歯肉炎症発症過程におけるヘパリチナーゼの役割

村 上 純 一

朝日大学歯学部歯周病学講座

(指導: 岩山幸雄教授)

(平成元年3月16日受付)

The Role of Heparitinase in the Initial Stage of Gingival Inflammation

Jyunichi MURAKAMI

Department of Periodontology, Asahi University, School of Dentistry

(Director: Prof. Yukio IWAYAMA)

For the purpose of elucidating the effect of heparitinase in gingival tissue, paper strips were inserted in the gingival sulcus of a dog and were treated with heparitinase (experimental group), an enzyme-free solution (control group) or inactivated enzyme (control group) for 20 minutes once a day in order to determine the pathohistological changes in the periodontium after 3, 10 and 14 days.

No marked difference was noted between the 3-day enzyme-treated group and the control groups, but for the 10-day and 14-day enzyme-treated groups, enlargement of the intercellular epithelium, neutrophil infiltration and inflammatory cellular infiltration, mainly of neutrophils, in the subepithelial connective tissue were observed. Examination of the effect of a tracer, ^3H -Dextran, on the permeability of the epithelium to heparitinase revealed incorporation of ^3H -Dextran by the enzyme-treated group at about 2

times as much as that by the control group, and there were more silver particles indicative of ^3H -Dextran according to autoradiographic findings. Determination of the intratissue location of bacterium-derived heparitinase by the fluorescent antibody technique revealed fluorescence positivity on the gingival sulcus epithelial side but not on the oral epithelial side, and that it was more frequent in the region of the enlarged intercellular area of the upper layer of the gingival sulcus epithelium.

These results suggest that bacterium-derived heparitinase present in the epithelium of the gingival sulcus of a dog lowered the defense competence peculiar to the epithelium and elevated of the permeability of epithelium to bacterium-produced substances, leading to its involvement in the onset of gingival inflammation by decomposing heparan sulfate, an inter-cellular epithelial matrix.

Key words: Heparitinase, Autoradiography, Gingival inflammation

要旨: 本研究の目的は、歯肉組織におけるヘパリチナーゼの影響を明らかにする目的で、イヌの歯肉溝にペーパーストリップスを挿入し、そこに実験群としてヘパリチナーゼを、また対照群として酵素を含まない溶液だけのもの、および失活酵素を用い、毎日1回、20分間浸み込ませ、3、10、14日後の歯周組織の変化を病理組織学的に検討した。その結果、酵素塗布3日群と対照群との間に著明な差は認められなかったが、酵素塗布10日群および14日群において、上皮間隙の拡大と好中球の浸潤ならびに、上皮下結合組織における好中球を中心とした炎症性細胞の浸潤が認められた。さらにトレーサーとして ^3H -Dextranを使用しヘパリチナーゼの上皮透過性に対する影響を調べた結果、酵

本論文の要旨は第31回春季日本歯周病学会総会(1988年4月14日)および第62回岐阜歯科学会(1988年6月18日)において発表した。

素塗布群は対照群に比べ、約2倍の ^3H -Dextranの取り込みを示した。またオートラジオグラフィーの所見においても対照群に比較して酵素塗布群で ^3H -Dextranを示す銀粒子を明らかに多く認めた。蛍光抗体法によって組織内での細菌由来ヘパリチナーゼの局在について検討した結果、蛍光陽性部位は、歯肉上皮において歯肉溝上皮側のみに存在し、口腔上皮側では認められなかった。さらにその存在部は歯肉溝上皮上層部の細胞間隙の拡大した部位に多く認められた。

以上の結果より、細菌由来ヘパリチナーゼは、イヌ歯肉溝上皮に存在し、上皮細胞間マトリックスであるヘパラン硫酸を分解することによって、上皮本来の防衛能を低下させ、細菌産生物質の上皮透過性を高め、歯肉炎症発症に関与することが示唆された。

索引用語：ヘパリチナーゼ，オートラジオグラフィー，歯肉炎症

緒 言

上皮細胞間マトリックスの1つであるヘパラン硫酸は、コアー蛋白と結合したプロテオグリカンとして、細胞の plasma membrane¹⁻³⁾ および basement membrane⁴⁻⁶⁾ に存在し、単に生体諸組織の細胞間隙を埋めて支持組織として働くのみならず、細胞接着⁷⁻¹⁰⁾ や細胞増殖¹¹⁻¹³⁾ など、生体において多彩な機能をになっている。近年、Bartold ら¹⁴⁾ および白木¹⁵⁾ は、歯肉上皮と上皮下結合組織を分離することにより、歯肉上皮における主要グリコサミノグリカンがヒアルロン酸とヘパラン硫酸であることを報告した。

一般に歯肉炎症の発症機構の一考察として、細菌由来の酵素により上皮細胞間マトリックスが破壊され、その結果外来侵襲物質の組織内侵入が容易になり、それと共に歯肉炎症が進展すると考えられている。

上皮を直接障害する酵素として、これまで蛋白を分解するプロテアーゼ¹⁶⁻¹⁹⁾、主要グリコサミノグリカンであるヒアルロン酸を分解するヒアルロニダーゼ²⁰⁻²⁶⁾ が研究され、それらが組織破壊に関与すると報告されてきた。しかしヒアルロン酸と共に歯肉上皮の主要グリコサミノグリカンであるヘパラン硫酸を分解する酵素の生体での役割については、腎臓の糸球体の basement membrane をヘパラン硫酸分解酵素処理すると、ferritin²⁷⁾ および albumin²⁸⁾ を透過させるという報告があるが、歯肉におけるヘパリチナーゼと歯肉炎症との関係についての研究は現在のところ報告されていない。

本研究は、歯肉組織に対するヘパリチナーゼの影響を明らかにすることを目的として、(1) ヘパリチナーゼ塗布による歯肉組織の変化 (2) ヘパリチナーゼの上皮透過性への影響 (3) 蛍光抗体法による組織内でのヘパリチナーゼの局在について検討した。

実験材料と方法

1. ヘパリチナーゼ塗布による歯肉組織の変化

実験動物として成犬3頭を使用し、健常歯肉を獲得するために約1ヵ月間、週2回のスクーリングとクロルヘキシジンによる洗浄を行なった。

酵素の調整は *Flavobacterium heparinum* から抽出された生化学工業社製ヘパリチナーゼ標品（至適 pH 7.0, 至適温度 43°C, 37°C で 80% 以上の酵素活性^{29,30)} 0.3 unit を 0.1 M 酢酸ナトリウム 180 μl 、0.01 M 酢酸カルシウム 20 μl に溶解した。この濃度は、Gaffar ら²²⁾ がヒアルロニダーゼの実験で使用した濃度を参考に決定した。対照群としては、酵素を含まない溶液だけのもの、および 56°C、5 分間熱変性することで失活した酵素を含む溶液を用いた。

いずれも簡易防湿下で、唾液、舌および頬を排除し乾燥後、イヌ歯肉溝に 2×3 mm のペーパーストリップスを歯肉を損傷しないように注意深く歯肉溝に挿入し、マイクロピペットにてストリップスに 2 μl 浸み込ませ、10 分間放置後再度塗布し、再び 10 分間放置した。なお塗布回数によって、1 頭のイヌで 3 日間塗布群、10 日間塗布群、14 日間塗布群の 3 群を設定した。

実験終了後それぞれの歯肉を切除し、直ちに 95% エタノールで 2 日間固定した後 4 μm のパラフィン切片を作製し、ヘマトキシリン-エオジン (HE) 重染色を行ない検鏡した。臨床的評価はペリオトロン値を用いた。すなわち頬側中央部を被験部位として、簡易防湿、乾燥後、歯肉溝に刺激を与えないように注意深くペーパーストリップスを挿入し、30 秒間静置した後これを廃棄し、2 度目のペーパーストリップスに浸透した 30 秒間の滲出液量をペリオトロン® (Harco Electric Co. Canada) にて計測することにより得た。

2. ヘパリチナーゼの上皮透過性への影響

ヘパリチナーゼ塗布実験と同様の方法で、同一イヌに酵素塗布群と酵素を含まない溶液のみ塗布する対照群を設定し、10日間塗布した。透過性実験のトレーサーとして Alfano ら³¹⁾の方法を改変して、³H-Dextran (分子量: 70,000) 9.25 MBq (250 μ ci) を PBS 250 μ l (pH 7.2) に溶解し使用した。

トレーサーの塗布は、ヘパリチナーゼ塗布終了後の11日目、ペントバルビタール (ピットマンムーア社、米国) 0.4 ml/kg、上肢静脈内注射による全身麻酔下で左右の開口器を装着、唾液、舌および頬を排除し、酵素塗布実験と同様 2×3 mm のペーパーストリップスを歯肉を損傷しないように注意深く挿入して、マイクロピペットにて ³H-Dextran 2 μ l [74 KBq (2 μ ci)] を30分毎にストリップスにしみ込ませた。なお血中への ³H-Dextran の移行を調べるため、15分毎に静脈より血液を採取し、その20 μ l ずつをアロカ社製 ASC-113 型自動試料燃焼装置にて燃焼させアロカ社製 LSC-903 SP 型液体シンチレーションカウンターにて RI 量を測定した。4時間後、血中への ³H-Dextran の移行を確認した後屠殺、0°C で組織の反応を停止させ、歯肉を切除、PBS (pH 7.2) で3回洗浄、切片をメスにて半分に分割、一方をオートラジオグラフィーによる検鏡用に、片方を自動試料燃焼装置で燃焼させ、液体シンチレーションカウンターにて RI 量を測定した。

液体シンチレーションカウンターによる RI 量の測定は、歯肉採取後直ちに3回洗浄、ろ紙にて余剰の水分を吸い取り湿重量を測定、-70°C で凍結保存した。一週間後解凍し、PBS (pH 7.2) で再度洗浄、1N NaOH 2 ml でホモジネート、Lowry 法³²⁾により蛋白量を測定、最初ホモジネートから 100 μ l を自動試料燃焼装置により燃焼させ、RI 量を液体シンチレーションカウンターにて測定した。オートラジオグラフィーの処理は、試料採取後直ちにカルノワ固定を行ない、Bennett ら³³⁾のグリコールメタクリレート (GMA) 樹脂 (日新 EM、東京) 包埋の方法を一部改変して行なった。すなわち 80% GMA 10分間、90% GMA 10分間、100% GMA 2日間、GMA-mixture 1日冷蔵庫内に保存後、60°C で一晚熱重合させ包埋した。包埋後、2 μ m の GMA 樹脂切片を作製、以後常法に従い、オートラジオグラフィー用乳剤サクラ NR-M 2 (1.5倍希釈) を、dipping 法により標本に密着させ、乾燥後4週間露出 (4°C) した。そして露出、現像、定着の後に、サリイ染色³³⁾を施し、光学顕微鏡下にて観察した。

図1 酵素塗布によるペリオトロン値の変動

3. イヌ歯肉組織におけるヘパリチナーゼの蛍光抗体法による局在

被験材料として、スケーリングなど健常歯肉を獲得する処置をしていない雑種成犬を使用した。歯肉切除後直ちに95%エタノールで2日間にわたり固定、パラフィン包埋、4 μ m の連続切片を作製して蛍光抗体法およびHE染色にて観察した。酵素の調整は、竹内ら²³⁻²⁵⁾の方法に準じ、免疫原として塗布実験に使用した酵素と同じく、*Flavobacterium heparinum* から抽出した生化学工業社製ヘパリチナーゼ標品を、50 unit/ml (蛋白量として0.02 mg/ml) の生食懸濁液とし、等量の incomplete adjuvant を混合して、その1 ml ずつを体重2,500 g 程度の家兎の後肢に週1回の割合で、4回筋肉内注射を実施した。

最終注射より1週間後、寒天ゲル内沈降反応により抗体価の上昇を確認した後に、頸動脈切断により全採血し抗血清を得た。それぞれの抗血清から過飽和硫酸塩析法によって crude globulin を抽出し各々の蛋白量にみあった量の FITC を10時間にわたって標識した後、DEAE cellulose column chromatography によって非特異的因子を除去した。また、予め未標識抗体で反応させ標識抗体で染色する阻止試験にて、染色後の蛍光陽性所見が特異的であることを確認した。

結 果

1. ヘパリチナーゼ塗布による歯肉組織の変化

イヌ歯肉溝にヘパリチナーゼを反復塗布し、臨床的評価としてペリオトロン値による歯肉溝滲出液量、ならびに組織学的な変化を検討した。その結果、ペリオトロン

図 2 酵素塗布 3 日目、炎症性細胞は少なく、ほぼ正常な歯周組織を示している。HE 染色，×50

図 3 図 2 の歯肉溝上皮側の拡大像
HE 染色，×100

値は、塗布開始 5 日目以降、対照群に比較し実験群の方が高い傾向を示した (図 1)。なお、肉眼的な炎症の臨床所見については、対照群と実験群の間に著明な差は認められなかった。組織学的な変化を検討した結果、酵素塗布 3 日群 (図 2, 3) と対照群 (図 4, 5) との間に著明な炎症性変化は認められなかったが、酵素塗布 10 日群 (図 6, 7) では、対照群 (図 8, 9) に比べ、上皮下結合組織

図 4 3 日目の対照群、歯肉溝上皮のわずかな剝離が認められるが炎症性細胞は少なく、ほぼ正常な歯周組織を示している。
HE 染色，×50

図 5 図 3 の歯肉溝上皮側の拡大像
HE 染色，×100

における多数の好中球、リンパ球ならびに単球の浸潤を認めた。また酵素塗布 14 日群 (図 10, 11) では、10 日群同様に対照群 (図 12, 13) に比較して上皮細胞の萎縮、上皮間隙の拡大が著しく、その拡大部への好中球の侵入、上皮下結合組織への好中球、リンパ球および単球の浸潤

図 6 酵素塗布 10 日目、歯肉溝上皮の剝離，多数の炎症性細胞浸潤を認める。HE 染色， $\times 50$

図 8 10 日目の対照群，炎症性細胞は少なく，ほぼ正常な歯肉組織を示す。HE 染色， $\times 50$

図 7 図 6 の歯肉溝上皮側の拡大像
HE 染色， $\times 100$

図 9 図 8 の歯肉溝上皮側の拡大像
HE 染色， $\times 100$

が認められた。また失活酵素を塗布した 14 日群においては，対照群と同様，著明な炎症性変化は認められなかった（図 14，15）。

2. ヘパリチナーゼの上皮透過性への影響

イヌ歯肉溝に酵素，または対照群として溶液のみを 10 日間反復塗布した後， ^3H -Dextran をトレーサーとして塗布し，ヘパリチナーゼの上皮透過性への影響を調べ

た。血中への RI の移行を調べるため，経時的に静脈血を採血， $20\ \mu\text{l}$ ずつ燃焼装置にて燃焼させ RI 量を測定した結果， ^3H -Dextran が歯肉溝上皮を通過して血中に随時移行していることが示された（図 16）。歯肉組織への ^3H -Dextran の取り込みを，歯肉を燃焼させることにより測定した結果，湿重量あたりおよび蛋白量あたりの取り込みは，いずれも酵素塗布群は対照群に比べ約 2 倍の

図 10 酵素塗布 14 日目，歯肉溝上皮の剝離ならびに拡大，上皮および上皮下結合組織への多数の炎症性細胞の浸潤を示す。HE 染色， $\times 50$

図 11 図 10 の歯肉溝上皮側の拡大像
HE 染色， $\times 100$

高い値を示した ($P < 0.05$) (表 1)。

オートラジオグラフィーの所見では，燃焼実験の結果同様，酵素塗布群 (図 17, 18) と対照群 (図 19, 20) との間に ^3H -Dextran の取り込みの差が認められた。すなわち，両群とも歯肉溝上皮表層より深部に向かって ^3H -Dextran を示す銀粒子を認めたが酵素塗布群において明

図 12 14 日目の対照群，炎症性細胞は少なく，ほぼ正常な歯周組織を示す。HE 染色， $\times 50$

図 13 図 12 の歯肉溝上皮側の拡大像
HE 染色， $\times 100$

らかに多くの銀粒子を認めた。その分布様式は，直接塗布した部位，すなわち歯肉溝頂部の上皮に多く歯肉溝の深い所に少なく，また上皮表層が多く上皮深部および上皮下結合組織になるに従って少なかった。また銀粒子は，細胞内および細胞間隙のいずれにも認められたが，細胞間隙により多く観察され，細胞間隙を通じて表層より徐々に浸透していったものと推察された。対照群にお

図 14 失活酵素を塗布した 14 日目、
上皮下結合組織にわずかな炎症性細胞浸潤を認める。
HE 染色, $\times 50$

図 15 図 14 の歯肉溝上皮側の拡大像
HE 染色, $\times 100$

いても銀粒子は、歯肉溝頂部の上皮より侵入し上皮下結合組織に達していたがその数は、明かに酵素塗布群に比較し少なかった。

3. イヌ歯肉組織におけるヘパリチナーゼの蛍光抗体法による局在

最終注射より 1 週間後に採取した血清による寒天ゲル内沈降反応は、単一かつシャープな沈降線を呈し抗体価

表 1 歯肉組織における ^3H -Dextran の取り込み量

対照側	* 1931 ± 1307 (dpm/mg wet weight)
	* 707 ± 548 (dpm/mg protein)
実験例	4035 ± 1756 (dpm/mg wet weight)
	1590 ± 827 (dpm/mg protein)
Mean $\pm$ S.D. * $P < 0.05$	
有意差は t 検定により求めた

図 16 血中への ^3H -Dextran の移行

図 17 酵素塗布群における ^3H -Dextran 塗布歯肉の歯肉溝上皮部、上皮表層より深部にかけ多くの銀粒子が認められる。サリー染色, $\times 200$

が十分に上昇していることが示された (図 21)。また抗ヘパリチナーゼ抗体で染色した組織切片は、歯肉溝上皮を中心に強い蛍光陽性所見が認められたが (図 22)、あらかじめ未標識抗体で反応させ、標識抗体で染色した阻止試験では染色性の明らかな低下が認められた (図 23)。これらのことより、得られた蛍光反応は、特異免疫反応の結果であることが示唆された。

上記のように調整した抗ヘパリチナーゼ抗体でイヌ歯

図 18 図 17 の強拡大，銀粒子は主に細胞間隙に認められる。サリー染色，×500

図 19 対照群における ^3H -Dextran 塗布歯肉の歯肉溝上皮部，銀粒子は酵素塗布群（図 17）に比べ少ない。サリー染色，×200

図 20 図 19 の強拡大，銀粒子は酵素塗布群に比べ少ない。サリー染色，×500

肉組織を染色し，蛍光陽性の部位を詳細に検討すると，上皮においては，歯肉溝上皮に限局して口腔上皮側における蛍光陽性例は認められなく，また歯肉溝上皮の表層から中間層にかけて強い蛍光を示し，深部になるにした

図 21 寒天ゲル内沈降反応

- (1) ヘパリチナーゼ
- (2) 抗ヘパリチナーゼ血清

図 22 FITC 標識抗ヘパリチナーゼ抗体による蛍光染色，歯肉溝上皮に蛍光陽性所見が認められる。×50

がって弱くなる傾向があった。そして上皮下結合組織においては，末梢血管において強い蛍光陽性を示した（図 24）。強拡大の所見において，上皮における蛍光陽性部位を，HE 所見と対比すると，上皮の萎縮，上皮間隙の離開，好中球を中心とした炎症性細胞浸潤が多い傾向を示した（図 25, 26）。

考 察

ヘパリチナーゼをイヌ歯肉溝に反復塗布し組織学的な変化を検討した結果，3 日間塗布群では対照群との間に

図 23 図 22 の歯肉を未標識抗体で反応させ標識抗体で染色した阻止試験，図 22 に存在した歯肉溝上皮での蛍光陽性所見が消失している。×50

図 24 FITC 標識抗ヘパリチナーゼ抗体染色，歯肉溝上皮部において強い蛍光陽性所見を認める，口腔上皮側には認められない。×50

明かな差は認められなかったが，10 日間および 14 日間塗布群での組織所見は，上皮細胞の萎縮，上皮間隙の拡大，さらにその拡大部への好中球の侵入，また上皮下結

図 25 図 24 の歯肉溝上皮部の強拡大，蛍光は細胞間隙に認められ細胞内はほとんど認められない。×200

図 26 図 24 の歯肉の HE 染色，多数の炎症性細胞の浸潤と上皮細胞間隙の拡大が認められる。×50

合組織への好中球，リンパ球および単球の浸潤ならびに末梢血管の若干の増加が認められた。

これらのヘパリチナーゼ塗布による組織変化は，過去に行なわれた，プロテアーゼ^{16~19)}，ヒアルロニダーゼ^{20~26)}の塗布実験での結果と類似していた。すなわち，

萩原¹⁶⁾、和泉¹⁷⁾は、ヒト白血球より抽出したプロテアーゼを家兎の歯肉溝に滴下すると、歯肉溝上皮は、炎症性変化や潰瘍を引き起こしたと報告している。また本多¹⁸⁾は、細菌性プロテアーゼを歯肉切除したラット歯肉に塗布し、歯周破壊と処置後の治癒の遅延を報告した。小嶋¹⁹⁾は、ラットの歯周組織に絹糸を結紮することにより引き起こした炎症が、細菌性プロテアーゼ滴下によりさらに悪化、進展することを報告している。

ヒアルロニダーゼについては、Schultz-Hautd^ら³⁴⁾が、1955年に歯肉に初めて作用させ、上皮細胞間隙の拡大、血管の拡張、そして結合組織諸細胞の空胞化などが生じると報告して以来、多くの研究がなされて来た。Stallad^ら²⁰⁾は、squirrel monkeyの歯肉溝上皮にヒアルロニダーゼとコラゲナーゼの混合物を作用させた後、³H-Thymidineを注入しオートラジオグラフィーで観察した結果、歯肉溝上皮の細胞分裂率が増加したと報告し、伊集院^ら²⁶⁾は、ラット臼歯部歯肉溝にヒアルロニダーゼを塗布し junctional epithelium (JE) に起こる超微形態学的変化を観察した結果、JE細胞間の desmosome の数の減少、細胞間隙の拡大、細胞内での著しい空胞の増加、好中球の浸潤などを観察している。一方、酵素など異種蛋白を14日間も局所に塗布することは、Arthus型³⁵⁾炎症反応など免疫反応による組織障害、およびペーパーストリップスの機械的刺激による炎症なども考えられる。

しかし失活した酵素を塗布した群および溶液のみ塗布した群と酵素塗布群とを比べると、失活した酵素塗布群でわずかに炎症を認めたものの明らかに酵素塗布群で強い炎症像を示し、酵素作用による反応である事が示唆された。

また、ヘパリチナーゼによる組織障害は、特に歯肉溝上皮の頂部が著明で歯肉溝底部では少なかった。この結果は、本実験において歯肉溝にペーパーストリップスを挿入し、そこに酵素を浸透させる方法を用いたが、歯肉溝滲出液の流れが歯肉溝底部から歯冠方向に向かう事を考慮すると、滲出液のために酵素の歯肉溝底までの到達が妨げられたからと考えられる。

ペリオトロン値の経時的変化において、実験スタート時に炎症の程度が低いと思われる側を、実験側に選んだにもかかわらず、対照群に比べ組織学的所見同様高い値を示した。なお対照群においても経時的にペリオトロン値が高くなる傾向を示したが、これはストリップス挿入による刺激、あるいは口腔清掃を中止したために沈着したプラークによるものと考えられるが、いずれにしても酵素作用群が高くなる傾向を示した。

以上の組織変化およびこれに伴う臨床的变化はヘパリチナーゼ自体の作用、あるいはヘパリチナーゼにより細胞間マトリックスが障害され、上皮本来の防衛能が低下し、プラーク中の細菌産生物質の上皮通過性が高まった結果、あるいは両者によるものと推察された。

この点をトレーサーによる上皮透過性の実験によってさらに詳細に検討した。透過性の実験は、これまで色々な種類のトレーサー^{22, 36-38)}が使用されてきた。酵素の透過性への影響を調べた実験では、Gaffar^ら²²⁾が、ヒアルロニダーゼをラット歯肉に作用させ Streptococcal Polysaccharide の上皮透過性が亢進することを蛍光抗体法による免疫病理学的手法で証明した。田中^ら³⁸⁾は、ラット歯肉にヒアルロニダーゼを作用させその後、cationized ferritin と microperoxidase をトレーサーとして歯肉に塗布し、電顕的に透過性を検討したが、好中球の遊走以外何ら歯肉に影響しなかったと報告している。しかしこれらの物質は正常な歯肉溝上皮では、ほとんど通過しないので微妙な変化は捉えにくい。したがって著者は、Alfano^ら³¹⁾が口腔粘膜上皮における basement membrane のバリアーとしての機能を調べるのに使用し、歯肉上皮を若干通過するけれどもほとんどは、上皮および basement membrane で阻害されると考えられる ³H-Dextran (M.W. 70,000) を使用した。また Dextran が水溶性であることを考慮に入れ、燃焼による RI 量の測定と、Alfano^ら³¹⁾の方法を改変しオートラジオグラフィーによる観察の両方によって、³H-Dextran の歯肉溝上皮への透過性を調べた。³H-Dextran 塗布後、静脈より得た血中の RI 量は、経時的に増加した。この血中への RI の移行は、歯肉溝上皮より随時 ³H-Dextran が浸透し上皮下結合組織の末梢血管を通じ血中へ移行したものと推察される。

歯肉組織を焼燃させることにより取り込まれた RI 量の測定の結果、酵素塗布群は対照群に比べ約2倍の ³H-Dextran の取り込みを示した ($P < 0.05$)。

この結果は、酵素塗布が高分子である ³H-Dextran の上皮通過性を亢進させ得ることを示唆しているが、上皮組織と結合組織の両者を含む歯肉での結果であるため、³H-Dextran の組織侵入の局在性については不明である。このためにオートラジオグラフィーの手法を用いて ³H-Dextran の局在性を検討した。その結果、燃焼実験同様、対照群に比べ酵素塗布群で ³H-Dextran を示す多くの銀粒子を歯肉溝上皮および上皮下結合組織に認め、酵素塗布による ³H-Dextran の透過性の亢進を確かめることができた。オートラジオグラフィーによる銀粒子の

分布様式は、当然のごとく塗布した歯肉溝上皮表層で多く存在し、深部に向かうにしたがって少なくなった。また、歯肉溝の頂部付近にのみ認められ、歯肉溝底部付近では少なかった。これは、酵素塗布によって炎症症状が認められた部位に一致していた。対照群における所見も含め検討すると、塗布実験の結果同様ペーパーストリップスを挿入しそこにトレーサーを浸透させるといった方法では、歯肉溝滲出液のため歯肉溝の深部までトレーサーが到達しなかったと考えられ、今後酵素およびトレーサーをいかに深部まで到達させるかは検討課題であろう。

上皮に透過した ^3H -Dextran は、細胞内および細胞間隙の何れにも観察されたが、細胞間隙に主に認められ、細胞間隙を通じ表層より徐々に浸透していったのではないかと考えられる。ヘパラン硫酸分解酵素が組織の透過性に与える影響を調べた過去の報告としては、Kanwar²⁷⁾がトレーサーとして ferritin を使用し、また Rosenzweig²⁸⁾が ^{125}I -Bovine Serum Albumin を使用して、ラットの腎臓の糸球体の basement membrane にヘパラン硫酸分解酵素を作用させると、トレーサーの透過性が亢進すると報告している。Kanwar²⁷⁾は同時に細菌性ヒアルロニダーゼ、コンドロイチナーゼ ABC を用いて同様の実験を行なっているが、この場合トレーサーの透過亢進が起らないことを報告している。

基底膜のヘパラン硫酸プロテオグリカンとは他のプロテオグリカンと異なり、物質透過に重要な役割を担っていると考えられ興味深い。

今回の実験では他のグリコサミノグリカン分解酵素の応用は行っていないが、ヘパラン硫酸分解酵素についてはこれらの報告と類似した結果であった。以上より、イヌ歯肉溝へのヘパリチナーゼ塗布は、歯肉上皮の透過性を亢進させることが示唆された。

ヒトの歯周疾患のほとんどは、歯肉縁下細菌叢と関連し、炎症病変が直接また間接的に惹起される。また、この細菌中に炎症病変を引き起こす種々の酵素を産生する細菌が存在する事が知られている。たとえば口腔内のヒアルロニダーゼ産生菌としては、*Streptococcus mitis*³⁹⁾、*Streptococcus salivarius*⁴⁰⁾、*Bacteroides gingivalis*⁴¹⁾、*Bacteroides melaninogenicus*⁴¹⁾、その他多くの細菌が証明されている。ヘパリチナーゼ産生菌に関しては、中村ら^{42~44)}が、ヒト歯周炎患者のポケットより *Bacteroides heparinolyticus* (ATCC 35895) を分離し、奥田ら^{45, 46)}は本菌がヘパラン硫酸分解能を持つ事を報告している。本実験は、これら細菌が産生した酵素が、実際にイヌ歯肉

に存在するか否か、また、もし存在するのならばその局在について明らかにするため、竹内ら²⁴⁾が、コンドロイチナーゼおよびヒアルロニダーゼの存在を、ヒト歯肉で証明した免疫病理学的手法を用い検討した。蛍光抗体法は、極めてコントラストのよい鮮明な染色像が得られることで反応の陽性、陰性の判定が容易であり、さらに抗原物質の組織細胞内の局在が、通常の顕微鏡では観察困難な大きさであっても、強い蛍光によってその所在が分かるという利点があり、比較的簡便な方法として広く使用されている。

本実験において蛍光陽性部は、上皮において歯肉溝上皮側のみに限局して認められたが口腔上皮には認められず、しかも上皮が萎縮し上皮間隙が拡大した上皮表層部に観察された。これらの蛍光反応は、組織由来の酵素である可能性も否定できない。組織由来のヘパリチナーゼとしては、Oosta⁴⁷⁾が、ヒトの血小板より分離精製している。しかし組織由来のものであれば当然口腔上皮にも蛍光が認められるはずであり、歯肉溝上皮表層のしかも細胞間隙の拡大した所に存在するという所見から、酵素は細菌に由来ししかも外部から侵入したと考えて妥当であろう。一方、結合組織に認められた蛍光反応は、血管周囲などが特に高く、血小板など組織由来の酵素である可能性が高いと思われる。

本研究の結果、ヘパリチナーゼは、歯肉炎症発症の初期において密接に関係しているものと考えられる。梶川⁴⁸⁾は、イヌ歯肉溝に糸糸を結紮することにより惹起した実験的歯周炎において、歯肉溝滲出液中のグリコサミノグリカンについて検討した結果、急性炎症期にヒアルロン酸とヘパラン硫酸が急激に増加したことを報告した。またプロテオグリカンと結合しているヘパラン硫酸は、蛋白分解酵素以外にも、ヘパラン硫酸分解酵素により、より低分子の蛋白に結合していないヘパラン硫酸単鎖に分解されることが知られている^{49, 50)}。

以上、細菌の産生したヘパラン硫酸分解酵素は、歯肉溝上皮に存在し、ヒアルロニダーゼ、プロテアーゼ共々、歯肉溝上皮細胞間マトリックスを障害することにより、上皮本来の防衛能を低下させ、上皮間隙の拡大、上皮透過性の亢進を引き起こし、その結果外来侵襲物質の組織内侵入を容易にすることにより、歯肉炎症を起こすイニシエーターになる可能性を示唆したが、より詳細に病態を検討する上で、多角度から実験を積み重ねて実態を解明する必要があると考えられる。

結 論

イヌ歯肉を対象とし、ヘパリチナーゼによる組織破壊ならびに上皮透過性への影響について検索した。さらに蛍光抗体法により酵素のイヌ歯肉での存在様式について検討し、以下の結論を得た。

(1) イヌ歯肉溝にヘパリチナーゼを反復塗布し組織学的な変化を検討した結果、3日間酵素塗布群では、著明な変化は認められなかったが、10日間および14日間酵素塗布群において、上皮間隙の拡大と好中球の浸潤ならびに、上皮下結合組織における好中球を中心とした炎症性細胞の浸潤が認められた。さらにペリオトロン値の経時的変動においても、酵素塗布群は対照群に比較して高い値を示した。

(2) ヘパリチナーゼの上皮透過性への影響を調べるため、トレーサーとして³H-Dextranを使用し、燃焼実験およびオートラジオグラフィーによる手法を用いて検討した結果、両実験とも対照群に比較して実験群で³H-Dextranの組織透過性が増加することが認められた。

(3) イヌ歯肉組織でのヘパリチナーゼの局在を蛍光抗体法で調べた結果、蛍光陽性部は歯肉上皮において歯肉溝上皮側のみに存在し、口腔上皮側では認められず、またその存在部は歯肉溝辺縁の比較的上層部であり、さらに細胞間隙の拡大した所に多く認められた。

以上から、細菌由来ヘパリチナーゼは、イヌ歯肉溝上皮に存在し上皮細胞間マトリックスであるヘパラン硫酸を分解することによって、上皮本来の防衛能を低下させ、細菌産生物質の上皮透過性を高め、歯肉炎症発症に関与することが示唆された。

謝 辞

稿を終えるにあたり、御指導と御校閲を賜った朝日大学歯学部歯周病学講座 岩山幸雄教授に深く感謝致します。さらに、貴重なる御助言と御校閲を頂きました本学病理学講座 竹内 宏教授、生化学講座 横田 豊教授ならびに本講座前助教授 勝谷芳文先生に深く感謝いたします。

また、研究に際し、御助力と御鞭撻をいただいた歯周病学講座 白木雅文助教授をはじめとする教室員の皆様ならびにRI研究施設、山口良三先生に深謝致します。

本研究は一部昭和61年度宮田研究奨励金の補助により行なわれたことを付記する。

文 献

- 1) Oldberg, Å., Kjellén, L. and Höök, M. : Cell-surface Heparan Sulfate. *J. Biol. Chem.*, 254 : 8505-8510, 1979.
- 2) Kjellén, L., Oldberg, Å. and Höök, M. : Cell-surface Heparan Sulfate. *J. Biol. Chem.*, 255 : 10407-10413, 1980.
- 3) Klinger, M.M., Margolis, R.U. and Margolis, R.K. : Isolation and Characterization of the Heparan Sulfate Proteoglycans of Brain. *J. Biol. Chem.*, 260 : 4082-4090, 1985.
- 4) Hayman, E.G., Oldberg, Å., Martin, G.R. and Ruoslahti, E. : Codistribution of Heparan Sulfate Proteoglycan, Laminin, and Fibronectin in the Extracellular Matrix of Normal Rat Kidney Cells and Their Coordinate Absence in Transformed cells. *J. Cell Biol.*, 94 : 28-35, 1982.
- 5) Laurie, G.W., Leblond, C.P. and Martin, G.R. : Localization of Type IV Collagen, Laminin, Heparan Sulfate Proteoglycan, and Fibronectin to the Basal Lamina of Basement Membranes. *J. Cell Biol.*, 95 : 340-344, 1982.
- 6) Leivo, I. : Basement Membrane-Like Matrix of Teratocarcinoma-derived Endodermal Cells : Presence of Laminin and Heparan Sulfate in the Matrix at Points of Attachment to Cells. *J. Histochem. Cytochem.*, 31 : 35-45, 1983.
- 7) Culp, L.A., Murray, B.A. and Rollins, B.J. : Fibronectin and Proteoglycans as Determinants of Cell-Substratum Adhesion. *J. Supramol. Struct.*, 11 : 401-427, 1979.
- 8) Schubert, D. and LaCorbiere, M. : A Role of Secreted Glycosaminoglycans in Cell-Substratum Adhesion. *J. Biol. Chem.*, 255 : 11564-11569, 1980.
- 9) Schubert, D. and LaCorbiere, M. : The Specificity of Extracellular Glycoprotein Complexes in Mediating Cellular Adhesion. *J. Neurosci.*, 2 : 82-89, 1982.
- 10) Woods, A., Höök, M., Kjellén, L., Smith, C.G. and Rens, D.A. : Relationship of Heparan Sulfate Proteoglycans to the Cytoskeleton and

- Extracellular Matrix of Cultured Fibroblasts. J. Cell Biol., 99 : 1743-1753, 1984.
- 11) Culp, L.A., Rollins, B.J., Buniel, J. and Hitri, S. : Two Functionally Distinct Pools of Glycosaminoglycan in the Substrate Adhesion Site of Murine Cells. J. Cell Biol., 79 : 788-801, 1978.
 - 12) Castellot, J.J., Addonizio, M.L., Rosenberg, R. and Karnovsky, M.J. : Cultured Endothelial Cells Produce a Heparinlike Inhibitor of Smooth Muscle Cell Growth. J. Cell Biol., 90 : 372-379, 1981.
 - 13) Ratner, N., Bunge, R.P. and Glaser, L. : A Neuronal Cell Surface Heparan Sulfate Proteoglycan is Required for Dorsal Root Ganglion Neuron Stimulation of Schwann Cell Proliferation. J. Cell Biol., 101 : 744-754, 1985.
 - 14) 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.
 - 15) 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.
 - 16) 萩原さつき : ヒト白血球からのライソゾーム酵素が歯周組織に与える影響について (ウサギにおける実験的研究). 日歯周誌, 21 : 392-409, 1979.
 - 17) 和泉雄一 : ヒト白血球より抽出したライソゾーム酵素が歯周組織に及ぼす影響について—*in vitro*ならびに *in vivo* における実験的研究—. 日歯周誌, 25 : 144-159, 1983.
 - 18) 本多隆保 : ラットの歯肉の創傷治癒におよぼす細菌性プロテアーゼとアロキサン糖尿病の影響. 日歯周誌, 28 : 39-55, 1986.
 - 19) 小嶋久雄 : 細菌性プロテアーゼの滴下によるラット歯周組織の病理組織学的変化について. 愛院大歯誌, 25 : 79-95, 1987.
 - 20) Stallard, R.E. and Awwa, I.A. : The Effect of Alterations in External Environment on the Dentogingival Junction. J. Dent. Res., 48 : 671-675, 1969.
 - 21) Smith, F.N. and Ramfjord, S.P. : Hyaluronidase Applied to the Gingiva of Rhesus Monkeys. J. Periodontol., 44 : 361-365, 1973.
 - 22) Gaffar, A., Coleman, E.J. and Marcussen, H.W. : Penetration of Dental Plaque Components into Gingiva : Sequential Topical Treatments with Hyaluronidase and Streptococcal Polysaccharide in rats. J. Periodontol., 52 : 197-205, 1981.
 - 23) 竹内 宏, 堀 泰典, 金久純也, 佐藤 勝, 並河 勇 : 辺縁性歯周炎の免疫病理学的研究. 第7報 歯周炎と細菌酵素 (その1) 歯垢中の chondroitinase と hyaluronidase の局在について. 歯基礎誌, 24 : 986-992, 1982.
 - 24) 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 歯周炎と細菌酵素 (その2) 炎症歯肉における bacterial chondroitinase ABC と hyarluronidase について. 歯基礎誌, 25 : 437-442, 1983.
 - 25) 竹内 宏, 堀 泰典, 佐藤 勝, 並河 勇 : 辺縁性歯周炎の免疫病理学的研究. 第7報 (その3) chondroitinase および hyaluronidase 産生菌の検討. 歯基礎誌, 25 : 443-447, 1983.
 - 26) 伊集院直邦, 高田 隆, 山崎 章, 二階宏昌 : 付着上皮, 歯小皮, 歯肉の微細構造と歯周疾患. 細胞, 15 : 12-17, 1983.
 - 27) Kanwar, Y.S., Linker, A. and Farquhar, M.G. : Increased Permeability of the Glomerular Basement Membrane to Ferritin after Removal of Glycosaminoglycans (Heparan Sulfate) by Enzyme Digestion. J. Cell Biol., 86 : 688-693, 1980.
 - 28) Rosenzweig, L.J. and Kanwar, Y.S. : Removal of Sulfated (Heparan Sulfate) or Nonsulfated (Hyaluronic Acid) Glycosaminoglycans Results in Increased Permeability of the Glomerular Basement Membrane to ^{125}I -Bovine Serum Albumin. Lab. Invest., 47 : 177-184, 1982.
 - 29) Hovingh, P. and Linker, A. : The Enzymatic Degradation of Heparin and Heparitin Sulfate. III. Purification of a Heparitinase and a Heparinase from Flavobacteria. J. Biol. Chem., 245 : 6170-6175, 1970.
 - 30) Linker, A. and Hovingh, P. : Heparinase and Heparitinase from Flavobacteria. Method in Enzymol., 28 : 902-911, 1972.

- 31) Alfano, M.C., Chasens, A.I. and Masi, C.W. : Autoradiographic Study of the Penetration of Radiolabelled Dextran and Inulin Through Non-Keratinized oral mucosa in vitro. *J. Periodont. Res.*, 12 : 368-377, 1977.
- 32) 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.
- 33) Bennett, H.S., Wyrick, A.D., Lee, S.W. and McNeil, J.H. : Science and Art in Preparing Tissues Embedded in Plastic for Light Microscopy, with Special Reference to Glycol Methacrylate, Glass knives and Simple Stains. *Stains Technol.*, 51 : 71-97, 1976.
- 34) Schultz-Haude, S.D. and Scherp, H.W. : Production of Hyaluronidase and Beta-Glucuronidase by Viridans Streptococci Isolated from Gingival Crevices. *J. Dent. Res.*, 34 : 924-929, 1955.
- 35) 林 秀男, 河野 正, 山本俊輔, 吉永 秀 : 炎症とプロテアーゼ, 村地 孝, 浅田敏雄, 藤田節郎 : 蛋白分解酵素と生体防禦. 学会出版センター, 東京, 99-124, 1979.
- 36) McDougall, W.A. : Penetration Pathways of a Topically applied foreign protein into rat gingiva. *J. Periodont. Res.*, 6 : 89-99, 1971.
- 37) Schwartz, J., Stinson, F.L. and Parker, R.B. : The Passage of Tritiated Bacteria Endotoxin Across Intact Gingival Crevicular Epithelium. *J. Periodontol.*, 43 : 270-276, 1972.
- 38) 田中輝男, 坂野 彰, 綾坂則夫 : ラット正常歯肉における付着上皮へのトレーサーとしての Cationized Ferritin と Microperoxidase の浸透性についての研究. *歯基礎誌*, 30 : 1-13, 1988.
- 39) Nord, C.E. : Purification and Properties of Hyaluronidase from *Streptococcus mitis*. *Odont. Revy.*, 22 : 125-136, 1971.
- 40) Rautela, G.S. and Abramson, C. : Crystallization and Partial Characterization of *Staphylococcus aureus* Hyaluronate Lyase. *Arch. Biochem. Biophys.*, 158 : 687-694, 1973.
- 41) Tipler, L.S. and Embery, G. : Glycosaminoglycan-Depolymerizing Enzymes Produced by Anaerobic Bacteria Isolated from the Human Mouth. *Archs Oral Biol.*, 30 : 391-396, 1985.
- 42) 中村 武 : 口腔内嫌気性 Heparinase 産生菌に関する研究. *十全医会誌*, 78 : 509-530, 1969.
- 43) 中村 武, 杉中芳幸, 高添一郎, 奥田克爾 : 口腔内 Heparinase 産生性 *Bacteroides* の Endotoxin の生物学的活性. *松本歯学*, 2 : 12-19, 1976.
- 44) Nakamura, T., Suganaka, Y. and Takazoe, I. : Heparinase Activity in Lesion of Periodontal Diseases. *Bull. Tokyo dent. Coll.*, 17 : 147-155, 1976.
- 45) 奥田克爾, 塩津二郎, 高添一郎, 中村 武 : *Bacteroides Heparinolyticus* sp. nov. に関する分類学的研究. *日細菌誌*, 39 : 596, 1984.
- 46) Okuda, K., Kato, T., Shiozu, J., Takazoe, I. and Nakamura, T. : *Bacteroides Heparinolyticus* sp. nov. Isolated from Humans with Periodontitis. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 35 : 438-442, 1985.
- 47) Oosta, G.M., Favreau, L.V., Beeler, D.L. and Rosenberg, R.D. : Purification and Properties of Human Platelet Heparitinase. *J. Biol. Chem.*, 257 : 11249-11255, 1982.
- 48) 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. *日歯周誌*, 28 : 500-515, 1986.
- 49) Oohira, A., Wight, T.N. and Bornstein, P. : Sulfated Proteoglycans Synthesized by Vascular Endothelial Cells in Culture. *J. Biol. Chem.*, 258 : 2014-2021, 1983.
- 50) 大平敦彦 : 細胞表層に存在するヘパラン硫酸プロテオグリカンの構造と機能. *代謝*, 21 : 9-17, 1984.