

藏本明子 論文内容の要旨

主 論 文

The formation of immune complexes is involved in the acute phase of periodontal destruction in rats

(免疫複合体形成はラットの活動期歯周組織破壊に関与する)

(藏本明子、吉永泰周、金子高士、鵜飼孝、白石千秋、押野一志、市村育久、原宜興)

(Journal of Periodontal Research in press)

長崎大学大学院医歯薬学総合研究科医療科学専攻

(主任指導教員：原宜興 教授)

緒 言

歯周炎は細菌感染により引き起こされる慢性炎症性疾患であり、アタッチメントロスと歯周組織破壊を特徴とする。これらは、細菌性病原因子による破壊作用ばかりでなく、歯周組織へ侵入した細菌に対する過剰な宿主の免疫反応により生じると考えられているが、そのメカニズムの詳細は不明である。これまでに歯周炎患者において歯周炎の病原細菌に対する血清 immunoglobulin G (IgG)抗体レベルの上昇が報告されており、さらに、血清 IgG 抗体レベルの上昇に伴い歯肉溝滲出液(GCF)中の IgG 抗体レベルは血清 IgG 抗体レベルよりも増加するとの報告もある。これらから歯周ポケットにおける免疫複合体の存在が示唆される。事実、歯周炎患者の歯肉組織で、活性化された補体成分が IgG とともに検出されており、歯周炎罹患部位の GCF 中からは健康部位と比較して多くの免疫複合体が検出されたという報告もある。

免疫複合体の形成は補体古典経路を活性化し、好中球の活性化を誘導する。活性化された好中球はサイトカインやタンパク分解酵素を放出することで歯周組織破壊に関与すると考えられている。しかし歯周組織で免疫複合体が形成されることが歯周炎の発症や進行に関与しているかどうかについては明らかになっていない。そこで今回我々は、歯周炎の発症や進行への免疫複合体の関与を明らかにするために、*Escherichia coli* (*E. coli*)の lipopolysaccharide (LPS)および生物学的活性の低い ovalbumin (OVA)を抗原として用い、これらに対する特異的 IgG 抗体を作製した後、LPS および OVA と特異的 IgG 抗体を交互にラット歯肉溝へ 10 日間滴下した。

対象と方法

E. coli LPSもしくはOVAによる免疫感作ラットを作製し、心血から血清を分離してラット抗 *E. coli* LPS 抗体および抗 OVA 抗体を精製した。これを抗 LPS IgG および抗 OVA IgG とした。また対照として、非感作ラットより精製した IgG を control IgG とした。各抗体の精製純度は SDS-PAGE ならびに western blotting にて確認を行い、抗体価は ELISA 法にて確認した。非感作ラット上顎両側第一臼歯口蓋側歯肉溝に 1 μ g/ μ l の抗 LPS IgG もしくは抗 OVA IgG と 50 μ g/ μ l の LPS もしくは OVA をそれぞれ 5 分毎に交互に 7 回ずつ滴下した。これを 1 クールとして、24 時間毎に 10 日間滴下を行った。そして 10 回目の滴下の 1 時間後に屠殺し、これを抗 LPS IgG 群もしくは抗 OVA IgG 群とした。対して、control IgG と LPS もしくは OVA を滴下した群を control LPS 群および control OVA 群、control IgG と PBS のみを滴下した群を control 群とした。ラットを屠殺後、上顎骨を採取し、採取した両側の上顎骨を AMeX 法にてパラフィン包埋、連続切片を作製して H.E. 染色を行った。破骨細胞同定のため、酒石酸耐性酸フوسفターゼ染色 (以下 TRAP 染色) を行い、歯槽骨頂部の骨面上に存在する多核の TRAP 陽性細胞を計測した。H.E. 染色切片を用いて、セメントエナメル境 (CEJ) から接合上皮 (JE) の根面に接している部位の歯冠側端までの距離をアタッチメントロスとし、また、CEJ から歯槽骨頂部までの距離を骨吸収量として計測した。さらに、JE 内及び JE に近接した結合組織中の炎症性細胞数を計測した。免疫複合体の検出のため、抗 C1qB 抗体を用いて免疫染色を行い、免疫複合体とアタッチメントロスとの関連性を検討した。

結 果

E. coli LPS もしくは OVA と、精製した抗 LPS IgG もしくは抗 OVA IgG を用い、抗原抗体反応の特異性の検討を ELISA 法にて検討した結果、control IgG と比較し、抗 LPS IgG の抗体価は 44.2 倍、抗 OVA IgG の抗体価は 341 倍上昇していた。

組織学的計測の結果、control 群、control LPS 群および control OVA 群にはアタッチメントロスをまったく認めず、一方、抗 LPS IgG 群では平均 173 μ m、抗 OVA IgG 群は平均 53 μ m であった。また、抗 LPS IgG 群では多数の好中球浸潤が、接合上皮および近接する結合組織に観察された。C1qB は control 群、control LPS 群および control OVA 群では検出されなかった。一方抗 LPS IgG 群、抗 OVA IgG 群では、好中球浸潤が見られる接合上皮内および近接する結合組織に C1qB が検出された。また、抗 LPS IgG 群のみ多数の破骨細胞を認めた。

考 察

本研究において、免疫複合体の形成が歯周組織破壊の活動期に関与し、抗原の生物学的活性も重要であることが示された。免疫複合体の形成は補体カスケードを活性化し、その結果炎症性細胞浸潤と局所の炎症性反応が促進されると言われている。これは細菌を破壊し壊死組織を排除するなど全身への炎症の波及を阻止することで宿主を保護する反面、局所の宿主組織を破壊する一面もある。今回の実験は高濃度抗原を短期間に集中して用いたため、急性炎症を誘導している。低濃度抗原を用いてより長期間にわたる実験を行ったならば、慢性炎症へ移行したかもしれない。そして抗 LPS IgG 群のみ破骨細胞が認められ、抗 OVA IgG 群と比較してアタッチメントロス、炎症性細胞数が増加していたことから、抗原の生物学的活性も重要であると考えられる。