

氏名	栗原英見		
学位(専攻分野)	博士(歯学)		
学位授与番号	博乙第2415号		
学位授与の日付	平成4年3月28日		
学位授与の要件	博士の学位論文提出者 (学位規則第4条第2項該当)		
学位論文題名	Humoral immune response to an antigen from <i>Porphyromonas gingivalis</i> 381 in periodontal disease (歯周病における <i>Porphyromonas gingivalis</i> 381 由来抗原に対する体液性免疫応答)		
論文審査委員	教授 村山 洋二	教授 加藤慶二郎	教授 谷口 茂彦

学位論文内容の要旨

【研究目的】

Porphyromonas gingivalis の有する抗原は、菌体構築成分あるいは生物工学の手法を用いて分離されたものが研究対象となっている。これらの抗原に対して、歯周病患者は血清IgG抗体を上昇させることから、*P. gingivalis* 抗原の歯周病態への研究アプローチは個体の宿主応答との関わりにおいて多く行われている。しかし、歯周病患者の体液性免疫応答は多様であるため、病態との関わりの中容は不明なままである。本研究は、強い免疫原性を有する抗原でありながら、その抗原に対する免疫応答が歯周病患者間で一様でない抗原を、*P. gingivalis* 381から分離し、その性状を調べることを目的とした。

【研究方法】

1. 供試菌および粗抗原の調製

P. gingivalis 381をBHIを基礎培地として、嫌気条件下、37℃で48時間培養した。全菌体を超音波処理した後の10万×g遠心上清を超音波抽出抗原(SE)とした。

2. 外膜および小胞の調製

外膜はKokeguchiらの方法に従って、小胞はGreinerとMayrandの方法によって調製した。

3. 抗原の分画

Sepharose CL-6Bによるイオン交換クロマトグラフィー分画をした。各画分について患者血清IgG抗体との反応を後述するウェスタンブロット法で調べた。

4. 被験者および診断

初診時の歯周病患者からSEに対する血清IgG抗体価が上昇している。(300 ELISA unit以上)患者77名(成人性歯周炎〔AP〕43名, 重度進行性歯周炎〔RPP〕30名, 若年性歯周炎〔JP〕4名)および低い血清IgG抗体価(100 ELISA unit以下)の健常者10名を選んで被験者とした。歯周病患者は, PageとSchroederの分類を基にしたMurayamaらの分類に従い, 臨床的に上記の病型に分類した。

5. SDS-ポリアクリルアミド電気泳動(SDS-PAGE)とウェスタンブロット法

SDS-PAGEはLacmmlいの方法に準じた。ウェスタンブロットはSDS-PAGE後のゲルからニトロセルロース膜に転写した抗原と患者血清とを反応させた後に, 血清IgGと反応したバンドをペルオキシダーゼ標識抗体を用いた酵素抗体法によって検出した。

6. 単クローン抗体の調製

SDS-PAGEでゲル中に展開した抗原から, 目的とする抗原をゲルごと切り出し感作抗原とした。単クローン抗体は, BALB/cマウスを用いた常法により調製した。

7. 免疫電子顕微鏡

P. gingivalis 全菌体を単クローン抗体および金コロイドで標識した後に透過型顕微鏡を用いて観察した。

8. 53kDa蛋白抗原の精製

単クローン抗体をリガンドとしたアフィニティークロマトグラフィーによって, 目的とした53kDa蛋白抗原をSEより精製した。

【研究結果】

1. SEと患者血清IgGとの反応

53kDa抗原(Ag53)はSEに含まれる他の抗原に比して多くの患者血清IgGと強く反応した。同時に患者血清IgG抗体とAg53との反応は患者間で明らかに異なるという特徴がみられた。

2. Ag53の精製

確立した6種の単クローン抗体産生ハイブリドーマ株の1つから得た単クローン抗体(MABgE)を用いてAg53の精製を行った。アフィニティークロマトグラフィーで精製したAg53はSDS-PAGEで53kDaの位置に単一バンドを形成した。

3. Ag53の形状

(i) Ag53と血清IgG抗体の反応

SEに対して高い血清IgG抗体価を示す77名の歯周病患者のうち, 54名の患者血清IgGがAg53と反応した。残りの23名の患者と5名の健常者の血清IgGはAg53と全く反応しなかった。他の健常者の5名の血清IgGはAg53と反応したものの, その反応は弱かった。Ag53に反応しない患者は早期発症型のRPPとJPに多い傾向があった。

(ii) Ag53の局在

MABgEを用いた免疫電子顕微鏡観察から, Ag53は*P. gingivalis*の小胞表層に局在し

て検出された。また、SDS-PAGEおよびMABgEを用いたウェスタンブロット法により、*P. gingivalis* の外膜・小包のいずれの画分にもAg53が構築成分として存在した。

(iii) *Porphyromonas* および *Prevotella* 種におけるAg53の分布

MABgEは*P. gingivalis*1021およびATCC 33277の67kDa抗原とおよび*P. endodontalis* ATCC 35406の53kDa抗原と反応したが、その他の*Porphyromonas*および*Prevotella*種菌株とは反応しなかった。

【考察と結論】

1. *P. gingivalis* 菌体に対して高い血清IgG抗体価を示す歯周病患者でも、Ag53に対して強く感作される者と感作されない者があった。
2. Ag53は*P. gingivalis* の外膜および小包に共通する構築成分であるが、小包表層にのみ特異的に発現していると考えられる。Ag53と共通するエピトープを持つ他の*P. gingivalis* 菌株の67kDa抗原が見いだされた。この共通な構造を有する2つの*P. gingivalis* 抗原は歯周病の新しい分類の指標となる可能性が示唆される。
3. Ag53は*P. gingivalis* の感染を示す特異なマーカーであるとともに、歯周病患者にみられる多様な体液性免疫応答の一面を表現し得る抗原である。

論文審査の結果の要旨

本研究は、歯周病原性細菌として注目されている*Porphyromonas gingivalis* から、歯周病患者間で異なる体液性免疫応答を示す特異抗原を分離・精製し、そのものの性状を明らかにしたものである。

P. gingivalis が感染の主体と考えられる歯周病患者は、53kDaの分子量を有する精製抗原 (Ag53) に対する血清IgG抗体の反応の有無によって二分された。また、Ag53は*P. gingivalis* の小包および外膜に共通する構築成分であった。*P. gingivalis* は、Ag53およびAg53と共通するエピトープを有する67kDa抗原によって新たに分類できることが示唆された。

これらの知見は、歯周病の発症と進行に関わる*P. gingivalis* の役割の解明に寄与する価値ある研究業績である。

よって、本申請者は博士 (歯学) の学位を得る資格があると認める。