イヌ歯槽骨のプロテオグリカン

本 田 準 虎 吉 村 昌 敏 森 本 淳 史
小 出 修 身 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)

(平成3年9月18日受付)

Proteoglycans in Alveolar and Non-Alveolar Regions of Canine Mandibular Bone

Junko HONDA, Masatoshi YOSHIMURA, Atsushi MORIMOTO, Osami KOIDE,
Masafumi SHIRAKI and Yukio IWAYAMA

Department of Periodontology, Asahi University School of Dentistry

1851-1 Hozumi, Hozumi-cho, Motosu-gun, Gifu, 501-02, Japan

(Chief : Prof. Yukio IWAYAMA)

Proteoglycans in alveolar and non-alveolar regions of canine mandibular bone were extracted and separated by gel-filtration and SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. Furthermore, qualitative and quantitative analysis of glycosaminoglycans liberated from these proteoglycans was performed to characterize the proteoglycans in alveolar bone as compared to those in non-alveolar bone. Proteoglycans in bone tissues were successfully extracted under demineralizing conditions achieved

in the presence of 0.25 M ethylenediaminetetraacetic acid. The amount of proteoglycan in alveolar bone was less than 50% of that in non-alveolar bone. The molecular weights of proteoglycans partially purified by CsCl centrifugation ranged from 70,000 to 76,000. It is possible that two different low molecular weight forms exist in bone. The glycosaminoglycans extracted from the proteoglycans consisted mainly of chondroitin sulfate in both alveolar and non-alveolar bones.

Key words : Proteoglycans, Glycosaminoglycans, Canine alveolar bone

要旨：イヌ下顎骨より歯槽骨と非歯槽骨を摘出，プロテオグリカンを抽出し，これをゲル濾過カラムを用いた HPLC と SDS-PAGE により検索した。さらにプロテオグリカンから分離，精製したグリコサミングリカンを定性，定量分析し，歯槽骨プロテオグリカンの特徴を非歯槽骨プロテオグリカンとの比較において検討し，次の結果を得た。骨組織中のプロテオグリカンは脱灰条件（0.25 M EDTA）下で，効率よく抽出された。しかし，歯槽骨のプロテオグリカン量は非歯槽骨に比べて 1/2 以下であった。CsCl 沈降平衡遠心で得られた粗精製プロテオグリカンは分子量 76 kDa と 70 kDa の 2 種類の低分子型プロテオグリカンと推察された。一方，プロテオグリカンから分離，精製したグリコサミングリカンは，歯槽骨，非歯槽骨ともにコンドロイチン硫酸が主要成分であった。

索引用語：プロテオグリカン，グリコサミングリカン，イヌ歯槽骨

緒 言

プロテオグリカン (PG) は、細胞外マトリックスの構成成分としてコラーゲン、非コラーゲン性糖タンパク質とともに広く結合組織に分布する基質成分の 1 つであり、水分保持、イオンの調節、コラーゲン線維形成、骨形成などに関与している^{1,2)}。その典型的分子形態は、軟骨のものについて詳細に研究^{3,4)}され、分子量約 2×10^6 の約 10% を占めるコアタンパク質に 50, 60 本の分子量約 30 kDa のコンドロイチン硫酸 (CS) 鎖が linkage region を介して結合したものである。さらに分子量約 6 kDa のケラタン硫酸 (KS) などが結合した複雑な形態をとる。また、構造とおそらく機能も相当に異なると思われる分子量の小さい PG の存在が知られている⁵⁾。PG はこれら多彩な生理的機能の他、組織の炎症と密接に関連している事も明らかにされている^{6,7)}。

一方、歯肉溝滲出液 (GCF) は、歯周炎による歯周組織の破壊程度や代謝性変化を反映し、病態を鋭敏に捉える一指標になる可能性があるとして注目されている⁸⁾。特に GCF 成分の 1 つとして知られるグリコサミノグリカン (GAG) の質的量的変動は、歯周炎の病態との相関の面から、種々の研究⁹⁻¹¹⁾が成されている。梶川ら¹²⁾の行ったヒト実験的歯肉炎に於ける GCF-GAG の検索では、健常時ではヒアルロン酸 (HA) のみが認められ、歯肉炎時に他の GAG は認められなかったものの、HA は明らかに増加する傾向があると報告している。永橋¹³⁾は成人型歯周炎患者の GCF-GAG について分析を行った結果、治療前に認められた HA およびデルマトン硫酸 (DS) が、歯周初期治療後では HA の顕著な減少と DS が消失した事を示している。また Last ら¹⁰⁾は、進行した歯周炎患者の GCF 中には単なる歯肉炎患者では認められない GAG が出現し、これはコンドロイチン-4-硫酸であると報告し、さらに矯正による歯牙移動中の圧迫側の GCF 中には CS が存在する事を示した¹⁴⁾。歯周組織の状態の違いによる、これら GCF 中の GAG の質的、量的変動は、その供給源として考えられる組織の炎症程度に深く関与すると思われる。

歯周炎は歯槽骨の吸収という破壊性変化を特徴とする病変であり、重度歯周炎時に歯槽骨が多量且つ急速に吸収されることから、GCF-GAG の供給源として、骨破壊産物が歯周ポケットから漏出する可能性が考え

られる。顎骨体においても、とりわけ歯槽骨は咀嚼時の機能圧を受けとめる部位としてなど、非歯槽骨部とは生理的環境が異なる。これら環境の違いから骨基質成分の質的量的差異が生じる可能性も考えられる。従って歯槽骨由来の GCF-GAG を捉えることは歯周炎の病態を的確に把握するための有効な手がかりとなる。しかしながら、歯槽骨中の GAG やこれにより構成されるプロテオグリカン (PG) に関する報告は少なく、Waddington ら¹⁵⁾の報告など若干が認められる^{16,17)}のみである。そこで、歯槽骨 PG および GAG が GCF 成分の 1 つとして出現する可能性を検索する目的で、イヌ下顎骨歯槽骨中の PG の特徴について、非歯槽骨中の PG と比較しながら検討した。

実験材料および方法

1. 試料の調製および抽出方法

図 1 に歯槽骨および非歯槽骨 PG の抽出方法とその精製過程の概要を示す。雑種成犬 2 頭より下顎骨を摘出し、骨髓、骨膜およびその他の軟組織を除去した後、歯槽骨部と非歯槽骨部に分離した。分離基準として、歯槽骨部は下顎管上部で抜歯窩に接する部位を、非歯槽骨部は下顎管下部より下顎骨底部に至る抜歯窩から充分離れた部位を選択した。これら試料は粉末とし、0.5 mm メッシュに篩過したものをを用いた。抽出は Termine ら¹⁸⁾の方法に準じて行った。組織の湿重量 30 g に対し未脱灰条件下に 100 倍量の 4 M 塩酸グアニジンを含む 50 mM トリス緩衝液 (pH 8.0) (Gd-緩衝液) で 72 時間抽出 (Gd-extract) 後、脱灰条件 (0.25 M EDTA) 下に同緩衝液中で 48 時間抽出 (E-extract) を行った。上記の操作はいずれも 4°C で行い、緩衝液

図 1 プロテオグリカンの抽出及び精製方法

図2 粗精製プロテオグリカンの分析経過

中にはタンパク質分解酵素阻害剤として、0.01 M N-エチルmaleイミド (NEM), 1 mM フェニルメタンスルホニルフルオリド (PMSF), 0.1 M 6-アミノヘキサン酸 (以上, 生化学工業, 東京) を加えた。得られた抽出液の一部についてウロン酸, およびタンパク質量を測定した。タンパク質の定量はウシ血清アルブミンを標準タンパク質として Lowry ら¹⁹⁾の方法で行い, ウロン酸量はグルクロン酸量として硫酸カルバゾール法²⁰⁾で行った。

2. プロテオグリカンの精製 (CsCl 沈降平衡遠心)

Hascall と Sajdera²¹⁾ による方法に準じて行った。抽出液は限外濾過濃縮後, 塩酸グアニジンだけを含まない抽出溶液に対して 3 日間透析し, 引き続き 0.5 M 塩酸グアニジンを含む抽出溶液に 4 日間同処理を行った。次に塩化セシウムを加え比重 1.6 g/ml となるように調製した。10,000 rpm, 30 分間の遠心で浮遊沈澱を除去した後, 35,000 rpm, 10°C, 72 時間遠心した。10 の画分 (底部より A1-A 10) に分画し, 各画分のタンパク質量およびウロン酸量の測定を行った。タンパク質/ウロン酸比の高値を示す画分を回収し, 0.5 M 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.0) に 48 時間, 引き続き蒸留水に対し 72 時間透析した後, 粗精製 PG 画分として -80°C 凍結保存した。図2に以後行った粗精製 PG 画分の分析経過の概要を示す。

3. 高速液体クロマトグラフィー (HPLC)

得られた粗精製 PG 画分はゲル濾過カラムを用いた HPLC 法で溶出分離を行った。分離には Superose 6 HR 10/30 カラム (Pharmacia) を接続したファルマシア FPLC システムを用い, 溶出溶媒は 0.2% Triton X-100 を含む Gd-緩衝液で流速 0.5 ml/min で溶出し, 検出は 280 nm の紫外吸収で行った。溶出液は, 各ピー

クごとに回収し, ウロン酸量を測定した。なお, 分子量マーカーとして, チログロブリン (669 k), フェリチン (440 k), アルドラーゼ (158 k), キモトリプシノーゲン (25 k) を用いた。各ピークは再度限外濾過法により脱塩, 濃縮し, 次の実験に供した。

4. SDS 電気泳動 (SDS-PAGE)

HPLC により得られた各ピークは, Laemmli²²⁾ の方法に準じた SDS-PAGE を行った。

分離には 12% T スラブゲルを用い, 2 mA/ウェルで 100 分間の泳動を行った。分子量マーカーは SDS-PAGE 用 calibration protein (Boehringer Mannheim Combithek®) を用いた。すなわち, フォスホリラーゼ b (97,4 k), グルタマイトデヒドロゲナーゼ (55,4 k), ラクテイトデヒドロゲナーゼ (36,5 k), トリプシンインヒビター (20,1 k) を含むものである。染色には PAGE タンパク質銀染色用シルベストステインキット (ナカライテスク, 京都) を用いた。

5. GAG の調製

CsCl 沈降平衡遠心法により得られた粗精製 PG 画分に対し乾燥重量の 30 倍量の 0.5 N 水酸化ナトリウムを加え, 4°C, 20 時間のアルカリ処理を行い, これを 1 M 塩酸で中和した後, 5 mM 塩化カルシウムを含む 0.1 M トリス緩衝液 (pH 7.8) を加えて 100°C, 30 分間の煮沸によるタンパク質の熱変性を行った。次いで, プロナーゼ E (70,000 p.u.k./g, 科研科学, 東京) を加え, 50°C, 48 時間酵素処理を行った。反応停止と酵素タンパク除去のため, 終濃度 10% トリクロロ酢酸 (w/v) を加え 4°C, 1 時間静置した。これを 10,000 g, 10 分間遠沈して, 得られた上清に 5% 酢酸カリウム (w/v) を含む 3 倍容のエタノールを加えて, 4°C, 24 時間静置した。更にこれを 12,000 g, 15 分間遠沈して, 得られた沈澱を蒸留水に対して透析, 凍結乾燥して GAG 試料を得た。

6. GAG の分析

1) セルロースアセテート膜電気泳動による分離

電気泳動膜は Separax (常光産業, 東京) を用い, Hata と Nagai²³⁾ の方法に準じて 2 次元電気泳動を行った。すなわち, 0.1 M ピリジン-0.47 M ギ酸緩衝液 (pH 3.0) を用い, 1 次元方向に 1 mA/cm, 90 分間泳動し, 次いでこれを 0.1 M 酢酸バリウム溶液 (pH 8.0) を用いて 2 次元方向に 1 mA/cm, 4.5 時間の泳動を行った。染色には 0.1% アルシアンブルー-8 GX (0.1% 酢酸溶液中) を用い 10 分間行った。脱色には 0.1% 酢酸溶液を用い 20 分間行った。なお, GAG

表 1 抽出効率

(a)	定量値			
	未脱灰		脱 灰	
	ウロン酸	タンパク質	ウロン酸	タンパク質
歯槽骨	0.10	8.60	0.76	5.76
非歯槽骨	0.10	5.00	1.77	9.76
mg/g of bone				
(b)	ウロン酸/タンパク質			
	未脱灰抽出	脱灰抽出	脱灰抽出/未脱灰抽出	
歯槽骨	0.01	0.132	11.34	
非歯槽骨	0.02	0.182	9.04	

(a) ウロン酸及びタンパク質の定量値 数値は骨湿重量に対する値を示す。(b) ウロン酸/タンパク質比 数値はウロン酸/タンパク質重量比を示す。

の標準試料として HA, CS, DS, KS, ヘパラン硫酸 (HS) (以上, 生化学工業) を用いた。

2) 酵素消化法による同定

各 GAG は, その易動度ならびに酵素消化法により同定した。すなわち, HA は放線菌ヒアルロニダーゼ (生化学工業) 消化により, CS と DS はコンドロイチナーゼ ACII およびコンドロイチナーゼ ABC (生化学工業) 消化により, KS にはセラタナーゼ (生化学工業) 消化により, HS にはヘパリチナーゼ (生化学工業) 消化により消失するスポットとして同定した。

3) GAG の定量

セルロースアセテート膜上に染色された各 GAG を 2 波長クロマトスキャナー (島津 CS-930) により測定した。すなわち, アルシアンブルーに対する吸光度を 615 nm で, バックグラウンドに対する吸光度を 471 nm で測定し, 標準試料より得られた検量線から各 GAG 量を算出した。

結 果

1. 歯槽骨および非歯槽骨プロテオグリカン (PG) の抽出および精製

1) 抽出効率

表 1 に抽出効率を示す。(a) はウロン酸およびタンパク質の定量値を, (b) はウロン酸/タンパク質比を示す。歯槽骨では, 未脱灰抽出に対して約 8 倍のウロン酸が脱灰抽出で認められたが, 逆にタンパク質の抽出量は, 未脱灰抽出が脱灰抽出量よりも上回った (Ed

-extract : 各 0.10, 8.60 E-extract : 各 0.76, 5.76 mg/g)。非歯槽骨では, ウロン酸, タンパク質ともに脱灰条件下で効率よく抽出された (Ed-extract : 各 0.10, 5.00 E-extract : 各 1.77, 9.76 mg/g)。ウロン酸/タンパク質比に着目した未脱灰抽出に対する脱灰抽出効率比は歯槽骨, 非歯槽骨それぞれ 11.34, 9.04 と高い値を示した。

2) CsCl 沈降平衡遠心

図 3 に歯槽骨 (a) および非歯槽骨 (b) の E-extract の CsCl 沈降平衡遠心による分離パターンを示す。歯槽骨 E-extract の分離状態は, タンパク質量は A 2 が最も低く, A 8 までは徐々に上昇し A 9 および A 10 では顕著な上昇を認め, また A 1 でわずかに上昇した。ウロン酸量は, A 1 で最も高い値を示し A 3 から A 8 まではほぼ一定し A 9 および A 10 で再び増加した。ウロン酸/タンパク質比はフラクション A 1 および A 2 にそのピークを認め, 以後順に減少を認めた。非歯槽骨においても同様の傾向が認められた。ウロン酸/タンパク質比が高値を示すフラクション A 1 および A 2 を回収し, 粗精製 PG 画分とした。

2. 粗精製 PG 画分の HPLC による溶出分離

図 4 に歯槽骨 (a) および非歯槽骨 (b) の粗精製 PG 画分のゲル濾過カラムを用いた溶出パターンを示す。ボイドボリュームにより 5 つの蛋白ピーク (ピーク I : 13-18, ピーク II : 19-29, ピーク III : 30-38, ピーク IV : 39-44, ピーク V : 45-50 ; 分) が認められた。各ピークについてそれぞれウロン酸量を測定したところ, ピーク II に集中し歯槽骨で全ウロン酸量の 83%, 非歯槽骨で 85% が認められ, 残りはボイドのピーク I に認められるのみでピーク III ~ V には殆ど認められなかった。なお, 歯槽骨と非歯槽骨抽出物間のピーク II の溶出時間に差異が認められ, 歯槽骨抽出物は, 分子量約 300 kDa の位置に, 非歯槽骨は分子量約 540 kDa の位置であった。

3. 粗精製 PG 画分の SDS-PAGE

図 5 に歯槽骨および非歯槽骨抽出物の HPLC により得られたピーク II の泳動結果を示す。歯槽骨, 非歯槽骨ともにピーク II には他のピークとは様相を異にする染色度の高い 2 つの明確なバンドが認められた。これらバンドは分子量約 76 kDa および 70 kDa であった。更に, 歯槽骨抽出物ではこれら 2 つのバンドが各々近接する 2 対のバンドとして認められた。他に, 染色度の低い複数のバンドが 54 kDa から 17 kDa の位置まで, 歯槽骨, 非歯槽骨ともに全てのピークにほぼ同

図 3 CsCl 沈降平衡遠心

(a) 歯槽骨, (b) 非歯槽骨 CsCl/0.5M 塩酸グアニジン, 比重 1.6g/ml

様に認められた。

4. 粗精製 PG 画分 GAG のセルロースアセテート膜電気泳動

図 6 (a), (b) に歯槽骨 GAG の 2 次元泳動像を示す。低移動度の位置のブロードなスポットと、コンドロイチン硫酸 (CS) の位置に相当するアルシアンブルー強陽性のスポットが認められた。移動度の高いスポットはコンドロイチナーゼによる酵素消化法で同定を行った結果, CS であることが確認された。しかしな

がら移動度の低いスポットはいずれの GAG 分解酵素にも消化されず残存し, 今回このスポットを X とした (図 6-a)。その後, 微量成分検索のため同試料を濃縮後, 再度電気泳動を行ったところ, 新たに 2 つのスポットが確認され, 酵素消化法によりデルマタン硫酸 (DS) およびケラタン硫酸 (KS) であることが確認された (図 6-b)。これら GAG の定量結果を表 2 に示す。歯槽骨の主要 GAG は, CS であり全 GAG の 93% (183 μg/g) を占め, 微量成分として DS が 5% (10.3 μg/g), KS

図 4 Superose 6 HR 10/30 のクロマトグラム

(a) 歯槽骨, (b) 非歯槽骨 溶媒; Gd-緩衝液/0.2% Triton X-100, 流速; 0.5ml/min, 検出; 280nm, 分子量マーカー; A-チログロブリン (669k), B-フェリチン (440k), C-アルドラーゼ (158k), D-キモトリプシノーゲン (25k), I~V; ピークを示す。

が1% (2.9 $\mu\text{g/g}$) 存在した。非歯槽骨においても GAG 組成比は同様な値を示した (CS: 286 $\mu\text{g/g}$, DS: 16.0 $\mu\text{g/g}$, KS: 5.0 $\mu\text{g/g}$) が骨湿重量に対する GAG の存在比率は約 1.6 倍と高い値を示した。なお, 図 6 (a), (b) は同条件で, GAG 標準試料を変えて行った。

考 察

プロテオグリカン (PG) の抽出には Termine ら¹⁸⁾ の連続抽出法の他に 2 M CaCl_2 による抽出も可能であり²⁴⁾, 本法を用いてはウサギ歯槽骨から PG を抽出している¹⁵⁾が, 至適濃度の幅が狭いなどの欠点があり, 塩酸グアニジンが最も有効であるとされている。今回用いた方法で, 骨から抽出される成分は可溶性コラーゲンや非コラーゲン性有機質などであるが, そのうち Gd-extract 中には毛細血管や骨様基質 (osteoid) などの非石灰化組織からの基質成分が, E-extract 中には主としてハイドロキシアパタイトと親和性がある成分が抽出される^{25,26)}。本実験での歯槽骨および非歯槽骨

の Gd-extract と E-extract の総抽出量は, それぞれもとの試料の湿重量に対して 1.52%, 1.67% とほぼ同じであった。骨組織中での非コラーゲン性有機質の割合が乾燥重量の 2-2.5% である^{27,28)}ことから比べると若干低い値を示したが, 試料の含水率の影響や脱灰条件の差異, また対象とした動物の違いを考えるとほぼ一致していると思われる。総ウロン酸量は, 歯槽骨に対して非歯槽骨が 2 倍以上の高い含有率を示した。今回, 骨 PG 画分として実験に供した E-extract で, ウロン酸とともにタンパク質量も非歯槽骨に多く認められたことは, GAG を構成成分の 1 つとして含む PG の含有率が高いことが考えられる。これは咀嚼等の機能的な面を含む生理的環境の違いが, この PG 量の差に影響を及ぼしている可能性も考えられるが, 詳細は不明である。量的差はあるものの, 抽出段階で, 見かけ上の PG 量を表すウロン酸/タンパク質比が歯槽骨, 非歯槽骨ともに Gd-extract に対し E-extract が約 10 倍であったことから, 骨組織からの PG が E-extract で効率よく抽出されたと考えられる。

図 5 SDS-PAGE

1;分子量マーカー, 2;歯槽骨プロテオグリカン, 3;非歯槽骨プロテオグリカン。

CsCl 沈降平衡遠心において、軟骨型 PG は遠心管底部より 1/3 に集中し、ウロン酸量にして約 90% が底部から 2/5 までに、一方 PG 以外のタンパク質は上部から 2/5 までにほとんどが回収される²⁹⁾。今回歯槽骨、非歯槽骨ともに A 1 および A 2 にウロン酸の高いピークが認められたこと、またタンパク質量が A 10 より下部の画分に移行するに従いほぼ減少傾向を認めるが A 1 において再び増加すること、さらに A 1 および A 2 の総ウロン酸/タンパク質比が、歯槽骨、非歯槽骨ともに約 1.8 であったことから、この画分にはほぼ精製された PG が存在すると考えられる。一方、A 9 および A 10 にはコアプロテインから分離した遊離の GAG 鎖、またはさらに分解され低分子化された糖鎖の存在として考えられるウロン酸のピークが認められた。これは、特定の酵素群による分解の可能性が考えられる

表 2 定量結果

	HA	CS	DS	KS
歯槽骨	n.d.	183	10.3	2.9
非歯槽骨	n.d.	286	16.0	5.0

μg/g of bone

HA : Hyaluronic Acid CS : Chondroitin Sulfate

DS : Dermatan Sulfate KS : Keratan Sulfate

n.d. : not detectable

数値は骨湿重量に対する値を示す。

図 6 セルロースアセテート膜 2 次元電気泳動

歯槽骨プロテオグリカンの (a) 濃縮前の泳動像, (b) 濃縮後の泳動像。

が、本抽出操作は低温下でプロテアーゼインヒビターの存在下のもとで行ったものであるため、試料を採取した時点ですでにこの状態のものが存在している可能性も考えられる。

粗精製 PG 画分の HPLC による溶出分離の結果、歯槽骨、非歯槽骨ともに、ピーク II に全ウロン酸量の約 85% が集中して認められた。他はボイドとして認められるピーク I に確認された以外、ピーク III-V では殆ど認められなかった。このことからピーク II が PG のピークとして考えられる。骨組織の PG に関して Fisher ら³⁰⁾は、オリゴ糖の付き方の異なる分子量 38 kDa, 43 kDa のコアタンパク質に 40 kDa の糖鎖が 1 本または 2 本ついた約 80-120 kDa であると報告している。さらに糖鎖が 1 本鎖型のものと 2 本鎖型のものは分子量が同じで、起源の異なるコアタンパク質に結合しており、2 本鎖型のものは幼若な骨組織中で多く認められると報告³¹⁾している。また分子量に関して、Franzen ら²⁶⁾は 74.6 kDa, Sato ら³²⁾は 70-120 kDa と報告している。しかしながら、ピーク II はその溶出位置から分子量約 300-540 kDa と、他の骨組織中で見られるような低分子型 PG より大型のものとして分離された。これは Gd-緩衝液中では 0.2% Triton X-100 を含むものの PG 自体の会合能力が強いため、見かけ上の分子量がかなり大きなものとして捉えられている可能性がある。実際、今回の SDS-PAGE の結果からは、本来の分子量はこれよりもかなり小さいものであることが確認された。一方、ウロン酸の認められなかったピーク III-V は、溶出位置より 25 kDa 以下のポリペプチドとして認められた。これらは、前述の CsCl 沈降平衡遠心²¹⁾では分離できなかった PG 以外の夾雑タンパク質、あるいはゲル濾過カラムによる溶出分離の操作途中で分解、低分子化された PG 由来ポリペプチドであると思われる。

HPLC 法により溶出分離し得られたピーク II の SDS-PAGE の泳動像は、歯槽骨、非歯槽骨ともに分子量約 70 kDa および 76 kDa の位置に主要タンパクバンドが認められた。これは Fisher ら³⁰⁾の報告した糖鎖が 1 本鎖型の PG の分子量に匹敵し、また Franzen ら²⁶⁾の報告にもほぼ一致した。更に歯槽骨 PG ではその主要タンパクバンドが各々近接する 2 対のバンドとして認められた。この歯槽骨と非歯槽骨間での違いが、部位特異的な分子種構成の差異を意味するものであるか否かは現段階では明確ではない。今回、粗精製 PG 画分をさらにゲル濾過カラムによる HPLC で溶出分離

を行ったにもかかわらず、54 kDa 以下の範囲に複数のタンパクバンドが認められた。これは、PG の会合能力の影響に起因するものか、操作途中で分解、低分子化されたものかの何れかであると思われる。

一方、骨組織中の GAG に関しては、ヒアルロン酸 (HA)、コンドロイチン硫酸 (CS)、デルマトン硫酸 (DS)、ヘパラン硫酸 (HS)、ケラタン硫酸 (KS) などの存在が知られている^{16,25,26,32-34)}。これら GAG 成分の構成比については、対象とする実験動物の種などにより若干の違いは認められるが、その主要 GAG はコンドロイチン-4-硫酸である事も報告^{15,17)}されている。歯槽骨においては、Waddington ら¹⁵⁾はウサギを用いて歯槽骨と支持骨とを分け GAG の定性定量を行い、主要 GAG はコンドロイチン-4-硫酸と KS であり微量成分は HA と DS であることを示した。さらに歯槽骨には支持骨より多くの KS が存在する事を報告した。また Bartold¹⁷⁾はヒト、ブタ、ウサギの歯槽骨の構成 GAG について検討した結果、ヒト、ブタの主要 GAG は CS であり、ウサギの主要 GAG は CS と KS であると報告し、主要 GAG においても種特異性のある事を示した。今回の結果から、主要 GAG は CS (93%) であり、その他の構成成分として DS (5%) も認められた。これはウサギを除いた他の動物の歯槽骨の報告^{15,17)}に一致している。種特異性が強いと考えられる KS はごく微量が認められるのみであった。

ところで、GCF-GAG の供給源として考えられる他の歯周組織中 GAG 構成について、勝谷³⁵⁾はイヌ歯肉構成 GAG は HA (41%), DS (48%), CS (5%), HS (6%) であったと報告している。また岩田³⁶⁾は、歯肉中の GAG は炎症初期で HA と DS の減少を認めるが、慢性炎症期では、健常時とほぼ同じ GAG 構成比を維持する傾向を示した。歯根膜、およびセメント質中にも CS は認められるものの質的、量的な面を考慮すると、GCF 成分に与える影響は低いと思われる。

この様に、歯槽骨は歯周組織の中で CS の特徴的な成分含有率を示し、進行した歯周炎患者に特徴的にみられる GCF-CS の供給源として大きな割合を占めているものと考えられる。

結 論

イヌ歯槽骨からプロテオグリカンを抽出し、生化学的検索を行い、歯槽骨プロテオグリカンの特徴を非歯槽骨プロテオグリカンとの比較において検討した。そ

の結果、次の結論を得た。

1. 歯槽骨中のプロテオグリカンは脱灰条件下で、効率よく抽出されたが、抽出量は、非歯槽骨部に対して1/2以下であった。

2. 歯槽骨プロテオグリカンは分子量約76 kDaと70 kDaの2種類の低分子型プロテオグリカンと推察された。

3. 歯槽骨および非歯槽骨プロテオグリカン構成主要グリコサミノグリカンはコンドロイチン硫酸であった。

以上の結果、歯槽骨プロテオグリカンは非歯槽骨プロテオグリカンと分子種構成をほぼ同じにするが、プロテオグリカン含有率が非歯槽骨部と比べて低いことが認められた。さらにその主要グリコサミノグリカンはコンドロイチン硫酸であった。

尚、本研究は平成2年度宮田奨励金の補助により行われたことを付記する。

文 献

- 1) 梶川 欽一郎：結合組織，第一版，金原出版，東京，327，1984.
- 2) Dorfman, A. : Studies on the biochemistry of connective tissue *Pediatrics*, 22 : 576-589, 1958.
- 3) Koji Kimata, James H. Kimura, Eugene M.A. Thonar, Hans-J. Barrach, Stephen Rennard and Vincent C. Hascal : Swarmrat chondrosarcoma proteoglycans. *J. Biol. Chem.*, 257 : 3826, 1982.
- 4) Koji Kimata, Minoru Okayama, Atsushi Oohira and Sakaru Suzuki : Heterogeneity of proteochondroitin sulfates produced by chondrocytes different stages of cytodifferentiation : *J. Biol. Chem.*, 249 : 1646-1653, 1974.
- 5) Koji Kimata, Hans-J. Barrach, Kenneth S. Brown and J.P. Pennypacker : Absence of proteoglycan core protein in cartilage from the cmd/cmd (cartilage matrix deficiency) mouse. *J. Biol. Chem.*, 256 : 6961-6968, 1981.
- 6) Baggi, G.F. and Prodi, G. : *Boll. Soc. Ital. Biol. Sper.* 29 : 1, 1953. In *International Review of Connective Tissue Research*. (Hall, D.A., Editor), 2 : 304, 1954.
- 7) Delaunay, A. and Bazin, S. : Mucopolysaccharids, Collagen, nonfibrillar proteins In inflammation. In *International Review of Connective Tissue Research*. (Hall, D.A., Editor), 2 : 306, 1964.
- 8) Polson, A.M. and Goodson, J.M. : Periodontal diagnosis. Current status and future needs. *J. Periodontol.*, 56 : 25-34, 1985.
- 9) 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.
- 10) Last, K.S., Stanbury, J.B. and Embery, G. : Glycosaminoglycans in human gingival crevicular fluid as indicators of active periodontal disease. *Archs Oral Biol.*, 30 : 275-281, 1985.
- 11) Embery, G., Oliver, W.H., Stanbury, J.B. and Purvis, J.A. : The electro phoretic detection of acidic glycosaminoglycans in human gingival sulcus fluid. *Archs Oral Biol.*, 27 : 177-179, 1982.
- 12) 梶川 潔, 永橋理宏, 水野 清, 白木雅文, 岩山幸雄：ヒトの実験的歯肉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*, 29 : 844-852, 1987.
- 13) 永橋理宏：歯周初期治療による歯肉溝滲出液グリコサミノグリカンの変動. *日歯周誌*, 32 : 422-433, 1990.
- 14) K.S. Last, C. Donkin and G. Embery : Glycosaminoglycans in human gingival crevicular fluid during orthodontic movement., 33 : 907-912, 1988.
- 15) Waddington, R.J., Embery, G. and Last, K.S. : The glycosaminoglycan constituents of alveolar and basal bone of the rabbit. *Connect. Tissue Res.*, 17 : 171-180, 1988.
- 16) Bartold, P.M. : Proteoglycan of the periodontium : Structure, role and function. *J. Periodont. Res.*, 22 : 431-444, 1987.
- 17) Bartold, P.M. : A biochemical and immunohistochemical study of the proteoglycans of alveolar bone. *J. Dent Res.*, 67 : 7-19, 1990.
- 18) Termine, J.D., Belcourt, A.B., Christner, P.J., Conn, K.M. and Nylen, M.U. : Properties of dissociatively extracted fetal tooth matrix proteins. I. Principal molecular species in developing bovine enamel. *J. Biol. Chem.* 255 : 9760-9768, 1980.
- 19) Lowry, O.H., Resebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J. : Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193 : 265-275, 1951.
- 20) Bitter, T. and Muir, H.N. : A modified uronic acid carbazole reaction. *Anal. Biochem.* 4 : 330-334, 1962.
- 21) Lawrence L. Faltz, A. Hari Reddi, Gretchen K. Hascall, Damon Martin, Julio C. Pita and Vincent C. Hascall : Characteristics of proteoglycans extracted from the swarm rat chondrosarcoma with associative solvents., 254 : 1375-1380, 1979.
- 22) Laemmli, U.K. : Cleavage of Structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T 4. *Nature* 227 : 680-685, 1970.
- 23) 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.
- 24) 新名正由：軟骨プロテオグリカン研究手技，整形・災

- 害外科, 26 : 1409-1424, 1983.
- 25) Franzen, A. and Heingard, D. : Extraction and purification of proteoglycans from mature bovine bone. *Biochem. J.*, 224 : 47-58, 1984.
 - 26) Franzen, A. and Heingard, D. : Characterization of proteoglycans from the calcified matrix of bovine bone. *Biochem. J.*, 224 : 59-66, 1984.
 - 27) Eastoe, J.E. : The organic matrix of bone, In : *The Biochemistry and Physiology of Bone*. Bourne, G. H., Editor, Academic Press, New York, 81-105, 1956.
 - 28) Oldroyd, D. and Herring, G.M. : A method for the study of bone mucosubstances by using collagenase. *Biochem. J.*, 104 : 20 P, 1967.
 - 29) 木全弘治 : 軟骨のプロテオグリカン, 日本生化学会編. 複合糖質研究法II, 東京化学同人, 東京, 253-263, 1986.
 - 30) Fisher, L.W., Termine, J.D., DeJter, Jr. S.W., Whitson, S.W., Yanagishita, M., Kimura, J.H., Hascall, V.C., Kleinman, H.K., Hassell, J.R. and Nilsson, B. : Proteoglycans of developing bone. *J. Biol. Chem.*, 258 : 6588-6594, 1983.
 - 31) Fisher, L.W. : The Nature of the proteoglycans of bone. In *The Chemistry and Biology of Mineralized Tissues*, Butler, W.T., Editor Alabama Ebsco Media, 188-196, 1985.
 - 32) Sato, S., Rahemtulla, F., Prince, C.W., Tonana, M. and Butler, W.T. : Proteoglycans of adult bovine compact bone. *Connect. Tissue Res.*, 14 : 65-75, 1985.
 - 33) Herring, G.M. : Studies on the protein-bound chondroitin Sulfate of bovine cortical bone. *Biochem. J.*, 107 : 41-49, 1968.
 - 34) Prince, C.W. Rahemtulla, F. and Butler, W.T. : Metabolism of rat bone proteoglycan *in vivo*. *Biochem. J.*, 216 : 589-596, 1983.
 - 35) 勝谷芳文 : イヌの実験的歯周炎における歯肉グリコサミノグリカン代謝について. *日歯周誌*, 24 : 266-284, 1982.
 - 36) 岩田 眞 : イヌの実験的歯周炎における歯肉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*, 30 : 1008-1020, 1988.

連絡先 :

朝日大学歯学部歯周病学講座

〒 501-02 岐阜県本巣郡穂積町穂積 1851