

Porphyromonas gingivalis 由来のリポ多糖の作用の
生化学的および行動学的特徴

日本大学大学院松戸歯学研究科

齊 藤 幸 治

(指導：三枝 禎教授)

概 要

Porphyromonas gingivalis (*Pg*) は、歯周疾患の発症へ関与すると考えられているグラム陰性桿菌のひとつである。グラム陰性菌の細胞壁の構成要素のリポ多糖 (Lipopolysaccharide: LPS) のうち、*Pg* 由来の *Pg*-LPS は、歯周疾患の進行において重要な役割を果たすことが示唆されている。

歯周疾患の全身への影響には、この疾患に関わる微生物または微生物由来の生理活性物質の血流を介した移行に関わることが考えられる。これまで全身麻酔下のラットを用いた *in vivo* の研究から、*Pg*-LPS は歯肉に局所投与すると同部位の細胞外液中の tumor necrosis factor (TNF) 量を一過性に増大させることが示されている。しかし、歯肉へ局所投与された *Pg*-LPS が血中の TNF- α 量に及ぼす影響については明らかでなかった。また、マウスの行動実験から、代表的なグラム陰性桿菌の *Escherichia coli* (*Ec*) 由来の LPS である *Ec*-LPS の全身投与は、うつ様行動のモデルのひとつとして知られる強制水泳試験 (forced swimming test: FST) において水中で浮いたままとなる不動を延長させることは報告されていたものの、*Pg*-LPS の全身投与が FST の不動を促進するか否かについては明らかではなかった。

そこで本研究の第 1 章では、urethane 麻酔下のラットから回収した血液を試料とし、*Pg*-LPS の歯肉への局所投与が試料中の TNF- α 量に及ぼす影響について生化学的に検討した。また第 2 章では、FST におけるマウスの不動時間へ *Pg*-LPS の全身投与が及ぼす影響について行動学的に検討した。いずれの実験も *Pg*-LPS の作用は *Ec*-LPS と比較して検討した。

第 1 章では、実験時の体重が 300~350 g の Sprague-Dawley 系雄性ラットを用いた。Urethane (1.5 g/kg) の腹腔内投与による全身麻酔を施した後、実験 1 とし

て上顎右側切歯に固定した歯肉実質への薬物注入用微小ニードルを介して、マイクロシリンジにより *Pg*-LPS (1 µg/1.0 µl) または *Ec*-LPS (1 µg/1.0 µl) を 30 秒かけて局所投与した。対照群には 1.0 µl の溶媒の滅菌精製水を同様に投与した。さらに実験 2 として歯肉に投与したのと同じ 1 µg の *Pg*-LPS または *Ec*-LPS の左外頸静脈に留置したカテーテルを介した投与実験のほか、比較のため高用量 (5 mg/kg) の *Ec*-LPS の投与実験も行った。これらの薬液と対照群に投与した溶媒 (saline) の投与量は体重 100 g あたり 100 µl とした。実験 1, 2 ともあらかじめ左外頸静脈に挿入したカテーテルを介して血液を試料として回収し、実験 1 では ELISA 法、実験 2 では蛍光ビーズ法を用いて TNF-alpha と interleukin (IL) -6 の定量に取り組んだ。

実験 1 の結果、溶媒または *Ec*-LPS (1 µg) の歯肉への投与では、試料中の TNF-alpha 量は検出限界以下であったが、*Pg*-LPS (1 µg) の歯肉内への投与で増加した。溶媒、*Pg*-LPS または *Ec*-LPS (1 µg) の投与では試料中の IL-6 量は有意な影響は受けなかった。実験 2 の結果、溶媒、*Pg*-LPS または *Ec*-LPS (1 µg) の静脈内投与では、試料中の TNF-alpha 量には有意な変化が認められなかったが、高用量の *Ec*-LPS (5 mg/kg) の静脈内投与で TNF-alpha 量は著しく増加した。一方、歯肉内へ投与した用量の *Pg*-LPS または *Ec*-LPS (1 µg) の静脈内投与は試料中の TNF-alpha 量に殆ど影響は及ぼさなかった。また試料中の IL-6 量は、溶媒または *Pg*-LPS (1 µg) の静脈内投与後には殆ど変化がなく、*Ec*-LPS (1 µg) の静脈内投与では増加する傾向が見られた一方で、高用量の *Ec*-LPS (5 mg/kg) の静脈内投与により顕著に増加した。以上の第 1 章の研究から、歯肉内に投与された *Pg*-LPS が血中 TNF-alpha 量を増加させることが *in vivo* の条件下で示された。また、この *Pg*-LPS が歯肉組織で LPS を認識する Toll-like receptor (TLR) 4 への結合を介し

て血中 TNF-alpha 量を増加させることが考えられた。この TNF-alpha の増加は、TNF-alpha の歯肉組織から血行への移行を介して起きたことが推察された。

第 2 章では、実験時の体重が約 20 g の ddY 系雄性マウスを用いた。FST は、マウスを水道水を注いだガラス製の円筒型水槽（直径 12 cm，高さ 27 cm）に静かに入れ行い、360 秒間の測定期間中に水中での移動を止めて浮いたままになった時間をストップウォッチで測定した。薬液または溶媒は腹腔投与し、体重当たりの投与量は 0.1 ml/10 g とした。はじめに実験条件の確認のため、抗うつ薬の desipramine または paroxetine の投与実験を行った。FST は抗うつ薬投与の 30 分後、*Ec*-または *Pg*-LPS 投与の 4 時間後にそれぞれ行った。対照には desipramine と LPS の溶媒の saline または paroxetine の溶媒の 10% DMSO をわずかに含む saline を投与した。その結果、マウスの不動時間は desipramine (40 mg/kg) により有意に減少したが、paroxetine (5 mg/kg) の影響はほとんどなかった。この不動時間は *Ec*-LPS の (100, 500, 840 µg/kg) による顕著な影響も受けなかった。また *Pg*-LPS (100, 500 µg/kg) で不動時間はやや減少する傾向だったが、この効果は統計学的には有意ではなかった。以上の第 2 章の研究から、本研究でマウスを用いて行った FST の不動時間は、desipramine により減少するが、paroxetine の影響は受けないことが示された。この FST の不動時間は、*Ec*-LPS だけでなく *Pg*-LPS の投与の影響もほとんど受けないことが示された。これらのことからマウスの移所行動を抑制することが知られている *Ec*-LPS による TLR4 の選択的な活性化は、FST の不動の発現には目立った役割を果たさないことが推察された。また、脳内の炎症性サイトカイン産生の促進はうつ様症状を誘発することが動物実験から示されているが、本研究のマウスに行った *Ec*-または *Pg*-LPS 処置は FST の不動を促進する炎症性サイトカインの産生を誘発し難いことが考えられた。

以上の第 1 章と第 2 章の実験動物を用いた生化学的および行動学的研究から *Pg*-LPS は、全身投与ではなく歯肉への局所投与により血中の TNF- α 量を増大させることと、全身投与ではうつ様の行動に対しては目立った影響を及ぼさないことが示された。歯周疾患の全身への影響へ関わると考えられる血中 TNF- α 量の増加が *Pg*-LPS の静脈投与ではなく歯肉への投与で誘発されることが示された。

第1章

Urethane 全身麻酔下のラットを用いた *in vivo* の実験で示された *Porphyromonas gingivalis* 由来の LPS の歯肉内への投与が誘発した血中 TNF-alpha 量の増加

緒言

Porphyromonas gingivalis (*Pg*) は、歯周疾患の発症に関与すると考えられているグラム陰性桿菌のひとつである。グラム陰性菌の細胞壁の構成要素の LPS で *Pg* 由来の *Pg*-LPS は、歯周疾患の進行において重要な役割を果たすことが示唆されている。

In vitro の研究で *Pg*-LPS は、代表的なグラム陰性桿菌の *Escherichia coli* 由来の LPS である *Ec*-LPS とは異なる効果を誘発することが示されている。例えば、歯肉線維芽細胞[1]および歯槽膜細胞[2]の interleukin (IL) -6 発現の増加は、*Pg*-LPS による処置では *Ec*-LPS の場合に比べて低下する。さらに *Pg*-LPS は歯髄幹細胞の IL-6 および TNF-alpha 量には目立った影響を及ぼさないのに対して、*Ec*-LPS はこれらのサイトカインを強く増加させる[3]。加えて *Pg*-LPS は単球由来の樹状細胞のサイトカイン産生に有意な変化を起こさないが、*Ec*-LPS は IL-6 および IL-10 の産生を増加させる[4]。

上記の通りサイトカインに及ぼす影響には違いが認められるものの、*Pg*-LPS と *Ec*-LPS がサイトカイン産生に対して異なる効果を発揮するメカニズムの詳細は不明である。*Pg*-LPS と *Ec*-LPS と相互作用する受容体の違いがこれらの相違に関与する可能性がある。TLRs は、病原体に関連する分子と結合し、免疫および宿主防御を活性化するパターン認識部位だが[5]、このサブタイプのひとつである TLR4 サブタイプを LPS は活性化する。TLR4 は細胞膜上に分布しており、サ

イトカインの合成および分泌を含む様々な過程に関わる。培養単球細胞を用いた研究では、*Ec*-LPS が TLR4 の活性化を介して IL-6 および TNF-alpha 量を増加させることが示唆されている。これとは逆に、*Pg*-LPS の IL-6 および TNF-alpha 量に対する影響は、TLR4 または TLR2 として知られる別のサブタイプのいずれかまたはこれら両方を介していることが報告されている[6]。さらに、*Pg*-LPS と *Ec*-LPS の異なる効果の誘発には、これらの LPS の TLR4 を活性化する能力の違いが関連している可能性もあり、先行研究からは *Ec*-LPS が TLR4 を強く刺激する一方で、*Pg*-LPS はそれを弱く刺激するか[7-10]、遮断することが示されている[11-14]。

In vivo の研究から、TNF-alpha に対する *Pg*-LPS と *Ec*-LPS の効果が異なることが特にラットの歯肉組織において示されている[15]。*Pg* および *Pg*-LPS は脳内の神経活動の変化と関連すると考えられており、例えばアルツハイマー病との関連を探る研究が進められている[16]。さらに *Pg* および *Pg*-LPS が動脈硬化に関与する可能性のある心血管系の細胞に強く影響を及ぼすことは、これらの生理的な影響が広範囲に及ぶ可能性を示唆している[17]。*Pg* および *Pg*-LPS の血流を介した移行は、歯周組織にとどまらずにさまざまな細胞に影響を与える可能性がある。これらのことから本研究では urethane による全身麻酔を施したラットを用い、*Pg*-LPS の歯肉内への投与が血中の TNF-alpha および IL-6 量に及ぼす影響について検討を行った。また、*Ec*-LPS の歯肉内への投与のこれらの血中サイトカイン量への影響についても検討を加えた。*Pg*-LPS は、歯肉への投与の際に想定される同部位の TLR への作用のみならず、血流へ移行して血中の TNF-alpha 量に影響する可能性も考えられる。この点について検討するため、歯肉内に投与したのと同じ量 (1 µg) の *Pg*-LPS の静脈内投与実験も実施した。比較の目的で、*Pg*-LPS

の歯肉内投与に使用される低用量だけでなく、より高い用量 (5 mg/kg) の *Ec*-LPS
の静脈内投与も行った。

材料および方法

動物

実験時の体重が 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 時間明暗サイクルに設定した飼育室で行い, 飼育期間中ラット・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。

実験は日本大学松戸歯学部動物実験委員会の承認の下, 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。1 群の使用動物数は 5~8 匹とした。

手術

ラットに urethane (Sigma-Aldrich; 1.5 g/kg) の腹腔内投与による全身麻酔を施した後, サーモスタットを備えたヒートパッドを用いて体温を 36°C に維持した。麻酔深度は, 角膜反射の有無と後肢への侵害刺激からの回避行動の観察に基づいて評価した。

歯肉内または静脈内への LPS の投与

市販の *Ec*-LPS (O55:B5; Sigma-Aldrich) および *Pg*-LPS (LPS-PG Standard または Ultrapure; InvivoGen) を投与した。*Ec*-LPS の株は先行研究に基づき選択した [18, 19]。これらの LPS は saline に溶解した後, 投与まで -20°C で保存した。この溶液は作成から 2 か月以内に使用した。

実験 1 の歯肉内への投与実験では, *Pg*-LPS (LPS-PG Standard) または *Ec*-LPS を滅菌精製水に溶解し, マイクロシリンジ (Hamilton) を使用して 30 秒かけて

1.0 μl を徒手で注入した。マイクロシリンジは、投与した液体の逆流を防ぐために投与終了から 30 秒後に取り外した。注入量の 1 μl は、Dumitescu ら[20]および先行の報告[15]に従って LPS の拡散を最小限に抑えることを目的として設定した。*Pg*-LPS (1 μg) および *Ec*-LPS (1 μg) の用量は、先行研究に基づいて選択した[15]。対照群には、歯肉内に 1.0 μl の溶媒（上述の精製水）を注入した。

実験 2 の静脈内投与では、1 μg の *Pg*-LPS (LPS-PG Ultrapure) または *Ec*-LPS, 溶媒 (saline) は、左外頸静脈に徒手で注射器を用いて投与した。投与量は体重 100g あたり 100 μl とした。実験 2 では、5 mg/kg の *Ec*-LPS の静脈内投与も行った。これは、*Ec*-LPS は代表的なグラム陰性菌の *Ec* 由来でその性質が広く知られており、これまでの報告で 5 mg/kg の *Ec*-LPS の静脈内投与はラットを死亡させないことが示されているためである[21]。

対照群には、溶媒 (saline: 体重 100 g あたり 100 μl) のみを静脈内へ挿入したカテーテルを介して投与した。

実験 1. *Ec*-または *Pg*-LPS の歯肉内への投与がラットの血液中の IL-6 および TNF-alpha 量に及ぼす影響

薬物注入用微小ニードルを備えたプローブの植立

本研究は、歯肉からの透析液の回収は目的とはしていないものの、実験条件を先行研究と一貫させるために歯肉内に透析プローブを挿入固定し、改良リングル液による灌流を流速 1-10 $\mu\text{l}/\text{min}$ で行った[15]。このため、urethane による全身麻酔を施したラットの上顎右側切歯の歯肉縁を 2% lidocaine で局所麻酔した後（手術参照）、同部位に薬物注入用微小ニードルを備えた市販の I 字型透析プローブ (PEMI-4.5-02, Eicom) を植立した。透析プローブは、長さ 4.5 mm のシャフト

部と先端部の長さ 2 mm で外径 440 μm , カットオフ分子量が 1000 kDa でポリエチレン (PE) 膜から構成され, 薬物注入用微小ニードル (フューズドシリカ製, 外径 150 μm , 内径 75 μm) を取り付けたものを使用した。このニードルの先端の位置は透析膜の中央の表面の真上 (40 μm 未満) とした。プローブの先端を歯肉縁より約 3 mm 下に配置することで, 透析膜を歯肉に 2 mm 挿入した。シャフト部は切歯の切縁に歯科用即時重合レジンで固定した。

全自動システムによる血液試料の回収

左外頸静脈にヘパリン-生理食塩溶液 (10 U/ml) を満たしたカテーテルを挿入し, 自動血液採取システム (DR-VS: Eicom) に接続した。このカテーテルを介して 60 分毎に試料として 1 ml の血液を採取し, 4°C のポリプロピレン製のチューブに回収した。

血中サイトカイン量の測定

IL-6 および TNF- α の血液中の濃度は, ラットの IL-6 および TNF- α 用の市販の ELISA キット (R&D Systems) を用い, 製造元の指示に従って測定した。血液試料は, 室温で 10-15 分凝固させた後, 1,900 \times g, 4°C で 10 分間遠心分離し, その後 ELISA まで 4°C のポリプロピレン製のチューブに保存した。IL-6 および TNF- α の測定に用いたすべての試料は, あらかじめ改良リンゲル液で希釈した。すべての分析は試料回収後 24 時間以内に実施した。

実験 2. *Ec*-または *Pg*-LPS の静脈内投与がラットの血液 IL-6 および TNF- α 量に及ぼす影響

血液採取と LPS の静脈内投与のためのカテーテルの挿入

Urethane 麻酔下のラットの左外頸静脈(手術参照)に血液試料の回収および LPS の投与のためカテーテルを挿入した。実験 2 で使用されるサイトカインの測定を正確に行うため、実験 1 で採用した全自動血液試料回収システムで必要なヘパリンを含む試料が使用できなかった。このため、60 分毎にシリンジを使用して血液 1 ml を徒手で採取し、ポリプロピレン製チューブに回収した。血液試料は室温で 10-15 分凝固させた後に 4°C で 10 分間 $1,900 \times g$ で遠心分離し、上清は分析まで 70°C で保存した。

血中サイトカイン量の測定

血清中の IL-6 および TNF- α の濃度は、磁性ビーズベースのマルチプレックスキットを使用して測定した (MILLIPLEX Mouse Cytokine/Chemokine Magnetic Bead Panel 96-Well Plate Assay, Merck KGaA, Cat.No. MCYTOMAG-70K-03)。試料は、測定の妨げとなる微粒子を除去するために 4°C で 4 分間 $16,000 \times g$ で遠心分離した後、キットメーカー提供の培地を使用して 2 倍希釈した。希釈した試料 25 μ l を 96-well プレートに分注し、抗体でコーティングしたビーズを固定するために 4°C で振盪しながら一晩インキュベートした。液体を取り除き、2 回の洗浄後、各 well に検出ビーズを追加したのち、プレートを室温で 1 時間インキュベートし、streptavidin-phycoerythrin を振盪しながら 30 分間追加した。上清を取り除いた後、各 well に 150 μ l の Drive Fluid を追加し、MAGPIX プレートリーダーおよび xPOINT ソフトウェアを使用してプレートを読み取った (Luminex 100/200™ System, Luminex Corp., Austin, TX, USA)。データは MILLIPLEX Analyst ソフトウェアを使用して解析した。

統計分析

データはすべて平均値と標準誤差 (S.E.M.) で表した。各時点のデータには正規分布していないものがあつたため、Kruskal-Wallis test の後、post hoc test として Steel-Dwass test を必要に応じて行った。有意水準はいずれも $P < 0.05$ とした。

結 果

TNF-alpha および IL-6 の検出限界

本研究では、血液試料中の TNF-alpha および IL-6 の定量のため ELISA 法（実験 1）および免疫ビーズ法（実験 2）による分析を行った。これらの分析における TNF-alpha の検出限界は、実験 1（5.0 pg）および実験 2（1.9 pg）で同程度であった。IL-6 の検出限界についても同様に、実験 1（21.0 pg）および実験 2（30.7 pg）の間で顕著な違いはなかった。血液試料中の基礎的な TNF-alpha 量は実験 1 のすべての個体および実験 2 のほとんどの個体（25 例中 20 例）で検出限界以下であった。これらの本実験条件下でラットの血液から得た試料に含まれる TNF-alpha 量が少なかったことは以前の報告と一致していた[22]。

TNF-alpha 量は実験 1 と 2 のいずれの試料においても低かったのに対し、試料中の IL-6 の量は実験 1 の方が実験 2 よりも大きかった。この差が起きた原因としては、実験 2 では実験 1 で行なった歯肉への薬物注入用微小ニードルを備えた透析プローブの植立を行わなかったことが考えられるものの、詳細な理由を分析するためにさらなる検討が必要である。

実験 1. ラットの血中 TNF-alpha および IL-6 量への *Ec*-LPS または *Pg*-LPS の歯肉内投与の効果の解析

1. 血液試料中の基礎的な TNF-alpha および IL-6 の量

ラットの血液試料中の TNF-alpha は 17 例で検出限界以下であったが、IL-6 は 16 匹のラット全てで検出された。基礎 IL-6 量は 252.6 ± 39.6 pg/ml ($n=16$) であった。

2. *Pg*-LPS の歯肉内投与が TNF-alpha および IL-6 量に及ぼす影響

歯肉内への溶媒の投与を行ったが、血液試料中の TNF-alpha は検出限界以下のままであった。*Pg*-LPS (1 µg) の歯肉内への投与は血液試料中の TNF-alpha の量を増加させた[Fig. 1, 処置 2 時間後, Kruskal-Wallis test, $P < 0.05$]。一方で *Ec*-LPS は有意な変化を起こさなかった。Post hoc Steel-Dwass test によると, *Pg*-LPS (1 µg) と溶媒の効果は有意に異なっていた ($P < 0.01$)。

試料間で量的な差は多少あったが、溶媒または LPS 処置前に IL-6 を血液試料から検出することができた (Fig. 2)。溶媒の歯肉内投与は 2 時間にわたり血液試料中の基礎的な IL-6 量を変化させなかった (Fig. 2 : n=5)。また, *Pg*-LPS および *Ec*-LPS (1 µg) も血液中の IL-6 量に有意な影響は及ぼさなかった (Fig. 2 : *Pg*-LPS : n=5; *Ec*-LPS : n=7)。

実験 2. ラットの血中 TNF-alpha および IL-6 量への *Ec*-LPS または *Pg*-LPS の静脈内投与の影響

1. 血液試料中の基礎的な TNF-alpha および IL-6 の量

基礎的な TNF-alpha 量は 2.3 ± 1.2 pg/ml (n = 25) であり, 基礎的な IL-6 量は 68.4 ± 49.2 pg/ml (n = 25) であった。ラットの血液試料のうちわずか数サンプルには検出可能な量の TNF-alpha および IL-6 が含まれていた。具体的には, TNF-alpha は 25 匹中 4 匹, IL-6 は 25 匹中 5 匹で検出可能であった。

2. 血液試料中の TNF-alpha および IL-6 へ高用量の *Ec*-LPS の静脈内投与および *Ec*-LPS または *Pg*-LPS の歯肉内投与が及ぼす影響

溶媒の静脈内投与後，血液試料中の TNF-alpha は検出限界以下であった。高用量の *Ec*-LPS (5 mg/kg) の静脈内投与は TNF-alpha 量を増加させた[Fig. 3, 処置後 1 および 2 時間, Kruskal-Wallis test, $p < 0.01$]。Post hoc Steel-Dwass test によると，*Ec*-LPS (5 mg/kg) と溶媒の効果は有意に異なった (処置後 1 および 2 時間, $p < 0.01$)。一方，歯肉内投与に用いた用量の *Pg*-LPS または *Ec*-LPS (1 μ g) の投与は，血液中の TNF-alpha 量に有意な影響を及ぼさなかった (*Pg*-LPS : $n = 6$; *Ec*-LPS : $n = 8$)。また，溶媒の静脈内投与後，血液試料中の IL-6 量に有意な変化は認められなかったのに対し，高用量の *Ec*-LPS (5 mg/kg) の静脈内投与は IL-6 量を増加させた[Fig. 4, 投与後 1 および 2 時間, Kruskal-Wallis test, $p < 0.01$]。Post hoc Steel-Dwass test によると，*Ec*-LPS (5 mg/kg) と溶媒の効果は有意に異なった (処置後 1 および 2 時間, $p < 0.01$)。歯肉内投与に用いた用量の *Pg*-LPS または *Ec*-LPS (1 μ g) は血液中の IL-6 量に有意な影響は及ぼさなかった (*Pg*-LPS : $n = 6$; *Ec*-LPS : $n = 8$)。

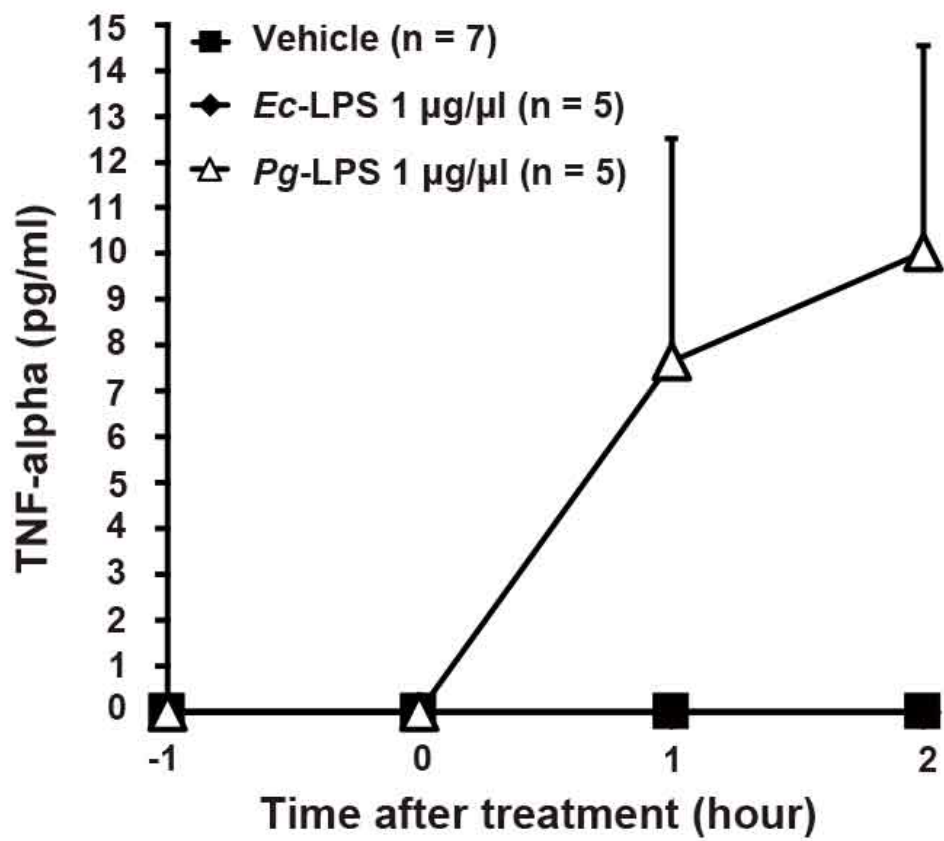


Fig. 1

Effects of intra-gingival injection of *Pg*-LPS or *Ec*-LPS on the blood levels of TNF-alpha. The data are expressed as the amount of TNF-alpha in 1-hour sample (ordinate) after intra-gingival injection of LPS (abscissa). Vertical bars indicate S.E.M.

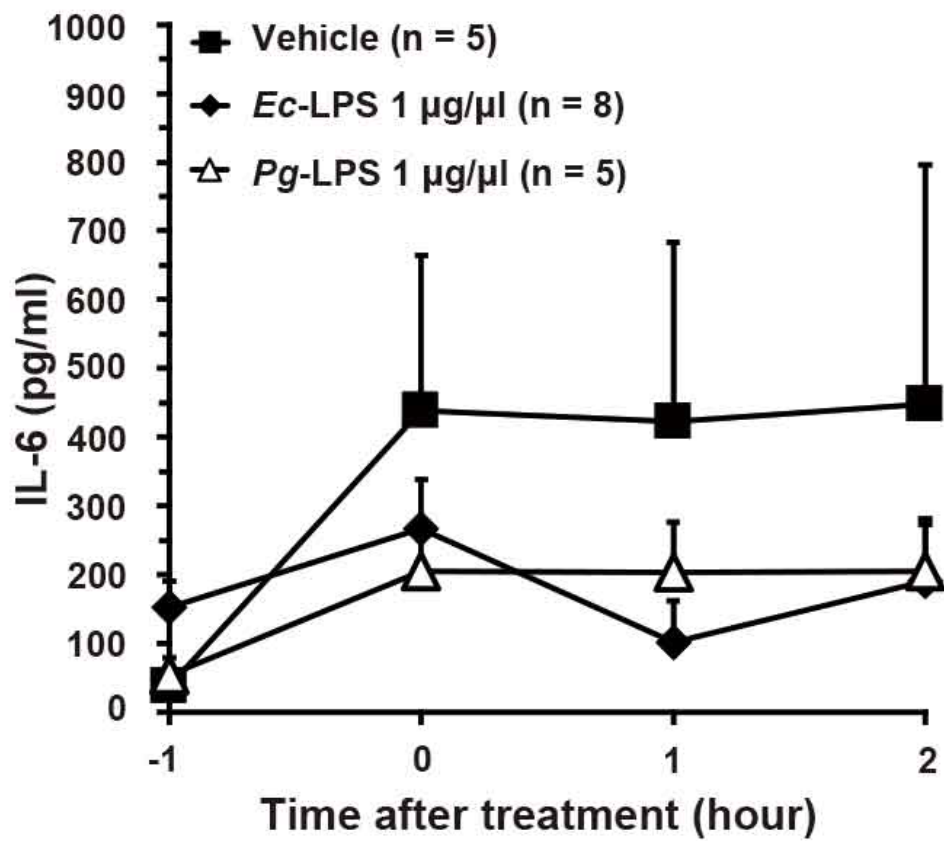


Fig. 2

Effects of intra-gingival injection of *Pg*-LPS or *Ec*-LPS on the blood levels of IL-6. The data are expressed as the amount of IL-6 in 1-hour-sample (ordinate) after intra-gingival injection of LPS (abscissa). Vertical bars indicate S.E.M.

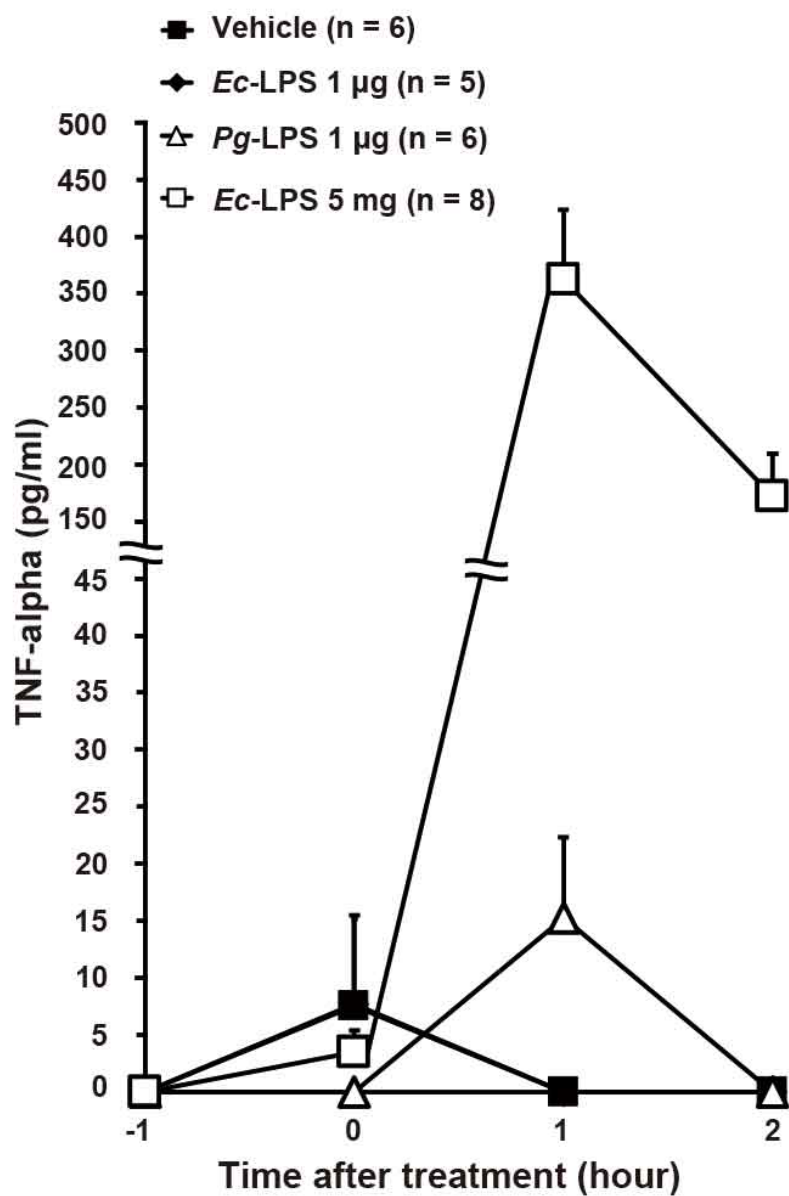


Fig. 3

Effects of intravenous administration of *Pg*-LPS or *Ec*-LPS on the blood levels of TNF-alpha. The data are expressed as the amount of TNF-alpha in 1-hour-sample (ordinate) after intravenous administration of LPS (abscissa). Vertical bars indicate S.E.M.

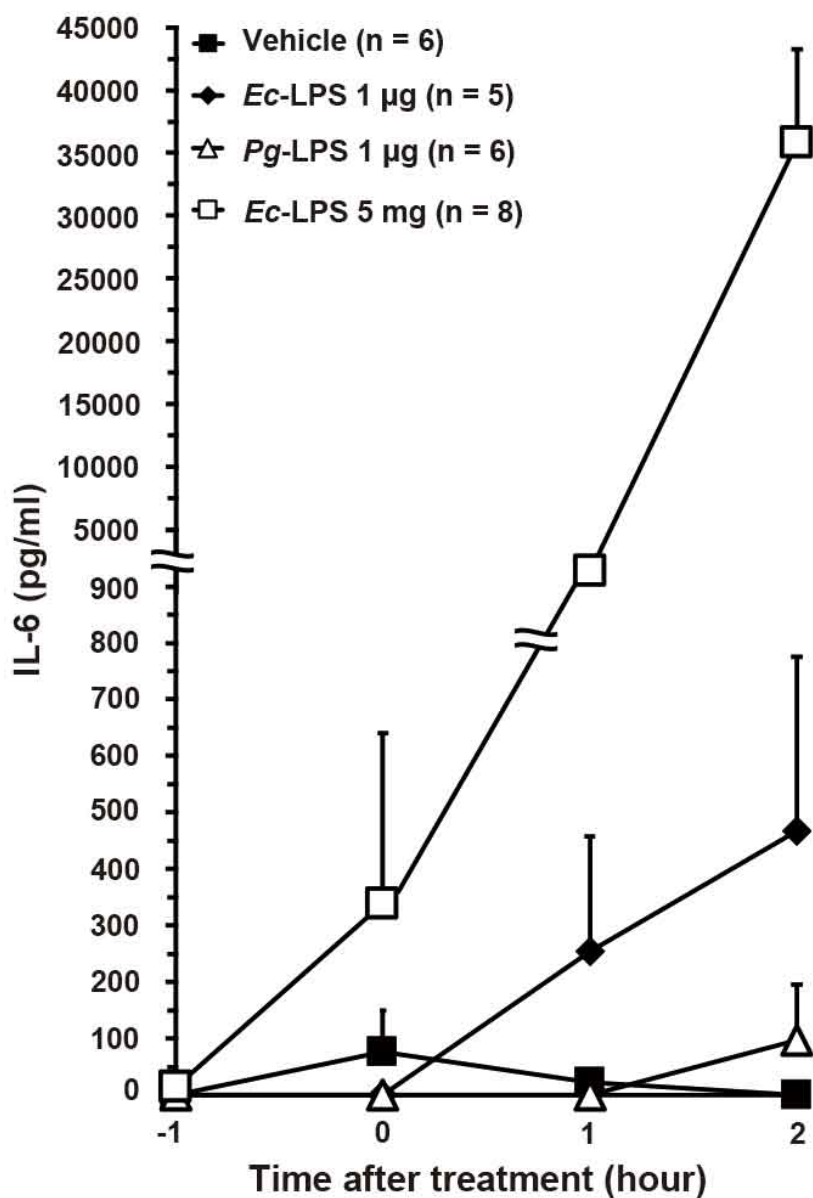


Fig. 4

Effects of intravenous administration of *Pg*-LPS or *Ec*-LPS on the blood levels of IL-6.

The data are expressed as the amount of IL-6 in 1-hour sample (ordinate) after intravenous administration of LPS (abscissa). Vertical bars indicate S.E.M.

考 察

本研究から *Pg*-LPS は *Ec*-LPS とは異なり歯肉内への投与により血中の TNF- α を増加させることが示された。これらの結果は、*Pg*-LPS は *Ec*-LPS と異なり歯肉への投与により、投与部位の細胞外液中の TNF- α 量の一過性の増加を誘発するという本研究と同じ実験条件で行われた以前の報告と一致していた[15]。本研究は、*Pg*-LPS および *Ec*-LPS の歯肉内への投与は投与部位の細胞外液と血流から採取された試料の両方で TNF- α に対して異なる影響を誘発することを示すものである。

Pg-LPS の歯肉内投与によって、*Pg*-LPS の投与部位から歯肉組織の血流への移行を介して血中 TNF- α 量が増加する可能性が考えられる。実際に歯肉内への投与量と同じ投与量である 1 μ g の *Pg*-LPS を静脈内に投与すると血中 TNF- α 量は増加する傾向が見られたが、これらの変化は統計学的に有意ではなかった。したがって、*Pg*-LPS の静脈内に投与した後に観察された血中 TNF- α 量の増加は、歯肉内に投与された *Pg*-LPS の血流への移行の面からは説明しがたい。むしろ歯肉内に投与された *Pg*-LPS によって誘発された血中 TNF- α 量の増加の発現は、*Pg*-LPS の歯肉組織に発現する TLR のサブタイプへの結合か、歯肉組織から血流への TNF- α の移行を介している可能性が考えられる。一方、本研究で採用した生化学実験に広く使用されている市販の *Pg*-LPS は、純度が実験 1 と 2 で違う可能性があり、実験 2 で使用したものは 1 とは異なりリポタンパクが含まれていることが考えられる[23]。このため上記の投与経路だけでなく、使用した *Pg*-LPS の純度が実験 1 と 2 の TNF- α への影響の違いに関与したことも考慮せざるを得ない。いずれにせよ、これらの説明の妥当性を評価するためにさらなる研究が必要である。

Ec-LPS (1 µg) は、歯肉内のみならず静脈内投与においても、血中 IL-6 および TNF-alpha 量を増加させる傾向を示したものの、いずれの変化も統計学的には有意ではなかった。これらの結果は、*Ec*-LPS (1 µg) の歯肉内への投与が投与部位の細胞外液中の IL-6 および TNF-alpha の濃度を変化させなかったとする以前の報告[15]と一致していた。これに対して高用量の *Ec*-LPS (5 mg/kg) の静脈内投与の結果、血中の IL-6 および TNF-alpha の量は有意に増加した。したがって、*Ec*-LPS (1 µg) の歯肉内および静脈内投与が IL-6 および TNF-alpha の血中濃度を変化させなかった理由のひとつとしてこれらのサイトカインの細胞外への分泌を刺激するために必要な LPS の投与量が不足していたことが考えられた。もうひとつの要因としては、パターン認識受容体のひとつとして知られている TLR4 が *Ec*-LPS (1 µg) の投与前に歯肉および血流中で内因性アゴニストによって飽和していたことが考えられた。これらのメカニズムが適切であるか否かについては、さらなる検討が必要である。

本研究は *in vivo* の実験条件下では、歯肉内への *Pg*-LPS の投与がラットの血中の IL-6 量は変化させずに TNF-alpha 量を増加させることを示している。この歯肉内への *Pg*-LPS の投与が、投与部位の細胞外液だけでなくラットの血液由来の試料で TNF-alpha を増加させるメカニズムは明らかではない。LPS は TLR4 と結合することが知られているが、TLR4 を活性化しうる *Ec*-LPS の処置は、本研究では IL-6 または TNF-alpha の両方に影響を及ぼさなかった。In vitro の研究からは、*Pg*-LPS は TLR4 と TLR2 の両方に作用する可能性が示唆されている[6]。したがって、歯肉に存在する TLR4 よりも TLR2 を介して歯肉内への *Pg*-LPS の投与が血中の TNF-alpha 量に影響を及ぼしたかについて今後検討する余地がある。

本研究は、*Pg*-LPS の全身性の炎症または口腔領域から遠隔の臓器への影響に関連して、重要な点を 2 つ示している可能性がある。すなわち第一に、歯肉内へ

の投与後に投与部位の歯肉の細胞外液中の TNF-alpha 量を増加させた用量 (1 µg) の *Pg*-LPS は、静脈内投与では血中の TNF-alpha 量には影響を及ぼさなかったことから、*Pg*-LPS が静脈内ではなく歯肉に投与された場合に歯肉および血流中で炎症促進性のサイトカインの TNF-alpha 量を増加させる可能性があることを本研究は示唆している。第二に、*Pg*-LPS の歯肉内への投与は、もう一つの炎症促進性のサイトカインである IL-6 の歯肉の細胞外液または血流中での量には影響を及ぼさなかった。これらのことは、*Pg* が歯周疾患の進展と口腔領域から離れた臓器にどのように影響を及ぼすかについて示していることが考えられる。即ち、*Pg* の構成成分である *Pg*-LPS は、血流中の分子ではなく歯肉内の分子との相互作用により、血中の IL-6 ではなく TNF-alpha の量の増加を誘発する可能性がある。

本研究の実験群には試料数が 5 のものが含まれている。これはノンパラメトリックな手法を用いた統計分析の結果を確かなものにする上で妨げとなる可能性がある。したがって本研究は、試料数が 6 以上となるよう実験を繰り返す余地があろう。さらに本研究結果は、少なくとも以下に示す 3 つの制限を考慮して解釈すべきである。第一に、本結果は、薬物投与に用いる微小注射針を据え付けた微小透析プローブの植立、頸静脈へのカテーテルの挿入のいずれかまたは両方を行った urethane 麻酔下のラットを使用して得られた点である。したがって、血液試料中の基礎的なサイトカイン量と LPS 処置に対する変化は、全身麻酔と手術の両方から影響を受けている。以前の研究 [15] に基づき、本研究で LPS はラットの上顎切歯の歯肉に局所的に投与した。LPS の局所投与が誘発した細胞外サイトカインへの影響は、投与部位の血流に依存する可能性がある。したがって第二に、LPS が投与された歯肉の血管の分布状態が LPS の血液試料中のサイトカイン量に対する効果に影響を及ぼす可能性がある。第三に、本結果は限られた用量の LPS の単回投与実験から得られたものである。ほとんどの歯周疾患に慢性炎症の

過程が関与する可能性を考慮すると, LPS の反復投与を行った実験動物における血液中の IL-6 および TNF-alpha 量の変化についても今後検討する必要がある。

以上のことから本研究は, 歯肉内に投与された *Pg*-LPS が血中 TNF-alpha 量を増加させるという *in vivo* の証拠を提供するものであり, これに対して *Ec*-LPS はこのような効果は示さないことを示している。本研究は, 歯肉内に投与された *Pg*-LPS が歯肉組織にある細胞の TLR サブタイプへの結合を介して血中 TNF-alpha 量を増加させることを示唆している。もしくはこの増加は, TNF-alpha の歯肉組織から血行への移行を介して起きた可能性がある。

第2章

LPS の全身投与により示されたマウスの強制水泳試験における不動の特徴

緒言

FST は、マウスをはじめとする実験動物が測定用水槽で泳ぐのを止めて浮いたままになる不動状態（不動）を観察しその時間（不動時間）を測定する行動薬理学実験である[24]。抗うつ薬の多くはこの不動時間を減少させることが知られている。このため FST は抗うつ薬の候補物質となる化学物質のスクリーニングに広く用いられている[24]。

一方、グラム陰性菌の細胞壁に含まれる内毒素の LPS は、病原体などを認識する TLR と結合する。グラム陰性菌の *Salmonella typhimurium* のほか *Ec* 由来の LPS である *Ec*-LPS の全身投与は、FST における実験動物の不動時間を増加させることが報告されている[25, 26]。第1章に述べた通り、*Pg* は歯周疾患に関連するグラム陰性菌のひとつで、これまでの *in vitro* の研究から *Ec*-LPS と *Pg*-LPS は異なる作用を示すことが報告されている。例えば、歯肉の線維芽細胞[1]と歯根膜細胞[2]における IL-6 の増加させる作用が *Ec*-LPS と比べて *Pg*-LPS は弱いほか、歯髄幹細胞における IL-6 と TNF- α は *Ec*-LPS 処置により増大するのに対して、*Pg*-LPS 処置では目立った変化がない[3]。さらに、樹状細胞由来の単球におけるサイトカイン産生では、*Ec*-LPS は顕著な IL-6 と IL-10 の増加を誘発するが *Pg*-LPS の影響はない[4]。また *in vitro* の条件下で TLR subtype のうち TLR4 を *Ec*-LPS は強く刺激するのに対し、*Pg*-LPS は弱い刺激[9]や遮断[13]と、少なくとも *Ec*-LPS とは作用様式が異なることが示唆されてきた。このことに関して我々が *in vivo* の条件下で行った実験では、新環境の提示がマウスに誘発する移所運動の

増加は*Ec*-LPSの全身投与によりTLR4刺激を介して強く抑制されたのに対して、*Pg*-LPSの全身投与による目立った影響は受けなかった(Saitoら, 投稿中)。これらのことからFSTにおいても*Ec*-LPSと*Pg*-LPSは異なる作用を示す可能性が考えられる。しかしながら,*Pg*-LPSがFSTの不動に及ぼす影響は明らかではない。このため本研究ではマウスを用いてFSTを行い,*Pg*-LPSの全身投与が不動時間を増加させるか否かについて検討した。

はじめに、本研究で採用したFSTの実験条件下で検出したマウスの不動時間が臨床で用いられている代表的な抗うつ薬の全身投与で減少するか確認した。この目的のため本研究では薬理的性質が異なる代表的な抗うつ薬を2種類採用した。即ち、三環系抗うつ薬に分類され脳内monoamineのnoradrenalineのほかserotonin(5-HT)の細胞内への取込みを阻害するdesipramineと、SSRI(選択的5-HT取込み阻害薬)に分類され5-HTの細胞内への取込みを選択的に阻害するparoxetineを腹腔投与した。また,*Pg*-LPSと比較するため*Ec*-LPSの投与実験も行った。

材料および方法

動物

ddY 系雄性マウス（5～6 週齢，体重約 25 g）を用いた。飼育は，恒温恒湿，午前 7 時点灯，12 時間明暗サイクルの飼育室で行い，飼育期間中ラット・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。

実験は日本大学松戸歯学部動物実験委員会の承認の下，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。

薬物処置

FST を行う水槽の傍らに置いたケージに一匹ずつ収容したマウスに対し，薬液または溶媒を体重 10 g あたり 100 μ l 腹腔投与した。すなわち，*Ec*-LPS（O55:B5, Sigma-Aldrich），*Pg*-LPS（LPS-PG Standard; InvivoGen）もしくは，これらの溶媒の saline の投与 240 分後に，desipramine, paroxetine もしくは，desipramine 薬液の溶媒の saline か paroxetine 薬液の溶媒の 10% dimethyl sulfoxide（DMSO）を含む saline を投与した。Desipramine, paroxetine の用量と投与方法は，Sugimoto らの報告[24]を参考にした。LPS の用量と投与方法は，新環境が誘発した移所運動量を指標とした行動実験（オープンフィールド試験）と血液中のサイトカイン量を指標とした生化学実験の実施条件を参考とした（Saito ら，投稿中）。

行動実験

薬液または溶媒の最終投与から 30 分後に FST を行った。マウスは水道水（24°C \pm 1°C）を深さ 21 cm まで注いだ直径 12 cm，高さ 27 cm のガラス製の円筒型水槽に静かに入れ，水中での移動を止めて浮いたままになっている時間（不動時間，

秒) をストップウォッチで測定した。これまでの報告[24,25]に基づき, 行動実験はマウスを水槽に入れてから 360 秒とし, マウスの行動は実験後に詳細な解析が行えるようビデオ録画した。

統計処理

各処置が不動時間に及ぼす影響は, 二群間の平均値の差は Student's *t*-test, 多群間の平均値の差は one-way ANOVA でそれぞれ分析した。有意水準は $p < 0.05$ とした。

結 果

1. Desipramine および paroxetine が不動時間に及ぼす影響

Desipramine 薬液の溶媒として用いた saline を投与したマウスの不動時間は 187 ± 17 秒であった ($n=8$)。この不動時間は, desipramine (40 mg/kg) の腹腔投与により 128 ± 16 秒まで有意に減少した ($n=8; p<0.05$: Fig. 5A)。一方, paroxetine 薬液の溶媒として用いた 10% DMSO を含む saline を投与した対照群のマウスの不動時間は 167 ± 37 秒であった ($n=10$: Fig. 5B)。この不動時間は paroxetine (5 mg/kg) の腹腔投与をおこなっても 177 ± 18 秒であり, 対照群との間に目立った差は認められなかった ($n=10$: Fig. 5B)。

2. *Ec*-または *Pg*-LPS が不動時間に及ぼす影響

Ec-LPS の 100, 500, 840 $\mu\text{g}/\text{kg}$ の腹腔投与を行ったが, これらのマウスと溶媒の saline を投与した対照群のマウスの不動時間との間で比較すると, 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 処置でやや延長する傾向ではあったが全体としては統計学的に有意な差は認められなかった (100 $\mu\text{g}/\text{kg}$, $n=8$; 500 $\mu\text{g}/\text{kg}$, $n=6$; 840 $\mu\text{g}/\text{kg}$, $n=6$; Fig. 6)。また, *Pg*-LPS の 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ($n=8$), 500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ($n=8$) の腹腔投与でマウスの不動時間はやや減少する傾向が認められたものの, 統計学的に有意ではなかった (Fig. 7)。

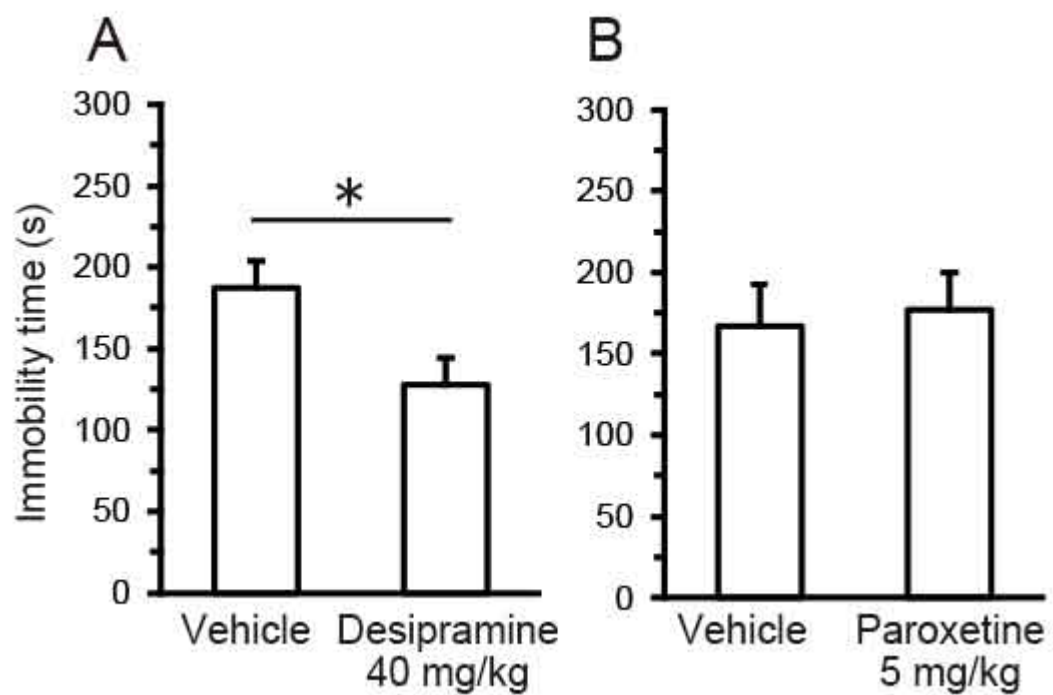


Fig. 5

A: Desipramine の腹腔投与が不動時間に及ぼす影響, B: Paroxetine の腹腔投与が不動時間に及ぼす影響

データは mean \pm S.E.M で示した (* $p < 0.05$)。

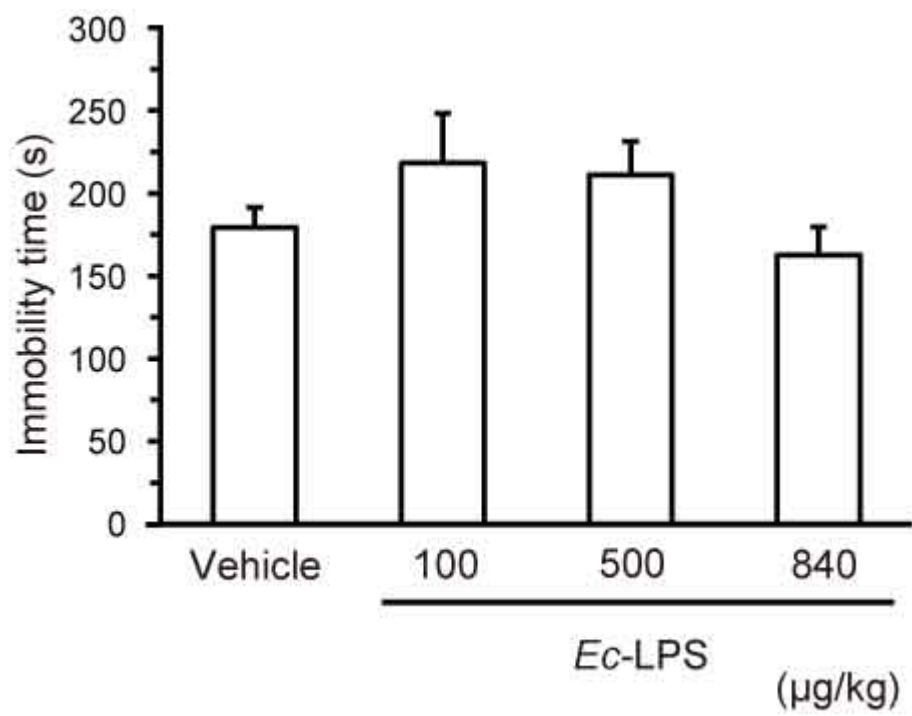


Fig. 6

Ec-LPS の腹腔投与が不動時間に及ぼす影響

データは mean ± S.E.M で示した。

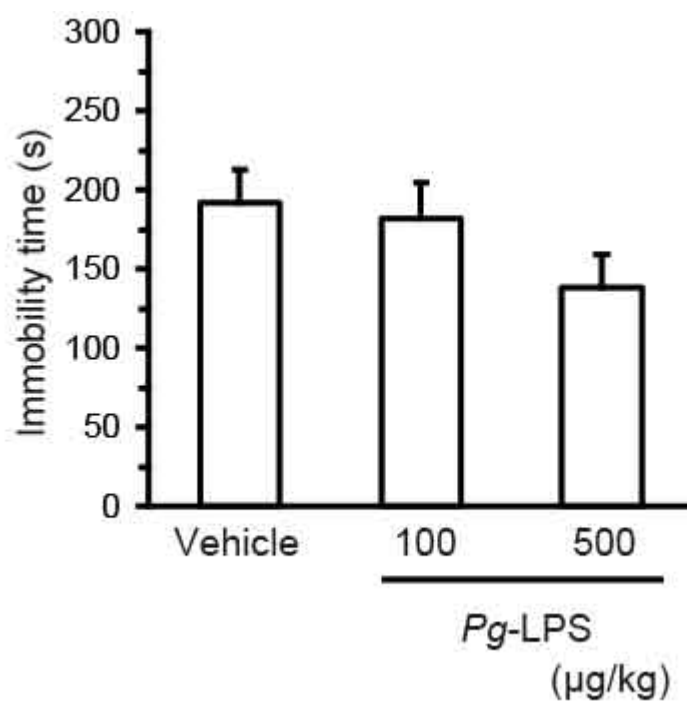


Fig. 7

Pg-LPS の腹腔投与が不動時間に及ぼす影響

データは mean ± S.E.M で示した。

考 察

マウスの FST は、抗うつ効果が期待される薬物のスクリーニングの目的で広く使用されている行動実験のひとつである。この実験でマウスが実験用水槽において泳がずに浮いたままとなった時間である不動時間は、水中からの脱出を諦めた心理状態を反映しているのではないかと考えられている。本研究で採用したマウスの FST の実験条件下で検出した不動時間は、総測定時間の 360 秒のうちおよそ 190 秒であった。この時間は同様の条件で行った他の報告の FST の不動時間とおおむね一致していた[24-25]。この不動時間は、本研究で全身投与した抗うつ薬のうち desipramine により約 130 秒まで減少した。こうした desipramine が示す不動の抑制効果は、本研究と同じ ddY 系マウスを使用して行われた Sugimoto らの研究で認められた結果[24]を支持するものであった。一方、マウスの FST の不動時間は、抗うつ薬のうち本研究でも採用した desipramine のほか fluoxetine の投与で減少するが²⁾、臨床ですでに用いられている選択的な 5-HT 取込み阻害作用を示す抗うつ薬の影響は受けにくいことがラットを用いた FST では示されている[27]。本研究で検出した FST の不動時間も paroxetine の全身投与の影響は受けなかった。マウスの系統間で FST の不動時間は paroxetine の効果に差が認められることが知られており、特に DBA/2 や BALB/c では不動時間が低用量で減少するが、これらの系統に比べると ICR 系と本研究で用いた ddY 系は不動時間の減少に高い用量を要することが示されている。こうしたマウスの系統間に見られる paroxetine の効果の差は、5-HT 受容体 subtype の発現や 5-HT 受容体取込みの違いが関わると考えられている[28]。

LPS が FST の不動時間を増加させるとする過去の報告[25, 26]とは異なり、本実験条件下の不動時間は Pg-LPS のみならず Ec-LPS の全身投与の影響も認めら

れなかった。このようなこれまでの報告との違いが生じた理由の詳細は明らかでない。今後使用する用量の範囲を広げて検討する必要があるものの、少なくとも本研究において採用した *Pg*-および *Ec*-LPS の全身投与は、マウスの移所行動量を指標とした行動実験であるオープンフィールドテストと血中サイトカイン量を指標とした生化学実験で著効を示すことを確認してある (Saito ら, 投稿中)。即ち、本研究と同じ条件によるマウスへの *Ec*-LPS (840 $\mu\text{g}/\text{kg}$) の腹腔投与は新環境の提示が誘発した移所行動量の増大を TLR4 刺激を介して抑制するほか、血中の IL-6, TNF-alpha, IL-10 をいずれも顕著に増大させた。また、この *Ec*-LPS が誘発した IL-10 の増加を本研究で採用した条件による *Pg*-LPS (500 $\mu\text{g}/\text{kg}$) の腹腔投与は抑制する可能性がある。したがってこれらの解析結果からは、本研究の *Pg*-および *Ec*-LPS の処置に採用した用量が行動学的および生化学的に全く無効な量だったとは言い難い。一方で Jain らは、マウスの FST で LPS の全身投与が誘発した不動の発現機構についてこの不動が cyclooxygenase (COX) 阻害薬の投与で抑制されたことから、脳内の炎症性変化がこの不動の誘発に関与すると考察している[25]。また、Sousa らは、FST で不動を起こす LPS 処置の結果、炎症に関わる p38MAP キナーゼおよび p-p65NF- κ B 経路の活性化と COX2 タンパク質の発現増加が脳皮質で起きており、これらの生化学的変化が行動実験でマウスの不動を抑制した薬物処置で打ち消されることを指摘している[26]。さらに脳内の炎症性サイトカイン産生の促進はうつ様症状を誘発することが動物実験から示されている[29]。したがって、本研究の LPS の処置ではこうした炎症性変化を脳内で誘発できなかったことが不動に目立った変化が認められなかった原因のひとつとして考えられる。今後は、LPS 全身投与が炎症に関連する分子の脳内での発現に及ぼす影響について検討を加える必要があろう。

本研究で FST の不動時間が特に *Ec*-LPS の全身投与では目立った影響を受けなかったことから、マウスのオープンフィールドテストの新環境における行動と FST の水槽における行動に対する TLR4 の関与様式が異なることが推察される。即ち *Ec*-LPS の全身投与による TLR4 の活性化は、マウスの新環境における移所行動を抑制できるが、FST の不動の発現には目立った役割を果たさないことが考えられた。興味深いことに実験動物の痛み様行動を指標とした研究から、desipramine を含む抗うつ薬の示す鎮痛様の作用の発現にはこれらの薬物が示す TLR4 遮断作用が関わるとの報告がある[30]。このため、本研究で desipramine が誘発した不動時間の減少についてもこれらの薬物による TLR4 の遮断が関与していた可能性について検討を加える余地がある。

本研究の不動時間は *Pg*-LPS の腹腔投与を行ったところ、やや減少する傾向はあったが、この *Pg*-LPS の効果は統計学的には有意ではなかった。In vitro の研究で *Ec*-LPS は TLR4 を強く刺激するのに対し、*Pg*-LPS は TLR4 を弱く刺激[9]するか遮断[13]することが示されており、in vivo 条件下でもこれらの LPS は異なる作用を示すことが考えられた。これに対して本研究結果は、urethane 麻酔下のラットの歯肉への *Pg*-LPS と *Ec*-LPS の局所投与は同部位の細胞外液中と血中の IL-6 量に対していずれも影響を及ぼさないとするこれらの LPS の作用に目立った違いは認められないという in vivo の研究結果[15]を支持するものであった。

以上の結果から本研究でマウスを用いて行った FST の不動時間は、desipramine の全身投与により減少したが、paroxetine の全身投与の影響は受けないことが示された。この FST の不動時間は、新環境の提示が誘発した移所行動に影響を及ぼさない用量の *Pg*-LPS のみならず、TLR4 刺激を介してこの移所行動を強く抑制する用量の *Ec*-LPS の投与でもほとんど影響が認められないことが示された。

これらのマウスを用いた研究から、新環境における移所行動は抑制できる TLR4 の活性化は、FST の不動の発現には目立った役割を果たさないことが示唆された。

総 括

Pg は、歯周疾患の発症へ関与すると考えられているグラム陰性桿菌のひとつで、*Pg* 由来の LPS は、歯周疾患の進行において重要な役割を果たすことが示唆されている。歯周疾患の全身への影響には、この疾患に関わる微生物または微生物由来の生理活性物質の血流を介した移行に関わることが考えられる。これまで全身麻酔下のラットを用いた *in vivo* の研究から、*Pg*-LPS は歯肉組織に局所投与すると同部位の細胞外液中の TNF- α 量を一過性に増大させることが示されている。しかし、歯肉へ局所投与された *Pg*-LPS が血中の TNF- α 量に及ぼす影響については明らかでなかった。また、マウスの行動実験から、代表的なグラム陰性桿菌の *Ec* 由来の LPS である *Ec*-LPS の全身投与は、うつ様行動のモデルのひとつとして知られる FST において水中で浮いたままとなる不動を延長させるとの報告はあったものの、*Pg*-LPS の全身投与が FST の不動を促進するか否かについては明らかではなかった。

そこで本研究の第 1 章では、urethane 麻酔下のラットから回収した血液を試料とし *Pg*-LPS の歯肉への投与が試料中の TNF- α 量に及ぼす影響について生化学的に検討した。また第 2 章では、FST におけるマウスの不動時間へ *Pg*-LPS の全身投与が及ぼす影響について行動学的に検討した。*Pg*-LPS の作用は、*Ec*-LPS と比較して検討した。

その結果、*Ec*-LPS とは異なり *Pg*-LPS のラットの歯肉への投与は、血液中の TNF- α 量の増大を誘発したが、歯肉に投与した量の *Ec*-LPS と *Pg*-LPS の静脈投与ではいずれも血液中の TNF- α 量への顕著な影響は認められなかった。一方、*Ec*-LPS だけでなく *Pg*-LPS の全身投与もマウスの FST の不動時間には目立った影響を及ぼさなかった。

以上の第 1 章と第 2 章の実験動物を用いた生化学的および行動学的研究から *Pg*-LPS は、全身投与とは異なり歯肉への局所投与により血中の TNF-alpha 量を増大させることと、全身投与ではうつ様行動には目立った影響を及ぼさないことが示された。歯周疾患の全身への影響に関わると考えられる血中 TNF-alpha 量の増加が *Pg*-LPS の静脈投与ではなく歯肉への投与で誘発されることが示された。

引用文献

1. Andrukhov O, Ertlschweiger S, Moritz A, Bantleon HP, Rausch-Fan X: Contrasting impact of *Porphyromonas gingivalis* and *Escherichia coli* lipopolysaccharides on interleukin-6 expression in human gingival fibroblasts. *Acta Odontologica Scandinavica*, 72: 337–345, 2014.
2. Nebel D, Nilsson BO, Arvidsson J, Holm A, Lillqvist J: Contrasting effects of lipopolysaccharides from *Escherichia coli* and *Porphyromonas gingivalis* on IL-6 production in human periodontal ligament cells. *Acta Odontologica Scandinavica*, 71: 892–898, 2013.
3. Lan C, Chen S, Jiang S, Lei H, Cai Z, Huang X: Different inflammatory cytokine expression patterns induced by lipopolysaccharides from *Escherichia coli* or *Porphyromonas gingivalis* in human dental pulp stem cells. *BMC Oral Health*, 22: 121, 2022.
4. Mahanonda R, Champaiboon C, Subbalekha K, Sa-Ard-Iam N, Rattanathammatada W, Thawanaphong S, Rerkyen P, Yoshimura F, Nagano K, Lang NP, Pichyangkul S: Human memory B cells in healthy gingiva, gingivitis, and periodontitis. *The Journal of Immunology*, 197: 715–725, 2016.
5. Fitzgerald KA, Kagan JC: Toll-like receptors and immunity control. *Cell*, 180: 1044–1066, 2020.

6. Zhang D, Chen L, Li S, Gu Z, Yan J: Lipopolysaccharide (LPS) of *Porphyromonas gingivalis* induces IL-1beta, TNF-alpha and IL-6 production by THP-1 cells in a way different from that of *Escherichia coli* LPS. *Innate Immunity*, 14: 99–107, 2008.
7. Tabeta K, Yamazaki K, Akashi S, Miyake K, Kumada H, Umemoto T, Yoshie H: Toll-like receptors confer responsiveness to *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide in human gingival fibroblasts. *Infection and Immunity*, 68: 3731–3735, 2000.
8. Ogawa T, Asai Y, Hashimoto M, Takeuchi O, Kurita T, Yoshikai Y, Miyake K, Akira S: Cell activation by *Porphyromonas gingivalis* lipid A molecule through Toll-like receptor 4- and myeloid differentiation factor 88-dependent signaling pathway. *International Immunology*, 14: 1325–1332, 2002.
9. Putnins EE, Sanaie AR, Wu Q, Firth JD: CD-14 and toll-like receptors 2 and 4 regulate LPS-induced keratinocyte growth factor 1 expression. *Infection and Immunity*, 70: 6541–6548, 2002.
10. Wang PL, Ohura K: *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide signaling in gingival fibroblasts - CD14 and toll-like receptors. *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine*, 13: 132–142, 2002.
11. Darveau RP, Cunningham MD, Bailey T, Seachord C, Ratcliffe K, Bainbridge B, Dietsch M, Page RC, Aruffo A: Ability of bacteria associated with chronic inflammatory

disease to stimulate E-selectin expression and promote neutrophil adhesion. *Infection and Immunity*, 63: 1311–1317, 1995.

12. Darveau RP, Arbabi S, Garcia I, Bainbridge B, Maier RV: *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide is both agonist and antagonist for p38 mitogen-activated protein kinase activation. *Infection and Immunity*, 70: 1867–1873, 2002.

13. Coats SR, Darveau RP, Bainbridge BW, Pham TT, Reife RA: *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide antagonizes *Escherichia coli* lipopolysaccharide at toll-like receptor 4 in human endothelial cells. *Infection and Immunity*, 71: 6799–6807, 2003.

14. Yoshimura A, Mori H, Ohishi M, Aki D, Hanada T: Negative regulation of cytokine signaling influences inflammation. *Current Opinion in Immunology*, 15: 704–708, 2003.

15. Taguchi H, Aono Y, Kawato T, Asano M, Shimizu N, Saigusa T: Intragingival injection of *Porphyromonas gingivalis*-derived lipopolysaccharide induces a transient increase in gingival tumour necrosis factor- α , but not interleukin-6, in anaesthetised rats. *International Journal of Oral Science*, 7: 155–160, 2015.

16. Costa MJF, de Araújo IDT, da Rocha Alves L, da Silva RL, Dos Santos Calderon P, Borges BCD, de Aquino Martins ARL, de Vasconcelos Gurgel BC, Lins RDAU: *Porphyromonas gingivalis* and Alzheimer's disease: A systematic review of pre-clinical studies. *Clinical Oral Investigations*, 25: 797–806, 2021.

17. Olsen I, Progulske-Fox A: Invasion of *Porphyromonas gingivalis* strains into vascular cells and tissue. *Journal of Oral Microbiology*, 7: 28788, 2015.
18. de Aquino SG, Guimaraes MR, Stach-Machado DR, da Silva JA, Spolidorio LC, Rossa C Jr: Differential regulation of MMP-13 expression in two models of experimentally induced periodontal disease in rats. *Archives of Oral Biology*, 54: 609–617, 2009.
19. Koyama S, Sato E, Nomura H, Kubo K, Miura M, Yamashita T, Nagai S, Izumi T: The potential of various lipopolysaccharides to release monocyte chemotactic activity from lung epithelial cells and fibroblasts. *European Respiratory Journal*, 14: 545–552, 1999.
20. Dumitrescu AL, Abd-El-Aleem S, Morales-Aza B, Donaldson LF: A model of periodontitis in the rat: effect of lipopolysaccharide on bone resorption, osteoclast activity, and local peptidergic innervation. *Journal of Clinical Periodontology*, 31: 596–603, 2004.
21. Knuepfer MM, Bloodgood TA, Matuschak GM, Lechner AJ: Cocaine enhances susceptibility to endotoxemic shock in a subset of rats. *Critical Care Medicine*, 32: 175–183, 2004.
22. Zahr NM, Luong R, Sullivan EV, Pfefferbaum A: Measurement of serum, liver, and brain cytokine induction, thiamine levels, and hepatopathology in rats exposed to a 4-day alcohol binge protocol. *Alcohol: Clinical and Experimental Research*, 34: 1858–1870, 2010.

23. Ogawa T, Asai Y, Makimura Y, Tamai R: Chemical structure and immunobiological activity of *Porphyromonas gingivalis* lipid A. *Frontiers in Bioscience-Landmark (FBL)*, 12: 3795–3812, 2007.
24. Sugimoto Y, Yamamoto M, Tagawa N, Kobayashi Y, Mitsui-Saitoh K, Hotta Y, Yamada J: Differences between mice strains in response to paroxetine in the forced swimming test: Involvement of serotonergic or noradrenergic systems. *European Journal of Pharmacology*, 672: 121–125, 2011.
25. Jain NK, Kulkarni SK, Singh A: Lipopolysaccharide-mediated immobility in mice: reversal by cyclooxygenase enzyme inhibitors. *Methods and findings in experimental and clinical pharmacology*, 23: 441–444, 2001.
26. Sabedra Sousa FS, Birman PT, Bampi SR, Fronza MG, Balaguez R, Alves D, Leite MR, Nogueira CW, Brüning CA, Savegnago L: Lipopolysaccharide-induced depressive-like, anxiogenic-like and hyperalgesic behavior is attenuated by acute administration of α -(phenylselanyl) acetophenone in mice, *Neuropharmacology*, 146: 128–137, 2019.
27. Cryan JF, Valentino RJ, Lucki I: Assessing substrates underlying the behavioral effects of antidepressants using the modified rat forced swimming test. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 29: 547–569. 2005.
28. Guzzetti S, Calcagno E, Canetta A, Sacchetti G, Fracasso C, Caccia S, Cervo L, Invernizzi RW: Strain differences in paroxetine-induced reduction of immobility time in

the forced swimming test in mice: role of serotonin. *European Journal of Pharmacology*. 594: 117–124, 2008.

29. 岩田正明：うつ病の炎症性神経障害仮説, *日生物精医会誌*, 29: 163–167, 2018.

30. Hutchinson MR, Loram LC, Zhang Y, Shridhar M, Rezvani N, Berkelhammer D, Phipps S, Foster PS, Landgraf K, Falke JJ, Rice KC, Maier SF, Yin H, Watkins LR: Evidence that tricyclic small molecules may possess toll-like receptor and myeloid differentiation protein 2 activity. *Neuroscience* 168: 551–563, 2010.