歯周疾患とカテプシン B, H, および L

國松和司・市丸英二・加藤伊八^{*1)}, 山本健二・加藤有三^{*2)}

Cathepsins B, H and L activities in gingival crevicular fluid from patients with chronic adult periodontitis To clarify a role of lysosomal cysteine proteinases, cathepsins B, H and L in periodontal tissue destruction, levels of their activities in gingival crevicular fluid (GCF) from patients with chronic adult periodontitis were determined using 4-methyl-7-coumarylamide substrates. All of the enzyme activities were positively correlated with the GCF volume, but not with the probing depth. Higher levels of the respective activities were found at sites with more serious signs of periodontal disease. The specific activity of each enzyme in GCF, however, was progressively decreased as the GCF volume increased, indicating the negative correlation between GCF volume and each enzyme activity. The results also suggest that cathepsins B, H and L are selectively released into gingival crevices at a mild stage of the periodontitis and that the levels of these enzymes in the GCF may be clinical parameters that reflect the degree of the periodontal tissue destruction.

Kazushi Kunimatsu・Eiji Ichimaru・Ihachi Kato^{*1)}, Kenji Yamamoto・Yuzo Kato^{*2)}

^{*1)}Department of Periodontology, Nagasaki University School of Dentistry

^{*2)}Department of Pharmacology, Nagasaki University School of Dentistry

key words : cathepsin B, cathepsin H, cathepsin L, periodontitis
gingival crevicular fluid

歯周疾患の発症ならびに進行因子としてプラーク(歯垢)や歯周ポケット内の細菌は、もっとも重要な存在であることは周知の事実である。歯周疾患は、まず、これらの細菌やその代謝産物によって宿主側が刺激され、非特異的な炎症としてはじまる。その後、宿主側にこれらに対する抗体が産出され、免疫反応を伴う慢性炎症性の免疫疾患として確立される。歯周疾患の主たる病態が、歯肉上皮ならびに結合組織などの比較的表面層に存在する歯周組織の破壊と、それに引きつづき起こる歯槽骨の吸収であることを考えると、それらを引き起こす宿主側の破壊因子と、それらの調節機構の研究は非常に重要であると思われる。

一般に、歯周疾患における歯周組織の破壊は、好中球およびマクロファージなどの炎症性細胞や線維芽細胞および上皮細胞などの非炎症性細胞から遊離される多くのリソゾーム性酵素(たとえばカテプシン群や中性プロテアーゼ群)ならびに活性酸素などによって、直接あるいは間接に引き起こされるものと考えられている¹⁻³⁾。

筆者らを含め他の多くの研究者によって、炎症による歯周組織の破壊過程を酵素化学的に解明するために、その破壊に関与すると考えられている各種プロテアーゼの同定と定量化が試みられてきた。しかしながら、今日まで、本疾患における歯周組織の破壊過程でいかなるプロ

テアーゼがどのような形で機能しているかなど、プロテアーゼの機能の詳細についてはほとんど解明されていない。

最近、歯肉溝滲出液中に検出されるコラゲナーゼ活性と歯周疾患の病勢の間に相関関係があることが示されているが^{4,5)}、炎症局所における酵素の調節機構(たとえば、インヒビター TIMP などとの関係)や免疫学的測定に基づいた酵素量の変化など不明な点が多く残されている。

本稿では、歯周疾患患者の歯肉溝滲出液に含まれるリソゾーム性システインプロテアーゼ、カテプシン B, H, および L の活性を測定し、本疾患の病勢との関連性について検討したので、その結果を述べる。

方 法

(1) 材 料

被検者は、長崎大学歯学部附属病院第2保存科を受診した患者で、軽度から高度の歯周炎を有し、全身の疾患を持たない平均年齢46.6歳(30~62歳)の13名(男6名, 女7名)である。被検部位は、X線写真上で明らかな垂直性の歯槽骨吸収の認められる歯周ポケット(合計48カ所)を任意に選択した。

(2) 試料の採取

歯肉溝滲出液(gingival crevicular fluid, GCF)の採取は以下の要領で行った。まず、簡易防湿後、歯肉縁上プラークを注意深く除去し、スリーウェイシリンジにてポ

^{*1)} 長崎大学歯学部歯科保存学第二講座

^{*2)} 同 歯科薬理学講座

図 1 GCF cathepsin B activity as functions of GCF volume (a) and probing depth (b) in chronic adult periodontitis groups

The GCF volumes were determined by Periortron readings. Cathepsin B activity in GCF collected from sites in patients with periodontitis was determined by using Z-Arg-Arg-MCA as a substrate. Sampling and extraction of the enzyme were carried out as described in "Materials and Methods".

ケット内を軽く洗浄・乾燥後、ペリオペーパー®(HAR-601, Harco)を30秒間歯周ポケット内へわずかに抵抗の感じられるまで挿入し、貯留 GCF を吸湿除去した。ただちに、新しいペリオペーパー®を同じ部位に3分間静置したあとに、吸湿採取し、これを歯周ポケット内に流出してくる GCF 試料とした。採取した GCF は、ペリオトロロン6000®(Harco)にて GCF 量を計測し、あらかじめ氷冷しておいた 300 μ l の 10 mM リン酸緩衝液 (pH 6.5) に浸し、0°C で 5~6 時間放置した。その後、試料を5分間超音波処理にかけ、遠心したあと、上清を抽出液として実験に供した。

(3) 酵素活性の測定および蛋白質定量

カテプシン B, H および L は、それぞれ Z-Arg-Arg-MCA, Arg-MCA, および Z-Phe-Arg-MCA を基質と

図 2 GCF cathepsin H activity as functions of GCF volume (a) and probing depth (b) in chronic adult periodontitis groups

Cathepsin H activity was determined by using Arg-MCA as a substrate. Other details are the same as described in Fig. 1.

して Barrett らの方法⁶⁾に従って測定した。蛋白質の定量は Lowry らの方法⁷⁾に従って行った。

(4) 歯周ポケットの深さ(PD)の測定

平型両頭のポケット探針(山浦)を用い、挿入圧約 25 g で測定し、mm 単位で表した。

(5) 統計処理

相関係数の有意差の検定は、Student の t 検定によった。

結 果

カテプシン B の GCF 中の活性量は、GCF 量の増加に比例して増加した(図 1 a)。ペリオトロロンでのユニット値が20のときの活性値は、1.2 mU/tube、ユニット値 55のときには 4.8 mU/tube となり、約 4 倍に増加した。カテプシン B の活性量の変化と GCF 量の変化の間には非常に高い相関(相関係数 0.71, $P < 0.001$)が認められた。これに対し、カテプシン B の活性量の変化と PD の

図3 GCF cathepsin L activity as functions of GCF volume (a) and probing depth (b) in chronic adult periodontitis groups. Cathepsin L activity was determined by using Z-Phe-Arg-MCA as a substrate. Other details are the same as described in Fig. 1.

変化の間にはほとんど相関が認められなかった(図1b)。また、カテプシンHの活性量は、カテプシンBの場合と同様、GCF量の増加に比例して増加した(図2a)(相関係数0.69, $P < 0.001$)。これに対し、PDとの間には相関は認められなかった(図2b)。

一方、カテプシンLの活性量は、上記二つの酵素と同様に、GCF量の増加に比例して増加したが、その相関係数は0.77($P < 0.001$)と最も高い相関を示した(図3a)。また、カテプシンLは、PDに関しても低いながらも相関を示した(相関係数0.34, $P < 0.05$)(図3b)。

つぎに、各酵素の歯周ポケットへの滲出の仕方を検討するために、GCF中に含まれる蛋白質当りの活性値(比活性値)を求めた。カテプシンBは図4に示したごとく、全活性量のパターンと違って、GCF量の増加に逆比例して比活性値は減少した。このときの相関係数は -0.43 ($P < 0.02$)で有意な相関が認められた。カテプシンBと同様の結果は、カテプシンHおよびLでも得られた(図

図4 specific activity of GCF cathepsin B as functions of GCF volume (a) and probing depth (b) in chronic adult periodontitis groups. The specific activity is defined as nmol of 7-amino-4-methylcoumarin (MCA) released from Z-Arg-Arg-MCA per min per mg GCF protein.

5および6)。それぞれの相関係数は、カテプシンHで -0.39 ($P < 0.05$)、カテプシンLで -0.39 ($P < 0.02$)であり、明らかにGCF量の変化と負の相関を示した。これらの結果は、GCF量が少ない段階、すなわち歯周疾患の病勢がまだ弱いと思われる段階で、カテプシンB、HおよびLは濃縮されて歯周ポケット内に遊出していることを示している。

一方、各酵素の比活性値とPD値の間にはまったく相関が認められなかった。

考 察

日常の臨床において、歯周疾患の診査・診断にもっともよく用いられるパラメーターは、歯周ポケットの深さ(PD)、歯肉の炎症状態を示す歯肉炎指数(GI)、歯肉溝の滲出液量(GCF)、歯の動揺の程度やX線写真からの歯槽骨吸収状態であろう。これらのパラメーターは、現状における病勢を把握し、治療をするうえで重要であると考えられている。

図5 specific activity of GCF cathepsin H as functions of GCF volume (a) and probing depth (b) in chronic adult periodontitis groups

The specific activity is defined as nmol of 7-amino-4-methylcoumarin(MCA) released from Arg-MCA per min per mg GCF protein.

それゆえ、これらパラメーターと GCF 中に含まれる各種酵素との相関を追究した研究は多い。特に、PD との相関を調べたものが多く、PD と相関があると報告された酵素の中には、アルカリ性フォスファターゼ⁸⁾、 β -グルクロニダーゼ⁹⁾、エラスターゼ¹⁰⁾、カテプシン D^{11,12)} およびコラゲナーゼ¹³⁾などがある。

本研究の結果は、カテプシン B、H および L のいずれの酵素も PD との相関はきわめて低いか、ほとんど認められなかった。これは、PD が過去の炎症による歯周組織破壊の結果を示すものであって、必ずしも現状における組織破壊の活性度を反映するものではないという所見¹⁴⁾に一致するものである。これは、現状における歯周組織の破壊の進行度(歯周病変活性度)を正確に把握するためには、PD 値のみでは不十分であり、他の有効なパラメーターの探索が必要であることを示している。GI は、歯周疾患の有効な臨床パラメーターであるが、本研究では、明らかな歯周組織破壊の認められる初診時の歯

図6 specific activity of GCF cathepsin L as functions of GCF volume (a) and probing depth (b) in chronic adult periodontitis groups

The specific activity is defined as nmol of 7-amino-4-methylcoumarin (MCA) released from Z-Phe-Arg-MCA per min per mg GCF protein.

周ポケットで、しかも、自然出血や排膿の認められない部位を対象として用いているため、GI 値はすべて1か2と判定されるものであった。

また、GI 値については、分類の基準が比較的大まかなため、本研究では、歯周疾患の成立過程や活性度の詳細を解析するためには用いることはできなかった。

PD とともに重要視されているもう一つの臨床パラメーターに GCF 量がある。GCF は、微量であるために注意ぶかい採取技術を要するが、ペリオペーパー®を用いれば比較的容易に液量を測定することができる。一般に、GCF 量は歯周疾患の進行程度と相関があるといわれていることから¹⁵⁾、多くの研究者によってそのに含まれるさまざまな成分の解析が試みられてきた。しかし、歯周疾患の病勢変化に伴う GCF 中のプロテアーゼの動態変化についての検討はほとんどなされていない。

今回の筆者らの結果は、代表的なリソゾーム性システインプロテアーゼのカテプシン B、H、および L の活性

量が、いずれも GCF 量と非常に高い相関を持つことが示された。これは、これらの酵素の正確な動態を把握することによって、歯周組織の破壊の進行程度を知ることができることを示唆したものである。また、これらの酵素の比活性が、GCF 量と負の相関を示したことは、これらの酵素が歯周組織の破壊過程の初期の段階で高濃度を選択的に歯周ポケット内に遊出してくることを示唆している。

今回の実験は、歯周疾患における歯周組織の破壊の程度と活性度を各種プロテアーゼの動態から把握することによって、正確な診断と治療に関する情報を得ようとしたものであり、各酵素の同定と定量化を必須の課題としていた。したがって、今回のように酵素活性を指標として研究を進める場合、それぞれの酵素を分別できる特異的基質の存在が必要である。しかし、今回用いた基質は、それぞれ特異性は高いものの、カテプシン B に対するものを除けば、必ずしもそれぞれの酵素に対しての唯一絶対のものではなかった。また、生体の組織や血中には多くの内在性インヒビターが存在しており、それらが歯肉溝滲出液に含まれている可能性が十分考えられ、酵素活性のみによる結果からでは、各酵素の GCF 中の動態を正確に把握しているとはいえない。もちろん、酵素活性が検出されるということは、歯周組織の破壊過程で、これらのプロテアーゼが active な状態で積極的な役割を果たしていることを強く示唆している点で意義が大きい。

今後は、歯周疾患の進行過程における各酵素の正確な動態を把握するためには、活性量の測定とともに、各酵素に対する特異抗体を用いた免疫学的定量が必要であり、筆者らは、これを今後の課題としている。

本研究の一部は、文部省科学研究費総合研究(A)(課題番号61304054)によって行われた。

文 献

- 1) Cimagoni, G.: Crevicular fluid updated. Basel: Karger, 1983, p 84-102.
- 2) Sandholm, L.: Proteases and their inhibitors in chronic inflammatory periodontal disease. J. Clin. Periodontol. 13: 19-26, 1986.
- 3) Bartold, P.M., Wiebkin, O.W., Thonard, J.C.: The effect of oxygen-derived free radicals on gingival proteoglycans and hyaluronic acid. J. Periodont. Res. 19: 390-400, 1984.
- 4) Kowashi, Y., Jaccard, F., Cimagoni, G.: Increase of free collagenase and neutral protease activities in the gingival crevice during experimental gingivitis in man. Archs oral Biol. 24: 645-650, 1979.
- 5) Kryshtalskyj, J.E., Sodek, J., Ferrier, J.M.: Correlation of collagenolytic enzymes and inhibitors in gingival crevicular fluid with clinical and microscopic changes in experimental periodontitis in the dog. Archs oral Biol. 31: 21-31, 1986.
- 6) Barrett, A.J., Kirschke, H.: Cathepsin B, Cathepsin, H., Cathepsin, L.: Methods Enzymol. 80: 535-561, 1981.
- 7) Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J.: Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193: 265-275, 1951.
- 8) Ishikawa, I., Cimagoni, G.: Alkaline phosphatase in human gingival fluid and its relation to periodontitis. Archs oral Biol. 15: 1401-1404, 1970.
- 9) Bang, J., Cimagoni, G., Held, A.J.: Beta-glucuronidase correlated with inflammation in the exudate from human gingiva. Archs oral Biol. 15: 445-451, 1970.
- 10) 中村正一: 歯周疾患と歯肉浸出液および唾液中の Protease 活性との関係について. 日歯周誌 21: 429-434, 1979.
- 11) Ishikawa, I., Cimagoni, G., Ahmad-Zadeh, C.: Possible role of lysosomal enzymes in the pathogenesis of periodontitis: A study on cathepsin D in human gingival fluid. Archs oral Biol. 17: 111-117, 1972.
- 12) Lah, T., Skalerič, U., Babnik, J., Turk, V.: Detection of cathepsin L-like proteinase and cathepsin D in gingival fluid. J. Periodont. Res. 21: 504-509, 1986.
- 13) Golub, L.M., Siegel, K., Ramamurthy, N.S., Mandel, I.D.: Some characteristics of collagenase activity in gingival crevicular fluid and its relationship to gingival disease in humans. J. Dent. Res. 55: 1049-1057, 1976.
- 14) Haffajee, A.D., Socransky, S.S., Goodson, J.M.: Clinical parameters as predictors of destructive periodontal disease activity. J. Clin. Periodontol. 10: 257-265, 1983.
- 15) Löe, H., Holm-Pedersen, P.: Absence and presence of fluid from normal and inflamed gingiva. Periodontics 3: 171-177, 1965.