歯周病原性細菌により刺激された好中球による 口腔上皮細胞株の傷害性

須藤美央* 葛城啓彰** 斎藤和子**

日本歯科大学新潟歯学部*歯周病学講座, **微生物学講座

(2002年10月5日受理)

Cytotoxic Activity of Neutrophil Leukocytes Stimulated with Periodontopathogens to Oral Epithelial Cells

Mihiro Sutoh*, Hiroaki Katsuragi** and Kazuko Saito**

Department of *Periodontology and **Microbiology, The Nippon Dental University School
of Dentistry at Niigata

Accepted for publication 5 October

Tissue destruction associated with periodontal disease is thought to result not only from direct pathogenic factors related to periodontal disease-causing bacteria, but also from excessive host inflammatory and immunological responses to the pathogenic bacteria concerned. The purpose of this study was to investigate the potential deleterious effects of neutrophils stimulated by periodontal disease pathogens on oral epithelial cells (KB cell line). Periodontal disease pathogens, human peripheral blood neutrophils, and KB cells were used to reproduce the gingival sulcus environment *in vitro*. Pathogenic bacteria used in this study comprised *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*), *Fusobacterium nucleatum*, (*F. nucleatum*) and *Actinomyces actinomycetemcomitans* (*A. actinomycetemcomitans*).

Cellular damage was assessed using the Alamar blue assay and rate of cellular desquamation as indices. In addition, the production of reactive oxygen species (Ros), tumor necrosis factor alpha (TNF α), and prostaglandin E₂ (PGE₂), as well as the release of elastase and matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) from neutrophils stimulated by periodontopathogens, were examined.

The results of this study revealed the following:

1. A 25~30% decline in KB cells was observed in *P. gingivalis*, *F. nucleatum* and *A. actinomycetemcomitans* groups. No significant differences were observed in KB cell reduction among bacterial groups.
2. Greater quantities of Ros, elastase, MMP-9 and TNF α were detected from the *P. gingivalis*, *F. nucleatum* and *A. actinomycetemcomitans* groups than from the PMN-only group. Although a significant difference was observed in quantity of Ros produced among stimulated bacterial species, no difference in amount of elastase or TNF α was identified.
3. A positive correlation was observed between the amount of elastase and MMP-9 released from neutrophils.
4. Compared to the *P. gingivalis* and *F. nucleatum* groups, neutrophilic PGE₂ production was significantly diminished in the *A. actinomycetemcomitans* group.

Based on these results, damage to epithelial cells from neutrophils stimulated by periodontopathogens cannot be attributed to any single factor, but seems to result from the interaction of several factors. J Jpn Soc Periodontol, 44 : 342~355, 2002.

Key words : neutrophils, periodontopathogens, oral epithelial cells

要旨：歯周炎における組織破壊は、歯周病原性細菌の直接的病原性因子のみならず歯周病原性細菌に対する宿主の過度の炎症反応や免疫反応が関与していると考えられている。そこで本実験は歯周病原性細菌により刺激された好中球の歯肉上皮細胞（KB細胞）に対する傷害性を検討することを目的として行った。歯周病原性細菌には *Porphyromonas gingivalis* (Pg), *Fusobacterium nucleatum* (Fn), *Actinobacillus actinomycetemcomitans* (Aa) を用いた。また、歯周病原性細菌により刺激された好中球からの活性酸素、腫瘍壊死因子 α (TNF α)、プロスタグランジン E₂ (PGE₂) 産生とエラスターゼ、好中球グラーチナーゼ (MMP-9) 放出について検討した。

1. Pg, Fn, Aa 実験群において KB 細胞の細胞生存率は、25～30% に低下したが、菌種による著明な差はなかった。
2. Pg, Fn, Aa 実験群において PMN 単独群よりも高い量の活性酸素、エラスターゼ、MMP-9, TNF α , が検出された。活性酸素量は刺激した菌種間で差を認めたが、エラスターゼ量、TNF α 量では認めなかった。
3. 好中球から放出されたエラスターゼ量と MMP-9 量との間に正の相関を認めた。
4. 好中球からの PGE₂ 産生は Pg 群, Fn 群に比べ、Aa 群で有意に低下していた。

以上のことより、歯周病原性細菌により刺激された好中球による上皮細胞への傷害は、単一要因によるものではなく様々な因子の相互作用による惹起されると考えられた。

索引用語：好中球、歯周病原性細菌、口腔上皮細胞

緒 言

歯周炎における組織破壊は、歯周病原性細菌の直接的病原性因子のみならず歯周病原性細菌に対する宿主の過度の炎症反応や免疫反応が関与していると考えられている。歯周炎の発症初期には、歯肉固有層の毛細血管から多数の好中球が組織中に遊走し、集積する。好中球は歯肉溝滲出液中の細胞成分の 90% を占め、正常な付着上皮内にも存在しているが、歯肉に炎症がおこると菌体成分やサイトカインの働きにより、滲出量が増加する。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の主体をなす好中球の作用は、異物の貪食、殺菌であり、これを担うのがアズール顆粒および特殊顆粒中に存在する好中球エラスターゼをはじめとした中性プロテアーゼおよび細胞膜に存在する NADPH オキシターゼ、およびアズール顆粒中に存在するミエロペルオキシダーゼにより産生される活性酸素である。これらの殺菌性物質は、微生物などの異物を殺菌・消化するものであるが、過剰に産生され細胞外へ放出されると歯周組織を破壊したり、新たな炎症性メディエーターの産生を促す可能性がある。

Altman ら¹⁾は、MPO-H₂O₂-ハロゲン化物とエラスターゼを上皮細胞に作用させることにより細胞崩壊 (lysis) と、細胞崩壊を伴わない剥離 (detachment) があると報告している。また、Katuragi ら²⁾は歯肉溝内に滲出した好中球が、歯周病原性細菌を貪食することにより細胞外に活性酸素を産生すると報告しており、また、鈴木ら³⁾により歯肉線維芽細胞である Gin-

1 細胞を対象として好中球と歯周病原性細菌による傷害について研究している。そこで今回は歯周病原性細菌に刺激された好中球の歯肉上皮細胞に対する傷害性を検討する目的で行った。本実験では歯肉上皮細胞のモデルとして鼻咽腔癌由来であるが、口腔粘膜上皮のモデルとして多くの実験⁴⁻⁹⁾に使用されており、また、実験の再現性が得られやすい KB 細胞を使用した。ヒト好中球と歯周病原性細菌を入れたセルカルチャーインサートシステムを用いて KB 細胞への傷害の検討を行った。歯肉溝の環境を *in vitro* で再現した好中球-上皮細胞培養系で歯周病原性細菌として *Actinobacillus actinomycetemcomitans* (A. actinomycetemcomitans), *Fusobacterium nucleatum* (F. nucleatum), *Porphyromonas gingivalis* (P. gingivalis) の 3 菌種を用いた。

材料および方法

1. 歯周病原性細菌の調製

使用菌株として A. actinomycetemcomitans Y 4, P. gingivalis FDC 381, F. nucleatum ATCC 25586 を用いた (いずれの菌もサンスター (株) より御分与頂いた)。A. actinomycetemcomitans は Brain Heart Infusion 液体培地 (BHI ; Difco, MD, USA), P. gingivalis は 0.5% Yeast Extract (BBL, MD, USA), 0.001% Vitamin K 1 (半井化学, 京都), 0.0005% Hemin (Sigma, MI, USA) を添加した BHI 液体培地, F. nucleatum は GAM ブイヨン (ニッスイ, 東京) を増殖培地とした。F. nu-

cleatum, *P. gingivalis* は嫌気培養装置 (ヒラサワ, 東京) 中で嫌気的条件下 (N_2 :80%, H_2 :10%, CO_2 :10%) で, *A. actinomycetemcomitans* は炭酸ガス培養器 (5% CO_2 , 95% air) 中でそれぞれ 37°C, 48 時間培養を行った。実験に供する際には, 菌を phosphate-buffered saline (PBS) で 2 回洗浄し, 0.1% gelatin を含む Hanks balanced salt solution (Gel-HBSS) にて懸濁液とし, 分光光度計 Spectronic 20 型 (島津製作所, 京都) を用い, 540 nm にて optical density (O.D.) 0.3 になるように調整した。

2. 上皮細胞の培養

本実験では鼻咽腔癌由来の上皮細胞株である KB 細胞 ATCC:CCL-17 (大日本製薬, 東京) を使用した。

培地には Keratinocyte-SFMTM (2.5 μ g Recombinant Epidermal Growth Factor, 25 mg Bovine Pituitary Extract 含有; GIBCO, NY, USA) を用い, 炭酸ガス培養器中 (5% CO_2 , 37°C) で培養した。細胞はサブコンフルエントになるよう週に一度継代と培地交換をそれぞれ行った。継代した KB 細胞を 12 ウェルセルカルチャープレート (Falcon, NJ, USA) に 5×10^4 cell/well 播種し, 炭酸ガス培養器中 (5% CO_2 , 37°C) で 24 時間培養し, 実験に供した。

3. 末梢血からの好中球と血清の分離

健常者の前腕正中皮静脈より静脈血をヘパリン加チューブに採取し, Mono-Poly Resolving Medium (大日本製薬, 東京) を用いた比重遠心法によって好中球を分離した。得られた好中球の分離層のみをサンプルチューブに移し, リン酸緩衝液 (PBS) を加え, 180×G で 2 回洗浄し, 1×10^7 cell/ml の細胞数に調整した。また静脈血の一部から通法に従って血清を分離し実験に供した。なお, 被験者には研究の主旨を説明し, 同意を得られた者から静脈血の採血を行った。

4. 細胞傷害性試験

1) アラマブルーアッセイ^{10,11)}

予備実験として 96 穴セルカルチャープレートに 1×10^2 cell/ml ~ 1×10^6 cell/ml の KB 細胞を播種し, 37°C, 5% CO_2 下で 24 時間インキュベート後, アラマブルー (大日本製薬, 東京) を 10% w/w になるよう添加した。37°C, 5% CO_2 下で 4 時間インキュベートし, 蛍光プレートリーダーフルオロスキャンアセント FL (大日本製薬, 東京) にて細胞生存数を測定 (励起波長 544 nm, 測定波長 590 nm) し, 細胞数と蛍光強度が比例していることを確認した。

2) 細胞生存数測定

12 穴セルカルチャープレートに KB 細胞を 5×10^4 cell/ml 播種し, 37°C, 5% CO_2 下で 24 時間インキュベートした。その後, セルカルチャーインサート (Falcon, NJ, USA) を挿入し, インサート内に好中球 (PMN) 0.2 ml, 歯周病原性細菌 0.2 ml, 血清 0.02 ml, HBSS 1.58 ml 加え, 全量を 2 ml にして 37°C, 5% CO_2 下でインキュベートしたものを実験群とした。また, 対照として各プレートに KB 細胞のみでインキュベートしたウェル (コントロール群), インサート内に PMN 0.2 ml, 血清 0.02 ml, HBSS を加え 2 ml とし, インキュベートしたウェル (PMN 単独群) とした。インキュベート時間は, 経時的な変化も調べるため 2 時間, 6 時間, 18 時間に設定した。各ウェルよりセルカルチャーインサートを撤去し, 18 時間インキュベートしたウェルの培養上清を -20°C で保存した。各ウェルに 10% アラマブルー添加培地 2 ml 加え, 37°C, 5% CO_2 下で 4 時間インキュベート後, 蛍光プレートリーダーフルオロスキャンアセント FL にて KB 細胞の細胞生存数を測定 (励起波長 544 nm, 測定波長 590 nm) した。さらに歯周病原菌単独による KB 細胞への影響を観察するため, セルカルチャーインサート内に歯周病原菌と HBSS のみを加え, KB 細胞とインキュベートしたウェルの生存細胞数を測定したが, KB への影響がコントロール群と差がなく, 以下の測定においてはコントロール群, PMN 単独群を実験群の対照とした。

5. 細胞剥離率の測定

細胞傷害性試験で使用したプレートを自然乾燥後メタノール固定し, ギムザ染色液で核染色した。これを倒立顕微鏡 Argus-20 画像解析システム (ニコン, 東京) を用いて各ウェルの任意の 3 カ所を 100 倍に拡大して観察し, 得られた画像を NIH image にて画像解析し, 3 カ所の視野における細胞の平均細胞占有面積値を求めた。コントロール群の平均細胞占有面積値と PMN 単独群および実験群の平均細胞占有面積値より剥離率を算出した。

剥離率(%) = $100 - \{ (\text{各テスト系ウェルの平均細胞占有面積値} / \text{コントロールウェルの平均細胞占有面積値}) \times 100 \}$

6. 活性酸素産生の測定

96 穴発光測定用マイクロプレート (大日本製薬, 東京) を用いて PMN 0.1 ml, 歯周病原性細菌 0.1 ml, 血清 0.01 ml, ルミノール (和光純薬, 大阪) 0.1 ml を加え, 37°C で 2 時間インキュベートし, 化学発光プレートリーダーフルオロスキャンアセント (大日本製薬, 東京) にて 2 時間の発光強度の変化を

測定した。

7. 好中球エラスターゼの測定

エラスターゼの測定には顆粒球エラスターゼ EIA™ (三和化学研究所, 名古屋) を使用した。細胞傷害性試験で保存した培養上清を検体希釈液で 51 倍に希釈し, 抗体結合プレートに検体を 50 μ l 入れ, 室温で 1 時間インキュベーションした。付属の洗浄液で 3 回洗浄し, 次に酵素標識抗体液を 50 μ l 入れ, 室温で一時間反応後, 洗浄液で 3 回洗浄した。基質液 100 μ l 入れ, 酵素反応を室温で 15 分行った後, 反応停止液 100 μ l 加え, 波長 490~492 nm で吸光度を Multi-Spectrophotometer Vient™ (大日本製薬, 東京) で測定し, 得られた検量線よりエラスターゼ濃度を算出した。

8. 腫瘍壊死因子 (TNF α) の測定

TNF α の測定には human TNF α Immunoassay kit (BIOSOURCE International, camarillo, CA, USA) を使用した。細胞傷害性試験で保存した培養上清を検体希釈液で 10 倍に希釈した。抗体結合プレートに検体を 100 μ l 入れ, 37°C で 2 時間置き, 4 回洗浄した。ビオチン化抗 TNF α 抗体 100 μ l 入れ, 室温で 1 時間置き, 4 回洗浄した。ストレプトアビジン-HRP 100 μ l を入れ, 室温で 30 分置き, 4 回洗浄した。基質液を 100 μ l 入れ, 室温で 30 分反応させた後, 反応停止液 100 μ l 加え, 波長 450 nm で Multi-Spectrophotometer Vient™ (大日本製薬, 東京) を用いて吸光度を測定し, 得られた検量線より TNF α 濃度を算出した。

9. プロスタグランジン E₂ (PGE₂) の測定

PGE₂ の測定には prostaglandin E₂ enzyme immunoassay (EIA) system (Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, UK) を使用した。抗体結合プレートに細胞傷害性試験で保存した培養上清, 抗体, PGE₂ 結合体をそれぞれ 50 μ l 入れ, 室温で 1 時間インキュベートした。付属の洗浄液で 4 回洗浄し, 基質液 150 μ l 入れ, 室温で 30 分おいた後, 波長 630 nm で Multi-Spectrophotometer Vient™ (大日本製薬, 東京) を用いて吸光度を測定し, 得られた検量線より PGE₂ 濃度を算出した。

10. マトリックスメタロプロテアーゼ (MMP-9) の測定

MMP-9 の測定には Matrix metalloproteinase-9 activity assay system (Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, UK) を使用した。マイクロプレートに細胞傷害性試験で保存した培養上清を 50 μ l 入れ, 一晚 2-8°C でインキュベートした。翌日, プレート内の上清サンプルを除去し, 付属の洗浄

液で 4 回洗浄した。p-Aminophenylmercuric acetate (APMA), アッセイバッファーをそれぞれ 50 μ l, 各ウェルに入れ, 37°C 1.5 時間インキュベートした。検出液 50 μ l を各ウェルに入れ, 波長 405 nm で Multi-Spectrophotometer Vient™ (大日本製薬, 東京) を用いて吸光度 (t_0) を測定した。37°C で 1 時間インキュベート後再び波長 405 nm で同様に吸光度 (t_2) を測定した。これらの波長データより検量線を作製し, MMP-9 濃度を算出した。

11. 細胞傷害抑制試験

各種活性酸素消去剤およびプロテアーゼインヒビターが好中球の KB 細胞傷害に及ぼす影響を検討した。傷害抑制実験に用いた阻害剤は, 10⁻³mol, 10⁻⁴mol アジ化ナトリウム (和光純薬, 大阪), 500 μ g/ml superoxide dismutase (SOD: SIG A, MI, USA), 500 μ g/ml カタラーゼ (SIGMA, MI, USA), 125 μ g/ml プロテアーゼインヒビター (PROTEASE INHIBITOR COCKTAIL: SIGMA, MI, USA) の 4 種類である。これら 4 種の阻害剤をセルカルチャーインサート内に添加し, プレートは傷害性試験と同様に 37°C, 5% CO₂ 下でインキュベートした。

歯周病原性細菌刺激好中球による細胞数の減少を細胞傷害率として表し, 阻害剤による影響を検討した。細胞傷害率は次式にて算出した。

$$100 - \{ (\text{各テスト系ウェルの細胞生存数} / \text{コントロールウェルの細胞生存数}) \times 100 \}$$

細胞傷害試験と同様に各ウェルよりセルカルチャーインサートを撤去し, 培養上清を -20°C で保存した。各ウェルに 10% アラマブルー添加培地 2 ml を加え, 37°C, 5% CO₂ 下で 4 時間インキュベート後, 蛍光プレートリーダーフルオロスキャンアセトン FL にて KB 細胞の細胞生存数を測定 (励起波長 544 nm, 測定波長 590 nm) した。細胞生存数を測定したプレートは, メタノール固定, ギムザ染色し, 剥離率を測定した。

12. 統計分析

有意差検定には Fisher の PLSD 検定を行った。また, 細胞傷害性と好中球由来傷害性因子, 傷害性因子間の相関の有無には Pearson の相関係数を求めることによって検定した。

結 果

1. 細胞傷害性試験

各歯周病原性細菌と PMN を 2 時間から 18 時間反応させ, KB 細胞と共培養したときの KB 細胞の細胞

図1 歯周病原性細菌により刺激された好中球による上皮細胞傷害の経時的変化

生存数（蛍光強度）の経時的変化を図1に示す。KB細胞と2時間共培養させた系ではコントロール群（KB細胞のみ）： $2,446.0 \pm 72.4$ (RFU), *P. gingivalis* 群： $2,584.4 \pm 219.5$ (RFU), *F. nucleatum* 群： $2,472.3 \pm 181.0$ (RFU), *A. actinomycetemcomitans* 群： $2,609.5 \pm 334.7$ (RFU) で各群間のKB細胞の生存細胞数に差は認めなかった。6時間値ではコントロール群： $2,527.6 \pm 34.9$ (RFU), *P. gingivalis* 群： $2,140.1 \pm 753.6$ (RFU), *F. nucleatum* 群： $1,795.5 \pm 772.9$ (RFU), *A. actinomycetemcomitans* 群： $1,845.6 \pm 626.0$ (RFU) となり、2時間から6時間の間では時間依存的に歯周病原性細菌をPMNと反応させた全ての群において減少を認め、6時間値においてコントロール群に対し、*F. nucleatum* 群, *A. actinomycetemcomitans* 群において有意なKB細胞の生存数減少を認めた ($p < 0.05$)。18時間値ではコントロール群の生存細胞数は2時間値と比べ変化がなく、 $2,456.7 \pm 118.9$ (RFU) であった。これに対し、*P. gingivalis* 群： $1,818.5 \pm 464.5$ (RFU), *F. nucleatum* 群： $1,778.1 \pm 386.3$ (RFU), *A. actinomycetemcomitans* 群： $1,804.3 \pm 486.0$ (RFU) となり、コントロール群に対し *P. gingivalis* 群, *F. nucleatum* 群, *A. actinomycetemcomitans* 群で有意な減少を認めた ($p < 0.0001$)。また、歯周病原性細菌3種とKB細胞を共培養し、菌の添加時のKB細胞生存数を測定したが、いずれもコントロール群と生存細胞数に差がなかった。

実験群のKB細胞生存数を18時間培養値で比較す

ると、*P. gingivalis* 群, *A. actinomycetemcomitans* 群に比べ、*F. nucleatum* 群においてKB細胞生存数のわずかな低下を認めたが、有意差はみられなかった。

2. 各歯周病原性細菌により刺激された好中球による細胞剥離

各歯周病原性細菌とPMNを2時間から18時間反応させ、KB細胞と共培養したときのKB細胞の剥離率の経時的変化を図2に示す。KB細胞と2時間共培養させた値では *P. gingivalis* 群： $7.0 \pm 15.8\%$, *F. nucleatum* 群： $-0.4 \pm 22.5\%$, *A. actinomycetemcomitans* 群： $1.5 \pm 11.2\%$ であった。6時間値では *P. gingivalis* 群： $4.5 \pm 6.9\%$, *F. nucleatum* 群： $4.3 \pm 9.9\%$, *A. actinomycetemcomitans* 群： $15.1 \pm 14.3\%$ であった。18時間値では *P. gingivalis* 群： $18.3 \pm 10.2\%$, *F. nucleatum* 群： $20.6 \pm 18.6\%$, *A. actinomycetemcomitans* 群： $23.5 \pm 20.3\%$ となり、*P. gingivalis* 群, *F. nucleatum* 群, *A. actinomycetemcomitans* 群ともにほぼ時間依存的に剥離率の上昇を認め、2時間、6時間、18時間の全ての時点において *A. actinomycetemcomitans* 群の剥離率が高い傾向を示した。18時間値での *P. gingivalis* 群, *F. nucleatum* 群, *A. actinomycetemcomitans* 群のKB細胞生存数の菌種間による比較では、*P. gingivalis* 群, *F. nucleatum* 群, *A. actinomycetemcomitans* 群はそれぞれ上記の値を示し、*A. actinomycetemcomitans* 群, *F. nucleatum* 群, *P. gingivalis* 群の順で高い率を認めたが、菌種間に有意差は存在しなかった。

図 2 歯周病原性細菌により刺激された好中球による上皮細胞剥離率の経時的変化

Pg : *P. gingivalis* Fn : *F. nucleatum* * : $p < 0.0001$
Aa : *A. actinomycetemcomitans* ** : $p < 0.05$

図 3 歯周病原性細菌の刺激による好中球からの活性酸素産生量 (積算値)

Pg : *P. gingivalis* Fn : *F. nucleatum*
Aa : *A. actinomycetemcomitans*

* : $p < 0.0001$ versus control

** : $p < 0.01$ *** : $p < 0.05$

図 4 培養上清中のエラスターゼ濃度

3. 活性酸素産生量

各歯周病原性細菌により刺激された PMN による活性酸素産生量 (積算値) は *P. gingivalis* : 10.9 ± 7.4 (RCU), *F. nucleatum* 群 : 30.6 ± 18.9 (RCU), *A. actinomycetemcomitans* 群 : 12.4 ± 14.2 (RCU) であり (図 3), *F. nucleatum* 群において *P. gingivalis* 群, *A. actinomycetemcomitans* 群に対し有意に高い産生量が認められた。無刺激 PMN 単独群からの活性酸素産生はほとんど認めなかった。

4. エラスターゼ放出量

図 4 に各歯周病原性細菌と PMN を 18 時間反応さ

せたときの培養上清中のエラスターゼ濃度を示す。PMN 単独群では 55.4 ± 30.4 ng/ml のエラスターゼの放出を認めたが, コントロール群 (KB 細胞のみ) ではほとんどエラスターゼの放出を認めなかった。*P. gingivalis* 群は 183.1 ± 74.2 ng/ml のエラスターゼ放出を示し, コントロール群に対し有意に高かった ($p < 0.01$)。*F. nucleatum* 群では 240.0 ± 121.3 ng/ml のエラスターゼ放出がみられ, コントロール群, PMN 単独群に対し有意に高い放出を認めた ($p < 0.0001$)。*A. actinomycetemcomitans* 群においても 233.7 ± 99.1 ng/ml のエラスターゼ放出がみられ, *F.*

図5 培養上清中のTNF α 濃度

図7 培養上清中のMMP-9濃度

nucleatum 群と同様、コントロール群、PMN 単独群に対し有意に高い放出を示した ($p < 0.0001$)。

5. TNF α 産生量

図5に各歯周病原性細菌とPMNを18時間反応させたときの培養上清中のTNF α 濃度を示す。コントロール群：13.3 $\pm$ 6.5 pg/ml, *P. gingivalis* 群：41.2 $\pm$ 47.1 pg/ml, *F. nucleatum* 群：39.9 $\pm$ 29.3 pg/ml, *A. actinomycetemcomitans* 群：26.4 $\pm$ 40.0 pg/ml, PMN 単独群：8.5 $\pm$ 3.5 pg/ml となり、歯周病原性細菌と反応させた群で高いTNF α の産生を認めたが、コントロール群、PMN 単独群との間に有意差は認められなかった。また、菌種間による比較では *P. gingivalis* 群, *F. nucleatum* 群がそれぞれ 40 pg/ml 前後であるのに対し *A. actinomycetemcomitans* 群では 26 pg/ml となり、*P. gingivalis* 群,

図6 培養上清中のPGE₂濃度

F. nucleatum 群に対し、*A. actinomycetemcomitans* 群からのTNF α 産生が低い傾向がみられた。

6. プロスタグランジン E₂ 産生量

図6に各歯周病原性細菌とPMNを18時間反応させたときの培養上清中のPGE₂濃度を示す。各群のPGE₂産生量は、*P. gingivalis* 群、6.2 $\pm$ 1.9 pg/ml, *F. nucleatum* 群：6.1 $\pm$ 2.8 pg/ml, *A. actinomycetemcomitans* 群：3.6 $\pm$ 2.5 pg/ml, PMN 単独群：6.8 $\pm$ 0.5 pg/ml となり、*P. gingivalis* 群, *F. nucleatum* 群, PMN 単独群ではほぼ同量のPGE₂産生量が認められた。*A. actinomycetemcomitans* 群ではこれら3群に対し、有意に低いPGE₂産生量を示した ($p < 0.05$)。

7. MMP-9 放出量

図7に各歯周病原性細菌とPMNを18時間反応させたときの培養上清中のMMP-9濃度を示す。コントロール群からのMMP-9放出は認めなかった。放出MMP-9量は *P. gingivalis* 群：4.1 $\pm$ 2.1 pg/ml, *F. nucleatum* 群：3.8 $\pm$ 1.5 pg/ml, *A. actinomycetemcomitans* 群：4.6 $\pm$ 3.5 pg/ml のMMP-9放出を認め、コントロール群に対し有意に高いMMP-9放出を認めた ($p < 0.01$)。また、菌種間による比較では *P. gingivalis* 群, *F. nucleatum* 群が近似した値を示し、*A. actinomycetemcomitans* 群はこれら2群に比べわずかに高いMMP-9放出量を示した。PMN 単独群では 2.1 $\pm$ 1.5 pg/ml となり、歯周病原性細菌と反応させた群の約1/2の放出量を認めたが、有意差はなかった。

8. 細胞傷害性と好中球由来傷害因子との相関関係

図8は各歯周病原性細菌とPMNを18時間反応させたときの細胞傷害と活性酸素産生量 (図8-a), 細胞傷害とエラスターゼ放出量 (図8-b), 細胞傷害とTNF α 産生量 (図8-c) との関係を示している。細

図 8 細胞傷害性と好中球由来傷害因子との相関関係

胞傷害と活性酸素産生量との間では、活性酸素産生量が高くなるに伴い細胞傷害が低下する傾向がみられた ($r = -0.219$)。細胞傷害とエラスターゼ放出量との間においてもエラスターゼ放出量が高くなるに伴い細胞傷害が増加する傾向がみられた ($r = -0.228$)。細胞傷害と TNF α 産生量の間では TNF α 産生量が高くなるに従い細胞傷害が増加する傾向がみられた ($r = 0.226$)。しかし、いずれの関係においても有意な相関関係は認められなかった。そこで活性酸素とエラスターゼの相乗効果を見る目的で、活性酸素産生量とエラスターゼ放出量の積算値と細胞傷害との相関を調べた結果、活性酸素産生量とエラスターゼ放出量の積算値が高くなるに伴い細胞傷害が有意に低下していることが認められた ($r = -0.372$) (図 8-d)。

9. 好中球由来傷害因子間の相関関係

図 9 は各歯周病原性細菌と PMN を 18 時間反応させたときの培養上清中の活性酸素産生量とエラスターゼ放出量 (図 9-a)、活性酸素産生量と TNF α 産生量 (図 9-b)、エラスターゼ放出量と TNF α 産生量 (図

9-c)、エラスターゼ放出量と MMP-9 放出量 (図 9-d) との関係を示している。活性酸素産生量とエラスターゼ放出量の間では活性酸素産生量が増加するにつれエラスターゼ放出量も増加する傾向がみられた ($r = 0.310$)。活性酸素産生量と TNF α 産生量の間では活性酸素産生量が増加するにつれ TNF α 産生量は減少する傾向がみられた ($r = -0.172$)。

エラスターゼ放出量と TNF α 産生量の間ではエラスターゼ放出量が増加するにつれ TNF α 産生量は有意な減少がみられた ($r = -0.517$)。エラスターゼ放出量と MMP-9 放出量の間ではエラスターゼ放出量が増加するにつれ MMP-9 放出量も有意に増加していた ($r = 0.433$)。

10. 各種阻害剤の活性酸素産生に及ぼす影響

活性酸素の阻害剤であるアジ化ナトリウム、SOD、カタラーゼが活性酸素産生に及ぼす影響を観察した (表 1)。P. gingivalis 群ではアジ化ナトリウム 10^{-3} mol 添加群において有意な活性酸素産生の抑制を認めた ($p < 0.005$)。F. nucleatum 群ではアジ化

図 9 好中球由来傷害因子間の相関関係

表 1 各種阻害剤による活性酸素産生に及ぼす影響

	積算値 (RCU)
<i>P. gingivalis</i> + PMN	阻害剤なし
	10.9 $\pm$ 7.4
	Azide 10 ⁻³ mol
	2.3 $\pm$ 1.7
	10 ⁻⁴ mol
	6.1 $\pm$ 8.0
<i>F. nucleatum</i> + PMN	SOD (500 μ g/ml)
	9.9 $\pm$ 7.8
	catalase (500 μ g/ml)
	12.9 $\pm$ 10.6
	阻害剤なし
	30.6 $\pm$ 18.9
<i>A. actinomycetemcomitans</i> + PMN	Azide 10 ⁻³ mol
	5.3 $\pm$ 3.3
	10 ⁻⁴ mol
	12.3 $\pm$ 8.2
	SOD (500 μ g/ml)
	30.1 $\pm$ 20.6
	catalase (500 μ g/ml)
	18.1 $\pm$ 11.6
	阻害剤なし
	15.1 $\pm$ 13.0
	Azide 10 ⁻³ mol
	2.1 $\pm$ 1.3
	10 ⁻⁴ mol
	4.4 $\pm$ 3.8
	SOD (500 μ g/ml)
	10.6 $\pm$ 10.2
	catalase (500 μ g/ml)
	8.4 $\pm$ 5.9

表 2 各種阻害剤による細胞傷害に及ぼす影響

		傷害率 (%)
<i>P. gingivalis</i> + PMS	阻害剤なし	27.6±17.1
	Azide 10 ⁻³ mol	17.6±18.6
	10 ⁻⁴ mol	18.9±20.9
	SOD (500 µg/ml)	4.7±3.6
	catalase (500 µg/ml)	N.D.
	Protease inhigitor (125 µg/ml)	8.2±11.3
<i>F. nucleatum</i> + PMN	阻害剤なし	28.1±15.7
	Azide 10 ⁻³ mol	29.7±20.1
	10 ⁻⁴ mol	30.8±22.0
	SOD (500 µg/ml)	16.2±1.9
	catalase (500 µg/ml)	6.9±5.8
	Protease inhigitor (125 µg/ml)	23.4±7.4
<i>A. actinomycetemcomitans</i> + PMN	阻害剤なし	27.4±17.6
	Azide 10 ⁻³ mol	42.8±34.5
	10 ⁻⁴ mol	30.8±20.0
	SOD (500 µg/ml)	22.1±3.2
	catalase (500 µg/ml)	25.5
	Protease inhigitor (125 µg/ml)	26.21±15.6

表 3 各種阻害剤による剥離率に及ぼす影響

		剥離率 (%)
<i>P. gingivalis</i> + PMN	阻害剤なし	18.3±10.2
	Azide 10 ⁻³ mol	23.6±20.8
	10 ⁻⁴ mol	21.0±26.0
	SOD (500 µg/ml)	44.1
	catalase (500 µg/ml)	8.4
	Protease inhigitor (125 µg/ml)	24.8±2.2
<i>F. nucleatum</i> + PMN	阻害剤なし	20.6±18.6
	Azide 10 ⁻³ mol	32.0±4.6
	10 ⁻⁴ mol	21.3±27.9
	SOD (500 µg/ml)	47.0
	catalase (500 µg/ml)	5.1
	Protease inhigitor (125 µg/ml)	26.6±12.8
<i>A. actinomycetemcomitans</i> + PMN	阻害剤なし	23.5±20.3
	Azide 10 ⁻³ mol	28.8±18.8
	10 ⁻⁴ mol	30.5±33.6
	SOD (500 µg/ml)	53.1
	catalase (500 µg/ml)	28.1
	Protease inhigitor (125 µg/ml)	9.4±6.1

ナトリウム 10⁻³ mol 添加群 (p<0.0001), 10⁻⁴ mol 添加群 (p<0.005) で活性酸素産生を有意に抑制していた。*A. actinomycetemcomitans* 群においても *F. nucleatum* 群と同様, アジ化ナトリウム 10⁻³ mol

(p<0.0001), 10⁻⁴ mol 添加群 (p<0.005) において有意な活性酸素産生の抑制が認められた。SOD 添加群, カタラーゼ添加群においてはいずれの菌種においても活性酸素産生の抑制は認められなかった。

11. 各種阻害剤が細胞傷害率に及ぼす影響

各種阻害剤が歯周傷害率に及ぼす影響を表2に示す。*P. gingivalis* 群ではアジ化ナトリウム添加群、SOD添加群、プロテアーゼインヒビター添加群においてKB細胞傷害率の低下がみられた。*F. nucleatum* 群ではアジ化ナトリウム添加群によるKB細胞傷害率への影響はみられず、SOD添加群、カタラーゼ添加群、プロテアーゼインヒビター添加群において低下がみられた。*A. actinomycetemcomitans* 群でもアジ化ナトリウム添加群によるKB細胞傷害率への影響はみられず、SOD添加群、カタラーゼ添加群、プロテアーゼインヒビター添加群においてわずかに低下がみられた。

12. 各種阻害剤が剥離率に及ぼす影響

各種阻害剤が細胞剥離率に及ぼす影響を表3に示す。*P. gingivalis* 群ではアジ化ナトリウム添加群、SOD添加群、プロテアーゼインヒビター添加群における剥離率への影響は認められず、カタラーゼ添加群においてのみ剥離率の低下がみられた。*F. nucleatum* 群ではアジ化ナトリウム添加群、SOD添加群、における剥離率への影響は認められず、カタラーゼ添加群、プロテアーゼインヒビター添加群で剥離率の低下がみられた。*A. actinomycetemcomitans* 群ではアジ化ナトリウム添加群、SOD添加群、カタラーゼ添加群における剥離率への影響は認められず、プロテアーゼインヒビター添加群でKB細胞傷害率への影響は認められず、プロテアーゼインヒビター添加群でKB細胞傷害率の低下がみられた。

考 察

近年、好中球の培養細胞に対する傷害作用に関する研究が報告されている。白血球が炎症巣に浸潤するとき起こる血管内皮細胞への接着により白血球の活性化があり、エラスターゼやカテプシンGなどのプロテアーゼを放出して血管内皮細胞に傷害を与え、血管透過性が亢進し、炎症が拡大する¹²⁾。その為、このような研究の多くは標的細胞として内皮細胞が用いられてきた¹³⁻¹⁶⁾。肺¹⁷⁾、胃、腸粘膜組織傷害^{18,19)}においても活性化好中球から放出される活性酸素やエラスターゼなどによる臓器傷害が惹起され、これらの傷害性因子に対するインヒビターを用いた治療が研究されている²⁰⁾。また、口腔の分野では歯周組織の恒常性の保持を保つのに重要な線維芽細胞が用いられている^{3,21)}。しかし、歯肉溝内には常に好中球が存在し、プラーク細菌からの刺激を受けているため、歯周炎の初発部位に位置するのは歯肉溝内の上皮細胞であり、外来刺激

に対する防御的役割を担っている。この上皮層の破壊や上皮細胞の間隙の拡張が起こり、線維芽細胞が侵襲を受け、歯周炎が深部に波及していくと考えられる。

そこで今回、KB細胞を歯肉上皮細胞モデルとし、好中球と歯周病原性細菌の共培養に基づく産物がKB細胞の生存、剥離に与える影響と培地に出される細胞傷害物質について検討した。歯肉上皮細胞の傷害はアラマーブルーアッセイと細胞剥離を傷害の指標とした。その結果、コントロール群、PMN単牛群、歯周病原性細菌とKB細胞のみを共培養した群ではKB細胞の傷害はほとんど観察されなかった。歯周病原性細菌のみの刺激による細胞への影響に関して、鈴木ら³⁾の歯肉線維芽細胞(Gin-1細胞)を用いた傷害実験では、*F. nucleatum*、*A. actinomycetemcomitans* では本実験と同様、標的細胞への影響はないが、*P. gingivalis* では40~50%の剥離率を認め、菌の細胞への影響を示している。本実験で影響がみられなかったのは、今回使用したKB細胞の培養器壁面への付着機構がGin-1と異なるか、または*P. gingivalis*の有するコラゲナーゼに対してKB細胞が耐性を有しているためか、これらに関しては今後、検討が必要と思われる。また、本実験における各歯周病原性細菌と好中球をインキュベートした実験群では、18時間までのインキュベートによって細胞傷害数、剥離率ともに著明な増加として観察されたため、今回観察されたKB細胞の傷害は、歯周病原性細菌によって刺激された好中球によるものであると考えられた。このような好中球による細胞傷害のメカニズムとしては1)好中球の活性酸素による細胞死を伴う傷害、2)好中球のライソゾーム酵素による細胞死を伴う傷害、3)好中球のライソゾーム酵素による細胞死を伴わない傷害の3つの可能性が報告されている²²⁾。そこで、活性酸素、エラスターゼとMMP-9、TNF α の測定とこれらの阻害剤を作用させることにより、本実験における主な傷害性因子の検出を試みた。さらに歯周炎の炎症パラメーターとして近年注目されているPGE₂²³⁾、歯周病の発症・進展に関わっている可能性が高いといわれているMMP-9²³⁾についても検討した。

歯周病原性細菌に刺激された好中球からは多量の活性酸素が観察され、この産生量が高くなるに伴い細胞傷害も増加している傾向がみられた。また、活性酵素抑制試験ではアジ化ナトリウムにて有意な産生量低下を認めたが、SOD、カタラーゼでは安定した結果が得られず、最終的には有意な抑制は認められなかった。末松ら²⁴⁾は好中球由来の活性酸素のルミノール発光を高感度光子撮像管にて観察した結果、アジ化ナトリウムによる抑制はあったが、SODでは抑制される

ものとされないものがあると報告している。また、阻害剤を作用させたことによる細胞傷害への影響は *P. gingivalis* 群において 10% の抑制を認めたが、*F. nucleatum* 群、*A. actinomycetemcomitans* 群では認められなかった。エラスターゼ、TNF α も同様に歯周病原性細菌刺激により好中球から有意に高い濃度が検出されたが、阻害実験による細胞傷害率、細胞剥離率に影響は認められなかった。

Altman ら²¹⁾は本実験同様、好中球による上皮細胞への傷害を観察している。ここでは活性酸素の一種である MPO-H₂O₂ ハロゲン化物単独で上皮細胞に作用させたものに対し、アジ化ナトリウム、カタラーゼによる歯肉上皮細胞の崩壊の抑制が観察されている。しかし今回の実験では好中球と歯周病原性細菌を直接反応させることにより行ったため、活性酸素のみを阻害しても他の要因により細胞崩壊は引き起こされていた可能性がある。好中球から産生される活性酸素には殺菌系および組織傷害に特に関与していると考えられている O₂⁻、H₂O₂、の他にも ¹O₂、OH[•] など多くの種類が存在している。補体、phorbol myristate acetate、血清処理ザイモザン、あるいは免疫複合体により活性化された多形核白血球による臍帯静脈や肺動脈由来血管内皮細胞への傷害作用はカタラーゼにより抑制されるが、SOD では抑制されないことが報告されている²⁶⁻²⁸⁾。

Smedly ら²⁹⁾は LPS と FMLP で活性化された多形核白血球が接触することにより、末梢血管由来の内皮細胞の細胞死が惹起され、この作用はエラスターゼに特異的なインヒビターにより抑制されることを報告している。Deguchi ら²¹⁾は同様の作用をヒト歯根膜線維芽細胞を用いて、また、鈴木ら³⁾は歯周病原性細菌により活性化された多形核白血球による同様の作用をヒト歯肉線維芽細胞を用いてそれぞれ細胞剥離を傷害の指標として報告しており、ここでは細胞死を伴わない剥離を観察している。HeLa 細胞³⁰⁾およびヒト新生児皮膚由来の線維芽細胞を標的として用いた研究においても好中球顆粒画分が細胞死をともしない細胞剥離を起こすことを示し、これらの作用はカタラーゼや SOD では抑制されず、タンパク質分解酵素のインヒビターにより抑制されることを報告している。今回の実験でみられた細胞剥離はプロテアーゼインヒビターによる抑制は *A. actinomycetemcomitans* 群においてみられたが、*P. gingivalis* 群、*F. nucleatum* 群では認められなかった。

TNF α は様々な細胞から産生されているが、好中球も主な産生細胞のひとつであり、みずから出した TNF により活性化状態になったり、さらに TNF を

産生することにより炎症が拡大すると考えられている。また、TNF が血管内皮細胞に作用すると傷害を引き起こしたり、血管内皮細胞の細胞間隙を解離させたりすることが知られている³¹⁾。

今回、コントロール、PMN 単独群に比べ、歯周病原性細菌により刺激を受けた好中球の反応系において高い TNF α の産生が認められたが、細胞傷害と産生量の相関関係においては、活性酸素、エラスターゼと同様の相関傾向は認められなかった。また、傷害因子間における産生量の相関関係では、エラスターゼと有意な負の相関を示した。これは、エラスターゼ、カタプシン G により TNF が抑制されるという Scuderi ら³²⁾の報告と一致した結果となった。

活性酸素の組織障害の機構には、直接の傷害作用、 α 1-プロテアーゼインヒビターを酸化的に失活させ、好中球エラスターゼを働きやすくすることによるもの、不活性型コラゲナーゼ、ゼラチナーゼの活性化などがある。また、活性酸素と TNF α は互いに産生を増強しているといわれている³³⁾。しかし TNF 刺激により上皮細胞からエラスターゼインヒビターが産出されるという報告³⁴⁾もあり、実際の生体においてはこれらの因子が多様に働き、そのバランスが崩れたときに組織破壊が発現すると考えられる。

PGE₂ はマクロファージや好中球から放出され局所の炎症の程度に相関して高値を示すといわれている²³⁾。歯周治療においては歯肉溝滲出液を用いて PGE₂ を検出し、炎症の活動状態を把握する試みが行われている。今回の実験では細胞傷害性試験で *P. gingivalis* 群、*F. nucleatum* 群、*A. actinomycetemcomitans* 群が同程度の傷害を受けていたにもかかわらず、PGE₂ 値は *A. actinomycetemcomitans* 群で有意に低い所見となった。これは *A. actinomycetemcomitans* が優位である若年性歯周炎において炎症所見が少ないにも関わらず高度に進行することとの関わりが推察された。

エラスターゼと同様好中球由来プロテアーゼである MMP は現在までにヒトにおいて 18 種類の存在が知られているが、歯周病の発症に関わっている可能性が高いのは MMP-1, 8, 9, 13 および MT1-MMP である。そのなかでも歯肉溝滲出液中に含まれているのは MMP-8 が主体であることが報告されている³⁵⁾が、MMP-8 と同様に好中球から放出され、歯肉溝内に存在するといわれている MMP-9 についての報告は少ない。そこで今回はこの MMP-9 についての検討も行った。シクロスポリンを投与している患者の歯肉溝では炎症のある部位で 500~1,000 ng/ml、健常部位で 50~100 ng/ml の濃度の MMP-9 が検出されたと

の報告³⁶⁾があるが、今回の実験で検出された量はわずかで、歯周病原性細菌と好中球を反応させた群で5 ng/ml程度であったが、コントロール群に対し有意に高い結果となった。本実験では好中球により産生されたものを測定したが、MMP-9は好中球の他にマクロファージ、単球でも産生されているため、実際の歯肉溝内における濃度とは異なるかもしれないが、MMP-9の動向を反映している結果であると思われる。

これまで口腔の上皮細胞に対する好中球由来の傷害については好中球抽出液によるもの³⁷⁾や、毒性物質そのものにより細胞に傷害を与え、その作用を報告しているものが多かったが、今回我々は歯周病原性細菌と反応させた好中球からの自然放出によりKB細胞への傷害性を観察した。このような状況では好中球から放出された様々な要因が複合的に作用しており、歯周組織破壊は生体防御面からも細菌学的な面からも多様な機構により引き起こされていると考えられる。今回は実験の再現性が得られやすい口腔癌由来のKB細胞を使用した。今後は正常は口腔粘膜細胞を使用し、今回検討しなかった因子や細菌を含め、さらに多角的な検討が必要であると思われる。

謝 辞

稿を終えるにあたり、本研究に御指導、御校閲を賜りました長谷川明教授に謹んで謝意を表します。さらに、本学微生物学講座の諸先生方に厚く御礼申し上げます。最後に、多くのご助言とご協力を頂きました医局員の皆様に深く感謝致します。

本論文の要旨は、第43回日本歯周病学会(2001年10月)において発表した。

文 献

- Altman LC, Baker C, Fleckman P, Luchtel D, Oda D : Neutrophil-mediated damage to human gingival epithelial cells. *J Periodont Res*, 27 : 70-79, 1992.
- Katsuragi H, Saito K : Correlation between activation of gingival crevicular fluid polymorphonuclear leukocytes and IL-8 in periodontal patients. *Dentistry in Japan*, 33 : 23-26, 1997.
- 鈴木安里, 葛城啓彰, 齊藤和子 : 口腔細胞の刺激によって発現する多形核白血球のヒト歯肉線維芽細胞傷害. *日歯周誌*, 35 : 179-191, 1993.
- Madianos PN, Papapanou PN, Sandros J : *Porphyromonas gingivalis* infection of oral epithelium inhibits neutrophil transepithelial migration. *Infect Immun*, 65 : 3983-3990, 1997.
- Duman MJ, Nakao S, Skobe Z, Xie H : Interactions of *Porphyromonas gingivalis* with epithelial cells. *Infect Immun*, 61 : 2260-2265, 1993.
- Madianos PN, Papapanou PN, Nannmark U, Dahlén G, Sandros J : *Porphyromonas gingivalis* FDC 381 multiplies and persists within human oral epithelial cells *in vitro*. *Infect Immun*, 64 : 660-664, 1996.
- Meyer DH, Sreenivasan PK, Fives-Taylor PM : Evidence for invasion of a human oral cell line by *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Infect Immun*, 59 : 2719-2726, 1991.
- Sandrol J, Papapanou PN, Dahlén G : *Porphyromonas gingivalis* invades oral epithelial cells *in vitro*. *J Periodont Res*, 29 : 219-226, 1993.
- Sreenivasan PK, Meyer DH, Fives-Taylor PM : Requirements for invasion of epithelial cells by *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Infect Immun*, 61 : 1239-1245, 1993.
- Babich H, Reisbaum AG, Zuckerbraun HL : *In vitro* response of human gingival epithelial S-G cells to resveratrol. *Toxicol Lett*, 114 : 143-153, 2000.
- 望月一男, 一色賢司 : AlamarBlueを用いた培養動関細胞の増殖モニター, 静岡県静岡工業技術センター研究報告, 39 : 135-137, 1994.
- 藤田 浩 : 白血球由来エラストラーゼの血管内皮細胞障害機序. *炎症*, 13 : 139-144, 1993.
- Taichman NS, Klass JE, Shenker BJ, Macarak EJ, Boehringer II, Tsai C : Suspected periodontopathic organisms alter *in vitro* proliferation of endothelial cells. *J Periodont Res*, 19 : 583-586, 1984.
- Vandenbroucke-graels CMJE, Thijssen HMWM, Kessel KPM, Asbeck BS, Verhoef J : Injury to endothelial cells by phagocytosing polymorphonuclear leukocytes and modulatory role of lipoxigenase products. *Infect Immun*, 55 : 1447-1454, 1987.
- Masui Y : Inhibitory effect pentoxifylline on neutrophilendothelial cell interactions induced by inflammatory mediators. *J Kyoto Pref Univ Med*, 109, 59-70, 2000.
- Harlan JM, Schwartz BR, Reidy MA, Schwartz SM, Ochs HD, Harker LA : Activated neutrophils disrupt endothelial monolayer integrity by an oxygen radical-independent mechanism. *Lab Invest*, 52 : 141-150, 1985.
- Ayars GH, Altman LC, Wosen H, Doyle T : The injurious effect of neutrophils on pneumocytes *in vitro*. *Am Rev Respir Dis*, 130 : 964-973, 1984.

- 18) Simpson R, Alon R, Kobzik L, Valeri CR, Shepro D, Hechtman HB : Neutrophil and nonneutrophil mediated injury in intestinal ischemia-reperfusion. *Ann Surg*, 218 : 444-454, 1993.
- 19) 国崎主税, 杉山 貢 : 特集 消化器疾患の病態生理 胃・十二指腸潰瘍を中心に 胃粘膜虚血における胃粘膜内ライソゾーム酵素と活性酸素の変動と急性胃粘膜病変発生に及ぼす影響 胃粘膜培養細胞を用いて. *Prog Med* 14 : 319-322, 1994.
- 20) 岡島研二 : 活性化白血球とプロテアーゼ/プロテアーゼインヒビター. *医学のあゆみ*, 198 : 51-56, 2001.
- 21) Deguchi S, Hori T, Creamer H, Gabler, W : Neutrophil-mediated damage to human periodontal ligament-derived fibroblasts : Role of lipopolysaccharide. *J Periodont Res*, 25 : 172-177, 1990.
- 22) Ward PA, Varani J : Mechanisms of neutrophil-mediated killing of endothelial cells. *J Leukocyte Biol*, 48 : 97-102, 1990
- 23) 村上伸也, 野崎剛徳 : 細胞間相互作用からみた病態診断, 吉江弘正, 宮田 隆, 歯周病診断のストラテジー, 医歯薬出版株式会社, 東京, 1999, 158-167.
- 24) 末松 誠, 大塩 力, 朴沢重成, 三浦総一郎, 関塚栄一, 永田博司, 森下鉄男, 土屋雅春. Neutrophil-mediated oxidative stresss 発動機構と活性酸素除去剤の効果 : Cyto-protection & biology. 6 : 369-375, 1988.
- 25) 相田宜利, 前田勝正 : 好中球とマクロファージの動態, 岡田 宏, 石川 烈, 村山洋二, 歯周病 新しい治療を求めて, 先端医療技術研究所, 東京, 2000, 298-308.
- 26) Sacks T, Moldow CF, Craddock PR, Bowers TK : Oxygen radicals mediate endothelial cell damage by complement-stimulated granulocytes : An in vitro model of immune vascular damage. *J Clin Invest*, 61 : 1161-1167, 1978
- 27) Weiss SJ, Young J, LoBuglio AF, Slivka A, Nimeh N : Role of hydrogen peroxide in neutrophil-mediated destruction of cultured endothelial cells. *J Clin Invest*, 68 : 714-721, 1981.
- 28) Martin WJII : Neutrophils kill pulmonary endothelial cells by hydrogen-peroxide-dependent pathway : An in vitro model of neutrophil-mediated lung injury. *Am Rev Respir Dis*, 130 : 209-213, 1984.
- 29) Smedly LA, Tonnesen MG, Sandhaus RA, Haslett C, Guthrie LA, Johnston RBJr, Henson PM, Worthen GS : Neutrophil-mediated injury to endothelial cells. *J Clin Invest*, 77 : 1233-1243, 1986.
- 30) Taubman SB, Cogen RB : Granule enzymes from human leukocytes : Their effect on HeLa Cells. *Proc Soc Exp Biol Med*, 145 : 952-957, 1974.
- 31) 笠倉新平 : サイトカイン, 第二版, 日本医学館, 東京, 1997, 226-235.
- 32) Scuderi P, Nez PA, Duerr ML, Wong BW, Valez CM : Cathepsin-G and leukocyte elastase inactivate human tumor necrosis factor and lymphotoxin. *Cell Immun*, 135, 299-313, 1991.
- 33) 広田昌彦, 野澤文昭, 小川道雄 : 活性化好中球による組織傷害のメカニズム. *臨床免疫*, 29 : 1155-1160, 1997.
- 34) 四元幸治 : ヒト接合上皮細胞における Interleukin-8 及び Secretory leukocyte protease inhibitor の産生能について. *日歯周誌*, 39 : 23-30, 1996.
- 35) Sorsa T, Ding YL, Salo T, Westerlund U, Haapasalo M, Konttinen YT : Cellular source, activation and inhibition of dental plaque collagenase. *J Clin Periodontol*, 22 : 709-717, 1995.
- 36) Atilla G, Sorsa T, Ronka H, Emingli G : Matrix metalloproteinases (MMP-8 and-9) and neutrophil elastase in gingival crevicular fluid of cyclosporin-treated patients. *J Periodontol*, 72 : 354-360, 2001.
- 37) Sugiyama E, Baehni P, Cimasoni, G : An in vitro study of polymorphonuclear leucocyte-mediated injury to human gingival keratinocytes by periodontopathic bacterial extracts. *Archs oral Biol*. 37 : 1007-1012, 1992.

連絡先 :

日本歯科大学新潟歯学部歯周病学講座

〒 951-8580 新潟市浜浦町 1-8