歯周炎の進行と補体活性化に関する研究

—実験的歯周炎における補体活性化について—

九州歯科大学大学院歯学研究科保存学第2講座(指導:山本博武教授)

九州歯科大学口腔細菌学講座(指導:内山長司教授)

松 原 成 年

昭和62年10月21日受付

Study on the Relationship between Development of Periodontal Disease and Cleavage of Complement

—Cleavage of Complement on Experimental Periodontitis in Rats—

Naritoshi Matsubara

Second Department of Conservative Dentistry (Director: Prof. Hakubu Yamamoto)

Department of Oral Bacteriology (Director: Prof. Choji Uchiyama)

Kyushu Dental College, Kitakyushu, Japan

The endotoxin of Gram-negative bacteria has various biological activities and many studies show evidence to support this. Especially in the initial lesion in periodontitis, endotoxin plays an important part in complement cleavage. The aim of this study was to investigate changes with time in complement and immunoglobulins in the gingiva and serum by inoculating the gingiva of rats with endotoxin from *E. coli*.

The results were as follows:

1. The immunofluorescent technique for locating C3 deposits in the periodontal tissue after LPS inoculation showed strong immunofluorescent stain in the blood vessel walls and the surrounding areas adjacent to the site of inoculation three hours after inoculation. The immunofluorescent stain decreased greatly six hours after inoculation.
2. The values of C3 in the gingival extracts were about 3.8 times higher at three hours, about 1.2 times higher at six hours, and about 1.8 times higher at 24 hours than the normal value, and were about normal at 168 hours.
3. No marked changes in C3 were observed in the serum.
4. The values of C3_c in the gingival extracts were about 3.7 times higher at one hour, about 1.8 times higher at six hours, and about 3.4 times higher at 24 hours than the normal value, and were about normal at 72 hours. A diphasic change was seen in increase and decrease.
5. No marked changes were seen in C3_c in the serum.
6. No marked changes were seen in complement titer of serum (CH50).
7. As to immunoglobulins in the gingival extracts at one hour, IgG was 1.4 times

higher, IgM 1.2 times higher, and IgA 1.1 times higher than the normal values, showing a slight increase. The values however were about normal in three to six hours.

8. No marked changes were found in whole IgG, IgM, and IgA in the serum.

9. With regard to anti-LPS immunoglobulins in the serum, no marked changes were seen for anti-LPS IgM and a definite increase was observed at 168 hours. A slight increase was seen for anti-LPS IgM at 72 hours and a definite increase was seen at 168 hours.

On the basis of the foregoing, the infiltration of LPS into the tissue led the complement at site to an abrupt cleavage through the alternative pathway. The direct effect of LPS and indirect effect through cells and others resulted in a biphasic change in increase and decrease. However, the complement in the serum circulated through the circulatory system did not show any changes. Only anti-LPS immunoglobulins showed changes in 72~168 hours.

Key words : *Endotoxin/Complement 3 (C3)/Complement 3_c (C3_c)
/Immunoglobulin/Gingival extracts/Rat serum*

緒 言

グラム陰性桿菌の細菌内毒素は生体レベル、細胞レベル、分子レベルで多彩な生物学的活性を有している。歯周疾患の周囲組織において、内毒素の侵入により、補体系の活性化と好中球、マクロファージのライソゾーム酵素の放出を促し、それによる直接的組織破壊、Bリンパ球の非特異的活性化がもたらされる。また内毒素は補体第2経路活性化を通じてアナフィラトキシンを形成し、炎症、軟組織破壊をもたらす一方、白血球遊走因子を放出させる。また内毒素はT細胞からのリンフォカインの放出、マクロファージからのプロスタグランディンの放出を促すなどが知られている。内毒素によるこれらの様々な生物学的活性が複雑に関与し、炎症、軟組織破壊、歯周ポケット形成、歯槽骨吸収へと進行して行くことが考えられている。歯周疾患の進行状態は病理組織学的ならびにその電顕観察所見より4つの病変期に分類される¹⁾。補体系は外来性物質に対する防御的反応や宿主組織に障害を喚起する主要な体液性エフェクター機構である。このことから、歯周疾患の初発期病変での局所の補体活性化は最も重要な生体反応とされ、歯周疾患の病因との関連が注目されている。また Patters ら (1979)²⁾によると補体の活性化は歯周疾患の程度と相関が認められるという報告も見受けられる。また、補体の活性化経路により補体第3成分 (以下 C3 と略す) が最も重要であり、C3 の濃度は補体の活性化の程度を反映している

と考えられている。ところが、内毒素を投与した際の局所および全身における補体の動向を検索した報告は見当らない。著者らは、すでにラットの血清および歯肉抽出液の補体 (C3) を ELISA 法を用いての測定条件を検討し報告した³⁾が、今回著者はラット臼歯部辺縁歯周組織に細菌内毒素を接種し、経時的に歯周組織とその抽出液および血清を採取した。その抽出液から免疫グロブリンおよび補体 (C3) の経時的な動態を検索し、さらに、蛍光抗体法により歯周組織内の補体 (C3) の局在性をも検索して、歯周組織に内毒素 (LPS) を接種後の補体 (C3) の動態に興味ある知見を得たので報告する。

実験材料および方法

I. 実験材料

A. 動物

実験動物には、体重250 g前後の Wistar 系ラットの雄を使用した。ラットは10日間以上飼育し、十分に環境に順応させた後実験に供した。

B. 内毒素

内毒素 (以下 LPS) は、*E. coli* 0111 B4 (Difco 社製) を使用した。接種時に滅菌生理食塩水で 10 μ g/0.05ml に希釈して使用した。

C. 抗血清

抗血清は抗ラット C3, IgG, IgM (ヤギ), IgA (ヒツジ) の各抗血清 IgG 画分 (Cappel 社製), 抗ラット C3c (ヤギ) 血清 IgG 画分 (Nordic 社製) を用いた。

標識抗体には抗ラット C3, IgG, IgM ペルオキシダーゼ標識 IgG 画分(Cappel 社製)を使用した. C3c においては抗ラット C3c 血清の IgG 画分(Nordic 社製)を Nakane ら(1979)⁴⁾の過ヨウ素酸改良法によりペルオキシダーゼ標識を行い使用した. IgA においては抗ヒツジ IgG ペルオキシダーゼ標識 IgG 画分(Cappel 社製)を使用した. なお抗血清はラット全血清に対し, 免疫電気泳動において対応する部位に1本の沈降線を示すことを確認した.

II. 実験方法

A. 内毒素の接種

ラット両側下顎第1臼歯部粘膜下に LPS (I-B) 10 μ g/0.05ml を接種した群と, 対照群には同様の方法で生理食塩水を 0.05ml 接種したものおよび未処置のものを実験に供した. 接種後 1, 3, 6, 12, 24, 72, 168 時間後にそれぞれ10匹ずつ屠殺して, 血清および歯肉抽出液を採取した. (Fig. 1)

Fig. 1 Schedule of the experiment

B. 血清および歯肉抽出液

1. 血清

心臓穿刺により採血し, 4°C, 12時間放置した. 上清を 4°C, 1500 $\times$ g 10分間遠心を2度行ない, 上清は-80°Cで保存した.

2. 歯肉抽出液

歯肉摘出後(以下 4°Cで操作) 0.01M EDTA-PBS に浮遊させ, 吸湿後, 湿重量を計測した. 材料 20mg に対して 1.0ml の 0.01M EDTA-PBS を加え, さらに sea sand (和光純薬工業社製) 1,500mg を加え 20分間粉碎した. その後凍結融解を5度くり返し, 2,500 $\times$ g, 15分間遠心を2度行った. 上清を 0.22 μ m FILTER UNIT (MILLEX-GS) にて濾過し, -80°Cで保存し

た. (Fig. 2)

gingiva
wash by 0.01M EDTA-PBS
determination of fresh weight (F.W.)
add 0.01M EDTA-PBS (1ml/20mg F.W.)
add sea sand (1,500mg)
homogenization (20min.)
freezing and thawing ($\times$ 5)
centrifugation (2,500 $\times$ g 15min $\times$ 2)
superanant
filtration (MILLEX-GS)
gingival extracts
store at -80°C

Fig. 2 Preparation procedure of gingival extracts

3. 補体および免疫グロブリン測定

a. C3 および C3c の測定法

抗ラット C3 血清の IgG 画分および抗ラット C3 ペルオキシダーゼ標識 IgG 画分(I-C)を使用し, 第1報³⁾で報告した測定条件に準じて ELISA 二抗体サンドイッチ法にて測定し, C3c も C3 の測定法に準じて行った. (Fig. 3)

b. 免疫グロブリン (IgG, IgM, IgA) の測定法

抗ラット IgG 血清の IgG 画分および抗ラット IgG ペルオキシダーゼ標識 IgG 画分(I-C)を使用し, ELISA 二抗体サンドイッチ法にて測定し, IgM も同様な方法で測定した.

IgA においては, 抗ラット IgA (ヒツジ) 血清 IgG 画分および抗ヒツジ IgG ペルオキシダーゼ標識 IgG 画分(I-C)を使用し, ELISA 間接法にて測定した.

c. 抗 LPS 免疫グロブリン (IgG, IgM) の測定法

LPS (I-B) 0.05 μ g/ml (0.01M 炭酸ナトリウム緩衝液 pH 9.6にて希釈) および抗ラット IgG ペルオキシダーゼ標識 IgG 画分(I-C)を使用し, ELISA 法にて測定した. (Fig. 4) また, 抗 LPS IgM も同様の方法で測定した.

Fig. 3 Microtiter ELISA method (C3)

Fig. 4 Microtiter ELISA method (anti-LPS IgG)

4. 血清補体価 (CH 50) の測定

感作ヒツジ赤血球を GVB に 5×10^8 個/ml となるよう調整し、被験血清を 81 倍希釈し、Mayer 原法の 1/2.5 スケールにて測定した。

5. 蛍光抗体法

凍結試料をクリオスタットにて $8 \mu\text{m}$ に薄切し、無蛍光スライドガラスに吸着させた。前処理として 4°C 、95% エタノールにて 30 分処理した後 4°C の冷 PBS で 15 分、3 回洗滌した。次にスライドガラス上の歯肉組織切片に 1 次抗体 (抗ラット C3 血清の IgG 画分) をかけ 37°C 、30 分間浸潤状態で反応した。反応終了後、冷 PBS 中に 30 分間、3 回浸し、切片が乾燥しない程度に PBS を拭き去る。次にスライドガラス上の歯肉組織切片に FITC 標識血清 (抗ヤギ IgG FITC 標識 IgG 画分) をかけ、 37°C 、60 分間浸潤状態で反応した。反応終了

後、冷 PBS 中に60分間、3回浸して余剰の標識抗体を除き、切片周囲の PBS を拭き取った。次に0.5M 炭酸緩衝液 pH 9.5 1容、特級無蛍光グリセリン 9容を混合したものを組織切片上に滴下し、無蛍光カバーガラスをかけ封入し、蛍光顕微鏡観察を行った。

実験成績

I. 標準曲線

段階希釈した標準歯肉抽出液 (100~25600) を用い、O.D 405 で測定し、希釈倍数の対数に対して、プロットして標準曲線を描いたところ、双曲線状を呈した。抗ラット C3 血清を用いた場合の例を Fig. 5 に示した。

Fig. 5 標準歯肉抽出液における C3 の標準曲線

Fig. 6 標準曲線の回帰直線

Mouton ら (1981)⁵⁾ は、X軸に $\log$ (希釈倍率)、Y軸に O.D 405 をとったグラフで標準曲線の $\log$ -linear な部分に対して直線回帰を試み成功した。しかし $\log$ -linear な部分のみで C3 量測定を行うのでは、測定の範囲を逸脱することがあり得るので、 $\log$ -logit 変換して直線回帰を試みた。すなわち市原ら (1982)⁶⁾ の方法により $\log$ -logit 変換式を用いて換算し回帰直線を得た。(Fig. 6)

$$X = \log_{10} (\text{dilution})$$

$$Y = \text{logit} (O.D. 405) = \log_{10} \left(\frac{O.D. 405 - A}{B - O.D. 405} \right)$$

(dilution: 希釈倍数, A: dilution を無限大にした場合の O.D 405, B: dilution を限りなく 0 に近づけた場合の O.D 405)

II. 蛍光抗体法による歯肉組織の C3 の局在

A. LPS 接種後の C3 の検索

LPS 接種後 3 時間には、接種部位に近接した血管壁とその周囲に強度の特異蛍光が認められた。(Fig. 7) さらに、LPS 接種後 6 時間では、特異蛍光は大幅に減少した。

B. 生理食塩水接種後の C3 の検索

生理食塩水接種後、3 時間、6 時間とも LPS 接種群に比較して、全体的に弱い自家蛍光が認められた。

Fig. 7 Immunofluorescent staining of gingival tissue

III. 歯肉抽出液における C3 の測定

A. LPS 接種後の C3 の経時的変動

C3 の経時的変動は Fig. 8 に示す通りである。LPS 接種後 1 時間で約 1.8 倍と徐々に増加し、3 時間には急激に増加し正常値の約 3.8 倍に達した。その後急激に減少して、6 時間には約 1.2 倍となった。その後、再度ゆるやかに増加して、12 時間には約 1.5 倍、24 時間には約 1.8 倍に達した。その後、徐々に減少して、168 時間にはほぼ正常値となった。

B. 生理食塩水接種後の C3 の経時的変動

C3 の経時的変動は Fig. 8 に示す通りである。生理食塩水接種後 1 時間には約 1.3 倍、その後やや増加して、3 時間には約 1.5 倍に達し、その後減少して、6 時間には約 1.2 倍、12 時間には正常値と同値となり経時的に著変は認められなかった。

Fig. 8 Complement (C3) concentration in gingival extracts after LPS and saline inoculation. Normal=1

IV. 血清中の C3 の測定

A. LPS 接種後の C3 の経時的変動

歯肉局所の経時的な C3 の変動は認められたが、循環系を介した血清中の C3 の変動は認められなかった。(Fig. 9)

Fig. 9 Complement (C3) concentration in serum after LPS inoculation. Normal=1

V. 歯肉抽出液の免疫グロブリンの測定

A. LPS 接種後の IgG, IgM, IgA の経時的変動
免疫グロブリンの経時的変動は Fig. 10 に示す通りで

ある。LPS 接種後 1 時間で IgG は 1.4 倍、IgM は 1.2 倍、IgA は 1.1 倍の順に、正常値よりわずかに増加が認められたが、IgG, IgA は 3 時間にはほぼ正常値となり、IgM は 6 時間にはほぼ正常値となり、その後著変は認められなかった。

B. 生理食塩水接種後の IgG, IgM, IgA の経時的変動

免疫グロブリンの経時的変動は Fig. 10 に示す通りであり、生理食塩水接種後の IgG, IgM および IgA とともにほとんど変化なくほぼ正常値で推移した。

Fig. 10 Immunoglobulin concentration in gingival extracts after LPS and saline inoculation. Normal=1

VI. 歯肉抽出液の C3c の測定

A. LPS 接種後の C3c の経時的変動

C3c の経時的変動は Fig. 11 に示す通りである。LPS 接種後 1 時間には急激に増加して正常値の約 3.7 倍に達した。その後、3 時間には約 2.5 倍、6 時間には約 1.8 倍と減少した。その後再び増加し、12 時間には約 2.7 倍、24 時間には約 3.4 倍に達し、その後 72 時間には正常値とほとんど同値で推移した。

B. 生理食塩水接種後の C3c の経時的変動

C3c の経時的変動は Fig. 11 に示す通りである。生理食塩水接種後 1 時間には正常値の約 1.7 倍に達した。その後、3 時間には約 1.5 倍、6 時間には約 1.1 倍と減少し、その後正常値と同値で推移した。

Fig. 11 Complement (C3c) concentration in gingival extracts after LPS and saline inoculation. Normal=1

Ⅶ. 血清中の C3c の測定

A. LPS 接種後の C3c の経時的変動

歯肉局所の経時的な C3c の変動は認められたが、循環系を介した血清には C3c の変動は認められなかった。(Fig. 12)

Fig. 12 Complement (C3c) concentration in serum after LPS inoculation. Normal=1

以上のことから、歯肉組織における補体系 (C3, C3c) と免疫グロブリン (IgG, IgM, IgA) 量はいずれも LPS 接種後 1～3 時間に増加した。

補体系の C3 においては、LPS 接種後急激に増加し、3 時間で正常値の約 3.8 倍の最高値に達した後、6 時間にかけて減少した。

一方、C3c においては、C3 より増加の速度が著明で、1 時間で正常値の約 3.7 倍の最高値に達した後、6 時間にかけて減少した。

このことから、LPS を接種した歯肉局所において補体の急激な開裂がおきたことが示唆された。また、LPS 接種後 6 時間より 24 時間にかけて C3, C3c とも再び増加し、C3 が約 1.7 倍であるのに対し、C3c は約 3.4 倍まで達した。また 24 時間後における C3 の変動幅は比較的少ないのに対し、C3c においては測定期間内で最大の変動幅を示し、不安定な動態が認められた。これらの動態は補体成分の局所における供給と消費のバランスによるものと考えられる。また、24 時間以降は、C3 は徐々に減少し、168 時間後に正常値に回復するのに対し、C3c は 72 時間後に正常値に回復している。また両者とも正常値回復後の変動幅は非常に少なかった。

免疫グロブリン IgG, IgM, IgA においては、接種後 1 時間で約 1.2～1.4 倍のわずかな増加を示した後、3 時間で正常値に回復し、168 時間後までほぼ同値で経過した。

これらのことから、LPS 接種直後、補体の急激な開裂による血管透過性の増大が示唆された。このように LPS 接種直後の IgG, IgM, IgA において経時的な増減はいずれも明らかに認められ、変動幅も比較的少なく安定した体液中の動態がみられた。このように局所においては免疫グロブリンは一相性の増減であったのに対し、C3, C3c は二相性の増減を示した。

しかし、血清においては C3, C3c とも著変は認められず、補体の増加は、歯肉組織のみに限られた反応であることが確認された。

Ⅷ. 血清補体価の測定

A. LPS 接種後の血清補体価の経時的変動

血清補体価の経時的変動は Fig. 13 に示す通りであり、C3, C3c と同様にほとんど変化なくほぼ正常値で推移した。

Fig. 13 Complement titer in serum after LPS inoculation. Normal=1

Ⅸ. 血清中の免疫グロブリンの測定

A. LPS 接種後の IgG, IgM, IgA の経時的変動

歯肉局所の経時的な免疫グロブリンの変動は認められたが、循環系を介した血清中の IgG, IgM, IgA の変動は認められなかった。(Fig. 14)

Fig. 14 Immunoglobulin concentration in serum after LPS inoculation.
Normal=1

B. LPS 接種後の抗 LPS IgG および抗 LPS IgM の経時的変動

抗 LPS IgG, 抗 LPS IgM の変動は Fig. 15, 16 に示す通りである。200倍に希釈した血清測定時の O.D

Fig. 15 Changes of anti-LPS IgG concentration represented as A 405 nm in serum after LPS inoculation.

405は、抗 LPS IgG において、LPS 接種後72時間まで著変は認められないが、168時間後において明らかな増加が認められた。

抗 LPS IgM において、LPS 接種後72時間でわずかな増加傾向が認められ、168時間後において明らかな増加が認められた。

Fig. 16 Changes of anti-LPS IgM concentration represented as A 405 nm in serum after LPS inoculation.

なお、LPS 接種後の歯肉抽出液における抗 LPS IgG, 抗 LPS IgM は測定限界以下であった。

以上のことから、血清において抗 LPS IgG は、接種後72時間まで変化を示さなかったのに対し、抗 LPS IgM は、わずかな増加を示した。その後、168時間において両者とも明らかな増加を示した。また、両者とも24時間後までの変動幅はきわめて少なく、ほぼ零に等しかったが、増加しはじめるにつれて変動幅が増大した。これらより、抗 LPS 抗体が産生され、血清中に検出されるには、抗 LPS IgG の場合168時間、抗 LPS IgM では72時間必要なことが示された。

これに対し、血清中の全 IgG, IgM, IgA 量において著変は認められず、同様に補体系においても変動は認められなかった。このように、血清においては抗 LPS 抗体のみに変動が認められるにすぎず、LPS 10 μg/0.05 ml 1回接種においては、膨大なクローンの1つが増加しても、全体の免疫グロブリン量には影響をおよぼさないことが示された。

考 察

健康な歯肉を有するヒトにプラークを蓄積させた結果、歯肉炎の発生を見た Løe ら (1965)⁷⁾ の報告に始まり、その後プラーク中に病原性因子が存在することが定

説となった。また、プラーク中から多くの菌種が分離同定され、各種菌の歯周病に対する役割が研究され、プラークの成熟にともなう細菌叢の変化が検討された。成熟プラークに多く見られるグラム陰性菌がラットに実験的歯周炎を惹起し、また無菌ラットへの単独感染においても多数の破骨細胞を伴う骨の吸収を生ずるという報告も見受けられる⁸⁾。その中でも近年、最も重要視されるのは、*Bacteroides gingivalis* や *Fusobacterium nucleatum* などの嫌気性グラム陰性桿菌であり、Genco ら (1984)⁹⁾ や Nair ら (1983)¹⁰⁾ 多くの学者によると、その細胞外壁に存在する LPS が、歯周疾患に重要な要因になっていると指摘している。また、グラム陰性菌より抽出された LPS が、歯周疾患の発症や進行に関する報告が *in vitro*, *in vivo* で数多く見受けられ、LPS が歯槽骨吸収を始めとする歯周病の諸症状の発症、進行にかかわっている可能性が明らかにされつつある。

内田ら (1980)¹¹⁾ は、歯石の LPS を温フェノール水法により抽出し、limulus テスト、局所シュワルツマン反応の結果から石灰化した状態でも LPS が遊離することを報告した。しかし、歯石の付着する部位と表面の機械的損傷能力、表面積当りの密度からその臨床的意義は軽視できないと考えられる。また歯肉溝に関して、グラム陰性の菌数と歯肉溝液の内毒素量、グラム陰性桿菌数と炎症程度、内毒素含量と炎症程度の間には正の相関性が見られるなど歯肉溝液の内毒素量が、臨床的や組織学的炎症程度に応じて増加するという報告も多い^{12), 13)}。このように、歯周組織は LPS を含んだ環境下に置かれているが、LPS が上皮組織を通過して結合組織内に侵襲することを証明した報告も数多い。Schwartz ら (1972)¹⁴⁾、Alfano ら (1975)¹⁵⁾ はトリチウムラベルした LPS を用い、基底膜が LPS の通過をある程度妨げるものの、LPS の健康上皮通過を確認している。また金久ら (1981)¹⁶⁾ は蛍光抗体法により LPS がヒト炎症歯肉の歯肉上皮および上皮下結合組織に侵襲していることを証明している。これらの報告より LPS は健康な上皮通過が可能であり、上皮に潰瘍などがあって基底膜の機能が失われると、より容易に結合組織内に侵入することが考えられる。また、歯周病患者歯肉の LPS 含量の増加に伴い歯肉の炎症も重篤となるという報告¹²⁾ も見受けられ、LPS が歯肉溝上皮から侵入し、歯肉組織の補体を活性化させる可能性が示唆される。

動物に実験的歯周炎を惹起させる抗原投与法は、様々な方法が考案されており、歯肉溝にろ紙を静置し、抗原液を滴下する方法、歯肉溝へシリンジで抗原液を注入す

る方法、糸に抗原液を浸み込ませて歯肉溝内へ静置したり、直接注射する方法などが見受けられる。しかし、*in vivo* の実験的歯周炎では体液性免疫と細胞性免疫の両者が組織反応として現れ、それらの反応の強弱により出現する反応が多様となる可能性も否定できない。

そこで著者は液量を正確に規定でき、麻酔の影響を極力排除する意味での無麻酔下での操作の確実性を考慮し、歯肉内注射法を採用した。

著者と同様に動物歯肉に LPS を接種し、歯周組織の影響を調べた報告も見受けられる。白石ら (1978)¹⁷⁾ は、ラット歯肉に *E. coli* の LPS を 1 回接種し、経時的に歯周組織の変化を観察して、投与側歯肉において炎症像が見られ、2 日後までは好中球を中心とした急性炎症像を呈し、その後はリンパ球、形質細胞を中心とした慢性炎症像を呈し、さらに、投与側歯槽骨骨膜部で変性を伴う骨融解像がみられ、金久ら (1982)¹⁸⁾ は、*Fusobacterium nucleatum* から抽出した LPS をラット歯肉に接種した場合、一過性の退行性変化を示した。接種直後 LPS は、膠原線維間に網状に広範囲に認められたが、3～6 時間を経過すると限局して、好中球を主とした貪食細胞内の特異蛍光だけが著明となり、LPS は比較的速かに、吸収、貪食、拡散などにより局所から消失すると報告している。金子ら (1984)¹⁹⁾ は、ラット歯肉に *E. coli* LPS と *Actinomyces viscosus* 菌破壊上清を接種し、両者とも炎症巣は高度の多核白血球浸潤と線維素性浸出を主とした炎症像を呈し、接種量、接種回数に相関してその程度は高度となったと報告した。磯村ら (1985)²⁰⁾ は、*Fusobacterium nucleatum* 由来の LPS で免疫したラットおよび非免疫ラットに対し、歯肉に LPS を数回接種した病理組織像において、非免疫ラットでは歯肉の高度の炎症、変性と壊死および破骨細胞による骨吸収を認めており、一方免疫ラットでは歯肉に強い Arthus 型の過敏反応を示す組織像が認められたと報告している。佐々木ら (1986)²¹⁾ は、*E. coli* LPS により免疫したラットと非免疫ラットに対して、歯肉に LPS を接種し、受身赤血球凝集反応により抗体価を測定した。免疫群においては抗体価がほぼ一定の値を示したのに対し、非免疫群では抗体価が徐々に上昇する傾向が認められ、24 時間後では $2^0 \sim 2^2$ で、1 週間後では $2^4 \sim 2^5$ の値が得られたと報告した。

このように、歯肉に抗原を接種した諸家の報告の有効性を認め、著者は LPS をラット歯肉に接種することにより、Roitt ら (1980)¹⁾ の分類の“初発期病変”において重要なファクターである歯肉の補体の動向を検索し

た。

補体は血清中に含まれる20種類以上の蛋白質によって構成され、C1 から C9 までの成分や、第2経路にかかわる因子および種々の不活性化物質などが含まれ、外因性、内因性の異物に対する生体防御反応に重要な役割を演じている。補体は内毒素、細菌性プロテアーゼ、プロテインAおよび抗原抗体複合体などによって活性化され、細胞溶解反応、溶菌反応などの抗原特異的免疫反応が知られている。

一方、補体は活性化の過程で多種多様の炎症性メディエーターが生成され、炎症を喚起すると同時に白血球の走化性を高め食菌作用を促進して生体防御反応に多面的に参画している。また、実験的に栄養状態を悪くした実験動物では抗原刺激に対する免疫応答が低下するにもかかわらず補体の力価低下がみられないこと²²⁾より、補体が生体の防御反応としてきわめて基礎的な役割を演じていることが示唆される。

口腔領域における補体の役割は歯周疾患の病因との関連性が注目され、歯周疾患の初期病変において、デンタルプラークや口腔内細菌はヒトの血清中の補体を消費することが知られ重要視されている。口腔細菌種と補体の活性化に関して、Okuda ら (1980)²³⁾、Hawley ら (1978)²⁴⁾、Nygren ら (1979)²⁵⁾、Tsai ら (1977)²⁶⁾ は、*in vivo* において *Actinomyces viscosus*, *Streptococcus mutans*, *S. sanguis*, *Bacteroides oralis*, *Veillonella parvula*, *Propionibacterium acnes*, *B. melanogenicus*, *Corynebacterium parvum* などがヒトの血清中の補体を活性化することを報告している。

また、歯肉溝液は質的に血清と変わらず、炎症性歯肉組織には補体成分が存在し、歯周病がおこる所に補体活性因子の相手となる補体が存在する²⁷⁻³⁰⁾。

補体の活性化が健康な歯周組織での歯肉炎の誘発について、Kahnberg ら (1976)³¹⁾、(1977)³²⁾、Attström ら (1974)³³⁾、Wennström ら (1980)³⁴⁾ は、補体の作用を除いたイヌで、プラークに対する歯肉の応答を検討し、歯肉組織の白血球の集積は補体系に依存していることを証明している。また、ヒト歯肉において、歯周局所で補体の活性化が起きていることは明らかで、補体活性化は歯周疾患の程度とよく相関しているという報告も見受けられる。

補体の活性化には、古典経路と第2経路とがあり、慢性歯周炎のヒト歯周局所においては、両経路を介して補体の活性化が行われている。歯周病患者の歯肉溝液には C3, IgG, IgM, IgA が高濃度で存在し、歯肉縁下プラ

ーク中の微生物は、免疫グロブリンおよび補体 (C3)、あるいはその両者に覆われている³⁵⁾。これらの補体成分を検索した報告は数多くある。Attström ら (1975)³⁶⁾、Niekrash ら (1983)³⁷⁾ は、C5 は健康歯肉には見られず炎症歯肉に見られ、さらに、C3 と C4 について慢性炎症の患者は健康人より多く、C3 賦活体のB因子も転換された形 (Bb) で存在していると報告している。Schenkein ら (1977)³⁸⁾、Clagett ら (1978)³⁹⁾ は、C3 が転換されて C3b が認められることを明らかにすると同時にB因子の開裂も確認している。

このように、補体成分のプロフィールを見ると、慢性炎の場合は、両経路を介しての補体の活性化が行われていることが証明されたが、著者の実験から LPS 接種後1時間で IgG, IgM, IgA はわずかに増加が認められたが、補体が急激に増加する1~3時間で LPS に対する抗体が産生されたとは考えられず、補体の活性化は第2経路を介したものと考えられた。また、補体の動態の検索に C3 を指標として、増減を検討した報告は数多く見受けられるが、供給としての C3、消費としての C3c を測定することは多彩な生物活性をもつ C3a, C3b を間接的に測定可能となり、C3 活性の指標としての C3c 測定は最も重要なことと考えられる。

著者は Clagett ら (1978)³⁹⁾ の PBS 抽出法に従い、歯肉に LPS を接種した歯肉抽出液からの補体 (C3, C3c) を経時的に測定した。

LPS 接種後 C3 は3時間後にピークに達したのに対し、C3c は1時間後に急激に増加して、正常値の約3.8倍となり C3 より C3c が先行した。これは LPS の直接的な作用により局所の補体は第2経路を介して急激に開裂が促進されていることを示唆している。また、この時期の C3c の大幅な増加は、補体の開裂の過程でアナフィラトキシンの C3a の放出が考えられ、これによる血管透過性が増大し、歯肉抽出液中の IgG, IgM, IgA のわずかな一過性の増加はこれらに起因したものと考えられる。また、この時期の補体は免疫グロブリンの増加の比率より高く、血管透過性の増大以外の要因によることが示唆される。これらの C3 は局所で単核球やマクロファージにより、全身的には肝実質細胞から供給され、消費の面では活性化により開裂が進行して最終的には細網内皮系によりすみやかに処理される。

これらのことから、C3, C3c の増減を考える場合、供給と消費のバランスが非常に重要となる。

歯肉抽出液の C3c は接種後1時間を境に減少し、3時間後に C3 がピークとなることは、C3 を開裂させる

C3bBb の半減期が5分、C3bBbP の半減期が30分であることも考慮すると、C3 の開裂する速度より供給が相対的に上まわったことに起因したものと考えられた。

次に蛍光抗体法による C3 の局在性は接種後3時間で接種部位に近接する血管壁とその周囲に強度の特異蛍光が認められ、接種後6時間では、3時間後と比較して大幅に特異蛍光は減少した。金久ら (1982)¹⁸⁾ は、*Fusobacterium nucleatum* の LPS をラット歯肉に接種した場合、歯肉組織内の LPS は3～6時間で吸収、貪食、拡散などにより大幅に減少することを報告している。また、白石 (1978)¹⁷⁾ は、顎下リンパ節の PFC, RFC の動向および病理組織像からも接種した LPS の影響が数日間続くことを報告している。これらの報告と同様に歯肉抽出液の C3, C3c の接種後6時間における減少は、供給と消費のバランスにより生じた現象であると考えられると同時に、6時間を境にして、LPS の直接的な作用による補体の増減が終了したものと推察される。

しかし、その後24時間後にかけて C3, C3c とも再び増加し、歯肉抽出液の C3 が正常値の約1.8倍、同様に C3c が約3.7倍に増加した。このことは白石 (1978)¹⁷⁾ の報告から LPS 接種直後は急性炎症像を呈すが、2日後には、リンパ球、形質細胞を中心とする慢性炎症像が見られたことから、C3, C3c の増加は局所細胞の活性化などの生体反応系を介した間接作用に起因している可能性を示唆している。同時に C3c はH因子、I因子によって C3b を不活化して生じるので、補体第2経路活性化の抑制機構による C3c の増加の可能性も否定できない。Christine ら (1984)⁴⁰⁾ は、歯周病患者の歯肉溝液中の C3 と C3c を歯周治療前後で測定している。慢性炎症の状態である治療前より、炎症が消退していくにつれて C3c の割合が C3 と比べて著しく低下することを示し、C3 活性の低下を指摘しており歯肉抽出液中の C3c が72時間後に、ほぼ正常値に回復した著者の成績と一致している。

全血清中の C3, C3c 量について、谷ら (1977)⁴¹⁾ は、歯周病患者血清中の C3 量は対照群に比較して、その量の増減をほとんど認めなかった。佐藤ら (1984)⁴²⁾ は、カニクイザルの臼歯部に絹糸を結札し、実験的歯周炎を誘発し、血清中の C3c 量は実験開始後4週目および5週目に若干の増加が認められるにすぎなかったと報告している。

著者の LPS を接種したラット血清において、一過性の歯肉炎において全身の C3, C3c 量に変化を示さなかった。しかし、LPS を数回投与し、慢性炎症を持続させ

た場合、C3c に若干の変化が現われる可能性もあると考えられる。

次に、歯肉組織中の免疫グロブリンの量に関して、石津ら (1974)⁴³⁾ は、歯周病患者の歯肉組織中の IgG/アルブミン比、IgA/アルブミン比は血清の同比より高値で血清由来に加え歯肉で産生された IgG, IgA の存在を示唆している。金城ら (1980)⁴⁴⁾ は、歯周病患者の歯肉組織中の可溶性免疫複合物/アルブミン比は、血清の同比より高く、歯肉組織中に多量の可溶性免疫複合物の存在を示し、また、アルブミンを血清からの夾雑の指標とし補正して、補正可溶性免疫複合物/補正 IgG 比はポケットの深さと相関がみられたと報告している。しかし、著者の実験において、IgG, IgM, IgA は血管透過性の増大によると考えられる接種後1時間にわずかに増加した以外著変は認められなかった。これは LPS が速かに吸収、貪食、拡散などにより、局所に留まる時間が短く¹⁸⁾、また、実験が短期間で膨大なクローンの1つが増加しても全体の IgG, IgM, IgA 量にさほど影響をおよぼさなかったためと考えられる。

次に、血清における免疫グロブリン量に関し、谷ら (1977)⁴¹⁾ は歯周病患者血清中の IgG, IgM は対照群と比較し増加傾向にあることを示している。山崎ら (1982)⁴⁵⁾ は、ヒトに口腔清掃を3週間停止し、実験的歯肉炎を惹起させた場合、末梢血中抗体価を上昇させるほどの影響はおよぼさないが、抗体産生細胞数の上昇、リンパ球の細胞障害の上昇傾向を認めている。著者の実験において、血清中の IgG, IgM, IgA に変化は認められなかった。それはプラークのように複合抗原による抗原の持続性は少く、抗原の1回接種で抗原の絶体量も、IgG, IgM, IgA 量を左右するほどではなかったものと考えられる。しかし、カニクイザルの臼歯部に絹糸を結札し実験的歯肉炎を惹起させた場合に、血清免疫グロブリン量に有意な変動は認められなかったにもかかわらず、*B. melaninogenicus* ATCC-15930 株に対する血清抗体価は発症後著明に上昇したという報告⁴²⁾ も見受けられる。最近、歯周病患者における単一抗原に対する血清抗体価を測定した報告は数多い。渡辺ら (1980)⁴⁶⁾ は、*Fusobacterium nucleatum* の LPS に対する血清抗 LPS 抗体価と Plaque Index, Gingival Index, Pocket Depth との間に有意な相関が認められたと報告し、内藤ら (1983)⁴⁷⁾ は、*B. gingivalis* に対する血清抗体価と Pocket Depth, Bone Resorption の間に強い関連性を認め、渡辺ら (1984)⁴⁸⁾ は、*B. gingivalis* に対する血清抗体価は治療後有意に低下したと報告している。著者の

実験において、血清中の IgG, IgM, IgA 量に有意な変動は認められなかったが、*E. coli* LPS に対する抗体は、抗 LPS IgM の場合72時間でわずかに上昇し、168時間後で著明に増加している。一方、抗 LPS IgG においては、接種後72時間まで全く変化は認められなかったが、168時間後において著明に増加した。このように、*E. coli* LPS 1回接種による単一感染の一過性の歯肉炎において全体の IgG, IgM, IgA 量に変化は認められなかったものの、抗 LPS IgG, 抗 LPS IgM は著明な増加を示した。これは諸家の報告と一致する成績である。

LPS はその生物学的活性、免疫学的活性により、歯周組織病変に様々な影響を与え、歯周疾患の病因の一つとして重要な意味を持っている。また歯周疾患における補体活性化の過程は多因子性であり、歯垢の直接的作用と歯周組織における mediator との連鎖的相互作用、供給と消費のバランス、活性化因子、制御因子の存在や作用時間、半減期などが様々に関連している。初期病変期において、抗原の組織内への侵入により、局所において補体は第2経路を通じて急激に活性化され、抗原の直接作用と、細胞などを介する間接作用により二相性の増減を示した。しかし、循環系を介した血清において補体は何ら変化は見られず、抗 LPS 免疫グロブリンのみに72～168時間後に変化が認められた。しかし、実際のヒト歯周炎において複合抗原による持続的侵襲が考えられ、生体は一次抗原に対する免疫応答と、さらに、複合抗原に対する免疫応答と、それに関与する体液性、細胞性因子を考慮すると複雑な反応系が山積しており、今後の問題として解明を切望したい。

結 論

内毒素 (LPS) は多彩な生物学的活性を有しており、特に歯周疾患の初期病変における補体の活性化は重要な役割である。著者はラット歯肉に LPS を接種し、歯肉および血清における C3, C3c, IgG, IgM, IgA, 血清における抗 LPS IgG, 抗 LPS IgM, 補体価ならびに歯肉組織の C3 の局在の経時的変動を検索し、次のような結果を得た。

1. LPS 接種後の蛍光抗体法による歯肉組織の C3 の

局在は、接種後3時間で接種部位に近接した血管壁とその周囲に強度の特異蛍光が認められ、さらに、接種後6時間で特異蛍光は大幅に減少した。

2. 歯肉抽出液における C3 は3時間後に正常値の約3.8倍、6時間後に約1.2倍、24時間後に約1.8倍となり、168時間後にほぼ正常値となった。

3. 血清において C3 に著変は認められなかった。

4. 歯肉抽出液における C3c は1時間後に正常値の約3.7倍、6時間後に約1.8倍、24時間後に約3.4倍となり、72時間後にほぼ正常値となり二相性の増減を示した。

5. 血清において C3c に著変は認められなかった。

6. 血清補体価に著変は認められなかった。

7. 歯肉抽出液における免疫グロブリンは、1時間後に IgG は1.4倍、IgM は1.2倍、IgA は1.1倍と正常値よりわずかな増加が認められたが、3～6時間でほぼ正常値となった。

8. 血清において全 IgG, IgM, IgA に著変は認められなかった。

9. 血清における抗 LPS 免疫グロブリンは抗 LPS IgG では接種後72時間まで著変は認められず、168時間後において明らかな増加が認められた。抗 LPS IgM では接種後72時間でわずかに増加し、168時間で明らかな増加が認められた。

稿を終るにあたり、終始懇篤な御指導と御校閲を賜った保存学第2講座山本博武教授、口腔細菌学内山長司教授に深甚なる謝意を表わすとともに、種々の御指導と助言を賜った口腔細菌学井上博雅講師に深く感謝致します。また本研究に対し、終始懇切なる御教示、御助力を賜った保存学第2講座および口腔細菌学講座の皆様に感謝の意を捧げます。

本論文の要旨の一部は、昭和61年5月25日第46回九州歯科学会総会、昭和61年11月20日第29回秋季日本歯周病学会総会、昭和62年5月23日第47回九州歯科学会総会において発表した。

引 用 文 献

- 1) Roitt, I.M. and Lehner, T. : *Immunology of oral diseases* 1st ed., Blackwell Scientific Pub., London, 1980.

- 2) Patters, M.R., Harvey, A.S. and Arthur, W. : A method for detection of complement cleavage in gingival fluid. *J. Dent. Res.* 58 : 1620—1624, 1979.
- 3) 松原成年・井上博雅・芳賀健輔・内山長司・山本博武 : 歯周炎の進行と補体活性化に関する研究. 第一報. 補体 (C3) 成分の測定法について. 九州歯会誌 40 : 836—844, 1986.
- 4) Nakane, P.K. : Preparation and standardization of enzyme-labelled conjugates. In : *Immunoassays in the clinical laboratory* (ed. by Nakamura, R.M., Dito, W.R. and Tucker, E.S.) Alan R. Liss Inc., New York, 1979, 81—96.
- 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. Immun.* 31 : 182—192, 1981.
- 6) 市原清志・宮井 潔 : データ処理. 酵素免疫測定法 第2版 (石川榮治・他編) 医学書院, 東京, 1982, 153—164.
- 7) Løe, H., Theilade, E. and Jensen, S.B. : Experimental gingivitis in man. *J. Periodontol.* 36 : 177—187, 1965.
- 8) Irving, J.T., Newman, M.G., Socransky, S.S. and Heeley, J.D. : Histological changes in experimental periodontal disease in rats monoinfected with a Gram-negative organism. *Archs. Oral Biol.* 20 : 219—220, 1975.
- 9) Genco, R.J. and Slots, J. : Host responses in periodontal disease. *J. Dent. Res.* 63 : 441—451, 1984.
- 10) Nair, B.C., Mayberry, W.R., Chen, P.B., Levine, M.J. and Hausmann, E. : Biological effects of a purified lipopolysaccharide from *Bacteroides gingivalis*. *J. Periodont. Res.* 18 : 40—49, 1983.
- 11) 内田武志・秀衡泰子・穴村紳一・白根 忠・久保田みどり・岡本 英 : 歯石および歯垢の内毒素量. 広歯誌 11 : 224—230, 1980.
- 12) Shapiro, L., Lodato, F.M., Courant, P.R. and Stallard, R.E. : Endotoxin determinations in gingival inflammation. *J. Periodontol.* 43 : 591—596, 1972.
- 13) Simon, B.I., Goldman, H.M., Ruben, M.P., Broitman, S. and Baker, E. : The role of endotoxin in periodontal disease, IV. Bacteriologic analyses of human gingival exudate as related to the quantity of endotoxin and clinical degree of inflammation. *J. Periodontol.* 43 : 468—475, 1972.
- 14) Schwartz, J., Stinson, F.L. and Parker, R.B. : The passage of tritiated bacterial endotoxin across intact gingival crevicular epithelium. *J. Periodontol.* 43 : 270—276, 1972.
- 15) Alfano, M.C., Drummond, J.F. and Miller, S.A. : Localization of rate-limiting barrier to penetration of endotoxin through nonkeratinized oral mucosa *in vitro*. *J. Dent. Res.* 54 : 1143—1148, 1975.
- 16) 金久純也・堀 泰典・竹内 宏・谷 明・佐川寛典 : 辺縁性歯周炎の免疫病理学的研究. 第4報. その(1)蛍光抗体法によるヒト炎症歯肉の endotoxin の局在性について. 歯基礎誌 23 : 464—472, 1981.
- 17) 白石悦郎・内山長司 : 内毒素の歯肉接種時における生体反応に関する研究. 1報. *E. coli* の内毒素について. 九州歯会誌 31 : 401—411, 1978.
- 18) 金久純也・堀 泰典・竹内 宏・谷 明・佐川寛典 : 辺縁性歯周炎の免疫病理学的研究. 第4報. その(2) endotoxin 接種によるラット骨組織の反応. 歯基礎誌 24 : 738—745, 1982.
- 19) 金子信雄・松原 潔・弓削朝子・梅津 彰・椎木茂嗣・木本椿作・井口雅夫・片瀬秀士 : 細菌成分によるラット歯槽骨の吸収について. 歯基礎誌 26 : 594—604, 1984.
- 20) 磯村公明 : *Fusobacterium nucleatum* 由来の細菌性内毒素に関する研究. とくに歯周疾患との関連について.

日歯周誌 27:328—351, 1985.

- 21) 佐々木静治・茂木久和・蝦名徹哉・石川潤一・遠藤英昭・神山義信・堀内 博: 免疫および非免疫ラット歯周組織に対する *E. coli* endotoxin 注入後の変化. 日歯周誌 28:620—627, 1986.
- 22) Sakamoto, M., Ishii, S. and Shimada, K.: Level of complement activity and components C1, C4, C2 and C3 complement response to bacterial challenge in malnourished rats. *Infect. Immun.* 32:553—556, 1981.
- 23) Okuda, K. and Takazoe, I.: Activation of complement by dental plaque. *J. Periodontal Res.* 15:232—239, 1980.
- 24) Hawley, C.E. and Falker, W.A.: The acticomplementary activity of lipopolysaccharide preparations and sonicates from a strain of *Fusobacterium nucleatum*. *J. Periodontal Res.* 13:24—36, 1978.
- 25) Nygren, H., Dahlen, G. and Nilsson, L.A.: Human complement activation by lipopolysaccharides from *Bacteroides oralis*, *Fusobacterium nucleatum* and *Veillonella parvula*. *Infect. Immun.* 26:391—396, 1979.
- 26) Tsai, C.C., Nilsson, U.R., Mearthur, W.P. and Taichman, N.S.: Activation of the complement system by some gram-positive oral bacteria. *Arch. Oral Biol.* 22:309—312, 1977.
- 27) Courts, F.J., Boackle, R.J., Fuderberg, H.H. and Silverman, M.S.: Detection of functional complement components in gingival crevicular fluid from humans with periodontal disease. *J. Dent. Res.* 56:327—331, 1977.
- 28) Brandtzaeg, P.: Immunological comparison of protein in human gingival fluid, serum and saliva. *Archs. Oral Biol.* 10:795—801, 1965.
- 29) Shillitoe, E.A. and Lehner, T.: Immunoglobulins and complement in crevicular fluid, serum and saliva in man. *Archs. Oral Biol.* 17:241—247, 1972.
- 30) Platt, D., Crosby, R.G. and Dalbow, M.H.: Evidence for the presence of immunoglobulins and antibodies in inflamed periodontal tissues. *J. Periodontol.* 41:215—222, 1970.
- 31) Kahnberg, K.E., Lindhe, J. and Attström, R.: The role of complement in initial gingivitis. I. The effect of de complementation by cobra venom factor. *J. Periodontal Res.* 11:269—278, 1976.
- 32) Kahnberg, K.E., Lindhe, J. and Attström, R.: The effect of de complementation by carrageenan on experimental initial gingivitis in hyperimmune dogs. *J. Periodontal Res.* 12:479—490, 1977.
- 33) Attström, R. and Larsson, U.: Effect of de complementation by carrageenan on the migration of neutrophils and monocytes into dog gingival crevices. *J. Periodontal Res.* 9:165—175, 1974.
- 34) Wennström, J., Heiji, L., Lindhe, J. and Socransky, S.: Migration of gingival leukocytes mediated by plaque bacteria. *J. Periodontal Res.* 15:363—372, 1980.
- 35) Nisengard, R. and Jarrett, C.: Coating of subgingival bacteria with immunoglobulin and complement. *J. Periodontol.* 47:518—521, 1976.
- 36) Attström, R., Laurel, A.B., Lahsson, V. and Sjöholm, A.: Complement factors in gingival crevice material from healthy and inflamed gingiva in humans. *J. Periodont. Res.* 10:19—27, 1975.
- 37) Niekrash, C.E. and Patters, M.R.: Simultaneous assessment of C3, C4 and Factor B cleavage in single gingival fluid samples. *J. Dent. Res.* 62 suppl.:939, 1983.
- 38) Schenkein, H.A. and Genco, R.J.: Gingival fluid and serum in periodontal diseases II. Evi-

- dence for cleavage of complement components C3, C3 proactivator (Factor B) and C4 in gingival fluid. *J. Periodontol.* 48:778—784, 1977.
- 39) Clagett, J.A. and Page, R.C.: Insoluble immune complexa and chronic periodontal diseases in man and the dog. *Arch. Oral Biol.* 23:153—165, 1978.
- 40) Christine, E., Mark, R.P. and Niklaus, P.L.: The relationship of complement cleavage in gingival fluid periodontal diseases. *J. Periodontal Res.* 19:622—627, 1984.
- 41) 谷 明・森 章一・日高 慧・竹下四郎・宮野 哲・佐川寛典・上田雅俊・依藤 正・宮嶋富士夫: 歯周疾患患者血清の免疫学的研究. 1 免疫グロブリン量および補体量について. 日歯周誌 19:47—52, 1977.
- 42) 佐藤豊雄・下島孝祐・藤橋 弘・楠 公伝・平松正彦・丸本淑子・池田克己: サル実験的歯周炎における免疫血清学的検討. 城歯大紀要 13:93—102, 1984.
- 43) 石津 勉: 歯周疾患に罹患したヒト歯肉組織中の各種免疫グロブリン (IgG, IgM, IgA) の測定. 口病誌 41:348—359, 1974.
- 44) 金城 寛: 歯肉組織中の可溶性免疫複合物の定量. 日歯周誌 22:1—10, 1980.
- 45) 山崎和久・苦江弘正・渡辺富栄・沢田 純・原 耕二: ヒト実験的歯周炎における末梢リンパ球の変動. 日歯周誌 24:427—435, 1982.
- 46) 渡辺 久: 歯周疾患患者血清中の抗 LPS (endotoxin) 抗体について. 日歯周誌 22:541—553, 1980.
- 47) 内藤祐子・内田克爾・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.
- 48) 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: 歯周治療後に見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.