Bacteroides gingivalis による好中球走化性 抑制作用とリソゾーム酵素の放出性について

中 村 正 一

サンスター株式会社基礎研究部

(昭和59年10月4日受付)

Depression of Neutrophil Chemotaxis by *Bacteroides gingivalis* and Lysosomal Enzyme Release

Masakazu NAKAMURA

Fundamental Research Laboratory, Sunstar Inc.

The purpose of the present study was to determine effects of culture supernatant of *Bacteroides gingivalis* on neutrophil chemotaxis and lysosomal enzyme release.

Neutrophil was prepared from heparinized venous blood of healthy donors by dextran sedimentation and Ficoll-Hypaque centrifugation. *B. gingivalis* (ATCC 33277) was cultured anaerobically in Brain Heart Infusion broth at 37°C for 3 days. Culture supernatant was lyophilized and used in the present study. Neutrophil chemotaxis was measured using Boyden chambers. 2×10^{-8} M of n-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine (FMLP) was used as a chemoattractant. Lysosomal enzyme release by neutrophil stimulated with FMLP was determined by measuring lysozyme activity in the cell supernatant after the reaction of neutrophil suspension.

Culture medium unaffected the chemotactic res-

ponse of neutrophil, however, culture supernatant of *B. gingivalis* showed dose-dependent depression of neutrophil chemotaxis. Release of lysosomal enzyme was seen in the dose-dependent manner of FMLP and about 10% of total lysozyme was released at 10^{-6} M of FMLP. The release was markedly increased in the presence of 5 $\mu\text{g/ml}$ of cytochalasin B and more than 50% of lysozyme was released. No release of lactate dehydrogenase which was cytoplasmic enzyme was seen in these conditions. However, culture supernatant of *B. gingivalis* at the concentration range of 1~1,000 $\mu\text{g/ml}$ unaffected the release of lysozyme from neutrophil in the presence and the absence of cytochalasin B.

From these results, it was clear that the depression of neutrophil chemotaxis by culture supernatant of *B. gingivalis* was not associated with lysosomal enzyme release.

Key words : *Bacteroides gingivalis*, Neutrophil, Chemotaxis, Lysosomal enzyme

要旨 : *Bacteroides gingivalis* (ATCC 33277) 培養上清のヒト好中球の走化性およびリソゾーム酵素の放出性に及ぼす影響を検討した。

2×10^{-8} M の n-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine (FMLP) を走化性物質として用いたが、*B. gingivalis* 培養上清は好中球の走化性を濃度依存的に抑制した ($p < 0.01$)。FMLP 刺激による好中球リソゾーム酵素の放出性はリゾチームを指標として測定したが、その放出性は FMLP の濃度に依存的であり、 10^{-6} M の FMLP で約 10% が、サイトカリン B 存在下では顕著に増加し、約 50% が放出された。細胞質酵素である乳酸脱水素酵素の放出は認めら

れなかった。しかし、この条件下では *B. gingivalis* 培養上清のリソゾーム酵素の放出性に対する影響は見られなかった。

このことから、*B. gingivalis* による好中球の走化性抑制作用は、リソゾーム酵素の放出性とは関連性がないことが明らかになった。

索引用語：バクテロイデスジンジバリス，好中球，走化性，リソゾーム酵素

緒 言

好中球をはじめとする食細胞は細菌などの感染に対する生体の防禦において重要な役割を担っている。好中球の機能が低下している場合には細菌感染が高まり、重篤化することが Klebanoff ら¹⁾によって知られている。また、ある種の歯周疾患患者においても、この好中球の機能が低下していると言われている。Cianciola ら²⁾、Clark ら³⁾、Lavine ら⁴⁾、Van Dyke ら⁵⁾は異常に激しい歯槽骨吸収をともなう限局性若年性歯周炎患者の多くは好中球の走化性が低下していることを報告している。また、成人性の歯周炎の末梢血好中球の走化性は、健康人と比べて有意の差はないと言われているが⁶⁾、Van Dyke ら⁷⁾は *Bacteroides gingivalis* などの歯周病原性細菌であると考えられているグラム陰性細菌は、*in vitro* でこの好中球の走化性を阻害することを示しており、歯周病巣局所での好中球機能の低下が、歯周炎と密接な関連性があると示唆している。このように、好中球は細菌感染に対して防禦的役割を果たしていると考えられている。

一方で、好中球などの食細胞は、細菌など外界からの異物を食食、消化しその侵襲を排除すると同時に、その過程で重要な役割を果たしているリソゾーム酵素が細胞外へ放出され、宿主組織を破壊することも報告されている。White ら⁸⁾、Tsai ら⁹⁾は種々の口腔細菌と好中球との相互作用において、細菌の食食時に好中球リソゾーム酵素の細胞外への放出が非常に増加することを示し、また他の研究者により、リソゾーム酵素である中性プロテアーゼを *in vitro* においてヒト歯肉片に、あるいはまた、*in vivo* でウサギ歯肉に作用させたと、顕著な組織の破壊が見られたことが報告されている¹⁰⁻¹³⁾。

また、好中球と走化性物質との相互作用によるリソゾーム酵素の放出に関する報告も散見される。Gallin ら¹⁴⁾や Fletcher ら¹⁵⁾は走化性物質である N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine (FMLP) を好中球に作用させると濃度依存的にリソゾーム酵素が放出され、走化性や好中球表面の FMLP のレセプターに影響を与える

ことを報告している。ところが、*B. gingivalis* の病原性については様々な観点から研究が行なわれているが、好中球との相互作用において、走化性とリソゾーム酵素の放出性に関連した研究は見当たらない。

そこで今回、*B. gingivalis* の培養上清を用いて、好中球の走化性とリソゾーム酵素の放出について検討を加え、若干の知見を得たので報告する。

材料および実験方法

被 験 菌

B. gingivalis 1021 株 (ATCC 33277) を被験菌とし anaerobic Brain Heart Infusion ブロスにて嫌氣的に3日間、培養した。培養液を 10,000×g で15分間遠心後、上清を得、凍結乾燥した。凍結乾燥標品は用時、PBSにて溶解し、試料として用いた。

好中球の分離

Van Dyke ら¹⁶⁾の方法に準じて行なった。すなわち、健康人からヘパリン化末梢血を採取後、デキストランにて赤血球を除去し、Ficoll-Hypaque にて好中球を分離した。PBS にて洗浄後、 2.5×10^6 cells/ml となるように、2% のウシ血清アルブミンを含む Gey's balanced salt solution に懸濁して用いた。

走化性の測定

好中球の走化性は変法ボイデンチャンパーを用いて、Snyderman ら¹⁷⁾の方法に準じて行なった。マイクロポアフィルター（ポアサイズ 5 μ m、ザルトリウスメンブレンフィルター、西ドイツ製）で仕切られたチャンパー上部に好中球懸濁液を加え、下部に 2×10^{-8} M の N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine (FMLP) を含む Gey's balanced salt solution-Gelatin veronal buffer を加え、5% CO₂ インキュベーター中、37°C で1時間反応させた。反応終了後、フィルターを中性ホルマリン緩衝液で固定、ヘマトキシリン染色後、フィルターの底面に遊走した好中球数を顕微鏡（×400）にて観察カウントした。

Table 1 Effect of culture supernatant of *B. gingivalis* on neutrophil chemotaxis.

	Number of cells per high power field
Control	41.1±7.1
Culture medium 100 µg/ml	40.1±7.6
<i>B.gingivalis</i> 100 µg/ml	25.9±4.8*

*Statistically significant difference P<0.01

リゾチーム酵素の放出の測定

2.5×10⁶ cells/ml の好中球懸濁液 0.5 ml にサイトカラシン B (10 µg/ml) を含む、あるいは含まない PBS を 0.5 ml 加え、37°C で 5 分間プレインキュベートする。それに種々の濃度の FMLP あるいは *B. gingivalis* 培養上清を 0.1 ml 加え、37°C で 1 時間インキュベートする。反応終了後、氷水に浸し、500×g で 15 分間遠心し、上清中のリゾチーム活性を測定する。

リゾチーム活性は Smolelis ら¹⁸⁾ の方法に準じ、*Micrococcus lysodeikticus* の溶菌活性を濁度にて比色測定した。すなわち、*Micrococcus lysodeikticus* (シグマ社製) を 0.15 mg/ml となるようにリン酸バッファー (pH 6.2) に懸濁し、その懸濁液 2.5 ml に上記上清を 0.5 ml 加え、37°C で 3~4 分間インキュベートした。450 nm における吸光度を測定し、その吸光度の減少速度をもってリゾチーム活性とした。

また、乳酸脱水素酵素は Zamboni¹⁹⁾ らの方法に準じ、シグマ社製のキット No. 500 を用いて、ピルビン酸から乳酸への変換時の NADPH の消費量をもって、その活性とした。

これらの酵素の好中球中のトータル活性は 0.1% Triton X-100 にて好中球を溶解して測定した。

実験結果

***B. gingivalis* 培養上清の好中球走化性に与える影響**
B. gingivalis 1021 株 (ATCC 33277) の培養上清の好中球走化性に与える影響を検討した結果を Table 1 に示した。

コントロールにおいては遊走した好中球数が 41.1±7.1 であるのに対して、培地 100 µg/ml を添加した場合、40.1±7.6 と変化は見られなかったが、*B. gingivalis* の培養上清を 100 µg/ml 添加すると 25.9±4.8 と好中球の走化性は低下した。この走化性抑制作用は 1% 以下の危険率で統計的に有意であった。

Fig. 1 Effect of culture supernatant of *B. gingivalis* on neutrophil chemotaxis.

(×) : Culture medium 100 µg/ml,
(○) : *B. gingivalis* 100 µg/ml

* Statistical difference between control and experimental groups p<0.05

次に、*B. gingivalis* 培養上清の走化性抑制作用の濃度依存性を調べた結果を Fig. 1 に示す。培地による影響では高濃度になるにつれてわずかながら抑制作用が見られたが、培養上清 10~1,000 µg/ml においては著明な走化性抑制作用が認められた。この抑制作用は 5% 以下の危険率で統計的にも有意であった。

好中球からのリゾチーム酵素の放出

走化性物質である FMLP によるリゾチーム酵素の放出について、サイトカラシン B 非存在下および存在下で検討した結果を Fig. 2 に示した。

サイトカラシン B 非存在下で、FMLP の刺激による好中球からのリゾチームの放出は FMLP の濃度に依存的で、10⁻⁸ M から認められ、10⁻⁶ M で約 10% が放出され、プラトーに達した。この好中球からのリゾチームの放出はサイトカラシン B により顕著に高まり、10⁻⁸ M で約

Table 2 Effect of *B. gingivalis* on granular lysozyme release by neutrophil with FMLP

	Percent of total lysozyme activity
PBS	4.8±1.4
FMLP	11.1±3.4
FMLP + <i>B.gingivalis</i>	10.8±3.5
Cytochalasin B	4.2±1.0
FMLP + cytochalasin B	52.7±1.4
FMLP + cytochalasin B + <i>B.gingivalis</i>	55.5±3.7

FMLP 10⁻⁶ M, cytochalasin B 5 µg/ml, *B.gingivalis* 100 µg/ml

Fig. 2 Effect of cytochalasin B on granular lysozyme release by neutrophil with FMLP (○) : control, (×) : cytochalasin B 5 µg/ml

25%, 10⁻⁶ M では 50% 以上にも達した。FMLP 非存在下でサイトカラシンB単独による刺激ではリゾチームの放出は認められなかった。

また, Fig. 2 には示していないが, 細胞質酵素である乳酸脱水素酵素の放出については上記実験条件下では常に 3~5% 以下と一定であり, FMLP やサイトカラシン B による細胞毒性作用は見られなかった。

この FMLP 刺激による好中球のリゾチームの放出に対して, *B. gingivalis* 培養上清の影響を調べた結果を Table 2 に示した。

好中球を 10⁻⁶ M の FMLP で処理することにより, 11.1% のリゾチームが放出されたが, これに *B. gingivalis* 培養上清 100 µg/ml を添加しても 10.8% と変化は見られなかった。データは示さないが, 培養上清 1~1,000 µg/ml においてもリゾチームの放出性には影響が認められなかった。

一方, FMLP 10⁻⁶ M にサイトカラシンBを 5 µg/ml

Fig. 3 Effect of *B. gingivalis* on granular lysozyme release by neutrophil stimulated with FMLP in the presence of cytochalasin B. FMLP 10⁻⁶ M, cytochalasin B 5 µg/ml Values indicated Mean±SD.

添加することにより, 好中球からのリゾチームの放出が 52.7% と増加したが, さらに *B. gingivalis* 培養上清を 100 µg/ml 添加しても, リゾチームの放出は 55.5% であり有意の差は認められなかった。

Fig. 3 に示したように, *B. gingivalis* は 1~1,000 µg/ml においては, この好中球からのリゾチームの放出に対して作用を及ぼさなかった。

考 察

近年, 好中球の機能と歯周疾患の関連性について活発な研究が行なわれるようになり, 走化性や食作用について次第に明らかになってきた⁶⁾。限局性若年性歯周炎患者などある種の歯周疾患患者では末梢血好中球の走化性が低下していることが知られており, 急速な骨吸収をとるような疾患の進展は生体防禦能の低下が一因であると考

えられている。一方、成人性の辺縁性歯周炎患者では、好中球機能と疾患の間に明確な相関性が認められず、病単局所での細菌の役割が重要視されている。

Van Dyke ら⁷⁾は種々の口腔細菌の好中球機能におよぼす影響を調べ、*B. gingivalis*, *Fusobacterium nucleatum*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans* などのグラム陰性細菌が好中球の走化性を抑制することを報告している。しかしながら、これらの細菌は食作用に対しては影響をおよぼさず、その作用は走化性に対して特異的であると考えられている。今回の実験結果でも、*B. gingivalis* 培養上清は好中球の走化性を濃度依存的に阻害し、上記の報告と一致していた。

一方、Gallin ら¹⁴⁾は FMLP による好中球の走化性とリソゾーム酵素の放出性との関連性からリゾチームの放出を調べ、走化性については 10 nM に至適濃度が認められ、FMLP 濃度の増加にともない走化性が低下するのに対し、リゾチームの放出性は濃度依存的に 10 nM から認められ、10 μ M まで漸次増加することを報告している。さらに、好中球の FMLP 刺激によるリゾチームの放出は好中球細胞膜下のマイクロフィラメント層を破壊すると考えられているサイトカラシン B により飛躍的に増加することも知られている。今回の結果でも、FMLP 刺激により好中球リソゾームからのリゾチームの放出性は高まり、 10^{-6} M の FMLP で約 10% が、さらにサイトカラシン B 存在下では飛躍的に増加し、約 50% のリゾチームが放出されたことは、彼らの報告を支持するものである。細胞質酵素である乳酸脱水素酵素の放出が認められなかったことから細胞融解などによるものではなく、FMLP の好中球表面への結合刺激による Exocytosis により、リソゾーム酵素が放出されたと考えられる。このリソゾーム酵素の放出を刺激することにより、好中球表面の FMLP のレセプターのアベイラビリティが高まり、逆に走化性が低下することが Fletcher ら¹⁵⁾により報告されている。また、*B. gingivalis* は FMLP の好中球表面上のレセプターへの結合を阻害することが知られており⁷⁾、従って走化性の抑制と同時に、リソゾーム酵素の放出性に何らかの影響をおよぼすものと考えられた。しかしながら、今回の実験結果では、*B. gingivalis* 培養上清は好中球の FMLP 刺激によるリソゾーム酵素の放出性に対して、サイトカラシン B 非存在下あるいは存在下においても全く作用が認められなかった。すなわち、*B. gingivalis* による好中球走化性の抑制はリソゾーム酵素の放出性とは関連のない現象であることが明らかになったが、その理由については現在のところ明確ではない。

い。

B. gingivalis 培養上清中の好中球走化性抑制物質は低分子物質であると考えられているが⁷⁾、詳細は不明であり、今回の実験においても培養液を用いたので、抑制物質の精製を進めながら、再度検討する必要がある。また、リゾチームは酸性顆粒と特殊顆粒の双方に存在することが知られているが、今回の結果ではいずれのリソゾーム画分のものかは不明であり、ミエロパーオキシダーゼのような特殊顆粒のみに存在する酵素の放出性もあわせて検討する必要がある。

B. gingivalis の病原性については様々な観点から研究が行われており²⁰⁾ 次第に明らかになりつつあるが、例えば酵素学的な観点からは、コラゲナーゼ²¹⁾やペプチダーゼ²²⁾などの酵素による直接的な歯周組織の破壊と同時に、IgA, IgG あるいは α -1 アンチトリプシン、 α -2 マクログロブリンの分解などによる宿主防禦機能の低下による間接的な作用²³⁻²⁴⁾ が関与しているものと考えられる。*B. gingivalis* と好中球の相互作用においてもこのような観点からさらに詳細に検討していく必要があると考えられる。

結 論

B. gingivalis 培養上清のヒト好中球走化性とリソゾーム酵素の放出性におよぼす影響を検討した。

1. *B. gingivalis* は濃度依存的に好中球の走化性を抑制した ($p < 0.01$)。
2. 好中球の FMLP 刺激によるリソゾーム酵素の放出性は FMLP の濃度に依存的で、 10^{-6} M で約 10% が放出された。このリソゾーム酵素の放出性は、サイトカラシン B 存在下で顕著に増加し、約 50% が放出された。
3. *B. gingivalis* は好中球の FMLP 刺激によるリソゾーム酵素の放出性に対して、サイトカラシン B 非存在下あるいは存在下で共に作用は認められなかった。
4. これらのことから、*B. gingivalis* 培養上清による好中球の走化性抑制作用はリソゾーム酵素の放出性とは関連性がないことが判明した。このメカニズムなど詳細についてはさらに検討していく必要があると考える。

謝 辞

本研究の遂行に際して懇切丁寧な御教示ならびに御助言を頂きましたニューヨーク州立大学バッファロー校 オーラルバイオロジー教室 ロバート J. ジェンコ教授に謹んで感謝の意を表します。

文 献

- 1) Klebanoff, S.J. and Clark, R.A. : The neutrophil : Function and clinical disorders. North Hollanda Publishing Co., New York, 1978.
- 2) Cianciola, L.J., Genco, G.J., Patters, M.R., Mckenna, J. and Van Oss, C.J. : Defective polymorphonuclear leukocyte function in human periodontal disease. *Nature*, 265 : 445-447, 1977.
- 3) Clark, R.A., Page, R.C. and Wilde, G. : Defective neutrophil chemotaxis in juvenile periodontitis. *Infect. Immun.*, 18 : 694-700, 1977.
- 4) Lavine, W.S., Maderazo, E.G., Stolman, J., Ward, P.A., Cogen, R.B., Greenblatt, I. and Robertson, P.B. : Impaired neutrophil chemotaxis in patients with juvenile and rapidly progressing forms of periodontitis. *J. Periodont. Res.*, 14 : 10-19, 1979.
- 5) Van Dyke, T.E., Horoszewicz, H.U., Cianciola, L.J. and Genco, R.J. : Neutrophil chemotactic dysfunction in human periodontitis. *Infect. Immun.*, 24 : 124-132, 1980.
- 6) Van Dyke, T.E., Levine, M.J. and Genco, R. J. : Host-Parasite Interaction in Periodontal Diseases. Genco, R.J. and Mergenhagen, S.E. (eds), American Society for Microbiology, Washington DC, 1982, 235-245.
- 7) Van Dyke, T.E., Bartholomew, E., Genco, R.J., Slots, J. and Levine, M.J. : Inhibition of neutrophil chemotaxis by soluble bacterial products. *J. Periodontol.*, 53 : 502-508, 1982.
- 8) White, R.R. and Montgomery, E.H. : Exocytosis of polymorphonuclear leukocyte lysosomal contents induced by dental plaque. *Infect. Immun.*, 46 : 934-937, 1977.
- 9) Tsai, C.C., Hammond, B.F., Baehni, P., McArthur, W.P. and Taichman, N.S. : Interaction of inflammatory cells and oral microorganisms. VI. Exocytosis of PMN lysosomes in response to gram-negative plaque bacteria. *J. Periodont. Res.*, 13 : 504-512, 1978.
- 10) Cergneux, M., Andersen, E. and Cimasoni, G. : In vitro breakdown of gingival tissue by elastase from human polymorphonuclear leukocytes. An electron microscopic study. *J. Periodont. Res.*, 17 : 169-182, 1982.
- 11) 萩原さつき : ヒト白血球からのライソゾーム酵素が歯周組織に与える影響について. *日歯周誌*, 21 : 392-409, 1979.
- 12) Ishikawa, I., Hagiwara, S., Izumi, Y., Watanabe, H. and Kinoshita, S. : Effect of lysosomal enzymes isolated from polymorphonuclear leukocytes on periodontal tissues. *J. Periodont. Res.*, 17 : 503-505, 1982.
- 13) 和泉雄一 : ヒト白血球より抽出したライソゾーム酵素が歯周組織に及ぼす影響について. *日歯周誌*, 25 : 144-159, 1983.
- 14) Gallin, J.I. and Wright, D.G. : Role of secretory events in modulating human neutrophil chemotaxis. *J. Clin. Invest.*, 62 : 1364-1374, 1978.
- 15) Fletcher, M.P. and Gallin, J.I. : Degranulating stimuli increase the availability of receptors on human neutrophils for the chemoattractant f-Met-Leu-Phe. *J. Immunol.*, 124 : 1585-1588, 1980.
- 16) Van Dyke, T.E., Reily, A.A., Horoszewicz, H.U., Gagliardi, N. and Genco, R.J. : A rapid semi-automated procedure for the evaluation of leukocyte locomotion in the micropore filter assay. *J. Immunol. Methods*, 31 : 271-282, 1979.
- 17) Snyderman, R., Gewurz, H. and Mergenhagen, S.E. : Interactions of the complement system with endotoxic lipopolysaccharide. *J. Exp. Med.*, 128 : 259-275, 1968.
- 18) Smolelis, A.N. and Hartsell, S.E. : The determination of lysozyme. *J. Bacteriol.*, 58 : 731-736, 1949.
- 19) Zambon, J.J., Deluca, C., Slots, J. and Genco, R.J. : Studies of leukotoxin from *Actinobacillus actinomycetemcomitans* using the promyelocytic HL-60 cell line. *Infect. Immun.*, 40 : 205-212, 1983.
- 20) Slots, J. : Host-Parasite Interactions in Periodontal Diseases. Genco, R.J. and Mergenhagen,

- S.E. (eds), American Society for Microbiology, Washington DC, 1982, 27-45.
- 21) Toda, K., Otsuka, M., Ishikawa, Y., Sato, M., Yamamoto, Y. and Nakamura, R. : Thiol-dependent collagenolytic activity in culture media of *Bacteroides gingivalis*. J. Periodont. Res., 19 : 372-381, 1984.
- 22) Nakamura, M. and Slots, J. : Dipeptidyl arylamidase activity of *Bacteroides gingivalis*. Microbios Letters, 25 : 157-160, 1984.
- 23) Killian, M. : Degradation of immunoglobulins A1, A2, and G by suspected principal periodontal pathogens. Infect. Immun., 34 : 757-765, 1981.
- 24) Carlsson, J., Hermann, B.F., Hofling, J.F. and Sundqvist, G.K. : Degradation of the human proteinase inhibitors Alpha-1-anti trypsin and Alpha-2-macroglobulin by *Bacteroides gingivalis*. Infect. Immun., 43 : 644-648, 1984.
-