ニフェジピン歯肉増殖症における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

尾崎 幸生 國松 和司 田尻 公一
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 10 年 2 月 9 日受付)

Immunohistochemical Study on Intraepithelial Distribution and Density of Langerhans Cells in Nifedipine-induced Overgrown Gingival Tissues

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

Department of Periodontology, Nagasaki University School of Dentistry

1-7-1 Sakamoto, Nagasaki 852-8588, Japan

(Chief : Prof. Ihachi Kato)

In order to clarify the roles of Langerhans cells (LCs) associated with host defence mechanisms in nifedipine (NF)-induced gingival overgrowth, the intraepithelial distribution and density of LCs in tissues from the following four groups were examined. Using a rabbit anti-human S-100 protein antibody assay, gingival tissue samples from patients with NF-induced gingival overgrowth (NF-responders, R group) were compared with those from NF-nonresponders (NR group), proliferative gingivitis patients secondary to the presence of dental plaque (ND group) and systemically healthy subjects (Ctrl group). Five patients in each group were randomly selected and all gave informed consent to take part in this study. Gingival tissue samples were carefully taken during periodontal flap surgery or tooth extraction and 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 LCs were defined as the total S-100 positive cells minus those positive cells identified with

Schmorl stain. Histologically, the S-100 positive cells from the specimens in all groups were scattered in both the basal and the spinous layers. The percentages of positive cells per total epithelial cells in all groups were increased in the following order, $R > ND > NR > Ctrl$. Statistically significant differences were seen between the groups, R and ND ($p < 0.05$), R and NR ($p < 0.01$), ND and NR ($p < 0.05$), R and Ctrl ($p < 0.01$), and ND and Ctrl ($p < 0.05$). On the contrary, no significance was seen between the groups of NR and Ctrl. The gingival epithelium investigated in this study was divided into two groups, S-100 protein positive LC-rich area and S-100 protein positive LC-poor area in each group. CD 3- positive cells appeared to be greatly infiltrated in the connective tissue beneath the epithelium accumulated by LCs. This tendency was remarkable especially in the R group. Similarly, the connective tissues examined were divided into two regions, the densely and/or sparsely infiltrated region by inflammatory cells. In comparison with the frequency of S-100 positive LCs in the connective tissues beneath each region, a significant relationship was seen only in the ND group ($p < 0.05$).

本論文の要旨は、Japanese Association for Dental Research 44 th Annual Meeting 1996 (1996 年 11 月 26 日) において発表した。

Also, the frequency of LCs in the epithelium of the R group among the sparsely infiltrated regions was significantly higher than any other groups ($p < 0.01$). Considering that the S-100 positive LCs were significantly increased in the oral epithelium

and that a large number of CD 3-positive cells was infiltrated beneath the epithelium, our findings suggest the enhancement of the pathophysiological roles of LCs and CD 3-positive cells in NF-induced gingival overgrowth.

Key words : Langerhans cell, S-100 protein, Nifedipine-induced gingival overgrowth, CD 3-positive cell

要旨 : 宿主免疫機構に関与するランゲルハンス細胞 (LC) のニフェジピン (NF) 歯肉増殖症における役割を調べる目的で、NF 誘発性歯肉増殖症患者 (NF-responders, R 群)、NF 非感受性歯周炎患者 (NR 群)、ブラークに起因する増殖性歯肉炎患者 (ND 群) および全身疾患を持たない臨床的健康歯肉保有患者 (Ctrl 群) から得られた歯肉組織中に存在する LC の上皮内分布ならびに存在密度を抗 S-100 蛋白抗体を用いて検索し、比較検討した。各群からそれぞれ 5 名ずつ被検者を任意に選択し、患者から同意を得た上で歯周外科時あるいは抜歯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。なお、計測時に全 S-100 蛋白陽性細胞数から連続切片におけるシュモール染色陽性細胞数を差し引いたものを S-100 蛋白陽性 LC 数とした。その結果、S-100 蛋白陽性細胞は、各群の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。なかでも、歯肉上皮の単位面積あたりに存在する総上皮細胞に対する LC の百分率は R 群 > ND 群 > NR 群 > Ctrl 群の順に高く、R 群と ND 群、R 群と NR 群、ND 群と NR 群、R 群と Ctrl 群、および ND 群と Ctrl 群との間にそれぞれ $p < 0.05$, $p < 0.01$, $p < 0.05$, $p < 0.01$ および $p < 0.05$ で有意差を認めた。なお、NR 群と Ctrl 群との間には有意差は認められなかった。また、歯肉上皮を LC に富んだ領域と少ない領域に分けた場合、LC が多く集積する上皮直下の結合組織中に CD 3 陽性細胞が多数浸潤する傾向がみられた。この傾向は、特に R 群において顕著であった。さらに、結合組織を炎症性細胞浸潤密度の高い領域と低い領域に分け、その直上の上皮内における LC の出現頻度を比較すると、ND 群でのみ有意な差がみられた ($p < 0.05$)。また、炎症性細胞浸潤密度の低い領域における R 群の LC の比率は、他群に比べて有意に高い値を示した ($p < 0.01$)。以上より、NF 歯肉増殖症では口腔上皮内に LC が有意に増加し、またその上皮直下結合組織に多くの CD 3 陽性細胞が浸潤していることから、本疾患においてこれら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。しかし、炎症性細胞浸潤の程度と LC の分布との関連を明らかにすることはできなかった。

索引用語 : ランゲルハンス細胞, S-100 蛋白, ニフェジピン誘発性歯肉増殖症, CD 3 陽性細胞

緒 言

カルシウム拮抗剤ニフェジピン (以下 NF と略す)¹⁾ は、免疫抑制剤のサイクロスポリン A²⁾ や抗てんかん薬フェニトイン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、NF 誘発性歯肉増殖症は、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充分には解明されておらず、特に、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⁴⁻⁸⁾。

抗原提示機能に直接関与する MHC クラス II を細胞膜上に保有し、上皮に侵入したさまざまな刺激因子を T 細胞に呈示するランゲルハンス細胞 (以下 LC と略す) は^{9,10)}、歯周疾患においても歯肉上皮組織中に

多く存在し¹¹⁻¹³⁾、生体防御の最前線としての役割を担っている。一般に、いずれの薬剤性歯肉増殖症においても、上皮組織の肥厚や角化の亢進あるいは上皮脚の不規則な伸長を認め、口腔上皮の防御能が増強していることが推察される^{4,5,14)}。過去に、宿主防御機構の一役を担う LC と薬剤誘発性歯肉増殖症の関連に着目した研究も数例報告されているが¹⁵⁻¹⁸⁾、NF 誘発性ヒト歯肉増殖症における報告は皆無である。そこで今回、NF 歯肉増殖症歯肉上皮における LC の動態を、その代表的なマーカーの一つである抗 S-100 蛋白抗体^{10,19)} を用いて検索し、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、NF 歯肉増殖症における宿主防御機構の特異性について若干の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二保存科を受診した患者の中から NF を 3 カ月以上服用し、臨床的に歯肉増殖を来した患者 (Responder, 以下 R 群, 平均年齢 66.3 歳, 男 2 名, 女 3 名), その対照として同薬剤を同様な期間および 1 日量服用しているが歯肉増殖を認めない患者 (Non-responder, 以下 NR 群, 平均年齢 62.4 歳, 男 4 名, 女 1 名), 歯肉の増殖を来す可能性のある薬剤を全く服用していないブラークに起因する増殖性歯肉炎患者 (Non-drug, 以下 ND 群, 平均年齢 40.2 歳, 男 2 名, 女 3 名), および臨床的健康歯肉を有するう蝕症などの患者 (Control, 以下 Ctrl 群, 平均年齢 43.0 歳, 男 1 名, 女 4 名) の 4 つの群に分け、臨床パラメーターに基づき各群から任意に 5 名の被検者を選択した (表 1)。なお, NF を服用しているが口腔内に歯肉増殖が見られず、採取部位にのみ歯周ポケットが存在する場合に、これを成人性歯周炎による Non-responder 歯肉と定義した。

2. 試料の採取および切片の作製

患者より同意を得た上で、抜歯および歯周外科手術の際に歯肉片 (R, NR, ND, Ctrl 群それぞれ 14, 14, 12, 7 部位) を注意深く採取した (表 1)。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)²⁰⁾ 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-Friedly Co., Chicago, IL) を用い、mm 単位で記録した。

採取した試料は、PLP (periodate-lysine-

paraformaldehyde) にて固定後、パラフィン包埋し、4 μ m 厚の連続切片を 1 つの試料に対し 4 枚作製した。その内訳は、順に、ヘマトキシリン-エオジン染色 (以下 H.E. と略す) 用、メラニン細胞同定のためのシュモール染色用、S-100 蛋白陽性細胞検出のためのウサギ抗 S-100 蛋白ポリクローナル抗体 (LSL CO., LTD., USA) 用、そして T リンパ球検出マーカーの CD3 モノクローナル抗体 (ZYMED LABO., INC., USA) 用である。ここで、シュモール染色²¹⁾は上皮組織に存在するメラニン細胞が LC と同様に S-100 蛋白を保有する^{10,19)}ことから、両者を識別するために用いられた染色法である。

3. 免疫染色

免疫染色の手順は ABC 法 (avidin-biotin-peroxidase complex method) を一部改変⁷⁾して行った。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。10% 正常ヤギ血清と室温で 30 分間反応させ、非特異的な蛋白の結合をブロックした後、一次抗体を負荷し、4°C にて一晩反応させた。これ以後の操作はすべて室温にて行った。二次抗体として抗ウサギ免疫グロブリンと 10 分間反応させ、3% 過酸化水素含有メタノールにて 15 分間内因性ペルオキシダーゼを不活性化させ、ABC と 5 分間反応させた。最後に、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) 中で反応産物を 5~10 分間発色させた。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、各ステップ間で十分な

表 1 被検者と被検部位数ならびに臨床データ

	Nifedipine taking patients		Non-drug taking patients (ND)	Control (Ctrl)
	Responder (R)	Non-responder (NR)		
Subject	5 < 2 males 3 females	5 < 4 males 1 female	5 < 2 males 3 females	5 < 1 male 4 females
Samples	14	14	12	7
Mean Age	66.3 Ys (60-78)	62.4 Ys (60-68)	40.2 Ys (19-65)	43.0 Ys (30-56)
Mean PD $\pm$ SD	5.4 $\pm$ 0.5	5.0 $\pm$ 1.3	4.8 $\pm$ 1.0	1.7 $\pm$ 0.5
Mean GI $\pm$ SD	2.1 $\pm$ 0.4	1.8 $\pm$ 0.7	2.3 $\pm$ 0.5	0.7 $\pm$ 0.5

PD ; Probing Depth (mm)

GI ; Gingival Index (Löe, 1967)

図 1 S-100 蛋白陽性細胞の組織学的計測方法

(A) 検鏡下にて歯肉上皮内に計測のための一定領域（グリッドで示した部分，面積 0.125 mm^2 ）を選定し，その領域に存在する上皮細胞の総数に対する LC 数の比率を算定した。

(B) 口腔上皮を LC が多く存在する部位（LC-rich 部）と少ない部位（LC-poor 部）に分け，その各々の領域における上皮直下結合組織（グリッドで示した部分，面積 0.125 mm^2 ）中に存在する CD 3 陽性 T 細胞数を計測した。

洗浄を行った。また，一次抗体として用いたウサギ抗 S-100 蛋白ポリクローナル抗体は 500 倍希釈，抗 CD 3 モノクローナル抗体は 10 倍希釈して使用し，対比核染色はヘマトキシリンにて行った。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。

4. 計測方法

図 1 (A) に示すように，検鏡下にて歯肉上皮内に任意に 10ヶ所の計測のための一定領域（グリッドで示した部分，面積 0.125 mm^2 ）を選定し，その領域に存在する上皮細胞の総数に対する LC 数の比率を算定した。なお，計測時に全 S-100 蛋白陽性細胞数から連続切片におけるシュモール染色陽性細胞数を差し引いたものを LC 数とした。また，LC と T 細胞との関連を検索するため，口腔上皮を LC が多く存在する部位と少ない部位，すなわち単位面積において 2% 以上の LC 率を示した部位を LC-rich 部，同じく 2% 未満の部位を LC-poor 部とし，その直下結合組織（図 1 (B) においてグリッドで示した部分，面積 0.125 mm^2 ）に存在する CD 3 陽性 T 細胞数を計測した。

さらに，LC と炎症性細胞の関連を検索するため，上皮直下の結合組織 0.125 mm^2 の領域を炎症性細胞浸潤が多い部位と少ない部位，すなわち炎症性細胞が 150 個未満の Mild Infiltration 部と 150 個以上の Severe Infiltration 部に分けて，それぞれに接する LC 率を算出した。

5. 統計学的分析

被検者の NF 服用期間，1 日服用量，PD 値，GI 値，歯肉上皮の単位面積あたりの LC 率，LC-rich 部および LC-poor 部における CD 3 陽性細胞数，ならびに Mild infiltration 部および Severe infiltration 部における LC 率の分析に際して，各群間の比較には Mann-Whitney's U-test を，群内での比較には Wilcoxon signed-ranks test を用いて統計学的検索を行った。

結 果

1. 被検部位の臨床評価

今回検索した R 群，NR 群，ND 群ならびに Ctrl 群の被検部位の平均 PD 値はそれぞれ $5.4 \pm 0.5 \text{ mm}$ ， $5.0 \pm 1.3 \text{ mm}$ ， $4.8 \pm 1.0 \text{ mm}$ および $1.7 \pm 0.5 \text{ mm}$ であり，平均 GI 値はそれぞれ 2.1 ± 0.4 ， 1.8 ± 0.7 ， 2.3 ± 0.5 および 0.7 ± 0.5 で Ctrl 群を除いた各群間に統計学的な有意差は認められなかった（表 1）。また，R 群および NR 群の NF 服用期間はそれぞれ平均 18.8 ± 7.8 ， 16.1 ± 13.0 カ月，さらに，1 日服用量は 42.0 ± 16.4 ， $34.0 \pm 10.7 \text{ mg}$ で，両者共に有意差はなかった。

図 2 Control (Ctrl 群) の H.E. 染色像 (×50)

炎症性細胞浸潤は軽度で、結合組織深部のコラーゲン線維の走行は規則正しい。

図 3 NF 感受性増殖歯肉 (R 群) の H.E. 染色像 (×50)

結合組織深部のコラーゲン線維は密に太い束を形成し、錯走している。

2. 組織学的所見

1) H.E. 染色所見

Ctrl 群の歯肉では上皮の肥厚、上皮脚の伸長および炎症性細胞の浸潤は殆どみられず、結合組織深部におけるコラーゲン線維の走行も規則正しかった (図 2)。一方、R 群歯肉の口腔上皮では、有棘層の肥厚、不規則に伸長した上皮脚ならびに錯角化がみられ、結合組織では深部においてコラーゲン線維が密に太い束を形成し、錯走しているものが多く認められた (図 3)。また、炎症性細胞浸潤は主としてポケット上皮直下と口腔上皮直下に多くみられたが、結合組織深部において形質細胞を主体とする集塊を形成している症例も認められた。さらに、NR 群歯肉においては Ctrl 群に比べて上皮の肥厚やポケット上皮直下と口腔上皮直下に炎症性細胞浸潤が見られたが、R 群に比べて顕著ではなかった。ND 群では上皮の肥厚と不規則な伸長が認められ、結合組織でも密に錯走するコラーゲン線維の束が認められたが、いずれも R 群の歯肉と比較すると顕著ではなかった。しかし、炎症性細胞浸潤の程度は他の群に比べて著しく強かった。

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、各群とも歯肉上皮の基底層から有棘層にかけて散在していた。しかし、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が認められた。陽性細胞は Ctrl 群の歯肉では極めて少数であったのに対し、R 群では多数認められた (図 4)。さらに、NR 群では Ctrl 群と同様に陽性細胞数は極めて少なかったのに対し (図 5)、ND 群では数多く認められたが、その数は R 群と比べると少なかった

図 4 NF 感受性増殖歯肉 (R 群) の抗 S-100 蛋白抗体による免疫染色像 (×66)

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 (矢印)。

(図 6)。

以上の結果をまとめると、S-100 蛋白陽性細胞は R 群 > ND 群 > NR 群 > Ctrl 群の順に多く認められた。

3) CD 3 陽性細胞の組織学的所見

CD 3 陽性細胞は、各群とも S-100 蛋白陽性細胞が

図5 NF非感受性歯肉(NR群)の抗S-100蛋白抗体による免疫染色像(×66)

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認められる(矢印)。R群およびND群に比べるとその数は軽微である。

図6 プラークに起因する増殖性歯肉炎患者(ND群)の抗S-100蛋白抗体による免疫染色像(×66)

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認められる(矢印)。その数はR群よりは少なく、NR群よりは多い。

多く検出された部位に一致して多数集積していた(図7 A, B)。

3. 総歯肉上皮細胞に対するLCの存在比率

歯肉上皮の単位面積(0.125 mm²)あたりのS-100蛋白陽性細胞の平均値はR群16.5±5.2個, NR群6.1±3.5個, ND群10.3±2.4個, Ctrl群2.5±0.7個で, シュモール染色陽性細胞はそれぞれ2.5±1.0個, 2.3±0.8個, 2.6±1.2個, 1.8±1.1個であった。この結果, 総歯肉上皮細胞に対するLCの出現頻度はR群3.6±1.7%, NR群1.3±1.1%, ND群2.3±0.8%, Ctrl群0.7±0.7%であり, R群とNR群(p<0.01), ND群(p<0.05)およびCtrl群(p<0.01)との間で, ND群とNR群(p<0.05), Ctrl群(p<0.05)との間で有意差が認められた。これに対し, NR群とCtrl群との間には有意差は認められなかった(図8)。

4. 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

R群のLC-richおよびLC-poor領域における平均CD3陽性細胞数はそれぞれ42.9±13.0個, 20.8±6.1個であり, ND群では30.9±6.8個, 14.6±3.8

個であった。各群でrich, poor領域間(p<0.01)において, また両群のLC-rich領域間(p<0.05)で有意差が認められた。さらに, NR群, Ctrl群のLC-poor領域での平均陽性細胞数は8.0±3.4個, 7.3±5.8個であり, LC-poor領域においてR群とNR群(p<0.01), ND群(p<0.05), およびCtrl群(p<0.01)間で, またND群とCtrl群(p<0.05)間で有意差が認められた(図9)。なお, NR群およびCtrl群においてLC-rich領域は極めて稀であり, 標本数が少数であったため統計処理から除外した。

5. LCと炎症性細胞浸潤との関連

R, NRおよびND群のSevere infiltration部におけるLCの比率は, それぞれ3.9±2.0%, 1.4±1.4%および3.0±1.4%であった。これに対し, R, NR, NDおよびCtrl群のMild infiltration部におけるLCの比率は, 3.4±1.5%, 1.1±0.9%, 1.7±0.6%および0.7±0.7%であり, ND群のみにSevereおよびMild infiltration部間で有意差を認めた(p<0.05)。また, Severe infiltration部においてR群とNR群間(p<0.01)およびND群とNR群間(p<0.05)で有意差が認められた。一方, Mild infil-

図 7 (A) R 群歯肉上皮内の S-100 蛋白陽性細胞の染色像 (×66)
(B) 同部位における CD 3 陽性細胞の染色像 (×66)

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。

tration 部において R 群と NR 群 ($p < 0.01$)、ND 群 ($p < 0.01$) および Ctrl 群間 ($p < 0.01$) において、また ND 群と Ctrl 群間 ($p < 0.05$) において有意差を認めた (図 10)。

考 察

上皮組織中に存在し、生体防御の最前線としての役割を担うランゲルハンス細胞 (LC) は、口腔内においてプラーク^{13,22)}、喫煙²³⁾、金属²⁴⁾などの影響で増加し、歯肉炎や歯周炎^{11~13)}や金属アレルギー²⁴⁾の場合に口腔上皮に多く出現することが報告されている。薬剤性の歯肉増殖症においても、フェニトイン誘導性では増加するが^{16~19)}、リイクロスポリン誘導性では逆に減少する¹⁵⁾。これに対し、NF 誘導性歯肉増殖症における LC の出現頻度に関する報告はこれまで皆無であるため、今回我々は、NF 感受性歯肉 (R 群) を対象として LC の出現に関する検索を行った。その結果、全ての症例において LC が検出され、NF 非感受性歯肉 (NR 群) やプラークが原因とされる歯肉炎 (ND 群) の歯肉上皮よりも S-100 蛋白陽性 LC 率が有意に増加していた。この所見は、我々が過去に報告したフェニトイン誘導性と同様に、本疾患においても LC の果たす役割が増強されている可能性を示唆するもの

である。この LC の増加の原因として、マクロファージや上皮細胞が NF により刺激され、インターロイキン-1などのサイトカインの産生が亢進し²⁵⁾、その結果 LC が歯周組織内に多数誘導された可能性が考えられる^{5,17)}。また、一般に LC は上皮の角化過程の調節に関与していると考えられ^{26,27)}、歯肉増殖症においてこのような機能が亢進したため²⁸⁾ LC の数が増加したのかもしれない。しかし、この方面の研究は少なく、詳細は不明のため今後に残された課題とも言える。

NF 療法における Non-responder の発現率は約 80%⁹⁾と高率でありながら、この群の詳細な特徴はまだ明らかにされてはいない。Barak ら¹⁴⁾は、Responder のみならず Non-responder においても上皮の肥厚を認めているが、今回我々の NR 群においても多くの症例でコントロールに比べ上皮の肥厚が見られた。また、炎症性細胞浸潤、さらに有意差はないが LC の存在密度の上昇傾向を認めた。これは、R 群との比較のために臨床パラメーターである PD と GI 値を両群で同等となるように考慮したため、比較的炎症が強い症例を優先的に採用したことが原因と考えられる。本研究では、NR 群において LC が顕著に少ないという興味ある所見が得られたが、今後 NR 群における炎症性細胞浸潤の程度差にも着目した LC の出現

* Statistically significant at $p < 0.05$
 ** Statistically significant at $p < 0.01$
 (Mann-Whitney's U test)

図8 単位面積当たりの全上皮細胞に占めるLCの存在比率(平均±標準偏差%)

LCの存在比率は、R群>ND群>NR群>Ctrl群の順に高く、R群とND群、R群とNR群、ND群とNR群、R群とCtrl群、およびND群とCtrl群との間にそれぞれ $p < 0.05$, $p < 0.01$, $p < 0.05$, $p < 0.01$ および $p < 0.05$ で有意差を認めた。なお、NR群とCtrl群との間には有意差は認められなかった。

に関するさらなる研究を行う予定である。

さらに、NF増殖症罹患歯肉における炎症性細胞の動態についての詳細な研究は少なく、わずかにNeryら²⁸⁾が形質細胞の増加を、また、Kunimatsuら⁷⁾がマクロファージの活性化について報告している程度である。一方、フェニトイン誘導性歯肉増殖症においても免疫反応の活性化傾向が認められ、形質細胞^{16,29,30)}、LC^{16~18)}および上皮直下のT細胞の増加^{18,31)}、さらにマクロファージの活性化³²⁾等が報告されている。そこで、LCとCD3陽性細胞の集積分布について詳しく調べたところ、R群とND群の両方の歯肉において両者に明らかな関連性が認められた。さらに、LCの抗原呈示をする細胞がT細胞であり、ND群に比べR群においてより多くのLCが認められたことから、NF歯肉増殖症の歯肉組織ではTリンパ球の仲介する免疫反応の活性化が生じている可能性が示唆された。

今回、我々が観察したNFおよびフェニトイン誘導性の増殖性歯肉は、Seymourら³³⁾やSaitoら³⁴⁾の報告と同様、類似した炎症像を呈したが、炎症の程度による差異を詳しく調べるため、炎症性細胞の浸潤程

■ LC-rich region □ LC-poor region

* Statistically significant at $p < 0.05$
 ** Statistically significant at $p < 0.01$
 (Mann-Whitney's U test)
 §§ Statistically significant at $p < 0.01$
 (Wilcoxon signed-ranks test)

図9 歯肉上皮をLCに富んだ領域(LC-rich region)と少ない領域(LC-poor region)に分けた場合の歯肉上皮直下結合組織中CD3陽性細胞数(平均±標準偏差)

R群とND群のrichおよびpoor領域間($p < 0.01$)において、また両群のLC-rich領域間($p < 0.05$)で有意差が認められた。

度による比較検討を試みた。しかし、R群における上皮内のLCの比率は、強い炎症性細胞浸潤領域と弱い領域との間で有意差が認められず、NF歯肉増殖症におけるLCの発現率と炎症性細胞浸潤との関連を明らかにすることはできなかった。この結果は、歯周疾患においても両者が関連するか否かについての統一見解が得られていないことを考えあわせると^{11,13)}、歯肉増殖症を含めた歯周疾患における口腔上皮の免疫反応の複雑さを反映しているのかもしれない¹³⁾。これに反して、上述したようにLC数とCD3陽性細胞数の間には緊密な相関関係が認められたことから、本疾患では抗原提示機能を持つLCが増加したものと推察される。

これまでLCの検出マーカーとしては、CD1a, HLA-DRやS-100蛋白などが知られている。S-100蛋白は細胞内のリン酸化反応やカルシウムイオン調節および細胞骨格形成に関与し、LCでは細胞質にびまん性に分布する³⁵⁾。また、従来より細胞増殖あるいは細

■ Severe infiltration □ Mild infiltration
 * Statistically significant at $p < 0.05$
 ** Statistically significant at $p < 0.01$ (Mann-Whitney's U test)
 § Statistically significant at $p < 0.05$ (Wilcoxon signed-ranks test)

図 10 結合組織内の炎症性細胞浸潤密度の高い領域 (Severe infiltration 部) および低い領域 (Mild infiltration 部) での LC の存在比率 (平均±標準偏差%)

ND 群でのみ Severe および Mild infiltration 部間で有意差を認めた ($p < 0.05$)。また、炎症性細胞浸潤密度の低い領域における R 群の上皮内 LC の比率は、他群に比べて有意に高い値を示した。

胞周期に関連したマーカーとしても用いられ^{10,36)}, Adenoma などの唾液腺腫瘍³⁷⁾や Histocytosis-X³⁸⁾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。一般に、抗 S-100 蛋白抗体を使用したパラフィン切片による LC の検出率は、抗 CD 1 a 抗体や抗 HLA-DR 抗体を用いた凍結切片によるものより低いと考えられている¹⁰⁾。しかし、我々は従来より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ため^{7,8,18)}、本研究においてもパラフィン切片で使用可能な抗 S-100 蛋白抗体を使用した。ただ、ここで考慮しておかなければならないことは、本抗体は LC の分布領域に近いメラニン生成細胞をも認識してしまうため¹⁰⁾、計測値に両者が混在している可能性が考えられることである。さらに、LC と

メラニン生成細胞は類似の樹枝状形態を呈するため²⁶⁾、基底層の陽性細胞を形態の上から光学顕微鏡的に鑑別することも困難である。そこで、両者を区別するために、シュモール染色によりメラニン産生細胞を同定し²¹⁾、同一領域における計測値を全 S-100 蛋白陽性細胞から控除することにより、LC 数を求める方法を採用した。しかし、LC とメラニン生成細胞のより正確な鑑別には、パラフィン切片だけでなく凍結切片を用いた方法も検討する必要があると思われる。この点については今後の研究の課題としたい。

以上の結果より、NF 歯肉増殖症罹患歯肉においては、ブラークにより引き起こされる歯肉炎や NF 非感受性歯肉と比較して、LC を始めとする宿主防御機構に特異性が認められることが示唆された。しかしながら、より詳細な解明には LC の検出法の工夫や炎症性細胞の産生するサイトカインやプロテアーゼなどの炎症性メディエーターにも焦点を当てた検索が必要であると考えられた。このことは、NF 歯肉増殖症の発症、ならびに進展のメカニズムの追求や治療法についての有益な知見を加えることが推察された。

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

- 1) Ramon, Y., Behar, S., Kishon, Y. and Engelberg, I. S.: Gingival hyperplasia caused by nifedipine-a preliminary report. *Int. J. Cardiol.*, 5: 195-206, 1984.
- 2) 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.
- 3) Kimball, O.P.: The treatment of epilepsy with sodium diphenyl-hydantoinate. *J. Am. Med. Ass.*, 112: 1244-1245, 1939.
- 4) Hassell, T.M. and Hefti, A.F.: Drug-induced gingival overgrowth: Old problem, new problem. *Crit. Rev. Oral Biol. Med.*, 2: 103-137, 1991.
- 5) Seymour, R.A., Thomason, J.M. and Ellis, J.S.: The pathogenesis of drug-induced gingival overgrowth. *J. Clin. Periodontol.*, 23: 165-175, 1996.
- 6) Nishikawa, S., Nagata, T., Morisaki, I., Oka, T. and Ishida, H.: Pathogenesis of drug-induced gingival overgrowth. A review of studies in the rat model. *J. Periodontol.*, 67: 463-471, 1996.
- 7) Kunitatsu, 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.
- 8) 尾崎幸生, 國松和司, 田尻公一, 原 宜興, 加藤伊八 : ヒトニフェジピン歯肉増殖症における抗 PCNA 抗体を用いた線維芽細胞の増殖に関する研究. *日歯周誌*, 39 : 217-225, 1997.
 - 9) Lombardi, T., Hauser, C. and Budtz-Jorgensen, E. : Langerhans cells : structure, function and role in oral pathological conditions. *J. Oral Pathol. Med.*, 22 : 193-202, 1993.
 - 10) Barrett, A.W. and Scully, C. : S 100 protein in oral biology and pathology. *J. Oral Pathol. Med.*, 23 : 433-440, 1994.
 - 11) 宮武祥子, 原 宜興, 前田勝正, 赤峰昭文, 相田宜利, 青野正男 : 歯周疾患における免疫系細胞の動態に関する免疫組織学的研究. 2. ランゲルハンス細胞の動態. *日歯周誌*, 28 : 179-185, 1986.
 - 12) Johannessen, A.C., Nilsen, R., Knudsen, G.E. and Kristoffersen, T. : In situ characterization of mononuclear cells in human chronic marginal periodontitis using monoclonal antibodies. *J. Periodont. Res.*, 21 : 113-127, 1986.
 - 13) Baelum, V., Fejerskov, O. and Dabelsteen, E. : Langerhans cells in oral epithelium of chronically inflamed human gingivae. *J. Periodont. Res.*, 24 : 127-136, 1989.
 - 14) Barak, S., Engelberg, I.S. and Hiss, J. : Gingival hyperplasia caused by nifedipine. *Histopathologic findings. J. Periodontol.*, 58 : 639-642, 1987.
 - 15) Niimi, A., Tohnai, I., Kaneda, T., Takeuchi M. and Nagura, H. : Immunohistochemical analysis of effect of cyclosporin A on gingival epithelium. *J. Oral Pathol. Med.*, 19 : 397-403, 1990.
 - 16) 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. *Histology and Histopathology*, 5 : 433-438, 1990.
 - 17) 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.
 - 18) 田尻公一, 國松和司, 尾崎幸生, 原 宜興, 加藤伊八 : 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学的研究. *日歯周誌*, 38 : 168-175, 1996.
 - 19) Cocchia, D., Michetti, F. and Donato, R. : Immunochemical and immuno-cytochemical localization of S-100 antigen in normal human skin. *Nature*, 294 : 85-87, 1981.
 - 20) Loe, H. : The gingival index, the plaque index and the retention index systems. *J. Periodontol.*, 38 : 610-616, 1967.
 - 21) Gupta, S.K., Rajwanshi, A.K. and Das, D.K. : Fine needle aspiration cytology smear patterns of malignant melanoma. *Acta. Cytologica.*, 29 : 983-988, 1985.
 - 22) Newcomb, G.M., Seymour, G.J. and Powell, R. N. : Association between plaque accumulation and Langerhans cell numbers in the oral epithelium of attached gingiva. *J. Clin. Periodontol.*, 9 : 297-304, 1982.
 - 23) Cruchley, A.T., Williams, D.M., Farthing, P.M., Speight, P.M., Lesch, C.A. and Squier, C.A. : Langerhans cell density in normal human oral mucosa and skin : relationship to age, smoking and alcohol consumption. *J. Oral Pathol. Med.*, 23 : 55-59, 1994.
 - 24) van Loon, L.A., van Elsas, P.W., Bos, J.D., ten Harkel-Hagenaar, H.C., Krieg, S.R. and Davidson, C.L. : T-lymphocyte and Langerhans cell distribution in normal and allergically induced oral mucosa in contact with nickel-containing dental alloys. *J. Oral Pathol. Med.*, 17 : 129-137, 1988.
 - 25) Henderson, J.S., Flynn, J.C., Tucci, M.A., Tsao, A. K., Zebrowski E.J., Odum, O. and Johnson, R.B. : Site-specific variations in metabolism by human fibroblasts exposed to nifedipine in vitro. *J. Oral Pathol. Med.*, 26 : 6-10, 1997.
 - 26) 二階宏昌, 伊集院直邦 : 口腔上皮内の樹枝状樹状細胞に関する考察. *広島大学歯学雑誌*, 7 : 102-126, 1975.
 - 27) Relay, P.A. : Function of high-level melanocyte. *Nature*, 201 : 1031, 1986.
 - 28) Nery, E.B., Edson, R.G., Lee, K.K., Pruthi, V.K. and Watson, J. : Prevalence of Nifedipine-Induced Gingival Hyperplasia. *J. Periodontol.*, 66 : 572-578, 1995.
 - 29) Butler, R.T., Kalkwarf, K.L. and Kaldahl, W.B. : Drug-induced gingival hyperplasia : phenytoin, cyclosporin, and nifedipine. *JADA*, 114 : 56-60, 1987.
 - 30) Dill, R.E. and Iacopino, A.M. : Myofibroblasts in phenytoin-induced hyperplastic connective tissue in the rat and in human gingival overgrowth. *J. Periodontol.*, 68 : 375-380, 1997.
 - 31) Dahllöf, G., Modéer, T., Otteskog, P. and Sundqvist, K-G. : Subpopulation of lymphocyte in connective tissue from phenytoin-induced gingival overgrowth. *Scand. J. Dent. Res.*, 93 : 507-512, 1985.
 - 32) Iacopino, A.M., Doxey, D., Cutler, C.W., Nares, S.,

- Stoever, J.F., Gonzales, A. and Dill, E. : Phenytoin and cyclosporin A specifically regulate macrophage phenotype and expression of platelet-derived growth factor and interleukin-1 in vitro and in vivo : Possible molecular mechanism of drug-induced gingival hyperplasia. *J. Periodontol.*, 68 : 73-83, 1997.
- 33) Seymour, R.A. and Heasman, P.A. : Drug and the periodontium. *J. Clin. Periodontol.*, 15 : 1-16, 1988.
- 34) Saito, K., Mori, S., Iwakura, M. and Sakamoto, S. : Immunohistochemical localization of transforming growth factor β , basic fibroblast growth factor and heparan sulphate glycosaminoglycan in gingival hyperplasia induced by nifedipine and phenytoin. *J. Periodont. Res.*, 31 : 545-555, 1996.
- 35) Donato, R. : Perspectives in S-100 protein biology. Review Article. *Cell Calcium*, 12 : 713-726, 1991.
- 36) Kligman, D. and Hilt, D.C. : The S 100 protein family. *Trends. Biochem. Sci.*, 13 : 437-443, 1988.
- 37) 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. & Histopathol.*, 401 : 237-249, 1983.
- 38) Stewart, J.C., 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.

連絡先 :

長崎大学歯学部歯科保存学第二講座

〒 852-8588 長崎市坂本 1-7-1