ビスフォスフォネートの好中球由来マトリックス メタロプロテアーゼ活性に与える影響

青木 威仁 大澤 銀子 仲谷 寛 鴨井 久一

日本歯科大学歯学部歯周病学教室
(1999 年 4 月 10 日受理)

The Effects of Bisphosphonates on Polymorphonuclear Leukocyte- Derived Matrix Metalloproteinase Activity

Takehito Aoki, Ginko Osawa, Hiroshi Nakaya and Kyuichi Kamoi

Department of Periodontology, The Nippon Dental University, School of Dentistry at Tokyo
Accepted for publication 10 April 1999

This study investigated the effects of bisphosphonates on the polymorphonuclear leukocyte (PMN)-derived matrix metalloproteinases (MMPs)/MMP-8 and MMP-9 activity *in vitro*. PMNs extracts were treated with various concentrations ($1 \times 10^{-6} \sim 1 \times 10^{-3}$ M) of tiludronate, etidronate, and tetracycline. MMP-8 and MMP-9 activities were assayed using FITC-conjugated type I collagen and type IV collagen as substrate. MMP-8 activity was inhibited by 1×10^{-6} M tiludronate and by 1×10^{-3} M tetracycline, but not inhibited by etidronate. MMP-9 activity was inhibited by tiludronate, etidronate, and tetracycline in a dose-dependent manner. The results revealed that PMN-derived MMP activities were inhibited by bisphosphonates. Especially, the inhibition of MMP activities by tiludronate was more evident than that by tetracycline, as is already well-known. In addition to a well-known pharmacological action, inhibition of osteoclastic bone resorption, the capability of bisphosphonates to inhibit the activities of PMN-derived MMPs may be beneficial to prevent tissue destruction in periodontal inflammation. J. Jpn. Soc. Periodontol., 41 : 99~107, 1999.

Key words : bisphosphonate, tiludronate, etidronate, MMP-8, MMP-9

要旨 : 本研究は、ビスフォスフォネートの好中球由来のマトリックスメタロプロテアーゼである MMP-8, MMP-9 の活性抑制作用について検討した。ヒト好中球の超音波破砕溶液に $1 \times 10^{-6} \sim 10^{-3}$ M のチルドロネート, エチドロネート, また陽性対照として塩酸テトラサイクリンを加え, FITC 標識 I 型コラーゲンまたは IV 型コラーゲンに対する分解効果を測定した。MMP-8 に対する活性抑制作用は, チルドロネートでは 1×10^{-6} M 以上の濃度で, 塩酸テトラサイクリンでは 1×10^{-3} M において認められたが, エチドロネートには認められなかった。MMP-9 に対する活性抑制作用は, チルドロネート, エチドロネート, 塩酸テトラサイクリンとも濃度依存的に強くなった。ビスフォスフォネートは, 好中球由来のマトリックスメタロプロテアーゼの活性抑制作用を有していることが明らかとなった。さらに, チルドロネートは, 従来から知られている塩酸テトラサイクリンを上回るマトリックスメタロプロテアーゼの活性抑制作用を有していた。ビスフォスフォネートは, 破骨細胞による骨吸収を抑制することがすでに知られている。したがって, マトリックスメタロプロテアーゼの活性抑制作用と破骨細胞による骨吸収抑制作用とを有するビスフォスフォネートは, 歯周炎による組織破壊を抑制する有用な新治療薬となり得ることが示唆された。

索引用語 : ビスフォスフォネート, チルドロネート, エチドロネート, MMP-8, MMP-9

結 言

歯周炎における歯周組織の破壊は、プラーク中の細菌に起因する炎症反応の結果であり、細菌とそれに対する宿主の炎症反応、免疫反応が複雑に係わっている¹⁻³⁾。そして、歯周治療は、機械的および化学的方法による局所部位における細菌のコントロールなしには成立しない。一方、宿主の炎症反応をコントロールすることにより歯周組織の破壊を抑制しようとの試みもなされている⁴⁾。コラゲナーゼをはじめとするマトリックスメタロプロテアーゼ (MMPs) は、細胞外基質の分解能を有する酵素群であり、歯周炎における組織破壊においても重要な役割を果たしていると考えられている⁵⁻¹⁰⁾。MMPs の活性を抑制する薬剤としては、テトラサイクリン系抗生物質が知られており、すでに多くの研究がなされている¹¹⁻¹⁵⁾。

ビスフォスフォネートは、破骨細胞による骨吸収を阻害する薬剤として、骨粗鬆症、ペーチェット病、悪性腫瘍による高カルシウム血症などの治療に使用されている¹⁶⁻¹⁸⁾。そして、このような骨吸収抑制作用に着目して歯周炎における歯槽骨の吸収を抑制する試みもすでに報告されている^{19,20)}。一方、ビスフォスフォネートの一種であるクロドロネートは、MMP-1 や MMP-8 の活性を抑制するとの報告^{21,22)}がされ、ビスフォスフォネートの破骨細胞による骨吸収の抑制作用以外の作用についても研究がなされてきたが、未だその詳細は明らかではない。そこで、本研究では成人性歯周炎における歯周組織破壊に重要な役割を果たしていると考えられている好中球由来の MMPs^{23,24)}、すなわち MMP-8, MMP-9 に対するビスフォスフォネートの活性抑制作用について、チルドロネートとエチドロネートを用い検討した。

材料と方法

1. ヒト好中球由来 MMPs の調製

本研究の主旨を説明し、同意の得られた喫煙習慣がない健康な男性 3 名 (25~27 歳) の末梢血をヘパリン加チューブ (Venoject II, Terumo, 東京) にて前腕の皮静脈より採取した。サンプルチューブ (Falcon 2096, Franklin Lake, NJ, U.S.A.) に Mono-Poly resolving medium (大日本製薬, 大阪) を 3 ml 入れ、その上に採取した血液 3.5 ml を重層した。その後、300×g で 30 分間、室温にて遠心分離し、好中球分画を採取した。好中球分画をリン酸緩衝生理食塩液 (PBS pH 7.4) に懸濁し、遠心操作にて 2 回洗浄

後、PBS にて 2×10^6 cells/ml の細胞浮遊液とした。この分離した PMN を氷温下で 5 分間 SONIFIER-450 (BRANSON, U.S.A.) を用いて超音波処理後、 $1,500 \times g$, 10 分間, 4°C の遠心操作によって得た上清をヒト好中球由来 MMPs 溶液とし、測定に供した。

2. ヒト好中球由来 MMPs 活性におよぼすビスフォスフォネートの影響

ビスフォスフォネートとしては、チルドロネート (4-chlorophenylthiomethylenebisphosphonic acid, Sanofi Inc., France より提供) (図 1) とエチドロネート (1-hydroxyethylidene-1,1-bisphosphonic acid, United States Pharmacopeial Convention, Inc., U.S.A.) (図 2) とを用いた。 1×10^6 cells/ml 相当のヒト好中球由来 MMPs 溶液にチルドロネート, エチドロネート, テトラサイクリン塩酸塩 (和光純薬, 大阪) を最終濃度が各々 1×10^{-3} M, 1×10^{-4} M, 1×10^{-5} M, 1×10^{-6} M になるよう希釈, 調製した。また、薬剤の無添加のものをコントロールとした。調製した各々の溶液を 37°C , 60 分間インキュベート後、MMP-8 活性および MMP-9 活性の測定に用いた。

3. MMP-8 活性の測定

ヒト好中球由来の MMP-8 の活性の測定には、FITC 標識コラーゲンをを用いた「I 型コラゲナーゼ活

図 1 チルドロネートの構造式

図 2 エチドロネートの構造式

性測定キット]²⁵⁾ (ヤガイ, 山形) を使用した。基質コラーゲン溶液 100 μ l に試料 100 μ l を加え (Blank にはキットの指示に従い精製水を試料として用いた), 37°C の恒温槽にて 4 時間, インキュベートした。さらに酵素反応停止液 (NaCl, 0-フェナントリン, 0.05 M トリス-塩酸バッファー, pH 9.5/エタノール) を 200 μ l 加え, 数秒間強く攪拌し, 30 分間室温で放置した。その後, 2,000 $\times$ g で 15 分間, 遠心し, 上清の蛍光強度を励起光 495 nm, 蛍光 520 nm にて分光蛍光光度計 (650-10 S, 日立, 東京) で測定した。

各種濃度のチルドロネート, エチドロネート, テトラサイクリン添加時の MMP-8 活性は, 無添加時の活性を 100 として%で算出した。

各種薬剤添加時の MMP-8 活性 (%) = [(検体の蛍光強度) - (Blank の蛍光強度) / (コントロールの蛍光強度) - (Blank の蛍光強度)] $\times$ 100

4. MMP-9 活性の測定

ヒト好中球由来 MMP-9 活性の測定には, FITC 標識 IV 型コラーゲンをういた「IV 型コラーゲナーゼ活性測定キット」^{25,26)} (ヤガイ, 山形) を使用した。基質 IV 型コラーゲン溶液 50 μ l に試料 50 μ l を加え (Blank にはキットの指示に従い精製水を試料として用いた), 室温にて 20 分間放置後, 42°C の恒温槽にて 6 時間, インキュベートした。さらにキット中の蛍光測定調整液を 300 μ l 加え, 攪拌し, 30 分間氷冷した。その後, 8,000 $\times$ g で 10 分間, 遠心し, 上清の蛍光強度を励起光 495 nm, 蛍光 520 nm にて分光蛍光光度計 (650-10 S, 日立, 東京) で測定した。

各種濃度のチルドロネート, エチドロネート, テトラサイクリン添加時の MMP-9 活性は, 無添加時の活性を 100 として%で算出した。

各種薬剤添加時の MMP-9 活性 (%) = [(検体の蛍光強度) - (Blank の蛍光強度) / (コントロールの蛍光強度) - (Blank の蛍光強度)] $\times$ 100

5. 統計学的検索

各々の検体についての測定は 5 回行い, 各濃度における MMP-8 活性および MMP-9 活性の変化について平均値 $\pm$ 標準偏差を求め, 一元分散分析および Fisher の PLSD 法による多重比較を用いて統計解析を行なった。

結 果

1. ビスフォスフォネートの MMP-8 活性におよぼす影響

チルドロネートは, 1×10^{-6} M, 1×10^{-5} M, $1 \times$

10^{-4} M, 1×10^{-3} M の各濃度において統計学的に有意な MMP-8 活性の抑制作用が認められた (図 3)。とくに, 1×10^{-3} M での MMP-8 活性は 28.5% であり, 1×10^{-6} M, 1×10^{-5} M, 1×10^{-4} M の各々 85.9%, 71.2%, 81.6% と比較しても統計学的に有意な MMP-8 活性の抑制作用が見られた ($p < 0.01$)。

エチドロネートでは, 1×10^{-6} M, 1×10^{-5} M, 1×10^{-4} M, 1×10^{-3} M での MMP-8 活性は, 各々 95.8%, 95.2%, 102.1%, 98.0% であり, 統計学的有意差は示さなかった。すなわち MMP-8 活性の抑制作用は認められなかった (図 4)。

塩酸テトラサイクリンにおいては, MMP-8 活性は 1×10^{-6} M, 1×10^{-5} M, 1×10^{-4} M の各濃度で各々 99.1%, 95.5%, 95.9% であり統計学的有意差は認められなかった。一方, 1×10^{-3} M においては, 70.1% であり, 統計学的に有意な MMP-8 活性の抑制作用が認められた ($p < 0.01$) (図 5)。

各薬剤間での MMP-8 活性の抑制作用を比較すると, 1×10^{-5} M, 1×10^{-4} M, 1×10^{-3} M のチルドロネートは, 同濃度のエチドロネートおよび塩酸テトラサイクリンに対し, 統計学的に有意な MMP-8 の活性抑制作用が見られた。塩酸テトラサイクリンは, エチドロネートと比較して, 1×10^{-3} M で統計学的に有意な MMP-8 活性の抑制作用が認められた ($p < 0.01$) (表 1)。

2. ビスフォスフォネートの MMP-9 活性におよぼす影響

チルドロネートでは, 1×10^{-6} M, 1×10^{-5} M, 1×10^{-4} M, 1×10^{-3} M の各濃度における MMP-9 活性は, 各々 97.7%, 86.6%, 47.5%, 20.2% で濃度依存的な MMP-9 活性の抑制作用が認められた ($p < 0.01$, ANOVA) (図 6)。 1×10^{-4} M, 1×10^{-3} M の濃度において, コントロールに比較して統計学的有意差が認められた ($p < 0.01$)。

エチドロネートにおいては, 1×10^{-6} M, 1×10^{-5} M, 1×10^{-4} M, 1×10^{-3} M の各濃度における MMP-9 活性は, 各々 93.7%, 82.7%, 60.7%, 28.0% であり, 濃度依存的な MMP-9 活性の抑制作用が認められた ($p < 0.01$, ANOVA) (図 7)。また, 1×10^{-4} M, 1×10^{-3} M の濃度において, コントロールに比較して統計学的有意差が認められた ($p < 0.01$)。

塩酸テトラサイクリンでは, 1×10^{-6} M, 1×10^{-5} M, 1×10^{-4} M, 1×10^{-3} M の各濃度における MMP-9 活性は, 各々 100.7%, 90.0%, 77.4%, 49.9% であり, 濃度依存的な MMP-9 活性の抑制作用が認められた ($p < 0.01$, ANOVA) (図 8)。また, 1×10^{-4} M, 1×10^{-3} M の濃度において, コントロールに比較

して統計学的有意差が認められた ($p < 0.01$)。

各薬剤間での MMP-9 活性の抑制作用を比較すると、 1×10^{-4} M, 1×10^{-3} M のチルドロネートは、同濃度の塩酸テトラサイクリンに対し、統計学的に有意な MMP-9 活性の抑制作用が見られた ($p < 0.01$)。また、 1×10^{-3} M のエチドロネートは、同濃度の塩酸テトラサイクリンに対し、統計学的に有意な MMP-9

活性の抑制作用が見られた ($p < 0.01$)。チルドロネートとエチドロネートの間には MMP-9 活性の抑制作用に統計学的有意差は認められなかった (表 2)。

考 察

プラークにより歯周組織に惹起された炎症は、コラーゲンをはじめとする歯周組織の基質成分の破壊・分解を亢進させる。その結果として、線維性付着の喪失や歯槽骨の吸収が起こる。この一連の現象の結果が歯周炎である。

細胞外基質の破壊に関係しているプロテアーゼには、セリンプロテアーゼ、システインプロテアーゼ、カルボキシプロテアーゼ、マトリックスメタロプロテアーゼ (MMPs) などがある^{27,28)}。なかでもコラゲナーゼに代表される MMP の一連の酵素群は、細胞外基質の破壊において中心的役割を果たすと考えられている。そして、歯周炎の進行における組織破壊でも、これらの MMPs は重要な役割を演じていると考えられている^{5~10,29)}。

現在の歯周治療は、歯周炎の直接原因である細菌を除去するための機械的プラークコントロール (ブラッ

図 3 チルドロネートによる MMP-8 活性の変化

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ (コントロールとの比較)

図 4 エチドロネートによる MMP-8 活性の変化

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ (コントロールとの比較)

図 5 塩酸テトラサイクリンによる MMP-8 活性の変化

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ (コントロールとの比較)

表 1 同一濃度の薬剤間での MMP-8 活性抑制効果の有意差

	薬剤の濃度 (M)			
	1×10^{-6}	1×10^{-5}	1×10^{-4}	1×10^{-3}
チルドロネート vs エチドロネート	ns	**	**	**
チルドロネート vs 塩酸テトラサイクリン	ns	**	*	**
エチドロネート vs 塩酸テトラサイクリン	ns	ns	ns	**

ns: 有意差なし * : $p < 0.05$ ** : $p < 0.01$

シング、スケーリング、歯肉剥離掻爬手術など）と化学的プラークコントロール（抗生物質、消毒薬など）とが主体をなしている。

その一方で、組織破壊に関与する酵素などの活性や産生を抑制する方法も試みられている。その代表的なものとして、NSAIDs（非ステロイド性抗炎症薬）、テトラサイクリン系抗生物質（塩酸テトラサイクリン、ミノサイクリン、ドキシサイクリンなど）、さらにはテトラサイクリンと類似した化学構造を持つものの抗菌作用を有していない CMT（chemically modified tetracycline）は、その投与により歯周炎による歯槽骨の吸収を抑制できることが示されている^{4,11-15,30-34}。

ビスフォスフォネートは、強力な破骨細胞の抑制作用を有することから、骨粗鬆症、パーチェット病、悪性腫瘍にともなう高カルシウム血症などの骨代謝異常症の治療に用いられている¹⁶⁻¹⁸。その破骨細胞抑制作用に着目し、歯周病の進行を抑制しようとの試みもなされている^{19,20}。

一方、Teronen ら^{21,22}は、ビスフォスフォネートの一種であるクロドロネートが MMP-1, MMP-8 の活性を阻害することを報告している。本研究の結果で

も、ビスフォスフォネートの一種であるチルドロネートおよびエチドロネートに、MMP-8, MMP-9 の活性抑制作用が見られた。MMPs は、細胞質内では潜在型 MMPs として産生され、細胞外にて活性型となり、その基質分解能力を発揮する。したがって、MMPs の作用を抑制する機序としては、MMPs の mRNA への転写の抑制、MMPs のタンパク質の合成

図7 エチドロネートによる MMP-9 活性の変化

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ (コントロールとの比較)

図6 チルドロネートによる MMP-9 活性の変化

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ (コントロールとの比較)

図8 塩酸テトラサイクリンによる MMP-9 活性の変化

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ (コントロールとの比較)

表2 同一濃度の薬剤間での MMP-9 活性抑制効果の有意差

	薬剤の濃度 (M)			
	1×10 ⁻⁶	1×10 ⁻⁵	1×10 ⁻⁴	1×10 ⁻³
チルドロネート vs エチドロネート	ns	ns	ns	ns
チルドロネート vs 塩酸テトラサイクリン	ns	ns	**	**
エチドロネート vs 塩酸テトラサイクリン	ns	ns	ns	*

ns : 有意差なし * : $p < 0.05$ ** : $p < 0.01$

阻害, MMPs の細胞外への放出の阻害, MMPs の酵素自体に対する活性阻害が考えられる。本研究では, 前原ら¹²⁾, 工藤ら³⁵⁾がすでに用いている方法に準じてヒト好中球を超音波破碎した上清を好中球の MMPs として, その活性を測定した。したがって, 本研究では, 好中球の MMP-8 と MMP-9 との活性型酵素に対する抑制作用を観察していることになる。

一般に, MMPs は細胞内で合成されるときに細胞外に放出され, 細胞質内に貯蔵されない。しかし, 好中球の MMPs は, 好中球の成熟とともに顆粒中に形成, 貯蔵されており, 脱顆粒により, MMPs が細胞外に放出されると考えられており, その細胞内での挙動は他の MMPs とは異なっている²⁹⁾。歯周炎におけるコラーゲンの破壊に関わるコラゲナーゼには MMP-1 (線維芽細胞由来)^{36~38)}, MMP-8 (好中球由来)^{39,40)} と細菌由来のコラゲナーゼ^{41,42)} とが関与していると考えられる。すなわち, 歯周炎により増加した歯周組織中の interleukin-1 (IL-1) や tumor necrosis factor TNF などのサイトカインにより線維芽細胞からの MMP-1 の産生を促進する場合, 歯周組織の炎症局所に浸潤した好中球の脱顆粒により MMP-8 が放出される場合, プラーク中の細菌より産生されたコラゲナーゼが放出される場合である。しかしながら, 成人性歯周炎の場合, 歯肉溝滲出液中に含まれるコラゲナーゼは, MMP-1 や細菌由来のコラゲナーゼではなく MMP-8 が主体であることが報告されている^{23,24)}。また, 脱顆粒により MMP-8 が好中球より放出されるということは, 同時に好中球中の顆粒に含まれている MMP-9 の放出も伴っていると考えられる。そして, MMP-9 の放出は基底膜などの破壊を惹起する。したがって, 成人性歯周炎において, 好中球由来の MMPs による基質分解作用の抑制は重要となってくる。

さらに, 近年, 好中球のみが産生すると考えられていた MMP-8 が軟骨細胞や線維芽細胞からも産生されることが, これらの細胞が MMP-8 の mRNA を発現することから示され, さらに, MMP-8 の mRNA の発現が IL-1 などにより上昇することも報告されている⁴²⁾。しかし, 線維芽細胞や軟骨細胞から MMP-8 が酵素として, まだ, 分離, 精製されているわけではない。そして, その基質分解能が好中球由来の MMP-8 と同様であるかの詳細も明らかではないものの, 好中球以外の細胞からも MMP-8 が歯周炎部位に放出されるのであれば, MMP-8 の活性の抑制は歯周炎の進行の抑制において, さらに大きな意味を持つことになると考えられる。

本研究の対照として用いた塩酸テトラサイクリン,

また, その他のテトラサイクリン系抗生物質, さらにはテトラサイクリンと類似した化学構造を持つものの抗菌作用を有していない CMT は, すでに MMPs の活性抑制作用を有することが報告されている^{11~15,33,34)}。この MMPs に対する抑制作用はテトラサイクリンの有するキレート作用によると考えられている。MMPs の活性の安定化には, Ca^{2+} イオンの存在が重要であると考えられており⁴⁴⁾, キレート剤として最も一般的な EDTA も *in vitro* において, MMPs の活性を抑制することが報告されている^{44,45)}。ビスフォスフォネートは, ピロリン酸のアナログであり, キレート作用を有している¹⁶⁾。したがって, 本研究に用いたチルドロネートおよびエチドロネートの MMP-8 と MMP-9 の活性抑制作用は, キレート作用によるものと考えられる。キレート剤による MMPs の活性抑制作用の機序は, 前述したように MMPs の活性の安定化に必要な Ca^{2+} イオンがキレート剤に結合することによるとの考え方が最も一般的である。しかしながら, MMPs は活性中心に Zn^{2+} イオンが必ず存在しており, キレート剤が MMPs 分子中の Zn^{2+} イオンと結合することにより, その活性を失わせる可能性も否定できない。

テトラサイクリン系抗生物質の MMPs の活性抑制作用は, 同一ではなく, ドキシサイクリン, ミノサイクリン, テトラサイクリンの順で MMPs の活性抑制作用が強いことが報告されている^{11,12)}。また, 本研究で用いたビスフォスフォネートについても, MMP-8 と MMP-9 とに対する活性抑制作用はエチドロネートに比べチルドロネートの方が強かった。また, Teronen ら²²⁾は, 1×10^{-4} M のクロドロネートにより約 80% の MMP-8 の活性抑制作用を報告しており, 本研究のチルドロネートとほぼ同様の結果である。テトラサイクリン系薬剤と同様に, ビスフォスフォネートの中でも MMPs の活性抑制作用が様々であると考えられる。また, その強度は, キレート作用の強さがそのまま反映しているのかについては, さらに検討が必要である。

破骨細胞による骨吸収が起こるためには, 骨芽細胞による骨表面の基質の分解が先だって起こり骨の石灰化層を露出させる必要がある。そして, このとき骨芽細胞の産生する MMP-1 などがその骨表面の基質分解に作用していると考えられている⁴⁶⁾。さて, ビスフォスフォネートは, 本実験結果に示すように MMP-8, MMP-9, さらには Teronen ら^{21,22)}が示すように MMP-1 などの MMPs の活性抑制作用を有している。従来, ビスフォスフォネートの作用は, 骨のハイドロキシアパタイト結晶に結合したビスフォスフォ

ネートが破骨細胞に取り込まれ、破骨細胞の機能を抑制すると考えられている¹⁶⁻¹⁸⁾。しかし、ビスフォスフォネートの投与により、骨芽細胞の産生する MMPs の活性抑制作用が起こり、骨表面の基質分解も抑制されて、破骨細胞が骨吸収のために接着すべき骨の石灰化した層が露出しない。すなわち、破骨細胞が骨吸収を起こすための場の形成の阻害により骨吸収が抑制されるという間接的に破骨細胞の機能を抑制するという前述した機序とは異なるビスフォスフォネートの骨吸収抑制作用の存在が考えられる。

ビスフォスフォネートは、テトラサイクリンと同様に MMP-8, MMP-9 の活性抑制作用を有しており、特にチルドロネートではその作用はテトラサイクリンを上回るものであった。また、従来から知られているようにビスフォスフォネートは、破骨細胞の機能抑制作用を有している。したがって、これら 2 つの機能を有するビスフォスフォネートは、歯周治療における有用な新治療薬となり得ることが示唆された。

文 献

- Listgarten, M.A. and Helldén, L. : Relative distribution of bacteria and periodontally diseased sites in humans. J. Clin. Periodontol., 5 : 115-132, 1978.
- Tanner, A.C.R., Haffer, G.T., Visconti, R.A. and Scoransky, S.S. : A study of the bacteria associated with advancing periodontitis in man. J. Clin. Periodontol., 6 : 278-307, 1979.
- Page, R.C. : The role of inflammatory mediators in the pathogenesis of periodontal disease. J. Periodont. Res., 26 : 230-242, 1991.
- Howell, T.H. : Blocking periodontal disease progression with anti-inflammatory agents. J. Periodontol., 64 : 828-833, 1993.
- Kryshtalskiy, E., Sodek, J. and Ferrier, J.M. : Correlation of collagenolytic and inhibitors in gingival crevicular fluid with clinical and microscopic changes in experimental periodontitis. Arch. Oral Biol., 31 : 21-31, 1986.
- Larivee, J., Sodek, J. and Ferrier, J.M. : Collagenase and collagenase inhibitor activities in crevicular fluid of patients receiving treatment for localized juvenile periodontitis. J. Periodont. Res., 21 : 702-715, 1986.
- Kryshtalskiy, E. and Sodek, J. : Nature of collagenolytic enzyme and inhibitor in crevicular fluid from healthy and inflamed periodontal tissues of beagle dogs. J. Periodont. Res., 22 : 264-269, 1987.
- Villela, B., Cogen, R.B., Bartolucci, A.A. and Birkedal-Hansen, H. : Collagenolytic activity in crevicular fluid from patients with chronic adult periodontitis, localized juvenile periodontitis and gingivitis, and from healthy control subjects. J. Periodont. Res., 22 : 381-389, 1987.
- Gangbar, S., Overall, C.M., McCulloch, A.G. and Sodek, J. : Identification of polymorphonuclear leukocyte collagenase and gelatinase activities in mouthrinse samples : Correlation with periodontal disease activity in adult and juvenile periodontitis. J. Periodont. Res., 25 : 257-267, 1990.
- Birkedal-Hansen, H. : Role of matrix metalloproteinases in human periodontal diseases. J. Periodontol., 64 : 474-484, 1993.
- Golub, L.M., Ramamurthy, N.S., McNamara, T. F., Gomes, B., Wolff, M., Ciancio, S., and Perry, H. : Tetracyclines inhibit tissue collagenase activity : A new mechanism in the treatment of periodontal disease. J. Periodontol. Res., 19 : 651-655, 1984.
- 前原玲子, 日野出大輔, 寺井 浩, 佐藤 誠, 中村 亮, 松田尚樹, 田中敏之, 杉原邦夫 : テトラサイクリン系抗生物質による *Bacteroides gingivalis* およびヒト由来コラゲナーゼ活性の阻害について. 日歯周誌, 30 : 182-190, 1988.
- Suomalainen, K., Sorsa, T., Ingman, T., Lindy, O., and Golub, L.M. : Tetracycline inhibition identifies the cellular origin of interstitial collagenases in human periodontal disease *in vivo*. Oral Microbiol. Immunol., 7 : 121-123, 1992.
- Ingman, T., Sorsa, T., Suomalainen, K., Halinen, S., Lindy, O., Lauhio, A., Saari, H., Konttinen, Y. T. and Golub, L. : Tetracycline inhibition and the cellular source of collagenase in gingival crevicular fluid in different periodontal diseases. A review article. J. Periodontol., 64 : 82-88, 1993.
- Mea, A.W. and Michael, B. : Tetracycline and its analogues : a therapeutic paradigm in periodontal diseases. Crit. Rev. Oral Biol. Med., 9 : 322-332, 1998.
- Fleisch, H. : Bisphosphonates : Pharmacology and use in the treatment of tumor-induced hypercalcaemic and metastatic bone disease. Drugs, 42 : 919-944, 1991.
- Lin J.H. : Bisphosphonate : A review of their pharmacokinetic properties. Bone, 2 : 75-85, 1996.
- 村上博志, 安部允泰 : ビスホスホネートの骨吸収抑制作用. 組織培養工学, 23 : 444-447, 1997.
- Brunsvold, M.A., Chaves, E.S., Kornman, K.S., Aufdemorte, T.B. and Wood, R. : Effects of a

- bisphosphonate on experimental periodontitis in monkeys. J. Periodontol., 63 : 825-830, 1992.
- 20) Reddy, M.S., Weatherford, T.W. III, Smith, C.A., West, B.D., Jeffcoat, M.K. and Jack, T.M. : Alendronate treatment of naturally occurring periodontitis in beagle dogs. J. Periodontol., 66 : 211-217, 1995.
 - 21) Teronen, O., Konttinen, Y.T., Lindqvist, C., Salo, T., Ingman, T., Lauhio, A., Ding, A., Santavirta, S., Valleala, H. and Sorsa, T. : Inhibition of matrix metalloproteinase-1 by dichloromethylene bisphosphonate (clodronate). Calcif. Tissue Int., 61 : 59-61, 1997.
 - 22) Teronen, O., Konttinen, Y.T., Lindqvist, C., Salo, T., Ingman, T., Lauhio, A., Ding, Y., Santavirta, S. and Sorsa, T. : Human neutrophil collagenase MMP-8 in peri-implant sulcus fluid and its inhibition by clodronate. J. Dent. Res., 76 : 1529-1537, 1997.
 - 23) Sorsa, T., Uitto, V., Suomakainen, K., Vauhkonen, M. and Lindy, S. : Comparison of interstitial collagenases from human gingiva, sulcular fluid and polymorphonuclear leukocytes. J. Periodont. Res., 23 : 386-393, 1988.
 - 24) Sorsa, T., Ding, Y., Ingman, T., Salo, T., Westerland, U., Haapasalo, M., Tschesche, H. and Konttinen, Y.T. : Cellular source, activation and inhibition of dental plaque collagenase. J. Clin. Periodontol., 22 : 709-717, 1995.
 - 25) 永井 裕, 堀 久枝, 服部俊治, 砂田泰伸, 寺戸国昭, 橋田亮一, 宮本和代 : コラゲナーゼ活性の簡易微量測定法とその応用 part I FITC-標識コラーゲンをを用いたコラゲナーゼ微量測定法. 炎症, 4 : 123-130, 1984.
 - 26) Otani, Y. : The collagenase activities, interstitial collagenase and type IV collagenase, in human stomach cancer : with special reference to local spreading and lymph node metastasis. Keio J. Med., 39 : 159-167, 1990.
 - 27) Tryggvason, K., Höyhty, M. and Salo, T. : Proteolytic degradation of extracellular matrix in tumor invasion. Biochimica. Biophysica. Acta., 907 : 191-217, 1987.
 - 28) 今井一志, 岡田保典 : 細胞外マトリックスの代謝とマトリックス分解酵素, 岩田 久, 別冊 医学のあゆみ 細胞外マトリックス, 医歯薬出版, 東京, 1997, 31-35.
 - 29) Birkedal-Hansen, H., Moore, W.I.G., Boedden, M. K., Windsor, L.J., Birkedal-Hansen, B., DeCarlo, A. and Engler, J.A. : Matrix metalloproteinase : A review. Crit. Rev Oral Biol. Med., 4 : 197-250, 1993.
 - 30) Nyman, S., Schroeder, H.E. and Lindhe, J. : Suppression of inflammation and bone resorption by indomethacin during experimental periodontitis in dogs. J. Periodontol., 50 : 450-461, 1979.
 - 31) Dybving, M.W., Sanavi, F., Zander, H. and Rifkin, B.R. : The effect of indomethacin on alveolar bone loss in experimental periodontitis. J. Periodont. Res., 17 : 90-100, 1982.
 - 32) Lasfargues, J.J. and Saffar, J.L. : Effect of indomethacin on bone destruction during experimental periodontal disease in the hamster. J. Periodont. Res., 18 : 110-117, 1983.
 - 33) Golub, L. M., McNamara, T. F., D'angelo, G., Greenwald, R.A. and Ramamurthy, N.S. : A non-antibacterial chemically-modified tetracycline inhibits mammalian collagenase activity. J. Dent. Res., 66 : 1310-1314, 1987.
 - 34) Yu, Z., Ramamurthy, N.S., Leung, M., Chang, K. M., McNamara, T.F. and Golub, L.M. : Chemically-modified tetracycline normalizes collagen metabolism in diabetic rats : A dose-response study. J. Periodont. Res., 28 : 420-428, 1993.
 - 35) 工藤功美子, 斎藤明子, 須藤和彦, 足立正一, 猪飼篤, 大藤泰人, 武内義晴, 吉江弘正, 原 耕二 : *Bacteroides gingivalis* 培養上清, ヒト末梢多形核白血球, 及びヒト歯肉溝滲出液中のコラゲナーゼ活性に対するチキン・オボマクログロブリンの抑制効果. 日歯周誌, 30 : 1061-1069, 1988.
 - 36) Richards, D. and Rutherford, R.B. : The effects of interleukin 1 on collagenolytic activity and prostaglandin-E secretion by human periodontal ligament and gingival fibroblast. Archs. Oral Biol., 33 : 237-243, 1988.
 - 37) Richards, D. and Rutherford, R.B. : Interleukin-1 regulation on of procollagenase mRNA and protein in periodontal fibroblasts in vitro. J. Periodont. Res., 25 : 222-229, 1990.
 - 38) Ohshima, M., Otsuka, K. and Suzuki, K. : Interleukin-1 β stimulates collagenase production by cultured human periodontal ligament fibroblasts. J. Periodont. Res., 29 : 421-429, 1994.
 - 39) Ohlsson, K., Olsson, I. and Tynelius-Bratthall, G. : Neutrophil leukocyte collagenase, elastase and serum protease inhibitors in human gingival crevices. Acta. Odont. Scand., 31 : 51-59, 1973.
 - 40) Kobayashi, S. and Nagai, Y. : Human leukocyte neutrophil proteases, with special reference to collagen metabolism. J. Biochem., 84 : 559-567, 1978.
 - 41) Gibbons, G.J. and Macdonald, J.B. : Degradation of collagenous substrates by *Bacteroides*

- melaninogenicus*. J. Bacteriol., 81 : 614-620, 1961.
- 42) Toda, Y., Otsuka, M., Ishikawa, Y., Sato, M. and Nakamura, R. : Thiol-dependent collagenolytic activity in culture media of *Bacteroides gingivalis*. J. Periodont. Res., 19 : 372-381, 1984.
- 43) Cole, A.A., Chubinskaya, S., Schmacher B., Huch, K., Cs-Sazbo, G., Yao, J., Mikecz, K., Hasty, K.A. and Kuettner, K.E. : Chondrocyte matrix metalloproteinase-8. J. Biol. Chem., 271 : 11023-11026, 1996.
- 44) Okada, Y., Nagase, H. and Harris, E.D. Jr. : A metalloproteinase from human rheumatoid synovial fibroblasts that digests connective tissue matrix components. J. Biol. Chem., 261 : 14245-14255, 1986.
- 45) Murphy, G., Reynolds, J.J., Bretz, U. and Baggiolini, M. : Partial purification of collagenase and gelatinase from human polymorphonuclear leucocytes. Analyses of their actions on soluble and insoluble collagens. Biochem. J., 203 : 209-221, 1982.
- 46) Sakamoto, S. and Sakamoto, M. : Biochemical and immunohistochemical studies on collagenase in resorbing bone in tissue culture. J. Periodont. Res., 17 : 523-526, 1982.

連絡先 :

日本歯科大学歯学部歯周病学教室

〒102-8158 東京都千代田区富士見 2-3-16