

## 総 説

## リソゾーム性プロテアーゼと歯周病診断

國松 和司

岩手医科大学歯学部歯科保存学第二講座

(主任：國松 和司 教授)

(受付：2003年11月4日)

(受理：2003年11月4日)

**Key Words** : lysosomal protease, gingival crevicular fluid, periodontal disease

## 1. はじめに

一般に、歯周疾患とは歯周組織に生じる病変の中から歯髓疾患に継発する根尖性歯周炎を除いた病変の総称である。歯周疾患の中で臨床的に最も多い病変は、歯肉に始まる炎症性疾患の歯肉炎と辺縁性の歯周炎である。歯周疾患の病因は、一般に局所因子と全身因子に分けられるが、局所因子の中の、特にプラーク細菌が重要である。歯周組織にプラーク細菌による感染が起こると炎症が生じ、付着上皮ならびに歯肉溝(歯周ポケット)上皮を經由して歯肉溝内に炎症性の滲出液が漏出し、それとともに好中球を主体とする炎症性細胞が遊走する<sup>1)</sup>。これらは細菌に対して貪食作用を有し、生体防御の重要な役割を果たしている<sup>2)</sup>が、その反面、それらが破壊されると、リソゾーム内のプロテアーゼ(蛋白質分解酵素)が細胞外に放出され、歯周組織を破壊すると考えられている<sup>3-4)</sup>。このリソゾームは、1層の脂質蛋白質膜に囲まれた70種以上の加水分解酵素を含む細胞内小器官で、細胞内外より取り込まれた蛋白質をジペプチドや

アミノ酸にまで分解して、リソゾーム外に放出する。また、線維芽細胞や上皮細胞、さらには骨芽細胞といった非炎症性の細胞からもプロテアーゼが放出されることも知られている。しかし、歯周疾患の発症ならびに進行過程で、いかなるプロテアーゼがどのように機能しているかなど、歯周組織の直接的破壊因子としてのプロテアーゼの機能の詳細についてはまだ不明の点が多い<sup>5)</sup>。そこで、歯周組織破壊のプロセスを理解するためには、これに關与するプロテアーゼの同定と定量ならびに歯周疾患の病態に伴う変化を調べることが必須の課題であると考えられる。従来からの臨床パラメーターに加えて、これら生化学的データに基づいた情報により現状の歯周組織破壊の程度と病変活動度を把握しうるし、また、的確な歯周治療を行う上できわめて重要であると考えられる。

これまでの歯周疾患とプロテアーゼに関する研究は宿主由来のプロテアーゼが主体であったが、歯周病原性細菌の研究の進歩とともに細菌由来のプロテアーゼも重視され、この方面の研

Lysosomal proteases and periodontal diagnosis

Kazushi KUNIMATSU

Department of Periodontology, School of Dentistry, Iwate Medical University

1-3-27 Chuo-dori, Morioka, Iwate 020-8505, Japan

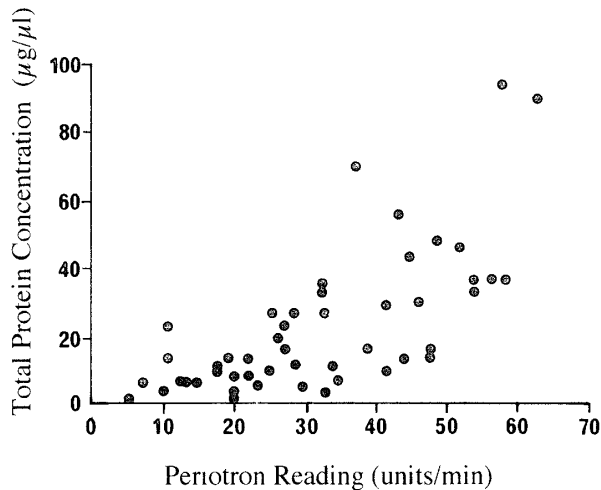


Fig. 1. Relationship between protein concentration and GCF volume. The GCF volume is expressed as Periotron<sup>TM</sup> units per minute. The protein concentration is increased with increasing the GCF volume. There is a positive correlation between them.

究も飛躍的に発展しつつある<sup>6-7)</sup>。しかし、筆者のこれまでの研究は一貫して宿主細胞由来のプロテアーゼに関するものであるため、本稿では細菌由来のプロテアーゼについては言及しないが、これがきわめて重要な課題であるという認識は十分に抱いている。

さて、本稿は薬剤誘発性歯肉増殖症における炎症性プロテアーゼの関連とならぶ筆者の重要なテーマである、歯周病による歯周組織破壊過程における宿主由来リソゾーム性プロテアーゼの役割ならびに歯周病診断への応用に関する研究をまとめたものである。検索対象はすべてヒトの歯肉溝滲出液であり、歯肉組織中のプロテアーゼの動態に関する筆者の研究に関しては文献を紹介するにとどめる。

## 2. 歯肉溝滲出液解析の意義と蛋白濃度

歯肉溝滲出液 (GCF) は歯肉溝上皮、付着上皮および歯の三者に囲まれた空間である歯肉溝または歯周ポケットに漏出する液体で、その液量は上皮結合組織中に存在する毛細血管から漏出する組織液量とリンパ管から回収される組織液量の差によって決定される<sup>4)</sup>と考えられている。歯肉が組織学的に健康な場合は、全くな

現すると、臨床的に炎症所見を認知するよりも早く、つまりサブクリニカルに GCF 量の増加が起こる<sup>8)</sup>。さらに、炎症の程度が強まると、この液量は増加する<sup>9)</sup>ことから GCF 量は歯周疾患による炎症の程度を知るための臨床パラメーターとして用いることが可能である<sup>10-11)</sup>。

一般に、GCF は簡易防湿後、ペリオペーパー<sup>TM</sup> (ProFlow, Inc., Amityville, NY) を歯肉溝内に静置して採取し、液量はペリオトロン 6000<sup>TM</sup> (ProFlow, Inc.) にて測定するが、本稿にみられる GCF の採取方法は他と若干の相違がある<sup>12)</sup>。つまり、これまでの報告の多くはペリオペーパー<sup>TM</sup>をやや抵抗を感じる位置まで挿入し、貯留滲出液を採取していたが、筆者は歯肉縁下約 1 mm の位置に 30 秒間挿入して貯留 GCF を吸湿除去し、その後ただちに新しいペーパーを同じ部位に 3 分間静置して新たに滲出してきた GCF を採取し、それを実験に使用している。これにより、歯肉に刺激を与えず、過去の炎症の結果に左右されにくい、現時点での微小環境下の歯周ポケットの状況を知ることが可能である。

さて、今回対象とした患者は、長崎大学歯学部附属病院第 2 保存科を受診し、本研究への参加に同意してくれた全身疾患を保有しない慢性歯周炎患者で、すべて同一検者が同一の方法にて臨床パラメーターの記録と GCF の採取を行ったものである。また、歯周組織の破壊は歯肉を始めとする歯周組織の蛋白質の破壊とも考えられ、その程度は GCF 蛋白の質的・量的成分分析により達成可能である<sup>13)</sup>。そこで、GCF の蛋白量を測定し、蛋白濃度を求めて、それが臨床パラメーターとして利用可能であるかについて調べた<sup>14)</sup>。結果を Fig. 1 に示す。これより、蛋白濃度と GCF 量の間には高い相関がみられ、GCF 量と同様に蛋白濃度も歯周炎の病勢を判定するのに重要な指標になることが示唆された。

## 3. 歯周組織破壊過程におけるリソゾーム性プロテアーゼの同定ならびに定量とその役割

### 1) リソゾーム性プロテアーゼ

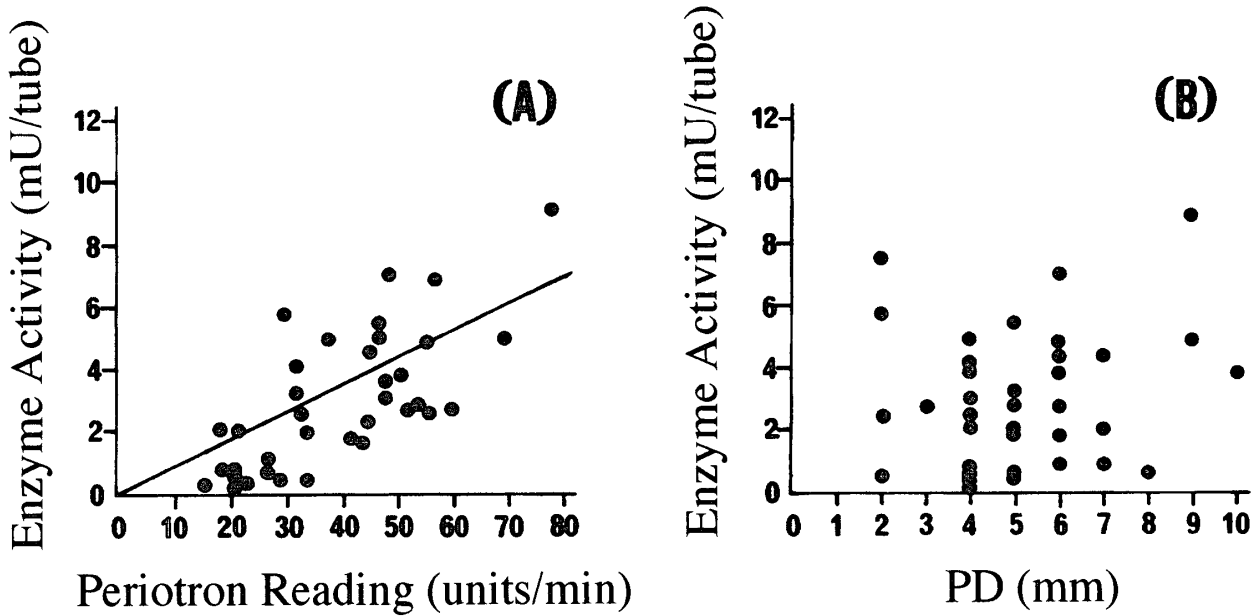


Fig. 2. The total cathepsin B activity in GCF as functions of GCF volume (A) and Probing Depth (PD) (B) in chronic adult periodontitis groups. The enzyme activities are expressed as values per 3-min sampling period.

歯周組織は、歯と歯肉溝上皮に集落を形成するさまざまな細菌と絶えず接触するため、炎症の認められる場合ばかりでなく、健康な時でも歯肉溝内に好中球が遊走し、細菌による感染から生体を保護するバリアー機構を備えている<sup>1,4,15)</sup>。これらの細胞の重要性は、好中球の減少や機能不全を有する人にしばしば重度の歯周炎を随伴する<sup>16-17)</sup>ことから明らかである。

しかし、本来、生体を防御すべき好中球も生体の制御機構からはずれたり、細胞死などによりその機能を失う時、それらの細胞成分が細胞外へ漏出し、宿主自身を傷害することが考えられる。事実、関節炎などでは、好中球から漏出したリソゾーム性プロテアーゼが病態の発現や進行と密接に関係していることが報告されている<sup>18)</sup>。

歯周疾患における歯周組織の破壊は、構成蛋白質の崩壊が主なものであり、プロテアーゼ、特にリソゾーム性プロテアーゼの関与が示唆される。一般に、プロテアーゼは酵素蛋白質の触媒機能を発現する部位である活性中心の特異性から、アスパルチックプロテアーゼ、システインプロテアーゼ、セリンプロテアーゼ、それにメタロプロテアーゼの4つに分類される。歯周

炎との関連で最も研究されているのはメタロプロテアーゼのコラゲナーゼ<sup>19-20)</sup>についてであるが、筆者はこれ以外の重要なプロテアーゼ、すなわち、システインプロテアーゼのカテプシンB, H, L, およびセリンプロテアーゼのカテプシンGとメダラシン(好中球エラスターゼ類似酵素)を対象とし、これらの歯周病との関連について研究している。

## 2) システインプロテアーゼの役割

システインプロテアーゼは、活性中心にシステイン残基を有するプロテアーゼの総称であり、中性からやや酸性に至適pHをもつ、細胞内蛋白質代謝に寄与している酵素群である<sup>21-22)</sup>。基質蛋白質やペプチドを分子内部から切断するエンドペプチダーゼと端から切断するエキソペプチダーゼに分類されるが、筆者の研究対象であるカテプシンB, HおよびLは、すべてエンドペプチダーゼに属する。これらの酵素を対象として、慢性歯周炎患者GCF中の動態について蛍光基質を用いた酵素活性により検索した<sup>23)</sup>(Figs. 2-4)。その結果、いずれの酵素も活性量はGCF量に比例して増加し、両者の間に非常に高い相関が認められた(それぞれ

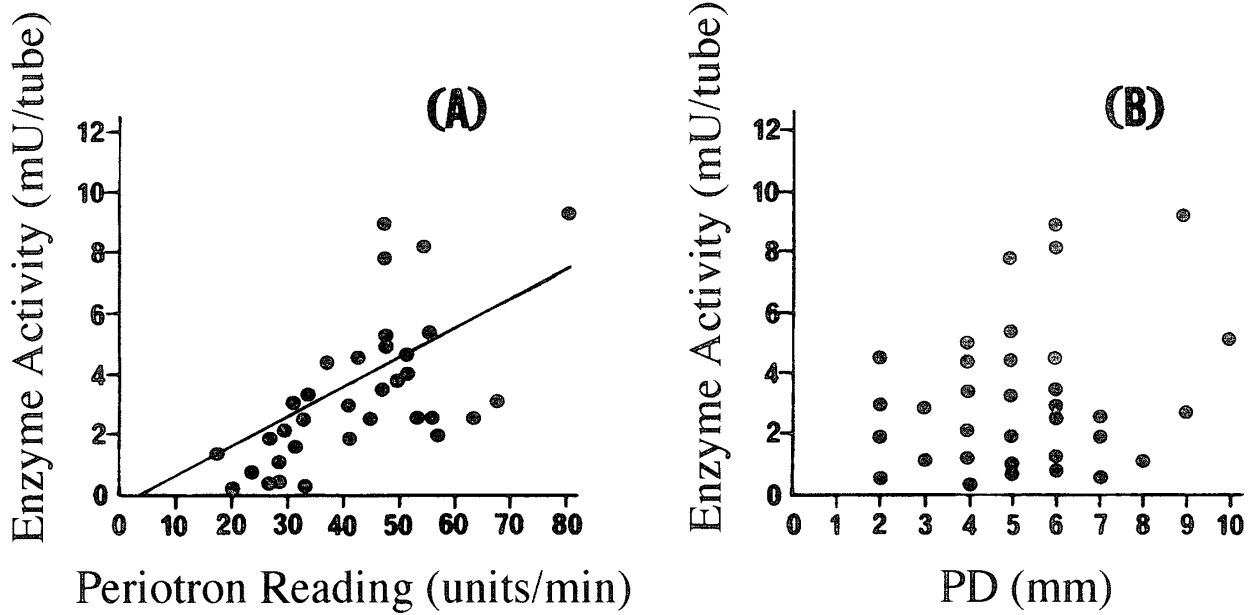


Fig. 3. The total cathepsin H activity in GCF as functions of GCF volume (A) and PD (B) in chronic adult periodontitis groups. Other details are the same as described in Fig. 2.

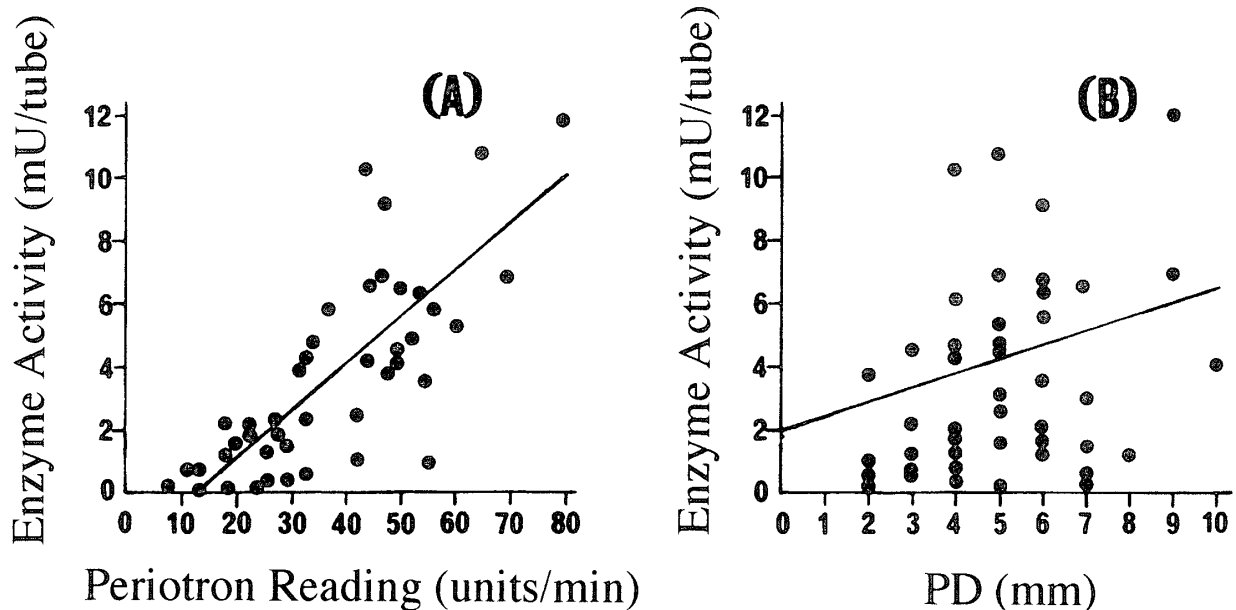


Fig. 4. The total cathepsin L activity in GCF as functions of GCF volume (A) and PD (B) in chronic adult periodontitis groups. Other details are the same as described in Fig. 2.

$r=0.71, 0.69, 0.77$ )。これに対し、もう一つの代表的な臨床パラメーターであるプロービングの深さ (Probing depth, PD) とは L が弱い相関がある以外、有意な相関はみられなかった。

これまで、さまざまな酵素の活性値と臨床パラメーターの関連について調べた研究は多い。その中で PD と相関があると報告された酵素の中には、アルカリフォスファターゼ<sup>24)</sup>、 $\beta$ -グルクロニダーゼ<sup>25)</sup>、エラスターゼ<sup>26)</sup>、カテプシン

D<sup>27)</sup> およびコラゲナーゼ<sup>28-29)</sup> などがある。本研究の結果との相違は、PD が過去の炎症における組織破壊の結果を表すもので、必ずしも現状における組織破壊の活性度を反映するものではない<sup>30)</sup> こと、および GCF の採取方法の差異によるものであろう。一方、GCF 量は歯周疾患の進行程度と相関がある<sup>4 8 9 31)</sup> ため、カテプシン B, H, L の酵素活性が GCF 量と相関することは、これらの酵素の動態を把握することによ

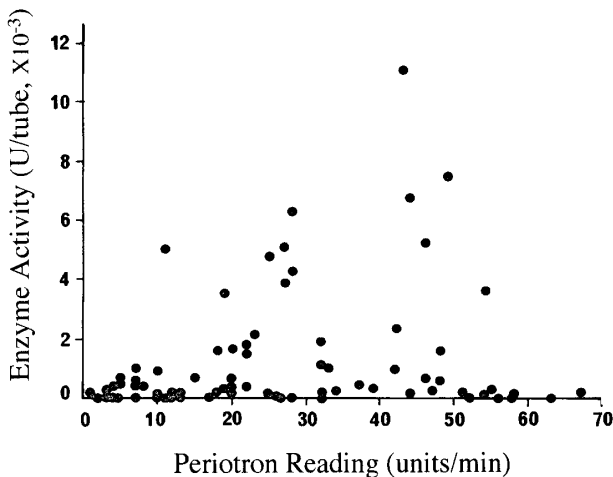


Fig. 5. The total elastase-like activity in GCF of chronic adult periodontitis patients as a function of GCF volume. The enzyme activity was assayed at pH 9 using Suc-Ala-Pro-Ala-MCA as a substrate and expressed as values per the 3-min sampling period.

り、歯周組織破壊の進行程度を知ることができることを示すものである。

本研究のように酵素活性を指標として研究を進める場合、それぞれの酵素を分別できる特異的基質の存在が必要である。しかし、今回用いた基質では、カテプシン B の基質以外は特異性に問題を残している<sup>32-34</sup>。この意味からも今後ますます特異基質の開発が望まれる。また、酵素活性とともに各酵素の特異抗体を用いた研究を同時に進める必要がある。この点で、共同研究者の市丸ら<sup>35</sup>によるヒト肝臓から精製したカテプシン B に対する特異抗体を用いた研究の結果は重要である。これによると、カテプシン B の酵素量（免疫定量値）は GCF 量と正の相関を示し、炎症の程度に従って増加した。また、筆者と同じ方法で測定した酵素の活性値は免疫定量値と一致したことから、カテプシン B に関しては活性測定単独でも酵素量を正確に把握できることが示唆された。

### 3) セリンプロテアーゼの役割

#### (1) 細胞内セリンプロテアーゼ

セリンプロテアーゼは活性中心にセリン残基 (His, Asp, Ser) をもち、中性付近に最適 pH

を有するプロテアーゼ群で、一般に活性基のセリン残基を化学修飾するジイソプロピルフルオロリン酸 (DFP) により不活性化されるエンドペプチダーゼの総称である。細胞内だけでなく細胞外にも幅広く存在し、凝固系、線溶系あるいは補体系における蛋白質分解に重要な役割を果たしている<sup>36</sup>。細胞内セリンプロテアーゼとしてはエラスターゼ、カテプシン G<sup>37-38</sup> やキマーゼ<sup>39</sup>などがよく知られている。

#### (2) メダラシンの動態

メダラシン (medullasin) は、赤芽球と顆粒球にのみ存在し、好中球エラスターゼに類似するがエラスチン分解能のない中性プロテアーゼ<sup>40</sup>で、炎症惹起作用を有している<sup>41</sup>ほか、リンパ球や単球の種々の機能の活性化<sup>42</sup>、ナチュラルキラー細胞の幼若細胞に直接作用して細胞障害作用をもつ成熟細胞に誘導する働きを有する<sup>43-44</sup>と言われている。好中球は歯周疾患の際、歯肉溝に最も多く存在する細胞であり、またリンパ球やナチュラルキラー細胞などの免疫担当細胞とも密接な位置関係にあるので、好中球に存在するメダラシンが歯周疾患やその進行過程でどのような挙動をとるのかは興味深い。

そこで、慢性歯周炎患者 GCF 中のメダラシンの動態をエラスターゼ酵素活性基質による酵素活性ならびに本酵素の特異抗体を用いた免疫定量により検索した<sup>45</sup>。その結果、メダラシンの酵素活性は GCF 量との間に有意な相関が認められなかった (Fig. 5)。これに対し、免疫定量値は Fig. 6 左パネルに示すように、初診時の歯周炎患者の GCF 中では液量の少ない段階 (ペリオトロン<sup>TM</sup>ユニット値で 20 程度までの範囲) では GCF 量に比例して増加するが、液量が中等度のレベル (ユニット値 25-30) で最高値に達し、その後は液量に関係なく酵素の最高値を維持した。この結果は、メダラシンが歯周炎の病状に比例して歯周ポケットに滲出してくるが、ある段階でプラトーに達し、新たに滲出してくるメダラシンと分解していく酵素との間に一定のバランスが生じたことを意味してい

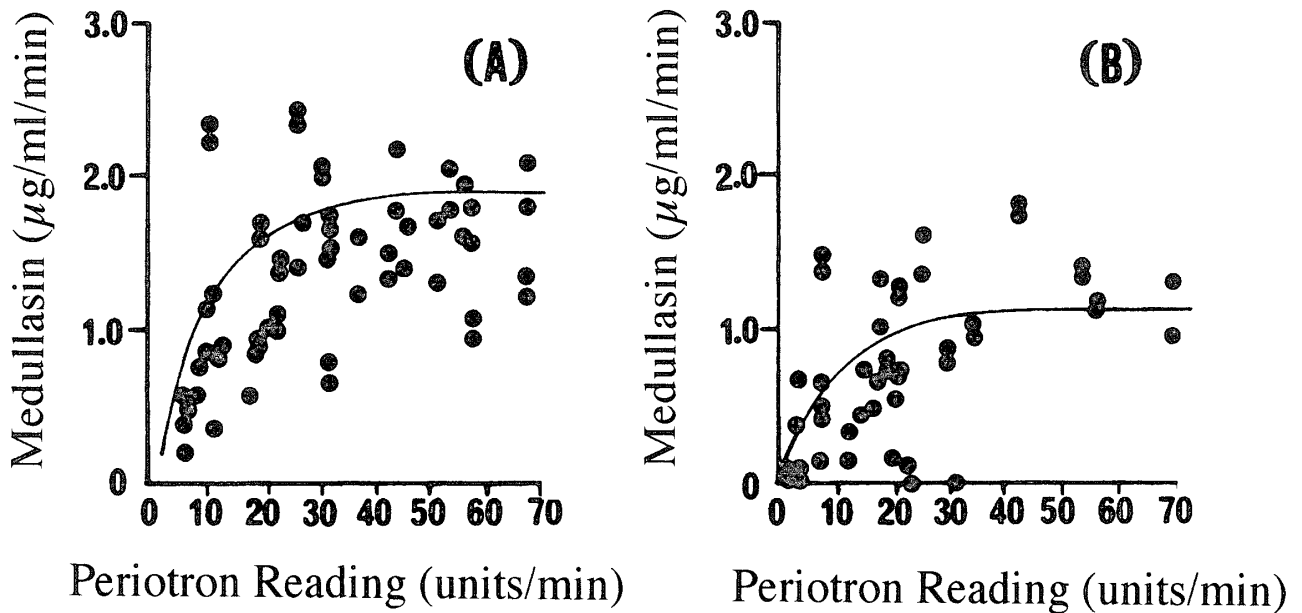


Fig. 6. The concentration of medullasin in GCF from periodontitis patients before (A) and after (B) initial periodontal treatment. The values are plotted as a function of the GCF volume.

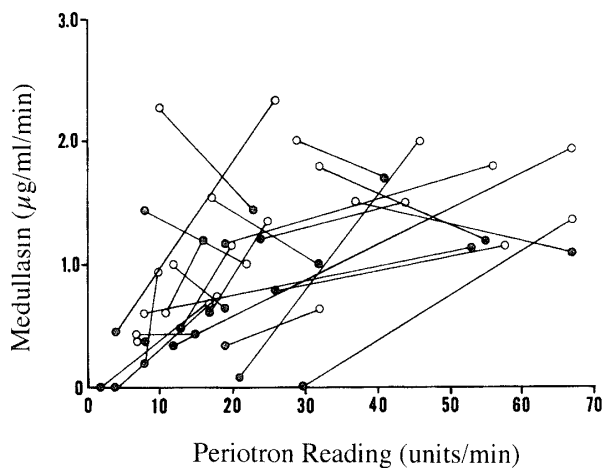


Fig 7 Changes in the quantity of GCF medullasin at the same sites of the identical periodontitis patients before (○) and after (●) initial periodontal treatment. The GCF samples were collected from the same sites of the identical patients and subjected to the enzyme immunoassay.

る。また、同じく Fig. 6 右パネルより、プラークコントロールおよびスケーリングを始めとする歯周基本治療を施すと GCF 中のメダラシン量は全体的に減少傾向を示すが、液量との関係は治療前と同様の滲出傾向を示した。すなわち、同じ GCF ユニット値であっても治療中のメダラシンの方が初診時のものより明らかに低値を示した。

さらに、同一患者の同一部位における治療前後の量的変化を図 7 に示すが、検討した対象部位の大部分が初診時に比べて治療下において明らかに低い GCF 量を示した。また、一部に治療中のものの方が初診時に比べ GCF 量の高い値を示すものもあるが、これらにおいてもメダラシン量は明らかに減少していた。歯周基本治療によりメダラシン量が著しく減少し、臨床症状の改善と一致したが、これらの結果は、慢性の歯周炎においてメダラシンは増悪期に増加し、緩解期に減少することを示しており、本疾患の進行と密接な関連があることを示唆するものと考えられた。

ここで、GCF 中に存在するメダラシンが顆粒球に存在する酵素と分子性状において一致しているかどうかを検討するために、免疫ブロッキングを施したところ、すべての試料で 32 kDa と 100kDa の位置にメダラシンが検出された(図省略)。この低分子のバンドは真性のメダラシンの位置を示し、高分子のバンドはおそらく血清中に多く存在する  $\alpha_1$ -プロテアーゼインヒビターと複合体を形成したものと考えられた。この複合体形成が歯周ポケット内で生じているのか、あるいは、実験操作の段階で生じているのかは不明だが、メダラシンが酵素活性測

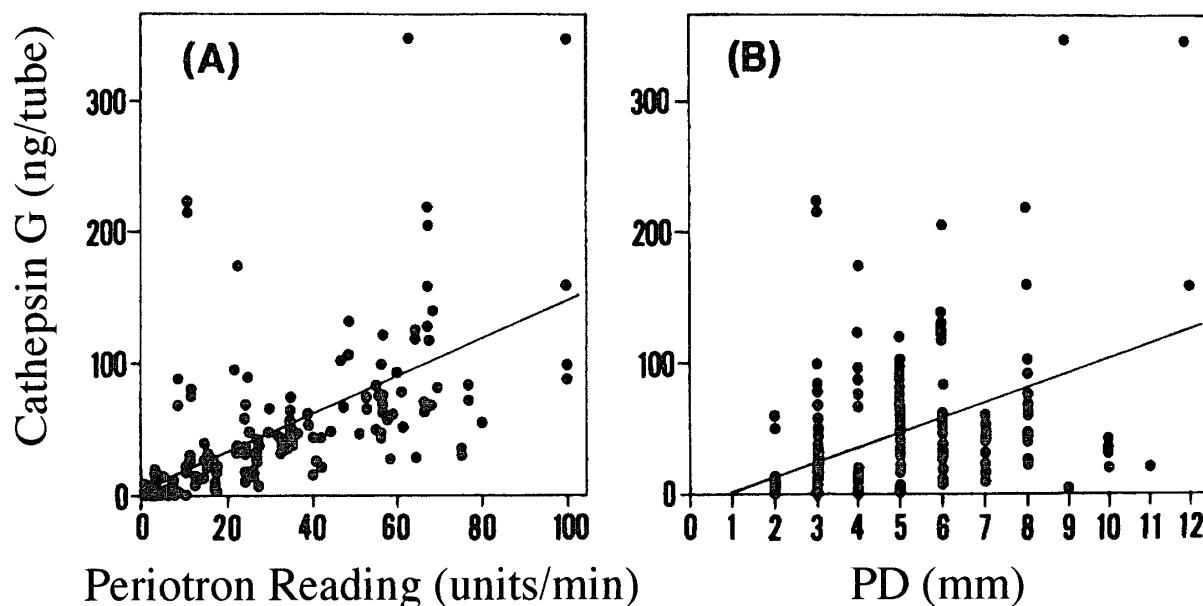


Fig 8. Relationships of cathepsin G levels in GCF from periodontitis patients to clinical parameters such as GCF volume and PD. Samples extracted from filter paper strips were subjected to the enzyme immunoassay.

定では十分に検出できない原因であるように思われた。しかし、Gustafsson<sup>46)</sup>は、ペリオペーパー<sup>TM</sup>を用いた GCF の採取では遊離の好中球エラスターゼの回収がほとんどゼロで、インヒビターと複合体を形成したエラスターゼだけが回収されると報告しており、活性型エラスターゼの検出のためには、今後、採取方法の検討も必要とされるであろう。

以上より、好中球エラスターゼやメダラシンの正確な測定には、現時点では免疫定量が望ましいことが理解され、同時に免疫定量値は病状の把握や治療効果の判定に有効であることも示唆された。

### (3) カテプシン G の動態

カテプシン G は顆粒球のアズール顆粒中に活性型として貯蔵されているキモトリプシン型酵素で、遺伝子構造は好中球エラスターゼに類似している。分子量は26–30kDa<sup>37)</sup>で、本酵素は常にエラスターゼとともに分泌され、コラーゲン<sup>47)</sup>、エラスチン<sup>48)</sup>、フィブロネクチン<sup>39)</sup>やプロテオグリカン<sup>49)</sup>などの分解を通して肺気腫や炎症性疾患と深い関連をもつことが報告されている。そこで、同じセリンプロテアーゼのメダ

ラシンと同様に、GCF 中のカテプシン G の定量を行った。本酵素はメダラシンと同様に酵素活性値としては GCF 量と PD のいずれとも有意な相関が認められなかった (図省略)<sup>50)</sup>。

そこで、本酵素の分子性状を調べるために免疫ブロッティングを施すと、カテプシン G の真性の淡いバンドとともに、蛋白濃度の大きい高分子のバンドが検出された。分子量の検定より、この高分子バンドがインヒビターである  $\alpha_1$ -プロテアーゼインヒビター<sup>51)</sup>との複合体である可能性が示唆されたため、次に  $\alpha_1$ -プロテアーゼインヒビターの免疫ブロッティングを行うと、カテプシン G における同様の蛋白バンドが検出されたことから、両者が複合体を形成して GCF 中に存在することが示された (図省略)。

さらに、Fig. 8 に示すように、カテプシン G の免疫定量値は PD ともわずかだが相関するが、それより大きく GCF 量と比例して存在することから、歯周病の病勢に比例して GCF 中に存在し、宿主防御機能を果たしていることが示唆される。しかし、カテプシン G が細胞外に放出された場合、本酵素の基質特異性の低い特徴を考慮すると歯周組織破壊の一因となってい

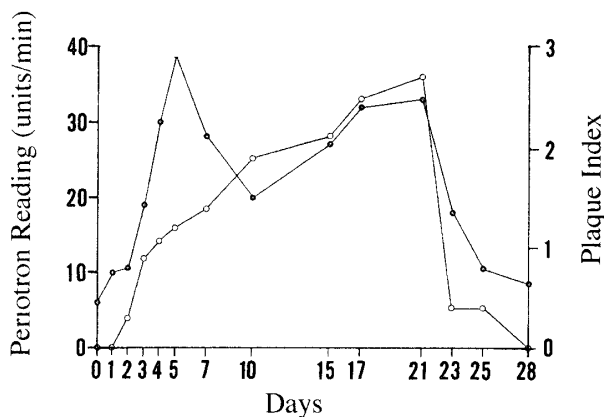


Fig. 9. Changes in the quantity of plaque index (○) and GCF volume (●) during the period of no oral hygiene. The fluid was sampled at the indicated days from experimental gingivitis subjects who are instructed to refrain from all oral hygiene measures for 21 days.

る可能性もある。いずれにせよ、カテプシンGが歯周炎の症状に比例して増加することは重要であり、また、酵素活性よりも免疫定量の方が、本酵素の動態をよく反映することが理解された。

#### 4. ヒト実験的歯肉炎における各種プロテアーゼの動態

##### 1) 実験的歯肉炎

数多くの疫学的研究より、歯周疾患の病因としてプラーク細菌が重要視されてきたが、それを実験的に完全に証明したのはLöeら<sup>52)</sup>である。彼らは臨床的に歯周組織に炎症のみられないボランティアに対し、歯口清掃を完全に停止させることにより歯肉炎を惹起できることを証明した。ヒトを対象として惹起させる実験的歯肉炎は、歯肉炎の発症モデルとして重要であるばかりでなく、一般炎症の発症モデルとしても注目されている。そこで筆者も、この方法を用いて歯肉炎の発症段階におけるリソゾーム性プロテアーゼの動態を、炎症性プロテアーゼであり、中性プロテアーゼのメダラシンとカテプシンGを用いて検索した<sup>45, 50)</sup>。

##### 2) 実験期間中の臨床病態と歯肉溝滲出液量の変化

##### (1) 実験的歯肉炎の計画

インフォームドコンセントの得られた歯周疾患のみられない、全身的にも健康な長崎大学歯学部学生6名(全員男性, 平均年齢25.7歳)をボランティアとして、すべての歯口清掃を3週間停止させることにより、全員に歯肉炎を惹起することができた。歯口清掃再開時に歯石の除去を含む徹底的な歯面の清掃を施し、1週間経過を観察した。実験期間中、経日的に被検者の6前歯歯肉の臨床パラメーターの採得ならびに歯肉溝よりGCFを採取し、量の測定とともに酵素の定量を行った。

##### (2) プラーク付着指数および歯肉炎指数の経日的変化

実験期間中のプラーク付着指数(Plaque Index)<sup>53)</sup>およびGCF量の関係についてFig. 9に示す(病態写真および歯肉炎指数のデータは省略)。歯口清掃停止3日目頃より歯垢の付着が明らかとなり、21日目まで漸次増加して行くのに対し、GCF量は直後より増加し、5日目頃にピークを迎え、その後いったん減少した後、10日目頃より漸次増加していった。歯口清掃を再開すると歯垢の付着は完全になくなり、GCF量もほとんど計測されなくなった。また、図には示さないが、歯肉の炎症は歯垢の付着より少し遅れ、3-5日目頃に明らかとなり、その後わずかに増加していく傾向が観察された。歯口清掃再開後1週間で炎症所見はみられなくなり、実験前と同じレベルにまで回復した。以上の結果より、歯垢の付着が肉眼で認められる前にGCF量は増加し、歯肉の炎症所見が最も遅く明らかとなり、逆に、歯口清掃再開とともにGCF量の急激な減少が生じ、歯肉炎の臨床的治癒が最も遅いことが理解された。

##### (3) 歯肉溝滲出液の典型的な滲出パターン

歯口清掃を停止すると、歯垢の付着に伴いGCF量は増加するが、Fig. 10に示すように大きく分けて3通りの滲出パターンが存在することが明らかとなった。すなわち、GCF量のピー



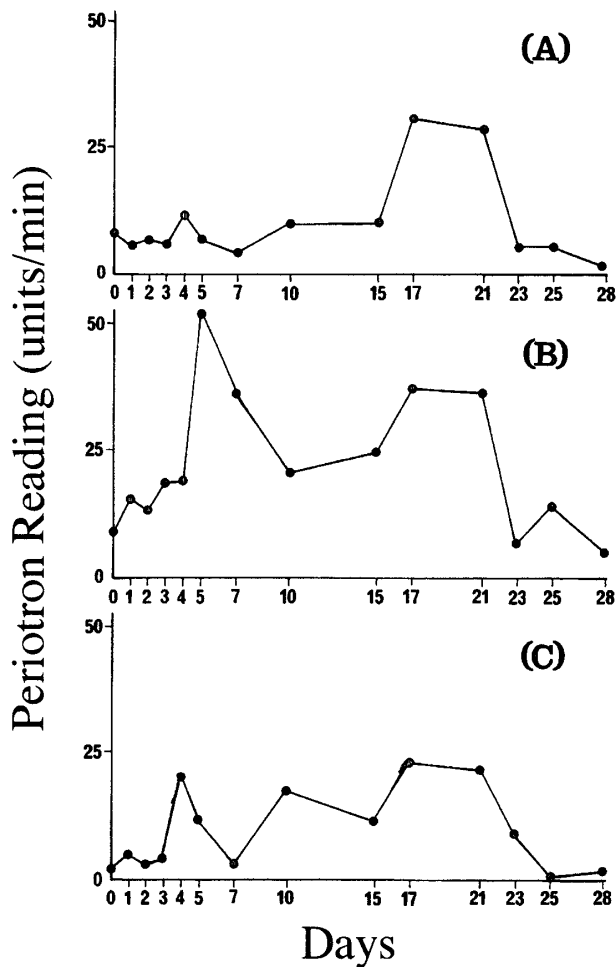


Fig. 10. Changes in gingival fluid flow in the experimental gingivitis subjects. The profiles A, B and C represent about 20%, 65% and 15% of the total exuding profiles of GCF, respectively.

クが1個で歯口清掃停止21日目頃にみられるもの(A), ピークが2個あり, 3~5日目と21日目頃にみられるもの(B), さらに, ピークが3個あり, 3-5日目, 10日目および21日目頃にみられるもの(C)である。これらの存在比率はそれぞれ20%, 65%, 15%であった。また, 歯口清掃を再開すると, いずれの場合でも GCF 量は著明に減少し, 2日間でほぼ正常の値となった。

これまで, 実験期間中の GCF 量の変化について個々の部位を単独で経日的に追求したものはきわめて少なく, 今回の研究で3通りのパターンが存在することが明らかとなったが, このパターンの相違の理由については不明のままである。しかし, 歯垢の付着に伴う生体の応答にも個々の部位により変化がみられるという事

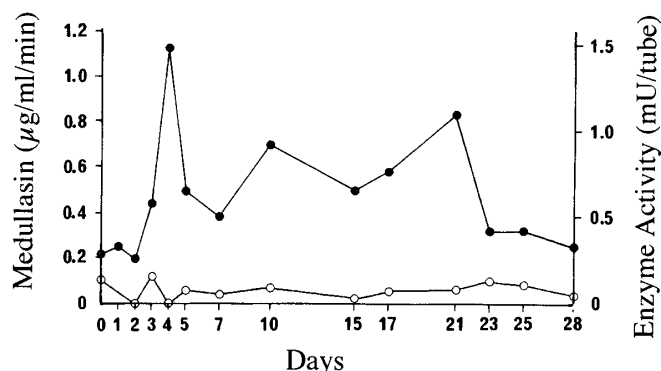


Fig. 11. Changes in the quantity of GCF medullasin (●) and elastase-like activity (○) during the period of no oral hygiene. The fluid was sampled at the indicated days from experimental gingivitis subjects.

実は, 歯周疾患の部位特異性という概念と相まってきわめて興味深い所見である。

#### (4) メダラシンの動態

メダラシンの動態について酵素活性を指標に検索した<sup>45)</sup>。しかし, ほとんど活性型としては検出できなかったため, 本酵素の特異抗体を用いた免疫定量にて調べた。結果を Fig. 11に示す。メダラシンは歯口清掃停止期間中, 3相性の滲出パターンを示して GCF 中に見いだされた。すなわち, 最初のピークは3~4日目頃に現れ, この時の酵素量は実験期間中最大を示した。その後, 一度急速に減少した後, 7日目頃より再び増加し始め, 歯口清掃停止最終日まで増加し続けた。このようにして増加した GCF 中のメダラシンは, 歯口清掃を再開することにより急速に減少し, 25日目(歯口清掃再開4日目)には正常のレベルにまで回復した。さらに, 本酵素は炎症の経過に従って3相性の滲出パターンを示したが, この傾向は Fig. 10で示した GCF 量パターンには影響を受けていなかった。また, 歯肉炎の発症のきわめて初期の段階で検出されたメダラシン量は, Fig. 6で示したように, 慢性の歯周炎患者でもかなり重度の臨床症状を示す段階のものに匹敵していた。

これらの結果より, 歯肉炎発症の初期の段階と慢性歯周炎の段階ではメダラシンの発揮する

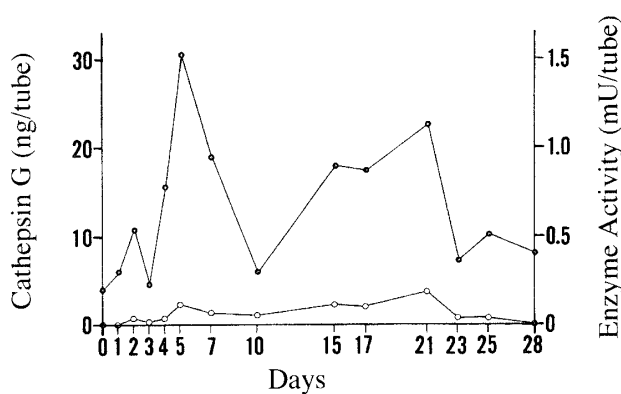


Fig 12. Changes in the quantity of GCF cathepsin G (●) and cathepsin G-like activity (○) during the period of no oral hygiene.

機能は異なっているかもしれないが、少なくとも本酵素が生体防御機構の一つとして歯肉炎発症の過程で何らかの重要な役割を担っていることが推測された。

#### (5) カテプシン G の動態

メダラシンの場合と同様に、実験的歯肉炎被検者の歯肉溝より GCF を採取し、酵素量を測定した<sup>50)</sup>。しかし、Fig. 12に示すように、メダラシンと同様に本酵素も活性型としてはほとんど検出できなかった。一方、免疫定量値は GCF 量と有意な相関がみられ、歯肉溝への滲出パターンはメダラシンと同様であった。カテプシン G が活性型として検出できない理由は、メダラシンの場合と同様にカテプシン G の供給源でもある好中球の歯肉溝への遊出とともに、これらのインヒビターも歯肉溝に滲出するため、ペリオペーパー<sup>TM</sup>に回収された時点で、あるいは測定の間活性が抑制されたためと推測される。また、前述したようにペリオペーパー<sup>TM</sup>を用いた採取方法自体にも問題があるのかも知れない。しかし、カテプシン G やメダラシン (エラスターゼ) がたとえ測定時にはインヒビターと複合体を形成して酵素活性を失っていたとしても、両酵素は細胞外に放出された段階で瞬時に機能を発揮する<sup>54)</sup>ので、歯肉溝において炎症惹起作用を始め、多彩な生理活性を果たしていることが容易に想像できる。

*in vitro* の研究では、プライミングされた好中球からカテプシン G とエラスターゼ (メダラシン) が放出されるが、その際、カテプシン G の方が若干放出に時間を要するとも考えられており、両酵素は炎症の場で必要とされる生理機能に微妙な差があり、そのため経日的観察では両酵素の滲出の仕方に差がみられたのかも知れない。また、今回は紹介しなかったが、リゾゾーム性プロテアーゼの慢性歯周炎および薬剤誘発性歯肉増殖症の歯肉組織中の動態も重要な研究課題で、筆者はカテプシン B、カテプシン G およびメダラシンを主な対象として、それらの組織中での同定および分布を通して病態生理学的役割について研究している<sup>35-37)</sup>。これらの酵素が生体防御と組織破壊の両面で重要であることを生化学的のみならず病理組織学的側面からも解析することの重要性を再認識している。

#### 5. まとめ

今回検索対象としたシステインプロテアーゼのカテプシン B は、至適 pH が酸性領域ではあるが、ほぼ中性領域でも機能を発揮するため、炎症の場でも生理活性を発揮できる。これに対し、カテプシン G やメダラシンは中性領域に至適 pH を有し、保有細胞が非常に限られているため炎症反応との関連のみを指摘されるが、近年、カテプシン G はヒト皮膚マスト細胞にもみいだされ<sup>58)</sup>、アレルギー反応を含む炎症以外の機能をも有する可能性が示唆されている。事実、薬剤誘発性歯肉増殖症の研究において、カテプシン G が歯周組織のマスト細胞に発現していることを筆者は確認している<sup>59)</sup>。現時点で機能の詳細は不明のままだが、多彩な機能を有する本酵素の新たな機能についても今後研究を進めたい。

一方、メダラシンは塩基配列において好中球エラスターゼときわめて高い相同性を有し、機能も類似しているため、両者は同一の酵素ではないかと考えられたこともある。メダラシンはカルボキシル末端に好中球エラスターゼより 20 個多いアミノ酸残基を有しているが、他の塩基配列は同一である。その微妙な構造上の差異が

エラスチン分解能を喪失している原因かも知れないが、詳細は不明で結論は出ていない。いずれにせよ両酵素はともに重要で、歯周炎の局所で重要な役割を果たしていることは間違いない。歯周炎患者の歯肉溝滲出液中にみられ、炎症惹起作用や免疫調節作用を有するこの酵素が、本稿では紹介しなかったが歯肉組織中でも同定され、一部は脱顆粒様の所見を呈しながら炎症性細胞に見いだされることは、本酵素の本疾患における重要な役割を示唆するものであり、さらなる生理機能の解明とともに、防御と破壊の両面での、局所における存在意義の解明についても今後の研究の課題としたい。

これまで、宿主由来のリソゾーム性プロテアーゼの歯周疾患との関連について、生化学的手法を用いて検索してきた。本稿で紹介したプロテアーゼはシステインプロテアーゼのカテプシン B, H, L, セリンプロテアーゼのカテプシン G および好中球エラスターゼ類似酵素のメダラシンであり、いずれも慢性歯周炎患者および実験的歯肉炎被検者の歯肉溝滲出液中に認められ、そのいずれもが歯周炎の病態と密接な関連を有しながら、局所にて機能していることが示唆された。

謝辞：稿を終えるにあたり、本稿を執筆する機会を与えてくださりました岩手医科大学歯学会、歯学会雑誌編集委員長の佐藤方信教授ならびに関係者各位に心から謝意を表します。また、実験の基礎から終始ご指導を頂き、現在も共同研究を続けてくださる九州大学大学院歯学研究院の山本健二教授に深謝致します。さらに、本稿の編集に際し、種々ご協力くださった歯科保存学第二講座の八重柏隆講師、藤本淳助手、遠藤憲行助手ならびに小塚雅孔医員に厚くお礼申し上げます。最後に、本稿に記載した研究成果の多くは、実践女子大学生活科学部青木洋祐教授および長崎大学大学院医歯薬学総合研究科の尾崎幸生助手の協力のもとに遂行されたことを付記し、感謝の意を表します。

## 文 献

- 1) Attström, R.: Presence of leukocytes in crevices of healthy and chronically inflamed gingivae. *J. Periodont. Res.* 5 : 42-47, 1970.
- 2) Miyasaki, K.T.: The neutrophil. Mechanisms of controlling periodontal bacteria. *J. Periodontol.* 62 : 761-774, 1991.
- 3) Ishikawa, I., Cimasoni, G., Ahamad-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.
- 4) Cimasoni, G.: Crevicular Fluid Updated. In: *Monographs in Oral Science* (Myers H.M., ed.). Basel-Kager, 1-152, 1983.
- 5) Sandholm, L.: Proteases and their inhibitors in chronic inflammatory periodontal disease. *J. Clin. Periodontol.* 13 : 19-26, 1986.
- 6) Kadowaki, T., Kitano, S., Baba, A., Takii, R., Hashimoto, M., Katunuma, N., Yamamoto, K.: Isolation and characterization of a novel and potent inhibitor of Arg-gingipain from *Streptomyces* sp. strain FA-70. *Biol. Chem.* 384 : 911-920, 2003.
- 7) 門脇知子, 瀧井良祐, 馬場貴代, 山本健二: 歯周病とジンジパイン, *日本薬理学雑誌*, 122 : 37-44, 2003.
- 8) Løe, H., Holm-Pedersen, P.: Absence and presence of fluid from normal and inflamed gingivae. *Periodontics* 3 : 171-177, 1965.
- 9) Björn, A.L., Koch, G., Lindhe, J.: Evaluation of gingival fluid measurements. *Odont. Rev.* 16 : 300-307, 1965.
- 10) Page, R.C.: Host response tests for diagnosing periodontal diseases. *J. Periodontol.* 63 (Suppl.) : 356-366, 1992.
- 11) Kunimatsu, K., Matakai, S., Tanaka, H., Mine, N., Kiyoki, M., Hosoda, K., Kato Y., Kato I.: A cross-sectional study on osteocalcin levels in gingival crevicular fluid from periodontal disease patients. *J. Periodontol.* 64 : 86-869, 1993.
- 12) 國松和司, 田中秀高, 加藤伊八: 初診時における歯肉溝滲出液量と臨床パラメーターの関連性について, *日歯周誌*, 32 : 673-680, 1990.
- 13) Curtis, M.A., Griffiths, G.S., Price, S.J., Coulthrust, S.K., Johnson, N.W.: The total protein concentration of gingival crevicular fluid variation with sampling time and gingival inflammation. *J. Clin. Periodontol.* 15 : 628-632, 1988.
- 14) 國松和司, 田中秀高, 峯直子, 村上浩典, 加藤伊八: 臨床パラメーターとしての歯肉溝滲出液タンパク濃度, *日歯周誌*, 33 : 929-935, 1991.
- 15) Attström, R.: The roles of gingival epithelium and phagocytosing leukocytes in gingival de-

- fence. *J. Clin. Periodontol.* 2 : 25-32, 1975.
- 16) Clark, R.A., Page, R.C., Wilde, G.: Defective neutrophil chemotaxis in juvenile periodontitis. *Infect. Immun.* 18 : 694-700, 1977.
  - 17) Van Dyke, T.E., Horoszewicz, H.U., Cianciola, L.J., Genco, R.J.: Neutrophil chemotaxis dysfunction in human periodontitis. *Infect. Immun.* 27 : 124-132, 1980.
  - 18) Fritz, H., Jochum, M.: In : *Proteinases in inflammation and tumor invasion*. Walter de Gruyter & Co., Berlin, 1-23, 1986.
  - 19) Kowashi, Y., Jaccard, F., 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.
  - 20) Kryshchalskyj, J.E., Sodek, J., Ferrier, J.M.: Correlation of collagenolytic enzymes and inhibitors in gingival crevicular fluid with clinical and microscopic changes in experimental periodontitis in the dog. *Archs Oral Biol.* 31 : 21-31, 1986
  - 21) Barrett, A.J.: Cathepsins B and other thiol proteinases. In : *Proteinases in Mammalian Cells and Tissues* (Barrett, A.J., ed.). North-Holland Publishing Co., Amsterdam, 181-208, 1977.
  - 22) Kirsche, H., Langner, J., Siemann, S.: Lysosomal cysteine proteinases. In : Ciba Foundation Symposium 75 (new series) *Protein Degradation in Health and Disease*. Excerpta Medica, Amsterdam, 15-35, 1980.
  - 23) Kunimatsu, K., Yamamoto, K., Ichimaru, E., Kato, Y., Kato I.: Cathepsins B, H and L activities in gingival crevicular fluid from chronic adult periodontitis patients and experimental gingivitis subjects. *J. Periodont. Res.* 25 : 69-73, 1990.
  - 24) Ishikawa, I., Cimasoni G.: Alkaline phosphatase in human gingival fluid and its relation to periodontitis. *Archs Oral Biol.* 15 : 1401-1404, 1970.
  - 25) Bang, J., Cimasoni, G., Held, A.J.: Beta-glucuronidase correlated with inflammation in the exudate from human gingiva. *Archs Oral Biol.* 15 : 445-451, 1970.
  - 26) 中村正一 : 歯周疾患と歯肉浸出液および唾液中の Protease 活性との関係について, 日歯周誌, 21 : 429-434, 1979.
  - 27) Lah, T., Skaleric, U., Babnik, J., Turk, V.: Detection of cathepsin L-like proteinase and cathepsin D in gingival fluid. *J. Periodont. Res.* 21 : 504-509, 1986.
  - 28) Golub, L.M., Siegel, K., Ramamurthy, N.S., Mandel, I.D.: Some characteristics of collagenase activity in gingival disease in humans. *J. Dent. Res.* 55 : 1049-1057, 1976.
  - 29) Villela, B., Cogen, R.B., Bartolucci, A.A., Birke-dal-Hansen, H.: Crevicular fluid collagenase activity in health, gingivitis, chronic periodontitis and localised juvenile periodontitis. *J. Periodont. Res.* 22 : 209-211, 1987.
  - 30) Haffajee, A.D., Socransky, S.S., Goodson, J.M.: Clinical parameters as predictors of destructive periodontal disease activity. *J. Clin. Periodontol.* 10 : 257-265, 1983.
  - 31) Garnick, J.J., Pearson, R., Harrell, D.: The evaluation of the Periotron. *J. Periodontol.* 50 : 424-426, 1979.
  - 32) Barrett, A.J., Kirschke, H.: Cathepsin B, cathepsin H, cathepsin L. *Methods Enzymol.* 80 : 535-561, 1981.
  - 33) Morita, T., Kato, H., Iwanaga, S., Takada, K., Kimura, T., Sakakibara, S.: New fluorogenic substrates for  $\alpha$ -thrombin, factor Xa, kallikreins, and urokinases. *J. Biochem.* 82 : 1495-1498, 1977.
  - 34) Makinen, K.K., Mäkinen, O.L.: Purification and characterization of the human erythrocyte arylamidases preferentially hydrolyzing N-terminal arginine or lysine residues. *J. Biochem.* 175 : 1051-1067, 1978.
  - 35) Ichimaru, E., Tanoue, M., Tani, M., Tani, T., Kaneko, T., Iwasaki, Y., Kunimatsu, K., Kato, I.: Cathepsin B in gingival crevicular fluid of adult periodontitis patients: Identification by immunological and enzymological methods. *Inflamm Res.* 45 : 277-282, 1996.
  - 36) Barrett, A.J., McDonald, J.K.: Serine Proteinases. In : *Endopeptidases*. Academic Press, London, 3-226, 1980.
  - 37) Starkey, P.M., Barrett, A.J.: Neutral proteinases of human spleen. Purification and criteria for homogeneity of elastase and cathepsin G. *Biochem J.* 155 : 255-263, 1976.
  - 38) Kunimatsu, K., Mine, N., Kato, I., Hase T., Aoki, Y., Yamamoto, K.: Possible functions of human neutrophil serine proteinases, medullasin and cathepsin G, in periodontal tissue breakdown. *J. Periodont. Res.* 28 : 547-549, 1993.
  - 39) Vartio, T., Seppä H., Vaheri A.: Susceptibility of soluble and matrix fibronectins to degradation by tissue proteinases, mast cell chymase and cathepsin G. *J. Biol. Chem.* 256 : 471-477, 1981.
  - 40) Aoki, Y.: Crystallization and characterization of a new protease in mitochondria of bone marrow cells. *J. Biol. Chem.* 253 : 2026-2032, 1978.
  - 41) Aoki, Y., Machinami, R.: Role of medullasin in granulocytes in the development of inflammation. I. Phlogistic activity and the effect on functions of macrophages and granulocytes. *Arthritis Rheuma.* 26 : 1002-1010, 1983.
  - 42) Aoki, Y., Machinami, R.: Medullasin and inflammation (part II). *Asian Med. J.* 26 : 15-37, 1983.
  - 43) Aoki, Y., Sumiya, M., Oshimi, K.: Medullasin

- enhances human natural killer cell activity. *J. Clin. Invest.* 69 : 1223-1230, 1982.
- 44) Aoki, Y.: The mechanism of activation of human natural killer cells by medullasin. *Jpn. J. Cancer Res. (Gann)* 77 : 1018-1026, 1986.
- 45) Kunimatsu, K., Ichimaru, E., Kato, I., Kato, Y., Sonoda Y., Aoki, Y., Yamamoto, K.: Granulocyte medullasin levels in gingival crevicular fluid from chronic adult periodontitis patients and experimental gingivitis subjects. *J. Periodont. Res.*, 25 : 352-357, 1990.
- 46) Gustafsson, A.: Methodological considerations in GCF sampling with paper strips: poor recovery of uncomplexed elastase. *J. Clin. Periodontol.* 23 : 432-436, 1996.
- 47) Starkey, P.M., Barrett, A.J., Burleigh, M.C.: The degradation of articular collagen by neutrophil proteinases. *Biochim. Biophys. Acta* 483 : 386-397, 1977.
- 48) Reilly, C.F., Travis J. The degradation of human lung elastin by neutrophil proteinases. *Biochim. Biophys Acta* 621 : 147-157, 1980.
- 49) Janoff, A., Feinstein, G., Malemud, C.J., Elias J. M.: Degradation of cartilage proteoglycan by human leukocyte granule neutral proteases. A model of joint injury. I. Penetration of enzyme into rabbit articular cartilage and release of <sup>35</sup>S O<sub>4</sub>-labelled material from the tissue. *J. Clin. Invest.* 57 : 615-624, 1976.
- 50) Kunimatsu, K., Mine, N., Muraoka, Y., Kato I., Hase, T., Aoki, Y., Yamamoto, K. :Identification and possible function of cathepsin G in gingival crevicular fluid from chronic adult periodontitis patients and from experimental gingivitis subjects. *J. Periodont. Res.* 30 : 51-57, 1995.
- 51) Vercaigne-Marko, D., Davril, M., Laine, A., Hayem, A.: Interaction of human  $\alpha 1$ -proteinase inhibitor with human leukocyte cathepsin G. *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* 366 : 655-661, 1985.
- 52) L oe, H., Theilade, E., Jensen, S.B.: Experimental gingivitis in man. *J. Periodontol.* 36 : 177-187, 1965.
- 53) Silness, J., L oe, H.: Periodontal disease in pregnancy. II. Correlation between oral hygiene and periodontal condition. *Acta Odont. Scand.* 22 : 121-135, 1964.
- 54) Starkey, P.M.: Elastase and cathepsin G; the serine proteinases of human neutrophil leukocytes and spleen. In : *Proteinases in mammalian cells and tissues.* (Barrett A.J., ed.) Amsterdam : North-Holland, 57-89, 1977.
- 55) 國松和司, 尾崎幸生, 市丸英二, 加藤伊八, 原宜興 : 慢性歯周炎罹患歯肉におけるリソゾーム性プロテアーゼの組織内分布に関する免疫組織学的研究—システインプロテアーゼのカテプシン B 陽性細胞の分布—, 日歯周誌, 45 : 82-88, 2002.
- 56) Kunimatsu, K., Ozaki, Y., Aoki, Y., Kato, I.: Possible roles of medullasin in nifedipine-induced human gingival overgrowth. *Archs Oral Biol.* 41 : 111-115, 1996.
- 57) Kunimatsu, K., Ozaki, Y., Hara, Y., Aoki, Y., Yamamoto, Y., Kato, I.: Immunohistochemical study of cathepsin G and medullasin in inflamed gingival tissues from periodontal patients. *J. Periodont. Res.* 32 : 264-270, 1997.
- 58) Schechter, N.M., Wang, Z.M., Blacher R.W., Lessin, S.R., Lazarus, G.S., Rubin, H.: Determination of the primary structures of human skin chymase and cathepsin G from cutaneous mast cells of urticaria pigmentosa lesions. *J. Immunol.* 152 : 4062-4069, 1994.
- 59) 國松和司, 尾崎幸生, 加藤伊八, 原 宜興 : ヒトニフェジピン誘発性増殖歯肉におけるトリプターゼ陽性マスト細胞の組織内分布に関する免疫組織学的研究, 日歯周誌, 44 : 561-569, 2001.