イヌ健常歯肉における歯肉溝滲出液中のコンドロイチン 硫酸プロテオグリカンの由来

柴田麻紀 村橋慶宣 塚田英治
堀木 到 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6年3月18日受付)

The Origin of Chondroitin Sulfate Proteoglycans in Gingival Crevicular Fluid of Dogs with Healthy Gingiva

Maki SHIBATA, Yoshinobu MURAHASHI, Eiji TSUKADA,
Itaru HORIKI 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)

The purpose of this study was to investigate the origin of chondroitin sulfate proteoglycans (chondroitin 4 sulfate proteoglycan, C4 S-PG, chondroitin 6 sulfate proteoglycan, C6 S-PG) in the gingival crevicular fluid (GCF) of dogs with healthy periodontal tissues.

Chondroitin sulfate proteoglycans obtained from gingiva, serum and GCF were separated by SDS-PAGE, blotted onto nitrocellulose membranes by Western blotting technique, and immunostained with specific antibodies (3-B-3, 2-B-6) against chondroitin sulfate proteoglycan isomers.

The major bands of C4 S-PG in GCF samples yielded an electrophoretic profile similar to that of serum. However, the GCF samples showed a few minor migrating bands which were not detectable on serum samples, coincident in electrophoretic mobility to those of gingival samples.

The distribution profile of C6 S-PG on electrophoresis was similar to that of C4 S-PG in all samples.

These observations show that chondroitin sulfate proteoglycans detected in GCF samples could be derived partly from gingiva as well as serum.

Key words: Proteoglycan, Gingival crevicular fluid, Western blotting

要旨: 本研究はイヌの歯肉溝滲出液 (GCF) 中のコンドロイチン硫酸プロテオグリカン (コンドロイチン 4 硫酸プロテオグリカン C4 S-PG, コンドロイチン 6 硫酸プロテオグリカン C6 S-PG) の由来を検討する目的で行った。

健常歯周組織を確立したイヌの歯肉, GCF, 血清を採取後, コンドロイチン硫酸プロテオグリカン (CS-PG) サンプルを作製した。サンプルは SDS ポリアクリルアミド電気泳動 (SDS-PAGE) を行いニトロセルロース膜に Western blotting した。転写後の膜は CS-PG 異性体に対するモノクローナル抗体 (3-B-3, 2-B-6) を用い C4 S-PG と C6 S-PG の免疫染色を行った。GCF の C4 S-PG の主要バンドは泳動パターンは血清のものと類似

していた。しかし、血清には検出されないが、歯肉と合致した位置に数本のバンドを認めた。C6S-PGの泳動パターンはC4S-PGと類似していた。以上の結果、GCFのC4S-PG、C6S-PGの一部は血清と同様、歯肉由来であることが示された。

索引用語: プロテオグリカン、歯肉溝滲出液、ウェスタンブロットング

緒 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、組織中では蛋白との複合体であるプロテオグリカン (PG) として存在し、結合組織の恒常性維持や、細胞活動の支配などの重要な役割を果たしている¹⁻⁴⁾。

グリコサミノグリカンプロテオグリカン (GAG-PG) の1つであるコンドロイチン硫酸プロテオグリカン (CS-PG) には構成部分としてN-アセチルガラクトサミン-4硫酸を持つコンドロイチン4硫酸 (C4S-PG) とN-アセチルガラクトサミン-6硫酸を持つコンドロイチン6硫酸 (C6S-PG) の異性体が存在する⁵⁾。

歯肉においても生化学的、免疫組織化学的手法を用いてCS-PGが存在する事が報告されている。一般的に、生化学的手法に基づいた研究ではC4S-PGのみが検出されているが、免疫組織化学的手法を用いた最近の研究においてはC4S-PGとC6S-PGの両者が歯肉に存在するとされている。

Shibutani ら⁶⁾はイヌの実験的歯周炎において歯肉溝滲出液 (GCF) 中のC4S-PGおよびC6S-PGをELISA法を用いて検索し、急性炎症初期の結紮3日目にC4S-PGが、急性炎症の著明な結紮7日目にC6S-PGがピークに示すことから、これらのCS-PGが炎症による組織破壊の活性を示すマーカーと成りうる可能性を示唆した。また、GCFのC4S-PGとC6S-PGの比は血清のものよりは歯肉のCS-PGに近いと報告している。

本研究はGCF中に歯肉代謝産物に由来するC4S-PG、C6S-PGが存在するかどうかを検索するために血清、歯肉、GCF中のCS-PGを分子量レベルで比較検討した。

材料と方法

1. 材料と方法

実験動物には雑種成犬3頭を用い1カ月間、週2回

のスクレーリングとブラッシングを行い健常歯肉を確立後、GCF、歯肉、及び血清を採取した。GCFは下顎左右第3、第4小臼歯及び第1大臼歯部を採取部位とした。歯肉縁上プラークを可及的に除去し水洗乾燥後、Micro Capillary Tube (MICROCAPS® Drummond USA) を出血させないように歯肉溝内に挿入して1μl採取後、ただちに0.15 M pH 7.2 phosphate buffer saline (PBS) で50倍希釈し、これをGCFサンプルとした。歯肉はGCF採取と同部位から全身麻酔下で採取した。歯肉はホモジナイズし、メタノールクロロホルムで30分間脱脂後、10,000 G 15分間遠心を行った。引き続き湿重量の50倍量の4 M 塩酸グアニジン含有50 mM トリス-塩酸緩衝液 (pH 7.0) で24時間インキュベートして、再度10,000 G 15分間遠心後、上清のみを採取した。上清は限外濾過を行って約5倍量に濃縮後、24時間透析して歯肉サンプルとした。またイヌの上腕静脈より採血後、血清を分離しPBSで50倍希釈して血清サンプルとした。なお全ての操作は4°Cの条件下で行い、各サンプルは-80°Cで保存した。なお試料調整はprotease inhibitor (pepstatin phenylmethylsulfonyl fluoride N-Ethylmaleimide, EDTA) の存在下で行った⁷⁾。

2. SDS-ポリアクリルアミド電気泳動 (SDS-PAGE)

泳動は、FUNA®電気泳動槽 MODEL-88 (FUNAKOSHI) を使用してLaemmliのバッファ-システムに準じて行った。各サンプルと分子量マーカー (Vector Laboratories USA) はサンプルバッファで希釈調整後、95°C、5分間加温してタンパクを変性させた⁸⁾。ゲルは4-20% SDS-PAGE mini gradient gel (TEFCO 社) を用い、室温下で20 mA、約1.5時間の通電でbromophenol blueがゲルの底部に到達するまで行った。

3. イムノブロットと膜染色

ゲルから、ニトロセルロース膜 (Trans Blot® Transfer Medium, Bio-Rad 社) への転写はFUNA® BLOTTING SET (FUNAKOSHI) を用い、祖父江^{7,9)}らの方法に準じて4°C 45 mA、20時間の条件下で行った。転写後の膜はそれぞれ免疫染色した。本実

図1 血清・歯肉・GCFのC4S-PGに対するウエスタンブロッティング

図2 血清・歯肉・GCFのC6S-PGに対するウエスタンブロッティング

験に用いたモノクローナル抗体は、3-B-3、2-B-6抗体(生化学工業社 東京)である。これら抗体はCS-PGの糖鎖を酵素により分解したときに生ずるコア一蛋白断端の不飽和2糖をエピトープとして認識するとされている。まずChondroitinase AC IIで消化後2-B-6抗体を反応させる事でC4S-PGを、Chondroitinase ABCで消化後3-B-3抗体を反応させる事でC6S-PGを検出した。すなわち転写後の膜は、Chondroitinase ABC, Protease freeまたはProtease inhibitorを加えたChondroitinase AC IIで室温3時間反応後、Tween-20を含むPBS (PBS-T)で洗浄し、1%ウシ血清アルブミン (BSA) 含有PBSで37°C 2時間ブロッティングした。引き続き50倍希釈した1次抗体を4°C 24時間反応させ、PBS-Tで洗浄、ビオチン-ストレプトアビジンシステム(ニチレイ)によりラベリングした。すなわち、ビオチン標識ウサギ抗マウスIgG+IgA+IgMを反応させPBS-Tで洗浄後、続いてペルオキシターゼ標識ストレプトアビジンを反応させ、3,3 diamino-benzidine 4 HCL (DAB)を用い発色させた。その後、膜は流水下で洗浄後乾燥し、各サンプルのバンドを比較検討した。

結 果

本実験に用いた実験動物は3頭であるが実験結果に個体差は認めなかった。

血清のC4S-PGは33 kDaと55 kDa, 94.5 kDaにバンドが認められ、最も明瞭なバンドは55 kDaであった。歯肉のC4S-PGは、55 kDa, 45 kDa, 44 kDaと20 kDa付近に3本のバンドを認めた(図1)。歯肉に認められた55 kDaのバンドは血清のそれに一致したが、55 kDa以外の血清と歯肉のバンドは分子量が一致しなかった。また血清に存在した94.5 kDaのバンドは歯肉に検知されなかった。

一方、GCFのC4S-PGは55 kDa, 33-55 kDaの範囲に5-6本と20 kDaにバンドを認めた。最も明瞭なバンドは55 kDaであった(図1)。55 kDaのバンドは血清、歯肉、GCFに共通していた。GCFの33-55 kDa間のバンドの一部と20 kDaのバンドは血清には存在しないが、歯肉には同じ分子量のバンドが存在した。

C6S-PGの血清、歯肉、GCF、の泳動パターンはC4S-PGのそれと類似していた(図2)。

考 察

歯肉溝滲出液は歯肉溝上皮や接合上皮を通じて組織から歯肉溝に滲出するが、炎症時に増量することから炎症の一指標として臨床で用いられている。滲出液には組織液、血清成分、細菌由来成分、組織代謝成分が含まれておりその比率は 1) 歯肉縁下細菌の量と構成比 2) 歯肉結合組織の代謝回転比 3) 上皮、基底膜、結合組織の透過性 4) 歯周組織の炎症の程度によって変化する¹⁰⁾。

結合組織の成分である GAG-PG が滲出液に含まれることを最初に報告したのは Embry ら^{11,12)}である。彼等は人の健康な歯肉溝滲出液にはヒアルロン酸が含まれ、炎症時にはこれが増量するとともに硫酸化 GAG であるデルマタン硫酸、コンドロイチン硫酸を検知した。

その後、梶川¹³⁾はイヌの実験的歯肉炎をモデルにして健常時にはヒアルロン酸と微量のヘパラン硫酸が、また急性炎症時には健常時には検知できなかった CS が認められたことを報告した。さらに、ヒトの実験的歯肉炎ではヒアルロン酸は増量するが CS は存在しないこと¹⁴⁾、歯周外科処置後やクロールヘキシジン洗浄後の滲出液では、処置前にあった硫酸化 GAG が消失した¹²⁾等の報告は、歯肉溝滲出液に存在する CS を中心とする硫酸化 GAG は歯周炎時の滲出液に特有のものといえる。すなわち、ヒアルロン酸は深部組織に破壊のない歯肉炎時に増量し、硫酸化 GAG は歯周炎の際に認められることから、CS は深部歯周組織の代謝、破壊産物と考えられる。

一方、深部歯周組織、とりわけ歯槽骨 GAG の大部分は CS であり、その分子種は C4S である¹⁵⁾。実際、骨代謝の著しい時期の歯肉溝滲出液には、有意に C4S が増量する^{16,17)}。

現在までに行われた研究の結果は、C4S が歯槽骨破壊の有力なマーカーとなる可能性を示しているといえる。しかしいずれの報告も直接証明ではなく、状況証拠の域を出ていない。とくに問題となる点は歯肉溝滲出液成分に多大の影響を与える歯肉に、C4S-PG が証明されていることであろう^{18,19)}。

本研究の結果は歯肉溝滲出液には歯周組織に由来するものも存在することを分子量レベルで証明した。

すなわち、GCF の泳動膜にみられる C4S-PG は、55 kDa に明瞭なバンド、33-55 kDa に 5-6 本の

細いバンド、さらに 20 kDa 付近に明瞭な細いバンドが分布していた。そのうちの 33-55 kDa の間に検出されたバンドと 20 kDa 付近のバンドは、血清には存在しないものである。歯肉の CS-PG の分子量は 21-25 kDa という報告⁵⁾から考えると、本研究の 20 kDa 付近に検出された C4S-PG がほぼそれに一致する。33-55 kDa の間に見られる数本のバンドについては、歯肉のそれと同一のものでない。従ってそのうちの一部のバンドは歯肉由来であるが、他のバンドは血清以外のもの、すなわち他の歯周組織に由来すると考えるのが妥当であろう。

本田らはイヌの歯槽骨から CsCl 沈降平衡遠心後高速液体クロマトグラフィ法を用いて PG を抽出し、SDS-PAGE により PG の分子量を検討した結果、70 kDa と 76 kDa にそれぞれ明瞭なバンドを認めた¹⁵⁾。本研究の GCF にはそれに類似したバンドの検出は不可能であった。しかし、歯槽骨破壊の活発な時期でない健康な歯周組織の GCF であるため、当然のことと思われる。なお、今回のイヌ血清の CS-PG の泳動パターンはおおむねヒト血清のものに近似していた^{20,21)}。C6S-PG の泳動像は C4S-PG と近似していた。歯肉に C6S の検出が不可能であることが報告されているが^{22,23)}、近年免疫組織化学的手法によってその存在が証明された^{18,19)}。しかし、組織内分布、染色性は C4S に比較して劣り、少量であることを伺わせる。本研究においても C6S-PG は C4S-PG に比較して染色度が低い傾向にあった。最近 HPLC の手法を用いた分析で C4S と C6S はほぼ同量サルの歯肉に存在することが報告されたが²⁴⁾、動物種、手法の違いによるものと思われる。

一方、歯肉縁下歯石は成長過程で GCF の影響を強く受けるものと考えられる。したがって縁下歯石の GAG 成分は GCF-GAG を考察する有力な資料になりうるものと思われる。ヒトの歯肉縁下歯石からはヒアルロン酸、CS、デルマタン硫酸が同定されたが、HPLC による CS 分析では、その殆どは C4S で、C6S は痕跡のレベルであった²⁵⁾。歯肉縁下歯石は成長過程で主として GCF の有機成分を取込むものと思われるが、なぜ C6S が検出されないかは不明である。しかし、ELISA 法による GCF の CS-PG の測定では C4S に比してやや低いレベル程度の C6S-PG の存在が報告されていることを考慮に入れると、免疫学的手法と生化学的手法の差に基づくものと思われる。

本研究はGCFにC4S-PG, C6S-PGが存在することを分子量レベルで明らかにし, それと類似するものが血清と歯肉に存在することから, GCFのCS-PGの由来は血清のみならず歯肉も含まれることを示唆した。同一個体のGCF, 歯肉, 血清を同一方法で検討した本研究の結果は, 比較する際の条件を満たしたものである。対象動物, 手法の違いが比較を困難にすることが多く, 今後は同一動物による手法の違いの差を検討すること, さらにGCF中のCS-PGの主供給源とされている歯槽骨を本研究と同様の方法で検討する必要がある。

結 論

歯肉溝滲出液中のCS-PG (C4S-PG, C6S-PG)の主要バンドのプロフィールは血清のそれと類似していたが, 血清には認められないが歯肉には認められるバンドが存在した。

このことは, GCFのCS-PGの由来組織として, 歯肉も含まれることを示したものである。

尚, 本研究は平成5年度文部省科学研究費 (一般C萌, 課題番号04807137) の補助により行われたことを付記して感謝する。

文 献

- 1) 梶川欽一郎: 結合組織, 第一版, 金原出版. 東京, 1984, 327.
- 2) Mayar, 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. Rev.*, 58: 225-317, 1978.
- 4) Modis, L.: The molecular structure of the inter-fibellar matrix in connective tissue. *Acta Biol. Acad. Sci. Hung.*, 29: 197-226, 1978.
- 5) Bartold, P.M.: Proteoglycans of the periodontium: Structure, role and function. *J. Periodont. Res.*, 22: 431-444, 1987.
- 6) Shibutani, T., Nishino, W., Shiraki, M. and Iwayama, Y.: ELISA detection of glycosaminoglycan (GAG) - linked proteoglycans in gingival crevicular fluid. *J. Periodont. Res.*, 28: 17-20, 1993.
- 7) Sobue, M., Takeuchi, J., Yoshida, K., Akao, S., Fukatsu, T., Nagasaka, T. and Nakashima, N.: Isolation and Characterization of Proteoglycans from Human Nonepithelial Tumors. *Can. Res.*, 47: 160-168, 1987.
- 8) Laemmli, U.K.: Cleavage of Structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.*, 227: 680-685, 1970.
- 9) Sobue, M., Nakashima, N., Fukatsu, T., Nagasaka, T., Fukata, S., Oiwa, N., Nara, Y., Ogura, T., Katoh, T. and Takeuchi, J.: Production and immunohistochemical characterization of monoclonal antibody raised to proteoglycan purified from a human yolk sac tumor. *Histochem. J.*, 21: 455-459, 1988.
- 10) Curtis, M.A., Gillet, I.R., Griffiths, G.S., Maiden, M.F.J., Sterne, J.A.C., Wilson, D.T., Witon, J.M.A. and Jonson, 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.
- 11) Embery, G., Oliver, W.M., Stanbury, J.B. and Purvis, J.A.: The electrophoretic detection of acidic glycosaminoglycans in human gingival sulcus fluid. *Archs Oral Biol.*, 27: 177-179, 1982.
- 12) 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.
- 13) 梶川 潔: イヌの実験的歯周炎における歯肉溝滲出液グリコサミノグリカンについて. *日歯周誌.*, 28: 500-515, 1986.
- 14) 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.
- 15) 本田準虎, 吉村昌敏, 森本淳史, 小出修身, 白木雅文, 岩山幸雄: イヌ歯槽骨のプロテオグリカン. *日歯周誌.*, 33: 897-906, 1987.
- 16) Last, K.S., Donkin, C. and Embery, G.: Glycosaminoglycans in human gingival crevicular fluid during orthodontic movement. *Archs Oral Biol.*, 33: 907-912, 1988.
- 17) 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 J Oral Maxillofac Implants.*, 6: 42-49, 1991.
- 18) Sibutani, T., Murahashi, Y. and Iwayama, Y.: Immunohistochemical localization of chondroitin sulfate and dermatan sulfate proteoglycan in human gingival connective tissue. *J. Periodont. Res.*, 24: 310-313, 1989.
- 19) 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.

- 20) Savolainen, H. : A sensitive method for the analysis of urinary proteoglycans. *Biochem. Int.*, 28 : 475-479, 1992.
- 21) Imanari, T., Shinbo, A., Ochiai, H., Ikei, T., Koshiishi, I. and Toyoda, H. : Study on proteoglycans having low-sulfated chondroitin 4-sulfate in human urine and serum. *J. pharmacobio-Dyn.*, 15 : 231-237, 1992.
- 22) Hiramatsu, M., Abe, I. and Minami, N. : Acid mucopolysaccharides in porcine gingiva. *J. Periodont. Res.*, 13 : 224-231, 1978.
- 23) Sakamoto, N., Okamoto, H. Okuda, K. : Qualitative and quantitative analyses of bovine gingival glycosaminoglycans. *Archs Oral Biol.*, 23 : 983-987, 1978.
- 24) Okazaki, J., Kamada, A., Gonra, Y. and Skaki, T. : Analysis of chondroitin sulfate isomers in the periodontium of the monkey using high-performance liquid chromatography. *J. Periodont. Res.*, 27 : 484-488, 1992.
- 25) 本田準虎：ヒト歯肉縁上並びに縁下歯石のグリコサミノグリカンの分離とその特性. *日歯周誌.*, 34 : 620-632, 1992.

連絡先：

朝日大学歯周病学講座

〒 501-02 岐阜県本巣群穂積町穂積 1851