歯周病患者血清中の総ヒドロキシプロリン量について

穴 村 紳 一 内 田 武 志 白 根 忠
秀 衡 泰 子 久保田 みどり 岡 本 莫

広島大学歯学部歯科保存学第2講座

(主任：岡本 莫教授)

(昭和54年2月27日受付)

Total Hydroxyproline Levels in Sera of Patients
with Periodontal Disease

Shinichi ANAMURA, Takeshi UCHIDA, Tadashi SHIRANE,
Yasuko HIDEHIRA, Midori KUBOTA and Hiroshi OKAMOTO

Department of Endodontology and Periodontology,
Hiroshima University School of Dentistry
(Director: Prof. Hiroshi OKAMOTO)

Measurements of total hydroxyproline levels in human sera were carried out on 11 clinical healthy subjects ranging from 23 to 27 years of age, and in 57 patients with periodontal disease ranging from 16 to 64 years of age.

The correlations between hydroxyproline levels and a few indices of periodontal disease were discussed in order to estimate hydroxyproline levels as an index of periodontal tissue destruction.

The following results were obtained.

1. Hydroxyproline levels in sera were constant regardless of age group.
2. Hydroxyproline levels in sera of patients were higher than the levels of clinical healthy subjects. But there was no significant difference in them.
3. No significant correlations were found out between indices of periodontal disease, i.e. Gingival Bone counts, Gingival scores, Bone scores and Salivary leucocyte counts, and total hydroxyproline levels in sera. But there was seen a significant correlation only between Bone scores and hydroxyproline levels in sera of clinical healthy subjects.

Some factors concerning hydroxyproline levels in sera are to be studied.

I. 緒 言

歯周病の診断、治療効果の判定のため種々の指数^{1~4)}

が用いられているが、これらは再現性、定量性、客観性において不十分なものが多い。そこで著者らは歯周病診断の客観的指標の開発を目的として、歯周組織の炎症の評価法として唾液中白血球数⁵⁾、歯周病の感染の評価法として末梢血白血球の NBT 還元率の利用⁶⁾などについて報告した。

歯周組織、特にその主たる構成成分であるコラーゲンの破壊の程度を臨床的に評価することができれば、歯周

本研究の一部は昭和52年度文部省科学研究費(No. 277561)によった。

本論文の要旨は昭和52年5月第20回春季日本歯周病学会(新潟)において発表した。

表 1 Variation with age of serum hydroxyproline

Age	Hydroxyproline levels ($\mu\text{g/ml}$)					
	Total		Clinical healthy subjects		Patients	
	number	mean $\pm$ SD	number	mean $\pm$ SD	number	mean $\pm$ SD
10—29	19	6.75 $\pm$ 0.86	11	6.56 $\pm$ 0.69	8	7.00 $\pm$ 1.05
30—49	35	6.91 $\pm$ 1.00	0		35	6.91 $\pm$ 1.00
50—69	14	6.95 $\pm$ 1.14	0		14	6.95 $\pm$ 1.14
Total	68	6.87 $\pm$ 0.98	11	6.56 $\pm$ 0.69	57	6.93 $\pm$ 1.02

図 1 Absorbance of the chromophore obtained from the hydroxyproline product

病の診断に大いに役立つはずである。Prockop, Kivirikko ら⁷⁻¹⁰⁾によると、コラーゲンの分解に伴ってコラーゲンに特異なアミノ酸であるヒドロキシプロリン(以下ハイプロと略記)が血中、尿中へ遊離する。プロリンは直接水酸化されハイプロになることはなく、必ずコラーゲン分子に合成された後水酸化されることから、血中及び尿中のハイプロ量はコラーゲンの分解産物と考えることができる。すなわち、コラーゲンの合成量が安定している状態においては、血中あるいは尿中のハイプロ量を測定することによりコラーゲンの分解量を知ることができるとしている。実際、骨破壊を伴う疾患や結合組織の代謝異常疾患では、血中のハイプロ量や尿中へのハイプロ排泄量が増加することが確かめられ、ハイプロ量の変化がこれらの疾患の重要な診断法となり得ることが報告されている⁷⁻¹⁴⁾。また Paunio¹⁵⁾ は歯肉溝滲出液中のハイプロ量を定量し、そのハイプロ含有物は歯肉溝

へ漏出した血清中成分、及び血漿蛋白分解酵素による歯肉コラーゲンの分解産物から由来すると考察している。さらに原ら¹⁶⁾は外科療法を施した際の歯周ポケット滲出液及び血清中ハイプロ含量の変動を調べ、その結果滲出液中のハイプロ量は血清中のそれと類似した動態を示し、滲出液ハイプロ含有物質は、歯肉コラーゲンから由来するのみでなく、一部は血清からも由来すると考察している。

本研究は、歯周病患者血液を資料として、その総ハイプロ量を定量し、歯周病の診断的価値を検討することを目的とした。

II. 材料と方法

検査対策：広島大学歯学部附属病院歯周病診療室を訪れた患者のうち、問診により歯周病及びう蝕以外には全身的に健康なことを確かめた16～64歳の男19名・女38名の計57名を被験者とした。なお、全身及び歯周組織の臨床的健康な歯学部学生23～27歳の男8名、女3名の計11名を対照とした。被験者の口腔内診査及びX線診査を行なうと同時に、肘正中静脈より採血、血清を分離し、用時まで凍結保存した。

ハイプロ定量：Kivirikko ら^{17,18)}の方法により血清中総ハイプロ量を定量した。すなわち、被験血清を6N塩酸中で121°C 15時間加水分解し、固形物を孔径5 μm のミリポアフアフィルター(ミリポア USA)で除去後pH 8.7に調整し遊離のハイプロを合わせピロールへ酸化し、エーリッヒ試薬と反応させ560 nmで比色定量した。

歯周病の評価：歯周病変の進行程度は被験者の口腔内診査、およびレントゲン診査を行ない Dunning と Leach¹⁹⁾ の Gingival score, Bone score, 及び Gingival-Bone count により評価した。また Klinkhamer ら²⁰⁾の提唱した混合唾液中の白血球数を改良した簡便法⁵⁾,

図2 Correlation between hydroxyproline levels in sera and gingival-bone count

● Patients with periodontal disease
○ Clinical healthy subjects

すなわち 5 ml の 1.2% 食塩水で1分間閉口含嗽した含嗽液中の白血球数を計算し、比較対照とした。

なおこれらと血清中総ハイプロ量との間の相関係数から、統計学的にその有意性を検討した。

III. 結 果

1. 血清中総ハイプロ量

既知濃度のハイプロ 0~4 $\mu\text{g/ml}$ は、560 nm の吸光度との間に図1の様に直線関係の得られることを確認した。

被験者の年齢によって分類した血清中総ハイプロ量を表1に示した。統計処理を行なったところいずれの年齢群の平均値の間にも有意の差はなかった。

また健康者群と患者群の平均値を比較したところ、それぞれ 6.56 $\mu\text{g/ml}$ 、6.93 $\mu\text{g/ml}$ とわずかに患者群の方が高い値を示したものの、有意の差は認められなかった。

2. 血清中総ハイプロ量と歯周病症状

1) ハイプロ量と Gingival-Bone count

図2、表2に示す様に血清中ハイプロ量と Gingival-Bone count との間には有意の相関関係は認められなかった。次いで Gingival Bone count を Gingival score と Bone score に分けて検討してみた。Gingival score, すなわち歯肉の炎症とハイプロ量との間の関係を図3、表2に、Bone score, すなわち歯槽骨破壊の結果とハイプロ量との間の関係を図4、表2に示した。被験者全体においては、いずれの関係においても有意の相関関係は認められなかった。

健康者群と患者群に分けて検討してみると、健康者群においての Bone score とハイプロ量の間にのみ有意の相関関係が認められた ($p < 0.02$)。

2) ハイプロ量と唾液中白血球数

図5、表2に示す様に血清中ハイプロ量と唾液中白血球数との間の相関係数は、低く ($r = 0.12$) 有意の相関関係はなかった。

図 3 Correlation between hydroxyproline levels in sera and gingival-bone count

● Patients with periodontal disease
○ Clinical healthy subjects

VI. 考 察

組織ハイプロが殆ど体内のコラーゲンに由来しこの分解の結果、大半はペプチドの形で一部は遊離のハイプロとして血中を経て尿中へ排泄される。そのため血中又は尿中の総ハイプロ量の定量はコラーゲン代謝に異常をきたす疾患の診断に応用価値が高い⁷⁻¹⁴⁾。

今回、歯周病患者の血清中総ハイプロ量を定量し、歯周病における歯肉結合組織及び歯槽骨の破壊との関連を調べ、その診断価値を検討した。

血中ハイプロの由来としてはコラーゲン分解の他に食事性に吸収されたハイプロが考えられる。本研究では、被験者が外来患者であるため完全な食事のコントロールは行なえなかった。採血はゼラチン食を摂取する可能性の少ない午前中に、食後3時間以上経過後に行なうよう心がけた。普通食(病院食)の場合、食後3時間毎に血中

ハイプロ量の変化を調べても変動しなかったと LeRoy ら¹¹⁾は報告しているが、一方実験的な高ゼラチン食では食後尿中血中ハイプロ量が増加し、2時間後に最大となるという Prockop ら^{21,22)}の報告もある。今回被験者血中ハイプロ量は Prockop らの報告にあるような高値(空腹時に比べゼラチン摂取2時間後で約10倍に増加)は示しておらず、被験者の食事は LeRoy らの「普通食」に近いものと考えられる。

ハイプロ定量法は Kivirikko, Prockop ら^{17,18)}の方法を微量化して行なった。彼らはそのハイプロ定量法が尿あるいは血清、組織を試料とした場合にも十分に適用でき、試料中の発色妨害物質による影響は10%以下であると述べている。

コラーゲン合成の盛んな乳児、少年期にはコラーゲンの分解量も多く血中ハイプロ量が増加する^{11,12)}とされているが、今回の研究の被験者においては年齢群の間のハイプロ量に有意の差はなく、対象とした年齢層において

⊠ 4 Correlation between hydroxyproline levels in sera and bone score
● Patients with periodontal disease
○ Clinical healthy subjects

⊠ 5 Correlation between hydroxyproline levels in sera and salivary leukocyte count
● Patients with periodontal disease
○ Clinical healthy subjects

表 2 Coefficients of correlation between hydroxyproline levels in sere and periodontal indices

Periodontal indices	Total	Clinical healthy subjects	Patients
Gingival-Bone count	0.18	0.38	0.09
Gingival score	0.05	0.27	-0.07
Bone score	0.24	0.70*	0.18
Leukocyte count	0.12	-0.13	0.08

* $p < 0.02$

は、血中ハイプロ量に年齢的要因は少ないと考えられる。

健康者群と患者群の平均値の間に特に有意の差はなかったが、患者群のハイプロ量の方がやや多い傾向を示した。

ハイプロ量と歯周病症状との関連においては、Gingival-Bone count, Gingival score, Bone score, 唾液中白血球数のいずれとも有意の相関は示さなかった。調べた歯周病指数との間では、Bone score との間の相関係数が最も大きな値を示した。またハイプロ量と健康者群における Bone score との間においては有意の相関が見られた。実際、骨病変においては特に尿中、血中ハイプロ量が増加するという多くの報告⁷⁻¹⁴⁾が見られる。今回の結果のうち有意の相関が認められたものについては例数が少なく(11名)多少問題はあるが、血清中ハイプロ量が歯周病の歯槽骨の吸収を反映している可能性が考えられこの点については更に検討の必要がある。

今回の実験では、血清中総ハイプロ量と歯周病指数のいずれとの間にも有意の相関は示さなかった。この理由として、第1に歯肉結合組織及び歯槽骨を構成するコラーゲン量は身体全体のそれからみると余りにも少量であり、それらの破壊も慢性であるため、血中のハイプロ量の変化として検出することが困難であるかも知れない。第2に被験者の食事コントロールの不徹底が挙げられる。普通食、高ゼラチン食にかかわらず、採血前24時間より絶食状態におくのがより正確な結果が期待できると考えられる。第3に定量法の問題が考えられる。LeRoy ら²³⁾は、本研究で使用了 Prockop ら¹⁸⁾の方法は尿、純粋な蛋白や血中の遊離のハイプロについては信頼できるが、血液を加水分解したものについては蛋白水解物中の阻害物質をピロールから完全に分離できず、血中総ハイプロ量の定量には問題があると報告している。

歯槽骨破壊の指標として血中ハイプロ量の利用のため

には、さらに厳密な条件の設定、鋭敏なハイプロ測定法が必要であろう。

V. 結 論

歯周病患者清中総ハイプロ量を定量し、各歯周病指数との関連を検討し、次の結果を得た。

1. ハイプロ量の平均値を年齢群により分類したところ、いずれの年齢群のハイプロ量の間にも有意の差はなかった。また健康者群と患者群に分けて比べるとやや患者群の方が大きな値を示したが、特に有意の差はなかった。

2. Gingival-Bone count, Gingival score, Bone score, および唾液中白血球数とハイプロ量との間に有意の相関はなかった。ただし、健康者群における Bone score とハイプロ量との間には有意の相関が認められた。また相関係数の値も他の指数とハイプロ量との間のものに比べより大きな値を示した。

歯槽骨破壊の指標として血中ハイプロ量を利用するためには、今後さらに研究の必要があると考えられる。

文 献

- 1) 岡本 莫, 河内勝和, 中島朋見, 東 富恵, 北木マサ子, 花本 裕: 歯周疾患の口腔診査法; 広大歯誌, 5: 1-17, 1973.
- 2) 今川与曹, 石川 純: 臨床歯周病学: 東京, 1968, 医歯薬, 34-49.
- 3) Carranza, F.A.: Glickman's Clinical Periodontology: Philadelphia, 1979, W.B. Saunders Company, 319-351.
- 4) Grant, D.A., Stern, I.B. and Everett, F.G.: Orban's Periodontics: Saintlouis, 1972, The C.V. Mosby Company, 153-169.
- 5) 内田武志, 菊地貞介, 東 磨美, 吉賀純子, 二宮順二, 穴村紳一, 岡本 莫: 歯周病の臨床検査としての混合唾液中の白血球数と潜血量の検討; 日歯周誌, 18: 406-413, 1976.
- 6) 内田武志, 菊地貞介, 穴村紳一, 春間由美子, 岡本 莫: 歯周病患者の白血球の Nitroblue tetrazolium 還元試験の検討; 日歯周誌, 18: 495-501, 1976.
- 7) Prockop, D.J. and Kivirikko, K.I.: Relationship of hydroxyproline excretion in urine to

- collagen metabolism : *Annals of Internal Medicine*, 66 : 1243-1266, 1967.
- 8) Prockop, D.J. and Kivirikko, K.I. : *Treatise on collagen* (Gould, B.S.ed.) : London & New York, 1968, Academic Press, 215-246.
 - 9) Kivirikko, K.I. : Urinary excretion of hydroxyproline in health and disease : *Int. Rev. Connective Tissue Res.*, 5 : 93-163, 1970.
 - 10) Laitinen, O. : Clinical applications of urinary hydroxyproline determination : *Acta. Med. Scand. suppl.*, 577 : 1-57, 1974.
 - 11) LeRoy, E.C. and Sjoerdsma, A. : Clinical significance of a hydroxyproline-containing protein in human plasma : *J. Clin. Invest.*, 44 : 914-919, 1965.
 - 12) Laitinen, O., Nikkilä, A. and Kivirikko, K.I. : Hydroxyproline in the serum and urine, Normal values and clinical significance : *Acta. Med. Scand.*, 179 : 275-284, 1966.
 - 13) Raad, W. : The practical importance of determining urinary hydroxyproline excretion : *Aerzt. Lab.*, 21 : 282-285, 1975.
 - 14) 堀 隆弘 : コラーゲン—化学・生物学・医学— (野田春彦, 永井 裕, 藤本大三郎編) : 東京, 1975, 南江堂, 207—249.
 - 15) Paunio, K. : On the hydroxyproline-containing components in the gingival exudate : *J. Periodont. Res.*, 6 : 115-117, 1971.
 - 16) 原 耕二, 会田富士子, 田辺秀也, 高橋徳也, 小林幸男 : 歯周手術後の歯肉組織修復と歯周ポケット
ト滲出液ハイドロオキシプロリン含有量との関係
について : *日歯保誌*, 17 : 336-345, 1974.
 - 17) Kivirikko, K.I., Laitinen, O. and Prockop, D.J. : Modifications of a specific assay for hydroxyproline in urine : *Anal. Biochem.*, 19 : 249-255, 1967.
 - 18) Prockop, D.J. and Udenfriend, S. : A specific method for the analysis of hydroxyproline in tissue and urine : *Anal. Biochem.*, 1 : 228-239, 1960.
 - 19) Dunning, J.M. and Leach, L.B. : Gingival-Bone count ; A method for epidemiological study of periodontal disease : *J. Dent. Res.*, 39 : 506-513, 1960.
 - 20) Klinkhamer, J.M. : Quantitative evaluation of gingivitis and periodontal disease ; I. The orogranulocytic migratory rate : *Periodontics*, 6 : 207-211, 1968.
 - 21) Prockop, D.J., Keiser, H.R. and Sjoerdsma, A. : Gastrointestinal absorption and renal excretion of hydroxyproline peptides : *Lancet*, 2 : 527-528, 1962.
 - 22) Prockop, D.J. and Sjoerdsma, A. : Significance of urinary hydroxyproline in man : *J. Clin. Invest.*, 40 : 843-849, 1961.
 - 23) LeRoy, E.C. Kaplan, A., Udenfriend, S. and Sjoerdsma, A. : A hydroxyproline-containing, collagen-like protein in plasma and a procedure for its assay : *J. Biol. Chem.*, 239 : 3350-3356, 1964.