

# 歯周病歯肉の病態に関する

## 臨床生化学的研究

葛 西 治 千 代

KASAI HARUCHIYO

弘前大学医学部歯科口腔外科学講座

(主任：鈴木 貢)

## I . 緒 言

歯周病は、歯肉、歯槽骨、セメント質、歯根膜という歯周組織に病変が限局した慢性の炎症性疾患であるとされている。その原因は、代謝障害、内分泌異常などの全身的因子と歯垢、歯石、食片圧入、歯列不正、不良補綴物などの局所的因子が考えられる<sup>1)</sup>。特に局所的因子では、盲嚢の自浄作用が不十分になることにより、歯頸部に沈着した歯垢が内毒素や酵素を産生し、それによる直接的組織障害作用と、さらに歯周組織の損傷により末梢血管の血行が阻害され、血管が増加して歯周病変が進行していくと考えられている<sup>2, 3)</sup>。

そこで、本研究では歯周病歯肉についてアラキドン酸代謝産物（以下AA代謝産物と略す）、過酸化脂質、フリーラジカルを測定し、同時に歯周組織における過酸化脂質を組織化学的過酸化脂質染色法（以下Schiff染色と略す）<sup>4)</sup>により、形態学的に観察した。

さらに歯周病の治療に対して、アスナロン



デンタルクリームを使用し、歯肉の炎症症状を改善させることにより歯肉中のAA代謝産物の変動を検討した。

## II. 試料及び研究方法

### 1. 試料

症例は平成2年12月から平成5年11月までの期間に歯周病を主訴として来院した患者で、Gingival Index<sup>5)</sup> (以下GIと略す) がGI.3の患者を対象とし歯周外科的処置を施し、その際得られた病的歯肉を試料とした。AA代謝産物の測定症例14例、ホスファチジルコリンヒドロペルオキシド (以下PC-00Hと略す) 及びフリーラジカルの測定症例10例、それらの患者のうち4例はアスナロندانタルクリーム (第一薬品産業製) を使用し、歯肉マッサージを施行させた。2週間後に歯周外科的処置を施し、得られた歯肉を試料とした。いずれも非ステロイド性の鎮痛剤等の使用は禁止した。

対象症例としては、非炎症性疾患に対して口腔外科的手術を行った際に得られ、臨床的

に正常と判断された歯肉を試料とし、AA代謝産物測定症例5例、PC-00H及びフリーラジカル測定症例10例とした。いずれの症例も全身的疾患の背景のないものを選んだ (表1)。

### 2. 方法

#### 1) 歯肉中のAA代謝産物の測定

##### (1) AA代謝産物の抽出

採取した歯肉はメタノール2mlを加え氷冷下にホモジネート後、遠心分離し得られた上清をPowell<sup>6)</sup>の方法に準じて蒸留水にてメタノール濃度が10%以下になるように希釈し、CDS-C18ミニカラム (Bondeiute, Analytichem International) に添加し1%酢酸、10%メタノール、99%イソオクタンで洗浄後、メタノールでロイコトルエン類 (以下LTsと略す)、ヒドロキシエイコサテトラエン酸類 (以下HETEsと略す) を溶出した。メタノール溶出液は濃縮乾固後、50%メタノール100 $\mu$ lに溶解した (図1)。

##### (2) AA代謝産物の分離定量<sup>7)</sup>



LT<sub>s</sub>, HETE<sub>s</sub>の分離、定量は逆相高速液体クロマトグラフィー (RP-HPLC) で行った。カラムは逆相系カラム (4.6 × 50 mm PG-pak A、日本分光製) を用いた。移動相はLT<sub>s</sub>がメタノール / アセトニトリル / 0.2 M 酢酸ナトリウム (25 : 25 : 50、pH 5.6)、HETE<sub>s</sub>がアセトニトリル / 水 / 酢酸 (60 : 40 : 0.1) を用いた。検出器はインテリジェント紫外可視分光検出器 (875 UV、日本分光製) を用い LT<sub>s</sub>は 270 nm、HETE<sub>s</sub>は 235 nm のカラム流出液の紫外線吸収により検出した。以上のLT<sub>s</sub>, HETE<sub>s</sub>の定量値は、インテグレイターにより標準物質のHPLCスペクトルの各ピークの面積との比較で求めた (図5)。

## 2) 過酸化脂質 (以下 LPO と略す) の測定

宮沢らの方法<sup>8)</sup>に準じて LPO は化学発光検出 - 高速液体クロマトグラフィー (CL-HPLC) 分析により PC-00H として検出した。試料は、採取された歯肉を図2の様に前処理して、図3の如く CL-HPLC 装置を用いて測定した。送液ポン

プは TRIROTAR III と PG350D (日本分光製) を用いた。

移動相はクロロホルム / メタノール液に n プロパノールと蒸留水を加えたものを使用、発光試薬として、pH 9.3 のホウ酸緩衝溶液にチトクローム C (type IV、シグマ社製) とルミノール (和光純薬社製) を用いた。HPLC カラムは順相系シリカゲルカラム (50 × 4.6 mm、250 × 4.6 mm) を使用した。標準試料は、卵黄精製ホスファチジルコリン (PC) を、0.1 mM のメチレンブルーを用いて光増感酸化し、その過酸化物価を KI 法で求めた後、希釈して使用した。20 μl 中 PC-00H 量 1326 pmol/mg 含んだ標準試料では、保持時間 16 分 30 秒前後に CL のピークが検出され、インテグレイター (807-IT、日本分光製) でピーク面積を求めた。化学発光による HPLC 分析ではピーク面積が PC-00H の濃度と 10 ~ 2000 pmol/mg の範囲で比例関係があるため、CL の面積と検量線から、試料の PC-00H 濃度を求めた (図6)。



### 3) フリーラジカル強度の測定

採取された歯肉はただちに凍結乾燥した後、粉末にし、50～150mgを試料として円筒状石英試験管に充填、電子スピン共鳴ESR (JES-FR-80、JEOL製) により $g=2.005$ に現れるシフトを直接測定した<sup>9)</sup>。試料のシグナルの最大振幅(hs)と標準試料(Mn)のシグナルの最大振幅(hr)により $hs/hr=ESR\ intensity$ を求め、S.H. (signal height)とし、個体試料重量で割った値をESR単位強度(S.H./mg)として求めた。(図4,7)

### 4) アスナロンドンタルクリームによる歯周病の治療法

歯周病患者に対しての治療は、局所の循環を積極的に促進させ、血管の弾性を賦活するとされるアスナロンドンタルクリームを使用した。アスナロンドンタルクリームの成分はヒノキチオール0.2% クロルカルバクロール0.1% 日局アミノ安息香酸エチル0.5%である。

使用方法は患部を清潔な乾いたガーゼでよ

く拭いた後、歯ブラシにアスナロンドンタルクリーム0.5gを付けよく擦り込ませた。回数は毎食後30分以内に3回、使用後、1時間以内は口腔内に物を入れないように指示し、2週間使用させた後、歯周外科的処置を施し、その際得られた歯肉を前述1)と同様の方法でAA代謝産物を測定した。

### 5) 組織化学的検索

試料は炎症歯肉組織のGI,3の典型的な2例を選んだ。対照は正常歯肉組織1例を使用した。Schiff試薬はBarger and Delamaterの方法で以下の順で作製した<sup>4)</sup>。

(1) 蒸留水400ccに塩基性フクシン1gを溶解。

(2) thionyl chloride( $SOCl_2$ )1gを溶解。

(3) 12時間放置後活性炭2gを入れ直ちに濾過。

Schiff染色法<sup>4)</sup>は、まず新鮮歯周歯肉からクリオスタットで5～7 $\mu$ の薄切凍結切片を作成し、その切片をSchiff試薬中に入れ、37℃で2時間放置し染色し、次いで蒸留水で水洗、その後ヘマトキシリン液で4分間核染色を行い、



水洗、乾燥後、オイキットで封入して鏡検した。

その局在性の観察は、同時に同一連続切片に対してヘマトキシリン-エオジン染色（以下H-E染色と略す）を行なった標本と比較検討した。

### Ⅲ．結 果

#### 1．歯周病歯肉中のAA代謝産物

正常歯肉、歯周病歯肉、共に15-HETE, 12-HETE, 5-HETE, LTC<sub>4</sub>が検出された。歯周歯肉中の15-HETE, 12-HETE, 5-HETE, LTC<sub>4</sub>の測定値は、それぞれ、15HETEでは132倍、12-HETEでは17倍、5-HETEでは5倍、LTC<sub>4</sub>では166倍といずれも正常歯肉と比較して顕著に高値を示していた（表2）。

#### 2．歯周病歯肉中のPC-00H

正常歯肉では、PC-00Hは検出されなかったが、歯周病歯肉の測定では533.0 pmol/mgの値を示した（表3）。

#### 3．歯周病歯肉中のフリーラジカル強度

正常歯肉では0.092 S.H./mgに対し、歯周病歯肉では1.663 S.H./mgと18倍の高値を示した。

（表3）

#### 4．アスナロンドンタルクリーム使用結果

##### 1）臨床所見

初診時、歯肉の疼痛、排膿を主訴として来院した歯周病患者4例は、前述の加療後に疼痛、排膿が消失し、歯周組織のGIでみるとGI.3がGI.2に2例、GI.1に2例それぞれに移行が認められた。

##### 2）AA代謝産物

アスナロンドンタルクリームを使用した歯周病歯肉では、15-HETE, 12-HETEがいずれも減少し、5-HETE, LTC<sub>4</sub>は消失した（表2）。

##### 3）組織化学的所見

新鮮歯周組織からの薄切凍結連続切片に対するSchiff染色は正常歯肉組織、急性炎症歯肉組織にSchiff陽性部が認められなかったが

（写真1）、慢性炎症歯肉組織2症例中1例には上皮下結合組織中に赤色のSchiff陽性部が



認められた (写真2)。同一連続切片のH-E染色像 (写真3) との比較により、脈管系が選択的に染色されている事が示された。

#### IV . 考 察

歯周病の歯周組織歯肉には、炎症性細胞浸潤が病理組織学的に Mackler<sup>10)</sup>, Seymour<sup>11)</sup>, Okada<sup>12)</sup>らにより多数観察されている。このことより歯周病の成立と進行には、細菌によって誘導される慢性の炎症が関与すると考えられる。

歯周病の特徴的な像として、歯肉と盲嚢に好中球の集積が認められた<sup>3, 13)</sup>。好中球は通常、種々の炎症性刺激に対して生体内で $O_2^-$ を生じ、血管外に遊走し生体防御に関与し、生体の恒常性を維持するとされる。

McMullen<sup>14)</sup>, Bissada<sup>15)</sup>, Cianciola<sup>16)</sup>らは、好中球の減少や機能低下があるとしばしば重症の歯周病を随伴すると報告していることより、常に歯肉には炎症が存在し、それを好中球の生体防御機構により恒常性が保たれてい

ると考えられる。しかしその恒常性がくずれることで好中球とともに単球、マクロファージの随伴が歯周歯肉に認められ、その単球、マクロファージが産生するサイトカイン<sup>17)</sup>は歯周組織の破壊を促しているものと考えられる。

近年、様々な炎症性疾患に関するAA代謝産物や活性酸素の研究がなされ、歯周病や智歯周囲炎など歯周疾患についても、いくつかの報告がなされているが<sup>18-24)</sup>、本研究では、正常歯肉と歯周病歯肉について、ケミカルメデエイターであるAA代謝産物と、組織障害を引き起こす過酸化脂質とフリーラジカルを測定したところ、歯周病歯肉のAA代謝産物は正常歯肉に比較して15-HETE, 12-HETE, 5-HETE, LTC<sub>4</sub>のいずれも著しい高値でありリポキシゲナーゼ系の亢進を示した。Turner<sup>25)</sup>らは12-HETEが好中球に対して化学走性を引き起こすことを発見し、Maclouf<sup>26)</sup>らによると白血球と血小板の共存により12-リポキシゲナーゼと



5-リポキシゲナーゼの相互作用により、 $\text{LTB}_4$ と5-HETEの産生を引き起こすと報告している。

以上のことを考えてみると、歯周組織局所で選択的に12-HETEの生成が高まることで、結合組織中の血管透過性が亢進し、好中球の化学走性を引き起こす。同時に上記の12-リポキシゲナーゼと5-リポキシゲナーゼの相互作用により $\text{LTB}_4$ と5-HETEの産生を促進するものと考えられた。

さらに $\text{LTC}_4$ の生成の亢進は好中球の遊走能が促進され微小循環に集積してくるとともに、集積した好中球は歯周組織に $\text{O}_2^-$ を過剰に生成して、さらに $\cdot\text{OH}$ を生成し血管内皮細胞障害を助長させると推定された<sup>27, 28)</sup>。

また歯肉のLPOはCL-HPLC分析によりPC-00Hとして検出した結果、正常歯肉には認められなかったが歯周病歯肉にPC-00Hのピークが顕著に検出され、フリーラジカルもESRにより $g=2.005$ に現れる $\text{LOO}\cdot$ のフリーラジカル強度を測定すると、正常歯肉の1.8倍の高値を示した。

以上のことから、微小循環に漏出したLDL-脂質を過酸化させ、過酸化脂質を生成すると共に、 $\text{LOO}\cdot$ を産生させて歯周組織の微小循環障害を引き起こし、炎症がさらに増悪し歯周組織の破壊へと導かれるものと考えられた。

さらにSchiff染色により、組織的に正常歯肉組織と急性歯肉組織を見るとSchiff陽性が認められず、慢性炎症歯肉組織の結合組織にのみ赤色のSchiff陽性が認められたことにより、過酸化脂質の存在が確認された。

山下ら<sup>4)</sup>は、組織とSchiff試薬の反応性は過酸化脂質量に比例して染色性が増すと報告していることから、慢性炎症歯肉組織の上皮増殖を示している部位の結合組織中には、微小循環の悪化に伴う上述のAA代謝産物の生成やPC-00H値、 $\text{LOO}\cdot$ の亢進を裏付けたものと考えられる。

つまり、このような推定はヒノキチオールを主成分とし消炎、殺菌、細胞賦活及び鎮痛作用を有するアスナロントラルクリームの加



療により、歯肉のAA代謝産物は15-HETE, 12-HETE, 5-HETE, LTC<sub>4</sub>のいずれの測定値も減少傾向が認められた。

このことで、歯周歯肉の炎症を助長させる因子を抑制することが、臨床的に歯肉の炎症所見の改善を裏付けたものとみなされる。従って歯周病は歯周歯肉の慢性炎症による発症であると考えられた。

#### V. 結 語

歯周病患者の歯肉のAA代謝産物、過酸化脂質、フリーラジカルを測定し、歯周病の病態に関して以下の知見を得た。

1、AA代謝産物の測定結果、歯周病歯肉で15-HETE, 12-HETE, 5-HETE, LTC<sub>4</sub>が顕著に高値を示したことは、炎症反応において12-HETEによる血管透過性の亢進とともに、LTB<sub>4</sub>と5-HETEの産生が促進され、その結果12-HETE, 5-HETE, LTB<sub>4</sub>とLTC<sub>4</sub>の生理作用により好中球の微小循環への集積が示唆された。

2、正常歯肉はPC-OOHが検出されず、歯周病

歯肉にPC-OOHが顕著に検出されフリーラジカル強度が高値を示したのは、結合組織に生成されたO<sub>2</sub><sup>-</sup>から・OHを生成し、LDL-脂質を過酸化させた結果過酸化脂質が生成され、この過酸化脂質が関与して、微小循環障害が引き起こされたものと推測される。

3、Schiff染色により慢性歯周結合組織に過酸化脂質の存在が認められたことは、微小循環の悪化に伴いAA代謝産物、PC-OOH、LOO<sup>・</sup>の生成亢進による脈管系の損傷を裏付けるものと考えられる。

4、アスナロントータルクリームの加療により歯周病歯肉の15-HETE, 12-HETE, 5-HETE, LTC<sub>4</sub>の減少傾向が認められたことは、臨床的に歯周病の発生に炎症が関与していることを裏付けたものと考えられる。



参 考 文 献

- 1) 中 静 正 : 歯 周 病 の 原 因 . 楠 正 夫 , 中 静 正 , 池 田 克 巳 他 ( 編 ) : 新 編 歯 周 治 療 学 . 1 版 , 57-70, 書 林 , 東 京 , 1977.
- 2) 秋 吉 正 豊 : 歯 周 疾 患 の 臨 床 病 理 学 . 今 田 喬 士 ( 編 ) : ペ リ オ ド テ ィ ッ ク ス の 臨 床 . 歯 界 展 望 別 冊 , 19-41, 1977.
- 3) Lazzari, E.P. (eds.): 口 腔 領 域 の 生 化 学 . 1 版 , 183-196, 医 歯 薬 出 版 , 東 京 , 1977.
- 4) 山 下 政 紀 , 中 島 輝 之 : 組 織 化 学 的 過 酸 化 脂 質 染 色 の 試 み 及 び 人 大 動 脈 壁 に お け る 過 酸 化 脂 質 の 形 態 学 的 観 察 . 久 留 米 医 学 会 雑 誌 , 43 : 1164-1176, 1980.
- 5) Loe, H.: The gingival index, the plaque index and the retention index systems. J. Periodontology, 38 : 610-616, 1967.
- 6) Powell, W.S.: Rapid extraction of arachidonic acid metabolites from biological samples using octadecylsilyl silica. Methods in Enzymology, 86 : 467,

1982.

- 7) 天 野 利 夫 , 寺 尾 靖 泰 次 : ア ラ キ ド ン 酸 カ ス ケ ー ド 代 謝 産 物 の 高 速 液 体 ク ロ マ ト グ ラ フ ィ ー 測 定 法 . 医 学 の あ ゆ み , 143 : 326-328, 1987.
- 8) Miyazawa, T., Yasuda, K., Fujimoto, K., et al.: Presence of phosphatidyl-cholinehydroperoxide in human plasma. J. Biochem 103 : 744-746, 1988.
- 9) Zweier, J.L., Flaherty, J.T. and Weisfeldt, M.L.: Direct measurement of free radical generation following reperfusion of ischemic myocardium. Proc Natl Acad Sci USA, 84 : 1404-1407, 1987.
- 10) Mackler, B.F., Frostad, K.B., Robertson, P.B., et al.: Immunoglobulin bearing lymphocytes and plasma cells in human periodontal disease. J. Periodont. Res., 12 : 37-45, 1977.
- 11) Seymour, G.J. and Greenspan, J.S.: The



phenotypic characterization of lymphocyte subpopulations in established human periodontal disease. J. Periodont. Res., 14 : 39-46, 1979.

12) Okada, H., Kida, T. and Yamagami, H.: Identification and distribution of immunocompetent cells in inflamed gingiva of human chronic periodontitis. Infect. Immun., 41 : 365-374, 1983.

13) 原 耕 二 , 原 沢 正 昭 , 高 塚 真 理 子 : 歯 肉 滲 出 液 と 歯 周 病 と の か か わ り あ い . 歯 界 展 望 , 50 : 235-244, 1977.

14) McMullen, J.A., Van Dyke, T.E., Horoszewicz, H.U., et al. : Neutrophil chemotaxis in individuals with advanced periodontal disease and a genetic predisposition to diabetes mellitus. J. Periodontol., 52 : 167-173, 1981.

15) Bissada, N.F., Manouchehr-Pour, M., Haddow, M., et al. : Neutrophil functional

activity in juvenile and adult onset diabetic patients with mild and severe periodontitis. J. Periodont. Res., 17 : 500-502, 1982.

16) Cianciola, L.J., Park, B.H., Bruck, E., et al: Prevalence of periodontal disease in insulin-dependent diabetes mellitus (juvenile diabetes). J. Am. Dent. Assoc., 104 : 653-660, 1982.

17) 辻 本 政 文 , 堀 隆 光 : サ イ ト カ イ ン に よ る リ ン 脂 質 代 謝 の 変 化 . 蛋 白 質 核 酸 酵 素 , 36 : 643-649, 1991.

18) 葛 西 治 千 代 , 西 郷 慶 悦 , 畠 山 る り 子 他 : 歯 周 疾 患 の 治 療 に 対 す る エ ラ ス タ ー ゼ の 治 療 効 果 に 関 す る 臨 床 的 検 討 . 診 療 と 新 薬 , 26 : 2238-2247, 1989.

19) 葛 西 治 千 代 , 高 橋 雅 幸 , 丸 屋 祥 子 他 : 智 歯 周 圍 炎 の 臨 床 的 考 察 に つ い て . み ち の く 歯 学 会 雑 誌 , 22 : 45-50, 1991.

20) Mendieta, C.F., Reeve, C.M. and Romero,



J.C. : Biosynthesis of prostaglandins in gingiva of patients with chronic periodontitis., J.Periodontol. 56 : 44-47, 1985.

21) 大浦 清, 篠原光子, 尾形圭五, 他 : 歯周疾患と活性酸素, フリーラジカルの臨床, 日本医学館, 4 : 77-85, 1990.

22) 木村博人 : 口腔疾患とフリーラジカル, 特集 : フリーラジカルーその臨床的意義, 最新医学, 45 : 1754-1761, 1990.

23) Fine, A.S., Egnor, R.W., Kazandjian, G. et al.: Effect of inflammation upon human gingival cyclic AMP metabolism. J. Oral Pathol., 14: 342-348, 1985.

24) Fine, A.S. and Person, P.: Biochemistry of gingival oxidative metabolism : a review. J. Oral Pathol., 13: 191-212, 1984.

25) Turner, S.R. Tainer, J.A., Lynn, W.S. : Biogenesis of chemotactic molecules by the arachidonate lipooxygenase system

of platelets. Nature, 257 : 680-681, 1975.

26) Macclouf, J. Laclos, B.F. and Borgeat, P. : Stimulation of leukotriene biosynthesis in human blood leukocytes by platelet-derived 12-hydroperoxy-icosatetraenoic acid. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 79 : 6042-6046, 1982.

27) 土屋雅春 : 微小循環障害における細胞間相互反応ー血管内皮細胞を中心に, 医学のあゆみ, 140 : 717-720, 1987.

28) 西田俊朗, 川島康生, 田川邦夫 他 : 虚血障害の分子機作, 代謝, 24 : 379-387, 1987.



表 2 歯肉中のアラキドン酸代謝産物の測定結果 ( ng/g )  
( リボキシゲナーゼ系 )

	15 HETE	12 HETE	5 HETE	LTC <sub>4</sub>
正常歯肉 ( n = 5 )	18.3 ± 10.7	60.0 ± 38.0	14.0 ± 14.0	6.2 ± 3.9
歯周病歯肉 ( n = 14 )	2416.7 ± 1405.4	1002.4 ± 314.3	69.4 ± 38.7	1030.3 ± 464.0
アスナロンデントラル クリーム使用例 ( n = 4 )	43.5 ± 43.5	883.8 ± 39.3	N.D.	N.D.

mean ± S.E.

N.D. : no detected

表 1 対 象 症 例

	アラキドン酸代謝 産物測定症例	PC-00Hおよびフリー ラジカル測定症例
歯周病症例	14	10
アスナロンデントラル クリーム使用症例	4	—
正常歯肉	5	10



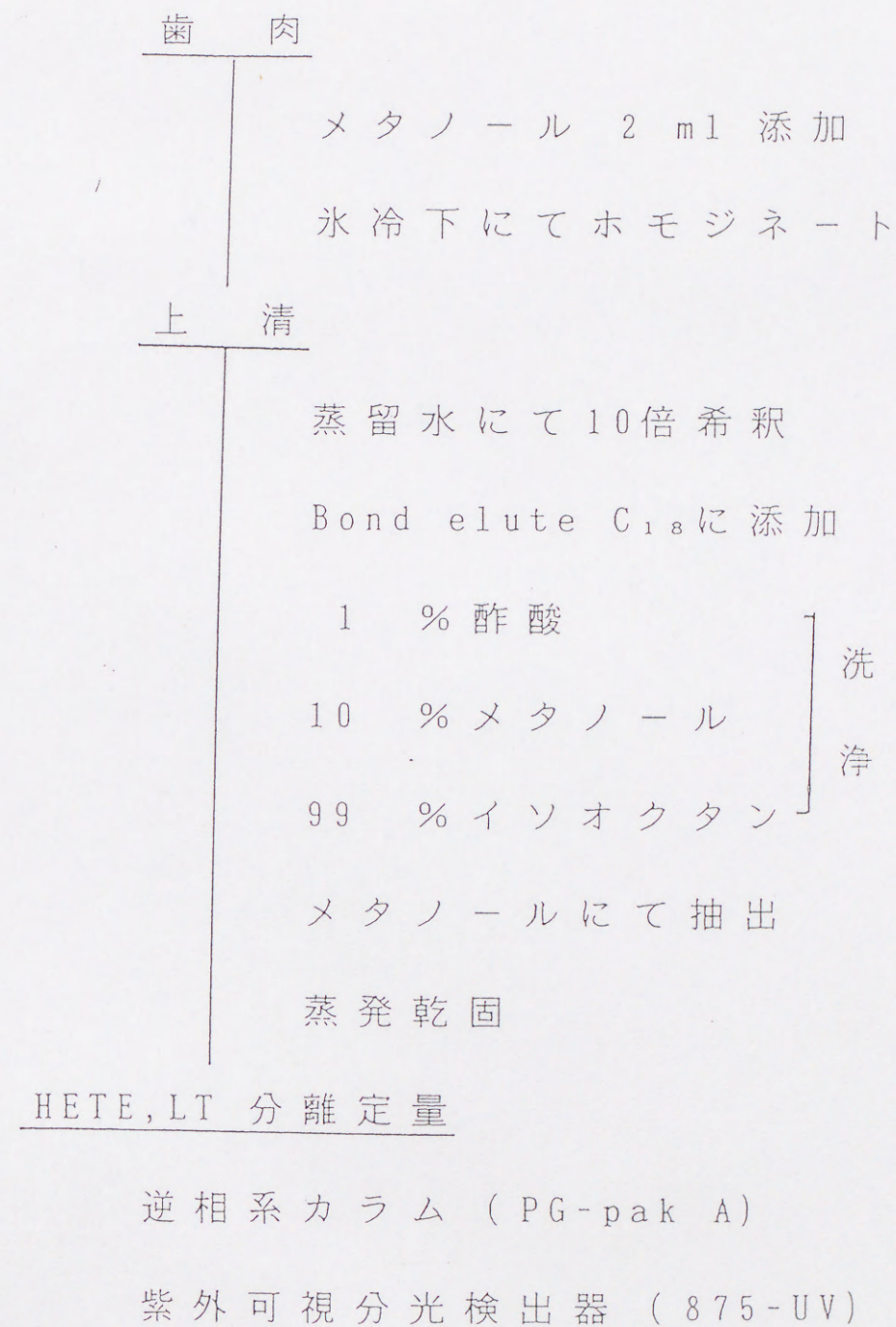


図 1 アラキドン酸代謝産物の抽出測定法

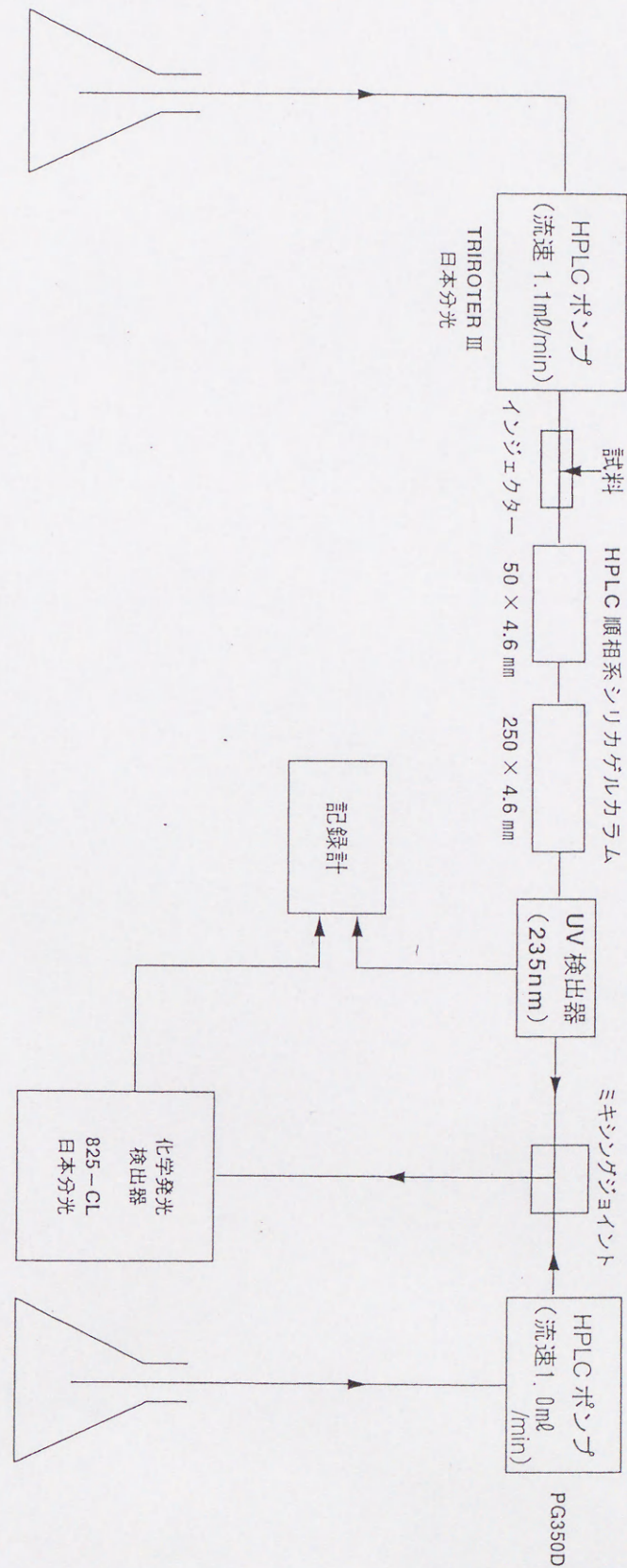
表 3 PC-00H 値およびフリーラジカル強度の測定結果

試料	PC-00H (p mol) フリーラジカル強度 (S.H./mg)
正常歯肉 ( n = 5 )	0 0.092 ± 0.042
歯周病歯肉 ( n = 10 )	533.0 ± 164.3 1.663 ± 0.1365

mean ± S.E.



移動相  
クロロホルム／メタノール  
(1 : 9)



発光試薬  
(チトクロムC 10  $\mu$ g/ml  
ルミノール 1  $\mu$ g/ml  
ホウ酸緩衝液 pH 9.3)

図3 菌肉中のPC-OOH分析方法  
(宮沢陽夫：過酸化脂質実験法—増補版—, P235, 1987 より)

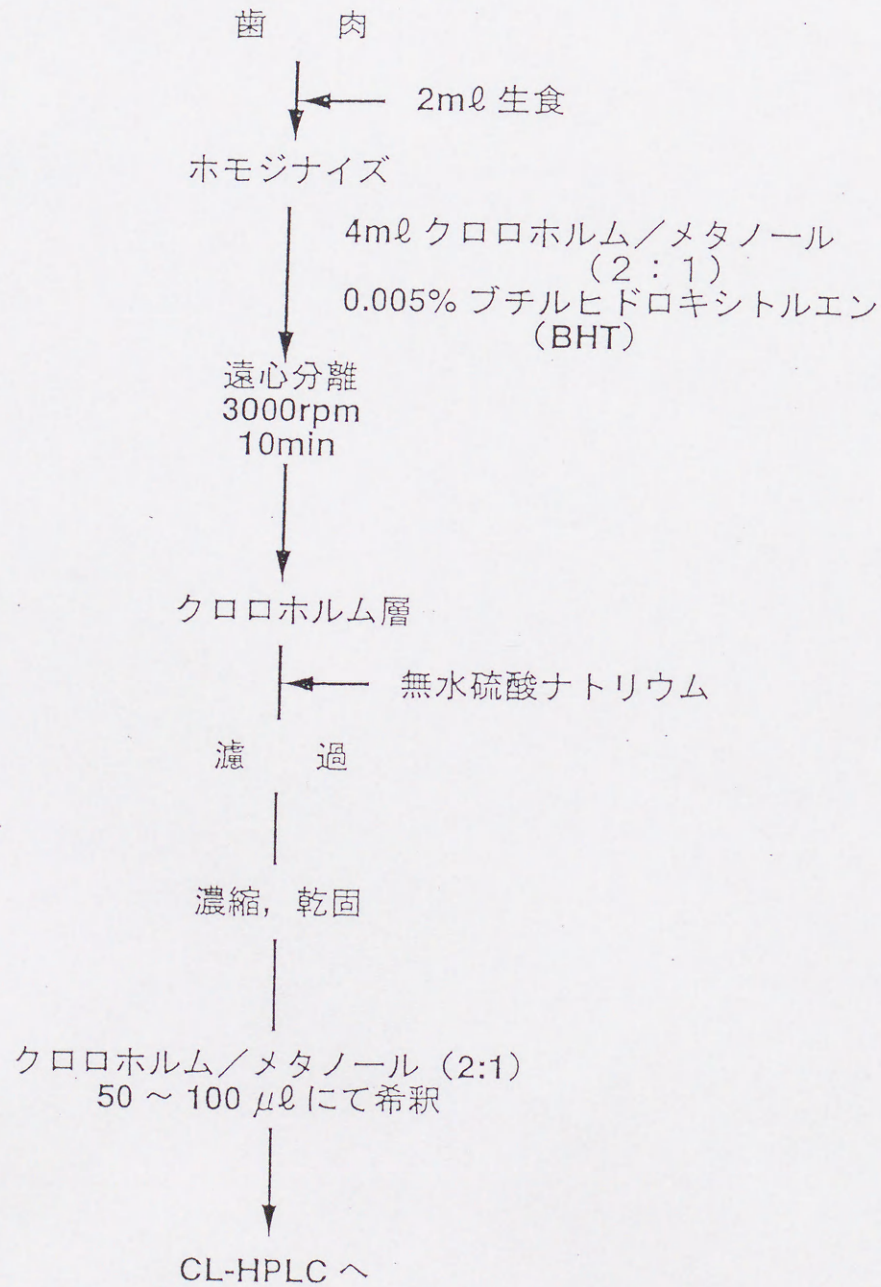


図2 CL-HPLC 測定のための前処理



変調周波数 : 100 kHz  
 分解能 : 500 mG  
 変調幅 : 8.0 G  
 掃引時間 : 0.5 G/sec

図 4 ESR 測定条件

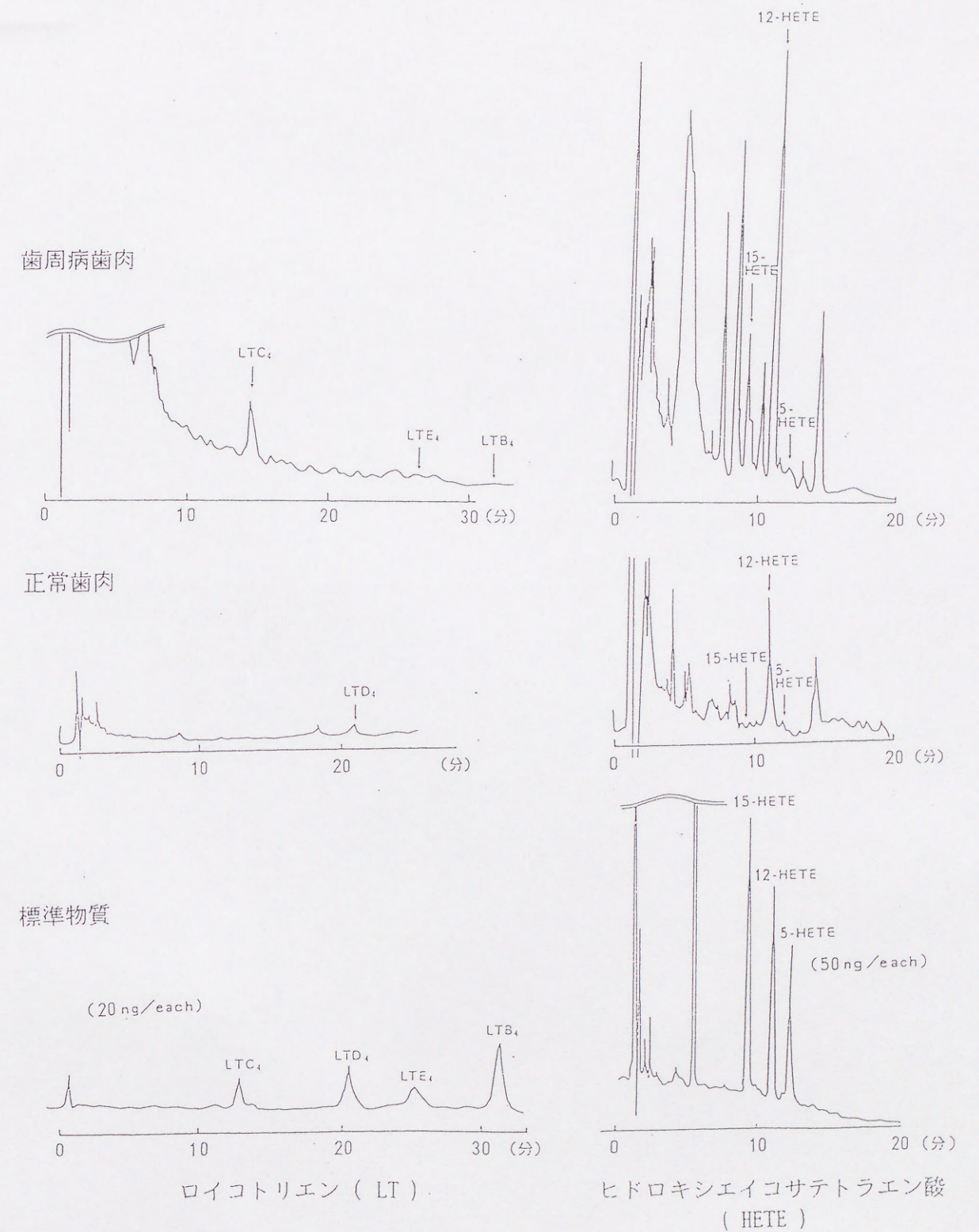


図5 アラキドン酸代謝産物のクロマトグラム



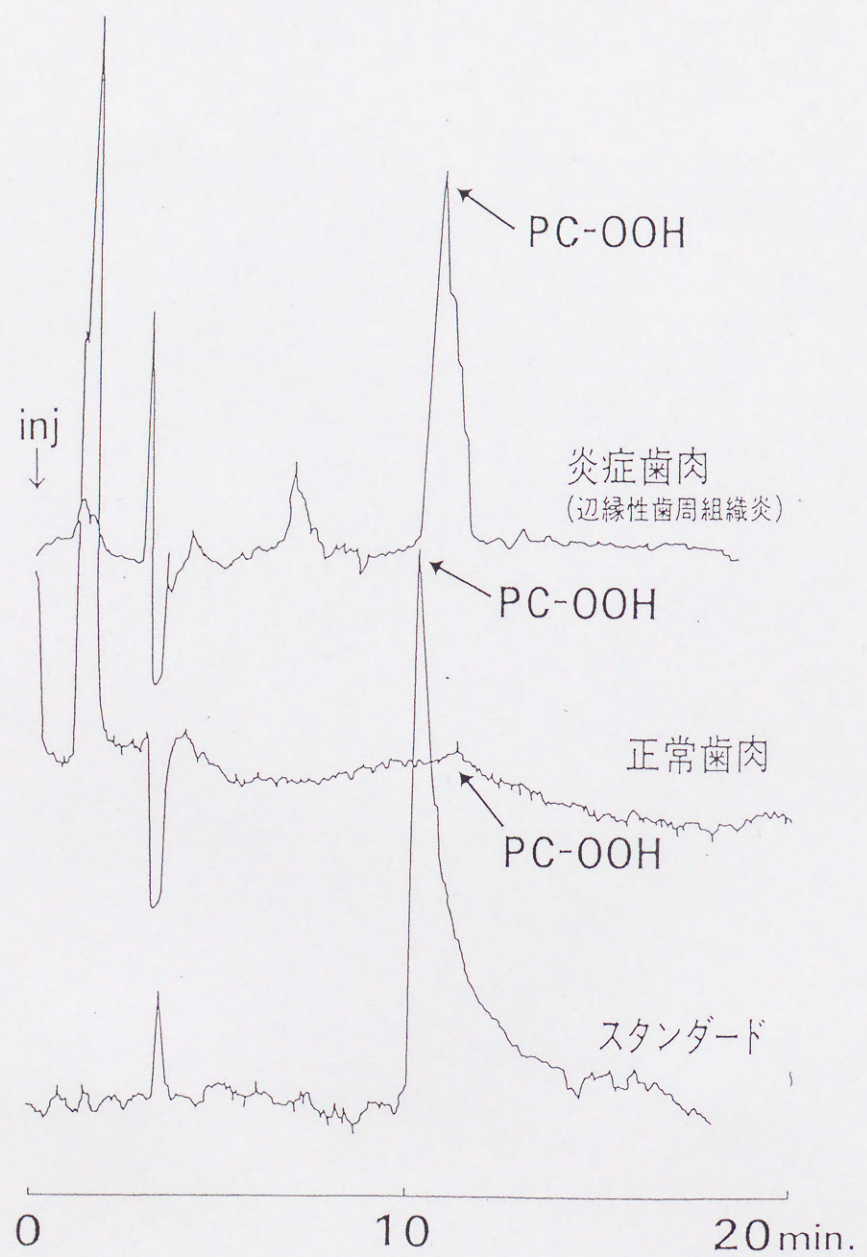


図6 CL-HPLCによるPC-OOH分析

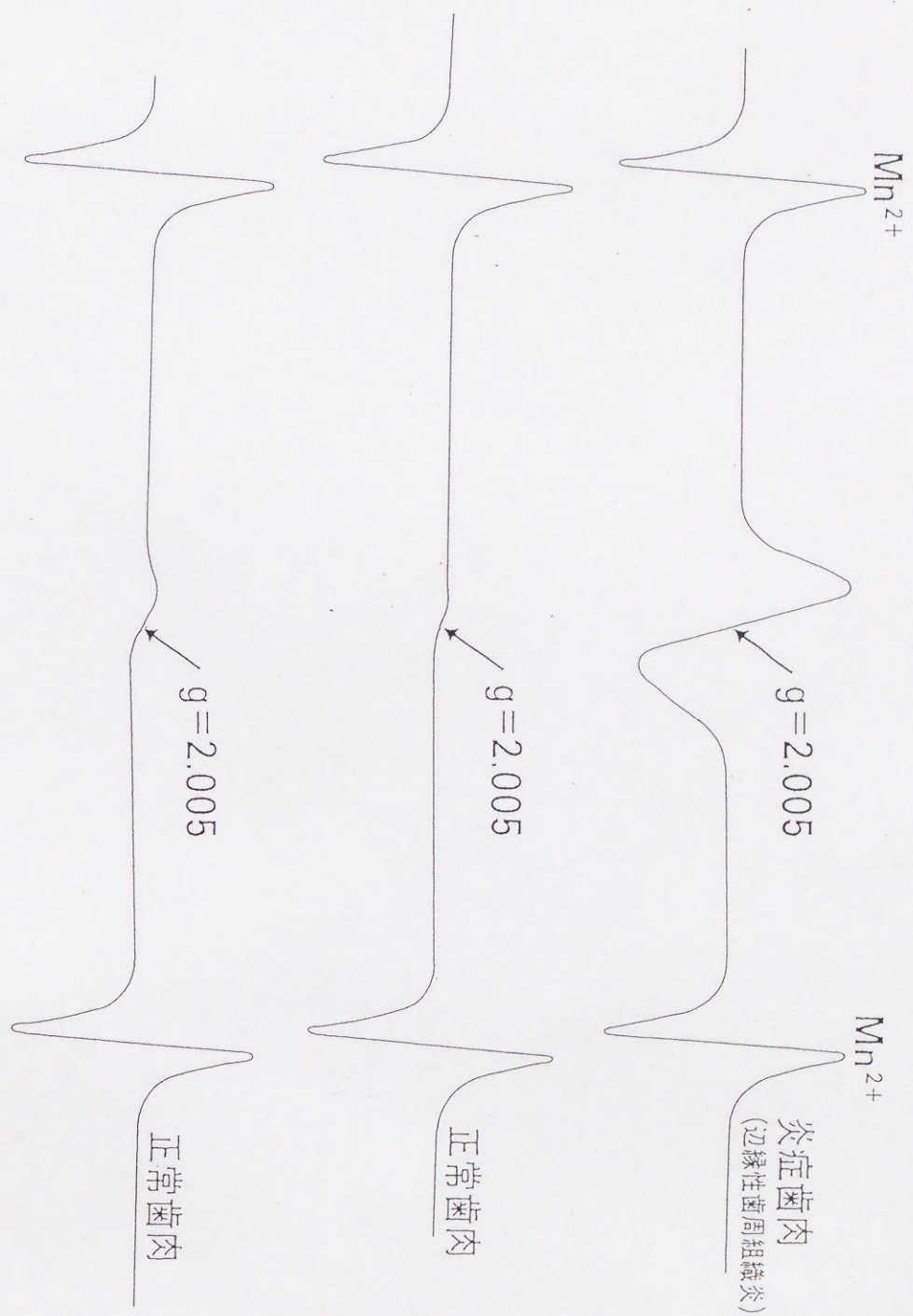


図7 電子スピン共鳴 (ESR) によるL O Oラジカル



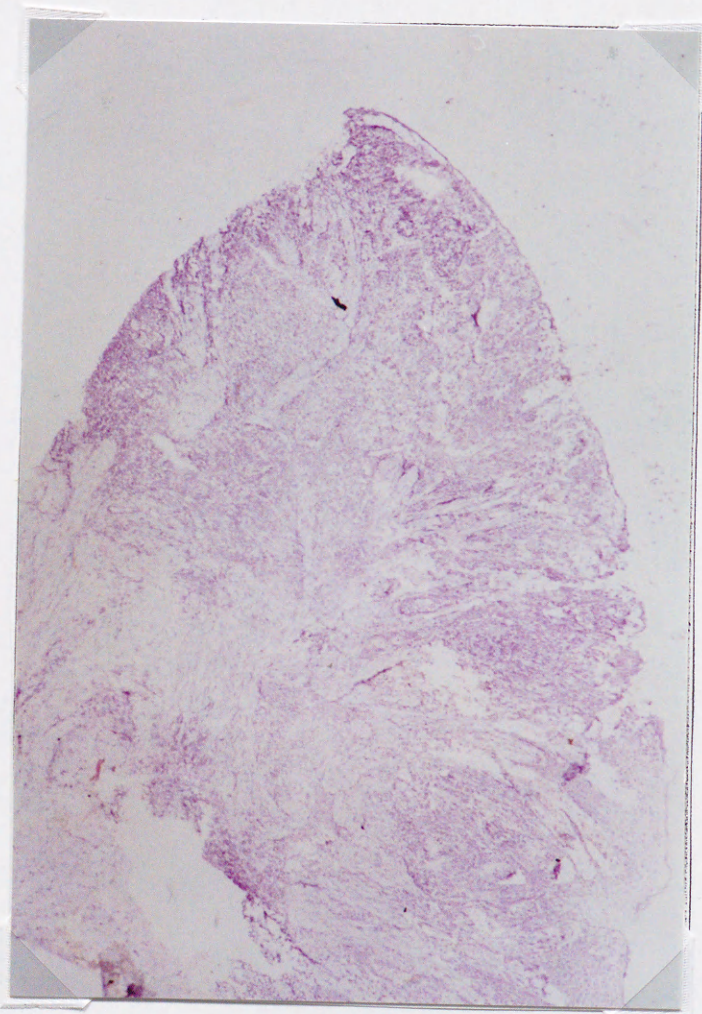


写真1 正常歯肉組織のSchiff染色による病理組織像

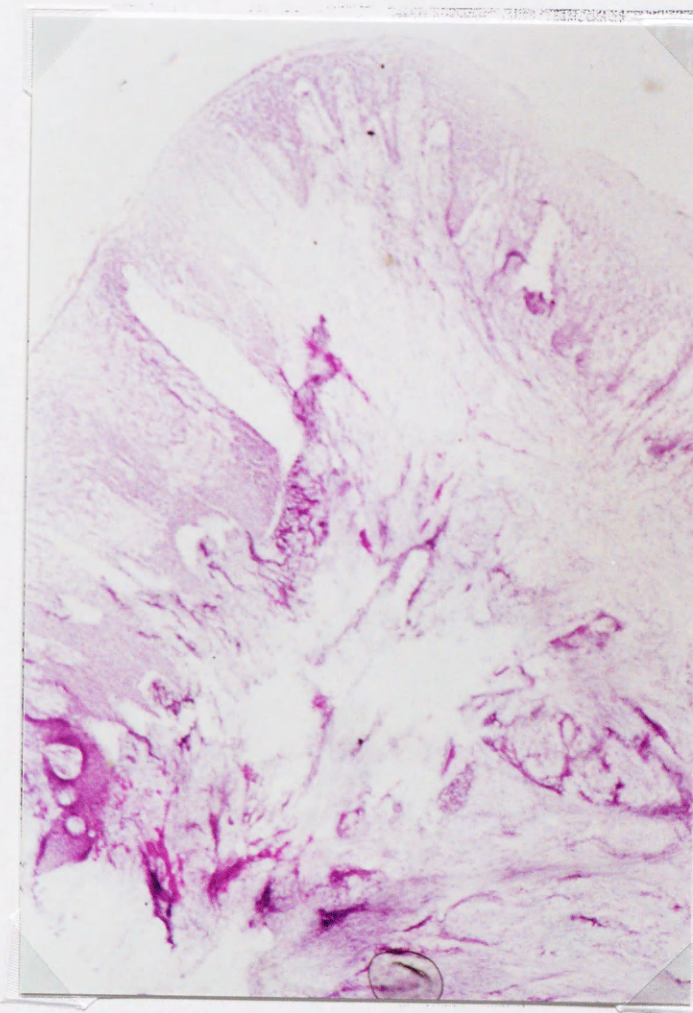


写真2 慢性炎症歯肉組織のSchiff染色による病理組織像



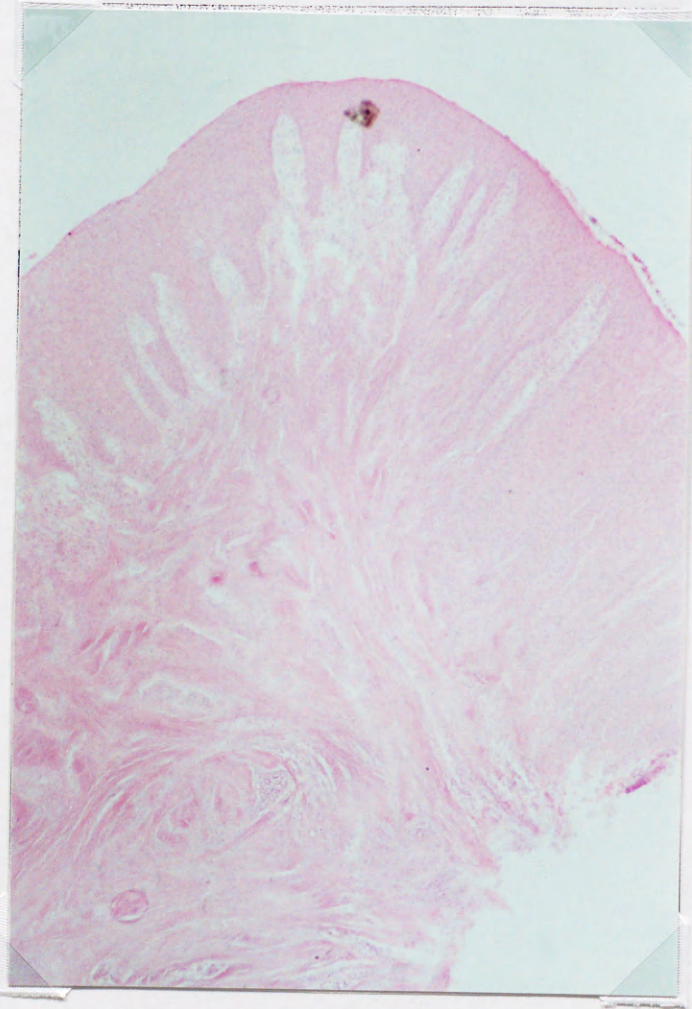


写真3 慢性炎症歯肉組織のH-E染色による病理組織像



