イヌの実験的歯肉炎におけるコラゲナーゼ活性について

柳 村 光 寛

新潟大学歯学部歯科保存学第2教室

(指導: 原 耕二教授)

新潟大学歯学部口腔生化学教室

(指導: 野原広美教授)

(昭和55年9月17日受付)

Collagenase Activities in Healthy and Inflamed Gingivae Induced by Plaque in Dogs

Mitsuhiro YANAGIMURA

Department of Periodontology and Endodontics

Niigata University School of Dentistry

(Director: Prof. Kohji HARA)

Department of Oral Biochemistry

Niigata University School of Dentistry

(Director: Prof. Hiroyoshi NOHARA)

The aim of this study was to extract the collagenase from the healthy and inflamed gingivae and to compare their activities. Healthy and inflamed gingivae were prepared according to the following procedure. To establish the healthy gingiva, toothbrushing was continued for seven to twelve weeks. After the establishment of healthy gingiva, the left bimaxillary gingiva as the experimental side and the right as the control side were selected. In the experimental side, a floss silk ligature was placed at the cervical area of teeth to accelerate the plaque formation and the dogs were fed on the soft diet during the experimental period. In the control side, the toothbrushing was continued. Three weeks later, the bilateral gingivae were resected and used for the extraction of collagenase.

Collagenase was extracted as follows:

1) by shaking for 22 hours (Fraction 1), 2) by sonication in 0.2M NaCl buffer (Fraction 2) and 3) by sonication in 1M NaCl buffer (Fraction 3)

The collagenase activities of these fractions were assayed using [14 C] acetylated collagen as the substrate.

At first, little collagenase activities were observed without treatment of the gingival extracts with trypsin, while after the treatment with trypsin significant collagenase activities were observed both in healthy and inflamed gingivae.

In addition, the gelatinase activities were assayed in both samples after treating with or without trypsin. The trypsin treatment resulted in the increase of the gelatinase activities

In conclusion, three extracts from the inflamed gingiva had higher collagenase activities than those from the healthy gingiva, respectively (Fraction 1 $P < 0.02$, Fraction 2&3 $P < 0.05$). However, no significant difference in the gelatinase activities was observed between healthy and inflamed gingivae.

緒 論

歯周病は歯肉結合組織の破壊を中心とした局所の炎症であり、結合組織中のコラーゲン代謝は炎症によって、その生成分解のバランスを失い、その結果コラーゲン線維の減少、消失が惹起されると考えられている¹⁾。コラーゲンの酵素的分解については広範な研究があり、その機序も詳細に検討されている²⁻⁵⁾。歯肉組織に於ても、コラーゲンの分解に関与するコラゲナーゼの存在が Fullmer ら⁶⁾ によって報告されて以来、培養歯肉によるコラゲナーゼの産生及びその性質が種々検討されて来ている⁷⁾。しかし歯肉から直接コラゲナーゼを抽出した研究は少ない。最近、Uitto ら⁸⁾ はヒト歯肉の抽出液中にコラゲナーゼの存在を認め、かつ大部分は latent form であることを報告している。本研究では実験的に惹起させたイヌの炎症歯肉中のコラゲナーゼ活性と健康歯肉中のそれを直接、定量的に比較検討して若干の知見を得たのでここに報告する。

またグラチナーゼの活性をも比較測定したので併せて報告する。

研究材料及び方法

I 材料

トリプシン (type III) 及びトリプシンインヒビター (type I-S) は、Sigma 社製を [1-¹⁴C] acetic anhydride は、The Radiochemical Centre, Amersham, England 製を使用した。

II イヌの実験的歯肉炎の発生方法について

Table 1 に示すとおり、実験には体重 10 kg 前後の雑種雄成犬 4 頭を使用した。実験部位は、上下顎の I₃ から P₄, M₁ (3 番から 8 番, 9 番) までの唇頬側辺縁歯肉、乳頭歯肉、付着歯肉とし、同一犬に於て左側を歯肉炎側 (実験側)、右側を健康歯肉側 (対照側)、に分けた。実験開始にあたりまず、ネプタール® (0.5 ml/kg) の麻酔下で全顎の歯石除去及びラバーカップで研磨材とともに、徹底した歯面の研磨を行なった。その後健康歯肉の確立のため、幼児用歯ブラシを使用して、7~12 週間、1 日 1 回チャーターズ法にて 1 カ所当り 60 回ブラッシングを続けた。ブラッシング期間中は、日本クレア社製のイヌ飼育用固型飼料をそのまま与え、ただちにブラッシングを行ない、できる限りプラークの蓄積のない様な

Table 1 Induction of experimental gingivitis in dog

Mongrel dog $\div$ 10 kg			
		cont.	exp.
Day 0	Scaling	8-3	3-8
		9-3	3-9
7-12W	Brushing		
	Establishment of healthy gingiva		
	Silk ligature		
3W	Plaque accumulation		
	Soft diet		
	Sacrifice, Sample collection		

配慮をした。臨床的に健康歯肉である事を確認した後、この時点を実験開始日とし実験側ではプラークの蓄積を促進させる目的で、各歯頸部にラウンドバーにて歯肉を損傷しない様に深さ 1 mm 前後の溝を全周にわたって形成した。ついで形成後の溝内に Johnson & Johnson 社製の絹糸を、2~3 重に歯表面から著しくはみ出すことのない様に結紮した。結紮部は脱落しない様シアノアクリレート系接着剤で接着した。その後の給餌は従来の固型飼料を軟泥状にして、これを 1 日 1 回、一定時間内に与えた。対照側では給餌後ただちにブラッシングを実験期間中続けて、健康歯肉を維持した。

実験的歯肉炎を起こす期間は 3 週間とし、その時点で唇頬側辺縁歯肉、乳頭歯肉、付着歯肉を剝離切除して、これら歯肉を抽出液の調製に使用した。

III 歯肉抽出液の調製法について

剝離切除した歯肉片は、ただちに冷却した生理的食塩水中で付着血液成分等を十分に洗滌し、濾紙にて水分を吸収後重量を計測した。以下抽出操作はすべて 4°C の低温室中で行なった。歯肉は、外科用ハサミを用いて 1 mm³ 前後に細片化した後、10 倍容量の Buffer A (0.03 M Tris-HCl 0.2 M NaCl 0.05 M CaCl₂ pH 7.5) を加えつつ、2 倍重量の海砂とともに乳鉢乳棒で均質なペースト状になるまで十分に磨砕した⁹⁾。磨砕後の全量を三角フラスコに移し、100 サイクル/分、5 cm の振幅で振盪させながら 22 時間抽出を行なった。この遠心 (6,000×g, 30 分) 上清を 60% 硫酸アンモニウムで濃縮し、その沈澱を 2 ml の Buffer A に suspend 後、1.0 l の同 Buffer に対して 72 時間透析した。透析後、遠心 (6,000×g, 30 分) 上清を Amicon-PM 10 で約

Table 2 Preparation procedure of gingival extracts

1 ml に濃縮し、これを歯肉抽出液分画の 1 (F 1) とした。

一方、振盪後の遠心沈渣には、Buffer A を加え、よく suspend した後、超音波発生装置 (Kubota-KMS-100) の出力を最大にして、3 分間 3 回超音波処理を行った。その遠心 (6,000×g, 30 分) 上清を 60% 硫酸アンモニウムで濃縮し、その沈澱を 2 ml の Buffer A に suspend した後、同 Buffer に対して 72 時間透析した。透析後、遠心 (6,000×g, 30 分) 上清を、Amicon-PM 10 にて約 0.5 ml に濃縮したものを、歯肉抽出液分画の 2 (F 2) とした。超音波処理後の沈渣を Buffer B (0.03 M Tris-HCl 1.0 M NaCl 0.05 M CaCl₂ pH 7.5) によく suspend し、3 分間 3 回超音波処理をした。その遠心 (6,000×g, 30 分) 上清を 60% 硫酸アンモニウムで濃縮し、上述の如く透析後、Amicon-PM 10 にて約 0.5 ml に濃縮したものを歯肉抽出液分画の 3 (F 3) とした。

以上の F 1, 2, 3 を歯肉抽出液として反応に使用し

た (Table 2)。

IV コラゲナーゼ活性の測定について

1) ¹⁴C 標識コラーゲンの調整法について

酸可溶性コラーゲンは、ラット皮膚より Gallop ら¹⁰⁾の方法に従い抽出精製しさらに 5% NaCl による沈澱を 2 回行なって精製した¹¹⁾。この様にして得られたコラーゲンのヒドロキシプロリン含量は 11.8% であり純度は 91% と計算された。なお総窒素は 17.0% であった。このコラーゲンは Gisslow ら¹²⁾の方法に従って、[1-¹⁴C] acetic anhydride を用いてラベルした。なお比放射活性は 12.5×10⁵ dpm/mg であった。

2) 反応溶液の組成について

反応溶液としては、Terato ら¹³⁾のものを、small scale に改変して用いた。即ち全量 0.1 ml 中に以下の溶液を含む。

(1) ¹⁴C-collagen (2 mg/ml) 0.01 ml ≒ 25,000 dpm

(2) acid soluble collagen (4 mg/ml) 0.01 ml

- (3) 0.06 M Tris-HCl 0.4 M NaCl 0.1 M CaCl_2 (pH 7.5) 0.02 ml
 (4) 4 M glucose 0.01 ml
 (5) gingival extract 0.05 ml

3) トリプシンによる歯肉抽出液の前処理について

歯肉抽出液 50 μl 当り, 40 μg のトリプシンを添加して, 30°C で1時間インキュベーションを行なった。その後, トリプシンインヒビターを10倍量加えてトリプシンの作用を停止させたものを反応に使用した。

4) 歯肉抽出液のコラゲナーゼ活性の測定について

歯肉抽出液の各分画について, 反応開始時から 0.5 M EDTA を 20 μl 加えたものを blank とし, トリプシンで前処理しない歯肉抽出液及びトリプシン前処理を行なった歯肉抽出液をそれぞれ 30°C で15時間インキュベーションを行なった。blank 以外のものには反応終了後に, 0.5 M EDTA を 20 μl 添加した。さらに各分画は 35°C で1時間インキュベーションを行ない室温に放置した。次に Terato ら¹³⁾の方法に従い, 50% ジオキサンを添加し, 4分間ミキサーで強く振盪した。これを 6,000 $\times g$ で10分間遠心し, その上清 100 μl をジオキサン系シンチレーター 10ml (Bray solution) に加え, Packard 社製液体シンチレーションスペクトロメーター 3320 型で1分間測定した。得られた cpm 値は外部線源

標準比法によって dpm に換算した。計数効率はや 65% であった。

5) トリプシンによる歯肉抽出液の前処理の条件について

歯肉抽出液を直接インキュベーションした場合, 低い活性しか得られなかったのでトリプシンで前処理する事にした。トリプシンの添加量を 0, 2, 10, 20, 40 (μg) と変化させ前処理した時の活性の変化は, Fig. 1 に示した。トリプシン量が 40 μg の時, 活性はほぼ plateau に達した。以上の結果より歯肉抽出液のトリプシンによる前処理量は各フラクションにつき 40 (μg) とすることにした。

V 歯肉抽出液によるコラーゲン分解産物の電気泳動について

歯肉抽出液と基質コラーゲンとの反応生成物が歯肉由来のコラゲナーゼによるものであるかどうかを確認するため, 5%ポリアクリルアミドゲル電気泳動による分析を行なった。即ち, 歯肉抽出液によるコラーゲン分解反応は, 8 M 尿素, 2% SDS (sodium dodecyl sulphate), 2% mercaptoethanol を含有した 100 μl の 0.1 M sodium phosphate buffer (pH 7.4) の添加により停止させ, 45°C で10分間加熱後, これに 20 μl の

Fig. 1 Effect of treatment with various amounts of Trypsin

bromphenol blue と 20 μ l の glycerol を添加して、ディスク電気泳動にかけた。SDS ポリアクリルアミドゲルの組成は、0.1 M sodium phosphate buffer (pH 7.4) 中に 5% polyacrylamide, 0.2% N, N'-methylenebisacrylamide, 0.2% SDS を含むものである¹⁴⁾。ゲルの直径 5 mm 長さ 10 cm にして、泳動時の電流は 5mA/gel であった。泳動終了後 7% acetic acid で 12 時間固定し、amido black (1% in 7% acetic acid) で 2 時間染色した。脱色は 7% acetic acid にて行なった。

さらにゲル内のコラーゲン分解産物の染色部位に一致して ^{14}C -放射能が認められるかどうかを確認するため、ゲルを 2 mm 間隔にスライスした。各スライスは 0.5 ml の 30% H_2O_2 で 40°C, 12 時間溶解した後、Triton X-100 を含むトルエン系シンチレーター 10 ml を加え液体シンチレーションスペクトロメーターでその放射能を測定した。

VI 歯肉抽出液中のゲラチナーゼの活性測定について¹⁵⁾

歯肉抽出液の F1 について、そのゲラチナーゼの活性を測定した。基質の ^{14}C -コラーゲンを 60°C で 30 分間熱変性させた後、トリプシン処理及び未処理の歯肉抽出液 F1 と 30°C で 15 時間インキュベーションを行なった。反応終了後、濃度 15% になる様 trichloroacetic acid を添加して、60 分間氷冷後、6,000 $\times$ g で 10 分間遠心し、その上清 100 μ l をジオキサン系シンチレーター 10 ml に加え、液体シンチレーションスペクトロメーターで 1 分間測定した。

VII 組織学的考察のための標本作製について

歯肉抽出液の調整に用いた歯肉の組織学的観察を行なうため、歯肉を剥離切除する際、実験側、対照側の上下 P_2 (6 番) の頬側歯肉中央部から組織片を採取した。10% 中性ホルマリンで固定後パラフィン包埋し、通法によりヘマトキシリン・エオジン染色標本を作製し、組織学的観察を行なった。

VIII その他

タンパク質の定量は、精製されたウシ血清アルブミンを標準として、Lowry ら¹⁶⁾の方法で行なった。

ハイドロキシプロリンの定量は、Switzer ら¹⁷⁾の方法に準じて行なった。

総窒素は Kjeldahl 法¹⁸⁾に準じて測定した。

結 果

1. 臨床的健康歯肉の確立について

今回使用した成犬 4 頭は、ブラッシング開始前は、いずれも歯肉の発赤、腫脹が強く認められ、ブラッシング開始時から約 2 週間は出血傾向が観察された。さらにブラッシングを続けることにより、約 4 週間後には発赤、腫脹、出血傾向は全く認められなくなり、臨床的健康歯肉を確立することができた。なおこのブラッシング期間中と実験的歯肉炎発生期間中の対照側歯肉へのブラッシングを、給餌後ただちに行なったことも効果的であったと考えられる (Fig. 2)。

2. 実験的歯肉炎の発生について

プラークの蓄積促進を目的として、歯頸部に浅い溝を形成し絹糸による結紮を行なった結果、プラークは 3 週

Fig. 2 Establishment of clinically healthy gingiva prior to the start of experiment
A : control side B : experimental side

Fig. 3 Establishment of gingivitis in the experimental side three weeks after the experiment

Fig. 4 Maintenance of healthy gingiva in the control side three weeks after the experiment

間後に結紮歯の歯頸部を中心に多量に蓄積し、それに接する歯肉には強い炎症が認められた (Fig. 3)。歯肉炎の状態は、Gingival Index で2の値を示し、探針で軽く歯肉溝を擦過しただけでも容易に出血し、発赤、腫脹もきわめて強く認められた。

実験的歯肉炎発生期間中は、固型飼料を軟泥状にしたものを与えたことがプラークの形成を一層促進した可能性が考えられる。なお、実験期間中、結紮は脱落したり緩んだりしたものは1歯も見られなかった。対照側歯肉は、臨床的に全く健康な状態を示していた (Fig. 4)。

3. コラゲナーゼ抽出に使用した歯肉量と各フラクションに於けるタンパク濃度について

コラゲナーゼ抽出に使用した歯肉の湿重量、抽出後の各フラクションに於けるタンパク量は、Table 3 に示した。使用した歯肉の湿重量は、対照側と実験側間では殆ど差がなく、各フラクションに於けるタンパク量もほぼ一定の割合で抽出できたが、一部抽出量に差が出た点は、最初の乳鉢乳棒による磨砕、均一化に若干の差異が生じたことに起因するものと考えられる。

Table 3 Wet weight of resected gingiva and protein content in each fraction

	Exp. 1	Exp. 2	Exp. 3	Exp. 4
Wet weight (g)				
Control	0.80	0.80	0.90	0.80
Gingivitis	0.85	0.80	1.10	0.80
Total protein (mg)	F 1 F 2 F 3	F 1 F 2 F 3	F 1 F 2 F 3	F 1 F 2 F 3
Control	6.4 1.6 1.2	4.7 1.6 2.1	3.5 2.1 1.3	4.6 1.5 1.1
Gingivitis	6.8 1.6 1.0	4.6 1.6 1.9	5.0 2.7 1.8	4.9 1.5 1.6

Fig. 5 SDS polyacrylamide gel electrophoresis of collagen
1. acid soluble collagen
2. incubated with control gingival extract
3. incubated with inflamed gingival extract

Fig. 6 ^{14}C -Profile of acid soluble collagen after SDS gel electrophoresis (without gingival extract)

4. 反応生成物の SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動による結果について

Fig. 5 は F 1 によるコラーゲン分解産物を SDS ポ

リアクリルアミドゲル電気泳動により分離した泳動パターンである。1 は未反応コラーゲン、2 は対照側の F 1 による反応生成物、3 は実験側の F 1 による反応生成

Fig. 7 ^{14}C -Profile of acid soluble collagen after SDS gel electrophoresis (control)

Fig. 8 ^{14}C -Profile of acid soluble collagen after SDS gel electrophoresis (gingivitis)

物である。2と3には、 β 及び α サブユニットのバンドのほかに、その直下に β と α の分解産物と考えられる新しいバンドの出現が見られ、 β^A 、 α^A と考えられる。さらに、コラーゲナーゼ活性の高い実験側の方には β^A 、 α^A の増加が見られ、コラーゲンの分解が進んでいることを示している。このゲルを 2 mm 間隔でスライスし、それらの放射能を測定した (Fig. 6-8)。未反応コラーゲン、対照側の反応生成物及び実験側の反応生成物の電気泳動後の放射能の各ピークは、先の泳動図のタンパクのバンドと位置的によく対応しており、前述の結果を確認するものと考えられる。またこのことは、アセチル化して得た ^{14}C -コラーゲンが基質として充分使用に耐えるものであることを示している。

5. 歯肉抽出液中の各フラクションに於けるコラーゲナーゼの活性について

Fig. 9, 10 は、歯肉抽出液の活性を各フラクション別に、さらにトリプシンの処理及び未処理別に表したものである。トリプシンで前処理しない場合は、コラーゲナーゼ活性は非常に低く、対照側と実験側間には差が認められなかった。一方、トリプシンで処理した歯肉抽出液のコラーゲナーゼ活性は、各フラクションとも実験側が対照側に比していずれも高く、特に F1 では著明な差が認め

られた。各抽出液に於ける活性は F1 が最も高く、次に F2, F3 の順であった。以上の結果をまとめたものが、Table 4 である。コラーゲナーゼ活性は、歯肉の g 当りの dpm で示した。

トリプシンで前処理しない場合、対照側と実験側間で各フラクションの平均値にはともに統計学的に有意な差が認められなかった ($P>0.05$)。一方トリプシンで処理した場合、実験側と対照側間では F1 の値が統計学的に危険率 2% 以下で有意の差が認められ、F2 と F3 では、危険率 5% 以下で有意の差が認められた。Table 5 は歯肉抽出液中のコラーゲナーゼ活性をコラーゲンの分解量で表したものである。

これらの結果から、実験的に歯肉炎を惹起した歯肉中のコラーゲナーゼ活性は、健康歯肉中のコラーゲナーゼ活性に比して、統計学的にも有意な差をもって増加していることが認められた。

6. 歯肉抽出液中のゲラチナーゼ活性について

実験側及び対照側の歯肉抽出液の F1 について、そのゲラチナーゼの活性を測定した結果が Table 6 である。歯肉抽出液をトリプシンで処理しない場合、活性は低く実験側と対照側間には差は認められなかった ($P>0.05$)。一方、トリプシンで処理すると両抽出液で活性

Fig. 9 Collagenase activities of gingival extracts (dpm/g tissue)

Fig. 10 Collagenase activities of gingival extracts (dpm/g tissue)

Table 4 Collagenase activities of gingival extracts

Control				(10 ⁻³ dpm / g tissue)		
untreated				Trypsin treated		
Fraction	F 1	F 2	F 3	F 1	F 2	F 3
Exp. 1	4.9	1.9	4.8	66.6	32.9	17.7
Exp. 2	13.2	8.3	9.1	116.5	47.9	41.4
Exp. 3	7.7	5.4	15.2	49.1	24.8	25.5
Exp. 4	19.8	13.1	17.7	53.1	30.7	39.1
	N.S.	N.S.	N.S.	*	**	**
Mean±S.D.	11.4±6.5	7.2±4.7	11.7±5.8	71.3±30.9	34.1±9.8	30.9±11.3

Gingivitis				(10 ⁻³ dpm / g tissue)		
untreated				Trypsin treated		
Fraction	F 1	F 2	F 3	F 1	F 2	F 3
Exp. 1	2.3	4.3	10.3	263.4	61.1	33.7
Exp. 2	17.1	11.5	16.3	201.6	68.6	60.6
Exp. 3	9.2	8.2	9.6	175.1	89.6	47.3
Exp. 4	24.7	12.6	15.7	178.1	64.7	41.5
	N.S.	N.S.	N.S.	*	**	**
Mean±S.D.	13.3±9.7	9.2±3.7	12.9±3.5	204.6±40.9	71.0±12.7	45.7±11.3

N.S. : not significant p > 0.05 * P < 0.02 ** P < 0.05

Table 5 Collagenase activities of gingival extracts

Control (μg of collagen degraded / g tissue)						
untreated				Trypsin treated		
Fraction	F 1	F 2	F 3	F 1	F 2	F 3
Exp. 1	10.3	4.7	11.6	160.0	79.0	42.4
Exp. 2	31.7	19.8	21.9	280.0	115.1	99.6
Exp. 3	18.6	12.9	36.6	118.1	59.7	61.3
Exp. 4	47.	31.5	42.6	128.1	73.8	93.9
	N.S.	N.S.	N.S.	*	**	**
Mean±S.D.	27.0±16.3	17.2±11.3	28.1±14.1	171.6±74.5	81.9±23.6	74.3±27.1

Gingivitis (μg of collagen degraded / g tissue)						
untreated				Trypsin treated		
Fraction	F 1	F 2	F 3	F 1	F 2	F 3
Exp. 1	5.6	10.5	24.9	633.3	146.9	81.1
Exp. 2	41.2	27.8	39.3	484.7	164.8	145.6
Exp. 3	22.1	19.9	23.1	420.9	215.3	113.7
Exp. 4	59.5	30.3	37.9	428.1	155.7	99.8
	N.S.	N.S.	N.S.	*	**	**
Mean±S.D.	32.1±23.4	22.1±8.9	31.3±8.4	491.8±98.6	170.6±30.6	110.1±27.2

N.S. : not significant p>0.05 *p<0.02 **p<0.05

Table 6 Gelatinase activities of gingival extracts

(10 ⁻³ dpm / g tissue)					
Control			Gingivitis		
	untreated	Trypsin treated		untreated	Trypsin treated
Fraction	F 1	F 1	Fraction	F 1	F 1
Exp. 1	48.2	184.8	Exp. 1	44.3	321.4
Exp. 2	19.2	286.0	Exp. 2	30.4	350.6
Exp. 3	21.9	276.4	Exp. 3	33.2	283.9
Exp. 4	41.8	367.1	Exp. 4	43.9	364.4
	N.S.	N.S.		N.S.	N.S.
Mean±S.D.	32.7±14.4	278.6±74.6	Mean±S.D.	37.9±7.2	330.0±35.6

N.S. : not significant p>0.05

が著明に上昇した。しかし実験側と対照側間には差は認められなかった (P>0.05)。

7. 対照側及び実験側の組織学的所見について

Fig. 11 は実験期間中ブラッシングを継続した対照側の一例である。対照側では、血管の形態変化及び増殖、

炎症細胞の浸潤は認められなかった。さらに歯肉溝上皮の肥厚も認められず、臨床的健康歯肉として使用した歯肉は、組織学的にも正常な歯肉であることが確認できた。Fig. 12 は実験側の一例である。炎症細胞は歯肉固有層中に広範囲に浸潤しており、浸潤部ではコラーゲンが著しく消失していた。なお歯肉溝上皮では上皮細胞間

Fig. 11 Histologic healthy specimen from the buccal area of the second premolar three weeks after the experiment
×45, H-E staining

Fig. 12 Histologic inflamed specimen from the buccal area of the second premolar three weeks after the ligature
×45, H-E staining

隙の拡大が認められ、側方への増殖をきたしており、上皮突起は不規則な形態を呈していた。また上皮に近接した部位には肉芽の形成及び血管の拡張、増殖が認められた。

考 察

歯周病の病因はきわめて複雑で、その病理学的所見も経時的に変化しやすく、多岐にわたっている。コラーゲンは歯肉に於て結合組織の主成分を占め、歯肉の機能を正常に維持するのに重要な鍵を担っていることはいうまでもない¹⁹⁾。

歯肉の炎症が進行するにつれて、歯肉のコラーゲンが質的、量的にきわめて大きく変化することが知られている¹⁾が歯肉炎の初期に於ては、線維芽細胞に変化が生じ、その結果、結合組織のコラーゲンの性状及び含有量に変化をきたすとも考えられている。即ち、炎症歯肉では総コラーゲン量に著しい減少が生ずる²⁰⁾が、酸及び塩可溶性コラーゲン量も増加してくるといわれている¹⁹⁾。コラーゲン量の変化については、(i) コラーゲン合成能の低下、(ii) コラーゲンの水解酵素の活性増大による機序が考えられる。著者は、歯肉組織中のコラーゲンを生理的温度、pH で切断するコラゲナーゼの存在に注目し、実験的に惹起させた炎症歯肉中に於ける歯肉コラゲナーゼの活性及びインヒビター的作用について検討した。さらに歯肉中のゲラチナーゼの活性についても検討した。

実験的に歯肉炎を惹起させた報告はこれまでに数多くあり^{21~26)}、これらの起炎因子としては細菌性プラークが主である事は広く知られた所である。著者は、急速に歯肉炎を生じさせるために実験側の歯頸部に浅い溝を形成し絹糸を結紮した。その結果、プラークが歯頸部を中心として多量に蓄積し、効果的であることが確認された。これらの方法は、細菌性プラークの蓄積を目的として行なった、Lindhe ら²⁶⁾、Kennedy ら²⁷⁾、Schroeder²⁸⁾らの方法と一致する。また、イヌ飼育用固型飼料を軟泥状にした soft diet を与えたが、このことは起炎性の食餌として細菌性プラークの蓄積を促進したものと考えられる。^{22,26~30)}

歯肉のコラゲナーゼについては、Fullmer ら⁶⁾が最初にコラーゲン・ゲル・プレート法を用いてその存在を確認して以来、主として培養細胞を用いてコラゲナーゼの研究がなされてきた^{31~33)}。さらに歯肉溝滲出液中のコラゲナーゼ活性も測定されている^{34,35)}。

一般的には、コラゲナーゼは組織から直接証明することは、いくつかの報告^{36~40)}を除くと困難であるとされてきた。その理由として組織中のこの酵素の量は一般に少なく、かつ α_2 -Macroglobulin (α_2 -M)^{8,24,41~43)} 及び

組織由来のインヒビター^{43,44)}などと結合して、latent form として存在することが考えられてきた。これに関連して Birkedal-Hansen ら⁴⁵⁾は、培養牛歯肉由来の latent なコラゲナーゼをトリプシンで処理することにより、コラゲナーゼと α_2 -M の複合体からのコラゲナーゼの遊離、あるいはプロコラゲナーゼの活性型酵素への転換、またはその両者によってコラゲナーゼが活性化されることを報告している。本研究に於ても latent な酵素の存在を示唆する様な結果がまず見られたため、比較的高濃度のトリプシンで歯肉抽出液を処理し、トリプシンインヒビターを 10 倍量加えたのちコラゲナーゼの活性を測定した結果、著明な活性の上昇が得られた。このことは、トリプシンにより抽出液中のコラゲナーゼと α_2 -M または組織中のインヒビターとの複合体からコラゲナーゼが遊離したことを強く示唆している。またプロコラゲナーゼの活性化⁴⁶⁾が生じた可能性も考えられるであろう。この活性化の度合は炎症側で著明であり、対照側に比し有意の差が認められた (F 1 $P < 0.02$, F 2 $P < 0.05$, F 3 $P < 0.05$)。なおここで検出されたコラーゲンの分解が、コラゲナーゼによるものであることは分解産物の SDS ポリアクリルアミド電気泳動での放射能の分布の研究からも確認されている。

ここで抽出した歯肉コラゲナーゼは、あくまで *in vitro* での活性であり、実際、組織中でこれらのコラゲナーゼがそのまま作用していたかについては問題がある。しかし、H-E 染色組織標本によるコラーゲンの分解程度と *in vitro* のコラゲナーゼの活性との間に相関が認められることは、*in vitro* でのコラゲナーゼ活性の増大が、ある程度 *in vivo* の状態を反映しているものと推定される。

今回著者は歯肉からのコラゲナーゼの抽出法をいくつかの過程に分けて行なった。歯肉ホモジネートからコラゲナーゼが抽出されたことは Uitto ら⁸⁾の報告と一致する。彼らは、ゲルクロマトグラフィー後のフラクションにコラゲナーゼの活性を認めているが、著者はゲルクロマトグラフィーによる分離を行わず、歯肉抽出液を直接比較的高濃度のトリプシンで処理することにより炎症歯肉及び健康歯肉中のコラゲナーゼ活性を比較検討することができた。また歯肉ホモジネートを超音波処理した抽出液からコラゲナーゼの活性を得ることができたが、このことは 22 時間振盪後、遠心した沈渣にもコラゲナーゼ活性が存在していることを示している。さらに塩濃度を 1.0 M にした buffer でよく suspend し、超音波処理したもののにも活性がみられた。これらの活性は、単

に振盪により抽出されるコラゲナーゼの活性のレベルよりは低いものの全例に認められた。振盪では抽出されず、超音波処理によって抽出されるコラゲナーゼは、基質にある強度をもって結合していることが示唆される。即ち、これらの、少なくとも一部は、コラーゲン線維に結合してその分解に関与している可能性が考えられる。この超音波処理により抽出される結合型のコラゲナーゼが炎症歯肉で増加していることは興味深い。なお結合型コラゲナーゼが熱処理で抽出されるという報告があるが⁸⁾、著者の実験では成功しなかった。

以上のことから歯肉のコラゲナーゼはその殆どが、latent form で存在しており、 α_2 -M 等のインヒビターと結合しているものと、基質コラーゲンに結合して存在するものとが考えられる。さらにプロコラゲナーゼの型で存在する可能性も考えられる。これらの存在様式で歯肉中のコラゲナーゼは、コラーゲンの消長に関与しているものと思われる。なお、インヒビターとコラゲナーゼの複合体形成が歯肉抽出液を得る過程で人工的に一部で生じた可能性も考慮しなければならないであろう。

歯肉コラゲナーゼの由来については、線維芽細胞⁴⁷⁾、上皮細胞⁴⁸⁾、白血球³⁹⁾、マクロファージ⁴⁹⁾などが考えられているが、今回使用した歯肉はこれら全てを含有するものであり、その由来は明らかでない。しかし、以上の産生細胞の質的、量的変化によるコラゲナーゼの産生の上昇は、歯肉結合組織の破壊の一因子とみてもよいであろう。

今回使用した炎症歯肉は、その組織像から炎症の程度は全般的にやや高度に属し、浸潤細胞もリンパ球を中心とした時期のものと考えられる。臨床的所見とコラゲナーゼ活性の関係については、歯周炎の場合が、軽度の歯肉炎や臨床的健康歯肉よりも活性が高いという報告^{31,50,51)}がある。実験的にヒトに歯肉炎を起こした Robertson ら²⁴⁾の報告では、初期の軽度の歯肉炎歯肉の組織培養によるコラゲナーゼ活性は、正常歯肉より活性が低かった。これは、この時期の血清成分の浸出によりコラゲナーゼ活性が抑制されたものと考えられている。

次に著者は ^{14}C -コラーゲンを熱変性させた基質を使用して炎症歯肉及び健康歯肉の抽出液のうち F 1 についてグラチナーゼ活性を検討した。グラチナーゼに関しては、Harris ら¹⁵⁾が滑膜組織の培養によってその活性を見出し、Sellers ら⁵²⁾は家兎骨の培養液からトリプシンで活性化されるゼラチン分解能を有する不活性型の酵素を分離している。さらに、Sellers ら⁵³⁾はコラゲナーゼインヒビターが、グラチナーゼのインヒビターとし

でも作用していることも示した。また、この酵素は latent form で存在し、トリプシンや 4-aminophenyl-mercuric acetate 等で活性化されることも示している⁵²⁾。

本研究の結果も、トリプシンで前処理しない抽出液では、ゼラチン分解活性が低く炎症歯肉及び健康歯肉間では有意な差は認められなかった。一方トリプシン処理により活性は著明に上昇したが、炎症歯肉と健康歯肉間には有意な差が認められなかった。トリプシン処理で活性が上昇することは、コラゲナーゼの場合と類似しており、歯肉ゲラチナーゼも大部分は、latent form で存在すると考えられる⁵⁴⁾。炎症歯肉及び健康歯肉中のゲラチナーゼの活性についての報告は見られないが、ゲラチナーゼとインヒビターの複合体、またはプロ酵素の型で存在することが本研究から示唆される。

結 論

実験的歯肉炎に於けるコラゲナーゼの活性及びゲラチナーゼの活性を検討した結果、以下の様な結論を得た。

1) 少量でかつ活性の低い歯肉組織のコラゲナーゼ活性を、比放射活性の高いアセチル化基質を使用することで測定比較することができた。

2) 歯肉コラゲナーゼは、トリプシンで処理することで活性が上昇し、実験側と対照側で直接、比較することができた。このことは、歯肉のコラゲナーゼは大部分が latent form として存在し、トリプシンによりコラゲナーゼとインヒビターの複合体、またはプロコラゲナーゼが活性化されたことを示唆するものである。

3) 超音波処理及び 1 M NaCl で抽出後の超音波処理による歯肉抽出液にもコラゲナーゼ活性が存在することが確認され、コラーゲンに結合したコラゲナーゼの作用が現れたものと考えられる。

4) 実験的に惹起した炎症歯肉と健康歯肉間ではコラゲナーゼ活性に著明な差が認められ、統計学的にも有意であった。

5) ゲラチナーゼ活性については、炎症歯肉と健康歯肉間には、統計学的に有意な差は認められなかった。

謝辞 稿を終えるにあたり、終始懇篤なる御指導と御校閲を賜りました、原 耕二教授、野原広美教授に心から感謝申し上げます。また本研究の遂行に際して御援助及び御協力いただきました、本学口腔生化学教室員ならびに保存学第2教室員の皆様に深謝いたします。

文 献

- 1) Page, R.C. and Schroeder, H.E. : Biochemical aspects of the connective tissue alterations in inflammatory gingival and periodontal disease. *Int. Dent. J.*, 23 : 455-469, 1973.
- 2) Woessner, J.F. Jr. : Mammalian collagenases. *Clin. Orthop.*, 96 : 310-326, 1973.
- 3) Harris, E.D. Jr. and Krane, S.M. : Medical progress: Collagenases, Part I, II, III. *N. Engl. J. Med.*, 291 : 557-563, 605-609, 652-661, 1974.
- 4) Weiss, J.B. : Enzymic degradation of collagen ; in *International review of connective tissue research*, ed. Hall, D.A. and Jackson, D.S., Vol. 7, Academic Press, New York and London, 1976, 101-157.
- 5) Gross, J. : Aspects of the collagenase ; in *Biochemistry of collagen*, ed. Ramachandran, G.N. and Reddi, A.H., Plenum Press, New York and London, 1976, 275-318.
- 6) Fullmer, H.M. and Gibson, W. : Collagenolytic activity in gingivae of man. *Nature*, 209 : 728-729, 1966.
- 7) Fullmer, H.M., Taylor, R.E. and Guthrie, R.W. : Human gingival collagenase: purification, molecular weight, and inhibitor studies. *J. Dent. Res.*, 51 : 349-355, 1972.
- 8) Uitto, V.-J., Turto, H. and Saxén, L. : Extraction of collagenase from human gingiva. *J. Periodont. Res.*, 13 : 207-214, 1978.
- 9) 高橋徳也, 野原広美, 原 耕二, 小林幸男 : ヒト歯肉スライスにおけるコラーゲン代謝, 中性塩溶液可溶性分画の SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動法による分析. *歯基礎誌*, 16 : 375-382, 1974.
- 10) Gallop, P.M. and Seifter, S. : Preparation and properties of soluble collagens ; in *Methods in enzymology*, ed. Colowick, S.P. and Kaplan, N.O., Vol. VI, Academic Press, New York, 1963, 635-641.
- 11) Kang, A.H., Nagai, Y., Piez, K.A. and Gross, J. : Studies on the structure of collagen utili-

- zing a collagenolytic enzyme from tadpole. *Biochemistry*, 5 : 509-515, 1966.
- 12) Gisslow, M.T. and McBride, B.C. : A rapid sensitive collagenase assay. *Anal. Biochem.*, 68 : 70-78, 1975.
 - 13) Terato, K., Nagai, Y., Kawanishi, K. and Yamamoto, S. : A rapid assay method of collagenase activity using ^{14}C -labeled soluble collagen as substrate. *Biochim. Biophys. Acta*, 445 : 753-762, 1976.
 - 14) Weber, K. and Osborn, M. : The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *J. Biol. Chem.*, 244 : 4406-4412, 1969.
 - 15) Harris, E.D. Jr. and Krane, S.M. : An endopeptidase from rheumatoid synovial tissue culture. *Biochim. Biophys. Acta*, 258 : 566-576, 1972.
 - 16) 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.
 - 17) Switzer, B.R. and Summer, G.K. : Improved method for hydroxyproline analysis in tissue hydrolyzates. *Anal. Biochem.*, 39 : 487-491, 1971.
 - 18) 高橋礼子 : タンパク質試料の準備. 生化学実験講座. 第1巻, 日本生化学会編, 東京化学同人, 東京, 1976, 5-40.
 - 19) Schluger, S., Yuodelis, R.A. and Page, R.C. : Periodontal disease, Lea & Febiger, Philadelphia, 1977, 222-238.
 - 20) Schroeder, H.E., Münzel-Pedrazzoli, S. and Page, R.C. : Correlated morphometric and biochemical analysis of gingival tissue in early chronic gingivitis in man. *Arch. Oral Biol.*, 18 : 899-923, 1973.
 - 21) Loe, H., Theilade, E. and Jensen, S.B. : Experimental gingivitis in man. *J. Periodontol.*, 36 : 177-187, 1965.
 - 22) Hamp, S.-E., Lindhe, J. and Loe, H. : Long term effect of chlorhexidine on developing gingivitis in the beagle dog. *J. Periodont. Res.*, 8 : 63-70, 1973.
 - 23) Listgarten, M.A. and Ellegaard, B. : Experimental gingivitis in the monkey. *J. Periodont. Res.*, 8 : 199-214, 1973.
 - 24) Robertson, P.B., Grupe, H.E. Jr., Taylor, R.E., Shyu, K.W. and Fullmer, H.M. : The effect of collagenase-inhibitor complexes on collagenolytic activity of normal and inflamed gingival tissue. *J. Oral Pathol.*, 2 : 28-32, 1973.
 - 25) Ericsson, I., Lindhe, J., Rylander, H. and Okamoto, H. : Experimental periodontal breakdown in the dog. *Scan. J. Dent. Res.*, 83 : 189-192, 1975.
 - 26) Lindhe, J. and Ericsson, I. : Effect of ligature placement and dental plaque on periodontal tissue breakdown in the dog. *J. Periodontol.*, 49 : 343-350, 1978.
 - 27) Kennedy, J.E. and Polson, A.M. : Experimental marginal periodontitis in squirrel monkeys. *J. Periodontol.*, 44 : 140-144, 1973.
 - 28) Schroeder, H.E. and Lindhe, J. : Conversion of stable established gingivitis in the dog into destructive periodontitis. *Arch. Oral Biol.*, 20 : 775-782, 1975.
 - 29) Lindhe, J., Hamp, S.-E. and Loe, H. : Experimental periodontitis in the beagle dog. *J. Periodont. Res.*, 8 : 1-10, 1973.
 - 30) Lindhe, J., Hamp, S.-E. and Loe, H. : Plaque induced periodontal disease in beagle dogs. *J. Periodont. Res.*, 10 : 243-255, 1975.
 - 31) Beutner, E.H., Triftshauser, C. and Hazen, S.P. : Collagenase activity of gingival tissue from patients with periodontal disease. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 121 : 1082-1085, 1966.
 - 32) Schneit, A.W. and Fullmer, H.M. : Specific collagenase from germ-free rat gingivae. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 135 : 436-438, 1970.
 - 33) Birkedal-Hansen, H., Cobb, C.M., Taylor, R.E. and Fullmer, H.M. : Bovine gingival collagenase : Demonstration and initial characterization. *J. Oral Pathol.*, 3 : 232-238, 1974.
 - 34) Golub, L.M., Siegel, K., Ramamurthy, N.S. and 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.
- 35) Kowashi, Y., Jaccard, F. and Cimasoni, G. : Increase of free collagenase and neutral protease activities in the gingival crevice during experimental gingivitis in man. *Arch. Oral Biol.*, 24 : 645-650, 1979.
 - 36) Ryan, J.N. and Woessner, J.F. Jr. : Mammalian collagenase: Direct demonstration in homogenates of involuting rat uterus. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 44 : 144-149, 1971.
 - 37) Nagai, Y. and Hori, H. : Vertebrate collagenase: Direct extraction from animal skin and human synovial membrane. *J. Biochem.*, 72 : 1147-1153, 1972.
 - 38) Sakamoto, S., Sakamoto, M., Goldhaber, P. and Glimcher, M.J. : Isolation of tissue collagenase from homogenates of embryonic chick bones. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 53 : 1102-1108, 1973.
 - 39) Lazarus, G.S., Brown, R.S., Daniels, J.R. and Fullmer, H.M. : Human granulocyte collagenase. *Science*, 159 : 1483-1485, 1968.
 - 40) 三木隆雄 : 歯肉のコラゲナーゼ活性に関する研究. *日歯周誌*, 14 : 1-9, 1972.
 - 41) Birkedal-Hansen, H., Cobb, C.M., Taylor, R. E. and Fullmer, H.M. : Serum inhibition of gingival collagenase. *J. Oral Pathol.*, 3 : 284-290, 1974.
 - 42) Werb, Z., Burleigh, M.C., Barrett, A.J. and Starkey, P.M. : The interaction of α_2 -macroglobulin with proteinases. Binding and inhibition of mammalian collagenases and other metal proteinases. *Biochem. J.*, 139 : 359-368, 1974.
 - 43) Sellers, A. and Reynolds, J.J. : Identification and partial characterization of an inhibitor of collagenase from rabbit bone. *Biochem. J.*, 167 : 353-360, 1977.
 - 44) Welgus, H.G., Stricklin, G.P., Eisen, A.Z., Bauer, E.A., Cooney, R.V. and Jeffrey, J.J. : A specific inhibitor of vertebrate collagenase produced by human skin fibroblast. *J. Biol. Chem.*, 254 : 1938-1943, 1979.
 - 45) Birkedal-Hansen, H., Cobb, C.M., Taylor, R. E. and Fullmer, H.M. : Activation of latent bovine gingival collagenase. *Arch. Oral Biol.*, 20 : 681-685, 1975.
 - 46) Sellers, A., Cartwright, E., Murphy, G. and Reynolds, J.J. : Evidence that latent collagenases are enzyme-inhibitor complexes. *Biochem. J.*, 163 : 303-307, 1977.
 - 47) Birkedal-Hansen, H., Cobb, C.M., Taylor, R. E. and Fullmer, H.M. : Synthesis and release of procollagenase by cultured fibroblast. *J. Biol. Chem.*, 251 : 3162-3168, 1976.
 - 48) Fullmer, H.M., Gibson, W.A., Lazarus, G.S., Bladen, H.A. and Whedon, K.A. : The origin of collagenase in periodontal tissues of man. *J. Dent. Res.*, 48 : 646-651, 1969.
 - 49) Wahl, L.M., Wahl, S.M., Mergenhagen, S.E. and Martin, G.R. : Collagenase production by endotoxin-activated macrophages. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 71 : 3598-3601, 1974.
 - 50) Fullmer, H.M. : Collagenase and periodontal disease: A review. *J. Dent. Res.*, 50 : 288-291, 1971.
 - 51) Robertson, P.B. and Simpson, J. : Collagenase : Current concepts and relevance to periodontal disease. *J. Periodontol.*, 47 : 29-33, 1976.
 - 52) Sellers, A., Reynolds, J.J. and Meikle, M.C. : Neutral metallo-proteinases of rabbit bone : Separation in latent forms of distinct enzymes that when activated degrade collagen, gelatin and proteoglycans. *Biochem. J.*, 171 : 493-496, 1978.
 - 53) Sellers, A., Murphy, G., Meikle, M.C. and Reynolds, J.J. : Rabbit bone collagenase inhibitor blocks the activity of other neutral metalloproteinases. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 87 : 581-587, 1979.
 - 54) Vaes, G., Eeckhout, Y., Lenaers-Claeys, G., François-Gillet, C. and Druetz, J.-E. : The simultaneous release by bone explants in

culture and the parallel activation of procollagenase and of a latent neutral proteinase that degrades cartilage proteoglycans and

denatured collagen. *Biochem. J.*, 172 : 261-274, 1978.