ラット歯肉への抗原接種による免疫応答に関する研究

安 西 裕 一

九州歯科大学歯学研究科口腔細菌学専攻 (指導: 内山長司教授)

平成5年6月25日受理

Study on Immune Response to Various Antigens after Gingival Injection to Rats

Yuichi Anzai

Department of Oral Bacteriology (Director: Prof. Choji Uchiyama)
Kyushu Dental College, Kitakyushu, Japan

It was expected that the bacterial plaque in the gingival crevice elicited immune response in periodontal diseases.

The purpose of this paper is to clarify the immune response which is elicited by the antigens injected from periodontium in rats.

Rats were immunized by the gingival injection of proteins, lipopolysaccharide (LPS) and ultrasonicated extracts of *Escherichia coli*, *Actinomyces naeslundii*, *Porphyromonas gingivalis* for three times a month. The number of the antibody-secreting cells in spleen and submandibullar lymph nodes were counted. The IgG subclasses of antigen specific antibodies were determined. The concentrations of cytokines which may affect the antibody secretion were also measured.

In the results of antibody-secreting cells, all of antigens induced antibody secretion in submandibullar lymph nodes, LPS greatly induced that in spleen as well. The predominant antibody in response to protein antigens was IgG1 subclass, that to LPS was IgG2a subclass, and that to three bacterial extracts was IgG2a subclass. The results showed that the subclass of antibody secretion in response to the immunization depended on the chemical composition of antigen.

The concentration of interleukin (IL)-1 decreased and that of IL-6 increased in the serum after three times gingival injections of all kinds of antigens.

The result showed that LPS greatly induced the response both in lymph nodes and in spleen. It was well-known that the concentration of LPS in periodontal tissue of the patients was higher than that of normal subjects.

It was suggested that the immune response in periodontal disease occurred both in neighboring periodontal tissue and in central immune organ.

Key words : Immune response / IgG subclass / Antibody secreting cell / Cytokine / Rat

緒 言

免疫応答は異物に対する生体内の防御機構の一手段であり、抗原が侵入すると樹状細胞等の抗原提示細胞が抗原を捕捉し、さらにマクロファージが interleukin (IL)-1 等のサイトカインを放出しそれぞれが協同して休止期の T 細胞を活性化させる。活性化された T 細胞は IL-2, 4, 5, 6 等を放出し、B 細胞を刺激し形質細胞へと分化、増殖させ抗体を産生させる。

歯周疾患はその進行状態により開始期病変、T 細胞が主要となる初期病変、B 細胞が主要となる確立期病変、歯槽骨の吸収が認められる発展期病変に分類されている。このことは歯肉溝内のプラークが抗原となって免疫応答が惹起されていることを示している。

また歯周組織に侵入した抗原はマクロファージ等の免疫担当細胞の防御機構に捕捉されるがそれを免れた抗原はリンパ節へと移動し、また一部の抗原は血管中にも侵入し脾臓へと到達する。これらは生体内で系統的な免疫応答を成立させることが知られている¹⁾。

免疫応答の成立は免疫担当細胞より放出されるサイトカインや、細胞表面上に表出されるサイトカインレセプターを検索することにより推察することができる。また検出されるサイトカインの種類により免疫応答の時期を推測できる可能性も示唆される。

このような免疫応答を惹起させる抗原であるプラークは種々の細菌によって構成されている。近年、歯周病原性細菌の関連菌の中でも、特に *Porphyromonas gingivalis* (*P. g*) が注目され、その構成成分である線毛や lipopolysaccharide (LPS) 等について免疫学的、遺伝学的に詳しい報告がある²⁻⁵⁾。しかしいまだに病原性物質が確定しているとはいえない状況にある。このことは歯周疾患の病型の多様性、疾患の進行性の差異に加え生体の防御能に差異が認められることが起因し、そのため病原菌あるいは病原物質が一つであると考えるのは難しい様に思える。そのため抗原物質の違いによる生体の免疫応答性の違いを検討する必要があるものと思われる。

以前より抗原の種類、抗原感作後の期間によって免疫グロブリンのクラス、サブクラスが異なることが一部明らかにされてきた⁶⁾。最近、歯周疾患患者の *P. g* に対する抗原特異的抗体のクラス、サブクラスの検索について、Ogawa ら (1989)⁷⁾ は歯周疾患患者の歯肉中の *P. g* 特異的抗体産生細胞を enzyme-linked immunospot (ELISPOT) 法を用い測定し、*P. g* の LPS と線毛では免疫グロブリンのサブクラスに違いを認め、また Sch-

enck ら (1987)⁸⁾ は患者血清中の *P. g* の LPS に対する IgG 抗体のサブクラスを enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) で検索し、IgG2抗体価が有意に高いと報告している。そのため抗原物質による免疫応答性の違いを免疫グロブリンのクラス、サブクラスを検索することで推察することができるものと思われる。

以上のような歯周疾患の病原性と生体防御機構の解明に用いられた、免疫応答の研究はヒトより分離した細胞、またはマウスを用いた報告が大部分である⁷⁻¹²⁾。実験動物であるラットは歯周組織の構造、プラークの構成細菌や歯周病原性細菌に対する感受性、また歯周病変の組織病理学的にヒトと類似しており、また微生物制御、遺伝制御の容易さ、経済性、処理の容易さ等から歯周病学の分野においても広く使用されている¹³⁾。しかしながら免疫応答に関するラットを用いた研究は僅かしか認められない。そこで著者は、ラット歯周組織に精製された幾つかの抗原および細菌の超音波破碎上清を抗原として接種し、それによって惹起される免疫応答を抗体産生能と血清中のサイトカイン量を測定することにより検索し、抗原の種類による免疫応答の場合、免疫グロブリンのクラス、サブクラスに違いを認めた。さらに抗原接種により血清中のサイトカイン (IL-1 と IL-6) の発現に差異が認められ、若干の興味ある知見を得たので報告する。

材料と方法

I. 実験材料

A. 動物

動物は6週齢の Wistar 系雄性ラットを九動株式会社より購入し、十分に環境に適応させた後実験に供した。

B. 供試菌株と調整法

供試菌株は *Escherichia coli* 0111 (*E. c*)、*Actinomyces naeslundii* ATCC 12104 (*A. n*)、*Porphyromonas gingivalis* 33277 (*P. g*) の3菌株を使用した。

培養法について、*E. c* は brain heart infusion (BHI) 培地 (Difco 社) 中で5日間培養した。*A. n* は BHI 培地中で嫌気的条件下で10日間培養した。*P. g* は Try-Soy Broth (BBL 社) に hemin (Sigma 社) 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、menadione (和光純薬社) 0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ を加え嫌気的条件下で1週間培養した。それぞれの菌株は培養後 7,000 rpm, 20 分間遠心して集菌し、菌懸濁液とした。さらに超音波 (2,000 W, 20 分間) で菌体を破壊し、10,000 rpm, 20 分間遠心しその上清を抗原溶液とした。また抗原溶液は固相に吸着させるコーティング溶液とし

でも実験に使用した。

C. 抗原溶液の調整

ラットの免疫には細菌抗原溶液 (*E. c.*, *A. n.*, *P. g* 菌体の超音波破碎上清) の他に, ウサギ γ -globulin (Cappel 社), ovalbumin (OVA: Sigma 社), *E. c* 0111: B 4 由来の lipopolysaccharide (LPS: Difco 社) を滅菌生理食塩水で溶解して 10 μ g/ml に調製して使用した。

D. 培養液

ELISPOT assay に使用した細胞の培養液は RPMI 1640 溶液 (Gibco 社) に 10% ウシ胎児血清 (FBS), ペニシリン 100 U/ml, ストレプトマイシン 100 μ g/ml を加えたものを使用した。

E. 酵素標識抗ラット抗体

酵素標識抗体には horseradish peroxidase (HRP)-マウス抗ラット IgM (μ 鎖特異的: Zymed 社), HRP-F (ab') 2 ウサギ抗ラット IgG (H+L 鎖: Zymed 社), HRP-マウス抗ラット IgA (α 鎖特異的: Zymed 社), HRP-マウス抗ラット IgG1 (Zymed 社), HRP-マウス抗ラット IgG2a (Zymed 社), HRP-マウス抗ラット IgG2b (Zymed 社), HRP-マウス抗ラット IgG2c (Zymed 社) を使用した。

ELISPOT assay では 1% 牛血清アルブミン (BSA) および 0.05% Tween 20 (半井化学社) を加えた PBS (PBS-T) で 500 倍に希釈し, ELISA では 0.2% BSA を含む PBS で 500 倍に希釈して使用した。

F. 抗サイトカイン抗体

ELISA で血清中の IL-1 を測定するためにポリクローナルウサギ抗ヒト IL-1 抗体 (Genzyme 社) を, また IL-6 の測定にポリクローナルウサギ抗ヒト IL-6 抗体 (Genzyme 社) を使用した。これらの抗体はラットに対して交差性を示す。

G. 二次抗体

サイトカイン測定 of ELISA には HRP 標識抗ウサギ IgGAM 抗体 (Binding site 社) を二次抗体として使用した。

H. 基質

ELISPOT 法では 3-amino-9-ethylcarbazole (AEC: Aldrich 社) 25mg を N,N-dimethylformamide (Kanto 社) 2 ml に溶解し, それを 0.05 M 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 5.0) 95 ml と混合し, 30% H_2O_2 40 μ l を加え, フィルター (0.45 μ m) で濾過して使用した。

ELISA では 2,2-Azino-bis [3-ethyl-benzothiazoline-6-sulfonic acid] (ABTS: 和光純薬社) を 0.1 mM

クエン酸リン酸緩衝液 (pH 5.0) に溶解し, さらに 0.03% H_2O_2 を加えたものを使用した。

II. 実験方法

A. 動物の免疫

エーテル麻酔下にてラットの下顎左右頬側歯肉および前歯部歯間乳頭部に抗原を 0.05 ml ずつ 3 週間にわたり 3 回接種した。そして最終接種後 4 日目に採血後, エーテル麻酔下で安楽死させ顎下リンパ節および脾臓を摘出した。

B. 細胞の分離

脾臓, 顎下リンパ節細胞を機械的に分散後, PBS に浮遊させた。同浮遊液より Lympholyte-Rat (Cedarlane 社) を用いた比重遠心法により単核細胞に富む画分を分離し, さらに 10% FBS 添加 RPMI 1640 培養液に再浮遊し細胞数を 1×10^6 個/ml に調整した。なお細胞の生存率はトリパンプルーテストにより 90% 以上であった。

C. 抗体産生細胞数の測定

脾臓と顎下リンパ節の抗体産生細胞数の測定を ELISPOT assay で免疫グロブリンのクラス, サブクラス別に行った¹⁴⁻¹⁶⁾。すなわちニトロセルロース膜で底面を加工した 96-well Millititer HA plate (Millipore 社) の各 well を抗原溶液 100 μ l で満たし, 4°C で一晚固相化させた。次に well に固相化されなかった余剰の抗原溶液を捨て, PBS-T で洗浄後, 非特異的吸着を阻害するために 4 倍希釈した Block ace (大日本製薬社) で 37°C, 1 時間ブロッキングを行った。

PBS-T で洗浄後, 抗体産生細胞を含む細胞浮遊液を 100 μ l ずつ倍数希釈系列を作って分注し, 5% CO_2 インキュベーター内にて 37°C, 4 時間インキュベートした。

PBS-T で洗浄後 500 倍希釈した HRP 標識抗ラットイムノグロブリン抗体を 100 μ l ずつ各 well に加え, 4°C で一晚反応させた。洗浄後, AEC 基質溶液を 100 μ l ずつ各 well に加え発色させた。

次に蒸留水で洗浄, 乾燥後, 弱拡大の顕微鏡下で赤い spot として出現する抗体産生細胞数をカウントした。

D. 血清の抗体価の測定

血清中の抗原特異的抗体価の測定は ELISA で行った。すなわち 96 穴 EIA 用プレート (EIA フラットプレート I: 三光純薬社) の各 well に抗原溶液を 50 μ l ずつ分注し, 4°C で一晚固相化させた。

次いで未吸着の抗原溶液を捨て PBS-T で洗浄後, 4 倍希釈 Block ace を 100 μ l ずつ分注し, 37°C, 1 時間

ブロッキングを行った。洗浄後、試料を 50 μ l ずつ分注し、37°C、2 時間インキュベーションした。

さらに洗浄後、HRP 標識抗体を 50 μ l ずつ分注し、37°C、2 時間反応させた。PBS-T で洗浄後、酵素反応基質 ABTS を 50 μ l ずつ分注し、37°C、30 分間反応させ、ELISA リーダー (Vmax kinetic microplate reader: 和光純薬社) で 405 nm における吸光度を測定した。

E. 血清中のサイトカイン測定

血清中に含まれるサイトカイン (IL-1, IL-6) は ELISA で測定した¹⁷⁾。すなわち 96 穴 EIA 用プレートにラット血清を 37°C、2 時間で固相化させた後、未吸着の試料を捨て PBS-T で洗浄後、4 倍希釈 Block ace で、37°C、1 時間ブロッキングを行った。次いで洗浄後、抗サイトカイン抗体と 37°C、2 時間反応させ、さらに HRP 標識二次抗体と 37°C、2 時間反応させた。PBS-T で洗浄後、酵素反応基質 ABTS で、37°C、30 分間反応させ、ELISA リーダーで 405 nm における吸光度を測定した。

結 果

I. 各臓器における抗体産生細胞の分布

ラット歯肉に抗原を接種してどこで主に抗体産生が行われているかを検索するため脾臓と顎下リンパ節の抗体産生細胞数をクラス別に ELISPOT 法で測定し、比較した結果、抗原の種類により抗体産生細胞の分布に差異を認め、さらに臓器別に spot の多様性が観察された。

A. 精製既存抗原に対する抗体産生細胞数

ウサギ γ -globulin に対する抗体産生細胞は顎下リンパ節において抗原特異的抗体産生細胞が多数認められ、大部分が IgG 産生細胞であった。また脾臓では抗原特異的抗体産生細胞はほとんど認められなかった。

OVA に対する特異的抗体産生細胞は脾臓と比較して IgG 産生細胞、IgM 産生細胞ともに顎下リンパ節で多数検出された。

LPS に対する特異的 IgG 産生細胞は顎下リンパ節においても検出されるが、それよりも脾臓で多数検出された。また他の抗原と比較すると脾臓では反応性が強いことが示され、抗原特異的 IgM 産生細胞も脾臓で多数検出された (Fig. 1)。

これらのことより蛋白抗原であるウサギ γ -globulin と OVA に対する抗体産生細胞は主に顎下リンパ節で認められ、多糖抗原である LPS は脾臓でも強く抗体産生が認められることが示された。

B. 細菌超音波破碎上清抗原に対する抗体産生細胞数
細菌の超音波破碎上清抗原に対する特異的抗体産生細胞を検索した。なお細菌の超音波破碎上清中には線毛等の蛋白や細胞壁多糖体等の種々の抗原物質を含んでいることを考慮した。

E. c 上清抗原に対する抗原特異的抗体産生細胞は顎下リンパ節では IgG, IgM 産生細胞ともに検出された。また脾臓においても顎下リンパ節と同程度の IgG 産生細胞が検出された。

A. n 上清抗原に対する抗原特異的抗体産生細胞は顎下リンパ節において検出され、脾臓ではほとんど検出されなかった。

P. g 上清抗原に対する抗原特異的抗体産生細胞は顎下リンパ節で特に IgG 産生細胞が多数検出された。また顎下リンパ節、脾臓においても IgM 産生細胞は検出された。さらに顎下リンパ節において IgA 産生細胞も少数検出されたが脾臓ではほとんど検出されなかった (Fig. 2)。

これらのことより *E. c* 上清抗原に対しては脾臓、顎下リンパ節共に抗体産生が誘導され、*A. n*, *P. g* 上清抗原に対しては主に顎下リンパ節において抗体産生が誘導され、菌種間で抗体産生の方が異なることが示された。

II. 抗体産生細胞の IgG サブクラス

顎下リンパ節における抗原特異的 IgG 産生細胞中の IgG サブクラスの割合を ELISPOT 法で検索した。その結果、抗原の種類により IgG サブクラスの割合に差異を認めた。なお検出された各サブクラスの spot の形状は大きさ、明瞭度等によりいくつかのパターンを生じていた。

A. 精製既存抗原特異的 IgG 産生細胞のサブクラス
ウサギ γ -globulin 特異的抗体産生細胞の IgG サブクラスの割合は IgG1 産生細胞が 70% 近くを占め最も多く、また spot も大きく明瞭であった。次に IgG2a 産生細胞が 20% を占め、IgG2c, IgG2b の順に認められた。

OVA 特異的 IgG 抗体産生細胞のサブクラスの占める割合は γ -globulin と同じく IgG1 産生細胞が 55% と多くを占めていた。

LPS 特異的 IgG 産生細胞中のサブクラスの割合は IgG2a 産生細胞が 50% と多くを占め、spot は大きく明瞭であった。次いで IgG1 産生細胞、IgG2a 産生細胞がそれぞれ 20% 前後を占めていた (Fig. 3)。

これらのことよりウサギ γ -globulin, OVA 等の蛋白抗原では IgG1 産生細胞が、多糖抗原である LPS では IgG2a 産生細胞が最も多く検出された。

Fig. 1 Number of antibody secreting cells for purified antigen in lymph nodes and spleen by ELISPOT assay.

SFC : Spot forming cells as a result of antibody secretion
lymph : Submandibular lymph nodes
sp : Spleen

Rabbit γ -globulin, OVA, LPS were used as antigens.
Bars show SE (n=5).

Number of cells per well : 1×10^6

Fig. 2 Number of antibody secreting cells for supernatant of bacteria in lymph nodes and spleen by ELISPOT assay.

E. c., *A. n.*, *P. g.* were used as antigens.

Bars show SE (n=5).

The others were same as Fig. 1.

Fig. 3 Specific antibody secreting cells in each IgG subclass in submandibular lymph nodes after purified antigen injection by ELISPOT assay. The results expressed as propotion of the number of cells secreting specific antibody in each IgG subclass to that in total IgG. Rabbit γ -globulin, OVA, LPS were used as antigens. Bars show SE (n=5). Number of cells per well : 1×10^6

Fig. 4 Specific antibody secreting cells in each IgG subclass in submandibular lymph nodes after supernant of bacteria injection by ELISPOT assay. *E. c.*, *A. n.*, *P. g.* were used as antigens. Bars show SE (n=5). The others were same as Fig. 3.

Fig. 5 Relative concentration of antibody for purified antigen in serum by ELISA.
O.D.: Optical density at 405 nm
Rabbit γ -globulin, OVA, LPS were used as antigens.
Bars show SE (n = 6).

Fig. 6 Relative concentration of antibody for supernatant of bacteria in serum by ELISA.
E. c, *A. n*, *P. g* were used as antigens.
Bars show SE (n = 6).
The others were same as Fig. 5.

B. 細菌超音波破碎上清抗原特異的 IgG 抗体産生細胞のサブクラス

E. c 上清抗原に反応する IgG 産生細胞のサブクラス
の割合は IgG2a 産生細胞が 61% と最も多くを占めてい

た。次いで IgG1 産生細胞が 24% と多くを占めた。

A. n 上清抗原に対する IgG 産生細胞のサブクラスは
IgG2a 産生細胞が 51% と最も多くを占めていた。

P. g 上清に対する IgG 抗体産生細胞のサブクラスは

IgG2a 産生細胞が 50% と最も多くを占めた (Fig. 4).

これらのことより著者の実験で用いた 3 種の細菌破碎上清抗原では IgG2a 産生細胞が IgG サブクラスの中で最も多くを占めた。

Ⅲ. 血清中の抗原特異的抗体価の測定

ラットの歯肉に抗原接種した血清中の抗原特異的抗体価を IgG サブクラス別に ELISA で測定した結果、抗原の種類により特異抗体のサブクラスに差異を認めた。

A. 精製既存抗原に対する特異抗体価

ウサギ γ -globulin 特異的 IgG サブクラスは、IgG1 が高く検出され、次いで IgG2a が検出された。IgG2b, IgG2c は僅かにしか検出されなかった。

OVA 特異的 IgG サブクラスは全体的に低い、ウサギ γ -globulin と同じく IgG1 が最も高く検出された。

LPS 特異的 IgG サブクラスは IgG2a が最も高く、次に IgG1, IgG2b の順に認められ、IgG2c は僅かにしか検出されなかった (Fig. 5)。

これらのことより著者の実験ではウサギ γ -globulin, OVA 等の蛋白抗原では IgG1 が、多糖抗原で T 細胞非依存性抗原である LPS では IgG2a が最も高く検出され、抗原の種類により IgG 抗体のサブクラスが異なっていることが示され、脾臓と顎下リンパ節中の抗体産生細胞と類似した結果を示した。

B. 細菌の超音波破碎上清抗原に対する特異抗体価

細菌の超音波破碎上清抗原に対する血清中の IgG サブクラスの抗体価を検索した。

E. c 上清抗原に反応した血清中の IgG 抗体のサブクラスは IgG2a が最も高く、次いで IgG1 も検出された。IgG2b, IgG2c は僅かにしか検出されなかった。

A. n 上清抗原に対する各 IgG サブクラスは血清中にはほとんど検出されなかった。

P. g 上清抗原に反応した血清中の IgG 抗体のサブクラスは IgG2a が他のサブクラスより非常に高く検出され、IgG1, IgG2b, IgG2c は僅かにしか検出されなかった (Fig. 6)。

これらのことより著者の実験では *A. n* 上清抗原に対してはほとんど抗原特異抗体が検出されなかったが、*E. c*, *P. g* の各上清抗原に対する血清中の抗原特異的 IgG 抗体のサブクラスは IgG2a が高く検出されることが示され、脾臓と顎下リンパ節中の抗体産生細胞と類似した結果を示した。

なお結果は示していないが各抗原とも抗原特異的 IgM は検出されるが、抗原特異的 IgA は僅かにしか検出されなかった。

Fig. 7 Concentration of cytokines in serum after gingival injection.

Control : O. D. of ELISA for cytokines (IL-1, IL-6) in serum of normal rat

Treated : O. D. of ELISA for cytokines (IL-1, IL-6) in serum of antigen injected rat

Rabbit γ -globulin, OVA, LPS, *E. c*, *A. n*, *P. g* were used as antigens.

Bars show SE (n=3).

Ⅳ. 血清中のサイトカイン測定

血清中の IL-1, IL-6 は正常ラット血清中のサイトカイン量を 1 として抗原接種後のラット血清中のサイトカインとの増減を比較した。

その結果ほとんどの抗原接種ラットは正常ラットに比較して IL-1 量に減少を認め、*P. g* 接種ラットのみがやや増加していた。それに対してどの抗原接種ラットも正常ラットに比較して血清中の IL-6 量は増加を認めた (Fig. 7)。

考 察

歯周疾患の成立機序に深く関与する免疫応答を検索する目的で、ラット歯肉より侵入した抗原によって惹起される免疫応答を抗体産生、サイトカインの変化の点より検討した。その結果抗原の種類により異なる免疫応答性が認められた。

I. 抗原の種類による抗体産生細胞の臓器別の比較について

著者はラット歯周組織に抗原感作を行い、抗体産生の場としての脾臓と顎下リンパ節を、それらの細胞を用いて ELISPOT 法で検索した。

ELISPOT 法で検出される抗体産生細胞は、細胞より

分泌される免疫グロブリンを発色させることにより spot として視覚化される特徴を持ち、この spot には大きさ、発色の強度、明度等によりいくつかのパターンが存在することが知られている¹⁸⁻²²⁾。著者の実験においてもサイズが大きく、比較的明瞭な spot から、サイズが小さく発色も弱い spot が存在し、またサイズは小さいが発色度が強く、辺縁のシャープな spot 等が観察された。この spot のパターンに関する報告について、Holt ら (1984)²¹⁾ はこれら spot の違いは細胞レベルでの問題 (抗体の親和性や細胞より産生される抗体量等) か、或いはプレートに固相化する抗原量に関する技術的な問題より生じることを示唆している。また Martin ら (1991)²²⁾ は細胞の生存率や細胞の表面免疫グロブリンの存在も spot のバリエーションに関係していることを示している。また Amano ら (1991)²³⁾ は産生される抗体量により spot の大きさが異なることに着目し、抗体産生細胞数を測定すると同時に spot の面積を digital image processing system により読み取り分泌抗体量も算定する方法を考案している。

これらのことより著者の spot のパターンは spot が大きく、明瞭なほど分泌抗体量が多く、B 細胞の分化も速やかに行われていることが推察された。また血清中の抗体価が高く検出される抗原ほど、比較的各臓器の spot も大きく、明度が高いことも B 細胞分化が進んでいることを示しているものと思われた。

生体内の免疫システムにはリンパ節や脾臓が関係し血液循環を介する系統的免疫系と腸管粘膜組織や呼吸器系組織に存在する mucosal-associated lymphoid tissue (MALT) が作用する局所免疫系とに大別されている²⁴⁾。

著者の歯肉接種法は粘膜内への直接的な抗原投与であることから、まず抗原の侵入に対する粘膜上の唾液や、上皮、基底膜の物理的防御は無視されること、次に経口的な腸管内への抗原感作も通常は考えられないこと、そのため MALT の主要な組織であるパイエル板刺激によって惹起される局所免疫応答²⁵⁾も除外して考えられること、これらの理由により歯肉に侵入した抗原に対する生体の系統的免疫応答を検索するには著者の接種法が最適であると考えた。

著者の実験ではほとんどの抗原で顎下リンパ節で多く抗体産生細胞が認められたが、LPS では脾臓での抗体産生細胞数が顎下リンパ節の抗体産生細胞数を上回った結果が得られた。この原因はまず抗原の移動性が考えられた。LPS は局所組織に留まらず速やかに循環系を介

し全身へと移行し脾臓に到達し、その際細胞の走化性が促進され各種の免疫担当細胞を刺激し免疫応答も活発に起こさせることが考えられた。また脾臓には *E. c* の LPS に反応するクローンが多数存在し、そのために脾臓で抗体産生が強く起こることも考えられた。またこの傾向は著者が用いた *E. c* の上清でも認められたことから、上清中に含まれる LPS の作用が考えられた。

II. 抗原の種類による IgG サブクラスの違いについて

抗原の種類により免疫グロブリンのサブクラスが異なることが知られている⁶⁾。また歯周疾患患者の抗原に対するサブクラスの差異に関する報告もある。Ogawa ら (1989)²⁶⁾ は歯周疾患患者の歯肉中の抗原特異的抗体産生細胞を ELISPOT 法で検索し、中等度の歯周疾患患者と進行性歯周疾患患者を比較すると IgG, IgA のサブクラスに変化が認められ、歯周疾患の進行度と免疫グロブリンの変動には関係があることを示唆している。また *P. g* の線毛と LPS を比較すると線毛特異的抗体産生細胞が多数検出され、両者の免疫グロブリンのサブクラスには差異を認め、歯周疾患における *P. g* 線毛の重要性に注目している。また Reinhardt ら (1989)²⁷⁾ は歯周疾患患者の症状の安定している疾患部位と活動的な部位とでは IgG サブクラスが異なることを報告している。さらに Lopatin ら (1992)²⁸⁾ は歯周疾患患者の血清中の *P. g* の LPS, ストレプトキナーゼ, tetanus toxoid のそれぞれに対しては IgG サブクラスが異なることを報告している。著者の実験においても抗原の種類により免疫グロブリンのサブクラスに差異が認められた。

これらの免疫グロブリンは H 鎖不変部の一次構造のアミノ酸配列による抗原性の差異により次のサブクラスに分類され、ヒトの IgG は IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 の 4 種類に分類されている。それぞれのサブクラスには生物学的活性の違いが認められ、異種皮膚との結合性は IgG1, IgG3, IgG4 に見受けられるが IgG2 には認められない。また補体結合性は IgG2 には弱く、IgG4 にはほとんど認められない。また *Staphylococcus* の protein A に対する結合性は IgG1, IgG2, IgG4 に強く認められるが IgG3 には認められないことが知られている⁶⁾。

次に抗原刺激により産生される IgG 抗体のサブクラスは、蛋白質抗原の場合 IgG1 が多く産生され IgG3, IgG4 が次いで産生される。また抗原感作が持続されると IgG3, IgG4 が有意に増加するといわれている。また多糖体抗原の場合通常 IgG2 サブクラスの産生能が上昇することが知られている⁶⁾。

次に動物の IgG のサブクラスはマウスでは IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3 に分類され、ラットでは IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG2c に分類されている。

ラットの IgG サブクラスにも生物学的活性に差異が認められている。 *Staphylococcus* の protein A に対する結合性は IgG1, IgG2c には認められるが IgG2a, IgG2b には認められないことが知られている²⁹⁾。また Grazych ら (1982)³⁰⁾ はラット IgG2a は *Schistosoma manso* に対する好酸球依存性障害活性を仲介する同種細胞親和性抗体であると報告し、また Appleton ら (1987)³¹⁾ は乳児ラットの *Trichinella spiralis* に対する防御排除機構には IgG1 が重要な役割を果たすと報告している。

さらに Balian ら (1980)³²⁾ はラットに種々の抗原を腹腔内あるいは静脈投与し、それによって誘導される IgG 抗体のサブクラスを検索している。彼らの報告によると OVA 等の蛋白抗原では IgG2a が、LPS の様な胸腺非依存性抗原 Type I では IgG2b と IgG2c が、また胸腺非依存性抗原 Type II である多糖体抗原では IgG2c が主に誘導されると報告している。しかし著者の抗原歯肉接種法による抗体産生誘導の実験では OVA やウサギ γ -globulin 等の蛋白抗原に対しては IgG1 が、LPS のような多糖抗原の場合は IgG2a が血清中にもリンパ組織においても誘導された結果となり彼等の報告と異った。彼等の実験は著者の実験と比較して抗原投与量が多く、また抗原投与方法が異なり、免疫期間が著者の実験と比較して長期であり、これらのことが原因となって結果が異なったものと考えられた。

Mosmann ら (1986)³³⁾ はマウス CD 4 陽性 T 細胞クローンをサイトカインの産生パターンより Th1 と Th2 の 2 種類の T 細胞亜集団に分類した。Th1 は IL-2, interferon (IFN)- γ , Tumor necrosis factor (TNF)- β を産生し、Th2 は IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13 を産生する。これら T 細胞は産生するサイトカインによって互いを抑制し通常平衡状態が保たれている。また Firestein ら (1989)³⁴⁾ はマウス CD 4 陽性 T 細胞クローンの中に Th1 と Th2 のクローンのそれぞれが産生するサイトカインを同時に産生するクローンが存在することをさらに明らかにし Th0 クローンと呼び Th0 細胞が分化して Th1 や Th2 になることを示した。この分化を左右するものとしては抗原提示細胞の種類、サイトカイン、抗原エピトープの性状等が考えられるが現在では不明の部分が多い。

Th1 の産生する IFN- γ は IgG2a の産生能を高めるこ

とが報告されている³⁵⁾。また Th2 の産生する IL-4 は IgG1, IgE の産生を著明に促進することが報告されており^{36, 37)}、IgG サブクラスの違いにはヘルパー T 細胞のサブセット違いが関係することが示唆されている。

これらのヘルパー T 細胞の検索はマウスを用いた実験で行われているが、ヘルパー T 細胞のサブセットの存在はヒトやラットについても報告されている³⁸⁻⁴⁰⁾。

著者の実験で抗原の種類によって IgG1 が主に産生されるものと、IgG2a が主に産生されるものとに大別されたがこれらの違いにはヘルパー T 細胞のサブセットが関与している可能性も考えられる。

Ⅲ. 抗原歯肉接種によるサイトカインの変化について
炎症反応、免疫反応においての細胞間の調節因子としてサイトカインは非常に重要な役割を果たすものと思われる。中でも炎症性サイトカインとしては IL-1, IL-6 等がよく知られている⁴¹⁻⁴³⁾。

IL-1 は単球、マクロファージをはじめとする種々の細胞から産生されるサイトカインであり、等電点の違いにより α と β に分類される。その標的細胞と生物活性は非常に多彩であり、生体の恒常性の維持、炎症反応、免疫反応の調節に関与している⁴¹⁾。

IL-6 も T 細胞、B 細胞、マクロファージ等の多彩な細胞より産生され、その標的細胞、生物活性也多岐にわたるところは IL-1 とよく類似している⁴³⁾。

IL-6 は B 細胞の抗体産生細胞への最終分化を誘導する免疫系の調節因子として主に研究され、IL-6 を添加することにより *in vitro*, *in vivo* 共に抗体産生が増強することが確認されている⁴⁴⁻⁴⁵⁾。

サイトカインと歯周疾患とを関連付ける研究の中で IL-1 は初期から研究が進んでいる⁴⁶⁻⁴⁹⁾。Wilton ら (1990)⁴⁹⁾ は成人性歯周疾患患者の歯肉溝中の IL-1 を ELISA で測定している。また Masada ら (1989)⁵⁰⁾ は歯肉溝中の IL-1 を測定すると同時に組織中の IL-1 の mRNA の発現を検索している。

歯周疾患に特徴的な B 細胞に富む病像の形成には IL-6 が関与していることが考えられる。IL-6 と歯周疾患に関する研究は IL-1 と比較して少ないが、鎌形ら (1989)⁵¹⁾ は病巣組織を培養して IL-6 産生と病態との相関性を示唆し、Takada ら (1991)⁵²⁾ はヒト歯肉線維芽細胞を LPS で刺激することにより IL-6 が産生されることを報告した。

IL-6 は B 細胞分化の最終段階に作用するのに対して IL-1 は B 細胞の増殖、分化の初期、中期に主に作用するといわれる。また IL-1 は抗原提示の際にも重要な役

割を果たすとされている。このことから IL-1 は免疫応答の主に前半に、IL-6 は主に後半に重要な役割を果たすことが考えられる。

抗原歯肉接種により抗原特異抗体を誘導できたが、その際ほとんどの抗原では血清中の IL-1 の減少と IL-6 の増加が認められた。このことは細胞間でのサイトカインネットワークが生じ、その免疫応答が後半の段階にあることを示唆するものと考えた。しかし *P. g* 上清でや IL-1 の増加が認められたことは上清中に種々の抗原が含まれ、それらの物質の免疫応答反応性が異なっているためと思われる。

結 論

抗原による免疫応答性の相違を検索する目的で、ラット歯周組織に種々の抗原を接種することにより惹起される免疫応答を抗体産生の場合、免疫グロブリンのサブクラス、血清中のサイトカイン量の変化の点から検索し、以下の結論を得た。

1. 抗原の種類別に脾臓と顎下リンパ節で抗体産生応答に差異を認めた。すなわち蛋白抗原であるウサギ γ -globulin と OVA に対しては主に顎下リンパ節で抗体産生が認められ、多糖抗原である LPS は脾臓でも強い抗体産生を認めた。また細菌抗原の場合 *E. c* 上清抗原に対しては脾臓、顎下リンパ節共に抗体産生が誘導され、*A. n.*、*P. g* 上清抗原に対しては主に顎下リンパ節において抗体産生が誘導された。

2. 抗原の種類によってリンパ器官および血清中においても誘導される IgG のサブクラスに差異が認められた。すなわち蛋白抗原であるウサギ γ -globulin、OVA では IgG1 が、多糖抗原である LPS では IgG2a が最も多く検出された。また実験で用いた *E. c.*、*A. n.*、*P. g* の 3 種の上清抗原では IgG2a が最も多く検出された。

3. 抗原を歯肉に接種することによりサイトカイン量に変化が認められた。すなわち実験に用いたほとんどの抗原で未処置のラットと比較して IL-1 の減少と IL-6 の増加を認めた。

以上のことより歯周組織より侵入した抗原は系統的免疫応答を成立させ、その主な反応臓器と免疫グロブリンのサブクラスは抗原の種類別に異なることが示唆された。また抗原が侵入することにより血清中のサイトカイン量に変化が生じることが示唆された。このことは歯周疾患を局所的にのみ捉えるのではなく全身的な免疫応答という点でも考慮しなければならない事を示しているものと思われる。

稿を終えるにあたり、終始懇篤な御指導と御校閲を賜った口腔細菌学講座内山長司教授に深甚なる感謝の意を捧げます。また本研究に対し、終始懇切なる御教示、御助力を賜った口腔細菌学講座の皆様に厚く御礼申し上げます。

本論文の要旨の一部は平成 4 年 5 月 30 日第 52 回九州歯科学会総会、平成 4 年 10 月 17 日第 35 回日本歯周病学会秋季総会において発表した。

引用文献

- 1) 吉江弘正, 前田勝正: 口腔の免疫応答. 臨床に役立つ口腔免疫学アトラス (前田勝正, 吉江弘正, 大石正道編). 医歯薬出版, 東京, 1991, 46-62.
- 2) Dickinson, D. P., Kubiniec, M. A., Yoshimura, F. and Genco, R. J.: Molecular cloning and sequencing of the gene encoding the fimbrial subunit protein of *Bacteroides gingivalis*. J. Bacteriol. 170 (4): 1658-1665, 1988.
- 3) Ogawa, T., Kusumoto, Y., Uchida, H., Nagashima, S., Ogo, H. and Hamada, S.: Immunobiological activities of synthetic peptide segments of fimbrial protein from *Porphyromonas gingivalis*. Biochem. Biophys. Res. Commun. 180 (3): 1335-1341, 1991.
- 4) Takahashi, Y., Yoshimura, F., Kawanami, M. and Kato, H.: Detection of fimbriin gene (fim A) in *Porphyromonas (Bacteroides) gingivalis* by Southern blot analysis. J. Periodont. Res. 27: 599-603, 1992.
- 5) Fujiwara, T., Ogawa, T., Sobue, S. and Hamada, S.: Chemical, immunobiological and antigenic characterizations of lipopolysaccharides from *Bacteroides gingivalis* strains. J. Gen. Microbiol. 136: 319-326, 1990.
- 6) 中村 弘, 秋吉順子: 免疫グロブリンのイソタイプ/サブクラスと抗体機能. 臨床免疫 21 (5): 753-766, 1989.
- 7) Ogawa, T., Mcghee, M. L., Moldoveanu, Z., Hamada, S., Mestecky, J., Mcghee, J. R. and Kiyono, H.: *Bacteroides*-specific IgG and IgA subclass antibody-secreting cells isolated from chronically inflamed gingival tissues. Clin. exp. Immunol. 76: 103-110, 1989.
- 8) Schenck, K. and Michaelsen, T. E.: IgG subclass distribution of serum antibodies against lipopolysaccharide from *Bacteroides gingivalis* in periodontal health and disease. Acta path. microbiol. immunol. scand. Sect. C. 95: 41-46, 1987.
- 9) Okada, H., Ito, H. and Harada, Y.: T-cell requirement for establishment of the IgG-dominant B-cell lesion in periodontitis. J. Periodont. Res. 22: 187-189, 1987.
- 10) Yamazaki, K., Ikarashi, F., Aoyagi, T., Takahashi,

- K., Nakajima, T., Hara K. and Seymour, G. J. : Direct and indirect effects of *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide on interleukin-6 production by human gingival fibroblasts. *Oral Microbiol. Immunol.* 7 : 218-224, 1992.
- 11) Sveen, K. and Skaug, N. : Comparative mitogenicity and polyclonal B cell activation capacity of eight oral or nonoral bacterial lipopolysaccharides in cultures of spleen cells from athymic (nu/nu-BALB/C) and thymic (BALB/C) mice. *Oral Microbiol. Immunol.* 7 : 71-77, 1992.
 - 12) Ogawa, T., Kusumoto, Y., Kiyono, H., McGhee, J. R. and Hamada, S. : Occurrence of antigen-specific B cells following oral or parenteral immunization with *Porphyromonas gingivalis* fimbriae. *Int. Immunol.* 4 (9) : 1003-1010, 1992.
 - 13) Klausen, B. : Microbiological and immunological aspects of experimental periodontal disease in rats : a review article. *J. Periodontol.* 62 : 59-73, 1991.
 - 14) Czerkinsky, C. C., Nilsson, L.-A., Nygren, H., Ouchterlony, O. and Tarkowski, A. : A solid-phase enzyme-linked immunospot (ELISPOT) assay for enumeration of specific antibody-secreting cells. *J. Immunol. Methods.* 65 : 109-121, 1983.
 - 15) 安西裕一, 井上博雅, 安 民鎬, 福泉隆喜, 内山長司 : 抗体産生細胞の動態に関する研究. 九州歯会誌 46 (2) : 375-382, 1992.
 - 16) Moller, S. A. and Borrebaeck, C. A. K. : A filter immuno-plaque assay for the detection of antibody-secreting cells *in vitro*. *J. Immunol. Methods.* 79 : 195-204, 1985.
 - 17) 内田 聡 : 歯周疾患におけるサイトカイン産生に関する研究 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 (6) : 829-847, 1990.
 - 18) Czerkinsky, C., Andersson, G., Ekre, H.-P., Nilsson, L.-A., Klareskog, L. and Ouchterlony, O. : Reverse ELISPOT assay for clonal analysis of cytokine production I. Enumeration of gamma-interferon-secreting cells. *J. Immunol. Methods.* 110 : 29-36, 1988.
 - 19) Czerkinsky, C., Moldoveanu, Z., Mestecky, J., Nilsson, L.-A. and Ouchterlony, O. : A novel two colour ELISPOT assay I. Simultaneous detection of distinct types of antibody-secreting cells. *J. Immunol. Methods.* 115 : 31-37, 1988.
 - 20) Sedgwick, J. D. and Holt, P. G. : A solid-phase immunoenzymatic technique for the enumeration of specific antibody-secreting cells. *J. Immunol. Methods.* 57 : 301-309, 1983.
 - 21) Holt, P. G., Sedgwick, J. D., Stewart, G. A., O'Leary, C. and Krska, K. : ELISA plaque assay for the detection of antibody secreting cells : Observations on the nature of the solid phase and on variations in plaque diameter. *J. Immunol. Methods.* 74 : 1-7, 1984.
 - 22) Coco-Martin, J. M., Koolwijk, P., Groot, Van der Velden-de Groot, C. A. M. and Beauvery, E. C. : An isotype-specific spot-ELISA for the enumeration of antibody-secreting hybridomas and the determination of isotype switch variants. *J. Immunol. Methods.* 145 : 11-18, 1991.
 - 23) Amano, M., Martin, J. C., McGhee, J. R., McCutcheon, M. J. and Kiyono, H. : Immunofluorescence-digital image processing system for the quantitation of secreted immunoglobulin by single cells. *J. Immunol. Methods.* 144 : 127-140, 1991.
 - 24) 山下昭 : Gut associated lymphoid tissue (GALT). 臨床免疫 24 (12) : 1776-1784, 1992.
 - 25) 清野 宏 : IgA 抗体産生の調節機構 : IgA アイソタイプ特異 T 細胞とその作用. 代謝 21 : 93-102, 1984.
 - 26) Ogawa, T., Tarkowski, A., McGhee, M. L., Moldoveanu, Z., Mestecky, J., Hirsch, H. Z., Koopman, W. J., Hamada, S., McGhee, J. R. and Kiyono, H. : Analysis of human IgG and IgA subclass antibody-secreting cells from localized chronic inflammatory tissue. *J. Immunol.* 142 (4) : 1150-1158, 1989.
 - 27) Reinhardt, R. A., McDonald, T. L., Bolton, R. W., DuBois, L. M. and Kaldahl, W. B. : IgG subclasses in gingival crevicular fluid from active versus stable periodontal sites. *J. periodontol.* 60 (1) : 44-50, 1989.
 - 28) Lopatin, D. E. and Blackburn, E. : Avidity and titer of immunoglobulin G subclasses to *Porphyromonas gingivalis* in adult periodontitis patients. *Oral Microbiol. Immunol.* 7 : 332-337, 1992.
 - 29) Bazin, H. and Lebacqz, A.-M. : Physicochemical and biological properties of rat antibodies. *Transplant. Proc.* 15 (2) : 1669-1671, 1983.
 - 30) Grzych, J.-M., Capron, M., Bazin, H. and Capron, A. : *In vitro* and *in vivo* effector function of rat IgG2a monoclonal anti-*S. mansoni* antibodies. *J. Immunol.* 129 (6) : 2739-2743, 1982.
 - 31) Appleton, J. A. and McGregor, D. D. : Characterization of the immune mediator of rapid expulsion of *Trichinella spiralis* in suckling rats. *Immunology.* 62 : 477-484, 1987.
 - 32) Balian, G. P. D., Slack, J., Clevinger, B. L., Bazin, H. and Davie, J. M. : Subclass restriction of murine antibodies. III. Antigens that stimulate IgG3 in mice stimulate IgG2c in rats. *J. Exp. Med.* 152 : 209-218, 1980.
 - 33) Mosmann, T. R., Cherwinski, H., Bond, M. W., Giedlin, M. A. and Coffman, R. L. : Two types of murine helper T cell clone I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J. Immunol.* 136 (7) : 2348-2357, 1986.
 - 34) Firestein, G. S., Roeder, W. D., Laxer, J. A., Town-

- send, K. S., Weaver, C. T., Hom, J. T., Linton, J., Torbett, B. E. and Glasebrook, A. L.: A new murine CD4+T cell subset with an unrestricted cytokine profile. *J. Immunol.* 143 (2): 518-525, 1989.
- 35) Stevens, T. L., Bossie, A., Sanders, V. M., Fernandez-Botran, R., Coffman, R. L., Mosmann, T. R. and Vitetta, E. S.: Regulation of antibody isotype secretion by subsets of antigen-specific helper T cells. *Nature.* 334 (21): 255-258, 1988.
 - 36) Vitetta, E. S., Ohara, J., Myers, C. D., Layton, J. E., Krammer, P. H. and Paul, W. E.: Serological, biochemical, and functional entity of B cell-stimulatory factor 1 and B cell differentiation factor for IgG1. *J. Exp. Med.* 162: 1726-1731, 1985.
 - 37) Snapper, C. M., Finkelman, F. D. and Paul, W. E.: Differentiation regulation of IgG1 and IgE synthesis by interleukin 4. *J. Exp. Med.* 167: 183-196, 1988.
 - 38) Wierenga, E. A., Snoek, M., De Groot, C., Chretien, I., Bos, J. D., Jansen, H. M. and Kapsenberg, M. L.: Evidence for compartmentalization of functional subsets of CD4+T lymphocytes in atopic patients. *J. Immunol.* 144 (12): 4651-4656, 1990.
 - 39) Rotteveel, F. T. M., Kokkelink, I., Van Lier, R. A. W., Kuenen, B., Meager, A., Miedema, F. and Lucas, C. J.: Clonal analysis of functionary distinct human CD4+ T cell subsets. *J. Exp. Med.* 163: 1659-1673, 1988.
 - 40) Spickett, G. P., Brandon, M. R., Mason, D. W., Williams, A. F. and Woollett, G. R.: MRC OX-22, a monoclonal antibody that labels a new subset of T lymphocytes and reacts with the high molecular weight form of the leukocyte-common antigen. *J. Exp. Med.* 158: 795-810, 1983.
 - 41) 笠倉新平: 炎症とサイトカイン. *炎症* 10 (1): 9-16, 1990.
 - 42) 力石秀美, 指田勝美, 熊谷勝男: 炎症反応とサイトカイン-概説. *臨床免疫* 22 (3): 384-392, 1990.
 - 43) 吉崎和幸: 急性炎症におけるメディエーターとしての IL-6. *炎症* 10 (2): 87-92, 1990.
 - 44) Muraguchi, A., Kishimoto, T., Miki, Y., Kuritani, T., Kaieda, T., Yoshizaki, K. and Yamamura, Y.: T cell-replacing factor-(TRF) induced IgG secretion in a human B blastoid cell line and demonstration of acceptors for TRF. *J. Immunol.* 127 (2): 412-416, 1981.
 - 45) Hirano, T., Teranishi, T., Lin, B. and Onoue, K.: Human helper T cell factor (s) IV Demonstration of a human late-acting B cell differentiation factor acting on *Staphylococcus aureus* cown I-stimulated B cells. *J. Immunol.* 133 (2): 798-802, 1984.
 - 46) Muraguchi, A., Hirano, T., Tang, B., Matsuda, T., Horii, Y., Nakajima, K. and Kishimoto, T.: The essential role of B cell stimulatory factor 2 (BSF-2/IL-6) for the terminal differentiation of B cells. *J. Exp. Med.* 167: 332-334, 1988.
 - 47) Charon, J. A., Luger, T. A., Mergenhagen, S. E. and Oppenheim, J. J.: Increased thymocyte-activating factor in human gingival fluid during gingival inflammation. *Infect. Immun.* 38 (3): 1190-1195, 1982.
 - 48) Honig, J., Rordort-Adam, C., Siegmund, C., Wiedemann, W. and Erard, F.: Increased interleukin-1 beta (IL-1 β) concentration in gingival tissue from periodontitis patient. *J. Periodont. Res.* 24: 362-367, 1989.
 - 49) Wilton, J. M. A., Bampton, J. L. M., Griffiths, G. S., Curtis, M. A., Life, J. S., Johnson, N. W., Powell, J. R., Harrap, G. J. and Critchley, P.: Interleukin-1 beta (IL-1 β) levels in gingival crevicular fluid from adults with previous evidence of destructive periodontitis. *J. Clin. Periodontol.* 19: 53-57, 1992.
 - 50) 鎌形有祐, 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 (4): 1081-1087, 1989.
 - 51) Takada, H., Mihara, J., Morisaki, I. and Hamada, S.: Induction of interleukin-1 and-6 human gingival fibroblasts cultures stimulated with *Bacteroides* lipopolysaccharide. *Infect. Immun.* 59 (1): 295-301, 1991.