生物学的試料におけるグリコサミノグリカン (GAG) 量の異なった定量法による比較分析

孔 祥忠 川畑仁克 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)

(平成9年11月10日受付)

Comparative Analysis for Glycosaminoglycan (GAG) Level in Biological Samples by Three Different Assay Methods

Yoshitada Kou, Yoshikatsu Kawabata, Masafumi Shiraki and Yukio Iwayama

Department of Periodontology, Asahi University School of Dentistry

1851 Hozumi-cho, Motosu-gun, Gifu 501-0296, Japan

(Chief : Prof. Yukio Iwayama)

Glycosaminoglycans (GAG) have been found in higher level in the gingival crevicular fluid associated with increased metabolic activity, such as periodontal inflammation or alveolar bone remodeling, and have also been proposed as a maker of periodontal disease activity.

There appears, however, to be some confusion about the different levels of GAG depending on the assay method used.

To compare three assay methods for GAG and glycosaminoglycan-linked proteoglycans (GAG-PG) in biological samples, we analyzed three samples: from gingival homogenate supernatant, synovial fluid, and carrageenin-induced exudate.

The isolated GAG were separated by electrophoresis on a cellulose acetate membrane and stained with Alcian blue. Substrate-dye complex was evaluated in a scanning densitometer. Unsaturated disaccharide isomers of chondroitin sulfate, obtained following chondroitinase digestion from isolated GAG, were analyzed by high-performance

liquid chromatography. For comparison, a small amount of GAG-PG was assayed using the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) method, with a combination of monoclonal antibodies and specific enzyme digestion.

Results were that the level of GAG obtained by the electrophoretic method was similar to that obtained by high-performance liquid chromatographic assay, while the GAG-PG level obtained using the ELISA method was 3-80 times higher than that by the other two methods. Dermatan sulfate was not detected by biochemical analysis in the samples from synovial fluid and carrageenin-induced exudate.

This indicates that an assay of GAG-PG does not necessarily substitute for GAG assay by biochemical methods.

These findings may be useful in selecting the assay methods for GAG and help discussions of the results for biological samples by different assay methods.

Key words : Glycosaminoglycan, Proteoglycan, Electrophoresis, High-performance liquid chromatography, Enzyme-linked immunosorbent assay

要旨：グリコサミノグリカン (GAG) は歯周組織の炎症や歯槽骨の吸収、再生などの代謝活性が上昇したときに、歯肉溝滲出液中に増加することが知られており、歯周病変活性のマーカーとしての可能性が示唆されている。

本論文の要旨は、第39回日本歯周病学会 (1996年4月25日)、第113回岐阜歯科学会 (1996年10月26日) において発表した。

る。

しかし、用いた分析法によって滲出液 GAG 量が異なるため混乱が生じている。

本研究は生物学的試料として歯肉ホモジネート上清液、関節液、カラゲニンからの滲出液の三種類を用い、GAG と GAG-プロテオグリカン (PG) を三方法の定量分析によって比較したものである。

抽出した GAG は電気泳動法によりセルロースアセテート膜上で分離を行い、アルシアンブルーで染色を行った。染色された部分はデンストメーターにより評価した。抽出した GAG からコンドロイチナーゼ消化を行ったコンドロイチン硫酸の不飽和二糖は、高速液体クロマトグラフィー (HPLC 法) で定量を行った。一方、少量の GAG-PG はモノクローナル抗体と特定の酵素消化を組み合わせた ELISA 法で定量を行った。

その結果、電気泳動法と HPLC 法では GAG のレベルは近似していたが、ELISA 法による GAG-PG のレベルは前二者と比較して 3~80 倍を示した。また、生化学的手法によってデルマトン硫酸は関節液と囊胞液において検出されなかった。

このことは、ELISA 法によって得られた GAG-PG 値は生化学的手法で得られた GAG 値とは著明に異なり、ELISA 法は生化学的方法の代用に必ずしもならないことを示している。

これらの結果は、GAG の分析方法を選択するのに役立ち、また、生物学的試料を異なった定量法で得た結果を考察する上での一助となることを示唆している。

索引用語：グリコサミノグリカン、プロテオグリカン、電気泳動法、高速液体クロマトグラフィー、酵素免疫測定法

緒 言

Glycosaminoglycan (GAG) は分子量が数千から数万に及ぶ糖鎖がコアタンパク質に共有結合した Proteoglycan (PG) の形で結合組織の細胞外マトリックスや基底膜に存在し、細胞外マトリックスタンパク質、細胞増殖因子などと相互作用し多くの生命現象に関わっている^{1~5)}。歯肉組織中には Hyaluronic acid (HA) と Dermatan sulfate (DS), Chondroitin sulfate (CS), Heparan sulfate (HS) の GAG 側鎖を持つ PG が検出されている^{6~9)}。近年、PG は CS 異性体である DS, Chondroitin-4-sulfate (C4S), Chondroitin-6-sulfate (C6S) を認識するモノクローナル抗体の開発により免疫組織化学的検索が行われるようになり、また、定量分析も行われるようになった^{10,11)}。

GAG は歯肉溝滲出液にも存在し、炎症や矯正的な歯の移動時に変化する。すなわち、歯周組織が健康な人の歯肉溝滲出液には HA のみが微量存在するが歯肉炎時には HA が増量し、歯周炎時には HA に加えて CS, DS などの硫酸化 GAG が検出される¹²⁾。一方、矯正時の歯の移動時には歯肉溝滲出液の C4S が増加することが報告されている¹³⁾。これらのことから、歯肉溝滲出液の GAG を炎症のマーカーとして、また CS を骨代謝マーカーとして位置づける研究¹⁴⁾が行われているが、採取部位は一本の歯の一歯面であることのために量的制限があり、GAG の検出は困難である。

GAG の定性、定量の方法として一般的に電気泳動法、高速液体クロマトグラフィー (High-performance liquid chromatography analysis; HPLC 法)、比色定量法などが用いられている。梶川¹⁵⁾は電気泳動法によりイヌ歯肉溝滲出液の分析を行ったが、量的問題を克服するために歯肉溝滲出液を全歯面から集める歯肉溝洗浄法を用いたため、各部位の分析は行っていない。したがって、歯肉溝滲出液に含まれる GAG を分析するためには微量定量法が不可欠である。現在有力な微量定量法として GAG を GAG-PG として測定する酵素免疫測定法 (Enzyme-linked immunosorbent assay; ELISA 法) がある。しかし、歯肉溝滲出液 GAG-PG の ELISA 法による測定結果は、従来多用されてきた電気泳動法に比して著明に測定値が高いこと、DS-PG の全 GAG-PG 量に対する比が高いことなどの違いがあることが報告されている¹⁶⁾。ELISA 法は GAG-PG を分析対象とする方法であるのに対し、電気泳動法はコアタンパク質を消化して分離した糖鎖を対象とするものであるから、結果が異なるのは当然の事とも考えられる。しかし、ELISA 法は微量定量に適しているので、今後とも歯肉溝滲出液中の GAG 分析に用いられる可能性が高い。そこで同一試料を用いて、それぞれの GAG の量や比率を ELISA 法と従来から用いられている電気泳動法、HPLC 法によって測定し、それぞれの方法の特色や問題点を明らかにしておく必要がある。このことによって、歯肉溝滲出液中の GAG の分析法の選択基準は明確になり、さらに異なった方法で測定して得た GAG の分析値を考察する上の評価基準が確立する

と考えられる。

本研究は生物学的試料としてヒト歯肉上清液（歯肉上清）、リウマチ性関節炎患者の関節液（関節液）、ラットのカラゲニン肉芽腫^{17,18)}における滲出液（囊胞液）を試料とし、同一試料について三種類のGAGならびにGAG-PG分析法、すなわち電気泳動法、HPLC法、ELISA法を用いて分析し、各方法間によるGAG、GAG-PGの分析値について質的、量的差異を比較検討するために行った。

材料と方法

1. 試料の採取

試料として歯肉ホモジナイズ上清、関節液、囊胞液を用いた。

歯肉上清については、歯周外科処置の行われた患者の歯肉（湿重量3.58g）から調製した。採取した歯肉に磷酸緩衝液pH 7.4（PBS）10 mlを加えホモジナイズし、遠心分離（7,500×g, 40分間）を行い上清を採取した。

関節液はリウマチ性関節炎（stage III）と診断された患者（71歳 男性）の膝関節から採取した。採取した試料を遠心分離（7,500×g, 40分間）しその上清を関節液試料とした。

囊胞液については、体重170g, 6週齢のオスのラットの背部に8 mlの空気を注入し、さらにその空気囊の中へカラゲニン（Marine Colloid Inc., New Jersey, U.S.A）の2%溶液4 mlを注入した。カラゲニン溶液の調製については、カラゲニン粉末を0.9% NaClに加えて攪拌し、オートクレーブで110°C, 15分間加熱溶解と同時に滅菌を行った。冷却後溶液にペニシリン、ストレプトマイシンを0.1 mg/mlの割合で加えた。40°Cで保温した状態で空気囊中に注入を行った。注入後8日目の滲出液を採取し遠心分離（7,500×g, 40分間）した上清を試料とした。

2. GAGの抽出

各試料ともにDi Ferranteの方法¹⁹⁾に準じてGAGの抽出を行った。各試料2 mlに蒸留水18 mlを加えさらに5%セチルピリジニウム溶液（CPC）800 μ lを加え4°C, オーバーナイト攪拌を行い、その後、遠心分離（7,500×g, 40分間）を行った。形成された酸性ムコ多糖セチルピリジニウム塩沈殿物に10%酢酸カリウムエタノール溶液20 mlを加え、2分間攪拌し遠心分離を3回繰り返して行った。分離後の沈殿物に蒸留水4 mlとプロナーゼ消化用緩衝溶液4 mlを加え100°Cで30分間熱処理をした後、1%プロナーゼ（科研製薬、東京）200 μ lを加えて、50°C 48時間で

タンパク質除去を行った。タンパク質除去後流水中で48時間透析を行い、その後蒸留水中で6時間透析後凍結乾燥を行ったものをGAG抽出試料とした。

3. 電気泳動法によるGAGの分析

抽出したGAGはSmithらの方法²⁰⁾に準じ、0.3 M酢酸カドミウム溶液pH 4.1を緩衝液として110 V, 5時間、セルロースアセテート膜（常光産業、東京）に試料を貼付して一次元電気泳動を行った。泳動後、アルシアンブルー-8 GX（0.1%酢酸溶液中）を用いて20分間染色後0.1%酢酸溶液で20分間脱色をした。GAGの標準試料としてAcid mucopolysaccharides kit（生化学工業、東京）を使用した。定量に関しては、泳動膜上に染色された各GAGを2波長クロマトスキャナーCS-930（島津製作所、京都）によってアルシアンブルーに対する吸光度を615 nmで測定し、バックグラウンドに対する吸光度を471 nmに設定した波形面積から標準試料による検量線をもとにして各GAGの測定値を算出した。

4. GAGから主最終生成物の分解

抽出したGAGに対し0.01% BSA含有PBSで溶解したヒアルロニダーゼSD（HAase SD）（生化学工業、東京）0.5 unit/vialにより37°Cで10分間酵素消化を行った後、100°Cで1分間加熱処理を行い、HAの不飽和二糖2-acetamido-2-deoxy-3-O- (β -D-gluc-4-enepyranosyluronic acid)-D-glucose (Δ Di-HA) に分解した。HAase消化されたものに対しコンドロイチナーゼ（CHase）AC, ABC消化用緩衝液（CHase消化溶液）で溶解したCHase AC II Arthro（生化学工業、東京）1 unit/vialによって40°C, 10時間で酵素消化を行った。これによりC4Sの不飽和二糖2-acetamido-2-deoxy-3-O- (β -D-gluc-4-enepyranosyluronic acid)-4-O-sulfo-D-galactose (Δ Di-4 S), C6Sの不飽和二糖2-acetamido-2-deoxy-3-O- (β -D-gluc-4-enepyranosyluronic acid)-6-O-sulfo-D-galactose (Δ Di-6 S) が生成される。HAase消化およびCHase AC II消化された試料に対してCHase消化溶液で溶解したCHase ABC（生化学工業、東京）1 unit/vialによって40°C, 16時間で酵素消化を行った。これによりDS由来の Δ Di-4 Sが生成される。また、CHase B（生化学工業、東京）は、DSのみを特異的に消化し Δ Di-C4 Sが生成されることからこの酵素消化を試みた。これらの条件については、HAase消化された試料40 μ lに対してCHase消化溶液で溶解したCHase B 0.1 unit/vialによって40°C, 16時間の操作により、関節液と囊胞液におけるGAGのみに行った。

5. HPLC による GAG の分析

酵素消化によって主最終生成物として分解された各 GAG 試料 (Δ Di-HA, Δ Di-4 S, Δ Di-6 S, DS 由来の Δ Di-4 S) に対して, 4 倍量のエタノールを加え 24 時間放置し, その後遠心分離を行った。上清を回収し凍結乾燥を行い 90% (v/v) メタノールで溶解したものを試料とした。分析の条件として, 溶媒はアセトニトリル-メタノール-0.5 M 蟻酸アンモニウム緩衝液 pH 4.8 (60:15:25, v/v) を使用し, 流速 1.0 ml/分で溶出, 254 nm の紫外吸収で検出を行った。分離には, Shodex RSpak DC-613 (昭和電工, 東京) のカラムを使用しカラムオープンで 70°C に設定した^{21,22)}。定量に関しては, 不飽和デルマト/ヒアルロー二糖キット D-Kit HPLC 用 (生化学工業, 東京) を標準試料として用いた。

6. ELISA 法による PG の分析

各試料を平底 96 穴マイクロタイタープレート (Nunc, U.S.A) の各ウェルに 50 μ l ずつ加えた。約 16 時間放置し, PBS で 3 回洗浄を行い Chondroitin-6-sulfate Proteoglycan (C6 S-PG) に対しては CHase ABC を, Chondroitin-4-sulfate Proteoglycan (C4 S-PG) に対しては CHase AC II Arthro を, DS-PG については CHase B によって酵素消化を行い各ウェルに 100 μ l ずつ加えた。室温で 1 時間消化後, PBS で洗浄を行い 1% ウシ血清アルブミン (BSA) を 100 μ l ずつ加え 2 時間ブロッキングを行った。その後 0.05% Tween 20 を含む緩衝液 (PBS-T) で洗浄を行い 8,000 倍希釈したモノクローナル抗体, 3-B-3 (Δ Di-C6 S), 2-B-6 (Δ Di-C4 S) (生化学工業, 東京) を各ウェルに加えて 1 時間吸着させ PBS-T で洗浄後 1,000 倍希釈のペルオキシダーゼ標識抗マウス免疫グロブリン (CAPPEL, U.S.A) を 50 μ l ずつ各ウェルに加えて 1 時間吸着させた。酵素基質液 (O-Phenylenediamine+0.03% H_2O_2) を 100 μ l ずつ各ウェルに加えて 20 分間反応させた後 4 N H_2SO_4 を 50 μ l 加えて反応を停止させた。その後, ELISA Reader MPR-A 4 (東洋曹達, 東京) によって 492 nm の吸光度で検出を行った。定量に関しては, C6 S-PG に対して Bovine Nasal Cartilage Proteoglycan (BNC-PG) Monomer を, C4 S-PG および DS-PG に対して Rat Chondrosarcoma Proteoglycan (RC-PG) Monomer (ともに ICN Biomedical, Inc.) を標準試料として用いた標準曲線から測定値を算出した。

HA はヒアルロン酸プレート (中外製薬, 東京) を用いて定量を行った。本法は Sandwich binding protein assay 法に基づいた方法²³⁾, すなわちマイクロタイタープレートに固相化した Hyaluronic acid bind-

ing protein (HABP) に試料中のヒアルロン酸を結合させ, 酵素標識 HABP を反応させることによりサンドイッチを形成させ, その後テトラメチルベンチジン (TMB) および基質の過酸化水素を加えることにより, 標識酵素の作用で TMB が酸化され呈色されたものを 450 nm の吸光度で測定を行った。定量は本キットに含まれる標準試料を用いた標準曲線から測定値を算出することにより行った。

結 果

1. 電気泳動法によるセルロースアセテート膜の染色像

各試料の電気泳動像は異なったアルシアンブルー陽性スポット像を示した (図 1)。歯肉上清では標準試料の HA に一致するスポットと, DS ならびに CS にほぼ一致する境界が明瞭でないブロードなバンドが認められた (図 1-1)。関節液については, 標準試料の HA に位置するテーリングしているスポットと DS と CS との間に位置するスポットが認められた (図 1-2)。このスポットを同定するために, HAase SD で酵素消化を行った結果, 標準試料の HA に一致するスポットは消失し, DS と CS との間に位置するスポットのみが残存した。更に CHase AC II 消化を行った結果, 本スポット (図 1-2) は消失し, DS と CS 間に存在するスポットは CS であることが確認された (図 2)。囊胞液については, 標準試料の HA に一致するスポットと CS に一致するスポットが認められ, その像は関節液と類似していた (図 1-3)。

2. HPLC 法による各 GAG のリテンションタイムとそのピーク

HPLC 法による各標準試料のリテンションタイムとそのピークを示した (図 3)。 Δ Di-HA は測定開始から 5 分にピークを認めた。 Δ Di-6 S Δ Di-4 S は測定開始から 5.6 分に Δ Di-6 S のピークを 7.1 分に Δ Di-4 S のピークを認めた。代表的なものとして歯肉上清 GAG の酵素消化によって得られた各主最終生成物のリテンションタイムとピークを示した (図 4)。HAase SD 消化試料では 5.1 分に Δ Di-HA のピークを認めた。更に CHase AC II 消化を行ったものでは 5.7 分に Δ Di-6 S のピークを, 7 分に Δ Di-4 S のピークを認めた。CHase ABC 消化を行った試料については, 7.1 分に DS 由来の Δ Di-4 S のピークを認めた。

3. 各試料の三種の定量法による GAG 量

歯肉上清の GAG 構成については, 電気泳動法では HA, DS, CS が検出され, CS を C4 S と C6 S の分子種に分離することはできなかった。一方, HPLC

図1 標準試料GAG (HA, HS, DS, CS) と各試料GAGの電気泳動像

1. 歯肉上清, 2. 関節液, 3. 囊胞液, 4. 標準試料

図2 関節液GAGの酵素消化した電気泳動像
上から順に、酵素未消化, HAase SD 消化,
CHase AC II 消化, 標準試料 (st) を示す。

図3 標準試料による各GAGのリテンション
タイムとピーク

Δ Di-HA, Δ Di-6S と Δ Di-4S (DS) のピークを示す。

カラム; RSpak DC-613

溶媒; アセトニトリル/メタノール/0.5 M ギ酸アンモニウム緩衝液 (pH 4.8) (60:15:25, v/v)

流速; 1.0 ml/分

法では HA, DS, C4S, C6S が検出され, ELISA 法においても, HA, DS, C4S, C6S の GAG-PG が検出された。電気泳動法と HPLC 法において HA は近似した値を示したが, ELISA 法による値は電気泳動法の 2.9 倍, HPLC 法の 4.8 倍を示した。すべての試料において電気泳動法での CS 異性体の分離が不可能であったため, 比較上 HPLC 法, ELISA 法で得た C4S と C6S の定量値の和を CS 値として表した。CS および DS の値は HA と同様に電気泳動法, HPLC 法ともに近似した値であった。ELISA 法を用いて測定した CS の値は電気泳動法の 21.5 倍, HPLC 法の 33 倍を示し, ELISA 法による DS の値は, 電気泳動法の 45.5 倍, HPLC 法の 40.1 倍を示した (表1)。

関節液の GAG 構成については, 電気泳動法では HA, CS が, HPLC 法では, HA, C4S, C6S が, ELISA 法では HA, C4S, C6S, DS が検出された。電気泳動法と HPLC 法において HA と CS は近似した値を示したが, ELISA 法における HA の値は電気泳動法の 25.6 倍, HPLC 法の 28 倍を示し,

図4 歯肉上清の各GAGのリテンションタイムとピーク

HAase SD消化したものは Δ Di-HA, CHase AC II消化したものは Δ Di-6 Sと Δ Di-4 S, CHase ABC消化したものは Δ Di-4 S (DS)を示す。

カラム; RSpak DC-613

溶媒; アセトニトリル/メタノール/0.5 M ギ酸アンモニウム緩衝液 (pH 4.8) (60:15:25, v/v)

流速; 1.0 ml/分

ELISA法におけるCSの値は電気泳動法の54.6倍, HPLC法の81.8倍を示した。電気泳動法, HPLC法でのDSの検出は不可能であったが, ELISA法では検出が可能であった(表2)。

囊胞液のGAG構成については, 電気泳動法においてHA, CSが検出された。HPLC法ではHA, C4S, C6Sが検出され, ELISA法ではHA, C4S, C6S, DSが検出された。電気泳動法, HPLC法によるHA, CSは近似した値を示した。ELISA法でのHAの値は電気泳動法の5.3倍, HPLC法の5.2倍を示し, ELISAでのCSの値は電気泳動法の8.9倍, HPLC法の11.1倍であった。関節液と同様に電気泳動法, HPLC法ではDSの検出は不可能であったが, ELISA法において検出された(表3)。

4. HPLC法とELISA法による各試料のC4S/C6Sの比

HPLC法とELISA法ではC4S, C6Sの分離が可能であったので両者の比をC6Sを分母にC4Sを分子として値を算出した。歯肉上清では, HPLC法に比較してELISA法では2.8倍, 関節液で3.1倍を示した。囊胞液では近似した値を示した(表4)。

考 察

生物試料の特定物質を測定した場合, 過去の報告との比較が重要である。その際, 結果が異なる場合の考察として抽出法や測定法の違い, 測定値の再現性, 安

表1 三種の定量法による歯肉上清のGAG量

各GAGの平均値と標準偏差値を示す。HPLC法, ELISA法ではCS値をC4S+C6S値で表した。

	HA	CS	DS
電気泳動法	85.5 $\pm$ 26.6	61.2 $\pm$ 15.8	51.2 $\pm$ 13.8
HPLC法	51.6 $\pm$ 1.8	39.8 $\pm$ 4.9	58.0 $\pm$ 2.2
ELISA法	249.8 $\pm$ 27.8	1314.6 $\pm$ 198.5	2328.6 $\pm$ 483.4

(μ g/ml)

表2 三種の定量法による関節液のGAG量

各GAGの平均値と標準偏差値を示す。HPLC法, ELISA法ではCS値をC4S+C6S値で表した。

	HA	CS	DS
電気泳動法	658.0 $\pm$ 78.7	103.0 $\pm$ 21.7	—
HPLC法	602.5 $\pm$ 9.9	68.7 $\pm$ 3.7	—
ELISA法	16861.0 $\pm$ 871.4	5624.9 $\pm$ 464.8	1434.0 $\pm$ 241.7

(μ g/ml)

表 3 三種の定量法による囊胞液の GAG 量
各 GAG の平均値と標準偏差値を示す。HPLC 法、
ELISA 法では CS 値を C4S+C6S 値で表した。

	HA	CS	DS
電気泳動法	72.9±17.8	115.1±13.7	—
HPLC 法	73.4±1.4	91.8±4.1	—
ELISA 法	384.7±31.4	1021.3±47.8	101.5±8.6

(μg/ml)

定性の問題、組織由来の違いなどに起因すると述べられることが多い。

従来、GAG の定性および定量は各 GAG の荷電の差を利用して電気泳動により分離し、標準試料の移動位置との一致性と各 GAG を消化する酵素を併用して同定を行い、アルシアンブルーに染色された分離スポットの濃度、面積から定量が行われてきた。生体において GAG はコアタンパク質と結合した PG として存在することから、電気泳動の試料として用いるためには、あらかじめコアタンパク質をタンパク質分解酵素²⁴⁾で分解して GAG を抽出しておく必要がある。試料が微量な場合には抽出操作の必要な測定法は測定値の再現性を阻害する恐れがあり、そのため試料をプールして量を確保する必要がある。

GAG の電気泳動による移動度は低い順に HA, HS, DS, CS であった (図 2)。HA 以外の硫酸化 GAG (HS, DS, CS) 間の分離度は明瞭なものとはいえず、その中の一つの GAG が多量に存在する場合には他の GAG がマスクされる危険性が高い。また、CS 異性体 (C4S と C6S) の分離は不可能であった。本研究は歯肉溝滲出液 GAG の測定を念頭においたものであるが、骨破壊のマーカーとして歯肉溝滲出液の C4S が提唱されており、骨破壊の動態を知るためには C4S の分離、定量が必要となる¹⁶⁾。Stanbury と Embury は緩衝液に酢酸カルシウムを用いて電気泳動を行い、染色されたシートにトランスイルミネーションを行って C4S と C6S の分離が可能であったと報告した²⁴⁾。しかし、本研究の生物学的試料で追試を行ったが成功しなかった。

一方、HPLC 法による GAG の分析が行われたのは比較的新しい。本研究では Murata ら^{21,22)}の方法に基づいたが、 Δ Di-HA と Δ Di-6S のリテンションタイムがほぼ同一時間になるために酵素消化を必要とした。CS と DS の同定に利用できる細菌由来の酵素には、CHase ABC と CHase AC がある^{26~28)}。これらの酵素は様々な性質を持ち、CHase ABC は、HA, DS, C4S および C6S を分解することができ、各基

表 4 各試料による C4S/C6S の比

	HPLC 法	ELISA 法
歯肉上清	0.60	1.66
関節液	1.46	4.55
囊胞液	2.24	2.07

質に対する相対活性は硫酸基のない HA に対しては極めて低く、CHase AC II は DS を除いて HA, C4S および C6S を分解することができ、中でも HA に対する活性は極めて高いことが知られている²⁹⁾。CS-PG に CHase AC II と CHase ABC を作用させた場合、繰り返し二糖に対する活性が両酵素で異なる³⁰⁾。CHase ABC は繰り返し二糖単位を一つ残して分解するが、CHase AC II は橋渡し構造のグルクロン酸の部位を分解することからも、HA を完全に分解するには CHase AC II と CHase ABC の両者による分解は有効であると考えられる。

本田³¹⁾は歯石中 GAG のコンドロイチン硫酸異性体の定量を行うため、HA を放線菌 HAase を用い二糖単位以外の生成物にすることによりこれらの影響を改善した。しかし、この方法では HA は検出されないため、本研究では HAase SD によって主最終生成物に分解した。更に CHase AC II Arthro の分解により Δ Di-6S, Δ Di-4S の検出が可能となる。DS の検出は更に前述したものに対して CHase ABC での分解により DS 由来の Δ Di-4S の検出を行った。関節液、囊胞液に対しても試みたが検出されなかったため、CHase B での分解を行ったが DS は検出されなかった。HPLC 法による GAG の分析は操作が煩雑で時間がかかるという難点はあるが、少量の試料への応用が可能で測定値の安定性に優れているという利点がある。

ELISA 法による GAG-PG の測定法は近年になって用いられてきた。Couchman ら^{10,11)}の開発した CS-PG に対するモノクローナル抗体は GAG 鎖の結合した PG を測定するものであるが、GAG そのものを測定しているわけではなく、PG の糖鎖を外した断端の不飽和二糖をエピトープとして認識している。ELISA 法の特徴は試料の抽出操作を必要としないことと、ng レベルでの微量定量が可能なことである。従って、歯肉溝滲出液 GAG-PG のような極めて微量のサンプルには適切な方法と思われ応用結果が報告されている³²⁾。HA の ELISA 法での定量は Sandwich binding protein assay 法を用いた。他の方法に比べ ELISA 法での HA の値は、電気泳動法、HPLC 法よりも高い値を示した。

本研究では同一の生物学的試料をそれぞれ三種類の
方法で測定し、測定法の違いによる質的および量的な
違いを明らかにすることを目的としている。歯肉は各
GAG (HA, DS, HS, CS) が含まれること、また、
関節液、嚢胞液は生体液であり歯肉溝滲出液と同様の
成分を含むことから測定対象とした。

歯肉上清を試料とした GAG の測定値は HA,
CS, DS の比率に若干違いはあるものの、電気泳動
法、HPLC 法ともに各 GAG のレベルは、51~86
μg/ml の範囲にあったが、ELISA 法による測定値は
前二者の方法による測定値の 3~25 倍の値を示した。
また、用いた試料によって GAG 値と GAG-PG 値の
比が異なっていた。生体には種々の分子量を持つ
GAG-PG が含まれ、コアタンパク質に GAG 鎖が一
本しか結合していない小型 PG から百本以上も結合する
大型 PG が存在している³³⁾。組織や生体液でそれらの
存在が一様でないために、また ELISA 法がいずれの
種類の GAG-PG を認識するのかは明らかでないため
に試料による差がでたものと思われる。

一方、HPLC 法を用いた Okazaki ら³⁴⁾はサルの歯
髄、歯肉、歯根膜、象牙質、歯槽骨、セメント質の
CS 異性体について HPLC 法により ΔDi-4S と ΔDi-
6S を測定した結果、各組織からの全 GAG における
ΔDi-4S の割合は、セメント質、歯槽骨、象牙質、歯
根膜、歯肉の順に高く、歯髄は ΔDi-6S の割合がわ
ずかに高いことを報告した。本研究においても C4S
と C6S について同様の比較を行った。関節液、嚢胞
液においては C4S の割合が高く、歯肉上清において
は C6S の割合が高かった。これは、歯周組織におい
て C4S が豊富であることに相反しているが、組織の
特性、各定量法に対する処理操作が要因として考えら
れる。また、同じ報告者ら³⁵⁾は、HPLC 法により健
常者、歯周疾患患者、無歯顎患者の唾液中の CS 異性
体について分析し、無歯顎患者では ΔDi-6S が多く、
歯周疾患患者は ΔDi-4S が著明に多かったと報告し
た。Shibutani ら¹⁶⁾は ELISA 法によってイヌの実験
的歯周炎モデルにおける歯肉溝滲出液と歯肉の GAG-
PG に対して血清のそれとの比較分析を行っている
が、血清のそれよりも歯肉溝滲出液およびホモジナ
イズした組織において C4S 量は多く炎症の経時的変化
においては起炎後 7 日目と 60 日目に C6S の増加が
みられたと報告した。本研究において HPLC 法では
C6S の値が高かったが、ELISA 法では C4S の値の
ほうが高く、歯肉の採取において炎症の経時的な変化
を考慮していないことが原因と思われる。

慢性関節リウマチは病巣局所で著しい滑膜増殖と炎
症細胞浸潤が認められ、滑膜細胞は HA を中心とし

た関節液成分の合成する³⁶⁾。HA は N-アセチルグル
コサミンと D-グルクロン酸が交互配列したもので、
細胞や組織の保持作用を示すとともに機械的外力や細
菌感染などに対する保護作用があることが知られてお
り³⁷⁾、リウマチ疾患患者膝関節液が増加することが明
らかにされている^{37~39)}。本研究においても関節液試
料において HA の割合がかなり高かった (表 2)。本
研究で使用したキットは、Sandwich binding protein
assay 法²³⁾に基づいた方法であるが HABP 結合ビ
ーズを使用せずマイクロタイタープレートに固相化した
HABP を使用した。HA 検出の感度は ng/ml オー
ダーであり操作性も優れたものである。

本研究において電気泳動法ならびに HPLC 法では
DS を検出することはできなかったが、ELISA 法で
は検出可能であった。ELISA 法はコアタンパク質を
酵素消化しない限り認識するエピトープは出現せず、
PG 中の糖鎖一本に関し一つのエピトープしか残存し
ないこと、新生した非還元末端の二糖構造を認識する
ため糖鎖中の繰り返し二糖の主要構造を必ずしも反映
するとは限らないこと⁴⁰⁾、に原因するものと考えられ
る。この方法における急性炎症期の滲出液は量的に不
十分であったが、慢性期における滲出液は十分な量が
得られたため 8 日目の滲出液を試料として用いた。実
験的開放創炎症の修復過程において、非硫酸化ムコ多
糖が増加し、次に硫酸化ムコ多糖が増加する^{41,42)}。こ
れらは炎症モデルによっても同様なことが起こり、慢
性炎症期には CS の割合が HA よりも高くなること
が考えられる。抽出された GAG から電気泳動法、
HPLC 法においては HA, CS が検出されたが、モデ
ルが慢性期であることから HA は著明な量を示さな
かったと思われる。

本研究の結果、ELISA 法による GAG-PG 値は従
来用いられてきた電気泳動法と HPLC 法による
GAG 値と著明に異なること、また電気泳動法ならび
に HPLC 法で検出できない DS を ELISA 法は DS-
PG として検出できる (関節液、嚢胞液) ことが分
かった。DS-PG の検出については質的違いが認めら
れたが、これらは、GAG-PG の分子量の違いに基づ
くものと思われる。例えば、試料中に小型 GAG-PG
が豊富に存在していたならば、電気泳動法や HPLC
法では検出するのが困難となると考えられる。この事
は GAG を測定する方法と GAG-PG を測定する方法
の両者の結果は同列に扱えないことを意味するものと
考えられる。即ち GAG を定量的目的とする際には抽
出、分離、定量的操作を必要とする電気泳動法や
HPLC 法による分析が妥当であろう。また、HPLC
法と電気泳動法による GAG 分析値に大差はなく、操

作の容易性という点では電気泳動法が、C4SとC6Sが分離可能という点ではHPLC法が望ましい。

一方歯肉溝滲出液への応用という観点から、微量定量にはELISA法が最適と思われる。しかし前述のごとく、ELISA法によって得られたGAG-PGの値、例えばCS-PGの値はPGのCS鎖を外した断端の不飽和二糖をエピトープとして認識するCSの測定法であるのに対して、HPLC法と電気泳動法はCS-PGのコアタンパク質を消化してCSに分離したものを生化学的に定量する方法である。すなわち、三種の方法はいずれもCSを測定する方法であるが、CSを分離するかまたは分離しないで測定するかの違いがある。

歯肉溝滲出液GAGを測定するために用いることができる試料は、一歯面の1~2 μ lの滲出液であり、これに応用するためにはELISA法しか選択の余地がないものと思われる。その際、ELISA法によるGAG値はGAGを直接定量する生化学的手法による値とは異なることを認識しておく必要があると考える。

本研究は、平成8年度文部省科学研究費基盤研究B(課題番号08457514)の補助を受けて行った。

文 献

- 1) Modis, L. : The molecular structure of the inter-fibrillar matrix in connective tissue. *Acta Biol. Acad. Sch. Hung.*, 29 : 197-226, 1978.
- 2) Comper, W.D. and Laurent, T.C. : Physiological function of connective tissue polysaccharides. *Physiol. Rev.*, 58 : 255-317, 1987.
- 3) Meter, K. : Biochemistry and biology of mucopolysaccharide. *Am. J. Med.*, 47 : 664-671, 1969.
- 4) 梶川欽一郎 : 結合組織, 第一版, 金原出版, 東京, 1984, 319-365.
- 5) 大高裕一 : 結合組織病, 第一版, 金原出版, 東京, 1984, 81-110.
- 6) 岩山幸雄 : 歯肉結合組織の破壊. *歯界展望*, 55 : 833-888, 1980.
- 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) 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, 1988.
- 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ノグリカンについて. *日歯周誌*, 24 : 266-284, 1982.
- 10) Couchman, J.R., Caterson, B., Christner, J.E. and Baker, J.R. : Mapping by antibody detection of glycosaminoglycans in connective tissue. *Nature*, 307 : 650-652, 1984.
- 11) Caterson, B., Christner, J.E., Baker, J.R. and Couchman, J.R. : Production and characterization of monoclonal antibodies directed against connective tissue proteoglycans. *Federation Proc.*, 44 : 386-393, 1985.
- 12) 岩山幸雄 : 歯周組織破壊の指標としての歯肉溝滲出液プロテオグリカン. *阪大歯誌*, 37 : 1-7, 1992.
- 13) Last, K. S., Dankin, C. and Embury, G. : Glycosaminoglycans in human gingival crevicular fluid during orthodontic movement. *Archs Oral Biol.* 33 : 907-912, 1982.
- 14) Embury, G. and Waddington, R. : Gingival crevicular fluid : Biomarkers periodontal tissue activity. *Adv Dent Res* 8(2) : 329-336, 1994.
- 15) 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 : 500-514, 1984.
- 16) 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.
- 17) 鶴藤 丞 : ラットの空気嚢型炎症. *炎症*, 1 : 381-390, 1981.
- 18) Fukuhara, M. and Tsurufuji, S. : The effect of injected antiinflammatory drugs on the carragenin granuloma in rats. *Biochem. Pharmacol.*, 18 : 475-484, 1969.
- 19) Di Ferrante, M.N. : The measurement of urinary mucopolysaccharides. *Anal. Biochem.*, 21 : 98-106, 1967.
- 20) Curwen, D.K. and Smith, C.S. : Quantitative microanalysis of aortic glycosaminoglycans. *Anal. Biochem.*, 79 : 291-301, 1977.
- 21) Murata, K. and Yokoyama, Y. : A high-performance liquid chromatography for constituent disaccharides of chondroitin sulfate and dermatan sulfate isomer. *Anal. Biochem.*, 146 : 327-335, 1985.
- 22) Murata, K. and Yokoyama, Y. : Enzymatic analysis with chondrosulfatases of constituent disaccharides of sulfated chondroitin sulfate and dermatan sulfate isomers by high performance liquid chromatography. *Anal. Biochem.*, 149 : 261-268, 1985.
- 23) 近藤孝司, 秩父賢司, 白杵浩志, 松浦 豪, 七条茂樹, 横山三男 : 血中ヒアルロン酸の簡易測定法. 臨

- 床病理., 36(5) : 536-540, 1991.
- 24) 石川 烈, 荻原さつき, 木下四郎 : 歯周疾患と多核形白血球. 歯界展望, 57 : 65-76, 1981.
- 25) Stanbury, J.B. and Embery, G. : An improved electrophoretic procedure for the detection of acidic glycosaminoglycans (mucopolysaccharides). Med. Lab. Sci., 34 : 267-269, 1977.
- 26) Yamagata, T., Saito, H., Hobuthi, O. and Suzuki, S. : Purification and properties of bacterial chondroitinase and chondrosulfatases. J. Biol. Chem., 243 : 1523-1535, 1968.
- 27) Saito, H., Yamagata, T. and Suzuki, S. : Enzymatic methods for the determination of small quantities of isomeric chondroitin sulfates. J. Biol. Chem., 243 : 1536-1542, 1968.
- 28) Hiyama, K. and Okada, S. : Crystallization and some properties of chondroitinase from *Arthrobacter aureescens*. J. Biol. Chem., 250 : 1824-1828, 1975.
- 29) 鈴木 旺, 永井克孝, 山川民夫, 山科郁男 : 複合糖質研究法 II 第一版, 続生化学実験講座, 東京, 1986, 314-315.
- 30) Oike, Y., Kimata, K., Shinomura, T., Nakazawa, K. and Suzuki, S. : Structural analysis of chick-embryo cartilage proteoglycan by selective degradation with chondroitinases (chondroitinases) and endo- β -D-galactosidase (kera-tanase). Biochem. J., 191 : 193-207, 1980.
- 31) 本田 準虎 : ヒト歯肉縁上なら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(3) : 620-632, 1992.
- 32) 西野恒理, 渋谷俊昭, 春名 領, 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(2) : 615-622, 1990.
- 33) 板倉照好 : 孤独な細胞外マトリックス, 羊土社, 東京, 1994, 25-30.
- 34) Okazaki, J., Kamada, A., Gonda, Y. and Sasaki, T. : Analysis of chondroitin sulfate isomers in the periodontium of the monkey using high-performance liquid chromatography. J. Periodont. Res., 27 : 484-488, 1992.
- 35) Okazaki, J., Kamada, A., Gonda, Y., Sasaki, T. and Embery, G. : High-performance liquid chromatography analysis of chondroitin sulfate isomers in human whole saliva in a variety of clinical condition. Oral Disease., 2 : 224-227, 1996.
- 36) O'Rahilly, R. and Gardner, E. : The development of the knee joint of the chick and its correlation with embryonic staging. Morphol. 98 : 49-88, 1956.
- 37) Laurent, T.C. and Fraser, J.R. : The properties and turnover of hyaluronan. Ciba foundation Symposium., 124 : 9-29, 1986.
- 38) 松浦 豪, 近藤孝司, 秩父賢司 : 関節疾患の非侵入襲性診断法 慢性関節リウマチ血清中のヒアルロン酸濃度の検討. 関節外科, 10(9) : 989-996, 1991.
- 39) Engstrom-Laurent, A. and Hallgren, R. : Circulating hyaluronate in rheumatoid arthritis : relationship to inflammatory activity and the effect of corticosteroid therapy. Ann Rheum Dis., 44 : 83-88, 1985.
- 40) Selye, H. : Use of "Granuloma pouch" technic in the study of antiphlogistic corticoids. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 82 : 328-333, 1953.
- 41) Bentley, J.R. : Rate of chondroitin sulfate formation in wound healing. Ann. Surg., 165 : 186-191, 1978.
- 42) Alexander, S.A. and Donoff, R.B. : The glycosaminoglycans of open wounds. J. Surg. Res., 29 : 422-429, 1980.

連絡先 :

朝日大学歯学部歯周病学講座

〒501-0296 岐阜県本巣郡穂積町穂積 1851