

歯周病原性因子、フィンブリエの白血球活性化作用 と歯周炎治療薬、マクロライドの抗炎症作用の機序 に関する研究

野添, 浩司

<https://doi.org/10.15017/1807146>

出版情報：九州大学, 2016, 博士（歯学）, 論文博士
バージョン：
権利関係：全文ファイル公表済

歯周病原性因子、フィンブリエの白血球活性化作用と歯周炎
治療薬、マクロライドの抗炎症作用の機序に関する研究

第1章 *Porphyromonas gingivalis* 由来フィンブリエに対する白血球の応答

第2章 マクロライドによる好中球のスーパーオキシド
産生抑制のメカニズム

2016年5月

野添浩司

九州大学歯学研究院 口腔機能修復学講座 歯周病学分野

(指導： 西村英紀教授)

対象論文

Mechanism of the macrolide-induced inhibition of superoxide generation by neutrophils

Kohji Nozoe, Yoshitomi Aida, Takao Fukuda, Terukazu Sanui and Fusanori Nishimura

Inflammation 39: 1039-1048, 2016

略語

DMSO, dimethyl sulfoxide

E. coli, *Escherichia coli*

fMLP, N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine

FITC, fluorescein isothiocyanate

HEPES, H-2-Hydroxyethylpiperazine-N-2-ethanesulfonic acid

IgG, immunoglobulin G

IL, interleukin

LPS, lipopolysaccharide

mAb, monoclonal antibody

MFI, mean channel of fluorescence intensity

MNC, mononuclear cells

O₂⁻, superoxide anion

Pam3, Pam₃Cys-Ser-(Lys)₄

PBS, phosphate buffered saline

PMA, phorbol myristate acetate

P. gingivalis, *Porphyromonas gingivalis*

PMXB, polymyxin B

SDS-PAGE, sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis

TLR, Toll-like receptor

目次

	頁
要旨	1
第1章 <i>Porphyromonas gingivalis</i> 由来フィンブリエに対する白血球の応答	
緒言	3
材料と方法	6
結果	12
考察	24
第2章 マクロライドによる好中球のスーパーオキシド産生抑制のメカニズム	
緒言	29
材料と方法	31
結果	37
考察	51
謝辞	56
参考文献	57

要旨

Porphyromonas gingivalis (*P. gingivalis*) の fimbriae は歯周炎における病原因子と考えられており、種々の細胞に作用して炎症性サイトカイン産生を誘導することが報告されてきた。本研究では *P. gingivalis* 菌体から精製した fimbriae の好中球に対する、活性酸素産生増強作用 (priming) 誘導能および interleukin-8 (IL-8) 産生誘導能を調べた。菌体由来物質の細胞に対する作用を調べる際に問題となる lipopolysaccharide (LPS) などの夾雑物質の混入に注意を払い、Triton X-114 を用いた phase separation 法で分画して、LPS およびその他の疎水性活性物質を除いた fimbriae を調製して、本研究で用いた。その結果、fimbriae は好中球に priming を起こさなかったが、試験管にコートした fimbriae は、LPS によって priming を受けた好中球に活性酸素産生を誘導した。また、fimbriae は好中球に微弱ながら IL-8 産生を誘導したが、fimbriae の IL-8 産生誘導活性は、*P. gingivalis* 由来 LPS より低かった。fimbriae で単核球を刺激すると IL-8 産生を誘導したが、その応答は lipopeptide、peptidoglycan および LPS より弱く、血清依存性も著明ではなかった。以上の結果から fimbriae タンパク自体には食細胞に作用して炎症性の細胞応答を誘導する活性はないか、あっても弱いと考えられた。

次に、好中球による O_2^- 産生に対する歯周炎治療薬であるマクロライドの効果を検討した。末梢血由来の好中球は LPS や走化性ペプチドにより priming

を受けると、走化性ペプチドや付着による刺激に応答して強い O_2^- 産生が誘導される。このような priming 後の走化性ペプチドや付着の刺激による O_2^- 産生の誘導はマクロライドで好中球を処理することで抑制された。アジスロマイシンによる O_2^- 産生の抑制には、血清の存在が必要であった。その効果は $NaHCO_3$ により置き換えることができ、pH を上昇させることで効果が発揮されていた。抑制の強さはアジスロマイシン=ロキシスロマイシン>クラリスロマイシン>エリスロマイシンの順であった。塩化アンモニウムはアジスロマイシンの効果を除去した。アジスロマイシン存在下で好中球を培養した後に塩化アンモニウムを加えても効果はなく、培養前に加えたときにのみに効果があったことから、塩化アンモニウムが好中球によるアジスロマイシンの取り込みを阻害している可能性が示唆された。アジスロマイシンは、LPS による priming の有無にかかわらず、好中球の alkaline phosphatase、CD11b、cytochrome b₅₅₈ の発現に影響を与えなかった。これらの結果より、マクロライドは好中球における LPS 刺激伝達経路に影響を与えることなく、 O_2^- 産生を選択的に抑制することが示された。エリスロマイシンの誘導体で、抗菌作用を持たないマクロライドとして開発された EM703 と EM900 は生理学的な pH (7.4) で好中球の O_2^- 産生の誘導を有意に抑制した。このエリスロマイシン誘導体は耐性菌の発生を誘導しないことから、将来有望な抗炎症剤となることが期待される。

第1章：*Porphyromonas gingivalis* 由来 fimbriae に対する白血球の 応答

緒言

歯周病原細菌の病原因子として、リポ多糖体 (LPS)、fimbriae が知られている (1)。LPS は、単球、マクロファージ、繊維芽細胞などに作用して interleukin-1, 6, 8 (IL-1, 6, 8)、tumor necrosis factor- α (TNF- α) などのサイトカインの産生を誘導する (2)。*Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*) の fimbriae は、細胞、唾液成分、コラーゲンに結合し、菌体の付着因子として働くとともに、歯肉上皮細胞、脾細胞、単球、マクロファージに作用して炎症性サイトカインの産生を誘導することが報告されている (1)。

好中球は、炎症局所に遊走し、細菌を貪食、消化して生体防衛的に働くとともに、炎症局所では細胞外に superoxide anion (O_2^-) を産生し、 O_2^- より生成した reactive oxygen intermediate (ROI) と呼ばれる一群の活性物質によるタンパク分解酵素群の活性化を通じて組織破壊を引き起こすことが明らかにされている (3,4)。好中球は LPS、N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine (fMLP)、サイトカイン (TNF- α 、IL-8) の作用を受けると priming を受けた状態となり、続いて異なる刺激を受けると、著明な O_2^- 産生 (triggering) を起こす (5)。また、priming を受け

た好中球は、試験管表面に coating した血清蛋白や細胞外基質に付着することによって、高い O₂ 産生を示す (6)。すなわち好中球が防御的、あるいは、破壊的に活性を発揮するのに2つの異なるステップ、priming と triggering を必要とすると考えられている (3)。歯周病関連細菌由来 LPS が好中球の活性酸素産生の priming を起こすことは報告されているが、fimbriae については分かっていない (7, 8)。一方、fimbriae は種々の細胞に作用してサイトカイン産生を誘導することは報告されている (2)。とりわけ IL-8 産生に関する研究としては fimbriae とその部分合成ペプチドが歯肉上皮細胞からの IL-8 産生を誘導することが報告されている (9)。好中球を fibrinogen 存在下に fimbriae と培養すると IL-8 産生が誘導されることが報告されている (10)。また fimbriae は好中球に作用して β₂ integrin の発現増強を誘導することが報告されている (11)。

fimbriae などの菌体由来成分を用いた研究において LPS を始めとする菌体成分の混在が常に問題となる。実際問題、混在すると考えられる LPS の影響を排除するような配慮がなされていない研究が多い。特に単球、マクロファージの fimbriae に対するサイトカイン応答を指標にする場合は混在する LPS およびその他の菌体成分の関与の可能性を注意深く排除することが求められる。Triton X-114 を用いた phase separation による分画によって可溶性タンパクから LPS を始めとする疎水性物質を分離・除去するこ

とができ、可溶性タンパクや plasmid DNA から endotoxin を除去する方法として広く用いられている (12)。

本研究においては Triton X-114 を用いた phase separation により LPS を始めとする疎水性活性物質を除いた *P. gingivalis* の fimbriae を調製し、(1) fimbriae が、好中球に作用して活性酸素産生の priming を誘導するか、(2) 好中球および単核球に IL-8 産生を誘導するかの 2 点について調べた。その結果 fimbriae には好中球の priming を起こす活性は認められなかった。一方 fimbriae は、好中球の付着とそれに伴う活性酸素産生を誘導することが分かった。好中球および単核球に対する IL-8 産生誘導は他の TLR2 および TLR4 のリガンドに比べて重量当たり極めて低い活性を示したという結果が得られた。これらの結果から *P. gingivalis* 由来 fimbriae の好中球・単核球の自然免疫活性化能はほとんどないか低いという結論が得られた。

材料と方法

試薬

P. gingivalis 由来 LPS は、*P. gingivalis* 381 株から調製したものを高田春比古博士 (東北大学) より分与された (13)。K235 由来 *Escherichia coli* (*E.coli*) LPS は Floyd McIntire 博士 (University of Colorado, Denver, CO) より分与を受けた (14)。*Staphylococcus aureus* 由来 peptidoglycan は Fluka Chemie GmbH (Buchs, Switzerland) より購入した。Lipopeptide, Pam₃Cys-Ser-(Lys)₄ (Pam3) は EMD Bioscience, Inc. (La Jolla, CA) から購入した。Cytochrome c、Histopaque 1077、ヒト血漿由来 fibrinogen は Sigma Chemical Co (St. Luis, MN, USA) より購入した。fMLP は Vega Biochemical (Tucson, AZ, USA) より購入した。Type IV collagen は Koken (Tokyo, Japan) より購入した。デキストラン (分子量 : 200,000–300,000, LPS-free) は United States Biochemical Co. (Cleveland, OH, USA) より購入した。Triton X-114, p-nitrophenol phosphate, 2-amino-2-methyl-propanol は Wako Pure Chemical Industries (Tokyo, Japan) より購入した。抗 IL-1 β monoclonal antibody (mAb), 抗 IL-8 mAb, rabbit 抗 IL-1 β 抗体, rabbit 抗 IL-8 抗体, horseradish peroxidase-conjugated ヤギ 抗マウス IgG は R&D systems (Minneapolis, MN) から購入した。抗 CD11a mAb (P01171M, clone 38) は Biodesign International (Kennebunk, ME) から、抗 CD11b mAb (MAS 439, clone 44) は Harlan Sera-Lab Limited (Loughborough, England) から、抗 CD11b mAb (Mo1, clone 94) は Coulter

Immunology (Hialeah, FL) から、抗 CD11c mAb (CBL 146, clone 3.9) は Cymbus Bioacience Limited (Southampton, England) から、抗 CD11c mAb (FK24) は Nichirei (Tokyo, Japan) から、抗 CD18 mAb (LFA-1, clone MEM 48) は Southern Biotechnology Associates Inc. (Birmingham, AL) から、control IgG1 は Ancell (Bayport, MN) からそれぞれ購入した。

***P. gingivalis* 由来 fimbriae の調製**

P. gingivalis は、ATCC33277 株を、hemin、menadion を加えた brain heart infusion 液体培地で、嫌氣的に培養し集菌した。菌体を超音波処理した後、20,000 g、10 分の遠心上清を 40%飽和硫酸で塩析し、10,000 g で遠心後の沈殿を Tris-HCl 緩衝液 (5 mM、pH8.0) にて透析して粗 fimbriae 画分を得た。この後の精製は 2 つの方法によって行った。1 つは非変性下の方法で、他は変性段階を含む精製法である。まず、粗 fimbriae 画分を DEAE イオン交換クロマトグラフィーにて分画し、NaCl の濃度勾配において ~200 mM NaCl にて溶出された画分を濃縮して Sepharose CL-6B を用いたゲル濾過を行い、Tris-HCl 緩衝液 (5 mM、pH8.0) にて透析して精製 fimbriae を得た (15)。一方、粗線毛画分から SDS-PAGE にて分離した 43 kDa の band を切り出して electro-elution (BioRad) により溶出した。その後、6M グアニジン塩酸存在下の Sepharose CL-6B を用いたゲル濾過に

よって、SDS を除去した *fimbriae* 画分を Tris-HCl 緩衝液 (5 mM、pH8.0) にて透析し、精製 *fimbriae* を得た (16)。上記 2 つの方法を用いて精製した *fimbriae* を 1 レーンあたり 5 μ g サンプルを用いて電気泳動し、43 kDa の単一のバンドであることを確認した。

Triton X-114 を用いた phase separation による分画

fimbriae の Triton X-114 を用いた phase separation による分画は既報の方法に準じて行った (12)。*fimbriae* (1~2 mg/ml) に Triton X-114 を 1% になるように加え、氷浴中で 5 分間静置した後 37°C に移してさらに 5 分間静置した。その後、20,000 g で 3 分間遠心して 2 層に分離させ、その上層を回収した。Phase separation を 3 サイクル行った後、残存した Triton X-114 は Bio-Beads (SM-2) (Bio-Rad, Hercules, CA) (100 mg beads/ml protein) に吸着させて除去した。Bio-Beads (SM-2) には endotoxin が混入しているため、既報にしたがって処理した後、180°C で 3 時間加熱して用いた (12)。

***Limulus* gelation test による endotoxin の測定**

残存した LPS は、*Limulus* gelation test により測定した。測定はサンプルと標準 LPS の 10 倍連続希釈系列を作成し、希釈サンプルと *Limulus* lysate を 2 : 1

の割合で混合させ、37°Cで60分間または120分間インキュベートした後、ゆっくり傾けて逆さまにしても液面が動かないものをゲル化陽性と判定した。サンプルと標準LPSの最終ゲル化濃度を比較してLPS濃度を決定した。3サイクルのphase separationによって、未分画fimbriae中の*Limulus gelation* 活性 (1 µg LPS/mg protein 相当) は約1,000分の1の1 ng LPS/mg protein 相当まで除去されたことが確認できた。

好中球および単核球の調製

好中球は看護師が採血したボランティアの末梢静脈血から、dextran sedimentation によって得た白血球画分をFicoll-Hypaque (Histopaque) gradient centrifugation により単核球画分と顆粒球画分に分離して得た。上層から単核球を回収した。下層の好中球を含む画分から低張食塩水 (0.2% NaCl) 処理により混在する赤血球を除去して好中球を得た。好中球はさらに20% Histopaque に重層し遠心することにより残存する血漿タンパクとヘモグロビンを除去した。両細胞ともリン酸緩衝化食塩水 (PBS) に浮遊させた。単核球画分には約28%の単球が含まれていた。得られた好中球画分の95%が好中球であり、単球の混在は0.1%であった (5)。好中球 (1.25×10^5 cells in 50 µl) の培養にはポリスチレンチューブを用いた。チューブは1%血漿で2時間coatingし、その後1 mlのPBS

にて2回洗浄したものを用いた。この coating 操作は好中球による非特異的活性化を消失させるために行った。

好中球の priming の測定

好中球の priming は、好中球 (5×10^6 cells/ml) と LPS または fimbriae を、血清の存在下、または非存在下で、 37°C 、30 分間培養した後、 1 mM Ca^{2+} 、 1 mM Mg^{2+} 、 0.2% glucose を含む $20 \mu\text{M}$ cytochrome c 存在下に $1 \mu\text{M}$ fMLP と 37°C 、7 分間培養し、遠心の後、上清中の還元された cytochrome c を測定することによって O_2^- 量を算出した。 O_2^- の算出ではその上清の 542 nm 、 550 nm 、及び 556 nm における吸光度を測定し、3つの値から isosbestic point を求め、真の 550 nm の吸光度を得た。この値から cytochrome c の吸光係数 $0.021 \mu\text{M}^{-1}$ を用いて O_2^- の濃度を計算した (5)。

付着による O_2^- 産生の測定

付着による O_2^- 産生の測定には精製 fimbriae で2時間 coating した後、type IV collagen ($30 \mu\text{g/ml}$)にて blocking を施したポリスチレンチューブを用いた。LPS によって priming した好中球 (1×10^6 cells/ml) を fimbriae にて coating したチューブ内で 1 mM Ca^{2+} 、 1 mM Mg^{2+} 、 0.2% glucose を含む $20 \mu\text{M}$ cytochrome c とともに

37°C、60 分間培養した後、細胞浮遊液を採取し、その遠心上清の還元 cytochrome c を測定した。浮遊細胞を除去した後の試験管を PBS にて洗浄後、試験管に付着した細胞の総蛋白を定量し、加えた細胞の総蛋白に対する割合を算出し、細胞の付着とした (6)。

IL-1 β および IL-8 産生誘導の測定

単核球 (0.5×10^6 cells/ml) または好中球 (1×10^6 cells/ml) を 10% 非働化牛胎児血清を含有あるいは非含有 RPMI1640 培地に浮遊させ、fimbriae とともに 37°C で 5% CO₂ 存在下に 16 時間 polystyrene tube 内あるいは 96 穴マイクロプレート内で培養後、上清中の IL-1 β および IL-8 の濃度を ELISA 法 にて測定した (17)。

統計分析

結果は、平均値 \pm 標準誤差として示した。統計上の有意差はマッキントッシュコンピューターの StatView program II を用いて Analysis of variance 解析と Scheffe's の F-test を組み合わせて評価し、5%の危険率で有意と判定した。

結果

fimbriae による好中球の priming

まず、Triton X-114 による分画を行っていない SDS-PAGE/electro elution によって精製した fimbriae が好中球の priming を起こすかどうか調べたところ、血清の存在しない条件下では、fMLP 刺激による O_2^- 産生はみられなかったが、血清存在下では、fimbriae の濃度依存性に priming が観察された (Fig. 1a)。非変性条件と変性条件の 2 通りの方法で得た fimbriae を比べると、非変性 fimbriae の方が活性は高かったが、大きな差はなかった(data not shown)。そのため、以下の結果は、変性条件の SDS-PAGE/electro elution によって精製した fimbriae を用いたものを示している。2 通りの方法によって精製された fimbriae には、*Limulus* lysate gelation test で、ともに $1 \mu\text{g}/\text{mg}$ protein の LPS に相当する *Limulus* lysate gelation 活性が含まれていることが確認された。そこで、 $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ - polymyxin B で前処理した fimbriae を用いて調べると、fimbriae による priming は抑制された (Fig. 1a)。この結果より、未処理の fimbriae で起こった priming は、混在している LPS の作用である可能性が生じたので、TritonX-114 を用いた Phase separation により、fimbriae を分画した。その結果、精製 fimbriae の gelation 活性を 1/1000 まで、すなわち LPS $1 \mu\text{g}/\text{mg}$ protein 相当から LPS $1 \text{ ng}/\text{mg}$ protein 相当程度まで除去できた。LPS 以外の疎水性物質がどこまで除去できたかについては調べて

いない。分画した fimbriae を用いて priming 効果を調べると、Fig. 1b に示すように、分画した fimbriae には、血清の存在する条件下においても、fMLP 刺激による好中球の O_2^- 産生の増強はみられなかった。このことより、fimbriae 自体には priming をおこす活性はないことが示された。なお *P. gingivalis* 由来 LPS による priming は 10 ng/ml 以上の濃度で観察された (7)。

Fig. 1

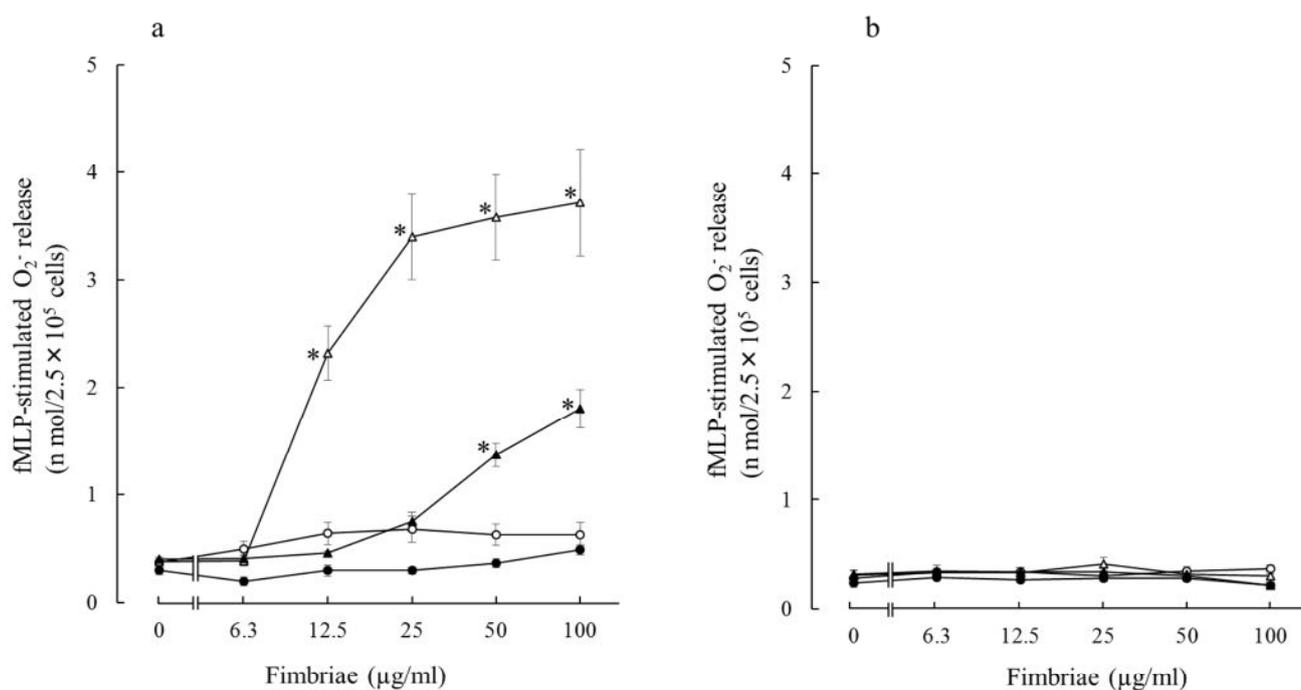


Fig. 1 Neutrophil priming activity of *P. gingivalis*-derived fimbriae.

Fimbriae was treated with Triton X-114 to remove endotoxin or other hydrophobic substances as described in Materials and Methods. Increasing concentrations of fimbriae were pre-incubated with PBS or 10 mg/ml-polymyxin B at 37°C for 60 min. Neutrophils (2.5×10^6 cells/ml) were incubated with fimbriae in the presence or absence of 1%-serum at 37°C for 30 min and then stimulated with 1 mM-fMLP at 37°C for 7 min. **Left panel:** untreated fimbriae, **right panel:** Triton X-114-treated fimbriae.

○, -serum, -polymyxin B; ●, -serum, +polymyxin B; △, +serum, -polymyxin B; ▲, +serum, +polymyxinB. The results are the means \pm SE from six experiments.

*Significantly different from the results without fimbriae at the 95% confidence level.

fimbriae による付着依存性の O_2^- 産生

次に、LPS により prime された好中球が不動化 fimbriae に付着し、付着依存性の活性酸素産生応答を示すかどうかを検討した。まず、ポリスチレンチューブへの非特異的付着によって起こる O_2^- 産生を除くため、数種類のタンパクの blocking 効果を試したところ、type IV collagen が効果的であることが確認できた (data not shown)。Triton X-114 処理 fimbriae でコートした後 type IV collagen で blocking したチューブを用いて以下の実験を行った。Triton X-114 処理 fimbriae, fibrinogen, plasma で coating したチューブ内で LPS で priming した好中球を培養し、付着と付着による O_2^- 産生を調べた (Fig. 2a)。その結果、fimbriae は fibrinogen, plasma と同様 (6)、付着と付着による O_2^- 産生を引き起こした。fimbriae への付着による O_2^- 産生のタイムコースを調べると、60 分にわたって産生が続くことが分かった (data not shown) (6)。この O_2^- 産生のタイムコースは、LPS によって priming された好中球を fMLP 刺激した際、3 分から 4 分で O_2^- 産生が終息するのと対照的であり、付着による活性酸素産生に特徴的な長時間にわたる応答を示した (6)。

次に図に示した濃度の Triton X-114 処理 fimbriae でコートしたチューブ内で LPS によって priming された好中球を培養し、 O_2^- の産生を調べると、コートする fimbriae の濃度依存性に O_2^- 産生量の増加がみられた (Fig. 2b)。この O_2^- 産

生が付着に依存したものであるかどうかを確認するため、 Mg^{2+} を除いた、非付着条件での O_2^- の産生と付着細胞数を測定した。すると、 Mg^{2+} を除いた条件では、付着細胞の減少とともに O_2^- 産生が減少した (data not shown)。これらの結果から fimbriae には priming された好中球を付着させ、付着により O_2^- 産生を誘導する活性があることが分かった。

さらに LPS で priming した好中球を抗 β_2 integrin 抗体 (5 μ g/ml) とインキュベートした後、抗体存在下に Triton X-114 処理 fimbriae で coating した試験管内で培養し、この抗体が O_2^- 産生と付着にどのような影響を与えるかを調べた。抗体非存在下で培養した好中球、コントロール IgG1 を用いて培養した好中球と比較し、 β_2 integrin の α 鎖、 β 鎖いずれに対する抗体で処理しても O_2^- の産生と付着の減少がみられた。特に抗 CD11c 抗体である FK24 による処理で強い抑制がみられた (Fig. 2c)。この結果より、fimbriae は LPS で priming した好中球に対し、 β_2 integrin を介して付着し、付着依存性に O_2^- 産生を誘導することが示された。

Fig. 2a

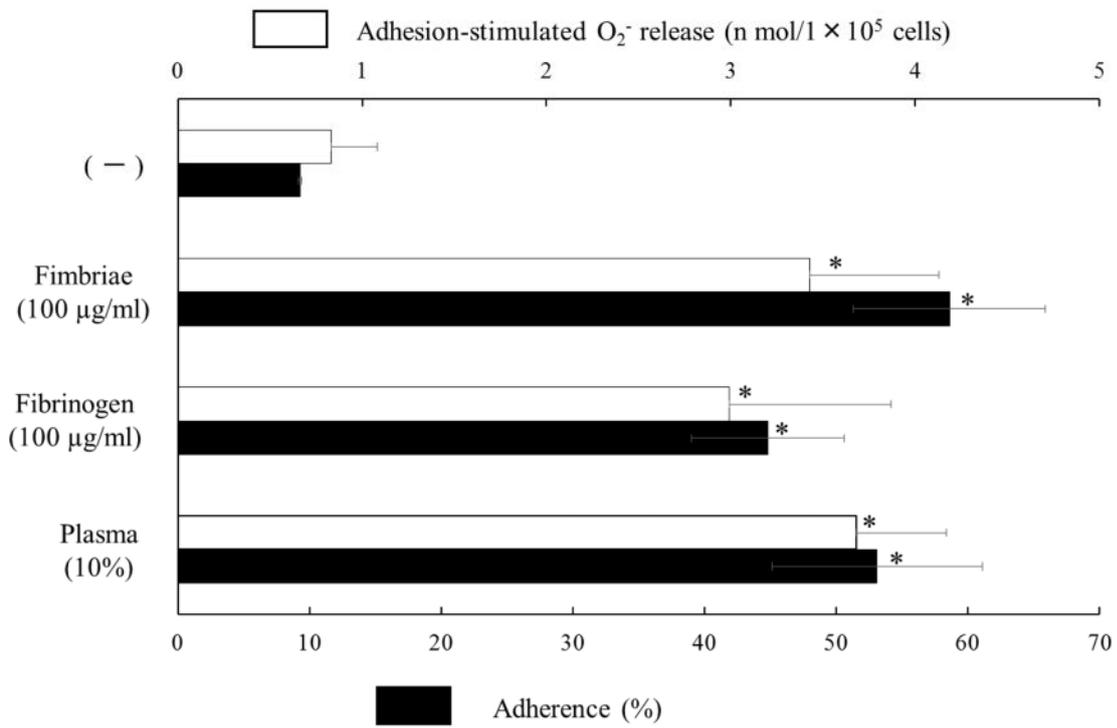


Fig. 2b

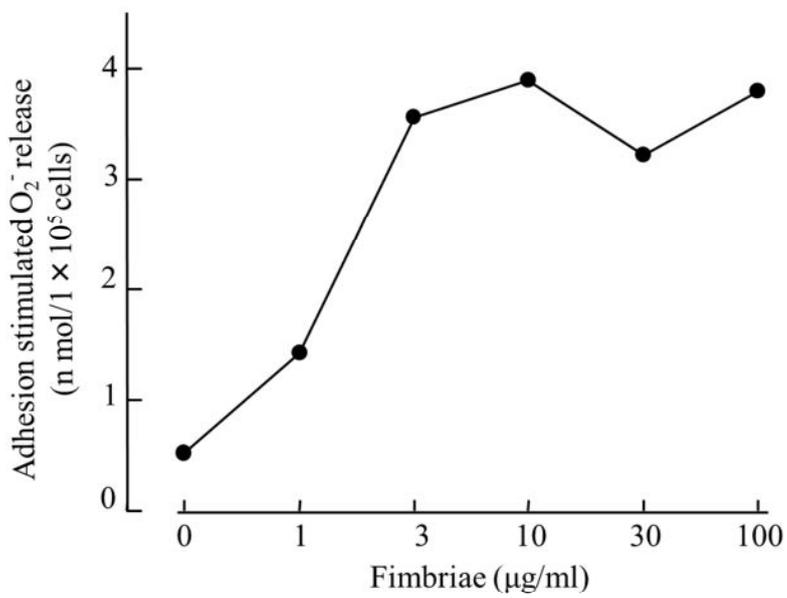


Fig.2c

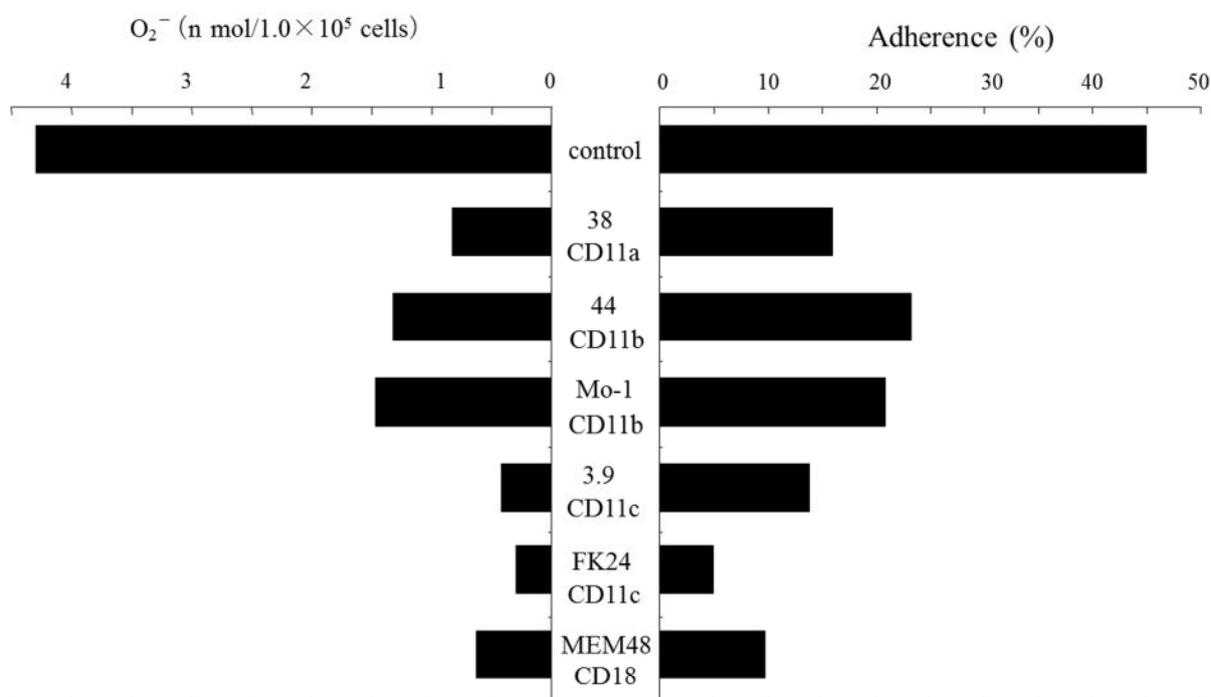


Fig. 2 Fimbriae-induced adhesion-stimulated O₂⁻ release by LPS-primed neutrophils.

a) Adhesion-stimulated O₂⁻ release by LPS-primed neutrophils. Polystyrene tubes were coated with 100 µg/ml-fimbriae, 100 µg/ml-fibrinogen or 10%-serum and then blocked with type IV collagen. LPS-primed neutrophils (1 x 10⁶ cells/ml) were incubated in protein-coated tubes at 37°C for 60 min, and adhesion-stimulated O₂⁻ release and adhesion of neutrophils to protein-coated tubes were determined as described in Materials and Methods.

Open bar, adhesion-stimulated O₂⁻ release; close bar, adherence. The results are the means ± SE from six experiments. *Significantly different from the results without fimbriae at the 95% confidence level.

b) Dose effect of fimbriae on adhesion-stimulated O₂⁻ release. Polystyrene tubes were coated with indicated concentrations of fimbriae for 2 h, blocked with 30 mg/ml-type IV collagen and then washed twice with PBS. LPS-primed neutrophils (1 x 10⁶ cells/ml) were incubated in fimbriae-coated tubes with cytochrome c at 37°C for 60 min followed by determination of O₂⁻. Results were means from two independent experiments.

c) Effect of treatment of LPS-primed neutrophils with anti-b2 integrin antibody.

LPS-primed neutrophils were incubated with antibodies as indicated in figure at 0°C for 30 min and then incubated in fimbriae-coated tubes at 37°C for 60 min. After the incubation, O₂⁻ release and adhesion were determined. Results were means from two independent experiments.

fimbriae による好中球の IL-8 産生

まず、好中球を Triton X-114 処理 fimbriae とともに培養後、上清中の IL-8 を測定した。その結果、血清非存在下で fimbriae は濃度依存性に IL-8 の産生を誘導することが観察された (Fig. 3a)。対照として用いた LPS は血清非存在下の条件では、*P. gingivalis* LPS と *E.coli* LPS のいずれも IL-8 産生は誘導されなかった。同じ条件下で、血清を添加しその影響を見たところ、血清を加えると LPS による IL-8 産生は濃度依存性に観察されるようになったが、血清添加は Triton X-114 処理 fimbriae による IL-8 産生を増加させることはなかった。このことより Triton X-114 処理 fimbriae による IL-8 産生は、非常に低レベルながら混在していることが考えられる LPS および lipoprotein の作用ではないことが示唆された。更に fimbriae または LPS を polymyxin B (10 µg/ml) で処理して調べたところ、polymyxin B 処理により LPS による IL-8 産生は抑制されたが、fimbriae による IL-8 産生は、影響を受けなかった (data not shown)。Triton X-114 処理 fimbriae による IL-8 産生のタイムコースを調べたところ、時間依存性に IL-8 産生の上昇がみられ、16 時間でほぼプラトーに達した (data not shown)。

次に、ポリスチレンチューブ を種々の濃度の Triton X-114 処理 fimbriae で coating した後、type IV collagen で blocking を施すことによって、固相化 fimbriae を調製した。この固相化 Triton X-114 処理 fimbriae 上で好中球を培養して IL-8 産

生を調べると、coatingする fimbriae の濃度依存性に IL-8 産生の増加がみられた。

固相化 Triton X-114 処理 fimbriae においても溶液状 Triton X-114 処理 fimbriae で好中球を培養した場合と同程度の IL-8 産生誘導が観察された (Fig. 3b)。対象として用いた固相化 fibrinogen と固相化血漿タンパクには活性は無かった。

Fig. 3a

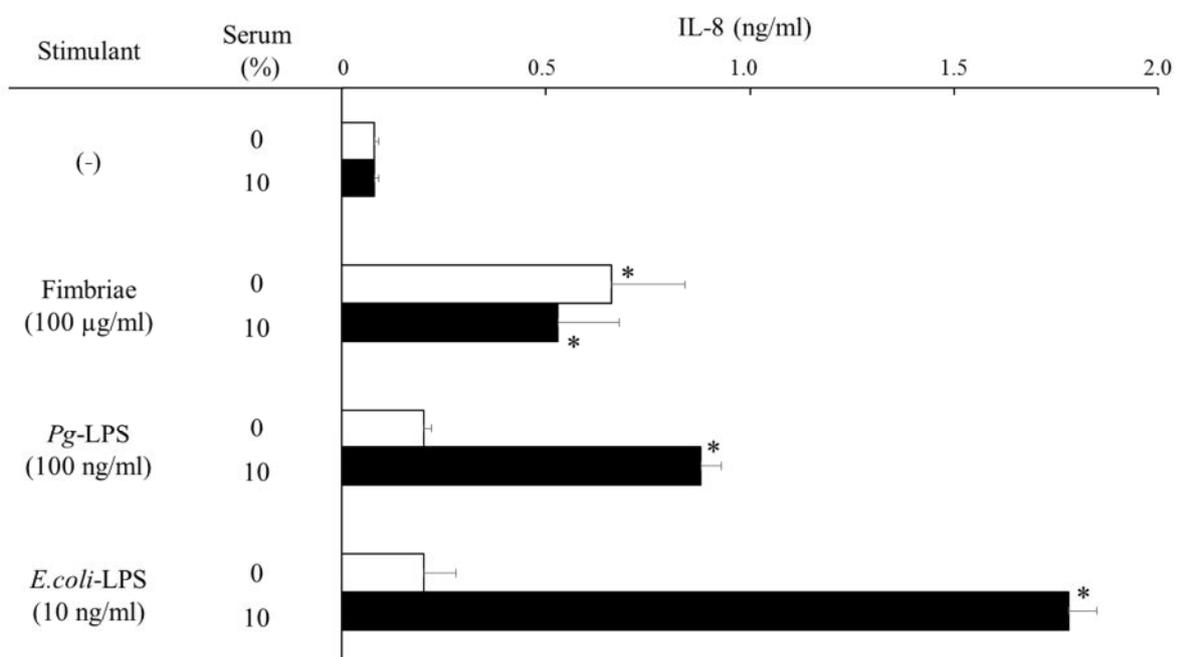


Fig. 3b

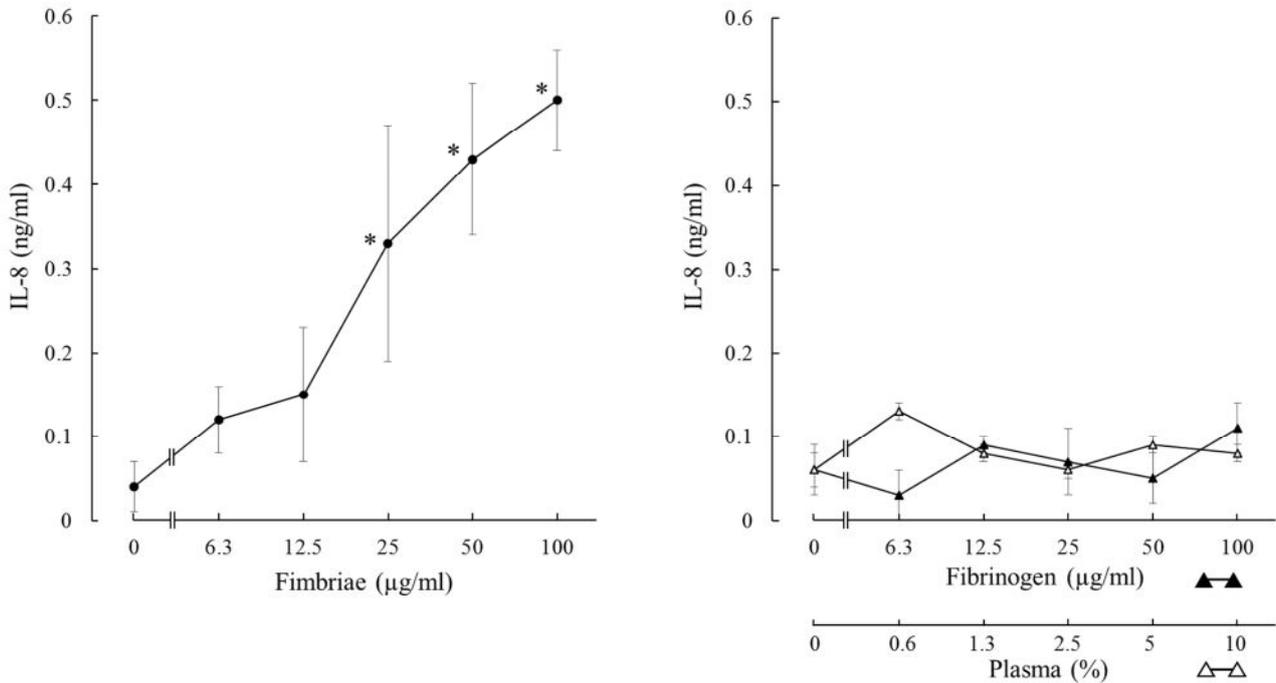


Fig. 3 Fimbriae-induced IL-8 production by neutrophils.

a) IL-8 induction by soluble form of Triton X-114-treated fimbriae. Neutrophils (2.5×10^6 cells/ml) were cultured with fimbriae or LPS in the presence or absence of 10%-serum at 37°C for 16 h in 5% CO_2 , and IL-8 in the supernatant was determined. The results are the means \pm SE from six experiments. *Significantly different from the results without stimulant at the 95% confidence level.

b) Surface-bound fimbriae-induced IL-8 production by neutrophils. Polystyrene tubes were coated with increasing concentrations of fimbriae, fibrinogen or plasma and then blocked with type IV collagen. Neutrophils (2.5×10^6 cells/ml) were cultured without serum at 37°C for 16 h in 5% CO_2 , and IL-8 in the supernatant was determined. The results are the means \pm SE from four experiments. *Significantly different from the results without fimbriae, fibrinogen or plasma at the 95% confidence level.

fimbriae による単核球の IL-1 β 産生誘導

単核球をそれぞれ Triton X-114 処理 *P. gingivalis*-fimbriae, *P. gingivalis*-LPS, *E. coli*-LPS と培養し、産生された IL-1 β 量を測定した (Fig. 4a)。Triton X-114 処理 fimbriae はわずかながら IL-1 β 産生を誘導した。血清添加によりわずかに産生は増加したが、*P. gingivalis*-LPS, *E. coli*-LPS による IL-1 β 産生が血清の添加により著明に上昇したのとは対照的であった。

fimbriae による単核球の IL-8 産生誘導

通法にしたがって調製された fimbriae には LPS の混入があり、通法にしたがって調製された *P. gingivalis* 由来 LPS には lipoprotein の混入があることが報告されている (18) ことから、本研究で用いた phase separation によって分画された *P. gingivalis* 由来 fimbriae にも依然として LPS と lipoprotein の残存が想定される。したがって以下の実験において TLR2 のリガンドである lipopeptide, Pam₃ と peptidoglycan, TLR4 のリガンドである LPS を対照として単核球からの IL-8 産生誘導能を Triton X-114 処理 fimbriae と比較した。

単球を含む単核球を血清 (5%) の存在あるいは非存在下に種々の濃度の Triton X-114 処理 fimbriae を用いて培養し、産生された IL-8 を測定した (Fig. 4b)。Triton X-114 処理 fimbriae は濃度依存性に単核球からの IL-8 産生を誘導した。血清存在下では非存在下よりも応答が強く認められたが、血清存在下では

fimbriae 非添加群においても IL-8 産生が認められ、両者のグラフは平行移動した形を呈したので、Triton X-114 処理 fimbriae による IL-8 産生誘導の血清依存性は弱いと考えた。一方、対照として用いた Pam₃, peptidoglycan, LPS による単核球の IL-8 産生誘導は明らかな血清依存性を示した。このことは fimbriae の IL-8 産生誘導は lipoprotein あるいは LPS によるものではないことを示唆する。これらの結果より、Triton X-114 処理 fimbriae, 10 µg/ml の IL-8 産生誘導活性は *E. coli* LPS, 0.01 ng/ml あるいは Pam₃, 0.1ng/ml の活性と同等であったことから、X-114 処理 fimbriae は単核球に作用して IL-8 産生を誘導するが、作用は Pam₃ や LPS に比べて著しく弱いものであることが分かった。データを示していないが、TNF-α 産生も IL-8 産生と同様であった。

以上の結果から、*P. gingivalis* の fimbriae には好中球の priming を誘導する活性はないが、弱いながら好中球に対して IL-8 産生を、単核球に対して IL-1β 産生と IL-8 産生を誘導する活性がある事が示された。用いた Triton X-114 処理 fimbriae には依然としてわずかながら夾雑物が残存しており、それらを除去した fimbriae を用いた実験により fimbriae のサイトカイン産生誘導能が真に fimbriae の持つ活性なのかどうか明らかになるものと考えられる。

Fig. 4a

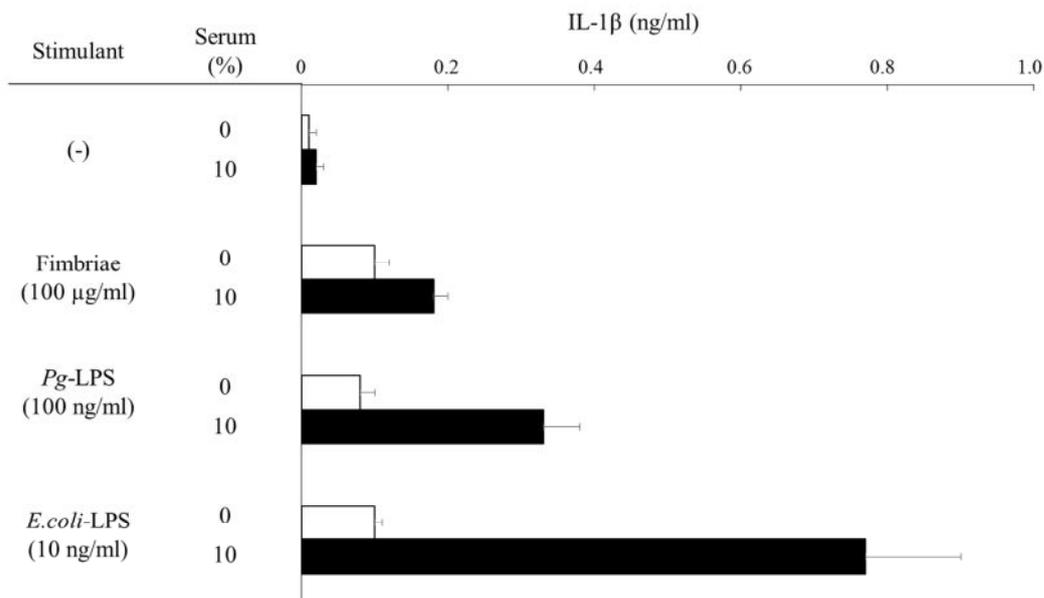


Fig. 4b

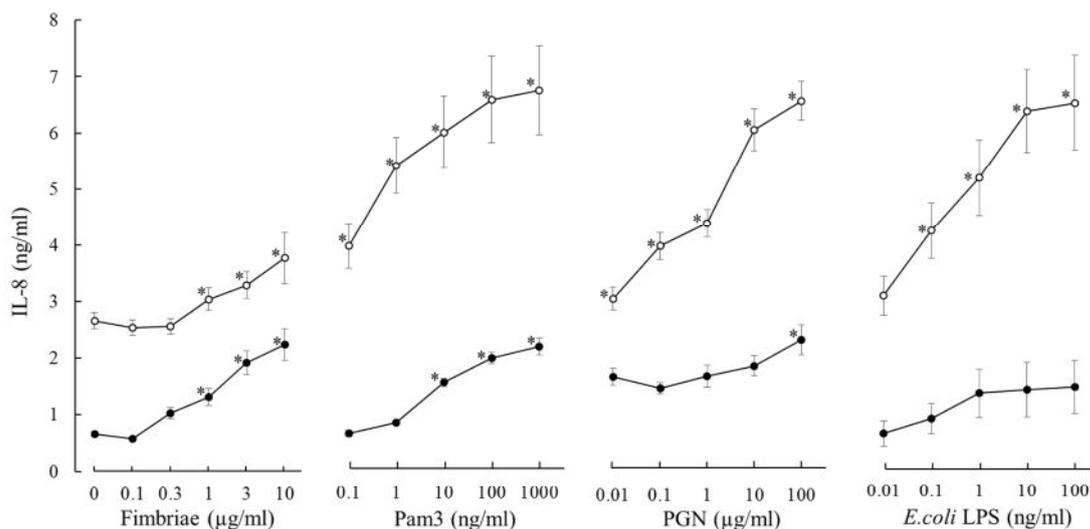


Fig. 4 Fimbriae-induced cytokine production by mononuclear cells.

a) Fimbriae-induced IL-1β production by mononuclear cells. Mononuclear cells (1×10^6 cells/ml) were cultured with fimbriae, *P gingivalis*-LPS or *E. coli*-LPS at indicated concentrations in the absence or presence of serum at 37°C for 16 h in 5% CO₂ and IL-1β in the supernatant was determined. The results are the means ± SE from three experiments.

*Significantly different from the results without fimbriae, fibrinogen or plasma at the 95% confidence level.

b) Fimbriae-induced IL-8 production by mononuclear cells. Mononuclear cells (1×10^6 cells/ml) were cultured with increasing doses of stimulants shown in figure in the presence or absence of 5% serum at 37°C for 16 h in 5% CO₂ and IL-8 in the supernatant was determined.

○, +serum; ●, -serum. The results are the means ± SE from four experiments. *Significantly different from the results without fimbriae, fibrinogen or plasma at the 95% confidence level.

考察

グラム陰性細菌が産生した種々の活性タンパク質を研究に用いる際、混在する LPS に特に注意を払うべきであるとの指摘がある (19)。かつて混在する lipoprotein を除去した *E. coli* LPS を用いた研究が、LPS 認識における TLR2 の関与を否定した (20)。また、リコンビナント蛋白が示すサイトカイン産生誘導が混在した LPS によるものであることが判明した例は少なくない (21)。本研究では混在する菌体成分として LPS にのみ注目していたが、むしろ LPS より lipoprotein が重要であることを示す結果の報告 (18, 22)、あわせて lipoprotein も Triton X-114 による分画において LPS 同様可溶性タンパクから分離できることを示す結果 (23, unpublished observation) とを考え合わせて考察した。

未処理の精製 fimbriae は、好中球の priming をおこしたが、fimbriae を Triton X-114 処理することによって混在している LPS を始めとする疎水性活性物質を除去することで、Triton X-114 処理精製 fimbriae は好中球に priming をおこす活性はもたないことが明らかになった (Fig. 1)。好中球の priming を誘導しないという結果は LPS を始めとする疎水性活性物質の除去は完全ではないにしても、好中球が応答する限界以下にまでこれらを除去できていることを示すと考える。*P. gingivalis*-LPS は TLR4 の antagonist である LA-14-PP によって抑制されないことが報告されている (7)。この結果を現在の知見に基づいて考察する

と、*P. gingivalis*-LPS には TLR4 以外のリガンド、おそらく TLR2 のリガンドが含まれていることが考えられる。

また一方で、*P. gingivalis*-LPS は *E. coli*-LPS に対して拮抗作用を示すことが報告されている (24, 25) ことから、*P. gingivalis*-LPS は TLR4 に結合はするが刺激伝達は惹起しないと考えられる。さらに *P. gingivalis*-LPS には lipoprotein が含まれており、lipoprotein の線維芽細胞からの IL-8 産生を誘導する活性は *P. gingivalis*-LPS の 1,000 倍であり、加えて *P. gingivalis*-LPS から調製した lipid A には IL-8 誘導活性はほとんどなかったとの報告 (22)、および *P. gingivalis* の lipoprotein 欠損株から調製した LPS には TLR2 および TLR4 を介した線維芽細胞からの IL-6 産生誘導活性はほとんどなかったとの報告 (18) を考え合わせると、*P. gingivalis*-LPS には proinflammatory な活性はなく、*P. gingivalis*-LPS の示す活性は混在する lipoprotein によるものであると考えられる。実際に、合成 *P. gingivalis*-lipid A (神奈川歯科大・梅本教授より分与)には好中球の priming を誘導する活性は認められなかった (unpublished observation)。Fimbriae についても同じように考えることができる。すなわち、fimbriae には contaminant として *P. gingivalis*-LPS と *P. gingivalis*-lipoprotein が含まれており、fimbriae が示す活性はやはり混在する *P. gingivalis*-lipoprotein によるものであるという考えが成り立つ。*P. gingivalis*-fimbriae の TNF- α 誘導活性が lipoprotein lipase によって消失すること

が報告されており、fimbriae 中の lipoprotein が活性の本体である可能性が指摘されている (26)。細菌由来 lipoprotein は Triton X-114 を用いた分画では Triton X-114 相に濃縮されることが報告されている (23) ので、本研究で用いられた fimbriae 中の lipoprotein は LPS と同様に fimbriae から除去されていると考えられる。今回用いた Triton X-114 によって分画された fimbriae には *P. gingivalis*-LPS と *P. gingivalis*-lipoprotein が微量しか残存していなかったために好中球の priming が観察されなかった。しかし残存 *P. gingivalis*-lipoprotein がわずかに IL-8 産生を誘導したと考えられる。

Lipoprotein による細胞活性化は CD14 および LPS binding protein (LBP) 依存性であること (27)、また LBP と CD14 を介して TLR2 と複合体を形成することが報告されている (28)。さらに TLR4 欠損マウスは *P. gingivalis* 菌体に対して、サイトカイン産生を示したが TLR2 欠損マウスでは認められなかったとの報告 (29) は *P. gingivalis* 菌体は TLR2 のリガンドを持っているが、TLR4 のリガンドを持っていないことを示し、*P. gingivalis*-fimbriae の自然免疫刺激活性が *P. gingivalis*-fimbriae 中の lipoprotein ではないかという仮説を支持するものである。

また、LPS によって priming を受けた好中球は試験管に固相化された fimbriae に応答して、付着依存性の O_2^- の産生を惹き起こすことが観察された

(Fig. 2)。Mg²⁺の存在しない条件、また、抗 β_2 integrin 抗体で好中球を前処理した条件では、付着細胞量の減少とともに、O₂⁻ の産生量が減少したことから、fimbriae は、活性化した好中球に β_2 integrin を介して付着し、結果的に応答を起こさせることが示された。この点に関しては fibrinogen を用いた結果と類似していた (unpublished observation)。 *P. gingivalis*-fimbriae と *P. gingivalis*-LPS はともに TLR2 を介した刺激伝達系を使うが、他の accessory signaling または ligand binding receptor (TLR1-2/CD14/CD11b/CD18) の関与において異なるパターンを示すことが報告されている (30)。

しかしながら、*P. gingivalis*-lipoprotein の関与の可能性を想定した考察はなされていない。Triton X-114 処理 fimbriae には好中球に IL-8 産生を誘導する活性はごくわずかしか認められなかった。Polystyrene tube に固相化した Triton X-114 処理 fimbriae は好中球に対して IL-8 産生を誘導したが、溶液中の fimbriae と同等の応答であった (Fig. 3b)。また、Triton X-114 処理 fimbriae による単核球の IL-8 産生誘導には、血清依存性は認められず、誘導の強さは Pam₃、peptidoglycan および LPS に比べて著しく弱いものであることが分かった (Fig. 4b)。また、*P. gingivalis*-LPS による単核球の IL-1 β 産生は好中球の priming と同様 LA-14-PP の影響を受けなかったことから、*P. gingivalis*-LPS 標品中の LPS とは異なる夾雑物が IL-1 β 産生を誘導していることが考えられる (17)。

P. gingivalis-fimbriae には 6 種類あり、最も広く分布しているのが type 2 であること、また type 2 fimbriae 保有 *P. gingivalis* の病原性が高いことが報告されている (1)。*P. gingivalis* 株の中の type 2 fimbriae 保有株、ATCC53977 株から fimbriae と考えられる単一のタンパクを精製してそのサイトカイン誘導活性を単核球で調べたところ type 1 fimbriae より高かったという結果 (未発表) を得ているが、精製 type 2 fimbriae を用いた報告が 1 つしかなく、用いた fimbriae の精製度の信頼性に疑問があったので結果を示さなかった。

以上の結果から、今後はより純度の高い *P. gingivalis* 由来 type 1 fimbriae, type 2 fimbriae, lipoprotein および LPS を調製し、それらを用いて *P. gingivalis* 菌体成分の自然免疫活性化物質の本体を検索していく必要があると考えられる。

第2章：マクロライドによる好中球のスーパーオキシド産生

抑制のメカニズム

緒言

マクロライドは、その抗菌活性とは別に好中球の respiratory burst の抑制、マクロファージによる炎症性メディエーターやサイトカイン産生の抑制を含む抗炎症活性を持つことが報告されてきた (31, 32)。EM703 と EM900 は北里生命科学研究所にて作られたエリスロマイシンAの新しい 12 membered ring derivatives であり、抗菌活性はないが抗炎症作用があることが報告されている (33, 34)。これらの薬剤による抗炎症作用は主として種々の細胞からのサイトカイン産生を抑制することを通じて発揮されることが報告されているが、好中球機能に及ぼす作用に関する報告はない。マクロライドは好中球、マクロファージ、線維芽細胞といった細胞の中に蓄積され、これらの細胞からゆっくりと放出されることがわかっている (35-37)。

好中球は病原体を一掃するだけでなく、組織破壊にも重要な役割を果たす (38)。好中球は3つの異なる表現形を持つ：resting な状態、priming を受けた状態、活性化された状態である (39)。LPS や Tumor necrosis factor (TNF)- α の刺激を受けた好中球は、priming を受けた状態となる。priming を受けた好中球は

N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine (fMLP) 等の刺激や付着など、第2の刺激に応答し superoxide anion (O_2^-) を産生する。 O_2^- 産生酵素である活性型 NADPH oxidase は好中球の表現形の変化に伴って、細胞膜上で cytochrome b₅₅₈ (p22phox と gp91phox / NOX2 の2つの膜貫通タンパク質)、3つの細胞質側のタンパク質 (p47phox、p67phox、p40phox) および GTP アーゼ (Rac1 のまたは RAC2) により形成される (39)。 O_2^- に由来する種々の酸素由来反応性物質は病原体を殺傷するとともに組織破壊をも引き起こす鍵となる分子である (38)。好中球による O_2^- 産生はマクロライドにより抑制されることが示されている (40-46)が、抑制されないとの結果も複数報告されており (47-49)、マクロライドが抗炎症作用を起こすメカニズムについては未だ不明な点が多い。

この研究において、6種類のマクロライドが好中球の活性酸素産生に及ぼす効果を調べた。すなわち4つのマクロライド、エリスロマイシン、アジスロマイシン、ロキスロマイシン、クラリスロマイシン、そして2つのエリスロマイシン由来の誘導体 EM703, EM900 の計6種の薬剤を用いた。pH 8.0 以上の条件下でマクロライドを用いて好中球を前処理することにより効果的に O_2^- 産生を抑制することが分かった。マクロライドは resting な好中球にも、priming を受けた好中球にも有効であった。アジスロマイシンは NH_4Cl によりその取り込みが抑制されることを示唆する結果を得た。アジスロマイシンは LPS により誘

導される脱顆粒に伴う cytochrome b₅₅₈ の発現に影響は与えなかったことから、アジスロマイシンが NADPH oxidase の活性化過程を抑制するものではないことが分かった。EM703 と EM900 は、生理的 pH (7.4) において O₂⁻ 産生を抑制した。

材料および方法

試薬

アジスロマイシンは Pfizer Pharmaceutical Inc. より分与を受けた。アジスロマイシン、エリスロマイシン、ロキシロマイシン、クラリスロマイシンは LKT Laboratories Inc. (St. Paul, MN) より購入した。EM703 と EM900 は砂塚敏明教授 (北里研究所、東京) より分与を受けた。マクロライドはジメチルスルホキサイド (DMSO) にて 10 mg/ml に溶解した。LPS は *Escherichia coli* (*E. coli*) K235 由来のものを Dr. Floyd McIntire より分与された (14)。Cytochrome c、phorbol myristate acetate (PMA)、Histopaque 1077 は Sigma Chemical Co (St. Louis, MO) より購入した。fMLP は Vega Biochemical (Tucson, AZ) より購入した。Dextran (分子量 : 200,000–300,000, LPS-free) は ICN Biomedicals Inc. (Cleveland, OH) より購入した。Triton X-100, p-nitrophenol phosphate, 2-amino-2-methyl-propanol, H-2-hydroxyethylpiperazine-N-2-ethanesulfonic acid (HEPES), DMSO は

Wako Pure Chemical Industries (Tokyo, Japan)より購入した。FITC 標識 anti-CD11b mAb、Bear-1 は Sanbio (Uden, Netherlands)から購入した。マウス anti-cytochrome b₅₅₈ mAb は中村三千夫教授 (長崎大学)から分与された (50)。FITC 標識ヤギ anti-mouse immunoglobulin G (IgG)は Kirkegaard & Perry Laboratories Inc. (Gaithersburg, MD)より購入した。

好中球の調製

好中球は看護師が採血したボランティアの末梢静脈血から、クエン酸ナトリウムを抗凝固剤として用い、以下の方法で調製した。赤血球をデキストランにより沈殿除去した後、白血球画分を Histopaque に重層し、遠沈により好中球と単核球を分離した。好中球に残存した赤血球は低張食塩水 (0.2%)にて溶血除去した。好中球各画分に残存する血清タンパクは好中球を 20% Histopaque に重層したのち遠沈することにより完全に除去した。好中球は、 5×10^6 cells/ml になるよう PBS pH7.2 に浮遊化させた。こうして調製されたものは、96%以上が好中球であり、単核球の混入は 0.1%であった (5, 6)。

好中球の培養

好中球 (1.25×10^5 cells in 50 μ l)の培養にはポリスチレンチューブを用いた。チューブは1% 血漿で2時間 coating し、その後1 ml の PBS にて2回洗浄したものを用いた。この coating 操作は好中球による非特異的活性化を消失させるために行った。

LPS もしくは fMLP により priming を受けた好中球の調製

LPS による好中球の priming は、好中球 (1.25×10^5 cells in 50 μ l)を LPS (10 ng/ml) および1% 血漿とともに37°Cで30分培養し、行った。その後 PBS にて2回洗浄した。fMLP による priming は、好中球を1 μ M fMLP と1 mM CaCl_2 存在下にて37°C、5分間培養し行い、その後洗浄し再度 5×10^6 cells/ml になるよう PBS に懸濁した。

好中球による O_2^- 産生の測定

fMLP 刺激による O_2^- 産生: O_2^- の産生は superoxide dismutase 感受性チトクロム c の還元により測定した (5)。LPS と培養したのち好中球 (2.5×10^6 cells/ml)を1 μ M fMLP にて、20 μ M cytochrome c, 1 mM CaCl_2 , 0.2% glucose 存在下に37°C、7分間刺激した。

PMA による O_2^- 産生

好中球を 1 mM $CaCl_2$ と 20 μM cytochrome c 存在下に 30 分間 PMA (10 ng/ml) にて刺激して、産生された O_2^- を測定した。

付着による O_2^- の産生： priming を受けた好中球を 1% 血漿で coating したチューブを用いて 20 μM cytochrome c, 1 mM $CaCl_2$, 1 mM $MgSO_4$, 0.2% glucose 存在下で 37°C、60 分間インキュベートした (5)。

O_2^- の測定：培養の後、好中球を 3,000 g、5 分間遠沈し、その上清の 542 nm, 550 nm, および 556 nm における吸光度を測定し、3 つの値から isosbestic point を求め、真の 550 nm の吸光度を得た。この値から cytochrome c の吸光係数 0.021 μM^{-1} を用いて O_2^- の濃度を計算した (5)。

細胞膜上のアルカリフォスファターゼ活性の測定

好中球のアルカリフォスファターゼ活性は、0.5% Triton X-100 の存在下で細胞を可溶化し総活性を、Triton X-100 非存在下にて細胞表面に存在する活性を測定し、2 つを比較することで測定した (5)。アルカリフォスファターゼ活性は *p*-nitrophenol phosphate (1 mg/ml) を基質として 0.1 M 2-amino-2-methyl-propanol (pH10.0), 10 mM $MgCl_2$ 中に 37°C で 60 分間反応させ、その後、0.02 M NaOH を添加し、2000 g にて 5 分間遠沈して細胞培養

上清を得た。上清の 410 nm における吸光度を測定し、細胞表面のアルカリフォスファターゼ活性 (-Triton X-100) の総活性 (+Triton X-100) に対する割合として、結果を解析した。

CD11b とチトクロム b₅₅₈ の発現

CD11b を secretory vesicles, specific granules, gelatinase granules の脱顆粒のマーカーとして用いた (51, 52)。好中球 (1.25×10^5 cells in 50 μ l) を、FITC-conjugated anti-CD11b mAb (1 μ g/ml) 存在下、氷浴中で 30 分間インキュベートした。チトクロム b₅₅₈ は mAb 7D5 (1,000 倍希釈したハイブリドーマ播種マウスの腹水) を用いて既報に従って測定した (50)。好中球は氷中にて 30 分間インキュベートした後、PBS にて洗浄し、さらに、FITC-conjugated goat anti-mouse IgG (5 μ g/ml) 存在下で 30 分間培養した。抗体の好中球への結合はフローサイトメーター (Ortho cytoron, Ortho Diagnostic Systems, Westwood, MA) にて分析を行った。総数 5,000~100,000 の好中球について蛍光強度を測定し、結果は蛍光強度の平均値、mean fluorescence intensity (MFI) として表記した。

Sephadex G-25 による血清のゲル濾過

ゲル濾過にはガラス製カラム (直径 18 mm, 総容積 131 ml) を用い、PBS で平衡化した Sephadex G-25 を用いた。分画は 3 ml/tube で行った。Void volume と total column volume はそれぞれアルブミンと 2メルカプトエタノールの溶出位置を $A_{280\text{ nm}}$ の吸光度として測定した結果より算定した。自然に凝固した血液から採取した血清を Sephadex G-25 にて分画し、溶出された各フラクションのタンパク濃度と pH を測定した。

統計分析

結果は、平均値±標準誤差として示した。統計上の有意差はマッキントッシュコンピュータの StatView II プログラムを用いて Analysis of variance 解析と Scheffe's の F-test を組み合わせて評価し、5%未満の危険率で有意と判定した。

結果

好中球の LPS による priming に及ぼすアジスロマイシンの影響

好中球 (2.5×10^6 cells/ml) をアジスロマイシン ($50 \mu\text{g/ml}$) と 10% 血清存在下に 37°C にて培養した。その後洗浄し、続けて 1% 血漿存在下で LPS (10 ng/ml) を加え、 37°C 、30 分間培養した。培養後、好中球を $1 \mu\text{M}$ fMLP により 37°C 、7 分間刺激し、産生された O_2^- を測定した。Fig. 5a に示すように、アジスロマイシンで 60 分間前処理することにより fMLP 刺激 O_2^- 産生は抑制された。前処理における 0%~30% の血清の効果を試したところ、10% 以上の血清がアジスロマイシンの抑制効果には必要であることが示された (Fig. 5b)。前処理における種々の濃度のアジスロマイシンについて調べたところ、10% 血清存在下でアジスロマイシンは濃度依存性に好中球の fMLP 刺激による O_2^- 産生を抑制した (Fig. 5c)。

Fig. 5

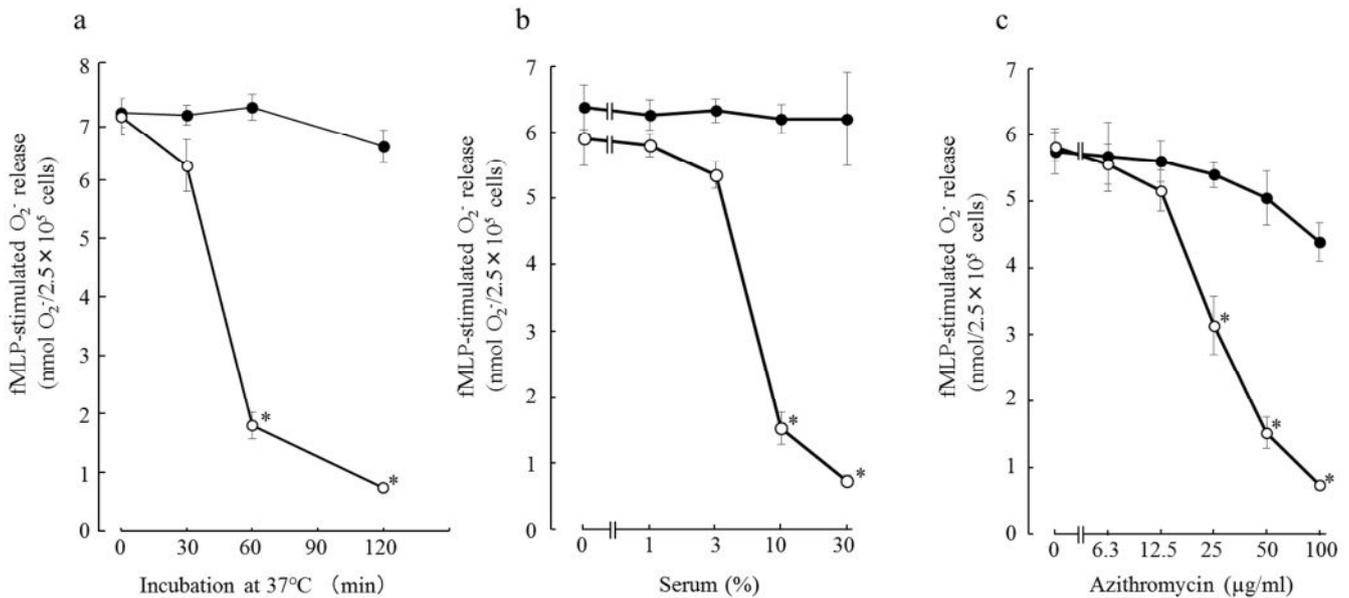


Fig. 5 AZ inhibited LPS-induced priming of neutrophils for enhanced release of fMLP-stimulated O₂⁻.

Neutrophils (2.5×10^6 cells/ml) were pre-incubated with AZ at 37°C. After the pre-incubation, neutrophils were washed and then further incubated with LPS (10 ng/ml) in the presence of 1% plasma at 37°C for 30 min, followed by stimulation by 1 µM fMLP at 37°C for 7 min. After the incubation, neutrophils were centrifuged at 3,000 g for 5 min and O₂⁻ released in the supernatant was determined as described in the Materials and Methods. The results are the means ± SE from six experiments. *Significantly different from the results without macrolide at the 95% confidence level.

a) Requirement of pre-incubation of neutrophils with AZ. Neutrophils were pre-incubated with PBS (●) or AZ (50 µg/ml) (○) in the presence of 10% serum for up to 120 min at 37°C. After the incubation, cells were washed and determined for LPS-induced priming for enhanced release of fMLP-stimulated O₂⁻.

b) Dose effect of serum on the inhibition of priming by LPS. Neutrophils were incubated with PBS (●) or AZ (50 µg/ml) (○) in the presence of increasing concentrations of serum at 37°C for 60 min. After the incubation, cells were washed and then incubated with LPS plus plasma, followed by determination of fMLP-stimulated O₂⁻ release.

c) Dose effect of AZ on the LPS-induced priming of neutrophils. Neutrophils were incubated with increasing concentrations of AZ in the presence (○) or absence (●) of 10% serum at 37°C for 60 min. After the incubation, cells were washed and then incubated with LPS plus plasma, followed by determination of fMLP-stimulated O₂⁻ release.

そこで好中球へのアジスロマイシンの作用に対する血清の役割について調べた。血清を Sephadex G-25 にて分画し、蛋白量を $A_{280\text{ nm}}$ にてモニターし、それぞれの画分の pH を測定した (Fig. 6)。ほぼすべての蛋白が void volume に溶出された。小分子量の画分は高い pH を示した。それぞれの画分が、アジスロマイシンの好中球の O_2^- 産生へ及ぼす影響を調べた。すると、アジスロマイシんと共に高い pH を示した画分を 10% 加えることにより fMLP による O_2^- 産生が抑制されることが分かった (Fig. 6)。この結果を支持するものとして、透析した血清にはアジスロマイシンによる fMLP の O_2^- 産生抑制作用を増強する効果が認められないという結果を得ている。

Fig. 6

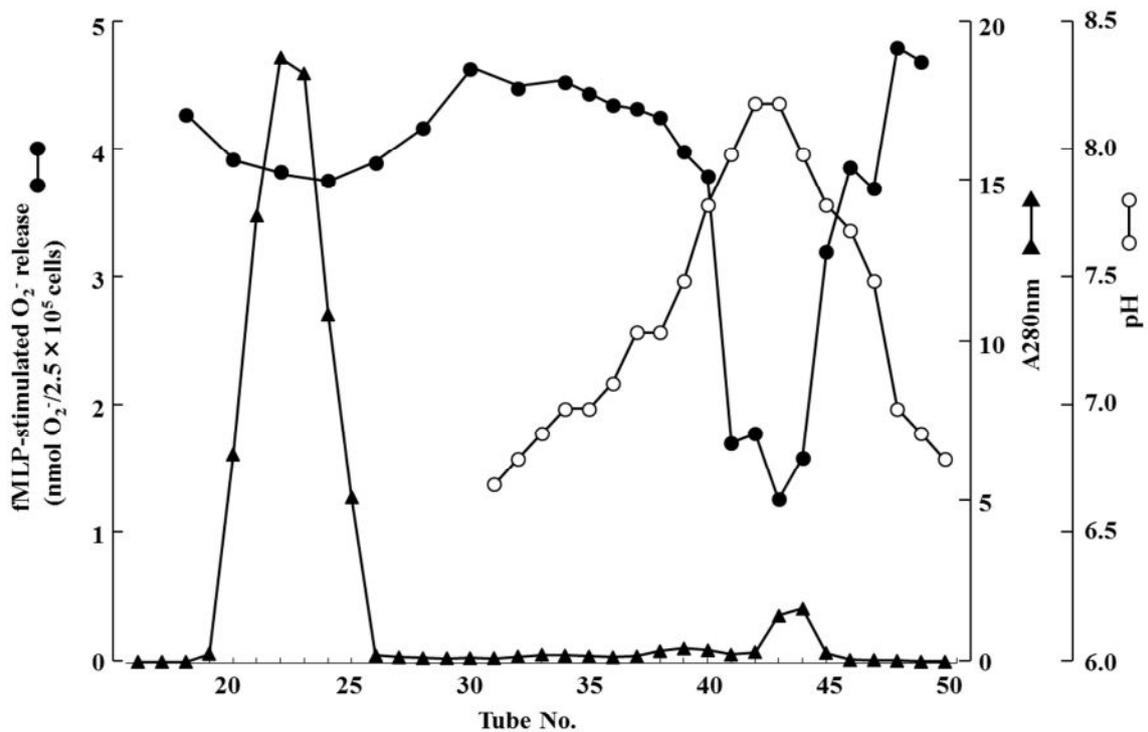


Fig. 6 Characterization of serum components that mediated AZ-induced inhibition of fMLP-stimulated O_2^- generation by LPS-primed neutrophil

Serum (2.6 ml) was fractionated on Sephadex G-25 (total bed volume: 131 ml) and fractions (3ml/tube) were determined for protein (A280 nm) and pH. Neutrophils were incubated with each fraction at 10% in the presence of AZ (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) at 37 $^\circ\text{C}$ for 60 min. After the incubation, neutrophils were washed and determined for the LPS-induced priming for enhanced release of fMLP-stimulated O_2^- . Results are representative of three similar experiments.

▲, A280 nm; ○, pH; ●, fMLP-stimulated O_2^- release.

好中球の付着による O_2^- 産生、また未処理好中球の PMA による O_2^- 産生に及ぼすマクロライドの影響

予備実験において、Sephacx G-25 分画における小分子量画分に塩酸を加えると発泡したことから、小分子量画分には $NaHCO_3$ が含まれていることが示唆されたので、以下の実験を行った。fMLP で priming を受けた好中球の付着による O_2^- 産生へ及ぼす $NaHCO_3$ の影響をエリスロマイシン、アジスロマイシン、ロキシスロマイシン、クラリスロマイシンについて調べた。fMLP で priming を受けた好中球を、2.5 mM $NaHCO_3$ (pH~8.0) 存在下で、マクロライドで前処理し、その後洗浄した。続いて、付着刺激による O_2^- 産生を測定した。マクロライドは濃度依存性に付着刺激による O_2^- 産生を抑制した (Fig. 7a)。抑制効果はマクロライドの種類によって異なっていた。これらの結果は、マクロライドが resting な好中球と同様に priming を受けた好中球にも影響を与えることを示している。加えて、血清は $NaHCO_3$ により代用でき、そのことは O_2^- 産生の抑制における血清の役割の少なくとも主要な部分が pH を高くすることであることを示している。実際、10% 血清の pH は 8.1 であった。

次に PMA 刺激による O_2^- 産生におけるマクロライドの影響を調べた。

Resting な好中球を 10% 血清存在下で 37°C、60 分間マクロライドで前処理して洗浄した後、1 mM $CaCl_2$ と 20 μ M cytochrome c 存在下に 30 分間 PMA (10 ng/ml)

で刺激し産生された $O_2\cdot$ を測定した。エリスロマイシンとクラリスロマイシンは強い抑制効果を示さなかったが、アジスロマイシンとロキシスロマイシンは PMA 刺激による $O_2\cdot$ 産生を強く抑制した (Fig. 7b)。これらの結果から、マクロライドは resting な好中球、priming を受けた好中球の双方に作用し、PMA による刺激、priming を受けた後の付着刺激による $O_2\cdot$ 産生も抑制することが分かった。そして、好中球による $O_2\cdot$ 産生の抑制効果はアジスロマイシン=ロキシスロマイシン>クラリスロマイシン>エリスロマイシンの順であった。

Fig. 7

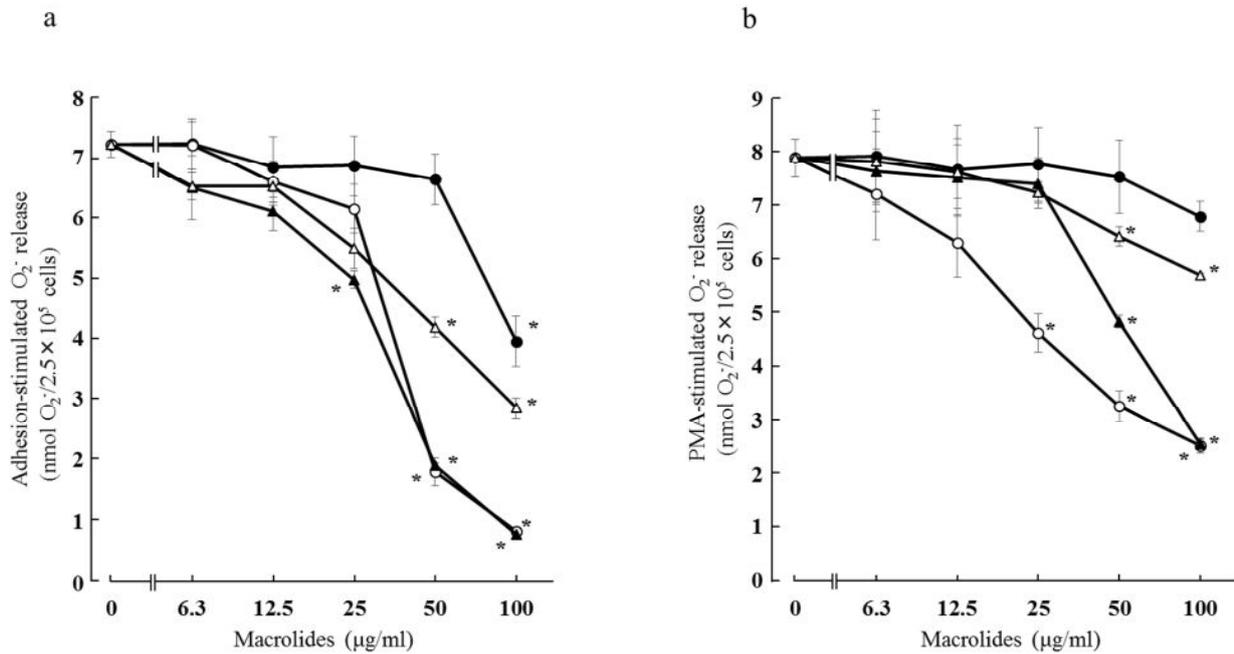


Fig. 7 Macrolides on adhesion-stimulated or PMA-stimulated O₂⁻ generation by neutrophils

a) Effects of macrolides on adhesion-stimulated O₂⁻ generation by fMLP-primed neutrophils in the presence of NaHCO₃.

fMLP-primed neutrophils were prepared by the incubation of neutrophils with 1 µM fMLP in the presence of 1 mM CaCl₂ at 37°C for 5 min. fMLP-primed neutrophils (2.5×10^6 cells/ml) were incubated with increasing concentrations of macrolides in the presence of 2.5 mM NaHCO₃ at 37°C for 60 min and then washed, followed by incubation at 37°C for 60 min in plasma-coated tubes, as described in Materials and Methods.

●, Erythromycin; ○, Azithromycin; ▲, Roxithromycin; △, Clarithromycin. The results are the means ± SE from three experiments. *Significantly different from the results without macrolide at the 95% confidence level.

b) Effects of macrolides on PMA-stimulated O₂⁻ release

Neutrophils (2.5×10^6 cells/ml) were incubated with increasing doses of macrolides in the presence or absence of serum (10%) at 37°C for 60 min and then washed followed by the stimulation with PMA (10 ng/ml) at 37°C for 30 min. After the incubation, cells were centrifuged and O₂⁻ released in the supernatants was determined.

●, Erythromycin; ○, Azithromycin; ▲, Roxithromycin; △, Clarithromycin. The results are the means ± SE from three experiments. *Significantly different from the results without macrolide at the 95% confidence level.

fMLPにより priming を受けた好中球の付着刺激による O_2^- 産生に対するアジスロマイシンの抑制作用への塩化アンモニウムの影響

塩化アンモニウムはアジスロマイシンを取り込んだ好中球からアジスロマイシンの放出を促進することが報告されている (36)。無刺激好中球におけるアジスロマイシンの作用における塩化アンモニウムの影響を見るため、アジスロマイシンで resting な好中球を前処理し、その後 fMLP により priming を行い、付着刺激による O_2^- 産生を測定した。無刺激好中球は、アジスロマイシンと 10% 血清、20 mM 塩化アンモニウム存在下で 37°C、60 分間 (1st) 培養した後洗浄し、その後 PBS 中でさらに 30 分間 (2nd) 培養した。その後好中球を fMLP により priming し、1% 血漿で coating したチューブにて 37°C、60 分間培養して付着による O_2^- 産生を調べた。すると、アジスロマイシンによる付着刺激による O_2^- 産生の抑制はみられなかった (Fig. 8, column 1)。

一方で、好中球をアジスロマイシンと血清存在下で 1 次培養し洗浄した後、塩化アンモニウムを添加して 2 次培養した際には、アジスロマイシンは付着刺激による O_2^- 産生の抑制を示した (column 4)。好中球を塩化アンモニウムとアジスロマイシンあるいは塩化アンモニウムと血清と 1 次培養しその後、血清あるいはアジスロマイシンと 2 次培養した場合は、付着刺激による O_2^- 産生は影響を受けなかった (column 2, 3)。1 次培養を塩化アンモニウム存在下で行い、

洗浄した後 2 次培養を血清およびアジスロマイシン存在下で行った場合、 $O_2^{\cdot -}$ 産生の抑制が起こった (column 5)。このことは塩化アンモニウムの効果は洗浄により除去されることを示している。アジスロマイシンあるいは血清存在下で 1 次培養し、その後血清存在下で塩化アンモニウムあるいはアジスロマイシン存在下で塩化アンモニウムと 2 次培養した場合、付着刺激による $O_2^{\cdot -}$ 産生は抑制を受けなかった (column 6, 7)。

これらの結果は、アジスロマイシンは血清と共に加えられたときにのみ効果を発揮し、血清と共に加えられたアジスロマイシンの抑制効果は細胞を洗うことでは影響を受けないことを示している。すべての条件において、1 次培養後の洗浄を省いても結果には影響を与えなかった (data not shown)。

塩化アンモニウムは Fig. 5 と同じ条件で cytochrome b_{558} の発現に影響を与えなかった (data not shown)。塩化アンモニウム (20 mM) それ自体は付着刺激による $O_2^{\cdot -}$ 産生に影響は与えなかった。クロロキンはアジスロマイシンの放出を引き起こすことが報告されている (36)。1 mM のクロロキンは $O_2^{\cdot -}$ 産生自体を抑制するためクロロキンはこの実験では用いることができなかった (not shown)。血清存在下にアジスロマイシンで前処理した好中球に塩化アンモニウムは影響を与えなかったという結果は、塩化アンモニウムがアジスロマイシンの取り込みを阻害している可能性を示唆している。

Fig. 8

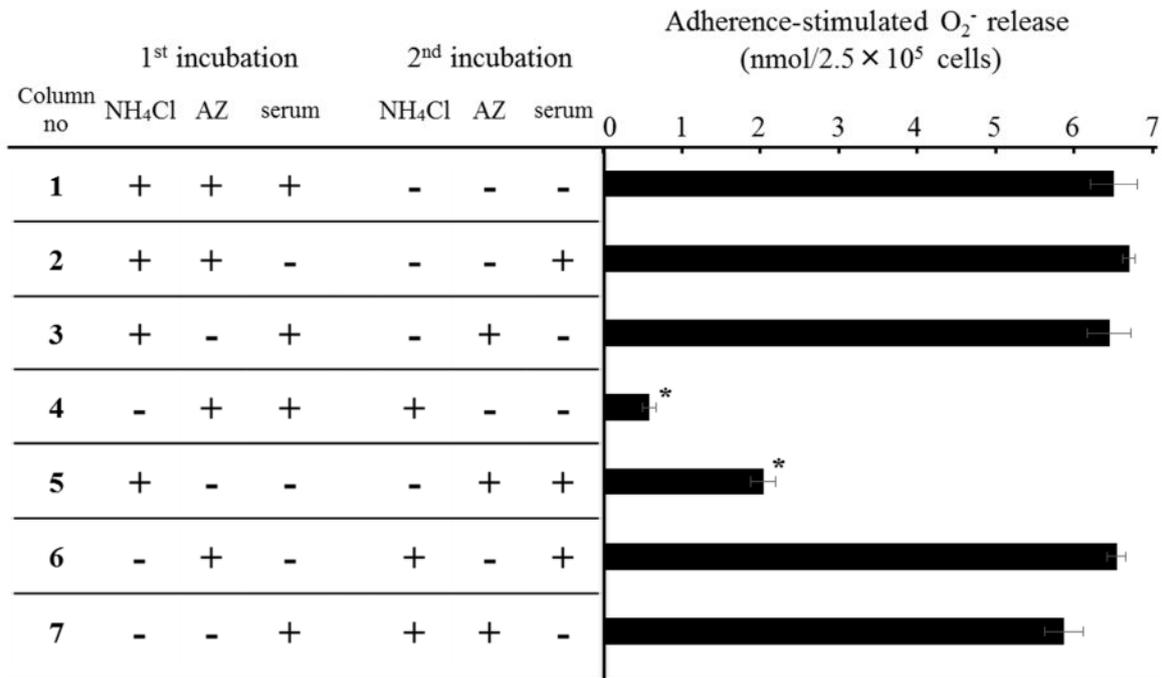


Fig. 8 Effect of ammonium chloride on AZ-induced inhibition of adhesion-stimulated O₂⁻ generation by fMLP-primed neutrophils

The effect of NH₄Cl on the action of AZ was examined by the pre-incubation of resting cells for further 30 min. Washed cells were primed by fMLP followed by incubation in plasma-coated tubes at 37°C for 60 min. **Column 2-4:** Neutrophils were first incubated with NH₄Cl plus AZ, NH₄Cl plus serum or AZ plus serum followed by washing and second incubation with serum, AZ or NH₄Cl, respectively. **Column 5-7:** Neutrophils were first incubated with NH₄Cl, AZ or serum followed by incubation with AZ plus serum, serum plus NH₄Cl or AZ plus NH₄Cl, respectively. Results were means ± SE from one experiment performed in triplicate.

*Significantly different from the results without AZ, 6.67 ± 0.06 nmol O₂⁻/ 1.25 × 10⁵ cells at the 95% confidence level.

無刺激好中球およびLPSにより priming を受けた好中球における顆粒動態に対するアジスロマイシンの影響

LPS や fMLP は好中球に作用して脱顆粒を起こすことが示されている (5)。

無刺激好中球あるいはLPSにより priming を受けた好中球でのアルカリフォスファターゼ、CD11b、cytochrome b₅₅₈ の膜発現にアジスロマイシンがどのような影響を与えるかを調べた。好中球を 10% 血清存在下に 37°C、60 分間アジスロマイシン処理し、洗浄した後 LPS 存在下、あるいは非存在下に 1%血漿で 37°C、30 分間培養した。培養後、アルカリフォスファターゼ、CD11b、cytochrome b₅₅₈ の発現を測定した。Fig. 9 に示すように、無刺激好中球においてアルカリフォスファターゼ、CD11b、cytochrome b₅₅₈ の発現はアジスロマイシンの影響を受けなかった。また、これらの分子の LPS による発現もアジスロマイシンの影響を受けなかった。並行して行った実験ではアジスロマイシンは LPS による好中球の priming を血清依存性に抑制した (Fig. 9d)。これらの結果は、アジスロマイシンが、脱顆粒に至る LPS の刺激伝達系に関与する分子に作用するものではないことを示唆するものであった。

Fig. 9

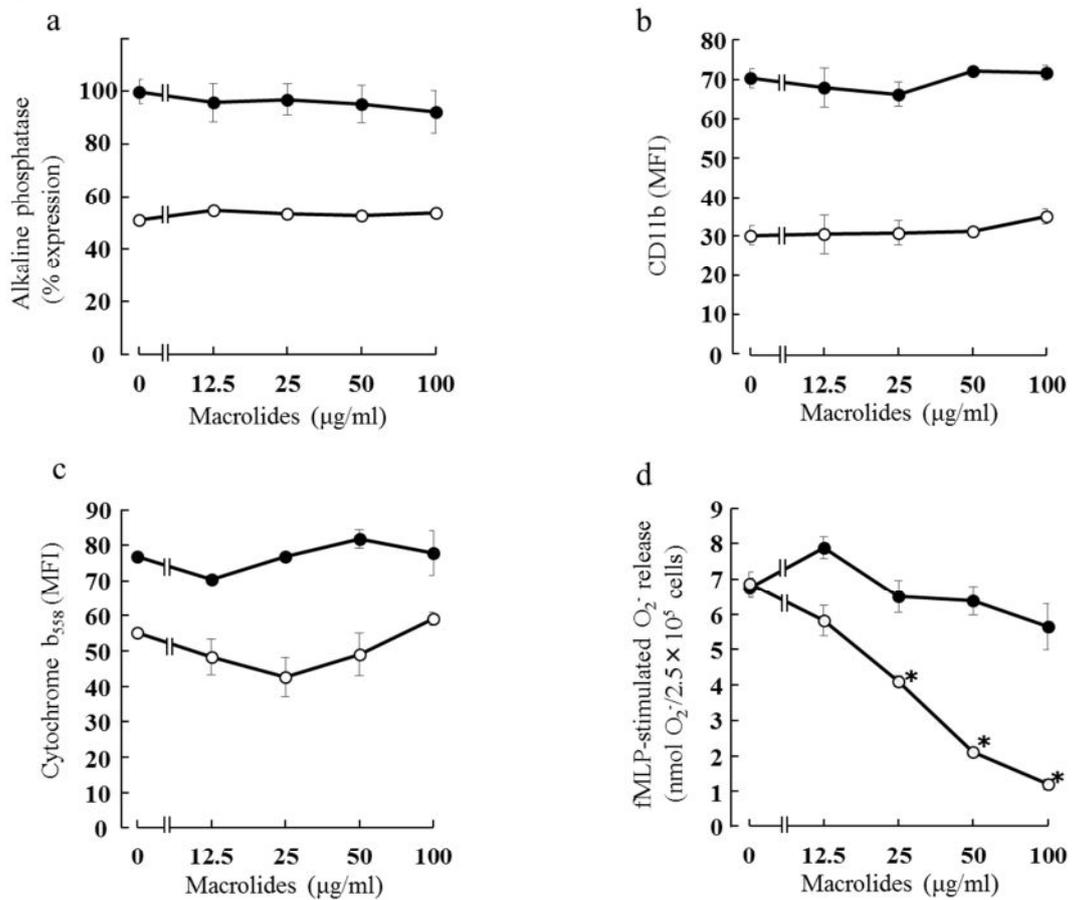


Fig. 9 Effect of azithromycin on the granule mobilization in neutrophils

Neutrophils (2.5×10^6 cells/ml) were incubated with increasing concentrations of AZ in the presence or absence of 10% serum at 37°C for 60 min and then washed. The washed neutrophils were used to determine the expressions of alkaline phosphatase, CD11b, or cytochrome b₅₅₈. The washed neutrophils were further incubated with 10 ng/ml LPS plus 1% plasma 37°C for 30 min; the fMLP-stimulated O₂⁻ release and the expressions of alkaline phosphatase, CD11b, or cytochrome b558 were then determined.

a-c) Effect of AZ on the responses of neutrophils to LPS. Neutrophils were incubated with AZ in the presence of serum (10%) and then washed, followed by incubation with PBS (○) or LPS (10 ng/ml) (●) in the presence 1% plasma. After the incubation, the expressions of alkaline phosphatase (a), CD11b (b), and cytochrome b558 (c) were determined as described in Materials and Methods.

d) Effect of AZ on LPS-primed fMLP-stimulated O₂⁻ release. Neutrophils were incubated with AZ in the presence (●) or absence (○) of serum (10%) and then washed, followed by determination of LPS-primed fMLP-stimulated O₂⁻ release. The results are the means ± SE from

three experiments. *Significantly different from the results without macrolide at the 95% confidence level.

fMLP により priming を受けた好中球の付着刺激による O_2^- 産生への EM703 と EM900 の影響

fMLP により priming を受けた好中球を EM703、EM900 あるいはアジスロマイシンと、pH の異なる HEPES buffer の中で 37°C、120 分間培養した。洗浄した後好中球を血漿で coating をしたチューブで、37°C、60 分間培養して付着刺激による O_2^- 産生を調べた。Fig. 10 に示すように、50 $\mu\text{g/ml}$ の EM703 は生理的な pH (7.4) で効果的に付着刺激による O_2^- 産生を抑制し、100 $\mu\text{g/ml}$ の EM703 はより強い抑制を示した。また EM900 (100 $\mu\text{g/ml}$) も pH7.4 で効果を示した。EM703 と EM900 は生理的な pH 下でアジスロマイシンより効果的に作用した。アジスロマイシンは生理的な pH にて有意な抑制を得るためには 100 $\mu\text{g/ml}$ の濃度を必要とした。

Fig. 10

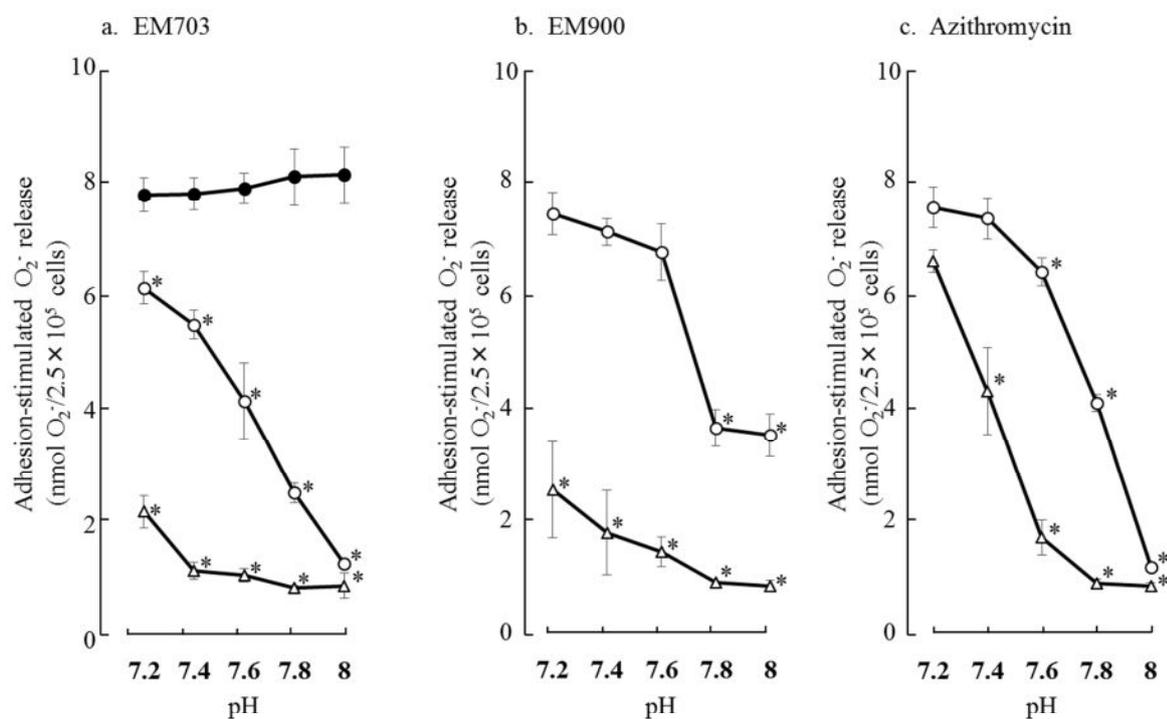


Fig. 10 pH-dependency of the effect of EM703 and EM900 on adhesion-stimulated O_2^- generation by fMLP-primed neutrophils

fMLP-primed neutrophils (2.5×10^6 cells/ml) were incubated with macrolides under different pH values at 37°C for 120 min and then washed. The washed neutrophils were incubated under adherence condition at 37°C for 60min and then centrifuged. The amount of O_2^- in the supernatant was determined. Macrolides: ●, 0 $\mu\text{g/ml}$; ○, 50 $\mu\text{g/ml}$; △, 100 $\mu\text{g/ml}$. The results are the means \pm SE of three experiments. *Significantly different from the results without macrolide at the 95% confidence level.

考察

無刺激好中球は、血漿存在下で LPS とあるいは fMLP と培養することで priming を受けた状態となる (5, 39)。無刺激好中球は、fMLP や付着による刺激に対しても少量の O_2^- しか産生しないが、LPS により priming を受けた好中球は fMLP、また Mg^{2+} 存在下でのチューブへの付着に応答し多量の O_2^- を産生する (5, 6)。また fMLP により priming を受けた好中球は付着に敏感に反応する。本研究では、刺激を受けていない好中球および priming を受けた好中球の活性酸素産生に対するマクロライドの影響を調べた。まず、刺激していない好中球をマクロライドで前処理し、LPS による fMLP 刺激 O_2^- 産生の priming 効果を調べた。さらに、LPS あるいは fMLP で priming を受けた好中球をマクロライドで処理し、付着刺激による O_2^- 産生を評価した。

アジスロマイシンは、刺激をしていない好中球に血清依存性に作用し、結果として LPS による priming を抑制した。アジスロマイシンが抑制的な効果を発揮するために必要な条件は以下の通りであった。(1) アジスロマイシン存在下で好中球を 60 分間以上培養すること、(2) 10% 以上の血清を添加すること、(3) 50 $\mu\text{g/ml}$ 以上のアジスロマイシンを用いること (Fig. 5)。アジスロマイシンが示す抑制効果における血清の役割を調べると、その一つは pH をあげることであることがわかった (Fig. 6)。4 種のマクロライドを 2.5 mM NaHCO_3 存在下で

fMLP により priming を受けた好中球と培養すると、付着による O_2^- 産生が抑制されることが観察された (Fig. 7a)。マクロライドはまた無刺激好中球の PMA 刺激による O_2^- 産生の抑制も起こした (Fig. 7b)。このように血清は $NaHCO_3$ で代用できることが分かった (Fig. 7a, b)。すなわちマクロライドの効果は pH 依存性であった。 O_2^- 産生抑制効果の強さは、アジスロマイシン=ロキシスロマイシン > クラリスロマイシン > エリスロマイシンであった。エリスロマイシンは、 O_2^- 産生抑制効果はわずかであった。

アジスロマイシンを好中球に作用させると細胞内に取り込まれることが報告されている (36)。好中球によるアジスロマイシンの取り込みの最適条件は pH8.7 であり (36)、ロキシスロマイシンの取り込みの最適条件は pH8.0 であるとされる (55)。ほかの報告では、アジスロマイシンの取り込みは血清依存性でないことが示されている (49)。ただこの報告では、好中球との培養の血清による pH の変化は、用いた培地、RPMI 1640 や Hanks balanced salt solution に緩衝作用があるため阻害されていた可能性は否定できない。エリスロマイシンとクラリスロマイシンの取り込みはアジスロマイシンより低く、60 分以内にプラトーに達することが示されている (35)。

本研究で好中球は血清存在下でアジスロマイシンを加える前に塩化アンモニウムにさらされると、アジスロマイシンの好中球の O_2^- 産生の抑制活性が

消失することを見出した。塩化アンモニウムは、サイトカラシン B あるいは PMA 存在下での fMLP による脱顆粒を抑制すること、その抑制はリソソーム内をアルカリ化する効果と関連することが報告されている (58)。塩化アンモニウムとクロロキンは好中球からアジスロマイシンの放出を著しく促進することが報告されている (36)。クロロキンは fMLP 刺激による O_2^- 産生を抑制したので本研究には使用できなかった。しかし塩化アンモニウムは抑制しなかったため以下の実験を行った。fMLP により priming を受けた好中球を塩化アンモニウム存在下にアジスロマイシン処理すると、付着刺激による O_2^- 産生に対するアジスロマイシンの抑制効果が消失した。好中球をアジスロマイシン処理した後に塩化アンモニウムを添加しても塩化アンモニウムの効果は認められなかった。このことは塩化アンモニウムが一旦取り込まれたアジスロマイシンの作用には影響しないことを示すものである。これらの結果は、塩化アンモニウムがアジスロマイシンの取り込みを阻害している可能性を示唆している (Fig. 9)。また、塩化アンモニウムは、LPS により priming を受けた好中球をアジスロマイシン存在下あるいは非存在下で培養しても、cytochrome b₅₅₈ の発現に影響を与えなかった。

アジスロマイシンは、無刺激好中球および LPS により priming を受けた好中球の両方において、アルカリフォスファターゼ、CD11b、cytochrome b₅₅₈ の発現に影響しなかった (Fig. 8)。これらの結果は、アジスロマイシンが顆粒の動態

に影響を与えるものではなく、LPS のシグナル伝達において NADPH oxidase のコンポーネントである cytochrome b₅₅₈ の発現亢進を含む、各種顆粒の動員に作用しないことを示している。

LPS により priming を受けた好中球において、cytochrome b₅₅₈ は細胞膜へ移動することが示されている (54, 59)。LPS と培養した好中球では、p67^{phox} でなく、p47^{phox} の細胞膜への膜移動が、LPS との培養に続いて fMLP で刺激した好中球においては、O₂[•] 産生に伴って p47^{phox} と p67^{phox} の膜移動が促進されることが報告されている (54)。Cytochrome b₅₅₈ の発現亢進はアジスロマイシンによる影響を受けないのでアジスロマイシンの O₂[•] 産生抑制における標的は cytochrome b₅₅₈ の細胞膜への移動ではなく NADPH oxidase の構成過程、特に p47^{phox} と p67^{phox} の膜へのトランスロケーションであると考えられる。LPS による priming において活性型 NADPH oxidase が構成されてくる過程の中で、cytochrome b₅₅₈ の upregulation はアジスロマイシンによる影響を受けなかった。このことは、アジスロマイシンが、cytochrome b₅₅₈ の upregulation 以外の過程に作用することを示している。ロキシスロマイシンは NADPH oxidase の活性化を阻害し、p47^{phox} と p67^{phox} の膜へのトランスロケーションを減少させることが報告されている (45)。それとは別にアジスロマイシンが付着刺激による O₂[•] 産生をほぼ完全に抑制することから、マクロライドは活性化した NADPH oxidase 自体の活性を抑制する

可能性も考えられる。

EM703 と EM900 はエリスロマイシン由来誘導体であり、そのものに抗菌活性がない (33, 34)。EM703 は抗炎症活性を示し、気管支上皮細胞における NF- κ B のシグナル経路を抑制 (33)するとともに、TGF- β シグナル (58)、そしてタイプ I コラーゲンの転写抑制を行うことが示されている (59)。EM900 は、ヒト気管支由来上皮細胞で炎症性サイトカインの誘導を抑制することが示されている (34)。これら誘導体の好中球に対する作用は分かっていない。EM703 と EM900 は fMLP により priming を受けた好中球による付着刺激による O₂⁻ 産生を抑制した。EM703 と EM900 の特徴はアジスロマイシンと比較してより低い pH でも作用を発揮することである。このことは、これらの薬剤が生理的条件下で抗炎症活性を発揮するという利点を有していることを示すものである。近年マクロライドの抗炎症作用が注目され種々の疾患に用いられつつある。臨床上、マクロライドは長期服用を要する疾患に用いられることが多く、耐性菌の出現が問題となっている。耐性菌の出現を防ぐ上で、これら抗菌活性を示すことなく抗炎症作用をもつ薬剤は有効である。本研究で示した結果はこれらの薬剤が種々の細胞の炎症性サイトカイン産生を抑制するのみならず、好中球の活性化に伴う組織破壊をも抑制する可能性を示すものであり、近年報告されつつある歯周炎におけるアジスロマイシンの著明な効果の機序の 1 つを示すものと考え

られる。

謝辞

E. coli-LPS を分与くださった Floyd McIntire 教授 (コロラド大)、*P. gingivalis*-LPS を分与くださった高田春比古教授 (東北大)、合成 *P. gingivalis*-lipid A を分与くださった梅本俊夫教授 (神奈川歯科大) に感謝いたします。

Azithromycin を分与くださった Pfizer Pharmaceutical Inc. に、EM703 および EM900 を分与くださった砂塚敏明教授 (北里研究所、東京) に、anti-cytochrome b₅₅₈ を分与くださった中村三千夫教授に感謝いたします。宮本智文博士および大村智博士のご協力に感謝いたします。

参考文献

1. ENERSEN M., K. NAKANO and A. AMANO. 2013. *Porphyromonas gingivalis* fimbriae. *J. Oral Microbiol.* **5**:20265.
2. PATHIRANA R.D., N.M. O'BRIEN-SIMPSON and E. C. REYNOLDS. 2010. Host immune responses to *Porphyromonas gingivalis* antigens. *Periodontology 2000.* **52**:218-237.
3. SCOTT, D.A. and J.L. KRAUSS. 2012. Neutrophils in periodontal inflammation. *Front. Oral Biol.* **15**:56-83.
4. WEISS, S.J. 1989. Tissue destruction by neutrophils. *N Engl J Med.* **320**:365-376.
5. AIDA, Y., and M. J. PABST. 1990. Priming of neutrophils by lipopolysaccharide for enhanced release of superoxide. Requirement for plasma but not for tumor necrosis factor- α . *J. Immunol.* **145**:3017-3025.
6. AIDA, Y., and M. J. PABST. 1991. Neutrophil responses to lipopolysaccharide. Effect of adherence on triggering and priming of the respiratory burst. *J. Immunol.* **146**:1271-1276.
7. AIDA, Y., T. KUKITA, H. TAKADA, K. MAEDA and M.J. PABST. 1995. Lipopolysaccharide from periodontal pathogens prime neutrophils for enhanced respiratory burst: Differential effect of a synthetic lipid A precursor IVa (LA-14-PP). *J. Periodont. Res.* **30**:116-123.

8. SHAPIRA, L., B. GORDON, M. WARBINGTON, and T.E. VAN DYKE. 1994. Priming effect of *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide on superoxide production by neutrophils from healthy and rapidly progressive periodontitis subjects. *J. Periodontl.* **65**:129-133.
9. ASAI, Y., Y. OHYAMA, K. GEN, and T. OGAWA. 2001. Bacterial fimbriae and their peptides activate human gingival epithelial cells through Toll-like receptor 2. *Infect. Immun.* **69**:7387-7395.
10. SAHINGUR, S.E., T.K. BOEHM, H.T. SOJAR, A. SHARMA, and E.DENARDIN. 2006. Fibrinogen-neutrophil interaction in response to fMLP and *Porphyromonas gingivalis* fimbrial peptides. *Immunol. Invest.* **35**:63-74.
11. HAROKOPAKIS, E., and G. HAJISHENGALLIS. 2005. Integrin activation by bacterial fimbriae through a pathway involving CD14, Toll-like receptor 2, and phosphatidylinositol-3-kinase. *Eur. J. Immunol.* **35**:1201-1210.
12. AIDA, Y., and M. J. PABST. 1990. Removal of endotoxin from protein solutions by phase separation using Triton X-114. *J. Immunol. Methods.* **132**:191-195.
13. TAKADA, H., H. HIRAI, T. KOGA, T. OGAWA, and S. HAMADSA. 1990. *Bacteroides* lipopolysaccharides (LPS) induce anaphylactoid and lethal reactions in LPS-responsive and –nonresponsive mice primed with muramyl dipeptide.

- J. Infect. Dis.* **162**:428-434.
14. MCINTIRE, F. C., G. H. BARLOW, H. W. SIEVERT, R. A. FINLEY, and A. L. YOO. 1969. Study on a lipopolysaccharide from *Escherichia coli*. Heterogeneity and mechanism of reversible inactivation by sodium deoxycholate. *Biochemistry* **8**:4063-4067.
 15. YOSHIMURA, F., K. TAKAHASHI, Y. NODASAKA, and T. SUZUKI. 1984. Purification and characterization of a novel type of fimbriae from the oral anaerobe *Bacteroides gingivalis*. *J. Bacteriol.* **160**:949-957.
 16. LEE, J-Y., T. H. T. SOJAR, A. AMANO and R.J. GENCO. 1995. Purification of major fimbrial proteins of *Porphyromonas gingivalis*. *Protein Expr. Purif.* **6**:496-500.
 17. AIDA, Y., M. TANAKA, K. KUSUMOTO, K. NAKATOMI and K. MAEDA. 1996. Induction of interleukin-1 β in human monocytes by lipopolysaccharides from periodontal pathogens: Differential effect of a synthetic lipid A precursor IVa (LA-14-PP). *Japan. J. Inflamm* **16**:125-128.
 18. HASHIMOTO, M., Y. ASAI, and T. OGAWA. 2004. Separation and structural analysis of lipoprotein in a lipopolysaccharide preparation from *Porphyromonas gingivalis*. *Int. Immunol.* **16**:1431-1437.
 19. WAKELIN, S.J., I. SABROE, C.D. GREGORY, I.R. POXTON, J.L.R. FORSYTHE, O.J. GAEDEN,

- and S.E.M. HOWE. 2006. "Dirty little secrets"-Endotoxin contamination of recombinant proteins. *Immunol. Letters*. **106**:1-7.
20. HIRSCHFELD, M., Y. MA, J.H. WEIS, S.N. VOGEL, and J.J. WEIS. 2000. Repurification of lipopolysaccharide eliminates signaling through both human and murine Toll-like receptor 2. *J. Immunol.* **165**:618-622.
21. ERRIDGE, C. 2010. Endogenous ligands of TLR2 and TLR4: agonists or assistants? *J. Leukoc. Biol.* **87**:989-999.
22. ASAI, Y., M. HASHIMOTO, H.M. FLETCHER, K. MIYAKE, S. AKIRA, and T. OGAWA. 2005. Lipopolysaccharide preparation extracted from *Porphyromonas gingivalis* lipoprotein-deficient mutant shows a marked decrease in toll-like receptor 2-mediated signaling. *Infect. Immun.* **73**:2157-2163.
23. HASHIMOTO, M., K. TAWARTUMIDA, H. KARIYA, K. AOYAMA, T. TAMURA and Y. SUDA. 2005. Lipoprotein is a predominant toll-like receptor 2 ligand in *Staphylococcus aureus* cell wall components. *Int. Immunol.* **18**:355-362.
24. YOSHIMURA, A., T. KANEKO, Y. KATO, D.T. GOLENBOCK, and Y. HARA. 2000. Lipopolysaccharides from periodontopathic bacteria *Porphyromonas gingivalis* and *Capnocytophaga ochracea* are antagonists for human Toll-like receptor 4. *Infect. Immun.* **70**:218-225.

25. COAT, S. R., R. A. REIFE, B.W. BAINBRIDGE, T-T.T. PHAM, and R.P. DARVEAU. 2003. *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide antagonizes *Escherichia coli* lipopolysaccharide at Toll-like receptor 4 in human endothelial cells. *Infect. Immun.* **71**:6799-6807.
26. AOKI, Y., K. TABETA, F. YOSHIMURA, and K. YAMAZAKI. 2010. Analysis of immunostimulatory activity of *Poephyromonas gingivalis* fimbriae conferred by Toll-like receptor 2. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **398**:86-91.
27. SCHRÖDER, N.W.J., H. HEINE, C. ALEXANDER, M. MANUKYAN, J. ECKERT, L. HAMANN, U. B. GÖBEL, and R.R. SCHUMANN. 2004. Lipopolysaccharide binding protein binds to triacylated and diacylated lipopeptides and mediates innate immune responses. *J. Immunol.* **173**:2683-2691.
28. RANOVA, D.R.E., S.L. KELLY, and R.I. TRAPPING. 2013. Human lipopolysaccharide binding protein (LBP) and CD14 independently deliver triacylated lipoproteins to toll-like receptor 1 (TLR1) and TLR2 and enhance formation of the ternary signaling complex. *J. Biol. Chem.* **288**:9729-9741.
29. BURNS, E., G. BACHRACH, L. SHAPIRA, and G. NUSSBAUM. 2006. TLR2 is required for the innate response to *Porphyromonas gingivalis*: Activation leads to bacterial persistence and TLR2 deficiency attenuates induced alveolar bone resorption. *J.*

Immunol. **177**:8296-8300.

30. HAJISHENGALLIS, G., R.I. TAPPING, E. HAROKOPAKIS, S. NISHIYAMA, P. RATTI, R.E. SCHIFFERIE, E.A. LYLE, M. TRIANTAFILOU, K. TRIANTAFILOU and F. YOSHIMURA. 2006. Differential interactions of fimbriae and lipopolysaccharide from *Porphyromonas gingivalis* with the Toll-like receptor 2-centered pattern recognition apparatus. *Cell. Microbiol.* **8**:1557-1570.
31. LABRO, M.T. 2004. Cellular and molecular effects of macrolides on leukocyte function. *Curr. Pharml. Design* **10**:3067-3080.
32. IANARO, A., A. IALENTI, P. MAFFIA, L. SAUTEBIN, L. ROMBOLAÁ, R. CARNUCCIO, T. IUVONE, F. D'ACQUISTO, and M. DI ROSA. 2000. Anti-inflammatory activity of macrolide antibiotics. *J. Pharmacol. Exp.l Ther.* **292**:156-163.
33. DESAKI, M., H. OKAZAKI, T. SUNAZUKA, S. OMURA, K. YAMAMOTO, and H. TAKIZAWA. 2004. Molecular mechanisms of anti-inflammatory action of erythromycin in human bronchial epithelial cells: Possible role in the signaling pathway that regulates nuclear factor- κ B activation. *Antimicrob. Agents Chemother.* **48**:1581-1585.
34. OTSU, K., H. ISHINAGA, S. SUZUKI, A. SUGAWARA, T. SUNAZUKA, S. OMURA, H. JONO, and K. TAKEUCHI. 2011. Effects of a novel nonantibiotic macrolide, EM900, on

- cytokine and mucin gene expression in a human airway epithelial cell line.
Pharmacology **88**:327-332.
35. BOSNAR, M., Z. KELNERIĆ, V. MUNIĆ, V. ERAKOVIĆ, and M. J. PARNHAM. 2005. Cellular uptake and efflux of azithromycin, erythromycin, clarithromycin, telithromycin, and cethromycin. *Antimicro. Agents Chemother.* **49**:2372-2377.
36. HAND, W. L., and D. L. HAND. 2001. Characteristics and mechanisms of azithromycin accumulation and efflux in human polymorphonuclear leukocytes. *Int. J. Antimicrob. Agents* **18**:419-425.
37. GLADUE, R. P., and M. E. SNIDER. 1990. Intracellular accumulation of azithromycin by cultured human fibroblasts. *Antimicrob. Agents Chemother.* **34**:1056-1060.
38. MITTAL, M., M. R. SIDDIQUI, K. TRAN, S. P. REDDY, and A. B. MALIK. 2014. Reactive oxygen species in inflammation and tissue injury. *Antioxid. Redox Signal.* **20**:1126-1167.
39. SHEPPARD, F. R., M. R. KELHER, E. E. MOORE, N. J. D. MCLAUGHLIN, A. BANERJEE, and C. C. SILLIMAN. 2005. Structural organization of the neutrophil NADPH oxidase: phosphorylation and translocation during priming and activation. *J. Leukoc Biol.* **78**:1025-1042.
40. LABRO, M. T., J. EL BENNA and C. BABIN-CHEVAYEC. 1989. Comparison of the

in-vitro effect of several macrolides on the oxidative burst of human neutrophils.

J. Antimicrob. Chemother. **24**:561-572.

41. H_{AND}, W. L., D. L. H_{AND}, and N. L. K_{ING}-T_{HOMPSON}. 1990. Antibiotic inhibition of the respiratory burst response in human polymorphonuclear leukocytes.

Antimicrob. Agents Chemother. **34**:863-870.

42. H_{AND} W. L., and D. L. H_{AND}. 1993. Interaction of dirithromycin with human polymorphonuclear leukocytes. *Antimicrob. Agents Chemother.* **37**:2557-2562.

43. A_{NDERSON}, R., A. J. T_{HERON}, and C. F_{ELDMAN}. 1996. Membrane-stabilizing, and-inflammatory interactions of macrolides with human neutrophils.

Inflammation **20**:693-705.

44. L_{EVERT}, H., B. G_{RESSIER}, I. M_{OUTARD}, C. B_{RUNET}, T. D_{INE}, M. L_{UYCKX}, M. C_{AZIN}, and J. C. C_{AZIN}. 1998. Azithromycin impact on neutrophil oxidative metabolism depends on exposure time. *Inflammation* **22**:191-201.

45. A_{BDELGHAFAR}, H., C. B_{ABIN-CHEVAYE}, and M. T. L_{ABRO}. 2005. The macrolide roxithromycin impairs NADPH oxidase activation and alters translocation of its cytosolic components to the neutrophil membrane in vitro. 2005. *Antimicrob.*

Agents Chemother. **49**:2986-2989.

46. H_{AND}, W. L., D. L. H_{AND}, and Y. V_{ASQUEZ}. 2007. Increased polymorphonuclear

- leukocyte respiratory burst function in type 2 diabetes. *Diabetes Res. Clin. Pract.* **76**:44-50.
47. GLADUE, R. P., G. M. BRIGHT, R. E. ISAACSON, and M. F. NEWBORG. 1989. In vitro and in vivo uptake of azithromycin (CP-62,993) by phagocytic cells: Possible mechanism of delivery and release at sites of infection. *Antimicrob. Agents Chemother.* **33**:277-282.
48. PASCUAL, A., G. LÓPEZ-LÓPEZ, J. ARAGÓN and E. J. PEREA. 1990. Effect of azithromycin, roxithromycin and erythromycin on human polymorphonuclear leukocyte function against *Staphylococcus aureus*. *Chemotherapy* **36**:422-427.
49. PASCUAL, A., M. CARMEN CONEJO, I. GARCIA and E. J. PEREA. 1995. Factors affecting the intracellular accumulation and activity of azithromycin. *J. Antimicrob. Chemother.* **35**:85-93.
50. NAKAMURA, M., M. MURAKAMI, T. KOGA, Y. TANAKA, and S. MINAKAMI. 1987. Monoclonal antibody 7D5 raised to cytochrome b₅₅₈ of human neutrophils: immunocytochemical detection of the antigen in peripheral phagocytes of normal subjects, patients with chronic granulomatous disease, and their carrier mothers. *Blood* **69**:1404-1408.
51. BORREGAARD, N., and J. B. COWLAND. 1997. Granules of human neutrophilic

- polymorphonuclear leukocyte. *Blood* **89**:3503-3521.
52. AIDA, Y., K. KUSUMOTO, K. NAKATOMI, H. TAKADA, M. J. PABST and K. MAEDA. 1995. An analogue of lipid A and LPS from *Rhodobacter sphaeroides* inhibit neutrophil response to LPS by blocking receptor recognition of LPS and by depleting LPS-binding protein in plasma. *J. Leukoc. Biol.* **58**:675-682.
53. BORREGAARD, N., L. J. MILLER, and T. A. SPRINGER. 1987. Chemoattractant-regulated mobilization of a novel intracellular compartment in human neutrophils. *Science* **237**:1204-1206
54. DELEO, F. R., J. RENESE, S. MCCORMIK, M. NAKAMURA, M. APICELLA, J. P. WEISS, and W. M. NAUSEEF. 1998. Neutrophils exposed to bacterial lipopolysaccharide upregulate NADPH oxidase assembly. *J. Clin Invest.* **101**:455-463.
55. HAND, W. L., N. KING-THOMPSON, and J. W. HOLMAN. 1987. Entry of roxithromycin (RU 965), Imipenem, Cefotaxime, Trimethoprim, and metronidazole into human polymorphonuclear leukocytes. *Antimicrob. Agents Chemother.* **31**:1553-1557.
56. KLEMPNER, M. S., and B. STYRT. 1983. Alkalinizing the intralysosomal pH inhibits degranulation of human neutrophils. *J. Clin. Invest.* **72**:1793-1800.
57. JINNOUCHI, A., Y. AIDA, K. NOZOE, K. MAEDA, and M. J. PABST. 2005. Local anesthetics inhibit priming of neutrophils by lipopolysaccharide for enhanced

release of superoxide: suppression of cytochrome b₅₅₈ expression by disparate mechanisms. *J. Leukoc. Biol.* **78**:1356-1365.

58. LI, Y. J. L., A. AZUMA, J. USUKI, S. ABE, K. MATSUDA, T. SUNAZUKA, T. SHIMIZU, Y. HIRATA, H. INAGAKI, T. KAWADA, S. TAKAHASHI, S. KUDOH, and S. OMURA. 2006. EM703 improves bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice by the inhibition of TGF- β signaling in lung fibroblasts. *Respiratory Research* **7**:16-28.
59. IKEDA, H., T. SUNAZUKA, H. SUZUKI, Y. HAMASAKI, S. YAMAZAKI, S. OMURA, and A. HATAMOCHI. 2008. EM703, the new derivative of erythromycin, inhibits transcription of type I collagen in normal and scleroderma fibroblasts. *J. Dermatol. Sci.* **49**:195-205.