歯周炎歯肉における抗ヒト IgG 抗体保有細胞の 存在に関する免疫組織学的研究

金子 高士 原 宜興 岩崎 由佳
市丸 英二 岩永 正憲 加藤 伊八

長崎大学歯学部歯科保存学第二講座

(主任：加藤伊八教授)

(平成5年1月22日受付)

Immunohistological Study of Plasma Cells Bearing Immunoglobulins Reactive to Human IgG in Human Periodontitis

Takashi KANEKO, Yoshitaka HARA, Yuka IWASAKI,
Eiji ICHIMARU, Masanori IWANAGA and Ihachi KATO

Department of Periodontology

Nagasaki University School of Dentistry

1-7-1, Sakamoto, Nagasaki 852, Japan

(Chief : Prof. Ihachi KATO)

In this study, we immunohistologically detected plasma cells bearing immunoglobulins reactive to human γ -globulin (IgG) in gingivae from patients with various types of periodontitis. In order to detect these cells, we developed an immunohistological method using human IgG conjugated with horseradish peroxidase (HRP). 41 subjects were grouped into 3 different types of periodontal disease; adult periodontitis (AP), early onset periodontitis (EOP) and hyperplastic gingivitis (HG), according to their histories and clinical findings. On analysis of all 63 specimens from 41 subjects, plasma cells bearing immunoglobulins reactive to IgG were detected in 14 specimens from 9 subjects.

These cells were observed in all groups and their existence ratios increased in the order of AP, HG and EOP. In almost all specimens in which plasma cells bearing immunoglobulins reactive to IgG were detected, these cells existed in the subepithelial connective tissues where plasma cells and lymphocytes tended to form clusters. In this study, it was unclear whether the existence of these cells related to clinical parameters. But the presence of many plasma cells bearing immunoglobulins reactive to IgG was confirmed in some phases of early onset periodontitis, suggesting that specific antibodies to human IgG are produced in gingiva affected by human periodontitis.

Key words : Periodontitis, Plasma cell, Immunohistology

要旨：辺縁性歯周炎罹患歯肉における抗ヒト IgG 抗体保有細胞の存在を検索する目的で、まずヒト IgG で感作したラット脾臓から凍結切片を作製し、ペルオキシダーゼ標識ヒト IgG を用いた標識抗原法を行い、抗ヒト IgG 抗体保有細胞を観察するための手法を確立した。そして実際にヒト歯肉において同法を行った結果、41 人から採取した 63 部位中、9 人 14 部位に抗ヒト IgG 抗体保有細胞が観察された。抗ヒト IgG 抗体保有細胞は今回分類し

本論文の要旨は、第 35 回春季日本歯周病学会総会 (1992 年 5 月 22 日)、The 9th International Conference on Periodontal Research (1992 年 9 月 24 日) において発表した。

た成人性歯周炎, 早期発症型歯周炎, 増殖性歯肉炎のすべてのグループにおいて観察され, その割合は早期発症型歯周炎が最も高く, 以下成人性歯周炎, 増殖性歯肉炎の順であった。抗ヒト IgG 抗体保有細胞はおもに口腔上皮近くのリンパ球や形質細胞が密集して浸潤した部位に存在していた。今回の検索では, 年齢, 種々の臨床パラメーターで抗ヒト IgG 抗体保有細胞の存在の有無を分けることはできなかった。しかし, 早期発症型歯周炎の一部においてはその歯肉中に多数の抗ヒト IgG 抗体保有細胞が確認され, IgG に対する特異的な抗体産生が起こっている可能性が示唆された。

索引用語: 歯周炎, 形質細胞, 免疫組織学的検索

緒 言

歯周病は細菌及びその代謝産物により引き起こされる慢性炎症性疾患である^{1,2)}が, その炎症反応の一部には自己免疫が関与している³⁾といわれている。歯周炎歯肉には血管炎やコラーゲン線維の破壊と増殖, 形質細胞・リンパ球・マクロファージなどからなる炎症性細胞の浸潤が観察され, 形質細胞は深部の血管周囲に集合して存在している⁴⁾。このような抗体保有細胞のなかには細菌抗原成分に対応するもの⁵⁾の他に IgG⁶⁾ やコラーゲン⁷⁾などの自己抗原に対応するものも存在することがenzyme-linked immunospot (ELISPOT) 法によって報告されている。さらに抗ヒト IgG 抗体が, 一部の歯周病患者の炎症歯肉, 歯肉縁下プラーク, 唾液, 末梢血中に存在することをラテックス凝集法やenzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) を用いて証明した報告がある⁸⁻¹⁰⁾。しかしながら現在使用されている歯周炎の分類に基づいて症例を分類した場合に, 抗ヒト IgG 抗体保有細胞の存在傾向に偏りがあるのか否か, あるいは組織学的にどの部位に局在するのかなどについては明らかでない。そこで今回われわれはヒト IgG で免疫したラットを用いて, 抗ヒト IgG 抗体保有細胞を標識抗原法により免疫組織学的に観察する方法を確立するとともに, 各種歯周炎罹患歯肉における抗ヒト IgG 抗体保有細胞の有無とその組織学的局在を検索したのでここに報告する。

材料と方法

1. ラット脾臓における検索

ヒト IgG (cappel 社) 3 mg を 1 ml の生食水に溶解した。そしてフロイント完全アジュバント (ナカライテスク社) と等量混合したエマルジョンを作製し, これを投与したものを実験群とした。一方, PBS の

みで作製したエマルジョンを用いたものを対照群として, Lewis 系ラット (6 週齢, 雄) の腹腔に 1 カ月間隔で 2 度注射した。最終投与して 2 週後にジエチルエーテルで麻酔死させ, 脾臓摘出後直ちにドライアイスエタノール中で O.C.T. compound に包埋した。これより 6 μ m の凍結切片を作製し, Leduc ら¹¹⁾および Abe ら¹²⁾の方法を一部改変して免疫組織学的検索を行った。すなわち風乾後冷アセトン (4°C, 10 分) と 0.03% 過酸化水素含有メタノール (室温, 30 分) で, 固定と内因性ペルオキシダーゼの除去を行った。次に 0.05% bovine serum albumin 含有 10 μ g/ml 西洋ワサビペルオキシダーゼ (HRP) 標識 IgG (cappel 社) または対照として PBS, 50 μ g/ml HRP (sigma 社) と湿潤箱内で 4°C, 一晚それぞれ反応させた。その後, AEC (3-amino-9-ethylcarbazole, DAKO 社) によって発色させ, メチルグリーンで核染し, グリセロールゼラチン封入後, 検鏡した。

2. ヒト歯周炎歯肉における検索

長崎大学歯学部附属病院第 2 保存科に来院した歯周疾患に罹患している患者 36 名 (男性 21 名, 女性 15 名, 年齢 19 歳から 65 歳, 平均 46.8 歳) を被検者とした。そして被検者を AAP のコンセンサスレポートにおいて推奨されている分類¹³⁾すなわち思春期前歯周炎, 若年性歯周炎, および急速進行性歯周炎をまとめた早期発症型歯周炎と成人性歯周炎に分類し, さらに増殖性歯肉炎 5 名 (7 部位) を加えた。そして歯周外科もしくは抜歯時に種々の臨床所見 (プロービングデプス, プリーディングオンプロービング, 排膿) を記録したうえで主として歯間部の歯肉を採取した。採取部位のプロービングデプスは手術時の採取ということもあり, プロービングデプスはすべて 4 mm 以上であった。採取した歯肉を, ただちに O.C.T. compound に包埋し, 凍結切片を作製後, 前述した方法を用いて抗ヒト IgG 抗体保有細胞の有無とその局在を検索した。さらに一部の歯肉については, 今回検索の対象である抗ヒト IgG 抗体保有細胞が変性 IgG に

対するものでないことを確認するため、HRP 標識 IgG と反応させる前に $10\text{ }\mu\text{g/ml}$ ヒト IgG でブロッキングを行った後に前述の手法を用いて光顕観察した。

各種歯周炎罹患歯肉において、抗ヒト IgG 抗体保有細胞が観察された割合の比較は Student's t-test により行った。

結 果

1. 免疫組織学的手法の確認

ヒト IgG で免疫したラット脾臓の凍結切片では、HRP 標識ヒト IgG を反応させると核膜および細胞質が赤染する形質細胞が実験群のみに、主として赤脾髄および濾胞周辺帯 (marginal zone) に確認され、内因性ペルオキシダーゼ活性を有するマクロファージ、

好中球、赤血球に反応はみられなかった (図 1)。そしてこの切片を HRP 標識 IgG ではなく、PBS あるいは HRP のみと反応させた場合には発色する細胞は認められなかった。一方、PBS を腹腔注射したのみの対照群の脾臓では HRP 標識ヒト IgG、PBS、HRP すべての場合において AEC による発色はみられなかった。

2. ヒト歯肉の組織学的所見

41 人から採取した 63 部位中、9 人 14 部位に核膜および細胞質が赤く発色した抗ヒト IgG 抗体保有細胞が確認された。さらに、ヒト IgG でブロッキングすることにより、抗ヒト IgG 抗体保有細胞における発色は抑制された。そして抗ヒト IgG 抗体保有細胞は今回分類した成人性歯周炎、早期発症型歯周炎、増殖性歯肉炎すべてのグループにおいて観察され、その割

図 1 ヒト IgG 感作ラット脾臓における免疫組織学的所見
細胞質が発色した抗ヒト IgG 抗体保有細胞を赤脾髄周辺に認める。

表 1 抗ヒト IgG 抗体保有細胞が観察された症例のうちわけ

	A	E	H	合計
反応のみられた人数/総被検者数	5/31	3/5	1/5	9/41
	ns			
	*		ns	
反応のみられた歯肉数/総歯肉数	5/43	8/13	1/7	14/63
	ns			
	**	*		

A：成人性歯周炎，E：早期発症型歯周炎，H：増殖性歯肉炎

Student t-test *： $p < 0.05$ ，**： $p < 0.01$ ，ns：有意差無し

図 2 形質細胞浸潤巣の抗ヒト IgG 抗体保有細胞
抗ヒト IgG 抗体保有細胞は口腔上皮に近いリンパ球や形質細胞が密集した部位に存在している。

図 3 形質細胞浸潤巣の抗ヒト IgG 抗体保有細胞
核膜および細胞質に発色がみられる。

合は早期発症型歯周炎が最も高く、次いで成人性歯周炎，増殖性歯肉炎の順であり，早期発症型歯周炎における割合は他の歯周炎群と比較すると有意差がみられた（表 1）。抗ヒト IgG 抗体保有細胞はおもに口腔上皮近くのリンパ球や形質細胞が密集して浸潤した部位に存在していた（図 2，3）。一方，1 切片に存在する数は被検者によってさまざまで，多くは数個であったが症例 No. 1 および No. 2 では 20 から 30 個存在していた（表 2）。

考 察

ラットにおける免疫組織学的所見から，この手法によって内因性ペルオキシダーゼ活性は除去され，かつ抗ヒト IgG 抗体保有細胞のみに反応が起こっていることが確認された。また核膜に反応がみられたことは，酵素抗原法を用いて抗体産生細胞を電顕的に観察した Abe らの報告¹²⁾における所見とも一致している。また今回は報告していないが，電顕的にも反応の見られた細胞が形質細胞であったことから，本法が歯周炎

表 2 抗ヒト IgG 抗体保有細胞が観察された症例の臨床パラメーター

	性別	年齢	PD (mm)	BOP	PUS	診断
症例 No. 1	F	19	10	+	+	E
			6	+	+	
			8	+	—	
No. 2	M	24	4	—	—	E
			4	+	—	
			5	+	—	
			10	+	—	
No. 3	F	28	8	+	+	E
No. 4	M	36	8	+	+	H
No. 5	F	48	6	+	+	A
No. 6	M	50	7	+	—	A
No. 7	M	54	8	+	+	A
No. 8	M	61	6	+	—	A
No. 9	F	65	5	+	—	A

PD: probing depth, BOP: bleeding on probing,
PUS: 排膿, A: 成人性歯周炎, E: 早期発症型歯周炎,
H: 増殖性歯肉炎

罹患歯肉における抗ヒト IgG 抗体保有細胞の組織学的検索に有効であると考えられた。

ただし、本法を実際にヒト歯周炎罹患歯肉において行う際には同種の IgG を用いるため、Fc レセプター保有細胞や抗イディオタイプ抗体保有細胞が反応する可能性を考慮する必要がある。まず Fc レセプターのうち IgG モノマーと高親和性をもつことから特に問題となるのは、単球およびマクロファージが保有する FcγR 1 (CD 64) である。しかし、抗ヒト IgG 抗体保有形質細胞以外の細胞にみられる反応は染色時間を調整することで、また仮に発色がみられても抗ヒト IgG 抗体保有形質細胞との染色性の相違から容易に除外することができた。次に、ある特定の抗体に対する抗イディオタイプ抗体保有細胞がヒト歯周炎罹患歯肉に存在する可能性も考えておかねばならないだろうが、今回使用した市販の HRP 標識 IgG に対する抗イディオタイプ抗体が、異なる複数の患者歯肉に存在する可能性はかなり低いと考えられる。おそらく今回の検索でみられた細胞のほとんどは、Fc に対応する抗ヒト IgG 抗体保有細胞であるものと推測されるが、これを明らかにするため、我々はパパイン分解 Fc 断片に HRP を標識し、同様の手法で実験を行う予定である。

今までいくつかの実験によって歯周炎罹患患者の炎症歯肉、歯肉縁下プラーク、唾液、末梢血中に抗ヒト IgG 抗体及び抗ヒト IgG 抗体産生細胞が存在するこ

とが報告されている^{6,8-10)}が、今回の実験で歯周炎罹患歯肉中に抗ヒト IgG 抗体保有細胞が他の形質細胞と混在して一部の症例にみられることが免疫組織学的に明らかになった。さらに、ヒト IgG によるブロッキングによりその反応発色が抑制されたことから、抗ヒト IgG 抗体保有細胞が保有する抗ヒト IgG 抗体は変性した IgG ではなく、インタクトな IgG に結合することが明らかになった。このことは、産生された抗ヒト IgG 抗体が分泌されれば、歯周炎罹患歯肉に多数存在する周囲の IgG と免疫複合体を形成する可能性を示唆している。今回の検索では、これら抗ヒト IgG 抗体が歯周疾患の発症ないし進行にいかなる影響を及ぼすのかを直接的に証明することはできなかった。しかしもし周囲に多数存在する IgG と免疫複合体を形成すれば、II 型、III 型アレルギーによる組織破壊を増長するであろうし、また逆に特異抗原に対応する IgG をマスクすれば、好中球、K 細胞、マクロファージなどが持つ Fc レセプターとの結合の抑制や、補体の活性化を妨げることで免疫反応の抑制を起こすであろうと考えられる。

歯周炎罹患歯肉に存在する抗ヒト IgG 抗体保有細胞の誘導の原因因子については 2 つの推測が成り立つ。まずプラーク中のリポ多糖体 (LPS)、デキストラン、レバンなどのマイトージェンのポリクローナル B 細胞活性化 (PBA) によって、このような抗体産生細胞が分化、増殖したとする考え方である。自己抗原や外来抗原に交差反応性を示す自己抗体が正常人の血清中に自然に存在することが明らかになって以来、それらは自然自己抗体 (natural autoantibody) と呼ばれている¹⁴⁻¹⁶⁾。そしてその大部分は IgM 抗体で抗原との親和性が低いことが知られており¹⁷⁾、CD 5 陽性 B 細胞が IgM 自己抗体産生に関与していることも報告されている¹⁸⁾ことから、PBA 活性がこうした細胞におよんだためとの推測が可能と思われる。いま一つの考え方は、何らかの原因により IgG に対して特異的に活性化され生じたものである。炎症性歯肉中および血清中の抗コラーゲン抗体産生細胞を検索した Hirsch ら⁷⁾は、これらの細胞はコラーゲンタイプ I, III, V に対応するもののみであり、抗コラーゲン抗体は PBA によるものではなく特異的に産生されたのであろうと推測している。さらに抗コラーゲン抗体のクラスは IgM より IgG が優位であったことも述べている。今回明らかになった抗ヒト IgG 抗体保有細胞の誘導の原因を探るためには、抗体のクラス、サブクラ

スや CD 5 陽性細胞の存在状況などの検討は必要かもしれない。

今回検索した症例では、病型の分類、年齢や既存の臨床パラメーターでは抗ヒト IgG 抗体保有細胞の存在傾向を明らかにすることはできなかった。成人性歯周炎、早期発症型歯周炎、増殖性歯肉炎のいずれにも陽性の部位があった点の解釈は困難であるが、ある特定の細菌に対する血清抗体価と血清中の IgG の Fc 部分に対する抗体すなわちリウマトイド因子の上昇に相関があるという報告¹⁰⁾などを参考にとすると、歯周ポケット中の細菌との関連も考える必要があるかも知れない。しかし早期発症型歯周炎において他の成人性歯周炎や増殖性歯肉炎と比較して有意に抗ヒト IgG 抗体保有細胞が存在した割合が高く、またその一部の症例では歯肉中に多数の抗ヒト IgG 抗体保有細胞が確認されたことは、早期発症型歯周炎において IgG に対する特異的な抗体産生が亢進している可能性もある。今後は症例数を増やすとともに、病態の分析と歯周ポケット内細菌叢との関連を追究することで抗ヒト IgG 抗体保有細胞の出現様式を明らかにすることが必要であろう。

結 論

各種歯周炎罹患歯肉における抗ヒト IgG 抗体保有細胞の存在を検索する目的で、ヒト IgG で感作したラット脾臓から凍結切片を作製し、ペルオキシダーゼ標識ヒト IgG を用いた標識抗原法を行い、抗ヒト IgG 抗体保有細胞を染め出すための手法を確立した。そして実際にヒト歯肉において同法を行った結果、以下の結論をえた。

1. 41 人から採取した 63 部位中、9 人 14 部位に抗ヒト IgG 抗体保有細胞が観察された。
2. 抗ヒト IgG 抗体保有細胞は今回分類した成人性歯周炎、早期発症型歯周炎、増殖性歯肉炎すべてに観察され、その割合は早期発症型歯周炎が最も高く、以下成人性歯周炎、増殖性歯肉炎の順であった。
3. 抗ヒト IgG 抗体保有細胞はおもに口腔上皮近くのリンパ球や形質細胞が密集して浸潤した部位に存在していた。

謝 辞

本実験においてラットを飼育していただいた長崎大学医学部附属動物実験施設職員の皆様に感謝の意を表します。

文 献

- 1) Listgarten, M.A.: Nature of periodontal diseases. : Pathogenic mechanisms. J. Periodont. Res., 22 : 172-178 : 1987.
- 2) Holt, S.C., Ebersole, J., Felton, J., Brunsvold, M. and Korman, K.S. : Implantation of *Bacteroides gingivalis* in nonhuman primates initiates progression of periodontitis. Science, 239 : 55-57 : 1988.
- 3) Anusaksathien, O. and Dolby A.E. : Autoimmunity in periodontal disease. J. Oral Pathol. Med., 20 : 101-107 : 1991.
- 4) Schluger, R.C. : 青野正男 (監訳) : シュルレーガー最新歯周治療学, 医歯薬出版, 1981, 169-195.
- 5) Ogawa, T., McGhee, M.L., Moldoveanu, Z., Hamada, S., Mestecky, J., McGhee, J.R. and Kiyono, H. : *Bacteroides*-specific IgG and IgA subclass antibody-secreting cells isolated from chronically inflamed gingival tissues. Clin. exp. Immunol., 76 : 103-110, 1989.
- 6) Hirsch, H.Z., Tarkowski, A., Koopman, W. and Mestecky, J. : Local production of IgA- and IgM-rheumatoid factors in adult periodontal disease. J. Clin. Immunol., 9 : 273-278, 1989.
- 7) Hirsch, H.Z., Tarkowski, A., Miller, E.J., Gay, S., Koopman, W.J. and Mestecky, J. : Autoimmunity to collagen in adult periodontal disease. J. Oral pathol., 17 : 456-459, 1988.
- 8) Gargiulo, A.V.Jr., Robinson, J., Toto, P.D. and Gargiulo, A.W. : Identification of rheumatoid factor in periodontal disease. J. Periodontol., 53 : 568-577, 1982.
- 9) Gargiulo, A.V.Jr., Toto, P.D., Robinson, J.A. and Gargiulo, A.W. : Latex slide agglutination vs. ELISA system. J. Periodont. Res., 20 : 31-34, 1985.
- 10) Thé, J. and Ebersole, J.L. : Rheumatoid factor (RF) distribution in periodontal disease. J. Clin. Immunol., 11 : 132-142, 1991.
- 11) Leduc, E.H., Avrameas, S. and Bouteille, M. : Ultrastructural localization of antibody in differentiating plasma cells. J. Exp. Med., 127 : 109-118, 1968.
- 12) Abe, T., Hara, Y. and Aono, M. : Penetration, clearance and retention of antigen en route from the gingival sulcus to the draining lymph node of rats. J. Periodont. Res., 26 : 429-439, 1991.
- 13) Nevins, M., Becker, W. and Kornman, K. (ed.) : 池田克巳, 石川 烈, 岡田 宏, 長谷川紘司 (訳) : AAP 歯周治療法のコンセンサス, クインテッセンス出版, 1992, I 28-I 30.
- 14) Guilbert, B., Dighiero, G. and Avrameas, S. : Naturally occurring antibodies against nine com-

- mon antigens in human sera. *J. Immunol.*, 128 : 2779-2787, 1982.
- 15) Dighiero, G., Lymberi, P., Mazie, J.C., Rouyre, S., Butler-Browne, G.S., Whalen, R.G. and Avrameas, S. : Murine hybridomas secreting natural monoclonal antibodies reacting with self antigens. *J. Immunol.*, 131 : 2267-2272, 1983.
 - 16) Dighiero, G., Lymberi, P., Holmberg, D., Lundquist, I., Coutinho, A. and Avrameas, S. : High frequency of natural autoantibodies in normal newborn mice. *J. Immunol.*, 134 : 765-771, 1985.
 - 17) Grabar, P. : Hypothesis. Auto-antibodies and immunological theories : An analytical review. *Clin. Immunol. Immunopathol.*, 4 : 453-466, 1975.
 - 18) Hayakawa, K., Hardy, R.R., Honda, M., Herzenberg, L.A., Steinberg, A.D. and Herzenberg, L. A. : Ly-1 B cells : Functionally distinct lymphocytes that secrete IgM autoantibodies. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81 : 2494-2498, 1984.

連絡先 :

長崎大学歯学部歯科保存学第2講座

〒852 長崎市坂本1-7-1