Alloxan 糖尿ウサギの歯肉の酸性ムコ多糖体, コラーゲンおよび 2・3 の lysosomal enzyme の変動について

平 松 正 彦 畠 山 桂 子
安 部 勲 南 直 臣

城西歯科大学・歯科薬理学教室
(昭和52年9月5日受付)

The Changes of Acid Mucopolysaccharides and Collagen Contents and Some of Lysosomal Enzyme Activities of Gingiva of Alloxan Diabetic Rabbits

Masahiko HIRAMATSU, Keiko HATAKEYAMA, Isao ABE and Naomi MINAMI

Department of Dental Pharmacology Josai Dental University

The influence of diabetes on connective tissue components of gingiva was examined in the present study. Diabetes was induced by a single injection of alloxan monohydrate (80 mg/kg, i.v.) in male white rabbits. Acid mucopolysaccharides (AMPS) and collagen contents and some of lysosomal enzyme activities of gingiva of diabetic rabbits were determined at different diabetic stage and these parameters were compared to those of gingiva of normal rabbits.

- 1) AMPS content was decreased slightly at 1 week of diabetic stage, but increased at 6 weeks stage and significantly increased at 12 weeks stage in diabetic group as compared to normal.
- 2) Salt soluble, acid soluble and insoluble collagen contents were decreased at all the stage in diabetic group as compared to normal.
- 3) Mucopolysaccharase (β -glucuronidase, N-acetyl- β -glucosaminidase, β -glucosidase and β -galactosidase) activities were tendency to decrease at 3 and 6 weeks stage and acid protease activity was increased at 12 weeks stage in diabetic group as compared to normal.

緒 言

糖尿病と歯周疾患との関係については、多くの臨床報告から、糖尿病患者に歯周疾患を併発する例が多数認められること、糖尿病は歯周疾患の経過や予後に大きな影響を与えることなどが知られており、糖尿病は歯周疾患の全身的要因として重要な疾患の一つであると考えられている。両疾患の関係については実験的にもいくつかの成

果が報告されている。Glickman¹⁾ は糖尿ラットに歯槽の退縮が認められることを報告し、小守²⁾ は糖尿ラットに辺縁性歯周炎、歯槽骨多孔症、歯槽退縮などの症状が認められることを報告した。井上³⁾ は糖尿犬の歯肉に局所的な刺激を加えた場合に歯肉炎が発現しやすいことを認めている。

歯周組織の代謝面からの研究としては、Kronman ら⁴⁾ の糖尿病患者の歯肉での報告、河合⁵⁾ およびわれわれ⁶⁻⁸⁾ の糖尿ラットの歯周組織の諸酵素の変動に関する報告など

がある。

一方、糖尿病が結合組織の代謝に影響を及ぼすことについては、以前からよく知られており、糖尿病時には細菌感染に対する抵抗性の減弱、創傷治癒の遅延、動脈硬化などの血管障害、腎病変など、結合組織の異常に基づくと思われる種々の病変を併発する。歯肉での結合組織成分の変動と糖尿病との関係については、Ramamurthy ら⁹⁻¹¹⁾ が糖尿ラットの歯肉でコラーゲン量が減少することを報告しており、Kofoed ら¹²⁾ は同じく糖尿ラットの歯肉で酸性ムコ多糖体 (AMPS) 量が減少することを報告している。

今回、われわれは糖尿病と歯肉の結合組織成分の動態との関係をさらに明らかにするため、alloxan 糖尿ウサギの歯肉の AMPS、コラーゲンおよびこれらの分解に関与すると考えられている 2・3 の lysosomal enzyme の経時的変動について検討し、以下の知見を得たので報告する。

実験材料および方法

1. Alloxan 糖尿ウサギ

体重約 2.5 kg の雄の白色ウサギを実験に使用した。ウサギを 24 時間絶食後、nembutal 麻酔下に alloxan monohydrate の 80 mg/kg を 5% 水溶液として耳静脈から投与した。投与後 2～5 日目に Lilly の Tes-tape で尿糖を測定し、尿糖陰性のウサギについては、alloxan monohydrate の 60 mg/kg を追加投与した。alloxan の初回投与後、1, 3, 6 および 12 週目に、1 夜絶食させた後放血死させ、Somogyi-Nelson 法で血清糖を測定し、高血糖を示したウサギ (300 mg/dl 以上) だけを選び、糖尿ウサギとして実験に使用した。投与 1 週後のウサギについては、alloxan の初回投与で尿糖陽性を示したものだけを選んだ。対照群として同一週令の正常ウサ

ギを使用した。屠殺時の正常および糖尿ウサギの体重および血清糖の平均値は表 1 に示した。

2. 歯 肉

臼歯部の上下顎夾側および舌側部から歯肉を採取し、1 匹から得た歯肉片はすべてプールし、0.25M sucrose で十分洗浄した後細切した。1 匹分の歯肉は AMPS、コラーゲンおよび lysosomal enzyme の定量のため、3 部分に分け以下の実験に使用した。

3. AMPS の分離および定量

歯肉を 40 倍量の acetone で 48 時間、chloroform-methanol (2:1) で 24 時間それぞれ脱脂し、脱脂乾燥組織に 0.1N NaOH を加え (10 mg につき 0.4 ml の割合)、2～3°C で 24 時間放置した。その後 0.1N HCl で中和し、1% の pronase E (科研化学) を含む 0.1M Tris-HCl buffer (pH 8.0) を加え (乾燥組織 10 mg につき 0.1 ml の割合)、50°C で 24 時間タンパク消化した。消化後、80% の trichloroacetic acid を終濃度が 10% になるよう加え、2～3°C で 1 時間放置後遠心分離した。上清を 8N NaOH で pH 7.0 に調整し、流水中で 72 時間透析した。透析内液に 3 倍量の ethanol (1% CH₃COOK 含有) を加えて 2～3°C で 24 時間放置し、遠心分離して沈殿物を得た。ここで得られた粗製の AMPS を少量の精製水に溶解し、uronic acid 量を Bitter and Muir の方法¹³⁾ で定量した。

4. コラーゲンの抽出および定量

コラーゲンの抽出は Nimni ら¹⁴⁾ の方法に従って行った。歯肉を少量の精製水で homogenize し、homogenate に 0.5M NaCl (5 mM EDTA 含有, pH 7.4) を加え (湿重量 100 mg につき 3.0 ml)、2～3°C で 24 時間放置し、遠心分離して上清を得た。さらに沈殿から同溶液の半量で同様な抽出操作を 2 回繰り返し、得られた上清をプールして塩可溶性分画とした。酸可溶性分画は塩可溶性分画を得た後の沈殿から 0.5M citrate buffer

表 1 Body weight and serum glucose level of normal and diabetic rabbits

Normal			Diabetes		
Weeks	Body weight	Serum	Body weight	Serum	
	(kg)	glucose (mg/dl)	(kg)	glucose (mg/dl)	
	1	2.8	118	2.3	468
	3	3.2	121	2.8	435
	6	3.6	110	3.1	388
12	4.2	116	3.6	428	

Each value represents the mean of 5 animals

(pH 3.6) を用いて上記と同様に抽出して得た。不溶性分画は酸可溶性分画を抽出した後の沈殿に 0.3M trichloroacetic acid を加え (最初の歯肉の湿重量 100 mg につき 3.0 ml), 90°C で 30 分間抽出し, さらに同溶液の半量で同様な抽出操作を 2 回繰り返し, 抽出液をプールして得た。

三分画の抽出液はいずれも流水中で 72 時間透析し, 透析内液を濃縮乾固した後, 6N HCl を加えて 110°C, 18 時間, 真空封管中で加水分解した。加水分解後, エバポレーターで HCl を除去した試料中の hydroxyproline 量を Neuman and Logan 法¹⁵⁾で定量した。

5. Lysosomal enzyme 活性の測定

歯肉を 0.154M KCl で 10% homogenate とし, 遠心分離 (5,000 G, 30 min) して得た上清を酵素液とした。 β -Glucuronidase 活性は Kato ら¹⁶⁾の方法で測定した。N-Acetyl- β -glucosaminidase, β -glucosidase および β -galactosidase 活性は Beck and Tappel の方法¹⁷⁾で測定した。Acid protease 活性は尿素変性 hemoglobin を基質とし, Anson の方法¹⁸⁾で測定した。タンパク質量は bovine serum albumin を標準とし, Lowry 法¹⁹⁾で定量した。

実験成績

正常および糖尿群の歯肉の AMPS 量は uronic acid 量として図 1 に示した。

糖尿群では, 1 週後で正常群に比較して減少する傾向がみられたが, 3 週後では変化はみられず, 6 週後では逆に増加する傾向がみられ, 12 週後では有意に増加した。

正常および糖尿群の歯肉のコラーゲン量は hydroxyproline 量として図 2～4 に示した。

糖尿群では, 塩可溶性コラーゲン量は 1 週後ですでに明らかに減少し, 3, 6 および 12 週後でも減少あるいは減少する傾向がみられた (図 2)。酸可溶性コラーゲン量はいずれの時期においても減少あるいは減少する傾向がみられ, 減少の程度は 3 週後で最も顕著であった (図 3)。不溶性コラーゲン量は 1 週後でわずかに減少する傾向がみられ, 3 および 6 週後では有意に減少し, さらに 12 週後でも減少する傾向がみられた (図 4)。

正常および糖尿群の歯肉の lysosomal enzyme 活性は図 5～9 に示した。

糖尿群では, β -glucuronidase 活性はいずれの時期においても正常群に比較してやや減少する傾向がみられた

図 1 Uronic acid content in gingiva of normal and diabetic rabbits. Each point represents the mean $\pm$ S.E. of 5 animals. —○—, normal; —●—, diabetes ** $p < 0.01$

図 2 Salt soluble collagen content in gingiva of normal and diabetic rabbits. Each point represents the mean $\pm$ S.E. of 5 animals. —○—, normal; —●—, diabetes * $p < 0.05$

図 3 Acid soluble collagen content in gingiva of normal and diabetic rabbits. Each point represents the mean $\pm$ S.E. of 5 animals. —○—, normal; —●—, diabetes

が, 有意な差は認められなかった (図 5)。N-Acetyl- β -glucosaminidase 活性は 1 週後では変化がみられなかったが, 3 および 6 週後では減少する傾向がみられた。12 週後ではやや増加する傾向がみられた (図 6)。 β -Glucosidase 活性はいずれの時期においても減少あるいは減

図4 不溶性コラーゲン含量在歯肉の正常および糖尿病ラット。各点、5動物の平均±S.E.を示す。*、 $p < 0.01$

図7 β-Glucosidase 活性在歯肉の正常および糖尿病ラット。各点、5動物の平均±S.E.を示す。*、 $p < 0.05$

図5 β-Glucuronidase 活性在歯肉の正常および糖尿病ラット。各点、5動物の平均±S.E.を示す。*、 $p < 0.05$

図8 β-Galactosidase 活性在歯肉の正常および糖尿病ラット。各点、5動物の平均±S.E.を示す。*、 $p < 0.05$

図6 N-Acetyl-β-glucosaminidase 活性在歯肉の正常および糖尿病ラット。各点、5動物の平均±S.E.を示す。*、 $p < 0.05$

図9 Acid protease 活性在歯肉の正常および糖尿病ラット。各点、5動物の平均±S.E.を示す。*、 $p < 0.05$

少する傾向がみられ、3週後では有意に減少した(図7)。β-Galactosidase 活性は1週後では変化がみられなかったが、3および6週後では減少する傾向がみられた。12週後ではやや増加する傾向がみられた(図8)。

Acid protease 活性は1、3および6週後では変化がみられなかったが、12週後では有意に増加した(図9)。

考 察

結合組織の主要成分である AMPS やコラーゲンは他の組織成分に比べて *turn over* が比較的長く、従ってこれらの成分に対する影響を比較する場合には、経時的にしかも長期間にわたって検討する必要があると思われる。糖尿病時の皮膚ならびに歯肉の結合組織成分の変動に関する報告は、いずれも糖尿発症後、一定期間後の成果であり、糖尿状態の各期で結果が異なることは当然考えられる。しかしこの点について詳細に検討した報告は見当らない。

本研究から、糖尿ウサギの歯肉の AMPS 量は正常群に比較して1週後ではやや減少する傾向がみられたが、6週後では逆に増加する傾向がみられ、12週後では有意に増加することがわかった。Kofoed ら¹²⁾は alloxan 糖尿ラットの歯肉で AMPS 量が著しく減少し、Schiller ら^{20,21)}の報告した皮膚での成果とよく類似すると報告している。われわれの糖尿ウサギでの結果は、AMPS 量は糖尿初期の段階でやや減少する傾向を示したが、比較的后期の段階では、彼らの報告¹²⁾とは異なりむしろ増加ないしは増加する傾向を示した。

AMPS の分解に関与する lysosomal enzyme のうち、 β -glucuronidase と β -glucosidase 活性はいずれの時期でも糖尿群で減少する傾向がみられ、さらに、N-acetyl- β -glucosaminidase と β -galactosidase 活性も3週と6週後で減少する傾向がみられた。従って、糖尿後期における AMPS 量の増加は、その分解系が低下した結果であることが示唆される。

伏見ら²²⁾は糖尿ラットの腎臓で2・3の glycosidase 活性が低下することを認め、これが糖尿病性細小血管症の原因として極めて重要であることを示唆している。糖尿病時には歯肉でも毛細血管壁の肥大がおこることが報告されており²³⁾、従って、これらの成果を併せて考えた場合、本研究での AMPS 量の増加は、glycosidase 活性低下に基づく毛細血管壁の AMPS あるいは glycoprotein の沈着による結果であるとも考えられるが、この点については組織化学所見も併せてさらに検討する必要がある。

糖尿群の歯肉のコラーゲン量は、塩可溶性、酸可溶性および不溶性分画ともにいずれの時期でも正常群に比較して減少あるいは減少する傾向がみられた。この結果は Ramamurthy ら⁹⁾の alloxan 糖尿ラットの歯肉の酸可溶性および不溶性コラーゲン量が減少するとの報告とよ

く一致した。

タンパク分解酵素の1つである acid protease は12週後で活性が有意に増加したが、その他の時期では正常群との間に変化はみられなかった。今回は collagenase 活性については検討していないが、コラーゲンに関しては塩可溶性、酸可溶性、不溶性分画ともにいずれの時期でも減少あるいは減少する傾向がみられたこと、糖尿初期の段階では不溶性分画に比較して塩可溶性および酸可溶性分画の減少が大であったこと、acid protease 活性は糖尿初期では変化がみられなかったことから、コラーゲンの減少は分解系の亢進よりはむしろその合成系が低下した結果であることが示唆される。歯肉のコラーゲンの減少は歯肉結合組織の耐性維持の低下と関係し、歯周病発現の内的要因の1つとして極めて重要であるものと考えられる。今後、糖尿病時の歯肉の組織化学所見、AMPS とコラーゲンの合成系についても併せて検討し、糖尿病と歯周疾患との関係を考察したい。

結 論

Alloxan 糖尿ウサギの歯肉の AMPS 量、コラーゲン量および2・3の lysosomal enzyme 活性の変動について検討し、以下の結果を得た。

- 1) 糖尿群の AMPS 量は alloxan 投与1週後では正常群に比較してやや減少する傾向がみられたが、3週後では変化はみられず、6週後では増加する傾向がみられ、12週後では有意に増加した。
- 2) 糖尿群のコラーゲン量は塩可溶性、酸可溶性および不溶性分画ともにいずれの時期でも正常群に比較して減少あるいは減少する傾向がみられた。
- 3) 糖尿群の β -glucuronidase と β -glucosidase 活性はいずれの時期でも正常群に比較して減少する傾向がみられた。N-acetyl- β -glucosaminidase と β -galactosidase 活性は3週と6週後で減少する傾向がみられた。Acid protease 活性は12週後で有意に増加した。

文 献

- 1) Glickman, I. : The periodontal structures in experimental diabetes. New York J. Dent., 16 : 226-251, 1946.
- 2) Komori, A. : Histological studies of the influence of occlusal function on the periodontal tissues of alloxan diabetic rats. Bull.

- Tokyo Med. Dent. Univ., 2 : 207-235, 1964.
- 3) 井上靖彦 : 実験的糖尿病犬の歯周組織に及ぼす局所的障害の影響について. 京大口科紀要, 2 : 151-183, 1960.
 - 4) Kronman, J.H., Cohen, M.M., Cote, D. and Waitzken, L. : Histologic and histochemical study of human diabetic gingiva. J. Dent. Res., 49 : 177, 1970.
 - 5) 河合 勝 : 実験的 alloxan 糖尿病ラットの歯周組織における組織化学的研究—特に脱水素酵素について—. 愛院大歯誌, 10 : 286-318, 1973.
 - 6) 南 直臣, 平松正彦, 安部 勲 : アロキサン糖尿病ラットの歯肉および2, 3組織の TCA-cycle の酵素について. 城歯大紀要, 3 : 107-112, 1974.
 - 7) 南 直臣, 平松正彦, 安部 勲 : アロキサン糖尿病ラットの歯肉および2, 3組織のアミノ酸代謝酵素, グリコース-6-リン酸脱水素酵素および乳酸脱水素酵素について. 城歯大紀要, 3 : 113-118, 1974.
 - 8) 南 直臣, 平松正彦, 安部 勲 : アロキサン糖尿病ラットの歯周組織の β -Glucuronidase および Phosphatase 活性について. 城歯大紀要, 4 : 163-169, 1975.
 - 9) Ramamurthy, N.S., Zebrowski, E.J. and Golub, L.M. : The effect of alloxan diabetes on gingival collagen metabolism in rats. Arch. Oral Biol., 17 : 1551-1560, 1972.
 - 10) Ramamurthy, N.S., Zebrowski, E.J. and Golub, L.M. : Collagenolytic activity of gingivae from alloxan-diabetic rats. Diabetes, 22 : 272-274, 1973.
 - 11) Ramamurthy, N.S., Zebrowski, E.J. and Golub, L.M. : Insulin reversal of alloxan-diabetes induced changes in gingival collagen metabolism of the rat. J. Periodont. Res., 9 : 199-206, 1974.
 - 12) Kofoed, J.A. and Tocci, A.A. : The acidic glycosaminoglycans of gingiva of diabetic rats. J. Periodont. Res., 8 : 323-326, 1973.
 - 13) Bitter, T. and Muir, H.M. : A modified uronic acid carbazole reaction. Anal. Biochem., 4 : 330-334, 1962.
 - 14) Nimni, M.E. and Bavetta, L.A. : Collagen defect induced by penicillamine. Science, 150 : 905-907, 1965.
 - 15) Neuman, R.E. and Logan, M.A. : The determination of hydroxyproline. J. Biol. Chem., 184 : 299-306, 1950.
 - 16) Kato, K., Yoshida, K., Tsukamoto, H., Nobunaga, M., Masuya, T. and Sawada, T. : Synthesis of p-nitrophenyl β -D-glucopyranosiduronic acid and its utilization as a substrate for assay of β -glucuronidase activity. Chem. Pharmacol. Bull., 8 : 239-242, 1960.
 - 17) Beck, C. and Tappel, A.L. : Rat-liver lysosomal β -glucosidase. A membrane enzyme. Biochim. Biophys. Acta, 151 : 159-164, 1968.
 - 18) Anson, M.L. : The estimation of pepsin, trypsin, papain and cathepsin with hemoglobin. J. Gen. Physiol., 22 : 79-89, 1939.
 - 19) Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J. : Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem., 193 : 265-275, 1951.
 - 20) Schiller, S. and Dorfman, A. : The metabolism of mucopolysaccharides in animals IV. The influence of insulin. J. Biol. Chem., 227 : 625-627, 1957.
 - 21) Schiller, S. and Dorfman, A. : The distribution of acid mucopolysaccharides in skin of diabetic rats. Biochem. Biophys. Acta, 78 : 371-373, 1963.
 - 22) 伏見尚子 : 糖尿病性細小血管症と水解酵素. 代謝, 12 : 1311-1318, 1975.
 - 23) McMullen, J.A., Legg, M., Gottsegen, R. and Camarini-Davalos, R. : Microangiopathy within the gingival tissues of diabetic subjects with special reference to the prediabetic stage. Periodontics, 5 : 61-69, 1967.