フェニトイン歯肉増殖症における
抗 S-100 蛋白抗体陽性ランゲルハンス細胞の
上皮内分布および密度に関する免疫組織化学的研究

田尻 公一 國松 和司 尾崎 幸生

原 宜興 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 8 年 2 月 8 日受付)

Immunohistochemical Study on Intraepithelial Distribution and Density
of Langerhans Cells Identified Using Anti-S-100 Protein Antibody
in Phenytoin-induced Overgrown Gingival Tissues

Koichi Tajiri, Kazushi Kunitatsu, Yukio Ozaki,
Yoshitaka Hara and Ihachi Kato

Department of Periodontology, Nagasaki University School of Dentistry

1-7-1 Sakamoto, Nagasaki 852, Japan

(Chief : Prof. Ihachi Kato)

In order to clarify the roles of Langerhans cells (LCs) associated with host defense mechanisms, LCs were identified in Phenytoin (PHT)-induced overgrown gingival tissues using rabbit anti-human S-100 protein antibody and compared with those in tissues from age- and sex-matched adult periodontitis (AP) patients with systemically good health. Five patients in each group were randomly selected and all gave informed consent to take part in this study. After the samples were carefully taken during periodontal surgery, the serial specimens were embedded in paraffin and routinely processed. The specimens were immunostained with anti-S-100 protein polyclonal antibody followed by histological analysis of the positive cells in gingival epithelium. The S-100 positive cells speci-

mens from both groups were scattered in both the basal and the spinous layers. The positive cells per square mm unit in gingival epithelium were counted and then the percentage of positive cells per total epithelial cells were then calculated. In the PHT group, the positive cells were significantly increased in both number and frequency as compared with those in the AP group ($p < 0.01$). In addition, numerous CD 3 positive cells were infiltrated in the connective tissues beneath the oral epithelium containing a significant number of S-100 positive cells and this tendency was remarkable in the PHT group specimens. These findings suggest enhancement of the pathophysiological roles of LCs in PHT-induced gingival overgrowth.

Key words : Langerhans cell, S-100 protein, Phenytoin-induced gingival overgrowth

要旨：宿主免疫機能に関与するランゲルハンス細胞の歯肉増殖症における役割を調べる目的で、フェニトイン誘発性ヒト増殖歯肉組織における動態を抗 S-100 蛋白抗体を用いて検索し、全身疾患を持たない成人性歯周炎罹患歯肉組織における動態と比較検討した。フェニトイン歯肉増殖症患者ならびに成人性歯周炎患者それぞれ

5名ずつを被検者とし、歯周外科時に試料を採取してパラフィン包埋連続切片を作製した。これらの切片にウサギ抗S-100蛋白ポリクローナル抗体を用いて免疫染色を施し、歯肉上皮内におけるS-100蛋白陽性細胞の組織学的検索を行った。その結果、S-100蛋白陽性細胞は、増殖症ならびに成人性歯周炎ともに歯肉上皮の基底層から有棘層にかけて散在性に存在していた。また、歯肉上皮の単位面積あたりに存在するS-100蛋白陽性細胞数および総歯肉上皮細胞数に対するS-100蛋白陽性細胞数の存在比率を計測すると、いずれも増殖症歯肉において有意に高い傾向 ($p < 0.01$) を認めた。さらに、多くのS-100蛋白陽性細胞が存在する歯肉上皮直下結合組織中にCD3陽性細胞が浸潤しており、特に増殖歯肉において顕著であった。以上の結果より、フェニトイン服用による増殖歯肉においては、成人性歯周炎と比べ口腔上皮内にS-100蛋白陽性細胞が有意に増加することから、本疾患においてこの細胞の果たす役割が増強されている可能性が示唆された。

索引用語：ランゲルハンス細胞、S-100蛋白、フェニトイン歯肉増殖症

緒 言

抗癲癇治療薬のフェニトイン¹⁾は、免疫抑制剤のサイクロスポリンA²⁾や本態性高血圧症治療薬であるカルシウム拮抗剤ニフェジピン³⁾などとともに、薬剤の副作用として歯肉の増殖性疾患を引き起こすことが知られている。近年、歯肉増殖症は、口腔清掃、咀嚼や発音を困難にするだけでなく、審美的な障害をも招くため病因の解明が切望されている。しかしながら、本疾患による宿主組織および細胞の生理的・病理的变化ならびに動態等に関してはまだ十分に解明されておらず、また、炎症反応や免疫機構との関連については、その重要性にもかかわらず不明の点が多い⁴⁾。

歯肉上皮組織中に存在し、抗原提示機能に直接関与する主要組織適合抗原のうち、MHCクラスIIを細胞膜上に保有するランゲルハンス細胞（以下LCと略す）は、外来からのさまざまな刺激因子に対して宿主の防御機能を司る重要な細胞の一つである^{5,6)}。歯周疾患においても、主に口腔上皮より侵入するさまざまな外来抗原に対して抗原提示機能を発揮し、生体防御の最前線としての役割を担っているが、一般に正常歯肉よりも歯周炎罹患歯肉組織中に数多く存在すると考えられている⁷⁾。このLCの検出マーカーとしては、これまでCD1a、HLA-DRやS-100蛋白などがあり、なかでもS-100蛋白は、従来より細胞増殖あるいは細胞周期に関連したマーカーとして用いられ^{8~10)}、通常のパラフィン切片においても使用可能なため、Adenomaなどの唾液腺腫瘍やHistiocytosis-Xなどの増殖性疾患における重要な診断マーカーとしても使用されている^{11,12)}。

一方、薬剤誘発性の歯肉増殖症に関する免疫組織学的研究も、これまでさまざまな特異抗体を用いて行われている。しかし、フェニトイン誘発性ヒト増殖歯肉組織中におけるLCの動態に関しては、CD1aやHLA-DRを検出マーカーとする凍結切片における研

究^{13,14)}があるだけで、しかもこれらは正常歯肉および歯肉炎罹患組織との比較であり、歯周炎罹患歯肉との比較は行われていない。そこで今回、フェニトイン歯肉増殖症におけるLCの動態を抗S-100蛋白抗体を用いて検索し、各種臨床パラメーターが同程度の歯周炎罹患歯肉組織におけるLCの動態と比較することを計画した。また併せて、LCが抗原を提示するTリンパ球の組織内分布についても検討を加え、歯肉増殖症における宿主防御機構の特異性について新たな知見を得たので報告する。

材料および方法

1. 被 検 者

被検者は、長崎大学歯学部附属病院第2保存科を受診した年齢24~41歳（平均34.5歳、フェニトイン一日平均服用量240mg）の歯肉増殖症患者5名（男3名、女2名）で、対照として同程度の歯周ポケットを有し、かつ全身疾患の既往のない成人性歯周炎患者5名（男3名、女2名、平均年齢39.2歳）を用いた。なお、対照の患者が歯肉増殖を来す可能性のある薬剤を服用していないことを問診にて確認した。

2. 試料の採取および切片の作製

歯周外科手術の際にフェニトイン歯肉増殖症ならびに成人性歯周炎患者の歯肉片を注意深く採取した。試料の合計はそれぞれ20個であった。また採取直前に、同部位の臨床評価として、臨床パラメーターであるProbing Depth (PD) およびGingival Index (GI)¹⁵⁾を同一検者がこの順に計測した。PDの測定は、Williams 歯周プローブ (Hu-Friedy Co., Chicago, IL) を用い、mm単位で記録した。

試料を採取後直ちに滅菌生理食塩水にて血液を十分に洗い流し、通法に従ってPLP (periodate-lysine-paraformaldehyde) にて固定後、パラフィン包埋して4μm厚の連続切片を作製した。

なお、歯肉の採取に先立って被検者に対し実験内容

図1 免疫染色の手順 (ABC法)

を十分説明し、了解のもとに本実験を遂行した。

3. 免疫染色

染色の手順はABC法 (avidin-biotin-peroxidase complex method) を一部改変¹⁶⁾して行った (図1)。まず、薄切パラフィン切片を脱パラフィンした後、0.5 M NaCl 添加 PBS (phosphate-buffered saline, pH 7.4) にて洗浄した。次に、10% 正常ヤギ血清を室温で30分間反応させ、非特異的な蛋白の結合をブロックした。その後、一次抗体としてウサギ抗 S 100 蛋白ポリクローナル抗体 (LSL Co., Ltd., USA) を500倍希釈して用い、4°C にて一晩反応させた。なお、抗体の希釈と切片の洗浄には0.5% ミルクプロテインおよび0.05% Triton X-100 含有 PBS 溶液を用いた。次に、抗ウサギ免疫グロブリンを二次抗体として使用し、室温にて10分間反応させた。さらに内因性ペルオキシダーゼを不活性化するために、3% 過酸化水素含有メタノールにて15分間室温にて反応させ、その後室温で5分間 ABC と反応させた。そして、Karnovsky の溶液 (3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride in 100 ml of 0.05 M Tris buffer, pH 7.4, containing 0.3% hydrogen peroxide and distilled water) 中で5~10分間発色させた。なお、各ステップ間では十分な洗浄を行い、対比核染色はヘマトキシリンを用いた。正常ヤギ血清、二次抗体、ABC はヒストファイン® (ニチレイ社製、東京) を使用した。また免疫染色に用いた切片の連続切片にヘマトキシリンエオジン染色を施し、組織学的検索の参考にした。さらに、Tリンパ球の検出マーカーには CD 3 を抗原

図2 S-100 蛋白陽性細胞の組織学的計測方法

接眼レンズに備え付けのグリッドを用いて、400倍の光学顕微鏡下にて上皮内に検出される陽性細胞を計測し、単位面積1 mm² 当りに換算して陽性細胞の比率(%)とした。

とする抗 CD 3 モノクローナル抗体 (ZYMED LABO., INC., USA) を用い、上記と同様の方法に従って免疫染色を施した。

4. 計測方法

S-100 蛋白陽性細胞の存在密度は、歯肉上皮内の任意に5ヵ所選んだ単位面積1 mm² に存在する S-100 蛋白陽性細胞数、さらに、その領域に存在する上皮細胞の総数に対する S-100 蛋白陽性細胞数の比率を計測した (図2)。

図 3 歯肉上皮内の S-100 蛋白陽性細胞の免疫染色像 (×50) および典型的な S-100 蛋白陽性細胞像 (×200)

a. 成人性歯周炎歯肉

S-100 蛋白陽性細胞が基底層から有棘層にかけて散在性にわずかに認められる。

b. フェニトイン歯肉増殖症歯肉

成人性歯周炎歯肉と比べ、S-100 蛋白陽性細胞が基底層から有棘層にかけて散在性に数多く認められる。

S-100 蛋白陽性細胞は歯肉上皮細胞間に細胞突起を不規則に伸長させて存在している。しかし、両者の S-100 蛋白陽性細胞の突起の長さに差は認められなかった。

5. 統計学的分析

歯肉上皮の単位面積 1 mm^2 に存在する S-100 蛋白陽性細胞数，ならびに総歯肉上皮細胞数に対する S-100 蛋白陽性細胞数の比率を，フェニトイン歯肉増殖症と成人性歯周炎患者間で Mann-Whitney 検定を用いて分析した。

結 果

1. 被検部位の臨床評価

今回検索した成人性歯周炎患者ならびにフェニトイン歯肉増殖症患者の被検部位の平均 PD 値はそれぞれ

*Statistically Significant at $p < 0.01$
(Mann-Whitney's U test)

図4 単位面積1 mm²あたりのS-100蛋白陽性細胞数(平均±標準偏差)

歯周炎群で平均 67.8 ± 28.9 個, 増殖症群で平均 132.5 ± 41.9 個と増殖症群が約2倍多く, 両群間で統計学的な有意差 ($p < 0.01$) が認められた。

*Statistically Significant at $p < 0.01$
(Mann-Whitney's U test)

図5 総歯肉上皮細胞数に対するS-100蛋白陽性細胞数の存在比率(平均±標準偏差)

歯周炎群で平均 $1.7 \pm 0.7\%$, 増殖症群で平均 $4.1 \pm 1.1\%$ と増殖症群に高く, 両群間で統計学的な有意差 ($p < 0.01$) が認められた。

4.9 ± 0.8 mm および 5.0 ± 0.9 mm であり, 平均GI値はそれぞれ 2.1 ± 0.7 および 2.0 ± 0.6 で両グループ間に統計学的な有意差は認められなかった。

2. 歯肉上皮内におけるS-100蛋白陽性細胞の組織学的所見

S-100蛋白陽性細胞は, フェニトイン歯肉増殖症および成人性歯周炎患者歯肉上皮の基底層から有棘層にかけて散在性に存在していた。しかし, 両群ともに同一切片内においても出現頻度や出現部位に多少の相違はあった。S-100蛋白陽性細胞は歯肉上皮細胞間に細胞突起を不規則に伸長させて存在しており, S-100蛋白は両群ともに細胞質から細胞突起にかけて存在し, 特に突起の長さによる差は認められなかった。典型的なS-100蛋白陽性細胞の免疫染色像を図3a, 3bに示した。

3. 単位面積あたりのS-100蛋白陽性細胞数

歯肉上皮の単位面積1 mm²あたりのS-100蛋白陽性細胞の出現頻度は症例によりさまざまであったが, 検索したすべての症例においてS-100蛋白陽性細胞が検出された。S-100蛋白陽性細胞数は, 歯周炎群で平均 67.8 ± 28.9 個, 増殖症群で 132.5 ± 41.9 個と増殖症歯肉において約2倍多く, 統計学的に有意に高い傾向 ($p < 0.01$) が認められた(図4)。

4. 総歯肉上皮細胞数に対するS-100蛋白陽性細胞数の存在比率

S-100蛋白陽性細胞の存在比率(出現頻度)は, 歯周炎群において平均 $1.7 \pm 0.7\%$, 増殖症群で $4.1 \pm 1.1\%$ と増殖症歯肉において高く, 両群間で統計学的

な有意差 ($p < 0.01$) が認められた(図5)。

5. 歯肉上皮直下結合組織中におけるTリンパ球(CD3陽性細胞)の分布

CD3陽性細胞は, 多くのS-100蛋白陽性細胞が存在する部位に浸潤する傾向が認められた。この傾向は, 今回検索した全ての症例において認められた(図6a, 6b)。

考 察

ランゲルハンス細胞(LC)は, さまざまな外来抗原に対してヘルパーT細胞を抗原特異的に刺激し, ハプテン特異的細胞障害性T細胞も誘導できる代表的な抗原提示細胞である⁹⁾。LCは歯肉上皮組織中にも存在し, 生体防御の最前線としての重要な役割を担っており, この細胞の動態を調べることは多様な歯周疾患の特異性を解析できる点で大変意義深い。今回検討したフェニトイン服用による増殖歯肉においても, 主として歯肉上皮内にS-100蛋白陽性細胞を認めた。歯肉上皮細胞の中で抗S-100蛋白抗体により同定される細胞は, LCとメラニン色素の合成に関与するメラニン生成細胞である¹⁷⁾。今回成人性歯周炎のものと比較してフェニトイン歯肉増殖症でS-100蛋白陽性細胞数が有意に増加していたが, 歯肉上皮の基底層より基底層上部において多数認められたことから, 本疾患においてLCの果たす役割が増強されている可能性が考えられた。しかしながら, LCとメラニン生成細胞

図 6

a. フェニトイン歯肉増殖症罹患歯肉上皮内の S-100 蛋白陽性細胞の染色像 (×50)

b. 同部位における CD 3 陽性細胞の染色像 (×50)

S-100 蛋白陽性細胞が数多く存在する上皮組織に近接した結合組織中に CD 3 陽性細胞が浸潤する傾向が認められる。

は類似の樹枝状形態を呈するため¹⁸⁾, 抗 S-100 蛋白抗体単独で上皮基底層の陽性細胞を光学顕微鏡的に鑑別することは困難である。パラフィン切片においても使用可能なメラニン生成細胞の同定法として Masson-Fontana 法があるが¹⁹⁾, この方法を用いても活性型メラニン生成細胞のみしか検出することができないため LC との正確な鑑別には適さない¹⁷⁾。一方, 凍結切片を用いた LC の検索法として CD 1 a や HLA-DR の抗体があり, これらを用いた LC の検出率は一般にパラフィン切片上でのいかなる抗体を用いた検索法よりも感度が高いとされている^{20,21)}。フェニトイ

ン歯肉増殖症においてもこれらの抗体を用いた報告^{13,14)}があり, いずれも本疾患において LC の数が有意に増加する結果を示しており, 対照が我々の研究とは異なるが, 抗 S-100 蛋白抗体を用いた成人性歯周炎との比較においても LC の数が有意に増加するという今回の我々の結果を支持するものである。我々は本実験と併行して, 増殖症歯肉組織における居住細胞の質的・量的変化ならびに局所に特異的に出現する細胞の同定を, パラフィン切片上での抗原抗体反応を通して検索している。そのため, 本研究もパラフィン切片においても使用可能な抗 S-100 蛋白抗体を用いたわ

けであるが、LC とメラニン生成細胞の確実な鑑別には、パラフィン切片だけでなく凍結切片や電子顕微鏡を用いた方法も検討する必要があると思われる。しかし、この点については今後の研究の課題としたい。

今回検索した全ての症例において LC が検出され、しかも歯周炎歯肉と比べフェニトイン歯肉増殖症に高い頻度で出現したことは、LC の生体防御への普遍的な関与とともに、薬剤の直接的あるいは間接的な影響に伴う歯周組織の変化を示唆するものである。この LC の増加の原因としてはいくつか考えられる。まず、薬剤の影響によりマクロファージや上皮細胞が刺激され、インターロイキン-1 や顆粒球・マクロファージコロニー刺激因子などのサイトカインの産生が亢進し、その結果 LC が歯周組織内に多数誘導されたことが考えられる^{22,23)}。また、LC は上皮の角化過程の調節に関与している^{24,18)}と考えられ、歯肉増殖症においてこのような機能が亢進した結果、LC の数が増加したのかもしれない。

さらに、LC は T リンパ球に抗原を提示することから、T リンパ球の仲介する免疫反応が重要な役割を果たすと考えられている^{6,25)}。今回、フェニトイン歯肉増殖症と成人性歯周炎の両方の歯肉において、S-100 蛋白陽性細胞と CD3 陽性細胞との集積分布に関連性が認められたが、成人性歯周炎に比べ歯肉増殖症においてより多くの LC が認められることを考えあわせると、増殖症の歯周組織において免疫反応の活性化が生じている可能性を示唆するものである。

最後に、今回は対照として用いなかったが、フェニトイン非感受性患者の歯肉組織中における LC の研究もまた今後の重要な課題である。いずれにせよ、歯肉増殖症罹患歯肉中に LC が集積することは大変興味深い所見と考えられる。

本研究は、平成7年度文部省科学研究奨励研究A（課題番号 07771769）の補助を受けて行われたことを付記する。

文 献

- Kimball, O.P. : The treatment of epilepsy with sodium diphenyl hydantoinate. J. Am. Med. Ass., 112 : 1244-1245, 1939.
- Rateitschak-Plüss, E.M., Hefti, A., Lörtscher, R. and Thiel, G. : Initial observation that cyclosporin-A induces gingival enlargement in man. J. Clin. Periodontol., 10 : 237-246, 1983.
- Ramon, Y., Behar, S., Kishon, Y. and Engelberg, I. S. : Gingival hyperplasia caused by nifedipine—a preliminary report. Int. J. Cardiol., 5 : 195-204, 1984.
- Hassell, T.M. and Hefti, A.F. : Drug-induced gingival overgrowth : Old problem, new problem. Crit. Rev. Oral Biol. Med., 2 : 103-137, 1991.
- Walsh, L.J., Seymour, G.J. and Powell, R.N. : Differential expression of class II (DR and DQ) antigens by human gingival Langerhans' cells and keratinocytes *in vitro*. J. Oral Pathol., 16 : 27-30, 1987.
- Lombardi, T., Hauser, C. and Budtz-Jørgensen, E. : Langerhans cells : structure, function and role in oral pathological conditions. J. Oral Pathol. Med., 22 : 193-202, 1993.
- DiFranco, C.F., Toto, P.D., Rowden, G., Gargiulo, A.W., Keene, Jr., J.J. and Connelly, E. : Identification of Langerhans cells in human gingival epithelium. J. Periodontol., 56 : 48-54, 1985.
- Kligman, D. and Hilt, D.C. : The S 100 protein family. Trends Biochem. Sci., 13 : 437-443, 1988.
- Barrett, A.W. and Scully, C. : S 100 protein in oral biology and pathology. J. Oral Pathol. Med., 23 : 433-440, 1994.
- Maeda, T., Iwanaga, T., Fujita, T. and Kobayashi, S. : Immunocytochemical Demonstration of S-100 Protein-Containing Dendritic Cells in the Normal and Inflamed Human Gingiva. Jpn. J. Oral Biol., 28 : 511-517, 1986.
- Hara, K., Ito, M., Takeuchi, J., Iijima, S., Endo, T. and Hidaka, H. : Distribution of S-100 b protein in normal salivary glands and salivary gland tumors. Virchows Archiv. A Pathol. Anat., 401 : 237-249, 1983.
- Stewart, J.C.B., Regezi, J.A., Lloyd, R.V. and McClatchey, K.D. : Immunohistochemical study of idiopathic histiocytosis of the mandible and maxilla. Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol., 61 : 48-53, 1986.
- Kinane, D.F., Drummond, J.R. and Chisholm, D. M. : Langerhans cells in human chronic gingivitis and phenytoin-induced gingival hyperplasia. Archs. oral Biol., 35 : 561-564, 1990.
- Ibáñez, P., Sagredo, E. and Pino, A. : Changes in the number and distribution of Langerhans cells in the hydantoin hyperplastic gingiva as compared with the clinically normal one. Histol. Histopath., 5 : 433-438, 1990.
- Löe, H. : The gingival index, the plaque index and the retention index systems. J. Periodontol., 38 : 610-616, 1967.
- Kunimatsu, K., Ozaki, Y., Aoki, Y. and Kato, I. : Possible roles of medullasin in nifedipine-induced

- human gingival overgrowth. *Archs. oral Biol.*, 41 : 111-115, 1996.
- 17) Barrett, A.W. and Scully, C. : Human oral mucosal melanocytes : a review. *J. Oral Pathol. Med.*, 23 : 97-103, 1994.
- 18) 二階宏昌, 伊集院直邦 : 口腔上皮内の樹枝状樹突細胞に関する考察. *広大歯誌*, 7 : 102-126, 1975.
- 19) Stevens, A. : Pigments and minerals, Bancroft, J. D. and Stevens, A., *Theory and practice of histological techniques* (3rd edn.), Churchill Livingstone, Edinburgh, 1990, 253-255.
- 20) Barrett, A.W., Beynon, A.D. and Reid, D.J. : A comparative study on tissue processing procedures for the immunohistochemical investigation of oral mucosal Langerhans cells. *Histochem. J.*, 26 : 134-141, 1994.
- 21) Pitigala-Arachchi, A., Crane, I.J., Scully, C. and Prime, S.S. : Epithelial dendritic cells in pathological human oral tissues. *J. Oral Pathol. Med.*, 18 : 11-16, 1989.
- 22) Moder, T., Karsten, J., Weintraub, A., Gidlund, M. and Sundqvist, K-G. : Phenytoin induces interleukin-1 production in vitro. *Life Sci.*, 44 : 35-40, 1989.
- 23) Paulli, M., Feller, A.C., Boveri, E., Kindl, S., Berti, E., Rosso, R., Merz, H., Facchetti, F., Gambini, C., Bonetti, F., Geerts, M.-L., Mller, P., Magrini, U., Samloff, M. and Solcia, E. : Cathepsin D and E co-expression in sinus histiocytosis with massive lymphadenopathy (Rosai-Dorfman disease) and Langerhans' cell histiocytosis : further evidences of a phenotypic overlap between these histiocytic disorders. *Virchows Archiv.*, 424 : 601-606, 1994.
- 24) Riley, P.A. : Function of high-level melanocytes. *Nature*, 201 : 1031, 1964.
- 25) Dahlf, G., Moder, T., Otteskog, P., Sundqvist, K-G. : Subpopulations of lymphocytes in connective tissue from phenytoin-induced gingival overgrowth. *Scand. J. Dent. Res.*, 93 : 507-512, 1985.

連絡先 :

長崎大学歯学部歯科保存学第二講座

〒 852 長崎市坂本 1-7-1