



Title	LPS投与後ラット歯周組織におけるマクロファージの動態とIL-1 $\beta$ の発現および破骨細胞に対する影響について：免疫組織化学・形態計測学的検討
Author(s)	大西, 明雄
Citation	大阪大学, 1998, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/40795">https://hdl.handle.net/11094/40795</a>
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、<a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">大阪大学の博士論文について</a>をご参照ください。

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

氏名	大西 明雄
博士の専攻分野の名称	博士(歯学)
学位記番号	第13776号
学位授与年月日	平成10年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 歯学研究科歯学基礎専攻
学位論文名	「LPS投与後ラット歯周組織におけるマクロファージの動態とIL-1 $\beta$ の発現および破骨細胞に対する影響について-免疫組織化学・形態計測学的検討-」
論文審査委員	(主査) 教授 伊集院直邦
	(副査) 教授 栗栖浩二郎 助教授 木村 重信 講師 島内 英俊

### 論文内容の要旨

#### 【研究目的】

グラム陰性菌の外膜に含まれるリポ多糖 (LPS : lipopolysaccharide) は、多形核白血球に対する遊走作用の誘導、破骨細胞性骨吸収や単球・マクロファージ系細胞の活性化による interleukin (IL) - 1 等のサイトカイン産生誘導など様々な作用を有することが知られ、辺縁性歯周炎の発症並びに進展増悪に重要な因子となることが知られている。一方、IL - 1 はマクロファージや線維芽細胞よりのサイトカインや PG の産生、コラゲナーゼなどの産生、破骨細胞の分化・誘導作用などを有していることが主として in vitro の実験系で明らかにされている。従って、マクロファージは歯周炎時の歯周組織破壊に大いに関与していることが強く示唆される。そこで本研究では、マクロファージに着目し、LPS 局所投与により惹起したラット実験歯周炎モデルを用い、辺縁歯周組織におけるマクロファージ系細胞の分布やその経時的変動を免疫組織化学的に検索するとともに、同部における IL - 1 $\beta$ 陽性細胞の出現・分布状況及び破骨細胞性骨吸収との関連性を in vivo で検討した。

#### 【材料および方法】

8 週齢、体重約 230 g の Wistar 系雄性ラット (124匹) を使用した。E.coli 由来 LPS (Sigma 社製) を 5.0 mg/ml の濃度で生理食塩水に混合し、直径 1 mm の綿棒に浸漬した。仰臥位に固定したラットの両側上顎歯部咬合面上に同綿棒を静置し、1 時間にわたって口蓋側歯肉溝から LPS を浸透投与した。投与開始後 3, 12 時間、1, 2, 3 および 7 日目 (IL - 1 $\beta$ 検索群に関しては、さらに 1 と 6 時間群を設定) に同部を顎骨ごと採取し、PLP 固定液を用いて 4 °C で、一晩固定した。固定後、10% EDTA 液中にて 7 日間、低温脱灰した。材料は AMeX 法にてパラフィン包埋するとともに、IL - 1 $\beta$ 免疫染色用に一部を OCT compound に包埋した。頬舌方向に平行に、可及的に歯冠から根尖までが含まれるように 4 ~ 5  $\mu$ m 厚の切片を作成した。切片にヘマトキシリン・エオジン染色を施すとともに、単球・マクロファージ系細胞に対してモノクローナル抗体 OX 6 [抗Ia抗原], ED 1 [抗マクロファージ系細胞], ED 2 [抗組織球] (Serotec 社), IL - 1 $\beta$ 産生細胞に対して抗 IL - 1 $\beta$ 抗体 (Yanaihara Institute Inc.), および破骨細胞同定のためポリクローナル抗体抗 carbonic anhydrase II 抗体を用いて ABC 法 (Dako 社) にて免疫組織化学染色を行なった。組織計測にあたり、ラット口蓋側歯周組織領域を、歯肉縁から接合上皮 (JE) までの領域、JE 根尖側端から歯槽骨縁までの領域、歯槽骨縁から根尖方向に約 1 mm までの歯根膜領域の 3 領域に分け、Video Micrometer (Olympus 社) を用いて計測し、t 検定および Mann-Whitney 検定にて比較した。

## 【結果】

- 1) LPS 投与により、3 時間後より JE や JE 直下結合織に水腫性変化や軽度の血管拡張、多形核白血球浸潤をともなう炎症性変化がみられ、1～3 日にかけて増強傾向を示したが、7 日後には減少していた。
- 2) 免疫組織化学的所見：(i) ED 1 陽性所見は、類円形、短紡錘形ないし樹状をした単球・マクロファージ系細胞と思われる細胞にみられ、JE 下および歯根膜結合織や血管周囲に多く認められた。また破骨細胞も陽性を示した。(ii) ED 2 陽性細胞は類円形、紡錘形および不整多角形をした細胞に見られたが、ED 1 や Ia 陽性を示す細胞に比べて少なかった。(iii) Ia 陽性反応は、樹状をした細胞および一部マクロファージ様の類円形ないし紡錘形をした細胞に認められた。(iv) IL-1 $\beta$  陽性を示す細胞は、JE 直下結合組織付近に多く見られた短紡錘形ないし橢円形をしたマクロファージ様細胞であった。また、破骨細胞も陽性を示した。(v) CA II 陽性反応は歯根膜側歯槽骨縁に沿って出現する単核あるいは多核の破骨細胞及び前駆破骨細胞に観察された。
- 3) 組織計測学的検索結果；(i) ED 1 は、JE 直下部において LPS 投与後 12 時間 (9.52 個/0.05 mm<sup>2</sup>) と 2 日 (15.87 個/0.05 mm<sup>2</sup>) にピークが認められる二峰性の増加パターンを示した。歯根膜部においては 3 時間 (10.94 個/0.05 mm<sup>2</sup>) と 2 日 (17.27 個/0.05 mm<sup>2</sup>) に各々増加が認められる二峰性のパターンを示した。(ii) ED 2 陽性細胞数は全 area を通じて経時的に変化が認められなかった。(iii) Ia 陽性細胞数は、3 時間後 (10.71 個/0.05 mm<sup>2</sup>) より増加がみられ、7 日後 (17.70 個/0.05 mm<sup>2</sup>) でピーク値に達していた。(iv) IL-1 $\beta$  陽性細胞は JE 直下部において、3 時間後 (12.08 個/0.05 mm<sup>2</sup>) に、また歯根膜部においては 6 時間後 (5.48 個/0.05 mm<sup>2</sup>) にピークがみられる単峰性の増加パターンを示した。(v) CA II 陽性細胞は、1 日後 (9.33 個) と 3 日後 (10.45 個) に増加が認められた。

## 【考察および結論】

- 1) 脱灰操作後でも良好な免疫染色結果を得るには、AMeX 法を用いた paraffin 包埋切片を作製し、トリプシン処理することが有効であった。
  - 2) LPS 投与により ED 2 陽性の組織常在性マクロファージ数に比べ ED 1 陽性を示す細胞の著明な増加がみられたことから、LPS は主に ED 1 陽性を示す滲出性マクロファージの集簇を惹起すると考えられた。
  - 3) IL-1 $\beta$  陽性反応は短紡錘形ないし、多角形をしたマクロファージ様細胞にみられ、LPS 投与後 3 から 12 時間に一過性に増加を示した。これらの細胞は LPS 投与により集積してきた ED 1 陽性浸出性マクロファージであることが示唆された。
  - 4) LPS 刺激によりマクロファージによって産生された IL-1 $\beta$  の一部は、LPS 投与 3 日後にみられる破骨細胞数の増加に関与している可能性が推測された。
  - 5) Ia 抗原陽性細胞は、LPS 投与 3 時間後から増加、7 日目には高値を示していたことから、免疫応答能が時間経過とともに高まることが示唆された。また、これら増加した Ia 陽性細胞は ED 1 陽性浸出性マクロファージが Ia 抗原を発現したものと考えられた。
- 以上の結果から LPS によって惹起されたラット実験的歯周炎において、LPS は血中より単球由来の ED 1 陽性浸出性マクロファージを炎症局所に集簇させ、集積してきたマクロファージが IL-1 $\beta$  産生をきたし、破骨細胞性骨吸收をはじめ様々な炎症反応に関与すると共に、Ia 抗原を発現し抗原提示細胞となり、局所の免疫応答能の亢進にも寄与することが示唆された。

## 論文審査の結果の要旨

本研究は、LPS 局所投与によりラット臼歯部に惹起した実験歯周炎組織における各種マクロファージ系細胞の出現、分布やそれらの経時的変動を AMeX 法を応用した硬組織免疫組織化学的手法により検索し、組織計測学的に解析検討すると共に、同細胞の IL-1 $\beta$  産生能や破骨細胞性骨吸收との関係について検討を加えたものである。

その結果、LPS 投与により辺縁歯周組織には血球単球由来の ED 1 陽性浸出性マクロファージが集積し、IL-1 $\beta$  産生を介したと推察される破骨細胞の増数や Ia 陽性抗原提示細胞の増加することが明らかになった。

以上の知見は、LPS に起因する辺縁歯周炎病巣におけるマクロファージの動態ならびにその働きの一端を明ら

かにしたものであり、博士（歯学）の学位請求に値するものと認める。