

Porphyromonas gingivalis LPS による B細胞活性化における CD14の関与

及川 ありさ

岩手医科大学歯学部歯科保存学第二講座

(主任代理: 菅原 教修 助教授)

岩手医科大学歯学部口腔微生物学講座

(指導: 木村 重信 教授)

(受付: 2002年10月25日)

(受理: 2002年11月25日)

Abstract : The functional role of CD14 as well as Toll-like receptors (TLRs) in the *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*) LPS-induced activation of B cells was assessed, using CD14-, TLR2- and/or TLR4-overexpressed murine B cells (CH12.LX). After stimulation with *P. gingivalis* LPS, both CD14- and TLR4-transfected (but not TLR2-transfected) CH12.LX cells showed higher induction of NF- κ B activation than a parent vector-transfected cells, suggesting that *P. gingivalis* LPS could induce B cell activation in a CD14-dependent pathway through TLR4 and NF- κ B activation. Furthermore, the control CH12.LX cells proliferated under stimulation with *P. gingivalis* LPS, accompanied by up-regulations of transforming growth factor (TGF)- β and interleukin (IL)-6 mRNA. In contrast, the overexpression of CD14 resulted in enhancement of the up-regulations of TGF- β mRNA, but not IL-6 mRNA or proliferative responses to *P. gingivalis* LPS. These results suggest that *P. gingivalis* LPS could induce B cell activation both in CD14-dependent and independent pathways. In a CD14-dependent pathway, TGF- β production could be induced upon stimulation with *P. gingivalis* LPS through TLR4 and NF- κ B activation. A CD14-independent pathway could also exist in the *P. gingivalis* LPS-induced activation of B cells that leads to proliferation and IL-6 production.

Key word : CD14, B cell, *Porphyromonas gingivalis*, lipopolysaccharide

緒 言

歯周炎の直接的な原因が歯肉縁下プラーク中に存在するある特定のグラム陰性嫌気性桿菌(歯周病原性細菌)であることは、臨床的および動物実験を含む基礎的研究から明らかにされている¹⁻⁴⁾。しかし、歯周病原性細菌の歯肉溝への定着が歯周炎に罹患していない小児口腔内に認められるとの観察結果⁵⁾をはじめとする多くの研究から、ヒトの歯周炎が、歯周病原性細菌の

一方的な侵襲により発症するのではなく、宿主-寄生体(病原体)相互作用の結果として成立することが明らかとなっている⁶⁾。それ故、*Porphyromonas gingivalis*をはじめとする歯周病原性細菌の歯肉溝への定着が必ずしも歯周炎の発症に結びつくものでないが、逆に、歯周炎患者の病巣歯肉縁下ポケットの細菌叢をみれば、その病型に対応する歯周病原性細菌数が増加することが報告されている⁷⁻¹¹⁾。歯肉溝/歯周ポケットへの定着後、歯周病原性細菌が歯肉

CD14-Dependent and Independent B-Cell Activations by Stimulation with Lipopolysaccharide from *Porphyromonas gingivalis*

Arisa OIKAWA

Department of Periodontology, School of Dentistry, Iwate Medical University
1-3-27 Chuo-dori, Morioka, Iwate 020-8505, Japan

岩手県盛岡市中央通1丁目3-27 (〒020-8505)

Dent. J. Iwate Med. Univ. 27 : 261-269, 2002

組織内に侵入するか否かについては長らく異論があったが, polymerase chain reaction (PCR) 法を用いた最近の研究^{12,13)}から, ヒトの歯周炎病巣歯肉組織内への歯周病原性細菌の侵入が認められるに至っている。しかし, 病巣歯肉組織内に確認される歯周病原性細菌数および抗原抗体複合体は極めて少なく^{14,15)}, 持続的な B 細胞優勢の炎症性細胞浸潤像を呈することが明らかにされている^{16,17)}。これらのことからすると, 侵入した歯周病原性細菌そのものの作用というよりは, その菌体成分あるいは菌体外産物による宿主免疫担当細胞への作用, 特に B 細胞の活性化が, 歯周炎の発症あるいは病状の進行に深く関与することが強く示唆される。

種々の細菌性物質のうち, lipopolysaccharide (LPS) は *in vitro* で B 細胞やマクロファージに対して強い免疫生物学的作用を発揮する^{18,19)}。LPS の単球/マクロファージ系細胞に対する作用機序については研究が進んでおり, 血清中の LPS 結合タンパク質 (LBP) と複合体を形成した LPS の刺激が, 細胞膜上の CD 14 および Toll-like receptor (TLR) を介してシグナル伝達されることが明らかにされている^{20,21)}。一方, B 細胞を含むリンパ系細胞に対する LPS の活性化機序については必ずしも明らかではない。Kimura らは, *Eshcherichia coli* 由来の LPS を用いて, LPS 刺激後の B 細胞活性化には, CD14 依存性および非依存性の両活性化経路が存在すること²²⁾, B 細胞内シグナル伝達系ではチロシンリン酸化反応系を介すること²³⁾を報告している。しかし, 歯周病原性細菌, 特に成人性歯周炎の原因菌である *P. gingivalis* の LPS は構造的に腸内細菌のそれと異なり, また生物活性の面でも, 腸内細菌の LPS に低 (非) 応答性の C 3 H/HeJ マウスの B 細胞やマクロファージを活性化することなど特異性のあることが示されている^{19,24)}。

そこで本研究では, 歯周病原性細菌の LPS による B 細胞活性化機構の解明を目的として, LPS 応答性マウス B 細胞株 (CH12.LX 細胞) に CD 14 あるいは TLR を強発現させ, *P.*

gingivalis の LPS 刺激後の B 細胞活性化反応を, NF- κ B 活性化を指標に検討を行った。さらに, CD14 強発現 CH12.LX 細胞および親ベクターのみを導入した対照細胞を用いて, *P. gingivalis* の LPS 刺激後の細胞増殖活性, IL-6, TGF- β および CD14 mRNA の発現量の変動について, CD14 を中心とする B 細胞膜上の機能的受容体の関与という面から検討した。

材料および方法

1. B 細胞株

B 細胞としてマウス B 細胞株 CH12.LX を用いた。培養は Kimura ら²²⁾の方法に準じて, RPMI-1640 培地 (日研生物医学研究所, 京都) にペニシリン-ストレプトマイシン溶液 (ペニシリン最終濃度, 100 U/ml; ストレプトマイシン最終濃度, 100 μ g/ml) および非働化したウシ胎児血清 (FCS; ICN Biomedicals, Inc., 大阪) (最終濃度 10%) を添加した培地 (C-RPMI) を用いて, 37°C, 5%CO₂-95%大気, 湿度 95% の条件下で行った。

2. LPS

P. gingivalis の LPS は *P. gingivalis* ATCC 33277 株の凍結乾燥全菌体より Hot phenol-water 抽出法を用いて分離, 精製したものをを用いた。*E. coli* 由来の LPS は, 市販の *E. coli* 0128 : B12 株由来の LPS (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) を再度精製したものをを用いた。LPS 標品は, いずれも木村重信博士 (岩手医科大学口腔微生物学講座) より恵与を受けた。

3. 発現プラスミドおよびルシフェラーゼレポータープラスミドの構築

CH12.LX 細胞由来 cDNA をテンプレートとし, プライマー TLR2, 5'-CGCTGTTCTGCT-CAGGAGTC-3', 5'-CTAGGACTTTATTGC-AGTTCTCA-3'; TLR4, 5'-ATGATGCCT-CCCTGGCTCCT-3', 5'-CCGCGGgtcgcac-TCAGGTCCAA-3' (小文字は *Sall* サイト) お

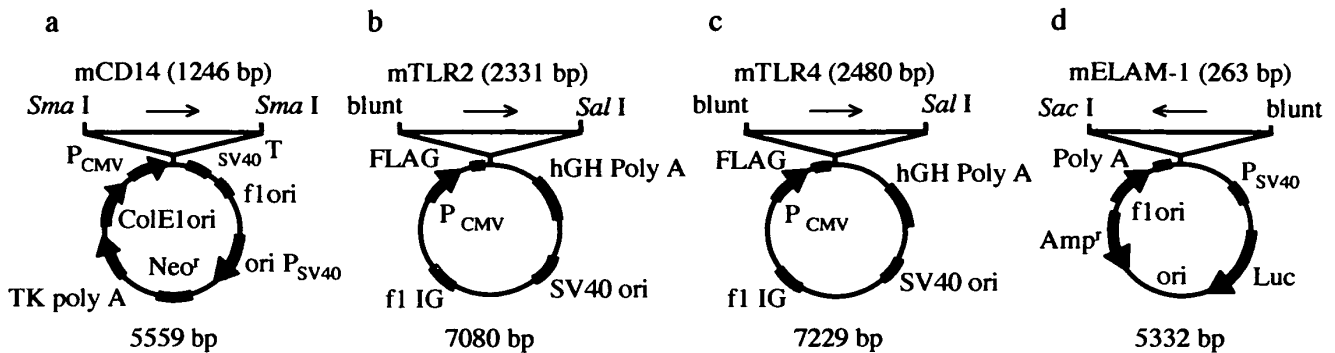


Fig. 1. Expression plasmids and a luciferase reporter plasmid. a, pCMV-mCD14 ; b, pFLAG-mTLR2 ; c, pFLAG-mTLR4 ; d, pGL3-mELAM-1.

よび AmpliTaq Gold DNA Polymerase (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) を用いて PCR 反応を行い、それぞれ TLR 2, TLR 4 をコードする領域を増幅した。精製後、TLR 2-DNA 断片は pGEM-Teasy (Promega Co., Madison, WI, USA) にクローニング後、*NotI* 切断断片を再び向きを変えて pGEM-Teasy の *NotI* サイトに挿入した。このプラスミドを *SpeI* 処理し、さらに Klenow フラグメントと T4 DNA ポリメラーゼで平滑末端化した後、*SalI* 処理して得られた断片を、pFLAG-CMV-1 (Sigma Chemical Co.) の平滑末端化した *NotI* サイト、*SalI* サイトに挿入し、pFLAG-TLR 2 を得た (Fig. 1-b)。PCR 増幅 DNA 断片を *SalI* 処理した TLR 4-DNA 断片は、pFLAG-CMV-1 の平滑末端化した *NotI* サイト、*SalI* サイトに挿入し、pFLAG-TLR 4 を得た (Fig. 1-c)。CD14 発現プラスミドである pCMV-CD14 (Fig. 1-a) および NF- κ B 結合部位を含むマウス ELAM-1 エンハンサーを組み込んだルシフェラーゼレポータープラスミドである pGL3-mELAM-1 (Fig. 1-d) は、いずれも根本優子博士 (岩手医科大学口腔微生物学講座) より恵与を受けた。制限酵素および修飾酵素は NEB (New England Biolabs Inc., Frankfurt, Main, Germany) 製を使用した。

4. CH12.LX 細胞でのレセプターの強発現とルシフェラーゼアッセイ

CH12.LX 細胞 (1×10^6 個) を 24 穴プレートに加え、レポータープラスミドである pRL-TK

($0.1 \mu\text{g}$) (Promega Co.) および、pGL3-mELAM-1 ($0.2 \mu\text{g}$)、レセプター発現プラスミド pCMV-CD14 あるいはその親ベクターである pCMV、または pFLAG-TLR 2, pFLAG-TLR 4 あるいはその親ベクターである pFLAG のいずれか ($0.4 \mu\text{g}$) を Lipofectamine Plus (Invitrogen, San Diego, CA, USA) と OPTI-MEM 1 (GIBCO-BRL, Grand Island, NY, USA) を用いたリポフェクション法により、Invitrogen のプロトコールに従って、遺伝子導入の最適化を行い、CH12.LX 細胞に共形質導入した。42 時間培養後、LPS ($1 \mu\text{g}/\text{ml}$) を添加し、さらに 6 時間培養を行った。培養終了後、細胞を $200 \mu\text{l}$ の細胞溶解緩衝液 (Promega Co.) で溶解し、ルシフェラーゼ活性を Dual-luciferase reporter assay system (Promega Co.) と ルミノメーター (Perkin-Elmer Co., Foster, CA, USA) を用いて測定した。

上記の CD14 あるいは TLR 強発現 CH12.LX 細胞では当該遺伝子はプラスミド上にあり、分裂増殖後の細胞に完全には保持されない。そのため実験ごとに細胞を調製し、くり返し実験を行った。結果には代表的な一例の成績を示した。

5. 細胞増殖活性の測定

CH12.LX 細胞 (1×10^4 個/穴) を C-RPMI あるいは FCS を含まない C-RPMI に懸濁し、LPS ($1 \mu\text{g}/\text{ml}$) で刺激、培養した。培養は 96 穴平底マイクロプレート (Nalge Nunc

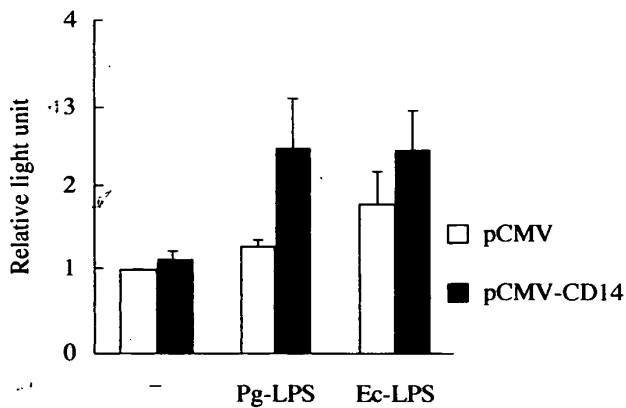


Fig. 2. *P. gingivalis* LPS-induced NF- κ B activation in CD14-overexpressed CH12.LX cells (pCMV-CD14). The results are expressed as the mean relative light unit \pm SEM.

International Co., Rochester, NY, USA) を用いて, 5%CO₂-95%大気, 湿度95%の条件下で, 37°C, 48時間行った。増殖活性は, 培養終了6時間前に添加した [6-³H] チミジン (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, USA) (37 kBq/穴) の取り込み量から測定した。

6. RT-PCR

CH12.LX細胞 (1 x 10⁶個) に0.4 μ gの発現プラスミドを導入し, 37°C, 5%CO₂-95%大気, 湿度95%の条件下で, 36時間培養した。LPS (1 μ g/ml) 添加後さらに12時間培養を行い, RNeasy (Qiagen, Chatsworth, CA, USA) を用いてRNAを精製した。精製RNA (1 μ g) より既報²⁵⁾に従いcDNAを調製した。RT産物0.25 μ l, 特異的プライマー0.5 μ MおよびLightCycler FastStart DNA Master SYBR Green (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) 反応系により, リアルタイムPCR装置 (LightCycler クイック システム 330; Roche Diagnostics) を用いてmRNA量を定量測定した。特異的プライマーは, Primer Express ソフトウェア (Applied Biosystems) で設計したものをを用いた: IL-6, 5'-AGTTGCCTTCTTGGGACTGATG-3', 5'-TTGGGAGTGGTATCCTCTGTGA-3'; TGF- β , 5'-GCTGAACCAAGGAGACGGAAT-3', 5'-

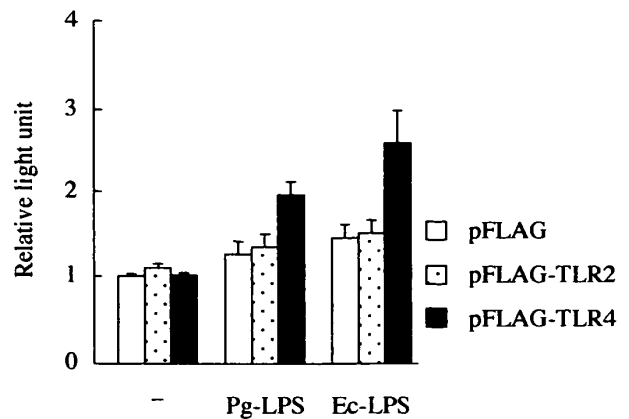


Fig. 3. *P. gingivalis* LPS-induced NF- κ B activations in TLR2-overexpressed (pFLAG-TLR2) and TLR4-overexpressed CH12.LX cells (pFLAG-TLR4). The results are expressed as the mean relative light unit \pm SEM.

GCTGATCCCGTTGATTTCCA-3' ; CD14, 5'-CGAGGAAAGTTGTTCTCTGCAA-3', 5'-CCGCCGTACAATTCCACATC-3' ; G3PDH, 5'-TGCACCACCAACTCTTAGC-3', 5'-CC-TGCTTCACCACCTTCTTGA-3'。

結 果

1. CD14強発現 CH12.LX 細胞における *P. gingivalis* LPS 刺激後の NF- κ B の活性化

B細胞として用いたCH12.LX細胞は, pre-B細胞様の表現型 (B220陽性, CD24陽性, CD43陰性) を示すLPS反応性マウスB細胞株で, マクロファージと比較してその発現量は少ないものの細胞膜上にCD14分子を発現していることが明らかにされている²²⁾。本研究では, CD14発現プラスミドを形質導入してCH12.LX細胞にさらにCD14を強発現させるとともに, NF- κ B結合部位を含むマウスELAM-1エンハンサーを組み込んだルシフェラーゼレポータープラスミドを共形質導入し, *P. gingivalis* LPS刺激後のNF- κ B活性化をルシフェラーゼの産生量を指標に測定した。

その結果, *E. coli* LPS同様, *P. gingivalis* LPS刺激により, 親ベクター (pCMV) のみを導入した対照細胞でNF- κ Bの活性化が認められた。さらにCD14強発現細胞では, 対照細胞

Table 1. Proliferative responses of CH12.LX cells to Pg-LPS

FCS	LPS	CH12.LX		CH12.LX [pCMV]		CH12.LX [pCMV- CD14]		
		Mean ± SEM (dpm)	E/C	Mean ± SEM (dpm)	E/C	Mean ± SEM (dpm)	E/C	
-	-	15531 ± 1970	1.00	16987 ± 2619	1.00	18982 ± 447	1.00	
	Pg - LPS	22899 ± 1631	1.47	22013 ± 854	1.30	23955 ± 178	1.26	
	Ec - LPS	20230 ± 1051	1.30	20014 ± 1906	1.18	22703 ± 1746	1.20	

+	-	215000 ± 8131	1.00	198905 ± 2532	1.00	175718 ± 3860	1.00	
	Pg - LPS	253365 ± 15365	1.18	223122 ± 6067	1.12	201331 ± 6562	1.15	
	Ec - LPS	306281 ± 9899	1.42	277999 ± 8189	1.40	232215 ± 16965	1.32	

Proliferative response to *P. gingivalis* LPS (Pg-LPS) and *E. coli* LPS (Ec-LPS) were determined by measuring the incorporation of [³H]TdR. The results are expressed as the mean ± SEM (dpm) and stimulation indices.

と比較して、LPS 刺激後の NF-κB の活性化が強く増強されることが明らかとなった (Fig. 2)。

2. TLR 2 および TLR 4 強発現 CH12.LX 細胞における、*P. gingivalis* LPS 刺激後の NF-κB 活性化

P. gingivalis LPS 刺激によっても CD14 依存性に B 細胞が活性化されることが明らかとなったことから、次に TLR 2 および TLR 4 強発現 CH12.LX 細胞を用いて、CD14 への結合後の *P. gingivalis* LPS 刺激後のシグナル伝達経路について検討を行った。その結果、*P. gingivalis* LPS、*E. coli* LPS のいずれの LPS 刺激によっても、親ベクターである pFLAG のみを導入した対照細胞と比較して、TLR 4 強発現 CH12.LX 細胞では NF-κB 活性化の強い増強が認められた (Fig. 3)。一方、TLR 2 強発現 CH12.LX 細胞ではいずれの LPS 刺激によっても、対照細胞と比較して NF-κB 活性化の増強は観察されなかった。

3. *P. gingivalis* LPS 刺激による CD14 強発現 CH12.LX 細胞の増殖活性

Kimura らの報告²²⁾で CD14 非依存反応とさ

れる LPS 刺激後の増殖活性について、CD14 強発現 CH12.LX 細胞を用いて検討した。*P. gingivalis* LPS 刺激によって、CH12.LX 細胞、親ベクター (pCMV) のみを導入した対照細胞および CD14 強発現細胞のいずれにおいても増殖活性が認められ、その活性化の程度に著明な差は認められなかった。さらに、血清 (FCS) 非存在下すなわち LBP の非存在下においても、*P. gingivalis* LPS 刺激によっていずれの細胞においても同程度の増殖活性が認められた (Table 1)。

4. *P. gingivalis* LPS 刺激による IL-6、TGF-β および CD14 mRNA 発現量の変動

P. gingivalis LPS 刺激による IL-6、TGF-β および CD14 の mRNA 発現系への CD14 の関与について、リアルタイム PCR 法を用いて検討した。その結果、IL-6 mRNA 発現量は、*P. gingivalis* LPS、*E. coli* LPS のいずれの LPS 刺激によっても増強されたが、親ベクター (pCMV) のみを導入した対照細胞と CD14 強発現細胞間で明らかな差は観察されなかった (Fig. 4)。

一方、TGF-β mRNA 発現量も *E. coli* LPS 刺激よりはやや弱いながらも無刺激時の細胞と

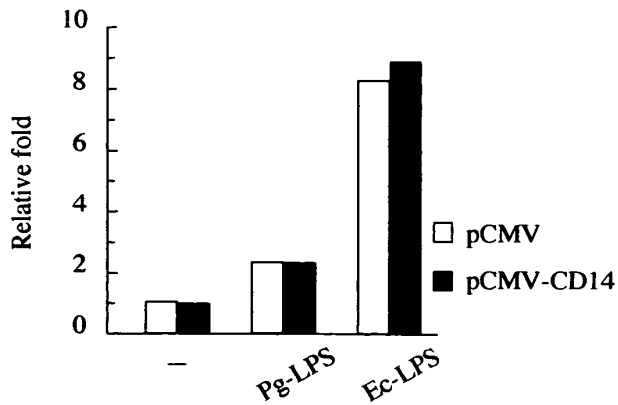


Fig. 4. *P. gingivalis* LPS-induced up-regulation of IL-6 mRNA in both control (pCMV) and CD14-overexpressed CH12.LX cells (pCMV-CD14). RT-PCR analysis was performed using a real-time PCR system. The results are expressed as the mean relative fold determined by the relative quantification of the level of cDNA products.

比較して *P. gingivalis* LPS 刺激により増強されたが、対照細胞と比較して CD14 強発現細胞でより強い TGF- β mRNA 発現量の増強が観察された (Fig. 5)。

CD14 mRNA 発現量は、対照細胞で、*P. gingivalis* LPS, *E. coli* LPS のいずれの LPS 刺激によっても増強された (Fig. 6)。しかし、CD14 強発現細胞では、無刺激で CD14 mRNA 発現量がすでに上昇しており、LPS 刺激の影響は観察されなかった。

考 察

CH12.LX 細胞は LPS 応答性マウス B 細胞株で、抗 CD14 抗体 (rmC5-3) を添加した系および無血清系での成績²³⁾から、*E. coli* LPS 刺激後の活性化機序に、CD14 依存性の経路と CD14 非依存性の経路の両者が存在することが示されている。しかし、用いる抗 CD14 抗体により、CD14 分子との親和性や CD14 を介する LPS 刺激に対する抑制効果が異なることが示唆されている^{26,27)}。さらに、*P. gingivalis* の LPS は構造的ならびに生物活性の面で腸内細菌のそれとは異なる特異性があることが示されている^{19,24)}。それ故、*P. gingivalis* の LPS による B 細胞活性化機構については依然不明な点が数多く残さ

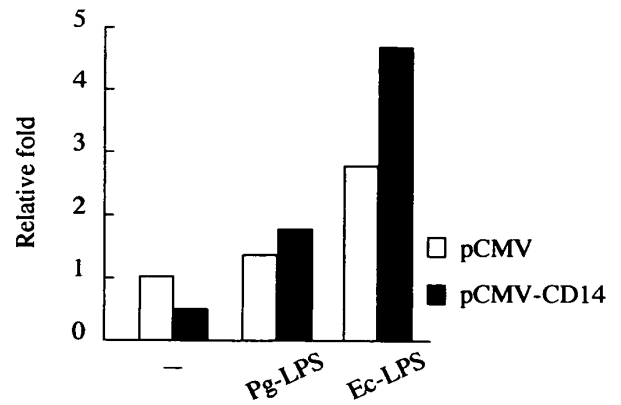


Fig. 5. *P. gingivalis* LPS-induced up-regulation of TGF- β mRNA in CD14-overexpressed CH12.LX cells (pCMV-CD14). RT-PCR analysis was performed using a real-time PCR system. The results are expressed as the mean relative fold determined by the relative quantification of the level of cDNA products.

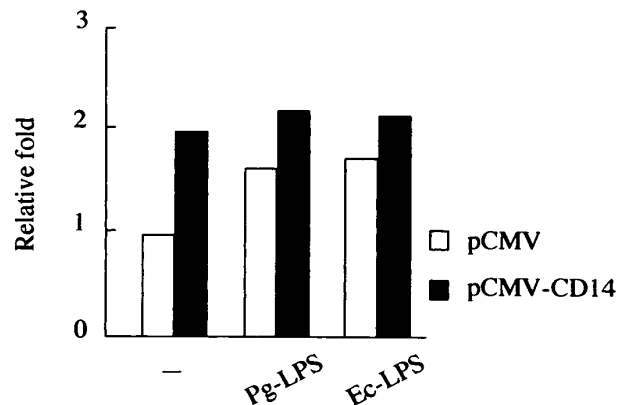


Fig. 6. *P. gingivalis* LPS-induced up-regulation of CD14 mRNA in CD14-overexpressed CH12.LX cells (pCMV-CD14). RT-PCR analysis was performed using a real-time PCR system. The results are expressed as the mean relative fold determined by the relative quantification of the level of cDNA products.

れている。

本研究では、CH12.LX 細胞に CD14 を強発現させ、*P. gingivalis* の LPS に対する反応性を親ベクター (pCMV) のみを導入した対照細胞と比較検討した。単球/マクロファージ系細胞では、血清中の LBP と複合体を形成した LPS の刺激が、細胞膜上の CD14 \rightarrow TLR 4 を介して細胞内にシグナル伝達され、NF- κ B の活性化が誘導されることが明らかにされている^{28,29)}。そのため、本研究では、CD14 発現プラスミドを

導入して CH12.LX 細胞に CD14 を強発現させるとともに、マウス ELAM-1 エンハンサーを組み込んだルシフェラーゼレポータープラスミドを共形質導入し、*P. gingivalis* LPS 刺激後の NF- κ B 活性化をルシフェラーゼ活性を指標に測定した。その結果、いずれの LPS 刺激によっても親ベクターのみを導入した対照細胞で NF- κ B の活性化が認められ、さらに CD14 強発現細胞では、対照細胞と比較して、LPS 刺激後の NF- κ B の活性化が増強されたことから、*P. gingivalis* LPS 刺激が、*E. coli* LPS 同様、CD14 依存性に B 細胞を活性化することが明らかとなった (Fig. 2)。B 細胞においても LPS 刺激が NF- κ B の活性化を誘導するとの本研究結果は、CD14 発現の見られない B 細胞株 (70Z/3) を用いた Lee ら³⁰⁾ の成績を支持する。

P. gingivalis LPS に対する機能的受容体としての TLR には異論があり、単球/マクロファージ系細胞あるいは線維芽細胞を用いた研究から、*E. coli* LPS とは異なり TLR 2 を介するとする報告³¹⁻³³⁾と、TLR 4 を介するとするもの³⁴⁻³⁶⁾がある。そこで本研究では、TLR 2 および TLR 4 を強発現させた CH12.LX 細胞を作製し、検討を行った。その結果、*P. gingivalis* LPS 刺激により、TLR 4 強発現 CH12.LX 細胞では NF- κ B 活性化の増強が強く認められたが、TLR 2 強発現 CH12.LX 細胞では NF- κ B 活性化は観察されず (Fig. 3)、*P. gingivalis* LPS 刺激が *E. coli* LPS 同様 TLR 4 を介して B 細胞内にシグナル伝達され、NF- κ B の活性化が誘導されることが強く示唆された。

Kimura ら²²⁾は *E. coli* LPS 刺激後の増殖活性が CD14 非依存性の B 細胞活性化反応であることを報告している。このことは本研究結果からも支持された。さらに、CD14 強発現 CH12.LX 細胞を用いて、*P. gingivalis* LPS 刺激による増殖活性について検討した結果、CD14 強発現細胞と対照細胞間で活性化の程度に差は認められず、また、無血清系でも同程度の増殖活性が認められた (Table 1)。この成績から、*P. gingivalis* LPS 刺激が、*E. coli* LPS 同様、CD

14 非依存性にも B 細胞を活性化することが強く示唆された。さらに、CD14 強発現細胞と対照細胞間で増殖活性の程度に差がないという本研究結果は、*P. gingivalis* LPS による CD14 非依存性 B 細胞活性化反応系に NF- κ B の活性化が関与しないことを示唆するもので、*P. gingivalis* LPS 刺激後の B 細胞の増殖活性は細胞内チロシンリン酸化反応を介するとの報告²³⁾を勘案すれば、*P. gingivalis* LPS 刺激は MAP キナーゼを介して核内にシグナル伝達される可能性が高いと考えられる。

本研究では、CD14 強発現 CH12.LX 細胞を用いて、IL-6、TGF- β および CD14 mRNA 発現系への CD14 の関与についてもリアルタイム PCR 法を用いて検討した (Figs. 4-6)。その結果、*P. gingivalis* LPS による B 細胞活性化反応では、*E. coli* LPS 刺激の場合と同様、CD14 非依存性に IL-6 産生が、CD14 依存性に TGF- β 産生が誘導されることが強く示唆された。

以上の成績より、*P. gingivalis* は、歯肉溝/歯周ポケットから歯周組織内に侵入後、その菌構築成分である LPS によって、宿主免疫系、特に B 細胞を活性化すること、また、*P. gingivalis* LPS による B 細胞活性化には、CD14 \rightarrow TLR 4 \rightarrow NF- κ B を介する TGF- β 産生誘導などの反応と、CD14 および NF- κ B に非依存性の増殖活性や IL-6 産生誘導などの反応が共存し、この両 B 細胞活性化反応の結果として、歯周炎病巣歯肉組織での特徴的な B 細胞優勢の炎症性細胞浸潤が誘導され、歯周炎の発症、病状の進展に関与することが強く示唆された。

謝辞：稿を終えるにあたり、本研究を行う機会を与えて頂いた上野和之名誉教授ならびに終始熱心なご指導とご校閲を賜った口腔微生物学講座 木村重信教授に深く感謝致します。

本研究に際し、終始ひとかたならぬご指導ならびにご助言をいただき、ご懇篤なる校閲を賜った口腔微生物学講座 根本優子講師に心か

ら感謝の意を表します。また、様々なご援助、ご協力をいただいた口腔微生物学講座および歯科保存学第二講座の皆様方に深謝致します。

文 献

- 1) Slots, J. : Subgingival microflora and periodontal disease. *J. Clin. Periodontol.* 6 : 351-382, 1979.
- 2) Tanner, A. C., Haffer, C., Bratthall, G. T., Visconti, R. A., and Socransky, S. S. : A study of the bacteria associated with advancing periodontitis in man. *J. Clin. Periodontol.* 6 : 278-307, 1979.
- 3) Slots, J., and Genco, R. J. : Black-pigmented *Bacteroides* species, *Capnocytophaga* species, and *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in human periodontal disease : virulence factors in colonization, survival, and tissue destruction. *J. Dent. Res.* 3 : 412-421, 1984.
- 4) Kimura, S., Nagai, A., Onitsuka, T., Koga, T., Fujiwara, T., Kaya, H., and Hamada, S. : Induction of experimental periodontitis in mice with *Porphyromonas gingivalis*-adhered ligatures. *J. Periodontol.* 71 : 1167-1173, 2000.
- 5) Kimura, S., Ooshima, T., Takiguchi, M., Sasaki, Y., Amano, A., Morisaki, I., and Hamada, S. : Periodontopathic bacterial infection in childhood. *J. Periodontol.* 73 : 20-26, 2002.
- 6) Genco, R. J., and Mergenhagen, S. E. (eds) : Host-parasite interactions in Periodontal disease. American Society for Microbiology, Washington, D. C., 1982.
- 7) Van Winkelhoff, A. J., Van Steenberghe, T. J., and De Graaff, J. : The role of black-pigmented *Bacteroides* in human oral infections. *J. Clin. Periodontol.* 3 : 145-155, 1988.
- 8) Zambon, J. J. : *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in human periodontal disease. *J. Clin. Periodontol.* 12 : 1-20, 1985.
- 9) Johnson, B. D., and Engel, D. : Acute necrotizing ulcerative gingivitis. *J. Periodontol.* 57 : 141-150, 1986.
- 10) Moore, W. E. : Microbiology of periodontal disease. *J. Periodontol. Res.* 22 : 335-341, 1987.
- 11) Slots, J., and Listgarten, M. A. : *Bacteroides gingivalis*, *Bacteroides intermedius* and *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in human periodontal diseases. *J. Clin. Periodontol.* 15 : 85-93, 1988.
- 12) 藤本 淳 : 成人型歯周炎における歯周病関連細菌と臨床的パラメーターとの関連 PCR法による病変部歯肉及び歯肉縁下プラークからの検出, 日本歯周病学会誌, 40 : 389-399, 1998.
- 13) 遠藤憲行 : 成人性歯周炎患者の病変部歯肉組織からの歯周病原性細菌の検出, 日本歯周病学会誌, 43 : 33-42, 2001.
- 14) Frank, R. M. : Bacterial penetration in the apical pocket wall of advanced human periodontitis. *J. Periodontol. Res.* 15 : 563-573, 1980.
- 15) 木村重信 : 歯周炎の病因 (Pathogenesis of human periodontitis), 東北のコロニー, 31 : 35-41, 2000.
- 16) Mackler, B. F., Frostad, K. B., Robertson, P. B., and Levy, B. M. : Immunoglobulin bearing lymphocytes and plasma cells in human periodontal disease. *J. Periodontol. Res.* 12 : 37-45, 1977.
- 17) Okada, H., Kida, T., and Yamagami, H. : Identification and distribution of immunocompetent cells in inflamed gingiva of human chronic periodontitis. *Infect. Immun.* 41 : 365-374, 1983.
- 18) Kimura, S., Kiyono, H., Michalek, S. M., Hamada, S., and McGhee, J. R. : Haptenated streptococcal antigens elicit either T cell-dependent type 1 or T cell-independent type 2 immune responses. *Immunobiology* 174 : 146-161, 1987.
- 19) Fujiwara, T., Ogawa, T., Sobue, S., and Hamada, S. : Chemical, immunobiological and antigenic characterizations of lipopolysaccharides from *Bacteroides gingivalis* strains. *J. Gen. Microbiol.* 136 : 319-326, 1990.
- 20) 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.
- 21) Hoshino, K., Takeuchi, O., Kawai, T., Sanjo, H., Ogawa, T., Takeda, Y., Takeda, K., and Akira, S. : Toll-like receptor 4 (TLR 4)-deficient mice are hyporesponsive to lipopolysaccharide : evidence for TLR 4 as the Lps gene product. *J. Immunol.* 162 : 3749-3752, 1999.
- 22) Kimura, S., Tamamura, T., Nakagawa, I., Koga, T., Fujiwara, T., and Hamada, S. : CD14-dependent and independent pathways in lipopolysaccharide-induced activation of a murine B-cell line, CH12.LX. *Scand. J. Immunol.* 51 : 392-399, 2000.
- 23) Kimura, S., Koga, T., Fujiwara, T., Kontani, M., Shintoku, K., Kaya, H., and Hamada, S. : Tyrosine protein phosphorylation in murine B lymphocytes by stimulation with lipopolysaccharide from *Porphyromonas gingivalis*. *FEMS Microbiol. Lett.* 130 : 1-6, 1995.
- 24) Takemura, A., Matsuda, N., Kimura, S., Fujiwara, T., Nakagawa, I., and Hamada, S. : *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide modulates the responsiveness of human periodontal ligament fibroblasts to platelet-derived

- growth factor. *J. Periodontal. Res.* 33 : 400-407, 1998.
- 25) Ohara-Nemoto, Y., Ikeda, Y., Kobayashi, M., Sasaki, M., Tajika, S., Kimura, S. : Characterization and molecular cloning of a glutamyl endopeptidase from *Staphylococcus epidermidis*. *Microb. Pathogenesis* 33 : 33-41, 2002.
- 26) Medeiros, L. J., Herrington, R. D., Gonzalez, C. L., Jaffe, E. S., and Cossman, J. : My 4 antibody staining of non-Hodgkin's lymphomas. *Am. J. Clin. Pathol.* 95 : 363-368, 1991.
- 27) Chaby, R., and Girard, R. : Interaction of lipopolysaccharides with cells of immunological interest. *Eur. Cytokine. Netw.* 4 : 399-414, 1993.
- 28) Takeuchi, O., Hoshino, K., Kawai, T., Sanjo, H., Takada, H., Ogawa, T., Takeda, K., and Akira, S. : Differential roles of TLR 2 and TLR 4 in recognition of gram-negative and gram-positive bacterial cell wall components. *Immunity* 11 : 443-451, 1999.
- 29) Kawai, T., Adachi, O., Ogawa, T., Takeda, K., and Akira, S. : Unresponsiveness of MyD88-deficient mice to endotoxin. *Immunity* 11 : 115-122, 1999.
- 30) Lee, J. D., Kato, K., Tobias, P. S., Kirkland, T. N., and Ulevitch, R. J. : Transfection of CD14 into 70Z/3 cells dramatically enhances the sensitivity to complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein. *J. Exp. Med.* 175 : 1697-1705, 1992.
- 31) Martin, M., Katz, J., Vogel, S. N., and Michalek, S. M. : Differential induction of endotoxin tolerance by lipopolysaccharides derived from *Porphyromonas gingivalis* and *Escherichia coli*. *J. Immunol.* 167 : 5278-5285, 2001.
- 32) Sugawara, S., Yang, S., Iki, K., Hatakeyama, J., Tamai, R., Takeuchi, O., Akashi, S., Espevik, T., Akira, S., and Takada, H. : Monocytic cell activation by Nonendotoxic glycoprotein from *Prevotella intermedia* ATCC 25611 is mediated by toll-like receptor 2. *Infect. Immun.* 69 : 4951-4557, 2001.
- 33) Hirschfeld, M., Weis, J. J., Toshchakov, V., Salkowski, C. A., Cody, M. J., Ward, D. C., Qureshi, N., Michalek, S. M., and Vogel, S. N. : Signaling by toll-like receptor 2 and 4 agonists results in differential gene expression in murine macrophages. *Infect. Immun.* 69 : 1477-1482, 2001.
- 34) Darveau, R. P., Arbabi, S., Garcia, I., Bainbridge, B., and Maier, R. V. : *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide is both agonist and antagonist for p38 mitogen-activated protein kinase activation. *Infect. Immun.* 70 : 1867-1873, 2002.
- 35) Tabeta, K., Yamazaki, K., Akashi, S., Miyake, K., Kumada, H., Umemoto, T., and Yoshie, H. : Toll-like receptors confer responsiveness to lipopolysaccharide from *Porphyromonas gingivalis* in human gingival fibroblasts. *Infect. Immun.* 68 : 3731-3735, 2000.
- 36) Wang, P. L., Azuma, Y., Shinohara, M., and Ohura, K. : Toll-like receptor 4-mediated signal pathway induced by *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide in human gingival fibroblasts. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 273 : 1161-1167, 2000.