歯周病原菌に対する正常および免疫マウスマクロファージの 酸化窒素産生と SNAP 誘導酸化窒素による殺菌効果

宮丸昌久 加藤千穂美 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 10 年 5 月 7 日受付)

Nitric Oxide Production of Normal and Immune Mice Macrophages against Periodontopathic Bacteria, and Bactericidal Effect of SNAP Generated Nitric Oxide

Masahisa Miyamaru, Chihomi Kato and Kazuko Saito

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

1-8 Hamauracho, Niigata 951-8580, Japan

(Chief : Prof. Kazuko Saito)

The purpose of this experiment was to estimate whether mouse peritoneal macrophages, both normal and immune, could produce nitric oxide (NO) against periodontopathic bacteria, and whether NO, which was produced by the macrophages, had the ability to eliminate periodontopathic bacteria.

The peritoneal macrophages of both immune and normal ICR mice were cultured with three different genera of periodontal bacteria: *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* and *Fusobacterium nucleatum*. NO and the inflammatory cytokines (IFN- γ , IL-1 β , TNF- α) in the supernatant fluid of the cell culture were titrated by Griess reagent and with ELISA kits. The bactericidal effect of NO was examined by using a SNAP generator of NO.

The macrophages of normal mice produced NO by stimulation with each of the bacteria, but the levels were under 20 nmol/ml. No significant differences between the genera of bacteria were found. The immune macrophages produced NO at a high level (85 nmol/ml) when stimulated with *F. nucleatum*, a moderate level (42 nmol/ml) when stimulated with *A. actinomycetemcomitans*, and a low level (under 20 nmol/ml) when stimulated with *P. gingi-*

valis. The level of NO when stimulated with *F. nucleatum* or *A. actinomycetemcomitans* showed a significantly higher titer compared with the normal control. Next, the titers of inflammatory cytokines between the normal and immune macrophages were compared. There were no significant differences in the titer levels between the bacteria, but there was a slight difference in the cytokines of immune macrophages of *F. nucleatum*, in the duration of production of IFN- γ and the level of TNF- α .

The bactericidal effect of NO was then compared between the 3 genera of bacteria at the concentration of 65 nmol/ml of NO and at pH levels of 7.4 or 5.0. At a lower pH levels NO demonstrated better bactericidal activity. The colony forming unit (CFU) of *A. actinomycetemcomitans* after 1 h of treatment with SNAP decreased by ~ 3 logs and *F. nucleatum* reduced by ~ 2 logs, but that of *P. gingivalis* was not clear due to a decrease in control CFU.

There were differences between the level of NO production of immune macrophages by the different bacteria, which were used for immunization. Therefore, these findings suggest a bactericidal effect of NO on periodontopathogens.

Key words: Mouse macrophages, Periodontopathic bacteria, Nitric oxide production, Live vaccine, Bactericidal effect

要旨: マウスマクロファージは誘導型酸化窒素合成酵素を持ち、刺激により酸化窒素 (NO) を合成し、殺菌に関与する。正常および歯周病原菌免疫マウス腹腔マクロファージ (MΦ) の生菌刺激時の NO とサイトカインの産生と、NO による殺菌効果の検討を目的とした。

腹腔 MΦ を培養、*A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, *F. nucleatum* で刺激後、培養上清の NO とサイトカイン (IFN- γ , TNF- α , IL-1 α) を Griess 試薬と ELISA kit で測定した。NO による殺菌は SNAP 1 mM (NO₂ 値 61 nmol/ml) で 1 時間処理後の CFU を測定した。正常 MΦ の NO 産生量は少なく、菌種間で差はなかった。生菌免疫 MΦ では *F. nucleatum* 免疫 MΦ の NO 産生量が最も多く、*A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis* の順であった。前 2 菌は正常 MΦ との間に有意な NO 産生量の増加を認めた。*F. nucleatum* と *A. actinomycetemcomitans* の間では *F. nucleatum* 刺激 MΦ が有意に高い NO 産生量を示した。サイトカイン産生では正常と免疫 MΦ 間で量的に差がなかったが、菌刺激後のピークに達する時間の遅れが見られた。

F. nucleatum 免疫 MΦ では IFN- γ 産生の持続時間が長く、TNF- α 産生量が他に比して多かった。NO 処理による殺菌は *A. actinomycetemcomitans* で $1/10^3$, *F. nucleatum* で $1/10^2$ に生残菌数が減少した。歯周病原菌免疫による MΦ の NO 誘導効果には菌種による違いのあること、および NO による歯周病原菌の殺菌の可能性を示した。

索引用語: マウスマクロファージ, 歯周病原菌, 酸化窒素産生, 生菌免疫, 殺菌効果

緒 言

歯周炎において歯周病原菌と宿主の相互作用の結果、歯肉溝の滲出液の増加があり、滲出液の中では滲出細胞数の増加¹⁾、歯周病原菌に対する抗体価の上昇²⁾、補体の活性化²⁾、炎症性サイトカインの増加^{1,3~6)}が見られる。多形核白血球 (好中球) の数は健康者の 7 倍以上となる¹⁾。歯肉溝、歯肉上層の白血球層の下にはマクロファージ、リンパ球を中心とする反応層がある⁷⁾。これらの総合的な生体側の反応はおそらく歯周炎の進行と非活動化にかかわっていると思われる。食細胞は食菌を通じて酸素依存性あるいは酸素非依存性の機構により殺菌を行っている。酸素依存性殺菌機構には活性酸素種によるものと酸化窒素種によるものがある。

活性酸素に関しては、従来から著者らは歯周病原菌として *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Fusobacterium nucleatum* を選び、マウスあるいはヒトの好中球ならびにマクロファージの活性酸素産生を調べてきた。その結果、これらの菌に対する活性酸素産生はマウスよりヒトで高く⁸⁾、マクロファージより好中球で高かった¹⁰⁾。また、*F. nucleatum* 生菌免疫マウスのマクロファージは同一菌の刺激で、活性酸素の産生と食菌率が増加するが、*P. gingivalis*, *A. actinomycetemcomitans* 生菌免疫では起こらなかった¹⁰⁾。更に好中球の *in vitro* における殺菌効果はヒトおよびマウスの系で補体や特異抗

体価の高い血清の添加にもかかわらず認められなかった¹¹⁾。

一方、もう一つの酸素依存性殺菌機構である酸化窒素 (NO) は L-Arginine から NO 合成酵素により生成される。NO と O₂⁻ からは ONOO⁻、さらにペルオキシ亜硝酸 (ONOOH) を生成して強力な殺菌作用に関与するといわれている⁸⁾。NO の産生はマウス好中球では無刺激、刺激状態においてほとんど認められない。また正常マウスマクロファージでは無刺激状態において NO の産生はほとんど認められないが、*Mycobacterium*, *Listeria*, *Salmonella*, *Legionella* などの細菌種、内毒素、あるいは内毒素と炎症性サイトカインの添加で NO 合成酵素が誘導され、NO の産生が亢進する^{12,13)}。またマクロファージの産生する NO による殺菌効果は *Mycobacterium tuberculosis*, *Listeria*, *Salmonella*, *Legionella* などの細菌、*Cryptococcus*, *Candida* などの真菌、インフルエンザウイルスなどで報告されている^{14~17)}が、歯周病原菌についての報告はない。ヒトのマクロファージにおいて NO 種の産生は低いといわれているが HIV¹⁸⁾, *Pneumocystis*¹⁹⁾, *Mycobacterium*²⁰⁾ とサイトカインの添加により NO 種の産生が起こることが報告されている。

Saglie²¹⁾ は歯周炎の非活動期には歯肉組織において T ヘルパー細胞, NK 細胞, マクロファージ/単球がより優位に存在していることを述べている。

そこで今回、マクロファージの酸化窒素の殺菌効果を見ることを目的とし、その第一段階としてマウスマ

クロファージを使い ① 歯周病原菌 (*A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, *F. nucleatum*) による正常および生菌免疫マウス腹腔マクロファージの *in vitro* における酸化窒素の誘導効果 ② 酸化窒素誘導時のサイトカインの動態 ③ NO 種の発生剤 S-nitroso-N-acetyl-penicillamine (SNAP) を用いた歯周病原菌に対する殺菌効果について調べた。

材料および方法

1. 使用動物と使用菌種

実験動物は SPF (specific pathogen free) ICR マウス雄 (日本エスエルシー, 静岡) 6~7 週齢を使用した。

歯周病原菌として *A. actinomycetemcomitans* Y 4, *P. gingivalis* 381, *F. nucleatum* ATCC 25586 を使用した。

2. 菌の培養方法および調製法

A. actinomycetemcomitans は Brain Heart Infusion (BHI) 培地 (DIFCO, U.S.A.) を用い, CO₂ 濃度 10%, air 90% の炭酸ガス培養器 (トキワ科学, 東京) 中で 37°C, 16~18 時間培養を行った。*P. gingivalis* は GAM ブイヨン培地 (日水製薬, 東京) 1 l に hemin (SIGMA, U.S.A.) を 5 mg, menadione (半井化学, 京都) を 0.5 μ l 加えた培地を用い, AnaeroPack・ケンキ (三菱ガス化学, 東京) を利用し嫌気条件下で 37°C, 16~18 時間培養を行った。*F. nucleatum* は GAM ブイヨン培地を用い, AnaeroPack・ケンキを利用し, 嫌気条件下で 37°C, 33~35 時間培養を行った。それぞれの菌体は, 10,000 $\times$ g, 10 分間遠心して集菌し, PBS (phosphate buffered saline) にて 2 回洗浄後, 分光光度計 Spectronic 20 型 (島津製作所, 京都) を用いて一波長 540 nm で optical density (O.D.) 0.3 になるように 0.1% gelatin (DIFCO) 含有 Hanks balanced salt solution (GHBS) にて調製をした。O.D. 0.3 の colony forming unit (CFU) は *A. actinomycetemcomitans* $1 \times 10^{9 \pm 0.14}$ CFU/ml, *P. gingivalis* $8 \times 10^{8 \pm 0.4}$ CFU/ml, *F. nucleatum* $6.8 \times 10^{7 \pm 0.7}$ CFU/ml であった。

3. 免疫方法

ICR マウスの免疫は生菌を用いて勅使河原ら¹⁰⁾の方法に従って行った。マウス 1 匹あたり生菌懸濁液 (湿重量 100 mg/ml) 0.1 ml を腹腔, 腹腔, 皮下の順に 1 週間おきに 3 回抗原として投与した。最終抗原投与後 2 週間経たるものを免疫マウスとして使用した。

4. 血清の調製

非免疫血清 (正常血清) および免疫血清は, 各マウ

スの頸動脈を切断した血液より通法により採取した。血清は直ちにコニカルチューブに少量ずつ分注し -80°C で保存した。抗体価の測定は Doty ら²²⁾の方法に準じ, enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) の変法で行った。終末点が O.D. 0.2 となる血清希釈倍数の逆数をもって抗体価とした。その結果免疫血清の IgM および IgG 抗体価は *A. actinomycetemcomitans* が 25×2^6 , 25×2^{11} , *P. gingivalis* が 25×2^6 , 25×2^{13} , *F. nucleatum* が 25×2^7 , 25×2^6 であった。

5. マクロファージの調製

マクロファージは 0.4% カゼイン (和光純薬, 大阪) 液を前述したマウス腹腔内に 2 ml 投与し, 4 日後に腹腔内に滲出した細胞を採取した。採取には heparin (半井化学) 5 U/ml 含有 Hanks balanced salt solution (HBSS) 6 ml を注射器で注入し, 浮遊細胞を吸引回収した。細胞は PBS にて 400 $\times$ g 5 分間, 4°C で 2 回遠心洗浄を行った。細胞数は Türk 液 (和光純薬) で染色, Bürker-Türk 血球計算板にて測定を行い, マクロファージ数が 1×10^7 個/ml になるよう 5% fetal bovine serum (FBS, Flow Lab., Australia) 添加 RPMI 1640 培地 (日水製薬) で調製した。

6. マクロファージの培養

マクロファージの培養は 24 well のプラスチックシャーレ (Falcon, 日本ベクトン・ディッキンソン, 東京) にて行った。1 well あたり細胞が $1, 5, 10 \times 10^5$ 個になるように細胞を希釈分注した。炭酸ガス培養器内でマクロファージを 5% FBS 添加 RPMI 1640 培地にて, 37°C, 2 時間培養して well 底に付着させた。次に培養上清を除去し, 付着細胞 1 に対して菌数が 1:0, 1:1, 1:10, 1:50, 1:100, 1:200 となるように血清無添加, 5% 正常マウス血清添加, 5% 免疫マウス血清添加 RPMI 1640 培地 (100 U/ml ペニシリン, 100 μ g/ml ストレプトマイシン含有) で希釈した菌液を 2 ml 加えた。菌の濃度はその都度 CFU を測定し的確な系のみデータに採用した。菌の添加時を 0 時間として経時的に培地の一部を採取し NO₂ あるいはサイトカインを測定した。well 底の細胞構成はマクロファージ $70 \pm 0.5\%$, 好中球 $20 \pm 0.5\%$, リンパ球 $10 \pm 0.5\%$ であった。この細胞集団をマクロファージと記述した。細胞密度, 細胞対菌の比率を変えて行った予備実験から本実験では細胞数 5×10^5 個/well, 細胞対菌数 1:10~1:100 個の範囲で行った。細胞培養時の FBS 添加は培地中の NO 量に影響を与えなかった。トリパンブルーを使った dye exclusion test では, 本実験期間中の生残細胞数に変

化は認められなかった。

7. NOの測定

Green ら²³⁾の方法に準じて行った。細菌刺激後に経時的に採取されたマクロファージ培養上清 100 μ l に等量の Griess 試薬 (1% sulfanilamide, 0.1% naphthyl-ethylen diamine dihydrochloride, 2.5% H_3PO_4) を加え、室温で 10 分間反応させマイクロフォトメーター-MTP-22 (コロナ, 茨城) を使い、1 波長 550 nm で測定した。無刺激対照の値を差し引いた後、 $NaNO_3$ を対照として作成した回帰式 $Y = 105.49x - 0.23$ ($Y = O.D.$, $x = nmol NO_2$) にて測定 $O.D.$ 値から NO_2 量に換算した。また経時的採取時の培地量の減少に対して補正を行い図示した。

8. サイトカインの測定

細菌刺激後に経時的に採取されたマクロファージ培養上清は測定時まで $-80^\circ C$ に保存し、ELISA キット (ENDOGEN, U.S.A.) にてサイトカイン IFN- γ , TNF- α , IL-1 α を測定した。測定はマイクロフォトメーター-MTP-22 を用い 2 波長 (450 nm, 550 nm) で $O.D.$ を測定し、標準曲線と対比して値を決めた。

9. NOによる殺菌の測定

殺菌効果は Kaplan ら²⁴⁾の方法に準じて行った。*A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, *F. nucleatum* 新鮮培養菌は PBS で 2 回洗浄後、PBS にて希釈し、540 nm の波長で $O.D.$ 0.3 になるように分光光度計 Spectronic 20 型にて調製した。実験に先立ち、まず NO の発生剤である S-nitroso-N-acetylpenicillamine (SNAP, SIGMA) 1 mM の PBS pH 5.0²⁵⁾, pH 7.4 における NO_2 の産生量を Griess 試薬にて測定した。いずれの pH においても発生量に差はなく 0 時間値 $6.6 \pm 5.7 nmol/ml$, 1 時間値 $61.0 \pm 13.2 nmol/ml$, 6 時間値 $52.9 \pm 0.5 nmol/ml$ を示した。SNAP の対照として N-acetylpenicillamine (NAP, SIGMA) を同条件で使用したが、 NO_2 の発生はなかった。各菌の 1×10^6 個/ml 相当に、SNAP ならびに対照である NAP 1 mM を試験管内で反応させた。0, 1 時間において SNAP, NAP および非添加対照群それぞれから反応液を 0.1 ml 取り出し 10 倍希釈系列で希釈し、各希釈液 10 μ l を各培地に接種し培養し CFU を求めた。*A. actinomycetemcomitans* は BHI 寒天平板培地を用い CO_2 濃度 10%, air 90% の炭酸ガス培養器中で $37^\circ C$, 48 時間培養を行った。*P. gingivalis* はアネロコロンビア血液寒天平板培地 (日本ベクトン・ディッキンソン) を用い、また、*F. nucleatum* は GAM 寒天平板培地 (日水製薬) を用い、AnaeroPack・ケンキを利用して嫌気条件下で $37^\circ C$, 96 時間培養を行った。培養後コロニーカウ

トを行い CFU/ml を算出した。

10. 統計学的解析

それぞれの実験は 3 回以上行い、平均値 $\pm$ 標準偏差 (SD) を求め、また、Welch 法による統計処理により t 検定を行った。

成 績

1. 歯周病原菌に対する正常および免疫マクロファージの NO 産生について

A. actinomycetemcomitans 刺激正常および免疫マクロファージの血清無添加培養、正常血清添加培養、免疫血清添加培養下の NO 産生量を経時的に培養液を採取して測定し、図 1 A, B, C に示した。図 1 の正常および免疫マクロファージの NO 産生量の最大値は、血清添加の有無、また刺激菌数 1:10~1:100 の変化にもかかわらず、正常マクロファージ間、および免疫マクロファージ間で有意差を示さなかった。細胞対菌数比の変化および血清無添加、血清添加培養の全条件下において免疫マクロファージの NO 産生量の最大値は同条件の正常マクロファージ最大値に比し $p < 0.05 \sim p < 0.0000005$ の値で有意に高いことを認めた。

P. gingivalis 刺激正常および免疫マクロファージの血清無添加培養、正常血清添加培養、免疫血清添加培養下の培養液中の NO 産生量を、図 2 の A, B, C に示した。図 2 の正常および免疫マクロファージの産生する NO の最大値は血清添加の有無、および細胞対菌数比 1:10~1:100 の変化にもかかわらず正常マクロファージ間、免疫マクロファージ間では有意差を認めなかった。また細胞対菌数比の変化および血清無添加、血清添加培養の全条件下における免疫マクロファージの最大 NO 産生量は同条件下の正常マクロファージの最大産生量に比し、免疫マクロファージの免疫血清添加の場合のみ $p < 0.01 \sim p < 0.05$ の値で有意差があった。

F. nucleatum 刺激正常および免疫マクロファージの血清無添加培養、正常血清添加培養、免疫血清添加培養下の培養液中の NO 産生量を、図 3 の A, B, C に示した。図 3 の正常マクロファージの最大 NO 産生量は血清添加の有無、刺激菌数に関係なく同レベルの値を示した。この値は *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis* 刺激の同条件下の正常マクロファージの最大 NO 産生量に比して高い値を示したが検定の結果、有意差は認められなかった。免疫マクロファージの産生 NO の最大値の比較では血清無添加と正常および免疫血清添加培養群間に有意差 ($p <$

図 1 *A. actinomycetemcomitans* 刺激による正常および免疫マクロファージの NO の産生

細胞対菌数比 1:10 ○, 1:50 △, 1:100 □ (正常マクロファージ), 1:10 ●, 1:50 ▲, 1:100 ■ (免疫マクロファージ) にて刺激をした。

A: 血清無添加培養, B: 正常血清添加培養, C: 免疫血清添加培養
値は平均±標準偏差で示した。

図 2 *P. gingivalis* 刺激による正常および免疫マクロファージの NO の産生

細胞対菌数比 1:10 ○, 1:50 △, 1:100 □ (正常マクロファージ), 1:10 ●, 1:50 ▲, 1:100 ■ (免疫マクロファージ) にて刺激をした。

A: 血清無添加培養, B: 正常血清添加培養, C: 免疫血清添加培養
値は平均±標準偏差で示した。

図3 *F. nucleatum* 刺激による正常および免疫マクロファージの NO の産生

細胞対菌数比 1:10 ○, 1:50 △, 1:100 □ (正常マクロファージ), 1:10 ●, 1:50 ▲, 1:100 ■ (免疫マクロファージ) にて刺激をした。

A: 血清無添加培養, B: 正常血清添加培養, C: 免疫血清添加培養

値は平均±標準偏差で示した。

0.05~ $p < 0.001$) があり, 血清添加が NO 産生の増加に影響を与えることを示した。

次に, 刺激菌種に対する正常マクロファージおよび免疫マクロファージそれぞれの NO の産生量の最大値間で有意検定を行い, 表 1 に示した。*F. nucleatum* と *A. actinomycetemcomitans* との間, *F. nucleatum* と *P. gingivalis* との間, *A. actinomycetemcomitans* と *P. gingivalis* との間で培養の条件にかかわらず, いずれの菌刺激においても正常マクロファージの NO 産生量間に有意差はなかった。免疫マクロファージの産生する最大 NO 量の比較では, *F. nucleatum* と *A. actinomycetemcomitans* 刺激間で血清無添加培養群間では有意差が認められなかったが, 正常および免疫血清添加培養群において両者の間に有意差が認められた。また *F. nucleatum* と *P. gingivalis*, および *A. actinomycetemcomitans* と *P. gingivalis* 刺激群との間では血清無添加, 正常血清添加培養の一部を除いて大部分に有意差が認められた。

2. 生菌刺激正常および免疫マクロファージ培養液中のサイトカインについて

IFN- γ の測定結果を図 4 (A: *A. actinomycetemcomitans*, B: *P. gingivalis*, C: *F. nucleatum*) に示した。*A. actinomycetemcomitans* 刺激では細胞対菌数の比にかかわらず, 正常マクロファージではピークが 12 時間にあり, 免疫マクロファージでは 24 時間であったが量的に有意差はなかった。*P. gingivalis* 刺激の正常マクロファージでは 12 時間にピークを示し, 24 時間には低下した。免疫マクロファージでは血清無添加では 24 時間に, 正常および免疫血清無添加では 48 時間にピークがあった。*F. nucleatum* 刺激の正常マクロファージでは 24 時間にピークを示し, 以後減少したが, 免疫マクロファージでは 48 時間においても高い値を維持した。

IL-1 α の結果を図 5 に示した。いずれの菌でも, また細胞対菌数比の変化にかかわらず免疫マクロファージで高い値を示した。

TNF- α の測定結果を図 6 に示した。正常および免疫マクロファージの *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis* 刺激および *F. nucleatum* 刺激正常マクロファージでは TNF- α の産生が見られなかったが, *F. nucleatum* 刺激免疫マクロファージ培養 48 時間においてのみ測定された。

3. NO による殺菌について

歯周病原菌に対する NO の殺菌効果について検討をした。食胞内の pH は酸性を示すので pH 7.4 に加えて 5.0 でも検討した。対照として NO を発生しない同位体の NAP をおいて比較した。

表 1 正常および免疫マクロファージの酸化窒素産生量に関する刺激菌種間の有意差検定

	Fn : Aa		Fn : Pg		Aa : Pg	
	免疫 MΦ 間	正常 MΦ 間	免疫 MΦ 間	正常 MΦ 間	免疫 MΦ 間	正常 MΦ 間
血清無添加						
細胞 : 菌						
1 : 10	—	p<0.05	p<0.05	—	—	p<0.05
1 : 50	—	—	—	—	p<0.005	—
1 : 100	—	—	p<0.00005	—	—	—
正常血清添加						
細胞 : 菌						
1 : 10	p<0.05	—	p<0.00005	—	—	—
1 : 50	p<0.01	—	p<0.000005	—	p<0.05	—
1 : 100	p<0.05	—	p<0.05	—	p<0.001	—
免疫血清添加						
細胞 : 菌						
1 : 10	p<0.01	—	p<0.05	—	p<0.05	—
1 : 50	p<0.001	—	p<0.0005	—	p<0.005	—
1 : 100	p<0.05	—	p<0.05	—	p<0.05	—

Fn : *F. nucleatum*, Pg : *P. gingivalis*, Aa : *A. actinomycetemcomitans*, MΦ : マクロファージ, — : p>0.1, 3 回以上の実験から平均値±標準偏差を求め, これを基に P 値を計算した。

A. actinomycetemcomitans に対する NO の殺菌効果を図 7 A に示した。0 時間の細菌数を 10^6 個/ml とし、NAP または SNAP 処理 1 時間後の pH 7.4 または pH 5.0 における菌数を測定した。pH 7.4 では NAP 処理での菌数は 1.04×10^6 個/ml であるのに対し、SNAP 処理では 3.1×10^5 個/ml に減少した。pH 5.0 においては NAP 処理での菌数 8.2×10^5 個/ml の対照に対し SNAP 処理では 10^2 個/ml 以下の菌数に減少した (p<0.05)。

P. gingivalis に対する NO の殺菌効果を図 7 B に示した。PBS では 1 時間後の生残菌数が 4.8×10^5 個/ml を示したが pH 7.4 の NAP では 5.6×10^4 個/ml と減少し、また SNAP 処理においては 2.8×10^4 個/ml を示し両者の間に有意差はなかった。pH 5.0 においては NAP 処理 1.6×10^4 個/ml に対し、SNAP 処理では 1.9×10^3 個/ml に減少した。

F. nucleatum に対する NO の殺菌効果を図 7 C に示した。pH 7.4 において NAP 処理で、菌数は 1.3×10^6 個/ml を示し、SNAP 処理では 2.6×10^5 個/ml を示した。pH 5.0 では NAP 処理で菌数は 1.2×10^6 個/ml に対し SNAP 処理では 2.3×10^4 個/ml に減少した。pH 5.0 においては p<0.05 の有意差を得た。

NO 10 nmol/ml 処理では 3 菌種の殺菌効果は認められなかった。

考 察

食細胞の殺菌機構の中に酸素依存性と酸素非依存性の殺菌機構があり、酸素依存性には活性酸素種によるものと酸化窒素種によるものがある。好中球では活性酸素産生が高いがマクロファージでは通常好中球の 1/10 位の活性を示すに過ぎない。NO はマウスマクロファージで産生が高く、好中球では低い。マクロファージの NO 合成酵素は誘導型酸化窒素合成酵素 (iNOS : inducible NO synthase) で、刺激のない時は NO を産生していないが、微生物の感染や、LPS 刺激、IFN- γ , TNF- α , IL-1 β などの存在でマクロファージの活性化の起こる時に誘導される^{8,15,16}。この NO の細胞内菌の殺菌にはアルギニン-NO 系が関与している。マクロファージの産生する NO は殺菌作用と同時に組織障害性を持つものとして注目されている²⁶。NO に対し感受性のある微生物とないものがある。前者に *Legionella*, *Listeria*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Staphylococcus aureus*^{14,17}, 真菌として *Cryptococcus*¹⁷, 原虫として *Leishmania*, *Entamoeba*, *Trypanozoma*^{14,17} などがあり、後者に *Salmonella*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Mycobacterium avium* group などがある¹⁶。

本研究では *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, *F. nucleatum* 生菌を正常ならびに生菌免疫マ

図4 歯周病原菌刺激時の正常および免疫マクロファージのIFN- γ の産生

A: *A. actinomycetemcomitans*, B: *P. gingivalis*, C: *F. nucleatum*

血清無添加培養: ○, 正常血清添加培養: △, 免疫血清添加培養: □ (正常マクロファージ), 血清無添加培養: ●, 正常血清添加培養: ▲, 免疫血清添加培養: ■ (免疫マクロファージ), 細胞対菌数比1:100にて刺激した。

値は平均±標準偏差で示した。

図5 歯周病原菌刺激時の正常および免疫マクロファージのIL-1 α の産生

A: *A. actinomycetemcomitans*, B: *P. gingivalis*, C: *F. nucleatum*

血清無添加培養: ○, 正常血清添加培養: △, 免疫血清添加培養: □ (正常マクロファージ), 血清無添加培養: ●, 正常血清添加培養: ▲, 免疫血清添加培養: ■ (免疫マクロファージ), 細胞対菌数比1:100にて刺激した。

値は平均±標準偏差で示した。

図 6 歯周病原菌刺激時の正常および免疫マクロファージの TNF- α の産生

A. *actinomycetemcomitans* : $\circ$, *P. gingivalis* : $\triangle$, *F. nucleatum* : $\square$ (正常マクロファージ), A. *actinomycetemcomitans* : $\bullet$, *P. gingivalis* : $\blacktriangle$, *F. nucleatum* : $\blacksquare$ (免疫マクロファージ)

正常血清添加培養下で, 細胞対菌数比 1 : 100 にて刺激した。
値は平均 $\pm$ 標準偏差で示した。

マクロファージに *in vitro* で感染させた。NO の産生を高めるため L-Arginine の含有量の高い RPMI 1640 培地を用いて培養し, 培養上清中の NO 量を測定した。培養細胞中には好中球, リンパ球も混在するが, 好中球については 10^6 個のマウス好中球でも NO 産生は $1 \mu\text{M}$ との報告²⁷⁾がある。またマウス T リンパ球からの NO の産生に関する報告は今までなかったが, 最近, Tayler-Robinson ら²⁸⁾はマラリア免疫マウスのヘルパー T 1 細胞が抗原と Con A および脾臓由来の APC の存在下で NO を産生することを報告した。これによるとヘルパー T 1 細胞 2×10^6 個の NO 生産量は 130 nmol/ml であり, 本実験での混入リンパ球 (5×10^4 個) すべてがヘルパー T 1 細胞と仮定しても 3.2 nmol/ml の低い NO 生産量となるので, 本実験における産生 NO 種の大部分はマクロファージ由来と考えられる。

P. gingivalis と *F. nucleatum* では, 補体と特異免疫血清の添加で食菌率に相加的効果が認められたが, *A. actinomycetemcomitans* では補体があれば良く, 特異抗体による相加効果がないこと (未発表データ) から補体, 抗体の添加の目的でマクロファージの培養液に血清および免疫血清の添加を行った。しかし, 正常マクロファージの NO 産生実験系では血清添加の効果は明らかではなく, また菌種間による差も少な

図 7 歯周病原菌の NO による殺菌効果

A : *A. actinomycetemcomitans*, B : *P. gingivalis*, C : *F. nucleatum*

1 mM SNAP (61 nmol/ml NO₂ 相当量) で各菌を 1 時間処理後, 各平板培地で培養後集落数を測定, CFU/ml で示した。対照に NAP を使用した。

値は平均 $\pm$ 標準偏差で示した。

* : $p < 0.05$

∇ : $< 10^2$

く, 統計学的有意差は認められなかった (図 1~3)。正常マクロファージの NO 産生実験系では補体, 抗体添加による NO 産生への影響が少ないことが分

かった。

免疫マクロファージのNO産生実験系では *F. nucleatum* および *A. actinomycetemcomitans* 刺激で、正常マクロファージ系に比し、高いNO値を示した(図1~3)。しかし *P. gingivalis* 刺激の場合は、細胞対菌数比1:50, 1:100で免疫マクロファージに免疫血清添加群のみが統計上有意であった。しかし、この *P. gingivalis* 免疫マクロファージと免疫血清の添加によるNO産生量の増加は *F. nucleatum* および *A. actinomycetemcomitans* 刺激正常マクロファージのNO産生量の域を出ない程度の値であった。免疫マクロファージのNOの産生量の最大値を菌種間で比較すると、*A. actinomycetemcomitans* は *P. gingivalis* の2倍、*F. nucleatum* の血清添加群では *A. actinomycetemcomitans* の更に2倍の高い値を示した。NO産生量は動物種間、株間、あるいは抗原である菌株間でも異なるといわれている^{17,29)}が正常マクロファージの間では刺激菌種の違いによる差が認められなかった。免疫によるマウスマクロファージのNO産生の増強効果についてはBCG免疫の例があり、免疫によるNO産生の亢進は生菌免疫特異的なものではなく、ヘルパーT1細胞から産生されるTNF, IFN- γ がこれを支えると考えられている¹⁷⁾。また、ヒトの末梢血単球の *in vitro* 培養系において、BCGに対するiNOS誘導を含む単球の活性化に、IFN- γ とBCG感作リンパ球の存在による二重のシグナルが必要であるとの報告もある³⁰⁾。本実験の免疫マクロファージ培養系でNO産生量が増大するのは、感作リンパ球の混在している可能性を含んでいる。

グラム陰性菌刺激によるマクロファージのNOの産生は菌のLPSに依存するとの報告があり³¹⁾、このLPSによるNOの産生が炎症性サイトカイン(IL-1 β , TNF- α , IFN- γ など)の存在により高まることが報告されている³²⁾。LPSとサイトカインをマクロファージ培養系に加えることにより、NO産生量がLPSとIFN- γ にdose-dependentに増加し³³⁾、さらにTNF- α を加えると、さらにNO量が増加することが報告されている³⁴⁾。IFNリガントやレセプターのノックアウトマウスではIFN- γ やiNOSの合成が消失することから³⁵⁾、IFN- γ はマクロファージのNO産生に重要な役割を果たすと考えられる。本実験では正常および免疫マクロファージの菌による刺激培養系でIFN- γ 量に著しい差は認められなかった。IL-1 α 量も免疫による有意な差はなかった。本実験ではサイトカイン値、特に免疫マクロファージ群の標準偏差値の大きいことまた刺激菌種間でサイトカイン産生量に明らかな差が認められなかったことから、サイトカイ

ンのNO産生における役割を結論づけることは出来なかった。しかし *F. nucleatum* 免疫マクロファージでIFN- γ の高い値が維持されること、TNF- α の値が上がることは意義のあることかも知れない。今後サイトカイン、特にIFN- γ のNO産生に関する役割については、更なる検討と抗IFN- γ による中和実験が必要であると考ええる。NOの存在が逆にT細胞の活性を抑制するという報告もあり²⁸⁾、生体における防御系の複雑さを示している³⁶⁾。また免疫に用いた抗原細菌種の差はマクロファージの成熟度、あるいは活性化の程度に影響を与えることが知られており³⁷⁾、この点も今後検討する必要がある。

細胞内寄生性細菌で免疫したマウスのマクロファージではNOの産生量が多いが、*F. nucleatum* 投与マウスでも γ/δ T細胞の誘導と、熱ショック蛋白の増加が起こることなど、細胞内寄生性細菌感染に類似した現象を呈する³⁸⁾。これも *F. nucleatum* 免疫マクロファージが高いNO産生を示す理由の一つかも知れない。

NOの発生剤としてS-nitroso-thiol誘導体が何種類か知られている。その一つS-nitroso-N-acetylpenicillamine (SNAP)は通常取り扱いにくいNOガスと異なり、常温で固体で、秤量が可能でありNOの発生量を制御できる利点がある³⁹⁾。本実験においてNOによる殺菌作用を調べるためにSNAPを使い、対照としてN-acetyl-penicillamine (NAP)を使用した。実験開始時のCFUを基準として1時間後のCFUで比較した。培養時間を1時間に限って行ったのは *P. gingivalis* が対照のNAPに感受性を示し減少することに由来する。SNAPは *A. actinomycetemcomitans* あるいは *F. nucleatum* 免疫マクロファージが産生し得るNO量を発生する1mMの濃度を菌に添加した。SNAPのこの濃度は他菌の殺菌の実験にも使用されている濃度である²⁴⁾。正常マクロファージが産生する10nmol程度のNO量では生残菌数の減少は認められなかった。またpH7.4よりpH5.0において生残菌数は減少した。食細胞において起こる食胞のpHの低下は殺菌に意義のあることを示している。*P. gingivalis* では対照のNAPで菌の減少が起こり、NOによる効果は明らかでない。

A. actinomycetemcomitans, *F. nucleatum* のSNAP添加群では菌数が $1/10^5$ および $1/10^2$ に減少した。*P. gingivalis* においてもNAPとの比較で菌数が $1/10$ に減少し、PBS対照との間には $1/100$ の減少があった。NOの殺菌効果については NaNO_2 ⁴⁰⁾、SNAP²⁴⁾、DEA/NO⁴¹⁾等に関して殺菌の報告がみられる。NOの殺菌効果についてその機構は十分明らか

ではないが, NO, N_2O_4 , HNO_2 , N_2O_3 さらに活性酸素と NO の反応から, より活性の高い ONOO⁻ が生成され, 殺菌作用を持つものと考えられている^{42,43}). 誘導型の NO はマウスマクロファージ系で産生が高いことが知られている。ヒトとマウスの iNOS 遺伝子について解析され, ほとんど類似の配列と相同性のあることが知られているが⁴⁴), ヒト末梢血マクロファージで NO 産生が低い理由は不明である。しかしヒトマクロファージでも特殊な感染の場合に NO の産生が上昇することが報告されている¹⁸⁻²⁰)ことからヒトにおいても NO による殺菌の可能性がある。今回 NO の殺菌効果について SNAP を利用して測定したが, 実際に免疫マクロファージで確かめることが必要である。

以上, マクロファージを用いた NO 産生, サイトカイン産生と酸化窒素による歯周病原菌に対する殺菌効果について述べた。マウス免疫血清, 好中球などの殺菌効果を調べた実験では CFU が最大 18% の減少に留まること¹¹)と比較すると免疫マクロファージの NO 産生は歯周病原菌の殺菌に有効な手段であるかも知れない。生体防御は 1 つの機構のみによって成立するものでなく, 種々の防衛機構の総和であり NO もその 1 つとして役立つであろうと考えられる。

本研究の一部は科学研究費基盤研究 C (課題番号 09671936) の補助によって行った。

文 献

- 1) 葛城啓彰, 長谷川明, 斎藤和子: 歯周病疾患患者における多形核白血球機能の検討 第 2 報 末梢血および歯肉溝多形核白血球の CR 1 (C3b レセプター) および歯肉溝多形核白血球の形態学的研究について. 歯学, 78: 720-741, 1990.
- 2) Willton, J.M.A., Johnson, N.W., Curtis, M.A., Gillett, I.R., Carman, R.J., Bampton, J.L.M., Griffiths, G.S. and Sterne, J.A.C.: Specific antibody responses to subgingival plaque bacteria as aids to the diagnosis and prognosis of destructive periodontitis. J. Clin. Periodontol., 18: 1-15, 1991.
- 3) Masada, M.P., Persson, R. and Kenney, J.S.: Measurement of interleukin-1 α and -1 β in gingival crevicular fluid: Implications for the pathogenesis of periodontal disease. J. Periodont. Res., 25: 156-163, 1990.
- 4) 鎌形有祐, 宮坂信之, 井上裕子, 橋本純子, 飯田正人: ヒト炎症歯肉組織から産生されるサイトカインに関する検討—特にインターロイキン 6 について—. 日歯周誌, 34: 1081-1087, 1989.
- 5) Rossomando, E.F. and White, L.: A novel method for the detection of TNF- α in gingival crevicular fluid. J. Periodontol., 64: 445-449, 1993.
- 6) Matsuki, Y., Yamamoto, T. and Hara, K.: Detection of inflammatory cytokine messenger RNA (mRNA) expressing cells in human inflamed gingiva by combined *in situ* hybridization and immunohistochemistry. Immunology, 76: 42-47, 1992.
- 7) Miyasaki, K.T.: The neutrophil: Mechanisms of controlling periodontal bacteria. J. Periodontol., 62: 761-774, 1991.
- 8) 谷口直之: 特集 活性酸素研究のブレイクスルー. 細胞工学, 15: 1370-1379, 1996.
- 9) 加藤千穂美, 荻原和孝, 斎藤和子: 歯周病原菌に対するヒト好中球のケミルミネッセンス反応と食菌能における補体レセプターの役割について. 日歯周誌, 36: 388-398, 1994.
- 10) 勅使河原秀三郎, 加藤千穂美, 斎藤和子: *F. nucleatum*, *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis* 免疫マウスの食細胞活性および抗体産生の比較. 日歯周誌, 34: 160-172, 1991.
- 11) 荻原和孝, 加藤千穂美, 斎藤和子: *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Fusobacterium nucleatum* に対する多形核白血球の活性酸素産生と食・殺菌系におよぼす補体, 抗体の影響. 日歯周誌, 37: 628-640, 1995.
- 12) Ding, A.H., Nathan, C.F. and Stuehr, D.J.: Release of reactive nitrogen intermediates and reactive oxygen intermediates from mouse peritoneal macrophage. J. Immunol., 141: 2407-2412, 1988.
- 13) Drapier, J.C., Wietzerbin, J. and Hibbs, Jr. J.B.: Interferon γ and tumor necrosis factor induce the L-arginine dependent cytotoxic effector mechanism in murine macrophages. Eur. J. Immunol., 18: 1587-1592, 1988.
- 14) Nathan, C.F. and Hibbs, J.J.: Role of nitric oxide synthesis in macrophage antimicrobial activity. [Review]. Current. Opinion in Immunology, 3: 65-70, 1991.
- 15) James, S.L.: Role of nitric oxide in parasitic infections. Microbiological Reviews, 59: 533-547, 1995.
- 16) Saito, S., Onozuka, K., Shinomiya, H. and Nakano, M.: Sensitivity of bacteria to $NaNO_2$ and to L-arginine-dependent system in murine macrophages. Microbiol. Immunol., 35: 325-329, 1991.
- 17) 中野昌康: マクロファージ機能とアルギニン-NO 系, 菊地浩吉, 矢田純一, 奥村 康, Annual Review 免疫, 中外医学社, 東京, 1993, 62-69.
- 18) Bukrinsky, M.I., Nottet, H.S.L.M., Schmidt-Maye-

- rova, H., Dubrovsky, L., Flanagan, C.R., Mulins, M.E., Lipton, S.A. and Gendelman, H.E. : Regulation of nitric oxide synthase activity in human immunodeficiency virus type I (HIV-1)-infected monocytes : Implications for HIV-associated neurological disease. *J. Exp. Med.*, 181 : 735-745, 1995.
- 19) Denis, M. : Human monocytes/macrophages : NO or no NO? *J. Leukoc. Biol.*, 55 : 682-684, 1994.
- 20) Dumarey, C.H., Labrousse, V. and Raestogi, N. : Selective *Mycobacterium avium* induced production of nitric oxide by human monocyte-derived macrophages. *J. Leukoc. Biol.*, 56 : 36-40, 1994.
- 21) Saglie, F.R. : Bacterial invasion and its role in the pathogenesis of periodontal disease, Hamada, S., Holt, S.C. and McGhee, J.R., *Periodontal Disease : Pathogen and host immune response*, Quintessence Publishing Co. Ltd., Tokyo, 1991, 27-40.
- 22) Doty, S.L., Lopatin, D.E., Syed, S.A. and Smith, F. N. : Humoral immune response to oral microorganisms in periodontitis. *Infect. Immun.*, 37 : 499-505, 1982.
- 23) Green, L.C., Wagner, D.A., Glogowaski, J., Skipper, P.L., Wisnok, J.S. and Tannebaum, S.R. : Analysis of nitrate, Nitrate and [¹⁵N] nitrate in biologic fluids. *Ann. Rev. Biochem.*, 126 : 131-138, 1982.
- 24) Kaplan, S.S., Lancaster, Jr. J.R., Basfold, R.E. and Simmons, R.L. : Effect of nitric oxide on *Staphylococcal* killing and interactive effect with superoxide. *Infect. Immun.*, 64 : 69-76, 1996.
- 25) 竹本公一郎 : 食作用, 水上茂樹, 柿沼カツ子, 白血球と食作用. 講談社サイエンティフィック, 東京, 1981, 56.
- 26) Cui, S., Reichner, J.S., Mateo, R.B., and Albina, J. E. : Activated murine macrophages induce apoptosis in tumor cells through nitric oxide-dependent or -independent mechanisms. *Cancer Res.*, 54 : 2462-2467, 1994.
- 27) Kim, C., Park, E., Quinn, M.R. and Schullerlevis, G. : The production of superoxide anion and nitric oxide by cultured murine leukocytes and the accumulation of TNF-alpha in the conditioned media is inhibited by taurine chloramine. *Immunopharmacology*, 34 : 89-95, 1996.
- 28) Tayler-Robinson, A.W., Liew, F.Y., Xu, D., McSorley, S., Grside, P., Padron, J. and Phillips, R.S. : Regulation of the immune response by nitric oxide differentially produced by T helper type 1 and T helper type 2 cells. *Eur. J. Immunol.*, 24 : 980-984, 1994.
- 29) Page, C. L.E., Sanceau, J., Drapier, J.-C. and Wietzerbin, J. : Differential expression of inducible NO synthase in two murine macrophage cell lines. *Immunology*, 89 : 274-280, 1996.
- 30) Gloria Bonecini-Almeida, M., Chitale, S., Boutsikakis, I., Geng, J., Doo, H., He, S. and Ho, J.L. : Induction of *in vitro* human macrophage anti-*Mycobacterium tuberculosis* activity : Requirement for IFN- γ and primed lymphocytes. *J. Immunol.*, 160 : 4490-4499, 1998.
- 31) Giovanni, M., George, W.C., Danuta, R. and Luigi, V. : Picolinic acid, a catabolite of L-tryptophan, is a costimulus for the induction of reactive nitrogen intermediate production in murine macrophages. *J. Immunol.*, 150 : 4031-4040, 1993.
- 32) Kolb, H. and Kolb-Bachofer, V. : Nitric oxide : a pathogenic factor in autoimmunity. *Immunol. Today*, 13 : 157-160, 1992.
- 33) Cho, H.J., Xie, Q., Calaycay, J., Mumford, R.A., Swiderek, K.M., Lee, T.D. and Nathan, C. : Calmodulin is a subunit of nitric oxide synthase from macrophage. *J. Exp. Med.*, 176 : 599-604, 1992.
- 34) Joao, S.S., Glaucia, N.R.V., Maria, A.G.C., Julio, C.S.A. and Fernando, Q.C. : Tumor necrosis factor alpha mediates resistance to *Trypanosoma cruzi* infection in mice by inducing nitric oxide production in infected gamma interferon-activated macrophages. *Infect. Immun.*, 63 : 4862-4867, 1995.
- 35) Wei, X.Q. : Altered immune response in mice lacking inducible nitric oxide synthase. *Nature*, 379 : 408-411, 1995.
- 36) Bauer, H., Jung, T., Tsikas, D., Stichtenoth, D.O., Hrolich, J.C. and Neumann, C. : Nitric oxide inhibits the secretion of T-helper 1- and T-helper 2- associated cytokines in activated human T cells. *Immunology*, 90 : 205-211, 1997.
- 37) 斎藤慎二 : マクロファージ活性化のシグナル, 菊地浩吉, 矢田純一, 奥村 康, *Annual review 免疫*, 中外医学社, 東京, 1994, 77-96.
- 38) Saito, K., Katsuragi, H., Mikami, M., Kato, C., Miyamaru, M. and Nagaso, K. : Increase of heat-shock protein and induction of γ/δ T cells in peritoneal exudate of mice after injection of live *Fusobacterium nucleatum*. *Immunology*, 90 : 229-235, 1997.
- 39) 丹野雅幸, 富田直樹 : 生体内で NO を発生する化合物. *現代化学*, 277 : 36-41, 1994.
- 40) Jorens, P.G., Boelaert, J.R., Halloy, V., Zamora, R., Schneider, Y.-J. and Herman, A.G. : Human and rat macrophages mediate fungistatic activity against *Rhizopus* species differently : In vivo and

- ex vivo studies. Infect. Immun., 63 : 4489-4494, 1995.
- 41) Pacelli, R., Wink, D.A., Cook, J.A., Krishna, M.C., DeGraff, W., Friedman, N., Tosokos, M., Smuni, A. and Mitchell, J.B. : Nitric oxide potentiates hydrogen peroxide-induced killing of *Escherichia coli*. J. Exp. Med., 182 : 1469-1479, 1995.
 - 42) Yoshida, K., Akaike, T., Doi, T., Saito, K., Ijiri, S., Suga, M., Ando, M. and Maeda, H. : Pronounced enhancement of 'NO-dependent antimicrobial action by an 'NO-oxidizing agent, Imidazolineoxyl *N*-oxide. Infect. Immun., 61 : 3552-3555, 1993.
 - 43) Liew, F.Y. and Cox, F.E.G. : Nonspecific defense mechanism : The role of nitric oxide. Immunol. Today, 12 : A 17-21, 1991.
 - 44) 立道昌幸, 江角浩安 : 炎症細胞での iNOS 発現と制御の特異性—ヒトとマウスでの相異—, 平田結喜緒, 別冊 医学のあゆみ NO のすべて. 医歯薬出版, 東京, 1996, 119-123.

連絡先 :

日本歯科大学新潟歯学部口腔微生物学教室
〒 951-8580 新潟市浜浦町 1-8