成人性歯周炎患者の歯肉溝滲出液における 多形核白血球のアポトーシスに関する研究

松村 道子 大崎 忠夫 沼部 幸博 鴨井 久一

日本歯科大学歯学部歯周病学講座
(2001年7月7日受理)

Apoptosis of Polymorphonuclear Leukocytes in Gingival Crevicular Fluid from Adult Periodontitis Patients

Michiko Matsumura, Tadao Ohsaki, Yukihiro Numabe and Kyuichi Kamoi

Department of Periodontology, Nippon Dental University School of Dentistry at Tokyo
Accepted for publication 7 July 2001

We studied the amount of dead polymorphonuclear leukocytes (PMNs) in gingival crevicular fluid (GCF) under going apoptosis comparing gingiva in adult periodontitis patients and healthy controls. GCF PMNs (GC-PMNs) were collected from 5 patients with adult periodontitis and 5 controls. To study the effect on peripheral blood PMNs (PB-PMNs) death by GCF, we isolated PB-PMNs from controls. GCF supernatant was taken from healthy (H-GCF) and diseased (AP-GCF) gingiva. To identify apoptotic and necrotic cells, FITC-annexinV and propidium iodide were used with flow cytometry and confocal laser scanning microscopy. We found much higher rate of apoptotic ($19.48 \pm 2.4\%$), and necrotic ($16.79 \pm 4.8\%$) cells in AP-GCF; the rate of apoptotic and necrotic cells in H-GCF was $3.25 \pm 1.86\%$ and $3.52 \pm 3.4\%$. Significantly fewer living cells were found in AP-GCF than in H-GCF. Comparisons among the rate of apoptotic cells of PB-PMNs stimulated by GCF showed controlled ($3.87 \pm 1.1\%$) and AP-GCF ($3.12 \pm 0.87\%$) to both be significantly higher than H-GCF ($1.59 \pm 0.57\%$).

These results demonstrate that diseased sites contain GC-PMNs that under go either apoptosis or necrosis more readily than in healthy subjects. J. Jpn. Soc. Periodontol., 43: 251~259, 2001

Key words : adult periodontitis, polymorphonuclear leukocytes, gingival crevicular fluid, apoptosis, necrosis

要旨：成人性歯周炎患者の歯周炎罹患部位および健常者歯肉における、それぞれの歯肉溝滲出液中の多形核白血球（以下 GC-PMNs）の細胞死に関して、アポトーシスの形をとるものが、どの程度占めているかについて検索した。成人性歯周炎患者および健常者各5名の協力を得、各被験者より GC-PMNs を採取した。また、歯肉溝滲出液（以下 GCF）成分による末梢血多形核白血球（以下 PB-PMNs）の細胞死への影響について検索するため、PB-PMNs を健常者より採取、GCF 上清により刺激した。GCF 上清は、健常者歯肉より採取したもの（以下 H-GCF 群）、歯周炎罹患部位より採取したもの（以下 AP-GCF 群）を用いた。解析は、アポトーシス細胞、ネクローシス細胞の検出試薬として、FITC 標識 annexinV、Propidium iodide を用いて、フローサイトメトリー、および共焦点レーザー走査顕微鏡により行った。その結果、健常者群 GC-PMNs におけるアポトーシス細胞およびネクローシス細胞の比率が、それぞれ $3.25 \pm 1.86\%$ 、 $3.52 \pm 3.4\%$ であるのに対して、患者群 GC-PMNs では、それぞれ $19.48 \pm 2.4\%$ 、 $16.79 \pm 4.8\%$ で、ともに健常者群に比較して患者群でアポトーシス細胞およびネクローシス細胞の比率が有意に高く認められた。生細胞の比率は健常者群に比較して患者群で有意に低かった。また、GCF 刺激による PB-PMNs のアポトーシス細胞の比率は、H-GCF 群 ($1.59 \pm 0.57\%$) に対してコントロール群 ($3.87 \pm 1.1\%$)、AP-GCF 群 ($3.12 \pm 0.87\%$) でそれぞれ有意に高く認められた。以上

の結果より、歯周炎罹患部位では、健常者歯肉に比較して、アポトーシスあるいはネクローシスの形をとる GC-PMNs が多く存在することが示唆された。

索引用語: 成人性歯周炎, 多形核白血球, 歯肉溝滲出液, アポトーシス, ネクローシス

緒 言

多形核白血球 (Polymorphonuclear leukocytes, 以下 PMNs) は歯肉溝滲出液 (Gingival crevicular fluid, 以下 GCF) 中の白血球細胞の 90% 以上を占めており^{1,2)}, 歯肉溝における歯周病原性細菌の侵入に対する初期防御機構において重要な役割を担っている。GCF 中の PMNs (以下 GC-PMNs) は、末梢血中を循環している PMNs (Peripheral blood PMNs, 以下 PB-PMNs) が歯肉結合組織中の毛細血管から遊出し、歯肉溝上皮、接合上皮を介して歯肉溝に達したものである。PMNs は血中に数時間とどまった後、すぐに組織に移行し、1~2 日で寿命を全うする³⁾が、役目を終えた PMNs の大部分はアポトーシスという形の細胞死に至り、貪食細胞により認識され貪食処理されると考えられている⁴⁾。

アポトーシスは、細胞の特徴的な形態学的変化とヌクレオソーム単位での DNA 断片化という生化学的変化の 2 つによって定義されている。アポトーシス細胞の形態学的特徴は、細胞の縮小、クロマチンの核膜周辺への凝縮、核の断片化、微絨毛の消失による細胞表面の平滑化、細胞膜内膜に存在するリン脂質成分であるホスファチジルセリン (Phosphatidylserine, 以下 PS) の細胞表面への露出などである。一方、生化学的変化であるヌクレオソーム単位での断片化は、ヌクレオソームコアをつなぐリンカー部位にある種のエンドヌクレアーゼが作用して、DNA が切断されることによって起こる。

IL-1 β , IL-8, IFN- γ , GM-CSF などのサイトカインや成長因子は、PMNs のアポトーシスを抑制、遅延させ、その寿命を延長することで有効な防御反応が起こるよう働いている^{5,6)}。しかし、PMNs の持つ貪食作用やサイトカイン産生能などは、過剰になると逆に生体に不利益をもたらしかねない。そこでこれらの細胞は役目が終わると同時に消滅することが望ましい。そのために備わっている内的プログラムがアポトーシスであると考えられる。

慢性関節リウマチ (Rheumatoid arthritis, 以下 RA) の病巣局所では、著しい滑膜増殖と炎症細胞浸潤が認められるが、臨床的には RA は決して腫瘍のように無制限に増殖するのではなく、その滑膜細胞の増殖傾向は進行、停止を繰り返すこと、ある程度軟骨

破壊が進むとその部分が繊維化し、炎症が収まっていくことが知られている。最近の研究から、RA 患者の滑膜細胞では Fas 抗原を介したアポトーシスが発現しており、RA 滑膜組織にアポトーシスによる制御機構が働いていることがわかってきている^{7,8)}。歯周炎は細菌感染であり、RA とその病態は異なるが、病巣局所への炎症細胞浸潤がみられるという点では共通しており、炎症反応の急性期には PMNs の過剰な集積が認められる。そして、炎症が抑制され、あるいは慢性化するに従い、その数は減少していくが、このことは急性炎症の際に動員され、相対的に過剰となった細胞の数を平常時の状態に戻すための機構が働いていることを示している。この機構にはアポトーシスが関与していることが考えられるが、歯周病の分野における報告はまだ少ない。

そこで我々は、成人性歯周炎患者の歯周炎罹患部位および健常者歯肉における、それぞれの GC-PMNs の細胞死に関して、アポトーシスの形をとるものがどの程度占めているかについて検索し、そのことが歯周病の発症、進行にどのように関わっているかについて検討するため、アポトーシス過程の早期に細胞表面に露出する PS と結合する性質を持つアポトーシス検出試薬である Annexin V を用いて、フローサイトメトリー、および共焦点レーザー走査顕微鏡による形態学的解析を行った。

研究材料および方法

1. 被験者の選択

被験者には、日本歯科大学歯学部附属病院歯周病科を受診し、成人性歯周炎と診断された患者 5 名 (男性 3 名, 女性 2 名, 平均年齢 51.2 ± 11 歳), および健常者群として日本歯科大学歯学部歯周病学教室医局員 (男性 3 名, 女性 2 名, 平均年齢 28.6 ± 1.3 歳) の協力を得た。被験者はすべて、研究の主旨の説明を十分に受け、理解して協力の得られた者を対象とした。尚、被験者はすべて全身疾患を有さず、過去 3 カ月以内に薬物投与を受けた経験のない者とした。

2. 被験部位の選択

GC-PMNs の採取にあたって、各被験者とも上顎あるいは下顎前歯部より被験部位を選択した。健常者および患者の被験部位の臨床パラメータとして、Gingival index (GI)⁹⁾, Plaque index (PII)¹⁰⁾, Probing

depth (PD) の記録を初診時に行い、患者では、 $GI=1.83\pm0.21$, $PII=1.68\pm0.39$, $PD=5.83\pm1.21$ mm で、4 mm 以上のプロービングデプスを認め、臨床的に歯周ポケットとみなされた部位を被験部位とし、スケーリング・ルートプレーニングが行われていないものを対象とした。また、健常者では、 $GI=0.15\pm0.05$, $PII=0.18\pm0.07$, $PD=1.88\pm0.22$ mm で、臨床的に正常歯肉溝とみなされ、炎症のみられない部位を被験部位とした。

3. 歯肉溝滲出液からの PMNs (GC-PMNs) の分離

上顎あるいは下顎前歯部を対象に、沼部ら¹¹⁾の方法に準じて採取を行った。すなわち、被験部位において、蠕動ポンプ (Perista Pump, アトー株式会社, 東京) で、0.1% ゼラチンを加えた Hanks' Balanced Salt Solution Ca^{2+} , Mg^{2+} -free (HBSS-CMF, Life Technologies Inc., Grand Island, NY, U.S.A.) を 1.8 ml/min の速度で歯肉溝に近心側 (または遠心側) から流入し、遠心側 (または近心側) から吸引、採取した (図 1)。採取後、その溶液を $400\times G$ で 10 分間、 $4^{\circ}C$ で遠心分離し、細胞沈渣を HBSS-CMF で洗浄後、HBSS-CMF 1 ml 中に 1×10^6 個の細胞数となるように調整した。細胞数の計測には、Hemacytometer (Clay Adams Co., Franklin Lake, NJ, U.S.A.) を用いて行った。

4. 末梢血からの PMNs (PB-PMNs) の分離

健常者の前腕の皮静脈より、末梢血 10 ml をヘパリン加チューブ (Venoject II, テルモ株式会社, 東京) を用いて採取した。サンプルチューブ (Falcon 2096, Franklin Lake, NJ, U.S.A.) に Mono-Poly resolving medium (Flow Laboratories Inc., Costamesa, U.S.A.) を 3 ml 入れ、その上に血液 3.5 ml を重層した。その後、 $300\times G$ で 30 分間、室温で遠心分離し、PMNs を含むバフィーコートを取り出した。それを別のサンプルチューブ (Centrifuge Tube 2327-015 イワキガラス株式会社, 千葉) に移し、リン酸緩衝液 (PBS (-), 日本製薬株式会社, 東京) で 2 回洗浄後、PBS (-) 1 ml 中に 2×10^6 個の細胞数となるように調整した。尚、生細胞率 (Viability) の測定は、0.4% Trypan Blue (SIGMA Chemical Co, St. Louis, MO, U.S.A.) を用いて、Trypan Blue Exclusion 法¹²⁾により行った。

5. Annexin V を用いたアポトーシスに伴う細胞表面変化の解析

1) Annexin V について

正常な細胞膜の内膜と外膜にはリン脂質成分が不均等に分布している。リン脂質成分である PS は、主と

図 1 GC-PMNs の回収法

して内膜に分布しているが、アポトーシスの過程の早期に、細胞の種類や誘発要因に関係なく、内膜の PS は細胞表面へ移行して露出する。

アポトーシス検出試薬である Annexin V は、カルシウムの存在下で PS と強固に結合するタンパク質である。Annexin V による染色はアポトーシスの比較的早期の変化であり、DNA 断片化や核凝縮、膜透過性などの変化に先行することが報告¹³⁻¹⁵⁾されていることから、本研究ではフローサイトメトリーおよび共焦点レーザー走査顕微鏡でのアポトーシスの検出に用いた。

2) 各 GC-PMNs 群のアポトーシス細胞の解析

1×10^6 個/ml に調整した各被験者の GC-PMNs 浮遊液 490 μl に、FITC 標識 Annexin V (以下 Annexin V) 5 μl および PI (Propidium iodide) を含む $CaCl_2$ 結合バッファ 5 μl (Annexin V-FITC Kit, Coulter/Immunotech Inc., France) を加え、穏やかに混和した後、 $4^{\circ}C$ 、暗所で 10 分間インキュベーションを行い、直ちに測定した。

解析にはフローサイトメーター (FACScan, Becton Dickinson Inc., San Jose, CA, U.S.A.) を用いて行った。図 2-A, B, C, D にその一例を示す。レーザー光源として波長 488 nm のアルゴンレーザーを用い、フローセル中を通過する細胞浮遊液に照射、前方散乱光 (FSC) および側方散乱光 (SSC) で得られたサイトグラム上で PMNs を識別、ゲーティングし、各サンプルごとに 3,000 個の細胞について解析を行った (図 2-A)。

その後、横軸が FL 1 (Annexin V の蛍光強度を示す)、縦軸が FL 2 (PI の蛍光強度を示す) からなるサイトグラムを作成し (図 2-B)、試料細胞の染色状態により、Annexin V 陽性、PI 陰性のものをアポ

図 2-A フローサイトメーターより得られたサイトグラム

R1 はゲーティングした PMNs の細胞集団を示す。横軸に前方散乱光 (FSC), 縦軸に側方散乱光 (SSC) を示している。

図 2-C フローサイトメーターより得られたヒストグラム (Annexin V)

横軸に蛍光強度 (FL 1), 縦軸に細胞数 (Counts) を示す。M1, M2 はそれぞれ, Annexin V 陰性, Annexin V 陽性の細胞群を表している。

トース細胞, Annexin V 陽性, PI 陽性のものをアポトーシス後期の二次的ネクローシス細胞あるいはネクローシス細胞 (以下ネクローシス細胞), Annexin V 陰性, PI 陰性のものを生細胞として識別し, 各々の全細胞数に占める比率を算出した。尚, プロットされた細胞集団の FL 1, FL 2 それぞれの蛍光強度が明瞭に分かれる領域を陽性, 陰性の境界とした。また, Annexin V および PI の蛍光それぞれに対して, 縦軸に細胞数 (Counts), 横軸に蛍光強度を示すヒスト

図 2-B フローサイトメーターより得られたサイトグラム

横軸の FL 1 は Annexin V の蛍光強度, 縦軸の FL 2 は PI の蛍光強度を示す。

LL は生細胞, LR はアポトーシス細胞, UR はネクローシス細胞を示している。

図 2-D フローサイトメーターより得られたヒストグラム (PI)

横軸に蛍光強度 (FL 2), 縦軸に細胞数 (Counts) を示す。M1, M2 はそれぞれ, PI 陰性, PI 陽性の細胞群を表している。

ラムを作成した (図 2-C, 2-D)。

3) GCF 成分の PMNs アポトーシス発現への影響についての検索

GCF 成分による PMNs のアポトーシス発現への影響を検索するために, 前述と同一の被験者の GCF 上清を用いて実験を行った。GC-PMNs の採取時に分離された GCF 含有 HBSS-CMF に対して, 室温にて

3000×Gで10分間、遠心分離を行った。2×10⁶個/mlに調整した健常者のPB-PMNs各浮遊液100 µlに、患者GCF上清100 µl（以下AP-GCF刺激群）、健常者GCF上清100 µl（以下H-GCF刺激群）、およびコントロール群としてPBS（-）100 µlを各々加え、37°Cのウォーターバス中で6時間プレインキュベーションを行った後、PBS（-）で洗浄し、前述のPMNsのアポトーシス発現の解析と同様の方法で実験を行った。尚、プレインキュベーションの時間設定は予備実験の結果より決定した。

4) 共焦点レーザー走査顕微鏡による形態学的解析

2)と同様に、インキュベーションを行ったサンプルを、蛍光退色防止剤（ProLong™ Antifade Kit, Molecular Probes Inc., Eugene, OR, U.S.A.）と共にスライドガラスに封入した。

各サンプルの観察には、共焦点レーザー走査顕微鏡（LEICA True Confocal System NT, Leica Microscopy and Scientific Instruments Group, Heerbrugg, Switzerland）を使用した。

6. 統計学的検索

健常者群GC-PMNsと患者群GC-PMNsとのアポトーシス細胞の比率（平均値±標準偏差、以下同様）、ネクローシス細胞の比率、および生細胞の比率の比較については対応のないt検定を、AP-GCF刺激群、H-GCF刺激群、およびコントロール群のそれぞれの群間比較については、一元配置分散分析およびFisherのPLSD法による多重比較検定を用いて統計解析を行った。

結 果

1. フローサイトメトリーによる形態学的解析

1) アポトーシス細胞の比率について

健常者群GC-PMNsと患者群GC-PMNsにおけるアポトーシス細胞の比率は、健常者群3.25±1.86%、患者群19.48±2.4%で、患者群においてアポトーシス細胞の比率が有意に高く認められた（ $p<0.01$ ）（図3-A）。

2) ネクローシス細胞の比率について

健常者群GC-PMNsと患者群GC-PMNsにおけるネクローシス細胞の比率は、健常者群3.52±3.4%、患者群16.79±4.8%で、患者群においてネクローシス細胞の比率が有意に高く認められた（ $p<0.01$ ）（図3-B）。

3) 生細胞の比率について

健常者群GC-PMNsと患者群GC-PMNsにおける生細胞の比率は、健常者群92.67±5.02%、患者群

図 3-A アポトーシス細胞の比率
平均値±標準偏差 ** $p<0.01$

図 3-B ネクローシス細胞の比率
平均値±標準偏差 ** $p<0.01$

図 3-C 生細胞の比率
平均値±標準偏差 ** $p<0.01$

62.29±6.37%で、患者群において生細胞の比率が有意に低く認められた（ $p<0.01$ ）（図3-C）。

4) GCF成分のPMNsアポトーシス発現への影響について

GCF刺激によるPB-PMNsのアポトーシス細胞の比率は、コントロール群3.87±1.1%、H-GCF群1.59±0.57%、AP-GCF群3.12±0.87%で、H-GCF群に対してコントロール群（ $p<0.01$ ）、AP-GCF群（ $p<0.05$ ）がそれぞれ有意に高く認められた（図4-A）。

また、GCF刺激によるPB-PMNsのネクローシス

図 4-A GCF 刺激による PB-PMNs のアポトーシス細胞の比率

平均値±標準偏差 * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$

図 4-B GCF 刺激による PB-PMNs のネクロシス細胞の比率

平均値±標準偏差

細胞の比率は、コントロール群 $5.07 \pm 2.64\%$ 、H-GCF 群 $6.07 \pm 2.87\%$ 、AP-GCF 群 $7.35 \pm 4.52\%$ で、各群間において有意差は認められなかった (図 4-B)。

2. 共焦点レーザー走査顕微鏡を用いた形態学的解析

1) GC-PMNs のアポトーシス細胞の観察像について

GC-PMNs のアポトーシス細胞では、細胞表面において Annexin V の染色がみられ、緑色蛍光として観察された。また、細胞膜の不透過性は維持されており、PI による分葉核の染色は認められなかった (図 5-A)。

2) GC-PMNs のネクロシス細胞の観察像について

GC-PMNs のネクロシス細胞では、細胞表面において Annexin V の染色による緑色蛍光がみられた。また、細胞膜透過性のため、分葉核は PI により染色

図 5-A GC-PMNs のアポトーシス細胞の観察像

GC-PMNs のアポトーシス細胞では、細胞表面において Annexin V による染色がみられ、緑色蛍光として観察された。また、細胞膜の不透過性は維持されており、PI による分葉核の染色は認められなかった。

図 5-B GC-PMNs のネクロシス細胞の観察像

GC-PMNs のネクロシス細胞では、細胞表面において Annexin V の染色による緑色蛍光がみられた。また、細胞膜透過性のため、分葉核は PI に染色され、赤色蛍光として観察された。

され、赤色蛍光として認められた (図 5-B)。

考 察

本研究では、成人性歯周炎患者の歯周炎罹患部位および健常者歯肉における、それぞれの GC-PMNs の細胞死に関して、アポトーシスの形をとるものがどの程度占めているかを調べるために、アポトーシス過程の早期に細胞表面に露出する PS の発現状態について検索した。その結果、健常者群 GC-PMNs に比較して、患者群 GC-PMNs においてアポトーシス細胞およびネクローシス細胞の比率が有意に高く認められたが、その理由としては以下のようなことが考えられる。

アポトーシスに関しては、一つには歯周炎罹患部位において、PMNs をはじめとする白血球細胞の炎症巣への浸潤が慢性化しており、長期の細胞の生存は組織破壊を助長することになる。炎症巣では、TNF- α などのアポトーシスを誘発する因子が存在しているほか、GC-PMNs は PB-PMNs に比較して、付着能、遊走能、貪食能など細胞の機能の低下が認められており¹⁶⁻¹⁸⁾、その生存周期が終末に近づいていることなど、細胞自身にプログラムされているアポトーシスの発現をはじめとする恒常性機能が働いて、これらのエフェクター細胞による組織破壊を抑えようとしていることが考えられる。Watson ら¹⁹⁾の研究によると、PMNs が貪食した *Escherichia coli* の数に比例して、そのアポトーシスが亢進することから、細菌を貪食した PMNs は早期にアポトーシスに陥ることで周囲組織に傷害を与えることなくマクロファージなどに処理されることが考えられる。

また、PMNs の細胞表面には LFA-1, Mac-1, p150/95 などの接着因子が存在しているが、GC-PMNs における Mac-1 (CR-3) の発現が、健常者に比較して成人性歯周炎患者で増加しているという報告^{20,21)}や、歯周ポケットの上皮細胞が、健常者の歯肉溝上皮細胞に比較して LFA-1, Mac-1 のリガンドである ICAM-1 を強く発現している²²⁾ことなどからも、歯周ポケットのような炎症の強い環境においては、これらの接着因子が強く発現しており、そのリガンドを持つ細胞などが接着することが考えられる。このように、末梢血中から組織に移行した PMNs の一部には、短い時間で歯肉溝や歯周ポケットを通過して口腔内に出てしまうものもあるが、歯肉溝、特に歯周ポケットにおいては比較的長時間、留まっているものが多く存在し、この間にアポトーシスの形で死滅していくものも少なくないと考えられる。

一方、ネクローシスに関しては、歯周炎罹患部位では PMNs のアポトーシスを抑制、遅延させる因子が多く存在していることから、生存期間中に細菌などの異物を貪食した PMNs がマクロファージに処理されず、respiratory burst を起こした後、ネクローシスの形で死滅していく²³⁾ことなどが理由として考えられる。

さらに本研究では、GCF 成分による PMNs のアポトーシス発現への影響についての検索を行ったが、GCF 刺激後の PB-PMNs のアポトーシス細胞の比率は、H-GCF 群に対してコントロール群、AP-GCF 群において、それぞれ有意に高く認められた。H-GCF 中の成分によりアポトーシスを抑制することが示されたことから、歯肉溝滲出液中の何らかの因子が、アポトーシスの抑制に影響を与えていることが考えられる。Crawford ら²⁴⁾は、歯肉溝滲出液中のエンドトキシンが PMNs のアポトーシスの遅延において主要な因子であると報告しているが、本研究結果においても要因の一つとなっているかもしれない。*Porphyromonas gingivalis* の LPS は PMNs のアポトーシスを濃度依存性に遅延する²⁵⁾といわれており、これらは炎症初期に PMNs により放出される幾つかのサイトカインの産生に関わっており、産生されたサイトカインが間接的にアポトーシスに関わっていることが考えられる。また、IL-1 β , IL-8, IFN- γ , GM-CSF などのサイトカインや成長因子も、PMNs のアポトーシスを遅延させることが報告^{5,6)}されている。これらのサイトカインは歯肉溝滲出液や、歯肉組織中に存在しており²⁶⁻²⁸⁾、歯肉組織の破壊にも関わっている²⁹⁻³²⁾。これら宿主から産生されたサイトカインは、細菌由来の因子とともに宿主応答に影響を与え、PMNs の活性化や、一部の PMNs のアポトーシスを抑制することにより生存期間を引き延ばしているものと考えられる。しかし、アポトーシスの抑制により、歯周ポケットにおける PMNs の細胞死はネクローシスの形態をとるものも多くなり、組織破壊につながる因子が放出されていることが考えられる。

組織中でアポトーシスによって死滅していく PMNs は、マクロファージにより貪食、排除されるが、この機構により、PMNs の細胞内酵素による組織破壊が生じる前に速やかに処理することができ³³⁾。またマクロファージは、アポトーシス細胞において発現している PS を認識、捕捉して貪食することがわかってきている³⁴⁻³⁶⁾。

また、アポトーシスの発現している PMNs では、Fc γ R III の著明な減少が認められるとともに、PS の発現がみられた³⁷⁾ことや、PMNs のアポトーシスの

過程が付着能, 遊走能, 貪食能などの低下に関わっていることが報告^{38,39)}されていることなどから, PMNsの機能の低下とアポトーシスは密接な関係にあるものと考えられる。

アポトーシスとネクローシスは共に, 歯肉縁下におけるPMNsの細胞死の形態として通常みられるものであるが, 歯周炎罹患部位では, 細胞の内的因子のほか, 宿主側の環境的因子, 宿主および細菌などの産生する様々な因子の影響により, アポトーシスあるいはネクローシスの形態をとるPMNsが多く認められたものと考えられる。

本論文の要旨は, 第44回日本歯周病学会(2001年4月25日)において発表した。

文 献

- 1) Attström, R. : Presence of leukocytes in crevices of healthy and chronically inflamed gingivae. *J. Periodont. Res.*, 5 : 42-47, 1970.
- 2) Skapski, H. and Lehner, T. : A crevicular washing method for investigating immune components of crevicular fluid in man. *J. Periodont. Res.*, 11 : 19-24, 1976.
- 3) Squier, M.K.T., Sehnert, A.J. and Cohen, J.J. : Apoptosis in leukocytes. *J. Leukoc. Biol.*, 57 : 2-10, 1995.
- 4) Savill, J.S., Henson, P.M. and Haslett, C. : Phagocytosis of aged human neutrophils by macrophages is mediated by a novel 'charge-sensitive' recognition mechanism. *J. Clin. Invest.*, 84 : 1518-1527, 1990.
- 5) Colotta, F., Re, F., Polentarutti, N., Sozzani, S. and Mantovani, A. : Modulation of granulocyte survival and programmed cell death by cytokines and bacterial products. *Blood*, 80 : 2012-2020, 1992.
- 6) Fossati, G., Mazzucchelli, I., Gritti, D., Ricevuti, G., Edwards, S.W., Moulding, D.A. and Rossi, M. L. : In vitro effects of GM-CSF on mature peripheral blood neutrophils. *Int. J. Mol. Med.*, 6 : 943-951, 1998.
- 7) Firestein, G.S., Nguyen, K., Aupperle, K.R., Yeo, M., Boyle, D.L. and Zvalifler, N., J. : Apoptosis in rheumatoid arthritis. p53 overexpression in rheumatoid arthritis synovium. *Am. J. Pathol.*, 149 : 2143-2151, 1996.
- 8) Nakajima, T., Aono, H., Hasunuma, T., Yamamoto, K., Shirai, T., Hirohata, K. and Nishioka, K. : Apoptosis and functional FAS antigen in rheumatoid arthritis synoviocytes. *Arthritis and Rheumatism*, 38 : 485-491, 1995.
- 9) Løe, H. and Silness, J. : Periodontal disease in pregnancy ; I. Prevalence and severity. *Acta. Odont. Scand.*, 21 : 533-551, 1963.
- 10) Silness, J. and Løe, H. : Periodontal disease in pregnancy ; II. Correlation between oral hygiene and periodontal condition. *Acta. Odont. Scand.*, 22 : 121-135, 1964.
- 11) 沼部幸博, 清信浩一, 鴨井久一 : 末梢血, 歯肉溝滲出液および唾液よりの多形核白血球の分離法について. *歯学*, 79 : 1578-1587, 1992.
- 12) Fallon, H.J., Frei, E., Davidson, J.D., Trier, J.S. and Burk, D. : Leukocyte preparations from human blood : Evaluation of their morphologic and metabolic state. *J. Lab. Clin. Med.*, 59 : 779-791, 1962.
- 13) Koopman, G., Reutelingsperger, C.P.M., Kuijten, G.A.M., Keehnen, R.M.J., Pals, S.T. and Van Oers, M.H.J. : Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis. *Blood*, 84 : 1415-1420, 1994.
- 14) Vermes, I., Haanen, C., Steffens-Nakken, H., and Reutelingsperger, C.P.M. : A novel assay for apoptosis flow cytometric detection of phosphatidylserine expression early apoptotic cells using fluorescein labeled Annexin, V. *J. Immunol. Methods*, 184 : 39-51, 1995.
- 15) van Engeland, M., Nieland, L.J.W., Ramaekers, F. C.S., Schutte, B. and Reutelingsperger, C.P.M. : Annexin V-affinity assay : A review on an apoptosis detection system based on phosphatidylserine exposure. *Cytometry*, 31 : 1-9, 1998.
- 16) Charon, J.A., Metzger, Z., Hoffeld, J.T., Oliver, C., Gallin, J.I. and Mergenhagen, S.E. : An *in vitro* study of neutrophils obtained from the normal gingival sulcus. *J. Periodont. Res.*, 17 : 614-625, 1982.
- 17) Scully, C. : Phagocytic and killing activity of human blood, gingival crevicular, and salivary polymorphonuclear leukocytes for oral streptococci. *J. Dent. Res.*, 61 : 636-639, 1982.
- 18) 清信浩一, 沼部幸博, 鴨井久一 : 末梢血, 歯肉溝滲出液および唾液中多形核白血球の貪食能に関する研究. *日歯周誌*, 37 : 272-286, 1995.
- 19) Watson, R.W.G., Redmond, H.P., Wang, J.H., Condrón, C. and Bouchier-Hayes, D. : Neutrophils undergo apoptosis following ingestion of *Escherichia coli*. *J. Immunol.*, 156 : 3986-3992, 1996.
- 20) 葛城啓彰 : 歯周疾患患者の末梢血および歯肉溝液多形核白血球の補体3レセプター, 活性酸素産生について. *日歯周誌*, 36 : 642-653, 1994.

- 21) 大崎忠夫, 清信浩一, 鴨井久一: 歯周炎患者の歯肉溝滲出液における多形核白血球の貪食能に関する研究. 日歯周誌, 40 : 175-187, 1998.
- 22) Takeuchi, Y., Sakurai, K., Ike, I., Yoshie, H., Kawasaki, K. and Hara, K. : ICAM-1-expressing Tcells in gingival tissue and gingival crevicular fluid as features characterizing inflammatory cell invasion and exudation in adult periodontitis. J. Periodont. Res., 33 : 75-82, 1998.
- 23) Baran, J., Guzik, K., Hryniewicz, W., Ernst, M., Flad, H.D. and Pryma, J. : Apoptosis of monocytes and prolonged survival of granulocytes as a result of phagocytosis of bacteria. Infect. Immun., 64 : 4242-4248, 1996.
- 24) Crawford, J.M., Wilton, J.M.A. and Richardson, P. : Neutrophils die in the gingival crevice, periodontal pocket, and oral cavity by necrosis and not apoptosis. J. Periodontol., 71 : 1121-1129, 2000.
- 25) Preshaw, P.M., Schifferle, R.E., Walters, J.D. : Porphyromonas gingivalis lipopolysaccharide delays human polymorphonuclear leukocyte apoptosis *in vitro*. J. Periodont. Res., 34 : 197-202, 1999.
- 26) Stashenko, P., Jandinski, J., Fujiyoshi, P., Rynar, J. and Socransky, S.S. : Tissue Levels of bone resorptive cytokines in periodontal disease. J. Periodontol., 62 : 504-509, 1991.
- 27) Prahbu, A., Michalowicz, B.S. and Mathur, A. : Detection of local and systemic cytokines in adult periodontitis. J. Periodontol., 67 : 515-522, 1996.
- 28) Okada, H. and Murakami, S. : Cytokine expression in periodontal health and disease. Crit. Rev. Oral. Med. Biol., 9 : 248-266, 1998.
- 29) Offenbacher, S., Odle, B.M. and Van Dyke, T.E. : The use of crevicular fluid prosta-glandin E₂ levels as a predictor of periodontal attachment loss. J. Periodont. Res., 21 : 101-112, 1986.
- 30) Birkedal-Hansen, H. : Role of matrix metalloproteinases in human periodontal diseases. J. Periodontol., 64 : 474-484, 1993.
- 31) Kornman, K.S., Crane, A., Wang, H-Y., di Giovine, F.S., Newman, M.G., Pirk, F.W., Wilson Jr., T.G., Higginbottom, F.L. and Duff, G.W. : The interleukin-1 genotype as a severity factor in adult periodontal disease. J. Clin. Periodontol., 24 : 72-77, 1997.
- 32) Cavanaugh Jr., P.F., Meredith, M.P., Buchanan, W., Doyle, M.J., Reddy, M.S. and Jeffcoat, M.K. : Coordinate production of PGE₂ and IL-1 β in the gingival crevicular fluid of adults with periodontitis : its relationship to alveolar bone loss and disruption by twice daily treatment with ketorolac tromethamine oral rinse. J. Periodont. Res., 33 : 75-82, 1998.
- 33) Savill, J.S., Wyllie, A.H., Henson, J.E., Walport, M.J., Henson, P.M. and Haslett, C. : Macrophage phagocytosis of aging neutrophils in inflammation : programmed cell death in the neutrophil leads to recognition by macrophages. J. Clin. Invest., 83 : 865-875, 1989.
- 34) Verhoeven, B., Schlegel, R.A. and Williamson, P. : Mechanisms of phosphatidylserine exposure, a phagocyte recognition signal, on apoptotic T lymphocytes. J. Exp. Med., 182 : 1597-1601, 1995.
- 35) Fadok, V.A., Savill, J.S., Haslett, C., Bratton, D. L., Doherty, D.E., Campbell, P.A. and Henson, P. M. : Different populations of macrophages use either the vitronectin receptor or the phosphatidylserine receptor to recognize and remove apoptotic cells. J. Immunol., 149 : 4029-4035, 1992.
- 36) Fadok, V.A., Voelker, D.R., Campbell, P.A., Cohen, J.J., Bratton, D.L. and Henson, P.M. : Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages. J. Immunol., 148 : 2207-2216, 1992.
- 37) Homburg, C.H.E., de Hass, M., von dem Borne, A. E.G. Kr., Verhoeven, A.J., Reutelingsperger, C.P. M. and Roos, D. : Human neutrophils lose their surface Fc γ R III and acquire annexin V binding sites during apoptosis *in vitro*. Blood, 85 : 532-540, 1995.
- 38) Whyte, M.K.B., Meagher, L.C., MacDermot, J. and Haslett, C. : Impairment of function in aging neutrophils is associated with apoptosis. J. Immunol., 150 : 5124-5134, 1993.
- 39) Lee, A., Whyte, M.K.B. and Haslett, C. : Inhibition of apoptosis and prolongation of neutrophil functional longevity by inflammatory mediators. J. Leukocyte Biol., 54 : 283-288, 1993.

連絡先 :

日本歯科大学歯学部歯周病学講座

〒102-8158 東京都千代田区富士見2-3-16