原 著

歯周疾患罹患部歯肉における *Actinomyces Naeslundii* の局在について

石 井 千 春 秦 周 平 福 田 富 男
岡 田 宏 青 野 正 男

九州大学歯学部歯科保存学第一教室

(主任：青野正男 教授)

(昭和51年6月20日受付)

Localization of *Actinomyces Naeslundii* in Human
Gingiva from Periodontal Disease.

Chiharu ISHII, Shuhei HATA, Tomio FUKUDA,
Hiroshi OKADA, Masao AONO.

Department of Endodontics and Periodontics
Faculty of Dentistry, Kyushu University
(Director: Prof. Masao AONO)

Localization of *Actinomyces naeslundii* in the chronically inflamed human gingiva was studied by immunohistochemical procedures.

Immunofluorescence was detected on the surface of crevicular epithelium and the tissue adjacent to epithelium.

Especially in a inflammatory connective tissue, immunofluorescence suggesting phagocytosis by histiocytes round infiltrating lymphocytes was detected. While there was no immunofluorescence in the clinically healthy gingiva.

緒 言

歯周疾患の原因と目される口腔内常在細菌の動態については次第に明らかになりつつある。これらの細菌が歯苔や歯肉溝周辺に存在しており歯周組織の炎症の初発はこれらの細菌の産生する酵素や代謝産物または細菌細胞自身などの細胞毒性因子や細菌抗原による免疫反応などが関与していると考えられている^{1~4)}。

歯周疾患と免疫反応との関係については Lehner^{5~8)}らは歯周疾患の程度と MIF 或いは Blastformation が或る程度相関すると報告している。また感作リンパ球よ

り分泌される Lymphotoxin が骨の吸収を惹起することも知られている⁹⁾。

ヒト歯苔中には *Actinomyces* が存在しており歯周疾患との関連が示唆されている^{10,11)}。

さらにヒト歯周疾患患者由来の *A. naeslundii*, *A. viscosus* を Gnotobiotic rat と Conventional hamster に感染させて歯苔形成と歯周疾患を発症しえたという報告もある^{12,13)}。

したがって歯周疾患患者の歯肉組織に *A. naeslundii* の存在を証明することは細胞免疫との関係や Lymphotoxin との関係の面でも興味あることと思われる。この目的のために蛍光抗体法を用いて *A. naeslundii* の存

在を検討した。

実験材料と方法

1) 抗血清の作り方

Actinomyces naeslundii (ATCC 12104) をホルマリン固定¹⁴⁾ し抗原として使用した。すなわち 10 mg (湿量) /ml の濃度の菌浮游液 1 ml を Freund の完全アジュバント 1 ml と混合し、油中水乳濁液とし、ウサギの両足趾内および背部皮下に注射し、4 週間後に上記乳濁液 2 ml を背部皮下および臀部筋肉内に注射して追加免疫を行なった。追加免疫、2 週間後より数日おきに数回採血した。常法どおり血清を分離し、分離した血清は -20℃ で凍結保存した。この分離した血清の凝集活性を測定したところ表 1 のような凝集価を示した。なお追加免疫後 9 日目と 22 日目に採血した血清については 2 メルカプトエタノールによる還元凝集活性を検討した。

2) Fluorescein isothiocyanate による標識法

川村¹⁵⁾らの方法に従っておこなった。図 1 はその概略を示したものである。すなわち抗血清を 35% 飽和硫酸による塩析で主として IgG を含む免疫グロブリンをえた。この分画を 0.1 M 炭酸重炭酸緩衝液 (pH 9.3) に透析後、IgG 1 モルに対して、8 倍モル当量の割合で FITC を加え、4℃ で 6 時間マグネチックスタラーにて攪拌を続けながら反応させた。

未結合の FITC は緩衝化食塩水に透析することにより除いた。ついで色素対タンパク (F/P) 結合モル比の高いものは、DEAE セルローズ (DE-23 Whatman 社製) を用いたカラムクロマトグラフィー法で除去した。すなわちカラムを pH 7.0 の 0.005 M リン酸緩衝液で緩衝化した 0.1 M 食塩水で置換し、同緩衝液で流出し

た分画を実験に使用した。各分画のタンパク濃度は 280 nm における吸光度で測定し、吸光度 0.5 以上の分画を集めた。ちなみにこの分画の F/P モル比は 1.38 で、35% 飽和硫酸による塩析でえられたグロブリン分画の 43% がこの分画にえられた。

3) 抗体の吸収

自然抗体および交叉反応を示す抗体をできるだけ減少させるために *Streptococcus mutans* (GS 5 株), *Streptococcus mutans* (BHT 株), *Fusobacterium fusiformis* (H-T 40 株), *Escherichia coli* (B 株), *Bacteroides melaninogenicus* (32~2 株), 各々を 10 mg (湿量)/ml の割りで加えこれらに対する抗体を吸収した。

図 1 家兎抗 *A. naeslundii* 抗血清の FITC による標識

表 1 Agglutinating activities of rabbit anti-*A. naeslundii* ATCC 12104 serum

Agglutinating titer

The day after last secondary immunization Anti- <i>A. naeslundii</i> ATCC 12104	3rd	8th	9th	14th	16th	20th	22th	24th
non-treated	2560*	2560	2560	2560	2560	2560	2560	2560
after reduction	-**	-	1280	-	-	-	2560	-

* Figures represent maximum dilution factors giving positive agglutination.

** Not tested.

さらにこの抗体溶液に感作抗原を 20 mg (湿量)/ml の割りで加え、抗 *A. naeslundii* 抗体を吸収した (図 1 参照)。その後凝集反応¹⁴⁾で抗体が吸収されたことを確認した後、これをネガティブコントロールとして用いた。

4) 歯肉組織の採取と切片の作り方

歯肉組織は正常歯肉 2 例と歯周疾患に罹患している歯肉 3 例を採取した。これらの歯肉組織は 2% キシロカインの局所麻酔下で採取し生検をおこなった。また正常歯肉は歯周疾患に罹患していない永久歯を抜歯する際、抜去前に採取して生検をおこなった。

歯周疾患に罹患している歯肉は、歯周ポケットの深さ 3~4 mm の歯肉 2 例、5~6 mm の歯肉 1 例を、手術開始前に生検をおこなった。採取された歯肉組織は浜島¹⁶⁾らの方法にもとづいて、冷却 95% エチルアルコールで固定した後、通法どうり低融パラフィンに包埋し切片を作製した。

5) 蛍光抗体による切片の染色

浜島¹⁶⁾らの方法によりおこなった。また図 1 に示した方法でえたネガティブコントロールによる染色でも蛍光を認めなかった。

実験結果

1. 蛍光抗体液による染色所見

1) 正常歯肉組織

未吸収の抗体液で染色した切片で蛍光を認めなかった。また図 1 に示した方法でえたネガティブコントロールによる染色でも蛍光を認めなかった。

2) 歯周ポケット深さが 3~4 mm の歯肉組織

歯周ポケット底部に近い内縁上皮の上皮面に (図 2)、また内縁上皮の上皮内に (図 3) 蛍光を認めた。結合組織では貪食細胞に貪食されているように観察される蛍光と上皮下結合組織内に瀰漫性に観察される蛍光像を認めた。

3) 歯周ポケット深さが 5~6 mm の歯肉組織

結合組織内に増殖している上皮の上皮内に蛍光を認めた (図 4)。また結合組織内に浸潤遊走している貪食細胞に貪食されているように観察される蛍光を認めた (図 5, 6, 7)。

2. ヘマトキシリン・エオジン重染色による染色所見

正常歯肉組織では歯周ポケット底部の結合組織にわずかに円形細胞を認めた。

歯周ポケット深さ 3~4 mm の歯肉組織ではポケット

図 2 歯周ポケット 3~4 mm 底部内縁上皮面

図 3 歯周ポケット 3~4 mm 底部内縁上皮内

図 4 歯周ポケット 5~6 mm 歯肉結合組織内増殖上皮部

図 5, 6 歯周ポケット 5~6 mm 結合組織内の貪食細胞内に蛍光を認める。

図 7 歯周ポケット 5~6 mm 歯肉結合組織部に瀰漫性の蛍光を認める。

底部に近い内縁上皮の上皮表層に軽度の糜爛が観察され、結合組織には円形細胞の強い浸潤がみられ内縁上皮は深部に増殖している。歯周ポケット深さ 5~6 mm の歯肉組織では内縁上皮は強く深部に増殖し内縁上皮の表層は強い糜爛を呈し上皮細胞は変性し結合組織は強度の円形細胞浸潤と浮腫を呈し結合組織線維の強い破壊が認められた。

考 按

蛍光抗体法を用いて炎症歯肉の内縁上皮の上皮面、上皮内及び結合組織内に蛍光を認めることができたが、竹内ら¹⁷⁾の報告と類似した所見をえた。Sussman ら¹⁵⁾は歯垢細菌の歯肉組織内への侵入を検索し、歯肉上皮面へのプラークの付着を認め、潰瘍形成を伴っている固有層に細菌を見出したが、損傷されていない上皮下固有層で

は細菌は見出せなかったと報告し、細菌侵入よりはむしろ細菌の産生物と歯肉炎症との関連性を指摘している。

本実験でも正常歯肉組織では *A. naeslundii* の存在を証明できなかった。炎症歯肉組織の病理組織学的検査¹⁶⁻¹⁸⁾の結果によると炎症歯肉組織では細菌細胞あるいは細菌細胞の産生物の歯肉組織内への侵入と局在が考えられる。ヘマトキシリン・エオジン重染色像では円形細胞を中心とした細胞浸潤の所見を呈していて、それらの部位において免疫応答が働いていることが示唆される。Slack ら¹⁹⁾は *Actinomyces* 間の血清学的反応の結果で *A. naeslundii* (ATCC 12104 株) が *A. israelii* の Serotype I と *A. viscosus* の Serotype I および Serotype II と交叉反応のあることを報告している。

Collins ら¹¹⁾の報告からも本実験に使用した *A. naeslundii* (ATCC 12104 株) に対する抗血清は、血清学的分類の異なった *Actinomyces* とも反応している可能性は否定できないが、*A. naeslundii* がヒトの歯周疾患に何らかの形で加担していることを本実験は示していると思われる。

結 論

蛍光抗体法を用いて歯周疾患に罹患している歯肉組織の内縁上皮の上皮面と上皮内ならびに歯肉結合組織内に *Actinomyces naeslundii* の存在を証明した。なお正常歯肉組織にはその存在を証明できなかった。

本論文の要旨は第17回日本歯周病学会総会(1974年—大阪)において発表した。

なお本研究には昭和50年度文部省科学研究費の補助を受けたことを記して謝意を表す。

文 献

- 1) Loe, H., Theilade, E. and Jensen, S.B. : Experimental gingivitis in man. J. Periodont., 36 : 177-187, 1965.
- 2) Lindhe, J., Hamp, S.E. and Loe, H. : Experimental periodontitis in the Beagle dog. J. Periodont. Res., 8 : 1-10, 1973.
- 3) Payne, W.A., Page, R.C., Ogilvie, A.L. and Hall, W.B. : Histopathologic features of the initial and early stages of experimental gingivitis in man. J. Periodont. Res., 10 : 51-64, 1975.
- 4) Johnson, N.W. and Hopps, R.M. : Cell dynamics of experimental gingivitis in macaques. J. Periodont. Res., 10 : 177-190, 1975.
- 5) Ivanyi, L. and Lehner, T. : Stimulation of lymphocyte transformation by bacterial antigens in patients with periodontal disease. Archs. oral Biol., 15 : 1089-1096, 1970.
- 6) Ivanyi, L. and Lehner, T. : The significance of serum factors in stimulation of lymphocytes from patients with periodontal disease by *Veillonella alcalescens*. Int. Archs. Allergy, 41 : 620-627, 1971.
- 7) Ivanyi, L. and Lehner, T. : Lymphocyte transformation by sonicates of dental plaque in human periodontal disease. Archs. oral Biol., 16 : 1117-1121, 1971.
- 8) Ivanyi, L., Wilton, M.A. and Lehner, T. : Cell-mediated immunity in periodontal disease; Cytotoxicity, migration inhibition and lymphocyte transformation studies. Immunol., 22 : 141-145, 1972.
- 9) Horton, J.E., Raisz, L.G., Simmons, H.A., Oppenheim, J.J. and Mergenhagen, S.E. : Bone resorbing activity supernatant fluid from cultured human peripheral blood leukocytes. Science, 177 : 793-795, 1972.
- 10) Howell, A., Rizzo, A. and Paul, F. : Cultivable bacteria in developing and mature human dental calculus. Archs. oral Biol., 10 : 307-313, 1965.
- 11) Collins, P.A., Gerencser, M.A. and Slack, J.M. : Enumeration and identification of *Actinomycetaceae* in human dental calculus using the fluorescent antibody technique. Archs. oral Biol., 18 : 145-153, 1973.
- 12) Socransky, S.S., Hubersack, C. and Propas, D. : Induction of periodontal destruction in gnotobiotic rats by a human oral strain of *Actinomyces naeslundii*. Archs. oral Biol., 15 : 993-995, 1970.
- 13) Jordan, H.V., Keyes, P.H. and Bellack, S. : Periodontal lesions in hamsters and gnotobiotic rats infected with *Actinomyces* of human origin. J. Periodont. Res., 7 : 21-28,

- 1972.
- 14) 福田富男：分泌型 IgA の精製と口腔内細菌に対する抗体活性について．歯科基礎医学会雑誌，16 (4)：395-406, 1974.
- 15) 川村明義：免疫アレルギー実験法（第一版），東京，1970，文光堂，554-577.
- 16) 浜島義博，安田健次郎：螢光抗体法，酵素抗体法（第一版），東京，1971，医学書院，43-58.
- 17) Takeuchi, H., Sumitani, M., Tsubakimoto, K. and Tsutsui, M.: Oral microorganisms in the gingiva of individuals with periodontal disease. J. Dent. Res., 53: 132-136, 1974.
- 18) Sussman, H.I., Bartels, H.A. and Stahl, S.S.: The potential of Microorganisms to invade the lamina propria of human gingival tissues. J. Periodont., 40: 210-215, 1969.
- 19) Leuy, B.M., Taylor, A.C. and Bernick, S.: Relationship between epithelium and connective tissue in gingival inflammation. J. Dent. Res., 48 (supplement 5): 625-629, 1969.
- 20) Freedman, H.L., Listgarten, M.A. and Taichman, N.S.: Electron microscopic features of chronically inflamed human gingiva. J. Periodont. Res., 3: 313-327, 1968.
- 21) 原 耕二，小林幸男，高橋徳也，野原広美：歯周炎罹患歯肉 biopsy から求めた組織学的炎症指数に関する一考察．日本歯科保存学会雑誌，14: 282-290, 1972.
- 22) Slack, J.M. and Gerencser, M.A.: Two types serological groups of Actinomyces. J. Bacteriol., 103: 266-267, 1970.