

# To niveauer af immunforsvar mod plak: perspektiver for vaccineudvikling

Jesper Reinholdt

Man har længe vidst at saliva indeholder antistoffer der kan binde til mundhulens bakterier, men antistoffernes rolle i kontrollen af den normale mundflora er uafklaret. I laboratorieforsøg kan antistofferne i oprenset form hæmme bakteriernes adhærens til tandlignende overflader og epitelceller. I mundhulen derimod kan medlemmer af normalfloraen persistere under antistoffernes tilstedeværelse. Endvidere synes antistoffernes evne til at forebygge plakdannelse at være begrænset.

Som en mulig forklaring er fremført at visse dominerende plakbakterier producerer enzymer, såkaldte IgA1 proteaser, der kløver salivas antistoffer hvorved deres adhærencehæmmende virkning elimineres. Nyere undersøgelser in vivo tyder på at salivas antistoffer mod normalfloraen repræsenterer en særlig type af immunreaktion som er mindre potent end de reaktioner der forsvare kroppen under infektionssygdomme. Formentlig sikrer dette at immunapparatet ikke eliminerer den normale mundflora der i lighed med normalfloraen på andre overflader, hovedsageligt er til gavn for sin vært.

Under særlige omstændigheder kan en mere potent reaktion etableres. Dette kan måske udnyttes til at styrke immunforsvaret mod kariogene bakterier.

De dominerende tandsygdomme caries og parodontitis er mikrobielt betingede sygdomme. Tilstedeværelse af bakteriel tandplak er i begge tilfælde en forudsætning for sygdomsudviklingen. Dette forhold, sammen med vor viden om immunreaktionernes vigtige rolle i forsvaret mod infektionssygdomme, har medført stor forskningsaktivitet vedr. plakbakteriernes forhold til immunsystemet. Denne forskning har givet svar på flere vigtige spørgsmål, specielt angående arten af de immunkomponenter (uspecifikke salivafaktorer, fagocytter, antistoffer), som har mulighed for at fungere i relation til tandoverfladerne. Disse komponenter og deres mulige funktioner har været omtalt i en tidligere artikel i *Tandlægebladet* (1).

Nærværende artikel vil specielt fokusere på antistoffernes rolle. Den direkte anledning hertil er en række nye forskningsresultater som tyder på at der er principielle forskelle i immunreaktionerne mod henholdsvis slimhindernes normalflora, herunder mundfloraen, og patogene mikroorganismer i klassisk forstand. Resultaterne kan bidrage til vor forståelse af de mekanismer som sikrer at normalfloraen, der hovedsagelig er gavnlig for kroppen, ikke elimineres af immunsystemet, så længe den opholder sig hvor den »hører hjemme«, dvs. på overfladerne. Endvidere synes resultaterne at sætte begrænsninger for hvilke vaccinationsstrategier der kan være relevante, hvis man ønsker at styrke mundhulens immunforsvar over for caries- eller parodontitis-relevante bakterier.

## *Tændernes immunforsvar har begrænset effekt*

Som udgangspunkt må det præciseres at det naturlige immunforsvar af tænderne ikke generelt kan opfattes som utilstrækkeligt. Det sikrer et funktionsdygtigt tandsæt ved lav, fysiologisk plakbelastning, som det ses hos vildtlevende dyr og hos mennesker der spiser en grov, sukkerfattig kost. Dog er det også klart at immunsystemet alene ikke magter at forebygge ophobning af plak hos mennesker med de kostvaner som i dag er fremherskende. Evnen til at opregulere et respons efter behov er karakteristisk for immunreaktioner mod mange patogene mikroorganismer. Dette synes ikke i samme grad at gælde reaktionerne på plakdannelse.

*IgA1 proteaser* – Som omtalt i den forudgående artikel (1) kan en del af forklaringen være at plakdannende bakterier har udviklet midler til at modvirke effekten af de lokale immunfaktorer. Et slående eksempel herpå er at de tre streptokokarter, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus sanguis* og *Streptococcus oralis*, som starter plakdannelsen på en rensset tandoverflade, alle producerer et enzym, IgA1 protease, der spalter den type antistofmolekyler der er dominerende i saliva, nemlig

IgA1-subklassen af IgA i sekretorisk form (S-IgA1) (2). I intakt form kan disse store molekyler, når de binder til deres mål-bakterier, camouflere de overfladestrukturer, kaldet adhæsiner, hvormed bakterierne kan adhærere til slimhinder og tandpellikel. Herved hæmmes bakteriernes adhærenceevne (3). Virkningen forstærkes af at bakterierne sammenklumpes (aggregeres) pga. antistofmolekylets fire antigenbindingssteder. Store bakterieaggregater hænger vanskeligt fast. Endvidere kan intakte S-IgA antistoffer gøre bakterier hydrofile. Streptokokkernes adhærence fremmes af deres hydrofobe overflade. Ved at binde til bakterierne kan S-IgA antistoffer, som generelt er stærkt hydrofile, neutralisere hydrofobiciteten. Laboratorieforsøg har vist at salivas S-IgA1 antistoffer ved spaltning med IgA1 protease mister deres adhærencehæmmende virkning, om end de resulterende, monovalente antistoffragmenter stadig kan binde til bakterierne (2). Det er nærliggende at antage at IgA1-proteaseaktiviteten i mundhulen kan fritage streptokokkerne for virkningen af S-IgA1-antistoffer og derved muliggøre deres dominans i den tidlige fase af plakdannelsen. Den videre opbygning af plakkens bakterielag vides at involvere binding via de samme og en række andre adhæsiner (4). Det er sandsynligt, om end ikke vist, at intakte S-IgA1-antistoffer også her kan virke hæmmende, og at effekten forsvinder efter spaltning med IgA1 protease.

*IgA1 proteaser in vivo* – To undersøgelser på Tandlægeskolen, Aarhus Universitet, har rejst tvivl om konsekvenserne af IgA1-proteasebetinget spaltning af salivas antistoffer. I en af disse undersøgelser (5) udnyttede man det forhold at de orale streptokokker, i lighed med mange andre bakteriearter, viser såkaldt klonal diversitet; dvs. at forskellige kloner (stammer) inden for en art ikke er helt ens. Eksempelvis findes der i menneskers mundflora forskellige *S. mitis*-kloner, hvoraf nogle producerer IgA1 protease og andre ikke gør. Klonernes overfladeantigener kan også være forskellige. På seks forsøgspersoner fulgte man ved jævnlige prøvetagninger over ni mdr. forekomsten af forskellige *S. mitis*-kloner i mund- og svælgh floraen. Det viste sig at blandt kloner som var til stede på et givet tidspunkt, kunne et fåtal, og hos børn slet ingen, genfindes ved en eller flere af de efterfølgende prøvetagninger. Et fund af særlig interesse var at evnen til at persistere i længere tid ikke var specielt knyttet til IgA1-proteaseproducerende kloner. Samtidige undersøgelser af forsøgspersonernes saliva viste samme niveau af antistoffer mod persisterende og ikke-persisterende kloner, i begge tilfælde med små og usystematiske variationer gennem perioden (5). Dette tyder på at forsøgspersonernes sekretoriske immunsystem ikke reagerede væsentligt på den enkelte klons tilstedeværelse.

I en anden undersøgelse (6) sammenlignede man den bakterielle sammensætning af initial plak hos normale individer med sammensætningen hos individer med såkaldt selektiv IgA-deficiens. Denne immundefekt karakteriseres ved en genetisk betinget total mangel på IgA i serum såvel som i sekreter og medfører som regel en øget forekomst af slimhindeinfektioner, især i luftvejene. De fleste IgA-deficiente personer kompenserer for defekten ved at lade IgM i form af S-IgM overtage S-IgA's plads i sekreterne. Sådanne personer er overvejende symptomfri, formentlig fordi det kompenserende S-IgM kan varetage de samme antistoffunktioner som det manglende S-IgA. Alle de IgA-deficiente forsøgspersoner som indgik i undersøgelsen, var af denne type. I den aktuelle sammenhæng er det væsentligt at IgM ikke spaltes af IgA1 protease. Hvis de IgA1-proteaseproducerende streptokokkers dominans i den initiale plakdannelse hos normale individer betinges af deres evne til at spalte og inaktivere S-IgA1, skulle de altså ikke nyde samme fordel hos S-IgM-kompenserende, IgA-deficiente individer. Imidlertid viste undersøgelsen samme dominans af IgA1-proteaseproducerende streptokokker i initial plak hos IgA-deficiente med S-IgM-kompensation som hos normale (6).

Resultaterne af disse undersøgelser understøtter ikke hypotesen om at evnen til at undslippe en kolonisationshæmmende virkning af S-IgA-antistoffer i saliva er af afgørende betydning for de tre streptokokarters succes i mundhulen. Det vides ikke nøjagtigt hvorfor de modsatrettede virkninger af henholdsvis S-IgA1 og IgA1 protease, som observeredes i laboratorieforsøg, ikke kom til udtryk i de omtalte in vivo-undersøgelser. Muligvis har laboratorieforsøgene overdrevet betydningen in vivo af de anvendte S-IgA antistoffer og IgA1 protease. Denne antagelse støttes indirekte af en række forskningsresultater der antyder at de immunreaktioner der under normale forhold varetager kontrollen af normalfloraen, er af en simplere og mindre potent art end de funktioner der involveres i kampen mod mikroorganismer under infektionssygdomme. Disse resultater har ført til revurdering af visse forhold vedr. immunsystemets organisering og funktion. I det følgende redegøres i summarisk form for nye aspekter vedr. den antistofbaserede del af det antimikrobielle forsvar.

### **Hypotesen om immunforsvar på to niveauer**

En lang række observationer har ført til den hypotese at det antistofbaserede forsvar har to reaktionsniveauer, repræsenteret ved to forskellige kategorier af aktiverede B-celler betegnet B1 og B2. Kun respons på det højeste niveau (niveau 2) resulterer if. hypotesen i dannelsen af antistoffer af høj koncentration og affinitet mod virulensrelevante komponenter

(epitoper), som mikroorganismer måtte have erhvervet gennem evolution (*a la carte*-antistoffer [7]). Også evnen til hurtigere og kraftigere respons ved gentagen kontakt med mikroorganismen (immunologisk hukommelse) synes at være begrænset til B2-celler (8). Patogene mikroorganismer og i princippet alle mikroorganismer og molekylære antigener der truer kroppens integritet, mødes med et respons der inkluderer B2-antistoffer. Forenklet udtrykt er B2-responset karakteriseret ved de egenskaber som i mange ældre lærebogsfremstillinger er tillagt det antistofmedierede forsvar generelt. På denne baggrund betegnes B2-antistofferne også konventionelle antistoffer.

Over for ikke-truende mikroorganismer, herunder den normale mikroflora, er reaktionen if. hypotesen begrænset til det simple niveau 1. Antistoffer dannet af B1-celler er overvejende rettet mod en række antigenstrukturer (epitoper) som er stærkt konserverede fylogenetisk set. Dvs. at de repræsenteret i de fleste levende organismer fra mikroorganismer til hvirveldyr, herunder mennesker. Disse strukturers udbredte forekomst er hypotetisk blevet begrundet ved at de er elementer i et fælles kemisk grundlag for alt liv (9). Konkret drejer det sig eksempelvis om nogle strukturer i cellemembraner, visse dna- og kulhydratstrukturer og nogle polypeptidtemaer i relaterede proteiner, såsom enzymer, hormoner, signalreceptorer og såkaldte stressproteiner (9, 10). I serum tilhører mange B1-antistoffer IgM-klassen. I sekreter optræder de i form af S-IgA i lighed med sekretantistoffer af B2-typen (11).

### *B1-antistoffernes kontroversielle egenskaber*

Ud over det begrænsede spektrum af målstrukturer og manglen på immunologisk hukommelse har niveau-1-reaktionerne flere kontroversielle træk som ikke stemmer med den traditionelle opfattelse af immunmekanismerne. For det første viser mange af de dannede B1-antistoffer såkaldt polyreaktivitet. Dvs. at et antistofmolekyle der genkender en af de ovennævnte epitoper også kan genkende én eller flere af de andre. Dette skyldes antagelig en særlig struktur af antistoffernes antigenbindende områder (12). For det andet dannes sådanne antistoffer i små mængder, helt uafhængigt af antigenkontakt. De kan påvises hos nyfødte, sideløbende med antistoffer overført fra moderen. Derefter øges deres mængde jævnt som resultat af den stigende antigenpåvirkning fra barnets erhvervede normalflora og fra andre antigener, herunder antigener i kosten. Deres relative andel af den samlede immunoglobulinmængde varierer, formentlig svarende til et varierende bidrag af B2-antistoffer produceret under angreb fra patogene mikroorganismer. Et sidste kontroversielt træk ved B1-antistoffer er at nogle af dem kan

reagere med komponenter i kroppen selv. Dette følger af at de reagerer med fylogenetisk konserverede strukturer. På denne baggrund betegnes B1-antistoffer også som »naturlige polyreaktive autoantistoffer« (7). Autoreaktiviteten giver ikke problemer, idet målstrukturerne i kroppen er intracellulære (fx dna) eller på anden måde camouflerede (10, 13). B1-antistoffers ofte begrænsede affinitet kan også spille en rolle. Det forhold at målstrukturer eksponeres ved enzymbehandling af normale celler (10) antyder at B1-antistoffer kan medvirke ved elimineringen af udtjent væv.

Mens B1-antistoffernes forekomst og særlige egenskaber er veldokumenterede, er B1-cellernes anatomiske og funktionsmæssige organisering inden for det samlede immunsystem endnu i høj grad uafklaret. Dog vides det at B1-cellepopulationen vedligeholdes ved mitose af B1-cellerne selv, og ikke ved uddifferentiering af nye celler fra stamceller i knoglemarven, som det er tilfældet for B2-cellepopulationen. Denne fundamentale forskel har bidraget til erkendelsen af de to cellepopulationer som selvstændige forsvarssystemer. De to systemers forskellige egenskaber er blevet behandlet i flere oversigtsartikler (7, 9, 14-17).

### *Fylogenetiske aspekter*

B1-celler og dermed B1-lignende antistoffer dominerer hos laverestående, vekselvarme dyr (7, 14). Antistofrespons af B2-typen findes hovedsagelig hos varmblodede hvirveldyr. Dette har ført til en teori om at B2-cellesystemet fylogenetisk er en overbygning på B1-systemet. Det antages at mikroorganismernes hurtige formering i varmblodede dyr, og et tilsvarende hurtigere forløb af infektionspatogenesen, har udgjort et væsentligt selektionspres for udvikling af B2-systemet (14). Som forklaring på at B1-systemet er bevaret i varmblodede dyr er anført at det konstante niveau af B1-antistoffer udgør et vigtigt paratforsvar over for angribende, patogene mikroorganismer, indtil et B2-respons er etableret (7). Hertil kommer at B1-systemet synes at udgøre et passende, ikke aggressivt forsvar over for den normale mikroflora, som hovedsageligt er til gavn for sin vært. Netop dette kan være væsentligt for en forståelse af forholdet mellem den plakdannende, orale mikroflora og det sekretoriske immunsystem.

### **Salivas antistoffer mod plakdannende streptokokker i nyt lys**

Vi har i dag en betydelig viden, ikke blot om S-IgA antistoffers mange funktioner i beskyttelsen af slimhinder og tænder, men også om det sekretoriske immunsystems stimulationsmekanismer (18). Det vides at særligt organiserede lymfoide follikler i fordøjelseskanalens og luftvejenes slimhinder kan

optage antigener fra slimhindeoverfladen, for dernæst at lade antigenerne stimulere folliklernes B-lymfocytter til produktion af specifikt antistof i form af IgA. Fra folliklerne migrerer de stimulerede B-lymfocytter til alle kroppens slimhinder, for der at lade deres antistof indgå i det lokale sekret i form af S-IgA. I fordøjelseskanalen findes folliklerne hovedsageligt i form af tarmens Peyer'ske plaques, men en lignende stimulatorisk funktion er påvist for de lymfoide væv i Waldeyers svælgring (svælg-, gane- og tungetonsiller).

Imidlertid er det også vist at antigener kan penetrere slimhinderne uden for folliklerne. Meget tyder på at B-celler også i dette tilfælde kan stimuleres til produktion af antistof, bl.a. i form af IgA (19). Det er ikke undersøgt i hvilket omfang således stimulerede IgA antistoffer indgår i det lokale sekret. Ej heller vides det om de stimulerede B-celler, i lighed med B-celler fra folliklerne, kan migrere til andre slimhinder, herunder spytkirtlerne.

*S-IgA antistoffer induceret af patogene mikroorganismer* – Det er veldokumenteret at patogene mikroorganismer ved kolonisation eller penetration af slimhinder inducerer potentielt beskyttende S-IgA antistoffer, som bl.a. kommer til udtryk i saliva (20). Et beskyttende S-IgA-respons har også kunnet opnås ved peroral eller intranasal immunisering med komponenter af patogene mikroorganismer i oprenset form. For flere patogene mikroorganismers vedkommende er det endvidere vist at induktionen involverer lymfoide follikler, fx de Peyer'ske plaques. I intet tilfælde har antistofferne været søgt klassificeret som B1 eller B2. Eftersom de inducerede reaktioner har vist betydelig immunologisk hukommelse (20), må det antages at B2-celler har været involveret. Hvad angår respons induceret i Peyer'ske plaques støttes denne antagelse endvidere af at B1-celler er yderst svagt repræsenteret i disse follikler (21).

*Salivas antistoffer mod orale streptokokker synes hovedsagelig at være af B1-typen*

På baggrund af observationerne vedr. patogene mikroorganismer er der opstået stor forskningsmæssig interesse for det sekretoriske immunsystems mulige rolle i kontrollen af orale streptokokker, specielt *Streptococcus mutans* og andre arter inden for *mutans*-gruppen. Tandplak med et højt indhold af *mutans*-streptokokker anses af mange for at være af afgørende betydning for udviklingen af caries (22). Et incitament for denne forskning er at S-IgA antistoffer reagerende med orale streptokokker, herunder *S. mutans*, kan påvises i normal human saliva (22, 23) (Fig. 1). På basis af longitudinelle undersøgelser af den orale streptokokflora og streptokokreaktive S-IgA antistoffer i saliva hos småbørn fremsatte de ameri-

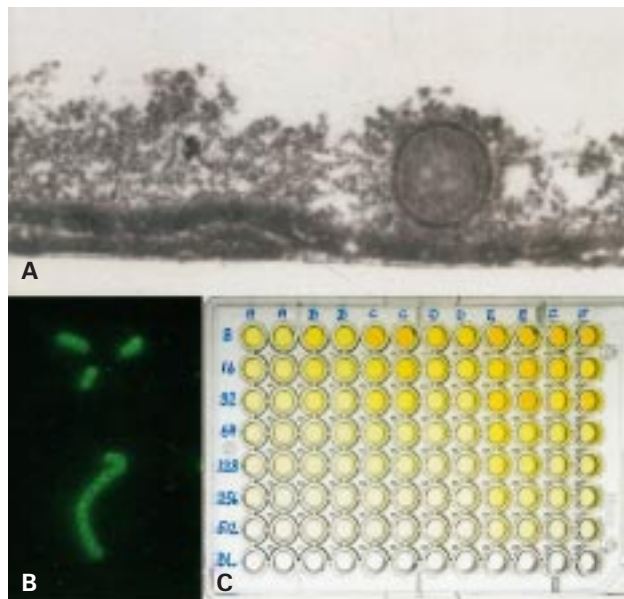


Fig. 1. Tre metoder, som anvendes i undersøgelser af orale streptokokkers adhærenssevne og binding af antistoffer.

A: Transmission-elektronmikroskopisk billede af en oral streptokok som adhærer til en tandpellikel dannet på en mylaroverflade *in vivo*. Bemærk bindingen af makromolekylære pellikelkomponenter til streptokokkens overflade (Billedet stillet til rådighed af Jørgen Theilade).

B: Binding af S-IgA antistoffer fra saliva til *Streptococcus oralis*. Antistoffer på bakteriens overflade er afsløret vha. immunfluorescenceteknik.

C: Kvantitering af S-IgA antistoffer i fem salivaprøver (A-F) mod en klon af *Streptococcus sanguis* vha. enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Stigende fortyndinger (8-512 fold) af saliva er inkuberet med en konstant mængde bakterier bundet i reaktionsbrønde af plast. B1: blank (fortyndingsbuffer alene). Antistoffer bundet til bakterierne er herefter afsløret vha. en enzymmærket probe og et kromogent substrat (gul farve). Det ses at salivaprøverne E og F indeholder mest antistof (positiv reaktion selv efter fortynding 512 fold).

Fig. 1. Three research techniques used in studies of oral streptococcal adherence and binding of antibodies.

A: Transmission electron micrograph of an oral streptococcus adhering to a pellicle formed on a mylarstrip *in vivo*. Note the binding of macromolecular pellicle components to the streptococcal surface (By courtesy of Jørgen Theilade).

B: Binding of S-IgA antibodies from saliva to *Streptococcus oralis*. Antibodies on the surface of the bacteria are revealed by immunofluorescence technique.

C: Quantification of S-IgA antibodies in five saliva samples (A to F) to a clone of *Streptococcus sanguis* by way of enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Increasing dilutions (8 to 512 fold) of saliva were incubated with a constant amount of bacteria immobilized in plastic reaction wells. B1, blank (dilution buffer only). Antibodies bound by the bacteria were subsequently revealed using an enzyme-labeled probe and a chromogenic substrate (yellow stain). Of the five saliva samples, E and F contained the most antibody (positive reaction even at 512 fold dilution).



kanske immunologer *Smith & Taubman* (24) den hypotese at tilstedeværelse af antistoffer reagerende med en given streptokokart er betinget af at netop denne art har koloniseret individet og induceret et respons. Velkontrollerede undersøgelser på såvel mennesker som forsøgsdyr har ikke bekræftet hypotesen. Flere forskere har således fundet *S. mutans*-reaktive salivaantistoffer hos individer fra hvilke *S. mutans* ikke kunne isoleres (25, 26). Endvidere er det vist at kolonisation af dyr med *S. mutans* sjældent efterfølges af en stigning i S-IgA antistoffer mod den koloniserende *S. mutans* (27). Også det tidligere omtalte fund (5), at successiv kolonisation med antigenmæssigt forskellige kloner af *S. mitis* ikke gav anledning til systematiske variationer i klonreaktive S-IgA antistoffer, er i modstrid med *Smith & Taubmans* hypotese. Endelig kan der hos mennesker ikke påvises nogen sikker sammenhæng mellem niveauet af *S. mutans*-reaktive S-IgA antistoffer og omfang og varighed af *S. mutans*-kolonisationen i mundhulen (28). Disse fund viser for det første at salivaantistoffer der reagerer med en bestemt oral streptokok (art eller klon), ikke nødvendigvis er induceret af netop denne streptokok. For det andet synes sådanne antistoffer ikke at stamme fra respons med immunologisk hukommelse. Resultaterne kunne samlet tyde på at salivas S-IgA antistoffer mod orale streptokokker hos normale individer hovedsagelig er af B1-typen.

Andre undersøgelser, bl.a. af streptokokkernes antigener, støtter denne antagelse. Det er vist at en række epitoper er konserverede i flere orale streptokokarter. Antistoffer rejst mod en sådan epitop hos en enkelt art eller klon vil reagere med alle bakterier der bærer epitopen. Konserverede epitoper er påvist ikke kun intracellulært, men også i bakteriernes cellevægge (29), overfladekulhydrat og -proteiner (4, 30). Nogle af epitoperne genfindes også hos ikke-orale streptokokker, hos bakterier uden for slægten *Streptococcus* og tilmed i vævskomponenter hos højerestående organismer (29, 31, 32). Nogle af disse konserverede epitoper er direkte vist at tilhøre de kendte målstrukturer for polyreaktive B1-antistoffer (10, 13, 29). Endelig er det for nylig vist at normal human saliva indeholder betydelige koncentrationer af polyreaktive S-IgA antistoffer som kan isoleres vha. deres affinitet til humane muskelcelleproteiner (11). Således isolerede S-IgA antistoffer viste sig at reagere med et stort antal overfladebundne og intracellulære antigener fra en slægtning til de orale streptokokker, *Streptococcus pyogenes*. Antigener fra orale streptokokker indgik ikke i undersøgelsen.

### **Påvirkes orale streptokokkers adhærence af salivas S-IgA-antistoffer?**

Som tidligere nævnt har laboratorieforsøg og undersøgelser

in vivo givet modstridende oplysninger om virkningerne af S-IgA antistoffer og IgA1 protease på orale streptokokkers kolonisationsevne. Hvis antagelsen om at salivas S-IgA antistoffer overvejende er af B1-typen kan verificeres, peger den på nogle mulige forklaringer på disse observationer. Det skal understreges at de følgende betragtninger er spekulative.

Det antages at alle intakte S-IgA antistoffer som reagerer med streptokokkernes overfladeantigener, kan bidrage til en hæmning af deres kolonisationsevne, dels ved at bevirke aggregation, dels ved at gøre bakterierne hydrofile. En særlig stor effekt kan forventes hvis antistofferne kan blokere funktionen af bakteriernes adhæsiner. Orale streptokokkers adhæsiner er store proteinmolekyler som indeholder mange epitoper. Dette gælder også de såkaldte antigen I/II-adhæsiner som synes at være særlig vigtige i adhærensen til tandoverflader (4). Antistoffer kan binde til visse af disse molekylers epitoper uden at dette påvirker adhæsins funktion. Sådanne epitoper er ofte konserverede strukturer (4). Andre af adhæsineres epitoper er funktionelt essentielle, idet de optræder som bindeled til receptorstrukturer på tand- og celleoverflader (4). Denne type epitoper sørger bakterierne formentlig for at variere ved evolution. Herved mindskes risikoen for at én bakteries adhærenceevne hæmmes af antistoffer dannet med en anden. I denne sammenhæng er det væsentligt at antistoffer med disse varierende epitoper tilsyneladende ikke hører til B1-antistoffernes begrænsede repertoire (7). Et fravær af B2-antistoffer vil altså delvis kunne forklare den begrænsede kolonisationshæmmende virkning af antistofferne in vivo, uafhængigt af en eventuel effekt af bakteriernes IgA1 proteaser. I så fald er det dog stadig uklart hvorfor den begrænsede virkning af B1-antistoffer og den modsatrettede virkning af IgA1 protease kom til udtryk i laboratorieforsøgene, men ikke i de omtalte in vivo-undersøgelser. En mulig forklaring er at laboratorieforsøgene ikke nøjagtigt afspejlede forholdene i mundhulen. Således var S-IgA i de fleste forsøg til stede i oprenset form, ikke som en del af naturlig saliva. Flere af de bakterieoverfladekomponenter som S-IgA antistofferne kan være rettet mod, binder også til salivas dominerende proteiner og glykoproteiner, såsom amylase, muciner og prolinrige proteiner (4). I lighed med bindingen til S-IgA antistoffer medfører dette aggregation, og formentlig også neutralisering af bakteriernes hydrofobicitet. Disse salivakomponenter udgør et immunologisk uspecifikt forsvar (1), hvis effekt kan tænkes at overstige effekten af saliv-S-IgA-antistoffer, især ved fravær af adhæsinblokerende B2-antistoffer. Udelukkelsen af disse proteiner og glykoproteiner i laboratorieforsøgene kan have medført overvurdering af den relative betydning af S-IgA antistofferne som den ville være kommet til udtryk in vivo.

Det skal understreges at de forhåndenværende data ikke udelukker at salivas S-IgA antistoffer spiller en rolle i kontrollen af orale streptokokker og initial plakdannelse. Blot understøtter de en opfattelse af at antistofferne er et ikke-aggressivt element i vort beredskab over for en overvejende gavnlige normalflora.

### Vaccinerelevante perspektiver

Muligheden af at den begrænsede virkning af salivas naturlige S-IgA antistoffer på orale streptokokkers kolonisationsevne kan forklares ved et fravær af B2-antistoffer har relevans for udviklingen af en eventuel cariesvaccine. Induktion af B2-antistoffer kunne være et væsentligt krav til en egnet vaccinationsstrategi. Det er derfor interessant at der i de senere år er opnået lovende resultater ved at udnytte det immunogene potentiale i komponenter fra visse patogene bakterier.

*Immunisering via slimhinder* – Et beskyttende S-IgA-respons mod *S. mutans* har kunnet opnås ved at kolonisere tarmen hos forsøgsdyr med virulenssvækkede salmonellabakterier, som ad genteknologisk vej er bragt til at producere adhæsin fra *S. mutans* (22). En anden metode bygger på at kolerabakteriens toksin kan manipuleres til anvendelse som hjælpestof (adjuvans) for en induktion af beskyttende S-IgA antistoffer i saliva mod *S. mutans*. Ved at koble antigen I/II-adhæsinet til den atoksiske, men stærkt slimhindebindende såkaldte B-del af toksinet, og dernæst immunisere peroralt eller intranasalt med dette kombinationsprotein plus en smule af det intakte toksin, kan der opnås en betydelig produktion af adhæsinblokerende antistoffer (33). Begge de nævnte former for immunisering efterlader immunologisk hukommelse. Med disse strategier er det tilsyneladende muligt at overføre de patogene bakteriers B2-stimulerende evne til antigener fra orale streptokokker.

*Parenteral immunisering* – Salivas S-IgA er ikke den eneste form for immunoglobulin som har mulighed for at deltage i tændernes immunbeskyttelse. Immunoglobuliner fra blod og væv, hovedsageligt IgG, serum-IgA og -IgM, tilføres tandoverfladerne i varierende mængde gennem gingivalvæsken og indeholder, ligesom S-IgA, antistoffer mod orale streptokokker. Disse immunoglobuliner nedbrydes imidlertid forholdsvis let af uspecifikke mikrobielle enzymer (1), og specielt det dominerende IgG har ikke S-IgA's hydrofile egenskaber. På denne baggrund har det vakt forundring at antistoffer af disse typer, induceret ved parenteral vaccination af forsøgsdyr med antigen I/II-adhæsin, har kunnet hæmme kolonisation med *S. mutans* og udvikling af caries (34). Disse

virksomheder er observeret direkte på de immuniserede dyr og endvidere efter applikation af de dannede antistoffer på tandoverflader hos ikke-immuniserede dyr (passiv immunisering) (35).

Antagelsen om at B2-antistoffer er særlig væsentlige for en kolonisationshæmmende virkning, er relevant også for en forklaring af disse resultater. *S. mutans* tilhører normalfloraen og genkendes formentlig under normale forhold af B1-antistoffer. Hvis dens antigener derimod forekommer i kroppens væv, opfattes de som patogener, specielt når de som led i en parenteral vaccination injiceres sammen med et adjuvans indeholdende substanser fra patogene bakterier. Under disse forhold vil antigenerne stimulere B2-celler i lymfeknuder. Muligvis skyldes den beskyttende virkning at adhæsinblokerende B2-antistoffer er blevet tilført dyrets tandoverflader gennem gingivalvæsken.

De omtalte vaccinationsstrategier har ikke været afprøvet på mennesker. Selvom en række problemer endnu er uløste, udgør resultaterne et biologisk grundlag for at antage at en vaccine, der styrker immunforsvaret mod *mutans*-streptokokker, vil kunne udvikles. Om en sådan strategi er ønskelig over for en livsstilsbetinget sygdom som caries, kan imidlertid diskuteres.

### Afsluttende bemærkninger

Denne artikel har behandlet hypotesen om immunreaktionernes niveaudeling, primært i relation til resultater vedr. orale streptokokker. Dette skyldes ikke en formodning om at hypotesen er mindre relevant i relation til andre orale bakterier, herunder de overvejende gramnegative medlemmer af plakfloraen, som synes at være særlig relevante i parodontitis-sammenhæng. Det skal i denne forbindelse nævnes at hypotesen i høj grad bygger på data vedr. immunreaktioner mod gramnegative tarmbakterier (17). Fremtidige undersøgelser må vise hvorvidt den tilbageholdenhed immunsystemet tilsyneladende viser over for orale streptokokker under normale forhold, også gælder de »parodontitisrelevante« bakterier.

### English summary

*Two levels of immunity against plaque: perspectives for vaccine development*

It has been amply documented that saliva contains antibodies binding to oral bacteria, but the role of the antibodies in the control of the oral flora is not clear. Experiments in vitro have shown that the antibodies in purified form may inhibit the adherence of oral bacteria to artificial tooth surfaces and epithelial cells. Still, the same types of bacteria may persist in the oral cavity for long periods in the presence of antibody-

containing saliva. In addition, the ability of the antibodies to inhibit the formation of dental plaque seems limited.

Conceivably, one explanation to this may be that several plaque-forming bacteria produce enzymes, the so-called IgA1 proteases, that cleave antibodies of the IgA1 molecular type, which predominate in saliva. Hereby the adherence-inhibiting effect of the antibodies is eliminated. However, studies in vivo have failed to document that IgA1 protease-producing bacteria enjoy facilitated colonization in the oral cavity.

Meanwhile, data have accumulated to indicate that salivary antibodies to normal oral flora are of limited potency even in intact form. In contrast to antibody responses stimulated during invasive infections, naturally induced antibodies to normal flora lack immunological memory and seem to be directed towards broadly occurring (phylogenetically conserved) molecular structures. Presumably, these do not include essential structures of bacterial adhesins. In immunological terms, a large proportion of salivary antibodies seems to belong to the category of »natural polyreactive autoantibodies« produced by the so-called B1-lymphocytes.

The limited potency of the antibodies may ensure that the normal flora, which is mainly beneficial to the host, is not eliminated. Under certain circumstances a more efficient response to oral bacteria can be established. This may provide for the development of vaccination strategies against cariogenic bacteria.

## Litteratur

1. Reinholdt J. Antimikrobielle faktorer i saliva. Tandlægebladet 1994; 98: 379-83.
2. Kilian M, Reinholdt J, Lomholt H, Poulsen K, Frandsen EVG. Biological significance of IgA1 proteases in bacterial colonization and pathogenesis: critical evaluation of experimental evidence. APMIS 1996; 104: 321-38.
3. Kilian M, Russell MW. Function of mucosal immunoglobulins. In: Ogra P, Mestecky J, Lamm ME, Strober W, McGhee JR, Bienenstock J, editors. Handbook of mucosal immunology. San Diego: Academic Press; 1994. p. 127-37.
4. Jenkinson HF, Lamont RJ. Streptococcal adhesion and colonization. Crit Rev Oral Biol Med 1997; 8: 175-200.
5. Hohwy J. Streptococcus mitis biovar 1 in the human oral cavity and pharynx: studies on serology, population dynamics, and antigenicity in relation to salivary antibodies. Tandlægebladet 1997; 101: 986-7.
6. Reinholdt J, Friman V, Kilian M. Similar proportions of immunoglobulin A1 (IgA1) protease-producing streptococci in initial dental plaque of selectively IgA-deficient and normal individuals. Infect Immun 1993; 61: 3998-4000.
7. Bouvet J-P, Dighiero G. From natural polyreactive autoantibodies to a la carte monoreactive antibodies to infectious agents: is it a small world after all? Infect Immun 1998; 66: 1-4.
8. Kocks C, Rajewsky K. Stable expression and somatic hypermutation of antibody V regions in B-cell development pathways. Ann Rev Immunol 1989; 7: 537-59.
9. Cohen IR. The cognitive paradigm and the immunological homunculus. Immunology Today 1992; 13: 490-4.
10. Allison AT, Nawata Y. Cytokines mediating the proliferation and differentiation of B1-lymphocytes and their role in ontogeny and phylogeny. Ann N Y Acad Sci 1992; 651: 200-21.
11. Quan CP, Berneman A, Pires R, Avrameas S, Bouvet J-P. Natural polyreactive immunoglobulin A autoantibodies as a possible barrier to infections in humans. Infect Immun 1997; 65: 3997-4004.
12. Casali P, Schettino EW. Structure and function of natural antibodies. Curr Top Microbiol Immunol 1995; 10: 167-79.
13. Berneman A, Guilbert B, Eschrich S, Avrameas S. IgG auto- and polyreactivities in normal human sera. Molec Immun 1993; 30: 1499-510.
14. Nahm MH, Kroese FGM, Hoffman JW. The evolution of immune memory and germinal centers. Immunology Today 1992; 13: 438-41.
15. Herzenberg LA, Herzenberg LA. Toward a layered immune system. Cell 1989; 59: 953-4.
16. Avrameas S, Ternynck T. Natural antibodies: the other side of the immune system. Res Immunol 1995; 146: 235-48.
17. Kroese FGM, de Waard R, Bos NA. B-1 cells and their reactivity with murine intestinal microflora. Sem Immunol 1996; 8: 11-8.
18. Mestecky J. Development and physiology of mucosal defense. Section A. In: Ogra P, Mestecky J, Lamm ME, Strober W, McGhee JR, Bienenstock J, editors. Handbook of mucosal immunology. San Diego: Academic Press; 1994. p. 11-137.
19. Husby S. Dietary antigens: uptake and humoral immunity in man. APMIS 1988; 96 (Suppl): 5-40.
20. Levine MM, Nataro JP. Intestinal infections. In: Ogra P, Mestecky J, Lamm ME, Strober W, McGhee JR, Bienenstock J, editors. Handbook of mucosal immunology. San Diego: Academic Press; 1994. p. 505-12.
21. Kroese FGM, Kantor AB, Herzenberg LA. The role of B-1 cells in mucosal immune responses. In: Ogra P, Mestecky J, Lamm ME, Strober W, McGhee JR, Bienenstock J, editors. Handbook of mucosal immunology. San Diego: Academic Press; 1994. p. 217-24.
22. Michalek M, Childers NK. Development and outlook for a caries vaccine. Crit Rev Oral Biol Med 1990; 1: 37-54.
23. Brandtzaeg P. Salivary immunoglobulins. In: Tenovuo JO, editor. Human saliva: Clinical chemistry and microbiology. Vol II. Boca Raton FL: CRC Press; 1989. p. 1-54.
24. Smith DJ, Taubman MA. Ontogeny of immunity to oral microbion in humans. Crit Rev Oral Biol Med 1992; 3: 109-33.
25. Bamman LL, Gibbons RJ. Immunoglobulin A antibodies reactive with Streptococcus mutans in saliva of adults, children, and preterm infants. J Clin Microbiol 1979; 10: 538-43.
26. Russell RRB, Beighton D. Specificity of natural antibodies reactive with Streptococcus mutans in monkeys. Infect Immun 1982; 35: 741-4.
27. Cole MF, Dana Hsu S, Sheridan MJ, MacStiles H. Natural transmission of Streptococcus sobrinus in rats: saliva and serum antibodies to colonization. Infect Immun 1992; 60: 778-83.

28. Russell MW, Mestecky J. Potential for immunological intervention against dental caries. *J Biol Buccale* 1986; 14: 159-75.
29. Kolberg J, Hoiby EA, Jantzen E. Detection of the phosphorylcholine epitope in streptococci, Haemophilus, and pathogenic Neisseria by immunoblotting. *Microb Pathog* 1997; 22: 321-9.
30. Cisar JO, Takahashi Y, Ruhl S, Donkersloot JA, Sandberg AL. Specific inhibitors of bacterial adhesion: observations from the study of gram-positive bacteria that initiate biofilm formation on the tooth surface. *Adv Dent Res* 1997; 11: 168-75.
31. Sørensen US. Pneumococcal polysaccharide antigens: capsules and C-polysaccharide. *Danish Med Bull* 1995; 42: 47-53.
32. Ayakawa GY, Bleiweis AS, Crowley PJ, Cunningham MW. Heart cross-reactive antigens of mutans streptococci share epitopes with group A streptococci and myosin. *J Immunol* 1988; 140: 253-7.
33. Hajishengallis G, Michalek M, Russell MW. Persistence of serum and salivary antibody response after oral immunization with a bacterial protein genetically linked to the A2/B subunits of cholera toxin. *Infect Immun* 1996; 64: 665-7.
34. Lehner T, Russell MW, Caldwell J. Immunization with a purified protein from *Streptococcus mutans* against dental caries in rhesus monkeys. *Lancet* 1980; i: 995.
35. Ma J, Lehner T. Prevention of colonization of *Streptococcus mutans* by topical application of monoclonal antibodies in human subjects. *Arch Oral Biol* 1990; 35 (Suppl): 115S-22S.

## **Forfatter**

*Jesper Reinholdt*, lektor, lic.odont.

Afdeling for Oral Biologi, Odontologisk Institut, Det Sundhedsvidenskabelige Fakultet, Aarhus Universitet