

## アジスロマイシンの免疫修飾作用

寺本育司<sup>1</sup> 玉井利代子<sup>2</sup> 清浦有祐

### Immunomodulatory Effects of Azithromycin

Ikuji TERAMOTO<sup>1</sup>, Riyoko TAMAI<sup>2</sup> and Yusuke KIYOURA<sup>2</sup>

The macrolide antibiotic azithromycin has been reported to be effective in treating periodontitis, possibly because it inhibits inflammatory cytokine production. While the enhanced host immune response is effective in helping white blood cells to target bacteria, it can also damage the host tissue. On the other hand, some reports suggest that azithromycin may induce cytokine production. In order to use azithromycin to treat periodontitis, it is necessary to seek more accurate understanding of its immunomodulatory effects. The aim of this study was to clarify the immunomodulatory effects of azithromycin by assessing its effects on the host immune response upon challenge by *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*).

Murine macrophage-like J774.1 cells (0.2 ml per well at  $1 \times 10^6$  cells/ml) were plated onto 96-well plates and cultured in RPMI1640 medium supplemented with 10% fetal bovine serum for 18 hours. Then azithromycin and *P. gingivalis* were added and the cells were cultured for an additional 24 hours. After the culture, levels of MCP-1, IL-6, and IL-10 in the culture medium were measured, and compared with the levels of these cytokines in wells that did not receive azithromycin.

MCP-1 and IL-6 were produced by J774.1 cells treated with *P. gingivalis* alone. When both azithromycin and *P. gingivalis* were added, J774.1 cells produced significantly more MCP-1 and IL-6. In contrast, IL-10 was not produced when cells were treated with *P. gingivalis* alone or with azithromycin and *P. gingivalis*.

While the addition of azithromycin increased the production of MCP-1 and IL-6, it had no effect on the production of anti-inflammatory cytokine IL-10. Thus, treating periodontitis with azithromycin might damage periodontal tissue by inducing an excessive inflammatory response. It is important to take these results into consideration when the duration of administration and dosage of this antibiotic are examined.

Key words : azithromycin, MCP-1, IL-6, *Porphyromonas gingivalis*

受付：平成27年5月8日，受理：平成27年6月27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口腔感染免疫  
学分野<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>  
Division of Oral Infection and Immunity, Department  
of Oral Medical Science, Ohu University School of  
Dentistry<sup>2</sup>  
(Director : Prof. Yusuke KIYOURA)

## 緒言

歯周炎は、歯周病原性細菌と呼ばれるグラム陰性嫌気性菌を主体とした細菌集団を原因とする感染症である。特にその中でも *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*), *Tannerella forsythia*, *Treponema denticola* の3菌種は、重度の歯周炎に罹患した歯周ポケットから分離される頻度が高いことが知られている。これらの細菌が持つ様々な病原因子の歯周組織に対する傷害作用、あるいは病原因子に対する宿主応答によって歯周組織の破壊が誘導される<sup>1-4)</sup>。

宿主の白血球を中心とした免疫担当細胞は、Toll-like receptor (TLR) と呼ばれる微生物の病原性に関連する分子パターンを認識するレセプターを保持している。このレセプターによって、ヒトは侵入した微生物を認識し、炎症性サイトカインの産生により、宿主の感染防御反応を引き起こすことが明らかにされている<sup>2,5-7)</sup>。細菌の持つペプチドグリカン、リポタイコ酸、リポタンパク質などが、TLRによって認識される<sup>5)</sup>。

歯周病原性細菌はグラム陰性菌であることから、細胞壁中には内毒素が存在する。また、菌種によっては莢膜や線毛などを持つものもある<sup>2,8,9)</sup>。それらの菌体成分も全てTLRによって認識される。TLRによって歯周病原性細菌を認識した白血球は、細胞質中のNF- $\kappa$ Bが活性化されて核内に移行して炎症性サイトカイン産生が起こる。それらの炎症性サイトカインが宿主の感染防御反応だけでなく、歯周組織の破壊を誘導することがある<sup>2,5-7)</sup>。

したがって、歯周組織で感染を起こしている歯周病原性細菌を死滅させることが歯周炎治療には有効と考えられる。しかし、通常の細菌感染症の治療で広く行われている抗菌薬の投与は、歯周治療では限定された治療方法である。抗菌薬の投与のみで歯周炎が治癒されることは、難しいとされてきた<sup>10)</sup>。

最近、マクロライド系抗菌薬のアジスロマイシンの投与が歯周炎治療に有効であるとの報告がなされている<sup>10-12)</sup>。アジスロマイシンが歯周炎治療薬として優れていると考えられる点は、次の二つ

である。細菌がヒトの体内に侵入すると、その場に好中球やマクロファージなどの食細胞が集まる。アジスロマイシンを投与すると、そのアジスロマイシンが好中球やマクロファージなどの食細胞に取り込まれ、細菌感染の場に食細胞が移動する。その結果、アジスロマイシンが食細胞によって感染の場に運ばれることになる。これが第一の理由である<sup>10)</sup>。

第二は、宿主の免疫応答に対する修飾作用である。アジスロマイシンは炎症反応を誘導する炎症性サイトカインの産生を抑制する一方で、反応を抑制する抗炎症性サイトカインの産生を亢進するという報告がある。このことが、歯周炎治療におけるアジスロマイシンの優位性を保っていると考えられる<sup>13-16)</sup>。

その一方で、アジスロマイシンが炎症性サイトカイン産生を亢進するとの報告もある<sup>17)</sup>。宿主の免疫応答の増強は貪食殺菌にプラスに働くが、炎症反応の増強は宿主組織の傷害を招くことが考えられる。逆に免疫応答が抑制される場合は感染が持続し、慢性炎症が継続する。

したがって、アジスロマイシンの免疫修飾作用を正しく把握することは、アジスロマイシンを使用する際に必須である。適切な使用によって、歯周組織の破壊に関与するサイトカイン産生をコントロールできる可能性も考えられる。

そこで、アジスロマイシンの免疫修飾作用の一端を明らかにするために、*P. gingivalis* 生菌に対する宿主の免疫応答に及ぼすアジスロマイシンの影響を調べた。アジスロマイシンは食細胞に取り込まれることが特徴であるため、食細胞であるマクロファージ様細胞株 J774.1細胞を実験に使用した。マクロファージは、微生物感染に伴って炎症性サイトカインを含む様々な種類のサイトカインを産生する<sup>18,19)</sup>。そのため、アジスロマイシンの免疫修飾作用は、J774.1細胞のサイトカイン産生が亢進、もしくは抑制されるのかを指標として調べることにした<sup>18,19)</sup>。

炎症性サイトカインは、炎症反応を促進する作用を示す。中でも微生物感染の初期に単球を感染の場に遊走させる monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) と早期に炎症反応を誘導する

中心的な役割を持つサイトカインの1つである interleukin-6 (IL-6) の2つは、重要なサイトカインである<sup>8,20-22)</sup>。さらに、炎症反応を抑制するサイトカインである interleukin-10 (IL-10) の産生についてもアジスロマイシンの影響を検討する必要がある<sup>23-27)</sup>。したがって、本研究ではこの3種類のサイトカイン産生が、アジスロマイシンによってどのように修飾されるかを明らかにすることを目的とした。

## 材料および方法

### 1. アジスロマイシンの調整

アジスロマイシン (ファイザー、東京) は滅菌蒸留水を使用して、100mg/ml の濃度に溶解した。実験に際しては、J774.1細胞の培養に使用した培養液である10% ウシ胎児血清 (fetal bovine serum, FBS; Biowest, Nuaille, France), 100 U/ml ペニシリンおよび100  $\mu$ g/ml ストレプトマイシン (GIBCO, Carlsbad, CA, USA) 含有 RPMI 1640 培地 (Sigma, St. Louis, MO, USA) で希釈して供試した。

### 2. *P. gingivalis* の調整

*P. gingivalis* ATCC33277株は、5  $\mu$ g/ml ヘミン (和光純薬、大阪) と1  $\mu$ g/ml メナジオン (和光純薬) を添加した GAM ブイヨン (日本製薬、東京) を使用して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 RPMI1640培地で菌を3回洗浄後、10%FBS 含有 RPMI1640培地で $2 \times 10^5$ 、 $2 \times 10^6$ 、あるいは $2 \times 10^7$ CFU/ml となるよう調整した<sup>18,19)</sup>。

### 3. マウスマクロファージ様細胞株 J774.1 細胞

マウスマクロファージ様細胞株 J774.1細胞は理化学研究所バイオリソースセンター (茨城) から分与された。細胞は、10% FBS 含有 RPMI1640培地を用いて、37°C、5% CO<sub>2</sub>-95% 湿空气中で継代培養して実験に使用した<sup>18,19)</sup>。

### 4. *P. gingivalis* による J774.1 細胞からのサイトカイン産生の誘導

J774.1細胞は、96well マイクロプレート (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA) を使用して37°C、5% CO<sub>2</sub>-95% 湿空气中で培養した。具体的には、細胞を10% FBS 含有 RPMI1640培

養液中に浮遊させて $1 \times 10^6$ /ml とし、各 well に200  $\mu$ l 分注した。一晚培養後、アジスロマイシン含有、もしくは非含有の10% FBS 含有 RPMI 1640培地を100  $\mu$ l 加えた。さらに *P. gingivalis* 菌液、もしくは対照の培養液を各 well に100  $\mu$ l 加えて24時間培養した<sup>18,19)</sup>。なお、培養時間がサイトカイン産生に及ぼす影響を調べる実験では、培養時間を4, 8, 24, 48時間とした。実験に使用した well 数は1実験群に付き、3well ずつとした。

### 5. サイトカインの測定

J774.1 細胞の培養終了後に遠心処理し、上清中の MCP-1、IL-6および IL-10の含有量をマウス ELISA キット (eBioscience, San Diego, CA, USA) を用いて、マイクロプレートリーダー (モデル680; Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA) で測定した<sup>18,19,28)</sup>。

### 6. 統計処理

実験結果は、平均値と標準誤差を求めて示した。有意差の検定は 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<sup>18,19)</sup>。P<0.05を有意とした。

## 結 果

### 1. アジスロマイシンによる MCP-1 産生亢進作用

マウス J774.1細胞にアジスロマイシンと *P. gingivalis* 生菌を加えて24時間培養して、上清中の MCP-1量を調べた (図1)。アジスロマイシンを25  $\mu$ M 及び50  $\mu$ M の濃度で加えた場合は、*P. gingivalis* 生菌のみと比較して MCP-1の産生が有意に亢進した。なお、アジスロマイシン単独ではいずれの濃度でも対照群と比較して MCP-1の有意な産生亢進は認められなかった。

### 2. アジスロマイシンによる MCP-1 産生亢進に及ぼす *P. gingivalis* 生菌数の影響

次に *P. gingivalis* 生菌数を変化させて、アジスロマイシンによる MCP-1産生亢進作用に及ぼす影響を調べた (図2)。加える菌数を $1 \times 10^6$ CFU/ml、もしくは $1 \times 10^7$ CFU/ml にした場合に、50  $\mu$ M の濃度のアジスロマイシンによって

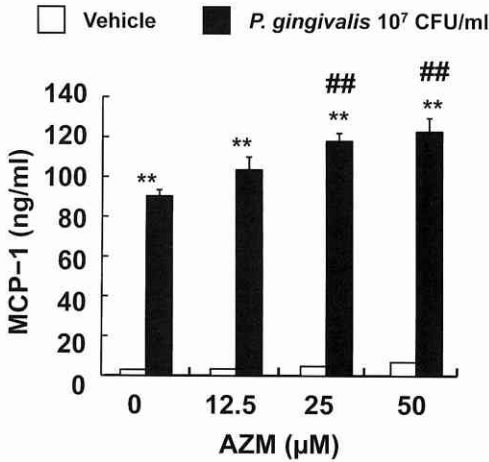


図1 アジスロマイシンによるMCP-1産生亢進作用  
 平均値+SEを示す  
 \*\* $P < 0.01$ : 培地のみに対する有意差  
 ## $P < 0.01$ : *P. gingivalis*単独に対する有意差

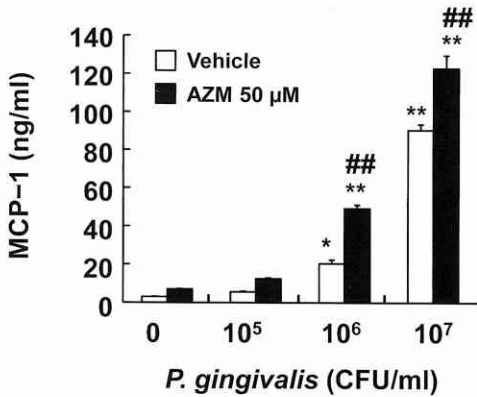


図2 アジスロマイシンによるMCP-1産生亢進に及ぼす  
*P. gingivalis*生菌数の影響  
 平均値+SEを示す  
 \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ : 培地のみに対する有意差  
 ## $P < 0.01$ : *P. gingivalis*単独に対する有意差

有意な産生亢進が認められた。しかし、 $1 \times 10^5$ CFU/mlではMCP-1の産生そのものが認められなかった。

### 3. アジスロマイシンによるMCP-1産生亢進に及ぼす培養時間の影響

アジスロマイシン $50 \mu\text{l}$ と $1 \times 10^7$ CFU/mlの*P. gingivalis*生菌を加えて培養開始後、4時間、8時間、24時間、48時間後の上清中のMCP-1量を調べた(図3)。培養4時間後には対照群と比較して、*P. gingivalis*生菌のみ、あるいはアジス

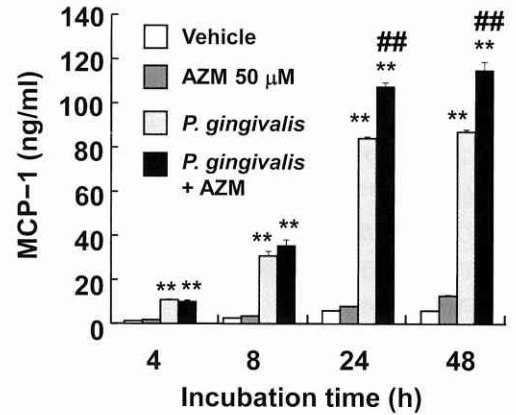


図3 アジスロマイシンによるMCP-1産生亢進に及ぼす  
 培養時間の影響  
 平均値+SEを示す  
 \*\* $P < 0.01$ : 培地のみに対する有意差  
 ## $P < 0.01$ : *P. gingivalis*単独に対する有意差

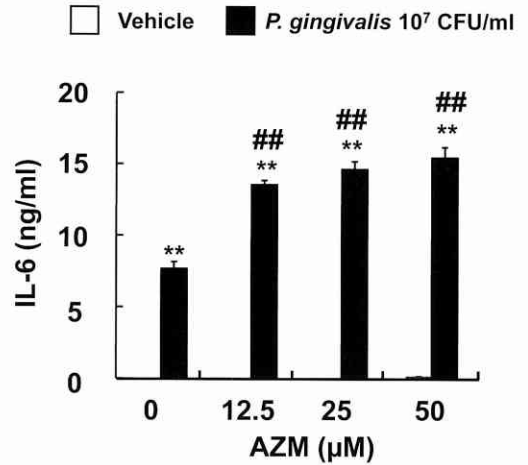


図4 アジスロマイシンによるIL-6産生亢進作用  
 平均値+SEを示す  
 \*\* $P < 0.01$ : 培地のみに対する有意差  
 ## $P < 0.01$ : *P. gingivalis*単独に対する有意差

ロマイシン $50 \mu\text{M}$ を共に加えた場合に有意なMCP-1の産生が認められた。アジスロマイシンを*P. gingivalis*生菌に加えたことによる有意な産生亢進は、培養24時間及び48時間でのみ認められた。

4. アジスロマイシンによるIL-6産生亢進作用  
 次にMCP-1と同じく炎症性サイトカインであるIL-6の産生がアジスロマイシンによってどのように影響されるかを調べた(図4)。J774.1細

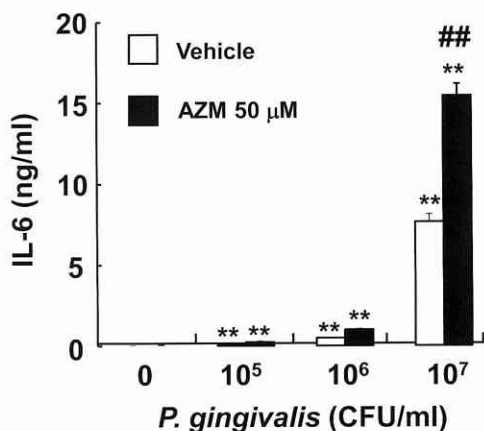


図5 アジスロマイシンによるIL-6産生亢進に及ぼす *P. gingivalis*生菌数の影響  
平均値+SEを示す  
\*\*  $P < 0.01$  : 培地のみに対する有意差  
##  $P < 0.01$  : *P. gingivalis*単独に対する有意差

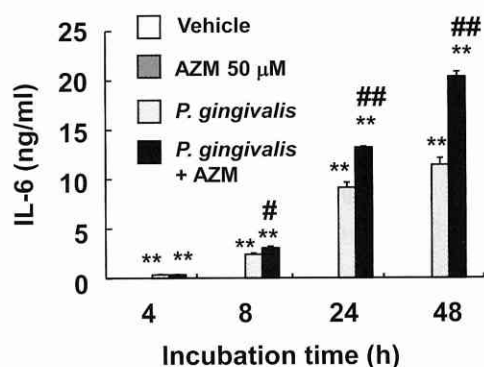


図6 アジスロマイシンによるIL-6産生亢進に及ぼす培養時間の影響  
平均値+SEを示す  
\*\*  $P < 0.01$  : 培地のみに対する有意差  
#  $P < 0.05$ , ##  $P < 0.01$  : *P. gingivalis*単独に対する有意差

胞に $1 \times 10^7$ CFU/mlの *P. gingivalis* 生菌とアジスロマイシンを12.5, 25, 50  $\mu$ Mの濃度で加えて培養して、上清中のIL-6量を調べた(図4)。MCP-1とは異なり、アジスロマイシンを12.5  $\mu$ Mの濃度で加えた場合も、*P. gingivalis* 生菌のみと比較してIL-6の産生が有意に亢進した。しかし、MCP-1の場合と同様にアジスロマイシン単独ではいずれの濃度でも対照群と比較してIL-6の有意な産生は認められなかった。

#### 5. アジスロマイシンによるIL-6産生亢進に及ぼす *P. gingivalis* 生菌数の影響

次に *P. gingivalis* 生菌数を変化させて、アジスロマイシンによるIL-6産生亢進作用に及ぼす影響を調べた(図5)。加える菌数を $1 \times 10^7$ CFU/mlにした場合のみ、50  $\mu$ Mのアジスロマイシンによって有意な産生亢進が認められた。

#### 6. アジスロマイシンによるIL-6産生亢進に及ぼす培養時間の影響

アジスロマイシンと *P. gingivalis* 生菌を加えて培養開始後、4時間、8時間、24時間、48時間後の上清中のIL-6量を調べた(図6)。MCP-1の場合と同様に培養4時間後には対照群と比較して、*P. gingivalis* 生菌のみ、あるいはアジスロマイシン50  $\mu$ Mを共に加えた場合に有意なIL-6の産生が認められた。

#### 7. アジスロマイシンのIL-10産生に及ぼす影響

アジスロマイシンが *P. gingivalis* 生菌によるJ774.1細胞からの炎症性サイトカイン産生を亢進したことから、抗炎症性サイトカイン産生に及ぼす影響も調べた。*P. gingivalis* 生菌数を $1 \times 10^5$ CFU/mlから $1 \times 10^7$ CFU/mlとし、アジスロマイシン50  $\mu$ Mを加えて24時間培養した。

図には示さないが、*P. gingivalis* 生菌の場合でもアジスロマイシンを共に加えた場合でもIL-10の産生は、まったく認められなかった。なお、使用したJ774.1細胞に大腸菌由来のlipid Aを加えて培養した場合には、IL-10が産生されることは確認されている。

### 考 察

*P. gingivalis* 生菌によるマウスマクロファージ様細胞のMCP-1産生は、アジスロマイシンによって有意に亢進した。MCP-1は、炎症性サイトカインの中でも特にケモカインと呼ばれる生理活性物質に属する<sup>8,21,29</sup>。ケモカインは好中球や単球を感染の場に誘導し、炎症反応を高める作用を持つ<sup>8,21,29</sup>。

MCP-1の産生亢進は、歯周炎と関連することが報告されている。侵襲性歯周炎患者の歯肉溝浸出液中では、高濃度のMCP-1が検出されてい

る<sup>30)</sup>。さらに、血清中の MCP-1 濃度を慢性歯周炎患者、歯肉炎患者、正常人の 3 群で比較すると正常人に比較して歯肉炎患者は高く、慢性歯周炎患者ではさらに高いとされ<sup>31)</sup>、血清中の MCP-1 濃度は歯周病の臨床マーカーとなりえると考えられた。歯肉溝滲出液中の MCP-1 は歯肉組織の線維芽細胞、単球、上皮細胞から産生される<sup>29)</sup>。実際、*P. gingivalis* 由来 LPS (内毒素) によって歯肉線維芽細胞から MCP-1 が産生されることが確認されている<sup>29)</sup>。

アジスロマイシンが *P. gingivalis* 生菌によるマクロファージ様細胞からの MCP-1 産生を亢進させたことは、*P. gingivalis* のような歯周病原性細菌が歯垢中に存在する歯周炎患者がアジスロマイシンを服用した場合に、歯周組織のマクロファージ、線維芽細胞、上皮細胞からの MCP-1 産生が亢進する可能性がある。その場合、歯周組織中で産生された MCP-1 がどのような作用をもたらすかが問題となる。

MCP-1 は、単球を遊走させる作用を示すサイトカインである。そのため、歯周病原性細菌の感染した歯周組織中への単球の浸潤を MCP-1 は促進することで、細菌に対する殺菌能を高める<sup>29)</sup>。

このような単球の感染部位への移動は、感染防御に有効なものである。しかし、単球の集積は組織傷害をもたらす可能性もある<sup>7)</sup>。

今回の結果とは異なって、アジスロマイシンのようなマクロライド系抗菌薬が炎症性サイトカイン産生を抑制するとの報告もある。これはアジスロマイシンが、サイトカイン産生細胞の核内タンパクである NF- $\kappa$ B 抑制因子として作用するためと考えられている<sup>15)</sup>。

アジスロマイシンは、15員環のマクロライド系抗菌薬である。本実験で認められたようなサイトカイン産生への修飾作用は、他のマクロライド系抗菌薬でも認められている<sup>32-34)</sup>。14員環のロキシスロマイシン (1~10  $\mu$ g/ml) はヒト気管支上皮細胞の IL-6, IL-8, GM-CSF の産生を抑制するとされる<sup>32)</sup>。さらに同じく14員環のエリスロマイシンは、ヒト気管支上皮細胞の IL-6 や IL-8 の産生を抑制することが報告されている<sup>33,34)</sup>。したがって、このような免疫修飾作用はマクロライド系抗

菌薬に広く認められるものと考えられる。このロキシスロマイシンのサイトカイン産生抑制は、前述のように NF- $\kappa$ B の活性化が抑制されるためと考えられている<sup>32)</sup>。

さらに、マクロファージの貪食作用はアジスロマイシンの他にエリスロマイシン、クラリスロマイシン、ロキシスロマイシンも亢進したことが報告されている<sup>35)</sup>。

MCP-1 以外に IL-6 も J774.1 細胞に *P. gingivalis* の生菌と共にアジスロマイシンを加えて培養すると、アジスロマイシン非添加に比較して有意に産生が亢進した。IL-6 は、歯周炎のような炎症性疾患において最も強力に関わる炎症性サイトカインである<sup>36,37)</sup>。このサイトカインは多面的な機能を持ち、単球、線維芽細胞、血管内皮細胞、T 細胞、B 細胞が産生し、骨芽細胞や滑膜細胞から破骨細胞分化因子の放出を増加させることで破骨細胞の活性を高める。炎症を起こした歯周組織では IL-6 は IL-1 と共に歯周組織からのマトリックスメタプロテアーゼ産生を増加させ、歯周組織の破壊をもたらすと考えられており、歯周炎の組織破壊において中心的な役割を担う。歯肉溝滲出液および歯肉組織中の IL-6 量と歯周炎の進展具合とは他の炎症性サイトカインと同様に関連性があり、IL-6 の産生量と歯周炎の重症度は比例する<sup>38)</sup>。また、歯周炎の治療が成功すれば、血清中や歯肉溝滲出液中の IL-6 のレベルは減少することが認められている。したがって、アジスロマイシンによる IL-6 産生亢進は MCP-1 の場合と同様に歯周組織破壊を誘導する可能性がある。

IL-10 に関しては、アジスロマイシン添加の有無に関わらず、*P. gingivalis* 生菌を感染させた J774.1 細胞からの産生は認められなかった。Berker らも同様な報告をしており、ヒト末梢血液由来単核細胞に *P. gingivalis* 生菌を *in vitro* で感染させても IL-10 の産生は認められないが、加熱処理した *P. gingivalis* では産生されたとしている<sup>39)</sup>。生菌で IL-10 の産生が誘導されなかったのは、*P. gingivalis* が産生するジンジパインのタンパク分解作用のためと考えられる<sup>39)</sup>。しかし、Berker らも本実験の結果のどちらも IL-10 産生の有無は、培養上清中の L-10 を酵素抗体法で調

べている<sup>39)</sup>。そのため、IL-10が検出さない理由としてはジンジパインのタンパク分解作用以外に、IL-10の産生そのものが起きていない可能性もある。

しかし、歯周炎患者の歯周ポケット中でIL-10が検出されることは報告されている<sup>23,39)</sup>。したがって、*P. gingivalis* 生菌は歯周組織からのIL-10産生を誘導すると考えられる。そのため、本実験においてIL-10が培養上清中に検出されないのはジンジパインによる分解作用のためと考えるのが妥当である。IL-10はヒトの歯周炎において防御的な役割を担うサイトカインとされている<sup>23)</sup>。IL-10産生遺伝子のノックアウトマウスに歯周病原性細菌を感染させると、歯槽骨吸収が非常に強く起こることが確認されている<sup>23)</sup>。したがって、*P. gingivalis* がIL-10を分解する作用を持つジンジパインを産生することは、この菌の病原性の強さを裏付けるものである。

今回の実験結果から、*in vitro* において*P. gingivalis* を感染させたJ774.1細胞による炎症性サイトカインのIL-6とMCP-1の産生をアジスロマイシンが亢進させることが示された。炎症反応そのものは、微生物感染に対する宿主の感染防御において不可欠のものである。したがって、*P. gingivalis* 感染に対する好中球やマクロファージの貪食殺菌を亢進させる範囲で終了するのであれば、アジスロマイシンの免疫修飾作用はヒトに有益なものとなる。しかし、適切な投与期間・投与量の決定は、個々の歯周炎の状態が多様であることから、その選択は容易ではない。ヒトへの投与では、この抗菌薬が細菌感染に対する宿主の炎症反応を高めることで、過剰な炎症反応を歯周組織で惹起することを念頭にして対処していくことが必要である。

## 文 献

- Hajishengallis, G. and Lamont, R. J. : Beyond the red complex and into more complexity : the polymicrobial synergy and dysbiosis (PSD) model of periodontal disease etiology. *Mol. Oral Microbiol.* **27** ; 409-419 2012.
- Moutsopoulos, N. M., Kling, H. M., Angelov, N., Jin, W., Palmer, R. J., Nares, S., Osorio, M. and Wahl, S. M. : *Porphyromonas gingivalis* promotes Th17 inducing pathways in chronic periodontitis. *J. Autoimmun.* **39** ; 294-303 2012.
- Miranda, T. S., Feres, M., Perez-Chaparro, P. J., Faveri, M., Figueiredo, L. C., Tamashiro, N. S., Bastos, M. F. and Duarte, P. M. : Metronidazole and amoxicillin as adjuncts to scaling and root planing for the treatment of type 2 diabetic subjects with periodontitis : 1-year outcomes of a randomized placebo-controlled clinical trial. *J. Clin. Periodontol.* **41** ; 890-899 2014.
- Shrestha, D., Choi, Y. H., Zhang, J., Hazlett, L. J. and Merchant, A. T. : Relationship between serological markers of periodontal bacteria and metabolic syndrome and its components. *J. Periodontol.* **21** ; 1-17 2014.
- Davey, M., Liu, X., Ukai, T., Jain, V., Gudino, C., Gibson, F. C. 3rd, Golenbock, D., Visintin, A. and Genco, C. A. : Bacterial fimbriae stimulate proinflammatory activation in the endothelium through distinct TLRs. *J. Immunol.* **180** ; 2187-2195 2008.
- Hajishengallis, G., Wang, M., Bagby, G. J. and Nelson, S. : Importance of TLR2 in early innate immune response to acute pulmonary infection with *Porphyromonas gingivalis* in mice. *J. Immunol.* **181** ; 4141-4149 2008.
- Papadopoulos, G., Weinberg, E. O., Massari, P., Gibson, F. C. 3rd, Wetzler, L. M., Morgan, E. F. and Genco, C. A. : Macrophage-specific TLR2 signaling mediates pathogen-induced TNF-dependent inflammatory oral bone loss. *J. Immunol.* **190** ; 1148-1157 2013.
- Nakamura, K., Deyama, Y., Yoshimura, Y., Suzuki, K. and Morita, M. : Toll like receptor 5 ligand induces monocyte chemoattractant protein-1 in mouse osteoblastic cells. *Biomed. Res.* **33** ; 39-44 2012.
- Hasegawa, Y., Nagano, K., Ikai, R., Izumigawa, M., Yoshida, Y., Kitai, N., Lamont, R. J., Murakami, Y. and Yoshimura, F. : Localization and function of the accessory protein Mfa3 in *Porphyromonas gingivalis* Mfa1 fimbriae. *Mol. Oral Microbiol.* **28** ; 467-480 2013.
- 五味一博：薬物療法。臨床歯周病学（吉江弘正，伊藤公一，村上伸也，申基詰編）第2版；54-61 医歯薬出版 東京 2013.
- Gomi, K., Yashima, A., Nagano, T., Kanazashi, M., Maeda, N. and Arai, T. : Effects of full-mouth scaling root planing in conjunction with systemically administered azithromycin. *J.*

- Periodontol. **78** ; 422-429 2007.
- 12) Yashima, A., Gomi, K, Maeda, N. and Arai, T. : One-stage full-mouth versus partial-mouth scaling and root planing during the effective half-life of systemically administered azithromycin. *J. Periodontol.* **80** ; 1406-1413 2009.
  - 13) Uriarte, S. M., Molestina, R. E., Miller, R. D., Bernabo, J., Farinati, A., Eiguchi, K., Ramirez, J. A. and Summersgill, J. T. : Effect of macrolide antibiotics on human endothelial cells activated by *Chlamydia pneumoniae* infection and tumor necrosis factor- $\alpha$ . *J. Infect. Dis.* **185** ; 1631-1636 2002.
  - 14) Hodge, S., Hodge, G., Brozyna, S., Jersmann, H., Holmes, M. and Reynolds, P. N. : Azithromycin increases phagocytosis of apoptotic bronchial epithelial cells by alveolar macrophages. *Eur. Respir. J.* **28** ; 486-495 2006.
  - 15) Li, D. Q., Zhou, N., Zhang, L., Ma, P. and Pflugfelder, S. C. : Suppressive effects of azithromycin on zymosan-induced production of proinflammatory mediators by human corneal epithelial cells. *Invest. Ophthalmol, Vis. Sci.* **51** ; 5623-5629 2010.
  - 16) Vrančić, M., Banjanac, M., Nujić, K., Bosnar, M., Murati, T., Munić, V., Stupin Polančec, D., Belamarić, D., Parnham, M. J. and Eraković Haber V. : Azithromycin distinctively modulates classical activation of human monocytes *in vitro*. *Br. J. Pharmacol.* **165** ; 1348-1360 2012.
  - 17) Kamemoto, A., Ara, T., Hattori, T., Fujinami, Y., Imamura, Y. and Wang, P. L. : Macrolide antibiotics like azithromycin increase lipopolysaccharide-induced IL-8 production by human gingival fibroblasts. *Eur. J. Med. Res.* **14** ; 309-314 2009.
  - 18) Tamai, R., Deng, X. and Kiyoura, Y. : *Porphyromonas gingivalis* with either *Tannerella forsythia* or *Treponema denticola* induces synergistic IL-6 production by murine macrophage-like J774.1 cells. *Anaerobe* **15** ; 87-90 2009.
  - 19) Deng, X., Tamai, R., Endo, Y. and 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.
  - 20) Kim, M. S., Day, C. J. and Morrison, N. A. : MCP-1 is induced by receptor activator of nuclear factor- $\kappa$ B ligand, promotes human osteoclast fusion, and rescues granulocyte macrophage colony-stimulating factor suppression of osteoclast formation. *J. Biol. Chem.* **280** ; 16163-16169 2005.
  - 21) Maekawa, T., Takahashi, N., Honda, T., Yonezawa, D., Miyashita, H., Okui, T., Tabeta, K. and Yamazaki, K. : *Porphyromonas gingivalis* antigens and interleukin-6 stimulate the production of monocyte chemoattractant protein-1 via the upregulation of early growth response-1 transcription in human coronary artery endothelial cells. *J. Vasc. Res.* **47** ; 346-354 2010.
  - 22) Sawada, S., Chosa, N., Ishisaki, A. and Naruishi, K. : Enhancement of gingival inflammation induced by synergism of IL-1 $\beta$  and IL-6. *Biomed. Res.* **34** ; 31-40 2013.
  - 23) Sasaki, H., Okamatsu, Y., Kawai, T., Kent, R., Taubman, M. and Stashenko, P. : The interleukin-10 knockout mouse is highly susceptible to *Porphyromonas gingivalis*-induced alveolar bone loss. *J. Periodontal Res.* **39** ; 432-441 2004.
  - 24) de Lima Oliveira, A. P., de Faveri, M., Gursky, L. C., Mestnik, M. J., Feres, M., Haffajee, A. D., Socransky, S. S. and Teles, R. P. : Effects of periodontal therapy on GCF cytokines in generalized aggressive periodontitis subjects. *J. Clin. Periodontol.* **39** ; 295-302 2012.
  - 25) Cian, R. E., López-Posadas, R., Drago, S. R., Sánchez de Medina, F. and Martinez-Augustin, O. : A *Porphyra columbina* hydrolysate upregulates IL-10 production in rat macrophages and lymphocytes through an NF- $\kappa$ B, and p38 and JNK dependent mechanism. *Food Chem.* **134** ; 1982-1990 2012.
  - 26) Gaddis, D. E., Maynard, C. L., Weaver, C. T., Michalek, S. M. and Katz, J. : Role of TLR2-dependent IL-10 production in the inhibition of the initial IFN- $\gamma$  T cell response to *Porphyromonas gingivalis*. *J. Leukoc. Biol.* **93** ; 21-31 2013.
  - 27) Kothari, P., Pestana, R., Mesraoua, R., Elcharki, R., Khan, K. M., Dannenberg, A. J. and Falcone, D. J. : IL-6-mediated induction of matrix metalloproteinase-9 is modulated by JAK-dependent IL-10 expression in macrophages. *J. Immunol.* **192** ; 349-357 2014.
  - 28) Masuda, T., Deng, X. and 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.
  - 29) Hanazawa, S., Kawata, Y., Takeshita, A., Ku-



- mada, H., Okithu, M., Tanaka, S., Yamamoto, Y., Masuda, T., Umemoto, T. and Kitano, S. : Expression of monocyte chemoattractant protein 1 (MCP-1) in adult periodontal disease : Increased monocyte chemotactic activity in crevicular fluids and induction of MCP-1 expression in gingival tissues. *Infect. Immun.* **61** ; 5219-5224 1993.
- 30) Emingil, G., Atilla, G. and Hüseyinov, A. : Gingival crevicular fluid monocyte chemoattractant protein-1 and RANTES levels in patients with generalized aggressive periodontitis. *J. Clin. Periodontol.* **31** ; 829-834 2004.
- 31) Pradeep, A. R., Daisy, H. and Hadge, P. : Serum levels of monocyte chemoattractant protein-1 in periodontal health and disease. *Cytokine* **47** ; 77-81 2009.
- 32) Kawasaki, S., Takizawa, H., Ohtoshi, T., Takeuchi, N., Kohyama, T., Nakamura, H., Kasama, T., Kobayashi, K., Nakahara, K., Morita, Y. and Yamamoto, K. : Roxithromycin inhibits cytokine production by and neutrophil attachment to human bronchial epithelial cells *in vitro*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **42** ; 1499-1502 1998.
- 33) Takizawa, H., Desaki, M., Ohtoshi, T., Kikutani, T., Okazaki, H., Sato, M., Akiyama, N., Shoji, S., Hiramatsu, K. and Ito, K. : Erythromycin suppresses interleukin 6 expression by human bronchial epithelial cells : a potential mechanism of its anti-inflammatory action. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **210** ; 781-786 1995.
- 34) Takizawa, H., Desaki, M., Ohtoshi, T., Kawasaki, S., Kohyama, T., Sato, M., Tanaka, M., Kasama, T., Kobayashi, K., Nakajima, J. and Ito, K. : Erythromycin modulates IL-8 expression in normal and inflamed human bronchial epithelial cells. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **156** ; 266-271 1997.
- 35) Yamaryo, T., Oishi, K., Yoshimine, H., Tsuchihashi, Y., Matsushima, K. and Nagatake, T. : Fourteen-member macrolides promote the phosphatidylserine receptor-dependent phagocytosis of apoptotic neutrophils by alveolar macrophages. *Antimicrob. Agents Chemother.* **47** ; 48-53 2003.
- 36) Moreira, P. R., Lima, P. M. A., Sathler, K. O., Imanishi, S. A., Cosata, J. E., Gomez, R. S., Gollob, K. J. and Dutra, W. O. : Interleukin-6 expression and gene polymorphism are associated with severity of periodontal disease in a sample of Brazilian individuals. *Clin. Exp. Immunol.* **148** ; 119-126 2007.
- 37) Otenio, C. C., Fonseca, I., Martins, M. F., Ribeiro, L. C., Assis, N. M., Ferreira, A. P. and Ribeiro, R. A. : Expression of IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , and iNOS in pregnant women with periodontal diseases. *Genet. Mol. Res.* **11** ; 4468-4478 2012.
- 38) Emingil, G., Gürkan, A., Atilla, G. and Kantarci, A. : Subantimicrobial-dose doxycycline and cytokine-chemokine levels in gingival crevicular fluid. *J. Periodontol.* **82** ; 452-461 2011.
- 39) Berker, E., Kantarci, A., Hasturk, H. and Van Dyke, T. E. : Blocking pro-inflammatory cytokine release modulates peripheral blood mononuclear cell response to *Porphyromonas gingivalis*. *J. Periodontol.* **84** ; 1337-1345 2013.

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口腔感染免疫学分野

Reprint requests : Yusuke KIYOURA, Division of Oral Infection and Immunity, Department of Oral Medical Science, Ohu University School of Dentistry 31-1 Misumido, Tomita, Koriyama, 963-8611, Japan