歯肉溝滲出液の Protein Mapping

—ミクロ多検体 2次元電気泳動法の臨床への応用—

齊 藤 隆 嗣

神奈川県大学保存修復学講座

(指導：岩本次男教授)

神奈川県大学口腔生化学教室

(指導：斎藤 滋教授)

(平成2年12月10日受付)

Microscale Multisample Two-dimensional Protein Mapping of Human Gingival Fluid

Ryuji SAITO

Department of Restorative Dentistry Kanagawa Dental College

82, Inaoka-cho, Yokosuka, 238 Japan

(Director : Prof. Tsugio IWAMOTO)

Department of Oral Biochemistry, Kanagawa Dental College

(Director : Prof. Shigeru SAITO)

Qualitative and quantitative studies on proteins in gingival fluid (GF) have greatly contributed to a better understanding of its nature and significance.

In this study, microscale multisample two-dimensional (2-D) electrophoresis in the absence of denaturing agent developed by Manabe et al. (1982) was applied for analyzing the whole proteins present in GF from various periodontal diseases.

The samples collected from 28 individuals, males and females aged 18 to 69 years, were classified into four groups according to their clinical findings. GF was collected from anterior tooth and also serum and whole saliva were sampled for comparison. Silver staining was used for both GF and whole saliva and Coomassie-Blue dye was applied for serum.

Some gels were transferred to nitrocellulose sheets for identification of GF protein according to

western blotting and these sheets were immunochemically stained by using anti-human serum, anti-human S-IgA and anti-human whole saliva, respectively. Both nitrocellulose sheets and polyacrylamide gels were imaged by TV-camera and analyzed by microcomputer system.

The results indicated that the majority of protein fraction in GF were mainly originated from serum, and that unidentified fractions whose counterparts are not in serum were particularly observed in GF from severe periodontitis. Furthermore, free hemoglobin and haptoglobin-hemoglobin complex were often detected in severe periodontitis.

Consequently, it was revealed that microscale multisample 2-D electrophoresis would provide valuable informations for diagnosis of periodontal disease.

Key words : Gingival fluid, Protein, 2-D electrophoresis, Western blotting

要旨：歯肉溝滲出液中のタンパク質の分析は歯周組織の病態変化を客観的に捉えるために、臨床上極めて価値あることと思われる。本研究では真鍋らの2次元電気泳動法がその分析に応用可能であるか否かを検討した。さらに、本法を臨床的に分類した歯周病患者の歯肉溝滲出液や全唾液ならびに血清の分析に応用すると共に滲出液成分の由来を知るため western-blot 法を用いて、抗ヒト全血清、抗ヒト全唾液および抗ヒト S-IgA に対する反応性を検討した。

その結果、滲出液中のタンパク質の多くが血清由来で歯周疾患の存在により増加する傾向が示された。IgA 付近には由来の不明な滲出液に特有と思われる、線状の分画が示された。また、遊離 Hb は病態群で、Hp-Hb complex は全ての症例で高頻度に認められた。

さらに、病態群の滲出液中に抗ヒト S-IgA に対する反応が高い頻度で認められたことから局所免疫応答の関与が示唆された。

索引用語：歯肉溝滲出液、タンパク質、2次元電気泳動法、Western-blot 法

緒 言

不良修復物に起因すると思われる歯周組織の炎症性変化は日常の臨床でしばしば見受けられる。この変化は時に、慢性経過をたどりながら重篤な歯周疾患へと移行することも少なくない。従って、このような一連の病態変化に対する定量的診断法の確立は、治療方針の決定およびその後の処置に係わる予後の経過を推測する上に極めて重要な要件となり得るものと考えられる。

今日、歯周組織の臨床的評価法には各種の index や計測値ならびに放射線学的画像診断法などが広く用いられているが、これらの方法では時に術者の主観が適切な診断情報を得るための妨げとなるため、より科学的根拠に基づいた客観的診断法が求められる。その一手段として、歯肉溝滲出液の滲出液量を計測して歯周組織の病態の程度を把握する方法が日常の臨床で用いられている。

歯肉溝滲出液は各種の刺激により歯肉局所の血管透過性が亢進することによって歯肉溝内に滲出する組織液であり、歯周病変の存在によりその滲出量やその中に含まれる血漿タンパク質が増加すると報告されている¹⁻³⁾。

しかしながら、滲出液量の変化と歯周疾患の程度との関係については、病態の進行に伴って増加するとの報告^{1,4-6)}がある一方、歯周病変の程度と滲出液中に含まれるニンヒドリン陽性物質は病態の進行と共に相関して増加するが歯肉溝滲出液は必ずしも増量しないとする末田⁷⁾や細田ら⁸⁾の報告もある。また、宮本⁹⁾は histamine 滴下による滲出液量の変化は極めて一過的で

あることを、寺中¹⁰⁾はイヌの歯肉に実験的歯周炎を惹起せしめ滲出液量とその中に含まれる kallikrein-like esterase 活性は相関を示すが、歯肉溝滲出液量の増加は歯周疾患が惹起された初期においては相関するものの、それ以後疾患の程度とは必ずしも一致しないと述べている。

一方、Brill ら¹¹⁾は 1960 年に免疫電気泳動法を用いて歯肉溝滲出液中で 7 種の血清タンパク質を同定し、特に、transferrin や γ -globulin の様なタンパク質を歯肉溝内に認めることは毛細血管の透過性亢進による歯肉溝上皮の間隙からの滲出の結果であるとの示唆を与えた。しかしながら、初期の研究では歯肉溝滲出液中に存在する血漿タンパク質の生物学的意義について、疑問視する動きもあったが、以後、これらのタンパク質に含まれる抗体の一部には歯肉炎の程度と相関を示すものが存在するとの報告¹²⁾から、次第にその生物学的役割を検索することの重要性が認識されるようになってきた。さらに、歯肉溝滲出液中にはこの様な血漿に由来するタンパク質や歯周組織の病変に由来する組織代謝産物ならびに細菌由来物質等が含まれることも報告^{13,14)}されている。

従って、歯肉溝滲出液量の増減のみで病態を捉えるには不安定要素が多くあるものと考えられるため、著者はこれらの要素を可及的に排除し、病態に関する、よりの確な診断情報を得るには歯肉溝滲出液中の内容成分の分析が最も適切であると考えた。

しかしながら、歯肉溝滲出液は採取困難な微量な試料であるため、その分析法には高精度かつ高感度な方法が必要である。

近年、真鍋ら¹⁵⁾によって開発されたマイクロ多検体 2 次元電気泳動法は試料が 1~2 μ l と微量で良いこと、

また、SDS や尿素等のタンパク質変性剤を用いない、所謂、試料の構成成分を変性させることなく、生理活性を保った状態で分離することを基本とするため、歯肉溝滲出液のような極めて有限的な試料に対してはこれまでの1次元電気泳動法より優れた分析法であると思われる。

この様な観点から、著者は本法を歯肉溝滲出液の臨床的分析に応用することによって歯周疾患の動的变化を“Real time”に捉え、その結果が臨床的にどの様な意義を持つものかを検討することを目的として本研究を遂行した。

実験材料および実験法

1. 試料の採取および調製

1) 被験者

被験者は神奈川歯科大学付属病院保存科に来院した年齢18～69歳の全身疾患を伴わない歯周疾患のみを有する患者で、歯肉溝滲出液採取部位、すなわち上顎前歯部に歯冠補綴物および修復物のない男女20名を選び、Gingival index (G.I.), Plaque index (P.I.)¹⁶⁾, Oral hygiene index (O.H.I.)¹⁷⁾, Pocket depth (P.D.) およびX線所見により、これらを歯肉炎群 (G) 9名、軽度および中等度歯周疾患群 (P₁) 5名、高度歯周疾患群 (P₂) 6名の3群に分類し、さらに、対照として臨床的正常群 (N) 8名を選んだ (表1)。

なお、今回用いた G.I. は Löe によって提唱¹⁶⁾された 0～3 の score の内、score 1 の評価基準が広範囲であるため、歯肉炎の初期変化をより厳密に捉えることを目的としてこれを2段階に分け、0～4 の5段階に改変した鈴木¹⁸⁾の評価法に従った。

2) 試料の採取

同一被験者より血清、全唾液および歯肉溝滲出液を採取し試料とした。

全血清は肘正中皮静脈より血液5mlを採取し、室温下に1時間静置後、1,750×g, 10分間遠心して調製した。

全唾液は無刺激下に自然に流出する唾液2mlを採取後、8,000×g, 30分間遠心しその上清を試料とした。

歯肉溝滲出液は被験部位の1歯を対象として生理的食塩水にて洗滌、低圧のエアースリンジにて乾燥後、簡易防湿を施し、さらに滲出液の蒸発を防止する目的で採取対象部位付近を食品用ラップフィルムにて約10分間被覆した。その後、予め2μlの位置に目盛りを付与したポリエチレンチューブをマイクロシリンジに装着し、歯肉溝に貯溜した滲出液を2μl採取した。

得られた全ての試料は急速凍結し、泳動開始まで-60℃にて保存した。

3) 泳動用試料の調製

歯肉溝滲出液については試料中のタンパク質成分の分子量、等電点による同定および抗原特異性を知ることが目的として western-blot 法¹⁹⁾を応用するため、採取された滲出液を1/3希釈とし、各々2μlずつの2試料を準備した。

また、血清および全唾液は原液のまま、各々2μlを試料とした。

これらの試料溶液にはショ糖を40% (w/v) となるよう加え、同一被験者につき歯肉溝滲出液は2試料、血清と全唾液はそれぞれ1試料の合計4試料を泳動に供した。

2. 試料の分析

試料分析は図1に示す手順に従って行った。

表1 歯周疾患の各病態とその臨床的評価

Classification	Number of Specimens	O.H.I.				
		Gingival Index	Plaque Index	Debris Index	Calculus Index	Pocket Depth (mm)
Normal (N)	8	0.54 ±0.46	0.53 ±0.27	3.56 ±0.71	0.61 ±0.38	1.11 ±0.18
Gingivitis (G)	9	2.17 ±0.72	1.43 ±0.74	4.16 ±1.28	2.24 ±1.60	1.60 ±0.27
Slight & Moderate Periodontitis (P ₁)	5	2.32 ±0.55	1.58 ±0.58	4.66 ±0.74	3.56 ±1.25	2.18 ±0.64
Advanced Periodontitis (P ₂)	6	2.93 ±0.85	1.60 ±0.74	4.78 ±0.78	3.08 ±1.03	2.52 ±0.69

Mean±SD

図1 分析および定量法

1) 2次元電気泳動法

分析には真鍋ら¹⁵⁾の開発したマイクロ多検体2次元電気泳動法ならびに装置 (Immuno Medica) を用い、1次元目には等電点電気泳動法を、次いで2次元目は直線濃度勾配ポリアクリルアミドゲルスラブ電気泳動法を用い、同時に2被験者8試料の泳動を行った。

(1) 等電点電気泳動

1次元目は内径1.3 mm、長さ42 mmのガラスチューブを用い、pH 3.5~5およびpH 3.5~10の40% Ampholine (Pharmacia LKB) を含む4% ポリアクリルアミドゲル等電点電気泳動法で泳動条件は陰極槽に0.04 M NaOH、陽極槽には0.01 M H₃PO₄を電極液として用い、ゲルカラム1本当たり0.1 mAの定電流で20分、次いで300 Vの定電圧で20分間泳動を行った。

(2) 濃度勾配スラブ電気泳動

2次元目は長さ35 mm、幅38 mm、厚さ1.0 mmの4~17%の直線濃度勾配ポリアクリルアミドゲルスラブ電気泳動法で、泳動条件は電極液に0.1% Bromophenol Blue (BPB) を含む0.05 M Tris-0.38 M Gly. 緩衝液、pH 8.3を用い、陰極槽および陽極槽間をろ紙(35×50 mm)にてブリッジ後、1ゲルスラブ当たり5 mAの定電流で120分間泳動した。

2) ゲルの染色および Western-blotting

(1) ゲルの染色法

泳動終了後、血清試料は0.1% Coomassie Brilliant Blue R-250 (CBB) を用いて染色し、次いで20% メタノール-酢酸にて脱色した。全唾液は Silver Stain Kit (Bio-Rad) により銀染色を行った。また、歯肉溝

滲出液については染色法の違いによる泳動像の差を検討するため、CBB および銀染色を行った。

(2) Western-blotting

歯肉溝滲出液は泳動終了後、その試料ゲルの1枚を滲出液中のタンパク質成分の同定、および特異血清に反応する分画ならびに非抗原性分画の検索を目的として、western-blot 法を応用した。

装置は真鍋ら¹⁹⁾の開発した水平型電気泳動式トランスファー・プロット装置 (OMY-I 型; Immuno Medica) で、ゲルスラブ上に nitrocellulose sheet (40×40 mm, pore size 0.45 μm; Millipore) を乗せ、0.025 M Tris-0.19 M Gly. 緩衝液 pH 8.3 を電極液とし、ゲル1枚当たり5 Vの定電圧で10分間泳動を行い、1試料につき3枚のレプリカを得、抗体染色を行った。染色には高感度微量蛋白質検出測定キット (Immun-Blot; Bio-Rad) を用い、1次抗体、すなわち抗血清にはウサギ抗ヒト血清 (Cappel Lab), ウサギ抗ヒト全唾液 (Nordic Immunological Lab), およびウサギ抗ヒト S-IgA; α 鎖特異性 (Cappel Lab) を用いた。

3. タンパク質成分の同定および定量

1) タンパク質の同定

ゲル試料のタンパク質の同定はすでに真鍋らが報告したヒト血漿タンパク質に関する正規化図 "Identification map of human plasma proteins" (図2)^{20,21)} を、さらに唾液タンパク質については Mogi ら^{22,23)} の正規化図を用いた。

2) タンパク質の定量

定量²⁴⁾には画像処理装置 (TIF-64; Immuno Medica) を用いた。図3はそのブロック・ダイアグラ

(Manabe, T: et al., Electrophoresis 1985. 6. 462-467)

図2 ヒト血漿タンパク質の正規化図

図3 画像処理装置のブロックダイアグラム

ムを表す。

測定値はゲルおよび nitrocellulose sheet に転写された任意のスポットを TV-Camera により映像化し、スポット中の個々の画像粒子すなわち画素の濃淡を 64 段階の輝度信号に変換し、その総和を濃度積算値 (Integrated density) として表した。

また、画素の濃淡を決定するための標準色には

white, lightgray, darkgray, black (Fuji Density Step Tablet, Fuji Photo Film) の 4 階調を用いた。

結果

1. 2次元電気泳動法

歯肉溝滲出液の 2 次元電気泳動法および western-blot 法の臨床への応用に先立ち、以下の検討を行った。

1) 血清、全唾液および歯肉溝滲出液の比較

図4は臨床的健康歯肉を有する同一被験者より採取された歯肉溝滲出液、血清および全唾液の 2 次元電気泳動像を示している。

血清で得られた全てのタンパク質は等電点 (pI) 4~8, 分子量 (MW) $7 \times 10^4 \sim 100 \times 10^4$ 付近に分布し、ほぼ正規化図と同様であったが、fibrinogen (Fg) 分画は認められなかった。また、それぞれの成分は境界明瞭な分画として得られた (図4-A)。

図4 血清、歯肉溝滲出液および全唾液の2次元電気泳動像

- A 血清 (CBB 染色)
B 歯肉溝滲出液 (銀染色)
C 全唾液 (銀染色)

全唾液には銀染色を用いた。その結果、先の血清とは異なり pI 4.5~8, MW $30 \times 10^4 \sim 100 \times 10^4$ 付近の高分子側に染色性の高い分画が得られ, secretory IgA (S-IgA) と同定された。また, pI 6, MW 17×10^4 付近には血清成分とは異なる amylase 分画を認めた。さらに、濃染部以外の他の領域には IgG, IgA, transferrin (Tf), ceruloplasmin (Cp), albumin (Alb) 等、血清にも見られる分画が認められた (図4-C)。

歯肉溝滲出液の泳動像は他の2試料に比較して各分画の境界が不明瞭な、所謂, streaking 様の現象が認められるものの、IgM, low density lipoprotein (LDL), IgG, α_2 -macroglobulin (α_2 M), haptoglobin (Hp), IgA, high density lipoprotein (HDL), C4, C3 activator (Bp), Cp, Tf, hemopexin (Hpx), Gc-globulin (Gc), Alb, α_1 -antitrypsin (α_1 AT), prealbumin (PA) 等、血清で認められるものと同一成分が16種類以上分離泳動されていた (図4-B)。

さらに、IgA 付近には矢印で示したように血清および全唾液には認められない、歯肉溝滲出液に特徴的と思われる pI 5.2, MW 18×10^4 の染色性の高い線状の分画が認められた。

一方、歯肉溝滲出液の泳動像の染色法による違いは図5-Aに示すごとく、血清試料で用いたCBBにより染色を行った場合には検出可能な成分は、IgM, α_2 M, IgG, IgA, Tf, Albの6分画のみであったが、同試料を引き続き銀染色すると図5-Bに示したごとくCBB

に比べ、より多数の分画を検出することが出来た。

従って、微量な歯肉溝滲出液中の多種成分の検出を目的とした場合には銀染色など、CBBより高感度な染色法を選択する必要があることが示されたため、滲出液の染色には以後全て銀染色を用いた。また、今回の様に銀染色のみを用いた場合には滲出液中のAlb分画はドーナツ状の形態として得られた (図4-B)。

2) 歯肉溝滲出液の抗原特異性

Western-blot法による歯肉溝滲出液成分の抗原特異性の検索は比較的液量の得られる病態群の歯肉溝滲出液を用いて検討した。図6-Aは試料の泳動後に銀染色によって得られた分離像を示している。

このような分離特性を示す試料の各分画の抗原特異性は、抗全唾液では図6-Bに示すごとくIgM, IgG, α_2 M, IgA, C4, Bb, Alb, PA等が認められ、歯肉溝滲出液中には唾液との共通抗原性を持つタンパク質の存在がうかがわれた。また、抗S-IgAについては歯肉溝滲出液中に血清由来のIgAの他、S-IgAの存在が示された (図6-C)。さらに、図6-Dに示す抗全血清ではblottingで認められる分画にIgM, LDL, IgG, α_2 M, Hp, IgA, C4, Bb, HDL, Cp, Tf, Hpx, antithrombin III (AT III), α_1 T-glycoprotein (α_1 T), α_2 HS-glycoprotein (α_2 HS), Gc, Alb, PA等18種が検出された。また、得られた分画の多くが pI 4~8, MW $7 \times 10^4 \sim 100 \times 10^4$ の付近に認められ、前二者と比較しても抗全血清と反応性の高い分画が存在し、歯肉溝滲出液中

図 5 歯肉溝滲出液に対する染色法の比較
A CBB 染色
B 銀染色

図 6 歯肉溝滲出液成分の同定 (Western-blotting)
A 歯肉溝滲出液の 2 次元電気泳動像
B 抗全唾液
C 抗 S-IgA
D 抗全血清

図 7 各症例の歯肉溝滲出液の2次元電気泳動像

- A 臨床的正常 (N)
- B 歯肉炎 (G)
- C 軽度および中等度歯周疾患 (P_1)
- D 高度歯周疾患 (P_2)

のタンパク質の多くが血清と共通抗原を持つことが示された。

これら一連の結果から、今回用いた2次元電気泳動法が歯肉溝滲出液の分析に応用可能であることが示されたため、臨床的評価法およびX線所見に基づいて分類した患者の歯肉溝滲出液の分析を試みた。

2. 2次元電気泳動法の臨床応用

1) 病態の臨床的分類

表1は実験に供した被験者の歯周疾患の病態とその分類に用いたscoreの測定値の平均および標準偏差を示している。得られた値は病態の進行と共に高くなる

傾向を示したが、P.D.は P_1 群、 P_2 群の間でその値に著しい差を認めなかった。しかしながら、X線所見では P_1 群より P_2 群に高度な骨吸収像を認めた。

2) 歯肉溝滲出液の分析

図7はそれぞれの病態の1症例より採取した歯肉溝滲出液の2次元電気泳動像でありAはN群、BはG群、Cは P_1 群、Dは P_2 群を表している。これらの比較では特にN群、 P_1 群および P_2 群の分画がstreaking様の現象により境界不明瞭な泳動像として得られた。また、この現象の出現傾向はG.I.およびP.D.で高値を示す P_1 群や P_2 群で著しく、特に、IgM、IgG、 α_2 M分

表 2 各病態群の試料の Integrated density

Classification	Number of Specimens	Serum	Gingival Fluid	Anti Serum	Anti Total Saliva	Anti S-IgA
Normal (N)	8	1560.34 ±186.59	1965.11 ±275.73	481.72 ±227.53	136.50 ±182.56	8.55 ±12.67
Gingivitis (G)	9	1817.84 ±209.32	3130.77 ±477.09	1128.05 ±178.45	768.48 ±163.16	222.47 ±35.01
Slight & Moderate Periodontitis (P ₁)	5	1495.10 ±129.60	2590.73 ±621.35	1849.34 ±372.80	882.62 ±135.78	251.85 ±73.46
Advanced Periodontitis (P ₂)	6	2276.42 ±253.50	3133.18 ±383.30	1650.01 ±346.54	910.04 ±258.07	191.60 ±56.44

Value ; Integrated Density Mean±SE

図 8 血清と歯肉溝滲出液の Integrated density

画などの高分子側で顕著であった。

一方、G群で得られた分画は最も明瞭な分離性を示した。また、染色性はG群およびP₂群が最も高く、次いでP₁群、N群の順であった。

さらに、G群およびP₂群ではpI 7, MW 8×10⁴付近に遊離のhemoglobin (Hb)²⁵⁾を、また、α₂Mの上下に渡りhaptoglobin-hemoglobin complex (Hp-Hb complex)の分画を認めた²⁵⁾。これら分画の出現はHbはG群で9例中3例、P₁群は5例中1例、P₂群では6例中の2例に見られたが、N群には認められなかった。また、Hp-Hb complexは極めて高頻度に見られ、N群は8例中5例に、病態群では全試料において認められた。

さらに、IgA付近に示される線状の分画はN群では4例、G群では8例、P₁群で4例、P₂群で5例と全28例中、21例の歯肉溝滲出液中で高頻度に認められた

が、血清、全唾液においては検出されなかった。また、この特徴的線状の分画を始め、各群の歯肉溝滲出液の泳動像上に認められるHp-Hb complexや先のHb等の分画は、抗全血清、抗全唾液および抗S-IgAを用いたwestern-blot法によっても反応性は認められなかった(図6-B, C, D)。

3) 画像処理装置によるタンパク質の定量

表2, 図8には病態の異なる歯周疾患患者の血清および歯肉溝滲出液の2次元電気泳動後のゲル上、および滲出液成分に対する抗血清による抗体染色によってnitrocellulose sheet上で得られたタンパク質の濃度積算値、すなわちintegrated densityの平均および標準誤差を示した。

血清ではN, G, P₁群間に差は認められないもののP₂群はN群と比較しp<0.05で有意に高い値を示した。

図 9 歯肉溝滲出液のレプリカ上の Integrated density

一方、歯肉溝滲出液は血清と同様、N, G, P₁ 群間で差は認められないが、P₂ 群の integrated density は N 群に対して $p < 0.05$ で統計学的有意を示した。

さらに、歯肉溝滲出液中の成分の抗原特異性は図 9 のごとく抗全血清、抗全唾液および抗 S-IgA に対し、共に G, P₁, P₂ 群の病態群で N 群より $p < 0.05$ で有意に高い反応性が示されたが、病態群間の統計学的有意差はいずれも認められなかった。

また、各病態群の index score (表 1) との相関を検討すると、抗全血清との反応性では G.I. および P.D. の値が共に高い P₁, P₂ 群で高値を示す傾向を認めたが、歯肉組織のみに炎症症状を示す G 群ではわずかに低い値であった。また、全唾液に対する抗体との反応性は病態群の index score との著しい相関は認められなかった。さらに、抗 S-IgA に対する integrated density は全血清や全唾液に対する抗体との反応性よりも低い値ではあるが、病態群では N 群に比較し $p < 0.05$ で明らかに高い値が認められた。

考 察

1. 歯肉溝滲出液への 2 次元電気泳動法の応用

電気泳動法による歯肉溝滲出液中のタンパク質の分析は 1960 年 Brill ら¹¹⁾が寒天を支持体とした免疫電気泳動法を応用したことに始まる。その後、同様な手法により他の研究者らも滲出液中のタンパク質の同定を行い、その臨床的意義について検討を加えている^{12,26,27)}。

しかしながら、免疫電気泳動法では特異抗体による成分の分離を基本とするため、多数の異なる分子量から成る不特定成分を分離するには不適当である。これに対し、優れた分子篩効果をもつ polyacrylamide gel を支持体とするディスク電気泳動法は多数の成分を高い分離能で得られることから、すでに滲出液の分析にも広く応用されている²⁸⁻³¹⁾。本法では試料成分を 1 次元方向に展開するため、得られた個々のバンドに複数の成分が重複すること、また、より高い分離能を得るためには十分量の試料を採取する必要がある、数歯の滲出液を集積し、泳動に供することが一般的であった。そのため、滲出液の分析結果は採取部位の平均値であり、各歯で異なる病態の stage を有する歯周疾患では的確な情報は得難い欠点があった。これに対し、今回著者の用いた試料は特定被験歯の 1 歯から採取されたものを用いている点で、得られる結果には合目的な情報が含まれているものと考えられる。

一方、1 次元電気泳動法より多数の成分を高い分離能で検出できる 2 次元電気泳動法は、分離の原理を異にする 2 種の電気泳動法を組み合わせ、高感度な検出法を選択することで、より効果的な分析が可能であるため、すでに種々のタンパク質の分析に応用されている。

特に、polyacrylamide gel を用いた 2 次元電気泳動法による歯肉溝滲出液の分析では、Mukherjee ら³²⁾が 1 次元目に尿素を含む polyacrylamide gel 等電点電気泳動法を、2 次元目に SDS-polyacrylamide gel スラブ電気泳動法を組み合わせ、所謂、O'Farrell の方法³³⁾によって、滲出液中に含まれる主なタンパク質は

分子量が 64 K~16 K のものであることを報告した。しかしながら、O'Farrell の方法は尿素や SDS 等のタンパク質変性剤を用いるため、試料タンパク質の存在状態の解析、すなわち生理活性を保持したままの分析ではなく、また、高分解能を得るためには 20~30 μ l の試料量が必要で、さらに泳動完了まで 40 数時間を要することから、臨床で採取した歯肉溝滲出液の分析結果を速やかに得るには困難を伴うものと考えられる。この様な観点からも、今回用いたマイクロ多検体 2 次元電気泳動法はタンパク質変性剤を用いることなく試料成分の生理活性を保持した状態で泳動することを基本とすること、試料が 1~2 μ l と微量なこと、また、同時に 8 検体の泳動が約 3 時間で完了することから有益な方法であると思われる。さらに、真鍋ら²¹⁾がヒト血漿で 31 個の血漿タンパク質を同定していることも、歯肉溝滲出液の分析に適する方法であると考えられる。

そこで、本法を歯周疾患の各種病態より得た歯肉溝滲出液の分析に応用するため、全血清、全唾液および歯肉溝滲出液の泳動像の比較を行った。

なお、本実験系では血漿の代わりに血清を用いたが、全血清では Fg 分画が得られず先の正規化図(図 2)とは若干異なる泳動像が得られた。これは試料の違いによるものと考えられるが、歯肉溝滲出液の採取を考慮すると、比較のための試料には血清が適切であると思われるため、本実験では血清を用いた。また、Hp 分画に Hp-Hb complex²⁵⁾ が認められたことは試料中に潜血があることを示すもので、採取や調製時に溶血が生じたことを示唆するものである。

全唾液の場合は血清とは染色法が異なるが、高分子側の方が低分子側より高い染色性が認められた。これは、この分画が全唾液中に含まれる最も優勢な免疫グロブリンである S-IgA であるためと考えられる。また、唾液中の血清成分については Mogi ら^{22,23)}は IgG や Alb を同定し、唾液中の血清成分の多くが歯肉溝滲出液に由来すると述べている³⁴⁾ことから、今回、全唾液中に認められた血清成分も滲出液に由来するものと推察される。また、高分子側の pI 5~8, MW 30×10⁴~100×10⁴ の分画には血清および唾液に由来する成分が重複している可能性も考えられる。さらに、今回の実験では唾液の高分子側分画が重複していたため、今後、泳動時間などの泳動条件を考慮する必要性が示唆された。

一方、前述の 2 試料と比較して歯肉溝滲出液の泳動像は血清のそれと類似しており、分離された分画の多

くが血清と同様 pI 4~8, MW 7×10⁴~100×10⁴ 付近に分布していた。この様な血清と滲出液のタンパク質の泳動後の分布については本実験のゲルあるいは nitrocellulose sheet 上で同定した 18 種のタンパク質の内、IgM, IgG, LDL, α_2 M, Tf, Cp, Alb 等 7 種の分画が Brill ら¹¹⁾, Mann ら²⁰⁾, Cimasoni¹⁴⁾により報告されている。また、滲出液の成分に対する抗原特異性に関する検討(図 6)でも、先の図 4-B に示した試料とは採取部位の臨床所見が異なるものの、図 6-D に示した血清に対する抗体との反応が全唾液(図 6-B)や S-IgA(図 6-C)に対する抗体との反応より高いことから、滲出液中のタンパク質の多くは血清由来であることが確認された。しかしながら図 4 の矢印で示す染色性の高い線状の分画は図 6-A においても認められ、共に IgA の pI 4.6~5.5, MW 17×10⁴ 付近の領域に位置していた。本分画に対する報告は未だなされておらず、また、血清、唾液および S-IgA に対する特異抗体によっても検出されなかったことから、血清、唾液以外に由来する成分と推察され、今回、2 次元電気泳動法の応用により始めて認められた滲出液に特有な分画と思われる。

さらに、これら抗原特異性に関する検索では図 6-B および C に示したごとく、滲出液中に唾液タンパクおよび S-IgA が含まれることが示唆された。しかしながら、S-IgA については今回用いた抗体が血清との共通抗原性を持つ α -chain 特異抗体であるため、血清由来の IgA と唾液由来の S-IgA のいずれと反応したものか明らかではない。

一方、歯肉溝滲出液の泳動後の成分の検出では銀染色が適することが確認されたが(図 5)、泳動完了後、銀染色を用いた場合には Alb 分画がドーナツ状に染色された(図 4, 6)。これは銀染色法のタンパク質に対する検出感度が CBB の 50~100 倍で、タンパク量過剰場合に生ずる³⁵⁾ことから、Alb が血漿タンパク質中で量的に最も多いことによるものと思われる。しかしながら、CBB 染色では Alb 分画に対する問題は排除されるものの、他のタンパク質成分に対する検出感度が低く、微量かつ血清より低濃度なタンパク質を含む滲出液¹¹⁾には銀染色法等、CBB より高感度な方法が適するものと考えられる。

さらに、高分子側の分画に著しい streaking が認められた(図 6-A)ことは、この現象が試料に含まれる特定のタンパク質成分の相対含量が極めて多く、また試料中の脂質が影響する場合に生ずるとの報告³⁶⁾があ

り、今回、泳動に供した試料に起因すると思われる。

この様に、一連の結果から今回実験に用いた2次元電気泳動法は極めて微量な歯肉溝滲出液の臨床生化学的分析に応用可能であることが示された。

2. 2次元電気泳動法による歯肉溝滲出液成分、分析の臨床的意義

歯肉溝滲出液の量的変動は局所歯肉の血管透過性の変化に起因することから、歯周病の臨床的診断法の一助として用いられている。しかしながら、液量の変化は採取法や採取部位によっても差が認められ^{11,14,37)}、日動変動³⁸⁾や全身的な代謝機能によっても影響される¹⁴⁾こと、さらに、Egelberg¹⁾が臨床的に正常と分類した症例の中にも種々な炎症段階が存在する可能性があることと述べていることから、滲出液量の変化のみで局所歯周病変の程度を論ずることは困難と考えられる。

近年、歯周疾患の進行に関し、Socranskyら³⁹⁾がPeriodontal disease activityなる概念を提唱し、病態には活動期と制止期の2つのstageが存在することを示唆していることから、歯周疾患の各stageにおける動的变化を詳細に捉えることが疾患の治療とその予後経過にとり重要であると考えられる。

この様な観点からも、今回の2次元電気泳動法が滲出液の分析に応用出来ることを証明したことは臨床的に意義あることと思われる。

前項において、今回の泳動に供した歯肉溝滲出液の試料濃度が血清のそれとは異なること、また、成分の検出は前者には銀染色を、後者ではCBBを用いているため、得られたintegrated density(表2, 図8)を両試料間で直接的に比較することは困難であるものの、血清ではN、GおよびP₁群間には差が認められず、P₂群のみがN群に対し $p < 0.05$ で有意に高い値を示した。この様な歯周疾患における血清のintegrated densityの増加は歯周病患者の血清中の総タンパク質濃度の変動に比べ、IgGやIgM等の高分子側の抗体タンパク質量が局所病態と正の相関を示すとの谷ら⁴⁰⁾の報告や、歯周病関連細菌に対する血中の血清IgG抗体価の上昇に関する報告⁴¹⁾ならびに歯周病治療後のIgGの減少に関する報告から⁴²⁾考えて、今回の結果は歯周疾患のような病変が局在する場合でも、他の炎症性疾患や感染症で起こると同様な全身的な生体防御反応、特に、体液性免疫機構の関与も示唆されるもので、所謂、全身的な免疫応答の成立とも考えられる。また、血清中のタンパク質濃度の増加はその成分中のリボタンパク質が加齢的に増加する⁴³⁾ため、血清タンパク質

を総量として捉えている本実験の結果から推測して、歯周疾患との因果関係とは別に今回の実験に用いた症例の年齢構成がN群はav.21歳、G群はav.27歳、P₁群でav.47歳、P₂群はav.48歳と、P₁、P₂群が高いことから、年齢による影響も一部関与しているものと思われる。

一方、歯肉溝滲出液のintegrated densityは泳動に供した試料の濃度が採取した滲出液を1/3に希釈したものであるにも拘わらず高い値を示し、病態との相関は血清と同様な傾向で、P₂群は $p < 0.05$ でN群に対し統計学的に有意な増加を示した(図8)。Brillら¹¹⁾は滲出液のタンパク質濃度は血清の1/10と希薄であることを述べているが、滲出液の組成に関する報告^{14,44)}にもあるように滲出液中には血漿成分を始め多種多様な物質が含まれていることを考慮すると、病態の変化に伴ってintegrated densityが増加する、今回の結果は十分に推察できることと思われる。

さらに、病態の泳動像(図7)ではN、P₁、P₂群のそれぞれの分画にはG群より顕著なstreaking様現象が認められた。これは今回の電気泳動法がタンパク質変性剤を用いないprotein mappingであり、脂質の複合体はそのまま分離されるため、組織タンパク質の場合には分画のまとまりが不十分となりやすく、血清タンパク質では影響が少ない³⁶⁾ことから、今回、泳動に供したN、P₁、P₂群の試料には組織成分が多く、特に、P₂群にその傾向が強く表れたものとも思われる。これに対しG群では局所血管透過性の亢進による血漿成分の滲出が組織成分より多いことが推察される。また、N群については病態のstageの多様性¹⁾によるもので、Nと分類した中にも臨床的評価法では捉えられない病変の存在を示唆するものとも考えられるが詳細については不明である。

また、pI 7, MW 8×10^4 付近の遊離のHbがN群を除く、G、P₁、P₂群の一部に見られたことは、それぞれの歯肉局所に出血を伴う炎症が存在し、溶血があることを示唆するものと考えられる。歯肉溝滲出液中におけるHpやHbの存在はすでに示されているが^{14,45)}、Hp-Hb complexの形成とその臨床的意義についての報告は見られない。HpはHbと特異的親和性を有するが、Hp-Hb complex形成に過剰となったHbが単一な分画として分離される²⁵⁾。すなわち、Hp-Hb complexはいずれの症例においても出現するが、Hbは病態の程度によって差が認められるものと推察される。また、Hp-Hb complexはタンパク質変性剤

の存在下では分離されないこと²⁵⁾、さらに、これまでの1次元電気泳動法ではHpのそれぞれの表現型であるHp 1-1, Hp 2-1, Hp 2-2, に準じたHp-Hb complexが明瞭な分画としては得られない。

この様に、歯肉溝滲出液中のHp-Hb complexや遊離Hbの存在は歯周疾患が極めて動的变化を示すものであることを示しており、今後、これらの分画が歯周疾患の病態変化を探るための一指標となるものとも考えられる。

さらに、この様な歯周疾患の指標物質となり得るものとして図4において矢印で示したIgA付近の線状分画がG.I.が1以下の症例で約40%に、2以上の80%以上に、またP.D.では2mm以上の80%に高率に認められたことから、この分画が歯周疾患に極めて緊密に関係していることを示唆するもので、本分画の同定と由来については今後の研究結果を待たねばならない。

一方、泳動像上で成分の変化を定量的に検討すると(表2, 図9), 歯肉溝滲出液中の血清タンパク質量はG, P₁, P₂群間に有意差を認めないが、N群に対しては有意に高い値を示すことから、病態の程度が滲出液中の血清タンパク質量を変動させるtriggerとなる可能性を示唆するものである。この様な血清タンパク質量の変動は歯肉溝滲出液中の*Bacteroides gingivalis* (Bg) など歯周病関連細菌に対しIgG抗体価が高まるなどの報告⁴⁶⁾とも一致するものと思われる。

さらに、全唾液およびS-IgAに対する抗体との反応性についても、先と同様、G, P₁, P₂群など病態間の差は認めず、N群に対する変化のみが統計学的有意差を示した。全唾液に対する抗体との反応性が認められたことについては唾液成分の滲出液中への混入があることを示したものとも考えられる。また、S-IgAに対する抗体との反応については歯肉溝滲出液中のIgAが血清型であるとする報告⁴⁷⁾から推測して、今回のこの反応は唾液中のS-IgAの免疫学的防御機能によって、歯周病変の存在する歯肉組織に吸着しこれが歯肉溝滲出液採取時に混入したためとも考えられる。また、S-IgAに対する抗体との反応は血清および全唾液に対する抗体との反応におけるintegrated densityより低いものの、今回、その存在が示唆されたことは歯周疾患における局所免疫の関与ならびに局所病態の様々な変化が歯肉溝滲出液に反映されていることをうかがわせるものである。

この様に、複雑な変化を示す歯周疾患では定型的な

症状が存在することは稀で、むしろ1つの病態に多様なstageが存在することが考えられる。従って、今回用いた2次元電気泳動法による歯肉溝滲出液の分析は病態の多様な変化を、極めて微量な試料によって分析出来る可能性を証明したものと考えられ、その臨床的意義は今後の歯周疾患の客観的診断法を確立する上に大きな示唆を与えたものとする。

結 論

歯周疾患の動的变化を的確に捉ええるため歯肉溝滲出液中の成分の精査を目的として、優れた分離能を有するマイクロ多検体2次元電気泳動法が応用可能であるかを検討した。さらに、臨床的評価法に基づき分類した歯周疾患患者より得られた歯肉溝滲出液、全唾液および血清のそれぞれの泳動像を比較し、また、歯肉溝滲出液についてはwestern-blot法を応用して成分の抗原特異性を検索し、その臨床的意義について検討を加えた。その結果以下の結論を得た。

1. 2次元電気泳動法

1) 血清で得られた全てのタンパク質はpI 4~8, MW $7 \times 10^4 \sim 100 \times 10^4$ 付近に分布し、Fg分画は認められない点を除き正規化図と同様な成分の分画が得られた。

2) 全唾液のタンパク質はpI 4.5~8, MW $30 \times 10^4 \sim 100 \times 10^4$ に分離されるものが多く高分子側にはS-IgAが同定された。またIgG, IgA, Tf, Cp, Alb等血清と同様な分画も示された。これは歯肉溝滲出液に由来すのものと思われた。

3) 歯肉溝滲出液では18種のタンパク質が分離され、western-blot法により血清由来であることが確認された。

また、IgA付近には滲出液に特有と思われる線状の分画が検出された。しかしながら、本分画の性状や由来については不明であった。歯肉溝滲出液成分の検出には銀染色などCBBより高感度な方法を選択する必要性のあることが示唆された。

2. 歯肉溝滲出液の臨床的分析

1) 分画には境界不明瞭なstreaking様の現象が認められ、この傾向はN, P₁, P₂群に著しく、P₂群は $p < 0.05$ でN群に対し有意な増加を示し、組織由来の成分が多く含まれる可能性が示唆された。しかしながら、G群の分画は明瞭で血清由来のタンパク質が多いことによると思われた。

2) GおよびP₂群のpI 7, MW 8×10⁴付近に遊離のHbを認めたが, N群では示されなかった。さらに, Hp-Hb complexは病態群では全症例に, またN群の5例に認められた。これらの分画は病態の各stageの動的変化を的確に捉えらるための, 指標物質となる可能性を示唆した。

3) 滲出液中のS-IgAは歯肉局所に吸着したS-IgAが混在した結果によるもので局所の免疫応答の成立が示唆された。

謝 辞

稿を終えるに当り, 終始懇篤なご指導とご校閲を賜りました神奈川歯科大学保存修復学講座岩本次男教授, 口腔生化学教室斎藤 滋教授に謹んで感謝致します。また, 貴重なるご助言とご校閲を戴きました歯肉療法教室長田 保教授ならびに口腔細菌学教室梅本俊夫教授に厚くお礼を申し上げます。

さらに, 本研究の遂行に際し多大なご助言を戴きました東京都立大学理学部化学科奥山典生教授ならびに現姫路工業大学理学部真鍋博士に深甚の謝意を表します。また, 神奈川歯科大学口腔生化学教室川瀬俊夫助教授, 中野 完博士ならびに保存修復学講座寺中敏夫助教授に謝意を表します。最後に, 口腔生化学教室および保存修復学講座の教員の方にお礼を申し上げます。

文 献

- 1) Egelberg, J.: Gingival exudate measurements for evaluation of inflammatory changes of the gingivae. *Odont. Rev.*, 15: 381-398, 1964.
- 2) Brill, N. and Bjorn, H.: Passage of tissue fluid into human gingival pocket. *Acta Odont. Scand.*, 17: 11-21, 1959.
- 3) Brill, N.: Influence of capillary permeability on flow of tissue fluid into gingival pockets. *Acta Odont. Scand.*, 17: 23-33, 1959.
- 4) Mann, W.V.: The correlation of gingivitis pocket depth and exudate from the gingival crevice. *J. Periodontol.*, 34: 379-387, 1963.
- 5) Brill, N.: Gingival conditions related to flow of tissue fluid into gingival pockets. *Acta Odont. Scand.*, 18: 421-446, 1960.
- 6) Oliver, R.C., Holm-Pedersen, P. and Loe, H.: The correlation between clinical scoring, exudate measurements and microscopic evaluation of inflammation in the gingiva. *J. Periodontol.*, 40: 201-209, 1969.
- 7) 末田 武: 歯肉嚢内に流出する体液について。重量

およびニンヒドリン陽性物質について。口病誌, 29: 269-280, 1962.

- 8) 細田裕康, 原 耕二, 羽成 基, 松野 滉: 歯科用合金の歯肉におよぼす影響について。一主として歯肉嚢滲出液の生化学的分析を中心として一。日歯保誌, 12: 130-140, 1970.
- 9) 宮本 尚: 起炎性物質滴下による辺縁歯肉の反応性について。一特に歯肉滲出液中のKallikrein様esteraseの動態一。日歯保誌, 23: 24-39, 1980.
- 10) 寺中敏夫: 歯肉縁下修復物の歯周組織に及ぼす影響。一特に歯肉溝滲出液量およびKallikrein様esterase活性の動態一。日歯保誌, 26: 103-121, 1983.
- 11) Brill, N. and Brönnestam, R.: Immuno-electrophoretic study of tissue fluid from gingival pockets. *Acta Odont. Scand.*, 18: 95-100, 1960.
- 12) Brandtzaeg, P.: Immunochemical comparison of proteins in human gingival pocket fluid, serum and saliva. *Archs oral Biol.*, 10: 795-803, 1965.
- 13) Golub, M.L., Borden, M.S. and Kleinberg, I.: Urea content of gingival crevicular fluid and its relation to periodontal disease in humans. *J. Periodont. Res.*, 6: 243-251, 1971.
- 14) Cimasoni, G.: Monographs in oral science, vol 12, Karger, Basel, 1983, 69-72, 29-43, 45-99, 103-106.
- 15) Manabe, T., Hyama, E. and Okuyama, T.: Microscale multisample two dimensional electrophoresis of proteins in human serum, cerebrospinal fluid, and urine. *Clin. Chem.*, 28: 824-827, 1982.
- 16) Loe, H.: The gingival index, the plaque index and the retention index systems. *J. Periodontol.*, 38: 610-616, 1967.
- 17) Greene, J.M. and Vermillion, J.R.: Oral hygiene index. A method for classifying oral hygiene status. *J. Amer. Dent. Ass.*, 61: 172-179, 1960.
- 18) 鈴木淳子: 歯肉縁下に及ぶコンポジットレジン修復物の歯肉に対する影響。日歯保誌, 28: 1-15, 1985.
- 19) Manabe, T., Takahashi, Y. and Okuyama, T.: An electroblotting apparatus for multiple replica technique and identification of human serum protein on micro two dimensional gels. *Anal. Biochem.*, 143: 39-45, 1984.
- 20) Manabe, T., Kojima, K., Jitzukawa, S., Hoshino, T. and Okuyama, T.: Normalization of two-dimensional electrophoretic patterns of human plasma protein and comparison of cerebrospinal fluid and urine patterns in terms of the normalized map. *J. Biochem.*, 89: 841-853, 1981.
- 21) Manabe, T., Takahashi, Y., Higuchi, N., Okuyama, T.: Identification map of human plasma proteins: micro two-dimensional electrophoresis followed by multiple immunoreplica technique. *Electrophoresis*, 6: 462-467, 1985.
- 22) Mogi, M., Hiraoka, B.Y., Fukasawa, K., Harada, M., Kage, T. and Chino, T.: Two-dimensional electrophoresis in the analysis of a mixture of

- human sublingual and submandibular salivary proteins. *Archs. oral Biol.*, 31 : 119-125, 1986.
- 23) Mogi, M., Hiraoka, B.Y., Fukasawa, K., Harada, M., Kage, T. and Chino, T. : Analysis and identification of human parotid salivary proteins by micro two-dimensional electrophoresis and western-blot techniques. *Archs. Oral Biol.*, 31 : 337-339, 1986.
 - 24) Manabe, T. and Okuyama, T. : Quantitative analysis of two-dimensional electrophorograms with a television camera - microcomputer system. *J. Chromatogr.*, 264 : 435-443, 1983.
 - 25) Manabe, T., Takahashi, Y. and Okuyama, T. : Analysis of human haptoglobin-hemoglobin complexes by micro two-dimensional electrophoresis. *Electrophoresis*, 4 : 359-362, 1983.
 - 26) Mann, W.V. and Stoffer, H.R. : The identification of protein components in fluid from gingival pockets. *Periodontics*, 2 : 263-266, 1964.
 - 27) Tollefsen, T. and Saltvedt, E. : Comparative analysis of gingival fluid and plasma by crossed immunoelectrophoresis. *J. Periodont. Res.*, 15 : 96-106, 1980.
 - 28) Dombrowski, J.C., Schacterle, G.R. and Pollack, R. L. : The comparative analysis of clinical normal and inflamed human gingiva, Study 1 : Protein separation by anionic and cationic disc gel electrophoresis. *J. Periodontol.*, 51 : 83-85, 1980.
 - 29) Biswas, S. and Lavelle, C.L.B. : Variations in crevicular exudate proteins in response to varying degrees of gingival inflammation. *IRCS Medical Science*, 4 : 516, 1976.
 - 30) 柳田猛昌 : 歯肉溝滲出液の生化学的研究, 一特に歯周疾患患者の蛋白質, ペプチドおよび遊離アミノ酸について. 神奈川歯学, 16 : 497-509, 1982.
 - 31) 早瀬一夫 : 歯周疾患患者の歯肉剥離掻爬術後における歯肉溝滲出液蛋白分画の変動に関する研究. 神奈川歯学, 17 : 481-493, 1983.
 - 32) Mukherjee, S., Novack, N., Blaustein, D. and Chambers, D.A. : Two-dimensional gel electrophoresis of dog crevicular fluid proteins. *J. Clin. Periodontol.*, 14 : 320-325, 1987.
 - 33) O'Farrell, P.H. : High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J. Biol. Chem.*, 250 : 4007-4021, 1975.
 - 34) 斎藤隆嗣, 寺中敏夫, 中嶋 正, 須田正文, 宮本尚, 岩本次男, 高木 亨, 斎藤 滋 : 歯肉溝滲出液中の Kallikrein 様 esterase の動態について. 一特に MBTH 法の改良と自動化一. 日歯保誌, 22 : 96-105, 1979.
 - 35) BIO-RAD, Bulletin 1089 : 1, 1986.
 - 36) 真鍋 敬, 奥山典生 : 組織蛋白質の検索表のための 2 次元電気泳動, 一蛋白質マップとポリペプチドマップ. 生物物理化学, 27 : 7-13, 1983.
 - 37) Lamster, I.B., Harper, D.S., Goldstein, S., Celenti, R.S. and Oshrain, R.L. : The effect of sequential sampling on crevicular fluid volume and enzyme activity. *J. Clin. Periodontol.*, 16 : 252-258, 1986.
 - 38) Suppipat, N., Johansen, J.R. and Gjermo, P. : Influence of "time of day", pocket depth and scaling on gingival fluid flow. *J. Clin. Periodontol.*, 4 : 48-55, 1977.
 - 39) Socransky, S.S., Haffajee, A.D., Goodson, J.M. and Lindhe, J. : New concepts of destructive periodontal disease. *J. Clin. Periodontol.*, 11 : 21-32, 1984.
 - 40) 谷 明, 森 章一, 日高 慧, 竹下士郎, 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.
 - 41) 新田 浩, 市村真美, 渡辺 久, 石川 烈 : 歯周疾患関連細菌に対する血清抗体価と加齢について. 日歯周誌, 32 : 667-672, 1990.
 - 42) 勝本正昭 : 歯周病の治癒の前後における血清蛋白質画分の変動に関する研究. 日歯周誌, 15 : 143-151, 1973.
 - 43) 今村幸雄 : 血漿蛋白質, 山川民夫, 織田敏次, 講座病態の生化学 4 血液, 中外医学社, 東京, 1971, 121.
 - 44) 原 耕二, 原沢正昭, 高塚真理子 : 歯肉滲出液と歯周病とのかかわりあい. 歯界展望, 50 : 235-244, 1977.
 - 45) Mukherjee, S. : The role of crevicular fluid iron in periodontal disease. *J. Periodontol. Special issue* : 22-27, 1985.
 - 46) 堀野一人 : *Bacteroides, Actinobacillus* に対する歯周疾患罹患者の血清及び歯肉溝滲出液抗体価について. 日歯周誌, 30 : 452-465, 1988.
 - 47) Holmberg, K. and Killander, J. : Quantitative determination of immunoglobuline (IgG, IgA and IgM) and identification of IgA-type in the gingival fluid. *J. Periodont. Res.*, 6 : 1-8, 1971.

連絡先 :

神奈川歯科大学保存修復学講座

〒 238 神奈川県横須賀市稲岡町 82