

〔原 著〕

## 歯肉溝滲出液による成人性歯周炎の病勢診断

沓澤 政幸, 小鷲 悠典, 久保木芳徳\*

北海道医療大学歯学部歯科保存学第一講座  
\*北海道大学歯学部生化学講座

(主任: 小鷲 悠典教授)  
\* (主任: 久保木芳徳教授)

## Diagnosis of disease activity of adult periodontitis by gingival crevicular fluid

Masayuki KUTSUZAWA, Yusuke KOWASHI and Yosinori KUBOKI\*

Department of Periodontology and Endodontology, School of Dentistry,  
Health Sciences University of Hokkaido  
\*Department of Biochemistry, Hokkaido University School of Dentistry

(Chief Prof Yusuke KOWASHI)  
\* (Chief Prof Yosinori KUBOKI)

### Abstract

The purpose of this study was to evaluate the pathological changes of the periodontal disease by measurement of total protein, matrix metalloproteinase (MMP)-8, interleukin (IL)-1  $\beta$  and granulocyte macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) in the gingival crevicular fluid (GCF)

A total of 157 sites were used in the experiment (124 sites with adult periodontitis and 33 sites with healthy periodontal tissue)

The measurement of total protein in GCF was performed by Bradford method. The determination of MMP-8 in GCF was performed by the EIA system. The measurements of IL-1  $\beta$  and GM-CSF were used by the ELISA systems. The flow of GCF, gingival index (GI), gingival bleeding index (GBI) and probing depth were examined as clinical parameters. The compositions of amino acid in GCF were analyzed by the amino acid analysis.

The results were as follows

---

本論文の要旨は第38回秋季日本歯周病学会学術大会 (1995年10月7日) において発表した。  
受付: 平成8年9月30日

- 1 There were close correlations among the inflammation indices (flow of GCF, GI and GBI) and the amounts of total protein, IL-1  $\beta$  and MMP-8 in GCF
- 2 The content of GM-CSF in GCF was not detected by this ELISA system ( $<7.6\text{ pg}$ )
- 3 By the amino acid analysis of GCF, the content of hydroxyprolin was less than the experimental error ( $0.001 < \text{residue}/1000\text{ residues}$ )
- 4 The rose-diagram of amino acids in GCF characterised the status of the periodontal disease

These results suggested that the measurements of total protein, IL-1  $\beta$  and MMP-8 in GCF were useful for the diagnosis of the periodontal disease activity and the amino acids analysis of GCF might characterize the pathological changes of the periodontal disease

**Key words** gingival crevicular fluid (GCF), matrix metalloproteinase (MMP)-8, interleukin (IL)-1  $\beta$ , granulocyte macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF), amino acid analysis

## 緒 言

歯周疾患は、疫学的な研究結果から歯周組織が長期間にわたり持続的にゆっくりと破壊される慢性の炎症性疾患であると考えられてきた。しかし、最近の知見から急性の歯周組織破壊が生じる活動期と組織破壊が認められない長期にわたる静止期とが交互に繰り返され<sup>1-3)</sup>、しかも、一歯あるいは一歯面だけに生じることがある部位特異的な炎症性病変であるということが明らかとなってきた<sup>4)</sup>。これまで、歯周疾患の局所病態は、臨床指標から診断されることが多く、歯周組織破壊の動態や治療の予後を推測する客観的診査法の検討は十分に行われてはいない。

歯肉溝滲出液(gingival crevicular fluid GCF)は、歯肉溝あるいは歯周ポケット内に滲出する血清由来の組織液で<sup>5)</sup>、組織中の代謝産物や細胞由来の酵素、サイトカインを含有し、その変動は組織の状態を反映し、部位特異的な歯周組織の炎症性破壊を把握する局所的指標として有用であると考えられている。

歯周疾患の組織中には、好中球が多数浸潤しており<sup>6-8)</sup>、好中球は侵襲物を貪食破壊することにより、宿主の防御機構の中で重要な役割を演

じている。しかし、好中球には様々な酵素が含まれており、それらが宿主細胞にも結果的に障害を与えてしまう点も注目しなくてはならない。中でも好中球特異酵素である好中球型コラゲナーゼのmatrix metalloproteinase(MMP)-8はI型コラーゲンを切断し<sup>9)</sup>、歯周組織破壊に強く関わっているものと考えられている。従って、GCF中のMMP-8を測定して、歯周組織破壊との関係を検索することは、病態を把握するうえで極めて有用であると思われるが、現在に至るまで、一歯あるいは一歯面より採取したGCF中のMMP-8の微量定量は行われていない。

また、歯周疾患の組織中では複雑なサイトカインネットワークを構成すると考えられている。その中でも炎症性因子としてのサイトカインである interleukin(IL)-1 $\beta$  は、骨吸収因子<sup>10-12)</sup>として歯周組織破壊に関与すると報告されており<sup>13,14)</sup>、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子(granulocyte macrophage colony-stimulating factor GM-CSF)は顆粒球、マクロファージ系の造血、分化・成熟に関与して<sup>15,16)</sup>、歯周疾患の成り立ちに深く関与すると考えられる。このような点からもGCF中の

IL-1 $\beta$ およびGM-CSFを微量定量する意義は大きいと考えられる。

さらに、歯周組織の炎症性破壊の過程ではコラーゲンの分解が生じており<sup>17)</sup>、生体内で生じている事象の情報源と考えられるGCFをアミノ酸レベルで分析して病態解析を行うことは非常に興味深い。

そこで本研究は、GCFを試料とした歯周疾患の病態解析を試みることを目的とし、GCFの生化学的分析として好中球型コラーゲナーゼ(MMP-8)の定量と、好中球への分化に関与するGM-CSFの定量、並びに炎症性サイトカインのIL-1 $\beta$ の定量を行い、臨床検査データと比較した。さらに、GCFのアミノ酸組成について、rose-diagramによるアミノ酸分析を行い、歯周組織破壊の中でも大きな位置を占めるコラーゲン分解についてコラーゲンを構成する特有のアミノ酸であるヒドロキシプロリンの検索とアミノ酸組成の変動について検討した。

## 実験材料および方法

### 1. 被験者および被験部位

被験者は、北海道医療大学歯学部附属病院保存科に歯周疾患を主訴として来院し、Pageら<sup>18,19)</sup>の分類にもとづき成人性歯周炎と診断され、全身疾患を認めず、6カ月以内に抗生物質や抗炎症性薬剤の投与および歯周治療の既往がない男性9名、女性6名計15名(平均年齢50.2 $\pm$ 5.7歳)の患者と歯周組織健全者、男性4名、女性3名計7名(平均年齢28.2 $\pm$ 6.4歳)である。

被験部位は歯冠修復物のない上顎前歯部を選択し、患者群の124部位、健全者群の33部位の計157部位よりGCFを採取した。

### 2. 歯肉溝滲出液の採取と保存方法

GCF採取はペーパーストリップを用いた歯肉溝内法<sup>20)</sup>で行った。

被験歯の歯肉縁上プラークを綿球で除去し、水洗して、ロール綿花にて簡易防湿後、被験歯

の歯頸部および歯肉溝部をエアーシリンジにて緩やかに乾燥させた。30秒間放置後、2mm $\times$ 13.5mmのペリオペーパー(Siemens, Germany)を歯肉溝あるいは歯周ポケットに抵抗感を得るまで挿入、30秒間歯肉溝内に保持した後、静かに除去し採取した。GCF量をPeriotron Economy(Harco Electronics, Canada)で測定した。液量測定後、ペリオペーパーは予め用意した容量1.5mlのpolypropylen(Degersheim, Switzerland)内に挿入し、直ちに-80°Cにて凍結保存した。なお、採取時に出血を認められた部位や血液の付着したものは試料への血液の混入を防ぐために廃棄した。

### 3. 臨床診査項目

臨床病態は、GCF量の測定と、GCF採取後のgingival index (GI), probing depth, gingival bleeding index (GBI)の測定により診査した。

#### 1) GCF量

GCF量の測定は、Golubらの方法<sup>21)</sup>を参考にPeriotron Economyを使用して測定した。なお、ヒト血清を試料としてPeriotron Economyの標準曲線を作製し、Periotron値1単位のGCF量を0.0068 $\mu$ lとして換算した。

#### 2) gingival index (GI)

歯肉炎指数は、各被験歯の辺縁歯肉を部位ごとにLöe & Silnessのgingival index<sup>22)</sup>で0～3の4段階で判定した。

#### 3) probing depth

CP-11型歯周ポケット測定器(Hu-Friedy, Chicago, IL)を用いて1mm単位で測定した。

#### 4) gingival bleeding index (GBI)

Ainamo & Bayが提唱したgingival bleeding index<sup>23)</sup>を一部改変して以下の判定基準で記録した。

- 0 : 歯肉溝および歯周ポケットに歯周ポケット測定器を25～30gの荷重で抵抗感が得られるまで挿入し、出血が認められないもの
- 1 : 歯肉溝および歯周ポケットに歯周ポケット

測定器を25～30 gの荷重で抵抗感が得られるまで挿入し、30秒以内に出血が認められたもの

#### 4. 実験方法

##### 1) GCF試料の調整方法

凍結保存していたペリオペーパーを室温(20°C)にてpH7.4 phosphate buffered saline (PBS) 500  $\mu$ lに浸漬し、20分間GCFの溶出を行った。vortexにて1分間の振盪を5回行った後、不純物および細胞成分の除去のため1800 rpmで10分間遠心分離を行い、その抽出液の上清をGCF試料として分析に用いた。

##### 2) タンパク定量

GCF試料のタンパク量は、Bradfordのdye-binding assay法<sup>24)</sup>に基づくprotein assayキット(Bio-Rad, Germany)を用いて測定し、標準タンパクとしてはウシ血清アルブミンを用いた。GCF試料または標準試料160  $\mu$ lとdye-reagent 40  $\mu$ lを96穴マルチマイクロプレートウェル(Nunc, Denmark)に分注し、40分室温にて放置した後、マイクロプレートリーダー(MPR-A41, Toso, Japan)を用い、595nmの吸光度で測定し、標準曲線から試料のタンパク量を定めた。

##### 3) IL-1 $\beta$ 定量およびGM-CSFの定量

GCF試料のIL-1 $\beta$ 量、GM-CSF量は、BIOTRAKサイトカインELISAシステムキット(Amarsham, England)を使用し、enzyme-linked immunospecific assayにて測定した。

抗ヒトIL-1 $\beta$ またはGM-CSF抗体を固相化した96穴マイクロプレートに標準recombinantヒトIL-1 $\beta$ またはGM-CSF溶液およびGCF試料を加えて室温で2時間反応させた。プレート洗浄後、horseradish peroxidase(HP)標準抗ヒトIL-1 $\beta$ 抗体またはGM-CSF抗体を加えて2時間反応させた。再びプレート洗浄後、基質溶液を反応させ20分後反応を硫酸で停止させ、直ちに各ウェルの吸光度をマイクロプレート

リーダーを用い450nmで測定した。標準IL-1 $\beta$ またはGM-CSFの吸光度より標準曲線を作成し、試料の吸光度を対比させ試料中のIL-1 $\beta$ 、GM-CSFを求めた。

##### 4) MMP-8定量

GCF試料のMMP-8量はone-step sandwich EIA system(Fuji Chemical Industries, Japan)を使用して測定した。

抗MMP-8抗体をコートしたマイクロプレートに100  $\mu$ lのGCF試料を添加し、60分間室温で反応させた。プレート洗浄後、反応基質溶液を100  $\mu$ l加え、30分室温で反応させた後、100  $\mu$ lの硫酸で反応を停止させ、492nmの吸光度を測定した。

試料のMMP-8量は、標準MMP-8の吸光度より標準曲線を作成して求めた。

##### 5) 統計処理

タンパク量、IL-1 $\beta$ 量、MMP-8量、GM-CSF量の比較は、GCF量、probing depthとの間にはPearsonの相関関係を求め、GI、GBIの有意差検定にはStudent's-t testまたはMann-Whitney U testを用い、 $P < 0.05$ を有意差ありと判定した。

##### 6) GCFのアミノ酸分析

###### (1) GCF試料の調整

GCF試料を脱塩処理機マイクロコン(Amicon, Beverly, MA)と0.1% trifluoroacetic acid (TFA)で脱塩処置後、上清を加水分解管に回収し、液体窒素を用いて凍結乾燥を行った<sup>25)</sup>。その凍結乾燥物を6 N HCl 500  $\mu$ lで110°C24時間加水分解を行い、エバポレーターにてHClを除去し、80  $\mu$ lの蒸留水で溶解して、0.45  $\mu$ mミリポアフィルターで濾過したもの50  $\mu$ lをアミノ酸分析用試料とした。

###### (2) アミノ酸分析

アミノ酸分析は、高速自動アミノ酸分析機8500(Hitachi, Japan)を使用して行った。

標準アミノ酸として、ホスホセリン(P-ser)、アスパラギン酸(Asp)、スレオニン(Thr)、セ

リン (Ser), グルタミン酸 (Glu), グリシン (Gly), アラニン (Ala), バリン (Val), シスチン (Cys), メチオニン (Met), イソロイシン (Ile), ロイシン (Leu), チロシン (Tyr), フェニールアルニン (Phe), ハイドロキシリジン (Hyl), リジン (Lys), ヒスチジン (His), アルギニン (Arg), ハイドロキシプロリン (Hyp), プロリン (Pro) の20種類のアミノ酸を用いた。

なお、血清を標準パターンとして分析した。

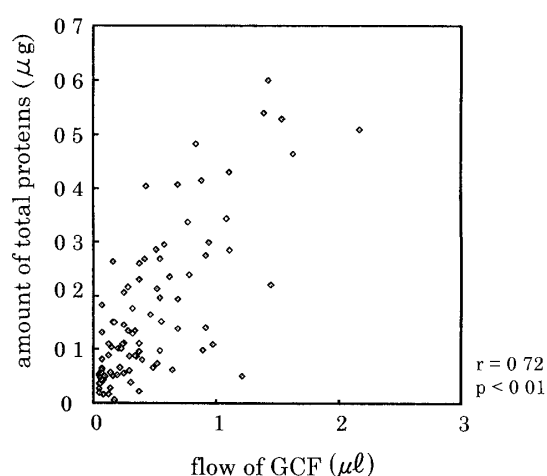


Fig 1 Scatter diagram of 80 sites, according to the flow of GCF and amount of total proteins in GCF

Amount of total proteins in GCF correlated with the flow of GCF ( $r=0.72$ ,  $p<0.01$ )

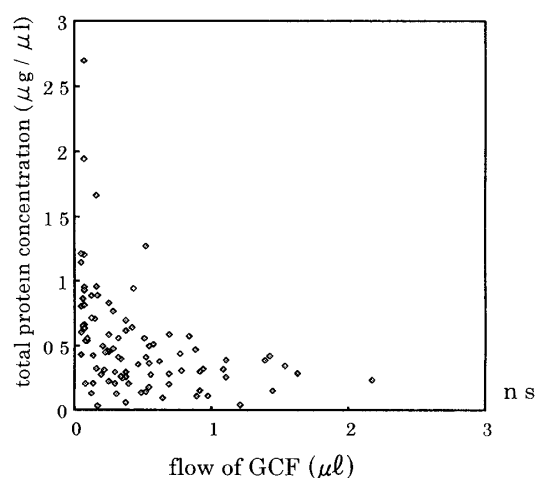


Fig 2 Scatter diagram of 80 sites, according to the flow of GCF and total protein concentration in GCF

No correlation was found between total protein concentration and flow of GCF in inflamed crevices

分析されたアミノ酸を1000残基あたりに換算し、アスパラギン酸, スレオニン, セリン, グリタミン酸, プロリン, グリシン, アラニン, バリン, メチオニン, イソロイシン, ロイシン, チロシン, フェニールアラニン, ヒスチジン, リジン, アルギニンの順に記録して rose-diagram を作製した。

## 結 果

### 1. タンパク量と臨床診査項目の関係について

#### 1) GCF量とタンパク量の関係

タンパク量はGCF量の増加に伴い有意に増加し、両者間には正の相関が認められた ( $r=0.76$ ,  $p<0.01$ ) (Fig. 1)。

#### 2) GCF量とGCF量あたりのタンパク濃度の関係

GCF量あたりのタンパク濃度 ( $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) は、GCF量との間には相関関係が認められず、GCF量の増加に伴いやや減少して収束する傾向が認められた (Fig. 2)。

#### 3) GIとタンパク量の関係

タンパク量は、歯肉炎指数 (GI) の指数の増加とともに有意に高い値を示した。GI 0 と 1,

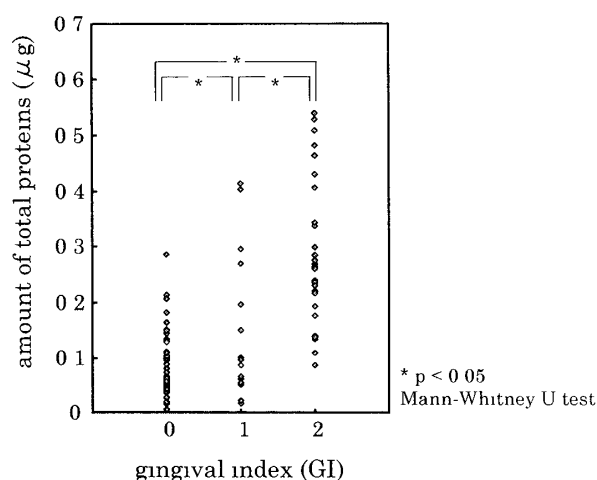


Fig 3 Scatter diagram of 80 sites, according to the gingival index (GI) and amount of total proteins in GCF

Significant difference between GI and amount of total proteins in GCF was positive at the  $p<0.05$

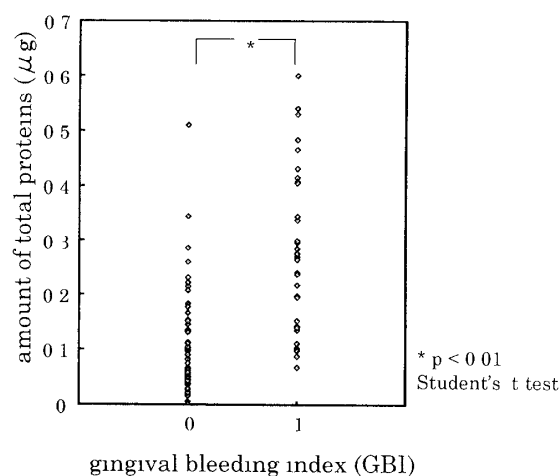
1と2, 0と2間で有意差 ( $p < 0.05$ ) を認めた (Fig 3)。

#### 4) GBIとタンパク量との関係

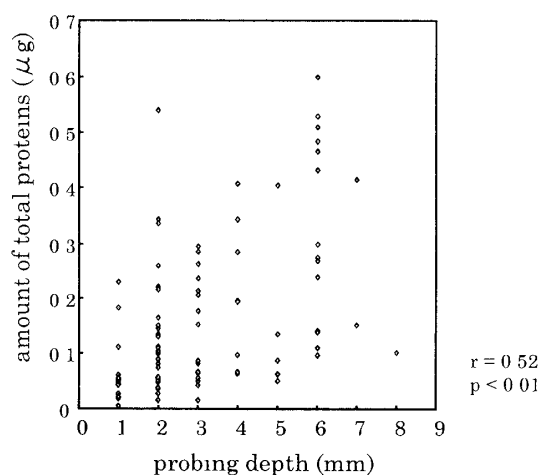
GBI 1 の部位のタンパク量は, GBI 0 の部位と比較して有意に高い値を示した ( $p < 0.01$ ) (Fig 4)。

#### 5) probing depthとタンパク量との関係

タンパク量はprobing depthとの間に相関



**Fig 4** Scatter diagram of 80 sites, according to the gingival bleeding index (GBI) and amount of total proteins in GCF  
Significant difference between GBI and amount of total proteins in GCF was positive at the  $p < 0.01$



**Fig 5** Scatter diagram of 80 sites, according to the probing depth and amount of total proteins in GCF  
Amount of total proteins in GCF correlated with the probing depth ( $r = 0.72$ ,  $p < 0.01$ )

( $r = 0.52$ ,  $p < 0.01$ ) が認められた (Fig 5)。

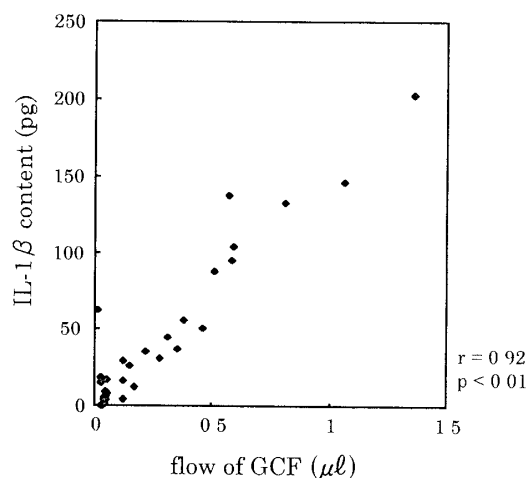
#### 2. IL-1 $\beta$ 量と臨床診差項目の関係

##### 1) GCF量とIL-1 $\beta$ 量との関係

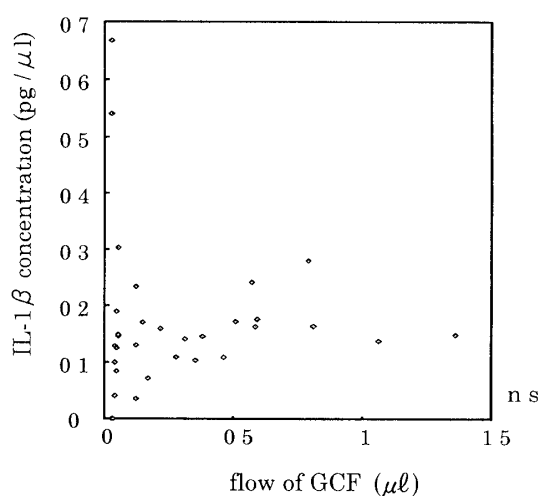
GCF量とIL-1 $\beta$ 量との間には正の相関 ( $r = 0.92$ ,  $p < 0.01$ ) が認められ, GCF量の増加とともにIL-1 $\beta$ 量は有意に増加した (Fig 6)。

##### 2) GCF量とGCF量あたりのIL-1 $\beta$ 濃度との関係

GCF量あたりのIL-1 $\beta$ 濃度 ( $\text{pg}/\mu\text{l}$ ) とGCF



**Fig 6** Scatter diagram of 33 sites, according to the flow of GCF and amount of IL-1 $\beta$  content in GCF  
IL-1 $\beta$  content in GCF correlated with the flow of GCF ( $r = 0.92$ ,  $p < 0.01$ )



**Fig 7** Scatter diagram of 33 sites, according to the flow of GCF and IL-1 $\beta$  concentration in GCF  
No correlation was found between IL-1 $\beta$  concentration and flow of GCF in inflamed crevices

量との間には、相関関係が認められなかった (Fig. 7)。

### 3) GIとIL-1 $\beta$ 量の関係

IL-1 $\beta$ 量は、GIの指数が高くなるに伴い、有意に高い値を示し、GIと1、1と2、0と2との間で有意差 ( $p < 0.01$ ) を認めた (Fig. 8)。

### 4) GBIとIL-1 $\beta$ 量との関係

GBI 1のIL-1 $\beta$ 量は、GBI 0と比較して有意に高い値 ( $p < 0.01$ ) を示した (Fig. 9)。

### 5) probing depthとIL-1 $\beta$ 量の関係

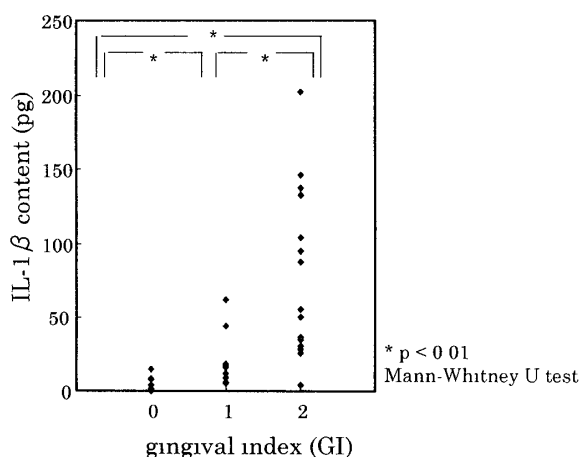


Fig 8 Scatter diagram of 33 sites, according to the GI and IL-1 $\beta$  content in GCF  
Significant difference between GI and IL-1 $\beta$  content was positive at the  $p < 0.01$

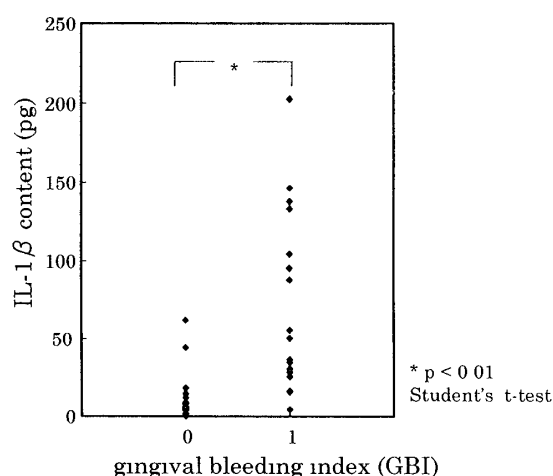


Fig 9 Scatter diagram of 33 sites, according to the GBI and IL-1 $\beta$  content in GCF  
Significant difference between GBI and IL-1 $\beta$  content was positive at the  $p < 0.05$

IL-1 $\beta$ 量とprobing depthとの間には、正の相関 ( $r = 0.65$ ,  $p < 0.01$ ) が認められた (Fig. 10)。

### 3. MMP-8量と臨床診査項目の関係について

#### 1) GCF量とMMP-8量の関係

GCF量とMMP-8量との間には正の相関 ( $r = 0.58$ ,  $p < 0.01$ ) が認められた (Fig. 11)。

#### 2) GCF量とGCF量あたりのMMP-8濃度の関係

MMP-8濃度 ( $\text{ng}/\mu\ell$ ) とGCF量との間には、負の相関 ( $r = -0.77$ ,  $p < 0.01$ ) が認められ

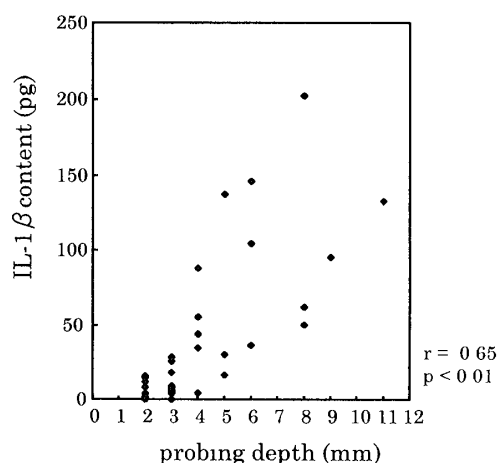


Fig 10 Scatter diagram of 33 sites, according to the probing depth and IL-1 $\beta$  content in GCF  
IL-1 $\beta$  content in GCF correlated with the probing depth ( $r = 0.65$ ,  $p < 0.01$ )

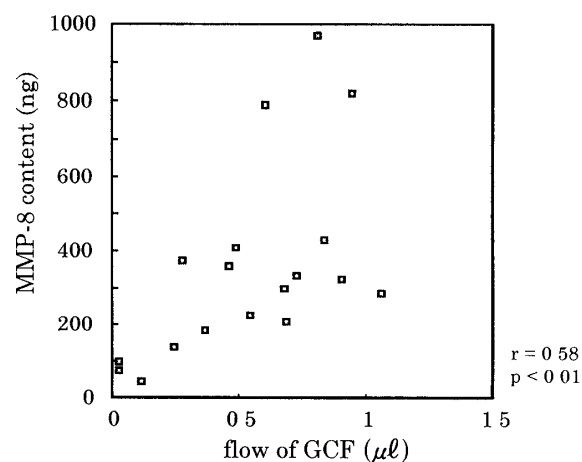


Fig 11 Scatter diagram of 20 sites, according to the flow of GCF and MMP-8 content in GCF  
MMP-8 content in GCF correlated with the flow of GCF ( $r = 0.58$ ,  $p < 0.01$ )

た (Fig 12)。

### 3) GIとMMP-8量の関係

GI 2 の場合MMP-8量は, GI 1 と比較して有意に高い値を示した ( $p < 0.01$ ) (Fig 13)。

なお, GI 0 の場合, MMP-8量は検出限界(19 ng) 以下であった。

### 4) GBIとMMP-8量との関係

GBI 1 の場合のMMP-8量は, GI 0 の場合と比較して有意に高い値 ( $p < 0.01$ ) を示した

(Fig 14)。

### 5) probing depthとMMP-8量の関係

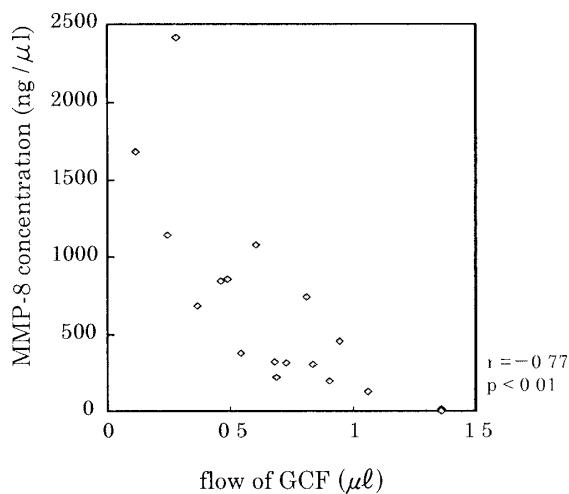
MMP-8とprobing depthとの間に相関は認められなかった (Fig 15)。

## 4. 歯肉溝滲出液中のGM-CSF量について

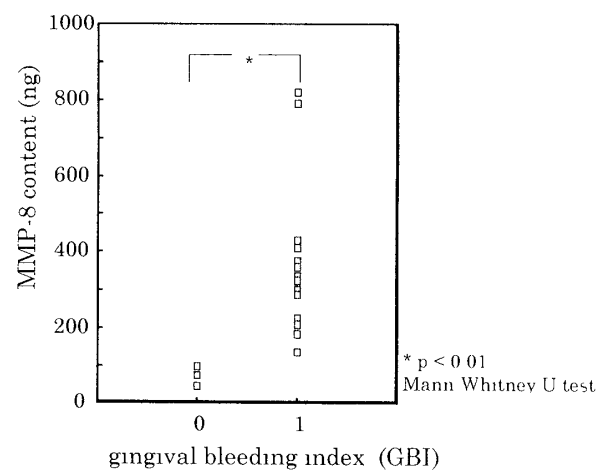
GCF中およびヒト血清中のGM-CSF量は検出限界 (7.6pg) 以下であった。

## 5. GCFのアミノ酸分析

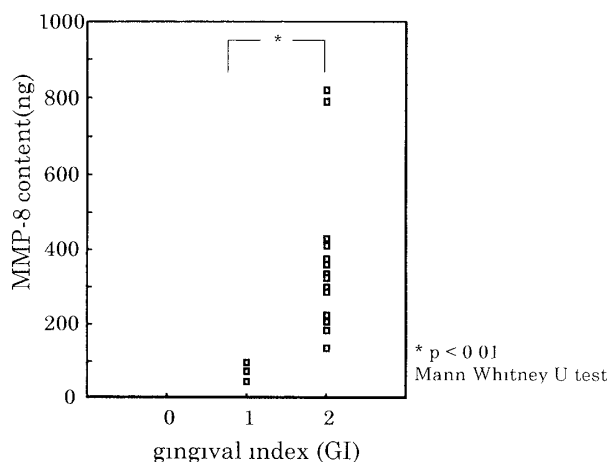
### 1) ハイドロキシプロリンの検出



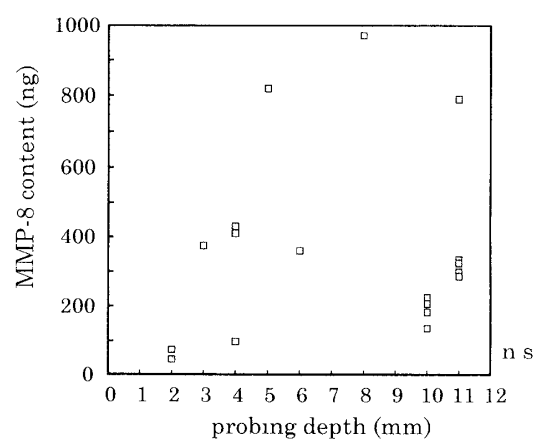
**Fig 12** Scatter diagram of 20 sites, according to the flow of GCF and MMP-8 concentration in GCF  
MMP-8 concentration in GCF correlated with the flow of GCF ( $r = -0.77$ ,  $p < 0.01$ )



**Fig 14** Scatter diagram of 20 sites, according to the GBI and MMP-8 content in GCF  
Significant difference between GBI and MMP-8 content was positive at the  $p < 0.01$

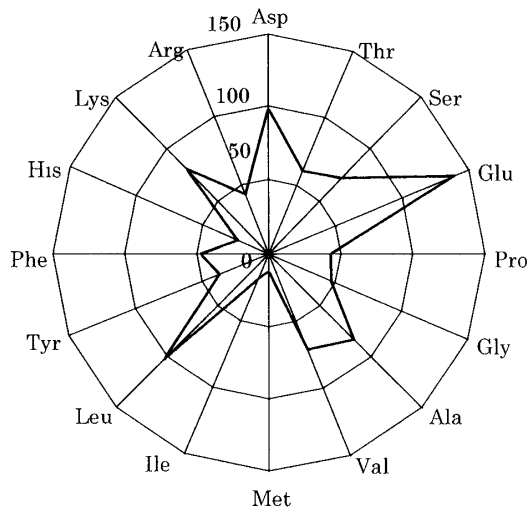


**Fig 13** Scatter diagram of 20 sites, according to the GI and MMP-8 content in GCF  
Significant difference between GI and MMP-8 content was positive at the  $p < 0.01$



**Fig 15** Scatter diagram of 20 sites, according to the probing depth and MMP-8 content in GCF  
No correlation was found between MMP-8 content in GCF and probing depth





	Asp	Thr	Ser	Glu
res/1000res	93 38	60 43	71 58	138 84
	Pro	Gly	Ala	Val
res/1000res	43 11	47 09	83 21	71 01
	Met	Ile	Leu	Tyr
res/1000res	11 62	17 93	102 91	36 86
	Phe	His	Lys	Arg
res/1000res	47 34	23 48	81 02	43 05

Fig 16 Rose-diagram of amino acid component in human serum (res/1000res)

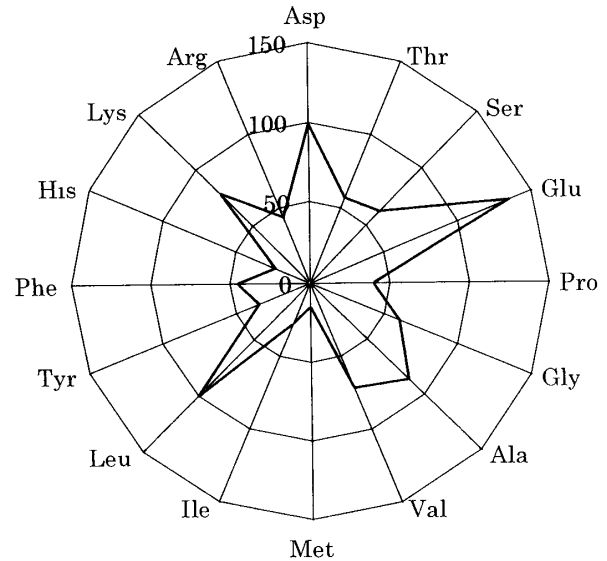
すべての部位でヒドロキシプロリンは検出限界 ( $0.001 < \text{残基}/1000\text{残基}$ ) 以下のレベルであった。

## 2) GCFとアミノ酸の関係について

GCFおよびヒト血清アミノ酸組成をrose-diagramにより解析した結果、初診時にGCF量が多く歯肉の炎症所見が強い歯周炎から採取したGCF (GCF量 $1.36\mu\text{l}$ , GI 2, GBI 1) のアミノ酸組成は、血清に類似したパターンが認められた (Fig. 16, 17)。

歯周ポケットの臨床診査時、probingによる出血が認められず、病態が比較的安定していると考えられる部位では、血清やポケット活動性が高いと考えられた部位とは著しく異なるパターンがみられた (Fig 18, 19)。

また各アミノ酸の比率を検討するとメチオニン、ロイシン、チロシン、フェニールアラニン、ヒスチジン、リジン、アルギニンの比率はすべ



	Asp	Thr	Ser	Glu
res/1000res	99 18	57 04	62 11	135 42
	Pro	Gly	Ala	Val
res/1000res	39 61	60 52	86 57	71 62
	Met	Ile	Leu	Tyr
res/1000res	14 89	27 52	100 11	34 57
	Phe	His	Lys	Arg
res/1000res	45 46	23 46	78 54	43 79

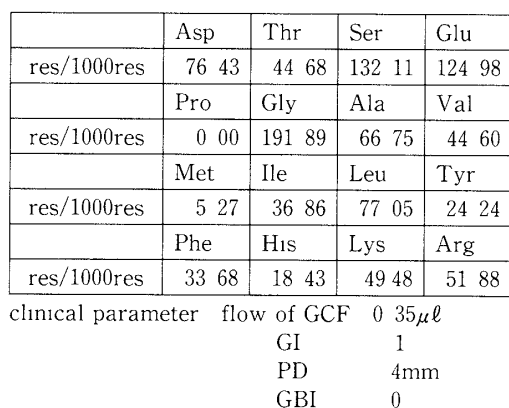
clinical parameter flow of GCF 1.36 $\mu\text{l}$   
GI 2  
PD 11mm  
GBI 1

Fig 17 Rose-diagram of periodontitis with severe inflammation (res/1000res)

ての患者ではほぼ一定であったが、アスパラギン酸、セリン、グルタミン酸、プロリン、グリシン、アラニンのレベルは症例により変化がみられ、特にグリシンは炎症の強い症例に比べ1.5倍以上の検出率を認めた。

## 考 察

歯周組織の病的変化を反映する歯肉溝や歯周ポケットに滲出するGCFは<sup>26)</sup>、全身疾患における血液、尿と同様に歯周組織の病態を反映する情報源と位置付けることができ、GCFに含まれる歯周組織由来の酵素、サイトカイン、代謝産物を測定して、歯周組織の病態との関連を調べることは、歯周疾患の病因解明に有益な情報を



与えてくれると考えられる。

A radar chart showing the relative concentrations of 16 amino acids in the plasma of a patient with a plasma amino acid concentration of 150 mg/dl. The chart has 16 axes representing different amino acids: Asp, Thr, Ser, Glu, Pro, Gly, Ala, Val, Met, Ile, Leu, Tyr, Phe, His, Lys, and Arg. Concentric circles are drawn at 50, 100, and 150 mg/dl. The data points for each amino acid are connected by a line. The concentrations are generally low, with most values below 50 mg/dl, except for Glu and Gly which are around 100 mg/dl.

Amino Acid	Relative Concentration (mg/dl)
Asp	~10
Thr	~10
Ser	~10
Glu	~100
Pro	~10
Gly	~100
Ala	~10
Val	~10
Met	~10
Ile	~10
Leu	~10
Tyr	~10
Phe	~10
His	~10
Lys	~10
Arg	~10

	Asp	Thr	Ser	Glu
res/1000res	105 89	45 51	103 55	151 62
	Pro	Gly	Ala	Val
res/1000res	29 36	141 18	77 60	45 94
	Met	Ile	Leu	Tyr
res/1000res	2 24	28 25	74 29	24 62
	Phe	His	Lys	Arg
res/1000res	34 85	19 40	59 96	37 95

clinical parameter    flow of GCF    0.22  $\mu$ l

GI    1

PD    4mm

GBI    0

成について、rose-diagramによるパターン解析を行った。

## 1. GCF中のタンパク量について

GCFはBrill<sup>27)</sup>をはじめ、今野<sup>28)</sup>、末田<sup>29)</sup>、原<sup>30)</sup>、Cimasoni<sup>31)</sup>、Kowashiら<sup>32,33)</sup>の報告があり、古くから多数の先駆者によって研究が進められてきた。とくに滲出液量の増減は、歯周組織の炎症と相関することが報告され、歯周組織の病態を表す指標と考えられている。

GCFのタンパク量測定はHattinghら<sup>34)</sup>がMcKnight法<sup>35)</sup>で定量している。今回、著者は、より簡便で鋭敏なBradfordのdye-binding assay法でGCF中のタンパク量を測定し、さらに微量のGCF試料でもタンパク量の測定が可

能であることを示した。また、GCF中のタンパク量は、GCF量、GI、GBIという炎症状態を表すパラメーターと正の相関あるいは有意差が認められ、probing depthとは比較的低い相関を示した。このことから、GCF中のタンパク量は歯周組織の炎症を把握する指標となることが示唆され、タンパクの構成成分を検索することは診断に有用であると思われる。

## 2. GCF中のIL-1 $\beta$ 量について

IL-1 $\beta$ は免疫応答、炎症反応の増幅因子であるとともに骨吸収作用を有するサイトカインで<sup>36-43)</sup>、歯周組織では、主に線維芽細胞やマクロファージより産生される<sup>42)</sup>。

今回、GCF中のIL-1 $\beta$ 量はGCF量、GI、GBIという炎症状態を表す臨床指標と正の相関あるいは有意差が認められ、さらにprobing depthとも相関性が認められた。

歯周組織中のIL-1 $\beta$ を産生する細胞は、線維芽細胞、マクロファージなど極めて多岐に及び、また、IL-1 $\beta$ は炎症の場合のみならず組織治癒の場合においても重要な役割を有していることから、IL-1 $\beta$ は歯周組織の炎症に反映して増加する有用な生化学的指標となることが示唆された。

## 3. GCF中のMMP-8量について

GCF中のプロテアーゼに関してはカテプシンD<sup>44,45)</sup>、コラゲナーゼ<sup>32,44)</sup>、エラスターゼ<sup>44)</sup>の活性が歯周組織の炎症とともに増加するという報告がある。また、歯周組織とコラゲナーゼの関連を調べた研究としては、ヒト歯肉の抽出液中に間質型コラゲナーゼ活性が認められたという報告<sup>46)</sup>や、抗ヒトコラゲナーゼポリクローナル抗体を用いた免疫組織化学的方法によって炎症歯肉に、その由来は不明であるがコラゲナーゼを同定したという報告がある<sup>46)</sup>。この酵素はI型コラーゲンの $\alpha 1$ 鎖の775-776残基グリシン-イソロイシン間、 $\alpha 2$ 鎖の775-776残基グリシン-ロイシン間の特定の位置で切断し、TC<sup>A</sup>

(3/4断片)およびTC<sup>B</sup>(1/4断片)を形成する能力を有し、コラーゲンの分解に関与していると考えられている<sup>9)</sup>。今回の実験ではGCF中のコラゲナーゼの由来細胞に関しては好中球由来のコラゲナーゼが優位であるという報告をもとに<sup>47)</sup>、MMP-8の定量を部位ごとに測定した。

本実験の結果、GCF中のMMP-8量はGCF量と正の相関が認められ、また、GI、GBIにおいても有意差が認められた。このことから、MMP-8量は歯周組織の炎症の程度を反映していると考えられる。しかし、probing depthとの間には相関性が認められなかった。probing depthは歯周組織破壊の結果、付着機構の喪失を主に示す臨床指標であることが確認された。以上より、GCF中のMMP-8量は歯周組織の炎症に応じて増加し、炎症性破壊の過程を示す1つの指標となる可能性が示唆された。

## 4. GCF中のGM-CSF量について

GM-CSFはT細胞、単球・マクロファージ、線維芽細胞、血管内皮細胞、NK細胞、肥満細胞などによって産生されるサイトカインである<sup>15)</sup>。好中球をGM-CSFでプライミングすると刺激に対する反応が増強され、membrane ruffling adhesion proteinの発現・脱顆粒・寿命の延長が認められる<sup>16)</sup>。炎症組織内は、好中球が増加していることからGCF中にGM-CSFの存在が考えられたが、GM-CSFはGCF中測定限界(76pg)以下であった。これは、GM-CSFはサイトカインネットワークに含まれているもののGCF中には微量のため検出がむずかしいことが考えられた。

## 5. GCFのタンパク濃度、IL-1 $\beta$ 濃度、MMP-8濃度について

GCF量とGCF中のタンパク濃度は相関がみられなかったが、GCF量の増加とともにやや減少傾向を示した。これにより、GCF量が増加しても一定濃度のタンパクが増加するのではなく、血管の拡張および血流の亢進の結果、血清

や組織液などが多くなることが考えられた。

GCF中のIL-1 $\beta$ 濃度は、GCF量が増加してもほぼ一定の濃度であった。IL-1 $\beta$ は、組織破壊や創傷治癒でも増加することから、GCF中にはIL-1 $\beta$ が炎症の状態にかかわらず、一定の濃度で放出されていることが考えられた。

しかし、GCF中のMMP-8濃度は、IL-1 $\beta$ の場合と異なり、GCF量の増加とともに減少したという結果が得られた。すなわち、直接歯周組織破壊に関わると考えられるMMP-8量は必ずしも炎症性滲出量と同様な消長を示さないと考えられる。

Kowashiら<sup>48)</sup>は、ヒトの実験歯肉炎での研究で好中球の歯肉溝への遊出とGCFの滲出とは同時に起こることが多いが、互いに独立した現象であると報告した。本実験の結果より直接、歯周組織の破壊に関わると考えられるMMP-8量は総量としては必ずしも炎症性滲出液量と同じ増減を示さず、GCF中のMMP-8濃度はGCF量の増加とともに減少したことから、GCF中のMMP-8量は、好中球の遊出と同様にGCF量と独立して増減を示す可能性が推測された。

## 6. GCFのアミノ酸分析について

ヒトGCFのアミノ酸組成の分析に関しては、従来ほとんど報告が認められず、アミノ酸自動分析機を用いた研究では、わずかにSyryanenら<sup>49)</sup>が5例の重度の歯周炎患者と健常者で、また、寺井ら<sup>50)</sup>が12名の成人性歯周炎患者のGCFについて分析を行っているのみである。

歯周疾患に罹患している部位の歯周ポケットのGCF中ではコラーゲナーゼ活性が増大していることが報告されていることから<sup>51)</sup>、GCF中には、遊離したコラーゲン構成アミノ酸の濃度が上昇していることが予想された。コラーゲンのアミノ酸組成の特徴は、グリシンが1/3、プロリンとヒドロキシプロリンが1/4を占めるとともに他のタンパクには認められないヒドロキシリジンが存在する<sup>52)</sup>。しかし、今回行った実験

においても、これまでの報告と同様にGCF中にヒドロキシプロリンは検出されなかった。これは、歯周組織の破壊が極めて短期間に起こりその瞬間が追従できにくいこと、また組織中ではヒドロキシプロリンのクリアランスが速やかに行われる可能性や、GCF中のヒドロキシプロリンの絶対量が少なく検知されなかったことが考えられた。Syryanenら<sup>49)</sup>の報告と比べて今回の実験結果では、プロリンは比較的高率で検出され、またグリシンは歯肉の炎症所見が強い部位より病態が比較的稳定していると考えられる部位のほうが1.5倍以上の検出率を認め、病態の違いによりアミノ酸組成には差が認められた。

今回の研究より、rose-diagram解析によるGCFのアミノ酸組成は、炎症の違いにより差が認められたことから、歯周疾患の病態を特徴づける可能性が示唆された。

## 結 論

本研究は、GCFを試料とした歯周疾患の病態解析を試みることを目的とし、GCF量および含有するタンパク量、GCF中の好中球型コラーゲナーゼであるMMP-8量、歯槽骨吸収因子であるIL-1 $\beta$ 量、顆粒球刺激因子であるGM-CSF量の定量、コラーゲン構成成分であるアミノ酸の検出をアミノ酸分析を行い以下の結果が得られた。

1. GCF中のタンパク量はGCF量と相関が認められた。さらに、GIの0と1、1と2、0と2間で有意差 ( $P < 0.05$ ) が認められ、またGBIの0と1間で有意差 ( $P < 0.01$ ) が認められた。しかし、probing depthとは比較的低い相関であった。以上より部位ごとに採取した微量試料であるGCF中のタンパク量は定量可能であり、歯周組織の炎症状態に反映することが示唆された。
2. GCF中のIL-1 $\beta$ 量はGCF量と高い相関が認

められた。さらに、GIの0と1, 1と2, 0と2間で有意差 ( $P < 0.01$ ) が認められ、またGBIの0と1間で有意差 ( $P < 0.01$ ) が認められた。また、probing depthと相関が認められた。以上より部位ごとに採取した微量試料であるGCF中のIL-1 $\beta$ 量は定量可能であり、歯周組織の炎症状態、さらに組織破壊に反映することが示唆された。

3. GCF中のMMP-8量は正の相関が認められた。さらに、GIの1と2間で有意差 ( $P < 0.01$ ) が認められ、またGBIの0と1間で有意差 ( $P < 0.01$ ) が認められた。probing depthとは相関は認められなかった。MMP-8濃度はGCF量の増加とともに減少したことからMMP-8量が必ずしもGCF量と同様の消長を示さず、GCF量とMMP-8量は独立した増減を示す可能性が示唆された。
4. GCF中のGM-CSFはGCF, ヒト血清中、ともに測定限界 (7.6pg) 以下であった。このことからGM-CSFはサイトカインネットワークに含まれているもののGCF中には微量のため検出がむずかしいことが考えられた。
5. GCFのアミノ酸分析の結果、歯周疾患罹患部位のGCF中では好中球型コラゲナーゼ活性が増大していることから、遊離したコラーゲン構成アミノ酸の増加が予想され、アミノ酸分析を試みたが、ハイドロキシプロリンは検出限界以下であった。これは、歯周組織破壊が極めて短期間に起こり、また、ハイドロキシプロリンのクリアランスが速やかに行われ、GCF中の絶対量が少なく検知されなかったことが考えられた。しかし、アミノ酸組成に炎症の違いによる差が認められたことから歯周疾患の病態を特徴づける可能性が示唆された。

以上より、本研究からGCF中のタンパク量、IL-1 $\beta$ 量、MMP-8量の検出およびアミノ酸分析は部位特異性の歯周疾患の病態を把握するため

の、新たな歯周疾患の診断法として有用であることから示唆された。

## 謝 辞

稿を終えるにあたり、終始懇切なる御指導と御校閲を賜りました本学口腔生化学講座、市田篤郎教授ならびに口腔病理学講座、賀来亨教授に厚く御礼申し上げます。さらにアミノ酸分析の实地にあたり御助力を戴きました北海道大学生化学講座、滝田裕子技官に深謝いたします。最後に本研究に御理解と御支援を戴きました本学歯周治療学教室教室員各位に心から御礼申し上げます。

## 文 献

- 1) Haffajee, A D, Socransky, S S and Goodson, J M Periodontal disease activity J Periodont Res 17 521-522, 1982
- 2) Goodson, J 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
- 3) Haffajee, A D, Socransky, S S and Goodson, J M Comparison of different data analysis for detecting changes in attachment level J Clin Periodontol 10 298-310, 1983
- 4) 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
- 5) Curtis, M A, Gillett, I R, Griffiths, G S Detection of high-risk groups and individuals for periodontal disease J Clin Periodontol 16 1-11, 1989
- 6) Egelberg, J Cellular elements in gingival pocket fluid Acta Odont Scand, 21 283-287, 1963
- 7) Attstrom, R Presence of leukocytes in crevices of healthy and chronically inflamed gingivae J Periodont Res 5 48-55, 1970
- 8) Ishikawa, I, Cimasoni, G Partial purification of a neutral protease from human polymorphonu-

- clear leukocytes and its proteolytic effect on immunoglobulin G Archs oral Biol 23 933-940, 1978
- 9) Birkedal-Hansen, H, Moore, W G I, Bodden, M K, Windsor, L J, Birkedal-Hansen, B, Decarlo, A, Engler, J A Matrix metalloproteinase, A review Clin Reviews in Oral Biology and Medicine 4 197-250, 1993
- 10) 白川文彦, 安部美穂子, 山下優毅・インターロイキン1 (IL-1) 臨床免疫 27・18-28, 1995
- 11) 小野崎菊夫・インターロイキン1 (IL-1) 日本臨床 53 771-774, 1995。
- 12) 後藤文正・インターロイキン1—炎症・免疫反応にかかわる多面的機能分子— 蛋白質 核酸 酵素 33・1728-1741, 1988
- 13) Ferdner, B D, Reinhardt, R A, Garbin, C P, Seymour, G J, Casey, J H Histological evaluation of interleukin-1 $\beta$  and collagen in gingival tissue from untreated adult periodontitis J Periodont Res 29 54-61, 1994
- 14) Ohshima, M, Otsuka, K, Suzuki, K Interleukin-1 $\beta$  stimulates collagenase production by cultured human periodontal ligament fibroblasts J Periodont Res 29 421-429, 1994
- 15) 奈良信雄・GM-CSF 臨床免疫 27・202-211, 1995
- 16) 木村文彦, 元吉和夫 顆粒球—マクロファージコロニー刺激因子 (GM-CSF) 日本臨床 53・806-809, 1995
- 17) Fullmer, H M and Gibson, W Collagenolytic activity in gingivae of man Nature 209 728-729, 1966
- 18) Page, R C, Altman, L C, Eversole, J L, Vandesteen, G E, Dahlberg, W H Williams, B L, Osterberg, S K Rapidly progressive periodontitis A distinct clinical condition J Periodontol 54 197-209, 1983
- 19) Bialt, J J and Mellonig, J T Radiographic evaluation of juvenile periodontitis (periodontosis) J Periodontol 58 321-326, 1987
- 20) Loe, H and Holm-Pedersen, P Absence and presence of fluid from normal and inflamed gingivae Periodontics 3 171-177, 1965
- 21) Golub, L M, Borden, S M and Kleinberg, I Urea content of gingival crevicular fluid and its relation to periodontal disease in humans J Periodont Res 6 243-251, 1971
- 22) Loe, H and Silness, J Periodontal disease in pregnancy I prevalence and severity Acta Odont Scand 21 533-551, 1963
- 23) Ainamo, J and Bay, I Problems and proposals for recording gingivitis and plaque Int Dent J 25 229-235, 1975
- 24) Bradford, M M A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding Anal Biochem 72 248-254, 1976
- 25) 山岸安子 試料の前処置 Medical Technology, 7 1143-1149, 1979
- 26) Loe, H Physiological aspects of the gingival pocket An experimental study Acta Odont Scand 19 387-395, 1961
- 27) Brill, N, and Krasse, B The passage of tissue fluid into the clinically healthy gingival pocket Acta Odont Scand 16 233-245, 1958
- 28) 今野寿一・歯槽膿漏症患者, 盲嚢内容物のペーパークロマトグラフィーによる検索 口病誌 27 392-410, 1960
- 29) 末田 武 歯肉嚢内に流出する体液について (重量およびニンヒドリン陽性物質について) 口病誌 29・269-280, 1962
- 30) 原 耕二 歯肉嚢内の膿と滲出液の糖について 口病誌 30・239-253, 1963
- 31) Cimasoni, G The crevicular fluid Monographs in Oral Science 3 92-99, 1974
- 32) Kowashi, Y, Jaccard, F, and Cimasoni, G Increase of free collagenase and neutral protease activities in the gingival crevice during experimental gingivitis in man Archs oral Biol 24 645-650, 1979
- 33) Kowashi, Y, Jaccard, F and Cimasoni, G Sulcular polymorphonuclear leucocytes and gingival exudate during experimental gingivitis in man J Periodont Res 15 152-158, 1980
- 34) Hattings, J and Ho, E The concentration of proteins in human gingival crevicular fluid J Periodont Res 15 90-95, 1980
- 35) McKnight, G S A colorimetric method for the determination of submicrogram quantities of protein Anal Biochem 78 86-92, 1977
- 36) Oppenheim, J J and Gery, I, Interleukin 1 is more than an interleukin Immunol Today, 3

- 113-118, 1982
- 37) Dinarello, C A Interleukin-1 and the pathogenesis of the acute-phase response *N Eng J Med* 311 1413-1418, 1984
- 38) Gowen, M, Wood, D D, Ihrie, E J, McGuir, M K B and Russel, R G G An interleukin-1 like factor stimulates bone resorption in vitro *Nature* 306 378-380, 1983
- 39) Charon, J A, Luger, T A, Mergenhagen, S E and Oppenheim, J J Increased thymocyte-activating factor in human gingival fluid during gingival inflammation *Infect Immun* 38 1190-1195, 1982
- 40) 飯山正夫・辺縁性歯周炎に対するインターロイキン1の関与 *日歯周誌* 28: 963-979, 1986
- 41) Ohmori, Y, Hasegawa, S, Amano, S, Miyoshi, T, Hirose, K and Kitano, S Spontaneous production of thymocyte-activating factor by human gingival fibroblasts and its autoregulatory effect on their proliferation *Infect Immun* 55 947-954, 1987
- 42) 後藤文正：炎症と免疫にかかわる多面的機能分子 インターロイキン1—その構造と生態防御における意義, 蛋白質 核酸 酵素, 33 1793-1802, 1988
- 43) Ohmori, Y, Honda, K, Kikuchi, H, Hasegawa, S, Amano, S, Hirose, K, Takeshita, A, Katoh, T and Kitano, S Inducing effect of periodontopathic bacteria on interleukin-1 production by mouse peritoneal macrophages *Oral Microbiol Immunol* 3 145-152, 1988
- 44) Cımasoni, G and Kowashi, Y Proteinases of the gingival crevice and their inhibitors In Lehner, T and Cımasoni, G (eds), *The Borderland between Caries and Periodontal Disease II* 31-49, Academic Press, London, 1980
- 45) Ishikawa, I, Cımasoni, G and Ahmad-Zadeh, C Possible role of lysosomal enzymes in the pathogenesis of periodontitis A study on cathepsin D in human gingival fluid *Archs oral Biol* 17 111-117, 1972
- 46) Uitto, V-J, Turto, H and Saxen, L Extraction of collagenase from human gingiva *J Periodont Res* 13 207-214, 1978
- 47) Sorsas, T, Suomalaime, K and Uitto, V-J The role of gingival crevicular fluid and salivary interstitial collagenase in human periodontal diseases *Archs oral Biol* 35 193-196, 1990
- 48) 小鷲悠典：実験歯肉炎と歯肉溝液の生化学的变化, 浜田茂幸 編集, う蝕と歯周病—研究の進歩—, 第1巻, p 249-269, 日本歯科評論, 東京, 1982
- 49) Syryanen, S M, Alakujala, L, Alakujala, P, Markkanen, S O and Markkanen, H Free amino acid levels in oral fluid of normal subjects and patients with periodontal disease *Archs oral Biol* 35 189-193, 1990
- 50) 寺井 浩, 日野出大輔, 萬好都美恵, 永田篤司, 佐藤 誠, 中村 亮：成人型歯周炎患者の歯肉溝浸出液中のトリプシン様酵素活性と遊離アミノ酸含量について *口衛誌* 41: 301-306, 1991
- 51) Gross J, and C M Lapiere Collagenolytic activity in amphibian tissue A tissue culture assay *Proc Natl Acad Sci* 48 1014-1022, 1962
- 52) 久保木芳徳：口腔組織のコラーゲンの生化学, 浜田茂幸 編集, う蝕と歯周病—研究の進歩—, 第2巻, p 199-243, 日本歯科評論, 東京, 1982