原 著

成人型歯周炎患者の歯肉溝浸出液中トリプシン 様酵素活性と遊離アミノ酸含量について

Trypsin-like Enzyme Activity and Free Amino Acid
Levels in Gingival Crevicular Fluids from
Adult Periodontitis Patients

寺 井 浩* 日野出大輔* 萬好都美恵*
永田篤司* 佐藤 誠* 中村 亮*

Hiroshi TERAJ*, Daisuke HINODE*, Tomie MAN-YOSHI*,
Atsushi NAGATA*, Makoto SATO* and Ryo NAKAMURA*

Received March 2, 1991; accepted May 25, 1991

Abstract: Trypsin-like enzyme activity was measured using a synthetic fluorescent substrate, *N*- α -benzoyl-L-arginine-7-amido-4-methylcoumarin, in gingival crevicular fluid (GCF) collected from periodontal pockets in 14 adult periodontitis patients. Two kinds of GCF were collected from each patient using Periopapers®; one from the deepest pocket (≥ 4 mm) and the other from the shallowest one (≤ 3 mm). The enzyme activity was detected in all of the GCF samples, and log 10 (trypsin-like activity) was significantly correlated with probing depth ($r=0.52$, $p<0.01$).

The presence and amount of free amino acids in GCF and whole saliva was also measured by automatic amino acid analyser in another 12 patients with adult periodontitis. The amino acid amounts varied considerably in all the fluids. The free amino acid levels in whole saliva did not seem to reflect those of GCF. Because of the wide range of the concentrations of amino acids, no significant differences were found statistically in the free amino acid levels between GCF from the deepest periodontal pockets and GCF from the shallowest ones.

索引用語: 歯肉溝浸出液, トリプシン様酵素活性, 遊離アミノ酸, 成人型歯周炎

Key words: Gingival crevicular fluid, Trypsin-like enzyme activity, Free amino acid, Adult periodontitis

結 言

歯肉溝や歯周ポケットは、歯肉炎や辺縁性歯周炎などの歯周疾患に罹患した辺縁部歯周組織の病的変化を反映

しやすい場と考えられる¹⁾と同時に、歯周ポケット内の細菌叢の変化が歯周疾患の発症や増悪と密接な関係にあることも明らかにされている²⁾。従って、歯肉溝や歯周ポケットの浸出液(歯肉溝浸出液, GCF)を利用して、

* 徳島大学歯学部予防歯科学講座(主任: 中村 亮教授)

* Department of Preventive Dentistry, The University of Tokushima School of Dentistry (Director: Prof. Ryo NAKAMURA)

歯周組織の病態を知ることができれば、歯周疾患の診断や進行の予防ならびに治療方法の決定につながる有力な手段になり得ることが期待される。

GCF 中には、宿主や細菌由来の種々の酵素活性の存在が報告されているが¹⁾、Loeshe ら³⁾は歯周炎に罹患した部位の歯肉縁下歯垢中にトリプシン様酵素活性が増大していること、Suido ら⁴⁾は、GCF 中のトリプシン様酵素を含む 3 種類の酵素活性の強さが、歯肉縁下歯垢中の *Porphyromonas (Bacteroides) gingivalis* や *Spirochaetes* の数や歯肉の炎症の程度と相関のあることを報告している。著者らは *P. gingivalis* の病原因子について研究を進め、同菌の歯周組織破壊に関与すると思われるトリプシン様酵素活性の性状について明らかにしてきた^{5,6)}。

本研究においては、GCF 中のトリプシン様酵素活性に注目し、成人型歯周炎患者の GCF 中の同酵素活性を測定し、歯周ポケットの深さとの関連性について検討を行うとともに、GCF 中の遊離アミノ酸の分析を行ったので報告する。

材料及び方法

被検者：徳島大学歯学部附属病院予防歯科外来にて、臨床ならびに X 線所見等により成人型歯周炎と診断した患者 14 名（20 歳—74 歳）をトリプシン様酵素活性測定のための被検者とし、同様に成人型歯周炎と診断した別の患者 12 名（23 歳—71 歳）をアミノ酸分析のための被検者とした。

GCF の採取：各被検者の歯周ポケットの最深部（4 mm 以上）と最浅部（3 mm 以下）の 2 部位より GCF の採取を行った。まず、被検部位の簡易防湿を行った後に、エアーシリンジにて歯頸部を乾燥させ、同部位の歯周ポケットに 2×15mm の Periopaper®（Harco Electronics, Canada）3 枚をポケット底部まで挿入、30 秒間 GCF の採取を行った。その後直ちに Periotron Economy®（Harco Electronics, Canada）を用いて、採取した GCF 量を測定した。トリプシン様酵素活性測定用の Periopaper®は、0.1mM dithiothreitol (DTT) を含む 550 μ l の N-Tris (hydroxymethyl) methyl-2-amino-ethan sulphonic acid (TES), pH 7.5 (TES buffer) 中に浸漬し、また、アミノ酸分析用のものは 300 μ l の 0.02N HCl 中に浸漬した。それぞれ、4°C 30 分間インキュベーションを行い、13,000×g で 2 分間遠心分離後、上清を得、実験に供した。

唾液の採取：各被検者に軽く水で洗口させた後に、滅

菌スピッツ管に全唾液（約 1 ml）を採取した。

採取後直ちに、13,000×g で 2 分間遠心分離を行い上清を得た。

トリプシン様酵素活性の測定：N- α -benzoyl-L-arginine-7-amido-4-methylcoumarin hydrochloride を基質として用い、Beighton らの方法^{7,8)}にしたがって測定した。96穴マイクロタイタープレートのウェル中に基質 20 μ l (100 μ g/ml in TES buffer), GCF 70 μ l, 0.1mM DTT 加 TES buffer 100 μ l を入れ、37°C 24 時間インキュベーションを行い、遊離された 7-amido-4-methylcoumarin を、ELISA ANALYZER ETY-96F（東洋測器）を用い、励起光 360nm、蛍光 450nm にて測定することにより、分解された基質の割合をモニターした。なお、測定は duplicate で行い、平均値をその標品の値とした。分解された基質量は、TES buffer 中に溶解した 4-methylumbelliferone の蛍光強度を測定して作製した標準曲線より求め、酵素活性は、上記の応系で 1 時間に分解された基質のナノモル濃度として表した。

アミノ酸分析：GCF 及び全唾液中のアミノ酸について、アミノ酸自動分析計（L-8500型、日立）を用い、蛍光分析法により測定を行った。標準アミノ酸として、以下の 34 種類のアミノ酸を用いた。ホスホセリン P-Ser, タウリン Tau, アスパラギン酸 Asp, ヒドロキシプロリン Hypro, スレオニン Thr, セリン Ser, アスパラギン酸 AspNH₂, グルタミン酸 Glu, サルコシン Sar, プロリン Pro, グリシン Gly, アラニン Ala, シトルリン Cit, a-アミノ-n-酪酸 a-ABA, バリン Val, シスチン Cys, メチオニン Met, シスタオチニン Cysthi, イソロイシン Ile, ロイシン Leu, チロシン Tyr, フェニールアラニン Phe, b-アラニン b-Ala, b-アミノイソ酪酸 b-AiBA, g-アミノ-n-酪酸 g-ABA, ヒドロキシジン Hylys, オルニチン Orn, リジン Lys, 1-メチルヒスチジン 1 Me-hys, ヒスチジン His, 3-メチルヒスチジン 3 Mehys, アンセリン Ans, カルノシン Car, アルギニン Arg.

結 果

14 名の成人型歯周炎患者より採取した GCF について、Periotron Economy®により測定した GCF 量と歯周ポケットの深さとの間には、有意な正の相関関係 ($r=0.9$, $P<0.01$) が認められ、深い歯周ポケットほど、GCF 量の多いことが確認された。

また、歯周ポケットの深さと、GCF 中のトリプシン様酵素活性との関連について検討したところ、Fig. 1 に

Fig. 1 Relationship between trypsin-like enzyme activity and periodontal pocket depth

*= Log_{10} (n mol of substrate hydrolysed/30 s sample/h)

示すように、 $\log_{10}$ (トリプシン様酵素活性) と歯周ポケットの深さとの間には正の相関関係 ($r=0.52$, $P<0.01$) が認められ、歯周ポケットが深くなるほど、酵素活性の上昇している事が観察された。しかし、Fig. 1からも明らかなように、GCF 中の酵素活性には、歯周ポケットの深浅に関わらず、標品間にバラつきのあることも認められた。

12名の成人型歯周炎患者より採取した GCF 及び全唾液中の遊離アミノ酸について分析を行った結果が Table 1 である。この表からも明らかなように、GCF、全唾液ともに標品中に含まれる各アミノ酸の濃度には、かなりのバラつきが認められた。GCF、全唾液ともにヒドロキシプロリン、 α -アミノ-n-酪酸、1-メチルヒスチジン、3-メチルヒスチジンは全く検出されなかった。アスパラギン、サルコシン、シスチン、アンセリンは、GCF 中には検出されなかったが、全唾液中では12例中アスパラギンは1例、サルコシンは5例、シスチンは1例、アンセリンは2例に認められた。各アミノ酸の検出率は、総じて全唾液の方が、GCF より高い傾向にあったが、ヒドロキシリジンの検出率は、GCF のほうが高値であった。

浅い歯周ポケットと深い歯周ポケット由来 GCF 中のアミノ酸の比較では、各アミノ酸の検出率は、両者間で同等あるいは深い歯周ポケット由来 GCF の方がやや高い傾向にあり、ホスホセリンは深い歯周ポケットでは12例中10例で検出されたが、浅い歯周ポケットでは12例中

4例であった。しかし、GCF 中の各アミノ酸の濃度は、浅い歯周ポケットと深い歯周ポケットの間で有意の差は認められなかった。

考 察

GCF 中のトリプシン様酵素は、歯周組織中の宿主細胞由来のもの及び歯肉縁下歯垢中の細菌由来のものが混在していると考えられるが、今回は、宿主細胞や菌体を遠心で除去した上清を標品として用いたため、GCF 中に溶解した状態で存在する酵素を測定に供したと考えられる。このような状態のトリプシン様酵素活性を測定したところ、深い歯周ポケット由来の GCF 中では、活性の上昇が認められたが、このことは、Beighton ら^{7,8)}の報告と一致するところである。しかし、同時に、酵素活性にバラつきが存在し、歯周ポケットは深いにも関わらず、低い活性しか示さない例、逆に歯周ポケットは浅いにも関わらず、高い活性を示す例も認められた。GCF 中には、 α_1 -antitrypsin や α_2 -macroglobulin などの、血清由来のプロテアーゼインヒビターの浸出が報告されている⁹⁾と同時に、歯肉縁下歯垢中の *P. gingivalis* は、それらのプロテアーゼインヒビターを分解する事も明らかにされている¹⁰⁾。したがって、歯周ポケット内のそれらプロテアーゼインヒビターの濃度や活性あるいは歯肉縁下歯垢細菌叢の違いが、GCF 中のトリプシン様酵素活性に影響を与えている事が推測される。また、GCF 中のトリプシン様酵素活性の差が、いわゆる歯周疾患の活動度¹¹⁾の違いを表している可能性も考えられる。今回の調査は、あくまでも、断面的調査にすぎないため、今後、臨床所見と並行した経時的な観察が必要であると思われる。

人の GCF 中の遊離アミノ酸の分析に関しては、従来ほとんど報告が認められず、今回と同様にアミノ酸自動分析計を用いた研究では、わずかに最近 Syrjänen ら¹²⁾が5例の重度の歯周炎患者と健常者の GCF 中遊離アミノ酸について、比較検討を行った報告が認められるのみである。彼らは、26種類のアミノ酸、今回の研究では34種類のアミノ酸について分析を行い、アミノ酸の種類や数には若干の違いがあるものの、分析を行った遊離アミノ酸の検出状況については、ヒドロキシリジンとプロリンを除いてよく似た傾向を示した。即ち、彼らの報告によるとヒドロキシリジンとプロリンが全く検出されなかったが、今回の調査では比較的高率に検出された。また、彼らの報告では、健常者の GCF 中には、アスパラギン、メチオニン、イソロイシン、ロイシン、チロシン、

Table 1 Free amino acid content ($\mu\text{mol/ml}$) in shallow periodontal pockets, deep periodontal pockets, and whole saliva

Amino acid	Shallow periodontal pockets*			Deep periodontal pockets**			Whole saliva		
	Number ^a	Mean	S D	Number ^a	Mean	S D	Number ^a	Mean	S D
P-Ser	4	561	1770	10	97	86	12	12	15
Tau	11	2891	3813	12	3519	2879	12	79	43
Asp	11	2712	3598	12	2523	4043	11	96	158
Hypro	0	N.M.	N.M.	0	N.M.	N.M.	0	N.M.	N.M.
Thr	7	166	175	12	263	226	12	6	3
Ser	12	1466	2859	12	601	516	12	20	12
AspNH ₂	0	N.M.	N.M.	0	N.M.	N.M.	1	1	3
Glu	10	863	627	12	1445	1281	12	25	26
Sar	0	N.M.	N.M.	0	N.M.	N.M.	5	10	14
Pro	12	24474	20320	12	11198	13379	12	60	28
Gly	12	2617	3389	12	1108	940	12	193	258
Ala	10	824	741	12	1021	837	12	31	26
Cit	4	58	111	7	108	152	11	27	49
a-ABA	0	N.M.	N.M.	0	N.M.	N.M.	0	N.M.	N.M.
Val	12	16228	20915	12	6537	12729	12	52	42
Cys	0	N.M.	N.M.	0	N.M.	N.M.	1	17	42
Met	1	3	10	2	26	75	2	6	3
Cysthi	9	379	543	10	272	423	7	2	3
Ile	2	26	68	3	30	47	8	7	14
Leu	6	214	348	11	288	320	12	16	22
Tyr	3	138	354	7	782	1484	12	177	230
Phe	3	38	74	5	77	127	12	16	13
b-Ala	1	4	13	2	14	17	6	1	2
b-AiBA	1	50	166	3	38	86	2	2	6
g-ABA	1	589	1953	2	15	19	2	1	3
Hylys	10	24042	34831	9	13895	26089	3	14	36
Orn	5	260	477	9	233	344	12	46	91
Lys	8	287	325	12	475	576	12	44	48
1 Mehis	0	N.M.	N.M.	0	N.M.	N.M.	0	N.M.	N.M.
His	3	28	52	4	46	74	12	13	7
3 Mehis	0	N.M.	N.M.	0	N.M.	N.M.	0	N.M.	N.M.
Ans	0	N.M.	N.M.	0	N.M.	N.M.	2	1	2
Car	2	1290	4136	3	956	2304	2	3	7
Arg	2	9	24	6	197	380	12	31	29

N. M. : not measurable

* : ≤ 3 mm, ** : ≥ 4 mm^a : The number of measurable subjects for that particular amino acid

アルギニンが検出されなかったが、今回の研究においてもロイシンを除き、浅い歯周ポケットでは、深い歯周ポケットに比べて GCF 中の上記のアミノ酸の検出率は低い傾向が認められた。

ところで、コラーゲンのアミノ酸組成には特徴が認められ、グリシンが 1/3、プロリンとヒドロキシプロリンが 1/4 を占めるとともに、他のタンパクには認められないヒドロキシリジンが存在する¹⁸⁾。歯周炎に罹患してい

る部位の歯周ポケットの GCF 中ではコラゲナーゼ活性が増大していることが報告されていることから^{14,15)}, GCF 中には、遊離したコラーゲン構成アミノ酸の濃度が上昇していることが予想された。しかし、ヒドロキシプロリンは、GCF 中には全く検出されず、グリシン、プロリン、ヒドロキシリジンは、歯周ポケットの浅い部位でも、深い部位でも、検出率や濃度に差は認められなかった。

Syrjänen et al.¹²⁾ は、GCF 中の遊離アミノ酸に歯周疾患の診断的価値とはばしいことを示唆しているが、今回の研究結果でも、GCF 中の遊離アミノ酸の種類や濃度と歯周ポケットの深さと間には特徴的な関係は認められなかった。

唾液中の遊離アミノ酸についてはいくつか報告があるが¹⁶⁻¹⁸⁾、アスパラギン酸、グルタミン酸、スレオニン、セリン、グリシン、アラニン、フェニールアラニン、ロイシン、イソロイシン、オルニチンといった通常存在の報告されているアミノ酸は、今回の調査でも全例に確認された。しかし、GCF と全唾液に含まれるアミノ酸の検出状況の違いから、両者のアミノ酸組成はそのままお互いを反映するものではない事も示唆された。

結 論

成人型歯周炎患者の歯肉溝浸出液中のトリプシン様酵素活性と遊離アミノ酸含量について調べた結果、以下のことが判明した。

- 1) 患者の歯周ポケットの深さと GCF 中のトリプシン様酵素活性の間には正の相関関係が認められた。
- 2) GCF 中の遊離アミノ酸の種類や濃度と歯周ポケットの深さとの間には特徴的な関係は認められなかった。
- 3) 浅い歯周ポケットでは、深い歯周ポケットに比べて GCF 中のアスパラギン、メチオニン、イソロイシン、チロシン、アルギニンの検出率は低い傾向が認められた。
- 4) GCF と全唾液に含まれるアミノ酸の検出状況の違いから、両者のアミノ酸組成はそのままお互いを反映するものではない事が示唆された。

文 献

- 1) 小鷲悠典：実験歯肉炎と歯肉溝液の生化学的変化，う蝕と歯周病一研究の進歩一第1巻，編集，浜田茂幸，日本歯科評論社，東京，1982，249頁。
- 2) Tanner, A.: Microbial succession in the

- development of periodontal disease, In Periodontal disease: Pathogens & host immune responses, Edited by Hamada, S., Holt, S. C. and McGhee, J. R., Quintessence Publishing C., Tokyo, 1991, p. 13.
- 3) Loseche, W. J., Syed, S. A. and Stoll, J.: Trypsin-like activity in subgingival plaque. A diagnostic marker for spirocheates and periodontal disease?, J. Periodont., 58; 266-273, 1987.
- 4) Suido, H., Zambon, J. J., Mashimo, P. A., Dunford, R. and Genco, R. J.: Correlations between crevicular fluid enzymes and the subgingival microflora, J. Dent. Res., 67; 1070-1074.
- 5) Otsuka, M., Endo, J., Hinode, D., Nagata, A., Maehara, R., Sato, M. and Nakamura, R.: Isolation and characterization of protease from culture supernatant of *Bacteroides gingivalis*, J. Periodont. Res., 22; 491-498, 1987.
- 6) Endo, J., Otsuka, M., Ohara, E., Sato, M. and Nakamura, R.: Cleavage action of a trypsin-like protease from *Bacteroides gingivalis* 381 on reduced egg-white lysozyme, Archs oral Biol., 34; 911-916, 1989.
- 7) Beighton, D. and Life, J. S. C.: Trypsin-like, chymotrypsin-like and glycylprolyl dipeptidase activities in gingival crevicular fluid from human periodontal sites with gingivitis, Archs oral Biol., 34; 843-846, 1989.
- 8) Beighton, D., Radford, J. R. and Naylor, M. N.: Protease activity in gingival crevicular fluid from discrete periodontal sites in humans with periodontitis or gingivitis, Archs oral Biol., 35; 329-335, 1990.
- 9) Cimaony, G. and Kowashi, Y.: Proteinases of the gingival crevice and their inhibitors, In the borderland between caries and periodontal disease II, Academic Press, London, 1980, p. 31.
- 10) Carlsson, J., Hermann, B. F., Hofling, J. F. and Sundquist, G. K.: Degradation of the human proteinase inhibitors alpha-1-antitrypsin and alpha-2-macroglobulin by *Bacteroides gingivalis*, Infect. Immun., 43; 644-648, 1984.
- 11) Haffajee, A. D., Socransky, S. S. and Goodson, J. M.: Periodontal disease activity, J. Periodont. Res., 17; 521-522, 1982.
- 12) Syrjänen, S. M., Alakuijala, L., Alakuijala, P., Markkanen, S. O. and Markkanen, H.: Free amino acid levels in oral fluids of normal subjects and patients with periodontal disease, Archs oral Biol., 35; 189-193, 1990.

- 13) 久保木芳徳：口腔組織コラーゲンの生化学，う蝕と歯周病—研究の進歩—第2巻，編集，浜田茂幸，日本歯科評論社，東京，1982，199頁。
- 14) Uitto, V.-J. and Raeste, A.-M. : Activation of latent collagenase of human leukocytes and gingival fluid by bacterial plaque, *J. Dent. Res.*, **57** ; 844-851, 1978.
- 15) Villela, B., Cogen, R. B., Bartolucci, A. A. and Birkedal-Hansen, H. J. : Crevicular fluid collagenase activity in healthy, gingivitis, chronic adult periodontitis and localized juvenile periodontitis patients, *J. Periodont. Res.*, **22** ; 209-214, 1987.
- 16) Kirch, E. R., Kesel, R. G., O'Donnell, J. F. and Wach, E. C. : Aminoacid in human saliva, *J. Dent. Res.*, **26** ; 297-301, 1947.
- 17) Syrjänen, S., Pillionen, P. and Markkanen, H. : Free amino-acid composition of wax-stimulated whole saliva in human subjects with healthy periodontium, severe chronic periodontitis and post-juvenile periodontitis, *Archs oral Biol.*, **29** ; 735-738, 1984.
- 18) Syrjänen, S., Piironen, P. and Markkanen, H. : Free amino-acid content of wax-stimulated human whole saliva as related to periodontal disease, *Archs oral Biol.*, **32** ; 607-610, 1987.