酵素免疫測定法による歯肉溝滲出液中の プロテオグリカンの測定

西野 恒理 澁谷 俊昭 春名 領
村橋 慶宣 白木 雅文 岩山 幸雄

朝日大学歯学部歯周病学講座

(主任：岩山幸雄教授)

(平成2年3月16日受付)

ELISA Detection of Glycosaminoglycan (GAG) Linked Proteoglycans (PG) in Gingival Crevicular fluid

Watari NISHINO, Toshiaki SHIBUTANI, Satoru HARUNA,
Yoshinobu MURAHASHI, Masafumi SHIRAKI and Yukio IWAYAMA

Department of Periodontology, School of Dentistry, Asahi University

1851-1 Hosumi-cho, Motosu, Gifu

(Chief : Professor Yukio IWAYAMA)

The purpose of this study was to develop an ELISA assay to chondroitin sulfate isomers (C4S, C6S and DS) proteoglycan in GCF associated with experimentally-induced periodontitis in dogs. Combination of these antibodies (9-A-2 and 3-B-3) and specific enzymatic digestion have made possible the identification of C4S, C6S and DS. Experimental periodontitis was induced by silk ligature placement below the gingival margin of the canine mandibular molars. GCF was collected in microcapillary tubes at 0, 3, 7, 21 and 60 days after ligature in three mongrel dogs. Samp-

les were diluted 5×10 in 0.15 M PBS pH 7.2. Indirect ELISA was performed. Standard curve and detection level of GAG-PG had been examined in a preliminary study using bovine nasal cartilage proteoglycan monomer. The quantity of C4S, C6S and DS, though fluctuating, increased in proportion with the severity of inflammation. In particular, C4S was increased in the acute phase and then decreased gradually. The present study has confirmed that ELISA assay enables the detection of GAGs in GCF associated with experimentally-induced periodontitis in the dog.

Key words : Gingival crevicular fluid, Glycosaminoglycan, ELISA, Monoclonal antibody, Experimental periodontitis

要旨：この研究はイヌの実験的歯周炎に伴う歯肉溝滲出液(GCF)中のコンドロイチン硫酸異性体(コンドロイチン4硫酸, コンドロイチン6硫酸, デルマトン硫酸)プロテオグリカン(CS-PG)をELISA法により検討する目的で行った。モノクローナル抗体3-B-3, 9-A-2は各種コンドロイチナーゼとの組合せによりコンドロイチン4硫酸(C4S), コンドロイチン6硫酸(C6S), デルマトン硫酸(DS)の定性が可能である。イヌの歯肉溝を外科用縫合糸で結紮することにより実験的歯周炎を惹起させた。結紮後0, 3, 7, 21, 60日目にマイクロキャピラリーチューブを用いてGCFを採取した。サンプルは0.5 M PBS pH 7.2で50倍に希釈した。その後, サンプルはELISA法により

測定された。

C4S, C6S, DS は炎症の進行に伴って変動した。とくに C4S は急性期に増加し, 漸次減少していった。本研究の結果, ELISA 法により GCF 中の CS-PG が測定可能であり炎症の進展に伴い変動することがあきらかになった。

索引用語: 歯肉溝滲出液, グリコサミノグリカン, 酵素免疫測定法, モノクローナル抗体, 実験的歯周炎

緒 言

細胞外マトリックスを構成する基質成分であるグリコサミノグリカン (GAG) は組織中ではコア蛋白と結合したプロテオグリカン (PG) の状態で存在し, 生体機能に重要な役割を担っている¹⁻⁴⁾。歯肉組織中の GAG に関しては, 岩山ら^{5,6)}, 三木ら^{7,8)}, のヒト歯肉についての報告, および勝谷⁹⁾ によるイヌ歯肉についての報告がなされている。また白木¹⁰⁾はイヌ歯肉を上皮と結合組織に分離し, 各々の GAG の定性, 定量を行い, 歯肉上皮組織中の主要 GAG はヒアルロン酸 (HA) とヘパラン硫酸 (HS) であり, 結合組織中では HA とデルマタン硫酸 (DS) であると報告している。岩田¹¹⁾は急性炎症期には歯肉結合組織中の DS は減少し, 一方慢性炎症期にはコンドロイチン硫酸 (CS) が増加することを報告している。梶川¹²⁾は, イヌの実験的歯周炎において歯肉溝滲出液 (GCF) 中の GAG が, 質的, 量的に変動し健常時 GCF 中にはみられなかった DS, CS が炎症時 GCF 中に出現したと報告している。以上のことより DS と CS は歯周炎と密接に関連していることが推測される。著者らは GCF から歯周組織の状態をモニターしようとする試みを進めており, その指標として歯肉結合組織中の無定形基質である GAG に着目し生化学的に検討してきた。しかし従来の生化学的手法では, GCF 中の GAG を測定するには多量の GCF を必要とし, 1 歯単位での微量な GCF-GAG の測定も困難と思われる。

近年, Couchman ら¹³⁻¹⁵⁾ は, コンドロイチン硫酸プロテオグリカン (CS-PG) に対する数種のモノクローナル抗体の作製に成功し, 各分野で CS-PG に対する免疫組織化学的検索が試みられてきた。Shibutani ら¹⁶⁾はこれらの抗体を用いてヒト歯肉結合組織中の GAG の局在性を明らかにし, GCF 中の GAG との関係性をより密接なものとした。そして今回, 同抗体を用いた ELISA 法によりイヌの実験的歯周炎における GCF 中のグリコサミノグリカン-プロテオグリカン (GAG-PG) の変動について検討を行なった。

材料と方法

1. 実験動物ならびに実験スケジュール

実験動物として雑種成犬 3 頭を使用し, 健常ならびに炎症歯肉の確立は以下のように行った。すなわち臨床的健常歯肉確立のために 1 カ月間, 週 2 回のブラッシングおよびスクレーリングを行い臨床的健常歯肉を確立後, 下顎左右第 3, 第 4 小臼歯および第 1 大臼歯の歯肉溝深部に外科用縫合絹糸 (No. 3) を 2 重に結紮し, プラークの沈着を増進することにより実験的歯周炎を惹起した。健常歯肉確立時と結紮後 3 日, 7 日, 21 日および 60 日目にレントゲン撮影, GCF 量の測定 (ペリオトロン® Harco Electro Co. Canada) および臨床パラメーターとして Gingival Index (Löe & Silness)¹⁷⁾, Plaque Index (Silness & Löe)¹⁸⁾, probing depth の測定と GCF の採取を行った。GCF は Micro Capillary Tube (MICRO-CAPS® DORAMOND U.S.A.) にて 1 μ l 採取後, 直ちに 0.15 M pH 7.2 phosphate buffer saline (PBS) 50 μ l 中に溶解し, これをサンプルとして測定時まで -40°C で保存した。

2. 酵素消化とモノクローナル抗体

今回用いたモノクローナル抗体の特徴は CS-PG の糖鎖を外した断端の不飽和二糖を epitope として認識している点である。CS に対して各種のコンドロイチナーゼで処理を行いコア蛋白の切り株 (stub) を露出させる必要がある。そしてその stub に対してそれぞれの抗体を反応させることにより, 目的とする CS の検出が可能で

Table 1 Assay method for each chondroitin sulfates

Enzyme	Antibody	GAG
Chondroitinase ABC	3-B-3	Chondroitin-6 S
	9-A-2	Chondroitin-4 S
		Dermatan Sulfate
Chondroitinase AC II	9-A-2	Chondroitin-4 S
Chondroitinase B	9-A-2	Dermatan Sulfate

Table 2 Fluctuation of Plaque Index associated with advancing inflammation

DAYS AFTER LIGATURE				
0	3	7	21	60
0	2.2±0.4	2.4±0.5	2.7±0.4	2.8±0.4

* : p<0.01

Table 3 Fluctuation of Gingival Index associated with advancing inflammation

DAYS AFTER LIGATURE				
0	3	7	21	60
0.1±0.3	2.8±0.4	2.9±0.9	2.4±0.5	2.6±0.5

* : p<0.01

ある (Table 1)。

3. ELISA 測定

前述サンプルを平底 96 穴マイクロタイタープレート (FALCON® BECTON DICKINSON 社 U.S.A.) の各ウェルに 50 μ l ずつ分注し、4°C で一昼夜放置してウェルに抗原を吸着させた。プレートは、0.05% Tween 20 を含む PBS (PBST) で 3 回洗浄後、コンドロイチン硫酸分解酵素を各ウェルに 100 μ l ずつ分注し、室温で 1 時間 incubate を行った後、さらに 1% BSA 100 μ l を加え、室温で 2 時間ブロッキングを行った。その後、 8×10^3 倍希釈のモノクローナル抗体 3-B-3, 9-A-2 (Miles 社 U.S.A.) を各ウェルに 50 μ l ずつ加え室温で 1 時間 incubate した後に、 1×10^3 倍希釈のペルオキシダーゼ標識抗マウス免疫グロブリン (CAPPEL 社 U.S.A.) を 50 μ l ずつ分注し、室温で 1 時間 incubate した。次に、酵素基質液 (O-Phenylenediamine+0.03% H_2O_2) を 150 μ l ずつ加え、20 分間室温で反応させ 50 μ l の 4 N H_2SO_4 で反応停止後、ELISA リーダー (MPR-A 4 東洋曹達社 東京) を用いて各ウェルの 492 nm における吸光度を測

Table 4 Fluctuation of probing depth associated with advancing inflammation

DAYS AFTER LIGATURE				
0	3	7	21	60
1.1±0.3	2.9±0.7	3.4±0.5	3.3±0.4	3.0±0.5

* : p<0.01

定した。また標準曲線は試料測定時に牛鼻軟骨プロテオグリカンモノマー (生化学工業社 東京) を用いて、上記と同じ ELISA 法により測定した。

結 果

1. 歯周炎の実験的発症と臨床パラメーター

外科用縫合糸を歯肉溝深部に結紮することにより、明らかな歯周炎の発症と進展を認めた。結紮 3 日目にはプラークが沈着し、発赤、腫脹などの急性炎症所見が遊離歯肉に顕著に認められた。又、結紮 0 日から 7 日目にかけて急性炎症症状が増大し、辺縁歯肉から自然出血するものが多く認められるようになり、炎症の範囲も次第に付着歯肉まで波及していった。結紮 7 日目、21 日目と経過するにしたがって、発赤、腫脹などの急性炎症所見は漸次軽減し、慢性炎症の様相を呈した。Plaque Index (PII) は結紮 3 日目に有意に増加し結紮 60 日目まで徐々に増加しつづけた (Table 2)。Gingival Index (GI), probing depth (PD) は結紮 7 日目以後減少する傾向があるものの結紮 0 日目とは有意に高い値 ($P < 0.01$) を示した (Table 3, 4)。ペリオトロン値も炎症の進展に伴い変化を示し、健常時と比較して急性炎症期では顕著に増加し、慢性炎症期に移行するのにしたがって漸次減少していった (Fig. 1)。また X 線写真による所見では健常時と比較して結紮 21 日目に歯間部における歯槽骨の吸収を示す暗影像が認められ、結紮 60 日目では明らかに骨吸収像が増大した所見が認められた (Fig. 2~4)。

2. ELISA 法による GAG-PG の測定

牛鼻軟骨プロテオグリカンモノマーによる ELISA 法では 15~1,000 ng/ μ l のレベルで測定可能であった (Fig. 5)。本測定系では 1 μ l レベルの微量の GCF で

Fig. 1 Fluctuation of PERIOTRON unit associated with advancing inflammation

Fig. 2 Rentgenogram of 0 day after ligature

Fig. 4 Rentgenogram of 60 days after ligature

Fig. 3 Rentgenogram of 21 days after ligature

GAG-PG の測定が可能であった。また、GCF 中の GAG-PG は実験期間中上記範囲内で推移していた。

3. イヌの実験的歯周炎における GCF 中の GAG-PG

GCF 中の各 GAG-PG の炎症の進展に伴う変動を示す (Fig. 6)。コンドロイチン 4 硫酸プロテオグリカン (C4S-PG) は、急性炎症の著名な 3 日目と慢性炎症期である 21 日目に健常時の 0.35 ± 0.30 に比し、それぞれ

Fig. 5 ELISA assay for bovine nasal cartilage proteoglycan monomer with the use of monoclonal antibody 9-A-2

0.69 ± 0.07 , 0.51 ± 0.11 と増加しペリオトロン値と相似した動向を示した。デルマタン硫酸プロテオグリカン (DS-PG) は慢性炎症期である 21 日目に健常時の

Fig. 6 ELISA assay for glycosaminoglycan proteoglycan in GCF

0.25±0.09 から 0.47±0.12 と増加し、コンドロイチン 6 硫酸プロテオグリカン (C6S-PG) は、7 日目に健常時の 0.35±0.07 から 0.54±0.10 と増加した。各 GAG-PG ともすべて、結紮 60 日目には健常時の値近くに減少した。

考 察

歯周組織の炎症に伴う GAG-PG の変動を検討する目的として短期間のうちに歯槽骨破壊を伴う歯周炎を惹起させるため、動物実験モデルとして雑種成犬の歯肉溝に外科用縫合糸を結紮する方法を用いた。本実験では病理組織学的検討は行っていないが口腔内所見、ペリオトロン値、X線所見から Schroeder ら¹⁹⁾、勝谷⁹⁾、梶川¹²⁾が報告したものと同様な経過をたどる歯周炎モデルであることが示された。

歯肉組織中の GAG に関しては、ヒト^{5-8, 20)}、イヌ⁹⁻¹¹⁾、ブタ²¹⁾、ウシ²²⁾、ウサギ²³⁾、など多くの動物で検討がなされており、それぞれの動物における構成 GAG は概ね一致している。本実験に供したイヌ歯肉の構成 GAG は HA, DS, CS, HS であることが知られており、勝谷⁹⁾は、各 GAG の構成比は HA (41%), DS (48%), CS (5%), HS (6%) であったと報告している。また白木¹⁰⁾は健常イヌ歯肉組織を上皮と結合組織とに分離しそれぞれの GAG 構成比は、上皮で HA (73.9%), HS (7.1%), CS (1.5%)、結合組織では、HA (36.2%), DS (51.9%), CS (7.2%) であると報告している。このように上皮下結合

組織の主要 GAG である DS は、コラーゲンとともに結合組織の細胞外マトリックス成分の重要な構成成分であり、生体内ではコラーゲン線維と密接に結合し線維の形成、配列、構築の維持に関与する^{24, 25)}と同時にコラーゲン分子間架橋結合を安定化させる働きを担っており²⁶⁾、最近では組織により Heterogeneity を示すこと²⁷⁾が知られている。事実、村橋ら²⁸⁾、Shibutani ら¹⁶⁾はイヌあるいはヒト歯肉を用いた免疫組織化学的研究において、コラーゲン線維の走行に沿って DS が存在していることを示した。また岩田¹¹⁾、勝谷⁹⁾は、イヌ歯肉組織中において急性炎症期では不溶性コラーゲンは減少し、代わって可溶性コラーゲンの増加に伴って DS が減少することを報告した。

以上の報告より、DS-PG は炎症初期より GCF 中に流出することが考えられるが、本実験では、DS-PG は結紮 21 日目のみ大きな変動を示した。セルロースアセテート膜二次元電気泳動法を用いた梶川¹²⁾の報告では、イヌの実験的歯周炎において急性炎症期の GCF 中に DS はほとんど認められず本実験と同様であった。破壊の著しい急性炎症期において DS-PG がほとんど認められないのは、DS-PG はコラーゲン線維と密接に結合しており炎症破壊に伴い多様な酵素が関与すると考えられ本抗体が認識する状態では分解されていないと推測される。

イヌ歯肉組織の CS は、含有量が他の GAG と比べ少ないものの歯肉結合組織に広く存在しており²⁸⁾細胞増殖と密接に関連している²⁹⁾。岩田はイヌ歯肉結合組織中において CS は急性炎症期より慢性炎症期に至るまで健常

時より高い値を持続すると報告しており、また Waddington ら³⁰⁾ は C4S は歯槽骨の主要 GAG であると示唆している。本実験における C4S-PG の変動は結紮 21 日目において増加した。この時期より X線写真に骨吸収像を認めるため骨破壊に伴い C4S-PG は GCF 中に流出したと思われるが、さらに今後の検討課題である。

C6S-PG に関しては、歯肉結合組織においては血管内皮、神経線維束周囲に認められ²⁸⁾ 本実験においては結紮 7 日目のみに増加した。本実験における C6S-PG の由来は不明であるが、C6S は歯肉組織中において含有量が極めて少なく³¹⁾、また GCF 中の CS を C4S と C6S に分けた報告が少ないためさらに多方面からの検討が期待される。

従来より GAG の測定に汎用される方法として、セルロースアセテート膜電気泳動法とアルシアンブルー染色を応用した報告^{12, 32, 33, 34)} があるが、Bartold ら³⁵⁾ は、上記の方法では $\mu\text{g/ml}$ レベルが限界であると報告している。しかし、上記の方法を用いて GAG を測定するには多量の GCF を必要とし、個々の歯牙単位の測定および臨床応用には困難と思われる。そこで今回、簡便で、微量定量が可能な ELISA 法^{36~39)} に着目し検討を行なった結果、 $1\mu\text{l}$ という微量な GCF で十分測定可能であり、GCF 中の GAG-PG が実験的歯周炎の進展に伴い変動した。以上の結果より、ELISA 法は、GCF 中の GAG-PG の測定に極めて有用であると思われる。

結 論

イヌの実験的歯周炎における歯肉溝滲出液中のコンドロイチン硫酸プロテオグリカンの変動をモノクローナル抗体を用いた ELISA 法により検索した結果、以下の結論を得た。

1. ELISA 法により歯肉溝滲出液中のグリコサミノグリカン-プロテオグリカンの測定が可能であった。
2. 歯肉溝滲出液グリコサミノグリカン-プロテオグリカンが炎症の進展に伴い、量的、質的に特徴的な変動を示した。
3. 以上の結果、本測定法は微量測定が可能であり歯周病変の動的指標としてのプロテオグリカン測定に有用と思われる。

尚、本研究の一部は昭和 63 年度宮田奨励金 A の補助により行われたことを付記する。

文 献

- 1) 梶川欽一郎：結合組織，第 1 版，金原出版，東京，1984，327.
- 2) Mayer, K. : Biochemistry and biology of mucopolysaccharides. *Am. J. Med.*, 47 : 664-671, 1969.
- 3) Comper, W.D. and Laurent, T.C. : Physiological function of connective tissue polysaccharides. *Physiol. Revy.*, 58 : 255-317, 1987.
- 4) Modis, L. : The molecular structure of the interfibrillar matrix in connective tissue. *Acta Biol. Acad. Sch. Hung.*, 29 : 197-226, 1978.
- 5) 岩山幸雄：歯肉結合組織の破壊。歯界展望，55 : 833-888, 1980.
- 6) 岩山幸雄，津谷啓治，勝谷芳文，喜多次郎，野村慶雄，三木隆雄，石田 浩，栢 豪洋，延原惇男，横溝一郎，足立綱三郎：ヒト病的歯肉結合組織成分に関する研究。II. ウロン酸ならびに可溶性コラーゲンについて。日歯周誌，18 : 50-55, 1976.
- 7) 三木隆雄，勝谷芳文，岩山幸雄，野村慶雄，石田浩，福原浩喜，横溝一郎，栢 豪洋，足立綱三郎：ヒト病的歯肉結合組織成分に関する研究。III. 酸性ムコ多糖の定性分析について。日歯周誌，19 : 13-17, 1977.
- 8) 三木隆雄，勝谷芳文，河合惇二，岩山幸雄，野村慶雄，石田 浩，山上紘志，栢 豪洋：ヒト歯肉結合組織成分に関する研究。IV. 酸性ムコ多糖の定量分析について。日歯周誌，19 : 364-368, 1977.
- 9) 勝谷芳文：イヌの実験的歯周炎における歯肉グリコサミノグリカン代謝について。日歯周誌，24 : 266-284, 1982.
- 10) 白木雅文：健康イヌ歯肉組織における上皮ならびに上皮下結合組織のグリコサミノグリカンについて。日歯周誌，28 : 785-799, 1986.
- 11) 岩田 真：イヌの実験的歯周炎における歯肉上皮ならびに上皮下結合組織のグリコサミノグリカンについて。日歯周誌，30 : 1008-1020, 1988.
- 12) 梶川 潔：イヌの実験的歯周炎における歯肉溝滲出液中のグリコサミノグリカンについて。日歯周誌，28 : 500-514, 1986.
- 13) Couchman, J.R., Caterson, B., Christner, J.E. and Baker, J.R. : Mapping by antibody detec-

- tion of glycosaminoglycans in connective tissues. *Nature*, 307 : 650-652, 1984.
- 14) Caterson, B., Christner, J.E., Baker, J.R. and Couchman, J.R. : Production and characterization of monoclonal antibodies directed against connective tissue proteoglycans. *Federation Proc.*, 44 : 386-393, 1985.
 - 15) Caterson, B., Baker, J.R., Chrietner, J.E. and Couchman, J.R. : Immunological methods for the detection and determination of connective tissue proteoglycans. *J. Invest. Dermatol.*, 79 : 45-50, 1982.
 - 16) Shibutani, T., Murahashi, Y., Iwayama, Y. : Immunohistochemical localization of chondroitin sulfate proteoglycan in human gingival connective tissue. *J. Periodontal Res.*, 24 : 310-313, 1989.
 - 17) Le, H. and Silness, J. : Periodontal disease in pregnancy. I : Prevalence and severity. *Acta Odont. Scand.*, 21 : 533-551, 1963.
 - 18) Silness, J. and Le, H. : Periodontal disease in pregnancy. II : Correlation between oral hygiene and periodontal condition. *Acta Odont Scand.*, 22 : 121-135, 1964.
 - 19) Schroeder, H.E. and Lindhe, J. : Conditions and pathological features of rapidly destructive, experimental periodontitis in dogs. *J. Periodontol.*, 51 : 6-19, 1980.
 - 20) Bartold, P.M., Wiebkin, O.W. and Thonard, J.C. : Glycosaminoglycans of human gingival epithelium and connective tissue. *Connect. Tissue Res.*, 9 : 99-106, 1981.
 - 21) 平松正彦, 阿部 勲, 南 直臣 : ブタ歯肉の酸性ムコ多糖について. *城歯大紀要*, 5 : 75-84, 1976.
 - 22) 榊 鉄也, 鶴身紀雄, 前田純典, 本多忠敬, 川勝賢一, 田治米保夫, 鎌田洋吾 : 歯肉の酸性ムコ多糖に関する研究 (1) ウシ歯肉酸性ムコ多糖について. *歯科医学*, 34 : 333-340, 1971.
 - 23) 坂本真喜 : 歯肉および歯髄の Acidic Glycosaminoglycan の生化学的研究 第1報 歯肉および歯髄の Acidic Glycosaminoglycan の微量定量. *広歯誌*, 9 : 169-177, 1977.
 - 24) Radharkishnamurthy, B., Ruiz, H.A. and Berenson, G.S. : Isolation and characterization of proteoglycans from bovine aorta. *J. Biol. Chem.*, 252 : 4831-4841, 1977.
 - 25) Toole, B.P. and Lowther, D.A. : Dermatan sulfate protein : Isolation from and interaction with collagen. *Arch. Biochem. Biophys.*, 128 : 567-578, 1968.
 - 26) Gelman, R.A. and Blackwell, J. : Collagen-mucopolysaccharides interaction at acid pH. *Biochim. Biophys. Acta.*, 342 : 254-261, 1974.
 - 27) Larjava, H. Heino, J. Krusius, T. Vuorio, E. and Tammi, M. : The small dermatan sulphate proteoglycans synthesized by fibroblasts derived from skin, synovium and gingiva show tissue-related heterogeneity. *Biochem. J.*, 256 : 35-40, 1988.
 - 28) 村橋慶宣, 渋谷俊明, 岩田 真, 白木雅文, 岩山幸雄 : イヌ歯肉結合組織中のコンドロイチン硫酸異性体の免疫組織化学的検討. *日歯周誌*, 29 : 498-453, 1987.
 - 29) Sampio, O.P., Dieyrich, C.P. and Filho, O.G. : Changes in sulfated mucopolysaccharides composition of mammalian tissues during growth and in cancer tissue. *Biochim. Biophys. Acta.*, 498 : 123-131, 1977.
 - 30) Waddington, R.J., Embery, G. and Last, K.S. : The glycosaminoglycan constituents of alveolar and basal bone of the rabbit. *Connect. Tissue Res.*, 17 : 171-180, 1988.
 - 31) Bartold, P.M. : Proteoglycans of the periodontium : Structure, role and function. *J. Periodont. Res.*, 22 : 431-444, 1987.
 - 32) 梶川 潔, 永橋理宏, 水野 清, 白木雅文, 岩山幸雄 : ヒトの実験的歯肉炎における歯肉溝滲出液中のグリコサノグリカンについて. *日歯周誌*, 29 : 844-852, 1987.
 - 33) Embery, G., Oliver, W.H., Stanbury, J.B. and Purvis, J.A. : The electrophoretic detection of acidic glycosaminoglycan in human gingival sulcus fluid. *Arch Oral Biol.*, 27 : 177-179, 1982.
 - 34) Last, K.S., Stanbury, J.B. and Embery, G. : glycosaminoglycan in human gingival crevicular fluid. *Arch Oral Biol.*, 30 : 275-281, 1982.
 - 35) Bartold, P.M. and Page, R.C. : A microdetermination method for assaying glycosaminogly-

- can and proteoglycan. *Anal. Biochem.*, 150 : 320-324, 1985.
- 36) Voller, A., Bartlet, A. and Bidwell, d.e. : Enzyme Immunoassays with special reference to ELISA techniques. *J. Clin. Pathol.*, 31 : 507-520, 1978.
- 37) Rennerd, S.I., Martin, G.R., Foidart, J.M. and Robey P.G. : Enzyme-linked immunoassay (ELISA) for connective tissue component. *Anal. Biochem.*, 104 : 205-214, 1980.
- 38) Baker, J.R., Caterson, B. and Christner, J.E. : Immunological characterization of cartilage proteoglycan. *Methods Enzymol.*, 83 : 216-234, 1983.
- 39) Voller, A., Bidwell, D. and Bartlet, A. : Microplate enzyme immunoassay for the immunodiagnosis of virus infection, Rose, N.R. and Fsieidman, H., *Manual of Clinical immunology*, American Society for Microbiology, Washington, D.C., 1976, 506-512.

連絡先 :

朝日大学歯学部歯周病学講座

〒 501-02 岐阜県本巣郡穂積町穂積 1851-1