

〔原著〕 松本歯学 24 : 198~205, 1998

key words : ヒト—歯肉—肥満細胞—歯周疾患

## ヒト歯肉組織の肥満細胞 免疫組織化学的研究

長谷川 亨, 大口弘和, 佐原紀行, 鈴木和夫

松本歯科大学 口腔解剖学第2講座 (主任 鈴木和夫教授)

Mast Cells in Human Gingiva : An immunohistochemical study

TORU HASEGAWA, HIROKAZU OGUCHI, NORIYUKI SAHARA and KAZUO SUZUKI

*Department of Oral Histology, Matsumoto Dental University School of Dentistry*

*(Chief : Prof. K. Suzuki)*

### Summary

Using anti-human mast cell tryptase antibodies, immunohistochemical examinations of mast cells were performed on 10 clinically healthy and 10 chronically inflamed human gingival specimens.

The clinically healthy gingiva was found to be rich in mast cells. Immunostaining revealed about 200 mast cells per mm<sup>2</sup>, and about 150 metachromatic cells per mm<sup>2</sup>. A significant difference in mast cell numbers between both techniques was found within the pocket area. Many mast cells were also found in the chronically inflamed gingival specimens, however, the number of mast cells showed extensive individual variations.

The results demonstrate that the immunostaining technique presently used is a specific and reliable method to examine of mast cells in human gingiva. Individual variations in mast cell density of chronically inflamed gingival specimens may be due to differences in degree, type and period of irritation, however, extended studies with larger samples are needed to provide additional information regarding on the role of the mast cells in gingival inflammation.

### 緒 言

肥満細胞は全身の結合組織中に広く分布している細胞で、細胞質内には histamine, heparin などの生理活性物質, protease, esterase などの分解酵素を含有した大型の分泌顆粒を多数持っているのが特徴である。

臨床的に健全なヒト歯肉組織においても多数の

肥満細胞が粘膜固有層中に存在することが報告されてる<sup>1-10)</sup>。しかし、炎症に伴う歯肉組織内の肥満細胞の分布や細胞数に関しては研究者により差異が認められ、炎症にともなって肥満細胞の細胞数が減少するという報告<sup>1,5,6,11-13)</sup>、増大するという報告<sup>14-17)</sup>、炎症と肥満細胞の細胞数には相関はないという報告<sup>18-20)</sup>など様々で、現在でも統一した見解は得られていない。その要因としては、観

察した試料の個体差、性差、年齢差、さらには炎症の程度による差などあげられているが、肥満細胞の同定方法の違いにも関係している可能性も考えられる。

肥満細胞の同定法として通常よく用いられているのは、トルイジンブルーやメチレンブルーのような塩基性アニリン色素でメタクロマジーを起こした顆粒を持った細胞として同定する方法である。この方法は簡便ではあるが、未成熟な肥満細胞の分泌顆粒はメタクロマジーを起こさないことが報告されており<sup>21)</sup>、すべての肥満細胞を同定できるわけではない。一方、肥満細胞の分泌顆粒内の分解酵素を組織化学的に染色する方法も試みられており、Hall<sup>1)</sup>や Zachrisson<sup>14,19)</sup>はヒト歯肉組織において、組織化学的染色法はトルイジンブルー染色によるメタクロマジー法に比較し、より多くの肥満細胞が同定できると報告している。また最近になり、抗原抗体反応を利用したより特異的な免疫組織化学的染色法で肥満細胞を同定しようとする試みがなされている<sup>22)</sup>。しかし、現在までヒト歯肉組織内の肥満細胞を免疫組織化学的染色法で観察した報告はない。

そこで本研究では、肥満細胞の分泌顆粒成分である tryptase に対するモノクローナル抗体を用い、免疫組織化学的にヒト歯肉組織内の肥満細胞の分布や細胞数を観察し、通常用いられているメタクロマジー法の観察結果と比較検討した。また、炎症に伴う肥満細胞の細胞数や分布変化についても検索した。

#### 材料および方法

##### 1. 試料

観察試料には、臨床的炎症所見が見られない歯肉を有する10名(30代男性)から摂取した歯肉と、フラップオペレーションおよび歯肉切除術の適応により切除された慢性辺縁性歯周疾患患者の歯肉10症例(30代男性10名)を用いた。

##### 2. 観察方法

切除した歯肉組織は、4%パラホルムアルデハイドと0.5%グルタルアルデハイドの混合液で12時間固定した。固定後、試料は0.1 M カゴジル酸緩衝液(pH 7.4)で一晩洗浄した後、5%から30%のショ糖を含んだ同緩衝液に順次浸漬した。試料はその後、O. C. T. compound (Poly-

science, USA) に包埋し、液体窒素中で急速に凍結した。凍結した試料は、クリオスタット (MICROM HM 500) を用いて 8  $\mu$ m の連続凍結切片とした。薄切片を貼着したスライドガラスは、室温で30分以上乾燥後、免疫組織化学的染色を行った。

免疫組織化学的染色は以下に述べるように行った。切片は0.9% NaCl を含んだ0.1 M リン酸緩衝液 (PBS) 中で洗浄した後、0.5% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> を含んだ100%メタノール液中で5分間反応させ、内因性のペルオキシダーゼ活性を除去した。切片をPBSでよく洗浄し、次に非特異的反應阻害のため、20倍に希釈した正常家兎血清 (Dakopatts, Denmark) に30分間浸漬した。その後、一次抗体として500倍希釈した抗ヒト肥満細胞 tryptase のモノクローナル抗体 (Chemion, USA) と室温で3時間反応させた。反応終了後、PBSで5分間3回洗浄し、二次抗体として100倍希釈した家兎抗マウス IgG 抗体 (Dakopatts, Denmark) に室温で1時間反応させた。切片は、PBSで洗浄後、100倍希釈したペルオキシダーゼ-抗ペルオキシダーゼ複合体 (PAP; Dakopatts, Denmark) に室温で1時間浸漬した。PBSで5分間

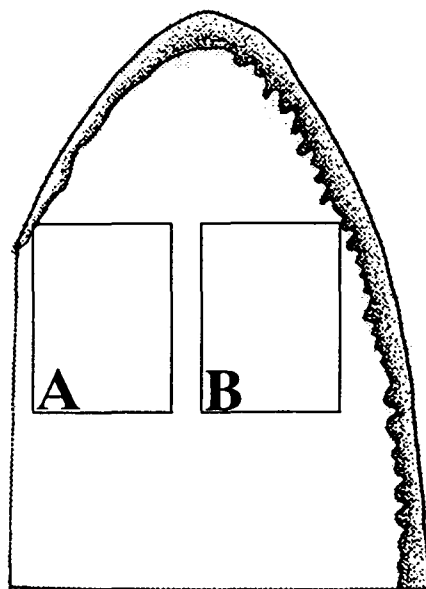


図1：肥満細胞の細胞数を観察した部位  
A 内縁上皮下部 (pocket area)  
B 外縁上皮下部 (oral area)

3回洗浄後、0.005%  $H_2O_2$  を含有した、0.05% diaminobenzidinetetrahydrochloride (DAB) 溶液中で5~10分間浸漬し、発色させた。陰性のコントロールとしては、一次抗体の代わりにPBSを用いた。切片は、glycerol gelatin (Merck, Germany) で封入後、光学顕微鏡下で観察した。

なお、メタクロマジー法の観察には、免疫組織化学的染色を行った隣接切片を用いトルイジンブルー (pH 1.0) で染色した。

### 3. 肥満細胞の分布と細胞数の算出方法

肥満細胞の分布については、1試料につき6枚の連続切片を用い、図1に示した内縁上皮下部 (pocket area) と外縁上皮下部 (oral area) の各部位を50倍で観察し、 $1\text{mm}^2$ あたりの肥満細胞の細胞数を算出し比較検討した。算出結果はすべ

て平均値 (mean) と標準偏差 (S. D.) で表示した。特に、臨床的に健全な歯肉組織内の肥満細胞のメタクロマジー法と免疫組織化学的染色の細胞数の比較、および臨床的に健全な歯肉と慢性辺縁性歯周疾患患者の各症例の歯肉内の細胞数の比較については、Student's t-test による有意差検定をそれぞれ行った。

## 結 果

### 1. 臨床的に健全な歯肉組織

歯肉の粘膜固有層内に多数の陽性細胞が観察された (図2 a)。細胞の形態は、円形、楕円形、紡錘形、さらには分岐した細胞突起を持ったものなどさまざまであった。陽性細胞の細胞形態と組織内の分布状態の間には、明確な関係は認められ

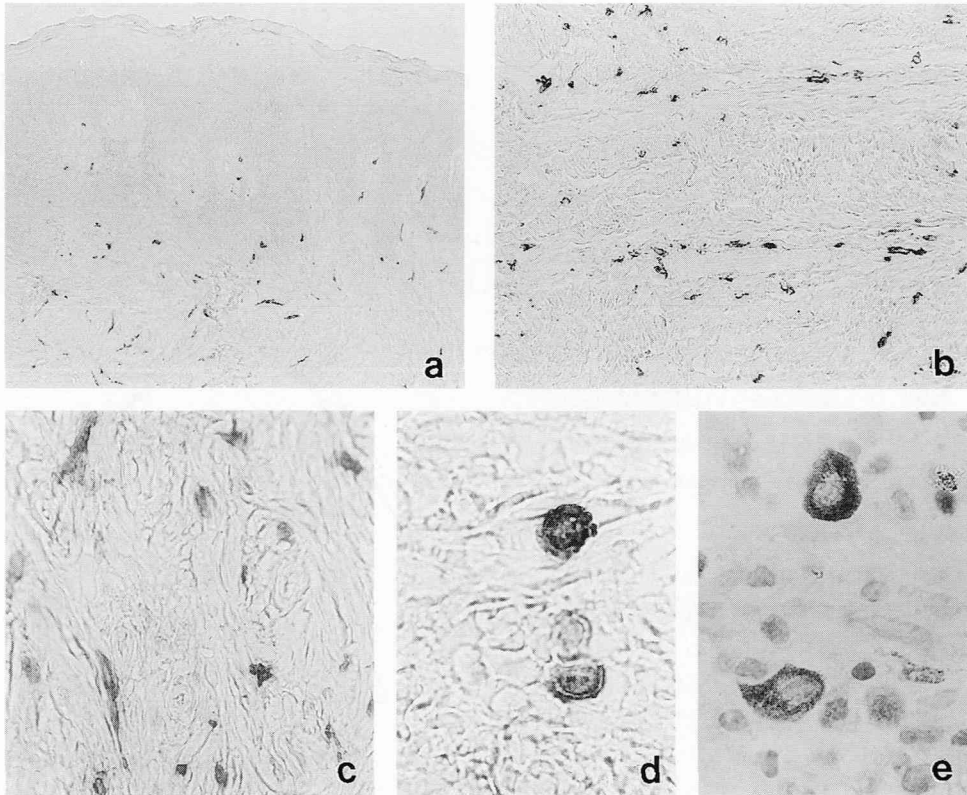


図2：臨床的に健全な歯肉組織

- a：固有層内に多数の陽性細胞（肥満細胞）が観察された。×62.5
- b：陽性細胞は血管周囲や歯肉線維束間に多数認められた。×125
- c：陽性細胞の形態は様々で、円形、楕円形、紡錘形のものなどがあつた。×250
- d：分泌顆粒に陽性反応が認められる。×625
- e：メタクロマジーを示している肥満細胞内の分泌顆粒。（トルイジンブルー染色）×625

なかった。しかし、円形、楕円形の陽性細胞は固有層の深部の血管周囲に多数観察され、紡錘形や複雑な形態をした陽性細胞は上皮直下の固有層内に多く分布している傾向を示していた(図2 b, c)。高倍率でこれらの陽性細胞を観察すると、細胞質内の顆粒状構造物に陽性の反応が認められた(図2 d)。トルイジンブルーで染色した標本で観察すると、これらの細胞はメタクロマジーを示す分泌顆粒が細胞質内に認められ、肥満細胞であることが確認された(図2 e)。なお、PBSを一次抗体の代わりに用いた陰性コントロールでは、陽性反応は全く認められなかった。

歯肉組織内の陽性細胞の細胞数を図1に示した2つの部位について算出すると、陽性細胞の細胞数は、外縁上皮下部(235.6±62.3/mm<sup>2</sup>)は内縁上皮下部(185.4±86.5/mm<sup>2</sup>)に比較しわずかに多かったが、両者の間には有意な差はなかった(図3)。免疫組織化学的染色に用いた切片に隣接した標本をトルイジンブルー染色し、メタクロマジー法で肥満細胞の細胞数を同様に算出し、免疫組織化学的染色の結果と比較した結果が同様に図3に示してある。免疫組織化学的染色による陽性細胞の細胞数とメタクロマジー法による肥満細胞の細胞数は外縁上皮下部ではほぼ同数であった。しかし、内縁上皮下部では免疫組織化学的染色による細胞数はメタクロマジー法による細胞数に比較し約2倍であり、有意差(P<0.05)が認められた。

## 2. 慢性辺縁性歯周疾患患者の歯肉組織

今回観察した10症例の歯肉の組織化学的炎症の程度は、内縁部から外縁部におよぶ炎症性細胞浸潤で、間質の線維が保持されている中程度の炎症を示すものから、内縁部から外縁部におよぶ広範性細胞浸潤で、歯肉線維の消失を伴う高度の炎症程度を示すものまでであった。免疫組織化学的染色を行うと、内縁上皮下部(図4 a)と外縁上皮下部(図4 b)の固有層内に共に多数の肥満細胞が観察された。高度の炎症を示す症例では、形質細胞とリンパ球からなる慢性の炎症巣内にも多数の肥満細胞が認められた(図4 c, d)。また、一部の症例では、上皮組織直下に肥満細胞が高頻度で認められ、上皮組織内に侵入しているものも観察された(図4 e, f)。

今回観察した10症例の歯肉組織内の肥満細胞の

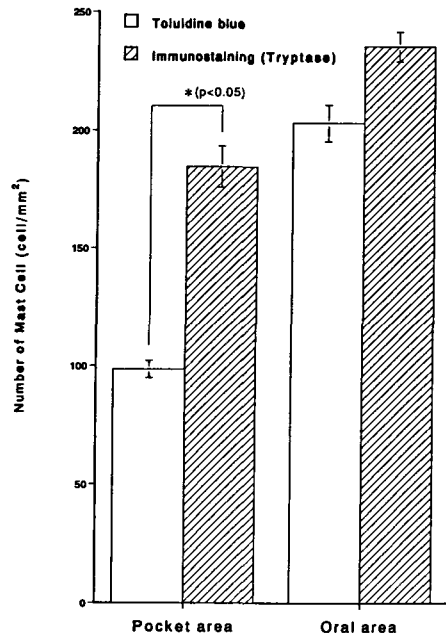


図3：臨床的に健全な歯肉組織内の内縁上皮下部(pocket area)と外縁上皮下部(oral area)でのメタクロマジー法と免疫組織化学的染色との肥満細胞の細胞数の比較。内縁上皮下部で両者の間に有意な差(P<0.05)が認められた。

細胞数を算出すると、各症例により著しい相異が認められた。臨床的に健全な歯肉組織内の細胞数に比較し有意に増加している症例が2例あった。反対に細胞数の減少が有意に認められる症例も4例あった。しかし、今回の観察した症例においては肥満細胞の細胞数と組織学的炎症の程度の間には相関は認められなかった(図5)

## 考 察

緒言でも述べたように、肥満細胞の同定法として通常よく用いられているのはトルイジンブルーやメチレンブルー染色でメタクロマジーを起こす分泌顆粒を含有する細胞を同定する、いわゆるメタクロマジー法である。この方法は簡便ではあるがすべての肥満細胞が同定できるわけではなく特異的なものではない<sup>21)</sup>。事実Hall<sup>4)</sup>やZachrisson<sup>14,15)</sup>は、ヒト歯肉組織内の肥満細胞の細胞数をメタクロマジー法とEpsilon amino caproic acid esteried naphthol ASを基質にしたtryptase活性の組織化学的染色法と比較し、組織化学的染

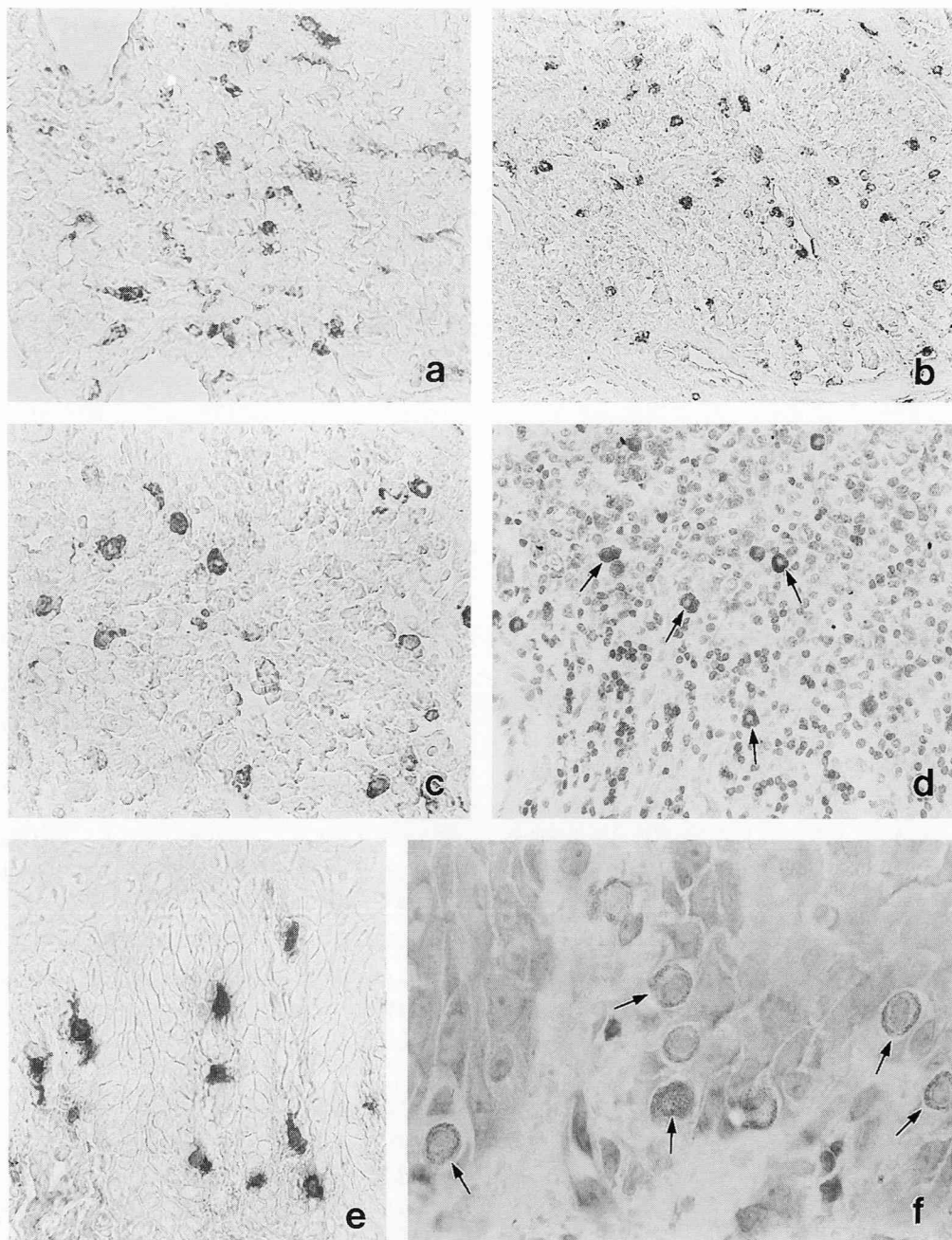


図4：慢性辺縁性菌周疾患患者の歯肉組織

- a：内縁上皮下部，不定形な肥満細胞が多く観察された．×125  
 b：外縁上皮下部，肥満細胞は円形や楕円形のもの多く観察された．×125  
 c：慢性の炎症巣内にも多数の肥満細胞が認められた．×250  
 d：慢性の炎症巣内の肥満細胞（矢印），（トルイジンブルー染色）×125  
 e：上皮組織直下に認められた多数の肥満細胞．×250  
 f：上皮組織内に侵入している肥満細胞（矢印），（トルイジンブルー染色）×625

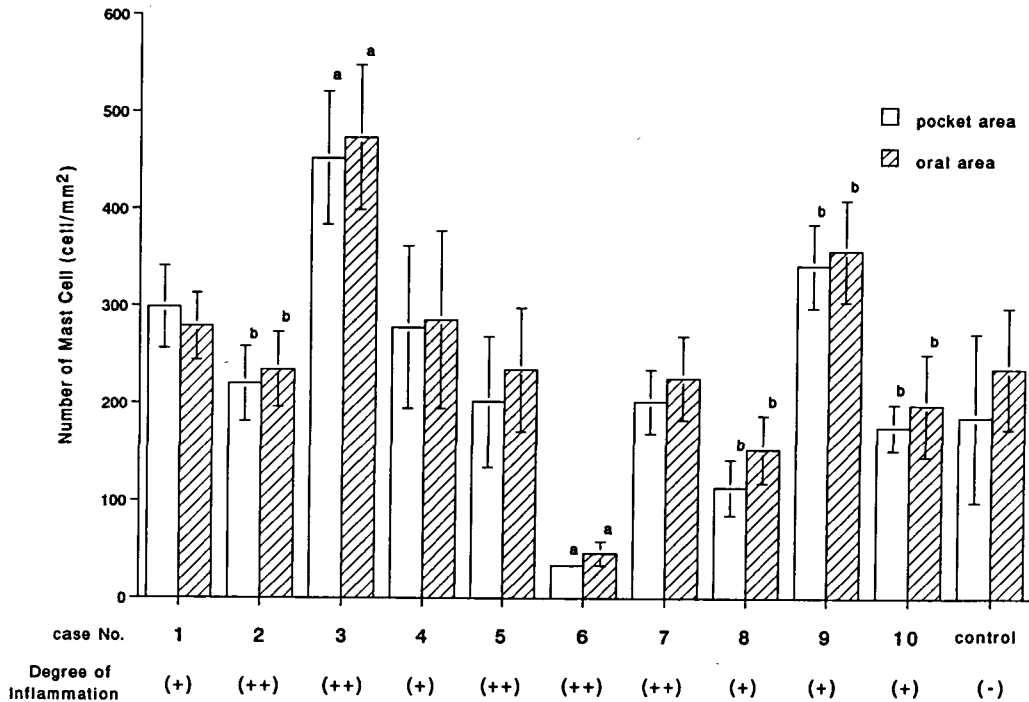


図5：慢性辺縁性歯周疾患患者の歯肉組織内の免疫組織化学的染色による肥満細胞の細胞数。各症例により細胞数の著しい差が認められた。臨床的に健全な歯肉組織 (control) に比較し、有意に多いものは2例、有意に少ないものは4例あった。(a:  $p < 0.01$ , b:  $p < 0.05$ ) しかし、組織学的炎症の程度と細胞数には相関は認められなかった。

(+)：中程度の炎症 (++)：高度の炎症

色法はメタクロマジー法に比べ約1.5から2倍の数の肥満細胞が検出できたと報告している。その理由について、Zachrisson<sup>10)</sup>は、未成熟な肥満細胞では、分泌顆粒中の酸性ムコ多糖類 (heparin に含まれている) がまだ十分硫酸化されていない為、メタクロマジーが起こらずメタクロマジー法では肥満細胞として同定できないが、tryptase などの protease は heparin より早期に肥満細胞に認められる<sup>23)</sup>からであると述べている。

本研究では、組織化学的染色法よりさらに特異性が高いと考えられている免疫組織化学的染色法で肥満細胞の同定を試み、メタクロマジー法の結果と比較した。抗ヒト肥満細胞 tryptase 抗体を一次抗体として用いた免疫組織化学的染色法では、内縁上皮下部と外縁上皮下部の固有層内に共に多数の肥満細胞を同定することができた。また、免疫組織化学的染色法により検出された肥満細胞の細胞数は、両観察部位でメタクロマジー法のものより多く、特に、内縁上皮下部では約2倍

の数の肥満細胞が認められた。この傾向は、tryptase 様活性を組織化学的に染色した報告<sup>4,14,15,17)</sup>とほぼ同様なものであった。以上の結果から、今回用いた免疫組織化学的染色法は、肥満細胞を同定する、より特異的な優れた方法であることが明らかになった。

肥満細胞は機械的刺激や異種の蛋白質、あるいはアレルギー毒などに対して敏感に反応し、heparin や histamine などの分泌顆粒成分を組織中に放出し、局所で炎症を引き起こすだけでなく、免疫応答や慢性炎症などの生体反応にも関連していると推察されている<sup>24)</sup>。このため、外界の刺激に常にさらされている歯肉組織の肥満細胞の分布状態や歯周疾患と肥満細胞の関連を検討することは興味深く、現在まで多くの研究者達による報告がなされてきた<sup>1-20)</sup>。臨床的に健全なヒト歯肉組織に関しては、報告により肥満細胞の細胞数に差は認められるが、本研究の結果と同様に、多数の肥満細胞が固有層内に広く分布していること

はすべての報告で一致している<sup>1-10)</sup>。しかし、歯肉組織の炎症と肥満細胞の関連性に関しては、報告により著しく異なっている<sup>1,5,6,11-20)</sup>。今回の観察では、30代の男性の慢性辺縁性歯周疾患患者の歯肉10症例について、肥満細胞の分布と細胞数を比較したが、細胞数に関しては症例間に著しい差異が認められ、炎症と肥満細胞の細胞数の相関については明らかにできなかった。

肥満細胞は炎症の起こっている部位の他にも、治りつつある傷（結合組織）の周囲にも多く集まっていることが知られており<sup>25-27)</sup>、Angelopoulos と Goaz<sup>27)</sup>は、肥満細胞から放出される heparin, histamine, さらにヒアルロン酸などは、線維芽細胞によって作られる結合組織を増加させると報告している。この観点から、歯肉組織においても、炎症性変化に伴う反応性の線維増殖の発現にも肥満細胞が重要な役割を果たしている可能性も考えられる。Aeschlimann ら<sup>13)</sup>は、慢性辺縁性歯周疾患患者に歯周外科手術を行うと、術後4ヶ月経過後に歯肉組織内の肥満細胞の細胞数が増加することを報告し、炎症の改善、組織の治癒と肥満細胞が密接な関係を持つことを示唆した。また組織の治癒過程と肥満細胞の関連性に関しては、結合組織だけではなく上皮組織でも報告されている<sup>28,29)</sup>。Amler ら<sup>29)</sup>は、抜歯窩の治癒の過程で新たに増生した上皮組織直下には、多数の肥満細胞が観察され、上皮内に侵入している肥満細胞も認められた、と述べている。今回の観察でも、一部の症例において多数の肥満細胞が上皮組織に近接あるいは侵入していた。歯周疾患患者の歯肉上皮組織内への肥満細胞の侵入は電顕レベルでも確認されており<sup>30)</sup>、肥満細胞が歯肉上皮の治癒、増殖にも関与している可能性も考えられた。

以上をまとめると、歯肉組織内の肥満細胞は、炎症に関するだけでなく、炎症により破壊された組織の修復過程にも重要な役割を果たしているものと考えられ、肥満細胞が歯周疾患にどのように関与しているかについては、さらに多くの症例を詳細に検討する必要があると思われる。

## 結 論

1. 抗ヒト肥満細胞 tryptase 抗体を用い、免疫組織化学的にヒト歯肉組織内の肥満細胞を同定する方法は、トルイジンブルーによるメタクロ

マジー法に比較し、より特異的に肥満細胞を同定できることが明らかになった。

2. 健全なヒト歯肉組織内には、多数の肥満細胞が存在していた。
3. 辺縁性歯周疾患患者の歯肉組織では、臨床的に健全な歯肉組織に比べると、肥満細胞の細胞数が増大する傾向を示した。しかし、今回の観察では、炎症と肥満細胞の細胞数の相関は明らかにされず、さらに多くの症例の観察が必要であると思われる。

## 文 献

- 1) Carranza FA and Cabrini RL (1955) Mast cells in human gingiva. *Oral Surg* **8** : 1093—9.
- 2) Dewar MR (1955) Mast cells in gingival tissue. *J Periodontol* **29** : 67—70.
- 3) Takeda Y (1958) Studies on the mast cells in gingival tissue. *Okajimas Folia Anat Jap* **31** : 377—400.
- 4) Hall WB (1966) Staining mast cells in human gingiva. *Archs oral Biol* **11** : 1325—36.
- 5) Zachrisson BU (1967) Mast cells of the human gingiva. I. Investigations concerning the preservation and demonstration of mast cells in the gingival area. *Odont Revy* **19** : 1—22.
- 6) Zachrisson BU (1967) Mast cells of the human gingiva. II. metachromatic cells at low pH in healthy and inflamed tissue. *J Periodont Res* **2** : 87—105.
- 7) Weinstock A and Albright JT (1967) The fine structure of mast cells in normal human gingiva. *J Ultrastruct Res* **17** : 245—56.
- 8) Turner C (1967) Histological categories of the clinically healthy gingiva. *J Periodontol* **38** : 211—7.
- 9) Angelopoulos AP (1973) Studies of mast cells in the human gingiva. I. Morphology. *J Periodont Res* **8** : 28—36
- 10) Barnett ML (1973) Mast cell in the epithelial layer of human gingiva. *J Ultrastruct Res* **43** : 247—55.
- 11) Helton LE and Hall WB (1968) Human gingival mast cells. *J Periodont Res* **3** : 214—23.
- 12) Robinson LP and De Marco TJ (1972) Alteration of mast cell densities in experimentally inflamed human gingivae. *J Periodontol* **43** : 614—22.
- 13) Aeschlimann CR, Kaminski EJ and Robinson PJ (1980) The effects of periodontal therapy on the mast cell population in gingival tissue. *J Periodon-*

- tol **51** : 193—8.
- 14) Zachrisson BU (1968) Mast cells of the human gingiva. III. Histochemical demonstration of immature mast cells in chronically inflamed tissue. *J Periodont Res* **3** : 136—45.
  - 15) Zachrisson BU (1968) Mast cells of the human gingiva. IV. Experimental gingivitis. *J Periodont Res* **4** : 46—55.
  - 16) Shapiro S, Ulmanský M and Scheuer M (1969) Mast cell population in gingiva affected by chronic destructive periodontal disease. *J Periodontol* **40** : 276—8.
  - 17) Kennett CN, Cox SW, Eley BM and Osman IARM (1993) Comparative histochemical and biochemical studies of mast cell tryptase in human gingiva. *J Periodontol* **64** : 870—7.
  - 18) Dummett CO, Bolden T and Goldsberry S (1963) Mast cell density. II. Gingiva in periodontitis. *J Periodontol* **34** : 281—4.
  - 19) Dienststein B, Ratcliff PA and Williams RK (1967) Mast cell density and distribution in gingival biopsies: A quantitative study. *J Periodontol* **38** : 198—203.
  - 20) 油井孝雄 (1991) 歯周疾患とマスト細胞の動態. *日歯周誌* **34** : 1710—21.
  - 21) Enerback L, Miller HRP and Mayrhofer G (1986) Methods for the identification and characterization of mast cells by light microscopy. In: *Mast cell differentiation and heterogeneity*. (eds) Befus AD, Beinstock J and Denburg JA pp. 405—17. Raven Press, New York.
  - 22) Willheim M, Agis H, Sperr WR, Koller M, Bankl HC, Kiener H, Fritsch G, Fureder W, Spittler A and Graninger W (1995) Purification of human basophils and mast cells by multi step separation technique and mAb to CDw 17 and CD 117/c-kit. *J Immunol Meth* **182** : 115—29
  - 23) Combs JW, Lagunoff D and Benditt EP (1965) Differentiation and proliferation of embryonic mast cells of the rat. *J Cell Biol* **25** : 577—92.
  - 24) Alexander JW and Good RA (矢田純一監訳, 1981) : 臨床免疫学入門, 56—7, 医学書院, 東京.
  - 25) Angelopoulos AP (1972) A method of quantitative estimation of tissue components and numbers of mast cells in the gingiva. *J Periodontal Res (Suppl. 9)* : 1—26.
  - 26) Willoughby DA (1972) The inflammatory response. *J Dent Res* **51** : 226—7.
  - 27) Angelopoulos AP and Goaz PW (1972) Incidence of diphenylhydantoin gingival hyperplasia. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* **34** : 898—906.
  - 28) Farnoush A and Mackenzie IC (1983) Sequential histological changes and mast cell response in skin during chemically induced carcinogenesis. *J Oral Pathol* **12** : 300—6.
  - 29) Amler MH, Javobs MS and Amler RW (1987) Mast cell migration during epithelization of extraction wounds. *Ann Dent* **4** : 16—9.
  - 30) Barnett ML (1973) The fine structure of human epithelial mast cells in periodontal disease. *J Periodont Res* **8** : 371—80.