

リポ多糖体刺激ラット組織における Toll-Like Receptor 4 の発現状況の解明

金沢良太

An Expression of Toll-Like Receptor 4 in Lipopolysaccharide-stimulating Rat Gingiva

Ryota KANAZAWA

In this study, an expression of Toll-Like Receptor 4 (TLR-4) in the rat gingiva after lipopolysaccharide(LPS) stimulation was examined by means of immunohistochemistry.

Wistar rats, 6 weeks of age, were used. A five μ l of saline containing 25 μ g of LPS from *E. coli* was injected into the palatal gingiva at the first molar of LPS-sensitized or non-sensitized rats. After perfusion fixation with PLP fixative, the gingiva was excised. Serial frozen sections were cut and stained immunohistochemically using polyclonal antibody against TLR4 and monoclonal antibody against monocyte/macrophage (ED1).

The gingival epithelium and capillary endothelial cells consistently expressed TLR4 not only in the LPS-injected groups but also in the saline-injected group and the non-treated normal control.

The injection of LPS to normal (non-sensitizing) rat gingiva brought about an infiltration of significant amount of neutrophils and mononuclear cells in the connective tissue after 12 to 24 and 24 to 36 hours, respectively. Most of the neutrophils and about a half of the mononuclear cells expressed TLR4. Most of the mononuclear cells showed positive immunostaining for ED1, some of which were dendritic or stellate in shape and exhibited nuclear indentation.

In the LPS-sensitized rats, re-challenge of LPS resulted in higher infiltration of both neutrophils and mononuclear cells than in the non-sensitized rats and those infiltrates were observed for longer period. A ratio of TLR4-positive mononuclear cells to the whole mononuclear cells appeared to increase.

The present results suggested that the gingival epithelium, capillary endothelial cells and infiltrating neutrophils constitutively expressed TLR4 and mononuclear cells expressed it in a stimulation-dependent manner. Both the gingival epithelium and capillary endothelial cells may play a part in the innate immune response in the rat gingiva.

Key words : Toll-Like Receptor 4, LPS, 免疫組織化学

表1 使用一次抗体

クローン /抗体名	標識細胞/分子	Source	Dilution
TLR4(L-14)	TLR4	Santa Cruz	1 : 50
ED1	全マクロファージ	BMA	1 : 200

表2 使用二次抗体

抗体名	標識分子	Source	Dilution
ビオチン標識抗ヤギ 二次抗体	ヤギIgG	Chemicon	1 : 100
ビオチン標識抗マウス 二次抗体	マウスIgG	Chemicon	1 : 100

緒 言

病原体が生体内に侵入すると、それを排除しようとする免疫系システムが働く。この免疫系には自然免疫と獲得免疫があり、前者は病原体の侵入を直ちに感知し、これに迅速に対応するシステムである。最近、この自然免疫の活性化がToll-Like Receptor (TLR) を介したシグナル伝達に担われていることが明らかになった¹⁾。現在哺乳類では10種類のTLRが知られており、それぞれ異なった物質に反応するが、慢性辺縁性歯周炎の主要な原因菌であるグラム陰性菌の細胞壁成分リポ多糖 (LPS) のシグナル伝達はTLR-4を介して行われる。これまでにいくつかの組織・臓器を対象に、TLR 4 発現細胞についての検討が試みられているが²⁻⁷⁾、歯周組織構成細胞におけるTLR 4 発現状況に関する報告は僅かであり^{8,9)}、LPS投与によって実験的に惹起された歯周組織の炎症病巣におけるTLR 4 発現細胞について検討した報告は見あたらない。ラットの歯肉にLPSを投与すると、好中球およびマクロファージ系細胞の局所浸潤を来すことが報告されている^{10,11)}。そこで、本研究では歯肉内にLPSを投与して同部に炎症性変化を惹起し、そこでのTLR 4 の発現状況を免疫組織学的に検討した。

材料と方法

1. 実験材料

実験動物として、6週齢雄性、体重160~180gのWistarラット (日本クレア社) 115頭を用いた。飼育は奥羽大学歯学部動物実験研究施設 (室温23

℃、湿度55%) において、自由飲水下で行い、飼料としてマウス・ラット・ハムスター用通常固形飼料MF (オリエンタル酵母社) を与えた。

ラットは以下の5群に分けた。ラット35頭の上顎第1臼歯口蓋側歯肉に、5mg/mlの濃度で生理食塩水に溶解した*Escherichia coli* (*E.coli*) 由来のLPS (Sigma社) をマイクロシリンジ (フナコシ社) にて5 μ l投与し、LPS投与群 (以下LPS群) とした。ラット35頭の歯肉に5 μ lの生理食塩水を投与し、生食投与群 (以下生食群) とした。歯肉投与はペントバルビタール (NENBUTAL[®], ABBOTT社) 全身麻酔下で行った。35頭のラットに、LPSの生理食塩水溶液とフロイントの完全アジュバント (Chemicon社) を混合したアジュバント混合液を0.2ml腹腔内投与した。それらのうち30頭には、腹腔内投与28日後にLPS群と同様の方法でLPSを歯肉投与し、感作・LPS投与群 (以下感作LPS投与群) とした。アジュバント混合液を投与した残りの5頭にはLPS歯肉投与を行わず、感作・LPS非投与群 (以下感作LPS非投与群) とした。LPS群、生食群および感作LPS投与群の各群では、LPSまたは生理食塩水の歯肉投与3, 6, 12, 24, 36, 48, 72時間後に組織材料を採取した。感作LPS非投与群では、混合液腹腔内投与28日後に組織試料を採取した。なお、アジュバント混合液を投与したラットにおける、血清中抗LPS抗体価の上昇はEndo Cab ELISA TEST KIT (HyCult社) にて確認した。上記いずれの処置も行わない5頭のラットを無処置対照群とし、試料を採取した。

2. 標本作製

組織試料採取に先立ち、全身麻酔下、左心室より2%パラホルムアルデヒドを含むPLP固定液100mlを灌流した。灌流後、左側上顎を一塊として採取し、4℃のPLP液にて5時間追加固定を行った。固定試料をリン酸緩衝生理食塩水 (pH 7.4, 以下PBS) にて洗浄した後、顎骨から歯肉・口蓋粘膜組織を剥離した。粘膜組織は凍結包埋剤に包埋したのち、ドライアイス・アセトンにて急速凍結し、厚さ6 μ mの前顎断連続切片を作製した。一部の切片にH.E染色を施し、病理組織学的観察を行った。

3. 免疫組織化学

TLR 4 発現状況の検討とTLR 4 発現細胞の同定のために、labelled-streptavidin-biotin法による免疫組織化学的検索を行った。切片には、4℃アセトンによる後固定ののちに、内因性ペルオキシダーゼの除去のために0.3%過酸化水素水(H₂O₂)加PBSを氷上で10分作用させた。次いで非特異的反応を防止するため、10%正常ロバまたは10%正常ヤギ血清を氷上で20分間作用させた。表1に示す一次抗体は室温で60分間反応させた。なお、一次抗体をPBSで置換して反応させた標本を免疫組織化学の陰性対照とした。一次抗体との反応に続き、ロバまたはヤギ由来の二次抗体(表2)に室温で30分浸漬したのち、ペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジン(ニチレイ社)を室温で30分反応させ、DAB基質キット(ニチレイ社)にて発色を行った。切片にヘマトキシリン核染色を施し、光学顕微鏡にて観察を行った。

結 果

1. 組織学的所見

好中球および単核細胞浸潤の時間経過に伴う変化を表3に示した。

1) 無処置対照群

無処置対照群の歯肉口蓋粘膜結合組織では、明らかな炎症細胞浸潤は認められなかった(図1, 2)。

2) 生食群

生理食塩水投与3時間後の歯肉口蓋粘膜は、無処置対照群と同様の組織像を示し、炎症細胞の浸潤は観察されなかった。投与後6時間から24時間にかけて結合組織内に少数の好中球浸潤が観察された。好中球浸潤は投与36時間以降では認められなかった(図3, 4)。単核細胞の浸潤は、観察期間を通じ、H.E標本では明らかでなかった。

3) LPS群

LPS投与後6時間で少数の好中球の浸潤が認められた。12, 24時間後には、歯肉固有層での好中球の数が増加し巣状を呈した(図5, 6)。36, 48時間後では固有層内での浸潤好中球の数が明らかに減少した(図7, 8)。12時間後から36時間後にかけて、少数の単核細胞浸潤が歯肉固有層に

認められた。LPS投与後72時間では単核細胞浸潤は明らかでなく、線維芽細胞様紡錘形細胞の出現が目立っていた。

4) 感作LPS非投与群

無処置対照群と同様の組織像を示し、炎症細胞浸潤は明らかでなかった。

5) 感作LPS投与群

LPS投与後3時間および6時間では、少数の好中球が結合組織内に浸潤していた。12時間後には広範囲にわたる高度の好中球浸潤が見られた(図9, 10)。24時間から48時間後にかけて好中球浸潤は減退傾向を示したが、浸潤した好中球の数は、同時期のLPS群に比べ明らかに多かった。単核細胞の浸潤が24時間から48時間にかけて顕著となり、その数は、同時期のLPS群より明らかに多く(図11, 12)、また好中球よりも多かった。

2. 免疫組織化学

免疫組織化学の陰性対照標本のいずれにおいても陽性反応は全く見られなかった(図13)。

1) 抗TLR 4 抗体染色

(1) 無処置対照群

接合上皮を含む歯肉上皮および口蓋粘膜上皮がともに全域にわたって、ほぼ均等な中等度のTLR 4 陽性を示した(図14)。粘膜固有層では、毛細血管内皮細胞が軽度ないし中等度の陽性反応を示した(図15)。固有層では、毛細血管内皮細胞をのぞく陽性細胞の存在は明らかでなかった。

(2) 生食群

投与後全観察期間において、歯肉および口蓋粘膜上皮と血管内皮細胞が無処置対照群とほぼ同様の陽性反応を示した。生食投与後3時間~36時間において、陽性を示す単核細胞と紡錘形細胞がいずれも散在性に少数観察された。それらの陽性単核細胞の一部においては細胞核に切れ込みや陥凹が認められた。また、6~24時間後のH.E染色標本で認められた少数の好中球が陽性反応を示した(図16, 17)。48時間以降の結合組織では、血管内皮細胞以外に陽性細胞は観察されなかった。

(3) LPS群

すべての観察期間で粘膜上皮および血管内皮細胞が中等度の陽性反応を示した。LPS投与3~6時間後では、浸潤した好中球の約半数が陽性で

あった。また、一部の標本では、類円形単核細胞および紡錘形細胞の少数が陽性であった。12, 24時間後では、浸潤した好中球の大半が陽性であり、単核細胞は約半数が陽性を示していた(図18, 19)。陽性単核細胞の一部においては細胞核に陥凹や切れ込みが認められた(図19)。48時間後においても、12, 24時間後と比べ数はやや少ないものの陽性の好中球が観察されるとともに、陽性単核細胞が少数観察された(図20, 21)。

(4) 感作LPS非投与群

粘膜上皮および血管内皮細胞に中等度の陽性反応が見られたのみで、固有層内に陽性細胞は観察されなかった。

(5) 感作LPS投与群

LPS投与後のいずれの時期においても、粘膜上皮と血管内皮細胞が中等度陽性を示した。LPS投与12, 24時間後には、好中球の大半が陽性を示し、また、単核細胞もその多くが陽性で、単核細胞全体に占める陽性細胞の割合が明らかに増していた(図22, 23)。36, 48時間後、好中球および単核細胞の多くが陽性を示したが、両者ともに陽性細胞の数は12, 24時間後と比べ減少していた。36, 48時間後では陽性単核細胞の数が陽性好中球の数を上回っていた(図24, 25)。

2) 抗マクロファージ抗体ED1染色

抗マクロファージ抗体ED1染色陽性細胞は観察したすべての組織標本で認められた。ED1陽性細胞の多くは、歯肉口蓋粘膜固有層内では、類円形あるいは紡錘形の形態をとっていたが、一部の陽性細胞は星芒状を呈した。また、上皮内において時折樹状の陽性細胞が観察された。全観察例を通じ、ED1陽性細胞数は、H.E染色標本で単核細胞と判定した細胞の数よりやや多い傾向にあった。TLR4陽性細胞の形態・分布状況はED1陽性細胞のそれにほぼ匹敵していたが、数は全観察例を通じ少なく、LPS群ではED1陽性細胞の約半数であった。感作LPS群では、TLR4陽性細胞のED1陽性細胞に対する比率は増すものの数は明らかに少なかった(図26)。

LPS刺激後の歯肉・口蓋粘膜組織におけるTLR4の発現状況を免疫組織化学的に検討したところ、歯肉および口蓋粘膜上皮と血管内皮細胞が、LPS刺激の有無にかかわらず、無処置対照群を含めつねに陽性反応を示し、恒常的にTLR4を発現することが示唆された。LPS刺激後一定時間において局所に浸潤してくる好中球はそのほとんどがTLR4陽性を示した。一方マクロファージは、LPS群では約半数がTLR4発現を示すにすぎなかったが、LPS感作ラットをLPSで再刺激するとTLR4発現細胞の占める割合が明らかに増加した。これらの結果から、以下のラット歯肉・口蓋粘膜における防御機構が推測される。組織内に侵入してくるグラム陰性菌は、最初に遭遇する上皮細胞や血管内皮細胞上に恒常的に発現しているTLR4によってまずその構成成分であるLPSを感知される。これらの細胞は、TLR4からのシグナル伝達によって種々の炎症性サイトカインを分泌し、好中球の浸潤を誘導する。好中球は自身の持つ貪食作用によってグラム陰性菌自体あるいはLPSの排除を図るとともに脱顆粒あるいはメディエーターの放出を通じマクロファージの遊走を促し、炎症反応を拡大させる。この際、TLR4を介するマクロファージの活性化は刺激依存性に生じる。

生体内に侵入してくる病原体に対し、上皮細胞が物理的な防壁としてのみならず、様々な因子の産生を通じて最初の防御ラインを構成することについてはいくつかの報告がある。Songら¹²⁾は、ヒト表皮ケラチノサイトが恒常的にCD14とTLR4を発現し、その発現はLPS刺激によって増大すると述べている。朝井¹³⁾は、培養ヒト歯肉上皮細胞を*Porphyromonas gingivalis*の抽出物や線毛成分で刺激すると、NF κ Bの活性化を通じMCP-1やIL-8等の炎症性サイトカインを産生すると報告している。*In vivo*の研究では、表皮、気管上皮、肺胞上皮、腸管上皮、尿細管上皮がTLR4を発現することが明らかにされており、いずれにおいても病原体の侵入に対する上皮細胞の防御作用を示すものと解釈されている^{2,5,14)}。さらにこのこと

は、TLR 4 ノックアウトマウスの気管に細菌性刺激を与えたところ、気管支上皮細胞によるTNF- α やMIP-1の産生がワイルドタイプのマウスに比べ著明に低かったことによっても確かめられている¹⁵⁾。一方歯肉上皮に関しては、TLR 2は発現するがTLR 4は発現しないことが*in vitro*の研究で示されており⁹⁾、本研究結果と異なっている。細胞の置かれた環境の違いによる可能性も考えられるが、歯肉上皮でのTLR 4発現に関しては上記引用文献以外に未だ報告がないところから、遺伝子レベルでの検索を加えさらに詳細に検討する必要がある。

血管内皮細胞が、炎症組織のみならず正常組織においても恒常的にTLR 4を発現することが報告されている。Faureら¹⁶⁾は、*in vitro*において、ヒト内皮細胞が主としてTLR 4を発現し、様々な感染性病原体に対する自然免疫反応に関わっていると述べている。Andoneguiら⁹⁾は、TLR 4欠損マウスを用いたキメラ実験で、LPS腹腔内投与によって惹起される好中球の肺への初期集結には、好中球自体のTLR 4発現より、内皮細胞でのTLR 4発現がより重要な役割を有していることを明らかにした。したがって、ラット歯肉血管内皮細胞でのTLR 4発現は、歯肉上皮、特に接合上皮を突破して、あるいは血行性に歯肉固有層内に侵入してくる病原体に対する初期防御ラインの存在を示したものと考えられる。

好中球がLPSに反応し、接着分子の発現やサイトカイン産生を高めることが明らかにされているが、TLRファミリーの発現との関連は十分に解明されていない。本研究でLPS刺激によって組織内に浸潤してきた好中球の大部分がTLR 4を発現し、生食注入刺激で少数ながら遊出してきた好中球の大部分も、同様にTLR 4を発現した。このことから、組織内に遊出した好中球は恒常的にTLR 4を発現することが示唆される。さらにTLR 4の発現は直接LPSに反応し、マクロファージの遊走、活性化を含む次の段階の炎症反応誘導に関与する可能性がある。一方Sabroeら¹⁷⁾は、TLR 2およびTLR 4の発現を指標とした実験で、LPS刺激に対するヒト末梢血好中球の反応性は単球に比べ低く、また、CD11bのup-regulationや

IL-8産生を指標とした実験では、LPS刺激に対する好中球の機能発現は単球の存在に依存することを示している。この結果彼らは、LPSに対する白血球の反応は単球によって調整され、好中球の役割は小さいと考えており、本研究結果での解釈とは多少異なっている。実験系すなわち*in vivo*と*in vitro*の違いによるものかもしれない。また、TLR 4発現の有無は判定できても強さの程度の判定はできない免疫組織化学的検索方法の限界を考慮する必要がある。

歴史的背景もあり、TLRに関する研究はもっぱら自然免疫において中心的役割を担うとされるマクロファージを対象に展開されてきた。特にレセプターから転写因子の活性化にいたるシグナル伝達経路の解明が中心になってきたところから研究のほとんどが*in vitro*で行われてきた。本研究では、無刺激の状況下でわずかながら存在するマクロファージはTLR 4を発現せず、またLPS刺激で組織へ遊走してくるマクロファージのすべてがTLR 4を発現するわけではなかった。一方、LPS感作ラットをLPSで再刺激すると局所へ浸潤するマクロファージの数が増加するとともにTLR 4陽性細胞の占める割合が明らかに増加した。これらのことから、組織内に遊走してきたマクロファージは、刺激依存性にあるいは病態の変化に伴ってTLR 4を発現する可能性が示唆される。感作群での所見は、獲得免疫の成立に伴いTLR 4を介したLPSに対するマクロファージの反応性が亢進していることを示したものと推測される。Marsikら¹⁸⁾は健康なボランティアにLPSを投与すると末梢血単球がTLR 4を発現することを見出し、単球でのTLR 4発現が刺激依存性に生じることを示唆している。

ED 1陽性でTLR 4を発現し、核に切れ込みを有する星芒状細胞は、形態学的特徴から樹状細胞と考えられる。近年TLRが自然免疫のみならず獲得免疫の誘導にも大きな役割を演じていることが明らかにされつつある¹⁾。獲得免疫の誘導には樹状細胞の成熟が必要であるが、その過程はTLRシグナルによる制御を受けていると考えられている¹⁹⁾。またT細胞増殖に必要な共刺激分子の発現もTLRのシグナルによって増強されるこ

とが示されている。従って、本研究結果は、ED 1 陽性細胞でのTLR 4 発現がラット歯肉における獲得免疫誘導に関与している可能性を示唆したものと考える。

ま と め

1. 無処置対照群を含む全観察例において歯肉口蓋粘膜上皮および固有層内血管内皮細胞がTLR 4 を発現した。これら細胞は恒常的にTLR 4 を発現することにより、組織内に侵入してくるグラム陰性菌を感知し、好中球やマクロファージの遊走を誘導すると考えられる。

2. LPS刺激12時間後に遊走してくる好中球は恒常的にTLR 4 を発現した。引き続き単核細胞（マクロファージ）の遊走を誘導するものと推測される。

3. LPS刺激24時間後に遊走してくる単核細胞はその大部分がED 1 陽性マクロファージ系細胞であった。LPS刺激群では約半数が、感作LPS刺激群ではより高い割合でTLR 4 を発現した。従ってマクロファージ系細胞は、刺激依存性にTLR 4 を発現すると推測される。

4. 樹状細胞とみなされるED 1 陽性細胞がTLR 4 を発現した。これらはTLR 4 を介して獲得免疫の誘導に関与していると考えられる。

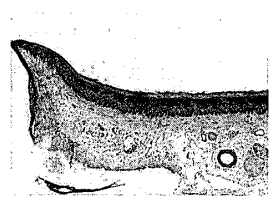


図1 H.E.染色
無処置対照群 ×40



図2 H.E.染色
無処置対照群 ×350
炎症細胞浸潤は見られない。

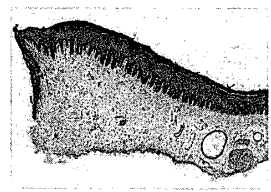


図3 H.E.染色
生食群 投与12時間後 ×40

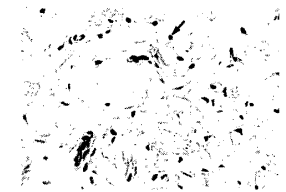


図4 H.E.染色
生食群 投与12時間後 ×350
ごく少数の好中球（矢印）が観察される。

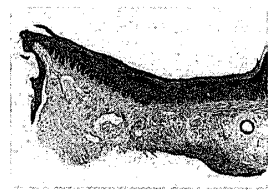


図5 H.E.染色
LPS群 投与12時間後 ×40
巣状の炎症細胞浸潤が観察される。

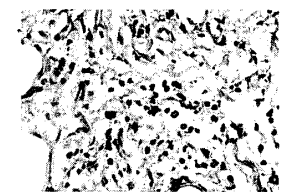


図6 H.E.染色
LPS群 投与12時間後 ×350
炎症細胞浸潤巣では好中球が観察される。

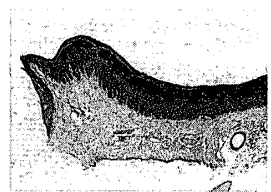


図7 H.E.染色
LPS群 投与48時間後 ×40
投与後24時間と比べ、炎症細胞浸潤の程度は軽度となる。

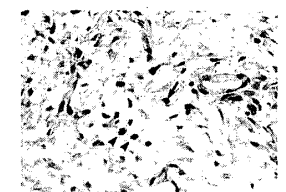


図8 H.E.染色
LPS群 投与48時間後 ×350
好中球（矢印）・単核細胞（矢頭印）が少数浸潤している。

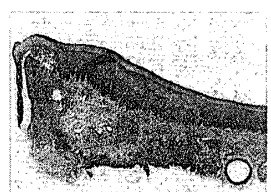


図9 H.E.染色
感作LPS投与群 投与12時間後 ×40
炎症細胞の密な浸潤が広範囲にわたって観察される。

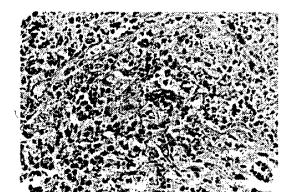


図10 H.E.染色
感作LPS投与群 投与12時間後 ×350
炎症細胞浸潤巣では多数の好中球が観察される。

表3 好中球および単核細胞浸潤の時間的推移

		無処置	生食群	LPS群	感作LPS 非投与群	感作LPS 投与群
3h	好中球	—	—	±	—	+
	単核細胞	—	—	—	—	—
6h	好中球	—	+	±	—	+
	単核細胞	—	—	—	—	—
12h	好中球	—	+	++	—	+++
	単核細胞	—	—	+	—	+
24h	好中球	—	+	++	—	++
	単核細胞	—	—	+	—	+++
36h	好中球	—	—	+	—	++
	単核細胞	—	—	+	—	+++
48h	好中球	—	—	+	—	++
	単核細胞	—	—	—	—	+++
72h	好中球	—	—	—	—	—
	単核細胞	—	—	—	—	±



図11 H.E.染色
感作LPS投与群 投与48時間後 ×40
炎症細胞の浸潤は12時間後と比べ軽度となっている。



図12 H.E.染色
感作LPS投与群 投与48時間後 ×350
単核細胞が多数観察される。



図21 TLR4免疫染色
LPS群 投与48時間後 ×350
陽性を示す好中球と陽性単核細胞はいずれも減少する。



図22 TLR4免疫染色
感作LPS群 投与12時間後 ×40
密に浸潤する炎症細胞が陽性となっている。

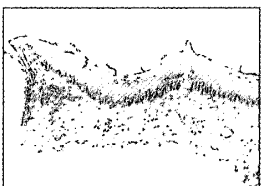


図13 免疫染色
陰性対照標本 ×40
陽性反応は認められない。



図14 TLR4免疫染色
無処置対照群 ×40
粘膜上皮が陽性を示している。

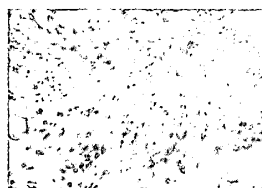


図23 TLR4免疫染色
感作LPS群 投与12時間後 ×350
陽性を示す好中球・単核細胞が多数見られる。



図24 TLR4免疫染色
感作LPS群 投与48時間後 ×40
12時間後と比べ陽性の細胞は少数となっている。



図15 TLR4免疫染色
無処置対照群 ×350
毛細血管に陽性反応が見られる。



図16 TLR4免疫染色
生食群 投与12時間後 ×40
粘膜上皮が陽性を示している。

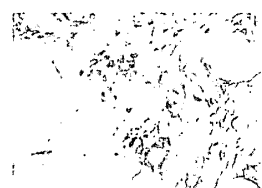


図25 TLR4免疫染色
感作LPS群 投与48時間後 ×350
単核細胞が陽性好中球数より大となっている。



図26 ED1染色(A)およびTLR4免疫染色(B)
LPS群 投与12時間後 ×350
TLR4陽性細胞の一部はED1染色陽性細胞と同様の形態をとる。



図17 TLR4免疫染色
生食群 投与12時間後 ×350
毛細血管と好中球(矢印)に陽性反応が見られる。

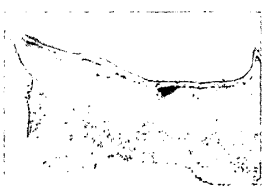


図18 TLR4免疫染色
LPS群 投与12時間後 ×40
粘膜上皮とともに炎症細胞に陽性反応が観察される。



図19 TLR4免疫染色
LPS群 投与12時間後 ×350
好中球(矢印)と単核細胞、毛細血管に陽性反応が見られる。不整な核を有する単核細胞(矢頭印)。



図20 TLR4免疫染色
LPS群 投与48時間後 ×40
12時間後と比べ、結合組織内の陽性細胞の個数は減少する。

謝 辞

稿を終えるにあたり、終始御懇篤な御指導と御高閲を賜りました本学口腔病理学講座、山崎 章教授に謹んで感謝の意を表しますとともに、種々ご援助いただきました口腔病理学講座ならびに岡本 浩病院教授、歯科保存学講座の教室員の皆様方に深く感謝いたします。

本論文の要旨は、第38回奥羽大学歯学会(平成16年11月郡山)において発表した。

文 献

- 1) 改正恒安：第1章 自然免疫とToll様受容体。免疫学最新イラストレイテッド（小安重夫編）；19-34 羊土社 東京 2003.
 - 2) Cario, E. and Podolsky, K.D. : Differential alteration in intestinal epithelial cell expression of Toll-Like Receptor 3(TLR3) and TLR4 in inflammatory bowel disease. *Infect Immun* **68** ; 7010-7017 2000.
 - 3) Imaeda, H., Yamamoto, H., Takaki, A. and Fujimiya, M. : In vivo response of neutrophils and epithelial cells to lipopolysaccharide injected into the monkey ileum. *Histochem Cell Biol* **118** ; 381-388 2002.
 - 4) Andonegui, G., Bonder, S.C., Green, F., Mulla-ly, S.C. *et al.* : Endothelium-derived Toll-like receptor-4 is the key molecule in LPS-induced neutrophil sequestration into lungs. *J Clin Invest* **111** ; 1011-1020 2003.
 - 5) Pivarcsi, A., Bodai, L., Rethi, B., Kenderesy-Szabo, A. *et al.* : Expression and function of Toll-like receptors 2 and 4 in human keratinocytes. *Int Immunol* **15** ; 721-730 2003.
 - 6) Wassef, A., Janardhan, K., Pearce, J.W. and Singh, B. : Toll-like receptor 4 in normal and inflamed lungs and other organs of pig, dog and cattle. *Histol Histopathol* **19** ; 1201-1208 2004.
 - 7) Satoh, M., Nakamura, M., Akatsu, T., Shimoda, Y. *et al.* : Toll-like receptor4 is expressed with enteroviral replication in myocardium from patients with dilated cardiomyopathy. *Lab Invest* **84** ; 173-181 2004.
 - 8) Mori, Y., Yoshimura, A., Ukai, T., Lien, E. *et al.* : Immunohistochemical localization of Toll-like receptors 2 and 4 in gingival tissue from patients with periodontitis. *Oral Microbiol Immunol* **18** ; 54-58 2003.
 - 9) Kusumoto, Y., Hirano, H., Saitoh, K., Yamada, S. *et al.* : Human gingival epithelial cells produce chemotactic factors interleukin-8 and monocyte chemoattractant protein-1 after stimulation with Porphyromonas gingivalis via Toll-Like receptor 2. *J Periodontol* **75** ; 370-379 2004.
 - 10) Ijuhin, N., Miyauchi, M., Ito, H., Takata, T., *et al.* : Enhanced collagen phagocytosis by rat molar periodontal fibroblasts after topical application of lipopolysaccharide? Ultrastructural observations and morphometric analysis. *J Periodont Res* **27** ; 167-175 1992.
 - 11) Miyauchi, M., Takata, T., Ito, H., Ogawa, I. *et al.* : Distribution of macrophage lineage cells in rat gingival tissue after topical application of lipopolysaccharide : an immunohistochemical study using monoclonal antibodies: OX6, ED1 and ED2. *J Periodont Res* **33** ; 345-351 1998.
 - 12) Song, P.I., Park, Y.M., Abraham, T., Harten, B. *et al.* : Human keratinocytes express functional CD14 and toll-like receptor 4. *J Invest Dermatol* **119** ; 424-432 2002.
 - 13) 朝井康行：細菌線毛ならびに同部分ペプチドによるToll-like receptor 2を介するヒト歯肉上皮細胞の活性化。歯基礎誌 **45** ; 43-51 2003.
 - 14) Wassef, A., Janardhan, K., Pearce, J.W. and Singh, B. : Toll-like receptor 4 in normal and inflamed lungs and other organs of pig, dog and cattle. *Histol Histopathol* **19** ; 1201-1208 2004.
 - 15) Wang, X., Moser, C., Lou-boutin J.-P., Lysenko, E.S. *et al.* : Toll-like receptor 4 mediates innate immune responses to Haemophilus influenzae infection in mouse lung. *J Immunol* **168** ; 810-815 2002.
 - 16) Faure, E., Equils, O., Sieling, P.A., Thomas, L. *et al.* : Bacterial lipopolysaccharide activates NF- κ B through Toll-like receptor 4 (TLR4) in cultured human dermal endothelial cells. *J Biol Chem* **275** ; 11058-11063 2002.
 - 17) Sabroe, I., Jones, C.E., Usher, R.L., Whyte, B.K.M. *et al.* : Toll-Like Receptor (TLR)2 and TLR4 in human peripheral blood granulocytes : A critical role for monocytes in leukocyte lipopolysaccharide responses. *J Immunol* **168** ; 4701-4710 2002.
 - 18) Marsik, C., Mayr, F., Cardona, F., Derhaschnig, U. *et al.* : Endotoxaemia modulates Toll-like receptors on leucocytes in humans. *Br J Haematol* **121** ; 653-656 2003.
 - 19) Kaisho, T. and Akira, S. : Dendritic cell function in Toll-like receptor-and MyD88-knock-out mice. *Trends Immunol* **22** ; 78-83 2001.
- 著者への連絡先：金沢良太，(〒963-8611)郡山市富田町字三角堂31-1 奥羽大学歯学部歯科保存学講座(歯周病学分野)
Reprint requests : Ryota KANAZAWA, Department of Conservative Dentistry, Division of Periodontics, Ohu University School of Dentistry.
31-1 Misumido, Tomita, Koriyama, 963-8611, Japan