ELISA 法による歯周初期治療前後の歯肉溝滲出液 プロテオグリカンの微量測定

西 野 恒 理

朝日大学歯学部歯周病学講座

(指導：岩山幸雄教授)

(平成4年3月18日受付)

Microassay by ELISA of Chondroitin Sulfate Isomer Proteoglycan in Gingival Crevicular Fluid before and after Initial Preparation

Watari NISHINO

Department of Periodontology, Asahi University School of Dentistry

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

(Director : Prof. Yukio IWAYAMA)

Chondroitin sulfate-proteoglycans (CS-PGs) in gingival crevicular fluid (GCF) from 14 subjects with adult periodontitis and 3 subjects with healthy gingiva were investigated by ELISA. The amount of CS-PGs in GCF before initial preparation were compared with the amount following treatment.

Chondroitin-4-sulfate proteoglycan (C4S-PG), chondroitin-6-sulfate proteoglycan (C6S-PG)

and dermatan sulfate proteoglycan (DS-PG) were detected in GCF from sites of adult periodontitis, but were not detected in GCF from sites of healthy gingiva.

After initial preparation, all CS-PGs in GCF were decreased significantly. These findings suggest that CS-PGs in a sample of GCF may be a sensitive marker for tissue destruction in periodontal disease.

Key words : Gingival crevicular fluid, Proteoglycan, ELISA, Monoclonal antibody, Initial preparation

要旨：成人型歯周炎と診断された患者(14名)と臨床的健康歯肉を有する者(3名)より歯肉溝滲出液(GCF)を採取し、歯周初期治療前後のコンドロイチン硫酸-プロテオグリカン(CS-PG)の変化をELISA法を用いて検討した。

歯周炎患者のGCF中にはコンドロイチン4硫酸-プロテオグリカン(C4S-PG)、コンドロイチン6硫酸-プロテオグリカン(C6S-PG)、デルマタン硫酸-プロテオグリカン(DS-PG)の検出が可能であったが、健康者からは検出できなかった。

歯周初期治療後、GCF中のCS-PGは治療前に比して有意に減少した。以上の結果よりGCF中のCS-PGは歯周炎による組織破壊の指標となる可能性が示唆された。

索引用語：歯肉溝滲出液、プロテオグリカン、ELISA法、モノクローナル抗体、歯周初期治療

緒 言

歯肉溝滲出液(GCF)は、歯周組織から歯肉溝内に

滲出する組織液であり、血清成分を主体として組織代謝産物を含有しており、その構成成分は歯周炎に伴う炎症性変化の影響を受け質的、量的に変動することが知られている¹⁻³⁾。

GCF の一成分であるプロテオグリカン (PG) は、歯周組織の細胞外マトリックスに由来するものと考えられており、PG はグリコサミノグリカン (GAG) がコアプロテインと呼ばれる非コラーゲン性タンパク質と 4 糖構造からなる linkage lesion を介して共有結合した複合体を形成し、生体組織の細胞間隙を埋める支持組織として働くばかりでなく、細胞活動を支配して多彩な生理機能を担っている^{4,5)}。

GAG は 2 糖繰り返し構造を持つ巨大な高分子重合体であり、その糖残基の種類によりコンドロイチン硫酸 (CS)、デルマタン硫酸 (DS)、ケラタン硫酸 (KS)、ヘパラン硫酸 (HS)、ヒアルロン酸 (HA) などが知られている^{6,7)}。歯周組織において、GAG-PG について生化学的、免疫組織化学的に検討が行われ、構成 GAG や歯周炎に伴う変動およびその局在性について詳細な報告がなされている⁸⁻¹⁵⁾。すなわち、急性炎症期では健常時と比較して歯肉結合組織中の DS は著明に減少するが CS は微量ながら増加し¹⁰⁾、免疫組織化学的にもコラーゲン線維の破壊に伴い DS の染色性が減少すると報告されている¹⁴⁾。また GCF 中の GAG-PG に関しても健常時には認められない CS と DS が歯周炎の発症と共に出現し、特に CS が急性炎症期に著明に増加することが報告されており¹⁶⁾、GCF 中の GAG-PG も歯周炎の進展に伴う組織破壊と修復機転の複雑な代謝性変化の影響を受けるものと考えられる。以上の研究結果より、CS、DS は歯周炎の進展と密接に関連しており、GCF 中のコンドロイチン硫酸異性体-プロテオグリカン (CS-PG) は歯周炎時の組織代謝を反映するダイナミックマーカーとなる可能性が示唆されている。

歯周炎は、慢性期と急性期を繰り返しながら部位特異的に進行することから¹⁷⁾、歯周炎の disease activity を予測するには一歯ごとの CS-PG の測定が必要であるが、従来の方法では大量の GCF を必要とするため個歯の歯面別の微量な GCF 中の CS-PG の動態を分析することは困難である。

本研究は CS-PG に対するモノクローナル抗体^{18,19)}を応用し、微量測定が可能な ELISA 法²⁰⁻²³⁾を用いて歯周初期治療前後における歯周炎患者の一歯ごとの GCF 中の CS-PG を測定し歯周炎の組織破壊の指標としての可能性を検討する目的で行った。

材料と方法

1. 研究対象

全顎的に臨床的健常歯肉を有する男性 3 名、26~30 歳 (平均年齢 28.0 歳) より Probing Depth が 2 mm 以下の 5 歯を対照群とした。

また、朝日大学歯学部附属病院歯周病科を受診し成人型歯周炎と診断された患者 14 名 (♂ 9, ♀ 5), 41~69 歳 (平均年齢 48.8 歳) より Probing Depth が 4 mm 以上の 44 歯を実験群とした。両被験者とも、全身疾患がなく、過去 3 ヶ月以内に抗生物質の使用がないものを選択した。被験対象歯の歯種は、対照群では前歯 5 本を、実験群では主として前歯部を対象とした (表 1)。

2. 実験スケジュール

実験群 44 歯のうち 23 歯については歯周初期治療後の GCF 中の CS-PG の比較検討を行った。すなわち、初診時に臨床的パラメーターの測定と GCF の採取を行った。その後、ブラークコントロール、スケーリング、ルートプレーニングを中心とした歯周初期治療を行い、治療終了後 1 ヶ月目の再評価時に初診時と同様に臨床的パラメーターの測定と GCF の採取を行った (図 1)。

3. 臨床的パラメーター

口腔内診査は次のように行った。

1) Probing Depth (PD)

表 1 被験対象歯歯種

対 照 群	前 歯	5
実 験 群	前 歯	34
	小 白 歯	9
	大 白 歯	1

(本)

●: 臨床パラメーターの測定

▲: GCF の採取

図 1 実験スケジュール

表 2 各コンドロイチン硫酸異性体—プロテオグリカンの分析方法

Enzyme	Antibody	GAG-PG
Chondroitinase ABC	3-B-3	Chondroitin 6 S-PG
	2-B-6	Chondroitin 4 S-PG
		Dermatan Sulfate-PG
Chondroitinase AC II	2-B-6	Chondroitin 4 S-PG
Chondroitinase B	2-B-6	Dermatan Sulfate-PG

- 2) Plaque Index (PII)
- 3) Gingival Index (GI)
- 4) Periotron 値

PD は、ウィリアムスのポケットプローブを用い 4 点計測法で測定し、最深部の PD を被験歯の PD とした。また、PD が最深部を示す部位を被験歯の実験部位とし、PII²⁴⁾、GI²⁵⁾、Periotron 値の測定および GCF の採取を行った。また、Periotron 値の測定は、歯肉縁上プラークを可及的に除去し、水洗乾燥を行い簡易防湿後、ハルコ社製ペリオトロン用濾紙ペリオペーパーを歯肉溝に刺激を与えないように挿入し、歯肉溝内に 30 秒間静置した後除去し、再度ペリオペーパーを同様に歯肉溝内に挿入し、二度目のペリオペーパーに浸潤する 30 秒間の GCF 量をハルコ社製ペリオトロン 6000® にて測定した。

4. GCF の採取

歯肉縁上プラークを可及的に除去し、水洗乾燥を行い簡易防湿後、マイクロキャピラリーチューブ (MICROCAPS® Drummond 社 U.S.A.) を出血させないように注意深く歯肉溝内に挿入し GCF を 1 μ l 採取した。採取後、直ちに 0.05 M pH 7.2 PBS 50 μ l 中に溶解し、これをサンプルとして測定時まで -40°C で保存した。

5. モノクローナル抗体

本実験に用いたモノクローナル抗体 (表 2) は 2-B-6, 3-B-3 抗体 (生化学工業 東京) であり、この両抗体は CS-PG の糖鎖を酵素消化により分解したときに生じるコア-蛋白側に残った GAG 構成二糖をエпитオプとして認識している^{18,19)}。すなわち CS-PG を各種コンドロイチナーゼで消化し、それぞれの抗体を反応させることにより目的とする CS-PG の検出が可能となる。本実験では、コンドロイチナーゼ ABC 消化後 3-B-3 抗体を反応させ C 6 S-PG を、コンドロイチナーゼ AC II 消化後 2-B-6 抗体を反応させ C 4 S-PG を、コンドロイチナーゼ B 消化後 2-B-6 抗体を反応させ DS-PG を検出する方法を用いた。

6. ELISA 測定

サンプルを 96 穴マイクロタイタープレート (FALCON® Becton Dickinson 社 U.S.A.) の各ウェルに 50 μ l ずつ加え、4°C で一昼夜放置してウェル壁に抗原をコーティングした。使用直前に、各ウェルを PBS で 3 回洗浄後コンドロイチン硫酸分解酵素を 100 μ l ずつ加え 37°C で一時間反応させた。次に、PBS でウェルを 3 回洗浄後 1% Bovine Serum Albumin 溶液 100 μ l を加え室温で二時間反応させプロッキングを行った。その後、0.05% TWEEEN 20 を含む PBS (PBST) でウェルを 3 回洗浄後、一次抗体として 5×10^3 倍希釈の 2-B-6, 3-B-3 抗体を 50 μ l 加え、室温で一時間反応させた後、同様に PBST で 3 回洗浄後、二次抗体としてペルオキシダーゼ標識抗マウス免疫グロブリン (Cappel 社 U.S.A.) を 50 μ l 加え室温で一時間反応させた。PBST で洗浄後、150 μ l の酵素基質溶液を加え、37°C で 30 分間反応させた。反応後、直ちに 4 NH₂SO₄ で反応停止後、ELISA リーダー (MPR-A 4 トーソー社 東京) を用いて各ウェルの 492 nm における吸光度を測定した。また、試料測定時に標準曲線を得る目的で C 4 S, DS-PG に対しては Rat Chondrosarcoma Proteoglycan Monomer (生化学工業社 東京) を、C 6 S-PG に対しては Bovine Nasal Cartilage Proteoglycan Monomer (生化学工業社 東京) を用いて前述と同じ ELISA 法により測定した。本測定系では、3.0~1000 ng/ml の範囲で測定可能であった (図 2, 3)。また、測定結果は、標準曲線を用いてサンプルの吸光度より得られた標品 PGng/ml 相当濃度を PG Unit として表した。

7. 統計学的処理

各臨床パラメーターおよび各 CS-PG Unit の歯周初期治療前後の比較はウィルコクソンのサイン・ラング検定法を用いた²⁶⁾。

図2 C4S, DS-PGの標準曲線

図3 C6S-PGの標準曲線

結 果

1. 初診時の臨床的パラメーター

実験群の初診時の臨床的パラメーターを表3に示した。PDが5~7mmの歯は被験歯の約77%であり、periotron値100以下の歯は44歯中34歯を占めた。

2. 初診時のGCF中の各CS-PG

対照群ではすべてのCS-PGは検出不能だったが、実験群ではC4S-PGが 16.2 ± 10.7 、C6S-PGが 12.1 ± 8.5 、DS-PGが 21.1 ± 33.6 、各CS-PGの総和であるTotal-PGは 49.4 ± 45.5 であった。各CS-PG中DS-PGが最も多く、C6S-PGが最も少ない値を示した(表4)。

3. 初診時の臨床的パラメーターと各CS-PGとの相関関係

C4S-PG、C6S-PG、Total-PGはすべての臨床パラメーターと相関関係は認められなかった。DS-PGはPDとの間にのみ相関関係が認められたが相関係数は

表3 初診時の臨床的パラメーター

Probing Depth	5.9 ± 1.2 (mm)
Plaque Index	1.3 ± 0.6
Gingival Index	1.7 ± 0.4
Periotron 値	74.4 ± 49.1

n=44

平均±標準偏差

表4 初診時の各コンドロイチン硫酸異性体—プロテオグリカン量

CS-PG	対照群 (n=5)	実験群 (n=44)
C4S-PG	N.D.	16.2 ± 10.7
C6S-PG	N.D.	12.1 ± 8.5
DS-PG	N.D.	21.1 ± 33.6
Total-PG	N.D.	49.4 ± 45.5

N.D.: not detected

単位: PG Unit
平均±標準偏差

表5 初診時の臨床的パラメーターとGCF-PGの相関関係

	相関係数	
C4S-PG* PD	0.163	N.S.
* GI	-0.373	N.S.
* PII	-0.247	N.S.
* Periotron 値	-0.132	N.S.
C6S-PG* PD	0.051	N.S.
* GI	-0.171	N.S.
* PII	0.033	N.S.
* Periotron 値	0.122	N.S.
DS-PG* PD	0.317	P<0.01
* GI	0.133	N.S.
* PII	-0.029	N.S.
* Periotron 値	-0.004	N.S.
Total-PG* PD	0.302	N.S.
* PI	-0.061	N.S.
* PII	-0.085	N.S.
* Periotron 値	-0.068	N.S.

N.S.: not significant

は0.317と小さく、GI、PII、periotron値とは相関関係は認められなかった(表5)。

4. 歯周初期治療前後の臨床的パラメーターの比較

歯周初期治療により各臨床的パラメーターは有意な改善を示した($p < 0.01$)。すなわちPDは治療後、治療前の74%に、PIIは治療後、治療前の7%に、GIは治療後、治療前の22%に、periotron値は治療後、治療前の48%にそれぞれ減少した(表6)。

表 6 歯周初期治療前後の臨床的パラメーターの比較

臨床的 パラメーター	治療前 平均±標準偏差 (n=23)	治療後 平均±標準偏差 (n=23)
Probing Depth	5.4±0.9(mm)	4.0±1.7*(mm)
Plaque Index	1.5±0.5	0.1±0.3*
Gingival Index	1.8±0.3	0.4±0.7*
Periotron 値	85.3±47.6	40.6±37.9*

Wilcoxon Signed-Ranks test

* p<0.01

表 7 歯周初期治療前後の GCF 中の各コンドロイチン硫酸異性体-プロテオグリカン量の比較

CS-PG (n=23)	治療前 平均±標準偏差	治療後 平均±標準偏差
C4S-PG	13.9±5.4	7.7±4.5*
C6S-PG	10.7±7.5	6.6±4.9*
DS-PG	14.4±8.8	6.0±2.9*
Total-PG	38.9±20.4	26.3±8.6*

Wilcoxon Signed-Ranks test

単位: PG Unit

* p<0.01

図 4 各コンドロイチン硫酸異性体プロテオグリカンの歯周初期治療前後の比較

(PG Unit)

図 5 歯周初期治療に伴うコンドロイチン硫酸異性体-プロテオグリカン量の変動

5. 歯周初期治療前後の GCF 中の各 CS-PG の比較

歯周初期治療前後の各 CS-PG の比較を表 7 に、そのヒストグラムを図 4 に示した。C4S-PG は治療後、治療前の 55% に、C6S-PG は治療後、治療前の 62% に、DS-PG は治療後、治療前の 42% に Total-PG は治療後、治療前の 52% にそれぞれ減少した (p<0.01)。

図 5 に初診時に GCF が採取できた 44 例、歯周初期治療後に GCF が採取できた 23 例、計 67 例の各 CS-PG の分布を示した。炎症が改善された歯周初期治療後の各 CS-PG は大部分が 20 PG Unit 以下を示す傾向がみられた。

考 察

歯周炎は慢性的に破壊が進行する炎症性疾患であると考えられてきたが、最近の研究では長い休止期と短い活動期を繰り返しながら部位特異的に進行することが報告されている^{17,27-29)}。したがって、歯周炎の活動期を個々の部位において正確に診断することが歯周治

療上必要であると考えられる。しかし、従来より用いられてきた臨床的パラメーターは歯周炎の発病から現在までの病変の既往を評価する静的指標であり、現在の歯周炎の活動性を知ることは困難である³⁰⁾。

GCF 中にはリンパ球、多形核白血球などの血球成分、プロテアーゼ、コラゲナーゼ、 β -グルクロニダーゼ、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼなどの細菌および組織由来の酵素³¹⁾、プロスタグランジン E2、インターロイキン 1 などの各種メディエーター^{32,33)}、コラーゲン、PG などの組織破壊産物が含まれており、GCF の各成分は歯周炎の活動期を知るためのダイナミックマーカーとなる可能性が示唆されている^{1,2)}。しかし、GCF 中のこれらの構成成分は、試料としての GCF 量が非常に少なく、十分な微量測定法が開発されていないことから、歯周炎の活動性との関連性は明らかにされておらず、現在までいずれも臨床的指標として利用されるにいたっていない。

歯周組織構成成分の破壊産物は、炎症性変化による組織破壊にともない GCF 中に流出したものであり^{1,2)}、他の GCF 成分と比べ GCF 採取時における歯周組織の破壊程度を直接的に知ることができると考えられている。GAG-PG も歯周組織構成成分の一つであり、とくに、硫酸化 GAG は歯肉炎 GCF 中には認められず歯周炎 GCF 中に認められることにより、歯周炎の活動期を判定する有力な材料と考えられる。

以上のように、GCF は歯周炎の活動性の指標としての有用性は高く、現在までいくつかの研究報告¹⁻³⁾がなされているがその量は非常に微量であるため、GCF を研究対象とする際には微量採取、微量測定という難問を克服しなければならない。

GCF の採取方法には歯肉溝洗浄法、濾紙法、マイクロキャピラリーチューブ法があるが、前二者は大量に GCF を採取することが可能であるが、定量的に採取するのは不可能である³⁴⁾。それに比べて、マイクロキャピラリーチューブ法は GCF を定量的に採取でき、しかも部位選択的に採取可能であり、部位特異的に進行する歯周炎の病態分析には現在のところ最も有効な GCF 採取法と思われる。しかし採取に時間を要し、採取量が微量であるため採取後の GCF 成分の定量的分析には難点があった。そのため、従来 GCF 中の GAG-PG の定量的研究^{16,35)}には歯肉溝洗浄法が用いられてきた。近年、モノクローナル抗体の開発に伴い、各分野で ELISA 法^{36,37)}が応用されている。ELISA 法は簡便で微量定量が可能であり、RIA 法のように放射性物

質を必要としないことから臨床レベルでの使用が可能である。CS-PG に対しても数種類のモノクローナル抗体^{18,19)}が開発され、ELISA 法により GCF 中の微量な CS-PG の測定が可能になった。すなわち、定量的に、部位選択的に GCF を採取できるマイクロキャピラリーチューブ法と微量定量が可能な ELISA 法の組み合わせは、GCF から歯周炎の病態を知るのに有効な方法と思われる。

本研究結果において臨床的健常歯肉では認められなかった CS-PG が歯周炎患者の GCF 中に認められ(表 4)、また歯周初期治療にともない GCF 中の CS-PG が減少したことは、CS-PG が歯周炎と密接に関係していることが考えられる。梶川¹⁶⁾はイヌの実験的歯周炎モデルを用い歯肉溝洗浄法により採取した GCF 中の GAG をセルロースアセテート膜二次元電気泳動法により定性、定量を行った結果、健常時では認められなかった CS、DS が歯周炎の惹起とともに GCF 中に出現したと報告しており、また本研究と同じ ELISA 法を用いた研究においても歯周炎の進展にともない GCF 中の CS-PG が質的、量的に変動することが示されており³⁸⁾、ヒトにおいても健常歯肉と歯肉炎の GCF 中には HA のみが検出されたのに対して歯周炎患者の GCF 中には CS、DS が存在し^{37,40)}、未治療の歯周炎患者の GCF 中に認められた DS が歯周初期治療後消失することも報告されている³⁵⁾。以上のように GCF 中の CS と歯周炎の関連性が示唆されており、本研究で認められた GCF 中の CS-PG も歯周炎における炎症性変化の影響を受け GCF 中に流出したものと考えられる。

永橋³⁵⁾は歯周炎患者の歯周初期治療前後の GCF 中の GAG をセルロースアセテート膜二次元電気泳動法により定性、定量を行った結果、DS は初診時の GCF 中に出現するものの歯周初期治療後消失し、CS は歯周初期治療前後のどちらの GCF 中にも認められなかったと報告している。本研究結果では、初診時の歯周炎患者の GCF 中に DS、CS の両 CS-PG を認め、DS は量的に大きな差はないが CS よりも多かった(表 4)。この相違は主として GAG の測定法の違いに基づくものと思われる。すなわち前者の手法は GAG-PG の GAG 鎖のみを分析しているのに対して、本研究で用いた抗体は PG のコアー蛋白の一部と末端 GAG 構成二糖を epitope としているため、炎症により GAG 鎖がいかにか分解されても抗体が認識可能な大きさのコアー蛋白と末端二糖が残っていれば検出可能であると

考えられ、PGの分析部位が異なっているためと思われる。

GCFは末梢血管より滲出する組織液であり、その構成成分には血清由来のものも含まれている³⁾。結合組織の主要な細胞外マトリックスであるPGは血清中にも存在しており、Hata⁴¹⁾らはヒト血清GAGの主要成分はlow sulfatedコンドロイチン硫酸であると示した。また、Niwa⁴²⁾は血清中に二種類のGAGを検出し、一方は蛋白と結合したGAG、すなわちPGの状態が存在するが、他方はfreeのGAGであり、この両GAGを定性した結果、PGの状態が存在するGAGはlow sulfatedコンドロイチン硫酸であり、freeの状態が存在するGAGはCSであると報告している。イヌの実験的歯周炎モデルを用いて血清中とGCF中の構成GAGの比較をした研究では、血清GAGの主要成分はlow sulfatedコンドロイチン硫酸であり、他に極微量のCSを認め、各炎症期のGCF中にはこのlow sulfatedコンドロイチン硫酸は認められなかった¹⁶⁾。これらのことから、血清中のCSはfreeの状態であるため本測定系では検出不可能であること、low sulfatedコンドロイチン硫酸はGCF-GAGに影響を及ぼさないこと¹⁶⁾、また本研究において健常者のGCF中にはPGは認められなかったことなどから、本研究結果で初診時のGCF中に認められたPGは血清由来ではなく歯周炎に伴う組織破壊産物であることが示唆された。

PGは結合組織の重要な非線維性細胞外マトリックスであり、組織中ではコアー蛋白にGAGが共有結合した複合体を形成している。GAGは、その糖残基の種類によりHA、C4S、C6S、DS、HS、KSに分類されている。GAG-PGは歯周組織にも豊富に存在しており、その構成GAGについて生化学的に定性、定量されている。白木¹⁰⁾はイヌの健常歯肉を上皮と上皮下結合組織に分離それぞれの構成GAGを定性、定量した結果、歯肉上皮の主要構成GAGがHAとHSであるのに対して歯肉結合組織の主要構成GAGはDSであることを示した。ヒト歯肉における他の報告においてもその比率に若干の相違はあるが構成GAGに関しては同様な結果が得られており、ヒト歯肉結合組織においても、主要構成GAGはDSであると報告されている^{43,44)}。イヌおよびヒトの歯肉結合組織GAGについて免疫組織化学的に検討した結果、DSは歯肉結合組織に広く存在し、コラーゲン線維に沿って強く染色され^{11,14,15,44,45)}、また、電子顕微鏡的観察ではコラーゲン

線維の周囲に周期的にDSが存在することが証明されている^{47,48)}。DSは歯肉結合組織の主要GAGであり、他の歯周組織においては微量成分^{10,25,43,44)}であること、さらに歯肉結合組織のDSは急性炎症期に減少し、慢性炎症期には健常時に近いレベルになることが生化学的¹³⁾、免疫組織化学的¹⁵⁾手法を用いた実験で示されていることから、本研究において初診時のGCF中に認められたDS-PGは主に歯肉結合組織由来であると考えられる。

一方、C4Sは歯肉組織のGAGの主要成分ではない^{10,43)}が、歯槽骨では主要GAGである^{12,49-54)}。Waddington⁵³⁾は歯槽骨中のGAG-PGを未脱灰のまま抽出したもの、EDTA脱灰後抽出したもの、脱灰後コラゲナーゼ処理を行った後抽出したものの三段階に分け、各段階で抽出されたGAGを比較検討している。その結果、歯槽骨の主要GAGであるC4Sは大部分がEDTA脱灰後の抽出により検出されたことから、C4Sは骨基質に関与するGAGであると述べている。

西野³⁸⁾はイヌの実験的歯周炎モデルにおいて、本研究と同様なELISA法を用い、炎症の進展に伴い経時的にGCF中のGAG-PGの変化を検討した結果、急性期のGCF中にC4S-PGを認めたと報告した。実験的歯周炎の組織学的研究においても急性期に骨吸収が認められること、また結合組織性付着や上皮の破壊と無関係に初期の骨吸収が起こることが示されている⁵⁵⁾。また、Last⁵⁶⁾はインプラント埋入後、経時的にインプラント周囲のGCF中のGAGを検討した結果、骨改造が活発に行われている埋入初期のGCF中にはC4Sの含有率が多く、骨改造が安定化するのに伴い減少し、骨の代謝活動とGCF中のC4Sの関連性を示唆した。これらの報告は、GCF中のC4S-PGは骨吸収と密接に関係していることを示唆するものと思われるが、C4Sは歯肉結合組織中にも含まれているため、本研究で認められたC4S-PGがすべて骨吸収に伴うものとは考えにくく、C4S-PGが歯槽骨吸収のマーカーとなるか否かはさらに詳細な検討が必要と思われる。

C6Sは生体内において加齢と共に増加する傾向を示し、成長と共に起こる骨形成に必要であることが知られている⁹⁾。しかし、歯周組織のC6Sの定量についての報告は少なく、若干の免疫組織化学的研究がなされているのみである^{15,46)}。すなわち、イヌ歯周組織においてC6Sは口腔上皮と上皮下結合組織の境界部、血管歯周および線維性付着部周囲に存在することが示さ

れている。村橋¹⁵⁾はイヌの実験的歯周炎モデルにおいて、本研究と同じ抗体を用いて検討した。その結果、骨吸収が活発に起こっている結紮3日目、7日目では、歯槽骨頂部から歯肉側の骨表面にかけて広範囲に多数の破骨細胞が出現し、C4S、C6S、DSが吸収窩の破骨細胞周囲および骨吸収後の疎な結合組織周囲に認められ、特にC6SがDSやC4Sより強い染色性を示したが、慢性期になると破骨細胞の数は減少し、急性期に認められたC6S、C4S、DSの染色性も見られなくなったと報告している。以上の歯槽骨吸収に伴うC6Sの変化はGCFに影響することが考えられ、事実、急性期のGCF中にC6Sが存在するが、慢性期のGCF中には認められないことが示されている³⁸⁾。

急性炎症期や慢性炎症期における歯周組織中でのCS-PGの質的、量的変化はGCFに反映されることが考えられるが、本研究結果においてGCF中の各CS-PGの構成に特徴的な所見は認められなかった。これは本研究で対象とした歯周炎患者の炎症状態がさまざままで規制を加えていないためと思われる。歯周初期治療の結果、臨床パラメーターであるGI、PII、Periotron値は大幅に減少し、PDも1.4 mmの減少がみられた(表6)。しかし、DS-PGとPDの関係を除けば、各臨床パラメーターとGCF中の各CS-PGとの間に相関関係は認められなかった。このことは、本研究で示唆したように、GCF中のCS-PGは歯周組織中でのCS-PGの炎症性変化を反映する動的指標であるのに対して、臨床パラメーターは前述したように静的指標であるため、両者の間に相関関係が認められないのは当然の結果ではないかと考えられる。また、DS-PGとPDとの間にもみ相関関係が認められたが、これまでの歯周組織中やGCF中におけるCS-PGの報告から考え合わせると、DS-PGは歯肉結合組織の主要GAGであり、PDが深くなるにつれて歯肉溝上皮の面積が増加するためGCFが組織内でのDS-PGの代謝の影響を受けやすくなるためと考えられる。

興味深いのは歯周初期治療後、C4S-PGならびにC6S-PGは1例を除いて、DS-PGは全例が20 PG Unit以下の値を示したことである。歯周初期治療の主たる目的は炎症性因子を可及的に除去することであり、主な内容はブラークコントロールとスケーリング、ルートプレーニングである。歯周初期治療後も炎症は軽減されるが残存し、ポケットも存続する(表6)。健康時には検知できないCS-PGが歯周初期治療後にも大部分20 PG Unit以下ではあるが存在することは(図

5)、この値が静止期の歯周炎を示す一つの境界値と考えることができるものと思われる。治療前、すなわち初診時のそれぞれのCS-PG値も70~80%が20 PG Unit以下であり(図5)、これらも静止期の歯周炎と考えられる。20 PG Unitという数値に関してはさらに検討が必要でと思われるが、本研究においてGCF中のCS-PGは歯周炎の破壊活性を表す指標となりうるものと思われる。特に、C4S-PGは歯槽骨の主要PGであり、C6S-PGは前述したように歯槽骨吸収と深く関係していることが考えられることから、この両CS-PGは深部歯周組織破壊のマーカーとなりうる可能性が示唆された。しかしGCFに含まれるCS-PGは修復と破壊の両方の影響を受けるものであり、組織破壊が先行する急性期のGCF中のCS-PGを解明し、歯槽骨を含む深部歯周組織破壊との関連性を検討することが重要課題であると考えられる。

結 論

成人型歯周炎患者の歯肉溝滲出液中のコンドロイチン硫酸異性体ープロテオグリカン(Chondroitin Sulfate Proteoglycan)を酵素免疫測定法を用いて歯周初期治療前後の変化を比較検討した結果、以下の結論を得た。

1. ELISA法を用いることにより歯周炎患者の歯肉溝滲出液中にコンドロイチン硫酸異性体ープロテオグリカン(C4S-PG、C6S-PG、DS-PG)の検出が可能であったが、健常者からは検出できなかった。
2. 歯周炎患者の初診時の歯肉溝滲出液C4S、C6S-PGは臨床パラメーター(Probing Depth, Plaque Index, Gingival Index, periotron値)と相関関係は認められなかったが、DS-PGはPrbing Depthと相関関係が認められた。
3. 歯周初期治療後、歯肉溝滲出液の各コンドロイチン硫酸異性体ープロテオグリカンは治療前に比して有意に減少した。

以上の結果、歯肉溝滲出液のコンドロイチン硫酸異性体ープロテオグリカンは歯周炎による組織破壊の指標となる可能性を示唆した。

謝 辞

稿を終えるにあたり、御指導と御校閲を賜った歯周病学講座岩山幸雄教授に深く感謝申し上げます。合わせて御懇篤な御校閲をいただいた本学口腔生化学教室横田豊教授ならびに口腔病理学教室竹内宏教授に謹んで感謝の意を表し

ます。さらに実験に際し常に甚大なる御助力をいただいた本学歯周病学教室白木雅文助教授、澁谷俊昭助手ならびに村橋慶宣助手を初めとする教室員の皆様に御礼申し上げます。

尚、本研究は一部、平成3年度文部省科学研究費奨励研究A(課題番号03857261)および朝日大学宮田研究奨励金の補助により行われたことを付記する。

文 献

- 1) Fine, D.H. and Mandel, I.D. : Indicators of periodontal disease activity. An evaluation. *J. Clin. Periodontol.*, 13 : 533-546, 1986.
- 2) Curtis, M.A., Gillett, I.R., Griffiths, G.S., Maiden, M.F.J., Sterne, J.A.C., Wilson, D.T., Wilton, J.M.A. and Johnson, N.W. : Detection of high-risk groups and individuals for periodontal diseases. Laboratory markers from analysis of gingival crevicular fluid. *J. Clin. Periodontol.*, 16 : 1-11, 1989.
- 3) 恵比須繁之, 松尾敬志 : 歯周病の診査, 診断, 青野正男監修, 歯周治療の科学, 医歯薬出版, 東京, 1991, 196-201.
- 4) 木全弘治 : プロテオグリカンの構造と機能, 藤本大三郎編, 細胞外マトリックスのバイオサイエンスとバイオテクノロジー, アイピーシー, 東京, 1990, 89-107.
- 5) 白木雅文, 岩山幸雄 : 歯周組織の病理, 青野正男監修, 歯周治療の科学, 医歯薬出版, 東京, 1991, 110-114.
- 6) 村田克己 : 細胞間マトリックスの炎症と修復・感染・炎症・免疫, 20 : 13-23, 1990.
- 7) 瀬野信子 : プロテオグリカンの構造と機能. 代謝, 18 : 603-627, 1981.
- 8) 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.
- 9) 田中龍男 : 妊娠ラットの歯肉組織におけるグリコサミノグリカン代謝について. *日歯周誌*, 28 : 516-530, 1986.
- 10) 白木雅文 : 健康イヌ歯周組織における上皮ならびに上皮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) 村橋慶宣, 澁谷俊昭, 岩田 真, 白木雅文, 岩山幸雄 : 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. *日歯周誌*, 29 : 797-803, 1986.
- 12) Bartold, P.M. : Proteoglycan of the periodontium : Structure, role and function. *J. Periodont. Res.*, 22 : 431-444, 1987.
- 13) 岩田 真 : イヌの実験的歯周炎における歯肉上皮ならびに上皮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.
- 14) 村橋慶宣, 澁谷俊昭, 西野恒理, 白木雅文, 岩山幸雄 : ラット脱灰歯周組織におけるコンドロイチン硫酸プロテオグリカンの免疫組織化学的検討. *日歯周誌*, 32 : 189-198, 1990.
- 15) 村橋慶宣 : 実験的歯周炎組織におけるコンドロイチン硫酸プロテオグリカンの免疫組織化学的局在性. *日歯周誌*, 33 : 35-55, 1991.
- 16) 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.
- 17) Haffajee, A.D., Socransky, S.S. and Goodson, I. M. : Comparison of different data analyses for detecting changes in attachment level. *J. Clin. Periodont.*, 10 : 298-310, 1983.
- 18) Couchman, J.R., Caterson, B., Christner, J.E. and Baker, J.R. : Mapping by monoclonal antibody detection of glycosaminoglycan in connective tissue. *Nature*, 307 : 650-652, 1984.
- 19) Caterson, B., Christner, J.E., Baker, J.R., and Couchman, J.R. : Production and characterization of monoclonal antibodies directed against connective tissue proteoglycans. *Fed. Proc.*, 44 : 386-393, 1985.
- 20) Voller, A., Bartlett, A. and Bidwell, D.E. : Enzyme immunoassay with special reference to ELISA techniques. *J. Clin. Pathol.*, 31 : 507-520, 1978.
- 21) Voller, A., Bidwell, D. and Barthlett, A. : Microplate enzyme immunoassay for the immunodiagnosis of virus infection, Rose, N.R. and Fiedman, H., *Manual of Clinical Immunology*, American society for Microbiology, Washington, D.C., 1976, 506-512.
- 22) Rennerd, S.I., Martin, G.R., Foidart, J.M. and Robey, P.G. : Enzyme-linked immunoassay (ELISA) for connective tissue component. *Anal. Biochem.*, 104 : 205-214, 1980.
- 23) Gomenz-Lechon, M.J. and Castell, J.V. : Enzyme-linked immunosorbent assay to quantify fibronectin. *Anal. Biochem.*, 145 : 1-8, 1985.
- 24) Silness, J. and Loe, H. : Periodontal disease in pregnancy. II : Correlation between oral hygiene and periodontal condition. *Acta Odont. Scand.*, 22 : 121-135, 1964.
- 25) Loe, H. and Silness, J. : Periodontal disease in pregnancy. I : Prevalence severity. *Acta Odont. Scand.*, 21 : 533-551, 1963.
- 26) 柏木 力 : 医学統計解析, 初版, 朝倉書店, 東京, 1987, 177-184.
- 27) Haffajee, A.D., Socransky, S.S. and Goodson, J. M. : Periodontal disease activity. *J. Periodont. Res.*, 17 : 521-522, 1982.
- 28) Goodson, G.M., Tanner, A.C.R., Haffajee, A.D., Sornberger, G.C. and Socransky, S.S. : Patterns of progression and regression of advanced destructive periodontal disease. *J. Clin. Periodontol.*, 9 : 472-481, 1982.

- 29) Socransky, S.S., Haffajee, A.D., Goodson, J.M. and Lindhe, J.: New concepts of destructive periodontal disease. *J. Clin. Periodontol.*, 11: 21-32, 1984.
- 30) Haffajee, A.D., Socransky, S.S. and Goodson, J.M.: Clinical parameter as predictors of destructive periodontal disease activity. *J. Clin. Periodontol.*, 10: 257-265, 1983.
- 31) 山本健二: 炎症とプロテアーゼ, 青野正男監修, 歯周治療の科学, 医歯薬出版, 東京, 1991, 99-104.
- 32) 木下正彦: 炎症と歯肉結合組織代謝, 青野正男監修, 歯周治療の科学, 医歯薬出版, 東京, 1991, 115-121.
- 33) 米田俊之: 炎症と骨吸収, 青野正男監修, 歯周治療の科学, 医歯薬出版, 東京, 1991, 159-166.
- 34) 鴨井久一, 吉永英司, 浜野泰子: 歯肉溝滲出液の測定法. *クインテッセンス*, 1: 90-99, 1982.
- 35) 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.
- 36) 石川栄治, 河合 忠, 宮井 潔: 酵素免疫測定法, 医学書院, 東京, 1987, 1-404.
- 37) 岩田和志: 抗マトリックス関連抗体の応用, 藤本大三郎編, 細胞外マトリックスのバイオサイエンスとバイオテクノロジー, アイピーシー, 東京, 1990, 424-438.
- 38) 西野恒理, 澁谷俊昭, 村橋慶宣, 白木雅文, 岩山幸雄: 酵素免疫測定法による歯肉溝滲出液中のプロテオグリカンの測定. *日歯周誌*, 32: 615-622, 1990.
- 39) Embery, G., Oliver, W.N., Stanbury, J.B., and Purvis, J.A.: The electrophoretic detection of acidic glycosaminoglycans in human gingival sulcus fluid. *Arch. Oral. Biol.*, 27: 177-179, 1982.
- 40) Last, K.S., Stanbury, J.B. and Embery, G.: Glycosaminoglycans in human gingival crevicular fluid as indicators of active periodontal disease. *Arch. Oral. Biol.*, 30: 275-281, 1985.
- 41) Hata, R., Ohkawa, S. and Nagai, Y.: Low-sulfated chondroitin sulfate in human blood and urine. *Biochim. Biophys. Acta*, 543: 156-166, 1978.
- 42) Niwa, M., Sobue, M., Toida, M., Akao, S., Tsukidate, K., Nakashima, N. and Takeuchi, J.: Nature of serum (or plasma) proteoglycans. *Ketugou-Soshiki*, 16: 238-239, 1985.
- 43) Bartold, P.M., Wiebkin, O.E. and Thonard, J.C.: Glycosaminoglycans of human gingival epithelium and connective tissue. *Connect. Tiss. Res.*, 9: 99-106, 1981.
- 44) Bartold, P.M., Wiebkin, O.E. and Thonard, J.C.: Proteoglycans of human gingival epithelium and connective tissue. *Biochem. J.*, 211: 119-127, 1983.
- 45) Shibutani, T., Murahashi, Y. and Iwayama, Y.: Immunohistochemical localization of chondroitin sulfate proteoglycan in human gingival connective tissue. *J. Periodont Res.*, 24: 310-313, 1989.
- 46) 林 崇範, 村橋慶宣, 澁谷俊昭, 白木雅文, 岩山幸雄: ヒト炎症歯肉組織におけるコンドロイチン硫酸プロテオグリカンの免疫組織化学的局在性, *日歯周誌*, 33: 364-370, 1991.
- 47) Scott, J.E.: Collagen-Proteoglycan interaction. Localization of proteoglycans in tendon by electron microscopy. *Biochem. J.*, 187: 887-891, 1980.
- 48) Scott, J.E. and Haigh M.: Identification of specific binding sites for keratan sulphate proteoglycans and chondroitin-dermatan sulphate proteoglycans on collagen fibrils in cornea by the use of cupromeronic blue in 'critical-electrolyteconcentration techniques. *Biochem. J.*, 253: 607-610, 1988.
- 49) Hering, G.M.: Studies on the proteinbound chondroitin sulphate of bovine cortical bone. *Biochem. J.*, 107: 41-49, 1968.
- 50) Prince, C.W., Rahemtulla, F. and Butler, W.T.: Metabolism of rat bone proteoglycan *in vivo*. *Biochem. J.*, 216: 589-596, 1983.
- 51) Franzen, A. and Heigard, D.: Characterization of proteoglycans from the calcified matrix of bovine bone. *Biochem. J.*, 224: 59-66, 1984.
- 52) Sato, S., Rahemtulla, F., Prince, C.W., Tomana, S. and Butler, W.T.: Proteoglycans of adult bovine compact bone. *Connect Tissue Res.*, 14: 65-75, 1985.
- 53) 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.
- 54) Bartold, P.M.: A biochemical and immunohistochemical study of the proteoglycans of alveolar bone. *J. Dent. Res.*, 67: 7-19, 1990.
- 55) Schroder, H.E. and Lindhe, J.: Conditions and pathological features of rapidly destructive, experimental periodontitis in dog. *J. Periodontol.*, 51: 6-19, 1980.
- 56) Last, K.S., Cawood, J.I., Howell, R.A. and Embery, G.: Monitoring of Tübingen endosseous dental implants by glycosaminoglycans analysis of gingival crevicular fluid. *Int. Oral Maxillofac. Implants*, 6: 42-49, 1991.

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 1851-1