内毒素の歯肉接種による補体成分 (C3) の分布に関する研究

九州歯科大学口腔細菌学講座 (指導: 内山長司教授)

松 浦 正 明

昭和55年11月26日受付

A Study on Distribution of Complement (C3) of Endotoxin Inoculated in Gingival Tissue of Mouse

Masaaki Matsuura

Department of Oral Bacteriology (Director: Prof. Choji Uchiyama)
Kyushu Dental College, Kitakyushu, Japan

The endotoxin of *Escherichia coli* was inoculated in the gingival tissue of mouse (ICR family) and the variation of T and B cell distribution in peripheral lymphonode was examined immunologically and chronologically. It is recognized that the complement (C3 and C5) activated by inoculating the endotoxin in gingival tissue was isolated to C3a and C5a in peripheral tissue.

1) The rate of T and B cells in peripheral lymphonode gradually increased after inoculation and reached a maximum on the third day.

2) A great number of infiltrated cells, which markedly fluoresced, were observed around blood vessel walls on the first day after inoculation.

3) The rate of complements (C3 and C5) in gingival tissue was a maximum on the first day and that of B lymphocytes in peripheral lymphonode on the third day.

4) It was confirmed by fluorescent antibody technique that the disintegration of complements depends on chemotaxy of polymorphonuclear leucocyte and macrophage from blood vessel wall.

緒 言

歯周疾患の病原因子として、宿主の歯周組織に密着して生息する歯垢の微生物が歯肉に炎症を起し、続いて起る歯周病の重要な因子であること、また歯周溝の微生物が歯周疾患の病因に重要な役割を演じていることは周知の通りである。近年、これらの微生物叢に存在するグラム陰性細菌の細胞壁合成成分である内毒素が歯周疾患に深い関係があることが注目されている。

Schwarg, *et al.* (1972)¹⁾ は、健康な歯肉上皮を内

毒素が通過して、組織内に分布することを明らかにしている。

この内毒素については、組織内で **classical pathway** および **alternate pathway** の両経路を経由して容易に補体を活性化し、白血球やマクロファージを遊走させることが知られている²⁻⁴⁾。

この補体の活性化物質は、口腔由来の細菌性産生物質をはじめとして、内毒素、細菌性のプロテアーゼ、プロテインAがあり、これらが **alternate pathway** の経路を経由して補体成分を開裂し、走化性因子を有する物

質が、再発生の歯周疾患の病状の悪化に重要であると報告されている⁵⁻⁷⁾。

最近、この歯周疾患の病原因子は免疫学的に解明されつつあるが、それも抗原物質に対する宿主の抗体産生細胞の分布と宿主の抵抗性に関する検索が多く、宿主に抗原物質が侵入後に起る補体成分の開裂と白血球およびマクロファージの走化性因子に関する免疫病理学的な報告は少いようである。

一方、ヒト口腔常在菌に対する抵抗性として、宿主の歯肉組織内には白血球やマクロファージの他に骨髄系のBリンパ球の抗体産生細胞に関与する分布が多いことも知られている。

ここで、宿主抗原物質が侵入直後に遊出される補体成分の受容体について、Feldman and Pepys (1974)⁸⁾は血清中に存在する補体第3成分の受容体はBリンパ球およびマクロファージの表面に存在すると述べ、Landen and Dierich (1979)⁹⁾は、補体第5成分(C 5)に対する受容体はRaji cell およびBリンパ球の表面に存在することを明らかにして、補体第5成分(C 5)の受容体は、補体第3成分(C 3)の受容体と同一であると報告した。

このように、内毒素は歯周疾患の病原因子と重要な役割を果たしていると考えられている。また、抗原物質として歯周組織内に侵入した内毒素は alternate pathway の経路を経由して補体成分を開裂し、白血球およびマクロファージの走化性因子が産生されと考えられている。そこで著者は、内毒素が歯周組織に侵入した直後に起る補体成分の分布と補体成分の開裂さらに多形核白血球、マクロファージ、Bリンパ球の分布を検索することを目的として、動物を用いて、歯肉組織内に内毒素を接種後、歯肉組織を病理組織学的に観察し、蛍光抗体法を用いて免疫病理学的に補体成分の分布と補体成分の開裂および、多形核白血球、マクロファージ、Bリンパ球の分布状態を検索した。さらに、顎リンパ節については免疫学的に検索して、歯周疾患の病原因子としての内毒素による補体成分の分布と開裂、さらに、顎リンパ節内の動態の関連性に興味ある結果を得たので報告する。

実験材料および方法

A. 実験材料

1. 実験動物

実験動物は、ICR系マウス♂(20-25g)を使用した。マウスは1週間以上飼育し、十分に環境に順応させ、実験に供した。

2. 内毒素

内毒素(Lipopolysaccharides, 以下 LPS と略す)は、E. coli 0111 B4 (LPS, Difco) を使用した。

3. 抗血清およびFITC標識抗血清

抗血清は、抗マウスC 3血清(Anti-Mouse C3 Serum)とFITC標識抗血清はFITC標識抗マウスC 3血清(Anti-Mouse C3 conj. FITC Serum)を使用した。

なお、C 3抗血清はFujizoki Pharmaceutical Co., LTD. を使用した。

B. 実験方法

1. 内毒素(LPS)の調整

内毒素は、1u/0.01ml 量に調整し、マウス右側第1大臼歯部歯肉に接種し、1, 3, 5, 7日の各々を経日的に棄殺し、歯周組織を採取した。その歯周組織の切片標本を作成して病理組織学的に検索し、さらに蛍光抗体法による免疫病理学的に補体(C 3)の局在部位について検索した。

2. 病理組織標本の作製

病理標本は、右側第1大臼歯部の歯肉を材料として採取し、ただちに10%中性ホルマリン固定後、通法に従いパラフィン包埋した。標本は10μの連続切片標本とし、Hematoxylin Eosin 重染色を行い、光学顕微鏡で観察した。また、切片標本は蛍光抗体法を行い、落射型蛍光顕微鏡(Nikon)で観察した。

3. 抗血清およびFITC標識抗血清の調製

Anti-Mouse C3 Serum と Anti-Mouse C3 conj. FITC Serum は、各々のPBS (pH 7.2) で5倍に希釈して蛍光抗体染色に使用した。

4. 蛍光抗体染色法

蛍光抗体染色は、奥田(1976)¹⁰⁾の間接法に従って行った。歯肉組織の切片標本は通法に従い、脱パラ後4°Cの冷PBSに入れ、組織切片を充分になじませるため、PBSを10-15分間ごとに3回交換した。次に、スライドガラス上の歯肉組織切片に第1抗体(Anti-Mouse C3 Serum)をかけ37°C, 30分間浸潤状態で反応した。反応終了後、冷PBSで2-3回洗滌し、切片が乾燥しない程度にPBSを拭き去る。次に、スライドガラス上の歯肉組織切片にFITC標識抗血清(Anti-Mouse C3 conj. FITC Serum)をかけ、37°C, 60分間浸潤状態で反応した。反応終了後、冷PBSで3-4回洗滌し標識抗体液を除き、切片周囲のPBSを拭き取った。

次に、無蛍光グリセリンを組織切片上に滴下し、カバーガラスをかけ封入する。その後、余分のグリセリンを

拭き取り、カバーガラスの周囲にマニキュアを塗り標本が乾燥しないようにシールした。

5. リンパ球の分離

a. 細胞浮遊液の調整

摘出したリンパ組織は、Minimum Essential Medium-Eagle's (Eagle's MEM) の中で、付着している結合組織を除去して、5% 仔牛血清加 Eagle's MEM で細胞を静かに浮遊させ、メッシュを通して細胞浮遊液とした。次に、細胞浮遊液からのリンパ球の分離は、Lymphoprep (比重 1.077, Nyegaard 社) を用い、平嶋ら (1975)¹¹⁾ の比重遠沈法により行った。なお、分離したリンパ球は、T cell 検出用に Eagle's MEM, B cell 検出用に Gelatin-Vellonal 緩衝液 (GVB) を用いて細胞数が $4 \times 10^6/\text{ml}$ となるように細胞浮遊液を調整した。

1) T cell の測定法

T cell は、矢田ら (1972)¹²⁾ の方法に準じて、ヒツジ赤血球 (SRBC) とリンパ球の rosette 形成試験により検出した。前記の被検リンパ球 $4 \times 10^6/\text{ml}$ に仔牛胎児血清 (FCS) と 1% SRBC を加え、 37°C , 15 分間 incubate した後、1000rpm, 5 分間遠沈して氷水中で 1 時間静置し、その後再浮遊して鏡検した。

なお、測定法は、リンパ球 200 個以上を算定し、SRBC の 3 個以上と rosette 形成しているリンパ球を陽性細胞とした。

2) B cell の測定法

B cell は、Stjernsward, *et al.* (1972)¹³⁾ の方法に準じて、SRBC と補体結合性 rosette 形成試験によって行った。

被検リンパ球液 $4 \times 10^6/\text{ml}$ に 1% EAC (1% 抗体感作補体結合 SRBC) を加え、500rpm, 2 分間遠沈し、 20°C , 30 分間 incubate した。測定は T cell と同ように行った。

実験成績

A. LPS 接種側の顎下リンパ節内の T cell, B cell の経時的な変動

顎下リンパ節内の rosette 試験による T cell, B cell の分布成績は Fig. 1 に示す通りである。

T cell の正常値は、18—24% であり、B cell の正常値は 12—18% であった。LPS 接種側の T cell の 1 日目は 24%、3 日目は 26% と正常値よりやや増加したが、5 日目は 22%、7 日目は 23% と正常値とほぼ同値に減少した。

一方、B cell の 1 日目は 27%、3 日目は 29% と正常値より急激に増加し、3 日目に最高値となった。しかし、5 日目は 23%、7 日目は 21% と減少し、経時的に正常値に近値した。

Fig. 1 Effect of immunization on T and B cell populations of mouse lymph node (right side)

B. 非 LPS 接種側の顎下リンパ節内の T cell, B cell の経時的な変動

顎下リンパ節内 rosette 試験による T cell, B cell の分布成績は、Fig. 2 に示す通りである。

非 LPS 接種側の T cell の 1 日目は 22%、3 日目は 22%、5 日目は 23%、7 日目は 24% と正常値とほとんど同値であった。

一方、B cell の 1 日目から 5 日目まで 16% で 7 日目に 17% と正常値とほとんど同値であった。このように、顎下リンパ節の T cell, B cell の変動は、LPS 接種側の T cell は正常値よりやや増加したが、ほとんど正常値と同値を示した。また、B cell は 1 日、3 日と正常値より増加したが 5 日、7 日と経時的に徐々に減少した。

一方、非 LPS 接種側の T cell, B cell は正常値と

ほとんど同値で変動はみられなかった。

Fig. 2 Effect of immunization on T and B cell populations of mouse lymph node (left side)

C. リンパ球およびマクロファージの補体 (C3)

受容体 (receptor) の確認

前記の方法で分離したリンパ球と組織内マクロファージおよび多形核白血球の補体 C3 (complement C3) に対する receptor の確認は蛍光抗体染色法によって行った。

リンパ球に対する complement C3 の receptor は、リンパ球の表面の全体に存在するのとリンパ球の表面に散在するものがあり、一部のリンパ球に patch formation が確認された (Photo. 1)。

次に、マクロファージおよび多形核白血球の complement C3 の receptor は、マクロファージおよび多形核白血球の表面全体に存在するものとマクロファージおよび多形核白血球の表面に散在するものがあり、両者とも receptor の存在が確認された。このように、リンパ球とマクロファージおよび多形核白血球の complement C3 に対する receptor が存在するのが *in vitro* で確認された (Photo. 2)。

D. 病理組織所見

歯肉組織において、LPS 接種後、1 日目の LPS 接種部位に近接した周囲組織には血管壁を中心に多数の炎症細胞浸潤がみられ、筋層にも中等数の炎症細胞浸潤がみられた。また、血管壁の周囲組織には、リンパ球、形質細胞、好中球の遊走細胞浸潤がみられた。その外側の周囲組織には散在した少数の炎症細胞浸潤がみられた。

次に、LPS 接種後、3 日目、5 日目の歯肉組織内は LPS 接種部位に近接した周囲組織の血管壁には中等数のリンパ球、形質細胞、好中球の遊走細胞浸潤はみられるが、筋層およびその外側の周囲組織の炎症細胞浸潤は減少した。

次に、LPS 接種後、7 日目、歯肉組織内の LPS 接種部位に近接した周囲組織の炎症細胞浸潤は減少し、軽度の慢性炎症像を呈していた。

E. 歯肉組織における補体 (C3) の局在

歯肉組織における補体 (C3) の局在は、蛍光抗体法により免疫病理学的にその動態を検索した。歯肉組織内に LPS 接種後、1 日目の免疫病理学的所見は、LPS 接種部位に近接する組織の血管壁とその周囲の細胞には多数の特異蛍光を有する細胞が見られ、そのやや外側の血管壁を中心とした周囲組織の細胞には中等数の散在した特異蛍光を有する細胞がみられたが、血管壁に近接した周囲組織の細胞にはごく少数の特異蛍光を有する細胞がみられた (Photo. 3)。

しかし、LPS 接種部位の近接した血管壁の周囲組織には、血管壁から遊走したと考えられる細胞に多数で強い特異蛍光を有する細胞が血管壁に輪状に存在し、その周囲組織の細胞にも特異蛍光を有する細胞が散在して認められた (Photo. 4)。

一方、LPS 接種部位の筋層の周囲組織の細胞にも多数で強い特異蛍光を有する細胞がみられ、血管壁から遊走した細胞が周囲組織に拡散されたと考える所見がみられた (Photo. 5)。

次に、LPS 接種後、3-5 日目の免疫病理学的所見は、LPS 接種部位の周囲組織の特異蛍光を有する細胞は、3 日目より 5 日目と減少した所見がみられた。また、LPS 接種部位に近接する血管壁および血管の周囲組織の特異蛍光を有する細胞は急激に減少したが、少数の特異蛍光を有する細胞は散在して認められた。しかし、隣接する筋層の周囲組織の細胞も特異蛍光を有する細胞は減少し、筋層の周囲に散在してみられた (Photo. 6)。

次に、LPS 接種後、7 日目の免疫病理学的所見は、

L P S 接種部位の血管の周囲組織の細胞と筋層の周囲組織の細胞にも特異蛍光を有する細胞は徐々に減少し、経日的に減少する傾向がみられた。

このように、歯肉組織内に L P S 接種後の蛍光抗体法による補体 (C 3) の局在性の変動は、L P S 接種後 1 日目の L P S 接種部位に近接する組織の血管壁を中心に強い多数の特異蛍光を有する細胞がみられ、その外側の組織の血管壁の細胞は中等数の特異蛍光を有する細胞がみられた。また、筋層の周囲組織にも多数の特異蛍光を有する細胞がみられた。次に、L P S 接種後の 3 日目の L P S 接種部位に近接する組織の血管壁とその周囲の特異蛍光を有する細胞が急激に減少したのがみられたが 5 日目には特異蛍光を有する細胞が散在しているのがみられた。

F. リンパ球と補体 (Complement C3) の動態

歯肉組織内に L P S 接種後の所属顎下リンパ節の B cell の経日的変化と L P S 接種局所組織内の complement C3 の分布状態の関連性について検索した成績である。

対照群の顎下リンパ節の B cell の分布は 12—18% であった。一方、歯肉組織内の蛍光抗体法による complement C3 の分布状態は血管壁の周囲組織にごく少数の complement C3 を有する細胞が散在し、筋層周囲の結合組織にごく少数の complement C3 を有する細胞がみられた。

このように、対照群の歯肉組織内には血管の周囲組織および筋層の結合組織にも少数の complement C3 を有する細胞が散在した。

次に、歯肉組織内に L P S 接種後、1 日目リンパ節の B cell は 25—29% であり、対照群に比較して約 10% 増加した分布状態がみられた。

これに対し、L P S 接種後 1 日目の歯肉組織の complement C3 の分布は L P S 接種部位に近接した組織の血管壁とその周囲には強い多数の complement C3 を有する細胞が、血管壁に対し輪状に存在した。その周囲の結合組織にも少数の complement C3 を有する細胞が認められた。また、L P S 接種部位の外側の周囲組織の血管壁とその周囲の結合組織には中等数の complement C3 を有する細胞が散在してみられた。

このように、L P S 接種後 1 日目は L P S 接種部位に近接した組織の血管壁とその周囲は多数の complement C3 を有する細胞が多くみられたが、その外側の組織の血管壁とその周囲には中等数の complement C3 を有する細胞の存在がみられた。この時の顎下リンパ節

の B cell は正常値より 10% 増加した分布状態であった。

次に、歯肉組織内に L P S 接種後 3 日目のリンパ節の B cell は 26—32% と対照群に比較し、約 15% 増加した分布がみられたが、5 日目のリンパ節の B cell は 22—24% と対照群に比較し、約 8% 増加しているが、3 日より B cell は減少した分布成績であった。

これに対し、L P S 接種後、3 日目の歯肉組織内の complement C3 の分布は L P S 接種部位に近接した組織の血管壁には complement C3 を有する細胞は急激に減少し少数の complement C3 を有する細胞が存在したが、その周囲の結合組織には中等数の散在した complement C3 を有する細胞がみられた。また、L P S 接種部位の外側の組織の血管壁とその周囲の結合組織には中等数の complement C3 を有する細胞が散在してみられた。

次に、L P S 接種後、3 日目の歯肉組織内の complement C3 の分布は、L P S 接種部位に近接した組織の血管壁には、中等数の complement C3 を有する細胞がみられた。また、L P S 接種部位の外側の組織の血管壁とその周囲の結合組織は、少数の complement C3 を有する細胞がみられた。

このように、L P S 接種後 3 日目は L P S 接種部位に近接した組織の血管壁の complement C3 を有する細胞が減少し、その周囲組織の complement C3 を有する細胞は散在してみられた。この時の顎下リンパ節の B cell は最高値を示し、正常値の約 15% 増加した分布状態であった。また、L P S 接種後 5 日目は L P S 接種部位の近接した組織とその外側の組織の血管壁と周囲組織とも complement C3 を有する細胞は徐々に減少する傾向がみられた。その時の顎下リンパ節の B cell は正常値より約 8% 増加した分布状態であった。

次に、歯肉組織内に L P S 接種後、7 日目のリンパ節の B cell は 18—23% と対照群に比較して約 7% 増加した分布状態がみられた。これに対し、L P S 接種後 7 日目の歯肉組織内の complement C3 の分布は L P S 接種部位に近接した組織の血管壁には、少数の complement C3 を有する細胞がみられたが、その周囲の結合組織および L P S 接種部位の外側の組織にはごく少数の complement C3 を有する細胞が散在してみられた。

総括ならびに考察

従来から歯周疾患の病原因子に細菌の代謝産物および

菌体成分などがあげられている。

このことは、すでに病理組織学的に解明されて来たが、かならずしも充分理解出来るものではない。近年、免疫学の発達に伴い、歯周疾患を生体反応として免疫学的に、また、局所組織を免疫病理学的に解明する試みがなされている。その一つに、即時型アレルギー反応は抗原侵入による組織内の抗原抗体反応と補体成分の活性化によって、多形核白血球とマクロファージおよびリンパ球の集積が起り、抗原抗体複合物などによる細胞障害が起るものと考えられている。もう一つ、遅延型アレルギー反応は、感作Tリンパ球と抗原の反応による **Lymphotoxin** を産生し、細胞障害が起ることが知られている。このように、歯周組織内に侵入した抗原物質による2種のアレルギー反応が起ることが歯周疾患の起因子と考えられている。

一方、Tempel, *et al.* (1970)⁵⁾, Chapilis, *et al.* (1971)⁶⁾, Margenhagen (1972)⁷⁾ によると、補体成分の活性化はヒト口腔由来の産生物の内毒素、細菌性プロテアーゼ、プロテインAにも多形核白血球の走化性を有することを述べ、このことが再発生の歯周炎の病状の悪化に重要な役割があると報告した。この内毒素は、生物学的にも多彩な活性を持ち、免疫応答にも複雑な反応を有することは知られている。このような性状をもつ内毒素を歯肉に接種し、歯肉組織内の免疫反応を所属リンパ節で観察した報告は、高添ら (1974)¹⁴⁾、白石ら (1978)¹⁵⁾ がある。彼らによると、歯肉組織に接種した内毒素によって早期から多数の抗体産生細胞が産生され長期にわたって抗体産生細胞が産生されると推測し、局所における免疫反応は所属リンパ節が重要な役割をしていると述べている。著者の成績からも歯肉組織に接種した内毒素によって、所属リンパ節に早期から抗体産生細胞が出現することと、また、局所組織の免疫反応は所属リンパ節が重要な役割については一致した成績が得られた。

従来から補体は血清中の正常成分で9種類のタンパク成分から成り立っており、炎症の **biological effector** として多くの機能を有していることはよく知られている。また、補体は抗原抗体複合物や内毒素、細菌性プロテアーゼ、プロテインAのような作用物質で活性化されると補体成分は開裂し、その結果、炎症過程に多く存在する生物学的な活性物を遊離する。この補体成分が活性化される系は、抗原や抗体と補体成分C 1, C 4, C 2 が関与して活性化される **classical pathway** と補体成分C 3以下の補体成分が活性化される系を **alternate pathway** と呼ばれている。

Götje and Müller (1974)²⁾, Williams, *et al.* (1975)³⁾, Schreiber, *et al.* (1979)⁴⁾ によると内毒素は **alternate pathway** における系の補体活性化する場合D因子, B因子, プロパージンの協力により、補体の活性化物質C 3bBを産生し、そのC 3bBは補体成分C 3をC 3a, C 3b, C 5aに開裂し遊離すると述べている。

次に、補体成分C 3の活性化により遊離されるC 3a, C 5aの活性化物質の生物学的活性について、Shin, *et al.* (1968)¹⁶⁾, Snyderman, *et al.* (1969)¹⁷⁾ は、内毒素と純化したモルモットの補体成分C 3, C 5の反応により、補体成分C 3, C 5は各々の2ケのフラグメントに開裂され、小さい方のフラグメントがC 3a, C 5aであり、開裂されたフラグメントが多形核白血球およびマクロファージに走化性活性を有することを認めている。また、Snyderman, *et al.* (1971)^{18), 19)} は、内毒素が *in vivo* で補体成分C 3, C 5を活性化し、補体成分C 3a, C 5aが遊離することを明らかにし、補体成分C 3, C 5が活性化され、局所組織に遊離されたC 3a, C 5aは、内毒素誘発性炎症初期における多形核白血球の集積には必要であり、24時間以内に局所組織内に多数の多形核白血球とマクロファージの走化性を認めている。

このようなことから、著者は、歯肉組織に内毒素を接種し、経時的に病理組織標本による多形核白血球とマクロファージおよびリンパ球の観察成績では接種後24時間目に接種部位に近接した血管壁に多数の多形核白血球とマクロファージおよびリンパ球の浸潤を認めた。Snyderman, *et al.* (1971)^{18), 19)} の報告と同様に内毒素による補体成分C 3, C 5が活性化され遊離したC 3a, C 5aによる炎症性細胞浸潤が起るものと考えられる。次に、多形核白血球とマクロファージおよびBリンパ球に対する補体成分C 3, C 5の受容体について、Feldman and Pepys (1971)⁸⁾, Pepys and Butterworth (1971)²⁰⁾ は、抗体産生系を用いた *in vitro* の実験で蛍光抗体法により、組織内の補体成分C 3, C 5の分布が明らかにされたものと考えられた。しかし、局所組織の炎症細胞浸潤に対して、所属リンパ節のBリンパ球の分布は10%の増加が認められたが、この時期ではBリンパ球の形質細胞化は著明ではなかったものと考えられる。

一方、3日目、5日目の病理組織の所見による歯肉組織内の血管壁の多形核白血球とマクロファージおよびリンパ球の浸潤は経時的に減少する傾向にあった。しかし、免疫病理学的所見では、内毒素接種部位の血管壁に

は散在した少数の特異蛍光を有する細胞が見られ、病理組織学的所見の浸潤細胞の分布状態がやや異った成績がえられたことを考えると、この時期は補体成分 C 3, C 5 が活性化され遊離した C 3 a, C 5 a が多形核白血球とマクロファージおよび B リンパ球の表面の受容体をブロックして Anti-Mouse C3 conj. FITC Serum の蛍光抗体染色が出来なかったものと考えられる。しかし、局所組織の炎症細胞浸潤に対して、所属リンパ節の B リンパ球の分布は、3 日目 15% 増加し最高値を示したが、5 日目は 7 % と減少した。3 日目は、B リンパ球の形質細胞化が著明な時期で、その後は経時的に局所組織の細胞浸潤と所属リンパ節の B リンパ球も徐々に減少する傾向にあった。

このような結果から、歯肉組織に単一接種した内毒素は、局所組織内で早期に alternate pathway における系で、補体成分 C 3, C 5 を活性化し C 3 a, C 5 a の遊離によって、多形核白血球とマクロファージおよびリンパ球を局所組織の血管壁からの補体成分 C 3 の役割を分析し、補体成分 C 3 の受容体は多形核白血球とマクロファージおよび B リンパ球に存在することを明らかにし、補体成分抗 C 3 はマクロファージか、または B リンパ球の膜上に結合して C 3 に対して作用することを認めた。また、Landen and Dierich (1979)⁹⁾, Muhlfelder, et al. (1979)²¹⁾ は、補体成分 C 5 に対する受容体が Raji 細胞とヒト赤血球および B リンパ球に存在すると明らかにし、その受容体が補体成分 C 3 の受容体と同一であったと述べている。この補体成分 C 3 の受容体について、著者の成績からも B リンパ球および組織内の多形核白血球およびマクロファージに Anti-Mouse C3 conj. FITC Serum による蛍光抗体染色を行い特異蛍光が観察されたことから補体成分 C 3 の受容体と同一であることを認められた。このようなことを背景にして、著者は歯肉組織内の内毒素誘発性初期の病理組織切片を Anti-Mouse C3 conj. FITC Serum を用いて蛍光抗体染色により補体成分 C 3, C 5 の分布を検索した結果は、病理組織の所見と同様であり、内毒素接種後 24 時間に接種部位に近接する血管壁には多数の特異蛍光細胞を認めた。このことは、Shin, et al. (1968)¹⁶⁾, Snyderman, et al. (1969, 1971)^{17), 18)} の内毒素による補体成分 C 3, C 5 が活性化され、遊離された C 5 a, C 3 a により多形核白血球とマクロファージおよび B リンパ球が 24 時間以内に局所組織内に集積することと Landen and Dierich (1979)⁹⁾ の補体成分 C 3, C 5 の受容体が同一であることを考えると、局所組織内に集

積された多形核白血球とマクロファージおよび B リンパ球は走化性を高め局所組織に集積され、かなり長期間にわたって、歯肉組織内に慢性炎症の病因として存在するものと考えられた。

内毒素の単一接種による歯肉組織内の補体成分 C 3, C 5 の分布と補体成分の開裂後の炎症細胞浸潤の動態について検索したが、臨床的には歯周炎の病態にあたいますものと考えられるが、その歯周炎に二次的に内毒素を接種した場合の歯肉組織内の細胞浸潤と抗原に対する免疫応答を再現し、解明しなければならないと考えられる。

以上のように、内毒素の多彩な生物活性を補体成分の分布と開裂を蛍光抗体法を用いて歯肉組織内で免疫病理学的に検索し歯周疾患の病因の一つとして重要な役割を持っていることが考えられた。

結 論

Escherichia coli の内毒素を用いて、ICR 系マウスの歯肉に接種し、経時的にリンパ節内の T, B cell の分布を免疫学的に検索と同時に歯肉に接種した内毒素による alternate pathway における系で補体成分 C 3, C 5 が活性化され C 3 a, C 5 a を遊離し、細胞浸潤が起る動態を経時的に蛍光抗体法を用いて免疫病理学的に、また、病理組織学的に検索して次のような知見を得た。

1. 所属リンパ節内の T cell は、対照群に比較し 1, 3 日目は徐々に増加し、3 日目が最高値が達したが、5 日目はやや減少し、7 日目は増加する傾向を示した。

一方、B cell は、対照群に比較し、1 日目は急激に増加し、3 日目も増加し最高値に達したが 5, 7 日目は徐々に減少した。

2. 歯肉組織の補体成分 C 3, C 5 の免疫病理学所見の 1 日目は血管壁を中心に強い多数の特異蛍光を有する細胞浸潤が観察され、その周囲組織には中等度の散在した特異蛍光を有する細胞が観察された。また、3 日目は血管壁に強い少数の特異蛍光を有する細胞が観察され、その周囲組織には中等度の特異蛍光を有する細胞が広範囲に観察された。5, 7 日目の血管壁には、中等度の散在した特異蛍光を有する細胞が観察され、内毒素の接種部位には限局した特異蛍光が観察された。

3. 歯肉組織の補体成分 C 3, C 5 の分布と、所属リンパ節の B リンパ球の動態から、1 日目の歯肉組織には補体成分 C 3, C 5 の分布が最も多数観察されたが、所

属リンパ節のBリンパ球は3日目が最高値の分布成績を得た。

4. 内毒素による補体成分の開裂は、血管壁からの多形核白血球およびマクロファージの走化性を有することが蛍光抗体法によって確認された。

稿を終るにあたり、御懇篤な御指導と御校閲を賜った恩師、本学口腔細菌学教室山長司教授に深甚なる感謝の意を表します。

また、教室員各位の御援助に感謝致します。

文 献

- 1) Schwarz, J., Stinson, F.L., *et al.*: The passage of tritiated bacterial endotoxin across intact gingival cervicural epithelium, J. Periodontol. 43:270—276, 1972.
- 2) Götze, O. and Müller-Eberhard, H.J.: The role of properdin in the alternate pathway of complement activation, J. Exp. Med. 139:44—57, 1974.
- 3) Williams, R.C., Challacombe, S.J., *et al.*: Immunoconglutinins and C3 in human saliva, Clin. Exp. Immunol. 19:423—435, 1975.
- 4) Scheiber, R.D., Morrison, D.C., *et al.*: Bactericidal activity of the alternative complement pathway generated from 11 isolated plasma proteins, J. Exp. Med. 149:870—882, 1979.
- 5) Tempel, T.R., Snyderman, R., *et al.*: Factors from saliva and oral bacteria, chemotactic for polymorphonuclear leucocytes: Their possible role in gingival inflammation, J. Periodontol. 41:71—90, 1970.
- 6) Chapilis, J., Ward, P.A., *et al.*: Generation of chemotactic activity from human serum and purified components of complement by *Serratia* proteinase, J. Immunol. 107:317—331, 1972.
- 7) Mergenhagen, S.E.: Complement as a mediator of the inflammatory response: Interaction of complement with mammalian and bacterial enzymes, J. Dent. Res. 51:251—278, 1972.
- 8) Feldman, M. and Pepys, M.B.: Role of C3 in *in vitro* lymphocyte cooperation, Nature 249:159—160, 1974.
- 9) Landen, B. and Dierich, M.P.: Identity of C3- and C5-receptors on lymphoid cells, J. Immunol. 122:1015—1017, 1979.
- 10) 奥田正治: 蛍光抗体法の実際と臨床的応用, ヘキストジャパン株式会社 20:14—15, 1975.
- 11) 平嶋邦猛・川瀬淑子・他: リンホブレップによるリンパ球分離法について, 臨床検査 19:76—79, 1975.
- 12) 矢田淳一・橘 武彦: ヒトリンパ球 Subpopulation の分別—ヒツジ赤血球結合性リンパ球の証明法, 免疫実験操作法 I, 日本免疫学会, 金沢, 1972, 473—475.
- 13) Stjernsward, J., Roben, M., *et al.*: Lymphopenia and change in distribution of human B and T lymphocytes in peripheral blood induced by irradiation for mammary carcinoma, Lancet 24:1352—1356, 1972.
- 14) 高添一郎・奥田克爾・他: 抗原の歯齦内接種による免疫応答, 歯科学報 74:484—486, 1974.
- 15) 白石悦郎・内山長司: 内毒素の歯肉内接種時における生体反応に関する研究. 1報 E. coli の内毒素について, 九州歯会誌 31:401—411, 1978.
- 16) Shin, H.S., Snyderman, R., *et al.*: Chemotactic and anaphylatoxic fragment cleaved from the fifth component of complement, Science 162:361—368, 1968.
- 17) Snyderman, R., Shin, H.S., *et al.*: A neutrophil chemotactic factor derived from C'5

- upon interaction of guinea pig serum with endotoxin, *J. Immunol.* 103 : 413—435, 1969.
- 18) **Snyderman, R., Shin, H.S., *et al.*** : A chemotactic factor for mononuclear leucocytes, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 138 : 387—401, 1971.
- 19) **Snyderman, R., Phillips, J.R., *et al.*** : Biological activity of complement *in vivo* : Role of C5 in the accumulation of polymorphonuclear leucocytes in inflammatory exudates, *J. Exp. Med.* 134 : 1131—1152, 1971.
- 20) **Pepys, M.B. and Butterworth, A.E.** : Inhibition by C3 fragment of C3-dependent rosette formation and antigen-induced lymphocyte transformation, *Clin. Exp. Immunol.* 18 : 273—282, 1974.
- 21) **Muhlfelder, T.W., Niemetz Kreutzer, D., *et al.*** : C5 chemotactic fragment induces leucocyte production of tissue factor activity : A link between complement and coagulation, *J. Clin. Invest.* 63 : 147—150, 1979.

Photo. 1 Immunofluorescent staining of lymphocyte

Photo. 2 Immunofluorescent of macrophage and polymorphonuclear leucocytes

Photo. 3 Immunofluorescent staining of gingival tissue

Photo. 4 Immunofluorescent staining of gingival tissue

Photo. 5 Immunofluorescent staining of gingival tissue

Photo. 6 Immunofluorescent staining of gingival tissue