

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—

日本大学大学院歯学研究科歯学専攻

田口 寛子

(指導: 清水典佳教授, 浅野正岳准教授, 川戸貴行准教授)

## 緒 言

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<sup>1,2)</sup>。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<sup>3)</sup>、その発症にはグラム陰性菌の感染の関与が示唆されている<sup>4)</sup>。グラム陰性菌の細胞壁の構成成分である lipopolysaccharide (LPS) 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おいて重要な役割を担うことが実験動物を用いた基礎研究から指摘されており<sup>5)</sup>、口蓋歯肉への *Escherichia coli* (*E. coli*) 由来の LPS の反復接種は接種部位での持続的な炎症性細胞浸潤と、結合組織成分の分解に関与するマトリックスメタロプロテアーゼ-13 の発現を誘発する<sup>6,7)</sup>。また、*Salmonella typhimurium* (*S. typhimurium*) 由来の LPS の歯肉への接種は、炎症性細胞浸潤、付着上皮の退縮、歯槽骨吸収および破骨細胞の活性化を伴う歯周組織の炎症を惹き起こす<sup>8)</sup>。歯肉への LPS 接種は、接種部位において炎症のケミカルメディエーターを増加させることが推察される。

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<sup>9-11)</sup>。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<sup>12)</sup>。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と考えられている<sup>13,14)</sup>。TNF- $\alpha$  も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<sup>13, 15)</sup>, さらに 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も亢進させることが報告されている<sup>13, 16-18)</sup>。一方で TNF- $\alpha$  は, 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ことで歯周病の進行を抑制することも示されており<sup>12)</sup>, 歯周病の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, *E. coli* 由来の LPS (*Ec*-LPS) の歯肉への反復接種<sup>7)</sup>, *S. typhimurium* 由来の LPS の歯肉への単回接種<sup>8)</sup> のいずれにおいて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<sup>4)</sup>, その細胞壁には LPS が含まれている<sup>19, 20)</sup>。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。*In vivo* 微小透析法は同一個体の脳内や末梢組織の特定の部位から透析膜を通して細胞外液を試料として継続的に回収することができる<sup>21, 22)</sup>。したがって本法は生体から切除しホモジナイズされた組織を試料とする方法とは異なり, LPS の接種直後の細胞外サイトカイン量の変化を観察するうえで有用である。

歯周組織において *in vivo* 微小透析法を用いた研究はなく、著者は歯肉組織の細胞外液に含まれる IL-6 および TNF- $\alpha$  の回収に応用できるのではないかと考えた。本研究では、*Pg*-LPS の歯肉内接種が同部位における IL-6 および TNF- $\alpha$  量に及ぼす影響について解析する目的で、透析膜の表面に薬物局所投与用微小ニードルを備えた透析プローブを使用した。一方、これまでに *Pg*-LPS と *Ec*-LPS とでは歯肉の上皮細胞<sup>23)</sup> および線維芽細胞<sup>19, 20)</sup>、歯根膜細胞<sup>24)</sup>、マクロファージ<sup>19)</sup> における IL-6 や TNF- $\alpha$  を含む炎症性サイトカインの発現に及ぼす影響が異なることが *in vitro* で示されている。また、それらの発現には LPS の Toll-like receptor (TLR) 2 および TLR4 への関与が重要であることが報告されている<sup>25, 26)</sup>。

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。さらに、これら LPS の receptor として働く TLR2 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を行った。

## 材料および方法

### 実験動物

体重約 300~350 g の Sprague-Dawley (SD) 系雄性ラット(高杉実験動物)を用いた。飼育は、恒温恒湿 ( $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ,  $55 \pm 5\%$ ), 午前 7 時点灯, 12 時間明暗サイクルの飼育室で行い, ラット・マウス用 MF 固形飼料(オリエンタル酵母工業)と水道水を自由に摂取させた。

実験は日本大学歯学部動物実験委員会の承認の下(承認番号 AP12D003), 動物実験指針に従って行い, 実験動物の苦痛軽減および使用動物数の低減に努めた。

### *In vivo* 微小透析法

透析実験には, 4.5 mm の柄部の先端に膜長 2 mm, 直径 440  $\mu\text{m}$ , 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, その隣に薬物局所投与用ニードルを備えた市販の直管型透析プローブ (PEMI-4.5-02; EICOM, Japan)を用いた。薬物局所投与用ニードル(フューズドシリカ製, 外径 150  $\mu\text{m}$ , 内径 75  $\mu\text{m}$ )の先端は, このプローブの微小透析膜の表面中央部から 40  $\mu\text{m}$  の直上に位置するよう設定した。透析プローブはポリエチレン膜を ethanol に 3 秒浸漬したのち歯肉へ植立した(第 1 図)。

ラットは urethane (Sigma-Aldrich, USA) にて全身麻酔 (1.5 g/kg, i.p) したのち, ヒートパッド上で実験中の体温を  $36^{\circ}\text{C}$  に保った。麻酔深度は角膜反射

の有無および後肢への侵害刺激からの回避行動を観察することで評価した。ラットの上顎右側切歯遠心部の歯肉に 2% lidocaine (AstraZeneca, Japan) による表面麻酔を施し、同部位に手指で微小透析プローブのポリエチレン膜を挿入した。プローブの先端は歯肉表面からおよそ 3 mm 下方に位置させ、2 mm の微小透析膜の全体を歯肉組織内に留置したのち、このプローブの柄部を切歯に歯科用常温重合レジンで固定した。この透析プローブの inlet と outlet にフッ化エチレンプロピレン (FEP) チューブ (内径 250  $\mu\text{m}$ ) を接続し、0.15% bovine serum albumin (BSA) を含む改良リンゲル液 (NaCl 147 mM, KCl 4 mM,  $\text{CaCl}_2$  2.3 mM,  $\text{MgCl}_2$  155.6 mM; pH 7.4) を push pump (EP-60; EICOM, Japan) に取りつけたマイクロシリンジで、pull pump (ERP-10; EICOM, Japan) を同時に稼働させて灌流した。これらの push pump と pull pump を同時に用いることで流速 1-10  $\mu\text{l}/\text{min}$  で改良リンゲル液を透析プローブへ灌流させ、FEP チューブにて透析液を試料として回収し、温度調節機能付きの fraction collector (EFC-82; EICOM, Japan) に蓄えた。プローブへの改良リンゲル液の灌流速度は、実験条件を安定させるため灌流開始 3 時間を 10  $\mu\text{l}/\text{min}$  としたのち、1  $\mu\text{l}/\text{min}$  に設定し 60 分毎に 6 時間にわたり灌流液を試料として回収した。試料はポリプロピレンチューブへ回収し、4°C で保管した。

### LPS の歯肉への接種

LPS は *Pg*-LPS (InvivoGen, USA, *P. Gingivalis*-LPS) と *Ec*-LPS (055:B5; Sigma-Aldrich, USA, *E. Coli*-LPS) を使用した。*Ec*-LPS はこれまでの報告を

もとに選択した<sup>7, 27)</sup>。

*Pg*-LPS または *Ec*-LPS を含む注射用滅菌水 1  $\mu$ l はマイクロシリンジ (Hamilton, USA)により薬物投与用ニードルを介して30秒かけて歯肉内に接種した。対照群には溶媒である注射用滅菌水を注入した。マイクロシリンジは、注入液の逆流を防ぐため LPS を接種終了後も 30 秒間はニードルと接続したままにした<sup>28)</sup>。注入液の容積を 1  $\mu$ l としたのは、Dumitescuら(2004)の報告<sup>8)</sup>に基づき LPS が作用する範囲を最小限にとどめるためである。*Pg*-LPS (1  $\mu$ g) と *Ec*-LPS (1 および 6  $\mu$ g)の接種量は製造者の指示を参考に設定した。*Pg*-LPS では 1  $\mu$ g/1  $\mu$ l, *Ec*-LPS では 6  $\mu$ g/1  $\mu$ l をそれぞれ超える高濃度は、非特異的作用を避けるため歯肉への接種に使用しなかった。

### **Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)**

歯肉から試料として得た透析液における IL-6 と TNF- $\alpha$  量は市販の ELISA kit (rat IL-6 および rat TNF- $\alpha$ ; R&D Systems, USA)を用い、製造者の指示に基づいて定量した。透析液はポリプロピレンチューブに回収したのちただちに 4°C で貯蔵し、回収後 24 時間以内に ELISA による解析を行った。試料の希釈は全て灌流に用いた改良リンゲル液で行った。

### **Revers transcription polymerasechain Reaction (RT-PCR)**

微小透析実験と同様にラット ( $n = 1$ ) を urethane で全身麻酔 (1.5 g/kg, i.p.) した後、上顎右側切歯の歯肉に 2% lidocaine による表面麻酔を行った。上

顎右側切歯遠心部の歯肉(約2 mm × 2 mm × 2 mm)を採取し、RNase-free条件下で、RNA stabilization reagent(RNA later; Ambion, USA)中に移した。Total RNAの抽出にはRNeasy mini kit(QIAGEN, Japan)を用いた。cDNAの合成にはrandom hexamersを使用し、Superscript III reverse transcriptase(Invitrogen, USA)を用いて行った。PCR反応は*EX Taq*(TaKaRa, Japan)を用いて、次のTLR2, TLR4のPCRプライマーを用いて行った。TLR2, 5'-GGCCACAGGACTCAAGAGCA-3'(forward) 5'-AGAGGCC-TATCACAGCCATCAAG-C-3'(reverse) TLR4, 5'-CTCACA ACTTCAGT-GGCTGGATTTA-3'(forward) 5'-GTCTCCACAGCCACCAGATTCTC-3(reverse)。My Cyclor(Bio-Rad, USA)にて、反応条件は、初期温度95℃ 3分、95℃ 30秒、60℃ 30秒、72℃ 30秒を40サイクルで反応させた。PCR産物を2% agarose gelで電気泳動し、ethidium bromide染色を行った。

### 免疫組織化学染色

ラットを urethane で全身麻酔(1.5 g/kg, i.p.)した後、未接種ラット及び *Pg*-LPS, *Ec*-LPS 接種ラット(各  $n = 1$ )は接種 2 時間後に、生理食塩水と 0.1M リン酸緩衝液(pH 7.4)に 4% paraformaldehyde を含んだ固定液にて灌流固定した。中性緩衝ホルマリンによる固定後、上顎切歯を含む周囲組織を一塊として採取し、10% ethylenediamine tetraacetic acid-5%塩酸(K-CX; FALMA, Japan)にて 1 週間脱灰した後、パラフィンに包埋した。歯軸に垂直な面での厚さ 4  $\mu$ m の切片を作製し脱パラフィン処理後、HE 染色標本作製

した。免疫染色では、脱パラフィン後の切片を同様に処理し、再水和後に、室温で20分間、0.3%過酸化水素水を作用させて内因性ペルオキシダーゼを不活化し、続いて、10 mM のクエン酸緩衝液 (pH 6.0) に浸漬して20分間煮沸することで抗原の賦活化を行った。さらに、非特異的反応部位をブロッキングするため、切片を1% BSA 含有トリス緩衝液(TBS)に室温で1時間浸漬した。一次抗体とした抗ラット TLR2 抗体および抗ラット TLR4 抗体 (Santa Cruz, USA) は、いずれも1% BSA-TBS で100倍希釈し、それぞれ切片に室温で1時間反応させた。1% BSA-TBS と反応させた切片をコントロールとした。その後、切片は、1% BSA-TBS で500倍希釈した horseradish peroxidase 標識の抗ウサギ IgG 抗体 (Jackson ImmunoResearch, USA) と室温で1時間反応させ、水洗後に、diaminobenzidine 溶液 (Sigma-Aldrich, USA) 中で7分間発色させて反応部位の検出を行った。Hematoxylin で核染色を施した免疫染色標本の顕鏡と撮影は、Leica DM5500B 光学顕微鏡 (Leica, Japan) で行った。

## 統計解析

経時データ (0-4 時間) の比較は二元配置分散分析 (two-way ANOVA) を使用して行い、post hoc 検定として Scheffé's test を行った。有意水準はいずれも  $P < 0.05$  とした。

## 結 果

### 1. LPS の接種が IL-6 および TNF- $\alpha$ 産生性に及ぼす影響

歯肉から得た透析液には 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 または Ec-LPS の歯肉への接種は, 歯肉から得た IL-6 量に対していずれも目立った影響を与えなかった(第 2 図)。

Pg-LPS の接種の結果, 接種直後から 2 時間にわたる TNF- $\alpha$  の増加が誘発された(第 3 図)。

一方, Ec-LPS 接種では TNF- $\alpha$  に影響は見られなかった(第 3 図 a, b)。Scheffé's test の結果, 溶媒処置群と Pg-LPS 接種群の間に有意差が認められた( $P < 0.05$ )。

### 2. LPS の歯肉内接種が歯肉組織に及ぼす影響

Pg-LPS の接種後 1-2 時間で一過性に TNF- $\alpha$  量の増加がみられたことから, LPS 接種 2 時間後の歯肉を組織学的に検索した。その結果, Pg-LPS と Ec-LPS の歯肉内接種はリンパ球浸潤などの炎症性反応を誘発しないことが示された(第 4 図)。

### 3. TLR2 と TLR4 の mRNA の発現

LPS 受容体である TLR2 および TLR4 のラット上顎切歯の歯肉組織におけ

る発現を RT-PCR によって検索した。その結果, TLR2 と TLR4 は, それぞれ 105 bp, 177 bp の単一のバンドとして検出された(第 5 図)。

#### 4. TLR2 と TLR4 の免疫組織化学

TLR2 は上顎切歯部の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(第 6 図 a-c)。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(第 6 図 d-f)。なお, TLR2 も TLR4 も, 歯肉線維芽細胞での発現は認められなかった。Selleri らが報告<sup>29)</sup>した通り, TLR2 および TLR4 は毛包細胞に, そして TLR4 は筋細胞でも認められた(データは示していない)。

## 考 察

本研究では urethane による全身麻酔を施したラットを用い *in vivo* 微小透析法により、切歯遠心部の歯肉内への *Pg*-LPS または *Ec*-LPS の接種が同部位の IL-6 および TNF- $\alpha$  量に及ぼす影響について解析を行った。微小透析プローブを歯肉内に挿入し半透膜を介して回収した細胞外液から得た透析液中の IL-6, TNF- $\alpha$  量は、ELISA 法で定量した。その結果、歯肉から得た透析液には IL-6 がおよそ 372 pg/ml 含まれていたのに対し、TNF- $\alpha$  は本研究で用いた ELISA 法の検出限界 (5 pg/ml) 以下であった。動物実験に用いる全身麻酔薬は、基本的な免疫応答に対してわずかながら影響を及ぼす可能性が考えられる。本研究で用いた urethane の場合、ラットの脾臓において IL-6 の mRNA を増加させ、TNF- $\alpha$  を減少させることが示されている<sup>30)</sup>。したがって、本研究で回収した歯肉透析液中の IL-6 および TNF- $\alpha$  量が urethane 処置の影響を受けた可能性についても考慮する必要がある。

本研究から *Pg*-LPS の歯肉内接種は同部位において IL-6 量に目立った影響を及ぼさないものの、TNF- $\alpha$  量は一過性に増加させることが示された。この結果はラットの足蹠への *Pg*-LPS の接種が接種部位の TNF- $\alpha$  を一過性に増加させたとする報告と一致するものであった<sup>31)</sup>。一方、*Pg*-LPS とは異なり *Ec*-LPS の歯肉内接種は歯肉透析液中に含まれる IL-6, TNF- $\alpha$  のいずれの量にも影響を及ぼさなかった。*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<sup>25)</sup>、2) TLR2 と TLR4 の両方または一方を活性化

する<sup>32)</sup>, 3) TLR2 ではなく TLR4 を活性化する<sup>33)</sup>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<sup>22)</sup>。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、この領域の歯肉において、線維芽細胞ではなく上皮細胞に 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。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- $\alpha$  の増加に関与した可能性が推察された。*Pg*-LPS は、マウス<sup>34)</sup>やヒト<sup>35, 36)</sup>由来の歯肉上皮細胞において TNF- $\alpha$  の産生を誘発することが示されている。

*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報告されている<sup>37, 38)</sup>。一方で TNF- $\alpha$  は、歯周病の発症において促進と抑制の両方に働く可能性があることが知られており<sup>12)</sup>、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上記のいずれの役割を果たしているかは明らかでない。しかし、本研究は、*Pg*-LPS の歯肉内接種が少なくとも炎症性サイトカインの IL-6 量に目立った変化は起こさず、接種部位の歯肉の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<sup>7)</sup>、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。この点で興味深いことにラットの歯肉への *S. typhimurium* 由来の LPS の場合、歯肉へ単回接種ただけで接種 7 日から 10 日後には炎症性細胞浸潤、付着上皮の根尖方向への移動、歯槽骨吸収および破骨細胞の活性化をいずれも伴う強い歯周炎様の症状を誘発することが報告されている<sup>8)</sup>。これらの研究結果は、LPS の示す炎症性細胞浸潤を伴う歯肉炎を誘発する作用が細菌種によって異なることを示唆するものである。本研究においても、*Pg*-LPS と *Ec*-LPS はいずれも少なくとも接種 2 時間後は接種部位の歯肉で炎症性細胞浸潤を惹き起さなかったが、同部位の細胞外液中の TNF- $\alpha$  量に対する影響が異なることが示された。

本報告は、脳内や末梢組織の細胞外液に含まれる生理活性物質の測定に用いられる *in vivo* 微小透析法により、炎症関連分子の IL-6 および TNF- $\alpha$  量の動態をラットの歯肉において経時的に捉えることができることを明らかにしたもので、歯周疾患の病態解明と治療に関する基礎研究の発展に寄与することが期待できる。

## 結 論

本研究は urethane 全身麻酔下のラットを用い、Pg-LPS の歯肉への局所接種が同部位の IL-6 および TNF- $\alpha$  量に及ぼす影響について *in vivo* 微小透析法により検討を行った。

その結果、以下の結論を得た。

1. 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。
2. Pg-LPS による歯肉の TNF- $\alpha$  の一過性の増加は、歯肉上皮細胞に発現した TLR2 を介する可能性が示唆された。

## 謝 辞

稿を終えるにあたり、懇切なるご指導およびご校閲を賜りました日本大学歯学部歯科矯正学講座の清水典佳教授に謹んで心より感謝申し上げます。

本研究をご指導下さいました日本大学歯学部・松戸歯学部薬理学講座の三枝禎教授，日本大学歯学部病理学講座の浅野正岳准教授，衛生学講座の川戸貴行准教授に深く感謝申し上げます。また本研究の遂行を終始支援して下さいました日本大学歯学部・松戸歯学部薬理学講座の青野悠里先生に深謝いたします。

最後に本研究にご協力を頂いた日本大学歯学部歯科矯正学講座の皆様  
に感謝いたします。

本研究の一部は，平成 24, 25 年度大学院歯学研究科研究費（学生分，田口寛子）および平成 26 年度日本大学歯学部佐藤研究費の助成により行われた。

## 文 献

- 1) Sanders NL (1999) Evidence-based care in orthodontics and periodontics: a review of the literature. *J Am Dent Assoc* 130, 521-527.
- 2) 中垣 晴男 (2004) 矯正歯科治療等における口腔衛生管理に関する提言(報告). *口腔衛生会誌* 54, 162-164.
- 3) Page RC (1991) The role of inflammatory mediators in the pathogenesis of periodontal disease. *J Periodontal Res* 26, 230-242.
- 4) Slots J (2013) Periodontology: past, present, perspectives. *Periodontol* 2000 62, 7-19.
- 5) Wilson M (1995) Biological activities of lipopolysaccharides from oral bacteria and their relevance to the pathogenesis of chronic periodontitis. *Sci Prog* 78 (Pt 1), 19-34.
- 6) Nakai K, Kawato T, Morita T, Inuma T, Kamio N, Zhao N, Maeno M (2013) Angiotensin II induces the production of MMP-3 and MMP-13 through the MAPK signaling pathways via the AT<sub>1</sub> receptor in osteoblasts. *Biochimie* 95, 922-933.
- 7) de Aquino SG, Guimaraes MR, Stach-Machado DR, Da Silva JA, Spolidorio LC, Rossa C Jr. (2009) Differential regulation of MMP-13 expression in two models of experimentally induced periodontal disease in rats. *Arch Oral Biol* 54, 609-617.
- 8) Dumitrescu AL, Abd El-Aleem S, Morales-Aza B, Donaldson LF (2004)

- A model of periodontitis in the rat: effect of lipopolysaccharide on bone resorption, osteoclast activity, and local peptidergic innervation. *J Clin Periodontol* 31, 596-603.
- 9) Fentoglu O, Koroglu BK, Hicyilmaz H, Sert T, Ozdem M, Sutcu R, Tamer MN, Orhan H, Ay ZY, Ozturk Tonguc M, Kirzioglu FY (2011) Pro-inflammatory cytokine levels in association between periodontal disease and hyperlipidaemia. *J Clin Periodontol* 38, 8-16.
- 10) Noh MK, Jung M, Kim SH, Lee SR, Park KH, Kim DH, Kim HH, Park YG (2013) Assessment of IL-6, IL-8 and TNF- $\alpha$  levels in the gingival tissue of patients with periodontitis. *Exp Ther Med* 6, 847-851.
- 11) Maeno M, Tanaka H, Zhang F, Kitami S, Nakai K, Kawato T (2013) Direct and indirect effects of IL-17A on RANKL-induced osteoclastogenesis. *J Hard Tissue Biol* 22, 287-292.
- 12) Garlet GP (2010) Destructive and protective roles of cytokines in periodontitis: a re-appraisal from host defense and tissue destruction viewpoints. *J Dent Res* 89, 1349-1363.
- 13) Graves D (2008) Cytokines that promote periodontal tissue destruction. *J Periodontol* 79, 1585-1591.
- 14) Fonseca JE, Santos MJ, Canhao H, Choy E (2009) Interleukin-6 as a key player in systemic inflammation and joint destruction. *Autoimmun Rev* 8, 538-542.

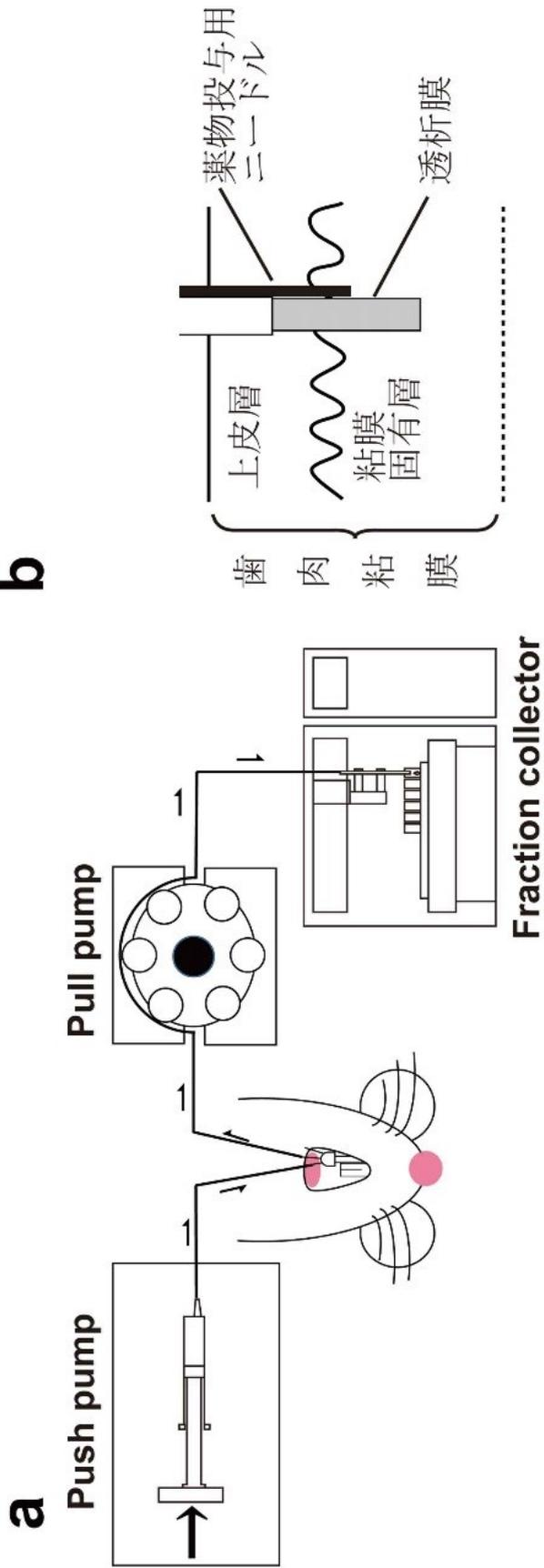
- 15) Graves DT, Cochran D (2003) The contribution of interleukin-1 and tumor necrosis factor to periodontal tissue destruction. *J Periodontol* 74, 391-401.
- 16) Okada N, Kobayashi M, Mugikura K, Okamatsu Y, Hanazawa S, Kitano S, Hasegawa K (1997) Interleukin-6 production in human fibroblasts derived from periodontal tissues is differentially regulated by cytokines and a glucocorticoid. *J Periodontal Res* 32, 559-569.
- 17) Garlet GP, Cardoso CR, Campanelli AP, Ferreira BR, Avila-Campos MJ, Cunha FQ, Silva JS (2007) The dual role of p55 tumour necrosis factor- $\alpha$  receptor in *Actinobacillus actinomycetemcomitans*-induced experimental periodontitis: host protection and tissue destruction. *Clin Exp Immunol* 147, 128-138.
- 18) Musacchio E, Valvason C, Botsios C, Ostuni F, Furlan A, Ramonda R, Modesti V, Sartori L, Punzi L (2009) The tumor necrosis factor- $\alpha$ -blocking agent infliximab inhibits interleukin 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) and IL-6 gene expression in human osteoblastic cells. *J Rheumatol* 36, 1575-1579.
- 19) Jones KJ, Ekhlassi S, Montufar-Solis D, Klein JR, Schaefer JS (2010) Differential cytokine patterns in mouse macrophages and gingival fibroblasts after stimulation with *Porphyromonas gingivalis* or *Escherichia coli* lipopolysaccharide. *J Periodontol* 81, 1850-1857.

- 20) Andrukhov O, Ertlschweiger S, Moritz A, Bantleon HP, Rausch-Fan X (2014) Different effects of *P. gingivalis* LPS and *E. coli* LPS on the expression of interleukin-6 in human gingival fibroblasts. *Acta Odontol Scand* 72, 337-345.
- 21) Plock N, Kloft C (2005) Microdialysis—theoretical background and recent implementation in applied life-sciences. *Eur J Pharm Sci* 25, 1-24.
- 22) de la Pena A, Liu P, Derendorf H (2000) Microdialysis in peripheral tissues. *Adv Drug Deliv Rev* 45, 189-216.
- 23) Sugiyama A, Uehara A, Iki K, Matsushita K, Nakamura R, Ogawa T, Sugawara S, Takada H (2002) Activation of human gingival epithelial cells by cell-surface components of black-pigmented bacteria: augmentation of production of interleukin-8, granulocyte colony-stimulating factor and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and expression of intercellular adhesion molecule 1. *J Med Microbiol* 51, 27-33.
- 24) Nebel D, Arvidsson J, Lillqvist J, Holm A, Nilsson BO (2013) Differential effects of LPS from *Escherichia coli* and *Porphyromonas gingivalis* on IL-6 production in human periodontal ligament cells. *Acta Odontol Scand* 71, 892-898.
- 25) Burns E, Eliyahu T, Uematsu S, Akira S, Nussbaum G (2010) TLR2-dependent inflammatory response to *Porphyromonas gingivalis* is

- MyD88 independent, whereas MyD88 is required to clear infection. *J Immunol* 184, 1455-1462.
- 26) Hajishengallis G, Lambris JD (2012) Complement and dysbiosis in periodontal disease. *Immunobiology* 217, 1111-1116.
- 27) Koyama S, Sato E, Nomura H, Kubo K, Miura M, Yamashita T, Nagai S, Izumi T (1999) The potential of various lipopolysaccharides to release monocyte chemotactic activity from lung epithelial cells and fibroblasts. *Eur Respir J* 14, 545-552.
- 28) Saigusa T, Aono Y, Sekino R, Uchida T, Takada K, Oi Y, Koshikawa N, Cools AR (2009) Contribution of vesicular and cytosolic dopamine to the increased striatal dopamine efflux elicited by intrastriatal injection of SKF38393. *Eur J Pharmacol* 624, 10-15.
- 29) Selleri S, Arnaboldi F, Palazzo M, Gariboldi S, Zanobbio L, Opizzi E, Shirai YF, Balsari A, Rumio C (2007) Toll-like receptor agonists regulate  $\beta$ -defensin 2 release in hair follicle. *Br J Dermatol* 156, 1172-1177.
- 30) Bette M, Schlimme S, Mutters R, Menendez S, Hoffmann S, Schulz S (2004) Influence of different anaesthetics on pro-inflammatory cytokine expression in rat spleen. *Lab Anim* 38, 272-279.
- 31) Dornelles FN, Santos DS, Van Dyke TE, Calixto JB, Batista EL Jr, Campos MM (2009) In vivo up-regulation of kinin B<sub>1</sub> receptors after treatment with *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide in rat paw. *J*

- Pharmacol Exp Ther 330, 756-763.
- 32) Darveau RP, Pham TT, Lemley K, Reife RA, Bainbridge BW, Coats SR, Howald WN, Way SS, Hajjar AM (2004) *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide contains multiple lipid A species that functionally interact with both toll-like receptors 2 and 4. Infect Immun 72, 5041-5051.
- 33) Costalonga M, Batas L, Reich BJ (2009) Effects of Toll-like receptor 4 on *Porphyromonas gingivalis*-induced bone loss in mice. J Periodontal Res 44, 537-542.
- 34) Ekhlassi S, Scruggs LY, Garza T, Montufar-Solis D, Moretti AJ, Klein JR (2008) *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide induces tumor necrosis factor- $\alpha$  and interleukin-6 secretion, and CCL25 gene expression, in mouse primary gingival cell lines: interleukin-6-driven activation of CCL2. J Periodontal Res 43, 431-439.
- 35) Andrian E, Grenier D, Rouabhia M (2005) *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide induces shedding of syndecan-1 expressed by gingival epithelial cells. J Cell Physiol 204, 178-183.
- 36) Beklen A, Sorsa T, Konttinen YT (2009) Toll-like receptors 2 and 5 in human gingival epithelial cells co-operate with T-cell cytokine interleukin-17. Oral Microbiol Immunol 24, 38-42.
- 37) Matsushita K, Tajima T, Tomita K, Takada H, Nagaoka S, Torii M

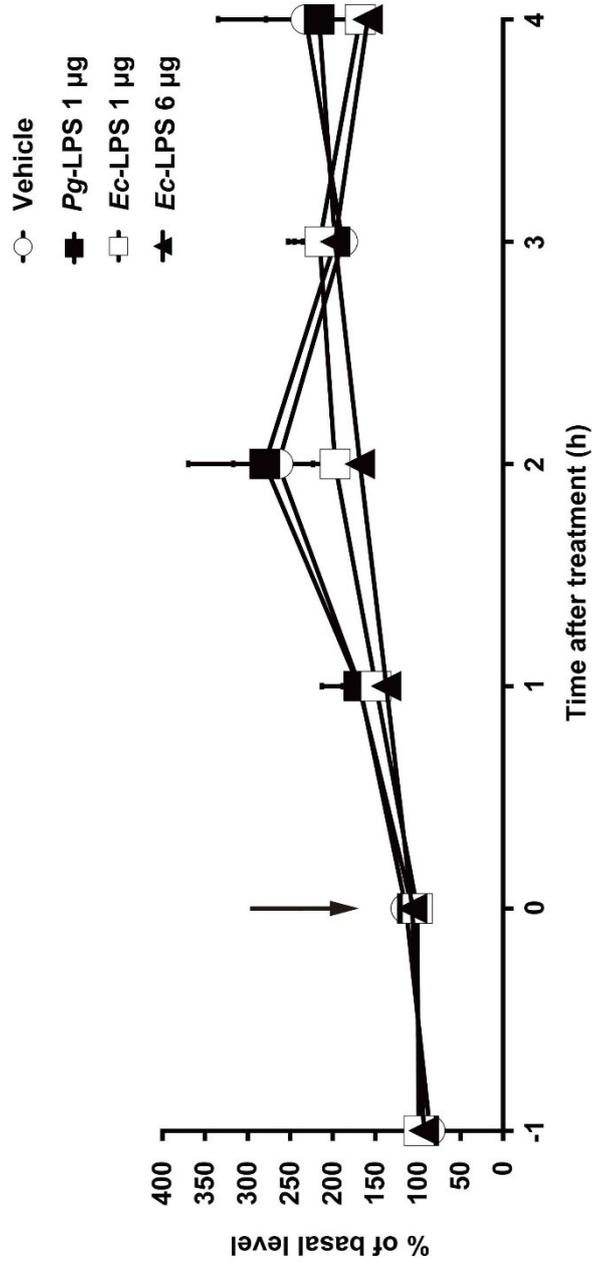
- (1999) Inflammatory cytokine production and specific antibody responses to lipopolysaccharide from endodontopathic black-pigmented bacteria in patients with multilesional periapical periodontitis. *J Endod* 25, 795-799.
- 38) Chen LL, Yan J (2001) *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide activated bone resorption of osteoclasts by inducing IL-1, TNF, and PGE. *Acta Pharmacol Sin* 22, 614-618.



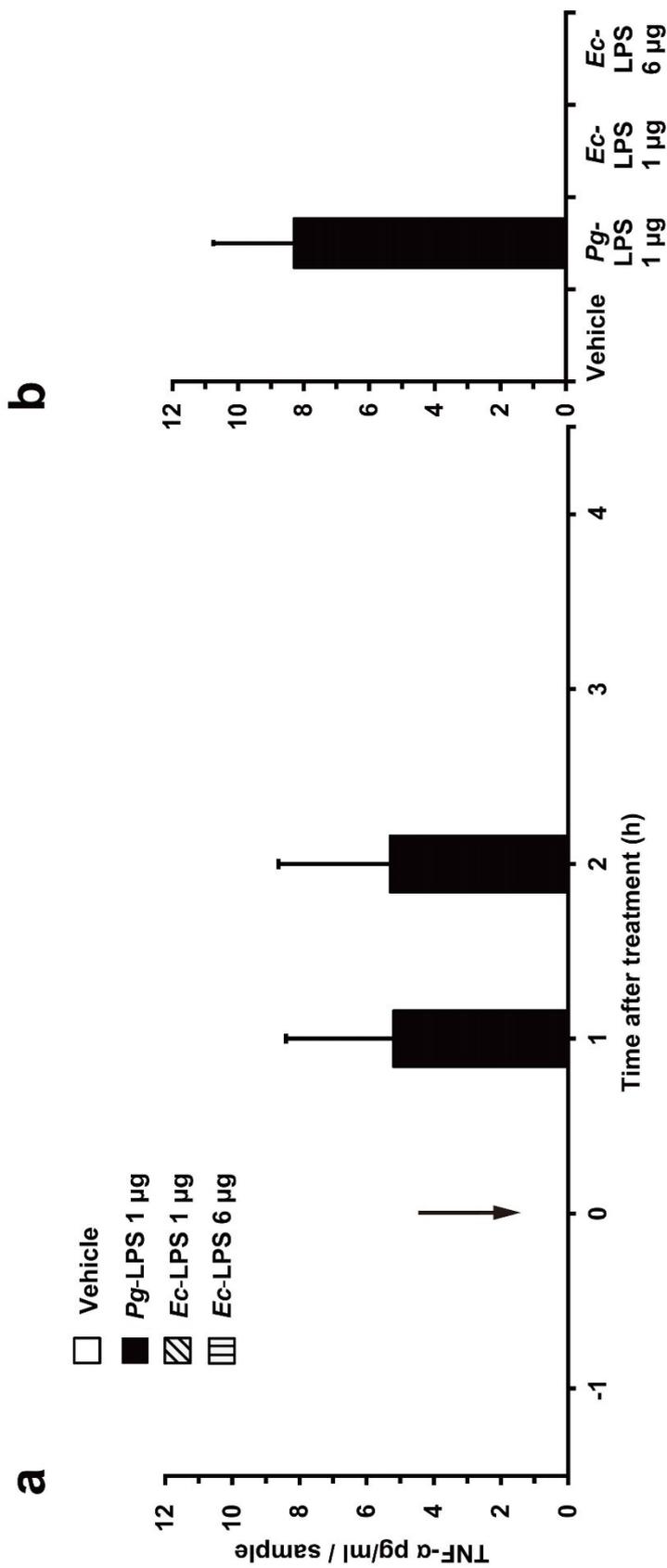
第 1 図 *In vivo* 微小透析法の概要

a: 微小透析実験装置

b: 微小透析プローブ



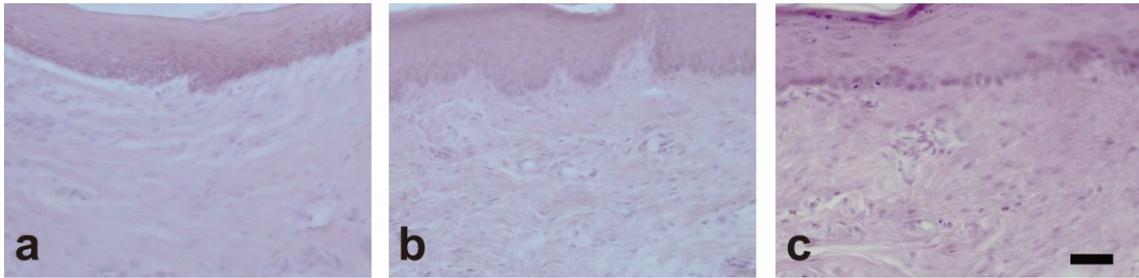
第2図 *Pg*-LPS または *Ec*-LPS の歯肉への接種が同部位の IL-6 に及ぼす影響  
 LPS 接種前 2 回 (-1, 0 の時点) の平均を 100% とし, それに対する各時点の IL-6 測定値を百分率で示した。データは平均値と標準誤差 (S.E.M.) で示した。矢印は LPS 接種を示す。  
 two-way ANOVA, treatment:  $F_{(3, 54)} = 0.3$ ,  $P = 0.8$



第3図 *Pg*-LPS または *Ec*-LPS の菌肉への接種が同部位の TNF- $\alpha$  に及ぼす影響

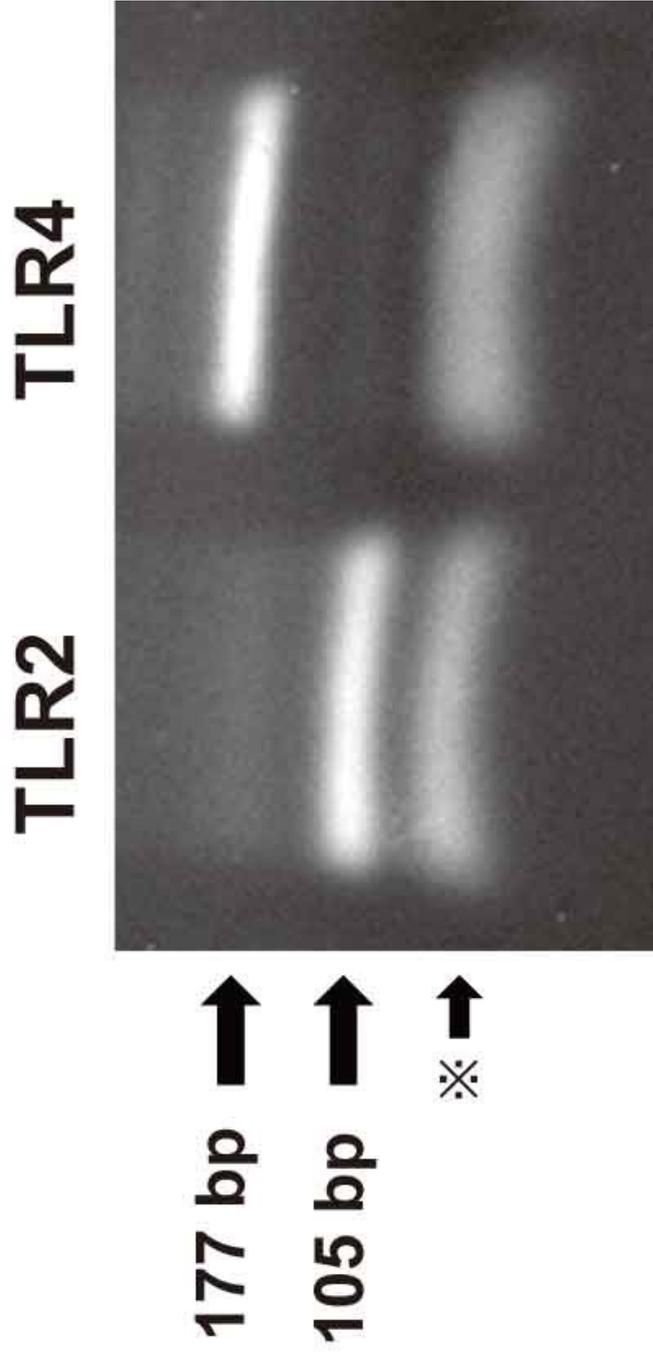
a: *Pg*-LPS の菌肉への接種による TNF- $\alpha$  の一過性の増加 ( $n = 5$ )。データは平均値と標準誤差 (S.E.M.) で示した。TNF- $\alpha$  は、基礎値が ELISA の検出限界以下だったため、菌肉からの透析液中の絶対量で示した (pg/ml)。矢印は LPS 接種を示す。two-way ANOVA, treatment:  $F_{(3,54)} = 6.2, P < 0.05$

b: *Pg*-LPS の菌肉への接種による TNF- $\alpha$  の最大増加データは平均値と標準誤差 (S.E.M.) で示した。これらの最大増加は *Pg*-LPS 接種後 1 から 2 時間後の時点に認められた ( $n = 5$ )。

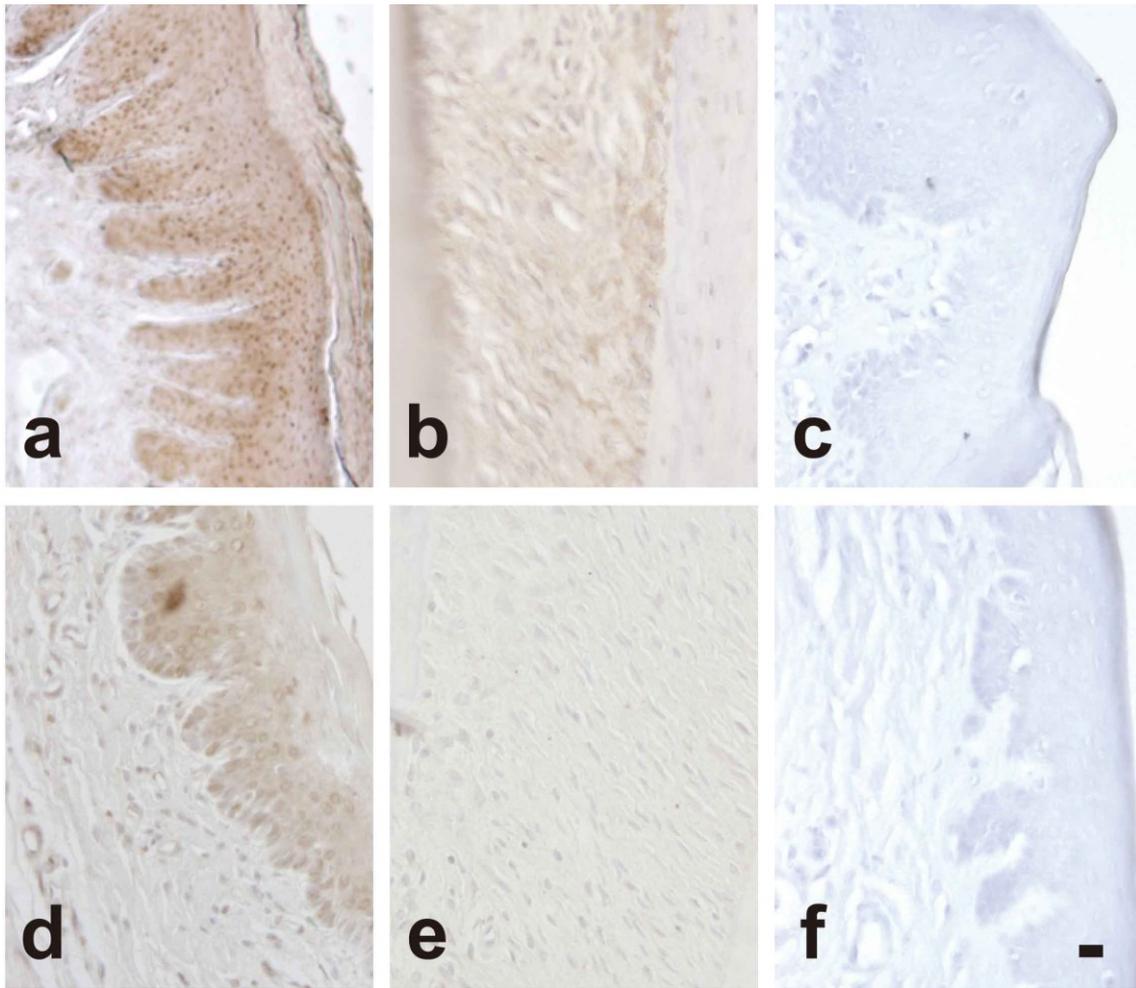


第 4 図 上顎切歯部歯肉の *Pg*-LPS および *Ec*-LPS 接種後の HE 染色

*Pg*-LPS (a) と *Ec*-LPS (b) いずれも 1  $\mu$ g 接種 2 時間後の像で, 炎症性細胞浸潤は認められなかった。c は LPS 非接種のコントロール像である。すべて同倍率で, 図中の bar は 100  $\mu$ m。



第5図 歯肉におけるTLR2およびTLR4のmRNA発現  
 歯肉組織より抽出したtotal RNAを用いてcDNAを作製した。TLR2およびTLR4特異的プライマーを用いてRT-PCRを行った。※ primer dimer



第 6 図 上顎切歯部歯周組織における TLR2 と TLR4 の免疫組織化学  
 抗 TLR2 抗体 (a, b) と抗 TLR4 抗体 (d, e) による免疫染色像で,  
 hematoxylin による核染色を施している。それぞれ c と f は抗体との反応を省  
 略したコントロール染色像である。すべて同倍率で f 中の bar は 100  $\mu\text{m}$ 。  
 a, d: 粘膜上皮層, b, e: 歯根膜