歯周組織における性ホルモンのヒト多形核白血球機能 に対する影響について

神田 昌宏 小川 智久 鴨井 久一

日本歯科大学歯学部歯周病学講座
(2002 年 10 月 5 日受理)

Effect of Sex Hormone on Polymorphonuclear Leukocyte Functions of Periodontal Tissue

Masahiro Kanda, Tomohisa Ogawa and Kyuichi Kamoi

Department of Periodontology, School of Dentistry at Tokyo, The Nippon Dental University

Accepted for publication 5 October 2002

Pregnancy gingivitis is considered to be related to increased sex hormone secretion and bacterial plaque formation. In recent years, increase in sex hormone secretion has been recognized to affect the immunological functions of hosts, and has been actively studied.

In our present study, to investigate the pathogenesis of pregnancy gingivitis, we allowed human polymorphonuclear leucocytes (PMN) to react simultaneously with sex hormones, i.e., estradiol and progesterone, and the ultrasonic extracts of *Prevotella intermedia* (*P. Intermedia*) (*P.i.*-BE), whose growth is promoted by these sex hormones. We then examined the effects of such addition on the phagocytic activity of the PMN, as well as on the release of IL-1 β , that is involved in tissue destruction, from these cells. The following results were obtained.

1. The phagocytic activity of the PMN was significantly decreased following reaction with *P.i.*-BE. When sex hormones were also added simultaneously, a significant decrease in the activity was found, depending on the concentration of the sex hormones.
2. In regard to the phagocytic state of PMN, the percentage of cells incorporating beads decreased significantly in a manner dependent on the sex hormone concentration, when these hormones were added simultaneously with *P.i.*-BE.
3. The amount of IL-1 β released from the PMN was significantly increased when sex hormones were added simultaneously with *P.i.*-BE.

In the light of these results, increases in the sex hormone concentration in the periodontal tissues during pregnancy, as well as the bacteria causing periodontal diseases, appear to decrease the phagocytic ability of PMN, and to increase the release of IL-1 β from these cells. In conclusion, during pregnancy, sex hormones and *P. intermedia* are suggested as influencing the development of periodontal diseases. J Jpn Soc Periodontol, 44 : 366~375, 2002.

Key words : estradiol, progesterone, polymorphonuclear leucocytes

要旨 : 妊娠性歯肉炎の原因は、性ホルモンの分泌量の増加と細菌性プラークによるものと考えられている。近年、性ホルモン分泌量の増加は、宿主の免疫機能に影響を与えることが知られ、研究が行われている。

本研究では、妊娠性歯肉炎の発症の過程について検討するために、ヒト多形核白血球 (PMN) に、性ホルモンの estradiol と progesterone、さらにこれらの性ホルモンで発育促進される *Prevotella intermedia* (*P. intermedia*) の超音波抽出物 (*P.i.*-BE) を同時に作用させ、その際の PMN の貪食能に対する影響と、組織破壊に

関与する IL-1 β の放出量について検索し、以下の結果を得た。

1. PMN の貪食率は、*P.i.*-BE を添加すると有意に低下し、さらに性ホルモンを同時に添加すると、性ホルモンの濃度依存的に有意な低下を示した。
2. PMN の貪食状態の観察では、性ホルモンと *P.i.*-BE を同時に添加すると、細胞内にビーズが取り込まれている割合は、性ホルモンの濃度依存的に有意に低下した。
3. PMN の IL-1 β の放出量は、*P.i.*-BE 存在下において、性ホルモンを同時に添加することにより有意に増加した。

以上の結果より、妊娠時の歯周組織における性ホルモン濃度の増加や、歯周病原性細菌が、PMN の貪食能を低下させ、さらに IL-1 β の放出量を増加させることが考えられ、妊娠時において、性ホルモンと *P. intermedia* は、歯周疾患の発症に影響を及ぼすことが示唆された。

索引用語：エストラジオール、プロゲステロン、多形核白血球

緒 言

歯周疾患の主要原因となる因子は、歯肉縁下プラーク中の歯周病原性細菌である。様々な修飾因子が関与している特殊な歯周疾患として、侵襲性歯周炎、急性壊死性潰瘍性歯肉炎/歯周炎 (ANUG/ANUP)、妊娠性歯肉炎、薬物性歯肉肥大などがあり、現在その発症機序や治療法について様々な研究が行われている。妊娠性歯肉炎の原因は、性ホルモンの分泌量の増加と細菌性プラークによるものと考えられている。妊娠時、性ホルモンである estradiol や progesterone は、末梢血中において高濃度で存在し、さらに歯肉溝滲出液中に移行する^{1,2)}。黒色色素産生性の嫌気性桿菌である *Prevotella intermedia* (*P. intermedia*) は、メナジオン (ビタミン K) を栄養素として発育するが、メナジオンのみでなく、性ホルモンも栄養素として発育するため、妊娠時の歯周ポケット内では *P. intermedia* が激増する³⁾。また、妊娠時の母体は、胎児を拒絶しないために免疫寛容状態が強いられ、免疫機能が低下している^{4,5)}。以上のことから、歯周ポケット内の歯周病原性細菌である *P. intermedia* が増加し、さらに、宿主においても免疫力の低下がみられ、その結果として妊娠時には、歯周組織に炎症症状がみられている。

多形核白血球 (PMN) は歯周組織の炎症部位で生体防御機構の一部として、走化性因子により炎症巣に集積し、生体に侵入した細菌を貪食作用で取り込み、殺菌をする。一方、PMN 自身から放出されるさまざまな化学伝達物質が歯周組織の炎症を惹起することから、PMN は炎症を修飾する宿主側の因子でもある。したがって、PMN の機能が低下すると易感染性になり、さらに PMN 由来の化学伝達物質による組織破壊が起こるなど、炎症と組織破壊に大きな影響を与えている。

妊娠時における性ホルモン分泌量の増加は、宿主の免疫機能に影響を与え、性ホルモンと宿主の免疫機能に関するさまざまな研究が行われている。Nohmi ら¹⁾ は、マウスの PMN に progesterone を作用させると、PMN が *Candida albicans* の発育を阻害しなくなり、その効果は 17 β -estradiol (estradiol) を同時に作用させることによりさらに強くなると報告している。また、性ホルモンが PMN の遊走能を低下させるとの報告もある^{2,6)}。さらに、妊娠時の末梢血 PMN の機能異常として、血管壁への接着能 (adherence) の抑制や、ケミルミネッセンス反応の低下などがあり^{4,5)}、また、リンパ球を含めた細胞性免疫には性ホルモンは抑制的に作用している⁷⁻⁹⁾。したがって性ホルモンの増加は、PMN の機能に様々な影響を与え、宿主の防御機能を低下させている。

Interleukin (IL)-1 β は最も重要な炎症性サイトカインであり、その作用として骨吸収の促進、線維芽細胞から PGE₂ 産生の増加、PMN 由来の活性酸素 (スーパーオキシドアニオン) 産生の増加などがあり、歯周組織の破壊につながる¹⁰⁻¹³⁾。IL-1 β は歯肉溝中で炎症時の濃度が増加し、効果的な処置を行うことで減少するという報告がある¹⁴⁻¹⁶⁾。また、末梢血中 PMN に、PMN の活性化因子である phorbol myristate acetate (PMA) や、歯周病原性細菌を作用させると、それぞれ IL-1 β を放出した¹⁷⁻¹⁹⁾。その結果、マクロファージとともに PMN 由来の IL-1 β は、歯周疾患の発症や進行に関与し、重要な炎症性サイトカインであると示唆されている。

以上のことより妊娠時の歯周組織では、歯周病原性細菌である *P. intermedia* の増加、免疫機能の低下、さらに様々な刺激による PMN 由来の IL-1 β の放出量の増加が考えられる。そこで本研究の目的は、妊娠性歯肉炎の発症の過程を検討するのに、性ホルモンの estradiol と progesterone、性ホルモンで発育促進される *P. intermedia* の超音波抽出物を同時に作用させ

た。その結果、PMN の機能に及ぼす影響について検索を行い、組織破壊に関与する炎症性サイトカインの放出についても検討を行った。

材料および方法

1. 性ホルモンと各種試料の調整について

本研究に用いた PMN に対する性ホルモンと各種試料は以下の通りである (表 1)。

1) 性ホルモン

性ホルモンとして、女性ホルモンである 17β -estradiol (SIGMA Chemical Co., St.Louis, MO, U.S.A.) と progesterone (SIGMA Chemical Co., St.Louis, MO, U.S.A.) を用いた。

2) *P. intermedia* の超音波抽出物

供試菌株として *P. intermedia* の標準菌株 ATCC 25611 を用い、0.01% Hemin, 0.005% Menadion を添加した BHI-broth (0.5% yeast extract) に供試菌体を接種した。その後、 37°C 、72 時間、嫌気条件下 ($85\% \text{N}_2$, $10\% \text{H}_2$, $5\% \text{CO}_2$ 混合ガス) で培養を行った。さらに、培養液を $10,000\times g$, 15 分間遠沈して集菌し、0.2 M sucrose buffer, 0.06 M Tris-HCl buffer : pH 7.6 にて 2 回洗浄した。続いて、氷温下で 5 分間 SONIFIER 450 (BRANSON, U.S.A.) を用いて超音波破碎を行い、 $12,000\times g$, 15 分間遠沈して得られた上清を *P. intermedia* の超音波抽出物 (*P. intermedia*-Bacteria Extracts ; 以下 *P.i*-BE と略す) として -80°C 凍結保存し、実験に供試した。また、タンパク量の測定は Protein assay reagent (BIO RAD, Hercules, CA, U.S.A.) を用いて Bradford 法により測定した。

3) PMA, LPS の調整

PMN の活性化因子で可溶性刺激剤として PMA (SIGMA Chemical Co., St.Louis, U.S.A.), *Escherichia coli* 由来の LPS (Serotype 055 : B 5) (SIGMA Chemical Co., St.Louis, MO, U.S.A.) (LPS) を用いた。

2. PMN の分離法

被験者は、特記すべき全身疾患の現症および既往がなく、健全な歯周組織を有する非喫煙者の男性 7 名 (平均年齢 : 29.6 歳) とした。また被験者には今回の研究の主旨について十分に説明を行い、理解し協力が得られた者を対象とした。末梢血は、ヘパリン加チューブ (Venoject II, TERUMO, 東京) にて前腕の皮静脈より採取し、サンプルチューブ (Falcon 2096, Flanklin Lake, NJ, U.S.A.) に Mono-Poly resolving medium (Flow Laboratories Inc., Cos-tamesa, CA, U.S.A.) を 3.0 ml 入れ、その上に血液 3.5 ml を重層した。その後、 $300\times g$, 室温にて 30 分間、遠心分離を行い、血清および PMN 画分を抽出した。PMN 画分をリン酸緩衝生理食塩液 (Phosphate Buffered Saline : PBS (—) pH 7.4) に懸濁し、遠心操作にて 2 回洗浄を行い、 $1\times 10^6 \text{ cell/ml}$ の濃度になるように調整した。さらに、フローサイトメーターを用いた貪食能の測定、共焦点レーザー走査型顕微鏡を用いた貪食像の観察について検索を行った。また、IL- 1β 濃度の測定には、遠心分離後の PMN 画分を RPMI 1640 培地 (SIGMA, Chemical CO., U.S.A.) に懸濁し、同様に調整し実験に供試した。

3. 貪食能の測定

1) 各種試料における各濃度の性ホルモンによる影響
PMN $100 \mu\text{l}$ に、終濃度が 1.0×10^{-7} , 10^{-6} , 10^{-5} , 10^{-4} mol/l になるように性ホルモン (estradiol+progesterone) を同時に加えた。さらに *P.i*-BE を終濃度が $100 \mu\text{g/ml}$, PMA を終濃度が $0.5 \mu\text{g/ml}$, LPS を終濃度が $5.0 \mu\text{g/ml}$ になるように各々加えた後、 37°C , 1 時間インキュベートを行い、細胞生存率、貪食能を測定した。また、コントロールとして PBS を用いた。

2) 貪食操作およびフローサイトメーターによる測定
インキュベート後の PMN $100 \mu\text{l}$ に、RPMI 1640 培地 $300 \mu\text{l}$, 新鮮な自家血清 $100 \mu\text{l}$ を加え、さらに貪食マーカーとして直径 $1 \mu\text{m}$ の FITC 標識ビーズ (ヤギ抗ウサギ IgG 抗体結合カルボキシレートビーズ, Polyscience Inc., Warrington, PA, U.S.A.)

表 1 各種試料

性ホルモン (estradiol+progesterone)	estradiol と progesterone を同時に添加
PBS	コントロール
<i>P.i</i> -BE	<i>Prevotella intermedia</i> 超音波抽出物 (標準菌株 AYCC 25611)
PMA	phorbol myristate acetate
LPS	<i>Escherichia coli</i> 由来の LPS (Serotype 055 : B 5)

図 1 各濃度の性ホルモンと各種試料による影響

図 2 Interleukin (IL)-1 β 濃度の測定

添加 PBS 溶液を $5\mu\text{l}$ 加えた。その後、 37°C 、30 分間インキュベートを行い、2% パラホルムアルデヒドで固定した。インキュベート後の PMN の食食能の測定は、フローサイトメーター (FAC Scan, Becton Dickinson, San Jose, CA, U.S.A.) を用い、5,000 個の細胞を対象に行った (図 1)。

(1) 食食率の算出

食食率の算出は、得られた蛍光強度のヒストグラムから全計測細胞中におけるビーズの蛍光を有する細胞数の割合を算出した²⁰⁾。

(2) 食食度の算出

食食度は、PMN 1 個あたりの摂取ビーズ数を食食細胞群の Mean Channel とビーズ 1 個の蛍光強度より算出した。

4. Interleukin (IL)-1 β 濃度の測定

RPMI 1640 培地で調整された PMN $100\mu\text{l}$ に性ホルモン (estradiol+progesterone) を、終濃度が 1.0×10^{-7} , 10^{-6} , 10^{-5} , 10^{-4} mol/l になるように同時に加えた。さらに P.i.-BE を終濃度が $100\mu\text{g/ml}$, PMA を終濃度が $0.5\mu\text{g/ml}$, LPS を終濃度が $5.0\mu\text{g/ml}$ になるように各々加えた後、 37°C 、24 時間インキュベートを行った。その後、 $250\times\text{g}$ 、5 分間で遠心分離を行い、培養上清を分注し、 -80°C で凍結保存したものを測定した。PMN 培養上清中の IL-1 β 産生量の測定には、human IL-1 β ELISA Kit (Amersham Int., Amersham, Buckinghamshire, U.K.) を用い、マイクロプレートリーダ (Sjeia オートリーダ II, 三光純薬, 東京) にて 450 nm で吸光度

測定を行った (図 2)。

5. 細胞生存率 (Viability) の測定

それぞれインキュベート後の PMN 生存率 (Viability) は 0.4% Trypan Blue (SIGMA Chemical Co., St. Louis, MO, U.S.A.) を用いた Trypan Blue Exclusion 法²¹⁾で細胞 100 個に対して計測し、平均値を算出した。

6. 共焦点レーザー走査型顕微鏡による観察

食食能の測定に用いた PMN を、1.7% のパラホルムアルデヒド添加 PBS 溶液で 30 分間 4°C にて固定した。遠心操作にて洗浄後、0.1% の Triton-X (SIGMA Chemical Co., St. Louis, MO, U.S.A.) 添加 PBS 溶液を加え、室温にて 10 分間放置した。再度 PBS にて洗浄後、終濃度が $0.3\mu\text{g/ml}$ になるように rhodamine phalloidine (Molecular Probes, Eugene, OR, U.S.A.) を添加し、室温にて 45 分間反応させた。その後、PMN をグリセリンにてスライドガラスに封入した (図 3)。

PMN の食食状態の観察には、共焦点レーザー走査型顕微鏡 (LEICA TCS SP, Leica Microsystems Inc. Germany) を使用した。画像は、蛍光波長 568 nm で励起した F-アクチンの赤色蛍光像と、蛍光波長 488 nm で励起したビーズの緑色蛍光像の合成像を用いた。PMN の細胞の合成像は、深さ方向に $1\mu\text{m}$ の厚さごとに、レーザー光軸に対して垂直に交わる平面で得た。すなわち PMN の上面から底面までの像を、連続断層像として観察できるようにし、三次元的に画像を再構築した。

図3 共焦点レーザー走査型顕微鏡によるPMNの貪食像の観察

図4 PMNを各濃度の性ホルモンと*P.i.-BE* (100 µg/ml)で処理した時の貪食率の変化

分散分析の結果、貪食率は性ホルモン濃度依存的に低下した ($p < 0.05$)。

PMNの平均的像は、PMNの細胞内に取り込まれているビーズの数と、細胞表面に付着しているビーズの数を計測し、細胞内に取り込まれているビーズの割合を算出した。

7. 統計学的検索

統計学的検索は、各種試料ごとに一元配置分散分析を用い、コントロールであるPBSに対する比較は、比率の検定を用いて統計解析を行った。

結 果

1. 細胞生存率

PMN、各種各濃度の性ホルモン、各種試料とインキュベート後、Trypan Blue Exclusion法による細胞生存率は全て ($n=7$) において90%以上であった。

2. 貪食能の検索

1) 性ホルモンと*P.i.-BE*添加による貪食能の変化

*P.i.-BE*存在下での各濃度の性ホルモン添加時の貪食率は、コントロールであるPBSでは $86.76 \pm 4.84\%$ 、*P.i.-BE*を加えることにより $70.49 \pm 2.90\%$ であり、PBSと比較して統計学的に有意な低下が認め

図5 PMNを各濃度の性ホルモンと*P.i.-BE* (100 µg/ml)で処理した時の貪食度の変化

められた ($p < 0.01$)。さらに、*P.i.-BE*と性ホルモンを加えると、貪食率は性ホルモン濃度依存的に統計学的に有意な低下が認められた ($p < 0.05$)。一方、貪食度は性ホルモン濃度 1.0×10^{-6} mol/lにおいて最も低かったが、統計学的に有意な差は認められなかった (図4, 5)。

2) 性ホルモンとPMA添加による貪食能の変化

PMA存在下での各濃度の性ホルモン添加時の貪食率は、コントロールであるPBSでは $86.76 \pm 4.84\%$ 、PMAを加えることにより $82.19 \pm 1.70\%$ であり、PBSと比較して統計学的に有意な低下が認められた ($p < 0.05$)。しかし、PMAと性ホルモンを添加した際の貪食率は、性ホルモン濃度 1.0×10^{-5} mol/lにおいて最も低かったが、統計学的に有意な差は認められなかった。一方、貪食度はすべてにおいてコントロールであるPBSと同程度であった (図6, 7)。

3) 性ホルモンとLPS添加による貪食能の変化

LPS存在下での各濃度の性ホルモン添加時の貪食率は、コントロールであるPBSでは $86.76 \pm 4.84\%$ 、LPSを加えることにより $80.89 \pm 4.62\%$ であり、PBSと比較して統計学的に有意な低下が認め

図 6 PMN を各濃度の性ホルモンと PMA (0.5 $\mu\text{g/ml}$) で処理した時の食食率の変化

図 7 PMN を各濃度の性ホルモンと PMA (0.5 $\mu\text{g/ml}$) で処理した時の食食度の変化

図 8 PMN を各濃度の性ホルモンと LPS (5.0 $\mu\text{g/ml}$) で処理した時の食食率の変化

分散分析の結果、食食率は性ホルモン濃度依存的に低下した ($p<0.05$)。

図 9 PMN を各濃度の性ホルモンと LPS (5.0 $\mu\text{g/ml}$) で処理した時の食食度の変化

られた ($p<0.05$)。さらに、LPS と各濃度の性ホルモンを加えると、食食率は性ホルモン濃度依存的に統計学的に有意な低下が認められた ($p<0.05$)。一方、食食度は性ホルモン濃度依存的に低下傾向を示したが、統計学的に有意な差は認められなかった(図 8, 9)。

3. IL-1 β 濃度の測定

PMN に各種試料 (PBS, *P.i.*-BE, PMA, LPS), 各濃度の性ホルモンを加えた際の IL-1 β 放出量は、コントロールである PBS のみでは検出されなかった。*P.i.*-BE を添加した際、 $3.09 \pm 2.01 \text{ pg/ml}$ 放出され、さらに各濃度の性ホルモンを加えることにより、統計学的に有意に濃度依存性をもって増加した ($p<0.05$)。また、PMA, LPS を添加した際も同様に、濃度依存的に有意な増加が認められた ($p<0.05$) (図 10)。

4. 共焦点レーザー走査型顕微鏡による観察

共焦点レーザー走査型顕微鏡を用いた PMN のビーズ食食状態の観察では、PMN の大きさは $10 \mu\text{m}$ 程度で、rhodamine phalloidine により F-アクチンが赤色に染まり、細胞膜内縁に局在する像が観察された。また、緑色に観察された FITC 標識ビーズの数は、PMN 表面に付着したビーズも含め、本研究における食食度の結果と同程度であった。一方、細胞表面に付着しているビーズも多く観察され、実際 PMN の細胞内にビーズが取り込まれている割合は、各種試料を添加した際、70% 以下であった。なかでも、*P.i.*-BE を添加した際、性ホルモン濃度依存的に統計学的に有意に低下していた ($p<0.05$) (表 2, 図 11)。

考 察

妊娠時の生体において、性ホルモンである

図 10 PMN を各濃度の性ホルモンと各種試料で処理した時の IL-1 β 放出量の変化

IL-1 β の放出量は *P.i.-BE*, *PMA*, *LPS* において性ホルモン濃度依存的に増加した ($p < 0.05$)。

estradiol や progesterone の分泌量は、妊娠後期のピーク時には、卵胞期と比較すると数十倍から数千倍増加する。それにともない、妊娠時の歯周ポケット内では *P. intermedia* が激増し、歯肉炎が発症することが知られている。妊娠時における歯肉炎の発症に関する最初の報告は、1877 年 Pinard²²⁾ であった。妊娠性歯肉炎の発症頻度に関する報告は 30~75% と様々である^{23~25)}。臨床的特徴としては歯肉の発赤、浮腫性の増殖、出血の増加が認められ、さらに血管腫様の炎症性変化である妊娠性エプーリスを認めることもある。妊娠性歯肉炎の発症因子としては、細菌学的因子のみだけでなく、生体における免疫学的因子についても報告され、近年この免疫学的因子に焦点を当てた研究が行われている。

妊娠中は生理的に様々な変化が母体内で生じている。なかでも免疫機能の変化は母体、胎児、胎盤系の多くの因子が複雑に関与している^{26~29)}。一般に、妊婦と胎児との間の主要組織適合抗原 (MHC, HLA) は一致しない。したがって、母親と胎児の間では何らかの免疫反応が起こる可能性があり、ときには流産の原因となっている。母親が胎児を拒絶せずに妊娠を持続するためには、母親の免疫機能の抑制が起こっている可能性がある。妊娠時には PMN 数の増加や、PMN 機能の変化がある。妊娠に伴う PMN 数の増加は、血中コルチゾールの増加、あるいは胎盤増成因子として産生される G-CSF や GM-CSF による影響が示唆されている^{30~34)}。PMN の機能の変化は、血管壁への接着能 (adherence) の抑制や、ケミルミネセンス反応の低下が報告されている^{4,5)}。妊婦の末梢血中 PMN の貪食能に関して、Mitchell ら³⁵⁾ は PMN の貪食能が低下、甕ら³⁶⁾ は PMN の貪食能が増加した

表 2 PMN を各濃度の性ホルモンと各種試料で処理した時の細胞内に取り込まれたビーズの割合の変化

	BPS	1.0 $\times 10^{-7}$	1.0 $\times 10^{-4}$ (mol/l)
BPS	79.0 $\pm$ 8.3	62.0 $\pm$ 8.9	64.2 $\pm$ 4.2
<i>P.i.-BE</i>	70.0 $\pm$ 6.7	67.0 $\pm$ 4.7	47.4 $\pm$ 6.8
<i>PMA</i>	65.6 $\pm$ 6.5	61.8 $\pm$ 3.0	63.5 $\pm$ 3.1
<i>LPS</i>	61.2 $\pm$ 12.9	59.9 $\pm$ 9.1	59.1 $\pm$ 10.3

平均 $\pm$ 標準偏差 (%)

P.i.-BE を添加した際、細胞内に取り込まれたビーズの割合は、性ホルモン濃度依存的に低下した (* $p < 0.05$)。

と報告しており、結果は様々である。

生体防御機構の一部として働く PMN は、歯周疾患の発症や進行に深く関与し、歯周組織への細菌感染に対して遊走し、貪食作用により取り込み、殺菌する免疫担当細胞である。しかし、過度に PMN が反応を起こすと、その過程において活性酸素やリゾチーム酵素を放出し、歯周組織に障害をきたす。一方、PMN の機能が低下することにより、感染が重篤化して歯周疾患を増悪させる。特に PMN の機能低下と限局型侵襲性歯周炎における報告が多数されている^{37~39)}。また、PMN の機能障害が認められている、Chediak-Higashi 症候群⁴⁰⁾や糖尿病⁴¹⁾の患者では、重度歯周疾患の症例が報告されている。以上のことから、PMN の機能低下は、歯周疾患において、重要なリスクファクターと考えられる。

本研究では、PMN に対して性ホルモンの estradiol と progesterone、性ホルモンで発育促進される *P. intermedia* を同時に作用させた。その結果、PMN の機能や歯周組織に及ぼす影響について検索し、妊娠性歯肉炎の発症の過程について検討を行った。

我々は、PMN の貪食能に対する、性ホルモンの影響について検索を行った。その際、estradiol と progesterone を同時に作用させたときのみ、PMN の貪食率に影響を与えるという結果を得たので、性ホルモンは estradiol と progesterone を同時に作用させた。

PMN に各濃度の性ホルモンを同時に作用させた際、PMN の貪食率に対する *P.i.-BE*, *PMA*, *LPS* の影響は、コントロールである PBS と比較すると、統計学的に有意に低下した。さらに、各濃度の性ホルモンと *P.i.-BE* 及び *LPS* を作用させた際、濃度依存的に統計学的に有意な低下が認められた。この結果から、*P.i.-BE*, *LPS* といった細菌刺激が存在する際、性ホルモン濃度の上昇にともない、PMN の貪食率は

図 11 共焦点レーザー走査型顕微鏡によるビーズの貪食像

低下すると考えられる。

PMN に各濃度の性ホルモン、各種試料を添加した際の貪食度に関する実験において、性ホルモンによる影響は認められなかったため、共焦点レーザー走査型顕微鏡を用い、PMN によるビーズの貪食状態の観察を行った。PMN 表面に付着したビーズを含めた

FITC 標識ビーズの数は、本研究における貪食度の結果と同程度であった。しかし、細胞内にビーズが取り込まれている割合は、各種試料を添加した際、70% 以下であった。この結果より、フローサイトメーターによる貪食度の測定では、細胞内に取り込まれずに細胞表面に付着しているビーズに関しても測定してしま

うが、共焦点レーザー走査型顕微鏡を用いた貪食状態の観察では、実際細胞内に取り込まれているビーズの割合は70%以下であった。なかでも、*P.i.*-BEを添加した際、細胞内にビーズが取り込まれている割合は、性ホルモン濃度依存的に統計学的に有意に低下していた ($p < 0.05$)。つまり、*P.i.*-BEを添加した際、フローサイトメーターを用いた貪食度の検索に関しては、影響は認められなかったが、共焦点レーザー走査型顕微鏡を用いた貪食状態の観察では、性ホルモンは濃度依存的に影響を及ぼし、ビーズの細胞内への取り込みを抑制したと考えられる。したがって、本研究において性ホルモンおよび *P. intermedia* は、PMNの貪食能に対して抑制的に働いている事が示唆された。

PMNと性ホルモン、各種試料を作用させた際のIL-1 β の放出量は、性ホルモンを加えた際、ほとんど影響が認められなかったが、*P.i.*-BE, PMA, LPSを各々添加することにより、性ホルモン濃度依存的に増加した。IL-1 β は最も重要な炎症性サイトカインとして、歯周組織における炎症を惹起させることが報告されている¹⁰⁻¹³⁾。したがって、妊娠期における性ホルモンの分泌量増加に加え、*P.i.*-BE, LPSといった細菌刺激を与えることによって、さらに歯周組織の破壊が進行すると考えられる。

以上のことから、妊娠時の歯周組織における性ホルモン濃度の増加や、歯周病原性細菌がPMNの貪食能を低下させ、さらにIL-1 β の放出量を増加させることが考えられる。これは実際の妊娠時の歯周組織において、血中から歯肉溝滲出液中に移行する高濃度の性ホルモンと、それに加えて、妊娠時における *P. intermedia* の増加により、PMNの機能低下と炎症性サイトカインの放出量の増加が起こる。その結果、妊娠時において、性ホルモンと *P. intermedia* は、歯周疾患の発症に影響を及ぼすことが示唆された。今後の課題として、性ホルモンと *P. intermedia* のPMNに対する作用機序や、その伝達経路に関して詳細に検索する必要性がある。

謝 辞

稿を終えるにあたり、本研究の遂行に際し適切なご助言とご支援を頂きました、本学歯周病学講座の講座員各位および関係者に、深く感謝いたします。

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

文 献

- 1) Nohmi T, Abe S, Dobashi K, Tansho S Yamaguchi H : Suppression of anti-Candida activity of murine neutrophils by progestosterone in vitro : a possible mechanism in pregnant women's vulnerability to vaginal candidiasis. Microbiol Immunol, 39 : 405-409, 1995.
- 2) 宮城昌治, 青山 旬, 森下真行, 岩本義史 : ヒト多形核白血球の遊走能に及ぼす性ホルモンの影響. 日歯周誌, 30 : 1033-1039, 1988.
- 3) Kornman KS, Loesche WJ : The subgingival microbial flora during pregnancy. J Periodontol Res, 15 : 111-122, 1980.
- 4) 飯島 悟 : 妊娠中の白血球増多と白血球活性度. 日バイオレオロジー会誌, 4 : 81-87, 1990.
- 5) 亀谷英輝 : 妊娠に伴う末梢血好中球 chemiluminescence の変動とその意義. 妊婦の進歩, 49 : 623-628, 1997.
- 6) Ito I, Hayashi T, Yamada K, Kazuya M, Naito M, Iguchi A : Physiological concentration of estradiol inhibits polymorphonuclear leukocyte chemotaxis via a receptor mediated system. Life Sciences, 56 : 2247-2253, 1995.
- 7) Oshimi K, Gonda N, Sumiya M, Kano S : Effects of corticosteroids on natural killer cell activity in systemic lupus erythematosus. Clin Exp Immunol, 40 : 83-88, 1980.
- 8) Clemens LE, Siiteri PK, Stites DP : Mechanism of immunosuppression of progesterone on maternal lymphocyte activation during pregnancy. J Immunol, 122 : 1978-1985, 1979.
- 9) Fuchs T, Hammarstrom L, Smith CI, Brundin J : In vitro induction of murine suppressor T-cells by human chorionic gonadotropin. Acta Obstet Gynecol Scand, 59 : 355-359, 1980.
- 10) Shapira L, Houry Y, Barak V, Halabi A, Soskolne WA, Stabholz A : Human monocyte response to cementum extracts from periodontally diseased teeth : effect of conditioning with tetracycline. J Periodontol, 67 : 682-687, 1996.
- 11) Mundy GR : Inflammatory mediators and the destruction of bone. J Periodont Res, 26 : 213-217, 1991.
- 12) Tasaki N : Effects of biological response modifiers on superoxide production from polymorphonuclear leukocytes. J Kyoto Pref Univ Med, 108 : 201-213, 1999.
- 13) 安 民鎬 : ラット歯肉に接種した内毒素の動態と好中球機能に関する実験研究. 九州歯科誌, 47 : 638-651, 1993.

- 14) Lin JM, Yamauchi M, Sato S : Effects of recombinant interleukin-1 beta on decorin gene expression in human periodontal ligament fibroblast and its possible transcriptional regulation. *J Periodont Res*, 32 : 225-232, 1997.
- 15) Honig J, Rordorf AC, Siegmund C, Wiedemann W, Erard F : Increased Interleukin-1 beta (IL-1 β) concentration in gingival tissue from periodontitis patients. *J Periodont Res*, 24 : 362-367, 1989.
- 16) Masada MP, Persson R, Kenny JS, Lee SW, Page RC, Allison AC : Measurement of interleukin-1 alpha and -1 beta in gingival crevicular fluid : implications for the pathogenesis of periodontal disease. *J Periodont Res*, 25 : 156-163, 1990.
- 17) Harris PJ : Neutrophil product with lymphocyte activating factor activity. *Clin Exp Immunol*, 50 : 474-478, 1982.
- 18) Tikku K, Tikku ML, Skosey JL : Interleukin 1 production by human polymorphonuclear neutrophils. *J Immunol*, 136 : 3677-3685, 1986.
- 19) 米村隆司 : 歯周炎患者多形核白血球の貪食能, 細胞内殺菌能, ならびにインターロイキン1産生能. *日歯周誌*, 31 : 403-423, 1989.
- 20) Dunn PA, Tyrer HW : Quantitation of neutrophil phagocytosis, using fluorescent latex beads. Correlation of microscopy and flow cytometry. *J Lab Clin Med*, 98 : 374-381, 1981.
- 21) Fallon HJ, Frei E, Davidson JD, Trier JS, Burk D : Leukocyte preparations from human blood : Evaluation of their morphologic and metabolic state. *J Lab Clin Med*, 59 : 779-791, 1962.
- 22) Pinard A : Gingivitis in pregnancy. *Dent Register*, 31 : 258-259, 1877.
- 23) Levin RP : Pregnancy gingivitis. *J Md State Dent Assoc*, 30 : 27, 1987.
- 24) Hansen L, Sobol SM, Abelson TI : Otolaryngologic manifestations of pregnancy. *J Fam Pract*, 23 : 151-155, 1986.
- 25) de Liefde B : The dental care of pregnant women. *N Z Dent*, 80 : 41-43, 1984.
- 26) 阿久沢由紀 : 妊娠免疫能の変動. *群大医短紀要*, 14 : 107-114, 1993.
- 27) 山本樹生 : 正常妊娠および妊娠中毒症における免疫複合体と好中球機能に関する研究. *日大医誌*, 40 : 949-959, 1981.
- 28) Crouch SP, Crocker IP, Fletcher J : The effect of pregnancy on polymorphonuclear leukocyte function. *J Immunol*, 155 : 5436-5443, 1995.
- 29) Shibuya T, Izuchi K, Kuroiwa A, Okabe N, Shirakawa K : Study on non-specific immunity in pregnant women : increased chemiluminescence response of peripheral blood phagocytes. *Am J Reprod Immunol Microbiol*, 15 : 19-23, 1987.
- 30) Andrews WC, Bonsnes RW : The leukocyte during pregnancy. *Am J Obst Gynec*, 61 : 1129-1135, 1951.
- 31) Efrati P : Leukocytes of normal pregnant women. *Obst Gynec*, 23 : 429-432, 1964.
- 32) Pitkin RM, White DL : Platelet and leukocyte counts in pregnancy. *J Am Med Assoc*, 242 : 2696-2698, 1979.
- 33) 川端政実 : 妊娠初期脱落膜細胞における顆粒球コロニー形成刺激因子産生. *日産婦人誌*, 42 : 361-362, 1990.
- 34) Wegman TG : The cytokine basis for cross talk between the maternal immune and reproductive systems. *Cur Opin Immunol*, 2 : 765-769, 1990.
- 35) Mitchell GW, Sbarra AJ : The role of the phagocyte in host-parasite interactions II. The phagocytic capabilities of leukocytes in pregnant women. *Am J Obstet Gynecol*, 91 : 755-762, 1965.
- 36) 甕その子, 新井奈美子, 川田幸枝, 森 初恵, 関口三郎 : 妊婦の免疫能に関する研究. *医学検査*, 44 : 1777-1782, 1995.
- 37) Genco RJ, VanDyke TE, Levine MJ, Nelson RD, Wilson ME : Molecular factors influencing neutrophil defects in periodontal disease. *J Dent Res*, 65 : 1379-1391, 1986.
- 38) Van Dyke TE, Levine MJ, Genco RJ : Neutrophil function and oral disease. *J Oral Pathol*, 14 : 95-120, 1985.
- 39) Van Dyke TE, Warbington M, Garder M, Offenbacher S : Neutrophil surface protein markers as indicators of defective chemotaxis in LJP. *J Periodontol*, 61 : 180-184, 1990.
- 40) Lavine WS, Page RC, Padgett GA : Host response in chronic periodontal disease. V. The dental and periodontal status of mink and mice affected by Chediak-Higashi syndrome. *J Periodontol*, 47 : 621-635, 1976.
- 41) Bissada NF, Manouchehr PM, Haddow M, Spagnuolo PJ : Neutrophil functional activity in juvenile and adult onset diabetic patients with mild and severe periodontitis. *J Periodont Res*, 17 : 500-502, 1982.

連絡先 :

日本歯科大学歯学部歯周病学講座

〒102-8158 千代田区富士見町 2-3-16