歯周病原細菌に対する血清抗体価測定法の改良について

中島啓介 冨永由美子 石川 烈

東京医科歯科大学歯学部第2歯科保存学教室
(主任：石川 烈教授)

(平成3年9月12日受付)

An Improved Method for Evaluating Serum Antibody Titers

Keisuke NAKASHIMA, Yumiko TOMINAGA and Isao ISHIKAWA

Department of Periodontology, Faculty of Dentistry, Tokyo Medical and Dental University
5-45, Yushima, 1-Chome, Bunkyo-ku, Tokyo, Japan
(Chief and Director : Prof. Isao ISHIKAWA)

The purpose of this study was to improve the conventional method we have been using used for evaluation of serum IgG antibody titers.

In previous studies, patient sera were serially diluted and absorbance at 410 nm was measured with enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). The dilution and absorbance were plotted on X- and Y-axes, respectively. The antibody titer was defined as $\log_2$ of the serum dilution at the intersection of 0.8 absorbance.

In this study, a standard serum was prepared from blood (for transfusion). The antibody titers of this standard serum against four bacterial strains, *Porphyromonas gingivalis, Prevotella intermedia, Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Fusobacterium nucleatum,* were determined. Antibody titers of 24 patient's sera against these bacterial strains were then measured ten times to ascertain the reproducibility of data obtained by the improved method.

The results were as follow :

1. This improved method is capable of analyzing six times more samples than the conventional method.
2. The reproducibility of results obtained by the improved method was greater than that of the conventional method.
3. Sera, in which titers were higher than nine with the conventional method, had nearly the same titer with the improved method. However, when titers were less than nine with the conventional method, the titers were higher with the improved method.

These results indicate that the improved method was effective in screening high-titer sera.

Key words : Serum antibody titer, ELISA

要旨：著者らの教室で行ってきた血清IgG抗体価測定法を迅速かつ検体処理能力の高いものとすることを目的として測定法の改良を試みた。標準血清を連続希釈して標準血清曲線を描き，すべての被験血清はこの標準曲線上にのるものとして，単一希釈した被験血清からその抗体価を算出した。24名の患者血清について *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans* および *Fusobacterium nucleatum* 4菌種に対する抗体価を10回ずつ測定した結果，改良した測定法では測定時間は短縮できなかったが単位時間当りの検体処理数が約6倍に改善された。しかし，比較的抗体価が低い場合は今までの抗体価より高く算出されるため，

本論文の要旨は，第55回口腔病学会学術大会（1990年11月17日）において発表した。

改良型血清抗体価測定法は比較的高い抗体価を示す血清をスクリーニングする際には有効であると考えられた。

索引用語：血清抗体価，ELISA

緒　言

歯周ポケット内の細菌は歯周疾患の発病と進行に深く関与していると考えられている。その中でも *Porphyromonas gingivalis*，*Actinobacillus actinomycetemcomitans* など数種の細菌は種々のビルレンス（病原因子）を保有し，発病と進行に特に密接に関連していると考えられている。現在，これらの細菌が保有するビルレンス因子（*P. gingivalis* の線毛，トリプシン様酵素など，*A. actinomycetemcomitans* のロイコトキシン，LPS など）については数多くの研究者により詳細な研究が行われている。また，これらの細菌あるいはビルレンス因子に対する宿主側の生体応答についても広く研究されている[1]。著者らの教室では7年程前から ELISA 法（酵素標識免疫吸着測定法）によってこれら歯周病原細菌に対する患者血清 IgG 抗体価の測定を行ってきた。その結果，歯周ポケット内細菌の中でも，*P. gingivalis* に対する抗体価は歯周疾患の進行程度と強く相関していること[2]，また歯周治療後にその抗体価が減少すること[3]などが明らかになった。

近年，著者らの教室でも抗体価測定のために採取する検体数が年々増加し，これらの検体を測定する上で，これまでの測定法では検体の処理能力に問題が生じるようになってきた。そこで，本研究では従来より行ってきた血清 IgG 抗体価測定法の単位時間当りの検体処理数を増加させることを目的として測定法の改良を試みた。また，改良後の測定法について，測定値の再現性およびこの測定法が従来より行ってきた測定法の代用となる可能性についても検討した。なお，本研究では従来より行っている測定法を従来型測定法，改良した測定法を改良型測定法とした。

材料と方法

1．供試菌と細菌抗原の調製

現在，著者らの教室で血清抗体価測定の際に用いている7種の細菌の中から特に，*Porphyromonas gingivalis* 381株（*Pg*），*Prevotella intermedia* ATCC 25611株（*Pi*），*Actinobacillus actinomycetemcomitans* Y 4株（*Aa*）および *Fusobacterium nucleatum* ATCC 25586株（*Fn*）の4菌種4菌株を選択し，供試菌とした。これら供試菌から渡辺ら[3]の方法に従い細菌抗原を調製した。つまり，各菌種3 g（湿重量）を蒸留水15 m*l* に懸濁し，氷冷下150～200 W で20分間の超音波処理を行った。菌体の70% 以上が破壊したことを確認後，12,000×g で15分間遠心した。遠心して得た上清を蒸留水に対して十分に透析した後，凍結乾燥し細菌抗原として用いた。

2．被験血清

1）標準血清

A型輸血用血液から遠心分離によって血清を分離した後，ポアサイズ0.45 μm のフィルター（マイレクス HA；日本ミリポアリミテッド，東京）にて濾過滅菌を行った。これを2 m*l* ずつガラス製バイアルに分注し，−20°C で凍結保存したものを標準血清として用いた。

2）患者血清

患者血清として，過去に第2保存科外来を受診した患者の血清を用いた。患者血清は標準血清と同様に濾過滅菌し，−20°C で凍結保存した。患者血清についてはすべて事前に従来型測定法にて供試菌に対する抗体価を測定した。本研究ではこの中から，歯周炎に罹患していない患者の血清8名分（血清番号1-8），歯周炎患者の血清16名分の合計24名分の血清を選択して用いた。歯周炎患者血清16名分のうち，8名分の患者血清は *P. gingivalis* に対して比較的高い抗体価を示す血清（血清番号9-16），8名分の患者血清は *A. actinomycetemcomitans* に対して比較的高い抗体価を示す血清（血清番号17-24）を選択した（表1）。

3．抗体価算出法

1）ELISA 法の測定手順

ELISA 法の測定手順は，従来型測定法の測定条件[3]を改変して決定した（表2）。つまり，まず各細菌抗原を10 μg（乾燥重量）/m*l* の濃度になるように0.1 M 炭酸緩衝液（pH 9.6）に懸濁して抗原溶液を調製した。この抗原溶液をマイクロタイタープレート（EIA/RIA プレート3590；Costar Corporation, Cambridge MA, USA）の各ウェルに200 μ*l* ずつ加え，4°C で12時間反応させた。その後，抗原溶液を捨て0.05% Tween 20を加えたリン酸緩衝生理食塩水（PBS

-0.05% Tween 20) に 1% の割合で牛血清アルブミンを溶解したブロッキング溶液を各ウェルに 200 μl ずつ加え，室温で 2 時間反応させた。反応終了後，ブロッキング溶液を捨てて PBS-0.05% Tween 20 で各プレートを 3 回洗浄した。洗浄後，被験血清を PBS-0.05% Tween 20 で希釈(標準血清は 2^5 倍から 2^{15} 倍まで，患者血清は 2^{12} 倍のみ)し後述のプレートデザイン(図 2 A)に従って各ウェルに加え，室温で 2 時間反応させた。PBS-0.05% Tween 20 によって 3 回洗浄後，アルカリホスファターゼ標識抗ヒト IgG (γ-chain) 抗体(Sigma Chemical Corporation, St. Louis MO, USA) を PBS-0.05% Tween 20 で 1000 倍希釈した二次抗体溶液を 200 μl ずつ加え，室温で 1 時間反応させた。さらに PBS-0.05% Tween 20 によって 3 回洗浄後，基質溶液(p-ニトロフェニルリン酸を 0.1% の濃度になるように 0.1 M 炭酸緩衝液に溶解したもの)を 200 μl ずつ加え，室温で 30 分間反応させた。30 分後，1 N NaOH を 50 μl ずつ加え発色反応を停止した。吸光度の測定は，マイクロプレートリーダー (MR 600 : Dynatech Laboratories, Inc. Alexandria, VA, USA) により 2 波長 (測定フィルター : 410 nm, 対象フィルター : 630 nm) で測定した。

表 1 従来型測定法による患者血清の抗体価

血清番号	*Pg*	*Pi*	*Aa*	*Fn*
1	5.75	7.00	4.68	3.28
2	4.79	8.36	7.74	9.96
3	8.45	4.91	10.60	4.07
4	6.60	5.57	3.39	0.00
5	7.58	6.40	5.07	9.45
6	5.78	7.55	7.54	3.12
7	8.65	10.27	8.79	9.37
8	8.50	5.69	6.56	4.34
9	12.06	10.16	9.98	0.00
10	11.70	9.87	9.42	7.92
11	9.57	8.87	8.09	7.93
12	10.16	5.07	7.84	9.75
13	8.89	9.04	7.05	7.93
14	10.88	6.50	1.03	7.58
15	9.66	7.32	9.25	7.25
16	11.54	10.65	9.55	9.62
17	10.95	10.42	10.87	10.09
18	10.07	6.88	10.85	4.54
19	9.61	8.24	11.20	9.29
20	11.03	9.19	12.67	9.43
21	9.74	8.13	11.16	9.48
22	5.05	7.69	10.60	2.16
23	9.77	7.52	11.49	7.87
24	9.51	8.84	11.51	6.28

標準血清の場合は，横軸に希釈倍率の 2 を底とする対数，縦軸に測定した吸光度をとり値をプロットした後，三次多項式により回帰した。なお，三次多項式は，アップル IIe コンピュータ上で Immunosoft 1.51 (Dynatech Laboratories, Inc. Alexandria, VA, USA) を使って求めた。

2) プレートのデザインと抗体価算出法

(1) 従来型測定法

従来型測定法では，図 1 A のようなプレートデザインに従って患者血清を加え反応させた。つまり，各患者血清を 2^5 倍希釈から 2^{15} 倍希釈まで 2 倍連続希釈した後，各希釈液を 2 ウェル(Duplicate)ずつ加えた。1 プレートについて 4 名分の患者血清を加えた後，残りの 8 ウェルにはネガティブコントロールとして血清の代わりに PBS を加えた。

反応終了後，横軸に希釈倍率の 2 を底とする対数，縦軸に測定した吸光度をとり値をプロットした後，三

表 2 改良型測定法の測定手順

1.	抗原のコーティング (各菌種 10 μg/ml)	4°C, 12 時間 (37°C, 2 時間)
2.	プレートのブロッキング (1% BSA)	室温, 1 時間 (37°C, 1 時間)
3.	PBS-0.05% Tween 20 によって 3 回洗浄	
4.	標準血清，患者血清との反応	
5.	PBS-0.05% Tween 20 によって 3 回洗浄	
6.	二次抗体との反応 (アルカリホスファターゼ標識抗ヒト IgG 抗体)	室温, 1 時間 (37°C, 1 時間)
7.	PBS-0.05% Tween 20 によって 3 回洗浄	
8.	基質との反応 (p-ニトロフェニルリン酸)	室温, 30 分間 (室温, 30 分間)
9.	1 N NaOH による発色停止後，410 nm にて吸光度測定	

※ ( ) 内は従来型測定法の測定条件

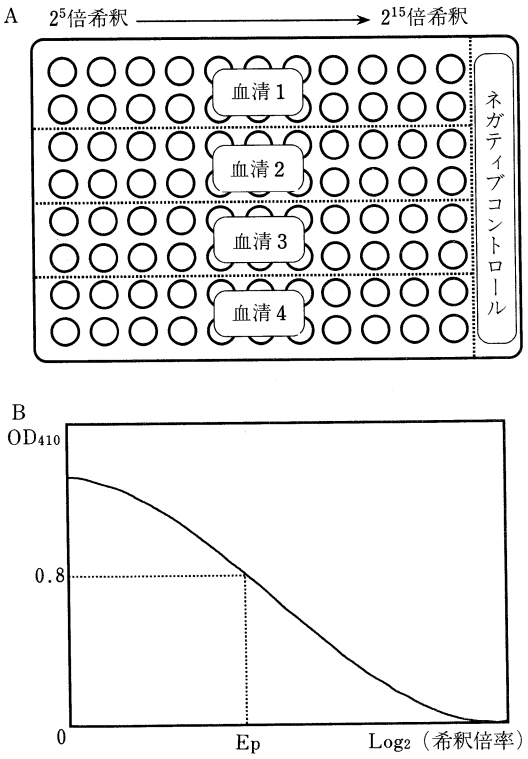


図 1　従来型測定法におけるプレートデザイン（A）と抗体価算出法（B）
Ep：求める患者血清の抗体価

次多項式により回帰した。従来型測定法では，得られた回帰曲線が吸光度 0.8 をとる時の横軸の値，つまり希釈倍率の 2 を底とする対象を求め患者血清の抗体価（Ep）とした（図 1 B）。

(2)　改良型測定法

改良型測定法では，図 2 A のようなプレートデザインに従って患者血清を加え反応させた。つまり，各患者血清は 2^{12} 倍希釈して 3 つのウェル（Triplicate）に加え，標準血清は 2^5 倍から 2^{15} 倍まで連続希釈してそれぞれの希釈液を 2 つのウェル（Duplicate）に加えた。24 名分の患者血清と標準血清を加えた後，残りの 2 ウェルについてはネガティブコントロールとして血清の代わりに PBS を加えた。なお，患者血清の示す吸光度がすべて 2 以下となるような最小の希釈倍率を調べた予備実験の結果から，患者血清の希釈倍率は 2^{12} と決めた。

改良型測定法では，患者血清の抗体価をあらかじめ従来型測定法により抗体価を決定した標準血清と比較することによって算出することにした。改良型測定法

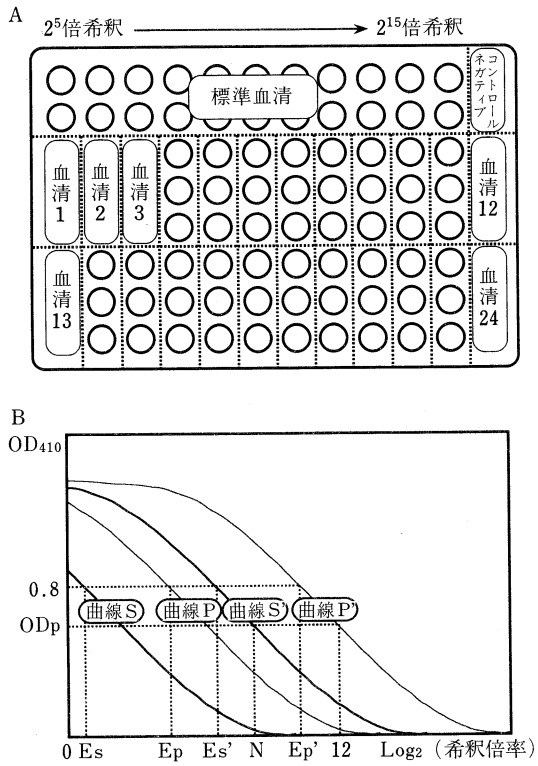


図 2　改良型測定法におけるプレートデザイン（A）と抗体価算出法（B）
曲線S'：ある測定時に得られた標準血清曲線
曲線P'：曲線S'が得られた時に得られると予想される患者血清曲線
曲線S：標準血清を数回測定した結果得られる平均的な標準血清曲線
曲線P：患者血清を数回測定した結果得られる平均的な患者血清曲線
ODp：2^{12} 倍希釈した患者血清が示す吸光度
N：曲線S'がODpをとる時の横軸の値
Ep'：ある測定時における患者血清の抗体価
Es'：ある測定時における標準血清の抗体価
Es：平均的な標準血清抗体価
Ep：求める患者血清の抗体価

では，従来型測定法で得られる抗体価と同様な抗体価を得るため，① すべての患者血清曲線は標準血清曲線と同じかたちの曲線をとること，② 外界の環境によって発色の程度に影響を受けた場合，血清曲線の形そのものは変化せず曲線が横軸方向へ平行移動する，といった仮定を立てこのような仮定の下に以下の算出法を考えた。

横軸に希釈倍率の2を底とする対数，縦軸に測定した吸光度をとり値をプロットした後，三次回帰曲線を描く。ある測定時に得られた標準血清曲線（曲線S'），曲線S'が得られた時に得られると予想される（実際には患者血清は単一希釈であるため，患者血清曲線は得られない）患者血清曲線（曲線P'），標準血清を数回測定した結果得られる平均的な標準血清曲線（曲線S），患者血清を数回測定した結果得られる平均的な患者血清曲線（曲線P）の4本の曲線を考える。2^{12}倍希釈した患者血清が示す吸光度をODp，曲線S'がODpをとる時の横軸の値をN，ある測定時における患者血清抗体価をEp'，ある測定時における標準血清の抗体価をEs'，平均的な標準血清抗体価をEs，求める患者血清の抗体価をEpとすると，以下の計算式が成立する。

$Ep-Es=Ep'-Es'$

$12-N=Ep'-Es'$

よって $Ep=Es+(12-N)$

つまり，求める患者血清の抗体価（Ep）は，標準血清の抗体価（Es）と2^{12}倍希釈した患者血清が示した吸光度をとるときの標準血清曲線の希釈倍率の対数（N）から求められることになる。よって，まず標準血清の供試菌に対する抗体価を求め，それから患者血清の抗体価を求めた。

結　果

1. 供試菌に対する標準血清の抗体価

標準血清の平均的な抗体価を求めるために，従来型測定法によって供試菌4菌種に対する抗体価を20回ずつ測定した。横軸に測定回数，縦軸に測定した抗体価をプロットした結果，測定1回目から20回目まで供試菌4菌種それぞれに対する抗体価がその時の条件によりかなり変動していることが明らかとなった（図3）。また，全体的な傾向として4菌種それぞれに対する抗体価の変動は，同様な変動の傾向を示していることも明らかとなった。20回測定した結果，*Pg*に対する抗体価の平均は8.70で，変動の幅（最大値－最小値）は2.08であった。*Pi*に対する抗体価の平均は7.92で，変動の幅は2.70であった。*Aa*に対する抗体価の平均は8.44で，変動の幅は2.15であった。*Fn*に対する抗体価の平均は7.17で，変動の幅は2.45であった。これらの結果から，本研究に用いた標準血清の*Pg*に対する抗体価を8.70，*Pi*に対する抗体価を7.92，*Aa*に対する抗体価を8.44，*Fn*に対する抗体価を7.17と設定した。

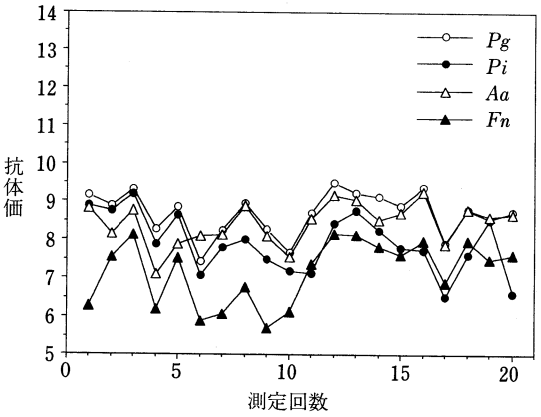


図3　供試菌に対する標準血清の抗体価

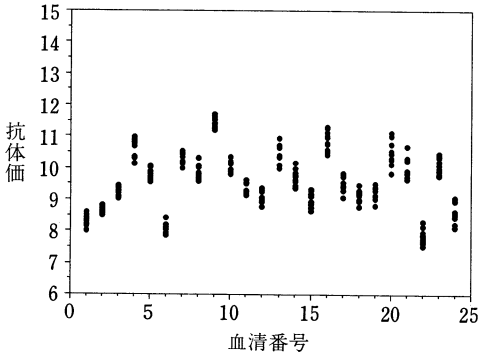


図4　*P. gingivalis*に対する患者血清の抗体価

2. 供試菌に対する患者血清の抗体価

設定した標準血清の抗体価から前述の計算式によって患者血清の抗体価を算出した。その後，横軸に患者血清番号，縦軸に抗体価をとった座標上に24名の患者血清の抗体価を10回測定した結果をプロットした。

1)　*Pg*に対する患者血清抗体価

10回の測定による各患者血清の抗体価の変動の幅（最大値－最小値）は0.33（血清番号2）から1.29（血清番号20）までさまざまであったが，2つの患者血清［血清番号20（1.29）および血清番号21（1.02）］以外は1.00以下であった（図4）。

2)　*Pi*に対する患者血清抗体価

10回の測定による各患者血清の抗体価の変動の幅は，0.33（血清番号3）から1.55（血清番号7）までさまざまであったが，3つの患者血清［血清番号7（1.55），血清番号13(1.09)および血清番号16(1.22)］以外は1.00以下であった（図5）。

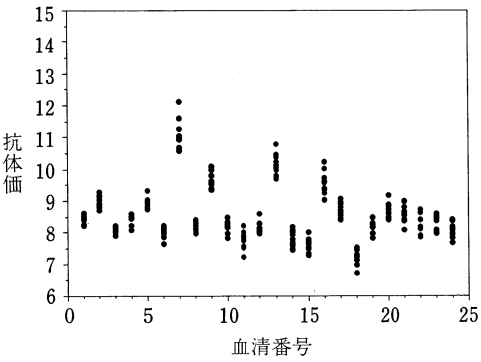


図 5　*P. intermedia* に対する患者血清の抗体価

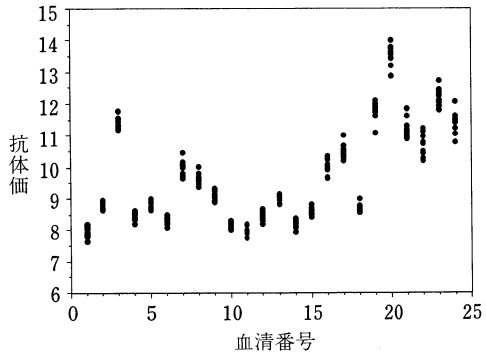


図 6　*A. actinomycetemcomitans* に対する患者血清の抗体価

3)　*Aa* に対する患者血清抗体価

10 回の測定による各患者血清の抗体価の変動の幅は，0.26（血清番号 10）から 1.29（血清番号 24）までさまざまであったが，3 つの患者血清［血清番号 20（1.13），血清番号 22（1.01）および血清番号 24（1.29）］以外は 1.00 以下であった（図 6）。

4)　*Fn* に対する患者血清抗体価

10 回の測定による各患者血清の抗体価の変動の幅は，0.24（血清番号 14）から 0.87（血清番号 2）までさまざまで，すべて 1.00 以下であった（図 7）。

以上のように改良型測定法によって供試菌 4 菌種に対する各患者血清の抗体価を，10 回測定したところ，2, 3 の患者血清以外を除けばその抗体価の変動は 1.00 以下であった。また，すべての中で最も変動が大きかった抗体価の変動の幅は 1.55 であった。

3.　従来型測定法による抗体価と改良型測定法による抗体価の関係

従来型測定法によって測定した抗体価と改良型測定法によって測定した抗体価との間に相関関係があるか

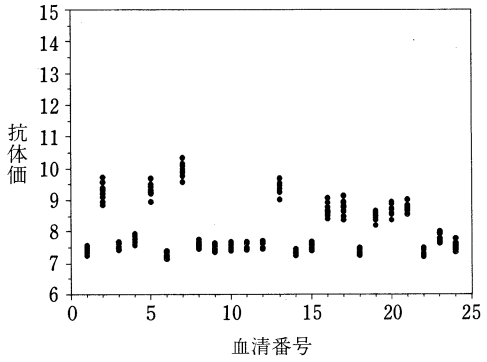


図 7　*F. nucleatum* に対する患者血清の抗体価

どうかを調べるために，横軸に従来型測定法によってあらかじめ測定した抗体価，縦軸に改良型測定法によって 10 回測定した抗体価の平均値をとってすべての患者血清の抗体価をプロットした。さらに，これら二つの測定法によって測定した抗体価間でのスピアマンの順位相関係数を求めた。

1)　*Pg* に対する患者血清抗体価

従来型測定法により 9 以上の抗体価を示す血清は $y=x$ の直線の周囲に分布していることから，改良型測定法によっても従来型測定法と同じような抗体価を示すと考えられた。従来型測定法により 9 未満の抗体価を示す血清は $y=x$ の直線より縦軸よりに分布していることから，改良型測定法によって測定した抗体価は，従来型測定法によって測定した抗体価よりも高い値を示すことが明らかになった（図 8 A）。また，順位相関係数を求めると 0.511 であり，従来型測定法による抗体価と改良型測定法による抗体価は危険率 5% で統計学的に相関していた。

2)　*Pi* に対する患者血清抗体価

従来型測定法により 7 以上の抗体価を示す血清は $y=x$ の直線の周囲に分布していることから，改良型測定法によっても従来型測定法と同じような抗体価を示すと考えられた。従来型測定法により 7 未満の抗体価を示す血清は $y=x$ の直線より縦軸よりに分布していることから，改良型測定法によって測定した抗体価は，従来型測定法によって測定した抗体価よりも高い値を示すことが明らかになった（図 8 B）。また，順位相関係数を求めると 0.487 であり，従来型測定法による抗体価と改良型測定法による抗体価は危険率 5% で統計学的に相関していた。

3)　*Aa* に対する患者血清抗体価

従来型測定法により 8 以上の抗体価を示す血清は

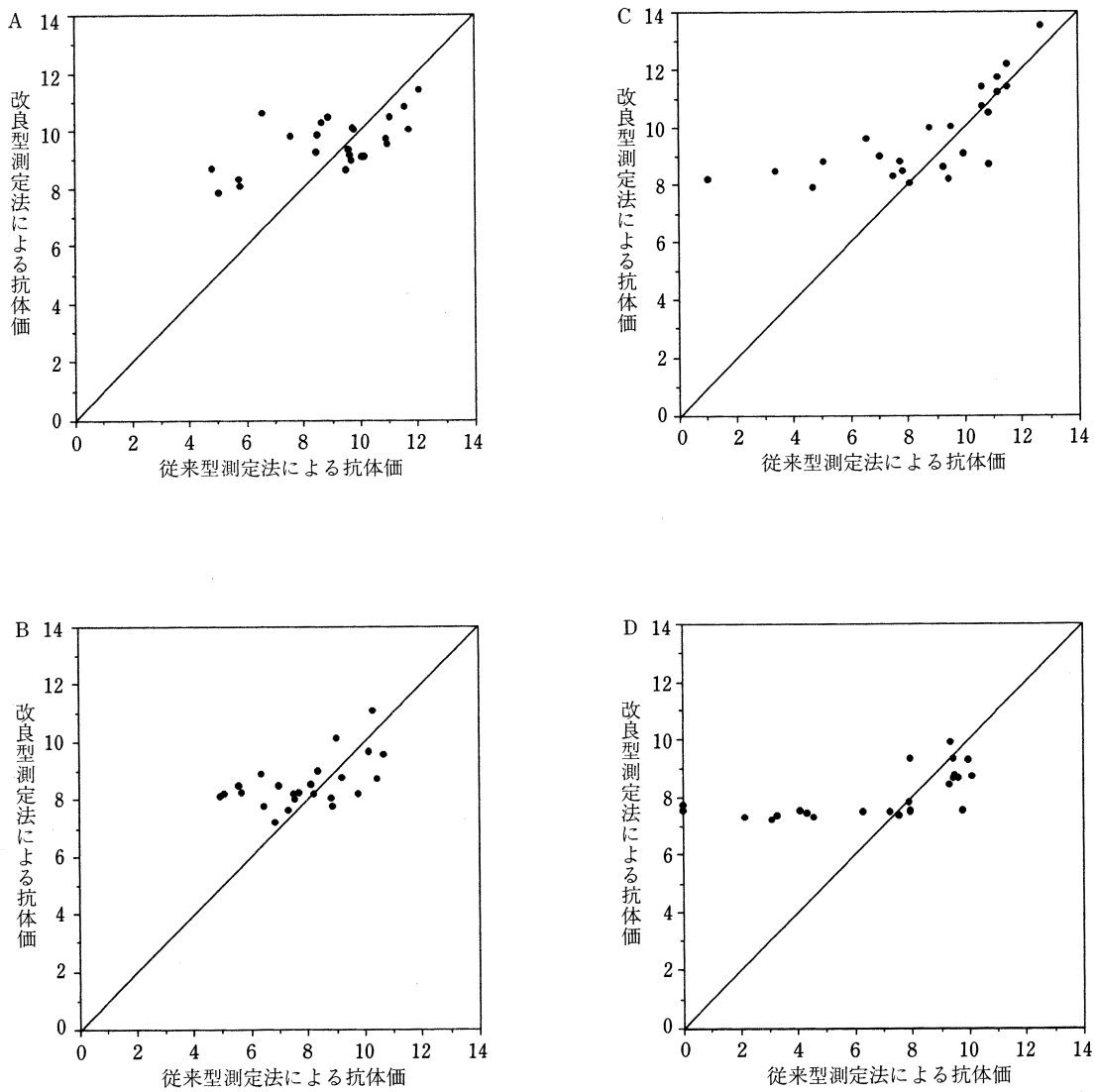


図 8　従来型測定法による抗体価と改良型測定法による抗体価の関係
A：*P. gingivalis* に対する患者血清の抗体価
B：*P. intermedia* に対する患者血清の抗体価
C：*A. actinomycetemcomitans* に対する患者血清の抗体価
D：*F. nucleatum* に対する患者血清の抗体価

y＝x の直線の周囲に分布していることから，改良型測定法によっても従来型測定法と同じような抗体価を示すと考えられた。従来型測定法により 8 未満の抗体価を示す血清は y＝x の直線より縦軸よりに横軸とほぼ平行に分布していることから，改良型測定法によって測定した抗体価は，従来型測定法によって測定した抗体価よりも高い値を示すことが明らかになった（図 8 C)。また，順位相関係数を求めると 0.775 であり，従来型測定法による抗体価と改良型測定法による抗体価は危険率 1% で統計学的に相関していた。

4)　*Fn* に対する患者血清抗体価

従来型測定法により 8 以上の抗体価を示す血清は y＝x の直線の周囲に分布していることから，改良型測定法によっても従来型測定法と同じような抗体価を示すと考えられた（図 8 D)。従来型測定法により 8 未満の抗体価を示す血清は y＝x の直線より縦軸よりに横

軸とほぼ平行に分布していることから，改良型測定法によって測定した抗体価は，従来型測定法によって測定した抗体価よりも高い値を示すことが明らかになった（図8 D）。また，順位相関係数を求めると0.695であり，従来型測定法による抗体価と改良型測定法による抗体価は危険率1%で統計学的に相関していた。

以上の結果から，二つの測定法によって測定した抗体価は統計学的に相関していると考えられた。また，従来型測定法により本研究で用いた供試菌に対して，9以上の抗体価を示す血清は改良型測定法によっても同様な抗体価を示すことが明らかになった。

考　察

1. 抗体価算出法について

1980年代になって，歯科の分野においてもELISA法による患者血清中の歯周病原細菌に対する特異的な抗体の量（抗体価あるいはELISA UNIT）の測定が行われるようになってきた。ELISA法は，少量でもその活性が検出できる高感度の酵素（アルカリホスファターゼ，β-ガラクトシターゼなど）をマーカーとして抗原あるいは抗体などと化学的に結合させ，抗原あるいは抗体などを測定する方法である。この測定法は，微生物学，免疫学的基礎研究にも用いられているが，各種感染症において生体の保有する抗体を測定する場合など臨床検査でよく用いられる大規模なスクリーニングにも応用されている。現在まで，この測定法を用いて歯周病原細菌に対する患者血清の抗体価を測定した報告は数多くある。これらの報告の中ではその測定の手順はほぼ同様であるが，抗体価の算出法は報告ごとに異なっているようである。

Ebersoleら[4]は，次のような算出法で抗体価を求めている。100倍希釈の時，吸光度1.697を示す血清を標準血清とし，100倍希釈した血清の抗体価（EU）を100と定める。この血清を未希釈から2倍連続希釈し，横軸に$\log_{10}$EUを縦軸に吸光度（OD）をプロットする。回帰分析から，標準血清の回帰直線［$OD=m(\log_{10}EU)+b$］を求める。

単一希釈した各被験者血清の吸光度を測定し，前述の式からEUを求める。求めたEUを測定した時の希釈率によって換算し，最終的なEUを求める。

内藤ら[2]は，次のような算出法で抗体価を求めている。3名の患者血清を混ぜて標準血清とし，これを1：50から1：12,800まで連続希釈したものを通法に準じて測定する。得られた吸光度をプロットして標準曲線を描き，その曲線に従って回帰直線を求める。各被験血清は標準血清のある希釈倍率で得られた吸光度を100 EUとし，この回帰直線上に乗るものとして計算により求める。

Moutonら[5]は，次のような算出法で抗体価を求めている。3つの血清をプールし，これを標準血清とする。免疫グロブリンのサブクラスごとにそれぞれ吸光度を測定して，横軸に希釈倍率の対数，縦軸に吸光度をプロットし標準曲線を描く。標準曲線の直線部分の測定値を用い，回帰直線を求める。また，吸光度が小さい場合にこの回帰直線からの隔たりが認められるため，数回の実験の平均バックグラウンド値（平均）を求め，平均＋2 SDを吸光度の感度の閾値としている。各被験血清を1/200（IgG，IgA）に希釈し（IgMでは1/100），吸光度を測定する。測定した吸光度と標準曲線の直線部分から得た1/200（IgMでは1/100）の時の吸光度を比較して抗体価を求める（ポジティブコントロールの抗体価をIgGでは100，IgA，IgMでは10とした）。

神山ら[6]は，次のような算出法で抗体価を求めている。予備実験にて比較的高い抗体価を示した血清を標準血清として各特定細菌ごとに選択する。標準血清を2^5倍から2^{15}倍まで連続希釈して，吸光度を測定する。吸光度を縦軸，希釈倍率を横軸にとって曲線を描く。この曲線を4変数logistic曲線を用いて回帰標準曲線を作製する。標準血清を512倍に希釈した時のEUを100として各被験血清の抗体価を算出する。

永井ら[7]は，次のような算出法で抗体価を求めている。200倍から12,800倍まで連続希釈した標準血清について吸光度を測定し，数値をプロットして曲線を描く。log-logit変換して回帰直線を得る。変換法は，標準血清の希釈倍率dの時の吸光度をB(d)，無限大濃度の第二抗体を反応させた場合の吸光度をM，第一抗体濃度0すなわち血清を生理食塩水に置き換えた場合の吸光度をNとして$x=-\log_{10}d$，$y=\log_{10}[B(d)-N)/(M-B(d)]$ このlog-logit変換式を用いて換算し，最小2乗法を適用して，回帰直線$y=A+Bx$を得る。これをEU算出のための標準曲線とし，供試菌のすべての調製抗原ごとに作製した。標準曲線$y=A+Bx$の定まっているある抗原に対し3200倍に希釈した被験血清の吸光度Pを示した場合，上述の式により$y(P)$と変換して，$d(P)=10^{-(y(p)-A/B)}$ この式から，この被験血清の抗体価と等価な標準血清の希釈倍率d(P)が得られる。EUの計算式は$EU=3.2\times10^5/d(P)$

とした。

以上の研究では，いずれも標準血清を設定しこれを希釈することによって標準曲線あるいは標準直線を求め，これと被験血清を比較することによって求める抗体価を相対的な抗体価として求めている。しかし，いずれも基準となる標準血清および算出法が異なっているので各研究間での抗体価の比較はできない。今後，基準となるような標準的な抗体価算出法が考案されれば研究間での比較も可能になり歯周病原細菌に対する生体応答についての研究はさらに進むと考えられる。

2. 改良型測定法の検体処理能力

従来型測定法を改良した改良型測定法では，反応時間を同様にしたため一回の測定に要する時間は短縮できなかった。しかし，従来型測定法では1プレートにつき4検体の測定が可能であったが改良型測定法では1プレートにつき24検体の測定が可能になり単位時間当りの検体処理数が約6倍に改善された。改良型測定法では検体をTriplicateで測定しているが，これをDuplicate，あるいはSingleで測定することによりそれぞれ36，72検体まで測定可能である。しかし，検体の数が多くなればなるほど検体をプレート内に入れる操作に時間がかかり，各検体間の反応時間の差が大きくなると考えられる。このため，改良型測定法において測定する検体数は24検体くらいが適当であると考えられた。

3. 改良型測定法による測定値の再現性

筆者らの教室では1984年渡辺ら[3]の方法に準じ，血清の希釈系列を横軸に，吸光度を縦軸にとった座標上に得られた値をプロットし，最小2乗法により回帰直線を求め，この直線上で吸光度としていた。しかし，現在は1986年渡辺ら[8]の方法に準じて，血清の希釈系列を横軸に，吸光度を縦軸にとった座標上に得られた値をプロットしそれに三次多項式による回帰を行い，得られた回帰曲線が吸光度0.8の線と交わる時の希釈倍率の対数をその抗体価としている。

従来型測定法では，被験血清を連続希釈して回帰曲線を得るため被験血清中の各細菌抗原に対する抗体の親和力（アビディティ）の違いが明瞭になる。改良型測定法および前述の多くの報告では被験血清を単一希釈し，それを標準血清と比較することによって抗体価を算出しているため特定の抗原に対する各血清抗体の親和力の違いは考慮されていない。このような点においては従来型測定法は優れていると考えられるが，従来型測定法ではこの曲線から吸光度0.8という絶対値によって抗体価を算出するため，測定環境の微妙な違いから算出した抗体価の再現性については必ずしも安定していないように思われた。渡辺ら[3]はすでに2例の血清について従来型測定法の再現性を報告しているが，本研究で従来型測定法により標準血清を20回測定した結果では測定値の変動の幅は最小で2.08（*Pg*），最大で2.70（*Pi*）でありそれほど再現性が良いとは考えられなかった。渡辺ら[3]の報告では抗体価の再現性について詳細な記述がないので不明であるが，おそらく本研究で明らかになった測定誤差は従来型測定法に固有のものではないかと考えられた。このような従来型測定法の再現性を改善するために改良した改良型測定法では，最も変動が大きかった抗体価の変動の幅でも1.55であり測定値の再現性は改善されたと考えられた。

二つの測定法による測定値の再現性を厳密に比較するためには標準血清以外の同じ血清についてそれぞれの測定法で測定したその測定値を比較しなければならない。本研究では，保存してある患者血清が少量であるためこのような測定ができなかった。今後，改良型測定法を使用する際には，この点について再度，測定値の再現性を比較してみる必要性があると考えられた。

4. 従来型測定法の代用としての改良型測定法

図8の結果から供試菌すべてに共通して，改良型測定法では測定した抗体価はすべて7以上の値を示していた。このような値を示す原因を探るため，以下のような分析を試みた。求める患者血清抗体価（Ep）は，標準血清の抗体価（Es）と2^{12}倍希釈した患者血清が示した吸光度をとるときの標準血清曲線の希釈倍率（N）から求められる［Ep＝Es＋(12－N)］。ここで，2^{12}倍希釈した患者血清が示した吸光度の最小値は0と考えられるから，この時の標準血清曲線の希釈倍率の対象（N）はこの曲線と横軸が交わる点となる。このような点を標準血清を20回測定した際（図3）の三次回帰曲線から求めるとNは13以下（*Pg*，*Pi*および*Aa*）あるいは12以下（*Fn*）となった（図9A-図9D）。標準血清の抗体価（Es）は，8.70（*Pg*），7.92（*Pi*），8.44（*Aa*），7.17（*Fn*）と設定したのでそれぞれの抗体価は，7.70以上（*Pg*），6.92以上（*Pi*），7.44以上（*Aa*），7.17以上（*Fn*）となることが明らかになった。このような理由により改良型測定法ではすべての血清が7以上の抗体価をとると考えられ，②外界の環境によって発色の程度に影響を受けた場合，血清曲線の形そのものは変

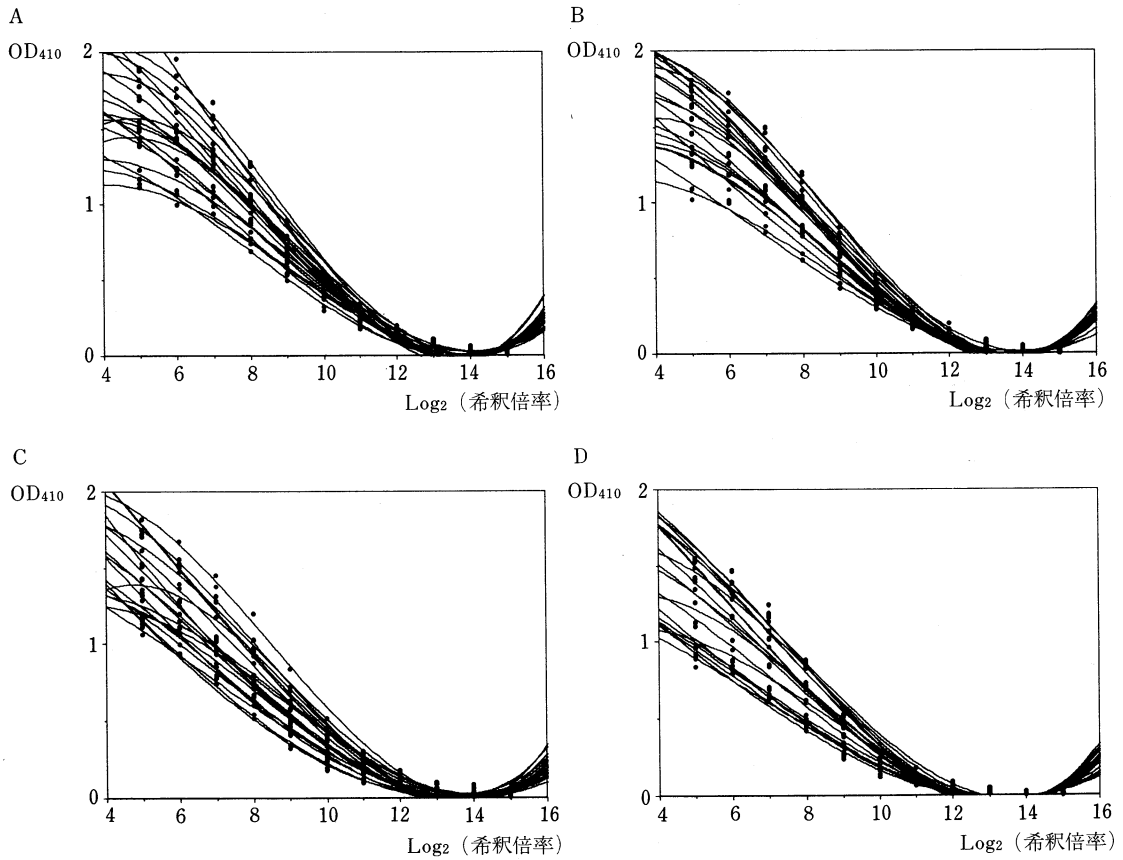


図 9　供試菌に対する標準血清曲線
A：*P. gingivalis*
B：*P. intermedia*
C：*A. actinomycetemcomitans*
D：*F. nucleatum*

化せず曲線が横軸方向へ平行移動する，といった仮定が現実には図9のように20回測定した際の各血清曲線が横軸と交わる点はほとんど変化せず希釈倍率が小さくなるに従って大きく変動するためこのような現象が生じたと考えられる。よって，本研究で考えた改良型測定法の抗体価算定法には再検討する余地があるようである。

供試菌4菌種ごとにスピアマンの順位相関係数を求めた結果，改良型測定法によって測定した抗体価は，従来型測定法によって測定した抗体価と統計学的に相関していることが明らかになった。統計学的に相関していることは明らかになったが，従来型測定法によって7未満の抗体価を示す血清を改良型測定法によって測定するとすべて7以上の抗体価を示すため，改良型測定法によって測定した抗体価をそのまま従来型測定法によって測定した抗体価と同様に扱うことはできない。よって改良型測定法をそのまま従来型測定法の代用にはできないと考えられる。しかし，従来型測定法によって9以上の抗体価を示す血清は，改良型測定法によっても同様な抗体価を示すことが明らかになっているので，従来型測定法により比較的高い抗体価を示す血清（9以上の抗体価）では改良型測定法を使って測定を行っても問題はないと考えられる。つまり，改良型測定法は多くの血清から比較的抗体価の高い血清をスクリーニングする場合には有効であると考えられる。

結　論

著者らの教室で行っている抗体価測定法を改良した改良型測定法によって24の患者血清を数回測定した結果，以下のような結論が得られた。

1．改良型測定法では，従来型測定法と反応時間をほぼ同じ時間にしたため1回の測定に要する時間は短縮できなかった。

2．改良型測定法では，抗体価算出法を変えたため単位時間当りの検体処理数が約6倍に改善された。

3．改良型測定法により測定した患者血清抗体価の再現性は，従来型測定法に比べて改善された。

4．改良型測定法により測定した患者血清抗体価は，従来型測定法で9以上の抗体価を示す血清の場合は同様な値を示すが，9未満の場合は高い値を示した。

5．改良型測定法は，多くの血清から比較的抗体価の高い血清をスクリーニングする場合には有効であると考えられた。

文　献

1) Wilton, J.M.A., Johnson, N.W., Curtis, M.A., Gillett, I.R., Carman, R.J., Bampton, J.L.M., Griffiths, G.S. and Sterne, J.A.C.：Specific antibody responses to subgingival plaque bacteria as aids to the diagnosis and prognosis of destructive periodontitis. J. Clin. Periodontol., 18：1-15, 1991.

2) 内藤祐子，奥田克爾，高添一郎，関　隆，渡辺久，長田　豊，竹蓋　弥，新居邦男，萩原さつき，石川　烈，木下四郎：歯周炎患者血清中の歯肉溝内グラム陰性菌に対するIgG抗体価とその病変との関連性について，日歯周誌，25：340-349, 1983.

3) 渡辺　久，石川　烈，長田　豊，萩原さつき，竹蓋弥，木下四郎，内藤祐子，奥田克爾，高添一郎：歯周治療後にみられる歯周病原菌に対する血清抗体価の変動について．日歯周誌，26：308-316, 1984.

4) Ebersole, J.L., Frey, D.E., Taubman, M.A. and Smith D.J.：An ELISA for measuring serum antibodies to *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. J. Periodont. Res., 15：621-632, 1980.

5) Mouton, C., Hammond, P.G., Slots, J. and Genco, R.J.：Serum antibodies to oral *Bacteroides asaccharolyticus* (*Bacteroides gingivalis*)：Relationship to age and periodontal disease. Infect. I mmun., 31：182-192, 1981.

6) 神山　章：歯周病の診断に関する細菌学的研究．日歯周誌，31：360-379, 1989.

7) 永井　淳，岡村和則，熊澤　寛，杉山雅昭，小林充治，横山雅之，栗原英見，野村慶雄，村山洋二：歯周病関連細菌に対する血清IgG抗体　第1報　歯周病の病状とIgG抗体との相関．日歯周誌，29：132-145, 1987.

8) 渡辺　久，杉山英一，堀部元雄，石川　烈：初期治療の歯周疾患関連菌に対する血清IgG抗体価に及ぼす影響について．日歯周誌，28：631-638, 1986.

連絡先：

東京医科歯科大学歯学部第2歯科保存学教室

〒113 文京区湯島1-5-45