

---

## 学位論文

---

### 歯髄炎の病態形成における Interferon- $\gamma$ inducible protein 10 (IP-10) の役割

足立 智彦

キーワード：歯髄炎，免疫応答，ケモカイン

### Roles of Interferon-gamma Inducible Protein 10 (IP-10) in the Pathogenesis of Pulpitis

Tomohiko ADACHI

**Abstract:** Dental pulp tissue surrounded by the hard tissue lacks epithelium lining and is in the special environment without the collateral circulatory system. For these specific anatomical characteristics, it is considered that the pulp tissue is easily led to irreversible pulpitis once this tissue is subjected to bacterial irritants. Therefore, to clarify the pathogenesis of pulpitis may lead to the development of new therapeutic approach to control this inflammation and improve the chance of spontaneous healing. The pulpitis is characterized as the immune response which is mainly triggered by invasion of the caries-related microorganisms into dental tubules and pulp. In this inflammation progresses, the significant inflammatory cells predominantly comprised of memory T cells and activated T cells infiltrates and recruitments into the lesion. However, these inflammatory infiltration mechanisms are far from being understood. Recently, it has been demonstrated that interferon-gamma-inducible protein-10 (IP-10), one of chemokines, have chemotactic activities against lymphocytes, binds to CXCR3 and then involves in the chemotaxis of CXCR3-positive activated T cells. It is conceivable that IP-10 may have an important regulatory role in activated T cell migration into inflamed tissue. Then, the purpose of this study is to elucidate the role of IP-10-CXCR3 system in the pathogenesis of pulpitis. First, in RT-PCR the expression levels of IP-10 mRNA in clinically inflamed pulp tissues were significantly increased than those in normal pulp tissue. Immunostaining results revealed that IP-10 was observed on fibroblasts, macrophages and endothelial cells in inflamed pulp tissue and CXCR3 was observed on lymphocytes migrated into pulp tissue. Second, the pulp fibroblast-like cells derived from normal dental pulp and PMA-differentiated human monocytic cell line (THP-1 cells) were stimulated with lived bacteria (*Streptococcus mutans* and *Lactobacillus plantarum*, which were reported to exist predominately in dental caries lesions), lipoteichoic acids, peptidoglycans, or various inflammatory cytokines in vitro. The result showed that IP-10 was secreted from cultured pulp fibroblasts and THP-1 cells, and that heat-killed *S. mutans* and *L. plantarum* did not induce IP-10 secretion. Taken together, this study suggests that the IP-10-CXCR3 system may play an important role in the immune response against the invasion of caries-related bacteria into dental pulp tissue beneath the carious lesion and may be involved in the progression of irreversible pulpitis.

## 緒 言

歯髄は硬組織に囲まれているため、生体の防御反応や異物除去反応が行われにくく、組織修復の機転が起こりにくいとされており、炎症の進行に伴い不可逆的な変化をたどりやすいと考えられている<sup>1)</sup>。事実、冷・温刺激痛など急性症状のある歯髄炎は、歯髄充血などごく初期のものを除き不可逆性歯髄炎と診断され<sup>2-4)</sup>、抜髄処置の適応とされている。特に、齶蝕除去中に露髄した場合は歯髄に炎症や細菌感染が生じている可能性が極めて高いという判断から、直接覆髄の禁忌とされている<sup>4,5)</sup>。しかしながら、術前に臨床症状のない症例では直接覆髄処置による歯髄の保存が可能であることも報告されている<sup>6-8)</sup>。このように、歯髄炎の診断は困難であり、歯髄にどのような変化が起これば不可逆となるかは、現在でも明らかにされていない。そのため、歯髄炎の詳細な pathogenesis が分かれば、歯髄の保存治療の開発にもつながると考えられる。

歯髄疾患の大部分を占める歯髄炎の原因として最も頻度が高いのは、齶蝕病変部の象牙細管に侵入した細菌による侵襲であるが、齶蝕病巣に存在する細菌について、Edwardsson<sup>9)</sup> は齶蝕象牙質深部には *Lactobacillus* が最も優位に存在し、次いで、*Streptococcus*, *Bifidobacterium* の順に存在すると報告し、Hoshino<sup>10)</sup> は *Propionibacterium*, *Eubacterium*, *Lactobacillus* などが優勢であると報告している。教室の中西ら<sup>11)</sup> は検索した齶蝕菌の90%以上に *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus casei*, *S. mutans* を検出したと報告している。これらの細菌が存在する浅在性の象牙質齶蝕病巣直下の歯髄では、歯髄炎の初期反応と考えられる樹状細胞の限局性の集積が齶蝕侵襲部に相当する象牙芽細胞近傍に認められ<sup>12)</sup>、さらに齶蝕細菌が象牙質の深部にまで侵入し歯髄に近接すると、リンパ球、マクロファージ、好中球などの炎症性細胞浸潤が認められるようになり<sup>13)</sup>、炎症病変すなわち歯髄炎が惹起される。リンパ球は炎症歯髄における細胞浸潤の中心的存在であり、特にT細胞は主たるリンパ球ポピュレーションであることから<sup>14,15)</sup>、歯髄炎の成立に重要な役割を果たしていると考えられる。そしてこのような炎症局所部位へのT細胞の血管外遊走には、走化因子であるケモカイン等が重要な役割を果たしていることが報告されている<sup>16)</sup>。

ケモカインは細胞間微小伝達物質であるサイトカインサブユニットに属し、白血球走化性・活性化作用を有し、塩基性でヘパリン結合性の強いタンパク質群で、炎症反応のみならず造血制御や血管新生などさまざまな生命現象に密接に関与することが知られている<sup>17-21)</sup>。ケモカインはシステイン残基の配列パターンから大きくCXC, CC, C, CX3Cの4つのサブファミリーに分類され、これらのケモカインに対応してCXCR, CCR, XCR, CX3CRに分類される受容体がこれまで約20種類同定されている<sup>22)</sup>。特に、CXCケモカイン

の interferon- $\gamma$  inducible protein 10 (以下 IP-10 と略す) は interferon- $\gamma$  (以下 IFN- $\gamma$  と略す) により線維芽細胞やマクロファージから発現誘導される10 kDaのタンパクで、T細胞や単球に対して走化活性を有することが知られており、心臓<sup>23)</sup>、肝臓<sup>24)</sup>、皮膚疾患<sup>25,26)</sup> およびリウマチ<sup>27)</sup> 等の病態形成に関与していることが示されている。しかし、歯髄炎病変局所へのリンパ球浸潤における IP-10 の役割については不明であり、これを解明することにより、歯髄炎の pathogenesis の一端を明らかにすることができると期待される。

そこで本研究では、IP-10に着目し、歯髄炎の病態形成における IP-10 の役割について検討した。すなわち、歯髄炎病変局所における IP-10 およびそのレセプターである CXCR3 の発現を *in situ* で解析した。さらに、臨床的正常歯髄より分離した歯髄線維芽細胞を用いて、代表的な齶蝕関連細菌である *Streptococcus mutans* および *Lactobacillus plantarum* の刺激、菌体成分である peptidoglycan (以下 PGN と略す) および lipoteichoic acid (以下 LTA と略す) の刺激、さらに炎症性サイトカインの刺激による IP-10 の遺伝子発現および IP-10 のタンパク産生への影響を解析するとともに、ヒト単芽球細胞株である THP-1細胞を phorbol 12-myristate 13-acetate (以下 PMA と略す) でマクロファージ様に分化させた細胞を用いて、*S. mutans* の刺激による IP-10 の遺伝子発現および IP-10 のタンパク産生への影響を解析することにより、歯髄炎の病態形成における IP-10 の役割について検討した。

## 材料と方法

### 1. ヒト歯髄組織の採取

実験に使用したヒト歯髄組織は徳島大学病院歯科を受診し、基礎疾患を有しておらず、過去6ヶ月間に投薬処置を受けていない患者から採取した。なお、試料の収集は徳島大学倫理審査委員会の承認のもとで実施し、被験患者には本研究の内容を説明し、同意を得た後に試料を実験に使用した。

### 2. 臨床的歯髄組織の RNA 抽出および RT-PCR 法

炎症歯髄組織試料としては、齶蝕病巣が歯髄に到達あるいは近接し、臨床症状から不可逆性歯髄炎と診断された9歯の歯髄組織を抜髄処置時に採取したものを、また対照の正常歯髄組織試料としては、臨床的に正常歯髄と診断され便宜抜歯された健全歯4歯の歯髄組織を採取したものをを用いた。

歯髄組織からの total RNA の抽出は、NucleoSpin RNA II (Macherey-Nagel Ltd, Banbury, Oxfordshire, UK) を用い、添付プロトコールに従って total RNA を抽出した。次に目的とする IP-10 の遺伝子発現レベルの検索を Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (以下 RT-PCR と略す) 法により検討した。すなわち、抽出し

表1 Primer の塩基配列および PCR 条件

増幅遺伝子		塩基配列	アニーリング温度(°C)	増幅産物(bp)
IP-10	sense	5'-TGACTCTAAGTGGCATTCAAGG-3'	52	188
	antisense	5'-AGTTCAGACATCTCTTCTCACCC-3'		
GAPDH	sense	5'-TGAAGGTCGGAGTCAACGGATTTGGT-3'	60	985
	antisense	5'-CACCACCTGGAGTACCGGGTGTAC-3'		

た total RNA を Reverse-iT RTase Blend 逆転写反应用キット (ABgene, Epsom, Surrey, UK) を用いて逆転写反応を行い cDNA の合成を得た。得られた cDNA に1  $\mu$ M の各遺伝子の上流および下流の特異的プライマー (表1) と PCR Master Mix (1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, ABgene) を加え、最終的に25  $\mu$ l となるように調整し、TaKaRa PCR Thermal Cycler SP (タカラバイオ, 大津) を用いて PCR 反応を行った。反応生成物は、エチジウムブロマイド含有1.5% アガロースゲルで電気泳動を行い、UV トランスイルミネーター (コスモバイオ, 東京) を用いて写真撮影した。また、mRNA 量は NIH Image 1.63ソフトウェアプログラムによってゲルのデンシトメトリーを測定することで半定量化し、数値化した。値は対照として用いた Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (以下 GAPDH と略す) との比で表した。

### 3. 免疫組織化学的解析

免疫組織化学的検索のための被験試料として、歯髄炎症状を認め、臨床上抜歯の適応と診断されたヒト抜歯歯を用いた。被験歯は抜歯後、歯根膜組織を取り除いて歯根中央で切断し、根の根尖側1/2を切断除去した。直ちに10% 中性緩衝ホルマリン溶液中に浸漬し、室温にて24時間固定してから、10% EDTA 溶液 (pH 7.4) にて約60日間脱灰処理を行った。その後、蒸留水で洗浄し、通法に従って脱水・パラフィン処理した後、厚さ6  $\mu$ m の薄切切片を作製した。

IP-10および CXCR3の発現と局在は抗ヒト IP-10ヤギポリクローナル抗体 (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) および抗ヒト CXCR3マウスモノクローナル抗体 (DAKO, Corporation, Carpinteria, CA, USA) を用いた酵素抗体法にて免疫組織化学的に解析した。すなわち、薄切切片を通法に従い脱パラフィンし、トリス塩酸緩衝生理食塩水 (以下 TBS と略す, pH7.6) に20分間浸漬した後、3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>を用いて内因性パーオキシダーゼを除去し、洗浄後、DAKO Protein Block Serum-free (DAKO) にてブロッッキングを行った。抗ヒト IP-10ヤギポリクローナル抗体および抗ヒト CXCR3マウスモノクローナル抗体を TBS で500倍に希釈し、一次抗体として切片に滴下した。4°C にて一晩反応させ、TBS にて3

回洗浄した後、二次抗体として IP-10の検出にはビオチン標識抗ヤギイムノグロブリン・ウサギ抗体 (DAKO) を、CXCR3の検出にはビオチン標識抗マウスイムノグロブリン・ヤギ抗体 (DAKO) を用いて室温で20分間反応させた。TBS にて3回洗浄した後、パーオキシダーゼ標識ストレプトアビジンを室温で10分間反応させた後、発色基質 (3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride, DAKO) を切片に滴下し、室温で10分間反応させた。反応液が茶色に発色したのを確認した後、ヘマトキシリンにて核染色を行い、グリセロールゲルにて封入した。

### 4. 細胞培養法

#### 1) 歯髄線維芽細胞

齶蝕および歯周炎を有さない健全智歯、あるいは矯正目的のために抜去された健全小白歯より歯髄を摘出し、細切したのち、1 mM の Modified Eagle's Medium, ピルビン酸ナトリウム (Gibco, Grand Island, NY, USA), 10% (v/v) fetal bovine serum (以下 FBS と略す, JRH Biosciences, Lenexa, KA, USA), 50 IU/ml ペニシリン (Gibco), 50  $\mu$ g/ml ストレプトマイシン (Gibco) を添加した Dulbecco's modified Eagle's medium (以下 DMEM と略す, Gibco) にて37°C, 5% CO<sub>2</sub>存在下で初代培養を行った。組織片より遊走した歯髄細胞を5~10代まで継代し、実験に使用した。

#### 2) マクロファージ様細胞

ヒト単芽球細胞株 THP-1 (以下 THP-1と略す, American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA) を用い、マクロファージ様細胞への分化誘導を Takashiba らの方法<sup>28)</sup> に準じて行った。すなわち、THP-1を10% FBS (JRH Biosciences), 100IU/ml のペニシリン (Gibco), 100  $\mu$ g/ml のストレプトマイシン (Gibco), 26 mM の HEPES (Gibco), を含む RPMI1640培地 (Gibco) にて、5% CO<sub>2</sub>存在下、37°C で培養した。引き続き、20 ng/ml の PMA (Sigma-Aldrich, Walkersville, MD, USA) を含む同培地にて48時間培養した後、PMA 無添加の同培地でさらに40時間前培養し、これをマクロファージ様細胞 (以下分化型 THP-1細胞と略す) として実験に供した。

### 5. 供試菌株および培養方法

*S. mutans* MT8148株は、大嶋隆博士（大阪大学大学院歯学研究科）から恵与された。*S. mutans* MT8148株は Brain Heart Infusion 培地（以下 BHI 培地と略す、Difco Laboratories, Detroit, MI, USA）で37℃、8時間培養したものを、*L. plantarum* ACTT8014株は一般乳酸菌接種用培地（日水製薬株式会社、東京）で37℃、12時間培養したものを実験に供した。*S. mutans*, *L. plantarum* は共に培養後、定常期における浮遊細菌を7000×gで7分間遠心することにより集菌・洗浄した後、DMEM培地で細菌数の調整を行った。また、調整した細菌の一部は100℃で10分間煮沸することにより死菌化した。

### 6. 歯髄線維芽細胞における IP-10タンパクの産生

歯髄線維芽細胞を24穴プレートに $1.5 \times 10^4$  cells/mlになるように播種し、ほぼコンフルエントに達するまで培養した後、FBS 1%含有 DMEM 培地にて24時間培養した後、各刺激因子で刺激を行った。すなわち *S. mutans* (生菌・死菌) および *L. plantarum* (生菌・死菌) の懸濁液は細菌/細胞比0~100になるように調製し、*Staphylococcus aureus* 由来 LTA (Sigma-Aldrich) は0.1~1 μg/ml で、PGN (Sigma-Aldrich) は1~10 μg/ml で、IFN-γ (PEPRO TECH EC., London, UK), Interleukin-1β (以下 IL-1β と略す、R&D systems), および Interleukin-4 (以下 IL-4 と略す、Boehringer Mannheim, Mannheim, Germany) は0.1~10 ng/ml で、Tumor Necrosis Factor Alpha (以下 TNF-α と略す、Upstate biotechnology, Lake Placid, NY, USA) は1.0~100 ng/ml で歯髄線維芽細胞を一定時間刺激した。細胞を刺激した後、培養上清および細胞を回収し、培養上清中の IP-10濃度を enzyme-linked immunosorbent

assay (以下 ELISA と略す、DuoSet ELISA Development system, R&D systems) を用い、波長450 nmの吸光度をマイクロプレートリーダー (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) にて測定した。また、回収した細胞における IP-10の遺伝子の発現は、前記のごとく total RNA を抽出した後、RT-PCR にて分析した。また、コントロールとして使用したヒト臍帯静脈血管内皮細胞 (以下 HUVEC と略す、Bio Whittaker, Walkersville, MD, USA) およびヒト皮膚線維芽細胞 (Cambrex Bio Science Walkersville, MD, USA) も同様に刺激した。

### 7. マクロファージ様細胞における IP-10の産生

分化型 THP-1細胞を24穴プレートに $5 \times 10^5$  cells/well になるように播種した後、*S. mutans* (生菌・死菌) および *L. plantarum* (生菌・死菌) の懸濁液を細菌/細胞比が0~100になるように播種し、刺激した。細胞を刺激した後、培養上清と細胞を回収し、上清中の IP-10 は ELISA 法にて定量し、また、回収した細胞における IP-10の遺伝子発現は、前記のごとく total RNA を抽出した後、RT-PCR 法にて解析した。

### 8. 統計分析

ELISA 法の測定および NIH Image におけるデータは平均±標準偏差で表し、Student の t 検定を用いて統計学的処理を実施し、 $p < 0.05$ にて有意差ありと判定した。

## 結 果

### 1. 歯髄組織における IP-10の遺伝子発現

臨床的炎症歯髄試料および臨床的 normal 歯髄試料を用いて、IP-10の遺伝子発現を RT-PCR を用いて解析した。

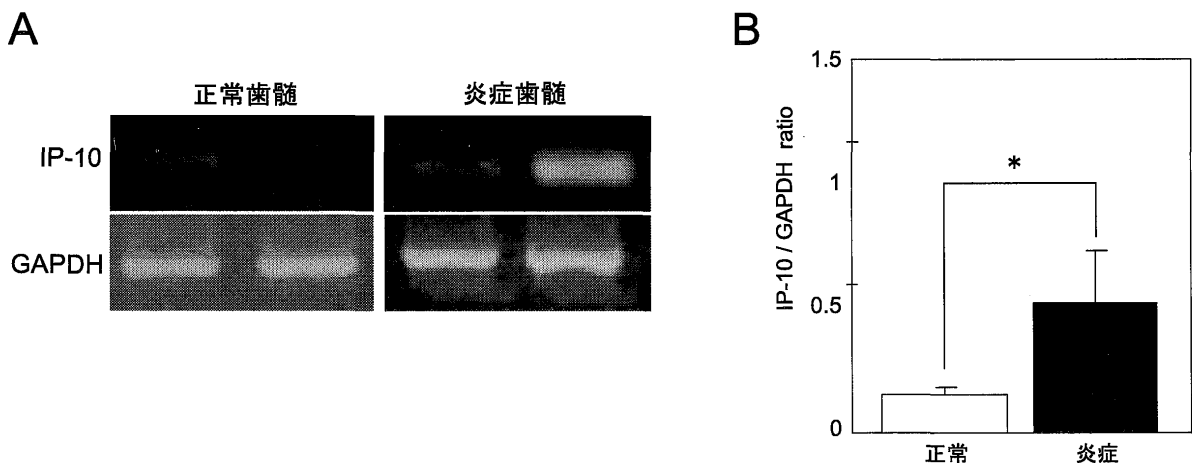


図1 臨床的炎症歯髄試料および臨床的 normal 歯髄試料における IP-10の遺伝子発現解析

歯髄組織から total RNA を抽出し、IP-10の遺伝子発現を RT-PCR にて解析した。IP-10の遺伝子発現は、臨床的炎症歯髄試料では全9症例中8症例、臨床的 normal 歯髄試料では全4症例中3症例で検出された。

(A) 正常歯髄および炎症歯髄における代表的な2症例の IP-10遺伝子発現の結果を示す。

(B) IP-10遺伝子の発現量を、GAPDH の発現量に対する比率として表した。

\* $p < 0.01$ ; 正常歯髄試料と比較して炎症歯髄試料で IP-10遺伝子発現量に有意差を認めた。

IP-10遺伝子の発現は、炎症歯髄試料では9症例中8症例に認められ、正常歯髄試料では4症例中3症例に認められた。正常歯髄試料および炎症歯髄試料における代表的なIP-10遺伝子発現の結果を示す(図1A)。すべての症例をNIH Imageにて各GAPDHの発現量と比較して解析した結果、炎症歯髄試料におけるIP-10の遺伝子発現は正常歯髄試料の遺伝子発現より有意に大きかった(図1B)。

## 2. 歯髄組織におけるIP-10, CXCR3陽性細胞の局在

臨床的炎症歯髄組織においてIP-10遺伝子が有意に強く発現していることが確認されたため、次に歯髄炎病巣部におけるIP-10の局在を免疫組織化学的に解析した。また、IP-10のレセプターであるCXCR3の発現についても同様に検索した。

その結果、IP-10は形態的にマクロファージと考えられる単核細胞、線維芽細胞および血管内皮細胞に発現が認められた(図2A, B)。また、CXCR3は形態的にリンパ球と考えられる細胞に発現していた(図2C)。

## 3. 刺激培養歯髄線維芽細胞からのIP-10発現

免疫組織化学的解析により、IP-10が歯髄内の線維芽細胞に発現していることが明らかとなった。しかし、どのような機序によりIP-10が発現しているのかは不明である。そこで、細菌刺激、細菌由来因子およびサイトカイン刺激による歯髄線維芽細胞のIP-10産生を*in vitro*で検討した。

### 1) 細菌刺激によるIP-10の発現

齧蝕関連細菌の*S. mutans* および*L. plantarum*を用い、培養歯髄線維芽細胞が細菌刺激によりIP-10を産生するかどうかについて、遺伝子発現はRT-PCRにて、タンパク発現はELISAにて解析した。歯髄線維芽細胞は*S.*

*mutans*の生菌で刺激したとき、刺激12時間後からIP-10遺伝子発現が認められ、刺激24時間後では菌濃度に依存して発現量が増強した(図3A)。上清中に産生されたIP-10タンパク量は刺激12時間から24時間にかけて有意に上昇した(図3C)。また、*L. plantarum*の生菌で刺激したときも*S. mutans*の時と同様に遺伝子発現およびタンパク産生が認められたが(図4A)、タンパク濃度は*S. mutans*の刺激と比較してより少なかった(図4C)。死菌刺激では各細菌刺激のいずれの刺激条件においてもIP-10遺伝子発現およびタンパク産生は認められなかった(図3Bおよび図4B)。

### 2) 細菌由来因子の刺激によるIP-10の発現

生菌による刺激により歯髄線維芽細胞からIP-10発現が認められたので、次に、細菌の構成成分の違いによるIP-10発現について解析するため、細菌の外膜構成成分であるLTAおよびPGNを用いて歯髄線維芽細胞からのIP-10発現を測定した。

LTAで歯髄線維芽細胞を刺激したとき、IP-10遺伝子発現はほとんど認められず(図5A)、上清中のIP-10タンパクも測定されなかった(図5B)。PGNによる刺激では、刺激4時間後にIP-10遺伝子発現が認められ(図5C)、刺激12時間後から上清中のIP-10タンパク産生の増強が認められた(図5D)。

### 3) サイトカイン刺激によるIP-10の発現

ヒト歯髄炎において様々なサイトカインが産生していることが報告されているが、それらが歯髄線維芽細胞を刺激してIP-10を産生しているかどうかを検索するために、pro-inflammatory サイトカインであるIFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$ およびIL-1 $\beta$ 、Th2型サイトカインであるIL-4を用いて実験を行った。また、IFN- $\gamma$ 刺激によりIP-10の産生が報告されているHUVECおよびヒト皮膚線維芽細胞を比較対象として同様にIP-10産生量を測定した。

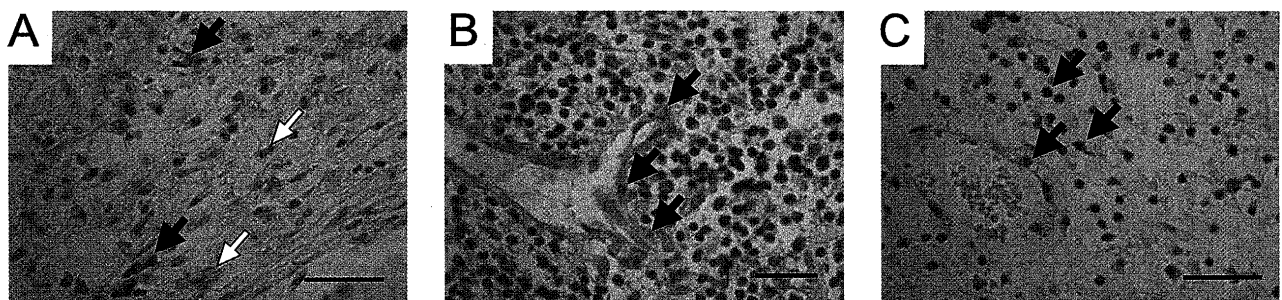


図2 臨床的炎症歯髄組織におけるIP-10およびCXCR3の免疫組織化学的解析

A, B: 炎症歯髄組織におけるIP-10像

C: 炎症歯髄組織におけるCXCR3像

歯髄組織よりパラフィン包埋切片を作成し、LSAB法を用いた免疫染色により検出した。IP-10は主に形態的にマクロファージ(A; 白矢印)、線維芽細胞(A; 黒矢印)および血管内皮細胞(B; 黒矢印)と考えられる細胞に認められた。CXCR3は形態的にリンパ球と考えられる細胞に認められた(C; 黒矢印)。(図2A, C: bar=50 nm, B: bar=25 nm)

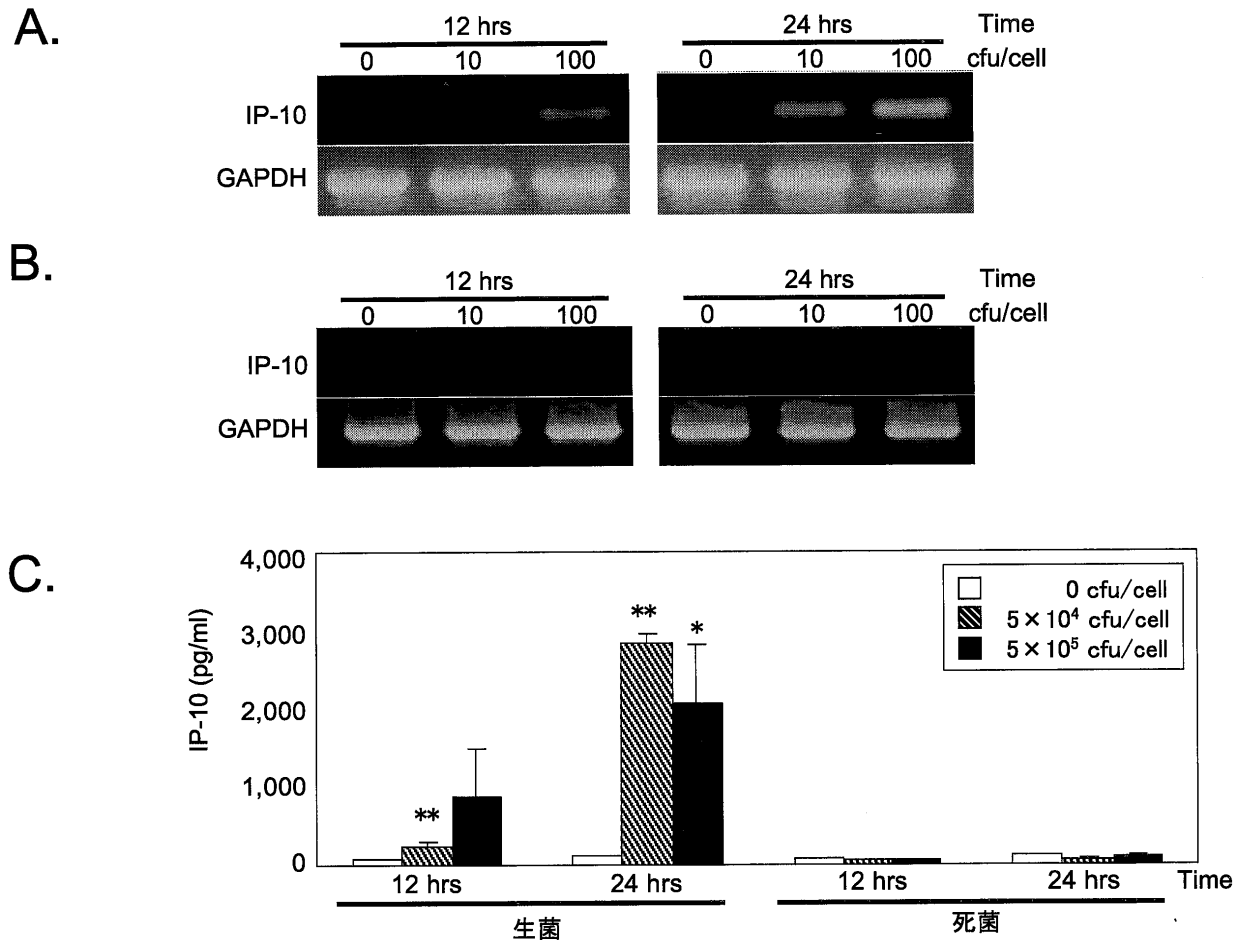


図3 *S. mutans* 刺激による歯髄線維芽細胞のIP-10発現の解析

- A: 歯髄線維芽細胞を *S. mutans* の生菌と死菌で12, 24時間刺激した後, total RNA を回収し, IP-10 mRNA の発現を RT-PCR によって解析した。歯髄線維芽細胞を  $5 \times 10^4$  cfu/cell,  $5 \times 10^5$  cfu/cell の生菌 *S. mutans* で刺激すると, 刺激後12時間から24時間まで, IP-10 mRNA の持続的な発現誘導が認められた。
- B: 死菌 *S. mutans* で刺激した時は, すべての刺激条件において IP-10 の遺伝子発現誘導は認められなかった。
- C: 歯髄線維芽細胞を *S. mutans* の生菌と死菌で12, 24時間刺激した後, 培養上清を回収し, IP-10 のタンパク産生量を ELISA によって解析した。 $5 \times 10^4$  cfu/cell,  $5 \times 10^5$  cfu/cell の生菌 *S. mutans* で歯髄細胞を刺激すると, 無刺激コントロールと比較して刺激後12時間から24時間で有意な IP-10 産生増強が認められた。死菌 *S. mutans* で刺激した時は, すべての刺激条件において IP-10 の産生増強は認められなかった。\* p < 0.05, \*\* p < 0.01; 無刺激コントロールと比較して有意差を認めた。

IFN- $\gamma$  で歯髄線維芽細胞を刺激したとき, 濃度1.0 ng/ml において刺激4時間後から IP-10 遺伝子発現が認められ (図6 A), 刺激12時間後まで持続しており, 濃度10 ng/ml では刺激48時間まで持続的に発現していた (図6 B)。培養上清中の IP-10 産生量は刺激4時間後から刺激濃度および刺激時間依存的に有意に増加しており, ヒト皮膚線維芽細胞 (図6 C) および HUVEC (図6 D) と同様の産生傾向が認められた。なお, 歯髄線維芽細胞の IP-10 の産生量はヒト皮膚線維芽細胞の産生量と同程度であった (図6 B, C)。TNF- $\alpha$  および IL-1 $\beta$  で刺激した歯髄線維芽細胞の IP-10 産生は, TNF- $\alpha$  刺激濃度1.0 ng/ml, IL-1 $\beta$  刺激濃度0.1 ng/ml より高濃度の刺激において IP-10 の遺伝子発現が認められ (図7 A), TNF- $\alpha$  刺

激の発現量は IL-1 $\beta$  刺激よりも強かった (図7 A, C)。TNF- $\alpha$  および IL-1 $\beta$  刺激における IP-10 タンパク産生量は共に刺激4時間後から認められ, 刺激12時間後でピークとなり, 刺激48時間後まで持続的に産生が認められた (図7 B, D)。なお, IL-4 刺激において歯髄線維芽細胞からの IP-10 遺伝子発現および IP-10 タンパク産生はいずれの刺激条件においても認められなかった (図7 E, F)。

#### 4. 細菌刺激 THP-1細胞からの IP-10 発現

*S. mutans* により歯髄線維芽細胞から IP-10 の産生が認められたが, 歯髄炎の病態形成には線維芽細胞以外にも様々な細胞が関与していると考えられる。そこで, 細菌感染による炎症局所において貪食能を発揮するマクロ

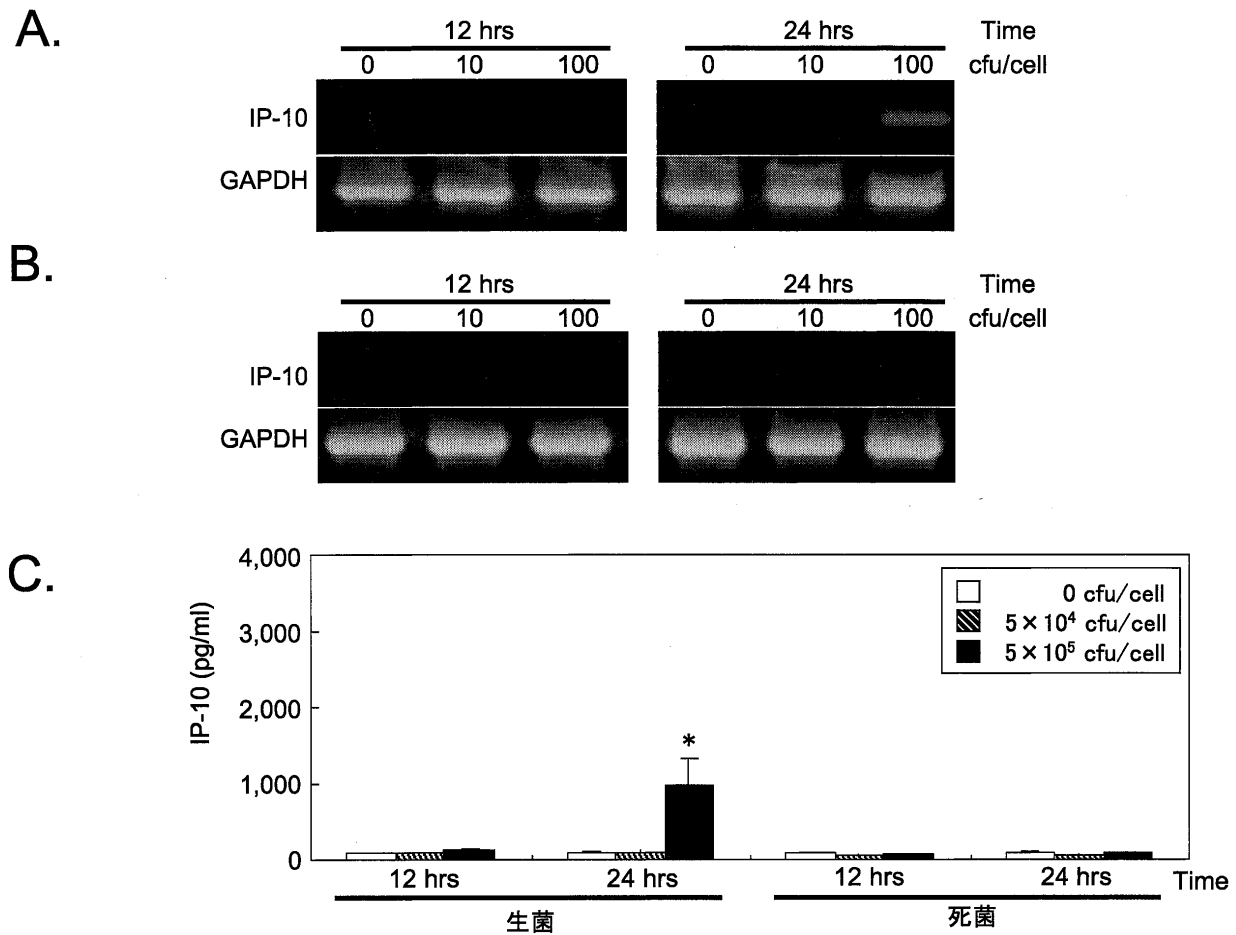


図4 *L. plantarum* 刺激による歯髄線維芽細胞の IP-10 発現の解析

- A: 歯髄線維芽細胞を *L. plantarum* の生菌と死菌で12, 24時間刺激した後, total RNA を回収し, IP-10 mRNA の発現を RT-PCR によって解析した。歯髄線維芽細胞を  $5 \times 10^4$  cfu/cell,  $5 \times 10^5$  cfu/cell の生菌 *L. plantarum* で刺激すると, 刺激後12時間から24時間まで, IP-10 mRNA の持続的な発現誘導が認められた。
- B: 死菌 *L. plantarum* で刺激した時は, すべての刺激条件において IP-10 の遺伝子発現誘導は認められなかった。
- C: 歯髄線維芽細胞を *L. plantarum* の生菌と死菌で12, 24時間刺激した後, 培養上清を回収し, IP-10 のタンパク産生量を ELISA 解析した。生菌 *L. plantarum* で ( $5 \times 10^5$  cfu/cell) 歯髄細胞を刺激すると, 無刺激コントロールと比較して, 刺激後24時間で有意な IP-10 の産生増強が認められた。死菌 *L. plantarum* で刺激した時は, すべての刺激条件において IP-10 の発現増強は認められなかった。\* p < 0.05; 無刺激コントロールと比較して有意差を認めた。

ファージに着目し, その IP-10 産生動態を検索した。

マクロファージ様細胞に分化誘導した THP-1 細胞を用い, 歯髄線維芽細胞の場合と同様に *S. mutans* で刺激したところ, 刺激8時間後において刺激濃度依存的に IP-10 遺伝子発現が認められた (図8A)。しかしながら, 24時間後では発現は認められなかった。なお, *S. mutans* の死菌刺激ではいずれの刺激条件においても IP-10 遺伝子発現は認められなかった (図8B)。培養上清中の IP-10 タンパク産生量は刺激8時間後から上昇した (図8C)。また, 死菌刺激では IP-10 タンパク産生は確認できなかった (図8C)。

## 考 察

歯髄における免疫応答が惹起されると, 著しいリンパ球の浸潤が認められるが<sup>29)</sup>, 一般にリンパ球の浸潤には免疫担当細胞の産生・分泌したサイトカインファミリーのケモカインが関与していることが知られている。当教室では CCR6 陽性メモリー T 細胞を遊走するケモカインの CCL20 が, *S. mutans* 刺激マクロファージから産生されるとともに, そのマクロファージから産生された炎症性サイトカインを介して, 歯髄線維芽細胞や血管内皮細胞からも CCL20 が産生されることを見出し, 歯髄炎の病態形成における CCL20 の重要性を明らかにした<sup>30)</sup>。しかし, 他のケモカインやケモカインレセプターを介したネットワークがどのように炎症性細胞の歯髄組織へ

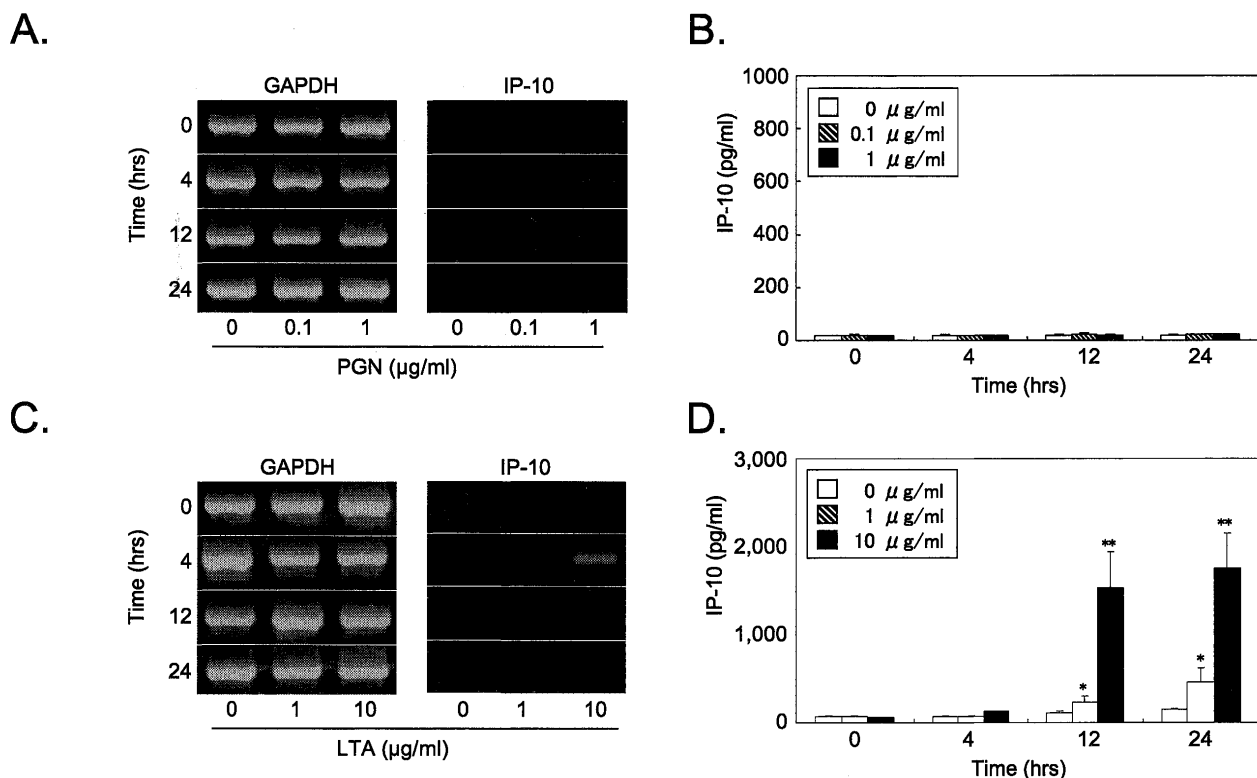


図5 LTA, PGN 刺激による歯髄線維芽細胞の IP-10 発現の解析

- A: 歯髄線維芽細胞を LTA で 4, 12, 24 時間刺激した後, total RNA を回収し, IP-10 mRNA の発現を RT-PCR によって解析した。歯髄線維芽細胞を LTA (1 μg/ml) で刺激すると, 刺激後 4 時間から 12 時間まで IP-10 mRNA の持続的な発現誘導が認められた。
- B: 培養上清を回収し, IP-10 のタンパク産生量を ELISA によって解析した。LTA で歯髄細胞を刺激すると, 無刺激コントロールと比較して IP-10 の産生量に変化は認められなかった。
- C: 歯髄線維芽細胞を PGN で 4, 12, 24 時間刺激した後, total RNA を回収し, IP-10 mRNA の発現を RT-PCR によって解析した。歯髄線維芽細胞を PGN (10 μg/ml) で刺激した時, 刺激 4 時間で IP-10 mRNA の発現が認められた。
- D: 培養上清を回収し, IP-10 のタンパク産生量を ELISA 解析した。PGN (1, 10 μg/ml) で歯髄線維芽細胞を刺激した時, 無刺激コントロールと比較して刺激 12 時間から 24 時間で有意な IP-10 の産生増強が認められた。\* p<0.05, \*\* p<0.01; 無刺激コントロールと比較して有意差を認めた。

の浸潤に関与しているのかは不明である。ケモカインの一つである IP-10 は IFN- $\gamma$  により線維芽細胞や血管内皮細胞から誘導され<sup>31)</sup>, IP-10 のレセプターである CXCR3 を発現している活性化 T 細胞の遊走・集積に関与していることが報告されている<sup>32)</sup>。冠動脈疾患において炎症時には IP-10 および Interleukin-8 (以下 IL-8 と略す) の産生が有意に上昇しているが regulated upon activation, normal T expressed and secreted (RANTES) の産生量は低く, IP-10 の存在が冠動脈疾患の炎症と関係があることが報告されている<sup>23)</sup>。しかし, 歯髄炎の炎症局所における IP-10 の発現および病態形成の関与については報告されておらず, 本研究は初めてこれを明らかにした。

臨床的炎症歯髄組織における IP-10 の遺伝子発現は, 正常歯髄組織よりも有意に増強していることが明らかとなり, 炎症歯髄組織における IP-10 の存在が組織の炎症

状態を表している可能性が示された。実際, 免疫組織学的検索においても臨床的炎症歯髄組織の線維芽細胞, マクロファージおよび血管内皮細胞において IP-10 タンパクの発現が認められており, さらにレセプターである CXCR3 の発現がリンパ球に認められたことから, IP-10 は CXCR3 陽性リンパ球を遊走させ, 組織にリンパ球浸潤を誘発して炎症状態をつくっていることが示唆された。このように歯髄における IP-10 の存在は正常歯髄と歯髄炎を判断する指標となりうる可能性が示された。今後どのように歯髄診断に応用するかが課題となろう。

次に, 齶蝕病巣に存在する代表的な細菌である *S. mutans* および *L. plantarum* に対する歯髄の IP-10 発現について検索した。その結果, 歯髄線維芽細胞は *S. mutans* および *L. plantarum* により IP-10 を産生し, その産生量は刺激細菌数の増加に伴い増強した。ヒト末梢



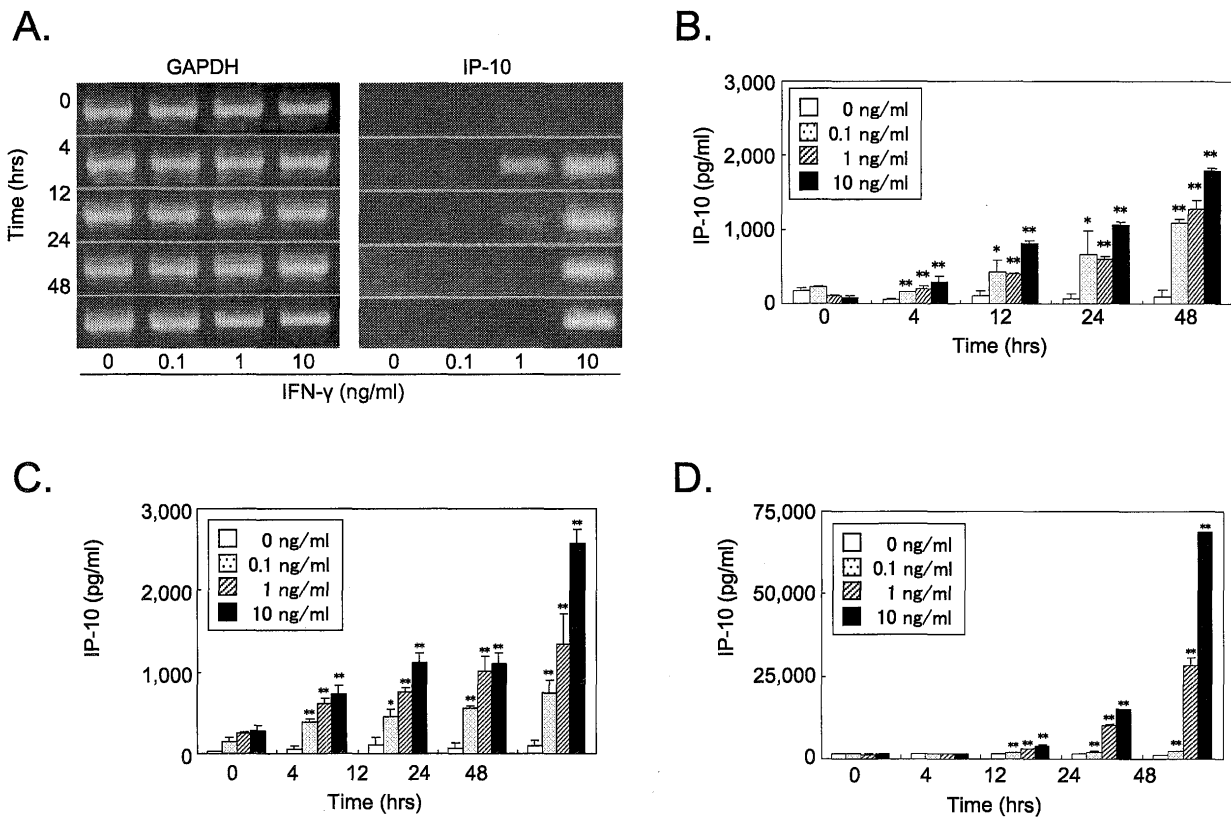


図6 IFN- $\gamma$  刺激による歯髄線維芽細胞の IP-10 の発現と、ヒト皮膚線維芽細胞および HUVEC の IP-10 発現の解析  
 A: 歯髄線維芽細胞を IFN- $\gamma$  で 4, 12, 24, 48 時間刺激した後, total RNA を回収し, IP-10 mRNA の発現を RT-PCR によって解析した。歯髄線維芽細胞を 0.1, 1, 10 ng/ml の IFN- $\gamma$  で刺激すると, 刺激後 4 時間から 48 時間まで, IP-10 mRNA の持続的な発現誘導が認められた。  
 B: 培養上清を回収し, IP-10 のタンパク産生量を ELISA 解析した。IFN- $\gamma$  で歯髄線維芽細胞を刺激した時, 無刺激コントロールと比較して, 刺激 4 時間から 48 時間で有意な IP-10 の産生増強が認められた。  
 C, D: ヒト皮膚線維芽細胞 (C) および HUVEC (D) を IFN- $\gamma$  で 4, 12, 24, 48 時間刺激した後, 培養上清を回収し, IP-10 のタンパク産生量を ELISA によって解析した。0.1, 1, 10 ng/ml の IFN- $\gamma$  でヒト皮膚線維芽細胞を刺激した時, 無刺激コントロールと比較して, 刺激後 4 時間から 48 時間で有意な IP-10 の産生増強が認められた (C)。同様に HUVEC では, 刺激 12 時間から 48 時間まで無刺激コントロールと比較して, IP-10 の発現誘導が認められた (D)。\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ ; 無刺激コントロールと比較して有意差を認めた。

血単核球 (以下 PBMC と略す) を *S. mutans* で刺激した場合も濃度依存的に IL-8 および monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) といったケモカインが産生されることが報告されている<sup>33)</sup>。したがって, ケモカインの産生は刺激する細菌量に従い増加するものと考えられる。

歯髄線維芽細胞の IP-10 の遺伝子発現は *L. plantarum* の刺激よりも *S. mutans* の刺激の方がより強いことが明らかとなった。実際, 歯髄線維芽細胞からの IP-10 タンパクの産生量も *S. mutans* の刺激では *L. plantarum* の刺激の時と比較して増強していた。Jiang ら<sup>33)</sup> は PBMC からのケモカインの産生量は, *P. endodontalis* による刺激よりも *S. mutans* および *P. anaerobius* による刺激の方が増強されると報告している。これらのことは, 細菌種の違いによりケモカインの産生量に差が生じることを示

している。従って, 進行する齶蝕病巣内の細菌種により IP-10 産生の誘導パターンが異なり, 以後の歯髄免疫応答が異なってくる可能性が考えられる。つまり, 齶蝕内の細菌が刺激となり歯髄炎が惹起する過程において, 局所に分泌されるケモカインの量はその細菌種により変化し, 以後の免疫応答に差異が生じて, 臨床的に慢性あるいは急性歯髄炎, さらに不可逆性歯髄炎への進展に関与することが考えられる。

*S. mutans* と *L. plantarum* に共通している要素としてこの細菌の細胞壁を構成する LTA や PGN が考えられる。細菌に由来する細菌因子の一部は宿主細胞の表面受容体である Toll-Like Receptor (以下 TLR と略す) と反応することにより細胞は活性化される<sup>34)</sup>。特に, LTA と PGN は TLR2 に対する特異性を有することが知られ

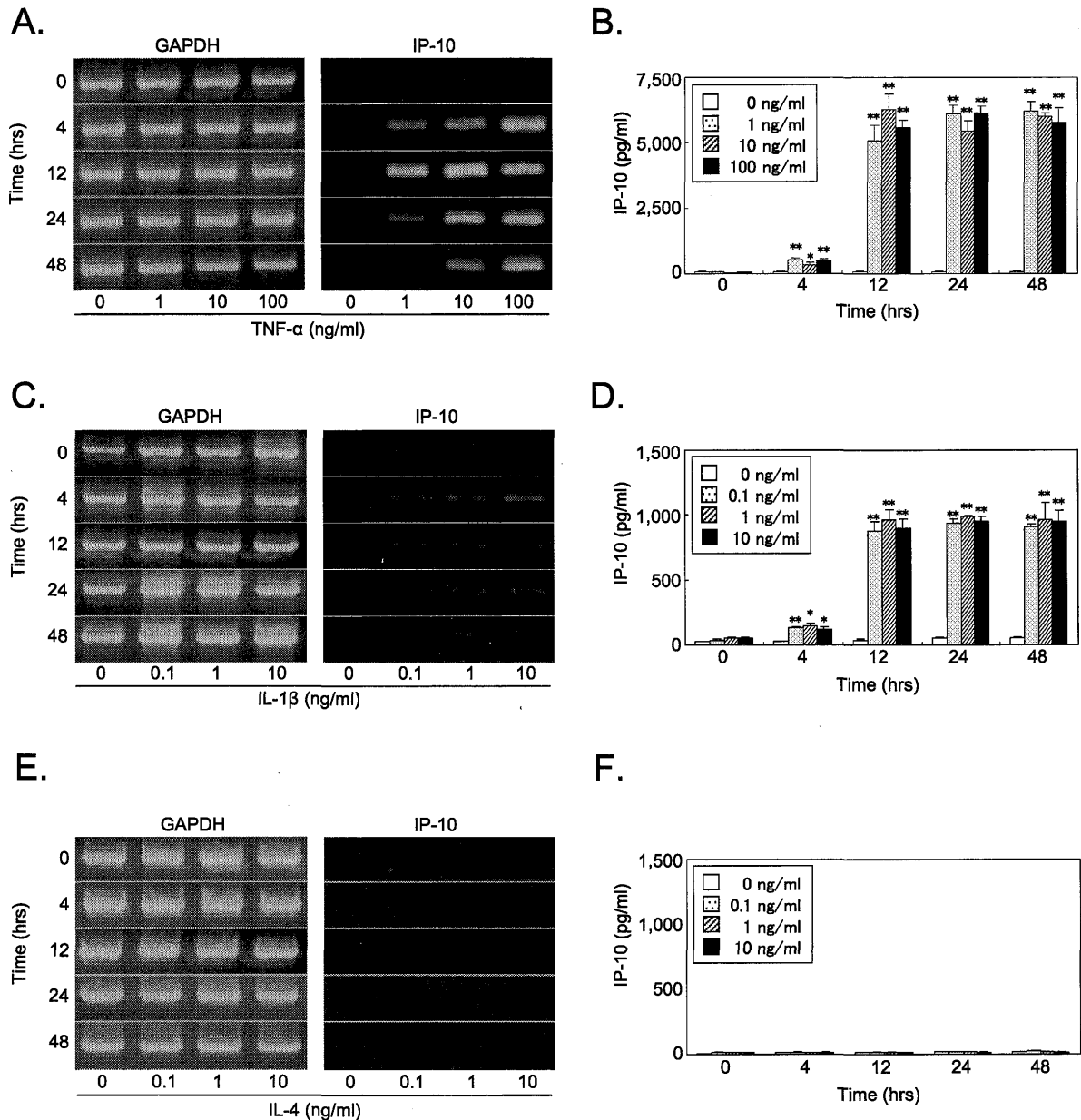


図7 TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  および IL-4刺激による歯髄線維芽細胞の IP-10の発現の解析

- A: 歯髄細胞を TNF- $\alpha$  で 4, 12, 24, 48時間刺激した後, total RNA を回収し, IP-10 mRNA の発現を RT-PCR によって解析した。歯髄線維芽細胞を 1, 10, 100 ng/ml の TNF- $\alpha$  で刺激すると, 刺激後 4 時間から 48 時間まで, IP-10 mRNA の持続的な発現誘導が認められた。
- B: 培養上清を回収し, IP-10 のタンパク産生量を ELISA 解析した。TNF- $\alpha$  で歯髄線維芽細胞を刺激した時, 無刺激コントロールと比較して, 刺激 4 時間から 48 時間で有意な IP-10 の産生増強が認められた。
- C: 歯髄線維芽細胞を IL-1 $\beta$  で 4, 12, 24, 48時間刺激した後, total RNA を回収し, IP-10 mRNA の発現を RT-PCR によって解析した。歯髄線維芽細胞を 0.1, 1, 10 ng/ml の IL-1 $\beta$  で刺激すると, 刺激後 4 時間から 48 時間まで, IP-10 mRNA の持続的な発現誘導が認められた。
- D: 培養上清を回収し, IP-10 のタンパク産生量を ELISA 解析した。IL-1 $\beta$  で歯髄線維芽細胞を刺激した時, 無刺激コントロールと比較して, 刺激 4 時間から 48 時間で有意な IP-10 の産生増強が認められた。
- E: 歯髄線維芽細胞を IL-4 で 4, 12, 24, 48時間刺激した後, total RNA を回収し, IP-10 mRNA の発現を RT-PCR 解析した。歯髄線維芽細胞を IL-4 で刺激しても IP-10 mRNA の発現誘導は認められなかった。
- F: 培養上清を回収し, IP-10 のタンパク産生量を ELISA によって解析した。IL-4 で歯髄細胞を刺激しても IP-10 の産生増強は認められなかった。\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ ; 無刺激コントロールと比較して有意差を認めた。

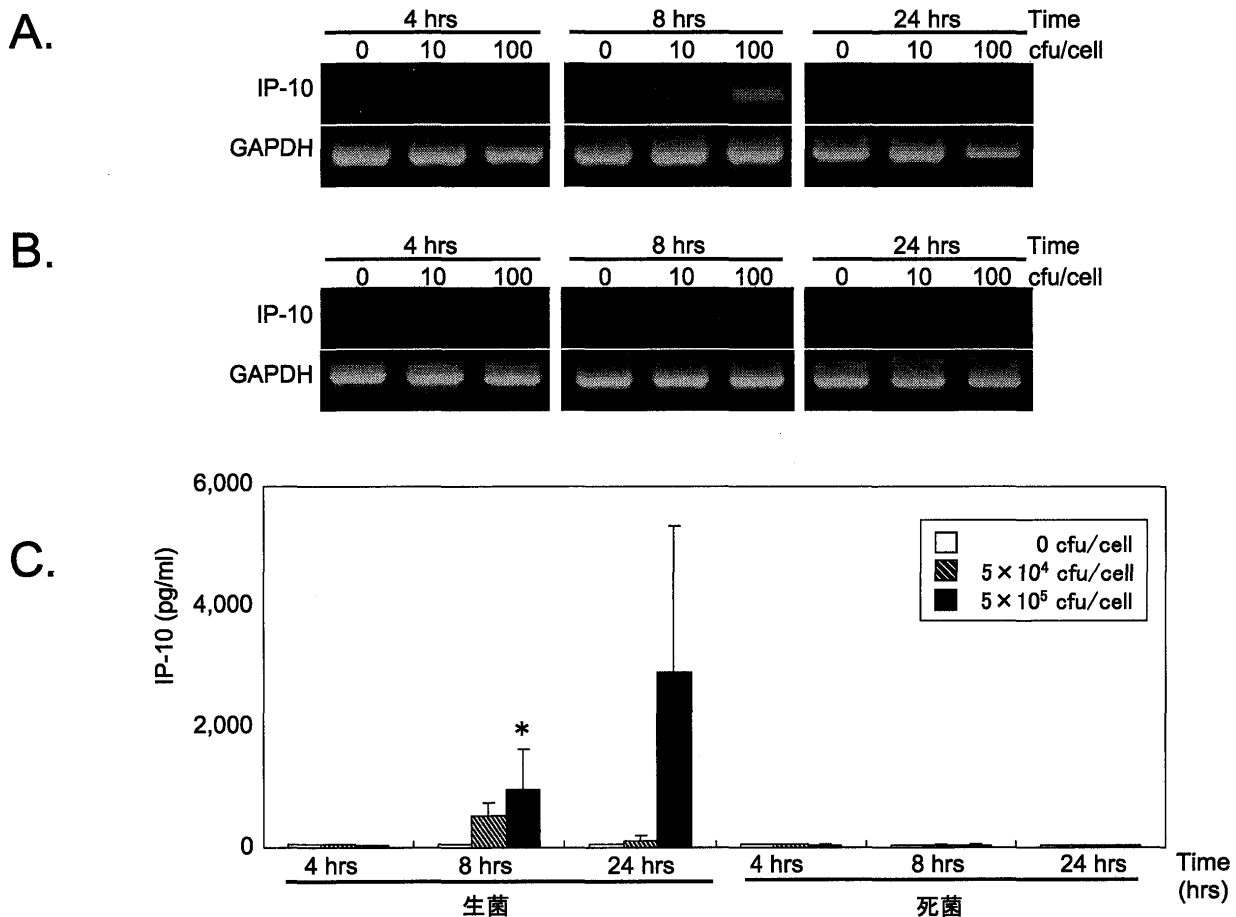


図8 *S. mutans* 刺激による分化型 THP-1細胞の IP-10発現の解析

A, B: 分化型 THP-1細胞を *S. mutans* の生菌と死菌で 4, 8, 24時間刺激した後, total RNA を回収し, IP-10 mRNA の発現を RT-PCR によって解析した。(A) THP-1細胞を  $5 \times 10^4$ ,  $5 \times 10^5$  cfu/cell の生菌 *S. mutans* で刺激すると, 刺激後 8 時間で IP-10 mRNA の発現誘導が認められた。(B) 分化型 THP-1細胞を死菌 *S. mutans* で刺激しても, すべての刺激条件において IP-10 mRNA の発現誘導は認められなかった。

C: 分化型 THP-1細胞を *S. mutans* の生菌と死菌で 4, 8, 24時間刺激した後, 培養上清を回収し, IP-10 のタンパク産生量を ELISA によって解析した  $5 \times 10^5$  cfu/cell の生菌 *S. mutans* で分化型 THP-1細胞を刺激した時, 無刺激コントロールと比較して, 刺激後 8 時間で有意な IP-10 産生増強が認められた。死菌 *S. mutans* で刺激した時は, すべての刺激条件において IP-10 の産生増強は認められなかった。

\*  $p < 0.05$ ; 無刺激コントロールと比較して有意差を認めた。

ており, 細菌種により反応性に差があることも報告されている<sup>35)</sup>。そこで, LTA と PGN の歯髄線維芽細胞に与える影響について検討した。なお, 今回用いた培養歯髄線維芽細胞は恒常的に TLR2 を細胞表面に発現していることを予備実験にて確認している (データ示さず)。その結果, LTA では IP-10 のタンパクの産生はほとんど認められなかったのに対し, PGN の刺激では IP-10 のタンパク産生が認められた。すなわち, LTA と PGN は共に TLR2 に作用すると考えられるものの, 歯髄線維芽細胞からの IP-10 産生に違いが生じる結果となった。LTA と PGN の刺激に対する IP-10 の発現量に差異が生じた理由として, Nucleotide oligomerization domain (以下 Nod と略す) と呼ばれる pattern recognition receptor の

関与が考えられる。事実, 歯髄線維芽細胞には TLR2 だけでなく, Nod の発現も確認されている (データ示さず)。Nod は細胞内に存在し, TLR と同じく自然免疫に関与する因子で, Nod1 と Nod2 が知られる<sup>36)</sup>。Nod1 は主にグラム陰性菌の PGN の diaminopimelic acid 構造を認識し<sup>37)</sup>, Nod2 はグラム陽性菌および陰性菌の PGN の構造 muramyl dipeptide を認識すると報告されている<sup>38)</sup>。市販されている PGN にはこのような Nod に反応する構造が含まれていることが報告されており<sup>39)</sup>, 今回の実験において, IP-10 のタンパク産生量に差が認められたのは, PGN は TLR2 と Nod に, LTA は TLR2 のみに反応したためと考えられる。その詳細は今後, 検討する必要がある。

歯髄線維芽細胞からの IP-10 産生が、細菌の直接的な刺激によるか間接的な刺激によるかは不明である。今回、死菌による刺激では歯髄線維芽細胞からの IP-10 の産生は認められなかった。生菌は培地中に様々な物質を産出することから、その産生物が刺激となって歯髄線維芽細胞の IP-10 を産生誘導する一方、死菌では刺激となる産生物がないため歯髄線維芽細胞の IP-10 産生は誘導されなかったと考えられる。このように、細菌の間接的な刺激により歯髄線維芽細胞の IP-10 産生が誘導されると考えられるが、生菌は培養中にも増殖することから、今回の生菌と死菌による歯髄線維芽細胞の IP-10 産生の差異は、刺激する細菌の数による可能性も考えられる。今後、明らかにする必要があるだろう。

齶蝕細菌の侵襲により発症した歯髄炎の病変局所には、免疫担当細胞が様々なサイトカインを産生しており、産生されたサイトカインが歯髄炎の病態を修飾していることが示されている<sup>40)</sup>。そこで、歯髄組織において発現・産生が報告されている IFN- $\gamma$ <sup>40)</sup>、TNF- $\alpha$ <sup>41~43)</sup> および IL-1 $\beta$ <sup>42~44)</sup> について、歯髄線維芽細胞に与える影響を検討した。IFN- $\gamma$  刺激による歯髄線維芽細胞の IP-10 の発現は、コントロールとして使用したヒト皮膚線維芽細胞および HUVEC と同様に、IFN- $\gamma$  刺激濃度および刺激時間に依存した発現を示した。さらに、TNF- $\alpha$  および IL-1 $\beta$  により歯髄線維芽細胞を刺激した結果、IP-10 の遺伝子発現が認められ、IP-10 タンパクの産生も認められた。これらのことは、歯髄組織に分布している樹状細胞やマクロファージ、好中球などの様々な免疫担当細胞が細菌刺激により炎症性サイトカインを産生し、これが IP-10 の産生を誘導して局所にリンパ球の遊走が惹起されることを示唆している。さらに、歯髄細胞は *S. mutans* 刺激により IFN- $\gamma$  を発現することが報告されていることから<sup>40)</sup>、*S. mutans* に刺激された歯髄線維芽細胞が IFN- $\gamma$  を産生し、オートクライン作用により歯髄線維芽細胞から IP-10 の産生が誘導されたという可能性も考えられる。事実、今回の実験において、歯髄線維芽細胞は IFN- $\gamma$  の刺激では刺激 4 時間後から IP-10 の産生が認められたのに対し、*S. mutans* の刺激では刺激 4 時間後に IP-10 の産生は認められず（データ示さず）、刺激 12 時間後から IP-10 の産生が認められた。この発現時間の遅れが生じたのは、まず *S. mutans* により IFN- $\gamma$  が産生され、その後に IFN- $\gamma$  が刺激物質となりオートクライン作用で IP-10 が産生された可能性が考えられる。

今回の免疫組織化学的検索によりマクロファージ様細胞が IP-10 を発現していたことから、マクロファージ様細胞に分化誘導した分化型 THP-1 細胞を用いて、IP-10 の産生動態の解析を行った。その結果、分化型 THP-1 細胞は生菌 *S. mutans* で刺激すると、歯髄線維芽細胞と同様に IP-10 の発現誘導を認めた。細菌の侵襲を受けた初期の歯髄局所では樹状細胞が細菌に対する免疫応答を行っているとは推測されている<sup>45, 46)</sup>。特に、*S. mutans* が

樹状細胞の成熟に関与し、抗原提示だけでなく 1 型ヘルパー T 細胞タイプのサイトカインを産生することを当教室において以前に報告しており<sup>47)</sup>、このサイトカインにより歯髄線維芽細胞やマクロファージといった歯髄組織に存在する細胞が刺激され IP-10 が産生されると考えられる。これらのことにより、歯髄炎病巣局所に存在する免疫担当細胞はサイトカインを産生・分泌するとともに、ケモカインの産生を行い、直接的あるいは間接的に局所へのリンパ球遊走を誘導している可能性が示された。

本研究により、歯髄組織での IP-10 の発現・産生が初めて明らかにされた。さらに、齶蝕細菌により刺激された歯髄線維芽細胞やマクロファージから IP-10 が直接産生されるだけでなく、サイトカインを介したオートクライン作用やパラクライン作用でも産生増強される可能性が示された。これらの事実は、歯髄炎の病態形成において IP-10-CXCR3 系が作動して重要な働きをしていることを示している。近年、この IP-10 をはじめ、CXCR3 リガンドの中にはリンパ球の遊走活性だけでなく、細菌に対する直接的な抗菌活性を有することが報告され<sup>48)</sup>、抗菌活性を有するディフェンシン等の抗菌ペプチドと共に注目されている。今後、IP-10-CXCR3 系のみならず細菌に対する抗菌性との関連が、どのように齶蝕細菌を原因とした歯髄炎へ関与するのか、そして、歯髄炎の可逆から不可逆化への関与について明らかにすることが重要であると考えられる。

## 結 論

歯髄炎の病態形成における IP-10 の役割を解析することを目的として、歯髄組織における IP-10 および CXCR3 の発現を RT-PCR および免疫組織化学的手法を用いて検討した。また、歯髄線維芽細胞およびマクロファージの IP-10 発現のメカニズムを解析するために、培養歯髄線維芽細胞および分化型 THP-1 細胞を用い、*S. mutans* および *L. plantarum* による細菌刺激、また、IFN- $\gamma$  や TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  および IL-4 によるサイトカインで刺激した場合の IP-10 産生について検討した。その結果、以下のような結論を得た。

1. 炎症歯髄組織における IP-10 の mRNA の発現は正常歯髄組織と比較して、有意に増強していた。
2. IP-10 は歯髄炎病変局所の線維芽細胞、マクロファージおよび血管内皮細胞に、CXCR3 は主に浸潤リンパ球に局在していた。
3. 培養歯髄線維芽細胞を *S. mutans* および *L. plantarum* で刺激すると IP-10 mRNA の発現および IP-10 タンパクの産生が認められた。また、LTA 刺激では IP-10 mRNA 発現および IP-10 タンパク産生はほとんど認められず、PGN 刺激では発現・産生が認められた。さらに、IFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$  および IL-1 $\beta$  で刺激した場合も IP-10 産生が認められた。
4. マクロファージ様に分化させた THP-1 細胞を *S.*

*mutans* で刺激すると, mRNA レベルおよびタンパクレベルにおいて発現・産生が認められた。

以上より, 齧蝕病原菌により歯髄炎を発症した歯髄局所において, マクロファージや血管内皮細胞および線維芽細胞が IP-10 を産生し, CXCR3 を発現しているリンパ球の遊走・集積に関与していることが明らかとなり, IP-10 は歯髄炎の病態形成に重要な役割を担っている可能性が示唆された。

## 謝 辞

稿を終えるにあたり, 終始御指導御校閲を賜った歯科保存学分野 松尾敬志教授に深甚なる謝辞を表しますとともに, 御校閲御助言を戴いた歯周歯内治療学分野 永田俊彦教授, 口腔感染症学分野 三宅洋一郎教授に深謝致します。また, 直接御指導と御助言を戴いた, 歯科保存学分野 中西 正講師に厚く御礼申し上げます。最後に, 数々の御教示と御援助を戴いた歯科保存学分野の諸先生方に深謝致します。

## 参考文献

- Simon JHS : Pathology. In pathways of the pulp (Cohen S and Burns RC ed.). 1st ed., Saint Louis, Mosby, 1976, 291-315
- 石橋眞澄 : 歯内療法学 ; 第 1 版, 京都, 永末書店, 1986, 130-131
- 福地芳則, 長田 保, 砂田今男 : 歯内療法学 ; 第 3 版, 京都, 1983, 118-119
- Tronstad L and Mjor IA : Capping of the inflamed pulp. Oral Surg Oral Med Oral Pathol 34, 477-485 (1972)
- Ingle JI and Bereride EE : Endodontics; 2nd ed., Philadelphia, Lea & Febiger, 197, 746
- Lim KC and Kirk EEJ: Direct pulp capping : a review; Endod Dent Traumatol 3, 213-219 (1987)
- Shovelton, DS, Friend LA, Kirk EEJ and Rowa AHR : The efficacy of pulp capping material: Br Dent J 130, 385-391 (1971)
- 今西和子, 松尾敬志, 中橋洋子, 鮫島義明, 恵比須繁之, 岡田 宏 : 直接覆髄における術前および術中所見と術後成績の関係について. 日歯保存誌32, 1745-1750 (1989)
- Edwardsson S : Bacteriological studies on deep areas of caries dentine. Odontol Revy Suppl 32, 1-143 (1974)
- Hoshino E : Predominant obligate anaerobes in human carious dentin. J Dent Res 64, 1195-1198 (1985)
- 中西 正, 高橋加奈子, 細川義隆, 尾崎和美, 松尾敬志 : 歯髄炎の病態形成における細菌侵襲と歯髄反応. 四国歯誌14, 255-263 (2002)
- Sakurai K, Okiji T and Suda H : Co-increase of nerve fibers and HLA-DR- and/or factor-XIIIa- expressing dendritic cells in dentinal caries-affected regions of the human dental pulp: an immunohistochemical study. J Dent Res 78, 1596-1608 (1999)
- Reeves R and Stanley HR : The relationship of bacterial penetration and pulpal pathosis in carious teeth. Oral Surg Oral Med Oral Pathol 22, 59-65 (1966)
- Izumi T, Kobayashi I, Okamura K and Sakai H : Immunohistochemical study on the immunocompetent cells of the pulp in human non-carious and carious teeth. Arch Oral Biol 40, 609-614 (1995)
- Hahn CL, Falkler WA Jr and Siegel MA : A study of T and B cells in pulpal pathosis. J Endodon 15, 20-26 (1989)
- Butcher EC and Picker LJ : Lymphocyte homing and homeostasis. Science 272, 60-66 (1996)
- Oppenheim JJ : Overview of chemokines. Adv Exp Med Biol 351, 183-186 (1993)
- Wolpe SD and Cerami A : Macrophage inflammatory proteins 1 and 2: members of a novel superfamily of cytokines. FASEB J 3, 2565-2573 (1989)
- Broxmeyer HE, Sherry B, Lu L, Cooper S, Oh KO, Tekamp-Olson P, Kwon BS and Cerami A : Enhancing and suppressing effects of recombinant murine macrophage inflammatory proteins on colony formation in vitro by bone marrow myeloid progenitor cells. Blood 76, 1110-1116 (1990)
- Graham GJ, Wright EG, Hewick R, Wolpe SD, Wilkie NM, Donaldson D, Lorimore S and Pragnell IB : Identification and characterization of an inhibitor of haemopoietic stem cell proliferation. Nature 344, 442-444 (1990)
- Broxmeyer HE, Sherry B, Cooper S, Lu L, Maze R, Beckmann MP, Cerami A and Ralph P : Comparative analysis of the human macrophage inflammatory protein family of cytokine (chemokine) on proliferation of human myeloid progenitor cells. Interacting effects involving suppression, synergistic suppression, and blocking of suppression. J Immunol 150, 3448-3458 (1993)
- Luster AD : Chemokine - chemotactic cytokines that mediate inflammation. N Engl J Med 338, 436-445 (1998)
- Rothenbacher D, Muller-Scholze S, Herder C, Koenig W and Kolb H : Differential expression of chemokines, risk of stable coronary heart disease, and correlation with established cardiovascular risk markers. Arterioscler Thromb Vasc Biol 26,194-199 (2006)
- Chuang YH, Lian ZX, Cheng CM, Lan RY, Yang GX, Moritoki Y, Chiang BL, Ansari AA, Tsuneyama K, Coppel RL and Gershwin ME : Increased levels of chemokine receptor CXCR3 and chemokines IP-10 and

- MIG in patients with primary biliary cirrhosis and their first degree relatives. *J Autoimmun* 25, 126-132 (2005)
- 25) Kanda N and Watanabe S : Substance P enhances the production of interferon-induced protein of 10kDa by human keratinocytes in synergy with interferon- $\gamma$ . *J Invest Dermatol* 119, 1290-1297 (2002)
- 26) Villagomez MT, Bae SJ, Ogawa I, Takenaka M and Katayama I : Tumour necrosis factor- $\alpha$  but not interferon- $\gamma$  is the main inducer of inducible protein-10 in skin fibroblast from patients with atopic dermatitis. *Br J Dermatol* 150, 910-916 (2004)
- 27) Hanaoka R, Kasama T, Muramatsu M, Yajima N, Shiozawa F, Miwa Y, Negishi M, Ide H, Miyaoka H, Uchida H and Adachi M : A novel mechanism for the regulation of IFN- $\gamma$  inducible protein-10 expression in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* 5, R74-R81 (2003)
- 28) Takashiba S, Van Dyke TE, Amar S, Murayama Y, Soskolne AW and Shapira L : Differentiation of monocytes to macrophages primes cells for lipopolysaccharide stimulation via accumulation of cytoplasmic nuclear factor kappa B. *Infect Immun* 67, 5573-5578 (1999)
- 29) Izumi T, Kobayashi I, Okamura K and Sakai H : Immunohistochemical study on the immunocompetent cells of the pulp in human non-carious and carious teeth. *Arch Oral Biol* 40, 609-614 (1995)
- 30) Nakanishi T, Takahashi K, Hosokawa Y, Adachi T, Nakae H and Matsuo T : Expression of macrophage inflammatory protein 3 alpha in human inflamed dental pulp tissue. *J Endodon* 31, 84-87 (2005)
- 31) Luster AD and Ravetch JV : Biochemical characterization of a  $\gamma$  interferon-inducible cytokine (IP-10). *J Exp Med* 166, 1084-1094 (1987)
- 32) By Marcel Loetscher, Basil Gerber, Pius Loetscher, Simon A Jones, Luca Piali, Ian Clark-Lewis, Marco Baggiolini and Bernhard Moser : Chemokine Receptor Specific for IP10 and Mig: Structure, Function, and Expression in Activated T-Lymphocytes. *J Exp Med* 184, 963-969 (1996)
- 33) Jiang Y, Russell TR, Schilder H and Graves DT : Endodontic pathogens stimulate monocyte chemoattractant protein-1 and interleukin-8 in mononuclear cell. *J Endod* 24, 86-90 (1998)
- 34) Michelsen KS, Aicher A, Mohaupt M, Hartung T, Dimmeler S, Kirschning CJ and Schumann RR : The role of toll-like receptors (TLRs) in bacteria-induced maturation of murine dendritic cells (DCs). Peptidoglycan and lipoteichoic acid are inducers of DC maturation and require TLR2. *J Biol Chem* 276, 25680-25686 (2001)
- 35) Han SH, Kim JH, Martin M, Michalek SM and Nahm MH : Pneumococcal lipoteichoic acid (LTA) is not as potent as staphylococcal LTA in stimulating Toll-like receptor 2. *Infect Immun* 71, 5541-5548 (2003)
- 36) Girardin SE, Travassos LH, Herve M, Blanot D, Boneca IG, Philpott DJ, Sansonetti PJ and Mengin-Lecreulx D : Peptidoglycan molecular requirements allowing detection by Nod1 and Nod2. *J Biol Chem* 278, 41702-41708 (2003)
- 37) Girardin SE, Boneca IG, Carneiro LA, Antignac A, Jehanno M, Viala J, Tedin K, Taha MK, Labigne A, Zahringer U, Coyle AJ, DiStefano PS, Bertin J, Sansonetti PJ and Philpott DJ : Nod1 detects a unique muropeptide from gram-negative bacterial peptidoglycan. *Science* 300, 1584-1587 (2003)
- 38) Uehara A, Yang S, Fujimoto Y, Fukase K, Kusumoto S, Shibata K, Sugawara S and Takada H : Muramyl dipeptide and diamino pimelic acid-containing desmuramyl peptides in combination with chemically synthesized Toll-like receptor agonists synergistically induced production of interleukin-8 in a NOD2- and NOD1-dependent manner, respectively, in human monocytic cells in culture. *Cell Microbiol* 7, 53-61 (2005)
- 39) Netea MG, Ferwerda G, de Jong DJ, Jansen T, Jacobs L, Kramer M, Naber TH, Drenth JP, Girardin Se, Kullberg BJ, Adema GJ and Van der Meer JW : Nucleotide-binding oligomerization domain-2 modulates specific TLR pathways for the induction of cytokine receptor. *J Immunol* 174, 6518-6523 (2005)
- 40) Hahn CL, Best AM and Tew JG : Cytokine induction by *Streptococcus mutans* and pulpal pathogenesis. *Infect Immun* 68, 6785-6789 (2000)
- 41) Engels-Deutsch M, Pini A, Yamashita Y, Shibata Y, Haikel Y, Scholler-Guinard M and Klein JP : Insertional inactivation of *pac* and *rmlB* genes reduces the release of tumor necrosis factor  $\alpha$ , interleukin-6, and interleukin-8 induced by *Streptococcus mutans* in monocytic, dental pulp, and periodontal ligament cells. *Infect Immun* 71, 5169-5177 (2003)
- 42) Coil J, Tam E and Waterfield JD : Proinflammatory cytokine profiles in pulp fibroblasts stimulated with lipopolysaccharide and methyl mercaptan. *J Endodon* 30, 88-91 (2004)
- 43) Yamaguchi M, Kojima T, Kanekawa M, Aihara N, Nogimura A and Kasai K : Neuropeptides stimulate production of interleukin-1 $\beta$ , interleukin-6, and tumor necrosis factor- $\alpha$  in human dental pulp cells. *Inflamm Res* 53, 199-204 (2004)
- 44) Hosoya S and Matsushima K : Stimulation of

- interleukin-1 $\beta$  production of human dental pulp cells by *Porphyromonas endodontalis* lipopolysaccharide. J Endodon 23, 39-42 (1997)
- 45) Jontell M, Okiji T, Dahlgren U and Bergenholtz G : Immune defence mechanisms of the dental pulp. Crit Rev Oral Biol Med 9, 179-200 (1998)
- 46) Kamal AM, Okiji T, Kawasima N and suda H : Defence responses of dentin/pulp complex to experimentally induced caries in rat molars: an immunohistochemical study on kinetics of pulpal Ia antigen-expression cells and macrophages. J Endodon 23, 115-120 (1997)
- 47) 高松夏子：齲蝕関連細菌の樹状細胞成熟に及ぼす影響について. 四国歯誌18, 149-160 (2005)
- 48) Cole AM, Ganz T, Liese AM, Burdick MD, Liu L and Strieter RM : Cutting edge: IFN-inducible ELR- CXC chemokine display defensin-like antimicrobial activity. J Immunol 167, 623-627 (2001)