

## 歯周病関連細菌表層の免疫調節物質

—— ビルレンス因子としての可能性 ——

高田 春比古

東北大学歯学部口腔細菌学講座

### Immunomodulators on cell surfaces of periodontal disease-associated bacteria

—— Possible virulence factors ——

Haruhiko Takada

*Department of Microbiology and Immunology, Tohoku University School of Dentistry*

**Abstract:** Various components on bacterial cell surfaces have numerous immunobiological activities. For example, peptidoglycans (PGN) are present on the cell surfaces of almost all bacterial species, lipoteichoic acids (LTA) on the cell surfaces of various gram-positive bacteria, and endotoxic lipopolysaccharides (LPS) on the outer membranes of gram-negative bacteria. Although the chemical structures of these components differ remarkably, their bioactive repertoire is similar. Cells comprising periodontal tissues are continuously subjected to stimuli from bacterial components. These stimuli disturb the defense mechanisms of periodontal tissues, which may result in periodontal destruction via excessive production of cytokines. We examined exhaustively the effects of LPS from black-pigmented bacteria (BPB) such as *Porphyromonas gingivalis* and *Prevotella intermedia* on cultured human gingival fibroblasts. During these studies, we found that BPB LPS showed a unique spectrum of bioactivity, unlike LPS from other bacteria, such as *Enterobacteriaceae*. Furthermore, the unique bioactivities of BPB LPS were apparently attributable to peculiar cell surface components of BPB. Further studies of unique and common bioactive components of bacteria associated with periodontal diseases may improve our understanding of the pathogenesis of such diseases.

**Key words:** immunomodulator, bacterial cell surface, periodontal disease, lipopolysaccharide, black-pigmented bacteria

### 1. はじめに

口腔には極めて多様な細菌が多数生息し、いわゆる常在細菌叢を形成している。歯周病の進行と細菌叢の消長とを詳細に調べた疫学的研究に基づいて、歯周病に係わりが深いとされた菌を“歯周病関連細菌”と呼んでいる。遺伝子分類法が一般化して、口腔細菌の分類体系も急速に整備された。その結果、細菌名が目まぐるしく変更され、新種の記載より以上に“新しい”歯

周病関連細菌が登場することとなった。しかし、歯周病関連細菌の語に象徴されているように、いずれの病型にしる歯周病の原因菌は未だ確定していない。さらに、口腔には未だに培養不可能な細菌が多数残されている。例えば、病的歯周ポケットに多数生息し、歯周病関連菌として根強く注目されてきた口腔スピロヘータ (*Treponema*) の多くの菌種の培養法は未だに確立されていない。したがって、今後新たな歯周病関連菌が登場する余地は充分に残されている。

歯周病の病因論を取り巻くこのような状況は、筆者が研究に着手した10年前と本質的に変わっていない。それまで筆者は一貫して細菌細胞表層成分と免疫担当細胞との相互作用、換言すれば細菌表層の免疫調節物質について研究してきた。その経験を生かして、筆者は次のような視点から歯周病研究に着手することにした。歯周組織に分布する免疫担当細胞ならびに歯周組織を構成する種々の細胞は相互に協調して生体防御に当たっている。そのような相互作用には様々なサイトカインが重要な役割を担い、いわゆるサイトカインネットワークを構成している。常時、侵襲細菌の刺激に晒される歯周組織では、本来生体防御を担うべきサイトカインが過剰に産生される為、慢性的炎症を招来して、組織破壊に至るのではないだろうか？ 以上の作業仮説を検証するために、さし当たり歯周病関連菌の菌体成分としてLPSを、標的細胞としてヒト歯肉線維芽細胞を供試して、研究を開始することにした。その記載に移る前に、さらに研究の背景について概観したい。

## 2. 菌体表層には免疫調節物質が局在している

細菌表層には免疫生物学的に活性な成分が局在している(表1)。すなわち、マイコプラズマを除く細菌に遍く分布するペプチドグリカン(PGN)<sup>1)</sup>、グラム陰性菌外膜を構成する内毒素性リポ多糖(LPS)<sup>2)</sup>、グラム陽性菌表層に広く分布するリポタイコ酸(LTA)<sup>3)</sup>、結核菌類縁の抗酸菌表層のリポアラビノマンナン

表1 広範な菌種の細胞表層に分布する免疫生物学的に活性な成分

- |                              |
|------------------------------|
| I. マイコプラズマを除く全ての細菌種：ペプチドグリカン |
| II. グラム陰性菌：リポ多糖(LPS)*, 外膜蛋白  |
| III. グラム陽性菌：リポタイコ酸(LTA)*等    |
| IV. 抗酸菌：リポアラビノマンナン(LAM)*     |

\* 両親嫌性物質

(LAM)<sup>4)</sup>等の複合糖質はいずれも多彩な免疫調節活性を発揮する。これらの物質については化学構造の解析も進み、PGNとLPSについては活性中心に当たるムラミルジペプチド(MDP)<sup>5)</sup>(図1)とリポドA<sup>6)</sup>(図2)が化学合成されている。さらに、多くの合成アナログを供試して詳細な構造・活性相関の検討が進んでいる。その結果、活性発現には厳密な化学構造が要求され、僅かな化学構造の違いが微妙に生物活性に反映することが明らかにされている<sup>7,8)</sup>。他方、これら全く化学構造を異にする菌体成分の活性のスペクトラムは互いに酷似している<sup>9,10)</sup>。しかも、これら菌体成分の作用は、免疫担当細胞ばかりでなく、殆ど全ての細胞種に及ぶと言っても過言ではない。筆者は細菌と宿主の密接な係わりが、悠久の進化の過程を通して、宿主細胞にこのような細菌認識機構を獲得させたとの考えを提示してきた<sup>11,12)</sup>。最近、このような考えを支持する証拠が次々と報告されている。

ガプトガニヤカイコ等の節足動物の血液細胞や体液

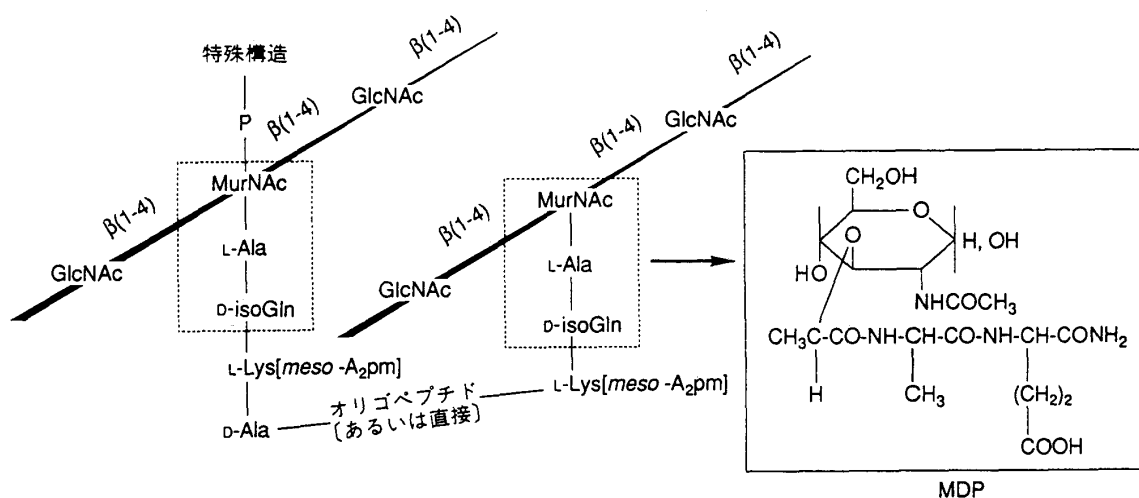


図1 細菌細胞壁ペプチドグリカン(PGN)の構造モデルと、その要構造を模して化学合成されたN-アセチルムラミル-L-アラニル-D-イソグルタミン(ムラミルジペプチド, MDP)。

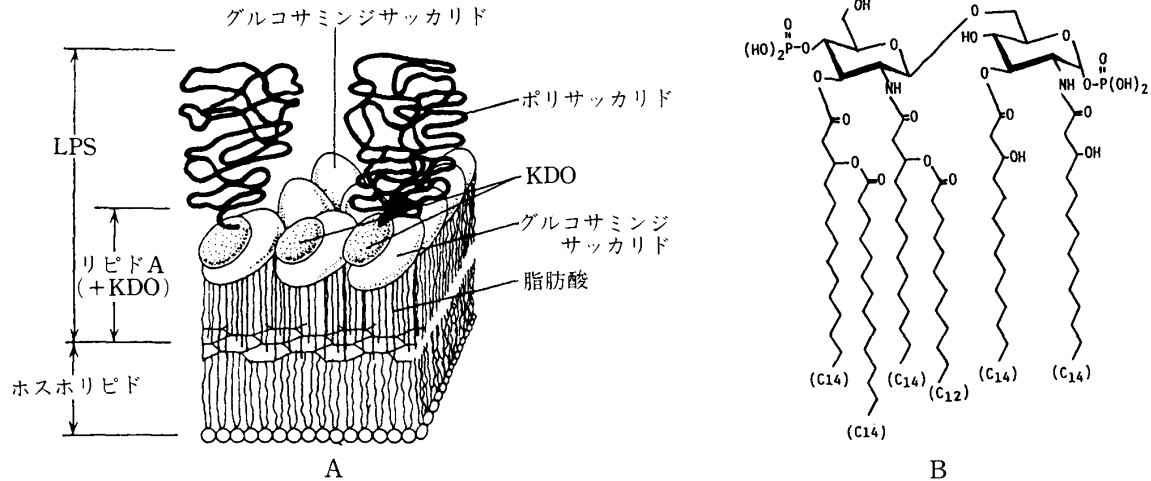


図2 グラム陰性菌外膜の模式図 (A) と内毒素活性を具備した *E. coli* 型リピド A (LA-15-PP) (B)。

中には、菌体表層の PGN や LPS を認識して凝固する一連の酵素系が存在している<sup>13,14)</sup>。これらの系は細菌の侵襲を感知して、その拡がりを阻止するものと考えられている。侵襲微生物表層に共通して存在する構造を識別するこのような機構が、高度な免疫系を獲得する以前の生物の主要な防御機構であったと考えられる。そして、この様な機構は、哺乳類とは別方向に進化した節足動物で、良く発達したのであろう。しかし、この種の仕組みは脊椎動物にも保持されている。おそらくは体液中では補体系がその1つであり、細胞表層にも別の認識分子が存在するものと考えられる。最近、内毒素レセプターとされる CD14 が、グラム陽性菌表層多糖, PGN, LTA, LAM 等とも親和性を示すことが相次いで報告されている<sup>15-19)</sup> (図3)。さらに、カイコの LPS 認識分子は CD14 と類似することが明らかにされた<sup>20)</sup>。これらの知見は上述の菌体成分の活性の多彩さ (multiple function) と重複性 (redundancy) を合理的に説明しうる興味ある知見と言えよう。

### 3. 黒色色素産生菌 (BPB) の LPS

成人性の歯周炎と最も深く関わると考えられている細菌は、*Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia* 等の黒色色素 (ヘマチン) を産生する偏性嫌気性のグラム陰性桿菌類 (black-pigmented bacteria, BPB) である<sup>21)</sup>。当然のことながら BPB も LPS を有し、その LPS は歯周病との係わりから、活発に研究されてきた。BPB LPS についての記載は '60 年代まで遡ることができる<sup>22)</sup>。以来、BPB LPS は古典的な LPS

即ち、LPS 研究の主たる対象であった *Escherichia coli* や *Salmonella* 属の諸菌種を含む腸内細菌科の LPS とは、化学構造の点でも、生物活性の点でも性質を異にしているとの多数の報告がなされてきた<sup>23,24)</sup>。最近、*P. gingivalis* リピド A の化学構造を解析した成績があいついで日本の研究者によって報告された<sup>25,26)</sup>。図4に示した様に、基本骨格は通常のリピド A と同じく  $\beta(1-6)$  グルコサミンジサッカリドであるとの点では両報告は一致している。しかし、1,4' 位にリン酸基2つを有するのか、4' 位のリン酸基を欠くモノリン酸リピド A かという点と、アシル基のパターンが、両報告で異なっている。もっとも、一般的にリピド A 構造は多様性に富んでいるので、提示された構造が多様な構造の中から両極端の構造を示したものと解すれば、互いに矛盾は無いとも言える。表2に以上の成績を含めて BPB LPS の特徴をまとめて示した。上述の合成リピド A 関連化合物を供試した研究成績<sup>8)</sup> と考えあわせると、BPB LPS の化学構造上の特徴は、いずれも低毒性を合理的に説明し得るものである。

### 4. BPB LPS に特異な生物活性

BPB LPS が低毒性であるとの知見は、歯周病の病因とは結ぶ付け難い性質であろう。むしろ、BPB LPS が通常 LPS には認められない活性を発揮することを、重視すべきと思われる。即ち、BPB LPS は通常 LPS に応答しない C3H/HeJ マウスのリンパ系細胞をも活性化する。さらに興味あることに、筆者らは BPB LPS がヒト歯肉線維芽細胞に作用して様々なサ

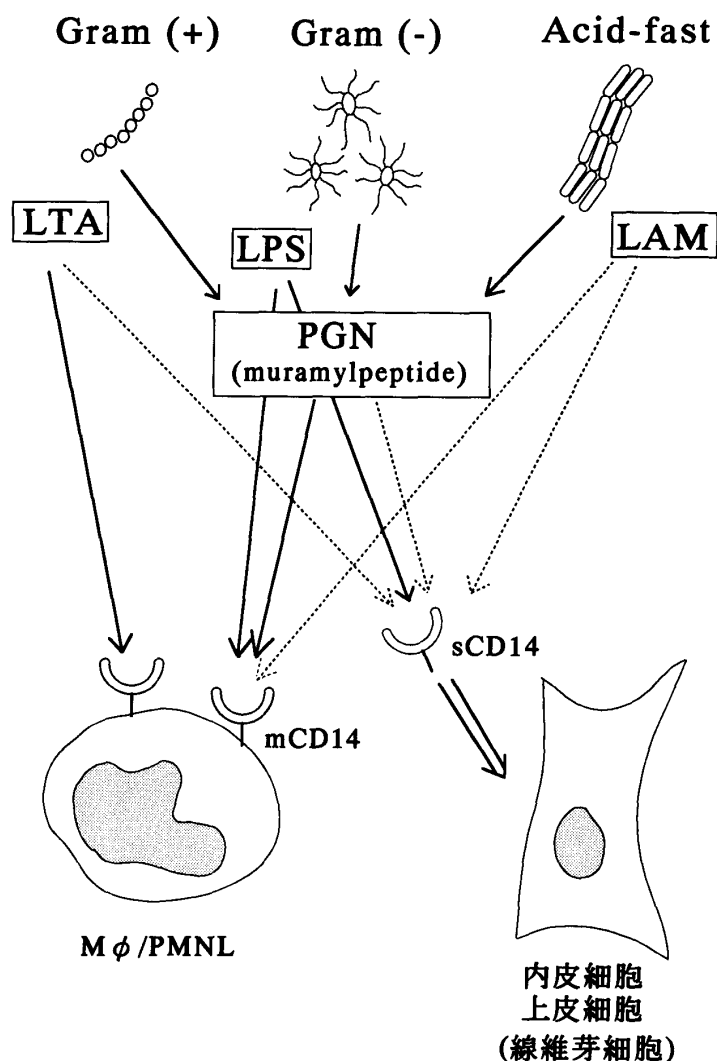


図3 菌体表層の免疫調節物質とCD14。広範な菌種の細胞表層に、免疫生物学的に活性な成分が広く分布している。即ち、ほぼ全ての菌種に分布するペプチドグリカン(PGN)、グラム陽性菌に広く分布するリポタイコ酸(LTA)、グラム陰性菌のリポ多糖(LPS)、ならびに抗酸菌のリポアラビノマンナン(LAM)は化学構造を異にしているが、その活性のスペクトラムは互いに類似している。最近、これらの菌体成分がマクロファージや好中球の膜上に発現しているCD14 (mCD14) によって認識されているとの知見が集積している。なお、膜型CD14 (mCD14) を有しない細胞種でも、遊離のCD14 (sCD14) を介して、菌体成分によって活性化される可能性がある。

イトカイン産生を促すことを見いだした<sup>27-29)</sup> (表3)。ちなみに、同じ実験条件下で腸内細菌科のLPSは線維芽細胞に殆ど作用しないか、弱い活性しか示さない。

では、このようなBPB LPSに特異な活性はそのリポドA構造から説明できるだろうか？ 筆者は否定的な見解を持っているが、異論も多い。筆者の否定的論拠は次の通りである。1) これまで化学合成された多数のリポドA関連化合物でC3H/HeJマウスのリンパ系細胞をも活性化したとの報告は皆無である。従って、基本骨格に違いのないBPB LPSに、他のリ

ポドAが共有するレセプターシステムを逸脱する作用を期待することは合理的でない。2) BPBは従来の分類では*Bacteroides*に属している。腸内の*Bacteroides fragilis*リポドAは上述のBPB LPSのリポドAと共通の化学構造上の特徴を備えている<sup>30)</sup>。そして、*B. fragilis* LPSから多糖部分を除去したりポドAはC3H/HeJマウス脾臓B細胞活性化作用が喪失するとの報告<sup>31)</sup>がある。3) 筆者ら<sup>29)</sup>は*P. intermedia* ATCC 25611より熱フェノール・水抽出したLPS (LPS-PW) とフェノール・クロロホルム・石油エー

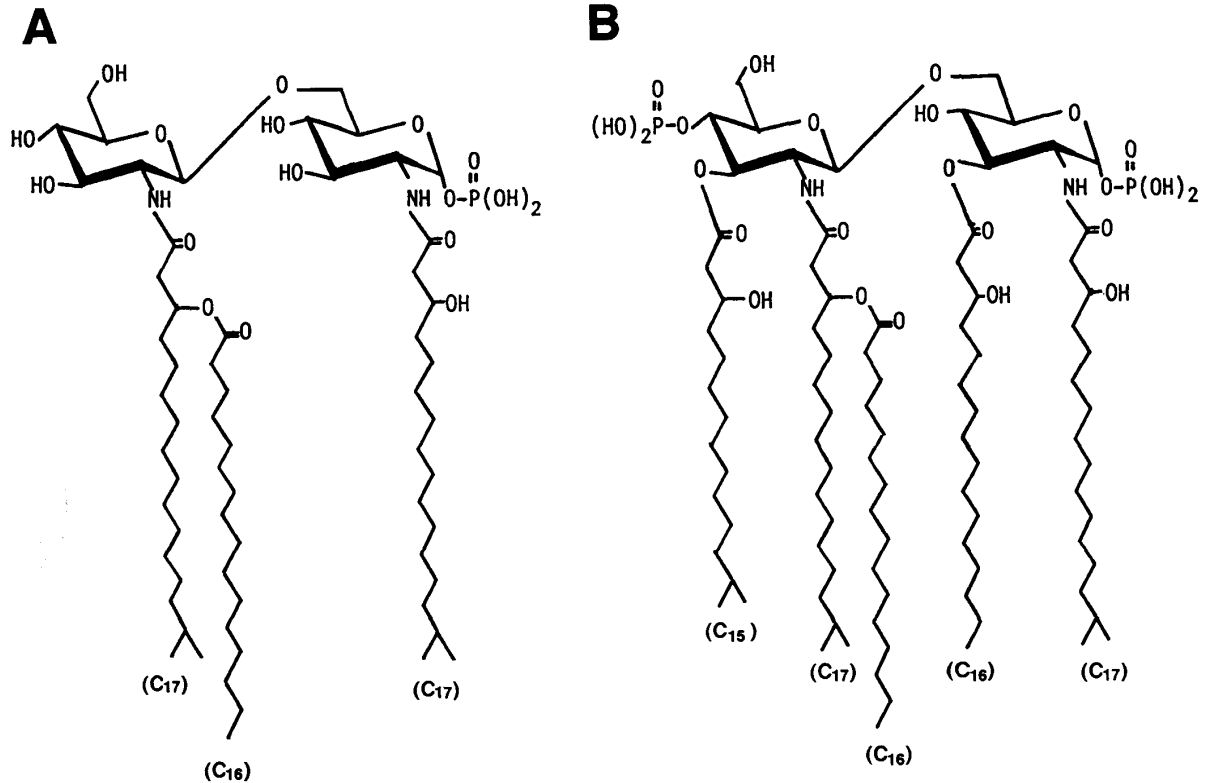


図4 *P. gingivalis* リピド A の推定構造。  
 A. Ogawa<sup>25)</sup> の提示した推定構造。 B. Kumada ら<sup>26)</sup> の提示した推定構造。

表2 BPB LPS の特徴

A. 化学構造の特徴	
1. 多糖部分	KDO がリン酸化されている ヘプトースは検出されない
2. リピド部分	長鎖脂肪酸を有する 分岐脂肺酸を有する 3-OH-15-Me-16:0, 13-Me-14:0 など ミリスチン酸 (14:0) や 3-OH-14:0 が殆ど検出されない 脂肪酸の数が少ない (1 分子あたり 3~5) 1-モノリン酸タイプの構造を多く含む
B. 生物活性の特徴	
1. 低毒性	発熱, 致死, Shwartzman 作用等が弱い
2.	免疫強化作用等は必ずしも弱くない
3.	他の LPS に認められない特異な活性を示す LPS 不応答性の C3H/HeJ マウスのリンパ系細胞をも活性化する 線維芽細胞を活性化する アナフィラキシー様反応を惹起する

テル抽出した LPS (LPS-PCP) とを調製した。LPS-PW は C3H/HeJ マウス脾細胞活性化作用を示すが、LPS-PCP は活性を示さなかった。

一方、Ogawa ら<sup>32)</sup> は上述の *P. gingivalis* リピド A が C3H/HeJ マウス脾細胞活性化作用を示したと報告している。棚本ら<sup>33)</sup> も同様の所見を示している。また切替ら<sup>34)</sup> は、BPB LPS を Manthey らの記載<sup>35)</sup> に従って、さらに精製しても、C3H/HeJ マウス脾細胞活性化作用は保持されたと報告している。調製した LPS ないしリピド A には必ず微量成分の混入がつきまとう。従って、最終結論を下すには、BPB LPS の合成対応物を調製して、実験を行う必要があろう。

### 5. BPB LPS の特異な活性を担う物質

上述のように、BPB LPS の特異な活性は、その特徴的なリピド A に基づくとの見解が有力視されている。筆者らは、上述の *P. intermedia* 由来の 2 つの LPS の活性の違いは、LPS-PW に含まれていて LPS-PCP には存在しない物質に起因すると考えている。換言すれば、BPB でも LPS やリピド A は古典的なエンドトキシンと本質的に同様の性質を保有していると考えて

表3 BPB LPS によるヒト歯肉線維芽細胞の活性化

事 項	文 献
サイトカイン産生誘導	
IL-1 Cell-associated IL-1 $\alpha$ と Cell-free IL-1 $\beta$ 活性の誘導	Takada ら <sup>27)</sup>
IL-1 $\alpha$ mRNA 発現誘導	Tamura ら <sup>28)</sup>
IL-6 Cell-free IL-6 活性の誘導	Takada ら <sup>27)</sup>
IL-6 mRNA 発現増強	Sakuta ら (未発表)
IL-8 IL-8 mRNA 発現誘導	Tamura ら <sup>28)</sup>
IL-8 分泌誘導 (ELISA)	Sakuta ら <sup>45)</sup>
HGF/SFHGF/SF 分泌増強 (ELISA)	Takada ら <sup>29)</sup>
増殖促進	Hamada ら <sup>53)</sup>
MHC クラス II 抗原 (HLA-DR) 発現	Matsushita ら <sup>54)</sup>

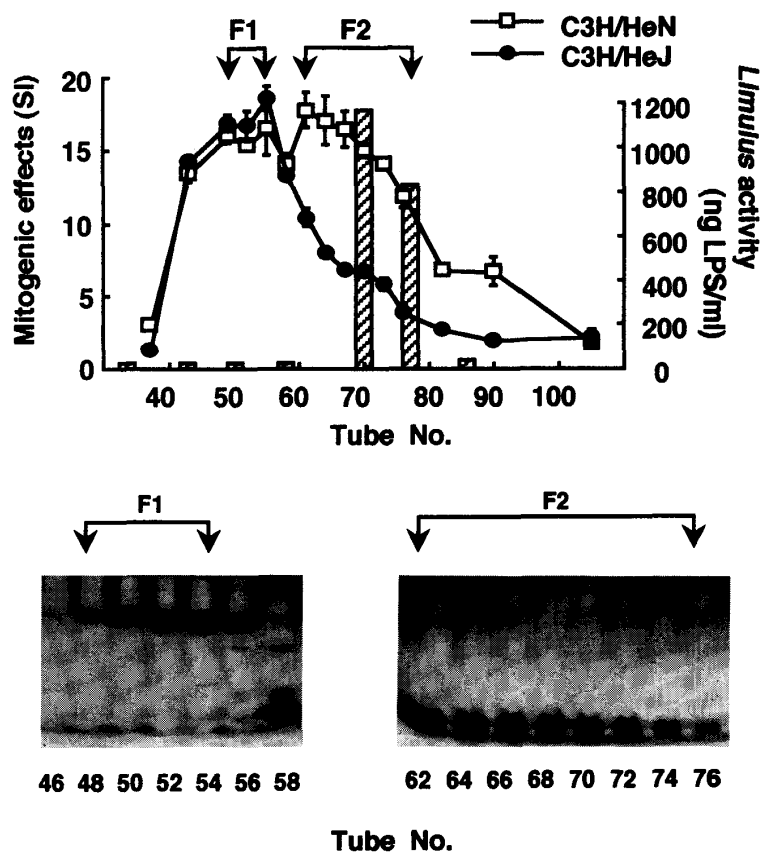


図5 BPB 表面の新奇な免疫調節物質を分離する試み。 *P. intermedia* ATCC 25611 から熱フェノール・水抽出して得た水相から、超遠心して LPS-PW を除いた画分 (S1) を得た。S1 をデオキシコール酸 (DOC) ナトリウム存在下で、Sephadex G-100 でゲル濾過した。分画に当たっては、C3H/HeN および C3H/HeJ マウス脾細胞に対するマイトゲン活性 (刺激係数 SI で表示), *Limulus* 活性 (ng LPS/ml で表示) ならびに DOC-PAGE (下図) でモニターした。図中の F1 画分は両系統のマウスに活性を示し, *Limulus* 活性を欠く画分で, 高分子量 (10-12 kDa) 物質より構成される。一方, F2 画分は, C3H/HeN マウス脾細胞に活性を示すが, C3H/HeJ マウス脾細胞には不活性で, 強い *Limulus* 活性を保有するエンドトキシン画分で, DOC-PAGE では低分子量 (3 kDa) の単一バンドを示す。なお, F1 をヌクレアーゼ処理後, 再度ゲル濾過して, 目的の PM 画分を得た。

いる。そして、LPS-PW の調製法から考えて、熱フェノール・水抽出画分に標的物質が多量に含まれていると予測し、その物質を *Prevotella* mitogen (PM) と名付けて、分離精製を試みた<sup>29)</sup> (図5)。現時点では PM の部分精製しか出来ていないが、LPS の高感度検出法である *Limulus* テストで、殆ど活性を示さない PM 画分を得ることが出来た。期待通り PM 画分は C3H/HeJ マウス脾細胞に強い mitogen 作用を及ぼすばかりでなく、同マウスの腹腔マクロファージを活性化してインターロイキン(IL)-6 産生を促した。さらにヒト歯肉線維芽細胞培養系でも様々な活性を發揮した。すなわち、IL-6 活性の誘導、IL-8 mRNA の発現誘導、肝細胞増殖因子/スキャッターファクター (HGF/SF) の産生誘導、核内転写因子 NF $\kappa$ B の活性化等を示した<sup>29)</sup>。ちなみに LPS-PCP は対象とした精製 *Salmonella abortusequi* LPS と同様にこれらの作用を殆ど示さなかったが、LPS-PW は PM 画分には劣るものの明確な活性を發揮した。これらの成績から筆者は、BPB LPS に特異な活性は、LPS 自体ではなく、標品に混入した微量な PM に帰結すると考えている。ちなみに *E. coli* の熱フェノール・水抽出画分には PM 様活性は認められない。また、*P. gingivalis* 381 の熱フェノール・水抽出画分にも PM 様活性が認められるが、上述の手法ではエンドトキシンと分別出来なかった。

## 6. それでも残る BPB LPS に 特異な生物活性

では、精製した BPB LPS は他の LPS よりも生物活性が劣るだけの弱活性 LPS であろうか。確かに大部分の実験系では然りである。例えば Ito ら<sup>36)</sup> は従来の報告<sup>37)</sup> とは異なり、*P. gingivalis* や *P. intermedia* の LPS のマウスの破骨細胞性の骨吸収促進活性は他の LPS よりむしろ弱かったと報告している。この実験ではマウスの骨髄細胞を供試しているが、BPB LPS は C3H/HeN の細胞では骨吸収活性を誘導したが、C3H/HeJ では誘導活性を示さなかったという。さらに PM 画分はいずれのマウスでも不活性であった。

筆者が調べたなかで、唯一 LPS-PCP が強い活性を發揮した実験系がある。上述のペプチドグリカンの最小有効構造である MDP をマウスに投与すると、それだけでは取り立てて変化は認められないが、数時間後をピークとして LPS, LTA 等に対する著しい感受性亢進が認められる<sup>38,39)</sup>。具体的には LPS の場合、致死

毒性やサイトカイン誘導作用が著しく増強される。これらの反応は通常の内毒素活性の増強であり、C3H/HeN マウスでは認められても C3H/HeJ マウスでは認められない。ところが、MDP を前投与したくつかの系統のマウスでは、ある種の LPS を静脈内注射すると、10-20 分後にアナフィラキシー様反応が起こり、多くのマウスが1時間以内に死亡する<sup>40)</sup>。この反応は従来の内毒素活性の範疇の外にあるようで、C3H/HeN ばかりでなく C3H/HeJ マウスも強い感受性を示す。このシステムでは、BPB LPS はおしなべて強い活性を發揮する<sup>41)</sup>。しかも PM が混入していない LPS-PCP がとりわけ強い活性を發揮した。最近 Endo ら<sup>42)</sup> は、LPS-PCP のアナフィラキシー様反応の誘導には MDP の前投与を要しないこと。この反応に先だって、末梢血から肺へのセロトニンの移行 (おそらくは血小板の移行)、と急性の肺病変が認められることを明らかにしている。以上の知見は内毒素活性が弱い BPB LPS も、通常のエンドトキシンとは別の経路で強い炎症を惹起し得ることを示している。

## 7. 炎症性サイトカイン産生増幅システム

上述の様に BPB LPS はヒト歯肉線維芽細胞に炎症性サイトカイン産生を促す。従来線維芽細胞による IL-8 産生はインターフェロン (IFN)- $\beta$  や  $\gamma$  によって抑制されるとの知見が一般的であった<sup>43,44)</sup>。我々は IFN- $\beta$  と  $\gamma$  で前処理された線維芽細胞は *P. intermedia* LPS に対する感受性が高まって高レベルの IL-8 mRNA 発現を示すと報告した<sup>28)</sup>。次いで Sakuta ら<sup>45)</sup> は *P. intermedia* LPS-PW を供試して、ヒト歯肉線維芽細胞による IL-8 mRNA 発現を指標に IFN 類による IL-8 産生調節、特に産生増強の研究を進めた。その結果 IFN- $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  のいずれについても、LPS と同時に線維芽細胞培養に加えると LPS の IL-8 mRNA 発現が著しく抑制されるのに対して、適当な時間 (18 時間が至適) IFN で細胞を前処理するとむしろ LPS に対する応答性が高まって、無処理細胞よりも強く IL-8 mRNA を発現することを明らかにした。なお、このような IFN 類の 2 面的調節作用は IL-1 $\alpha$  や TNF- $\alpha$  を惹起物質とした場合にも認められた。また、LPS 刺激を受けた線維芽細胞では NF $\kappa$ B の活性化が認められたが、IFN を前処理しなくても、その活性化の程度に差は認められなかった。

以上の知見は菌体成分として BPB LPS 画分を供試

して得られたものであり、上述の理由から PM に対する反応と考えられる。線維芽細胞に作用する他の菌体成分でも、同様のサイトカイン産生調節システムが作用する可能性がある。標的細胞を線維芽細胞に限らなければ、種々の炎症性サイトカイン相互の相乗作用の記載は枚挙に暇がない。さらに、菌体成分相互の相乗的作用の報告も数多い。筆者らも、PGN と LPS, PGN と LTA, LPS と LTA 等の相乗的あるいは、適当な時間を隔てて投与した場合の効果増強を観察している。

## 8. その他の BPB 菌体表層の活性物質

筆者らの研究は、広範な細菌種の表層に広く分布する活性物質に着目してスタートしたが、BPB LPS に特異な活性の本体を追求した結果、共通構造物ではない、おそらくは BPB 固有の活性物質、PM の存在を示唆する所見を得るに至った。これまでの成績から PM の活性本体はタンパクではなく多糖と考えている<sup>29)</sup>。さらに、その調製法も考慮すると莢膜多糖である可能性が高い。この多糖が他の菌体表層の複合糖質と同様に CD14 によって認識されるのかどうかは、今後の興味ある研究課題である。

BPB に特異な菌体表層物質としては、線毛タンパクの研究が盛んである。*P. gingivalis* の線毛は最初 Yoshimura ら<sup>46)</sup> によって記載され、その方法で調製された 43 (あるいは 41) kDa の線毛タンパク (fimbriin) は、当初、菌の付着因子として研究されたが、その後、免疫担当細胞や線維芽細胞等を活性化して多彩な作用を示すことが明らかにされている<sup>47)</sup>。Ogawa ら<sup>48-51)</sup> は、同タンパクの部分ペプチドを網羅的に合成して、様々な活性を担う構造の解析を進めている。一方、

Matsushita ら<sup>52)</sup> は、*P. intermedia* 表層の 55 kDa のタンパクを分離精製して、様々な生物活性を観察している。なお、同タンパクは *P. gingivalis* を除く BPB 表層タンパクと共通抗原性を示すという。BPB 以外の線毛タンパクについても研究が進めば、あるいは共通の活性構造が存在する可能性もあろう。

## 9. おわりに

歯周病関連細菌の表層成分として、BPB LPS を中心に論じてきたが、ここでもその一端が表れているように、この種の研究では常に、広範な菌種に共通して認められる活性と、特定の菌種に特異的な活性に注意して研究を進める必要がある。上述の線毛タンパクの場合は、LPS とは逆に、現時点では特異的な活性物質として注目を集めているが、今後、普遍的側面が明らかになるかも知れない。いずれにしても、普遍性と特異性の両面を考慮することが歯周病の病因を論じる上に意味を持つであろう。このことは、歯周病関連菌では、これまであまり取り上げられる機会のなかった他の菌体成分についても当てはまるであろう。グラム陰性菌の外膜タンパク、さらには歯周病との係わりでは軽視されてきたグラム陽性菌の LTA を始めとする両親媒性物質、細菌に遍く分布する PGN 等もそのような視点で取り上げれば、未知の部分は際限なく広がることになる。

最後に、本稿は新任の挨拶代わりに依頼されたものと勝手に解釈して、意識的に筆者の研究紹介に主眼をおいて記載させて頂いた。通常の総説と異なり客観性を欠くきらいがあるとすればご容赦願いたい。

**内容要旨:** 細菌細胞表層の構成成分には、免疫生物学的活性を発揮する物質が多い。即ち、殆ど全ての菌種に分布するペプチドグリカン (PGN)、グラム陽性菌に広く分布するリポタイコ酸 (LTA)、グラム陰性菌外膜を構成する内毒素性リポ多糖 (LPS) 等は化学構造を異にするにも係わらず、互いに類似の極めて多彩な活性を発揮する。歯周組織を構成する細胞はこれら菌体成分に常に晒されていると考えられる。その結果、歯周組織の生体防御機構に乱れが生じ、過剰のサイトカイン産生等を通じて、組織破壊を招来している可能性がある。このような可能性を実証するために、筆者らは *Porphyromonas gingivalis* や *Prevotella intermedia* 等の黒色色素産生菌 (BPB) の LPS のヒト歯肉線維芽細胞に対する作用を詳細に検討した。その結果、BPB LPS は通常の細菌の LPS とは異なる特性を有することが明らかになった。さらに、BPB LPS の特異な活性は、BPB に特有の菌体成分によって担われている可能性が示された。このような歯周病関連細菌に特異な菌体成分と普遍的な菌体成分を視野に入れて研究を進めることによって、歯周病の病因の一端を明らかにしたいと考えている。



## 文 献

- 1) Seidl, P.H. and Schleifer, K.H. (edit.) : Biological properties of peptidoglycan. Walter de Gruyter, Berlin, 1986, pp. 1-436.
- 2) Morrison, D.C. and Ryan, J.L (edit.) : Bacterial endotoxic lipopolysaccharides. Vol. I. Molecular biochemistry and cellular biology. CRC Press, Boca Raton, Florida, 1992, pp. 1-449.
- 3) Fischer, W. : Bacterial phosphoglycolipids and lipoteichoic acids. Handbook Lipid Res. **6** : 123-234, 1990.
- 4) Fenton, M.J. and Vermeulen, M.W. : Immunopathology of tuberculosis: roles of macrophages and monocytes. Infect. Immun. **64** : 683-690, 1996.
- 5) Kusumoto, S., Tarumi, Y., Ikenaka, K. and Shiba, T. : Chemical synthesis of *N*-acetylmuramyl peptides with partial structures of bacterial cell wall and their analogs in relation to immunoadjuvant activities. Bull. Chem. Soc. Jpn. **49** : 533-539, 1976.
- 6) Imoto, M., Yoshimura, H., Shimamoto, T., Sakaguchi, N., Kusumoto, S. and Shiba, T. : Total synthesis of *Escherichia coli* lipid A, the endotoxically active principle of cell-surface lipopolysaccharide. Bull. Chem. Soc. Jpn. **60** : 2205-2214, 1987.
- 7) Kotani, S., Tsujimoto, M., Koga, T., Nagao, S., Tanaka, A. and Kawata, S. : Chemical structure and biological activity relationship of bacterial cell walls and muramyl peptides. Fed. Proc. **45** : 2534-2540, 1986.
- 8) Takada, H. and Kotani, S. : Structural requirements of lipid A for endotoxicity and other biological activities. CRC Crit. Rev. Microbiol. **16** : 477-523, 1989.
- 9) Wicken, A.J. and Knox, K.W. : Bacterial cell surface amphiphiles. Biochim. Biophys. Acta **604** : 1-26, 1980.
- 10) Dziarski, R. : The 70 kDa peptidoglycan/lipopolysaccharide receptor. Endotoxin Res. Ser. **2** : 151-165, 1993.
- 11) Takada, H. and Kotani, S. : Immunopharmacological activities of synthetic muramyl-peptides. Stewart-Tull, D.E.S. (edit.) : Immunology of the bacterial cell envelope. John Wiley & Sons, Chichester, 1985, pp. 119-152.
- 12) 高田春比古 : 細菌表層の複合糖質で免疫のはたらしを強める. 化学増刊 **122** : 105-113, 1992.
- 13) Muta, T. and Iwanaga, S. : Clotting and immune defense in *Limulidae*. Prog. Mol. Subcell. Biol. **15** : 154-189, 1996.
- 14) Ashida, M. and Yamazaki, H.I. : Biochemistry of the phenoloxidase system in insects: with special reference to its activation. Ohnishi, E. and Ishizaki, H. (edit.) : Molting and metamorphosis. Jpn. Sci. Soc. Press, Tokyo, 1990, pp. 239-265.
- 15) Pugin, J., Heumann, D., Tomasz, A., Kravchenko, V.V., Akamatsu, Y., Nishijima, M., Glauser, M.P., Tobias, P.S. and Ulevitch, R.J. : CD14 is a pattern recognition receptor. Immunity **1** : 509-516, 1994.
- 16) Wright, S.D. : CD14 and innate recognition of bacteria. J. Immunol. **155** : 6-8, 1995.
- 17) Soell, M., Lett, E., Holveck, F., Scholler, M., Wachsmann, D. and Klein, J.-P. : Activation of human monocytes by streptococcal rhamnose glucose polymers is mediated by CD14 antigen, and mannan binding protein inhibits TNF- $\alpha$  release. J. Immunol. **154** : 851-860, 1995.
- 18) Kusunoki, T., Hailman, E., Juan, T.S.-C., Lichenstein, H.S. and Wright, S.D. : Molecules from *Staphylococcus aureus* that bind CD14 and stimulate innate immune responses. J. Exp. Med. **182** : 1673-1682, 1995.
- 19) Cleveland, M.G., Gorham, J.D., Murphy, T.L., Tuomanen, E. and Murphy, K.M. : Lipoteichoic acid preparations of gram-positive bacteria induce interleukin-12 through a CD14-dependent pathway. Infect. Immun. **64** : 1906-1912.
- 20) Lee, W.-J., Lee, J.-D., Kravchenko, V.V., Ulevitch, R.J. and Brey, P.T. : Purification and molecular cloning of an inducible gram-negative bacteria-binding protein from the silkworm, *Bombyx mori*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **93** : 7888-7893, 1996.
- 21) Zambon, J.J., Grossi, S., Dunford, R., Haraszthy, V.I., Preus, H. and Genco, R.J. : Epidemiology of subgingival bacterial pathogens in periodontal disease. Genco, R. et al.

- (edit.) Molecular pathogenesis of periodontal disease. ASM Press, Washington DC, 1994, pp. 3-12.
- 22) Hofstad, T.: Chemical characteristics of *Bacteroides melaninogenicus* endotoxin. Arch. Oral Biol. **13**: 1149-1155, 1968.
  - 23) Hamada, S., Takada, H., Ogawa, T., Fujiwara, T. and Mihara, J.: Lipopolysaccharides of oral anaerobes associated with chronic inflammation: chemical and immunomodulating properties. Int. Rev. Immunol. **6**: 247-261, 1990.
  - 24) Wilson, M.: Biological activities of lipopolysaccharide and endotoxin. Shah, H. N., Mayrand, D. and Genco, R.J. (edit.): Biology of the species *Porphyromonas gingivalis*. CRC Press, Boca Raton, Florida, 1993, pp. 171-197.
  - 25) Ogawa, T.: Chemical structure of lipid A from *Porphyromonas (Bacteroides) gingivalis* lipopolysaccharide. FEBS Lett. **332**: 197-201, 1993.
  - 26) Kumada, H., Hashimoto, Y., Umemoto, T. and Tanamoto, K.-I.: Structural study on the free lipid A isolated from lipopolysaccharide of *Porphyromonas gingivalis*. J. Bacteriol. **177**: 2098-2106, 1995.
  - 27) Takada, H., Mihara, J., Morisaki, I. and Hamada, S.: Induction of interleukin-1 and -6 in human gingival fibroblast cultures stimulated with *Bacteroides* lipopolysaccharides. Infect. Immun. **59**: 295-301, 1991.
  - 28) 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.
  - 29) Takada, H., Iki, K., Sakuta, T., Sugiyama, A., Sawamura, S. and Hamada, S.: Lipopolysaccharides of oral black pigmented bacteria and periodontal diseases. Prog. Clin. Biol. Res. **392**: 59-68, 1995.
  - 30) Lindberg, A.A., Weintraub, A., Zähringer, U. and Rietschel, E.T.: Structure-activity relationships in lipopolysaccharides of *Bacteroides fragilis*. Rev. Infect. Dis. **12**: s133-s141, 1990.
  - 31) Williamson, S.I., Wannemuehler, M.J., Jirillo, E., Pritchard, D.G., Michalek, S.M. and McGhee, J.R.: LPS regulation of the immune response: separate mechanisms for murine B cell activation by lipid A (direct) and polysaccharide (macrophage-dependent) derived from *Bacteroides* LPS. J. Immunol. **133**: 2294-2300, 1984.
  - 32) Ogawa, T., Nakazawa, M. and Masui, K.: Immunopharmacological activities of the nontoxic monophosphoryl lipid A of *Porphyromonas gingivalis*. Vaccine **14**: 70-76, 1996.
  - 33) 棚本憲一, 飯田貴敏, 安住聡子, 配島由二, 熊田秀文, 梅本俊夫: *Porphyromonas gingivalis* リピド A の生物活性—特に内毒素不応答マウスに対する作用—日細菌誌 **50**: 117, 1995.
  - 34) 切替富美子, 切替照雄, 新田敏正, 中野昌康: 歯周病原性細菌 LPS に対する LPS 低応答性 C3H/HeJ マウス由来マクロファージの反応性の再検討. 日細菌誌 **50**: 120, 1995.
  - 35) Manthey, C.L., Perera, P.-Y., Henricson, B.E., Hamilton, T.A., Qureshi, N. and Vogel, S.N.: Endotoxin-induced early gene expression in C3H/HeJ (Ips<sup>d</sup>) macrophages. J. Immunol. **153**: 2653-2663, 1994.
  - 36) Ito, H.-O., Shuto, T., Takada, H., Koga, T., Aida, Y., Hirata, M. and Koga, T.: Lipopolysaccharides from *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia* and *Actinobacillus actinomycetemcomitans* promote osteoclastic differentiation in vitro. Arch. Oral Biol. **41**: 439-444, 1996.
  - 37) Hausmann, H., Raisz, L.G. and Miller, W.A.: Endotoxin: stimulation of bone resorption in tissue culture. Science **168**: 862-864, 1970.
  - 38) Parant, M., Parant, F., Vinit, M.-A., Jupin, C., Noso, Y. and Chedid, L.: Priming effect of muramyl peptides for induction by lipopolysaccharide of tumor necrosis factor production in mice. J. Leukocyte Biol. **47**: 164-169, 1990.
  - 39) Takada, H., Kawabata, Y., Arakaki, R., Kusumoto, S., Fukase, K., Suda, Y., Yoshimura, T., Koikeguchi, S., Kato, K., Komuro, T., Tanaka, N., Saito, M., Yoshida, T., Sato, M. and

- Kotani, S.: Molecular and structural requirements of a lipoteichoic acid from *Enterococcus hirae* ATCC 9790 for cytokine-inducing, antitumor, and antigenic activities. *Infect. Immun.* **63**: 57-65, 1995.
- 40) Takada, H. and Galanos, C.: Enhancement of endotoxin lethality and generation of anaphylactoid reactions by lipopolysaccharides in muramyl-dipeptide-treated mice. *Infect. Immun.* **55**: 409-413, 1987.
- 41) Takada, H., Hirata, H., Fujiwara, T., Koga, T., Ogawa, T. and Hamada, S.: *Bacteroides* lipopolysaccharides (LPS) induce anaphylactoid and lethal reactions in LPS-responsive and -nonresponsive mice primed with muramyl dipeptide. *J. Infect. Dis.* **162**: 428-434, 1990.
- 42) Endo, Y., Shibasaki, M., Nakamura, M. and Takada, H.: Contrasting effects of lipopolysaccharides (endotoxins) from oral black-pigmented bacteria and *Enterobacteriaceae* on platelets, a major source of serotonin, and on histamine-forming enzyme in mice. *J. Infect. Dis.* submitted.
- 43) Oliveira, I.C., Sciavolino, P.J., Lee, T.H. and Vilček, J.: Downregulation of interleukin 8 gene expression in human fibroblasts: unique mechanism of transcriptional inhibition by interferon. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**: 9049-9053, 1992.
- 44) Takigawa, M., Takashiba, S., Myokai, F., Takahashi, K., Arai, H., Kurihara, H. and Murayama, Y.: Cytokine-dependent synergistic regulation of interleukin-8 production from human gingival fibroblasts. *J. Periodontol.* **65**: 1002-1007, 1994.
- 45) Sakuta, T., Tokuda, M., Tamura, M., Jimi, E., Ikebe, T., Koga, T., Nagaoka, S. and Takada, H.: Dual regulatory effects of interferon- $\alpha$ , - $\beta$  and - $\gamma$  on interleukin-8 gene expression by human gingival fibroblasts stimulated with lipopolysaccharide from *Prevotella intermedia*, interleukin-1 $\alpha$  or tumor necrosis factor- $\alpha$ . *Infect. Immun.* submitted.
- 46) Yoshimura, F., Takahashi, K., Nodasaka, Y. and Suzuki, T.: Purification and characterization of a novel type of fimbriae from the oral anaerobe *Bacteroides gingivalis*. *J. Bacteriol.* **160**: 949-957, 1984.
- 47) Hamada, S., Ogawa, T., Shimauchi, H. and Kusumoto, Y.: Induction of mucosal and serum immune responses to a specific antigen of periodontal bacteria. *Adv. Exp. Med. Biol.* **327**: 71-81, 1992.
- 48) Ogawa, T., Kusumoto, Y., Uchida, H., Nagashima, S., Ogo, H. and Hamada, S.: Immunobiological activities of synthetic peptide segments of fimbrial protein from *Porphyromonas gingivalis*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **180**: 1335-1341, 1991.
- 49) Ogawa, T. and Hamada, S.: Hemagglutinating and chemotactic properties of synthetic peptide segments of fimbrial protein from *Porphyromonas gingivalis*. *Infect. Immun.* **62**: 3305-3310, 1994.
- 50) Ogawa, T., Uchida, H. and Hamada, S.: *Porphyromonas gingivalis* fimbriae and their synthetic peptides induce proinflammatory cytokines in human peripheral blood monocyte cultures. *FEMS Microbiol. Lett.* **116**: 237-242, 1994.
- 51) Ogawa, T., Ogo, H. and Hamada, S.: Chemotaxis of human monocytes by synthetic peptides that mimic segments of *Porphyromonas gingivalis* fimbrial protein. *Oral Microbiol. Immunol.* **9**: 257-261, 1994.
- 52) 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.
- 53) Hamada, S., Takada, H., Mihara, J., Nakagawa, I. and Fujiwara, T.: LPS of oral *Bacteroides* species: general properties and induction of cytokines in human gingival fibroblast cultures. *Endotoxin Res. Series 1*: 285-294, 1990.
- 54) Matsushita, K., Fujimaki, W., Kato, H., Uchiyama, T., Igarashi, H., Ohkuni, H., Nagaoka, S., Kawagoe, M., Kotani, S. and Takada, H.: Immunopathological activities of extracellular products of *Streptococcus mitis*, particular-

ly a superantigenic fraction. *Infect. Immun.*  
**63**: 785-793, 1995.