ウサギにおける Sjögren 症候群様病変の 作成に関する実験的研究

浜 田 和 家

東京医科歯科大学歯学部第2口腔外科学教室（指導：伊藤秀夫教授）

（昭和49年2月10日受付）

Experimental Production of the Sjögren's Syndrome-like Changes on Rabbits

Kazuie Hamada

The Second Department of Oral Surgery, School of Dentistry,
Tokyo Medical and Dental University
(Director: Prof. Hideo Ito)

要旨：Sjögren 症候群の成り立ちを検討する目的で、ウサギを用いて同症候群様病変の作成に関する実験的研究を行なった。すなわち、正常ウサギおよびウシ血清アルブミンで過免疫状態にしたウサギを、同種ウサギの唾液腺および涙腺から抽出した細胞質膜系リポ蛋白で長期間免疫した。その結果、過免疫状態のウサギの血清に、抗唾液腺リポ蛋白抗体およびリウマチ因子などの検出、ならびに γ -グロブリン値の上昇などの免疫異常状態が出現した。また、組織学的には、唾液腺および涙腺に、細胞浸潤、腺組織の萎縮ないしは消失、小導管の拡張および線維の増加などの諸変化が観察された。しかし組織学的変化は全般的に弱く、定型的な Sjögren 症候群患者の唾液腺にみられる中等度以上の細胞浸潤、導管上皮の増殖および筋上皮島の形成などの所見は得られなかった。

結 言

Sjögren 症候群は乾燥性角結膜炎、口腔乾燥およびリウマチ性関節炎などを主要症状とし、涙腺および耳下腺をはじめとする多腺性の萎縮性変化が徐々に進行する慢性の疾患であるが、その原因については不明な点が多い。しかし患者の血清中には唾液腺に対する抗体¹⁾あるいは唾液腺導管上皮に対する特異抗体²⁾、およびリウマチ因子をはじめとする諸種の非臓器特異的抗体が検出され、また、 γ -グロブリンの増加がみられるなどの免疫異常状態が存在するところから、その成り立ちには自己免疫機構の介在が推測されている³⁻⁶⁾。したがって、この方面からの解明を意図したいくつ

の実験的研究が試みられているが、いずれも十分な結果が得られていないようである⁷⁻¹⁶⁾。

そこで著者は報告されている従来の実験方法を検討した結果、ウサギを用いて、その唾液腺および涙腺から抽出した細胞質膜系リポ蛋白 (LP) を抗原とした実験的研究を行ない、免疫学的にも、また、唾液腺の組織学的変化からも、人の Sjögren 症候群に類似した所見が得られたので、その結果を報告する。

実 験 方 法

1. 実験動物

実験動物として雌のウサギ71匹を使用し、これ

を第 1, 第 2 および第 3 の 3 群に分けて, 以下の実験を行なった。

2. 抗原

抗原にはウシ血清アルブミン Fraction 5 (BSA) と, ウサギの耳下腺, 顎下腺および涙腺から抽出した細胞質膜系 LP の 2 種類を用いた。抽出された LP 抗原の蛋白量は Lowry 法¹⁷⁾により測定した。

a) 細胞質膜系 LP 抗原の抽出

Smith らの方法¹⁸⁾を改良した倉田らの変法¹⁹⁾に準じて抗原を抽出した。すなわち, ウサギの凍結唾液腺および涙腺組織を細切し, これに 2 倍量の Solution 1 (KCl 11.93 g/l, モノヨード酢酸 186 mg/l およびクエン酸ソーダ 5 g/l) を加え, Waring blender で約 5 分間さらに細切混合した。これをガーゼ 2, 4 および 8 枚でそれぞれ 1 回ずつ濾過し, 濾液に再び 10 倍量以上の Solution 1 を加え, teflon homogenizer で 15 分間 homogenize 後, 9,000 r.p.m. で 30 分間遠沈した。この沈渣に Solution 2 (KCl 74.5 g/l, モノヨード酢酸 186 mg/l クエン酸ソーダ 10 g/l を HCl で pH 4.7 にした) を 10 倍量以上加え, teflon homogenizer で 15 分間 homogenize 後, 9,000 r.p.m. で 30 分間遠沈した。この沈渣に再び Solution 2 を加えての操作を 7 回以上行ない, 遠心上清が Orcinol による RNA 反応および TCA による蛋白反応がいずれも陰性であることを確かめた。上記の全操作は 0 ~ 4 °C の冷室で行なった。

得られた沈渣は細胞質膜系 LP で, これを desiccator で乾燥後, -18°C に保存し, 1 ~ 2 カ月の間に抗原として実験に用いた。

b) Sodium desoxycholate 可溶抗原の抽出

LP 抗原 100 mg を 0.2% Sodium desoxycholate (DOC) 溶液 10 ml に入れ, teflon homogenizer で 15 分間 homogenize 後, 冷室内で stirrer により 12 時間以上攪拌し, teflon homogenizer でさらに 15 分間 homogenize 後, 9,000 r.p.m. で 10 分間遠沈した。この上清に 5 倍量以上の冷アセトンを加え, -18°C, 24 時間冷却すると乳白色の浮遊物を生じた。これを 3,000 r.p.m. で 15 分間遠沈

し, この沈渣を 10 ml の生理的食塩水に入れ, 9,000 r.p.m. で 10 分間遠沈し, 得られた上清を DOC 可溶区分 (LP-sol) とした。

3. 感作方法

a) 第 1 群

ウサギ 40 匹を使用し, 最初に BSA による感作を行なった。すなわち, 3% BSA 加生理的食塩水 9 に対し, Freund の不完全 adjuvant (流動パラフィン 85%, Arlacel A 15%) を 1 の割合に加えてよく振盪したのち, 超音波発生装置を用いて水冷下で数分間処置し, 水中油滴の懸濁液とした^{20,21)}。これをウサギの固有背筋内に, 2 週間に 1 回の割合で, BSA 100 mg ずつを注射した。

BSA 感作 100 日後から, これに加えて, 細胞質膜系 LP 抗原の注射を行なった。すなわち, 耳下腺 LP 20 mg, 顎下腺 LP 20 mg および涙腺 LP 10 mg (いずれも乾燥重量) に 1 ml の生理的食塩水を加えて十分 homogenize 後, 同量の Freund の完全 adjuvant (流動パラフィン 8.5 ml, Arlacel A 1.5 ml, BCG 10 mg) と混合し, 油中水滴とした。これを 150 日までは 2 週間に 1 回, それ以後からは 4 週間に 1 回の割合で, 1 カ所に 0.1 ml ずつ合計 1 ml を皮下注射した。注射の部位は足蹠, 背部, 頸部および腹部等である。

b) 第 2 群

ウサギ 8 匹を使用し, 第 1 群に記載した LP 抗原のみによる免疫を行なった。

c) 第 3 群

対照群で, ウサギ 23 匹を使用し, 19 匹には BSA 免疫のみを行ない, また, 別の 4 匹には生理的食塩水と Freund の完全 adjuvant の混合物を投与した。

なお, BSA 感作 100 日後における BSA 抗原に対する沈降性抗体および凝集性抗体はつぎのようであった。

イ) 沈降性抗体は第 1 群および第 3 群とも寒天内二重拡散法で, 抗原量 1 mg/ml を用い, 最高 256 倍を示した。

ロ) 凝集性抗体はタンニン酸処理赤血球凝集法で, 抗原量 500 μ g/ml, タンニン酸 20,000 倍を用い

第1群では最高 2^{17} 倍, 第3群では最高 2^{18} 倍を示した。

4. 免疫学的検索

a) 抗唾液腺抗体の検索

イ) 沈降性抗体の証明

Ouchterlony 法²²⁾による寒天内拡散法および毛細管法²³⁾によって行なった。Ouchterlony 法では乾燥 LP 10 mg を0.2% DOC 1 ml で十分攪拌した LP 抗原および LP sol (1 mg/ml) 抗原を用いた。また、毛細管法では LP Sol 抗原を用いた。

被検血清は原液を用い、室温湿状態で3~4日間反応させた。

ロ) 凝集性抗体の証明

Stavitsky 法²⁴⁾によるタンニン酸処理赤血球凝集反応を行なった。すなわち、調整されたタンニン酸処理赤血球浮遊液1 ml に PBS (pH 6.4) 4 ml と抗原液1 ml (LP Sol 500~250 μ g/ml) を加え、37°C で10分間 incubate 後、1,500 r.p.m. で10分間遠沈した。この沈渣に $1/100$ 希釈ウサギ血清2 ml を加え、1,500 r.p.m. で10分間遠沈後、1 ml 同希釈ウサギ血清に浮遊させた。この感作赤血球0.025 ml に被検血清0.25 ml を加え、室温下で12時間反応させた。判定は16倍以上を陽性とした。

なお、被検血清希釈には $1/100$ 希釈ウサギ血清を使用した。また、血清は56°C で30分間非動化後、等量の packed sheep red cell を加え、37°C で10分間 incubate し吸収した。

b) 血清蛋白の検索

血清蛋白は cellulose acetate 膜電気泳動法²⁵⁾により行なった。すなわち、acetate 膜は、oxid 製で長さ48 mm, 幅10 mm のものを用いた。緩衝液には veronal buffer (pH 8.6, $\mu=0.06$) を用い、氷冷下で、膜幅10 mm につき0.5 mA 定電流で40分間通電した。0.4% Ponceau 3R で2分間染色後、1%酢酸で2分ごとに4回脱色した。泳動膜は自然乾燥させ、測定時に decaline で透明にし、densitometer で500 μ の filter, 0.5×5 の slit を用い測定した。血清蛋白の測定

には日立製の蛋白計を用いた。

c) リウマチ因子の検出

イ) Waaler-Rose 試験

Waaler-Rose 試験は Heller の変法^{26,27)}によって行なった。すなわち、1%ヒツジ赤血球浮遊液0.5 ml に等量の抗ヒツジ赤血球ウサギ血清を加え、37°C で2時間 incubate 後、冷室に12時間放置して、凝集素価を定め、さらに、これを4倍希釈して subagglutinating dosis とした。この4倍希釈血清0.5 ml に等量の1%ヒツジ赤血球浮遊液を加え、37°C で30分間 incubate 後、2,500 r.p.m. で5分間遠沈し、PBS (pH 7.2) で1回洗滌後、1%浮遊液とした。この感作ヒツジ赤血球浮遊液0.5 ml に等量の被検ウサギ血清を加え、37°C で2時間 incubate 後、12時間冷室に放置した。判定は16倍以上を陽性とした。

なお、ウサギ血清は56°C で30分間 incubate して非動化し、これに $1/5 \sim 1/10$ 量の packed sheep red cell を加えて、37°C で3時間 incubate 後、12時間冷室に放置して吸収した。吸収不十分な血清についてはさらにこの操作を数回行なった。

ロ) Heller の Fr. II 法^{28,29)}

ヒツジ赤血球を PBS で3回洗滌後、PBS で3倍に希釈した。この1 ml に同量の60,000倍タンニン酸溶液を加え、37°C で10分間振盪しながら incubate 後、1,500 r.p.m. で10分間遠沈した。これを PBS で1回洗滌後、また PBS を加えて合計1 ml とした。このタンニン酸処理赤血球浮遊液1 ml に対し aggregate したウサギ IgG 1.25 mg/ml を含む溶液を2の割合に加え、37°C で30分間 incubate 後、1,500 r.p.m. で10分間遠沈した。この感作赤血球に5倍量のウサギ血清加 PBS (56°C で30分間 incubate 後、ヒツジ赤血球で吸収した正常ウサギ血清を PBS で500倍希釈したもの)を加えて1回洗滌後、上記のウサギの血清加 PBS で0.25%感作赤血球浮遊液となるように希釈した。この感作赤血球浮遊液0.5 ml に同量の被検血清を加えて攪拌し、冷室に12時間放置した。判定は16倍以上を陽性とした。

なお、ウサギ IgG は70°C で10分間 incubate

し, aggregated IgG とした。また, 緩衝液は pH 8.0 の PBS を用いた。被検ウサギ血清についての吸収は Waaler-Rose 試験の場合と同様の操作で行なった。

ハ) 抗ヒトラテックス結合試験^{27,30)}

被検ウサギ血清を 56°C で 30 分間 incubate して非動化し, Hyland 社製の RA test 試薬を用いて行なった。

ブ) 赤血球の直接抗グロブリン試験 (Coombs 試験^{31,32)})

被検ウサギ赤血球の 2% 浮遊液を作り, その 2 滴に十分量の生理的食塩水を加え, 2,500 r.p.m. で 5 分間遠沈し, この操作を 3 回繰り返した。上清を捨て Coombs 血清 2 滴を加え, よく混和してから 1,000 r.p.m. で 1 分間遠沈後判定した。Coombs 血清は数種のウサギ赤血球で十分吸収したものをを用いた。

5. 組織学的検索

第 1 および第 2 群については LP 抗原による免疫を開始してから, 約 50, 100, 150, 200 および 250 日以上の時点の数匹のウサギについて, 耳下腺, 顎下腺 および 涙腺の組織学的検索を行なった。また, 第 3 群については 250 日以上のものについて検索した。固定は 10% formalin 固定, 染色は hematoxylin-eosin, PAS, mucicarmine および van-Gieson 染色である。

実験結果

I 免疫学的検査結果

ア) 抗唾液腺抗体

イ) 沈降性抗体

第 1 群: LP 抗原による免疫を開始してから 125 日 (BSA 感作 225 日) 以上を経過した 9 匹について, LP 抗原および LP-sol 抗原を用いて (Ouchterlony) 法を行なったが, 沈降線は全例に認められなかった。しかし, 毛細管法を行なったところ, 耳下腺 LP-sol 抗原では全例に, 顎下腺 LP-sol 抗原では 9 匹中 8 匹 (88.9%) に, それぞれ沈降線が認められた (表 1)。

第 2 群: LP 抗原による免疫を開始してから 100

Tab. 1 Agglutination titers and precipitation in 1st group

Rabbit No	Agglutination		Precipitation	
	PG	SMG	PG	SMG
25	2 ⁵	2 ⁶	-(+)	-(+)
26	2 ⁷	2 ⁴	-(+)	-(+)
29	2 ⁷	2 ⁷	-(+)	-(+)
30	—	2 ⁶	-(+)	-(+)
31	2 ⁶	2 ⁵	-(+)	-(+)
32	2 ⁷	2 ⁶	-(+)	-(+)
38	2 ⁶	2 ⁶	-(+)	-(+)
44	2 ⁸	2 ⁷	-(+)	-(+)
56	2 ⁶	2 ⁷	-(+)	-(+)

PG: parotid gland

SMG: submandibular gland

—: Ouchterlony method

(-), (+): capillary method

Tab. 2 Agglutination titers and precipitation in 2nd group

Rabbit No	Agglutination		Precipitation	
	PG	SMG	PG	SMG
16	2 ⁸	2 ¹¹	-(+)	+(+)
19	2 ⁵	2 ⁸	+(+)	+(+)
20	2 ⁸	2 ⁷	-(+)	-(+)
21	2 ⁸	2 ⁷	+(+)	-(+)
22	2 ⁷	2 ⁶	+(+)	-(+)
23	2 ⁷	2 ⁷	-(+)	-(+)

PG: parotid gland

SMG: submandibular gland

—, +: Ouchterlony method

(-), (+): capillary method

日後のウサギの一部に, 耳下腺および顎下腺 LP 抗原に対する沈降性抗体が認められた。その後陽性例が増加し, 最終実験日までの 6 匹中, (Ouchterlony) 法では耳下腺 LP 抗原で 3 匹 (50%), 顎下腺 LP 抗原で 2 匹 (33.3%) に, それぞれ沈降線が認められた。また, 毛細管法では, 耳下腺 LP-sol 抗原および顎下腺 LP-sol 抗原でそれぞれ 5 匹 (83.3%) に沈降線が認められた (表 2 および図 1)。なお, Ouchterlony 法と毛細管法のいずれも陰性は耳下腺 LP 抗原で 1 匹 (No. 16),

Fig. 1 Precipitin line against parotid LP (2nd group: No. 19)

顎下腺 LP 抗原で1匹 (No. 23) であった。また Ouchterlony 法で陰性、毛細管法で陽性は、耳下腺 LP 抗原で2匹、顎下腺 LP 抗原で3匹であった。

涙腺 LP および LP-sol 抗原では第1群および第2群とも全例が陰性であった。

ロ) 凝集性抗体

第1群および第2群のいずれにおいても、LP 抗原による免疫を開始してから50日後に凝集性抗体価の上昇がみられるようになり、100日後ではほとんどすべてのウサギが陽性となった。抗体価は125日まではわずかに上昇したが、それ以後はほとんど上昇がみられず、同程度の抗体価が維持されていた (表1および2)。第1群と第2群では、後者のほうにやや高い抗体価がみられた。また、耳下腺 LP と顎下腺 LP とでは大差がみられなかった。なお、涙腺 LP に対する抗体は全例が陰性であった。

b) 血清蛋白

第1群: LP 免疫50日 (BSA 感作150日) の時点で、約半数に γ -グロブリンの増加 (20%以上) がみられたが、A/G 比の低下はなかった。LP 免疫100日 (BSA 感作200日) の時点では、 γ -グロブリンの増加傾向は鈍化していたが、A/G 比の低下が約半数に認められた。また、アルブミンの減少と α - および β -グロブリンの増加の傾向がみられた。LP 免疫150日 (BSA 感作250日) の時点では、 γ -グロブリンは同程度で維持されていたが、

Tab. 3 Serum protein fraction in 1st group

Rabbit No	150 days				200 days			
	TP (g/dl)	AL	γ -G	A/G	TP (g/dl)	AL	γ -G	A/G
25	6.5	38%	18%	0.62	6.3	47%	24%	0.87
26	8.3	30%	17%	0.42				
29	6.9	35%	18%	0.54				
30	6.0	40%	20%	0.68	6.0	33%	21%	0.48
31	9.0	43%	33%	0.76	9.8	40%	28%	0.68
32	6.3	47%	25%	0.89				
38	7.3	59%	18%	1.53	7.1	65%	16%	1.82
44	6.3	49%	15%	0.97	6.1	50%	17%	1.00
56	9.0	56%	25%	1.27	7.6	41%	22%	0.70

TP: total protein

AL: albumin

γ -G: γ -globulin

A/G: A/G ratio

A/G 比の低下を示すものが増加し、9匹中7匹 (77.8%) にそれがみられた。また、すでに A/G 比が低下していたウサギではさらに下降する傾向がみられた (No. 29, 30および31)。LP 免疫200日 (BSA 感作300日) の時点では、 γ -グロブリンおよび A/G 比とも前時点とほぼ同様であった (表3)。

なお、No. 31, 44および56のウサギは LP 免疫150日の時点で、片側の耳下腺および顎下腺を摘除して組織学的検索に供し、その後50日以上生存していたウサギである。

第2群: 血清蛋白の著明な変動はみられなかった。

第3群: BSA 単独群では第1群に近い傾向がみられたが、Adjuvant 単独群では変動がみられなかった。

c) リウマチ因子

イ) Waaler-Rose 試験

第1群: Heller の変法に準じて行なった。Waaler-Rose 試験の結果は表4および図2のようである。すなわち、LP 免疫50日 (BSA 感作150日) では9匹中1匹のみが陽性 (32倍) であったが、LP 免疫100日 (BSA 感作200日) の時点では、9匹中6匹 (66.7%) が32倍以上の陽性であり、LP 免疫150日 (BSA 感作250日) の時点では全例が32倍から256倍の抗体価を示し、そのうちの4

Tab. 4 Waaler-Rose test in 1st group

Rabbit No	50 days	100 days	150 days	200 days
25	—	—	32×	32×
26	—	32×	64×	
29	—	—	128×	
30	—	—	64×	128×
31	—	32×	64×	256×
32	—	64×	64×	
38	—	32×	256×	256×
44	32×	256×	256×	128×
56	—	32×	64×	

Fig. 2 Waaler-Rose test in 1st group

Fig. 3 Waaler-Rose test in 2nd group

匹には前時点より抗体価の上昇がみられた。LP 免疫200日（BSA 感作300日）の時点では、5匹

中2匹には抗体価の上昇、1匹には低下がそれぞれみられた。

第2群：結果は図3に示すようで、LP 免疫50日の時点では、8匹中3匹が陽性（16倍から32倍）であり、LP 免疫100日の時点では、9匹中5匹（55.6%）に64倍から128倍の抗体価がみられ、また LP 免疫150日の時点では、8匹中4匹（50%）が64倍から 256倍の抗体価を示した。しかし別の4匹は両時点において陰性であり、明瞭な個体差がみられた。なお、LP 免疫200日の時点での抗体価は150日とほぼ同程度であった。

第3群：BSA 群中の2匹に最高32倍の抗体価がみられた以外はすべて陰性であった。

ロ) Heller の Fr II 法

第1群についてのみ行なった。その結果は表5

Tab. 5 Heller Fr. II test in 1st group

Rabbit No	150 days	200 days
25	32×	32×
26	32×	
29	16×	
30	64×	64×
31	64×	512×
38	16×	16×
44	16×	64×
56	128×	512×

Tab. 6 Rheumatoid factor in 1st group

Rabbit No	LFT	W-R
31	++	256×
36	+	64×
44	±	256×
56	±	64×
C2	±	—

LFT latex fixation test

W-R Waaler-Rose test

C2 3rd group

のようで、LP 免疫150日（BSP 感作250日）および LP 免疫200日（BSA 感作300日）では、Waaler-Rose 試験の結果とほぼ一致して、ウサギの aggregated IgG 感作赤血球に対する凝集性抗体

Tab. 7 Histological changes in 1st group

	Rabbit No	Cell infiltration			Ductal dilatation			Atrophy of glandular tissue		
Stage 1	23	P (-)	S (-)	L (-)	P (-)	S (-)	L (-)	P (-)	S (-)	L (-)
	27	P (-)	S (-)	L (-)	P (-)	S (-)	L (-)	P (-)	S (-)	L (-)
	28	P (-)	S (-)	L (-)	P (-)	S (-)	L (-)	P (-)	S (-)	L (-)
	41	P (-)	S (-)	L (-)	P (-)	S (+)	L (-)	P (-)	S (-)	L (-)
Stage 2	26	P (-)	S (-)	L (-)	P (-)	S (+)	L (-)	P (+)	S (+)	L (-)
	29	P (-)	S (±)	L (-)	P (-)	S (+)	L (-)	P (-)	S (+)	L (-)
	31	P (-)	S (-)		P (-)	S (+)		P (+)	S (+)	
	32	P (-)	S (-)	L (-)	P (-)	S (-)	L (-)	P (+)	S (-)	L (-)
	44	P (-)	S (±)		P (+)	S (-)		P (-)	S (+)	
	56	P (-)	S (-)		P (-)	S (+)		P (-)	S (-)	
Stage 3	25	P (-)	S (+)	L (+)	P (+)	S (+)	L (H)	P (-)	S (+)	L (H)
	30	P (+)	S (+)	L (±)	P (+)	S (+)	L (-)	P (+)	S (H)	L (+)
	31	P (+)	S (H)	L (-)	P (H)	S (H)	L (-)	P (H)	S (H)	L (-)
	38	P (-)	S (-)	L (+)	P (-)	S (-)	L (H)	P (-)	S (-)	L (H)
	44	P (+)	S (±)	L (±)	P (+)	S (+)	L (-)	P (+)	S (+)	L (+)
	56	P (-)	S (-)	L (-)	P (-)	S (+)	L (-)	P (-)	S (+)	L (-)

P : parotid gland

S : submandibular gland

L : lacrimal gland

の出現がみられた。

ハ) ラテックス結合試験

第1群についての結果は Table 6 のよう、LP 免疫150日 (BSA感作250日) 以上の10匹中1匹に強度陽性、1匹に陽性、2匹に偽陽性がみられ、6匹は陰性であった。

第2群では6匹のすべてが陰性であり、また第3群では生理的食塩水と Freund の完全 adjuvant の混合物投与の1匹のみが偽陽性であった。

ド) 赤血球の直接抗グロブリン試験 (Coombs 試験)

第1群の LP 免疫170日 (BSA 感作270日) の2匹 (22.2%) のウサギ (No. 30および31) が陽性であり、他の7匹は最後まで陰性であった。

第2群および第3群のウサギはすべて陰性であった。

II 組織学的所見

第1群

LP 抗原による免疫を開始してから100日 (BSA 感作200日) までを第1期、101日から200日 (BSA

感作300日) までを第2期、および201日から275日 (BSA 感作375日) までを第3期として観察した。結果の一覧は表7のようである。

第1期：耳下腺、顎下腺および涙腺ともに著明な変化はみられず、No. 41のウサギの顎下腺に極めて軽微な小導管の拡張像がみられるのみであった。

第2期：被検数6匹のうち、2匹の顎下腺の一部に軽度の細胞浸潤、また、4匹の顎下腺に小導管の拡張と導管上皮の扁平化、および腺房の萎縮など諸変化がみられ、腺房が消失した部分はエोजン好性の無構造の物質で占められていた。しかし、全体的には組織学的変化は微弱であった。

涙腺にはほとんど変化がみられず、また、耳下腺の変化も軽微であった。

第3期：顎下腺では全般的にやや進行した変化がみられた。すなわち、被検数6匹中の4匹 (No. 25, 30, 31および44) には単核細胞が主体と思われる軽度から中等度の細胞浸潤がかなり広範囲にわたって存在し、また5匹 (No. 25, 30, 31, 44

Fig. 4 Histological changes in submandibular gland (1st group: No. 31) PAS stain (×120)

Fig. 5 Higher magnification of fig. 4 PAS stain (×300)

Fig. 6 Histological changes in parotid gland (1st group: No. 31) PAS stain (×120)

および56) には小導管の拡張と導管上皮の扁平化および腺房の萎縮あるいは消失がみられた。とくに LP 免疫223日の1匹 (No. 31) では、それら

Fig. 7 Higher magnification of fig. 6 PAS stain (×300)

Fig. 8 Histological changes in lacrimal gland (1st group: No. 38) PAS stain (×120)

Fig. 9 Higher magnification of fig. 8 PAS stain (×300)

の変化がかなり著明であった。拡張した導管の中に PAS 陽性物質がみられるものがあつた。また、腺房が消失した部分にはエオジン好性無構造の物質あるいは線維性組織の増加などがみられた

(図4および5)。

耳下腺および涙腺にもほぼ同様の変化がみられたが、顎下腺に比べて軽微であり、またその範囲も小葉単位で限局的であった(図6, 7, 8および9)。

第2群

6匹中2匹(No. 16および23)の顎下腺に軽微な細胞浸潤、小導管の拡張および腺房の萎縮などの変化がみられ、また1匹(No. 19)の涙腺に軽微な細胞浸潤がみられたが、第1群に比べて変化ははるかに軽度であった。

第3群

7匹について観察したが、うち、BSA 単独群の一匹の耳下腺および顎下腺に極めて軽微な変化がみられるのみであった。

考 察

Sjögren 症候群は乾燥性角結膜炎および口腔乾燥と粘膜の萎縮を主要症状とし、しばしばリウマチ性関節炎を合併する慢性遷延性の疾患であるが、その経過中に結節性動脈周囲炎、多発性筋炎あるいは全身性エリテマトーデス等の発現をみることがあり、また、患者の血清に γ -グロブリンの増加、Coombs 試験陽性およびリウマチ因子、抗核抗体などの非臓器特異抗体の出現などがかなり高率にみられるところから、自己免疫の色彩が極めて濃いと考えられている。

唾液腺における主な組織学的変化はリンパ球を主体とした細胞浸潤、腺房の萎縮または消失、小導管の拡張、導管上皮の増殖および筋上皮島の形成などであるが、患者の血清中に唾液腺に対する沈降性抗体が証明されており¹⁾、また、唾液腺導管に対する抗体も蛍光抗体法によって証明されている²⁾。これらは一応臓器特異抗体と考えられているが、橋本氏病における抗甲状腺抗体のように明確でなく、また、唾液腺導管に対する抗体の存在意義についても問題があるようである^{33,34)}。

以上のように Sjögren 症候群は自己免疫機構の介在が強く推測されている疾患であり、その病態は次第に明らかにされてきているのであるが、そ

の成り立ちについてはまだ不明の点が少ない。したがってその解明を意図して本症候群状態を作成する実験的研究も少なからず試みられているが、満足されるような成果は得られていない。そこで著者は従来の実験方法を検討すると共に、本症候群患者にみられる異常免疫状態に注目して、BSA 感作によって過免疫状態としたウサギを同種の唾液腺および涙腺から抽出した細胞質膜系 LP 抗原で免疫し、従来の報告よりもかなり進んだ変化を観察することができたので、実験方法および実験結果について考察したい。

1. 実験方法に関して

Sjögren 症候群様病変の作成に関する実験的研究は主としてモルモット^{8,10,11,12,14)}、ウサギ^{8,9,13,15,16)}、ラット^{10,11)}あるいはネコ⁷⁾を用いて行なわれており、抗原としては同種の涙腺および唾液腺の抽出液を用いたものが多い。それらの結果をみると、組織学的変化としては、唾液腺に軽度の細胞浸潤と腺組織の崩壊を含む萎縮像がみられるにとどまっており、また免疫学的には感作ウサギの血清中に腺抽出液に対する沈降性抗体の出現がみられているが(Beutner ら⁹⁾および浅川¹⁵⁾)、それ以上の結果は報告されていない。また倉田ら¹⁴⁾は各種の動物の耳下腺および顎下腺から特異抗原性をもつと考えられる細胞質膜系 LP を抽出し、これを抗原として Freund の完全 adjuvant とともにモルモットに投与して、主として耳下腺に細胞浸潤を中心とした組織学的変化を観察したが、十分な変化とはいえないと述べている。

そこで著者は Sjögren 症候群の病態を検討した結果、この疾患は単に涙腺や唾液腺のみを反応の場とするものではなくて、むしろ免疫異常を伴った全身性の疾患であると考えられていることに注目して、まず、BSA を用いてウサギの遷延感作を行ない、その後、倉田らの方法にならって細胞質膜系 LP による免疫を併用する実験を行なった。BSA の感作は岡林らの流パラ懸濁法²⁰⁾に従ったが、この方法は一度に大量の BSA が投与できるし、また、2週間に1回の投与間隔で十分な免疫効果が得られるようである。また、投与部位

としては固有背筋を選んだが、1 回ごとに左右を交代することができるので、実験期間中に投与部位に異常反応はほとんどみられなかった。

北条³⁵⁾、岡林³⁶⁾および多田³⁷⁾らの遷延感作の実験によると、感作を開始してから100日を境として、リウマチ因子をはじめとする各種の非特異的自己抗体が出現し、免疫学的異常状態が生起されるといわれている。そこで著者は BSA 感作100日後から LP 抗原による免疫を開始した。免疫はウサギの耳下腺、顎下腺および涙腺から抽出した細胞質膜系 LP を混合して行なったが、これによって adjuvant の量を最小にとどめることができたと思われるし、また、1カ所あたりの投与抗原量2.5 mg/ml で、投与部位に異常は認められなかった。

なお、同種免疫に関する実験にはウサギは適さないという見解があり³⁷⁾、実際にウサギを使用した本症候群作成に関する実験では、必ずしも十分な組織学的変化を得るにいたっていないようである^{8,9,11,13,15,16)}。しかし本研究のように長期間にわたる遷延感作によって免疫学的異常状態を作成するにはウサギが最も適しているので、著者はウサギを使用して実験を行ない、上記のようにある程度の成果が得られた。しかし、この点についてはモルモットを使用した実験を追加し、これと対比させることも必要であると思われる。

2. 実験結果に関して

1) 血清学的結果について

倉田¹⁴⁾はモルモットを用いて同種唾液腺 LP 抗原の免疫を行ない、それに対する沈降性抗体の出現をみている。本実験の第2群はそれにならって行なわれたものであるが、LP 抗原の長期間免疫によって、実験数の過半数に、耳下腺 LP および顎下腺 LP に対する沈降性ならびに凝集性抗体の出現がみられた。しかし BSA の遷延感作に LP による免疫を併用した第1群では、耳下腺 LP および顎下腺 LP に対する凝集性抗体はほぼ全例に観察されたが、沈降性抗体は Ouchterlony 法では観察されず、毛細管法でのみ沈降線が出現した。

多田³²⁾は卵白アルブミンまたは BSA を用いて遷延感作したウサギと、未感作のウサギをそれぞれヒト γ -グロブリンで2週間免疫し、3者ともにヒト γ -グロブリンに対する沈降性抗体がほぼ同程度に産生されたが、凝集性抗体の産生は BSA 群(感作300日)が最も高く、未感作群、卵白アルブミン群(感作100日)の順に低いと報告している。著者の実験では、唾液腺 LP に対する凝集性抗体の出現は第1群および第2群ともほぼ全例にみられたが、抗体価は前者の方がやや低い傾向であった。また、沈降性抗体については、毛細管法でのみ両群に沈降線の出現をみたが、Ouchterlony 法では第1群の全例に沈降線が証明されなかった。このように、遷延感作が行なわれた動物では、同種唾液腺 LP 抗原に対する反応と、ヒト γ -グロブリンのような異種抗原に対する反応とは、抗体産生の面で多少異なるようである。この点については、遷延感作によって免疫学的異常状態が出現すると、異種抗原に対しては比較的容易に認識されるが、同種抗原のような抗原性の低いものに対しては識別能が低下しているので、それに対する抗体の産生も不十分となるのではないかと推測される。しかし、このことに関してはさらに多種類の異種抗原および同種他臓器特異抗原によって検討する必要があると思われる。

北条³⁵⁾は卵白アルブミンを用いた遷延感作の研究を行ない、ウサギの血清蛋白変動に関して次のように報告している。すなわち、 γ -グロブリンについては感作の50日から80日を頂点とする前期と、100以後の後期とに2相性の上昇がみられ、一方、アルブミンは初期に急激に減少するが、40日から50日頃に回復し、後期の γ -グロブリンの第2次上昇に一致して再び減少する。また、感作後しばらくの間は α - および β -グロブリンには著しい変動がみられないが、感作200日をすぎて γ -グロブリンの下降傾向とアルブミンの著明な減少がみられるようになると、 α - および β -グロブリンの増加が起こるようになる。著者の第1群では、LP 免疫50日(BSA 感作 150日)で、多数のウサギに20%以上の γ -グロブリンがみられ、その後

LP 免疫150日 (BSA 感作250日) まではその状態が維持されたが, LP 免疫200日 (BSA 感作300日) 以後ではむしろわずかながら下降の傾向がみられた。一方, アルブミンは LP 免疫100日 (BSA 感作200日) の時点で急激な下降がみられたが, LP 免疫200日 (BSA 感作300日) 以後ではその傾向が停止した。また, A/G 比は LP 免疫150日 (BSA 感作250日) および LP 免疫200日 (BSA 感作300日) で最も低い値であったが, この時期では逆に α - および β -グロブリンが増加していた。

以上のように, 第1群における血清蛋白の変動については, 多少の時間的なずれはあるにしても, 北条の知見とほぼ同様であり, また, 第3群の BSA 単独感作群でもこれに近い傾向がみられた。しかし, 第2群においては血清蛋白に著明な変動はみられないので, 本実験における血清蛋白の変動に関しては, LP 抗原による免疫の影響は少ないものと考えられる。

Abruzzo ら²⁹⁾はフォルマリン殺菌した *E. coli* および *B. subtilis* を抗原として, ウサギに長期間静注による感作を行ない, その血清中に感作ヒツジ赤血球凝集試験 (Waller-Rose 試験に相当) および aggregated ヒト γ -グロブリンと aggregated ウサギ γ -グロブリン (Heller Fr. II 法に相当) に反応するリウマチ因子様物質 (rheumatoid factor-like substance, RFLS) をみだし, また, 長期間免疫することにより RFLS の抗体価がさらに上昇することを示している。また, 北条³⁵⁾および多田³²⁾らは, これを Waller-Rose 試験およびラテックス結合試験などによって検討し, 感作の後期からリウマチ因子 (RF) の抗体価が上昇することを示している。著者の第1群の LP 抗原免疫150日 (BSA 感作250日) の時点では, Waller-Rose 試験で全例に32倍以上の抗体価がみられ, 第2群の同時期では半数の4匹に64倍以上の抗体価がみられたが, 他の4匹では最終実験日まで陰性であった。抗体価の上昇に関しては Abruzzo ら²⁹⁾が述べているように, 感作が長期間に及ぶほど抗体価の上昇がみられたが, そのピー

クは LP 免疫150日の時点で, それ以後では明らかな上昇をみたものはなく, むしろ低下する傾向がみられた。Heller の Fr. II 法で測定したウサギ IgG に対する RF については, Waller-Rose 試験とほぼ一致した抗体価の上昇がみられた。しかし, タンニン酸と, ウサギ aggregated IgG のより適正な濃度を用いれば, より高い抗体価が得られるように思われるので, このことについてはさらに検討していきたい。

ヒト IgG に対する凝集性については, 多田³²⁾がラテックススライド凝集法で, Abruzzo ら²⁹⁾が赤血球凝集反応で検討している。著者もヒト IgG 感作ラテックススライド凝集法によって検討したが, 第1群では10匹中2匹が陽性, 2匹が偽陽性であり, 第2群では全例が陰性であった。陽性および偽陽性のうちの3匹は Waller-Rose 試験では64倍以上, Heller の Fr. II 法でも64倍以上の抗体価を示したもので, ヒト RF とも関連性があるものと思われる。

卵白アルブミンを使用した遷延感作の実験においては, 80日頃から直接抗グロブリン試験の陽性化がみられるといわれている³²⁾。著者の第1群では, 2匹に直接抗グロブリン試験陽性がみられたが, いずれも Waller-Rose 試験, Heller の Fr. II 法で高い抗体価がみられたウサギであった。

以上のように, 本研究の特に第1群において, 同種唾液腺 LP 抗原に対する沈降性および凝集性抗体, ならびに RF などの非特異的自己抗体, さらに γ -グロブリンの増加などの血清蛋白異常など, いくつかの免疫異常状態が観察されたが, これは Sjögren 症候群患者の血清学的臨床検査結果にかなり類似しているように思われる。

2. 組織学的変化に関して

Sjögren 症候群患者の唾液腺 (小唾液腺を含む) にみられる組織学的変化として, 単核細胞を主体とした細胞浸潤, 腺房の萎縮ないしは消失, 小導管の不規則な拡張および線維成分の増加などが挙げられており, 進行した変化としては導管上皮の増殖および筋上皮島の形成などがみられるといわれている (石川ら³⁸⁾)。本症候群のモデル実験に

において、Maxwell⁷⁾、Waterhouse¹⁰⁾、Chan¹²⁾、Kurata ら¹⁴⁾、浅川¹⁵⁾および金子¹⁶⁾らが、涙腺または唾液腺に細胞浸潤と腺組織の崩壊壊死像等の組織学的変化がみられたと報告しているが、変化としては軽微であり、また、その発現部位もさまざまであって、十分な所見が得られたとはいえないようである。

著者の LP 抗原のみの免疫を行なった第 2 群では約 1 カ年後の 1 匹に涙腺に軽度の細胞浸潤がみられ、他の 1 匹の顎下腺に導管および末梢血管周囲性に軽度の細胞浸潤と小導管の軽度の拡張がみられたのみで、それ以上の変化は観察されなかった。しかし、BSA の遷延感作に LP 抗原の免疫を追加した第 1 群の 200 日以後の多数のウサギの耳下腺および涙腺では小葉単位に、また、顎下腺ではかなり広範囲に比較的著明な腺房の萎縮ないしは消失、小導管の拡張、導管上皮の扁平化およびその部分を中心とした軽度から中等度の細胞浸潤がみられた。拡張した導管内に PAS 陽性の無構造の物質がみられたが、これは PAS 消化試験陰性で、mucicarmine にも非可染性であった。なお、第 1 群の No. 31、44 および 56 の 3 匹においては、LP 免疫 150 日前後の時点の耳下腺および顎下腺には組織学的に著しい変化がみられなかったが、その後約 100 日を経過した時点での反対側の耳下腺および顎下腺には上記のようなかなり著明な組織学的変化が観察されているので、同一ウサギでも、免疫期間が長くなると組織学的変化も増強されるように思われる。また、唾液腺の組織学的変化が特に強く現れた No. 31 ウサギは、抗唾液腺 LP 抗体およびリウマチ因子の出現、抗グロブリン試験陽性、 γ -グロブリンの増加および A/G 比の低下などの免疫異常状態が顕著に現れていたもので、特に興味深い実験例であった。

このように本実験においては先人の報告よりも多少増強された組織学的変化を観察することができたが、これが唾液腺 LP 抗原による特異的反応であるか否かについては蛍光抗体法による検討を追加する必要があると思われる。

3. Sjögren 症候群との関係について

著者はウサギに Sjögren 症候群様病変を作成する目的で本実験を行なったが、その結果は上述のようで、特に BSA の遷延感作に、唾液腺および涙腺から抽出した細胞質膜系 LP の免疫を追加した第 1 群のウサギに、 γ -グロブリンの増量、同種の耳下腺および顎下腺 LP に対する沈降性ならびに凝集性抗体の出現、RF 陽性および直接抗グロブリン試験などの免疫異常が観察され、また、涙腺、耳下腺および顎下腺に、比較的軽度ではあったが、単核細胞を主体とした細胞浸潤、小導管の拡張、腺房の変性、萎縮あるいは消失などの組織学的諸変化を観察することができた。これらの所見は Sjögren 症候群患者についての臨床検査結果に類似しているため、その病変の進展にはこれらの免疫異常が重要な意味をもっているであろうと推測される。

しかし、本症候群患者の大多数は女性であり、年齢的には 40 歳以上の比較的高年齢層が多いが、20~30 歳代の患者も少なくないので、その成り立ちには女性ホルモンとの関係を考慮すべきであろうし、また、患者の家系には関節リウマチに罹患の病歴がある人が少なくないといわれているので、遺伝的な関係も無視できないように思われる。さらにまた、自己免疫的ともいえる本疾患の免疫異常状態がどのような因子によって誘発されるかが最も重要な課題であると思われるので、今後はこの実験的成果を基盤に、上記の諸因子を加えて研究を進めていきたい。

結 語

ウサギを 3 群に分け、第 1 群には BSA による遷延感作とウサギ涙腺および唾液腺 LP 抗原による免疫を行ない、第 2 群には LP 抗原のみによる免疫を行ない、また第 3 群に対照群として、BSA の遷延感作または Freund の adjuvant のみの免疫を行ない、特に第 1 群において次の結果を得た。

1. 同種ウサギ唾液腺 LP に対する沈降性および凝集性抗体の出現がみられた。
2. 遷延感作後期に γ -グロブリンの上昇および

A/G 比の著明な低下がみられた。

3. LP 免疫50日 (BSA 感作150日) から Waler-Rose 試験が陽性になるものがみられ, LP 免疫150日 (BSA 感作250日) 以後のすべてのウサギで同試験および Heller の Fr. II 法が陽性になり, また, 高い抗体価がえられた。

4. LP 免疫 170日 (BSA 感作270日) の2匹のウサギに赤血球の直接抗グロブリン試験が陽性になるもののみがれた。

5. LP 免疫200日 (BSA 感作300日) 以後のウサギに唾液腺および涙腺に腺組織の萎縮性変化, 軽度から中等度の細胞浸潤および線維の増加などの諸変化がみられた。

以上の免疫学的ならびに組織学的所見は人の Sjögren 症候群にみられる所見に類似するものであった。

謝 辞

稿を終わるにあたり, 終始, 御懇篤な御指導と御校閲を賜った当教室伊藤秀夫教授, ならびに御校閲を賜った口腔細菌学教室堀川高大教授, 第1口腔外科学教室上野正教授に深甚なる感謝の意を表します。また, 本研究に対し, 終始, 御懇切な御指導をいただいた口腔細菌学教室鷹森健志郎助教授, 本教室の榎本昭二講師, 藤林孝司博士および南雲正男博士, また, 御懇切な御教示を下された金沢大学医学部倉田自章教授, 千葉大学医学部多田富雄博士, 本学医学部付属病院中央検査部浅川英男博士, 口腔病理学教室小守昭助教授に感謝の意を表し, また, 本研究の遂行に当り特に御援助をいただいた第2口腔外科学教室員各位に心からの謝意を表します。

本論文の要旨の一部は, 昭和48年6月第27回日本口腔学会総会において発表した。

文 献

- 1) Jones, B. R.: Lacrimal and salivary precipitating antibodies in Sjögren's Syndrome, *The Lancet*, 11: 773, 1958.
- 2) Bertram, U. and Halberg, P.: A specific antibody against the epithelium of the salivary ducts in sera from patients with Sjögren's Syndrome, *Acta Allergol.*, 19: 458, 1964.
- 3) Bloch, K. J. et al.: Sjögren's Syndrome, *Medicine*, 44: 187, 1965.
- 4) Bloch, K. J. et al.: Sjögren's Syndrome; I Serologic reaction in patients with Sjögren's Syndrome with and without rheumatoid arthritis, *Arth. and Rheum.*, 3: 287, 1960.
- 5) Bunim, J. J. et al.: Clinical, pathologic and serologic studies in Sjögren's Syndrome, *Ann. Int. Med.*, 61: 509, 1964.
- 6) Cardell, B. S. and Gurling, K. J.: Observations of the pathology of Sjögren's Syndrome, *J. Path. Bact.*, 68: 137, 1954.
- 7) Maxwell, J. H.: Chronic lymphoepithelial sialadenopathy with sialodochiectasis, *Trans. Amer. Acad. Ophthalm. Otolaryng.*, 64: 225, 1960.
- 8) Bunim, J. J.: A broader spectrum of Sjögren's Syndrome and its pathogenetic implications, *Ann. Rheum. Dis.*, 20: 1, 1961.
- 9) Beutner, E. H. et al.: Serologic studies of rabbit antibodies to rabbit submaxillary glands, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 107: 486, 1961.
- 10) Waterhouse, J. P.: Focal adenitis in salivary and lacrimal glands, *Proc. Royal Soc. Med.*, 56: 911, 1963.
- 11) Bloch, K. J. and Bunim, J. J.: Sjögren's Syndrome and its relation to connective tissue diseases, *J. Chron. Dis.*, 16: 915, 1963.
- 12) Chan, W. C.: Experimental sialoadenitis in guinea-pigs, *J. Path. Bact.*, 88: 592, 1964.
- 13) Beutner, E. H. et al.: Studies on immune responses of rabbits to rabbit submaxillary antigens, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 118: 893, 1965.
- 14) Kurata, Y. et al.: Immunological studies of insoluble lipoproteins; II. On the salivary gland-characteristic antigens, *Int. Arch. Allergy*, 35: 392, 1969.
- 15) 浅川英男: Sjögren 症候群, *内科*, 25: 841, 1970.
- 16) 金子哲也: Sjögren 症候群における唾液腺病変と免疫異常の関係及び家兎による唾液腺病変作製実験, *リウマチ*, 11: 336, 1971.
- 17) Lowry, O. H. et al.: Protein measurement with the folin phenol reagent, *J. Biol. Chem.*, 193: 265, 1951.
- 18) Smith, J. T. et al.: Cellular lipoproteins, *Exp. Cell Res.*, 13: 96, 1957.
- 19) Kurata, Y. and Okada, S.: Immunological studies of insoluble Lipoproteins, *Int. Arch. Allergy*, 29: 495, 1962.
- 20) 岡林篤: 感作病概説: 実験的全身性ループスの示説, *最新医学*, 18: 506, 1963.

- 21) 桜林武成：“Adjuvant-超音波処理”による効果的な1感作法，アレルギー，8：86，1959.
- 22) Ouchterlony, Ö.: Antigen-antibody reaction in gels, *Acta Path. Microb. Scand.*, 32: 231, 1953.
- 23) 医科学研究所学友会：細菌学実習提要，東京，1970，丸善株式会社，246頁.
- 24) Stavitsky, A. B.: Micromethods for the study of proteins and antibodies, *J. Immunol.*, 72: 360, 1954.
- 25) 小川恕人：免疫学，アレルギー学実験法，東京，1971，文光堂，111頁.
- 26) Heller, G. et al.: A modification of the hemagglutination test for rheumatoid arthritis, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 72: 316, 1949.
- 27) 勝田保男ら：免疫学，アレルギー学実験法，東京，1971，文光堂，793頁.
- 28) Heller, G. et al.: The hemagglutination test for rheumatoid arthritis; II The influence of human plasma fraction II (gamma globulin) on the reaction, *J. Immunol.*, 72: 66, 1954.
- 29) Abruzzo, J. L. and Christian, C. L.: The induction of rheumatoid factor-like substance in rabbits, *J. Exp. Med.*, 114: 791, 1961.
- 30) Singer, J. M. et al.: The detection of anti-globulin factors utilizing pre-coated latex particles, *Arth. and Rheum.*, 8: 194, 1965.
- 31) 鈴木忠彦：獲得性溶血性貧血，日本血液学会雑誌，22: 384，1959.
- 32) 多田富雄：遷延感作ウサギにおける抗体産生の変貌，日新医学，50: 404，1963.
- 33) Whaley, K. et al.: Salivary duct autoantibody in Sjögren's Syndrome; Correlation with focal sialadenitis in the labial mucosa, *Clin. Exp. Immunol.*, 4: 273, 1969.
- 34) Anderson, L. G. et al.: Cellular-versus-humoral autoimmune responses to salivary gland in Sjögren's Syndrome, *Clin. Exp. Immunol.*, 13: 335, 1973.
- 35) 北条憲二：遷延感作と血清蛋白変動，アレルギー，10: 554，1961.
- 36) 岡林篤：感作，感染の免疫病理学的研究，日病会誌，51: 223，1962.
- 37) 大高裕一：自己免疫の病理，東京，1969，医学書院，70頁.
- 38) 石川悟朗，秋吉正豊：口腔病理学II，京都，1970，永末書店，897頁.