ヒト病的歯肉結合組織成分に関する研究

I. ヘキソサミンならびにコラーゲン量について

岩 山 幸 雄 野 村 慶 雄 勝 谷 芳 文
津 谷 啓 治 石 田 浩 喜 多 治 郎
三 木 隆 雄 栢 豪 洋 横 溝 一 郎

大阪大学歯学部口腔治療学教室

足 達 綱三郎

大阪大学歯学部生化学教室

Studies on Gingival Connective Tissue Components of Patients with Periodontal Disease

1. Hexosamine and Collagen Contents

Yukio IWAYAMA, Yoshio NOMURA, Yoshifumi KATSUTANI, Keiji TSUTANI,
Hiroshi ISHIDA, Jiro KITA, Takao MIKI, Hidehiro KAYA, and Ichiro YOKOMIZO

Department of Endodontics and Periodontics, School of Dentistry, Osaka University

Kozaburo ADACHI

Department of Biochemistry, School of Dentistry, Osaka University

Inflammatory changes of hexosamine and collagen in the human gingival tissues were studied quantitatively.

Careful comparison was made between the free gingiva as a severely diseased tissue and the attached gingiva as a least diseased one.

It has been demonstrated that hexosamine in a higher level and collagen in a lower level were present in the free gingival tissue by comparison with the attached gingival tissue.

緒 言

結合組織の主要な構成成分は、線維成分としてのコラーゲンと基質成分としてのグリコサミノグリカン（以下GAGと略す）であり、両者とも炎症に密接に関係して変動することが多くの実験成績によって示されてきた。一般に炎症の初期において、不溶性コラーゲンは正常組織に比して低い値を示すが、15～16日後には正常レベル

に回復するという結果が実験的炎症を中心に得られている¹⁾。

すなわち、Houck²⁾は、クロトンオイルを起炎剤としてラットの皮膚に急性炎症を惹起し不溶性コラーゲンを測定したところ、起炎後2日目ですでに対照の60%にまで減少し、7日目まではほぼ一定の値を示すが14日目には約70%、23日目にはほぼ対照値に戻ることを報告した。また Sakata³⁾は、家兎の背部皮膚に4 cm²の切傷をつくり、3日から14日までの創傷治癒過程にお

けるコラーゲンの変動について検討した。その結果、不溶性コラーゲンは3日目には健康値の55%, 6日目には65, 10日目には72%と漸次増加し, 14日目には83%にまで回復したとのべている。Reynold⁴⁾も, また, ラット皮膚の開放切創を用いた実験において, 減少した総コラーゲンは15日目には元の値に戻ることを報告している。

歯肉コラーゲンについても, 歯肉炎症との関連性について近年2, 3の報告がなされている。Flieder⁵⁾は, ヒト炎症歯肉は非炎症歯肉に比してコラーゲン性蛋白が減少し, 非コラーゲン性蛋白が著明に増加することを報告した。また, Stern⁶⁾は, 不溶性コラーゲンはヒト炎症歯肉においては, 正常歯肉に比して大幅に減少したとのべている。

一方, ヘキシサミンについては, Baggi⁷⁾の研究以来, 皮膚を中心に多くの報告がみられる。それらのほとんどは実験的急性炎症をあつかったものであり, それらに共通していえることは, 炎症中心部のヘキシサミン量は炎症の発現とともに急速に増加し, その後安定した一時期を経て次第に減少して正常値に戻るというパターンが存在することである。しかし歯肉のヘキシサミンについての研究はきわめて少ない。岩山⁸⁾は, ヒト炎症歯肉の総ヘキシサミンと臨床的歯肉炎症所見との関連性について追求したが, 両者の間には有意の関連性は認められなかったと報告した。最近, Ciancio⁹⁾は, ヒト炎症歯肉についてグルクロン酸ならびにヘキシサミンを定量した結果, 両者とも正常組織のそれに比して約35%減少していることを明らかにし, これは細菌酵素によって歯肉コラーゲンが分解を受けやすくさせるためであろうと推察した。

以上のごとく, 歯肉コラーゲンについては皮膚で行なわれた実験的炎症の結果とほぼ一致するが, GAG についての Ciancio⁹⁾らの結果については先人の報告と一致するにいたっていない。歯肉の結合組織の正常性は, 上皮付着の耐性を大きく左右するといわれている。また, 辺縁性歯周組織炎のような慢性的性格をもったものについては, 炎症の進行とも関係した結合組織の生化学的変動を知ること, はなはだ興味のあることである。したがって, 歯周病において, 歯肉コラーゲンならびに GAG 炎の症性変化を追求することが, すなわち, この疾患の病態の推移を追求する一つの手懸りになると考えられる。このような意味で著者らは, ヒト病的歯肉に含有される総コラーゲン量をヒドロキシプロリンを指標として, また GAG をヘキシサミンを指標として追求し, 歯

図1 組織採取の模式図

肉炎症との関連性について検討するために本実験を行なった。

材料と方法

1) 被検歯肉

大阪大学歯学部付属病院歯周病診療室で歯肉切除を行なった年齢17~45歳の40名（男性14名, 女性26名）の患者の歯肉を被検材料として用いた。年齢の内わけは10代2名, 20代16名, 30代18名, 40代4名で大半は20~39歳であった。切除部位ならびに病型については制限を加えなかった。得られた歯肉は切除後ただちに生理的食塩水で十分洗滌を行ない, 乳頭部を中心とした遊離歯肉部（A部）と付着歯肉部を中心とした部分（B部）に分離した（図1）。採取した歯肉を両部に分離したのは, 考察のところで述べるように, 検鏡的所見で両部の間には炎症の程度に所見差が認められたので, 採取した同一被検材料での部位的な異りによる炎症の程度差を利用して, 後述するようにB部をA部の対照として用いたのである。上記のような理由で分離したA部, B部をそれぞれミンチ状に細切し, エーテル・アセトン混合液で24時間脱脂, 脱水を行ない, さらに一晚60°Cで乾燥を行なった。一部をヒドロキシプロリン定量用に残し, 他の大部分をGAG抽出のために使用した。

2) GAGの抽出

GAGの抽出はSvejar¹⁰⁾の方法に準じた。すなわち, A部, B部をそれぞれ乾燥試料（10~30mg）をScrew Cap 付きの試験管に入れて, これに1~2mlの0.5M Tris Buffer (pH 7.5)を加え20分間煮沸を行なった。つづいて乾燥重量1mgあたり10μgのプロ

表 1 ヒト病的菌肉のヘキソサミン量

	No.	$\mu\text{g}/\text{mg dry weight}$
A	40	1.28 ± 0.55
B	40	0.97 ± 0.41

図 2 ヒト病的菌肉のヘキソサミン比

ナーゼを加えて 65°C で 24 時間蛋白消化を行なった。プロナーゼ処理後、100% のトリクロール酢酸を最終濃度 5% になるように加えて遠沈し、沈澱物を 5% のトリクロール酢酸を加えて遠沈した。この上清に 5% の酢酸カリを含む 3 倍量のエタノールを加えて、一夜 4°C で放置し、GAG を沈澱せしめ、遠沈により粗 GAG を得た。

ヘキソサミンの定量は Erson-Morgan 法¹¹⁾に準じた。

3) 総コラーゲンの定量

乾燥試料 (5~10 mg) を 110°C で 16 時間 6 N 塩酸のもとに加水分解を行ない、これを減圧濃縮後 Dowex 50×8, 200~400 mesh の陽イオン交換樹脂を用いてカラムクロマトグラフィーを行なった。すなわち、試料を内径 1 cm, 高さ 15 cm のカラムに注入して 1 N HCl で溶出を行ない、ハイドロキシプロリンを他の妨害物質から分離し、えられたハイドロキシプロリンを Newman-Logan 法¹²⁾にしたがって比色定量を行なった。コラーゲン量はハイドロキシプロリン量からコラーゲン量を算出する一般的方法に準じて算出した¹³⁾。

結 果

1) ヘキソサミン

40 例の菌肉について、乳頭部を中心とした遊離菌肉部 (A 部) と付着菌肉部を中心とした部分 (B 部) についてヘキソサミン量を測定した結果、A 部は B 部に比して高い値を示した (表 1)。測定した B 部のヘキソサミン値を 100 とし、それぞれに対応する A 部のヘキソサミン

表 2 ヒト病的菌肉のコラーゲン量

	No.	$\mu\text{g}/\text{mg dry weight}$
A	24	197.7 ± 78.3
B	24	321.5 ± 76.8

図 3 ヒト病的菌肉のコラーゲン比

表 3 ヒト病的菌肉のヘキソサミンコラーゲン

	No.	$\mu\text{g}/\text{mg}$
A	22	5.9 ± 3.4
B	22	2.8 ± 1.3

の比の平均値をあらわしたのが図 2 である。A 部は $134 \pm 32\%$ となり、B 部に比して明らかに高い比率を示した。このことは、遊離菌肉部を中心とした部分は、付着菌肉部を中心とした部分に比してヘキソサミン量が多いことを示している。

2) 総コラーゲン

測定した 24 例の菌肉総コラーゲン量は、B 部に比して A 部が低い値を示した (表 2)。また、B 部のコラーゲン値を 100 としそれぞれに対応する A 部のコラーゲンの比の平均値は $61 \pm 21\%$ となり (図 3)、ヘキソサミンの場合とは、逆に B 部に比して A 部は低い値を示した。

3) ヘキソサミン/コラーゲン比

組織乾燥重量 1 mg あたりのヘキソサミン値とコラーゲン値の比をあらわしたのが表 3 である。A 部は B 部に比して約 2 倍の値を示した。1), 2) と同じく、それぞれの B 部の値を 100 としそれぞれに対応する A 部の比の平均値をあらわしてみると $195 \pm 76\%$ となり、B 部に比して約 2 倍の値となった。

考 察

ヒト病的菌肉は、菌肉切除術、菌肉剝離搔爬術などの

図 4 ヒト病的菌肉のヘキソサミン/コラーゲン比

ばずと考えられる factor (aging, 個体差, 性差等) を除くことが可能である。実際, B 部に対する A 部のヘキシサミンの比は, 個々の測定値よりかなり安定した値を示した (図 2)。一方, コラーゲン量についてもヘキシサミンと同様の結果が得られた。測定値の標準偏差値はかなり大きい (表 2), B 部に対する A 部の比は個々の測定値に比して安定した値を示した (図 3)。

一般に急性炎症においては, 不溶性コラーゲンが減少²⁾³⁾, ヘキシサミンは増加する¹⁴⁾¹⁵⁾といわれている。著者らの用いたヒト病的歯肉は, 慢性あるいは亜急性炎症の状態であると考えられるが, B 部に比して, A 部はヘキシサミンについては約 30% の増加であり, 総コラーゲンについては約 40% の減少であった。すなわち, 炎症の severe な部分は mild な部分あるいはほとんどない部分に比して, ヘキシサミンは増加しコラーゲンは減少した。この結果は, 皮膚等の実験的急性炎症を用いて行なった先人の成績と一致した。しかしながら, ヘキシサミンについては Ciancio ら⁹⁾の成績とは逆の結果となった。著者らの結果と, Ciancio らの結果のどちらかが事実であるかということについては, いまだ Data も不十分でありさらに検討を加えなければならないと考えている。しかし Synobial tissue から得た fibroblast のヒアルロン酸合成は, 白血球によって 2~6 倍に促進されるという Yaron & Caster¹⁷⁾ の報告は, 炎症時の GAG の動向を示唆するものと思われる。

一方, ヒト歯肉コラーゲンについて, Flieder⁵⁾ は Normal に比して inflamed gingiva が約 60% 減少すると報告した。また Stern⁶⁾ も不溶性コラーゲンの減少は normal に比して Inflamed fibrotic gingiva は約 30% であり, Inflamed edematous gingiva は約 37% であったとのべている。Stern の結果は, 炎症時におけるヒト歯肉コラーゲンの減少率が, 約 40% であったという著者らの結果と合致した。

また, コラーゲンを base にしたヘキシサミン値と, 乾燥重量を base にしたヘキシサミン値を, B 部に対する A 部の比でみてみると前者の方が後者よりも大きい値を示した。

このことは逆の方向に変動する 2 つの因子が存在する歯肉の慢性炎症時においては, 乾燥重量よりも両者を関連させた表し方, すなわち, 減少するコラーゲンを base して, 増加するヘキシサミンの値を示すことの方が, 炎症による変化をより適確に把握することになるのではないと思われる。Sobel¹⁶⁾は, ヘキシサミン/コラーゲン比 (H/C) を老化の生化学指標とする考え方を発表して

いる。

すなわち, 一般に加齢とともに線維成分であるコラーゲンが増加し, 基質成分であるヘキシサミンが減少することに着目し, (H/C) を Biochemical age と名付けているが, これも逆の方向に変動する 2 つの因子をからみあわせて, 適確に老化をあらわそうとする試みであるように思われる。

本実験においては, ヒト病的歯肉のヘキシサミン量と, 総コラーゲン量について検討を加えたが, この 2 つの因子のみで歯肉炎症を論ずることは早計であろう。GAG については, いまひとつの主要構成成分であるウロン酸, さらには, ヒアルロン酸, コンドロイチン硫酸, デルマトン硫酸等の個々の酸性ムコ多糖体について検討を加える必要があり, またコラーゲンについても可溶性コラーゲンの動向について検索する必要がある。こういった結合組織成分の変動を明らかにすることは, 歯周病の病態を明らかにするための重要な課題であろう。

結 論

歯周病の外科療法の際に得られた歯肉を, 乳頭部を中心とした遊離歯肉部 (A 部) と, 付着歯肉部を中心とした部分 (B 部) に分離し, それぞれについて, ヘキシサミン量ならびに総コラーゲン量を測定して次の結果を得た。

- 1) ヘキシサミン量は B 部に比して A 部は約 30% の増加を示した。
- 2) 総コラーゲン量については, B 部に比して A 部は約 40% の減少を示した。
- 3) ヘキシサミン/コラーゲン比は, B 部に比して A 部は約 2 倍の値を示した。

以上の結果にもとづき, ヘキシサミンならびにコラーゲンの A 部と B 部についての測定の意義ならびに炎症との関連性について考察を加えた。

本論文の要旨は昭和 49 年 10 月の第 17 回歯周病学会において発表した。

文 献

- 1) Delauney, A. and Bazin, S.: Mucopolysaccharides, collagen and nonfibrillar proteins in inflammation. in International Review of Connective Tissue Research. (Hall, D.A., editor) New York and London. 1964. Acad-

- emic Press. 2 : 301.
- 2) Houck, J.R. and Jacob, R.A. : The chemistry of local dermal inflammation. *J. invest. Dermatology*. 36 : 451, 1961.
 - 3) Sakata, R. : Biochemical studies on the collagen metabolism. 3. Collagen metabolism in healing wounds. *Kumamoto med. J.* 13 : 54, 1960.
 - 4) Reynolds, B.L. et al. : Metabolic parameters in the healing of open skin wounds in animals. *American Surgeon*. 29 : 325, 1963.
 - 5) Flieder, D.E. et al. : Chemistry of normal and inflamed human gingival tissues. *Periodontics*. 4 : 302, 1966.
 - 6) Stern, B.T. : Collagen solubility of normal and inflamed human gingiva. *Periodontics*. 5 : 167, 1967.
 - 7) Baggi, G.F. and Prodi, G. : *Boll. Soc. Ital. Biol. Sper.* 29 : 1, 1953. in *International connective tissue reseach*. (Hall, D.A., editor) 2 : 304, 1964.
 - 8) 岩山ほか : 歯周病患者の歯肉コラゲナーゼ活性, *阪大歯誌*, 17 : 116, 1972.
 - 9) Ciancio, S.G. and Mather, M.L. : Acid mucopolysaccharides in gingivitis and periodontitis. *J. periodont. Res.* 6 : 188, 1971.
 - 10) Svejcar, J. and Robertson, W.B. : Micro separation and determination of mammalian acidic glycosaminoglycans (Mucopolysaccharides) *Anal. Biochem.* 18 : 333, 1967.
 - 11) Elson, L.A. and Morgan, W.T. : A colorimetric method for the determination of glucosamine and chondrosamine. *Biochem. J.* 27 : 1824, 1933.
 - 12) Newman, R.E. and Logan, M.A. : The determination of hydroxyproline. *J. Biol. Chem.* 184 : 299, 1950.
 - 13) Verzar, F. : Aging of the collagen fiber. in *International review of connective tissue research*. (Hall, D.A. editor) 2 : 272, 1964.
 - 14) Houck, J.C. and Jacob, R.A. : Some systemic chemical responses to local inflammation. *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.* 98 : 655, 1958.
 - 15) Houck, J.C. et al. : Dermal chemical changes with local inflammation. *Am. J. Path.* 40 : 531, 1962.
 - 16) Sobel, H. et al. : Hormonal influences upon connective tissue changes of aging. *Recent Progress Hormone Res.* 14 : 457, 1958.