イヌの実験的歯肉炎における不溶性免疫複合物の動態

山下 智* 原 耕・二* 野原 広美**

* 新潟大学歯学部歯科保存学第2教室

(主任：原 耕二教授)

** 新潟大学歯学部口腔生化学教室

(主任：野原広美教授)

(昭和59年3月20日受付)

Insoluble Immune Complexes in Experimental Gingivitis of Dogs

Satoshi YAMASHITA*, Kohji HARA* and Hiroyoshi NOHARA**

Departments of Periodontology* (Director : Prof. Kohji HARA) and Oral

Biochemistry** (Director : Prof. Hiroyoshi NOHARA) Niigata University

School of Dentistry

This study was undertaken to examine the levels of insoluble immune complexes in healthy and inflamed gingiva by measuring citrate buffer-elutable IgG.

After establishment a clinically healthy gingiva by continuous toothbrushing for 6 weeks, the experimental gingivitis was induced by placement of silk floss ligature to accelerate plaque formation for 1 week, 1 and 3 months. The excised gingiva was prepared by the elution procedure with PBS and citrate buffer.

The concentration of PBS-elutable IgG in gingiva was measured by SRID, besides the citrate buffer-elutable IgG was determined by ELISA and RIA.

As a results;

1) The amount of PBS-elutable IgG had a tend-

ency to increase in inflamed gingiva at each experimental period and the IgG level was significantly higher at 3 months experimental period than the healthy.

2) The citrate buffer-elutable IgG significantly increased in inflamed gingiva at each experimental period and the rate of increase was more prominent with advancing gingivitis.

3) There was an increase in ratio of citrate buffer-to PBS-elutable IgG at each experimental period as compared with at the healthy.

4) As shown $r=0.945$ in a coefficient of correlation, a close correlation between ELISA and RIA was found.

Key words : Insoluble immune complex, Experimental gingivitis, Citrate buffer-elutable IgG, ELISA, RIA

要旨：イヌに実験的歯肉炎を誘発させ、歯肉組織中の不溶性免疫複合物の経時的変動を ELISA と RIA の二つの免疫学的測定法を用いて検索した。すなわち健康歯肉を確立後、口腔内を4区分し、それぞれ1週、1ヵ月、3ヵ月病期の歯肉炎を惹起させた。屠殺時、採取した歯肉を citrate buffer で溶出し、この画分中の IgG 量を ELISA ならびに RIA で測定した。その結果、その IgG 量は健康時に比べ炎症歯肉で有意に上昇し、炎症の経過とともに増加の傾向を示した。また ELISA と RIA とでは両者間に高い相関性のあることが確認された。

索引用語：不溶性免疫複合物、実験的歯肉炎、クエン酸緩衝液可溶性 IgG、酵素免疫測定法、ラジオイムノアッセイ

緒 論

歯周疾患において体液性免疫反応が重要な位置を占めていることは、多くの研究者により報告されている。たとえば、歯周組織が細菌あるいはその代謝産物などの抗原刺激を持続的にうけ、結果的に Immunoglobulin を産生するリンパ球や形質細胞の増加をきたすこと¹⁾や、補体系の活性化を生ずること²⁾などはその一例といえよう。著者の一人山下³⁾は、既にイヌを実験対象とし、その歯肉組織中の各種 Immunoglobulin の動態を病期により経時的にとらえ、健康時に比べ IgM が1週病期で、IgG が3ヵ月病期で有意に増加していることをつきとめた。近年、さらにある種の細菌に特異的な IgG の力価を測定することも試みられ⁴⁾、この種の研究も特異抗体の検索を中心に発展しつつあるように思われる。

一方、歯肉組織中では細菌抗原と局所的に産生された免疫グロブリンとの間に抗原抗体反応が生じ、その結果免疫複合物ができることが知られている。中でも、組織に沈着した不溶性免疫複合物の存在は、補体の関与とともに歯周組織に障害をもたらす Arthus 型アレルギー反応が生じていることを示唆しており⁵⁾、その動向が注目されている。

このため今回、著者らはイヌに実験的歯肉炎を誘発させ、歯肉組織中の不溶性免疫複合物の経時的変動を Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) と Radioimmunoassay (RIA) の二つの免疫学的測定法を用いて検索する目的で本実験を行った。

Fig. 1 Purification of dog IgG

Fig. 2 Preparation of anti-dog IgG (produced in rabbit)

研究材料と方法

1. イヌ IgG の精製

Fig. 1 に示すとおり、新鮮血より得たイヌ全血清 100 ml を生理的食塩水で2倍に希釈後、40% 硫酸で1回、33% 硫酸で2回塩析した。次いでその沈渣を 0.01 M PBS (pH 7.4) で溶解後、24時間純水に対して透析し約 500 mg の不溶化した γ グロブリン画分を得た。一方、CNBr-activated Sepharose® 4B にリガンド (抗体) として Miles Lab. 製の抗イヌ IgG 家兔血清 (IgG 画分) を固定化させることにより、イヌ IgG を特異的に吸着させるアフィニティークラム ($\phi 1 \times 5$ cm) を調製した。固定化した抗体蛋白量の1.5倍の γ グロブリン画分を使用し、原則にそって、アフィニティークロマトグラフィーを行ったのち、KSCN で溶出し、総蛋白量 65 mg の精製イヌ IgG を得た。このものは Immuno-electrophoresis (IEP) による検定で特異性を確認した。

2. 抗イヌ IgG の調製

Fig. 2 は抗イヌ IgG の調製法を示したもので、さきに精製したイヌ IgG 10 mg を等量の Freund's Complete Adjuvant (FCA) と共に家兔の四肢掌に1ヵ所 0.1 ml/ずつ皮下注射した。次いで各 5 mg の IgG に同様な処理を施した後、2週間隔で2回今度は家兔の背部に追加投与した。最終回の注射より1週後に家兔の耳より試験採血し、遠心上清を Ouchterlony 法で titration した。

その結果、titer 上昇を認め、次いで特異性の検定を IEP で行ったところ、特異性を確認したので、家兔を瀉血し、得られた血清を $11,000 \times g$ で30分間遠沈し、特異抗血清を得た。

このものは分析に供するまで -70°C に凍結保存し

た。

3. 実験的歯肉炎の発生

体重が約 10 kg 前後ですべて雄の雑種成犬 4 頭を使用, 上顎 I₃~P₄, 下顎 I₃~M₁ の唇頰側歯肉を実験対象とした。Fig. 3 は実験的歯肉炎の概要を示したもので, 各犬共口腔内を 4 区分し, 異った病期の歯肉炎を発生させる様考慮した。実験操作に関しては, 著者が以前に報告したと同じ方法で行い, 屠殺時にプラーク蓄積 3 ヶ月, 1 ヶ月, 1 週間各時期の炎症歯肉と臨床的健康歯肉が同時に採取できるようにした。採取した歯肉は余分の血液成分を生理的食塩水で十分に洗い流した後, -70°C にて凍結保存した。なお, 採取した各病期の歯肉は一部組織学的に観察した。

4. 歯肉抽出液の調製

Fig. 4 は歯肉抽出液の調製法を示したものである。まず著者の一人山下がすでに報告した方法に準じて行ったもので, 歯肉を磨砕, PBS に溶出, 凍結と融解をくり返し, 超音波処理後, 遠沈して得たものを PBS 抽出画分 (Fraction 1; F-1) とした。残った沈渣に対し PBS にて同じ溶出操作を 7 回繰り返して得た画分をそれぞれ Fraction 2~Fraction 8 とした。更に残った沈渣に対し今度は 0.02 M citrate buffer (pH 3.2) を加えて酸可溶成分を溶出後, 得られた画分を Fraction 9; F-9 とした。なお, Fraction 1~Fraction 8 は Amicon PM-10 を用い

Fig. 3 Induction of experimental gingivitis

Fig. 4 Preparation procedure of gingival extracts

Fig. 5 Microtiter ELISA method

0.5 ml まで限外濾過し、0.01% NaN_3 を加えたものを $-20^\circ C$ にて保存した。また Fraction 9 は、pH を中性にもどしたのち、 $-20^\circ C$ で保存した。

5. IgG の定量方法

1) Single radial immunodiffusion

著者らが以前報告した通り、Manciniら⁶⁾の方法(1965)に準じて PBS 抽出画分 (F-1) 中の IgG を定量した。

2) Enzyme-Linked Immunosorbent assay (ELISA)

Goldsmith⁷⁾の方法(1981)に準じて citrate buffer 抽出画分 (F-9) 中の IgG 量を測定した。方法に関する詳細は、Fig. 5 に示したとおり次のようになる。

a) 第1抗体の Coating

即ち Miles Lab. 製の抗イヌ全血清(ヤギ)の IgG 画分を、アフィニティークロマトグラフィー用担体である Protein A-Sepharose CL-4B (Pharmacia Fine Chemicals) により精製した後、これを Coating buffer [0.1

M $NaHCO_3$ (pH 9.6)/0.002% NaN_3] で 140 倍希釈、Gilson 社製 Pipetman® を用いて microtiter plate (NUNG) に 1 well 当り $100 \mu l$ (抗体量 $2 \mu g$) ずつ Coating した。次いで $4^\circ C$ で 1 晩インキュベートした後、PBS-Tween を入れた洗浄ビンを用いて plate を 5 回洗浄することにより well に吸着しなかった余剰の抗体を除いた。

b) 試料及び標準 IgG の Coating

さらに Fig. 5 はその方法を示したもので、歯肉抽出液及び標準 IgG の連続希釈系を Diluent-buffer [0.02 M PBS (pH 7.4)/1 mM $MgCl_2$ /0.05% Tween/1% BSA] で調製し、プレート 1 well 当り $200 \mu l$ ずつ注入した。そして再び $4^\circ C$ で 1 晩インキュベート後、プレートを再度 PBS-Tween により 5 回洗浄した。

c) 酵素標識抗体の Coating

即ちその方法は、Fig. 5 に図示しており、peroxidase 標識抗イヌ IgG 家兔血清 (Miles Lab.) を Diluent-buff-

er で 200 倍に希釈後, 1 well 当り 200 μ l ずつ注入した。室温で 2 時間インキュベートし, 再度 PBS-Tween で plate を洗浄し余剰の抗血清を除去した。

d) 基質の添加及び酵素反応

方法は Fig. 5 の最下段に図示したもので, 基質として σ -phenyldiamine を使用, H_2O_2 と共に 0.1 M クエン酸に混ぜこれをプレート 1 well 当り 200 μ l ずつ注入し, 90 分間酵素反応を行わせた。

e) 吸光度測定及び IgG 量の算出

MTD 12 型マイクロプレート光度計 (コロナ社製) を用いて各 well ごと 405 nm の吸光度で測定した。この結果, Fig. 6 に示すとおり, 定量可能範囲は, 5~150 ng/well であり, 得られた標準曲線より試料中の IgG 量を算定した。

3) Radioimmunoassay (RIA)

著者らは, BF 分離法 (B は標識蛋白, F は遊離蛋白) として入江ら⁸⁾の二抗体法 (1974) 及び Desbuquois ら⁹⁾の PEG 法 (1971) を組合せた方法で citrate buffer 抽出画分 (F-9) 中の IgG 量を測定した。

a) イヌ IgG の ^{125}I 標識

RIA にさきだち, イヌ IgG の ^{125}I 標識を行った。この方法は, Hunter と Greenwood¹⁰⁾ (1962) のクロラミン T 法に準じ, これを一部改変したものである。すなわち, シオノギチューブにクロマト精製イヌ IgG 5 μ l (蛋白量 2.5 μ g) を入れ, そこにクロラミン T 液 10 μ l (クロラミン T 20 μ g) 及び Na ^{125}I 5 μ l (500 μ Ci) を 0.25 M phosphate buffer (pH 7.4) と共に加え 30 秒間攪拌しながら反応させた。その後 Sodium metabisulfate 50 μ l (100 μ g) と 10% KI 10 μ l をチューブに加え, 反応を停止させた。

続いて標識蛋白と free の NaI を分離するため, Sephadex G-25 を用いてゲル濾過を行なった。

即ち反応液を Sephadex G-25 column (ϕ 0.6 $\times$ 25 cm) にかけたのち, 0.25% BSA 加 0.01 M PBS (pH 7.4) で溶出し, 各画分の放射活性を測定したところ 2 つのピークを得た。その結果, 第一ピークが ^{125}I 標識イヌ IgG であることを確認し, その中でカウントが最大の画分を分注してこれを $-70^\circ C$ で保存した。尚, この画分中の IgG 量は, 1167.5 ng (400 μ l) であり, IgG の比放射活性は 17.5 μ Ci/ μ g であった。

b) 第一抗体の至適希釈量の決定

抗血清として第一抗体は, Miles Lab. の抗イヌ IgG (家兎) を, 第二抗体としては第一ラジオアイソトープ研究所製の家兎 γ グロブリン抗血清 (山羊) と正常家

Fig. 6 Standard curve for IgG using ELISA (Goldsmith, 1981)

兎血清を set したものを使用した。

操作手順として, Fig. 7 に示すとおり最初に第一抗体の抗イヌ IgG を 0.01 M PBS (pH 7.4) で, それぞれ 1,000 倍, 4,000 倍, 16,000 倍, 64,000 倍に希釈し, これをシオノギチューブに 0.1 ml ずつ分注した。続いて ^{125}I 標識イヌ IgG を 0.25% BSA を含む PBS で希釈しそれぞれチューブに 0.1 ml ずつ加えた (10,000 cpm/1 チューブ)。さらに SD (25 mM EDTA, 0.5% BSA を含む PBS) を 0.3 ml ずつ加え十分攪拌した後, $4^\circ C$ で 24 時間インキュベートした。その後第二抗体の家兎 γ グロブリン抗血清 (山羊) と正常家兎血清をそれぞれ 0.1 ml ずつ, 5% PEG (半井化学) を 0.7 ml ずつ加え攪拌ののち, 再び 24 時間インキュベートした。そして $2,200 \times g$ で, 30 分間遠心後, 上清を吸引し, チューブの壁についた余剰の反応液を綿棒で清拭した。この沈渣の cpm をオートウエルガンマシステム (アロカ社) で測定し, B/T を算出した結果, B/T=50 となる第一抗体の希釈倍数は 1,000 倍となったため, 以下の実験はすべてこの希釈倍数で行った。

c) 標準曲線の作成と試料の測定

試料の測定と同時に Fig. 8 に示すごとく, 標準曲線の作成を行った。操作手順は, 既知の各種濃度 0.5~512 ng の標準イヌ IgG ないしは歯肉抽出液を PBS で希釈調製したものをチューブに各 0.1 ml ずつ入れ, さらに 1,000 倍希釈の第一抗体, ^{125}I 標識イヌ IgG を 0.1 ml ずつ, SD を 0.3 ml ずつそれぞれ加え 24 時間インキュベートした。以後の操作は前述の第二抗体加入後の操作手順と全く同一に行った。この結果, 5~320 ng/ml の範囲でイヌ IgG の測定が可能となり, この標準曲線より試料中の IgG 量を算出した。

Fig. 7 Radioimmunoassay

- ▬ : rabbit anti-dog IgG (IgG fraction)
- ▨ : 125I-dog IgG
- : dog IgG
- ▤ : goat anti-rabbit immunoglobulin

Fig. 8 Standard curve for IgG using RIA

6. 蛋白量及び DNA 量の測定

蛋白量は Lawry ら¹¹⁾ (1951) の方法に基づき, BSA を標準蛋白として測定した。一方, DNA 量は Burton¹²⁾ (1956) の変法で測定した。

結 果

1) 実験的歯肉炎の各病期における肉眼的ならびに組織学的所見

各病期のいずれの歯肉においても特徴ある病態を呈した。すなわち, 健康歯肉と設定した部位は, 実験期間を通して徹底したブラッシングの励行によりプラークの附着がまったくみられず, 健康歯肉が維持できた。また,

Table 1 Levels of PBS and citrate buffer-elutable IgG ($\mu\text{g}/100 \mu\text{g DNA}$)

	0	1W	1M	3M
SRID	88.2 $\pm$ 17.3	101.1 $\pm$ 16.9	156.8 $\pm$ 34.2	183.2 $\pm$ 21.8
	*			
ELISA	0.148 $\pm$ 0.029	0.411 $\pm$ 0.039	0.671 $\pm$ 0.051	0.774 $\pm$ 0.070
	*			
RIA	0.116 $\pm$ 0.035	0.306 $\pm$ 0.060	0.326 $\pm$ 0.063	0.426 $\pm$ 0.079
	*			

* : significant at $P<0.05$

Values are means $\pm$ S.E.

Table 2 Levels of citrate buffer-elutable/PBS-elutable IgG (%)

	0	1W	1M	3M
ELISA	0.189 $\pm$ 0.024	0.307 $\pm$ 0.051	0.527 $\pm$ 0.067	0.520 $\pm$ 0.091
	N.S.			
	*			
RIA	0.174 $\pm$ 0.039	0.231 $\pm$ 0.052	0.277 $\pm$ 0.037	0.261 $\pm$ 0.037
	N.S.			

* : significant at $P<0.05$

N.S. : not significant at $P>0.05$

Values are means $\pm$ S.E.

組織学的には、歯肉溝の上皮脚は認められず、歯肉結合組織中の炎症性細胞浸潤、血管の拡張も殆んどみられなかった。一方、プラーク蓄積1週間後の歯肉所見では、軽度の発赤、腫脹が認められ、歯頸部に少量のプラークが蓄積していた。組織学的には、歯肉溝上皮直下結合組織中に好中球の浸潤、集積が生じ、血管の拡張も顕著であった。プラーク蓄積1ヵ月後における歯肉の炎症は、より高度となり、組織学的には少量の好中球、形質細胞の出現のほか、リンパ球主体の細胞浸潤と歯肉固有層中の結合組織線維の破壊が著しくなった。プラーク蓄積3ヵ月後になると多量のプラークが歯頸部に附着し、高度の歯肉炎の様相を呈した。組織学的には、形質細胞及びリンパ球の浸潤が主体を占め、また歯肉結合組織線維の破壊が強く認められた。

2) 実験的歯肉炎の各病期における歯肉抽出液中のPBS可溶性IgGについて

各病期における歯肉のPBS溶出画分(F-1)中のIgG量をSRIDで測定し、その結果をTable 1の上段に示した。これによると健康歯肉での値は、88.2 $\pm$ 17.3 $\mu\text{g}/100$

$\mu\text{g DNA}$ であったのに対し、炎症歯肉では経時的に漸次増加の傾向を示し、特に3ヵ月病期の歯肉では183.2 $\pm$ 21.8 $\mu\text{g}/100 \mu\text{g DNA}$ となり、健康歯肉との間に統計学的な有意差が認められた($P<0.05$)。

3) 実験的歯肉炎の各病期における歯肉抽出液中のcitrate buffer可溶性IgGについて

各病期における歯肉のcitrate buffer溶出画分(F-9)中のIgGは、Table 1の中でELISA値は中段、RIA値は下段に示した。ELISAでは健康歯肉が0.148 $\pm$ 0.029 $\mu\text{g}/100 \mu\text{g DNA}$ に対して、炎症歯肉では1週で0.411 $\pm$ 0.039、1ヵ月で0.671 $\pm$ 0.051、3ヵ月で0.774 $\pm$ 0.070と経時的に漸次増加の傾向を示した。健康歯肉に対して、炎症歯肉ではいずれの病期も統計学的に有意差が認められた($P<0.05$)。一方、RIAの場合も、ELISAの結果と同様な傾向を示した。すなわち、健康歯肉の0.116 $\pm$ 0.035 $\mu\text{g}/100 \mu\text{g DNA}$ に対し、炎症歯肉では1週で0.306 $\pm$ 0.060、1ヵ月で0.326 $\pm$ 0.063、3ヵ月で0.426 $\pm$ 0.079といずれも有意に増加していた($P<0.05$)。

Fig. 9 Comparison of ELISA versus RIA determination of dog IgG

4) 歯肉抽出液中の PBS 可溶性 IgG に対する citrate buffer 可溶性 IgG の割合

Table 2 は ELISA 及び RIA の値を示す。ELISA では健康歯肉 0.189% に対し、病期 1 週、1 ヶ月、3 ヶ月ではそれぞれ 0.307%、0.527%、0.520% となり、1 ヶ月及び 3 ヶ月で統計学的に有意な増加が認められた ($P < 0.05$)。一方、RIA では健康歯肉の 0.174% に対し、1 週で 0.231% と増加したものの、その後 1 ヶ月、3 ヶ月では 0.277%、0.261% と若干の増加にとどまった。

5) ELISA と RIA の相関性

Fig. 9 は、ELISA と RIA による citrate buffer 可溶性 IgG 量の相関関係をあらわしたものである。すなわち相関係数 $r=0.945$ となり、両者間に高い相関性のあることが証明された。また、 r の有意性の検定を行ったところ、 $t=10.81$ 、しかるに $n=16$ となり、1% の危険度における t 値は 2.977 であることから $r=0.945$ はすこぶる有意義であり、ELISA と RIA の相関の存在が十分確認された。

考 察

著者の一人山下は既に、イヌに実験的歯肉炎を惹起させその歯肉中の各種免疫グロブリン (IgG, IgA, IgM) を定量した³⁾。その結果、IgG がプラーク著積 1 ヶ月、3 ヶ月で有意に増加したのに対し、IgM は 1 週で急増し、その後はやや減少傾向を示した。これらの事実より免疫細胞の IgM → IgG 変換¹³⁾あるいは白血球由来のライソゾーム酵素による IgM の構造変化¹⁴⁾が考えられる。Page & Schroeder¹⁾ はその分類の中で初期病変の主役は、プラークなどの外来抗原の内部拡散により遊走活性を得た多形核白血球であるとのべており、これが局所の

免疫応答によって惹起される防御的あるいは破壊的反応をコントロールしていることも理解できる。多形核白血球の存在は、組織障害の機構を知る上で重要な因子である。特に、歯肉組織中に存在する細菌の代謝産物や様々な組織抗原などは組織中の IgM, IgG と反応し免疫複合物 (Immune Complex) を形成する。そして結果的に Arthus 型のアレルギー反応を惹起させ白血球の食食を促進する¹⁵⁾。これにより多形核白血球の脱顆粒が生じライソゾーム酵素の放出とともに組織破壊が生ずる。

Arthus 型アレルギー反応における免疫複合物の役割は重要であるが、この免疫複合物の生物活性としては、組織に沈着して障害をもたらすほか、補体系の賦活化、マクロファージの活性化、リンパ球のコントロールなど血液成分に対して多種多様に作用する¹⁶⁾。本来生体中に存在する免疫複合物は、血中免疫複合物の型であり、多くはこのままマクロファージ (脾臓、リンパ節)、Kupfer (肝臓) など網内系の細胞により食食される。しかし免疫複合物の性状によっては、補体結合性をもっている抗体や、強い陰性荷電をもつ抗原を含む場合は組織に沈着しやすいとされ、歯肉組織にも同様の現象が生じている可能性がある。むしろ腎や肺などの臓器は、体内の濾過を司る構造上の特徴を有するため歯肉などよりもはるかに免疫複合物が沈着しやすい。しかし、歯肉は陽性荷電を示すコラーゲン線維を多く含有し、これが強い陰性荷電を持つ DNA との間に化学的な結合をしやすい、免疫複合物沈着の原因の一つとして考えられる。一般に腎炎などでは血中の免疫複合物が増加し、その炎症程度と免疫複合物 (DNA-抗 DNA 抗体) 量に相関性があるという報告¹⁷⁾もある。一方、歯周疾患の場合免疫複合物がその組織中に存在することを示唆した報告¹⁸⁾はみられるものの、それを組織学的あるいは生化学的に解明し、歯周疾患の程度とどのような因果関係があるかを証明した例は少ない。Clagett ら¹⁹⁾ は anti-double stranded DNA 抗体とポケットの深さとの相関はみられたものの、不溶性免疫複合物を pH 3.2 の citrate buffer で解離させ構成抗原である IgG を RIA で測定した結果、ポケットの深さとの間に有意な相関はみられなかったとのべている。また、イヌ歯肉による蛍光抗体法で C3, IgG の局在も同時に確認し得たが、それがきわめて微量であるため、歯肉中に局在する不溶性免疫複合物の生物学的活性は、歯周疾患を惹起するには非常に弱いと報告している。一方、金城²⁰⁾ は歯肉中の可溶性免疫複合物を Clq binding assay を用いて測定し、歯周ポケットの深さと正の相関があることを証明した。

今回著者らは組織固着性不溶性免疫複合物の測定に際し, citrate buffer (pH 3.2) で組織を処理し, そこに含まれる構成抗原である IgG を定量するという間接的な手法を用いた。免疫複合物の定量法としては今日 PEG 法, C1q binding assay などが一般的であるが, 実験動物がイヌの場合, C1q の精製法がヒトに比べ難しいこと, PEG 濃度の設定がヒトの場合と異なり難しいことを理由とした。この結果, 炎症歯肉の citrate buffer 溶出画分 (F-9) 中の IgG は健康時に比し, RIA, ELISA のどちらも有意に上昇し, しかも歯肉炎の進行に伴って増加した。しかし, citrate buffer-elutable IgG の絶対量が PBS-elutable IgG の 1/200 以下である事実からこの免疫複合物が歯周疾患の進行にどの程度影響を及ぼしているかは疑問である。ただ微量ではあるが citrate buffer-elutable IgG が炎症の進行に伴い増加したことは, initial lesion では白血球による免疫複合物の貪食がさかに行われたのに対し, early lesion や established lesion においては局所における白血球数の減少が免疫複合物貪食の低下につながり, 複合物が容易に可溶化除去されにくいことを示している。一方, C3 の局在を蛍光抗体法を用いて免疫病理学的に検索した茂手木²¹⁾の報告によると, プラーク蓄積後 1 ヶ月で可溶性の免疫複合物が急激な増加を示し, しかも結合組織中に局在していたが, 不溶性の免疫複合物は観察されなかったとのべている。著者らの行った免疫複合物の検索ではその構成抗原を IgG のみにしぼったが, 歯肉という組織を考える以上 IgM あるいは DNA を抗原とする免疫複合物も, 今後検討していく必要があるように思える。

著者らは今回 PBS-elutable ならびに citrate buffer-elutable IgG 量を, 前者は SRID で後者は ELISA 及び RIA でそれぞれ測定した。SRID は操作が非常に簡便である一方, 検出感度が $10 \mu\text{g/ml}$ と低いことから PBS-elutable IgG を定量した。citrate buffer-elutable IgG は, ごく微量であるために検出感度が数百倍も高い免疫学的定量法として ELISA 及び RIA を用いた。著者らが行った ELISA は非競合的反応を利用したサンドイッチ法⁷⁾で, 抗原は少なくとも二つ以上の結合部位があること, 固相化抗体と標識抗体の交叉反応がないことなどの条件が必要であるが, IgG という安定な抗体に酵素を標識しており, 抗原結合能を失わずに微量な定量が可能であるとの利点がある。その上, 酵素活性は -20°C で保存しておけば 1 年以上保たれる。一方, RIA は競合的反応を利用し, BF 分離法として二抗体法と PEG 法を組合わせた手法を用いた。前者の二抗体法はその簡便さなどから

多く利用されている方法であるが, さらにこれに抗体の特異性を損わずに IgG を沈殿させる PEG 法を加えることにより, 微量な IgG 量の測定が可能となった。RIA は高い特異性と再現性をもち, しかも高感度 ($\text{ng/ml} \sim \text{pg/ml}$ が測定可能) で, 優れた定量法といえるが, 経時的比放射活性の低下による標識化合物の短期間使用, 実験室や測定機器の制限など様々な問題があり, 今後は RIA と同感度の ELISA の有用性が注目されることになる。

今回著者らは IgG 量の測定で ELISA と RIA を比較したが, 両者の相関性の有意さを確認し得たことから, 両者のどちらもこの citrate buffer-elutable IgG 量の測定に有用な方法であると結論づけられる。ただし ELISA と RIA の絶対量が個々で異なり, 前者の方が若干高値を示していたが, このことは測定法や抗体などの特性の差, RIA における PEG 濃度などの影響が多分に考えられる。今後はこれらの検討を十分に行い, さらにバラツキの少ない, より簡便で精度の高い測定法を開発していく必要がある。

総括ならびに結論

あらかじめ実験前に健康歯肉を確立したイヌの歯頸部に絹糸を結紮し, プラークの蓄積を促進させ, 各 quadrant (1/2 顎) ごとにそれぞれ 1 週, 1 ヶ月, 3 ヶ月病期の歯肉炎を惹起させた。イヌを屠殺後, 歯肉組織を採取し, これを PBS ならびに citrate buffer で溶出し, 各画分中の IgG 量を前者は SRID で, 後者は ELISA ならびに RIA で測定した。

結果は次のとおりである。

1) 歯肉組織の PBS 溶出画分 (F-1) 中の IgG 量は, 健康時に比べ, プラーク蓄積 1 週, 1 ヶ月, 3 ヶ月のいずれの炎症歯肉においても増加し, 特に 3 ヶ月との間に統計学的に有意の差がみられた。

2) 歯肉組織の citrate buffer 溶出画分 (F-9) 中の IgG は ELISA ならびに RIA にて定量が可能となった。健康時に比べ炎症歯肉中の含有量は有意に高く, 経時的に増加の傾向がみられた。

3) PBS 溶出画分中の IgG 量に対する citrate buffer 溶出画分中の IgG 量の比は, 健康時に比べ炎症歯肉では経時的に増加の傾向を示し, 特に ELISA では 1 ヶ月, 3 ヶ月病期で有意に増加していることが確認された。

4) ELISA と RIA とでは相関係数が $r=0.945$ となり, 両者間に高い相関性のあることが証明された。

謝 辞

本研究の遂行に際して懇切丁寧な御教示ならびに御助言を賜りました新潟大学脳研究所神経化学部門阿部輝雄助教授ならびに新潟大学医学部精神医学教室奥田正英先生に謹んで感謝の意を表します。また放射性同位元素の面から御助力いただきました本学放射線取扱主任者水野 敏先生に厚く御礼申し上げます。最後に本研究に御援助および御協力いただきました本学口腔生化学教室、歯科保存学第2教室員一同に深謝いたします。

本研究の一部は1982年(昭和57年)、文部省科学研究費一般研究B課題番号57480351の補助で行われたこと付記する。

文 献

- 1) Page, R.C. and Schroeder, H.E. : Pathogenesis of inflammatory periodontal disease. A summary of current work. *Lab. Invest.*, 33 : 235-249, 1976.
- 2) Okuda, K. and Takazoe, I. : Activation of complement by dental plaque. *J. Periodont. Res.*, 15 : 232-239, 1980.
- 3) 山下 智 : イヌの実験的歯肉炎における歯肉免疫グロブリンの動態. *日歯周誌*, 24 : 249~265, 1982.
- 4) Ebersole, J.L., Frey, D.E., Taubman, M.A. and Smith, D.J. : An ELISA for measuring serum antibodies to *Actinobacillus actinomycetem-comitans*. *J. Periodont. Res.*, 15 : 621-632, 1980.
- 5) Nisengard, R., Beutner, E.H., Neugeboren, N., Neiders, M. and Asaro, J. : Experimental induction of periodontal disease with Arthus-type reactions. *Clin. Immunol. Immunopathol.*, 8 : 97-104, 1977.
- 6) Mancini, G., Carbonara, A.O. and Heremans, J.H. : Immunochemical quantitation of antigens by single radial immunodiffusion. *Immunochem.*, 2 : 235-254, 1965.
- 7) Goldsmith, P.K. : A highly sensitive enzyme-linked immunosorbent assay for human Immunoglobulin E : Comparison of microtiter plate and disk methodologies. *Anal. Biochem.*, 117 : 53-60, 1981.
- 8) 斉藤十九子 : B, F の分離, 入江 実編, ラジオイムノアッセイ, 講談社, 東京, 1976, 96~115.
- 9) Desbuquois, B. and Aurbach, G.D. : Use of polyethylene glycol to separate free and antibody-bound peptide hormones in radioimmunoassays. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 33 : 732-738, 1971.
- 10) Hunter, W.M. and Greenwood, F.C. : Preparation of iodine-131 labelled human growth hormone of high specific activity. *Nature*, 194 : 495-496, 1962.
- 11) Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J. : Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193 : 265-275, 1951.
- 12) Burton, K. : A study of the conditions and mechanism of the diphenylamine reaction for the colorimetric estimation of deoxyribonucleic acid. *Biochem. J.*, 62 : 315-323, 1956.
- 13) Lawton, A.R., Kincade, P.W. and Cooper, M.D. : Sequential expression of germline genes in development of immunoglobulin class diversity. *Fed. Proc.*, 34 : 33-39, 1975.
- 14) Higuchi, Y., Honda, M. and Hayashi, H. : Production of chemotactic factor for lymphocytes by neutral SH-dependent protease of rabbit PMN leukocytes from immunoglobulins, especially IgM. *Cell. Immunol.*, 15 : 100-108, 1975.
- 15) Genco, R.J., Mashimo, P.A., Krygier, G. and Ellison, S.A. : Antibody-mediated effects on the periodontium. *J. Periodontol.*, 45 : 330-337, 1974.
- 16) Roitt, I.M., Male, D.K., Hay, F.C. and Nineham, L.J. : The biological role of immune complexes. Steffen, C and Ludwig, H., *Clin. Immunol. Allergol.*, Elsevier/North-Holland Biomedical Press, 1981, 169-195.
- 17) Sano, H. and Morimoto, C. : DNA isolated from DNA/anti-DNA antibody immune complexes in systemic lupus erythematosus is rich in guanine-cytosine content. *J. Immunol.*, 128 : 1341-1345, 1982.
- 18) Toto, P.D., Lin, L.-M. and Gargiulo, A.W. : Immunoglobulins and complement in human periodontitis. *J. Periodontol.*, 49 : 631-634, 1978.
- 19) Clagett, J.A. and Page, R.C. : Insoluble immune complexes and chronic periodontal diseases in

- man and the dog. Archs. Oral Biol. 23 : 153-165, 1978.
- 20) 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.
- 21) 茂手木義男 : イヌの実験的歯肉炎に関する免疫病理学的研究 第2報 歯肉炎発生と免疫複合体について. 日歯周誌, 23 : 569-579, 1981.
-