イヌ歯肉結合組織中のコンドロイチン 硫酸異性体の免疫組織化学的検討

村 橋 慶 宣 澁 谷 俊 昭 岩 田 真
白 木 雅 文 岩 山 幸 雄

朝日大学歯学部歯周病学講座

(主任：岩山幸雄教授)

(昭和62年6月19日受付)

Immunohistochemical Localization of Chondroitin Sulfates in Dog Gingival Connective Tissue

Yoshinobu MURAHASHI, Toshiaki SHIBUTANI, Makoto IWATA,
Masafumi SHIRAKI and Yukio IWAYAMA

Department of Periodontology, Asahi University School of Dentistry
(Chief: Prof. Yukio IWAYAMA)

The present study was performed to investigate by immunohistochemistry using monoclonal antibodies the localization of the chondroitin sulfates (Chondroitin-4 sulfate, -6 sulfate and Dermatan sulfate) and chondroitin in dog gingival connective tissue.

Dermatan sulfate was widespread in connective tissue, with especially strong response shown in col-

lagen fiber bundles under the epithelial basement membrane. Chondroitin-4 sulfate occurred widely in connective tissue but showed only weak response.

Chondroitin-6 sulfate was located in peripheral nerve fibers and blood vessels. Chondroitin was not detected in gingival connective tissue.

Key words: Chondroitin sulfates, Monoclonal antibodies, Immunohistochemistry, Dog Gingiva

要旨：イヌ歯肉結合組織中のコンドロイチン硫酸異性体の局在性を明らかにする目的として、3種のモノクローナル抗体を用い免疫組織化学的に検索した。その結果、歯肉結合組織中にはデルマタン硫酸が広く存在し、とくに上皮直下の結合組織線維束にそって特徴的に見られた。コンドロイチン4硫酸は結合組織に広く見られたが弱陽性所見であった。またコンドロイチン6硫酸は血管や神経線維束周囲に局限し、コンドロイチンは認められなかった。

索引用語：コンドロイチン硫酸異性体，モノクローナル抗体，免疫組織化学，イヌ歯肉

結 言

細胞外マトリックスを構成する基質成分であるグリコサミノグリカン (GAG) は組織中ではコア蛋白と結合し

たプロテオグリカン (PG) の状態で存在し、生体機能に重要な役割を担っている¹⁻⁴⁾。歯肉組織中の GAG に関しては岩山ら^{5,6)}三木ら^{7,8)}のヒト歯肉についての報告および勝谷⁹⁾によるイヌ歯肉についての報告がなされている。また白木¹⁰⁾はイヌ歯肉を上皮と結合組織に分離し各

Table 1 Monoclonal antibodies

Monoclonal Antibodies	Antibody class and working dilution
1-B-5 (anti 0S) (antiproteoglycan Δ Di-0)	Mouse IgG 1 : 100
3-B-3 (anti 6S) (antiproteoglycan Δ Di-6)	Mouse IgG 1 : 100
9-A-2 (anti 4S) (antiproteoglycan Δ Di-4)	Mouse IgM 1 : 100

各の GAG の定性, 定量を行ない, 結合組織中の主要 GAG はデルマトン硫酸であると報告している。しかしいずれの報告も生化学的手法により定性, 定量を目的として行われたものであり, 実際に組織中での局在性についてその詳細は明らかではない。

近年 Couchman ら^{11,12)}は, コンドロイチン硫酸プロテオグリカンに対する数種のモノクローナル抗体の作製に成功し, 各分野でコンドロイチン硫酸異性体の局在性に関して免疫組織化学的検索が試みられている¹³⁾。

本研究は, このモノクローナル抗体を用いてコンドロイチン硫酸異性体 (コンドロイチン, コンドロイチン4硫酸, コンドロイチン6硫酸, デルマトン硫酸) のイヌ歯肉組織中での局在を明らかにすることを目的として行った。

材料および方法

1. 実験動物ならびに標本作製

実験動物として雑種成犬3頭を実験に供した。前処置として健康歯肉を確立するために除石後1ヵ月間, 1週間に3回のブラッシングを行なった後に, 全身麻酔下で上顎側歯肉を biopsy し直ちに 4°C, 1% 酢酸エタノールで12時間固定後, 通法に従いパラフィン包埋し 4 μ m の薄切連続切片を作製した。

2. モノクローナル抗体

今回用いたモノクローナル抗体 (Table 1) の特徴は, コンドロイチン硫酸-プロテオグリカン (Chs-PG) の糖鎖を外した断端の stub (切り株) を epitope として認識している点であり, コンドロイチン硫酸に対して各種のコンドロイチナーゼで処理し, コア蛋白の stub を露出させた後に, それぞれの抗体を反応させることにより, 目的とするコンドロイチン硫酸異性体の検出が可能である。Table 2 にその組み合わせを示す。

Table 2 Assay method for each of the chondroitin sulfates

Enzyme	Antibody	GAG
Chondroitinase ABC	1-B-5	Chondroitin
	3-B-3	Chondroitin-6S
	9-A-2	Chondroitin-4S Dermatan Sulfate
Chondroitinase ACII	9-A-2	Chondroitin-4S
Chondroitinase B	9-A-2	Dermatan Sulfate

Paraffinsection 4 μ m
↓
Deparaffinate and Rehydrate Section
↓ PBS wash 10 min
Peroxidase Blocking (3% H₂O₂) 10 min
↓ PBS wash 5 min×3
Enzyme Digestion
Chondroitinase ABC (2.5 U/ml)
Chondroitinase AC II (2.5 U/ml)
Chondroitinase B (0.05 U/ml)
incubation 37° C 1h
↓ PBS wash 5 min×3
Primary Antibodies
1-B-5 (anti 0S) 1 : 100
3-B-3 (anti 6S) 1 : 100
9-A-2 (anti 4S) 1 : 100
30 min
↓ PBS wash 5 min×3
Secondary Antibodies
(Biotinized Antimouse Immunoglobulin)
30 min
↓ PBS wash 5 min×3
Antibiotin Streptavidin 30 min
↓ PBS wash 5 min×3
AEC
↓ PBS wash 5 min×3
Hematoxylin
↓
Mounting

Fig. 1 Staining procedure

3. 免疫組織化学

Fig. 1 に示すように, パラフィン切片を通法に従い脱パラフィンした後に 4°C, pH 7.2, 0.01 M phosphate buffered saline (PBS) に10分間浸漬した。次に内因性 peroxidase を除去するために 3% H₂O₂ を切片上で反応

Fig. 2 酵素未消化抗 4S 抗体 (対照群): 陽性所見は認められない。

Fig. 3 コンドロイチナーゼ ABC 消化, 抗 0S 抗体: 陽性部位は認められない。

させた後に PBS で 5 分間 3 回洗浄した。酵素消化にはコンドロイチナーゼ ABC (2.5 U/ml), コンドロイチナーゼ AC II (2.5 U/ml), コンドロイチナーゼ B (0.05 U/ml) (生化学工業) をそれぞれの切片上で 37°C, 1 時間反応させた後 PBS で洗浄した。またこのとき対照として未消化の切片も用意した。1 次抗体には 1-B-5 抗体 (mouse IgG 1:100), 3-B-3 抗体 (mouse IgM 1:100), 9-A-2 抗体 (mouse IgG 1:100) (MILES) を用いた。それぞれの 1 次抗体を 30 分間反応させた後, PBS で洗浄した。その後, 通常のプロオチン-ストレプトアビジンシステム (ストレプトアビジン®生化学工業) を用いた酵素抗体間接法により染色を行なった。すなわち 2 次抗体にはプロオチン標識抗マウス免疫グロブリンを使用し, 1 次

Fig. 4 コンドロイチナーゼ ABC 消化, 抗 6S 抗体: 血管や神経束周囲に陽性所見が認められる。

抗体を反応させた切片上で 30 分間反応させた。PBS で洗浄した後ペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジンを 30 分間反応させた。その後 PBS で洗浄し発色剤には 3-amino-9-ethylcarbazole (AEC) を用い 30 分間反応させ, 核染色にはヘマトキシリンを用いた。染色終了後, 水性封入剤 (GVA-MOUNT®, ZYMED) で封入し光学顕微鏡で観察した。

結 果

コントロールとして酵素消化を行なわなかった群ではどの標本にも陽性所見は認められなかった (Fig. 2)。コンドロイチナーゼ ABC 消化を行ない抗 0S 抗体を反応させた群では陽性部位はほとんど認められなかった (Fig. 3)。また抗 6S 抗体を反応させた群では陽性部位は極めて少なかったものの, 結合組織深部の血管や神経線維束周囲に陽性所見を認めた (Fig. 4)。同酵素消化を行ない抗 4S 抗体を反応させた群においては歯肉結合組織中に広く陽性所見が認められ, 特に上皮直下の固有層において線維束の走行にそった強陽性所見が認められた (Fig. 5)。コンドロイチナーゼ AC II 消化し抗 4S 抗体を反応させた群においては, 結合組織に広く陽性所見を認めたもののコンドロイチナーゼ ABC 消化による群に比べその陽性度は弱く上皮直下の強陽性所見も認められなかった (Fig. 6)。コンドロイチナーゼ B 消化し抗 4S 抗体を反応させた群では, コンドロイチナーゼ ABC 消化の場合と同様の強陽性所見を認めた (Fig. 7)。

Fig. 5 コンドロイチナーゼ ABC 消化, 抗 4S 抗体: 歯肉結合組織中に広く陽性所見が見られ, 特に上皮直下の線維束の走行にそった強陽性所見が認められる。

考 察

GAG の組織化学的検出法としては古くからトルイジンブルー・メタクロマジー法, アルシアンブルーサフニン O 重染色法, アルシアンブルー・アクリフラビン法, 塩化バリウム・ロジン酸ナトリウム法, などが知られている¹⁴⁾。千代延ら¹⁵⁾はヒト炎症歯肉組織中の GAG をアルシアンブルーを中心にした組織化学的研究で, 深部結合組織や血管周囲部に強い反応があり, またコラーゲン線維にそった陽性反応を示すことを報告している。組織化学的な各 GAG の同定に関しては酵素消化法¹⁴⁾などが知られているが, 特異性に関して多くの問題が残っている¹⁶⁾。

生化学的には歯肉組織中の GAG については, ヒト^{5-8, 17)}, イヌ^{9, 10)}, ブタ¹⁸⁾, ウシ^{19, 20)}, ウサギ²¹⁾など多くの動物での検討がなされており, それぞれの動物における構成 GAG はおおむね一致している。本実験に供したイヌ歯肉 GAG に関してはヒアルロン酸 (HA), デルマトン硫酸 (DS), コンドロイチン硫酸 (Ch-S), ヘパラン硫酸 (HS) であることが知られており, 勝谷⁹⁾は各 GAG の構成比は HA (41%), DS (48%), Ch-S (5%), HS (6%) であったと述べている。また白木¹⁰⁾は健常イヌ歯肉組織を上皮と結合組織とに分離しそれぞれの

Fig. 6 コンドロイチナーゼ AC II 消化, 抗 4S 抗体: Fig. 5 に比べ陽性度は弱く上皮直下の強陽性所見も認められない。

Fig. 7 コンドロイチナーゼ B 消化, 抗 4S 抗体: Fig. 5 同様, 上皮直下の線維束の走行にそった強陽性所見が認められる。

GAG 構成比は, 上皮で HA (73.9%), HS (17.5%), DS (7.1%), Ch-S (1.5%), 結合組織では HA (36.2%), DS (51.9%), Ch-S (7.2%) であると報告している。このように上皮下結合組織の主要 GAG であるデルマトン硫酸は, コラーゲンとともに結合組織の細胞外マトリックス成分の重要な構成成分であり, 皮膚, 心臓弁大動脈, 角膜に多量に含まれると報告されている²²⁾。またデルマトン硫酸は生体内ではコラーゲン線維と密接に結合し線維の形成, 配列, 構築の維持に関与する²³⁻²⁵⁾と同時に, コラーゲン分子間架橋結合を安定化させる働きを担っている²⁶⁾。勝谷⁹⁾はイヌの炎症歯肉組織において, 組織破壊

の著しい炎症初期ではデルマトン硫酸の減少にともなって不溶性コラーゲンが減少し、代わって可溶性コラーゲンは増加すると述べており、可溶性コラーゲンの増加は慢性炎症期よりも急性期に顕著であることを示した。本研究においても結合組織中のデルマトン硫酸の広範囲な存在および上皮直下での粗性結合組織中のコラーゲン線維にそった強陽性所見は、デルマトン硫酸とコラーゲン線維とが密接に関係して、歯肉結合組織中で重要な機能を担っている可能性を強く示唆している。梶川²⁷⁾はイヌに実験的歯周炎を惹起させ、その歯肉溝滲出液中には健康時にはみられないデルマトン硫酸やコンドロイチン硫酸が検出されることから歯周組織の degradation に際して結合組織成分が歯肉溝滲出液中に流出する可能性を示唆している。また竹内²⁸⁾はデルマトン硫酸、コンドロイチン硫酸に対する消化酵素であるコンドロイチナーゼ ABC のヒト炎症歯肉組織中での局在性をポリクローナル抗体を用いた蛍光抗体法で検索し、上皮下結合組織においてはコラーゲン線維に一致した蛍光陽性所見を認め、さらに組織中に浸潤した好中球やマクロファージにも強い陽性所見を認めている。このようなことから健康時にコラーゲン線維にそって存在するデルマトン硫酸は炎症に際し、特異的または非特異的に分解され、上皮間隙を通り滲出液として排出されることが考えられる。

Couchman ら¹¹⁾は蛍光抗体法によりラット皮膚の粗性結合組織中にデルマトン硫酸が多いことを報告している。彼らはデルマトン硫酸とコンドロイチン 4 硫酸の判別法として抗 4S 抗体を反応させる前処置としての酵素消化をコンドロイチナーゼ ABC とコンドロイチナーゼ AC II で行なって、コンドロイチナーゼ ABC 消化で陽性であるもののコンドロイチナーゼ AC II では弱陽性あるいは陰性であることからデルマトン硫酸であろうと述べている。本研究においては前述のコンドロイチナーゼ ABC, コンドロイチナーゼ AC II に加え、さらに最近開発されたコンドロイチン 4 硫酸, 6 硫酸を分解しないコンドロイチナーゼ B^{29,30)}を用い 3 種の酵素消化後にその染色状態を比較し、その陽性所見の主体はデルマトン硫酸であることを確認した。しかしコンドロイチナーゼ AC II 消化によりコンドロイチン 4 硫酸の存在をも認めたことは生化学的な研究での報告^{31,32)}と一致するが、その陽性度は弱く消化酵素の問題をも含めてさらに検討する必要がある。

コンドロイチンに関しては軟骨に限定され皮膚には存在しないという報告¹¹⁾と同様に本研究でも認められなかった。またコンドロイチン 6 硫酸に関しては、抗 6S 抗

体が他の 2 種類の抗体に比べ特異性に若干問題が残るものの^{11,12)}、以前の報告ではラットの血管内皮、筋肉、末梢神経においてみられており、本研究でも結合組織深部の血管や神経線維束周囲において陽性所見を認めた。コンドロイチン 4 硫酸や 6 硫酸に関してはいまだその機能や動向は明らかではなく、今後の各分野での検討が期待される。

本研究では健康イヌ歯肉結合組織中でのコンドロイチン硫酸異性体の局在を明らかにしたが、今後さらに歯周疾患時での変動や滲出液中での検出、上皮組織中での局在についても検索し、コンドロイチン硫酸異性体の歯周組織中での多岐にわたる機能の検討が必要と思われる。

結 論

イヌ歯肉結合組織中のコンドロイチン硫酸異性体の局在性を 3 種のモノクローナル抗体をもちい免疫組織化学的に検索した結果、以下の結論を得た。

1. デルマトン硫酸は歯肉結合組織中に広く存在し、特に上皮直下の結合線維束にそって特徴的に見られた。
2. コンドロイチン 4 硫酸は結合組織中に広く見られたが弱陽性であった。
3. コンドロイチン 6 硫酸は血管や神経線維束周囲に限局していた。
4. コンドロイチンは認められなかった。
5. デルマトン硫酸とコラーゲン線維とが密接に関係して、結合組織中で重要な機能を担っている可能性が示唆された。

尚、本研究は昭和 62 年文部省科学研究費、奨励研究 A (課題番号 62771580) の補助で行なわれたことを付記する。

文 献

- 1) 梶川欽一郎：結合組織，第 1 版，金原出版，東京，1984，327。
- 2) Meyer, K. : Biochemistry and biology of mucopolysaccharides. Am. J. Med., 47 : 664-671, 1969.
- 3) Comper, W.D. and Laurent, T.C. : Physiological function of connective tissue polysaccharides. Physiol. Revy., 58 : 255-317, 1978.
- 4) Modis, L. : The molecular structure of the interfibrillar matrix in connective tissue. Acta

- Biol. Acad. Sch. Hung., 29 : 197-226, 1978.
- 5) 岩山幸雄：歯肉結合組織の破壊。歯界展望, 55 : 883-888, 1980.
 - 6) 岩山幸雄, 津谷啓治, 勝谷芳文, 喜多治郎, 野村慶雄, 三木隆雄, 石田 浩, 栢 豪洋, 延原惇男, 横溝一郎, 足立綱三郎：ヒト病的歯肉結合組織成分に関する研究。II. ウロン酸ならびに可溶性コラーゲンについて。日歯周誌, 18 : 50-55, 1976.
 - 7) 三木隆雄, 勝谷芳文, 岩山幸雄, 野村慶雄, 石田浩, 福原浩喜, 横溝一郎, 栢 豪洋, 足立綱三郎：ヒト病的歯肉結合組織成分に関する研究。III. 酸性ムコ多糖の定性分析について。日歯周誌, 19 : 13-17, 1977.
 - 8) 三木隆雄, 勝谷芳文, 河合惇二, 岩山幸雄, 野村慶雄, 石田 浩, 山上紘志, 栢 豪洋：ヒト歯肉結合組織成分に関する研究。IV. 酸性ムコ多糖の定量分析について。日歯周誌, 19 : 364-368, 1977.
 - 9) 勝谷芳文：イヌの実験的歯周炎における歯肉グリコサミグリカンについて。日歯周誌, 24 : 266-284, 1982.
 - 10) 白木雅文：健常イヌ歯肉組織における上皮ならびに上皮下結合組織のグリコサミノグリカンについて。日歯周誌, 28 : 785-799, 1986.
 - 11) Couchman, J.R., Caterson, B., Christner, J.E. and Baker, J.R. : Mapping by monoclonal antibody detection of glycosaminoglycans in connective tissue. *Nature*, 307 : 650-652, 1984.
 - 12) Caterson, B., Christner, J.E. and Baker, J.R. : Identification of a monoclonal antibody that specifically recognizes corneal and skeletal keratin sulfate. *J. Biol. Chem.*, 258 : 8848-8854, 1983.
 - 13) 中垣茂男, 辻 克光, 鳥居洋子, 満中陽子, 大橋千華子, 長谷川敏明, 村上 栄, 祖父江三津子, 深津俊明, 中島伸夫, 竹内 純：モノクローナル抗体を用いたコンドロイチン硫酸異性体の免疫組織化学的識別法。臨床病理, 39 : 129, 1986.
 - 14) 佐野榮春：酸性ムコ多糖の組織化学, 吉沢善作, 長谷川栄一, ムコ多糖実験法 (II), 南江堂, 東京, 1973, 286-289.
 - 15) 千代延俊賢, 花本 裕, 岡本 莫：歯周病患者歯肉におけるムコ多糖に関する組織化学的研究。日歯周誌, 15 : 215-222, 1973.
 - 16) Hallison, F., Hoof, J.U. and Vanroelen, C. : On the presence of proteolytic activity in glycosaminoglycan-degrading enzyme preparation. *J. Histochem. Cytochem.*, 34 : 1231-1235, 1986.
 - 17) Bartold, P.M., Wiebkin, O.W. and Thonard, J.C. : Glycosaminoglycans of human gingival epithelium and connective tissue. *Connect. Tissue Res.*, 9 : 99-106, 1981.
 - 18) 平松正彦, 安部 勲, 南 直臣：ブタ歯肉の酸性ムコ多糖について。城歯大紀要, 5 : 75-84, 1976.
 - 19) 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) 牛歯肉酸性ムコ多糖について。歯科医学, 34 : 333-340, 1971.
 - 20) 多和敏一, 本多忠敬, 藤田 厚, 宮井芳二, 金有鳳, 鄭 泰英, 桑島 惇, 松本光彦, 三木基二：歯肉酸性ムコ多糖に関する研究。歯科医学, 39 : 799-811, 1976.
 - 21) 坂本真喜：歯肉および歯髄の Acidic Glycosaminoglycan の生化学的研究 第1報 歯肉および歯髄の Acidic glycosaminoglycan の微量定量。広歯誌, 9 : 169-177, 1977.
 - 22) Damle, S.P., Coster, L. and Gregory, D. : Proteodermatan sulfates isolated from pig skin. *J. Biol. Chem.*, 257 : 5523-5527, 1982.
 - 23) Wüsteman, F.S. : Glycosaminoglycans of bovine lung parenchyma and pleura. *Experimentia*, 28 : 887-888, 1972.
 - 24) Radharkishnamurthy, B., Ruiz, H.A. and Berrenson, G.S. : Isolation and characterization of proteoglycans from bovine aorta. *J. Biol. Chem.*, 252 : 4831-4841, 1977.
 - 25) Toole, B. P. and Lowther, D. A. : Dermatan sulfate-protein : Isolation from and interaction with collagen. *Arch. Biochem. Biophys.*, 128 : 567-578, 1968.
 - 26) Gelman, R.A. and Blackwell, J. : Collagen-mucopolysaccharides interactions at acid pH. *Biochem. Biophys. Acta.*, 342 : 254-261, 1974.
 - 27) 梶川 潔：イヌの実験的歯周炎における歯肉溝滲出液中のグリコサミノグリカンについて。日歯周歯, 28 : 500-515, 1986.
 - 28) 竹内 宏, 堀 泰典, 金久純也, 上田雅俊, 谷明, 佐川寛典：辺縁性歯周炎の免疫病理学的研究。第7報 歯周炎と細菌毒素 (その2) 炎症歯肉に

- おける bacterial chondroitinase ABC と hyaluronidase について. 歯基礎誌, 25 : 437-442, 1983.
- 29) Michelacci, Y.M. and Dietrich, C.P. : A comparative study between a chondroitinase B and chondroitinase AC from flavobacterium heparinum. Biochem. J., 151 : 121-129, 1975.
- 30) Ototani, N. and Yosizawa, Z. : Purification of chondroitinase B and chondroitinase C using glycosaminoglycan-bound AH-Sepharose 4 B. Carbohydr. Res., 70 (2) : 295-306, 1979.
- 31) 宮城 功 : ジフェニルヒダントイン性歯肉増殖症の生化学的研究. ラット歯肉コハク酸 $-1,4^{14}\text{C}$ 由来 glycosaminoglycan 合成における DPH の影響. 神奈川歯学, 21 : 473-483, 1987.
- 32) Dahlöf, G., Modeer, T., Reinholt, F.P., Wikström, and Hjerpe, A. : Proteoglycans and glycosaminoglycans in phenytoin-induced gingival overgrowth. J. Periodont. Res., 21 : 13-21, 1986.
-