

歯周炎患者の歯肉溝滲出液中に含まれる I 型プロコラーゲンペプチド およびオステオカルシンの定量分析

中村輝夫 スルヨノ 木戸淳一 永田俊彦

徳島大学歯学部歯科保存学第二講座
(2002 年 1 月 12 日受理)

Quantitative Analyses of Propeptide of Type I Procollagen and Osteocalcin in Gingival Crevicular Fluid of Periodontal Disease Patients

Teruo Nakamura, Suryono, Jun-ichi Kido and Toshihiko Nagata

Department of Periodontology and Endodontology, Tokushima University School of Dentistry

Accepted for publication 12 January 2002

Biochemical markers in gingival crevicular fluid (GCF) have been studied to precisely and objectively diagnose periodontal disease. Carboxy terminal propeptide of type I procollagen (P1CP) and osteocalcin (OCN) are bone-related proteins produced by osteoblasts that are useful clinical indicators of metabolic bone diseases such as osteoporosis and hyperparathyroidism. To determine bone-related markers in GCF, we studied the presence of P1CP and OCN in GCF from periodontitis patients using immunoenzymatic kits and the relationship between P1CP/OCN amounts and clinical parameters involving gingival index (GI), probing depth (PD), and bleeding on probing (BOP). GCF samples were collected with paperstrips from 70 diseased sites (PD > 4 mm) in 70 periodontitis patients and from 30 healthy sites (PD < 3 mm) in 30 healthy volunteers. A mean of 1.04 ng/site (0.91 ng/ μ l) P1CP was found at diseased sites and a mean of 0.17 ng/site (0.38 ng/ μ l) at healthy sites, showing a 6.1-fold amount of P1CP at diseased sites. A mean of 56.3 pg/site (47.6 pg/ μ l) OCN was found at diseased sites and a mean of 38.8 pg/site (123.9 pg/ μ l) at healthy sites, showing a 1.5-fold amount of OCN at diseased sites. Both P1CP and OCN in GCF correlated positively with GI and PD, especially P1CP, P1CP greatly increased at BOP-positive sites (5.5-fold), suggesting that P1CP may reflect disease activity in alveolar bone metabolism. These results indicate that P1CP and OCN are present in GCF and that these molecules may be useful as a bone-related marker in periodontitis. P1CP may prove to be an especially potent marker for bone turnover in periodontitis. J Jpn Soc Periodontol, 44 : 73–81, 2002.

Key words : gingival crevicular fluid, carboxy terminal propeptide of type I procollagen, osteocalcin, periodontitis

要旨： 歯周病を正確かつ客観的に診断するために、歯肉溝滲出液 (GCF) 中の生化学的な指標を見出そうという研究が長年行われている。I 型プロコラーゲン C 末端ペプチド (P1CP) およびオステオカルシン (OCN) は、骨芽細胞によって産生される骨代謝関連蛋白であり、骨粗鬆症や副甲状腺機能亢進症のような代謝性骨疾患において有用な臨床指標として用いられている。本研究では、GCF 中の骨代謝関連指標を探索するために、P1CP と OCN が GCF 中に存在するかどうかを酵素抗体法キットを用いて検証するとともに、P1CP 量および OCN 量を定量し、それらの値と臨床パラメーターである歯肉炎指数 (GI)、プロービング値 (PD)、プロービング時の出血 (BOP) の有無との関連をそれぞれ調べた。GCF 試料はペーパーストリップスを用いて、70 名の歯周炎患者から歯周ポケット 70 部位 (PD > 4 mm)、および 30 名の健常者から健常歯肉溝 30 部位 (PD < 3 mm) を選んで採取された。GCF 中の P1CP 量はポケット部位で平均 1.04 ng/site (0.91 ng/ μ l)、健

常部位で0.17 ng/site (0.38 ng/ μ l) であり、ポケット部位で6.1 倍の P1CP 量が探知された。OCN 量はポケット部位で平均 56.3 pg/site (47.6 pg/ μ l), 健常部位で 38.8 pg/site (123.9 pg/ μ l) であり、ポケット部位で1.5 倍の OCN 量が探知された。P1CP 量および OCN 量は、いずれも GI および PD と正の相関関係を示した。とくに、P1CP は両方の指標と強く相関していた。さらに、P1CP 量は BOP の認められる部位で高く (5.5 倍値)、歯槽骨代謝における疾患活動性を反映している可能性が示唆された。以上の結果は、GCF 中には P1CP および OCN が存在し、これらの分子は歯周炎の骨代謝関連指標になりうる可能性があることを示すものであり、とくに P1CP は歯周炎における骨代謝回転を反映する指標として有力であることが示唆された。

索引用語: 歯肉溝滲出液, I 型プロコラーゲン C 末端ペプチド, オステオカルシン, 歯周炎

緒 言

歯肉溝滲出液 (GCF) 中に含まれる種々の成分を定量する手法は、歯周炎の炎症の程度や疾患活動度を把握し、病態を客観的に評価する上で重要である。GCF 中には血清成分だけでなく、歯周組織局所の代謝に関連する酵素や代謝産物、さらには歯周組織の破壊や修復によって産生される物質も数多く含まれている。このうち、プロスタグランジン E_2 ¹⁾, β -グルクロニダーゼ²⁾, インターロイキン-1³⁾, アスパルテート・アミノトランスフェラーゼ⁴⁾, カルプロテクチン⁵⁾などは、歯周炎の進行を予知するための有用な診断指標となりうるということが示唆されている。

歯周炎は、歯周病原菌の感染によって引き起こされた炎症が歯周組織の深部に波及し歯槽骨が吸収された結果、最終的には支持を失った歯が脱落する疾患である。もし歯槽骨の吸収が起これなければ歯を失うこともなく、歯周炎は食生活を脅かすような重大疾患とはならないはずである。したがって、実際の臨床において将来の歯槽骨の吸収程度や再生能を予知できるような指標があれば、有用な診断指標となるに違いない。なお、GCF 中に含まれるプロスタグランジン E_2 やインターロイキン-1 は骨吸収と密接に関連する物質であるが、同時に炎症反応の指標でもあるため、歯周炎における骨代謝関連指標として特異的であるとはいえない。

I 型プロコラーゲン C 末端ペプチド (P1CP) は、I 型コラーゲンが産生される際に、細胞外に分泌されたプロコラーゲンが蛋白分解酵素によって切断された後、血中に放出される C 末端部分のペプチド (分子量約 10 万) のことである。I 型コラーゲンは人体のコラーゲンの 70% 以上を占め、その多くが骨に存在している。一般に、血清中の P1CP レベルは骨形成指標と相関することから、骨芽細胞の活動および骨形成を反映するものと考えられている⁶⁾。臨床的には、骨代謝異常がみられる種々の疾患 (副甲状腺機能亢進症, Paget 病, 慢性腎不全, 前立腺癌など) で血清

P1CP 値が上昇することが知られている。また、P1CP が高値のものほど腰椎骨密度が低い傾向があるという報告がみられ⁷⁾, 低骨密度のスクリーニングに対する有用性も期待されている。歯周病においても P1CP が GCF 中に存在し、その進行や治癒に応じて変動する可能性が考えられるが、GCF 中の P1CP について調べた報告は現在のところ見当たらない。

オステオカルシン (OCN) は、骨芽細胞によって産生される分子量約 5,900 の低分子蛋白であり、骨の非コラーゲン蛋白の 10~20% を占める。血清中の OCN の存在は骨の形成活性および吸収活性の両方に関与するので、その評価は複雑であるが、一般に OCN は、P1CP と同様に骨形成の指標として位置づけられている⁸⁾。臨床的には、高回転型骨粗鬆症、副甲状腺機能亢進症、甲状腺機能亢進症、慢性腎不全、悪性腫瘍骨転移などで血中濃度が上昇することから、種々の骨疾患に対する有用な指標として用いられている^{6,8)}。さらに、血中 OCN 値が高いほど骨密度が低い傾向があることや、閉経後の骨粗鬆症の前後で大きく増減することなどから、骨減少率の予測指標としても有用であると考えられている⁹⁾。歯周病においても GCF 中の OCN 量を分析する研究が行われている。しかしながら、歯周炎では OCN 量が増加するという報告⁹⁻¹¹⁾と、変化しないという報告¹²⁾があり、一部に見解の相違が認められる。

今回、著者らは歯周炎患者および健常者から GCF を採取し、GCF 中に含まれる P1CP および OCN の定量分析を行った。まず、骨代謝に関与するこれら 2 つの分子が GCF 中に存在することを検証し、次に、歯周炎患者と健常者での定量値を臨床指標を交えて比較することによって、P1CP および OCN の歯周炎における骨代謝関連指標としての有用性について検討した。

材料および方法

1. 被験者および被験部位

徳島大学歯学部附属病院第二保存科を受診した成人

性歯周炎患者 70 名, およびボランティアとして本研究に参加した歯周炎をもたない大学職員 30 名, 合計 100 名 (男性 40 名, 女性 60 名, 平均年齢 49.7 ± 1.3 歳) を被験者とした。被験者の選定に際しては, 基礎疾患をもたず, 過去 6 カ月以内に歯周治療や抗菌剤投与の既往のないことを条件とした。歯周炎患者の平均年齢は 54.3 ± 1.3 歳, 健常者の平均年齢は 39.2 ± 2.2 歳であり, 両者には有意差が認められたが, 年齢差により P1CP および OCN の測定値に差がないことを事前に確認した。歯周炎患者にはインフォームドコンセントを得た上で GCF を採取し, 採取部位として, 歯周ポケットが存在し X 線写真上で歯根長の $1/2 \sim 2/3$ の歯槽骨吸収像が認められる歯を選択した。GCF は, 被験者 1 名から 1 個所の部位を選んで採取することを原則とし, 100 名の被験者から 100 試料を得た。その内訳は, P1CP 分析用として 60 試料 (歯周炎患者 40 名の 4 mm 以上の歯周ポケットから 40 試料, 健常者 20 名の歯肉溝から 20 試料), OCN 分析用として 40 試料 (歯周炎患者 30 名の 4 mm 以上の歯周ポケットから 30 試料, 健常者 10 名の歯肉溝から 10 試料) である。P1CP 分析の歯周炎患者 40 名の内訳は男性 11 名, 女性 29 名, 同じく健常者 20 名の内訳は男性 12 名, 女性 8 名であった。OCN 分析の歯周炎患者 30 名の内訳は男性 11 名, 女性 19 名, 同じく健常者 10 名の内訳は男性 6 名, 女性 4 名であった。被験部位は, 歯周炎患者では上下顎前歯, 小臼歯, 大臼歯すべてが含まれ, 健常者では上顎前歯, 小臼歯, あるいは大臼歯に限定された。なお, 被験者の上顎と下顎での測定値に有意差は認められなかった。分析に際しては, 歯周炎患者の歯周ポケット部位をポケット部位, 健常者の歯肉溝部位を健常部位と呼ぶこととした。

2. GCF の採取および回収

GCF の採取は, Hou らの方法¹³⁾を一部改変した当教室の方法^{14,15)}で行った。まず, 被験個所の周囲を綿栓で防湿シエアーで乾燥させた後, 当該部位にペリオパーストリップス (Harco Electronics, Winnipeg, Canada) を軽く抵抗が感じられるまで挿入し, 10 秒間保持して GCF を浸透させ採取した。この操作を同一部位で連続 3 回行い, 各ストリップスに含まれる液量をペリオトロン 8000 (Harco Electronics) を使って測定し, 3 枚のストリップスから得られた値の合計値を 1 部位の GCF 量とした。次に, ストリップスに含まれる GCF を分離回収するために, Griffiths らの方法¹⁶⁾に従った 2 重構造チューブを調製し, ストリップスの入ったチューブに $110 \mu\text{l}$ の 10 mM トリス塩酸緩衝液 (pH 7.4) を加えて水中

で 10 分間インキュベートした後, 遠心操作 ($3,000 \times g$, 15 分) を行った。遠心して得られた GCF 溶液を 1 本のチューブに回収し, これを P1CP あるいは OCN 定量用試料とした。

3. P1CP および OCN の定量分析

GCF 中の P1CP の定量は, Procollagen Type 1 C-Peptide (P1CP) EIA キット (宝酒造, 草津) を用いて行った。すなわち, 抗 P1CP 抗体でコートされた 96 穴プレートに 10 mM トリス塩酸緩衝液 (pH 7.4) で希釈した GCF 試料あるいは P1CP 標準液を加え, 37°C で 2 時間インキュベートし, 次にペルオキシダーゼ標識抗 P1CP 抗体を加え, 37°C で 1 時間インキュベートした。さらに, テトラメチルベンジジン基質溶液を加え, 遮光下にて室温で 15 分間酵素反応させ, 引き続き, 1 N 硫酸を加えて反応を停止させた。反応液は, マイクロプレートリーダー (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) を用いて 450 nm の波長で吸光度を測定し, 検量線から GCF 中の P1CP 量を算出した。なお, キットの検出限界および測定有効範囲は, それぞれ 0.5 ng/ml および $0.5 \sim 16 \text{ ng/ml}$ であった。

GCF 中の OCN の定量は, Gla-type Osteocalcin (Gla-OCN) EIA キット (宝酒造) を用いて行った。このキットは, γ -カルボキシグルタミン酸 (Gla) 残基を有する骨基質結合能のある OCN を特異的に認識し, Gla 残基を有しない分解産物としての OCN は認識しない。すなわち, 一般臨床で用いられているものと同様に骨形成に伴う生理活性を有する OCN を特異的に定量するキットである。測定には, 抗 Gla-OCN 抗体でコートされた 96 穴プレートに 10 mM トリス塩酸緩衝液 (pH 7.4) で希釈した GCF 試料あるいは Gla-OCN 標準液を加え, 室温で 2 時間インキュベートし, 次にペルオキシダーゼ標識抗 OCN 抗体を加えた。以後の操作は, P1CP の場合と全く同じ手順で行った。なお, キットの検出限界および測定有効範囲は, それぞれ 10 ng/ml および $10 \sim 640 \text{ ng/ml}$ であった。

1 回の測定には, 回収した GCF 試料の総量 (約 $110 \mu\text{l}$) から $100 \mu\text{l}$ を採取して定量し, 測定値から P1CP および OCN の総量を算出し, それぞれ ng/site , pg/site で表示した。さらに, GCF $1 \mu\text{l}$ あたりの濃度も算出し, それぞれ $\text{ng}/\mu\text{l}$, $\text{pg}/\mu\text{l}$ で表示した。

4. 歯周組織診査

歯周組織診査として, 当該部位 (歯肉溝あるいは歯周ポケット) のプロービング (PD) 値を測定した。同時にプロービング時の出血の有無 (BOP) を調べ

るとともに、歯肉炎指数 (GI) を Löe と Silness の基準¹⁷⁾に従って数値化した。

5. 統計分析

統計学的有意差を判定するために、P1CP および OCN 値のポケット部位と対照部位での比較、および BOP の有無での比較は、Mann-Whitney *U*-test により評価した。また、P1CP および OCN 値と GI や PD 値との相関関係は、Spearman の順位相関分析により評価した。

結 果

1. 被験部位の歯周組織診査

被験者 100 名のポケット部位 70 箇所および健常部位 30 箇所の GI 値、PD 値、および BOP (+) 数、ならびに P1CP 用被験者、OCN 用被験者に分けた場合のそれらの値について調べた結果を表 1 に示す。その結果、ポケット部位での GI 値はいずれも 2 前後、PD 値は 6 mm 前後、BOP (+) 箇所は 80% 以上であった。一方、健常部位での GI 値はすべて 0、PD 値はすべて 2 mm、BOP (+) 箇所は全く認められなかった。

2. GCF 量

ポケット部位と健常部位での GCF 総量を比較した結果を表 2 に示す。全試料でみた場合、ポケット部位では健常部位の 2.9 倍の GCF 量があり、P1CP 用試料と OCN 用試料の個々でみた場合も、ポケット部位で有意に高く、P1CP 用試料で 2.6 倍、OCN 用試料で 3.4 倍であった。このように、歯周炎患者の歯周ポケットからの GCF 量は、健常者歯肉溝からの GCF 量と比べ明らかに増量していることが示された。

3. GCF 中の P1CP 量および OCN 量

図 1 は、ポケット部位および健常部位での P1CP 量と OCN 量を示したものである。P1CP 量はポケット部位で 1.04 ± 0.14 ng、健常部位で 0.17 ± 0.02 ng であり、歯周炎患者の歯周ポケットでは健常者の歯肉溝と比較して GCF 中に 6.1 倍の P1CP 量が含

まれていた。一方、OCN 量に関しては、ポケット部位で 56.3 ± 3.7 pg、健常部位で 38.8 ± 6.3 pg であり、歯周炎患者の歯周ポケットでは健常者の歯肉溝と比較して GCF 中に 1.5 倍の OCN 量が含まれていた。

次に、P1CP と OCN のレベルをそれぞれ濃度 (μl あたりの量) で表示したものが図 2 である。P1CP 濃度はポケット部位で 0.91 ± 0.15 ng/ μl 、健常部位で 0.38 ± 0.04 ng/ μl であり、歯周炎患者の歯周ポケット GCF における P1CP 濃度は健常部位の 2.4 倍であった。このように、P1CP レベルは総量でも濃度でもポケット部位で有意に高い値を示した。一方、OCN 濃度に関しては、ポケット部位で 47.6 ± 3.4 pg/ μl 、健常部位で 123.9 ± 26.9 pg/ μl であり、OCN は健常部位の方が高濃度となりポケット部位の 2.6 倍の値を示していた。この結果は図 1 と異なり、総量と濃度で相反する結果となった。すなわち、総量表示ではポケット部位で OCN レベルが高く (1.5 倍)、濃度表示では逆に健常部位で OCN レベルが高い (2.6 倍) という結果が得られた。

4. GCF 中の P1CP 量および OCN 量と臨床指標との関連

図 3 は、GCF 中の P1CP 量と歯肉炎指数 GI あるいは PD 値との相関を調べた結果である。P1CP 量と GI との間、および P1CP 量と PD 値との間には、いずれも強い正の相関関係が認められた。同様に OCN においても、GI および PD 値との間にそれぞれ正の相関関係が認められた (図 4)。相関の程度を比

表 2 ポケット部位と健常部位での GCF 量の比較

	ポケット部位 (μl)	健常部位 (μl)
全試料 (n=100)	$1.23 \pm 0.04^*$ (n=70)	0.43 ± 0.03 (n=30)
P1CP 用被験者 (n=60)	$1.23 \pm 0.06^*$ (n=40)	0.47 ± 0.04 (n=20)
OCN 用被験者 (n=40)	$1.22 \pm 0.06^*$ (n=30)	0.36 ± 0.04 (n=10)

健常部位に対して有意差あり (* $p < 0.0001$)

表 1 ポケット部位と健常部位での臨床指標値

	ポケット部位			健常部位		
	GI	PD	BOP (+)	GI	PD	BOP (+)
全被験者 (n=100)	2.11 ± 0.07	6.03 ± 0.20 (n=70)	62/70	0.00	2.00 (n=30)	0/30
P1CP 用被験者 (n=60)	2.23 ± 0.09	5.90 ± 0.30 (n=40)	37/40	0.00	2.00 (n=20)	0/20
OCN 用被験者 (n=40)	1.97 ± 0.10	6.20 ± 0.23 (n=30)	25/30	0.00	2.00 (n=10)	0/10

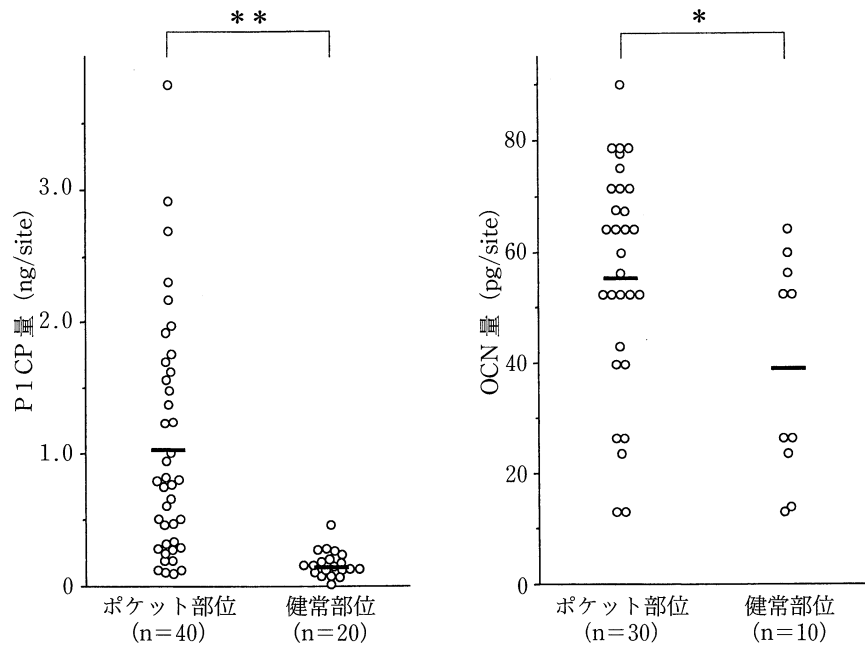


図 1 歯周炎患者における GCF 中の P1CP 量および OCN 量
(バーは平均値を示す。* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$)

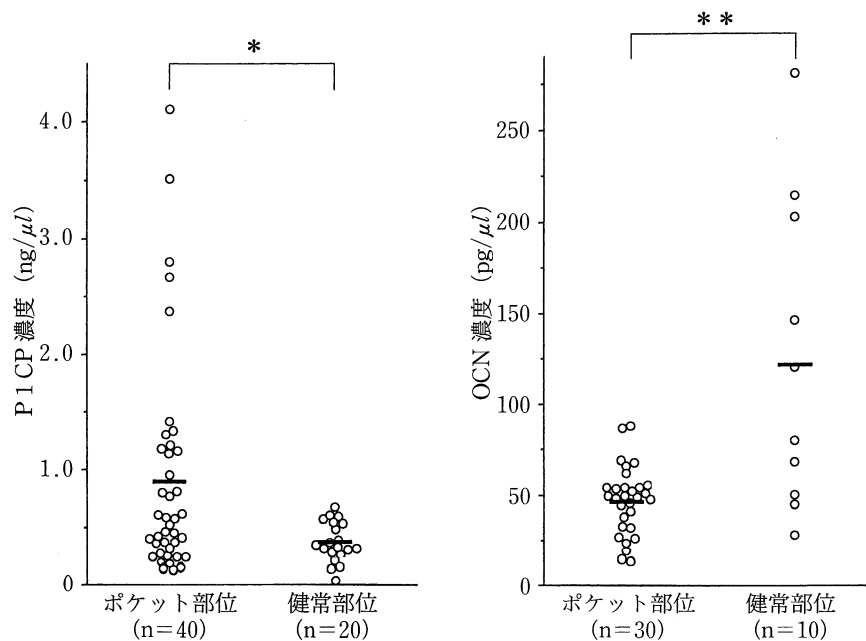


図 2 歯周炎患者における GCF 中の P1CP 濃度および OCN 濃度
(バーは平均値を示す。* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$)

較すると、P1CPの方がOCNより強い相関関係を示していた。次に、健康者、歯周炎患者にかかわらず、BOPの有無によって被験者を2つの群に分けた場合のP1CP量およびOCN量を比較した(表3)。その結果、P1CP量はBOP(+)の部位ではBOP

(-)の部位に比べ5.5倍の高値を示したが、OCN量に関してはBOPの有無によって有意差は認められなかった。以上の結果、P1CP量およびOCN量ともGIおよびPD値と正の相関関係があることから、GCF中のP1CPおよびOCNは歯肉炎症の進展や歯

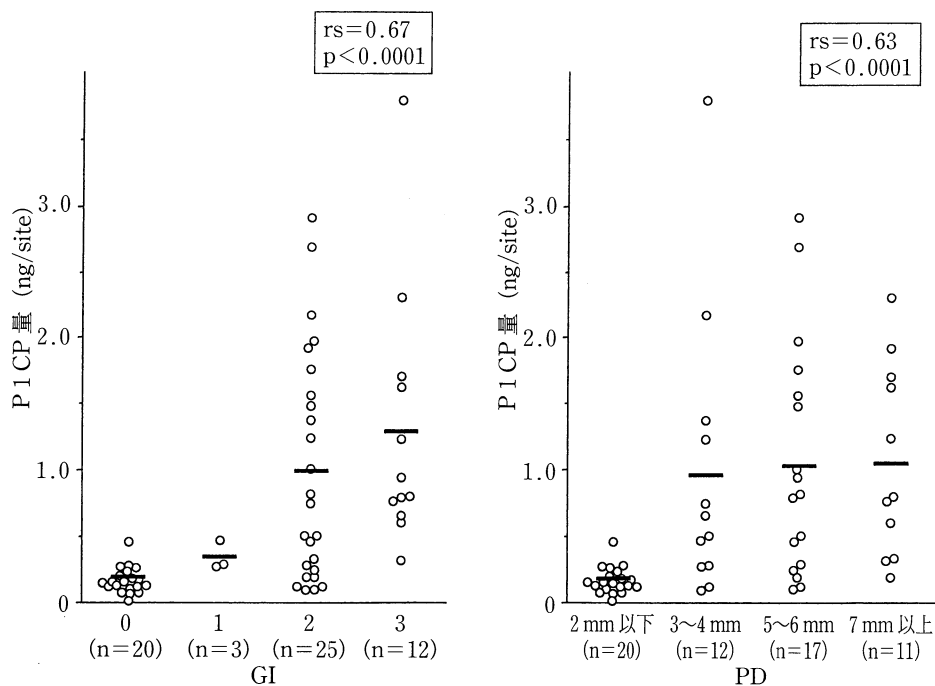


図3 歯周炎患者におけるGCF中のP1CP量とGI値およびDP値との相関関係

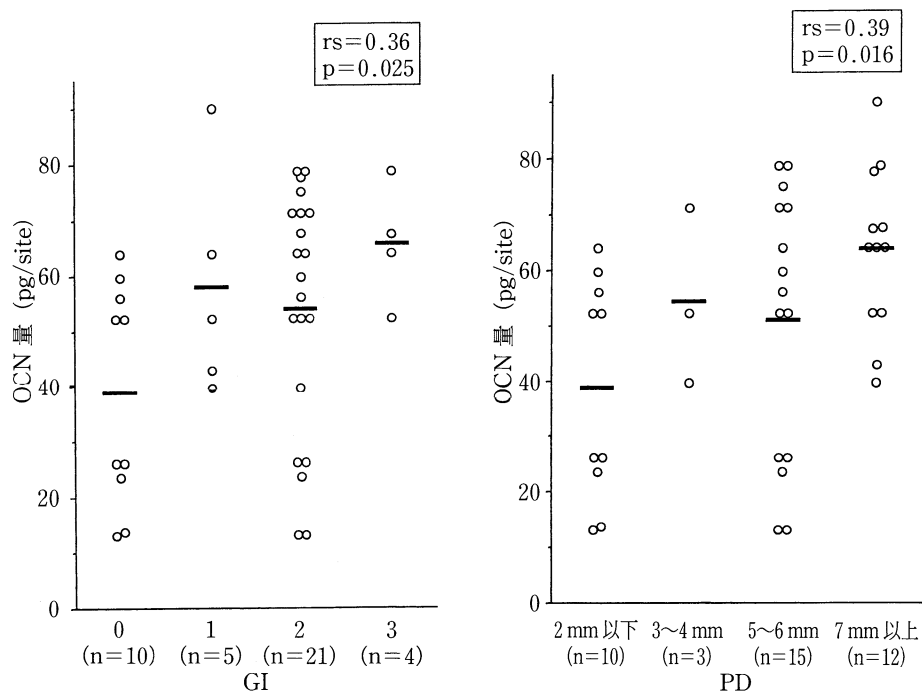


図4 歯周炎患者におけるGCF中のOCN量とGI値およびDP値との相関関係

周ポケットの形成に伴って増加するとともに、P1CPはBOPの認められる部位で著明に増加することが明らかとなった。

考 察

本研究では、GCF中に含まれる骨代謝指標物質

P1CP および OCN の定量を行った。P1CP は、I 型プロコラーゲン分子が合成され細胞外に分泌される際に分断遊離され、そのままの形で血中に溶出し、肝細胞に取り込まれて代謝される⁹⁾。骨芽細胞の活動に対する鋭敏さという点では OCN に及ばないものの、安定で保存しやすく測定も比較的簡便であることから P1CP の一般臨床での利用価値は高いと言われている⁹⁾。実際、副甲状腺機能亢進症、Paget 病、前立腺癌などの疾患では有用な指標として頻用されている。一方、OCN は骨芽細胞あるいは骨芽細胞様細胞のみによって産生されることから、骨代謝を鋭敏に反映する指標として知られており、血清 OCN 値は骨粗鬆症などの骨疾患の重要な診断指標、とりわけ骨代謝回転の速い場合に増加する指標として一般臨床に用いられている^{6,8)}。さらに、閉経後の骨粗鬆症の診断や治療経過の指標としても期待されている⁹⁾。

本研究では、歯周炎患者のポケット部位での GCF 量が健常者の歯肉溝 GCF 量より 2~3 倍増量することを最初に確認した。これは、GCF 量は歯周組織の炎症に伴って増加するというコンセンサスを裏付ける結果である。次に、GCF 中に P1CP および OCN が存在することを確認した。GCF 中の P1CP の存在については、今回著者らがはじめて明らかにしたものであり、OCN については過去に 5 編の報告がみられる^{9~12,18)}。P1CP、OCN とともに健常部位およびポケット部位の両方から検出され、その濃度は、血清値と比較して著しく高い値を示していた。すなわち、通常の血清 P1CP および OCN レベルは、それぞれ 100~120 pg/ μ l¹⁹⁾ および 5~8 pg/ μ l²⁰⁾ 程度であるのに対し、今回調べた GCF における健常部位での平均値は P1CP と OCN でそれぞれ 380 pg/ μ l および 124 pg/ μ l、ポケット部位での平均値はそれぞれ 910 pg/ μ l および 48 pg/ μ l であり、いずれも血清中よりかなり高い濃度で存在していた (P1CP で 3~9 倍、OCN で 6~25 倍)。この事実は、GCF 中の P1CP と OCN が局所で産生され滲出したことを意味しており、健常部位においては歯槽骨を含めた歯周組織の活発なターンオーバー^{21,22)}に起因し、ポケット部位においては歯周組織の破壊に引き続いて起こる骨代謝回転のさらなる上昇が加わった結果であろうと推察される。P1CP は明らかに合成系の産物であり、OCN についても使用したキットが合成産物としての OCN を測定しているの、両者とも骨形成系指標として解釈することができる。ちなみに、骨芽細胞で合成分泌された OCN は、約 2/3 が骨基質に取り込まれ、残り 1/3 が血中に放出される⁹⁾。一方、骨吸収に伴って遊離される OCN はライソゾーム酵素であるカテプシン

表 3 BOP の有無における P1CP 量および OCN 量の変化

	P1CP (ng/site)	OCN (ng/site)
BOP (+)	1.09 $\pm$ 0.15* (n=37)	56.0 $\pm$ 4.2 (n=25)
BOP (-)	0.20 $\pm$ 0.02 (n=23)	45.2 $\pm$ 5.5 (n=15)

BOP (-) に対して有意差あり (*p<0.01)

B, D, L, H, S によって断片化されることも明らかにされている²³⁾。Kunimatsu ら⁹⁾は、OCN の N 末端 20 残基を認識する酵素抗体法で定量分析していることから、彼らが測定した GCF 中の OCN は骨形成と骨吸収の両方を反映していると自ら考察している。

P1CP と OCN とを比較した場合、P1CP の方が臨床指標との間により深い関連が認められた。すなわち、P1CP は、1) ポケット部位と健常部位での差が顕著であること、2) GI および歯周ポケットの深さと強い相関関係が認められること、3) BOP の認められる部位で著明に増加することの 3 点が主要な違いとして示された。BOP は付着の喪失や組織破壊の予知指標として認められている²⁴⁾ことから、BOP (+) の部位で P1CP 量が上昇するという事実は、歯槽骨代謝の盛んな時期、おそらく歯周病変が高代謝回転型で進行しているときに P1CP が増量することを意味しているのではないかと推察される。OCN に関しては、1) における増加程度が P1CP より少なく、2) においては相関関係の強さが P1CP ほどでなく、3) においては有意差が認められなかった。とくに、1) では OCN を濃度で表示した場合に健常部位の方がポケット部位より有意に高い値を示す結果となった。これは炎症による GCF 量の増加率が OCN 量の増加率を大きく上回ったために起こった現象であると考えられる。同様の現象は過去の報告にもみられ、Lee ら¹²⁾によれば、OCN の総量は健常部位とポケット部位では差がなく、濃度で表示すると健常部位で高くなる傾向を示す。また、Nakashima ら¹⁰⁾によれば、OCN 総量は歯肉炎より歯周炎において高いが、濃度で表示すると有意差がなくなる。これらの原因として、炎症の強い部位で複数回の GCF を採取すると GCF 中の成分は希釈されやすくなる²⁵⁾ため、濃度で表示すると結果が不明瞭になるものと考えられる。したがって、GCF に関する研究では GCF 量の増加によってデータの分析が困難になりがちなことから、濃度表示ではなく一定時間内に採取した量として分析する場合が多く、過去の OCN の報告でも量の変化を分析してデータを評価している^{9~11,13)}。

Kunimatsu ら⁹⁾や Nakashima ら¹⁰⁾は、GCF 中の OCN 量は歯周組織の炎症指標と正の相関関係を示すことを報告し、Giannobile ら¹¹⁾は、イヌの GCF を用いた実験で、OCN は歯槽骨破壊を反映するが、コラーゲンの架橋物質である ICTP (C 末端テロペプチド)の方が歯槽骨破壊の指標としては優れていると報告している。Lee ら¹²⁾は、OCN は歯周炎の病態を反映する指標として適切でないことを報告している。このように OCN の評価が分かれる原因を考えると、健康部位とポケット部位での圧倒的な差が得られないこと、測定産物が骨形成と骨吸収の両方を反映する系を用いている場合があること、OCN 分子が不安定であることの3点が関連しているように思われる。一方、P1CP は健康部位とポケット部位での差が顕著に現われること、形成系産物としてのみ存在すること、分子が安定であることなどから、歯周炎の骨代謝関連指標としての有用性は OCN 以上に高いものと評価できる。以上のように、今回の研究では P1CP および OCN とともに歯周炎における骨代謝関連指標としての有用性が示唆されるとともに、P1CP が優れた指標になりうる可能性が示された。しかしながら、今回の結果は横断研究であり、歯周炎患者の一時期での一断面を示したにすぎない。GCF 中の P1CP 量が歯周炎における有力な骨代謝関連指標としての位置づけを得るためには、経時的な“diagnostic test”を行って GCF 中の P1CP 量と歯槽骨吸収との相関関係を調べる必要がある。

本研究は日本学術振興会科学研究費補助金(課題番号 11557168 および 13307059)の援助により行われた。

本研究の内容の一部は第 42 回秋季歯周病学会学術大会(1999 年 10 月 22 日、横浜)において発表した。

文 献

- Offenbacher S, Odle BM, Van Dyke TE : The use of crevicular fluid prostaglandin E₂ levels as a predictor of periodontal attachment loss. *J Periodont Res*, 21 : 101-112, 1986.
- Lamster IB, Oshrain RL, Harper DL, Celenti RS, Hovliaras CA, Gordon JM : Enzyme activity in crevicular fluid for detection and prediction of clinical attachment loss in patients with chronic adult periodontitis. Six month results. *J Periodontol*, 59 : 516-523, 1988.
- Stashenko P, Fujiyoshi P, Obernesser MS, Prostak L, Haffajee AD, Socransky SS : Levels of interleukin 1 beta in tissue from sites of active periodontal disease. *J Clin Periodontol*, 18 : 548-554, 1991.
- Persson GR, DeRouen T, Page RC : Relationship between levels of aspartate aminotransferase in gingival crevicular fluid and gingival inflammation. *J Periodont Res*, 25 : 81-87, 1990.
- Kido J, Nakamura T, Kido R, Ohishi K, Yamauchi N, Kataoka M, Nagata T : Calprotectin in gingival crevicular fluid correlates with clinical and biochemical markers of periodontal disease. *J Clin Periodontol*, 26 : 653-657, 1999.
- 藤本清一, 清野佳紀 : 骨形成の生化学マーカーによる病態診断, 松本俊夫編集, 分子骨代謝学と骨粗鬆症, メディカルレビュー社, 東京, 1996, 279-287.
- Tokita A, Kelly PJ, Nguyen TV, Qi JC, Morrison NA, Risteli L, Risteli J, Sambrook PN, Eisman JA : Genetic influences on type I collagen synthesis and degradation : further evidence for genetic regulation of bone turn over. *J Clin Endocrinol Metab*, 78 : 1461-1466, 1994.
- Seibel MJ, Pols HAP : Clinical application of biochemical markers of bone metabolism, edited by Bilezikian JP, Raisz LG, Rodan GA, Principles of bone biology, Academic Press, San Diego, 1996, 1293-1311.
- Kunimatsu K, Matakaki 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 patients. *J Periodontol*, 64 : 865-869, 1993.
- Nakashima K, Roehrich N, Cimasoni G : Osteocalcin, prostaglandin E₂ and alkaline phosphatase in gingival crevicular fluid : their relations to periodontal status. *J Clin Periodontol*, 21 : 327-333, 1994.
- Giannobile WV, Lynch SE, Denmark RG, Paquette DW, Fiorellini JP, Williams RC : Crevicular fluid osteocalcin and pyridinoline cross-linked carboxyterminal telopeptide of type I collagen (ICTP) as markers of rapid bone turnover in periodontitis. A pilot study in beagle dogs. *J Clin Periodontol*, 22 : 903-910, 1995.
- Lee AJ, Walsh TF, Rawlinson A : Gingival crevicular fluid osteocalcin in adult periodontitis. *J Clin Periodontol*, 26 : 252-256, 1999.
- Hou L-T, Liu C-M, Rossomando EF : Crevicular interleukin-1 β in moderate and severe periodontitis patients and the effect of phase I periodontal treatment. *J Clin Periodontol*, 22 : 162-167, 1995.
- Kido J, Nakamura T, Kido R, Ohishi K, Yamauchi N, Kataoka M, Nagata T : Calprotectin in gingival crevicular fluid correlates with clinical and biochemical markers of periodontal disease. *J Clin Periodontol*, 26 : 653-657, 1999.

- chi N, Kataoka M, Nagata T : Calprotectin, a leukocyte protein related to inflammation, in gingival crevicular fluid. *J Periodont Res*, 33 : 434-437, 1998.
- 15) Nakamura T, Kido J, Kido R, Ohishi K, Yamachi N, Kataoka M, Nagata T : The association of calprotectin level in gingival crevicular fluid with gingival index and the activities of collagenase and aspartate aminotransferase in adult periodontitis patients. *J Periodontol*, 71 : 361-367, 2000.
- 16) Griffiths GS, Curtis MA, Wilton JMA : Selection of a filter paper with optimum properties for the collection of gingival crevicular fluid. *J Periodont Res*, 32 : 355-361, 1997.
- 17) Löe H, Silness J : Periodontal disease in pregnancy (I) Prevalence and severity. *Acta Odontol Scand*, 21 : 532-551, 1963.
- 18) Griffiths GS, Moulson AM, Petrie A, James IT : Evaluation of osteocalcin and pyridinium cross-links of bone collagen as markers of bone turnover in gingival crevicular fluid during different stages of orthodontic treatment. *J Clin Periodontol*, 25 : 492-498, 1998.
- 19) 山本逸雄 : 生化学的検査 骨代謝マーカー PICP, *日本臨床*, 57(増刊号) : 215-218, 1999.
- 20) Price PA, Parthemore JG, Deftos LJ : New biochemical marker for bone metabolism. Measurement by radioimmunoassay of bone Gla protein in the plasma of normal subjects and patients with bone disease. *J Clin Invest*, 66 : 878-883, 1980.
- 21) Sodek J : A comparison of the rates of synthesis and turnover of collagen and non-collagen proteins in adult rat periodontal tissues and skin using a microassay. *Arch Oral Biol*, 22 : 655-665, 1977.
- 22) 秋吉正豊 : 骨改造のメカニズム・病理学的立場から. *歯科ジャーナル*, 20 : 600-608, 1984.
- 23) Baumgrass R, Williamson MK, Price PA : Identification of peptide fragments generated by digestion of bovine and human osteocalcin with the lysosomal proteinases cathepsin B, D, L, H, and SJ. *Bone Miner Res*, 12 : 447-455, 1997.
- 24) Greenstein GS, Rethman MP : 進行性の破壊性歯周病変の診査・診断, 小野善弘, 中村公雄 (監訳), *ペリオドンタルセラピー・臨床と科学的根拠 Vol. 1 : クインテッセンス出版*, 東京, 1998, 71-87.
- 25) Eley BM, Cox SW : Cathepsin B/L-, elastase-, tryptase-, trypsin- and dipeptidyl peptidase IV-like activities in gingival crevicular fluid : correlation with clinical parameters in untreated chronic periodontitis patients. *J Periodont Res*, 27 : 62-69, 1992.

連絡先 :

徳島大学歯学部歯科保存学第二講座

〒770-8504 徳島市蔵本町3丁目18-15