歯周疾患と抵抗因子・第1編, 歯周ポケットにおける抗菌因子の免疫病理学的観察

竹内 宏 金久 純也 堀 泰典

上田 雅俊* 今井 久夫*

岐阜歯科大学口腔病理学講座

(主任:寺崎太郎教授)

*大阪歯科大学歯周病学講座

(主任:山岡 昭教授)

(昭和56年9月19日受付)

Periodoal Disease and Resistance Factor, I, Immunopathological Study for Detection of Antibiotic Factors in the Pocket Fluid

Hiroshi TAKEUCHI, Junya KANEHISA, Yasunori HORI

Masatoshi UEDA* and Hisao IMAI*

Department of Oral Pathology, Gifu College of Dentistry

(Director: Prof. Taro TERASAKI)

Department of Periodontology, Osaka Dental University

(Director: Akira YAMAOKA)

This study was made to clarify the existence of antibiotic factors to oral bacteria in the gingival pocket fluid of individuals with periodontal disease by using fluorescent antibody techniques. Fluorescein-labeled antisera were obtained from human oral bacteria, Clq, C3, properdin, IgG, IgA, IgM, IgD, IgE, Fab, fibrinogen, and serious frozen sections were stained by them.

The results were as follows:

- 1) Each substance was detected in the bacterial mass as showing Table 1 and Fig. 1.
- 2) IgG, IgA, Fab, and fibrinogen were demon-

strated most frequently as Fig. 3.

From above results, we arrived at following conclusions:

- 1) Main defensive system to the oral bacteria in the gingival pocket were immunoglobulins and activated complement system.
- 2) The complement was the alternative pathway in addition to classical pathway.
- 3) We were suggested that both complement systems raised to activity of phagocytosis, and finally caused to bacterial lysis in the gingival pocket.

緒 言

ヒトは、ヒトに常在する各種微生物と共生関係を形成

している。その代表的な部位は口腔、腸管、上気道粘膜、女性の外生殖器および皮膚であるが、微生物に生息の場を与えつつもヒトに感染症が成立しないのは、主として生体側の常在微生物に対する侵襲阻止能に起因する

ものである。

このような阻止能の中心をなすものは、自然免疫と獲得免疫の両免疫機構である。口腔の最も代表的な常在菌定着部は歯肉溝であり、ここには、嫌気性菌を主とする各種細菌群が生息し、歯肉内縁上皮を介して歯肉および歯肉以外の歯周組織と対峙している。そもそも、歯肉内縁上皮自体が他の被蓋上皮と同様に外来侵襲物に対して阻止能を有することから、自然免疫機構の重要なものの1つである。秋吉(1977)¹⁾あるいは二階ら(1980)²⁾は、内縁上皮を構成する上皮細胞がライソゾーム酵素を有し、かつ、異物の食能を發揮することをみだし、有力な細菌阻止を行い得ることを報告している。しかし、ある年齢に達すると、すべてのヒトの歯肉には病理組織学的なレベルにおける炎症反応が展開されているのは周知の事実である。このことは、内縁上皮に細菌阻止能が備わっているものの、細菌による起炎刺激が内縁上皮下に到達していることを示すものである。そして、このような炎症反応が拡大せぬままに経過する場合と、臨床レベルにまで進展し、歯周組織の傷害を伴う場合とに分かれる。この両経過を左右する因子には、歯周炎の原因として掲げられている多くの原因が考えられるが、自然免疫および獲得免疫もまたこのような因子の重要なものの1つをなすことは明らかである。しかし今日、歯周疾患における免疫機構に関しては、過敏反応のごとく、傷害因子としてよく研究されているものの、本来の免疫すなわち“疫を免がれる”という面からの考究は極めて少ないのが現状である。

そこで今回、狭義の免疫機構が歯周疾患にどのような形で関与しているのかを明らかにする一助として、歯周ポケットに生息する細菌に対して如何なる抗菌因子が作用しているのかを免疫病理学的に検索し、若干の知見を得たので報告する。

実験材料と実験方法

歯周ポケットにおける抗菌因子を顕微鏡的に観察することは極めて困難であるが、多くの場合、同部における抗菌因子はそこに生息する細菌をコートしている。今回、この点に着目し、切除歯肉に付着してきた細菌に、如何なる抗菌因子がコートしているかを蛍光抗体法によって精査した。

1. 実験材料

a. 被験材料

被験材料は、大阪歯科大学歯周病学講座を来院し、辺縁性歯周炎と診断され、initial preparation の後、なお症状の軽減しない患者の切除歯肉 50 例である。これらはいずれも切除後即座にフロンガスで凍結し、4~6 μ の連続切片とし、95% 冷エタノールで 10 分間固定して各種染色に供した。

b. 染色材料

染色方法はすべて蛍光抗体法であって、用いた蛍光標識抗血清は、抗ヒト口腔細菌家兔抗血清、抗ヒト C1q 山羊抗血清、抗ヒト C3 山羊抗血清、抗ヒト properdin 山羊抗血清、抗ヒト IgG 山羊抗血清、抗ヒト IgA 山羊抗血清、抗ヒト IgM 山羊抗血清、抗ヒト IgD 山羊抗血清、抗ヒト IgE 山羊抗血清、抗ヒト Fab 山羊抗血清、抗ヒト fibrinogen 山羊抗血清の 11 種類で、抗ヒト口腔細菌抗血清以外は Miles 社製のものを使用した。

2. 実験方法

観察に際して、各症例を先ず蛍光標識抗ヒト口腔細菌家兔抗血清で染色し、切除歯肉の内縁上皮付近に口腔細菌が付着しているか否かを調べ、これを認め得た症例のみ、連続切片を用いて各種蛍光抗体染色を施した。

なお、各蛍光抗体染色はすべて室温下で行い、overnight 反応させた。また、蛍光陽性所見の量的判定は、付着した細菌全域に蛍光を認めたものを卍、細菌塊の 1/2 程度に蛍光を認めたものを卐、1/3 程度のものを+とした。

実験結果

各蛍光陽性所見は表 1 に示すごとくである。すなわち、付着した口腔細菌を認めたのは 50 例中 41 例で、この 41 例について各抗菌因子の分布をみると、C1q は 38 例、C3 は 26 例、properdin は 29 例、IgG は 39 例、IgA は 41 例、IgM は 37 例、IgD は 28 例、IgE は 29 例、Fab は 40 例、fibrinogen は 40 例においてそれぞれ検出された。このような蛍光陽性所見の 1 例を示したのが図 1 で、これをみると分かるように、細菌に抗菌因子がコートしている例において、その浸出経路を明確に把握される例、すなわち付近の歯肉組織に同因子が滲出している例と、組織にほとんどこれを見ることなく、細菌にコートした状況でのみ把握得る例があった。前者の例は、各免疫グロブリン、Fab、fibrinogen に多く、後者の例は

表 1 各抗菌物質の検出頻度

[illegible]

図 1 連続切片上における抗菌物質の 1 例

A : 細菌をコートした Fab, 付近の組織間隙にも Fab を誌める (卅)。

B : 同症例の C1q (卅)。A, B とも倍率は $\times 200$ 。

properdin に往々認められる傾向にあった。しかし、この傾向は画一的ではなく、例外も少なくなかった。

細菌にコートした状態の抗菌因子を量的に判定すると、図 2 に示すごとく、卅を呈したものは Fab と fibrinogen が最も多く、続いて IgG, C1q, IgA で C3,

properdin, IgD, IgE は極めて少数例であった。また、卅は C3, properdin, IgD を除けば、いずれも類似の陽性数を示し、+ はすべてにわたってほぼ同等の蛍光陽性例数を示した。

図 2 歯周ポケットの細菌をコートする各抗菌因子の量的関係

考 察

感染に対する生体側の防御機構には、自然免疫と獲得免疫の2つの系統がある。自然免疫に包含されるべきものとしては、皮膚・粘膜上皮のごとき解剖学的防御壁、自然抗体、非抗体性の補体, properdin, リゾチーム, β -リジン, インターフェロンなどがある。また、獲得免疫には、特異抗体や特異的なリンホカインがある。

歯周組織においても、これらの感染防御機構が機能していることはいうまでもないが、歯周疾患の防御という面からみると、生体は先ず、歯肉溝における口腔細菌の増殖や組織内侵襲を阻止する必要がある。この目的のために位置する内縁上皮は、他の上皮と異なって極めて特殊な性状を有している。すなわち、本上皮はほとんど角化層がなく、かつ菲薄であり、種々の刺激に対して反応性に増殖するものの、根面に沿っていわゆる深行増殖をなし、剝離して深い歯周ポケットを形成する。この歯周ポケットの形成が、より一層、口腔細菌の増殖の場を提供していることは周知の事実ですらある。これらのみをとってあげて考究する限りにおいては、内縁上皮は自然免疫としての機能をほとんど果し得ないもののごとき感を与える。また、Schwartz, J. ら (1972)³⁾の説くごとく、endotoxin が inact な内縁上皮を通過し得るということになればなおさらこの感が強い。しかし、この上皮通過性の大なることを逆に目的論的にみれば、内縁上皮を介して種々の抗菌因子が容易に歯周ポケットに到達し得ることにもなり、今回の実験のごとく、顕微鏡的に細菌をコートした因子を認め得たことは、これを裏付けるものである。

抗菌因子の作用機序はそれぞれにおいて異なり、また、不明なる点も多いが、例外を除けば、大部分のものは互いに協調して機能していることは明らかである。今回、明らかにし得たのは、体液性抗体と補体およびこれに随伴する抗菌因子が歯周ポケットで作用していることである。体液性抗体には自然免疫に属する自然抗体と、獲得免疫に属する特異抗体とがあるが、その主たる作用は、抗体単独で発揮するよりも、補体系および食食系との共同の下で発揮することが多く、かつ強力である。この場合、抗体としては IgG や IgM が中心となり、補体系は classical pathway で活性化され、これらに機縁付けられて好中球が強い食食能を展開する。歯周ポケットの細菌をコートするごとく、IgG や IgM のごとき抗体とともに、C1q や C3 のごとき補体を検出し得たことはこの機構の存在を証明するものである。また、classical pathway はさらに進行すると、溶菌作用をも発揮することが知られている。この点に関して、近年、Inoue, K. ら (1968)⁴⁾ はコレラ菌を用いて、同抗原と抗原抗体反応を起こした後に補体が結合し活性化されると、先ず細菌の増殖が抑えられ、続いてリゾチームによって溶菌が生じるとしている。この際に、補体は増殖能を抑制し、C5b, 6, 7, 8, 9 が細菌に瘻孔を形成するとともに、白血球にリゾチームを放出させ、そのリゾチームが瘻孔より入り込んで細菌膜のムコ多糖を分解するとみなされている。歯周ポケットにおいて、C5b, 6, 7, 8, 9 が形成されるか否かは現在のところ不明であるが、Attström, R. ら (1975)⁵⁾ は, electroimmuno assay によって、歯周ポケットから C3, C4, C5, C3 proactivator を検出していることを考え合わせるとその可能性は大である。

このように、補体を介する抗菌作用には重要なものがあるが、これにはどうやら alternative pathway も関与していることがうかがわれる。それは、properdin が細菌をコートしていることが1つの証拠立てである。Minta, J.O. and Lepow, I.H. (1974)⁶⁾ が述べるごとく, properdin は 45,000~50,000 の分子量を有する4つのサブユニットから成る血清タンパクで, alternative pathway において, C3b, Bb に結合し, C3b, Bb, P となって C3b, Bb を安定化させる重要な物質である。alternative pathway の activator には, このほかに, IgG, IgD, IgE のごとき免疫グロブリン, endotoxin のリポ多糖などがある。これらの activator は歯周ポケットにも存在するところから, alternative pathway が抗菌作用を発揮する可能性はさらに濃厚である。

また, IgA も往々歯周ポケットの細菌をコートしている。IgA は他の免疫グロブリンとは異なり, 単独で機能して, 増殖抑制や破壊に関与するよりもむしろ, 細菌をコートして上皮との付着性を阻止し, ひいては細菌の組織内への侵襲を妨げているとみる方が妥当性が高い。この点に関しては, William, R.C. and Gibbons, R.J. (1972)⁷⁾ は, 耳下腺の分泌型 IgA が, 各種連鎖球菌に対して粘膜付着阻止能を有していることを報じ, また, Fubara, E.S. and Freter, R. (1973)⁸⁾ は, 腸管における分泌型 IgA がコレラ菌をコートし, 腸粘膜への付着を阻止することによって感染を防御すると述べている。

最後に, 歯周ポケットに生息する細菌群が, 頻度高く Fab にコートされているという今回の実験結果は, 上記のごとき免疫グロブリンを初発とする各種抗菌作用をより一層明確にするものと考えられる。

結 論

1. 歯周ポケットにおける抗菌因子を究明することを目的として, 内縁上皮に付着した口腔細菌をコートしつつある抗菌物質を蛍光抗体法で検出した。
2. その結果, Clq, C3, properdin, IgG, IgA, IgM, IgD, IgE, Fab, fibrinogen を観察し得た。
3. このうち, IgG, IgA, Fab, fibrinogen の検出頻度が高く, いずれもほぼ全例に認めることができた。
4. 今回の実験結果から, 歯周ポケットの抗菌因子は, 主として免疫グロブリンと補体の協同作用で行わ

れ, 貪食細胞の走化性亢進と貪食能の強化(オプソニン), 補体による溶菌作用の2つの機作が要をなしていると考えられた。

5. 補体の活性化に際しては, classical pathway はもとより, properdin, IgD, IgE の存在から推して, alternative pathway も関連するとみられた。

6. IgA も頻度高く検出し得たが, 本抗体は先人達の報告から, 歯周ポケットにおいても細菌の上皮付着性を阻止しているとみなし得た。

7. なお, 免疫グロブリンがこれら抗菌作用の出発点になることは, Fab が極めて頻度高く細菌をコートしている所見から想起したものである。

文 献

- 1) 秋吉正豊：歯周疾患の臨床病理学：歯界展望，別刷：19-41，1977。
- 2) 二階宏昌：付着上皮の超微所見からみた防御と破壊のメカニズム，歯界展望，55：867-871，1980。
- 3) Schwartz, J., Stinson, F.L. and Parker, R.B. : The passage of tritiated bacterial endotoxin across intact gingival crevicular epithelium. J. Periodontol., 43 : 270-276, 1972.
- 4) Inoue, K., Yonemasu, K., Takamizawa, A. et al : Studies on the immune bacteriolysis XIV. Requirement of all nine components of complement for immune bacteriolysis. Biken J., 11 : 203-206, 1968.
- 5) Attsröm, R., Laurel, A., Lahsson, U. et al : Complement factors in gingival crevice material from healthy and inflamed gingiva in humans. J. Periodont. Res., 10 : 19-27, 1975.
- 6) Minta, J.O. and Lepow, I.H. : Studies on the subunit structure of human properdin. Immunochimistry, 11 : 361-368, 1974.
- 7) William, R.C. and Gibbons, R.J. : Inhibition of bacterial adherence by secretory immunoglobulin A : A mechanism of antigen disposal. Science, 177 : 697-699, 1972.
- 8) Fubara, E.S. and Freter, R. : Protection against enteric bacterial infection by secretory IgA antibodies. J. Immunol., 111 : 395-403, 1973.