

成人歯科検診受診者の歯周病原性細菌に対する血中抗体価と Community Periodontal Index の関連性

鹿児島大学大学院歯学研究科
(指導教員 於保 孝彦 教授)

申請者氏名 鉛山 ゆかり

歯周病は細菌感染によって生じる歯周組織の炎症性変化であり、症状の進行に伴って歯の支持組織の破壊、ひいては歯の喪失に繋がると考えられている。歯肉溝に棲息する多数の細菌の中で、特に歯周病と関連が深いと考えられているのは *Porphyromonas gingivalis* と *Aggregatibacter (Actinobacillus) actinomycetemcomitans* で、歯周病においてはこれらの細菌に対する血清の特異抗体価が上昇することが報告されている。しかし、現在の測定方法については、その診断学的価値を高めるために多くの改善の余地が残されている。その一つとして、*A. actinomycetemcomitans* には5つの異なる血清型(抗原性)の菌株の存在が知られており、病原性の違いが示唆されている。しかし抗体価を測定するための抗原物質の違いについて十分な検討はなされていない。本研究では *A.*

actinomycetemcomitans の各血清型に対する抗体価を測定して歯周病の程度との関連性を分析した。同時に *P. gingivalis* の全菌体と精製線毛に対する抗体価を測定し、使用する抗原による比較を行った。これらの結果から、*P. gingivalis* と *A. actinomycetemcomitans* に対する血清抗体価を歯周病診断に応用する際の信頼性と、さらなる可能性について検討した。

鹿児島県 A 町に居住する 40 歳以上の成人 183 名(男性 80 名、女性 103 名、年齢 40~85 歳、平均 58.0 歳)を対象に調査を行った。歯周組織の評価は Community Periodontal Index (CPI) を用いて行った。*A. actinomycetemcomitans* の各血清型(a~e)の全菌体、および *P. gingivalis* の全菌体、同精製線毛に対する IgG 抗体価は Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) 法により測定した。菌株として *A. actinomycetemcomitans* は、ATCC 29523 (血清型 a)、Y4 (血清型 b)、NCTC 9710 (血清型 c)、IDH 781 (血清型 d)、IDH 1705 (血清型 e) を、*P. gingivalis* は ATCC 33277 を用い、それぞれの凍結乾燥菌体をリン酸緩衝生理食塩水に懸濁し、氷冷下にて超音波粉碎を行った後冷却した。これを繰り返して全菌体抗原とした。また *P. gingivalis* の主線毛は、既報に従って精製した。各抗原を ELISA 用プレートに吸着させた後、ブロッキングを行い、その後、希釈した被験者の血清を加えてインキュベートした。プレート洗浄後、アルカリフォスファターゼ標識抗ヒト IgG 抗体を反応させ、p-ニトロフェニルリン酸溶液を用いた発色反応を行い、吸光度を測定した。実験毎に標準血清の段階希釈液を用いて反応を行い、4パラメーターロジスティック変換により測定値を補正した。各被験者血清の抗体価は標準血清の抗体価を 100 ELISA units (EU) とした時の相対値で表した。

各々の抗原に対する抗体価間では、*A. actinomycetemcomitans*の各血清型に対する抗体価間全てに有意な正の相関が認められ、c型、e型に対する抗体価は抗*P. gingivalis*全菌体抗体価とも有意な正の相関を示した。抗*P. gingivalis*線毛抗体価は抗*P. gingivalis*全菌体抗体価と*A. actinomycetemcomitans*のa型全菌体に対する抗体価に相関を示した。歯周病重症度とは*A. actinomycetemcomitans*の血清型aとeの全菌体、*P. gingivalis*の全菌体、同線毛に対する抗体価が有意な相関を示した。

今回歯周疾患の指標として用いたCPIと各種抗原に対する抗体価との関連性を調べた結果では、歯周病の集団検診に抗*P. gingivalis*抗体価を測定する方法が効果的であることが示された。さらに*A. actinomycetemcomitans*の5つの血清型の中で、aおよびe型に対する抗体価はCPIとの関連性が示唆されたことから、これらの菌由来の抗原は歯周病の診断に使用できる可能性が示された。*P. gingivalis*と*A. actinomycetemcomitans*はともに歯周病原菌として知られているが、その病態は異なっており、各々の菌に対する抗体価を併用することで、より正確な歯周病診断が可能になるものと思われる。

(口腔衛生学会雑誌58巻1号, 2008年1月掲載予定)

平成20年2月7日

鹿児島大学大学院
歯学研究科長 殿

学位審査委員会

主査 於保孝彦

副査 中村典史

副査 松口徹也

副査 野口和行

学位論文審査経過報告書

平成19年12月19日（水）開催の第269回研究科委員会で付託された下記申請者の論文審査と試験（学力確認）を終了しましたので、経過を報告します。

学位申請者 鉛山 ゆかり

第1回審査委員会：平成19年12月19日（水）18:30～18:45（歯学部大会議室）

1. 本委員会の主査として於保委員を選出した。
2. 論文審査は、申請者による口頭説明および審査委員との質疑応答で行うこととした。
3. 大学院博士課程修了者と同程度の学力、識見を有することの確認は、論文内容とそれに関連した事項についての質疑応答によって行うこととした。
4. 第2外国語（独語）の学力確認は独文和訳2題によって行い、出題は於保委員と野口委員が行うこととした。
5. 申請者に対する審査は、平成20年2月4日（月）16:30より第7セミナー室において行うこととした。

第2回審査委員会：平成20年2月4日（月）16:30～17:50（第7セミナー室）

1. 第1回審査委員会で協議した手順に従って審査を行った。
2. 第2外国語は独文和訳2題を課し、十分な学力を有することを確認した。
3. 申請者による約25分の論文内容の説明を受けた後、各審査委員と申請者との間で、次のような質疑応答が行われた。

Q1. 和文タイトルと英文抄録のタイトルが少し違う。英文には Kagoshima-prefecture が含まれているが、和文には地域のことは示されていない。本研究は、歯周病原性が地域および人種により特異性があるということを意識しての研究ではないのでしょうか？

A1. 確かに、地域によって特異性はあると言われていますが、タイトルにはそういった意味は含めておりません。特に地域性などを重視して英文に Kagoshima-prefecture 含めたわけではありませんでした。

Q2. 標準血清は *P. gingivalis* に対する抗体価が高かった 13 名から得たということですが、歯周病患者さんから採取したものでしょうか？

A2. 分析対象者とは別の歯周病に罹患している患者さんから得たものです。

Q3. ELISA の方法ですが、標準血清の ELISA Unit を 100 としてありますが、何を 100 としているのですか？

A3. 標準血清を 6 段階で希釈してそれぞれの吸光度を測定し、標準曲線を作成し、これらの標準血清の 1 倍希釈の時の値を 100 としています。

Q4. *P. gingivalis* の菌株として ATCC33277 を使用していますが、この株を使った理由がありますか？

A4. ポピュラーな株で、よく使用されています。

Q5. *A. actinomycetemcomitans* の血清型は糖鎖抗原の違いによるということですが、LPS 中のポリサッカライドに対する違いということですか？

A5. *A. actinomycetemcomitans* 表層に存在する LPS 中の O 抗原の違いによると考えています。

Q6. 急性期にあつて炎症がアクティブな場合は、慢性期にある場合と同様な抗体価を示すのですか？

A6. 慢性期に比べてアクティブな炎症がある場合は、高い抗体価が出る可能性はあると思います。ただ、抗体価は過去から現在までの感染を反映するため、必ずしもすぐに高い抗体価を示すとは限らないと思います。

Q7. *A. actinomycetemcomitans* の血清型の分布は様々なようですが、抗体価は主に何に影響を受けるのですか？

A7. やはり、人種、地域、病原性の差が影響していると思います。

Q8. 各種抗原に対する抗体価間の関連性について Spearman の順位相関係数解析を行っていますが、一般にこの解析では相関係数 0.2~0.4 では低い相関とされているため、相関係数 0.4 以上のものを相関があるとすべきではないのでしょうか？

A8. ご指摘の通り相関係数がかなり低いものもありますが、低いながらも統計学的には有意な相関があると判断しました。その中でも b 型と d 型の間には高い相関があるとみなしました。

Q9. ELISA の解析で全菌体を使っていることに問題を覚えます。全菌体を使用すると、LPS の構造の異なる部位だけでなく、かなり共通の菌体成分が含まれるため、a~e 型に対する抗体価にかなり相関が出てくるとは思いますがいかがでしょうか？

A9. ご指摘の通り全菌体を使用しているため、共通抗原を認識して、抗体価間に相関がみられると思います。しかし、その中でも b 型と d 型の間には特に高い相関がみられたことは意味があると思われます。今後、共通抗原の影響を少なくするために、精製した抗原を使用すべきであると思います。

Q10. 各種抗原に対する抗体価間に関連性があるというのは何を意味しているのですか？

A10. あくまで推測ですが、血清型 d を持っている人は血清型 b も持っている可能性があると思います。

Q11. 両方の抗原をもっていると判断するか、共通抗原の影響か、どう思いますか？

A11. 全体的に *A. actinomycetemcomitans* に対する抗体価間には相関があります。これは共通抗原がかなり影響していると思います。しかし、b 型と d 型は高い相関がありますので、両方の抗原をもっているという可能性もあると思います。

Q12. 今回 *A. actinomycetemcomitans* の血清型についてのみ着目し、*P. gingivalis* の血清型については調べていないのは何故でしょうか？

A12. *A. actinomycetemcomitans* は若年性歯周炎の原因菌として知られていますが、一般的な成人性歯周炎の原因菌は *P. gingivalis* のみでなく、*A. actinomycetemcomitans* を含め他の細菌も原因菌と考えられます。成人性歯周炎の原因菌として *P. gingivalis* については多数の報告がありますが、*A. actinomycetemcomitans* についての報告は少ないので今回この菌の血清型に着目いたしました。

Q13. *A. actinomycetemcomitans*、*P. gingivalis* の両方陽性、あるいは片方だけ陽性の場合があると思いますが、CPI コードとの相関はどのようなのでしょうか？

A13. 今回は調べていませんが、両菌が陽性の場合抗体価が高くなる可能性があると思われる。

Q14. 血清抗体価の測定は、細菌を直接培養して PCR 等で調べる方法より感度が低いので大衆を対象にした検査に有効であろうということですが、これは将来的にはチェアサイドの歯周病リスク診断への応用をイメージして研究しているのですか？

A14. チェアサイドでの応用は今のところ考えておりません。あくまでも、スクリーニング検査としての応用の可能性を考えております。

Q15. CPI コードと各抗体価との関連性ですが、相関があるといっても相関係数は低いと思います。臨床的に用いることができるのでしょうか？

A15. 確かに *P. gingivalis* 線毛などと比較して相関係数は低いと思います。*P. gingivalis* 線毛との組み合わせ、あるいはさらに *A. actinomycetemcomitans* の抗原を精製し、共通抗原の影響を受けないような工夫が必要と思います。

Q16. CPI コードと各抗体価の関連性ですが、かなり標準偏差が大きい。この結果はスクリーニングに使えるのでしょうか？

A16. 抗体価が 0 に近い人はスクリーニングが困難と思われます。抗原の精製、細菌の種類を増やすなどの工夫が必要と思います。

Q17. スクリーニングにおいては false positive はあってもよいが、false negative はあってはならないと思います。歯周病は最終的には口腔内診査をするのがよいのではないのでしょうか？

A17. 確かに、直接口腔内診査を行うのが一番よいのですが、全身的な健康診断等の際に採取した血液を使用できるという点が利点だと思います。

以上の質疑応答を終了した後、本審査委員会は、学位論文の評価および申請者の学力、識見の評価を行った。

その結果、本審査委員会は、本論文が学位論文として十分な価値を持ち、さらに、申請者が大学院歯学研究科博士課程修了者と同等の学力ならびに識見を有し、博士（歯学）の学位を与えるに十分な資格を有するものと判定した。

第3回審査委員会：平成20年2月5日（火）（持ち回り）
歯学研究科長に提出する書類を作成した。

論文審査要旨および担当者

様式 15

報告番号	歯論第 70 号	氏名	鉛山 ゆかり	
論文審査担当者	主査	於保 孝彦		
	副査	中村 典史	松口 徹也	野口 和行

成人歯科検診受診者の歯周病原性細菌に対する血中抗体価と Community Periodontal Index の関連性

歯周病は細菌感染によって生じる歯周組織の炎症性変化であり、症状の進行に伴って歯の支持組織の破壊、ひいては歯の喪失に繋がると考えられている。歯肉溝に棲息する多数の細菌の中で、特に歯周病と関連が深いと考えられているのは *Porphyromonas gingivalis* と *Aggregatibacter (Actinobacillus) actinomycetemcomitans* で、歯周病においてはこれらの細菌に対する血清の特異抗体価が上昇することが報告されている。しかし、現在の測定方法については、その診断学的価値を高めるために多くの改善の余地が残されている。その一つとして、*A. actinomycetemcomitans* には 5 つの異なる血清型（抗原性）の菌株の存在が知られており、病原性の違いが示唆されている。本研究では *A. actinomycetemcomitans* の各血清型に対する抗体価を測定して歯周病の程度との関連性を分析した。同時に *P. gingivalis* の全菌体と精製線毛に対する抗体価を測定し、使用する抗原による比較を行った。これらの結果から、*A. actinomycetemcomitans* と *P. gingivalis* に対する血清抗体価を歯周病診断に応用することの信頼性と、さらなる可能性について検討した。

鹿児島県 A 町に居住する 40 歳以上の成人 183 名（男性 80 名、女性 103 名、年齢 40～85 歳、平均 58.0 歳）を対象に調査を行った。歯周組織の評価は Community Periodontal Index (CPI) を用いて行った。*A. actinomycetemcomitans* の各血清型 (a～e) の全菌体、および *P. gingivalis* の全菌体、同精製線毛に対する IgG 抗体価は Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) 法により測定した。菌株として *A. actinomycetemcomitans* は、ATCC 29523 (血清型 a)、Y4 (血清型 b)、NCTC 9710 (血清型 c)、IDH 781 (血清型 d)、IDH 1705 (血清型 e) を、*P. gingivalis* は ATCC 33277 を用い、それぞれの凍結乾燥菌体をリン酸緩衝生理食塩水に懸濁し、全菌体抗原とした。また *P. gingivalis* の主線毛は、既報に従って精製した。各抗原を ELISA 用プレートに吸着させた後、ブロッキングを行い、その後、希釈した被験者の血清を加えてインキュベートした。プレート洗浄後、アルカリフォスファターゼ標識抗ヒト IgG 抗体を反応させ、p-ニトロフェニルリン酸溶液を用いた発色反応を行い、吸光度を測定した。実験毎に標準血清の段階希釈液を用いて反応を行い、4 パラメーターロジスティック変換により測定値を補正した。各被験者血清の抗体価は標準血清の抗体価を 100 ELISA units (EU) とした時の相対値で表した。

各々の抗原に対する抗体価間では、*A. actinomycetemcomitans* の各血清型に対する抗体価間全てに有意な正の相関が認められ、特に b 型と d 型の間には強い相関が認められた。また c 型、e 型に対する抗体価は抗 *P. gingivalis* 全菌体抗体価とも有意な正の相関を示した。抗 *P. gingivalis* 線毛抗体価は a 型の *A. actinomycetemcomitans* 全菌体に対する抗体価と抗 *P. gingivalis* 全菌体抗体価に相関を示した。歯周病重症度とは *A. actinomycetemcomitans* の血清型 a と e の全菌体、*P. gingivalis* の全菌体、同線毛に対する抗体価が有意な相関を示した。

今回歯周疾患の指標として用いたCPIと各種抗原に対する抗体価との関連性を調べた結果では、歯周病の集団検診に抗*P. gingivalis*抗体価を測定する方法が効果的であることが示された。さらに*A. actinomycetemcomitans*の5つの血清型の中で、aおよびe型に対する抗体価はCPIとの関連性が示唆されたことから、これらの菌由来の抗原は歯周病の診断に使用できる可能性が示された。*P. gingivalis*と*A. actinomycetemcomitans*は、ともに歯周病原菌として知られているが、その病態は異なっており、各々の菌に対する抗体価を併用することで、より正確な歯周病診断が可能になるものと思われる。

以上、本論文は成人健康診査で得られた血清中の歯周病細菌に対する抗体価を測定し、歯周病重症度との関連性を示したものである。これらの結果は、集団を対象とした歯周病のスクリーニング検査において、血清抗体価を診断に応用することの信頼性と今後の発展性について有用な情報を提供しているものと思われる。よって本審査委員会は、本論文が学位論文として価値があるものと判断した。

試験(学力確認)の結果の要旨および担当者

様式16

報告番号	歯論第 70 号	氏名	鉛山 ゆかり	
論文審査担当者	主査	於保 孝彦		
	副査	中村 典史	松口 徹也	野口 和行
<p>審査委員会は、平成20年2月4日(月)、上記学位申請者に面接して学位論文の内容について説明を求めると共に、これと関連する細菌学および免疫学的諸問題や歯周病との関連についての試問を行った結果、いずれも満足すべき回答が得られた。</p> <p>なお、第1外国語(英語)については、平成15年8月1日に実施された学位取得のための第1外国語試験に合格していることが確認され、また第2外国語試験(独語)についても独文和訳の結果から、大学院博士課程修了者と同等の学力があると判断された。</p> <p>以上のことから、申請者は大学院歯学研究科博士課程修了者と同等あるいはそれ以上の学力と識見を有するものと認め、博士(歯学)の学位を与えるに十分な資格を持つものと判断した。</p>				