

ニフェジピン投与ラットの歯肉増殖への細胞外マトリックスの関与

中 條 葉 子 加 藤 牧 子 白 木 雅 文
岩 山 幸 雄

朝日大学歯学部歯周病学講座(主任 岩山幸雄教授)

抄録 歯肉増殖はカルシウム拮抗薬による副作用である。本研究の目的は、ニフェジピンによる増殖歯肉の細胞外マトリックスの主成分であるグリコサミノグリカンとコラーゲン性蛋白の代謝を検討することである。

生後20日齢のSpecific pathogen freeのラットを無作為に3群に分けた。実験群は40日間と80日間、ニフェジピン含有の飼料を与えた。歯肉より抽出されたグリコサミノグリカンは定性・定量分析のため、セルロースアセテート膜電気泳動によって分離した。グリコサミノグリカンとコラーゲン性蛋白の代謝実験には³H-グルコサミン、³H-プロリンを各々指標として用いた。

実験群におけるグリコサミノグリカン量はニフェジピン投与依存性に対照群より増量した。コラーゲン性蛋白への³H-プロリンの取り込みは対照群と比較して、実験群において高い傾向を示した。一方、グリコサミノグリカンへの³H-グルコサミンの取り込みについてはニフェジピンの影響は認められなかった。

以上の結果より、ニフェジピン投与ラットにおける歯肉のグリコサミノグリカンの増量は、グリコサミノグリカンの分解の抑制による可能性が示唆された。

キーワード：ニフェジピン、歯肉増殖、グリコサミノグリカン

緒 言

現在、高血圧や狭心症の治療薬である降圧剤ニフェジピン(NF)の服用による副作用として歯肉増殖が起こることは知られている^{1~6)}。薬物誘発性歯肉増殖は抗癌薬のフェニトインで報告されて以来⁷⁾、免疫抑制剤のシクロスポリン、降圧剤のNFでも同様に歯肉増殖が起こることが報告されている^{8,9)}。特に降圧剤のNFは、フェニトインやシクロスポリンに比べて使用頻度が高く、今後の高齢化社会において服用者の増加が予測される。

歯肉増殖の発症メカニズムについては多くの研究が行われているが、その結果は一様ではない。即ち、薬物が歯肉線維芽細胞に直接働いてコラーゲンや基質の合成を増加させる¹⁰⁾、歯肉細胞の増殖、DNA合成を促進させる^{10,11)}と報告されている一方、線維芽細胞を薬物と培養すると線維、コラーゲン合成が減少すること^{12,13)}、細胞増殖が減少すること¹²⁾など相反する報告も

なされている。特にNF誘発性歯肉増殖においてはフェニトインと異なって、研究の歴史が浅く、その発症機序は今だ不明な点が多い¹⁴⁾。

薬物による歯肉増殖は上皮の肥厚と結合組織の増生を特徴としている^{15,16)}。歯肉結合組織の細胞外マトリックスは基質成分としてのグリコサミノグリカン(GAG)と線維成分としてのコラーゲンから構成されている。細胞外マトリックスの主成分であるGAGは生体内ではタンパクと結合した高分子物質であるプロテオグリカンとして存在し、結合組織の構築の維持や物質運送の調節に重要な役割を果たしている^{17~19)}。

歯肉GAGは炎症に伴い変動することが知られているが^{20~22)}、薬物依存性歯肉増殖においてもGAGが変化し、コラーゲン増殖に関与していることも報告されている²³⁾。しかし、未だ知見が乏しく、GAGの歯肉増殖への関与については解明にまでは至っていない。

本研究はNF投与ラットの増殖歯肉において、細胞外マトリックス成分であるGAGならびにコラーゲン性蛋白に着目し、GAGの定性・定量によって歯肉増殖との関連性を生化学的に分析した。さらに、GAGならびにコラーゲン性蛋白の合成能を*in vitro*ならびに*in vivo*で取り込み実験を行った。

本論文の要旨は、第141回岐阜歯科学会例会(平成13年12月1日、岐阜)において発表した。

本論文の一部は、第42回秋季日本歯周病学会学術大会(平成11年10月23日、横浜)および第44回秋季日本歯周病学会学術大会(平成13年10月19日、岡山)において発表した。
(平成15年2月18日 受理)

材料および方法

1. 実験動物と歯肉増殖の発症

実験動物として、生後20日齢の雄性Specific Pathogen freeのフィッシャー系ラット(日本チャールズリバー社, 横浜)を71匹使用した。これを対照群は22匹, 実験群NF250群(NF250群)は26匹, 実験群NF500群(NF500群)は23匹の3群に分け, 対照群には普通粉末飼料CE-2(日本クレア社, 大阪)を与え, NF250群は, 普通粉末飼料中にNF粉末(和光純薬社, 大阪)を最初の1週間は125mg/kg, 以後は実験終了時まで250mg/kgを混和し自由摂取させ, NF500群は, 普通粉末飼料中にNF粉末を最初の1週間は250mg/kg, 以後は実験終了時まで500mg/kgを混和し自由摂取させた。また, 1週間毎に体重を測定し成長の指標とした。なお, 3群の飼育期間は40日間ならびに80日間とした。

2. 歯肉増殖の確認

80日目に各群のラットをエーテル麻酔下で屠殺し, 歯肉を含めて顎骨ごと臼歯部を採取してトリミングを行い, 10%中性ホルマリン固定後10%EDTA溶液で脱灰した。その後, 常法に従いパラフィン包埋し, 5 μ mの連続切片を作製し, ヘマトキシリン-エオジン(H-E)染色を行った。歯肉増殖は増殖した歯肉の面積を測定することによって確認した。即ち, 微量計測用タブレットメジャーユニット(オリンパス社, 東京)を用いて, 染色された切片をセメント・エナメル境と歯肉歯槽粘膜境を結んだ線より歯冠側よりの歯肉部分の面積を3群において測定した。

3. serum中のNF量

80日目のラット屠殺時に採取した3群のserumをSadanagaら²⁴⁾の方法により測定した。

4. GAGの調製

歯肉組織からHataら²⁵⁾の方法に準拠してGAGを調製した。即ち, 80日目の3群のラットの歯肉を採取後, 直ちに氷冷した生理食塩水にて血餅などの付着物をよく洗い去り, アセトン処理30分, クロロホルム・メタノール処理4 $^{\circ}$ C, さらにエーテル処理にて脱脂・脱水し, デシケーター中で48時間真空乾燥して, 乾燥重量を測定した。

乾燥重量の30倍量の0.5N水酸化ナトリウム2mlを加え, 4 $^{\circ}$ C, 20時間のアルカリ処理を行い, これを1N塩酸1mlで中和した後, プロナーゼ消化用トリス緩衝液3ml(pH7.8)を加えて100 $^{\circ}$ C, 30分間の煮沸による蛋白の熱変性処理を行った。次いで, プロナーゼE(科研製薬, 東京)を加え50 $^{\circ}$ C, 48時間酵素処理を行った後, 30%トリクロル酢酸3mlを加えて4 $^{\circ}$ C, 1時間静置した。これを8,000 \times g, 20分間遠心して得られた上清に5%酢酸カリウム含有エタノール27mlを加えて4 $^{\circ}$ C, 24時間静置した。これを再び13,000 \times g, 20分間遠心して得られた沈渣を流水中で48時間透析を行い,

その後蒸留水中で6時間透析後, 凍結乾燥してGAG試料を得た。

5. GAGの分析

Smithら²⁶⁾の方法に準じて, セルロースアセテート膜(常光産業, 東京)に3群の試料を同量アプライし, その後, 0.3M酢酸カドミウム溶液(pH4.1)を緩衝液として110V, 4.5時間の一次元電気泳動を行った。泳動後, アルシアンブルー8GX(0.1%酢酸溶液中)を用いて10分間染色し0.1%酢酸溶液で20分間脱色をした。GAGの標準試料としてAcid Mucopolysaccharide Kit(生化学工業, 東京)を使用した。定量は, 泳動膜上に染色された各GAGを2波長フライングスポットスキニングデンシトメーターCS-9300PC(島津製作所, 京都)によりアルシアンブルーによって染色された部分を吸光度を615nmで測定し, 標準GAG試料を用いた酢酸カドミウム一次元電気泳動法による検量線(図1)に基づいてGAGを算定した。

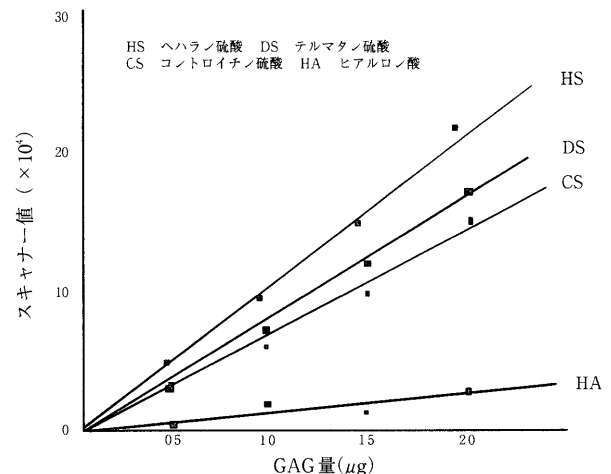


図1 酢酸カドミウム一次元電気泳動法による検量線
HS ヘパラン硫酸 DS デルマタン硫酸
CS コンドロイチン硫酸 HA: ヒアルロン酸

6. GAGへの³H-グルコサミンならびにコラーゲン性蛋白への³H-プロリン取り込み

1) *in vitro*の取り込み

3群のラットを使用した。GAGならびにコラーゲン性蛋白の代謝活性を知る指標としてD-[6-³H]Glucosamine(³H-グルコサミン)(比放射能: 555GBq/mmol, Amersham社, USA)とL-[2,3,4,5-³H]Proline(³H-プロリン)(比放射能: 3.92TBq/mmol, Amersham社, USA)を用いた。40日目と80日目の3群のラットをエーテル麻酔下で屠殺し, 歯肉組織を採取後, Davidら²⁷⁾の方法に準じて氷冷したHank's Balanced Salt Solution(Hank's)(ナカライテスク, 京都)で十分に洗浄した後, Dulbecco's Modified Eagle Medium(DMEM)(ナカライテスク, 京都)中にて振盪させなが

ら、37℃、5%CO₂ condition下で30分間予備培養を行った。予備培養終了後、直ちに終濃度185KBq/mlになるように³H-グルコサミン0.75ml及び³H-プロリン0.15mlを各々分けて加えたDMEM培養液中で振盪させながら4時間の本培養を行った。培養終了後、水冷したHank'sにて洗浄し余剰のアイソトープを取り除いて、湿重量を測定した。その後、全自動試料燃焼装置(ALOKA社, ASC-113, 東京)にて歯肉を燃焼させ、歯肉に取り込まれた放射能を液体シンチレーションカウンター(ALOKA社, LSC-6100, 東京)にて測定した。

2) *in vivo*の取り込み
40日目と80日目の3群のラットに³H-グルコサミン及び³H-プロリンを各々37MBq/kgずつ腹腔内注射により投与し²⁸⁾、6時間後、20%ホウ酸クロラルによる麻酔下で、0.1M cacodylate buffered 1%glutaraldehyde 3.85%paraformaldehyde溶液を用い灌流固定を行い顎骨ごと臼歯部を採取した。そして、歯肉を採取して0.1M cacodylate buffered 1%glutaraldehyde

結

1. 体重変化

実験期間中ラット体重の一週間の増加量は、対照群が約28.0g, NF250群が約26.2g, NF500群が約24.2gで有意な差はなく、3群とも同様の成長パターンを示した(図2)。

2. 歯肉増殖の確認

組織学的に3群の80日目の歯肉を観察すると、対照群, NF250群, NF500群となるに従って、上皮の肥厚及び結合組織の増生が認められ、歯肉増殖を起こしていることが確認された(図3 a, b, c)。さらに、歯肉面積でも同時期の歯肉において、対照群では約3600μm², NF250群では約6100μm², NF500群では約7800μm²と有意に増加した(表1)(図4)。

3. serum中のNF量

80日目のラットにおいて、対照群は定量限界以下、NF250群で約380.1ng/ml, NF500群で約571.4ng/mlであり、対照群と比較して実験群で有意にNF量が増加していることが認められた(図5)。

4. GAGの定性・定量

抽出した3群の80日目の歯肉GAGをセルロースアセテート膜一次元電気泳動後にアルシアンブルーで染色した結果、ヒアルロン酸(HA)、ヘパラン硫酸(HS)、デルマトン硫酸(DS)、コンドロイチン硫酸(CS)に相当する画分が染色された(図6)。対照群では、HAとDSが多く濃く染色され、HSとCSは微量であり薄く染色された。NF250群とNF500群では対照群と比較して、HAとDSのスポットが濃染された。

HA, HS, DS, CSの合計値である総GAG量は80日目のラットにおいて、対照群で約0.33μg/mg, NF250群で約0.71μg/mg, NF500群で約1.48μg/mgであり対照

3.85%paraformaldehyde溶液にて再固定後、湿重量を測定した。その後、全自動試料燃焼装置で歯肉を燃焼させ、歯肉に取り込まれた放射能を液体シンチレーションカウンターにて測定した。

7. オートラジオグラフィーによる観察

*in vivo*での80日目の3群のラット歯肉を用いた。固定後、常法に従いグリコールメタクリレート(GMA)樹脂(日新EM, 東京)包埋を行った²⁹⁾。次いで、2μmの切片を作製し、オートラジオグラフィー用乳剤(NTB-2, KODAK, USA.)をdipping法により塗布し、乾燥後冷暗所(4℃)にて2~4週間露出した。露出後、現像(コニカドール, コニカ, 東京)を5分、定着(コニカフィックス, コニカ, 東京)を7分行い、水洗後トルイジンブルーにて後染色して光学顕微鏡にて観察した。

8. 統計学的処理

3群間における統計処理は全てt-検定(StatView J-4.5)を用いて行った。

果

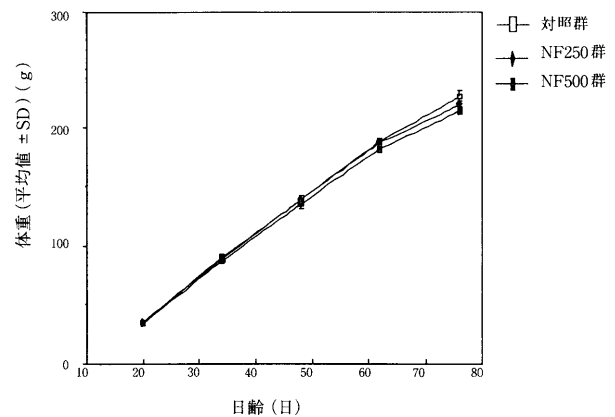


図2 ラット体重の変化

群と比較してNF250群で約2倍, NF500群で約4倍であり有意に増加した(表2)。さらに各GAGを定量した結果、80日目のラットで対照群, NF250群, NF500群となるに従ってHAとDSの増加が著明であり、HAは対照群で約0.11μg/mg, NF500群で約0.70μg/mgであり、約6倍, DSは対照群で約0.17μg/mg, NF500群で約0.61μg/mgであり、約3.5倍の増加が認められた(図7)。

5. GAGへの³H-グルコサミンならびにコラーゲン性蛋白への³H-プロリンの取り込み

1) *in vitro*の取り込み

³H-プロリンでは、80日目のラットにおいて対照群で約4800dpm/mg, NF250群で約6400dpm/mg, NF500群で約5300dpm/mgであり、対照群より両実験群で高い取り込み傾向を認めた。一方、³H-グルコサミンの取り込みは対照群と両実験群で有意差は認めなかった(図8 a, b)。

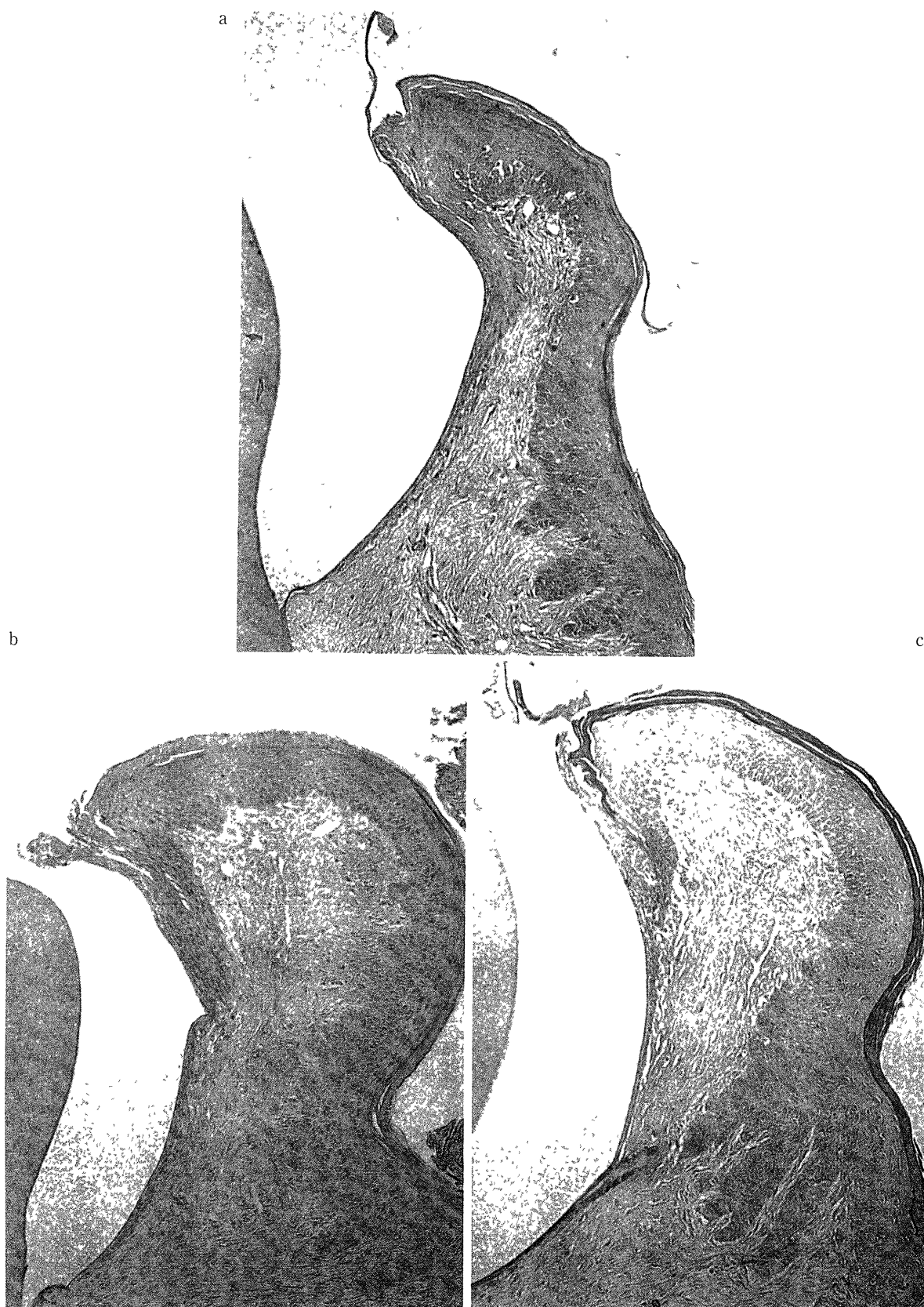


図3 歯肉の形態(80日, H-E染色, $\times 50$)
 a. 対照群 b. NF250群 c. NF500群

2) *in vivo*の取り込み

^3H -プロリンでは, 80日目のラットにおいて対照群で約6000dpm/mg, NF250群で約9200dpm/mg, NF500群で約10000dpm/mgであり, 対照群より両実験群にお

いて高い取り込み傾向を示し, さらに, NF250群, NF500群となるに従ってより高い取り込みを認めた. 一方, ^3H -グルコサミンの取り込みは対照群と両実験群で著明な差は認められなかった(図9 a, b).

表 1. 歯肉増殖面積(80日)

対 照 群 (n = 5)	3630.4 ± 471.3	
NF250群 (n = 5)	6117.8 ± 987.6	
NF500群 (n = 5)	7854.9 ± 385.9	
(μm ²)		※P<0.05 ※※P<0.01

表 2. 総GAG量(80日)

対 照 群 (n = 22)	0.33 ± 0.11	
NF250群 (n = 26)	0.71 ± 0.33	
NF500群 (n = 23)	1.48 ± 0.52	
μg/mg 組織乾燥重量		※P<0.05



図 4 歯肉面積測定部位(80日)
セメント・エナメル境と歯肉歯槽粘膜境を結んだ線より歯冠側の歯肉部分

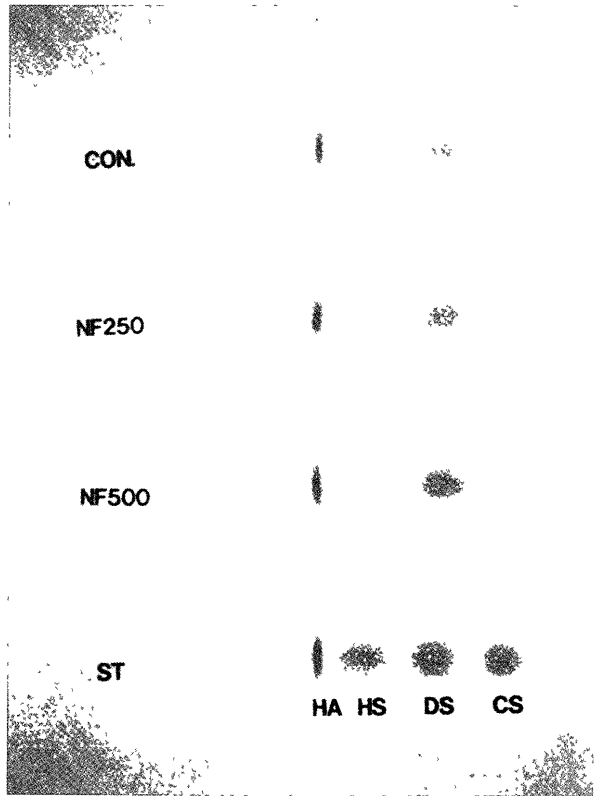


図 6 GAG(80日)と標準試料(ST)のセルロースアセテート膜一次元電気泳動図
上から順に対照群(CON), NF250群(NF250), NF500群(NF500), 標準試料(ST)を示し、左からHA, HS, DS, CSを表す。

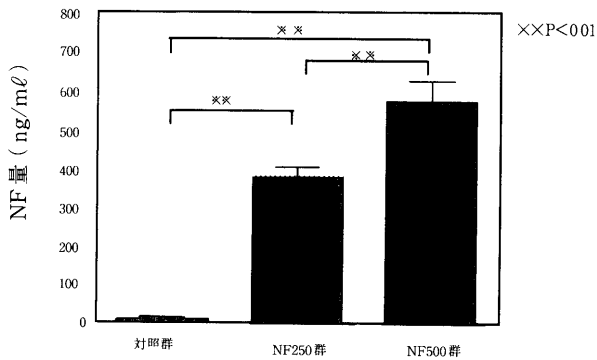


図 5 serum中のNF量(80日)

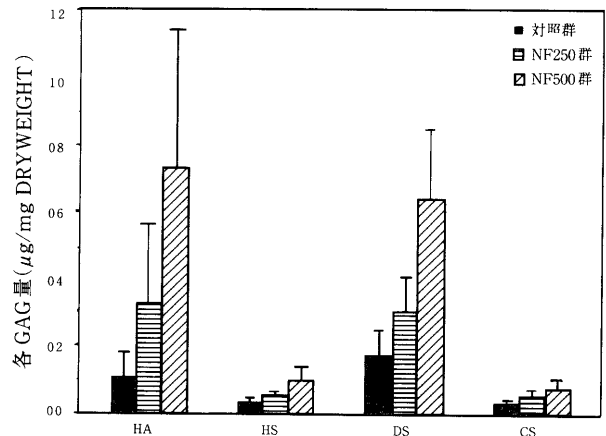


図 7 各GAG画分量(80日)

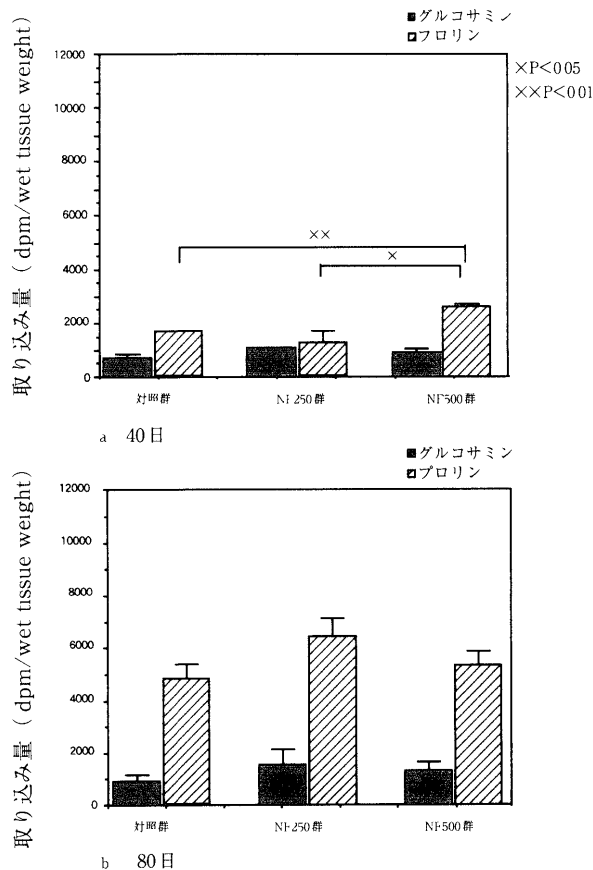


図8 歯肉への*in vitro*の取り込み
a. 40日 b. 80日

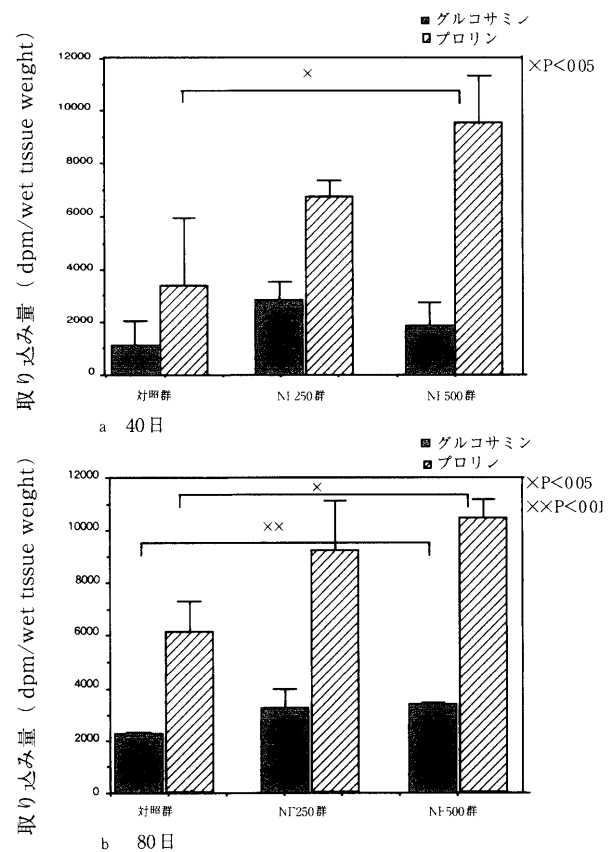


図9 歯肉への*in vivo*の取り込み
a. 40日 b. 80日

6. オートラジオグラフィー所見

80日目のラットの歯肉を用いた、 ^3H -グルコサミンの取り込みを示すgranは対照群、両実験群とも主に歯肉上皮細胞に局在し、主に上皮細胞間隙に認められた。一方、結合組織ではgranの数は上皮に比して微量であ

考 察

歯肉増殖症を副作用とする薬剤としてフェニトイン、シクロスポリン、NFが挙げられる。Ca²⁺拮抗剤の1つであるNFは高血圧、狭心症などの循環系疾患の患者に対し使用頻度が高く、今後も本疾患の発生の増加が予想される。よって、NFを含めた薬物投与の副作用による歯肉増殖症の発症メカニズムの解明は、これからの高齢者社会において有意義であると思われる。本研究ではNF投与ラットも、非投与ラットも同様に体重が増加しており、これは森崎らの報告とほぼ一致し¹⁾、成長の抑制は認められなかった。

投与するNF量と飼育期間は以前の報告に基づいたが¹⁾、今回はさらにNF量と飼育期間は倍増させて、さらなる歯肉増殖を惹起させた。NF250群とNF500群でのserum中のNF量はヒトの血中濃度の約5倍量と約10倍量である³⁰⁾。両実験群では明らかにserum中にNFが含まれていた。歯肉増殖の確認は測定用プローベをラット歯肉溝に挿入して、その底部から辺縁歯肉頂までの距離を測定する方法があるが³¹⁾、本研究では、3群の

った(図10a, b, c)。 ^3H -プロリンのgranは結合組織で対照群より両実験群でgranが多く局在する傾向が認められた(図11a, b, c)。これは、取り込み実験と同様の結果を示した。

ラットの同一部位の歯と歯肉を選択し、組織学的に歯肉面積を測定して歯肉増殖の評価を行った。その結果、両実験群では対照群より上皮の肥厚が著明であり、また、結合組織が増大し歯肉全体が増殖していた。

歯肉組織のGAGについては、主としてイヌを用いた研究が行われている。即ち、勝谷²¹⁾はイヌの健常歯肉組織に含まれるGAG成分は、HA、HS、DS、CSであり、そのうちHAとDSが主成分、HSとCSが微量成分であることを報告した。これは、今回ラットの対照群歯肉組織のGAGにおいても同様の結果を示した。さらに、白木³¹⁾はイヌの健常歯肉を上皮と上皮下結合組織に分離し、それぞれの構成GAGを定性、定量し、歯肉上皮における主要成分GAGはHA、HSであり、結合組織における構成GAGはDSとHAがその主要成分であることを示した。

HAは細胞と細胞の接着、細胞移動の促進、さらには細胞分化の調節など細胞機能に積極的に関与するとされているが、特に細胞外マトリックス成分の普遍的成

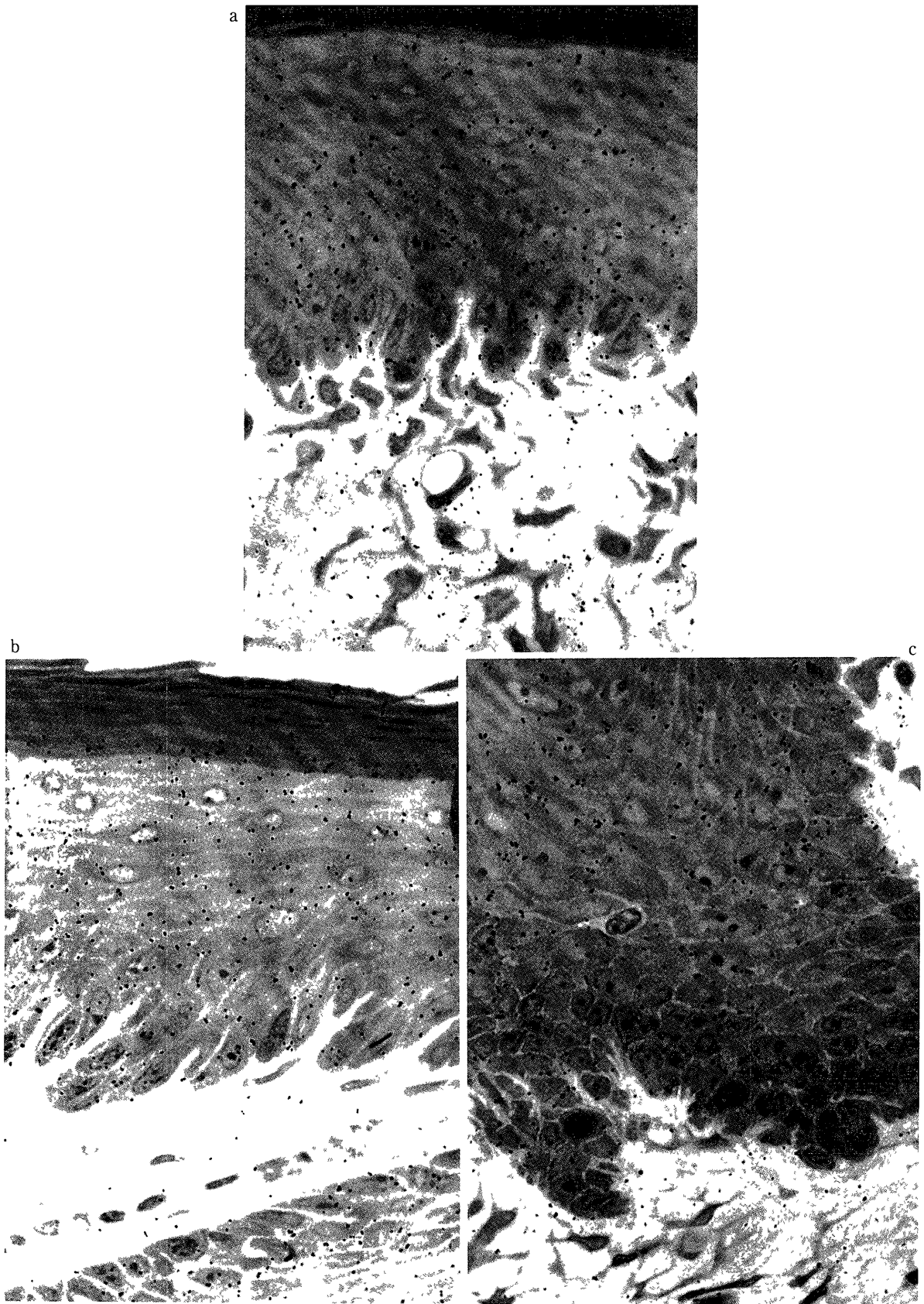


図10 ^3H -グルコサミンの取り込み
(80日, トルイジンブルー染色, $\times 400$)
a. 対照群 b. NF250群 c. NF500群

分として組織の構築を担っている³²⁾。本研究においても、HAは歯肉増殖における歯肉組織の増大に伴って増加したと考えられる。

DSはコラーゲンと共に結合組織の細胞外マトリックス成分の重要な構成成分であり、生体内においてコラーゲン線維と結合し³³⁾、コラーゲンの分子間架橋結

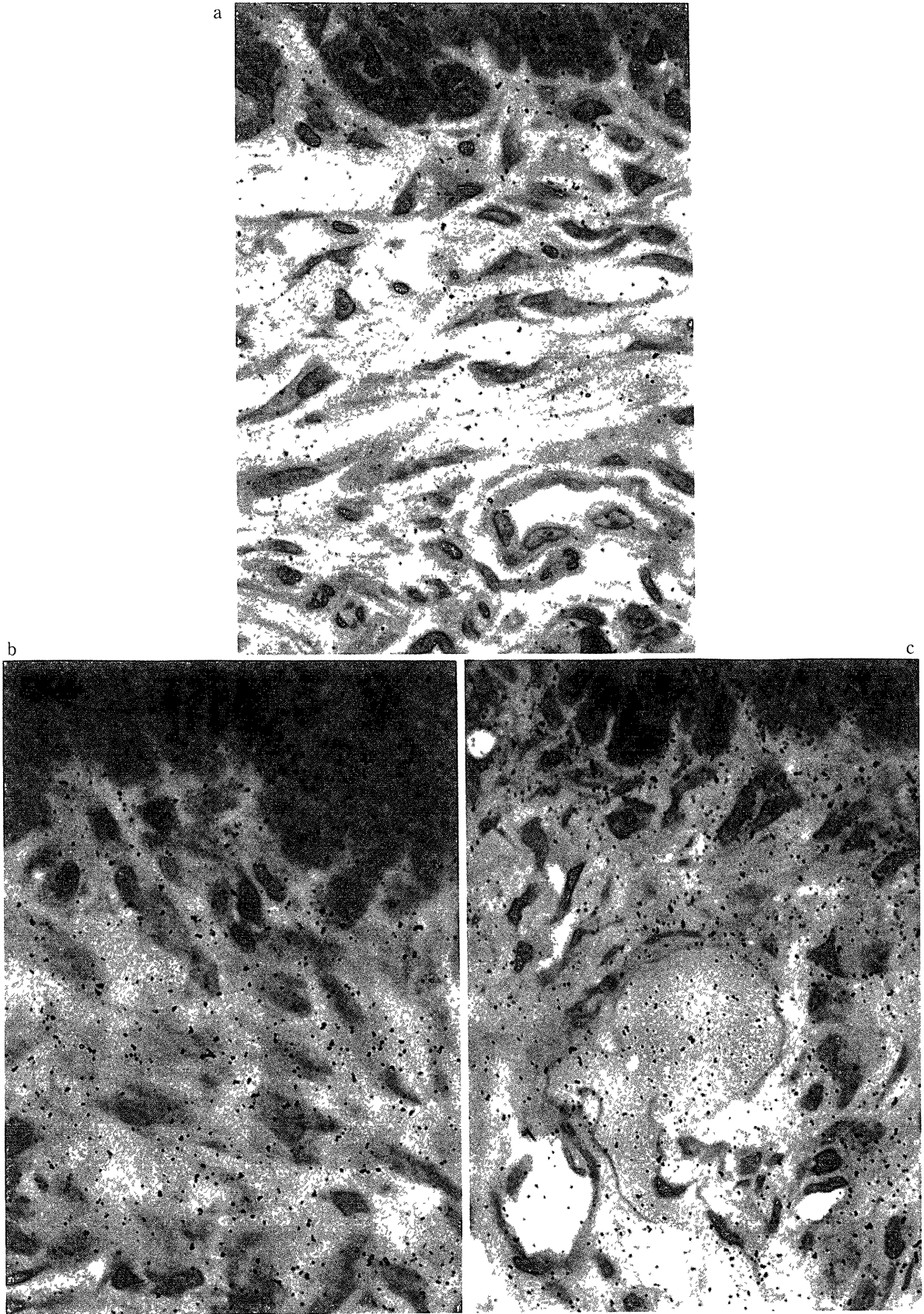


図11 ^3H -プロリンの取り込み
(80日, トルイジンブルー染色, $\times 400$)

a. 対照群 b. NF250群 c. NF500群

合を安定させる働きをしていることが示唆されている³⁴⁾. 本研究でも, 結合組織におけるコラーゲン線維の増加に伴い, DSも増加したと思われる. HA, DSの増

加については, HAでは細胞接着との関係, DSではコラーゲン線維との関連を含めてどのようなメカニズムで増加するのか, より踏みこんだ研究が必要である.

一方、HS、CS成分も微量ながらNF投与群では、対照群と比べて増加した。この増加については、今後さらなる検討が必要である。

歯肉GAGは炎症に伴い量的、質的に変動することが知られている²⁰⁻²²。今回3群とも組織学的に炎症所見は特に認められなかったことから、NF依存による歯肉増殖と考えられる。NF投与ラットでは対照群と比較して総GAG量(HA+HS+DS+CS)がNF250群で約2倍、NF500群で約4倍と増加しており(表2)、さらに、各GAGにおいてはHAが対照群と比較してNF500群で約6倍、DSは対照群と比較してNF500群で約3.5倍の増加が認められた(図7)。この2成分が増加したことは、歯肉増殖症の組織学的所見において上皮の肥厚と結合組織の増生が特徴的であることと、この2成分が上皮及び結合組織の主成分GAGであるためと考えられる。

薬物依存増殖歯肉におけるGAGの動態についても異なった見解が示されている。シクロスポリン服用患者の歯肉GAGを生化学的に検討したRochaら³⁵は対照とほぼ同量であると述べた。しかし、フェニトイン患者歯肉では対照に比して、約2倍の値を示したと報告している^{36,37}。

本実験のNF投与ラットでは、後者の報告と同様の結果で、NF250群は約2倍、NF500群は約4倍の総GAG増量を認めた。

シクロスポリン誘発歯肉増殖については、組織化学的検討においてもGAGが高いレベルにあること³⁸、また線維芽細胞の培養実験においても対照に比してGAGの増量を示す^{39,40}等の報告を考え合わせると、NF投与ラットでのGAGの増量という結果は妥当性があるものと思われるが、薬物の種類による差という可能性も否定できない。

GAGの増加については合成促進と分解抑制の両面が考えられる。NF投与ラットの増殖歯肉におけるGAGの合成能を知る指標として、GAGへの³H-グルコサミンの取り込みを^{39,41}、さらにコラーゲン性蛋白への³H-プロリンの取り込みを行い、比較検討した。その結果、*in vitro*ならびに*in vivo*実験において、³H-プロリンの取り込みは対照群と比較して両実験群において高くなる傾向が認められ、さらに、*in vivo*ではNF投与量依存に高くなる傾向を示した(図9-a, b)。これはコラーゲン性蛋白の合成能が高まっていることを示唆している。一方、³H-グルコサミンは3群ともほぼ同様であり、GAGの合成能には差がなかった。今後は歯肉におけるGAGの分解ならびに分解酵素の検討が必要と

結

NF投与ラットの増殖歯肉において、GAGの定性・定量、さらに合成能を検討すると同時に、コラーゲン性蛋白の分析を行い、歯肉増殖の実態を生化学的に検討し、以下の結果を得た。

考えられる。

また、³H-プロリンの取り込みは³H-グルコサミンより高い傾向が認められたが、これはプロリンとグルコサミンの代謝回転の違いなどもあり、一概に比較できないと思われる。40日飼育と80日飼育では後者の方が全体的に取り込み量が高かった。これは40日は成長段階の途中であり、歯肉増殖のピークにまだ達していない可能性が推測される。さらに*in vitro*に比較して*in vivo*が高い値を示したが、これは生体内でのdirectな反応を見ているのに対して、*in vitro*は歯肉採取してからの反応となり、時間的、手技的な要因が関与することも原因と思われる。

オートラジオグラフィの所見(図10, 11)は取り込み実験の結果と一致した。歯肉上皮中のGAGについてはオートラジオグラムでその局在性が報告されている^{31,42}。田中⁴²はラットに³H-グルコサミンと³⁵S-硫酸を腹腔内投与し、4時間後採取した歯肉組織を検索した結果、³⁵S-硫酸のgranは上皮と結合組織ともほぼ同程度であったにもかかわらず、³H-グルコサミンのそれは上皮でより多くの取り込みを示したことから、上皮では非硫酸化GAG、即ち、HAの代謝が結合組織に比べて活発であることを示唆した。

また、白木ら⁴³も歯肉への³H-グルコサミンの取り込み実験において、結合組織に比較して上皮には著しく多くのgranの存在を認め、上皮のGAGは結合組織のGAGよりも代謝回転が速いことを示した。本実験でも³H-グルコサミンのgranは歯肉上皮に局在した。これは結合組織に比べて上皮の代謝回転が速く、そのためgranが多く局在したと考えられる。しかし、対照群と両実験群ではほぼ同様の傾向であった。³H-プロリンのgranは結合組織において、対照群より両実験群で多く局在する傾向を示した。また、今回の培養時間は4時間で行ったが、培養時間を変えてその時間的変化を追っていく必要もあると思われる。

今回は³H-プロリンを用いたコラーゲン性蛋白についての結果であり、本来のコラーゲンでないこと、またコラーゲンの増加が合成能の増加によるものなのか、あるいは分解の抑制によるものなのか、さらなる研究が求められる。

本研究では、NF投与ラットの歯肉増殖の質的変化の一部分を明らかにしたが、今後はヒト歯肉での比較検討が必要であり、特に、歯肉増殖の実態を解明するのに細胞外マトリックスであるGAGの分解経路を追求することが重要である。

論

1. NFの投与量依存による総GAGの増量が認められた。各GAG分子は一樣に増量し、分子種に特異性は認められなかった。
2. GAGの合成能は対照群と実験群とでは著明な差は

認められなかった。

3. コラーゲン性蛋白の合成能はNF投与量依存性に高くなる傾向を示した。

以上のことから、NF投与ラットの増殖歯肉はGAG量の増加が関連していること、その増量はGAGの分解が抑制されている可能性が示唆された。

文 献

- 1) 森崎市治郎, 加藤一生, 南 一恵, 丸川依子, 三原丞二 ラットにおけるニフェジピン誘発性歯肉肥大. 投与期間と肥大との関係. 障歯誌, **13** 157~161, 1992.
- 2) 加藤一生, 丸川依子, 森 裕子, 三原丞二, 森崎市治郎 ラットにおけるニフェジピン誘発性歯肉肥大発現の年齢依存性について. 障歯誌, **14** 123~127, 1993.
- 3) Morisaki I, Kato K, Loyola-Rodriguez, J P, Nagata T and Ishida H Nifedipine-induced gingival overgrowth in the presence or absence of gingival inflammation in rats *J Periodont Res*, **28** 396~403, 1993.
- 4) Ishida H, Kondoh T, Kataoka M, Nishikawa S, Nakagawa T, Morisaki I, Kido J, Oka T and Nagata T Factors Influencing Nifedipine-Induced Gingival Overgrowth in Rats *J Periodontol*, **66** 345~350, 1995.
- 5) Earl, Fu, Shin, Nieh, Chiang, Tung Hsiao, Yao-Dung, Hsieh, Ulf, M E Wikesj and E-Chun, Shen Nifedipine-Induced Gingival Overgrowth in Rats Brief Review and Experimental Study *J Periodontol*, **69** 765~771 1998.
- 6) Mela, Nakou, Joanna, J Kamma, Alkyoni, Andronikaki and Fotis, Mitsis Subgingival Microflora Associated With Nifedipine-Induced Gingival Overgrowth *J Periodontol*, **69** 664~669, 1998.
- 7) Kimball, O P and Horan, T N The use of Dilantin in the treatment of epilepsy *Am Intern Med*, **13** 787~793, 1939.
- 8) Pluss, E M R, Hefti, A, Lotscher, R and Thiel, G Initial observation that cyclosporin A induces gingival enlargement in man *J Clin Periodontol*, **10** 237~246, 1983.
- 9) Ramon, Y, Behar, S, Kishon, Y, and Engelberg, I S Gingival hyperplasia caused by nifedipine a preliminary report *Int J Cardiol*, **5** 195~204, 1984.
- 10) Fujii A, Matsumoto H, Nakao S, Teshigawara H, Akimoto Y Effect of calcium-channel blocker on cell proliferation, DNA synthesis and collagen synthesis of cultured gingival fibroblasts derived from human nifedipine responders and non-responders *Arch Oral Biol*, **39** 99~104, 1994.
- 11) Willershausen-Zonnchen, B, Lemmen, C, Zonnchen, B, Hamm, G, Schumacher, U Influence of nifedipine on the metabolism of gingival fibroblasts *Biol Chem Hoppe-Seyler*, **375** 299~303, 1994.
- 12) Pernu, H E, Oikarinen, K, Hietanen, J, Knuuttila, M Verapamil-induced gingival overgrowth a clinical, histologic and biochemic approach *J Oral Pathol Med*, **18** 422~425, 1989.
- 13) Salo, T, Oikarinen, K S, Oikarinen, A I Effect of phenytoin and nifedipine on collagen gene expression in normal human gingival fibroblasts *J Oral Pathol Med*, **19** 404~407, 1990.
- 14) Hassell, T M and Hefti, A F Drug-induced gingival overgrowth old problem, new problem *Oral Biol Med*, **2** 103~137, 1991.
- 15) M Ilhan, Uzel, Alpdogan, Kantarcı, Hsiang-Hsi, Hong, Cem, Uygur, Michael, C Sheff, Erhan, Firath and Philip, C Trackman Connective Tissue Growth Factor in Drug-Induced Gingival Overgrowth *J Periodontol*, **72** 921~931, 2001.
- 16) Ayanoglu, C M, Lesty, C Cyclosporin A-induced gingival overgrowth in the rat a histological, ultrastructural and histomorphometric evaluation *J Periodont Res*, **34** 7~15, 1999.
- 17) Laurent, T C Interaction between proteins and glycosaminoglycans *Fed Proc*, **36** 24~27, 1977.
- 18) Puoslahti, E Proteoglycans in cell regulation *J Biol Chem*, **264** 13369~13372, 1989.
- 19) 梶川 欽一郎 結合組織, 1版, 金原出版株式会社(東京), 325~330, 1984.
- 20) 岩田 眞. イヌの実験的歯周炎における歯肉上皮ならびに上皮下結合組織のグリコサミノグリカンについて. 日歯周誌, **30** 1008~1020, 1988.
- 21) 勝谷芳文 イヌの実験的歯周炎における歯肉グリコサミノグリカン代謝について. 日歯周誌, **24** 266~284, 1982.
- 22) 梶川 潔. イヌの実験的歯周炎における歯肉溝滲出液中のグリコサミノグリカンについて. 日歯周誌, **28** 500~515, 1986.
- 23) Saito K, Mori S, Iwakura M and Sakamoto S Immunohistochemical localization of transforming growth factor β , basic fibroblast growth factor and heparan sulphate glycosaminoglycan in gingival hyperplasia induced by nifedipine and phenytoin *J Periodont Res*, **31** 545~555, 1996.
- 24) Sadanaga T, Hikida K, Tameto K, Matsushima Y and Ohkura Y Determination of Nifedipine in Plasma by High-Performance Liquid Chromatography *Chem Pharm Bull*, **30** 3807~3809, 1982.
- 25) Hata, R and Nagai, Y Distribution of acidic glycosaminoglycans in tadpole back skin *Biochim Biophys Acta*, **304** 408~412, 1973.
- 26) Curwen, K D and Smith, S C Quantitative mi-

- croanalysis of aortic glycosaminoglycans *Anal Biochem*, **79**: 291~301, 1977.
- 27) David, A Pye, Shant, Kumar, Min, J Wang and Robin, D Hunter Irradiation of bovine aortic endothelial cells enhances the synthesis and secretion of sulphated glycosaminoglycans *Biochim Biophys Acta*, **1220**: 266~276, 1994.
- 28) 水谷 匡：上顎前歯咬合挙上板装着が下顎頭に及ぼす影響。岐歯学誌, **9**: 114~140, 1981.
- 29) Bennet, H S, Wyrick, A D, Lee, S W and Mcneil, J H Science and art in preparing tissues embedded in plastic for light microscopy, with special reference to glycol methacrylate, glass knives and simple stains *Stain Technol*, **51**: 71~97, 1976.
- 30) 中村元巨, 平 則夫：高血圧症の治療薬としてのCa²⁺拮抗薬, カルシウム拮抗薬—基礎と臨床。医薬ジャーナル社(大阪), 256~271, 1986.
- 31) 白木雅文：健常イヌ歯肉組織における上皮ならびに上皮結合組織のグリコサミノグリカンについて。日歯周誌, **28**: 785~799, 1986.
- 32) Toole, B P Cell biology of extracellular matrix (ed by Hay, E D) Plenum Press, (New York): 259~294, 1981.
- 33) Radhakrishnamurthy, B, Ruiz, H A and Berenson, G S Isolation and characterization of proteoglycans from bovine aorta *J Biol Chem*, **252**: 4831~4841, 1977.
- 34) Gelman, R A and Blackwell, J Collagen-mucopolysaccharide interactions at acid pH *Biochim Biophys Acta*, **342**: 254~261, 1974.
- 35) Rocha, L A G, Martins, R C L, Werneck, C C, Feres-Filho, E J, Silva, L C F Human gingival glycosaminoglycans in cyclosporin-induced overgrowth *J Periodont Res*, **35**: 158~164, 2000.
- 36) Bartold, P M Proteoglycans of the periodontium structure, role and function *J Periodont Res*, **22**: 431~444, 1987.
- 37) Dahllof, G, Modeer, T., Reinholt, E P, Wikstrom, B, Hjerpe, A Proteoglycans and glycosaminoglycans in phenytoin-induced gingival overgrowth *J Periodont. Res*, **21**: 13~21, 1986.
- 38) Mariani, G, Calastrini, C, Carinci, F, Bergamini, L, Stabellini, G Ultrastructural and histochemical features of the ground substance in cyclosporin A-induced gingival overgrowth *J Periodontol*, **67**: 21~27, 1996.
- 39) Edward, J Zebrowski, Susan, P Pylypas, Olva, Od-lum and Roger, B. Johnson Comparative Metabolism of ³H-Glucosamine by Fibroblast Populations Exposed to Cyclosporine *J Periodontol*, **65**: 565~567, 1994.
- 40) Jeff, Newell and Chris, R Irwin Comparative Effects of Cyclosporin on Glycosaminoglycan Synthesis by Gingival Fibroblasts *J Periodontol*, **68**: 443~447, 1997.
- 41) Kohei, Johkura The Aging Change of Glycoconjugate Synthesis in Mouse Kidney Studied by ³H-Glucosamine Radioautography *Acta Histochem Cytochem*, **29**: 57~63, 1996.
- 42) 田中龍男 妊娠ラット歯肉組織におけるグリコサミノグリカン代謝について。日歯周誌, **28**: 516~530, 1986.
- 43) 白木雅文, 田中龍男, 堀 敏子, 水野 清, 村橋慶宣, 岩山幸雄, 譚 鉄錚：実験的歯周炎における歯肉グリコサミノグリカン代謝のオートラジオグラフィによる検討。日歯周誌, **31**: 667~674, 1989.

Effect of Extra-cellular Matrix on Gingival Overgrowth Induced by Nifedipine in Rat

YOUKO NAKAJYO, MAKIKO KATO, MASAFUMI SHIRAKI and YUKIO IWAYAMA

*Department of Periodontology, Asahi University School of Dentistry
(Chief Prof Yukio Iwayama)*

Key words Nifedipine, Gingival overgrowth, Glycosaminoglycan

Abstract *Gingival overgrowth is a common side effect associated with calcium channel blockers. The objective of this study was to examine the metabolism of glycosaminoglycan and collagenous protein, which are major components of extra-cellular matrix in gingival overgrowth by nifedipine.*

Specific pathogen-free, 20-day-old male rats were randomly divided into 3 groups. Animals in experimental groups were fed a diet containing nifedipine for 40 and 80 days.

Glycosaminoglycans were extracted from gingiva and separated by cellulose acetate membrane electrophoresis for both qualitative and quantitative analysis. ^3H -glucosamine and ^3H -proline were used for metabolic study of glycosaminoglycan and collagenous protein, respectively.

The glycosaminoglycan levels in nifedipine groups were higher than that of control in a dose-dependent manner. The incorporation of ^3H -proline into collagenous protein was increased in the experimental groups compared to the control group, however, nifedipine showed effect on ^3H -glucosamine incorporation into glycosaminoglycan.

These results suggest that the high level of gingival glycosaminoglycan in nifedipine rats may have been due to the suppression of glycosaminoglycan degradation.