

# 歯周炎罹患歯肉組織中のインターリュウキン1 (IL-1)mRNA発現マクロファージの 局在と歯肉溝滲出液中IL-1活性

松 木 裕 山 本 格\* 原 耕 二

新潟大学歯学部歯科保存学第2教室

(主任:原 耕二 教授)

\*新潟大学医学部腎研究施設病理形態学部門

(主任:木原 達 教授)

Localization of Interleukin-1 (IL-1) mRNA-expressing macrophages in human inflamed gingiva and IL-1 activity in gingival crevicular fluid

Yutaka MATSUKI, Tadashi YAMAMOTO\*, kohji HARA

*Department of Periodontology, Niigata University School of Dentistry*

*(Chief: Prof. Kohji HARA)*

*\*Department of Pathology, Institute of Nephrology, Niigata University School of Medicine*

*(Chief: Prof. Itaru KIHARA)*

**Key words** : インターリュウキン1, マクロファージ, *in situ* hybridization, 歯肉溝滲出液

The purpose of this study was to determine the exact cell type and site(s) involved in interleukin-1 (IL-1) production during gingival inflammation. By combining immunohistochemistry and *in situ* hybridization, IL-1 messenger RNA (mRNA) -expressing cells in human inflamed gingiva were identified as macrophages. The rate of IL-1 $\alpha$  mRNA expression in these macrophages was the same as IL-1 $\beta$  mRNA expression.

Additionally, the rate of IL-1 mRNA expression was higher in tissue sections furthest from sulcular areas than in those closest of sulcular lesions, although more macrophages were present at the sulcular site. The IL-1 activity in gingival crevicular fluid (GCF) obtained from inflamed gingiva was higher than that from healthy gingiva and decreased after periodontal therapy. The IL-1 activity in GCF was almost completely abolished by the addition of anti-IL-1 $\alpha$  antibody but not anti-IL-1 $\beta$  antibody, indicating that IL-1 $\alpha$  is the predominant form in GCF. However, the IL-1 activity in GCF was unrelated to the number of IL-1 mRNA-expressing macrophages in the same gingival site where the GCF was obtained at the same time.

The results suggest that macrophages in the oral side contribute to the production of IL-1 but those in the sulcular side play a different role in the generation of gingival inflammation.

## 要 旨

歯周炎罹患者の歯肉組織中におけるインターリュウキン1 (IL-1) mRNA発現細胞の局在及び歯肉溝滲出液 (GCF) 中のIL-1活性について検索した。

歯周炎罹患患者28名のうち19名から歯周外科時に歯肉組織を採取し、18名からGCFを採取した。対照群としての歯肉組織は、本学矯正科に来院した患者から歯の便宜抜去時に採取し、GCFは歯肉健常者のボランティアから採取した。

採取後の歯肉組織はパラフィン包埋切片としPAP法による免疫組織化学的にマクロファージ、T細胞、B細胞、内皮細胞を染色し、同一切片上で*in situ* hybridizationをIL-1 $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ について<sup>35</sup>S標識のプロンプを用いて行った。

GCFのIL-1活性はC3H/HeJマウスの胸腺細胞の増殖を<sup>3</sup>H-thymidinの取り込み量で測定した。また、 $\alpha/\beta$ をみるために中和実験を行った。

その結果、歯周炎罹患歯肉組織中のIL-1 mRNA発現マクロファージはポケット側より口腔側に多く認められ、その局在に関しては、炎症局所における機能的対応が示唆された。GCF中のIL-1活性は健常者に比べ歯周炎罹患患者で有意に高く、歯周治療により有意に減少した。また、 $\alpha$ タイプが圧倒的に多くその活性を占めていた。GCF中のIL-1活性は、歯周炎の病態変化と深い関係が認められることから、新しい臨床診断法としての可能性が期待される。

## 緒 言

インターリュウキン1 (IL-1) は様々な生物活性を示すことによって炎症、免疫、造血、内分泌などあらゆる生体反応に重要な働きを果たしているサイトカインとして知られている<sup>1)-3)</sup>。近年、歯周炎の発症、進行にも関与する因子として注目されている。IL-1はTNF $\alpha$ 、TNF $\beta$ と共に破骨細胞活性化因子 (OAF) のひとつであるが、なかでも最も強力な骨吸収作用を有するものとして知られている<sup>4)</sup>。さらに歯肉線維芽細

胞に作用してコラゲナーゼ、プロスタグランジンE<sub>2</sub>の産生を高める<sup>5)</sup>など歯周組織破壊に重要な役割を担っていると考えられる。IL-1の産生は*in vitro*で多くの細胞から報告されているが実際の炎症局所での実証はなかった。筆者らは歯周炎罹患歯肉組織におけるIL-1の主たる産生細胞がマクロファージであることを免疫組織化学並びに*in situ* hybridizationを併用することで証明した<sup>6)</sup>。ここではさらにその局在について調べ、局所でのIL-1産生マクロファージの役割について考察した。一方歯肉溝滲出液 (GCF) は歯周炎における診断指標としても有用性が認められ、臨床的にも意義のあるものである<sup>7)</sup>。そこでGCF中のIL-1活性を、健常者と歯周炎罹患者との比較、治療による変化、臨床パラメーターとの相関などについて調べた。

## 材料および方法

### 1. 対象

新潟大学歯学部附属病院保存科を受診した中等度から高度の歯周炎罹患患者28名を対象とした。被検者は男性13名、女性15名で、平均年齢は43.5±12.3歳であった。GCFと歯肉組織を採取した部位の臨床的状态はTable 1にまとめた。GCFのみ採取した部位は44部位で9名から、歯肉組織のみ採取した部位は13部位で10名から、GCFと歯肉組織両方から採取した部位は9名の14部位である。対照群としてボランティアの健常者4名から10部位のGCFを、歯肉組織は本学矯正科患者の便宜抜去時に3名6部位から採取した。GCF、歯肉組織の採取前に行った臨床項目は以下に記す通りである。

Gingival index (GI)<sup>8)</sup>、Probing depth (PD)、Loss of attachment (LA)、Roentgenographic bone loss (BL)<sup>9)</sup>。

### 2. 歯肉組織採取と切片作成

歯周外科時に局所麻酔下で27部位 (19名) より炎症歯肉組織及び6部位 (3名) の健康歯肉組織を採取した。直ちにdiethyl pyrocarbonate (DEPC) 処理の冷PBSで軽く洗い10%中性緩衝ホルマリンに6から12時間固定し、通法に従いパ

Table 1 Clinical assessments of the sampling sites

sample	GI	PD(mm)	LA(mm)	BL(%)
GCF only (n = 44)	0 - 2 <sup>a</sup> 1.4±0.6 <sup>b</sup>	1 - 7 4.9±1.7	2 - 11 6.7±1.8	10 - 90 53.0±23.1
GT only (n = 13)	1 - 2 1.6±0.6	5 - 9 6.9±1.2	7 - 10 8.5±1.3	20 - 90 59.3±17.7
GCF and GT (n = 14)	1 - 3 1.5±0.5	3 - 11 5.5±2.7	4 - 14 7.3±2.7	30 - 100 68.6±20.7
Mean±SD	1.4±0.6	5.3±1.9	7.0±1.9	59.0±23.3

a: range (minimum value—maximum value)

b: mean±SD: the respective mean score of clinical parameters measured on the sampling sites.

GI: Gingival index; PD: Probing depth; LA: Loss of attachment

BL: Alveolar bone loss on roentgenographs.

GCF: Gingival crevicular fluid; GT: Gingival tissue.

ラフィン包埋し、0.01%Poly-L-lysine (Sigma) でコートしたスライドグラスに6  $\mu$ mの切片を作成した。

### 3. 免疫組織化学 (PAP)

以上述べた切片をキシレンにより脱パラフィンし、上昇エタノールで脱水後、内因性ペルオキシダーゼを除去するため0.3% $H_2O_2$ メタノールで20分間処理した。PBSで洗浄し、5%正常ラビットまたはヤギ血清でブロッキング後、次にあげる1次抗体を作用させた。抗ヒトマクロファージ (CD68, KP1)、抗ヒトT細胞 (CD45RO; UCHL-1)、抗ヒトB細胞 (CD20; L26) のモノクローナル抗体 (すべてDAKO社のマウス抗体) 及び血管内皮細胞を認識する抗ヒト von Willebrand factor (Scripps Clinic and Research Foundation, La Jolla, CA. の Theodor S. Zimmerman 博士より提供されたもの) のポリク

ローナル抗体である。室温1時間インキュベート後、PBSで洗浄し、次に、ラビット抗マウス抗体及びヤギ抗ラビット抗体を2次抗体 (DAKO社) として室温で30分間反応させた。PBSで洗浄後、PAP (マウス及びラビット抗体) を室温で1時間インキュベート後、ペルオキシダーゼを発色させるため diaminobenzidine tetrahydrochloride を基質として用い発色させた。

### 4. In situ hybridization

免疫組織化学後の切片について *in situ* hybridization を行った。使用するすべてのバッファ類はRNaseを不活化にするためDEPCで処理した。まず、除タンパクのため0.2N HClを室温10分、DEPC水で水洗後1%Triton-X100を90秒室温で処理した。ついでDEPC水で水洗後、Proteinase K (1.0  $\mu$ g/ml) を37°Cで15分作用させた。その後、Proteinase Kを除くため

0.2%グリシンPBSで洗った後、0.3Mアンモニア酢酸エタノールで脱水し風乾した。ネガティブコントロールとして、組織中のmRNAを消化するためRNase T1 (200U/ml, Bethesda Research Laboratories) と RNase A (100  $\mu$ g/ml, Sigma) を37°Cで30分処理したものを使用した。

合成オリゴヌクレオチドはヒト IL-1 $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  mRNAに相補的な30mer、GC=43%、Tm=86°Cの Exon 5、6、7のmixtureを用いた (British Bio-technology Limited)。コントロールプローブとして同じ30mer、GC=43%、Tm=86°Cの合成オリゴヌクレオチド (GGCGACGCGCCGATATTTATAATTCATTATG) を日立製 DNA S I S を用いて GenBank data base (June 1990) によりどのDNAとも低ホモロジーなものを選びDNA合成装置 (Cyclone Plus DNA synthesizer, MilliGen/Biosearch Division of MILLIPORE) にて製作した。これらのオリゴヌクレオチドは<sup>35</sup>S-dATPを terminal deoxynucleotidyl transferase (宝酒造) を用いた末端標識法によってラベルし Sephadex G-25で精製後、プローブとして用いた。specific activity は  $1 \times 10^8$  dpm/ $\mu$ gである。hybridization mixture は 50% formamide, 5x Denhardt's solution, 5x hybridization salt, 10% dextran sulfate, 500  $\mu$ g/ml denatured salmon sperm DNA からなり、これに final  $1 \times 10^5$  dpm/ $\mu$ l となるようにプローブを加え、最後に各 hybridization mixture に dithiothreitol を 10mM になるように加えた。切片を風乾後、この mixture を加えて 37°C overnight で湿箱にてハイブリダイゼーションを行った。洗いの操作は以下のように行った。2x saline sodium citrate buffer (SSC) を用いて室温15分で2回、0.1x SSCで室温10分を2回、60°Cで10分、37°Cで15分、最後に2x SSCで室温10分の順に洗いを行った。切片を乾燥させた後、オートラジオグラフィを行った。乳剤はNR-M2 (Konica社) を用いた。暗箱の中で4°C、7日間放置した後、Konicadol-X (Konica社) で5分間現像、Konicafix (Konica社) で10分間定着、水洗後、

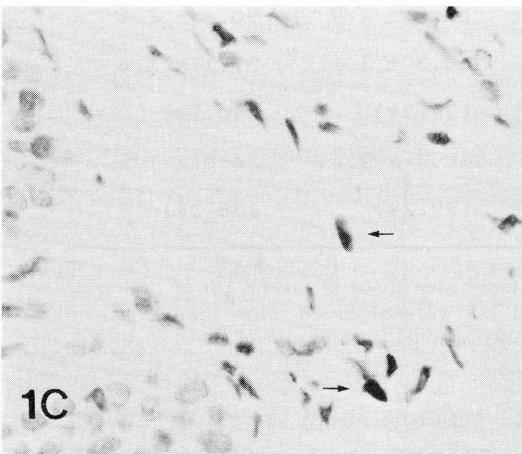
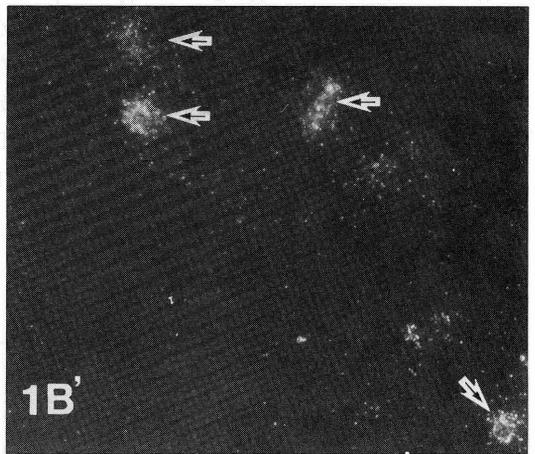
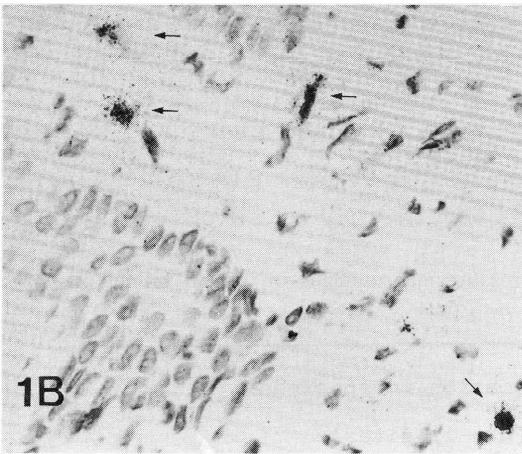
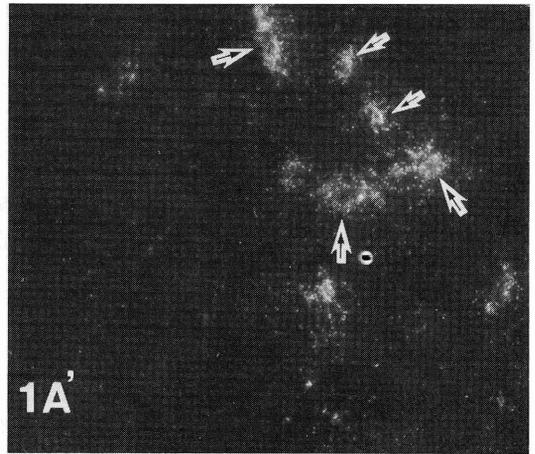
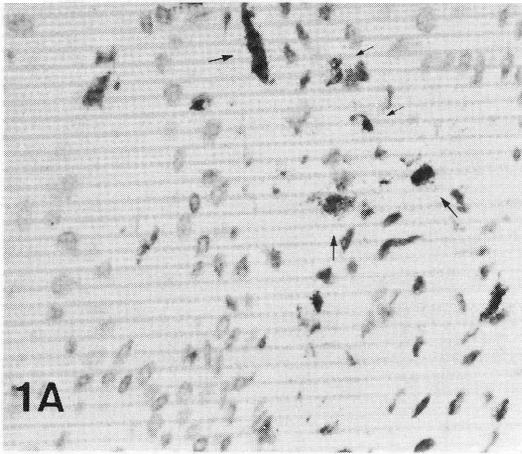
ヘマトキシリンで対比染色し検鏡した。マクロファージやmRNA発現細胞数の測定にあたり、各切片について歯肉固有層をポケット側1/3、口腔側1/3、中央1/3に分け各々無作為に5ヶ所 (1ヶ所の面積が0.42mm x 0.54mm; 0.23mm<sup>2</sup>) の測定部位を選んだ後、その中の細胞数を測定し5ヶ所での平均値を算出した。

## 5. GCFの採取

GCFは歯周炎罹患者の歯周ポケット及び対照群として健常者の歯肉溝より採取した。まず採取する部位の縁上プラークをグレースケーラーにて除去後、ロールワッテで簡易防湿を施し、小綿球にて歯面を清掃、エアーで乾燥させた。ついで Periopaper (HARCO社) をポケットに軽く抵抗が得られるまで入れ、およそ30秒間放置し、GCFを採取した<sup>10)</sup>。直ちに、Periotron 6000 (HARCO社) にて液量を測定し、2-4  $\mu$ l になるまで繰り返し採取を続けた。尚、ペリオトロン値は液量と比例関係にあり、予め換算表を作っておいた。試料は冷PBS 500  $\mu$ lの中に浸せきし、機械的に濾紙を粉碎した後5000rpm、5分間遠心した上清を使用することとし、測定まで-80°Cで保存した。

## 6. IL-1活性測定

IL-1活性はC3H/HeJマウス (4-6週齢) の胸腺細胞の増殖能を目安として測定した。まず、マウスから胸腺細胞を取り出し5% FCS 加RPMI 1640培地に $1.0 \times 10^7$  cells/mlとなるように調整し細胞浮遊液とし、96穴平底プレート上に用意した試料 (100  $\mu$ l/well) にこの細胞浮遊液 (100  $\mu$ l/well) を加えた。これを44時間37°Cにて5% CO<sub>2</sub>インキュベーター中で培養後、<sup>3</sup>H-thymidine (0.5  $\mu$  Ci/well) を加え、その4時間後にマルチプルセルハーベスターでハーベストし液体シンチレーションカウンターで<sup>3</sup>H-thymidineの取り込み量を測定した。IL-1活性の中和実験はGCFサンプルと抗IL-1 $\alpha$ 、 $\beta$ 抗体を予め1時間37°Cでインキュベートし、その後胸腺細胞を加えた。ここで用いたU/ml値はrecombinant IL-1 $\alpha$ 、 $\beta$ をポジティブコントロールとし、この最大取り込み量の50%を1



**Fig. 1**  
 In inflamed gingival tissues, autoradiographs show binding of IL-1 $\alpha$ /IL-1 $\beta$  oligonucleotide probes (1A, /1B. 1A' and 1B' are darkfield micrographs) to macrophages depicted by immunoperoxidase technique (arrows).  
 A few macrophages (arrows) are observed by immunohistochemistry in healthy gingival tissues, while neither IL-1 $\alpha$  nor IL-1 $\beta$  (not show) mRNA demonstrated (1C). X500

U/mlとした。また、recombinant IL-1 $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 及び抗ヒトIL-1 $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 抗体は、大塚製薬、平井博士より提供されたものである。

#### 7. 統計処理

IL-1活性測定はすべてtriplicateとし、組織切片における統計処理はすべてWilcoxon検定を用いて行った。

## 結 果

### IL-1 mRNA発現細胞の局在

炎症歯肉組織中におけるIL-1 mRNA発現細胞は主としてマクロファージであることが本研究より説明された (Fig. 1A, 1A', 1B, 1B')。僅かではあるが血管内皮細胞にも発現が認められたものの、T細胞、B細胞には明らかな銀粒子は認められなかった(図示せず)。また、健康歯肉ではマクロファージは認められるが、IL-1 mRNAの発現はみられなかった (Fig. 1C)。

マクロファージの頻度は、採取した歯肉組織によりバラエティに富んでいた。しかしIL-1 mRNA発現マクロファージの局在をみるとTable 2に示すようにその頻度に明らかな傾向が認められた。つまり、ポケット側1/3より口腔側1/3の方が発現頻度は高く、IL-1 $\alpha$ とIL-1 $\beta$ 間では差はなかった。

コントロールプローブを用いた場合の歯周炎歯肉組織では銀粒子はみられず、RNase処理した切片においても明らかな銀粒子は認められなかった(図示せず)。

### GCF中のIL-1活性

GCF中のIL-1活性は健康歯肉に比べ歯周炎罹患歯肉で有意に高かった (Fig. 2)。また、歯周炎罹患歯肉の活性はFig. 3に示すように歯周治療 (スケーリング、ルートプレーニング、歯周外科など) の前後でどの部位も低下していた。しかし、IL-1活性とPD ( $r=0.09$ )、GI ( $r=0.2$ )、LA ( $r=-0.15$ )、BL ( $r=-0.04$ )

Table 2 The numbers<sup>a</sup> of IL-1 mRNA-expressing macrophages in human inflamed gingival tissues

		Location in specimen (n = 11 sites)		
		Sulcular 1/3	Middle 1/3	Oral 1/3
Total	M $\phi$	117.8 $\pm$ 4.9	62.6 $\pm$ 1.9	90.8 $\pm$ 3.6
IL-1 $\alpha$ mRNA(+)	M $\phi$	17.8 $\pm$ 1.7 <sup>b</sup> (15.1%) <sup>c</sup>	18.3 $\pm$ 1.1 (29.2%)	37.1 $\pm$ 1.6 (40.9%)
IL-1 $\beta$ mRNA(+)	M $\phi$	16.9 $\pm$ 1.3 <sup>b</sup> (14.3%)	18.3 $\pm$ 1.4 (29.2%)	34.8 $\pm$ 1.9 (38.3%)

The number of macrophages in sulcular 1/3 was more than those in middle 1/3 or oral 1/3. IL-1 mRNA-expressing macrophages in oral 1/3 were observed more than those in sulcular or middle 1/3. There was no difference between the localization of IL-1 $\alpha$  mRNA expression and that of IL-1 $\beta$  mRNA expression.

a: number of IL-1 mRNA (+) macrophages (M $\phi$ ) = mean  $\pm$  SE/mm<sup>2</sup>

b: significant difference vs. oral 1/3 (P < 0.01)

c: (%) : percentage of IL-1 mRNA expressing M $\phi$

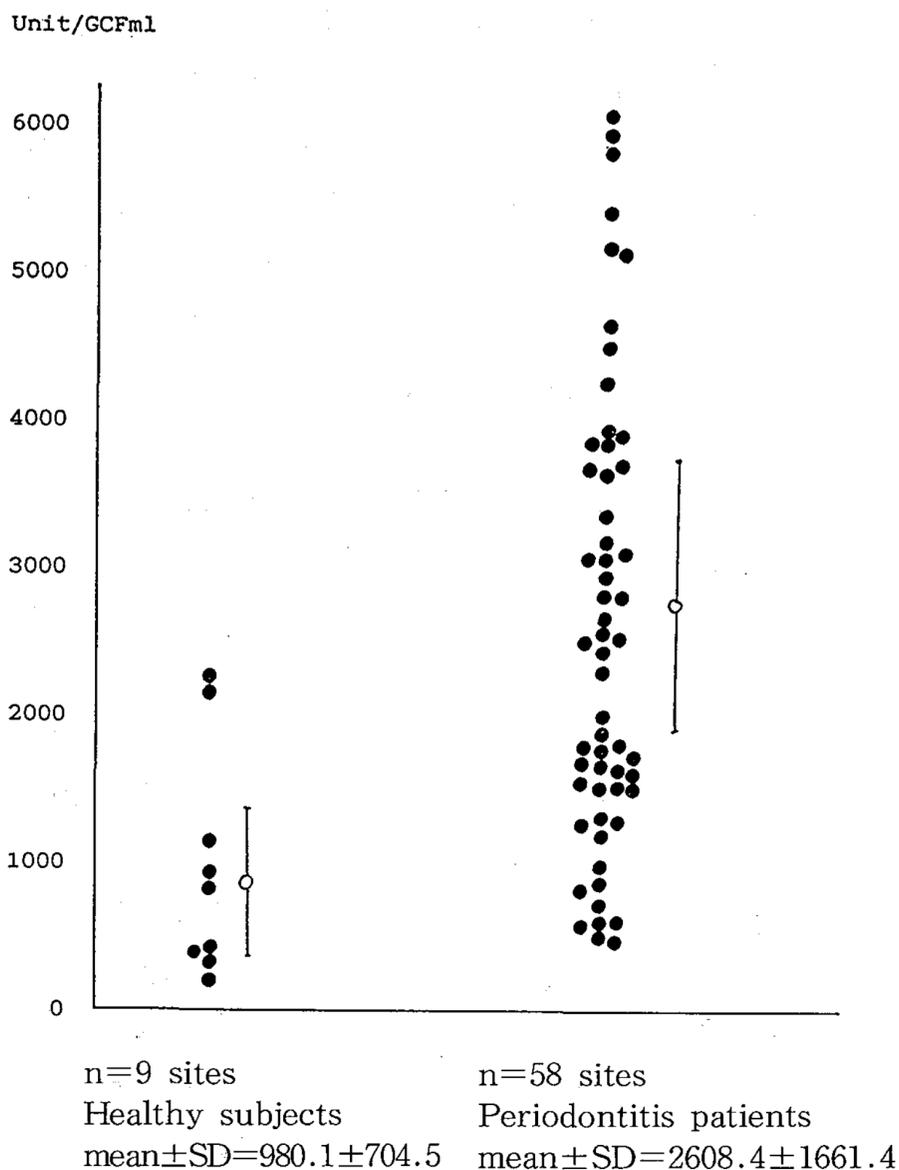


Fig. 2  
IL-1 activity in GCF: healthy vs. periodontitis.  
IL-1 activity of GCF obtained from inflamed gingiva is much higher than that from healthy gingiva. Bar represents the mean±SD for each group.

の臨床パラメーターとの間ではいずれも相関性は得られなかった。

次に、抗ヒトIL-1抗体によるGCF中のIL-1活性の中和実験をみたところ、抗ヒトIL-1α抗体はマウス胸腺細胞の増殖はほぼ完全にブロックしたが、抗ヒトIL-1β抗体では殆ど効果がみられなかった (Fig. 4)。つまり、GCF中のIL-1α並びにIL-1βの生物活性の割合は、圧倒的にαタイプが優位を占めていることを示した。

GCF中のIL-1活性と歯肉組織中のIL-1 mRNA発現との関係

Table 3は同一部位とほぼ同一時間に採取した

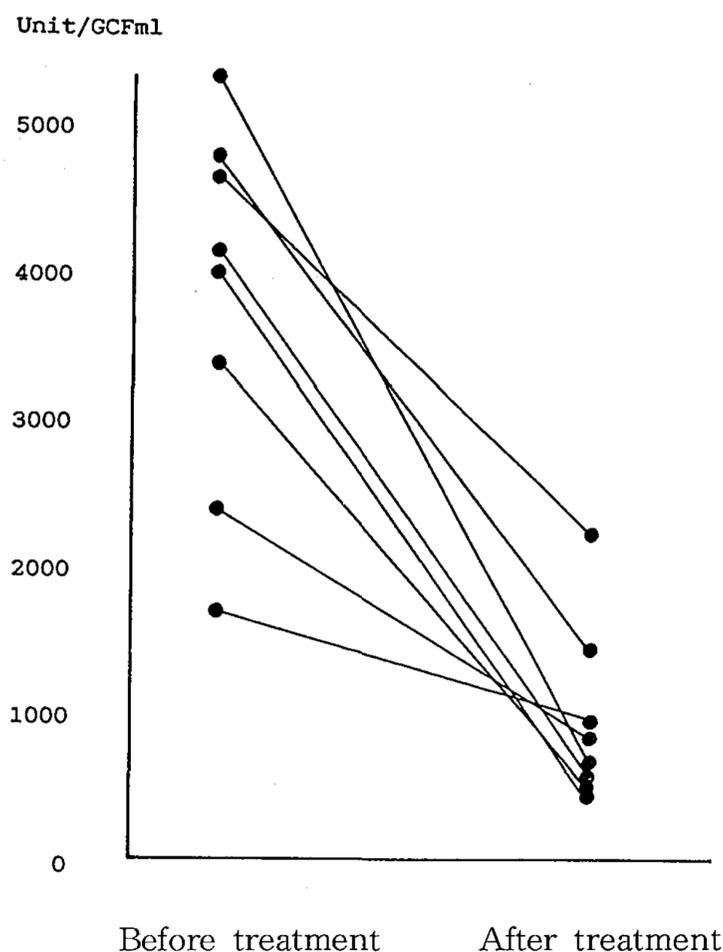


Fig. 3  
The reduction of IL-1 activity in GCF following periodontal treatment.  
IL-1 activity in GCF was measured before and after periodontal treatment. All cases showed the reduction of IL-1 activity.

GCF中のIL-1活性と歯肉組織のIL-1 mRNA発現細胞の頻度、局在についてまとめたものを示す。サンプル#67と#74のポケット側1/3は、IL-1βの方がIL-1αよりmRNAの発現が多かった。この場合GCFのIL-1活性は抗IL-1α抗体で約90%の抑制がみられたが、IL-1αのmRNA発現の多い部位 (#29、#35、#65、#75)では、すべてほぼ100%の抑制があり、活性のほとんどはαタイプであることを示した。しかし、GCF中のIL-1活性と歯肉中のIL-1 mRNA発現頻度の間には相関関係はみられなかった。また、免疫組織化学的に染色されたマクロファージ、T細胞、B細胞の切片中に占める割合とIL-1活性やIL-

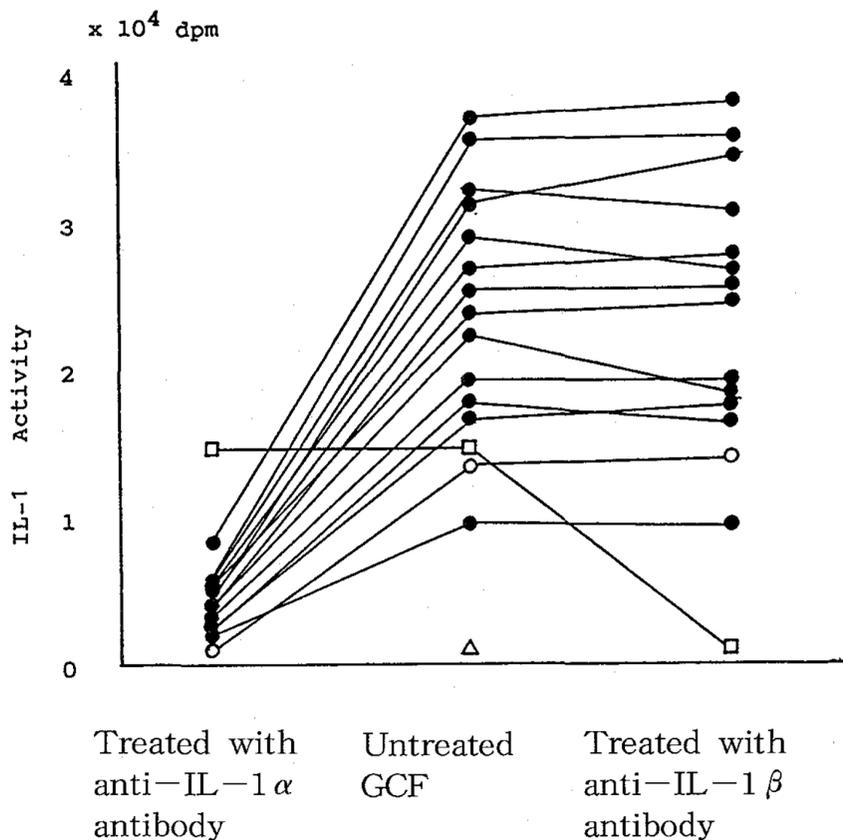


Fig. 4  
Effects of anti-human IL-1 antisera on the activity of IL-1 in GCF.  
Anti-human IL-1 $\alpha$  antiserum blocked the activity to stimulate murine thymocyte proliferative responses, but anti-human IL-1 $\beta$  failed to do so. This figure shows that the IL-1 $\alpha$  is predominant form in GCF.

- : GCF samples
- △: control level (background)
- : recombinant IL-1 $\alpha$  (1U/ml)
- : recombinant IL-1 $\beta$  (1U/ml)

1 mRNA発現の頻度との間についても明らかな相関関係は認められなかった。

## 考 察

GCFは細菌性プラークや多くの抗原刺激物質を含んでおり、歯肉組織中のポケット側にマクロファージや活性化したT細胞が多く存在することは容易に考えられる。しかし、この研究では、歯周炎罹患歯肉組織中のマクロファージは口腔側よりポケット側に多く観察されたものの、IL-1 mRNA発現マクロファージはむしろ口腔側において多くみられた。この理由として以下のことが考えられる。ひとつは、ポケット側に存在する活性化T細胞、好中球、マクロファージなどがマクロファージからのIL-1産生を抑制する因子、たとえば、IL-4<sup>11),12)</sup>やPGE<sub>2</sub><sup>13)</sup>を産生してい

ること、もうひとつは、マクロファージの機能面からみでの heterogeneity<sup>14)</sup>の存在が考えられることである。Seymourらはヒトの実験的歯肉炎においてマクロファージの優位なタイプは食作用を主とするもので、抗原提示細胞としてのマクロファージは僅かであると報告している<sup>15)</sup>。また、マクロファージ同様抗原提示を司るランゲルハンス細胞はポケット側には殆どみられず口腔側に存在すると言う報告がある<sup>16)</sup>。抗原提示機能をもつ細胞群に共通して認められる性状のひとつにIL-1を産生し、分泌し、あるいは膜上に保有するということが言われている<sup>17)</sup>。つまり、このことは主として食作用を担うマクロファージはポケット側に多く、抗原提示を担うそれは口腔側に存在するということなのかも知れない。

Fig. 2、3に示したように、GCF中のIL-1活性は健康歯肉に比べて歯周炎罹患歯肉で高く、歯周治療により減少すること、さらに臨床パラメーターとは相関関係を有しないということに対しては次のように考えられる。つまり、歯周ポケット内でIL-1活性が高まっているということは、局所で現在炎症反応ないしは免疫反応が活発に起こっていることを意味しており、一方、PD、LA、BLなどの臨床パラメーターは主として過去の歯周組織の破壊の状態を反映したものと考えられ、この discrepancy が結果にあらわれたものと思われる。

Kobashimaらの報告<sup>18)</sup>と同様、GCF中のIL-1活性は $\alpha$ タイプがそのほとんどを占めていた。IL-1 $\alpha$ の由来は*in vitro*で $\alpha$ を多く産生するケラチノサイト<sup>19)</sup>が有力視されていたが*in situ* hybridization<sup>6)</sup>や免疫組織化学(蛍光抗体法)の手法<sup>20)</sup>によりその可能性の低いことが示された。歯肉組織中でのIL-1 mRNA発現は $\alpha$ 、 $\beta$ ほぼ同じであったが、GCF中のIL-1活性は $\alpha$ タイプが100%近くを占めていた。また、GCF中のIL-1をELISA法で検討した他の報告<sup>21,22)</sup>でもIL-1 $\alpha$ の方が多いたとしている。歯周炎と同じく骨破壊を伴う慢性炎症性疾患である慢性関節リュウマチにおいても、滑液中のIL-1活性のほとんどは $\alpha$ タイプが占めていた<sup>23)</sup>。

Table 3 IL-1 in GCF and gingival tissue sampled simultaneously

The numbers (mean/mm <sup>2</sup> ) of							
IL-1 mRNA-expressing cells				IL-1 in GCF		Histology	
location in specimen							
Sample		S	M	O	% inhibition	U/ml	
#29	IL-1 $\alpha$	5.7	5.2	24.3	100	2500	B
	IL-1 $\beta$	3.5	2.6	19.1	0		
#35	IL-1 $\alpha$	20.0	17.4	65.2	100	4217	T
	IL-1 $\beta$	17.4	9.6	56.5	17		
#65	IL-1 $\alpha$	17.2	19.1	24.3	98	997	Plasma
	IL-1 $\beta$	14.8	15.7	24.3	0		
#67	IL-1 $\alpha$	7.0	37.4	41.3	91	5608	Plasma
	IL-1 $\beta$	19.1	43.5	24.3	5		
#74	IL-1 $\alpha$	15.2	19.1	36.5	88	1180	T
	IL-1 $\beta$	27.4	12.2	12.2	11		
#75	IL-1 $\alpha$	62.6	28.7	57.8	100	2135	B
	IL-1 $\beta$	35.7	38.3	53.9	0		

S: sulcular 1/3, M: middle 1/3, O: oral 1/3 of gingival tissue samples.

% inhibition =  $1 - \left\{ \frac{\text{dpm of thymocyte + mitogen + sample + anti-human IL-1 antiserum}}{\text{dpm of thymocyte + mitogen}} \right\} \times 100$ .

The most noticeable cell types were shown as T: T cells, B: B cells, and Plasma: Plasma cells in the "Histology"

マクロファージ由来のIL-1は $\alpha$ :  $\beta$  = 1: 10である<sup>24)</sup>とされている。このギャップについて、詳しいことは不明であるが、次のことが考えられる。IL-1 $\beta$ は酸化に対して不安定であるがIL-1 $\alpha$ は安定であるということ<sup>3)</sup>、IL-1 $\alpha$ の前駆体は活性を持つが、 $\beta$ の前駆体は持たないということ<sup>25)</sup>などが考えられる。また、実際の組織では *in vitro* とは異なり様々な細胞、様々な液性因子や接着因子などが複雑に関係し合っているためと思われる。現在ではIL-1 $\alpha$ とIL-1 $\beta$ は同じレセプターを共有しているため、ほぼ同

じ生物活性を示すと言われている<sup>26)</sup>。未だ未知なことは多く、更に今後の研究によりこの病気の組織破壊に於けるメカニズムも解明されていくものと思われる。GCFは、将来実際の診療に於て、その経時的変化の検査ができることやサンプリングの容易さなどから有効な臨床的指標になり、従って組織破壊の重要な指標となり得るGCF中のIL-1を検索することは重要である。

同一部位より同一時間に採取したGCF中のIL-1活性と歯肉組織中のIL-1 mRNA発現頻度との間には相関性がみられなかった。しか

し、病変局所で部位、時間の一致したサンプルの組織学的及び生化学的検索の両面からのアプローチにより病態の真相により迫るものと考えられる。

## 結 論

歯周炎罹患患者28名より採取したGCF中のIL-1活性及び歯肉組織中のIL-1 mRNA発現細胞の局在を検索し以下のような結論を得た。

- 1) 歯周炎罹患歯組織中でのIL-1 mRNA発現細胞のほとんどはマクロファージであり、その局在はポケット側より口腔側に多くみられた。このことより炎症局所におけるマクロファージの役割(食作用、抗原提示作用)に局在性があることが示唆された。
- 2) 歯周炎罹患患者のGCF中のIL-1活性は健康者のそれに比べて有意に高く、歯周治療により低下することが明らかとなった。さらに、バースト期の予測が難しい従来の臨床パラメーターに対して、GCF中のIL-1活性を調べることはバースト期を知る手がかりとなり得ることが示唆された。また、GCF中のIL-1活性のほとんどは $\alpha$ タイプであった。
- 3) 同一時期に、同一部位より採取したGCF中のIL-1活性と歯肉組織中のIL-1 mRNA発現頻度との間に明らかな相関関係はみられなかった。

## 謝 辞

本稿を終えるにあたって、本研究の遂行に際し、ご理解、御協力下さいました本学医学部腎研究施設病理形態学部門、木原達教授、川崎克俊助手、矢尾板永信助手、吉田貫氏並びに、歯肉組織採取の際の患者管理にご懇切なるご指導、ご助言を賜りました本学歯科保存学第2教室、吉江弘正助教授、対照群としての歯肉組織採取の際に御協力下さいました本学歯科矯正学教室の諸先生に深く感謝致します。

## 参 考 文 献

- 1) Oppenheim, J. J., Kovacs, E. J., Matsushima, K., Durum, S. K.: There is

- more than one interleukin-1. *Immunology Today*, **7**: 45-56, 1986.
- 2) di Giovine, F. S., Duff, G. W.: Interleukin 1: The first interleukin. *Immunology Today*, **11**: 13-20, 1990.
- 3) Dinarello, C. A.: Interleukin-1 and its biologically related cytokines. *Advanced Immunology*, **44**: 153-205, 1989.
- 4) Stashenko, P., Dewhirst, F. E., Peros, W. J., Kent, R. L., Ago, J. M.: Synergistic interactions between interleukin-1, tumor necrosis factor, and lymphotoxin in bone resorption. *J. Immunol.*, **138**: 1464-1468, 1987.
- 5) Richards, D., Rutherford, R. B.: The effect of interleukin-1 on collagenolytic activity and prostaglandin E secretion by human periodontal ligament and gingival fibroblast. *Archs. oral Biol.*, **33**: 237-243, 1988.
- 6) Matsuki, Y., Yamamoto, T., Hara, K.: Interleukin-1 mRNA-expressing macrophages in human chronically inflamed gingival tissues. *Am. J. Pathol.*, **138**: 1299-1305, 1991.
- 7) Curtis, M. A., Gillett, I. R., Griffiths, G. S., Maiden, M. F. J., Sterne, J. A. C., Wilson, D. T., Wilton, J. M. A., Johnson, N. W.: Detection of high-risk groups and individuals for periodontal diseases laboratory markers from analysis of gingival crevicular fluid. *J. Clin. Periodontol.*, **16**: 1-11, 1989.
- 8) Loe, H.: The gingival index, the plaque index and the retention index systems. *J. Periodontol.*, **38**: 610-616, 1967.
- 9) Schei, O., Wearhang, J., Lovdal, A.: Alveolar bone loss as related to oral hygiene and age. *J. Periodontol.*, **30**: 7-15, 1959.
- 10) Horino, K., Yoshie, H., Hara, K.:

- Correlation between serum and gingival crevicular fluid antibodies and periodontal status. *J. Dent. Res.*, **68**: 1688–1690, 1989.
- 11) Essner, R., Rhoades, K., McBride, W. H., Morton, D. L., Economou, J. S. : IL-4 down regulates IL-1 and TNF gene expression in human monocytes. *J. Immunol.*, **142**: 3857–3861, 1989.
  - 12) Donnelly, R. P., Fenton, M. J., Finbloom, D. S., Gerrand, T. L. : Differential regulation of IL-1 production in human monocytes by IFN- $\gamma$  and IL-4. *J. Immunol.*, **145**: 569–575, 1990.
  - 13) Knudsen, P. J., Dinarello, C. A., Strom, T. B. : Prostaglandins posttranscriptionally inhibit monocyte expression of interleukin-1 activity by increasing intracellular cyclic adenosine monophosphate. *J. Immunol.*, **137**: 3189–3194, 1986.
  - 14) Shibata, Y., Bautista, A. P., Pennington, S. N., Humes, J. L., Volkman, A. : Eicosanoid production by peritoneal and splenic macrophages in mice depleted of bone marrow by  $^{89}\text{Sr}$ . *Am. J. Pathol.*, **127**: 75–82, 1987.
  - 15) Seymour, G. J., Gemmell, E., Walsh, L. J., Powell, R. N. : Immunohistological analysis of experimental gingivitis in humans. *Clin. exp. Immunol.*, **71**: 132–137, 1988.
  - 16) Newcomb, G. M., Powell, R. N. : Human gingival Langerhans cells in health and disease. *J. Periodont. Res.*, **21**: 640–652, 1986.
  - 17) Unanue, E. R., Beller, D. I., Lu, C. Y., Allen, P. M. : Antigen presentation: comments on its regulation and mechanism. *J. Immunol.*, **132**: 1–5, 1984.
  - 18) Kobashima, H., Maeda, K., Iwamoto, Y., Hirofuji, T., Yoneda, M., Yamashita, K., Aono, M. : Partial characterization of an interleukin-1 like factor in human gingival crevicular fluid from patients with chronic inflammatory periodontal disease. *Infect. Immun.*, **58**: 2621–2627, 1990.
  - 19) Kupper, T. S., Ballard, D. W., Chua, A. O., McGuire, J. S., Flood, P. M., Horowitz, M. C., Langdon, R., Lightfoot, L., Gubler, U. : Human keratinocytes contain mRNA indistinguishable from monocyte interleukin-1 $\alpha$  and  $\beta$  mRNA; keratinocyte epidermal cell-derived thymocyte activating factor is identical to interleukin-1. *J. Exp. Med.*, **164**: 2095–2100, 1986.
  - 20) Jandinski, J. J., Stashenko, P., Feder, L. S., Leung, C. C., Peros, W. J., Rynar, J. E., Deasy, M. J. : Localization of interleukin-1 $\beta$  in human periodontal tissue. *J. Periodontol.*, **62**: 36–43, 1991.
  - 21) Masada, M. P., Persson, R., Kenney, J. S., Lee, S. W., Page, R. C., Aillon, A. C. : Measurement of interleukin-1 $\alpha$  and interleukin-1 $\beta$  in gingival crevicular fluid: Implication for pathogenesis of periodontal disease. *J. Periodont. Res.*, **25**: 156–163, 1990.
  - 22) 北村正博 : 歯周炎の疾病活動度の診断. *日歯周誌*, **32**: 331–354, 1990.
  - 23) Buchan, G., Barrett, K., Turner, M., Chantry, D., Maini, R. N., Feldmann, M. : Interleukin-1 and tumor necrosis factor mRNA expression in rheumatoid arthritis: prolonged production of IL-1 $\alpha$ . *Clin. exp. Immunol.*, **73**: 449–455, 1988.
  - 24) March, C. : Cloning sequence and expression of two distinct human inter-

- leukin-1 complementary DNAs. *Nature.*,  
**315**: 641-647, 1985.
- 25) Dower, S. K., Urdal, D. L. : The  
interleukin-1 receptor. *Immuology Today.*,  
**8**: 46-51, 1987.
- 26) Dower, S. K., Kronheim, S. R., Hopp,  
T. P., Cantrell, M., Deeley, M., Gillis,  
S., Henney, C. S., Urdal, D. L. :  
The cell surface receptors for interleukin  
-1 $\alpha$  and interleukin-1 $\beta$  are identical.  
*Nature*, **324**: 266-268, 1986.