辺縁性歯周組織疾患患者の歯肉組織における 口腔内常在菌の侵入経路に関する研究

竹 内 宏 水 野 修 造 高 木 幹 正
たけ うち ひろし みず の しゅう ぞう たか き みき まさ
高 垣 健 太 郎 芦 田 忠 市 筒 井 正 弘
たか がき けん た ろう あし だ ちゅう いち つつ い まさ ひろ

大阪歯科大学 口腔病理学教室(主任 筒井正弘教授)*

〔受付：昭和46年9月18日〕

結 言

辺縁性歯周組織疾患の原因については、口腔内の環境が非常に複雑であり、原因と考えられる要素が複雑多岐であるため、主たる要因は不明確である。しかし、先人たちの過去の業績から、口腔内常在菌による感染すなわち内因感染も重要な原因の1つであるといわれており、これらの細菌を用いた動物実験から混合感染症であることが示唆されている¹⁻⁶⁾。さらに、この細菌が歯周組織を炎症に至らしめる要因として、細菌が産生する酵素や代謝産物が直接歯周組織に働きかける場合⁷⁻⁹⁾や、抗原物質として働きかけ、2次的に免疫学的な炎症反応を惹起せしめる場合¹⁰⁻¹⁵⁾の2通りがあげられている。しかし、これらの細菌が歯周組織に影響を及ぼす初期の場合としての、菌体や菌体成分あるいはそれらの産生物の侵入経路についてはほとんど確認されていない。

そこで今回、口腔内常在菌が歯肉組織中に侵入しつつある状態と考えられるすべての場面を主に蛍光抗体法と gram 染色法によってとらえ、辺縁性歯周組織疾患と口腔内常在菌の関連性についての今後の研究の一助としたので報告する。

なお、実験に供した細菌は、混合感染症において必須の菌であるといわれ (MACDONALD⁵⁾, TA-

KAZOE¹⁶⁾), collagenase を産生する (GIBBONS ら¹⁷⁾) こと、あるいは endotoxin を産生する (MERGENHAGEN ら¹⁸⁾, 本間¹⁹⁾) こと等から本疾患の発症や経過に深い関連性があるといわれている (MACDONALD ら²⁰⁾) 嫌気性菌の *Bacteroides melaninogenicus* と、口腔内の膿瘍などから多く分離され、且つ上皮組織を破壊するといわれている hyaluronidase を産生する (秋貞²¹⁾) Streptococci 中の *Streptococcus pyogenes* である。

実験材料と実験方法

1. 辺縁性歯周組織疾患患者の歯肉組織

本学歯周病学講座で臨床的に P₂-P₃ と診断された辺縁性歯周組織疾患患者の切除歯肉を95%の cold ethanol (4°C) に24時間浸漬して固定した後、無水 ethanol (4°C) で脱水し、SAINTE-MARIE²²⁾の方法に準じて硬パラフィンで包埋した。そして本資料を4μの連続切片に薄切し、1枚のスライドガラス上に4枚の切片を載せ、同一ステージで2種類の細菌の検出が同時におこなえるようにした。

2. 抗原の作製

1) *Bacteroides melaninogenicus* 32-2株 (以後 *B. melaninogenicus*)

東京歯科大学細菌学教室より分与を受けた *B.*

Invasion of oral bacteria into the gingival tissue of periodontal patients

H. TAKEUCHI, S. MIZUNO, M. TAKAGI, K. TAKAGAKI, T. ASHIDA and M. TSUTSUI (Department of Oral Pathology, Osaka Dental University, Kyobashi, Higashi-ku, Osaka)

* 大阪市東区京橋 1-47(〒540)

Jap. J. Oral Biol. 13 : 565-575, 1971.

Table 1 Composition of medium for *B. melaninogenicus*.

Heart infusion broth (Difco)	2.5%
Menadione (Takeda pharmaceutical, Kativ injection)	0.5/ml
Hemin (Sigma)	5.0mg/ml
J-agar (Sanko Junyaku)	1.5%
Horse blood (Shiihashi Syoten)	10.0%

melaninogenicus 32-2 株を Table 1 に示すような hemin および menadione を加えた血液寒天培地に塗抹し、黄燐燃焼法で 37°C, 7 日間嫌気培養し、培養後 0.1% のフェノール溶液 1 ml に 20 mg (湿菌量) の割合で浮遊させ抗原とした。

2) *Streptococcus pyogenes* 089 株 (以後 *S. pyogenes*)

Todd Hewitt broth (Difco) に好氣的に本菌を培養し、37°C, 7 日間培養後、生食による洗滌と遠沈を 3 度繰り返して培地成分を十分に除去した後凍結乾燥し、0.1% フェノール溶液 1 ml に対して 20mg (乾燥菌量) の割合で浮遊させ抗原とした。

なお、以後の免疫学的な試験のための可溶性抗原は、両細菌とも、生食 1 ml に抗原 20mg の割合に浮遊させ、ホモジナイザーで 30 分間ホモナイズしたものを使用した。

3. 免疫方法

各抗原のフェノール浮遊液と等量の Freund の incomplete adjuvant (Difco) とをよく混合したものを、体重 2.5-3.0kg の家兎の後肢大腿筋に、1 週間に 1 度計 4 回筋肉内注射し、最終注射より 1 週間後に、耳静脈よりフェノール溶液浮遊抗原を 2 日おきに計 7 回 1 ml (20mg/ml) をそれぞれ抗原別に注射した。さらにこれより 1 週間後に、頸動脈から無麻酔下で全採血して抗血清を得たが、この抗血清の最終抗体価は、Latex の凝集反応で、*B. melaninogenicus* が $\times 1024$, *S. pyogenes* が $\times 2048$ であった。また、得た抗血清と抗原との Ouchterlony の寒天ゲル内拡散法では Fig. 1 のような沈降線を示し、両抗原の間には本法および免疫電気泳動法では交叉反応が認められなかった (Fig. 2) し、顕微鏡的にも交叉染色性は示さな

かった。

4. 螢光抗体液の作製

各抗血清から $1/3$ 飽和硫酸法で粗 globulin を分離し、これに MARSHALL ら²³⁾の方法に基づいて fluorescein isothiocyanate (Baltimore Biological Laboratory) を標識し、DEAE-cellulose (Brown) で非特異因子を除去した。

5. 染色方法

H-E 染色, gram 染色, 螢光抗体染色の 3 法を用いて染色したが、螢光抗体染色法は通法によって脱パラフィンした切片を 0.15 M pH 7.2 の phosphate buffered saline で 2 回洗い、同一スライドガラス上の 2 枚の切片に *B. melaninogenicus* による螢光抗体液を、他の 2 枚の切片に *S. pyogenes* によるそれを滴下し、37°C で 1 時間 incubate した。染色後再び phosphate buffered saline で洗い、free の染色液を除去し、glycelin buffer で封入して UV 励起法で鏡検した。

なお、本実験での症例数は、螢光抗体染色で何らかの形で fluorescence positive を示した 25 症例を対称とし、他は除外した。

実験結果

以上のように *B. melaninogenicus* および *S. pyogenes* による螢光抗体染色と gram 染色とを併用して、辺縁性歯周組織疾患患者の歯肉組織への菌体や菌体成分あるいはその産生物の侵入経路について検索したところ、侵入状態を示す源は歯肉組織と共に付着してきた debris にあった。debris の周囲、あるいはその全域に細菌が存在し、それら細菌が一部歯肉嚢内で上皮組織に接していた。ところでこの debris 中の細菌について詳しく観察してみると、1 debris 中に *B. melaninogenicus* と *S. pyogenes* とが同程度に存在した症例は殆んどなく、1 つの debris 中に一方の細菌が存在すれば、他方の細菌がほとんど存在しないか、あるいは存在したとしても極く少数であった。Fig. 3 はそれを示したものである。したがって上皮組織の表面に壁着した細菌も一種類であり、両細菌が同一部位に共存して壁着することは

稀であった (Fig. 4)。

debris が存在する直下の上皮組織を H.E 染色で観察すると、角化層や錯角化層が堅固で、何ら変化の認められない場合、あるいはその部位の角化層が剝離している場合などがあったが、これらを蛍光抗体法で観察すると、角化層が消失してしまっている症例では細菌が上皮組織の内部に侵入している率が高かった。また、角化層が堅固であっても、その角化層の直下の重層扁平上皮層と接する部位に細菌の侵入が認められる症例もあった (Fig. 5)。なお、Fig. 6 や Fig. 7 は上皮組織中に侵入した細菌の分布状態の代表例を示したものであり、拡大された上皮細胞間隙に添い侵入していることがうかがえる。このように細菌が侵入している部位の上皮組織は H.E 所見では殆んど細胞間隙が拡大し、細胞自体も空胞変性などに陥っているものが多かったが、基底層に向うにしたがって健全な状態を保っていた。ところが、ある症例ではこの基底層に近い上皮組織中に外形核白血球が侵入し、蛍光抗体染色で特異蛍光を発している症例があった (Fig. 8) し、Fig. 9 のように上皮組織中に細菌の侵入が認められない場合でも、そこに特異蛍光を発する外形核白血球の侵潤の認められるものもあった。

またある症例では、上皮組織が表層から基底層に向って col 状に深い切れ込みを呈している中に細菌の認められる症例もあった (Fig. 10)。

つぎに、結合組織について観察してみると、上皮組織中に細菌が侵入した症例では、その直下の結合組織に多数の貪食細胞の細胞質と少数の菌体とに特異蛍光の認められた症例が多かった (Fig. 11) が、上皮組織に細菌の侵入が認められなかった症例においても、結合組織中に菌体の侵入の認められる症例があった。このような症例では、細菌と共に付近の貪食細胞にも特異蛍光が認められたもの (Fig. 12) と、細菌にのみ蛍光が認められた (Fig. 13) ものとの2つの所見を得た。

さらに、上皮組織が著しく薄く直下の結合組織が殆んど乳頭層を形成していない、すなわち上皮組織側からみれば上皮突起のみられない症例で、

基底層付近の結合組織に貪食細胞が侵潤し、特異蛍光を呈する症例もあった (Fig. 14)。

以上のように上皮組織あるいは結合組織中に侵入した菌体や菌体成分などを検出した症例においても、同一症例中に同時に両菌を検出し得たのはまれであった。

最後に菌種別に歯肉組織中に侵入した菌体や菌体成分あるいはその産生物の検出頻度についてみると、上皮組織のそれは *B. melaninogenicus* の場合25症例中7例、*S. pyogenes* 場合1例、結合組織中のそれは *B. melaninogenicus* が5例、*S. pyogenes* が3例であった。また、同一症例で両菌体が同時にみられたものはわずか2例であった。

考 察

辺縁性歯周組織疾患の発症の初期には、その付近の歯肉嚢内に多種類の口腔内常在菌が集積や増加を示すことが SHULTZ-HAUDT²⁴⁾、HEMMENS²⁵⁾、ROSEBURY²⁶⁾、SOCRANSKY²⁷⁾ 等によって確認されており、歯肉嚢内での細菌の異常増殖が歯周組織を破壊に導く一要素になりうることを示唆している。SOCRANSKY²⁸⁾ はこれらの細菌が上皮組織や結合組織の細胞を破壊し、歯周組織を維持し得る能力を低下させ、組織の破壊に伴って炎症を生じせしめると述べている。今回の実験から、まず上皮組織に細菌が侵入しそこから直下の結合組織に影響を及ぼす場合と、上皮組織に細菌が侵入しなくても外部から直接結合組織に影響の及ぶ場合の2つの可能性を確認し得たが、このことから、歯周組織の内外で常に組織に細菌が働きかけていることが分った。

その細菌の侵入経路については、本実験からも歯肉嚢内に棲息する多数の細菌がその源であることは想像に難くなく、何らかの因子で一度、上皮組織に細菌が侵入すると、この侵入状態にある細菌は付近の上皮細胞に影響を与えながら基底部に向い、ついには結合組織に達すると考えられ、このことは Fig. 6 のように、上皮組織の表層部に細菌が侵入し、その直下の基底部に近い健全な上皮組織にも特異蛍光を発する多形核白血球が浸潤

していた症例や、その直下の結合組織に少数の菌体や多数の貪食細胞に特異蛍光を認めた症例から推測し得る。COURANT ら²⁹⁾も蛍光抗体法によって、炎症を伴う歯肉組織から *B. melaninogenicus* を検出しているが、この実験で上皮組織直下の結合組織に band 状や patch 状に認められた蛍光は上皮組織を通じて本菌が侵入したことを示しているといっている。

また、薄層をなす上皮組織の場合、その直下の結合組織が菌体成分等の影響を受けることもこの実験から推測することができるが、さらに Fig. 7 でみられるように、細菌の侵入がなくても上皮組織に細菌の影響、すなわち菌体成分やその産生物の侵入のある可能性も十分に考えられる。竹内ら³⁰⁾はラットの歯肉嚢内に培養直後の *B. melaninogenicus* を一週間毎に数回接種して、上皮組織中に浸潤した多形核白血球や、結合組織中の大食細胞に特異蛍光を認めているが、この事実は歯肉嚢内からの細菌の影響を実際に把握した所見といえる。

ところで、結合組織に多数の細菌のみの特異蛍光を認めた症例にていては、とくに、歯肉切除時等における人為的な要素を考慮しなければならない。

上皮組織への細菌の侵入機序については、物理的な外傷や潰瘍形成のある場合、そこからの細菌の侵入は容易であると考えられるが、ここで、細菌の生物学的な性状による機序についても考慮する必要がある。ELLISON³¹⁾も SOCRANSKY²⁸⁾と同様、歯肉嚢に棲息する細菌が増加傾向をたどる過程で、組織に対して透過性を高めるような物質を産生し、上皮組織に対して edema や intracellular space を拡大する作用を有するようになる述べている。また AISENBERG³²⁾や SCHULTZ-HAUDT ら³³⁾は Staphylococci や Streptococci によって産生される hyaluronidase がこの上皮組織を破壊に導く一因であることを報告している。

最後に、口腔内常在菌の接種による動物実験あるいは口腔内の感染症の細菌学的な検索から、その多くは混合感染症であるといわれてきたが、今

回の実験では同一症例において *B. melaninogenicus* と *S. pyogenes* を同時に検出することは殆んどなかった。今後、菌種をさらに増やして本疾病と混合感染症との間の関連性を確認する必要があるが、現在、動物実験によって口腔内常在菌の動態あるいは消長という点に関して検討中である。

文 献

- 1) ROSEBURY, T. and FOLEY, G.: Experimental vincent's infection. *J A D A.*, **26**: 1798-1881, 1939.
- 2) ROSEBURY, T., CLARK, A. R., ENGEL, S. G., et al.: Studies of fusospirochetal infections. I. Pathogenicity for guinea pigs of individual and combined culturing of spirochetes and other anaerobic bacteria, derived from the human mouth. *J. infect. Dis.*, **87**: 217-225, 1950.
- 3) ROSEBURY, T., CLARK, A. R., TERGIS, F., et al.: Studies of fusospirochetal infection. II. Analysis and attempted quantitative recombination of the flora of fusospirochetal infection after repeated guinea pig passage. *J. infect. Dis.*, **87**: 226-233, 1950.
- 4) ROSEBURY, T., CLARK, A. R., MACDONALD, J. B. et al.: Studies fusospirochetal infections. III. Further studies of a guinea pig passage strain of fusospirochetal infection, including the infectivity of sterile exudate filtrates, of mixed cultures through ten transfers, and of recombined pure culturing. *J. infect. Dis.*, **87**: 234-248, 1950.
- 5) MACDONALD, J. B., SUTTON, R. M., KNOLL, M. L., et al.: The pathogenic components of an experimental fusospirochetal infection. *J. infect. Dis.*, **98**: 15-20, 1956.
- 6) SOCRANSKY, S. S., and Gibbons, R. J.: Required role of *Bacteriodes melaninogenicus* in mixed anaerobic infection. *J. infect. Dis.*, **115**: 247-253, 1965.
- 7) RIZZO, A. A.: Absorption of bacterial endotoxin into rabbit gingival pocket tissue. *Periodontics*, **6**: 65-70, 1968.
- 8) BURNETT, G. W. and SCHERP, H. W.: *Oral Microbiology and Infectious Disease* (3rd ed.), pp. 409-466, Williams & Wilkins, Baltimore, 1968.
- 9) BEUTNER, E. H., TRIFTSHAUSER, C. and HAZEN, S. P.: Collagenase activity of gingival tissue from patients with periodontal disease. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, **121**: 1082-1085, 1966.

- 10) ZWEMER, J. D., MENG, H. M. and NUTTER, R. L.: The immunohistochemical localization of plasma proteins in human gingivae. *J. dent. Res.*, **38**: 844, 1959.
- 11) COWLEY, G. C.: Immunofluorescence studies in relation to gingival inflammation. *J. dent. Res.*, **44**: 1182, 1965.
- 12) SCHNEIDER, T. F., TOTO, P. D., GARGIULO, A. W. et al.: Specific bacterial antibodies in the inflamed human gingiva. *Periodontics*, **4**: 53-57, 1966.
- 13) GUSTAFSSON, G. T.: Hypersensitivity mechanisms in bacterial inflammation with special reference to periodonal disease. *Acta Path. Microbiol. Scand.*, **196**: 1-45, 1968.
- 14) MERGENHAGEN, S. E.: Complement as a mediator of inflammation, Formation of biologically-active products after interaction of serum complement with endotoxins and antigen-antibody complexes. *J. Periodont.*, **41**: 202-204, 1970.
- 15) GENCO, R. J.: Immunoglobulin and periodontal disease. *J. Periodont.*, **41**: 196-201.
- 16) TAKAZOE, I. and NAKAMURA, T.: Experimental mixed infection by human gingival crevice material. *Bull. Tokyo dent. Coll.*, **12**: 85-93, 1971.
- 17) GIBBONS, R. J. and MACDONALD, R. J.: Degradation of collagenous substrates by *Bacteroides melaninogenicus*. *J. Bacteriol.*, **81**: 614-625, 1966.
- 18) MERGENHAGEN, S. E., HAMPP, E. G. and SCHERP, H. W.: Preparation and biological activities of endotoxins from oral bacteria. *J. infect. Dis.*, **108**: 304-310, 1961.
- 19) 本間孝: *Bacteroides melaninogenicus* の内毒素に関する研究. 歯科学報, **69**: 1506-1521, 1969.
- 20) MACDONALD, J. B. and GIBBONS, R. J.: The relationship of indigenous bacteria to periodontal disease, *J. dent. Res.*, **41**: 320-326, 1962.
- 21) 秋貞泰輔, 広木彦吉, 堀川高大ら: 歯学微生物学, (5版). 384-402頁, 医歯薬出版, 東京, 1968.
- 22) SAINTE-MARIE, G.: A paraffin embedding technique for studies employing immunofluorescence. *J. Amer. med. Ass.*, **173**: 982-985, 1960.
- 23) MARSHALL, J. D., EVELEND, W. C. and SMITH, C. W.: Superiority of fluorescein isothiocyanate (Riggs) for fluorescent antibody technique with a modification of its application. *Pro. Soc. exp. Biol. Med.*, **98**: 898-900, 1958.
- 24) SCHULTZ-HAUDT, S. D., BRUCE, M. A. and BIBBY, B. G.: Bacterial factors in nonspecific gingivitis. *J. dent. Res.*, **33**: 454-458, 1954.
- 25) HEMMENS, E. S. and HARRISON, R. W.: Studies on the anaerobic bacterial flora of suppurative periodontitis. *J. infect. Dis.*, **70**: 131-146, 1942.
- 26) ROSEBURY, T., MACDONALD, J. B. and CLARK, A. K.: A bacteriologic survey of gingival scraping from periodontal infections by direct examination, guinea pig inoculation and anaerobic cultivation. *J. dent. Res.*, **29**: 718-731, 1950.
- 27) SOCRANSKY, S. S., GIBBONS, R. J., BORTNICK, D. L., et al.: The microbiota of the gingival crevice area of man-I. Total microscopic and viable counts and counts of specific organisms. *Arch. oral Biol.*, **18**: 275-280, 1963.
- 28) SOCRANSKY, S. S.: Relationship of bacteria to the etiology of periodontal disease. *J. dent. Res.*, Suppl. **2**: 203-222, 1970.
- 29) COURANT, P. D. and BADER, H.: *Bacteroides melaninogenicus* and its products in the gingiva of man. *Periodontics*, **4**: 131-136, 1966.
- 30) 竹内宏, 岡下守正, 姫野宏ら: 螢光抗体法による歯頸性歯周組織疾患の免疫病理学的研究. ラットの歯肉嚢に接種された *Bacteroides melaninogenicus* の動態と歯肉組織の反応性. 歯科医学, **33**: 758-762, 1970.
- 31) ELLISON, S. A.: Oral bacteria and periodontal disease. *J. dent. Res.*, **40**: 198-202, 1970.
- 31) AISENBERG, M. S. and AISENBERG, A. D.: Hyaluronidase in periodontal disease. *Oral Surg. oral Med. oral Path.*, **4**: 317-320, 1951.
- 32) SCHULTZ-HAUDT, S. D. and SCHERP, H. W.: Production of hyaluronidase and beta-glucuronidase by viridans streptococci isolated from gingival crevice. *J. dent. Res.*, **34**: 924-929, 1955.

Fig. 1 Ouchterlony's double diffusion pattern of anti *B. melaninogenicus* (A) and anti *S. pyogenes* (B) serum. Saline extract of antigen (1-5), Saline (6), Rabbit antiserum (7).

Fig. 2 Double diffusion (A) and immunoelectrophoretic (B) patterns of anti *B. melaninogenicus* serum (1). Saline extract of *B. melaninogenicus* (2, 4, 6) and *S. pyogenes* (3, 5, 7).

Fig. 3 Staining with fluorescein-labeled anti *B. melaninogenicus* (A) and *S. pyogenes* (B). Specific fluorescence of *B. melaninogenicus* in plaque debris (A) and non-fluorescence of *S. pyogenes* in same area (B) ($\times 400$)

Fig. 4 *S. pyogenes* adhered to gingival surface ($\times 400$)

Fig. 5, 6, 7 Bacterial cells in intracellular space of epithelium ($\times 400$).

Fig. 8, 9 Staining with fluorescein-labeled anti *B. melaninogenicus* serum. Specific fluorescence in the cytoplasm of polymorphonuclear leucocytes in epithelial tissue ($\times 400$).

Fig. 10 Staining with fluorescein-labeled anti *S. pyogenes* serum.
Bacterial cells within col epithelium ($\times 400$)

Fig. 11, 12 Staining with fluorescein-labeled anti *B. melanogenicus* (11) and *S. pyogenes* (12) serum.
Specific fluorescence of bacterial cells and phagocytes
($\times 400$).

Fig. 13 Staining with fluorescein-labeled anti *S. pyogenes* serum. Bacterial cells in connective tissue ($\times 400$).

Fig. 14 Staining with fluorescein-labeled anti *B. melaninogenicus* serum. Specific fluorescence in the cytoplasm of phagocytes in connective tissue ($\times 400$).