辺縁性歯周炎の酵素組織化学的研究—ヒ ト炎症歯肉とモルモット感染歯肉 における脱水素酵素—

田 中 昭 男

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53年11月13日]

抄録: 辺縁性歯周炎罹患患者から、初診時ならびに brushing や scaling といった前処置後に歯肉を、また2群のモルモットの歯肉に口腔内細菌を注射し、経時的にその部の歯肉を採取した。これらの歯肉について Barka と Anderson の方法に基づき、LDH, NAD-MDH, NAD-ICDH, GDH, β -HBDH, α -GDH, ADH, NADP-MDH, NADP-ICDH, G6PDH, 6PGDH, NADHDH, NADPHDH, SDH の各酵素活性を検出した。さらに Ogawa らの方法により、ヒト炎症歯肉の SDH の活性を電顕的細胞化学的に検索した。電顕的観察では、下部上皮層の細胞の mitochondria に電子密度の高い沈着物がみられた。光顕的観察から、炎症の程度や時間の経過によって酵素活性に変動が認められ、とくに貧食や増殖に関与する macrophage や fibroblast などの細胞の酵素活性の増強が観察された。

緒 言

生体の生理的な生命現象は恒常性維持機構によって、一定の制約の元におかれた代謝機能に基づいている^{1,2)}。それらの代謝機能を展望すると、解糖系を経て TCA cycle に入る代謝系がエネルギー産生に重要な骨子をなしている。この代謝系において作用している生体触媒は脱水素酵素であり、病態時にはそれらの酵素にも種々な活性を中心とする動的变化がみられる³⁾。この現象はほとんどの疾患に際して発現する可能性があるので、酵素活性や酵素局在の変化をとりあげ、それらの特徴を把握すれば、疾病の診断に役立てることができる。従って、酵素組織化学的な観点から検索すれば、よりの確な診断結果が得られる。

口腔内の二大疾患の一つである 辺縁性歯周炎に

際しても、種々の酵素活性の変化が現われるものと考えられる。

従来、歯肉の脱水素酵素活性に関しては、数多くの報告がなされ⁴⁻¹¹⁾、上皮組織における NAD 依存性酵素の活性は基底層から顆粒層にかけて、NADP 依存性酵素のそれは顆粒層に強いと記載されている。しかし、多数の酵素について系統的に検索したものや、炎症性細胞について検討したものは数少ない。一方、口腔内細菌による細菌性炎症惹起 モルモットの歯肉における脱水素酵素の局在を検索したものに阪田 (1974)¹²⁾の報告があるが、NADH や NADPH Dehydrogenase, α -Glycerophosphate Dehydrogenase, β -Hydroxybutyrate Dehydrogenase などの脱水素酵素の活性については検討していない。また、歯肉局所に数回、口腔内細菌を反復注射した場合の歯肉の脱

An Enzyme-Histochemical study on Periodontal Disease—Dehydrogenase on inflamed human gingivae and gingivae of guinea pigs inflamed with oral bacteria—

Akio TANAKA (Department of Oral Pathology, Osaka Dental University, Osaka)

* 大阪市東区京橋 1-47 (〒540)

Jap. J. Biol. 21: 55-77, 1979.

水素酵素活性や、ヒト炎症歯肉における脱水素酵素の局在を電顕的レベルで検索したものは、ほとんどみられない。これらの事柄を解明することは、歯周組織の機能的な変化の一面を知ると同時に、辺縁性歯周炎の様相を有機的に理解する上に重要であると考えられる。

そこで、本研究ではヒト炎症歯肉と口腔内細菌を注射したモルモット歯肉を用い、それら歯肉の Lactate Dehydrogenase (E.C. 1.1.1.27.~28., 以下 LDH と略す), Alcohol Dehydrogenase (E. C. 1.1.1.1., 以下 ADH と略す), α -Glycerophosphate Dehydrogenase (E. C. 1.1.1.8., 以下 α -GDH と略す), β -Hydroxybutyrate Dehydrogenase (E. C. 1.1.1.30., 以下 β -HBDH と略す), Glutamate Dehydrogenase (E. C. 1.4.1.2., 以下 GDH と略す), Succinate Dehydrogenase (E. C. 1.3.99.1., 以下 SDH と略す), Isocitrate Dehydrogenases (E. C. 1.1.1.41., 以下 NAD-ICDH と略す, E. C. 1.1.1.42 以下 NADP-ICDH と略す), Malate Dehydrogenases (E. C. 1.1.1.37., 以下 NAD-MDH と略す, E. C. 1.1.1.40., 以下 NADP-MDH と略す), Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase (E.C. 1.1.1.49., 以下 G6PDH と略す), 6-Phosphogluconate Dehydrogenase (E. C. 1.1.1.44., 以下 6PGDH と略す), NADH Dehydrogenase (E. C. 1.6.99.3., 以下 NADHDH と略す), NADPH Dehydrogenase (E. C. 1.6.99.1., 以下 NADPHDH と略す)の各酵素活性を光顕的に、そして歯肉の一部については SDH の局在を電顕的に観察した。その結果、興味ある知見を得たので報告する。

実験材料および方法

1. ヒト炎症歯肉：

実験材料は大阪歯科大学付属病院歯周病科を訪れた患者のうち、辺縁性歯周炎 ($P_2 \sim P_3$) と診断されたヒトの初診時の採取歯肉10例 (20歳~40歳代) と brushing や scaling などの前処置後に、flap operation により採取された歯肉60例 (20歳~40歳代) とである。なお、対照として、臨床的に健全な歯周組織を有すると思われるヒトから、

便宜的抜去時に採取し得た歯肉2例 (4唇側, ♂, ♀, 11歳) を用いた。

2. 口腔内細菌注射モルモットの歯肉組織：

口腔内細菌として、無作為に辺縁性歯周炎罹患患者の上顎小臼歯頰面から得た歯垢を、Brain Heart Infusion agar (Difco 社製) 上に塗抹し、好氣的ならびに嫌氣的 (黄燐燃焼法, 鈴木ら (1969)¹³⁾) に1週間培養した。両者をそれぞれ標準白金耳で集菌して、凍結乾燥し、それぞれ10mg ずつ計20mg を生理的食塩水 (以下生食水と略す) 1 ml 中に浮遊させた。これを0.05ml ずつ、体重600~800g のハートレー系モルモットの顎前歯部唇側の歯肉2ヶ所に接種した (Fig. 1)。なお、実験は次の2群に分けて行なった。

Fig. 1 Injection sites of oral bacteria saline suspension.

1) 局所への口腔内細菌1回注射群 (Group I)

モルモットにエーテル麻酔下で、先の生食水浮遊液を注射し、10, 30分, 1, 3, 6, 12時間, 1, 3, 7, 14, 21, 28日後に総頸動脈より放血, 致死させ、注射部位の歯肉組織を採取した。それぞれ3匹ずつ用いた。

2) 局所への口腔内細菌の5回 (週2回の割合) 連続注射群 (Group II)

モルモットに Group I と同じく生食水浮遊液を接種し、最終接種後、1, 3, 7, 14, 21, 28日目に歯肉組織を採取した。それぞれ3匹ずつ用いた。

なお、対照として、無処置ならびに生食水を実験群と同部位に注射したモルモットを用いた。

3. 標本の作製

採取歯肉は Fig. 2 のように、ヒト歯肉は3分割し、モルモット歯肉は2分割した。ヒト歯肉は病理組織学的、酵素組織化学的そして電顕的細胞

Fig. 2 Direction dividing specimens.

化学的に、モルモット歯肉は病理組織学および酵素組織化学的に、それぞれ観察するため、次のように処理した。

1) 病理組織学的観察

組織片は10%中性ホルマリンで固定し、通法により paraffin 包埋し、5 μ 前後に薄切して、主に hematoxylin・eosin 染色を施し、必要に応じて masson trichrome 染色, toluidine blue 染色, methylgreen pyronine 染色などを行なった。

2) 酵素組織化学的観察

採取組織片の付着血液を冷生食水で除き、組織片を未固定のまま、速かに dry ice で凍結し、即座に-20 $^{\circ}$ C の cryostat (Bright 社製) 内で厚さ 8 μ 前後の cryostat 連続切片を作製した。切片を slide glass に貼付後、室温で約20分間風乾し、Table 1 に示した各種脱水素酵素活性の検出に供した。酵素活性の検出には Barka と Anderson¹⁴⁾ の方法に従って37 $^{\circ}$ C、30~60分間浸漬した。その

後、蒸留水により10分間水洗し、反応停止後、10%中性ホルマリンで約30分間室温で固定して、glycerine jelly で封入、鏡検した。

なお、対照実験として、1) 基質を含まないソディウムに浸漬、2) 10%中性ホルマリンで固定後、あるいは切片を100 $^{\circ}$ C の湯の中に投入(5分間)し失活させ浸漬、そして3) SH 基について検討するため、DDD 法¹⁵⁾により、あるいは1% trichloro acetate で固定し、アルカリ域の tetrazolium 塩溶液で反応させ、その基を検出した。

観察に際して、顕微鏡は Olympus BH-10型を、写真撮影には FK タイプのレンズを用い、Kodak Ektachrome (ASA 64) および Fuji Neopan F (ASA 32) を使用した。

3) 電顕的細胞化学的観察

ヒト炎症歯肉の一部は SDH の局在を電顕的に検索するために、2 mm³ のブロックに細切し、未固定のまま、あるいは1% paraformaldehyde で4 $^{\circ}$ C、10分間固定後、水洗し、Vibratome (Oxford 社製) により厚さ 40 μ の切片を作製した。この切片を Ogawa ら (1968)¹⁶⁾の方法に従い、37 $^{\circ}$ C、20~30分間浸漬し、その後水洗して1% Osmium tetroxide により4 $^{\circ}$ C、1時間固定し、通法により Epon 812 に包埋した。そして Porter MT 2 により薄切し、酢酸ウランと硝酸鉛の二重染色ならびに無染色で、日立 HU-12A型電子顕微鏡により観察した。一方、通常電顕像の観察も行った。なお、対照として、基質を含まないソデ

Table 1. Detected dehydrogenases

NAD dependent dehydrogenases	Lactate dehydrogenase	(LDH)
	Malate dehydrogenase	(NAD-MDH)
	Isocitrate dehydrogenase	(NAD-ICDH)
	Glutamate dehydrogenase	(GDH)
	Alcohol dehydrogenase	(ADH)
	β -Hydroxybutyrate dehydrogenase	(β -HBDH)
	α -Glycerophosphate dehydrogenase	(α -GDH)
NADP dependent dehydrogenases	Glucose-6-phosphate dehydrogenase	(G6PDH)
	6-Phosphogluconate dehydrogenase	(6PGDH)
	Malate dehydrogenase	(NADP-MDH)
	Isocitrate dehydrogenase	(NADP-ICDH)
	NADH dehydrogenase	(NADHHDH)
	NADPH dehydrogenase	(NADPHDH)
	Succinate dehydrogenase	(SDH)

イウムに浸漬し、以下同様に処理した。

実験成績

A. ヒト歯肉

ヒト歯肉の炎症の程度を Listgarten と Ellegard¹⁷⁾の方法に準じて分類すると、Table 2 のようになる。

Table 2. The classification of gingivae with periodontal disease by Listgarten and Ellegaard

	I	II	III	IV	total
at the first examination		1	2	7	10
after the treatment		30	25	5	60
control	2				2

1) 病理組織所見

対照歯肉では、oral sulcular epithelium (以下 OSE と略す)における上皮突起の不規則な増殖は少なく、極軽度の円形細胞の浸潤が認められた。初診時と brushing や scaling の前処置後に採取された歯肉には、Acanthosis, OSE における上皮突起の不規則な増殖、上皮細胞間の浮腫、上皮細胞間隙への多形核白血球(以下 PMN と略す)やリンパ球の浸潤などが認められた。固有層ではリンパ球や形質細胞の浸潤があり、肥満細胞は炎症性細胞浸潤巣(以下炎症巣と略す)から離れた部位に観察された。また好酸球を認める症例もあった。

2) 酵素組織化学的所見

酵素活性の程度は、強陽性、中陽性、弱陽性、微陽性、陰性の5段階に分けて表わした。対照実験の反応は陰性であった (Fig. 3)。tetrazolium 塩は SH 基により非特異的に還元されるので、SH 基の局在を検討する必要がある。検索したところ上皮組織の表層に極僅かに認められた。

a) 臨床的健全歯肉

上皮組織:

NAD 依存性酵素のうち、LDH の活性は Fig. 4 に示したように、OSE よりも、oral gingival epithelium (以下 OGE と略す)に強く、NAD-MDH や GDH のそれは OSE, OGE の両者に中陽性、NAD-ICDH, α -GDH, β HBDH などの

それは弱陽性であった。なお、ADH の活性は陰性であった。

NADP 依存性酵素のうち、G6PDH や ICDH の活性は中陽性で、前者は OGE よりも OSE にやや活性が強かった。6PGDH や MDH のそれは弱陽性であった。

NADH DH や NADPH DH の活性は強陽性で、後者は前者よりも、やや活性の程度は弱かった。NADH DH の活性は OGE よりも OSE にやや強い傾向が窺えた (Fig. 5)。

SDH は弱陽性の活性が基底層から下部有棘層に認められた。以上の酵素活性は角化層には、ほとんど認められなかった。

固有層:

毛細血管壁には、強陽性の NADH DH や LDH の活性があり、円形細胞や線維芽細胞に中陽性の活性が認められた。NADPH DH, NAD-MDH, G6PDH などの活性も比較的強かった。SDH, NAD-・NADP-ICDH, GDH, α -GDH, β -HBDH, 6PGDH などの活性は弱陽性、ADH や NADP-MDH のそれは微陽性であった。

b) 初診時の採取歯肉

上皮組織:

NAD 依存性酵素のうち、LDH (Fig. 6) の活性は強陽性、次いで MDH, GDH の順で、OGE の活性は OSE のそれよりも、やや強い傾向が認められた。ICDH と α -GDH は OGE, OSE とともに弱陽性であった。 β -HBDH は OSE よりも OGE に活性が強く、とくに上部有棘層から顆粒層にかけて中陽性を示す症例が多かった。ADH の活性は全症例に陰性～微陽性であった。

NADP 依存性酵素のうち OSE の活性は G6PDH (Fig. 7), 6PGDH, ICDH の順に、OGE のそれは ICDH, G6PDH 6PGDH の順に弱くなった。なお、MDH の活性は弱陽性であった。OGE の上部有棘層と顆粒層のこれら酵素の活性は基底層よりも強かった。

NADH DH の局在は NAD 依存性酵素のそれと類似し、その活性の程度は LDH とほぼ同程度であった (Fig. 8)。

NADPH DH は、OGE では上部有棘層から顆粒層に (Fig. 9), そして OSE にも中陽性の活

性が認められた。

SDH の活性は OGE, OSE とともに弱陽性であった。

固有層:

NAD 依存性酵素のうち, LDH の活性は毛細血管壁に強陽性, 線維芽細胞や円形細胞に中陽性であった。MDH の活性は LDH のそれよりも, やや弱い, 炎症巣中に中陽性の活性を有する細胞も散見された。GDH や ICDH は円形細胞に弱陽性の活性が, GDH はさらに毛細血管壁にも弱陽性のそれが認められた。 α -GDH (Fig. 10)。や β -HBDH の活性は円形細胞に弱陽性であるが, ADH のそれは陰性であった。

NADP 依存性酵素のうち, G6PDH の活性が最も強く, 毛細血管壁に中陽性, 円形細胞や線維芽細胞に弱~中陽性の活性があり, 6PGDH のそれは G6PDH よりもかなり弱かった。歯肉頂部付近の線維に, G6PDH の中陽性の活性を呈する症例もあった。

NADHDH は毛細血管壁に強陽性, 円形細胞, 線維芽細胞, 線維などに中陽性, 拡張血管に弱~中陽性の活性があり, これらの活性は OGE 付近よりも OSE 付近に存在するものに, 強い傾向を示した (Fig. 11)。

NADPHDH の活性は NADHDH よりも弱かったが, OSE 付近にみられる円形細胞に強く (Fig. 12), OGE 付近のものには微~弱陽性であった。OGE 付近にみられる線維芽細胞や線維などに NADPHDH の中陽性の活性が認められた。

SDH の微~弱陽性の活性が毛細血管壁や円形細胞にみられた。

c) brushing や scaling の前処置後の採取歯肉上皮組織:

NAD 依存性酵素のうち, LDH の活性の程度は, 初診時の採取歯肉よりも, やや減弱の傾向が認められた (Fig. 13)。しかし, MDH, ICDH, β -HBDH (Fig. 14), ADH および α -GDH の活性の程度は, 初診時とほぼ類似していた。GDH も類似し, 中陽性の活性を示した (Fig. 15)。

NADP 依存性酵素のうち, G6PDH の活性の程度は, 初診時のものとほぼ同程度か, やや弱い傾向を示し (Fig. 16), 6PGDH, ICDH, MDH

などの活性はあまり差はなかった。

NADHDH や NADPHDH の活性の程度は初診時のものよりも, やや弱い傾向を示した。

SDH は初診時のものと差はなかった。ただ, 歯垢付着症例もあり, それに強陽性の活性が認められ, それらは糸状菌様の形態を呈していた (Fig. 17)。

固有層:

NAD 依存性酵素のうち, LDH では毛細血管壁や線維芽細胞に強陽性の活性があったが, 円形細胞の活性の程度は初診時のものよりも, やや弱い傾向がみられた (Fig. 18)。MDH, GDH, ICDH, α -GDH, β -HBDH, ADH などの活性の程度は初診時のものとあまり差はなかった。

NADP 依存性酵素のうち, G6PDH では中陽性の活性が毛細血管壁に, ついで円形細胞に弱陽性の活性が認められたが, 初診時のものよりも, やや弱い傾向が窺えた (Fig. 19)。ほかに円形細胞に活性を有するのは ICDH, 6PGDH などであったが, 初診時と大差なかった。線維芽細胞や線維には G6PDH, 6PGDH, MDH などの活性がみられた。

NADHDH の活性は毛細血管壁に強陽性, 円形細胞や線維芽細胞に中陽性であり, 初診時のものよりも, やや弱い傾向を示した。

NADPHDH も NADHDH とほぼ同じ局在を示しているが, その強さは NADHDH よりもやや弱く, 炎症巣に認められる細胞の酵素活性は初診時のものよりやや弱かった。以上をまとめたのが Table 3, 4である。

3) 電顕的細胞化学的所見

今回は, SDH について観察した。光顕的所見では, 主に OGE の基底層から下部有棘層に活性がみられたので, その部を主に観察し, 次のような結果を得た。

mitochondria の outer compartment に一致して電子密度の高い沈着物が認められた (Fig. 20, 21)。

B. 対照群モルモット歯肉 (無処置ならびに生食水の注射モルモット歯肉)

1) 病理組織所見

上皮突起は少なく, 基底層は平滑で, 固有層は

Table 3. The localization of the NAD dependent dehydrogenases activities in the inflamed human gingivae at the first examination and after the treatment

	epithelium				connective tissue		
	ba. 1.	sp. 1.	gr. 1.	ke. 1.	cap.	inflam. c.	fibrob.
LDH	##	##	##	—	++	++	++
	##	++	++	—	++	+	++
MDH	##	##	++	—	+	+	+
	##	##	++	—	+	+	+
ICDH	++	+	!	—	! ~ +	+	—
	++	+	!	—	! ~ +	+	—
GDH	++	+	+	—	+	+	+
	++	+	+	—	+	+	!
ADH	!	!	!	—	—	—	—
	!	!	!	—	—	—	—
β -HBDH	+	+	++	—	—	—	—
	+	+	++	—	—	—	—
α -DGH	++	++	+	!	! ~ +	! ~ +	!
	++	++	+	!	! ~ +	! ~ +	!

severe : ##, moderate : ++, slight : +, trace : !, negative : —

upper part : at the first examination, lower part : after the treatment, ba. : basal,

L. : layer, sp. : spinous, gr. : granular, ke. : keratin, cap. : capillary, inflam.

c. : inflammatory cell, fibrob. : fibroblast

Table 4. The localization of the NADP dependent, NADH, NADPH, and Succinate dehydrogenases activities in the inflamed human gingivae at the first examination and after the treatment

	epithelium				connective tissue		
	ba. 1.	sp. 1.	gr. 1.	ke. 1.	cap.	inflam. c.	fibrob.
G6PDH	+	++	++	!	++	++	++
	+	++	++	!	++	+	++
6PGDH	+	+ ~ ++	+ ~ ++	!	+	+	+
	+	+	+	!	+	+	+
MDH	+	+	+	!	! ~ +	! ~ +	! ~ +
	+	+	+	!	! ~ +	! ~ +	! ~ +
ICDH	+	+	+	!	! ~ +	! ~ +	! ~ +
	+	+	+	!	! ~ +	! ~ +	! ~ +
NADH DH	##	##	##	!	++	##	++
	##	##	##	!	++	++	++
NADPH DH	++	##	##	!	+ ~ ++	+ ~ ++	+ ~ ++
	++	++	++	!	+ ~ ++	+ ~ ++	+ ~ ++
SDH	+	! ~ +	! ~ +	—	!	+	!
	+	! ~ +	! ~ +	—	!	!	!

severe : ##, moderate : ++, slight : +, trace : !, negative : —

upper part : at the first examination, lower part : after the treatment, ba. : basal,

l. : layer, sp. : spinous, gr. : granular, ke. : keratin, cap. : capillary, inflam.

c. : inflammatory cell, fibrob. : fibroblast

緻密な線維性結合組織で構成され、線維芽細胞が散見された。

2) 酵素組織化学的所見

上皮組織:

NADHDH (Fig. 22) と NAD 依存性酵素の LDH や MDH の活性は強陽性、ついで GDH, NAD-ICDH や β -HBDH であり、それは基底層から顆粒層にかけて存在し、表層に向うにつれて活性は減弱の傾向を示した。NADPHDH や NADP 依存性酵素は、主として上部有棘層や顆粒層にビマン性に formazan の沈着がみられ、基底層に向うにつれて活性は減弱した。一方、角化層に微陽性の活性が認められる場合もあったが、ほとんどは活性はみられなかった。SDH は下部有棘層や基底層に弱陽性の活性が観察された。

固有層:

ADH や α -GDH はほとんど活性を呈さず、 β -HBDH も動脈壁に弱陽性の活性を有する以外は、ほとんど活性はみられなかった。NADHDH や LDH は、血管壁、線維芽細胞などに強陽性の活性が、NAD-MDH, NAD-ICDH, GDH などは、それらに中陽性の活性が認められた。結合組織成分に、中陽性の NADPHDH や G6PDH の活性が、そして弱陽性の NADP-ICDH, 6PGDH, NADP-MDH などの活性がみられた。なお、SDH の活性は微陽性であった。

無処置ならびに生食水を注射したモルモットの両者間には、特記すべき差異はなかった。

C. 口腔内細菌を注射したモルモット歯肉の病理組織ならびに酵素組織化学的所見(菌体注射部付近を中心に観察した)

a) Group I

1) 注射10分後

細菌塊周辺の血管の拡張充血は強く、PMN の血管壁への壁着は認められた (Fig. 23) が、PMN の組織内への浸潤は未だみられなかった。

菌体には、検索したすべての酵素において、弱陽性の活性が認められたが、その周辺の組織の酵素活性は対照群と大差なかった。

2) 注射30分後

血管拡張、浮腫とともに10分後よりも強くなり、PMN の組織内への浸潤が認められるようになった。

細菌塊の中に浸潤した PMN に LDH, NAD-MDH, NADHDH (Fig. 24) などの中陽性の活性と、それよりやや弱い NADPHDH や G6PDH の活性がみられた。

3) 注射1時間後

PMN の浸潤、浮腫ともにかなり強くなり、PMN に GDH の活性が認められるようになった (Fig. 25)。

4) 注射3時間後

細菌塊はまだ明瞭に認められ、周囲組織の破壊は著しく、多数の PMN がみられた。

PMN の増加とともに酵素活性を有する細胞の数も増しているが、一方では酵素活性のない PMN も散見された。酵素活性の程度は1時間後とほぼ類似していた。

5) 注射6時間後

組織の破壊は一段と進み、PMN の自己融解や化膿巣の形成がみられた。化膿巣周辺には、大食細胞(以下 $M\phi$ と略す)も確認された。

化膿巣の形成が次第に明確化するにつれて、その部の酵素活性は減弱ないし消失した。しかし、強陽性の LDH 活性を有する細胞も存在し (Fig. 26)、ほかに NADHDH, NAD-MDH, NADPHDH, G6PDH などの活性も認められた。一方、化膿巣周辺の細胞には3時間後のそれよりも、やや活性の増強の傾向を示した。とくに LDH, NAD-MDH, NADHDH, NADPHDH などにみられた。それよりやや弱いのは GDH, G6PDH, NADP-ICDH などであった。 β -HBDH, α -GDH, ADH, NADP-MDH, NAD-ICDH, SDH などの活性は陰性であった。

6) 注射12時間後

化膿巣と周囲組織との境界はさらに明確となった。

化膿巣周辺の酵素活性の程度は6時間後のそれより、やや増強したが、化膿巣内の PMN の各種酵素の活性は減弱した。

7) 注射1日後

化膿巣は周囲組織と全く隔絶され、PMN の浸潤は peak に達し、 $M\phi$ も比較的多く認められ、リンパ球様細胞も散見された。

酵素活性は膿瘍周辺の細胞に12時間後よりも、

やや強く認められたが、これらは LDH, NAD-HDH, NADPHDH などであった。それら細胞の NAD-MDH, NADP-ICDH, G6PDH などの活性の程度は弱～中陽性であった。膿瘍内では LDH, NAD-MDH, NADP-ICDH, NADHDH, NADPHDH (Fig. 27) などの中陽性の活性を有する PMN も認められた。なお, GDH, G6PDH, 6PGDH などの活性は弱陽性で, α -GDH, β -HBDH や ADH のそれは陰性であった。

8) 注射3日後

PMN の数はやや減少の傾向を示し, $M\phi$ は増加し, 線維芽細胞の増生も僅かに認められた。

膿瘍周辺の PMN に SDH の微陽性の活性がみられた。LDH の活性は組織全体に強陽性であり, それよりやや弱い NAD-MDH の活性が, 炎症性細胞や血管壁に認められた (Fig. 28)。NAD-ICDH の活性は膿瘍内にも散在的にみられ, 1 日後のそれよりもやや増強していた。中陽性の GDH の活性は膿瘍周辺の血管壁や炎症性細胞などに, 弱陽性の α -GDH や β -HBDH のそれは炎症性細胞にみられた。ADH の活性は陰性であった。NADHDH の活性は膿瘍中心部ではほとんどないが, 所々, 強陽性の活性を有する炎症性細胞がみられ, 血管壁や線維芽細胞などにも中陽性の活性が認められた。なお, NADPHDH の活性も同様に認められたが, NADHDH の活性より弱かった。

9) 注射7日後

かなり多数の $M\phi$ が出現し, そのほとんどが細菌や壊死物を貪食して胞体が大きくなっていた。

SDH の活性は炎症巣周辺の細胞に弱陽性で, その程度は3日後のそれよりも, やや増強の傾向がみられた。LDH や NAD-MDH は炎症性細胞や線維芽細胞に中陽性の活性を示した。なお, GDH の活性は弱陽性であった。NAD-ICDH は3日後のそれとほぼ類似していた。 β -HBDH の活性は炎症巣周辺の細胞に弱陽性であり, 弱陽性の α -GDH の活性は動脈壁に認められた。NADP-ICDH や G6PDH は炎症巣中の細胞に弱陽性の活性があり, G6PDH の活性はその周辺の細胞には, より強かった。それらの細胞に NADP-

MDH の活性は微陽性で, 6PGDH のそれはほとんど陰性であった。NADHDH の中陽性の活性を有する細胞が炎症巣に散見され, NADPHDH の活性は弱～中陽性で, その活性を有する細胞は部分的に集簇あるいは散在していた。

10) 注射14日後

泡沫化した $M\phi$ がみられ, 線維芽細胞の増生もよく観察された。

SDH は7日後とほぼ類似していた。LDH や NAD-MDH は, 炎症巣を包囲している線維芽細胞に中陽性の活性がみられた。NAD-ICDH や GDH の活性は炎症性細胞に弱陽性, GDH のそれは, さらに周辺の線維芽細胞や血管壁に弱～中陽性であった。弱陽性の β -HBDH の活性は炎症巣の周辺に観察されたが, ADH のそれは微陽性であった。 α -GDH の活性は炎症巣周辺の細胞に, ほとんど陰性であるが, 炎症巣内の細胞には弱陽性であった。組織内の NADP-MDH や 6PGDH の活性は微陽性であったが, NADP-ICDH や G6PDH は炎症性細胞に弱～中陽性の活性があり, G6PDH の活性は炎症巣周辺よりも炎症巣内に強くみられた。NADHDH (Fig. 29) や NADPHDH の活性は, 炎症巣周辺の線維芽細胞に中～強陽性の活性が, 炎症巣内の細胞には中陽性のそれが認められた。

11) 注射21日後

多数の線維芽細胞, 少数のリンパ球様細胞, $M\phi$ などが認められ, 破壊された組織の修復がみられた。

LDH や NAD-MDH の活性は14日目のそれよりも線維芽細胞に, やや強い傾向がみられたが, SDH, NAD-ICDH, NADP-MDH, 6PGDH などの活性は14日目のそれとほぼ類似していた。GDH の活性は線維芽細胞に弱陽性であった。線維芽細胞や $M\phi$ には中陽性の G6PDH や NADPHDH の活性が, そして強陽性の NADHDH のそれが認められた。

12) 注射28日後

組織の修復は21日後よりもさらに進行していた。

各種酵素の活性程度は21日後とほぼ同じか, あるいはやや増強の傾向がみられた。G6PDH は炎

症巣周辺よりも炎症巣内に強い活性が観察されたのが、特徴的であった。

b) Group II

1) 注射 1 日後

細菌塊周辺には多数の PMN が浸潤し、組織の破壊は相当に強く、fibrin の析出もみられた。

SDH, NAD-ICDH, α -GDH などは動脈壁のみに弱陽性の活性が認められた。LDH の活性は Group I と同様に膿瘍形成部には、ほとんどみられなかった。しかし、膿瘍周辺の炎症性細胞に中陽性、動脈壁には強陽性の活性があった。NAD-MDH の活性は LDH のそれよりも弱く、特異な点は、膿瘍内の PMN の少数のものに弱陽性の活性が存在していたことであった。GDH の活性は膿瘍周辺の細胞に中陽性であり、膿瘍中心に向うにつれて減弱した。 β -HBDH の活性は動脈壁や膿瘍周辺の細胞に弱陽性で、膿瘍内では全く陰性であった。ADH の活性も陰性であった。膿瘍周辺の細胞に G6PDH や NADP-ICDH の中陽性の活性がみられたが、NADP-MDH や 6PGDH のそれは陰性であった。膿瘍内に NADHDH (Fig. 30) や NADPHDH の弱陽性の活性を有する PMN が散見されたが、膿瘍周辺では中～強陽性の活性が観察された。

2) 注射 3 日後

多数の PMN に加えて、M ϕ の著明な浸潤があり、組織の破壊は強く、かなり大型の pyronine 好性細胞が炎症巣付近に認められた (Fig. 31)。

SDH の活性は陰性であった。炎症巣から離れるにつれて炎症性細胞の β -HBDH の活性が強くなり、 α -GDH の活性も出現した。LDH や NAD-MDH (Fig. 32) では、炎症巣周辺の M ϕ や線維芽細胞などに中陽性の活性がみられた。GDH, NAD-ICDH, ADH などは 1 日目と大差なかった。NADP-ICDH や G6PDH は炎症性細胞に中陽性の活性が認められたが、6PGDH や NADP-MDH はほとんど陰性であった。NADHDH や NADPHDH は 1 日後とほぼ類似していた。

3) 注射 7 日後

M ϕ の増生が著明であるとともに、線維芽細胞やリンパ球様細胞も比較的多く、pyronine 好性細胞も散見された。

NAD-ICDH や ADH の活性は陰性であるが、炎症性細胞に SDH や GDH の弱陽性の活性が認められた。LDH は 3 日後とほとんど差異はなかったが、炎症巣内の細胞に弱陽性の活性がみられた。炎症性細胞や線維芽細胞に中陽性の NAD-MDH の活性が、そして弱陽性の β -HBDH や α -GDH のそれが認められた。NADP-ICDH や G6PDH の活性は M ϕ , 線維芽細胞、動脈壁などに中陽性であり、NADP-MDH や 6PGDH のそれは微陽性であった。NADPHDH の活性は炎症巣の細胞に種々な程度にみられたが、血管系では動脈壁に最も強く、NADPHDH も同様の傾向が認められた。

4) 注射 14 日後

7 日後よりもリンパ球様細胞、M ϕ の浸潤が強く、M ϕ は泡沫化し、巨細胞も認められた (Fig. 33)。

ADH の活性は陰性であったが、SDH や NAD-ICDH は炎症巣周辺の細胞に弱陽性の活性がみられた。LDH (Fig. 34) や NAD-MDH の活性は線維芽細胞に、7 日後のそれよりも増強の傾向が窺えた。GDH や β -HBDH の弱陽性の活性が炎症巣周辺の細胞に、 α -GDH の微陽性のそれが炎症巣内にみられた。弱陽性の NADP-ICDH の活性と中陽性の G6PDH のそれが線維芽細胞に、巨細胞には中陽性の G6PDH の活性 (Fig. 35) が認められた。NADHDH や NADPHDH の活性は総体的に 7 日後より増強の傾向にあった。なお巨細胞にもそれらの酵素の活性がみられた。

5) 注射 21 日後

リンパ球様細胞を主とする細胞浸潤があり、M ϕ も散見され、線維芽細胞の増生が観察された。

SDH は 14 日目とほぼ類似していた。LDH や NAD-MDH の活性は肉芽形成部に、とくに強く、後者は前者よりもやや活性は弱かった。NAD-ICDH や GDH は肉芽組織や血管壁に弱陽性の活性があり、動脈壁には弱～中陽性のそれがみられた。 β -HBDH や α -GDH の活性は肉芽組織や静脈壁に微～弱陽性、動脈壁には弱陽性であった。NADP-MDH や NADP-ICDH は線維芽細胞に弱陽性の活性があり、G6PDH は M ϕ や線維芽細胞に中陽性のそれが認められた (Fig. 36)。

6PGDH は動脈壁のみに弱陽性の活性がみられた。NADHDH や NADPHDH の活性は Mφ や線維芽細胞、血管壁などに中～強陽性であった。

6) 注射28日後

21日後よりも線維化が強く、血管周辺に pyronine 好性細胞の集簇が観察された。

酵素組織化学的所見は21日後とほぼ同じであった。

考 察

生体の臓器、組織、細胞の生理的ないし病態生理的機能を熟慮して、種々な疾患の本態の究明に役立てることは重要である。とくに形態的な側面に生化学的な一面を加味した酵素組織化学は機能という抽象的なものを topographical に確認できるという利点がある^{18,19)}。

酵素組織化学とりわけ脱水素酵素の検出には、従来から種々な tetrazolium 塩が用いられてきたが²⁰⁻²²⁾、その還元は脱水素酵素作用のみならず、浸漬メディウスの pH、組織内の SH 基、あるいは浸漬液に加えるシアン化物の濃度などによっても影響を受ける²³⁾。この非特異的な反応は浸漬液の pH を中性付近に保ち²⁰⁻²⁵⁾、シアン化物の濃度を0.01M 以下にする²³⁾ことにより除去できると報じられている。本研究でもこの原則に基づいて行なった。

一方、標本作製という過程で酵素活性の低下が起り得るが、Akiyoshi ら (1976)²⁶⁾の内耳の研究によると、凍結操作により、前庭器官の有毛細胞の電子伝達系や脱水素酵素系の活性は、コルティ器有毛細胞に比べてかなり減弱し、臓器差が存在すると報告されている。Meijer ら (1977)²⁷⁾は、凍結あるいは凍結乾燥を行った場合に、SDH の活性は後者において有意差をもって減弱すると述べている。

ところで、歯周疾患の発現に関して認められるのは、歯肉に原発する非特異的慢性炎症に起因する組織破壊である。この炎症の原因は歯肉溝付近に生息してる種々な口腔内細菌である。これら細菌の各種の毒素や酵素などにより歯周組織が直接破壊されるだけでなく、口腔内細菌とその対応抗

体との間に生ずる抗原抗体反応も、歯周組織の破壊因子になり得ることが示唆されている²⁸⁻³⁶⁾。このような歯周組織において、臨床症状の激烈なものから、比較的穏かなものまで種々な様相を呈していることは、日常よく経験するところである。この症状を修飾するものとして、全身因子が関与することも明らかである。全身性の代謝障害があれば、当然種々な酵素活性の変動も生じる可能性は十分に考えられる。局所においても、炎症や退行性変化の病変が認められる時には、その組織は少なからず種々な代謝系の影響をうけていることは容易に想像できる。

そこで今回、臨床的に炎症の強い状況下の歯肉組織と、比較的弱い状態下のそれに関して、脱水素酵素活性が如何なる様相を呈するかを把握するため、実験を行なった。すなわち、初診時の炎症の強い状態下に、そして brushing や scaling などの消炎療法を施し、発赤、腫脹の消退後に、採取された歯肉を用い、脱水素酵素の活性を検討した。さらに急性炎症時の組織の酵素活性を検討するために、細菌性炎症を惹起させたモルモット歯肉を用いた。

正常歯肉に関する基礎的な酵素組織化学的な状態を把握するために、全身疾患がなく、臨床的に健全と思われる歯周組織を有するヒトから、矯正の便宜抜去時に採取し得た歯肉について検索した。その結果、実験群よりも総体的に弱い活性を呈していた。このことは酵素の種類は異なるが、Mori (1961)³⁷⁾の Aminopeptidase, Larmas ら (1973)³⁸⁾の Arylaminopeptidase および Burstone (1960)³⁹⁾のチトクローム酸化酵素などの活性が、炎症歯肉よりも非炎症歯肉に弱いという報告と一脈相通ずるところがあるかもしれない。つまり炎症が起ると、それに伴って種々な炎症性細胞の浸潤があり、それらに各種酵素の活性が、増強することが推察される。しかし、炎症が高度になると、活性は低下する可能性が十分にある。

ところで、脱水素酵素はエネルギー産生に重要な役割を演ずる酵素であるから、エネルギーが要求される時には、これらの酵素活性が高まることは当然予測される。

今回、著者は初診時の歯肉も用いたが、その

H-E 染色像をみると円形細胞の浸潤が広範囲にわたってみられ、Listgarten と Elegard¹⁷⁾の分類に従うと、CTI score III~IVのものが多かった。なお、充血が内縁上皮下によく観察され、PMN の散見される症例も多々あった。PMN の貪食作用が始まると、ペントース回路（以下 HMPs と略す）、解糖、乳酸産生、TCA cycle、脂質代謝などが促進される⁴⁰⁾。浸潤細胞は、他に Mφ や多くのリンパ球、形質細胞などが認められるが、Mφ にも貪食時には以上のような代謝系の増強が起こっているものと考えられる。また、歯周組織において免疫反応が認められる²⁸⁻³⁶⁾ことから、抗体産生に関与する形質細胞やリンパ球も機能亢進を起こしていると推察される。Oren ら (1963)⁴¹⁾はモルモットの PMN、単球および肺 Mφ について、その代謝も検討しているが、それによると PMN や単球はエネルギーを解糖系に、Mφ は酸化的リン酸化に依存していると述べている。このことから脱水素酵素活性の増強が起こりうることが窺われる。従って初診時に得られた歯肉の炎症性細胞の酵素活性の程度が、総体的に消炎療法後に採取された歯肉のそれよりも、やや強い傾向を示していたことは、ある程度妥当性があると考えられる。さらに炎症の程度が軽度、中等度になると、内在性酵素の活性が高まると杉山 (1960)⁴²⁾が述べていることから明らかである。また、細胞の分裂分化にはエネルギーが必要であり、TCA cycle 系が細胞の分裂に関与すると Bullough (1952)⁴³⁾や Montagna (1956)⁴⁴⁾は述べている。Gerson ら (1968)⁴⁵⁾は、ラット頬および口蓋粘膜における LDH や MDH の局在は、分裂細胞と tonofibril の分布に関連し、Klingsberg (1961)⁴⁶⁾は、SDH の局在は分裂細胞の分布と関連があると報告している。

歯肉組織における脱水素酵素の電顕的観察は皆無に等しいので、今回、著者は光顕的所見と比較するため、SDH について検索した。その結果、mitochondria の outer compartment に一致して電子密度の高い沈着物がみられた⁴⁷⁻⁵³⁾。電顕的観察では、Ogawa ら (1968)¹⁶⁾のフェリシアン化銅法を用いたが、これは tetrazolium 塩を用いた場合と同様の結果が得られると言われている⁵²⁾。

つまり Kalina ら (1972)⁵⁰⁾は BSPT (2-(2'-benzothiazolyl)-5-styryl-3-(4'-phthalhydrazidyl) tetrazolium chloride) を用いて SDH の活性を検出している。上皮組織の電顕所見では、mitochondria は基底層の細胞の basal lamina 側に数多く認められ、有棘層から表層にかけて、その数は減少した。このことから、基底層ないし有棘層に、酵素活性が高いことが裏付けられる。同一細胞内に、SDH の活性の認められない mitochondria もあり、これは機能の異質性が存在していると報じられている⁵²⁾。また mitochondria に日周差が存在することが Ago (1974)⁵³⁾により示されている。

ヒト歯肉に付着している plaque に、SDH の活性がかなり強く認められたが、これは秋吉ら (1973)⁵⁴⁾、鈴木 (1973)⁵⁵⁾の報告とよく一致している。なお歯牙表面の付着 plaque について、Garlicks ら (1974)⁵⁶⁾の報告がある。すなわち、健全歯とエナメル質ウ蝕歯の付着 plaque における酵素活性は、前者では表層に活性が強く、エナメル質表面付近では活性が弱い。そして後者では逆の関係が認められている。

次に、モルモット歯肉に注射された口腔内細菌の酵素活性は、slide glass の塗抹生菌のそれよりも弱い傾向が認められた。実験に供した菌は凍結乾燥したが、Meijer ら (1977)²⁷⁾は、凍結乾燥した組織と生のそれとの間に、酵素活性の有意差はなかったと報告している。bacteria の酵素活性が低下したのは、凍結乾燥、凍結融解といった一連の操作に基づくものと思われる。

ところで Group I では、注射 30 分後頃から PMN の浸潤が生じ、それに一致して LDH、NAD-MDH、NADHDH などの活性が比較的強くみられた。注射された細菌の酵素活性は、1 日後頃まで比較的よく認められたが、経時的に活性は低下した。これは貪食されたためであると思われる。1 時間後頃から、GDH の活性も認められるようになり、アミノ酸代謝も活発に生じていることが窺える。3 間後には、浸潤細胞の数が増すにつれて酵素活性を有する細胞の数も増加した。しかし、一方では PMN の自己融解に基づく酵素活性の消失も散見されるようになった。注射 1 日

後になると、PMN の数もかなり増し、著明な膿瘍形成がみられた。それを圍繞している細胞には、12時間後よりは1日後というように経時的に、LDH, NAD-MDH, NADHHDH, G6PDHなどの活性が増強した。G6PDHについて、Itoizら(1974)⁵⁷⁾は損傷部に、Dunhamら(1977)⁵⁸⁾は増殖部に、その活性が増強すると述べている。このことは解糖系やHMPsの代謝が活発で、一部TCA cycleの代謝も進んでいることを推察させる。細胞の増殖の面から考えると、エネルギー産生の効率のよいTCA cycle系酵素の活性が一段と高まっていなくても不思議ではない。

化膿巣でも、比較的強い活性を有する細胞が散見され、それらの酵素はLDH, NAD-MDH, NADP-ICDH, NADHHDH, NADPHDHなどであった。ここで注目すべきことは、NADP-ICDH, NADPHDHなどの活性は、部分的に極めて強い活性が認められ、NAD依存性酵素やNADHHDHと趣を異にしていることであった。このことは、化膿巣形成期から修復期にかけて機能の異質性が生じているものと考えられる。いずれにしろ、14日目頃から線維芽細胞や組織球などに種々な酵素の活性の増強がよく観察された¹²⁾。とくにNAD依存性酵素に明確に観察され、組織の修復が盛んであることが窺えた。創傷治癒期には、チトクローム酸化酵素の活性も増強しているとLibbinら(1968)⁵⁹⁾は述べ、Fineら(1976)⁶⁰⁾は受傷後2日目から酵素活性の増強があると報告している。しかし、これらはすべて無菌的炎症のため、本研究とやや異っていると考えられる。

Group IIにおいてもGroup Iとほぼ類似している。注射1日後、細菌塊周辺には多数のPMNが浸潤し、同時にFibrinの析出も顕著であり、膿瘍形成部にはほとんど酵素活性はみられなかった。しかし、NAD-MDHの活性が散在的に認められた。これより、膿瘍形成期のある時期には、解糖系よりもTCA cycle系の代謝が活発であると考えられる。しかし、発炎後4～5日目に、浸出液のpHが最も低くなると言われている⁶¹⁾ので、解糖系の代謝も旺盛であると思われる。

化膿巣の中心部には、種々な酵素の活性の低下が認められるが、その周辺にはTCA cycle系

の酵素活性もよく認められた。これは田坂ら(1958)⁶¹⁾が述べているように、炎症の中心部には呼吸酵素活性の低下と糖中間代謝産物の蓄積があり、その周辺には呼吸酵素活性の亢進が認められていることと、ほぼ一致すると考えられる。Mφも食食時には、エネルギーが必要であり、その産生に関与する代謝系の酵素活性も増強しているのであろう。Group IIにおける組織反応は、アレルギー反応も関与しているが、免疫と酵素活性についてはさらに検討を要する。

辺縁性歯周炎のような慢性経過をとる炎症では、主としてリンパ球や形質細胞が出現し、それらに種々な酵素の活性が、程度差はあるが認められ、細胞の機能を果たしていることが窺える。しかしながら、Group I, IIにおける急性炎症では、PMNの機能時には活性が認められるが、自己融解を起こし膿瘍の形成時期になると、PMNの酵素活性は減弱し、消失する。従ってリンパ球や形質細胞に活性が認められるということは、それらの細胞が機能を果たしていることであり、初診時に採取された歯肉に、一部の酵素活性の増強傾向がみられたのは、何らかの形で免疫反応や食食作用により強く関与していると考えられる。

結 論

辺縁性歯周炎罹患患者から、初診時ならびにbrushingやscalingといった前処置後に採取された歯肉につき、LDH, NAD-MDH, NAD-ICDH, GDH, β -HBDH, α -GDH, ADH, NADP-MDH, NADP-ICDH, G6PDH, 6PGDH, NADHHDH, NADPHDH, SDHの各酵素の活性を光顕的に検索するとともに、電顕的にSDHの局在を検討した。また、口腔内細菌を注射したモルモットの歯肉を経時的に採取し、上記の各酵素の動態を光顕的に検索し、炎症歯肉の酵素活性について明らかにした。

1) ヒト炎症歯肉では、初診時に採取された歯肉において、炎症性細胞の示す各種脱水素酵素活性のうち、とくにLDH, G6PDH, NADHHDH, NADPHDHの活性の程度は、前処置後に採取されたものよりも、やや強い傾向がみられた。しかし、NAD-MDH, NAD-ICDH, GDH, ADH, β -

HBDH, α -GDH, NADP-MDH, NADP-ICDH, 6PGDH, SDH の各酵素活性には、あまり差異はなかった。

2) ヒト炎症歯肉の SDH の電顕的観察では、上皮組織の基底層や下部有棘層の細胞の mitochondria の outer compartment に一致して電子密度の高い沈着物が認められた。

3) モルモット歯肉では、両群において、急性炎症時の化膿巣に種々な酵素の活性の減弱や消失がみられ、その周辺には呼吸酵素系の活性の亢進が若干あり、14日目頃から組織の修復に参与する細胞に酵素活性のやや増強する傾向が認められた。

4) 以上の結果から、炎症の程度や時間の経過によって酵素活性に変動が認められ、とくに食食

や増殖に参与する macrophage や fibroblast などの細胞の酵素活性が増強するのが確認できた。また、急性炎症時と慢性炎症時に出現する細胞の酵素活性のパターンも異なることが立証できた。

稿を終るにあたり、終始御懇篤な御指導と御稿閲を賜った口腔病理学教室筒井正弘教授に深甚なる謝意を表わすとともに、有益な御助言をいただいた西田健助教授、教室員ならびに総合研究部電顕室の各位に厚くお礼申し上げます。

本論文の要旨は第18回歯科基礎医学会総会（1976年10月、盛岡）、第253回大阪歯科学会例会（1977年8月、大阪）および第18回日本組織細胞化学会総会（1977年10月、大阪）において発表した。

Summary: Many reports have been made on the dehydrogenase activity of human gingivae, and some on this activity on gingiva of guinea pigs infected with oral bacteria. But very few investigations have ever been made into the dehydrogenase activity on the inflammatory cells of human gingivae and on the gingivae of guinea pigs which had been injected several times with oral bacteria. The materials used for the experiment were a piece of gingiva excised from patients at our hospital at the first examination and after antiphlogistic treatment, who was suffering from marginal periodontitis, and a piece of gingiva of guinea pigs inoculated with oral bacteria. These gingivae were used as a cryostat serial section, and each dehydrogenases of LDH, NAD-MDH, NAD-ICDH, GDH, ADH, β -HBDH, α -GDH, NADP-MDH, NADP-ICDH, G6PDH, 6PGDH, NADHHDH, NADPHDH, and SDH was detected by the method of Barka and Anderson and observed by means of an optical microscope, while a part of the inflamed human gingivae was made into a section by means of vibratome and SDH according to Ogawa's method was observed by an electron microscope. The following results were obtained:

1) In the case of the inflamed human gingivae, the activity of the LDH, G6PDH, NADHHDH, and NADPHDH on the inflammatory cells among others was observed a little stronger in the gingivae excised at the first examination than the one excised after antiphlogistic treatment. But little difference was found with each dehydrogenases, that is, NAD-MDH, NAD-ICDH, GDH, ADH, β -HBDH, α -GDH, NADP-MDH, NADP-ICDH, 6PGDH, and SDH:

2) The electron microscopic examination of the inflamed human gingivae revealed a reaction of SDH with high electron density on the outer compartment of the mitochondria of the lower cell layer of the epithelium.

3) In both cases of the gingivae of the guinea pigs, a considerable degree of decrease or disappearance of the almost enzyme activity was observed in the suppurative focus inflicted by an acute inflammation and there was found a little increase of the activity about the respiratory enzyme system around the suppurative focus. Since the fourteenth day of the experiment, a gradual increase of the enzyme activity on the cells being responsible for the repair of the tissue began to be observed.

4) From these findings, the enzyme activity changes in accordance with the degree and process of the inflammation, and the enzyme activity of macrophage and fibroblast being responsible for

phagocytosis and proliferation was observed to increase. While the pattern of enzyme activity on cells appearing at the stage of the acute and chronic inflammation has also been established.

文 献

- 1) 阿部正和, 井川幸雄: 代謝のコントロール. 代謝の生理と病態 (高橋忠雄, 吉川春寿編集), 初版, 161-193, 朝倉書店, 東京, 1961.
- 2) 水上茂樹: 代謝調節のしくみ. 代謝—基礎と臨床—(吉川春寿, 阿部正和編集), 初版, 127-139, 朝倉書店, 東京, 1970.
- 3) 岸野泰雄: 循環障害の酵素組織化学. 病態酵素組織化学 (武内忠男, 小川和朗, 宇尾野公義編集), 初版, 38-58, 朝倉書店, 東京, 1972.
- 4) 森 昌彦, 田中淑郎, 下里常弘, 保志信男, 高田嘉定: 歯肉の脱水素反応に関する組織化学的研究. 口腔科誌, 7: 483-491, 1958.
- 5) KAWAKATSU, K., MORI, M. and KISHIRO, A.: Histochemical demonstration of the succinic dehydrogenase of the human gingiva. *Dent. Bull. Osaka Univ.*, 1: 79-87, 1960.
- 6) SHAHRIK, H. A. and EICHEL, B.: Nitro-BT formazan disclosure of DPNH reductase, lactic dehydrogenase, glucose-6-PO₄ dehydrogenase in human gingiva. *J. dent. Res.*, 40: 748-749, 1961.
- 7) SHAHRIK, H. A., EICHEL, B., LISANTI, V. F., YACOVONE, J. A. and KLINKHAMER, J. M.: Histochemical study of succinic dehydrogenase in human gingival epithelium. *Periodontics*, 1: 28-33, 1963.
- 8) SHAHRIK, H. A., EICHEL, B. and LISANTI, V. F.: Cytochemical localization and distribution of lactate utilizing enzyme system in human gingiva. *Arch. oral Biol.*, 9: 1-15, 1964.
- 9) EICHEL, B., SHAHRIK, H. A. and LISANTI, V. F.: Cytochemical demonstration and metabolic significance of reduced diphosphopyridinenucleotide and triphospho-pyridine-nucleotide reductases in human gingiva. *J. dent. Res.*, 43: 92-106, 1964.
- 10) LÖE, H. and NUKI, K.: Oxidative enzyme activities in keratinizing and non-keratinizing epithelium of normal and inflamed gingiva. *J. periodont. Res.*, 1: 43-50, 1966.
- 11) STAMBOLIEVA, E. and BOURKOVA, T.: Comparative enzymatic histochemical investigations of gingival papillae in early parodontosis (periodontosis) and parodontitis (periodontitis) traumatica. *J. periodont.*, 41: 532-535, 1970.
- 12) 阪田 収: 辺縁性歯周炎の酵素組織化学的研究, 第2報, 患者歯肉における脱水素酵素群の組織内分布と実験感染歯肉における動態について. 歯科医学, 37: 211, 1974.
- 13) 鈴木祥一郎, 上野一恵: 嫌気性菌. 第2版, 18-19, 医学書院, 東京, 1974.
- 14) BARKA, T. and ANDERSON, P. J.: *Histochemistry Theory Practice and Bibliography*, 3rd edition, 196-219, Hober Medical Division Harper & Row Publishers Inc., New York, Evanston and London, 1963.
- 15) 佐野 豊: -SH 基および-S-S 基のためのDDD法. 組織学研究法, 第4版, 436-438, 南山堂, 東京, 1975.
- 16) OGAWA, K., SAITO, T. and MAYAHARA, H.: The site of ferricyanide reduction by reductases within mitochondria as studied by electron microscopy. *J. histochem. cytochem.*, 16: 49-57, 1968.
- 17) LISTGARTEN, M. A. and ELLEGAARD, B.: Experimental gingivitis in the monkey. *J. periodont. Res.*, 8: 199-214, 1973.
- 18) 武内忠男: 酵素組織化学の基本的理論. 酵素組織化学 (武内忠男, 清水信男, 小川和朗編集), 第8版, 9-26, 朝倉書店, 東京, 1973.
- 19) 武内忠男: 光学顕微鏡の組織化学. 新組織化学 (小川和朗, 武内忠男, 森富編集), 初版, 3-25, 朝倉書店, 東京, 1975.
- 20) 小川和朗: 酸化還元酵素組織化学の理論. 酵素組織化学 (武内忠男, 清水信男, 小川和朗編集), 第8版, 96-105, 朝倉書店, 東京, 1973.
- 21) 森 昌彦: Oxidoreductase (I)—光学顕微鏡レベルでの oxidoreductase 活性検出法. 新組織化学 (小川和朗, 武内忠男, 森富編集), 初版, 183-207, 朝倉書店, 東京, 1975.
- 22) 森 昌彦: Dehydrogenase. 第1回組織細胞化学講習会テキスト (武内忠男ほか編集), 82-90, 日本組織細胞化学会, 京都, 1975.
- 23) 橋本 健, 小川和朗: テトラゾリウム塩の SH 基による非酵素的還元について. *Arch. histol. jap.*, 21: 239-249, 1961.
- 24) PEARSE, A. G. E.: *Histochemistry Theoretical and Applied Volume II* 3rd edition, 880-961, Churchill Livingstone, Edinburgh and London, 1973.
- 25) 市川 収: 生体内脱水素反応の解析. 細胞化シンポジウム, 4: 113-147, 1956.
- 26) AKIYOSHI, M., YANO, S. and Nakada, H.: Histochemical study on effect of freezing and thawing on tetrazolium reducibility of the hair cells of the inner ear. *Acta histoc-*

- hem cytochem*, 9 : 12-29, 1976.
- 27) MEIJER, A. E. F. H., BENSON, D. and SCHOLTE, H. R. : The influence of freezing and freeze-drying of tissue specimens on enzyme activity. *Histochem*, 51 : 297-303, 1977.
  - 28) 竹内 宏 : 蛍光抗体法による歯頸性歯周組織疾患の免疫病理的研究—ラットの歯肉に注射された *Bacteroides melaninogenicus* の動態と歯肉組織の反応性—。歯科医学, 33 : 386-404, 1970.
  - 29) GENCO, R. J., MASHIMO, P. A., KRYGIER, G. and ELLISON, S. A. : Antibody-mediated effects on the periodontium. *J. periodont.*, 41 : 330-337, 1970.
  - 30) BARAM, P. and ARNOLD, L. : Immunologic aspects of periodontal disease. *J. periodont.*, 41 : 617-619, 1970.
  - 31) SOCRANSKY, S. S. : Relationship of bacteria to the etiology of periodontal disease. *J. dent. Res.*, 49 : 203-222, 1970.
  - 32) BERGLUND, S. E. : Immunoglobulins in human gingiva specificity for oral bacteria. *J. Periodont.*, 42 : 546-551, 1971.
  - 33) HORTON, J. E., OPPENHEIM, J. J. and MERGENHAGEN, S. E. : A role of cell-mediated immunity in the pathogenesis of periodontal disease. *J. Periodont.*, 45 : 351-360, 1974.
  - 34) NIESENGARD, R. : Immediate hypersensitivity and periodontal disease. *J. Periodont.*, 45 : 344-347, 1974.
  - 35) 秋吉正豊 : 歯周ポケットの形成機序。日歯周病誌, 16 : 193-196, 1974.
  - 36) 西田 健 : 辺縁性歯周疾患の免疫病理学的研究。歯基礎誌, 17 : 69-83, 1975.
  - 37) MORI, M. and KISHIRO, A. : Histochemical observation of aminopeptidase activity in the normal and inflamed oral epithelium. *J. Osaka Univ. dent. Sch.*, 1 : 39-45, 1961.
  - 38) LARMAS, L. A., MÄKINEN, K. K. and PÄUNIO, K. U. : A histochemical study of hydantoin induced hyperplastic, healthy and inflamed human gingiva. *J. Periodont. Res.*, 8 : 21-27, 1973.
  - 39) BURSTONE, M. S. : Histochemical of cytochrome oxidase in normal and inflamed gingiva. *Oral. Surg. oral Med. oral Path.*, 13 : 1501-1505, 1960.
  - 40) 臼井朋包, 小林陽之助 : 細胞内殺菌作用における superoxide anion および hydrogen peroxide の役割。感染, 炎症, 免疫, 6 : 183-190, 1976.
  - 41) OREN, R., FARNHAM, A. E., SAITO, K., MILOFSKY, E. and KARNOVSKY, M. L. : Metabolic patterns in three types of phagocytizing cells. *J. Cell Biol.*, 17 : 487-501, 1963.
  - 42) 杉山正彦 : ヒト歯肉の脱水素酵素活性について。口病誌, 27 : 335-343, 1960.
  - 43) BULLOUGH, W. S. : The energy relation to mitotic activity. *Biol. Rev.*, 27 : 133-168, 1976.
  - 44) MONTAGNA, W. : The structure and function of skin. 1st edition, 51-56, *Academic Press. Inc. Publishers*, New York, 1956.
  - 45) GERSON, S. J., MEYER, J. and METTERHEIMER, H. : Quantitative histochemistry of rat oral mucosa : lactate and malate dehydrogenases. *J. invest. Dermat.*, 47 : 536-532, 1968.
  - 46) KLINGSBERG, J., CANCELLARO, L. A. and BUTCHER, E. O. : The comparative distribution of glycogen, succinic dehydrogenase and acid mucopolysaccharides in different aged animals. *J. dent. Res.*, 40 : 461-469, 1961.
  - 47) OGAWA, K. and BARNETT, R. : Electron histochemical examination of oxidative enzymes and mitochondria. *Nature*, 203 : 724-726, 1964.
  - 48) KALINA, M., WEAVERS, B. and PEARSE, A. G. E. : Ultrastructural localization of succinate dehydrogenase in mouse liver mitochondria ; a cytochemical study. *J. histochem. cytochem.*, 19 : 124-130, 1971.
  - 49) SELIGMAN, A. M., NIR, I. and PLAPINGER, R. E. : An osmiophilic distyryl ditetrazolium salt (DS-NBT) for ultrastructural dehydrogenase activity. *J. histochem. cytochem.*, 19 : 273-285, 1971.
  - 50) KALINA, M., PLAPINGER, R. E., HOSHINO, Y. and SELIGMAN, A. M. : Non-osmiophilic tetrazolium salts that yield osmiophilic lipophobic formazans for ultrastructural localization of dehydrogenase activity. *J. histochem. cytochem.*, 20 : 685-695, 1972.
  - 51) SPECTOR, G. J. : The ultrastructural cytochemistry of lactic dehydrogenase, succinic dehydrogenase, dihydro-nicotinamide adenine dinucleotide diaphorase and cytochrome oxidase activities in hair cell mitochondria of the guinea pig cochlea. *J. histochem. cytochem.*, 23 : 216-234, 1975.
  - 52) 小川和朗 : 電子顕微鏡の細胞化学。組織化学の最新技術 (濱島義博, 藤田哲也編), 97-131, 日本組織細胞化学会, 京都, 1977.
  - 53) AGO, Y. : Ultracytochemical studies on the diurnal change of the enzymatic activity in various tissues of the rat, with special reference to the mitochondrial oxidoreductase activity. *Acta histochem. cytochem.*, 7 : 19-43, 1974.

- 54) 秋吉正豊, 中村 享, 黒岩剛正, 鈴木 健: 歯苔および歯石の微生物の酵素活性の組織化学的研究. 日歯周病誌, 15 : 93-94, 1973.
- 55) 鈴木 健: 歯苔及び歯石の微生物の酵素活性の組織化学的研究について. みちのく歯学誌, 4 : 40-41, 1973.
- 56) GARLICH, V. A., BRANDAU, H. and BÖSMANN, K.: Histotopochemical determination of metabolic activity of carbohydrate metabolism in plaque from sound and carious enamel. *Caries Res.*, 8 : 234-248, 1974.
- 57) ITOIZ M. E., FRASH, A. C. C., CRIVELLI, M. E. and BARROS, R. E.: Microspectrophotometric study of succinic dehydrogenase and glucose 6-phosphate dehydrogenase in the hyperkeratinized epithelium of oral lesions in man. *Arch. oral Biol.*, 19 : 1101-1104, 1974.
- 58) DUNHAM, J., SHEDDEN, R. G., CATTERALL, A., BITENSKY, L. and CHAYEN, J.: Pentose-shunt oxidation in the periosteal cells in healing fracture. *Calc. Tiss. Res.*, 23 : 77-81, 1977.
- 59) LIBBIN, R. M., PERSON, P. and STAHL, S. S.: Biochemical and histochemical of aerobic oxidative metabolism of oral tissues: IV. oxidase histochemistry of human gingiva-pre and post gingivectomy. *Periodontics*, 6 : 214-219, 1968.
- 60) FINE, A. S., EGNOR, R., STAHL, S. S. and SCOPP, I. W.: Distal oxidative metabolic responses induced by epidermal injury. *J. periodont. Res.*, 11 : 61-65, 1976.
- 61) 田坂定孝, 荒木嘉隆: 炎症の生理化学的機転—細胞の代謝と血管反応—, 最新医学, 13 : 949-961, 1958.

Explanation of figures

- Fig. 3 Cryostat section incubated in the substrate-free medium. orig. mag. $\times 33$.
- Fig. 4 Cryostat section incubated to show the LDH activity in clinically healthy gingiva. Note the more intense activity on the oral gingival epithelium than on the oral sulcular. orig. mag. $\times 20$.
- Fig. 5 Cryostat section incubated to show the NADH activity in clinically healthy gingiva. Note the more intense activity on the oral sulcular epithelium than on the oral gingival. orig. mag. $\times 20$.
- Fig. 6 Cryostat section incubated to show the LDH activity in the specimen of gingiva excised at the first examination. Note the moderate to severe activity on the cell from basal to granular layer, capillary and inflammatory cells. orig. mag. $\times 13.2$.
- Fig. 7 Cryostat section incubated to show the G6PDH activity in the specimen of gingiva excised at the first examination. Note the moderate activity on the capillary, and oral sulcular epithelium. orig. mag. $\times 33$.
- Fig. 8 Cryostat section incubated to show the NADH activity in the specimen of gingiva excised at the first examination. Note the severe deposition of formazan at the perinucleus of the epithelium and on the capillary and inflammatory cells. orig. mag. $\times 33$.
- Fig. 9 Cryostat section incubated to show the NADPH activity in the specimen of gingiva excised at the first examination. Note the severe deposition of formazan on the epithelium, especially the upper prickle and granular cell layer. orig. mag. $\times 33$.
- Fig. 10 Cryostat section incubated to show the α -GDH activity in the specimen of gingiva excised at the first examination. Note the slight to moderate activity on the inflammatory cells. orig. mag. $\times 33$.
- Fig. 11 Cryostat section incubated to show the NADH activity in the specimen of gingiva excised at the first examination. Note the severe activity on the capillary, inflammatory cells, and fibroblasts. orig. mag. $\times 66$.
- Fig. 12 Cryostat section incubated to show the NADPH activity in the specimen of gingiva excised at the first examination. Note the moderate activity on the capillary, inflammatory cells, and fibroblasts. orig. mag. $\times 66$.
- Fig. 13 Cryostat section incubated to show the LDH activity in the specimen of gingiva excised after the treatment. Note the moderate to severe activity on the epithelium, capillary, inflammatory cells, and fibroblasts, and the less deposition found progressively towards the surface. orig. mag. $\times 33$.
- Fig. 14 Cryostat section incubated to show the β -HBDH activity in the specimen of gingiva excised after the treatment. Note the slight activity in the upper prickle and granular cell layer. orig. mag. $\times 33$.
- Fig. 15 Cryostat section incubated to show the GDH activity in the specimen of gingiva excised after the treatment. Note the slight activity on the epithelium and subepithelial tissue. orig. mag. $\times 33$.
- Fig. 16 Cryostat section incubated to show the G6PDH activity in the specimen of gingiva excised after the treatment. Note the slight to moderate activity on the oral sulcular epithelium, especially the superficial layer, capillary, inflammatory cells, and fibroblasts. orig. mag. $\times 33$.
- Fig. 17 Cryostat section incubated to show the SDH activity in the specimen of gingiva excised after the treatment. Note the severe activity on the plaque. orig. mag. $\times 132$.
- Fig. 18 Cryostat section incubated to show the LDH activity in the specimen of gingiva after the treatment. Note the moderate to severe activity on the capillary, inflammatory cells, fibroblasts. orig. mag. $\times 66$.
- Fig. 19 Cryostat section incubated to show the G6PDH activity in the specimen of gingiva excised after the treatment. Note the moderate activity on the capillary and slight activity on the fibroblasts. orig. mag. $\times 66$.
- Fig. 20 Succinate-ferricyanide reductase activity in the specimen of gingiva excised after the treatment with electron microscopic observation. Note the products on the mitochondria.

- ×3500.
- Fig. 21 Succinate-ferricyanide reductase activity in the specimen of gingiva excised after the treatment with electron microscopic observation. Note the products on the outer compartment of mitochondria. ×8500.
- Fig. 22 Control specimen. Cryostat section incubated to show the NADHDH activity. Note the moderate activity on the epithelium, capillary, and connective tissue cells. orig. mag. ×33.
- Fig. 23 10 minutes after injection in group I. Photomicrograph of bacteria near the vessel and PMN retaining at the wall of the vessel. masson-trichrome stain. orig. mag. ×132.
- Fig. 24 30 minutes after injection in group I. Cryostat section incubated to show the NADHDH activity. Note the severe activity on the PMN adjacent to bacteria and slight activity on the bacteria. orig. mag. ×66.
- Fig. 25 1 hour after injection in group I. Cryostat section incubated to show the GDH activity. Note the moderate activity on the PMN. orig. mag. ×66.
- Fig. 26 6 hours after injection in group I. Cryostat section incubated to show the LDH activity. Note the moderate to severe activity on the PMN and vessel. orig. mag. ×33.
- Fig. 27 1 day after injection in group I. Cryostat section incubated to show the NADPHDH activity. Note the slight to moderate activity on the PMN. orig. mag. ×66.
- Fig. 28 3 days after injection in group I. Cryostat section incubated to show the NAD-MDH activity. Note the slight to moderate activity on the inflammatory cells and vessel. orig. mag. 33.
- Fig. 29 14 days after injection in group I. Cryostat section incubated to show the NADHDH activity. Note the severe activity on the inflammatory cells and fibroblasts. orig. mag. ×50.
- Fig. 30 1 day after injection in group II. Cryostat section incubated to show the NADHDH activity. Note the moderate activity on the inflammatory cells and around the abscess. orig. mag. ×25.
- Fig. 31 3 days after injection in group II. Photomicrograph of pyroniophilic cells. methylgreen-pyronine stain. orig. mag. ×132.
- Fig. 32 7 days after injection in group II. Cryostat section incubated to show the NAD-MDH activity. Note the slight to moderate activity on the inflammatory cells and fibroblasts. orig. mag. ×66.
- Fig. 33 14 days after injection in group II. Photomicrograph of giant cells. hematoxylin-eosin stain. orig. mag. ×132.
- Fig. 34 14 days after injection in group II. Cryostat section incubated to show the LDH activity. Note the severe activity on the fibroblasts. orig. mag. ×66.
- Fig. 35 14 days after injection in group II. Cryostat section incubated to show the G6PDH activity. Note the slight to moderate activity on the giant cells. orig. mag. ×132.
- Fig. 36 21 days after injection in group II. Cryostat section incubated to show the G6PDH activity. Note the moderate activity in the fibrous tissue. orig. mag. ×66.

Fig. 3

Fig. 8

Fig. 4

Fig. 9

Fig. 5

Fig. 10

Fig. 6

Fig. 11

Fig. 7

Fig. 12

Fig. 13

Fig. 16

Fig. 14

Fig. 17

Fig. 15

Fig. 18

Fig. 19

Fig. 20

Fig. 21

Fig. 22

Fig. 27

Fig. 23

Fig. 28

Fig. 24

Fig. 29

Fig. 25

Fig. 30

Fig. 26

Fig. 31

Fig. 32

Fig. 34

Fig. 33

Fig. 35

Fig. 36