

## 論文の内容の要旨

氏名：田 口 寛 子

博士の専攻分野の名称：博士（歯学）

論文題名：ラットの歯肉への LPS 接種が IL-6 と TNF- $\alpha$  産生性に及ぼす影響

—*In vivo* 微小透析法を用いた解析—

矯正装置の口腔内への装着に伴う自浄性の低下および不潔域の増加は、歯周疾患を進展させる誘因のひとつである。歯周病では歯周組織の破壊を起こす慢性の炎症が見られ、その発症にはグラム陰性菌感染の関与が示唆されている。グラム陰性菌細胞壁の構成成分である lipopolysaccharide (LPS) の歯肉への接種は、歯周組織における炎症の惹起とこれに伴う組織破壊に関与することが動物実験で示されている。このことは LPS の実験動物の歯肉への接種は、接種部位における炎症のケミカルメディエーターを増加させることを示唆している。歯周病においてインターロイキン (IL) や腫瘍壊死因子 (TNF) をはじめとする炎症性サイトカインは、歯周組織の破壊を促進する。特に、IL-6 と TNF- $\alpha$  は微生物刺激により産生が促される炎症性サイトカインであり、歯周病の発症に関与している。IL-6 は、歯周病における炎症性細胞の遊走および破骨細胞の形成に関与することから歯周病発症を促進する役割を果たすことが考えられる。一方、TNF- $\alpha$  は歯槽骨の吸収や歯肉上皮の結合組織性付着の喪失を起こすことが知られており、IL-1 $\beta$  および IL-6 といった炎症促進性サイトカインの産生を亢進させる反面、感染や炎症を起こしている部位への食細胞の遊走を促進させる。したがって、TNF- $\alpha$  は歯周病発症を促進させるだけでなく抑制する可能性も考えられる。

これまでの実験動物を用いた研究の結果、*Escherichia coli* (*E. coli*) 由来の LPS (*Ec*-LPS) の歯肉への反復接種および *Salmonella typhimurium* (*S. typhimurium*) 由来の LPS の歯肉への単回接種は、いずれも接種後少なくとも 5~7 日が経過してから歯周組織の破壊が観察されている。しかしながら *E. coli* と *S. typhimurium* はいずれも一般に歯周病原菌として報告されておらず、LPS の歯肉への接種が同部位における炎症性サイトカインに及ぼす影響については明らかでない。グラム陰性嫌気性桿菌の *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*) は歯周病の進行に関わる病原菌のひとつであり、その細胞壁には LPS が含まれている。そこで本研究では urethane 全身麻酔下のラットを用いて、*P. gingivalis* 由来の LPS (*Pg*-LPS) の歯肉への接種が同部位における IL-6 および TNF- $\alpha$  産生に及ぼす影響について *in vivo* 微小透析法により解析した。

微小透析実験には、4.5 mm の柄部の先端に膜長 2 mm、直径 440  $\mu$ m、カットオフ分子量 1,000 kDa のポリエチレン製微小透析膜と、その表面に薬物局所投与用ニードルを備えた直管型透析プローブを用いた。このプローブは lidocaine 表面麻酔下で上顎右側切歯遠心部の歯肉へ挿入し、微小透析膜全体を歯肉内に留置した。LPS は薬物局所投与用ニードルを介してマイクロシリンジで接種した。これまでに *Pg*-LPS と *Ec*-LPS は、IL-6 や TNF- $\alpha$  を含む炎症性サイトカインの発現に対する影響が異なることが歯周組織由来の細胞を用いた *in vitro* の実験で示されている。そこで本研究では、*Pg*-LPS の影響と比較する目的で *Ec*-LPS が歯肉の IL-6 および TNF- $\alpha$  産生性に及ぼす影響についても検討を加えた。IL-6 および TNF- $\alpha$  は ELISA で定量した。さらに、*Pg*-LPS と *Ec*-LPS の receptor として働く Toll-like receptor (TLR) 2 および TLR4 の歯肉における mRNA 発現の有無、免疫組織化学によりこれら receptor の歯周組織における局在についても解析した。

その結果、歯肉から得た透析液中には IL-6 が約 372 pg/ml 含まれていたが、TNF- $\alpha$  は本測定に用いた ELISA kit の検出限界 (5 pg/ml) 以下であった。*Pg*-LPS (1  $\mu$ g) または *Ec*-LPS (1 および 6  $\mu$ g) の歯肉への接種は、IL-6 量にはほとんど影響を与えなかった。*Pg*-LPS (1  $\mu$ g) を接種したところ、接種直後から 2 時間にわたる TNF- $\alpha$  の増加が誘発されたが、*Ec*-LPS (1-6  $\mu$ g) 接種では TNF- $\alpha$  に影響は見られなかった。LPS 接種 2 時間後の歯肉の組織学的検索を行ったが、*Pg*-LPS (1  $\mu$ g) と *Ec*-LPS (1-6  $\mu$ g) を接種した部位においてリンパ球浸潤などの炎症性反応は認められなかった。透析液の回収を行った歯肉では、RT-PCR 法により TLR2 と TLR4 の mRNA 発現が確認されたので、これら receptor の歯周組織における発現を免疫組織学的に検索した。TLR2 は粘膜上皮である重層扁平上皮、主に基底細胞と有棘細胞に明瞭に発現がみられ、また一部の歯根膜細胞にも発現がみられた。一方、TLR4 は粘膜上皮層の基底細胞と有棘細胞で発現が認められたが歯根膜細胞では観察されなかった。

これまで *Pg*-LPS の作用機序としては 1) TLR2 の活性化が TLR4 よりも優位である、2) TLR2 と TLR4 の両方または一方を活性化する、3) TLR2 ではなく TLR4 を活性化することがそれぞれの研究から示唆さ

れている。これに対し *Ec*-LPS は *Pg*-LPS と比べて TLR4 を選択的に刺激することが知られている。本研究では、微小透析を行った領域である上顎右側切歯遠心部歯肉において TLR2 および TLR4 の両方の mRNA が検出できた。さらに免疫組織化学的解析の結果、この領域の歯肉上皮細胞に TLR2 および TLR4 タンパクが発現していることが明らかになった。前述の通り、*Pg*-LPS は TLR2 のみならず TLR4 にも作用する可能性が示唆されているが、本実験条件下においては、歯肉上皮細胞に局在が確認された TLR2 への刺激が *Pg*-LPS の誘発した TNF- $\alpha$  の増大に関与した可能性が推察された。このことは、マウスやヒト由来の歯肉上皮細胞において *Pg*-LPS が TNF- $\alpha$  の産生を誘発するという *in vitro* の研究結果と一致するものであった。

*Pg*-LPS による歯肉上皮細胞における TNF- $\alpha$  産生の増加は、結合組織破壊および骨吸収の開始にそれぞれ相関することが知られているが、TNF- $\alpha$  は歯周病の発症を促進するだけでなく抑制することも指摘されている。本研究で *Pg*-LPS 接種が誘発した TNF- $\alpha$  の一過性の増加が歯周病発症の面でいずれの役割を果たしているかは明らかではない。しかし、*Pg*-LPS 接種は接種部位の歯肉において、少なくとも炎症性サイトカインの IL-6 量にほとんど影響を与えず、炎症性細胞浸潤も誘発しないとの結果を得た。また、*Ec*-LPS のラットの歯肉への反復接種が接種開始から 5 日目で接種部位に炎症性細胞浸潤を引き起こすという報告とは異なり、本実験で行った *Ec*-LPS の単回接種では接種部位に炎症性細胞浸潤は認められなかった。これらのことから 1) 炎症性細胞浸潤を伴う歯肉の炎症は、*Ec*-LPS または *Pg*-LPS の歯肉への接種後ただちには誘発されないうえに、2) 歯肉組織に実験的炎症性変化を誘発するには歯肉が継続的に LPS へ曝される必要があることが示された。これまで LPS の示す炎症性細胞浸潤を伴う歯肉炎を誘発する作用は細菌種によって異なることが示唆されてきた。本研究から、*Pg*-LPS と *Ec*-LPS の歯肉への接種は、いずれも接種部位で炎症性細胞浸潤を惹き起さないが TNF- $\alpha$  量に対する影響は異なることが示された。

以上の結果から、*Pg*-LPS は *Ec*-LPS とは異なり、歯肉内への単回接種では TNF- $\alpha$  を一過性に増加させたが、IL-6 産生性には影響を与えないことが *in vivo* の条件下で示された。また、*Pg*-LPS による歯肉の TNF- $\alpha$  の一過性の増加は、歯肉の上皮細胞に発現した TLR2 を介する可能性が示唆された。