Ca拮抗薬（アムロジピン）が培養ヒト歯肉線維芽細胞に及ぼす影響

江連雅孝^{*1} 稲田全規^{*1} 橋本尚詞^{*2}
石川 博^{*2} 河村 博^{*3} 鴨井久一^{*1}

^{*1}日本歯科大学歯学部歯周病学教室

^{*2}東京慈恵会医科大学医学部解剖学講座第二

^{*3}日本歯科大学歯学部内科学教室

(1999年10月9日受理)

Ca Channel Blocker (Amlodipine) Effects on Human Gingival Fibroblasts in Tissue Culture

Masataka Ezure^{*1}, Masaki Inada^{*1}, Hisashi Hashimoto^{*2},
Hiroshi Ishikawa^{*2}, Hiroshi Kawamura^{*3} and Kyuichi Kamoi^{*1}

^{*1}Department of Periodontology, School of Dentistry at Tokyo, The Nippon Dental University

^{*2}Department of Anatomy (II), The Jikei University School of Medicine

^{*3}Department of Internal Medicine, School of Dentistry at Tokyo The Nippon Dental University

Accepted for publication 9 October 1999

The effects of amlodipine, a third generation dihydropyridine calcium antagonist, on human gingival fibroblasts were investigated *in vitro*. The growth of fibroblasts obtained from an intact donor was inhibited by amlodipine in a concentration-dependent manner. Amlodipine reduced the growth rate, DNA synthesis and oxygen consumption of the fibroblasts. Furthermore, the addition of amlodipine in culture media changed the spindle-like appearance of adherent fibroblasts to round shapes, caused cell detachment from the culture plate and decreased cell viability. In addition, the presence of amlodipine prevented the fibroblasts floating in suspension from attaching to the culture plate and severely decreased the viable cell rate. These results indicate that amlodipine has no profitable action, but shows inhibitory effect on human gingival fibroblast *in vitro*. This finding suggests that gingival hyperplasia induced by amlodipine is not ascribed to the direct action of amlodipine on gingival fibroblasts. J. Jpn. Soc. Periodontol., 41: 371~379, 1999.

Key words : amlodipine, human gingival fibroblasts, gingival hyperplasia

要旨：本研究はジヒドロピリジン系の第三世代Ca拮抗薬であるアムロジピンが培養ヒト歯肉線維芽細胞に及ぼす影響を検討した。アムロジピンは歯肉線維芽細胞の増殖を濃度依存的に抑制した。アムロジピンによって歯肉線維芽細胞の細胞分裂、DNA合成、酸素消費が抑制された。アムロジピンによって細胞の大きさが小さくなり、形態も紡錘形から円形に変化した。アムロジピンの存在下で細胞の接着率は低下し、これに伴って生細胞率が減少した。以上のことより、アムロジピンは培養ヒト歯肉線維芽細胞の代謝を抑え増殖を抑制することが明らかとなった。これらより、Ca拮抗薬による歯肉増殖の発症は、Ca拮抗薬の歯肉線維芽細胞への直接作用による増殖促進が引き起こされた結果として生じるのではない可能性を示唆している。

索引用語：アムロジピン、ヒト歯肉線維芽細胞、歯肉増殖症

結 言

薬物の副作用による歯肉増殖症については1939年のKimball¹⁾が抗てんかん薬であるフェニトインによる報告以来、免疫抑制剤のサイクロスポリンA²⁾、Ca拮抗薬のニフェジピン^{3,4)}等、多数の報告がある。これら歯肉増殖症の発症は口腔衛生状態の改善による予防および再発防止の報告⁵⁻⁷⁾があるが、他方、プラーク等の除去では発症を抑制できないとの報告⁸⁻¹¹⁾もあり、歯周病原性因子と歯肉増殖症の進行に関する一定の見解は得られていない。また、服用量や服用期間と歯肉増殖症の発症の機序^{5-7,12)}や重症度¹³⁻¹⁵⁾との関連が検討されたが、現在のところ明確な指標は見い出されていない。とりわけCa拮抗薬は、循環器系疾患の治療薬として用いられていることから中高年者に高頻度に服用され、歯肉増殖症を含む歯周病の増悪因子としての関連が論じられてきた。さらに、ジヒドロピリジン系薬剤の第一世代のCa拮抗薬であるニフェジピンの内科的なその副作用を改善するために、新たに開発されたCa拮抗薬でも歯肉増殖症が発症する¹⁶⁻¹⁹⁾と報告され、Ca拮抗薬の基本的な化学構造式に由来して歯肉増殖症が発症することが推察される。ジヒドロピリジン系の第三世代のCa拮抗薬として開発したアムロジピンは、高血圧疾患に対する降圧効果は緩徐であるが長時間持続することの特徴とし、使用頻度が増加している。アムロジピンの優れた薬理作用と副作用の減少により、歯肉増殖症の発症も軽減することが期待されたが、その後の研究により歯肉増殖症の発症が確認された²⁰⁻²²⁾。しかしながら、アムロジピンによる歯肉増殖症の発症機序を検討した報告は未だ見られない。そこで本研究はアムロジピンがヒト正常歯肉由来の線維芽細胞に及ぼす影響を検討した。

材料および方法

ヒト歯肉線維芽細胞の培養

ヒト歯肉線維芽細胞は日本歯科大学歯学部附属病院に来院した患者より十分にインフォームドコンセントを得て採取し、以下の方法で培養することにより得られた。歯肉組織片を採取後、リン酸緩衝液[PBS(): Ca free phosphate-buffered saline]で数回洗浄し、歯肉組織を細片化して10%ウシ胎仔血清(FBS), Penicillin (50 U/ml) -Streptomycin (50 µg/ml) (GIBCO社・米国), NaHCO₃ (2.1 g/l) を含むα-Minimum Essential Medium (α-MEM) (GIBCO社・米国) を入れた培養シャーレ上に静置

し、増殖してきた歯肉線維芽細胞をOut Growth法²³⁾を用いて分離・培養した。細胞はα-MEMを成長培地として用い、5% CO₂を含む気相下で37°Cにて継代培養した。実験には5代から7代まで継代した細胞を正常歯肉線維芽細胞として供した。

1) 細胞増殖曲線の作成

60 mm 培養シャーレに 1.2×10^5 個の細胞を播種し、24時間後から、 $1 \times 10^{-7} \sim 1 \times 10^{-4}$ mol/l (以下M)のアムロジピンを添加した。アムロジピン処理濃度はニフェジピンを用いた西川ら²⁴⁾の報告を参考とし決定した。全実験に使用したアムロジピンは希釈溶媒に溶解後、各最終濃度となるように培養液を調整した。コントロールは処理群と同量の溶媒のみを添加して実験を行った。添加後24, 48, 72, 96, 120時間目に0.1% Trypsin-0.02% EDTA/PBS (一)にて細胞を剥離後、遠沈管に回収し、1,000回転で10分間遠心後、血球計算盤にて細胞数を求めた。また、72時間後の細胞数より細胞増殖率を計算した。

2) DNA合成の測定

DNA合成能はELISA法(Enzyme-linked immunosorbent assay)により測定した。歯肉線維芽細胞を96穴プレート中に 1×10^3 cells/wellの細胞数で播種し、培養開始24時間後にアムロジピンを $10^{-7} \sim 10^{-4}$ M添加し、72時間作用させた。ELISA法はCell proliferation assay system (Amersham社製、米国)を用いた。その原理は細胞培養液にBromodeoxyuridine (BrdU)と1/10量のfluoro-deoxyuridineを加えて2時間インキュベートし、DNA合成期の細胞核にBrdUを取り込ませた後、アセトン/エタノールで細胞を固定する。PBS (一)で洗浄後、3% BSAでブロッキングし、ヌクレアーゼの存在下に抗BrdU抗体と反応させ、さらに洗浄後、ペルオキシダーゼ標識の二次抗体と反応させる。その後、ペルオキシダーゼの発色基質溶液で一定時間反応させた後、反応を停止させ、溶液の410 nmにおける吸光度を測定する方法である。実験はこのプロトコールに従って行い、410 nmの吸光度はマイクロプレートリーダー[MPR-A 4 i (東ソー社製・東京)]を用いて測定した。

3) 細胞培養液中における溶存酸素量の測定

アムロジピンによる歯肉線維芽細胞の基礎代謝の変化を、細胞の酸素消費量を指標として検討した。細胞培養液中の溶存酸素量の測定にはクラーク式電極法を用いた溶存酸素測定装置: DOX-10 (ダイキン社製、茨城)を用いた²⁵⁾。歯肉線維芽細胞を0.1% Trypsin/0.02% EDTA含有PBS (一)にて剥離後、細胞を遠沈管に回収して1,000回転で10分間遠心した。得られた細胞を 1×10^6 , 2×10^6 , 4×10^6 cells/mlの濃

度で細胞懸濁液を調整し、細胞濃度による酸素消費量の検討に用いた。また、 2×10^6 cells/ml に調整された歯肉線維芽細胞にアムロジピンを 10^{-5} 、 10^{-4} M で作用させ、酸素消費量の変化を検討した。各実験における細胞懸濁液は調整直後に実験に使用し、測定開始から 60 分間の酸素消費量の変化を解析した。

4) 歯肉線維芽細胞の形態変化に対する検討

アムロジピンによる細胞形態の変化を検討するために、細胞播種時にアムロジピンを添加する群 (同時添加群) と播種 24 時間後にアムロジピンを添加する群 (接着後添加群) に分け、実験を行った。アムロジピンの添加濃度は 10^{-4} M とし、細胞の形態と接着に及ぼす影響を、アムロジピン添加後から 1, 6, 24 時間後に位相差顕微鏡を用い観察した。

5) 接着性細胞率とトリパンプルー排斥試験

4) と同様の実験においてアムロジピン添加 24 時間後の培養上清に検出される細胞を浮遊細胞画分とし、付着細胞は 0.1% Trypsin/0.02% EDTA 含有 PBS (一) で剥離して付着細胞画分とした。両画分の細胞数を血球計算盤を用いてカウントし、付着細胞/全細胞数により接着率を求めた。生存細胞率の検討は、トリパンプルー排斥試験²⁶⁾により求めた。両画分の細胞懸濁液 (1.5 ml) に 0.4% トリパンプルー染色液 (0.5 ml) を混合し、染色陽性を死細胞、染色陰性を生細胞として全細胞に対する生細胞の割合を生存細胞率とした。

統計学的検索

統計処理には student の *t*-検定を用いた。

結 果

1) アムロジピンの細胞増殖に及ぼす影響

アムロジピンが歯肉線維芽細胞の増殖に及ぼす作用を検討するために、アムロジピン濃度別の細胞増殖曲線を作成した (図 1)。歯肉線維芽細胞の増殖は対照群と比較してアムロジピン 10^{-7} M の添加群より抑制され、 10^{-4} M 添加群において最も顕著に抑制された。また、細胞増殖率の結果から、細胞増殖はアムロジピン 10^{-7} M 添加群で 26.8% ($p < 0.05$)、 10^{-6} M で 33.3% ($p < 0.05$)、 10^{-5} M で 38.3% ($p < 0.01$) 抑制され、 10^{-4} M の添加では 49.4% ($p < 0.001$) となり、増殖抑制は濃度依存的であった (図 2)。

2) アムロジピン添加による DNA 合成能の変化

アムロジピン添加による歯肉線維芽細胞の DNA 合成能の変化を ELISA 法を用いて検討した結果、歯肉線維芽細胞の DNA 合成はアムロジピンの濃度依存的に抑制された。各作用濃度における DNA 合成の抑制

図 1 アムロジピン処理による細胞増殖曲線の変化 (n=3)

アムロジピン処理による細胞増殖の抑制傾向が認められた。

図 2 細胞増殖の抑制 (n=3)

アムロジピン処理濃度依存的に細胞増殖の抑制が認められた。

は、 10^{-7} M 添加群で 10.2% ($p < 0.05$)、 10^{-6} M 添加群で 25.8% ($p < 0.01$)、 10^{-5} M 添加群で 31.7%、 10^{-4} M 添加群では 52.3% であった (図 3)。これらの結果は、細胞増殖曲線で得られたアムロジピン添加による歯肉線維芽細胞の増殖抑制の結果と関連性が認められた。

3) アムロジピン添加による歯肉線維芽細胞の酸素消費量の変化

細胞の代謝変化を細胞呼吸による酸素消費量の変化としてとらえるために、細胞培養液中の酸素消費量の測定をおこない、歯肉線維芽細胞の基礎代謝を検討した(図4-1)。

細胞数を段階的に増加させ、容存酸素量を測定した結果から、 1×10^6 個/ml の細胞数で1時間に0.30 ppm, 2×10^6 個/ml の細胞数で0.69 ppm, 4×10^6 個/ml の細胞数で0.95 ppm の酸素消費が確認され、細胞数に比例した酸素消費量の増加が認められた。また、アムロジピン添加によりこれらの細胞呼吸は抑制され、対照群と比較して 10^{-5} M 添加群で53.9%, 10^{-4} M 添加群で55.2% の酸素消費の抑制が認められ

図3 DNA 合成能の変化 (n=3)

アムロジピン処理濃度依存的に DNA 合成の阻害が認められた。

図4-1 細胞数による酸素消費量の変化 (n=3)

細胞数に比例した酸素消費量の増加が認められた。

た(図4-2)。

4) アムロジピンによる歯肉線維芽細胞の形態的変化

歯肉線維芽細胞の播種後24時間に、対照群では経時的に接着する細胞が増加した。一方、播種時にアムロジピンを添加した同時添加群では、播種24時間後でもプレート上に接着する細胞はほとんど認められなかった(図5-1)。また、歯肉線維芽細胞がプレート上に接着した後にアムロジピンを添加した接着後添加群では作用時間に依存して細胞が縮小し、円形の細胞や浮遊性の細胞が増加した。対照群では紡錘形の典型的な歯肉線維芽細胞が認められた(図5-2)。

同時添加群における細胞接着率は、対照群では98%であるのに対して10%以下であり、細胞接着の有意な減少を示した。(p<0.001)。一方、接着後添加群における細胞接着率は、対照群の98%に対して55%であり、細胞接着は有意に減少した。(p<0.001)。アムロジピン添加による細胞接着の減少は、添加方法に関わらず認められたが、同時添加群においてより顕著であった。(p<0.001)(図6)。

5) トリパンプルー排斥試験の検討

トリパンプルー排斥試験による生細胞率はアムロジピン同時添加群では $28.3 \pm 4.3\%$ 、接着後添加群では $61.4 \pm 0.65\%$ であり、両群とも対照群と比較して有意に減少し同時添加群においてより顕著であった(p<0.001)(図7)。

図4-2 アムロジピンによる細胞呼吸の抑制 (n=3)

アムロジピン処理濃度依存的に細胞の酸素消費は低下し、呼吸の抑制が認められた。

図 5-1 アムロジピンによる歯肉線維芽細胞の形態変化 (n=3)

コントロール；1時間後細胞が付着し始める。6時間後細胞が付着をし極性化が徐々に認められる。24時間後細胞は線維芽細胞の特徴的形態を示している。

図 5-2 アムロジピンによる歯肉線維芽細胞の形態変化 (n=3)

コントロール；1時間後，6時間後，24時間後，細胞は紡錘形を示し，細胞分裂像も認められる。また経時的に細胞数の増加が認められる。

図 6 細胞接着率の変化 (n=3)

アムロジピン添加による接着性細胞の減少は、添加方法に関わらず認められたが、同時添加群においてより顕著であった。

図 7 アムロジピン添加による生細胞率の変化 (n=3)

添加方法に関わらず生細胞の減少が認められたが、同時添加群においてより顕著であった。

考 察

Ca 拮抗薬は 1970 年代はじめに抗狭心症薬として開発された。1972 年に Schamroth ら²⁷⁾が頻拍性心房細動に応用し、1974 年に Kinkler と Spurrell²⁸⁾は発作性上室性頻拍症に対する効果、1981 年に Kimura と Kishida²⁹⁾が異型狭心症等の心疾患に対する効果について報告している。Ca 拮抗薬は従来の降圧薬に比べ、より強力な降圧効果を発揮することに加えて中枢神経系および代謝系への影響が少ないことで汎用されてき

た³⁰⁾。最近、これら Ca 拮抗薬を血管拡張や降圧作用などの薬効により分類するという流れがある³¹⁾。ニフェジピンは 1971 年に Bossert と Vater³²⁾により抗狭心症薬として開発され、1972 年に Murakami ら³³⁾が高血圧合併例に対し降圧作用があると報告し、第 1 世代薬として高血圧の薬物療法に大きな影響を与え、使用頻度は著しく増加した。ニフェジピンはジヒドロピリジン系に分類され、25 年以上にわたって使用されてきたが、新規の Ca 拮抗薬の開発により転換期を迎えようとしている。第 3 世代の Ca 拮抗薬であるアムロジピン³⁴⁾は、循環器疾患では優れた治療効果を発揮し、高血圧症や狭心症に対する治療薬として世界中で広く使用されている。アムロジピンはニフェジピンと比較して、受容体への結合速度や受容体との解離速度が非常に緩徐で、血中濃度半減期が 37 時間と極めて長いことが特徴である。さらに作用の発現が緩徐であるために反射性交感神経刺激作用が比較的弱く、動悸、頻脈などの副作用が少ないことが利点とされている³⁰⁾。これら、アムロジピンの副作用の少ない優れた薬理作用から歯肉増殖作用を生じないのではないかと期待がもたれたが、その後の研究によって歯肉増殖症の発症が報告された^{20~22)}。

これまでにも、ニフェジピンによる歯肉増殖症の *in vitro* 研究^{35~38)}の報告があるが、Ca 拮抗薬の直接的な作用点は明らかにされていない。そこで、本研究ではアムロジピンが *in vitro* で歯肉線維芽細胞に及ぼす影響を検討した。アムロジピンは 10^{-7} M の添加でも歯肉線維芽細胞の増殖を抑制し、 10^{-4} M 添加群において最も顕著に抑制した。これらのアムロジピンによる細胞増殖の抑制傾向は作用濃度に依存していた。また、歯肉線維芽細胞の DNA 合成はアムロジピンの添加濃度依存的に抑制され、細胞増殖曲線で得られたアムロジピン添加による歯肉線維芽細胞の増殖抑制の結果と密な相関性が認められた。このことから、アムロジピンによる細胞増殖の抑制は DNA 合成の抑制によることが示唆された。Ca 拮抗薬と同様に歯肉増殖症を誘発するダイランチンは、細胞増殖を活性化するという報告^{39,40)}がある一方で、Hassel ら⁴¹⁾は細胞増殖には影響しないと報告している。Ca 拮抗薬を用いた実験系では、西川ら³⁵⁾がニフェジピン誘発性の歯肉増殖症患者より分離した歯肉線維芽細胞を用いて検討した結果、高濃度のニフェジピン (10^{-5} M) 添加により細胞増殖の抑制が認められたと報告した。また、これらの作用は、ニフェジピン誘発性の歯肉増殖症を発症していない患者由来の歯肉線維芽細胞でも同様の結果³⁵⁾を示している。今回の結果でも、アムロジピン添加した健常者由来の歯肉線維芽細胞は濃度依存的に細

胞増殖が抑制され、高濃度添加においても同様の結果であった。

アムロジピンによる細胞増殖の抑制作用を、細胞の代謝の面から解析するために歯肉線維芽細胞の基礎酸素消費を検討した。今回用いた容酸素測定装置は当初細菌に対する抗生剤の薬剤感受性試験を目的に開発されたが、その後癌細胞に対する薬剤感受性についても使用可能であることが明らかにされている。本装置を使用して測定した結果、正常線維芽細胞数に依存した酸素消費量の増加が認められたことから、正常線維芽細胞の酸素消費量を測定することも可能であることが示された。アムロジピンを添加すると細胞呼吸は抑制され、増殖抑制作用の顕著な高濃度添加群では、対照群と比較して著しい酸素消費の抑制が認められた。これらの結果より、アムロジピンは歯肉線維芽細胞の基礎代謝を阻害する可能性が示唆された。

プレート上に接着した歯肉線維芽細胞にアムロジピンを作用させると、作用濃度および時間に依存して細胞が萎縮し、円形の細胞や浮遊性の細胞が増加した。また、歯肉線維芽細胞の播種時にアムロジピンを添加した同時添加群では、播種から24時間経過してもプレート上に接着する細胞はほとんど認められなかった。さらに、アムロジピンが歯肉線維芽細胞の接着率に及ぼす影響を検討したところ、接着性細胞は、アムロジピン添加方法に関わらず減少したが、同時添加群においてより顕著であった。 Ca^{2+} は細胞増殖の開始、 G_1/S 期移行を制御し⁴²⁾、 Ca^{2+} 結合蛋白により、細胞代謝の活性化、細胞内の遺伝子発現を介して細胞内の構造変化を引き起こしてS期へ導く⁴³⁾と考えられている。これらのことからCa拮抗薬によるCa代謝阻害により G_1/S 期移行がスムーズに行われなかったのではないかと示唆された。さらにアムロジピン添加による歯肉線維芽細胞の接着抑制は、細胞内のCaシグナル伝達経路の異常によって、接着性蛋白質や細胞骨格が変調を来したために誘起されたものと考えられる。トリパンプブルー排斥試験で示された生細胞率は、アムロジピン同時添加群、接着後添加群とも対照群と比較して有意に減少し、接着阻害が強く認められた。同時添加において生細胞が著しく減少した。これらの結果から、アムロジピンは、細胞内Caによる情報伝達系を遮断することにより、細胞分裂、酸素消費、細胞接着を抑制し、細胞増殖の抑制と細胞の生存率を減少させることが示された。

現在、Ca拮抗薬とサイトカインや炎症性因子の相互作用^{24,36)}による歯肉線維芽細胞の増殖の変化や歯肉増殖症患者由来組織における歯肉線維芽細胞の増殖因子TGF- β 、b-FGFの産生上昇⁴⁴⁾等が報告され、歯

肉増殖症の発症におけるCa拮抗薬の間接的な歯肉線維芽細胞の増殖促進が示唆されている。一方、歯肉組織の大部分を構成する細胞外基質であるコラーゲンやグリコサミノグリカンのCa拮抗薬による産生促進と分解抑制が示され⁴⁵⁻⁵⁰⁾、歯肉線維芽細胞の増殖促進のみに非依存的な歯肉増殖症の成因が示されている。本研究において、Ca拮抗薬であるアムロジピンは歯肉線維芽細胞の増殖を直接的な作用により抑制した。以上の知見より、アムロジピンによる歯肉増殖症の発症機序は、アムロジピンによる直接的な歯肉線維芽細胞の増殖促進作用ではない可能性が示唆された。

本論文の要旨は、第40回春季日本歯周病学会学術大会(1997年4月24日)、76th General Session & Exhibition of the IADR(1998年6月25日)において発表した。

文 献

- 1) Kimball, O.P.: The treatment of epilepsy with sodium diphenyl hydantoin. J. Am. Med. Assoc., 112: 1244-1245, 1939.
- 2) Rateitschak-Plüss, E.M., Hefti, A., Lörtscher, R. and Thiel, G.: Initial observation that cyclosporine-A induces gingival enlargement in man. J. Clin. Periodontol., 10: 237-246, 1983.
- 3) Ramon, Y., Behar, S., Kishon, Y. and Engelberg, I. S.: Gingival hyperplasia caused by nifedipine-a preliminary report. Int. J. Cardiol., 5: 195-206, 1984.
- 4) Lederman, D., Lumerman, H., Reuben, S. and Freedman, P.D.: Gingival hyperplasia associated with nifedipine therapy. J. Oral Surg., 57: 620-622, 1984.
- 5) McGaw, T., Lam, S. and Coates, J.: Cyclosporin-induced gingival overgrowth: Correlation with dental plaque scores, gingivitis scores, and cyclosporin levels in serum and saliva. Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol., 64: 293-297, 1987.
- 6) Pernu, H.E., Pernu, L.M.H., Huttunen, K.R.H., Nieminen, P.A. and Knuuttila, M.L.E.: Gingival overgrowth among renal transplant recipients related to immunosuppressive medication and possible local background factors. J. Periodontol., 63: 548-553, 1992.
- 7) Modéer, T. and Dahllöf, G.: Development of phenytoin-induced gingival overgrowth in non-institutionalized epileptic children subjected to different plaque control programs. Acta. Odontol. Scand., 45: 81-85, 1987.
- 8) Seymour, R.A. and Smith, D.G.: The effect of a

- plaque control programme on the incidence and severity of cyclosporin-induced gingival changes. *J. Clin. Periodontol.*, 18 : 107-110, 1991.
- 9) Wondimu, B., Dahllöf, G., Berg, U. and Modéer, T. : Cyclosporin-A-induced gingival overgrowth in renal transplant children. *Scan. J. Dent. Res.*, 101 : 282-286, 1993.
 - 10) Dahllöf, G. and Modéer, T. : The effect of a plaque control program on the development of phenytoin-induced gingival overgrowth. A 2-year longitudinal study. *J. Clin. Periodontol.*, 13 : 845-849, 1986.
 - 11) Tyldesley, W.R. and Rotter, E. : Gingival hyperplasia induced by cyclosporin-A. *Br. Dent. J.*, 157 : 305-309, 1984.
 - 12) 岩倉政城, 渋谷芳郎, 安野陽子, 島田義弘 : ニフェジピン療法を受けている患者の歯肉増殖有病状況についての予備的研究. *口腔衛生会誌*, 40 : 53-59, 1990.
 - 13) Hassell, T., O'Donnell, J., Pearlman, J., Tesini, D., Murphy, T. and Best, H. : Phenytoin induced gingival overgrowth in institutionalized epileptics. *J. Clin. Periodontol.*, 11 : 242-253, 1984.
 - 14) Daley, T.D., Wysocki, G.P. and Day, C. : Clinical and pharmacologic correlations in cyclosporine-induced gingival hyperplasia. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.*, 62 : 417-421, 1986.
 - 15) Peñarrocha-Diago, M., Bagán-Sebastián, J.V. and Vera-Sempere, F. : Diphenylhydantoin-induced gingival overgrowth in man : A clinico-pathological study. *J. Periodontol.*, 61 : 571-574, 1990.
 - 16) Lombardi, T., Fiore-Donno, G., Belser, U. and Di Felice, R. : Felodipine-induced gingival hyperplasia : a clinical and histologic study. *J. Oral Pathol. Med.*, 20 : 89-92, 1991.
 - 17) Pernu, H.E., Oikarinen, K., Hietanen, J. and Knuuttila, M. : Verapamil-induced gingival overgrowth : a clinical, histologic, and biochemic approach. *J. Oral Pathol. Med.*, 18 : 422-425, 1989.
 - 18) Brown, R.S., Sein, P., Corio, R. and Bottomley, W. K. : Nitrendipine-induced gingival hyperplasia. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.*, 70 : 593-596, 1990.
 - 19) Bowman, J.M., Levy, B.A. and Grubb, R.V. : Gingival overgrowth induced by diltiazem. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.*, 65 : 183-185, 1988.
 - 20) Ellis, J.S., Seymour, R.A., Thomason, J.M., Monkman, S.C. and Idle, J.R. : Gingival sequestration of amlodipine and amlodipine-induced gingival overgrowth. *Lancet*, 341 : 1102-1103, 1993.
 - 21) Seymour, R.A., Ellis, J.S., Thomason, J.M., Monkman, S.C. and Idle, J.R. : Amlodipine-induced gingival overgrowth. *J. Clin. Periodontol.*, 21 : 281-283, 1994.
 - 22) Jorgensen, M.G. : Prevalence of amlodipine-related gingival hyperplasia. *J. Periodontol.*, 68 : 676-678, 1997.
 - 23) 日本組織培養学会編 : 組織培養の技術, 第二版, 朝倉書店, 東京, 1988, 174-177.
 - 24) 西川聖二, 上野明道, 石田 浩, 永田俊彦, 浜崎章弘, 幸田直彦, 木戸淳一, 若野洋一 : ニフェジピンによる歯肉増殖症に関する研究—ヒト歯肉線維芽細胞におけるニフェジピンおよびEGFの増殖に及ぼす影響—. *日歯周誌*, 28 : 168-175, 1986.
 - 25) Amano, Y., Okumura, C., Yoshida, M., Unten, S., Arai, J., Tagawa, T., Hoshino, S., Hashimoto, H., and Ishikawa, H. : Measuring respiration of cultured cell with oxygen electrode as a metabolic indicator for drug screening. *Human Cell*, 12 : 3-12, 1999.
 - 26) Mclimans, W.F., Davis, E.V., Glover, F.L. and Rake, G.W. : The submerged culture of mammalian cells : The spinner culture. *J. Immunol.* 79 : 428-433, 1957.
 - 27) Schamroth, L., Krikler, D.M. and Garrett, C. : Immediate effects of intravenous verapamil in cardiac arrhythmias. *Br. Med. J.*, 1 : 660-662, 1972.
 - 28) Krikler, D.M. and Spurrell, R.A. : Verapamil in the treatment of paroxysmal supraventricular tachycardia. *Postgrad. Med. J.*, 50 : 447-453, 1974.
 - 29) Kimura, E. and Kishida, H. : Treatment of variant angina with drug : A survey of 11 cardiology institutes in Japan. *Circulation*, 63 : 844-848, 1981.
 - 30) 石井當男 : Ca拮抗薬. *臨床と研究*, 74 : 94-98, 1997.
 - 31) Van Zwieten, P.A. and Karlberg, B.E. : Introduction of amlodipine symposium. *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, 24(suppl. B) : v, 1994.
 - 32) Bossert, F. und Vater, W. : Dihydropyridine, eine neue Gruppe stark wirksamer Coronartherapeutika. *Naturwissenschaften*, 58 : 578, 1971.
 - 33) Murakami, M., Murakami, E., Takekoshi, N., Tsuchiya, M., Kin, T., Onoe, T., Takeuchi, N., Funatsu, T., Hara, S., Ishise, S., Mifune, J. and Maeda, M. : Antihypertensive effect of 4-(2,6-dimethyl-1,4-dihydropyridine-3,5-dicarboxylic acid dimethylester (Nifedipine, Bay-a 1040), a new coronary dilator. *Jpn. Heart. J.*, 13 : 128-135, 1972.
 - 34) Nayler, W.G. : The preclinical of amlodipine : An overview. *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, 24(suppl. B) : S1-S5, 1994.
 - 35) Nishikawa, S., Tada, H., Hamasaki, A., Kasaha-

- ra, S., Kido, J., Nagata, T., Ishida, H. and Wakano, Y.: Nifedipine-induced gingival hyperplasia: A clinical and *in vitro* study. J. Periodontol., 62: 30-35, 1991.
- 36) 戸村真一: ニフェジピン歯肉増殖の関連性に関する研究—IL-1 存在下でのニフェジピンが培養線維芽細胞のウロン酸産生に与える影響—. 日歯周誌, 34: 315-322, 1992.
- 37) 石濱済美, 中尾寿美, 藤井 彰: ニフェジピン投与による実験的歯肉肥厚に関する研究. —実験モデルと肥厚部線維芽細胞におけるカルシウム取り込みに対するカルシウム拮抗薬の影響—. 日大口腔科学, 18: 27-37, 1992.
- 38) Fujii, A., Matsumoto, H., Nakao, S., Teshigawara, H. and Akimoto, Y.: Effect of calcium-channel blockers on cell proliferation, DNA synthesis and collagen synthesis of cultured gingival fibroblasts derived from human nifedipine responders and non-responders. Archs. Oral Biol., 39: 99-104, 1994.
- 39) Shafer, W.G.: Response of radiated human gingival fibroblast-like cell to dilantin sodium in tissue culture. J. Dent. Res., 44: 671-677, 1965.
- 40) 松尾 朗, 矢嶋俊彦: 培養線維芽細胞の増殖とコラゲン線維形成. 歯基礎誌, 27: 53-63, 1985.
- 41) Hassell, T.M., Page, R.C., Narayanan, A.S. and Cooper, C.G.: Diphenylhydantoin (Dilantin) gingival hyperplasia: Drug-induced abnormality of connective tissue. Proc. Natl. Acad. Sci., 73: 2909-2912, 1976.
- 42) 宇野 功: 細胞内調節因子による細胞増殖の制御. 蛋白質核酸酵素, 34: 1028-1039, 1989.
- 43) 飯田秀利: カルシウムと G 1 制御. 実験医学, 8: 1347-1354, 1990.
- 44) Saito, K., Mori, S., Iwakura, M. and Sakamoto, S.: Immunohistochemical localization of transforming growth factor β , basic fibroblast growth factor and heparan sulphate glycosaminoglycan in gingival hyperplasia induced by nifedipine and phenytoin. J. Periodont. Res., 31: 545-555, 1996.
- 45) Hassell, T.M.: Evidence for production of an inactive collagenase by fibroblasts from phenytoin-enlarged human gingivae. J. Oral. Pathol., 11: 310-317, 1982.
- 46) Vernillo, A.T. and Schwartz, N.B.: The effects of phenytoin (5, 5-diphenylhydantoin) on human gingival fibroblasts in culture. J. Periodont. Res., 22: 307-312, 1987.
- 47) Shikata, H., Utsumi, N., Shimojima, T., Oda, Y. and Okada, Y.: Increased expression of type IV collagen genes in drug-induced gingival enlargement. FEBS., 334: 65-68, 1993.
- 48) Schincaglia, G.P., Forniti, F., Cavallini, R., Piva, R., Calura, G. and del Senno, L.: Cyclosporin-A increases type I procollagen production and mRNA level in human gingival fibroblasts *in vitro*. J. Oral. Pathol. Med., 21: 181-185, 1992.
- 49) Tipton, D.A., Stricklin, G.P. and Dabbous, M.K.: Fibroblast heterogeneity in collagenolytic response to cyclosporine. J. Cell. Biochem., 46: 152-165, 1991.
- 50) McCulloch, C.A.G. and Knowles, G.C.: Deficiencies in collagen phagocytosis by human fibroblasts *in vitro*: A mechanism for fibrosis? J. Cell. Physiol., 155: 461-471, 1993.

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