Fusobacterium nucleatum のヘプチルチオグルコシド抽出
表層物質によるヒト好中球のケミルミネセンス反応,
インターロイキン-8 産生および遊走の誘導

三上 正人 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
(1999 年 10 月 9 日受理)

Chemiluminescence, Interleukin-8 Production and Migration of Human
Neutrophils in Response to the Heptylthiogluco-side-Extractable
Surface Materials of *Fusobacterium nucleatum*

Masato Mikami, Chihomi Kato and Kazuko Saito

Department of Oral Microbiology, The Nippon Dental University, School of Dentistry at Niigata
Accepted for publication 9 October 1999

To understand the interaction between neutrophils and *Fusobacterium nucleatum*, a periodontopathic bacteria, we investigated the effects of bacterial surface materials on activation of neutrophil functions *in vitro*.

Heptylthiogluco-side extract (HE) and a cell envelope fraction (CE) were prepared from *F. nucleatum* ATCC 25586. Human peripheral neutrophils were stimulated with HE or CE in the absence of serum, and superoxide anion released from the cells was measured by chemiluminescence (CL) assay. The CL-stimulation activity of HE was much higher than that of CE, and was not inhibited by proteinase K. Therefore, we obtained CL-inducing surface materials (CSM) from proteinase K-digested HE by anion exchange and gel permeation column chromatography. Analysis by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis showed that CSM contained some polypeptides, lipopolysaccharide (LPS) and other polysaccharide materials. Although *F. nucleatum* LPS exhibited no neutrophil CL stimulation, CSM stimulation was inhibited by addition of polymyxin B and by pretreatment of heat or phenol. These results demonstrated that neutrophil CL was mediated by LPS and proteinaceous factors of the bacterial cell surface. Furthermore, we observed that CSM stimulated the release of interleukin-8 (IL-8) from neutrophils in the culture medium using enzyme-linked immunosorbent assay and exhibited neutrophil migration by Boyden method. The induction of IL-8 and neutrophil migration were not inhibited by addition of polymyxin B or by heat treatment of CSM. After CSM had been treated with phenol, IL-8-releasing activity was present in the phenol-extractable fraction and migration-stimulating activity was detected in the water-soluble fraction.

These results indicate that the surface materials of *F. nucleatum* stimulate the activation and the migration of human neutrophils and are involved in the initiation and progression of periodontal tissue inflammation. J. Jpn. Soc. Periodontol., 41 : 417~428, 1999.

Key words : *Fusobacterium nucleatum*, neutrophils, chemiluminescence, interleukin-8, migration

要旨 : 歯周病関連細菌である *Fusobacterium nucleatum* と好中球の相互作用の解析のために, 本研究では菌体表層物質による好中球機能の活性化について検討した。*F. nucleatum* ATCC 25586 株のヘプチルチオグルコシド抽出物 (HE) および細胞エンベロープ (CE) を調製し, 血清非存在下でヒト末梢好中球を刺激して, スー

パーオキシサイドの産生をケミルミネッセンス (CL) 法にて測定した。HE の CL 誘導活性は CE より高く、プロテイナーゼ K の影響を受けなかった。そこでプロテイナーゼ K 処理 HE を陰イオン交換カラム、続いてゲル濾過カラムにより分画し、CL 誘導表層物質 (CSM) を得た。SDS-ポリアクリルアミド電気泳動の結果、CSM はポリペプチド、リポ多糖体 (LPS) およびその他の多糖体成分を含む複合体であった。*F. nucleatum* の LPS は好中球 CL を誘導しなかったが、CSM の CL 誘導活性はポリミキシン B の添加や、熱およびフェノール処理により抑制された。この結果は LPS と蛋白質性因子が好中球 CL に関与することを示している。さらに CSM の好中球に対するインターロイキン (IL)-8 誘導活性が ELISA 法により、また遊走刺激活性がボイデン法により認められた。これらの活性はポリミキシン B および熱処理の影響を受けなかったが、CSM をフェノール処理した場合には、IL-8 誘導活性はフェノール抽出画分に、また遊走刺激活性は水溶性画分に認められた。以上の結果から、*F. nucleatum* 表層物質はヒト好中球の活性化や遊走の亢進を引き起こし、歯周組織における炎症の惹起や進行に関与している可能性が示唆された。

索引用語: *Fusobacterium nucleatum*, 好中球, ケミルミネッセンス反応, インターロイキン-8, 遊走

緒 言

好中球は初期生体防御に働く主要な細胞であり、細菌感染時には迅速に局所へ遊走して異物を貪食、殺菌する。好中球の殺菌機構は酸素非依存性と酸素依存性に分けられ、前者は異物を取り込んだ食胞が細胞内顆粒と融合することで、顆粒内の殺菌性蛋白質により殺菌を行うものであり、後者は貪食に伴い酸素代謝が亢進し、その結果産生された種々の活性酸素分子が殺菌に関与するものである。活性酸素の中でスーパーオキシドアニオンは細胞膜の NADPH オキシダーゼの活性化によって産生され、その後過酸化水素、次亜塩素酸、ヒドロキシルラジカルなどのより反応性の高い活性酸素分子に代謝される¹⁾。またスーパーオキシドアニオンは一酸化窒素と反応して、強力な酸化剤であるパーオキシナイトライトを生成する²⁾。一連の活性酸素分子は蛋白質や脂質などと反応し、代謝や情報伝達に影響を及ぼすことにより細胞毒性を示す。貪食により、あるいは細胞産生物の刺激を受けて活性化した好中球は、細胞内のみならず細胞外にも活性酸素を放出し組織傷害を引き起こす。歯肉溝においては滲出細胞の大部分が好中球であり、歯周ポケットや接合上皮に存在する細菌を貪食、殺菌する。歯周疾患の成立と進行には細菌の持つ病原因子に加え、好中球由来の活性酸素が関与している可能性が示唆されている。

一方、好中球の感染局所への遊走には遊走因子が関与しており、従来から血小板活性化因子、ロイコトリエン B₄、補体成分 C5a などの内因性因子や、リポ多糖体 (LPS)、ペプチドグリカン、ホルミルペプチドなどの菌体成分が遊走因子として知られている。近年、内因性蛋白質であるケモカインが白血球遊走に深く関与することが明らかになり、なかでもインターロイキン (IL)-8 は、好中球に対し遊走のみならず活性

化や血管外浸潤に関与する重要な因子であることが報告されている^{3,4)}。IL-8 の産生細胞は単球、マクロファージ、繊維芽細胞、表皮細胞、血管内皮細胞など多岐にわたり、またオートクラインにより好中球は自らが産生した IL-8 により活性化する。Tsai らは歯周病患者の歯肉溝液中の IL-8 のレベルが健常人より高いことを報告しており、歯周組織への好中球浸潤においても IL-8 が関与していると考えられる⁵⁾。

Fusobacterium nucleatum は、歯肉縁下ブラークから高頻度に分離されるグラム陰性偏性嫌気性菌で、歯周疾患部位からの検出率が高いことや、歯周病患者において本菌に対する血清抗体価が上昇することが報告されており、歯周疾患との関連が示唆されている⁶⁻¹⁰⁾。また *in vitro* での好中球に対する *F. nucleatum* の作用として、血清非存在下における菌体刺激に伴う好中球から活性酸素産生やケミルミネッセンス (CL) 反応、超音波破砕物による好中球遊走作用、リポ多糖体刺激による好中球からのサイトカイン産生などが報告されている¹¹⁻¹⁴⁾。筆者らも歯周病原菌刺激に伴うヒトあるいはマウス好中球の CL 反応について調べ、*Porphyromonas gingivalis* や *Actinobacillus actinomycetemcomitans* に比較し *F. nucleatum* による CL 反応が高いことを報告した¹⁵⁻¹⁷⁾。以上のように好中球に対して活性化作用を有する *F. nucleatum* であるが、活性化機構の解析はほとんどなされていない。活性酸素産生や CL 反応に関しては、糖による阻害実験からレクチン様の相互作用が示唆されているものの^{11,12,17)}、誘導因子の同定は行われていない。

好中球と *F. nucleatum* の相互作用についての解析を進めるために、本研究では、非イオン性界面活性剤であるヘプチルチオグルコシドを用いて抽出された *F. nucleatum* 表層物質によるヒト末梢好中球の活性化に関して検討した。スーパーオキシド産生に伴うケミルミネッセンス (CL) 反応を指標に、ヘプチル

チオグルコシド抽出物からCL誘導表層物質(CSM)を分離し、その性状について調べた。さらに好中球のIL-8産生および遊走に対するCSMの作用についても検討した。その結果、蛋白質、LPS、多糖体から成る菌体表層の複合体が好中球活性化に関与することが示され、その刺激活性はLPSより高いことが明らかになった。

材料および方法

1. F. nucleatum からの CSM の調製

F. nucleatum ATCC 25586 株を GAM ブイヨン(日水製薬, 東京)に接種して、37°C で3日間、スチールウール法にて嫌気的に培養した。培養液を遠心して集菌し、リン酸緩衝液(pH 7.4, PBS (-))にて2回、続いて脱イオン蒸留水にて2回洗浄した後、凍結乾燥した。乾燥菌体を40 mmol/l *n*-heptyl- β -D-thiogluconide (HTG; 同仁化学, 熊本), 5 mmol/l ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA, 同仁化学)含有トリス塩酸緩衝液(TBS; 10 mmol/l Tris-HCl, 150 mmol/l NaCl, pH 7.4)に懸濁し、4°C で16時間攪拌した後、15,000 $\times$ g, 4°C で20分間遠心した。得られた上清を集めてHTG抽出物(HE)とし、TBSに対して透析した。続いて固相化法によるproteinase K処理を行った。すなわち、100 mmol/l MOPS緩衝液(pH 7.5)にproteinase K(PK; Sigma, St. Louis, MO, USA)を溶解し(5 mg/ml), 等容のAffi-Gel 10(Bio-Rad Laboratories, Calif., USA)を添加した。4°C で4時間カップリング反応を行った後、glycineを終濃度100 mmol/lに添加して4°C で1時間ブロッキング反応を行った。上清を除去した後、MOPS緩衝液、続いてTBSで洗浄し固相化PKを調製した。ゲル1 ml当たりのPK結合量は3.3 mgであった。TBSに溶解したHE(10 mg/ml, w/v) 1 mlに対し固相化PK 0.1 mlを混合して37°C で1時間反応させた後、遠心して上清を回収した。またゲルは3倍容のTBSにて洗浄し、洗浄液を先の上清に合わせた。上清は脱イオン蒸留水に対して透析した後、凍結乾燥した。乾燥試料はPK処理前と等容の10 mmol/l Tris-HCl, 10 mmol/l 四ホウ酸ナトリウム(pH 7.5, Buffer A)に溶解し、CL試験および以下のイオン交換カラムクロマトグラフィーに供した。予めBuffer Aで平衡化したDEAE Bio-Gel Aカラム(DEAEカラム; 1.8 $\times$ 30 cm, Bio-Rad)にPK処理HE溶液を重層し、300 mlのBuffer Aにてカラムを洗浄した後、四ホウ酸ナトリウム濃度を100 mmol/lとしたBuffer Aをカラムに通じ吸着成分を溶

出した。溶出画分は脱イオン蒸留水に対して透析後、凍結乾燥してDEAE画分とした。DEAE画分は0.01% triethylamine 含有TBS(Buffer B)に溶解し(30 mg/ml), Toyopearl HW-55 Fカラム(ゲル濾過カラム; 1.2 $\times$ 100 cm, 東ソー, 東京)に重層した後、Buffer Bを流速40 ml/hでカラムに通じた。溶出液は1 ml ずつ試験管に分取し、ペプチド濃度を280 nmにおける吸光度により、糖質濃度をフェノール-硫酸法¹⁸⁾によりモニターした。ピークごとに分画して脱イオン蒸留水に対して透析し、凍結乾燥した後、CL試験を行い活性を有する分画をCSMとした。

2. 細胞エンベロップ画分(CE)の調製

乾燥菌体を5 mmol/l EDTA 含有TBSに懸濁し、超音波発生装置(UR-200 P, トミー精工, 東京)にて、氷水中で冷却しながら出力120 Wで5分間、断続的に破碎処理を行った。1,500 $\times$ g, 4°C で5分間遠心して未破碎菌体を除去した後、25,000 $\times$ g, 4°C で30分間遠心して得られた沈渣を脱イオン蒸留水で2回洗浄し、凍結乾燥してCEとした。

3. リボ多糖体(LPS)の調製

Westphalらの方法¹⁹⁾を改変してLPSを調製した。乾燥菌体を脱イオン蒸留水に懸濁して68°Cに加温した後、同温度に加温した90%フェノールを等量加えて20分間激しく振盪した。氷中で冷却後、15,000 $\times$ g, 4°C で30分間遠心して水相を分取した。フェノール相は脱イオン蒸留水を加えて再抽出した。得られた水相を合わせて脱イオン蒸留水に対して透析した後、100,000 $\times$ g, 4°C, 18時間遠心して得られた沈渣を粗LPS標品とした。粗LPSをTBSに懸濁し、deoxy-ribonuclease I (Sigma)およびribonuclease A (Sigma)を終濃度各20 μ g/mlに添加して37°Cで1時間保温し、さらにPKを終濃度50 μ g/mlに添加し37°Cで1時間保温した。反応液を100,000 $\times$ g, 4°Cで18時間遠心し、得られた沈渣を脱イオン蒸留水にて2回洗浄した後、凍結乾燥して精製LPS標品とした。

4. 蛋白質および糖質の定量

試料の蛋白質濃度はウシアルブミンを標準としてProtein Assay (Bio-Rad)にて測定した。糖質濃度はグルコースを標準としてフェノール-硫酸法にて測定した。また内毒素活性はLimulus ES-II Test (和光純薬, 大阪)を使用して測定し、添付のEscherichia coli UKT-B株由来LPSを標準として、試料1 ng当たりのendotoxin unit (EU)を算出した。

5. ヒト末梢血からの好中球の調製

健常成人からヘパリン採血した末梢静脈血をMono-Poly resolving medium (大日本製薬, 大阪)

に重層して $400\times g$ 、室温で 20 分間遠心し、好中球画分を分取した。得られた細胞を PBS で 2 回遠心洗浄した後、Turk 液（和光純薬、大阪）で染色し、細胞数を Bürker-Türk 血球計算板にて測定した。細胞は、生細胞率 98% 以上で、好中球が 95% 以上を占めた。その後細胞を 0.1% gelatin を含む Hanks' balanced salt solution (GBSS) に懸濁し、 1×10^7 cells/ml に調製した。細胞は水中に保存し、採血後 6 時間以内に実験に使用した。

6. スーパーオキシドアニオンの測定

(1) CL 法。スーパーオキシドアニオンと特異的に反応する CLA (2-methyl-6-phenyl-3,7-dihydroimidazo-[1,2-a] pyrazin-3-on, 東京化成工業, 東京) を発光プローブとして使用し、Nakano らの方法²⁰⁾を改変して CL 反応を測定した。反応キュベットに好中球 1×10^6 cells, $1\mu\text{mol/l}$ CLA を含む GBSS 0.45 ml を分取し、 0.05 ml の菌体標品を添加した。直ちに Lumiphotometer TD-4000 (フタバメディカル, 東京) にセットし、 37°C で 10 分間の反応を測定した。10 秒毎に記録される relative light unit (rlu) の 10 分間の積算値 (Total rlu/10 min) を算出し、刺激時の CL 反応の値から未刺激時の CL 反応の値を差し引いた値を CL 誘導活性として表した。

(2) シトクロム *c* 還元法。GBSS 1.0 ml 中に好中球 1×10^6 cells, $40\mu\text{mol/l}$ シトクロム *c* (Sigma) および菌体標品を含む反応液を調製し、 37°C で 10 分間反応させた。対照として予め $30\mu\text{g/ml}$ の superoxide dismutase (Sigma) を添加した反応液を調製し、同時に反応させた。反応後、直ちに氷中で冷却し $10,000\times g$, 30 秒間遠心して上清を分取し、 540 nm および 550 nm の吸光度を 2 波長分光光度計 (U-3000 型, 日立製作所, 東京) にて測定した。シトクロム *c* のモル吸光係数の差 ($\Delta\epsilon = 19.1\times 10^3\text{ mol}^{-1}\cdot\text{l}\cdot\text{cm}^{-1}$) から生成されたスーパーオキシドアニオン量を算出した。

7. IL-8 の測定

好中球は 5% 非働化ウシ胎児血清 (FBS; 大日本製薬), 100 U/ml ペニシリン G カリウム (和光純薬), $100\mu\text{g/ml}$ 硫酸ストレプトマイシン (和光純薬) を含む RPMI 1640 培地 (日水製薬) にて 1×10^6 cells/ml に調製し、48 ウェル培養プレート (Coster, USA) の各ウェルに 1 ml づつ播種した。細胞は、 37°C , 5% CO_2 の条件下で 1 時間培養した後、CSM または LPS を各ウェルに添加して、培養を続けた。1, 6, 24 時間後に培養液を回収し、 $6,700\times g$, 1 分間遠心して得られた培養上清を IL-8 の測定まで

-80°C で保存した。培養上清中の IL-8 の測定は ELISAView Human IL-8 cytokine ELISA キット (東洋紡績, 大阪) にて行った。

8. 好中球遊走の測定

Kurashige らの方法²¹⁾を改変して遊走試験を行った。好中球は 10% FBS を含む RPMI 1640 培地にて、 1×10^6 cells/ml に調製した。チャンバー (ラボサイエンス, 東京) をポアサイズ $3\mu\text{m}$ のポリカーボネート製メンブレンフィルター (Nuclepore, Costar, USA) で区分し、上室に細胞懸濁液を、下室にテスト標品を添加した RPMI 培地を入れ、 37°C , 5% CO_2 の条件下で 90 分間保温した。その後、フィルターをメチルアルコール固定しギムザ染色を行った。顕微鏡下 (400 倍) で遊走した細胞を観察し、無作為に選んだ 5 視野の総細胞数を計測した。培地のみに対して遊走したランダム遊走細胞数 (N_0) および試料添加培地に対して遊走した細胞数 (N_s) から、次式により遊走指数 (Migration index) を算出し、試料の遊走刺激活性とした。

$$\text{Migration index} = (N_s - N_0) / N_0$$

9. CSM の前処理

(1) 熱処理。PBS に溶解した CSM を 80°C または 95°C で 20 分間加熱した。

(2) フェノール処理。CSM 溶液に PBS 飽和フェノールを等量加えて 5 分間混和した後、室温にて $8,000\times g$ で 10 分間遠心した。水相および界面の沈殿物を含むフェノール相をそれぞれ分取し、フェノールを除去するため脱イオン蒸留水に対し十分に透析した後、凍結乾燥した。

10. ポリミキシン B 添加の影響

CL 試験においては、CSM 溶液 ($100\mu\text{g/ml}$) にポリミキシン B 硫酸 (Sigma) を種々の濃度に添加して室温で 30 分間保温した後、実験に供した。ポリミキシン B 濃度は CL 反応液中における最終濃度として表した。IL-8 誘導試験においては、CSM $0.1\mu\text{g/ml}$ を添加する 30 分前に培地に $10\mu\text{g/ml}$ の濃度にポリミキシン B を添加し、CSM 添加 24 時間後の培養上清中の IL-8 濃度を測定した。走化性試験においては、予め培地に $10\mu\text{g/ml}$ となるようポリミキシン B を添加し、CSM $1\mu\text{g/ml}$ の遊走刺激活性を測定した。いずれの実験においても、ポリミキシン B を添加しないものを対照とした。

11. SDS-PAGE

Laemmli の方法²²⁾を改変して SDS-PAGE を行った。30% acrylamide ストック溶液 (acrylamide: *N,N'*-methylene-bis-acrylamide, 1:0.027) を使用し、濃縮ゲルを 3% acrylamide, 0.1% SDS, 125

mmol/l Tris-HCl (pH 6.8), 0.1% ammonium persulfate (APS), 0.1% N, N, N', N'-tetramethylethylenediamine (TEMED) にて作成した。また分離ゲルは 10~20% acrylamide 濃度勾配ゲルとし, 0.1% SDS, 375 mmol/l Tris-HCl (pH 8.8), 0.1% APS, 0.04% TEMED にて作成した。泳動試料は 2% SDS, 100 mmol/l dithiothreitol, 10% glycerol, 0.01% bromophenol blue, 62.5 mmol/l Tris-HCl (pH 6.8) に溶解し, 100°C で 3 分間加熱した。泳動用緩衝液には 25 mmol/l Tris, 192 mmol/l glycine, 0.1% SDS を用い, スラブ型電気泳動装置 (アトー, 東京) にて 50 V の定電圧で泳動した。泳動後のゲルは Coomassie Brilliant Blue 染色または銀染色²³⁾を行った。

12. 統計学的処理

各実験は 3 人以上の異なる提供者から各々調製した好中球を使用し, 同一好中球試料について 2 回行った。結果は平均値±標準誤差として表した。2 つの実験群間の有意差検定は Student の t 検定を行い, $P < 0.05$ を有意とした。

結 果

1. F. nucleatum 表層の好中球 CL 誘導物質の分離

F. nucleatum から調製した HE および CE の好中球に対する CL 誘導活性は, 平均 1275 および 262 rlu/10 min (100 μ g/ml 刺激時, $n=3$) であった。この結果から, HE から CL 誘導物質を分離することとし, 最初に PK 処理を行った。PK 処理前後の HE の CL 誘導活性は, 処理前 HE 濃度 100 μ g/ml 相当において, 平均 1060 および 1913 rlu/10 min ($n=3$) であった。PK 処理により HE の重量は 200 mg から 70 mg (35%) に減少し, 含まれる蛋白質は 140 mg から 16 mg (11%) に, また糖質は 22 mg から 19 mg (86%) に減少した。以上の結果から CL 誘導物質は PK 抵抗性を示す成分と考えられたので, 続いて糖質の分画を行った。

PK 処理 HE を DEAE カラムにて分画した結果, 試料の約 35% が素通り画分に, 約 55% が DEAE 画分に回収された。素通りおよび DEAE 画分の CL 誘導活性は, 平均 34 および 617 rlu/10 min (10 μ g/ml 刺激時, $n=3$) であり, CL 誘導物質は DEAE 画分に回収された。そこでゲル濾過カラムにより CSM を

図 1 F. nucleatum 菌体表層物質の Toyopearl HW-55 F カラムクロマトグラフィー。菌体のヘプチルチオグルコシド抽出物をプロテイナーゼ K 処理した後, DEAE Bio-Gel A カラム吸着画分をゲル濾過カラムに重層した。矢印は既知蛋白質の溶出位置を示す。T, Thyroglobulin (670,000); G, γ -Globulin (158,000); M, Myoglobin (17,000); V, Vitamin B-12 (1,350)。V₀, 排除容量; V_t, 全カラム容量

図2 *F. nucleatum* CSMおよびLPSのSDS-PAGEプロファイル。試料はレーン1, CSM (50 μ g);レーン2, LPS (50 μ g);レーン3, CSM (10 μ g);レーン4, LPS (10 μ g)。染色はレーン1および2, Coomassie Brilliant Blue 染色;レーン3および4, 銀染色。左端矢印は分子量を示す。

分画した。

DEAE 画分はゲル濾過カラムにより蛋白質, 糖とともに含む四つのピークに分れた (図1)。ピークIのCL誘導活性は, 10 μ g/ml 刺激において, 549 rlu/10 min ($n=3$) であった。ピークII, IIIおよびIVの各画分刺激による好中球CL反応は, 未刺激対照のレベル以下であり, CL誘導活性は認められなかった。(データ省略)。したがってピークI画分をCSMとして以降の実験に供した。乾燥菌体1g当たり26mgのCSMが得られた。SDS-PAGEの結果から, CSMには52 kD以下に複数の蛋白質バンドが認められ (図2, レーン1), またLPSに特有なはしご状のバンドや, 多糖体成分に由来すると考えられる幅広いバンドが認められた (レーン3)。CSMの糖質含量は重量比23%であり同菌LPSの糖質含量 (重量比

図3 *F. nucleatum* CSM刺激による好中球のCL反応。10⁶個の細胞をCSM濃度1 (■), 5 (▲), 10 μ g/ml (●) またはLPS濃度10 μ g/ml (○) で刺激した。波線は未刺激時の反応を示す。rlu, 相対発光強度

9%) に比較して高かった。なおリムス活性はCSM, LPSともに1 EU/ngであり, *E. coli* UKT-B株由来LPSの活性 (5 EU/ng) より低かった。

2. 好中球のスーパーオキシドアニオン産生

CSMは1 μ g/ml (w/v) 以上の濃度で好中球に対しCL反応を誘導した。CL反応はCSM濃度に依存して増強し, 濃度の上昇にともないCLピークは高くなり, またピークに達するまでの時間が短くなった (図3)。またシトクロムc還元法による測定においてもCSM濃度1 μ g/ml (w/v) 以上でスーパーオキシドアニオンの産生が認められた (表1)。好中球からのスーパーオキシドアニオン産生は, CL反応およびシトクロムc還元法による測定ともに, CSM濃度10 μ g/mlでほぼ最大となった。一方, 同菌のLPS刺激では10 μ g/mlの濃度においても好中球からのスーパーオキシドアニオンの誘導は認められなかった (図3および表1)。

3. 好中球に対するIL-8誘導

初めにCSM濃度とIL-8産生量について検討するため, 好中球に0.001~1 μ g/mlの濃度でCSMを添加して培養し, 6時間後におけるIL-8産生量を調べた (図4)。その結果, 0.01 μ g/ml以上のCSM添加群では非添加群に比較してIL-8産生量が有意に高く, CSMのIL-8誘導活性が認められた。活性はCSM濃度に依存して上昇したが, 0.1 μ g/ml以上でほぼ一定となった。次に, 0.1 μ g/mlのCSMを添加して好中球を培養し, 1, 6, 24時間後のIL-8産生量を調べた (表2)。非添加群においても構成的なIL-8

表 1 *F. nucleatum* CSM および LPS 刺激による好中球からのスーパーオキシドアニオンの産生。10⁶ 個の細胞に CSM または LPS を添加し 37°C, 10 分間反応させた。(1) CL 誘導活性 (n=3), (2) シトクロム c 還元法による測定 (n=3)。値は平均±標準誤差で表した。* p<0.05 (未刺激対照との比較)

Stimulus	Concentration (μg/ml)	⁽¹⁾ Chemiluminescence (Total rlu/10 min)	⁽²⁾ Superoxide release (nmol/10 min)
None		122±25	0.5±0.2
CSM	0.1	159±34	0.8±0.3
	1	338±105 *	1.2±0.4 *
	10	1773±570 *	19.6±3.8 *
	20	1330±110 *	23.1±4.5 *
LPS	0.1	125±31	0.5±0.2
	1	141±21	0.5±0.2
	10	106±19	0.4±0.1

図 4 *F. nucleatum* CSM による好中球からの IL-8 産生。CSM 添加 6 時間後における培養上清中の IL-8 濃度を ELISA 法により測定した。値は平均±標準誤差として表した (n=3)。* P<0.05 (未刺激対照との比較)

産生が認められ、培養上清中の IL-8 濃度は経時的に上昇した。CSM 添加群における IL-8 産生量は、すべての測定時間において非添加群に比較して有意に高く、誘導活性は 24 時間後まで認められた。これに対し、0.1 μg/ml の LPS を添加した場合の IL-8 産生量は、1 時間後では非添加群に比較し有意に高く誘導活性が認められたが、6 および 24 時間後においては非添加群と同じレベルであり、誘導活性は認められなかった。

4. 好中球に対する遊走刺激活性

CSM 濃度 0.01 μg/ml 以上で好中球の遊走能の亢進が認められたが、遊走刺激活性は 0.01~10 μg/ml において濃度間での有意差はなかった (表 3)。これに対し LPS には 0.01~10 μg/ml の濃度範囲におい

表 2 *F. nucleatum* CSM および LPS 添加培養による好中球からの IL-8 の産生。10⁶ 細胞/ml に CSM または LPS を 0.1 μg/ml の濃度に添加して培養し、1, 6, 24 時間後の培養上清中の IL-8 の濃度を ELISA 法により測定した (n=4)。値は平均±標準誤差で表した。* p<0.05 (実験群間における比較)

Incubation time	Stimulus	IL-8 production (pg/1×10 ⁶ cells)
1 h	none	42.2±15.8
	CSM	91.7±24.9
	LPS	68.4±35.6
6 h	none	332.9±184.3
	CSM	972.5±287.2
	LPS	356.3±127.9
24 h	none	1075.2±114.8
	CSM	3919.4±2038.3
	LPS	835.5±303.6

て、遊走刺激活性は認められなかった。

5. CSM の前処理が好中球活性化に及ぼす影響 (表 4)

好中球に対する CSM の CL 誘導活性は、80°C および 95°C の熱処理により低下したが、IL-8 誘導活性および遊走刺激活性に関しては熱処理による活性の低下は認められなかった。

また CSM 溶液をフェノール処理した場合には、水相およびフェノール相いずれの成分にも CL 誘導活性は認められなかった。IL-8 誘導活性はフェノール、水、両相の成分に認められたが、水相成分の活性はフェノール相成分の約 10 分の 1 であった。一方、遊

走刺激活性は水相成分において認められたが、フェノール相成分には認められなかった。なお SDS-PAGE により、LPS は水相にのみ、蛋白質はフェノール相にのみ抽出されたことを確認した（データ省略）。

6. ポリミキシン B が CSM の好中球活性化作用に及ぼす影響

ポリミキシン B で CSM を処理した後に好中球の CL 反応を行った場合、ポリミキシン B 濃度に依存して CL 反応は抑制され、40 $\mu\text{g/ml}$ の処理により未処理の 5.1% に低下した（図 5）。これに対し、ポリミキシン B 添加時における CSM の IL-8 誘導活性および遊走刺激活性は、非添加対照の $99.1 \pm 5.8\%$ ($n=3$) および $90.3 \pm 15.5\%$ ($n=3$) であり、有意な抑制

は認められなかった。

考 察

グラム陰性細菌の外膜は LPS、ペプチドグリカン、リン脂質、蛋白質などの成分で構成され、それぞれの

図 5 *F. nucleatum* CSM の CL 誘導活性に対するポリミキシン B の影響。CSM にポリミキシン B を添加し、室温で 30 分間静置後、 10^6 個の好中球を CSM 濃度 10 $\mu\text{g/ml}$ で刺激した。ポリミキシン B 濃度は CL 反応液中における終濃度として示した。CL 誘導活性はポリミキシン B 非添加対照を 100 とした割合で、平均±標準誤差として表した ($n=3$)。

表 3 *F. nucleatum* CSM および LPS の好中球遊走刺激活性。ポイデン法による遊走細胞数を測定し、Migration index を算出した ($n=3$)。値は平均±標準誤差で表した。* $p < 0.05$ (CSM と LPS の同濃度における比較)

Stimulus	Concentration ($\mu\text{g/ml}$)	Migration index
CSM	0.01	$0.8 \pm 0.5^*$
	0.1	$2.2 \pm 1.3^*$
	1	$3.4 \pm 2.3^*$
	10	$1.5 \pm 0.3^*$
LPS	0.01	0.1 ± 0.1
	0.1	0.4 ± 0.4
	1	0.2 ± 0.3
	10	0.0 ± 0.3

表 4 *F. nucleatum* CSM の前処理が好中球活性化に及ぼす影響。(1) CL 誘導活性。各標品 10 $\mu\text{g/ml}$ 刺激時の活性を、未処理 CSM を 100 とした割合で示した ($n=4$)。 (2) IL-8 誘導活性。各標品 0.1 $\mu\text{g/ml}$ 添加 24 時間後の好中球培養上清中の IL-8 の濃度を測定し、非添加対照の測定値を差し引いた値について、未処理 CSM を 100 とした割合で示した ($n=3$)。 (3) 遊走刺激活性。各標品 0.1 $\mu\text{g/ml}$ に対する Migration index で示した ($n=3$)。値は平均±標準誤差で表した。N. D., 未実験

Treatment of CSM	⁽¹⁾ Chemiluminescence (%)	⁽²⁾ IL-8 induction (%)	⁽³⁾ Migration index
Untreated CSM	100	100	3.1 ± 1.8
Heat treatment :			
80°C, 20 min	24.0 ± 13.8	N.D.	N.D.
95°C, 20 min	2.5 ± 2.3	120.8 ± 11.0	2.6 ± 2.2
Phenol treatment :			
Phenol fraction	2.6 ± 2.0	155.4 ± 15.2	0.1 ± 0.2
Aqueous fraction	0.4 ± 0.6	16.3 ± 9.3	3.7 ± 2.3

成分は多様な生物活性を発揮する。しかし外膜の構造は複雑で種々の成分が相互作用し合っており、外膜としての活性を考える場合には、成分個々の作用の他に複合体としての作用を考慮する必要がある。本研究では *F. nucleatum* の外膜を成分複合体として扱い、好中球活性化因子の実体について検討した。菌体抽出には土屋ら²⁴⁾の報告を参考に、外膜構造をできるだけ破壊や変性を伴わずに抽出でき、透析によって除去可能な HTG を使用した。得られた抽出物 (HE) と、通常、細胞エンベロープ画分 (CE) として用いられる菌体の超音波破壊物について好中球に対する CL 誘導活性を比較した。その結果、HE は CE の約 5 倍の活性を示し、CL 誘導物質の抽出には HTG が有効であった。また HE は CE に比べ糖含有量が高いこと、SDS-PAGE において蛋白質バンドが多く認められたこと、40 mmol/l の HTG では溶菌しなかったこと (以上、データ省略) などから、HTG は外膜の最表層を構造をある程度保持したまま抽出したものと考えられた。

HE は重量比約 70% の蛋白質を含有することから、CL 誘導活性への蛋白質の関与を調べるために、PK 処理を行った。処理に際しては後の操作への残存酵素の影響を除くために、固相法を採用したが、本研究で調製した固相化 PK は十分な酵素活性を保ち、また支持体からの酵素の遊離も認められなかった。PK 処理により HE の蛋白質量は 11% に、糖質量は 86% に減少したが、CL 活性は 1.8 倍に上昇した。この結果は CL 誘導物質が PK の影響を受けないことを示しており、活性への糖質成分の関与が予想された。そこで続いて DEAE イオン交換カラムを四ホウ酸ナトリウムで平衡化し、ホウ酸イオン型カラムとして PK 処理 HE の分画を行った。これはホウ酸イオンがシス型に隣接したヒドロキシル基を有する化合物と錯体を形成する性質を利用して、多糖体成分をカラムに吸着させるためである。溶出液の四ホウ酸ナトリウム濃度を上げるにより、吸着成分はカラムから溶出される。CL 誘導活性はカラムに吸着し、100 mM の四ホウ酸ナトリウムで溶出した。この結果から多糖体成分が活性に関与していることが明らかになった。DEAE カラム吸着画分をゲル濾過カラムによって分画したところ、カラム排除容量直後に溶出されるピーク I にのみ CL 誘導活性が認められたので、それを CSM とした (図 1)。CSM は菌体表層成分の複合体であり、ゲル濾過カラムにおいて分子量は数 100 キロダルトンと推定されたが、菌体表層にこのような高分子凝集体が存在するか否かは不明である。その理由として、CSM 調製の過程において菌体表層では本来結合していない

分子同士が凝集した可能性が考えられるからである。なかでも LPS は分子内に疎水性部分であるリピド A と親水性部分である O 抗原多糖体を有することから、LPS 同士であるいは他の成分と凝集しやすい性質を持つ。また CSM はプロテイナーゼ K 処理を経て調製されており、菌体表層では他の蛋白質と相互作用していることも考えられ、CSM の構造に関しては今後詳細な検討が必要である。

CSM は好中球に対し、スーパーオキシドアニオンや IL-8 の誘導、および遊走刺激活性を示し、その活性は LPS より強力であることが認められた。まず CL 試験およびシトクロム c 還元法による測定において、CSM 刺激では 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度以上で好中球からのスーパーオキシドアニオン産生が認められたのに対し、LPS 刺激では 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ においても産生は認められなかった。しかし CSM の CL 誘導活性が LPS 活性阻害剤であるポリミキシン B によって抑制されたことは、CL 誘導活性に LPS が必要であることを示している。一方、CSM の熱処理やフェノール処理による CL 誘導活性の低下は、蛋白質変性に起因すると考えられた。したがって CL 誘導活性においては、LPS と蛋白質の複合体が活性の実体である可能性が示唆された。CSM に含まれる蛋白質は PK 処理後の残存ポリペプチドであり、それらの由来や PK 抵抗性を示す構造に関しては、今後の検討課題である。LPS と結合し外毒素活性を有する外膜蛋白質として、endotoxin-associated protein (EAP) や、lipid A-associated protein (LAP) が、歯周病関連菌においても報告されている²⁵⁻²⁷⁾。また Takada ら²⁸⁾は *F. nucleatum* から外膜の主要蛋白質である 41 kD ポーリン蛋白質を分離し、その免疫生物学的活性は LPS とは異なることを報告しているが、その際 LPS を完全に除去することはできなかったとしている。すなわち *F. nucleatum* のポーリン蛋白質の一部は LPS と結合して存在することが推測される。これらの蛋白質の CL 誘導活性については検討されていないが、CSM の成分として活性に関与している可能性がある。

好中球のスーパーオキシドアニオン産生に関しては、LPS によるプライミング効果が知られている^{29,30)}。これは細胞を 1~10 ng/ml の LPS と 1% 程度の血清と共に前処理することにより、その後の刺激に伴うスーパーオキシド産生が亢進する現象である。本研究の実験系においては血清非添加であり、細胞の前処理も行っていないことから、CSM によるスーパーオキシドアニオン産生にはプライミング効果は関係していない。

これまでに *F. nucleatum* 菌体や菌体成分刺激によ

る好中球からの活性酸素産生を、ガラクトースが抑制することが報告されており^{11,12,17)}、ガラクトースを介した好中球と菌体との接着が示唆されている。CSMにおいてもそのCL誘導活性がガラクトースにより部分的に抑制されることを確認している(データ省略)。ガラクトースは*F. nucleatum* LPSのO抗原多糖体の成分であり、CL誘導活性へのLPSの関与はこれらの報告を支持するものである。

CSMはまた好中球からのIL-8産生を強く誘導した。IL-8誘導活性はLPSにも認められたが、誘導パターンは両者で異なっていた。すなわち、CSMによる誘導は24時間後まで持続的に認められたのに対し、LPSによる誘導は6時間後には認められなくなった。この結果は少なくとも好中球に対しては、CSMがIL-8誘導の本質的因子である可能性を示唆している。またLPSによるIL-8誘導はポリミキシンBで抑制されたが、CSMのIL-8誘導活性はポリミキシンBの影響を受けなかったこと、さらにCSMをフェノール処理した場合にはフェノール相にIL-8誘導活性が抽出されたことから、IL-8誘導の活性本体は水相に抽出されるLPSとは異なる成分であり、CSMとLPSではIL-8誘導機構に違いがあるものと思われる。Yoshimuraら¹⁴⁾は、*F. nucleatum* LPSのIL-8誘導能は*P. gingivalis*や*Capnocytophaga ochracea*のLPSに比較して高く、*A. actinomycetemcomitance*のLPSと同等であったと報告している。本研究の結果は*F. nucleatum*にはIL-8誘導因子としてLPSに加え、LPSよりも強い活性を有する表層物質が存在することを示している。生体内においては炎症局所で誘導されたIL-8が好中球浸潤や活性化に関わる本質的因子であることから、LPSやCSMは歯周組織における防御機能に影響を及ぼしているものと考えられる。

ボーデン法を用いた遊走試験により、0.01 µg/ml以上のCSM濃度において好中球遊走が認められた。遊走活性は熱処理CSMにおいても認められ、またフェノール処理CSMにおいては水相成分が遊走刺激活性を示した。しかし、CSMの活性はポリミキシンBの影響を受けず、LPSには活性が認められなかったことから、活性の本体はLPS以外の耐熱性の水溶性成分と考えられた。好中球の遊走に関しては、CSMに対する直接的な作用ではなく、添加したウシ胎児血清に由来する遊走因子が、CSMの成分により修飾されて好中球に作用した可能性が考えられるが、熱あるいはフェノール処理の結果からCSMの酵素的な作用はなかったものと思われる。CSMの遊走刺激作用はIL-8の誘導とともに好中球集積に強く関与し

ている可能性を示唆するものである。Lareauら¹³⁾、Sundqvistら³¹⁾は*F. nucleatum*菌体破砕物の遊走作用を報告しているが、本研究とは試料の調製法や検定方法が異なり、CSMの遊走因子と同一であるか否かは不明である。

今回検討したCSMによる好中球活性化作用において、遊走とIL-8は0.01 µg/mlで誘導されたのに対し、スーパーオキシドアニオンの誘導にはその100倍の1 µg/mlの濃度を要した。これらは*in vitro*における結果であり、生体内における作用濃度とは異なるかもしれないが、CSMが歯周組織における好中球機能に影響を及ぼしていることが考えられる。すなわち好中球はCSM濃度勾配に伴って遊走を始め、その際に自らもIL-8を産生してさらに多くの好中球が動員される。*F. nucleatum*が定着している感染局所に到達し、CSM濃度が高くなると好中球はスーパーオキシドアニオンを産生して殺菌を行うものと推察される。歯周組織の細菌叢の中で*F. nucleatum*と他の細菌のバランスが適当である場合には、好中球機能が亢進し生体防御にとって有効に作用するかもしれない。しかし*F. nucleatum*が優勢となった場合は、組織内に滲出する好中球が増加し、活性酸素や他の炎症性メディエーターが大量に放出され組織傷害が引き起こされるであろう。またIL-8のみならずIL-1や腫瘍壊死因子(TNF)など好中球から産生されたサイトカインが、他の免疫担当細胞を活性化し炎症を増悪させることが考えられる。

慢性的な炎症である歯周疾患と*F. nucleatum*との関連を明らかにするために、好中球からの炎症性メディエーターやサイトカイン産生に対してCSMが関与するかどうか検討し、さらにマクロファージやリンパ球などに対するCSMの作用についても解析する必要がある。CSMは多種成分の混合物であり、好中球活性化作用には幾つかの異なる成分が関与していることが明らかになったので、今後これらの成分を同定、精製し、好中球と*F. nucleatum*との相互作用の解明を進めていきたい。

本研究の一部は、平成9、10年度科学研究費補助金(課題番号09771588)の補助により行われた。

文 献

- 1) Klebanoff, S. J.: Oxygen metabolism and the toxic properties of phagocytes. *Ann. Intern. Med.*, 93: 480-489, 1980.
- 2) Tamir, S. and Tannenbaum, S. R.: The role of

- nitric oxide (NO) in the carcinogenic process. Biochem. Biophys. Acta., 1288 : F 31-F 36, 1996.
- 3) Yoshimura, T., Matsushima, K., Tanaka, S., Robinson, E. A., Appella, E., Oppenheim, J. J. and Leonard, J. : Purification of a human monocyte-derived neutrophil chemotactic factor that has peptide sequence similarity to other host defense cytokines. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84 : 9233-9237, 1987.
 - 4) Middleton, J., Neil, S., Wintle, J., Clark-Lewis, I., Moore, H., Lam, C., Auer, M. Hub, E. and Rot, A. : Transcytosis and surface presentation of IL-8 by venular endothelial cells. Cell, 91 : 385-395, 1997.
 - 5) Tsai, C., Ho, Y. and Chen, C. : Levels of interleukin-1 β and interleukin-8 in gingival crevicular fluids in adult periodontitis. J. Periodontol., 66 : 852-859, 1995.
 - 6) Socransky, S. S. : Present status studies on the microbial etiology of periodontal diseases. Genco, R. J. and Mergenhagen, S. E., Host-parasite interactions in periodontal diseases, American Society for Microbiology, Washington, D. C., 1981, 1-12.
 - 7) Kamma, J. J., Nakou, M. and Manti, F. A. : Predominant microflora of severe, moderate and minimal periodontal lesions in young adults with rapidly progressive periodontitis. J. Periodontal. Res., 30 : 66-72, 1995.
 - 8) Moore, W. E. C., Moore, L. H., Ranney, R. R., Smibert, R. M., Burmeister, J. A. and Schenkein, H. A. : The microflora of periodontal sites showing active destructive progression. J. Clin. Periodontol., 18 : 729-739, 1991.
 - 9) Dzink, J. L., Socransky, S. S. and Haffajee, A. D. : The predominant cultivable microbiota of active and inactive lesions of destructive periodontal diseases. J. Clin. Periodontol., 15 : 316-323, 1988.
 - 10) Falkler, W. A. Jr., Lai, R., Vincent, J. W., Dober, L., Spiegel, C. and Hayduk, S. : The ELISA system for measuring antibody reactive to *Fusobacterium nucleatum* in the sera of patients with chronic periodontitis. J. Periodontol., 53 : 762-766, 1982.
 - 11) Mangan, D. F., Novak, M. J., Vora, S. A., Mourad, J. and Kriger, P. S. : Lectinlike interactions of *Fusobacterium nucleatum* with human neutrophils. Infect. Immun., 57 : 3601-3611, 1989.
 - 12) Passo, S. A., Syed, S. A. and Silva, J. Jr. : Neutrophil chemiluminescence in response to *Fusobacterium nucleatum*. J. Periodontal. Res., 17 : 604-613, 1982.
 - 13) Lareau, D. E., Herzberg, M. C. and Nelson, R. D. : Human neutrophil migration under agarose to bacteria associated with the development of gingivitis. J. Periodontol., 55 : 540-549, 1984.
 - 14) Yoshimura, A., Hara, Y., Kaneko, T. and Kato, I. : Secretion of IL-1 β , TNF- α , IL-8 and IL-1 α by human polymorphonuclear leukocytes in response to lipopolysaccharides from periodontopathic bacteria. J. Periodont. Res., 32 : 279-286, 1997.
 - 15) 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.
 - 16) 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 Chemiluminescence 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.
 - 17) 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・殺菌系に及ぼす補体, 抗体の影響. 日歯周誌, 37 : 628-640, 1995.
 - 18) Hodge, J. E. and Hofreiter, B. T. : Determination of reducing sugars and carbohydrates. Methods in Carbohydrate Chemistry. 1 : 380-394, 1962.
 - 19) Westphal, O. and Jann, K. : Bacterial lipopolysaccharides. Extraction with phenol-water and further applications of the procedure. Methods in Carbohydrate Chemistry, 5 : 83-91, 1965.
 - 20) Nakano, M., Sugioka, K., Ushijima, Y. and Goto, T. : Chemiluminescence probe with *Cypridina* luciferin analog, 2-methyl-6-phenyl-3,7-dihydroimidazo [1,2-a] pyrazin-3-one, for estimating the ability of human granulocytes to generate O₂⁻. Anal. Biochem., 159 : 363-369, 1986.
 - 21) Kurashige, S. and Mitsuhashi, S. : Macrophage activity in sarcoma 180 bearing mouse and EL-4 bearing mouse. Gann., 73 : 85-90, 1982.
 - 22) Laemmli, U. K. : Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T 4. Nature, 227 : 680-685, 1970.
 - 23) Merrill, C. R., Goldman, D., Sedman, S. A. and Ebert, M. H. : Ultrasensitive stain for proteins in polyacrylamide gels shows regional variation in cerebrospinal fluid proteins. Science, 211 : 1437-1438, 1981.
 - 24) 土屋友房, 島本 整, 斎藤節生 : 新しい非イオン性界面活性剤ヘプチルチオグルコシドとオクチルチオグルコシドによる膜蛋白質の可溶化と再構成. 蛋白質核酸酵素, 30 : 1058-1066, 1985.
 - 25) Reddi, K., Wilson, M., Poole, S., Meghji, S. and Henderson, B. : Relative cytokine-stimulating

- activities of surface components of the oral periodontopathogenic bacterium *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. Cytokine, 7 : 534-541, 1995.
- 26) Reddi, K., Meghji, S., Wilson, M. and Henderson, B. : Comparison of the osteolytic activity of surface-associated proteins of bacteria implicated in periodontal disease. Oral. Dis., 1 : 26-31, 1995.
- 27) Sharp, L., Poole, S., Reddi, K., Fletcher, J., Nair, S., Wilson, M., Curtis, M., Henderson, B. and Tabona, P. : A lipid A-associated protein of *Porphyromonas gingivalis*, derived from the haemagglutinating domain of the RI protease gene family, is a potent stimulator of interleukin 6 synthesis. Microbiology, 144 : 3019-3026, 1998.
- 28) Takada, H., Ogawa, T., Yoshimura, H., Otsuka, K., Koikeguchi, S., Kato, K., Umemoto, T. and Kotani, S. : Immunobiological activities of a porin fraction isolated from *Fusobacterium nucleatum* ATCC 10953. Infect. Immun., 56 : 855-863, 1988.
- 29) Guthrie, L. A., McPhail, L. C., Henson, P. M. and Johnston, R. B. Jr. : Priming of neutrophils for enhanced release of oxygen metabolites by bacterial lipopolysaccharide. Evidence for increased activity of the superoxide-producing enzyme. J. Exp. Med., 160 : 1656-1671, 1984.
- 30) Aida, Y. and Pabst, M. J. : Neutrophil responses to lipopolysaccharide. Effect of adherence on triggering and priming of the respiratory burst. J. Immunol., 146 : 1271-1276, 1991.
- 31) Sundqvist, G. and Johansson, E. : Neutrophil chemotaxis induced by anaerobic bacteria isolated from necrotic dental pulps. Scand. J. Dent. Res., 88 : 113-121, 1980.

連絡先 :

日本歯科大学新潟歯学部口腔微生物学教室

〒 951-8580 新潟県新潟市浜浦町 1-8