

Serological Response to Fusobacterium nucleatum of Patients with Various Oral Diseases

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/8151

各種口腔疾患患者の *Fusobacterium nucleatum* に 対する血清学的反応

金沢大学医学部歯科口腔外科学講座 (主任: 山本悦秀教授)

高 井 勇 学

(平成1年10月27日受付)

各種の口腔疾患を有する患者の *Fusobacterium nucleatum* (*F. nucleatum*) に対する免疫について検討した。血清中の *F. nucleatum* に対する抗体価の測定は、*F. nucleatum* KO-31 株の培養上清から作製した TFT-310 (本態はリポ多糖) を感作した赤血球を用いる間接赤血球凝集反応により行った。アガロース電気泳動、TSKgel G3000SW カラムクロマトグラフィーにより血清を分画した結果、TFT-310 と反応する抗体は IgM であることが示された。更に、各種ヒト血清成分に対する抗体を用いた中和反応、血清の2-メルカプトエタノール処理により抗 TFT-310 抗体は IgM であることが確認された。健康人104名、非炎症性口腔疾患を有する患者136名、炎症性口腔疾患を有する患者127名の血清中の抗 TFT-310 抗体価はいずれの群においても8~1,024の範囲であった。32~128の抗体価を示す場合が多く、健康人群では74名 (71.2%)、非炎症性口腔疾患症例群では108名 (79.4%)、炎症性口腔疾患症例群では104名 (81.9%) であった。16以下の低抗体価を示す症例は、健康人群、非炎症性口腔疾患群、炎症性口腔疾患群では各々10例 (9.6%)、23例 (16.9%)、18例 (14.2%) であった。512以上の高抗体価を示す症例は健康人群では12例 (11.5%) と比較的多かったが、非炎症性口腔疾患群、炎症性口腔疾患群では各々3例 (2.2%)、1例 (0.8%) にすぎず、健康人より有意に少なかった ($P < 0.01$, $P < 0.001$)。口腔癌患者23名の抗 TFT-310 抗体価は前3群と著しく異なり、被験全例において抗体価は8以下であった。8以下の抗体価を示した症例は健康人群では1例 (1.0%)、非炎症性口腔疾患群では5例 (3.7%)、炎症性口腔疾患群では4例 (3.1%) にすぎず、抗 TFT-310 抗体価が低いことは口腔癌患者の特徴と考えられた。以上の結果、口腔癌あるいは白板症病巣において特に *Fusobacterium* が増殖するのは、本菌に対する生体側の免疫能の低下が関与していることが示唆された。また抗 TFT-310 抗体価の測定が口腔癌の診断に有用である可能性が示唆された。

Key words antibody titer, *Fusobacterium nucleatum*, lipopolysaccharide, malignant tumor, oral cancer

Fusobacterium は口腔内常在菌の一種である¹⁾。本菌は歯肉膿瘍、顎嚢胞、歯性上顎炎、顎骨髄炎等口腔内領域の炎症性疾患、あるいは前癌病変とされる白板症、口腔癌の感染病巣より分離されるが、特に白板症、口腔癌の感染病巣からの分離率が高い^{2,3)}。口腔内常在菌の中で特に *Fusobacterium* と口腔癌との間に密接な関係が見られたことから、Tamai ら⁴⁾ は

Fusobacterium が抗腫瘍活性を有しているのではないかと考え、白板症からの分離菌株である *Fusobacterium nucleatum* (*F. nucleatum*) KO-31 株を用い、その抗腫瘍活性を検討し、本菌の培養上清液中に抗腫瘍物質が存在することを明らかにした。その後、本抗腫瘍物質は精製され、TFT-310 と名付けられた⁵⁾。TFT-310 の本態についてはリポ多糖 (lipopolysac-

Abbreviations: *E. coli*, *Escherichia coli*; *F. nucleatum*, *Fusobacterium nucleatum*; HPLC, high performance liquid chromatography; Ig, immunoglobulin; LPS, lipopolysaccharide; PB, phosphate buffer; PBS, phosphate-buffered saline; TF, Tamai-Fukuda

haride, LPS) であることが示されている⁷⁾.

細菌感染に対する生体防御に関し免疫は大きな役割を果たしていることは周知の事実である。前癌病変とされる白板症、あるいは口腔癌の感染病巣から *Fusobacterium* が高率に分離されることは、生体防御の点から考えると口腔癌患者においては特に *Fusobacterium* に対する免疫が低下していることが想定される。

以上の観点から本研究では、健康人、非炎症性口腔疾患を有する患者、炎症性口腔疾患を有する患者、口腔癌患者の血清中の *Fusobacterium* に対する抗体価を TFT-310 を抗原として用いることにより測定し、口腔癌患者における *Fusobacterium* に対する免疫の特異性について検討した。

材料および方法

I. 対 象

健康人としては男性49名(年齢, 11~80歳), 女性55名(年齢, 11~77歳), 合計104名を対象とした。非炎症性口腔疾患症例としては男性72名(年齢, 11~75歳), 女性64名(年齢, 10~71歳), 合計136名を対象とした。疾患別の詳細は、顎骨嚢胞患者57名, 顎骨良性腫瘍患者23名, 顎骨骨折患者22名, 口腔軟組織良性腫瘍患者15名, 口腔粘膜異常患者7名, 歯牙異常患者5名, 顎骨骨肥大患者3名, 唾石症患者2名, 顔面神経麻痺患者1名, 口腔内異物患者1名である。炎症性口腔疾患症例としては男性64名(年齢, 15~80歳), 女性63名(年齢, 12~75歳), 合計127名を対象とした。疾患別の詳細は、顎骨骨髓炎患者42名, 歯性上顎洞炎患者34名, 歯根嚢胞患者25名, 唾液腺炎患者11名, 智歯周囲炎患者5名, 顎骨骨折に感染を伴った患者4名, 頬部蜂窩織炎患者3名, 術後性頬部嚢胞患者2名, エナメル上皮腫に感染を伴った患者1名である。また口腔癌患者症例としては男性10名(年齢, 19~80歳), 女性13名(年齢, 21~82歳), 合計23名を対象とした。詳細は舌癌患者9名, 上顎洞癌患者4名, 歯肉癌患者3名, 頬粘膜癌患者2名, 下顎癌患者2名, 咽頭癌患者2名, 口腔底癌患者1名である。

以上合計390名について血液を採取し血清を調製した。

II. *F. nucleatum* KO-31 標品 (TFT-310) の作製

F. nucleatum KO-31 株の培養上清液からの抽出標品である TFT-310 は Tamai ら⁸⁾の方法に従って作製した。*F. nucleatum* KO-31 株の玉井・福田培地⁹⁾ (Tamai-Fukuda medium, TF 培地) (日水, 東京) 2,000ml での37°C・48時間培養菌液を4,500×g・20分間遠心した。得られた培養上清液にエチルアルコール

を濃度が60%になるように加え, 充分攪拌後4°Cで一晩静置し, 10,000×g・20分間遠心した。得られた沈殿物質に1/15M 磷酸緩衝液 (pH 7.0) (phosphate buffer, PB) 200ml を加え, 1 N NaOH で pH 8.0 に調整後, プロナーゼ E (科研, 東京) を10mg/ml になるように加えた。室温で24時間作用させた後, 10,000×g・20分間遠心した。遠心上清にエチルアルコールを60%の割合に加え, 生じた沈殿物質に PB50ml を加え, イオン交換カラム Dowex 1×4 (Dow-Chemical, Midland, USA) で吸着させた後, PB で溶出させ, 限外濾過膜 UK50 (東洋濾紙, 東京) で濾過後, ミリポアフィルター (孔径; 0.45μm) (日本ミリポア, 東京) で濾過滅菌した。濾過後凍結乾燥した標品を TFT-310 として使用した。なお TFT-310 以外の抗原としては *Escherichia coli* (*E. coli*) LPS (Sigma, St. Louis, USA) を使用した。

III. 抗 TFT-310 抗体価の測定

血清中の抗 TFT-310 抗体の検出・定量は間接赤血球凝集反応により行った。

1. TFT-310 感作赤血球の作製

1) 沢部ら⁹⁾の方法

ヒツジ保存血 (日本生物材料センター, 東京) 1容量に10容量の0.01M 磷酸緩衝食塩水 (pH 7.2) (phosphate-buffered saline, PBS) を加え, 攪拌した後, 1,000×g・10分間遠心することにより赤血球を洗浄した (遠心洗浄)。同操作を3回行った後のヒツジ赤血球沈査に PBS を加えて調整した3%赤血球浮遊液1容量に2容量の TFT-310 溶液 (TFT-310 濃度; 1mg/ml PBS) を加えよく混合し37°Cで30分間反応させた。反応後10容量の PBS を加え遠心洗浄を行った。遠心洗浄を3回行った後の TFT-310 感作ヒツジ赤血球沈査に0.1%ウシ血清アルブミン (和光, 大阪) 加 PBS を加え, 0.2% TFT-310 感作赤血球浮遊液を調整した。

2) タンニン酸処理血球法¹⁰⁾

PBS で作製したタンニン酸溶液 (0.04mg/ml) 3容量に, PBS 2容量, 遠心洗浄を3回行ったヒツジ赤血球沈査1容量を混合し, 37°Cで45分加温した。加温後10容量の PBS で3回遠心洗浄し, タンニン酸処理赤血球沈査を作製した。タンニン酸処理赤血球沈査2容量と, TFT-310 溶液3容量をよく混合し, 37°Cで3時間反応させた。反応後, 10容量の PBS で遠心洗浄を行った後, 先の場合と同様, 0.1%ウシ血清アルブミン加 PBS を用い, 0.2% TFT-310 感作赤血球浮遊液を調整した。

3) 測定法

マイクロプレートを用いるマイクロタイター法により行った。マイクロプレートは96穴のU底タイタープレート (C. A. Greiner und Sohne, Frickenhausen, W. Germany) を用いた。PBS を用いての2段階階希釈血清 50 μ l に、TFT-310 感作ヒツジ赤血球浮遊液 50 μ l を加え、混合した後、37°C で2時間静置した。その後室温にて24時間静置した後、管底赤血球凝集像を観察した。凝集陽性を示す最大血清希釈倍数の逆数を凝集価とした。この間接赤血球凝集反応により求めた凝集価を被験血清の抗 TFT-310 抗体価とした。

IV. 分画採取用アガロース電気泳動

試料血清の分画採取用アガロース電気泳動は右田ら¹⁴⁾の方法により行った。26 \times 16 \times 1 cm のアガロースブロック (ペロナール・ペロナールソーダ緩衝液 (pH 8.6, μ = 0.05) に1%のアガロース (和光) を溶かして作ったゲル) に22 \times 0.2 \times 1 cm の溝を切り、2 ml の試料血清を2 ml のアガロースゲルと混合して溝に満たして固まらせた。電気泳動は、電源 PAV200 (常光産業, 東京) を用い、150V, 80mA で240分を行った。泳動終了後、アガロースゲルは0.5cm ずつ幅のブロックとして切り出し、各ブロックはそれぞれ試験管に入れて凍結融解法により各分画を抽出し、その凝集活性を調べた。各分画のタンパク濃度はバイオラッドプロテインアッセイキット (Bio-Rad Laboratories, Richmond, USA) を用い OD₂₈₀ を測定することにより求めた。

V. 高速液体クロマトグラフィー (high performance liquid chromatography, HPLC) による血清分画

TSKgel G3000SW カラム (東洋ソーダ, 東京) を装着した高速液体クロマトグラフ Model 302 (Gilson, Villiers le Bel, France) を用いた。0.1ml の試料血清を添加し、pH 6.0 の PBS を溶媒として、0.2ml ずつの分画を採取した。タンパク濃度は装置に付属した自記吸光度計 Model 111 (Gilson) により OD₂₈₀ を測定することにより求めた。それぞれのピークはプールして凍結乾燥後、0.1ml の蒸留水に溶かして、その凝集活性を調べた。

VI. 各種抗ヒト血清抗体による血清の間接赤血球凝集活性の中和試験

ヒト血清成分に対する抗体としては、ウサギ抗ヒト全血清抗体 (INC Immuno Biologicals, Lisie, Israel), ウサギ抗ヒトアルブミン抗体 (生化学工業, 東京), ウサギ抗ヒト免疫グロブリン (immunoglobulin, Ig) 抗体 (Dako, Glostrup, Denmark), ウサギ抗ヒト IgG 抗体 (生化学工業), ウサギ抗ヒト IgM 抗体

(INC Immuno Biologicals) を用いた。

中和試験は以下の如くに行った。凝集価16に調整した被験血清と、等量のそれぞれの抗体を混合し、37°C で60分間反応させた。反応後、混合液の残存凝集活性を測定した。

VII. 血清の2-メルカプトエタノール処理

血清中の IgM 抗体の抗原との反応性を失わせるため、血清を2-メルカプトエタノールで処理した。血清の2-メルカプトエタノール処理は Deutsch ら¹⁵⁾の方法により行った。

VIII. 統計処理

抗 TFT-310 抗体価の各群間の比較には X²検定法を用い P < 0.05 を有意とした。

成 績

I. 抗 TFT-310 抗体検出・定量のための間接赤血球凝集反応の検討

抗 TFT-310 抗体の検出・定量は TFT-310 感作ヒツジ赤血球を用いる間接赤血球凝集反応により行った。間接赤血球凝集反応はマイクロタイター法により行ったが、先ず本間接赤血球凝集反応における諸条件について、N. S. 血清を用いて検討した。

1. 感作赤血球濃度の検討

沢部らの方法により TFT-310 感作ヒツジ赤血球を作製し、感作赤血球濃度0.1, 0.2, 0.25, 0.5%について比較検討した。赤血球濃度が0.1%の場合、凝集価は128であり、最も高い値を示したが、凝集像は薄く判定に困難を来たした。赤血球濃度が0.2, 0.25%の場合、凝集価は共に64を示し、また凝集像の判定も明確であった。赤血球濃度が0.5%の場合凝集像の判定は明確であったが、凝集価は32と低値を示した。

2. タンニン酸処理赤血球法との比較

沢部らの方法により作製した TFT-310 感作赤血球を用いた間接赤血球凝集反応の感受性について、タンニン酸処理赤血球法により作製した TFT-310 感作赤血球を用いた場合と比較検討した。この際いずれにおいても血球濃度を0.2%とした。

いずれの感作赤血球を用いても凝集価は64であり、感作赤血球の作製法の違いによる感受性の差異は認められなかった。

3. 管底血球凝集像の判定時間

TFT-310 感作血球浮遊液 (沢部らの方法により作製) と2段階階希釈 N. S. 血清との混合液の管底血球凝集像を、37°C・2時間静置後、次いで室温に移し24時間静置後、48時間静置後に観察した。37°C・2時間静置後の凝集価は32、24時間静置後及び48時間静置後

の凝集価は共に64であった。

以上の結果に基づき抗 TFT-310 抗体の検出・定量のための間接赤血球凝集反応には沢部らの方法により作製した血球濃度0.2%の TFT-310 感作ヒツジ赤血球を用いることとした。また管底血球凝集像の判定は感作血球浮遊液と被験血清の混合液を37°C・2時間、次いで室温にて24時間静置後に行うこととした。

上述の方法により求めた凝集価をその血清の抗 TFT-310 抗体価とした。

II. TFT-310 と反応する血清成分の解析

TFT-310 感作血球凝集反応にて64の凝集価を示した N. S. 血清を用い、TFT-310 と反応する血清成分の解析を行った。

1. 分画採取用アガロース電気泳動による解析

凍結融解法により抽出した各分画 (5 ml) について凝集反応を行ったが、いずれの分画も凝集反応陰性であった。このことは各分画において TFT-310 と反応

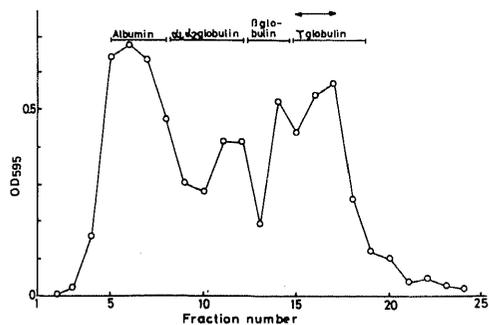


Fig. 1. Agarose electrophoresis of serum sample. \leftrightarrow , hemagglutination-positive fractions.

する血清成分の量が陽性反応を示す濃度以下に希釈されたと考えられたので、各分画を凍結乾燥により濃縮した。即ち各分画を凍結乾燥した後0.4mlの蒸留水に溶解し、凝集活性を検討した。凝集活性は15, 16, 17画分のみに認められた (図1)。これらの画分は γ -グロブリンに相当し、TFT-310 と反応する血清成分は免疫グロブリンであることが示唆された。

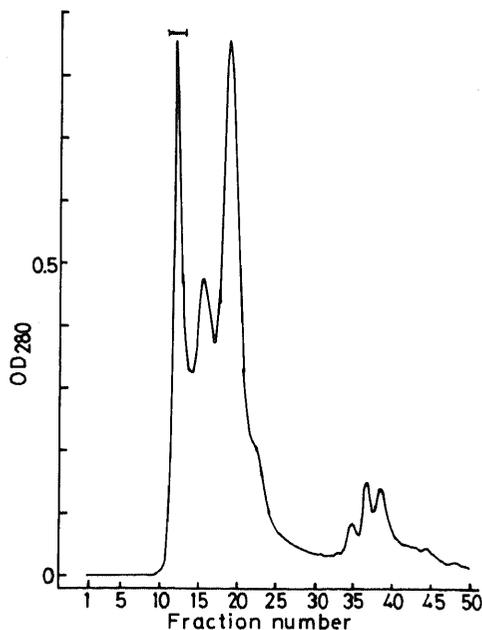


Fig. 2. TSKgel G3000SW column chromatography of serum sample. \leftrightarrow , hemagglutination-positive fractions.

Table 1. Neutralization of indirect hemagglutination reaction by various antibodies

Rabbit antibody added to serum sample	Residual hemagglutination titer of serum sample		
	Dilution of antibody added		
	$\times 1$	$\times 10$	$\times 100$
Normal rabbit serum	8	8	8
Anti human whole serum	1	4	8
Anti human Ig	1	4	8
Anti human IgM	—*	2	8
Anti human IgG	8	8	8
Anti human albumin	8	8	8

Fifty μ l of serum sample with a hemagglutination titer of 16 was incubated at 37°C for 30min with an equal volume of each antibody and then the residual hemagglutination activity of the mixture was measured.

* Hemagglutination-negative.

2. TSKgel G3000SW カラムクロマトグラフィーによる解析

凝集活性は最初のピーク (11, 12画分) にのみ認められた (図2). このピークはIgM に相当するところから, TFT-310 と反応する血清成分は IgM 抗体であることが示唆された.

3. 各種抗体による中和試験による解析

各種のウサギ抗ヒト血清抗体, 即ち抗ヒト全血清, Ig, IgG, IgM, アルブミン抗体の凝集活性に対する中和能を検討した. この際被験血清としては, 凝集価16に調整した血清を用いた. またウサギ抗ヒト血清抗体としては原液, 10倍, 100倍希釈抗体について検討した.

原抗体による中和試験では抗 IgM 抗体を用いた時凝集活性は完全に中和された (表1). また抗全血清抗体, 抗 Ig 抗体による中和試験では凝集価は1を示したにすぎず, 両抗体も凝集活性に対する中和能を有することが分かった. 10倍希釈抗体による中和試験では抗 IgM 抗体を用いた時, 凝集価は2, 抗全血清抗体, 抗 Ig 抗体を用いた場合凝集価は4を示し, これら3種の抗体は, 原抗体を用いた場合と同様, 凝集活性を中和した.

以上の結果, TFT-310 と反応する血清成分は IgM 抗体であることが分かった.

4. 2-メルカプトエタノール処理による解析

先の実験で TFT-310 と反応する血清成分は IgM 抗体であることが判明したが, 更にこのことを確認するため, 2-メルカプトエタノール処理による被験血清の凝集価の変動を検討した. 2-メルカプトエタノール処理をしないコントロール血清は, 凝集価32を示したが, 2-メルカプトエタノール処理血清では凝集反応陰

性であった. 以上の結果より TFT-310 と反応する血清成分は IgM 抗体であることが確認された.

III. 健常人の血清中の抗 TFT-310 抗体価

健常人104名の血清について抗 TFT-310 抗体価を測定した結果を表2に示した.

健常人の血清中の抗 TFT-310 抗体価は8~1,024におよんだが, 抗体価64を示す場合が最も多く, 被験104名中45名 (43.3%) が抗体価64を示した. 次いで, 順次, 抗体価128 (18名, 17.3%), 抗体価32 (11名, 10.6%) を示す場合が多く, 被験健常人の71.2% (74名) が32~128の抗体価を有していた. 16以下の低い抗体価を有する健常人は極めて少なく, 104名中わずか10名 (9.6%) にすぎなかった. 逆に512以上の高い抗体価を有する健常人は比較的多く, 12名 (11.5%) 存在した.

加齢による抗体価の変動はみられなかった. また性差による抗体価の特徴もみられなかった.

IV. 非炎症性口腔疾患を有する患者の血清中の抗 TFT-310 抗体価

顎骨嚢胞患者57名, 顎骨良性腫瘍患者23名, 顎骨骨折患者22名, 口腔軟組織良性腫瘍患者15名, 口腔粘膜異常患者7名, 歯牙異常患者5名, 顎骨骨肥大患者3名, 唾石症患者2名, 顔面神経麻痺患者1名, 口腔内異物患者1名, 計136症例についての血清中の抗 TFT-310 抗体価を表3に示した.

136症例の抗 TFT-310 抗体価は健常人と同様8~1,024の範囲におよんだ. また健常人と同様, 抗体価64を示す場合が最も多く (44名, 32.4%), 次いで, 順次, 抗体価128 (33名, 24.3%), 抗体価32 (31名, 22.8%) を示す場合が多かった. これら32~128の抗体価を有する症例の割合は被験136症例中108名 (79.4%)

Table 2. Antibody titers against TFT-310 of 104 healthy persons

Antibody titer against TFT-310	Number of persons showing each antibody titer						
	Age (years old)						
	11-20	21-30	31-40	41-50	51-60	61-70	71-80
8	0	0	0	1	0	0	0
16	5	2	2	0	0	0	0
32	1	1	5	0	3	1	0
64	19	11	10	3	2	0	0
128	1	9	3	3	1	0	1
256	0	3	2	1	1	1	0
512	0	0	2	0	0	0	1
1,024	2	3	2	1	1	0	0

を占め、健常人の場合とほぼ等しかった。16以下の低抗体価を示した症例は23例(16.9%)であり、健常人に較べやや多かったが有意差は認められなかった。また抗体価8を示した症例は5症例(3.7%)みられた。これらの症例は17~34歳の症例であり、疾患的には顎骨骨折が2例、顎骨嚢胞が2例、顎骨良性腫瘍が1例であった。

抗体価512以上を示した症例は3例(2.2%)にすぎず、健常人と較べ有意に少なかった(P<0.01)。

V. 炎症性口腔疾患を有する患者の血清中の抗 TFT-310 抗体価

顎骨骨髓炎患者42名、歯性上顎洞炎患者34名、歯根嚢胞患者25名、唾液腺炎患者11名、智歯周囲炎患者5名、顎骨骨折に感染を伴った患者4名、頬部蜂窩織炎患者3名、術後性頬部嚢胞患者2名、エナメル上皮腫に感染を伴った患者1名、計127症例についての血清中抗 TFT-310 抗体価を表4に示した。

127症例の TFT-310 抗体価は健常人と同様8~1,024の範囲におよんだ。また健常人、あるいは非炎

症性口腔疾患群と同様、抗体価64を示す場合が最も多く(45名, 35.4%)、次いで順次、抗体価128(31名, 24.4%)、抗体価32(28名, 22.0%)を示す場合が多かった。これら32~128の抗体価を有する症例の割合は被験127症例中104例(81.9%)を占め、健常人、非炎症性口腔疾患群と大きな差異はみられなかった。

16以下の抗体価を示した症例は18例(14.2%)存在し、非炎症性口腔疾患群の場合と同様、健常人に較べやや多かったが有意差は認められなかった。また抗体価8を示した症例は4例(3.1%)みられた。これら4症例の年齢分布は先の非炎症性口腔疾患群の場合とは逆に37~69歳の高齢者であった。症例的には歯根嚢胞が1例、歯性上顎洞炎1例、顎骨骨髓炎が2例であった。

抗体価512以上を示した症例はわずか1例(0.8%)にすぎず、健常人に較べ有意に少なかった(P<0.001)。

VI. 口腔癌患者の血清中の抗 TFT-310 抗体価

舌癌患者9名、上顎洞癌患者4名、歯肉癌患者3

Table 3. Antibody titers against TFT-310 of 136 patients with non-inflammatory oral diseases

Antibody titer against TFT-310	Number of patients showing each antibody titer						
	Age (years old)						
	11-20	21-30	31-40	41-50	51-60	61-70	71-80
8	2	2	1	0	0	0	0
16	3	2	7	2	2	1	1
32	6	3	6	8	5	2	1
64	6	4	11	6	6	8	3
128	6	6	4	5	7	4	1
256	0	0	0	1	0	0	1
1,024	3	0	0	0	0	0	0

Table 4. Antibody titers against TFT-310 of 127 patients with inflammatory oral diseases

Antibody titer against TFT-310	Number of patients showing each antibody titer						
	Age (years old)						
	11-20	21-30	31-40	41-50	51-60	61-70	71-80
8	0	0	1	1	1	1	0
16	2	6	2	1	1	2	0
32	1	2	6	6	5	5	3
64	4	6	5	11	6	8	5
128	5	7	4	5	5	2	3
256	1	1	1	0	0	1	0
1,024	1	0	0	0	0	0	0

Table 5. Antibody titers against TFT-310 of 23 patients with oral cancer

Antibody titer against TFT-310	Number of patients showing each antibody titer							
	Age (years old)							
	11-20	21-30	31-40	41-50	51-60	61-70	71-80	81-90
1	1	1	0	0	0	0	2	0
2	0	0	0	2	0	0	2	0
4	0	1	0	2	1	1	0	0
8	0	0	0	0	2	6	1	1

名、頬粘膜癌患者2名、下顎癌患者2名、咽頭癌患者2名、口腔底癌患者1名、計23症例についての血清中抗 TFT-310 抗体価を表5に示した。

癌患者の血清中の抗 TFT-310 抗体価は先に述べた健康人、非炎症性口腔疾患を有する患者、炎症性口腔疾患を有する患者の場合と明確に異なっていた。即ち被験23名全てにおいて抗体価は8以下であり、抗体価16以上を有する患者はみられなかった。

VII. *E. coli* LPS に対する抗体価

E. coli LPS に対する血清中の抗体価を、健康人10名、口腔癌患者5名について測定した。抗体価の測定は、抗 TFT-310 抗体価の場合と同様、間接赤血球凝集反応により行った。

抗 *E. coli* LPS 抗体価は健康人群、口腔癌患者群共に64~512であり、両群の間には差異は認められなかった。

考 察

口腔内には *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Lactobacillus*, *Corynebacterium*, *Peptostreptococcus*, *Branhamella*, *Bacteroides*, *Veillonella*, *Propionibacterium*, *Fusobacterium* 等多種類の細菌が常在菌として存在している¹¹⁾。*F. nucleatum* は歯周病患者的の歯垢からは最も頻りに分離され、時には歯垢湿重量 1g 当り約 10^8 個存在する場合もある¹²⁾。本菌は歯肉膿瘍、顎嚢胞、歯性上顎洞炎、顎骨骨髓炎等口腔内領域の炎症性疾患からは数%の頻度で分離されるが、特に白板症、口腔癌の感染病巣からの分離率は高く数10%の割に分離される²³⁾。

Tamai ら⁴⁹⁾は口腔癌の前癌病変と考えられている白板症、および口腔癌の感染病巣から *F. nucleatum* が高率に分離されることから、*F. nucleatum* が抗腫瘍性を有しているのではないかと考え、白板症からの分離菌株である *F. nucleatum* KO-31 株の抗腫瘍活性を検討した。彼らは *F. nucleatum* KO-31 株の抗腫瘍活

性をマウスに移植したエールリッヒ腹水癌細胞、サルコーマ180細胞、およびメスA細胞の固型腫瘍について検討し、本菌の培養上清液中に抗腫瘍物質が存在することを明らかにした。その後本抗腫瘍物質は精製され TFT-310 と名付けられた⁹⁾。TFT-310 の本態については種々検討され細胞壁構成成分である LPS であることが示されている⁷⁾。

抗腫瘍活性を有する *F. nucleatum* が前癌状態である白板症、あるいは口腔癌病巣で特に増殖をしていることは、癌に対する生体の防御反応としては一見合目的である様に思われるが、感染防御の点からは生体の本菌に対する免疫能が低下していることを意味している様に思われる。著者は *F. nucleatum* が特に癌患者において増殖する現象について、本菌に対する血中抗体の点から検討した。

本研究ではまず TFT-310 感作赤血球と反応する血清成分を明らかにすべく検討を行った。血清を電気泳動により分画した結果、反応成分はγグロブリン画分にあることが明らかとなり、反応成分は抗体であることが示唆された。次いで抗体のクラスを知るため、血清を TSKgel G3000SW カラムを用いた高速液体クロマトグラフィーにより分画した結果、反応成分は IgM 画分にのみ存在し、IgM 抗体であることが明らかとなった。このことは更に TFT-310 感作赤血球との凝集反応は抗ヒト全血清抗体、抗ヒト Ig 抗体あるいは抗ヒト IgM 抗体により中和されるが、抗ヒト IgG 抗体、抗ヒトアルブミン抗体によっては中和されないこと、及び2-メルカプトエタノール処理血清は反応陰性であることにより確認された。

抗原が細菌の LPS であり、かつ少量の抗原で刺激された場合に産生される抗体は主として IgM である¹⁵⁾⁻¹⁷⁾。また最近 *F. nucleatum* は特に IgM の産生を増強することが示されている¹⁸⁾¹⁹⁾。以上の事を考えれば、その本態が *F. nucleatum* の LPS である TFT-310 に対する抗体は IgM であったことは妥当な

ものと考えられる。健康者の血清中には *Bacteroides*, *Fusobacterium* 等の嫌気性菌に対する抗体が存在することが種々報告されている^{20)~24)}。F. nucleatum に対する血清中の抗体価は、抗原として菌体あるいは菌体の超音波抽出物質を用い、血清殺菌法、酵素結合抗体免疫アッセイ、ラジオイムノアッセイにより測定されているが、抗体陽性率は30~100%と研究者により異なる²⁰⁾²³⁾²⁴⁾。

著者は F. nucleatum KO-31 標品 TFT-310 を抗原として用い、間接赤血球凝集反応により F. nucleatum に対する抗体価を測定したが、被験健康者104例全例において抗体価8以上を示した。非感作赤血球に対する凝集価は4以下であったので、被験全例が F. nucleatum に対する抗体陽性と考えることが出来る。F. nucleatum に対する抗体の陽性率の差異は用いる抗原、測定法の違いによるものと思われる。

非炎症性口腔疾患症例136例、炎症性口腔疾患症例127例の抗 TFT-310 抗体価は全例において8以上を示したが、健康人と較べた場合抗体価の上昇はみられなかった。このことは対象とした顎骨髄炎、歯性上顎洞炎、歯根嚢胞、唾液腺炎等の炎症性疾患においては *Fusobacterium* の分離率が数%にすぎないことに原因する可能性はある³⁾。しかしながら F. nucleatum をも含めた口腔内常在菌が原因と考えられている歯根膜炎においても F. nucleatum に対する IgM 抗体価の上昇はみられない²⁵⁾。抗体価の上昇がみられないのは口腔内感染症の多くは口腔内常在菌によるものであり、かつ数種の菌の複合感染である²⁶⁾ことによるものと思われる。

癌患者の免疫能は一般に低下しており、特に細胞性免疫能の低下が顕著である²⁵⁾。頭頸部癌においても遅延型皮膚反応の低下²⁶⁾²⁷⁾、リンパ球幼若化反応の低下^{28)~30)}、OKT4/8比(ヘルパー・インデューサーT亜集団とキラー・サブレッサーT亜集団の比)の低下等³¹⁾³²⁾が報告されている。頭頸部癌患者の液性免疫能について、坂口ら³³⁾は31人の頭頸部癌患者について各種の液性因子を測定し、血清γグロブリン量、血清IgG量、Bリンパ球数の減少は認められず、むしろ血清α₂グロブリン量、IgG量に増加が認められたこと等から、これらの癌患者では液性因子の低下はないと推察した。また胃癌患者³⁴⁾、肺癌患者³⁵⁾でも、γグロブリン、あるいはIgGの増量が報告されている。

本研究では口腔癌患者においては F. nucleatum の細胞壁成分である TFT-310 に対する抗体価が極めて低値であることが明らかにされた。本研究では血清Ig量は測定していないので、低抗 TFT-310 抗体価は

血清Ig量の減少を反映している可能性は否定できないが、上述の如く癌患者ではIg量がむしろ増加している。口腔癌患者では抗 TFT-310 抗体量が特異的に低下しているものと考えられる。この事は少数ではあるが、抗 E. coli LPS 抗体価を測定した結果、口腔癌患者においても抗 E. coli LPS 抗体価は健康人と同様64~512であったことによっても支持される。抗 TFT-310 抗体価が口腔癌患者において低値を示す理由については色々と考えられる。F. nucleatum が癌病巣に高率に見い出されること、また TFT-310 はその本態が LPS でありT細胞非依存性抗原に属することを考慮に入れると、免疫学的寛容により抗体産生の抑制がおこったと考えるのが妥当と思われる。免疫学的寛容のため F. nucleatum に対する抗体が産生されないことが、癌患者において特に F. nucleatum が増殖することに関与するものと考えられる。しかしながら低抗 TFT-310 抗体価が口腔癌の結果あるいは原因として口腔癌と本質的な関係を有するか否かについては不明である。

口腔癌では上述の如く抗 TFT-310 抗体価は8以下の低値を示したことから、抗 TFT-310 抗体価の測定が、他の悪性腫瘍の診断に有効である可能性が考えられる。試験的に肝癌、胃癌、肺癌、食道癌、直腸癌、悪性リンパ腫、悪性黒色腫、悪性線維性組織球腫各々数例について抗 TFT-310 抗体価を測定した結果、いずれの患者においても抗 TFT-310 抗体価は8以下であった。このことは低抗 TFT-310 抗体価が悪性腫瘍の診断に有用である可能性を示唆するが、今後更に検討すべきことと思われる。

結 論

健康人、非炎症性口腔疾患を有する患者、炎症性口腔疾患を有する患者、口腔癌患者の血清中の F. nucleatum に対する抗体、抗体価を解析し、口腔癌患者における F. nucleatum に対する免疫の特異性について検討し、以下の成績を得た。この際、F. nucleatum に対する抗体価は F. nucleatum KO-31 株標品 TFT-310 を感作抗原とする間接赤血球凝集反応により測定した。

1. 分画採取用アガロース電気泳動、TSKgel G3000SW カラムクロマトグラフィーにより血清を分画した結果、抗 TFT-310 抗体はIgMであることが示された。

2. 更に、各種ヒト血清成分に対する抗体を用いた中和試験、ならびに血清の2-メルカプトエタノール処理を行った結果、抗 TFT-310 抗体はIgMであること

が判明した。

3. 健常人104名中74名(71.2%)が32~128の抗TFT-310抗体価を有していた。16以下の低抗体価を示す例は10名(9.6%)にすぎなかったが、512以上の高抗体価を有する例は12名(11.5%)存在した。

4. 非炎症性口腔疾患患者症例136例中108例(79.4%)、炎症性口腔疾患患者症例127例中104例(81.9%)が32~128の抗TFT-310抗体価を示した。16以下の低抗体価を示す例は、非炎症性口腔疾患群、炎症性口腔疾患群では各々23例(16.9%)、18例(14.2%)存在し、健常人よりやや多かったが有意差は認められなかった。512以上の高抗体価を示す例は、非炎症性口腔疾患群、炎症性口腔疾患群では各々3例(2.2%)、1例(0.8%)にすぎず、健常人より有意に少なかった($P < 0.01$, $P < 0.001$)。

5. 口腔癌患者症例の抗TFT-310抗体価は被験23例全例共に8以下であった。8以下の抗体価を示した症例は健常人群、非炎症性口腔疾患群、炎症性口腔疾患群では各々1例(1.0%)、5例(3.7%)、4例(3.1%)にすぎず、8以下の低抗TFT-310抗体価は口腔癌患者の特徴と考えられた。

謝 辞

稿を終るに臨み、御懇篤なる御指導、御校閲を賜りました恩師故玉井健三教授、山本悦秀教授に深甚なる謝意を捧げます。また本研究にあたり終始多大なる御指導、御校閲を賜りました本学微生物学講座、中村信一教授に衷心より感謝の意を表します。さらに本実験に際し、貴重なる御助言を賜りました、がん研究所分子免疫部、右田俊介教授、および検体採取に多くの御協力を戴きました本学第2外科学教室、泉良平講師に対し心より感謝の意を表します。また本研究に御協力戴いた歯科口腔外科学教室の諸先生方に深く感謝いたします。

文 献

- 1) Hentges, D. J.: Anaerobes as normal flora. In S. M. Finegold & W. L. George (eds.), Anaerobic Infections in Humans, p37-53, Academic Press, San Diego, 1989.
- 2) Newman, M. G. & Goodman, A. D.: Oral and dental infections. In S. M. Finegold & W. L. George (eds.), Anaerobic Infections in Humans, p233-261, Academic Press, San Diego, 1989.
- 3) 玉井健三: 口腔内嫌気性菌感染症. 嫌気性菌感染症研究, 15, 247-254 (1985).
- 4) Tamai, K., Nakao, J., Takematsu, K. & Nakagawa, K.: Studies on the antitumor activity of *Fusobacterium nucleatum* strain KO-31. Microbi-

ol. Immunol., 26, 163-165 (1982).

- 5) Tamai, K., Nakao, J., Nakagawa, K., Watanabe, K., Sakashita, H., Nishiwaki, Y. & Nakashin, T.: Antitumor activity in the culture supernatant fluid of *Fusobacterium nucleatum* strain KO-31. Jpn. J. Exp. Med., 53, 251-256 (1983).
- 6) Tamai, K., Watanabe, K. & Maeda, T.: Antitumor activity of sediment fractions from *Fusobacterium nucleatum* culture supernatant. Jpn. J. Exp. Med., 54, 159-170 (1984).
- 7) 藤元栄輔: *Fusobacterium nucleatum* KO-31 標品 (TFT-310) の腫瘍壊死因子産生に関する実験的研究. 十全医会誌, 95, 191-203 (1986).
- 8) 玉井健三, 福田順子: 口腔内嫌気性菌の研究 (第1報). 分離培地の検討. 口科誌, 19, 495-504 (1970).
- 9) 沢部孝昭, 向井 達, 藤田 浩, 木村禮代二: L-Asparaginase の生体内動態 (第2部), L-Asparaginase 投与時の血中抗体形成について. 癌と化学療法, 1, 221-226 (1974).
- 10) 医科学研究所学友会: 細菌学実習提要, 改訂5版, 239-243頁, 丸善, 東京, 1976.
- 11) 右田俊介, 松下 央: 大量分画採取用の寒天電気泳動. 免疫実験操作法 V (日本免疫学会編), 1401-1409頁, 日本免疫学会, 金沢, 1976.
- 12) Deutsch, H. F. & Morton, J. I.: Dissociation of human serum macroglobulins. Science, 125, 600-601 (1957).
- 13) 福田順子: 口腔内嫌気性菌の研究. 十全医会誌, 83, 544-563 (1974).
- 14) Hadi, A. W. & Russell, C.: Quantitative estimations of fusiforms in saliva from normal individuals and cases of acute ulcerative gingivitis. Arch. Oral Biol., 13, 1371-1376 (1968).
- 15) Cunningham, A. J.: The morphology of antibody-forming cells in the mouse. Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci., 46, 141-153 (1968).
- 16) Michael, J. G. & Rosen, F. S.: Association of "natural" antibodies to gram-negative bacteria with the gamma 1-macroglobulins. J. Exp. Med., 118, 619-626 (1963).
- 17) Robbins, J. B., Kenny, K. & Suter, E.: The isolation and biological activities of rabbit IgM and IgG anti-*Salmonella typhimurium* antibodies. J. Exp. Med., 122, 385-402 (1965).
- 18) Mangan, D. F. & Lopatin, D. E.: Polyclonal activation of human peripheral blood B

- lymphocytes by *Fusobacterium nucleatum*. Infect. Immun., **40**, 1104-1111 (1983).
- 19) Mangan, D. F., Won, T. & Lopatin, D. E.: Nonspecific induction of immunoglobulin M antibodies to periodontal disease associated microorganisms after polyclonal human B-lymphocyte activation by *Fusobacterium nucleatum*. Infect. Immun., **41**, 1038-1045 (1983).
- 20) Evans, R. T., Spaeth, S. & Morgenhagen, S. E.: Bactericidal antibody in mammalian serum to obligately anaerobic gram-negative bacteria. J. Immunol., **97**, 112-119 (1966).
- 21) Courant, P. R. & Gibbons, R. J.: Biochemical and immunological heterogeneity of *Bacteroides melaninogenicus*. Arch. Oral Biol., **12**, 1605-1613 (1967).
- 22) Quick, J. D., Goldberg, H. S. & Sonnenwirth, A. C.: Human antibody to *Bacteroidaceae*. Am. J. Clin. Nutr., **25**, 1351-1356 (1972).
- 23) Doty, S. L., Lopatin, D. E., Syed, S. A. & Smith, F. N.: Humoral immune response to oral microorganisms in periodontitis. Infect. Immun., **37**, 499-505 (1982).
- 24) Tew, J. G., Marshall, D. R., Moore, W. E. C., Best, A. M., Palcanis, K. G. & Ranney, R. R.: Serum antibody reactive with predominant organisms in the subgingival flora of young adult with generalized severe periodontitis. Infect. Immun., **48**, 303-311 (1985).
- 25) Robinson, J. C.: Assays of immunocompetence in the staging and prognosis of cancer. Surg. Gynecol. Obstet., **153**, 909-921 (1981).
- 26) Lundy, J., Wanebo, H., Pinsky, C., Strong, E. & Oettgen, H.: Delayed hypersensitivity reactions in patients with squamous cell cancer of the head and neck. Am. J. Surg., **128**, 530-533 (1974).
- 27) Eilber, F. R., Morton, D. L. & Ketcham, A. S.: Immunologic abnormalities in head and neck cancer. Am. J. Surg., **128**, 534-538 (1974).
- 28) Parker, R., Alexander, S., Shaheen, O.H. & Parkes, P.: On the immunology of head and neck cancer. J. Laryngol. Otol., **89**, 687-695 (1975).
- 29) Wanebo, H. J., Jun, M. Y., Strong, E. W. & Oettgen, H.: T cell deficiency in patients with squamous cell cancer of the head and neck. Am. J. Surg., **130**, 445-451 (1975).
- 30) Garrich, D. B., Good, R. A. & Gatti, R. A.: Lymphocyte response to phytohemagglutinin in patients with nonlymphoid tumors. Lancet, I, 618 (1970).
- 31) 諸山隆正, 遠藤邦彦, 筈谷純三郎, 巖 準一, 白築俊彦, 三井一史, 杉原敬三, 岡原芳孝, 原 潤一, 阪本知二, 管田辰海, 芳村喜道, 吉賀浩二, 高田和彰: 顎・口腔領域扁平上皮癌患者の末梢リンパ球サブセットの変動. 癌の臨床, **31**, 117-121 (1985).
- 32) 林 良夫, 佐藤光信, 古本奈奈代, 吉田秀夫, 梁川哲雄, 田良義明, 西田敏信: 頭頸部癌患者末梢血リンパ球数サブセットの異常-単クローン抗体による解析. 医学のあゆみ, **128**, 507-508 (1984).
- 33) 坂口幸作, 奥田 稔, 富山俊一: 頭頸部癌患者の免疫能. 日耳鼻, **81**, 113-121 (1978).
- 34) 赤井貞彦, 吉田奎介: 癌患者の血漿蛋白質. 最新医学, **23**, 1709-1718 (1968).
- 35) 志摩 清, 池田 俊, 安藤正幸, 岳中耐夫, 津田富康, 徳臣時比古: 肺癌患者の Ig. α_2 HS, C₃, 血清蛋白分画. 癌の臨床, **22**, 1391-1396 (1976).

Serological Response to *Fusobacterium nucleatum* of Patients with Various Oral Diseases Yugaku Takai, Department of Dento-Oral Surgery, School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920—J. Juzen Med. Soc., 98, 1060—1070 (1989)

Key words antibody titer, *Fusobacterium nucleatum*, lipopolysaccharide, malignant tumor, oral cancer

Abstract

Immunity against *Fusobacterium nucleatum* (*F. nucleatum*) was investigated in patients with various oral diseases. Antibody titers of sera against *F. nucleatum* were measured by indirect hemagglutination test, in which sheep red blood cells were sensitized with TFT-310 with a moiety of lipopolysaccharide, prepared from culture supernatant of the *F. nucleatum* KO-31 strain. By agarose electrophoresis and TSKgel G3000SW column chromatography of the serum sample, antibody reactive to TFT-310 was found to be IgM. Furthermore, by the neutralization test with antibodies against various human serum components and by treatment of the test serum with 2-mercaptoethanol, it was confirmed that the antibody reactive to TFT-310 is IgM. Antibody titers against TFT-310 were measured in 104 healthy persons, 136 patients with non-inflammatory oral diseases and 127 patients with inflammatory oral diseases. In all three groups the antibody titers ranged between 8 and 1,024. In more than 70% of cases, the groups showed antibody titers of 32 to 128; 74 (71.2%) healthy persons, 108 (79.4%) patients with non-inflammatory oral diseases and 104 (81.9%) patients with inflammatory oral diseases. The numbers of cases with low antibody titers of 16 or less were 10 (9.6%) in healthy persons, 23 (16.9%) in patients with non-inflammatory oral diseases and 18 (14.2%) in patients with inflammatory oral diseases. The number of cases with high antibody titers of 512 or more in healthy persons was 12 (11.5%), while that in patients with non-inflammatory or inflammatory oral diseases was only 3 (2.2%) or 1 (0.8%), respectively, significantly lower ($p < 0.01$, $p < 0.001$) in comparison with that in healthy persons. The antibody titers of patients with oral cancer were 8 or less in all 23 cases tested, distinctively different from those of three groups mentioned above. The number of cases with antibody titers of 8 or less in healthy persons, patients with non-inflammatory or inflammatory oral diseases was 1 (1.0%), 5 (3.7%), or 4 (3.1%), respectively, indicating that low titers of the antibody is a characteristic feature of patients with oral cancer. These findings seem to indicate that high multiplication of *Fusobacterium* in a leukoplakia lesion or oral cancer may be related to the decrease of the patients immunity against *Fusobacterium*. Furthermore, these results indicate that the measurement of the antibody titer against TFT-310 might be useful for the diagnosis of oral cancer.