ウ蝕象牙質2層のコラーゲン線維の生化学

久保 木 芳 徳

東京医科歯科大学歯学部 生化学講座*

大串 貫 太 郎   総 山 孝 雄

東京医科歯科大学歯学部 第一歯科保存学講座*

〔受付：昭和51年3月31日〕

抄録：フクシン染色法によって染別されるウ蝕象牙質2層のコラーゲン線維のアミノ酸組成と分子間架橋結合のパターンを健全象牙質のそれと比較検討した。フクシンに染まらないウ蝕象牙質第2層（深層部）のコラーゲンは、健全象牙質に比較して架橋結合が少なく、代りに架橋結合の前駆体が増加していた。このことは、架橋結合とその前駆体間の平衡関係が前駆体側に可逆的に推移しているものと考えられた。これに対して、フクシンに濃染するウ蝕象牙質第1層（浅層部）のコラーゲンは、架橋結合とその前駆体がともに著しく減少しており、さらに未同定のものを含む多数の還元性物質が生じており、このことから第1層ではコラーゲンが非可逆性の変性をとげているものと考えられた。各層のアミノ酸組成には有意の差は認められなかった。

緒 言

著者らのグループは、ウ蝕象牙質の除去に関する科学的根拠をもった明確な臨床指針を作るために、ウ蝕象牙質の構造と除去法について種々の観点から研究を進めてきた¹⁻³⁾。そしてこれまでの研究により、ウ蝕象牙質には次の2層が存在することを明らかにした⁴⁻⁶⁾。すなわち、ウ蝕象牙質の表層部には著しく脱灰され、有機成分のコラーゲン線維も変性し、象牙芽細胞突起が消失して、生理的に再石灰化しえない部分があり、これを第1層と命名した。これに対して深層部、すなわち、第1層と健全象牙質の間には、多少とも脱灰されているが、有機成分のコラーゲン線維はいまだ健在で、象牙芽細胞突起が存在しており、適切な処置を施せば生理的な再石灰化をする部分があり、これを第2層と命名した。また、細菌感染はこの第1層にはあるが、第2層にはおよんでいないことが判明した^{6,7)}。一方、第1層は0.5%塩基

性フクシン・プロピレングリコール溶液に濃染するが、第2層は全く染まらないことが総山、寺嶋²⁾によって発見され、大串⁶⁾が組織化学的および電子顕微鏡観察によって確認し、佐藤⁷⁾によって臨床的にも確認された。

ウ蝕象牙質の生理的再石灰化がその第2層にのみ起りうる理由としては、象牙芽細胞突起の存在も考えられる。しかしこの他に、黒崎⁵⁾はアマルガムから溶出した金属元素が表層の第1層を透過して第2層にのみ沈着集積されることを報告しており、このことはCaやその他の金属塩沈着の基盤となるコラーゲン線維の性状もまた再石灰化の能否に重要な関係をもつことを予想せしめる。両者のコラーゲン線維の形態を電子顕微鏡を用いて観察したところ、第2層には健全象牙質と同様に固有の横紋構造を示すコラーゲン線維が密に一定の配列をもって存在するが、第1層ではコラーゲン線維がバラバラにほぐれて著しく減少し、残存線維も横紋構造が不明瞭になっていることを発見

Collagen biochemistry of the two layers of carious dentin.

Yoshinori KUBOKI (Department of Biochemistry, School of Dentistry, Tokyo Medical and Dental University, Tokyo) Kantaro OHGUSHI and Takao FUSAYAMA (Department of Operative Dentistry, School of Dentistry, Tokyo Medical and Dental University, Tokyo)

* 東京都文京区湯島 1-5-45 (〒113)

Jap. J. oral Biol., 18 : 182-187, 1976.

した⁶⁾。

今回は、これら2層のコラーゲン線維の分子レベルでの性状の差異を生化学的に検討する目的で、コラーゲン線維の生理的機能や、化学的ならびに機械的な安定性に最も重要な役割をはたすとされている架橋結合⁸⁻¹²⁾を分析した結果、興味ある知見を得たので報告する。

材料ならびに方法

材料の調製 本学付属病院にて抜去された31本の象牙質ウ蝕を有する歯牙を、抜去後ただちに冷生食水(防腐剤として *n*-caprylic acid を0.1%含む)に浸漬し冷蔵庫内(5°C)に保存した。この歯牙を縦断し、一側を0.5%塩基性フクシン・プロピレングリコール溶液で染色してウ蝕象牙質の第1層と第2層との分布を明らかにし、これを参照しつつ縦断面の他側の第1層および第2層からウ蝕象牙質のサンプルをスプーンエキスカベーターにて削り取り、これら2層の切片を冷凍保存した。また正常象牙質のサンプルとしては、ウ蝕のない智歯30本を抜去後ただちに0.1% *n*-caprylic acid を含む生食水中に浸漬し、ついでエナメル質およびセメント質を削除し、歯髄を除去して冷凍保存した象牙質を用いた。

ついで、各サンプルを液体窒素で凍結し、ステンレス製の乳鉢および乳棒によって粉碎した後、0.5M EDTA を含む pH 7.4 の0.05M Tris-HCl 緩衝液にて透析チューブ内で1週間脱灰した。脱灰終了後、蒸留水にて十分水洗して遠心分離をくりかえした後、残渣を凍結乾燥して分析試料とした。

アミノ酸分析 各試料2~3mg に再蒸留した共沸塩酸(6N)を1ml 加え、窒素置換、減圧封管し、110°C 24時間加水分解した。ついで塩酸をロータリーエヴァポレーターにて除去し、その0.2mg を日本電子製 JLC-6AH 型アミノ酸自動分析装置にかけ、one column 方式でアミノ酸の全分析を行った。

架橋物質の分析⁹⁾ 各試料30mg に30ml の pH 7.5 の0.05M Tris-HCl 緩衝液を加え、Dow Antiform B を1滴加えて攪拌した。この試料に放射性還元試薬として、 NaB^3H_4 (New England

Nuclear 製, 100mCi/m Mol) に9倍量の NaBH_4 を加えて dimethylformamide で1~2%になるよう溶解したものを、コラーゲン重量の $1/30$ 量加えて1時間反応させた。ついで試料から過剰の試薬を透析によって除去し、凍結乾燥した後、3N 塩酸3ml を加え、窒素置換、減圧封管し、110°C で24時間加水分解した後、塩酸をロータリーエヴァポレーターにて除去し、これを濾過して、その濾液を、陽イオン交換樹脂 Aminex A-4 樹脂を充填して60°C に保った0.9×55cm のカラムに添加してクロマトグラフィーを行って分析した。すなわち、0.1M ピリジン・ギ酸緩衝液(pH 2.90)の330ml と1.0M ピリジン・ギ酸緩衝液(pH 5.20)の330ml とを連結して直線的勾配に pH および濃度が上昇する緩衝液系を流速60ml/hr で上記のカラムに通し、流出した溶出液を3ml 毎のフラクションとして試験管にとった。これらのフラクションから200 μ l ずつを自動ピペットでとって試験管に移し、各試験管に下記組成のトルエンシンチレーション混液10ml を加えて液体シンチレーションカウンターで放射能を測定し、フラクション毎の強さを記録した。

トルエンシンチレーション混液の組成

2,5-diphenyloxazole (PPO).....8g

1,4-bis-2-(4-methy-5-phenyloxazole)-benzene (dimethy-POPOP).....0.2g

Biosolv BBS-3 (Beckman).....80ml

トルエンを加えて2l にする。

試料は予め、上記のクロマトグラフィーにおいてすでに溶出位置の判っている標準アミノ酸を加えておき、ニンヒドリン法によってそれらアミノ酸の溶出フラクションを確認した。そして、放射能のピークとして現われた架橋結合およびその前駆体は、それらアミノ酸の溶出フラクションの位置との相関によって同定した。

結 果

1) 健全象牙質およびウ蝕象牙質2層のアミノ酸組成

健全象牙質およびウ蝕象牙質の第2層および第1層のアミノ酸について全分析し、各層のアミノ酸組成をアミノ酸1000残基あたりの各アミノ酸の

表 1 健全象牙質およびウ蝕象牙質 2 層の
コラーゲン線維のアミノ酸組成 (ア
ミノ酸1000残基中の各アミノ酸の残
基数であらわす)

アミノ酸	健全象牙質	ウ蝕象牙質 第2層	ウ蝕象牙質 第1層
Hyp	115	112	111
Asp	50	51	38
Thr	17	19	18
Ser	34	34	32
Glu	64	66	65
Pro	118	115	118
Gly	316	313	319
Ala	111	110	112
Val	24	24	24
Met	7	7	6
Ile	9	9	9
Leu	23	23	22
Tyr	4	3	3
Phe	13	13	13
Hyl	8	7	8
His	5	4	4
Lys	21	18	19
Arg	63	73	68

残基数で表わし表 1 に示した。健全象牙質ではコラーゲン特有のアミノ酸 hydroxyproline, glycine および hydroxylysine の量は各々, 115, 316 および 8 残基であり, ウ蝕象牙質の第 2 層および第 1 層においても, これらの含有率はほぼ同様であった。また, 上記以外のアミノ酸についても, 健全象牙質とウ蝕象牙質の第 2 層および第 1 層は同様の組成を示していた。

2) 健全象牙質およびウ蝕象牙質 2 層の コラーゲン線維の分子間架橋結合

健全象牙質およびウ蝕象牙質の第 2 層, 第 1 層のコラーゲン線維の分子間架橋結合の分析結果を図 1 に示した。横軸には採取したフラクションの試験管番号を示し, 縦軸には各フラクションの 0.2ml あたりの放射能を CPM で示したものである。

健全象牙質のコラーゲン線維の分子間架橋結合物質は次の 4 種のものが検出された。すなわち, proline の直前にある高いピークは架橋結合の前駆体の 1 つである di-hydroxynorleucine (以下

図 1 健全象牙質およびウ蝕象牙質 2 層のコラーゲン線維分子間架橋結合のカラムクロマトグラフ

diOH-NL と略す) であり, glycine の直後のごく低いピークは前駆体の hydroxynorleucine (以下 OH-NL と略す) である。さらに, hydroxylysine の直前にある 2 つのピークのうち, フラクション番号の若い方の極端に高いピークは架橋結合の 1 つである di-hydroxylysinylnorleucine (以下 diOH-LNL と略す) であり, もう一つの低いピークは hydroxylysinylnorleucine (以下 OH-LNL と略す) である。健全象牙質では, 2 つの前駆体のピークよりも, 架橋結合である diOH-LNL のピークははるかに高くなっていた。

ところがウ蝕象牙質第 2 層のコラーゲン線維ではこの関係が逆になっており 架橋結合の前駆体である diOH-NL のピークが架橋結合のピーク (diOH-LNL および OH-LNL) よりも一きわ高くなっていた。さらにもう一つの前駆体である OH-NL のピークも健全象牙質のそれと比較すると高くなっていた。架橋結合 diOH-LNL のピークは

健全象牙質のそれより低くなり、OH-LNL のピークは健全象牙質のそれとほぼ同程度の高さであった。また tyrosine の直後には糖類 (hexose) と lysine の結合体である hexytollysine の無水物と考えられるピーク (以下 A_2 と略す) がごく低く認められた。

これに対してウ蝕象牙質第1層のコラーゲン線維では架橋結合のピークが著しく低く不明瞭となり、特に OH-LNL のピークは確認不能となっていた。そして、その代りに数個の未同定物質のピークが現われていた。この他に第1層には新たに hexytollysine と考えられるピーク (以下 A_1 と略す) が出現し、第2層ではほんのわずかであったその無水物 A_2 のピークも著明になっていた。

考 察

これまで多くの研究者の電子顕微鏡観察により¹³⁻¹⁵⁾、象牙質石灰化の基盤としてコラーゲン線維が重要な役割を演じていると考えられているが、加藤ら⁴⁾によればウ蝕象牙質には生理的に再石灰化する層 (第2層) としない層 (第1層) があることが確かめられている。したがって、これら2層のコラーゲン線維には本質的な差があるものと思われる。現に、著者らのグループによる組織化学的検討の結果、その第2層のみが正常なコラーゲン線維の染色性をもっている事が明らかになり¹⁶⁾、さらに電子顕微鏡の観察によれば、第2層のコラーゲン線維のみが特有な640Å 周期の cross-band やさらに微細な interband の構造を明瞭に示していた⁶⁾。

ウ蝕象牙質のタンパク質成分のアミノ酸組成に関しては、アミノ酸分析法の発達の初期段階において Armstrong¹⁷⁾が、コラーゲン特有のアミノ酸である hydroxyproline や、その他 proline, arginine などが健全象牙質よりも減少することを報告している。しかしその差は極端なものではなく、いずれのアミノ酸組成も本質的にはコラーゲンのパターンを示すものであると述べている。その後斉藤¹⁸⁾も、ウ蝕および健全象牙質の間の差は大きなものではないと報告している。今回のわれわれの研究によれば、ウ蝕象牙質の二つの層およ

び健全象牙質の間には、コラーゲンを構成する各アミノ酸の組成に関しては顕著な差はみられなかった。おそらく Armstrong ら¹⁷⁾のデータはアミノ酸を別の方法で分析したことなどによる分析技術上の問題を含むのではないかと考えられる。

いずれにしても個々のコラーゲン分子のアミノ酸レベルで破壊や、非コラーゲン性タンパクの多量の混在は、ウ蝕象牙質2層においては起っていないのではないと思われる。また三条¹⁹⁾も、ウ蝕象牙質コラーゲンにおける遊離アミノ末端の増加は valine と leucine にかぎられていたと報告しているので、ペプチド鎖としても極端な切断はなく、むしろ限定された切断しか起っていなかったものと考えられる。

しかしながら、コラーゲン線維の分子間架橋結合の量に関しては3層の間に明らかな差異があることが本研究によってはじめて見いだされた。すなわち、健全象牙質に比較してウ蝕象牙質の第2層は架橋結合がやや減少し、代りに前駆体が増加していたが、それほど本質的なパターンの差異はなかった。健全象牙質から第2層への変化は成熟した分子間架橋結合の前駆体への後戻り現象のように思われる。実際、Mechanic が行なった *in vitro* の実験では²⁰⁾、コラーゲンの分子間架橋結合である Schiff 塩基はその前駆体であるアルデヒドと平衡関係をもっており、酸性側においてはその平衡が前駆体側に移行するが、再び中性付近に pH が戻れば前駆体は架橋結合に再び移行することが報告されている。さらに Lian ら²¹⁾によれば、酸性の条件下で調製されたコラーゲンでは、架橋結合は少なく前駆体側に傾いているが、同じ試料を中性の条件下で調製した場合は前駆体が架橋結合に移行している事が報告されている。これらのことから第2層における前駆体への推移も可逆的なものであり、適切な条件下では第2層のコラーゲン線維は再び健全象牙質のそれと同等のものに回復する可能性を持つことが予想される。

しかしながら、第1層では架橋結合のピークが著しく低くなったばかりでなく、上記2層では見られなかった多数の未同定物質のピークが出現していた。これは架橋結合の単なる前駆体へ推移のみでなくコラーゲンの構造の崩壊が起っているこ

とを示唆するものである。すなわち Paz ら²²⁾は変性したコラーゲンにおいては NaB^3H_4 還元を行なった場合、かような多数の還元性物質が出現することを認め、これを amino alcohol と同定報告している。したがって、第1層のコラーゲン線維は非可逆的に変性しているものと推測することができよう。このようなコラーゲンの変性と架橋結合の著しい減少は、先に著者らのグループが発見したウ蝕象牙質第1層におけるコラーゲン線維の横紋構造の消失や⁶⁾、染色性の変化や^{2,16)}、生理的な再石灰能力の消失⁴⁾にも関連することが予想される。

第1層では、この他にコラーゲンの lysine と糖質との結合体である hexytollysine (A_1) とその無水物 (A_2) のピークが多量に検出されたが、これは第1層が細菌に感染しているために^{6,7)}、細菌代謝に関係した糖質が、変性し、架橋を失ったコラーゲンと反応して生じたものと推測される。なお、細菌感染のない第2層^{6,7)}にもごく少量の A_2 が見られたが、これは何らかの原因により迷入したものであろうと思われる。

結 論

0.5%塩基性フクシンプロピレングリコール染色法によって染別されるウ蝕象牙質2層のコラーゲン線維のアミノ酸組成と、分子間架橋結合を生化学的に検討した。その結果、ウ蝕象牙質の第1層と第2層および健全象牙質の間にはコラーゲンを構成する各アミノ酸の組成に関しては差がなかった。しかし、コラーゲンの分子間架橋結合のパターンに関しては3層の間には明らかな差があった。すなわち、健全象牙質と比較して、ウ蝕象牙質の第2層は分子間架橋結合がやや減少し、前駆体がやや増加していたが、両者の間に本質的な差異はなく、したがって、かような変化は可逆的なものと思われた。しかし第1層では、架橋結合のピークが著しく低くなり、数種の未同定物質のピークが出現し、コラーゲン構造の非可逆的な変性が起っているものと思われた。

また、第1層には、細菌代謝に関係があると思われるコラーゲンと糖の結合体である hexytollysine が出現していた。

謝 辞

本研究に関して、東京医科歯科大学歯学部生化学教室の佐々木哲教授より多大の御指導、御援助をいただきましたことを深謝いたします。

文 献

- 1) FUSAYAMA, T., OKUSE, K. and HOSODA, H.: Relationship between hardness, discoloration and microbial invasion in carious dentin. *J. Dent. Res.*, 45: 1033, 1966.
- 2) 寺嶋節子: ウ蝕象牙質二層の染別に関する研究. 口病誌, 37: 1, 1970.
- 3) FUSAYAMA, T. and KUROSAKI, N.: Structure and removal of carious dentin. *Int. Dent. J.*, 22: 401, 1972.
- 4) KATO, S. and FUSAYAMA, T.: Recalcification of artificially decalcified dentin in vivo. *J. Dent. Res.*, 49: 1061, 1970.
- 5) KUROSAKI, N. and FUSAYAMA, T.: Penetration of elements from amalgam into dentin. *J. Dent. Res.*, 52: 309, 1973.
- 6) OHGUSHI, K. and FUSAYAMA, T.: Electron microscopic structure of the two layers of carious dentin. *J. Dent. Res.*, 54: 1019, 1975.
- 7) 佐藤裕一郎: フクシン染色を指標とする感染象牙質除去, 第2報臨床実験. 口病誌, 41: 202, 1974.
- 8) 久保木芳徳: コラーゲンの機能と架橋結合. 歯界展望, 42: 522, 1973.
- 9) 久保木芳徳, 下川仁弥太, 佐々木哲, 小口春久, 高木亨: コラーゲンの架橋結合の研究法. 歯界展望, 44: 97, 1974.
- 10) PIEZ, K. A.: Cross-linking of collagen and elastin. *Annu. Rev. Biochem.*, 37: 547, 1968.
- 11) TANZER, M. L.: Cross-linking of collagen. *Science*, 18: 561, 1973.
- 12) BAILEY, A. J., ROBINS, S. P. and BALIAN, G.: Biological significance of the intermolecular cross-links of collagen. *Nature*, 251: 105, 1974.
- 13) TAKUMA, S.: Preliminary report of the mineralization of human dentin. *J. Dent. Res.*, 39: 964, 1960.
- 14) JOHANSEN, E. and PARKS, H.: Electron-microscopic observations on soft carious human dentin. *J. Dent. Res.*, 40: 235, 1961.
- 15) JOHNSON, N., TAYLOR, B. and BERMAN, D.: The response of deciduous dentine to caries studied by correlated light and electron microscopy. *Caries Res.*, 3: 348, 1969.
- 16) 大串貫太郎: ウ蝕象牙質2層のコラーゲン線維の性状, 第1報, 組織化学的観察. 口病誌, 40: 65, 1973.

- 17) ARMSTRONG, W. G.: A quantitative comparison of the amino acid composition of sound dentine, carious dentine and the collagenase resistant fraction of carious dentine. *Arch. Oral Biol.*, 15 : 115, 1961.
- 18) 斉藤毅 : 象牙質ウ蝕の病巣における蛋白質 (ことにそのアミノ酸組成), 糖質, Ca, Mg, P の量的変動. 歯月報, 37 : 90, 1963.
- 19) 三条大助 : 健全およびウ蝕象牙質における遊離アミノ基の状態について. 口腔病会誌, 30 : 224, 1963.
- 20) MECHANIC, G. L.: The intermolecular cross-link precursors in collagens as related to function. *Israel J. Medical Sciences*, 7 : 458, 1971.
- 21) LIAN, J. B., MORRIS, S., FARIS, B., ALBRIGHT, J. and FRONZBLAU, C.: The effect of acetic acid and pepsin on the crosslinkages and ultrastructure of corneal collagen. *Biochim. Biophys. Acta*, 328 : 193, 1973.
- 22) PAZ, M., HENSEN, E., ROMBAUER, R., ABRAH, L., BLUMENFELD, O. and GALLOP, P.: Amino alcohols as products of a reductive side reaction of denatured collagen with sodium borohydride. *Biochemistry*, 9 : 2123, 1970.