



Title	Bacteroides gingivalis 線毛蛋白の経口免疫によるマウスの体液性免疫応答の誘導に関する研究
Author(s)	島内, 英俊
Citation	大阪大学, 1990, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/36815
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

Bacteroides gingivalis 線毛蛋白の経口免疫による
マウスの体液性免疫応答の誘導に関する研究

大阪大学歯学部口腔治療学講座
(主任：岡田 宏教授)

島 内 英 俊

緒 言

ヒトや動物に寄生し、あるいは病原性を発揮する細菌細胞の最表層には、しばしば繊維状構造物、すなわち線毛(fimbriae, pili)が存在し、細菌の生体への付着、あるいは菌体間の相互作用に関与すると考えられている¹⁾。例えば、エンテロトキシン産生性のEscherichia coli²⁾やNeisseria gonorrhoeae³⁾は、線毛により当該粘膜部位へ付着した後体内へ侵入し、これら細菌に独特の病原性を発揮することが報告されている。線毛にはこのような付着因子(adhesin)としての機能のみならず、ウサギのバイエル氏板より分離した単核細胞とE. coliの1株より得たAF/R1線毛を共に培養すると、その培養上清中には同線毛に対する特異抗体が分泌される。すなわち、線毛は消化管に隣接するリンパ節(GALT)中に存在するリンパ球を刺激することにより特異免疫応答を誘導する⁴⁾。より直截には、下痢症患者の腸管分泌液中ではエンテロトキシン産生性E. coliに由来するCFA/IならびにCFA/II両線毛に対する特異抗体価が上昇することが報告されている⁵⁾。これらの研究結果は、線毛保有菌による粘膜感染症において、線毛がGALTを刺激して特異免疫応答を誘導することを示唆している。

さらに、線毛に対する特異抗体は、線毛を介した付着を阻害することが期待され、線毛保有菌による感染症の初期に線毛ワクチンが有効に働くと考えられる。従って、現在までに様々な菌種において線毛ワクチンが開発されて、同菌による感染を防御することが報告されている⁶⁻⁸⁾。

Bacteroides gingivalisは、ヒト口腔由来の糖非分解性の黒色色素産生性の細菌であり⁹⁾、成人性歯周炎の有力な原因菌のひとつと考えられている¹⁰⁻¹³⁾。さらに、同歯周炎患者の血清中には、B. gingivalisの抗原性物質に対する特異免疫応答が誘導されることが明らかにされている¹⁴⁻¹⁶⁾。従って、こうして生じた特異抗体が歯周炎の発病にどのように関わっているかについては、免疫学的な観点からも注目されている。B. gingivalisの菌体最表層にも他のグラム陰性菌と同様に線毛の存在が以前より知られており¹⁷⁾、これら線毛の単離・精製の試みも行なわれている¹⁸⁾。B. gingivalisの線毛は、分子量が41Kのサブユニット蛋白に

より構成されており、最近、この線毛をコードする遺伝子のクローニングで、全塩基配列とアミノ酸配列が決定された¹⁹⁾。

さらに、*B. gingivalis* の精製線毛蛋白を抗原として、成人性歯周炎患者の血清中の特異抗体レベルを検索すると、健常対照群に比して明らかにそのレベルに上昇が認められた²⁰⁾。さらに、Ogawa ら²¹⁾ は最近、成人性歯周炎の悪化に伴い病巣部歯肉組織中に同線毛抗原に対する特異抗体産生細胞が著しく増加することを明らかにした。これらの所見から、*B. gingivalis* の線毛は強い免疫原性を有し、同菌の感染に継起して宿主の免疫応答が全身あるいは局所粘膜中に誘導されることが示唆される。

本研究は、細菌の表層蛋白抗原に対する宿主の免疫応答を解析することを目的として、*B. gingivalis* の精製線毛抗原を用いて、マウスに投与し、その投与経路やマウスの系統差による全身的ならびに局所的な免疫応答について体系的に検討しようとするものである。

材料と方法

1. 実験動物

実験動物として、9つの異なる系統の雄性マウス（体重20～24g，生後6週齢）10～12匹を一群として用いた。供試したマウスのうち、BALB/c，DBA/2，C57BL/6，CBA/J，C3H/HeN，C3H/HeJ マウスは、日本チャールスリバー株式会社（厚木）より、C57BL/10，B10.BR，B10.D2マウスは、日本エスエルシー株式会社（浜松）よりそれぞれ購入した。

2. 供試菌株

本研究に用いた*B. gingivalis* 381 線毛保有株は、本学口腔細菌学教室より分与を受けた。

B. gingivalis 381株の培養は、ヘミン(5mg/ℓ，和光純薬，大阪)およびメナジオン(10μg/ℓ，和光)を添加したGAM ブイヨン(日水製薬，東京)に本菌を接種し、嫌気チェンバー (Model 1024, Forma Scientific, Marietta, Ohio, U.S.A.) を用いて、5% CO₂-5% H₂-90% N₂ 混合ガスによる嫌気的条件下で、37℃，26時間行なった。

3. 線毛抗原の分離ならびに精製

B. gingivalis 381 株の菌体からの線毛の分離ならびにその大量精製法は、Yoshimura ら¹⁸⁾ の記載を一部改変して行なった。すなわち、GAM ブイヨン（日水製薬）16ℓ 中で嫌気培養後、10,000 x g, 25℃, 30分間の遠心により集菌した菌体（約120 g, 湿重量）を、0.15M NaClおよび10mM MgCl₂ を含む20mMトリス塩酸緩衝液 (pH7.4) に再度懸濁し、十分にピペティングし、線毛を菌体から機械的に剥離した。10,000 x g, 25℃, 30分間の遠心により菌体を除去後、線毛を含む遠心上清に40%飽和となるように硫酸アンモニウムを加えて、4℃で16時間静置した後、沈殿物を25,000 x g, 4℃, 30分間遠心により集め、約50mℓの20mMトリス塩酸緩衝液 (pH 8.0) に再び懸濁し、さらに25ℓ の同緩衝液に対して透析した。透析内液を10,000 x g, 4℃, 15分間後不溶物を除去して得た上清を、20mMトリス塩酸緩衝液 (pH8.0) で平衡化したDEAE-Sephadex Fast Flow (Pharmacia LKB Biotechnology, Uppsala, Sweden) カラム(5cm x 15cm)を用いて分画した。すなわち、1.5ℓの20mMトリス塩酸緩衝液 (pH8.0) でカラムを洗浄後、0.15M NaClを含む20mMトリス塩酸緩衝液 (pH8.0) により線毛を溶出させた。線毛を含む画分を集め、硫酸アンモニウムを50%飽和になるように加え線毛蛋白を沈殿させた。得られた沈殿物を25,000 x g, 4℃, 30分間遠心して集め、再度少量の20mMトリス塩酸緩衝液 (pH8.0) に懸濁し、さらに20mMトリス塩酸緩衝液 (pH8.0) に対して透析したものを、精製線毛抗原とした。

精製線毛標品中の蛋白量の定量は、Smith ら²²⁾ の記載に従い、ウシ血清アルブミン (BSA, Fraction V; Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo, U.S.A.) を標準蛋白として用い、BCA プロテインアッセイキット (Pierce, Rockford, Ill, U.S.A.) を用いて定量した。

4. SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動

線毛抗原の精製の程度は、Neville²³⁾ の記載に従い、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) 法により調べた。すなわち、濃縮用ゲルとして4%ポリアクリルアミドゲル、分離用ゲルとして12% ポリアクリルアミドゲルをそれぞれ用いて、1% SDS存在下で100℃, 5分間熱処理を行な

った試料を20mAの定電流下で90分間泳動した。泳動終了後、ゲルをクマシーブルー (Sigma) を用いて25℃, 60分間染色した。なお、標準分子量マーカーとしては、電気泳動用低分子量キャリブレーションキット (Pharmacia LKB) を用いた。

5. 供試アジュバント

免疫実験に用いたアジュバントである N^2 -[(*N*-Acetylmuramyl)-*L*-alanyl-*D*-isoglutaminyl]- N^6 -stearoyl-*L*-lysine [MDP-Lys(L18)]²⁴⁾ は、第一製薬製品企画部 (東京) より、また、*Lactobacillus plantarum* 由来の半合成ジサッカリドテトラペプチドである Sodium- β -*N*-acetylglucosaminyl-(1 $\rightarrow$ 4)-*N*-acetyl-muramyl-*L*-alanyl-*D*-isoglutaminyl-(*L*)-stearoyl-(*D*)-*meso*-2, 6-diaminopimelic acid-(*D*)-amide-*D*-alanine (GM-53)²⁵⁾ は、大日本製薬総合研究所 (大阪) よりそれぞれ供与された。

6. 免疫原の調製

投与媒体として用いたリボソームは Inoue²⁶⁾ の記載に従って調製した。すなわち、レシチン (DL- α -phosphatidyl choline, dipalmitoyl, Grade I; Sigma) およびコレステロール (Sigma) を各々30 μ Mずつ、茄子形フラスコ中でクロロフォルム3mlに溶解後、ロータリーエバポレーターで減圧乾固し、フラスコ内面にリボソーム人工膜を形成した。20mMトリス塩酸緩衝液 (pH8.0) に所定の濃度に溶解した線毛抗原を、単独あるいは所定量のアジュバントと共に同フラスコに容れ、55℃の恒温槽中で振盪することによりリボソームを作製した。なお、一部の実験においては、所定量の線毛抗原を20mMトリス塩酸緩衝液 (pH8.0) に溶解したものを免疫原として用いた。

7. 免疫実験のスケジュール

1) 免疫

経口免疫では、所定量の線毛抗原を単独ないしはアジュバントと共にリボソームに取り込ませたものあるいは20mMトリス塩酸緩衝液 (pH8.0) に溶解させたものをそれぞれ免疫原として、図1に示したように初回免疫として0, 1日目に、追加免疫として27, 28日目に、経口ゾンデ (夏目製作所, 東京) を用いて、一群10~12匹のマウスに各々0.25mlずつ経口投与し

た。

一方，皮下免疫では，経口免疫の場合と同様にして調製した免疫原を，0，28日目にそれぞれ初回および追加免疫としてマウス背部皮下に各々0.25ml /匹ずつ注射した。追加免疫後5日目，すなわち初回免疫後33日目に，ジエチルエーテル麻醉下で，眼窩下静脈叢より微量採血管（テルモ，東京）を用いて採血し，遠心により血清を分離した。また，唾液は，ネンブタール（大日本製薬）麻醉下（40μg/g 体重）で，塩酸ピロカルピン（和光，5μg/g 体重）を腹腔内に注射した後，分泌される唾液をパスツールピペットを用いて採取した。被験血清ならびに唾液は，抗体濃度の測定まで-20℃で凍結保存した。

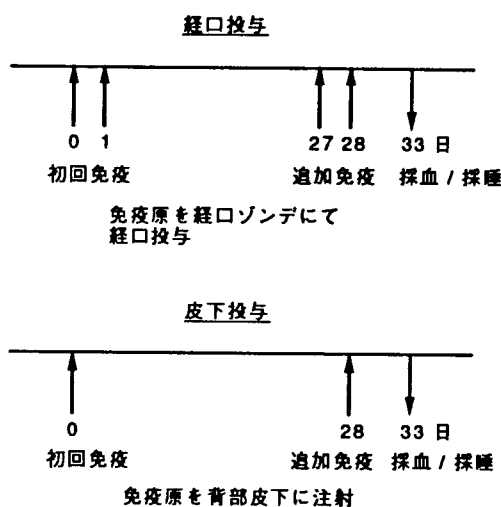


図1 免疫実験のスケジュール

2) 試料中の抗体濃度の算出

被験血清ならびに唾液中の抗線毛抗体濃度の測定はVollerら²⁷⁾の記載を一部改変した酵素結合抗体免疫アッセイ(ELISA)を用いて行ない，その免疫グロブリンクラスならびにサブクラスも併せて調べた。すなわち，線毛抗原を0.1M重炭酸緩衝液(pH9.6)に10μg/mlの濃度になるように溶解し，96穴平底マイクロプレート(M128; Dynatech LaboratoriesLtd.)

Billingshurst, U.K.)の各ウェルに100 μ l ずつ加えた後、プレートを4 $^{\circ}$ C, 16時間静置した。0.05% Tween 20 (和光) および0.2%アジ化ナトリウム (和光) を含むPBS (PBS-T) にてプレートの各ウェルを3回洗浄後、1% BSA (Sigma)溶液を各ウェルに容れ、再度4 $^{\circ}$ C, 16時間静置し処理した。PBS-T で洗浄後、所定の濃度にPBS-T で希釈した被験血清ならびに唾液を各々100 μ l ずつ各ウェルに添加し、4 $^{\circ}$ C, 16時間反応させた。反応終了後ウェルを洗浄し、さらに、各免疫グロブリンのクラス別の測定には、PBS-T で 1,000倍に希釈したアルカリフォスファターゼ標識ヤギ抗マウスIgG(γ 鎖特異性; Zymed Laboratories Inc., San Francisco, Calif., U.S.A.), IgM(μ 鎖特異性; Zymed)ならびにIgA(α 鎖特異性; Zymed)抗体, またサブクラスの測定には、500倍に希釈したアルカリフォスファターゼ標識ウサギ抗マウスIgG1(γ 1鎖特異性; Zymed), IgG2a(γ 2a鎖特異性; Zymed), IgG2b(γ 2b鎖特異性; Zymed)ならびにIgG3(γ 3鎖特異性; Zymed)抗体を用い、これらの抗体を各々100 μ l ずつ各ウェルに加え、37 $^{\circ}$ C, 2時間反応させた。PBS-T で洗浄後、*p*-nitrophenyl phosphate (Phosphate Substrate 104; Sigma)をジエタノールアミン溶液(pH9.8) にて 1mg/ml の濃度に溶解し、その基質溶液100 μ l を加えて25 $^{\circ}$ C, 30分間反応させた。次いで、50 μ l の3N塩酸を各ウェルに添加して反応を停止後、波長405nm における吸光度(A_{405})を、Titertek Multiskan MC photometer (Flow Laboratories Inc., McLean, Va., U.S.A.) を用いて測定した。測定は各試料ごとに4通り行ない、 A_{405} の平均値を測定値とした。

被験血清ならびに唾液中の抗線毛抗体の濃度は、以下に記載する標準検量線を用いて算出した。すなわち、96穴平底マイクロプレート (Dynatech) の各ウェルに、重炭酸緩衝液(pH9.6) で10 μ g/ml の濃度に希釈したヤギ抗マウスIgG(γ 鎖特異性; Zymed), IgM(μ 鎖特異性; Zymed)ならびにIgA(α 鎖特異性; Zymed)抗体を100 μ l ずつ添加し、4 $^{\circ}$ C, 16時間静置した。PBS-T で洗浄後、100 μ l の1% BSA (Sigma)溶液を各ウェルに容れ処理した。さらにPBS-T で洗浄後、試料中の抗体濃度を測定する検量線を作成するためにPBS-T を用いて2倍連続希釈した精製マウスIgG(Zymed), IgM(マウスミエローマ蛋白TEPC185; Cappel, Oraganon Teknika Corpora-

tion, West Chester, Pa., U.S.A) ならびに IgA (MOPC315; Cappel) 各々 100 μ l を各ウェルに添加した。4 $^{\circ}$ C, 16時間反応後, ウェルを洗浄し, 二次抗体として PBS-T で 1,000倍に希釈したアルカリフォスファターゼ標識ヤギ抗マウス IgG (Zymed), IgM (Zymed) ならびに IgA (Zymed) 各抗体をそれぞれ各ウェルに 100 μ l ずつ容れ, 37 $^{\circ}$ C, 2時間反応した。また IgG 抗体の各サブクラスについては, 同様にマウス IgG1 (MOPC21; Cappel), IgG2a (RPC5; Cappel), IgG2b (MOPC195; Cappel), IgG3 (FLOPC212; Cappel) 各抗体を 2倍連続希釈してそれぞれ 100 μ l をウェルに添加した。ついで, 二次抗体としてアルカリフォスファターゼ標識ウサギ抗マウス IgG1 (Zymed), IgG2a (Zymed), IgG2b (Zymed) あるいは IgG3 (Zymed) 各抗体を用い, 4 $^{\circ}$ C, 16時間反応後, PBS-T で各ウェルを洗浄した。反応基質溶液を加え 30分間反応した。さらに 3N塩酸にて反応停止後, A_{405} を測定し, 4通りの平均値を測定値とした。免疫グロブリンクラスならびにそのサブクラス別の各抗体濃度による用量反応曲線を得た。この曲線を PC9801vm パーソナルコンピューター (NEC, 東京) を用いて log-logit 変換^{2a)}を行ない, 各標準検量線を作成した。これら標準検量線を用いて, 被験血清ならびに唾液中の抗線毛抗体濃度を算出した。

3) 統計処理

各実験群間の有意差の検定は, Student の t-検定を用いて行なった。

結 果

1. 精製線毛抗原の調製

B. gingivalis の精製線毛蛋白標品を DEAE-Sephrose Fast Flow イオン交換カラムクロマトグラフィーを行なったところ, 線毛抗原は, 0.15M NaCl により単一のピークとして溶出した (図2)。このピーク画分を 1% SDS 存在下で 100 $^{\circ}$ C, 5分間処理したものを SDS-PAGE により分析を行なった結果, 分子量 41K の単一のバンドが認められた (図3)。以上の結果から, 上記の方法で調製された線毛は, 十分な精製度を有する蛋白質標品であることが明らかになった。

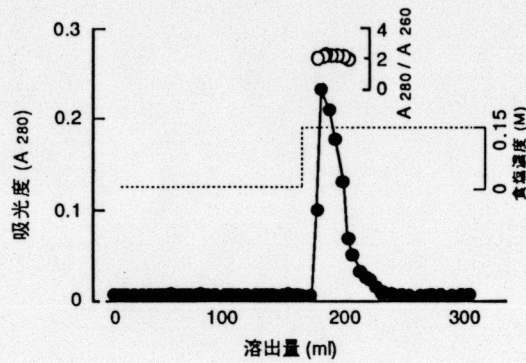


図2 DEAE-Sepharose Fast Flowカラムクロマトグラフィーによる線毛蛋白の溶出パターン

B. gingivalis 菌体より抽出した粗線毛標品を、20mMトリス塩酸緩衝液 (pH 8.0) で平衡化したDEAE-Sepharose Fast Flowカラム (内径5cm x 高さ15cm) に吸着し、0.15M のNaClの段階的濃度勾配により溶出した。●は、波長280 nmで測定した時の吸光度 (A_{280})、○は、波長280 nmと波長260 nmにおける吸光度の比 (A_{280}/A_{260}) を各々表わす。

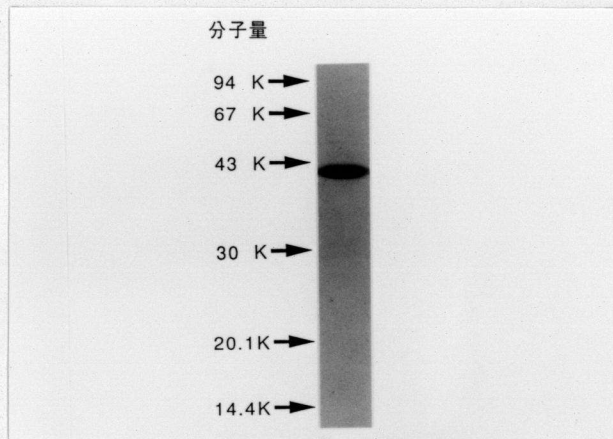


図3 *B. gingivalis* 精製線毛のSDS-PAGEのパターン

1% SDS存在下で100 °C, 10分間精製線毛を処理し、20mAの定電流で12% ポリアクリルアミドゲルに泳動したときのパターンを示す。なお、標準分子量マーカーとして、 α -ラクトグロブリン (14.4K), 大豆トリプシン阻害因子 (20.1K), カルボニックアンヒドラーゼ (30K), 卵白アルブミン (43K), ウシ血清アルブミン (67K) ならびにホスホリラーゼ b (94K) を用いた。

2. 経口投与における投与条件の検討

1) 投与媒体

精製した線毛抗原 ($500\mu\text{g}$ / 匹) をリボソームに取り込ませて 0, 1 日目および 27, 28 日目に BALB/c マウスに各々経口投与したところ, 血清中の抗線毛抗体濃度, 特に IgG クラスが線毛抗原非投与群にくらべて有意に上昇した ($p < 0.05$)。しかしながら, 投与媒体をリボソームから 20mM トリス塩酸緩衝液 (pH 8.0) に変えると, マウスの血清中の特異抗体濃度の上昇は認められなかった (図 4)。

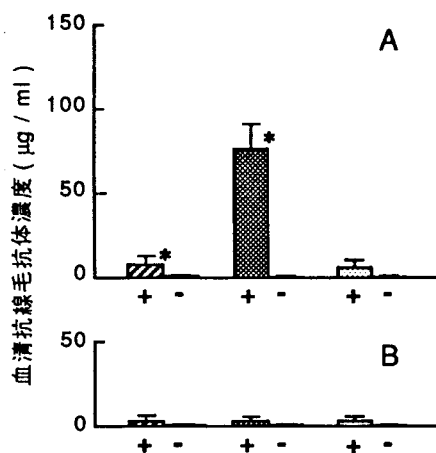


図 4 線毛抗原の BALB/c マウスへの経口投与により産生される血清中の特異抗体の投与媒体による影響

線毛抗原 ($500\mu\text{g}$ / 匹 / 回) を, 投与媒体であるリボソーム (A) あるいは 20mM トリス塩酸緩衝液 (pH 8.0) (B) と共に, 0, 1 日目ならびに 27, 28 日目に計 4 回, BALB/c マウスに経口投与した。(+) は免疫群, (-) は非免疫対照群を各々示す。最終免疫後 5 日目に採血し, 血清中の線毛抗原に対する特異抗体濃度を ELISA 法を用いて算出した。各抗体濃度は, 平均値と標準誤差を示す。免疫グロブリンのクラス別では,  は IgM,  は IgG,  は IgA を各々示す。* は, 対照群との間に有意差があることを示す (* $p < 0.05$, Student の t -検定)。

2) 線毛抗原の投与量

線毛抗原を投与媒体としてリボソームを用い経口投与する場合に, 同抗

原の投与量とマウスの血清中における特異抗体濃度の上昇との間の用量—反応関係を検討した。100 ～1,000 μ g / 匹 / 回の投与量の線毛抗原をリボソームに取り込ませてBALB/cマウスに経口投与したところ、線毛抗原の投与量の増加に伴い、抗線毛抗体、特にIgG クラスの抗体濃度の著しい上昇が認められた。線毛抗原の投与量を500 μ g / 匹 / 回にすると抗線毛抗体の濃度は最大に達した(図5)。従って以後の実験におけるマウスへの抗原の投与量は、500 μ g / 匹 / 回とした。

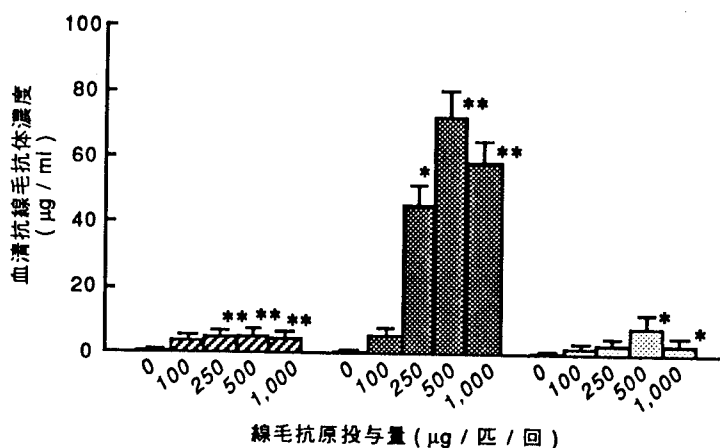


図5 線毛抗原の投与量とBALB/cマウスの血清中の抗線毛抗体濃度との間の用量—応答関係

線毛抗原(100 ～ 1,000 μ g / 匹 / 回)をリボソームに取り込ませて、0, 1日目ならびに27, 28日目に計4回、BALB/cマウスに経口投与した。最終免疫後5日目に採血し、血清中の線毛抗原に対する特異抗体濃度をELISA法を用いて算出した。各抗体濃度は、平均値と標準誤差を示す。免疫グロブリンのクラス別では、はIgM, はIgG, はIgAを各々示す。*,**は、リボソーム投与対照群との間に有意差のあることを示す(* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$)。

3) アジュバントの投与量

線毛抗原を経口投与する場合に、血清中の特異抗体の産生・増強における有効なアジュバントの至適投与量をGM-53を用いて検討した(図6)。リボソームを投与媒体として、500 μ g / 匹 / 回の線毛抗原を50～500 μ g /

匹/回のGM-53と共にBALB/cマウスに経口投与したところ、500 μ gのGM-53を線毛抗原と共に投与した場合に、血清中の抗線毛抗体濃度が線毛抗原単独投与群にくらべて有意に上昇した($p < 0.05$)。以上の結果より、アジュバントの投与量は500 μ gとして以下の実験を行なった。

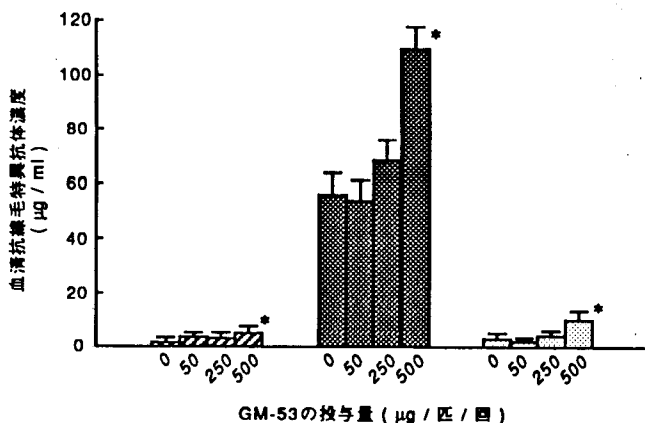


図6 アジュバントであるGM-53によるBALB/cマウスの血清中の抗線毛抗体の産生・増強作用

GM-53 (50~500 μ g / 匹/回)を線毛抗原 (500 μ g / 匹/回)と共にリボソームに取り込ませたものを免疫原として、0, 1日目ならびに27, 28日目に計4回、BALB/cマウスに経口投与した。最終免疫後5日目に採血し、血清中の線毛抗原に対する特異抗体濃度をELISA法を用いて算出した。各抗体濃度は、平均値と標準誤差を示す。免疫グロブリンのクラス別では、斜線はIgM、黒塗り(IgG)、点線(IgA)を各々示す。*は、線毛抗原単独投与群との間に有意差があることを示す(* $p < 0.05$)。

3. 免疫経路とアジュバントの違いによる抗線毛抗体の産生・増強作用の比較

線毛抗原を経口ならびに皮下投与したときに産生される血清中の抗線毛抗体濃度の程度ならびに種々のアジュバントの添加による特異抗体の産生増強について検討した。線毛ならびにアジュバントの1回の投与量は、経口投与においては500 μ g、皮下投与においては100 μ gとした。

線毛抗原をリボソームを投与媒体としてBALB/cマウスに経口投与すると、線毛抗原非投与群にくらべて、血清中の特異IgG抗体濃度の有意の上

昇 ($p<0.01$) が認められた (図7)。しかしながら、経口投与による特異抗体濃度の上昇の程度は、同抗原をリボソームに取り込ませて皮下投与した場合のそれに比べて約1/20程度に過ぎなかった。

アジュバントとしてGM-53 を線毛抗原と共に経口投与すると、線毛抗原単独投与群にくらべて血清中の特異IgG 抗体濃度の有意の上昇 ($p<0.05$) が認められた。また、線毛抗原をGM-53 あるいはMDP-Lys (L18) と共に皮下投与すると、いずれのアジュバントを添加した群においても、線毛抗原単独投与群にくらべ有意の特異抗体濃度の上昇が認められた ($p<0.05$)。

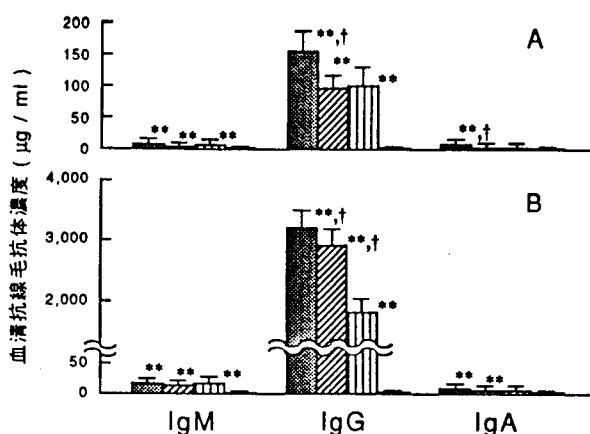


図7 線毛抗原をBALB/cマウスに経口あるいは皮下投与した場合の血清中の抗線毛抗体濃度の比較

経口投与 (A) の場合は、線毛抗原 ($500\mu\text{g}$ / 匹 / 回) を単独で、あるいはGM-53 ならびにMDP-Lys (L18) を各々 $500\mu\text{g}$ / 匹 / 回と共にリボソームに取り込ませて、0, 1日目ならびに27, 28日目に計4回BALB/cマウスに経口投与した。また、皮下投与 (B) の場合は、線毛抗原 ($100\mu\text{g}$ / 匹 / 回) を単独、あるいはGM-53 ならびにMDP-Lys (L18) を各々 $100\mu\text{g}$ / 匹 / 回と共にリボソームに取り込ませて、BALB/cマウスの背部皮下に0, 28日目に計2回注射した。最終免疫後5日目に採血し、血清中の線毛抗原に対する特異抗体濃度をELISA法を用いて算出した。各抗体濃度は、平均値と標準誤差を示す。■は線毛抗原+GM-53投与群、▨は線毛抗原+MDP-Lys (L18)添加群、□は線毛抗原単独投与群、□はリボソーム投与対照群を各々示す。**は、リボソーム投与対照群との間に有意差のあることを示す ($p<0.01$)。†は、線毛抗原単独投与群との間に有意差のあることを示す ($p<0.05$)。

4. 抗線毛抗体のサブクラスの検討

線毛抗原を、単独あるいはGM-53 と共にリボソームに取り込ませて経口あるいは皮下投与することにより上昇した血清中の特異IgG サブクラスについて検討した(図8)。線毛抗原をGM-53 と共に経口投与した群において、血清中の抗線毛特異IgG のサブクラスを調べた結果、主としてIgG1 (68.4%) が上昇し、次いでIgG2b (14.0%), IgG2a (13.6 %), IgG3 (4.0%) の順に高かった。また、線毛抗原を単独で経口投与した場合でも同様の結果を示したが、その各抗体濃度はアジュバント添加群のそれには及ばなかった。また、線毛抗原を単独あるいはGM-53 と共に皮下投与すると、血清中の抗線毛特異IgG のサブクラスは経口投与群のそれと同様のパターンを示し、特にGM-53 添加群では、IgG1 (86.5%), IgG2a (8.1%), IgG2b (5.0 %), IgG3 (0.4%) の順であり、経口投与群のそれとくらべて、IgG1の占める割合が約18% 増加していた。

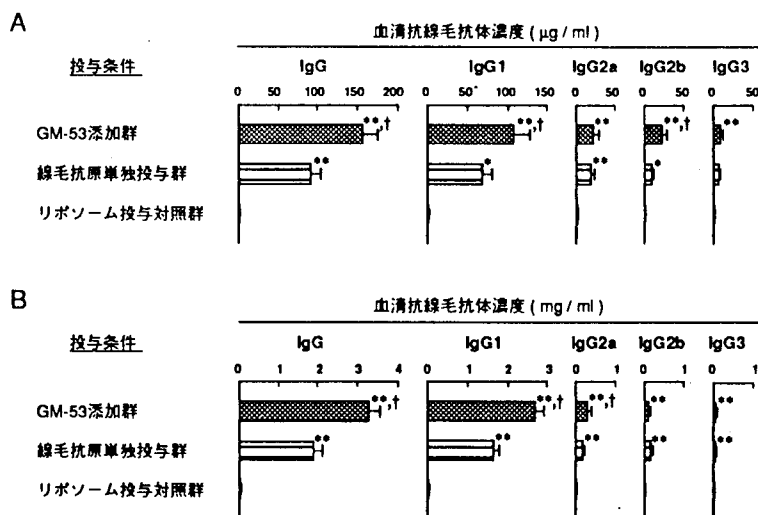


図8 線毛抗原のBALB/cマウスへの経口あるいは皮下投与により産生される血清中の抗線毛IgG サブクラスの比較
経口(A)ならびに皮下(B)投与の条件は、図7のそれと同じ。*,**は、リボソーム投与対照群との間に有意差があることを示す(* $p<0.05$, ** $p<0.01$)。†は、線毛抗原単独投与群に対して有意差があることを示す(† $p<0.05$)。

5. 唾液中の抗線毛抗体濃度の検討

線毛抗原を単独あるいはアジュバントと共にリボソームに取り込ませて、BALB/cマウスに経口あるいは皮下投与することにより産生・増強される唾液中の抗線毛抗体濃度について検討した(図9)。IgG クラスについては、線毛抗原単独投与ならびにGM-53 あるいはMDP-Lys(L18)のアジュバントと共に経口投与した群において、いずれの場合にも抗線毛抗体濃度の上昇はほとんど認められなかった。一方、皮下投与群では、アジュバント添加群において、抗線毛抗体濃度の有意の上昇($p<0.01$)が認められた。

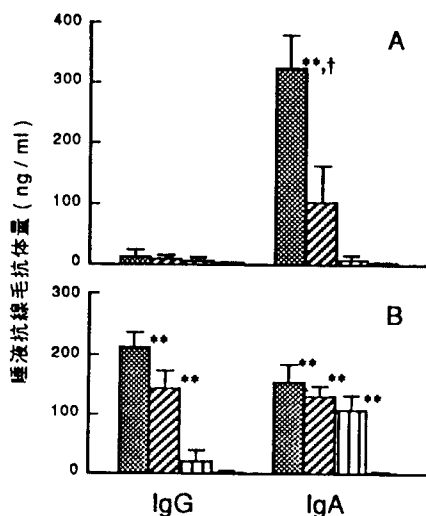


図9 線毛抗原のBALB/cマウスへの経口あるいは皮下投与により産生される唾液中の抗線毛抗体濃度の比較

経口(A)ならびに皮下(B)投与の条件ならびに他の記号等は、図7に同じ。なお、最終免疫後5日目にマウスから採唾し、唾液中の抗線毛抗体濃度を各免疫グロブリン別に、すなわち、IgG およびIgA をELISA 法を用いて算出した。

一方、IgA クラスに関しては、経口投与を行なった場合、線毛抗原単独投与群では抗線毛抗体濃度の上昇は認められなかった。しかしながら、アジュバント添加群、特にGM-53 添加群においては特異IgA 抗体濃度が上昇した($p<0.01$)。また、皮下投与群では、アジュバント添加群のみならず線毛抗原単独投与群においても、有意の特異IgA 抗体濃度の上昇が認められ

た ($p<0.01$)。しかしながら、皮下投与群の特異IgA 抗体濃度は、経口投与群のそれには及ばなかった。

6. 線毛抗原の経口投与による血清中の特異抗体濃度の経日的変化

線毛抗原を単独あるいはGM-53 と共にBALB/cマウスに経口投与することにより産生される血清中の抗線毛抗体濃度の経日的変化を、IgM , IgG およびIgA の各抗体のクラス別に検討した (図10)。

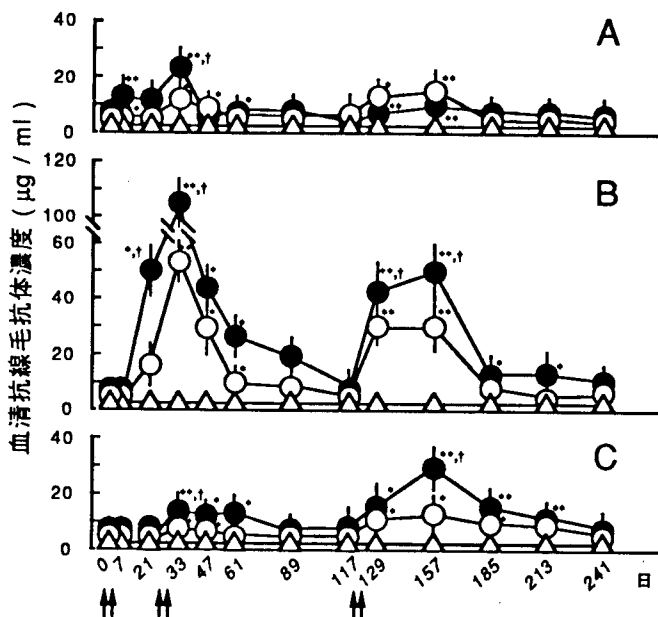


図10 線毛抗原のBALB/cマウスへの経口投与により産生される血清中の抗線毛抗体濃度の経日的変化

線毛抗原 (500μg / 匹 / 回) を単独あるいはGM-53 (500μg / 匹 / 回) と共にリボソームに取り込ませて、0, 1日目, 27, 28日目 (初回追加免疫) ならびに123, 124 日目 (2 回目の追加免疫) に計6回, BALB/cマウスに経口投与した (↑)。図に示した各所定日にマウスから採血し、血清中の線毛抗原に対する抗体濃度を各免疫グロブリンクラス別、すなわち、IgM (A), IgG (B) およびIgA (C) をELISA 法を用いて算出した。各抗体濃度は、平均値と標準誤差を示す。投与条件として、●は線毛抗原+GM-53 添加群、○は線毛抗原単独投与群、△はリボソーム投与対照群を各々示す。*, ** は、リボソーム投与対照群との間に有意差があることを示す (* $p<0.05$, ** $p<0.01$)。† は、線毛抗原単独投与群に対して有意差があることを示す († $p<0.05$)。

線毛抗原単独投与群ならびにGM-53 添加群のいずれにおいても、その特異抗体濃度の上昇の程度に差はあるものの、初回免疫後7日目にIgM が上昇し、ついで21日目にはIgG が順次上昇し始めた。27, 28日目に追加免疫を行なうと、全てのクラスの特異抗体濃度が有意に上昇した ($p<0.01$)。なお、GM-53 添加群では、線毛抗原単独投与群にくらべて有意に高い特異抗体濃度の上昇が、全てのクラスにおいて認められた ($p<0.05$)。追加免疫による特異抗体濃度の上昇はその後漸次低下したので、123, 124日目に2回目の追加免疫を行なった。その結果、再び全てのクラスの特異抗体濃度の著しい上昇が認められ、追加免疫後1ヶ月で抗体濃度は最大に達した。しかしながら、IgM ならびにIgG クラスの特異抗体濃度は、1回目の追加免疫後のそれには及ばなかった。また、IgA クラスについては、2回目の追加免疫により、1回目の追加免疫後に認められたピークを凌ぐ特異抗体濃度の上昇が認められた。その後、血清中の抗線毛抗体濃度は漸次減少したが、有意の抗体濃度の上昇は少なくとも約7ヶ月間持続することが認められた。

7. 線毛抗原の経口投与による唾液中の特異抗体濃度の経日的変化

つぎに、線毛抗原を単独あるいはGM-53 と共にBALB/cマウスに経口投与することにより産生される唾液中の抗線毛抗体濃度の経日的変化を、IgG およびIgA クラス別に検討した (図11)。

唾液中のIgG クラスについては、線毛抗原単独投与群ならびにGM-53 添加群のいずれの場合においても抗線毛抗体濃度の上昇は全く認められなかった。一方、IgA クラスについては、初回免疫後27, 28日目の1回目の追加免疫後に、GM-53 を添加した群において、線毛抗原単独投与群とくらべて有意の特異抗体濃度の上昇が認められた ($p<0.05$)。初回免疫後61日目に産生される抗体の最初のピークが生じたが、その後1ヶ月以内に急速にその抗体濃度は減少した。そこで、123, 124 日目に2回目の追加免疫を行なうと、追加免疫後5日目 (すなわち初回免疫後129 日目) に最初のピークを凌ぐ特異抗体濃度の上昇が認められた。その後、特異IgA 抗体濃度は漸次減少し、初回免疫後6ヶ月目には対照群のそれとほぼ同レベルにまで低下した。線毛抗原の単独投与群においては、特異IgA 抗体濃度の上昇

は、IgG クラスと同様全く認められなかった。

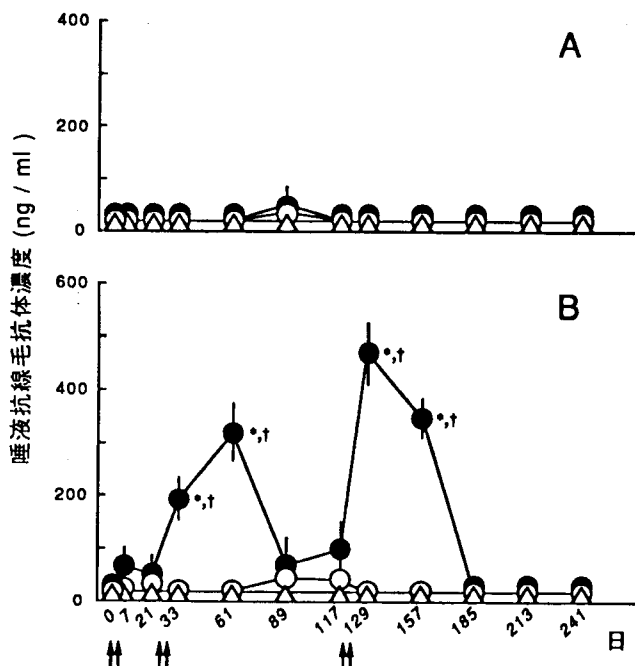


図11 線毛抗原のBALB/cマウスへの経口投与によりに産生される唾液中の抗線毛抗体濃度の経日的変化

経口投与の条件は図10に同じ。なお、図に示した各所定日にマウスから採唾し、唾液中の線毛抗原に対する特異抗体濃度を各免疫グロブリン別、すなわち、IgG (A) およびIgA (B) をELISA法を用いて算出した。各抗体濃度は、平均値と標準誤差を示す。その他の記号は図10に同じ。

8. 線毛抗原に対する系統の異なるマウスの免疫応答性

遺伝的な系統の異なる6種類のマウス、すなわち、BALB/c, DBA/2, C57BL/6, CBA/J, C3H/HeN, C3H/HeJについて、線毛抗原をGM-53 と共にリボソームに取り込ませて、0, 1日目ならびに27, 28日目に経口投与を行ない、血清中ならびに唾液中の抗線毛抗体濃度の程度を検討した(図12)。血清中の抗線毛抗体濃度については、特異抗体濃度の上昇が最も顕著であったIgG クラスについて比較検討すると、DBA/2 > BALB/c > C3H/HeN > C3H/HeJ > CBA/J > C57BL/6 マウスの順に抗体濃度の上昇が認められた。

また、唾液中の抗線毛抗体濃度については、BALB/cならびにDBA/2 マウスにおいて特異IgA 抗体濃度の上昇が認められたが、IgG クラスについては、いずれの系統のマウスにおいても有意に検出されなかった。

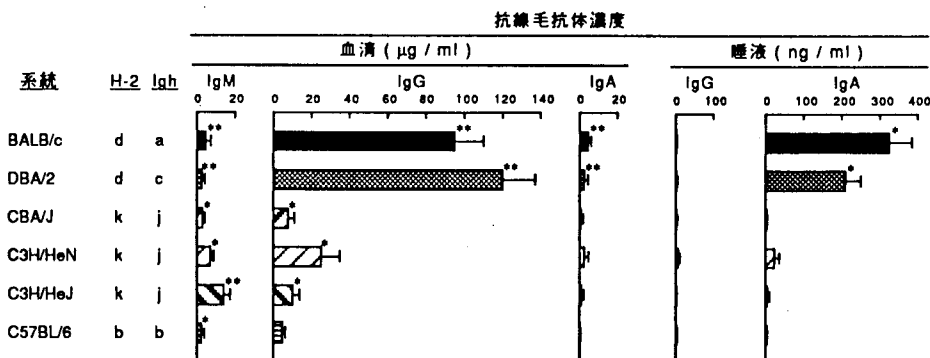


図12 線毛抗原の経口投与により血清ならびに唾液中に産生される抗線毛抗体濃度のマウス系統差による比較

各マウスへの経口投与ならびに抗体濃度の測定条件は、図7および図9に同じ。*,** は、各マウスのリボソーム投与対照群との間に有意差があることを示す (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$)。

以上の結果より、経口投与による線毛抗原に対するマウスの免疫応答性の違いにより、線毛抗原に高応答性であるDBA/2 およびBALB/cマウス、中応答性であるC3H/HeN, C3H/HeJ, およびCBA/J マウスならびに低応答性であるC57BL/6 マウスの3群に分別し、各々のマウスのH-2 ハプロタイプとの関連について検討した。高応答性のマウスは全てH-2^dであり、これに対して中応答性のマウスはH-2^kで、低応答性のマウスはH-2^bであることが明らかになった。線毛抗原に対する特異免疫応答性の違いは、H-2 ハプロタイプの差異によることが示唆された。

さらに、線毛抗原に対するマウスの免疫応答性の差異を詳しく検討するために、H-2 ハプロタイプ以外は遺伝学的背景がすべて同じであるB10コンジェニックマウスを用いて検討した。すなわち、B10.D2 (H-2^d), B10.BR (H-2^k) およびC57BL/10 (B10, H-2^b) の3種類のマウスに線毛抗原をGM-53 と共にそれぞれ経口投与することにより、血清中ならびに唾液中の抗線毛抗体濃度の上昇の程度を調べると、図13に示すように、B10.D2 >

B10.BR > C57BL/10 マウスの順に高かった。これらの結果から、*B. gingivalis* 線毛抗原に対するマウスの免疫応答性は、そのH-2 ハプロタイプに拘束されていることが強く示唆された。

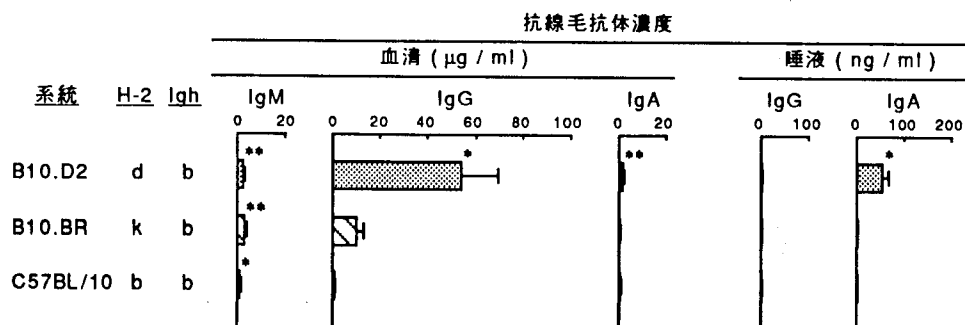


図13 線毛抗原の経口投与により血清ならびに唾液中に産生される抗線毛抗体濃度の種々のB10 コンジェニックマウスによる比較
マウスへの経口投与ならびに抗体濃度の測定条件は、図7および図9に、また他の記号等は図12に同じ。

考 察

B. gingivalis から分離・精製した線毛蛋白をBALB/cマウスに経口投与すると、投与媒体としてリボソームを用いた場合に、血清中の特異IgG 抗体濃度が著明に上昇することを示した(図4)。リボソームのこのような作用については、以下のようなメカニズムが考えられる。第一に、リボソームが消化管壁に存在するリンパ球やマクロファージなどの免疫担当細胞に直接的に作用し、これらの細胞を活性化することが考えられる。たとえば、van Rooijen ら²⁹⁾ は、ヒト血清アルブミンをリボソームに取り込ませて免疫すると、マクロファージによる抗原認識が亢進されることを示している。また、Kramers ら³⁰⁾ は、リボソームがラット胸線細胞に付着し、リンパ球の細胞膜におけるNa⁺, K⁺ イオン輸送を変化させることによりT リンパ球を刺激することを示唆している。さらに、リボソームはBALB/cマウスやヒトのリンパ球に対してマイトジェン作用を示すこ

と^{31, 32)}が知られている。また、ジフテリア毒素³³⁾，血清アルブミン^{29, 34, 35)}あるいは γ -グロブリン³⁶⁾などの蛋白質抗原をリボソームに取り込ませて免疫すると，リボソーム自身がアジュバント作用を発揮し，投与した蛋白抗原に対する抗体の産生が上昇することが明らかにされている。第二に，抗原を取り込ませたリボソームを経口投与すると，リボソーム中の抗原は消化液などによる分解作用を受けないことが考えられる。Rowland と Woodly³⁷⁾は，リボソームが胃液の低pHあるいは胆汁や膵液中に含まれるリパーゼに対して安定であり，リボソームに取り込まれた抗原は分解を受けることなくGALTへ運ばれ，免疫応答が十分に惹起されることを示している。

GALT中，特に，パイエル氏板には，他のリンパ組織とくらべて多数のIgA 産生前駆細胞が存在し，パイエル氏板のM細胞に取り込まれた抗原により感作を受けたIgA 抗体産生前駆細胞が，腸間膜リンパ節より体内循環を介して成熟し，腸管粘膜固有層ならびに唾液腺，乳腺，涙腺などの外分泌腺に選択的に到達し，抗原特異的な分泌型IgA 抗体を産生する³⁸⁻⁴¹⁾。またGALTにおいては，同時にT細胞による免疫調節機構が存在しており，経口的に取り込まれた抗原に対する免疫応答を調節している。すなわち，Richman ら⁴²⁾は，可溶性の蛋白抗原を経口投与した場合にはパイエル氏板より取り込まれた抗原に対して，IgA 抗体の産生を特異的に賦活するヘルパーT細胞とIgG 抗体の産生を特異的に抑制するサブレッサーT細胞が誘導されることを報告している。McDonald^{43, 44)}は，経口投与された抗原に対する特異的サブレッサーT細胞がパイエル氏板のみならず腸間膜リンパ節にも存在することを示している。これらヘルパーならびにサブレッサーT細胞による調節機構により，分泌型IgA 抗体の産生が賦活化され，他方，全身的なIgG あるいはIgM 応答が抑制されることが示唆される⁴⁵⁻⁴⁷⁾。また，Czerkinskyら⁴⁸⁾は，ヒトにStreptococcus mutans死菌体を経口投与すると，唾液中のS. mutans 抗原特異抗体レベルの上昇に先がけて血清中にS. mutans 抗原に対する特異IgA 抗体産生前駆細胞が出現することを認めた。しかしながら，血清中の特異抗体価の上昇は全く認められなかったと述べている。さらに，経口投与抗原として卵白アルブミ

ン⁴⁹⁾ やキーホールリンベットヘモシアニン (KLH)⁵⁰⁾ などの可溶性の蛋白抗原を用いた研究で、投与条件は必ずしも本研究におけるそれと同一ではないが、唾液における分泌型IgA 抗体の産生・誘導が困難であったという。

一方、経口投与に用いる抗原の種類によっては、外分泌液中のみならず血清中においても特異抗体の産生が誘導される。例えば、抗原としてコレラ毒素⁵⁰⁾ をマウスに経口投与した場合には、外分泌液中の特異IgA 抗体ならびに血清中の特異IgG 抗体が共に上昇することが報告されている。また、Ogawa ら⁵¹⁾ は、本研究と同様の免疫スケジュールにしたがって、ウシ血清アルブミン (BSA) を抗原とし、MDP-Lys (L18)あるいはGM-53 と共にマウスに経口投与することにより、血清中の特異IgG 抗体価の上昇が生じたのに対し、唾液中における特異抗体価の上昇はIgA, IgGいずれのクラスでも検出されなかったと報告している。本研究においては、線毛抗原をアジュバント、特にGM-53 と共にリボソームに取り込ませてBALB/cマウスに経口投与すると、線毛抗原単独投与群にくらべて血清中の特異抗体、特にIgG クラスの産生・増強が主に認められ、また、唾液中においては特異IgA 抗体濃度の上昇することが明らかになった (図7, 9)。以上のような免疫応答の差異は、経口投与された種々の抗原の化学的、物理的性状の違いに起因するものであると考えられる。

抗原をアジュバントと共に経口投与すると、唾液や涙液等の外分泌液中の特異IgA 抗体が産生・増強される現象が近年注目されている。*S. mutans* の全菌体や同細胞壁などの粒子状抗原あるいは型特異多糖抗原のような可溶性抗原を、MDP やその誘導體と共に経口免疫するとIgA を中心とする免疫応答の増強が観察された⁵²⁻⁵⁴⁾。経口免疫に用いられるアジュバントとしてはこの他に、コレラ毒素サブユニットB (CTB) が知られている。すなわち、KLH⁵⁰⁾、不活化したセンダイウイルス⁵⁵⁾ あるいは*S. mutans* の表層蛋白抗原であるAgI/II⁵⁶⁾をこのCTB に結合して経口投与すると、外分泌液中の特異IgA ならびに血清中の特異IgG 抗体レベルが上昇することが報告されている。これらの結果は、本研究において供試した線毛抗原とアジュバント、GM-53 の経口投与の結果観察された血清IgG な

らびに唾液IgA 抗線毛抗体の産生・増強作用と一致した所見である。

線毛抗原を単独で、あるいはアジュバントと共に皮下投与することにより、唾液中の特異IgA ならびにIgG 抗体の上昇が認められた(図9)。S. mutans の死菌体⁵⁷⁾、Streptococcus pneumoniae の多糖抗原⁵⁸⁾などの抗原をマウスやヒトに皮下注射することにより、唾液中に抗原特異的なIgA ならびにIgG 抗体の産生が誘導されることが報告されており、本研究と一致した結果が得られている。線毛抗原の経口投与により血清中に産生される特異IgG 抗体のサブクラスは、主としてIgG1で、IgG2b およびIgG2a がこれに続き、IgG3の抗体濃度は極めて低いものであった(図8)。

破傷風毒素やジフテリア毒素のような蛋白抗原をヒトに免疫すると、主として産生される特異免疫グロブリンのサブクラスは、IgG1であることはよく知られている^{59, 60)}。これらの結果は、本研究で用いた線毛抗原について得られた所見とよく一致している。一方、多糖抗原を免疫原とした場合には、主としてIgG2クラスの特異抗体が産生されることが報告されており⁶¹⁻⁶³⁾、産生される特異IgG 抗体のサブクラスは、免疫に用いられる抗原の種類により大きく規定されるようにみえる。

線毛抗原の経口投与により血清中に産生される抗線毛抗体濃度ならびにその免疫グロブリンのクラスを経日的に調べると、血清中では初回追加免疫後全てのクラスの特異抗体濃度が上昇するが、2回目の追加免疫を行なうと、特にIgA クラスの抗体濃度の上昇が著しかった(図10)。また、唾液中においても特異IgA 抗体濃度が初回追加免疫後明確に上昇を示し、2回目の追加免疫後さらに高い上昇の程度が認められた(図11)。これらの結果より、線毛抗原に対する特異免疫応答は、その免疫グロブリンのクラスでは、特にIgA クラスにおいて長期間保持されていることが明らかになった。Keren ら⁶⁴⁾は、Shigella flexneri の生菌をウサギに経口免疫すると、腸管分泌液中のIgA 抗体の免疫学的記憶が特に長期間にわたって成立することを報告している。また、McChesney ら⁶⁵⁾は、N. gonorrhoeae の線毛ワクチンをあらかじめヒトに接種し、約1年後に同ワクチンを追加接種すると速やかに生殖器粘膜分泌液中の特異IgA 抗体価の上昇を認め、また、この線毛ワクチンの接種が、同菌種の感染に対して宿主に防御的に

働くことを明らかにしている。

B. gingivalis 線毛抗原をGM-53 と共にリボソームに取り込ませて、種々の系統のマウスに経口投与したところ、血清中ならびに唾液中に誘導される特異免疫応答は、H-2^dハプロタイプのDBA/2, BALB/c, B10.D2 マウスにおいて高応答性であり、H-2^bハプロタイプのC57BL/6, C57BL/10 マウスでは低応答性であることが示された(図12, 13)。これらの結果から、線毛抗原に対するマウスの特異免疫応答は、その主要組織適合抗原遺伝子複合体(MHC)により拘束されていることが示唆された。種々の抗原に対するマウスの免疫応答は、MHCに連鎖した免疫応答遺伝子、すなわち、Ir遺伝子により制御されていることが知られている^{66, 67)}。蛋白のアミノ酸配列が既に決定されている蛋白抗原、すなわち、ブドウ状球菌由来のヌクレアーゼ⁶⁸⁾、チトクロームc⁶⁹⁾、インシュリン^{70, 71)}、そしてミオグロビン⁷²⁾などの抗原に対する免疫応答性が、Ir遺伝子によって制御されていることがこれまでに詳細に調べられている。また、Elson ら⁷³⁾は、コレラ毒素を経口投与することにより誘導される血清中のIgG ならびに腸管粘膜における分泌型IgA 抗体の産生が、H-2 遺伝子により制御されることを示している。

アジュバントとマウスのMHC との関係については、Staruch とWood⁷⁴⁾が、BSA を抗原としてMDP と共にマウスに皮下投与すると、H-2^dハプロタイプのマウスは、抗原単独投与群にくらべて血清中の抗BSA 抗体の産生増強作用が明確に認められるのに対し、H-2^bハプロタイプのマウスではほとんどその作用は認められないことを明らかにしている。

本研究で誘導・産生されたマウスの血清中ならびに唾液中の抗線毛抗体のin vivoでの役割については現段階ではいまだ明らかではない。しかしながら、他の多くの菌種では細菌の線毛は、生体への付着因子として感染の初期に主要な機能を果たすものとして注目されており、同線毛抗原に対する特異抗体が、線毛を介した付着を阻止することにより、感染予防に寄与するものなのかも知れない。たとえば、E. coli 1 型線毛ワクチン^{75, 76)}、N. gonorrhoeae P32 ワクチン⁶⁵⁾を用いることにより、in vivoにおいて同菌種による感染を予防できるとの報告がある。また、E.

coliの1型線毛に対する特異抗体は、ブタの小腸粘膜上皮⁷⁷⁾ やヒトの頬粘膜細胞⁷⁸⁻⁸⁰⁾ への細菌の付着を阻止することが、in vitroにおいて示されている。

Peros ら⁸¹⁾ は、テトラサイクリンを加えた培地を用いて培養した B. gingivalis はその菌体表層の線毛の発育が悪く、それに伴って同菌の人工的に作成したペリクルへの付着が低下すると述べている。それゆえに、B. gingivalis 線毛は、菌体間ならびに宿主細胞への付着因子として機能している可能性を考えねばならない。また、Okuda ら⁸²⁾ は、ハムスターを用いた B. gingivalis 感染実験モデルにて、B. gingivalis 全菌体あるいは同菌の培養上清より精製した血球凝集素に対する抗体を用いた受動免疫によって、実験的歯周炎病巣への B. gingivalis の定着が有意に抑制されることを報告し、B. gingivalis 菌体表層抗原に対する抗体が同菌の感染に対して防御的に働く可能性を示唆している。

B. gingivalis 由来の線毛抗原をモデル抗原として用いた本研究は、免疫学的な観点から歯周病発症の作用機序を解明するための有力なモデルを提供する。また、線毛抗原に対する全身的ならびに局所的免疫応答に関する研究を今後進めていくことは、歯周病原性細菌の感染に対する宿主の防御機構が果たす役割を明らかにするとともに、歯周病の病態の解明ならびにその治療や予防法の開発に役立つであろう。

結 論

B. gingivalis 381 株より分離・精製した線毛蛋白を抗原として、種々の免疫条件下において、マウスの血清中ならびに唾液中に誘導される特異免疫応答について検討した。

1. B. gingivalis 線毛蛋白をリボソームと共にBALB/cマウスに経口投与すると、血清中の抗線毛抗体、特に特異IgG1抗体濃度が上昇した。さらに、アジュバントとしてGM-53 を添加すると、血清中の特異抗体の産生増強が認められた。また、唾液中においては、線毛抗原をGM-53 と共に経口投与した場合に特異IgA 抗体濃度の上昇が認められ、皮下投与群のそれを

上回った。

2. 線毛抗原の経口投与群において、血清中の抗線毛抗体濃度の経日的変化を調べると、初回免疫7日目にIgMが、ついで21日目にIgGが上昇し、27, 28日目の1回目の追加免疫により全ての免疫グロブリンクラスの抗体濃度の上昇が認められた。なかでも、特異IgA抗体濃度については、初回免疫後123, 124日目に行なった2回目の追加免疫により27, 28日目の1回目のそれを凌ぐ上昇を示した。また、唾液中の特異抗体濃度の経日的変化については、初回免疫後27, 28日目の1回目の追加免疫後、特異IgA抗体濃度が明確に上昇し、123, 124日目の2回目の追加免疫によりさらにその抗体濃度が上昇したが、IgGクラスの上昇は認められなかった。

3. 線毛抗原をGM-53と共にリボソームに取り込ませて、種々の系統の異なるマウス、すなわちBALB/c, DBA/2, C57BL/6, CBA/J, C3H/HeNならびにC3H/HeJマウスに経口投与したところ、特に、BALB/cやDBA/2マウスにおいて血清中ならびに唾液中の抗線毛抗体濃度の顕著な上昇が認められた。さらに、この免疫応答性の差異について、B10コンジェニックマウスを用いて詳細に検討すると、血清中ならびに唾液中の抗体濃度の上昇の程度は、B10.D2(H-2^d) > B10.BR(H-2^k) > C57BL/10(H-2^b)マウスの順に高かった。以上の研究結果より、経口投与による線毛抗原に対する免疫応答性は、H-2ハプロタイプにより遺伝的に拘束されていることが強く示唆された。

稿を終えるにあたり、本研究を行なう機会を与えて頂き、ご教示、ご鞭撻を賜った口腔治療学講座岡田宏教授に深謝致します。

本研究に際し、細部にわたりご懇篤なるご指導とご校閲を賜った口腔細菌学講座浜田茂幸教授に衷心より謝意を表します。また、終始ご指導ならびにご助言を頂いた口腔細菌学講座小川知彦博士に心より感謝致します。さらに、さまざまなご援助を頂いた口腔治療学教室および口腔細菌学教室の教室員の皆様方にも厚くお礼申し上げます。

文 献

- 1) Pierce, W. A. and Buchanan, T. M. (1980) : Structure and cell membrane-binding properties of bacterial fimbriae ; in Receptors and recognition, Series B, Vol. 6 : Bacterial adherence (Beachey, E. H., editor). Chapman and Hall, London, 291-344.
- 2) Evans, D. G., Silver, R. P., Evans, D. J., Jr., Chase, D. G. and Gorbach, S. L. (1975) : Plasmid-controlled colonization factor associated with virulence in Escherichia coli enterotoxigenic for humans. Infect. Immun., 12, 656-667.
- 3) Swanson, J., Kraus, S. J. and Gotschlich, E. C. (1971) : Studies on Gonococcus infection. I. Pili and zones of adhesion : their relation to gonococcal growth patterns. J. Exp. Med., 134, 886-906.
- 4) Axelrod, D. A. (1985) : Primary and secondary in vitro immune response of the rabbit Peyer's patch and spleen to RDEC-1 pili. Clin. Immunol. Immunopathol., 37, 124-134.
- 5) Stoll, B. J., Svennerholm, A.-M., Gothefors, L., Barua, D., Huda, S. and Holmgren, J. (1985) : Local and systemic antibody responses to naturally acquired enterotoxigenic Escherichia coli diarrhea in an endemic area. J. Infect. Dis., 153, 527-534.
- 6) Tramont, E. C., Sadoff, J. C., Boslego, J. W., Ciak, J., McChesney, D., Brinton, C. C., Wood, S. and Takafuji, E. (1981) : Gonococcal pilus vaccine. Studies of antigenicity and inhibition of attachment. J. Clin. Invest., 68, 881-888.
- 7) Tramont, E. C. and Boslego, J. W. (1985) : Pilus

- vaccines. Vaccine, 3, 3-10.
- 8) Stewart, D. J., Clark, B. L., Emery, D. L., Peterson, J. E., Jarrett, R. G. and O'Donnell, I. J. (1986) : Cross-protection from Bacteroides nodosus vaccines and the interaction of pili and adjuvants. Aust. Vet. J., 63, 101-106.
 - 9) Coykendall, A. L., Kaczmarek, F. S. and Slots, J. (1980) : Genetic heterogeneity in Bacteroides asaccharolyticus (Holdeman and Moore 1970) Finegold and Barnes 1977 (approved lists, 1980) and proposal of Bacteroides gingivalis sp. n. ov. and Bacteroides macacae (Slots and Genco) comb. nov.. Int. J. Syst. Bacteriol., 30, 559-584.
 - 10) Slots, J. (1982) : Importance of black-pigmented Bacteroides in human periodontal disease ; in Host-parasite interactions in periodontal disease (Genco, R. J. and Mergenhausen, S. E., editor). American Society for Microbiology, Washington, D. C., 27-45.
 - 11) Loesche, W. J., Syed, S. A., Schmidt, E. and Morrison, E. C. (1985) : Bacterial profiles of subgingival plaques in periodontitis. J. Periodontol., 56, 447-456.
 - 12) Slots, J. (1986) : Bacterial specificity in adult periodontitis. A summary of recent work. J. Clin. Periodontol., 13, 912-917.
 - 13) Slots, J. and Listgarten, M. A. (1988) : Bacteroides gingivalis, Bacteroides intermedius and Actinobacillus actinomycetemcomitans in human periodontal diseases. J. Clin. Periodontol., 15, 85-93.
 - 14) Mouton, C., Hammond, P. G., Slots, J. and Genco, R. J. (1981) : Serum antibodies to oral Bacteroides asaccharolyticus (Bacteroides gingivalis) : relationship to age

- and periodontal disease. Infect. Immun., 31, 182-192.
- 15) Naito, Y., Okuda, K. and Takazoe, I. (1984) : Immunoglobulin G response to subgingival gram-negative bacteria in human subjects. Infect. Immun., 45, 47-51.
- 16) Ebersole, J. L., Taubman, M. A., Smith, D. J. and Frey, D. E. (1986) : Human immune responses to oral microorganisms. : patterns of systemic antibody levels to Bacteroides species. Infect. Immun., 51, 507-513.
- 17) Slots, J. and Gibbons, R. J. (1978) : Attachment of Bacteroides melaninogenicus subsp. asaccharolyticus to oral surfaces and its possible role in colonization of the mouth and of periodontal pockets. Infect. Immun., 19, 254-264.
- 18) Yoshimura, F., Takahashi, K., Nodasaka, Y. and Suzuki, T. (1984) : Purification and characterization of a novel type of fimbriae from the oral anaerobe Bacteroides gingivalis. J. Bacteriol., 160, 949-957.
- 19) Dickinson, D. P., Kubinec, M. A., Yoshimura, F., and Genco, R. J. (1988) : Molecular cloning and sequencing of the gene encoding the fimbrial subunit protein of Bacteroides gingivalis. J. Bacteriol., 170, 1658-1665.
- 20) Yoshimura, F., Sugano, T., Kawanami, M., Kato, H. and Suzuki, T. (1987) : Detection of specific antibodies against fimbriae and membrane proteins from the oral anaerobe Bacteroides gingivalis in patients with periodontal diseases. Microbiol. Immunol., 31, 935-941.
- 21) Ogawa, T., McGhee, M. L., Mordoveanu, Z., Hamada, S., Mestecky, J., McGhee, J. R. and Kiyono, H. (1989) : Bacteroides-specific IgG and IgA subclass antibody-secreting cells isolated from chronically inflamed

- gingival tissues. Clin. Exp. Immunol., 76, 103-110.
- 22) Smith, P. K., Krohn, R. I., Hermanson, G. T., Mallia, A. K., Gartner, F. H., Provenzano, M. D., Fujimoto, E. K., Goeke, N. M., Olson, B. J. and Klenk, D. C. (1985) : Measurement of protein using bicinchonic acid. Anal. Biochem., 150, 76-85.
- 23) Neville, D. M., Jr. (1971) : Molecular weight determination of protein-dodecyl sulfate complexes by gel electrophoresis in a discontinuous buffer system. J. Biol. Chem., 246, 6328-6334.
- 24) Kotani, S., Takada, H., Tsujimoto, M., Kubo, T., Ogawa, T., Azuma, I., Ogawa, H., Matsumoto, K., Siddiqui, W. A., Tanaka, A., Nagao, S., Kohashi, O., Kanoh, S., Shiba, T. and Kusumoto, S. (1982) : Nonspecific and antigen-specific stimulation of host defence mechanisms by lipophilic derivatives of muramyl dipeptides ; in Bacteria and cancer (Jeljaszewicz, J., Pulverer, G. and Roszkowski, W., editor)., Academic Press, London, 67-107.
- 25) Furuta, R., Kawata, S., Naruto, S., Minami, A. and Kotani, S. (1986) : Synthesis and biological activities of N-acetylglucosaminyl- β (1 $\rightarrow$ 4)-N-acetylmuramyl tri- and tetrapeptide derivatives. Agric. Biol. Chem., 50, 2561-2572.
- 26) Inoue, K. (1974) : Permeability properties of liposomes prepared from dipalmitoyllecithin, dimyristoyllecithin, egg lecithin, rat liver lecithin and beef brain sphingomyelin. Biochim. Biophys. Acta , 339, 390-402.
- 27) Voller, A., Bidwell, D. and Bartlett, A. (1980) : Enzyme-linked immunosorbent assay ; in Manual of clinical immunology (Rose, N. R. and Friedman, H., editor), ed. 2,

- American Society for Microbiology, Washington, D. C., 359-371.
- 28) Rodbard, D., Bridson, W. and Rayford, P. L. (1969) : Rapid calculation of radioimmunoassay results. J. Lab. Clin. Med., 74, 770-781.
- 29) van Rooijen, N. and van Nieuwmegen, R. (1979) : Liposomes in immunology : impairment of the adjuvant effect of liposomes by incorporation of the adjuvant lysolecithin and the role of macrophages. Immunol. Commun., 8, 381-396.
- 30) Kramers, M. T. C., Patrick, J., Bottomley, J. M., Quinn, P. J. and Chapman, D. (1980) : Studies of liposome interactions with rat thymocytes. Eur. J. Biochem., 110, 579-585.
- 31) Oka, S., Tanaka, Y., Yano, I., Masui, M., Ogawa, T. and Kotani, S. (1981) : Immunoadjuvant activity of acidic phospholipids ; in Immunomodulation by microbial products and related synthetic compounds (Yamamura, Y., Kotani, S., Azuma, I., Koda, A. and Shiba, T., editor)., Elsevier Science Publishing Co., Amsterdam, 528-531.
- 32) Chen, S. S.-H. and Keenan, R. M. (1977) : Effect of Phosphatidylcholine liposomes on the mitogen-stimulated lymphocyte activation. Biochem. Biophys. Res. Commun., 79, 852-858.
- 33) Allison, A. C. and Gregoriadis, G. (1974) : Liposomes as immunological adjuvants. Nature, 252, 252.
- 34) Heath, T. D., Edwards, D. C. and Ryman, B. E. (1976) : The adjuvant properties of liposomes. Biochem. Soc. Trans., 4, 129-133.
- 35) van Rooijen, N. and van Nieuwmegen, R. (1977) : Liposomes

- in immunology : the immune response against antigen-containing liposomes. Immunol. Commun., 6, 489-498.
- 36) van Rooijen, N. and van Nieuwmege, R. (1978) : Liposomes in immunology : further evidence for the adjuvant activity of liposomes. Immunol. Commun., 7, 635-644.
- 37) Rowland, R. N. and Woodly, J. F. (1980) : The stability of liposomes in vitro to pH, bile salts and pancreatic lipase. Biochim. Biophys. Acta, 620, 400-409.
- 38) Bienenstock, J. and Befus, A. D. (1980) : Mucosal immunology. Immunology, 41, 249-270.
- 39) Mestecky, J. and McGhee, J. R. (1987) : Immunoglobulin A (IgA) : molecular and cellular interactions involved in IgA biosynthesis and immune response. Adv. Immunol., 40, 153-245.
- 40) Mestecky, J. (1987) : The common mucosal immune system and current strategies for induction of immune responses in external secretions. J. Clin. Immunol., 7, 265-276.
- 41) McGhee, J. R., Mestecky, J., Elson, C. O. and Kiyono, H. (1989) : Regulation of IgA synthesis and immune response by T cells and interleukins. J. Clin. Immunol., 9, 175-199.
- 42) Richman, L. K., Chiller, J. M., Brown, W. R., Hanson, D. G. and Vaz, N. M. (1978) : Enterically induced immunologic tolerance. I. Induction of suppressor T lymphocytes by intragastric administration of soluble proteins. J. Immunol., 121, 2429-2434.
- 43) MacDonald, T. T. (1982) : Enhancement and suppression of the Peyer's patch immune response by systemic priming. Clin. Exp. Immunol., 49, 441-448.
- 44) MacDonald, T. T. (1982) : Immunosuppression caused by antigen feeding. I. Evidence for the activation of a

- feedback suppressor pathway in the spleens of antigen-fed mice. Eur. J. Immunol., 12, 767-773.
- 45) Mattingly, J. A. and Waksman, B. H. (1978) : Immunologic suppression after oral administration of antigen. I. Specific suppressor cells formed in rat Peyer's patches after oral administration of sheep erythrocytes and their systemic migration. J. Immunol., 121, 1878-1883.
- 46) Ngan, J. and Kind, L. S. (1978) : Suppressor T cells for IgE and IgG in Peyer's patches of mice made tolerant by the oral administration of ovalbumin. J. Immunol., 120, 861-865.
- 47) Hanson, D. G., Vaz, N. M., Maia, L. C. S. and Lynch, J. M. (1979) : Inhibition of specific immune responses by feeding protein antigens. III. Evidence against maintenance of tolerance to ovalbumin by orally induced antibodies. J. Immunol., 123, 2337-2343.
- 48) Czerkinsky, C., Prince, S. J., Michalek, S. M., Jackson, S., Russell, M. W., Mordoveanu, Z., McGhee, J. R. and Mestecky, J. (1987) : IgA antibody-producing cells in peripheral blood after antigen ingestion : evidence for a common mucosal immune system in humans. Proc. Natl. Acad. Sci. USA , 84, 2449-2453.
- 49) Wold, A. E., Dahlgren, U. I. H., Hanson, L. Å., Mattsby-Baltzer, I. and Midvetdt T. (1989) : Difference between bacterial and food antigens in mucosal immunogenicity. Infect. Immun., 57, 2666-2673.
- 50) Elson, C. O. and Ealading, W. (1984) : Generalized systemic and mucosal immunity in mice after mucosal stimulation with cholera toxin. J. Immunol., 132, 2736-2741.

- 51) Ogawa, T., Kotani, S. and Shimauchi, H. (1986) : Enhancement of serum antibody production in mice by oral administration of lipophilic derivatives of muramylpeptides and bacterial lipopolysaccharides with bovine serum albumin. Meth. and Find. Exptl. Clin. Pharmacol., 8, 19-26.
- 52) Morisaki, I. Michalek, S. M., Harmon, C. C., Torii, M., Hamada, S. and McGhee, J. R. (1983) : Effective immunity to dental caries : enhancement of salivary anti-Streptococcus mutans antibody responses with oral adjuvants. Infect. Immun., 40, 577-591.
- 53) Michalek, S. M., Morisaki, I., Gregory, R. L., Kiyono, H., Hamada, S. and McGhee, J. R. (1983) : Oral adjuvants enhance IgA responses to Streptococcus mutans. Mol. Immunol., 20, 1009-1018.
- 54) Michalek, S. M., Morisaki, I., Gregory, R. L., Kimura, S., Harmon, C. C., Hamada, S., Kotani, S. and McGhee, J. R. (1984) : Oral adjuvants enhance salivary IgA responses to purified Streptococcus mutans antigens. ; in Protides of biological fluids (Peeters, H., editor). Pergamon Press, Oxford, 47-52.
- 55) Liang, X., Lamm, M. E. and Nedrud, J. G. (1988) : Oral administration of cholera toxin-Sendai virus conjugate potentiates gut and respiratory immunity against Sendai virus. J. Immunol., 141, 1495-1501.
- 56) Czerkinsky, C., Russell, M. W., Lycke, N., Lindblad, M. and Holmgren, J. (1989) : Oral administration of a streptococcal antigen coupled to cholera toxin B subunit evokes strong antibody responses in salivary glands and extramucosal tissues. Infect. Immun., 57, 1072-1077.

- 57) Challacombe, S. J. and Lehner, T. (1979) : Salivary antibody responses in rhesus monkeys immunized with Streptococcus mutans by the oral, submucosal or subcutaneous routes. Arch. Oral Biol., 24, 917-925.
- 58) Lue, C., Tarkowski, A. and Mestecky, J. (1988) : Systemic immunization with pneumococcal polysaccharide vaccine induces a predominant IgA2 response of peripheral blood lymphocytes and increases of both serum and secretory anti-pneumococcal antibodies. J. Immunol., 140, 3793-3800.
- 59) Sepälä, I. J. T., Routonen, N., Sarnesto, A., Mattila, P. A. and Mäkelä, O. (1984) : The percentages of six immunoglobulin isotypes in human antibodies to tetanus toxoid : standardization of isotype-specific second antibodies in solid-phase assay. Eur. J. Immunol., 14, 868-875.
- 60) Morrow, C. D., Dorey, F. and R. H. Stevens (1983) : Isoelectric focusing of human anti-diphtheria toxoid antibodies : identical spectrotypes of anti-fragment A antibodies with the same IgG subclass and light chain constant regions are expressed in multiple individuals. J. Immunol., 130, 818-823.
- 61) Yount, W. J., Dorner, M. M., Kunkel, H. G. and Kabat, E. A. (1968) : Studies on human antibodies. VI. Selective variations in subgroup composition and genetic markers. J. Exp. Med., 127, 633-646.
- 62) Johnston, R. B., Jr., Anderson, P., Rosen, F. S. and Smith, D. H. (1973) : Characterization of human antibody to polyribophosphate, the capsular antigen of Hemophilus influenzae, type B. Clin. Immunol. Immunopathol., 1,

234-240.

- 63) Matter, L., Wilhelm, J. A., Angehrn, W., Skvaril, F. and Schopfer, K. (1985) : Selective antibody deficiency and recurrent pneumococcal bacteremia in a patient with Sjögren's syndrome, hyperimmunoglobulinemia G, and deficiencies of IgG2 and IgG4. N. Engl. J. Med., 312, 1039-1042.
- 64) Keren, D. F., Kern, S. E., Bauer, D. H., Scott, P. J. and Porter, P. (1982) : Direct demonstration in intestinal secretions of an IgA memory response to orally administered Shigella flexneri antigens. J. Immunol., 128, 475-479.
- 65) McChesney, D., Tramont, E. C., Boslego, J. W., Ciak, J., Sadoff J. and Brinton, C. C. (1982) : Genital antibody response to a parenteral gonococcal pilus vaccine. Infect. Immun., 36, 1006-1012.
- 66) McDevitt, H. O. and Chinitz, A. (1969) : Genetic control of the antibody response : relationship between immune response and histocompatibility (H-2) type. Science, 163, 1207-1208.
- 67) Benacerraf, B. and McDevitt, H. O. (1972) : Histocompatibility-linked immune response genes. A new class of genes that controls the formation of specific immune responses has been identified. Science, 175, 273-279.
- 68) Lozner, E. C., Sachs, D. H. and Shearer, G. M. (1974) : Genetic control of the immune response to staphylococcal nuclease. I. Ir-Nase : control of the antibody response to nuclease by the Ir region of the mouse H-2 complex. J. Exp. Med., 139, 1204-1214.
- 69) Hannum, C., Ultee, M., Matis, L. A., Schwartz, R. H. and Margoliash, E. (1978) : The major B and T cell determinant

- on pigeon cytochrome c in B10.A mice. Adv. Exp. Med. Biol., 150, 37-51.
- 70) Keck, K. (1975) : Ir-gene control of immunogenicity of insulin and A-chain loop as a carrier determinant. Nature, 254, 78-79.
- 71) Rosenwasser, L. J., Barcinski, M. A., Schwartz, R. H. and Rosenthal, A. S. (1979) : Immune response gene control of determinant selection. II. Genetic control of the murine T lymphocyte proliferative response to insulin. J. Immunol., 123, 471-476.
- 72) Kohno, Y. and Berzofsky, J. A. (1982) : Genetic control of the immune response to myoglobin. V. Antibody production in vitro is macrophage and T cell-dependent and is under control of two determinant-specific Ir genes. J. Immunol., 128, 2458-2464.
- 73) Elson, C. O. and Ealding, W. (1987) : Ir gene control of the murine secretory IgA reponse to cholera toxin. Eur. J. Immunol., 17, 425-428.
- 74) Staruch, M. J. and Wood, D. D. (1982) : Genetic influences on the adjuvantcity of muramyl dipeptide in vivo. J. Immunol., 128, 155-160.
- 75) Silverblatt, F. J. and Cohen, L. S. (1979) : Antipili antibody affords protection against experimental ascending pyelonephritis. J. Clin. Invest., 84, 333-338.
- 76) Jayappa, H. G., Goodnow, R. A. and Geary, S. J. (1985) : Role of Escherichia coli type 1 pilus in colonization of porcine ileum and its protective nature as a vaccine antigen in controlling colibacillosis. Infect. Immun., 48, 350-354.
- 77) Issacson, R. E., Fusco, P. C., Brinton, C. C. and Moon,

- H. W. (1978) : In vitro adhesion of Escherichia coli to porcine small intestinal epithelial cells : pili as adhesive factors. Infect. Immun., 21, 392-397.
- 78) Abraham, S. N., Hasty, D. L., Simpson, W. A. and Beachey, E. H. (1983) : Antiadhesive properties of a quaternary structure-specific hybridoma antibody against type 1 fimbriae of Escherichia coli. J. Exp. Med., 158, 1114-1128.
- 79) Guerina, N. G., Kessler, T. W., Guerina, V. J., Neutra, M. R., Clegg, H. W., Langermann, S., Scannapieco, F. A. and Goldmann, D. A. (1983) : The role of pili and capsule in the pathogenesis of neonatal infection with Escherichia coli K1. J. Infect. Dis., 148, 395-405.
- 80) Weinstein, R. and Silverblatt, F. J. (1983) : Antibacterial mechanisms of antibody to mannose-sensitive pili of Escherichia coli. J. Infect. Dis., 147, 882-889.
- 81) Peros, W. J., Etherden, I., Gibbons, R. J. and Skobe, Z. (1985) : Alteration of fimbriation and cell hydrophobicity by sublethal concentrations of tetracycline. J. Periodont. Res., 20, 24-30.
- 82) Okuda, K., Kato, T., Naito, Y., Takazoe, I., Kikuchi, Y., Nakamura, T., Kiyoshige T. and Sasaki, S. (1988) : Protective efficacy of active and passive immunizations against experimental infection with Bacteroides gingivalis in ligated hamsters. J. Dent. Res., 67, 807-811.

Studies on the Induction of the Humoral Immune Responses to *Bacteroides gingivalis* Fimbrial Antigen in Mice

Hidetoshi SHIMAUCHI

Department of Periodontology and Endodontology
Osaka University, Faculty of Dentistry
1-8, Yamadaoka, Suita, Osaka 565, Japan

Key words: *Bacteroides gingivalis* • Fimbriae • MDP derivatives •
Humoral immune response • Mice

Serum and salivary antibody responses to *Bacteroides gingivalis* fimbriae administered either orally or subcutaneously (s.c.) with or without an adjuvant in various strains of mice were examined in this study.

Following results were obtained.

- 1) Oral administration of *B. gingivalis* fimbriae with GM-53 as an adjuvant in liposomes, but not in Tris-HCl buffer, definitely enhanced the fimbriae-specific IgG responses, mainly IgG1 followed by IgG2b, IgG2a and IgG3 in serum and IgA response in saliva of BALB/c mice. On the other hand, s.c. injection of fimbriae with GM-53 or MDP-Lys(L18) also raised the fimbriae-specific IgG followed by IgA and IgM responses in serum, and both IgA and IgG responses in saliva of BALB/c mice. Oral immunization was less effective than s.c. injection in terms of the production of serum antibody in the mice. However, the level of salivary antibody of mice injected s.c. was similar to that of mice immunized orally.
- 2) High anti-fimbriae antibodies in serum were maintained in BALB/c mice immunized orally with fimbriae and GM-53 in liposomes for approximately 7 months after the primary immunizations. Oral administration also induced and held the fimbriae-specific IgA response in saliva for at least 6 months after the primary immunizations. The levels of fimbriae-specific IgA in saliva after the second boosters on days 123 and 124 were higher than those after the primary ones on days 27 and 28.
- 3) Among various strains of mice immunized orally with fimbriae and GM-53 in liposomes, BALB/c and DBA/2 mice (H-2^d) significantly produced

high levels of both serum IgG and salivary IgA antibodies specific for fimbriae. Furthermore, B10.D2 mice (H-2^d) were responders followed by B10.DR (H-2^k), while C57BL/10 mice (B10, H-2^b) were low responders to the fimbriae. These results show that the combined use of fimbriae together with an adjuvant results in a sharply increased IgA antibody response in saliva and a predominantly stimulated IgG antibody in serum, respectively, and it was suggested that these responses are restricted by H-2 haplotype.