歯周炎と Interleukin-6 遺伝子発現に関する研究

菅 野 直 之

日本大学歯学部保存学教室歯周病学講座

(指導：村井正大教授)

(平成4年1月17日受付)

Study of Interleukin-6 Expression in Periodontitis

Naoyuki SUGANO

Department of Periodontology, Nihon University School of Dentistry

1-8-13, Kanda-surugadai Chiyoda-ku, Tokyo 101, Japan

(Director : Prof. Seidai MURAI)

Experimental studies have suggested that interleukin-6 (IL-6) may play an important role in periodontitis. The purpose of this study was to investigate, by use of reverse transcriptase polymerase chain reaction assay, the expression of IL-6 in the gingival tissues and the potency of neuropeptide Substance P (SP) for inducing IL-6 expression.

IL-6 expression was detected in 10 of 15 gingival tissue samples from periodontitis patients, however, levels of IL-6 expression were not associated with probing depth, bone level or Gingival Index.

SP induced IL-6 expression in peripheral blood mononuclear cells *in vitro*. High levels of IL-6 expression were detected by 3 hours and continued 12 hours. The maximum SP effect occurred at 10^{-8} M by 6 hours. Subsequent experiments were performed to establish the specificity of the SP effect. SP antagonist (10^{-6} M) reduced the expression of IL-6 that had been induced by 10^{-8} M SP.

These findings identify a potent mechanism for nervous system regulation of cytokine expression in periodontitis.

Key words : Periodontitis, Interleukin-6, Substance P, Polymerase chain reaction assay

要旨：歯周炎の発症への関与が示唆されている Interleukin-6 (IL-6) 遺伝子の歯周組織における検出と神経ペプチドの一つである Substance P (SP) による末梢血単核球の IL-6 発現の誘導について PCR 法を用いて検討した。PCR 法は感受性と特異性に優れ、微量な臨床サンプルからのサイトカインの検出に有効な方法であり、この方法を用い、歯周炎歯肉 15 例中 10 例に IL-6 の発現を認めた。しかし、その発現の程度と臨床症状には有意な相関は見られなかった。SP は末梢血単核球の IL-6 の発現を SP の濃度が 10^{-8} M、添加後 6 時間で最も強く誘導することが示された。その発現は antagonist を加えることにより抑制された。このことから歯周組織の IL-6 遺伝子の発現に SP が関与していることが考えられ、歯周組織には SP の遊離を介した防御メカニズムが構成されていることが推察された。

索引用語：歯周炎、インターロイキン 6、Substance P、PCR 法

緒 言

歯周炎は上皮付着の喪失と歯槽骨の破壊を特徴とする慢性の非特異性炎症性疾患であり、プラーク中の細菌により引き起こされると考えられている¹⁾。しかし、その発症機序については未解明の部分が多く、細菌を介した複雑なステップが想定されている。近年、様々な免疫学的検索から、歯周組織破壊は細菌などによる生体の免疫応答の結果生じることが示唆され^{1~6)}、歯周炎局所における免疫応答を介した生体の防御機構を把握することが歯周炎発症機序解明の手掛かりになると考えられている。

歯周炎はその進行過程において、形質細胞を主体とした細胞浸潤を認めることが知られており^{7~10)}、これらは歯周病原性菌に対する抗体を産生することにより防御的に作用する一方、歯周炎の活動期の著明な形質細胞の増加は過剰な抗体を産生することにより、免疫複合体などを形成し、歯周組織の破壊にも関与する可能性が示唆されている^{1,11)}。

Interleukin-6 (IL-6) はB細胞を最終的に抗体産生細胞に分化させる働きを持ち¹²⁾、またT細胞の分化増殖にも関与していることなどから、炎症局所の免疫応答において、重要な役割を担っているとされている¹³⁾。一方、IL-6 は plasmacytoma、関節リウマチなどの疾患の形態の成立に深い関連性があるとされ^{14~16)}、その産生機序が注目されている。IL-6 の産生は、従来から細菌などの外来抗原の刺激により誘導されることが知られており、その産生細胞はマクロファージ、T細胞、B細胞、上皮細胞、線維芽細胞などであるとされている^{2,13,17)}。しかし、細菌などの抗原刺激を介さないサイトカイン産生の可能性などが報告^{18,19)}されていることからその産生機序は一元的ではなく様々な経路が推測されている。

歯周病においては、歯周病原性菌による抗原刺激に対応して、マクロファージ、線維芽細胞などから IL-6 の産生が報告²⁾されている。しかし、無菌ラットを用いた検索で、細菌の関与なしでもその歯周組織に炎症性細胞浸潤が認められたとする報告²⁰⁾などから細菌感染を介さない他の IL-6 誘導因子の存在が示唆されている。

一方、神経伝達物質と考えられていた Substance P (SP) が熱、圧力、化学物質など非特異的な刺激に対して軸索反射 (axon reflex) を起こし、局所に遊離する

ことにより炎症巣の形成を促進することが知られている^{21,22)}。SP は好中球やマクロファージの遊走、T細胞の活性化、サイトカイン、免疫グロブリンの産生に関与していることが報告^{18,19,23~30)}され、加えて歯周炎組織において SP 含有神経の存在が示されている^{31,32)}ことから、歯周組織における SP を介した免疫応答の可能性が考えられている。

そこで著者は、歯周炎発症における SP の役割を解明する目的で、歯周組織における IL-6 の検出と末梢血単核球における *in vitro* での SP による IL-6 発現の誘導について検討したので報告する。

材料および方法

1. 供試試料

1) 歯周炎罹患歯肉

日本大学歯科病院歯周病科に来院した患者で、歯周炎と診断され初期治療を行ない再評価後、歯周外科手術の適応と判定した 15 例の歯肉を供試試料とした。歯肉は採取時にプロービングデプスの平均値 (PD)、骨レベルの平均値 (BL)、Löe and Silness⁴⁷⁾ の Gingival Index (GI) を記録した (表 1)。得られた歯肉は湿重量を測定後、凍結乾燥し、実験に供するまで -20°C で凍結保存した。

2) 末梢血単核球

常法に従って健康者 5 名の肘正中皮静脈から採取したヘパリン加静脈血を用いた。採取したヘパリン加静

表 1 供試試料の臨床症状と IL-6 の発現

Sample No.	PD (mm)	BL (mm)	GI	IL-6
1	3.7	6.3	1.4	0.0
2	3.0	4.4	1.7	6.5
3	4.2	4.7	1.7	0.0
4	4.8	8.0	1.8	0.0
5	3.2	5.3	1.0	7.0
6	3.5	4.5	1.0	5.6
7	2.5	4.8	1.3	0.0
8	4.6	5.5	1.8	14.5
9	3.4	5.8	1.0	1.9
10	3.1	5.4	1.4	0.0
11	4.0	7.4	1.8	3.8
12	2.5	3.8	1.0	8.2
13	3.0	4.4	1.4	7.1
14	1.8	3.0	0.3	8.5
15	3.4	4.6	1.0	5.6

脈血を phosphate buffered saline (PBS; 和光純薬, 大阪) で 2 倍希釈後, Ficoll-Hypaque 比重遠沈法³³⁾により単核球画分を分離した。分離した単核球画分は PBS で 3 回洗浄したのち, 10% 牛胎児血清 (Gibco, N.Y., U.S.A.) を加えた RPMI-1640 培地 (Gibco) に 1×10^6 個/ml となるように浮遊させた。調整した倍地に lipopolysaccharide (LPS; Escherichia coli 0111 B 4) $50 \mu\text{g/ml}$, SP (Cambridge Research Biochemicals, England) はそれぞれ, 1×10^{-6} , 1×10^{-8} , 1×10^{-10} , 1×10^{-12} M/ml, また, SP 1×10^{-8} M に SP antagonist^{34,44)} (Peptide Institute Inc., Japan) 1×10^{-6} M の各種濃度になるように調整し, 37°C , 5% CO_2 インキュベーターで 6 時間培養した。 1×10^{-8} M/ml の濃度については 1, 3, 6, 12, 24 時間培養した。培養後, 培養細胞は使用直前まで -20°C で保存した。

2. 試料からの RNA の抽出

歯肉は細切後, Proteinase K (1.5 mg/ml ; Life Technologies Inc., N.Y., U.S.A.) 溶液 1 ml 中で 37°C , 12 時間処理した。末梢血単核球は常法³⁵⁾に従い, solution D [guanidine thiocyanate; 25 mM sodium citrate (pH 7.0), 0.1 M 2-mercaptoethanol, 0.5% sarcosyl, diethyl pyrocarbonate-treated water (DEPC-W; Aldrich Chemical Co., Inc., Wisconsin, U.S.A.)] を, 酵素処理した歯肉には 2 倍濃度の solution D を 1 ml 加えエッペンドルフチューブに回収し 22 gauge disposable 注射針 (テルモ社製) を用いて 20~30 回通過させたのち, solution D $200 \mu\text{l}$ あたりフェノール $200 \mu\text{l}$, クロロホルム/イソアミルアルコール (49:1, vol/vol) $40 \mu\text{l}$, 2 M 酢酸ナトリウム溶液 $20 \mu\text{l}$ を加え, 10 秒間振盪した後, 水中で 15 分間静置した。その後, 4°C , $10,000 \times g$, 20 分間遠沈して上清を回収し, その上清に等量のイソプロパノールを加え, -20°C , 一昼夜静置した。さらに 4°C , $10,000 \times g$, 20 分間遠沈し, 沈渣に solution D $60 \mu\text{l}$, イソプロパノール $200 \mu\text{l}$ を加え, -20°C で 1 時間静置した。その後 4°C , $10,000 \times g$, 10 分間遠沈してその沈渣に 75% エタノールを加え, 4°C , $10,000 \times g$, 10 分間遠沈, エタノールを除去, 乾燥し DEPC-W に再懸濁し, 分光光度計 (DU-64; Beckman, CA, U.S.A.) を使用し, 内蔵の核酸分析プログラムによって定量を行ない RNA 試料とした。

3. Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) 法^{36,37)}

1) RNA からの complementary DNA (cDNA)

の合成

10 ng の RNA 溶液を 65°C , 5 分間加熱後水中で急冷した。これに, ribonuclease inhibitor (宝酒造, 京都), 10 倍 PCR buffer [500 mM KCl, 200 mM Tris-HCl buffer (pH 8.4), 25 mM MgCl_2 , 1 mg/ml BSA], 1.25 mM dNTP's (dATP, dCTP, dGTP, dTTP; Pharmacia LKB Biotechnology), 10 倍 hexanucleotide mixture (Boehringer Mannheim, Germany), 0.1% dithiothreitol (Aldrich Chemical Co., Inc., Germany), reverse-transcriptase (200 units/ml ; 宝酒造) を加え, 42°C 60 分間反応させた。 94°C , 5 分間加熱して反応を停止させ水中で急冷し, この反応産物を cDNA として RT-PCR に供した。

末梢血単核球に LPS を添加したものについては特異性および検出感度を検討する目的で, 最初に加える RNA の量を 10 ng から 100 fg まで段階希釈しさらに, yeast RNA (Toura yeast RNA) を $10 \mu\text{g}$ を加えて, 同様にして cDNA を作製した。

2) RT-PCR 法

得られた cDNA に 10 倍 PCR buffer, 20 mM MgCl_2 , 1.25 mM dNTP's, 3' プライマー (ATGTTACTCTTGTTACATGT), 5' プライマー (GCGCCTTCGGTCCAGTTG) および DNA 合成酵素として Taq ポリメラーゼ (Perkin Elmer Cetus, Norwalk, CT, U.S.A.) を加え, さらに蒸発を防ぐために, ミネラルオイルを重層した。RT-PCR 法には DNA サーマルサイクラー (Perkin Elmer Cetus, Norwalk, CT, U.S.A.) を使用した。温度および時間は以下の通りである。

(1) predenature	94°C , 10 min
(2) denature	94°C , 30 sec
(3) annealing	55°C , 30 sec
(4) extension	72°C , 60 sec
(5) (2) から (4) の行程を 1 サイクルとし, 35 サイクル行なった。	
(6) re-extension	72°C , 10 min
(7) storage	4°C

なお, 反応に用いたプライマーはオリゴ合成機 (PCR MATE model 391; Applied Biosystems, Inc., Foster City, CA, U.S.A.) を用いて作製した。作製したプライマーは高速液体クロマトグラフィー (東ソー, 東京) ならびにカラムクロマトグラフィー (Sephadex G 50; Pharmacia, CA, U.S.A.) を使用して精製した。プライマーは単一エクソン上とし, 5' プライマーと 3'

図1 LPSで刺激した末梢血単核球のIL-6の発現

プライマーとの間にイントロンをはさむように設定して、RT-PCR 反応後、DNA と cDNA との判別が可能ないようにした。増幅した DNA 10 μ l に loading buffer 1 μ l を加えて、ethidium bromide (和光純薬、東京) を含む TAE [Trisbase, 0.5 M EDTA (pH 8.0), 氷酢酸, DEPC-W] 泳動用 buffer を使用し、1.7% アガロースゲルでサイズマーカー (ϕ X 174/Hae III cut) とともに電気泳動した。泳動後、UV ライト上で適正な位置にバンドがあるかどうかを確認した後、サザントランスファーを行なった。

4. サザンハイブリダイゼーション

1) サザントランスファー

電気泳動を行ったアガロースゲルを 20 倍 Standard Saline Citrate (SSC) で 5 分間振盪した後、SOAK 1 溶液 (0.15 M NaCl, 0.05 M NaOH) で denature し、さらに 20 倍 SSC で 5 分間浸漬した後、20 倍 SSC で 3 時間、ナイロン膜 (Zeta-probe Blotting Membrane; Bio-Rad Lab., CA, U.S.A.) にサザントランスファーし、トランスファー終了後、6 倍 SSC に浸漬、UV cross linker を使用し固着させ、風乾した後ハイブリダイゼーションを行った。

2) ハイブリダイゼーション

IL-6 のインターナルプローブ (CTCCTTTCTCA-GGGCTGAG) はオリゴ合成機を用い、プライマーと同様にして作製した。プローブは MEGALABEL Kit (宝酒造、京都) を用い、5' 末端にラジオアイソトープを標識した。すなわち、300 ng のインターナルプローブを 3 μ l の蒸留水に溶解し、94°C 5 分間加熱、氷中で急冷した。これに反应用緩衝液 1 μ l, γ -³²P-ATP (10 μ Ci/ μ l, ICN Biomedicals, CA, U.S.A.) 5 μ l, T4 polynucleotide kinase 1 μ l を加え、37°C, 90 分間反応させた。反応後、push column (Stratagene, CA, U.S.A.) を用いて精製し、液体シンチレーションカウンターで活性を測定した後、ハイブリダイゼー

図2 段階希釈した試料の IL-6 発現

ションに供した。ハイブリダイゼーションは 3 時間行い、洗浄した後、Diagnostic X-Ray film (Kodak, NY, U.S.A.) で、-80°C, 1 時間感光させ、オートラジオグラフを作製した。

現像した X 線フィルムはデンスitomーターで濃度測定を行い、LPS で刺激した末梢血リンパ球 10 ng の試料を基準値 10 として段階希釈したリンパ球および歯肉の IL-6 mRNA の発現を数値化した。

成 績

1. IL-6 検出に用いた RT-PCR 法の感受性ならびに特異性

IL-6 検出のための RT-PCR 法の感受性、特異性を検討する目的で、LPS で刺激した末梢血単核球から抽出した RNA について 10 ng から 100 fg まで段階希釈し、それぞれに yeast RNA 10 μ g を添加した試料で検討を行なった結果、yeast RNA に影響されずに、10 万倍に希釈した RNA 100 fg の試料についても図 1 に示すように、IL-6 の発現が認められた。

また、その発現についてデンスitomーターで濃度測定を行った結果から、図 2 に示すような検量線が得られた。

2. 歯周炎歯肉の IL-6 mRNA の発現

上記と同様な RT-PCR 法を用い、歯周炎組織から抽出したそれぞれ 10 ng の RNA について IL-6 の検出を試みたところ、図 3 に示すように発現量に差を認

図3 歯周炎歯肉中の IL-6 の発現
Lane 1~15 : sample No.

図5 SPによる末梢血単核球の IL-6 の誘導

めるものの15例中10例において検出された。

さらに IL-6 の発現量をデンシトメーター測定した後、数量化を行ない(表1), 臨床症状との比較を行なったところ, 図4に示すように, IL-6 の発現が強くなるにしたがって, 組織破壊や炎症の程度を示す PD, BL, GI のいずれについてもその数値は減少する傾向にあったが, いずれも有意な相関は認められなかった。

図4 臨床症状と IL-6 の発現

3. 末梢血単核球の *in vitro* における SP を介した IL-6 の誘導

SP 添加による IL-6 発現の濃度依存性を健常者末梢血より分離した単核球を用い検討を行なった。SP の濃度は 10^{-6} M から 10^{-12} M で行ない、陽性対照は LPS 刺激の末梢血単核球を用い、培養時間は LPS による IL-6 発現の至適時間により 6 時間と規定した。その結果、SP の濃度が 10^{-6} M で明らかな発現を示し、 10^{-8} M ではこの発現がさらに強くなり、LPS 刺激の試料と同程度の発現が認められ、 10^{-10} M では 10^{-6} M と同様な発現を示したが、 10^{-12} M では明らかな発現を示さなかった。さらに明らかな SP を介した IL-6 の誘導を確認する目的から、最も強い発現を示した 10^{-8} M の SP を添加した試料に SP の antagonist を SP と同時に加えた。その結果、図 5 に示すように発現量の明らかな抑制が見られた。

SP 添加による IL-6 発現の時間的推移を検討する目的で、上記と同様な方法により SP の濃度は最も強い IL-6 の発現を示した 10^{-8} M に規定し行なった。その結果、図 5 に示すように SP 添加後、1 時間では極めて弱く明らかな発現を認めなかったが、3 時間では強く認められ、6 時間後が最大であり、12 時間後でも明らかな発現を示したが、24 時間後では認められなかった。

考 察

RT-PCR 法の感受性ならびに特異性を検討する目的から、著者は明らかに IL-6 を発現するとされている末梢血単核球を LPS で刺激した試料で 100 fg まで希釈した試料でもその発現をオートラジオグラフ上で確認できた。RT-PCR 法の感受性については従来より約 100,000 細胞から 1 μ g の RNA が抽出出来ることが報告³⁸⁾されており、このことから、計算上 1 pg の RNA は 1 個の細胞から得られたとすることが可能であり、今回の RT-PCR 法の感受性の検討から少なくとも 1 個の IL-6 産生細胞が存在すれば検出が可能であることが示唆された。また特異性の検討では、同一試料に加えた yeast RNA の影響を受けずに同様に IL-6 の発現が検出された結果から、検索試料が細菌などに汚染されていても、それに影響されずに検出できる特異性の高さが示された。

この方法を用い、歯周炎歯肉の IL-6 発現の検討を試みたところ、15 例中 10 例にその発現を確認するこ

とが可能であった。IL-6 は炎症巣の形成に必須とされるサイトカインネットワークの成立に重要な役割を演じていることは周知の事実であり¹⁹⁾、上記の結果から歯周炎の発症に IL-6 の関与が示唆された。

従来より IL-6 は歯周炎歯肉培養上清中などで、ELISA 法、パイオアッセイによりその存在が確認されている^{39,40)}が、抗体の非特異的結合やインヒビターの存在による特異性の問題、IL-6 の IL-6 レセプターとの結合による検出感度の低下、多量の培養上清を必要とするなどの点からその検出法としては未だ不十分なのが現状である。今回、著者の確立した RT-PCR 法による IL-6 の検出方法はこれらの問題を解決する方法として有効であると思われる。

RT-PCR 法を用いてサイトカインを検出した報告⁴¹⁻⁴³⁾は今までに human immunodeficiency virus をヒト末梢血単核球に感染させ、その感染細胞のサイトカイン発現能を検索した報告や、マウスの移植実験を行なった際のマウスにおける各臓器のサイトカイン発現の検出、炎症性滲出液中のマクロファージや好中球を用いた検索などがあるが、ヒト炎症組織でのサイトカイン発現を調べた報告は著者の渉猟した範囲では無く、今後この方法を用いることにより歯周炎組織のみならず種々の組織での検索が可能となると思われる。

歯周炎の臨床症状、すなわち PD, BL および GI の値と IL-6 の発現量についての統計学的な検討において、有意な相関は認められなかった。このことから炎症巣の成立には、他のサイトカインとの相互作用が必要であることが示唆された。

SP は 1931 年最初にウマ腸管から発見され、1971 年に構造決定された 11 個のアミノ酸からなるペプチドであり、中枢神経、末梢神経のいずれにも広く存在し、侵害性刺激の神経伝達物質である⁴⁴⁾。末梢神経において SP は痛覚伝達に関係する一次知覚神経の神経伝達物質であるとされ、熱、圧力、化学物質など非特異的な刺激を中枢に伝える一方、その刺激が逆行性に伝わり、別の神経末端から SP が遊離する軸索反射 (axon reflex) が起きることが知られている^{21,22)}。SP は血管の拡張や透過性の亢進、肥満細胞からのヒスタミン遊離等に関与し、遊離した局所において SP は神経原性の炎症反応を惹起し、喘息などのアレルギー疾患に深く関与するという報告もなされている^{19,45)}。

歯周組織についても SP 含有神経の検索がなされ、ヒトにおいては健康な歯肉、歯周炎歯肉にその存在が

示されている^{31,32)}。ラット歯肉においてはSP含有神経が接合上皮下に神経叢を形成し、神経線維の一部が上皮内に自由神経終末となって侵入しており、逆に外縁上皮ではSP含有神経はあまり認められないことが報告されている⁴⁶⁾。

今回の検索から、SPが末梢血単核球に作用し、IL-6を発現させることが明らかになり、歯周ポケット内接合上皮に、何らかの刺激を介し、軸索反射によって遊離したSPが、歯肉局所に浸潤しているリンパ球に対し、IL-6を産生させるメカニズムの存在が示唆された。このことは著者らが報告³²⁾した歯周炎歯肉組織から採取したリンパ球の抗体産生細胞数をSPを添加することにより増加させるとするメカニズムに、SPによるIL-6発現が関与していることが考えられた。

以上のことから歯周ポケット内には、従来より報告されている免疫担当細胞による防御システム以外にも非特異的な刺激を認識する防御メカニズムが接合上皮下の神経細胞によるSPの遊離を介して構成されている可能性が推察された。

結 論

歯周炎発症におけるSPの役割を解明する目的で、歯周組織におけるIL-6の検出と末梢血単核球の*in vitro*でのSPによるIL-6発現の誘導について検討した結果、以下の結論を得た。

1. RT-PCR法により末梢血単核球のIL-6 mRNAについて検討し、RNA 100 fgにyeast RNA 10 μ gを添加した試料についてもその発現が確認でき、その感受性と特異性の高さが示された。

2. RT-PCR法により歯周炎歯肉から15例中10例にIL-6の発現が認められた。その発現の程度と臨床症状には有意な相関は見られなかった。RT-PCR法は歯肉のように微量な臨床サンプルからサイトカインの検出に有効な方法で、半定量的な測定も可能であることが示された。

3. SPは末梢血単核球のIL-6発現を誘導することが示された。その発現はantagonistを加えることにより抑制された。

これらのことから、歯周炎歯肉のIL-6の発現には細菌に対する炎症、免疫担当細胞の応答のみならず神経細胞の遊離するSPも関与していることが考えられた。

謝 辞

稿を終るにあたり、終始御指導、御校閲を賜った日本歯学部保存学教室歯周病学講座 村井正大教授に深く感謝致します。

さらに、終始御助言、御協力頂いた伊藤公一助教授、病理学教室 茂呂 周教授、斉藤一郎博士ならびに保存学教室歯周病学講座、病理学教室の各位に厚く御礼申し上げます。

文 献

- 1) Tew, J., Engel, D. and Mangan, D.: Polyclonal B cell activation in periodontitis. J. Periodont. Res., 24: 225-241, 1989.
- 2) Takada, H., Mihara, J., Morisaki, I. and Shigeyuki Hamada: Induction of interleukin 1 and 6 in human gingival fibroblast cultures stimulated with Bacteroides Lipopolysaccharides. Infect. Immun., 59: 295-301, 1991.
- 3) Christine, G. McFarlane, Reynolds, J. and Murray, C. Meikle: the release of interleukin-1 β , tumor necrosis factor- α and interferon- γ by cultured peripheral blood mononuclear cells from patients with periodontitis. J. Periodont. Res., 25: 207-214, 1990.
- 4) Scott, W., Garrison and Frank, C., Nichols: 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.
- 5) Saglie, F.R., Simon, K., Merrill, J. and Koeffler, H. P.: Lipopolysaccharide from Actinobacillus actinomycetemcomitans stimulates macrophages to produce interleukin-1 and tumor necrosis factor mRNA and protein. Oral Microbiol. Immunol., 5: 256-262, 1990.
- 6) Walsh, L.J., Strtzel, F., Yamazaki, K., Bird, P.S., Gemmell, E. and Seymour, G.J.: Interleukin-1 and interleukin-1 inhibitor production by human adherent cells stimulated with periodontopathic bacteria. Archs. Oral Biol., 34: 679-683, 1989.
- 7) Mackler, B.F., Frostad, K.B., Robertson, P.B. and Levy, B.M.: Immunoglobulin bearing lymphocytes and plasma cells in human periodontal disease. J. Periodont. Res., 12: 37-45, 1977.
- 8) Seymour, G.J. and Greenspan, J.S.: The phenotypic characterization of lymphocyte subpopulations in established human periodontal disease. J. Periodont. Res., 14: 39-46, 1979.
- 9) Okada, H., Kida, T. and Yamagami, H.: Identification and distribution of Immunocompetent cells in inflamed gingiva of human chronic periodontitis. Infect. immun., 41: 365-374, 1983.

- 10) 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 form localized chronic inflammatory tissue. *J. Immunol.*, 142 : 1150-1158, 1989.
- 11) Reinhardt, R.A., Bolton, R.W., McDonald, T.L., Dubois, L.M. and Kaldahl, W.B. : In situ lymphocyte subpopulations from active versus stable periodontal sites. *J. Periodontol.*, 59 : 656-670, 1988.
- 12) Hirano, T., Yasukawa, K., Harada, H., Taga, T., Watanabe, Y., Matuda, T., Kasiwamura, S., Nakajima, K., Koyama, K., Iwamatsu, A., Tsunasawa, S., Sakiyama, F., Matui, H., Takahara, Y., Taniguchi, T. and Kishimoto, T. : Complementary DNA for a novel human interleukin (BSF-2) that induces B lymphocytes to produce immunoglobulin. *Nature*, 324 : 73-76, 1986.
- 13) Akira, S., Hirano, T., Taga, T. and Kishimoto, T. : Biology of multifunctional cytokines : IL-6 and related molecules. *FASEB J.*, 4 : 2860-2867, 1990.
- 14) Damme, J.V., Opdenakker, G., Simpson, R.J., Rubila, M.R., Cayphas, S., Vink, A., Billiau, A. and Snick, J.V. : Identification of the 26-kD protein, interferon β 2 (IFD- β 2), as a B cell hybridoma/plasmacytoma growth factor induced by interleukin 1 and tumor necrosis factor. *J. Exp. Med.*, 165 : 914-919, 1987.
- 15) Hirano, T., Matsuda, T., Turner, M., Miyasaka, N., Buchan, Tang, B., Sato, K., Shimizu, M., Maini, R., Feldmann, M. and Kishimoto, T. : Excessive production of interleukin 6/B cell stimulatory factor-2 in rheumatoid arthritis. *Eur. J. Immunol.*, 18 : 1797-1801, 1988.
- 16) Suematsu, S., Matsuda, T. and Aozasa, K. : IgG1 plasmacytosis in interleukin 6 transgenic mouse. *Proc. Natl. Sci. U.S.A.*, 86 : 7547-7552, 1989.
- 17) Villiger, P., Cronin, M., Amenomori, T., Wachsmann, W. and Lotz, M. : IL-6 production by human T lymphocytes. *J. Immunol.*, 146 : 550-559, 1991.
- 18) Lotz, M., Vaughan, J. and Carson, D. : Effect of neuropeptides on production of inflammatory cytokines by human monocytes. *Science*, 241 : 1218-1221, 1988.
- 19) Edward S. Kimball : Substance P, Cytokines and Arthritis. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 594 : 293-308, 1990.
- 20) Yamasaki, A., Niakai, H., Nitani, K. and Ijuhin, N. : Ultrastructure of the junctional epithelium of germfree rat gingiva. *J. Periodont.*, 50 : 641-648, 1979.
- 21) Bengt, Pernow : Role of tachykinins in neurogenic inflammation. *J. Immunol.*, 135 : 812-815, 1985.
- 22) Peter, J. Barnes : Asthma as an axon reflex. *Lancet*, 8474 : 242-244, 1986.
- 23) 山崎博臣, 岩本逸夫, 木村 亮, 中川典明, 落合賢一, 富岡玖夫, 吉田 尚 : substance P によるヒト好中球活性化の機序, 炎症, 10 : 185-188, 1990.
- 24) Hartung, H.S., Wolters, K. and Toyka, K.V. : Substance P binding properties and studies on cellular responses in guinea pig macrophages. *J. Immunol.*, 136 : 3856-3863, 1986.
- 25) Richard, Peck : Neuropeptides modulating macrophage function. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 564 : 264-270, 1987.
- 26) Pascual, D.W., Amano, J., Kiyono, H., Mcghee, J. and Bost, K. : Substance P acts directly upon cloned B lymphoma cells to enhance IgA and IgM production. *J. Immunol.*, 146 : 2130-2136, 1991.
- 27) Andrzej, M. Stanis, Raffaele, Scicchitano, Donald, G. Payan and John, Bienenstock : In vitro studies of immunoregulation by substance P and somatostatin. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 564 : 217-225, 1987.
- 28) Stanis, A.M., Befus, D. and Bienenstock, J. : Differential effects of vasoactive intestinal peptide, substance P, and somatostatin on immunoglobulin synthesis and proliferations by lymphocytes from peyer's patches, mesenteric lymph nodes, and spleen. *J. Immunol.*, 136 : 152-156, 1986.
- 29) Payan, D.G. and Goetzl, E.J. : Modulation of lymphocyte function by sensory neuropeptides. *J. Immunol.*, 135 : 783-785, 1985.
- 30) Scicchitano, R., Bienenstock, J. and Stanis, A. M. : In vivo immunomodulation by the neuropeptide substance P. *Immunology*, 63 : 733-735, 1988.
- 31) Luthman, J., Friskopp, J., Dahllof, G., Ahlstorm, U., Sjostorm, L. and Johansson, O. : Immunohistochemical study of neurochemical markers in gingiva obtained from periodontitis-affected sites. *J. Periodont. Res.*, 24 : 267-278, 1989.
- 32) 菅野直之, 小宮山一雄, 斉藤豊彦, 小林隆志, 茂呂周, 伊藤公一, 村井正大 : Substance P の抗体産生に与える影響. 日歯周誌, 33 : 639-643, 1991.
- 33) Feige, U., Overwien, B. and Sorg, C. : Purification of human blood monocytes by hypotonic density gradient centrifugation in percoll. *J. Immunol. Methods*, 54 : 309-315, 1982.
- 34) Leander, S., Hakanson, R., Rosell, S., Folkers, K., Sundler, F. and Tornqvist, K. : A specific substance P antagonist blocks smooth muscle contraction induced by non-cholinergic, non-adrenergic nerve stimulation. *Nature*, 294 : 467-469, 1981.
- 35) Chomczynski, P. and Sacchi, N. : Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate - phenol - chloroform extraction. *Analytical Biochem.*, 162 : 156-159, 1987.
- 36) Erlick, H.A. : Polymerase chain reaction. *J. Clin. Immunol.*, 9 : 437-446, 1989.

- 37) Saito, I., Serenius, B., Compton, T. and Fox, R. I. : Detection of Epstein Barr virus DNA polymerase chain reaction in blood and tissue biopsies from patients with sjögren's syndrome. *J. Exp. Med.*, 169 : 2191-2198, 1989.
- 38) Kawasaki, E., Clark, S., Coyne, M., Smith, S., Champlin, R., Witte, O. and McCormick, F. : Diagnosis of chronic myeloid and acute lymphocytic leukemias by detection of leukemia-specific mRNA sequences amplified in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85 : 5698-5702, 1988.
- 39) 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. *日歯周誌*, 31 : 1081-1087, 1989.
- 40) Kono, Y., Beagley, K., Fujihashi, K., Mcghee, J., Taga, T., Hirano, T., Kishimoto, T. and Kiyono, H. : Cytokine regulation of localized inflammation. *J. Immunol.*, 146 : 1812-1821, 1991.
- 41) Gendelman, H., Friedman, R., Joe, S., Baca, L., Trupin, J., Dveksler, G., Meltzer, M. and Dieffenback, C. : A selective defect of interferon α production in human immunodeficiency virus-infected monocytes. *J. Exp. Med.*, 172 : 1433-1442, 1990.
- 42) Dallman, M., Larsen, C. and Morris, P. : Cytokine gene transcripton in vascularised organ grafts : analysis using semiquantitative polymerase chain reaction. *J. Exp. Med.*, 174 : 493-496, 1991.
- 43) 武市 収 : 根尖病巣の免疫学的研究. *日歯保誌*, 34 : 614-628, 1991.
- 44) Pernow, B. : Substance P. *Pharmacol. Rev.*, 35 : 85-141, 1983.
- 45) 岩本逸夫 : 免疫, アレルギーと神経ペプチド. *Annual Review 免疫*, 東京, 1991, 200-207.
- 46) 糸田川徳則 : ラット硬口蓋粘膜と歯肉に分布する神経に関する免疫組織化学的研究. *阪大歯学誌*, 35 : 78-92, 1990.
- 47) Löe, H. and Silness, J. : Periodontal disease in pregnancy. *Acta. Odont Scad.*, 21 : 533-551, 1963.

連絡先 :

日本大学歯学部保存学教室歯周病学講座

〒101 千代田区神田駿河台 1-8-13