口腔細菌の刺激によって発現する多形核白血球の ヒト歯肉線維芽細胞傷害

鈴木 安里 葛城 啓彰 斎藤 和子

日本歯科大学新潟歯学部口腔微生物学教室

(主任：斎藤和子教授)

(平成4年12月21日受付)

Human Gingival Fibroblast Injury by Polymorphonuclear Leukocytes Exposed to Oral Microorganisms

Anri SUZUKI, Hiroaki KATSURAGI and Kazuko SAITO

Department of Oral Microbiology, Nippon Dental University, School of Dentistry at Niigata

1-8, Hamaura-cho, Niigata-shi, Niigata 951, Japan

(Chief : Prof. Kazuko SAITO)

This study was designed to examine whether human polymorphonuclear leukocytes (PMN) exposed to oral microorganisms damage human gingival fibroblasts (Gin-1 cells) and to clarify the role of PMN in mediating gingival injury. *A. actinomycetemcomitans* Y 4, *A. viscosus* NIAH 1010, *F. nucleatum* ATCC 243726 or *P. gingivalis* 381 was incubated with PMN on Gin-1 cells labeled with ^{51}Cr . Damage to Gin-1 cells was assessed by estimating cytolysis and cell detachment.

No cytolysis was found in any of the PMN or bacterial systems through the 4 h incubation time. Injury to Gin-1 cells as a result of PMN and bacterial interaction was determined by labeled cell detachment. When Gin-1 cells were incubated with PMN alone or each bacterial species, except for *P. gingivalis*, there was minimal injury as determined by detachment. However, when Gin-1 cells were incubated with both PMN and bacteria adjusted in CFU, we found a significant increase in Gin-1 cell detachment which was time and PMN-dose dependent without detectable cytolysis. *P. gingivalis* caused a significant increase of Gin-1 cell

detachment without PMN. The incubation with both *P. gingivalis* and PMN demonstrated the same amount of detachment as found in the sample incubated with *P. gingivalis* alone. No significant difference could be detected between PMN-mediated cell detachment if the concentrations of 3 the kinds of bacterial solution were adjusted to 1 mg/ml.

This injury to Gin-1 cells was inhibited by the α_1 -protease inhibitor (α_1 -PI), PMSF, and 5% human serum, but not by scavengers of oxygen radicals and acid protease inhibitor. But Gin-1 cells detachment caused by PMN and *F. nucleatum*, which has been reported to induce large amounts of oxygen radicals formation in PMN, resisted the inhibitory effect of α_1 -PI.

These results suggest that Gin-1 cell detachment might be due mainly to neutral proteases which are derived from PMN. Furthermore oxidative inactivation of α_1 -PI function by oxygen radicals derived from PMN exposed to *F. nucleatum* was observed.

Key words : Gingival fibroblast, Polymorphonuclear leukocytes, Oral microorganisms, Lysosomal enzyme

要旨 : 歯周病原細菌に誘導される多形核白血球 (PMN) の、培養ヒト歯肉線維芽細胞 (Gin-1) への傷害を観察し、歯周疾患における歯肉の傷害細胞としての PMN の役割を明らかにしようと試みた。このため ^{51}Cr 標識した Gin-1 上で健常者 PMN と、*A. actinomycetemcomitans*, *A. viscosus*, *F. nucleatum*, *P. gingivalis* を、それぞれ 37°C で反応させ、Gin-1 傷害の指標として細胞崩壊と細胞剥離を測定した。この結果、4 時間までの反応ではどの系においても細胞崩壊は発現せず、Gin-1 傷害は著明な細胞の剥離として観察された。PMN 単独、*P. gingivalis* を除く菌単独での傷害作用はみられなかったが、菌と PMN との混合により、細胞崩壊を伴わない著明な Gin-1 の剥離が発現した。この時の Gin-1 剥離は、反応時間の延長と、Gin-1 に対する PMN の割合の増加に伴って上昇した。*P. gingivalis* は菌単独でも、PMN との反応によっても 1 時間でほぼ同等の Gin-1 剥離率を示した。また、菌の浮遊液濃度が一定 (1 mg/ml) ならば、各菌種と PMN との反応による Gin-1 剥離率のあいだにはほとんど差はなかった。Gin-1 剥離は α_1 -PI, PMSF, 5% ヒト血清によって抑制されたが、酸性プロテアーゼインヒビターや活性酸素のスキャベンジャーによる抑制はほとんど起らなかった。このとき、PMN から多量の活性酸素を誘導することが報告されている *F. nucleatum* を PMN 刺激に用いると、 α_1 -PI による Gin-1 剥離の抑制率は他の菌を用いたときと比較して有意に低いものとなった。これらの結果は、この実験における Gin-1 の剥離が、おもに PMN から放出される中性プロテアーゼによることを示している。また PMN と *F. nucleatum* の反応により放出される活性酸素によるプロテアーゼインヒビターの不活化作用が観察された。

索引用語 : 歯肉線維芽細胞, 多形核白血球, 口腔細菌, ライソゾーム酵素

緒 言

歯周病原菌は、線毛, cell-associated proteins などを通して歯肉溝周辺の歯面や上皮細胞に付着し、増殖してプラークを形成する。プラークの堆積と共に、歯肉溝部には歯肉溝滲出液 (GCF) の増加がみられるようになり¹⁾、菌由来、補体起源の走化性因子などによって PMN を主とする炎症性細胞が多量に誘導される²⁾。PMN は食殺菌作用によって、生体防御の重要な役割を担っているが、PMN の活性化は傷害性を持つライソゾーム酵素、活性酸素、アラキドン酸代謝産物の細胞外への漏洩を伴い、歯周組織へ傷害をもたらすことが知られている。Garant³⁾ は、単一感染させたラットの電顕的な観察によって、歯肉溝に誘導させた PMN が食菌をしている像の周囲には、上皮組織の崩壊、細胞間隙の拡張などの傷害的变化があることを観察している。

このような PMN 仲介の傷害が、歯周疾患の病態とどのように関わっているかを理解するためには、PMN 活性化機構の多様性、エフェクターとなる毒性産物、ターゲットとなる組織構成物についての検討が必要と思われる。

PMN 活性化因子として炎症局所にはさまざまな性状の物質が存在するが、細菌によって活性化が誘導される場合、菌種の違いが PMN 放出物に影響を与え

るという報告がある。Taichman ら⁴⁾ は、歯肉縁上プラークで PMN を刺激した場合、歯肉縁下プラークを用いた場合と比較して多量のライソゾーム酵素が誘導されることを観察し、歯肉縁上プラークの構成菌として多くを占めるグラム陽性菌が、グラム陰性菌と比較して高いライソゾーム酵素の誘導能を持つことを示唆している。また加藤ら⁵⁾ は、多種の口腔細菌で PMN 刺激をおこなったとき放出される活性酸素量を、ケミルミネッセンス反応によって測定し、活性酸素誘導能は菌種間で有意な差があり、とくに *F. nucleatum* において高いことを観察している。

放出産物の種類によって、ターゲットが異なってくれば、傷害の発現の仕方も様々となる。培養系細胞をもちいた実験によって、PMN による細胞傷害には、主に活性酸素によって誘導される細胞崩壊 (lysis) と⁶⁾、ライソゾーム酵素によって誘導される細胞崩壊を伴わない剥離 (detachment)⁷⁻⁹⁾ があることが知られている。

PMN 仲介の傷害の発現は、各種 PMN 放出産物作用の相互関係の結果であるともいえる。活性酸素とライソゾーム酵素は互いに傷害作用を増強しあうという報告があり^{10,11)}、アラキドン酸代謝産物の存在によって PMN の付着活性が高まり、ライソゾーム酵素により傷害性を増すことが観察されている⁷⁾。さらに、活性酸素は中性プロテアーゼのおもなインヒビターである α_1 -protease inhibitor (α_1 -PI) を酸化不活化

し、組織のプロテアーゼ侵襲への感受性を高めることが知られている¹²⁻¹⁶⁾。

このようなPMN仲介の*in vitro*における歯周組織由来の培養系細胞への傷害作用が検討されている。Altmanら⁸⁾はphorbol myristate acetate (PMA)によって活性化されたPMNが、ヒト歯肉上皮細胞に細胞崩壊を伴わない剝離を発現させることを示した。Deguchiら¹⁷⁾は, lipopolysaccharide (LPS)とformylmethionyl-leucyl-phenylalanine (FMLP)の同時刺激を受けたヒトPMNが、ヒト歯根膜由来の線維芽細胞の傷害を発現させることを蛍光二重染色法によって示している。

今回我々は正常ヒト歯肉線維芽細胞(Gin-1)を標的細胞とし、歯周病原菌と目されている4種類の口腔細菌を用いて健康者PMNを刺激したとき発現する傷害を、細胞の崩壊と剝離を指標として測定した。供試菌として*A. actinomycetemcomitans*, *A. viscosus*, *F. nucleatum*, *P. gingivalis*を用い、これらのPMN傷害誘導能を菌種間で比較した。

またPMNの主な傷害因子の解明のため、PMN仲介の細胞剝離作用に対する、数種の活性酸素のスカベンジャー、酵素インヒビターの抑制効果を観察した。さらにこの系において、プロテアーゼ酵素のなかでもとくに蛋白分解能が高いといわれているPMNエラスターゼの放出量を測定した。

方 法

1. 供試菌の調整

供試菌として*Actinobacillus actinomycetemcomitans* Y4 (*A. actinomycetemcomitans*), *Actinomyces viscosus* NIAH 1010 (*A. viscosus*), *Fusobacterium nucleatum* ATCC 243726 (*F. nucleatum*), *Porphyromonas gingivalis* 381 (*P. gingivalis*)を用いた。*A. actinomycetemcomitans*と*A. viscosus*はBrain Heart Infusion 液体培地(BHI; Difco, Michigan, USA), *P. gingivalis*はBHI液体培地に0.5% Yeast Extract (BBL, Cockeysville, USA), 0.0001% Vitamin K₁ (半井化学, 京都)と, 0.0005% Hemin (Sigma, St. Louis, USA)を加えて補強したもの、また*F. nucleatum*はGAMブイヨン(ニッスイ, 東京)を増殖培地とした。*A. viscosus*, *F. nucleatum*, *P. gingivalis*は嫌気培養装置(ヒラサワ, 東京)中で嫌気的条件下(N₂: 80%, H₂: 10%,

CO₂: 10%)で、*A. actinomycetemcomitans*は炭酸ガス培養器(5% CO₂, 95% air)中でそれぞれ37°C 24時間培養を行った。実験に供する際には、菌をphosphate-buffered saline (PBS)で2回洗浄し、0.1% Gelatinを含むHanks balanced salt solution (Gel-HBSS)に5% (v/v)濃度で自家血清を添加したもので5×10⁸ CFU(集落形成菌数)/mlとなるように懸濁させ、37°Cで30分のインキュベーションによりオプソナイズ処理をほどこした。これをさらに2回洗浄し、Gel-HBSSで3×10⁸ CFU/ml、または1 mg/mlの菌懸濁液として使用した。

2. 多形核白血球と血清の分離

全身疾患が認められず、歯周組織が健康な本学部学生および職員(男子22名, 22~31歳)のヘパリン処理された静脈血(20~30 ml)から、Ficoll-Hypaque混合溶液(モノ・ポリ分離溶液; Flow Laboratories Inc, Verginia, USA)を用いた比重遠心法によってPMNを分離した。混在している赤血球は低張処理によって除去した。また静脈血の一部から通法に従って血清を分離し、自家血清として菌のオプソニン化と、細胞剝離抑制実験に供した。PMNは実験に際して、Gel-HBSSで3×10⁶ cells/mlの浮遊液に調整して用いた。

3. Gin-1の培養と放射線標識

標的細胞として正常ヒト歯肉線維芽細胞: Gin-1, ATCC CRL 1292 (Flow Lab)を供試した。細胞は通法に従い、10% (v/v)濃度でウシ胎児血清(FBS; Flow Lab)を含有するMEM-Dulbecco Medium (Flow Lab)を増殖培地として、炭酸ガス培養器中(37°C, 5% CO₂-95% air)で培養した。細胞は1週間毎に継代率1:2で継代培養し、継代数14~19のものを用いた。実験に際し、Gin-1を96 well マイクロタイタープレート(no. 3596; Coster, Mass, USA)に1.25×10⁵ cells/mlの培地浮遊液0.2 ml/wellの割合で分注し24時間培養した。Gin-1の放射線標識のため、各wellの培地を⁵¹Cr; Sodium Chromate (特異活性185 MBq/ml; Amersham, England)を37 KBq/wellで含む同量の培地と交換し、さらに24時間炭酸ガス培養器で培養した。最終的にGin-1数は48時間培養で2.0×10⁴/wellとなった。

4. 細胞傷害測定

⁵¹Cr標識したGin-1の崩壊と剝離の測定は、Harlanら⁹⁾の記載に準じた。

1) Gin-1 傷害性試験

プレート中の Gin-1 は、実験に供する直前に Gel-HBSS で 5 回洗浄した。各 well に前述のように調整した供試菌懸濁液を 0.1 ml ずつ加え、プレートごと 1,200×g で 8 分間の遠心をかけ、つづいて各 well に調整した PMN 浮遊液を 0.1 ml ずつ加えた。これによって 3×10^8 CFU/ml の菌懸濁液を添加したものにおいては、各 well 中の細胞比はおおよそ Gin-1:PMN=1:15, PMN:菌=1:100 となった。また 1 mg/ml の菌懸濁液を用いた同一の実験を行い、傷害率を比較した。

① ^{51}Cr 放出率の測定；細胞傷害試験の測定は次の方法によって行った。well 上清 150 μl を、マイクロピペットでプレート底面に触れないように注意して吸い取り、遠沈管で 1,200×g, 5 分間の遠心にかけた。その上清 100 μl を測定バイアルに移し、 γ -カウンターで放射活性を測定して ^{51}Cr 放出のテスト系 cpm とした。Gin-1 単独でインキュベートした well の上清を同様に測定し、自然放出 cpm とした。また well 中の全放射線活性量を測定するために、200 μl の 0.1% TX-100 でインキュベートした well の 100 μl の上清を全 cpm として測定した。Gin-1 の ^{51}Cr 放出率の算出は次の公式に従って行った。 $\% \text{ 放出率} = (\text{テスト系 cpm} - \text{自然放出 cpm} / \text{全 cpm} - \text{自然放出 cpm}) \times 100$ 。

② Gin-1 剥離率の測定；各 well は上清を除去したのち、ただちにマイクロピペットを用いた軽いすすぎの操作 (200 μl PBS で底に渦をまく程度) に 2 回かけ、底面に辛うじて付着している損傷細胞を除去した^{7,9)}。well 底面に残っている細胞を 200 μl の 0.1% TX-100 処理にかけ、得られた細胞溶液のうちの 100 μl を測定バイアルに移し、 γ -カウンターで特異活性を測定してテスト系 cpm とした。また、Gin-1 単独でインキュベートした well を同様の操作にかけその特異活性を全 cpm として測定した。細胞剥離率の算出は次の公式に従って行った。 $\% \text{ 剥離率} = (\text{全 cpm} - \text{テスト系 cpm} / \text{全 cpm}) \times 100$ 。また、インキュベート終了後に 2 回の洗浄操作を行わないコントロール cpm に対する全 cpm の割合を求め、自然発生する Gin-1 剥離率として測定した。これは 1.5 時間までの反応時間において常に 15% 以下の値であった。

2) Gin-1 剥離抑制試験

細胞剥離作用に対する阻害剤を用いた抑制実験によって Gin-1 傷害を行っている主な毒性産物を検討

した。このため以下の試薬を次の濃度になるように、反応前の傷害実験系各 well に添加した。100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Superoxide Dismutase (SOD: 和光純薬), 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ catalase (Sigma), 100 μM , 10 μM pepstatin A (Sigma), 2 mM, 1 mM phenylmethanesulfonyl fluoride (PMSF: Sigma), 150 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ α_1 -protease inhibitor (α_1 -PI: Sigma), 5% 自家血清。PMSF と pepstatin A は dimethyl sulfoxide (DMSO) に溶解して用いたが、この時反応系に添加した際の DMSO 濃度が 0.1% 以下となるようにした。プレートは傷害性試験と同様に、炭酸ガス培養器中で 37°C で 1 時間インキュベートした。

5. PMN エラスターゼの放出量の測定

各菌の刺激による PMN 傷害性実験の反応上清中に放出された酵素のうち、エラスターゼの量を、顆粒球エラスターゼ測定キット (Merck) を用いた enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) 法で測定した。このキットは血清測定用であり、血清中に存在する顆粒球エラスターゼはほとんどが α_1 -PI との複合体になっているため、エラスターゼは α_1 -PI との複合体として測定される。しかしながら PMN 顆粒中のエラスターゼは活性型の形で存在し、今回の実験系においては上清に放出されたエラスターゼは周囲に α_1 -PI がいないためほとんどが遊離の形と考えられた。このため、反応液を測定前に 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 濃度の α_1 -PI で処理し、エラスターゼと α_1 -PI の複合体の形にして測定を行った。操作手順は Neumann ら¹⁸⁾ の記載を参考にして次の要領で行った。

マイクロプレート中の傷害実験の反応液を遠沈管に移し、まず 4°C 1,100 g×10 分の遠心で崩壊によるライソゾームの漏出がおこらないように PMN を除去する。つづいて 4°C 7,000×g 20 分の遠心で菌を除く。得られた上清 0.15 ml を 200 μg α_1 -PI を含む 30 mM の Tris (Hydroxymethyl) aminomethane/HCl buffer pH 8.0 に 85 mM の NaCl を含んだもの 0.85 ml で 30 分、37°C でインキュベートする。この条件で α_1 -PI はサンプル中のエラスターゼを完全に複合体にした。得られたエラスターゼ- α_1 -PI 複合体を含む溶液を、50~300 倍に希釈して ELISA 法で測定を行った。標準曲線によってサンプルのエラスターゼ- α_1 -PI 複合体量を測定し、添加した PMN と同量の PMN 超音波破碎液から算出された量を全複合体量として、これに対する割合として表した。PMN の超音

波破碎は、氷冷低温下で加熱が発現していないか十分に注意し、30秒づつ2回、計1分行い、完全に細胞が破碎されているかを検鏡で確認した。

6. 統計分析

有意差検定は Student-t 検定によった。

結 果

1. PMN 仲介の Gin-1 傷害

1) Gin-1 崩壊と Gin-1 剥離の経時的变化；図 1 は、Gin-1 に各菌と PMN を 30～90 分反応させた

きの Gin-1 崩壊率 (a) と、Gin-1 剥離率 (b) の経時的变化を示している。Gin-1 崩壊の増加はいずれの菌を PMN 刺激としたときにも観察されず、4 時間までの時間の延長によっても ^{51}Cr の放出は発現しなかった。一方、Gin-1 剥離はどの菌を PMN 刺激として使用したときにも、時間の延長に伴って著明な剥離率の増加が観察された。このため以後は Gin-1 剥離率を傷害の指標として実験を行った。

2) Gin-1 の傷害による形態変化；図 2 に実験前の正常な Gin-1 の走査電顕像 (a) と菌と PMN とのインキュベートによって傷害を受けた Gin-1 の走査

図 1 PMN 仲介の Gin-1 崩壊 (a) と、剥離 (b) の経時的变化
(—○; *A. actinomycetemcomitans* + PMN, —●; *A. viscosus* + PMN
-----△; *F. nucleatum* + PMN, -----▲; *P. gingivalis* + PMN)

図 2 PMN 仲介で傷害を受けた Gin-1 の形態変化

紡錘形を呈し、プレート底面に強固に付着した正常な Gin-1 (a, $\times 3,000$) と、球形に変化しプレート底面から剥がれようとしている、傷害を受けた Gin-1 (b, $\times 2,000$)

図 3 PMN 仲介の Gin-1 剥離に対する PMN 数変化 (a), 菌数変化 (b) の影響
(—●; PMN + *A. viscosus*, ----○; PMN, ----□; *A. viscosus*) 反応 30 分の値

電顕像 (b) を示した。正常な細胞は形態が紡錘状で、細長い繊維状の配列を示し、付着力が強く洗浄操作によっても、プレート底面からほとんど剥離しなかった。これに対して、傷害を受けた細胞は形態が球形に変化し、付着性を失って軽い洗浄操作によってプレート底面から容易に剥離された。

3) Gin-1 剥離に対する PMN 数, および菌数の影響; 図の 3 に, 傷害実験系におけるエフェクター細胞である PMN 数と, その活性化を行う菌の数を変化させたときの Gin-1 剥離率 (%) の 30 分値を示した。供試菌種は菌数を統一したときもっとも高い Gin-1 剥離誘導能を示した *A. viscosus* をもちいた。その結果 Gin-1 と菌数を一定にしたとき, Gin-1 に対する PMN の数の割合の増加に伴って Gin-1 剥離率の上昇がみられ (a), 同様に Gin-1 と PMN 数を一定にしたとき, PMN に対する菌数の割合の増加に伴って Gin-1 剥離率の上昇がみられた (b)。

4) 各菌種の Gin-1 剥離誘導能の比較; 図 4 は各菌種における Gin-1 剥離誘導能を比較するため, 菌数を同一にした場合 (a) と, 菌懸濁液濃度を 1 mg/ml にした場合 (b) についての Gin-1 剥離率の 1 時間値を示したものである。(a) において, 無刺激の PMN 単独, *P. gingivalis* を除く菌単独では Gin-1 の剥離はほとんど示さないことがわかる。また, グラム陽性菌である *A. viscosus* で PMN を刺激した場合は, 他の 3 菌のすべてにくらべて有意に高い Gin-1 剥離率を示した。また *A. actinomycetemcomitans* を

もちいたものは他の菌に比較して低い剥離率を示した。(b) においては, 各菌の刺激による剥離率の差は (a) と比較して少なくなり, 有意の差は認められなくなった。

5) *P. gingivalis* の Gin-1 剥離能と熱処理による不活化; *P. gingivalis* は菌のみで, 56.7% の剥離率を示した。また菌と PMN との反応による剥離率もこれとほとんど変わらなかった。したがってこの反応系における PMN 放出産物の Gin-1 傷害を菌そのものの作用と区別することはできなかった。このため, 60 分の湯せんによって *P. gingivalis* を熱処理菌として同様の実験を行った結果を図 5 に示した。*P. gingivalis* は熱処理によって菌単独での剥離作用を失い, PMN との反応によって熱処理菌に Gin-1 剥離誘導能のあることが示されたが, この値は他の 3 種の菌を PMN 刺激としたときと比較して有意に低かった。

6) 各試薬の Gin-1 剥離抑制効果; 表 1 に, *P. gingivalis* 以外の各菌と PMN との反応による Gin-1 剥離に対する試薬の抑制効果を示した。中性プロテアーゼのインヒビターである α_1 -PI と PMSF は, それぞれの菌と PMN の反応による Gin-1 剥離に対して濃度に依存した抑制作用を示した。とくに α_1 -PI の抑制効果は著明であり, 90% 前後に達するものであったが, *F. nucleatum* と PMN との反応による Gin-1 剥離には, 他の菌を用いたときと比較して有意に低い抑制率を示した。また血清も, 5% 濃度ですべての菌と PMN との反応による Gin-1 剥離を著明に

a 同一菌数における剥離の発現

b 同一菌量における剥離の発現

図4 PMNと各菌とのインキュベートによるGin-1剥離の発現
反応1時間の値

図5 *P. gingivalis*の生菌と熱処理菌、およびPMNとのインキュベーションによるGin-1剥離の発現
反応1時間の値

表1 各試薬によるPMN仲介のGin-1剥離に対する抑制効果

		反応 1 時間の値		
Reagent		PMN +		
		<i>A. actinomy-</i> <i>cetemcomitans</i>	<i>A. viscosus</i>	<i>F. nucleatum</i>
		剥離抑制率 (%)		
α_1 -PI	100 μ g/ml	58.68	84.75	26.88
	150 μ g/ml	84.94	96.67	37.38
		<div> <div></div> <div>★★</div> <div>★★★</div> </div>		
PMSF	1 mM	31.71	59.52	33.81
	2 mM	56.35	63.87	41.87
pepstatin A	0.025 mM	1.90	7.25	6.44
	0.1 mM	3.10	8.67	6.50
catalase	0.01 mg/ml	1.28	4.67	4.37
	0.02 mg/ml	5.78	5.44	9.95
SOD	100 μ g/ml	2.80	2.52	18.70
		<div> <div></div> <div>★</div> <div>★★★</div> </div>		
Serum	5%	82.33	89.77	80.27
		<div> <div></div> <div>★</div> <div>★★★</div> </div>		
		★ : p=0.05 ★★ : p=0.01		

★ : $p=0.05$ ★★ : $p=0.01$

図6 PMN エラスターゼによる Gin-1 剥離作用
反応1時間の値

抑制した。一方、活性酸素のスキャベンジャーである SOD と catalase, 酸性プロテアーゼインヒビターである pepstatin A は, Gin-1 剥離の抑制作用はほとんど示さなかった。ただし *F. nucleatum* で PMN を刺激した系の剥離率においては, SOD 添加によって, わずかであるが他の菌を用いたときに比較して高い抑制率を示し, 有意差もみられた。なお, 実験前に使用濃度での試薬そのものの直接的な Gin-1 剥離作用はないことを確認した。

2. 好中球エラスターゼによる Gin-1 剥離作用

図6に市販のヒト PMN エラスターゼ (Sigma) を, 0.1~20 $\mu\text{g/ml}$ まで濃度を変化させて Gin-1 に作用させたときの Gin-1 剥離率を示した。Gin-1 の剥離作用は濃度依存性に上昇し, 50% の剥離率を得るのに 20 $\mu\text{g/ml}$ 濃度のエラスターゼが必要であった。

3. エラスターゼ放出量

表2に, 各菌と PMN を反応させたときの well 上清に放出されたエラスターゼの測定量を示した。各エラスターゼ量は, 添加した PMN の全エラスターゼ量に対する割合と濃度で表した。エラスターゼ放出量の割合は, 多い順に *P. gingivalis*, *F. nucleatum*, *A. viscosus*, *A. actinomycetemcomitans* となったが, この結果と各条件での細胞剥離率との間には, ほとんど相関はなかった。なおこの時の PMN から自然放出したエラスターゼ量は, 添加した PMN の全エラスターゼ量の 0.4% であった。

考 察

歯肉線維芽細胞は, 細胞間物質の合成, 組織代謝の

表2 各菌と PMN を反応させたときの上清中における PMN のエラスターゼ濃度の比較

		%	$\mu\text{g/well}$
PMN +	<i>A. actinomycetemcomitans</i>	2.95 ± 0.32	0.0318 ± 0.004
	<i>A. viscosus</i>	4.61 ± 0.41	0.0462 ± 0.004
	<i>F. nucleatum</i>	5.71 ± 1.02	0.0615 ± 0.018
	<i>P. gingivalis</i>	6.17 ± 1.32	0.0647 ± 0.021
Total PMN elastase		100	1.0127 ± 0.314

仲介, 貪食作用などを行い, その正常な機能と構造は, 歯周組織の恒常性の保持に不可欠であると考えられる。歯肉溝部の炎症による上皮層の崩壊や上皮細胞間隙の拡張がおこると, これらの細胞はブラク細菌や遊走してきた PMN の直接的な侵襲を受ける。侵襲を受けた細胞の傷害は, 形態的な変化¹⁹⁾, 増殖阻害²⁰⁾, 代謝合成の変化²¹⁾などによって *in vitro* で計測観察することができる。今回我々は, 細胞崩壊と細胞剥離を傷害の指標として, 歯肉線維芽細胞の傷害を測定した。その結果, 4種の口腔細菌と PMN とのインキュベートによって発現する Gin-1 傷害は, 4時間までの反応において細胞崩壊を伴わない著明な細胞の剥離として観察された。

細胞崩壊が発現しなかったことから, 今回の実験における Gin-1 剥離が, ライソゾーム酵素によるものであることをある程度予測できた。それは活性酸素系の傷害がはじめて細胞膜破壊に作用して崩壊を発現させ, 細胞崩壊を伴わない剥離は示さないことが知られているためである^{9,6)}。また Gin-1 剥離は常に 30 分以内に発現したが, Varani ら⁶⁾によると, PMN の活性酸素による内皮細胞崩壊の発現には時間がかかり, 3時間以降に著明となるといふ。このように, 我々の PMN 仲介の Gin-1 傷害測定は, 剥離のみを指標としなければならないことが判明したが, 活性酸素による侵襲がまったくなかったとは考えにくいものであった。ここで問題となるのは, 活性酸素の傷害を検討する際, 標的となる細胞種の活性酸素への感受性を考慮に入れる必要があるということである。いくつかの細胞種を用いた *in vitro* の実験によれば, 活性酸素による細胞崩壊作用への感受性は血管内皮系の細胞がもっとも高く, 上皮系細胞では 50% の細胞を死滅させるのに内皮細胞の 14 倍の濃度の H_2O_2 が必要であり²²⁾, 線維芽細胞は, 上皮系細胞よりさらに感受性が低いこ

とが示されている²³⁾。このため、Gin-1は、活性酸素による傷害をみるには不適当な細胞であったということも考えることができる。

一方細胞の剥離においては、細胞崩壊とは異なり、細胞は死滅には至らない。しかし、Gin-1のように伸展した形態で生理機能を営む細胞にとって、*in vitro*において細胞単層から剥離した状態は分化増殖の妨げになり、傷害的な変化の表れであると考えられる。このような細胞の剥離は、付着に関与している細胞外基質の分解によって発現すると考えられている。Harlanら⁹⁾は、活性化したPMNによって剥離された上皮細胞の表面蛋白から、フィブロンectin成分が消失することを観察してこれを明らかにしている。また、酸素の作用も高濃度では細胞の崩壊を導く。結果は示していないが、試薬を用いたGin-1傷害実験において、trypsinを0.01%以上で1時間反応させると反応上清に⁵¹Crの放出がみられた。

供試菌4種は、それぞれ違った大きさ、形状、構造物を持つため、異なったPMNの毒性産物の誘導能を示すことが予想された。まずPMNに対する菌の個数を統一した場合、もっとも高いGin-1剥離誘導能を示したのは*A. viscosus*であった。これはこの菌が健康者歯肉縁上プラークの主な構成菌であり、歯肉炎の際に著明に増加する²⁴⁾ことを考えると妥当な結果と思われた。*A. viscosus*のような菌自体の細胞毒性の弱い菌が、炎症性変化を発現させるのには、PMN仲介の傷害の貢献が大きいのかもしれない。Taichman²⁵⁾は、PMNのライソゾーム酵素の誘導能が、*A. viscosus*の病原菌株には観察されるが、非病原菌株にはみられないことから、この性質が*A. viscosus*の病原性を決定する因子のひとつである可能性を示唆している。この菌のPMN活性誘導能が高いのは、グラム陽性菌に特有である付着に関する菌体外多糖によるとするTaichmanらの考察に加えて、他の歯周病原菌と比較してPMNに活発に食菌作用を起こさせることにも関係していると考えられる。また、活性化PMNから外部に漏洩するライソゾーム酵素の量は、取り込む粒子の大きさに依存するという報告もあり、菌数が同じであるとき、比較的大きい*A. viscosus*が、小さい*A. actinomycetemcomitans*などと比較してPMNをより強く活性化するかもしれない。

しかしながら、添加する菌の懸濁液の濃度を統一すると、各菌のGin-1剥離誘導能にはほとんど差がみられなくなった。これは、添加する重量が等しけれ

ば、菌種の違いはPMN毒性、食菌阻害などの性質によっても、PMNからのライソゾームの誘導能には大きな影響を与えないことを示していると思われる。このことから、PMN仲介のGin-1剥離はその部位に優勢な菌が比較的非特異的に誘導しているとも考えられ、非特異的な炎症反応であるとみなされている歯肉炎と深く関わっている可能性を示した。

今回の実験でみられた*P. gingivalis*の菌単独での細胞剥離作用は、この菌の持つ細胞毒性²⁶⁾、コラゲナーゼ活性²⁷⁻²⁹⁾、その他のプロテアーゼ活性、ヒアルロニダーゼ、などによると考えられ、Phillipsら³⁰⁾の報告と一致するものであった。Phillipsらは、*P. gingivalis*の抽出物が、線維芽細胞の細胞骨格であるアクチンフィラメントに特異的に作用して繊維構造を失わせ、これが細胞形態の変化と付着性喪失の原因となることを示唆している。熱処理によって単独でのGin-1剥離作用を失った*P. gingivalis*のPMNを介してのGin-1剥離誘導能は、他の菌を用いたものより著明に低いものであった。これは食菌されにくいという構造上の性質が原因とみられる。

剥離抑制実験において中性プロテアーゼインヒビターである α_1 -PIと、PMSFが著明な抑制率を示し、口腔細菌に誘導されるPMN仲介のGin-1剥離は、ライソゾーム酵素の中でも中性プロテアーゼによるものであることが明らかになった。中性プロテアーゼは、その作用を規制している血清中や組織由来のインヒビターの不足によって、敗血症時の繊維素溶解作用³¹⁾、進行性の肝障害³²⁾、呼吸器系疾患などの病因となることが知られている。中性プロテアーゼのうち、エラスターゼ、キモトリプシン、非特異的なコラゲナーゼは、アズール顆粒中に存在するセリン系のプロテアーゼで、基質特異性が低くたくさんの細胞外基質、補体因子や抗体などを分解し、炎症時の細胞傷害に関与していると考えられる。これらのプロテアーゼの分解の対照となるGin-1の細胞外基質成分には、エラスチン、プロテオグリカン、フィブロンectin、I~IV型コラーゲンなどがあるがエラスターゼは3つの中性プロテアーゼのなかでもとくに蛋白分解作用が強く、すべてに作用する。非特異的なコラゲナーゼは、エラスチン、フィブロンectinは分解しない³³⁾。こうして、中性プロテアーゼでも特にエラスターゼの傷害性が注目されている。

またインヒビターの作用によって、さらにこれらの中性プロテアーゼの剥離に対する役割が明白になるか

もしれない。 α_1 -PI は、前述の 3 種類の中性プロテアーゼの全部に対する抑制作用を持つが、PMSF は、コラゲナーゼを抑制しない³⁴⁾。このため PMSF の抑制作用が α_1 -PI に及ばないのはエラスターゼ以外の中性プロテアーゼ酵素の Gin-1 剥離作用も大きな割合を占めているためと考えられた。

A. actinomycetemcomitans, *A. viscosus* で PMN 刺激をした系では α_1 -PI の Gin-1 剥離抑制作用は著明であったが、*F. nucleatum* で PMN 刺激をした系においては α_1 -PI の Gin-1 剥離抑制作用はかなり低下していた。この α_1 -PI 作用の不活化は、*F. nucleatum* が、PMN からの高い活性酸素誘導能をもっているという報告によって説明される。プロテアーゼインヒビターは活性化したプロテアーゼの基質結合に対応する領域に結合し、競合的にその基質分解能を阻害している³⁵⁾。しかし α_1 -PI は、反応中心のメチオニン残鎖の酸化によってプロテアーゼと結合できなくなり、その抑制作用を失うことが解明されている。そして炎症局所においてこの酸化不活化はおもに活性化した白血球によってもたらされる。 α_1 -PI の酸化作用に対する感受性は高く、*in vitro* において myeloperoxidase system のハムスター α_1 -PI への作用は、97% の不活率を示している³⁶⁾。さらに、抗原抗体複合体¹²⁾、PMA¹³⁾ によって活性化された PMN の存在下において、血清中の α_1 -PI が不活化されることが観察され、この作用が還元剤の添加によって回復することから、PMN から放出された活性酸素によるものであることが確認されている。さらに Stroncek ら³⁷⁾は、PMN 仲介の細胞傷害が、活性酸素の存在下では生理的濃度の α_1 -PI の添加によっても抑制されないことを観察している。今回我々の実験系においては、 α_1 -PI を 150 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、血清を 5% 濃度で使用したが、血清中の α_1 -PI 濃度は正常でおおよそ 54 $\mu\text{Mol}/\text{ml}$ であるため、実験系に添加された α_1 -PI 量は両者においてほぼ等しかったことになる。しかしながら *F. nucleatum* で PMN 刺激を行った系において、血清は Gin-1 剥離を完全に抑制し、 α_1 -PI の作用は大幅に不活されていた。血清はインヒビターとして α_1 -PI のほかに、 α_2 -macroglobulin (α_2 -M), α_1 -antichymotrypsin (α_1 -AC), antithrombin III (AT III), α_2 -plasmin inhibitor (α_2 -PI), Cl-inactivator (Cl-INA) を含み、 α_1 -PI が不活化されても、それ以外の α_2 -M のような酸化不活化に抵抗性をもつインヒビターがその作用を補っていると思われた。それにもかかわらず、炎症の

発現に伴って PMN の活性酸素が放出されつづければ、その周囲には α_1 -PI の不活化されたゾーンが広範に広がり、組織のエラスターゼ感受性は高まっていると考えられている。なお、被験者の各口腔細菌に対する血清中の特異抗体価を測定し、今回のデータに示した被験者 22 名は、各菌の超音波破碎抗原に対する血清中の IgG 抗体価を、永井ら³⁸⁾および Voller ら³⁹⁾記載の方法に準じて ELISA 法によって測定したとき、ELISA UNIT が正常範囲 (100 以下) であることを確認した。

PMN エラスターゼ量は 3 $\mu\text{g}/10^6$ PMN という報告があり、ELISA 法によって測定された我々の全 PMN エラスターゼ量は、この量とほぼ一致するものであった。合成基質を使ったエラスターゼ活性の測定を行うには、多量の PMN が必要であり、今回適応した ELISA 法による測定は、抗原としてのエラスターゼ量しか測定できないが、微量の PMN で感度のよい結果が得られるという利点がある。しかしながら、測定された反応上清中のエラスターゼ量はごくわずかであり、菌種間における PMN エラスターゼ放出誘導能を正確に比較できたとはいえなかった。また、*A. viscosus* 刺激によって放出されたエラスターゼ量と、Gin-1 剥離を発現させる市販の好中球エラスターゼの濃度を比較すると、1 時間で 51.7% の剥離率を示すのに必要な市販の好中球エラスターゼ濃度は、20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ であるのに対し、89% もの剥離率を示している *A. viscosus* の反応上清には 0.23 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 濃度のエラスターゼしか測定されなかった。これは、反応上清エラスターゼ測定の操作上の問題か、市販の精製されたエラスターゼの Gin-1 への作用上の問題か、あるいは細胞剥離に関与しているのがエラスターゼだけでなく、他の中性プロテアーゼなどの作用も大きいことを示しているものと思われた。反応系におけるライソゾーム酵素量の決定には、さらなる検討が必要と考えられる。

このように PMN ライソゾーム酵素、とくにエラスターゼの細胞傷害性に関心がよせられ、さらに生体防御機構とのバランスの観点から、そのインヒビターである α_1 -PI もあわせて歯周疾患との関わりが考えられている。GCF のエラスターゼ、そのインヒビター、両者の複合体の測定が行われ、歯周疾患の進行度^{40,41)}、臨床パラメーター⁴²⁾、歯肉縁下の細菌叢⁴³⁾との関連が検討されている。エラスターゼやそのインヒビターは反応性の蛋白であり、炎症の発現やその症状

の進行に伴って増加することが明らかとなっている。

PMN ライソゾーム酵素によって Gin-1 の細胞外基質成分の分解が発現し、これによって炎症局所では上皮層においては細胞間接触の消失、細胞内浮腫による細胞壊死脱落、結合組織においては組織透過性の亢進などの病理的变化と関連すると考えられる。しかしながら PMN のライソゾーム酵素の作用の *in vivo* における細胞外マトリックス変化との関係を解明することは、難しいと考えられる。GCF 中の酵素には菌由来のものもあるが、線維芽細胞もサイトカインによって活性化されてコラゲナーゼなどの金属プロテアーゼを放出し、自らの産生したコラーゲンを分解することが知られている⁴⁴⁾。また細菌の内毒素がマクロファージのプロテアーゼインヒビター産生を規制することも報告されており⁴⁵⁾、さらに、ある種の細菌が PMN の酵素に対するインヒビターを持っていることが報告されている⁴⁶⁾。これらの複雑な相互関係を結びつけて、PMN 仲介の傷害を理解していくことが、今後重要であると思われた。

結 論

A. actinomycetemcomitans, *A. viscosus*, *F. nucleatum*, *P. gingivalis* を刺激としたときの、ヒト末梢血 PMN による培養歯肉線維芽細胞 (Gin-1) の傷害を、細胞の剥離 (detachment) と、崩壊 (lysis) を指標として観察し、阻害剤による抑制実験を行った。

1. *A. actinomycetemcomitans*, *A. viscosus*, *F. nucleatum* は PMN と反応させることによって 1 時間で著明な Gin-1 の剥離を発現させた。また、菌のみでの Gin-1 の剥離作用はみられなかったことから、この作用が PMN 放出物によるものであることがわかった。Gin-1 の崩壊は 4 時間のインキュベートによってもどの系においても発現しなかった。

2. *P. gingivalis* は、菌のみで 54% の剥離作用を示し、PMN と反応させたときもこの剥離率の増加はほとんどみられなかった。このことから菌体の持つ Gin-1 剥離作用が主体であり、PMN を介する作用は弱いことが明らかになった。

3. Gin-1 の剥離を高度に抑制したのは、5% 血清と、中性プロテアーゼインヒビターである α_1 -PI, PMSF であり、酸性プロテアーゼインヒビターである pepstatin A, 活性酸素のスカベンジャーによる

Gin-1 の剥離の抑制は低かった。しかしながら *F. nucleatum* を PMN 刺激としたときの Gin-1 剥離作用への α_1 -PI の抑制作用は、他の菌をもちいたときと比較して低下していた。

以上のことから、菌と PMN の反応の結果、Gin-1 すなわち線維芽細胞の剥離が生じることが明らかとなり、この傷害作用はエラスターゼを含む中性プロテアーゼによるものであることが示唆された。また、PMN から放出される活性酸素も、プロテアーゼインヒビターの不活作用によって PMN 仲介の傷害に関与している可能性が示された。

謝 辞

稿を終えるにあたり、懇切丁寧な御指導をくださいました本学口腔生化学教室の下村浩巳教授、斎藤英一助教授、口腔衛生学教室の八重垣健助教授に心からの感謝を表します。

文 献

- 1) Stoller, N.H., Karras, D.C. and Johnson, L.R.: Reliability of crevicular fluid measurements taken in the presence of supragingival plaque. *J. Periodontol.*, 61: 670-673, 1990.
- 2) Attström, R.: Presence of leukocytes in crevices of healthy and chronically inflamed gingivae. *J. Periodont. Res.*, 5: 42-47, 1970.
- 3) Garant, P.R.: An electron microscopic study of the periodontal tissues of germ-free rats and rats monoinfected with *Actinomyces naeslundii*. *J. Periodont. Res.*, Suppl. 15: 1-79, 1976.
- 4) Taichman, N.S., Tsai, C., Beahni, P.C., Stoller, N. and McArthur, W.P.: Interaction of inflammatory cells and oral microorganisms IV. *in vitro* release of lysosomal constituents from polymorphonuclear leukocytes exposed to supragingival and subgingival bacterial plaque. *Infect. Immun.*, 16: 1013-1023, 1977.
- 5) 加藤千穂美, 鈴木幹雄, 斎藤和子: 口腔細菌に対するマウス多形核白血球のケミルミネッセンス反応と食作用について. *歯学*, 77: 876-887, 1989.
- 6) Ayars, G.H., Altman, L.C., Rosen, H. and Doyle, T.: The injurious effect of neutrophils on pneumocytes *in vitro*. *Am. Rev. Respir. Dis.*, 130: 964-973, 1984.
- 7) Vandenbroucke-graels, C.M.J.E., Thijssen, H.M. W.M., Kessel, K.P.M., Asbeck, B.S. and Verhoef, J.: Injury to endothelial cells by phagocytosing polymorphonuclear leukocytes and modulatory role of lipoxigenase products. *Infect. Immun.*,

- 55 : 1447-1454, 1987.
- 8) Altman, L.C., Baker, C., Fleckman, P., Luchtel, D. and Oda, D. : Neutrophil-mediated damage to human gingival epithelial cells. *J. Periodont. Res.*, 27 : 70-79, 1992.
 - 9) Halran, J.M., Killen, P.D., Harker, L.A. and Striker, G.E. : Neutrophil-mediated endothelial injury *in vitro*. *J. Clin. Invest.*, 68 : 1394-1403, 1981.
 - 10) Varani, J., Ginsburg, I., Schuger, L., Gibbs, D.F., Bromberg, J., Johnson, K.J., Ryan, U.S. and Ward, P.A. : Endothelial cell killing by neutrophils. Synergistic interaction of oxygen products and proteases. *Am. J. Pathol.*, 135 : 435-438, 1989.
 - 11) Kusner, D.J. and King, C.H. : Protease-modulation of neutrophil superoxide response. *J. Immunol.*, 143 : 1696-1702, 1989.
 - 12) Carp, H. and Janoff, A. : *In vitro* suppression of serum elastase-inhibitory capacity by reactive oxygen species generated by phagocytosing polymorphonuclear leukocytes. *J. Clin. Invest.*, 63 : 793-797, 1979.
 - 13) Johnson, D. and Travis, J. : The oxidative inactivation of human α_1 -proteinase inhibitor. Further evidence for methionine at the reactive center. *J. Biol. Chem.*, 254 : 4022-4026, 1979.
 - 14) Carp, H. and Janoff, A. : Potential mediator of inflammation. Phagocyte-derived oxidants suppress the elastase-inhibitory capacity of α_1 -proteinase inhibitor *in vitro*. *J. Clin. Invest.*, 66 : 987-995, 1980.
 - 15) Clark, R.A., Stone, P.J., Hag, A.E., Calore, J.D. and Franzblau, C. : Myeloperoxidase-catalyzed inactivation of α_1 -protease inhibitor by human neutrophils. *J. Biol. Chem.*, 256 : 3348-3353, 1981.
 - 16) Carrell, R.W. : α_1 -antitrypsin : Molecular pathology, leukocytes, and tissue damage. *J. Clin. Invest.*, 78 : 1427-1431, 1986.
 - 17) Deguchi, S., Hori, T., Creamer, H. and Gabler, W. : Neutrophil-mediated damage to human periodontal ligament-derived fibroblasts. : Role of lipopolysaccharide. *J. Periodont. Res.*, 25 : 293-299, 1990.
 - 18) Neumann, S., Hennrich, H., Gunzer, G. and Lang, H. : Enzyme-linked immunoassay for human granulocyte elastase in complex with α_1 -proteinase inhibitor, In Hörl, W., and Heidland, A. (eds.), *Proteases : Potential role in health and diseases*, Plenum Press, New York, London, 1984, 379-390.
 - 19) DeRenzis, F.A. and Chen, S-Y. : Ultrastructural study of cultured human gingival fibroblasts exposed to endotoxin. *J. Periodontol.*, 54 : 86-90, 1983.
 - 20) Stevens, R.H., Sela, M.N., Shapira, J. and Hammond, B.F. : Detection of a fibroblast proliferation inhibitory factor from *Capnocytophaga sputigena*. *Infect. Immun.*, 27 : 271-275, 1980.
 - 21) 田方義弘 : 歯周病原菌由来内毒素によるヒト培養歯肉線維芽細胞のコラーゲン代謝に対する影響について. *日歯周誌*, 31 : 755-771, 1989.
 - 22) Simon, R.H., DeHart, P.D. and Todd, R.F. : Neutrophil-induced injury of rat pulmonary alveolar epithelial cells. *J. Clin. Invest.*, 78 : 1375-1386, 1986.
 - 23) Suttorp, N. and Simon, L.M. : Lung cell oxidant injury. Enhancement of polymorphonuclear leukocyte-mediated cytotoxicity in lung cells exposed to sustained *in vitro* hyperoxia. *J. Clin. Invest.*, 70 : 342-350, 1982.
 - 24) Slots, J., Mönbo, D., Langebaek, J. and Frandsen, A. : Microbiota of gingivitis in man. *Scand. J. Dent. Res.*, 86 : 174-181, 1978.
 - 25) Taichman, N.S., Hammond, B.F., Tsai, C. and McArthur, W.P. : Interaction of inflammatory cells and oral microorganisms VII. *In vitro* polymorphonuclear responses to viable bacteria and to subcellular components of avirulent and virulent strains of *Actinomyces viscosus*. *Infect. Immun.*, 21 : 594-604, 1978.
 - 26) Eke, P.I., Laughon, B.E. and Rotimi, V.O. : Cytotoxic activity of crude extracts of *Bacteroides gingivalis*. *J. Med. Microbiol.*, 28 : 5-8, 1989.
 - 27) Smalley, J.W., Birss, A.J. and Shuttleworth, C. A. : The degradation of type I collagen and human plasma fibronectin by the trypsin-like enzyme and extracellular membrane vesicles of *Bacteroides gingivalis* W 50. *Arch. Oral. Biol.*, 33 : 323-329, 1988.
 - 28) Jin, K.C., Barua, P.K., Zambon, J.J. and Neiders, M.E. : Proteolytic activity in black-pigmented bacteroides species. *J.E. endodontics*, 15 : 463-467, 1989.
 - 29) Birledal H.H., Tayler, R.E., Zambon, J.J. and Neiders, M.E. : Characterization of collagenolytic activity from strains of *Bacteroides gingivalis*. *J. Periodont. Res.*, 23 : 258-264, 1988.
 - 30) Phillips, J.R., Nadim, H.S. and Layman, D.L. : Alterations in cell morphology and cytoskeletal proteins in gingival fibroblasts exposed to a *Bacteroides gingivalis* extract. *J. Periodont. Res.*, 25 : 339-346, 1990.
 - 31) Laurell, C.B. and Eiksson, S. : The electrophoretic α_1 -globulin pattern of serum in α_1 -antitrypsin deficiency. *Scandinav. J. Clin. Lab. Invest.*, 15 : 132-140, 1963.
 - 32) Sharp, H.L., Bridges, R.A., Krivit, W. and Freier, E.F. : Cirrhosis associated with α_1 -antitrypsin deficiency : A previously unrecognized inherited disorder. *J. Lab. Clin. Med.*, 73 : 934-939, 1969.
 - 33) Havemann, K. and Gramse, M. : Physiology and pathophysiology of neutral proteinases of human

- granulocytes., Hörl, W. and Heidland, A., *Proteases : Potential role in health and diseases.*, Plenum Press, New York, London, 1984, 1-20.
- 34) Kowashi, Y., Cimasoni, G. and Matter, J. : Collagen breakdown by gingival collagenase and elastase. *Experientia*, 36 : 395-396, 1980.
 - 35) Tschesche, H. : Structure and function of natural inhibitors as antagonist of proteinase activities., Hörl, W. and Heidland, A., *Proteases : Potential role in health and diseases.*, Plenum Press, New York, London, 1984, 73-87.
 - 36) Zaslow, M.C., Clark, R.A., Stone, P.J., Calore, J., Sinder, G.L. and Franzblau, C. : Myeloperoxidase-induced inactivation of α_1 -antiprotease in hamsters. *J. Lab. Clin. Med.*, 105 : 178-184, 1985.
 - 37) Stroncek, D.F., Vercellotti, G.M., Huh, P.W. and Jacob, H.S. : Neutrophil oxidants inactivate alpha-1-protease inhibitor and promote PMN-mediated detachment of cultured endothelium. Protection by free methionine. *Arteriosclerosis*, 6 : 332-340, 1986.
 - 38) 永井 淳, 栗原英見, 木下正彦, 松尾美千恵, 清水秀樹, 戸田洋子, 野村慶雄, 村山洋二, 苔口 進, 加藤慶二郎 : 歯周病原性細菌に対する血清抗体価測定のための酵素免疫測定法 (ELISA) の検討. *日歯周誌*, 26 : 317-328, 1984.
 - 39) Voller, A., Bidwell, D. and Bartlett, A. : Microplate enzyme immunoassays for the immunodiagnosis of virus infection, Rose, N.R. and Friedman, H., *Manual of clinical immunology*, American Society for Microbiology, Washington, D.C. 1976, 506-512.
 - 40) Palcanis, K.G., Larjava, I.K., Wells, B.R., Suggs, K.A., Landis, J.R. and Chadwick, D.E. : Elastase as an indicator of periodontal disease progression. *J. Periodontol.*, 63 : 237-242, 1992.
 - 41) Huynh, C., Roch, A.M., Meyer, J. and Giroud, J. P. : Gingival crevicular fluid of patients with gingivitis or periodontal disease. Evaluation of elastase-alpha 1 proteinase inhibitor complex. *J. Clin. Periodontol.*, 19 : 187-192, 1992.
 - 42) Lamster, I.B., Oshrain, R.L., Celenti, R., Levine, K. and Fine, J.B. : Correlation analysis for clinical and gingival crevicular fluid parameters at anatomically related gingival sites. *J. Clin. Periodontol.*, 18 : 272-277, 1991.
 - 43) Zafiroopoulos, G.G., Flores, J.L., Todt, G., Kolb, G., Havemann, K. and Tatakis, D.N. : Gingival crevicular fluid elastase-inhibitor complex. Correlation with clinical indices and subgingival flora. *J. Periodont. Res.*, 26 : 24-32, 1991.
 - 44) Page, R.C. : The role of inflammatory mediators in the pathogenesis of periodontal disease. *J. Periodont. Res.*, 26 : 230-242, 1991.
 - 45) Barbey-Morel, C., Pierce, J.A., Campbell, E.J. and Perlmutter, D.H. : Lipopolysaccharide modulates the expression of α_1 -proteinase inhibitor and other serine proteinase inhibitors in human monocytes and macrophages. *J. Exp. Med.*, 166 : 1041-1054, 1987.
 - 46) Grenier, D. : Production of trypsin and chymotrypsin inhibitors by oral bacterial isolates. *J. Periodont. Res.*, 26 : 381-387, 1991.

連絡先 :

日本歯科大学新潟歯学部口腔微生物学教室

〒 951 新潟市浜浦町 1-8