M. oralis* の Cpn に対してはどの群の被験者血清も強く反応するものが多く, HSP60 に対してはほとんどの被験者血清が全く反応を示さなかった。これらはドットブロット法の結果と一致するものであったが, 各 CCT サブユニットに対する血清反応性はドットブロット法よりも全体的に弱かった。健常者群との比較で有意差をもって強く反応した CCT サブユニットは, 歯周病患者群と自己免疫疾患群ともに CCT4 だけであった。また, 被験者群ごとに調べた *M. oralis* の Cpn と各 CCT サブユニットに対する血清反応性の相関分析では, どの被験者群においても相関が無かった。CCT に対する自己抗体産生には立体エピトープが重要であると報告されており²⁷⁾, 今回のドットブロット法とウエスタンブロット法の反応性の違いはこれに起因するものと考えられる。

今回の研究では, 患者, 健常者を問わず *M. oralis* の Cpn に反応する抗体が産生されていることが明らかとなった。メタン生成古細菌は食物にも含まれており³⁷⁾, ヒト

の免疫機構は恒常的に古細菌とその Cpn に感作されている可能性が高い。歯周病患者では、歯周炎局所での *M. oralis* とその Cpn による感作が抗 CCT 抗体の産生と関連している可能性が示された。また、これまで多くの先行研究で注目されていた HSP60 よりも CCT の方が歯周病患者や自己免疫疾患患者において、自己抗原としてより病態と関連している可能性の高いことが示された。そして CCT サブユニットの中では CCT3, CCT4, そして CCT8 が主に自己抗体の標的となっていることが明らかとなった。CCT は自己免疫疾患の診断マーカーとしての有用性が報告されているが²⁷⁾、今回の結果から CCT3, CCT4, あるいは CCT8 を使用することで、より特異的な診断法が開発できるものと考ええる。これらの研究成果が得られた一方で、*M. oralis* の Cpn と CCT との間で交差反応が起きているかどうかを示す直接的な結果は得られていない。さらに、CCT に対する自己抗体が歯周病や自己免疫疾患の病態にどのように関与しているのかについては、他の先行研究においても不明な点を多く残している。しかしながら、自己抗体が産生されている事実は、免疫複合体の形成などから、少なくとも歯周病や自己免疫疾患における炎症反応や組織破壊が CCT に対する免疫応答によって修飾されている事を示している。今後は被験者群のサンプル数を増やし、詳細な病型別の調査と解析を行うことで、慢性炎症における抗 CCT 抗体の役割、古細菌感染の影響が解明できるものと考ええる。

結論

歯周病患者ならびに自己免疫疾患を有する歯周病患者においては、HSP60 よりも CCT がより自己抗体を産生されやすいこと、またその中でもサブユニットである CCT3, CCT4, そして CCT8 に対する自己免疫応答が強く誘導されており、病態に関与していることが示唆された。

謝辞

稿を終えるにあたり、終始御懇篤なるご指導と御校閲を賜った岡山大学大学院医歯薬学総合研究科病態制御科学専攻病態機構学講座歯周病態学分野の高柴正悟教授に心から感謝致します。また、様々な面にわたり貴重な御助言とご協力を下さいました、岡山大学大学院医歯薬学総合研究科病態制御科学専攻病態機構学講座歯周病態学分野の前田博史准教授、大森一弘助教、岡山大学大学院医歯薬学総合研究科社会環境生命科学専攻国際環境科学講座口腔微生物学分野の苔口進准教授、ならびに歯周病態学分野の諸先生に厚く御礼申し上げます。

参考文献

- 1) Woese, C.R., Kandler, O. and Wheelis, M.L.: Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **87**, 4576-4579, 1990.
- 2) Oren, A., Ginzburg, M., Ginzburg, B., Hochsten, L.I. and Volcani, B.E.: *Haloarcula marismortui* (Volcani) sp. nov. rev., an Extremely Halophilic Bacterium from the Dead Sea. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **40**, 209-210, 1990.
- 3) Schleper, C., Puehler, G., Holz, I., Gambacorta, A., Janekovic, D., Santarius, U., Klenk, H.P. and Zillig, W.: *Picrophilus* gen. nov., fam. nov.: a Novel Aerobic, Heterotrophic, Thermoacidophilic Genus and Family Comprising Archaea Capable of Growth around pH 0. *J. Bacteriol.*, **177**, 7050-7059. 1995.
- 4) Takaki, K., Nakamura, K., Toki, T., Tsunogai, U., Miyazaki, M., Miyazaki, J., Hirayama, H., Nakagawa, S., Nunoura, T. and Horikoshi, K.: Cell proliferation at 122 degree C and isotopically heavy CH₄ production by a hyperthermophilic methanogen under

high-pressure cultivation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **31**. 10949-10954. 2008

- 5) Belay, N., Johnson, R., Rajagopal, B.S., de Macario, E.C. and Daniels, L.: Methanogenic bacteria from human dental plaque. *Appl. Environ. Microbiol.*, **54**, 600-603, 1988.
- 6) Karlin, D.A., Jones, R.D., Stroehlein, J.R., Mastromarino, A.J. and Potter, G.D.: Breath methane excretion in patients with unresected colorectal cancer. *J. Natl. Cancer Inst.*, **69**, 573-576, 1982.
- 7) Belay, N., Mukhopadhyay, B., Conway, D.M., Galask, R. and Daniels, L.: Methanogenic bacteria in human vaginal samples. *J. Clin. Microbiol.*, **28**, 1666-1668, 1990.
- 8) Socransky, S.S., Haffajee, A.D., Cugini, M.A., Smith, C. and Kent, R.L.Jr.: Microbial complexes in subgingival plaque. *J. Clin. Periodontol.*, **25**, 134-144, 1998.
- 9) Lepp, P.W., Brinig, M.M., Ouverney, C.C., Palm, K., Armitage, G.C. and Relman, D.A.: Methanogenic Archaea and human periodontal disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **101**, 6176-6181, 2004.

- 10) Yamabe, K., Maeda, H., Kokeguchi, S., Tanimoto, I., Sonoi, N., Asakawa, S. and Takashiba, S.: Distribution of Archaea in Japanese patients with periodontitis and humoral immune response to the components. *FEMS Microbiol. Lett.*, **287**, 69-75, 2008.
- 11) Vianna, M.E., Conrads, G., Gomes, B.P. and Horz, H.P.: T-RFLP-based *mcrA* gene analysis of methanogenic *Archaea* in association with oral infections and evidence of a novel *Methanobrevibacter* phylotype. *Oral. Microbiol. Immunol.*, **24**, 417-422, 2009.
- 12) Vianna, M.E., Holtgraewe, S., Seyfarth, I., Conrads, G. and Horz, H.P.: Quantitative analysis of three hydrogenotrophic microbial groups, methanogenic *Archaea*, sulfate-reducing bacteria, and acetogenic bacteria, within plaque biofilms associated with human periodontal disease. *J. Bacteriol.*, **190**, 3779-3785, 2008.
- 13) Yamabe, K., Maeda, H., Kokeguchi, S., Soga, Y., Meguro, M., Naruishi, K., Asakawa, S. and Takashiba, S.: Antigenic group II chaperonin in *Methanobrevibacter oralis* may cross-react with human chaperonin CCT. *Mol. Oral. Microbiol.*, **25**, 112-22, 2010.
- 14) Ellis, R.J. and van der Vies, S.M.: Molecular chaperones. *Annu. Rev. Biochem.*, **60**, 321-347, 1991.

- 15) Hartl, F.U.: Molecular chaperones in cellular protein folding. *Nature*, **381**, 571-580, 1996.
- 16) Horwich, A.L. and Willison, K.R.: Protein folding in the cell: functions of two families of molecular chaperone, hsp60 and TF55-TCP1. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.*, **339**, 313-325, 1993.
- 17) Kubota, H., Hynes, G., Carne, A., Ashworth, A. and Willison, K.: Identification of six Tcp-1-related genes encoding divergent subunits of the TCP-1 containing chaperonin. *Curr. Biol.*, **4**, 89-99, 1994.
- 18) Mercado, F.B., Marshall, R.I. and Bartold P.M.: Inter-relationships between rheumatoid arthritis and periodontal disease. *J. Clin. Periodontol.*, **30**, 761-772. 2003.
- 19) Matsuura, E., Kobayashi, K., Matsunami, Y., Shen, L., Quan, N., Makarova, M., Suchkov, S.V., Ayada, K., Oguma, K. and Lopez, L.R.: Autoimmunity, Infection Immunity, and Atherosclerosis. *J. Clin. Immunol.*, **29**. 714-721. 2009.
- 20) Phipps, B.M., Hoffmann, A., Stetter, K.O. and Baumeister, W.: A novel ATPase

complex selectively accumulated upon heat shock is a major cellular component of thermophilic archaeobacteria. *EMBO. J.*, **10**, 1711-1722, 1991.

21) Kubota, H., Hynes, G. and Willison, K.: The chaperonin containing t-complex polypeptide 1 (TCP-1). Multisubunit machinery assisting in protein folding and assembly in the eukaryotic cytosol. *Eur. J. Biochem.*, **230**, 3-16, 1995.

22) Maeda, H., Miyamoto, M., Hongyo, H., Nagai, A., Kurihara, H., and Murayama, Y.: Heat shock protein 60 (GroEL) from *Porphyromonas gingivalis*: molecular cloning and sequence analysis of its gene and purification of the recombinant protein. *FEMS Microbiol. Lett.*, **119**, 129-35, 1994.

23) Maeda, H., Miyamoto, M., Koikeguchi, S., Kano, T., Nishimura, F., Takashiba, S. and Murayama, Y.: Epitope mapping of heat shock protein 60 (GroEL) from *Porphyromonas gingivalis*. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, **28**, 219-224, 2000.

24) Choi, J.I., Chung, S.W., Kang, H.S., Rhim, B.Y., Park, Y.M., Kim, U.S. and Kim, S.J.: Epitope mapping of *Porphyromonas gingivalis* heat-shock protein and human heat-shock protein in human atherosclerosis. *J. Dent. Res.*, **83**, 936-940, 2004.

- 25) Yamazaki, K., Ueki-Maruyama, K., Honda, T., Nakajima, T. and Seymour, G.J.: Effect of periodontal treatment on the serum antibody levels to heat shock proteins. *Clin. Exp. Immunol.*, **135**, 478-482, 2004.
- 26) Yamazaki, K., Ohsawa, Y., Itoh, H., Ueki, K., Tabeta, K., Oda, T., Nakajima, T., Yoshie, H., Saito, S., Oguma, F., Maizawa, Y. and Seymour, G.J.: T- Cell clonality to *Porphyromonas gingivalis* and human heat shock protein 60s in patients with atherosclerosis and periodontitis. *Oral Microbiol. Immunol.*, **19**, 160-167, 2004.
- 27) Yokota, S., Hirata, D., Minota, S., Higashiyama, T., Kurimoto, M., Yanagi, H., Yura, T., and Kubota, H.: Autoantibodies against chaperonin CCT in human sera with rheumatic autoimmune diseases: comparison with antibodies against other Hsp60 family proteins. *Cell Stress Chaperones*, **5**, 337-346, 2000.
- 28) Endo, Y. and Sawasaki, T.: Cell-free expression systems for eukaryotic protein production. *Curr. Opin. Biotechnol.*, **17**, 373-380, 2006.
- 29) Wael Amgad Hassan: Analysis of Human Oral Bacterial Communities in health and Disease. *岡山歯誌*, **29**, 2010. (ティークス)

- 30) Seah, C.L., Chow, V.T. and Chan, Y.C.: Semi-nested PCR using NS3 primers for the detection and typing of dengue viruses in clinical serum specimens. *Clin. Diagn. Virol.*, **4**,113-120, 1995.
- 31) Kokeguchi, S., Kato, K., Kurihara, H. and Murayama, Y.: Cell surface protein antigen from *Wolinella recta* ATCC 33238. *J. Clin. Microbiol.*, **27**, 1210-1217, 1989.
- 32) Armitage, G.C.: Development of a classification system for periodontal diseases and conditions. *Ann. Periodontol.*, **4**, 1-6, 1999.
- 33) Pochart, P., Lemann, F., Flourie, B., Pellier, P., Goderel, I. and Rambaud, J.C.: Pyxigraphic sampling to enumerate methanogens and anaerobes in the right colon of healthy humans. *Gastroenterology*, **105**, 1281-1285, 1993.
- 34) Eckburg, P.B., Bik, E.M., Bernstein, C.N., Purdom, E., Dethlefsen, L., Sargent, M., Gill, S.R., Neison, K.E. and Reiman, D.A.: Diversity of the human intestinal microbial flora. *Science*, **312**, 1355-1359, 2005.
- 35) Pozsonyi, E., György, B., Berki, T., Bánlaki, Z., Buzás, E., Rajczy, K., Hossó, A.,

Prohászka, Z., Szilágyi, A., Cervenak, L. and Füst, G.: HLA-association of serum levels of natural antibodies. *Mol. Immunol.*, **46**, 1416-1423, 2009.

36) Shovman, O., Sherer, Y., Gilbourd, B., Gerli, R., Bocci, E.B., delle Monache, F. and Shoenfeld, Y.: Low levels of heat shock protein-60 and -65 autoantibodies in Sjögren's syndrome. *Isr. Med. Assoc. J.*, **7**, 778-780, 2005.

37) Brusa, T., Ferrari, F. and Canzi, E.: Methanogenic bacteria: Presence in foodstuffs. *J. Basic Microbiol.*, **38**, 79-84, 1998.

表題脚注

岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 病態制御科学専攻 病態機構学講座

歯周病態学分野

(指導：高柴正悟教授)

表 1. PCR 法に用いたプライマーの塩基配列

標的遺伝子	プライマーの塩基配列		増幅産物 (bp)
	1st PCR	Nested PCR	
CCT3	F: 5'-GCAGCGTTTCTGGGCTTCT-3'	F: 5'-GCCGTCGAGGATGGGCCATCGTCCAGTG-3'	2107
	R: 5'-AGCCTTGCCTAGCACCTCACT-3'	R: 5'-CCTTGACTAGTACTCACTCCTGGCCAGCA-3'	
CCT4	F: 5'-AACCCAGACACAGCGGAGTT-3'	F: 5'-CGGAGCTCGAGATGCCCGAGAATGT-3'	2352
	R: 5'-CAGTGATGAGCATATTGGCCATT-3'	R: 5'-TGGTACTAGTCAGTTATCCAGATTA-3'	
CCT8	F: 5'-GGTCGCCGTGAACCTGCTTC-3'	F: 5'-CAGGCTCGAGATGGCCCTTACCGTTCCC-3'	1895
	R: 5'-ACTACAATAACAGCCCTCACCCTAC-3'	R: 5'-TAAGACTAGTTCAAATCATTTTGGTCAT-3'	
<i>M. oralis</i> Cpn	F: 5'-CCCAGTAATAATGTAGAAAAGG-3'	F: 5'-TGATTCTCGAGGGCACAAAGGTCAACCA A-3'	1929
	R: 5'-AAAAGATTTTCATCAGCATCA-3'	R: 5'-ATTACTAGTCTACATCATTTGGAGGCA-3'	

Nested PCR のプライマーには Xho I および Spe I の制限酵素認識部位を付与した (表中下線部)。F, Forward ; R, Reverse

図の説明

図 1. リコンビナントタンパク CCT3, CCT4, CCT8, *M. oralis* の Cpn 合成後から精製後各分画の SDS-PAGE 解析

精製前の合成タンパク溶液を $21,600\times g$, 10 分間遠心して上清画分（可溶性画分）と沈殿画分（不溶性画分）とに分け、上清画分を用いたクロマトグラフィー精製後の溶出画分と共に SDS-PAGE 解析後、ゲルの CBB 染色を行った。

M, 分子量マーカー ; NC, 陰性対照 (3 μ l) ; T, 精製前合成タンパク溶液 (3 μ l) ; S, 可溶性画分 (3 μ l) ; P, 不溶性画分 (3 μ l) ; FT, フロースルー画分 (3 μ l) ; E1, 溶出画分 (1.25 μ l) ; E2, 溶出画分 (2.5 μ l) ; E3, 溶出画分 (5 μ l) ; E4, 溶出画分 (10 μ l)

図 2. ドットブロット法による各 Cpn サブユニットに対する血清反応性の解析

ヒトのリコンビナント Cpn (CCT1, CCT3, CCT4, CCT5, CCT6, CCT8, HSP60), そして *M. oralis* の Cpn に対して各被験者血清（健常者 10 人, 歯周病患者 10 人, 自己免疫疾患患者 15 人）の血清 IgG 抗体の反応性をドットブロット法で検討した。図にはナフトール染色後の NC 膜の一部を代表例として示した。（A）各 Cpn をブロッキングしたメンブレン上の位置, (B) 健常者血清を使用した代表例 (h1-h5), (C)

歯周病患者血清を使用した代表例 (p1 – p5), (D) 自己免疫疾患患者血清を使用した代表例 (a1-a2) をそれぞれ示した。

図 3. ドットプロット法による各 Cpn に対する発色強度の群間比較

各リコンビナント Cpn に対する被験者血清の反応性を解析ソフト ImageJ を用いて各スポットの発色強度を数値化した。図は Cpn ごとに被験者群間を比較したものを示した。エラーバーは中央横線の平均値からの標準誤差を示した。被験者群間の比較には Student's *t*-test を用いて検定した。

H, 健常者 ; P, 歯周病患者 ; A, 自己免疫疾患患者 ; *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$

図 4. ドットプロット法による *M. oralis* の Cpn とヒトの Cpn (各 CCT サブユニット, HSP60) に対する発色強度の相関解析

(A) 健常者群, (B) 歯周病患者群, (C) 自己免疫疾患患者群ごとに, *M. oralis* の Cpn とヒトの Cpn (各 CCT サブユニット, HSP60) に対する血清反応のシグナル値の散布図を示した。図中の直線は回帰直線を示し, 相関の検定には Pearson's product-moment correlation coefficient を用いた。図には得られた相関係数 r から決定係数 r^2 を求め, Student's *t*-test により得られた有意水準 p を並列して示した。

図 5. ウェスタンブロット法による各 Cpn サブユニットに対する血清反応性の解析

リコンビナントヒト CCT3, CCT4, CCT8, *M. oralis* の Cpn と HSP60 を使用して、各被験者血清（健常者 18 人，歯周病患者 30 人，自己免疫疾患患者 31 人）の血清の IgG 抗体の反応性をウェスタンブロット法で検討した。図には，ナフトール染色後の PVDF 膜の一部を代表例として示した。

M, 分子量マーカー ; P, 陽性対照

図 6. ウェスタンブロット法による各 Cpn に対する発色強度の群間比較

各リコンビナント Cpn に対する被験者血清の反応性を解析ソフト ImageJ を用いて各スポットの発色強度を数値化した。図は Cpn ごとに被験者群間を比較したものを示した。エラーバーは中央横線の平均値からの標準誤差を示した。被験者群間の比較には Student's *t*-test を用いて検定した。

H, 健常者 ; P, 歯周病患者 ; A, 自己免疫疾患患者 ; *, $p < 0.05$

図 7. ウェスタンブロット法による *M. oralis* の Cpn とヒトの Cpn (各 CCT サブユニット

ト, HSP60) に対する発色強度の相関解析

(A) 健常者群, (B) 歯周病患者群, (C) 自己免疫疾患患者群ごとに, ヒトのリコンビナント Cpn (CCT3, CCT4, CCT8) と *M. oralis* の Cpn に対する血清反応のシ

グナル値の散布図を示した。図中の直線は回帰直線を示し、相関の検定には Pearson's product-moment correlation coefficient を用いた。図には得られた相関係数 r から決定係数 r^2 を求め、Student's t -test により得られた有意水準 p を並列して示した。

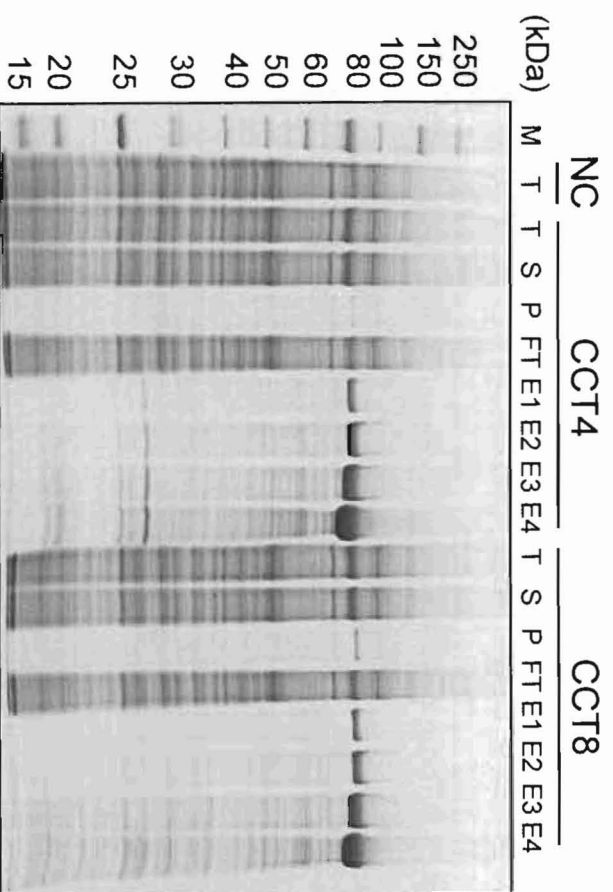
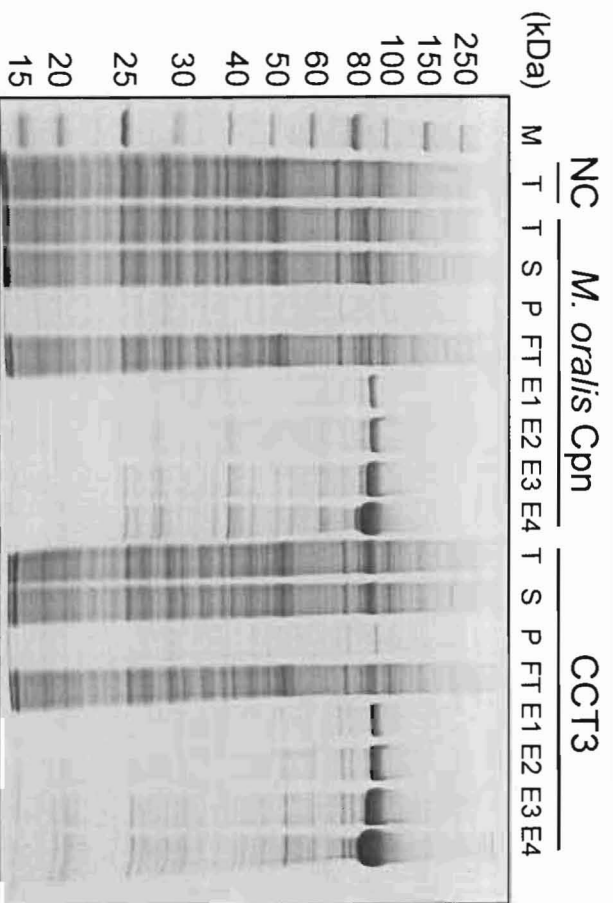


图1

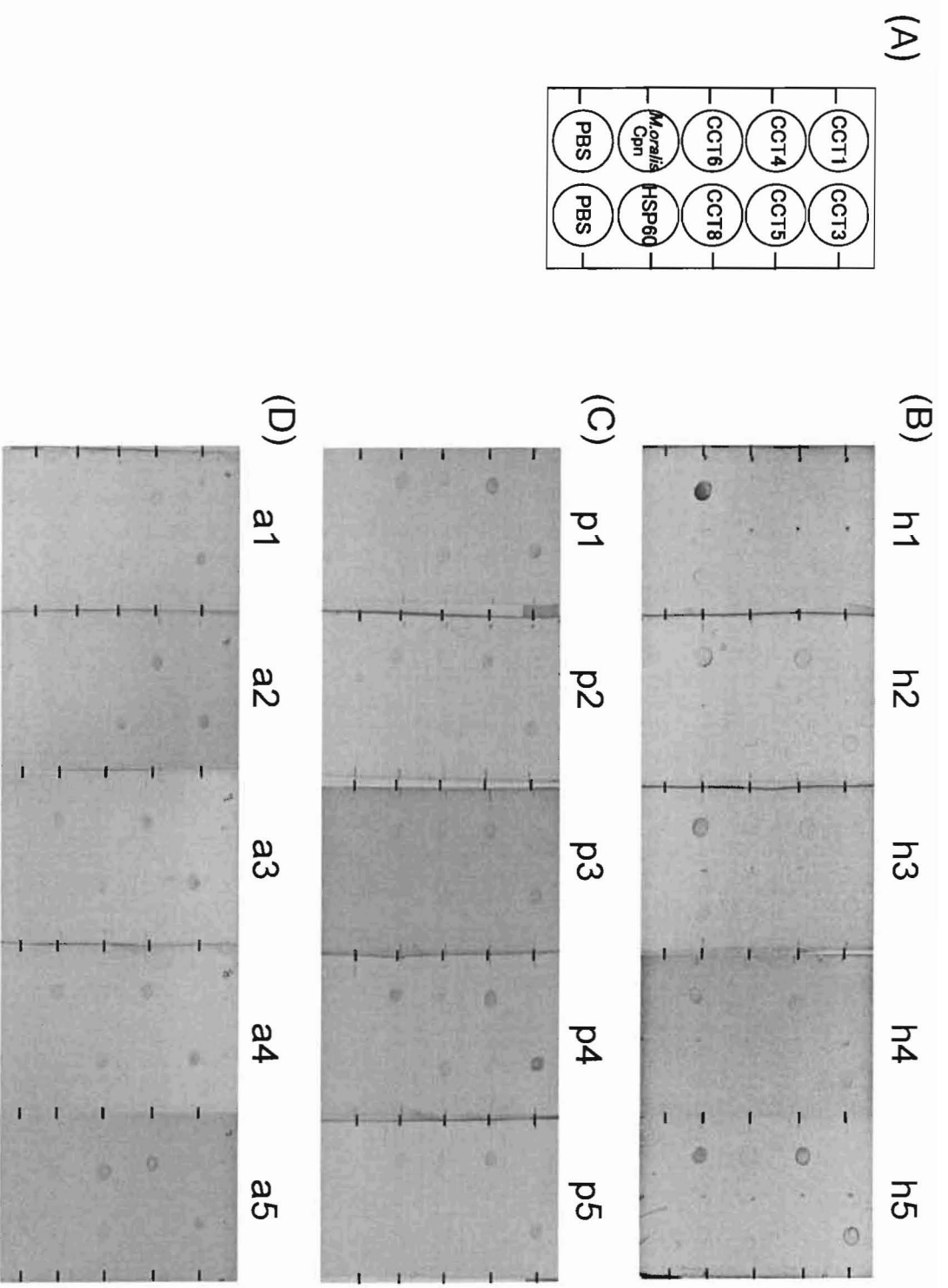


图2

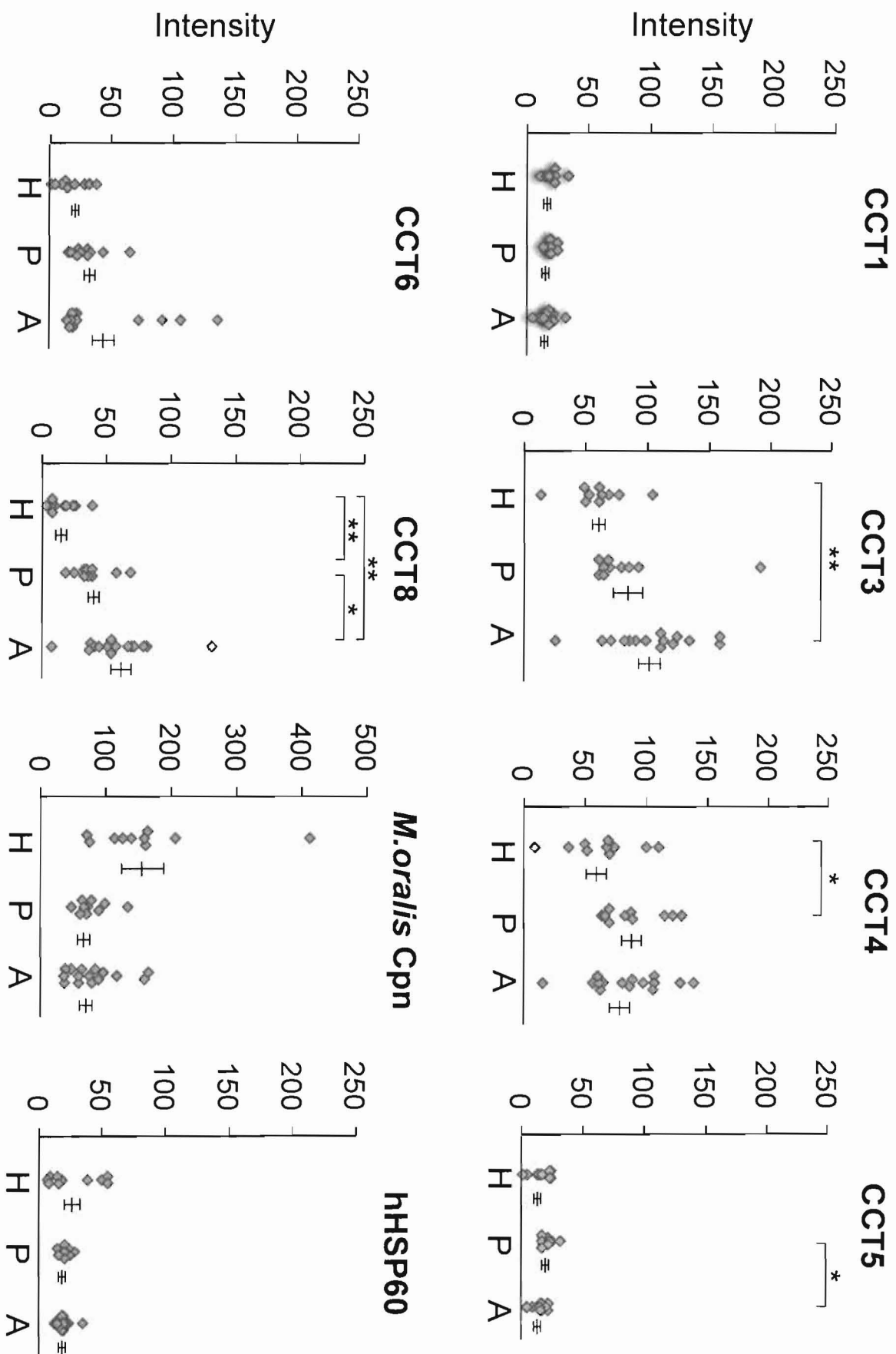


図3

(A)

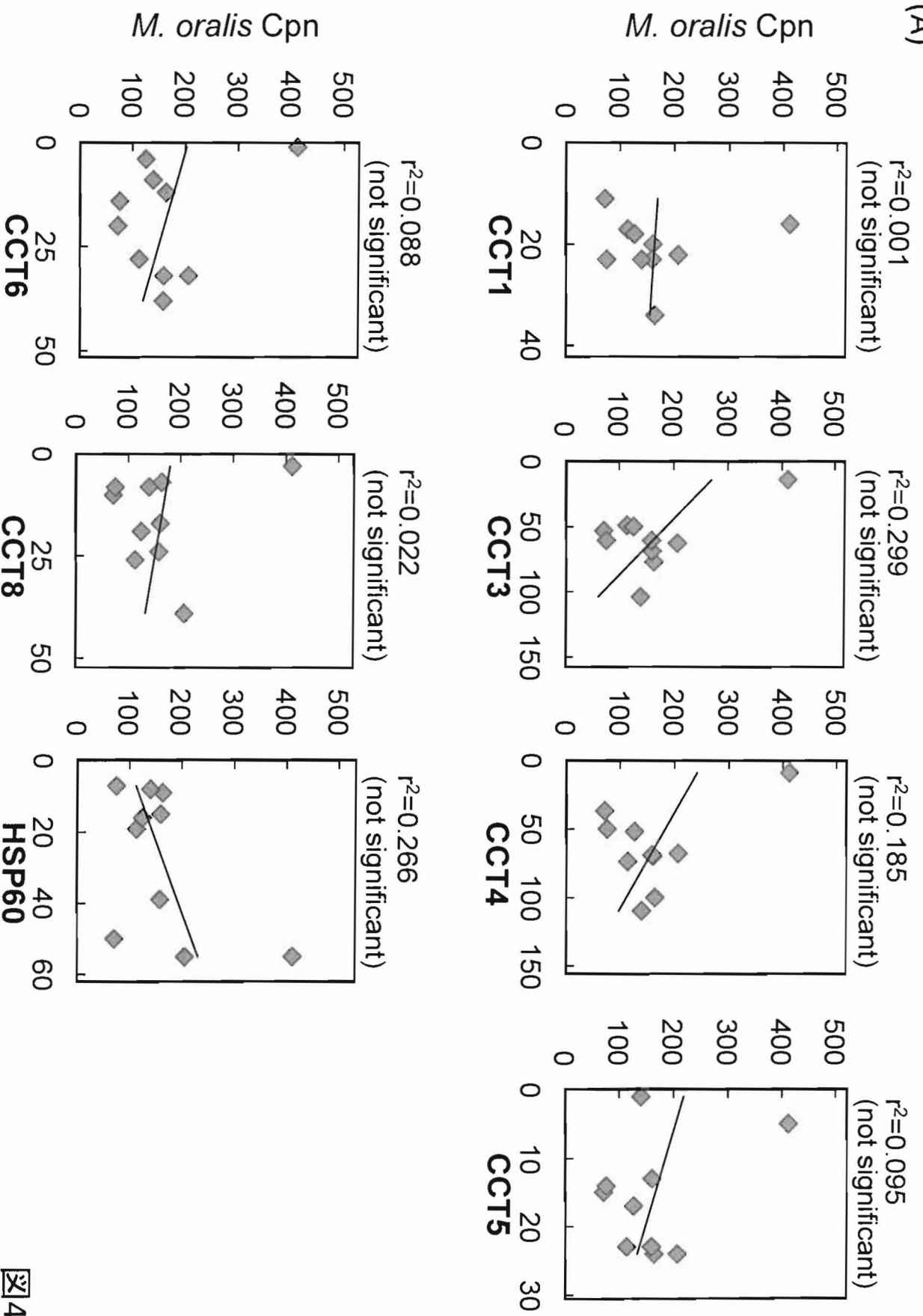


图4

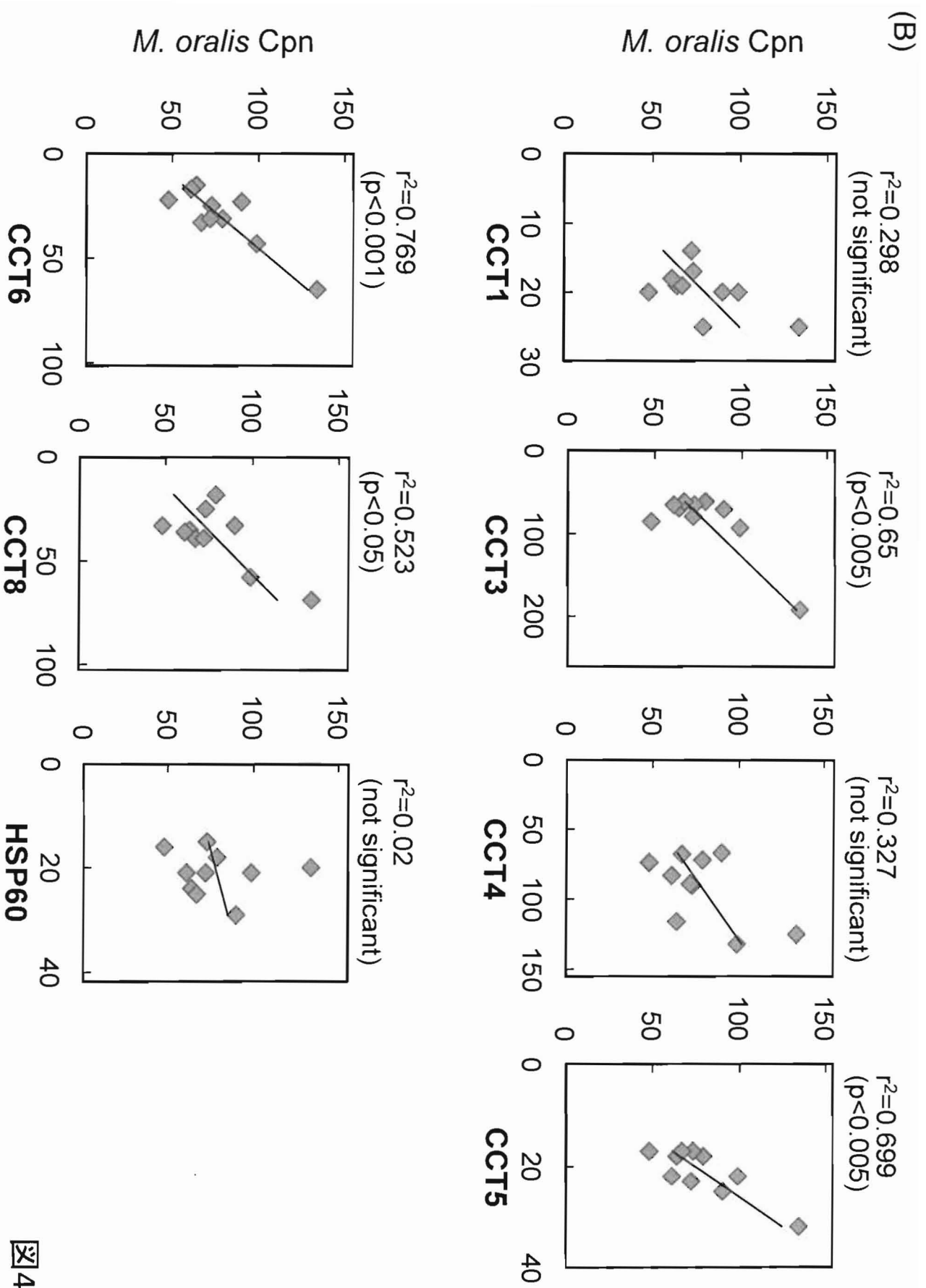


图4

(C)

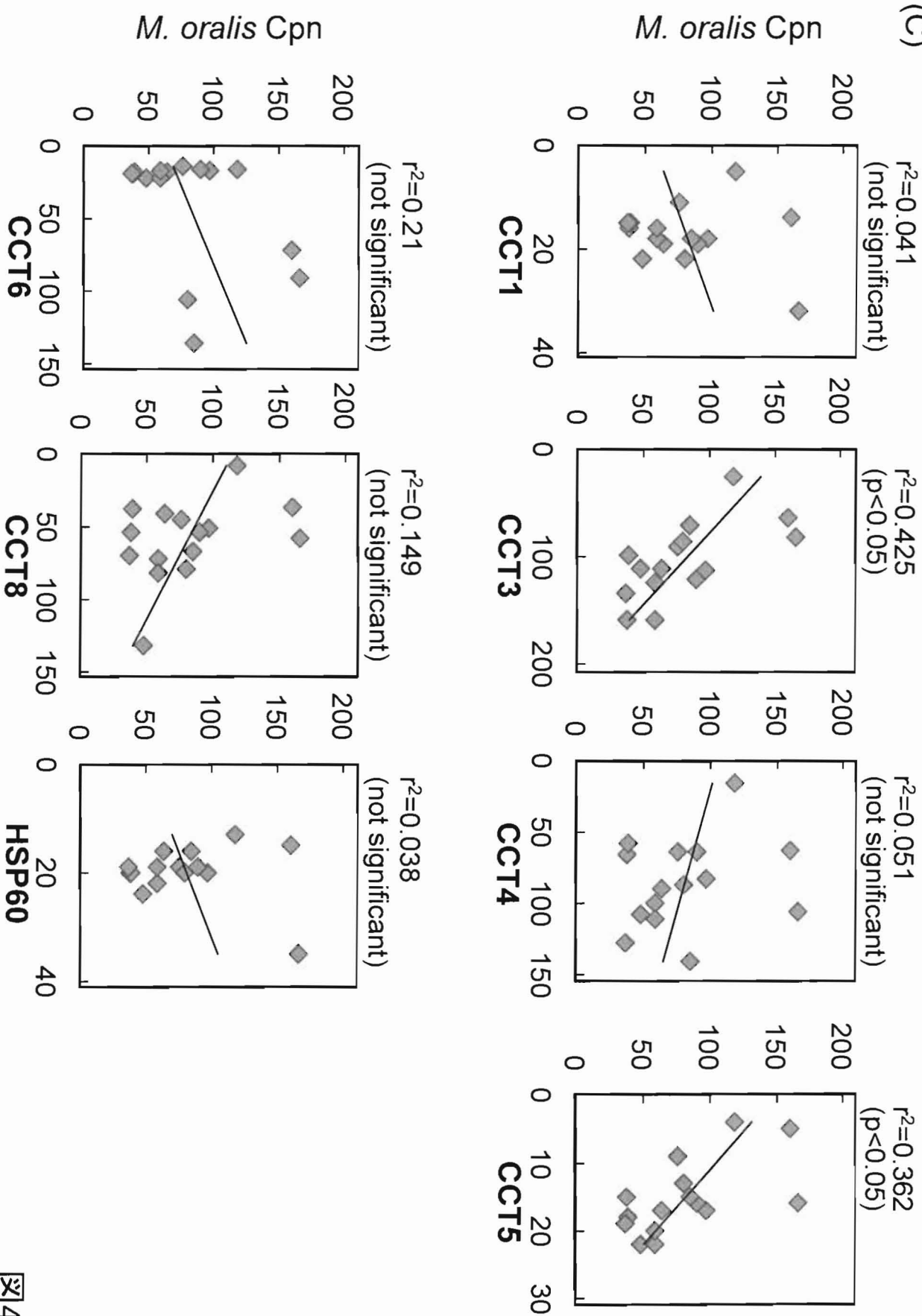


図4

平井公人

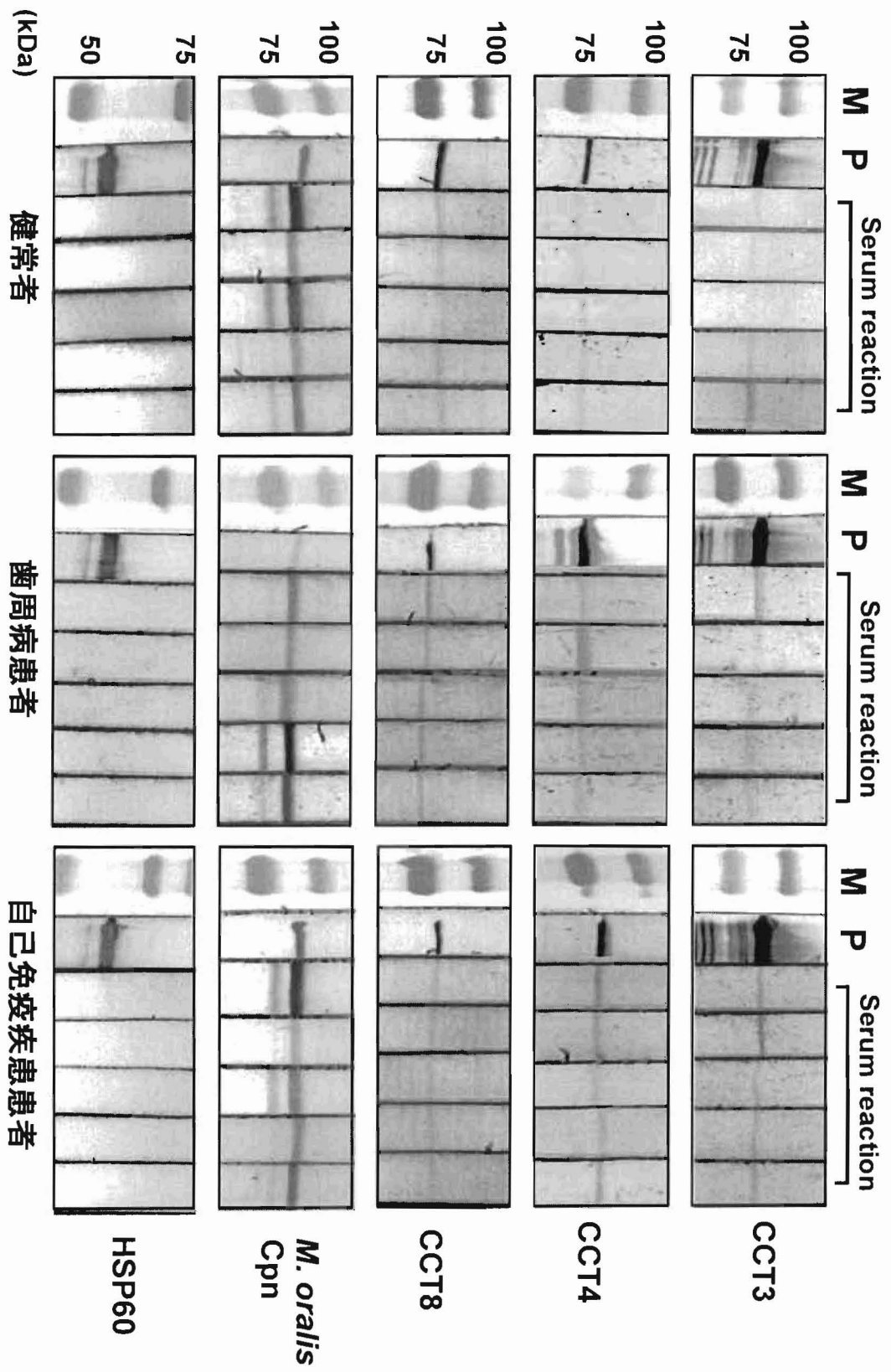
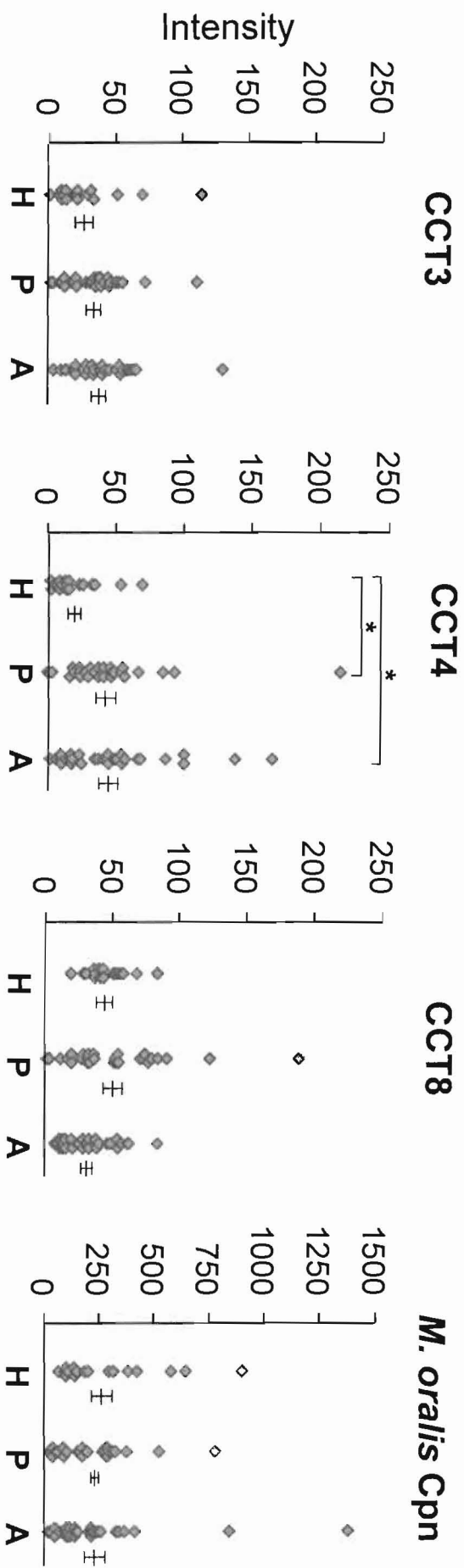


图5



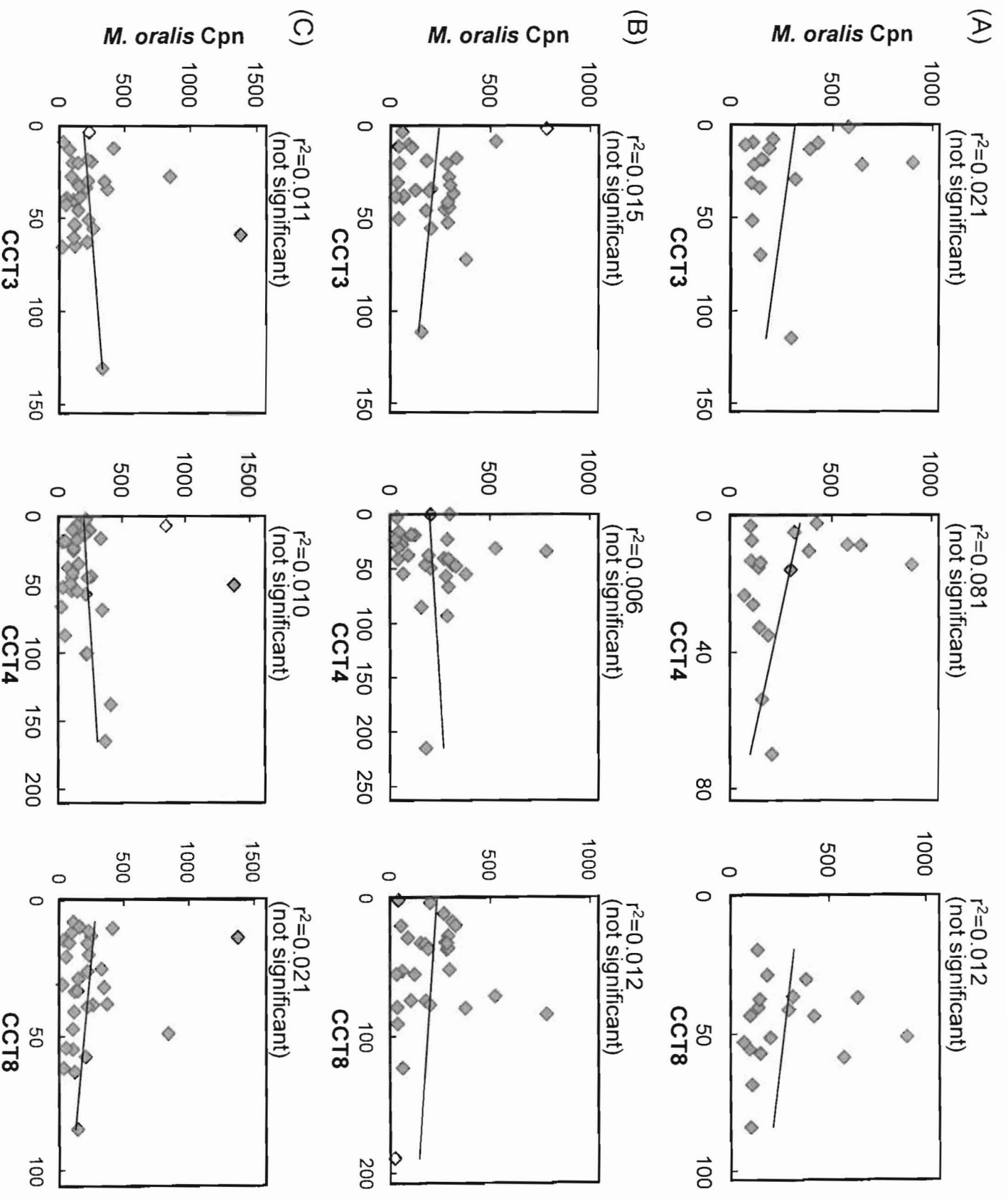


図7