歯周病患者血清中の抗コラーゲン抗体について

穴 村 紳 一 内 田 武 志 白 根 忠

久保田みどり 中 西 恵 治 岡 本 莫

広島大学歯学部歯科保存学第2講座

(主任：岡本 莫教授)

(昭和54年9月10日受付)

Anticollagen Antibodies in Sera of Patients with Periodontal Disease

Shinichi ANAMURA, Takeshi UCHIDA, Tadashi SHIRANE,
Midori KUBOTA, Keiji NAKANISHI and Hiroshi OKAMOTO

Department of Endodontology and Periodontobogy
Hiroshima University School of Dentistry
(Director: Prof. Hiroshi OKAMOTO)

The purpose of this paper is to detect antibodies to collagen in sera of patients with periodontal disease by passive haemagglutination,

Human gingival acid soluble collagen and bovine skin acid soluble collagen were used as antigens.

Determination of anticollagen antibody titers in human sera was carried out on 10 clinical healthy subjects ranging from 23 to 27 years of age and in 57 patients with periodontal disease ranging from 16 to 69 years of age. The correlation between anti-collagen antibody titers and a few indices of periodontal disease was discussed to estimate antibody titers as an index of periodontal tissue destruction.

The following results were obtained.

1. Human gingival acid soluble collagen was found to have antigenicity.
2. Bovine skin acid soluble collagen was found to have antigenicity, too. And antiserum to bovine collagen had cross reaction to human gingival collagen.
3. Antibodies to human gingival collagen were not detected in any sera of 10 clinical healthy subjects, but in 6 sera of 57 patients. But no significant correlation was found between antibody titers and clinical indices, i. e. Gingival-Bone count, salivary leucocyte count and total hydroxyproline levels in sera.
4. Antibodies to bovine skin collagen were detected in 37 sera of 57 patients and in 4 sera of 10 clinical healthy subjects. But no significant correlation was found between antibody titers and clinical indices, i. e. Gingival-Bone count, salivary leucocyte count and total hydroxyproline levels in sera.

I. 緒 言

長い間コラーゲンには抗原性がないと信じられていた。1954年 Watson¹⁾により初めてコラーゲンの抗原

本論文の要旨は昭和53年10月第21回秋期日本歯周病学会(東京)において発表した。

性が証明されたが、その抗原性は低いと考えられている。その後いわゆる自己免疫という概念が普及するとともに、体蛋白の主な構成成分であるコラーゲンの抗原性についての研究²⁻⁶⁾が進められてきた。中でもリウマチ様関節炎を始めとする結合組織疾患をもつ患者の血清中には高い頻度で抗コラーゲン抗体が検出されるという Steffen など⁷⁻¹⁰⁾の報告は臨床家にとって大へん興味深

いものである。この抗体の意義については議論のあるところで、Steffen⁷⁾は抗コラーゲン抗体（自己抗体）が疾患（リウマチ様関節炎）の病因に大きな役割を果しているとして述べており、それに対し Michaeli ら¹⁰⁾は422名の肺気腫患者血清中の約70%に変性コラーゲンに対する抗体が存在し、16.5%に native コラーゲン（いずれもヒトコラーゲン）に対する抗体が存在することを示し、これらは肺結合組織破壊の結果生じた抗体であり、その存在を示すことは肺気腫の早期診断に役立つと考察している。先に著者ら¹¹⁾は、歯周病患者血清中にコラーゲンの分解産物であるヒドロキシプロリンが存在することを報告した。

以上のことから著者らは Michaeli ら¹⁰⁾の仮説に基づき、歯周病においても歯周組織の破壊に伴って血清中抗コラーゲン抗体が増加するのではないかと考え、歯周組織破壊の程度と血清中の抗コラーゲン抗体との関係を検討した。

II. 材料と方法

1. 検査対象

広島大学歯学部付属病院歯周病診療室を訪れた患者のうち、問診により歯周病及び歯肉炎以外には全身的に健康なことを確かめた16~69歳の男18名、女39名計57名を被験者とした。なお全身及び歯周組織の臨床的健康な歯学部学生23~27歳の男8名、女2名の計10名を対照とした。被験者の口腔内診査及びX線診査を行うと同時に、肘正中静脈より採血、血清を分離し、用時まで凍結保存した。

2. 抗原

歯周病の外科療法の際切除した歯肉を凍結保存し、Piez¹²⁾の方法を modify した Michaeli ら¹³⁾の方法に従って酸可溶性コラーゲンを抽出精製し、ヒト歯肉酸可溶性コラーゲン（ヒト歯肉 AS コラーゲン）とした。またウシ皮膚酸可溶性コラーゲン（ウシ皮膚 AS コラーゲン, Sigma）も対照抗原として利用した。

これらのコラーゲンの性状を知るため Apo-Ferritin, γ -Globulin, Albumin を標準試料とし、SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動法¹⁴⁾（8% ゲル）により蛋白を分離、パターンの検討をした。

3. 抗血清

抗コラーゲン血清は Michaeli ら¹³⁾の方法に従い家兎にヒト歯肉 AS コラーゲン、ウシ皮膚 AS コラーゲンをそれぞれ皮下注射し作製した。すなわち、0.05% 酢酸に

溶かした 5 mg/ml のコラーゲン溶液と等量のフロイント完全アジュバントを混ぜた 4 ml のエマルジョンを足趾、腰部の4カ所の皮下及び筋肉内へ2週間毎に4回、すなわち合計 40 mg のコラーゲンを注射した後、受身感作血球凝集反応で抗体の産生を確認し、全採血し血清を分離、抗血清を得た。この血清をさらに非働化し、メンヨウ血球で吸収したものを被験抗血清とした。歯周病患者より採血、分離した血清についても同様の処置を施した。

4. 抗体価の測定

Steffen ら¹⁵⁾の方法に準じて行った。すなわち、メンヨウ血球を pH 7.2 のリン酸緩衝食塩水（PBS）で洗浄後血球濃度を 2.5% とし、等量の 4 万倍希釈タンニン酸 PBS（pH 7.2）で 37°C 10 分間処理後さらに洗浄し、PBS（pH 7.2）に 2.5% 濃度で浮遊させた。これに等量のヒト AS コラーゲン、又はウシ AS コラーゲンの 0.01% PBS（pH 6.4）を加え 37°C で 30 分間感作後洗浄し、2.5% 感作血球浮遊液とした。感作血球の洗浄と血清の希釈には血球で吸収した正常ウサギ血清を 1% 加えた PBS（pH 7.2）を用いた。この感作血球を用い、被験血清の凝集素価を microtiter 法で測定した。なおウサギ抗血清及びウサギ正常血清がそれぞれ positive control, negative control となることを確認した。またヒト血清は無作為抽出した 28 例においてヒト AS コラーゲンを 45°C 15 分間熱変性したものによる感作血球と反応させ抗体価を測定した。

5. 歯周病の評価

歯周病変の進行程度は被験者それぞれに歯周組織診査及びX線診査を行った後 Dunning と Leach¹⁶⁾の Gingival-Bone count を求めて評価した。また Klinkhamer ら¹⁷⁾の提唱した混合唾液中の白血球数を改良した簡便法¹⁸⁾、すなわち 5 ml の 1.2% 食塩水を口腔内で 1 分間強く含嗽させその含嗽液中の白血球数を計算し、さらに著者ら¹¹⁾がすでに報告した方法で血清中総ヒドロキシプロリン量を測定し、歯周病の臨床指数として用いた。

これらの歯周病指数と血清中抗コラーゲン抗体価との間の相関関係の有意性を統計学的に検討した。

III. 結果

1. 抗原

湿重量 17.7 g のヒト歯肉から酸可溶性コラーゲンを 147.0 mg 得た。

ヒト歯肉 AS コラーゲンの SDS ポリアクリルアミドゲルの泳動は 3 本のバンドを呈し、その易動性から泳動

の遅いバンドから、I, II, III とし、標準試料の分子量を対照として各バンドの分子量を Fig. 1 のようにおよそ I : 300,000, II : 170,000, III : 135,000 と推測した。すなわち I, II, III のバンドはそれぞれ β_{11} 鎖と β_{12} 鎖の重なったもの、および α_1 鎖、 α_2 鎖に相当するものとした。また同時に行ったウシ皮膚 AS コラーゲンも同様のパターンを呈した。

2. 抗コラーゲンウサギ血清

Table 1 に示すように抗ヒト歯肉 AS コラーゲン血清、抗ウシ皮膚 AS コラーゲン血清のいずれも抗体価を検出し、両コラーゲンに抗原性のあることが確認された。両抗血清はそれぞれの homologous 抗原に対し heterologous 抗原よりも高い凝集素価を示すものの、そ

Fig. 1 Semilogarithmic Plots of Rf vs Molecular Weight for Collagen Peptides

の交叉反応は弱く、またヒト歯肉 AS コラーゲンとウシ皮膚 AS コラーゲンは抗原的に同一ではないが、一部共通抗原を有していることがわかった。

3. ヒト血清中抗コラーゲン抗体検出率

Table 2 に示すように抗ヒトコラーゲン抗体は患者群で 10.5%，健康者群で 0%，全体としては 9.0% (67 例中 6 例) に検出した。一方、抗ウシコラーゲン抗体は患者群で 64.9%，健康者群で 40%，全体としては 61.2% (67 例中 41 例) に検出した。抗体の出現頻度は健康者群より患者群においていずれの抗体も高く、抗ヒトコラーゲン抗体よりも抗ウシコラーゲン抗体の出現率が高い値を示した。

4. 抗ヒトコラーゲン抗体価と歯周病指数の関係

抗体を保有する被験者と抗体を保有しない被験者の歯周病指数の平均値は Table 3 に示すように Gingival-Bone count は同一で、Salivary leucocyte count, 総ハイドロキシプロリン量は抗体保有者群の方が非保有者群よりやや高い値を示したが、純計学的にはいずれも有意の差は認められなかった。

これらの指数と抗体価の関係を Fig. 2, Fig. 3, Fig. 4 にプロットした。Gingival-Bone count, Salivary leucocyte count 総ハイドロキシプロリン量と抗体価の相関関係を健康者群, 患者群, 被験者全体について統計学的検索を行った結果、いずれにも有意の相関性は認めら

Table 1 Haemagglutination Titers (Reciprocal Values) in Homologous and Heterologous Antisera

Tanned Red Cell sensitized with	Antisera against	
	Human Gingiva	Bovine Skin
Human Gingival Collagen	32	16
Bovine Skin Collagen	2	4096

Table 2 Incidence of Antibodies to Collagen

	Patients with periodontal disease	Clinical healthy subjects	Total
anti Human Collagen	6/57 (10.5%)	0/10 (0%)	6/67 (9.0%)
anti Bovine Collagen	37/57 (64.9%)	4/10 (40.0%)	41/67 (61.2%)

Table 3 Mean Values of Clinical Periodontal Indices of Subjects with the Presence or Absence of Antibodies to Human Gingival Collagen

	with Antibodies			without Antibodies		
	Number	Mean	± SD	Number	Mean	± SD
Gingival-Bone count	6	2.76	±2.10	52	2.76	± 1.74
Salivary leucocyte count (× 10 ⁵)	6	107.4	±108.5	61	77.6	± 85.9
Total hydroxyproline (μg/ml serum)	5	7.02	±1.13	58	6.91	± 0.96

Fig. 2 Correlation between Anti-Human Gingival Collagen Titers and Gingival-Bone Count

れなかった。また健康者群の抗体価の平均値は患者群のそれよりも低かったが、やはり有意の差はなかった。

変性コラーゲンに対しての抗体価は、無作為抽出した 28 例中 4 例において上昇が見られ 24 例は変わらなかった。

5. 抗ウシコラーゲン抗体価と歯周病指数の関係

歯周病臨床指数と抗体価の関係を Fig. 5, Fig. 6, Fig. 7 にプロットした。Gingival-Bone count, Salivary leucocyte count, 総ヒドロキシプロリン量と抗体価の相関関係を、健康者群、患者群、被験者全体について統計学的検索を行った結果、いずれにも有意の相関性は認められなかった。また健康者群の抗体価の平均値は患者群

のそれよりも低かったが有意の差はなかった。

IV. 考 察

ヒト血清中抗コラーゲン抗体が結合組織疾患（リウマチ様関節炎）の病因に大きな役割を果しているという考え⁷⁾と、この抗体は結合組織破壊に基づくものであり、従ってその存在を示すことが診断の補助となり得るという考え¹⁰⁾がある。今回著者らは後者の考えに基づき、歯周病患者血清中に歯周組織破壊の反応結果として抗コラーゲン抗体が出現するのではないかと推察し、その検索を行った。また、もし抗体が検出されればそれが歯周病

Fig. 3 Correlation between Anti-Human Gingival Collagen Titers and Salivary Leucocyte Count

Fig. 4 Correlation between Anti-Human Gingival Collagen Titers and Hydroxyproline Concentration in Sera

指数との関連において歯周病診断の一助となるのではないかと考え、両者の間の統計学的検討も行った。

コラーゲン抽出は Michaeli ら¹³⁾の方法により可溶性コラーゲンを抽出した。可溶性コラーゲンに抗原性のあることは Watson ら¹⁾以来多くの報告がなされてきたが、不溶性コラーゲンは現在のところ免疫学的研究には

使用困難であり、著者らも可溶性コラーゲンを使用した。西岡ら³⁾は各種皮膚病患者において、酸可溶性コラーゲンに対する抗体の方が中性塩可溶性コラーゲンに対する抗体より多く検出されたと述べており、さらに今回歯肉より抽出した可溶性コラーゲンのうち中性塩可溶性コラーゲンは極めて少量であった。従って著者らは今回

Fig. 5 Correlation between Anti-Bovine Skin Collagen Titers and Gingival-Bone Count

抗体出現の可能性が高いと考えられる歯肉 AS コラーゲンについてのみ検討した。

抗原としたコラーゲンの性状を知るため、SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動法¹⁴⁾を用いた。ヒト歯肉 AS コラーゲンとウシ皮膚 AS コラーゲンの泳動パターンの類似性からも、その抗原性の類似性が想像できる。コラーゲンペプチドは同分子量の球状蛋白に比べより低い電気泳動性を示し、SDS ポリアクリルアミド電気泳動法による分子量の測定限界は 5,000~200,000 であると Furthmayr ら¹⁹⁾は述べている。試料はかなり大きな分子量のペプチドも含んでおり正確な分子量の測定は不可能であるが、推測される分子量 α_1 鎖: 170,000, α_2 鎖: 135,000, は高橋ら²⁰⁾の報告に近い値を示し、またゲルへの添加試料を増加してもこれらのバンドの他は認めなかったことから用いた抗原をコラーゲンと見なすことができる。

抗体価の測定には感度の鋭敏な受身感作血球凝集反応

を用いた。Menzel ら²¹⁾はヒトコラーゲンに対する抗血清は沈降せず、受身感作血球凝集反応によってのみ反応すると述べている。

可溶性コラーゲンに抗原性のあることは、Watson ら¹⁾の報告以来定説となっているが、今回ヒト歯肉 AS コラーゲンにも抗原性のあることが判明した。またヒト歯肉 AS コラーゲンとウシ皮膚 AS コラーゲンは一部共通抗原を有していると考えられる。Timpl ら²²⁾はウシ皮膚 AS コラーゲンに対するウサギ抗血清について、ヒツジ、ラット、モルモット、ウサギの各皮膚、及びコイ浮袋の AS コラーゲンとの交叉反応を凝集阻止反応により行った。その結果、対象の全コラーゲンに共通する抗原決定基の存在が推測され、それらは同一ではないがごく一部において構造が一致していると考えた。また Steffen ら²³⁾はヒト脳硬膜酸可溶性コラーゲンに対するウサギ抗血清について、抗ヒトコラーゲン抗体を種属特異的分画と非特異的分画に分けた。そしてそのヒト脳硬膜 AS コラー

Fig. 6 Correlation between Anti-Bovine Skin Collagen Titers and Salivary Leucocyte Count

ゲンとウシ腱 AS コラーゲンの種属特異的抗原決定基は同様の構造をもつと結論した。著者らが今回行ったヒト歯肉 AS コラーゲンとウシ皮膚 AS コラーゲンの間についても同様に共通抗原決定基が存在すると考えられる。

Andriopoulos ら⁹⁾はヒト乳児皮膚 native コラーゲンをを用い I 型コラーゲンに対し 50 例中 4 例 (8%), III 型コラーゲンに対し 50 例中 3 例 (6%) の抗体を, Michaeli ら¹⁰⁾はヒト乳児皮膚 native 可溶性コラーゲンに対し 1,900 例中 18 例 (1%) の抗体を, Wells ら²⁴⁾はヒト皮膚 native 可溶性コラーゲンに対し 200 例中 5 例 (2.5%) の抗体をそれぞれ健康者の血清中に検出している。今回の実験においては 67 例中 6 例 (9%) において抗体が検出され、その内分けはすべて歯周病患者血清中のものであったが、抗体価と歯周病指数との間に有意の相関は見られなかった。今回の被験者の血清は結合組織病患者としての特徴はなく、抗体価の検出率では前述の報告にみられる「健康者」の血清にほぼ近いものと言える。しかし歯周病患者群にのみ抗体を検出したことは注目値する。ちなみに、Andriopoulos ら⁹⁾はヒトのリウマチ

様関節炎に見られる抗体の検出率は患者群では健康者群よりも高いものの、抗体価と疾病の程度との間に有意の相関はなかったと報告している。

変性ヒト歯肉 AS コラーゲンについての抗体価は 28 例中 4 例において上昇が見られ、他のものは変わらなかった。最近の報告⁴⁻⁶⁾によるとコラーゲンの抗原決定基は C 末端、N 末端部 (non-helical)、三次構造部 (helical determinant)、および中央のらせん構造が解けて露出した部 (central determinant) などにあると考えられている。コラーゲンが変性すると末端部及び三次構造部の抗原決定基は破壊されるが central determinant は逆に抗原決定基が露出してくる。これらのことから著者らのヒト歯肉 AS コラーゲンは変性によって central determinant が露出したため抗体価が上昇したと考えられる。

ウシ皮膚 AS コラーゲンに対する抗体は 67 例中 41 例に検出されたが、それら抗体価と歯周病指数との間にも有意の相関は認められなかった。Bray ら²⁵⁾は健康なヒト血清中にラット可溶性コラーゲンやウシゼラチンに対

Fig. 7 Correlation between Anti-Bovine Gingival Collagen Titers and Hydroxyproline Concentration in Sera

する抗体が存在することを示し、食物中コラーゲンがその抗原になり得るのではないかと推察している。また高添²⁶⁾は、口腔は絶えず外来性抗原に曝露されており、細菌性抗原はもちろん、食物、化学薬剤など口腔に入るものはすべて抗原となり得ると述べている。ヒト血清中のウシコラーゲンと反応する抗体は以上のような機作により感作、産生した抗ウシコラーゲン抗体か、あるいは抗ヒトコラーゲン抗体の交叉反応なのかは今回の実験からは不明である。

コラーゲン分解産物は血液中に遊離し、血清中総ヒドロキシプロリン量はコラーゲンの分解速度を反映していると考えられる。そこでこのヒドロキシプロリン量と血清中抗コラーゲン抗体価との関係をも検討したが、抗ヒトコラーゲン抗体価、抗ウシコラーゲン抗体価、い

ずれとも有意の相関は認められなかった。

今回の実験では抗コラーゲン抗体価といずれの菌周病指数との間にも有意の相関は見られなかった。この理由として、歯肉結合組織を構成するコラーゲン量は身体全体のそれからみるとあまりにも少量であるということが考えられる。また今回検出された抗ヒトコラーゲン抗体は生理的状态におけるコラーゲン代謝の過程で血清中に出現した抗体である可能性も十分考えられる。この抗体が果して自己抗体か否かということを含め、今後さらに検討されるべき問題であろう。

V. 結 論

ヒト歯肉酸可溶性コラーゲンの抗原性を検討した。対

照としてウシ皮膚酸可溶性コラーゲンをを用いた。また歯周病患者血清中抗コラーゲン抗体価を測定し、各歯周病指数との関連を検討し、以下の結果を得た。

1. ヒト歯肉コラーゲンに抗原性のあることが判明した。

2. ウシ皮膚コラーゲンにも抗原性があり、ヒト歯肉コラーゲンとの間に共通抗原の存在が判明した。

3. 抗ヒト歯肉コラーゲン抗体は健康者群血清中には検出されず、歯周病患者群血清中に検出された。しかしその抗体価と Gingival-Bone count, Salivary leucocyte count, 及び血清中総ハイドロキシプロリン量との間に有意の相関はなかった。

4. 抗ウシ皮膚コラーゲン抗体は健康者、歯周病患者ともに被験者血清中に検出されたが、その抗体価と Gingival-Bone count, Salivary leucocyte count, 及び血清中総ハイドロキシプロリン量との間に有意の相関はなかった。

本研究の一部は昭和52年度文部省科学研究費(No. 277561)によった。

文 献

- Watson, R.F., Rothbard, S. and Vanamee, P. : The antigenicity of rat collagen: J. exp. Med., 99, 535-551, 1954.
- O'Dell, D.S. : Treatise on collagen Vol. 2 Biology of collagen Part A (Gould, B.S.ed.) : London & New York, 1968, Academic Press, 311-322.
- 佐野栄春, 西岡五郎: 免疫学からみた結合組織病 (畔柳武雄, 大高裕一, 松橋直編): 東京, 1974, 医学書院, 44-61.
- Furthmayr, H. and Timpl, R. : Immunochemistry of collagens and procollagens: Int. Rev. Connective Tissue Res., 7, 61-99, 1976.
- Timpl, R., Wick, G. and Gay, S. : Antibodies to distinct types of collagens and procollagens and their application in immunohistology: J. Immunological Methods, 18, 165-182, 1977.
- Beard, H.K., Faulk, W.P., Conochie, L.B. and Glynn, L.E. : Some immunological aspects of collagen: Prog. Allergy, 22, 45-106, 1977.
- Steffen, C. : Consideration of pathogenesis of rheumatoid arthritis as collagen autoimmunity: Z. Immun-Forsch., 139, 219-227, 1970.
- Cracchiolo, A., Michaeli, D., Goldberg, L.S. and Fudenberg, H.H. : The occurrence of antibodies to collagen in synovial fluids: Clin. Immunol. Immunopath., 3, 567-574, 1975.
- Andriopoulos, N.A., Mestecky, J., Miller, E.J. and Bradley, E.L. : Antibodies to native and denatured collagens in sera of patients with rheumatoid arthritis: Arthritis Rheum., 19, 613-617, 1976.
- Michaeli, D. and Fudenberg, H.H. : Antibodies to collagen in patients with emphysema: Clin. Immunol. Immunopath., 3, 187-192, 1974.
- 穴村紳一, 内田武志, 白根 忠, 秀衡泰子, 久保田みどり, 岡本 莫: 歯周病患者血清中の総ハイドロキシプロリン量について: 日歯周誌, 21, 158-164, 1979.
- Piez, K.A., Eigner, E.A. and Lewis, M.S. : The chromatographic separation and amino acid composition of the subunits of several collagens: Biochemistry, 2, 58-66, 1963.
- Michaeli, D., Benjamini, E. and Leung, D.Y.K.: Immunochemical studies on collagen-II Antigenic differences between guinea pig skin collagen and gelatin: Immunochemistry, 8, 1-6, 1971.
- 林 健志: SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法: 免疫実験操作法, (日本免疫学会編), III, 615-620, 1973.
- Steffen, C., Timpl, R. und Wolff, I. : Immunogenität und Spezifität von Kollagen III. Erzeugung und Nachweis von Anti-Kollagen-Antikörpern und serologischer Vergleich von nativem und denaturiertem löslichem Kollagen: Z. Immun-Forsch., 134, 91-108, 1967.
- Dunning, J.M. and Leach, J.B. : Gingival-Bone count; A method for epidemiological study of periodontal disease: J. Dent. Res., 39, 506-513, 1960.
- Klinkhamer, J.M. : Quantitative evaluation of gingivitis and periodontal disease; I. The orogranulocytic migratory rate: Periodontics, 6, 207-211, 1968.

- 18) 内田武志, 菊地貞介, 東 磨美, 吉賀純子, 二宮順二, 穴村紳一, 岡本 莫: 歯周病の臨床検査としての混合唾液中の白血球数と潜血量の検討, 日歯周誌, 18, 406-413, 1976.
- 19) Furthmayr, H. and Timpl, R.: Characterization of collagen peptides by sodium dodecyl-sulfate-polyacrylamide electrophoresis: *Anal. Biochem.*, 41, 510-516, 1971.
- 20) 高橋徳也, 野原広美, 原 耕二, 小林幸男: ヒト歯肉スライスにおけるコラーゲン代謝, 中性塩溶液可溶性分画の SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法による分析: 歯基礎誌, 16, 375-382, 1974.
- 21) Menzel, J. and Steffen, C.: Immunogenicity and specificity of collagen XIII. Preparation and definition of soluble collagen-anti-collagen complexes by gel filtration: *Immunology*, 26, 417-423, 1974.
- 22) Timpl, R., Wolff, I., Wick, G., Furthmayr, H. and Steffen, C.: Immunogenicity and specificity of collagen VII. Differences between various collagens demonstrated by cross-reaction studies: *J. Immunol.*, 101, 725-729, 1968.
- 23) Steffen, C., Dichtl, M., Knapp, W. and Brunner, H.: Immunogenicity and specificity of collagen XII. Demonstration by immunofluorescence and haemagglutination of antibodies with different specificity to human collagen: *Immunology*, 21, 649-657, 1971.
- 24) Wells, J.V., Michaeli, D. and Fudenberg, H.H.: Antibodies to human collagen in subjects with selective Ig A deficiency: *Clin. exp. Immunol.*, 13, 203-208, 1973.
- 25) Bray, J.P., Estess, F. and Bass, J.A.: Anti-collagen antibodies following thermal trauma: *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, 130, 394-398, 1969.
- 26) 高添一郎: 歯周疾患の病因論: 日本歯科医学会会報, 5, 3-8, 1979.