

*Treponema denticola* 분쇄액이  
조골세포 및 파골세포에 미치는 영향

연세대학교 대학원

치 의 학 과

진 승 욱

*Treponema denticola* 분쇄액이  
조골세포 및 파골세포에 미치는 효과

지도 유 윤 정 교수

이 논문을 석사 학위논문으로 제출함

2000년 12월 일

연세대학교 대학원

치 의 학 과

진 승 욱

# 진승욱의 석사 학위논문을 인준함

심사위원\_\_\_\_\_인

심사위원\_\_\_\_\_인

심사위원\_\_\_\_\_인

연세대학교 대학원

2000년 12월 일

## 감사의 글

이 논문이 완성되기까지 부족한 저에게 많은 격려와 가르침을 주신 이승일, 박광균, 유윤정, 최봉규 선생님께 감사를 드립니다. 특히 어렵고 힘들 때마다 이 논문이 완성될 수 있도록 힘을 북돋아주신 유윤정 선생님께 더욱 감사를 드립니다. 실험과정 뿐만 아니라 여러 가지로 도움을 아끼지 않으신 강정화, 이현정, 옥승호 선생님께도 감사를 드립니다.

언제나 격려해주시고 관심을 보여주신 최병갑 교수님과 승재형, 호진, 해룡과 임일규, 갈지선 위생사님들에게도 고맙다는 말밖에 할 말이 없습니다.

이제는 제 곁에 안 계시지만 항상 우리 가족 마음속에 자리하고 계신 아버지와 사랑하는 어머니, 동생 석훈, 그리고 아내 주현에게 이 논문을 바칩니다.

2000년 12월

저자 씀

# 차 례

그림차례	ii
국문요약	iii
<b>I. 서론</b>	<b>1</b>
<b>II. 실험재료 및 방법</b>	<b>4</b>
1. 실험재료	4
2. 실험방법	4
가. 세균배양 및 균액 조제	4
나. 조골세포의 분리	5
다. Alkaline phosphatase 활성측정	5
라. 세포독성능 측정	6
마. 골수세포의 분리	6
바. 파골세포의 형성유도	6
사. Tartrate resistant acid phosphatase(TRAP)염색	6
<b>III. 결과</b>	<b>8</b>
1. <i>T. denticola</i> 분쇄액의 농도에 따른 조골세포 분화억제효과	8
2. 열처리한 <i>T. denticola</i> 분쇄액에 의한 조골세포 분화억제효과	8
3. <i>T. denticola</i> 분쇄액에 의한 조골세포 분화억제시 indomethacin이 미치는 영향	8
4. <i>T. denticola</i> 분쇄액이 조골세포의 증식에 미치는 영향	9
5. <i>T. denticola</i> 분쇄액에 의한 파골세포 형성능	9
<b>IV. 고찰</b>	<b>15</b>
<b>V. 결론</b>	<b>19</b>
참고문헌	20
영문요약	26

## 그림 차례

Figure 1. Inhibitory effect of sonicated extracts of <i>T. denticola</i> on ALPase expression in mouse calvarial cells. . . . .	10
Figure 2. Inhibitory effect of heat-treated extracts of <i>T. denticola</i> on ALPase expression in mouse calvarial cells. . . . .	11
Figure 3. The effect of indomethacin on inhibition of ALPase expression induced by sonicated extracts of <i>T. denticola</i> in mouse calvarial cells. . . . .	12
Figure 4. The effect of sonicated extracts of <i>T. denticola</i> on viability of mouse calvarial cells. . . . .	13
Figure 5. The effect of sonicated extracts of <i>T. denticola</i> on osteoclast formation in co-culture system. . . . .	14

## 국 문 요 약

# *Treponema denticola* 분쇄액이 조골세포 및 파골세포에 미치는 영향

연세대학교 대학원 치의학과

진 승 욱

치주질환의 주요 증상은 치조골 파괴로서 이는 정상적인 골개조, 즉 골생성 및 골흡수의 불균형에 의해 야기되며 이러한 불균형은 치은연하치태내에 존재하는 세균에 의해 야기되는 것으로 여겨지고 있다. 치은연하치태내에 존재하는 세균 중 *Treponema(T) denticola*는 성인 치주염 환자에서 치주질환을 유발하는 주요 원인균으로 알려져 있으며, 이 균주의 증가가 치주질환의 진행에 중요한 지표로 이용된다. *T. denticola*는 다양한 병원성을 가지고 있으며, 치주염 발생시 이러한 병원성이 골조직에 존재하는 조골세포에 어떠한 영향을 끼치는지를 알아보고, 나아가 골개조 기전에서의 역할에 대한 기본적인 자료를 제공하고자 본 연구에서는 *T. denticola* 분쇄액이 조골세포 및 파골세포의 분화에 미치는 영향을 관찰하였다. 조골세포 분화억제능은 마우스 두개골세포에서 조골세포 분화의 초기 표현인자인 alkaline phosphatase(ALPase)의 발현 정도로 평가하였으며, 마우스 두개골세포의 증식능은 MTT assay를 이용하여 측정하였다. 또한 이 세균이 조골세포에 미치는 영향과 비교하기 위해, 마우스 골수세포와 두개골세포를 함께 배양하는 co-culture system에서 *T. denticola*에 의한 파골세포 형성능을 관찰하였으며, 형성된 파골세포의 수는 tartrate resistant acid phosphatase(TRAP)염색으로 확인하였다.

1. *T. denticola* 분쇄액의 농도 0.25, 2.5  $\mu\text{g/ml}$  에서 마우스 두개골세포의

ALPase 형성능이 감소되었다.

2. *T. denticola* 분쇄액 (2.5  $\mu\text{g/ml}$ )을 열처리한 경우, ALPase 형성억제능이 열처리를 하지않은 균주와 차이를 보이지 않았다.
3. Prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) 생성억제인자인 indomethacin을 *T. denticola* 분쇄액과 함께 처리한 경우에는, *T. denticola* (2.5  $\mu\text{g/ml}$ )에 의한 ALPase 형성억제능이 indomethacin을 처리하지 않은 경우와 차이를 보이지 않았다.
4. *T. denticola* 분쇄액은 0.25 및 2.5  $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 마우스 두개골세포의 증식을 억제하지 않았다.
5. *T. denticola* 분쇄액 (2.5  $\mu\text{g/ml}$ )에 의해 TRAP 양성인 파골세포의 형성이 증가되었다.

이러한 결과는 *T. denticola*가 파골세포의 형성을 증가시킬 뿐만 아니라, 조골세포의 분화를 억제하여 치주염시 야기되는 골흡수를 유발할 수 있음을 시사하며, *T. denticola*에 의한 조골세포의 분화억제는 PGE<sub>2</sub> 가 아닌 다른 매개인자를 통하여, 열에 안정한 물질에 의해 유도되는 것으로 사료된다.

---

핵심말 : *Treponema denticola*, Alkaline phosphatase, 치주질환,  
치조골파괴, 조골세포 분화, 파골세포 분화

# *Treponema denticola* 분쇄액이 조골세포 및 파골세포에 미치는 영향

연세대학교 대학원 치의학과

진 승 욱

(지도교수 유 윤 정 조교수)

## I. 서 론

치주질환은 치은연하치태 내에 존재하는 세균에 의해 발생하는 염증성 질환으로 치아지지조직을 파괴하는 병리현상이다. 치주질환이 진행됨에 따라 *Spirochetes*, *Porphyromonas gingivalis*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans* 등의 혐기성 그람 음성세균의 비율이 증가하게 된다. 그중에서도 *Spirochetes*는 치주질환에 이환된 치은연하치태 내에서 관찰되는 여러 혐기성 세균중에서 우세한 균종으로 알려져 왔고, 현미경으로 관찰할 때 만성 성인형치주염에서는 균수가 급격히 증가하여 치주낭 세균총의 평균 55%이상을 차지한다는 보고도 있으며, 구강내 *Spirochetes*의 증가가 치주염의 진행을 말해주는 중요한 지표로 이용될 수 있다고 보고있다 (Armitage 등, 1982; Greenstein 등, 1985; Loesche, 1988).

*Spirochetes*는 모두 *Treponema* (*T*)속에 속하고, 일반적으로 배양가능한 8가지 종으로 분류된다.- *T. denticola*, *T. socranskii*, *T. vincentii*, *T. pectinovorum*, *T. medium*, *T. amylovorum*, *T. maltophilum*, *T. lecithinolyticum*

그러나, 이들은 치태내에서 분리가 어렵고, 순수배양이 까다롭다는 문제점때문에 치주질환내에서 이들의 역할을 밝히는데 어려움이 있었다. 그러나, 배양이 어려움에

도 불구하고, 치주질환에서 Spirochetes의 역할을 암시하는 여러 보고들이 있었고, 그중에서도 *T. denticola*는 가장 분리가 용이하며, 상대적으로 배양이 쉬운 종으로 알려져 있다.

*T. denticola*는 치주염 이환율과 중요한 상관관계를 갖는다고 알려졌고 (Moore 등, 1985), 치주염 이환시 양적으로도 가장 많이 증가하는 균종으로 보고되어 있으며, 염증정도가 심할수록 치태내에서 더 많은 균수가 발견되어지는 것이 관찰되어 그 특이성이 강조되어왔다 (Loesche 등, 1990; Bretz 등, 1990; Simonson 등, 1990). 또한 치주질환이 심하게 진행된 개체에서, 치주치료후 채취된 치은연하치태표본을 단클론 항체를 이용하여 조사해봤을 때 *T. denticola* 수가 현저히 감소되었다. 이러한 사실은 이 균주가 치주질환에 깊은 연관이 있을 뿐만 아니라, 질병 이환의 표식인자라는 것을 암시한다 (Simonson 등, 1992).

현재 주요한 치주원인균으로 주목받는 *T. denticola*가 이런 질환을 유발할 수 있는 이유는, 이들이 잠재적인 다양한 병원성을 가지고 있기 때문이다. 즉, 백혈구의 기능을 억제하는 인자를 함유하고 있고 (Boehlinger 등, 1986; Sela 등, 1988), 섬유아세포의 성장, 증식을 억제하며 (Baehni 등, 1992), 특정한 부착기전을 이용하여 숙주조직이나 기질 단백질에 부착하여 상피, 결합조직에 침투하여 감염을 일으킬 수 있다고 알려졌으며, 이 과정에서 세균의 단백질분해효소와 부착인자가 관여하는 것으로 알려졌다. (Graciela 등, 1995). 또한, 조직에 부착된 후에는 적혈구의 용해를 일으키거나, 여러 형태의 단백질분해효소를 분비하여 외막단백질이나 단백질분해효소복합체를 매개로 상피세포등에 세포독성효과를 나타낼 수도 있다 (Denec 등, 1996; Chan과 Mcnaughlin, 2000). 최근에는 53kDa 표면단백질이 pore를 형성하여 상피세포나 혈구세포에 대해 독성효과를 나타낸다고 보고되기도 하였다 (Fenno 등, 1998).

이와같이 치주질환을 일으키는 주요한 균종으로 알려져있는 *T. denticola*의 병원성이 매우 다양하게 보고되고 있지만, 아직 이 균주가 골을 형성하는 기본조직인 조골세포와 파골세포에 어떠한 영향을 미치는지는 알려진 바가 없다.

정상적인 골개조는 골기질을 생성하는 조골세포와 골기질을 흡수하는 파골세포의 상호작용에 의해 조절되는 과정이고, 이 과정에서 부갑상선 호르몬, prostaglandin E<sub>2</sub> ,

interleukin-1,  $1\alpha$ , 25-dihydroxy vitamin D<sub>3</sub> 와 같은 매개인들이 조골세포에 작용하여 파골세포 분화조절인자 (Osteoclast differentiation factor, ODF)의 형성을 유도한다. 이렇게 유도된 ODF는 파골세포의 활성을 자극하게 되어 결국 골생성과 골흡수의 균형이 이루어진다. 이 과정에서 조골세포는 골기질을 합성할 수 있을 뿐만 아니라, ODF의 유도를 통해 파골세포가 분화하는 과정을 조절할 수도 있다 (Suda 등, 1995) 이런 조절된 세포체계에 방해인자가 개입되면, 정상적인 골개조 과정에 균형이 깨져서 치조골이 흡수되며, 이 과정에 치은연하치태내 세균이 관여할 것이라고 생각된다.

치주질환이 발생했을 때 세균이 골파괴를 유도할 수 있는 기전으로는, 직접적으로 산이나 단백질분해효소를 분비하여 골기질을 파괴하거나, 파골세포의 분화를 촉진하여 골흡수를 증가시키거나, 조골세포의 골합성 과정을 억제하는 세가지 가정을 생각해 볼 수 있다 (Sean 등, 1996). 보고된 바로는, 세균이 직접 골기질을 파괴한다는 가정보다는 세균이 병원 성분을 분비하여 골세포에 영향을 미쳐서 치조골의 흡수를 일으킨다고 하는 설명이 일반적으로 받아들여지고 있으며, 이러한 염증성 골파괴가 일어날 때에는 파골세포뿐만 아니라 조골세포의 분화와 이에 따른 골의 형성에도 영향을 미친다고 한다. 또한 치주원인균으로 인해 골이 흡수될 때, 파골세포의 분화는 조골세포가 함께 존재할 때에만 일어난다고 보고되었다 (Loomer 등, 1998). 하지만 치은연하치태내 혐기성 세균들이 골이 흡수되는 과정에서 어떤 역할을 하는지에 관해서는 많이 보고가 되어 있으나, 세균들이 골생성 및 골개조 과정을 기시하는 조골세포에 어떻게 영향을 미치는가에 대한 연구는 상대적으로 보고된 바가 적다. 특히 치주질환의 주요 원인균인 *T. denticola*가 조골세포에 어떠한 영향을 미치는 지는 알려진 바가 없다.

따라서, 본 연구에서는 최근 치주질환의 주요 원인균으로 여겨지는 *T. denticola*의 병원성이 조골세포 및 파골세포의 분화에 어떠한 영향을 미치는지를 알아보고, 이 균주가 골개조 과정에서 어떠한 역할을 하는지에 대한 기본적인 자료를 제공하여 치주염시 야기되는 치조골 파괴에서 본 균주의 역할을 밝히고자 하였다.

## II. 실험재료 및 방법

### 1. 실험재료

조골세포를 분리하기 위해서 생후 1일된 ICR 마우스 수컷을 사용하였으며, 골수 세포분리에는 생후 4주된 ICR 마우스 수컷을 사용하였다. 세포배양에 사용되는 배지인 alpha minimum essential medium ( $\alpha$ -MEM), 항생제, 항진균제 용액, fetal bovine serum (FBS)은 Gibco BRL (NY, USA)에서 구입하였으며, ascorbic acid,  $\beta$ -glycerophosphate, indomethacin, ALPase kit (ALP-10), TRAP-staining kit는 Sigma (St. Louis, USA)에서 구입하였다. 두개골세포를 분리하기 위하여 사용하는 효소인 collagenase와 dispase는 Wako (Japan)에서 구입하여 사용하였다.

### 2. 실험방법

#### 가. 세균배양 및 균액 조제

본 실험에 사용된 균주인 *T. denticola* (ATCC 33521)는 OMIZ-Pat 액체 배지에서 혐기적으로 배양하여 사용하였다 (Wyss 등, 1996). OMIZ-Pat 액체 배지 (50 ml)에서 일주일간 배양한 배양액을 4 °C, 5000×g에서 10분간 원심분리하여 배지를 제거한 다음 얻은 균체를 50 ml의 phosphate buffer saline (PBS)에서 3회 세척하였다. 세척한 균주를 1 ml PBS에 현탁시키고 초음파분쇄기 (Branson model 250 sonifier, Fisher scientific)를 사용하여 세포를 분쇄한 후, 4 °C, 5000×g에서 10분간 원심분리하여 상층액을 취하여 균액으로 사용하였으며, 균액의 단백질 농도는 Bradford methods로 Bio-rad protein assay kit (Biorad, CA, USA)를 이용하여 측정하였다. 균액의 열처리 시료는 80°C에서 30분간 처리 후 사용하였다.

## 나. 조골세포의 분리

생후 1일된 ICR 마우스 10마리를 에탄올 용액에 담가 희생시킨 후 두개골을 무균적으로 적출하고, 10 ml의 효소용액 (0.2 % collagenase 및 0.1 % dispase가 함유된  $\alpha$ -MEM배지)에 부유시킨 후 37 °C에서 10분간 교반했다. 이후 상층액을 제거하였고, 다시 10 ml의 효소용액을 넣고 37 °C에서 20분간 교반하여 조골세포가 부유하고 있는 상층액을 모았다. 이 과정을 3회 반복하여 얻어진 상층액을 2000×g에서 5분간 원심분리하여 마우스 두개골세포를 얻었다.

분리한 세포 중 조골세포 분화능을 관찰하기 위한 세포는 24 well 평판배양기에  $8 \times 10^5$ 개가 되도록 분주하여 조골세포 배양배지(10 % FBS가 함유된  $\alpha$ -MEM 배지)에서 배양하였으며, 파골세포 분화능 관찰에 사용할 세포는 10 cm 평판세포 배양기에 세포수가  $2 \times 10^6$ 개가 되도록 분주하여 동일한 배지에 배양하였다.

## 다. ALPase 활성측정

24 well 평판배양기에서 밀생단일층이 형성될 때까지 마우스 두개골세포를 배양한 후, 배지를 제거하고, ascorbic acid (50  $\mu$ g/ml) 와  $\beta$ -glycerophosphate (10 mM), *T. denticola* 균액 (0.25, 2.5  $\mu$ g/ml), 열처리한 균액 또는 indomethacin이 함유된 배지로 교환하였다. 3일에 한번씩 배지를 교환하면서 10일간 연속배양하였다. 배양배지를 제거한 후 각 well당 효소용액 (0.2 % collagenase, 0.1 % dispase) 100  $\mu$ l를 첨가하고, 37 °C에서 20분간 반응시킨 후, 세포를 1.5 ml 시험관에 옮기고, 흔들어서 세포간 교원질을 분리시켰다. 원심분리하여 상층액을 버리고 세포만을 모은 후 PBS로 2번 세척하였다. 분리한 세포를 얼음이 담긴 비이커에 옮긴 후 100  $\mu$ l의 1 % triton X-100 (Sigma, St. Louis, USA)용액을 첨가하여 30분간 두면서, 세포막을 파괴시켰다. 5000×g에서 10분간 원심분리하여 상층액을 모아 ALPase assay에 사용하였다. 30 °C에서 20  $\mu$ l의 세포액을 1 ml의 ALP-10 (Sigma, St. Louis, USA)용액과 혼합하여 각각 30초, 2분간 반응시킨 후 생성되는 p-nitrophenol의 양을 405 nm 흡광도에서 측정하였다.

## 라. 세포독성능 측정

*T. denticola* 분쇄액에 의한 세포독성능은 MTT 방법을 이용하여 측정하였다. 24 well 평판배양기에 well당  $8 \times 10^5$ 개의 마우스 두개골세포를 분주한 후 배지에서 37 °C로 배양하여, 밀생단일층이 형성되면 배지를 제거하고, 50  $\mu$ g/ml ascorbic acid, 10 mM  $\beta$ -glycerophosphate, *T. denticola* 균액이 함유된 배지로 교환하였다. 배지를 3일에 1번씩 교환하였으며, 10일간 연속배양한 후 MTT 방법으로 세포독성능을 측정하였다.

## 마. 골수세포의 분리

생후 4주정도 경과한 ICR 마우스의 경골과 대퇴골로부터 연조직을 제거한 후 골말단 부위를 절단하였다. 주사 바늘 (25 gauge)로  $\alpha$ -MEM배지를 골수강내로 주입하여 골수세포를 뽑아낸 후 2000 $\times$ g에서 5분간 원심분리를 하였다. 상층액을 제거한 후 10 ml의 적혈구 용해용액 (10 mM Tris · Cl, 0.83 % ammonium chloride)을 첨가하여 5분간 반응시켜 골수세포로부터 적혈구를 제거하였다.

## 바. 파골세포 형성유도

조골세포 및 골수세포를 48 well 세포배양기에 well당 세포수가 각각  $1 \times 10^4$  및  $1 \times 10^5$ 개가 되도록 조절하여 배지 (10 % FBS가 함유된  $\alpha$ -MEM배지) 400  $\mu$ l에서 3일간 배양하였다. 3일후 배지를 제거하고, 2.5  $\mu$ g/ml의 *T. denticola* 균액을 첨가한 배지로 교환한 후 4일간 연속배양하여 파골세포 형성을 유도하였다.

## 사. TRAP 염색

파골세포 형성유도 후 파골세포의 표지물질인 tartrate 저항성 산성인산분해효소 (tartrate resistant acid phosphatase, TRAP)를 다음과 같은 방법으로 염색하여 균액에 의한 파골세포 형성능을 평가하였다.

배양된 세포를 고정액 (25 ml citrate solution, 65 ml acetone, 8 ml 37 % formaldehyde)

으로 처리하여 30초간 고정시킨 후 증류수로 세척하였다. TRAP assay kit (Sigma, St.Louis, USA)를 이용하여 제조한 염색액을 고정한 세포에 처리하여 빛이 들어가지 않도록 주의하면서 37 °C 항온수조에서 1시간동안 염색하였다. 증류수로 세척한 후 위상차현미경 상에서 핵이 3개이상인 TRAP 양성 세포의 수를 세어 비교하였다.

### III. 결 과

#### 1. *T. denticola* 분쇄액의 농도에 따른 조골세포 분화억제 효과

*T. denticola* 분쇄액이 조골세포의 분화를 억제하는지 관찰하기 위하여 마우스 조골세포를 0.25  $\mu\text{g/ml}$  및 2.5  $\mu\text{g/ml}$ 의 *T. denticola* 분쇄액이 함유된 배지에서 10일간 연속배양한 후, 각 농도에 따른 조골세포의 분화억제효과를 관찰하기 위해 조골세포 분화 초기발현인자인 ALPase 형성능을 측정하였다. 실험결과 세균 분쇄액의 농도가 증가함에 따라 조골세포 분화표식인자인 ALPase 형성능이 감소하였다 (Fig. 1).

#### 2. 열처리한 *T. denticola* 분쇄액에 의한 조골세포 분화억제 효과

*T. denticola* 분쇄액이 조골세포 분화억제에 관여하는 물질의 열 안정성을 보기 위하여 80  $^{\circ}\text{C}$ 의 온도에서 30분동안 열처리한 2.5  $\mu\text{g/ml}$  *T. denticola* 분쇄액 또는 열처리를 하지않은 2.5  $\mu\text{g/ml}$  *T. denticola* 분쇄액이 함유된 배지에서 마우스 두개골세포를 10일간 연속배양하여, 열처리한 균 분쇄액에 의한 조골세포 분화억제효과를 비교하였다. 실험결과 열처리를 하지않은 경우와 비교하여 열처리한 경우에도 ALPase 형성능은 차이를 보이지 않았다 (Fig. 2).

#### 3. *T. denticola* 분쇄액에 의한 조골세포 분화억제시 indomethacin이 미치는 영향

조골세포 분화억제에  $\text{PGE}_2$  가 작용하는지를 보기 위해 마우스 두개골세포를 2.5  $\mu\text{g/ml}$ 의 *T. denticola* 분쇄액과 prostaglandin 합성을 억제하는 indomethacin을

함께 처리하여 *T. denticola*에 의해 조골세포의 분화가 억제되는지 평가하였다. 실험결과 *T. denticola* 분쇄액이 포함된 배지에서 ALPase 형성능이 감소하였으나, 이와 비교했을때 각 농도의 indomethacin이 첨가된 경우에는 ALPase 형성능에 큰 차이가 나타나지 않았다 (Fig. 3).

#### 4. *T. denticola* 분쇄액이 조골세포의 증식에 미치는 영향

마우스 두개골세포를 0.25, 2.5  $\mu\text{g/ml}$ 의 *T. denticola* 분쇄액이 함유된 배지에서 10일간 연속배양한 후, MTT assay로 조골세포에 대한 세균 분쇄액의 세포독성능을 평가한 결과, 세균 분쇄액이 포함되지 않은 경우와 비교하였을 때, *T. denticola*가 조골세포의 증식에 영향을 미치지 않음을 알 수 있었다 (Fig. 4).

#### 5. *T. denticola* 분쇄액에 의한 파골세포 형성능

마우스 골수세포 및 조골세포를 2.5  $\mu\text{g/ml}$ 의 *T. denticola* 분쇄액이 함유된 배지에서 4일간 배양한 후 TRAP 염색을 실시하여 파골세포 형성능을 측정하였다. 조골세포의 분화를 억제했던 2.5  $\mu\text{g/ml}$  농도에서 *T. denticola* 분쇄액이 파골세포의 형성을 증가시키는 것을 알 수 있었다 (Fig. 5).

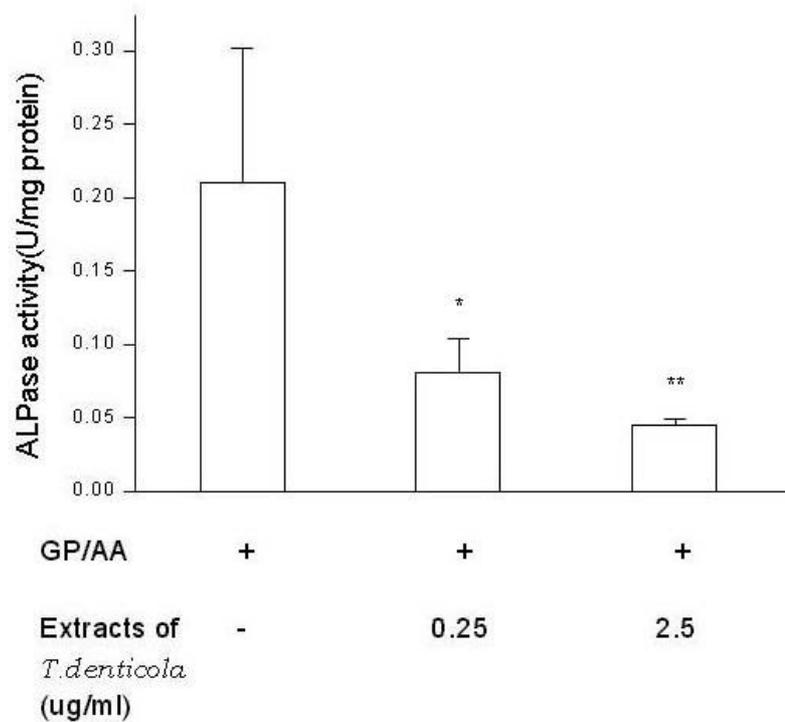


Figure 1. Inhibitory effect of sonicated extracts of *T. denticola* on ALPase expression in mouse calvarial cells. Mouse calvarial cells were cultured to confluent, and then were treated with 10 mM  $\beta$ -glycerolphosphate/50  $\mu$ g/ml ascorbic acid (GP/AA) in the absence or presence of sonicated extracts of *T. denticola* for 10 days. ALPase activity was estimated by measuring the amount of p-nitrophenol with spectrophotometer. The results are expressed as means  $\pm$  SD of 3 cultures.

\* significantly different from GP/AA treated group.

\*\* significantly different from 0.25  $\mu$ g/ml extracts-treated group.

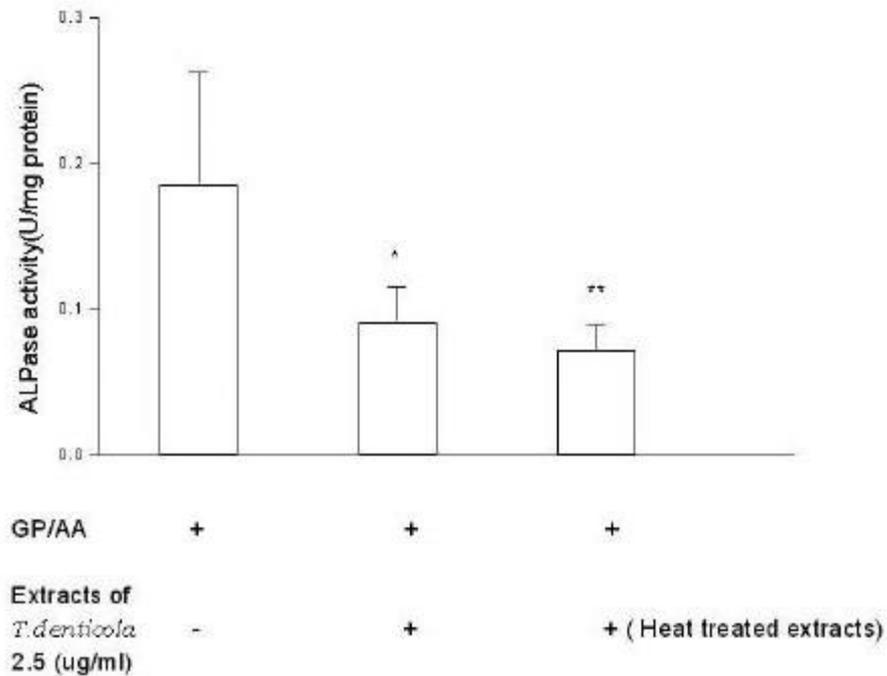
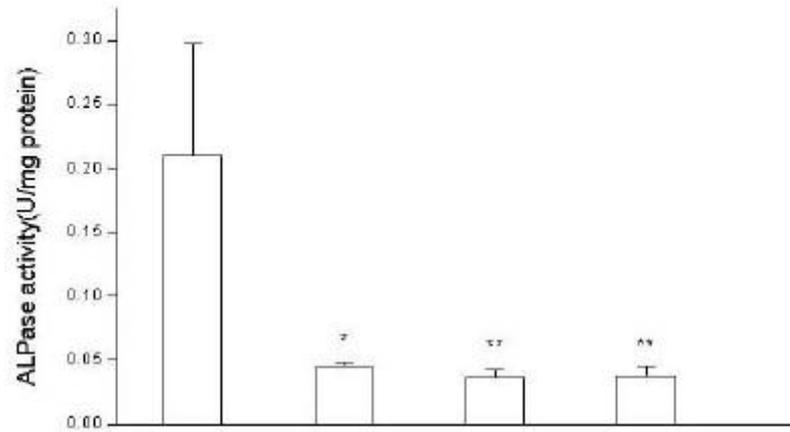


Figure 2. Inhibitory effect of heat-treated extracts of *T. denticola* on ALPase expression in mouse calvarial cells. Mouse calvarial cells were cultured to confluent, and then treated with heat-treated extracts of *T. denticola* for 10 days. ALPase activity was estimated by measuring the amount of p-nitrophenol with spectrophotometer. The results are expressed as means  $\pm$  SD of 3 cultures.

\* significantly different from GP/AA treated group.

\*\* significantly different from extracts-treated group.



GP/AA	+	+	+	+
Extracts of <i>T. denticola</i> 2.5(ug/ml)	-	+	+	+
Indomethacin 1uM	-	-	+	-
Indomethacin 5uM	-	-	-	+

Figure 3. The effect of indomethacin on the inhibition of ALPase expression induced by sonicated extracts of *T. denticola* in mouse calvarial cells. Mouse calvarial cells were cultured to confluent, and then were treated of with sonicated extracts of *T. denticola* ( $2.5 \mu\text{g/ml}$ ) in the presence or absence of indomethacin ( $1, 5 \mu\text{M}$ ) for 10 days. ALPase activity was estimated by measuring the amount p-nitrophenol with spectrophotometer. The results are expressed as means  $\pm$  SD of 5 cultures.

\* significantly different from GP/AA-treated group.

\*\* not significantly different from extracts-treated group.

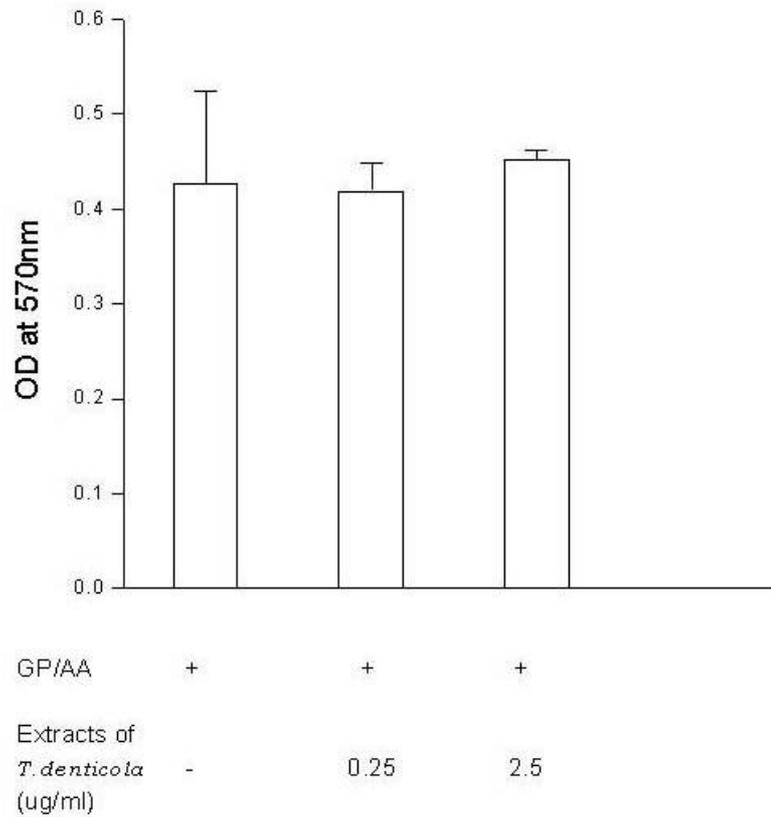


Figure 4. The effect of sonicated extracts of *T. denticola* on viability of mouse calvarial cells. Mouse calvarial cells were cultured for 10 days with sonicated extracts of *T. denticola*. The viability of cells were estimated by MTT assay, and data was represented as optical density(OD) at 530 nm. The results are expressed as means  $\pm$  SD of 3 cultures.

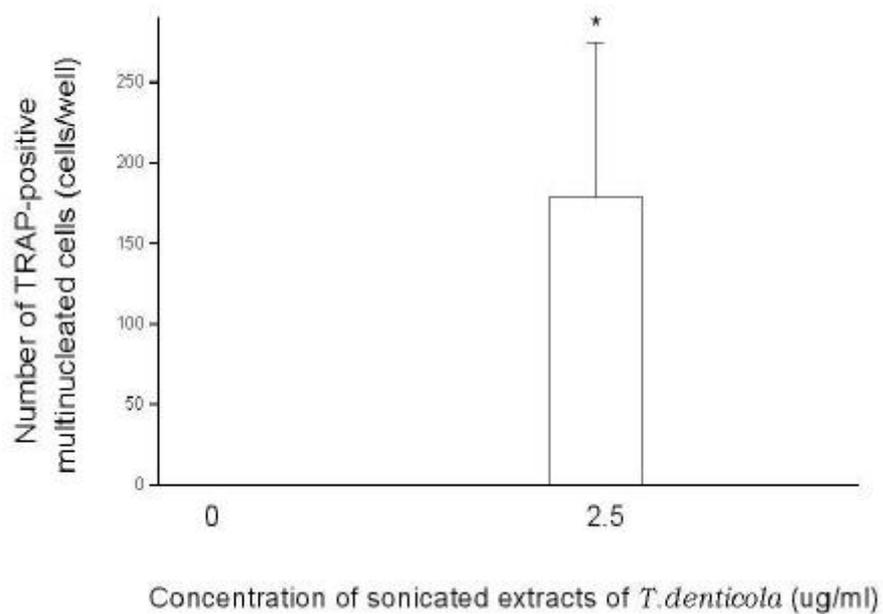


Figure 5. The effect of sonicated extracts of *T. denticola* on osteoclast formation in co-culture system. Mouse bone marrow cells and calvarial osteoblastic cells were co-cultured for 3 days. After change of the medium, cells were treated with sonicated extracts of *T. denticola* (2.5  $\mu\text{g/ml}$ ). Then, cells were fixed and stained for TRAP. TRAP-positive multinucleated cells were counted as osteoclast. The results are expressed as means  $\pm$  SD of 2 cultures.

\* significantly different from non-treated group.

## IV. 고찰

정상적인 골개조는 골을 생성하는 조골세포와 골을 흡수하는 파골세포의 상호 조절과정이다. 조골세포가 부갑상선 호르몬과 같은 골흡수 자극인자의 존재 하에 교원질 분해효소를 분비하여 골표면을 덮고있는 유기기질을 제거하면서 골흡수 과정이 시작되고, 이렇게 노출된 골표면으로 화학주성인자에 의해 파골세포가 이동하게 된다. 이후 파골세포로부터 다양한 수용성 효소가 분비되어 노출된 유기기질을 분해하면서 골흡수가 이루어지게 된다. 그 후 조골세포전구세포의 증식, 분화를 자극하는 여러 성장인자와 교원질 분해효소억제인자가 조골세포로부터 분비되어 새로운 골기질이 합성된다. 이러한 골형성 및 흡수는 부갑상선호르몬,  $1\alpha,25$ -dihydroxy vitamin  $D_3$ ,  $PGE_2$ , IL-1과 같은 골대사 조절인자들에 의해 영향을 받는다 (Chamber, 1991; Sean 등, 1996). 치주질환원인균이 이 과정에 개입되게 되면, 결국 위에 언급한 골형성과 골흡수의 균형기전을 깨뜨리게 되어 국소적인 치조골의 소실을 야기할 것으로 생각되고 있다.

본 연구에서는 최근 치주질환의 주 원인균으로 주목되는 *T. denticola*에 의해 조골세포의 분화가 억제되어 골형성 효과가 감소하는지를 보기 위해 조골세포 분화표현인자인 ALPase의 발현 정도를 측정하였다. 조골세포의 분화표현인자에는 몇가지 잠재적인 인자들이 존재하지만, ALPase는 초기에 골기질이 형성, 증식되는 시기에 발현되는 인자로서 가장 먼저 조골세포의 분화능을 알아볼 수 있는 표현인자이다. 배양조건, 사용되는 세포의 종류 등에 따라 약간씩 차이가 나지만, 여러 가지 조골세포 분화표현인자들의 발현은 시간에 따라 이루어지며, 마우스 두개골세포에서 유도된 조골세포의 경우에는 ALPase가 대개 배양 10일경에 최대 수치로 발현된다고 알려져 있다 (Choi 등, 1996).

따라서 *T. denticola* 균주가 포함된 배지에서 마우스 두개골세포를 10일간 배양한 후, 발색반응을 이용하여 ALPase 형성능을 측정하였으며 그 결과, 0.25, 2.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$

의 농도에서 모두 *T. denticola* 분쇄액에 의해 ALPase 형성능이 감소하는 것을 알 수 있었다 (Fig. 1). 이는 *T. denticola*가 조골세포의 분화에 관여하여 골생성을 억제하는 기전에 영향을 미칠 수 있음을 시사한다.

치주질환에 의한 골흡수가 유발되는 과정에서 세균의 여러가지 구조물들이 관여하게 되는데, *T. denticola* 이외의 다른 치주원인균들은 상대적으로 배양이 용이하여 이들 세균의 어떤 성분이 조골세포에 의한 골대사에 관여하는지가 비교적 많이 알려져있다. *P. gingivalis*의 경우, LPS (Lipopolysaccharide)나 섬모를 매개로 하여 숙주세포 염증반응에 의해 조골세포의 분화를 억제하여 골생성을 감소시키는 것으로 알려졌고 (Wilson, 1995; Kadono 등, 1999), *A. actinomycetemcomitans*의 경우에는 헵탁다당체가 관여하여 조골세포에 대해 퇴화성 세포사를 유도하는 것으로 보고된 바 있다 (Yamamoto 등, 1999; Morimoto 등, 1999). 본 실험결과와 유사하게 *P. gingivalis*, *A. actinomycetemcomitans*, *P. intermedia*와 같은 치주질환원인균의 경우에도 세균의 LPS에 의해 마우스 두개골세포에서 ALPase 발현이 억제되고, 칼슘, 무기인의 침착과 교원질 합성이 감소되는 등 조골세포의 분화를 억제한다는 보고가 있다 (Meghi 등, 1992; Loomer 등, 1995; Loomer 등, 1998).

이와같이 세균에 따라 골형성 억제인자가 다양한 것을 알 수 있고, 그러므로 *T. denticola*가 조골세포 분화를 억제하는 과정에서도 어떠한 세균내 성분이 관여할 것이라는 가정하에, *T. denticola* 분쇄액을 열처리한 후 마우스 조골세포에서 ALPase 형성능을 측정해보았고, Fig. 2 에서와 같이 열처리한 후에도 열처리를 하지 않은 세균 분쇄액과 차이 없이 ALPase 형성능이 억제되는 것을 볼 수 있었다. 따라서, *T. denticola*가 조골세포에 영향을 미칠 때 관여하는 구조물은 아마도 세균내의 열에 안정한 물질에 의한 가능성이 크다고 생각된다.

Gopalsami등은 (1993) 처음으로 *T. denticola*로부터 분리된 외막이 마우스 두개골의  $Ca^{2+}$ 유리량을 증가시키며, 외막을 열처리한 경우에도  $Ca^{2+}$ 유리량이 억제되지 않는 것으로 보아, 외막에 존재하는 열에 안정한 LPS 유사물질이 조골세포의 분화와 관련이 있을 것으로 보고하였고, 따라서 이전 연구결과에 근거하여 본 실험주인 *T. denticola*의 경우에도 열에 안정한 LPS 유사물질이 골생성을 억제하는 구조물로 추정되며, LPS의 관련여부에 대해서는 더 연구해야 할 필요가 있

을 것으로 사료된다.

이 과정에서 *T. denticola*가 조골세포에 직접적인 영향을 끼쳐 조골세포 분화능을 억제할 수도 있지만, 이 과정에 어떤 매개인자가 개입하여 간접적인 영향을 끼칠 가능성도 배제할 수는 없다. LPS는 세균외막에 존재하는 병원성 성분으로 염증성 cytokine이나 eicosanoid 합성의 잘 알려진 자극인자로서, 최근에는 조골세포를 자극하여 골용해성인자, 즉 IL-1, IL-6, PGE<sub>2</sub>, nitric oxide를 분비하여 치주조직을 파괴하는 주요 구조물로 알려져있다 (Sean 등, 1996). 그중 PGE<sub>2</sub>는 골대사를 조절하는 잠재적인 매개인자로서 파골세포 기능을 촉진시키며 동시에 조골세포의 collagen 합성을 억제하여 골생성을 억제함으로써 골흡수를 촉진시키는 역할을 한다고 알려져 왔다. 하지만 다른 한편으로는 조골세포에서 collagen 합성과 DNA 합성을 촉진시켜 골생성을 증진시킬 수 있다고 보고된 바가 있다. 따라서 PGE<sub>2</sub>는 골형성의 조절시에 파골세포뿐만 아니라 조골세포의 기능에도 작용을 하는 양면성을 갖고 있으며, 주어진 실험조건에 따라서 조골세포의 분화를 억제하기도 하며, 반대로 촉진할 수도 있다고 볼 수 있다 (Hakeda 등, 1986; Kaneki 등, 1999).

Lerner에 의하면 (1998), 그람양성세균인 *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermis*의 경우에 PGE<sub>2</sub>가 매개인자로 관련되어 조골세포에서 골기질 단백질의 합성을 억제한다는 보고가 있었으므로 이와 연관지어 볼 때, 실험군주인 *T. denticola* 분쇄액에 의해 조골세포의 분화가 억제되는 과정에서도 PGE<sub>2</sub>가 연관성이 있는지를 검토해보고자 하였다. 따라서 이 실험에서는 cyclooxygenase의 작용을 저해하여 PGE<sub>2</sub>의 합성을 억제하는 indomethacin을 균 분쇄액에 함께 첨가하여 보았다. 그러나, 실험결과에서는 indomethacin의 첨가가 ALPase발현에 유의한 영향을 끼치지 않았다. 즉, indomethacin이 첨가되어도 ALPase발현이 억제되는 것을 볼 수 있었다 (Fig. 3). 결과적으로 PGE<sub>2</sub>는 관여하지 않을 것이라고 생각할 수 있다. 따라서 매개인자가 어떠한 cytokine인지는 앞으로 더 연구가 되어야 할 부분일 것이다.

*A. actinomycetemcomitans*의 경우, 세균자체가 조골세포의 퇴화성 세포사를 유발시키는 것으로 보아, *T. denticola*도 세균 자체가 조골세포에 영향을 줄 수 있다는 가정하에 MTT assay를 시행하였으나, 이 연구에서는 ALPase 발현을 억제했던 2.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서도 조골세포의 활성화에는 영향을 미치지 않았다 (Fig. 4). 따라서

*T. denticola* 자체가 조골세포를 직접적으로 억제하는 것으로 보이지는 않으며, 다른 세균의 경우와 유사하게 열에 안정한 LPS유사물질이 어떤 세포매개인자를 통하여 간접적인 방법으로 조골세포를 억제할 것이라고 확인할 수 있다.

골개조는 조골세포와 파골세포가 서로 상호작용하는 과정이므로 *T. denticola* 분쇄액이 동일한 농도에서 파골세포에는 어떻게 작용하는지를 비교해보았고, 마우스 골수세포와 조골세포를 함께 배양하는 co-culture system을 이용하여 관찰한 결과, 마우스 두개골세포의 ALPase 발현을 억제한 동일한 농도에서 파골세포 형성능을 증가시켰다 (Fig. 5). 이전의 연구결과와 동일하게 *T. denticola*가 파골세포의 형성을 촉진시켜 골흡수를 유발하는 것을 알 수 있다 (최 등, 1999)

이상의 결과에서 *T. denticola*는 파골세포의 형성을 자극할 뿐만 아니라, 열에 안정한 물질이 PGE<sub>2</sub>가 아닌 다른 어떠한 매개인자를 통하여 조골세포의 분화를 억제하여 골생성을 감소시켜 골흡수를 유발할 수 있는 것으로 보인다. 하지만, 조골세포의 분화를 억제하는 과정에 매개인자가 무엇인지, 세균에 의해 조골세포의 분화가 억제되는 과정에서 직접 조골세포에서 ODF의 유도가 이루어질 가능성은 없는지에 대해서는 앞으로 더 연구가 필요할 것이다.

## V. 결 론

본 연구에서는 최근 치주질환의 주 원인균으로 간주되고 있는 *T. denticola*가 골생성에 미치는 영향을 평가하고자 *T. denticola* 분쇄액에 의해 조골세포의 분화가 억제되는지를 보았다. 마우스 조골세포의 분화정도를 보기 위해서 조골세포 초기 분화표현인자인 ALPase 형성능을 측정하였고, 세균에 대한 조골세포의 증식능은 MTT assay를 이용하였다. 또한 마우스 골수세포와 조골세포를 함께 배양하는 co-culture system을 이용하여 이 균주가 파골세포에는 어떠한 영향을 미치는지를 확인하였다.

1. *T. denticola* 분쇄액 0.25, 2.5  $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 ALPase 형성능이 감소하여 조골세포의 분화가 억제되는 것을 알 수 있다.
2. *T. denticola* 분쇄액 (2.5  $\mu\text{g/ml}$ ) 을 열처리한 경우에는, 열처리를 하지않은 균주 분쇄액과 비교하여 ALPase 형성억제능에 차이가 없었다.
3. PGE<sub>2</sub> 생성억제인자인 indomethacin을 *T. denticola* 분쇄액과 함께 처리한 경우에는, indomethacin을 처리하지 않은 경우와 비교하여 ALPase 형성능에 차이가 없었다.
4. *T. denticola* 분쇄액은 0.25, 2.5  $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 조골세포의 증식에 영향을 미치지 않았다.
5. *T. denticola* 분쇄액 2.5  $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 TRAP 양성인 파골세포의 형성이 증가하였다.

이러한 결과는 *T. denticola*의 성분 중 열에 안정한 물질이 PGE<sub>2</sub>가 아닌 다른 매개인자를 통하여 조골세포의 분화를 억제하여 골생성을 감소시키며 동시에 파골세포의 형성을 증가시켜 골흡수를 유발할 수 있는 것으로 생각된다.

## 참고문헌

- Armitage GC, Dickinson WR, Jenderseck RS, Levine SM, Chambers D.W : Relationship between the percentage of subgingival spirochetes and the severity of periodontal disease. J Periodontol 53: 550-556, 1982
- Baehni PC, Song M, McCulloch CAG, Ellen RP : *Treponema denticola* induces actin rearrangement and detachment of humal gingival fibroblast. Infect Immun 60:3360--3368, 1992
- Boehringer H, Berthold PH, Taichman NS : Studies on the interaction of human neutrophils with plaque spirochetes. J Perio Res 21:195-209, 1986
- Bretz WA, Lopatin DE, Loesche WJ : Benzoyl-arginine naphthylamide (BANA)hydrolysis by *Treponema denticola* and/or *Bacteroides gingivalis* in periodontal plaques. Oral Microbiol Immunol 5:275-279, 1990
- Chamber TJ : Regulation of osteoclastic bone resorption in vitro. Bone 2:141-173 1991
- Chan EC, McLaughlin R : Taxonomy and virulence of oral spirochetes (mini-review) Oral Microbiol Immunol 15:1-9, 2000
- Choi JY, Lee BH, Song KB, Park RW, Kim IS, Sohn KY, Jo JS, Ryoo

HM : Expression patterns of bone-related proteins during osteoblastic differentiation in MC3T3-E1 cells. J Cell Biochem 61:609-618, 1996

Denee DT : Aspects of adherence of oral spirochetes. Crit Rev Oral Bio Med 7:4-11, 1996

Fenno J, Hannam M, Leung W, Tamura M, Uitto V-J, McBride B : Cytopathic effects of the major surface protein and the chymotrypsin-like protease of *Treponema denticola*. Infect Immun 66:1869-1877, 1998

Gopalsami C, Yotis W, Corrigan K, Schade S, Keene J, Simonson L : Effect of outer membrane of *Treponema denticola* on bone resorption. Oral Microbiol Immunol 8:121-124, 1993

Graciela R, Ronit N, Ezra R, Ruth Y, Michael NS : Proteases of *Treponema denticola* outer sheath and extracellular vesicles. Infect Immun 63:3973-3979, 1995

Greenstein G, Polson A : Microscopic monitoring of pathogens associated with periodontal diseases. A review. J Periodontol 56: 740-747, 1985 Dec

Hakeda.Y, Yoshino.T, Natakani.Y, Kurihira.N, Maeda.N, Kumegawa.M : Prostaglandin E<sub>2</sub> stimulates DNA synthesis by a cyclic AMP-independent pathway in osteoblastic clone MC3T3-E1 cells. J Cell Physiol 128:155-16, 1986

Kadono H, Kido J, Kataoka M, Yamaguchi N, Nagata T : Inhibition of osteoblastic cell differentiation by lipopolysaccharide extract from *Porphyromonas gingivalis*. Infect Immun 67:2841-2846, 1999

- Kaneki H, Takasugi I, Fujiedam M, Kiri M, Mizuochi S, Ide H :  
Prostaglandin E<sub>2</sub> stimulates the formation of mineralized bone nodules by a  
cAMP-independent mechanism in the culture of adult rat calvarial  
osteoblast. *J Cell Biochem* 73:36-48, 1999
- Lerner UH, Sundquist G, Ohlin A, Rosenquist B : Bacteria inhibit  
biosynthesis of bone matrix proteins in human osteoblasts. *Clin Orthop*  
346:244-254, 1998
- Loesche WJ : The role of spirochetes in periodontal disease. *Adv Dent*  
*Res* 2:275-283, 1988
- Loesche WJ, Giodano J, Hujoel PP : The utility of the BANA test for  
monitoring anaerobic infections due to spirochetes(*Treponema denticola*)in  
periodontal disease. *J Dent Res* 69:1696-1702, 1990
- Loomer PM, Bernd S, Barlam S, Ellen RP, and Tenenbaum HC : Direct  
effects of metabolic products and sonicated extracts of *Porphyromonas*  
*gingivalis* 2561 on osteogenesis in vitro. *Infect Immun* 62:1289-1297, 1994
- Loomer PM, Ellen RP, Tenebaum HC : Effects of *porphyromonas*  
*gingivalis* 2561 extracts on osteogenic and osteoclastic cell function in  
co-culture. *J Periodontol* 69:1263-1270, 1998
- Loomer PM, Ellen RP, Tenebaum HC : Characterization of inhibitory  
effects of suspected periodontopathogens on osteogenesis in vitro.  
*Infect Immun* 63:3287-3296, 1995

Meghji S, Henderson B, Nair S, Wilson M : Inhibition of bone DNA and collagen production by surface-associated material from bacteria implicated in the pathology of periodontal disease. J Periodontol 63:736-742, 1992

Moore WEC, Holdeman LV, Cato EP, Smibert RM, Burmeister JA, Palcanis KG, Ranney RR : Comparative bacteriology of juvenile periodontitis. Infect Immun 48:507-519, 1985

Morimoto Y, Morimoto H, Murata T, Kobayashi S, Ohba T, Hanej T : Extracts of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* induce apoptotic cell death in human osteoblastic MG63 cells. J Dent Res 78:735-742, 1999

Murata T, Ansai T, Takehara T, Kobayashi S, Haneji T : Extracts of *Prevotella intermedia* and *actinobacillus actinomycetemcomitans* inhibit alkaline phosphatase activity in osteoblastic cells in vitro. Oral Disease 3:106-112, 1997

Nakagawa N, Kinoshita M, Yamaguchi K, Shima N, Yasuda H, Yano K, Morinaga T, Higashio K : RANK is the essential signaling receptor for osteoclast differentiation factor in osteoclastogenesis. Biochem Biophys Res Commun 263:395-400, 1998

Sean PN, Sajeda M, Michael W, Krisanavane R, Peter W, Brian H : Bacterially induced bone destruction ; mechanisms and misconceptions. Infect Immun 64:2371-2380, 1996

Sela MN, Weiberg A, Borinsky R, Holt SE, Dishon T : Inhibition of superoxide production in human polymorphonuclear leukocytes by oral

treponemal factors. *Infect Immun* 56:589-594, 1988

Simonson LG, Goodman CH, Morton HE : Quantitative immunoassay of *Treponema denticola* serovar c in adult periodontitis. *J Clin Microbiol* 28:1493-1496, 1990

Simonson LG, Robinson PJ, Pranger RJ, Cohen ME, Morton HE : *Treponema denticola* and *Porphyromonas gingivalis* as prognostic markers following periodontal treatment. *J Periodontol* 63:270-273, 1992

Suda T, Uagawa N, Nakamura I, Miyaura C, Takahashi N : Modulation of osteoclast differentiation by local factors. *Bone* 17:87s-91s, 1995

Wilson M : Biological activities of lipopolysaccharides from oral bacteria and their relevance to the pathogenesis of chronic periodontitis. Review. *Science Progress* 78:19-34, 1995

Wyss C, Choi BK, Schupbach P, Guggenheim B, Gobel UB : *Treponema maltophilum* sp.nov., a small oral spirochete isolated from human periodontal lesions. *Int J Sys Bacteriol* 46:745-752, 1996

Yasuda H, Shima N, Nakagawa N, Yamaguchi K, Kinosaki M, Mochizuki SI, Tomoyasu A, Yano K, Goto M, Murakami A, Tsuda E, Morinaga T, Higashino K, Udagawa N : Osteoclast differentiation factor is a ligand for osteoprotegerin/osteoclastogenesis-inhibitory factor is identical to TRANCE/RANKL. *Proc Natl Acad Sci* 95:3597-3602, 1998

Yamamoto S, Mogi M, Kinpara K, Ishihara Y, Ueda N, Amano K, Nishihara T, Noguchi T, Togari A : Anti-proliferative capsular-like polysaccharide

antigen from *Actinobacillus actinomycetemcomitans* induces apoptotic cell death in mouse osteoblastic MC3T3-E1 cells. J Dent Res 78:1230-1237, 1999

최봉규, 이현정, 정국진, 정순희, 광월아, 유윤정 : *Treponema denticola* 분쇄액에 의한 파골세포 형성효과. 대한치주과학회지 29:995-1004, 1999

# ABSTRACT

## Effect of sonicated extracts of *Treponema denticola* on osteoblast and osteoclast differentiation

Seung Wook Jin

*Department of Dentistry*

*The Graduate School, Yonsei University*

(Directed by Associated Professor Yun Jung Yoo, D.D.S., Ph.D)

*Treponema (T) denticola* is often considered as a predominant type of periodontopathic bacteria. It has been also known to have various virulence factors, but, their effect on osteoblast differentiation was not clearly elucidated. In the present study, we investigated the effect of extracts of *T. denticola* on osteoblast and osteoclast differentiation in bone remodelling mechanism. Osteoblast differentiation was estimated by measuring the activity of alkaline phosphatase (ALPase) in mouse calvarial cells, and osteoclast differentiation was analysed by measuring the formation of trap positive multinucleated cells in co-culture system of mouse calvarial cells and bone marrow cells. Sonicated extracts of *T. denticola* (0.25, 2.5  $\mu$ g/ml) inhibited ALPase activity in a dose-dependent manner ( $p < 0.05$ ). Inhibitory ability of ALPase activity was not significantly different between heat-treated extracts and non heat-treated extracts ( $p < 0.05$ ). Indomethacin, an inhibitor of prostaglandin, had no effects on inhibition of ALPase activity induced by sonicated extracts of *T. denticola* ( $p < 0.05$ ). Sonicated extracts of *T. denticola* did not affect the viability of mouse calvarial cells. Furthermore, in the concentration of 2.5  $\mu$ g/ml extracts, formation of TRAP po

sitive multinucleated cells was increased in co-culture system of mouse calvarial cells and bone marrow cells.

These results suggest that *T. denticola* could induce alveolar bone resorption by stimulation of osteoclast and inhibition of osteoblast differentiation, and heat-stable substance plays an important role in this process. However, PGE<sub>2</sub> signalling pathway seems not to be involved in inhibitory activity of osteoblast differentiation.