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

中 村 正 一

サンスター歯磨(株)基礎研究所

(昭和54年9月10日受付)

The Relationship between Periodontal Disease and Protease Activity
in Gingival Fluid and in Saliva.

Masakazu NAKAMURA

Central Research Lab., Sunstar Inc., Osaka.

Cathepsin D and elastase activities in gingival fluid and in saliva collected from patients with periodontal disease were measured using acid denatured hemoglobin and N-Succinyl-L-alanyl-L-alanyl-L-alanine-p-nitroanilide and compared with the clinical findings such as PMA-index and pocket depth. Acid phosphatase activity, fluid weight, quantity of protein in fluid and occult blood in saliva were also measured.

Statically significant correlations were found between these protease activities and PMA-index, as well as pocket depth. These protease activities in gingival fluid and in saliva were also correlated.

The activities of cathepsin D and elastase were seemed to reflect the degree of periodontal disease as well as acid phosphatase activity.

緒 言

成人の健康な歯肉溝には上皮組織から漏出した歯肉分泌液が少量存在し、これは組織液と異なり、炎症性の浸出液であると考えられている¹⁾。さらに、歯周ポケットには種々の細菌や白血球などの炎症性細胞が存在し、浸出液とともに歯周組織の破壊や防禦に何らかの影響を与えていると考えられている。また、歯周組織の炎症の進展増悪にともなって浸出液の量が有意に増加することから、歯周疾患の診断の補助として応用されている。

このような歯肉浸出液については、その性状や成分^{2,3)}のみならず、酵素学的にも研究されている。すなわち、Acid phosphatase^{4,5)}、Alkaline phosphatase⁶⁾、 β -Glucuronidase^{7,8)} など細菌や宿主由来の水解酵素の存在が報告されている。しかし、歯周組織の破壊に大きな役割を

演じていると考えられる Protease に関する報告は比較的少なく、Ishikawa ら⁹⁾がポケットの深さと浸出液中の Cathepsin D 活性について、Ohlson ら¹⁰⁾が健康歯肉と慢性炎症歯肉の浸出液中の Elastase, Collagenase 活性について、大森¹¹⁾が歯周疾患と浸出液中の Kininase 活性について報告しているに過ぎない。

一方、唾液中の Protease についてはあまり研究されていない。Söder¹²⁾、Lindqvist ら¹³⁾、Mod'eer ら¹⁴⁾が唾液中の Protease に関する報告を行なっているが、その性質については不明な点が多く、また臨床所見との関連性については検討されていない。

そこで、今回著者は歯周健康者と歯周疾患患者の歯肉浸出液および唾液中の Acid phosphatase, Cathepsin D, Elastase 活性を測定し、それと主な臨床所見とを比較検討したので報告する。

実験方法

1. 被験者

被験者は、特定の内科的疾患がないと思われ、また4+4に修復物がない男性(25~49歳)から、臨床的に健康な歯周の被験者3名と歯周疾患患者17名、合計20名を選んだ。

2. 臨床所見

被験者の臨床所見は3+3について、次の基準によって、それぞれ記録した。

(1) 歯肉炎症指数(PMA index): 歯肉の炎症状態は、Schour & Massler¹⁵⁾のPMA indexを参考にして行ない、一歯当たりの平均指数で表わした。

(2) 歯周ポケットの深さ(Pocket depth): 目盛付歯周ポケット測定器を用いて、各歯牙の唇側の近心、中央、遠心の計18カ所を測定し、一歯当たりの平均値をmmで表わした。

3. 試料の採取

(1) 唾液: 食間に自然流出の混合唾液を3ml採取し、10,000×g, 10 min 遠心分離後、上清をとり、これを唾液上清試料とした。

つぎに、沈渣にSodium deoxycholateを含む生理食塩水1.5mlを加え、37°Cで30 min インキュベートし、遠心分離した上清と、さらに、この沈渣を生理食塩水1.5mlで洗浄し、同様に遠心分離した上清とを合わせて、唾液沈渣試料とした。

(2) 歯肉浸出液: 歯肉浸出液は口紙法により採取した。上顎前歯部位(3+3)歯肉に対して簡易防湿を施した後、エアーを軽く吹きつけて、歯肉を乾燥し、20枚の口紙片(東洋口紙 No. 2, 1.5×19 mm)を順序よく歯肉溝底部に軽く接触するまで挿入し、3 min 保持した。その後、口紙片を取り出し、直ちに秤量し、採取前後の重量差をもって浸出液量とした。また、その口紙片に3mlの生理食塩水を加え、ホモジナイザーで粉碎処理し、5,000×g, 10 min. 遠心分離し、上清を浸出液試料とした。

4. 酵素活性の測定

(1) Acid phosphatase 活性の測定: Jacobson¹⁶⁾の方法に準じて行なった。0.05M Citrate 緩衝液(pH 4.8) 0.7 ml に浸出液 0.2 ml を加え、基質として 0.055 M p-Nitrophenyl phosphate 0.1 ml を加えて、37°C で 15 hr インキュベートし、反応終了後、0.1N Sodium hydroxide を 4 ml 加え、遊離した p-Nitrophenol の量を

400 mμ における吸光度で測定した。予め作成した検量線より、遊離 p-Nitrophenol μg/total/15 hr を浸出液中の Acin phosphatase 活性とした。

(2) Cathepsin D 活性の測定: Anson 法の変法¹⁷⁾に準じて、1% Acid denatured hemoglobin (pH 3.2) 3 ml と 0.05M Acetate 緩衝液(pH 3.2) 0.2 ml に、唾液上清および浸出液 0.8 ml を加え、37°C で 15 hr インキュベートし、反応終了後、9% Trichloroacetic acid 2 ml を加え、室温に 60 min. 放置し、口過後、口液中の Trichloroacetic acid soluble peptide を 280 mμ における吸光度で測定した。予め作成した検量線より、遊離 Tyrosine μg/ml/15 hr および Tyrosine μg/total/15 hr をそれぞれ唾液中、浸出液中の Cathepsin D 活性とした。

(3) Elastase 活性の測定: Feinstein¹⁸⁾らの方法に準じて行なった。唾液上清および沈渣 0.5 ml, 浸出液 1.0 ml に、0.1M Phosphate 緩衝液(pH 8.0)を加え、さらに 6.0 mM N-Succinyl-L-alanyl-L-alanyl-L-alanine-p-nitroanilide 0.1 ml を加え(反応容量 3 ml) 37°C で 15 hr インキュベートし、遊離した p-Nitroaniline の量を 410 mμ における吸光度で測定した。予め作成した検量線より、遊離 p-Nitroaniline μg/ml/15 hr および p-Nitroaniline μg/total/15 hr をそれぞれ唾液上清、沈渣および浸出液中の Elastase 活性とした。

(4) 潜血量の測定: 混合唾液中の潜血量は Hemastix ® (Miles-Sankyo 製)で測定した。評価は、一、±、+、から卅まで7段階に分け、一を0点、±を0.5点、+を1点、以下卅を3点とした。

(5) 蛋白量の測定: Lowry 法¹⁹⁾に準じて行なった。予め Bovine serum albumin を用いて作成した検量線より、浸出液中の全蛋白質量(μg)を測定した。

実験結果

各被験者における歯周疾患の主な臨床所見のうち、歯肉炎症の状態を示す PMA index と歯周ポケットの深さについて診察記録した。歯肉浸出液および唾液中の Acid phosphatase, Cathepsin, D Elastase を測定した。さらに、浸出液について、浸出液重量と蛋白質量を測定し、歯肉からの出血量を示す唾液中潜血量について測定した。これらの測定値は表1に示すとおりである。

すなわち、歯周ポケットの深さは全被験者において比較的浅く、歯周健康者では 1 mm 前後、歯周疾患患者においても最高 3 mm 弱であった。浸出液重量、全蛋白質量、Acid phosphatase 活性、Elastase 活性は炎症の増

Table 1 Relation between the clinical findings and enzyme activities in gingival fluid and in saliva.

No	Age	D.D.	PMA index	Pocket depth(mm)	Gingival Fluid					Saliva			
					weight(mg)	Protein(μ g)	APase	Cat.D	Elastase	O.B.	Cat.D	Elastase1	Elastase2
1	26	N	0	0.81	0.7	144	119	0	9.9	0.5	475	3.8	1.2
2	33	N	0	1.08	6.7	180	145	0	13.5	1.5	479	2.6	2.0
3	35	N	0	1.58	11.5	252	144	90	22.2	0.5	391	2.4	1.8
4	25	G	0.17	1.61	29.4	80	201	49	13.8	0.	381	0.6	0.2
5	26	G	0.50	1.64	2.6	108	23	11	6.0	0.5	505	1.2	0
6	27	G	0.33	1.39	12.4	64	140	30	17.4	2.5	401	2.2	1.6
7	27	G	0.17	1.28	7.9	216	132	0	6.6	0.5	530	21.6	5.0
8	27	G	0.17	1.14	5.0	216	225	0	14.4	0.5	490	1.6	0.4
9	26	G	0.17	1.42	9.7	342	189	214	18.6	3.0	483	2.8	1.2
10	26	G	0.67	1.14	3.0	128	128	83	14.7	0.5	499	2.2	1.4
11	25	G	0.50	0.97	8.2	252	29	0	4.8	1.0	416	3.4	1.2
12	36	G	0.67	1.58	7.4	306	200	150	24.3	3.0	860	70.2	64.4
13	49	G	0.67	1.28	7.7	342	216	233	25.8	2.0	504	2.2	4.4
14	27	G	0.67	1.17	12.2	630	225	233	22.5	3.0	874	18.0	12.2
15	39	P	1.83	1.61	4.6	630	293	240	37.8	3.0	961	19.0	60.0
16	40	P	1.83	2.86	90.3	522	614	281	38.4	2.5	891	29.0	17.8
17	38	G	0.83	1.08	0.2	234	179	0	9.3	2.0	669	4.8	43.6
18	32	P	1.17	2.33	4.3	378	323	53	55.2	3.0	906	108.2	99.0
19	40	P	2.83	2.97	37.9	720	756	353	82.5	3.0	893	89.6	124.4
20	28	G	0.67	1.61	3.2	594	177	49	4.2	3.0	470	13.2	10.8

D.D. : Degree of Disease N : Clinical healthy G : Gingivitis P : Periodontitis

APase : Acid phosphatase activity was expressed in liberated p-nitrophenol μ g/total/15hrs.

Cat.D : Cathepsin D activities in gingival fluid and in saliva were expressed in liberated tyrosine μ g/total/15hrs and liberated tyrosine μ g/ml saliva/15hrs.

O.B. : Occult Blood in saliva

Elastase : Elastase activities in gingival fluid and in saliva were expressed in liberated p-nitroaniline μ g/total/15hrs and liberated p-nitroaniline μ g/ml saliva/15hrs.

Elastase1 and Elastase2 show the activities in saliva supernatant and in saliva sediment.

悪と共に増加する傾向が見られた。浸出液中の Cathepsin D 活性は弱く、ほとんど検出されない者もあったが、唾液中の Cathepsin D 活性は全ての被験者に認められ、歯肉炎症症状と共に増大する傾向が見られた。また、唾液中の Elastase 活性は $10,000 \times g$ 遠心上清と沈渣の双方に認められ、共に歯肉炎症との相関が推察された。

PMA index とこれらの測定値との相関関係は表 2 に示すとおりである。PMA index と歯周ポケットの深さとの間には危険率 0.1% で、浸出液重量との間には危険率 5% で、蛋白質量との間には危険率 0.1% で、浸出液中の Acid phosphatase 活性との間には危険率 0.1% で、Cathepsin D 活性との間には危険率 0.1% で、Elastase 活性との間には危険率 0.1% でそれぞれ有意な相関関係が認められた。また、唾液中潜血量との間には危険率 1

% で、唾液中の Cathepsin D 活性との間には危険率 0.1% で、唾液上清中の Elastase 活性との間には危険率 1% で、沈渣中の Elastase 活性との間には危険率 0.1% で、それぞれ有意な相関関係が認められた。

歯周ポケットの深さとこれらの測定値との相関関係は表 3 に示すとおりである。唾液中潜血量との間には統計的に有意な相関関係は認められなかったが、その他の因子との間には、PMA index と同様に、全て有意な相関関係が認められた。

次に、Cathepsin D および Elastase 活性について、歯肉浸出液中と唾液中の活性の相関関係を統計的に分析した結果が表 4 である。Cathepsin D 活性については危険率 5% で、また、Elastase 活性については、浸出液と唾液上清および沈渣双方との間に共に 0.1% の危険率で

Table 2 Analysis of correlation between PMA index and other factors.

Factor		r	Level of significance
A	B		
PMA index	vs Pocket depth	0.7833	P<0.001
"	vs Fluid weight	0.5082	P<0.05
"	vs Fluid protein	0.7459	P<0.001
"	vs Acid phosphatase activity in fluid	0.8513	P<0.001
"	vs Cathepsin D activity in fluid	0.7213	P<0.001
"	vs Elastase activity in fluid	0.8286	P<0.001
"	vs Occult blood in saliva	0.5689	P<0.01
"	vs Cathepsin D activity in saliva	0.7763	P<0.001
"	vs Elastase activity in saliva supernatant	0.6255	P<0.01
"	vs Elastase activity in saliva sediment	0.7848	P<0.001

Table 3 Analysis of correlation between pocket depth and other factors.

Factor		r	Level of significance
A	B		
Pocket depth	vs Fluid weight	0.7192	P<0.001
"	vs Fluid protein	0.5511	P<0.05
"	vs Acid phosphatase activity in fluid	0.8600	P<0.001
"	vs Cathepsin D activity in fluid	0.6229	P<0.01
"	vs Elastase activity in fluid	0.8090	P<0.001
"	vs Occult blood in saliva	0.4404	—
"	vs Cathepsin D activity in saliva	0.5852	P<0.01
"	vs Elastase activity in saliva supernatant	0.6889	P<0.001
"	vs Elastase activity in saliva sediment	0.6542	P<0.001

Table 4 Correlation of protease activity between in gingival fluid and in saliva.

Gingival fluid	Sathepsin D	r	Level of significance
Cathepsin D	vs Cathepsin D	0.6179	P<0.05
Elastase	vs Elastase in supernatant	0.7996	P<0.001
Elastase	vs Elastase in sediment	0.8563	P<0.001

有意な相関関係が認められた。

考 察

歯周ポケットの中には種々の細菌や炎症性細胞が存在し、歯周組織の破壊と密接な関連性を持っている。歯肉上皮組織からこのポケット内に漏出した炎症性の浸出液に関して、近年数多くの研究が行なわれ、Cimasoni は細菌および宿主由来の種々の Hydrolase の存在を示し、これらの酵素は歯周ポケット内の炎症症状を反映すると同時に、組織破壊に何らかの役割を果たしているものと

推察される。

一方、唾液は外的因子によって影響を受け、変動しやすく、歯周疾患との関連性は浸出液ほど直接的ではないために、十分な研究はされていない。しかし、歯周ポケット内に集積した多核白血球が唾液中に流入することなどから、唾液中の成分は歯肉浸出液の影響を受けていることが推測される。

今回、著者は浸出液および唾液中の Cathepsin D と Elastase 活性を中心に臨床所見との関連性について検討したが、両 Protease 活性は共に歯周疾患と強い相関性が認められた。

歯肉浸出液中の Acid phosphatase は β -Glucuronidase と共に良く研究されており, Sueda ら⁴⁾は歯周ポケットの深さと相関性があることを報告しているが, 今回の実験結果はそれを支持しており, さらに歯肉炎症指数とも相関性が認められた。本酵素活性は歯周ポケット内の様相を反映しているものであり, 炎症状態の一つの指標になると考えられる。

また, 歯肉浸出液中の Cathepsin D 活性, Elastase 活性は共に歯肉炎症指数と歯周ポケットの深さとの間に強い相関性が認められた。Cathepsin D 活性については, Ishikawa ら⁹⁾が歯周ポケットの深さとにのみ相関性があることを報告しているが, 今回の結果では歯肉炎症指数とも相関性が見られた。これは浸出液の採取方法や被験者の相違によるものであらうと考えられる。また, 活性が小さく測定誤差も考慮しなければならないが, 測定法については現在検討を進めている。Elastase 活性については, Ohlson ら¹⁰⁾が健康歯肉と炎症歯肉の浸出液で有意の差があることを報告しており, 著者の実験事実には, さらに歯周疾患との相関性を明確にしたものと考ええる。

最近, 炎症における多核白血球の役割²²⁾が歯科以外の分野でも注目を浴び, 特に Protease による組織破壊²³⁾においては, Cathepsin D Elastase が Collagenase と共にリソゾーム中に存在することから^{24, 25)}, 上記の結果はその可能性を示唆しているかもしれない。

さらに, 唾液中の Cathepsin D, Elastase 活性もまた歯肉炎症指数と歯周ポケットの深さとの間に強い相関性が認められたが, これは非常に興味深いことである。

これまで, 唾液中の Protease に関する報告は少なく, Mäkinen が Aminopeptidase²⁶⁾について, Lindqvist ら¹³⁾が Protease 活性の唾液中における分布について, また, Modéer ら¹⁴⁾が Protease の性質について報告しており, その他にもいくつかの報告があるが, 充分でなく, 特に臨床的な面からはほとんど研究されていない。唾液中の Protease の由来については全く不明であるが, 歯垢に由来するもの, 歯周ポケット内の細菌や白血球などの炎症性細胞に起因するものなどが考えられる。

また, 浸出液中と唾液中のこれらの Protease 活性に相関性が認められたことは, 唾液中の Protease の由来は別にして, 唾液もまた歯肉炎症の状態を間接的に反映しているものと推察された。

今回の著者の実験結果により, 歯肉浸出液中の Cathepsin D および Elastase 活性は歯周疾患と密接な関係が

あり, さらに, これらの Protease 活性が唾液中にも認められることが明確にされた。それらの性質や由来については今後の課題である。

結 論

健康者と歯周疾患患者の歯肉浸出液および唾液中の Protease 特に Cathepsin D と Elastase 活性を測定し, それと主な臨床所見とを比較検討し, 次の知見を得た。

1. 歯肉浸出液中の Cathepsin D 活性は歯肉炎症指数との間に 0.1% の危険率で, 歯周ポケットの深さとの間には 1% の危険率で, それぞれ有意な相関性を示した。また, 歯肉浸出液中の Elastase 活性は歯肉炎症指数, 歯周ポケットの深さとの間に共に 0.1% の危険率で有意な相関性を示した。

2. 唾液中の Cathepsin D 活性および Elastase 活性は共に歯肉炎症指数, 歯周ポケットの深さとの間に統計的に有意な相関性が認められた。

3. 歯肉浸出液中と唾液中の Cathepsin D 活性は 5% の危険率で, また Elastase 活性は 0.1% の危険率で, それぞれ有意な相関性が認められた。

以上のことから, 歯肉浸出液および唾液中の Cathepsin D 活性と Elastase 活性は, Acid phosphatase などと同様に歯周疾患の炎症状態を反映することがわかった。

終わりに臨み, 終始懇切なる御指導を頂いたサンスター歯磨機基礎研究所, 所長 橋本浩明博士, 大阪大学名誉教授松村敏治博士, および御校閲を頂いた愛知学院大学歯学部 中静 正教授に深謝の意を表します。

文 献

- 1) Krasse, B. and Egelberg, J.: The relative portion of sodium, potassium and calcium in gingival pocket fluid. Acta. Odont. Scand., 20: 143-157, 1962.
- 2) Mann, W.V.: The correlation of gingivitis pocket depth and exudate from the gingival crevice. J. Periodont., 34: 367-387, 1963.
- 3) Brill, N. and Björn, H.: Passage of tissue fluid into human gingival pocket. Acta. Odont. Scand., 17: 11-21, 1959.
- 4) Sueda, T. Cimasoni, G. and Held, A.J.: High level of acid phosphatase in human gingival

- fluid. *Archs. Oral. Biol.*, 12 : 1205-1207, 1967.
- 5) Sueda, T. and Cimasoni, G. : The origins of acid phosphatase in human gingival fluid. *Archs. Oral. Biol.*, 13 : 553-558, 1968.
 - 6) Ishikawa, I. and Cimasoni, G. : Alkaline phosphatase in human gingival fluid and its relation to periodontitis. *Archs. Oral. Biol.*, 15 : 1401-1404, 1970.
 - 7) Bang, J., Cimasoni, G. and Held, A.J. : Beta-Glucuronidase correlated with inflammation in the exudate from human gingiva. *Archs. Oral. Biol.*, 15 : 445-451, 1970.
 - 6) 大森 靖 : 歯周疾患と β -Glucuronidase との関係についての研究, II 歯肉浸出液中の β -Glucuronidase 活性値, 日歯周誌, 17 : 200-207, 1975.
 - 9) Ishikawa, I., Cimasoni, G. and 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.
 - 10) Ohlson, K., Olsson, I. and Tynelius-Bratthall, G. : Neutrophil leukocyte collagenase, elastase and serum protease inhibitors in human gingival crevice. *Acta. Odont. Scand.*, 31 : 51-59, 1973.
 - 11) 大森 恒 : 歯周疾患における歯肉浸出液中の Bradykininase 活性について, 日歯周誌, 16 : 1-8, 1974.
 - 12) Söder, P.-Ö. : Proteolytic activity in the oral cavity. : Proteolytic enzymes from human Saliva and dental plaque material, *J. Dent. Res.*, Supple. 2 : 389-393, 1972.
 - 13) Lindqvist, L., Söder, P.-Ö., Modéer, T. and Lundblad, G. : The distribution of proteolytic and alkaline phosphatase activities in human saliva treated with sodium deoxycholate. *Acta. Odont. Scand.*, 32 : 103-113, 1974.
 - 14) Modéer, T. : Some properties of proteolytic enzymes in human saliva. *Acta. Odont. Scand.*, 32 : 321-328, 1974.
 - 15) Schour, I. and Massler, M. : Prevalence of gingivitis in young adults. *J. Dent. Res.*, 27 : 733-734, 1948.
 - 16) Jacobson, K. : The determination of tartrate inhibited phosphatase in serum. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, 12 : 367-380, 1960.
 - 17) Ikezawa, H., Aoyagi, T., Takeuchi, T. and Umezawa, H. : Effect of protease inhibitors of actinomycetes on lysosomal peptide-hydrolases from swine liver. *J. Antibiot.*, 24 : 488-490, 1971.
 - 18) Feinstein, G. and Janoff, A. : A rapid method for purification of human granulocyte cationic neutral proteases. : Purification and characterization of human granulocyte chymotrypsin-like enzyme. *Biochim. Biophys. Acta.*, 403 : 477-492, 1975.
 - 19) Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Faar, A.L. and Randall, R.J. : Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193 : 265-275, 1951.
 - 20) Cimasoni, G., Ishikawa, I. and Jaccard, F. : Enzyme activity in the gingival crevice. "The borderland between caries and periodontal disease." Ed. Lehner, T. Acad. Press, London, 13, 1977.
 - 21) Schrött, C.R. and Löe, H. : The origin and variation in number of leukocytes in the human saliva. *J. Periodont. Res.*, 5 : 36-41, 1970.
 - 22) Goldstein, I.M. : Polymorphonuclear leukocyte lysosomes and immune tissue injury. *Prog. Allergy.*, 20 : 301-340, 1976.
 - 23) Havemann, K. and Janoff, A. : "Neutral proteases of human polymorphonuclear leukocytes." Urban Schwarzenberg, Baltimore-Münich, 1978.
 - 24) Ishikawa, I. and Cimasoni, G. : Isolation of cathepsin D from human leukocytes. *Biochim. Biophys. Acta.*, 480 : 228-240, 1977.
 - 25) Ishikawa, I. and Cimasoni, G. : Partial purification of a neutral protease from human polymorphonuclear leukocytes and its proteolytic effect on immunoglobulin G. *Archs. Oral. Biol.*, 23 : 933-940, 1978.
 - 26) Mäkinen, K.K. : Studies on oral enzymes. I. Fractionation and characterization of aminopeptidases of human saliva. *Acta. Odont. Scand.*, 24 : 579-604, 1966.