

# ヒト歯肉線維芽細胞からの炎症性サイトカイン産生に 対する amphotericin B の修飾作用

小林良誌<sup>1</sup> 玉井利代子<sup>2</sup> 清浦有祐<sup>2</sup>

## Amphotericin B Modulates Inflammatory Cytokine Production in Human Gingival Fibroblasts

Yoshifumi KOBAYASHI, Riyoko TAMAI<sup>1</sup> and Yusuke KIYOURA<sup>1</sup>

Amphotericin B (AMPH) is a representative polyene anti-mycotic that reportedly increases the host defense mechanism, thereby indirectly inhibiting fungal infection. The present study determined the effects of AMPH on human gingival fibroblast-mediated inflammatory cytokine production in response to infection by the oral indigenous bacteria *Fusobacterium nucleatum* (*F. nucleatum*).

Human gingival fibroblasts were cultured for 24 hours in 10% FBS containing  $\alpha$ -MEM medium in 96-well microplates at  $1 \times 10^5$ /ml (0.2 ml/well). Following this, AMPH and a *F. nucleatum* suspension was added, and the fibroblasts were cultured for an additional 24 hours. Levels of inflammatory cytokines IL-6, IL-8, and MCP-1 in the culture medium were measured using ELISA kits.

Production of IL-6 and IL-8 was significantly greater when 2.5  $\mu$ g/ml AMPH was added concurrently with a *F. nucleatum* suspension ( $1 \times 10^5$  CFU/ml), compared to *F. nucleatum* treatment alone. However, AMPH significantly decreased human gingival fibroblast-mediated MCP-1 production in response to *F. nucleatum*.

These results suggest that AMPH both enhances and inhibits bacteria-mediated host cell inflammatory cytokine production. Accordingly, AMPH may be cytotoxic to the host cell by causing disarray in the host cell's cytokine network.

Key words : amphotericin B, inflammatory cytokine, human gingival fibroblasts, cytokine

### 緒 言

Amphotericin B (AMPH) はポリエン系の代表的な抗真菌薬であり、*Candida albicans*(*C. albicans*) が主たる原因であるカンジダ症などの真菌感染症の治療に広く使用されている<sup>1-4)</sup>。

AMPH は真菌の細胞膜の ergosterol に結合して、細胞膜を傷害することで殺菌作用を示す<sup>1,5)</sup>。一方、そのような直接的な殺菌作用以外に宿主の感染防御機能を亢進させることで、真菌感染を抑制する側面も AMPH にあることが報告されている<sup>1,5-8)</sup>。このような作用は、AMPH 以外の抗真菌薬でも

受付：平成24年3月27日，受理：平成24年4月24日  
奥羽大学大学院歯学研究科口腔感染症学専攻<sup>1</sup>  
奥羽大学歯学部口腔病態解析制御学講座<sup>2</sup>  
(指導：清浦有祐教授)

Department of Oral Infectious Diseases, Ohu University, Graduate School of Dentistry<sup>1</sup>  
Department of Oral Medical Science, Ohu University School of Dentistry<sup>2</sup>  
(Director : Prof. Yusuke KIYOURA)

報告されており、*C. albicans* を始めとした真菌感染症では免疫応答を介した間接的な抗真菌作用の発現が認められる<sup>9-12)</sup>。AMPH が感染防御機能を高めるメカニズムの一つとして、Toll-like receptor (TLR) のリガンドとなることが考えられる<sup>1,13)</sup>。TLR は白血球などの感染防御に携わる細胞が持つレセプターで、病原微生物の菌体成分を認識してサイトカインを産生することで宿主の感染防御機能を高める<sup>1,13)</sup>。AMPH は *Streptomyces nodosus* の産生物のため、微生物の菌体成分として TLR によって認識されることが報告されている<sup>1)</sup>。

TLR を介した宿主の白血球の活性化は、ヒトに傷害的に作用する可能性もある<sup>9,14)</sup>。我々は、骨粗鬆症治療薬である bisphosphonates が起こす顎骨壊死の発症に bisphosphonates のサイトカイン産生増強作用が関与する可能性を報告している<sup>14,15)</sup>。その中でマクロファージおよび歯肉線維芽細胞の TLR は歯周病原性細菌を認識し、サイトカインを産生すること、および、bisphosphonates によって細胞質タンパクの caspase-1 および Smad3 が活性化されることでサイトカイン産生が亢進することを示した<sup>14,15)</sup>。

したがって、カンジダ症の治療において *C. albicans* の殺菌を目的に AMPH を投与した場合、宿主の常在微生物に対する過剰な免疫応答が起こる可能性が考えられる。

AMPH による宿主細胞の免疫応答増強に関しては、主に好中球、マクロファージやリンパ球などの白血球を中心に報告されている<sup>1,16)</sup>。しかしながら、代表的な真菌感染症であるカンジダ症は口腔領域で起こることが多く、口腔組織の細胞に対する AMPH の影響についても明らかにする必要性が指摘されている<sup>4,17-19)</sup>。本研究では、歯周病原性細菌の 1 種でヒトの口腔内に多く存在する *Fusobacterium nucleatum* (*F. nucleatum*)<sup>20,21)</sup> に対するヒト歯肉線維芽細胞の宿主応答に及ぼす AMPH の影響を炎症性サイトカインの産生に焦点を当てて、明らかにすることを試みた。

## 材料と方法

### 1. AMPH の調整

250  $\mu\text{g/ml}$  の AMPH 溶液 (Sigma, St. Louis,

MO, USA) を実験に際して、10% ウシ胎児血清 (fetal bovine serum, FBS ; GIBCO, Carlsbad, CA, USA) 含有  $\alpha$ -minimal essential medium ( $\alpha$ -MEM) 培養液 (Sigma, St. Louis, MO, USA) で各濃度に調整した。

### 2. *F. nucleatum* の調整

*F. nucleatum* ATCC10953 株を GAM ブイヨン (日本製薬, 東京) で 37°C, 嫌気条件下で 48 時間培養した。実験に際しては、無血清  $\alpha$ -MEM 培養液で菌を 3 回洗浄後、10% FBS 含有  $\alpha$ -MEM 培養液で図に示す濃度になるように調整した。

### 3. ヒト歯肉線維芽細胞の培養

ヒト歯肉線維芽細胞は、我々がヒト歯肉組織から分離して凍結保存している細胞を溶解して使用した<sup>15)</sup>。具体的には 37°C 温浴で溶解した細胞をプラスチックディッシュ (Falcon, BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA) で 10% FBS 含有  $\alpha$ -MEM 培養液を使用して 37°C, 5% CO<sub>2</sub>-95% 湿空气中で培養した。ディッシュ内で細胞がコンフルエントな状態になった時に 0.05% trypsin 溶液を加えて細胞を剥離させた。剥離した細胞は、1000rpm で 5 分間の遠心処理によって沈殿させた。沈殿させた細胞は無血清  $\alpha$ -MEM 培養液で洗浄し、同様の遠心処理を行った。次に、沈殿した歯肉線維芽細胞を 10% FBS 含有  $\alpha$ -MEM 培養液で  $1 \times 10^5/\text{ml}$  になるように調整した。その細胞溶液を 96 well マイクロプレート (Falcon, BD Biosciences) の各 well に 0.2ml 加えて、24 時間培養した。

培養後に培養液を除去し、無血清  $\alpha$ -MEM 培養液で well 内を 3 回洗浄した。次に well 内に、任意の濃度に調整した AMPH 溶液 100  $\mu\text{l}$  と *F. nucleatum* 菌液 100  $\mu\text{l}$  を加えた。なお、各 well の最終溶液量は 200  $\mu\text{l}$  になるように 10% FBS 含有  $\alpha$ -MEM 培養液を加えて調整して、24 時間培養した。

### 4. 各種サイトカインの測定

培養終了後に 96 well プレートに 1500rpm で 5 分間遠心処理を行い、培養上清を回収してサイトカインの定量に用いた。サイトカイン量は、ELISA キット (eBioscience, San Diego, CA, USA,

R & D Systems, Minneapolis, MN, USA および Bender MedSystems, Vienna, Austria) を使用して測定した。サイトカインは, interleukin-6 (IL-6), interleukin-8 (IL-8), monocyte chemoattractant protein -1 (MCP-1), interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), tumor necrosis factor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ),  $\gamma$ -interferon ( $\gamma$ -IFN) の6種類である。

## 5. 統計処理

統計処理は one - way analysis of variance を用いた分散分析の後, Bonferroni or Dunn method による多重比較検定を行った。

## 結 果

### 1. AMPH および *F. nucleatum* による IL-6 産生誘導作用

AMPH と *F. nucleatum* をそれぞれ単独, もしくは両方をヒト歯肉線維芽細胞に加えて24時間培養した。培養終了後に培養上清を回収して, 上清中のサイトカインを調べた。その結果を図1に示す。

AMPH のみを2.5  $\mu$ g/ml 加えて24時間培養した場合は, 歯肉線維芽細胞からの有意な IL-6 の産生が認められなかった。一方, *F. nucleatum* を  $1 \times 10^7$  CFU/ml 加えた場合は菌を加えない場合と比較して IL-6 の産生が有意に高かった。さらに, 2.5  $\mu$ g/ml の濃度の AMPH を *F. nucleatum*  $1 \times 10^6$  CFU/ml, もしくは  $1 \times 10^7$  CFU/ml と同時に加えた場合は, *F. nucleatum* 単独よりも IL-6 の産生が有意に増強された。なお, 結果には示していないが, IL-6 の産生を認めたのと同じ培養条件で IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ ,  $\gamma$ -IFN の産生についても調べた。しかし, 産生は認められなかった。

次に AMPH の添加濃度を0.4  $\mu$ g/ml, 1.0  $\mu$ g/ml, 2.5  $\mu$ g/ml に変化させて24時間培養し, IL-6 に及ぼす影響を調べた (図2)。すでに図1で示したように, 2.5  $\mu$ g/ml の濃度の AMPH は *F. nucleatum*  $1 \times 10^7$  CFU/ml の刺激による歯肉線維芽細胞からの IL-6 産生を有意に増強したが, 0.4  $\mu$ g/ml および1.0  $\mu$ g/ml の濃度の AMPH ではそのような効果は認められなかった。また, いずれの濃度の AMPH でも単独で有意な IL-6 の産生は認められなかった。

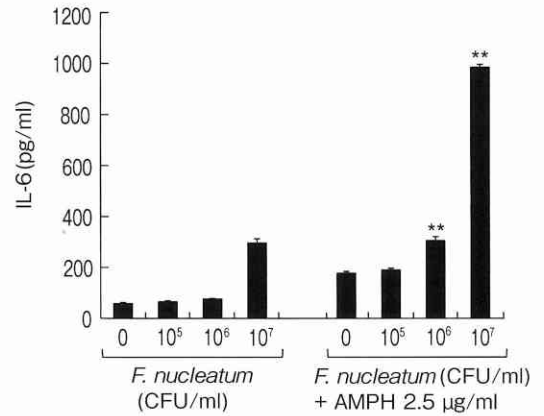


図1 Amphotericin B (AMPH) 2.5  $\mu$ g/mlによる*F. nucleatum* 誘導IL-6産生の増加。平均値 $\pm$ SEを示す  
\*\* $P < 0.01$ , compared with *F. nucleatum* without AMPH.

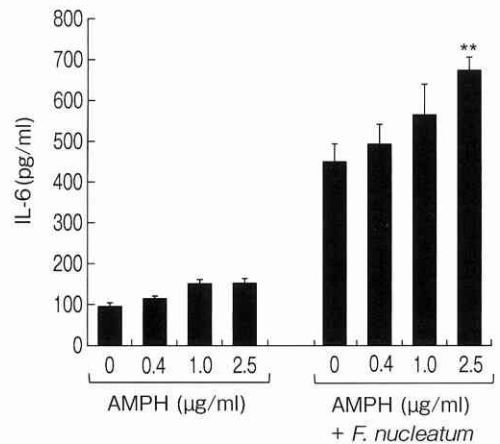


図2 Amphotericin B (AMPH) による *F. nucleatum* ( $10^7$  CFU/ml) 誘導 IL-6産生の濃度依存的増加。平均値 $\pm$ SEを示す  
\*\* $P < 0.01$ , compared with *F. nucleatum*  $10^7$  CFU/ml without AMPH.

### 2. AMPH および *F. nucleatum* による IL-8 産生誘導作用

IL-6の場合と同様に AMPH と *F. nucleatum* をそれぞれ単独, もしくは両方を同時にヒト歯肉線維芽細胞に加えて24時間培養した (図3)。IL-8も IL-6と同様に2.5  $\mu$ g/ml の濃度の AMPH を *F. nucleatum*  $1 \times 10^7$  CFU/ml と共に加えた場合は, IL-8の歯肉線維芽細胞からの産生が *F. nucleatum* 単独よりも有意に増加した。しかし,

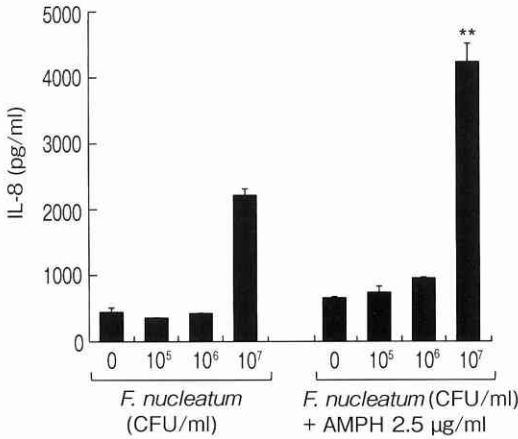


図3 Amphotericin B (AMPH) 2.5 µg/ml による *F. nucleatum* 誘導 IL-8 産生の増加. 平均値±SEを示す  
\*\**P* < 0.01, compared with *F. nucleatum* without AMPH.

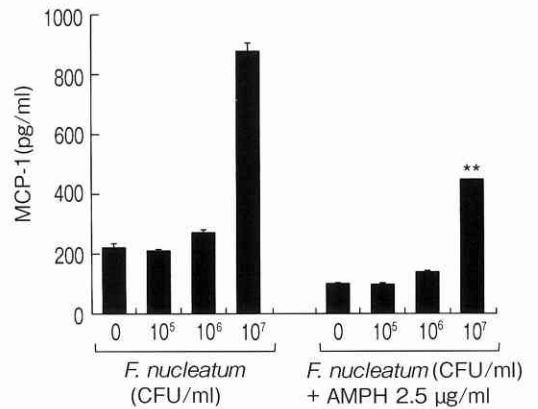


図5 Amphotericin B (AMPH) 2.5 µg/ml による *F. nucleatum* 誘導 MCP-1 産生の減少. 平均値±SEを示す  
\*\**P* < 0.01, compared with *F. nucleatum* without AMPH.

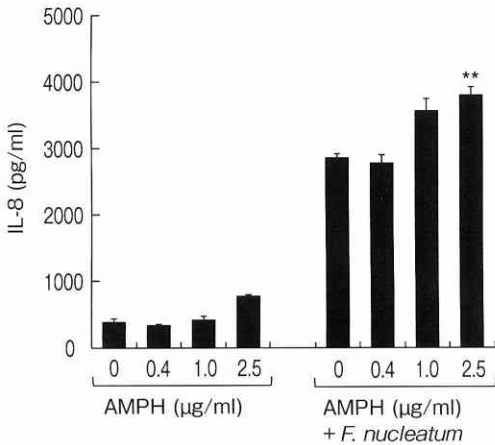


図4 Amphotericin B (AMPH) による *F. nucleatum* (10<sup>7</sup> CFU/ml) 誘導 IL-8産生の濃度依存的増加. 平均値±SEを示す  
\*\**P* < 0.01, compared with *F. nucleatum* 10<sup>7</sup> CFU/ml without AMPH.

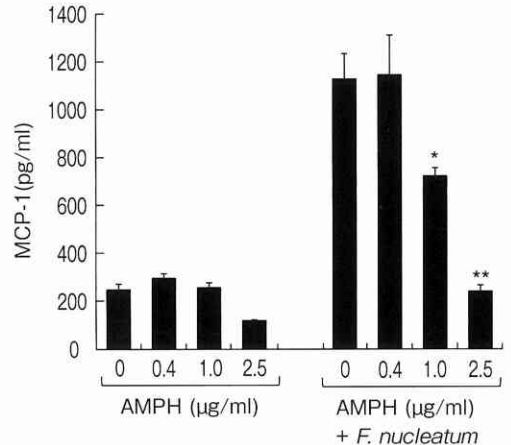


図6 Amphotericin B (AMPH) による *F. nucleatum* (10<sup>7</sup> CFU/ml) 誘導 MCP-1産生に対する濃度依存的抑制. 平均値±SEを示す  
\**P* < 0.05 and \*\**P* < 0.01, compared with *F. nucleatum* 10<sup>7</sup> CFU/ml without AMPH.

IL-6とは異なって1×10<sup>6</sup>CFU/mlの菌数ではIL-8産生の増加は認められなかった。

さらに AMPH の濃度を0.4 µg/ml, 1.0 µg/ml, 2.5 µg/mlにした場合, *F. nucleatum* による IL-8産生に対する増強作用は0.4 µg/ml および 1.0 µg/ml の濃度の AMPH では認められなかった (図4)。また, いずれの濃度の AMPH でも単独で有意な IL-8の産生増加を認めなかった。

### 3. *F. nucleatum* による MCP-1 産生誘導に対する AMPH の抑制作用

1×10<sup>7</sup> CFU/ml の *F. nucleatum* を歯肉線維芽細胞に加えて24時間培養した場合, 有意に高い MCP-1産生が認められた。しかし, 2.5 µg/ml 濃度の AMPH を *F. nucleatum* 1×10<sup>7</sup> CFU/ml と同時添加した場合は, *F. nucleatum* 単独よりも歯肉線維芽細胞からの MCP-1産生が有意に抑制

された (図5)。

AMPH の濃度を  $0.4 \mu\text{g/ml}$ ,  $1.0 \mu\text{g/ml}$ ,  $2.5 \mu\text{g/ml}$  にすると MCP-1 産生抑制作用は、 $2.5 \mu\text{g/ml}$  の他に  $1.0 \mu\text{g/ml}$  の濃度の AMPH でも認められた (図6)。

以上のことから、AMPH は IL-6 や IL-8 の場合とは異なり、歯肉線維芽細胞からの MCP-1 の産生を抑制することが示された。

## 考 察

抗真菌薬である AMPH が宿主の免疫機能を亢進することは、*in vitro* におけるマクロファージのサイトカイン産生を指標とした実験系で報告されている<sup>15-8,16)</sup>。しかし、このような AMPH の薬理作用は過剰なサイトカイン産生が宿主に傷害をもたらすことで、有害事象となる可能性も考えられる。AMPH は、細菌である *Streptomyces nodosus* の産生物である<sup>1)</sup>。したがって、宿主内に病原微生物の構成成分が侵入した場合と同様に、免疫担当細胞表面の TLR2 と CD14 によって認識される<sup>1)</sup>。その後、細胞内の MyD88 と NF- $\kappa$ B を介したサイトカイン遺伝子の発現が惹起される<sup>1)</sup>。

本研究では、AMPH が *F. nucleatum* に対する歯肉線維芽細胞のサイトカイン産生に対して産生増強と抑制の二面性を持つことを明らかにした。*F. nucleatum* はヒトの口腔常在菌であり、ヒト歯根膜細胞の持つ TLR2 と TLR4 によって認識されることが報告されている<sup>21)</sup>。

*F. nucleatum* の刺激による歯肉線維芽細胞からのサイトカイン産生が認められた IL-6, IL-8, MCP-1 の中で、MCP-1 のみが AMPH によって産生が抑制された。同じ炎症性サイトカインの中でこのような違いが認められた理由としては、以下のようなことが考えられる。我々は骨吸収抑制薬である alendronate が、J774.1 細胞の MCP-1 産生に対して抑制作用を示し、IL-6 に対しては増強作用を示すことを報告した<sup>22)</sup>。TLR2、もしくは TLR4 リガンドの刺激によって TLR を介した細胞内の NF- $\kappa$ B の活性化が起きて MCP-1 は産生されることが示されている<sup>22)</sup>。しかし、その際に細胞を alendronate で前処理した場合は、TLR のリガンドで刺激しても MCP-1 の産生は前

処理しない場合と比較して有意に抑制されている<sup>22)</sup>。その理由として、alendronate が J774.1 細胞内で転写因子である Smad 3 の活性化を起こすことを示唆している。Smad 3 は IL-6 の転写は促進するが、MCP-1 の転写は抑制することが明らかにされている<sup>22-24)</sup>。AMPH と alendronate は、IL-6 の産生増強と MCP-1 の産生抑制という同様な免疫薬理作用を示す。このことから、AMPH の IL-6 と MCP-1 産生に対する相反した作用は線維芽細胞の持つ Smad 3 を活性化するためと考えられる。なお、alendronate による IL-6 産生増強の原因としては、J774.1 細胞の IL-1 $\beta$  産生が増強され、この IL-1 $\beta$  が IL-6 の産生を増強する可能性が示されている<sup>25, 26)</sup>。しかし、今回使用した歯肉線維芽細胞は IL-1 $\beta$  を産生しなかった。したがって、AMPH が IL-1 $\beta$  の産生を誘導して IL-6 の産生が増強されるとは考えられない。

なお、Inadera らは環境エストロゲンがヒト乳癌細胞の MCP-1 産生を抑制することを報告した<sup>27)</sup>。そのメカニズムとして、MCP-1 遺伝子発現調節領域に存在する NF- $\kappa$ B 領域を介して転写活性が抑制されるためとしている。したがって、このような各々のサイトカインに特有な抑制メカニズムが働く可能性も考えられる。

ヒト歯肉線維芽細胞は、ヒトの白血球と同様に TLR を細胞表面に保持し、微生物の病原因子を認識する。そして、NF- $\kappa$ B の活性化などの一連のシグナルトランスダクションを惹起してサイトカインを産生する<sup>15)</sup>。したがって、歯肉線維芽細胞で認められた IL-6 と MCP-1 の産生増強・抑制作用は白血球全般でも認められると考えられる。

一方、歯肉線維芽細胞は *F. nucleatum* の刺激によって IL-6, IL-8 および MCP-1 を対照に比較して有意に高く産生した。しかし、白血球と比較すると産生するサイトカインの種類が限定される。今回、IL-6, IL-8, さらに MCP-1 を検出した同一の培養液中を調べても IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ ,  $\gamma$ -IFN のような典型的な炎症性サイトカインは検出されなかった。したがって、AMPH が歯肉線維芽細胞の限定的なサイトカイン産生をさらに増強、もしくは抑制することで細菌感染に伴う炎症反応を一定の方向に誘導することになると考え

られる。

特に産生増強が認められた IL-6 は、炎症反応の中心的な役割を担うヘルパー T 細胞の 17 型を未分化 T 細胞から発生させる役目を持つサイトカインである<sup>28, 29)</sup>。また、歯周病における歯周組織破壊に IL-6 が重要な役割を担うことは明らかにされている<sup>30)</sup>。IL-6 は、線維芽細胞からの血管内皮細胞増殖因子やカテプシンの産生を増強する。血管内皮細胞は組織の炎症を増悪し、カテプシンは組織の基質タンパクを分解することで歯周組織の炎症と破壊を誘導する<sup>30)</sup>。

次に IL-8 は IL-6 と同様な炎症性サイトカインであるが、好中球を感染局所に集めると共に活性化させるケモカインとしても作用する。その産生は、さまざまな微生物感染の際に高まることが明らかにされている<sup>31-33)</sup>。

また、MCP-1 も同じく炎症反応を促進するタンパク質因子であるが、感染部位に単球・マクロファージを遊走させるケモカインである<sup>24, 34, 35)</sup>。したがって、微生物感染において、MCP-1 産生が抑制されることは、マクロファージによる感染微生物の迅速な除去を妨げることに繋がる可能性がある。

AMPH の有害事象としては腎機能障害があり、低カルシウム血症、低マグネシウム血症、多尿症などを起こすことが報告されている<sup>36-38)</sup>。さらに今回示したように、口腔領域における AMPH の投与は、口腔常在微生物に対する炎症性サイトカインの過剰な産生を誘導する可能性も考えられる。したがって、AMPH の使用に際しては、サイトカイン産生の乱れが生じる可能性を考慮する必要がある。

## 文 献

- 1) Sau, K., Mambula, S. S., Latz, E., Henneke, P., Golenbock, D. T., Levitz, S. M. : The antifungal drug amphotericin B promotes inflammatory cytokine release by a Toll-like receptor- and CD14-dependent mechanism. *J. Biol. Chem.* **278** ; 37561-37568 2003.
- 2) Borg-von Zepelin, M., Kunz, L., Rùchel, R., Reichard, U., Weig, M., Gross, U. : Epidemiology and antifungal susceptibilities of *Candida* spp. to six antifungal agents : results from a surveillance study on fungaemia in Germany from July 2004 to August 2005. *J. Antimicrob. Chemother.* **60** ; 424-428 2007.
- 3) Yang, C., Gong, W., Lu, J., Zhu, X., Qi, Q. : Antifungal drug susceptibility of oral *Candida albicans* isolates may be associated with apoptotic responses to Amphotericin B. *J. Oral Pathol. Med.* **39** ; 182-187 2010.
- 4) Schelenz, S., Abdallah, S., Gray, G., Stubblings, H., Gow, I., Baker, P., Hunter, P. R. : Epidemiology of oral yeast colonization and infection in patients with hematological malignancies, head neck and solid tumors. *J. Oral Pathol. Med.* **40** ; 83-89 2011.
- 5) Mozaffarian, N., Berman, J. W., Casadevall, A. : Enhancement of nitric oxide synthesis by macrophages represents an additional mechanism of action for amphotericin B. *Antimicrob. Agents Chemother.* **41** ; 1825-1829 1997.
- 6) Chia, J. K., Pollack, M. : Amphotericin B induces tumor necrosis factor production by murine macrophages. *J. Infect. Dis.* **159** ; 113-116 1989.
- 7) Tokuda, Y., Tsuji, M., Yamazaki, M., Kimura, S., Abe, S., Yamaguchi, H. : Augmentation of murine tumor necrosis factor production by amphotericin B in vitro and in vivo. *Antimicrob. Agents Chemother.* **37** ; 2228-2230 1993.
- 8) Tohyama, M., Kawakami, K., Saito, A. : Anticryptococcal effect of amphotericin B is mediated through macrophage production of nitric oxide. *Antimicrob. Agents Chemother.* **40** ; 1919-1923 1996.
- 9) Ben-Ami, R., Lewis, R. E., Kontoyiannis, D. P. : Immunocompromised hosts : immunopharmacology of modern antifungals. *Clin. Infect. Dis.* **47** ; 226-235 2008.
- 10) Cenci, E., Mencacci, A., Del Sero, G., Bistoni, F., Romani, L. : Induction of protective Th1 responses to *Candida albicans* by antifungal therapy alone or in combination with an interleukin-4 antagonist. *J. Infect. Dis.* **176** ; 217-226 1997.
- 11) Mencacci, A., Cenci, E., Bacci, A., Bistoni, F., Romani, L. : Host immune reactivity determines the efficacy of combination immunotherapy and antifungal chemotherapy in candidiasis. *J. Infect. Dis.* **181** ; 686-694 2000.
- 12) Clemons, K. V., Brummer, E., Stevens, D. A. : Cytokine treatment of central nervous system infection : efficacy of interleukin-12 alone and synergy with conventional antifungal therapy in experimental cryptococcosis. *Antimicrob. Agents Chemother.* **38** ; 460-464 1994.

- 13) Razonable, R. R., Henault, M., Lee, L. N., Laethem, C., Johnston, P. A., Watson, H. L., Paya, C. V. : Secretion of proinflammatory cytokines and chemokines during amphotericin B exposure is mediated by coactivation of toll-like receptors 1 and 2. *Antimicrob. Agents Chemother.* **49** ; 1617-1621 2005.
- 14) Deng, X., Tamai, R., Endo, Y., Kiyoura, Y. : Alendronate augments interleukin-1 $\beta$  release from macrophages infected with periodontal pathogenic bacteria through activation of caspase-1. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **235** ; 97-104 2009.
- 15) Tamai, R., Sugiyama, A., Kiyoura, Y. : Alendronate regulates cytokine production induced by lipid A through nuclear factor- $\kappa$ B and Smad3 activation in human gingival fibroblasts. *J. Periodontal Res.* **46** ; 13-20 2011.
- 16) Cleary, J. D., Chapman, S. W., Nolan, R. L. : Pharmacologic modulation of interleukin-1 expression by amphotericin B-stimulated human mononuclear cells. *Antimicrob. Agents Chemother.* **36** ; 977-981 1992.
- 17) Ellepola, A. N., Samaranyake, L. P. : Oral candidal infections and antimycotics. *Crit. Rev. Oral Biol. Med.* **11** ; 172-198 2000.
- 18) Kamagata-Kiyoura, Y., Abe, S., Yamaguchi, H., Nitta T. : Detachment activity of human saliva *in vitro* for *Candida albicans* cells attached to a plastic plate. *J. Infect. Chemother.* **9** ; 215-220 2003.
- 19) Epstein, J. B., Polsky, B. : Oropharyngeal candidiasis : a review of its clinical spectrum and current therapies. *Clin. Ther.* **20** ; 40-57 1998.
- 20) Steeves, C. H., Potrykus, J., Barnett, D. A., Bearne S. L. : Oxidative stress response in the opportunistic oral pathogen *Fusobacterium nucleatum*. *Proteomics.* **11** ; 2027-2037 2011.
- 21) Sun, Y., Shu, R., Li, C. L., Zhang, M.Z. : Gram-negative periodontal bacteria induce the activation of Toll-like receptors 2 and 4, and cytokine production in human periodontal ligament cells. *J. Periodontol.* **81** ; 1488-1496 2010.
- 22) Masuda, T., Deng, X., Tamai, R. : Mouse macrophages primed with alendronate down-regulate monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) and macrophage inflammatory protein-1 $\alpha$  (MIP-1 $\alpha$ ) production in response to Toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4 agonist via Smad3 activation. *Int. Immunopharmacol.* **9** ; 1115-1121 2009.
- 23) Spooner, C. J., Guo, X., Johnson, P. F., Schwartz, R. C. : Differential roles of C/EBP $\beta$  regulatory domains in specifying MCP-1 and IL-6 transcription. *Mol. Immunol.* **44** ; 1384-1392 2007.
- 24) Feinberg, M. W., Shimizu, K., Lebedeva, M., Haspel, R., Takayama, K., Chen, Z., Frederick, J. P., Wang, X. F., Simon, D. I., Libby, P., Mitchell, R. N., Jain, M. K. : Essential role for Smad3 in regulating MCP-1 expression and vascular inflammation. *Circ. Res.* **94** ; 601-608 2004.
- 25) Sanders, J. L., Tarjan, G., Foster, S. A., Stern, P. H. : Alendronate/ interleukin-1 $\beta$  cotreatment increase interleukin-6 in bone and UMR-106 cells : dose dependence and relationship to the antiresorptive effect of alendronate. *J. Bone Miner. Res.* **13** ; 786-792 1998.
- 26) Ono, M., Kantoh, K., Ueki, J., Shimada, A., Wakabayashi, H., Matsuta, T., Sakagami, H., Kumada, H., Hamada, N., Kitajima, M., Oizumi, H., Oizumi, T. : Quest for anti-inflammatory substances using IL-1 $\beta$ -stimulated gingival fibroblasts. *In Vivo.* **25** ; 763-768 2011.
- 27) Inadera, H., Sekiya, T., Yoshimura, T., Matsu-shima, K. : Molecular analysis of the inhibition of monocyte chemoattractant protein-1 gene expression by estrogens and xenoestrogens in MCF-7 cells. *Endocrinology* **141** ; 50-59 2000.
- 28) Bettelli, E., Carrier, Y., Gao, W., Korn, T., Strom, T. B., Oukka, M., Weiner, H. L., Kuch-roo, V. K. : Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature* **441** ; 235-238 2006.
- 29) Veldhoen, M., Hocking, R. J., Atkins, C. J., Locksley, R. M., Stockinger, B. : TGF- $\beta$  in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells. *Immunity.* **24** ; 179-189 2006.
- 30) 成石浩司 : 線維芽細胞を中心とした歯周病・歯肉増殖症の病態形成に関する基礎的研究. *日歯周誌* **51** ; 7-18 2009.
- 31) Mukaida, N., Harada, A., Matsushima, K. : Interleukin-8 (IL-8) and monocyte chemoattractant and activating factor (MCAF/MCP-1), chemokines essentially involved in inflammatory and immune reactions. *Cytokine Growth Factor Rev.* **9** ; 9-23 1998.
- 32) Shalit, I., Halperin, D., Haite, D., Levitov, A., Romano, J., Oshero, N., Fabian, I. : Anti-inflammatory effects of moxifloxacin on IL-8, IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  secretion and NF $\kappa$ B and

- MAP-kinase activation in human monocytes stimulated with *Aspergillus fumigatus*. *J. Antimicrob. Chemother.* **57** ; 230-235 2006.
- 33) Chung, H. K., Kim, O. Y., Lee, H., Do, H. J., Kim, Y. S., Oh, J., Kang, S. M., Shin, M. J. : Relationship between dietary folate intake and plasma monocyte chemoattractant protein-1 and interleukin-8 in heart failure patients. *J. Clin. Biochem. Nutr.* **49** ; 62-66 2011.
- 34) Charo, I. F., Taubman, M. B. : Chemokines in the pathogenesis of vascular disease. *Circ Res.* **95** ; 858-866 2004.
- 35) Esche, C., Stellato, C., Beck, L. A. : Chemokines : key players in innate and adaptive immunity. *J. Invest. Dermatol.* **125** ; 615-628 2005.
- 36) Laniado-Laborin, R., Cabrales-Vargas, M. N. : Amphotericin B : side effects and toxicity. *Rev. Iberoam. Micol.* **26** ; 223-227 2009.
- 37) Tonomura, Y., Yamamoto, E., Kondo, C., Itho, A., Tsuchiya, N., Uehara, T., Baba, T. : Amphotericin B-induced nephrotoxicity : characterization of blood and urinary biochemistry and renal morphology in mice. *Hum. Exp. Toxicol.* **28** ; 293-300 2009.
- 38) Safdar, A., Ma, J., Saliba, F., Dupont, B., Wingard, J. R., Hachem, R. Y., Mattiuzzi, G. N., Chandrasekar, P. H., Kontoyiannis, D. P., Rolston, K. V., Walsh, T. J., Champlin, R. E., Raad, I. I. : Drug-induced nephrotoxicity caused by amphotericin B lipid complex and liposomal amphotericin B : a review and meta-analysis. *Medicine* **89** ; 236-244 2010.

著者への連絡先 : 清浦有祐, (〒963-8611) 郡山市富田町字三角堂31-1 奥羽大学歯学部口腔病態解析制御学講座  
Reprint requests : Yusuke KIYOURA, Department of Oral Medical Science, Ohu University School of Dentistry 31-1 Misumido, Tomita, Koriyama, 963-8611, Japan