

歯周病におけるカルプロテクチンの役割と発現調節機構の解明

木戸 淳一

徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部歯周歯内治療学分野

The Role of Calprotectin in Periodontal Diseases and Regulation of its Expression

Jun-ichi Kido

Department of Periodontology and Endodontology, Institute of Health Biosciences,
The University of Tokushima Graduate School

はじめに

カルプロテクチン(Calprotectin)は好中球の細胞質ゾルの主要な蛋白であり, S100A8 と S100A9 または Macrophage migration inhibitory factor-related protein 8 と 14 (MRP8 と MRP14) と呼ばれる分子量の異なる 2 つのペプチドの複合体より構成されるカルシウム結合性蛋白である^{1,2)}。カルプロテクチンは亜鉛キレート作用による抗菌作用, 走化作用およびアポトーシス誘導などの生理作用を有しており, 好中球ばかりでなく単球/マクロファージや上皮細胞においてもその発現が認められる¹⁻³⁾。Fagerhol ら⁴⁻⁶⁾は, カルプロテクチンレベルがいくつかの炎症性疾患において上昇することを報告し, 潰瘍性大腸炎やリウマチ性関節炎の疾患マーカーとなることを示した。また, カルプロテクチンは正常な歯肉や口腔粘膜の上皮あるいは腔の粘膜上皮に存在し, 幅広く細菌に対して抗菌性を示すことより自然免疫系での生体の感染防御の役割が注目されている。

口腔疾患におけるカルプロテクチンの研究は, 1990年代のはじめに Eversole ら^{7,8)}により炎症を伴うカンジダ症や扁平苔癬の口腔粘膜でのカルプロテクチンの

発現上昇が報告されていたが, 歯周疾患との関連性については詳細は明らかではなかった。私たちは 1995年頃に歯石中にカルプロテクチンの存在を認め⁹⁾, その後歯肉溝滲出液(Gingival crevicular fluid: GCF)中の存在や歯周病における GCF 中のカルプロテクチンレベルの変化について臨床研究を行い, カルプロテクチンが歯周病診断マーカーとなりうる可能性を示した¹⁰⁻¹²⁾。また, GCF 中のカルプロテクチンの由来の追及から歯周病原因子や関連する炎症性サイトカインがカルプロテクチンの遊離と発現を調節することを見出した¹³⁻¹⁶⁾。一方, Herzberg ら¹⁷⁾はカルプロテクチンが *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*) の上皮細胞への付着を低下させることを示し, Miyasaki ら¹⁸⁾はこの蛋白が *Capnocytophaga sputigena* の増殖を抑制することを報告し, さらに私たちはカルプロテクチンが *P. gingivalis* の増殖を抑制することを認めた。これらの研究は, 抗菌ペプチドであるカルプロテクチンによる歯周病の免疫療法の可能性を示すものと考えられる。

本稿では, 私たちが行ってきたカルプロテクチンによる歯周病診断の臨床研究および好中球, 単球や上皮細胞におけるカルプロテクチンの遊離・発現調節に関する基礎研究を中心に歯周病におけるカルプロテクチ

連絡先: 木戸淳一

〒770-8504 徳島市蔵本町3丁目18-15

徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部 歯周歯内治療学分野

Jun-ichi Kido

Department of Periodontology and Endodontology, Institute of Health Biosciences,

The University of Tokushima Graduate School

kido@dent.tokushima-u.ac.jp

ンの役割について概説した。

1. カルプロテクチンによる歯周病診断

歯周病の正確かつ客観的な診断は歯周病の予防、適切な治療法の選択、さらに新たな歯周病治療法の開発において非常に重要な課題である。また、歯周疾患活動度の診断のためにも GCF や唾液中の様々な因子がバイオマーカーとして注目され、研究が行われている¹⁹⁾。カルプロテクチンは好中球、単球/マクロファージや口腔上皮細胞由来の蛋白であり、肺炎、敗血症、リウマチ性関節炎あるいは潰瘍性大腸炎の血液、関節滑液や便中でそのレベルが上昇することより炎症のマーカーとしての有用性が報告されている^{1,2,4-6)}。私たちは、カルプロテクチンレベルが歯周病罹患部位の GCF 中で増加していると考え、ELISA 法にてカルプロテクチン量の測定を行った。その結果、歯周ポケットが 4 ミリ以上の歯周病部位の GCF 中のカルプロテクチン濃度は平均 2.15 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ GCF と 3 ミリ以下の健常部位の濃度 (0.59 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ GCF) と比較すると約 3.6 倍と有意に高い値を示した (表 1) 10)。さらに、カルプロテクチンレベルとプロービングデプス (Probing depth: PD), プロービングデプス時出血 (Bleeding on probing: BOP) および歯肉炎指数 (Gingival index: GI) などの臨床マーカーとの相関関係を調べた (表 2)。その結果、歯周病部位からの GCF サンプルにおいて BOP 陽性部位でのカルプロテクチン濃度は陰性部位のものより有意に高い値を示し、歯周炎指数との相関関係は相関係数値が 0.56 と高い正の相関関係を示した^{11,12)}。また、PD 値とも軽度ではあるが有意な相関関係が認められた。さらに、歯周病の他のバイオマーカーとして知られている Interleukin-1 β (IL-1 β), Prostaglandin E₂ (PGE₂), Collagenase (COL) および Aspartate aminotransferase (AST) などのレベルとの関係を調べると、主に炎症のマーカーである IL-1 β , PGE₂あるいは COL とそれぞれ 0.55, 0.6 や 0.57 の相関係数を示す有意な正の相関関係を示し、組織破壊のマーカーである AST との間にも軽度な正の相関関係が見られた (表 2) ^{11,12)}。このようにカルプロテクチンは他のバイオマーカー、特に炎症のマーカーとの間に強い相関関係を示した。また、8~12 人の患者について歯周治療による GCF 中のカルプロテクチンレベルの変化を検討すると、初期治療を行った部位のカルプロテクチンレベルは初診時を 100%とした場合約 43%に減少し、さらに歯周外科治療を行うと約 20%にまで減少した。ELISA 法を用いたこれらのバイオマーカーの測定過程において、カルプロテクチンは GCF 中の濃度が高く、大部分の GCF サンプルでその含有量の測定が可

表 1 GCF 中のかかるプロテクチンレベル

GCF 採取部位	GCF 試料数	カルプロテクチン濃度 ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$ GCF)
健常部位 ¹	43	0.59
歯周病部位 ²	74	2.15

¹ 歯周ポケットが 3mm 以下、² 歯周ポケットが 4mm 以上、カルプロテクチン濃度は平均値を示す。(*P < 0.01 : Mann-Whitney U 検定)

表 2 カルプロテクチンと他の歯周病マーカーとの相関関係

カルプロテクチン vs	相関係数 (r)	P値	相関関係
プロービングデプス値	0.41	P<0.0001	+
歯肉炎指数	0.56	P<0.0001	++
Interleukin-1 β	0.55	P<0.0005	++
Prostaglandin E ₂	0.60	P<0.005	++
Collagenase	0.57	P<0.0001	++
Aspartate amino-transferase	0.40	P<0.005	+

能であったが他のバイオマーカー因子の中には GCF 中の量が少なく既存の測定キットでは測定が困難なものがあった。これらの一連の研究結果により、カルプロテクチンが歯周病診断の有用なバイオマーカーとなりうることが示唆された。

2. 好中球と単球におけるカルプロテクチンの遊離と発現の調節

カルプロテクチンは GCF 中に比較的高い濃度が認められるが、この由来については明らかではなかった。しかしながら、この蛋白の産生細胞であり、歯周病罹患部位の周辺に存在する好中球、単球/マクロファージあるいは歯肉上皮細胞からの産生と遊離が考えられた。歯周組織におけるカルプロテクチンの分布を免疫組織染色にて調べたところ、歯周病患者の結合組織の炎症性細胞浸潤局所や歯肉上皮に強いカルプロテクチンの発現が確認され¹⁴⁾、Schlegel ら²⁰⁾の別のカルプロテクチン抗体を使った免疫染色の結果と類似した分布が認められた。そこで、ヒト好中球や単球におけるカルプロテクチンの発現と遊離はどのような調節を受けているのかと言う疑問が生じた。すでに、Fagerhol ら²¹⁾は Chemotaxin である C5a や formyl-methionine-leucine-phenylalanine がヒト多形核白血球からのカルプロテクチンの遊離を誘導することを報告して

いた。私たちは歯周病原因子に注目し、*P. gingivalis*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Prevotella intermedia*, *Fusobacterium nucleatum* などの歯周病原性細菌由来 lipopolysaccharide (LPS) がヒト好中球からのカルプロテクチン遊離を増加させることを示した¹⁵⁾。特に *P. gingivalis* 由来 LPS (P-LPS) については好中球を P-LPS で処理すると 30 分後に対照群の 12 ~ 20 倍のカルプロテクチンが遊離した。この P-LPS によるカルプロテクチンの遊離促進は、LPS 受容体である CD-14 の抗体や Toll-like receptor 2 の抗体により抑制され、さらに転写因子 NF- κ B の複数の阻害剤によっても抑制された¹³⁾。しかしながら、Toll-like receptor 4 の抗体では有意な減少は認められなかった。これらの結果より P-LPS 刺激による好中球からのカルプロテクチンの遊離促進はすでに知られている *P. gingivalis* 由来 LPS のシグナル経路を介して引き起こされることが判明した。また、この遊離促進はチュブリンの重合阻害剤によっても抑制されることから、P-LPS によるカルプロテクチン遊離は図 1 で示すような経路を介してそのシグナルが伝達され、細胞膜のマイクロチューブルを通して遊離されることが明らかとなった¹³⁾。

歯周病において炎症を伴った歯周組織中には好中球とならび単球やマクロファージの浸潤が認められ、これらの細胞はカルプロテクチンを産生する。Sorg^{22,23)} は、HL-60 細胞においてその分化を調節する 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ や Dimethylsulfoxide がカルプロテクチンの構成ペプチドである S100A8 と S100A9 の発現を増加させること、あるいは S100A9 発現増加に転写因子の C/EBP α が関与していることなどを報告している。私たちは、P-LPS がヒト末梢血単球からのカルプロテクチンの遊離を促進すること、また炎症性サイトカインの IL-1 β と Tumor necrosis factor- α (TNF- α) もこの遊離を増加させることを認めた (表 3)¹⁴⁾。さらに、単球では P-LPS、IL-1 β および TNF- α が S100A8 と S100A9 の遺伝子発現を上昇させ、カルプロテクチン蛋白の産生も増加させた (表 3)¹⁶⁾。これらの研究より、歯周病病変局所において病原因子の P-LPS および IL-1 β や TNF- α などの炎症性サイトカインが好中球や単球でのカルプロテクチンの産生や遊離を促進させ、その結果 GCF 中のカルプロテクチンレベルが高まることが推察された。

歯周病の病態は主に歯周病原性細菌の感染による炎症と組織破壊であり、カルプロテクチンの発現についても炎症関連因子による発現調節の研究が行われてきた。一方、歯周病の増悪因子として心理的 (精神的) ストレスが知られている。ストレスが歯周病の発症や

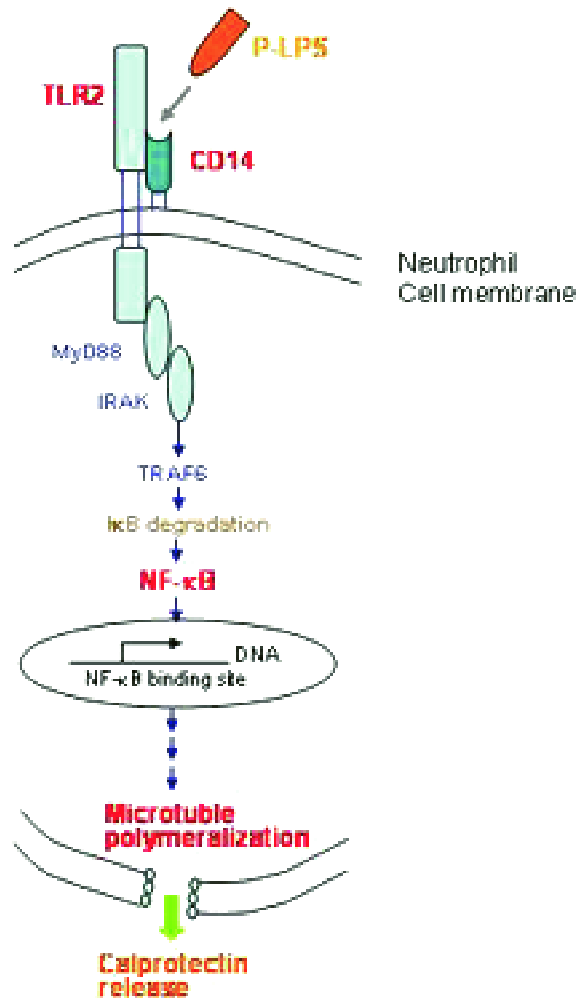


図 1 *P. gingivalis* 由来 LPS 刺激による好中球からのカルプロテクチンの遊離

表 3 ヒト単球におけるカルプロテクチンの遊離と産生に及ぼす P-LPS*, IL-1 β と TNF- α の影響

実験群	カルプロテクチン遊離 (対照群に対する%)	カルプロテクチン産生 (対照群に対する%)
対照	100 ¹⁾	100 ²⁾
P-LPS*	292	166
IL-1 β	150	190
TNF- α	233	165

* *P. gingivalis* 由来 LPS

¹⁾ 対照群の単球からの遊離カルプロテクチン量: 2.82 pg / 細胞

²⁾ 対照群の単球中のカルプロテクチン量: 6.65 pg / 細胞

進行に与える影響については以前から疫学的な研究が行われているが、歯周病におけるストレスの生理的作

用機構に関する研究は多くない。心理的ストレスは、中枢神経系、神経内分泌系および免疫系の経路を介して免疫反応に影響を与える。ストレスのシグナル伝達物質として自律神経系のノルアドレナリンあるいは視床下部-下垂体-副腎皮質系のコルチゾールが知られている^{24,25)}。そこで、私たちはストレスによるカルプロテクチン発現の影響を検討するために、ヒト単球株化細胞を用いてノルアドレナリンとコルチゾールのカルプロテクチン発現への影響を調べた。その結果、ノルアドレナリンはカルプロテクチンの遺伝子と蛋白の発現を有意に増加させたが、コルチゾールは明らかな効果を示さなかった²⁶⁾。さらに、ノルアドレナリンによるカルプロテクチンの発現上昇には転写因子であるC/EBP α が関与している可能性が示された。心理的ストレスとカルプロテクチンの発現調節についてはさらなる研究が必要であるが、ストレスのシグナル伝達物質であるノルアドレナリンが自然免疫を担うカルプロテクチンの発現を調節することにより免疫反応に影響を及ぼしている可能性が考えられる。

3. 上皮細胞におけるカルプロテクチンの発現調節

カルプロテクチンは健康な口腔上皮において常時発現しており、その抗菌作用により自然免疫を担う一員として働いているが、炎症に伴いその発現が上昇する。私たちも、歯周炎患者の歯肉組織において健康人のそれと比較して歯肉上皮の有棘層でのカルプロテクチンの発現が増加していることを確認している¹⁴⁾。Rossら²⁷⁾は、炎症に関連するLPSとIL-1 β を不死化した歯肉上皮細胞に作用させ、S100A8とS100A9の遺伝子の発現を調べたが有意な効果は認められなかったと報告している。一方、健康な皮膚上皮ではカルプロテクチンの発現は見られないが、嚢胞性線維症や乾癬など炎症を伴う皮膚疾患においてその発現が認められる。Moekら²⁸⁾やBonifaceら²⁹⁾は、健康なヒト皮膚由来上皮細胞において炎症性サイトカインであるIL-1 β 、TNF- α およびIL-22がS100A8とS100A9の遺伝子発現を上昇させることを報告し、炎症を伴った皮膚におけるカルプロテクチンの発現調節の一端を示した。さらに、Thoreyら³⁰⁾は、マウス皮膚の創傷実験において、炎症を伴わない上皮組織部位でS100A8とS100A9の発現が上昇することを報告し、カルプロテクチンの発現が創傷治癒過程の上皮の分化に関連している可能性を示唆した。このような研究により上皮組織におけるカルプロテクチン発現は炎症関連因子だけでなく上皮細胞分化関連因子により調節されていることが考えられた。しかしながら、口腔上皮でのRossらの結果は、皮膚上皮の結果と異なり、炎症を伴う口腔上皮でのカルプロテクチン発現の増加と一致し

ない。そこで、私たちは、ヒト歯肉由来の上皮細胞を用いて炎症関連因子および上皮細胞関連因子によるS100A8とS100A9の遺伝子発現への影響について検討を行った(図2)³¹⁾。その結果、炎症関連因子であるIL-1 β 、IL-6およびTNF- α はS100A8とS100A9の遺伝子発現を明らかに増加させたが、P-LPSは軽度な増加傾向を示したのみであった。また、IL-1 α と高カルシウムは上皮細胞の分化指標であるCK14とInvolucrinの発現を高め、S100A8とS100A9の遺伝子とカルプロテクチン蛋白の発現も増加させた。一方、上皮細胞の分化を抑制するTransforming growth factor- β とRetinoic acid、あるいはVitamin D₃はS100A8とS100A9の遺伝子発現を抑制することが判明した。これらの結果は、歯肉上皮の炎症時には複数の炎症性サイトカインによりカルプロテクチンの発現が促進調節されており、健康時には上皮細胞の分化関連因子やその他の因子により複雑に調節されていることを示唆している。特に、IL-1 α は上皮細胞において恒常的に発現されており、オートクライン的に働き上皮細胞の分化を促進すると共に主要な上皮の抗菌ペプチドである β -ディフェンシンの発現も増加させる^{32,33)}。これらのことより、IL-1 α は上皮でのカルプロテクチンやディフェンシンなどの抗菌ペプチドの発現の維持、調節を行うことにより自然免疫機構に関与していることが考えられる。

4. 歯周病治療におけるカルプロテクチンの役割

近年、医科分野では疾患診断技術の発展は目覚しくナノテクノロジーを応用した様々な疾患診断の器具やシステムの研究・開発が進んでいる。私たちは片岡らと共同でマイクロチップ電気泳動法を用いて微量サン

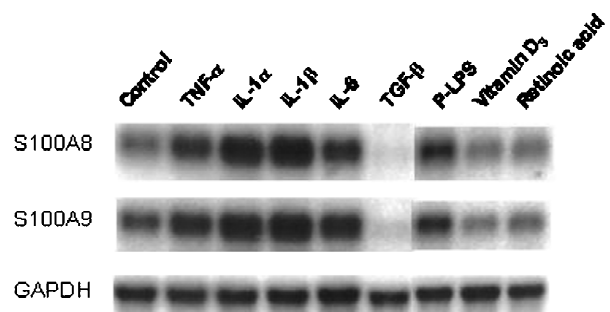


図2 ヒト歯肉上皮細胞におけるS100A8とS100A9の遺伝子発現に及ぼす各因子の影響(ノーザンブロット分析)

各因子の濃度: TNF- α (25 ng/ml), IL-1 α (10 ng/ml), IL-1 β (10 ng/ml), IL-6 (100 ng/ml), TGF- β (20 ng/ml), P-LPS (2 μ g/ml), Vitamin D₃ (100 ng/ml), Retinoic acid (300 ng/ml)

プル中の疾患マーカーの測定に関する研究を行っているが^{34,35)}、歯周病診断においては発展途上と言わざるを得ない。歯周病の診断において、カルプロテクチンやサイトカイン類をはじめ炎症や歯周組織破壊あるいは骨代謝関連物質などの複数のバイオマーカーをナノテクノロジー技術を応用した診断デバイスで測定することができれば歯周病診断の正確性や客観性を向上でき、歯周病の病態解明をいっそう推し進めると同時に個々の患者のオーダーメイド治療に貢献すると考えられる。また、予防医学の観点より、カルプロテクチンなどのバイオマーカーを用いた歯周病診断システムは将来的にポイント・オブ・ケア検査法の開発にも応用でき、歯周病検診での利用や患者自身による歯周病予防のモチベーションにも有用になるであろう。

また、一方で歯周病の新たな予防・治療法としてワクチン療法、抗体療法あるいは抗菌ペプチド療法などの免疫療法の研究が進められている^{17,36,37)}。歯肉上皮細胞が発現する抗菌ペプチドであるカルプロテクチンは、亜鉛キレート作用により軽度ではあるが幅広く細菌に対して抗菌作用を示す。*P. gingivalis*などの歯周病原性細菌に対してもその効果が認められることより歯周病の抗菌ペプチド療法への応用が考えられる。現在、私たちはカルプロテクチンをはじめ上皮細胞が発現するいくつかの抗菌ペプチドの発現調節機構について検討を行っている。このような研究から上皮細胞が産生する複数の抗菌ペプチドの発現機構を明らかにすることは、抗菌ペプチドを用いた歯周病の免疫療法への道を開くものと考えている。

おわりに

高齢者の増加に向けて発症率が上昇することが予想される歯周病に対して、正確で、客観的な診断およびこれらを用いた新たな予防・治療法の開発が必要となっている。これらの問題に対して私たちが研究を行ってきたカルプロテクチンは歯周病診断のバイオマーカーとして、また歯周病治療の抗菌ペプチドとしてその応用が考えられる。さらに、カルプロテクチンを含む他のバイオマーカーや抗菌ペプチドの研究を包括的に行うことは歯周病の診断と治療の開発において大きな貢献をもたらすと期待される。

謝 辞

稿を終えるにあたり、一連の研究にご協力を頂きました徳島大学大学院 永田俊彦教授、産業技術総合研究所 片岡正俊博士、Ullevaal University Hospital Fagerhol 博士をはじめとする多くの共同研究者の先生方に感謝の意を表しま

す

文 献

- 1) Fagerhol MK, Andersson KB, Naess-Andresen CF, Brandtzaeg P, Dale I: Calprotectin (The L1 Leukocyte Protein). In: Smith VL, Dedman JR, eds. Stimulus response coupling: The role of intracellular calcium-binding proteins. CRC Press, Boca Raton, 1990, 187-210.
- 2) Kerkhoff C, Klempt M, Sorg C: Novel insights into structure and function of MRP8 (S100A8) and MRP14 (S100A9). *Biochim Biophys Acta*, 1448: 200-211, 1998.
- 3) Yui S, Nakatani Y, Mikami M: Calprotectin (S100A8/S100A9), an inflammatory protein complex from neutrophils with a broad apoptosis-inducing activity. *Biol Pharm Bull*, 26: 753-760, 2003.
- 4) Sander J, Fagerhol MK, Bakken JS, Dale I: Plasma levels of the leucocyte L1 protein in febrile conditions: relation to aetiology, number of leucocytes in blood, blood sedimentation reaction and C-reactive protein. *Scand J Clin Lab Invest*, 44: 357-362, 1984.
- 5) Berntzen HB, Munthe E, Fagerhol MK: A longitudinal study of the leukocyte protein L1 as an indicator of disease activity in patients with rheumatoid arthritis. *J Rheumatol*, 16: 1416-1420, 1989.
- 6) Fagerhol MK: Calprotectin, a faecal marker of organic gastrointestinal abnormality. *Lancet*, 356: 1783-1784, 2000.
- 7) Eversole LR, Miyasaki KT, Christensen RE: The distribution of the antimicrobial protein, calprotectin, in normal oral keratinocytes. *Archs Oral Biol*, 37: 963-968, 1992.
- 8) Eversole LR, Miyasaki KT, Christensen RE: Keratinocyte expression of calprotectin in oral inflammatory mucosal diseases. *J Oral Pathol Med*, 22: 303-307, 1993.
- 9) Kido J, Nishikawa S, Ishida H, Yamashita K, Kitamura S, Kohri K, Nagata T: Identification of calprotectin, a calcium binding leukocyte protein, in human dental calculus matrix. *J Periodont Res*, 32: 355-361, 1997.
- 10) Kido J, Nakamura T, Kido R, Ohishi K, Yamauchi N, Kataoka M, Nagata T: Calprotectin, a leukocyte protein related to inflammation, in gingival crevicular fluid. *J Periodont Res*, 33: 434-437, 1998.
- 11) Kido J, Nakamura T, Kido R, Ohishi K, Yamauchi

- N, Kataoka M, Nagata T : Calprotectin in gingival crevicular fluid correlates with clinical and biochemical markers of periodontal disease. *J Clin Periodontol*, 26: 653-657, 1999.
- 12) Nakamura T, Kido J, Kido R, Ohishi K, Yamauchi N, Kataoka M, Nagata T : The association of calprotectin level in gingival crevicular fluid with gingival index and the activities of collagenase and aspartate aminotransferase in adult periodontitis patients. *J Periodontol*, 71: 361-367, 2000.
 - 13) Kido J, Kido R, Suryono, Kataoka M, Fagerhol MK, Nagata T : Calprotectin release from human neutrophils is induced by *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide via the CD-14 - Toll-like receptor - NF- κ B pathway. *J Periodont Res*, 38: 557-563, 2003.
 - 14) Suryono, Kido J, Hayashi N, Kataoka M, Nagata T : Effect of *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide, tumor necrosis factor- α and interleukin- 1β on calprotectin release in human monocytes. *J Periodontol*, 74: 1719-1724, 2003.
 - 15) Kido J, Kido R, Suryono, Kataoka M, Fagerhol MK, Nagata T : Induction of calprotectin release by *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide in human neutrophils. *Oral Microbial Immunol*, 19: 182-187, 2004.
 - 16) Suryono, Kido J, Hayashi N, Kataoka M, Nagata T : Calprotectin expression in human monocytes: induction by *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide, tumor necrosis factor- α , and interleukin- 1β . *J Periodontol*, 76: 437-442, 2005.
 - 17) Nisapakultorn K, Ross KF, Herzberg MC : Calprotectin expression in vitro by oral epithelial cells confers resistance to infection by *Porphyromonas gingivalis*. *Infect Immun*, 69: 4242-4247, 2001.
 - 18) Miyasaki KT, Bodeau AL, Murthy ARK, Lehrer RI : *In vitro* antimicrobial activity of the human neutrophil cytosolic S-100 protein complex, calprotectin, against *Capnocytophaga sputigena*. *J Dent Res*, 72: 517-523, 1993.
 - 19) Ozmeric Nurdan : Advances in periodontal disease markers. *Clinica Chimica Acta*, 343: 1-16, 2004.
 - 20) Schlegel GR, Langer P, Pelka M, von den Driesch P, Johannessen AC, Simon M Jr. : Variational expression of functionally different macrophage markers (27E10, 25F9, RM3/1) in normal gingival and inflammatory periodontal disease. *J Clin Periodontol*, 22: 341-346, 1995.
 - 21) Hetland G, Talg GJ, Fagerhol MK : Chemotaxins C5a and fMLP induce release of calprotectin (leucocyte L1 protein) from polymorphonuclear cells in vitro. *J Clin Pathol: Mol Pathol*, 51: 143-148, 1998.
 - 22) Roth J, Goebeler M, van den Bos C, Sorg C : Expression of calcium-binding proteins MRP8 and MRP14 is associated with distinct monocytic differentiation pathways in HL-60 cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 191: 565-570, 1993.
 - 23) Klempt M, Melkonyan H, Hofmann HA, Eue I, Sorg C : The transcription factors c-myb and C/EBP β regulate the monocytic / myeloid gene MRP14. *Immunobiol*, 199: 148-151, 1998.
 - 24) Breivik T, Thrane PS, Murison R, Gjermo P : Emotional stress effects on immunity, gingivitis and periodontitis. *Eur J Oral Sci*, 104: 327-334, 1996.
 - 25) Genco RJ, Ho AW, Kopman J, Grossi SG, Dunford RG, Tedesco LA : Models to evaluate the role of stress in periodontal disease. *Ann Periodontol*, 3: 288-302, 1998.
 - 26) Suryono, Kido J, Hayashi N, Kataoka M, Shinohara Y, Nagata T : Norepinephrine stimulates calprotectin expression in human monocytic cells. *J Periodont Res*, 41: 159-164, 2006.
 - 27) Ross KF, Herzberg MC : Calprotectin expression by gingival epithelial cells. *Infect Immun*, 69: 3248-3254, 2001.
 - 28) Mørk G, Schjerven H, Mangschau L, Søyland E, Brandtzaeg P : Proinflammatory cytokines upregulate expression of calprotectin (L1 protein, MRP-8/MRP-14) in cultured human keratinocytes. *Br J Dermatol*, 149:484-491, 2003.
 - 29) Boniface K, Bernard FX, Garcia M, Gurney AL, Lecron JC, Morel F : IL-22 inhibits epidermal differentiation and induces proinflammatory gene expression and migration of human keratinocytes. *J Immunol*, 174: 3695-3702, 2005.
 - 30) Thorey IS, Roth J, Regenbogen J, Halle JP, Bittner M, Vogl T, Kaesler S, Bugnon P, Reitmaier B, Durka S, Graf A, Wöckner M, Rieger N, Konstantinow A, Wolf E, Goppelt A, Werner S : The Ca²⁺-binding proteins S100A8 and S100A9 are encoded by novel injury-regulated genes. *J Biol Chem*, 276: 35818-35825, 2001.
 - 31) Hayashi N, Kido J, Suryono, Kido R, Wada C, Kataoka M, Shinohara Y, Nagata T : Regulation of calprotectin expression by interleukin- 1α and transforming growth factor- β in human gingival keratinocytes. *J Periodont Res*, 42: 1-7, 2007.
 - 32) Eller MS, Yaar M, Ostrom K, Harkness DD, Gilchrist BA : A role for interleukin-1 in epidermal differentiation : regulation by expression of functional versus decoy receptors. *J Cell Sci*, 108: 2741-2746, 1995.

-
- 33) O'Neil DA, Porter EM, Elewaut D, Anderson GM, Eckmann L, Ganz T, Kagnoff MF : Expression and regulation of the human β -defensins hBD-1 and hBD-2 in intestinal epithelium. *J Immunol*, 163: 6718-6724, 1999.
- 34) 片岡正俊, 木戸淳一, 篠原康雄 : マイクロチップ電気泳動の生物学的解析への応用の可能性, 電学論 C, 印刷中.
- 35) Maeda E, Kataoka M, Hino M, Kajimoto K, Kaji N, Tokeshi M, Kido J, Shinohara Y, Baba Y : Determination of human blood glucose levels using microchipelectrophoresis. *Electrophoresis*, in press.
- 36) Abiko Y : Passive immunization against dental caries and periodontal disease : development of recombinant and human monoclonal antibodies. *Crit Rev Oral Biol Med*, 11: 140-158, 2000.
- 37) Persson RG : Immune responses and vaccination against periodontal infections. *J Clin Periodontol*, 32 (Suppl. 6) : 39-53, 2005.
-