

## ニコチンによるマクロファージからの 炎症性サイトカイン産生促進機構の検索

沼田 匠<sup>1</sup> 廣瀬 公治<sup>2</sup>

### Inductive Effect of Nicotine on Inflammatory Cytokine Production by Macrophages

Takumi NUMATA<sup>1</sup> and Kimiharu HIROSE<sup>2</sup>

Tabaco smoking is one of significant risk factor for periodontal disease. Nicotine is a major component and pharmacologically active agent in tabaco. The objective of this study was to evaluate the effect of nicotine and *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide (P. g-LPS) in combination on human macrophage line cell U937 production of inflammatory cytokine.

U937 cells were treated with or without nicotine and P. g-LPS. Pro-interleukin-1(IL-1) $\beta$  mRNA was identified RT-PCR. IL-1 $\beta$ , NOD-like receptor family, pyrin domain containing 3 (NLRP3) and caspase-1 proteins were quantified using western blotting.

Compared with untreated cultures, 10<sup>-3</sup> M nicotine significantly elevated expression of pro-IL-1 $\beta$  mRNA. Furthermore, nicotine induced IL-1 $\beta$ , NLRP3 and caspase-1 proteins production in the cells.

These results demonstrated that nicotine upregulate inflammatory cytokine which is produced by P. g-LPS-activated macrophages. Combined treatment to elevate cytokine production further, which may have implications for the progression of periodontitis in smoker.

Key words : macrophage, nicotine, periodontitis

### 緒 言

喫煙は歯周病のリスクファクターの一つであることが広く認識されるようになってきた<sup>1-3)</sup>。Mossら<sup>4)</sup>は、歯周病患者と歯周組織健常者を比較検討した患者対照研究において、喫煙は歯周病罹患に関して4.95のリスクオッズがあることを示している。そして、喫煙と歯周病との関連についての基礎的知見を得るために、*in vitro*における

いくつかの研究がなされてきた。これらの研究では、タバコ煙中の主要な有害物質であるニコチンが、歯肉上皮細胞が分泌する抗菌タンパクであるディフェンシンの産生を抑制すること<sup>5)</sup>、また、ニコチンは歯周病原性細菌の口腔上皮細胞への定着を修飾することが明らかにされている<sup>6)</sup>。さらにニコチンは、歯周病原性細菌のリポ多糖(LPS)と相乗して歯肉ケラチノサイト<sup>7)</sup>、歯肉口腔上皮細胞<sup>8)</sup>、および歯肉線維芽細胞<sup>9)</sup>からの炎症性サ

受付：平成26年9月30日、受理：平成27年1月8日  
奥羽大学大学院歯学研究科口腔保健学専攻<sup>1</sup>  
奥羽大学歯学部口腔衛生学講座<sup>2</sup>  
(指導：廣瀬公治教授)

Department of Oral Health, Ohu University, Graduate  
School of Dentistry<sup>1</sup>  
Department of Preventive Dentistry, Ohu University,  
School of Dentistry<sup>2</sup>  
(Director : Prof. Kimiharu HIROSE)

イトカインの産生を促進することも報告されている。しかしながら、これら研究の多くは歯周組織のバリアである口腔粘膜の細胞についてのもので、歯周病の発症や進行に関与している免疫応答細胞に対するニコチンの作用を検討したものではない。

歯周組織における免疫応答のひとつである歯周病原性細菌の貪食を行うのはマクロファージや好中球である。マクロファージは細菌を貪食すると炎症性サイトカインを産生することが示されている<sup>10-12</sup>。それら炎症性サイトカインのうち、interleukin-1(IL-1)は破骨細胞活性化因子の主要な構成要素として骨吸収に積極的に関与していることが知られている<sup>13-15</sup>。

歯周組織における IL-1 産生細胞は歯肉上皮細胞や歯肉線維芽細胞<sup>16</sup>、そしてマクロファージであるとされる<sup>17</sup>。このうちマクロファージは辺縁部歯周組織において異物処理はもちろんのこと、抗体産生細胞に抗原提示を行うなど、歯周病の発症と進行に重要な役割を果たしていると考えられている<sup>17</sup>。さらに、このマクロファージは歯周病原性細菌である *Porphyromonas gingivalis* (P. g) により IL-1 の産生が強く促進されることも示されている<sup>17</sup>。そして、IL-1 $\beta$  の分泌を制御しているのはインフラマソームと呼ばれるタンパク複合体である<sup>18</sup>。インフラマソームは NOD-like receptor family, pyrin domain containing 3(NLRP3) を介して病原微生物の構成成分を認識し、さらには非活性型の pro-caspase-1 を活性型の caspase-1 とし、caspase-1 は IL-1 $\beta$  前駆体である pro-IL-1 $\beta$  を活性のある分泌型 IL-1 $\beta$  に変換することが示されている<sup>19,20</sup>。

このように、マクロファージは歯周組織における重要な免疫担当細胞であるが、ニコチンが及ぼすマクロファージからの炎症性サイトカイン産生への作用、および歯周病原性細菌の LPS によるマクロファージからの炎症性サイトカイン産生に、ニコチンがどのような影響を及ぼすかを検討した報告はいずれも少ない。

そこで本研究では、歯周病原性細菌が促進するマクロファージからの IL-1 $\beta$  産生にニコチンが及ぼす影響を明らかとすることを目的に以下の実験を行った。

表 1 Sequences of forward and reverse primers used for RT-PCR

		Reference
pro-IL-1 $\beta$		
Forward	GCCCTAAACAGATGAAGTGTCC	21
Reverse	ATTGCATGGTGAAGTCAGTTATATC	
G3PDH		
Forward	TGAAGGTCTCGAGTCAACGGATTGGT	22
Reverse	CATGTGGGCCATGAGGTCCACCAC	

## 材料および方法

### 1. 培養細胞

ヒトマクロファージ様細胞である U937 細胞 (理化学研究所バイオリソースセンターより分与) を用いた。U937 細胞は直径 10mm のプラスチックシャーレ (BD Falcon, Franklin Lakes, NJ, USA) を用い 10% 牛胎児血清 (Fetal bovine serum, FBS; Gibco, NY, USA) 添加 RPMI-1640 培地 (和光純薬工業, 大阪) にて 37°C, 5%CO<sub>2</sub>-95% 湿空気中の環境下にて継代培養を行ったものを実験に供した。

### 2. U937 細胞へのニコチンと P. g 由来 LPS の添加

U937 細胞は、0.5%FBS 添加 RPMI-1640 培地 5ml を入れた直径 60mm のプラスチックシャーレ (BD Falcon) に 10<sup>6</sup> 個播種した。その後、10<sup>-5</sup> ~ 10<sup>-3</sup>M 濃度のニコチン (ナカライテスク, 京都) および P. g 由来 LPS (1  $\mu$ g/ml; InvivoGen, San Diego, CA, USA) を添加し 6 時間まで培養を行った。培養終了後、U937 細胞と培養上清を回収し IL-1 $\beta$ , pro-IL-1 $\beta$ , NLRP3 および caspase-1 産生動態解析の試料とした。

### 3. Total RNA の回収と RT-PCR

U937 細胞からの total RNA の回収は Isogen-LS (和光純薬工業, 大阪) を用いて行った。回収された total RNA は ReverTra Ace qPCR kit (TOYOBO, 大阪) を用い逆転写を行い cDNA を得た。この cDNA に pro-IL-1 $\beta$  をターゲットとして、また、glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase(G3PDH) をインターナルコントロールとして PCR を行った。Pro-IL-1 $\beta$  および G3PDH に対するプライマーのシークエンス<sup>21,22)</sup>

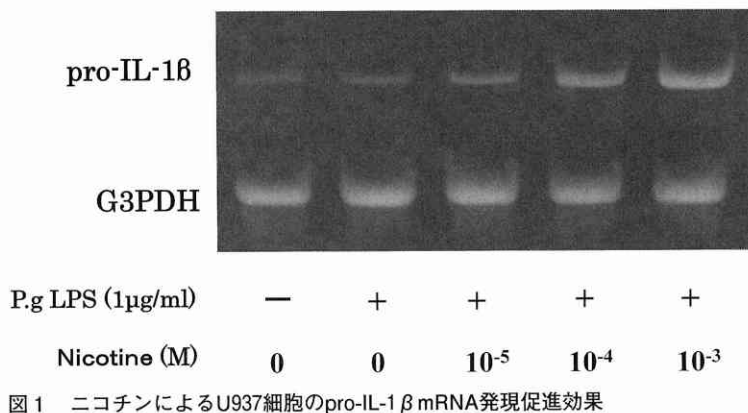


図1 ニコチンによるU937細胞のpro-IL-1 β mRNA発現促進効果

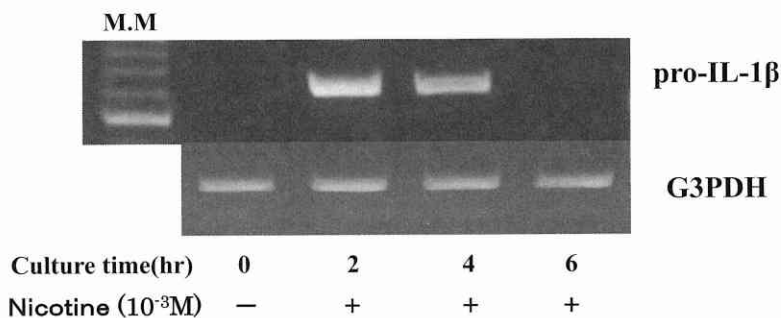


図2 ニコチンとP. g由来LPSの同時添加の際のU937細胞によるpro-IL-1 β mRNA発現の経時的変化

を表1に示す。PCRではポリメラーゼとしてTaKaRa EX Taq (Takara, 滋賀)を用い、サーマルサイクラー (TP600, Takara, 滋賀)にて27サイクルの増幅を行った(アニーリング温度60℃)。PCRの生成物は1.5%アガロースゲル(Takara)にて展開し、エチジウムブロマイドにて染色を行った後、トランスイルミネーターを用い観察した。

#### 4. ウエスタンブロット

IL-1βについては培養上清を、NLRP3とcaspase-1についてはU937細胞をMPER (Thermo, Rockford, IL, USA)にて細胞溶解処理したものをそれぞれ試料とした。各試料のタンパク質濃度は、BCA Protein assay kit (Thermo)にて測定した。次に、そこからタンパク質量50 μgを10%SDSポリアクリルアミドゲルにて電気泳動を行うことで展開した。電気泳動終了後、展開

されたタンパク質をニトロセルロース膜(アドバンテック東洋, 東京)に転写した。ニトロセルロース膜はBlock ACE (大日本住友製薬, 大阪)でブロッキングした後、一次抗体としてIL-1β, NLRP3及びcaspase-1に対する抗体(Santa Cruz Biotech., CA, USA)を60分室温にて反応させた。その後、リン酸緩衝生理食塩水(PBS)に0.1%のTween-20(和光純薬工業, 東京)を加えた洗浄液(PBS-Tween)にて3回洗浄を行い、未結合の一次抗体を除去した。次に、ビオチン標識二次抗体にて、ニトロセルロース膜上に結合した一次抗体を標識し、一次抗体処理後と同様PBS-Tweenにて3回洗浄を行った。その後、さらにVectastain Elite ABC kit (Vector, Burlingame, CA, USA)にて処理した後、3,3'-diaminobenzidine (同仁化学研究所, 熊本)にて発色させ観察を行った。

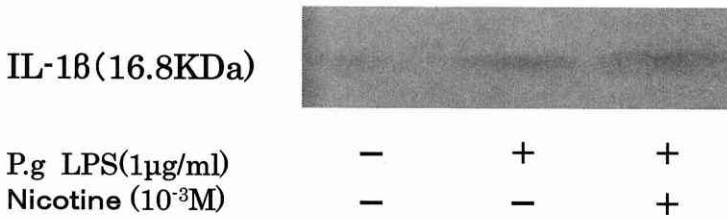


図3 P. g由来LPSが誘導するU937細胞のIL-1 $\beta$ 産生に対するニコチンの効果



図4 P. g由来LPSが誘導するU937細胞のNLRP3の産生に対するニコチンの効果

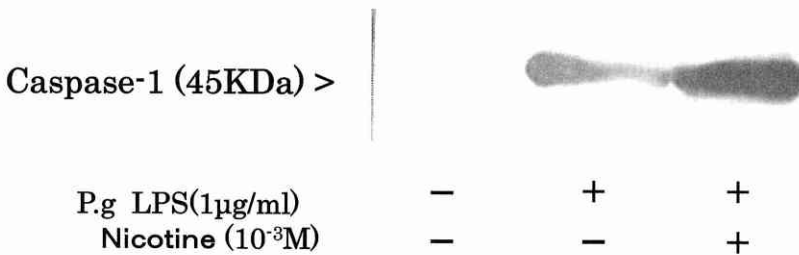


図5 P. g由来LPSが誘導するU937細胞のカスパーゼ-1の産生に対するニコチンの効果

結 果

1. U937 細胞における pro-IL-1 $\beta$  mRNA 発現

に及ぼす P. g 由来 LPS とニコチンの併用効果

U937細胞に P. g 由来 LPS のみを添加して培養した場合と比べ、P. g 由来 LPS とニコチンの両方を添加した場合においては、pro-IL-1 $\beta$  mRNA の発現がニコチンの濃度依存的に促進され、その濃度が10<sup>-3</sup>M で最大となった(図1)。また、P. g 由来 LPS と10<sup>-3</sup>M ニコチンの併用効果が認められる培養時間は2~4時間であった(図2)。よって、以後の実験では、添加するニコチンの濃度を10<sup>-3</sup>M、P. g 由来 LPS とニコチンの作用時間を4時間とした。

2. U937 細胞の IL-1 $\beta$ , NLRP3 および caspase-1 産生に及ぼす P. g 由来 LPS とニコチンの併用効果

U937細胞における IL-1 $\beta$ , NLRP3 および caspase-1 いずれの産生量も、P. g 由来 LPS のみを添加した時と比べ、P. g 由来 LPS とニコチンを併用添加した時に、その産生が増加していた(図3~5)。さらに NLRP3 においては、ニコチン単独添加においてもその産生の促進が認められた(図4)。

考 察

健康日本21(第2次)の目標である健康寿命の延伸において、生活習慣病の発症予防と重症化

予防の徹底が謳われている<sup>23)</sup>。そしてこの生活習慣病は Non Communicable Disease(NCD) であること、さらにはこの NCD のリスクファクターとして最も重要なものが喫煙であることが示されている<sup>23)</sup>。このように喫煙は健康の保持・増進の外敵要因である。

一方、喫煙は歯周病のリスクファクターであることが疫学的研究の結果から明らかにされ<sup>4)</sup>、これまでに、喫煙時に口腔内へ吸引されるニコチンが歯周組織構成細胞に及ぼす害作用として、ネクロシスの促進<sup>24)</sup>、口腔上皮細胞からの炎症性サイトカインの産生促進<sup>8)</sup>などが報告されている。また歯周病原性細菌が歯周組織構成細胞に及ぼす作用に対して、ニコチンがどのような影響をあたえるかについての検討もなされるようになってきた。これら研究の一つでは、ニコチンはケラチノサイトにおいて、歯周病原性細菌である P.g の LPS が誘導する IL-1 の産生を促進させることが示されている<sup>7)</sup>。しかしながら、それら研究の多くのものは、ケラチノサイト<sup>7)</sup>や epi4細胞<sup>8)</sup>などの上皮系細胞を用いたもので、歯周組織における有力な IL-1 産生細胞であるマクロファージについて検討したものは少ない。

マクロファージは歯周組織において異物排除や抗原提示など多彩な免疫応答に関わっている。免疫応答の際には IL-1 $\beta$  や腫瘍壊死因子など破骨細胞活性化因子とされる炎症性サイトカインを産生し、慢性歯周炎の代表的病変である骨吸収に関与していることが示されている<sup>25-27)</sup>。そこで本研究では、まずマクロファージ様細胞である U937 細胞にニコチンと P. g 由来 LPS を同時に添加し、IL-1 $\beta$  の前駆体である pro-IL-1 $\beta$  の mRNA 発現について RT-PCR を用い検討を行った。その結果、ニコチンは濃度依存的に P. g 由来 LPS による U937 細胞の pro-IL-1 $\beta$  mRNA 発現誘導を促進した (図 1)。また、そのようなニコチンの作用が最大となる時間はニコチン添加後 2 および 4 時間であった (図 2)。このことから、歯周病患者における喫煙行動は、歯槽骨吸収を促進し、歯周病を増悪させる要因となることが推察された。一方、ニコチンの作用発現が 2~4 時間と比較的短時間に認められ、かつその後急速に効果が減少

した。このことは、喫煙頻度の低い者においては、ニコチンの害作用は一過性である可能性があるが、反復喫煙する者においては、その害作用が持続し、歯周病が発症あるいは進行するリスクが高まることを示唆している。

このように、本研究ではまずニコチンが P. g 由来 LPS とともに U937 細胞の pro-IL-1 $\beta$  mRNA 発現を促進することが明らかにされたことから、次に IL-1 $\beta$  タンパクの産生が P. g 由来 LPS とニコチンにより促進されているか否かについてウエスタンブロットを用い検討を行った。その結果、pro-IL-1 $\beta$  mRNA と同様、ニコチンは U937 細胞において、P. g 由来 LPS とともに IL-1 $\beta$  タンパクの産生を促進することが確かめられた (図 3)。このことは、ニコチンが転写レベルのみならず翻訳のレベルで IL-1 $\beta$  の産生を up-regulation している可能性を示すものである。

IL-1 $\beta$  は、その前駆体である pro-IL-1 $\beta$  がスプライシングを受けたものである<sup>28)</sup>。これまで、このスプライシングに関わる酵素として IL-1 $\beta$  converting enzyme が挙げられていたが<sup>28)</sup>、これがカスパーゼ 1 であることが知られるようになってきた。そして、このカスパーゼ 1 の活性化は細胞質にある NLRP3 インフラマソームと呼ばれるタンパク複合体の活性化によるものであることも明らかとなってきた<sup>19,20)</sup>。

従来から、P. g 由来 LPS はマクロファージに対する強力な IL-1 $\beta$  産生促進因子であることが示されている<sup>17)</sup>。また、P. g の持つ線毛もまた同様の作用を示すことが報告されている<sup>29,30)</sup>。これら P. g 由来 LPS と線毛は Toll-like receptor (TLR)-2 のリガンドであり、MyD88 アダプター分子を介したシグナル伝達系によりマクロファージからのサイトカイン産生を促進することが示されている<sup>31,32)</sup>。よって、LPS を含む P. g の菌体構成成分はこれら TLR-2 によるシグナル伝達と NLRP3 インフラマソームを介した caspase-1 の活性化という二つの経路によりマクロファージからの IL-1 $\beta$  の産生を促進している可能性が示唆される。なお、Taxman ら<sup>32)</sup>は、NLRP3 インフラマソーム形成に必要な apoptotic-associated speck-like protein containing a caspase-

recruitment domain, いわゆる ASC の形成を TLR-2 経路で促進することを示している。

一方、今回の研究では、ニコチンが U937 細胞において P. g 由来 LPS の同時添加がなくても NLRP3 インフラマソーム産生 (図 4) を促進することをウエスタンブロットで確認した。このことは、ニコチン自体に NLRP3 インフラマソームを活性化させる効果があることを示すものである。

NLRP3 インフラマソームを活性化する要因の一つに細胞傷害があることを Duewell ら<sup>34)</sup> は示している。すなわち、マクロファージがコレステロール結晶を取り込むとリソソーム膜からのカテプシン B が放出されて細胞傷害が起こるために NLRP3 インフラマソームが活性化されることを明らかにしている。喫煙者の唾液中ニコチン濃度の平均は 672.5 ng/ml であることが Jarvis ら<sup>35)</sup> により示されている。しかしながらこの濃度は 1 日の平均であることから喫煙直後の唾液中ニコチン濃度これに比べはるかに高いことが推察され、高濃度のニコチンによる細胞傷害が生じる可能性が考えられる。よって今回の研究で用いたニコチンの最大濃度である  $10^{-3}$  M においてはニコチンによる細胞傷害が生じることで NLRP3 インフラマソームが活性化されたことが推察される。よって、今後はニコチンが及ぼす NLRP3 インフラマソームの活性化機序についてより詳細な検索が必要であると考えられる。

## 結 論

歯周病のリスクファクターである喫煙の害作用についての基礎的知見を得るため、ニコチンが、歯周病原性細菌によるヒトマクロファージ系細胞の炎症性サイトカイン産生を修飾するかについて検討を行った。その結果、ニコチンは、IL-1 $\beta$  の前駆体 mRNA 発現の促進、ならびに NLRP3 インフラマソームと caspase-1 の活性化によって P. g 由来 LPS による IL-1 $\beta$  の産生を促進することを見出した。このことは喫煙が歯周病の重要なリスクファクターである根拠を示す知見として興味あるものと言える。

本論文の要旨は第55回奥羽大学歯学会 (平成25年6月

15日 郡山市) において発表した。

## 文 献

- 1) Haber, J., Williams, J., Crowley M., Mandell, R., Joshipura, K. and Kent, R.L. : Evidence for cigarette smoking as a major risk factor for periodontitis. *J. Periodontol.* **64** ; 16-23 1993.
- 2) Bergstorm, J. and Perber, H. : Tobacco use as a risk factor. *J. Periodontol.* **65** ; 545-550 1994.
- 3) Jansson, L. and Lavstedt, S. : Influence of smoking on marginal bone loss and tooth loss - a prospective study over 20 years. : *J. Clin. Periodontol.* **29** ; 750-756 2002.
- 4) Moss, M. E., Beck, J. D., Kaplan, B. H., Offenbacher, S., Weintraub, J. A., Koch, G. G., Genco, R. J., Machtei, E. E. and Tesesco, L. A. : Exploratory case-control analysis of psychosocial factors and adult periodontitis. *J. Periodontol.* **67** ; 1060-1069 1996.
- 5) Mhanonda, R., Sa-Ard-Iam, N., Eksomtramate, M., Rerkyen, P., Phairat, B., Schaedher, K. E., Fukuda, M. M. and Pichyangkul, S. : Cigarette smoke extract modulate human beta-defensin-2 and interleukin-8 expression in human gingival epithelial cells. *J. Periodontal Res.* **44** ; 557-564 2009.
- 6) Teugheles, W., Van Eldere, J., van Steenberghe, D., Cassiman, J. J., Fives-Taylor, P. and Quirynen, M. : Influence of nicotine and cotinine on epithelial colonization by periodontopathogens. *J. Periodontol.* **76** ; 1315-1322 2005.
- 7) Johnson, G. K., Guthmiller, J. M., Joly, S., Organ, C. C. and Dawson, D. V. : Interleukin-1 and interleukin-8 in nicotine- and lipopolysaccharide-exposed gingival keratinocyte cultures. *J. Periodontal Res.* **45** ; 583-588 2010.
- 8) Kawagishi, Y., Yanagita, M., Kojima, Y., Shimabukuro, Y. and Murakami, S. : Nicotine up-regulates IL-8 expression in human gingival epithelial cells following stimulation with IL-1 $\beta$  or *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide via nicotinic acetylcholine receptor signaling. *Arch. Oral Biol.* **57** ; 483-490 2012.
- 9) Almasri, A., Wisithphrom, K., Windsor, L. J. and Olson, B. : Nicotine and lipopolysaccharide affect cytokine expression from gingival fibroblasts. *J. Periodontol.* **78** ; 533-541 2007.
- 10) Palacios, R., Ivhed, I., Sideras, P., Nilsson, K., Sugawara, I. and Fernandez, C. : Accessory function of human tumor cell lines. I. Production of interleukin 1 by the human histiocyte

- lymphoma cell line U-937. *Eur. J. Immunol.* **12** ; 895-899 1982.
- 11) Arenzana-Seisdedos, F. and Virelizier, J. L. : Interferons as macrophage-activating factors. II . Enhanced secretion of interleukin 1 by lipopolysaccharide-stimulated human monocytes. : *Eur. J. Immunol.* **13** ; 437-440 1983.
  - 12) Bendtzen, K. and Petersen, J. : Role of monocytes/macrophages and interleukin 1 in antigen-induced human lymphokine production. *Cell Immunol.* **83** ; 101-106 1984.
  - 13) Gowen M., Wood, D. D., Ihrie, E. J., McGuire, M. K. and Russell, R. G. : An interleukin 1 like factor stimulates bone resorption in vitro. *Nature* **306** ; 378-380 1983.
  - 14) Gowen, M., Wood, D. D. and Russell, R. G. : Stimulation of the proliferation of human bone cells in vitro by human monocyte products with interleukin-1 activity. *J. Clin. Invest.* **75** ; 1223-1229 1985.
  - 15) Sato, K., Fujii, Y., Asano, S., Ohtsuki, T., Kawakami, M., Kasano, K., Tsushima, T. and Shizume, K. : Recombinant human interleukin 1 alpha and beta stimulate mouse osteoblast-like cells (MC3T3-E1) to produce macrophage-colony stimulating activity and prostaglandin E2. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **141** ; 285-291 1986.
  - 16) Ohmori, Y., Hanazawa, S., Amano, S., Miyoshi, T., Hirose, K. and Kitano, S. : Spontaneous production of thymocyte-activating factor by human gingival fibroblasts and its autoregulatory effect on their proliferation. *Infect. Immun.* **55** ; 947-954 1987.
  - 17) Hanazawa, S., Nakada, K., Ohmori, Y., Miyoshi, T., Amano, S. and Kitano, S. : Functional role of interleukin 1 in periodontal disease : induction of interleukin 1 production by *Bacteroides gingivalis* lipopolysaccharide in peritoneal macrophages from C3H/HeN and C3H/HeJ mice. *Infect. Immun.* **50** ; 262-270 1985.
  - 18) Shimada, K., Crother, T. R., Karlin, J., Dagvardorj, J., Chiba, N., Chen, S., Ramanujan, V.K., Wolf, A. J., Vergnes, L., Ojcius, D. M., Rentse-dorj, A., Vargas, M., Guerrero, C., Wang, Y., Fitzgerald, K. A., Underhill, D. M., Town, T. and Arditi, M. : Oxidized mitochondrial DNA activates the NLRP3 inflammasome during apoptosis. *Immunity* **36** ; 401-414 2012.
  - 19) Pope, R. M. and Tschopp, J. : The role of interleukin-1 and the inflammasome in gout. *Arthritis Rheum.* **56** ; 3138-3188 2007.
  - 20) Hoffman, H. M. and Brydges, S. D. : Genetic and molecular basis of inflammasome-mediated disease. *J. Biol. Chem.* **286** ; 10889-10896 2011.
  - 21) Schwarz, Y. A., Amin, R. S., Stark, J. M., Tra-penell, B. C. and Wilmott, R. W. : Interleukin-1 receptor antagonist inhibits interleukin-8 expression in A549 respiratory epithelial cells infected in vitro with a replication-deficient recombinant adenovirus vector. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **21** ; 388-394 1999.
  - 22) Ercolani, L., Florence, B., Denaro, M. and Alexander, M. : Isolation and complete sequence of a functional human glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene. *J. Biol. Chem.* **263** ; 15335-15341 1988.
  - 23) 厚生科学審議会地域保健健康増進栄養部会, 次期国民健康づくり運動プラン策定専門委員会 : 第3章 健康日本21 (第2次) の基本的な方向. 健康日本21 (第2次) の推進に関する参考資料 ; 16-20 厚生労働省 東京 2012.  
[http://www.mhlw.go.jp/bunya/kenkou/dl/kenkounippon21\\_02.pdf](http://www.mhlw.go.jp/bunya/kenkou/dl/kenkounippon21_02.pdf)
  - 24) Sugano, N., Minegishi, T., Kawamoto, K. and Ito, K. : Nicotine inhibits UV-induced activation of the apoptotic pathway. *Toxicol. Lett.* **125** ; 61-65 2001.
  - 25) Jandinski, J. J. : Osteoclast activating factor is now interleukin-1 beta : historical perspective and biological implications. *J. Oral Pathol.* **17** ; 145-152 1988.
  - 26) Pfeilschifter, J., Chenu, C., Bird, A., Mundy, G.R. and Roodman, G. D. : Interleukin-1 and tumor necrosis factor stimulate the formation of human osteoclast like cells in vitro. *J. Bone Miner. Res.* **4** ; 113-118 1989.
  - 27) Ishikawa, H., Tanaka, H., Iwato, K., Tanabe, O., Asaoku, H., Nobuyoshi, M., Yamamoto, I., Kawano, M. and Kuramoto, A. : Effect of glucocorticoids on the biologic activities of myeloma cells : inhibition of interleukin-1 beta osteoclast activating factor-induced bone resorption. *Blood.* **75** ; 715-720 1990.
  - 28) Howard, A. D., Kostura, M. J., Thornberry, N., Ding, G. J., Limjuco, G., Weidner, J., Salley, J. P., Hogquist, K. A., Chaplin, D. D. and Mumford, R. A. : IL-1-converting enzyme requires aspartic acid residues for processing of the IL-1 beta precursor at two distinct sites and dose not cleave 31-kDa IL-1 alpha. *J. Immunol.* **147** ; 2964-2969 1991.
  - 29) Hanazawa, S., Hirose, K., Ohmori, Y., Amano, S. and Kitano, S. : *Bacteroides gingivalis* fimbriae stimulate production of thymocyte-activating factor by human gingival fibroblasts. *Infect. Immun.* **56** ; 272-274 1988.

- 30) Hanazawa, S., Murakami, Y., Hirose, K., Amano, S., Ohmori, Y., Higuchi, H. and Kitano, S. : *Bacteroides(Porphyromonas) gingivalis* fimbriae activate mouse peritoneal macrophages and induce gene expression and production of interleukin-1. *Infect. Immun.* **59** ; 1972-1979 1991.
- 31) Nemoto, E., Darveau, R. P., Foster, B. L., Nogueira-Fiho, G. R. and Somerman, M. J. : Regulation of cementoblast function by *P. gingivalis* lipopolysaccharide via TLR2. *J. Dent. Res.* **85** ; 733-738 2006.
- 32) Aoki, Y., Tabeta, K., Murakami, Y., Yoshimura, F. and Yamazaki, K. : Analysis of immunostimulatory activity of *Porphyromonas gingivalis* fimbriae conferred by Toll-like receptor 2. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **398** ; 86-91 2010.
- 33) Taxman, D. J., Zhang, J., Champagne, C., Bergstralh, D. T., Iocca, H. A., Lich, J. D. and Ting, J. P. : Cutting edge : ASC mediates the induction of multiple cytokines by *Porphyromonas gingivalis* via caspase-1-dependent and-independent pathways. *J. Immunol.* **177** ; 4252-4256 2006.
- 34) Duewell, P., Kono, H., Rayner, K. J., Sirois, C. M., Vladimer, G., Bauernfeind, F. G., Abela, G. S., Franchi, L., Nunez, G., Schnurr, M., Espevik, T., Lien, E., Fitzgerald, K. A., Rock, K. L., Moor, K. J., Wright, S. D., Hornung, V. and Latz, E. : NLRP3 inflammasomes are required for atherogenesis and activated by cholesterol crystals. *Nature.* **464** ; 1357-1361 2010.
- 35) Jarvis, M., Tunstall-Pedoe, H., Feyerabend, C., Vesey, C. and Sallojee, Y. : Biochemical markers of smoke absorption and self reported exposure to passive smoking. *J. Epidemiol. Community Health.* **38** ; 335-339 1984.
- 著者への連絡先：沼田 匠，(〒963-8611)郡山市富田町字三角堂31-1 奥羽大学歯学部口腔衛生学講座  
Reprint requests : Takumi NUMATA, Department of Preventive Dentistry, Ohi University School of Dentistry  
31-1 Misumido, Tomita, Koriyama, 963-8611, Japan