

〔原著〕 松本歯学 18 : 54~59, 1992

key words : 酸性ホスファターゼ - アイソザイム - 歯根 - ヒト抜去歯

ヒト歯根表層組織中の酸性ホスファターゼアイソザイムについて

須澤弥生子, 出口敏雄

松本歯科大学 歯科矯正学講座 (主任 出口敏雄 教授)

原田 実

松本歯科大学 口腔生化学教室 (主任 原田 実 教授)

Isozymes of Acid Phosphatase on the Root Surface Tissue of Human Extracted Teeth

YAEKO SUZAWA and TOSHIO DEGUCHI

*Department of Orthodontics, Matsumoto Dental College
(Chief : Prof. T. Deguchi)*

MINORU HARADA

*Department of Oral Biochemistry, Matsumoto Dental College
(Chief : Prof. M. Harada)*

Summary

Acid phosphatase (EC 3. 1. 3. 2., AcP) is widely distributed in several tissues such as prostate, placenta, liver, spleen and leucocyte. Their activities are distinguished as five isozymes (1, 2, 3, 4 and 5) according to electro-mobility on disk gel electrophoresis.

In this study we determined the AcP activity on the root surface tissue of 11 extracted human premolars (subjects 12-17 years old) as a standard activity of the AcP in the healthy root surface condition. The average activity (nmol/min/mg) of 11 teeth was determined to be 23.6 ± 9.3 (mean \pm SD), and the activity was reduced to 18.2 ± 7.5 by the addition of 10mM L-tartrate. Therefore 77% of the total activity represented tartrate resistant AcP activity. On polyacrylamid gel electrophoresis, isozyme bands of 1, 3 and 5, compared to leucocyte isozyme pattern, were demonstrated as the general pattern of AcP activity on the root surface of human tooth. The color development of the active bands, 1 and 3 were reduced by the addition of L-tartrate, while 5 was not reduced and identified as tartrate resistant AcP.

緒 言

酸性ホスファターゼ (EC 3.1.3.2., 以下 AcP と略す) は, オルトリン酸エステルを加水分解し, リン酸エステルを遊離する酵素のうち, 酸性領域に至適 pH を持つ酵素で, 前立腺¹⁾, 胎盤²⁾, 肝³⁾, 脾⁴⁾, 骨⁵⁾などで存在が証明されている。また, 血液においても, 赤血球や白血球⁶⁾, 血漿中⁷⁾に AcP 活性が存在する。白血球や血漿中の AcP は, ポリアクリルアミドゲル電気泳動法 (PAGE) により, 5つのアイソザイム (番号 1, 2, 3, 4, 5) に分画され, 1, 2, 3 および 4 は L-酒石酸で阻害される酒石酸感受性酸性ホスファターゼ (TSAcP) で, 5 は L-酒石酸に阻害されない酒石酸抵抗性酸性ホスファターゼ (TRAcP) である。AcP のアイソザイムパターンは, 細胞の種類または, 特定の疾患のときの血清中で異なるため, 細胞の同定や臨床診断で応用されている^{6,7)}。すなわち, 有毛細胞白血病では, TRAcP 活性値が著明に上昇する。また, 組織化学的に TRAcP は, 破骨細胞, 破歯細胞の標識酵素として用いられている⁸⁾。歯胚や歯周組織においても, 組織化学的, 生化学的に AcP の存在が示唆されているが, ヒト歯根表層組織中のアイソザイムパターンならびに TRAcP, TAcP の両者の活性の割合については不明である。そこで, ヒト抜去歯の歯根表層組織の AcP 活性値およびアイソザイムパターンについて検討した。

材料および方法

1. 実験試料の調整

(1) ヒト歯根表層組織

矯正歯科治療のために抜去した小臼歯で健常なものを使用し, 1歯ずつ試料を調整した。歯根部を冷却した 0.25 M スクロースで数回洗浄し, 表層の軟組織を鋭匙で剥離したものに, 0.25 M スクロースを 350 μ l 加え, ハンドホモジナイザーで均質化し, 遠心分離 (400 xg, 5分) した上清を試料とした。

(2) ヒト血清

健常者の全血 10 ml を試験管にとり, 室温で 30 分静置し, 試験管壁に付着した血餅を剝し, 遠心分離 (1600 xg, 10分) した上清を使用した。

(3) ヒト白血球

健常者の全血 10 ml を 1%ヘパリン溶液で処理した試験管にとり凝固阻止したものに, 6%デキストラン (分子量 20万) を生理食塩水に溶解したものを 1.7 ml 加え, 1時間静置し, 上清を遠心分離 (100 xg, 20分) した沈渣を白血球として用いた⁹⁾。沈渣に, 5%トリトン X-100 を含むトリス-塩酸緩衝液を加え, 冷却下でハンドホモジナイザーを用いて均質化したものを試料とした。

2. 実験方法

(1) AcP 活性測定法

3種類の基質について活性測定を行い, 比較した。また, 反応液に L-酒石酸を 1-20 mM 加え, その阻害度を測定した。

① p-ニトロフェニルリン酸 (p-NPP)

Anderson ら¹⁰⁾の方法に準じた。0.1%トリトン X-100 を加えた 0.1M 酢酸緩衝液 (pH 5.8) と 9.2 mM p-NPP と試料を混合し, 総量 2.0 ml とした反応液を 37°C で 30 分間反応させた。0.05N NaOH 2.0 ml で反応を停止させた後, 生成した p-ニトロフェノールの吸光度を 410 nm で測定した。

② α -ナフチルリン酸 (α -NAP)

Li ら¹¹⁾の方法に準じて測定した。0.1M 酢酸緩衝液 (pH 5.0), 5.0 mM α -NAP, 試料を加え総量 3.0 ml とした反応液を 37°C で, 30 分間反応させた後, 0.1M トリス-塩酸緩衝液に 4.0% SDS, 0.2% ファーストレッド ITR を加えた液を 1.0 ml 加え, 15 分後に吸光度 (545 nm) を測定した。

③ ナフトール ASBI リン酸 (ASBI-P)

α -NAP と同様の反応系で基質を 0.5 mM ASBI-P に変えて測定した⁷⁾。

(2) タンパク質量の測定

試料中のタンパク質量は, Hartree の方法¹¹⁾に準じて行い, 基準としてウシ血清アルブミンを用いた。

(3) ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (PAGE)

各種試料のホモジネートは, Reisfeld ら¹²⁾の方法, Axline の方法¹³⁾に準じて電気泳動を行なった。0.5%トリトン X-100 を含む酢酸緩衝液 (pH 4.0) の 7.5% ポリアクリルアミドゲルを用い, 35 mM β -アラニン酢酸緩衝液 (pH 4.0) を上下の泳動槽に入れ, 上部を陽極, 下部を陰極にして, 4°C-電流値 4 mA/カラムで 90 分間, 泳動した。

(4) AcP 活性バンドの染色

泳動後、ゲルを4 mM ASBI-Pを含む0.1M 酢酸緩衝液(pH5.0)に浸漬し、37°Cで2時間反応させた後、30 mM ファーストガーネット GBC を加えた0.1M酢酸緩衝液内に30分間静置した。その後、7.5%酢酸溶液で反応を停止させ、そのまま保存した⁶⁾。また、ASBI-Pと反応させるときに27 mM L-酒石酸を加え、AcP 活性への影響を観察した。

結 果

1. 個々の歯におけるヒト歯根表層組織の AcP 活性値、およびアイソザイムパターンの比較

矯正歯科治療を行っている患者(12~17歳)から抜歯された小白歯、11本についてそれぞれのAcP 活性値、10 mM L-酒石酸添加時の AcP 活性値をp-NPP を基質として測定した結果を表1に示した。

試料により異なるが、AcP の総活性値(平均±SD)23.6±9.3 nmol/min/mg で、そのうち約23%がL-酒石酸により阻害を受ける TSAcP で、残り約77%が阻害を受けない TRAcP であった。ただし、両酵素のタンパク質量は測定していない。

また、同じ11歯について PAGE を行い、活性染

表1：ヒト歯根表層組織の AcP 活性値：

基質にp-NPPを用いてL-酒石酸を加えていないとき(-)と10 mM 存在下(+)での活性測定値。

No	年齢	部位	タンパク質量 (mg/ml)	比活性値(nmol/min/mg)	
				酒石酸(-)	酒石酸(+)
1	15	4	2.7	33.5	32.0
2	17	4	4.0	5.9	5.9
3	12	4	1.7	41.6	23.1
4	16	5	3.3	16.7	16.7
5	13	4	0.8	24.0	19.2
6	13	4	0.9	17.7	13.2
7	15	5	2.5	28.9	22.3
8	12	4	5.0	18.9	14.0
9	12	4	3.8	31.0	29.0
10	14	4	1.4	18.0	11.2
11	14	4	1.2	22.9	13.1
平均±S.D.			2.5±1.3	23.6±9.3	18.2±7.5

色によりアイソザイムを観察した結果、AcP アイソザイム 1, 3, 5 の存在が同定でき、27 mM L-酒石酸存在下で、アイソザイム 1 と 3 の活性バンドが消失し、5 に相当する部分のみ残存した。アイソザイム 5 については、活性バンドの発色の程

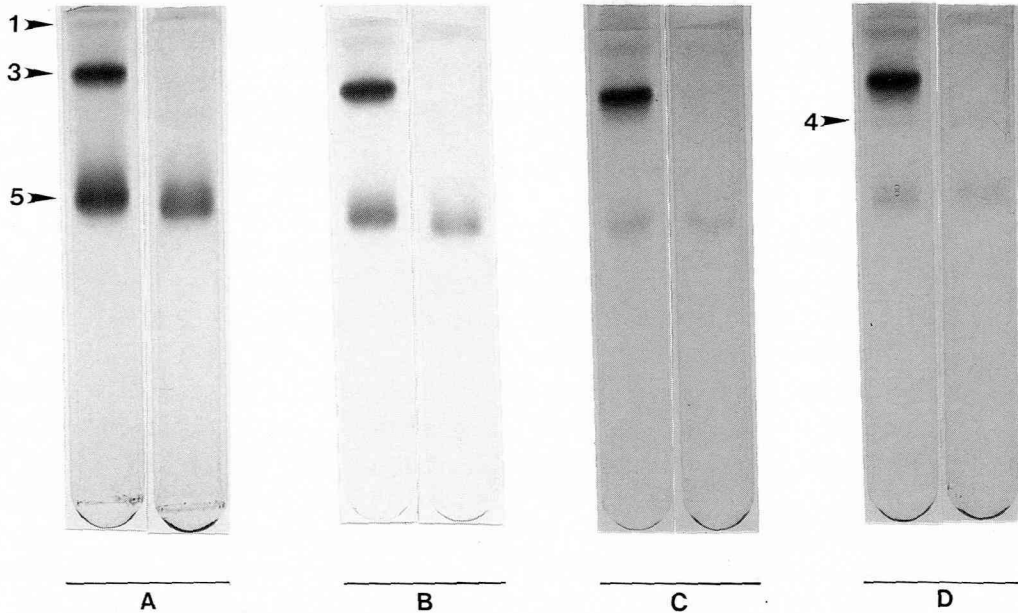


図1：ヒト歯根表層組織の AcP アイソザイムパターン：

それぞれ左はL-酒石酸を加えず活性染色し、右は27 mM L-酒石酸を加え活性染色した。

度が試料により異なり、アイソザイム 3 と比較して、より濃く染色されているもの(図 1-A), 痕跡程度に染色されているもの(図 1-C), 両者の中間のものがあり(図 1-B), 差異が認められた。また、アイソザイム 4 の存在が認められるもの(図 1-D) もあった。これらアイソザイムのバンドに付した番号は、Li ら⁹⁾の白血球のパターンと比較したものである(図 4, 写真参照)。

2. AcP 活性値の L-酒石酸による影響

p-NPP, α-NAP, ASBI-P の 3 種類の基質について、同一試料で活性測定したものを表 2 に示す。ASBI-P は他の 2 種類の基質に比較して、やや低い値を示した。この値は各試料のホモジネートについて測定値を提出することは量的に不可能なためホモジネートを混合したものについて測定したものである。また、反応液に L-酒石酸を添加した場合の活性値の変化(%) を図 2 に示した。p-NPP と α-NAP は 5 mM で約 30~35% の阻害がみられ、ASBI-P は 5 mM で約 40%, 15 mM で約 50% の阻害が認められた。

表 2 : ヒト歯根表層組織の基質による活性値の変化

比活性値(nmol/min/mg)		
p-NPP	α-NAP	ASBI-P
32.8	29.4	23.1

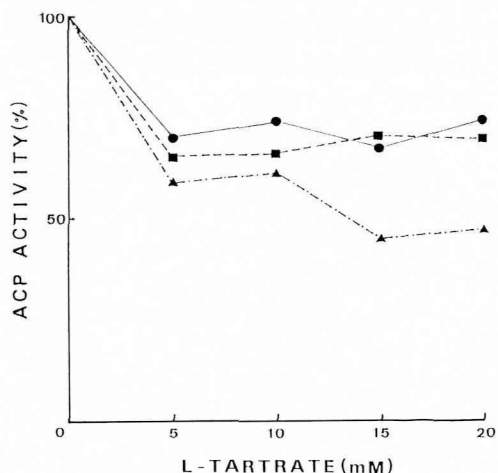


図 2 : L-酒石酸濃度の変化にともなう AcP 活性値の変化: 基質に p-NPP(■), α-NAP(●), ASBI-P(▲)を用い同一試料で活性測定をした。

3. AcP 活性におよぼすフッ素の影響

AcP の阻害剤として知られるフッ素を 1-20 mM 加えたときの活性値の変化を図 3 に示した。10 mM のフッ素存在下で約 80% が阻害され、L-酒石酸よりも強い阻害作用が認められた。

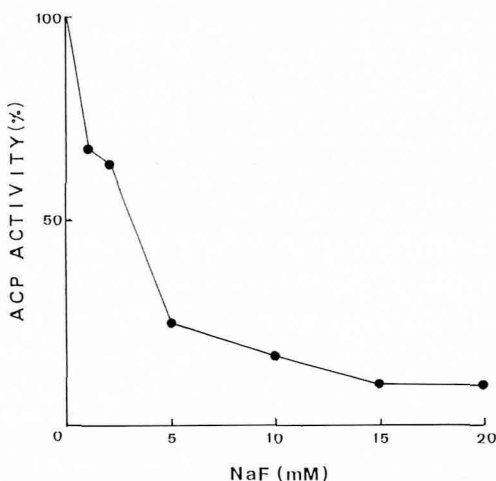


図 3 : フッ化ナトリウム濃度の変化にともなう AcP 活性値の変化: 基質に p-NPP を用いて 2 回測定した平均値。

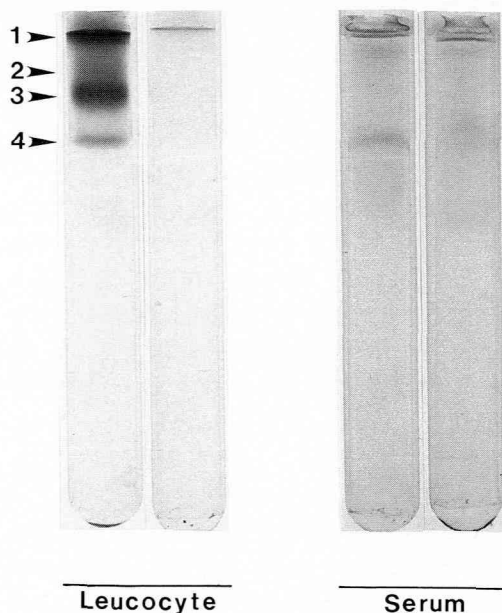


図 4 : 白血球, 血清の AcP アイソザイムパターン: それぞれ左は L-酒石酸を加えず活性染色し, 右は 27 mM L-酒石酸を加え活性染色した。

4. ヒト血清、白血球の AcP アイソザイムパターンとの比較

白血球、血清の PAGE による泳動パターンを図 4 に示した。白血球には 1, 2, 3, 4 の活性バンドがみられ、5 はみられなかった。血清については、不明瞭なバンド 3, 5 が認められた。両者とも、歯根表層組織のアイソザイムパターンとは異なるものであった。

考 察

AcP は生体内に広く分布し、特定の臓器や細胞によっては数種のアイソザイムが存在する^{6,7)}。歯周組織に関しては、矯正力を加えた際の圧迫側に破骨細胞または、破歯細胞が出現するため、このマーカーとして組織化学的に TRAcP 活性の観察が行なわれている¹⁴⁾。細胞レベルでは、培養ヒト歯根膜細胞、歯肉線維芽細胞について検索が行なわれている¹⁵⁾。しかし、歯根表層組織のアイソザイムパターンについての報告はない。

矯正歯科治療によって便宜抜去された歯は健全な歯根膜組織を構成していると基本的に考え、便宜抜去歯 11 本を材料とし各歯根表層組織中のアイソザイムパターンならびに TRAcP, TSAcP 両酵素の活性の割合がいかなる値であるかを測定した。

抜去歯 1 本より得たホモジネートを酵素材料として測定したアイソザイムパターンは個々の試料によって差があったが、白血球中のアイソザイム 1, 3, 5 と対応する活性バンドが観察され、L-酒石酸の添加により、1, 3 は TSAcP, 5 は TRAcP と同定できた(図 1, 4 参照)。活性測定結果から TSAcP と TRAcP の活性値は、およそ 23.6 ± 9.3 と 18.2 ± 7.5 (nmol/min/mg) で、割合は、TSAcP が 23%, TRAcP が 77% であった。培養歯根膜細胞と歯肉線維芽細胞について報告¹⁵⁾された値は、いずれも全活性の 60% が TRAcP 活性と求められており、いずれの細胞においても TRAcP の値が多いことを示唆する。しかし、PAGE のパターンで観察する限り、L-酒石酸存在下における活性の低下は著しいと考えられるが、これは、両活性バンドの比活性の相違に基づくものと推測する。

フッ化物による AcP の阻害は、前立腺の酵素で阻害機構が研究されている¹⁶⁾。ラット歯胚のエナ

メル芽細胞の AcP でもフッ化物による阻害が報告¹⁷⁾され、L-酒石酸の阻害の有無にかかわらず起こることは本実験の結果でも同様であった。

組織化学的には、TRAcP は破骨細胞^{8,18)}や破歯細胞¹⁹⁾に存在し、マーカーとして用いられる可能性が示唆されている。一方、マウス骨髄、脾臓、肺の培養細胞に TRAcP が観察されることから、破骨細胞のマーカーとしては TRAcP 活性は同定のみで、妥当性がない²⁰⁾。

今回、実験に供したヒト抜去歯歯根組織は、歯根膜に存在する細胞を主体とし、少量のセメント質、僅かな血液成分などを含むものと考えられる。しかし、白血球や血清とは異なるアイソザイムパターンを示すことから、歯根膜に存在する細胞すなわち、線維芽細胞に由来する可能性が高い。

今後、TRAcP, TSAcP の両酵素について酵素化学的研究を進め、歯周組織におけるその役割について検討していきたい。さらに本実験の結果は、歯の移動にもなるアイソザイムパターンの変化を検討するための基礎となる。

結 論

矯正治療のために抜去した小臼歯で健全な 11 歯を試料とし、歯根表層組織の AcP について検討した結果、以下のように結論した。

1. *p*-NPP を基質とし、比活性値(nmol/min/mg)を測定した結果、11 歯各々の値は異なるが、平均値 \pm S.D. の値は、反応系に L-酒石酸を添加した場合、 18.2 ± 7.5 、酒石酸無添加の場合、 23.6 ± 9.3 と測定され、この結果より、77% が TRAcP であり、23% が TSAcP 活性であった。

2. PAGE により、Li らの白血球の AcP アイソザイムの報告と比較して、全ての試料にアイソザイム 1, 3, 5 のバンドが観察でき、1 例のみ、アイソザイム 4 が存在した。アイソザイム 1, 3, 4 のバンドは L-酒石酸で活性が阻害される TSAcP であり、アイソザイム 5 は L-酒石酸で阻害されない TRAcP であった。

3. 歯根表層組織の AcP は 10 mM フッ素により、80% が阻害された。

謝 辞

本実験に試供した抜去歯の収集にご協力くださいました松本歯科大学口腔外科学第 1 講座 北村豊助教授

ならびに、口腔外科第2講座 古澤清文講師に深謝いたします。また、本実験を進めるに当りご協力いただいた松本歯科大学口腔生化学教室 平岡行博講師に感謝いたします。

文 献

- 1) Gutman, E. B., Sproul, E. E. and Gutman, A. B. (1936) Significance of increased phosphatase activity of bone at the site of osteoplastic metastases secondary to carcinoma of the prostate gland. *Am. J. Cancer.* **28**: 485-495.
- 2) Ketcham, C. M., Roberts, R. M., Simmen, C. M. and Nick, H. S. (1989) Molecular cloning of the type 5, iron-containing, tartrate-resistant acid phosphatase from human placenta. *J. Biol. Chem.* **264**: 557-563.
- 3) Kaneko, A., Ikeda, T. and Onoe, T. (1970) Acid phosphatase from different cell types in rat liver. *Biochem. Biophys. Acta.* **222**: 218-221.
- 4) Robinson, D. B. and Robert, H. G. (1980) A tartrate-resistant acid phosphatase from Gaucher spleen. *Purification and properties.* *J. Biol. Chem.* **255**: 5864-5870.
- 5) Webber, D., Braidman, I. P., Robertson, W. R. and Anderson, D. C. (1989) The effect of tartrate on bone cell acid phosphatase activity: A quantitative cytochemical study. *J. Bone Min. Res.* **4**: 809-815.
- 6) Li, C. Y., Yam, L. T. and Lam, K. W. (1970) Acid phosphatase isoenzyme in human leucocytes in normal and pathologic conditions. *J. Histochem. Cytochem.* **18**: 473-481.
- 7) Li, C. Y., Chuda, R. A., Lam, W. K. W. and Yam, L. T. (1973) Acid phosphatase in human plasma. *J. Lab. Clin. Med.* **82**: 446-460.
- 8) Minkin, C. (1982) Bone acid phosphatase: Tartrate-resistant acid phosphatase as a marker of osteoclast function. *Calcif. Tissue Int.* **34**: 285-290.
- 9) Rabinowitz, Y. (1964) Separation of lymphocytes, polymorphonuclear leucocytes and monocytes on glass column, including tissue culture observations. *Blood.* **23**: 811-828.
- 10) Anderson, T. R. and Toverud, S. U. (1977) Quantitative studies of acid β -glycerophosphatase activity in developing rat teeth and bones. *Archs. Oral Biol.* **22**: 367-374.
- 11) Hartree, E. F. (1972) Determination of protein: A modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. *Anal. Biochem.* **48**: 422-427.
- 12) Reisfeld, R. A., Lewis, U. J. and Williams, D. E. (1962) Disk electrophoresis of basic proteins and peptides on polyacrylamide gels. *Nature.* **195**: 281-283.
- 13) Axline, S. G. (1968) Isozymes of acid phosphatase in normal and Calmetteguerin bacillus-induced rabbit alveolar macrophages. *J. Exp. Med.* **128**: 1031-1048.
- 14) 甲斐哲也 (1991) 圧迫側歯根膜に出現するマクロファージと破骨細胞に関する組織化学的研究. *日矯歯誌*, **50**: 424-440.
- 15) 吉田英泉. (1991) 培養ヒト歯根膜細胞および歯肉線維芽細胞のアルカリホスファターゼおよび酸性ホスファターゼ活性. *日大歯学*, **65**: 824-831.
- 16) Reiner, J. M., Tsuboi, K. K. and Hudson, P. B. (1955) Acid phosphatase. IV. Fluoride inhibition of prostatic acid phosphatase. *Arch. Biochem. Biophys.* **56**: 165-183.
- 17) Matsuo, S., Nakahara, H., Takano, Y., Ichikawa, H., Wakisaka, S. and Akai, M. (1989) Localization of two distinct acidphosphatase in secretory ameloblasts of rat molar tooth germs. *Archs. Oral Biol.* **34**: 599-608.
- 18) Van de Wijngaert, F. P. and Burger, E. H. (1986) Demonstration of tartrate-resistant acid phosphatase in un-decalcified, glycolmethacrylate-embedded mouse bone: A possible marker for (pre)osteoclast identification. *J. Histochem. Cytochem.* **34**: 1317-1323.
- 19) 鈴木 浩. (1988) ヒト破骨細胞の分化過程における酸性ホスファターゼ活性の局在変化に関する細胞化学的研究. *昭歯誌*, **8**: 260-273.
- 20) Modderman, W. E., Rapp, A. C. t.-B. and Nijweide, P. J. (1991) Tartrate-resistant acid phosphatase is not an exclusive marker for mouse osteoclasts in cell culture. *Bone.* **12**: 81-87.