

〔原 著〕

ジフェニルヒダントイン(DPH)と
リポポリサッカライド(LPS)のヒト歯肉由来
培養線維芽細胞の細胞活性に対する影響

松尾 朗, 國本 隆明, 矢嶋 俊彦

東日本学園大学歯学部口腔解剖学第1講座

Effects of Diphenylhydantoin (DPH) and
Lipopolysaccharide (LPS) on Cell Activities in Human
Gingival Fibroblasts *in vitro*

Akira MATSUO, Takaaki KUNIMOTO, and Toshihiko YAJIMA

Department of Oral Anatomy, School of Dentistry,
HIGASHI-NIPPON-GAKUEN UNIVERSITY

Abstract

The effects of diphenylhydantoin (DPH) and lipopolysaccharide (LPS) in culture medium on cell proliferation and several cell activities were investigated in human gingival fibroblasts.

The cell proliferative rate was not affected by DPH ($5 \mu\text{g}/\text{ml}$) and LPS (*E. coli*, $25 \mu\text{g}/\text{ml}$) in culture medium. DPH increased the total protein, hydroxyproline content and alkaline phosphatase (ALPase) activity of fibroblast cultures as compared with the control. LPS decreased the hydroxyproline content and ALPase activity and increased acid phosphatase (ACPase) activity of cultures, but no effect was seen on the total protein. On the other hand, the level of hydroxyproline content, ALPase activity and ACPase activity in DPH+LPS-cultures were also the same as those in LPS-cultures, whereas the total protein returned to the levels of DPH-cultures. The changes in weekly increase of hydroxyproline content of fibroblast cultures were associated with the changes of ALPase activity. The amount of hydroxyproline content could be expressed almost completely by the collagen fibrogenesis index, which were obtained using a Monocellater® that displayed the relative absorbance of cultures stained with Van Gieson's solution.

受付：昭和61年4月24日

A striking difference seen between nonLPS- and LPS-cultures was the much higher level of noncollagenous protein found in the latter ones.

These results indicate that the administration of LPS may stimulate the synthesis of noncollagenous protein in human gingival fibroblasts, and this was particularly enhanced in presence of DPH.

Key words : Diphenylhydantoin, lipopolysaccharide, hydroxyproline, fibroblast

緒 言

抗痙攣剤のジフェニルヒダントイン (sodium 5, 5-diphenylhydantoin, DPH) の投与により, しばしば歯肉の肥大が起ることが知られており, 多くの研究がなされてきている。ヒトでの DPH による歯肉の肥大は口腔衛生状態と関連し, 衛生状態の不良な患者でより悪化することが示されている¹⁾。動物実験においても, DPH の投与のみでは歯肉の肥大は起らず, 歯肉に炎症が併発している場合に肥大が生ずるとされている^{2,3)}。また, ラットでの DPH 性の歯肉肥大は歯垢の存在部分に限定されることも報告されている⁴⁾。

一方, DPH の培養線維芽細胞への直接作用については, 細胞増殖の促進や^{5,6)} コラーゲン蓄積量の増加が示されている⁷⁾。また我々は, ラット皮膚由来の線維芽細胞への DPH の添加により, 細胞増殖とコラーゲン線維形成が促進されたことを報告している⁸⁾。

歯周組織の炎症の発生原因の一つとして, 歯垢蓄積が重要な役割を果しており⁹⁾ 歯垢内の細菌からの内毒素などが炎症の発症およびその進行に関与していることが知られている。

そこで DPH 性歯肉肥大症の発症を DPH と細菌の内毒素との関連から研究を試みた。本研究では, 線維芽細胞に対する DPH と内毒素の作用のモデル実験系として, 内毒素の主な生物活性物質であるリポポリサッカライド (lipopolysaccharide, LPS) と DPH を培養線維芽細胞へ添加し, DPH と LPS の細胞増殖と種々の

細胞活性に対する影響について検討を試みた。

材料および方法

1. 培養細胞と培地

実験には, ヒト健康歯肉由来の線維芽細胞, HGF-1 を用いた。

培地には, 仔ウシ血清 (Hyclone Laboratories, Utah, U. S. A.) を 5% 加えた, ペニシリン (100U/ml) と硫酸ストレプトマイシン (100 μ g/ml) を含む, α -MEM (Flow Laboratories Inc., California, U. S. A.) (α MEM-5%) が使用された。

実験群には, 0.1M NaOH で希釈したジフェニルヒダントイン (DPH, アレビアチン[®], 大日本製薬, 大阪) と蒸留水に溶解したリポポリサッカライド (LPS, B. E. coli 0111; B4, Difco Laboratories, Michigan, U. S. A.) が下記のように添加された。

- 1) 対照群: α MEM-5%のみ (DPH, LPS 無添加)
- 2) DPH 群: DPH (最終濃度 5 μ g/ml) を添加
- 3) LPS 群: LPS (最終濃度 25 μ g/ml) を添加
- 4) LPS+DPH 群: LPS と DPH (上記濃度) を添加

なお, 対照群には, DPH と等量の 0.1M NaOH と LPS と等量の蒸留水が加えられた。

2. 培養法

細胞 (5.0×10^4 cells) は, プラスチック培

養シャーレ (Nunc, Roskilde, Denmark) 中で α MEM-5% 培地で24時間培養後、各実験群の培地に交換され、実験が開始された。細胞は、炭酸ガス培養器 (5% CO₂-95% air, 37°C) で培養され、培地は週2回交換された。

3. 総蛋白質量、ALPase・ACPase 活性の測定

培養物は、永冷した0.25M saccharose で洗浄後、Potter-Elvehjem 型テフロンホモジナイザーにより0.25M saccharose 中でホモジナイズされ、測定試料とされた。

総蛋白質量は、Lowry らの方法¹⁰ に従い、牛血清アルブミン (Fraction V, 和光純薬工業、大阪) を標準として測定された。

アルカリ性ホスファターゼ (ALPase) 活性の測定は Komoda and Sakagishi の方法¹¹ に基いて行い、予備実験の結果より一部変更した。*p*-nitrophenylphosphate (10mM) を基質として、1 mM MgCl₂ を含む50mM carbonate-bicarbonate 緩衝液、pH 10.5, 30°C を反応液とし、活性が測定された。

酸性ホスファターゼ (ACPase) 活性は、Walter and Schütt の方法¹² に基いて、10mM *p*-nitrophenylphosphate を含む50mM citrate 緩衝液、pH 4.8 を反応液とし、30°C で20分間反応し、測定された。

4. ヒドロキシプロリン量の測定

培養物は、永冷したリン酸緩衝塩類溶液 (PBS) で洗浄後、6 N HCl 中で110°C, 22時間加水分解され、減圧乾固の後、蒸留水で再溶解し測定試料とされた。

ヒドロキシプロリン量は、Bergman and Loxley の方法¹³ に従い、L-hydroxyproline (和光純薬工業) を標準として測定された。

5. Van Gieson 染色とその比較

培養物はシャーレのまま、0.1M リン酸緩衝10%中性ホルマリン (pH 7.2) で固定された後、Van Gieson 染色を施された。

培養物のフクシン染色性を比較するため、Monocellater[®] (オリンパス、東京) を使用した。染色されたシャーレ全体の Monocellater による相対吸光度が、コラーゲン線維形成インデックス (collagen fibrogenesis index) として表わされた。培養5週の対照群の染色度がインデックス100とされた。

結 果

1. 細胞増殖

各実験群間での細胞の生存率と増殖には差異が認められなかった。つまり、DPH 単独および LPS との同時添加でも、細胞増殖の促進あるいは抑制作用はみられなかった。

2. 総蛋白質量

各実験群とも培養5週まで総蛋白質量に差は認められず、5週での総蛋白質量は約1.0mg/dish であった (Fig. 1)。培養6週以降の DPH 無添加群 (対照群と LPS 群) 間の蛋白質量に差は認められず、11週で約1.6mg/dish であった。DPH 添加群 (DPH 群と LPS+DPH 群) では、培養6週以降で DPH 無添加群より総蛋白質量が増加し、その差は培養期間と共に著しくなり、11週で DPH 群では対照群より14%、LPS+DPH 群では LPS 群より19%増加した。

3. ALPase 活性

LPS 無添加群 (対照群と DPH 群) では、培養2~4週にかけて、急激に ALPase 活性が上昇し、培養4~5週でピークとなり約55mU/dish の活性であった (Fig. 2)。6週以後、活性はやや低下し、ほぼ一定となった。11週での ALPase 活性は、対照群で36mU/dish、DPH 群で50mU/dish であった。

LPS 添加群 (LPS 群と LPS+DPH 群) の ALPase 活性は、LPS 無添加群より低く、培養4~5週までゆっくりと上昇した。培養6週以降に、活性はほぼ一定となった。2週以降の ALPase 活性は、対照群の20~40%で LPS に

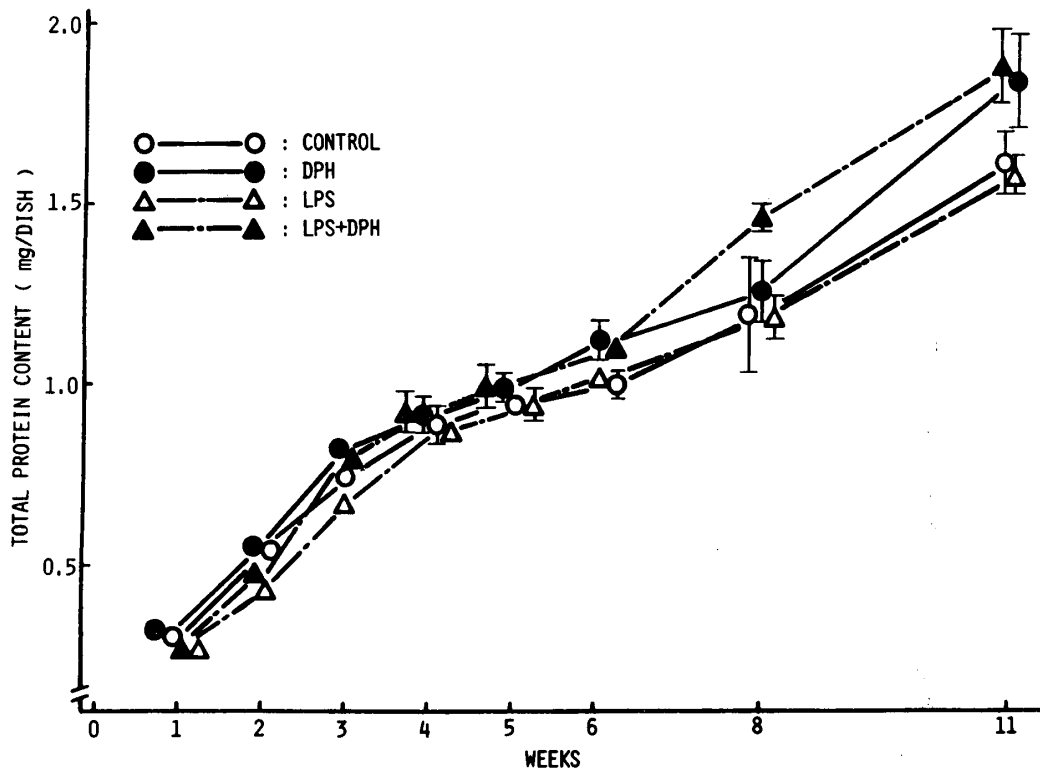


Fig. 1. Effect of DPH and LPS on total protein in human gingival fibroblast cultures. Results are expressed as the means \pm standard deviations of the three determinations of triplicate dishes, except for the cultures of the first three weeks which were analysed in duplicate. open circle, control; closed circle, $5 \mu\text{g}$ DPH; open triangle, $25 \mu\text{g}$ LPS; closed triangle, $5 \mu\text{g}$ DPH + $25 \mu\text{g}$ LPS in culture medium. (Plottes and symbols in Fig. 2-6 are also the same as in Fig. 1).

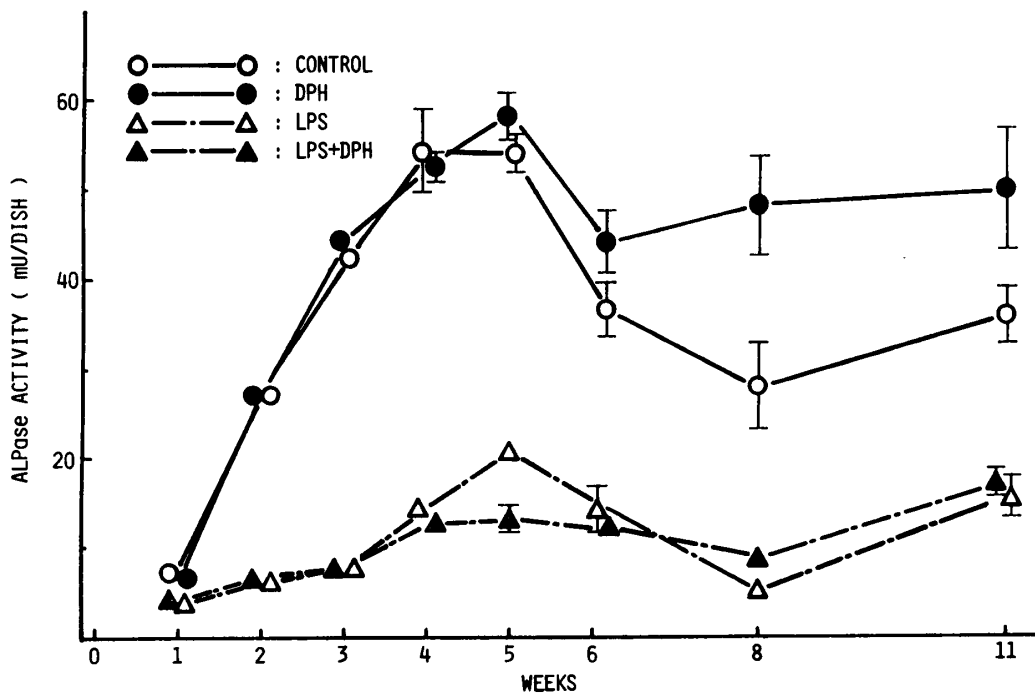


Fig. 2. Changes in ALPase activity with culture time in fibroblasts by DPH and LPS.

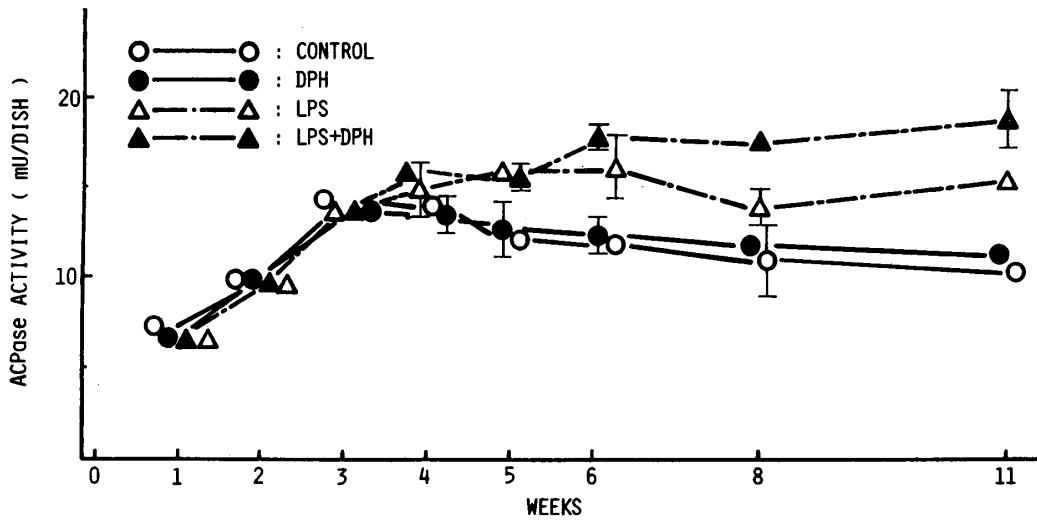


Fig. 3. Changes in ACPase activity with culture time in fibroblasts by DPH and LPS.

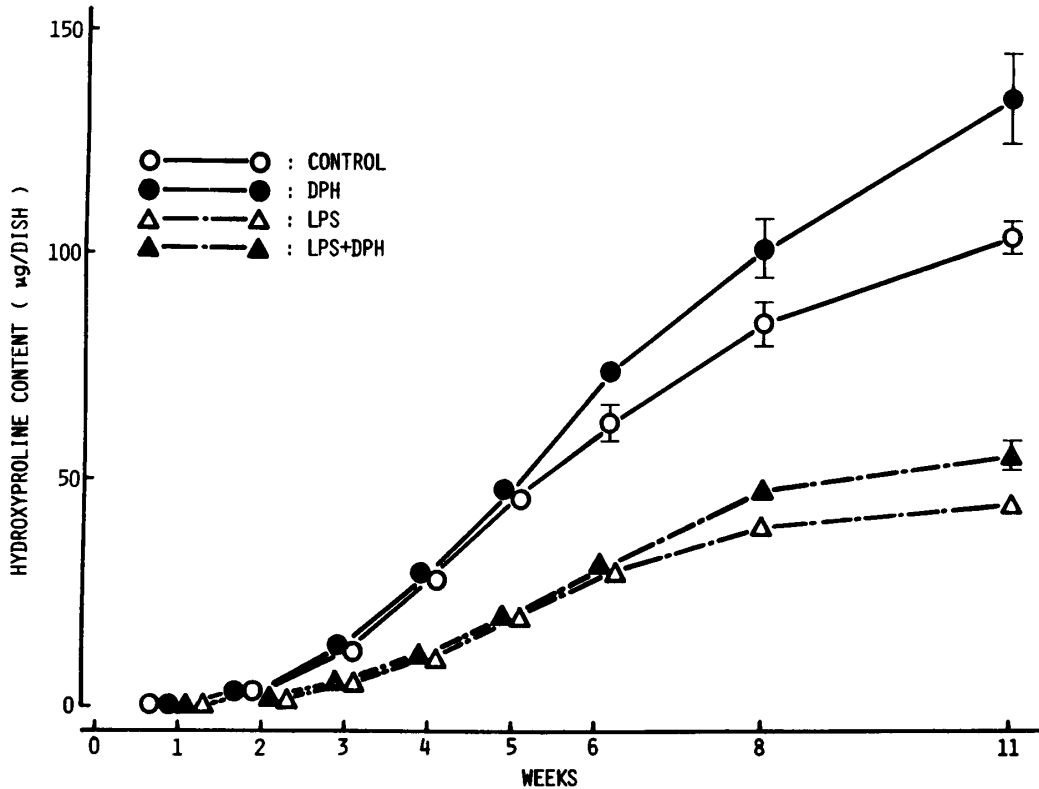


Fig. 4. Effect of DPH and LPS on hydroxyproline content in fibroblast cultures.

よる活性の顕著な抑制が認められた。

4. ACPase 活性

培養3週まで、全実験群の ACPase 活性はほぼ同様に上昇した (Fig. 3)。その後、LPS 無添加群の ACPase 活性は、わずかずつ低下し、11週で10~11mU/dish となった。しかし、LPS 群ではさらに5週まで ACPase 活性は上

昇し、以後ほぼ一定で16mU/dish の活性であった。LPS+DPH 群では6週まで ACPase 活性が上昇した後、ほぼ一定となり、18mU/dish の活性であった。

5. ヒドロキシプロリン量

対照群のヒドロキシプロリン量は、S 字曲線状に増加し、培養11週では104 μg/dish であっ

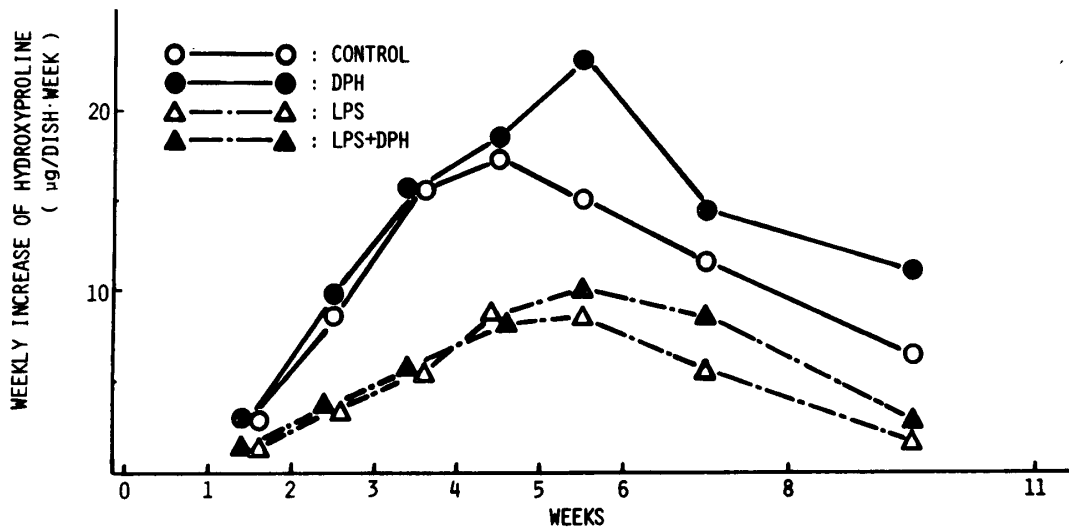


Fig. 5. Changes in weekly increase of hydroxyproline in fibroblast cultures by DPH and LPS.

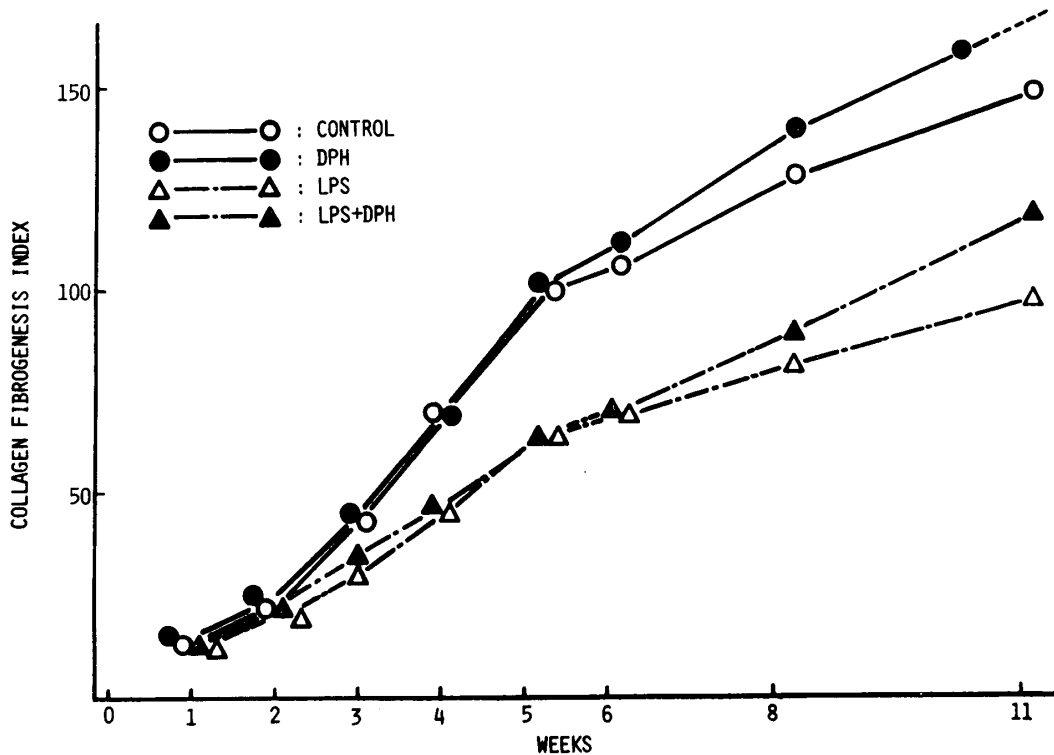


Fig. 6. Comparison of the time courses of collagen fibrogenesis by fibroblasts cultured with or without DPH and LPS. Collagen fibrogenesis index of control culture at five weeks is expressed as index 100 (See Materials and Methods for details).

た (Fig. 4)。

DPH 群のヒドロキシプロリン量は、培養 5 週まで対照群と差は認められなかった。6 週以降に対照群より、ヒドロキシプロリン量が増加し、11 週で約 30% の増加があった。1 週間当りのヒドロキシプロリンの増加量は、5-6 週以

降に対照群より約 50% 増加していた (Fig. 5)。

LPS 群では、ALPase 活性と同様に著しい低下が認められ、ヒドロキシプロリン量は対照群の 40~50% で 11 週では 45 $\mu\text{g}/\text{dish}$ であった。

LPS+DPH 群においても 6 週まで、ヒドロキシプロリン量は LPS 群との間に差はなかつ

た。しかし、DPH 群と同様に、培養 8～11 週ではヒドロキシプロリン量は LPS 群より増加し、11 週で 26% の増加が認められた。また、週当たりの増加量は 6～8 週と 8～11 週で LPS 群より約 50% 増加していた。

5. Van Gieson 染色

Van Gieson 染色では、培養 3 週で島状に酸性フクシンに染まる部分が認められ、培養期間と共に染色部位が増加し、濃染されるようになった。

コラーゲン線維形成インデックスの増加曲線は (Fig. 6)、ヒドロキシプロリン量の増加曲線とよく一致した。

考 察

1. DPH の影響

各実験群間の細胞増殖に差は認められず、DPH 単独、LPS との同時添加の両者共に促進または抑制作用を示さなかった。しかし、一方、DPH によって線維芽細胞の増殖が促進されるとの報告もあり^{5,6} 実験結果の不一致は細胞の DPH 感受性や実験条件の差異によるものかもしれない。

DPH によるヒドロキシプロリン蓄積の促進は、DPH 群で培養 6 週以降に、LPS + DPH 群で 8 週以降に認められた。しかし、LPS + DPH 群での促進効果は、LPS により抑制された蓄積量を対照群のレベルに回復させるほど強くはなかった。

培養 11 週の総蛋白質量を比較すると、DPH 群の増加量は対照群に対し約 230 μg で、コラーゲン量をヒドロキシプロリン量 $\times 7.46$ から推定すると⁷、この総蛋白質量の差は、両実験群のヒドロキシプロリン量の差 (約 30 μg) にほぼ一致する。しかし、LPS + DPH 群の LPS 群に対する総蛋白質量の増加は約 300 μg で、両群のヒドロキシプロリン量の差 (12 μg) から推定されるコラーゲン量より多く、増加した蛋白質の多

くは非コラーゲン性蛋白質と考えられる。また、LPS + DPH 群のヒドロキシプロリン量は対照群の 55%、DPH 群の 40% と低く、コラーゲン量も両群に比較し低下したと考えられるが、総蛋白質量は対照群より 17% 高く、DPH 群とほぼ同量であるので、LPS と DPH の同時添加により、DPH 群よりもさらに非コラーゲン性蛋白質が増加したと考えられる。

DPH により肥大した歯肉の組織学的定量によると、細胞とコラーゲン線維の占める割合に対して、非コラーゲン性の細胞間基質の割合が相対的に増加していることがヒト¹⁴ と実験動物¹⁵ で明らかにされている。生化学的にも、DPH を投与されたラットの皮膚で、蛋白質量、ヒドロキシプロリン量の増加と共にヘキサミンの増加が¹⁶、また DPH により肥大した歯肉でも、蛋白質量、ヒドロキシプロリン量と共に非コラーゲン性蛋白質の増加¹⁷ が報告されている。さらに、DPH により肥大した歯肉に由来する線維芽細胞では、グリコサミノグリカンの蓄積増加が示されている¹⁸。つまり DPH による歯肉の肥大は、非コラーゲン性蛋白質の増加がその大きな要因の一つとなっていると考えられる。

すでに述べたように、DPH による歯肉の肥大には歯肉の炎症や、炎症の発症原因の一つと考えられる歯垢が関与していることが明らかにされている⁴。また、歯垢の成分の一つである内毒素が、健康な歯肉溝上皮を通過し結合組織に達することはよく知られることである。従って本実験の結果は、DPH による歯肉肥大の非コラーゲン性細胞間基質の増加を、歯垢中の内毒素がさらに促進している可能性を示唆しているものと考えられる。

2. LPS の影響

線維芽細胞の増殖に対する LPS の影響について、Aleo ら¹⁹ は 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以上の濃度で増殖を抑制するが、50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以下では細胞の生存率と増殖に影響を与えないとしている。また、

低濃度 (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) の大腸菌由来 LPS の添加により、線維芽細胞のアミノ酸取り込みと DNA 合成の抑制がみられるが、特にプロリンの取り込みが強く抑制されることが報告されている²⁰。歯垢抽出物の培養骨組織への作用でも、細胞増殖に影響を与えない低濃度では非コラーゲン性蛋白質合成をほとんど抑制しないが、コラーゲン合成を強く抑制することが報告されている²¹。また同様の実験で、DNA とコラーゲン量は減少するが総窒素量は変化しないことも示されている²²。本実験の 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の LPS 濃度では、細胞増殖と総蛋白質量は対照群と差がなかったが、ALPase 活性とヒドロキシプロリン量は著しく低下した。

歯垢抽出物の添加により、歯肉由来の培養線維芽細胞のヒアルロン酸合成が促進され^{23, 24}。大腸菌由来の LPS でも歯垢抽出物より微弱ではあるがヒアルロン酸合成が促進されることが報告されている²⁴。LPS の添加により、ムコ多糖を主成分とする糖蛋白質合成が促進されていると推測される。

今回の実験で、LPS 添加群ではヒドロキシプロリン量が半減し、コラーゲン量が減少していると考えられるにもかかわらず、総蛋白質量の低下が認められない理由として、糖蛋白質などの非コラーゲン性蛋白質の増加が考えられる。

DPH と内毒素の歯肉肥大発症との関連についてはさらに十分な検討が必要と考えられる。

3. ALPase・ACPase 活性とヒドロキシプロリン量

LPS 無添加群である対照群と DPH 群は、同じ ALPase 活性曲線で上昇した。しかし、6 週以後、ALPase 活性の低下が対照群でみられたのに対し、DPH 群ではその低下はわずかであった。長期培養における ALPase 活性の低下を DPH は抑制しているように思われる。他方、LPS 添加群の ALPase 活性は、LPS 無添加群の 20~40% しかなく、LPS による著しい活性

抑制効果が認められた。また、LPS 群と、LPS + DPH 群との間に差異はなく、LPS の ALPase 活性の抑制が DPH の作用より強いことが示された。

線維芽細胞の ALPase 活性も研究されて来ているが、その機能・役割はまだ十分に明らかにされていない。しかし、同じ間葉系細胞で、同じアイソザイムを持つ骨芽細胞では、骨基質形成期に ALPase 活性が高い。そして、物質の細胞膜透過、線維性タンパクの形成、ムコタンパクの形成等に ALPase が関与していることが示唆されている²⁵。また、本実験においても、ALPase 活性の高い群で、さらに ALPase 活性の高い時期に一致してヒドロキシプロリン量が高いことが示されており (Fig. 2, 5)、これらを考え合せると、ALPase のヒドロキシプロリン合成・蓄積 (コラーゲン合成および線維形成) との関連が推測される。しかし、ALPase の役割については、ALPase の生理的作用 pH やその基質等が解明されて、始めて明らかになってくるものと思われる。

ACPase 活性の変化と、ヒドロキシプロリン量との間には相関が認められなかった。ただ、LPS 添加群の 4 週以後の ACPase 活性は、LPS 無添加群に比べて高く、LPS が細胞内に取り込まれ (endocytosis)、ライソゾーム系での消化・分解が高まっていることが推察される。しかし、培養初期ではその差異がないことや、コラーゲンの消化・分解への関与については、さらに研究が必要である。

4. Van Gieson 染色の定量化

培養物が Van Gieson 染色されるのは、培養 3 週以降であり、1-2 週での低い染色性は、細胞質などの非特異的な色素の吸着の結果と考えられる。しかし、3 週以降の Monocellater による染色度の測定は、ハイドロキシプロリン量の定量結果とよく一致した。

Monocellater の測定波長は 555 nm で、Van

Gieson 染色の染色液 (酸性ピクロフクシン液) の吸収極大 (544 nm) よりわずかに長波長である。しかし, 555 nm での染色液の吸光度は544 nm の83%であり, 測定には問題はないと考えられる。

Van Gieson 染色試料の Monocellater による測定と, ヒドロキシプロリン量の変化はよく一致し, コラーゲン量つまり線維形成・蓄積の簡易な比較手段として有効と思われる。

結 論

ヒト歯肉由来の培養線維芽細胞を用いて, 細胞増殖, ALPase 活性, ACPase 活性, 総蛋白質量, ヒドロキシプロリン量, コラーゲン線維形成に対する DPH と LPS の影響を検討し, 以下の結果を得た。

1. 培養液への DPH (5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) と LPS (25 $\mu\text{g}/\text{ml}$) の単独添加と両者の同時添加は, 線維芽細胞の生存率と増殖にほとんど影響を与えなかった。
2. DPH の培養液への添加は, 培養6週以降に, 細胞の ALPase 活性の低下を抑制し, 培養物中のヒドロキシプロリンの蓄積量を増加させ, 総蛋白質量を高める傾向を示した。
3. LPS の培養液への添加により, 細胞の ALPase 活性は抑制され, 培養物中のヒドロキシプロリン量は低下し, 培養5週以降では ACPase 活性が上昇した。しかし, 培養物中の総蛋白質量は対照群とほぼ同量であった。LPS の培養液への添加が, 培養物中の非コラーゲン性蛋白質量を増加させることを示した。
4. LPS と DPH の培養液への同時添加により, 培養8週以降に培養物中のヒドロキシプロリン量が LPS 群より増加したが, 対照群より低かった。しかし, 総蛋白質量は LPS 群・対照群より高く, DPH 群とほぼ同量であった。LPS と DPH の同時添加により, 培養物中の非コラーゲン性蛋白質量が DPH 群, LPS 群よ

りさらに増加した。

5. 線維芽細胞の ALPase 活性と培養物中のヒドロキシプロリン量との間には相関が認められ, ALPase 活性とヒドロキシプロリンの合成・蓄積との関連が示唆された。
6. 培養物の Van Gieson 染色性 (collagen fibrogenesis index) は, ヒドロキシプロリン量とよく一致した。

文 献

1. Angelopoulos, A. P. and Goaz, P. W.: Incidence of diphenylhydantoin gingival hyperplasia, *Oral Surg.*, 34 ; 898—906, 1972.
2. Nuki, K. and Cooper, S. H.: The role of inflammation in the pathogenesis of gingival enlargement during the administration of diphenylhydantoin sodium in cats, *J. Periodont. Res.*, 7 ; 102—110, 1972.
3. Nascimento, A., Barreto, R. C., Bozzo, L., and Almeida, O. P.: Interaction of phenytoin and inflammation induces gingival overgrowth in rats, *J. Periodont. Res.*, 20 ; 386—391, 1985.
4. Yamada, S., Sato, T., and Miake, K.: Experimental pathological studies on dilantin gingival hyperplasia in rat: (I) Macroscopical and light-microscopical observations, *Bull. Tokyo Dent. Coll.*, 18 ; 181—193, 1977.
5. Shafer, W. G.: Effect of dilantin sodium on growth of human fibroblast-like cell cultures, *Proc. Soc. Exp. Biol.*, 104 ; 198—201, 1960.
6. Shafer, W. G.: Effect of dilantin sodium on various cell lines in tissue culture, *Proc. Soc. Exp. Biol.*, 108 ; 694—696, 1961.
7. Kasai, S. and Hachimine, K.: Effect of 5, 5-diphenylhydantoin sodium on the synthesis of collagen by some fibroblastic cell lines including gingiva derived cells, *Bull. Tokyo Dent. Coll.*, 15 ; 53—62, 1974.
8. 松尾 朗, 矢嶋俊彦: 培養線維芽細胞の増殖とコラーゲン線維形成, *歯基礎誌*, 27 ; 53—63, 1985.
9. Helderman, W. H. P.: Microbial etiology of periodontal disease, *J. Clin. Periodontol.*, 8 ; 261—280, 1981.
10. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., and

- Randall, R. J. : Protein measurement with the Folin phenol reagent, *J. Biol. Chem.*, 193 ; 265—275, 1951.
11. Komoda, T. and Sakagishi, Y. : Inhibition of alkaline phosphatase by sialic acid, *Biochim. Biophys. Acta*, 482 ; 79—88, 1977.
 12. Walter, K. and Schütt, C. : Acid and alkaline phosphatase in serum. (Two-point method), "Methods of Enzymatic Analysis", ed. Bergmeyer, H. U., volume 2, p. 856—860, Academic Press, Inc., New York, 1974.
 13. Bergman, I. and Loxley, R. : Two improved and simplified methods for the spectrophotometric determination of hydroxyproline. *Anal. Chem.*, 35 ; 1961—1965, 1963.
 14. Dahllöf, G., Reinholt, F. P., Hjerpe, A., and Modéer, T. : A quantitative analysis of connective tissue components in phenytoin-induced gingival overgrowth in children. A stereological study, *J. Periodont. Res.*, 19 ; 401—407, 1984.
 15. Hall, B. K. and Squier, C. A. : Ultrastructural quantitation of connective tissue changes in phenytoin-induced gingival overgrowth in the ferret, *J. Dent. Res.*, 61 ; 942—952, 1982.
 16. Houck, J. C., Jacob, R. A., and Maengwyn-Davies, G. D. : The effect of sodium dilantin administration upon the chemistry of the skin, *J. Clin. Invest.*, 39 ; 1758—1762, 1960.
 17. Ballard, J. B. and Bulter, W. T. : Proteins of the periodontium. Biochemical studies on the collagen and noncollagenous proteins of human gingivae, *J. Oral Pathol.*, 3 ; 176—184, 1974.
 18. Kantor, M. L. and Hassell, T. M. : Increased accumulation of sulfated glycosaminoglycans in cultures of human fibroblasts from phenytoin-induced gingival overgrowth, *J. Dent. Res.*, 62 ; 383—387, 1983.
 19. Aleo, J. J., Renzis, F. A., Farber, P. A., and Varboncoeur, A. P. : The presence and biologic activity of cementum-bound endotoxin, *J. Periodontol.*, 45 ; 672—675, 1974.
 20. Singer, R. E. and Dutton, W. G. : A comparison of the effects of endotoxin upon fibroblast proliferation and macromolecular synthesis, *J. Dent. Res.*, 58 ; 1634—1639, 1979.
 21. Multanen, V. -M., Paunio, K., and Larjava, H. : Inhibition of bone collagen synthesis by dental plaque extract, *J. Periodont. Res.*, 20 ; 637—643, 1985.
 22. Larjava, H. : Effect of human dental bacterial plaque extract on the connective tissue of in vitro cultured fetal rat calvaria, *Archs. Oral Biol.*, 28 ; 371—374, 1983.
 23. Larjava, H., Jalkanen, M., Penttinen, R., and Paunio, K. : Enhanced synthesis of hyaluronic acid by human gingival fibroblasts exposed to human dental bacterial extract, *J. Periodont. Res.*, 18 ; 31—39, 1983.
 24. Larjava, H. : Metabolic change in cultured gingival fibroblasts exposed to bacterial extracts. Stimulation of hyaluronic acid synthesis, *J. Periodont. Res.*, 19 ; 230—237, 1984.
 25. McComb, R. B., Bowers, G. N., Jr. and Posen, S. : *Alkaline Phosphatase*, Plenum Press, New York, 1979.