

〔原著〕 松本歯学 15 : 38~45, 1989

key words: 齲蝕免疫 — 臨床検査 — 唾液 — 免疫グロブリン

## 齲蝕免疫に関する基礎的研究

宮沢裕夫, 大隈敦子, 今西孝博

松本歯科大学 小児歯科学講座 (主任 今西孝博 教授)

半戸茂友

松本歯科大学 臨床検査室

### Basic Study of Anticaries Immunity

HIROO MIYAZAWA, ATSUKO OOKUMA and TAKAHIRO IMANISHI

*Department of Pedodontics, Matsumoto Dental College  
(Chief : Prof. T. Imanishi)*

SHIGETOMO HANDO

*Clinical Laboratory, Matsumoto Dental College*

#### Summary

The mouth, which is an open organ, is constantly covered with secretory and serum antibodies. These antibodies, which are resistant to protein-dissolving enzymes and bacterial protein-dissolving enzymes, are believed to prevent the attachment of oral bacteria such as *Str. mutans* on the tooth surface, and to control their multiplication by working as neutralizing or cohesive antibodies.

In a basic study of anticaries immunity, Taubman, Michaleck and others suggested the existence of secretory type IgA acted clearly as an anticaries agent. From a clinical viewpoint, Arnold and others suggested the existence of secretory type IgA which acted against *Str. mutans* in the colostrum and saliva.

In this study we investigated the relationship between Ig in the colostrum and the amount of Ig and pH in the infant saliva, as a preparatory study for examining the significance of the amount of Ig in controlling the activity of caries and the adhesion of bacteria in the mouth.

The results obtained are as follows.

1) The SRID (Single Radial Immunodiffusion) method was valuable for measuring the amount of Ig in saliva.

- 2) In regard to the amount of Ig in the saliva, no significant difference was recognized between batches prior to processing and those receiving no processing.
- 3) No significant difference was recognized in the amount of Ig within natural saliva and saliva subjected to stimulus.
- 4) Sexual difference had no significant effect on the amount of Ig in the saliva.

結 言

開放性の器官である口腔は分泌性並びに血清抗体で常に覆われており、これら抗体は細菌性の蛋白質分解酵素に抵抗性を持っていることから、病原体の侵入や増殖を阻止する機能を有している。齶蝕との関連では、唾液から分泌される分泌型IgA (Secretory IgA,以下S-IgAと略す)や歯肉溝に由来するIgGがVirus, Bacteria, 食餌抗原等に対して抗体活性があることが知られており、特に抗齶蝕免疫の基礎的研究ではTaubman<sup>1)</sup>, Michaleck<sup>2)</sup>などにより、S-IgAによる明確な抗齶蝕作用が示唆されている。小児歯科領域では唾液は無痛かつ容易に摂取が可能であることから齶蝕活性のみならず、臨床検査の対象としての利用価値も高いと考えられる。そこで、新生児の齶蝕原性菌の口腔内への定着と初乳中のS-IgAとの関連、さらにIgG, IgMの免疫応答が齶蝕発症にどのような関わりがみられるかについて検索を行うにあたり、今回予備的研究として成人を対象に一元放射免疫拡散法(Single radial immunodiffusion: SRID法)による唾液中IgA, IgG, IgMの測定方法および測定条件の設定等、基礎的検討を行なった。

試料および方法

1. 対象

研究対象は全身的、かつ口腔内に特記事項のない健康な19才から29才までの成人男子8名、成人女子12名、計20名を被検者として採取した唾液および血液を資料とし、分析検討を行った(表1)。唾液採取は各被検者から直径約8mm、長さ20mmのロールコットンを用い、自然唾液は舌下に約3分間挿入放置したものを、また刺激唾液は同ロールコットンを3分間咀嚼したものを3000rpm、10分間遠心分離<sup>3)</sup>、その上清を使用時まで-35℃に冷凍保存した(図1)。一方、血液は唾液採取時に肘静脈より1ml採血し、3000rpm、10分間遠心分離を行い同様に上清を冷凍保存した。

2. 測定方法

(1) 免疫グロブリン(Ig)の測定

血清Ig測定にはHoechst社の高濃度定量用NOR Partigen plate、唾液には低濃度定量用LC Partigen plateを用いた。血清Ig量の測定はPartigen plateの試料孔に被検血清20μlを注入、室温で48時間反応後、沈降輪の直径を0.1mmの単位まで判読し、標準直線からその濃度を求めた。同様に唾液Igの測定は、被検唾液5μlを室温で24時間反応させ、その濃度を求めた。

表1: 調査対象 (Immunogloblin) 単位: 人

		男	女	合計	
血 清	IgA	8	12	20	
	IgG	7	12	19	
	IgM	7	12	19	
唾 液	スプレーゼなし	IgA 自然	8	12	20
		IgA 刺激	8	12	20
	スプレーゼあり	IgG 自然	5	1	6
		IgG 刺激	7	12	19
		IgA 自然	8	4	12
		IgA 刺激	8	4	12
	IgG 自然	8	4	12	
	IgG 刺激	8	4	12	

唾液採取法

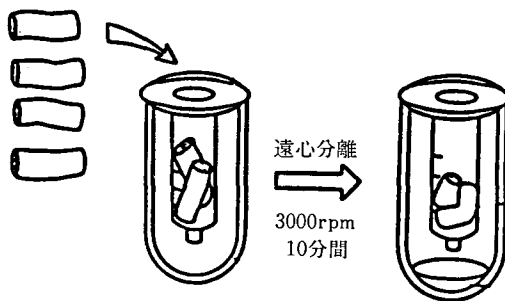


図1

(2) 唾液の前処理

唾液 Ig の測定に先立ち唾液中のムチン、パーオキシターゼ等の酵素による測定への影響を調べるためヒアルロニダーゼを添加したものとししないものとに分け、再度3000 rpm, 10分間遠心分離し、上清を試料した。

(3) 検量線の作成

使用時まで-35℃に冷凍保存した血清 Ig 用標準曲線(検量線)は標準血清を原液, 2倍稀釈, 4倍稀釈したものを被検血清同様に, また, 唾液 Ig 用検量線は, 標準血清 LC-V の稀釈系列を被検唾液同様に操作し作成した。

(4) 再現性試験

同一サンプルによる測定値の変動を見るため血清, 唾液の各 IgA について, 同一資料をそれぞれ10回ずつ測定を行ない測定濃度の検討を行った。

(5) カリオスタット (C. A. T) の測定。

各 Ig と齶蝕活性との関連を知ることを目的に, 唾液採取時に通法に従い資料を採取し24時間イン

キュベート後の pH 測定を行なった。

結 果

1. 唾液の前処理

唾液 Ig 測定の前処理について唾液中に含まれるムチン, peroxydase 等の酵素による測定値に誤差が生ずるか否かを検討するため粘性性ムコ多糖類分解酵素であるヒアルロニダーゼ(スブラーゼ)を自然および刺激唾液に添加し, 前処理群と前処理なし群について検討したところ唾液中各 Ig は自然唾液, 刺激唾液共に有意差は認められず, 本法では特に前処理の必要性は認められなかった(表2, 3)。

2. 検量線について

血清, 唾液各 Ig の検量線はいずれも直線回帰の傾向にあり良好な結果が得られた(図2~図7)。なお, 測定範囲は NOR Partigen では, IgA 50~752 mg/dl, IgG 288~4348 mg/dl, IgM 39~594 mg/dl, また LC Partigen では IgA

表2: 唾液中 IgA の平均

	前処理(有無)	Mean±SD	
自然 N=20	前処理(有り)	4.5±2.3	] NS
	前処理(なし)	5.2±2.7	
刺激 N=20	前処理(有り)	5.4±2.2	] NS
	前処理(なし)	5.7±2.3	

前処理(スブラーゼ)

単位: mg/dl

表3: 唾液中 IgG の平均

	前処理(有無)	Mean±SD	
自然 N=11	前処理(有り)	0.4±0.7	] NS
	前処理(なし)	0.7±0.8	
刺激 N=5	前処理(有り)	0.6±0.6	] NS
	前処理(なし)	0.9±0.5	

前処理(スブラーゼ)

単位: mg/dl

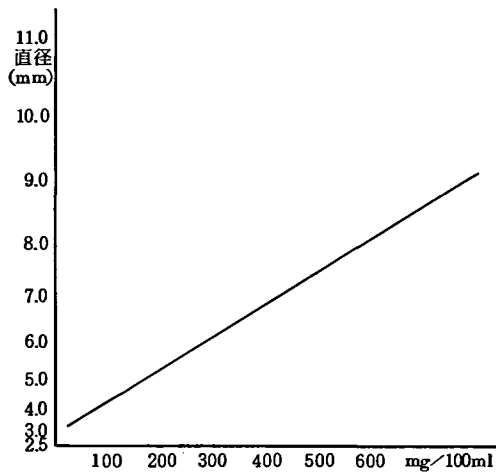


図2

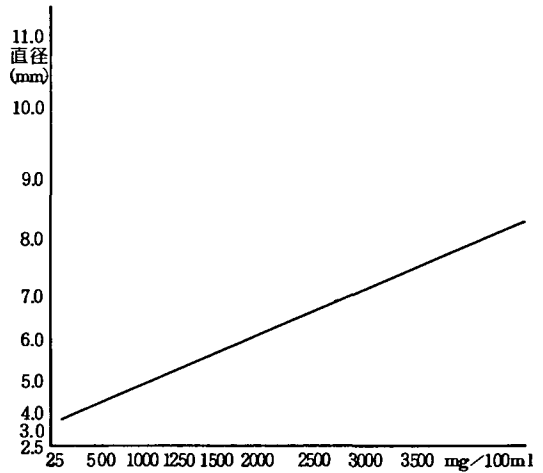


図3

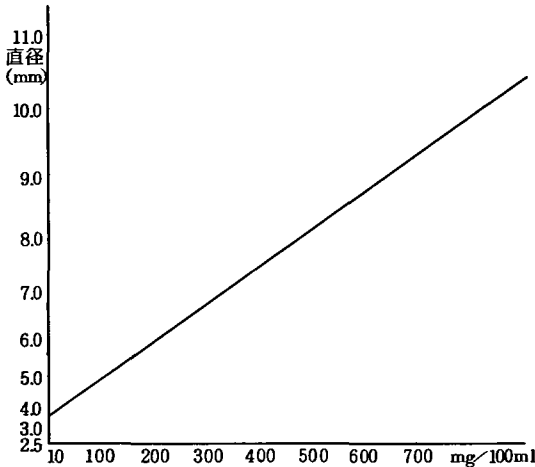


図 4

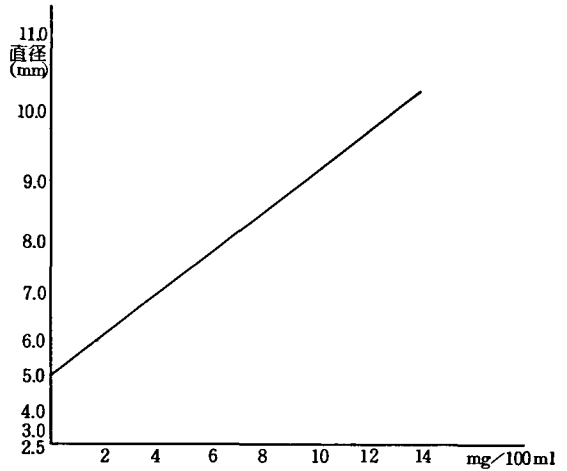


図 5

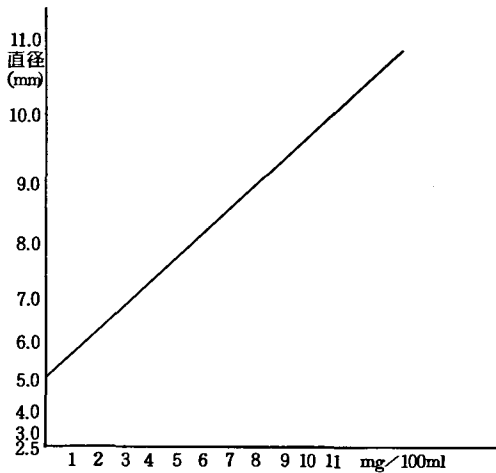


図 6

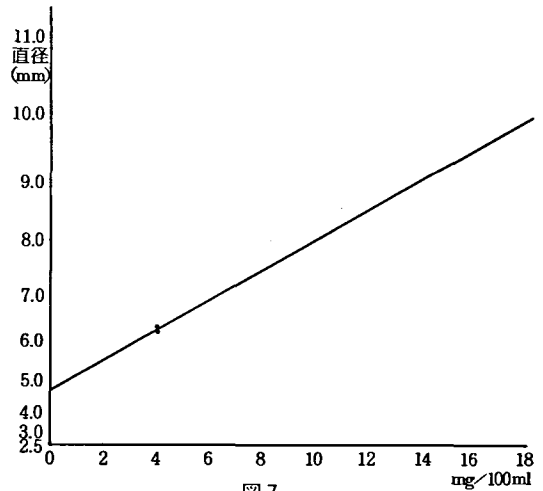


図 7

0.8~13.5 mg/dl, IgG 0.8~13.5 mg/dl, IgM 1.1~18 mg/dlであった。

### 3. 自然唾液と刺激唾液

自然唾液と刺激唾液のIgA量は相関係数  $r=0.64$  と有意水準0.5%で正の相関が認められた。しかし、血清と唾液IgAには相関は認められなかった(図8, 図9)。同様に、自然唾液と刺激唾液のIgA量は、自然唾液 $5.4 \pm 2.7$  mg/dl, 刺激唾液 $5.5 \pm 2.2$  mg/dlと採取法の違いによる差は認められなかった。

### 4. 性差

男性8名, 女性12名を対象に血清, 唾液(自然および刺激)IgA, IgGの性差について検討した。

#### (1) IgA

血清中のIgAの性差について表4に示した。血清IgAは男性8名の平均では $263 \pm 64$  mg/dl, 女性12名の平均は $253 \pm 98$  mg/dlで有意な性差は認められなかった(表4)。唾液IgAのうち自然唾液では、男性平均 $6.3 \pm 2.5$  mg/dl, 女性の平均 $4.8 \pm 2.8$  mg/dl, 刺激唾液では、男性平均 $6.0 \pm 2.6$  mg/dl, 女性平均 $5.2 \pm 1.9$  mg/dlといずれも男, 女間の性差は認められなかった(表5)。

#### (2) IgG

同様に血清IgGの性差については表5に示すように男性平均 $1035 \pm 504$  mg/dl, 女性平均 $1353 \pm 520$  mg/dlであり有意差は認められなかった(表6)。また唾液IgGについては測定条件の設定で自然唾液, 刺激唾液に差が見られないことか

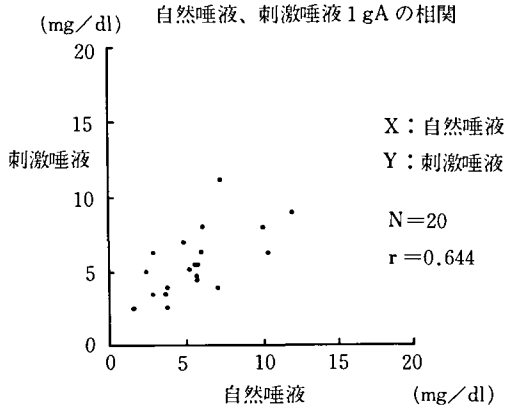


図 8

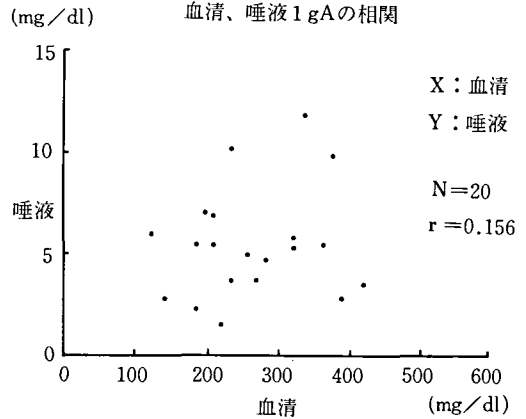


図 9

表 4：血清中 IgA の男女差

性別	人数	Mean±SD
男	8	263±64
女	12	253±98
合計	20	257±85

NS

単位：mg/dl

表 7：唾液中 IgG の男女差（自然唾液）

性別	人数	Mean±SD
男	7	0.7±0.2
女	12	0.7±0.8
合計	19	0.7±0.7

NS

単位：mg/dl

表 5：唾液中 IgA の男女差

性別	人数	Mean±SD
自然	男	8 6.3±2.5
	女	12 4.8±2.8
合計	20	5.4±2.7
刺激	男	8 6.0±2.6
	女	12 5.2±1.9
合計	20	5.5±2.2

NS

単位：mg/dl

表 6：血清中 IgG の男女差

性別	人数	Mean±SD
男	7	1035±504
女	12	1353±520
合計	19	1236±382

NS

単位：mg/dl

表 8：再現性

	血清 IgA(mg/dl)	唾液 IgA(mg/dl)
	260	6.2
	260	6.2
	260	5.4
	313	5.7
	286	5.9
	260	6.2
	249	6.2
	225	5.9
	225	6.2
	225	6.1
	260	6.2
N	11	11
X	256.6	6.03
SD	26.752	0.272
CV(%)	10.4	4.5

れなかった(表 7)。

5. 再現性試験

ら自然唾液のみによる検討を行なった。その結果、男性平均0.7±0.2 mg/dl、女性平均0.7±0.8 mg/dlと同様に血清、唾液 IgG に有意な性差は認めら

同一サンプルによる測定法の変動を見るために血清、唾液各 IgA についてその再現性を検討した結果、血清 IgA256.6±26.8 mg/dl, CV10.4%、唾液 IgA6.03±0.27 mg/dl, CV4.5%と良好な結

表9：血清・唾液中の各Ig値

Sample	Sex	IgA (mg/dl)		IgG (mg/dl)		IgM (mg/dl)	
		血清	唾液	血清	唾液	血清	唾液
1	F	358	2.7	1400	0.0	520	0.0
2	M	330	11.8	910	0.7	171	0.0
3	M	357	5.4	550	0.5	210	0.0
4	F	180	262	1070	0.0	181	0.0
5	M	190	7.0	1840	0.8	243	0.0
6	F	315	5.7	1750	2.8	84	0.0
7	F	215	1.4	1145	0.5	171	0.0
8	M	315	5.2	1650	0.7	222	0.0
9	M	150	4.9	835	0.7	135	0.0
10	M	262	3.6	625	1.0	84	0.0
11	M	202	6.8	835	0.0	108	0.0
12	M	202	5.4	/	/	/	/
13	F	370	9.8	1145	1.2	222	0.0
14	F	225	10.1	1570	0.5	181	0.0
15	F	275	4.6	1650	1.7	298	0.0
16	F	415	3.4	1400	0.0	565	0.0
17	F	225	3.6	1570	1.2	310	0.0
18	F	137	2.7	1320	0.0	76	0.0
19	F	118	5.9	990	0.4	135	0.0
20	F	180	5.4	1230	0.0	423	0.0
$\frac{N}{X}$		20	20	19	19	19	19
基準値		257	5.4	1236	0.64	228	0.0
		112~443	1.4~11.8	28~340	0~2.1	58~340	0.0

表10：CAT程度別IgAの平均

	人数	血清	唾液(自然)	唾液(刺激)
(-)	5	194.4±41.9	4.8±2.2	5.3±3.3
(+)	9	266.0±85.9	5.0±1.2	5.4±1.6
(++)	5	304.0±98.7	7.6±4.3	6.3±2.2

単位：mg/dl

表11：CAT程度別血清IgMの平均

	人数	Mean±SD
(-)	5	209±134
(+)	5	236±142
(++)	5	264±169

単位：mg/dl

表12：CAT程度別IgGの平均

	人数	血清	唾液(自然)
(-)	5	1274±356	0.3±0.4
(+)	9	1299±448	0.8±0.9
(++)	5	1219±264	0.5±0.5

単位：mg/dl

果が得られた(表8)。

### 6. 基準値

表9に示すように、20サンプルについて血清、唾液の各Igを測定し基準値を求めた。その結果血清IgA、112~443 mg/dl、唾液IgA、1.4~1.8 mg/dl、血清IgG、28~340 mg/dl、唾液IgG 0~2.1 mg/dl、血清IgM、58~340 mg/dl、唾液IgM、0.0 mg/dlであった。

### 7. カリオスタット(CAT)値とIg量

CAT値が(-)から(+), (++)になるに従いIgAは血清では194.4±41.9 mg/dl, 266.0±85.9 mg/dl, 304±98.7 mg/dl, 自然唾液では4.8±2.2 mg/dl, 5.0±1.2 mg/dl, 7.6±4.3 mg/dl 刺激唾液では5.3±3.3 mg/dl, 5.4±1.6 mg/dl, 5.3±2.2 mg/dlとすべて値が高くなっていく傾向がみられた(表10)。IgMについても同様であったがIgGは、血清、自然唾液ともに一定の傾向は認められなかった(表11, 表12)。

## 考 察

ヒトの身体は絶えず外界の微生物や異物と接触

しその侵入と刺激にさらされているが、生体の防護反応の1つとして局所免疫 (local immunity) がある。ヒトの免疫グロブリン (immunoglobulin, Ig) には IgM, IgG, IgA, IgE, IgD の5クラスがあるが、分泌液では IgA が主成分で、IgG が主成分の血清と異なる。

IgA は唾液、涙、気管支分泌液、初乳、腸粘液などの分泌液に存在し、これらを特に分泌型 IgA (S-IgA) と呼んでいる。口腔内においては *Streptococcus mutans*, *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus mitior* の歯面や頬粘膜への定着が、S-IgA により阻害されていると考えられている<sup>4)</sup>。Lehner ら<sup>5)</sup>は唾液中の IgA 量と齶蝕罹患状態とは負の相関があるとし、下野ら<sup>6)</sup>は乳幼児における IgA 量は歯牙年齢と加味すれば齶蝕と相関する傾向があると報告している。また Arnold ら<sup>7)</sup>によれば、S-IgA 免疫不全症の患者では口腔内に存在する *Streptococcus mutans* に対する唾液中の S-IgA が分泌 IgM 抗体に代わる機能を担うことが示唆されている。一方、免疫不全症にみられるウイルス性または細菌性の難治性下痢症やポリオの生ワクチン投与後にみられる持続性のポリオウィルスの腸管排出に対し、母乳の S-IgA の経口投与が治療の効果のあることから、S-IgA バクテリアやウイルスに対する抗体活性を有し感染防護に大きく作用していることを示している<sup>8)</sup>。

#### 測定方法

今回、予備的研究として成人を対象に Ig 量の測定を行ったが、Fahey および Mancini による SRID 法は、抗体を含む寒天ゲル中で抗原を放射状に拡散させてできる沈降輪の面積が抗原料に比例することを応用した方法で、原理は寒天に特異抗体を混合して作製したゲル平板に抗原孔を作り、一定量の抗原をいれて反応させると沈降輪ができるが、この沈降輪の大きさと抗原濃度の間に一定の比例関係があるといわれるもので濃度既知の標準物質と同時に反応させて標準直線を作れば、未知抗原濃度が求められるというものである<sup>9-12)</sup>。レーザー・ネフェロメトリー (Laser nephelometry)、比濁法 (Turbidimetry) 等と比較して SRID 法の操作法は非常に簡便で特別な装置を必要としない利点がある。また、混濁した検体でも検査できる、ゲル内沈降反応であるから地帯

現象が少ないなどの長所を持っている<sup>13)</sup>。本法は比較的簡便で広く用いられており、血清、唾液 Ig ともに検量線は直線回帰の傾向にあり、精度においても良好な結果が得られ、特に微量な唾液 Ig 量測定には有用と思われた。また、再現性試験においても良好な結果が得られている。

#### 唾液の前処理

S-IgA 濃度は唾液中の酵素による測定誤差が生ずる可能性があり、特に唾液では粘調性のムチンの処理方法が影響を及ぼすという報告がある。著者らは、粘調性ムコ多糖類分解酵素としてヒアルロニダーゼを添加しその影響を、唾液 IgA, IgG について検討した結果、自然唾液、刺激唾液の違いに関係なく添加群 (前処理群) と非添加群 (前処理なし群) に差は認められなかった。このことから測定に際しての主にムチンを中心とした糖蛋白や唾液酵素の影響は少ないものと考えられた。

#### 性差

血清および唾液中 IgA, IgG に性差は認められなかったことから新生児についても男女を区別せず行なって差し支えないものと考えられる。

#### 自然唾液、刺激唾液

自然および刺激唾液 Ig の間に相関係数  $r=0.64$  有意水準 5% で正の相関が認められた。このことから、唾液採取に際して、自然、刺激唾液の判別採取が困難な新生児、乳幼児を対象とした測定では、自然刺激唾液の区別なく測定することに、問題はないと考えられた。

#### カリオスタットと Ig 量

血清 IgA および IgG と CAT との関連については、対象が口腔常在菌であること、対象が成人であり齶蝕活性が安定していること、全身的、局所的に臨床的に異常がなく健全であることなどを考えると、細菌叢の増殖が Ig 量に変化をもたらす程の量的変化は少なく、CAT グレードに与える変化は少ないと思われた。しかし、個体差、環境差の著しい小児では齶蝕原生菌も含めて、その定着や増殖に Ig 量との関連が深いと考えられる。

## 結 論

今回、著者らは新生児の齶蝕原性菌の口腔内への定着と初乳中の S-IgA との関連、さらに IgA, IgG の免疫応答が齶蝕発症にどのような関わりがみられるかについて検索を行うにあたり、今回予

備的研究として成人を対象に SRID 法による唾液中の IgA, IgG, IgM の測定を行い測定方法および条件, 設定について検討した結果以下の結論を得た。

- 1) 唾液 Ig の測定には SRID 法による測定は有用であることが示唆された。
- 2) 唾液各 Ig の定量に際しての前処理(ヒアルロダーゼ)群と処理しない群の間に有意差は認められなかった。
- 3) 自然唾液, 刺激唾液の IgA 量に有意差は認められなかった。
- 4) 唾液各 Ig 量に性差は認められなかった。

#### 文 献

- 1) Taubman, M. A. and D. J. Smith (1977) Effect of immunization with glucosyltransferase from streptococcus mutans on dental caries in rats and hamsters. *J. Immunol.* **118**: 710-720.
- 2) Michalek, S. M., McGhee, J. R. Mestecky, J. Arnold, R. R. and Bozzo, L. (1976) Ingestion of streptococcus mutans induces secretory immunoglobulin A and caries immunity. *Science* **192**: 1238-1240.
- 3) 水島愛子, 藤沢隆一, 久保木芳徳 (1986) 唾液の臨床生化学検査. *臨床検査*, **30**: 537-539.
- 4) 清野 宏, 浜田茂幸 (1982) 口腔における分泌型免疫応答, う蝕と歯周症, 第 2 巻 (浜田茂幸編) 109-133. 日本歯科評論社.
- 5) Lehner, T. (1967) Immunoglobulin in Saliva and Serum in Dental Caries. *Lancet*, **1**: 1249-1297.
- 6) 下野 勉 (1977) 唾液中の IgA とむし歯. *大阪大学歯学雑誌*, **19**: 174.
- 7) Arnold, R. R. (1977) Secretory IgM antibodies to Streptococcus mutans in subjects with serective IgA deficiency. *Clin. Immun. Immunopathol.* **8**: 475-486.
- 8) 松本修三, 渡辺 徹, 小林邦彦 (1981)  $\gamma$  グロブリン製剤の改良と分泌型 IgA の経口投与. *日本臨床*, **39**: 1813-1820.
- 9) 櫻林郁之介, 榎本博光 (1979) 免疫グロブリン 1. 免疫グロブリンの定量. *臨床検査*, (臨時増刊) **23**: 1128-1136.
- 10) 右田俊介 (1976) 一元放射状免疫拡散法の実施. *臨床検査*, **20**: 133-157.
- 11) 河合 忠, 榎本博光 (1981) 一元放射状免疫拡散法 (SRID 法) による免疫グロブリンの定量. *免疫と疾患*, **1**: 251-256.
- 12) 長縄謹子, 三浦隆雄, 猿田英助 (1985) SRID 法. *検査と技術*, **13**: 257-264.
- 13) ヘキスト社 (1986) パルチゲンプレート使用説明書.