

---

 総 説
 

---

## 口腔細菌の熱ショック蛋白質とその歯周病への関与

日野出大輔

キーワード：口腔細菌，熱ショック蛋白質，歯周病

 Heat Shock Proteins from Oral Bacteria and Their Potential Contributions  
to Periodontal Disease

Daisuke HINODE

**Abstract:** The oral cavity is subjected to a wide range of environmental changes such as heat stress that may affect the biology of oral bacteria. Bacterial heat shock proteins (HSPs), especially, GroEL protein is one of immunodominant antigen in infection. The high degree of conservation of GroEL implies that molecular mimicry may occur, antibodies against microbial GroEL can cross-react with host HSP60 antigens. Several groups showed that GroEL proteins from periodontopathogenic bacteria were immunodominant serum antigens in patients with periodontitis. It also revealed in our study the immunologic cross-reactivity between human fibronectin and *Actinobacillus actinomycetemcomitans* GroEL. These phenomena may lead to an autoimmune response and contribute to tissue destruction during periodontitis. On the other hand, *Campylobacter rectus* GroEL and *A. actinomycetemcomitans* GroEL possessed the ability to stimulate production of interleukin (IL)-6 by a confluent monolayer of human gingival epithelial cells and gingival fibroblasts. This result clearly indicates that GroEL proteins play a role in initiation and progression of periodontal disease. Interestingly, salivary IgA antibody directed to *C. rectus* GroEL from patients with periodontitis caused a partial inhibition of IL-6 production. Salivary IgA may have a protective role by reducing the inflammatory response induced by oral microbial GroEL. I review here the several reports regarding HSPs from oral bacteria and demonstrate their potential contributions to periodontal disease.

## はじめに

幾つかの細菌感染症において，病原細菌の産生する熱ショック蛋白質（heat shock protein: HSP）が注目されている。HSPの名称は細菌を含む生体細胞を通常より数度高い温度にさらすだけで，きわめて短時間のうちに幾種類かの蛋白質の新たな合成が始まることに由来するが，熱ショックだけでなく，酸化剤，重金属，アルコールなどの細胞傷害物質，異常蛋白質の誘導剤，グルコース飢餓，pH変動，エネルギー産生系や各種酵素の阻害

剤といった種々の細胞傷害因子によっても誘導されるため，ストレス蛋白質とも呼ばれている<sup>1)</sup>。HSPのいくつかは平常時にも細胞内に存在し，蛋白質の折り畳み（三次構造の形成）や会合状態（四次構造の形成）を制御して機能的構造体の形成を助ける分子シャペロン（介添役）の役割を果たしているものもある<sup>2,3)</sup>

ところで，従来より，結核やらいなどの細菌感染症では，病原菌の産生するHSPが免疫応答の主要な標的となっていることが報告されてきた<sup>4)</sup>。感染時に細菌が

大量の HSP を産生することや HSP 自体が強い抗原性を持っていること、更には感染を繰り返すことによって病原体の中でよく保存された分子である HSP に対する免疫記憶ができていくことなどがその理由と考えられる<sup>5)</sup>。慢性持続性の口腔感染症である歯周病は、特定の歯周病原細菌がその発症・進展に深く関与している。歯周病に罹患した歯周局所では病原細菌が起炎刺激となり宿主細胞との間で相互に作用することが想定されるが、この際細菌自身も歯周ポケット内での温度上昇<sup>6)</sup>を含む多くのストレスを受ける。そのため、歯周病原細菌由来 HSP も上記に示す感染症と同様に、宿主との免疫応答において重要な役割を果たすことが推察される。本総説では HSP60 family に属する口腔細菌の GroEL を中心にその歯周病への関与について、これまでの研究成果を含めて考察する。

### 1. 歯周病原細菌 HSP の構造

生物種によって熱ショック応答を引き起こす温度条件は異なるにもかかわらず、誘導される HSP は進化をこえて保存された構造や性状を有することが報告されている<sup>7)</sup>。我々は歯周病原細菌の HSP の分子性状を調べるため、*Actinobacillus actinomycetemcomitans* (*A.a.*), *Porphyromonas gingivalis* (*P.g.*), *Tannerella forsythensis* (*T.f.*) (以前は *Bacteroides forsythus*), *Campylobacter rectus* (*C.r.*) より GroEL および HSP70 family に属する DnaK を adenosine 5'-triphosphate (ATP) 分解活性を有する特徴を利用して抽出を試みた<sup>8,9)</sup>。

*P. gingivalis* について [<sup>14</sup>C] で標識されたアミノ酸混合液を 37℃ または 44℃ の条件下で取り込ませて調べたところ、図 1 のレーン 2 に示すように熱ストレス条件下では 75kDa と 68kDa に増幅バンドが認められ、ATP-agarose を用いたクロマトグラフィーにより、これらの増幅蛋白質が分離されることが確認された (レーン 3)。また、Western immunoblotting 法により、それぞれは *P.g.*DnaK, *P.g.*GroEL と考えられた。このアフィニティークロマトグラフィーに SDS-PAGE 及び電気泳動溶出の手法を組み合わせると歯周病原細菌から HSP の抽出・精製を行ったところ、GroEL は先に述べたすべての細菌から、DnaK は *P. gingivalis*, *T. forsythensis* から相当量の蛋白質を抽出することができ、両物質とも ATP 分解活性を有すると推測された<sup>9,10)</sup>。一方、これら抽出物の N 末端アミノ酸解析では、GroEL (35 残基) および DnaK (16 残基) とともに高いアミノ酸配列の相同性を示した<sup>11)</sup>。その後の遺伝子解析により、各細菌の GroEL 核酸配列が明らかにされている<sup>12)</sup> が、我々は、*C.r.*GroEL の核酸配列を検索し、GroEL 上流に存在する GroES とオペロン形成していることを報告した<sup>13)</sup>。また、*Helicobacter pylori* (*H.p.*) や他の歯周病原細菌との配列を比較したところ、各細菌 GroEL の *C.r.*GroEL に対する核酸配列の homology は *H. pylori* 76.3%, *P. gingivalis* 60.6%, *A.*

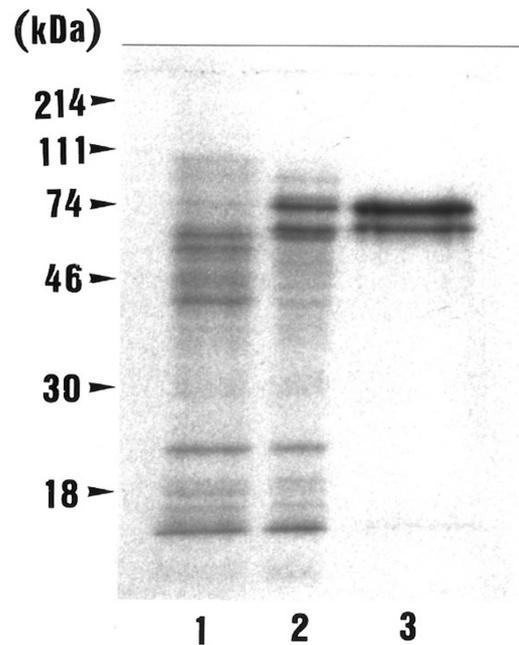


図 1 <sup>14</sup>C アミノ酸混合液を取り込ませた *P. gingivalis* の fluorography  
レーン 1 : 37℃ で取りこませた菌体, レーン 2 : 44℃ で取りこませた菌体, レーン 3 : 44℃ 取り込み菌体破砕物より ATP-agarose クロマトグラフィーにて精製した画分, 各レーンとも 400 dpm をアプラインした。

*actinomycetemcomitans* 63.6%, *Escherichia coli* (*E.c.*) 62.2%, ヒト HSP60 (HuHSP60) 51.4% といずれも高い相同性を示した。

前述のアフィニティークロマトグラフィーおよびゲル濾過の手法を組み合わせ、高次構造を保った native *A.a.*GroEL を精製してその微細構造を電子顕微鏡にて観察した。その結果、図 2 A に示すように、直径約 12 nm の 7 角形状にサブユニットが配置したリング形状となっていることを確認している<sup>14)</sup>。*E. coli* で認められる GroEL 複合体は、図 2 B に示すような 7 分子がリング状の複合体を形成し、それが背中合わせに 2 つ積み重なって円筒構造となっている。それ故、図 2 A は図 2 B の矢印方向からの観察像と考えられ、*A.a.*GroEL においても類似の構造を有していると推察された。また、抗 *A.a.*GroEL 抗体を作用させた菌の電子顕微鏡像において、GroEL の菌体外への放出を確認している<sup>14)</sup>。感染症において、強い免疫原性を発揮する蛋白質の局在性を探求することは非常に重要であり、*Chlamydia trachomatis*, *H. pylori* などでは HSP が菌体表層に存在していることが示されている<sup>15,16)</sup>。歯周病原細菌においても HSP が菌体表層に局在するかあるいは菌体周囲へ分泌されるのであれば、歯周局所に菌体が定着した際の抗原提示分子として重要な役割を果たすことが考えられる。

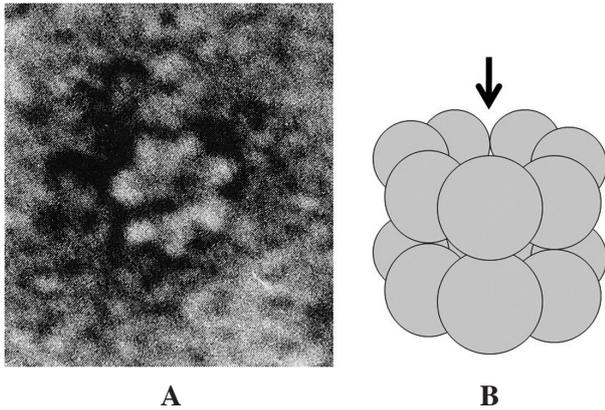


図2 *A. actinomycetemcomitans* GroEL の微細構造  
A：精製 *A.a.GroEL* の電子顕微鏡像，B：推定される *A.a.GroEL* 複合体モデル。

## 2. 歯周病原細菌 HSP の抗原性状

感染微生物の HSP を抗原として認識することは宿主にとって功罪の両側面が考えられる。六反は<sup>17)</sup>、その利点として、細菌の HSP 分子が菌種間でほぼ同一のため、いわば広域スペクトル抗生剤のように広い範囲の細菌感染症に対処できるが、逆に細菌とヒト由来 HSP の分子が類似しているため、本来は細菌の HSP を抗原として認識したものが誤ってヒト HSP を抗原として認識し、自己免疫疾患を誘発する可能性を指摘している。*P.g.GroEL*、*A.a.GroEL* および *C.r.GroEL* は HuHSP60 のアミノ酸配列との高い相同性（それぞれ48%、48%、52%）が認められている<sup>13,18)</sup>。歯周病原細菌 HSP に関する初期の基礎的研究において、*P.g.GroEL* のアミノ酸配列には歯周組織の主たる構成成分である type I collagen や type III collagen との相同性が高い部位が存在したこと<sup>19)</sup> や、歯周病原細菌とも反応する抗 HSP60モノクローナル抗体を用いた免疫組織像において、歯周炎患者から採取した歯肉切片の基底細胞や血管内皮細胞が強く反応することが報告された<sup>20)</sup>。我々は *C.r.GroEL* の抗原性状について検索し、HuHSP60に対するモノクローナル抗体 (mAb-HuHSP60) を用いた Western immunoblotting の結果、*C.r.GroEL* と交叉反応をすることを明らかにした<sup>10)</sup>。歯周病患者においても HuHSP60に免疫反応する抗体の保持により、歯周局所における宿主と病原細菌に由来する HSP の分子相同性に基づく自己免疫疾患（宿主は病原細菌の HSP と自己の HSP との判別が出来ず、宿主の HSP と間違った免疫応答を生じる）として関与しているかも知れない。

*A.a.GroEL* と宿主蛋白質との分子相同性は非常に興味深い。抗 *A.a.GroEL* ポリクローナル抗体 (pAb-*A.a.GroEL*) はヒト plasma fibronectin と強い交叉反応 (図3のレーン2) を、ヒト線維芽細胞由来 fibronectin と弱い交叉反応 (図3のレーン3) を示した。*A.a.GroEL* と plasma fibronectin のアミノ酸配列を解析した結果、8カ所にア

ミノ酸配列4残基が一致する部位が存在し、そのうちの2つ (GQLI と TGLE) は *E.c.GroEL* には存在しない *A.a.GroEL* に特有の配列であった。さらに表面プラズモン共鳴を利用したバイオセンサー (BIACORE 1000) を用いた解析により、TGLE は pAb-*A.a.GroEL* と交叉反応することが示された<sup>21)</sup>。以上の結果は早期発症型歯周炎患者において認められる急速な歯周組織破壊のメカニズムに、抗歯周病原細菌 HSP 抗体-fibronectin 複合体の関連した免疫応答の可能性を示唆している。

一方、pAb-*A.a.GroEL* を用いた Western immunoblotting の結果から、*C. rectus* ATCC33238 株由来 GroEL は S-layer protein と共通抗原を有し、これに関与する抗原基は糖鎖抗原であることを示した<sup>22)</sup>。*C. rectus* S-layer protein は強い抗原性を有し、また歯周病患者由来の血清中にこれに対する抗体の存在が報告されている<sup>23)</sup> ため、*C. rectus* が定着した歯周局所では、抗 S-layer protein 抗体は自身の分子だけでなく *C.r.GroEL* とも活発に抗原抗体反応を引き起こすことも考えられる。

## 3. 熱ショック蛋白質と免疫応答

先にも述べたように、病原細菌の HSP は宿主免疫応答の標的となっている点で注目されている<sup>4)</sup>。宿主細胞が自らを守るため HSP を発現するが、病原微生物の HSP と相同性が高いと微生物の HSP に対して誘導された T 細胞は宿主細胞の HSP も認識し、活性化して Th2 サイトカインを産生する。更に B 細胞により HSP を認識する自己抗体の産生から、自己免疫疾患に認められる

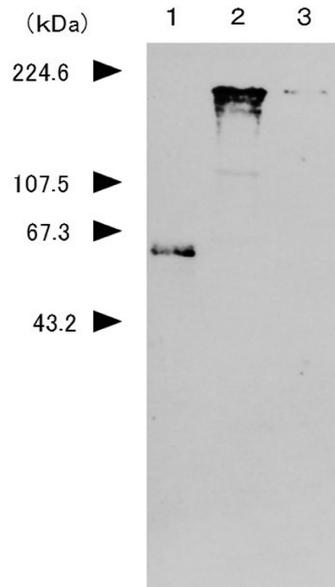


図3 抗 *A. actinomycetemcomitans* GroEL 抗体と fibronectin との交叉反応を示す Western immunoblotting  
レーン1：*A.a.GroEL* (0.02 µg)，レーン2：ヒト plasma fibronectin (1.67 µg)，レーン3：fibroblast fibronectin (1.67 µg)。

炎症反応や抗原-抗体複合体形成によるⅢ型アレルギー反応などが生じると考えられる。*H. pylori* 感染患者の血清中に存在する抗 *H.p.*GroEL 抗体 (抗 HspB 抗体) に関して、HuHSP60 との間で DNA 塩基配列及びアミノ酸配列に高い homology が認められること、免疫学的交叉反応が存在すること、更に幾つかの mAb-*H.p.*GroEL が胃粘膜に寄生した *H. pylori* を認識するだけでなく胃粘膜上皮や唾液腺の導管上皮と交叉反応することが報告されている<sup>24)</sup>。この結果は、抗 *H.p.*GroEL 抗体が自己抗体として挙動し、上部消化管の自己免疫学的な機序による炎症を引き起こす可能性を示唆している。

歯周病原細菌の GroEL と歯周病の関連性を示唆する幾つかの臨床研究がある。21名の若年性歯周炎あるいは急速進行性歯周炎患者から採取した血清のうち、9名の血清は *A.a.*GroEL と強く反応したとして Koga ら<sup>25)</sup> により HSP と歯周炎との関連性が初めて報告された。更に、Maeda ら<sup>26)</sup> は *P. gingivalis* に対して血清抗体価が上昇している患者10人中8人では、リコンビナント *P.g.*GroEL (*rP.g.*GroEL) に対する抗原抗体反応が認められたことを報告した。Tabeta ら<sup>27)</sup> も歯周病患者において *rP.g.*GroEL と HuHSP60 の両方に対する血清抗体陽性の頻度が健常者と比較して有意に高いことを報告している。このように、歯周病患者において病原細菌の HSP に対する抗体価が末梢血中で上昇していることが報告されている。

IgG や IgA 産生などに代表される宿主の体液性免疫応答は感染症に対して防御的な役割を担っていると考えられているが、HSP に対する唾液 IgA 抗体は血清中の抗体とは異なる傾向が認められたという報告がある。健常者、歯肉炎患者及び歯周炎患者より得られた血清中及び全唾液の GroEL に対する IgA 抗体価を調べた Schett らの報告<sup>28)</sup> では、歯周炎患者群からの血清中に健常者群、歯肉炎患者群のそれに対して有意に高い IgA 抗体価を認めたが、逆に全唾液を検体として用いると歯肉炎患者群は健常者群及び歯周炎患者群に対して有意に高い IgA 抗体価を認めている。我々も、Western immunoblotting の結果から歯周病患者唾液 IgA と種々の口腔細菌 GroEL との免疫反応を観察している (典型的な免疫反応を図 4 B に示す)。しかし、Schett らとは異なり、*C.r.*GroEL および *P.g.*GroEL に対して歯周炎患者群の IgA 抗体価陽性の頻度は対象群のそれより有意に高いことを示している<sup>29)</sup>。一方 *C.r.*GroEL に対する抗体価陽性者から精製した唾液 IgA は、後述する *C.r.*GroEL の有する interleukin(IL)-6 産生能を部分的に阻害する (約31%) ことも見出した<sup>29)</sup>。一般に唾液 IgA は、小腸にあるパイエル板への抗原刺激によって強く誘導され、IgA 前駆細胞が腸管膜リンパ節へ移動後、唾液腺組織に至って免疫細胞となり、この細胞中で産生された分泌型免疫グロブリンが口腔内に分泌されて、微生物の付着防止、排除などの働きをされるとされている<sup>30)</sup>。口腔細菌 GroEL を

認識する唾液 IgA の産生メカニズムには不明な点もあるが、増産された GroEL 認識唾液 IgA はその炎症性サイトカイン誘導を抑制すると考えられることから、歯周病の進行に対して宿主防御的に働いているのかも知れない。

最近 *rP.g.*GroEL を歯周病進行抑制のワクチンとして用いた動物実験が報告された<sup>31)</sup>。*P. gingivalis* 単一感染群だけでなく6種の歯周病原細菌を用いた混合感染実験系においても、ワクチン摂取群は対照群と比較して有意な歯槽骨吸収の抑制が認められている。また、歯槽骨吸収量と抗 *P.g.*GroEL 血清抗体価が負の相関関係を示したことから、抗 *P.g.*GroEL 抗体価が細菌誘導型歯周病に対する防御能の predictor となる可能性を示唆している。

#### 4. 熱ショック蛋白質の生物活性

歯周病原細菌に関連する HSP の生物活性としては、分子シャペロンとしての機能以外に、炎症性サイトカイン誘発性や歯根膜上皮細胞の増殖促進 (cell proliferation) が注目されている。宿主細胞からのサイトカインの分泌は生体にとって重要な防御機構の因子であ

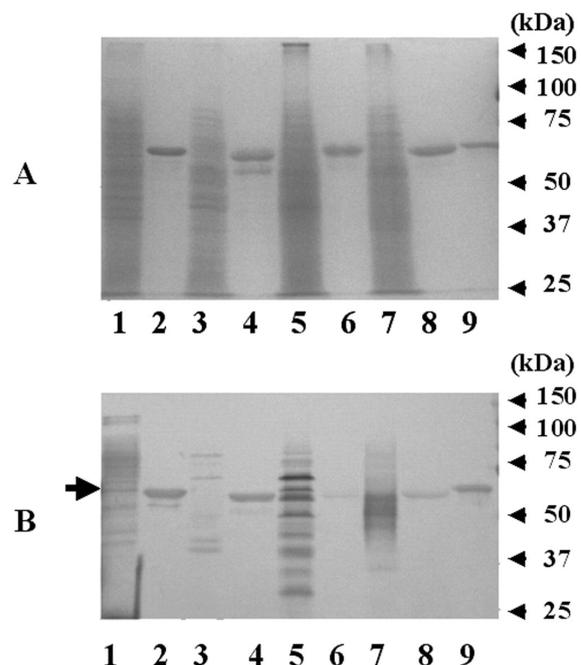


図4 歯周病患者唾液 IgA 抗体と口腔細菌および GroEL との免疫反応

A : Coomassie 染色による SDS-PAGE, B : 歯周病患者唾液を 1 次抗体、抗 IgA 抗体を 2 次抗体とした Western immunoblotting. レーン 1 および 2 : *C. rectus* 菌体および *C.r.*GroEL, レーン 3 および 4 : *A. actinomycetemcomitans* 菌体および *A.a.*GroEL, レーン 5 および 6 : *P. gingivalis* 菌体および *P.g.*GroEL, レーン 7 および 8 : *E. coli* 菌体および *E.c.*GroEL, レーン 9 : HuHSP60. B の矢印は菌体中の *C.r.*GroEL との反応を示す。

るものの、過度の生体反応は逆に種々の傷害を引き起こす「諸刃の剣」である。Marcatili ら<sup>32)</sup>は、大腸菌由来の GroEL が Keratinocyte に作用して TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\alpha$ 、IL-6 が産生誘導されて培養上清中へ放出することを報告したが、*H.p.*GroEL も胃粘膜上皮細胞に作用して、IL-8 産生を促進することが明らかにされている<sup>33)</sup>。我々は、精製 *A.a.*GroEL 及び *C.r.*GroEL を用いてヒト歯肉上皮細胞 (HGE) やヒト歯肉線維芽細胞 (HGF) に作用させ、歯周局所における炎症反応に関与する種々のサイトカインについて検索した。GroEL 3.0  $\mu\text{g/ml}$  とともに HGF を 22 時間培養した後、培養上清中のサイトカイン量を調べた結果、IL-6 量及び IL-8 量は無刺激のものと比較して、*E.c.*GroEL はそれぞれ 1.8 倍及び 1.4 倍であったのに対して、*C.r.*GroEL ではそれぞれ 5.4 倍と 3.5 倍と高い値を示し<sup>34)</sup>、mRNA レベルでも、無刺激の細胞に比較してそれぞれの遺伝子発現の増加が確認された<sup>18)</sup>。また、図 5 に示すように *C.r.*GroEL を HGE に作用させたところ *A.a.*GroEL と同様に 1.0  $\mu\text{g/ml}$  をプラトーとして IL-6 産生促進が確認された<sup>13)</sup>。一般に HSP は宿主細胞上の Toll-like receptor (TLR) と結びつき、シグナル伝達系を介して炎症性サイトカイン産生に働くことが知られているが、*H.p.*GroEL では、TLR2 および MAP kinase 系を介してヒト単球細胞から IL-8 放出を促すことが報告されている<sup>35)</sup>。*A.a.*GroEL や *C.r.*GroEL においても同様のメカニズムによって IL-6 や IL-8 が産生されているのか調べる必要がある。

一方、*A.a.*GroEL は歯根膜上皮細胞の増殖 (cell proliferation) を引き起こす能力を有する。我々はブタ由来の歯根膜上皮細胞を用いた細胞傷害実験において、*A.a.*GroEL 様蛋白質は 0.4~1.0  $\mu\text{g/ml}$  の低濃度では細胞の増殖を促進する反面、これ以上の高濃度では培養細胞数を減少させることを報告している<sup>14)</sup>。Paju ら<sup>36)</sup>は熱ストレスにより膜画分への *A.a.*GroEL 増幅が強い *A.actinomycetemcomitans* 菌株では歯根膜上皮細胞の増殖を促進し、これにより歯周局所において付着上皮細胞が根尖側へ増殖するとした仮説を示している。同研究グループはこれら上皮細胞増殖の理由として ERK1 および MAP kinase 系を介した細胞増殖のメカニズムを示しており、また、*rHuHSP60* では同様の現象が起こらないため、細菌の GroEL に特有なペプチド配列部分が関与することを報告している<sup>37)</sup>。

### まとめ

以上、概説してきたように歯周病原細菌の HSP、特に主要な GroEL は宿主細胞に作用し、炎症性サイトカイン産生を通して歯周病の発症・進展に関与することが示されてきた。HSP の分子相同性が関与した体液性免疫応答に関しては依然不明な点も多いが、歯周病患者で認められる GroEL に対する血清 IgG や唾液 IgA 抗体価の上昇は歯周病の進行に対して宿主防御的に働くと考え

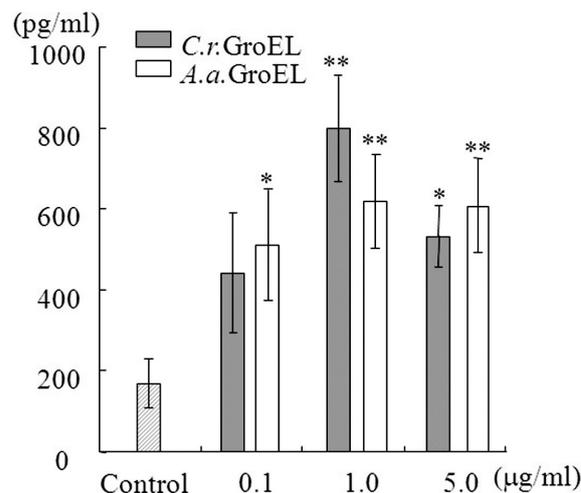


図 5 歯周病原細菌 GroEL のヒト歯肉上皮細胞刺激による IL-6 産生促進  
 図中の\*は Control 群 (無刺激上皮細胞) との有意差を示す (\*;  $p < 0.05$ , \*\*;  $p < 0.01$ ).

られる。今後、歯科で求められるテーラーメイド治療にあたり、歯周疾患初期の段階からその活動性や進展方向 (歯肉炎でとどまるか、歯周炎と進行するか) を予測する抗体検査として、HSP 抗体価測定を応用する価値は十分ある。

奥田<sup>38)</sup>は HSP 抗原に対する交叉反応 (免疫病理学的反応) が心冠動脈で起こると、その部位に III 型アレルギー反応または自己免疫疾患に認められる炎症が惹起され、動脈硬化が発症してくるメカニズムの可能性を幾つかの報告を引用して説明している。一方、口腔領域での自己免疫疾患として、口腔細菌の HSP はパーチェット病に認められる口腔粘膜疾患や顎関節部のリウマチとの関連が指摘されている<sup>39)</sup>。歯科医療従事者が循環器疾患や自己免疫疾患の予防を念頭にした歯周疾患治療を実施するに当たり、歯周病原細菌の持続感染を調べる生化学検査として HSP 抗体検査が必要となるかも知れない。更なる研究が待ち望まれる。

### 文 献

- 1) van Eden W and Young DB: Stress proteins in medicine, Marcel Dekker, Inc. New York, 1-26 (1996)
- 2) Welch WJ: Heat shock proteins functioning as molecular chaperones: their roles in normal and stressed cells. Phil Trans R Soc Lond B 339, 327-333 (1993)
- 3) Wynn RM, Davie JR, Cox RP and Chuang DT: Molecular chaperones: Heat-shock proteins, foldases, and matchmakers. J Lab Clin Med 124, 31-36 (1994)
- 4) 細川陽子. “感染症” ストレス蛋白質-基礎と臨床. 初版. 東京, 中外医学社, 1994, 196-202
- 5) Young RA and Elliot TJ: Stress proteins, infection, and immune surveillance. Cell 59, 5-8 (1989)

- 6) Haffajee AD, Socransky SS and Goodson JM: Subgingival temperature (I). relation to baseline clinical parameters. *J Clin Periodontol* 19, 401-408 (1992)
- 7) Gething MJ and Sambrook J: Protein folding in the cell. *Nature* 355, 33-45 (1992)
- 8) Hinode D, Grenier D and Mayrand D: Purification and characterization of a DnaK-like and a GroEL-like protein from *Porphyromonas gingivalis*. *Anaerobe* 1, 283-290 (1995)
- 9) Hinode D, Grenier D and Mayrand D: A general procedure for the isolation of heat-shock proteins from periodontopathogenic bacteria. *J Microbiol Methods* 25, 349-355 (1996)
- 10) Hinode D, Yoshioka M, Tanabe S, Miki O, Masuda K and Nakamura R: The GroEL-like protein from *Campylobacter rectus*: immunological characterization and interleukin-6 and -8 induction in human gingival fibroblast. *FEMS Microbiol Lett* 167, 1-6 (1998)
- 11) Hinode D, Nakamura R, Grenier D and Mayrand D: Cross-reactivity of specific antibodies directed to heat shock proteins from periodontopathogenic bacteria and of human origin. *Oral Microbiol Immunol* 13, 55-58 (1998)
- 12) Goulhen F, Grenier D and Mayrand D: Oral microbial heat-shock proteins and their potential contributions to infections. *Crit Rev Oral Biol Med* 14, 399-412 (2003)
- 13) Tanabe S, Hinode D, Yokoyama M, Fukui M, Nakamura R, Yoshioka M, Grenier D and Mayrand D: *Helicobacter pylori* and *Campylobacter rectus* share a common antigen. *Oral Microbiol Immunol* 18, 79-87 (2003)
- 14) Goulhen F, Hafezi A, Uitto V-J, Hinode D, Nakamura R, Grenier D and Mayrand D: Subcellular localization and cytotoxic activity of the GroEL-like protein isolated from *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Infect Immun* 66, 5307-5313 (1998)
- 15) Raulston, JE, Davis EC, Schmiel DH, Morgan MW and Wyrick PB: Molecular characterization and outer membrane association of a *Chlamydia trachomatis* protein related to the hsp70 family of proteins. *J Biol Chem* 268, 23239-23147 (1993)
- 16) Eschweiler B, Bohrmann B, Gerstenecker B, Schiltz E and Kist M: In situ localization of the 60 k protein of *Helicobacter pylori*, which belongs to the family of heat shock proteins, by immuno-electron microscopy. *Zbl Bakt*, 280, 73-85 (1993)
- 17) 六反一仁. ストレス研究はいま: 熱ショック蛋白質 (ストレス蛋白質) をめぐって. 初版. 東京, ブラックウェルサイエンス出版, 1999, 65-67
- 18) 日野出大輔, 田部慎一, 吉岡昌美, 中村 亮. 歯周病原性細菌の産生する熱ショック蛋白質. 口腔衛生会誌 50, 2-11 (2000)
- 19) Hotokezaka H, Hayashida H, Ohara N, Nomaguchi H, Kobayashi K and Yamada T: Cloning and sequencing of the *groESL* homologue from *Porphyromonas gingivalis*. *Biochim Biophys Acta* 1219, 175-178 (1994)
- 20) Ando T, Kato T, Ishihara K, Ogiuchi H and Okuda K: Heat shock proteins in the human periodontal disease process. *Microbiol Immunol* 39, 321-327 (1995)
- 21) Yoshioka M, Grenier D, Hinode D, Fukui M and Mayrand D: Antigenic cross-reactivity and sequence homology between *Actinobacillus actinomycetemcomitans* GroEL protein and human fibronectin. *Oral Microbiol Immunol* 19, 124-128 (2004)
- 22) Hinode D, Yokoyama M, Tanabe S, Yoshioka M and Nakamura R: Antigenic properties of the GroEL-like protein of *Campylobacter rectus*. *Oral Microbiol Immunol* 17, 16-21 (2002)
- 23) Koeguchi S, Kato K, Kurihara H, Murayama Y: Cell surface protein antigen from *Wolinella recta* ATCC33238. *J Clin Microbiol* 27, 1210-1217 (1989)
- 24) 六反一仁. *Helicobacter pylori* 感染と熱ショック蛋白質. *Helicobacter Research* 3, 295-299 (1999)
- 25) Koga T, Kusuzaki T, Asakawa H, Senpuku H, Nishihara T and Noguchi T: The 64-kilodalton GroEL-like protein of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *J Periodont Res* 28, 475-477 (1993)
- 26) Maeda H, Miyamoto M, Hongyo H, Nagai A, Kurihara H and Murayama Y: Heat shock protein 60 (GroEL) from *Porphyromonas gingivalis*: molecular cloning and sequence analysis of its gene and purification of the recombinant protein. *FEMS Microbiol Lett* 119, 129-136 (1994)
- 27) Tabeta K, Yamazaki K, Hotokezaka H, Yoshie H and Hara K: Elevated humoral immune response to heat shock protein60 (hsp60) family in periodontitis patients. *Clin Exp Immunol* 120, 285-293 (2000)
- 28) Schett G, Metzler B, Kleindienst R, Moschen I, Hattmannsdorfer R, Wolf H, Ottenhoff T, Xu Q and Wick G: Salivary anti-hsp65 antibodies as a diagnostic marker for gingivitis and a possible link to atherosclerosis. *Int Arch Allergy Immunol* 114, 246-250 (1997)
- 29) Fukui M, Hinode D, Yokoyama M, Tanabe S, Yoshioka M: Salivary immunoglobulin A directed to oral microbial GroEL in patients with periodontitis and their potential protective role. *Oral Microbiol Immunol* 21, 289-95 (2006)
- 30) 奥田克爾. 口腔の感染症とアレルギー, 第1版. 東京, 一世出版, 1996, 243-248
- 31) Lee JY, Yi NN, Kim US, Choi JS, Kim SJ and Choi JI: *Porphyromonas gingivalis* heat shock protein vaccine

- reduces the alveolar bone loss induced by multiple periodontopathogenic bacteria. *J Periodontol Res* 41, 10-14 (2006)
- 32) Marcatili A, Cipollaro de l'Ero G, Galdiero M, Folgore A and Petrillo G: TNF- $\alpha$ , IL-1 $\alpha$ , IL-6 and ICAM-1 expression in human keratinocytes stimulated *in vitro* with *Escherichia coli* heat-shock proteins. *Microbiology* 143, 45-53 (1997)
- 33) Yamaguchi H, Osaki T, Kurihara N, Kitajima M, Kai M, Takahashi M, Taguchi H and Kamiya S: Induction of secretion of interleukin-8 from human gastric epithelial cells by heat-shock protein 60 homologue of *Helicobacter pylori*. *J Med Microbiol* 48, 927-933 (1999)
- 34) 日野出大輔, 中村 亮. “歯周病原細菌の熱ショック蛋白質”. 歯周病 新しい治療を求めて. 初版. 東京, 先端医療技術研究所, 2000, 248-252
- 35) Zhao Y, Yokota K, Ayada K, Yamamoto Y, Okada T, Shen L, Oguma K *Helicobacter pylori* heat-shock protein 60 induces interleukin-8 via a Toll-like receptor (TLR)2 and mitogen-activated protein (MAP) kinase pathway in human monocytes. *J Med Microbiol* 56, 154-164 (2007)
- 36) Paju S, Goulhen F, Asikainen S, Grenier D, Mayrand D and Uitto VJ: Localization of heat shock proteins in clinical *Actinobacillus actinomycetemcomitans* strain and their effects on epithelial cell proliferation. *FEMS Microbiol Lett* 182, 231-235 (2000)
- 37) Zhang L, Pelech SL, Mayrand D, Grenier D, Heino J, Uitto VJ. Bacterial heat shock protein-60 increases epithelial cell proliferation through the ERK1/2 MAP kinases. *Exp Cell Res* 266, 11-20 (2001)
- 38) 奥田克爾. “歯周病と心血管系疾患”. Preventive Periodontology. 第1版. 東京, 医歯薬出版, 2007, 89-95
- 39) Camp C, Lei Y, Costalonga M, Zhang Y, Zaia A, Vajna R, Ross KF and Herzberg MC: Systemic disease and the oral microbiota. *Oral microbiology and immunology*. Washington DC, ASM Press, 2006, 361-376