原著論文

歯肉溝浸出液のタンパク分画の分析

—その特徴と歯周疾患における変動—

高柳 育行

Analysis of Protein Band Pattern in Gingival Crevicular Fluid

— Character and Clinical Comparison between Healthy Subjects and
Periodontal Disease Patients —

Yasuyuki Takayanagi

Abstract : We have been studied the characteristics of protein components in gingival crevicular fluid (GCF) with isoelectric focusing technique. The purpose of this study was to investigate the relationship between those proteins and clinical findings such as Gingival Index (Loe & Sillness), Pocket depth, Plaque Index (Quigley & Hein), Gingival Bleeding Index and Bone Index. GCF, serum and mixed saliva collected from the same subject were analyzed, and following results were obtained. The patterns of protein bands in GCF were similar to those in serum but different from mixed saliva, and the pI of main protein band of GCF and serum were 4.9. No apparent difference was observed on the patterns between clinically healthy gingiva and those received periodontal disease. Protein patterns were compared with the before mentioned clinical findings and GCF volume. Main protein bands were observed on cathode side (pI 8.0-9.0) at the patterns against Gingival Index : 0-1 or >2, Gingival Bleeding Index : + or -, Pocket Depth : 0-1 or >2 and Bone Index : 1 or >3. It was suggested that the study of the proteins on cathode side is important.

Key words : gingival crevicular fluid, isoelectric focusing, protein bands, clinical findings, periodontal disease

I. 緒 言

残存歯およびその周囲組織の病態の把握は、補綴処置の治療方針の決定、治療計画の立案、また補綴処置後の

予後の良否に重大な影響を及ぼす因子の1つであるため、客観的かつ正確な評価は非常に重要である。今日まで残存歯、特に支台歯およびその周囲組織の炎症の程度を評価する方法は、歯肉の色調の変化、ポケットからの出血や排膿の有無、ブラークや歯石の付着状態あるいはポケットの深さの計測などによって行われてきている。しかしこれらの評価方法は測定者の主観が入り込み易いため、正確な診断法とはいいがたい面もある。Brill ら¹⁾ (1958) により初めて歯肉溝浸出液の存在が報告された

昭和大学歯学部第3補綴学教室
The Third Department of Prosthodontics, Faculty of
Dentistry, Showa University
平成元年11月6日受付

のを契機として、歯周疾患における歯肉溝浸出液の研究が始められた。歯肉の炎症程度を表す指標として、浸出液量の測定が行われるようになった²⁻⁹⁾。近年では、浸出液量を測定する専用装置として開発されたペリオトロン(Harco Electronics Ltd., Winnipeg Canada)を用いての浸出液量の測定が普及し、これに関する多くの報告もなされている¹⁰⁻¹⁵⁾。

部分床義歯では、鉤歯の補綴処置による負担の増加や、クラスプなどの維持装置による形態上の変化によって歯周組織が影響を受けるため、歯肉溝浸出液の液量に変化が生じることは十分考えられる。特に少数歯残存症例などではその影響は大きいことが予測される。補綴物が歯周組織に及ぼす影響について各方面から研究がなされており¹⁶⁻²³⁾、その影響を歯肉溝浸出液量で検討した報告もある。歯肉溝浸出液中には、細胞成分、電解質、糖質、タンパク質、組織の代謝産物、細菌性毒素、酵素などが含まれており、これらの成分は歯肉溝および歯周ポケット内の生理的、病理学的、微生物学的環境に対して重要な役割を演じていることが十分予測できる。歯肉溝浸出液中のタンパク質の組成が、炎症により変化すると報告はされているが^{24, 25)}、詳細な報告はない。それは歯肉溝浸出液の採取量が非常に微量であるため、適切な分析方法および検出方法がなかったことに起因していると思われる。

そこで筆者は、歯肉溝浸出液に含まれるタンパク質成分を詳細に分析することを試みることにした。タンパク分析には主に電気泳動法と、クロマトグラフィー法の2つが用いられる。このうち超微量の歯肉溝浸出液の分析に最適な方法として、アガロース等電点電気泳動法を採用した。これは予備実験の結果、等電点電気泳動法が卓越した分離能を有していること、また採取した試料を支持体に直接アプライすることが可能なのはアガロースであることが判明したことによる。そこで本泳動法を用いて歯肉溝浸出液タンパク質の特徴を調べ、さらに歯周疾患の進行程度を主な臨床所見と対比しつつタンパク分画との関係について検索を行ったので報告する。

II. 実験材料および方法

1. 被検者

被検者は、全身の疾患のない健康な32名(年齢18～56歳、男16名、女16名)を対象とし、また被検歯は修復や補綴処置の施されていない、上顎前歯のいずれかを選択した。

2. 臨床的指標の評価

被検歯の臨床的指標は、試料の採取時に同時に以下の基準によりそれぞれ測定した。

1) Gingival Index (GI)

Loe & Silness の Gingival Index²⁶⁾ により被検歯の唇側面を評価した。

2) 歯肉溝の深さ (Pocket Depth, PD)

被検歯唇側面の近心、中央、遠心の3点を1mm単位で各々測定し、その値を平均とした。

3) Plaque Index (P1 I)

Quigley & Hein の歯苔指数²⁷⁾を参考に0～5の6段階で被検歯唇側面を評価した。

4) Gingival Bleeding Index (GBI)

日歯大型規格荷重ペリオプロープ(山浦製作所製)により、一定荷重でプロービングを行い、10秒以内に出血のあるものを(+), 出血のないものを(-)と評価した。

5) 歯肉溝浸出液量 (GCF 量)

歯肉溝浸出液量の測定にはペリオトロン・エコノミーを使用した。

6) Bone Index (BI)

X線における骨吸収の程度を、根長の1/3までを1度、根長の1/3～1/2程度を2度、根長の1/2～2/3程度を3度、根長の2/3以上の吸収を4度とした。

3. 試料の採取

1) 歯肉溝浸出液 (GCF)

GCF は簡易防湿を施した後、軽く水洗し、エアーシリンジで乾燥させた後、被検歯の唇側中央部の歯肉溝にペリオペーパーを20秒間挿入し、直接採取した。採取後そのペリオペーパーを分析するまで冷蔵保存した。

2) 血清

血液は肘静脈より5ml採取し、室温で30分放置後、1,500回転10分間遠心を行った。遠心後に血清を分離し、冷蔵保存した。

3) 混合唾液

十分に漱口後、口腔底に貯留した唾液を5ml採取した。

4. 実験方法

1) アガロース等電点電気泳動法

アガロース等電点電気泳動法は佐野が考案した方法²⁸⁾によった。三角フラスコに蒸留水100mlをとり、0.54gのアガロースIEF(ファルマシア社)を加え、良く混和した後、沸騰水浴中で10分加熱溶解した。そして試

験管に 15 ml ずつ分注し、使用時まで冷蔵保存した。使用時に再溶解した後、60°C まで放置してからアンホライン (pH 3.5~pH 9.5, LKB 社) を 1 ml 加え、よく混和後プラスチックプレート (12.0×11.0 cm, ゲルボンド, マリンコロイド社) 上でゲル化した。ゲルは湿潤箱中 7°C で約 1 時間熟成させた後、ワットマン 3 MM ろ紙 (ワットマン社) を静かにゲル上にのせ、10 分間ゲル中の水分を吸い取った。アガロース等電点電気泳動装置は LKB 社製を用いた。ガラスプレート上にケロシンを一樣にたらし、その上に気泡が入らないようにしてゲルをのせ、陰極側スポンジから 1 cm 陽極側の位置に採取したペリオペーパーをおいた。電極液は陽極に 0.5 M 酢酸液、陰極に 0.5 M 水酸化ナトリウム液を用い、各々を電極スポンジにしみこませた後、各極においた。電気泳動は 7°C に冷却しながら、1 プレートあたり 6.25 W、最大 1,500 V、20 mA で 60 分間行った。血清は蒸留水で 10 倍に希釈した希釈血清、混合唾液はミニコン B 15 (アミコン社) で 5 倍に濃縮した濃縮唾液を、それぞれペリオペーパーに 10 μ l 湿らせゲル上にのせた。

2) クーマシーブリリアントブルー R-250 (CBBR-250) タンパク染色法

泳動後、ゲルをただちに 3.46% スルホサリチル酸—11.5% トリクロロ酢酸液中に 5 分間浸しタンパクを固定した後、ゲルを 95% エタノール中に 10 分間、2 回浸した。そして 95% エタノールで湿らされたワットマン 3 MM ろ紙 (12.0×11.0 cm) をゲル上におき、さらにその上に厚ろ紙を 3 枚のせた後、約 1 kg の重さでプレスした。ついで 70°C オープン中でゲルを乾燥し、CBBR-250 染色液で 10 分間タンパク染色した後、脱色液 (35% エタノール、10% 酢酸液) でバックグラウンドがきれいになるまで脱色し、再びオープン中で乾燥しフィルム状にした。

3) 銀タンパク染色法

タンパク固定から乾燥までの操作は、CBBR-250 タンパク染色と同様に行った。乾燥後用時調製した現像液 (A 液: 8% 炭酸ナトリウム液, B 液: 硝酸アンモニウム 1.90 g, 硝酸銀 2 g, ケイタングステン酸 10 g, 37% ホルマリン 7.3 ml を加えて蒸留水で 1,000 ml とする) を A 液: B 液 = 35: 65 の割合で混合した液をホウロウパットに入れ、ゲルを浸した。そして約 30 cm 離れた所から光源ランプをあて、24°C に保ったサーキュレーターにホウロウパッドをうかべ、一定速度でゆっくり動かしながら鮮明な黒化像が得られるまで (約 15 分間) 現像した。その後 1% 酢酸液にゲルを 10 分間つけて反応を

(+)

(-)

CBBR-250 染色

銀染色

図 1 CBBR-250 染色と銀染色の比較

停止し、オープン中で乾燥させた。

III. 実験結果

1. GCF のアガロース等電点電気泳動によるタンパク染色について

泳動後のタンパク染色法として、CBBR-250 染色法および銀染色法のいずれがよいかをまず検討した。両者の泳動像を比較したところ、銀染色法の方が高感度で CBBR-250 染色法と比較し約 2 倍多いバンドが確認された。しかし、タンパク濃度の少ないバンドを染色しようとすると、逆に高濃度のバンドが濃く染まりすぎてしまい、かえって全体的なパターンの把握が困難になりがちであった (図 1)。CBBR-250 タンパク染色法で約 20 本程度のバンドが確認された。バンドの本数は銀染色法に比べ少ないが、逆にその泳動像は鮮明で、各バンドを正確にとらえやすいということから CBBR-250 タンパク染色を採用した。

2. GCF タンパク分画と血清、および混合唾液タンパク分画パターンの比較

アガロース等電点電気泳動法で得られた歯肉溝浸出液タンパク分画が浸出液に特有なバンドか否かをみるために、同一被検者 2 名 (A, B) から浸出液のほか、血清、唾液を採取し、そのタンパク分画パターンとの比較を試みた。泳動像を図 2 に、得られた各タンパクバンドのデンストメトリー像を図 3 に示した。A 検体では、血清は pI 4.6 から pI 9.4 まで 14 本、混合唾液は pI 4.6 から pI 9.4 まで 16 本、また GCF では pI 4.6 から pI 9.4 まで 29 本に分画された。血清は各バンドがブロードでパ

図 2 GCF, 血清, 混合唾液のタンパクパターン

ンドとしてとらえにくかったが、浸出液ではいずれのバンドも明確に分画されるのが特徴的であった。B 検体では、血清は pI 4.6 から pI 9.4 まで 17 本、混合唾液 pI 4.6 から pI 9.4 まで 19 本、GCF では pI 4.6 から pI 9.4 まで 25 本に分画された。2 例を総合的に観察すると、主バンドは血清では pI 4.9 のバンド、その濃度パーセントは A では 32.17%, B では 44.71% で平均 38.44% であった。pI からそのバンドはアルブミンであると判断した。歯肉溝浸出液では血清と同様に主バンドは pI 4.9 で、その濃度パーセントは A では 20.10%, B では 17.08% で平均 18.59% であった。主バンドがいずれもアルブミンであることから、浸出液には血清由来のタンパクが含まれていることが判明した。一方混合唾液では主バンドは pI 6.6 のバンドで、その濃度パーセントは A では 44.60%, B では 44.25% で平均 44.43% であった。主バンドが血清とは異なることから、唾液中には血清由来のタンパクは少ないと考えた。しかしながら血清の主バンドである pI 4.9 のバンドは、A では濃度パーセントが 8.85%, B では 17.44% で pI 6.6 のバンドについて高濃度であることから、血清由来のものも多少含まれていることが推察された。

3. 疾患による GCF タンパク分画パターンの比較

32 例中各種の指標から臨床的に健康と思われる 5 例の歯肉 (健康群) と、歯周疾患であると判断した 5 例の歯肉 (疾患群) について、得られた GCF 中のタンパクバンドの pI を pI 4.6 から pI 9.4 まで 0.1 間隔で測定し、そのバンドの出現率と濃度パーセントを調べた (図 4)。ただし、肉眼的には判定可能であるが、デンストメーターではバンドとしてとらえにくい場合がある。この場合、便宜的にその間の濃度パーセントを平均して、

図 3 GCF, 血清, 混合唾液のデンストメトリー像

図 4 臨床的に健康な歯肉と疾患を有する歯肉のタンパクパターン

そのバンドの濃度パーセントとした。健康群では平均 26 本、疾患群では平均 27 本のバンドが出現した。各症例について各タンパクバンドの出現頻度をみたとすると、100% 出現するのは pI 4.9, pI 8.7 のバンドであった。健康群に比べ疾患群で 2 倍以上の高頻度であったのは、pI 4.8, pI 5.4, pI 6.2, pI 8.3, pI 8.8 で、逆に頻度の低かったのは、pI 5.0, pI 6.9, pI 7.5, pI 7.7, pI 7.9, pI 8.0, pI 8.2,

図 5 GI を基準にしたタンパクパターンと比較

図 6 GBI を基準にしたタンパクパターンと比較

pI 8.6, pI 8.9, pI 9.3 であった。つぎに各タンパクバンドの濃度パーセントについてみた。主たるバンドは pI 4.9 で、健康群の歯肉で 18.10%、疾患群の歯肉では 18.89% であった。タンパクは pI 4.6 から pI 9.4 まで幅広い pI をもつタンパクが出現したが、pI 4.9 ほど高濃度で出現したバンドはなく、それ以外のバンドはいずれも 10% 以下の濃度であった。健康群と疾患群の間で各バンドの濃度パーセントに有意な差があるかどうか統計学的にみた。pI 4.7 で健康群 $4.52 \pm 2.31\%$ (平均値 + 標準偏差) に対し、疾患群 $1.77 \pm 2.00\%$ 、pI 6.9 で健康群 $2.05 \pm 1.66\%$ に対し疾患群 $0.44 \pm 0.98\%$ 、pI 7.7 で健康群 $1.83 \pm 1.72\%$ に対し疾患群は 0% であり危険率 0.05 以下で有意に健康群の方が高値であった。

4. 各臨床的指標とタンパク分画の関連について

1) Gingival Index (GI)

GI が 0 または 1 の被検歯 5 本の平均濃度パーセントと、GI が 2 以上の被検歯 9 本の平均濃度パーセントを比較したところ、pI 4.6 から pI 9.4 の範囲で 3 分画 (pI 6.0, pI 8.8, pI 9.0) に有意差が認められた (図 5)。

2) Gingival Bleeding Index (GBI)

GBI が (-) の 19 本の被検歯の平均濃度パーセントと、GBI が (+) の 13 本の被検歯の平均濃度パーセントを比較したところ、pI 4.6 から pI 9.4 までの範囲で 3 分画 (pI 6.0, pI 8.0, pI 9.2) に有意差が認められた (図 6)。

3) Plaque Index (PII)

PII が 0 または 1 の 6 本の被検歯の平均濃度パーセントと、PII が 3 以上の 4 本の被検歯の平均濃度パーセントを比較したところ、pI 4.6 から pI 9.4 までの範囲で 7

図 7 PII を基準にしたタンパクパターンと比較

分画 (pI 4.8, pI 5.3, pI 6.2, pI 6.3, pI 7.0, pI 7.7, pI 8.8) に有意差が認められた (図 7)。

4) 歯肉溝浸出液量 (GCF 量)

ペリオトロン値が 15 以下の 6 本の被検歯の平均濃度パーセントと、ペリオトロン値 40 以上の 8 本の被検歯の平均濃度パーセントを比較したところ、pI 4.6 から pI 9.4 までの範囲で 6 分画 (pI 5.0, pI 5.3, pI 5.7, pI 6.7, pI 8.0, pI 8.2) に有意差が認められた (図 8)。

5) Pocket Depth (PD)

PD が 1 mm 以下の 5 本の被検歯の平均濃度パーセントと、PD が 3 mm 以上の 4 本の被検歯の平均濃度パーセントを比較したところ、pI 4.6 から pI 9.4 までの範囲で 2 分画 (pI 7.7, pI 8.2) に有意差が認められた (図 9)。

6) Bone Index (BI)

図 8 GCF を基準にしたタンパクパターン比較

図 10 BI を基準にしたタンパクパターンの比較

図 9 PD を基準にしたタンパクパターンの比較

BI が 1 の 5 本の被検歯の平均濃度パーセントと、BI が 3 以上の 5 本の被検歯の平均濃度パーセントを比較したところ、pI 4.6 から pI 9.4 までの範囲で 5 分画 (pI 4.7, pI 4.8, pI 7.7, pI 8.2, pI 8.8) に有意差が認められた (図 10)。

IV. 考 察

タンパク質などの両性電解質を、それぞれのもつ等電点によって分離する等電点電気泳動法の支持体としては、電気浸透のないポリアクリルアミドゲルが広く用いられていた。近年ほとんど電気浸透を示さないアガロースが、等電点電気泳動用の支持体として市販された。ア

ガロースはポリアクリルアミドゲルに比べ、ゲルの調整および染色、脱色操作が容易である。

タンパク染色法は CBBR-250 タンパク染色および銀染色を用いたが、歯肉溝浸出液中のタンパク濃度が比較的高いため、高感度な銀染色法を用いなくても染色操作がより簡単な CBBR-250 タンパク染色で十分と判断し、この染色法を用いることにした。またデンストメトリーをした場合、銀染色よりも CBBR-250 タンパク染色の方がタンパク間の染色度の違いが少ないことから、濃度をより反映したデンストメトリー像が得られた。今回の実験は歯肉溝浸出液のタンパク分画の特徴と、歯周疾患の程度によるタンパク分画パターンの特徴をとらえることを主眼としたが、より高感度の銀染色法では微量なバンドを検出し、その詳細な検索をするのにはよい染色法と考えられる。等電点電気泳動法による GCF の研究では、芝²⁹⁾ (1983) が pI 3.5~pI 5.0, pI 6.6 付近, pI 8~pI 9 の間のバンドと大きく 3 群に分け、特に pI 8~pI 9 の間に他の体液にはみられない明確な、しかも濃染されるバンドがみられるのが特徴的であると報告しているが、今回の実験でも同様に陰極側において特徴的なタンパクパターンを示した。Sano³⁰⁾や、小林³¹⁾はアガロース等電点電気泳動法を用いて体液のタンパク分析を行った結果、タンパク濃度の少ない体液の分析でも良好な結果が得られることを報告している。これまでに歯肉溝内容物、あるいは浸出液中の成分について、化学的な分析が行われている³²⁻³⁵⁾が、タンパク質成分の分析によりさらに詳細な化学的分析ができるものと思われる。GCF を採取した同一被検者から、唾液 および 血液を採

取して各体液タンパクの比較を試みたが、タンパク分画パターンは図2に示したように、GCFは血清と同様に主タンパクバンドがアルブミンであった。Brillら³⁶⁾の実験結果では、分子量の小さな物質だけでなく分子量の大きな血漿タンパクも、上皮下の結合組織からポケット上皮層を通過してポケット内へ移行することが認められていることから、血液成分がGCF中に多く含まれていることは当然考えられる。またTolo³⁷⁾は3Hを標識したアルブミンを用いた実験により、口腔粘膜と同じ重層扁平上皮により構成されているポケット上皮は、分子量68,000以下のタンパクを通過させ、他の口腔粘膜より大きな透過性をもっていることを報告している。原ら²⁴⁾(1977)は、炎症により血管の透過性が高まり、GCFの成分中に多くの血清成分が含まれていると報告しているが、今回の実験結果はこれらの報告と一致している。一方、混合唾液はGCFや血清と異なる唾液特有のタンパク分画パターンを示したことから、唾液中には特有の主タンパクが存在することがわかった。これは鈴木ら³⁸⁾の報告とも一致するバンドであった。

泳動像の陰極側で血清のタンパク分画パターンとは一致しなかったが、その原因を生化学的見地から考察すると、2つの因子すなわち、1つは歯周組織の代謝異常であり、もう1つは歯肉溝あるいは歯周ポケット内の常在菌の関与が考えられる。GCFが血管の透過性の亢進によってのみ出現するのであれば、血液と同様なタンパク分画パターンを示すことが考えられるが、特に陰極側でのタンパク分画が血液と異なっているのは常在菌の影響によるものと考えられる。今回はアンホライン(pH3.5~pH9.5)を使用し、広範囲のpHでの血清との違いを検討したが、今後pHの範囲をしぼっての比較も必要と考えられる。

今回の実験では、GCFの総タンパク量あるいは各分画のタンパク量について、採取量が超微量であるため測定することができなかったが、かなり濃染されたことから、Bangら³⁹⁾が報告しているごとく、血清と同程度のタンパク濃度があることが十分考えられる。Brandtzaeg⁴⁰⁾は、GCF中に抗体が存在することから、歯周疾患は免疫反応が関与している可能性を示唆している。抗原抗体反応により形成される免疫複合体は、補体をはじめとする血清成分や、血球成分に作用して広範囲な生物学的活性を発揮し、生体の防御だけでなく組織の障害をも引き起こすと考えられている。特に陰極側に出現した各タンパクバンドについて、そのタンパク質が分析されるとこれらの免疫複合体の量的変化がわかり、生体の防御や組織障

害のメカニズムも明らかになることと推察される。吉永ら⁴¹⁾(1984)は、GCF中の免疫複合体量は血清中に比較し高濃度でブラッシング指導により増加し、免疫複合体量とGIの間に相関があったと報告している。これらの点についての分析も今後行う必要がある。

これまでの歯周疾患は慢性の炎症性疾患であると考えられてきたが、最近の研究結果ではそれぞれの部位において比較的短期間に疾病活動期が存在し、歯周組織の破壊が起こった後は、長期間非活動期が継続することが報告されている^{42~44)}。そこで歯周組織の破壊が生ずる活動期を個々の歯牙について正しく評価できるならば、支台歯の選択などの補綴処置の際、合理的に行うことが可能となり、さらに活動期を客観的にしかも早期に予知できるならば、歯周疾患を予防することも可能であることが考えられる。病変の中心となるポケット上皮の炎症状態を的確に把握する方法として、組織学的検索やGCFの生化学的検索があげられるが、各臨床的指標のよい状態と悪い状態におけるGCFのタンパク分画パターンを比較することにより、疾病活性の出現や予知について検査してみた。各臨床的指標により、臨床的に健康と思われる歯肉(健康群)と疾病を有する歯肉(疾患群)を選択し、それぞれのタンパク分画パターンを比較した。両群について100%出現するのはpI4.9, pI8.6であった。臨床的に健康な歯肉に比べ、疾患群では全体に比較的高頻度の出現率が分散していた。また青木ら²⁵⁾(1987)は血清については健康群と疾患群に差異が認められなかったが、歯肉溝浸出液では健康群においてpI6付近に濃染された分画が認められ、疾患群においてはpI4.5~pI5.0付近に濃染された分画が認められたと報告している。本実験では、pI4.7とpI6.9において危険率0.05以下で、pI7.7において危険率0.01以下で有意に健康群が高い濃度パーセントを示したが、今回の実験では、濃度パーセントに違いは認められたものの、健康群と疾患群で明らかに異なった等電点をもつタンパクの違いを認めることはできなかった。健康群に比べ疾患群に高頻度の出現率を示したバンドの多くは、炎症が進むにつれてGCFに含まれているタンパクの種類の増加、もしくは分散が起因しているものと考えられる。

GIとGCFのタンパク分画パターンについて、GIが0または1の被検者(A群)とGIが2以上の被検者(B群)に分けて比較検討した。pI8.8, pI9.0の陰極側のタンパクバンドにおいて、危険率0.05以下で有意にB群が高い濃度パーセントを示した。GIが2以上の歯肉では、赤色の浮腫や出血の傾向があり、GCFの成分中には

血清成分が多く含まれていることが考えられる。黒岩⁴⁵⁾ (1979) は組織学的には、辺縁性歯周炎のポケット上皮下の炎症は、小数の白血球および漿液の浸出を伴う非特異性炎症と形質細胞およびリンパ球の浸潤よりなる免疫性反応からなっており、小血管の拡張、さらに細胞間隙の拡張によりポケット上皮の透過性が亢進して GCF 量は増加してくると報告している。しかし血液のタンパク分画パターンにおいては、ほとんどバンドが認められない陰極側において GI の高い群が有意に高い値を示していたことから、これらのバンドが歯肉の炎症によって増加するタンパクであると考えられる。GI は比較的多く使われる指標の 1 つであり、初期治療などに伴う歯肉の状態の変化は GBI, GCF, PD などと相関があることが報告されている⁴⁶⁾。臨床的に健康な歯肉 (健康群) と GI (A 群) のタンパクパターン、また疾患群と GI (B 群) のタンパクパターンを比較すると、ほぼ同じパターンを示している。このことから、GI が歯肉の炎症状態を評価する指標として適していると思われる。

GBI については、出血のなかった (-) 群と出血のあった (+) 群で比較したが、pI 8.0, pI 9.3 において危険率 0.05 以下で有意に (-) 群が高い濃度パーセントを示した。GI と比較すると、陰極側で逆の結果を示していると考えられるが、pI 4.9 の濃度パーセントが (-) 群と (+) 群にバラツキと濃度差が認められ、これらが影響していることも考えられる。また GI と比較して、(+) 群では pI 4.9 において高い濃度パーセントを示す血清に近いタンパク分画パターンを示しており、このことは炎症による歯肉の血管の透過性亢進を示すと考えられる。すなわち GBI は、GI よりも歯肉の血管の透過性が高まるなどの組織的变化をより反映している指標と思われる。GI の場合と異なるのは、陰極側において (-) 群が高い濃度パーセントを示していることである。pI 4.9 のアルブミン濃度が高ければ、逆にほかのタンパク質濃度は同濃度含まれていても低下するわけであり、(+) 群が必ずしも陰極側でタンパク質の濃度が減少していることを示すものではないと思われる。しかし、GI と GBI は、ともに出血傾向を判定の 1 基準にしており、その点では GBI の方が pI 4.9 において (+) 群が (-) 群より高い濃度パーセントを示し、血清のタンパク分画パターンに近く、歯肉の血管の透過性などの状態をより的確に示していると考えられる。GBI は、歯肉の状態を評価する場合最適な評価方法であると報告されているが、今回の結果からも評価方法が簡単なうえ適切に評価できると考えられる。神山⁴⁷⁾ (1985) の報告では、ポケット浸出液量

とブロービング後の浸出液中のヘモグロビン量との間に有意の相関があったと報告しているが、浸出液量とポケット上皮の炎症に関連があることを示していると考えられる。今回の実験でも GCF 量を基準にしたパターンと相似したパターンを示しており、同様な結果を示すものと考えられる。

PII は、PII が 0 または 1 の被検者 (A 群) と、3 以上の被検者 (B 群) に分けて比較検討し、比較的広範囲にわたり有意差が認められた。陰極側では、pI 8.8 において危険率 0.01 以下で有意に B 群が高い値を示した。執ら⁴⁸⁾によれば Plaque 蓄積期においては、GBI > GI > GCF の順に相関があり、また除去期には GBI > GI の順に相関があったが、GCF とは相関がなかったと報告している。ともに相関が高いのは GBI で、Plaque の多い B 群と GBI (+) 群のタンパク分画パターンを比較すると相似したパターンを示しておらず、特に pI 8.8 のタンパク濃度は高い値を示した。PI I (A 群) と GBI (-) 群のタンパクパターンは似ており、また健康群のパターンとも相似していた。

GCF では、pI 5.7 において危険率 0.01 以下で、また pI 5.0, pI 5.3, pI 6.7, pI 8.0, pI 8.2 において危険率 0.05 以下で有意に GCF 量の少ない被検者群が高い濃度パーセントを示した。1965 年、Loe and Holm-Pedersen⁵⁾ は、GCF の存在は歯周組織に歯周疾患が潜在的に始まっている証拠で、構造上の変化を起こす以前の兆候であるとしており、初期歯肉炎の診断に活用できると述べている。また歯周治療にたいして、肉眼的所見よりも GCF の方が鋭敏に反応するという報告や、初期治療前後において GCF のバラツキが大きく、処置に対応した一定のパターンがみられないという報告もある⁴⁸⁾。GCF 量と臨床所見の関係については、Mann³⁾ (1963) がポケットの深さと相関関係があることを、Tsuchida ら⁴⁹⁾ (1981) もペリオトロン値とポケット深さ (0~5 mm) との関係を調べ、有意に相関関係のあったことを報告している。さらに林ら¹¹⁾ (1977) は GCF 量と GI, GCF 量と PD の間には相関性の傾向がうかがわれたと報告している。ごとく、GCF 量と歯肉炎の間には相関性が認められるが、歯周疾患において GCF 量との間に相関性は認められていない。今回の実験では、ペリオトロン値が 15 以下の A 群と 40 日以上 B 群に分けて比較検討したが、GBI と同様 pI 4.9 のアルブミンの濃度パーセントが高く、A 群と B 群の差は 5% 近くあった。このことから GCF は、歯周組織の血管の透過性亢進などの変化を適切に評価できると考えられる。また有意差の認められた各タン

パクバンドは、浸出液量の少ないA群で高い濃度パーセントを示しており、これらの分析が疾病活性や歯周疾患のメカニズムを解明するのに役立つと思われる。陰極側のバンドが炎症に関与していることが示唆されるが、それぞれのバンドと疾患との関連は明らかにできなかった。

PD については、1 mm 以下の A 群と 3 mm 以上の B 群に分けそれぞれの泳動像を比較検討した。両群とも pI 4.9 の濃度パーセントが高く、ほとんど同様のパターンを示しているが、pI 8.2 において A 群が有意に高い濃度パーセントを示していることから、このタンパク質の分析が重要であると思われる。PD が直接疾病活性を示すとは考えにくい、疾病活動期にはポケットが増加したり、深いポケットでは増悪する傾向がある。特にポケットの浅い A 群に多いタンパクは、ポケット内の状態の良好な時に存在するタンパクとして重要であると思われる。GI や GCF のタンパクパターンと比較すると、指標の良好な群の間ではほぼ同様のパターンを示しており、また悪い群の間でもそれに近いパターンを示している。特に A 群が危険率 0.01 以下で有意に高い濃度パーセントを示した pI 8.2 は、GCF でも A 群が危険率 0.05 以下で有意に高い濃度パーセントを示した。

BI については、X線骨吸収程度が根長の 1/3 までの A 群と根長の 1/2 以上の B 群に分け、それぞれの泳動像を比較検討した。PD と同様 pI 8.2 において危険率 0.01 で有意に A 群が高い濃度パーセントを示した。米良⁵⁰⁾ (1985) の報告によると、初期治療によって歯槽骨の改善が認められ、それは重度群ほど改善が出現しやすく、その頻度も高くなることが報告されている。このため BI で疾病活性を予測することは難しいと思われるが、有意差の認められたアルブミンより陽極側のタンパクと、陰極側のタンパクについて今後さらに分析すると、疾病活性に関与するタンパクが解明されると思われる。

V. 結 論

アガロース等電点電気泳動法と CBBR-250 タンパク染色法により、32 名の GCF のタンパク分画パターンを分析した。

1. CBBR-250 タンパク染色法により、GCF、血清、混合唾液、それぞれ特有なタンパクパターンが得られた。銀染色法はさらに高感度であり、分析の内容により染色法を考慮する必要があると思われた。

2. GCF、血清、混合唾液について泳動を行った結果、

GCF の主バンドは血清と同じ pI 4.9 であったが、混合唾液の主バンドは約 pI 6.6 と異なった。

3. 臨床的に健康な歯肉と疾患を有する歯肉のタンパク分画パターンを比較したところ、3 分画で有意差が認められたが、顕著なパターンの特徴や違いは認められなかった。またそれぞれのバンドと疾患との関連は明らかにできなかった。

4. 各臨床的指標とタンパク分画パターンを比較した結果、PII と GCF 量のパターンでは、比較的多くの有意差が認められた。GI、GBI、PD、BI では陰極側に有意差が認められた。このことから陰極側 (pI 8~9) のタンパクバンドの分析が重要であると思われた。

稿を終えるに臨み、終始懇篤なご指導を賜りました芝 燁彦教授に深甚なる感謝の意を表します。また生化学的立場から貴重なご教示、ご助言を賜りました東京医科歯科大学検査部生化学芝紀代子講師に深謝致します。また本研究に理解を示され、実験に協力してくださいました第3補綴学教室、東京医科歯科大学検査部生化学検査室の方々に、心より感謝致します。

本論文の要旨の一部は、第4回昭和歯学会総会、第77回日本補綴歯科学会学術大会および第30回秋期日本歯周病学会において発表した。

文 献

- 1) Brill, N. and Krasse, B.: THE PASSAGE OF TISSUE FLUID INTO THE CLINICALLY HEALTHY GINGIVAL POCKET, *Acta Odontol Scand*, 16: 233~245, 1958.
- 2) Brill, N.: GINGIVAL CONDITIONS RELATED TO FLOW OF TISSUE FLUID INTO GINGIVAL POCKETS, *Acta Odontol Scand*, 18: 421~446, 1960.
- 3) Mann, W.V.: The Correlation of Gingivitis Pocket Depth and Exudate from the Gingival Crevice, *J Periodontol*, 34: 379~387, 1963.
- 4) Egelberg, J.: Gingival exudate measurement for evaluation of inflammatory changes of the gingivae, *Odontol Revy*, 15: 381~398, 1964.
- 5) Loe, H. and Holm-Pedersen, P.: Absence and Presence of Fluid from Normal and Inflamed Gingivae, *Periodontics*, 3: 171~177, 1965.
- 6) Bjorn, A.L., Koch, G. and Lindhe, J.: Evaluation of gingival fluid measurements, *Odontol Revy*, 16: 300~307, 1965.
- 7) Orban, J.E. and Stallard, R.E.: Gingival Crevicular Fluid. A Reliable Predictor of Gingival Health? *J Periodontol*, 40: 231~235, 1969.
- 8) Borden, S.M., Golub, L.M. and Kleinberg, I.: The

- effect of age and sex on the relationship between crevicular fluid flow and gingival inflammation in humans, *J Periodont Res*, 12 : 160~165, 1977.
- 9) Hanock, E.B., Gray, R.J. and O'Leary, T.J. : The Relationship Between Gingival Crevicular Fluid and Gingival Inflammation, A clinical and histological study, *J Periodontol*, 50 : 13~19, 1979.
 - 10) 水野克巳, 大森 恒, 萩本増彦ほか : 歯周疾患患者の歯周ポケット浸出液量と主なる臨床所見との関係, *愛院大歯誌*, 13 : 234~238, 1975.
 - 11) 林 和夫, 護邦忠弘, 三瀬博司ほか : 歯周疾患における病態の推移とポケット浸出液量との関連性について (その 1), *日歯周誌*, 19 : 231~238, 1977.
 - 12) 宮本 尚, 宮国 敏, 寺中敏夫ほか : 歯肉浸出液量測定装置「ペリオトロン」の実用性に関する検討, *神奈川歯学*, 14 : 245~252, 1979.
 - 13) Garnick, J.J., Pearson, R. and Harrell, D. : The Evaluation of the Periotron, *J Periodontol*, 50 : 424~426, 1979.
 - 14) Bickel, M. and Cimasoni, G. : Reliability of volume measurements with new Periotron 6000, *J Periodont Res*, 19 : 313~316, 1984.
 - 15) 土屋昭夫, 吉永英司, 沼部幸博ほか : 歯肉溝浸出液測定器の臨床的検討, *日歯周誌*, 28 : 347~354, 1986.
 - 16) Brill, N., Tryde, G. and Stoltze, K. : Ecologic changes in the oral cavity caused by removable partial dentures, *J Prosthet Dent*, 38 : 138~148, 1977.
 - 17) 井上昌幸 : 辺縁性歯周疾患における歯冠補綴物の原因性に関する検討, *補綴誌*, 21 : 10~20, 1977.
 - 18) 松永和子, 奥野叶人, 橋本輝夫ほか : 金属焼付ポーセレン冠が歯肉に及ぼす影響に関する臨床的研究, 歯肉溝浸出液について, *補綴誌*, 22 : 551~557, 1978.
 - 19) Jameson, L.M. : Comparison of the volume of crevicular fluid from restored and nonrestored teeth, *J Prosthet Dent*, 41 : 209~214, 1979.
 - 20) 香川博一郎 : 全部鋳造冠辺縁の歯肉におよぼす影響, 歯肉溝浸出液による観察, *愛院大歯誌*, 17 : 131~147, 1979.
 - 21) 松井裕子 : 鋳造冠辺縁が歯周組織に及ぼす影響, *補綴誌*, 25 : 207~226, 1981.
 - 22) 山賀 保, 三代知史, 野首孝祠ほか : 鈎歯の歯肉溝浸出液量に関する臨床的研究 (第 1 報) タンニン, フッ化化合物の影響について, *補綴誌*, 26 : 999~1006, 1982.
 - 23) 塩山 司, 石井秀明, 木村英敏ほか : 歯冠補綴物と歯肉に関する臨床的研究 (第 1 報) 歯冠補綴物装着までの過程が歯肉に及ぼす影響, *補綴誌*, 31 : 62~73, 1987.
 - 24) 原 耕二ほか : 歯肉溝浸出液と歯周病とのかかわりあい, *歯界展望*, 50 : 235~244, 1977.
 - 25) 青木裕子, 吉永英司, 玉澤 修ほか : 等電点電気泳動法による歯肉溝浸出液の分析 (第 1 報), *日歯周誌*, 29 : 296, 1987.
 - 26) Loe, H. : The Gingival Index, the Plaque Index and the Retention Index Systems, *J Periodontol*, 38 : 610, 1967.
 - 27) Quigley, G.A. and Hein, J.W. : Comparative Cleansing Efficiency of Manual and Power Brushing, *JADA*, 65 : 26, 1962.
 - 28) 佐野紀代子 : 薄層アガロースゲル等電点電気泳動 体液蛋白と血清酵素アイソザイム分析, *臨床検査*, 26 : 1192~1200, 1982.
 - 29) 芝 燁彦 : 歯肉溝浸出液の生化学的分析, *補綴誌*, 27 : 411~412, 1983.
 - 30) Sano, K., Nakao, M. and Siba, A. : An ultramicro-assay for proteins in biological fluids other than blood using a combination of agarose gel isoelectric focusing and silver staining, *Clinica Chimica Acta*, 137 : 115~122, 1984.
 - 31) 小林久美子, 鈴木 潔, 芝 燁彦ほか : アガロース等電点電気泳動法と銀染色の組合せによる体液蛋白分析 銀染色法に関する基礎的検討, *臨床病理*, 31 : 1012~1016, 1983.
 - 32) 末田 武 : 歯肉嚢内に流出する体液について 重量およびニンヒドリン陽性物質について, *口病誌*, 29 : 269~280, 1962.
 - 33) Hasegawa, K. : BIOCHEMICAL STUDY ON GINGIVAL FLUID, *Tokyo Med Dent Univ*, 14 : 359~372, 1967.
 - 34) Sueda, T., Cimasoni, G. and Held, A.J. : HIGH LEVELS OF ACID PHOSPHATASE IN HUMAN GINGIVAL FLUID, *Arch Oral Biol*, 12 : 1205~1207, 1967.
 - 35) Golub, L.M., Bsorden, S.M. and Kleinberg, I. : Urea content of gingival crevicular fluid and its relation to periodontal disease in humans, *J Periodont Res*, 6 : 243~251, 1971.
 - 36) Brill, N. and Bjorn, H. : Passage of tissue fluid into human gingival pockets, *Acta Odont Scand*, 17 : 11~21, 1959.
 - 37) Tolo, K.J. : A STUDY OF PERMEABILITY OF GINGIVAL POCKET EPITHELIUM TO ALBUMIN IN GUINEA PIGS AND NORWEGIAN PIGS, *Arch Oral Biol*, 16 : 881~888, 1971.
 - 38) 鈴木 潔, 鈴木 満, 芝 燁彦 : 銀染色法を用いた唾液タンパクの分析, *補綴誌*, 29 : 48~54, 1985.
 - 39) Bang, J.S. and Cimasoni, C. : Total Protein in Human Crevicular Fluid, *J Dent Res*, 50 : 1683, 1971.
 - 40) Brandtzaeg, P. : IMMUNOCHEMICAL COMPARISON OF PROTEINS IN HUMAN GINGIVAL POCKET FLUID, SERUM AND SALIVA, *Arch Oral Biol*, 10 : 795~803, 1965.
 - 41) 吉永英司, 玉沢 修, 鴨井久一 : 歯肉溝浸出液中の免疫複

- 合体の定量 歯肉炎における量的変化について, 日歯周誌, 26 : 684~695, 1984.
- 42) Goodson, J.M., Tanner, A.C.R. and Haffajee, A.D. et al : Evidence for Episodic Periodontal Disease Activity, J Dent Res, 60 A : Abstr. 305 : 387, 1981.
- 43) Goodson, J.M., Tanner, A.C.R. and Haffajee, A.D. et al : Pattern of progression and regression of advanced destructive periodontal disease, J Clin Periodontol, 9 : 472~481, 1982.
- 44) Socransky, S.S. Haffajee, A.D. and Goodson, J.M. et al : New concepts of destructive periodontal disease, J Clin Periodontol, 11 : 21~32, 1984.
- 45) 黒岩剛正 : 辺縁性歯周炎におけるポケット上皮の透過性防衛機構に関する病理組織学的ならびに組織化学的研究, 日歯周誌, 21 : 306~323, 1979.
- 46) 朴 英樹, 神谷洋行, 奥田一博ほか : 歯周ポケット内細菌叢からみた歯周初期治療の効果, 日歯周誌, 26 : 329~338, 1984.
- 47) 神山義信 : Bleeding Index を用いた歯周疾患の診断法に関する研究 1 歯周ポケット浸出液採取装置による評価, 日歯周誌, 27 : 65~81, 1985.
- 48) 執 良治, 勝谷芳文, 堀口優美ほか : ヒトの実験的歯肉炎における各種臨床的指数の再評価, 日歯周誌, 25 : 830~836, 1983.
- 49) Tsuchida, K. and Hara, K. : Clinical significance of gingival fluid measurement by 「Periotron」, J Periodontol, 52 : 697~700, 1981.
- 50) 米良豊常, 岡野友宏, 石川 烈 : 初期治療による歯槽骨の改善について—光学的サブトラクション法を用いた研究一, 日歯周誌, 27 : 902~911, 1985.