歯肉炎における歯肉コラーゲンの性状変化 と加水分解酵素活性

杉 山 勝 三

岡山大学医学部薬理学教室*

山 本 健 二 鎌 田 理 勝 田 信 夫

九州大学歯学部歯科薬理学教室**

〔受付：昭和53年10月24日〕

抄録：歯肉炎の歯肉結合組織に及ぼす影響を組織コラーゲンの性状変化とそれに関連する酸性加水分解酵素および中性プロテイナーゼ活性の動向から検討した。

ヒト歯肉炎の切除歯肉組織中には対照歯肉に比べ可溶性の蛋白質および透析性ハイドロキシプロリン量が著しく増加し、塩可溶性および酸可溶性コラーゲンも約2～3倍の増加を示した。これに対し不溶性コラーゲンは疾患群において減少を示した。酸性加水分解酵素活性は疾患群と対照群に変動が認められなかったが、中性pH域で活性を示すコラーゲン分解活性およびカテプシンB₁活性は疾患群において著明な増大を示した。しかしカテプシンG活性には差が認められなかった。以上の結果から歯肉炎における歯肉結合組織のコラーゲンの質的転換にはカテプシンB₁およびコラゲナーゼが重要な役割を果していることが示唆された。

緒 言

結合組織の崩壊および退縮が結合組織の代謝に関連する諸種の酵素作用によることは明らかであり、これらの酵素としてはリソゾーム由来の酸性加水分解酵素をはじめとして中性のpH域で活性を示すプロテイナーゼおよびそれらを賦活する酵素が知られている¹⁻⁴⁾。しかし、これら酵素の局在や性質等に関する多くの研究にもかかわらず、酵素相互の関連性やその調節機構および組織の性状変化や機能との関係等については不明な点が多い。

著者らは歯肉炎における歯肉結合組織の崩壊ないしは組織の改造、修復機構を酵素レベルで追究することを目的とし、このためまず疾患時におけるヒト歯肉の酸性加水分解酵素活性および中性プ

ロテイナーゼ活性を測定し、それら酵素活性の変化と歯肉コラーゲンの性状との関連性について検討したので報告する。

材料及び方法

1. 被検歯肉

九州大学歯学部付属病院保存科及び口腔外科で歯肉切除術を行った歯肉炎患者の歯肉を無作為に採取して用いた。対照群の歯肉は臨床的には健康であるが補綴処理のため歯肉切除を必要とする患者からのものを用いた。得られた歯肉は切除後、直ちに0.9% NaClで洗浄し、濾紙で水分を拭い秤量した。歯肉重量の20倍容の0.9% NaClを加え、組織をハサミで細片にし、ガラスホモジナイザーを用いてホモジネートにした。このホモジネートを遠心(10,000g, 25分間)後、上清液と沈渣

Alterations in the quality of collagen and activities of hydrolases in the gingival connective tissues of patients with periodontitis.

Katsumi SUGIYAMA (Department of Pharmacology, Okayama University Medical School, Okayama)
Kenji YAMAMOTO, Osamu KAMATA and Nobuo KATSUDA (Department of Pharmacology, Faculty of Dentistry, Kyushu University, Fukuoka)

* 岡山市鹿田町2-5-1 (〒700)

** 福岡市東区馬出3-1-1 (〒812)

Jap. J. Oral Biol. 21: 22-27, 1979.

に分け各々酵素活性の測定試料にした。これらの操作はすべて4°C 以下で行った。

2. 歯肉コラーゲンの分画

歯肉ホモジネートの0.5~1 ml を0.1M 酢酸緩衝液 (pH 4.5) で2倍に希釈して透析チューブに入れ、同緩衝液に対して4°C, 24時間透析を行った。透析後の外液を透析性 ハイドロキシプロリン分画とした⁵⁾。塩および酸可溶性コラーゲンと不溶性コラーゲンの抽出は Nimni らの方法⁶⁾に準じて行った。歯肉ホモジネートの1 ml に5 mM EDTA*を含む0.5M NaCl (pH 7.4) 5 ml を加え、4°Cで24時間攪拌して抽出し、遠心(10,000g, 20分間)して上清液を得た。この抽出操作は2回行い、それぞれの上清液を合せて塩可溶性分画とした。この分画後の沈渣に0.5M ケン酸ソーダ (pH 3.6) 5 ml を加え、上記のごとく抽出したものを酸可溶性分画とした。更に残りの沈渣に0.3M トリクロル酢酸 3 ml を加え90°C, 30分間加熱後、遠心して得た上清液を不溶性分画とした。この抽出も2回繰り返した。それぞれの分画液は脱イオン水に対して4°C, 24時間透析した後、減圧下に濃縮し、6M HCl 中で封管、118°C で16時間加水分解した。各分画に含まれるハイドロキシプロリン (Hyp) 量は Kivirikko らの方法⁷⁾で定量した。

3. 酵素活性の測定

i. 酸性フォスファターゼ

p-ニトロフェニルリン酸を基質として、0.1% Triton X-100を含む33mM 酢酸緩衝液 (pH 5.0) 中で酵素試料と37°C, 10分間反応させ、生成した *p*-ニトロフェノールを測定した⁸⁾。蛋白量はウシ血清アルブミンを標準として Lowry らの方法⁹⁾で測定した。

ii. カテプシンD

酸変性させたヘモグロビンを基質として Cohn らの方法¹⁰⁾に従って測定した。

iii. アリルスルファターゼ

p-ニトロカテコールスルフェートを基質として 0.12% Triton X-100存在下で Roy の方法¹¹⁾に従って測定した。

iv カテプシン B₁

N- α -ベンゾイル-D, L-アルギニン-2-ナフチルアミドを基質として Barrett の方法¹²⁾に従って測定した。

v. カテプシンG

N-ベンゾイル-D, L-フェニルアラニン-2-ナフチルエステルを基質として Starkey らの方法¹³⁾によって測定した。

vi. コラーゲン分解活性

歯肉ホモジネートを遠心 (6,000g, 20分間) し、その沈渣を0.9% NaCl で洗った後、20mM NaCl および5mM CaCl₂ を含む50mM Tris-HCl (pH 7.8) に懸濁させ、その1 ml にペニシリン (200units) およびストレプトマイシン (250 μ g) を加え37°Cで20時間保温した。これを遠心 (10,000g, 20分間) して上清液と沈渣に分け、それぞれに含まれる Hyp 量を定量した。コラーゲンの分解は上清液と沈渣に含まれる総 Hyp 量に対する上清液中の Hyp 量の%として表わした¹⁴⁾。

結 果

1. コラーゲン分画

表1は歯肉組織のコラーゲンを溶解性の差異によって分画したときの結果を示す。疾患群の歯肉組織は対照に比べ透析性 Hyp 量が極めて高い値を示した。同様に塩および酸可溶性分画も疾患群が高い値を示した。これに対して不溶性コラーゲン分画は疾患群において減少を示した。

2. 可溶性蛋白と酸性加水分解酵素活性

表2は歯肉ホモジネート及びホモジネートの遠心後の上清液についてそれぞれの蛋白量と酸性加水分解酵素活性を示す。上清液中の可溶性の蛋白量は疾患群が対照群に比べ明らかに高い値を示した。一方、酸性 pH 域で活性を示す3種類の酵素活性についての結果は酸性フォスファターゼが疾患群でやや高い活性を示したがアリルスルファターゼおよびカテプシンD 活性は対照群と疾患群において顕著な差はみられなかった。

3. 中性プロテイナーゼ活性

表3は中性附近の pH 域で活性のあるカテプシン B₁ およびカテプシンG活性とコラーゲン分解活性に関する結果を示す。カテプシン B₁ 活性は疾患群の方が対照より約2倍の高い活性を示し、

* Ethylenediaminetetraacetate

Table 1. Hydroxyproline Contents of Gingival Collagen

Case No.	Collagen fractions (Hydroxyproline, %)			
	Dialyzable hydroxyproline	Salt-soluble	Citrate-soluble	Insoluble
1 (Control)	0.3	11.2	1.5	86.9
3 (Disease)	1.0	27.1	1.6	71.8
4 "	4.3	28.8	4.3	62.5
5 "	8.9	42.0	4.5	44.7
7 "	2.3	22.4	3.1	72.2

Table 2. Protein Contents and Acid Hydrolase Activities of Human Gingivae

Case No.	Protein (mg/ml)		Acid hydrolases (Units/mg protein)					
			Arylsulfatase		Cathepsin D		Acid phosphatase	
	Hom. ^{a)}	Sup. ^{b)}	Hom.	Sup.	Hom.	Sup.	Hom.	Sup.
1 (Control)	3.1	0.9(29%) ^{c)}	1.0	4.0	1.0	4.0	38.0	6.0
2 "	10.4	2.7(27%)	0.3	1.5	1.2	3.5	14.0	27.0
3 (Disease)	9.9	6.1(62%)	2.8	5.2	1.1	1.2	22.2	25.3
4 "	2.8	1.5(54%)	N.D. ^{d)}	N.D.	1.2	N.D.	32.7	31.0
5 "	3.8	2.1(55%)	N.D.	5.7	2.2	2.0	43.1	53.4
6 "	16.1	4.1(25%)	1.3	3.6	1.2	3.6	16.5	29.5
7 "	7.0	2.3(33%)	0.3	2.7	1.4	3.2	17.5	26.0

a) Homogenate.

b) Supernatant.

c) Percent of soluble protein in total homogenate.

d) Not determined.

Table 3. Activities of Proteinases with Optima around Neutral pH

Case No.	Cathepsin B ₁ (Units/mg protein)		Cathepsin G		Collagenolytic activity (Collagen digestion, %)		
	Hom.	Sup.	Hom.	Sup.	4°C	37°C	37°C EDTA*
2 (Control)	0.34	0.26	1.07	4.58	0.2	8.0	2.7
6 (Disease)	0.61	0.80	1.59	4.06	0.1	12.9	0.3
7 "	0.57	0.62	1.73	5.12	0.4	20.0	11.1
8 "	0.86	2.38	1.53	5.32	0.3	15.1	4.7
9 "	0.65	0.65	1.89	4.15	0.5	18.3	6.1

* EDTA (50 mM)

この活性は上清液において著明であった。しかし、カテプシンG活性はホモジネートおよび上清液共に対照と比較して疾患群に差は認められなかった。一方、コラーゲン分解活性を示すHypの遊離率については、4°Cにおける対照および疾患群の値に差は認められなかったが、37°Cに保温すると対照、疾患群共にHypの遊離が増大した。

この増加は疾患群においてより著明であった。また37°Cの保温中にコラゲナーゼの阻害剤であるEDTAを添加するとHyp遊離率は顕著に減少した。

考 察

結合組織は単なる力学的な支持組織であるばか

りでなく栄養物、電解質、ホルモン等の伝達やその緩衝作用あるいは炎症、免疫、治癒の場としての機能をもつ組織でもある。コラーゲンはこの結合組織の主要構成要素として生理的、病的に重要な役割を担っている。それ故、著者らは歯肉炎の歯肉結合組織に及ぼす影響を組織コラーゲンの性状変化とそれに関連する諸種酵素活性の動向から考察した。

炎症過程の進展に伴って結合組織のコラーゲンは量的および質的に変動することはよく知られていること³⁾、これは炎症の進行状態によるコラーゲンの合成および分解系の動的平衡関係の攪乱と考えられる。歯肉コラーゲンを可溶化法によって分画した著者らの結果は、対照例に比べ疾患群が透析性 Hyp 分画と塩および酸可溶性分画の増大を示し、不溶性分画が減少することを示した。この結果は炎症の程度の差異や測定法にもよるが、Stern¹⁵⁾がヒト炎症歯肉で行った結果ともよく一致していた。塩および酸可溶性コラーゲンの増大する機構は明らかではないが“depolymerase”や“cross-linkase”等の酵素作用によるコラーゲン分子間架橋の解体¹⁶⁾、あるいはコラーゲンの未成熟線維が増加した結果とも考えられる¹⁷⁾。透析性 Hyp 量が疾患群において対照より極めて大きかったことも炎症過程における結合組織のコラーゲン合成および分解系の異常を示すものと考えられる⁵⁾。

コラーゲン崩壊の機構としては現在2つのルートが考えられている¹⁸⁾。一つは細胞外において、コラーゲンとムコ多糖類複合体との解離が depolymerase 作用としてのエラスターゼやカテプシンGなどの作用によっておこり^{19,20)}、ついでコラゲナーゼによるコラーゲンの特異的な分解の後、非特異的なプロテイナーゼやペプチダーゼによって更に分解されていく過程である。もう一つは細胞内での崩壊であり、これは大食細胞や線維芽細胞等の貪食によるものである。この過程には細胞内リソゾーム酵素が関与し最近では特にカテプシン B₁ の作用が注目されている²¹⁾。歯肉組織におけるコラゲナーゼについては Fullmer²²⁾らの報告以来多くの研究がなされているが、そのほとんどが歯肉組織の培養によるものであり、直接的

にコラゲナーゼを組織から抽出して測定したものではない。これはコラゲナーゼが血清中の α_2 -マクログロブリンやその他組織中の阻害物によって不活性化されること、および不活性なプロコラゲナーゼとして存在するために通常の測定法では活性が測定できないことによるものと考えられている²³⁾。著者らは歯肉ホモジネート中のコラゲナーゼ活性を直接的に測定する試みとして、最近組織コラゲナーゼ活性の測定によく用いられている Na SCN 処理法²⁴⁾、トリプシンやヘパリン添加による活性化²⁵⁾、および熱処理法²⁶⁾等を行ったが、いずれの方法でもコラゲナーゼ活性を証明することはできなかった。そこで Woessner ら¹⁴⁾が分娩後のラット退縮子宮で測定した方法を適用して、歯肉ホモジネートの遠心後の沈渣を Ca²⁺ の存在下にインキュベートしたところ Hyp が遊離することを認めることができた。これは厳密な意味でのコラゲナーゼ活性ではないが、この活性が温度依存性であり、中性 pH でみられること、EDTA の添加によって著しい阻害を受けることから歯肉組織のコラーゲン分解にコラゲナーゼの関与を示すものとして理解できる。

最近、リソゾーム様の顆粒に含まれるカテプシン B₁ がコラーゲン分解に直接あるいは間接的に関与することが報告されている^{20,21)}。直接的な関与としては貪食されたコラーゲンの phagosomes 内での消化分解であり、これは酸性 pH で活性があるとされている。間接的なものとしては中性 pH 付近でプロコラゲナーゼの活性化に関与しているとするものである²⁷⁾。いずれにせよ広範囲 pH 域で活性のあるカテプシン B₁ がコラーゲン分解に関与していることは確かなものと思われる。著者らの結果も疾患群においてカテプシン B₁ 活性が上昇を示したことから、この酵素がコラーゲン分解活性を高め、コラーゲンの性状変化に影響するものと推察される。他方、カテプシンGは多核白血球等の顆粒中に見出されたキモトリプシン様酵素であるが²⁸⁾、この酵素の機能としては中性 pH においてプロテオグリカンに作用し、コラゲナーゼの作用を容易にすることが推測されている。著者らの結果からは、疾患群と対照においてカテプシンG活性に差異を認めることはできな

ったがこれはカテプシンGがコラゲナーゼと同様に血清成分の α_2 -マクログロブリンや α_1 -トリプシン阻害物などによって活性阻害を受けるためとも考えられ測定法の改良等今後の課題であろう。

リソゾーム由来の酸性加水分解酵素活性に関する著者らの結果は、酸性フォスファターゼが対照群に比べ疾患群にわずかの活性上昇を示したに過ぎず、アリルスルファターゼおよびカテプシンD活性には対照との差異は認められなかった。これらの結果は歯肉炎時にリソゾーム酵素活性が増大するという現在までの知見と矛盾するようであるが³⁾、その原因の一つに試料のとり方にも問題が

あると考えられる。著者らの用いた試料は切除歯肉の全ホモジネートであるため炎症部位と健常部位とが混合し、蛋白量当りの酵素活性値が見かけ上低く測定されたものと考えられる。他方、著者らが用いた歯肉組織は炎症性細胞浸潤が既にかきた後の二次的な崩壊段階のものである可能性も考えられ、これらの点に関しては歯肉組織の部位的な病理組織学的検索と平行した生化学的な検討を行うことが重要であろう。

謝辞：歯肉試料の採取に御助力をいただきました九州大学歯学部保存学青野正男教授および口腔外科学田代英雄教授に深謝いたします。

Summary: The biochemical changes in gingival connective tissue components under periodontitis were studied by determining the alterations in the quality of collagen and the activities of acid and neutral hydrolases in surgical specimens obtained from patients.

1) Soluble protein and dialyzable hydroxyproline contents were markedly increased in diseased gingivae as compared with clinically normal gingivae. Both salt-soluble and acid-soluble collagen in diseased tissues increased 2 or 3 fold over those in normal tissues.

2) There were no significant differences in acid hydrolase activities between diseased and normal tissues. Cathepsin B₁ and collagenolytic activities which were measured at neutral pH increased markedly in diseased gingivae. On the other hand, no significant difference in cathepsin G activity was noted between normal and diseased tissues.

These findings suggested that cathepsin B₁ and collagenase played an important role in the alteration of connective tissue components under periodontitis.

文 献

- 1) WINER, R. A., O'DONNELL, L. J., CHAU-NCEY, H. H. and MCNAMARA, T. F.: Enzyme activity in periodontal disease. *J. Periodont.*, **41**: 449-456, 1970.
- 2) ISHIKAWA, I., CIMASONI, G. and AHMAD-ZADEH, C.: Possible role of lysosomal enzyme in the pathogenesis of periodontitis: A study on cathepsin D in human gingival fluid. *Archs. Oral Biol.*, **17**: 111-117, 1972.
- 3) PAGE, R. C. and SCHROEDER, H. E.: Biochemical aspects of the connective tissue alterations in inflammatory gingiva and periodontal disease. *Int. Dent. J.*, **23**: 455-469, 1973.
- 4) JANOFF, A.: At least three human neutrophil lysosomal proteases are capable of degrading joint connective tissue. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **256**: 402-408, 1975.
- 5) KAWAMOTO, T. and NAGAI, Y.: Developmental changes in glucosaminoglycans, collagen and collagenase activity in embryonic chick skin. *Biochim. Biophys. Acta*, **437**: 190-199, 1976.
- 6) NIMNI, M. E. and BAVETTA, L. A.: Collagen defect induced by penicillamine. *Science*, **150**: 905-907, 1965.
- 7) KIVIRICKO, K. T., LAITINE, O. and PROCKOP, D. J.: Modification of a specific assay for hydroxyproline in urine. *Anal. Biochem.*, **19**: 249-255, 1967.
- 8) NEIL, M. W. and HORNER, M. W.: Studies on acid hydrolase in adult and foetal tissues, acid p-nitrophenylphosphohydrolases of adult guinea-pig liver. *Biochem. J.*, **92**: 217-224, 1964.
- 9) LOWRY, O. H., ROSENBOUGH, N. J. FARR, A. L. and RANDALL, R. J.: Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**: 265-275, 1951.
- 10) COHN, Z. and WIENER, E.: The particu-

- ate hydrolases of macrophages. I. Comparative enzymology, isolation and properties. *J. Exp. Med.*, **118** : 991-1008, 1963.
- 11) ROY, A. B. : The sulphatase of ox liver. 1. The complex nature of the enzyme. *Biochem. J.*, **53** : 12-15, 1953.
 - 12) BARRETT, A. J. : A new assay for cathepsin B₁ and other thiol proteinases. *Anal. Biochem.*, **47** : 280-293, 1972.
 - 13) STARKEY, P. M. and BARRETT, A. J. : Neutral proteinases of human spleen : Purification and criteria for homogeneity of elastase and cathepsin G. *Biochem. J.*, **155** : 255-263, 1976.
 - 14) WOESSNER, J. F. Jr. and RYAN, J. N. : Collagenase activity in homogenates of the involuting rat uterus. *Biochim. Biophys. Acta*, **309** : 397-405, 1973.
 - 15) STERN, B. D. : Collagen solubility of normal and inflamed human gingivae. *Periodontics*, **5** : 167-171, 1967.
 - 16) MILSOM, D. W., STEVEN, F. S., HUNTER, J. A. A., THOMAS, H. and JACKSON, D. S. : Depolymerisation of human and bovine polymeric collagen fibrils. *Connect. Tissue Res.*, **1** : 251-265, 1972.
 - 17) PIEZ, K. A. : Cross-linking of collagen and elastin. *Ann. Rev. Biochem.*, **37** : 547-570, 1968.
 - 18) BURLEIGH, M. C. : Degradation of collagen by nonspecific proteinases. In *Proteinases in mammalian cells and tissues.*, pp. 285-307 (ed. Barrett A. J.) Elsevier North-Holland Biomedical Press, 1977.
 - 19) JANOFF, A. : Mediators of tissue damage in leukocyte lysosomes. X. Further studies on human granulocyte elastase. *Lab. Invest.*, **22** : 228-236, 1970.
 - 20) STARKEY, P. M. and BARRETT, A. J. : Human lysosomal elastase, catalytic and immunological properties. *Biochem. J.* **155** : 265-271, 1976.
 - 21) BURLEIGH, M. C., BARRETT, A. J. and LAZARUS, G. S. : Cathepsin B₁ ; A lysosomal enzyme that degrades native collagen. *Biochem. J.*, **137** : 387-398, 1974.
 - 22) FULLMER, H. M. and GIGSSON, W. : Collagenolytic activity in gingiva of man. *Nature*, **209** : 728-729, 1966.
 - 23) NAGAI, Y., HORI, H., KAWAMOTO, T. and KOMIYA, M. : A regulation mechanism of collagenase activity *in vitro* and *in vivo*. In *Dynamics of connective tissue macromolecules.*, pp. 171-183, (ed. Burleigh, P. M. C. and Poole, A. R.) North-Holland Publishing Company-Amsterdam-Oxford, American Elsevier Publishing Co., Inc.-New York.
 - 24) NAGAI, Y. : Vertebrate collagenase ; Further characterization and the significance of its latent form *in vitro*. *Mol. Cell. Biochem.*, **1** : 137-145, 1973.
 - 25) SAKAMOTO, S., SAKAMOTO, M., GOLDHABER, P. and GILMCHER, M. J. : Studies on the interaction between heparin and mouse bone collagenase. *Biochim. Biophys. Acta*, **385** : 41-50, 1975.
 - 26) WEEKS, J. G., HALME, J. and WOESSNER, F. Jr. : Extraction of collagenase from the involuting rat uterus. *Biochim. Biophys. Acta*, **445** : 205-214, 1976.
 - 27) EECKHOUT, Y. and VEAS, G. : Further studies on the activation of procollagenase, the latent precursor of bone collagenase. *Biochem. J.* **166** : 21-31, 1977.
 - 28) SCHMIDT, W. and HAVEMANN, K. : Isolation of elastase-like and chymotrypsin-like neutral protease from human granulocytes. *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* **355** : 1077-1082, 1974.