実験歯肉炎における多形核白血球の動態

伊 集 院 直 邦*

Distribution and roles of neutrophilic polymorphonuclear leukocytes in experimental gingivitis in rats
For the purpose to study on the distribution and role of polymorphonuclear leukocytes (PML) in the junctional epithelium (JE) in gingivitis, morphological changes of the rat molar JE following topical application of sterile saline, squid ink, latex particles, hyaluronidase and lipopolysaccharide were examined by light and electron microscopy. Ultrastructure of the gingival pocket induced by experimental plaque accumulation on the rat molar teeth was also studied. Small numbers of PML were always revealed under physiological condition in the JE and gingival sulcus, while they rapidly increased in number and extent of distribution after topical application of those substances. In the gingival pockets, regardless of their depth or width, and pocket-lining epithelium, numerous PML were also present and formed a dense layer surrounding the bacterial plaque. Desmosome-like structures were often demonstrated on the closely adjoining cytoplasmic membranes between PML around the plaque. PML within gingival sulcus and/or pocket were often found to phagocytose bacteria, squid ink and latex particles. These observations strongly suggested that PML in the JE, gingival sulcus, and even in the gingival pocket as well as the pocket epithelium might form a strong protective barrier against the irritants from the oral cavity.

Naokuni Ijuhin*

* Department of Oral Pathology, Hiroshima University School of Dentistry

key words: *polymorphonuclear leukocyte, junctional epithelium, experimental gingivitis, rat, electronmicroscopy*

歯周組織を徐々に破壊し、最終的には歯の脱落をきたす慢性の炎症性疾患である歯周炎の主な原因の一つとして、歯面上に沈着形成された細菌性プラーク(歯垢)があげられる^{1,2)}。すなわち、プラーク由来の細菌、毒素、酵素などが、歯面と歯肉縁との間に形成される歯肉溝を経て、物質透過性の高いといわれる歯肉接合上皮³⁻⁵⁾(junctional epithelium, JE)や歯肉溝上皮^{6,7)}を通過し、上皮下に達し、種々の炎症反応を引き起こし、歯周組織の破壊をきたすといわれている。このような物質透過性の高いJE部や歯肉溝中には、生理的状态においてさえ、しばしば多形核白血球(polymorphonuclear leukocytes, PML)の存在が認められ⁸⁾、PMLが外来侵襲物の侵入による同部炎症の発現ならびにその進展増悪に重要な働きをしていることが示唆される。

私たちの教室では、辺縁歯周炎の成立機序を明かにする目的で、これまで主にラットを用い、種々の条件下におけるJEの変化を、光顕・電顕的に観察し、種々の知見を得てきた⁹⁻¹³⁾。今回、特にPMLに注目し、ラット臼歯部歯肉溝より各種物質を局所投与した場合およびラット臼歯歯面上にプラーク沈着をうながし、慢性辺縁性歯周炎を惹起させた場合のJEや、歯肉溝あるいはポケット壁に生じる変化を形態学的に観察し、同部における

PMLの存在意義や、歯肉炎の発生ならびにその進展増悪におけるPMLの果たす役割について検討した。

材料と方法

(1) 歯肉溝よりの各種物質の局所投与実験

8週齢 Wistar 系雄性ラットをウレタン麻酔下で仰臥位に実験台に固定し、開口状態で滅菌生食水(大塚製薬)、イカ(甲イカないしヤリイカ)の墨粒子および latex 粒子(Dow Chemical 社, polystyrene, 0.312 μm 径), hyaluronidase (Bovine Testes, P.L. Biochemical 社), lipopolysaccharide (026 : B6, Sigma 社)などを綿球に浸漬した状態で、上顎臼歯咬合面上に1時間静置し、20分ごとに新鮮な液を追加滴下しながら、歯肉溝より上皮内および上皮下への浸透を図った。投与開始後より1, 2, 3, 12時間, 1, 2, 3, 7日後に上顎臼歯部を取り出し、口蓋側辺縁歯周組織、特にJE部を光顕、電顕的に観察した。

(2) プラーク付着による実験的歯周炎の形成

8週齢 Wistar 系雄性ラットの臼歯部口蓋側歯面に金属線(0.2 mm 径)をコンボジットレジン(クリアフィル F II)で接着し、高蔗糖含有粉末飼料(Keyes diet 2000)で飼育し、3日~8ヵ月後に同部を適宜採取し、JE部あるいは生じたポケット部を光顕、電顕的に観察した。

(3) 観察方法

* 広島大学歯学部口腔病理学教室

図1 通常飼育ラット臼歯部JEの光顕および電顕像

a: JE 細胞間および JE 直下結合織に PML の遊走が認められる. ES: 脱灰エナメル質空隙
b: 歯冠頂側部 JE は角化を示す歯肉溝上皮(OSE)と明瞭に区別される. ES: 脱灰エナメル質空隙, GS: 歯肉溝, GM: 歯肉縁, OE: 歯肉口腔上皮

光顕用材料は10%中性ホルマリンで固定後, 10% EDTA・4Na で脱灰し, パラフィン切片を作製し, HE 染色を施して観察した. また, 電顕観察用にエポキシ樹脂包埋した材料より得られた thick section をトルイジンブルーで染色し, 光顕用観察に供した. 電顕用材料は2%グルタルアルデヒドで前固定し, 10% EDTA・4Na で脱灰後1%オスミウム酸で後固定し, エポキシ樹脂に包埋し, 超薄切片を作製し, 酢酸ウラニル・クエン酸鉛二重染色を施し観察した.

結果

(1) 通常飼育時および各種物質の局所投与時の JE および歯肉溝における PML

ラット臼歯部歯肉の構造は比較的ヒトのそれと類似しているが¹⁴⁾, 歯肉溝上皮が角化している点でヒトと異なり, それゆえ, JE と比較的容易に区別がつく(図1b). 超微形態学的にみて, JE は歯面に平行に並ぶ扁平な細胞(keratinocyte)から構成され, 他部口腔上皮と異なり, 細胞間隙がひろく, desmosome や gap junction の数も少ない(図1a). 角化や membrane coating granules に

図2 HUase 塗布2日後の JE の電顕像
 著明に拡張した JE 細胞間隙にはいちじるしい PML 浸潤がみられる. ES: 脱灰エナメル質空隙

よる透過性関門¹⁵⁾の形成も認められず, 物質の通過が比較的容易に起こることが推察される. 通常飼育ラットの JE や歯肉溝を, 光顕的に観察してもほとんど炎症細胞浸潤を認めないが, 電顕的に観察すると, 散在性であるが, 常に少数の PML の JE 細胞間や歯肉溝中への遊走を認めた(図1a). しかしながら, 同じ通常飼育ラットでも, JE 内に遊走している PML の数に差異があり, 口腔内環境のわずかな変化で, JE や歯肉溝中の PML の数がすみやかに変化することが推察された.

そこで, 滅菌生食水を歯肉溝より投与したところ, 投与後1時間で歯肉溝や JE 細胞間に遊走する PML 数の増加がみられた. しかしながら, このような現象は軽度で, しかも比較的短時間で回復し, JE の構造自体にも著変はなかった. つぎに, hyaluronidase(HUase) (8 mg/ml 生食水)を歯肉溝より投与した結果, JE 細胞間の desmosome 数の減少傾向が同われ, 細胞間のいちじるしい拡張とともに JE や歯肉溝中に著明な PML の浸潤がみられた(図2). また, JE 細胞自体の変性, 壊死, 剥離などがみられ, なかには投与後1~2日で JE 歯冠頂側部 JE 内, あるいは歯面との間に, PML を入れた形成初期の歯周ポケットを思わせる裂隙の形成も認められた. しかも, このような変化は, 比較的長期的にわたり認められ, 7日後でも未処置のものにくらべて細

図3 歯肉溝より投与したイカの墨および latex 粒子を貪食した PML

a: イカの墨粒子を貪食した, 歯肉溝中の PML. N: 核

b: latex 粒子 (LX) を貪食した JE 細胞 (JEC) 間の PML. N: 核

胞間隙の拡張や PML の浸潤が著明に認められた。その他 HUase 塗布により、剥離した JE と歯面との間に、あるいは JE 内に形成された裂隙に沿い、根尖側方向へ侵入してきた口腔細菌の PML による貪食像がしばしばみられた。なお、口腔細菌は一部 JE 細胞自体によっても貪食されていた。そこで、歯肉溝より marker 物質として、イカの墨粒子 ($0.04\sim0.15\mu\text{m}$) や latex 粒子 ($0.312\mu\text{m}$) を投与したところ、これらの粒子は深部 JE 細胞間へは浸透しなかったが、HUase を塗布した場合と同様に、盛んな PML の遊走を JE 細胞間や歯肉溝中に惹起し、歯冠頂側部 JE 細胞間や歯肉溝中に、イカの墨粒子や latex 粒子を貪食した PML が多数見られた (図3)。また、これらの marker 物質は、歯冠頂側部 JE 細胞によっても貪食されていた。

最後に、グラム陰性菌の細胞壁に存在し、PML に対する走化作用や骨吸収作用などさまざまな作用を有し、歯周炎の成立に重要な因子となると考えられている lipopolysaccharide^{16,17)} (LPS) (5 mg/ml 生食水) を歯肉溝より投与した。LPS 投与後1時間で、歯肉溝、JE、JE 直下結合織にかなり著明な PML の浸潤が見られはじ

図4 実験開始1カ月後に形成されたプラークを囲む歯肉ポケットの光顕像

プラーク (PI) とポケット上皮 (PE) の間に PML の密な浸潤層が形成され、ポケット上皮内や上皮下にも著明な PML の浸潤がみられる。ES: 脱灰エナメル質空隙

め、1～2日目にピークに達した。また、PML の遊走とともに3時間～2日後にかけ、JE 細胞の変性・壊死・剥離、細胞間隙の拡張、歯冠頂側部 JE 内にポケット状裂隙の形成などがみられた。PML の浸潤や、JE 細胞に生じた形態変化は1週間後には比較的正常に近い状態に戻っていた。

(2) プラークからの持続的刺激に対する PML の反応

人工的にラット臼歯部口蓋側歯面にプラーク付着を図り、JE を含め辺縁歯周組織に惹起される経時的な形態変化については教室の伊東がすでに報告している¹³⁾。プラークの沈着は、早いものでは実験開始後約2カ月以内に肉眼的に明らかになり、時間の経過とともに増大した。

組織学的には、1週間後の標本の一部にプラーク付着が認められた。プラークは JE 歯冠頂側端部歯面上に沿って付着し、プラークの下端と JE 歯冠頂側端との間に、歯肉溝より遊走してきた PML の集塊が認められた。2週以後、プラークの増大に伴う JE 細胞の変性剥離により、JE 内にポケットの形成と、その拡大・深化

図5 プラークを囲む PML 浸潤層の電顕像

a: PML は敷石状に密に接し、細胞間には接着装置様構造が認められ、一部の PML には細菌(Bac)の食食像もみられる。

b: desmosome 様構造を示す PML 細胞間の強拡大像

がみられ、3～4カ月後ではポケット底がセメントエナメル境より下端のセメント質上に達するポケット形成も認められた。プラークを囲んで形成されたポケット壁には、常に PML の浸潤がみられ、しばしばポケット上皮とプラーク表面との間には密に浸潤した敷石状の PML の層が形成されていた(図4, 5)。プラークに接して、盛んな細菌の食食像を示す PML が多数認められる一方、逆に食食した細菌による破壊像を示すものも多かった。また、プラーク周囲には、lysosome 顆粒の少ない胞質の明るい PML も多数みられた。

超微形態学的観察により、敷石状に密に浸潤している PML 細胞間に、種々の発育段階を示す細胞間接合装置様構造が認められ、なかには desmosome に類似した構造を示すものも認められた(図5)。このように密な PML の帯状の浸潤層を縫って、一部の細菌はポケット上皮表層近くまで侵入していた(図5a)が、ポケット上皮内あるいは上皮下へ侵入している細菌は皆無だった。また、PML の浸潤は、ポケット上皮内やポケット上皮直下の結合組織および血管周囲にもみられ(図4)、ポケットの深さや大きさに関係なく認められた。上皮下結合組織への浸潤は、比較的表層にのみ認められ、深部に及んでおらず、ヒトなどの慢性辺縁歯周炎の際のポケット壁にみられるリンパ球や形質細胞の浸潤層も認められなかった。

考 察

歯肉上皮の一部である JE が、他部口腔粘膜上皮とく

らべていちじるしく物質の透過性が高いことは、JE の形態学的特徴から推察されるのみならず、これまで多数行われてきた種々の tracer 物質の透過性実験からも明らかである³⁻⁷⁾。

通常飼育ラットの電顕的観察によると、このような物質透過性のよい JE や歯肉溝中には、PML の遊走が常に認められた⁹⁾。同部に遊走する PML の働きに関しては種々考えられるが、その一つとして、歯肉溝よりの口腔内細菌の侵入阻止作用があげられる¹⁵⁾。このことは、歯が口腔内に萌出し、外部環境にさらされるやいなや JE 部に PML が出現することからも示唆される⁹⁾。一方、無菌飼育ラットの JE 内にも PML が存在していることが報告され^{19,20)}、PML がたんに口腔内細菌だけでなく、唾液や食物中の種々の物質の侵入に対しても、防御能を発揮することが推察される。

今回の実験で、歯肉溝より生食水、HUase、イカの墨、latex 粒子、LPS など種々の性状の異なる物質を投与した場合に、程度の差こそあれ、数時間のうちに同部に PML の遊走が起こったことから、その可能性が推察された。

投与物質の違いにより、JE や歯肉溝中に遊走してくる PML の数や時間・範囲などかなりの差異が認められ、個体差、投与する物質の濃度や量の違いも当然考えられるが、PML 浸潤をきたす機序に違いのあることが推察された。たとえば、HUase により JE の透過性が亢進することはすでに報告されている^{21,22)}。

今回の観察で、特に細胞間隙の拡張が顕著にみられ、このような細胞間の拡張が PML の JE 内や歯肉溝への浸潤を容易にする一方、口腔内の種々の走化性因子の上皮下結合組織への浸透を亢進させ、いちじるしい PML の浸潤を惹起する可能性も推察される。このような JE 細胞間隙の拡張は、上皮下へ達した HUase による血管透過性の亢進により惹起される同部の水腫性変化によって起こった二次的現象である可能性も考えられるが、電顕観察による desmosome の減少傾向や歯面と JE 細胞の剝離が示すように、HUase の細胞同士あるいは歯面と JE 細胞の接着構造への直接的破壊作用によって生じた可能性が強い²³⁾。

一方、LPS を投与した際にみられる PML の JE 内への著明な浸潤は、もっぱら上皮下へ浸透した LPS 自体のもつ PML に対する走化作用によって惹起されたものと考えられる^{17,24)}。また、LPS の直接的傷害による JE 細胞の変性消失が細胞間隙の拡張を起し、透過性の亢進をきたす可能性もある。メラニン顆粒の一種であるイカの墨も、それ自体に PML に対する走化作用を有すると考えられる。ラテックス粒子や生食水の PML に対する走化性は、あまりないと考えられるが、歯肉溝に滴下した際に、口腔内の走化作用を持つ物質が上皮下へ浸透し、PML の遊走をある程度惹起したと考えられる。その他、JE 内や歯肉溝中へ浸出してきた PML の崩壊によって細胞外に放出された lysosome 顆粒や酵素により JE 細胞が破壊され、これらの破壊産物が PML に対する走化作用をきたすことも推察される^{23,25)}。

歯肉溝や JE に遊走してきた PML の働きとしては、もっぱら酵素の細胞外への放出や食食作用による殺菌作用が主なものと考えられる¹⁸⁾。今回の観察でも、歯肉溝中に浸出してきた PML が、HUase 塗布により剝離した JE と歯面との間隙に侵入してきた細菌や、歯肉溝より投与したイカの墨粒子あるいは latex 粒子を食食している像を認めた。しかし、これらの細菌や tracer 物質が、JE 深部や上皮下へ侵入している像はほとんど認められなかった。歯肉溝よりプラーク由来の細菌、毒素、酵素、あるいは食物に含まれる種々の起炎物質が JE を通過し、上皮下へ到達する可能性が常に存在しているが、これに対して PML はすみやかに対応し、同部の外来侵襲物に対する防御作用に重要な役割を担っていると考えられる¹⁸⁾。ちなみに、PML に機能異常があるといわれる Chediak-Higashi syndrome mink では、対照群とくらべて、より重篤な実験的歯周炎を惹起することが報告されている²⁶⁾。

このような PML の働きは、プラーク沈着により生じた実験的慢性辺縁性歯周炎の場合にも基本的には同じと思われた。ポケット内のプラーク周囲には、厚い PML の浸潤層が形成され、ポケット上皮内や上皮下結合組織に

も常に PML の浸潤がみられ、上皮内や上皮下へ侵入しているプラーク細菌は認められなかった。電顕観察により敷石状に密にプラークを取り囲む PML 細胞膜間に desmosome 様構造の形成がみられ、PML の機械的な barrier としての働きが示唆された。PML 間のこのような構造に関しては、筆者の知るかぎり報告例はなく、今後さらに検討したい。また、今回ラットに形成された慢性辺縁性歯周炎の場合、ヒト²⁷⁾、サル²⁸⁾、イヌ²⁹⁾などと異なり、ポケット壁にリンパ球や形質細胞のいちじるしい帯状浸潤を認めなかったことは興味深い点であり、免疫機構の関与が弱いのか、宿主側の抵抗特に PML の働きやポケット上皮あるいは JE 細胞の防御能³⁰⁾の強いことなどが考えられ、今後、十分な検討の必要性が示唆された。

まとめ

ラット臼歯部辺縁歯周組織を用い、種々の物質を歯肉溝より投与し、あるいはプラーク沈着による実験的辺縁歯周炎を惹起させ、主に超微形態学的観察を行った結果、JE や歯肉溝中に常在する PML は、歯肉溝より侵入する種々の物質に対応してすみやかに増加し、食食能や酵素による消化作用を発揮することにより、物質透過性の高い同部における外来侵襲物に対するもっとも重要な防御的役割を担うことが示唆された。また、このような PML の働きは、プラーク沈着により形成された慢性歯周炎のポケット壁においても、同じように認められた。プラークを取り囲み、密に浸潤する PML には、細胞間接着装置様構造による機械的な barrier としての働きのあることが推察された。ラットでの観察結果が、そのままヒトにあてはまるとは考えられないが、辺縁歯周組織における慢性炎症病巣の成立と、その進展増悪にとって、PML による防御能が重要な因子になることが強く示唆された。

文 献

- 1) Garant, D.A., Stern, I.B., Everett, F.G.: Periodontics. Microbiology (plaque). The C.V. Mosby Company, St. Louis, 1979, p 130-151.
- 2) Lindhe, J., Hamp, S.-E., Loe, H.: plaque induced periodontal disease in beagle dogs. A 4-year clinical, roentgenographical and histometrical study. J. Periodont. Res. 10: 243-255, 1975.
- 3) Ratcliff, P.A.: Permeability of healthy gingival epithelium by microscopically observable particles. J. Periodontol. 37: 291-293, 1966.
- 4) McDougall, W.A.: Penetration pathways of topically applied foreign protein into rat gingiva. J. Periodont. Res. 6: 89-99, 1971.
- 5) Tanaka, T.: Transport pathway and uptake of microperoxidase in the junctional epithelium of healthy rat gingiva. J. Periodont. Res. 19: 26-

- 39, 1984.
- 6) Schwartz, J., Stinson, F.L., Parker, R.B.: The passage of tritiated bacterial endotoxin across intact gingival crevicular epithelium. *J. Periodontol.* 43: 270-276, 1974.
- 7) Steinberg, A.D., Joseph, C.E., Evans, M.A.: Sulcular penetration and diffusion into surrounding tissues of ^{14}C -phenytoin and ^{14}C -albumin. *J. Periodont. Res.* 16: 481-489, 1981.
- 8) Schroeder, H.E.: Ultrastructure of the junctional epithelium of the human gingiva. *Helv. Odont. Acta.* 13: 65-83, 1969.
- 9) 仁井谷 究: ラット臼歯部付着上皮の形成過程に関する超微形態学的観察. *日歯周誌* 21: 111-133, 1979.
- 10) 山崎 章, 二階宏昌, 伊集院直邦, 仁井谷 究, 高田 隆: ラット臼歯部付着上皮における酸性ホスファターゼの電顕的証明. *日歯周誌* 21: 435-444, 1979.
- 11) 伊集院直邦, 二階宏昌, 高田 隆, 山崎 章: ラット臼歯部歯肉由来培養上皮細胞の食食作用について. 超微形態学的研究. *歯基礎誌* 23: 839-858, 1981.
- 12) 高田 隆: ラット臼歯部付着上皮の再生過程に関する超微形態学的研究. *日歯周誌* 24: 225-248, 1982.
- 13) 伊東博司: ブラック付着によるラットの実験的ポケット形成に関する病理学的研究. *広大歯誌* 18: 99-119, 1986.
- 14) Listgarten, M.A.: Similarity of epithelial relationships in the gingiva of rat and man. *J. Periodontol.* 46: 677-680, 1975.
- 15) Shimono, M., Clementi, F.: Intercellular junctions of oral epithelium. 1 Studies with freeze fracture and tracing methods of normal rat keratinizing oral epithelium. *J. Ultrastruct. R.* 56: 121-136, 1976.
- 16) 青野正男, 岡田 宏: 歯周疾患と細菌内毒素. *歯界展望* 46: 217-223, 1975.
- 17) Daly, C.G., Seymour, G.J., Kieser, J.B.: Bacterial endotoxin: a role in chronic inflammatory periodontal disease. *J. oral Path.* 9: 1-15, 1980.
- 18) Attström, R.: The roles of gingival epithelium and phagocytosing leukocytes in gingival defence. *J. Clin. Periodontol.* 2: 25-32, 1975.
- 19) Yamasaki, A., Nikai, H., Niitani, K., Ijuhin, N.: Ultrastructure of the junctional epithelium of germfree rat gingiva. *J. Periodontol.* 50: 641-648, 1979.
- 20) Rovin, S., Costich, E.R., Gordon, H.A.: The influence of bacteria and irritation in the initiation of periodontal disease in germfree and conventional rats. *J. Periodont. Res.* 1: 193-203, 1966.
- 21) Schultz-Hardt S., Dewar, M., Bibby, B.G.: Effects of hyaluronidase on human gingival epithelium. *Science* 117: 653-655, 1953.
- 22) Stallard, R.E., Awwa, I.A.: The effect of alteration in external environment on the dentogingival junction. *J. Dent. Res.* 48: 671-675, 1969.
- 23) Thilander, H.: The effect of leukocyte enzyme activity on the structure of the pocket epithelium in man. *Acta. Odont. Scand.* 21: 431-451, 1963.
- 24) 磯村公明: *Fusobacterium nucleatum* 由来の細菌性内毒素に関する研究—とくに歯周疾患との関連について. *日歯周誌* 27: 328-351, 1985.
- 25) 守山隆章: 機能的にみた歯周組織破壊のメカニズム. *歯界展望* 47: 31-39, 1976.
- 26) Lavine, W.S., Page, R.C.: Padgett, G.A.: Host response in chronic periodontal disease V. The dental and periodontal status of mink and mice affected by Chediak-Higashi Syndrome. *J. Periodontol.* 47: 621-635, 1976.
- 27) Müller-Glauser, W., Schroeder, H.E.: The pocket epithelium: A light-and electronmicroscopic study. *J. Periodontol.* 53: 133-144, 1982.
- 28) Simpson, D.M., Avery, B.E.: Histopathologic and ultrastructural features of inflamed gingiva in the baboon. *J. Periodontol.* 45: 500-510, 1974.
- 29) Neuman, S.M., Kenney, E.B., Traurig, H.: The effect of topically application of dextran on the gingiva of the beagle dog. *J. Periodontol.* 47: 171-179, 1976.
- 30) 伊集院直邦, 高田 隆, 山崎 章, 二階宏昌: 付着上皮, 歯小皮, 歯肉の微細構造と歯周疾患. *細胞* 15: 414-419, 1983.