

長野 史子 論文内容の要旨

主 論 文

Gram-positive bacteria as an antigen topically applied into gingival sulcus of immunized rat accelerates periodontal destruction.

(ラットにおけるグラム陽性細菌の感作および歯肉溝内滴下は
歯周組織破壊を促進する)

(長野史子、金子高士、吉永泰周、鵜飼孝、蔵本明子、
中津 晋、押野一志、市村育久、原 宜興)

(Journal of Periodontal Research・掲載時期は未定)
〔ページ数未定〕

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

歯周炎は歯槽骨の吸収とアタッチメントロスを特徴とし、その発症には細菌および細菌成分と宿主の免疫系が関与するとされている。当講座では蔵本らがラット歯肉溝における*E. coli* LPSとその特異抗体による免疫複合体の形成は歯周組織破壊を誘導すること、さらに卵白アルブミンと比較することで抗原の有する生物学的活性も影響することを報告した。また吉永らは*E. coli* LPSで感作後に歯肉溝へ同LPSを滴下すると、同様の歯周組織破壊が起こることを報告した。しかし、これらの研究で用いているグラム陰性細菌は口腔内細菌ではない。そこで今回の研究では口腔内に存在するグラム陽性細菌*Staphylococcus aureus* (以下*S. a.*)とグラム陰性細菌*Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (以下*A. a.*)の菌体破砕物を抗原として用いて、吉永と同様の実験を行い、その歯周組織破壊への影響を検討した。

対象と方法

菌体破砕物は *S. a.* または *A. a.* を 100℃で 10 分加熱した後に 1 分間超音波破砕したものを用いた。9 週齢のルイス系雄性ラットを、それぞれの菌体破砕物で感作もしくは非感作の 4 グループに分けた。感作群では菌体破砕物とフロイントの不完全アジュバントの混和物をラット腹腔内に投与し、28 日後に再度ブースター投与を行なった。非感作群ではフロイントの不完全アジュバントと PBS のみを、感作群と同じスケジュー

ールで二度腹腔内投与した。その 24 時間後から、上顎第一臼歯口蓋側歯肉溝内にそれぞれの菌体破砕物 $25 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ を 30 分間滴下し、24 時間ごとに 10 日間繰り返した。10 日目の滴下の 24 時間後に屠殺して上顎骨を摘出した。これをパラフィン包埋し、作製した頬舌的な連続切片に対して HE 染色、TRAP 染色、C1qB 染色を行った。感作の状態を確認するために、1 回目と 6 回目の滴下の直前と屠殺時にラットの眼窩化静脈から採血を行った。

結 果

血清中の *S. a.* または *A. a.* に対する IgG 抗体レベルは、*S. a.*、*A. a.* 感作群ともに滴下開始後 5 日目には血清抗体レベルが上昇しており、屠殺直前にも上昇していた。それに対して非感作群では血清抗体レベルはほとんど変化していなかった。そして、感作群は非感作群に比べて、有意にアタッチメントロスが大きかった。また歯槽骨頂部の TRAP 陽性多核細胞は有意に増加しており、かつ歯槽骨レベルの低下も認められた。とくに *A. a.* 感作群では、血清抗体レベルとアタッチメントロスとの間に強い相関関係が認められた。C1qB 染色では、感作群にのみ接合上皮および接合上皮周囲の結合組織に陽性反応が観察された。

考 察

これまでに歯周病患者においては、*A. a.* や *P. g.* に対する血清 IgG 抗体レベルが高いことが報告されている。また血清 IgG 抗体レベルが上昇している歯周炎患者では、歯肉溝浸出液 (GCF) 中の IgG 抗体レベルも上昇している。今回の実験で、ラットの歯肉溝内の抗体レベルを測定することは困難だったが、血清抗体レベルの上昇は確認されたので、GCF 中の抗体レベルも上昇していたと思われる。そして C1qB を利用した免疫組織学的染色では *S. a.*、*A. a.* 滴下群ともに感作群のみに反応が見られ、同部での免疫複合体の形成が示唆された。*S. a.* 滴下群、*A. a.* 滴下群ともに、感作群において有意に深い歯周ポケットが形成され、強い炎症性細胞の浸潤や歯槽骨の吸収も認められた。この結果から、グラム陽性菌あるいはグラム陰性菌の菌体破砕物で感作をした後に、同一の菌体破砕物の歯肉溝滴下を行うと免疫複合体が形成され、歯周組織の破壊が生じることが示唆された。おそらく免疫複合体の形成とそれに伴う補体の活性化により、好中球の走化因子として働く C5a や C3a などの補体成分が産出され、好中球が浸潤したと考えられる。活性化された好中球は殺菌作用を有する反面、活性酸素や蛋白質分解酵素を放出し組織破壊を起こす。活性化された好中球も歯周組織の破壊を生じさせたと考えられる。一方加熱処理をした *S. a.* は、TNF- α 、IL-8、IL-10 などのサイトカイン産生を促進することが知られており、構成成分の PGN などが骨吸収を促進したと思われる。一方、加熱した *A. a.* に存在する生物学的活性を有する成分としては、熱に強く、接合組織細胞の壊死誘導骨吸収を促進する作用を持つ LPS だと考えた。最近の研究では骨吸収に関連した LPS と PGN の相乗効果が報告されており、*A. a.* に関しては PGN が破骨細胞の形成の促進を助長した可能性もある。

今回の実験では、細菌で感作された状態で歯肉溝内に細菌が存在すれば、グラム陽性細菌であっても歯周ポケット形成が促進される可能性が示唆された。

(1961 文字) *2000 字以内