

自然免疫系による歯周病原性細菌の認識機構についての解析

吉 村 篤 利

長崎大学大学院医歯薬学総合研究科医療科学専攻
発生分化機能再建学講座歯周疾患病因・再生解析学分野

Recognition of Periodontopathic Bacteria by Innate Immune System

Atsutoshi Yoshimura

Nagasaki University Graduate School of Biomedical Sciences, Course of Medical and Dental Sciences,
Department of Developmental and Reconstructive Medicine, Division of Periodontology

はじめに

歯周病は歯面に付着したデンタルプラークバイオフィルム中の細菌を原因として発症する。一方、歯周組織にはこれらの細菌の侵入を防ぐために免疫系を中心とした宿主防御機構が備わる。免疫系はBリンパ球やTリンパ球などを主体としてそれぞれの抗原を特

異的に認識する獲得免疫系と好中球や単球などを主体として病原体に特有な構造 Pathogen Associated Molecular Patterns (PAMPs) を認識する自然免疫系に大別されるが、これらは歯周組織においても相互に協調して働いていると考えられる (図1)。このうち、自然免疫系に関する研究は1990年代後半のToll-like receptor (TLR) ファミリーの発見以来、急速に進歩を遂げヒトにおいてはTLR 1~10 までが

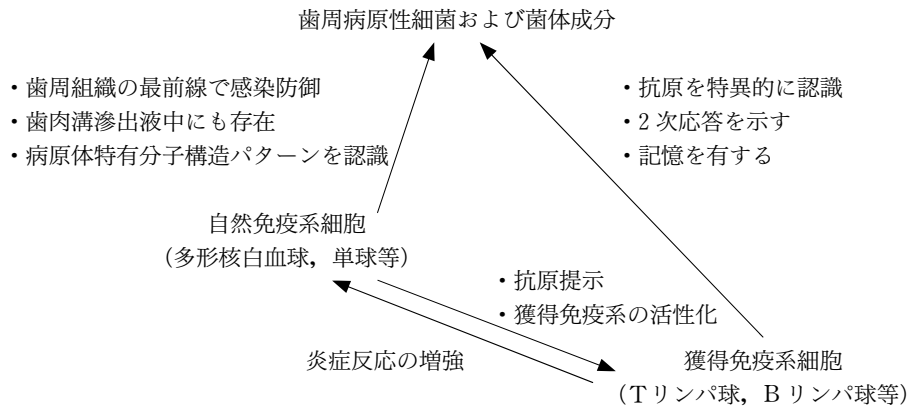


図1 歯周組織における自然免疫系と獲得免疫系のクロストーク

連絡先：吉村篤利

〒852-8588 長崎市坂本1-7-1 長崎大学大学院医歯薬学総合研究科医療科学専攻発生分化機能再建学講座歯周疾患病因・再生解析学分野

Atsutoshi Yoshimura

Nagasaki University Graduate School of Biomedical Sciences, Course of Medical and Dental Sciences, Department of Developmental and Reconstructive Medicine, Division of Periodontology

1-7-1, Sakamoto, Nagasaki 852-8588, Japan

E-mail ayoshi@net.nagasaki-u.ac.jp

同定され、そのリガンドや刺激伝達経路が明らかにされてきた。これら自然免疫系による歯周病原性細菌の認識機構に関する我々の取り組みを他の多くの研究者により明らかにされた最近の知見を交えて簡潔にまとめる。

1. 歯周病原性細菌リポ多糖 (LPS) に対する単球, 多形核白血球の応答

多くの菌体構成成分の中でもグラム陰性菌の外膜を構成する LPS は 1 ng/ml 以下の低濃度で単球や多形核白血球を活性化する強力な免疫活性化因子として知られている。歯肉溝滲出液中の細胞成分の大半を占める多形核白血球は歯周組織において最初に菌体成分による刺激を受ける細胞の1つと考えられるが、LPS により活性化されると、IL-1, IL-8, TNF- α などの炎症性サイトカインを産生し、局所での炎症反応を拡大すると共に新たな炎症性細胞の遊走を誘導する。我々は、歯周病原性細菌から抽出した内毒素でヒト多形核白血球を刺激し、産生されるサイトカイン量を測定して菌種による内毒素活性の違いについて解析した。この研究において、ヒト多形核白血球を *Porphyromonas gingivalis* LPS, *Capnocytophaga ochracea* LPS で刺激した場合、*Actinobacillus actinomycetemcomitans* LPS, *Fusobacterium nucleatum* LPS で刺激した場合と比較して IL-1, IL-8, TNF- α の産生

量がいずれも明らかに低かった。また、マウス腹腔マクロファージをこれらの LPS で刺激したところ TNF- α の産生に関して同様の結果が得られた²⁾。これらの結果は Ogawa ら³⁾や Gemmell ら⁴⁾の *P. gingivalis* LPS の単球に対する低刺激性を示した報告と一致しており、歯周病原性細菌内毒素の菌種間での活性の違いを明らかとしたものではあるが、当時、内毒素に対する細胞内刺激伝達分子は発見されておらず、活性の差が何に起因するのか十分に解明するには至らなかった。

2. LPS 刺激伝達分子

1990 年、Wright ら⁵⁾は CD 14 が LPS と LPS binding protein (LBP) 複合体のレセプターであることを報告したが、その後の生化学的研究やノックアウトマウスを用いた研究等により、CD 14 は LPS と物理的に結合し、CD 14 存在下では LPS への感受性が非存在下と比較して飛躍的に高まることが証明された。しかしながら CD 14 は glycosylphosphatidylinositol (GPI) アンカーを介して細胞膜と結合しているため、細胞膜貫通領域および細胞内領域は保有していない。これは細胞内への刺激伝達には他の細胞内領域を有する分子が関与していることを意味する。我々⁶⁾は LPS 刺激伝達分子を同定するために、Chinese hamster ovary fibroblasts (CHO 細胞) にヒト CD 14 を発現

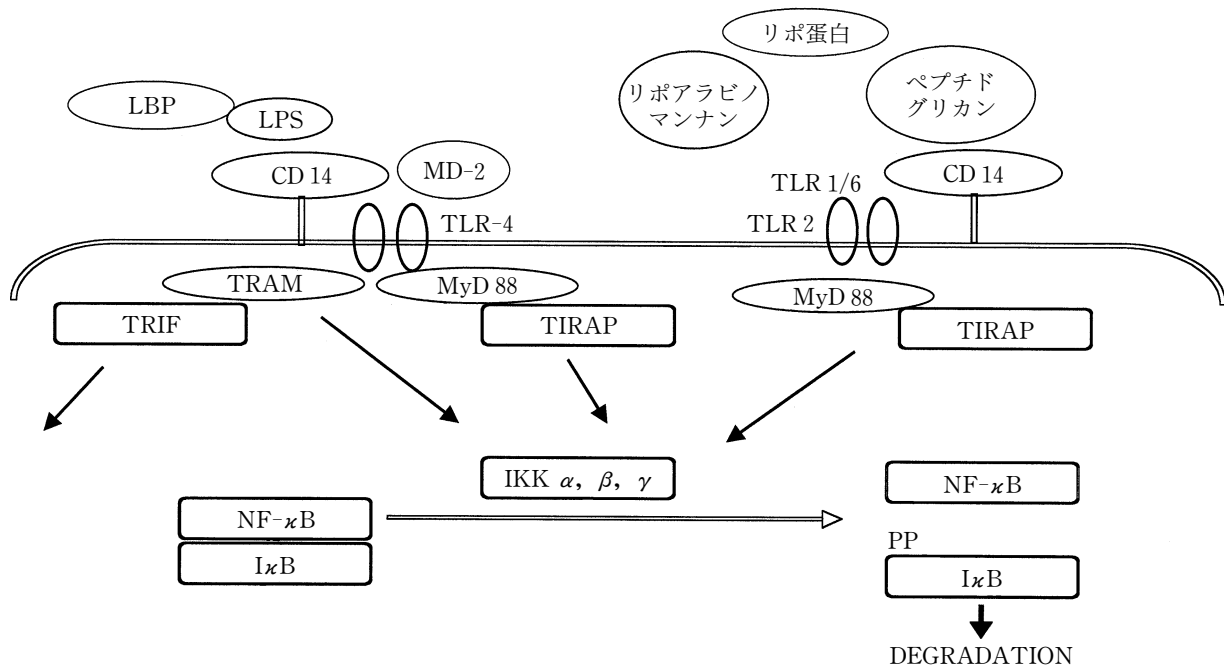


図 2 自然免疫系による病原体に特有な分子構造パターンの認識

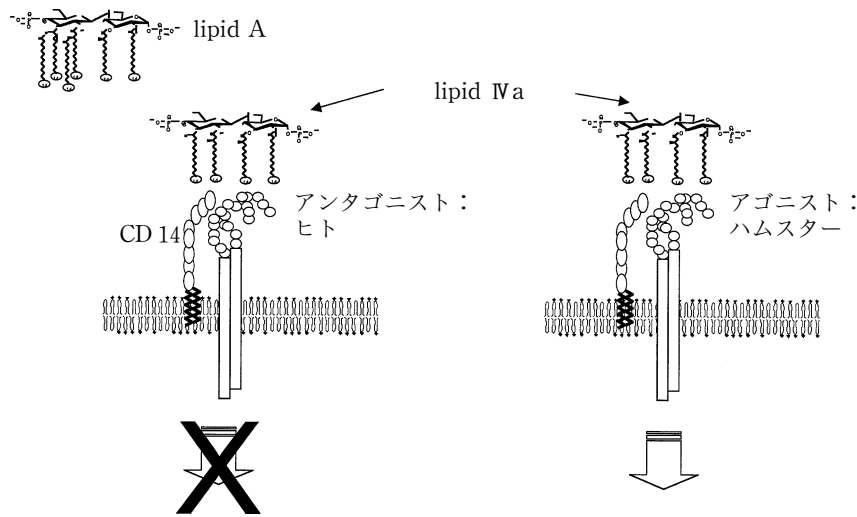


図 3 Lipid A の種特異的認識

させ、LPS レポーター細胞を作製した。このレポーター細胞に突然変異を誘発することにより、LPS 刺激伝達経路において、CD 14 の下流に少なくとも 2 つ以上の刺激伝達分子が存在することを明らかとした。この直後に、Godowski ら⁷⁾と Rothe ら⁸⁾は LPS 非感受性の HEK 293 細胞に TLR 2 を発現させると LPS 感受性になることを報告した。I 型膜貫通蛋白である TLR 2 が細胞内刺激伝達分子であることが証明されたわけである。しかしながら、我々の作製した CHO レポーター細胞においては TLR 2 は遺伝学的に発現されておらず、TLR 2 が主要な刺激伝達分子ではないことが示された⁹⁾。その後、LPS 低応答性マウスとして知られる C 3 H/HeJ, C 57 BL/10 ScCr マウスでは *Tlr4* 遺伝子に変異がみられること¹⁰⁾、TLR 4 ノックアウトマウスは LPS に反応しないこと¹¹⁾が報告され、LPS の主要な刺激伝達分子は TLR 4 であることが明らかとなった (図 2)。

3. MD 2-TLR 4 複合体による lipid A の種特異的認識

Miyake ら¹²⁾は Toll と同様に細胞外に Leucine-rich repeat を有する分子 RP 105 が MD-1 と会合することを明らかにしていたが、MD-1 に相当性を示す分子 MD-2 をクローニングし、LPS 非感受性 Ba/F 3 細胞に TLR 4 と MD-2 の両方を発現させると LPS 応答性へと変化することを明らかにした。我々も¹³⁾ CHO レポーター細胞の LPS 刺激伝達経路変異株 7.19 には MD-2 の変異がみられ、野生株 MD-2 を発現させると LPS 応答性へと変化することから、LPS

認識には MD-2 の発現も必須であることを明らかとした (図 2)。

また、CHO レポーター細胞はハムスター由来の細胞でありハムスター TLR 4 を発現しているため lipid A 前駆体である lipid IVa や *Rhodobacter sphaeroides* の lipid A (RSLA) を認識して応答するがヒト由来の細胞はこれらに不応答性である。我々¹⁴⁾は CHO レポーター細胞にヒト TLR 4 を過剰発現させると lipid IVa, RSLA に不応答性へと変化することから、TLR 4 は内毒素の活性中心である lipid A への種特異的反応において必須の分子であることを明らかとした (図 3)。同様に Beutler ら¹⁵⁾もマウス TLR 4 とヒト TLR 4 を用いて lipid A の種特異的認識には TLR 4 が重要な役割を果たすことを報告している。一方、Miyake ら¹⁶⁾はこれらのリガンドに対する種特異性は MD-2 によるものであると報告している。これらの違いは、それぞれの実験系における TLR 4, MD-2 の発現量の違いによるものかもしれないが、これらの分子が LPS の活性中心である lipid A の種特異的認識に関与していることを示している点で共通しており、このような菌体成分の種特異的認識は宿主の病原体への感受性を決定する重要な因子の一つであると思われる。

4. TLR 2 による菌体成分の認識

当初 LPS レセプターとして報告された TLR 2 が、LPS の主要な刺激伝達分子でないとするとそのリガンドは何であろうか? 我々は、TLR の発見以前から病原体特有の分子構造に対するパターン認識レセプタ

ーとして知られていた CD 14 が、LPS 以外の菌体成分も認識し得る点に注目した。LPS を保有しないグラム陽性菌の細胞壁に存在するペプチドグリカン層は CD 14 の存在下で効率よく認識される。加熱処理したグラム陽性菌や可溶性ペプチドグリカンで遺伝学的に TLR 2 を欠如した CHO/CD 14 レポーター細胞を刺激しても NF- κ B の活性化は起こらなかったが、レポーター細胞に TLR 2 を発現させると NF- κ B が活性化された。すなわち、TLR 2 はグラム陽性菌やペプチドグリカンの認識に必須であった¹⁷⁾ (図 2, 4)。また TLR 2 は、ペプチドグリカン以外にも菌体由来のリポ蛋白、リポペプチド、リポアラビノマンナンなど多くの菌体成分を認識するパターン認識分子であることも明らかとなった¹⁸⁻²⁰⁾。このうちリポ蛋白、リポペプチド等の認識には TLR 2 と TLR 1, TLR 6 が協調的に関与していることが明らかとなったが、Shibata ら^{21,22)}は口腔由来の *Mycoplasma salivarium* や歯周病原性細菌 *Bacteroides forsythus* からリポ蛋白を抽出し、リポペプチドの構造と生物学的活性の関係を明らかにした。また、我々²³⁾は TLR 2 がペプチドグリカンのどのような構造を認識しているかについても検討した。ペプチドグリカンは *N*-acetylmuramic

acid と *N*-acetylglucosamine が交互に β 1, 4 結合した多糖体直鎖をペプチドが網目状に結ぶ構造物であるが、*Staphylococcus epidermidis* のペプチドグリカンの網目状ペプチド鎖を *S. aureus* lytic enzyme によって特異的に切断しても活性は失われなかったが、M-1 endo-*N*-acetylmuramidase によって糖鎖を分解すると TLR 2 による応答性は消失した (図 4)。すなわち、TLR 2 はペプチドグリカン中の、ペプチドで修飾された糖鎖の重合構造を認識していることが明らかとなった。後に、ペプチドグリカン中のアジュバンド活性を示す最小構造単位として知られる MurNAc-L-Ala-D-isoGln (MDP) は Nod 2 によって、またグラム陰性菌ペプチドグリカン中の diaminopimelate を含む GlcNAc-MurNAc tripeptide は Nod 1 によって認識されることが明らかとなった²⁴⁻²⁷⁾。

5. *Porphyromonas gingivalis* LPS の TLR 4 アンタゴニストとしての作用

前述したように代表的歯周病原性細菌 *P. gingivalis* LPS で単球や多形核白血球を刺激した場合、炎症性サイトカインの産生量は他の細菌の LPS で刺激した場合と比較して著しく少ない。これは TLR を介する LPS 認識機構においてどのような特性を意味するのであろうか。我々²⁸⁾は、ヒト TLR 4 を発現した CHO レポーター細胞を *P. gingivalis* LPS で刺激したがレポーター細胞の NF- κ B は活性化されず、逆に *P. gingivalis* LPS は *E. coli* LPS や *A. actinomycetemcomitans* LPS により誘導される活性化を阻害した。すなわち、*P. gingivalis* LPS はヒト TLR 4 のアンタゴニストとして作用した。これは Genco ら²⁹⁾が THP-1 細胞を *E. coli* LPS で刺激した場合に、*P.*

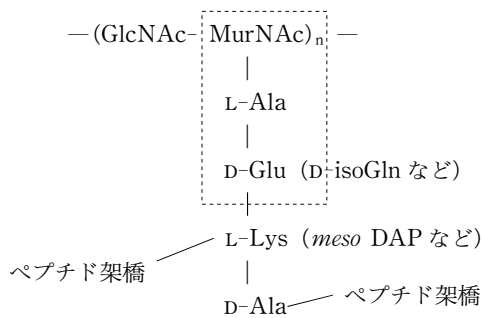


図 4 ペプチドグリカンの基本構造

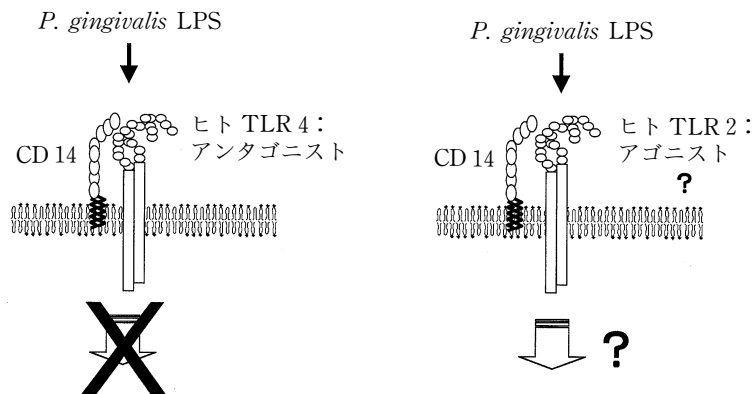


図 5 *P. gingivalis* LPS のヒト TLR 2 および TLR 4 への作用

gingivalis LPS が TNF- α , IL-6 産生を阻害したとする報告や, Darveau ら³⁰⁾が TLR 4 を発現したヒト血管内皮細胞を *E. coli* LPS で刺激した場合に *P. gingivalis* LPS が E-selectin の発現や NF- κ B の活性化誘導を阻害したとする報告とも一致する。但し, 精製 *P. gingivalis* LPS は血球系細胞に弱い活性化作用を示すことが以前から知られている。Vogel ら³¹⁾は再精製により endotoxin protein を除去した *P. gingivalis* LPS も TLR 2 を活性化することを示しており, TLR 2 と TLR 4 の両方を発現した血球系細胞は, 精製 *P. gingivalis* LPS で刺激された場合に主に TLR 2 を介して活性化されるものと思われる。しかしながら Ogawa ら³²⁾は *P. gingivalis* lipid A を合成し, 合成 lipid A は TLR 2 に対して活性化作用を示さないことを報告しており, 精製 *P. gingivalis* LPS の TLR 2 に対する作用に関しては今後も議論の余地があるものと思われる。

6. 歯周組織における TLR 2 および TLR 4 の発現

このように菌体成分の認識に重要な役割を果たす TLR 2 および TLR 4 は, 歯周組織においてどのような発現を示しているのであろうか。Mori ら³³⁾は正常歯肉および重度歯周炎罹患歯肉において, CD 14, TLR 2, TLR 4 の発現を免疫組織学的に解析した。主に血球系細胞にこれらの分子の強い発現が観察され, 上皮, 結合組織, 血管内皮細胞における発現は比較的弱いものであった。正常歯肉と比較して重度歯周炎罹患歯肉では TLR 2 および TLR 4 の発現が上昇し, また, 口腔上皮側の歯肉よりもポケット上皮側歯肉で発現の上昇がみられた。このことは重度歯周炎罹患歯肉のポケット上皮側で炎症性細胞の接合上皮直下に侵入した菌体あるいは菌体成分がこれらのパターン認識分子で認識され得ることを意味している。これに対し, CD 14 の発現率は正常歯肉と比較して重度歯周炎罹患歯肉で, また, 口腔上皮側の歯肉よりもポケット上皮側歯肉で低下していた。これは歯周ポケットからの菌体成分, サイトカイン, ケミカルメディエーターによる刺激で浸潤細胞が活性化または分化したために起きた現象と思われる。このように機能的に変化した細胞によるサイトカイン産生や抗原提示は宿主防御のみならず組織破壊にも大きな影響を与えているものと思われ, 今後も詳細な検討が必要と思われる。

おわりに

これらの研究成果は TLR を中心とした自然免疫系による菌体成分の認識機構を分子レベルで明らかにするとともに *P. gingivalis* など一部の歯周病原性細菌の自然免疫系による認識における特性についても解析したものである。今後, これら自然免疫系と歯周病原性細菌の相互作用をより詳細に検討することにより, 歯周病の進行過程の解明, 早期診断法ならびに予防法の開発に貢献できることが期待される。

謝 辞

稿を終えるにあたり, 研究の遂行に終始ご指導, ご協力いただきました本学加藤伊八名誉教授, 歯周疾患病因・再生解析学分野原宜興教授をはじめとする多くの先生方に深く感謝の意を表します。

本論文の要旨は, 第 47 回春季日本歯周病学会学術大会(平成 16 年 5 月 21 日)において発表した。

文 献

- 1) Yoshimura A, Hara Y, Kaneko T, Kato I : Secretion of IL-1 β , TNF- α , IL-8 and IL-1ra by human polymorphonuclear leukocytes in response to lipopolysaccharides from periodontopathic bacteria. J Periodont Res, 32 : 279-286, 1997.
- 2) 吉村篤利, 原 宜興, 岡野久美子, 金子高士, 谷真彦, 加藤伊八 : 歯周病関連細菌 LPS のマウス腹腔マクロファージに対する TNF- α 産生誘導能. 日歯周誌, 37 : 468-474, 1995.
- 3) Ogawa T, Uchida H, Amino K : Immunobiological activities of chemically defined lipid A from lipopolysaccharides of *Porphyromonas gingivalis*. Microbiology, 140 : 1209-16, 1994.
- 4) Gemmell E, Seymour GJ : Interleukin 1, interleukin 6 and transforming growth factor- β production by human gingival mononuclear cells following stimulation with *Porphyromonas gingivalis* and *Fusobacterium nucleatum*. J Periodontal Res, 28 : 122-129, 1993.
- 5) Wright SD, Ramos RA, Tobias PS, Ulevitch RJ, Mathison JC : CD 14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein. Science, 249 : 1431-1433, 1990.
- 6) Delude RL, Yoshimura A, Ingalls RR, Golenbock DT : Construction of a lipopolysaccharide reporter cell line and its use in identifying mutants defective in endotoxin, but not TNF- α , signal

- transduction. *J Immunol*, 161 : 3001-3009, 1998.
- 7) Yang RB, Mark MR, Gray A, Huang A, Xie MH, Zhang M, Goddard A, Wood WI, Gurney AL, Godowski PJ : Toll-like receptor-2 mediates lipopolysaccharide-induced cellular signalling. *Nature*, 395 : 284-288, 1998.
 - 8) Kirschning CJ, Wesche H, Merrill Ayres T, Rothe M : Human Toll-like receptor 2 confers responsiveness to bacterial lipopolysaccharide. *J Exp Med*, 188 : 2091-2097, 1998.
 - 9) Heine H, Kirschning CJ, Lien E, Monks BG, Rothe M, Golenbock DT : Cutting edge : cells that carry a null allele for Toll-like receptor 2 are capable of responding to endotoxin. *J Immunol*, 162 : 6971-6975, 1999.
 - 10) Poltorak A, He X, Smirnova I, Liu MY, Van Huffel C, Du X, Birdwell D, Alejos E, Silva M, Galanos C, Freudenberg M, Ricciardi-Castagnoli P, Layton B, Beutler B : Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10 ScCr mice : mutations in *Tlr 4* gene. *Science*, 282 : 2085-2088, 1998.
 - 11) Hoshino K, Takeuchi O, Kawai T, Sanjo H, Ogawa T, Takeda Y, Takeda K, Akira S : Cutting edge : Toll-like receptor 4 (TLR4)-deficient mice are hyporesponsive to lipopolysaccharide : evidence for TLR4 as the *Lps* gene product. *J Immunol*, 162 : 3749-3752, 1999.
 - 12) Shimazu R, Akashi S, Ogata H, Nagai Y, Fukudome K, Miyake K, Kimoto M : MD-2, a molecule that confers lipopolysaccharide responsiveness on Toll-like receptor 4. *J Exp Med*, 189 : 1777-1782, 1999.
 - 13) Schromm AB, Lien E, Henneke P, Chow JC, Yoshimura A, Heine H, Latz E, Monks BG, Schwartz DA, Miyake K, Golenbock DT : Molecular genetic analysis of an endotoxin nonresponder mutant cell line : a point mutation in a conserved region of MD-2 abolishes endotoxin-induced signaling. *J Exp Med*, 194 : 79-88, 2001.
 - 14) Lien E, Means TK, Heine H, Yoshimura A, Kusumoto S, Fukase K, Fenton MJ, Oikawa M, Qureshi N, Monks B, Finberg RW, Ingalls RR, Golenbock DT : Toll-like receptor 4 imparts ligand-specific recognition of bacterial lipopolysaccharide. *J Clin Invest*, 105 : 497-504, 2000.
 - 15) Poltorak A, Ricciardi-Castagnoli P, Citterio S, Beutler B : Physical contact between lipopolysaccharide and Toll-like receptor 4 revealed by genetic complementation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 97 : 2163-2167, 2000.
 - 16) Akashi S, Nagai Y, Ogata H, Oikawa M, Fukase K, Kusumoto S, Kawasaki K, Nishijima M, Hayaishi S, Kimoto M, Miyake K : Human MD-2 confers on mouse Toll-like receptor 4 species-specific lipopolysaccharide recognition. *Int Immunol*, 13 : 1595-1599, 2001.
 - 17) Yoshimura A, Lien E, Ingalls RR, Tuomanen E, Dziarski R, Golenbock D : Cutting edge : recognition of Gram-positive bacterial cell wall components by the innate immune system occurs via Toll-like receptor 2. *J Immunol*, 163 : 1-5, 1999.
 - 18) Lien E, Sellati TJ, Yoshimura A, Flo TH, Rawadi G, Finberg RW, Carroll JD, Espevik T, Ingalls RR, Radolf JD, Golenbock DT : Toll-like receptor 2 functions as a pattern recognition receptor for diverse bacterial cell wall products. *J Biol Chem*, 274 : 33419-33425, 1999.
 - 19) Means TK, Lien E, Yoshimura A, Wang S, Golenbock DT, Fenton MJ : The CD14 ligands lipooligosaccharide and lipopolysaccharide differ in their requirement for Toll-like receptors. *J Immunol*, 163 : 3920-3927, 1999.
 - 20) Means TK, Wang S, Lien E, Yoshimura A, Golenbock DT, Fenton MJ : Human Toll-like receptors mediate cellular activation by *Mycobacterium tuberculosis*. *J Immunol*, 163 : 3920-3927, 1999.
 - 21) Okusawa T, Fujita M, Nakamura J, Into T, Yasuda M, Yoshimura A, Hara Y, Hasebe A, Golenbock DT, Morita M, Kuroki Y, Ogawa T, Shibata K : Relationship between structures and biological activities of mycoplasmal diacylated lipopeptides and their recognition by Toll-like receptors 2 and 6. *Infect Immun*, 72 : 1657-1665, 2004.
 - 22) Hasebe A, Yoshimura A, Into T, Kataoka H, Tanaka S, Arakawa S, Ishikura H, Golenbock DT, Sugaya T, Tsuchida N, Kawanami M, Hara Y, Shibata K : Biological activities of *Bacteroides forsythus* lipoproteins and their possible pathological roles in periodontal disease. *Infect Immun*, 72 : 1318-1325, 2004.
 - 23) Yoshimura A, Takada H, Kaneko T, Kato I, Golenbock D, Hara Y : Structural requirements of muramylpeptides for induction of Toll-like receptor 2-mediated NF- κ B activation in CHO cells. *J Endotoxin Res*, 6 : 407-410, 2000.
 - 24) Inohara N, Ogura Y, Fontalba A, Gutierrez O, Pons F, Crespo J, Fukase K, Inamura S, Kusumoto S, Hashimoto M, Foster SJ, Moran AP, Fernandez-Luna JL, Nunez G : Host recognition of bacterial muramyl dipeptide mediated through NOD2. Implications for Crohn's disease. *J Biol Chem*, 278 : 5509-5512, 2003.

- 25) Girardin SE, Boneca IG, Viala J, Chamaillard M, Labigne A, Thomas G, Philpott DJ, Sansonetti PJ : Nod2 is a general sensor of peptidoglycan through muramyl dipeptide (MDP) detection. *J Biol Chem*, 278 : 8869-8872, 2003.
- 26) Chamaillard M, Hashimoto M, Horie Y, Masumoto J, Qiu S, Saab L, Ogura Y, Kawasaki A, Fukase K, Kusumoto S, Valvano MA, Foster SJ, Mak TW, Nunez G, Inohara N : An essential role for NOD1 in host recognition of bacterial peptidoglycan containing diaminopimelic acid. *Nat Immunol*. 4 : 702-707, 2003.
- 27) Girardin SE, Boneca IG, Carneiro LA, Antignac A, Jehanno M, Viala J, Tedin K, Taha MK, Labigne A, Zahringer U, Coyle AJ, DiStefano PS, Bertin J, Sansonetti PJ, Philpott DJ : Nod1 detects a unique muropeptide from gram-negative bacterial peptidoglycan. *Science*, 300 : 1584-1587, 2003.
- 28) Yoshimura A, Kaneko T, Kato Y, Golenbock DT, Hara Y : Lipopolysaccharide from periodontopathic bacteria *Porphyromonas gingivalis* and *Campylobacter jejuni* are antagonists for human Toll-like receptor 4. *Infect Immun*, 70 : 218-225, 2002.
- 29) Hajishengallis G, Martin M, Schifferle RE, Genco RJ : Counteracting interactions between lipopolysaccharide molecules with differential activation of Toll-like receptors. *Infect Immun*, 70 : 6658-6664, 2002.
- 30) Coats SR, Reife RA, Bainbridge BW, Pham TT, Darveau RP : *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide antagonizes *Escherichia coli* lipopolysaccharide at Toll-like receptor 4 in human endothelial cells. *Infect Immun*, 71 : 6799-6807, 2003.
- 31) Hirschfeld M, Weis JJ, Toshchakov V, Salkowski CA, Cody MJ, Ward DC, Qureshi N, Michalek SM, Vogel SN : Signaling by Toll-like receptor 2 and 4 agonists results in differential gene expression in murine macrophages. *Infect Immun*, 69 : 1477-1482, 2001.
- 32) Ogawa T, Asai Y, Hashimoto M, Takeuchi O, Kurita T, Yoshikai Y, Miyake K, Akira S : Cell activation by *Porphyromonas gingivalis* lipid A molecule through Toll-like receptor 4-and myeloid differentiation factor 88-dependent signaling pathway. *Int Immunol*, 14 : 1325-1332, 2002.
- 33) Mori Y, Yoshimura A, Ukai T, Lien E, Espevic T, Hara Y : Immunohistochemical localization of Toll-like receptors 2 and 4 in gingival tissue from patients with periodontitis. *Oral Microbiol and Immunol*, 18 : 54-58, 2003.