

口腔 *Bacteroides* と歯周組織のサイトカインネットワーク

——歯周病の機序試論——

高 田 春比古

鹿児島大学歯学部 口腔細菌学教室

Oral *Bacteroides* and Cytokine Network in Periodontal Tissues

—— A Possible Mechanism of Periodontal Diseases ——

Haruhiko Takada

Department of Oral Microbiology, Kagoshima University
Dental School, 8-35-1 Sakuragaoka, Kagoshima 890, Japan

Abstract

Oral *Bacteroides* species represented by *Bacteroides (Porphyromonas) gingivalis* and *Bacteroides intermedius (Prevotella intermedia)*, which are predominant in subgingival plaques of adult periodontitis patients and are possible periodontopathic bacteria, possess bioactive materials such as cytoplasmic membranes, peptidoglycans, outer membrane proteins, lipopolysaccharides (LPS), capsules, and fimbriae on their cell surfaces. These materials may modulate the cytokine network in periodontal tissues and induced excessive production of cytokines. Some cytokines are involved in inflammatory as well as immunological responses, and are designated as inflammatory cytokines. Among the inflammatory cytokines, interleukin (IL) 1 has been the most extensively studied, and its existence in periodontal tissues of periodontitis patients and its etiological correlation with periodontitis have been well demonstrated. We found that oral *Bacteroides* LPS, but not other LPS, induced cell-associated IL-1 α and cell-free IL-1 β and IL-6 in normal human gingival fibroblast cultures. The fibroblasts primed with some cytokines, including interferon (IFN)- β , IFN- γ and tumor necrosis factor, produced much higher cell-associated IL-1 α than the non-primed fibroblasts upon stimulation with *Bacteroides* LPS. The IL-1 is capable of inducing proliferation, matrix formation, and production various

cytokines such as IL-1 itself, IL-6, IL-8, colony stimulating factors in fibroblasts themselves and other cells in periodontal tissues. These cytokines in turn augment the inflammatory responses in periodontal tissues. This vicious cascade may be involved in the initiation and development of periodontal diseases characterized by localized chronic inflammation accompanying bone resorption.

Key words

Bacteroides; Lipopolysaccharide; Cytokine network; Fibroblast; Interleukin 1

はじめに

歯周病患者の歯周ポケット内ではグラム陰性の嫌気性桿菌が優位を占めている。なかでも *Bacteroides* (*Porphyromonas*) *gingivalis* ならびに *Bacteroides intermedius* (*Prevotella intermedia*) を始めとする黒色素産生性 *Bacteroides* は疫学的研究に基づき、成人性歯周炎との係わりが研究者の間で広く認められている¹⁾。そこで、歯周病発症機序の解明を目指してこれら菌種に関する研究が多方面から活発に展開されてきた^{2,3)}。

生体内の細胞は相互に調節しあいながら調和のとれた共同作用を営み、生体の恒常性を維持している。サイトカインは細胞間の相互作用に重要な役割を演じており、この機構はサイトカインネットワークと呼ばれている。慢性炎症病巣においては、この調節機構に乱れが生じてサイトカインの異常産性が起っていると考えられる⁴⁾。特にインターロイキン (IL)-1, IL-6, IL-8, 腫瘍壊死因子 (TNF) などは炎症性サイトカインと呼ばれ、炎症病巣の形成に深く関わっている。

本稿では、まず炎症性サイトカイン誘導能を示す口腔 *Bacteroides* の菌体表層成分を概観する。次に *Bacteroides* のリポ多糖 (LPS) の歯肉線維芽細胞を廻るサイトカインネットワークに対する影響を、筆者らの研究を中心にして紹介した後、歯周組織におけるサイトカインネットワークの乱れと歯周病成立との係わりについて論じることとする。

II. 口腔 *Bacteroides* の生物学的に活性な菌体成分

細菌細胞表層には生体反応調節物質 (Biological response modifier, BRM) が局在している。むしろ細菌細胞表層に全く生物活性を欠く成分を見出すことは困難であると言える。これは宿主と寄生性あるいは病原性細菌が地球上に誕生して以来、連綿と続いてきた相互作用が両者の進化に及ぼした効果の集積と言

えよう。これら菌体成分のうちでも細菌細胞壁に普遍的に存在するペプチドグリカンとグラム陰性菌の外膜を構成する LPS については膨大な研究がなされてきた。そして、それぞれの活性中心であるムラミルジペプチド (MDP) とリピド A が化学合成され、種々の合成アナログを供試した研究によって、活性-構造相関が明らかにされている^{5,6)}。これらの研究を通じて菌体成分の生物活性の多くが、それら成分によって宿主細胞に誘導される各種サイトカインの作用に帰することが示唆されている。Fig. 1 はグラム陰性菌のなかでも、最も研究が進んでいる *Escherichia coli* の細胞表層を模式的に示した図である。*Bacteroides* 属の表層構造も基本的には類似のものであるが、いくつかの独特な性状を有している。次に口腔 *Bacteroides* の表層成分について、内側より順次その特徴と生物活性を概説する。

A. 細胞質膜

細胞質膜は動・植物等の真核細胞と細菌等の原核細胞に共通して認められる構造である。しかも細菌では、最内層の膜構造である。そのため生物活性の点ではあまり期待されず、研究は遅れている。しかし、細胞壁を欠き細胞質膜が露出している *Mycoplasma* については、音波破砕物の遠心沈渣が、ヒトならびにマウスのリンパ球 (主として B リンパ球) の増殖を促すマイトジェン作用を示すことが知られている⁸⁾。筆者らは *Staphylococcus aureus* の L 型菌 (細胞壁を欠く) の細胞質膜中に、熱ならびにトリプシン耐性で、クロロホルム・メタノール混液に可溶の B 細胞マイトジェンを見出した^{9,10)}。最近、熊谷らのグループ¹¹⁾は、種々のグラム陽性菌の細胞質膜がヒト T リンパ球を IL-2 非依存的に増殖させることを明らかにし、その活性は膜に組み込まれた 10~15 KDa のタンパクによることを示した。*Bacteroides* を含めて、グラム陰性菌の細胞質膜については、LPS や外膜タンパクの混入のない標品を調製することが困難なこともあって、これまでのとこ

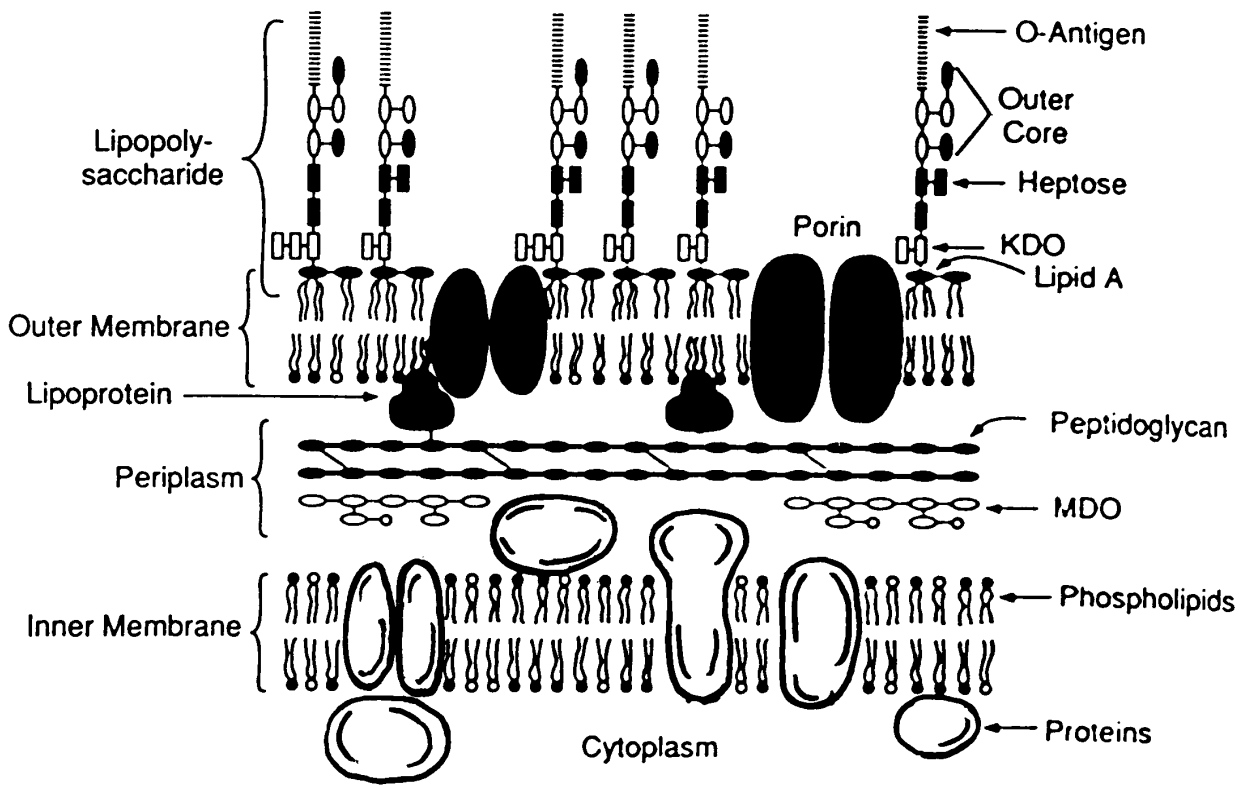


Fig. 1. Schematic structure of the *E. coli* envelope. Ovals and rectangles depict sugar residues. Circles represent the polar headgroups of phospholipids. MDO are membrane-derived oligosaccharides, and KDO is 3-deoxy-D-manno-octulosonic acid. KDO and heptose make up the inner core of LPS. (Quoted from Raetz, C. R. H.⁷⁾)

ろ生物活性の報告は見られない。

B. ペプチドグリカン

上述のようにペプチドグリカンの活性中心である MDP (*N*-アセチルムラミル-L-アラニル-D-イソグルタミン) が化学合成されて以後、この方面の研究は急速に進歩した。MDP は極めて多彩な生物活性を発揮する^{5,12,13}。口腔 *Bacteroides* のペプチドグリカンも MDP 構造を保有しているが、他の構成アミノ酸は必ずしも菌種間で共通ではないようである。例えば、軸ペプチド間の架橋に係わるアミノ酸は、*B. gingivalis* では L-リジンである¹⁴)のに対し、*B. intermedius* ではジアミノピメリン酸である¹⁵。しかし口腔 *Bacteroides* のペプチドグリカンを供試してサイトカイン誘導作用等の生物活性を調べた報告は、現在のところ見られない。

C. 外膜タンパク

外膜タンパクで最も研究が進んでいるのはポーリンである。ポーリンは疎水性の脂質二重層である外膜に

透過孔を形成して、菌体内に親水性物質を取り込む役割を担っている。一方、口腔 *Bacteroides* に関しては、*B. gingivalis* を供試して、多くの外膜タンパクが分離・精製されている¹⁶。これらの外膜タンパクは、主として歯周病患者の *B. gingivalis* に対する免疫状態をスクリーニングする抗原として利用されている。しかし、外膜タンパクは抗原として作用するばかりでなく、免疫担当細胞を非特異的に活性化する作用を示す¹⁷。実際、*B. gingivalis* の細胞表層をドデシル硫酸ナトリウム (SDS) で処理して調製した外膜タンパクに富む画分は、モルモットの卵白アルブミンに対する抗体応答を高め、遅延型過敏症を誘導するアジュバント活性を示すとともに、マウスに対し強力な B 細胞マイトジェンとして作用する¹⁸。最近、Yoshimura ら¹⁹は *B. gingivalis* 381 株よりポーリン活性を欠く 75 KDa のタンパクを精製した。この主要外膜タンパクはマウス脾細胞にマイトジェン活性ならびに多クローン性 B 細胞活性化 (PBA) 作用を発揮し、マウス腹腔マクロファージ培養で IL-1 を誘導すると報告されている²⁰。

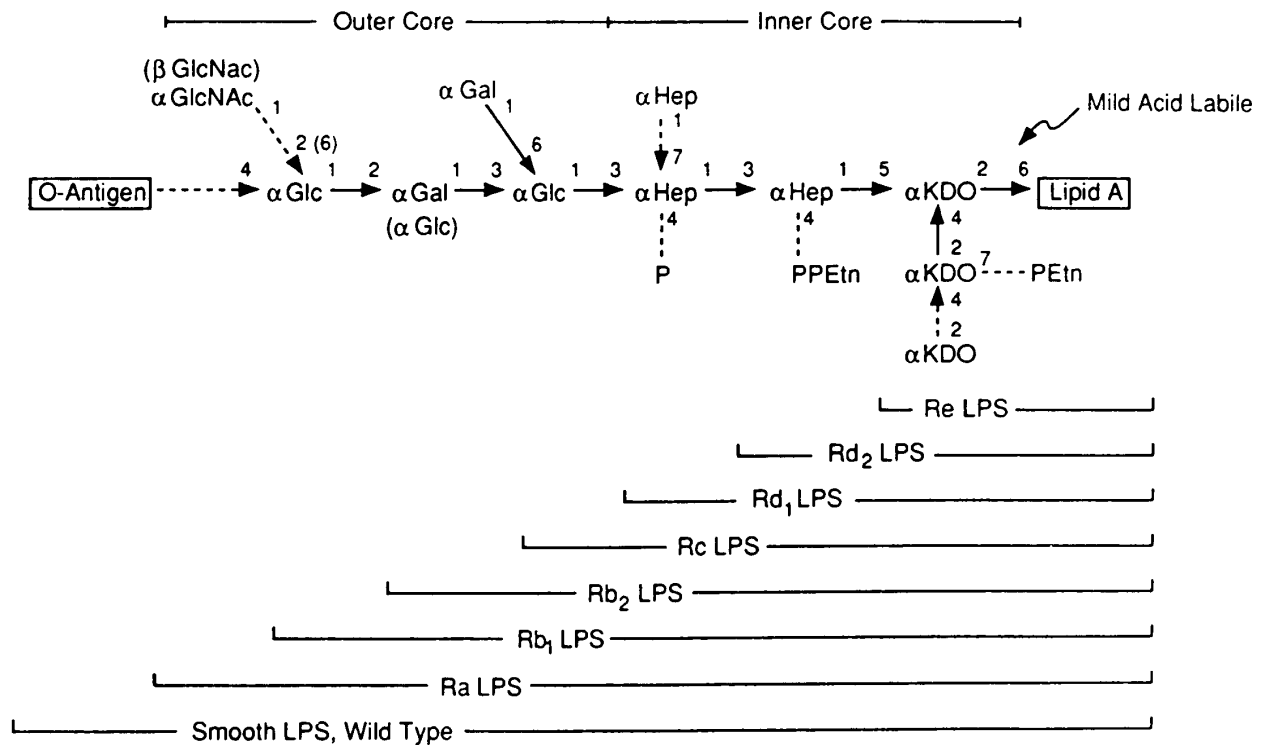


Fig. 2. The core structures of LPS from *S. typhimurium* and *E. coli* K 12 (unique features of *E. coli* in parentheses). (Quoted from Raetz, C. R. H.⁷⁾)

D. LPS

LPSの研究は主として*E. coli*, *Salmonella* 属等の腸内細菌科の菌を供試して進められてきた。Fig. 2は*Salmonella typhimurium*あるいは*E. coli*のLPSの化学構造である。またTable 1は、これまでに報告されたLPSないしリポドAの主な生物活性をまとめて示したものである。一方、*Bacteroides*のLPSの化学構造には未解決の部分が多い。しかし、これまでの報告によって少なくとも*Bacteroides*のLPSは化学構造の点でも、生物活性の点でも腸内細菌科のそれとは異なる特異な性状を有していることが明らかにされている。

1. *Bacteroides* LPSの化学構造

最近、DNA 相同性分析のデータに基づいて、口腔*Bacteroides*を腸内の*Bacteroides fragilis*群等と区別して、別の菌属に分類することが提唱され、*Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*等の菌名が研究者の間で受け入れられつつある。Table 2は従来の菌名と新しい菌名とを対比して示したものである。しかし、これら菌種のLPSは共通する性状を示す場合が多い。そこで本稿では、一括して*Bacteroides* LPSとして論じることとし、従来の菌名を用いることにする。

1968年のHofstadの報告²¹⁾以来、*Bacteroides*のLPS

には腸内細菌科のコア多糖成分に特徴的な成分であるヘプトースとKDO (Fig. 2)が検出されないとされてきた。通常、KDOの分析はLPSを酢酸等の弱酸で加水分解して、KDOとリポドAとの結合を切断した後に実施する。この加水分解を塩酸等の強酸で行うと、*Bacteroides* LPSでもKDOが検出される²²⁻²⁴⁾。これは*Bacteroides* LPSではKDOの4位ないし5位にリン酸が結合していて、リポドAとの結合を酸水解に対して抵抗性になっているためと解釈されている。モノクローナル抗体を供試した解析によると、*B. gingivalis*のLPSには少なくとも2種の血清型が存在するようである²⁵⁾が、それぞれのエピトープは不明である。SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動(PAGE)の成績は*B. gingivalis*のLPSも他のS型のLPSと同様のラダーパターンを示し、繰り返し構造の多糖の存在が示唆されている²⁵⁾。一方、筆者らのデオキシコール酸(DOC)-PAGEの成績では、*B. gingivalis*を除く口腔*Bacteroides*のLPSにはほとんどラダーパターンが認められず、R型のLPS様の泳動パターンを示している(Fig. 3)。特に*B. intermedius* ATCC 25611株のそれはほぼ単一のバンドとなり、その移動度から見て、*Salmonella minnesota*のRcないしRd1 (Fig. 2)に相当する分子量を有することが示唆された(未発表)。いずれにしても口腔*Bacteroides*のLPSのコア多糖の

Table 1. Bioactivities of LPS or lipid A

Lethal toxicity	Adjuvant (immunomodulating) activity
Pyrogenicity	Increase of nonspecific resistance to infection
Preparative and provocative activity for local Shwartzman reaction	Induction of tumor necrosis
Induction of hypothermia in mice	Induction of tumor necrosis factor (TNF)
Induction of leukocytosis	Induction of interferon (IFN)
Induction of bone marrow necrosis	Induction of colony stimulating factor (CSF)
Depression of blood pressure	Induction of prostaglandin (PG) synthesis
Toxicity enhanced by BCG	Induction of tolerance to endotoxin
Toxicity enhanced by adrenalectomy	Induction of early refractory state to temperature change
Toxicity enhanced by galactosamine	
Enhanced dermal reactivity to epinephrine	Somnogenic effect
	Analgesic effect
Platelet aggregation	
Complement activation	
Hageman factor activation	Mitogenic activity for B lymphocytes
Induction of plasminogen activator	Macrophage activation
Limulus activity (activation of clotting enzyme cascade of amoebocyte lysate of horseshoe crab)	Polymorphonuclear leukocyte activation
	Endothelial cell activation
Embryonic bone resorption	Induction of mouse liver pyruvate kinase
Type C RNA virus release from mouse spleen cells	Inhibition of phosphoenolpyruvate carboxykinase

Quoted from Takada, H. and Kotani, S.⁶⁾

Table 2. Nomenclature of black-pigmented anaerobic rods

Former designation	New designation
black-pigmented <i>Bacteroides</i>	black-pigmented anaerobic rods
<i>B. gingivalis</i>	<i>Porphyromonas gingivalis</i>
<i>B. asaccharolyticus</i>	<i>Porphyromonas asaccharolytica</i>
<i>B. endodontalis</i>	<i>Porphyromonas endodontalis</i>
<i>B. intermedius</i>	<i>Prevotella intermedia</i>
<i>B. corporis</i>	<i>Prevotella corporis</i>
<i>B. melaninogenicus</i>	<i>Prevotella melaninogenica</i>
<i>B. denticola</i>	<i>Prevotella denticola</i>
<i>B. loescheii</i>	<i>Prevotella loescheii</i>

From Van Steenberg, T.J.M. et al.¹⁾

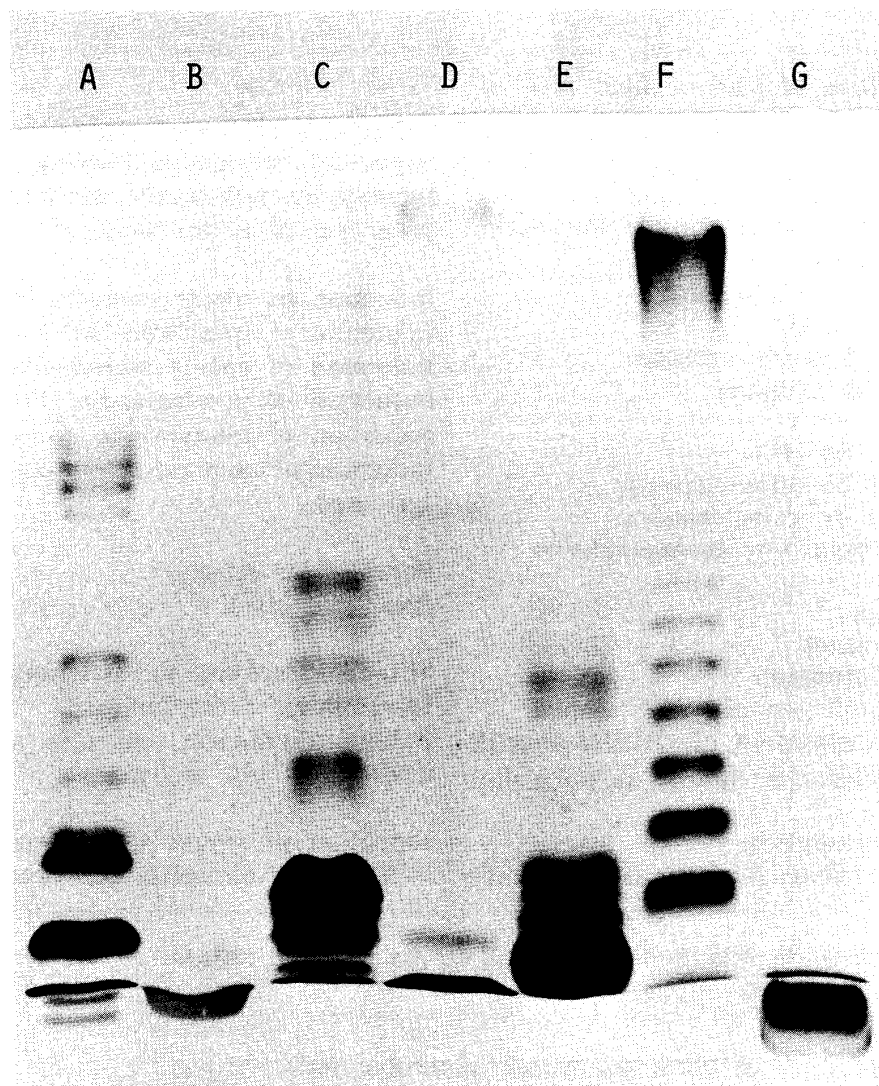


Fig. 3. Migration patterns of LPS from various *Bacteroides* species and reference bacteria. LPS samples (2 μ g each) from *B. gingivalis* 381 (lane A), *B. intermedius* ATCC 25611 (B), *B. loescheii* ATCC 15930 (C), *B. corporis* ATCC 33547 (D), *B. oralis* ATCC 33269 (E), *S. abortus-equi* (F), and *S. minnesota* R595 Re (G) were applied to DOC-PAGE and stained with a silver-stain kit. (Quoted from Takada, H. et al.²⁶⁾)

構造は解明されていない。

Bacteroides LPS のリピドAの構造に関しては, *B. fragilis* 群のLPSを供試した Wollenweberらの先駆的な研究²⁷⁾によって, 特異な脂肪酸組成を示すことが明らかにされている。*B. fragilis*群のリピドAに共通して認められる特徴として, 多くの菌種のLPSに広く認められるテトラデカン酸(ミリスチン酸:14:0)や3-ヒドロキシテトラデカン酸(3-OH-14:0)が検出されないこと, 13-メチル-テトラデカン酸(13-Me-14:0)や3-ヒドロキシン-15-メチル-ヘキサデカン酸(3-OH-15-Me-16:0)などの分岐脂肪酸が高率に検出されることが挙げられる。口腔 *Bacteroides* のLPSについて

も本質的に同様の知見が報告されている^{24,25)}。最近 Weintraubら²⁸⁾は *B. fragilis* のリピドAの推定構造を提示した。Fig. 4にその構造と *E. coli* のリピドAの化学構造とを並べて示しておく。両者とも β (1 \rightarrow 6)グルコサミンジサッカリド骨格の2および2'位にアミド, 3および3'位にエステル結合した脂肪酸を有している。しかし, その脂肪酸組成は上述のように著しく異なっている。また *E. coli* では2'と3'位に2つのアシルオキシアシル脂肪酸を有するのに対し, *B. fragilis* のリピドAは2'位に1つのアシルオキシアシル基を有するのみである。さらに *E. coli* のリピドAは1および4'位に2つのリン酸基を有するのに対し, *B. fragilis* のリピドA

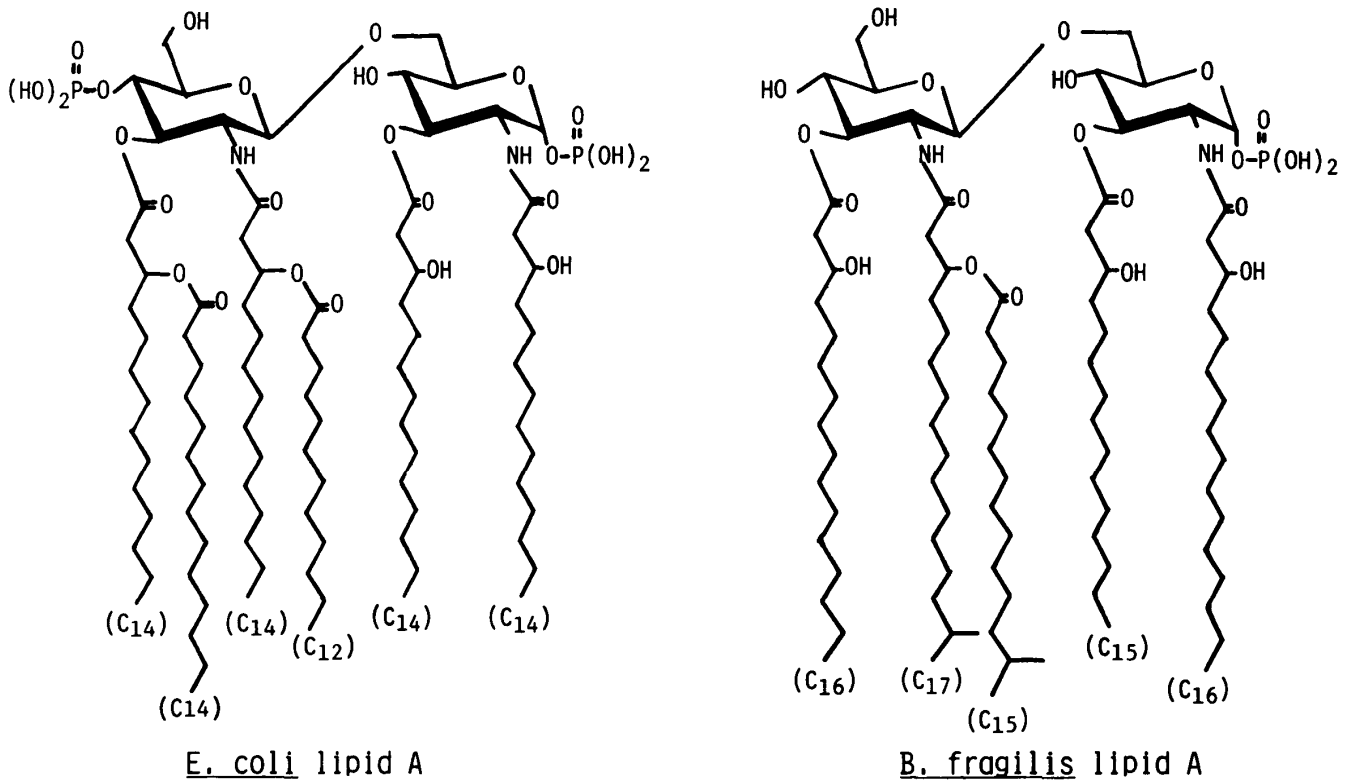


Fig. 4. Proposed chemical structure of *B. fragilis* lipid A as compared with a defined chemical structure of *E. coli* lipid A. (Quoted from Weintraub, A. et al.²⁸)

は4'位のリン酸を欠き、リン酸基は1位の1つだけである。

2. *Bacteroides* LPS の生物活性

Table 1 に示した LPS の生物活性のなかで、致死毒性、発熱作用、Shwartzman 活性などの“毒性”は一般に内毒素作用と呼ばれている。*Bacteroides* LPS の内毒素作用は極めて弱い^{29,30}。このことは合成リピド A 関連化合物を供試した研究の結果^{6,31}とよく一致している。すなわち上述の *Bacteroides* のリピド A の化学構造の特徴である 1) 4'位のリン酸を欠くモノリン酸リピド A であること、2) アシル基がテトラデカン酸 (C14) より相当に長鎖であること、および 3) アシルオキシアシル基が1つしかないことのいずれもが、内毒素活性の減弱をもたらす。このように内毒素活性は極めて構造要求性が厳しく、*E. coli* 型のリピド A に近い構造のみが明確な内毒素活性を発現する^{6,31}。一方、免疫増強作用、各種サイトカイン誘導作用など Table 1 に示した他の大部分の作用は比較的構造要求性が緩やかで、広範なりピド A 関連化合物に共通に認められる^{6,31}。実際、内毒素活性の弱い *Bacteroides* の LPS も *in vitro* 培養系でリンパ球やマクロファージを強く活

性化する^{32,33}。さらにマウスの腹腔マクロファージならびにヒト末梢血単球を刺激して IL-1 を誘導する³⁴⁻³⁷。

なお、*Bacteroides* の LPS は、通常 LPS に対して応答しない C3H/HeJ マウスのリンパ球やマクロファージをも活性化するとその多数の報告がある^{30,32,33}。しかしこれらの作用はいずれも *in vitro* 培養系で調べられたものであり、*in vivo* 検定系では、*Bacteroides* の LPS も C3H/HeJ マウスには作用しない³⁰。但し、筆者らが見出した MDP 前処理マウスにアナフィラキシー様反応と急性死を導く *Bacteroides* LPS の作用に対しては、C3H/HeJ マウスも反応性を示す^{26,38}。ちなみに、これらの研究では供試された LPS はほとんどが熱フェノール・水抽出法³⁹で調製されたものである。筆者らは *B. intermedius* ATCC 25611 株より石油エーテル・クロロホルム・フェノール混液で LPS を抽出 (PCP 法⁴⁰) 後、脱塩とトリエチルアミンによる可溶化を繰り返して⁴¹不純物を除去した LPS を調製した。この標品は LPS 応答性の C3H/HeN マウスに対するマイトジェン作用を保持しているが、C3H/HeJ マウスには同作用を及ぼさなかった⁴²。この所見は *Bacteroides* LPS の C3H/HeJ マウスに対する作用が、LPS 標品中に混入した他の成分の活性に帰する可能性を示唆している。

Table 3. Cytokines and growth factors produced by fibroblasts

CYTOKINESInterleukin 1 α and β (IL-1 α and β)

Interleukin 6 (IL-6)

Interleukin 8 (IL-8)

Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF)

Granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF)

Macrophage colony-stimulating factor (M-CSF)

Interferon β (IFN- β)**GROWTH FACTORS**

Epidermal growth factor (EGF)

Insulin-like growth factor (IGF)

Platelet-derived growth factor (PDGF)

Fibroblast growth factor (FGF)

Transforming growth factor β (TGF- β)Quoted from Takada, H. et al.⁵⁷⁾**E. 莢膜**

Bacteroides の多くの菌株が莢膜を有しており熱フェノール・水抽出法で調製した LPS には莢膜が混入している可能性がある^{43,44)}。上述の C3H/HeJ マウスに対する *Bacteroides* LPS の作用もあるいは莢膜成分に帰する可能性もある。しかし、*Bacteroides* の莢膜を精製してその生物活性を調べた研究はこれまでのところ見られない。

F. 線毛

多くの口腔 *Bacteroides* が線毛を有している。Yoshimura ら^{45,46)}は *B. gingivalis* 381 株より線毛を精製し、単位タンパクである fimbrilin の特性を明らかにした (43 KDa で等電点 6)。さらに Dickinson⁴⁷⁾は同タンパクの遺伝子をクローニングしてアミノ酸配列を明らかにした。その後の研究で *B. gingivalis* の線毛にはアミノ酸配列の点でも抗原性の点でも多用性が認められるという^{48,49)}。同線毛は頬粘膜の上皮細胞に付着する性質を示し、同菌の付着因子として機能していると考えられる⁵⁰⁾。Ogawa ら⁵¹⁻⁵⁴⁾は同精製線毛 (但し 41 KDa) を抗原として歯周病患者の病巣局所で免疫応答を細胞レベルで解析するとともに実験動物の同抗原に対する免疫応答を多面的に研究している。一方、

Hanazawa ら⁵⁵⁾は、*B. gingivalis* の線毛がヒト歯肉線維芽細胞を刺激して IL-1 様因子を誘導すると報告している。

III. 歯周組織のサイトカインネットワークの破綻

前節に記した様に、口腔 *Bacteroides* の菌体表層には多様な生物活性物質が局在し、これらはいずれも宿主細胞を刺激して種々のサイトカインを誘導する可能性を有している。従って歯肉溝に *Bacteroides* が増殖した場合、局所で過剰のサイトカインが産生されてサイトカインネットワークに破綻を来す恐れがおる。これが歯周病発症機序の重要な要因と考えられる。このような観点から筆者は菌体成分の中でも生物活性の研究が最も進んでいる LPS を供試し、歯周組織のサイトカインネットワークに対する作用の研究に着手した。これまで、この方面の研究は、実験動物の腹腔マクロファージや脾リンパ球あるいはヒト末梢血中の単球やリンパ球といった全身的な免疫を担当する細胞を供試したものが多かった。しかし、ヒト歯周組織局所での反応を想定したモデルとしては、これらの細胞は必ずしも適当ではない。そこで筆者は歯周組織を構成する主要細胞であり、潜在的に多彩なサイトカイン産生能を有す

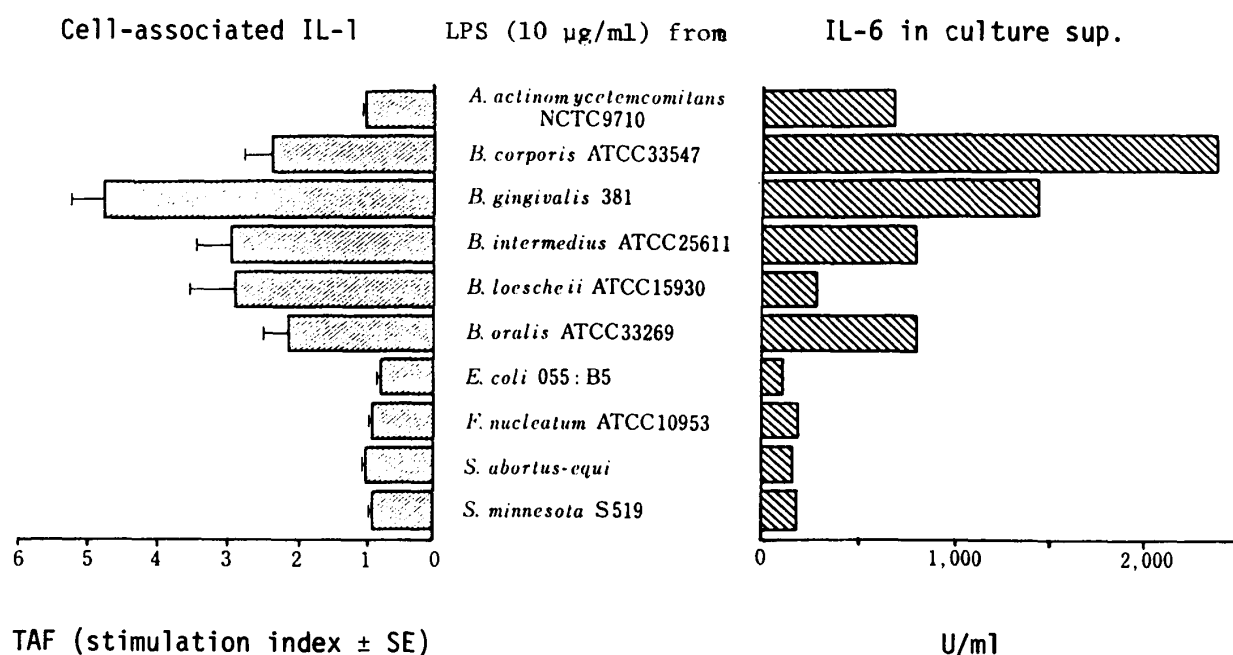


Fig. 5. Induction of IL-1 and human gingival fibroblast cultures by various LPS. (From Takada, H. et al.⁶⁵)

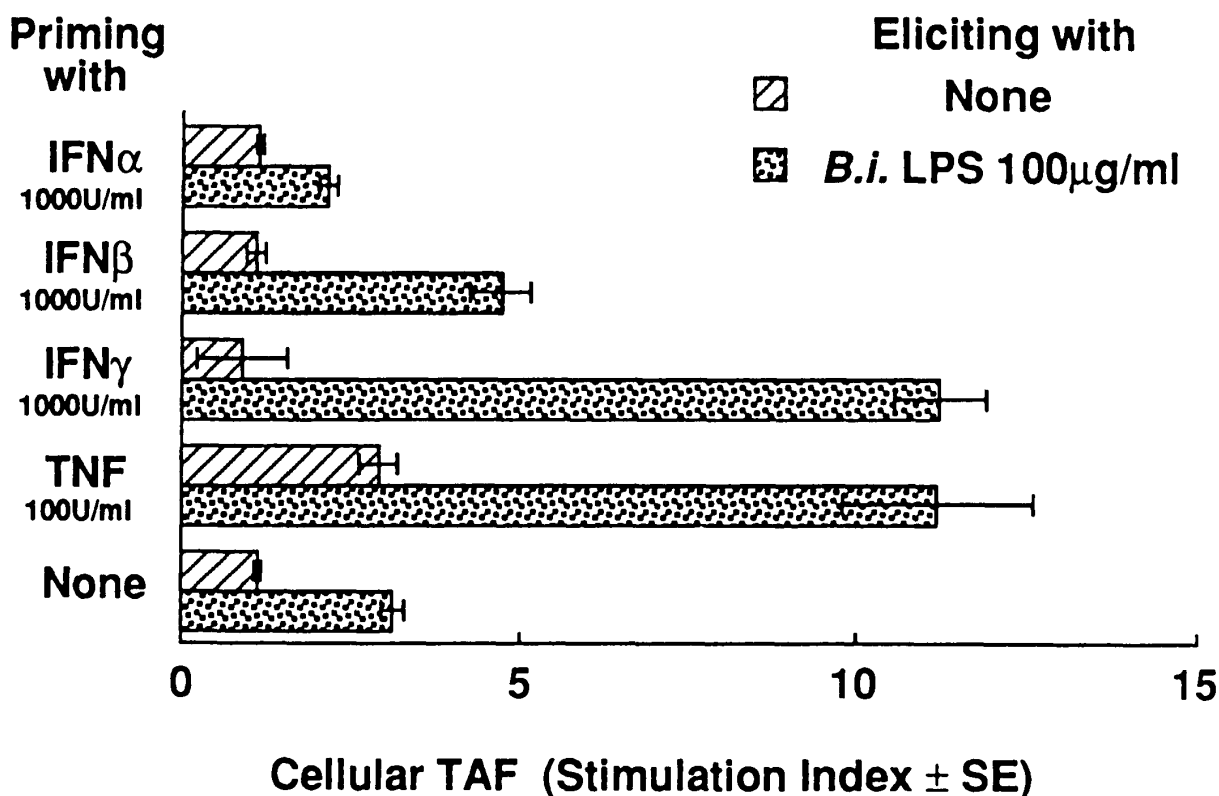


Fig. 6. Priming effects of natural human interferons and recombinant human TNF for generation of cell-associated TAF, which was revealed to be IL-1 α , by human gingival fibroblasts elicited with *B. intermedius* LPS. (Quoted from Hamada, S. et al.³³)

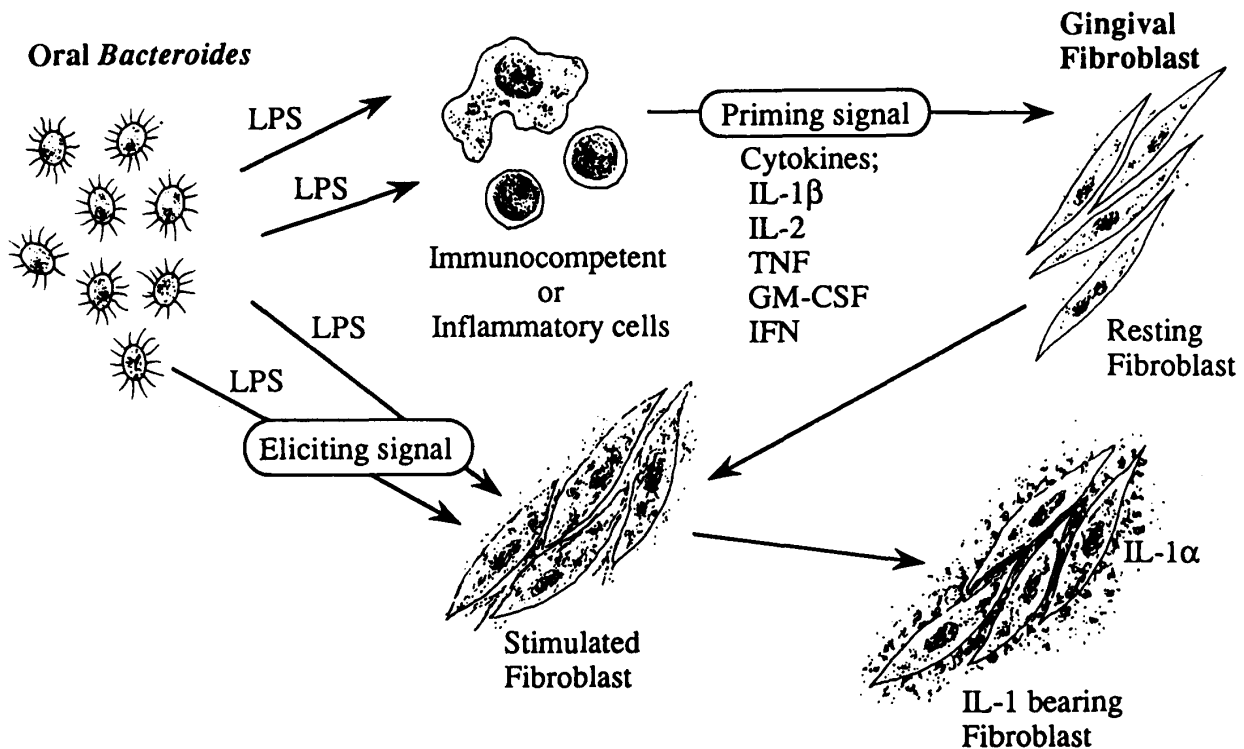


Fig. 7. Fibroblasts under immunological or inflammatory responses generate high levels of IL-1 upon stimulation with bacterial stimuli. Gingival fibroblasts were primed with various cytokines produced by immunocompetent and inflammatory cells stimulated with *Bacteroides* LPS in the periodontal tissues. The stimulated fibroblasts were capable of generating large amounts of membrane IL-1 α upon stimulation of *Bacteroides* LPS. (Quoted from Takada, H. et al.⁵⁷⁾)

る（後述）歯肉線維芽細胞を供試することにした。

A. 線維芽細胞と LPS

歯周病の発症に LPS が重要な役割をはたしているとの考えは研究者の間に広く受け入れられてきた。しかし、これまでのところ LPS を文字通り“毒素”と見なして、培養細胞に対する毒性を調べた研究が多い。この種の研究の標的細胞として、しばしば歯周組織の線維芽細胞が供試され、LPS による増殖抑制、各種マトリックス産生抑制などが報告されてきた^{33,56)}。しかし線維芽細胞は単に結合織の構成要素として物理的バリアを形成するだけではない。Table 3 に示すように、線維芽細胞に適度な刺激を加えれば、他の細胞を凌ぐ多様なサイトカインならびに成長因子を産生する。従って線維芽細胞は炎症・免疫反応に係わる重要な細胞としてサイトカインネットワークの要めの位置を占めている可能性がある。

サイトカインのなかで実際に歯周病患者の病巣中に

検出され、病態との疫学的関係が証明されているものは意外に少なく、現時点では IL-1 と IL-6 のみである⁵⁸⁻⁶²⁾。最近、Kabashima ら⁶³⁾は、慢性歯周炎患者の歯肉溝滲出液中の IL-1 様活性は、IL-1 α に基づくもので IL-1 β はほとんど関与していないことを明らかにしている。筆者は歯肉線維芽細胞培養を口腔 *Bacteroides* の LPS で刺激し、IL-1 ならびに IL-6 が誘導されるかどうかを検討した。ちなみに Kurt-Jones ら⁶⁴⁾は *E. coli* の LPS は、ヒト皮膚線維芽細胞に膜結合性の IL-1 を誘導しなかったと報告している。

B. *Bacteroides* LPS によるヒト歯肉線維芽細胞培養系での IL-1 ならびに IL-6 の誘導

口腔由来の 4 菌種を含む種々グラム陰性菌の LPS を正常ヒト歯肉線維芽細胞に作用させて、IL-1 誘導作用を調べた。IL-1 活性は培養上清と凍結融解して得た細胞画分を供試して、フィトヘムアグルチニン (PHA, 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 存在下で C3H/HeJ マウスの胸線細胞の増殖

Table 4. Inflammatory activities of IL-1

<i>In vivo</i> activities	<i>In vitro</i> activities
Hematological effects	Immunological activities
Neutrophilia	T cell activation
Increased GM-CSF	IL-2 production and increased IL-2 receptors
Bone marrow stimulation	B cell activation and growth factor for B cells
	Synergism with IL-4
Effects on vascular wall	Induction and synergism with IL-6
Increased leukocyte adherence	Activation of natural killer cells
Increased PGE synthesis	Synergism with IL-2, interferons, on NK cells
Decreased systemic vascular resistance	Increased lymphokine production
Chemoattractant	Macrophage cytotoxicity
	Increased IL-1 production
Metabolic effects	Other activities
Increased acute-phase protein	Basophile histamine release
Decreased albumin synthesis	Eosinophile degranulation
Increased sodium excretion	Increased collagenase production
Increased corticosteroid synthesis	Bone resorption
	Induction of fibroblast and endothelial CSF activity
Effects on central nervous system	Production of PGE ₂ in dermal and synovial fibroblasts
Fever	Increased neutrophile and monocyte thromboxane synthesis
Brain PGE ₂ synthesis	Keratinocyte proliferation
Increased ACTH	Proliferation of dermal fibroblasts
	Increased collagen synthesis

Quoted from Dinarello, C. A.⁷⁰⁾ with modifications.

を促進する胸線細胞活性化 (TAF) 作用を指標にして測定した。その結果、上述の Kurt-Jones らの報告に一致して、腸内細菌科等の LPS は IL-1 誘導作用を示さなかったが、*Bacteroides* 4 菌種の LPS はいずれも、培養上清ならびに細胞画分に IL-1 活性を誘導した (Fig. 5)。TAF 活性には、IL-1 以外に IL-6 などの他のサイトカインも関与する可能性がある。そこで、特異抗体と各種リコンビナントサイトカインを供試して解析したところ、培養上清の IL-1 活性は IL-1 β が主体でそれを IL-6 が増強しているのに対し、細胞画分の IL-1 活性は全て IL-1 α に基づくことが明らかになった⁶⁵⁾。次に同様に調製した培養上清ならびに細胞画分を供試して IL-6 活性を測定した。測定は IL-6 依存性細胞株 MH 60. BSF 2⁶⁶⁾ に対する増殖刺激作用を指標にして行った。その結果、*Bacteroides* LPS は他の菌種の LPS よりも強力に IL-6 を培養上清中に誘導することが明らかになった (Fig. 5)。なお、細胞画分にはほとんど IL-6 活性は検出されなかった。

C. 歯肉線維芽細胞を廻るサイトカインネットワーク

1. IL-1 産生増巾システム

歯肉線維芽細胞が生体内で実際に *Bacteroides* LPS の刺激を受けるときには、局所に多少とも炎症・免疫反応が起こり、周囲に種々のサイトカインが存在していると考えられる。従って歯肉線維芽細胞は LPS にさらされるとともに種々のサイトカインにも接しているであろう。線維芽細胞に作用するサイトカインとしては TNF, インターフェロン (IFN) などが知られている。そこで TNF, IFN- β ないし γ で歯肉線維芽細胞を前刺激 (プライミング) した後、*B. intermedius* の LPS で刺激 (惹起刺激) すると、非処理細胞よりも高レベルの細胞画分 IL-1 α が誘導された (Fig. 6)。ちなみに TNF は単独でも線維芽細胞に IL-1 α を誘導する^{64,67,68)} が、IFN- β および γ の単独では IL-1 は誘導されない⁶⁵⁾ (Fig. 6)。また *Bacteroides* の LPS で線維芽細胞に IL-1 α を誘導する際に培養系に IFN- β に対する抗血清を加えておくと IL-1 α が誘導されなくなることから、LPS による IL-1 α の誘導には内在性の IFN- β が介在していることが示唆された⁶⁵⁾。

Huleihel ら⁶⁹⁾ は種々のサイトカイン (IL-1 β , IL-2,

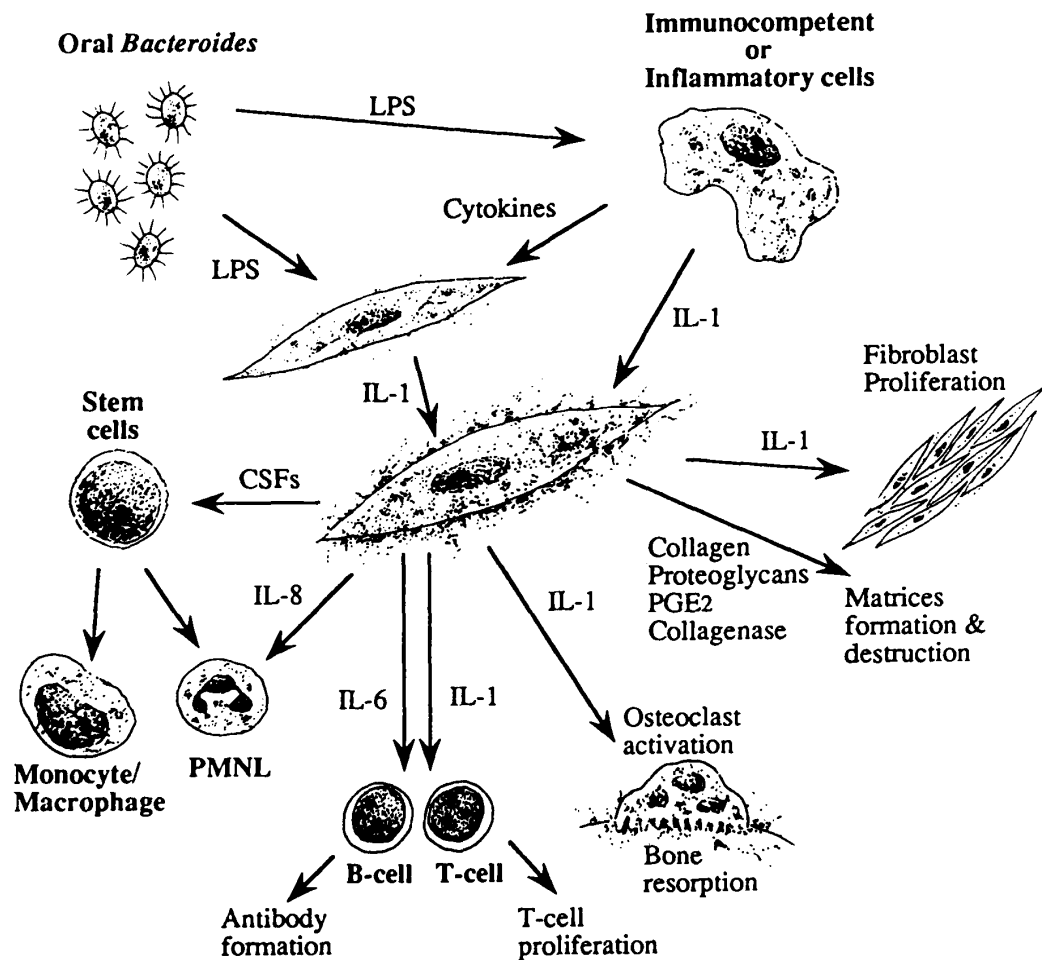


Fig. 8. Cytokine network in the gingival fibroblasts and possible implications in pathogenesis of periodontal diseases. (Quoted from Takada, H. et al.⁵⁷⁾)

顆粒球・マクロファージコロニー刺激因子 (GM-CSF), TNF, IFN- α , および β] でマウスの胎仔線維芽細胞を前処理した後, LPS で惹起刺激すると, 無処理細胞では誘導できなかった IL-1 活性が細胞画分に誘導される (培養上清には活性は検出されないという) こと, さらにこの時点で細胞には IL-1 α と β の両方のメッセンジャー RNA (mRNA) が発現しているが, 実際に検出された IL-1 活性の大部分は抗 IL-1 α 抗体で抑制されることを示した。上述の筆者らの成績と考えあわせると, Fig. 7 のような構図を描くことができる。歯周組織の炎症反応の場では線維芽細胞は周囲に存在する免疫担当細胞や炎症性細胞の産生する種々のサイトカインにさらされておりプライミング刺激を受けている。そのため *Bacteroides* を始めとする種々の歯周病関連細菌の LPS に感受性となり, 高レベルの細胞画分 (膜結合性) IL-1 α を産性する。in vitro 系と異なり実際の炎症の場には種々のタンパク分解酵素が存在するので, 細胞画分 IL-1 α は処理されて一部は遊離の形で放出さ

れるであろう。この構図は前述の Kabashima らの成績⁶³⁾ともよく一致する。

2. 歯周組織破壊

上述のような機序により細菌の侵襲した歯周組織で線維芽細胞は IL-1 α を持続的に産生している可能性がある。IL-1 は代表的な炎症性サイトカインであり, 炎症反応に関連する多彩な活発を發揮する (Table 4)。例えば本稿の主題である線維芽細胞に対する作用だけを取りあげても, IL-1 は増殖を促し⁷¹⁾, コラーゲン⁷²⁾ やプロテオグリカン⁷³⁾ などのマトリックス形成を調節する一方で, コラゲナーゼ^{74,75)} などの酵素やプロスタグランジン⁷⁵⁾ 産生を増強する。さらに IL-1 は線維芽細胞を刺激して IL-1 自体 (α および β) の産生を促す^{76,77)} ほか, IL-6⁷⁸⁾, IL-8⁷⁹⁾, GM-CSF⁸⁰⁾, G-CSF⁸¹⁾, M-CSF⁸¹⁾ などの種々のサイトカインの産生を誘導する。要するに IL-1 は炎症の場でサイトカインネットワークを構成する最も重要な要素と言える。

歯周病の最も特徴的な症状である歯槽骨の吸収に関しても IL-1 が中心的な役割を担っている⁸²⁾。IL-1 は *in vitro* 実験系で骨吸収を促す。長管骨を供試した実験では IL-1 β のほうが IL-1 α よりも強い骨吸収作用を示すが、頭蓋骨を供試した実験では両 IL-1 は同程度の活性を示すという⁸²⁾。Nishihara ら⁸³⁾ はマウスマクロファージ系細胞 P338 D₁ の膜結合型 IL-1 α が *in vitro* でマウス頭蓋骨の吸収を促したと報告している。TNF も骨吸収作用を示すことが知られているがその作用は IL-1 よりも弱い^{82,84)}。IL-1 や TNF は破骨細胞に直接作用するよりもむしろ骨芽細胞などに作用して破骨細胞の分化を促すと考えられている。実際に骨髄培養系に L-1 あるいは TNF を加えて長期培養すると多核の破骨細胞様細胞が形成される⁸²⁾。最近、IL-6 も同様な多核細胞の形成を誘導するところが明らかにされた⁸⁵⁾。なお破骨細胞の分化には M-CSF を産生する間葉系細胞の助けが必要と言われている⁸⁶⁾。いずれにしても骨吸収に関しても IL-1 が要めとなっており、自ら IL-1 を産生するとともに、IL-1 に応答して M-CSF を産生する線維芽細胞などの間葉系細胞が重要な役割を担っているものと考えられる。ちなみに、Hopps ら⁸⁴⁾ は *B. gingivalis* LPS ならびに MDP は骨膜の線維芽細胞を刺激して IL-1 やプロスタグランジン E₂ などの骨吸収因子を産生させ、骨吸収を促進すると報告している。

IV. おわりに

以上記載した知見を筆者の視点から総合して Fig. 8 に図解した。この図では菌体成分を *Bacteroides* LPS に代表させているが、II 欄でも論じたように多くの菌体成分が LPS と同様の作用を示す可能性を有している。実際、上述のように *B. gingivalis* の線毛はヒト歯肉線維芽細胞に IL-1 様因子を誘導する⁵⁵⁾。また MDP も線維芽細胞を刺激して IL-1 様因子の産生を促すことが知られている^{84,87,88)}。またサイトカインネットワークの要めの位置に線維芽細胞を配したが、この位置に上皮の角化細胞、血管内皮細胞あるいはマクロファージ系細胞を置いて同様な図を描くことも可能である。要するに歯周局所に細菌が増殖すればサイトカインネットワークの破綻を導き、炎症性サイトカインが過剰に産生され、組織破壊が進行すると考えられる。

文 献

- 1) Van Steenberg, T. J. M., Van Winkelhoff, A. J. & De Graaff, J.: Black-pigmented oral anaerobic rods: classification and role in periodontal disease., In ; Periodontal Disease : Pathogens & Host Immune Responses, S. Hamada, S. C. Holt & J. R. McGhee, Ed. 41-52, Quintessence, Tokyo, 1991.
- 2) Mayland, D., Mouton, C. & Grenier, D.: Chemical and biological properties of cell-surface components of oral black-pigmented *Bacteroides* species., In ; Periodontal Disease : Pathogens & Host Immune Responses, S. Hamada, S. C. Holt & J. R. McGhee, Ed. 99-115, Quintessence, Tokyo, 1991.
- 3) Mayrand, D. & Holt, S. C.: Biology of asaccharolytic black-pigmented *Bacteroides* species. Microbiol. Rev. 52, 134-152, 1988.
- 4) 宮坂信之: サイトカイン産性調節の逸脱, Mebio 7, 36-43, 1990.
- 5) Takada, H. & Kotani, S.: Immunopharmacological activities of synthetic muramylpeptides., In ; Immunology of the Bacterial Cell Envelope, D. E. S. Stewart-Tull & M. Davies. Ed. 119-152, John Wiley & Sons, Chichester, 1985.
- 6) Takada, H. & Kotani, S.: Structural requirements of lipid A for endotoxicity and other biological activities. CRC Crit. Rev. Microbiol. 16, 477-523, 1989.
- 7) Raetz, C. R. H.: Biochemistry of endotoxins. Ann. Rev. Biochem. 59, 129-170, 1990.
- 8) Naot, Y. & Ginsburg, H.: Activation of B lymphocytes by mycoplasma mitogen(s). Immunology 34, 715-720, 1978.
- 9) Takada, H., Hirachi, Y., Hashizume, H. & Kotani, S.: Mitogenic activity of cytoplasmic membranes isolated from L-forms of *Staphylococcus aureus*. Microbiol. Immunol. 24, 1079-1090, 1980.
- 10) Takada, H., Hirachi, Y., Hashizume, H. & Kotani, S.: Mitogenic effect of cytoplasmic membranes and a cytoplasmic fraction of *Staphylococcus aureus* L-forms on human peripheral blood lymphocytes. Microbiol. Immunol. 25, 317-326, 1981.
- 11) 力石秀実, 佐藤秀樹, 熊谷勝男: 細胞質膜タンパク質. 歯科ジャーナル 31, 936-946, 1990.
- 12) 小谷尚三, 高田春比古: 細菌細胞壁ならびに関連

- する合成標品（ムラミルペプチド）の免疫薬理作用. 薬学誌 103, 1-27, 1983.
- 13) 高田春比古, 小谷尚三: 細菌表層ムラミルペプチドと生体反応. 最新医学 43, 1268-1276, 1988.
 - 14) Shah, H. N., Williams, R. A. D., Bowden, G. H. & Hardie, J. M.: Comparison of the biochemical properties of *Bacteroides melaninogenicus* from human dental plaque and other sites. J. Appl. Bacteriol. 41, 473-492, 1976.
 - 15) Hammann, R. & Werner, H.: Presence of diaminopimelic acid in propionate-negative *Bacteroides* species and in some butyric acid-producing strains. J. Med. Microbiol. 14, 205-212, 1981.
 - 16) Holt, S. C. & Ebersole, J. L.: The surface of selected periodontopathic bacteria: possible role in virulence., In; Periodontal Disease: Pathogens & Host Immune Responses, S. Hamada, S. C. Holt & J. R. McGhee, Ed. 79-98, Quintessence, Tokyo, 1991.
 - 17) Takada, H., Ogawa, T., Yoshimura, F., Otsuka, K., Kokeguchi, S., Kato, K., Umamoto, T. & Kotani, S.: Immunobiological activities of a porin fraction isolated from *Fusobacterium nucleatum* ATCC 10953. Infect. Immun. 56, 855-863, 1988.
 - 18) Kato, K., Kokeguchi, S., Ishihara, H., Murayama, Y., Tsujimoto, M., Takada, H., Ogawa, T. & Kotani, S.: Chemical composition and immunobiological activities of sodium dodecyl sulphate extracts from the cell envelopes of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Bacteroides gingivalis* and *Fusobacterium nucleatum*. J. Gen. Microbiol. 133, 1033-1043, 1987.
 - 19) Yoshimura, F., Watanabe, K., Takasawa, T., Kawanami, M. & Kato, H.: Purification and properties of a 75-kilodalton major protein, an immunodominant surface antigen, from the oral anaerobe *Bacteroides gingivalis*. Infect. Immun. 57, 3646-3652, 1989.
 - 20) 渡辺清子, 熊田秀文, 梅本俊夫, 吉村文信: *Bacteroides gingivalis* 菌体成分の免疫生物活性. 歯基礎誌 32 (補), 164, 1990.
 - 21) Hofstad, T.: Chemical characteristics of *Bacteroides melaninogenicus* endotoxin. Arch. Oral Biol. 13, 1149-1155, 1968.
 - 22) Garoff, M., Lebbar, S. & Szabo, L.: Do endotoxins devoid of 3-deoxy-D-manno-2-octulosonic acid exist? Biochem. Biophys. Res. Commun. 143, 845-842, 1987.
 - 23) Kumada, H., Watanabe, K., Umenoto, T., Haishima, Y., Kondo, S. & Hisatsune, K.: Occurrence of O-phosphorylated 2-keto-3-deoxyoctonate in the lipopolysaccharide of *Bacteroides gingivalis*. FEBS Microbiol. Lett. 51, 77-80, 1988.
 - 24) Johne, B., Olsen, I. & Bryn, K.: Fatty acids and sugars in lipopolysaccharides from *Bacteroides intermedius*, *Bacteroides gingivalis* and *Bacteroides loescheii*. Oral Microbiol. Immunol. 3, 22-27, 1988.
 - 25) Fujiwara, T., Ogawa, T., Sobue, S. & Hamada, S.: Chemical, immunobiological and antigenic characterizations of lipopolysaccharides from *Bacteroides gingivalis* strains. J. Gen. Microbiol. 136, 319-326, 1990.
 - 26) Takada, H., Hirai, H., Fujiwara, T., Koga, T., Ogawa, T. & Hamada, S.: *Bacteroides* lipopolysaccharides (LPS) induce anaphylactoid and lethal reactions in LPS-responsive and -nonresponsive mice primed with muramyl dipeptide. J. Infect. Dis. 162, 428-434, 1990.
 - 27) Wollenweber, H.-W., Rietschel, E. T., Hofstad, T., Weintraub, A. & Lindberg, A. A.: Nature, type of linkage, quantity, and absolute configuration of (3-hydroxy) fatty acids in lipopolysaccharides from *Bacteroides fragilis* NCTC 9343 and related strains. J. Bacteriol. 144, 898-903, 1980.
 - 28) Weintraub, A., Zähringer, U., Wollenweber, H.-W., Seydel, U. & Rietschel, E. T.: Structural characterization of the lipid A component of *Bacteroides fragilis* strain NCTC 9343 lipopolysaccharide. Eur. J. Biochem. 183, 425-431, 1989.
 - 29) Lindberg, A. A., Weintraub, A., Zähringer, U. & Rietschel, E. T.: Structure-activity

- relationships in lipopolysaccharides of *Bacteroides fragilis*. Rev. Infect. Dis. 12 (Suppl.), S133-S141, 1990.
- 30) 高田春比古 : LPS と合成リピド A. 歯科ジャーナル 31, 917-927, 1990.
- 31) Takada, H. & Kotani, S.: Structure function relationships of lipid A., In; Bacterial Endotoxic Lipopolysaccharides. Vol. 1. Molecular Biochemistry and Cellular Biology, D. C. Morrison & J. L. Ryan Ed., CRC Press, Boca Raton, in press.
- 32) Hamada, S., Koga, T., Nishihara, T., Fujiwara, T. & Okahashi, N.: Characterization and immunobiologic activities of lipopolysaccharides from periodontal bacteria. Adv. Dent. Res. 2, 284-291, 1988.
- 33) Hamada, S., Takada, H., Ogawa, T., Fujiwara, T. & Mihara, J.: Lipopolysaccharides of oral anaerobes associated with chronic inflammation: chemical and immunomodulating properties. Int. Rev. Immunol. 6, 247-261, 1990.
- 34) Koga, T., Nishihara, T., Fujiwara, T., Nishizawa, T., Okahashi, N., Noguchi, T. & Hamada, S.: Biochemical and immunobiological properties of lipopolysaccharide (LPS) from *Bacteroides gingivalis* and comparison with LPS from *Escherichia coli*. Infect. Immun. 47, 638-647, 1985.
- 35) Hanazawa, S., Nakada, K., Ohmori, Y., Miyoshi, T., Amano, S. & Kitano, S.: Functional role of interleukin 1 in periodontal disease: induction of interleukin 1 production by *Bacteroides gingivalis* lipopolysaccharide in peritoneal macrophages from C3H/HeN and C3H/HeJ mice. Infect. Immun. 50, 262-270, 1985.
- 36) Lindemann, R.A., Economou, J. S. & Rothermel, H.: Production of interleukin-1 and tumor necrosis factor by human peripheral monocytes activated by periodontal bacteria and extracted lipopolysaccharides. J. Dent. Res. 67, 1131-1135, 1988.
- 37) Garrison, S. W. & Nichols, F. C.: LPS-elicited secretory responses in monocytes: altered release of PGE₂ but not IL-1 β in patients with adult periodontitis. J. Periodont. Res. 24, 88-95, 1989.
- 38) Takada, H. & Galanos, C.: Enhancement of endotoxin lethality and generation of anaphylactoid reactions by lipopolysaccharides in muramyl-dipeptide-treated mice. Infect. Immun. 55, 409-413, 1987.
- 39) Westphal, O., Lüderitz, O. & Bister, F.: Über die Extraktion von Bakterien mit Phenol/Wasser. Z. Naturforsch. Teil B, 7, 148-155, 1952.
- 40) Galanos, C., Lüderitz, O. & Westphal, O.: A new method for the extraction of R lipopolysaccharides. Eur. J. Biochem. 9, 245-249, 1969.
- 41) Galanos, C. & Lüderitz, O.: Electrodialysis of lipopolysaccharides and their conversion to uniform salt forms. Eur. J. Biochem. 54, 603-610, 1975.
- 42) 沢村彰一郎, 高田春比古, 栗林甚博, 小川知彦, 浜田茂幸: *Bacteroides intermedius* ATCC 25611 より熱フェノール・水で抽出される非 LPS 性 B 細胞マイトジェン. 日細菌誌 44, 616, 1989.
- 43) Mansheim, B. J. & Kasper, D. L.: Purification and immunochemical characterization of the outer membrane complex of *Bacteroides melaninogenicus* subspecies *asaccharolyticus*. J. Infect. Dis. 135, 787-799, 1977.
- 44) Mansheim, B. J., Onderdonk, A. B. & Kasper, D. L.: Immunochemical and biological studies of the lipopolysaccharide of *Bacteroides melaninogenicus* subspecies *asaccharolyticus*. J. Immunol. 120, 72-78, 1978.
- 45) Yoshimura, F., Takahashi, K., Nodasaka, Y. & Suzuki, T.: Purification and characterization of a novel type of fimbriae from the oral anaerobe *Bacteroides gingivalis*. J. Bacteriol. 160, 949-957, 1984.
- 46) Yashimura, F., Takasawa, T., Yoneyama, M., Yamaguchi, T., Shiokawa, H. & Suzuki, T.: Fimbriae from the oral anaerobe *Bacteroides gingivalis*: physical, chemical, and immunological properties. J. Bacteriol. 163, 730-734, 1985.

- 47) Dickinson, D. P., Kubiniec, M. A., Yoshimura, F. & Genco, R. J.: Molecular cloning and sequencing of the gene encoding the fimbrial subunit protein of *Bacteroides gingivalis*. J. Bacteriol. 170, 1653-1665, 1988.
- 48) Genco, R. J., Lee, J.-Y. & Bedi, G. S.: Comparison of *Bacteroides gingivalis* fimbriin subunit proteins: evidence for sequence, size and antigenic heterogeneity. J. Dent. Res. 68, 1006, 1989.
- 49) Suzuki, Y., Yoshimura, F., Takahashi, K., Tani, H. & Suzuki, T.: Detection of fimbriae and fimbrial antigens on the oral anaerobe *Bacteroides gingivalis* by negative staining and serological methods. J. Gen. Microbiol. 134, 2713-2710, 1988.
- 50) Isogai, H., Isogai, E., Yoshimura, F., Suzuki, T., Kagota, W. & Takano, K.: Specific inhibition of adherence of an oral strain of *Bacteroides gingivalis* 381 to epithelial cells by monoclonal antibodies against the bacterial fimbriae. Arch. Oral Biol. 33, 479-485, 1988.
- 51) Ogawa, T., Tarkowski, A., McGhee, M. L., Moldoveanu, Z., Mestecky, J., Hirsch, H. Z., Koopman, W. J., Hamada, S., McGhee, J. R. & Kiyono, H.: Analysis of human IgG and IgA subclass antibody-secreting cells from localized chronic inflammatory tissue. J. Immunol. 142, 1150-1158, 1989.
- 52) Ogawa, T., Shimauchi, H. & Hamada, S.: Mucosal and systemic immune responses in BALB/c mice to *Bacteroides gingivalis* fimbriae administered orally. Infect. Immun. 57, 3466-3471, 1989.
- 53) Ogawa, T., McGhee, M. L., Moldoveanu, Z., Hamada, S., Mestecky, J. & McGhee, J. R.: *Bacteroides*-specific IgG and IgA subclass antibody-secreting cells isolated from chronically inflamed gingival tissues. Clin. Exp. Immunol. 76, 103-110, 1989.
- 54) Ogawa, T., Shimauchi, H., Kusumoto, Y. & Hamada, S.: Humoral immune response to *Bacteroides gingivalis* fimbrial antigen in mice. Immunology 69, 8-13, 1990.
- 55) Hanazawa, S., Hirose, K., Ohmori, Y., Amano, S. & Kitano, S.: *Bacteroides gingivalis* fimbriae stimulate production of thymocyte-activating factor by human gingival fibroblasts. Infect. Immun. 56, 272-274, 1988.
- 56) Bartold, P. M.: Modulation of gingival fibroblast function by lipopolysaccharides., In; Periodontal Disease: Pathogens & Host Immune Responses, S. Hamada, S. C. Host & J. R. McGhee Ed. 277-290, Quintessence, Tokyo, 1991.
- 57) Takada, H., Mihara, J., Morisaki, I. & Hamada, S.: Production of cytokines by human gingival fibroblasts., In; Periodontal Disease: Pathogens & Host Immune Responses, S. Hamada, S. C. Host & J. R. McGhee Ed. 265-276, Quintessence, Tokyo, 1991.
- 58) Charon, J. A., Luger, T. A., Mergenhagen, S. E. & Oppenheim, J. J.: Increased thymocyte-activating factor in human gingival fluid during gingival inflammation. Infect. Immun. 38, 1190-1195, 1982.
- 59) Masada, M. P., Persson, R., Kenney, J. S., Lee, S. W., Page, R. C. & Allison, A. C.: Measurement of interleukin-1 α and -1 β in gingival crevicular fluid: implications for the pathogenesis of periodontal disease. J. Periodont. Res. 25, 156-163, 1990.
- 60) Hönig, J., Rordorf-Adam, C., Siegmund, C., Wiedemann, W. & Erard, F.: Increased interleukin-1 beta (IL-1 β) concentration in gingival tissue from periodontitis patients. J. Periodont. Res. 24, 362-367, 1989.
- 61) 鎌形有裕, 宮坂信之, 井上裕子, 橋本純子, 飯田正人: ヒト歯周炎歯肉組織から産生されるサイトカインの検討—特にインターロイキン-1 (IL-1 α , β) と腫瘍壊死因子 (TNF α) について—, 日歯周誌, 31, 843-848, 1989.
- 62) 鎌形有裕, 宮坂信之, 井上裕子, 橋本純子, 飯田正人: ヒト炎症歯肉組織から産生されるサイトカインに関する検討—特にインターロイキン-6について—, 日歯周誌 31, 1081-1087, 1989.
- 63) Kabashima, H., Maeda, K., Iwamoto, Y., Hirofujii, T., Yoneda, M., Yamashita, K. &

- Aono, M.: Partial characterization of an interleukin-1-like factor in human gingival crevicular fluid from patients with chronic inflammatory periodontal disease. *Infect. Immun.* 58, 2621-2627, 1990.
- 64) Kurt-Jones, E.A., Fiers, W. & Pober, J. S.: Membrane interleukin 1 induction on human endothelial cells and dermal fibroblasts. *J. Immunol.* 139, 2317-2324, 1987.
- 65) Takada, H., Mihara, J., Morisaki, I. & Hamada, S.: Induction of interleukin-1 and -6 in human gingival fibroblast cultures stimulated with *Bacteroides* lipopolysaccharides. *Infect. Immun.* 59, 295-301, 1991.
- 66) Matsuda, T., Hirano, T. & Kishimoto, T.: Establishment of an interleukin 6 (IL-6)/B cell stimulatory factor 2-dependent cell line and preparation of anti-IL 6 monoclonal antibodies. *Eur. J. Immunol.* 18, 951-956, 1988.
- 67) Hamada, S., Takada, H., Mihara, J., Nakagawa, I. & Fujiwara, T.: LPS of oral *Bacteroides* species: general properties and induction of cytokines in human gingival fibroblast cultures., In; Cellular and Molecular Aspects of Endotoxin Reactions, A. Nowotny, J. J. Spitzer & E. Ziegler Ed. 285-294, Elsevier, Amsterdam, 1990.
- 68) Le, J., Weinstein, D., Gubler, U. & Vilcek, J.: Induction of membrane-associated interleukin 1 by tumor necrosis factor in human fibroblasts. *J. Immunol.* 138, 2137-2142, 1987.
- 69) Huleihel, M., Douvdevani, A., Segal, S. & Apte, R. N.: Regulation of interleukin 1 generation in immune-activated fibroblasts. *Eur. J. Immunol.* 20, 731-738, 1990.
- 70) Dinarello, C. A.: Interleukin-1 and its biologically related cytokines. *Adv. Immunol.* 44, 153-205, 1989.
- 71) Schmidt, J. A., Mizel, S. B., Cohen, D. & Green, I.: Interleukin 1, a potential regulator of fibroblast proliferation. *J. Immunol.* 128, 2177-2182, 1982.
- 72) Goldring, M. B. & Krane, S. M.: Modulation by recombinant interleukin 1 of synthesis of types I and III collagens and associated procollagen mRNA levels in cultured human cells. *J. Biol. Chem.* 262, 16724-14729, 1987.
- 73) Bartold, P. M.: The effect of interleukin 1 β on proteoglycans synthesized by human gingival fibroblasts *in vitro*. *Connective Tissue Res.* 17, 287-304, 1988.
- 74) Postlethwaite, A. E., Lachman, L. B., Mainarde, C. L. & Kang, A. H.: Interleukin 1 stimulation of collagenase production by cultured fibroblasts. *J. Exp. Med.* 157, 801-806, 1983.
- 75) Dayer, J.-M., Zavadil-Grob, C., Ucla, C. & Mach, B.: Induction of human interleukin 1 mRNA measured by collagenase- and prostaglandin E₂-stimulating activity in rheumatoid synovial cells. *Eur. J. Immunol.* 14, 898-901, 1984.
- 76) Mauviel, A., Temime, N., Charron, D., Loyau, G. & Pujol, J.-P.: Interleukin-1 α and β induce interleukin-1 β gene expression in human dermal fibroblasts. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 156, 1209-1214, 1988.
- 77) Dalton, B. J., Connor, J. R. & Johnson, W. J.: Interleukin-1 induces interleukin-1 α and interleukin-1 β gene expression in synovial fibroblasts and peripheral blood monocytes. *Arthritis Rheum.* 32, 279-289, 1989.
- 78) Content, J., De Wit, L., Poupart, P., Opdenakker, G., Van Damme, J. & Billiau, A.: Induction of a 26-kDa-protein mRNA in human cells treated with an interleukin-1-related, leukocyte-derived factor. *Eur. J. Immunol.* 152, 253-257, 1985.
- 79) Larsen, C. G., Anderson, A. O., Oppenheim, J. J. & Matsushima, K.: Production of interleukin-8 by human dermal fibroblasts and keratinocytes in response to interleukin-1 or tumour necrosis factor. *Immunology* 68, 31-36, 1989.
- 80) Zucali, J. R., Dinarello, C. A., Oblon, D. J., Ann Gross, M., Anderson, L. & Weiner, R. S.: Interleukin 1 stimulates fibroblasts to produce granulocyte-macrophage colony-stimulating activity and prostaglandin E₂.

- J. Clin. Invest. 77, 1857-1863, 1986. 954, 1987.
- 81) Fibbe, W.E., Van Damme, J., Billiau, A., Duinkerken, N., Lurvink, E., Ralph, P., Altrock, B.W., Kaushansky, K., Willenze, R. & Falkenburg, J. H. F. : Human fibroblasts produce granulocyte-CSF, macrophage-CSF, and granulocyte-macrophage-CSF following stimulation by interleukin-1 and poly (rI). poly (rC). *Blood* 72, 860-866, 1988.
- 82) Jandinski, J.J. : Osteoclast activating factor is now interleukin-1 beta: historical perspective and biological implications. *J. Oral Pathol.* 17, 145-152, 1988.
- 83) Nishihara, T., Ishihara, Y., Noguchi, T. & Koga, T. : Membrane IL-1 induces bone resorption in organ culture. *J. Immunol.* 143, 1881-1886, 1989.
- 84) Hopps, R.M. & Sisney-Durrant, H.J. : Mechanisms of alveolar bone loss in periodontal disease., In ; *Periodontal Disease : Pathogens & Host Immune Responses*, S. Hamada, S. C. Holt & J. R. McGhee Ed. 307-320, Quintessence, Tokyo, 1991.
- 85) Kurihara, N., Bertolini, D., Suda, T., Akiyama, Y. & Roodman, G.D. : IL-6 stimulates osteoclast-like multinucleated cell formation in long term human marrow cultures by inducing IL-1 release. *J. Immunol.* 144, 4226-4230, 1990.
- 86) 能勢誠, 新飯田俊平, 大亀泰久, 梅本俊夫, 小玉博明 : 新生仔大理石病 (op/op) マウス頭蓋冠由来の前脂肪細胞株の樹立. *歯基礎誌* 32 (補), 63, 1990.
- 87) Iribe, H., Koga, T., Kotani, S., Kusumoto, S. & Shiba, T. : Stimulating effect of MDP and its adjuvant-active analogues on guinea pig fibroblasts for the production of thymocyte-activating factor. *J. Exp. Med.* 157, 2190-2195, 1983.
- 88) Ohmori, Y., Hanazawa, S., Amano, S., Miyoshi, T., Hirose, K. & Kitano, S. : Spontaneous production of thymocyte-activating factor by human gingival fibroblasts and its autoregulatory effect on their proliferation. *Infect. Immun.* 55, 947-