実験的歯肉炎における線維芽細胞の動態と コラーゲン線維の消長について

小 原 三 和 矢 嶋 俊 彦* 久米川 正 好* 池 田 克 巳

城西歯科大学歯周病学講座

(主任：池田克巳教授)

*城西歯科大学口腔解剖学第1講座

(主任：久米川正好教授)

(昭和56年9月20日受付)

Ultrastructural studies on the gingival connective tissues of experimental gingivitis

Miwa OHARA, Toshihiko YAJIMA*,
Masayoshi KUMEGAWA* and Katsumi IKEDA

Department of Periodontology, Josai Dental University

(Chief : Prof. Katsumi IKEDA)

*Department of Oral Anatomy, Josai Dental University

(Chief : Prof. Masayoshi KUMEGAWA)

This histological study was undertaken on the gingival connective tissue in experimental gingivitis. Gin-pack (#2) was ligated around $\frac{3}{13}$ tooth neck from 0 to 9 days in an adult male *Macaca irus* monkey that was given soft food and water.

Gingival biopsy specimens were taken before (13) and after (13) the experimental period. They were studied at light microscopic and ultrastructural levels. The following results were obtained :

1) 13 (control gingiva) : There was no evidence of inflammatory changes. Typical half desmosomes were viewed between the epithelium and the basal lamina. In the connective tissue, active fibroblasts were found with a high collagen content.

2) 13 (inflammatory gingiva) : The tissue was vas-

cularized and poor in collagen. A variety of inflammatory cells were found. Sometimes many lymphocytes were found in close contact with fibroblasts.

3) Fibroblastic phagocytosis of collagen was observed.

4) Phagocytosed collagen fibrils in an electron-dense matrix were enclosed by unit membrane. The unit membranes were closely associated with and fused to several lysosomal dense bodies. Also collagen fibrils were seen interiorized in phago-lysosomes and residual bodies.

5) Since FLS-like structure was not observed extracellularly, the loss of collagen fibrils may be due to fibroblastic phagocytosis.

元来、付着上皮は歯肉上皮とは異なり明確な barrier が認められないことから、歯と歯肉の付着部は口腔内微生物による有害な産生物の侵入経路となりやすい。そ

してそれらは上皮の細胞間基質を分解しながら細胞間隙をひろげ、さらに有害な物質の結合組織内への浸透を容易にする。その結果、結合組織が炎症性反応の主要な場となっていくことは周知のとおりである。したがって歯周疾患の病理組織学的検索では、結合組織を構成する線

本研究の要旨は、第23回春季日本歯周病学会総会(昭和56年5月)で発表した。

図 1 臨床的に健康な歯肉 (3)。

図 2 実験開始後 9 日目。3 歯肉に軽度な発赤腫脹が認められる。

維芽細胞とコラーゲン線維の動態は重要であり、それは炎症性細胞と密接な相互作用を有している。

歯肉炎に関するヒトを対象とする臨床的研究および試験を用いた実験的研究は、形態学的²⁻⁸⁾および生化学的⁹⁻¹¹⁾に多数行なわれてきている。しかし歯肉結合組織における微細構造学的研究は少なく^{12,13)}、とくに結合組織における炎症の展開については、まだ微細構造学的・組織細胞化学的に十分にはとらえられていない。そこで私たちは実験的にサルに歯肉炎を惹起させ、とくに初期の炎症時における歯肉結合組織の病態像—コラーゲン線維と線維芽細胞の動態—を光学顕微鏡および電子顕微鏡を用いて検索した。

I. 実験材料と方法

1. 実験動物

全身の所見、口腔内所見とともにくに異常のないカンタイザル (♂ 体重 6 kg) を用い、恒温恒湿 (28°C ± 1°C, 50~60%) の条件下で自由飲水 (水道水) およびソフトフード (日本クレア社製粉末飼料を水で泥状にした) を与えて飼育した。なお、飼育は本学中央実験動物センターで行なった。

2. 実験的歯肉炎

14 日間の準備期間をもうけた。すなわち毎日 1 回ブラッシングを行ない、硬いサル用固型飼料 (日本クレア社製)、レモン、リングおよび自由飲水で 14 日間飼育し臨床的健康歯肉とした。その後ケタラル 50 (三共株式会社, 0.3 ml/kg) の筋注による全身麻酔下で $\frac{3}{13}$ の歯肉溝にジンパック (井上アタッチメント) NO. 2 を挿

入 (1 回巻き) し結紮した^{4,14)}。なお 3 を無処置対照とした (図 1)。

実験期間は 9 日間とし、3 日目に 3 歯肉 (歯肉辺縁に軽度な歯肉炎を認めた。頬側および舌側での歯周ポケットの深さは 2 mm) および 9 日目 3 歯肉 (歯肉辺縁に軽度ないし中等度の歯肉炎を認めた (図 2)。頬側および舌側での歯周ポケットの深さは 3 mm) をそれぞれ歯肉切除法¹⁵⁾に準じて頬側歯肉を採取した。

3. 観察の方法

上記の方法によって採取された歯肉はただちに冷生理食塩水中で洗い、可及的に付着血液を除去後、0.1 M cacodylate buffer (pH 7.4) で緩衝した 2.5% glutaraldehyde で 3 時間固定した。その後、上記緩衝液で洗浄し 1% OsO₄ で 2 時間後固定を行なった後、エタノール系列で脱水、propylene oxide を経て通法にしたがい Epon 812 に包埋した。厚切り切片 (1~2 μm) は toluidin blue (pH 7.0) 染色をほどこし光顕で観察し、病理組織学的検索を行なった。同部位の超薄切片を作り酢酸ウラニール—クエン酸鉛で二重染色、および PTA 染色を施し、日本電子 JEOL 100B, 100CX 型電子顕微鏡で観察し、微細構造学的検索を行なった。

II. 実験成績

1. 対照歯肉 (正常歯肉組織)

a. 光学顕微鏡所見

臨床的に健康な 3 歯肉 (図 3 a) では歯肉上皮、歯肉溝および付着上皮はいずれも正常構造を示した。またこれらの上皮および上皮結合組織にも炎症性細胞の浸潤

図 3 a 対照の歯肉 (3)。

図 3 b 図 3 a の枠内拡大像。炎症性の細胞浸潤は認められない。線維芽細胞に沿ってコラーゲン線維が密に走行している。
GSE: 歯肉溝上皮 JE: 付着上皮

図 4 a 実験開始後 3 日目の歯肉 (3)。増殖した歯周ポケット上皮下に軽度の炎症性細胞の浸潤が認められる。

図 4 b 図 4 a の枠内拡大像。細静脈の拡張とその周辺に軽度の炎症性細胞の浸潤が認められる。
PE: 歯周ポケット上皮 V: 細静脈

図 5a 実験開始後9日目の歯肉(13)。炎症性結合組織は歯周ポケット側の半分を占め細静脈が著明に拡張している。

図 5b 図 5a の枠内拡大像。拡張した細静脈の周辺に炎症性細胞の浸潤が認められる。
GE : 歯肉上皮 V : 細静脈

図 6 13 歯肉上皮および上皮下結合組織。密に配列したコラーゲン原線維に囲まれた細胞小器官のよく発達した線維芽細胞。上皮下には明瞭な basal lamina が存在する。
BL : basal lamina F : 線維芽細胞
GE : 歯肉上皮 HD : half desmosome

は認められなかった。また、付着上皮は薄く、細胞間隙も顕著でなかった。コラーゲン線維束の配列も規則的で緻密であり、それらの線維束間には線維芽細胞が観察された(図3b)。

b. 電子顕微鏡所見

歯肉および付着上皮結合組織では粗面小胞体、ゴルジ装置などの細胞小器官のよく発達した線維芽細胞が観察され、その周囲は密で平行に配列したコラーゲン原線維で占められ、無定形物質はほとんど認められなかった。上皮下には basal lamina が明瞭に観察され、上皮細胞は half desmosome を形成していた(図6)。

結合組織中央部においては上皮下結合組織と同様、小器官が比較的よく発達した線維芽細胞が認められ、コラーゲン原線維の消失や炎症性細胞などは認められなかった(図7a)。これらの部位の線維芽細胞には貪食された細胞内コラーゲン原線維が時に認められたが、その出現頻度は非常に低かった。密なコラーゲン原線維間には、ところどころ弾性線維の micro fibril の集合が観察された(図7b)。

図 7a [3 歯肉結合組織中央部。小器官の発達した線維芽細胞と密に配列したコラーゲン原線維。
C : コラーゲン原線維 F : 線維芽細胞

図 7b [3 歯肉結合組織中央部。密なコラーゲン原線維間に認められた弾性線維の micro fibril の集合。
C : コラーゲン原線維 F : 線維芽細胞
MF : micro fibril

2. 実験開始後 3 日目

ジンパック挿入 3 日で歯周ポケット上皮の増殖と、上皮下に軽度な炎症性細胞の浸潤および細静脈の拡張を認めた (図 4 a, 4 b)。しかし歯肉上皮および上皮下結合組織はほぼ正常構造を示していた。

3. 実験開始後 9 日目

a. 光学顕微鏡所見

歯肉にジンパックを挿入した 9 日目の歯肉では、臨床的に歯肉辺縁に軽度ないし中等度の炎症症状が明らかに認められ、歯周ポケットは頬側および舌側で深さ 3 mm であった。

初期炎症像として、ポケット上皮の根尖への増殖と多層化、炎症性結合組織が歯周ポケット側半分を占め、細静脈に著明な拡張が認められた (図 5 a, 5 b)。しかし歯肉上皮側では細静脈の拡張にもかかわらず、その周辺への炎症性細胞の浸潤は著明ではなかった。歯周ポケット上皮間隙の拡大およびその間隙部には中等度のリンパ球の浸潤が観察された。

b. 電子顕微鏡所見

歯肉上皮側では対照と同様に明瞭な basal lamina が観察され、消失や断裂は認められなかった。また、half desmosome が basal lamina との間に形成されていた。

歯肉上皮下結合組織の線維芽細胞は比較的良好に発達した細胞小器官を持ち、細胞周囲でのコラーゲン原線維の消失もほとんど認められなかった。ときに線維芽細胞同志や mast cell の近接、集合が観察されたが、それらの細胞間には特別な結合構造は認められなかった (図 8)。

歯周ポケット側結合組織は炎症性組織であり、細静脈周辺では浸潤したリンパ球および好中球と線維芽細胞との近接、集合が観察された (図 9)。また一部の線維芽細胞には限界膜で囲まれた細胞内コラーゲン原線維一食された一が存在が認められた。これらの線維芽細胞周囲では、コラーゲン原線維の走向の乱れや消失が観察され消失部位は無定形物質で占められていた (図 10 a, 10 b)。また、一次 lysosome 様な電子密度の高い物質で囲まれたコラーゲン原線維 (図 11) や、コラーゲン原線維の横紋が逐次消失し、phagosome 全体が dense となったものなどが観察された (図 12)。

他方、炎症が局所的に強い部では、歯周ポケット上皮の配列は乱れ、上皮細胞の変性やまた basal lamina の上皮細胞からの剝離やその断裂および消失が観察された (図 13)。これらの上皮下では線維芽細胞の変性や細胞片が認められた (図 14)。

図 8 3 歯肉上皮 および 上皮下結合組織。mast cell と線維芽細胞との interaction に注目。
BL : basal lamina CP : 毛細血管
F : 線維芽細胞 M : mast cell

図 9 3 歯肉の歯周ポケット側結合組織。細静脈周辺で認められたリンパ球，線維芽細胞および好中球の集合。
F : 線維芽細胞 L : リンパ球
Neu : 好中球 V : 細静脈

図 10 a コラーゲン原線維をとり込んだ線維芽細胞。周囲は無定形物質で占められている(3 歯肉)。
AS : 無定形物質 C : 細胞内コラーゲン原線維 F : 線維芽細胞

図 10 b 図 10 a の枠内拡大像。限界膜で囲まれた細胞内コラーゲン原線維。
C : 細胞内コラーゲン原線維 RER : 粗面小胞体 矢印 : 限界膜

III. 考 察

結合組織の改造現象で果たすコラーゲンの合成と破壊

の役割は大きい。近年，コラーゲンの合成，分泌を担っている線維芽細胞にコラーゲン線維の貪食能のあることが Pérez-Tamayo (1970)¹⁶⁾ によって明らかにされた。その後 Listgarten (1973)¹⁷⁾，Deporter ら (1973)¹⁸⁾，

図 11 電子密度の高い一次 lysosome 様物質で囲まれた細胞内コラーゲン原線維。
C : 細胞内コラーゲン原線維 Co : 細胞外コラーゲン原線維

図 12 横紋構造が消失し全体が dense になった phagosome (矢印)。
C : 細胞外コラーゲン原線維

Ten Cate ら (1974)¹⁹, Soames ら (1977)²⁰ たちは歯肉および歯周靱帯の線維芽細胞に細胞内コラーゲン原線維の存在を認め、これら結合組織の線維芽細胞に貪食能のあることを明らかにしている。また Ten Cate ら (1974)²¹, Eley ら (1975)²², Frank ら (1977)²³, 南出

図 13 basal lamina の剥離と一部断裂像。
BL : basal lamina PE : 歯周ポケット上皮
矢印 : basal lamina の断裂部

図 14 変性した線維芽細胞と細胞片。
F : 変性線維芽細胞 PE : 歯周ポケット上皮

ら (1980)²⁴ は、コラーゲンの細胞内消化は改築現象の活発に行なわれている結合組織の線維芽細胞で高頻度に観察されたと報告している。本実験では9日目の実験群の軽度から中等度の炎症部位で、炎症性細胞との近接、集合—interaction²⁸—をみない線維芽細胞にコラーゲン原線維の活発なとりこみを観察した。しかし、対照群(正常)では著明には認められなかった。

一方, in vitro では Yajima ら (1977)²⁵⁾, Rose ら (1980)²⁶⁾ はコラーゲン線維が食食されつつあるときまたはその直後では細胞内コラーゲン原線維は限界膜で囲まれた小体内に存在している実態を観察しているが, 私たちも図 10 b で上記のような所見 (TypeA²⁷⁾) を認めている。すなわち, 食食されたコラーゲン線維は先人たちの報告にもあるように, 一次 lysosome 様の dense な基質で囲まれて消化が始まり (TypeB²⁷⁾) (図 11), それ線維の消化とともに横紋構造は消失し, 細胞内消化分解が促進しやがて phagosome 全体が電子密度の高い物質となり (図 12) residual body に至ると思われる結果が得られた。

また本実験では以上のような細胞内消化を受けたコラーゲン線維を多数認めたが, 細胞外基質中にはコラーゲンの細胞外消化と考えられる FLS 様構造を観察することができなかった。つまり, 本実験のような初期の炎症時におけるコラーゲン線維の消失は線維芽細胞の食食によるものと推測される。

また本実験では実験的歯肉炎の初期において細静脈の拡張とそれに伴って炎症性細胞, 特にリンパ球および好中球の浸潤が先行するのを観察し, 炎症性組織内においてはこれらの炎症性細胞と線維芽細胞との interaction を多数認めた (図 8)。このような実験的歯肉炎における炎症性細胞同志又は炎症性細胞と線維芽細胞との interaction についてはすでに多くの研究者によって考察されている^{28,29)}。とくにリンパ球に mediate された細胞性反応を受けると標的細胞—線維芽細胞など—は, その機能に変化が生じることが推測される。

また, Garant ら (1980)³⁰⁾ は, リンパ球と線維芽細胞の interaction が認められる場合は線維芽細胞による active なコラーゲン線維の食食が起こってくることを明らかにしている。私たちは図 8, 9 以外でも実験開始後 9 日の歯肉において線維芽細胞と炎症性細胞の近接, 集合—interaction—を観察している。しかし多くの線維芽細胞ですべてコラーゲン線維の食食を認めたわけではない。これを上記の Garant ら³⁰⁾の実験と比べると, 彼らの実験期間は 2 週から 7 週という比較的長期間であるのに対し, 今回の私たちの実験期間は 9 日間で, 短かったという点で差が現れてきたのではないかと考える。

また一方, 今回の実験では炎症の強かった上皮下結合組織においては線維芽細胞数の減少が認められたり, 変性や cell debris が認められたことから Garant らの所見と多少異なった結果が得られたものと考えられる。

こんごは, 線維芽細胞とリンパ球の interaction など

を中心にコラーゲン線維の細胞内消化について検討を進めて行きたい。

IV. 結 論

カニクイザルの 3 歯肉を対照に $\frac{3}{3}$ 歯肉にジンパック (No. 2) を挿入し, ソフトフードを与えて 3 日間および 9 日間飼育し, 歯肉炎を惹起させた。そして, 歯肉切除の術式に従って歯肉を切除し, 炎症性歯肉の結合組織とくに線維芽細胞とコラーゲン線維の働きを中心に, これを光学顕微鏡および電子顕微鏡で観察を行ない, 以下に示す結論を得た。

1. 炎症性歯肉では細静脈の拡張とその周辺にリンパ球および好中球の浸潤が認められた。そしてリンパ球と線維芽細胞との interaction をとところどころで観察した。

2. 炎症性細胞との interaction を認めない線維芽細胞においては細胞内コラーゲン原線維を認めるものがあった。

3. 細胞内コラーゲン原線維の動態は当初限界膜に囲まれ, それがさらに一次 lysosome 様の電子密度の高い物質に囲まれて行き, 細胞内消化が始まる。ついでコラーゲン原線維の横紋に消失が起こり, やがて phagosome 全体が dense となり residual body に至る。

4. 線維芽細胞内コラーゲン原線維にはコラーゲン細胞外消化と考えられる FLS 様構造は認められなかった。したがって炎症の初期におけるコラーゲン線維の消失は線維芽細胞の食食によるものではないかと考えられる。

文 献

- 1) 秋吉正豊: 歯周ポケットの形成機序. 日歯周誌, 16: 63-66, 1974.
- 2) Listgarten, M.A. and Ellegaard, B.: Experimental gingivitis in the monkey. J. Periodont. Res., 8: 199-214, 1973.
- 3) Kennedy, J.E. and Polson, A.M.: Experimental marginal periodontitis in squirrel monkeys. J. Periodontol., 44: 140-144, 1973.
- 4) 石川 純, 松江一郎, 鈴木文雄: 局所刺激による研究. 日歯槽膿漏誌, 5: 57-65, 1963.
- 5) 山崎 章, 二階宏昌, 伊集院直邦, 仁井谷究, 高田 隆: ラットの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-

- 440, 1979.
- 6) 柴田昌治：実験的に起した慢性辺縁性歯周炎における歯肉上皮の細胞代謝に関する研究。日歯周誌, 12 : 10-18, 1970.
- 7) Schroeder, H.E. : Transmigration of leukocytes in human junctional epithelium. *Helv. Odont. Acta.*, 17 : 6-18, 1973.
- 8) Skougaard, M. : Turnover of the gingival epithelium in marmosets. *Acta. Odont. scand.*, 23 : 623-643, 1965.
- 9) 岩山幸雄, 野村慶雄, 勝谷芳文, 津谷啓治, 石田浩, 喜多治郎, 三木隆雄, 栢豪 洋, 横溝一郎：ヒト病的歯肉結合組織成分に関する研究 I. ヘキソサミンならびにコラーゲン量について。日歯周誌, 17 : 65-70, 1975.
- 10) Ciancio, S.G. and Mather, M.L. : Acid mucopolysaccharides in gingivitis and periodontitis. *J. periodont. Res.*, 6 : 188, 1971.
- 11) Stern, B.T. : Collagen solubility of normal and inflamed human gingiva. *Periodontics.*, 5 : 167, 1967.
- 12) 永井教之：歯齦結合組織の微細構造と改造帰転。歯科学報, 77 : 1233-1247, 1977.
- 13) Garant, P.R. and Cho, M.I. : Histopathogenesis of spontaneous periodontal disease in conventional rats. II. Ultrastructural features of the inflamed subepithelial connective tissue. *J. Periodont. Res.*, 14 : 310-322, 1979.
- 14) 池田直人, 本間 博, 石川 純：蔗糖を含む Soft Food による実験的歯肉炎—カニクイザルでの観察一。日歯周誌, 18 : 20-31, 1976.
- 15) Goldman, H.M., Cohen, D.W. : Gingivectomy. : Periodontal therapy : 658-691, The C.V. Mosby Company, Saint Louis U.S.A., 1968.
- 16) Ruy Pérez-Tamayo, M.D. : Collagen resorption in Carrageenin Granulomas. II. Ultrastructure of collagen resorption. *Lab. Invest.*, 22 : 142-159, 1970.
- 17) Listgarten, M.A. : Intercellular collagen fibrils in the periodontal ligament of the mouse, rat, hamster, guinea pig and rabbit. *J. periodont. Res.*, 8 : 335-342, 1973.
- 18) Deporter, D.A. and Ten Cate, A.R. : Fine structural localization of acid alkaline phosphatase in collagencontaining vesicles of fibroblasts. *J. Anat.*, 114 : 457-461, 1973.
- 19) Ten Cate, A.R. and Deporter, D.A. : The role of the fibroblast in collagen turnover in the functioning periodontal ligament of the mouse. *Archs. oral Biol.*, 19 : 339-430, 1974.
- 20) Soames, J.V. and Davies, R.M. : Intercellular collagen fibrils in early gingivitis in the beagle dog. *J. Periodont. Res.*, 12 : 378-386, 1977.
- 21) Ten Cate, A.R. and Freeman, E. : Collagen remodelling by fibroblasts in wound repair. Preliminary observations. *Anat. Rec.*, 179 : 543-546, 1974.
- 22) Eley, B.M. and Harrison, J.D. : Intercellular collagen fibrils in the periodontal ligament of man. *J. Periodont. Res.*, 10 : 168-170, 1975.
- 23) Frank, R.M., Cimasoni, G., Tsamouranis, A., Matter, J. and Fiore-Donno, G. : Collagen resorption by fibroblasts in human gingiva. *J. Biol. Buccale.*, 5 : 343-351, 1977.
- 24) 南出千景, 矢嶋俊彦, 久米川正好：ヒト・ダイラ ンチン性肥大歯肉線維芽細胞によるコラーゲン線 維食食について—電顕観察—歯基礎誌, 22 : 630- 638, 1980.
- 25) Yajima, T. and Rose, G.G. : Phagocytosis of collagen by human gingival fibroblasts in vitro. *J. Dent. Res.*, 56 : 1271-1277, 1977.
- 26) Rose, G.G., Yajima, T. and Mahan, C.J. : Human gingival cell lines in vitro. I. Electron microscopic studies of collagenolysis. *J. Periodont. Res.*, 15 : 53-70, 1980.
- 27) Garant, P.R. : Collagen resorption by fibroblasts : A theory of fibroblastic maintenance of the periodontal ligament. *J. Periodontol.*, 47 : 380-390, 1976.
- 28) Schroeder, H.E. and Page, R. : Lymphocyte-fibroblast interaction in the pathogenesis of inflammatory gingival disease. *Experientia.*, 28 : 1228-1230, 1972.
- 29) Simpson, D.M. and Avery, B.E. : Pathologically altered fibroblasts within lymphoid cell infiltrates in early gingivitis. *J. Dent. Res.*, 52 : 1156, 1973.
- 30) Garant, P.R. and Cho, M.I. : Histopathogenesis

of spontaneous periodontal disease in conventional rats. III. the mononuclear cell infiltrate

and cytoplasmic changes in associated fibroblasts. J. Periodont. Res., 15 : 165-176, 1980.