菌破壊液滴下により発生したイヌの初期歯肉炎について

第2報 特に *Fusobacterium* 菌破壊液の免疫犬を使用した場合

山 岸 茂

新潟大学歯学部歯科保存学第2教室

(指導: 原 耕二 教授)

(昭和56年9月20日受付)

Initial Gingivitis Induced by Topical Application of Sonicates from Oral Microorganisms in Dog

II. The Effect of *Fusobacterium* Sonicate on Immunized Dog

Shigeru YAMAGISHI

Department of Periodontology and Endodontics Niigata University School of Dentistry

(Director: Prof. Kohji HARA)

The aim of present study was to examine the effect of immunization on the initial inflammatory changes in the marginal gingiva.

Two dogs were used. After *Fusobacterium* sonicate was topically applied to two jaw quadrants of the dogs with clinically healthy gingivae for 8 hours, gingival strips were obtained. Furthermore, similar topical application was carried out in the remaining quadrants of the dogs which had been immunized by *Fusobacterium* sonicate and the gingival strips were also taken. The gingival strips were fixed in 10%

formalin and embedded in paraffin. The serial buccolingual cross sections of 5 μ m thickness were prepared and stained with hematoxylin and eosin, Masson · Goldner and PAS · Alcian blue.

The histologic sections showed that in the immunized dog, after topical application of *Fusobacterium* sonicate the numbers of polymorphonuclear leucocytes in the marginal gingiva tended to increase as compared with those before immunization.

This fact may reflect the leucocyte chemotaxis via complement activation in a classical pathway.

結 論

歯周病発生の原因としては、一般にプラク中の細菌が主役を演ずると考えられ¹⁻⁵⁾、その発生機構として細菌の産生酵素や細菌の代謝産物または菌体成分などの細胞毒が因子として考えられる一方、歯周組織中の抗体や補体または末梢リンパ球などの関与する免疫学的役割についても解明されてきた⁶⁻¹³⁾。

本教室の吉江は、*Actinomyces viscosus*, *Fusobacterium nucleatum* の超音波破壊液を用いた in vitro 実験において、マウス脾細胞は抗体産生を増強すること¹⁴⁾、さらにその作用機作を実験的に明らかにした¹⁵⁾。

すでに著者は、第1報¹⁶⁾で報告のとおり、これら菌の破壊液をイヌの健康歯肉溝に8時間連続滴下するという in vivo 実験を行い、歯肉上皮ならびに結合組織中に多形核白血球の浸潤を中心とした初期病変が発生し、しかもその変化は、*Fusobacterium* で著明であることを明らかにした。

そこで本研究は、*A. viscosus* より強い病変をもたら

本論文の要旨は、昭和56年5月第24回春季日本歯周病学会総会において発表した。

表 1 実験の概要

すことがはっきりした *F. nucleatum* の菌破壊液で予めイヌを免疫しておき、この免疫犬に同じ菌破壊液を健康歯肉に作用させた場合、歯肉の変化はいかなる影響を受けるかを検討すべき、以下の実験を行った。

研究材料と方法

実験の概要

雑種成犬 2 頭 (体重 10~12 kg, 年齢不明) を用い、まず右側上下顎小臼歯部: $\frac{76}{76}$ を免疫前の対照側とし、ケタラル 50 (0.3 ml/kg) の筋肉内注射による全身麻酔下で歯石除去を行った。その後 4 週間その部の頰側歯肉に 1 日 1 回徹底したブラッシングと 0.2% クロールヘキシジン溶液の噴霧塗布を続けた。健康歯肉の確立後、ケタラルの筋肉内注射とネプタール® (0.5 ml/kg) の下肢静脈内注射併用による全身麻酔下で、下肢静脈より約 10 ml 採血し、血清中の *F. nucleatum* に対する抗体価を測定した。その後、イヌを背位に固定したのち、 $\frac{76}{76}$ の頰側歯肉辺縁中央の歯肉溝入口に、1 歯当り 1 枚静置した濾紙片 (幅 3 mm×長さ 5 mm) を介して、第 1 報と同様な方法で調整したタンパク濃度 2 mg/ml の *F. nucleatum* の菌破壊液を、ファイン・ピペットにて 1 カ所 1 回 10 μ l ずつ 10 分間隔で 8 時間連続滴下した。使用濾紙片は 6 回滴下ごとに新しい濾紙片と交換した。滴下終了後、滴下部の各頰側歯肉辺縁中央部から、幅約 5 mm×長さは歯肉辺縁から歯肉頰移行部までとした短冊形の歯肉片を採取した。その後、表 1 に示すごと

く、犬 I, II とともに 6 週から免疫を開始した。犬 I では *F. nucleatum* の菌破壊液 1 ml (タンパク濃度 5 mg/ml) と完全フロイドアジュバント 1 ml の混合液計 2 ml を 6, 8 週にイヌの四肢掌および背部数カ所に、1 カ所 0.05~0.1 ml の割合で注射し、9 週より免疫後の実験側と定めた左側上下顎小臼歯部: $\frac{67}{67}$ の歯石除去およびブラッシングと 0.2% クロールヘキシジン溶液の噴霧塗布を開始した。さらに 10, 11 週にタンパク濃度 0.05 mg/ml, 13, 14 週に 0.5 mg/ml の *F. nucleatum* の菌破壊液を毎回 20 ml 静脈内注射した。12, 14, 15 週に下肢静脈よりおのおの約 10 ml 採血し、*F. nucleatum* に対する抗体価を測定した。抗体価の上昇を確認した 15 週に、健康歯肉を確立した $\frac{67}{67}$ 部を使用して、対照側と同様 *F. nucleatum* の菌破壊液を、頰側歯肉辺縁中央の歯肉溝入口においた濾紙片を介して、10 分間隔で 8 時間連続滴下した。滴下終了後歯肉片を採取した。

犬 II では 14 週までは犬 I と同様の操作をおこなったが、*F. nucleatum* に対する抗体価が上昇しなかったため、15 週から 17 週の間に 4 回、毎回タンパク濃度 1 mg/ml の *F. nucleatum* の菌破壊液 20 ml を静脈内注射した。17 週に採血し、血清中の抗体価測定と、犬 I と同様、健康歯肉を確立した $\frac{67}{67}$ 部に *F. nucleatum* の菌破壊液を 10 分間隔で 8 時間連続滴下し、歯肉片を採取した。

各時期に採血したイヌの血清中の *F. nucleatum* に対する抗体価は次の 2 つの方法、1) 沈降反応 (ゲル拡散法)、2) 間接赤血球凝集反応 (塩化クロム法) により測

表 2 血清中の抗体価

血清	沈 降 反 応			
	1	2	3	4
実験(犬)				
I	0	2	4	4
II	0	0	0	0
血清	間接赤血球凝集反応			
	1	2	3	4
実験(犬)				
I	4	512	1024	2048
II	16	32	256	512

図 1 歯肉上皮の多形核白血球数

表 3 歯肉上皮の多形核白血球数 実験 I (犬 I)

部 位	免 疫 前		免 疫 後		免 疫 前		免 疫 後	
	76	67	76	67	76	67	76	67
	X	S. E.	X	S. E.	X	S. E.	X	S. E.
歯 肉 溝 上 皮	2.0±0.4		7.6±1.5		3.2±0.7		4.4±0.6	
	_____*				_____NS			
付 着 上 皮	2.5±0.6		8.1±1.3		3.3±0.5		5.6±0.8	
	_____*				_____*			

* : P<0.05で有意差あり
NS : P>0.05で有意差なし

定を行った¹⁷⁾。
採取した歯肉片の組織標本の作製にいたるまでの操作は、第1報¹⁶⁾の方法に準じて行った。

組織学的検索

観察部位は、各被検歯の歯肉上皮で 1)歯肉溝上皮 と 2)付着上皮の2ヵ所と、これら上皮直下結合組織の2ヵ所の合計4部位とし、細胞数の測定は接眼レンズにセットしたプラニメーター中のグリッド数を上皮で10グリッド、上皮直下結合組織では20グリッドと定めて行った。なお、観察項目、細胞の同定、歯肉微細血管の拡張、歯肉上皮細胞間腔の拡大、歯肉結合組織線維の破壊の判定は第1報¹⁶⁾と同じ基準に従って行った。

結 果

血清中の *F. nucleatum* に対する抗体価

表2に示すとおり実験I(犬I)は、免疫前、沈降反応0、間接赤血球凝集反応4であったのが、免疫後の菌破壊液滴下時(4回目の採血時)には、沈降反応4、間

接赤血球凝集反応2048と増加した。一方、実験II(犬II)では、免疫前、沈降反応0、間接赤血球凝集反応16で、免疫後の菌破壊液滴下時(4回目の採血時)には、沈降反応0、間接赤血球凝集反応512と、実験I(犬I)に比較して抗体価の上昇は少なかった。

組織学的所見

実験 I (犬 I)

歯肉上皮の多形核白血球(表3, 図1)

1) 歯肉溝上皮

76で免疫前2.0±0.4であったのが、免疫後67で7.6±1.5と免疫前の約4倍増加し、両者の間で統計学的に有意差が認められた(P<0.05)。一方、76で免疫前3.2±0.7、免疫後は67で4.4±0.6となり、両者の間に統計学的に有意差はなかった(P>0.05)。

2) 付着上皮

付着上皮では、76で免疫前2.5±0.6であったものが免疫後67で8.1±1.3と免疫前の約3倍増加した。76では免疫前3.3±0.5に対し、免疫後67で5.6±0.8と約2倍増加し、いずれも統計学的に有意差が認められた

表 4 歯肉上皮直下結合組織の多形核白血球数 実験 I (犬 I)

部 位	免 疫 前		免 疫 後		免 疫 前		免 疫 後	
	$\overline{76}$	S. E.	$\overline{67}$	S. E.	$\overline{76}$	S. E.	$\overline{67}$	S. E.
歯肉溝上皮	7.3±1.2		9.9±1.5		8.1±1.0		5.0±1.1	
			NS				NS	
付着上皮	5.5±0.7		9.2±1.5		10.7±0.7		5.6±0.7	
			*				*	

* : P<0.05で有意差あり
NS : P>0.05で有意差なし

(P<0.05)。

歯肉上皮直下結合組織の多形核白血球 (表 4, 図 2)

1) 歯肉溝上皮

76 で免疫前 7.3±1.2, 免疫後 67 で 9.9±1.5, 76 では, 免疫前 8.1±1.0, 免疫後 67 で 5.0±1.1 となり, いずれも統計学的に有意差はなかった (P>0.05)。

2) 付着上皮

76 で免疫前 5.5±0.7 に対し, 免疫後 67 で 9.2±1.5 と増加し, 一方, 76 では免疫前 10.7±0.7, 免疫後 67 で 5.6±0.7 と減少し, いずれも統計学的に有意差が認められた (P<0.05) (図 3)。

図 2 歯肉上皮直下結合組織の多形核白血球数

図 3 *F. nucleatum* の菌破壊液滴下後の組織標本 (実験 I)

- A. 免疫前: 歯肉上皮ならびに歯肉上皮直下結合組織に多形核白血球の浸潤が認められる, ×165, H-E 染色
- B. 免疫後: 歯肉上皮ならびに歯肉上皮直下結合組織の多形核白血球の浸潤が免疫前より増加し, かつ微細血管の拡張, 上皮細胞間腔の拡大が認められる, ×165, H-E 染色

表 5 歯肉上皮の多形核白血球数 実験 II (犬 II)

部 位	免 疫 前		免 疫 後		免 疫 前		免 疫 後	
	$\overline{76}$ X	S. E.	$\overline{67}$ X	S. E.	$\overline{76}$ X	S. E.	$\overline{67}$ X	S. E.
歯 肉 溝 上 皮	3.5±0.7		1.5±0.4		3.9±1.1		4.7±0.7	
			*————				———— NS	
付 着 上 皮	1.9±0.4		3.5±0.7		6.7±0.7		6.1±0.8	
			———— NS				———— NS	

* : P<0.05で有意差あり
NS : P>0.05で有意差なし

* : P<0.05で有意差あり
NS : P>0.05で有意差なし

図 4 歯肉上皮の多形核白血球数

マクロファージ

歯肉上皮では、免疫前、免疫後ともマクロファージは認められなかった。歯肉上皮直下結合組織では、免疫前、免疫後とも0～4の範囲でわずかに認められた。

肥満細胞

歯肉上皮及び歯肉上皮直下結合組織で、免疫前、免疫後とも肥満細胞は認められなかった。

形質細胞

歯肉上皮では免疫前、免疫後とも形質細胞は認められなかった。歯肉上皮直下結合組織では、免疫前、免疫後とも0～2の範囲でわずかに認められた。

リンパ球

歯肉上皮では、免疫前、免疫後ともリンパ球は認められなかった。歯肉上皮直下結合組織では、免疫前、免疫後とも0～6の範囲で認められた。

歯肉結合組織微細血管の拡張

歯肉微細血管の拡張を歯肉溝上皮及び付着上皮別に観察したが、免疫前に、歯肉溝上皮直下結合組織に(±)が1標本(3.3%)、免疫後には、同じく歯肉溝上皮直下結合組織に(+)が1標本(3.3%)認められたのみで、他はいずれも微細血管の拡張は認められなかった。

歯肉上皮細胞間腔の拡大

歯肉上皮細胞間腔の拡大を歯肉溝上皮及び付着上皮別に観察したが、免疫前にはいずれも変化は認められなかった。免疫後、歯肉溝上皮に(±)が2標本(6.7%)、付着上皮では(±)が3標本(10%)、(+)が3標本(10%)認められたが、他はいずれも上皮細胞間腔の拡大は認められなかった。

歯肉結合組織線維の破壊

歯肉結合組織線維の破壊を歯肉溝上皮及び付着上皮別に観察したが、免疫前にはいずれも破壊は認められなかった。免疫後、歯肉溝上皮直下結合組織で(±)が2標本(6.7%)認められたが、他はいずれも歯肉結合組織線維の破壊は認められなかった。

実験 II (犬 II)

歯肉上皮の多形核白血球 (表 5, 図 4)

1) 歯肉溝上皮

76で免疫前 3.5±0.7 であったものが、免疫後 67で 1.5±0.4 と減少し統計的に有意差が認められた (P<0.05)。76では免疫前 3.9±1.1, 67で免疫後 4.7±0.7 となり、両者の間に統計的に有意差を認めなかった (P>0.05)。

2) 付着上皮

76で免疫前 1.9±0.4, 免疫後 67で 3.5±0.7, 76で免疫前 6.7±0.7, 67で免疫後 6.1±0.8 となり、いずれも免疫前後で統計的に有意差を認めなかった (P>0.05)。

歯肉上皮直下結合組織の多形核白血球 (表 6, 図 5)

1) 歯肉溝上皮

76で免疫前 4.2±0.5, 免疫後 67で 2.3±0.4に減少し両者間で統計的に有意差が認められた (P<0.05)。一方、76では免疫前 5.6±0.8, 67で免疫後 5.0±0.7 と両者の間で統計的に有意差は認められなかった (P>0.05)。

表 6 歯肉上皮直下結合組織の多形核白血球数 実験 II (犬 II)

部 位	免 疫 前		免 疫 後		免 疫 前		免 疫 後	
	$\overline{X}$	S. E.	$\overline{X}$	S. E.	$\overline{X}$	S. E.	$\overline{X}$	S. E.
歯 肉 溝 上 皮	4.2±0.5		2.3±0.4		5.6±0.8		5.0±0.7	
付 着 上 皮	4.5±0.5		2.4±0.3		6.4±0.8		5.7±0.7	

* : P<0.05で有意差あり
NS : P>0.05で有意差なし

* : P<0.05で有意差あり
NS : P>0.05で有意差なし

図 5 歯肉上皮直下結合組織の多形核白血球数

2) 付着上皮

76で免疫前 4.5±0.5, 67で免疫後 2.4±0.3 と減少し、歯肉溝上皮同様、両者の間で統計学的に有意差が認められた (P<0.05)。一方、76では免疫前 6.4±0.8, 67で免疫後 5.7±0.7 と免疫前後で統計学的に有意差は認められなかった (P>0.05)。

マクロファージ

歯肉上皮では、免疫前、免疫後ともマクロファージは認められなかった。歯肉上皮直下結合組織では、免疫前、免疫後とも 0～2 の範囲でわずかに認められた。

肥満細胞

歯肉上皮では、免疫前、免疫後とも肥満細胞は認められなかった。歯肉上皮直下結合組織では肥満細胞 1 が免疫後 3 標本に認められた。

形質細胞

歯肉上皮では、免疫前、免疫後とも形質細胞は認められなかった。歯肉上皮直下結合組織では、免疫前、免疫後とも 0～2 の範囲でわずかに認められた。

リンパ球

歯肉上皮では、免疫前、免疫後ともリンパ球は認められなかった。歯肉上皮直下結合組織では、免疫前、免疫

後とも 0～9 の範囲で認められた。

歯肉結合組織微細血管の拡張

歯肉微細血管の拡張を歯肉溝上皮及び付着上皮別に観察すると、免疫前には歯肉上皮直下結合組織に(±)が 3 標本 (10%), (+) が 6 標本 (20%) に認められたが、他はいずれも歯肉微細血管の拡張は認められなかった。免疫後、付着上皮直下結合組織に(±)が 1 標本 (3.3%), (+) は歯肉溝上皮直下結合組織に 3 標本 (10%), 付着上皮直下結合組織に 1 標本 (3.3%) 認められたが、他は認められなかった。

歯肉上皮細胞間腔の拡大

歯肉上皮細胞間腔の拡大を歯肉溝上皮及び付着上皮別に観察したが、免疫前、免疫後、いずれも拡大は認められなかった。

歯肉結合組織線維の破壊

歯肉結合組織線維の破壊を歯肉溝上皮及び付着上皮別に観察したが、免疫前、免疫後ともいずれにおいても破壊は認められなかった。

考 察

著者はすでに、第 1 報¹⁶⁾においてイヌの健康歯肉溝に *A. viscosus* および *F. nucleatum* の菌破壊液を 8 時間連続滴下することにより、歯肉上皮ならびに結合組織中に多形核白血球の浸潤を中心とした初期病変が発生し、しかもその変化は *Fusobacterium* で著明であることを明らかにした。

そこで本研究は、*A. viscosus* より強い病変をもたらすことがはっきりした *F. nucleatum* の菌破壊液で予めイヌを免疫しておき、この免疫犬に同じ菌破壊液を第 1 報と同様、健康歯肉に作用させた場合、組織学的にどのような変化が起こるかを観察した。

免疫操作¹⁸⁻²²⁾により、犬Ⅰでは抗体価が免疫前、沈降反応0、間接赤血球凝集反応4であったものが、免疫後に沈降反応4、間接赤血球凝集反応2048とともに増加した。一方、犬Ⅱでは免疫前、沈降反応0、間接赤血球凝集反応16で、免疫後は沈降反応0、間接赤血球凝集反応512と後者においてのみ抗体価の上昇がややみられた。

細菌性プラクが作用して歯肉局所に多形核白血球を浸潤させる因子としては、1) 菌体成分が直接走化性因子として作用する、2) 菌体成分が歯肉中の補体C3に作用し、補体を活性化する(副経路を介しての補体の活性化)、3) 細菌性抗原と歯肉組織中の抗体が抗原・抗体複合体を形成し、その抗原・抗体複合体が補体C1に作用し、補体を活性化する(古典経路を介しての補体の活性化)など3つの反応が考えられる。本研究で免疫が成立した犬Ⅰでは *F. nucleatum* の菌破壊液滴下により免疫前と比較して歯肉の多形核白血球の浸潤が増加した。一方、免疫後抗体価の上昇が低い犬Ⅱでは歯肉の多形核白血球浸潤の程度は、免疫前後で変らなかった。

歯肉炎の初期変化に関して、免疫反応の役割を考えてみると、卵白アルブミンで予め免疫したサルに再び卵白アルブミンを作用させると、過敏症反応の誘発によってヒトの歯肉炎に類似した病変が発生すること²³⁾や、Kahnbergら²¹⁾のヒトのプラク抽出物で免疫したイヌ、ヒトのプラク抽出物で免疫後、補体を除去したイヌ、非免疫犬の3群にヒトのプラク抽出物を10分間隔で6時間半作用させた実験では、多形核白血球の浸潤の増加と歯肉微細血管の透過性亢進が免疫犬においてみられ、免疫後補体を除去したイヌではこれらの反応が著しく減少した。さらに horseradish peroxidase (HRP) で免疫したイヌと非免疫のイヌでは HRP の投与後、免疫犬の歯肉付着上皮内の多形核白血球数は非免疫犬の6倍、単核球は2倍増加したことも報告されており²⁰⁾、本研究結果はこれら所見とほぼ同じ傾向を示した。そのメカニズムとして過敏症反応Ⅲ型、即ち免疫複合体の形成が補体を活性化し、走化性が生ずると述べている。Gencoら²⁴⁾は、歯肉中に免疫グロブリン、補体が局在することを証明しており、歯周病における抗原・抗体複合体の形成、補体の活性化により血管透過性の亢進や走化性が発生することで、免疫複合体の役割を説明している。

今回、グラム陰性嫌気性菌である *F. nucleatum* を使用したが、Hawleyら^{25,26)}は、同じく *F. nucleatum* の菌破壊液を使用してモルモット補体の消費を検討した結果、*Fusobacterium* は副経路を介しての補体の活性化を

促進することを示した。Snydermanら^{27,28)}は、多形核白血球の走化性因子として、内毒素による補体活性化の可能性を示しており、Wennströmら²⁹⁾は、また多形核白血球の浸潤を起こす因子として、グラム陰性菌の有する内毒素、リポ多糖類をあげ、これが副経路を介して補体を活性化すると考えている。さらに Attsrömら³⁰⁾は、イヌに免疫複合体による補体の活性化を妨げるカラゲニン(carrageenan)を投与したにもかかわらず、プラク蓄積後、歯肉溝内に白血球が浸潤したことは、副経路を介しての補体の活性化によるものと考えている。

他方、ペルオキシダーゼ(peroxidase)の免疫家兎にペルオキシダーゼを歯肉溝に滴下した場合、結合組織内に浸透しにくく、かつ歯肉溝上皮には著しく多形核白血球が浸潤していた。その理由について、McDougall³¹⁾は、歯肉溝上皮の細胞間空隙に形成された抗原・抗体複合体が関与するためと述べている。また Rylanderら²²⁾は、プラク抗原による免疫犬は非免疫犬に比べてプラクの蓄積は同じでも結合組織中の細胞浸潤の広がりや歯肉滲出液量はむしろ少ないことを観察しており、これらの所見は一種の歯-歯肉付着部での防禦反応の現れと解釈している。

また、歯肉滲出液中の免疫グロブリンの濃度は血清中のそれと似ている³²⁾ことから、免疫犬の歯肉滲出液中の抗体量は非免疫のときよりも増加し、歯肉溝中で抗原・抗体反応が促進し、抗原を消費することにより歯肉に対して防禦反応として作用することが考えられる³³⁾。

以上、多形核白血球の走化性をもたらし因子としては種々考えられるが、免疫後、歯肉組織中の多形核白血球数が免疫前と比較して増加した本研究結果から、歯肉に滴下した *F. nucleatum* の菌破壊液の抗原と、免疫操作により増加した歯肉組織中の抗体とで抗原・抗体複合体が形成され、補体系を活性化する古典経路が走化性の要因として成立していることが考えられる。

総括ならびに結論

本研究は、イヌ2頭を用い、まず右側上下顎小白歯部を免疫前の対照側とし、歯石除去後4週間徹底したブラッシングおよび0.2%クロールヘキシジン溶液の噴霧塗布を行い健康歯肉を確立したのち、第1報と同様に、*F. nucleatum* の菌破壊液を歯肉溝入口に静置した濾紙片を介して、10分間隔で8時間連続滴下した。その後、イヌを *F. nucleatum* の菌破壊液で免疫し、抗体価の上

昇を確認した時点で、対照側と同様に *F. nucleatum* の菌破壊液を滴下した。対照側、実験側とも滴下終了後、滴下部の頬側歯肉辺縁中央部から歯肉片を採取し、歯肉の変化を病理組織学的に検索した。観察部位は、歯肉上皮で1)歯肉溝上皮と2)付着上皮の2カ所とこれら上皮直下結合組織2カ所の合計4部位について、一定面積当りの(1)多形核白血球、(2)マクロファージ、(3)肥満細胞、(4)形質細胞、(5)リンパ球の各細胞数、(6)歯肉上皮直下結合組織にみられる微細血管の拡張、(7)歯肉上皮細胞間腔の拡大、(8)歯肉上皮直下結合組織線維の破壊、の8項目について行った。

その結果、次のような結論が得られた。

1) 血清中の *F. nucleatum* に対する抗体価は、イヌ2頭のうち1頭(犬I)は、免疫前、沈降反応0、間接赤血球凝集反応4であったのが、免疫後には、沈降反応4、間接赤血球凝集反応2048と増加したが、もう1頭(犬II)は、免疫前、沈降反応0、間接赤血球凝集反応16で、免疫後、沈降反応0、間接赤血球凝集反応512と抗体価の上昇は少なかった。

2) 免疫後、*F. nucleatum* の菌破壊液に対する抗体価が上昇した犬Iで、同じ菌破壊液を作用させた場合、歯肉組織の多形核白血球は増加の傾向が認められ、抗体価の上昇が少なかった犬IIでは、免疫前後における歯肉組織の多形核白血球の浸潤に大きな変化が認められなかった。

3) 2頭とも、マクロファージ、肥満細胞、形質細胞、リンパ球の各細胞数、歯肉微細血管の拡張、歯肉上皮細胞間腔の拡大、歯肉結合組織線維の破壊については、免疫前後における変化は認められなかった。

以上、多形核白血球の走化性をもたらし因子としては種々考えられるが、免疫後、歯肉組織中の多形核白血球数が免疫前と比較して増加した本研究結果から、歯肉に滴下した *F. nucleatum* の菌破壊液の抗原と、免疫操作により増加した歯肉組織中の抗体とで抗原・抗体複合体が形成され、補体系を活性化する古典経路が走化性の要因として成立していることが考えられる。

謝辞：稿を終わるにあたり、終始御懇篤なる御指導と御校閲を賜りました原 耕二教授に心から感謝申し上げます。また本研究の遂行に際し、懇切丁寧な御教示ならびに御助力を賜りました新潟大学歯学部口腔病理学教室石木哲夫教授に深謝いたします。また本研究の実施に当り終始多大な御援助をいただいた本学歯科保存学第2教室の吉江弘正博士ならびに茂手木義男大学院生に心から感謝するとともに、同教室員一同に厚く御礼申

上げます。

なお、本研究で使用した *Fusobacterium* は本学口腔細菌学教室から提供していただきましたことを付記いたします。

本研究の一部は、昭和54年度文部省科学研究費奨励研究A課題番号477803の補助で行われたことを付記する。

文 献

- 1) Løe, H., Theilade, E. and Jensen, S.B. : Experimental gingivitis in man. J. Periodontol., 36 : 177-187, 1965.
- 2) Theilade, E., Wright, W. H., Jensen, S.B. and Løe, H. : Experimental gingivitis in man II. A longitudinal clinical and bacteriological investigation. J. Periodont. Res., 1 : 1-13, 1966.
- 3) Løe, H., Theilade, E., Jensen, S.B. and Shiött, C.R. : Experimental gingivitis in man III. The influence of antibiotics on gingival plaque development. J. Periodont. Res., 2 : 282-289, 1967.
- 4) Socransky, S.S. : Relationship of bacteria to the etiology of periodontal disease. J. Dent. Res., 49 : 203-222, 1970.
- 5) Kelstrup, J. and Theilade, E. : Microbes and periodontal disease. J. Clin. Periodontol., 1 : 15-35, 1974.
- 6) Nisengard, R.J. and Beutner, E.H. : Immunologic studies of periodontal disease V. IgG type antibodies and skin test responses to Actinomyces and mixed oral flora. J. Periodontol., 41 : 149-152, 1970.
- 7) Mackler, B.F., Faner, R.M., Schur, P., Wright, III T. E. and Levy, B. M. : IgG subclasses in human periodontal disease II. Cytophilic and membrane IgG subclass immunoglobulins. J. Periodont. Res., 13 : 433-444, 1978.
- 8) Norman, M. E., Baehni, P.C., Tsai, C.-C., Stoller, N., McArthur, W.P. and Taichman, N.S. : Studies of host responses during experimental gingivitis in humans II. Changes in acute phase reactants, serum immunoglobulins and complement during the development of gingival inflammation. J. Periodont. Res., 14 : 361-369, 1979.

- 9) Gross, A., Setterstrom, J. A., D'Alessandro, S. M. and Van Swol, R. L. : Immunoglobulins in periodontal tissues I. Concentrations of immunoglobulins in normal and inflamed gingiva. *J. Periodontol.*, 50 : 581-585, 1979.
- 10) Ivanyi, L. and Lehner, T. : Stimulation of lymphocyte transformation by bacterial antigens in patients with periodontal disease. *Archs. Oral Biol.*, 15 : 1089-1096, 1970.
- 11) Smith, F.N., Lang, N.P. and L, H.A. : Cell mediated immune responses to plaque antigens during experimental gingivitis in man. *J. Periodont. Res.*, 13 : 232-239, 1978.
- 12) Church, H. and Dolby, A.E. : The effect of age on the cellular immune response to dento-gingival plaque extract. *J. Periodont. Res.*, 13 : 120-126, 1978.
- 13) Patters, M. R., Sedransk, N. and Genco, R.J. : The lymphoproliferative response during human experimental gingivitis. *J. Periodont. Res.*, 14 : 269-278, 1979.
- 14) 吉江弘正 : 口腔常在菌の免疫調節機構 への影響 I. 抗体産生の増強効果について. *日歯周誌*, 21 : 134-145, 1979.
- 15) 吉江弘正 : 口腔常在菌の免疫調節機構 への影響 II. 抗体産生増強の作用機作について. *日歯周誌*, 22 : 175-186, 1980.
- 16) 山岸 茂 : 菌破壊液滴下により発生したイヌの初期歯肉炎について—主として病理組織学的観察を中心として—. *日歯周誌*, 23 : 71-85, 1981.
- 17) 医科学研究所学友会編 : 細菌学実習提要, 丸善株式会社, 東京, 1976, 239—242 頁, 250-253 頁.
- 18) 宮野 哲 : *Fusobacterium* の免疫学的研究 とくに歯周疾患との関連性について. *歯科医学*, 40 : 487-502, 1977.
- 19) Ahlstedt, S. and Rylander, H. : Immunoradiometric assay for quantification of serum antibodies to dental plaque antigen in immunized dogs. *J. Periodont. Res.*, 10 : 224-229, 1975.
- 20) Kahnberg, K.-E., Morgan, P. and Lindhe, J. : The cellular response to topically applied horseradish peroxidase in the gingiva of normal and immunized dogs. *J. Periodont. Res.*, 13 : 46-59, 1978.
- 21) Kahnberg, K.-E., Lindhe, J. and Attstrm, R. : The effect of de complementation by carrageenan on experimental initial gingivitis in hyperimmune dogs. *J. Periodont. Res.*, 12 : 479-490, 1977.
- 22) Rylander, H., Lindhe, J. and Ahlstedt, S. : Experimental gingivitis in immunized dogs. *J. Periodont. Res.*, 11 : 339-348, 1976.
- 23) Ranney, R. R. and Zander, H.A. : Allergic periodontal disease in sensitized squirrel monkeys. *J. Periodontol.*, 41 : 12-21, 1970.
- 24) Genco, R. J., Mashimo, P. A., Krygier, G. and Ellison, S. A. : Antibody-mediated effects on the periodontium. *J. Periodontol.*, 45 : 330-337, 1974.
- 25) Hawley, C. E. and Falkler, W.A. : The anticomplementary activity of lipopolysaccharide preparations and sonicates from a strain of fusobacterium nucleatum. *J. Periodont. Res.*, 13 : 24-36, 1978.
- 26) Hawley, C. E. and Falkler, W.A. : The effect of divalent cation chelators and magnesium on activation of the alternative complement pathway by *Fusobacterium polymorphum* (nucleatum). *J. Periodont. Res.*, 14 : 390-396, 1979.
- 27) Snyderman, R., Gewurz, H. and Mergenhagen, S.E. : Interactions of the complement system with endotoxic lipopolysaccharide. *J. Exp. Med.*, 128 : 259-275, 1968.
- 28) Snyderman, R. : Role for endotoxin and complement in periodontal tissue destruction. *J. Dent. Res.*, 51 : 356-361, 1972.
- 29) Wennstrm, J., Heijl, L., Lindhe, J. and Socransky, S. : Migration of gingival leukocytes mediated by plaque bacteria. *J. Periodont. Res.*, 15 : 363-372, 1980.
- 30) Attstrm, R. and Larsson, U. : Effect of de complementation by carrageenan on the emigration of neutrophils and monocytes into dog gingival crevices. *J. Periodont. Res.*, 9 : 165-175, 1974.
- 31) McDougall, W.A. : The effect of topical antigen on the gingiva of sensitized rabbits. *J. Periodont. Res.*, 9 : 153-164, 1974.

- 32) Holmberg, K. and Killander, J. : Quantitative determination of immunoglobuline (IgG, IgA and IgM) and identification of IgA-type in the gingival fluid. J. Periodont. Res., 6 : 1-8, 1971.
- 33) Shillitoe, E. J. and Lehner, T. : Immunoglobulins and complement in crevicular fluid, serum and saliva in man. Archs. Oral Biol., 17 : 241-247, 1972.
-