象牙質第一および第二画分の分離およびその性状

柳 田 勇 夫

岐阜歯科大学 小児歯科学教室* (主任: 吉田定宏教授)

[受付: 昭和49年3月22日]

抄録: これまでに、齲蝕の発生・進行の機構を解明し、効果的な予防・抑制手段を開発する一つのステップとして歯質硬組織の生化学的性状の一部を明らかにしてきた。

この研究では、人象牙質粉末の1N 塩酸で可溶化される部分を Sephadex G-50で gel 濾過し、3つの peak 画分を得た (総アミノ基量で, Frac. I: 12.5%, II: 20.8%, III 66.7%)。Frac. I, IIをさらに精製する目的で Sephadex G-75, Sephadex G-50で再クロマトグラフィーを行ない、Iからは分子量が10,000以上(I-A, I-B)の2つの, IIからは3,000程度と目される1つの peak を得た。

これらには、III-C に存在することを報告した Amino Butyric Acid のような、人歯質中には、存在するという報告のない構成成分や結合の存在を示唆する結果は得られなかったが、いずれの画分も出発材料に比べて NH_2 が極めて多く、Asp, Thr, Ser もかなり多い Fraction (I-16, II-28) がとれたことは興味深い。

緒 言

前報¹⁾でも触れたように齲蝕の発生・進行および歯質崩壊機構の解明、その結果手にすることができであろう、現状よりもさらに組織的な齲蝕予防・抑制方法の確立などのために、歯牙硬組織有機成分についての研究を推めてきた¹⁻¹²⁾。

今回は、象牙質の一規定塩酸可溶部分のうちの、第1および第2画分について述べる。

材料および方法

材料

象牙質粉末: 新鮮人抜去歯牙 (前歯) の歯根部象牙質を用いた。すなわち、注水下で歯科用エアー・タービンを用いて、抜去歯牙の歯冠部を離断したのち歯根部に残っているエナメル質およびセメント質を徹底的に除去し、ハンドリーマー、エンジンリーマー、ピーソーリーマーなどを順次用いて可能な限り歯髓、Odontoblast, Preadentin を除去、根管を十分拡大し機械的に清掃したのち、蒸留水で洗浄、Sonic Oscillator (Ultrasonic Vi-

brator, Solid State Type 200, Yoshida Dental MFG. Co., Tokyo) により付着物を十分除去し、ついで水洗、アルコール洗浄、アセトン洗浄を行ない、その後減圧乾燥して出発材料の歯質象牙質をえた。

このようにしてえた225本の歯根のうち、5本を無作為に抽出し、各歯牙を薄切して数枚ずつ研磨標本を作製し、実体顕微鏡下でこれらの歯根が象牙質のみからなることを確認した。

十分乾燥させたのち、これらの歯根象牙質を試料粉碎機 (Vibrating Sample Mill, Model T 1-1, 平工製作所, 東京) で粉碎し、100mesh の篩を通過する44.268g (比重2.108) の象牙質粉末とした。

このようにしてえた象牙質粉末の40g を、50ml の一規定塩酸に浮遊させ、500ml の一規定塩酸に対し透析脱灰した (4°C で計10回、のべ10日間) (脱灰および無機構造の変化については、文献6, 8~9を参照されたい)。透析内容をさらに水に対して透析し、 Cl^- が全く認められなくなるまで4°C で透析を繰り返したのち、その透析内容を

Isolation and characterization of the first and the second fraction of human dentin.

Isao YANAGIDA (Department of Pedodontics, Gifu College of Dentistry, Hozumi-Cho, Gifu)

* 岐阜県本巣郡穂積町高野 (〒501-02)

Jap. J. oral Biol., 16: 260-265, 1974.

10,000g, 30分の遠心により, その上清に象牙質の一規定塩酸可溶画分^{1,5-7)}をえた(一規定塩酸不溶画分については, 文献5~9参照)。

方法

1) 遊離および総アミノ基量

Ghuysen らの記載¹³⁾を若干改変した DNFB 法¹⁻³⁾を用いた。

すなわち, 乾燥試料に定沸点塩酸を加え, 封管中で100°C 12時間⁴⁻⁶⁾加水分解後, DNFB 法により発色させ, 島津 UV-200R 型分光光度計(島津製作所, 京都)を用い420m μ で定量した。

2) 濾紙電気泳動

未水解および上述の条件で加水分解した試料について実施した。

すなわち, 東洋 No. 514濾紙(東洋科学産業, 大阪)を用い, 2M ピリジン-醋酸緩衝液(pH 5.0)および0.2M ピリジン-醋酸緩衝液(pH 3.1)で, グルタミン酸, アラニンおよびリシンを標準として泳動させた。なお実施は氷室(0~4°C)内において, 東洋Ⅲ-B 型定電圧装置(東洋科学産業, 大阪)を用いて20v/cmで2.5時間泳動後, ニンヒドリンで発色させスポットの位置を確認した。

3) 濾紙クロマトグラフィーによる構成アミノ酸の同定

1)と同条件で加水分解した試料について, 東洋 No. 51A濾紙(60×60cm, 東洋科学産業, 大阪)で一次元および2次元展開を下降法で18時間展開した。展開溶媒としては, 1次元に n-ブタノール:ピリジン:水:氷醋酸(60:40:30:3, v/v) 2次元には, n-ブタノール:水:氷醋酸(4:2:1, v/v)を主として用い, その他必要に応じて n-ブタノール:水:氷醋酸(4:1:1, v/v), n-ブタノール:水:氷醋酸(4:5:1, v/v)も併用した。

4) アミノ酸自動分析機による構成アミノ酸の分析

試料1)と同条件で加水分解したのち, 全アミノ酸自動分析装置(JLC-6HA 型)および JLC-DK デジタルインテグレーター(いずれも日本電子株式会社, 東京)により, カラム温度52°Cで測定, 計測した。

結 果

方法の部で記載したようにしてえた一規定塩酸可溶性画分をロータリー・エバポレーターで減圧濃縮後, Sephadex G-50 coarse(2.5×100cm)で分画し, Fraction I, II, IIIの3つのアミノ基の画分(総アミノ基量でそれぞれ12.5%, 20.8%および66.7%)をえた^{1,5,7)}(図1, 2および表1)。

今回は, 一規定塩酸可溶画分のうち, Fraction I および II について報告する(Fraction III については文献¹⁾参照)。

Sephadex G-50 coarse による溶出パターン(図2)のうち, Fraction I および II をさらに精製するために Fraction I を Sephadex G 75 (カラム: K 25/100, 直径2.5cm, 長さ100cm, fraction volume: 10ml/frac., flow rate: 30ml/hr.)で水で溶出(図3), Fraction II を Sephadex G-50 coarse (K 25/100, 10ml/frac. 60ml/hr)で(図4)水で溶出, 再クロマトグラフィーを実施した。

Fraction I は1~2, Fraction II は, 1つの peak として回収された。Fraction I の tube No. 19までを I-A, 20以後を I-B とすれば, 総アミノ基量としては, 50.2:49.8(表1)であり, Frac,

図1 分画操作過程

* 当論文に記載した分

** 文献¹⁾参照

*** 文献⁵⁻⁸⁾参照

図 2 Gel Chromatogram (amino groups)

表 1 Distribution of Total Amino Groups

Fraction	Subfraction	% in Fraction	% in I + II + III	M. W. from Sephadex Chromatograph
I	I - A (16)	50.2%	6.3% } 12.5%	above ca. 10000
	I - B (26)	49.8 }		
II	Main (28)	100.0	20.8	ca. 3000
III*	III - A (15)	48.6 }	32.4 } 66.7	ca. 900-2000 ca. 200-400 below ca. 100
	III - B (21)	37.2 }		
	III - C (26)	14.2 }		
I + II + III (Total)		1590 μ mole	100%	

* 文献¹⁾による。

図 3 Gel Chromatogram (Fraction I)

図 4 Gel Chromatogram (Fraction II)

図 5 電気泳動図 (pH 5.0)
500v/20cm, Toyo No. 514 filter paper.

図 6 電気泳動図 (pH 3.1)
500v/20cm Toyo No. 514 filter paper.

16と26をそれぞれの代表とみなした。

Fraction I-A, I-B およびIIについての電気泳動的挙動および構成アミノ酸の組成について検討したものを示す(図5, 6, 表2)。

これらのことから Sephadex での分画により、分子量の違いのみならず電気泳動的にも I-A, I-B, IIは異なったものとして分画されており、Fraction Iから2つ、Fraction IIからは1つの画分がえられた。

ただしアミノ酸分析の結果では、IとIIは、あまり相違はなく、ただ Lysine(I : 0.18, II : 0.35), Histidine (I : 0.04, II : 0.16), Gly- cine(I : 2.95, II : 2.57) が違う位である。

考 察

現在の日本における齲蝕罹患率、患者の齲蝕病

状の程度は、憂うべき状態であり、特に小児のそれらは、病状が急速に進行して重篤な状態になることもあいて、それに対処する臨床家を苦慮せしめてきている。

このことは、ひとり小児歯科にたずさわる者のみの問題などではなく、歯科医学もしくは歯科医療にたずさわるすべての者が、鮮明な認識をもってすみやかに対処すべき問題であろう(齲蝕症または、これに継発する、もしくは、その結果としてひき起こされる臨床上の諸問題が、歯科医療の中でいかに大きな比重を占めているかを考えれば、このことは明らかであろう)。

——今や抽象的推論や貧弱な傍証をかき集め、その上での議論をする時期ではなかろうと思われる。——

このような要請にわずかでも答えるべく、齲蝕

表 2 Dentin Powder, 1N 塩酸処理により分画された画分, およびその残渣の構成アミノ酸比 (アラニンを 1.00 とする)

Weight %	Starting Weight(40g)	1N HCl Soluble Part		1N HCl Residue
	100%	I (I -16)	II (II-28)	16.7%
Total Amino groups	2,490m μ mole/mg			10,712 m μ mole/mg
Amino Acid	amino groups			
	100%	12.5%	20.8%	72%
HyLys	0.08	—	—	0.07
Lys	0.15	0.18	0.35	0.14
His	tr.	0.04	0.16	tr.
NH ₃	0.46	4.25	4.40	0.15
Arg	0.40	—	—	0.39
HyPro	0.40	—	—	0.38
Asp	0.50	1.09	1.07	0.46
Thr	0.15	0.25	0.24	0.15
Ser	0.35	0.58	0.52	0.29
Glu	0.96	0.89	0.95	0.65
Pro	0.94	1.04	1.13	0.93
Gly	2.90	2.95	2.57	2.96
Ala	1.00	1.00	1.00	1.00
Val	0.19	0.25	0.24	0.20
Met	tr.	—	—	tr.
Ileu	0.08	0.11	0.10	0.09
Leu	0.23	0.33	0.35	0.23
Phe	tr.	—	—	0.12

の発生・進行を効果的に抑制する薬剤についての若干の知見^{2-4,11,12)}をえてきたが, さらにそれを系統的に研究するため, 歯牙硬組織の生化学的性状について研究してきた^{1,5-10)}。

前報¹⁾では, 象牙質第3 (III) 画分について, 現報では, 象牙質有機成分の分画と精製の方法, 象牙質第1および第2 (I, II) 画分の性状について報告した。

それらの中で, III-C画分に人歯牙硬組織からそれまで存在することを報告されていない Amino Butyric Acid であると思われる Ninhydrin 陽性物質が存在することとIII-Cの主部分の推定構造を提出した。

しかし, 現報告で示したように, 第1および第2画分では, 上述の Amino Butyric Acid* とか

その他の特徴的な構成成分—例えば, 豚の Aorta 由来の Elastin 中には, Lysine が4つ縮合した型の Desmosine や Isodesmosine が存在すること^{15,23)}, Duckling の Aorta 由来の Elastin や Bovine Nuchae Ligamentum, Bovine Aorta 中に見いだされた Merodesmosine や Dehydrosmosine¹⁶⁾, 人の象牙質, 牛のエナメル質, 象牙質, 骨に見いだされた Phosphorylated Polypeptide^{17,18)}, 人象牙質に P の多い Phosphoprotein¹⁹⁻²¹⁾, その他 Saccharide など²²⁾が存在すると報告されてきている—は, 見いだせなかった。その上, 組成も簡単ではなく, 構造の推定もこの段階では不可能であったが, さらに一層の研究により, 興味ある事実が, 明らかになるう。

文 献

- 1) 柳田勇夫: 象牙質第三画分の分離およびその性状. 歯基礎医学雑誌, 15: 293-299, 1973.
- 2) YANAGIDA, I., NISHINO, M., HANO, T. and

* 牛の "Dentin Collagen" 由来の画分中には, α -Amino Butyric Acid の存在することが示されている¹⁴⁾。

- YOSHIDA, S.: Effects of diammine silver fluoride on organic constituents of human deciduous teeth. Read at IADRmeeting held in Tokyo, *J. dent. Res.*, **50** : 1144, 1971.
- 3) 柳田勇夫, 西野瑞穂, 羽野健敏, 吉田定宏: 人乳歯象牙質有機成分に対するフッ化ジアンミン銀の作用. 小児歯誌, **9** : 39-46, 1971.
- 4) 柳田勇夫, 吉田定宏: 歯牙有機成分と齲蝕抑制物質(その1). 小児歯誌, **10** : 179-180, 1972. (抄).
- 5) 大橋健治, 柳田勇夫: 人象牙質有機成分の分画およびその性状. 第11回日本小児歯科学会総会(於岐阜, 昭和48年5月19日), 1973.
- 6) 柳田勇夫, 大橋健治: 未発表.
- 7) YANAGIDA, I., OHHASHI, K. and YOSHIDA, S.: Fractionation and partial characterization of the organic constituents of human dentin. IADR meeting held in Takarazuka, 12/6-7, 1973.
- 8) 大橋健治: 象牙質有機成分の化学的性状—四規定塩酸処理成分について—. 未発表.
- 9) 大橋健治, 岡田 実, 柳田勇夫: 酸による象牙質の脱灰とそれに伴う構造変化について, I. 塩酸による場合, 未発表.
- 10) 柳田勇夫, 鈴木俊行, 吉田定宏: 歯質有機成分に関する研究, その1, エナメル質有機成分の化学的性状. 小児歯誌, **9** : 218, 1971. (抄)
- 11) 柳田勇夫, 鈴木俊行, 吉田定宏: 歯質有機成分に関する研究, その2, エナメル質有機成分の蛋白分解酵素に対する態度. 小児歯誌, **9** : 219, 1971. (抄)
- 12) YOSHIDA, S., YANAGIDA, I., HANO, T. and NISHINO, M.: An inhibitory actions on enzymatic action of organic constituents of human deciduous teeth by diammine silver fluoride. The 3rd International Symposium on Child Dental Health held in Copenhagen, 8/21-23, 1971.
- 13) GHUYSEN, J.-M., TIPPER, D. J. and STROMINGER, J. L.: Enzymes that degrade bacterial cell walls. *Method in Enzymology*(edited by Colowick, S. P. and Kaplan, N.O.), Vol. VIII, Complex Carbohydrates, pp. 685-699, Academic Press, New York, 1966.
- 14) SCHULEUTER, R. J. and VEIS, A.: The macromolecular organization of dentin matrix collagen. 2. Periodate degradation and carbohydrate cross-linking. *Biochemistry*, **3** : 1657-1665, 1964.
- 15) SMITH, D. W., BRAWN, D. M. and CARNES, W. H.: Preparation and properties of salt-soluble elastin. *Biological Chem.*, **44** : 2427-2432, 1972.
- 16) PAZ, M. A., HENSON, E., BLUMENFELD, O. O., SEIFER, S. and GALLOP, P. M.: Dehydromerodesmosine and merodesmosine in elastin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **44** : 1518-1523, 1971.
- 17) SEYER, J. M. and GLIMCHER, M. J.: The isolation of phosphorylated bovine enamel. *Biochim. Biophys. Acta*, **236** : 279-291, 1971.
- 18) LEVER, A. G. and SHUTTLEWORTH, C. A.: The isolation from human dentine and ox-bone of phosphate-containing peptides. *Arch. oral Biol.*, **11** : 1209-1211, 1966.
- 19) VEIS, A. and PERRY, A.: The phosphoprotein of the dentine matrix. *Biochemistry*, **6** : 2409-2415, 1967.
- 20) VEIS, A., SPECTOR, A. R. and ZAMOSCIANYK, H.: The isolation of an EDTA-soluble phosphoprotein from mineralizing bovine dentin. *Biochim. Biophys. Acta*, **257** : 404-413, 1972.
- 21) CARMICHAEL, D. J.: Dentine matrix collagen: Evidence for a covalently linked phosphoprotein attachment. *Calc. Tiss. Res.* **7** : 331-344, 1971.
- 22) BUTLER, W. T. and CUNNINGHAM, L. W.: Evidence for the linkage of a disaccharide to hydroxylysine in tropocollagen. *J. Biological Chem.*, **241** : 3882-3889, 1966.
- 23) STARCHER, B. C., PARTRIDGE, S. M. and ELSDEN, D. F.: Isolation and partial characterization of a new amino acid from reduced elastin. *Biochemistry*, **6** : 2425-2432, 1967.