

Phenytoin による歯肉増殖症の発症機序 に関する免疫学的検討

第 2 編

Phenytoin によるアレルギー反応の発現 ——遅延型アレルギーを中心として

岡山大学歯学部口腔外科学第 1 講座 (主任: 西嶋克己教授)

魚 川 正 美

(昭和 年 月 日受稿)

Key words: Phenytoin
delayed hypersensitivity
gingival hyperplasia
MIF
antigen-antibody binding

緒 言

前報において、全く化学的な修飾を行わない Phenytoin-BSA (BSA-Ph) conjugate でウサギを感作した際、Ph に対する液性抗体が作られる事を報告した。この知見より、Phenytoin (Ph) 慢性投与に際して観察される種々な副作用が、アレルギー反応として理解される可能性が強く示唆された。また、Ph を投与されている全症例において液性抗体が出現している事が判明した。しかし、Ph 投与後発現する歯肉増殖をアレルギー性反応として認識しようとする立場からすれば、Ph 投与によって歯肉において IV 型アレルギーが発症しているものと考えなければならない。本論文では、1) BSA-Ph conjugate をモルモットに投与して果して遅延型アレルギー反応を誘発させるのか否かを検討すること、及び、2) Ph を経口投与した際、果して歯肉にどの程度 Ph が移行しうるのかについて検討し、この二点から Ph 投与後の歯肉増殖症が IV 型アレルギーとして理解されうる可能性があるのか否かについて調べることにした。

実 験 方 法

I. 体液性免疫反応

1) 赤血球凝集反応

被検者血清 0.5ml を 56°C で 30 分間加熱した後、sheep red blood cell (SRBC) 浮遊液 (1×10^8 cells/ml) 0.5ml を加え、時々攪拌しながら 37°C で 1 時間 incubate し、1,000 rpm で 5 分間遠心した。その上清を microplate に添加し、gelatin-veronal buffer (pH 7.5) で順次倍数希釈してゆき、その上に tannic acid 処理で Phenytoin (Ph) を coating した SRBC 浮遊液や正常な SRBC 浮遊液 (2×10^8 cells/ml) を滴下し、37°C で 1 時間 CO₂ incubator 中で incubate して赤血球凝集反応を行った¹⁾。

2) ³H-Ph binding assay

患者血清 0.1ml に ³H-Ph 0.05 μCi (0.1ml) と 0.05M acetate buffer (pH 6.8) 0.1ml を加え、4°C で 12 時間静置した。これに dextran-coated charcoal (DCC) 0.5ml を加えて (37°C) よく攪拌し、直ちに 3,000 rpm で 5 分間遠心し、上清 0.5ml の放射活性を liquid scintillation counter (Aloka liquid scintillation system, LSC-700) で測定し、被検血清の ³H-Ph binding

capacity (B/T%) を求めた。

3) 蛍光抗体法による抗核抗体の検出

マウス肝の凍結切片標本を0.1M phosphate buffered solution (PBS, pH7.2) にひたして被検血清を加え、室温で1時間放置し、その後過剰な抗体を ice-cooled PBS で充分洗浄して除去した。その切片に FITC で label したヒト-globulin 抗体をのせ、室温下に1時間静置した。その後充分量の PBS で洗浄し、蛍光顕微鏡 (Olympus FLM) 下で鏡検を行った²⁾。

4) 間接 Coombs 試験

2% O型赤血球浮遊液2滴と被検血清4~6滴を混和し、37°Cで1時間 incubate した。これに充分量の生理食塩液を加えて混和した後、遠沈を行って赤血球を分離した。この様な操作を反復して赤血球を洗浄した後、赤血球の沈渣に Coombs 血清を1滴加えてよく混和し、直ちに1,000rpm, 1分間遠心を行い試験管を静かに振って凝集の有無を観察した³⁾。

II. 細胞性免疫反応

1) 抗原の作成

前報⁴⁾に従って BSA に Ph を coupling させた BSA-Ph conjugate を作成し、これを抗原とした。carrier (BSA) 対 hapten (Ph) のモル比は1:5に調整した。なお、これと並行して carrier を egg albumin (EA) とした conjugate, 即ち EA-Ph (1:5) も作成した。

2) Foot pad reaction

遅延型アレルギーの古典的な証明法である foot pad reaction は、Volkman and Collins⁵⁾ の原法に準じてマウスの代りにモルモットで行った。BSA-Ph 0.25mg を saline 0.25ml に溶解し、同量の Freund complete adjuvant (FCA) と混和し、これを雄性モルモット (Hartley 系) の背側皮内に注射した。4週間後に BSA, BSA-Ph, EA, EA-Ph の各 50 μ g をいずれも 50 μ l の 0.9% NaCl 液に溶かして感作モルモットの一方の足蹠皮内に注射し、他側 (対照側) 足蹠皮内には 0.9% NaCl 液 50 μ l を注射した。その後、経時的に両足蹠の容積を水銀 manometer 法で測定し⁶⁾、容積の増加率を算出した。また、他の例では1回目の感作を行った6週後に更に BSA-Ph 0.25mg を saline 0.25ml に溶か

し、更に Freund incomplete adjuvant (FIA) 0.25ml に懸濁させて背側皮内に注射し (booster), その4週後に前と同様に種々な異種蛋白を足蹠皮内に注射する foot pad reaction を行った。

3) Local passive transfer⁷⁾

BSA-Ph 0.25mg を 0.9% NaCl 0.25ml に溶解させ、その後同量の FCA と混和して懸濁させ、これをモルモットの背側皮内に注射した。4週後に BSA-Ph 0.25mg の saline 液 0.25ml と FIA 0.25ml の混合懸濁液で booster を行った。2週後に感作モルモットの腹腔内に流動パラフィン 20ml を注入し、その4日後に Hanks 液 20ml を腹腔内に注入して腹壁を massage した。腹腔を正中切開して Hanks 液を回収し、滲出細胞を集めた。その後 Hanks 液で更に3回腹腔を洗浄した。この様にして集めた腹腔滲出細胞 (0.8×10^7 cells) を BSA-Ph, BSA, EA-Ph, EA 液などと混合し、0.5mg/ml となるように調整した。この 0.1ml を正常モルモットの背側皮内に注射し、その後注射部位における皮膚反応を観察した。この場合の対照実験としては、1) 腹腔滲出細胞を異種蛋白と接触させる事なく、単独で皮内注射した際の皮膚反応や、2) 感作動物の血清と異種蛋白とを混合させた液を未感作の正常モルモットの背側皮内に注射し、その皮膚反応を観察した。

4) Migration inhibition test

Lymphokine の検出は、Clausen の変法⁸⁾による migration inhibition test で行った。腹腔細胞 transfer 実験で述べたのと同様に BSA-Ph で感作したモルモットの腹腔滲出細胞を用いて遊走阻止試験を行った。培養用ゲルの作成は、agarose と agar を 1:1 (w/w) に混合し、2倍濃度の培養液および非働化牛胎児血清を加えて、最終濃度 1.1-1.2% の agarose-agar mixed gel を作成し、シャーレ1個 (直径 6cm) あたりに 5ml の培養ゲルを注入した。1mg/ml に調整した種々な抗原溶液 (BSA-Ph, BSA, EA-Ph, EA) 0.1ml と感作腹腔浸出細胞の浮遊液 (2×10^8 cells/ml) 0.1ml とを混合し、95% O₂ + 5% CO₂-incubator 中に 37°C, 1時間静置した。次に、予め作っておいた培養ゲルに、直径 3mm の well を数個あけ、この中に腹腔細胞の

単独液や腹腔細胞と抗原との混液をマイクロピペットを用いて注入した。5% CO₂ incubator で24時間孵置した後、シャーレの底面に広がった遊走部分の直径をノギスで計測し、Index of migration を算出した。Index は、腹腔浸出細胞のみの遊走直径(X)に対する腹腔細胞に抗原を作用させた混液の遊走直径(Y)の比(Y/X)で求めた。

5) 遅延型アレルギー発症部位の組織片の作成
動物を出血致死させた後、アレルギー反応をおこした部位の皮膚を切除し、15%ホルマリン液に固定し、その後充分水洗して alcohol で脱水した。次にパラフィン包埋し、マイクロトームで薄切した組織片を hematoxylin-eosin 液で染色した。

III. 歯肉中の Ph 含量の測定

Wistar 系雄性ラット (約200g) に、0.5% sodium carboxymethyl cellulose (CMC) に懸濁させた Ph を200mg/kg 経口投与し、その後経時的に断頭した。歯肉を切除し、そのに含まれる Ph を抽出し、歯肉中の Ph 含量を RIA によって測定した。同時に血清中の Ph 濃度も測定し、両者の相関関係について検討した。

歯肉を約10mg採取し、10% HClO₄ 1ml を加えて sonication (Handy Sonic, UR-20P) を10分間行って組織を破壊した。次に CHCl₃ 5ml を加え、1分間振盪し、Ph を抽出した。水層を aspiration により除去し、有機層をろ過し、これに0.2N NaOH 2ml を加え、1分間振盪して Ph を水層に逆抽出し、2,000rpm で5分間遠心した水層の1ml をとり、0.2N HCl 1ml を加えて中和し、これを水で希釈してサンプルとし、RIA 測定を行った⁴⁾。

実験結果

1. Ph 慢性投与患者血清を用いたアレルギー反応

前報に報告した如く、BSA-Ph を adjuvant と共にウサギに投与すると、Ph に対する抗体が産生される事が明らかになった。この知見より逆に推定すれば、Ph を慢性的に投与されている患者の血清には、Ph に対する抗体を含有する可能性がある。かかる見地より、患者の液性抗体

Table 1 Immunological reactions tested on the serum obtained from the Phenytoin-treated patients

patient	Phenytoin dose (mg/day)	Hemoagglutination Ph-SRBC	Anti-DNA test	Coombs test	³ H-Ph-binding test (B/T %)
A	150	-	-	-	0.14
B	100	-	-	-	0.16
C	80	-	±	-	0.21
D	50	-	-	-	0.12
E	50	-	±	-	0.23
F	50	-	-	-	0.17
G	50	-	±	-	0.28
H	20	-	±	-	0.20
I	0	-	-	-	0.08
normal serum	0	-	-	-	0.08

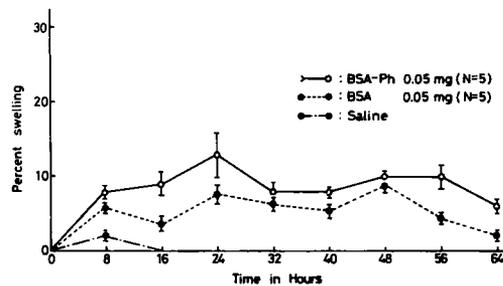


Fig. 1 Sequential changes in the foot-pad volume provoked by BSA-Ph and BSA challenges. Single immunization was carried out with BSA-Ph in FCA emulsion.

の関与する免疫反応を検討し、その結果を Table 1 に一括して示した。赤血球凝集反応及び Coombs 試験は全員陰性であった。しかし、抗核抗体は患者9名中の1人が陽性で4人が疑陽性、残りの4人は陰性であった。Ph を毎日連続して服用していた8名の患者血清は、全員³H-Ph に対する結合能が正常人血清に比べて2~3倍高く、患者血清中に抗 Ph 抗体の存在することが明らかになった。

2. 遅延型アレルギー反応

1) Foot pad reaction

Fig. 1 は、FCA を adjuvant として1回だけ BSA-Ph を感作したモルモットの足蹠に、抗原を challenge した際の足蹠容積変動の時間経

過を示している。BSA-Ph 及び対照の BSA とほぼ同様な時間経過で足蹠の腫張が起っており、いずれも10%前後の腫張率を示した。48時間後における両者の腫張には、有意差は見られなかった。しかし、BSA-Phの方が全経過を通じて高い腫張率を示した。

Fig. 2は、足蹠反応における Ph の関与を

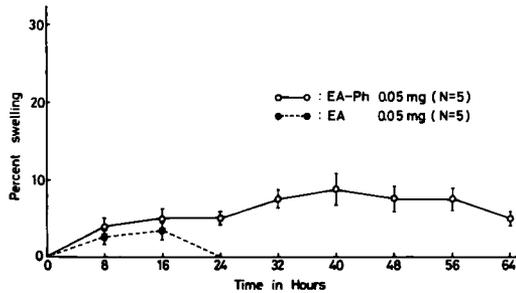


Fig. 2 Sequential changes in the foot-pad volume of sensitized guinea pigs provoked by EA-Ph and EA challenges. Single immunization was achieved similarly.

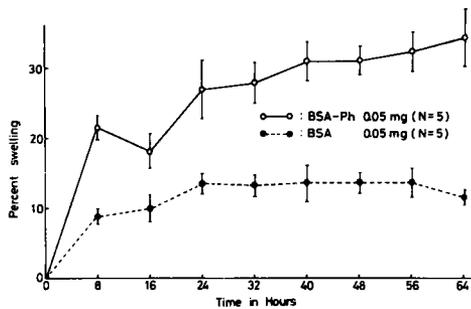


Fig. 3 Sequential changes in the foot-pad volume provoked by BSA-Ph and BSA challenges. Immunization was performed with BSA-Ph in FCA and FIA emulsion.

より明確に把握する目的で行ったもので、BSAとは heterogeneous な蛋白質である EA に Ph を coupling したものと、EA 単独液とを BSA-Ph で感作したモルモットの足蹠皮内に注射し、その後の足蹠容積の変化を経時的に調べたものである。EA 単独注射の場合には、24時間以内で浮腫は完全に消失してしまっている。しかし、EA-Ph を注射した足蹠では、24時間以上経過し

ても8%前後の swelling が48時間以上持続した。

Fig. 3は、1回目の感作の際、FCA を adjuvant として添加し、2回目 (booster) には FIA を adjuvant として感作したモルモットの足蹠に抗原を皮内注射した後の足蹠腫張の変動を示している。FCA を adjuvant として1回だけ BSA-Ph で感作した動物に比較し、BSA-Ph, BSA いずれを注射した場合でも、足蹠の腫張は著しく高い腫張率を示し、しかも両者の腫張の差は非常に顕著であった。48時間後の BSA-Ph の腫張率は31%で、BSA 単独の場合は15%であり、両者の間には危険率0.01で有意差が認められた。

Fig. 4は、前と同様にして2回感作を行っ

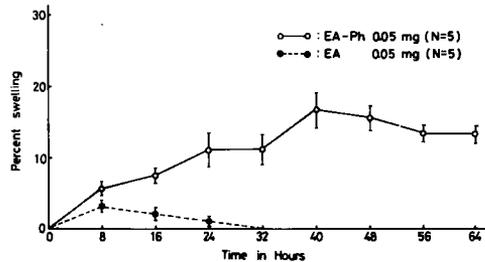


Fig. 4 Sequential changes in the foot-pad volume provoked by EA-Ph and EA challenges. Initial immunization and the second booster injection were given similarly.

たモルモットの足蹠に EA-Ph と EA 液の皮内注射を行い、その後の足蹠腫張の経時的変化を比較したものである。EA 単独注射の場合には、約24時間で浮腫は完全に消失したが、EA-Ph を注射した場合には40時間以後も著明な浮腫が持続した。

2) Local passive transfer

local に passive transfer させた48時間後の皮内反応は、腹腔浸出細胞 + BSA-Ph の注射部位において最も著明であり、発赤及び腫大も著明で、硬結した中心部は一部壊死に陥った。腹腔浸出細胞 + EA-Ph の混液を注射した部位においても、やはり顕著な発赤、腫張、硬結が見られた。しかし、いずれの対照部位においても、発赤、腫張は全く認められなかった。感作動物の血清と抗原の混合液を注射した部位でもやはり腫張や硬結は見られなかった。Fig. 5は実際の皮膚反応を示しており、Fig. 6には注射部位と各局所



Fig. 5 Appearance of delayed-type skin reactions provoked by various combinations of sensitized macrophages and a variety of antigens.

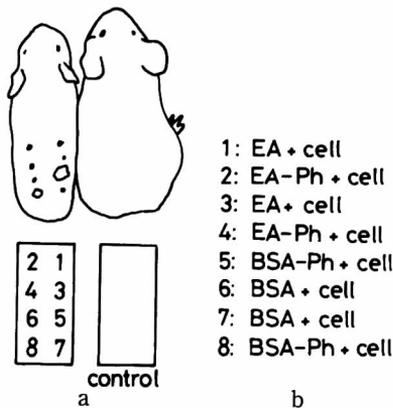


Fig. 6

Fig. 6 Schematic illustration of the sites intradermal injection (a) and combinations of injecting materials (b).

に皮内注射した抗原と macrophage との組み合わせを模式的に示している。

3) 遅延型アレルギー反応をおこした部位の組織像

Fig. 7 は、腹腔浸出細胞 + BSA-Ph を局所

伝達したモルモットの注射部位における組織像を示している (×400)。この部位では、一部組織の壊死が起っているが、多形核白血球に比較して単核球の浸出がより著明である。右半分は腹腔浸出細胞と BSA の混液を注射した対照部位の組織像 (×400) を示している。この部位には、軽度な細胞浸潤が僅かに認められるのみである。

4) Migration inhibition test

Migration inhibition test の結果は Fig. 8 に一括して示した。BSA-Ph と BSA との間には、危険率 2% で有意差が認められた。一方、BSA とは異種な蛋白である EA に Ph を結合させた EA-Ph と EA との間には有意差は $P=0.05$ で差は有意であった。いずれにせよ、Ph で感作された動物の腹腔 macrophage の遊走は、Ph の存在下で低い遊走指数を示した。Ph によって誘発された遅延型反応においても、lymphokines の一種である MIF の存在が確認された。

5) 歯肉中の Ph 濃度変化

Ph の投与後、経時的に出血致死させたウサギ

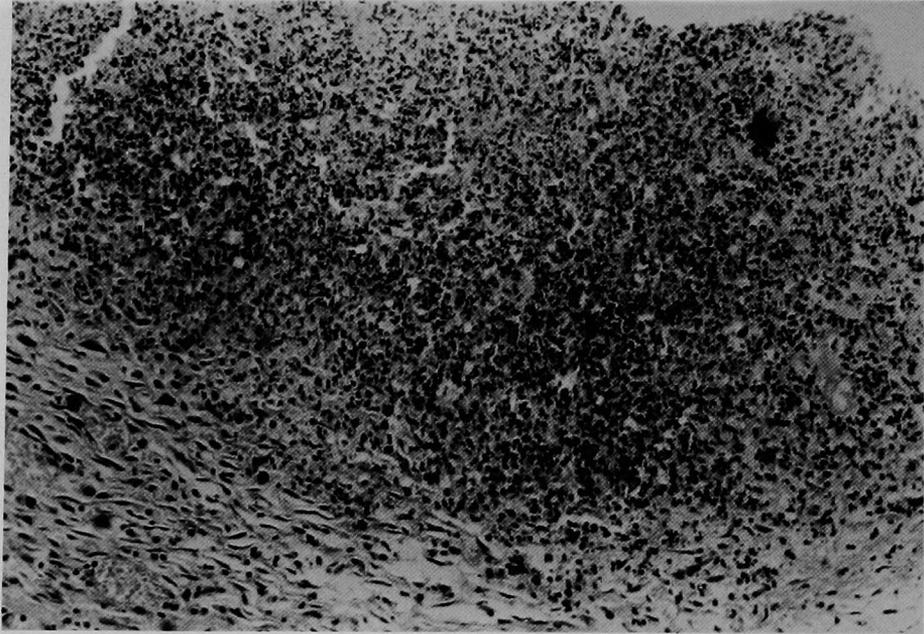


Fig. 7 Sections of skins taken from sensitized guinea pigs.
a: delayed hypersensitivity provoked by challenging
with BSA-Ph,

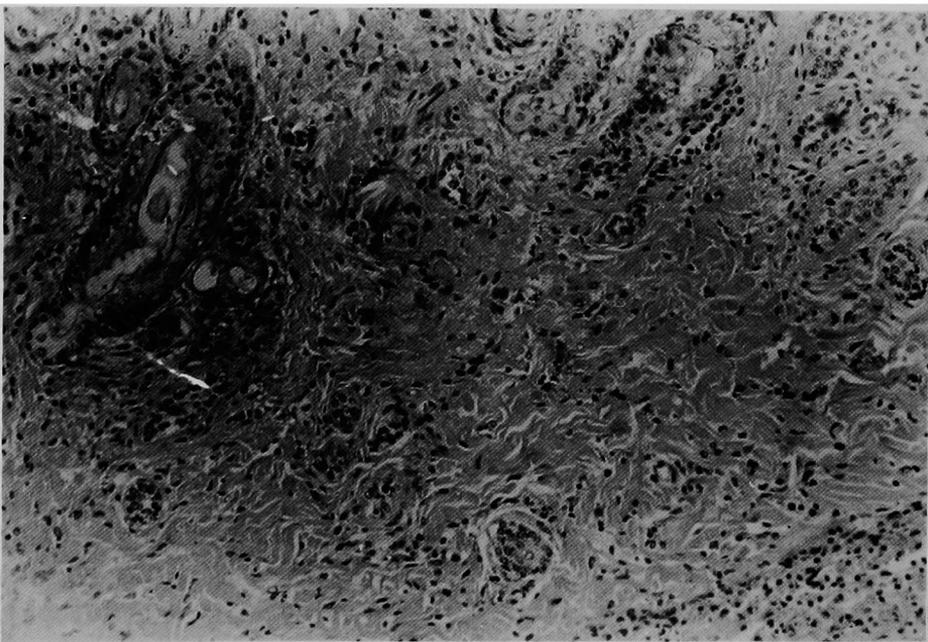


Fig. 7 b: control

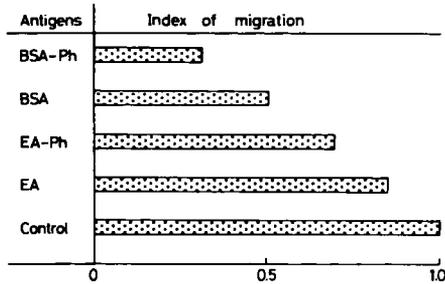


Fig. 8

Fig. 8 Changes in the index of migration of macrophages under coexistence with various antigens.

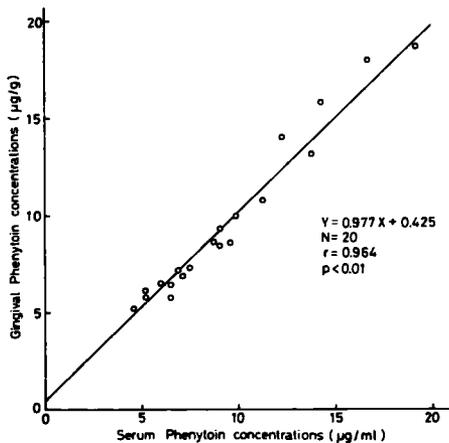


Fig. 9

Fig. 9 Relation between the serum and gingival concentrations of Phenytoin in rats.

血中の Ph 濃度は投与後比較的速やかに上昇し、最大点に到達した後漸次下降した。出血致死させた時点で歯肉を切除してその中の Ph 量を測定したが、Ph の血清濃度と歯肉中の組織濃度との間には、正の相関関係が成立し、相関係数は $r=0.964$ ($P<0.01$) と高い相関性を認めた (Fig. 9)。

考 察

Ph 投与の際の過敏性反応として、皮膚発疹、骨髄障害、全身性紅斑性狼瘡 (systemic lupus erythematosus, SLE) や、Stevens-Johnson 症候群などが出現する事はよく知られている⁹⁾。

SLE の診断にしばしば用いられる抗 DNA 抗体の検出試験において、患者 9 名中 5 名が疑陽性、あるいは陽性を示した。SLE は、自己免疫病であると考えられており、患者血清中における自己抗体の存在を強く示唆するものと考えられる。しかし、Coombs 試験では、患者血清中に自己抗体を検出することはできなかった。採血をした患者は、外観上皮膚症状がでておらず、Coombs 試験によって自己抗体が検知される程重篤な副作用を呈するには至っていないものと考えられる。

Ph を連続投与した際、再生不良性貧血、巨赤芽球性貧血、顆粒球減少症などの造血臓器における副作用が生ずることは周知である。このうち、巨赤芽球性貧血¹⁰⁾については、Ph の長期投与による葉酸欠乏がその一因とされている。赤血球凝集反応によっては検出されなかったが、³H-Ph の binding assay では患者血清中に抗 Ph 抗体の存在を確認することができた。液性抗体が存在するという事になれば、溶血性貧血の発症は II 型のアレルギー反応として理解される。また、その他の麻疹様の発疹や無顆粒球症といった過敏性反応も液性抗体によるアレルギー性反応として理解される。但し、てんかん患者は Ph だけでなく、Phenobarbital などの他の抗けいれん薬を併用している例も多く、それらの抗けいれん薬と Ph との相互作用あるいは代謝物もこれらの副作用を修飾する要因になりうる可能性は充分あると考えられる。Ph 投与後経時的に測定した血清 Ph level と歯肉組織中の Ph 濃度との間には、高度の相関関係が認められた。この所見は、Ph が歯肉の増殖と直接的な因果関係をもっているかのような示唆を与える。事実、Ph が gingival fibroblast の増殖を刺激したという報告¹¹⁾もあるが、逆に歯肉組織より分離培養した fibroblast の増殖には抑制的に作用したという報告¹²⁾もあり、fibroblast 増殖と Ph 投与とを一義的に結びつけるのは今の所困難である。一方、Ph を連続投与した際に観察される皮膚炎や発疹は、Ph による drug allergy であることが証明されている¹³⁾。これらの所見より、Ph 慢性投与による歯肉増殖を免疫学的立場から検討するという事になれば、慢性増殖性炎症ない

しは線維症にもつながりうる遅延型アレルギーと結びつく可能性が最も高いと考えられる。このような見地から、PhがIV型アレルギーを起し得るかを主に検討した訳である。Foot pad reactionにおいて、BSA-Phを1回だけ感作した動物ではPhの作用は顕著ではなかった。しかし、2回感作を行った動物では、BSA-Ph challenge後とBSAを単独でchallengeした後の足蹠容積の差が極めて顕著であった。また、BSAとは全く異質な蛋白質であるEAにPhをcouplingさせたEA-Phをchallengeした場合にも足蹠の腫張が著明に起こり、このことはPhによる遅延型アレルギー誘発の可能性を強く示唆するものと考えられる。なお、foot pad reactionでの遅延型アレルギーの判定基準は、抗原challenge 48時間後の足蹠容積の腫張率を基準にした。24時間後の腫張を基準にすれば、抗原と液性抗体との複合体による皮膚反応、即ちArthus型皮膚反応(Type II)由来である可能性がある。より正確に遅延型アレルギー反応であると判定するために、48時間後の腫張率を問題にした訳である。

次にPhによる遅延性の皮膚反応が本当に遅延型アレルギーであるのか否かを更に確かめるため、local passive transferの実験を行った。BSA-Phを抗原としてモルモットを感作した場合、感作動物の腹腔浸出細胞と特異抗原とを混在させた時にのみlocal passive transferが成立した。その際の組織像は、単核球の浸潤が著明で遅延型アレルギーの典型的な組織像が観察された。また、foot pad reactionにおいても異種蛋白抗原であるEAをBSA-Phで感作したモルモットにchallengeしても全く皮膚反応が見られなかったのに、EAにPhをcouplingさせたものをchallengeした際には、40時間後にpeakに達する腫張を示す皮膚反応が誘発されている。これらの所見をつなぎ合わせて考えると、Phが遅延型アレルギーを誘発しうる可能性は極めて高いものと考えられる。

遅延型アレルギーにおけるもう1つの特長は、感作T細胞が特異抗原に再び遭遇した際、lymphokinesがT細胞から放出される事である。lymphokinesは50種以上のものがあると言われて

いるが¹⁴⁾、本実験ではlymphokinesの中の典型的な1つであるMIF(遊走阻止因子)をClausenの変法によって検出した。この方法は、従来の毛細管法に比べて技術的に容易で測定精度が高い⁹⁾。この結果より、感作T細胞よりMIFが放出される事が確認された。この所見は、Phが遅延型アレルギーを誘発しうる1つの有力な証拠になりうると思われる。

Phによる遅延型アレルギーと歯肉増殖症との間にどのような因果関係があるのかという問題がのこる。Phの慢性投与を受けることによってPhが歯肉に蓄積し、歯肉中のPhが抗原となって、あたかもモルモットのfoot pad reactionで観察された様な、歯肉に限局する遅延型アレルギーが起こり、これが歯肉に慢性的増殖性炎症を惹起したのではないかと考えられる。しかし、Phの慢性投与を受けているにもかかわらず、全く歯肉増殖の起こらない患者(low-responder)もある。しかし、歯肉の腫張が上、下顎の歯肉全体に惹起されずに、上顎切歯付近を中心とする限局的な好発部位が観察されるという事実は単純なアレルギー説で説明するのは困難である。口腔内における種々な原因が、歯肉増殖を促進する要因になりうるという局所説もアレルギー一仮説と並行して考慮していかなければならないものと考えられる。てんかん患者は、Phのみならず、他の抗てんかん薬も併用している場合が多く、他剤との相互作用も考えなければならない。従って、歯肉増殖症の発症機序の解明には、臨臨床的、免疫学的研究のみならず、全身ないしは歯肉を中心にしたこれら薬物の代謝も生化学的に研究することは必須と考えられる。しかし、Phの慢性投与によって遅延型アレルギーが誘発されうるという知見は、今後Phによる歯肉増殖症の原因究明の一助になりうると思信する。

結 論

Ph慢性投与の際発現する種々な副作用を、体液性ないしは細胞性アレルギーの面から検討した。特に歯肉増殖が遅延型アレルギーを基礎として発症し得るか否かの検討を主な目的として本実験を行った。

1. Ph 慢性投与の患者血清には、 ^3H -Ph と結合する液性抗体が存在する事が判明した。Coombs 試験は陰性であったが、抗核抗体は被検患者血清の約半数に認められた。

2. モルモットを BSA-Ph で感作した際、遅延型皮膚反応が観察された。感作モルモットの腹腔細胞を抗原と共に正常モルモットの皮内に注射した際、その局所に遅延型アレルギー反応が発現した事より、この皮膚反応が細胞性免疫反応である事が判明した。

3. 経口投与後測定した歯肉内 Ph 濃度は、血

清 Ph 濃度と高度な相関関係を示した。

これらの所見から、Ph 投与による歯肉増殖は遅延型アレルギーをその基礎として発症する可能性が強く示唆された。

謝 辞

本稿を終るに当り、御指導、御校閲を賜った、岡山大学歯学部西嶋克己教授ならびに薬学部田坂賢二教授に深甚なる謝意を表します。

また、患者血液を御提供いただきました旭川児童院重症心身障害児施設の方々に深謝致します。

文 献

1. Boyden, S.V.: The adsorption of proteins on erythrocytes treated with tannic acid and subsequent hemagglutination by anti-protein serum. *J. Exp. Med.* **93**, 107—120, 1951.
2. Aarons, I.: Renal immunofluorescence in NZB/NZW mice. *Nature*, **203**, 1080—1081, 1964.
3. 大藤 真：日常診療に必要な免疫学の知識. p.65 金原出版, 1973.
4. 魚川正美：Phenytoin による歯肉増殖症の発症機序に関する免疫学的検討. 第1編：Phenytoin の radio-immunoassay による測定法について. 岡山医会誌 **94**, 829—842, 1982.
5. Volkman, A. and Collins, F.M.: Recovery of delayed-type hypersensitivity in mice following suppressive doses of X-radiation. *J. Immunol.* **101**, 846—859, 1968.
6. Arman, C.G. van, Begany, A.J., Miller, L.M. and Pless, H.H.: Some details of the inflammations caused by yeast and carrageenin. *J. Pharmacol. exp. Ther.* **150**, 328—334, 1965.
7. 吉田 彪：細胞性抗体の検出法. 細胞性免疫 (畔柳武雄他編) p.266—268, 医学書院, 1972.
8. Clausen, J.E.: Migration inhibitory effect of cell-free supernatants from mixed human lymphocyte cultures. *J. Immunol.* **108**, 453—459, 1972.
9. Gilman, A.G., Goodman, L.S. and Gilman, A.: *The Pharmacological Basis of Therapeutics*. 6th ed., p.454, MacMillan Publishing Co., New York, 1980.
10. Klipstein, F.A.: Subnormal serum folate and macrocytosis associated with anticonvulsant drug therapy. *Blood* **23**, 68—86, 1964.
11. Shafer, W.G.: Effect of dilantin sodium on various cell lines in tissue culture. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **108**, 694—696, 1961.
12. 葛西四朗, 吉住典也, 福田 博, 鉢嶺清有：歯肉細胞の増殖と膠原線維形成に及ぼす dilantin (5,5'-diphenylhydantoin sodium) の影響. 歯基礎誌, **14**, 155—157, 1972.
13. Braverman, I.M. and Levin, J.: Dilantin-induced serum sickness. *Am. J. Med.* **35**, 418—421, 1963.
14. 狩野恭一：細胞性免疫におけるエフェクター分子. 医学免疫学 p.78 東京大学出版会, 1980.

**Immunological studies on the etiology of gingival hyperplasia
induced by chronic administration of Phenytoin**

II. Cell-mediated, delayed hypersensitivity

Masayoshi UOKAWA

The First Department of Oral Surgery, Okayama University Dental School

(Director: Prof. K. Nishijima)

BSA-Ph is a product of covalent coupling of p-aminophenytoin to bovine serum albumin (BSA). Hartley strain guinea pigs were immunized initially with BSA-Ph in Freund's complete adjuvant and 6 weeks later all animals received a booster injection of the same antigen as an emulsion in Freund's incomplete adjuvant; these injections were administered subcutaneously in the back of the neck and haunches. 4 weeks later, various antigens (BSA-Ph, BSA, EA-Ph and EA) which were dissolved in 0.1 ml of saline were injected in the foot pad of sensitized guinea pigs and the volume of the injected foot was measured at 48 hr after antigen injection. Remarkable swelling of the foot was induced in the animals challenged with BSA-Ph but not with the others. Macrophages obtained from the abdominal cavity of the sensitized animals were injected with various antigens in the skin of normal guinea pigs. At the injection sites, an area of erythema developed and this was followed by the development of indurated nodules over the next 24 to 48 hr.

When Ph was given to guinea pigs through the mouth, fairly large amounts of Ph were detected in the gingiva and there was a good correlation between the tissue concentration of Ph and the serum Ph concentration.

These findings strongly suggest that delayed-type allergy can be a possible reason for gingival hyperplasia after Ph administration.