歯周疾患とプロスタグランジン産生に関する研究

—補体活性化とプロスタグランジン産生との相互作用について—

坂 口 洋 一

九州歯科大学大学院歯学研究科歯科保存学第二専攻 (指導: 横田 誠教授)

九州歯科大学口腔細菌学講座 (指導: 内山長司教授)

平成2年10月26日受理

Study on the Relationship between Periodontal Disease and Production of Prostaglandin —Interaction between Cleavage of Complement and Production of Prostaglandin—

You-ichi Sakaguchi

Department of Periodontology and Endodontology (Director: Prof. Makoto Yokota)

Department of Oral Bacteriology (Director: Prof. Choji Uchiyama)

Kyushu Dental College, Kitakyushu, Japan

Lipopolysaccharide (LPS) from the wall of gram-negative bacteria plays an important part as an initiative factor in periodontal disease. LPS has various biological activities, and causes cleavage of complement by both the classical and the alternate pathways, production of anaphylatoxins, secretion of lymphokines, chemotaxis of neutrophils, production of prostaglandins, increase of collagenase activity. In initial lesion in periodontitis, complements and prostaglandins may play the role of chemical mediator or chemical modulator. Recently, it was shown that complements promote prostaglandins production, and prostaglandins promote increase of collagenase activity *in vitro*. Experimental periodontitis was induced by inoculating the gingiva of rats with LPS from *E. coli*.

There were three aims in this study: First, to investigate changes with time in the amount of complement and prostaglandins, and the activities of collagenase in gingiva and serum. Second, to clarify the immunohistochemical localization of prostaglandin E_1 . Third, to investigate direct effect of LPS, with and without anti-interleukin 1, on prostaglandin E_1 release from freshly isolated rat peritoneal macrophages and fibroblastic cell ATCC CRL 1213.

Results were as follows.

1. There were 2 peaks in amount of C3c in gingival extracts. The values of C3c were 1.57 times higher after three hours, 1.02 higher after six hours, and 1.97 higher after 12 hours than the normal level, and were nearly normal level after 72 hours.

2. No marked changes were seen in C3c in serum.

3. There were 2 peaks in amount of PGE_1 in gingival extracts. The values of PGE_1 were

7.44 times higher after three hours, 2.64 higher after six hours, and 9.81 higher after 24 hours than the normal level, and were nearly normal level after 72 hours.

4. PGE_1 in serum was below the level of detection.

5. There were 2 peaks in amount of PGE_2 in gingival extracts. The values of PGE_2 were 4.98 times higher after three hours, 2.30 higher after six hours, and 12.46 higher after 24 hours than the normal level, and were nearly normal level after 72 hours.

6. PGE_2 in serum was below the level of detection.

7. The immunohistochemistry of PGE_1 in periodontal tissue showed strong PGE_1 -positive staining in lamina propria three hours after LPS inoculation. The positive staining decreased greatly six hours after inoculation.

8. In the cell culture experiment, PGE_1 production in cell-free supernatants of macrophages stimulated by LPS increased at 16.6 ng after 360 minutes. Stimulated by LPS in the presence of anti-IL-1, the production increased at 5.9 ng after 60 minutes, and decreased afterward.

9. In the cell culture experiment, PGE_1 production in cell-free supernatants of fibroblastic cell line ATCC CRL 1213 stimulated by LPS increased at 10.25 ng after 360 minutes. Stimulated by LPS in the presence of anti-IL-1, the production increased at 3.10 ng after 180 minutes, and decreased afterward.

10. There was diphasic change in amount of type I collagen in gingival extracts. The values of type I collagen were 0.95 times higher after three hours, 0.90 higher after six hours, and 0.79 higher after 24 hours than the normal level. According to these results, it was shown that LPS stimulate cleavage of complement, production of prostaglandin, increase of collagenase activity. The direct effect of LPS and indirect effect through cells and others resulted in diphasic changes. Cleavage of complement, production of prostaglandin, increase of collagenase activity interact in initial lesion in periodontal disease.

Key words : LPS / Complement 3c / Prostaglandin E_1 / Prostaglandin E_2 / Rat

緒 言

歯周疾患は他の口腔疾患と同様に歯垢中に存在する各種病的因子と宿主のもつエフェクター機構との平衡関係の破綻により発症し、炎症、軟組織破壊、歯周ポケット形成、歯槽骨破壊へと進行していくと考えられている¹⁾。

近年、歯周疾患の進行にともない歯肉縁下のグラム陰性菌が有意に増加すると報告され、各種病原性因子の中でも特に細菌内毒素が歯周疾患において重要な役割を演じている可能性が指摘されてきた。本来、内毒素はグラム陰性菌が自己融解した際に放出される因子で、その主要成分はグラム陰性菌の細胞壁成分の一部をなす lipopolysaccharide (以下 LPS) である。この内毒素は classical pathway と alternate pathway の両経路を

介して補体を活性化し、アナフィラトキシン形成、好中球遊走を促し、ライソゾーム酵素の放出を促進する。また、マクロファージに作用しプロスタグランジン産生、コラゲナーゼ活性の上昇を促すことが知られている。

補体は炎症初期において外来性の病的物質に対する防御的機構や宿主組織に障害を喚起する主要な体液性エフェクター機構である。一方、Harada ら (1982)²⁾ はラットカラゲニン気嚢胞において PGE 産生量と血管透過性亢進反応は一致するパターンとなったと報告し、プロスタグランジンも炎症初期に血管拡張、血管透過性亢進作用など炎症の chemical mediator ないしは chemical modulator としての機能を有している可能性を示唆した。

近年、*in vitro* において補体成分がマクロファージ、

線維芽細胞を活性化し、プロスタグランジンの産生を促進するという報告がある³⁻⁷⁾。また、マクロファージをLPSで刺激するとコラゲナーゼ活性は上昇するが、同時にプロスタグランジンE₂を加えるとコラゲナーゼ活性は約10倍に増加するという報告もある⁸⁾。このように歯周疾患時の歯肉組織内では、各種炎症性細胞と炎症性mediatorが相互に作用し、歯周疾患が進行している可能性が考えられる。

そこで著者はラット両側下顎M1頬側歯肉に内毒素を接種し、実験的に歯肉炎(歯肉の炎症)を惹起させ、経時的に歯周組織とその抽出液および血清を採取した。その抽出液および血清中の補体第三成分c(以下C3c)、プロスタグランジンE(以下PGE)およびコラーゲンI型の経時的な動態を検索し、さらに、歯肉組織内のPGE₁の局在を免疫学的組織染色法により検索した。また、*in vitro*においてはマクロファージ、線維芽細胞のPGE₁産生量を経時的に検索した。

これらのことから、ラット歯肉にLPS接種後の補体、プロスタグランジン、コラゲナーゼの相互作用と経時的な動態および*in vitro*におけるPGE₁産生量の動態を比較検討し興味ある知見を得たので報告する。

実験材料および方法

I. 実験材料

A. 実験動物

実験動物には、成和実験動物研究所(株)より購入した体重150g前後の6週齢Wistar系雄ラットを使用した。ラットは1週間以上飼育し充分環境に適応した後、実験に供した。

B. LPSの調製

LPSは、*Escherichia coli* 0111:B4由来のLPS(Difco社製)を使用した。*in vivo*では接種時に滅菌生理食塩水にてLPS 10 µg / 0.05 ml生理食塩水に希釈して使用した。また、*in vitro*では添加時にLPS 10 µg / 0.05 ml α-MEMに希釈して使用した。

C. 緩衝液

PGE用緩衝液は、10 mM リン酸ナトリウム pH 7.0 に0.1 M NaCl, 1 mM MgCl₂, 0.1% NaN₃, 0.1% BSAを含有したものを緩衝液Aとし各抗体、試料希釈用に、緩衝液Aより0.1% BSAを除いたものを緩衝液Bとし洗浄用に使用した。

補体、コラーゲン用緩衝液は、抗体、試料希釈用にPBSを、洗浄用に0.05% Tween 加PBSを使用した。

D. 抗血清の調製

抗血清は、抗ラットC3c(ヤギ)血清IgG画分(Nordic社製)、抗Collagen I型(ウサギ)血清IgG画分(Advance社製)、抗PGE₁(ヤギ)血清IgG画分(Cambridge medical社製)、抗PGE₂(ウサギ)血清IgG画分(Advanced magnetic社製)、抗マウスIL-1(ウサギ)血清IgG画分(Genzyme社製)を使用した。標識抗体は、抗ヤギIgGペルオキシダーゼ標識IgG画分(E. Y.社製)、抗ウサギIgGペルオキシダーゼ標識IgG画分(Cappel社製)を使用した。PGE₁, PGE₂は、PGE₁(半井化学社製)、PGE₂(Paesel社製)を使用した。なお、β-ガラクトシダーゼ標識PGE₁, PGE₂は、Erlangerら(1959)⁹⁾の方法に基づいた酸無水物法により調製した。

E. 基質溶液

C3c, コラーゲンI型測定用には、ヒトの場合¹⁰⁾と同様に0.2 mg / ml ABTS-100 mM クエン酸-リン酸緩衝液に使用直前に0.03% H₂O₂を等量混合したものを使用した。PGE測定用には、0.2 mM 4-methylumbelliferyl-β-D-galactosideを使用した。歯肉組織染色には、3, 3'-diaminobenzidine, tetrahydrochloride (0.05 M Tris-HCl pH 7.6)に使用直前に0.05%になるようにH₂O₂を添加したものを使用した。

II. 実験方法

A. 歯肉へのLPSの接種

実験群はラット両側下顎M1頬側歯肉粘膜下にLPS 10 µg / 0.05 ml滅菌生理食塩水を接種した。対照群は同様に滅菌生理食塩水0.05 mlを接種したものおよび未処置のものを実験に供した。接種後、1, 3, 6, 12, 24, 72, 120, 168時間後に経時的にそれぞれ5匹づつ屠殺し血清および歯肉を採取した。歯肉は右側をC3c, コラーゲンI型用に、左側をPGE用に使用した(Fig. 1)。

Fig. 1 Schedule of experiment (*in vivo*)

B. 歯肉抽出液の調製

1. C3c, コラーゲン I 型の抽出

C3c, コラーゲン I 型の抽出法はヒトにおける歯肉抽出法¹⁰⁾と同様の方法で行った。

2. PGE の抽出

PGE の抽出は平田ら (1980)¹¹⁾ の方法に改良を加えて行った。すなわち、歯肉組織摘出後、湿重量を計測した。歯肉組織 20 mg に対し 1 ml の 1 mM インドメタシン加 95% エタノールに浮遊させ、sea sand (和光純薬工業社製) 1500 mg を加え 2000 回粉碎した。12 時間静置後、3000 × g 15 分間遠心を行い、上清を採取した。上清は窒素ガスで凝固濃縮後、95% エタノール：水 (2 : 1 by vol) 10 ml に溶解し、同量の石油エーテルを加え 10 分間振盪した。上記操作を 2 回繰り返し石油エーテル層を除去後、エタノールを窒素ガスにて除去した。1 N HCl で pH 3.0 に調整後、同量のジエチルエーテルを加え 5 分間振盪しジエチルエーテル層を回収した。上記操作を 3 回繰り返し回収したジエチルエーテルを窒素ガスで濃縮後、エタノールで希釈し 0.22 μm FILTER UNIT (MILLEX-GV) にて濾過し、-95℃ で保存した。なお、抽出操作は 4℃ の環境下で行った (Fig. 2)。

```

isolation of gingiva
|
determination of fresh weight
|
homogenizing in ice-cold 95% ethanol with
1 mM indomethacin
|
standing overnight at 4°C
|
centrifugation
|
collection of supernatant
|
redissolving in 10ml of ethanol-water(2:1,
by vol)
|
washing with 10ml of petroleum ether
|
collection of ethanol-water
|
evaporation in a stream of nitrogen
|
acidification to pH 3.0 with 1N HCl
|
washing with diethyl ether
|
collection of diethyl ether
|
filtration

```

Fig. 2 Preparation procedure of gingival extracts (PGE)

C. 血清の採取および調製

心臓穿刺により採血し、4℃ 12 時間静置した。その後、4℃ 1500 × g 10 分間遠心を 2 回行い上清を採取した。

C3c, コラーゲン I 型測定用は、0.22 μm FILTER UNIT (MILLEX-GV) にて濾過後、-95℃ で保存した。

PGE 測定用には上清採取後、歯肉抽出液と同様の方法で血清中より PGE の抽出を行い -95℃ で保存した。

D. マクロファージの採取および培養

エーテル麻酔下にてラット腹腔に 10 units/ml ヘパリン加 Eagle's MEM 2 ml を接種し、15 分後に α-MEM (no serum) 5 ml にて 2 回洗浄後、腹腔細胞を採取した。プラスチックシャーレ中にて 37℃ 5% CO₂ 下で 2 時間インキュベートし、α-MEM で 3 回洗浄後、非付着細胞を除去した。プラスチックシャーレに 0.1% EDTA 含 PBS 5 ml を添加後 4℃ 45 分間処理し、スクレーパーを使用して付着細胞を剥離して腹腔マクロファージとして分離した。1000 × g 10 分間遠心後、上清を除去し α-MEM で洗浄した。上記操作を 2 回繰り返し、1 × 10⁶ cells / 2 ml α-MEM (no serum) となるように調整後、12 時間インキュベートした。培養液を交換後、実験に供した。

E. 線維芽細胞の培養

ラット上皮線維芽細胞 ATCC CRL 1213 株を Dulbecco's modified Eagle's MEM (以下 D-MEM) 10% FCS 加中に懸濁後、37℃ 5% CO₂ 下で継代培養を行った。0.25% トリプシン加 PBS 3 ml を添加後、室温で 20 分間静置し、線維芽細胞を剥離した。1000 × g 10 分間遠心し、上清を除去後 D-MEM で洗浄した。上記操作を 2 回繰り返し、細胞数 1 × 10⁶ cells / 2 ml D-MEM 10% FCS 加となるように調整後、12 時間インキュベートした。培養液を交換後、実験に供した。

F. *in vitro* における LPS の添加

LPS 群として LPS 10 μg / 0.05 ml α-MEM を、LPS + 抗 IL-1 群として LPS 10 μg / 0.05 ml α-MEM と抗マウス IL-1 抗体 10 μl を同時にシャーレに添加した。対照群として 0.05 ml α-MEM を添加した。添加後、15, 30, 60, 180, 360 分後に経時的に培養上清を採取した。上清は、0.22 μm FILTER UNIT (MILLEX-GV) にて濾過後、-95℃ で保存した。

G. C3c, コラーゲン I 型および PGE の測定法

1. C3c の測定

抗ラット C3c (ヤギ) 血清 IgG 画分および抗ヤギ

IgG ペルオキシダーゼ標識 IgG 画分 (I-D) を使用し、ヒトの場合¹⁰⁾に準じ ELISA 二抗体直接法にて測定を行った。なお、測定値は総蛋白量による補正を行った。

2. コラーゲン I 型の測定

抗コラーゲン I 型 (ウサギ) 血清 IgG 画分および抗ウサギ IgG ペルオキシダーゼ標識 IgG 画分 (I-D) を使用し、C3c の場合と同様の方法で行った。

3. PGE の測定

PGE は競合的免疫反応を利用し、その酵素活性を ELISA 蛍光法を用いて測定した。以下 PGE₁ の場合を示す。抗 PGE₁ (ヤギ) 血清 IgG 画分 (I-D) を緩衝液 A で希釈後、ELISA 用平底マイクロプレート各穴に 100 μ l 分注し 37°C 2 時間インキュベートした。その後プレートは緩衝液 B で 3 回洗浄した。プレート洗浄後 BSA を緩衝液 A で希釈し 37°C 30 分間インキュベートした。その後プレートは緩衝液 B で 3 回洗浄した。30 pg $\sim$ 1 ng に段階希釈した PGE₁ (I-D) または測定用試料 50 μ l をプレートに分注し、4°C 5 分間インキュベートした。その後、 β -ガラクトシダーゼ標識 PGE₁ (I-D) 50 μ l を分注し、25°C 1 時間インキュベートした。さらに、4°C 12 時間インキュベートした後、緩衝液 B で 3 回洗浄し、0.2 mM 4-methylumbelliferyl- β -D-galactoside 150 μ l を加え、30°C 45 分間インキュベートした。1 M グリシン-NaOH 緩衝液 pH 10.3 50 μ l を加え、Titertek Fluoroskan II (大日本製薬社製) にて λ_{ex} 360 nm, λ_{em} 450 nm で測定した (Fig. 3)。

H. 歯肉組織染色法

凍結試料をクリオスタットにて 6 μ m に薄切し、ポリ-L-リジン (Sigma 社製) で処理したスライドガラスに吸着させた。吸着後、ブアン固定液で固定し、通法に従い洗浄を行った。内在性ペルオキシダーゼ除去のため 0.3% H₂O₂ メタノール中で 4°C 30 分間処理し、蒸留水で 3 回洗浄し乾燥させた。スライドガラス上の歯肉組織にブロックエース (雪印乳業) を滴下し、37°C 30 分間湿潤状態で反応させた。反応終了後、冷 PBS で 15 分間 3 回洗浄した。次に、一次抗体として抗 PGE₁ (ヤギ) 血清 IgG 画分 (I-D) を滴下し、37°C 1 時間反応させた。反応終了後、冷 PBS で 15 分間 3 回洗浄した。次に、標識抗体として抗ヤギ IgG ペルオキシダーゼ標識 IgG 画分 (I-D) を滴下し、37°C 1 時間反応させた。反応終了後、冷 PBS で 15 分間 3 回洗浄し、12 時間冷 PBS 中に静置した。基質溶液 (I-E) を滴下し 37°C 10 分間反応させた。Tris-HCl 緩衝液 pH 7.6, PBS で

```

coating plate with anti-PGE(lgG fraction)
| 37°C 2hrs
washing plate by buffer B
|
coating plate with BSA
| 37°C 30mins
washing plate by buffer B
|
coating plate with gingival extracts(PGE)
| 4°C 5mins
coating plate with PGE- $\beta$ -galactosidase
| 25°C 1hr
| 4°C 12hrs
washing plate by buffer B
|
coating plate with substrate solution
| 30°C 45mins
addition of 1M glycine-NaOH buffer
|
reading emission at 450nm with excitation
at 360nm

```

Fig. 3 Microtiter ELISA method (PGE)

洗浄後メチルグリーンで対比染色を行い蒸留水で洗浄した。なお、非特異的反応による染色状態と比較するため、一次抗体をかけずに染色を行ったものを染色対照群とした。

実験成績

I. 標準曲線

C3c, コラーゲン I 型は段階希釈した未処置歯肉抽出液を用いて ELISA 二抗体直接法で測定後、希釈倍率の対数に対してプロットし標準曲線を得た。

PGE₁, PGE₂ は段階希釈し ELISA 競合法で測定後、同様に標準曲線を得た。標準曲線の log-liner な部分に対して直線回帰を試み、標準曲線を作製した (Fig. 4)。

Fig. 4 Standard curve of PGE₁

II. *in vivo* における C3c の動態

A. LPS 接種後の C3c の動態

LPS 接種後 1 時間で 1.42 倍, 3 時間で 1.57 倍と増加した。6 時間で 1.02 倍と減少した後, 12 時間で 1.97 倍と再び増加し, 24 時間で 1.70 倍となり, その後, 徐々に減少し 72 時間以降はほぼ正常値となる二相性の増減を示した (Fig. 5)。

B. 生理食塩水接種後の C3c の動態

生理食塩水接種後 1 時間で 1.11 倍とわずかに上昇したが, 3 時間で 1.02 倍となった。6 時間以降はほぼ正常値となり経時的に著変は認められなかった (Fig. 5)。

C. 血清中の C3c の動態

LPS 接種後の血清中の C3c は, ほぼ正常値であり著変は認められなかった。

Fig. 5 Complement (C3c) concentration in gingival extracts after LPS and saline inoculation

III. *in vivo* における PGE₁ の動態

A. LPS 接種後の PGE₁ の動態

LPS 接種後 1 時間で 4.18 倍, 3 時間で 7.44 倍と急増した。6 時間で 2.64 倍, 12 時間で 2.47 倍と減少したが, 24 時間で 9.81 倍と再び急増した。その後, 徐々に減少し, 72 時間で 1.74 倍, 120 時間で 1.35 倍, 168 時間で 1.44 倍と 72 時間以降はほぼ正常値となる二相性の増減を示した (Fig. 6)。

B. 生理食塩水接種後の PGE₁ の動態

生理食塩水接種後 1 時間で 1.66 倍と増加したが, 3 時間で 1.44 倍, 6 時間で 1.08 倍と徐々に減少し, その後はほぼ正常値となり経時的に著変は認められなかった (Fig. 6)。

C. 血清中の PGE₁ の動態

LPS 接種後の血清中の PGE₁ は限界測定値以下であった。

Fig. 6 Prostaglandin (PGE₁) concentration in gingival extracts after LPS and saline inoculation

IV. *in vivo* における PGE₂ の動態

A. LPS 接種後の PGE₂ の動態

LPS 接種後 1 時間で 3.92 倍, 3 時間で 4.98 倍と急増した。6 時間で 2.30 倍, 12 時間で 1.91 倍と減少したが, 24 時間で 12.46 倍と再び急増した。その後, 徐々に減少し, 72 時間で 1.05 倍, 120 時間で 1.16 倍, 168 時間で 0.80 倍と 72 時間以降はほぼ正常値となる二相性の増減を示した (Fig. 7)。

B. 生理食塩水接種後の PGE₂ の動態

生理食塩水接種後 1 時間で 1.51 倍, 3 時間で 0.73 倍, 6 時間で 0.92 倍と徐々に減少し, その後はほぼ正常値となり経時的に著変は認められなかった (Fig. 7)。

C. 血清中の PGE₂ の動態

LPS 接種後の血清中の PGE₂ は限界測定値以下であった。

Fig. 7 Prostaglandin (PGE₂) concentration in gingival extracts after LPS and saline inoculation

V. *in vitro* における PGE_1 の定量A. マクロファージ培養上清中の PGE_1

LPS 群では添加後 15 分で 1.17 ng, 30 分で 2.83 ng, 60 分で 7.93 ng と急速に PGE_1 量は増加した。その後, PGE_1 量は, 180 分で 11.4 ng, 360 分で 16.6 ng と緩やかに増加した。

LPS+抗 IL-1 群では添加後 15 分で 1.85 ng, 30 分で 3.50 ng, 60 分で 5.90 ng と緩やかに増加した。その後 180 分で 4.23 ng, 360 分で 1.18 ng と経時的に減少した。

対照群では 15 分で 0.33 ng, 30 分で 0.38 ng, 60 分で 0.41 ng, 180 分で 0.25 ng, 360 分で 0.31 ng と著変はほとんど認められなかった (Fig. 8)。

Fig. 8 Time course of the induction of PGE_1 from macrophages

B. 線維芽細胞培養上清中の PGE_1

LPS 群では添加後 15 分で 1.34 ng, 30 分で 1.66 ng, 60 分で 3.46 ng, 180 分で 5.29 ng, 360 分で 10.25 ng と経時的に増加した。

LPS+抗 IL-1 群では添加後 15 分で 0.89 ng, 30 分で 1.66 ng, 60 分で 2.30 ng, 180 分で 3.10 ng と徐々に増加し, その後, 360 分で 1.60 ng と減少した。

対照群では 15 分で 0.15 ng, 30 分で 0.22 ng, 60 分で 0.12 ng, 180 分で 0.16 ng, 360 分で 0.21 ng と著変はほとんど認められなかった (Fig. 9)。

VI. 歯肉組織中における PGE_1 の分布

LPS 接種群では, 歯肉組織における 3 時間での

Fig. 9 Time course of the induction of PGE_1 from the fibroblastic cell line ATCC CRL 1213

PGE_1 は生理食塩水接種群と比較して歯肉固有層において広範囲に強陽性部位が認められた。また, その周囲に肥満細胞および, その脱顆粒が認められた (Fig. 10)。

Fig. 10 The localization of PGE_1 (arrows) in gingival tissue

6 時間における歯肉組織では 3 時間と同様に肥満細胞およびその脱顆粒は認められたが, 反応陽性部位は減少した。

一方, LPS 接種群において一次抗体をのぞいた染色対照群では反応陽性部位は認められなかった。また, 生

理食塩水接種群では、歯肉固有層にわずかに反応陽性部位が認められた。

VII. *in vivo* におけるコラーゲン I 型の動態

A. LPS 接種後のコラーゲン I 型の動態

LPS 接種後 3 時間で 0.95 倍、6 時間で 0.90 倍と急速に減少したが、12 時間で 0.90 倍と変化は認められなかった。その後、24 時間で 0.79 倍、72 時間で 0.67 倍と徐々に減少したが、168 時間で 0.76 倍まで増加する二相性の減少を示した (Fig. 11)。

B. 生理食塩水接種後のコラーゲン I 型の動態

生理食塩水接種後 6 時間で 0.93 倍と減少したが 12 時間で 0.95 倍と増加し、その後著変は認められなかった (Fig. 11)。

Fig. 11 Type I collagen concentration in gingival extracts after LPS and saline inoculation

考 察

Löe ら (1965)¹²⁾ は健康歯肉に歯垢を蓄積させ、初めて実験的歯周炎を惹起し、プラークの蓄積が歯周疾患の原因であることを示唆した。その後、Freedman ら (1968)¹³⁾ は歯周疾患患者歯肉を電顕的に観察した結果、いかなる細菌も歯肉中に認められなかったと報告し、細菌代謝産物、細菌の産生する酵素、内毒素のような菌体成分に歯周疾患の初発因子としての可能性があることを示唆した。

特に内毒素は個体レベルでは、発熱作用、シュワルツマン作用、致死作用を有し、細胞レベルでは、アジュバンド作用、補体の活性化、マクロファージの活性化、B 細胞の幼若化など多彩な生物活性を有しており、免疫反応との関わりが注目されてきた。

そこで著者は内毒素の主成分である LPS を使用し、ラットに実験的に歯肉炎 (歯肉の炎症) を惹起させ、その病態の変化とともに各種炎症性 mediator の相互作用について考察した。

I. LPS 接種方法について

動物に実験的に歯周炎を惹起させる方法には、種々の報告があるが、このうち著者は、歯肉に抗原を直接接種する方法を採用した。この方法は、歯周疾患時の体液性免疫、細胞性免疫の複雑な反応系を検索する際に病変期の確定が容易で、実験群の同一条件下での検索に最適と考えたからである。

II. 補体について

補体系は、20 種類以上の血清蛋白因子より構成される主要な体液性エフェクター機構である。その因子には古典経路や第二経路にかかわる因子および種々な不活性化物質などが含まれ、外因性、内因性の異物に対する生体防御機構に重要な役割を演じている。また、補体は活性化の過程で多種多様な炎症性 mediator を生成する。このように補体は免疫系細胞の活性化、細胞溶解作用、オプソニン作用などの生物活性をあらわすことが知られている。

口腔領域において、補体は歯周疾患の病因との関連が注目され、現在、口腔内細菌がヒト血清中の補体を活性化することが知られている。Hawley ら (1978)¹⁴⁾、Tasi ら (1977)¹⁵⁾、Irving ら (1978)¹⁶⁾、Nygren ら (1979)¹⁷⁾、Okuda ら (1980)¹⁸⁾ は、*in vivo* において、*Bacteroides gingivalis*, *Bacteroides oralis*, *Fusobacterium nucleatum*, *Capnocytophaga strain*, *Streptococcus mutans*, *Actinomyces viscosus* などがヒト血清中の補体を活性化することを報告した。歯肉溝液は血清と質的に変わらず、炎症歯肉組織では、歯周局所で補体の活性化が起こっていることは明らかである。

歯周疾患患者歯肉中における C3 の開裂、実験的歯肉炎における C3 の開裂を検索した報告は数多くある。なかでも、Schenkein ら (1977)¹⁹⁾ は、ヒト歯周疾患患者の歯肉溝液を測定し C3 から C3b への転換が認められたと報告している。Patters ら (1979)²⁰⁾、Niekrash ら (1984)²¹⁾、(1986)²²⁾ は、歯肉溝液を測定することによりヒト歯周疾患患者の歯肉中では健康人よりも C3 の開裂が活発に起こると報告した。また、松原 (1987)²³⁾ はラット実験的歯周炎において C3c が 1 時間と 24 時間にピークを持つ二相性の増加曲線を示したと報告している。著者の成績では C3c は 3 時間と 12 時間にピークを有する二相性の増加曲線を示した。C3 は局所では単

核球やマクロファージにより、全身的には肝実質細胞から供給され、活性化により開裂が進行して最終的には細網内皮系によりすみやかに処理される。即ち、C3cの3時間での増加はLPS刺激により歯肉組織中のマクロファージが活性化し、C3を急速に開裂したためであると思われる。Uchidaら(1983)²⁴⁾によると、炎症反応において単核球の炎症組織への集積は24時間でプラトーに達すると報告している。著者の成績で、12時間でのC3cの増加は単核球、マクロファージ集積によりC3産生細胞数が増加し、C3の開裂が進んだためと思われる。Niekrashら(1984)²¹⁾は歯周疾患患者の歯肉溝液中のC3とC3cを歯周治療前後で測定し、慢性炎症である治療前より炎症が消退していくにつれてC3cの割合がC3と比べて著しく低下することを指摘している。著者の成績で、72時間以降歯肉組織抽出液中のC3cがほぼ正常値となり、その後、著変が認められなかったことと一致するものと思われる。

III. プロスタグランジンについて

アラキドン酸代謝産物は膜リン脂質に含まれるアラキドン酸が外来刺激に伴い、主としてphospholipase A₂によって切り出され、シクロオキシゲナーゼ系、または、リポキシゲナーゼ系により代謝、産生されるオクタコイドの一種である。PGE₁、PGE₂はシクロオキシゲナーゼ系により産生されるアラキドン酸代謝産物の一つで、ヒスタミン、ブラジキニンなどによる血管透過性を増強し、炎症反応に対して促進的に働く。また、T細胞によるリンホカイン分泌抑制、B細胞よりの抗体産生抑制、肥満細胞、好塩基球からの脱顆粒を抑制するなど炎症時における免疫反応に複雑に関わっている。

アラキドン酸代謝産物はマクロファージ、線維芽細胞、好中球、リンパ球などにより産生されるが、その主たる産生細胞はマクロファージである。マクロファージは各種抗原、菌体成分、サイモザン、LPSなどにより活性化されアラキドン酸代謝産物を産生する。

Garrisonら(1988)²⁵⁾は、*B. gingivalis*, *B. intermedius*, *H. actinomycetemcomitance*より温フェノール法で抽出したLPSでヒト末梢血単球を刺激するとPGE₂を産生すると報告した。また、Garrisonら(1989)²⁶⁾は、歯周疾患患者と健常者の末梢血単球をそれぞれ分離し、*B. gingivalis*, *B. intermedius*, *H. actinomycetemcomitance*より温フェノール法で抽出したLPSで刺激すると歯周疾患患者の単球の方がPGE₂産生量が増大すると報告した。このように歯周疾患患者歯肉中では血清中より遊離したマクロファージが活性化しPGE

産生が活発に起こっていることは明らかである。

歯周疾患時にPGE₂が産生されていることを示す報告は数多くある。なかでも、平田(1980)¹¹⁾、Offenbacherら(1981)²⁷⁾、ElAtterら(1986)²⁸⁾は、歯周疾患患者と健常人の歯肉を比較し歯周疾患患者歯肉中にPGE₂が多量に認められたと報告している。

著者の*in vivo*における成績では、PGE₁、PGE₂ともにそれぞれ1時間で4.18倍、3.92倍、3時間で7.44倍、4.98倍と急増した。Browningら(1987)²⁹⁾、Iwamotoら(1989)³⁰⁾はそれぞれヒト末梢血単球、肺泡マクロファージにLPS、IL-1を作用させるとPGEを産生すると報告した。また、Friteauら(1988)³¹⁾はヒト末梢血単球にLPS、IL-1を作用させた時のPGE₂産生量を測定すると、それぞれ単独で加えた場合より両者を同時に加えた場合の方がPGE₂産生量は相乗的に増加したと報告している。

著者の*in vitro*におけるマクロファージ培養上清中のPGE₁産生量はLPS群では60分で7.93 ngと急増し、その後も上昇を続け360分で16.6 ngとなった。一方、LPS+抗IL-1群では60分で5.90 ngと上昇したが、その後、減少し360分で1.18 ngとなった。これは、LPS群ではマクロファージはLPS刺激によりIL-1を産生し、LPSの単独作用、またはLPSとIL-1の相乗作用によりPGE₁を産生したためと思われる。一方、LPS+抗IL-1群ではLPS群と比較してLPS刺激により産生されたIL-1が抗IL-1によりマクロファージ膜表面receptorへの結合を阻害され60分以降PGE₁産生量が低下したものと思われる。

Newtonら(1987)³²⁾、Godfreyら(1988)³³⁾、Elias(1988)³⁴⁾はヒト線維芽細胞にIL-1を作用させるとPGE₂を産生したと報告している。

著者の*in vitro*における線維芽細胞培養上清中のPGE₁の動態では、LPS群は暫時増加し360分で10.25 ngのPGE₁を産生した。一方、LPS+抗IL-1群では180分まで暫時増加したが、その増加量は3.10 ngと少なく、その後、360分で1.60 ngまで減少した。これは、LPS群では、LPS刺激により産生されたIL-1が線維芽細胞自身を刺激しPGE₁を産生したためと思われる。一方、LPS+抗IL-1群では抗IL-1がIL-1の線維芽細胞膜表面receptorへの結合を阻害し、PGE₁が産生されにくかったためと思われる。また、内田(1990)³⁵⁾はラットの実験的歯周炎において、歯肉中のIL-1の動態を検索し、健常時と比較して1時間で1.86倍、3時間で2.07倍であったと報告している。

これらのことより、著者の *in vivo* における PGE の最初の増加は LPS により歯肉局所に存在したマクロファージが活性化され PGE を産生したものと思われる。マクロファージは同時に IL-1 を産生し、LPS と IL-1 の相乗作用により PGE 産生が促進されたものと思われる。また、IL-1 は線維芽細胞をも刺激し PGE 産生を促進したものと思われる。その後、PGE₁、PGE₂ は、それぞれ 6 時間で 2.64 倍、2.30 倍、12 時間で 2.47 倍、1.19 倍と減少した。これは、歯肉組織に局在したマクロファージ、線維芽細胞の細胞膜中アラキドン酸が枯渇し、PGE 産生量が低下したためと思われる。その後、PGE₁、PGE₂ は 24 時間で再び増加し、それぞれ 9.81 倍、12.46 倍となった。Uchida ら (1983)²⁴⁾ は炎症時における単核球の浸潤は 24 時間でプラトーに達すると報告している。また、金久ら (1982)³⁶⁾ は *Fusobacterium nucleatum* の LPS をラット歯肉に接種した場合、歯肉組織の LPS は 3-6 時間で吸収、貪食、拡散などにより大幅に減少したと報告している。著者の実験で、接種後 24 時間経過した歯肉組織内に LPS が留まっているとは思われず、他の液性因子の作用によりマクロファージが活性化され PGE 産生が行われたものと思われる。内田 (1990)³⁵⁾ は、ラットの実験的歯周炎において、LPS 接種後 24 時間経過したときの IL-1 量は健常時の 2 倍近くに増加したと報告している。著者の 24 時間での PGE の増加は PGE 産生細胞であるマクロファージが歯肉局所に集積し、再び増加した PGE 産生細胞に IL-1 が作用し、PGE 産生量が増加したものと思われる。また、PGE₁、PGE₂ 産生量は 24 時間がピークを示すが、これは、マクロファージの PG 産生能が最も強く、また、遊走してきたマクロファージ細胞数が非常に多かったためと思われる。

Rutherford ら (1983)³⁾ は、ヒト末梢血単球に C 3 b、C 3 bi を加えると 24 時間まで時間に依存して PG を産生したと報告している。Hartung ら (1983)⁴⁾ は、Guinea pig 末梢血単球に C 3 b を加えると PGE を時間に依存して産生したが、同時に抗 C 3 b 抗体を加えると PGE の産生は認められなかったと報告している。Imagawa ら (1983)⁵⁾ はマウス腹腔マクロファージにおいて、Hansch ら (1984)⁶⁾ はラット腹腔マクロファージにおいて C 5-9 を加えると PGE₂ を産生すると報告した。Kempis ら (1989)⁷⁾ はヒト滑膜線維芽細胞様細胞において C 5 b-9、C 5 b-8 を作用させると PGE₂ を産生したと報告している。

著者の *in vivo* における C 3 c は 3 時間と 12 時間に

ピークを有する二相性の増加曲線を示した。C 3 c は C 3 b の代謝産物であり C 3 b 産生量を反映している。一方、PGE₁、PGE₂ は 3 時間と 24 時間にピークを有する二相性の増加曲線を示し、C 3 c と比較するとそのピークはほぼ同時か、若干遅れた結果を得た。

Passwell ら (1979)³⁷⁾ はヒト末梢血単球に IgG の Fc fragment を作用させると PGE₂ を産生すると報告した。松原 (1987)²³⁾ は実験的歯周炎における IgG は、LPS 接種後 1 時間で 1.4 倍となったが、その後はほぼ正常値と同値であったと報告している。

これらのことより、著者の PGE の 3 時間と 24 時間の産生には補体、免疫グロブリンなどの他の液性因子が関わっている可能性も考えられる。

Friteau ら (1988)³¹⁾ はヒト末梢血単球に LPS、IL-1 と同時に IFN- γ を加えた場合、PGE₂ 産生量の抑制は LPS と同時に加えたときには僅かであるが、IL-1 と IFN- γ を同時に加えたときには PGE₂ 産生量は著明に減少したと報告している。Browning ら (1987)²⁹⁾、Kunkel ら (1987)³⁸⁾ は IFN- γ がマクロファージの PG 産生能を抑制すると報告した。白石ら (1978)³⁹⁾ は LPS 接種直後は急性炎症像を呈するが、2 日後にはリンパ球、形質細胞を中心とした慢性炎症像がみられたと報告した。

著者の *in vivo* における成績でも PGE₁、PGE₂ ともに 24 時間以降急速に減少し 72 時間以降ほぼ正常値と同値をとり、その後の著変は認められなかった。これは浸潤してきたマクロファージのアラキドン酸が枯渇し PGE 産生能が低下したためと思われる。また、リンパ球の産生した IFN- γ により IL-1 の PGE 産生能が抑制された可能性も考えられる。

IV. コラーゲン I 型について

Fits ら (1986)⁴⁰⁾ はヒト歯周疾患患者血清中のコラーゲン I 型を測定し健常人と比較して高値を示したと報告した。歯周疾患患者歯肉中ではコラーゲナーゼ活性が高まりコラーゲンの流出が起こっているものと思われる。つまり、歯肉局所におけるコラーゲン I 型の測定は、コラーゲナーゼ活性を間接的に測定することになると思われる。

Wahl ら (1974)⁴¹⁾、(1977)⁸⁾ は Guinea pig の腹腔マクロファージを LPS 刺激するとコラーゲナーゼ活性は上昇したが、同時に PGE₁、PGE₂ を加えるとコラーゲナーゼ活性は 2-10 倍に達したと報告している。田方 (1989)⁴²⁾ は温フェノール法で抽出した *B. gingivalis*、*B. intermedius*、*E. coli* の LPS を線維芽細胞に作用さ

せると、コラゲナーゼ活性の上昇とコラーゲン合成量の抑制がみられたと報告した。

著者の *in vivo* における歯肉中コラーゲン I 型の動態は 1 時間より急速に減少し 6 時間で 0.90 倍まで減少した。これは、LPS 刺激によりマクロファージのコラゲナーゼ活性が上昇したためと思われる。また、 PGE_1 、 PGE_2 が 1 時間より急速に産生されており、LPS と PGE_1 、 PGE_2 の作用によりコラゲナーゼ活性が相乗的に上昇しコラーゲン I 型が急速に流出したものと思われる。また、LPS により線維芽細胞のコラゲナーゼ活性が高まりコラーゲン合成が抑制されたものと思われる。その後、コラーゲンは 12 時間より 24 時間で 0.79 倍まで減少した。これは、歯肉局所で産生された IL-1 が線維芽細胞のコラゲナーゼ活性を上昇させ、コラーゲンが分解したためと思われる。小野ら (1987)⁴³⁾ は正常ヒト線維芽細胞に PG を作用させると PGE_1 では僅かに、 PGE_2 では著明に線維芽細胞の増殖を抑制したと報告している。

著者の *in vivo* におけるコラーゲン I 型は 1-6 時間、12-24 時間で急速に分解され、72 時間まで分解が続いた。これは、 PGE_1 、 PGE_2 が 24 時間に急速に産生量が増加しており、歯肉局所の線維芽細胞の増殖が抑制され、コラーゲン I 型が 72 時間まで低値をとったものと思われる。

V. 血清中の各種 mediator について

in vivo における血清中の C3c は著変は認められず、 PGE_1 、 PGE_2 は限界測定値以下であった。これは、LPS $10 \mu\text{g} / 0.05 \text{ ml}$ 生理食塩水の 1 回接種では血清中の各種 mediator の変動は起こらず、接種部位局所での免疫反応しか起こっていないことを示すものと思われる。

歯周疾患は細菌代謝産物、内毒素などの各種抗原物質により、歯周組織内で免疫反応が繰り返行われ、抗原物質による直接作用、活性化した免疫細胞の産生した各種 mediator などの間接作用により歯周組織破壊が進行する疾患である。著者は実験的歯肉炎（歯肉の炎症）における C3c、 PGE_1 、 PGE_2 、そしてコラゲナーゼ活性を間接的に測定する目的でコラーゲン I 型に着目し、各種 mediator の動態を相互的に検索した。しかし、実際の歯周炎では、様々な細胞性因子や体液性因子がその反応系に関わっており、また、歯周疾患が反復性の疾患ということを考えると、これら各種 mediator の相互作用は非常に複雑な反応系となるものと思われる。事実、歯周疾患時における免疫反応系の解明には多くの問題が残っており今後の研究を切望したい。

結 論

LPS は歯周疾患時には多彩な生物学的活性を発揮し、各種炎症性 mediator の活性化に重要な役割を演じている。著者は実験的に歯肉に LPS を接種して、ラットに歯肉炎（歯肉の炎症）を惹起させ、経時的に歯周組織および血清を採取して、C3c、 PGE_1 、 PGE_2 、コラーゲン I 型を定量し、さらに歯肉組織中の PGE_1 の局在を酵素抗体法で検索した。また、培養マクロファージ、線維芽細胞の培養上清中の PGE_1 をも定量し、次のような結論を得た。

1. 歯肉抽出液中の C3c は、3 時間後に正常値の 1.57 倍、6 時間で 1.02 倍、12 時間で 1.97 倍となり、72 時間後にはほぼ正常値となる二相性の増減を示した。
2. 血清中の C3c に著変は認められなかった。
3. 歯肉抽出液中の PGE_1 は、3 時間後に正常値の 7.44 倍、6 時間で 2.64 倍、24 時間で 9.81 倍となり、72 時間後にはほぼ正常値となる二相性の増減を示した。
4. 血清中の PGE_1 は限界測定値以下であった。
5. 歯肉抽出液中の PGE_2 は、3 時間後に正常値の 4.98 倍、12 時間で 1.91 倍、24 時間で 12.46 倍となり、72 時間後にはほぼ正常値となる二相性の増減を示した。
6. 血清中の PGE_2 は限界測定値以下であった。
7. 歯肉組織中の PGE_1 の局在は、3 時間で歯肉固有層に肥満細胞の浸潤像とともに強反応陽性部位が認められ、6 時間では反応陽性部位は減少した。
8. マクロファージ培養上清において、LPS 群は 360 分まで 16.6 ng と増加したが、LPS+抗 IL-1 群は 60 分まで 5.90 ng と増加し、その後、減少した。
9. 線維芽細胞培養上清において、LPS 群は 360 分まで 10.25 ng と増加したが、LPS+抗 IL-1 群は 180 分まで 3.10 ng と増加し、その後、減少した。
10. 歯肉抽出液中のコラーゲン I 型は、3 時間後に正常値の 0.95 倍、6 時間で 0.90 倍、24 時間で 0.79 倍、72 時間で 0.67 倍となる二相性の減少を示した。

稿を終るにあたり、終始懇篤な御指導と御校閲を賜った歯科保存学第二講座横田誠教授、口腔細菌学講座内山長司教授に深甚なる謝意を表すと同時に、種々の御指導と御助言を賜った口腔細菌学講座井上博雅助教授に深く感謝致します。さらに、大学院入学以来 3 年間にわたり御指導を賜りました歯科保存学第二講座山本博武前教授に感謝の意を表します。また、本研究に対し、終始懇切なる御教示、御助言を賜った歯科保存学第二講座お

よび口腔細菌学講座の皆様に感謝の意を捧げます。

本論文の要旨の一部は、平成元年5月21日第49回九州歯科学会総会、平成元年10月6日第32回秋季日本歯周病学会総会、平成2年5月18日第33回春季日本歯周病学会総会において発表した。

引用文献

- 1) Roitt, I. M. and Lehner, T.: Immunology of oral diseases 1st ed., Blackwell Scientific Pub., London, 1980.
- 2) Harada, Y., Tanaka, K., Uchida, Y., Ueno, A., Oh-ishi, S., Yamashita, K., Ishibashi, M., Miyazaki, H. and Katori, M.: Changes in the levels of prostaglandins and thromboxane and their roles in the accumulation of exudate in rat carrageenin-induced pleurisy—a profile analysis using gas chromatography-mass spectrometry. Prostaglandins 23 : 881–895, 1982.
- 3) Rutherford, B. and Schenkein, H. A.: C3 cleavage products stimulate release of prostaglandins by human mononuclear phagocytes *in vitro*. J. Immunol. 130 : 874–877, 1983.
- 4) Hartung, H. P., Hadding, U., Bitter-Suermann, D. and Gerns, D.: Stimulation of prostaglandin E and thromboxane synthesis in macrophages by purified C3b. J. Immunol. 130 : 2861–2865, 1983.
- 5) Imagawa, D. K., Osifchin, N. E., Paznekas, W. A., Shin, M. L. and Mayer, M. M.: Consequences of cell membrane attack by complement: Release of arachidonate and formation of inflammatory derivatives. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 80 : 6647–6651, 1983.
- 6) Hänsch, G. M., Seitz, M., Martinotti, G., Betz, M., Rauterberg, E. W. and Gerns, D.: Macrophages release arachidonic acid, prostaglandin E₂, and thromboxane in response to late complement components. J. Immunol. 133 : 2145–2150, 1984.
- 7) Kempis, J., Torbohm, I., Schönermark, M., Jahn, B., Seitz, M. and Hänsch, G. M.: Effect of late complement components C5b-9 and of platelet-driven growth factor on the prostaglandin release of human synovial fibroblast-like cells. Int. Arch. Allergy Appl. Immunol. 90 : 248–255, 1989.
- 8) Wahl, L. M., Olsen, C. E., Sandberg, A. L. and Mergenhagen, S. E.: Prostaglandin regulation of macrophage collagenase production. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 74 : 4955–4958, 1977.
- 9) Erlanger, B. F., Borek, F., Beiser, S. M. and Liebermann, S.: Steroid-protein conjugates II. Preparation and characterization of conjugates of bovine serum albumin with progesterone, deoxycorticosterone, and estrone. J. Biol. Chem. 234 : 1090–1094, 1959.
- 10) 坂口洋一, 井上博雅, 寺坂修治, 芳賀健輔, 内山長司, 山本博武: 歯周疾患と補体に関する研究—ヒト歯肉中の補体活性化について—. 九州歯会誌 42 : 1043–1050, 1988.
- 11) 平田博則: 歯周病発症におけるプロスタグランジンの役割—その骨カルシウム遊離作用と歯肉での動態について—. 広歯誌 12 : 252–264, 1980.
- 12) Löe, H., Theilade, E. and Jensen, S. B.: Experimental gingivitis in man. J. Periodontol. 36 : 177–187, 1965.
- 13) Freedman, H. L., Listgarten, M. A. and Taichman, N. S.: Electron microscopic features of chronically inflamed human gingiva. J. Periodont. Res. 3 : 313–327, 1968.
- 14) Hawley, C. E. and Falkler, W. A.: The anti-complementary activity of lipopolysaccharide preparations and sonicates from a strain of *Fusobacterium nucleatum*. J. Periodont. Res. 13 : 24–36, 1978.
- 15) Tasi, C. C., Nilsson, U. R., McArthur, W. P. and Taichman, N. S.: Activation of the complement system by some gram-positive oral bacteria. Archs. Oral Biol. 22 : 309–312, 1977.
- 16) Irving, J. T., Socransky, S. S. and Tanner, A. C. R.: Histological changes in experimental periodontal disease in rats monoinfected with gram-negative organisms. J. Periodont. Res. 13 : 326–335, 1978.
- 17) Nygren, H., Dahlen, G. and Nilsson, L. A.: Human complement activation by lipopolysaccharides from *Bacteroides oralis*, *Fusobacterium nucleatum* and *Veillonella parvula*. Infect. Immun. 26 : 391–396, 1979.
- 18) Okuda, K. and Takazoe, I.: Activation of complement by dental plaque. J. Periodont. Res. 15 : 232–239, 1980.
- 19) Schenkein, H. A. and Genco, R. J.: Gingival fluid and serum in periodontal disease. II. Evidence for cleavage of complement components C3, C3 proactivator (Factor B) and C4 in gingival fluid. J. Periodontol. 48 : 778–784, 1977.
- 20) Patters, M. R., Schenkein, H. A. and Weinstein, A.: A method for detection of complement cleavage in gingival fluid. J. Dent. Res. 58 : 1620–1624, 1979.
- 21) Niekrash, C. E., Patters, M. R. and Lang, N. P.: The relationship of complement cleavage in gingival fluid to periodontal disease. J. Periodont. Res. 19 : 622–627, 1984.
- 22) Niekrash, C. E. and Patters, M. R.: Assessment of complement cleavage in gingival fluid in humans

- with and without periodontal disease. *J. Periodont. Res.* 21 : 233-242, 1986.
- 23) 松原成年 : 歯周炎の進行と補体活性化に関する研究—実験的歯周炎における補体活性化について—, 九州歯会誌 41 : 1108-1122, 1987.
 - 24) Uchida, Y., Tanaka, K., Harada, Y., Ueno, A. and Katori, M. : Activation of plasma kallikrein-kinin system and its significant role in pleural fluid accumulation of rat carrageenin-induced pleurisy. *Inflammation* 7 : 121-131, 1983.
 - 25) Garrison, S. W., Halt, S. C. and Nichols, F. C. : Lipopolysaccharide-stimulated PGE₂ release from human monocytes. *J. Periodontol.* 59 : 684-687, 1988.
 - 26) Garrison, S. W. and 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.
 - 27) Offenbacher, S., Farr, D. H. and Goodson, J. M. : Measurement of prostaglandin E in crevicular fluid. *J. Clin. Periodont.* 8 : 359-367, 1981.
 - 28) ElAtter, T. M. A., Lin, H. S., Killoy, W. J., Vanderhoek, J. Y. and Goodson, J. M. : Hydroxy fatty acids and prostaglandin formation in diseased human periodontal pocket tissue. *J. Periodont. Res.* 21 : 169-176, 1986.
 - 29) Browning, J. L. and Ribolini, A. : Interferon blocks interleukin 1-induced prostaglandin release from human peripheral monocytes. *J. Immunol.* 138 : 2857-2863, 1987.
 - 30) Iwamoto, G. K., Monick, M. M., Burmeister, L. F. and Hunninghake, G. W. : Interleukin 1 release by human alveolar macrophages and blood monocytes. *Am. J. Physiol.* 256 : C 1012-1015, 1989.
 - 31) Friteau, L., Francesconi, E., Lando, D., Dugas, B. and Damais, C. : Opposite effect of interferon- γ on PGE₂ release from interleukin-1-stimulated human monocytes or fibroblasts. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 157 : 1197-1204, 1988.
 - 32) Newton, R. C. and Covington, M. : The activation of human fibroblast prostaglandin E production by interleukin 1. *Cell. Immunol.* 110 : 338-349, 1987.
 - 33) Godfrey, R. W., Johnson, W. J., Newman, T. and Hoffstein, S. T. : Interleukin-1 and tumor necrosis factor are not synergistic for human synovial fibroblast PLA₂ activation and PGE₂ production. *Prostaglandins* 35 : 107-114, 1988.
 - 34) Elias, J. A. : Tumor necrosis factor interacts with interleukin-1 and interferons to inhibit fibroblast proliferation via fibroblast. *Am. Rev. Respir. Dis.* 138 : 652-658, 1988.
 - 35) 内田 聡 : 歯周疾患におけるサイトカインに関する研究—インターロイキン 1 (IL-1) と腫瘍壊死因子 (TNF α) について—, 九州歯会誌 44 : 829-847, 1990.
 - 36) 金久純也, 堀 泰典, 竹内 宏, 谷 明, 佐川寛典 : 辺縁性歯周炎の免疫病理学的研究 第 4 報(2) endotoxin 接種によるラット骨組織の反応, 歯科基礎誌 24 : 738-745, 1982.
 - 37) Passwell, J. H., Dayer, J. M. and Merler, E. : Increased prostaglandin production by human monocytes after membrane receptor activation. *J. Immunol.* 123 : 115-120, 1979.
 - 38) Kunkel, S. L., Remick, D. G., Spengler, M. and Chensue, S. W. : Modulation of macrophage-derived interleukin-1 and tumor necrosis factor by prostaglandin E₂. *Adv. Prostaglandin Thromboxane Leukotriene Res.* 17 : 155-158, 1987.
 - 39) 白石悦郎, 内山長司 : 内毒素の歯肉接種時における生体反応に対する研究 第 1 報 *E. coli* の内毒素について, 九州歯会誌 31 : 401-411, 1978.
 - 40) Fitts, A., Singh, G. and Dolby, A. E. : Antibody to collagen type I in periodontal disease. *J. Periodontol.* 57 : 693-698, 1986.
 - 41) Wahl, L. M., Wahl, S. M., Mergenhagen, S. E. and Martin, G. R. : Collagenase production by endotoxin-activated macrophages. *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.* 71 : 3598-3601, 1974.
 - 42) 田方義弘 : 歯周病病原菌由来内毒素によるヒト培養歯肉線維芽細胞のコラーゲン代謝に対する影響について, 日歯周誌 31 : 755-772, 1989.
 - 43) 小野耕資, 木下正彦, 野村慶雄, 清水秀樹, 宝来宏治, 後藤弘幸, 難波秀樹, 新井英雄, 村山洋二 : 歯周疾患病態とプロスタグランジンの関係—歯肉線維芽細胞の生理機能におよぼすプロスタグランジンの影響—, 日歯保誌 30 : 716-724, 1987.