



Title	炎症関連因子mRNA発現プロファイルのクラスタ分析による歯周炎病態解析
Author(s)	野崎, 剛徳
Citation	大阪大学, 2000, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.11501/3172721
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

炎症関連因子 mRNA 発現プロファイルの
クラスタ分析による歯周炎病態解析

大阪大学 歯学部
口腔治療学講座

野崎 剛徳
(指導教官：岡田 宏教授)

緒言

歯周炎は歯肉縁下プラーク中の細菌の刺激により惹起される歯周組織の慢性炎症性疾患と定義されている。この歯周炎の疾患感受性、疾病活動度は個々の患者および部位ごとで異なり多様な病態を示す⁽¹⁾が、この病態の多様性は、原因因子である歯肉縁下プラーク細菌の量的、質的多様性と、これに対する生体応答の多様性が複雑に絡み合って生ずるものと考えられている。歯周炎の原因因子である歯肉縁下プラーク細菌は、生体外である歯周ポケット内に存在するため、免疫機構による排除を十分に受けることなく長期にわたって慢性的に歯周組織に種々の病的刺激を加える。これに対し宿主細胞は、持続的な、そして時として過剰な免疫応答、炎症反応を繰り返して、その結果、生体応答自身が歯周組織の破壊に関与することになる⁽²⁾。それゆえ歯周病の発症、進行を理解するためには、炎症歯周組織における病原性因子の動態とともに、生体応答をモニターすることが大切であると認識されている。ところが、現在臨床で実施されている歯周組織診査は、歯肉の発赤や出血の有無、歯周ポケットのプロービング深さや X 線写真による歯槽骨の破壊の程度の評価が主流のままである。これらの臨床診査は歯周炎の病態に関わる生体応答の検査ではなく、炎症の結果もたらされた歯周組織の破壊の程度を知るための診査にすぎない。また、現在最もよく用いられている歯周炎の病型分類法の一つである AAP（米国歯周病学会）の分類（1989 年）も、主として発症年齢の違いに基づき、歯周炎を成人性歯周炎（AP）と早期発症型歯周炎（EOP）に大別し、さらに歯周組織の破壊の状態・程度の差異により各々をさらに細かく分類しているにすぎない⁽³⁾⁽⁴⁾。すなわち歯周炎の病態診断法、病型分類法はいまだ確立されていない。それゆえ、歯周組織における炎症反応の状態を客観的かつ詳細に解析し得る、全く新しい歯周組織検査法の確立が望まれている。

炎症歯周組織において惹起されている生体応答をモニターする試みとして、歯周ポケットより採取される歯肉溝滲出液(gingival crevicular fluid: GCF)や歯周外科処置時に採取され

る歯肉組織が試料として用いられ、各種炎症関連因子発現の定性・定量的解析や組織内分布の検出が行なわれてきた⁽⁵⁾⁽⁶⁾⁽⁷⁾。しかしながら、GCF は多因子の検査が可能な量を採取することがしばしば困難であり、しかも歯肉縁下プラーク細菌などの影響により炎症反応を忠実に反映していない可能性が考えられる。また、歯肉組織は歯周炎の特徴である結合組織付着の破壊の最前線であり試料として望ましいが、医療倫理の観点から、初診時の炎症部位から組織を採取することは極めて困難であった。それゆえ病巣組織を検査のために適宜採取できる試料採取法の開発が望まれる。

これまでの一連の研究成果において特定の炎症関連因子の発現が臨床的炎症所見と相関するとの報告がなされているものの、いずれの因子も単独で歯周炎の多様な病態の差異を説明するには至っていない⁽⁶⁾。一方、我々の研究室におけるこれまでの歯周病の疾病活動度に関する研究から、病巣局所における病原因子-宿主の状態を反映しうる複数の因子を同時検出し重みづけ分析を行うことで、将来の疾患の活動度を予測することが可能であるとの結果を得ており⁽⁸⁾、複数の炎症関連因子の発現状況を同時に解析することで歯周炎の炎症像の詳細な解析が可能になると期待される。

そこで本研究では穿刺生検法により歯周ポケット底部から微量の組織を採取し、分子生物学的手法により各種炎症性因子 mRNA 発現をモニタリングすることで、歯周炎の病巣局所で惹起している炎症反応の特徴を明らかにしようとした。そして、クラスタ分析により、各種炎症性因子 mRNA の発現プロファイルの解析を行うことにより、歯周炎の病態に関わる生体応答を客観的に解析して歯周病の病型分類、診断法を開発することを目的とした。

材料と方法

本研究は大阪大学歯学部倫理委員会の承認を得て、被験対象患者に本研究の内容を十分に説明し実験への参加の同意をいただいた後、試料の採取を行った。また、本研究におい

ては臨床的歯周組織検査によってプロービング深さ(PD)が 3mm 以下でプロービング時の出血(BOP)が認められず歯肉炎指数(GI)が 1 以下の部位を臨床的健常部位とし、PD が 4mm 以上で BOP が認められ、GI が 2 以上の部位を臨床的歯周炎罹患部位とした。

1. 歯周病病変部局所における炎症関連因子 mRNA 発現プロファイルの解析

1-1 被験者ならびに被験部位

大阪大学歯学部附属病院歯周病診療室を受診し、AAP の診断基準に基づき AP と診断された患者 10 名 (女性 5 名、男性 5 名、平均年齢 46.8 歳) ならびに EOP と診断された患者 16 名(女性 9 名、男性 7 名、平均年齢 24.2 歳)を被験者とした。

この AP 患者から 15 部位の歯周炎罹患部位ならびに 10 部位の臨床的健常部位を、また EOP 患者から 27 部位の歯周炎罹患部位ならびに 16 部位の臨床的健常部位をそれぞれ選択し被験部位とした。

1-2 歯肉組織穿刺生検針の作成と歯肉組織採取

18G 注射針 Neolus (TERUMO, Tokyo, Japan) の針部を約 10mm の長さに切断し、針部の内外側にカット面を付与した歯肉組織穿刺針を作成した (図 1)。組織採取部の浸潤麻酔の後、穿刺針を用いて歯肉縁部から歯周ポケット底部に向け穿刺を行い、歯周ポケット底部より微量 (湿重量約 100mg) の歯肉組織を採取した。採取した歯肉組織は直ちに 400 μ l の RNAzol(Tel-Test, Inc., Friendswood, TX, USA)中に投入し、-80 $^{\circ}$ C にて保存した。

1-3 歯肉組織からの総 RNA の抽出と cDNA 合成

総 RNA の抽出は AGPC 法[®]に準じて行なった。この総 RNA を鋳型として 200unit の M-MLV 逆転写酵素(Life Technologies Inc, Gathersburg, MD, USA) ならびに 20unit の RNasin (Takara, Kyoto, Japan) 、ランダムヘキサマー(Amersham Pharmacia Biotech AB, Uppsala, Sweden)を用いて 37 $^{\circ}$ C、1 時間の逆転写反応を行い cDNA を合成した。

1-4 各種因子特異的プライマー、オリゴプローブの設計

GenBank より interleukin (IL) -1 β 、IL-6、IL-8、IL-10、IL-15、tumor necrosis factor (TNF) α 、

interferon (IFN) γ 、 monocyte chemoattractant factor (MCP)-1、 cyclooxygenase (Cox)-1、 Cox-2、 glycerolaldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)の cDNA 配列情報を得て、それぞれの因子に特異的なプライマーならびにオリゴプローブを設計した (表1)。これらすべてのプライマーは、Polymerase chain reaction (PCR)時の至適アニーリング温度が60°Cとなるように設計した。プライマーの特異性は遺伝子データベース検索による確認の後、実際のPCRによって期待される単一の増幅産物のみが生成されることによって確認した。オリゴプライマーは DIG oligonucleotide 3'-end labelling kit (Boehringer Mannheim Biochemica, Mannheim, Germany)を用いて Digoxigenin (DIG)標識を行った。

1-5 PCR 条件の設定

各種因子 mRNA 発現検出のための PCR の条件は、すべての因子の鋳型量/増幅産物量曲線の特徴が一定となるように、設定を行った。すなわち 0.5 μ M の各因子特異的プライマー、1.5unit AmpliTaq Gold (Perkin Elmer Applied Biosystems, Forester City, CA, USA)、15mM Tris-HCl (pH8.0)、50mM KCl、1.5- 2.0mM MgCl₂、各 150-180 μ M の dNTPs (Perkin Elmer Applied Biosystems)の液組成にて、GeneAmp PCR system 9600 (Perkin Elmer Applied Biosystems)にて 95°C 9min の前加熱の後、94°C 30sec, 60°C 30sec, 72°C 30sec を 1 サイクルとして 21- 30 サイクルの増幅を行った。

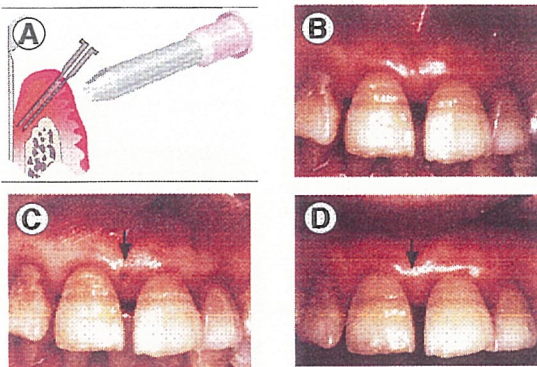


図1 穿刺法による微量歯肉組織検体採取法の開発

A: 穿刺法による組織検体採取法の図示、B: 採取前の歯肉の状態、C: 採取直後の歯肉の状態、D: 採取後1ヶ月の歯肉の状態を示す。組織採取部位の良好な治癒がみられる。

表1 RT-PCRならびにサザンハイブリダイゼーションに用いたプライマーとプローブの塩基配列

	Upstream (5')primer Downstream (3')primer	Oligonucleotide Probe
GAPDH	5' TGAAGTCGGAGTCAACGGATTGGT 3' 3' CATGTGGCCATGAGTCCACCAC 3'	5' CCAGCGTCAAAGGTGGAGAGTGGGTG 3'
IL-1 β	5' ATGGCAGAAGTACCTAAGCTCGC 3' 3' ACACAATTGCATGGTGAAGTCAGTT 3'	5' TGGACGAGACATCACCAAGCTTTTCTG 3'
IL-6	5' ATGAACCTCTCTCCACAAGCGC 3' 3' GAAGAGCCCTCAGGCTGGACTG 3'	5' CTCTCATTGAATCCAGATTGGAAGCATCC 3'
IL-8	5' ATGACTTCCAAAGCTGGCCCTGGCT 3' 3' TCTCAGCCCTCTCAAAACTCTCTC 3'	5' TCCACTCTCAATCACTCTCAGTCTTTGAT 3'
IL-10	5' ATGCCCAAGCTGAGAACAGACCCA 3' 3' TCTCAAGGGGCTGGGTCACTATCCC 3'	5' CCTGATGTCTCAGTTTCGTATCTCATTGT 3'
IL-15	5' CCATCCCAATATATGGCCATGTGGCTCT 3' 3' ACAGCCCAAAATGAAGCATGATGCCA 3'	5' GCATGGAAACATGATGGAAACATTTGCT 3'
TNF α	5' GAGTGACAAGCTGTAGCCCATGTTGTAGCA 3' 3' GCAATGATCCCAAGTAGACCTGCCAGACT 3'	5' ATCTCTCAGCTCCAGCCATTGGCCAGGAG 3'
IFN γ	5' GCATCGTTTTGGTTCTCTGGCTGTACTGC 3' 3' CTCTTTTTGCTCTCCCTGTTTAAAGTCTGG 3'	5' TCTGGTCATCTTTAAAGTTTTAAAGATT 3'
MCP-1	5' CTCACGATGAAGTCTCTGCGCCCT 3' 3' CAAGCTCTCGAGTTTGGGTTGCTTGTCT 3'	5' ATGGAATCCTGAACCCACTCTCTGTTGGGGTCAGCA 3'
Cox-1	5' TGCCAGCTCTGCGCCGCGCTT 3' 3' GTGCATCAACACAGCCGCTCTCTC 3'	5' CCATCCAGCACCTGGTACTTGAATTCCECA 3'
Cox-2	5' TTCAAATGAGATTGTGGAAATTTGCT 3' 3' AGATCACTCTGCTGAGTATCTT 3'	5' CTGATGCGTGAAGTCTGGGCAAGATGC 3'

1-6 PCR 産物の Southern blotting による検出と定量

1.8%アガロースゲル電気泳動により単一鎖長の増幅産物が得られていることを確認した後、PCR 産物をナイロンメンブレン Hy-bond N+ (Amersham Pharmacia Biotech AB)にアルカリ条件下でトランスファーし、上記の各因子特異的 DIG ラベルプローブを用いたサザンハイブリダイゼーションを行った。シグナルの検出には DIG Luminescent detection kit (Boehringer Mannheim Biochemica)を用い、さらに得られたシグナルの強度の解析には画像解析ソフトウェア NIH-image を使用した。

1-7 GAPDH mimic の作成

歯周外科処置時に採取された歯肉組織より上記方法にて総 RNA の抽出ならびに cDNA 合成を行った後、PCR を行い GAPDH 特異的な PCR 産物を作成した。得られた PCR 産物を精製した後、*Dpn* II(NEB, Beverly, MA, USA)による制限酵素処理ならびに DNA Ligation kit Ver.2(Takara, Kyoto)を用いた再ライゲーションを行い、中間部の 194bp を欠落した GAPDH 欠落変異遺伝子(GAPDH mimic)を作成した(図 2A)。得られた GAPDH mimic は T4 polymerase(NEB)を用いた末端平滑化ならびに T4 Polynucleotide Kinase(NEB)と dATP(Amersham Pharmacia Biotech AB)を用いた 5'末端リン酸化の後、pBlueScript II SK+ (Stratagene, La Jolla, CA, USA)にサブクローニングを行い、XL-1 Blue (Stratagene)に遺伝子導入して大量複製を行った。

1-8 競合 PCR による GAPDH mRNA 発現量の定量

各検体由来の cDNA の濃度を正確に定量するために競合 PCR を行った。上記 GAPDH mimic を既知量(100, 10, 1, 0.1 fmole)の各検体由来の cDNA に混合し、GAPDH 特異的プライマーを用いた PCR を行った後、DIG ラベルした GAPDH 特異的オリゴプローブを用いたサザンブロットティングを行い、各検体の GAPDH mRNA 発現量の定量を行った (図 2B)。さらに逆転写反応液と同一の液組成の希釈液を用いて、各検体由来の cDNA 濃度を 1 fmole/ μ l に調整した後、同様の方法で GAPDH mRNA 発現量の定量を行い、すべての検体

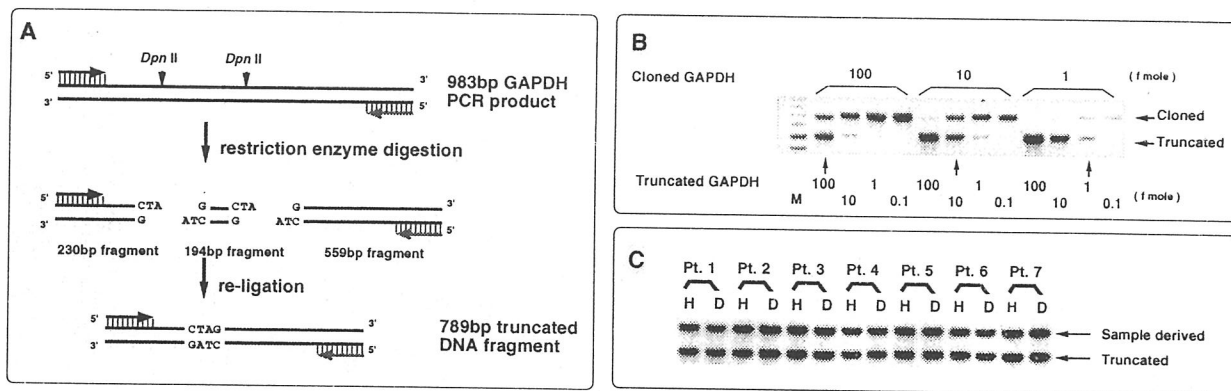


図2 GAPDHの中間部欠落変異遺伝子の作成と競合PCR

A: 中間部欠落変異遺伝子のデザイン, B: 競合PCRによるGAPDH mRNA発現量の定量, C: GAPDH mRNA発現検出による各サンプルのcDNA濃度の調整
 B, CはRT-PCR後DIGラベルしたオリゴプローブ(表1)を用いてサザンブロットングを行った結果を示す。

のGAPDH cDNA量が等しくなっていることを確認した(図2C)。

2. 歯肉縁下プラーク中の歯周病原性細菌の検出

2-1 被験者ならびに被験部位

歯周病変部局所における炎症関連因子 mRNA 発現プロファイルの検討を行った上記患者のうち、過去3ヶ月以内の抗生剤服用歴を有する患者を除いた患者を被験対象とし、歯肉組織採取部位と同一の部位を被験部位とした。すなわち AP 患者9名(女性5名、男性4名、平均年齢47.0歳)ならびに EOP 患者10名(女性5名、男性5名、平均年齢24.8歳)を被験者とし、それぞれ14部位の歯周炎罹患部位ならびに9部位の臨床的健常部位と16部位の歯周炎罹患部位ならびに10部位の臨床的健常部位を選択し被験部位とした。

2-2 歯肉縁下プラークの採取

歯肉縁下プラークの採取は北村⁽⁵⁾の記載に従いペーパーポイント法を用いて行った。すなわち被験部位を簡易防湿後、滅菌小綿球にて歯肉縁上プラークを除去し、#40の滅菌ペーパーポイント(DENTSPLY-MAILLEFER, Ballaigues, Swiss) 2本を歯周ポケット底部まで挿入して30秒間静置することにより歯肉縁下プラークを採取した。このペーパーポイントを直ちに200μlの滅菌蒸留水中に投入し、vortex mixerにて20秒間の攪拌を行い歯肉縁下プラーク検体とし-40℃で保存した。

2-3 歯肉縁下プラーク検体からの細菌ゲノム DNA の抽出

歯肉縁下プラーク検体 50 μ l を用い、0.1mg/ml, ProteinaseK(Boehringer mannheim)、0.5% Tween 20、15mM Tris-HCl (pH8.0)、50mM KCl、1.5- 2.0mM MgCl₂ の組成で液量が 30 μ l となるように調整した反応液を 55 $^{\circ}$ C にて 60 分間インキュベートした後、さらに 98 $^{\circ}$ C にて 5min 加熱しプラーク細菌ゲノム DNA 抽出液とした。

2-4 PCR ならびにサザンハイブリダイゼーションによる *P.g.* ならびに *A.a.* の検出と定量

P.g. に特異的なプライマーとして *P.g.* 40K Da 細胞外膜蛋白をコードする遺伝子を認識するプライマーならびにプローブ(日本大学松戸歯学部 安孫子宜光教授より供与)を、また *A.a.* に特異的なプライマーとして *A.a.* Leukotoxin をコードする遺伝子(*lktA*)を認識するプライマーを使用した。*A.a.* に特異的なプローブに関しては *lktA* の遺伝子配列情報を基に設計、作成した (表 2)。これらのプローブは前述の方法で DIG による標識を行った。プラーク細菌ゲノム DNA 抽出液 10 μ l をテンプレートとして 0.5 μ M の各因子特異的プライマー、1.5Unit AmpliTaq Gold (Perkin Elmer Applied Biosystems)、15mM Tris-HCl (pH8.0)、50mM KCl、1.8mM MgCl₂、各 180 μ M の dNTPs (Perkin Elmer Applied Biosystems)の液組成にて、GeneAmp PCR system 9600 (Perkin Elmer Applied Biosystems)にて 95 $^{\circ}$ C 9 分間の前加熱の後、94 $^{\circ}$ C 30sec, 58 $^{\circ}$ C 30sec, 72 $^{\circ}$ C 45sec を 1 サイクルとして 35、40 サイクルの増幅を行った。また、PCR 産物のサザンブロッティングによる検出と定量は上記の方法にて行った。

表 2 *P.g.* ならびに *A.a.* の検出に用いたプライマーとプローブの塩基配列

	Primers	Probes
<i>P.g.</i> 40KDa omp	5' CTCACCAACATACTG 3'	5' TCCGCATTGGACATTGGATGGTG 3'
	5' AGGAACTAAGACTTTAAGGA 3'	
<i>A.a.</i> lktA	5' TCGCGAATCAOCTCGCCG 3'	5' ATTCCGCCTTCTTGGAAAGAT 3'
	5' GCTTTGCAAGCTCCTCACC 3'	

PDR-サザンハイブリダイゼーションによる *P.g.* ならびに *A.a.* の検出に用いたプライマーならびにプローブの塩基配列を示す。*P.g.* は 40KDa 細胞外膜蛋白を *A.a.* はロイコトキシンをそれぞれコードする遺伝子配列を用いた。

3. EOP 患者由来細胞による IL-8 および IFN γ mRNA 発現の *in vitro* 解析

3-1 EOP 患者末梢血からの単核球ならびに多形核白血球の分離

上述の EOP 患者 10 名より末梢血を採取し、HISTOPAQUE-1077 (Sigma, St. Louis, MO, USA)を用いた比重遠心法ならびに浸透圧による赤血球破碎により単核球(PBMC)ならびに多形核白血球(PMN)を分取し、HBSS(Sigma)にて 2 回洗浄後、10%FCS 添加 RPMI1640 (Sigma)培地にて 5.0×10^6 個/ml の濃度に調整し 35mm 細胞培養用ディッシュ(Corning glass works, Corning, NY, USA)に播種した。

3-2 *P.g.*ならびに *A.a.*の超音波破碎上清の調製

*P.g.*の超音波破碎菌体画分(*P.g.* SE)の調製は、Shenker ら⁹⁾の記載にもとづいて行った。すなわち *P.g.* 381 株を GAM プイヨン(Nissui, Tokyo, Japan)に 5mg/ml ヘミン (Wako pure chemical industries, Osaka, Japan)ならびに 0.5mg/ml メナジオン (Wako pure chemical industries)を添加したものを培地として、嫌気培養装置(Forma Scientific, OH, USA)を用いて、5%CO₂, 5%H₂, 90%N₂混合ガスによる嫌气的条件下で 37°C, 24時間培養した。集菌した *P.g.* 381 株菌体は PBS(pH7.2)に懸濁し、超音波破碎装置(TOMY, Tokyo, Japan)を用い氷上にて 10 分間超音波破碎処理を行った。その後 10,000 \times g, 4°C で 30 分間の遠心によって得られた上清成分を孔径 0.45mm のフィルター(Corning Glass Works)にて濾過した。このようにして得た *P.g.*SE を BCA protein assay kit(Pierce, IL, USA)を用いた蛋白質定量の後、20mg/ml の濃度に調整した。

*A.a.*の超音波破碎菌体画分(*A.a.*SE)の調整は *A.a.*Y4 株を BHI(Difco, Laboratories, Detroit, USA)を培地として嫌气的条件下で 37°C, 24 時間培養後、*P.g.*と同様の方法で SE を調整した。

3-3 PBMC、PMN の *P.g.*SE、*A.a.*SE による刺激

35mm 細胞培養用ディッシュ(Corning glass works)に播種した PBMC ならびに PMN を無刺激で、あるいは刺激物質として *P.g.*SE(10 μ g/ml), *A.a.*SE(10 μ g/ml)を添加して 5%CO₂ 湿潤

条件下で培養した。培養 0, 2, 4, 6 時間後に PBMC、PMN をそれぞれ回収し、直ちに 1ml の RNAzol(Tel-Test, Inc)を添加しホモジナイズした後、AGPC 法にて総 RNA の抽出を行った。

3-4 PBMC、PMN における IL-8、IFN γ mRNA 発現の検出

抽出した各検体に由来する総 RNA の 1 μ g を用い、上述の方法で逆転写反応ならびに PCR、サザンハイブリダイゼーションを行い IL-8、IFN γ mRNA の発現を検出した。陰性対照として PBMC においては GAPDH mRNA の発現検出を行ったが、PMN においては GAPDH mRNA の発現が低く他の因子と比べ PCR のサイクル数の条件が大きく異なるため、陰性対照として Cox-1 mRNA の発現検出を行った。

結果

1 歯肉組織における複数の炎症関連因子 mRNA 発現モニタリング法の開発

1-1 歯肉組織穿刺生検法の開発

材料および方法の項に記載した歯肉組織穿刺生検法により、各被験部位から歯肉組織の採取を行った。この方法により歯周ポケット底部より湿重量約 100mg の微量歯肉組織検体の採取が可能となった。また穿刺による組織採取後の創傷は小さく、採取後の疼痛や歯肉退縮を引き起こすことなく約 2 週間で臨床的に良好な治癒が得られた。これにより、歯肉組織の状態を大きく変化させることなく任意の治療段階で歯周炎病巣局所から歯肉組織を採取することが可能となった (図 1)。

1-2 歯肉組織における GAPDH mRNA 発現の競合 PCR による定量的検出

本研究では採取された歯肉組織における各炎症関連因子の mRNA 発現量を、できる限り定量的に評価することを目標としている。そのため、各試料中の GAPDH mRNA 発現量の正確な定量が必要とされる。そこで PCR の内部コントロールとして天然型の GAPDH cDNA と同一のプライマー結合部位を有し、同一の増幅特性を示す一方、プライマー結合

部位間の 194bp の欠落のため最終的な PCR 産物鎖長が天然型の GAPDH cDNA と異なる GAPDH 欠落変異遺伝子を作成し、競合 PCR を行った (図 2A)。この GAPDH 欠落変異遺伝子を既知の濃度に調整して競合鋳型とし、組織由来の cDNA と混合して競合 PCR を行い、サザンハイブリダイゼーションによる検出を行った。その結果、両者の GAPDH cDNA のモル濃度が等しい場合に等しい強度のシグナルが得られた (図 2B)。この競合 PCR は、通常の PCR と比べ高い定量性を有することが知られており、この方法を用いることにより、歯肉組織における GAPDH mRNA 発現量を定量的に検出し、全サンプルの cDNA 濃度をより正確に調整することが可能となった (図 2C)。

1-3 PCR を用いた各種炎症関連因子、成長因子 mRNA 発現検出法の定量性の検討

RT-PCR の定量性を検討する目的で IL-1 β , 6, 8, 10, 15, TNF α , IFN γ , MCP-1, Cox-1, Cox-2, TGF β , IGF-1, EGF, GM-CSF 各種因子に対するプライマーならびにプローブを設計し (表 1)、これを用いて既知量の各因子 cDNA クローンを鋳型とした PCR ならびにサザンハイブリダイゼーションを行い、PCR 産物量の測定を行った。代表例として IL-1 β の検出結果を示すが、その結果、いずれの因子においても至適条件下では PCR 産物量は鋳型量依存的に、また PCR のサイクル数依存的に増加し、半定量的検出が可能であることが示された (図 3)。

1-4 微量歯肉組織からの炎症関連因子、成長因子 mRNA 発現の検出

試験的に 7 名の歯周病患者から、臨床的に歯肉の炎症所見の著明な部位ならびに臨床的炎症所見が認められない部位をそれぞれ選択し、上記プライマーを用いて各部位の炎症関連因子、成長因子の mRNA 発現検出を行った。その結果、上記すべての因子の mRNA 発現が検出された。すなわち患者の微量歯肉組織を検体として、複数のサイトカイン mRNA 発現を同時に検出し得る系が確立された。これら炎症関連因子は歯肉の炎症所見が著明な部位ではより高い mRNA 発現を示す傾向が認められる一方、成長因子の mRNA 発現は

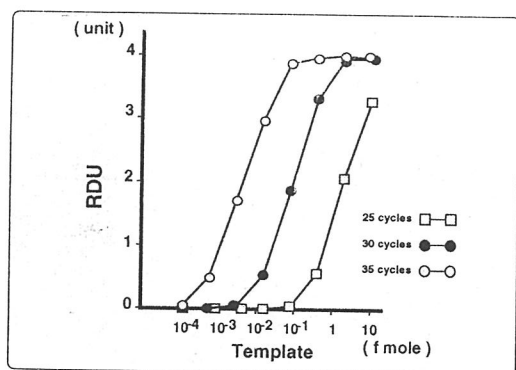


図3 鋳型cDNA量の違いによるPCR産物量の変化
IL-1 β 特異的プライマーを用いて25サイクル(□)、30サイクル(●)、35サイクル(O) PCRを行った際の鋳型cDNA量とPCR産物量の関係を示す。

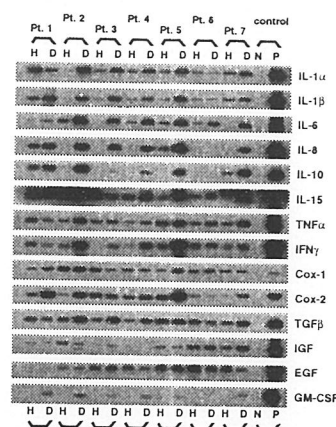


図4 臨床的歯周炎罹患部位と非罹患部位から穿刺法によって得られた歯肉組織片中の炎症関連因子mRNA発現の検出
採取した歯肉組織片より総RNAを抽出し、GAPDH mRNA発現量で標準化された(図2参照)cDNA試料を鋳型としてPCRならびにサザンブロットイングを行った結果を示す。
図中Hは臨床的健常部位を、Dは臨床的歯周炎罹患部位を示す。

両部位で著明な差は認められなかった。さらに、各種炎症関連因子の mRNA 発現量は、歯周炎罹患部位間で異なっていた(図4)。このことは臨床的には一律に炎症部位と表現される部位でも、その部位間にサイトカインプロファイルの差異が存在することを示しており、このサイトカイン発現プロファイルの解析によって局所の炎症病態を詳細に把握し得る可能性が示された。

2 歯肉縁下プラーク中の歯周病原性細菌の検出法の開発

2-1 genomic PCR による *P.g.*, および *A.a.* の検出法の開発

P.g. 40kDa 細胞外膜蛋白遺伝子ならびに *A.a.* LktA 遺伝子に対する特異性の確認されたプライマー、プローブ(表2)⁽¹⁰⁾⁽¹¹⁾を用い、材料および方法に記載した方法に従いPCRならびにサザンハイブリダイゼーションによる *P.g.* 381株ならびに *A.a.* Y4株の検出を行った。その結果、いずれの検出系においても菌体数依存的な強さのシグナルが得られ、半定量的に特異的増幅産物が得られた(図5A, D)。またこの検出方法を用いることにより、サンプル中の10個以下の菌体の存在が検出可能であることが示された。

2-2 間接蛍光抗体法と genomic PCR による歯周病原性細菌検出法の検出感度の比較

8名のAP患者から5mmのPDを有する部位を各々一部位ずつ選択し、同部位より材料

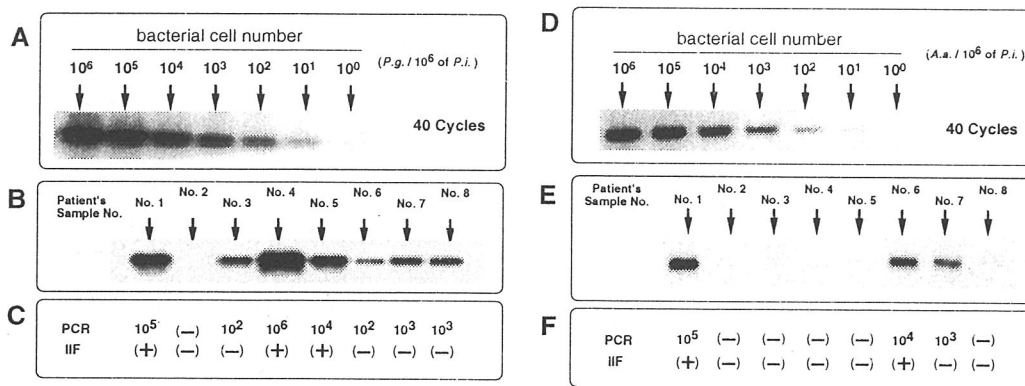


図5 PCRを用いたP.g.ならびにA.a.の検出法：間接蛍光抗体法との検出感度の比較

*p.g.*381培養菌株もしくは*A.a.*Y4培養菌株と*Preotella intermedia*(*P.i.*)33563培養菌株を各菌数に調整し(A, D)、もしくは歯周炎患者のポケットより採取した歯肉縁下プラーク試料(B, E)から細菌のゲノムDNAを抽出しPCR-サザンハイブリダイゼーションにて検出した結果、ならびに各菌株に対するポリクローナル抗体を用いた間接蛍光抗体法(IIF)にて検出し、両者の検出感度を比較した結果(C, F)を示す。図中のNo.1~No.8は患者番号を示す。C, Fにおいて、数値もしくは(+)は検出されたことを、(-)は検出されなかったことを示す。

および方法に記載した方法に従い採取した歯肉縁下プラーク中の *P.g.*ならびに *A.a.*の存在を、genomic PCR-サザンハイブリダイゼーションにより検出した。その結果を図5B, Eに示す。*P.g.*は8部位中7部位で、また*A.a.*は8部位中4部位で検出され、本細菌検出法が臨床的に採取されたプラークサンプルにも応用できることが確認された。次に同一プラークサンプルを用いて間接蛍光抗体法により *P.g.*および *A.a.*の検出を行った。その結果、*P.g.*は8部位中3部位で、*A.a.*は8部位中3部位で細菌の存在が検出された。また、間接蛍光抗体法で検出が可能であったすべての検体から genomic PCR-サザンハイブリダイゼーションにより 10^4 個以上の特定細菌が検出され、 10^4 菌体以上の細菌が存在しないと間接蛍光抗体法による検出が不可能であることが示され、この結果から genomic PCR-サザンハイブリダイゼーションを用いた歯周病原性細菌検出法は間接蛍光抗体法に比して約 1000 倍以上高感度であることが示された (図5C, F)。

3 歯周炎患者の各種臨床所見と炎症関連因子 mRNA 発現の関連の検討

3-1 臨床的炎症所見と炎症関連因子 mRNA 発現の関連性

臨床的に AP ならびに EOP と診断された歯周病患者より歯周病非罹患部位ならびに歯周病罹患部位をそれぞれ選択し、同部位における Cox-1 ならびに炎症関連因子である IL-

IL-1 β , IL-6, 8, 10, 15, TNF α , IFN γ , MCP-1, Cox-2 の mRNA 発現を検出した。その結果、臨床的健康部位においてもこれらの炎症関連因子 mRNA の発現がしばしば認められることが示された。また、AP ならびに EOP 患者のいずれにおいても、すべての炎症関連因子 mRNA の発現が GI の上昇とともに強くなる傾向が認められた (図 6)。一方、恒常的に産生され炎症に際してもその発現の変動が少ないことが知られている Cox-1 の mRNA 発現は GI の値にかかわらず一定であった。この結果は現在までの種々の報告⁽¹²⁾⁽¹³⁾⁽¹⁴⁾と概ね一致するものであり、単一の炎症関連因子だけでは現行の臨床診査によって得られる炎症の程度以上の多様な病態メカニズムを鑑別することは不可能であることを示唆している。

3-2 初期治療前後の炎症関連因子 mRNA 発現の変化

次に初期治療前後における歯肉組織での炎症関連因子 mRNA 発現の変化を同様の方法により検討した。初診時の歯周病罹患部位では AP ならびに EOP 患者のいずれにおいても、ほぼすべての炎症関連因子の強い mRNA 発現が認められる一方、歯周病非罹患部位では mRNA 発現は相対的に弱かった。初期治療終了後には、初診時に認められた炎症関連因子の強い mRNA 発現は、そのほぼすべてにおいて有意に低下し、歯周病非罹患部位に近い発現量となった。特に IL-6, 8 においては、その変化が著明である一方、IL-1 β , 10, 15, IFN γ ではその変化は比較的弱いことが示された。また、Cox-1 は初期治療前後で mRNA 発現量に差は認められなかった (図 7)。

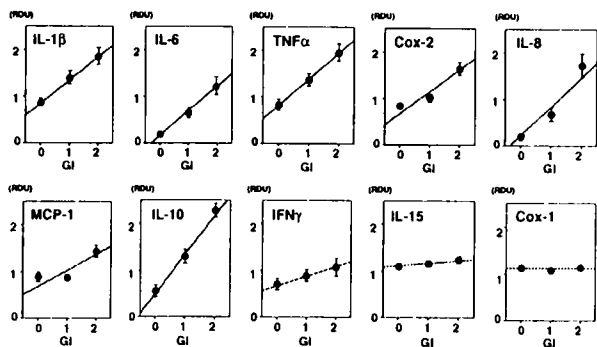


図6 GIと各炎症関連因子mRNA発現の関連性
組織採取部位をGIによって分類し、各群における各々の炎症関連因子mRNA発現量の平均値を示す。

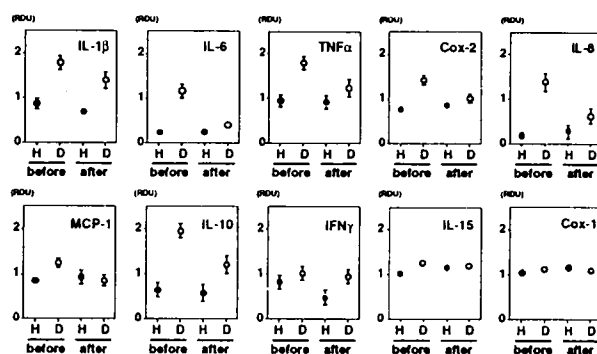


図7 初期治療による各炎症関連因子mRNA発現量の変化
初期治療前後における各々の炎症関連因子mRNA発現量の平均値を示す。
図中Hは臨床的健康部位を、Dは臨床的歯周炎罹患部位を示す。

4 炎症関連因子 mRNA 発現プロファイル解析に基づく歯周炎病型分類の可能性

4-1 クラスタ分析による炎症関連因子 mRNA 発現プロファイルの解析

歯肉組織における炎症関連因子 mRNA 発現の検出結果を基に Ward 法によるクラスタ分析を行い、各被験部位の炎症関連因子 mRNA 発現プロファイルの特徴を明確にすることを試みた。このクラスタ分析はユークリッド距離を基に統計学的に似通った変数のグループ化を行うための分析手法であり、それゆえ類似した mRNA 発現プロファイルを有する部位を客観的にグループ化することが可能となる。その結果、全被験部位が炎症関連因子の mRNA の発現プロファイルは、その類似性を基に5つのクラスタに分類された(図8)。これらの各クラスタの mRNA 発現プロファイルの特徴として、クラスタ A では解析に用いたすべての炎症関連因子の強い mRNA 発現が、クラスタ B では IFN γ ならびに IL-6 mRNA の相対的に低い発現とその他の各因子の強い mRNA 発現が、クラスタ C では IFN γ mRNA の相対的に低い発現とその他の各因子の中等度の mRNA 発現が、クラスタ D では IL-8 mRNA の相対的に低い発現とその他の各因子の中等度の mRNA 発現が、そしてクラスタ E ではすべての因子の低い mRNA 発現が認められた(図9)。

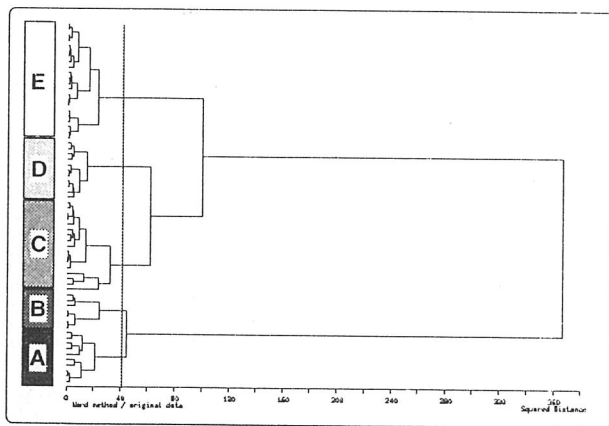


図8 各種炎症関連因子mRNA発現によるクラスタ分析の結果を示す樹状図

炎症関連因子mRNA発現プロファイルの類似した部位を統計学的に分類するためクラスタ分析(Ward法)を行った。結果を樹状図で示す。

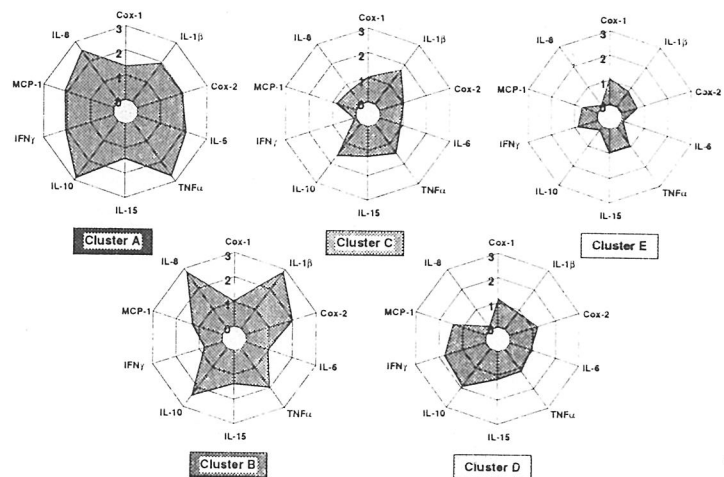


図9 各クラスタにおける炎症関連因子mRNA発現プロファイル
各クラスタにおける各種炎症関連因子mRNA発現量の平均値をレーザチャートにて示す。

4-2 炎症関連因子 mRNA 発現プロファイルと臨床診断ならびに臨床的炎症所見との関係

次に、クラスタ分析により得られた mRNA 発現プロファイルと臨床診断ならびに GI の関連について検討を行った。その結果、各クラスタと GI の関係において、クラスタ A、B には GI が大きい部位が多く含まれる傾向が認められた。このうちクラスタ A には AP で GI が大きな値を示す部位が多く含まれ、逆にクラスタ B では EOP で GI が大きい部位が多く含まれていた。クラスタ C、D には GI が中等度の部位が多く含まれていたが、特にクラスタ C では EOP の割合が高かった。また、クラスタ B、C、D に分類される部位では IFN γ または IL-8 mRNA の低発現を示す部位が存在したが、EOP で GI が中等度の部位のほとんどすべてが、これらのクラスタのいずれかに分類された。さらにクラスタ E には GI が中等度以下の部位が多く含まれており、臨床的に健常部位であると診断された部位のほとんどがこのクラスタ E に分類された (表 3)。

一方、従来の診断病名とクラスタの関連を検討すると、AP と診断された患者の歯周病非罹患部位のほとんどはクラスタ E に分類され、歯周病罹患部位の多くがクラスタ A に分類された。また、EOP と診断された患者の歯周病非罹患部位の多くが AP 患者と同様に

Clinical Diagnosis	Clinically Healthy	Diseased	
		E	D
AP	E	E	
	E	D	
	E	A	
	E	D	D
	C	B	A
	E	A	A
	E	A	A
	E	D	B
	E	A	A
	D	A	
EOP	E	C	B
	D	D	A
	E	C	C
	E	C	C
	D	D	
	E	E	D
	E	C	B
	E	C	
	E	R	
	E	C	C
	E	C	B
	C	D	B
	E	E	C
	E	C	B
	C	C	B

図10 患者別の各部位のクラスタと臨床診断との関係

臨床的診断においてAP、EOPと診断された患者の臨床的健常部位ならびに臨床的歯周炎罹患部位がいかなるクラスタに属するかを患者毎に部位別で示した。図中のA、B、C、D、Eはそれぞれのクラスタを示す。

表 3 各クラスタとGIもしくは臨床的診断病名との関係

Cluster	Numbers of sites	GI			Clinical diagnosis	
		0	1	2	AP	EOP
Cluster A	9	0	2	7	8	1
Cluster B	8	0	1	7	2	6
Cluster C	17	1	13	3	1	16
Cluster D	11	1	6	4	5	6
Cluster E	23	12	11	0	9	14

GI(Silness & Loe)が3の部位は被験部位中に存在しなかったため省略した。AAPの分類(1989)に基づく臨床的診断病名を用いた。

クラスター E に分類され、歯周病罹患部位の約半数がクラスター C に分類された (図 10)。

5 炎症関連因子 mRNA 発現プロファイルに差異が生ずる原因の検討

5-1 歯周病原性細菌検出率と mRNA 発現プロファイルの関連性

歯肉縁下細菌叢の質的もしくは量的差異が、各部位の炎症関連因子 mRNA 発現プロファイルに影響するか否か検討を行った。その結果、*P.g.* はクラスター A、B、C、D で高い検出率を示し、特にクラスター A では 9 被験部位中 8 部位から検出された。反対にクラスター E の *P.g.* 検出率は他のクラスターに比較してやや低かったが、それでも検出率は 50% 以上であり、各クラスター間で著明な *P.g.* 検出率の差は認められなかった。一方、*A.a.* は *P.g.* と比較していずれのクラスターにおいても検出率がやや低い傾向を示し、その検出率は 50% 以下で、各クラスター間の検出率に著明な差は認められなかった (図 11)。

5-2 EOP 患者由来細胞の *in vitro* における炎症関連因子 mRNA 発現能と局所における mRNA 発現プロファイルの関連性

図 8 で示したように、クラスター B、C、D の mRNA 発現プロファイルの特徴として IL-8 あるいは IFN γ mRNA の低発現性が認められた。これは患者由来細胞における歯肉縁下プラーク細菌に対する応答性の差異によるものであるかも知れない。そこで炎症関連因子の mRNA を検討した同一患者由来の PBMC、PMN に対し *P.g.* SE、*A.a.* SE による刺激を行い IL-8 ならびに IFN γ の mRNA 発現を検出した。その結果、いずれの細胞においても

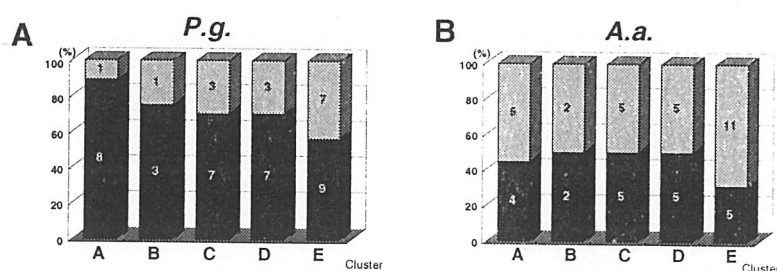


図 11 各クラスター別の *P.g.*、*A.a.* の検出率

各クラスター別の *P.g.* (A) ならびに *A.a.* (B) の検出率を示す。図中 (■) は検出された部位の割合を、(□) は検出されなかった部位の割合を示す。また図中の数字は部位数を示す。

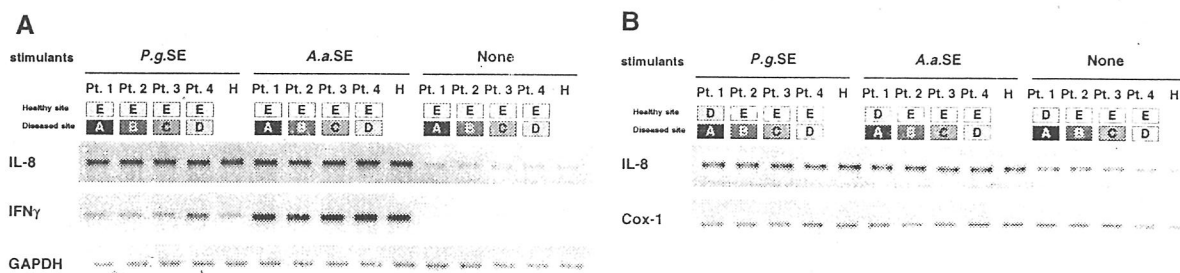


図 12 PBMCならびにPMNにおけるIL-8、IFN γ mRNA発現に対する*P.g.*SE刺激もしくは*A.a.*SE刺激の影響

各種のクラスタに分類される被験部位を有する歯周炎患者より末梢血PBMC(A)ならびに末梢血PMN(B)を分離し*P.g.*SE (1mg/ml)もしくは*A.a.*SE (1mg/ml)存在下で37°Cにて1時間培養後、RT-PCRによりIL-8ならびにIFN γ mRNAの発現を検出した結果の代表例を示す。図中Pt.は歯周炎患者をHは健康人ボランティアを示す。また、A、B、C、D、Eは被験者が有する歯周病罹患部位がどのクラスタに分類されたかを示す。なお、PMNに関してはGAPDH mRNA発現が非常に低いため陰性対照としてCox-1 mRNAの発現を検出した。また、PMNにおいてはIFN γ mRNAの発現は検出されなかった。

*P.g.*SE, *A.a.*SE 刺激により IL-8 mRNA 発現が対照とした健康人の場合と同程度の上昇が認められた。また、PBMC に対する *P.g.*SE, *A.a.*SE 刺激によって IFN γ mRNA 発現上昇が認められた。一方、PMN では IFN γ の mRNA 発現は認められなかった。このことからクラスタ B、C、D でみられた IFN γ または IL-8 mRNA の低発現の原因が *P.g.* ならびに *A.a.* に対する宿主の低応答性によるものではないことが示された (図 12)。

考察

歯周病の病態を正しく理解するためには、炎症歯周組織における宿主の生体応答を客観的かつ詳細に把握することが必須であるとの考えから、本研究では歯肉組織穿刺法によって得られた微量歯肉組織中の複数の炎症関連因子 mRNA 発現を RT-PCR にて検出し、さらにその発現プロファイルのクラスタ分析による解析を行った。その結果、図 8、9 で示すような 5 群に歯周炎の局所で見られる炎症を病型分類することが可能であった。すなわち、クラスタ A: すべての炎症関連因子の高い mRNA 発現が認められる発現型、クラスタ B: IL-6 ならびに IFN γ の mRNA の相対的低発現が認められる発現型、クラスタ C: IFN γ mRNA の相対的低発現が認められる一方、他の因子の mRNA の中等度の発現が認められる発現型、クラスタ D: IL-8 mRNA の相対的低発現が認められる一方、他の因子の mRNA の中等度の発現が認められる発現型、クラスタ E: すべての炎症関連因子 mRNA の発現

が低い発現型、の5つの mRNA 発現プロファイルが存在することが示された。

今回のクラスタ分析を用いた解析の最も意義深い点は、各因子の発現を個々に評価するのではなく、複数の因子の発現を同時に検出し、その発現プロファイルによる病態の評価を試みたことであり、これによって炎症関連因子の mRNA 発現プロファイルの差異で歯周炎を病態分類できる可能性が示されたことである。本研究においても個々の炎症関連因子の発現が、これまでの報告⁽⁷⁾⁽¹²⁾⁽¹⁵⁾⁽¹⁶⁾⁽¹⁷⁾と同様に臨床的炎症所見と強い関連性を有することが示されている (図 6)。しかしながら、この事実は単一因子の発現の高低を検出しても、GI 等の臨床的パラメータの診査によって得られる以上の詳細な病態解析が行えるわけではないことを示唆しているとも言える。Kitamura⁽²⁾⁽⁵⁾⁽¹⁸⁾は GCF 中のプロスタグランデイン E₂、IL-1 α 、IL-1 β とリポ多糖濃度ならびにコラゲナーゼ活性を経時的に測定し、線形判別分析を行うと、GCF 採取部位の疾病活動度を約 60%の確率で識別しうると報告している。この結果は、歯周病の病態を正確に把握するには、局所の炎症状態を反映しうる多因子の同時解析が必須であることを示唆している。Roberts⁽¹⁹⁾⁽²⁰⁾は歯周外科手術時に採取した歯肉組織ならびに健常な歯肉組織における炎症性ならびに抗炎症性サイトカイン mRNA 発現を比較検討し、両者の mRNA 発現の検出頻度に差があると述べており、局所でのサイトカインの発現バランスに差異が存在しうると示唆している。

本研究においては半定量的な検出系と統計学的解析法を用いることで、mRNA 発現の検出頻度のみならず、各炎症関連因子間の mRNA 発現バランスに関する検討を可能とするとともに、客観的なサイトカイン mRNA 発現プロファイル解析を可能とした。その結果、歯周炎病巣局所における炎症関連因子の mRNA 発現プロファイルが 5 種類に分類された (図 8)。この分類のクラスタ B、C、D に見られる特徴である IL-6、8 および IFN γ の各 mRNA の発現が低い病態が存在することは、複数のサイトカインの mRNA 発現プロファイル解析を行うことによって初めて明らかにされたものである (図 9)。また、今回の解析結果より、一被験者の口腔内においても各部位毎で mRNA 発現プロファイルが異な

っていることが示され、異なる炎症病態を示す菌周炎が一口腔内に混在しうること（図 10）が示唆された。これは換言すれば、菌周炎の病理発生機構が、一患者の口腔内であっても部位毎に異なっている場合が存在する可能性を示すものであり、過去の報告で言うランダムバーストセオリー⁽⁴⁾の考え方を裏付けるものであると考えられる。さらに、従来の臨床的診査法に基づけば同一の炎症状態として分類される部位でも異なった mRNA 発現プロファイルを示す例が示され、これらの部位の炎症病態に臨床診査では判別できない差異が存在することが示唆された（表 3）。

本研究では菌周組織での生体応答をモニターするための検体として、菌周炎の特徴である組織破壊が進行する局所である菌周ポケット底部の菌肉組織を選択した。そして初診時においても炎症部位からの組織採取を可能とする組織採取法について検討を行い、穿刺生検法を応用することで、組織に与える外科的侵襲を最小限にしながら菌周ポケット底部、すなわち菌周炎病巣局所から、確実に微量の菌肉組織検体を得る方法を開発した（図 1）。さらに、最も高感度な検出法である RT-PCR を応用することにより同検体中の約 20 種類以上の mRNA の発現を半定量的に解析することを技術的に可能とした。今回確立された方法は組織採取部位の治癒が速やかであるため、菌周治療後の菌肉組織の変化を経時的にモニターすることが可能となり、創傷治癒期における菌肉組織での各種サイトカイン発現変動の解析にも応用できると期待される。

一方、RT-PCR を用いた定量的解析には十分な注意が必要であることが従来より指摘されている。そこで、本研究では RT-PCR による mRNA 発現量検出法の確立にあたり、プライマーの設計、反応液組成、増幅条件を至適化することによって、少なくとも一定の増幅サイクル数の範囲内では半定量的に増幅産物量が増加することを検証した。また、PCR による mRNA 発現の半定量的検出において最も大きな問題とされる PCR 産物の飽和に関しては、サザンハイブリダイゼーションの併用によって PCR 産物の検出感度を向上させ、PCR のサイクル数を低く止めることで回避が可能であることを示した（図 3）。また、

RT-PCR を用いて複数検体間の炎症関連因子 mRNA 発現の比較を行うためには、検体由来の mRNA 濃度もしくは逆転写後の各試料の cDNA 濃度が正確に等しいことが必要とされる。そこで本研究ではハウスキーピング遺伝子である GAPDH mRNA の定量に、通常の PCR に比べて高い定量性を有することが知られている競合 PCR を応用し、cDNA 濃度の均一化を確認した (図 2)。これらの一連の手法により、本研究における RT-PCR を応用した mRNA 発現検出法の半定量性がほぼ達成されているものと考えられる。

これまでのサイトカイン発現量と菌周組織の炎症所見との関連性を調べた報告のほとんどでは、炎症菌周組織におけるサイトカイン発現量の代表値として平均値もしくは最頻値が用いられており、また複数のサイトカイン間の相対的発現バランスの検討が行なわれていないため、少数存在する相対的なサイトカイン低発現部位が見落とされていたものと思われる。本研究において、菌周組織局所における IL-8 ならびに IFN γ の mRNA の発現量は、平均値でみると肉眼的炎症所見とはほぼ正の相関を有している一方で、特に EOP 患者においてこれらの因子の mRNA 低発現が認められる例が存在することが示された。このことは、IL-8 あるいは IFN γ mRNA の炎症菌周組織における相対的低発現性が同部への炎症細胞浸潤の特徴を規定する一因となっている可能性を示すものであり、IL-8 ならびに IFN γ mRNA の相対的低発現性の発生メカニズムが今後さらに詳細に検討されることにより、EOP の発症機序が説明されるかもしれない。

IL-8 は単球、マクロファージ、線維芽細胞、上皮細胞等の細胞から産生される CXC ケモカインで、好中球、T細胞に対する走化性因子であり、特に好中球の血管外浸潤、局所集積に必須の分子である⁽²¹⁾⁽²²⁾。それゆえ IL-8 は菌周炎の発症初期ならびに進行過程において局所への炎症細胞浸潤の制御に重要な役割をはたしているものと考えられている。事実、この IL-8 と菌周炎の関係を示す報告として、菌周炎罹患部では GCF 中の IL-8 量が上昇しているとの報告⁽²³⁾や、急速進行性菌周炎では血清中の IL-8 が上昇しており、菌肉上皮や直下の結合織における IL-8 mRNA 発現も上昇しているとの報告⁽²⁴⁾、LJP においては

GCF の IL-8 濃度が GI と負の相関を示すが、GCF 中の IL-8 の量と濃度は LJP と健常者の間で差がないとする報告⁽¹²⁾が存在する。さらに、IL-8 と他の因子の発現の関連性を検討した報告として、IL-6 と IL-8 の発現は *in vivo* でも *in vitro* でも強く相関しており、歯周病変部から採取した歯肉線維芽細胞では IL-6 や IL-8 を産生しうる表現型が増加しているとの報告⁽²⁵⁾が存在する。

一方、IFN γ は T 細胞ならびに NK 細胞から産生され、リンパ球、単球・マクロファージ等に作用し、主として細胞性免疫応答の制御において中心的な役割を担っている。また、炎症歯周組織においては歯肉線維芽細胞が IFN γ を産生していることが報告されており⁽²⁶⁾⁽²⁷⁾、それゆえ IFN γ は歯周炎病巣局所における Th1/Th2 バランスの制御に深く関与していると考えられる。これまでに、Th1/Th2 バランスに関与することが示唆されている IFN γ 、IL-4、6、10、12 などのサイトカイン⁽²⁸⁾⁽²⁹⁾⁽³⁰⁾⁽³¹⁾の歯周組織における発現を検出した報告⁽³²⁾⁽³³⁾⁽³⁴⁾⁽³⁵⁾が存在するが、Th1、Th2 のいずれのヘルパー T 細胞亜集団が歯周炎の病巣局所において優勢であるかに関しては最終的な結論には至っていない。また、IFN γ ならびに IL-6 の歯周組織破壊への関与に関する報告として、歯周病巣局所では B 細胞/プラズマ細胞が優勢で⁽³⁶⁾⁽³⁷⁾、進行性の歯周病では Th2 が優勢であるとの報告⁽³⁸⁾や、IFN γ または IL-6 を遺伝的に欠失したマウスにおいては *P.g.* 感染による歯槽骨吸収が抑制されることから IFN γ が歯周組織破壊に関与するとした報告⁽³⁹⁾が存在しており、IFN γ mRNA の低発現性から、EOP 患者の急速な歯周組織破壊の機序を説明し得るかもしれない。

それではいかなる要因がクラスター B、C、D に認められるような特定のサイトカインの低発現性を局所で惹起したのであろうか。その原因として、歯周炎の原因たる歯周病原性細菌の質的あるいは量的差異の存在が疑われる。そこで、現在有力な歯周病原性細菌と考えられている *P.g.* と *A.a.* の genomic PCR による高感度検出法を確立し、歯肉組織採取と同時に同一部位の歯周ポケットから歯肉縁下プラークを採取し、これらの細菌の検出を行った。その結果、各クラスター間で *P.g.*、*A.a.* の検出率、検出菌数に明らかな差異は認められ

ず（図 11）、局所の炎症病態がこれらの特定細菌の存在の差異のみによって規定されるわけではないことが示唆された。

このように特定細菌の存在に差異が存在しなかったことから、宿主側に特定のサイトカインの低発現性が存在することが疑われた。そこで、これらの特定細菌に対する宿主細胞の応答性の差異が存在するか否かを検討した。特にクラスタ B、C には EOP 患者の歯周炎罹患部位の多くが分類されたため、これらのクラスタで認められた IL-8 ならびに IFN γ mRNA の相対的低発現性に着目して宿主細胞の応答性を検討した。すなわち EOP 患者ならびに健常者の末梢血から好中球ならびに単核球を分取し、*P.g.*ならびに *A.a.*の超音波破碎上清による刺激を行い、誘導される IL-8 ならびに IFN γ mRNA 発現量の比較を行った。しかしながら、EOP 患者と健常者において誘導される IL-8 ならびに IFN γ mRNA 発現量に著明な差は認められなかった(図 12)。また、LJP 患者においては好中球に遊走能、貪食能等の機能異常が認められるとの報告⁽⁴⁰⁾⁽⁴¹⁾と認められないとする報告⁽⁴²⁾⁽⁴³⁾が混在しているため、今回研究に参加していただいた EOP 患者と健常者の fMLP 刺激に対する好中球遊走能の比較も行ったが、両群の間に有意な差異は認められなかった（結果には示さず）。これらの結果は、クラスタ B、C で認められる IL-8 ならびに IFN γ mRNA の低発現性が宿主の遺伝的要因によって規定されているものではないことを示唆している。上述の解析結果は、今回解析対象としていない宿主の因子が各々のクラスタを形成する直接的な要因となっているか、あるいはそのような因子が IL-8 や IFN γ mRNA 低発現性を惹起する局所の環境を提供している可能性を提示している。さらに、特定のクラスタがその他のクラスタへの移行期のプロファイルを意味する可能性なども考慮し、今後さらなる解析が必要とされる。

本研究によって、歯周病の新しい診断法を開発するための戦略が提案されたと考えられる。すなわち、歯周炎の病巣局所における生体応答を解明し、従来の臨床的診断に用いられてきた AP、EOP という診断病名の枠にとらわれない、病理発生機構の差異に

基づく診断法、病型分類法が提示されなければならないことが示されたと考えられる。一方、各クラス間における疾病活動度の差異あるいは歯周治療に対する反応性の差異、治療後の再発率の差異といった魅力的な研究課題が現時点で残されており、今回開発された方法ならびに評価法が今後、多方面の経時的臨床研究に応用可能なものとして期待される。将来、このような情報の蓄積が、部位特異的な host-modulating drug の開発につながることも期待され、近未来における歯周病に対する個別医療の確立に大いに寄与するものと思われる。

結論

1. 歯周炎病巣局所より同部の侵襲が少なく任意の治療段階で微量歯肉組織を採取する微量歯肉組織穿刺生検法が確立されるとともに、同微量歯肉組織片から RT-PCR を用いて半定量的に 20 種類以上の mRNA 発現を検出し得る検出系が確立された。
2. 歯肉縁下プラークサンプルから genomic PCR を用いて *P.g.* ならびに *A.a.* を高感度かつ半定量的に検出する検出系が確立された。
3. クラスタ分析を用いた歯周病変部局所における各種炎症関連因子 mRNA 発現プロファイルの解析を行った結果、歯周炎が 5 つのクラスタに分類されることが示された。さらにいくつかのクラスタでは IL-8 ならびに IFN γ mRNA の相対的低発現性が認められた。
4. 各クラスタに分類された炎症関連因子 mRNA の発現プロファイルは一口腔内においても必ずしも一様ではなく、部位単位で異なっており、歯周病の診断における部位単位の生体応答の把握の重要性が示された。
5. 炎症関連因子 mRNA 発現プロファイルのうち、IL-8、IFN γ の相対的低発現性は、*P.g.*、*A.a.* の存在の有無や、これらの細菌に対する遺伝的に規定された宿主応答性の差異によって生ずるものではないことが示された。

謝辞

稿を終えるにあたり、御懇篤なる御指導と御校閲を賜りました大阪大学歯学部口腔治療学講座岡田 宏教授、村上伸也講師、北村正博講師に謹んで感謝の意を表します。また、本研究の遂行にあたり、直接御指導頂きました楠本 豊博士、平野裕之博士に深く感謝いたします。

最後に、本研究に対してさまざまな御援助、御協力を頂きました口腔治療学講座教室員の皆様に厚く御礼申し上げます。

参考文献

1. Socransky SS, Haffajee AD, Goodson JM, Lindhe J. New concepts of destructive periodontal disease. *J Clin Periodontol* 1984; 11(1): 21-32.
2. Okada H, Murakami S. Cytokine expression in periodontal health and disease. *Crit Rev Oral Biol Med* 1998; 9(3): 248-66.
3. Nevins M, Becker W, Komman K. Proceedings of the world workshop in clinical periodontics. Tokyo: Quintessence; 1992.
4. Newman MG, Tibbetts LS 1996 Consensus Reports from the 1996 World Workshop in periodontics. Chicago: The American Academy of Periodontology; 1996.
5. Kitamura M, Kohyama A, Ebisu S, Okada H. Distinction between active and inactive lesion by subgingival plaque bacteria and gingival crevicular fluid. *Dentistry in Japan* 1991; 28: 151-4.
6. Kjeldsen M, Holmstrup P, Bendtzen K. Marginal Periodontitis and Cytokines: a review of the literature. *J Periodontol* 1993; 64(11): 1013-22.
7. Lamster IB, Grbic JT. Diagnosis of periodontal disease based on analysis of the host response. *Periodontology 2000* 1995; 7: 83-99.
8. Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 1987; 162(1): 156-9.
9. Shenker BJ, Slots J. Immunomodulatory effects of *Bacteroides* products on in vitro human lymphocyte functions. *Oral Microbiol Immunol* 1989; 4(1): 24-9.
10. Hiratsuka K, Yoshida W, Hayakawa M, Takiguchi H, Abiko Y. Polymerase chain reaction and an outer membrane protein gene probe for the detection of *Porphyromonas gingivalis*. *FEMS Microbiol Lett* 1996; 138(2-3): 167-72.
11. Goncharoff P, Figurski DH, Stevens RH, Fine DH. Identification of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*: polymerase chain reaction amplification of *lktA*-specific sequences. *Oral Microbiol Immunol* 1993; 8(2): 105-10.
12. Ozmeric N, Bal B, Balos K, Berker E, Bulut S. The correlation of gingival crevicular fluid interleukin-8 levels and periodontal status in localized juvenile periodontitis. *J Periodontol* 1998; 69(11): 1299-304.
13. Liu CM, Hou LT, Wong MY, Rossomando EF. Relationships between clinical parameters, Interleukin 1 β and histopathologic findings of gingival tissue in periodontitis patients. *Cytokine* 1996; 8(2): 161-7.

14. Rossomando EF, Kennedy JE, Hadjimichael J. Tumour necrosis factor alpha in gingival crevicular fluid as a possible indicator of periodontal disease in humans. *Arch Oral Biol* 1990; 35(6): 431-4.
15. Offenbacher S, Odle B, Van Dyke T. The use of crevicular fluid prostaglandin E2 levels as a predictor of periodontal attachment loss. *Journal of periodontal Research* 1986; 21: 101-12.
16. Irwin CR, Myrillas TT. The role of IL-6 in the pathogenesis of periodontal disease. *Oral Dis* 1998; 4(1): 43-7.
17. Reinhardt RA, Masada MP, Kaldahl WB, DuBois LM, Kornman KS, Choi JI, et al. Gingival fluid IL-1 and IL-6 levels in refractory periodontitis. *J Clin Periodontol* 1993; 20(3): 225-31.
18. Okada H, Murakami S, Kitamura M, Nozaki T, Kusumoto Y, Hirano H, et al. Diagnostic strategies of periodontitis based on the molecular mechanisms of periodontal tissue destruction. *Oral Dis* 1996; 2(1): 87-95.
19. Roberts FA, Hockett RD, Jr., Bucy RP, Michalek SM. Quantitative assessment of inflammatory cytokine gene expression in chronic adult periodontitis. *Oral Microbiol Immunol* 1997; 12(6): 336-44.
20. Roberts FA, McCaffery KA, Michalek SM. Profile of cytokine mRNA expression in chronic adult periodontitis. *J Dent Res* 1997; 76(12): 1833-9.
21. Matsushima K, Morishita K, Yoshimura T, Lavu S, Kobayashi Y, Lew W, et al. Molecular cloning of a human monocyte-derived neutrophil chemotactic factor (MDNCF) and the induction of MDNCF mRNA by interleukin 1 and tumor necrosis factor. *J Exp Med* 1988; 167(6): 1883-93.
22. Cacalano G, Lee J, Kikly K, Ryan AM, Pitts Meek S, Hultgren B, et al. Neutrophil and B cell expansion in mice that lack the murine IL-8 receptor homolog *Science* 1994; 265(5172): 682-4.
23. Mathur A, Michalowicz B, Castillo M, Aeppli D. Interleukin-1 alpha, interleukin-8 and interferon-alpha levels in gingival crevicular fluid. *J Periodontal Res* 1996; 31(7): 489-95.
24. Gainet J, Chollet Martin S, Brion M, Hakim J, Gougerot Pocidalo MA, Elbim C. Interleukin-8 production by polymorphonuclear neutrophils in patients with rapidly progressive periodontitis: an amplifying loop of polymorphonuclear neutrophil activation. *Lab Invest* 1998; 78(6): 755-62.
25. Dongari Bagtzoglou AI, Ebersole JL. Increased presence of interleukin-6 (IL-6) and IL-8 secreting fibroblast subpopulations in adult periodontitis. *J Periodontol* 1998; 69(8): 899-910.
26. Shimabukuro Y, Murakami S, Okada H. Interferon-gamma-dependent immunosuppressive effects of human gingival fibroblasts. *Immunology* 1992; 76(2): 344-7.

27. Shimabukuro Y, Murakami S, Okada H. Antigen-presenting-cell function of interferon gamma-treated human gingival fibroblasts. *J Periodontal Res* 1996;31(3):217-28.
28. Mosmann TR, Coffman RL. Th1 and Th2 cells: Different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu Rev Immunol* 1989; 7: 145-73.
29. Del Prete GF, De Carli M, Mastromauro C, Biagiotti R, Macchia D, Falagiani P, et al. Purified protein derivative of *Mycobacterium tuberculosis* and excretory-secretory antigen(s) of *Toxocara canis* expand in vitro human T cells with stable and opposite (type 1 T helper or type 2 T helper) profile of cytokine production. *J Clin Invest* 1991; 88(1): 346-50.
30. Mosmann TR, Sad S. The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more. *Immunol Today* 1996; 17(3): 138-46.
31. Fiorentino DF, Bond MW, Mosmann TR. Two types of mouse T helper cell. IV. Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones. *J Exp Med* 1989; 170(6): 2081-95.
32. Taubman M, Eastcitt J, Shimauchi H, Takeichi O, Smith D. Modulatory role of T lymphocytes in periodontal inflammation. Washington, DC: ASM press; 1994.
33. Yamazaki K, Nakajima T, Kubota Y, Gemmell E, Seymour GJ, Hara K. Cytokine messenger RNA expression in chronic inflammatory periodontal disease. *Oral Microbiol Immunol* 1997; 12(5): 281-7.
34. Seymour GJ, Gemmell E, Kjeldsen M, Yamazaki K, Nakajima T, Hara K. Cellular immunity and hypersensitivity as components of periodontal destruction. *Oral Dis* 1996; 2(1): 96-101.
35. Seymour GJ, Gemmell E, Westerman B, Cullinan M. Periodontics into the 21st century. *Ann R Australas Coll Dent Surg* 1996; 13: 71-8.
36. Mackler BF, Frostad KB, Robertson PB. Immunoglobulin bearing lymphocytes and plasma cells in human periodontal disease. *J Periodontal Res* 1977; 12: 37-45.
37. Okada H, Kida T, Yamagami H. Identification and distribution of immunocomponent cells in inflamed gingiva of human chronic periodontitis. *Infect Immun* 1983; 41: 365-74.
38. Gemmell E, Seymour G. Modulation of immune responses to periodontal bacteria. *Curr Opin Periodontol* 1994; 2: 28-38.
39. Baker PJ, Dixon M, Evans RT, Dufour L, Johnson E, Roopenian DC. CD4(+) T cells and the proinflammatory cytokines gamma interferon and interleukin-6 contribute to alveolar bone loss in mice. *Infect Immun* 1999; 67(6): 2804-9.

40. Page RC, Sims TJ, Geissler F, Altman LC, Baab DA. Defective neutrophil and monocyte motility in patients with early onset periodontitis. *Infect Immun* 1985; 47(1): 169-75.
41. Perez HD, Kelly E, Elfman F, Armitage G, Winkler J. Defective polymorphonuclear leukocyte formyl peptide receptor(s) in juvenile periodontitis. *J Clin Invest* 1991; 87(3): 971-6.
42. Kinane DF, Cullen CF, Johnston FA, Evans CW. Neutrophil chemotactic behaviour in patients with early-onset forms of periodontitis (II). Assessment using the under agarose technique. *J Clin Periodontol* 1989; 16(4): 247-51.
43. Kinane DF, Cullen CF, Johnston FA, Evans CW. Neutrophil chemotactic behaviour in patients with early-onset forms of periodontitis (I). Leading front analysis in Boyden chambers. *J Clin Periodontol* 1989; 16(4): 242-6.