ラット歯肉のグリコサミノグリカンとコラーゲンの 加齢による変動について

四 方 英 夫 近 藤 真 弓 理 内 海 順 夫
平 松 正 彦* 畠 山 桂 子* 南 直 臣*

城西歯科大学口腔病理学講座

(主任：内海順夫教授)

城西歯科大学歯科薬理学講座*

(主任：南 直臣教授)

(昭和 56 年 11 月 12 日受付)

Effect of Age on Glycosaminoglycan and Collagen Contents in the Rat Gingiva

Hideo SHIKATA, Mayuri KONDO, Nobuo UTSUMI,
Masahiko HIRAMATSU*, Keiko HATAKEYAMA*
and Naomi MINAMI*

Department of Oral Pathology, Josai Dental University

(Chief and Director : Prof. Nobuo UTSUMI)

*Department of Dental Pharmacology, Joasi Dental University

(Chief and Director : Prof. Naomi MINAMI)

Effect of age on the contents of glycosaminoglycans (GAG) and collagen in the rat gingiva was studied biochemically and histochemically. Male wistar rats of 4, 11~12 and 56~64 weeks old were used as young adult and old groups, respectively. The results are as follows :

1 No marked difference in the GAG content was found among the three groups.

Qualitative analysis of GAG by two dimensional electrophoresis revealed the presence of hyaluronic acid, dermatan sulfate and heparan sulfate. No marked difference was found in the intensity of the staining in these components between young and old groups.

2 Sulfated GAG was observed in the part of

connective tissue, while nonsulfated GAG observed mainly in the epithelial part of the gingiva by histochemical staining.

Staining intensity was almost equal between young and old groups.

3 Total collagen content was extremely high in adult and old groups as compared with young group. This finding was also confirmed by histochemical staining.

4 Both the contents of salt-and soluble collagens were increased in adult group but the increased levels were declined in old group. The content of insoluble collagen was extremely high in adult and old groups as compared with young group.

緒 言

グリコサミノグリカン (GAG) とコラーゲンは結合組織の主要構成成分であり、加齢あるいは疾患により両成分が量的および質的に変動することは広く知られている。皮膚や動脈では、GAG のコラーゲンに対する割合が加齢に伴い著しく減少することから、この比率変化は結合組織の老化の生化学的指標ともされている¹⁾。

歯肉の両成分の変動については、歯周疾患との関係についていくつかの報告があり、一般に炎症歯肉ではコラーゲン量が減少し^{2,3)}、GAG 量が増加することが知られている⁴⁾。また、実験的糖尿病動物の歯肉でも同様な変化がみられることが報告されている^{5,6)}。しかし、歯肉の結合組織成分と加齢との関係についての検討は少なく、坂本⁷⁾ がウシとウサギの歯肉で GAG 量の加齢による減少を報告しているにすぎない。本研究で我々は、ラット歯肉の GAG とコラーゲンが加齢に伴いどのように変動するかを生化学的および組織化学的に検討した。

実験材料および方法

1. 実験動物

雄の Wistar 系幼若ラット (4 週齢)、成熟ラット (11~12 週齢) および老齢ラット (56~64 週齢) を実験に使用した。

2. 歯肉の採取

ラットを放血致死させ、上顎頰側、下顎の舌側と頰側の歯肉を切除し、切除歯肉は生理食塩水で十分に洗浄して使用した。また切除歯肉の一部は生化学的定量に用いたが、この場合、各部位をプールして使用した。

3. GAG の抽出および定量

6~8 匹分の歯肉をプールして細分し、アセトンを加えて脱脂、脱水した後、乾燥組織 10 mg あたり 0.5 ml の 0.1% Pronase E (科研化学) を含む 0.1M Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.8) を加え、40°C で 48 時間タンパク消化を行なった。消化後、50% のトリクロール酢酸を終濃度が 10% になるように加え、2~3°C で 1 時間放置後、遠心分離して上清を得た。上清を NaOH で中和し、流水中で一夜透析した後、3 倍量のエタノール (1% CH₃COOK 含有) を加え、2~3°C で 16 時間放置した。その後、遠心分離して得られた沈殿を少量の蒸留水に溶解し、試料中の GAG 量をウロン酸量として Bitter and Muir の方法⁸⁾ で定量した。

各 GAG の分離は Hata and Nagai⁹⁾ の二次元電気泳動法で行なった。支持体としてセパラックス (常光産業) を使用し、0.1M ピリジン-0.47M ギ酸緩衝液 (pH 3.0) 中で 1mA/cm, 1.5 時間泳動させ、次いで 0.1M 酢酸バリウム溶液 (pH 8.0) 中で二次元方向に 1mA/cm, 4.5 時間泳動させた。泳動後のセパラックスは 0.1% Alcian blue 8GX-0.1% 酢酸溶液中で染色した。

4. コラーゲンの抽出および定量

歯肉に少量の 6N 塩酸を加え、真空封管中で 110°C, 18 時間加水分解した。加水分解後、エバポレーターで塩酸を除去し、さらに NaOH で中和した試料中の hydroxyproline 量を Woessner 法¹⁰⁾ で定量した。

塩可溶性、酸可溶性および不溶性コラーゲンの抽出は前報⁹⁾ と同様に行なった。塩可溶性コラーゲンは 0.5M NaCl (5 mM の EDTA 含有, pH 7.4), 酸可溶性コラーゲンは 0.5M クエン酸緩衝液 (pH 3.6), 不溶性コラーゲンは 0.3M トリクロール酢酸で抽出し、抽出後のコラーゲンにつき、上記と同様にして hydroxyproline 量を定量した。

5. 組織化学的観察

歯肉を 2% 酢酸カルシウムを含む 10% 中性ホルマリンで 2 日間固定後、通法によりパラフィン包埋を行ない、5 μ の厚さの連続切片を作製した。GAG は pH 1, pH 2.5 の条件下で、さらに 0.05M, および 0.5M MgCl₂ 存在下での Alcian blue 染色で観察した¹¹⁾。コラーゲンは 10% 中性ホルマリンで固定した後の切片を Mallory-Azan 染色で観察した。

Fig. 1 The content of uronic acid in rat gingiva. Each point shows means $\pm$ S.E. of 4 experiments.

Fig. 2 Two dimensional electrophoresis patterns of GAG from young (left) and old (right) samples.

Fig. 3 The content of hydroxyproline in rat gingiva. Each point shows means+S.E. of 5 experiments. †, $P < 0.01$ compared with the value of 4 weeks.

実験結果

1. GAG の変動

歯肉の GAG 量の加齢による変動についての結果は Fig. 1 に示した。

GAG 量は幼若群に比較して成熟群でやや増加する傾向が認められ、老齢群では成熟群に比較して減少する傾向が認められたが、有意差はなかった。

幼若群と老齢群の GAG の二次元電気泳動パターンは

Fig. 4 The content of soluble and insoluble collagens in rat gingiva. Values are expressed as the content of hydroxyproline. Each point shows mean±S.E. of 4 experiments. *: $P < 0.05$, †: $P < 0.01$ compared with the value of 4 weeks.

Fig. 2 に示した。

ラットの歯肉では、ヒアルロン酸 (HA)、デルマタン硫酸 (DS) およびヘパラン硫酸 (HS) に一致する成分の

Fig. 5 Ratio of uronic acid to hydroxyproline. Each point shows mean $\pm$ S.E. of 4 experiments. ※: $P < 0.05$, †: $P < 0.01$ compared with the value of 4 weeks.

存在が認められた。コンドロイチン硫酸 (C4S) に一致する成分はほとんど認められなかった。幼若群と老齢群のパターンを比較した場合、各成分の染色程度にほとんど差異はみられなかった。

2. コラーゲンの変動

歯肉のコラーゲン量の加齢による変動についての結果は Fig. 3 と 4 に示した。

全コラーゲン量は幼若群に比較した場合、成熟群と老齢群で著しい増加が認められた。塩可溶性コラーゲン量は成熟群で著しい増加が認められたが、老齢群では逆に明らかな減少が認められた。酸可溶性コラーゲンも塩可溶性コラーゲンとほぼ同様な変動を示した。一方、不溶性コラーゲン量は成熟群で増加が認められるが、老齢群でも成熟群とほぼ同程度の値を示した。

したがって、ラットの歯肉では加齢に伴い GAG のコラーゲンに対する割合が著しく低下することが明らかとなった (Fig. 5)。

3. 組織化学的観察

GAG の Alcian blue による染色は、pH と塩濃度の差で染色される成分に違いがみられることが知られており、pH 1 の条件下では主に硫酸化 GAG、pH 2.5 では非

Fig. 6 Buccal gingiva of mandible, showing high density of extracellular stain. Note the loss of epithelial intercellular stain. Old rat. Alcian blue pH 1.0. $\times 120$.

硫酸化 GAG、0.05M $MgCl_2$ 存在下では全 GAG、0.5M $MgCl_2$ 存在下では硫酸化 GAG が染色されることが報告されている¹¹⁾。

ラット歯肉の GAG は、Fig 6~9 に示したように、pH 1 の条件下では結合組織が陽性反応を示し、pH 2.5 では結合組織よりも上皮組織でより強い陽性反応がみられた。また、0.05M $MgCl_2$ 存在下では上皮組織でより強い陽性反応が認められたが、0.5M $MgCl_2$ 存在下の場合に比べてやや弱い、結合組織にも陽性反応がみられた。

これらの染色の程度は幼若群と老齢群との間では差異は認められなかった。

一方、コラーゲンの分布は、歯根の方向に沿って認められた。

コラーゲンの分布状況についてみると、幼若群に比較して老齢群では密であり、このことは生化学的定量的結

Fig. 7 Buccal gingiva of mandible, showing epithelial stain. Old rat. Alcian blue pH 2.5. $\times 120$.

Fig. 8 Buccal gingiva of maxilla, showing dense stain of epithelial intercellular substance. Old rat. Alcian blue 0.05M $MgCl_2$. $\times 120$.

果とも一致している。

考 案

本研究の結果から、ラット歯肉の GAG 量は加齢によりほとんど変動しないこと、一方、コラーゲン量は加齢に伴い増加し、とくに不溶性コラーゲン量の増加が著しいことが明らかとなった。これらの結果は Murray ら¹²⁾の皮膚組織での結果とよく一致している。一方、Sobel ら¹¹⁾は皮膚と大動脈の結合組織成分の加齢変化について検討し、hexosamine 量は著しく減少するが、hydroxyproline 量は変化しないことから、GAG/コラーゲンの比率の低下は結合組織の老化の生化学的指標となり得ることを報告している。我々の歯肉での結果は Sobel らの結果とは異なるが、いずれにしても加齢に伴い GAG/コラーゲンの比率が低下することは明かである。

坂本⁷⁾はウシとウサギの歯肉で GAG 量が加齢に伴い減少することを報告しているが、ラットの歯肉では幼若群、成熟群および老齢群の間で GAG 量（ウロン酸量として測定）に有意な差は認められなかった。これらの結果の相異は、種属間での GAG の各成分の比率の違いによる結果であると考えられる。

歯肉の GAG は HA, HS, DS, C4S および C6S の成分から成ることが知られているが、個々の成分比率は種差によりかなり異なるものと思われる。たとえばイヌの歯肉では DS が 69% をしめ、残りの大部分が HA であるのに対し¹³⁾、ウシ、ブタ、ウサギの歯肉では C4S の占める割合が比較的高い^{7, 14-16)}。DS は、皮膚組織では他の成分と異なり加齢に伴い、むしろ増加するとの報告があり^{17, 18)}、成分比率の違いは結合組織の基質成分の加齢

Fig. 9 Buccal gingiva of maxilla. Old rat. Alcian blue 0.5M MgCl₂. $\times 120$.

変動に大きく関与するものと思われる。

我々がラット歯肉の GAG を二次元電気泳動法で定性したところ、DS と HA が主成分であり、さらに少量の HS が認められたが、C4S と C6S はほとんど認められなかった。また、幼若群と老齢群との間で、泳動パターンと染色の程度に差異はみられなかったことから、ラット歯肉の GAG は加齢により質的にも変化しないことが示唆される。

組織学的観察から、硫酸化 GAG は結合組織に分布し、非硫酸化 GAG は結合組織よりも、むしろ上皮層で多く分布することが確認された。ラット歯肉では硫酸化 GAG は大部分が DS であること、また、非硫酸化 GAG は HA であることから、両成分の役割は結合組織ではコラーゲン線維の形成に、上皮層では水分や電解質の保持に関係しているようである。

歯肉の線維成分の変動については、疾患との関係についての報告は比較的多いが、加齢変化についての検討はなされていない。一般に炎症歯肉ではコラーゲン量は減少することが知られているが^{2,3)}、これは炎症に基づくコ

ラーゲン分解活性の亢進による結果であると考えられる。また、糖尿病における歯肉でもコラーゲン量が減少することが報告されている^{5,6)}。

皮膚などの結合組織では、加齢に伴う可溶性コラーゲンの減少、不溶性コラーゲンの減少、不溶性コラーゲンの増加が認められるが^{20,21)}、本実験のラットの歯肉でもほぼ同様な結果が得られた。すなわち不溶性コラーゲン量は、幼若群に比較して成熟群と老齢群では約 1.7 倍の増加が認められた。一方、塩可溶性および酸可溶性コラーゲン量は、幼若群に比較して成熟群で増加するが、老齢群では逆に明らかな減少が認められた。

可溶性コラーゲンは不溶性コラーゲンの前駆物質であると考えられており²¹⁾、とくに塩可溶性成分は turnover が早く不安定で、架橋構造をもたないことから、これらの成分は加齢に伴い物理的、化学的に安定なコラーゲン成分に変化していくものと思われる。

今回はコラーゲンについてその量的変化を検討したにすぎないが、今後コラーゲンの代謝、分子内および分子間架橋結合の加齢変化などについてさらに検討していきたいと考える。

結 論

ラット歯肉の GAG とコラーゲン量が加齢に伴い、どのように変動するかを生化学的および組織化学的に検討し、以下の結果を得た。

1. GAG 量は幼若、成熟および老齢群の間で顕著な変化はみられなかった。GAG の二次元電気泳動から、HA、DS および HS が同定されたが、幼若群と老齢群との間で泳動パターンと染色の程度に差異はみられなかった。

2. 組織化学的には、硫酸化 GAG は結合組織で、非硫酸化 GAG は主として上皮層に分布することが観察されたが、これら GAG の加齢による分布状況と染色の程度に差はみられなかった。

3. コラーゲン量は幼若群に比較して成熟群と老齢群で著しい増加が認められた。組織学的にも同様の所見であった。

4. 塩可溶性および酸可溶性コラーゲン量は幼若群に比較して成熟群では増加するが、老齢群では逆に減少した。不溶性コラーゲン量は成熟群と老齢群ではほぼ同程度の増加が認められた。

Fig. 10 Buccal gingiva of maxilla, showing dense collagen in connective tissue. Left : young rat, right : old rat. Mallory-Azan. $\times 120$.

文 献

- 1) Sobel, H., Wright, E.T., Gabay, S. and Nelson, N.H. : *Gerontologia*, 2 : 59-63, 1958.
- 2) Fliedner, D.E., Sun, C.N. and Schneider, B.C. : Chemistry of normal and inflamed human gingival tissues. *Periodontics*, 4 : 302-307, 1966.
- 3) Stern, B.D. : Collagen solubility of normal and inflamed human gingivae. *Periodontics*, 5 : 167-171, 1967.
- 4) 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 : ヒト病的歯肉結合組織成分に関する研究 1. ヘキシサミンならびにコラーゲン量について, *日歯周誌*, 17 : 245-250, 1975.
- 5) Ramamurthy, N.S., Zebrowski, E.J. and Golub, L.M. : The effect of alloxan diabetes on gingival collagen metabolism in rats. *Archs. Oral Biol.*, 17 : 1551-1560, 1972.
- 6) 平松正彦, 畠山桂子, 安部 勲, 南 直臣 : 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, *日歯周誌*, 19 : 358-363, 1977.
- 7) 坂本真喜 : 歯肉 および 歯 髄 の Acidic glycosaminoglycan の生化学的研究 第2報 歯肉および歯髄の Acidic glycosaminoglycan の加齢的変化, *広歯誌*, 9 : 52-60, 1977.
- 8) Bitter, T. and Muir, H.M. : A modified uronic acid carbazole reaction. *Anal. Biochem.*, 4 : 330-334, 1962.
- 9) Hata, R. and Nagai, Y. A rapid and micro method for separation of acidic glycosaminoglycans by two dimensional electrophoresis. *Anal. Biochem.*, 45 : 462-468, 1972.
- 10) Woessner, J.F. : The determination of hydro-

- xyproline in tissue and protein samples containing small proportions of this amino acid. *Arch. Biochem. Biophys.*, 93 : 440-447, 1961.
- 11) Pedlar, J. : Histochemistry of glycosaminoglycans in the skin and oral mucosa of the rat. *Archs. Oral Biol.*, 24 : 777-786, 1979.
 - 12) Murray, D.H., Watts, W.R. and Ring, J.R. : Hexosamine and hydroxyproline concentrations in skin and buccal mucosa of an aging rat population. *J. Geront.*, 16 : 17-19, 1961.
 - 13) 多和敏一, 島田惣四郎, 安柄善, 小野博治, 湯原良通, 藪内政憲, 富岡成夫, 堀内章久, 石崎好洋 : 歯肉の酸性ムコ多糖に関する研究 (3) イヌ歯肉酸性ムコ多糖の構成比率について, *歯科医学*, 40 : 119-124, 1977.
 - 14) 宗本健一 : 歯肉組織の酸性ムコ多糖体に関する研究, *阪大歯学誌*, 13 : 257-268, 1968.
 - 15) 榊 鉄也, 鶴身紀雄, 前田純典, 本多忠敬, 川勝賢一, 田治米保夫, 鎌田洋吾 : 歯肉の酸性ムコ多糖に関する研究 (1) 牛歯肉の酸性ムコ多糖について, *歯科医学*, 34 : 333-340, 1971.
 - 16) Hiramatsu, M., Abe, I. and Minami, N. : Acid mucopolysaccharides in porcine gingiva. *J. Periodont. Res.*, 13 : 224-231, 1978.
 - 17) Prodi, G. : Effect of age on acid mucopolysaccharides in rat dermis. *J. Geront.*, 19 : 128-131, 1964.
 - 18) 松本義也 : ラット皮膚加齢に伴うグリコサミノグリカン, コラーゲンの変化, *日皮会誌*, 89 : 685-694, 1979.
 - 19) Procop, D.J. and Kivirikko, K.I. : Hydroxyproline and the metabolism of collagen. In *Treatise on collagen*, ed. Gould, B.S., Vol. 2, Part A, Academic Press, New York, 215-246, 1968.
 - 20) Bakerman, S. : Distribution of the α - and β -components in human skin collagen with age. *Biochim. Biophys. Acta*, 90 : 621-623, 1964.
 - 21) Gould, B.S. : Collagen biosynthesis. In *Treatise on collagen*, ed. Gould, B.S. Vol. 2, Part A, Academic Press, New York, 138-188, 1968.