

# 標識抗體法에 의한 齒牙齲蝕症의 病理學的 研究

—齲蝕象牙質의 human  $\gamma$ -globulin의 局在에 對하여—

서울大學校 齒科大學 口腔病理學敎室

林昌潤 · 尹柱洪

## PATHOLOGIC AL STUDIES ON THE DENTAL CARIES BY FLUORESCIN ANTIBODY TECHNIQUE

—LOCALIZATION OF HUMAN  $\gamma$ -GLOBNLIN IN CARIOUS DENTINE—

Lim Chanh Yun, Joo Hong Yoon,

*Deptment of Oarl Pathology, College of Dentistry, Seoul National University.*

### .....> Abstract <.....

An attempt was made to detect the localization of immunoglobulin in human sound and carious dentine with a fluorescent antibody technique (Coons and Kaplan, 1950)

Freshly extracted sound and carious human permanent teeth were immediately put in cold 95% ethanol for fixation. These were devided into 2 segments by use of dental caburandam disc. Each segment (1×2×3) were removed enamel and demineralized 0.5M pH 7.4 EDTA(2Na-salt) at 4°C for 7 to 14 days. And made paraffin embedding and sections of 7 $\mu$ . Rabbit antiserum to human  $\gamma$ -globulin was prepared. Fluorescein isothiocyanate was conjugated with the globulin fraction of rabbit antiserum. Paraffin sections were stained with the labeled antiserum. The results are as follows.

1. Specific fluorescent of antihuman  $\gamma$ -globulin conjugate were observed in dentinal tibules, dentinal fibers and predentine of sound dentine. The specific fluorescence was mild in dentino-enamed junction and intense in pulpal side.
2. Intense specific fluorescence was observed in the dentinal tubules around the acute carious dentine.
3. The specific fluorescence was negative in translucent zone and positive beneath the zone in chronic carious dentine

## I. 緒 論

齒牙齶蝕症發生에 細菌이 關與하고 있음을 最初로 報告한 것은 Erdle(1843)으로 그後 많은 學者들에 依하여 齶蝕症과 細菌間의 關係가 檢討되어 왔다.

現在 齶蝕細菌으로는 多數의 菌種이 檢出되었으나 이들 細菌이 自己의 生物學的活性에 依하여 食物 또는 齒質을 侵蝕하여 直接 또는 間接의 硬組織에 齶蝕病變을 惹起시킨다고 보고 있다.

齶蝕症時에 免疫學的 機轉이 어느 程度 關與하고 있음은 齒牙가 生體 一部分이라는 點에서 齶蝕의 發生이나 經過를 全身의 또는 局所的인 面으로 生覺할 때 今後의 研究에 期待되는 바이며 免疫學的 面에 依한 觀察이 度外視 될 수 없다고 본다.

唾液中에 存在하는  $\gamma$ -globulin 特히 IgA等 諸種의 抗 菌 因子가 包含되어 있음은 周知의 事實으로 이들 成分이 齒牙齶蝕症의 發生 또는 經過에 어떠한 役割을 하고 있다고 生覺된다<sup>1)</sup>. Geller<sup>2)</sup>(1959), Green<sup>3)</sup>(1959, 1963), Toto<sup>4)</sup>(1960) 등은 齶蝕症이 적은 患者의 唾液中에  $\gamma$ -globulin이 많다고 하였고 Lehner<sup>5)</sup>(1967, 1967)는 齶蝕에 抵抗성을 갖고 있는 사람이 感受성이 높은 사람에서 보다 唾液과 血清中의 IgA量이 增加하고 있다고 하였다.

또한 Nordh<sup>6)</sup>(1963)는 齶蝕症이 많은 患者의 血清에는  $\alpha_2$ -globulin이 增加하나 serum albumin은 減少한다고 報告하였다.

한편 Blechman<sup>7)</sup>, 등(1965)과 Mori<sup>10)</sup>, (1966, 1966, 1968)는 齶蝕象牙質의 抗血清이 唾液이나 口腔細菌의 培養液과, 또 健全象牙質 또는 齶蝕象牙質 抗原이 7S  $\gamma$ -globulin이나 serum albumin의 抗血清과 沈降反應을 일으킨다고 하였다.

著者は 齶蝕齒牙에서 齶蝕病變과 關連하여 齒細管에 存在하는  $\gamma$ -globulin의 分布를 螢光抗體法을 利用하여 觀察한 바를 報告하는 바이다.

## II. 實驗材料 및 方法

### 1. 實驗材料

本實驗에 使用된 齒牙는 齶蝕症을 갖고있는 齒牙로써 齒髓炎으로 拔去된 齒牙를 對象으로 하였다.

### 2. 實驗方法

1) 研磨 및 EDTA脫灰標本: 拔去한 齒牙는 95% ethanol에 24~48時間 固定後 0.15M pH 7.2 phosphate buffered saline(以下 PBS로 略함)으로 洗滌한 後 齒科用 Diamond disk를 使用하여 齶蝕病巢部를 中心으

로 切斷하고 PBS 또는 cold ethanol을 滴下 시키면서 砥石을 使用하여 約 70 $\mu$  두께의 研磨標本을 만들었다.

그런다음 0.5M pH7.4의 EDTA (2Na-Salt)로 4°C에서 2~7日間 脫灰하고, PBS로 洗滌하여 螢光抗體液으로 染色하였다.

2) EDTA脫灰 및 Paraffin切片 標本: 研磨 및 EDTA脫灰標本製作때와 같이 拔去한 齒牙를 95% ethanol에 1~2日間 固定後 齒科用 disk로 切斷하여 enamel層을 除去하여 小切片을 만들어 0.5M pH7.4 EDTA 脫灰液(2Na-Salt)으로 4°C에서 7~14日間 脫灰하여 水洗後 Sainte-Marie<sup>12)</sup>(1962)法에 準하여 Paraffin 包埋하고 7~14 $\mu$  두께의 連續切片을 만들었다.

3) 免疫方法: Human  $\gamma$ -globulin(16.5mg/ml. IgG 85%, IgM 15% 綠十字社製)을 抗原으로 하여 Incomplete Freund's adjuvant와 等量 混合하여 週 1회 2mg씩 8週間 家兎後肢 大腿筋에 筋肉注射한後 抗原原液 0.2cc(0.033mg/ml)를 週 1회씩 4週間 耳靜脈에 Booster injection하였다.

最終注射日로부터 1週經過後 頸動脈으로 부터 無麻酔下에 全血採血하여 抗血清을 얻었다.

全血採血後 抗血清과 抗原間에 Ouchterlony<sup>13)</sup>의 agar gel diffusion 沈降反應으로 抗體形成을 確認하였다.

4) 螢光抗體液의 製作: 以上과 같이 하여 얻은 抗血清을 1/3 飽和流安法으로 3회 分割하여 globulin分割에 F.I.T.C(B. B. L. 社製)를 標識하여 pH 7.2 PBS에 鹽折後 DEAE-Cellulose(0.81mEq/g Difco製) Column Chromatography로 非特異因子를 除去하였다.

螢光抗體液의 Fraction I 과 Fraction II 만을 使用하였고 Fraction III는 使用치 않았다.

實除로 Fraction I 과 Fraction II 는 非特異因子가 없으나 一部 螢光抗體液에서는 이를 念慮하여 牛肝臟粉沫에 吸收시켰다.

### 3. 觀察方法

paraffin切片 및 對照群으로 齒牙鍊磨標本을 脫 paraffin 및 alcohol을 거쳐 pH 7.2 0.15MPBS에 洗滌後 螢光抗體液을 slide glass 切片上에 滴下後 室溫에서 24時間 反應시키고 螢光顯微鏡으로 齒細管에 存在하는  $\gamma$ -globulin의 局在를 健康象牙質과 齶蝕象牙質에서 觀察하였다.

## III. 實驗成績

豫備實驗의 目的으로 研磨 및 EDTA脫灰標本과 EDTA 脫灰 및 Paraffin 切片標本과 螢光抗體染色에서 螢光強度가 若干 減弱되었으나 實驗上大差가 없음을 確認하였으며 EDTA脫灰切片標本을 本實驗에 使用하여도

檢索이 可能하였다.

螢光抗體法에 依한  $\gamma$ -globulin의 局在을 健康象牙質과 齶蝕象牙質에서 觀察한바 다음과 같았다.

1. 健康象牙質: 抗人  $\gamma$ -globulin 螢光色素는 象牙細管 齒纖維(dentinal fibers) 및 前象牙質(predentine)에서 觀察되었다.

象牙細管的 特異螢光是 瑛瑯象牙境界(dentino-enamel junction)에서 微弱하였고 齒髓腔側으로 移行되면서 漸次 增加되었다.

2. 齶蝕象牙質: 象牙質의 齶蝕病巢部의 周圍. 象牙細管들은 강한 特異螢光을 보이며 齶蝕病巢部下의 象牙基質에서는 輕微한 反應을 보였다. 그러나 H-E 染色에서 齶蝕病巢가 粗雜한 組織像을 보이는 곳에서는 螢光抗體 反應 亦是 不規則하였고 陽性反應이었다.

即 急性齶蝕病巢에서는 齶蝕病巢部 周圍의 齒細管에서 강한 螢光을 發하나 慢性齶蝕病巢에서 H-E 染色에서 齒細管의 閉鎖 및 脂肪變性을 일으키고 있는 部位에서 螢光抗體反應에서 陰性反應을 보이며 그 下部에서 다시 螢光 陽性反應을 보였고 이 部位는 H-E染色에서 健康象牙質임을 確認하였다.

#### IV. 總括 및 考按

齶蝕의 免疫에 對한 最初의 報告는 von Beust<sup>14)</sup>(1912)로 이後 MacPhee<sup>15)</sup>(1933)가 實驗的인 方法을 導入하여 齶蝕免疫에 關한 研究을 行하였다. 그는 健康象牙質과 齶蝕象牙質의 食鹽水抽出上清液을 使用하여 沈降反應과 補體結合反應을 施行한 結果 齶蝕罹患者의 血清은 齶蝕象牙質食鹽水抽出液과 강한 反應을 보였으나 健康象牙質食鹽水抽出液과는 全혀 反應을 보이지 않았고 反應을 보였어도 輕微하였다고 하였다. 또 그는 齶蝕에 對한 個體의 免疫程度와 相互 比例한다고 하였다.

그後 이 方面의 研究으로는 主로 Lactobacillus를 齶蝕의 主因菌으로 生覺하여 Lactobacillus와 齶蝕과 關連시켜 免疫反應을 觀察한 業績이 많이 發表되었다.

最近 Nordh<sup>8)</sup>는 paper-electrophoresis를 利用하여 齶蝕多發患者의 血清蛋白의 成分을 檢査한바  $\gamma$ -globulin이나  $\alpha_2$ -globulin의 濃도가 높은 値를 보였고 反對로 齶蝕이 적은 患者에서는 albumin值가 높고  $\gamma$ -globulin이나  $\alpha_2$ -globulin의 濃도가 낮았다고 報告하였다.

森<sup>11)</sup>는 齶蝕에 依한 感染이 있는 境遇 다른 感染症과 마찬가지로 血清蛋白에 反應을 보이는 것은 齶蝕과 抗體生産과의 問題에 關連하여 興味 있는 일이라 하였고 그는 齶蝕과 免疫의 問題에 對하여 健康象牙質과 齶蝕象牙質에 存在하는 抗原性物質의 探索과 性狀에 對하여

實驗한바 있고 齶蝕象牙質抗血清으로 부터 globulin 劃을 使用하여 螢光抗體法을 應用하여 齶蝕症의 免疫的 研究을 行한 바 있다. 그 結果 健康象牙質이나 齶蝕象牙質內에어 抗原性物質로 唾液成分과 細菌性成分에 血清成分으로 albumin 및 circulating antibody. 알려진 7S-gammaglobulin은 檢出할 수 있었다 하였다.

또한 螢光抗體法으로 螢光顯微鏡下에서 檢索한 結果 齶蝕象牙質脫灰切片 標本에서 齶蝕象牙質螢光抗體液作用시킴에 齶蝕象牙質病巢進行部는 勿論 感染象牙細管에서도 黃綠色의 螢光을 發하는 感染細菌으로 보이는 物質들이 多數 檢出되었다고 報告 하였다.

von Kreudenstein<sup>16)</sup>은 象牙質液(dentinal fluid)의 齒髓液(dental pulp fluid) 및 唾液과 交流되고 있으며 象牙質에서 齶蝕이 發生됨은 이들液의 交流에 依함이라고 하였다.

Ellison<sup>17)18)</sup>(1958, 1960), Mandel<sup>19)</sup>(1961), Kraus<sup>20)</sup>(1962), Leach<sup>21)</sup>(1953) 등은 唾液中에서  $\gamma$ -globulin serum albumin 등의 血清蛋白과 같은 成分이 檢出된다고 하였고 Stöffer<sup>22)</sup>(1962)도 IgG, IgM. 을 Ishizaka<sup>23)</sup>(1965), Tomasi<sup>24) 25)</sup>(1965, 1968)는 IgA를 Brandzaeg<sup>26)</sup>(1965)는 IgA와 IgG가 檢出되었으나 IgM은 檢出되지 않았다고 하였다.

Schubert<sup>27)</sup>(1955), 佐藤<sup>28)</sup>(1953)은 動物의 齒髓組織을 homogenize하여 얻은 抽出液을 電氣泳動시켜 分析한 結果 serum albumin,  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\beta_1$ ,  $\gamma$ -globulin의 分劃이 存在함을 報告하였고 Honjo<sup>29)</sup>(1969)등도 螢光抗體法으로 齒髓組織에서 serum albumin, immunoglobulin, fibrinogen 등이 存在함을 確認하였다.

住谷<sup>30)</sup>(1973)는 사람의 健康象牙質과 齶蝕象牙質에 唾液 immunoglobulin 및 serum albumin 등 各 螢光抗體液으로 染色한바 象牙芽細胞層, 幼若象牙質, 象牙細管 齒纖維 및 enamel叢에서 特異螢光을 보았다 하였다.

著者의 實驗에서도 住谷<sup>30)</sup>의 報告와 付合되며 特히 健康象牙質에서는 幼若象牙質層에서 강한 特異螢光을 보였고 齶蝕病巢部 近處의 象牙細管에서 강한 特異螢光을 보였고 慢性齶蝕病巢에서는 象牙細管이 脂肪變性 乃至 閉鎖된 部分에서는 陰性이 였고 그 下部에서 螢光陽性을 보였다.

#### V. 結 論

1. 健康象牙質의 象牙細管, 齒纖維 및 前象牙質에서 抗人  $\gamma$ -globulin의 特異螢光을 보였고 이 特異螢光是 瑛瑯象牙境界에서 微弱하였고 齒髓腔側으로 移行되면서

加되었다.

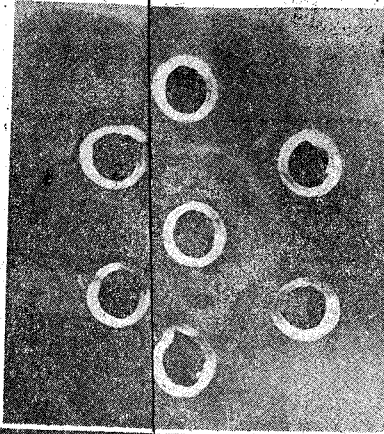
2. 急性齲蝕病巢部 周圍 象牙細管에서 特異螢光을 보고 그 下部의 象牙基質에서는 輕微한 螢光 陽性을 보이다.

3. 慢性齲蝕病巢部の 透明層에서는 螢光陰性이었고 明層下에서 螢光陽性이었다.

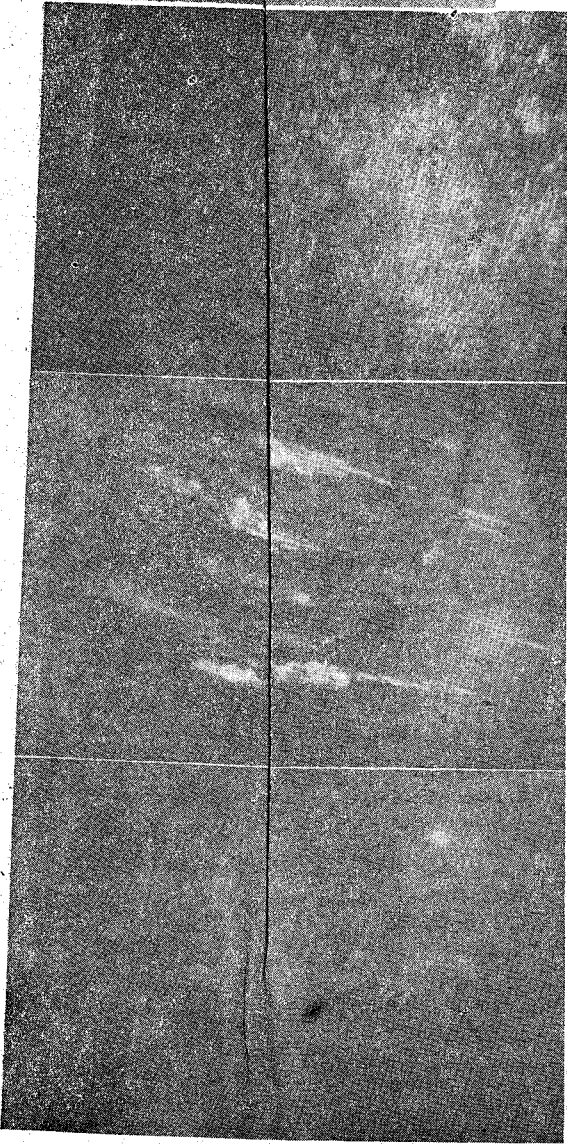
## REFERENCES

- 1) 森政和; 齒牙齲蝕症의 免疫學的 研究, 齲蝕とその豫防 醫齒藥出版株式會社. 140-174, 1968.
- 2) Geller, J.H. & Robelstad, G.H.; Electrophoresis of saliva; Relationship of protein components to dental caries. J. Dent. Res. 38: 1060-1065, 1959.
- 3) Green, G.E.; Bacteriolytic agent in salivary globulin of caries immune beings. J. Dent. Res. 18: 262-275, 1959.
- 4) Green, G.E. & Wilson, R.M.; Chromatographic comparison of caries immune and caries susceptible salivas. J. Dent. Res. 42: 1380-1386, 1963
- 5) Toto, P.D., Grisamore, T., Rapp, G.W. Delo R. & Hammond, H.; The correlations of Lactobacillus count and gamma globulin level of human saliva. J. Dent. Res. 39: 285-288, 1960
- 6) Lehner, T., Cardwell, J.E. & Clarry, E.D.; Immunoglobulins in saliva and serum in dental caries. J. Dent. Res. 46: 1262-1263, 1967
- 7) Lehner, T., Cardwell, J.E. & Clarry, E.D.; Immunoglobulins in saliva and serum in dental caries. Lancet, 1: 1294-1296, 1967
- 8) Nordh, F.; Serum protein response in high incidence of dental caries and chronic oral inflammatory condition with and without additional infections. Odonto. Revy. 14: 8-18, 1963
- 9) Blechman, H. & Mori, M.; Antigenic substances in sound and caries dentin. Ann. N.Y. Acad. Sci. 131-898-904, 1965.
- 10) 森政和; 齒牙齲蝕症의 免疫學的 研究. 齒科基礎醫學會雜誌 7: 102-105, 1966.
- 11) 森政和; むし齒の免疫學的 研究. 齒界展望 28: 497-512, 1966.
- 12) Sainte-Marie, G.; A paraffin embedding technique for studies employing immunofluorescence J. Histochem. Cytochem. 10: 250-256, 1962
- 13) Ouchterlony, O.; handbook of immunodiffusions and immunoelectrophoresis(2nd.edi.) 1-59 Ann Arbor Sci. Publihsers, Michi. 1968
- 14) Von Benst, T.A.; A contribution to the study of

- immunity to dental caries, Dent. Cosmos, 54-159, 1912.
- 15) MacPhee, G.G.; Immunological reactions in dental caries J. Dent. Res. 13: 273, 1933.
- 16) Spreter von Kreudenstein, T.; Dentinstoff wechstudien. I. Mitteilung über den Dentinliquor. Dtsch. Zahnarzt. Z. 10: 473-476, 1955.
- 17) Ellison, S.A. & Mashimo, P.A.; Immunochemical studies of saliva J. Dent. Res. 37: 28, 1958.
- 18) Ellison, S.A. & Mashimo, P.A. & Mandel I.D.; Immunochemical studies of saliva, I. The demonstrations of serum proteins in whole and paroitd saliva. J. Dent. Res. 39: 892-898, 1960.
- 19) Mandel, I.D. & Ellison, S.A.; Characterization of salivary components seperated by paper electrophoresis Arch. Oral Biol. 3: 77-85, 1961.
- 20) Kraus, F.W. & Sirisinha, S.; Gammaglobulin in saliva Arch. Oral Biol. 7: 221-234, 1962.
- 21) Leach, L.B., Wyshak, G.H. & Weisberger, D.; Human saliva; Its antigenic composition J. D. nt. Res. 42: 568-574, 1963.
- 22) Stoffer, H.R., Kraus, F.W. and Holmes, A.C.; Immunochemical identifications of salivary prosence Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 111: 467-471, 1962.
- 23) Ishizaka, K.; The presence of reagin and gamma A-globulin in saliva J. Allergy 35: 143-148, 1964.
- 24) Tomasi, T.B. Jr., Tan, E.M. Solomon, A. & Predergast, R.A.; Characteristics of an immune system common to certain external secretion J. Exp. Med. 121: 101-124, 1965.
- 25) Tomasi, T.B. Jr. & Bienstock, J.; Secretory immunoglobulins, Advan. Immunol. 9: 1-96, 1968.
- 26) Brandzaeg, P.; Immunochemical comparison of proteins in human pocket fluid serum and saliva. Arch. Oral Biol. 10: 795-803, 1965.
- 27) Schubert, H. & Schubert, P.; Grundlagenforschung an Pul-peneiweizu Fragen des Herdgeschens, Dtsch. Zahnarzt Z. 10: 1831-1850, 1955.
- 28) 佐藤學而; 實驗的 顎骨骨髓炎 に於ける 血清蛋白質並びに 齒髓蛋白質の 態度. 日大醫學雜誌, 12. 709-727, 1953.
- 29) Honjo, H. Tsubakimoto K. & Sumitani M.; Homologous plasma proteins in human dental pulp, J. Osaka Dent. Univ. 2: 147-154, 1968
- 30) 住谷道夫; 標識抗體法による 齒牙齲蝕症の 病理學的 研究. 齒科基礎醫學會雜誌 13: 544-564, 1971.



**Fig. 1** Ouchterlony's double diffusion of rabbit antiserum to human  $\gamma$ -globulin.



**Fig. 2** Specific fluorescence in dentinal tubules of the cross section of sound dentine. ( $\times 100$ )

**Fig. 3** Specific fluorescence in infected dentinal tubules ( $\times 200$ )

**Fig. 4** High power magnification of the upper section ( $\times 450$ )