

ヒト由来マクロファージ様細胞株の生存に対する *Actinobacillus actinomycetemcomitans* の影響に関する研究

福 永 真 佐 美

Study on the viability of human macrophage like cell line against *Actinobacillus actinomycetemcomitans*

Masami Fukunaga

(平成 8 年 1 月 31 日 受付)

結 言

歯周疾患は、歯周病原性菌の感染と、宿主の免疫応答によって発症し確立することが知られている。歯周病の病態は、一般的に細菌感染によって急性炎症に始まりその後慢性化に移行する。急性炎症における免疫担当細胞は好中球が主体であるが、慢性化した病変部歯肉には、多数のマクロファージが認められ、また同時に抗体を産生する形質細胞も認められる¹⁾。従ってマクロファージは、抗原提示細胞として免疫応答の開始に重要な役割を担っていると考えられる。

歯周病原性菌として *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans* などが知られている²⁾ がそのなかでも *A. actinomycetemcomitans* は、急速に骨吸収を認める若年性歯周炎の患者から高頻度に分離されること、また、免疫応答を抑制することが知られている^{3,4)}。*A. actinomycetemcomitans* の有する主な病原因子としては、内毒素である LPS, ロイコトキシン, コラゲナーゼ, プロテアーゼ, などが知られている^{5,6)}。ロイコトキシンは、白血球の細胞膜を直接障害し、免疫応答を抑制するなどその細胞障害性についての報告は多い⁷⁻⁹⁾。しかし *A. actinomycetemcomitans* が免疫応答を抑制する因子については、いまだ不明な点が多い。

細胞の致死様式にはアポトーシスとネクローシスが知られている¹⁰⁾。歯周病の病巣局所においても、感染細菌によって障害されたマクロファージは、どちらか

の致死様式をとると考えられるが、その致死様式については、いまだ不明な点が多い。二つの致死様式を誘導する機序は異なっている¹⁰⁾ ことから *A. actinomycetemcomitans* の細胞障害性を検索するためには致死様式を明確にしておく必要がある。

これまでの *A. actinomycetemcomitans* の細胞障害性についての報告は、菌の病原性の増強に伴う被験細胞の障害性の変化を検索したもの¹¹⁻¹³⁾ であり、病原性に対する被験細胞の感受性の相違によって、障害性がどのように変化するかについての報告は少ない¹⁴⁾。

そこで本研究では *A. actinomycetemcomitans* の免疫応答を抑制する機序を明らかにすることを目的としその一端として、成熟度の異なったヒトマクロファージ様細胞株 U937 の *A. actinomycetemcomitans* による細胞障害性について検討した。また、細胞障害性を認めたものについて、致死様式を検討した。さらに細胞障害性を誘導する因子についても検討を加えた。

材料および方法

I. 被験細胞の調製

1. 被験細胞および培養条件

被験細胞には、ヒト単球芽球様細胞株である U937 細胞 (以下 U937 と略す, 理化学研究所) を用いた。培地は, RPMI1640 (三光純薬) に 10% 牛胎児血清 (FBS), ペニシリン 5000 U/ml, ストレプトマイシン 5 mg/ml, ネオマイシン 10 mg/ml, ゲンタマイシン 10 μg/ml (以上 GIBCO) を添加したものをを用いた。5% CO₂, 95% AIR, 37°C にて, 細胞数を 3×10⁶ cells/ml 以下の濃度に保って培養した。

供試した U937 のマクロファージとしての同定を行

うために通法¹⁵⁾により U937 にエステラーゼ染色を行った。即ち、マクロファージの細胞質に特異的に認められるエステラーゼ反応を確認した後、実験に供した。分化誘導剤無添加で培養した U937 を以下 N-U937 とする。

2. 被験細胞の分化誘導

(1) Vitamin D による分化誘導

24穴のマルチウェルプレート (Falcon) に U937 を 1 ウェルあたり 1×10^6 cells/ml に調整し、10 nM の $1\alpha, 25$ -Dihydroxyvitamin D₃ (以下 Vitamin D と略す, BIOMOL) を添加し、37°C で培養した。24, 48, 72, 96時間後の細胞数を血球計算盤上でカウントした。また貧食能については Olsson ら¹⁶⁾, Leijh ら¹⁷⁾の方法に準じて検索した。即ち、U937 (5×10^6 cells/ml) とヒト血清にてオプソニン化を行った *Streptococcus sanguis* (5×10^8 cells/ml) を抗生物質を含まない RPMI1640 に 10% FBS を添加した培地に懸濁し、37°C で、振とう下にて共培養を行った。180分後に、細胞浮遊液をスライドグラスに滴下し位相差顕微鏡下で観察した。Vitamin D を添加し培養した U937 を、以下 VD-U937 とする。

(2) PMA による分化誘導

24穴のマルチウェルプレート (Falcon) に U937 を 1 ウェルあたり 1×10^6 cells/ml に調整した。Manzella ら¹⁸⁾の方法に準じ、0~15 ng の phorbol-12-myristate 13-acetate (以下 PMA と略す, SIGMA) を含む培地で 72時間培養した。PMA 添加72時間後に浮遊細胞数を血球計算盤上でカウントした。次いで培地を吸引後 10 mM の EDTA を添加し、37°C 5分間インキュベートによって U937 を剥離した。200×g, 5分間の遠心によって細胞を沈殿させ、pH 7.2 のリン酸緩衝食塩水 (PBS) で 2回洗浄した。その時点で細胞数をカウントし、全細胞数に対する接着細胞数を算定した。同時に生細胞数の割合をトリパンブルー排除試験¹⁹⁾によって確認した。なお、以後の細胞障害性の実験にも浮遊細胞を除去した後、10 mM の EDTA によって接着細胞を剥離し PMA-U937 として実験に供した。

(3) 被験細胞の顕微鏡観察

N-U937, VD-U937, PMA-U937 を位相差顕微鏡下で観察した。

II. 供試菌並びに培養上清の処理

1. 供試菌および培養方法

供試菌として、*A. actinomycetemcomitans* Y4 (A.a.), *Haemophilus aphrophils* 1351b (H.a.), *Streptococcus sanguis* ATCC10556 (S.s.), *Porphyromonas gingivalis* GAI7802 (P.g.), *Prevotella intermedia* ATCC25611

(P.i) を用いた。A.a., H.a., S.s. の培養には、ブレインハートインフュージョン培地 (BHI, Difco) を用い、P.g., P.i. には BHI 培地にビタミン K とヘミンを添加したものを用いた。また A.a., P.g., P.i. は、嫌気培養装置にて 37°C, 80% N₂, 10% H₂, 10% CO₂ の条件下で培養した。H.a., S.s. は、37°C, 5% CO₂, 95% AIR の条件下で培養した。

2. 菌体の調製

(1) 生菌

対数増殖期まで培養した菌液を 1,000×g で 15分間遠心、集菌し、PBS で 2回洗浄したものを生菌として用いた。菌数は PBS に懸濁した菌液を、Petroff-Hauser chamber に滴下し位相差顕微鏡下で計測することによって算定した²⁰⁾。

(2) 熱処理

PBS に懸濁した生菌 (1×10^9 cells/ml) を 56°C で 30分間、100°C で 30分間のインキュベート及び、オートクレーブ (121°C, 15分間) の 3つの条件で処理を行った。処理後 1,000×g で 15分間遠心、PBS で 2回洗浄したものを実験に用いた。

(3) グルタルアルデヒド処理

生菌 (1×10^9 cells/ml) を 0.25% のグルタルアルデヒドを含む PBS 中で 20°C で 18時間のインキュベートを行った。処理後 1,000×g で 15分間遠心し、PBS で 2回洗浄したものを実験に用いた。

3. 培養上清の調製

(1) 未処理培養上清

一度静止期まで培養した菌液を新しい培地で 10倍希釈し再度培養した。再培養開始時点、対数増殖期、対数増殖期終了時点において菌液を 1,000×g で 15分間遠心した後、菌体を除いた上清を 0.22 μm フィルター (ミリポア) で濾過し実験に用いた。

(2) 熱処理

上記の方法で得たそれぞれの培養上清に 56°C, 70°C, 100°C で各々 30分間の熱処理を行い実験に供した。

III. 細胞障害性の検索

1. 被験細胞の生存率の算定

細胞障害性は、トリパンブルー排除試験¹⁹⁾による被験細胞の生細胞数の変化によって評価した。細胞浮遊液とトリパンブルー生理食塩水溶液を 1:1 の割合で混合し、血球計算盤を用い、光学顕微鏡下で 3分以内に青色に染色された細胞を死細胞と判定した。

2. 供試菌との共培養の影響

U937 と菌体の共培養による影響について検索するために、被験細胞と菌体の比が 1:100 (5×10^6 cells/

ml: 5×10^8 cells/ml) となるよう試料を調整した。即ち、被験細胞については、 1×10^7 cells/ml、菌体については 1×10^9 cells/ml の濃度で抗生物質を含まない RPMI1640 に10% FBS を添加した培地中に懸濁し、各々を 2.5 ml ずつ 50 ml のプラスチック遠心管 (Falcon) に添加した。混合液を振とう下にて 37°C でインキュベートし、30分、60分、180分後に被験細胞の生細胞数を算定した。供試菌としては A.a., H.a., S.s. を用いた。また、A.a. については被験細胞との比が 1:1, 1:10, 1:50 についても検索を行った。

3. 培養上清の影響

細菌の培養上清中に 1×10^6 cells/ml となるよう被験細胞を加え、 37°C でインキュベートを行った。インキュベート時間は30分、180分間とした。インキュベート後被験細胞を $200 \times g$ で5分間遠心後 PBS で洗浄し、RPMI1640 に10% FBS を添加した培地にて再培養した。培養時間は、N-U937, VD-U937 は72時間、PMA-U937 は3時間とし、経時的に被験細胞の生細胞数を算定した。

IV. 致死様式の確認

1. 形態観察

培養上清の影響について検索した被験細胞の形態変化を位相差顕微鏡下で観察した。また、形態変化を認めた被験細胞に、エステラーゼ染色を通法¹⁵⁾に従い行った。

2. DNA の断片化の検出

DNA の断片化の検出は、Mangan ら²¹⁾の方法に準じて行った。即ち A.a. の培養上清でインキュベートした N-U937 (1×10^6 個) を 6, 24, 48時間後に $200 \times g$, 5分間の遠心によって沈殿させた。次いで、0.1 ml の 10 mM のトリス塩酸緩衝液 (pH 7.5) に 5 mM EDTA 並びに 0.5% TritonX100 を含んだ溶液を用いて溶解し、 4°C で15分インキュベートした。13,000 $\times g$, 15分間の遠心後、採取した上清に、 $2 \mu\text{l}$ の RNase (10 mg/ml) と Proteinase K (10 mg/ml) を添加し 37°C で120分間インキュベートした。イソプロパノール沈殿によって DNA を分離後、1% アガロースゲル (GIBCO) によって電気泳動 (100 V, 60分) を行った。

結 果

I. 被験細胞の成熟

U937 の細胞増殖は、10 nM の Vitamin D 添加によって48時間後に抑制傾向が認められ72時間後にコントロールとの差は著明であった (図1)。図2には、貧食能について検索した結果を示す。細胞質に S.s.

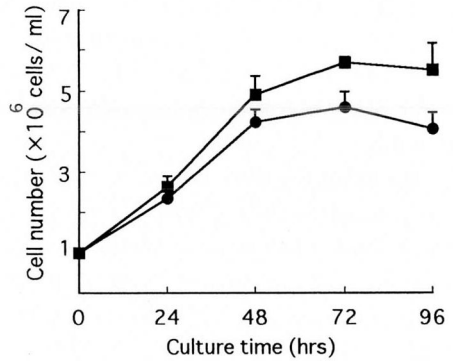


図1 Vitamin D 添加による U937 の細胞増殖。
 ■ Vitamin D 無添加での培養。
 ● 10 nM の Vitamin D を添加し培養した。
 各数値は 3 回の平均値 +SD を示す。

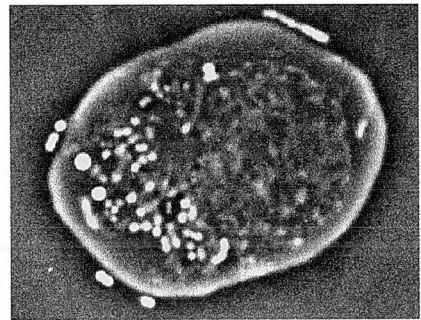


図2 VD-U937 の *S. sanguis* の貪食像。(x500)。
 VD-U937 と *S. sanguis* を180分間共培養したときの位相差顕微鏡像を示す。

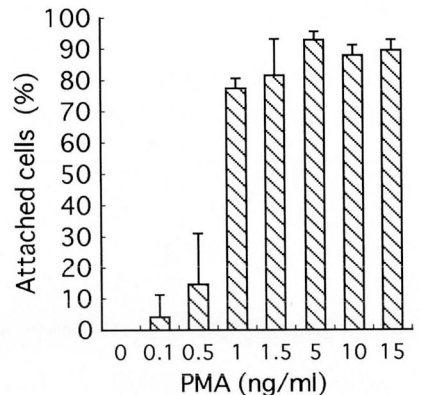


図3 PMA 添加による U937 の分化誘導。
 72時間培養後、プラスチック底面に接着した細胞の割合を示す。
 各数値は 3 回の平均値 +SD を示す。

の存在を認め、VD-U937 が S.s. を貧食していることが示された。即ち、Vitamin D 添加により U937 に貪食能が誘導され成熟していることを確認した。図3は、PMA 添加によってフラスコ底面に接着した U937 の割合を示したものである。接着細胞数は、1 ng/ml の濃度の PMA 処理では全細胞数の70%が接着しており PMA の濃度が増加するほど接着細胞数も増加していた。しかし、細胞の生存率は PMA の濃度が増加すると低下する傾向を認めた (図4)。従って以後の実験では、PMA の濃度を 1 ng/ml とした。

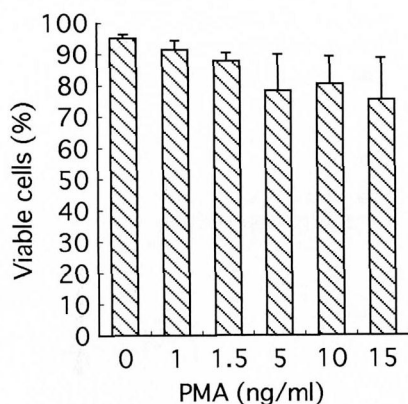


図4 PMA 添加が U937 の生存におよぼす影響。72時間培養後の生細胞数の割合を示す。各数値は3回の平均値 +SD を示す。

図5には、N-U937, VD-U937, PMA-U937 を位相差顕微鏡下で観察した結果を示す。N-U937 は培地中に浮遊して生存していた。一方、VD-U937 はフラスコ底面に単層で付着していた。また、PMA-U937 はフラスコ底面に強固に接着しており、EDTA 処理によってのみ剥離することが可能であった。即ち、U937 は N-U937 に比し Vitamin D, または PMA 添加

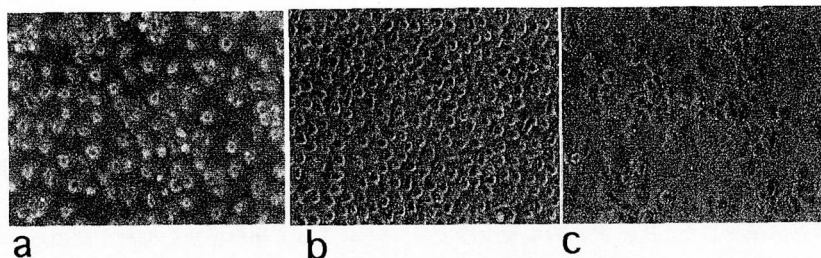


図5 成熟度の異なる U937 の位相差顕微鏡像。(×200)。

- 分化誘導剤無添加で培養した U937.
- 10 nM の Vitamin D を添加して72時間培養した U937.
- 1 ng/ml の PMA を添加して72時間培養した U937.

によって成熟していることを確認した。

II. 細胞障害性

1. 菌体による細胞障害性

(1) 生菌との共培養

各種菌体との共培養による U937 の生細胞数に与える影響について調べた結果を図6に示す。N-U937 の生細胞数は、A.a., H.a., S.s. のいずれの菌との共培養によっても、180分後まで変化せず、細胞障害性は認められなかった。VD-U937 には A.a. 生菌との共培養によって生細胞数減少が認められ、180分後の生細胞数はコントロールの50%であった。しかし、H.a., S.s. との共培養では生細胞数の変化は認められなかった。PMA-U937 は、A.a. との共培養によって180分後に生細胞数が数%に減少したが、H.a., S.s. との共培養によっては生細胞数に変化は認められなかった。被験細胞と A.a. の比が 1:1, 1:10 並びに 1:50 までは、コントロールの細胞と比べて生細胞数に変化は認められなかったが、1:100 において顕著に生細胞数減少が認められた (図7)。

(2) 処理した菌体との共培養

A.a. の菌体を処理した時の PMA-U937 に対する生細胞数の変化を図8に示す。56°C で30分間の処理を行った菌体との共培養では、被験細胞の生細胞数は共培養開始60分後に、コントロールの細胞の30%となった。A.a. 菌体の細胞障害性は、56°C で30分間の処理では抑制されなかった。しかし、グルタルアルデヒド処理、オートクレーブ処理、100°C 30分の処理では、PMA-U937 の生細胞数はコントロールの細胞と同程度であり生菌の A.a. によって認められた細胞障害性は抑制されることが示された。

2. 培養上清による細胞障害性

(1) 未処理の培養上清

PMA-U937 を A.a. の培養上清で30分間インキュ

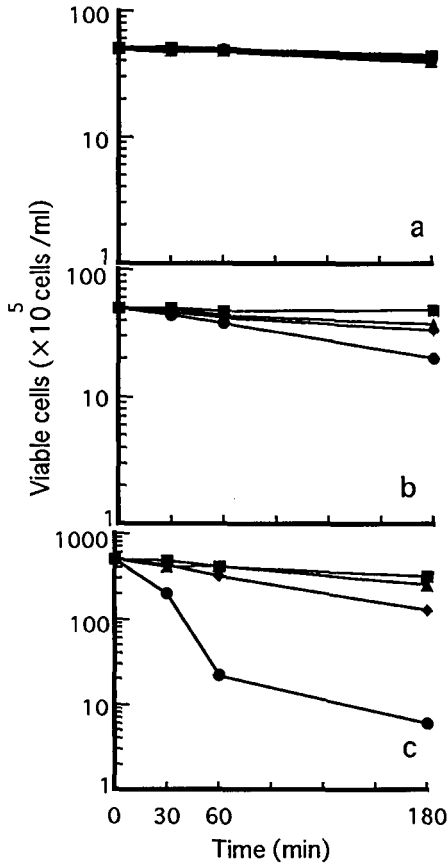


図6 成熟度の異なる U937 に対する菌体の影響。
 U937 と菌体を 1:100 の割合で180分間共培養したときの U937 の生細胞数の変化を示す。
 ■: control (菌無添加), ●: A.a., ▲: S.s., ◆: H.a.
 a: N-U937.
 b: VD-U937.
 c: PMA-U937.
 各数値は3回の平均値。

バートした後の生細胞数の変化を図9に示す。洗浄、培地交換時点で対数増殖期の培養上清とのインキュベーションによって、生細胞数は50%に減少し、180分後には10%に減少した。図10には、A.a, P.g., P.i. の対数増殖期の培養上清と PMA-U937 とを180分間インキュベーションを行った時の生細胞数の変化を示す。A.a. の培養上清において PMA-U937 を再培養後180分後に生細胞数が数%に減少した。P.g., P.i. の培養上清では A.a. の培養上清で認められた細胞数の減少は、認められなかった。図11には、N-U937 及び VD-U937 に対する A.a, P.g., P.i. の対数増殖期の培養上清の影響について調べた結果を示す。N-U937, VD-U937 と

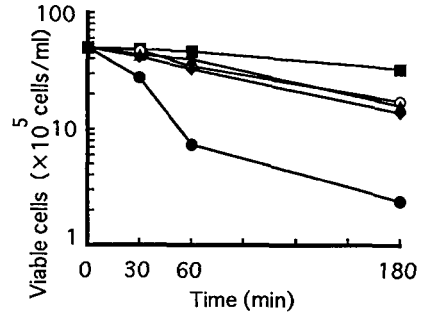


図7 PMA-U937 に対する A.a. 菌体の影響。
 PMA-U937 と A.a. の比を 1:1~1:100 まで変化させて180分間共培養したときの PMA-U937 の生細胞数の変化を示す。
 ■: control (A.a. 無添加).
 ○: U937 : A.a. = 1:1,
 ▲: U937 : A.a. = 1:10.
 ◆: U937 : A.a. = 1:50,
 ●: U937 : A.a. = 1:100.
 各数値は3回の平均値。

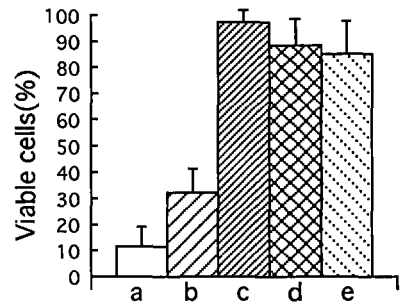


図8 A.a. 菌体の各種の処理が PMA-U937 に及ぼす影響。
 A.a. 無添加の PMA-U937 の生細胞数を100%とした。
 各数値は3回の平均値 +SD を示す。
 a: 未処理の A.a.
 b: 56°C で30分間処理。
 c: 100°C で30分間処理。
 d: グルタルアルデヒド処理。
 e: オートクレーブ処理。

もに再培養開始時点では、生細胞数に変化は認められなかった。再培養開始後24時間、48時間、72時間では、N-U937 には A.a. の培養上清とのインキュベーションによって細胞増殖の抑制が認められた。一方 VD-U937 については A.a. の培養上清添加によって、24時間後に生細胞数が数%に減少した。P.g., P.i. の培養上清との処理では、N-U937, VD-U937 と同様の細胞増殖がみられた。

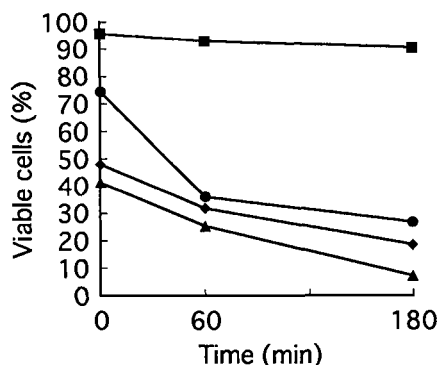


図9 PMA-U937 に対する A.a. 培養上清の影響。
PMA-U937 と培養上清のインキュベート時間は30分とした。
■ : control; BHI 培地によるインキュベート。
● : A.a. を再培養した時点の培養上清。
▲ : 対数増殖期の培養上清。
◆ : 対数増殖期終了時点の培養上清。
横軸は、再培養後の時間を示す。
各数値は3回の平均値。

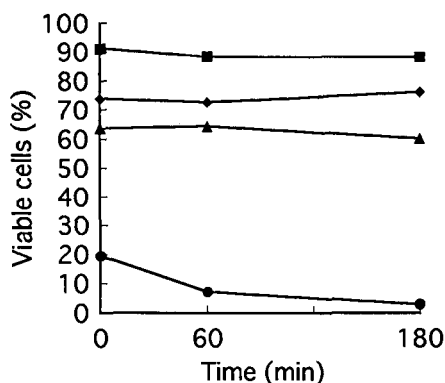


図10 PMA-U937 の生存に対する A.a., P.g., P.i. の培養上清の影響。
PMA-U937 と培養上清とのインキュベート時間は180分とした。
■ : control; BHI 培地によるインキュベート。
● : A.a. 対数増殖期の培養上清。
▲ : P.g. 対数増殖期の培養上清。
◆ : P.i. 対数増殖期の培養上清。
横軸は、再培養後の時間を示す。

(2) 熱処理した培養上清

図12は、異なった条件で熱処理した A.a. の培養上清が PMA-U937 の生細胞数に与える影響を示したものである。未処理の A.a. の培養上清の PMA-U937 に対する細胞障害性を、56°C 30分で処理したものと比

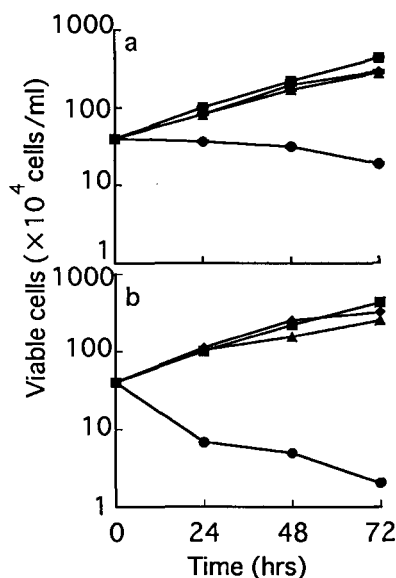


図11 U937 の増殖に対する培養上清の影響。
U937 と培養上清のインキュベート時間は30分とした。
■ : control; BHI 培地。
● : A.a. 対数増殖期の培養上清。
▲ : P.g. 対数増殖期の培養上清。
◆ : P.i. 対数増殖期の培養上清。
横軸は、再培養後の時間を示す。
a: N-U937。
b: VD-U937。
各数値は3回の平均値。

較した。再培養開始時点の培養上清では、56°C 30分の処理によって生細胞数の減少は認められなかった。対数増殖期、対数増殖期終了時点の培養上清では、未処理の培養上清と同様に生細胞数の減少がみられた。一方、70°C 30分および100°C 30分の熱処理では生細胞数の減少は認められなかった。即ち未処理の培養上清の PMA-U937 に対する細胞障害性は56°C 30分の熱処理では抑制されなかったが、70°C 30分および100°C 30分の熱処理では抑制されることが示された。

II. 障害をうけた U937 の致死様式

1. 形態観察

N-U937 では、A.a. の培養上清とインキュベートし、再培養を始めて3時間後から細胞の縮小や細胞膜の彎曲が認められた(図13)。これらの変化を認める細胞の割合は、6時間後まで増加した。PMA-U937 では、再培養を始めて24時間後に全ての細胞が一様に膨潤していることが確認された(図14)。図15は N-U937 及び VD-U937 を A.a. の培養上清とインキュ

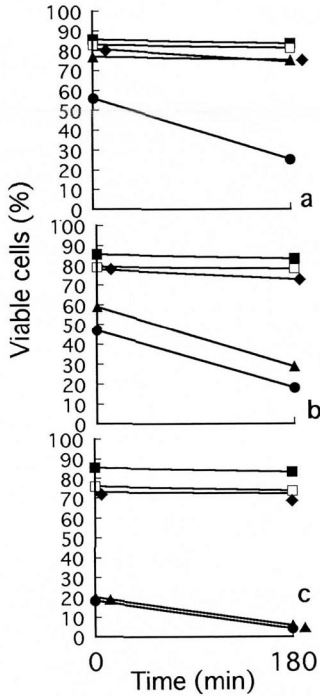


図12 A.a. 培養上清の熱処理が PMA-U937 に及ぼす影響.

- a: 再培養開始時間の培養上清.
- b: 対数増殖期の培養上清.
- c: 対数増殖期終了時点の培養上清.
- : control; BHI 培地.
- : 未処理の培養上清.
- ▲: 56°C 30分で処理した培養上清.
- ◆: 70°C 30分で処理した培養上清.
- : 100°C 30分で処理した培養上清.

横軸は、再培養後の時間を示す.

* 培養上清とのインキュベーション時間は180分とした.

各数値は3回の平均値.

べートし、再培養を始めて48時間後にエステラーゼ染色を行ったものを示す。VD-U937では、クロマチンの凝縮を形成する細胞が認められた(図15d)。またN-U937, VD-U937ともに細胞が肥大化していることが確認された(図15b, d)。

2. DNAの断片化

図16はN-U937より抽出したDNAのアガロースゲル電気泳動像である。A.a.の培養上清とインキュベートし、再培養を始めて6時間後の細胞から抽出したDNAに、180bpの整数倍のラダーが検出された。培養24時間、48時間後には180bpの整数倍のラダーは確認されなかった。

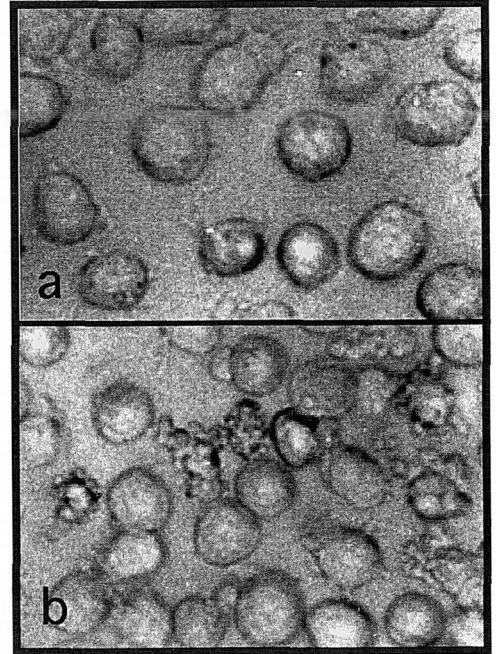


図13 A.a.の培養上清処理によるN-U937の位相差顕微鏡像。(×400).

a: control; BHI 培地.

b: 対数増殖期のA.a.の培養上清.

* 培養上清とのインキュベーション時間は30分とした.

考 察

I. 被験細胞の選択および調製について

本研究の被験細胞にはヒト monocyte-macrophage cell line である U937 を用いた。U937 は分化誘導剤の添加によって様々な機能を獲得し成熟するが、分化誘導剤無添加の状態では、マクロファージの性質である貪食能や、接着能は認めないことが知られている¹⁶⁾。本研究では貪食能および接着能を成熟の基準とし、Vitamin D 添加によって貪食能を、PMA 添加²²⁾によって接着能を誘導した。Vitamin D の濃度は 10 nM としたが、この濃度の Vitamin D は、U937 の生存率に影響を及ぼさず貪食能を誘導することが知られている¹⁶⁾。一方、高濃度の PMA 添加では、U937 に細胞障害性が認められることが知られている²³⁻²⁷⁾。従って細菌による細胞障害性の影響を検討するために PMA 添加による細胞障害性を抑制しておくことが必要であると考え、U937 の生存に影響のみられなかった 1 ng/ml を PMA 処理の濃度とした。

また PMA 添加 U937 は、細胞内寄生細菌である *Brucella species* の宿主細胞として用いられている²⁸⁾。

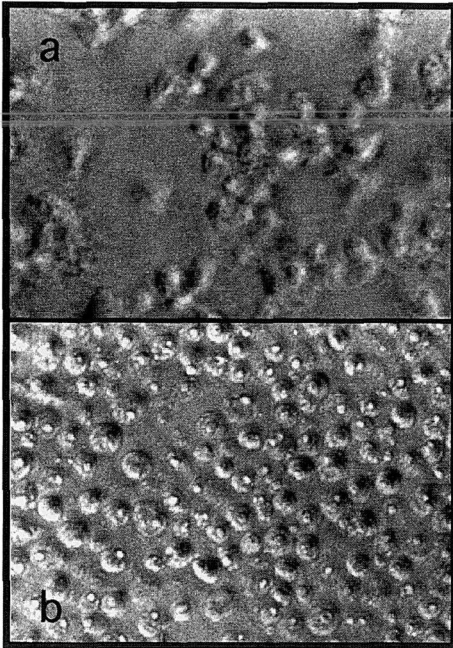


図14 A.a. 培養上清処理による PMA-U937 の位相差顕微鏡像. ($\times 200$).

A.a. 対数増殖期の培養上清で30分間インキュベートしてから24時間後の形態変化を示す.

a: control; BHI 培地.

b: A.a. 対数増殖期の培養上清.

またマクロファージがプロスタグランジン E_2 産生能を獲得する研究にも使われている^{29,30}). これらの報告の中で, Caron ら²⁸) は感染および炎症の場におけるマクロファージのモデルとして, PMA を添加した U937 を被験細胞として用いていることから, 本研究でも被験細胞として選択した。

II. 供試菌について

菌体との共培養の影響を調べる実験では, A.a. の細胞障害性を比較検討するための非病原性菌として, グラム陰性菌の H.a. と, グラム陽性菌の S.s. を用いた。H.a. を選択した理由は, H.a. と A.a. が分類学的に近似していること³¹⁻³⁴), H.a. を非病原性菌として A.a. の対照菌として用いている報告が多いこと^{5,35,36}) による。S.s. は, プラーク中に優勢な菌であるが, A.a. や他の歯周病原性菌に報告されている細胞障害性や, 組織障害性についての報告はみられない。本研究からも, S.s. H.a. は U937 に対して細胞障害性を認めず, 被験細胞に対する細胞障害性は, A.a. に特異的である可能性が示された。

次に培養上清の影響では, A.a. の細胞障害性を比較検討するための歯周病原性菌として, P.g., P.i. を選択した。P.g., P.i. の病原因子については LPS, トリプシン様酵素, コラゲナーゼ, 蛋白分解酵素などが

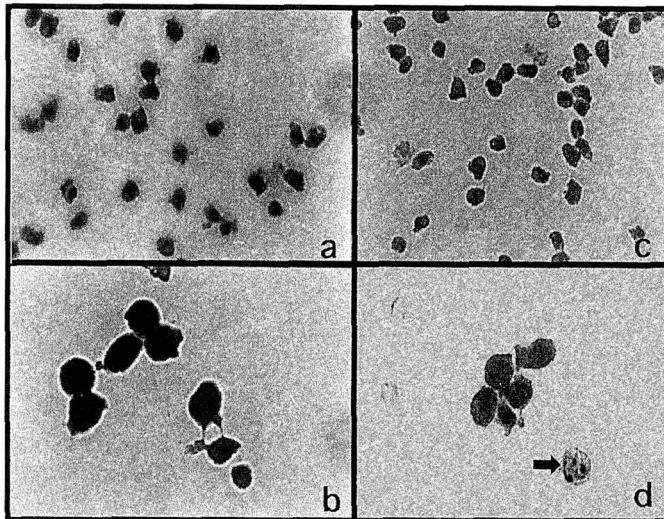


図15 A.a. 培養上清による U937 の形態変化. ($\times 200$).

A.a. 対数増殖期の培養上清で30分間インキュベートしてから48時間後の形態変化を示す.

a: N-U937; BHI 培地.

b: N-U937; A.a. 培養上清.

c: VD-U937; BHI 培地.

d: VD-U937; A.a. 培養上清.

→: クロマチンの凝縮を認めた細胞を示す.

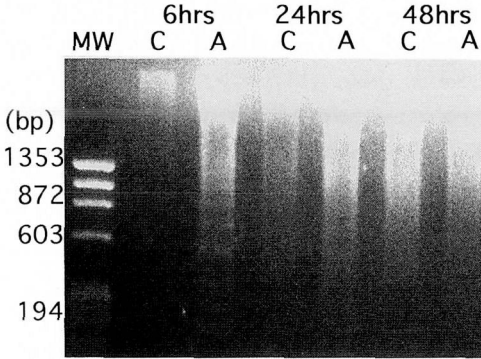


図16 N-U937 の DNA アガロースゲル電気泳動像。
 MW：分子量マーカー。
 C：BHI 培地。
 A：A.a. 対数増殖期の培養上清。
 * 培養上清とのインキュベーション時間は30分とした。
 上記の時間はインキュベーション後の再培養時間を示す。

知られている³⁷⁻⁴²⁾。また P.i. はリンパ球の機能を抑制するという報告もある⁴³⁾。P.g, P.i. の免疫担当細胞に対する細胞障害性についての報告はみられない。本研究においても、P.g, P.i. の培養上清は被験細胞に対して細胞障害性を認めず、被験細胞に対する細胞障害性は、菌周病原性菌のなかでも A.a. に特異的である可能性が示された。

Ⅲ. 細胞障害性について

1. 菌体の影響

(1) 被験細胞の成熟度

A.a. 菌体との共培養によって N-U937 には細胞障害性は認められなかったが、VD-U937 および PMA-U937 に対しては認められることが示された。この結果から A.a. の U937 に対する細胞障害性は、Vitamin D の添加あるいは PMA の添加によって変化する U937 の性質と関係がある可能性が考えられる。例えば、U937 は Vitamin D, PMA の添加によって、膜抗原である CD14 の発現が高まることが知られている^{44,45)}。グラム陰性菌の持つ LPS は、CD14 と結合するとの報告⁴⁶⁾ があることから、細胞障害性の発現は A.a. と CD14 の結合によって誘導される可能性が考えられる。

PMA-U937 は A.a. との共培養によって30分後に生細胞数が50%に半減し180分後には数%であったが、VD-U937 の生細胞数は180分後に50%に半減した。この現象は VD-U937 よりも PMA-U937 に A.a. を認識する部位が増加しているためかあるいは全く異なった

メカニズムによるものなのかは、今後の研究に待たねばならない。

(2) A.a. 菌体処理

A.a. は菌周病原性菌肉内組織内において、生菌の状態が存在しているとの報告⁴⁷⁻⁴⁹⁾ や、上皮細胞に侵入し細胞内において生菌の状態が存在するとの報告³⁶⁾ がある。従って A.a. の細胞障害性は、生菌の時に増強される可能性が考えられる。一方 U937 細胞の培地中では、細菌の生存は添加した FBS の存在によって左右されることが知られている¹⁷⁾。そこで予備実験として RPMI1640 に10% FBS を添加した培地の中で A.a. が生菌の状態で保たれているかについて検討した。結果には示していないが生菌の A.a. の数について Colony forming units を算定したところ、60分間は変化が認められなかった。従って共培養後60分間は、A.a. は生菌として存在していると考えられた。また、死菌では細胞障害性を認めなかったことから、PMA-U937 と A.a. を共培養すると30分後にすでに生細胞数が50%に半減した理由として、A.a. が生菌の状態であることが必要であると考えられる。また、PMA-U937 と細菌の比が 1:1, 1:10, 1:50 までは、生細胞数減少に影響を与えなかったことから一定量以上の A.a. によって PMA-U937 の細胞障害性が発現するものと考えられる。

A.a. 菌体の PMA-U937 に対する細胞障害性は、菌体を熱処理あるいはグルタルアルデヒドで処理することにより抑制された。これらの処理によっては LPS は失活しないこと⁵⁰⁾ から、本研究で認められた細胞障害性は LPS 以外の因子による可能性が示唆された。

以上より、被験細胞に対する細胞障害性は、A.a. が生菌の状態のときに発現すること、さらに A.a. による細胞障害性は U937 の成熟によって増強されることが示された。

2. 培養上清の影響

(1) 被験細胞の成熟度

共培養の影響と同様に、Vitamin D あるいは PMA の添加によって U937 を成熟させると、A.a. の培養上清による細胞障害性が増強した。N-U937 には、180分間の A.a. 菌体との共培養による生細胞数の減少は認められなかった。しかし、A.a. の培養上清とのインキュベートでは、同細胞の増殖抑制が認められた。即ち、分化誘導剤無添加の U937 にも細胞障害性が認められるほど、A.a. の培養上清の細胞障害性は、強い可能性が示された。また、細胞障害性の増強には Vitamin D の添加、あるいは PMA の添加によって変化する U937 の性質と関係がある可能性が、この実験

系によっても示唆された。過去に A.a. の U937 に対する細胞障害性を検討した報告はみられない。しかし Armitage ら¹⁴⁾の報告によると、ヒト前骨髄性白血病由来細胞株である HL-60 では A.a. によって48時間まで細胞増殖が抑制されているが、レチノイン酸添加で成熟させた HL-60 は、A.a. 添加によって24時間後に増殖抑制のみならず生細胞数が60%減少している。即ち細胞を成熟させたことにより A.a. による細胞障害性の増強を認めたことは、本研究と一致している。細胞障害性の増強について Armitage ら¹⁴⁾は、レチノイン酸添加によって HL-60 に A.a. を認識する部位が増加する可能性を考察している。従って、U937 においても A.a. から遊離する物質に結合する部位が、Vitamin D の添加あるいは、PMA の添加によって増加している可能性が考えられる。

(2) A.a. の培養上清処理

A.a. の培養上清処理による PMA-U937 に対する細胞障害性は、再培養開始時点の培養上清に比べ対数増殖期、対数増殖期終了時点の培養上清とのインキュベートの方が増強される傾向を認めた。従って、U937 に細胞障害性をもたらす因子は A.a. によって菌体外にも放出され、A.a. の増殖に伴って培養上清中に増加している可能性が考えられる。さらに、再培養開始時点の培養上清でも PMA-U937 のインキュベート時間の経過とともに細胞障害性が増強されていることから、細胞障害性をもたらす因子は、U937 に微量で短時間の作用によって致死作用をもたらしている可能性も考えられる。

A.a. の外毒素であるロイコトキシンは菌体表層に局在し、白血球や単球に対して細胞障害性を有することが知られている^{7,11,51,52)}。A.a. は全ての株においてロイコトキシン産生能を有しており、培養条件によって産生量が変わると言われている⁵³⁾。Ohta ら⁵⁴⁾は、A.a. のロイコトキシンの産生には、培地が制限栄養状態であること、また連続培養条件下で産生されると報告しており、今回の BHI 培地ではロイコトキシンは産生されていない可能性が高いと考えられる。一方、ロイコトキシンは 56°C 30分の熱処理によって失活する⁵⁵⁾ことから、培養上清を熱処理して未処理の培養上清の細胞障害性と比較した。A.a. の再培養開始時点の培養上清では、56°C 30分の熱処理によって細胞障害性の抑制が認められた。しかし、対数増殖期および対数増殖期終了時点の培養上清では 56°C 30分の熱処理によって PMA-U937 に対する細胞障害性は抑制されなかった。従って A.a. の増殖に伴って培地中に増加している U937 に細胞障害性をもたらす因子は、ロイコトキシン以外の物質であると考えられ

る。

Armitage ら¹⁴⁾は、HL-60 に対する A.a. の細胞障害性は 56°C 30分の熱処理で失活したと報告しており、彼等は細胞障害性を誘導する因子についてロイコトキシンの可能性があると考察している。細胞を成熟させると細胞障害性の増強が認められたことについては、本研究と一致したが、細胞障害性を誘導する因子については異なった結果を得た。

一方、菌体及び培養上清を 70°C 30分、100°C 30分で熱処理すると細胞障害性は抑制された。LPS はこれらの熱処理によっても失活しないことから、LPS は細胞障害性の誘導因子ではないと考えられる。

A.a. による細胞障害性は、細胞の成熟に伴って増強されることが示された。さらに A.a. の持つ細胞障害性因子は、A.a. が生菌のときに培地中に遊離されていること、またロイコトキシンではないことが示された。

IV. Viability 算定に用いたトリパンブルー染色法について

A.a. の細胞障害性の報告には、今回用いたトリパンブルー染色の他に⁵¹Cr 遊離法を用いている報告⁵¹⁾や、乳酸脱水素酵素 (LDH) を測定している報告⁹⁾がある。本研究においては、簡便かつ鋭敏に生死を判定できることや形態観察も同時に行えることなどの理由から、トリパンブルー染色法を用いた。

V. 致死様式について

1. U937 の成熟に伴う致死様式の変化について

A.a. の培養上清処理とのインキュベートによって、N-U937 にはアポトーシスが認められ、PMA-U937 にはネクローシスが認められた。N-U937 では、A.a. の培養上清によって3時間後に細胞膜が彎曲した細胞を認めたこと、6時間後には DNA の断片化を認めたことより、アポトーシスが起きていると判断した。また、VD-U937 にはクロマチンが凝縮している細胞を認めたがクロマチンの凝縮もアポトーシスの特徴であること¹⁰⁾から VD-U937 にもアポトーシスが生じていると考えられる。しかし、細胞数の減少が N-U937 よりも早かったことから、アポトーシスとネクローシスの両方が混在していると考えられる。アポトーシスを起こした細胞には DNA の変化が先に認められ、蛋白合成や RNA 合成および細胞膜の機能は保たれていることが知られている¹⁰⁾。A.a. の培養上清によって N-U937 にアポトーシスを誘導した際にもトリパンブルーの取り込みを認めなかったことから、細胞膜の機能は保たれていたと考えられる。

一方、PMA-U937 には、N-U937 および VD-U937 に認められた細胞膜の彎曲やクロマチンの凝縮は認められなかった。また、A.a. の培養上清処理後30分後にすでにトリパンブルーの取り込みを認めたこと、また培養上清処理後全ての細胞が膨潤していたことから PMA-U937 の致死様式は、ネクローシスによるものと考えられた。

2. N-U937 に認められたアポトーシスについて

培養上清とのインキュベートによるアポトーシスの誘導を、2つの側面から考察できると思われる。HL-60 は、最終分化の結果アポトーシスを生じることが知られている⁵⁶⁾。従って、U937 においても細胞の分化を促進した結果、死を早めた可能性が考えられる。一方 Kato ら⁵⁷⁾ は、マウスの腹腔マクロファージに A.a. を感染させるとアポトーシスが認められたと報告している。また室らは、A.a. の LPS がマクロファージの膜抗原である CD14 と結合し PKC を活性化することでアポトーシスが誘導される可能性を示唆している⁵⁸⁾。従って、U937 においても、細胞障害の結果としてアポトーシスが起った可能性が考えられる。

3. PMA-U937 に認められたネクローシスについて

分化誘導剤無添加の U937 は、本研究で用いた PMA よりも高濃度の PMA 添加によってアポトーシスを認めることが知られている⁵⁹⁾。しかし、本研究では A.a. の培養上清によって PMA-U937 に誘導される致死様式はネクローシスであった。一般に細胞の致死様式は、細胞が受ける刺激の程度によって、アポトーシスからネクローシスへ変化することが知られている^{10,60)} が、本研究では細胞の成熟度が変化すると、同一刺激によっても致死様式が変化することが示された。

4. 臨床的な意義について

多川ら⁶¹⁾ は、歯周炎に罹患した歯肉組織内において多形核白血球、上皮細胞、線維芽細胞にアポトーシスが誘導される可能性を示唆している。一般にアポトーシスは、周辺部組織に障害を与えず、ネクローシスは周辺部組織に障害を与える¹⁰⁾。今回の研究では、マクロファージがどちらの死をとることが、生体にとって有利なのかは不明である。しかし、病原因子の側からすると、宿主細胞がアポトーシスに陥る方が宿主細胞が持つ酵素や過酸化水素⁶²⁾ など、病原因子にとって不利なものの影響が少ないのではないかと考えられる。本研究からは、臨床的な意義を考察することは難しいが、A.a. によるマクロファージ致死様式の違いは、歯周疾患の免疫応答の発現を修飾している可

能性を示唆していると考えられる。

結 論

Actinobacillus actinomycetemcomitans を菌体と上清に分けてそれぞれを成熟度の異なったヒトマクロファージ様細胞株 U937 に対して作用させ、被験細胞の生細胞数の変化と致死様式の観察により A.a. の細胞障害性を検討した。さらに、細胞障害性を誘導する因子について検討し、以下の結果を得た。

1. A.a. 菌体との共培養によって U937 に細胞障害性が認められた。また、この細胞障害性は、U937 が成熟すると増強した。

2. A.a. の培養上清とのインキュベーションによって、U937 に細胞障害性が認められた。また、この細胞障害性は、U937 が成熟すると増強した。

3. A.a. の菌体をグルタルアルデヒド処理、オートクレーブ処理、100°C 30分処理することにより、A.a. の U937 に対する細胞障害性は抑制された。

4. A.a. の培養上清を 70°C 30分、100°C 30分熱処理することによって A.a. の U937 に対する細胞障害性は抑制された。

5. 接着能を獲得させた U937 に対する A.a. の細胞障害性は、56°C 30分の熱処理では抑制されなかった。

6. A.a. の培養上清処理による U937 の致死様式は、細胞を成熟させるとアポトーシスからネクローシスに変化した。

以上の結果から、A.a. は U937 に対して細胞障害性を有し、その細胞障害性は U937 の成熟によって増強されることが示された。また、A.a. によって誘導される U937 の致死様式は、U937 の成熟度の相違によって異なることより歯周疾患の宿主免疫応答の発現を修飾している可能性が示唆された。さらにその細胞障害性を誘導する因子は、A.a. が生菌の状態の時に培地中に遊離され、ロイコトキシンや LPS 以外の物質である可能性が示唆された。

謝 辞

稿を終えるにあたり、本研究の御指導および御校閲を賜った本学予防歯科学講座岩本義史教授に深甚なる感謝の意を表わします。また、本研究遂行上、御助言御校閲賜った本学口腔生化学講座加藤幸夫教授ならびに本学歯科保存学第2講座栗原英見教授に深謝致します。また本研究の遂行、まとめおよび論文の作成上、御指導御助言を頂いた本学予防歯科学講座森下真行講師に感謝の意を表わします。さらに本研究の供試菌に関して御助言、御協力をいただきました本学予防歯科学

講座鶴田圭伊子博士並びに、形態観察に関して御助言、御協力をいただきました本学予防歯科学講座河原和子博士に感謝の意を表します。最後に本研究を進めるに際し、多大なる御支援を頂いた本学予防歯科学講座関係各位に心から感謝致します。

文 献

- 1) 茂呂 周：歯周組織の防御機構。歯医学誌 12, 124-128, 1993.
- 2) 奥田克爾：歯周病の病因。歯医学誌 12, 113-117, 1993.
- 3) van Winkelhoff, A.J., de Groot, P., bas, F. and de Graaf f, J.: Quantitative aspects of the subgingival distribution of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in a patient with localized juvenile periodontitis. *J. Clin. Periodontol.* 21, 199-202, 1994.
- 4) Vincent, J.W., Suzuki, J.B., Falkler, W., Jr. and Cornett, W.C.: Reaction of human sera from juvenile periodontitis, rapidly progressive periodontitis, and adult periodontitis patients with selected periodontopathogens. *J. Periodontol.* 56, 464-469, 1985.
- 5) Zambon, J.J., Slots, J. and Genco, R.J.: Serology of oral *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and serotype distribution in human periodontal disease. *Infect. Immun.* 41, 19-27, 1983.
- 6) Shenker, B.J., Kushner, M.E. and Tsai, C.C.: Inhibition of fibroblast proliferation by *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Infect. Immun.* 38, 986-992, 1982.
- 7) Iwase, M., Lally, E.T., Berthold, P., Korchak, H.M. and Taichman, N.S.: Effects of cations and osmotic protectants on cytolytic activity of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* leukotoxin. *Infect. Immun.* 58, 1782-1788, 1990.
- 8) Iwase, M., Korchak, H.M., Lally, E.T., Berthold, P. and Taichman, N.S.: Lytic effects of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* leukotoxin on human neutrophil cytoplasm. *J. Leuko. Biol.* 52, 224-227, 1992.
- 9) Zambon, J.J., DeLuca, C., Slots, J. and Genco, R.J.: Studies of leukotoxin from *Actinobacillus actinomycetemcomitans* using the promyelocytic HL-60 cell line. *Infect. Immun.* 40, 205-212, 1983.
- 10) 田沼靖一：アポトーシス；3版，東京大学出版会，東京，10-18, 1994.
- 11) Taichman, N.S. and Wilton, J.M.: Leukotoxicity of an extract from *Actinobacillus actinomycetemcomitans* for human gingival polymorphonuclear leukocyte. *Inflammation* 5, 1-12, 1981.
- 12) Taichman, N.S., Iwase, M., Korchak, H., Berthold, P. and Lally, E.T.: Membranolytic activity of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* leukotoxin. *J. Periodont. Res.* 26, 258-260, 1991.
- 13) Taichman, N.S., Iwase, M., Lally, E.T., Shattil, S.J., Cunningham, M.E. and Korchak, H.M.: Early changes in cytosolic calcium and membrane potential induced by *Actinobacillus actinomycetemcomitans* leukotoxin in susceptible and resistant target cells. *J. Immunol.* 147, 3587-3594, 1991.
- 14) Armitage, G.C. and Holt, S.C.: Effect of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Wolinella recta* and *Bacteroides gingivalis* on the viability of retinoic acid-induced and dimethyl sulfoxide-induced HL-60 cells. *Oral Microbiol. Immunol.* 5, 241-247, 1990.
- 15) 小池恒明：マクロファージの同定；マクロファージ実験マニュアル（徳永徹編。）1版，講談社，東京，86-104, 1992.
- 16) Olsson, I., Gullberg, U., Ivhed, I. and Nilsson, K.: Induction of differentiation of the human histiocytic lymphoma cell line U-937 by 1 alpha, 25-dihydroxycholecalciferol. *Cancer Res.* 43, 5862-5867, 1983.
- 17) Leijh, P.C.J., R. van Furth, and T.L. van Zwet.: Handbook of experimental immunology; In vitro determination of phagocytosis and intracellular killing of polymorphonuclear and mononuclear phagocytes. 46. 1-46. 21, 1986.
- 18) Manzella, L., Giuffrida, M.A., Pilastrro, M.R., Girlando, G., Picardi, G., Malaguarnera, L. and Mes-sina, A.: Possible role of the transcription factor interferon regulatory factor 1 (IRF-1) in the regulation of ornithine decarboxylase (ODC) gene expression during IFN gamma macrophage activation. *Febs Letters* 348, 177-180, 1994.
- 19) 今井勝行，川口 進，原田孝之：トリパンブルー色素排除法による生細胞，死細胞の算定；細胞免疫実験操作法；1版，理工学社，東京，15-16, 1982.
- 20) 鶴田圭伊子：思春期における歯肉炎の細菌学的研究。広歯誌，23, 249-260, 1991.
- 21) Mangan, D.F. and Wahl, S.M.: Differential regulation of human monocyte programmed cell death (apoptosis) by chemotactic factors and pro-inflammatory cytokines. *J. Immunol.* 147, 3408-3412, 1991.
- 22) Ferreira, O., Jr., Valinsky, J.E., Sheridan, K., Wayner, E.A., Bianco, C. and Garcia-Pardo, A.: Phorbol ester-induced differentiation of U937 cells enhances attachment to fibronectin and distinctly modulates the alpha 5 beta 1 and alpha 4 beta 1 fibronectin receptors. *Exp. Cell Res.* 193, 20-26, 1991.
- 23) Balcewicz-Sablinska, M.K., Wollman, E.E., Gorti, R. and Silberstein, D.S.: Human eosinophil cyto-

- toxicity-enhancing factor. II. Multiple forms synthesized by U937 cells and their relationship to thioredoxin/adult T cell leukemia-derived factor. *J. Immunol.* **147**, 2170-2174, 1991.
- 24) Chung, T. and Kim, Y.B.: Two distinct cytolytic mechanisms of macrophages and monocytes activated by phorbol myristate acetate. *J. Leuko. Biol.* **44**, 329-336, 1988.
 - 25) Elsas, M.I., Dessein, A.J. and Elsas, P.X.: Selection of U937 histiocytic lymphoma cells highly responsive to phorbol ester-induced differentiation using monoclonal antibody to the eosinophil cytotoxicity-enhancing factor. *Blood* **75**, 2427-2433, 1990.
 - 26) Silberstein, D.S., Dessein, A.J., Elsas, P.P., Fontaine, B. and David, J.R.: Characterization of a factor from the U937 cell line that enhances the toxicity of human eosinophils to *Schistosoma mansoni* larvae. *J. Immunol.* **138**, 3042-3050, 1987.
 - 27) Koehler, L., Hass, R., DeWitt, D.L., Resch, K. and Goppelt-Struebe, M.: Glucocorticoid-induced reduction of prostanoid synthesis in TPA-differentiated U937 cells is mainly due to a reduced cyclooxygenase activity. *Biochem. Pharmacol.* **40**, 1307-1316, 1990.
 - 28) Caron, E., Liautard, J.P. and Kohler, S.: Differentiated U937 cells exhibit increased bactericidal activity upon LPS activation and discriminate between virulent and avirulent *Listeria* and *Brucella* species. *J. Leuko. Biol.* **56**, 174-181, 1994.
 - 29) Koehler, L., Hass, R., Goppelt-Struebe, M., Kaefer, V. and Resch, K.: Differential effect of dexamethasone on the regulation of phospholipase A2 and prostanoid synthesis in undifferentiated and phorbol ester-differentiated U937 cells. *J. Cell. Biochem.* **40**, 397-406, 1989.
 - 30) Sanduja, S.K., Mehta, K., Xu, X.M., Hsu, S.M., Sanduja, R. and Wu, K.K.: Differentiation-associated expression of prostaglandin H and thromboxane A synthases in monocytoid leukemia cell lines. *Blood* **78**, 3178-3185, 1991.
 - 31) Bolstad, A.I., Kristoffersen, T., Olsen, I., Preus, H.R., Jesen, H.B., Vassstrand, E.N. and Bakken, V.: Outer membrane proteins of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Haemophilus aphrophilus* studied by SDS-PAGE and immunoblotting. *Oral Microbiol. Immunol.* **5**, 155-161, 1990.
 - 32) Brondz, I. and Olsen, I.: Determination of bound cellular fatty acids in *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Haemophilus aphrophilus* by gas chromatography and gas chromatography-mass spectrometry. *J. Chromat.* **308**, 282-288, 1984.
 - 33) Brondz, I. and Olsen, I.: Differentiation between *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Haemophilus aphrophilus* based on carbohydrates in lipopolysaccharide. *J. Chromat.* **310**, 261-272, 1984.
 - 34) Brondz, I. and Olsen, I.: Differentiation between major species of the *Actinobacillus Haemophilus Pasteurella* group by gas chromatography of trifluoroacetic acid anhydride derivatives from whole-cell methanolsates. *J. Chromat.* **342**, 13-23, 1985.
 - 35) Holm, A., Kalfas, S. and Holm, S.E.: In vivo chemotaxis evoked by *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Haemophilus aphrophilus*. *Oral Microbiol. Immunol.* **4**, 30-34, 1989.
 - 36) Sreenivasan, P.K., Meyer, D.H. and Fives-Taylor, P.M.: Requirements for invasion of epithelial cells by *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Infect. Immun.* **61**, 1239-1245, 1993.
 - 37) Grenier, D. and Belanger, M.: Protective effect of *Porphyromonas gingivalis* outer membrane vesicles against bactericidal activity of human serum. *Infect. Immun.* **59**, 3004-3008, 1991.
 - 38) Grenier, D.: Inactivation of human serum bactericidal activity by a trypsinlike protease isolated from *Porphyromonas gingivalis*. *Infect. Immun.* **60**, 1854-1857, 1992.
 - 39) Mihara, J., Yoneda, T. and Holt, S.C.: Role of *Porphyromonas gingivalis*-derived fibroblast-activating factor in bone resorption. *Infect. Immun.* **61**, 3562-3564, 1993.
 - 40) Imamura, T., Potempa, J., Pike, R.N. and Travis, J.: Dependence of vascular permeability enhancement on cysteine proteinases in vesicles of *Porphyromonas gingivalis*. *Infect. Immun.* **63**, 1999-2003, 1995.
 - 41) Matsushita, K., Nagaoka, S., Arakaki, R., Kawabata, Y., Iki, K., Kawagoe, M. and Takada, H.: Immunobiological activities of a 55-kilodalton cell surface protein of *Prevotella intermedia* ATCC 25611. *Infect. Immun.* **62**, 2459-2469, 1994.
 - 42) Tamura, M., Tokuda, M., Nagaoka, S. and Takada, H.: Lipopolysaccharides of *Bacteroides intermedius* (*Prevotella intermedia*) and *Bacteroides* (*Porphyromonas*) *gingivalis* induce interleukin-8 gene expression in human gingival fibroblast cultures. *Infect. Immun.* **60**, 4932-4937, 1992.
 - 43) Shenker, B.J., Vitale, L. and Slots, J.: Immunosuppressive effects of *Prevotella intermedia* on in vitro human lymphocyte activation. *Infect. Immun.* **59**, 4583-4589, 1991.
 - 44) Oberg, F., Botling, J. and Nilsson, K.: Functional antagonism between vitamin D₃ and retinoic acid in theregulation of CD14 and CD23 expression during monocytic differentiation of U937 cells. *J. Immunol.* **150**, 3487-3495, 1993.
 - 45) Zhang, D.E., Hetherington, C.J., Gonzalez, D.A., Chen, H.M. and Tenen, D.G.: Regulation of CD14 expression during monocytic differentiation

- induced with 1 alpha, 25-dihydroxyvitamin D₃. *J. Immunol.* **153**, 3276-3284, 1994.
- 46) Wright, S.D., Ramos, R.A., Tobias, P.S., Ulevitch, R.J. and Mathison, J.C.: CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein. *Science* **249**, 1431-1433, 1990.
- 47) Saglie, F.R., Smith, C.T., Newman, M.G., Carranza, F., Jr., Pertuiset, J.H., Cheng, L., Auil, E. and Nisengard, R.J.: The presence of bacteria in the oral epithelium in periodontal disease. II. Immunohistochemical identification of bacteria. *J. Periodontol.* **57**, 492-500, 1986.
- 48) Saglie, F.R., Pertuiset, J.H., Smith, C.T., Nestor, M.G., Carranza, F., Jr., Newman, M.G., Rezende, M.T. and Nisengard, R.: The presence of bacteria in the oral epithelium in periodontal disease. III. Correlation with Langerhans cells. *J. Periodont.* **58**, 417-422, 1987.
- 49) Christersson, L.A., Albin, B., Zambon, J.J., Wikesjo, U.M. and Genco, R.J.: Tissue localization of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in human periodontitis. I. Light, immunofluorescence and electron microscopic studies. *J. Periodont.* **58**, 529-539, 1987.
- 50) Lindemann, R.A. and Economou, J.S.: *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Bacteroides gingivalis* activate human peripheral monocytes to produce interleukin-1 and tumor necrosis factor. *J. Periodontol.* **59**, 728-730, 1988.
- 51) Sato, N., Takahashi, K., Ohta, H., Kurihara, H., Fukui, K., Murayama, Y. and Taniguchi, S.: Effect of Ca²⁺ on the binding of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* leukotoxin and the cytotoxicity to promyelocytic leukemia HL-60 cells. *Biochem. Mol. Biol. Int.* **29**, 899-905, 1993.
- 52) Berthold, P., Forti, D., Kieba, I.R., Rosenbloom, J., Taichman, N.S. and Lally, E.T.: Electron immunocytochemical localization of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* leukotoxin. *Oral Microbiol. Immunol.* **7**, 24-27, 1992.
- 53) Spitznagel, J., Jr., Kraig, E. and Kolodrubetz, D.: Regulation of leukotoxin in leukotoxic and non-leukotoxic strains of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Infect. Immun.* **59**, 1394-1401, 1991.
- 54) Ohta, H., Hara, H., Fukui, K., Kurihara, H., Murayama, Y. and Kato, K.: Association of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* leukotoxin with nucleic acids on the bacterial cell surface. *Infect. Immun.* **61**, 4878-4884, 1993.
- 55) Tsai, C.C., Shenker, B.J., DiRienzo, J.M., Malamud, D. and Taichman, N.S.: Extraction and isolation of a leukotoxin from *Actinobacillus actinomycetemcomitans* with polymyxin B. *Infect. Immun.* **43**, 700-705, 1984.
- 56) Martin, S.J., Bradley, J.G. and Cotter, T.G.: HL-60 cells induced to differentiate towards neutrophils subsequently die via apoptosis. *Clin. Exp. Immunol.* **79**, 448-453, 1990.
- 57) Kato, S., Muro, M., Akifusa, S., Hanada, N., Semba, I., Fujii, T., Kowashi, Y. and Nisiharai, T.: Evidence for apoptosis of murine macrophages by *Actinobacillus actinomycetemcomitans* infection. *Infect. Immun.* **63**, 3914-3919, 1995.
- 58) 室三之, 加藤幸紀, 小関健由, 大井戸真理, 西原達次, 小鷲悠典: *Actinobacillus actinomycetemcomitans* 感染マクロファージにみられたアポトーシスの発現機序について. 日菌周誌, **37**, 131, 1994
- 59) de Vente, J., Kiley, S., Garris, T., Bryant, W., Hooker, J., Posekany, K., Parker, P., Cook, P., Fletcher, D. and Ways, D.K.: Phorbol ester treatment of U937 cells with altered protein kinase C content and distribution induces cell death rather than differentiation. *Cell Growth. Different.* **6**, 371-382, 1995.
- 60) Martin, S.J. and Cotter, T.G.: Ultraviolet B irradiation of human leukaemia HL-60 cells in vitro induces apoptosis. *Int. J. Radiat. Biol.* **59**, 1001-1016, 1991.
- 61) 多川知里, 松尾敬志, 中西正, 白神俊之, 清水洋利, 恵比須繁之: 歯周炎におけるapoptotic cellの検索. 日菌周誌, **36**, 188, 1994.
- 62) 網脇祥子: 活性酸素生成能, 今日の臨床免疫, **26**, 47-57, 1993.