Actinobacillus actinomycetemcomitans 菌体表層成分の 破骨細胞誘導能に関する研究

上 田 信 男

愛知学院大学歯学部歯科保存学第三講座

(指導：野口俊英教授)

(平成7年8月25日受付)

Cell-surface Components of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* Promote Osteoclast Formation *In Vitro*

Nobuo Ueda

Department of Periodontology, School of Dentistry, Aichi Gakuin University

2-11 Suemori-dori, Chikusa-ku, Nagoya 464, Japan

(Chief and Director : Prof. Toshihide Noguchi)

The mechanism of osteoclastic bone resorption induced by periodontopathic bacteria *Actinobacillus actinomycetemcomitans* cell-surface components was investigated in mouse organ cultures and in a mouse bone marrow culture system. Lipopolysaccharide and capsular polysaccharide isolated from *A. actinomycetemcomitans* Y4 induced bone resorption in C3H/HeN mouse calvarium organ culture. Many multinucleated cells were formed when mouse bone marrow cells were cultured with *A. actinomycetemcomitans* Y4 capsular polysaccharide or lipopolysaccharide for 9 days. The multinucleated cells showed several characteristics of osteoclasts, the production of including tartrate-resistant acid phosphatase and the ability to resorb calcified dentine. In this study, monospecific anti-mouse recombinant interleukin-1 α serum and indomethacin completely inhibited the formation of osteoclasts in the presence of *A. actinomycetem-*

comitans Y4 capsular polysaccharide. An IL-1 receptor antagonist significantly inhibited the osteoclast formation in mouse marrow cultures. Bioactive IL-1 was detected in the culture supernatant of mouse bone marrow cells stimulated with *A. actinomycetemcomitans* Y4 capsular polysaccharide. These results indicate that IL-1 α is involved in the mechanism of formation of osteoclast-like cells induced by *A. actinomycetemcomitans* Y4 capsular polysaccharide. There was also a good correlation between the number of osteoclasts formed in the mouse marrow culture and the amount of prostaglandin E₂ released into the culture medium. These findings suggest that *A. actinomycetemcomitans* capsular polysaccharide may play an important role in inflammatory bone resorption by promoting osteoclast formation in periodontal diseases.

Key words : *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, Capsular polysaccharide, Bone resorption, Interleukin-1, Prostaglandin

要旨 : *Actinobacillus actinomycetemcomitans* Y4株から抽出精製したリポ多糖 (lipopolysaccharide ; LPS) および莢膜多糖の骨吸収活性および破骨細胞形成能を調べた。5日齢マウス頭蓋骨を用いた骨器官培養系

本論文の要旨は、第36回日本歯周病学会 (1993年10月15日)、第37回日本歯周病学会 (1994年4月21日)、第36回歯科基礎医学会 (1994年10月18日)、第42回 Japanese Association for Dental Research (1994年12月10日)、第80回 The American Academy of Periodontology (1994年9月21日)、第75回 The International Association for Dental Research (1995年7月1日) において発表した。

で Y 4 株由来の LPS および莢膜多糖は強い骨吸収活性を発現した。また、マウス骨髄細胞から破骨細胞が分化誘導されるか否かについて調べたところ、Y 4 株由来の LPS および莢膜多糖は著しい数の破骨細胞の形成を誘導した。さらに、この培養系でマウス IL-1 α に対する抗体、マウス IL-1 β に対する抗体およびインドメタシンが破骨細胞形成にどのような影響を及ぼすかについて調べたところ、マウス IL-1 α に対する抗体およびインドメタシンは Y 4 株由来の莢膜多糖による破骨細胞の形成を阻害した。そこで、骨髄細胞培養液中の IL-1 量、プロスタグランジン E₂ 量を測定したところ、Y 4 株由来莢膜多糖で刺激したマウス骨髄細胞の培養上清中には、多量の IL-1 とプロスタグランジンが存在していることが明らかとなった。以上の結果から、Y 4 株由来の莢膜多糖による破骨細胞の分化誘導には炎症性メディエーターである IL-1 およびプロスタグランジンが深く関与している可能性が強く示唆された。

索引用語: *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, 莢膜多糖, 骨吸収, インターロイキン 1, プロスタグランジン

緒 言

歯周疾患は加齢とともに進行していくものと考えられてきたが、これまでの細胞学および臨床的研究の結果から、本疾患の病因の中心が特異的な細菌を主体とする歯肉縁下プラークであるという考え方が一般的となってきた。その歯周病関連細菌の 1 つと考えられる *Actinobacillus actinomycetemcomitans* (*A. actinomycetemcomitans*) は、限局型若年性歯周炎 (Localized juvenile periodontitis, 以下 LJP) の主な関連菌とされている¹⁻⁴⁾。この菌は非運動性のグラム陰性小桿菌で、CO₂ 存在下で比較的良好に生育し、CO₂ 非存在下ではほとんど生育しないことが知られている。特に、*A. actinomycetemcomitans* を選択的に分離する培地が開発されたこともあって、本菌が LJP 患者の罹患部位から高頻度に分離、同定されるようになった⁵⁾。一方、LJP が *A. actinomycetemcomitans* による感染を伴っていることは免疫血清学的検索の結果からも支持される。すなわち、LJP 患者の血清中では本菌に対する血中抗体価が高く、さらに、深い歯周ポケットを有する LJP 患者の同菌に対する IgA 抗体価が高い⁶⁻⁹⁾。*A. actinomycetemcomitans* が LJP の発症と進行において果たしている役割を考えるためには、本菌の有する病原因子の解明が重要な課題となる。Hammond ら¹⁰⁾は、その候補としてロイコトキシン、リポ多糖 (lipopolysaccharide; LPS)、膜小胞を挙げている。とくにロイコトキシンはヒトの多形核白血球と単球に対し毒性を示すタンパク毒素で LJP の発症メカニズムを考える上で、重要な因子になると述べている。このような *A. actinomycetemcomitans* の多彩な活性は、本菌の歯周ポケット中での定着と増殖、宿主組織への侵入、それに続く組織破壊の過程において極めて重要な役割を果たしていると思われる。

歯周ポケット内から分離される *A. actinomycetemcomitans* は、ゲル内沈降反応および間接免疫蛍光抗体法に基づいて、a, b, c の 3 つの血清型に分類されている¹¹⁾。また、最近では、血清型 a, b, c 以外の血清型 d および e も報告¹²⁾されている。ヒトの口腔内からは、血清型 c に比較して、血清型 a と血清型 b が多く分離されると報告¹¹⁾されている。特に血清型 b は LJP 患者から最も高頻度に分離されるため、この血清型の菌株の LJP における病原性因子としての役割が重要視されている¹³⁾。また Ebersole ら¹⁴⁾は、患者の血清を用いて ELISA で血清抗体価を測定したところ LJP 患者の 90% に *A. actinomycetemcomitans* Y 4 株 (血清型 b) に対する抗体が検出されたと報告している。近年、Amano ら¹⁵⁾により血清型特異抗原の化学構造が明らかにされ、血清型 b の型特異抗原はラムノースとフコースから構成されている莢膜様の多糖であり、-[3)- α -D-Fucp-(1-2)- β -L-Rhap-(1)n の繰り返し構造をもつことが示された。しかし、この型特異抗原の歯周病の発症および進行における病因論的役割についてはあまり明らかにされていない。

若年性歯周炎に罹患すると、急激かつ著しい歯槽骨吸収が引き起こされることが広く知られている。骨組織は常に形成と吸収を繰り返すことにより、その正常な機能が維持されている。この現象は骨の改造 (bone remodeling) と呼ばれ、骨芽細胞による形成と破骨細胞による破壊、吸収の平衡のうえに維持されている。歯槽骨でみられるような炎症性骨吸収では、破骨細胞の機能の亢進がみられる。一般に骨吸収が引き起こされている場では、破骨細胞は活性化されるだけでなく、造血系細胞から分化誘導されてくると考えられている。若年性歯周炎患者では著しい歯槽骨吸収がみられ、さらに、*A. actinomycetemcomitans* と若年性歯周炎との間に強い因果関係が認められることから、本研究では *A. actinomycetemcomitans* の菌体表層に特異的に存在する莢膜多糖に着目し、この多糖に

よる骨吸収発現について検討を加えた。さらに、骨吸収の場において宿主細胞が産生する炎症性メディエーターとしてインターロイキン1およびプロスタグランジンの役割についても検討を加えた。

材料および方法

1. 供試菌株と培養方法

A. actinomycetemcomitans の血清型 a, b, c の菌株は国立予防衛生研究所口腔科学部から供与を受け、ATCC 29523 株 (血清型 a), Y 4 株 (血清型 b), NCTC 9710 株 (血清型 c) の 3 菌株を使用した。各菌株は, Todd-Hewitt Broth (Difco Laboratories, Detroit, MI, U.S.A.) に 1% 酵母エキス (Difco) を加えた培地に接種し, 5% CO₂ インキュベーター中で 37°C, 3 日間培養した。培養終了後, 6,000×g で 20 分間遠心分離して集菌し, 蒸留水にて 3 回洗浄後, 凍結乾燥したものを実験に供した。

2. 抗原の抽出および精製

1) オートクレープ抽出物

全菌体 30 g を 300 ml の生理食塩水に浮遊させ, 120°C で 15 分間オートクレープ処理を行った¹⁶⁾。冷却後, 4000×g で 20 分間遠心して上清を分取後, 再度 300 ml の生理食塩水を加え上述の抽出操作を繰り返した。得られた上清を集め蒸留水に対して十分透析し凍結乾燥した。この標品をオートクレープ抽出抗原とした。

2) 莢膜多糖の精製

A. actinomycetemcomitans より抽出したオートクレープ抽出抗原 0.5 g を 5 ml の 0.01 M トリス・塩酸緩衝液 (pH 8.2) に溶解し, 同緩衝液に対して 4°C, 2 日間透析した。この抗原溶液を, 同緩衝液で平衡化した DEAE-Sephadex A-25 カラム (2×60 cm, Pharmacia Fine Chemicals U.S.A.) を用いてイオン交換クロマトグラフィーを行った。4°C にて, 200 ml の同緩衝液で溶出した後, 0 から 1 M の塩化ナトリウムによる直線濃度勾配をかけて, さらに溶出を行った。1 画分は 10 ml とし, 各画分について全糖量とタンパク質量の定量を行った。血清型特異抗血清と寒天ゲル内で沈降線を形成した画分を集め, 60°C にてロータリーエバポレーターを用いて濃縮後, 蒸留水に対して 4°C, 3 日間透析した。同標品について, Sephacryl S-300 カラム (1.5×100 cm, Pharmacia) を用いてゲル濾過を行った。溶出液として, 蒸留水を用いた。1 画分は 3 ml とし, 各画分について全糖量およびタンパク質量の定量を行った後, 寒天ゲル内沈降反応にて血清型特異抗血清と反応した画分を集め,

これを凍結乾燥したものを莢膜多糖とした¹⁵⁾。

3) フェノール・水抽出物

Westphal と Jann ら¹⁷⁾の方法に従って全菌体から抽出した。10 g (乾燥重量) を 350 ml の注射用蒸留水に浮遊させ, 同量の 90% フェノール (和光純薬大阪) を加えて 65°C で 20 分間攪拌した。氷冷後 8,000×g, 20 分間遠心して水層とフェノール層に分離した。水層を分取後, フェノール層に再度 350 ml の蒸留水を加え抽出操作を繰り返した。得られた水層を集め蒸留水に対して十分に透析し, 凍結乾燥を行った。この凍結乾燥標品 1 g を 100 ml の蒸留水に溶解し 100,000×g, 3 時間超遠心を行った。得られた沈査を 0.1 ml ZnCl₂ を含む 10 mM トリス・塩酸緩衝液 (pH 7.4) に溶解し, スクレアーゼ P1 (ヤマサ醤油千葉) を 400 mg 加え, 37°C で 16 時間反応させた。蒸留水に対して透析後, 100,000×g, 3 時間の超遠心処理をさらに 2 回繰り返した。この沈査を凍結乾燥しフェノール・水抽出物として用いた。

4) フェノール・水抽出物のゲル濾過クロマトグラフィー, アフィニティークロマトグラフィーおよび多糖部分の調製

A. actinomycetemcomitans Y 4 株のフェノール水抽出物 5 mg を 3 ml の溶出用緩衝液 [0.2 M NaCl, 0.25% デオキシコール酸, 1 mM EDTA, 0.02% NaN₃ を含む 10 mM トリス塩酸緩衝液 (pH 8.0)] に溶解し Sephadex G-200 カラム (2×80 cm, Pharmacia) でゲル濾過を行った^{18,19)}。流速は 10 ml/時間とし 3 ml ずつ画分を収集した。各画分は 2 つの画分ごとにまとめてデオキシコール酸を含まない溶出用緩衝液に対して室温で透析し, さらに 4°C で蒸留水に対して透析した。透析後の各画分について, フェノール, 硫酸法により中性糖の比色定量を行った。定量の結果から明らかとなった 2 つのピークを集めて凍結乾燥した。各ピーク 4 mg を 4 ml の PBS に溶解し, Affi-Prep polymyxin matrix (Bio Rad Laboratories U.S.A.) 16 ml を加えて, 4°C で 12 時間反応させた。その後, カラム (18 mm×300 mm) に充填し, 10 ml の PBS と 10 ml の 1 N NaOH で溶出させた²⁰⁾。流速は 5 ml/時間とし 0.5 ml ずつ画分を集め, 各画分について中性糖の定量を行った。次に, 精製された Y 4 LPS から多糖部分を分離するため 1% 酢酸中において 100°C で 2 時間加水分解を行った。遠心処理にて上清を分取後, 蒸留水に対して十分透析し凍結乾燥した。この標品を Y 4 LPS の多糖画分として用いた^{19,21)}。

3. 動物実験

実験動物として C3H/HeN マウス 及び C3H/

HeJ マウス (5 日齢と 6 週齢の雌) (日本 SLC 静岡) を使用した。

4. 骨器官培養

莢膜多糖による骨吸収を新生児マウス頭蓋骨を用いた器官培養系で調べた²²⁾。5 日齢の C3H/HeN マウス頭蓋骨を無菌的に摘出し、24 時間 1 mM インドメタシンを含む BGJb 培地 (GIBCO Laboratories, Grand Island, NY) にて前培養を行った。その後、あらかじめ莢膜多糖及び LPS を加えた培地中に骨片を移し 5% CO₂ 存在下 37°C で 72 時間培養し、培養終了後に培地中に遊離したカルシウム量をカルシウム C-Test (和光純薬 大阪) により測定した。テスト側のカルシウム量からコントロール側のカルシウム量を引いたものを骨吸収活性として表した。

5. 骨髓細胞培養

骨髓細胞は 6 週齢の C3H/HeN マウスおよび C3H/HeJ マウスから常法に従って無菌的に採取した²³⁾。次に骨髓細胞を 10% 牛胎児血清、ペニシリン G カリウム (100 u/ml) およびストレプトマイシン (100 µg/ml) を含む α -MEM 培地 (GIBCO) にて 1×10^6 /ml に調製した。24 ウェルマイクロタイタープレート (CORNING U.S.A.) を用い、各ウェルに骨髓細胞 (1×10^6) および各種試験試薬を加え、5% CO₂ 存在下 37°C で 3 日目ごとに培地交換をしながら 9 日間培養した。培養終了後、10% ホルマリンを含むリン酸緩衝化生理食塩水 (以下 PBS と略す) で細胞を 10 分間固定した。続いて、エタノール・アセトン (1:1) で 1 分間後固定した。乾燥後、50 mM の酒石酸を含む酒石酸抵抗性酸フォスファターゼ (Tartrate Resistant Acid Phosphatase; TRACP) 反応液を入れた。室温にて 10~15 分間放置後、水洗、乾燥させ光学顕微鏡下で観察した。通常 3 核以上の核を有する TRACP 陽性多核細胞を破骨細胞として計測した。この実験系において抗マウスリコンビナントインターロイキン 1 α 血清 (抗 mouse rIL-1 α) (Sigma U.S.A.), 抗マウスリコンビナントインターロイキン 1 β 血清 (抗 mouse rIL-1 β) (R & D Systems U.S.A.), マウスインターロイキン 1 レセプターアンタゴニスト (mouseIL-1 ra)²⁴⁾, サーマンカルシトニン (Sigma), インドメタシン (和光純薬 大阪), およびポリミキシン B (Sigma) が、Y4 株莢膜多糖による破骨細胞形成にどのような影響を及ぼすかについても検討した。また、培養初日、3, 6, 及び 9 日目の培養上清中に含まれるプロスタグランジン E₂ 量を、bicyclic PGE₂ [3H] radioimmunoassay kit (TRK 800; Amersham Corp, Little Chalfont, Buckinghamshire, U.K.) を用いて測定した。さら

に、この培養系にプロスタグランジン E₂ を培養開始時、3 日目、6 日目に加えた時の破骨細胞形成数を調べた。

次に、マウス骨髓細胞から分化した TRACP 陽性多核細胞が破骨細胞としての形質を備えていることを確認するために、Y4 株莢膜多糖で刺激したマウス骨髓細胞を象牙小片上で 9 日間培養し検索を加えた。培養終了後、0.1% トリプシン (type I, Sigma) で処理し、象牙小片上に付着している細胞を除き、水洗、乾燥後、象牙小片上の吸収窩を走査型電子顕微鏡 (Scanning Electron Microscopy) で観察した。

6. インターロイキン 1 (interleukin 1; IL-1) 量の測定

培地中に遊離した IL-1 量の測定には、IL-1 依存性細胞株である RPMI 1788 細胞を用いた²⁵⁾。RPMI 1788 細胞は 10% FCS, 2 mM L-グルタミン, 1 mM ピルビン酸ナトリウム, 10 mM HEPES (N-2-hydroxyethylpiperazine-N-2-ethanesulfonic acid) および抗生物質を含む RPMI 1640 培地で調整し、96 穴平板タイタープレート (CORNING) の各ウェルに 5×10^2 となるように播種した。あらかじめ Y4 株莢膜多糖で刺激したマウス骨髓細胞培養上清を段階希釈し、RPMI 1788 細胞に加えて、116 時間培養した。培養終了 4 時間前に MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromide; 2.5 mg/ml; Sigma) 試薬を加え、酸性プロパノールで細胞を溶解した後、マイクロリーダー (東京ソーダ東京) を用いて測定波長 570 nm, 対照波長 620 nm で 2 波長測定を行った。あらかじめスタンダードとしてヒト rIL-1 α (R & D Systems) を用いて検量線を作製し、これと得られた測定値を比較することにより、骨髓細胞培養上清中に遊離した IL-1 量を求めた。

7. 統計学的解析

実験結果は全て平均 + SD で表示した。統計処理は Student の *t* 検定を用いて評価した。

結 果

1. *A. actinomycetemcomitans* Y4 株莢膜多糖および LPS の骨吸収活性について

新生児マウス頭蓋骨を用いた骨器官培養で、Y4 株由来の莢膜多糖および LPS の骨吸収活性を調べたところ、莢膜多糖は 25 および 50 µg/ml の濃度で強い骨吸収活性を発現した。この活性は、Y4 株由来の LPS (25 µg/ml) により発現される活性にほぼ匹敵するものであった (図 1)。

図1 新生児マウス頭蓋骨を用いた器官培養系に *A. actinomycetemcomitans* Y4株莢膜多糖およびY4株LPSを加えた時のカルシウム遊離量

(A) *A. actinomycetemcomitans* Y4株莢膜多糖 (2.5 μg/ml) 添加群

(B) *A. actinomycetemcomitans* Y4株莢膜多糖未添加群

図2 *A. actinomycetemcomitans* Y4株莢膜多糖の破骨細胞形成能

2. *A. actinomycetemcomitans* ATCC 29523株 (血清型a), Y4株 (血清型b), NCTC 9710株 (血清型c) 由来の莢膜多糖およびY4株LPSによるTRACP陽性多核細胞分化誘導について

Y4株莢膜多糖でマウス骨髄細胞を刺激することにより図2Aに示すようなTRACP陽性多核細胞が形成された。さらに、Y4株LPSにおいてもこのようなTRACP陽性多核細胞の形成が認められた。これに対して、何も添加していないコントロール側においては、TRACP陽性多核細胞の形成はほとんど認められなかった (図2B)。マウス骨髄細胞培養系にY4株莢膜多糖2.5 μg/mlを添加することにより多数のTRACP陽性多核細胞が形成された (図3)。一方、ATCC 29523株及びNCTC 9710株から抽出精製した莢膜多糖をマウス骨髄細胞培養系に加えても、ほとんどTRACP陽性多核細胞分化誘導能を示さなかった

(図3)。また、Y4株LPSは1 μg/mlの濃度で最も強いTRACP陽性多核細胞分化誘導能を示した (図3)。しかし、Y4株LPSから調製した多糖画分は今回用いた濃度ではほとんどTRACP陽性多核細胞を誘導しなかった (図3)。これらの結果より、本研究においてY4株莢膜多糖の濃度は、2.5 μg/mlを用いた。

3. *A. actinomycetemcomitans* Y4株莢膜多糖によるTRACP陽性多核細胞形成における経時的变化

マウス骨髄培養系にY4株莢膜多糖2.5 μg/mlを加えた時の培養開始時、3日目、6日目、9日目のTRACP陽性多核細胞形成数を計測したところ、6日目以降に多数のTRACP陽性多核細胞が認められた。しかしながら、未添加群ではTRACP陽性多核細胞の形成はほとんど認められなかった (図4)。

図3 *A. actinomycetemcomitans* Y4株莢膜多糖, Y4株LPS, Y4株LPSより調製した多糖画分, ATCC 29523株莢膜多糖, NCTC 9710株莢膜多糖

多糖でマウス骨髄細胞を刺激した時のTRACP陽性多核細胞形成数

- Y4株莢膜多糖添加群
- Y4株LPS添加群
- ATCC 29523株莢膜多糖添加群
- NCTC 9710株莢膜多糖添加群
- ▲ Y4株LPSより調製した多糖画分添加群

図4 *A. actinomycetemcomitans* Y4株莢膜多糖 (2.5 $\mu\text{g/ml}$) によるTRACP陽性多核細胞形成における経時的变化

- : Y4株莢膜多糖 (2.5 $\mu\text{g/ml}$) 添加群
- ▲: Y4株莢膜多糖未添加群

4. 破骨細胞の同定

Y4株莢膜多糖により形成されたTRACP陽性多核細胞を象牙小片上で培養すると、図5で示すように吸収窩が形成された。さらに、Y4株莢膜多糖によるTRACP陽性多核細胞形成はカルシトニンにより濃度依存的に阻害された(図6)。以上の結果より、Y4株莢膜多糖によりマウス骨髄細胞培養系において形成されたTRACP陽性多核細胞は破骨細胞であるとい

図5 *A. actinomycetemcomitans* Y4株莢膜多糖 (2.5 $\mu\text{g/ml}$) により誘導されたTRACP陽性多核細胞を象牙小片上で培養することにより形成された吸収窩

図6 *A. actinomycetemcomitans* Y4株莢膜多糖 (2.5 $\mu\text{g/ml}$) によるTRACP陽性多核細胞形成に対するカルシトニンの影響

うことが強く示唆された。

5. *A. actinomycetemcomitans* Y4株莢膜多糖のTRACP陽性多核細胞形成におけるLPSの影響

Y4株由来のLPSは著しいTRACP陽性多核細胞の形成を誘導したが、LPSから調製した多糖画分は、今回用いた濃度では、ほとんどTRACP陽性多核細胞形成を誘導しなかった(図3)。さらに、Y4株莢膜多糖によるTRACP陽性多核細胞形成を、遺伝的にLPSに対して応答性を示さなくなったC3H/HeJマウスの骨髄細胞を用いて調べたところ、C3H/HeNマウスで得られたTRACP陽性多核細胞とほぼ同数のTRACP陽性多核細胞が検出された。すなわ

図7 *A. actinomycetemcomitans* Y4株莢膜多糖 (2.5 $\mu\text{g/ml}$) による TRACP 陽性多核細胞形成に対する抗マウス IL-1 α 血清および抗マウス IL-1 β 血清の影響

図8 *A. actinomycetemcomitans* Y4株莢膜多糖 (2.5 $\mu\text{g/ml}$) による TRACP 陽性多核細胞形成に対するマウス IL-1 レセプター-アントゴニストの影響

ち, C3H/HeJ マウス骨髄細胞から Y4 株莢膜多糖 2.5 $\mu\text{g/ml}$ で 1 ウェルあたり 25 個の TRACP 陽性多核細胞が形成された。また LPS の阻害剤であるポリミキシン B を C3H/HeN マウス骨髄細胞に加え, Y4 株莢膜多糖の TRACP 陽性多核細胞形成に及ぼす影響について調べたところ, ポリミキシン B は Y4 株莢膜多糖の TRACP 陽性多核細胞形成に全く影響を及ぼすことはなかった。

6. TRACP 陽性多核細胞形成における IL-1 の関与

Y4 株莢膜多糖による TRACP 陽性多核細胞分化誘導において炎症性サイトカインである IL-1 が関与しているか否かについて調べた。まず, 抗 mouse rIL-1 α および抗 mouse rIL-1 β をこの培養系に加え

表1 *A. actinomycetemcomitans* Y4 株莢膜多糖 (2.5 $\mu\text{g/ml}$) でマウス骨髄細胞を刺激した時の培養上清中の IL-1 量

培養時間 (日)	IL-1 量 (ng/ml)	
	未添加群	Y4 株莢膜多糖添加群 (2.5 $\mu\text{g/ml}$)
3	<0.01	84.2 $\pm$ 4.1
6	<0.01	96.0 $\pm$ 3.5
9	<0.01	97.3 $\pm$ 6.1

TRACP 陽性多核細胞形成に及ぼす影響を調べた。抗 mouse rIL-1 α は, 濃度依存的に Y4 株莢膜多糖による TRACP 陽性多核細胞形成数を減少させたが, 抗 mouse rIL-1 β は今回用いた濃度では何ら影響を与えることはなかった (図7)。さらに, IL-1 の活性を特異的に抑制する物質である mouse IL-1 ra をマウス骨髄培養に加え, その影響を調べた。Y4 株莢膜多糖による TRACP 陽性多核細胞形成を mouse IL-1 ra は 10 $\mu\text{g/ml}$ で完全に阻害した (図8)。

7. マウス骨髄細胞培養上清中の IL-1 量について

Y4 株莢膜多糖でマウス骨髄細胞を刺激した際に培養上清中に IL-1 が産生されている可能性を考え, IL-1 依存性細胞株 RPMI 1788 細胞を用いて IL-1 量を測定した。リコンビナントの IL-1 α をスタンダードとして用い, Y4 株莢膜多糖で刺激したマウス骨髄細胞の培養上清を段階希釈することで, 3 日目, 6 日目及び 9 日目の IL-1 量を測定した。その結果, 3 日目に 84.2 ng/ml, 6 日目に 96.0 ng/ml, 9 日目に 97.3 ng/ml の IL-1 が検出された。これに対し, 未刺激の骨髄細胞培養上清中では IL-1 はほとんど検出されなかった (表1)。次に, RPMI 1788 細胞を用いた培養

系で検出された IL-1 が IL-1 α あるいは IL-1 β のいずれであるかを確認するために、抗 mouse rIL-1 α および抗 mouse rIL-1 β を添加し、RPMI 1788 細胞の応答性を調べた。抗 mouse rIL-1 α を Y4 株莢膜多糖添加骨髓細胞の培養上清とともに加えると、著しく RPMI 1788 細胞の増殖は抑制された。一方、抗 mouse rIL-1 β はこの培養上清による RPMI 1788 細胞の増殖に全く影響を与えなかった (図 9)。

8. TRACP 陽性多核細胞形成におけるインドメタシンの影響について

マウス骨髓培養系における Y4 株莢膜多糖の TRACP 陽性多核細胞分化誘導におけるプロスタグ

図 9 A. actinomycetemcomitans Y4 株莢膜多糖 (2.5 $\mu\text{g/ml}$) でマウス骨髓細胞を刺激した時の培養上清添加群に対する抗マウス IL-1 α 血清および抗マウス IL-1 β 血清の影響

ランジンの役割について調べた。プロスタグランジン合成阻害剤であるインドメタシンを Y4 株莢膜多糖とともに 9 日間培養したところ、インドメタシンの濃度依存的に Y4 株莢膜多糖による TRACP 陽性多核細胞の形成は抑制された。Y4 株莢膜多糖による TRACP 陽性多核細胞形成は、0.05 μM のインドメタシンで完全に阻害されたが、この濃度では 1 α , 25(OH) $_2\text{D}_3$ (10^{-8}M) による TRACP 陽性多核細胞の形成には影響を及ぼすことはなかった (表 2)。

9. TRACP 陽性多核細胞形成におけるプロスタグランジンの関与

マウス骨髓細胞培養上清中のプロスタグランジン E_2 量と TRACP 陽性多核細胞形成との間の相関を調べた。Y4 株莢膜多糖で刺激した際の培養 3 日目までのプロスタグランジン E_2 量は、コントロール側に比べて、有意な増加は認められなかった。しかしながら、培養 6 日あるいは、9 日目の培養上清中には、185.9~188.6 ng/ml と多量のプロスタグランジン E_2 が検出された。それにともない、TRACP 陽性多核細胞の出現数も増加した (表 3)。一方、マウス骨髓培養系で、培養開始時、3 日目、6 日目にプロスタグランジン E_2 を加えたところ、培養 3 日目と 6 日目に 10^{-6}M のプロスタグランジン E_2 を加えることにより 38 個という多数の TRACP 陽性多核細胞が形成された。これは培養開始時、3 日目、6 日目の全ての時にプロスタグランジン E_2 を加えた時の 32 個の TRACP 陽性多核細胞に匹敵するものであった (表 4)。しかしながら、培養開始時にのみプロスタグランジン E_2 を加え、3 日目、6 日目にはプロスタグランジン E_2 を加えずに 9 日間培養すると TRACP 陽性多核細胞の形成は平均 4.4 個にとどまった (表 4)。

表 2 A. actinomycetemcomitans Y4 株莢膜多糖 (2.5 $\mu\text{g/ml}$) および 1 α , 25(OH) $_2\text{D}_3$ (10^{-8}M) による TRACP 陽性多核細胞形成に対するインドメタシンの影響

インドメタシン (μM)	TRACP 陽性多核細胞数 (細胞数/ウェル)		
	未添加群	Y4 株莢膜多糖添加群 (2.5 $\mu\text{g/ml}$)	1 α , 25(OH) $_2\text{D}_3$ 添加群 (10^{-8}M)
0	0	18.3 $\pm$ 1.4	22.3 $\pm$ 4.9
0.005	0	10.2 $\pm$ 2.6	19.8 $\pm$ 3.9
0.01	0	2.2 $\pm$ 1.0	22.2 $\pm$ 5.9
0.05	0	0.5 $\pm$ 0.3	19.3 $\pm$ 4.7
0.1	0	0	19.3 $\pm$ 4.2

表 3 *A. actinomycetemcomitans* Y4 株莢膜多糖 (2.5 $\mu\text{g/ml}$) でマウス骨髄細胞を刺激した時の培養上清中におけるプロスタグランジン量と TRACP 陽性多核細胞形成数との関係

培養時間 (日)	プロスタグランジン E_2 (ng/ml)		TRACP 陽性多核細胞数 (細胞数/ウェル)	
	未添加群	Y4 株莢膜多糖添加群 (2.5 $\mu\text{g/ml}$)	未添加群	Y4 株莢膜多糖添加群 (2.5 $\mu\text{g/ml}$)
0	N.D.	N.D.	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0
3	8.0 $\pm$ 0.5	7.1 $\pm$ 0.9	0 $\pm$ 0	0.2 $\pm$ 0.2
6	11.8 $\pm$ 1.8	188.6 $\pm$ 10.5*	0.8 $\pm$ 0.7	19.3 $\pm$ 1.6**
9	14.3 $\pm$ 2.5	185.9 $\pm$ 18.3*	0.8 $\pm$ 0.5	29.5 $\pm$ 1.6**

* $p < 0.05$ ...Y4 株莢膜多糖 (2.5 $\mu\text{g/ml}$) 添加および未添加群のプロスタグランジン E_2 産生量を Student's t 検定を用いて比較

** $p < 0.05$ ...Y4 株莢膜多糖 (2.5 $\mu\text{g/ml}$) 添加および未添加群の TRACP 陽性多核細胞形成数を Student's t 検定を用いて比較

表 4 プロスタグランジン E_2 を経時的に添加した時の TRACP 陽性多核細胞形成数

プロスタグランジン E ₂ 添加 (10 ⁻⁶ M)			TRACP 陽性多核細胞数 (細胞数/ウェル)
培養時間(日)			
0	3	6	
—	—	—	0±0
+	—	—	4.4±1.6
—	+	—	15.8±3.3
—	—	+	19.6±3.4
+	+	—	15.0±3.2
+	—	+	12.0±2.9
—	+	+	38.0±3.5
+	+	+	32.0±5.1

考 察

歯周病は細菌性プラークにより歯周組織の破壊を起こすことがいくつかの研究によって示されてきた²⁶⁻²⁸⁾。歯周組織の破壊をもたらす菌体成分としては、LPS や莢膜などに加え、酵素や代謝産物等の菌体外産物が広く知られている¹⁰⁾。なかでも LPS は歯周組織である歯根膜や歯槽骨に直接的に毒性作用を示すとともに *in vitro* や *in vivo* において骨吸収を惹起することが明らかにされている²⁹⁻³¹⁾。Wilson ら³²⁾は *A. actinomycetemcomitans* 9710 株より莢膜様物質を NaCl で抽出し、ゲル濾過およびイオン交換クロマトグラフィーを用いて精製し、この莢膜様多糖とフェノール、水法により抽出した LPS の骨吸収活性を比

較したところ莢膜多糖がより強い骨吸収活性を発現することを明らかにした。著者が行った研究において、マウス新生児頭蓋骨とともに Y4 株由来の莢膜多糖を培養すると、リボ多糖の骨吸収活性と匹敵する活性が認められた。この結果から、Y4 株由来の莢膜多糖は既存の破骨細胞を活性化し、骨吸収を引き起こしていることが強く示唆された。

現在、若年性歯周炎の主たる関連菌と考えられている *A. actinomycetemcomitans* は血清型 a, b, c, d, e の 5 群に分類されている¹²⁾。Amano ら¹⁵⁾は、このうちの血清型 a, b, c の血清型莢膜多糖の推定構造式を明らかにし、血清型 a 莢膜多糖は、-3)-6-デオキシ- α -D-タロピラノース-(1-, 血清型 b 莢膜多糖は -3(- α -D-フコピラノース-(1-2)-6- β -L-ラムノピラノース-(1-, 血清型 c 莢膜多糖は、-3)-6-デオキシ- α -L-タロピラノース-(1-2)-6-デオキシ- α -L-タロピラノース-(1-であることを報告した。本研究では、*A. actinomycetemcomitans* の中で病原性が強いと考えられている¹³⁾血清型 b の Y4 株から莢膜多糖を抽出精製し、マウス骨髄培養系で破骨細胞分化誘導能について詳細な検討を加えた。一般に、骨吸収が既存の破骨細胞活性化だけでなく、破骨細胞の新生にも深く関与していると考えられる。そこで、Y4 株由来の莢膜多糖が、マウス骨髄細胞から破骨細胞への分化を誘導するか否かを調べた。本研究では、酒石酸抵抗性酸フォスファターゼ (TRACP) 染色を行い、3 核以上を有する TRACP 陽性多核細胞を破骨細胞として計測したが、マウス骨髄培養系における TRACP 陽性多核細胞が破骨細胞としての特徴をほとんど備えていることは Takahashi ら³³⁾によって確認されている。さらに、本研究においても Y4 株莢膜多糖により形

成された TRACP 陽性多核細胞が、象牙小片上に吸収窩を形成したこと、さらにカルシトニンにより形成が完全に阻害されたことなどから考慮して、この多核細胞が破骨細胞としての機能を備えていることは間違いないと思われる。Y 4 株由来の莢膜多糖は $2.5 \mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度で最も強い TRACP 陽性多核細胞すなわち破骨細胞の形成を誘導した。これに対して今回使用した血清型 a である ATCC 29523 株及び血清型 c である NCTC 9710 株はほとんど TRACP 陽性多核細胞を誘導しなかった。これまでに Amano ら¹⁵⁾は血清型 a 及び血清型 c の構造式にのみアセチル基が存在することを報告している。さらに、ATCC 29523 株と NCTC 9710 株からアセチル基を除去すると IL-1 の誘導を刺激するというこれまでの報告³⁴⁾もあり、このアセチル基が *A. actinomycetemcomitans* による骨吸収において重要な役割を演じていると思われる。いずれにしても *A. actinomycetemcomitans* 莢膜多糖は既存の破骨細胞の活性化と破骨細胞形成の両面から骨吸収に関与している可能性が強く示唆された。マウス骨髄培養系に Y 4 株莢膜多糖 $2.5 \mu\text{g}/\text{ml}$ を加えた時の培養開始時、3 日目、6 日目、9 日目の TRACP 陽性多核細胞数を計測したところ、6 日目以降に多数の TRACP 陽性多核細胞が認められた。この結果より、この培養系では 9 日間培養の後期に、破骨細胞前駆細胞が成熟した破骨細胞に分化することが明らかとなった。

本研究では、Y 4 株由来の LPS および莢膜多糖によるマウス TRACP 陽性多核細胞形成について検討を加え、LPS のみならず莢膜多糖も強い TRACP 陽性多核細胞形成能を有することを明らかにした。このことから、Y 4 株莢膜多糖による TRACP 陽性多核細胞形成が LPS の混入によるものである可能性が示唆された。そこでまず、遺伝的に LPS に対して応答性を示さなくなった C3H/HeJ マウスを用いて TRACP 陽性多核細胞形成の実験を行った。その結果、LPS に対して通常の応答を示す C3H/HeN マウスと同様に Y 4 株莢膜多糖 $2.5 \mu\text{g}/\text{ml}$ で最も強い TRACP 陽性多核細胞形成能が認められた。また、LPS の阻害剤であるポリミキシン B を C3H/HeN マウス骨髄培養系に添加しても TRACP 陽性多核細胞形成に影響を及ぼすことはなかった。さらに、Y 4 株 LPS より調製した多糖画分は TRACP 陽性多核細胞形成を誘導しなかった。以上の結果とこれまで報告された Y 4 株由来の莢膜多糖¹⁵⁾および LPS の多糖画分の糖組成の結果²¹⁾から、Y 4 株莢膜多糖による TRACP 陽性多核細胞形成は LPS 中の多糖の混入によるものではないことが強く示唆された。

In vitro および *in vivo* における骨吸収に様々な炎症性メディエーターが関与しているということは広く知られている³⁵⁾。そこで、Y 4 株莢膜多糖による TRACP 陽性多核細胞形成に炎症性メディエーターとして IL-1 が関与している可能性を考え、抗 mouse rIL-1 α 及び抗 mouse rIL-1 β をマウス骨髄培養系に加え、TRACP 陽性多核細胞形成に及ぼす影響について調べた。その結果、抗 mouse rIL-1 α は、濃度依存的に TRACP 陽性多核細胞の形成を抑制し、抗 mouse rIL-1 β は本研究で用いた濃度ではなんら影響を与えることはなかった。さらに、IL-1 の活性を強く阻害することが知られている mouse IL-1 ra²⁴⁾ を用いて調べたところ mouse IL-1 ra は、 $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度で Y 4 株莢膜多糖による TRACP 陽性多核細胞形成を完全に阻害した。以上の結果から、Y 4 株莢膜多糖による TRACP 陽性多核細胞形成には IL-1 なかでも IL-1 α が深く関与していることが強く示唆された。そこで、Y 4 株莢膜多糖で刺激したマウス骨髄培養上清中に IL-1 が産生されている可能性を考え、IL-1 に特異的に反応する RPMI 1788 細胞を用いて培養上清中の IL-1 量測定を行った。Y 4 株莢膜多糖で刺激したマウス骨髄培養上清中には、3 日目に $84.2 \text{ ng}/\text{ml}$ 、6 日目に $96.0 \text{ ng}/\text{ml}$ 、9 日目に $97.3 \text{ ng}/\text{ml}$ の IL-1 が存在した。これに対し、何も刺激していないコントロール側では IL-1 はほとんど検出されなかった。また、RPMI 1788 細胞を用いた培養系に抗 mouse rIL-1 α 及び抗 mouse rIL-1 β を加えたところ、抗 mouse rIL-1 α は Y 4 株莢膜多糖で刺激して得た培養上清による RPMI 1788 細胞の増殖を著しく抑制したが、抗 mouse rIL-1 β は全く影響を与えなかった。このことから Y 4 株莢膜多糖で刺激した際、マウス骨髄細胞培養上清中に産生される IL-1 は、主に IL-1 α であることが明らかとなった。以上の結果から考えて、Y 4 株莢膜多糖による TRACP 陽性多核細胞形成には IL-1 のうちの IL-1 α が深く関与していることは間違いないと思われる。さらに、Takahashi ら³⁴⁾は Y 4 株莢膜多糖でマウスの単球、マクロファージ系の細胞を刺激すると IL-1 が誘導されることを報告しており、本研究においても IL-1 の産生はこれらの細胞および破骨細胞の形成、増殖に不可欠とされる骨芽細胞によるものであることが示唆される。

次に、プロスタグランジン合成阻害剤であるインドメタシンをマウス骨髄細胞培養系に加え、Y 4 株莢膜多糖による TRACP 陽性多核細胞形成に及ぼす影響について調べたところ、 $0.05 \mu\text{g}/\text{ml}$ のインドメタシンで TRACP 陽性多核細胞形成は完全に阻害された。さらに、Y 4 株莢膜多糖で刺激した際のマウス骨髄細

胞培養上清中のプロスタグランジン E_2 量と TRACP 陽性多核細胞形成との間の相関を調べた。その結果、培養後期に高濃度のプロスタグランジン E_2 が検出され、それに伴い TRACP 陽性多核細胞すなわち破骨細胞の増加が認められた。プロスタグランジンが強い骨吸収活性を発現することは広く知られており、歯周病においても組織破壊の起因物質として注目されてきた³⁶⁾。Akatsu ら³⁷⁾は、プロスタグランジン E_1 とプロスタグランジン E_2 がマウス骨髄培養系において TRACP 陽性多核細胞形成を著しく誘導し、TRACP 陽性多核細胞形成はプロスタグランジン E_2 (10^{-5} M) の存在下において8日間で頂点に達することを報告した。本研究におけるマウス骨髄細胞培養系にプロスタグランジン E_2 を培養開始時、3日目、6日目に加えた時の TRACP 陽性多核細胞形成数を調べたところ、培養3日目と6日目に 10^{-6} M のプロスタグランジン E_2 を加えることにより38個という多数の TRACP 陽性多核細胞が形成された。これは培養開始時、3日目、6日目の全てにプロスタグランジン E_2 を加えた時の TRACP 陽性多核細胞形成数に匹敵するものであった。しかしながら、プロスタグランジンを培養開始から3日間だけ加えたところ、ほとんど TRACP 陽性多核細胞の形成は認められなかった。これらの結果から、Y4株莢膜多糖による TRACP 陽性多核細胞形成は培養中期から培養後期にかけて産生されたプロスタグランジンにより引き起こされていると考えられた。一方、Akatsu ら³⁸⁾は、IL-1によるマウス TRACP 陽性多核細胞の形成にはプロスタグランジン E_2 が深く関与していると報告しており、Y4株莢膜多糖存在下のマウス骨髄細胞培養系における TRACP 陽性多核細胞形成には、培養初期に産生された IL-1 α が2次的にプロスタグランジン E_2 を誘導することによって引き起こされている可能性が強く示唆された。

歯周病における歯槽骨吸収のメカニズムを歯周病関連細菌の菌体表層に特異的に存在する物質で調べたものはこれまで見られない。また、その作用機序を宿主細胞が産生する炎症性メディエーターを中心に解析したものもほとんどみられない。宿主と細菌の相互作用、及びそれに付随する生体の応答を IL-1 およびプロスタグランジンを中心にマウス骨髄細胞を用いたモデルで解析した本研究は歯周局所における炎症性骨吸収を解明していく上での大きな指標になるものと考えられる。

謝 辞

稿を終えるにあたり、御教示御校閲を頂きました野口俊

英教授に心から感謝の意を表します。

本研究の実施にあたり、御協力を頂きました歯科保存学第三講座教室員各位、ならびに国立予防衛生研究所口腔科学部諸先生方に御礼を申し上げます。

文 献

- 1) Asikainen, S.: Occurrence of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Spirochetes* in relation to age in localized juvenile periodontitis. J. Periodontol., 57: 537-541, 1986.
- 2) Mandell, R.L.: A longitudinal microbiological investigation of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Eikenella corrodens* in juvenile periodontitis. Infect. Immun., 45: 778-780, 1984.
- 3) Slots, J. and Rosling, B.G.: Suppression of the periodontopathic microflora in localized juvenile periodontitis by systemic tetracycline. J. Clin. Periodontol., 10: 465-486, 1983.
- 4) Christersson, L.A., Slots, J., Rosling, B.G. and Genco, R.J.: Microbiological and clinical effects of surgical treatment of localized juvenile periodontitis. J. Clin. Periodontol., 12: 465-476, 1985.
- 5) Slots, J.: Selective medium for isolation of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. J. Clin. Microbiol., 15: 606-609, 1982.
- 6) Ebersole, J.L., Taubman, M.A., Smith, D.J., Genco, R.J. and Frey, D.E.: Human immune responses to oral microorganisms. Clin. Exp. Immunol., 47: 43-52, 1982.
- 7) Ebersole, J.L., Sandoval, M.N., Steffen, M.J. and Cappelli, D.: Serum antibody in *Actinobacillus actinomycetemcomitans* - infected patients with periodontal disease. Infect. Immun., 59: 1795-1802, 1991.
- 8) Mandel, R.L., Ebersole, J.L. and Socransky, S.S.: Clinical immunologic and microbiologic features of active disease sites in juvenile periodontitis. J. Clin. Periodontol., 14: 534-540, 1987.
- 9) Sandholm, L., Tolo, K. and Olsen, I.: Salivary IgG, a parameter of periodontal disease activity? J. Clin. Periodontol., 14: 289-294, 1987.
- 10) Hammond, B.F. and Stevens, R.H.: *Capnocytophaga* and *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. Occurrence and pathogenic potential in juvenile periodontitis. Genco, R.J. and Mergenhagen, S.E., Host-parasite interactions in periodontal diseases, American Society for Microbiology, Washington, D.C., 46-61, 1982.
- 11) Zambon, J.J., Slots, J. and Genco, R.J.: Serology

- of oral *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and serotype distribution in human periodontal disease. Infect. Immun., 41 : 19-27, 1983.
- 12) Gumur, R., MaNabb, H., van Steenberg, T.M.J., Baehni, P., Mombelli, A., van Winkeihoff, A.J. and Guggenheim, B. : Seroclassification of hitherto nontypable *Actinobacillus actinomycetemcomitans* strains : evidence for a new serotype e. Oral Microbiol. Immunol., 8 : 116-120, 1993.
  - 13) Zambon, J.J. : *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in human periodontal disease. J. Clin. Periodontol., 12 : 1-20, 1985.
  - 14) Ebersole, J.L., Frey, D.E., Taubman, M.A. and Smith, D.J. : An ELISA for measuring serum antibodies to *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. J. Periodont. Res., 15 : 621-632, 1980.
  - 15) Amano, K., Nishihara, T., Shibuya, N., Noguchi, T. and Koga, T. : Immunochemical and structural characterization of a serotype-specific polysaccharide antigen from *Actinobacillus actinomycetemcomitans* Y 4 (serotype b). Infect. Immun., 57 : 2942-2946, 1989.
  - 16) Rantz, L.A. and Randall, E. : Use of autoclaved extracts of hemolytic streptococci for serological grouping. Stanford Medical Bulletin., 13 : 290-291, 1955.
  - 17) Westphal, O. and Jann, K. : Bacterial lipopolysaccharides. Extraction with phenol water and further applications of the procedure. Methods. Carbohydr. Chem., 5 : 83-91, 1965.
  - 18) Peterson, A.A. and McGroarty, E.J. : High-molecular-weight components in lipopolysaccharides of *Salmonella typhimurium*, *Salmonella minnesota*, and *Escherichia coli*. J. Bacteriol., 162 : 738-745, 1985.
  - 19) 中島啓介 : モノクローナル抗体を用いた *Actinobacillus actinomycetemcomitans* の菌体抗原の解析. 日歯周誌, 32 : 71-92, 1990.
  - 20) Issekutz, A.C. : Removal of gram-negative endotoxin solutions by affinity chromatography. J. Immunol. Methods., 61 : 275-281, 1983.
  - 21) 西原達次 : *Actinobacillus actinomycetemcomitans* の免疫生物学的活性に関する研究—リポ多糖体, 全菌体抽出物, および菌体外産物の化学組成と免疫生物学的活性について. 日歯周誌, 28 : 56-78, 1986.
  - 22) Lerner, U.L.F.H. : Modifications of the mouse calvarial technique improve the responsiveness to stimulators of bone resorption. J. Bone. Miner. Res., 2 : 375-383, 1987.
  - 23) Suda, T., Takahashi, N. and Martin, T.J. : Modulation of osteoclast differentiation. Endocrine. Rev., 13 : 66-79, 1992.
  - 24) Nishihara, T., Ohsaki, Y., Ueda, N., Saito, N. and Mundy, G.R. : Mouse interleukin-1 receptor antagonist induced by *Actinobacillus actinomycetemcomitans* lipopolysaccharide blocks the effect of interleukin-1 on bone resorption and osteoclast-like cell formation. Infect. Immun., 62 : 390-397, 1994.
  - 25) Vandenabeele, P., Declercq, W., Libert, C. and Fiers, W. : Development of a simple, sensitive and specific bioassay for interleukin-1 based on the proliferation of RPMI 1788 cells. Comparison with other bioassays for IL-1. J. Immunol. Methods., 135 : 25-32, 1990.
  - 26) Page, R.C. and Schroeder, H.E. : Periodontitis in man and other animals. KARGER., 1982.
  - 27) Slots, J. and Genco, R.J. : Black-pigmented *Bacteroides* species, *Capnocytophaga* species, and *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in human periodontal disease : Virulence factors in colonization, survival, and tissue destruction. J. Dent. Res., 63 : 412-421, 1984.
  - 28) Slots, J. and Listgarten, M.A. : *Bacteroides gingivalis*, *Bacteroides intermedius* and *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in human periodontal disease. J. Clin. Periodontol., 15 : 85-93, 1988.
  - 29) Ishihara, Y., Nishihara, T., Maki, E., Noguchi, T. and Koga, T. : Role of interleukin-1 and prostaglandin in *in vitro* bone resorption induced by *Actinobacillus actinomycetemcomitans* lipopolysaccharide. J. Periodont. Res., 26 : 155-160, 1991.
  - 30) Iino, Y. and Hopps, R.M. : The bone-resorbing activities in tissue culture of lipopolysaccharides from the bacteria *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Bacteroides gingivalis* and *Capnocytophaga ochracea* isolated from human mouths. Arch. Oral. Biol., 29 : 59-63, 1984.
  - 31) Nishihara, T., Ishihara, Y., Noguchi, T. and Koga, T. : Membrane IL-1 induces bone resorption in organ culture. J. Immunol., 143 : 1881-1886, 1989.
  - 32) Wilson, M., Kamin, S. and Harvey, W. : Bone resorbing activity of purified capsular material from *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. J. Periodont. Res., 20 : 484-491, 1985.
  - 33) Takahashi, N., Yamaura, H., Yoshiki, S., Roodman, G.D., Mundy, G.R., Jones, S.J., Boyde, A. and Suda, T. : Osteoclast-like cell formation and its regulation by osteotropic hormones in mouse bone marrow cultures. Endocrinology., 122 : 1373-1382, 1988.
  - 34) Takahashi, T., Nishihara, T., Ishihara, Y., Amano, K., Shibuya, N., Moro, I. and Koga, T. : Murine macrophage interleukin-1 release by cap-

- sular-like serotype-specific polysaccharide antigens of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. Infect. Immun., 59 : 18-23, 1991.
- 35) Gowen, M. and Mundy, G.R. : Actions of recombinant interleukin 1, interleukin 2, and interferon- γ on bone resorption *in vitro*. J. Immunol., 136 : 2478-2482, 1986.
- 36) Ray C. Williams, D.M.D. : Periodontal disease. N. Engl. J. Med., 322 : 373-383.
- 37) Akatsu, T., Takahashi, N., Debari, K., Morita, S., Nagata, N., Takatani, O. and Suda, T. : Prostaglandins promote osteoclastlike cell formation by a mechanism involving cyclic adenosine 3',5'-monophosphate in mouse bone marrow cell cultures. J. Bone. Miner. Res., 4 : 29-35, 1989.
- 38) Akatsu, T., Takahashi, N., Udagawa, N., Imamura, K., Yamaguchi, A., Sato, K., Nagata, N. and Suda, T. : Role of prostaglandins in interleukin-1-induced bone resorption in mice *in vitro*. J. Bone. Miner. Res., 6 : 183-190, 1991.

連絡先 :

愛知学院大学歯学部歯科保存学第三講座

〒464 名古屋市千種区末盛通 2-11