歯肉ミトコンドリアの呼吸調節に関する研究

福岡歯科大学歯科保存学第2講座(指導: 栢 豪洋教授)

原 賀 義 昭

昭和60年12月23日受付

A Study on Respiratory Control of Mitochondrial Preparation in Dog Gingiva

Yoshiaki Haraga

Department of Endodontics and Periodontics (Director: Prof. Hidehiro Kaya)
Fukuoka Dental College, Fukuoka, Japan

Many authors have studied the gingival respiration with slice and homogenate to measure the respiration in Warburg respirometer flask. However, no study on the ability to respiratory control of gingiva has been reported. The author prepared the several mitochondrial fractions from gingiva and measured the mitochondrial respiration to obtain the fractions with ability to respiratory control.

The gingiva was excised from dogs during anesthesia and minced in cold. The minced gingiva was homogenized with Polytron for 0.5 min., 1 min., 1.5 min., 2 min., 5 min. and 10 min. separately. And then, the nucleus, mitochondrial and supernatant fractions were prepared by differential centrifugation method.

On the other hand, the minced gingiva was treated with 0.04%, 0.2%, 1% and 5% collagenase respectively and homogenized with Polytron for 1 min.. Then, the nucleus, mitochondrial and supernatant fractions were prepared by centrifugation.

Relative specific activity of the succinate dehydrogenase was measured on each fraction. Furthermore, the respiration of the mitochondrial preparation was measured by using the oxygen electrode.

Results are:

1. In the mitochondrial fractions treated with Polytron for 0.5 min. to 10 min., the highest relative specific activity of the succinate dehydrogenase was observed in the treatment for 2 min..

2. The highest activity was present in the mitochondrial fraction treated with 1% collagenase in the course of digestions with 0.04%, 0.2%, 1% and 5% collagenase.

3. The respiratory control was observed in the mitochondrial preparations treated with 1% and 5% collagenase when the endogenous, succinate-stimulated and ADP-stimulated respirations were measured.

4. The mitochondrial preparation treated with 1% collagenase had the highest ADP/O ratio and respiratory control rate in the present study.

Key words : *Respiratory control/Gingival mitochondria/Oxygen electrode*

結 言

ミトコンドリアの呼吸活性に関する研究は1913年 Warburg が細胞中に不溶性の呼吸能力のある顆粒があるのを見出したのに始まり, Hogeboom (1948)¹⁾, Schneider (1948)²⁾ らが 0.25M ショ糖液の組織ホモジネートを遠心分画してこの顆粒を単離してからその基礎が築かれ, それ以来著しく進歩し数多くの報告がなされている³⁻⁵⁾.

心筋は持続的で激しい筋肉運動を行っており, 心筋ミトコンドリアの調製には肝組織の場合のように緩やかな組織破碎手段をとるわけにいかず, 現在では, 機械的に破碎するポリトロンホモジナイザーによる方法と *Bacillus subtilis* 由来のナガーゼを用いるタンパク分解酵素消化法を併用する調製方法が行われている⁶⁾. また, 酵母は単細胞生物でそのミトコンドリアにおける呼吸系は高等動物に似ており古くから研究されているが, その細胞壁が強固なためミトコンドリアを分離することが出来なかった. 従って, この細胞壁をタンパク分解酵素を使って破壊する酵素法で調製が行われている^{7,8)}.

こうして調製されたミトコンドリアは呼吸基質や ADP を添加することにより呼吸状態を変化させ, この変化から Chance ら (1963)⁶⁾ の分類する各段階の酸素消費量を求めることにより酸化のリン酸化の研究がなされている.

歯肉の呼吸活性については Glickman ら (1950)¹⁰⁾ が歯周外科手術時に得た歯肉をスライスして炎症歯肉酸素消費量を測定している. それによると, 歯肉に炎症が存在すると歯肉の酸素消費量は増加するが, 細胞変性を併うものは酸素消費量は減少したという報告をしており, その後, 川勝ら (1958)¹¹⁾, 鍛型 (1957)¹²⁾, 高田ら (1957)¹³⁾ らもヒト正常歯肉, 歯肉炎, 歯周病やダイランチン性歯肉炎についても検討し酸素消費量の変動を報告している. 呼吸基質の影響に関する研究は Lehninger (1964)¹⁴⁾ や木下 (1959)¹⁵⁾ らが歯肉スライスにコハク酸を添加して, 歯肉酸素消費量の増加を報告している. しかし, それをさらに発展させた歯肉ホモジネートに関する研究では, Person ら (1960)¹⁶⁾, Eichel ら (1957)¹⁷⁾, 木下 (1959)¹⁵⁾ らが Warburg manometer を用いて呼吸活性を研究, 歯肉ホモジネートに呼吸基質を加えると酸素消費量は増加するものの, 歯肉スライスに比して酸素消費量が低いことに疑問を持ち始めた. 歯肉ホモジネートにチトクローム C, NAD, FAD を添加することによって呼吸活性にいくぶん回復がみられることか

ら, 彼等は歯肉をホモジネートすることにより電子伝達系阻止物質の遊離, チトクロームの破壊, “dilution effect” による補酵素の分散などの仮説をたて研究を行ったが^{12,13)}, それらを考慮に入れても内在呼吸の著しい低下を説明出来る他の因子は不明のままになっており, ミトコンドリア細胞分画や呼吸活性に関する研究はまったく報告されていない.

そこで著者は本研究において, 心筋のタンパク分解酵素消化法と酵母の細胞壁に対するタンパク分解酵素法に着眼し, コラーゲンに富む歯肉組織¹⁸⁾ からミトコンドリアを調製するため歯肉コラーゲンをコラーゲン分解酵素で消化する方法を用いてミトコンドリアを調製し, コハク酸脱水素酵素と酸素消費量を指標として, 呼吸調節を有する歯肉ミトコンドリアの調整方法を検索した.

実験材料ならびに方法

I. 歯肉ミンス状細片

実験材料として, 雄性成犬の臨床的に正常とみなされる上下顎臼歯部頰側歯肉を, ペントバルビタール・ナトリウム麻酔下にて顎骨より採取した. 採取した歯肉は 220mM mannitol, 70mM sucrose, 5 mM MOPS (pH 7.4) からなる溶液¹⁹⁾ にて洗浄しメスを用いミンス状細片とした.

II. ポリトロンによる歯肉ホモジネートの調製

A. ポリトロンホモジナイザーによる調製

上記のようにして得られたミンス状細片にあらかじめ氷冷した3倍量の 53.9mM mannitol, 17.2mM sucrose, 0.05mM EDTA, 1g/1 BSA, 1.2mM MOPS (pH 7.4) からなる溶液¹⁹⁾ を加え, キネマチカ社製 RT 10-35 ポリトロンを用い氷冷下でそれぞれ 0.5分, 1分, 1.5分, 2分, 5分, 10分間ホモジネートした (以後ポリトロンホモジネートと略す).

B. ポリトロンホモジネートとコラーゲン分解酵素による調製

氷冷したミンス状細片を 0.04%, 0.2%, 1%, 5% コラーゲン分解酵素を含む 20ml の Hanks の溶液 (pH 7.4) に入れ 20°C, 20分間インキュベーションしたのち, ポリトロンにて1分間ポリトロンホモジナイズした. コラーゲン分解酵素はつぎの操作の 4500×g で遠心除去した.

III. 歯肉ミトコンドリアの調製

上記の方法で調製した歯肉ポリトロンホモジネートを 4500×g で10分間遠心し上清は上清 (S₁) 画分とし, 沈渣に 20ml の 100mM KCl, 2g/1 BSA, 50mM MOPS

(pH 7.4) からなる溶液¹⁹⁾ を加えテフロンホモジナイザーにてホモジナイズした。つぎに、 $500 \times g$ で10分間遠心しその沈渣を核画分とし、上清は $4500 \times g$ にて10分間遠心を行い、ミトコンドリア画分と上清 (S_2) 画分に分離した。

Ⅳ. 酸素消費量と呼吸活性の測定

酸素消費量の測定にはガラス製で2重構造の特殊な容器をもつユニオン技研社製酸素電極装置を使用した。この装置の反応容器はミトコンドリアと反応液をマグネチックスターラーにより攪拌し、反応容器のまわりに 25°C の恒温水を循環させることにより反応容器内を一定温度に保ち酸素を消費させるように工夫してある。容器左右上部にはガラス棒に白金電極と塩化銀電極を内蔵させその先端をセルローズでコーティングし、両電極間に 0.65 V の電圧をかけ自動平衡記録計に電解電流値を記録させ酸素消費量を測定した。なお、 2 mM コハク酸や $100\text{ }\mu\text{M}$ adenosine 5-diphosphate (以下 ADP と略す) の添加は反応容器上部のキャピラリーよりマイクロシリンジを用いて行った (Fig. 3)。

Fig. 1 Procedure for the preparation of mitochondrial fraction from dog gingiva (Polytron).

Fig. 2 Procedure for the preparation of mitochondrial fraction from dog gingiva (collagenase).

Fig. 3 Apparatus of oxygen electrode.

呼吸活性は Chance ら (1955)²⁰⁾ の state 1, 2, 3, 4 と分類して行い, state 4 が観察できたミトコンドリア画分については state 3 の酸素消費量も測定した。酸素消費量は溶存酸素の減少を電解電流の減少として記

録させ、電流値あたりの溶存酸素量は萩原 (1965)²¹⁾の方法により求めた。ADP/O 比や呼吸調節率については Estabrook (1967)²²⁾の方法により求めた。

V. 酵素活性とタンパク量の測定

A. コハク酸脱水素酵素活性

ミトコンドリアの指標酵素として一般的に用いられているコハク酸脱水素酵素はフェリシアン化カリの還元能にて定量を行う Slater と Bonner の改良法²³⁾を用いた。測定は試料に 0.3M KCN を加え、コハク酸脱水素酵素以外の呼吸系を阻害したのち、0.4M コハク酸、75 μ M $K_3Fe(CN)_6$ を加え、日立社製 200-20 型分光光度計にて吸光度 455nm で測定した。

B. タンパク量の測定

タンパク量の測定は Lowry ら (1951) の方法²⁴⁾に従った。標準タンパクとして bovine serum albumin を使用した。

VI. 試薬

コラーゲン分解酵素 (タイプ I), ADP は Sigma Chemical 社製, Hanks の溶液は阪大微生物病研究会, コハク酸 2 ナトリウム, MOPS, EDTA は半井化学薬品社製を使用した。

結 果

I. ポリトロンホモジネート操作時間とコハク酸脱水素酵素の比活性

ポリトロンを用いてイヌ 歯肉ミンス状細片を 0.5 分, 1 分, 1.5 分, 2 分, 5 分と 10 分間ホモジネートし調製した核画分, ミトコンドリア画分, 上清 (S_2) 画分のコハク酸脱水素酵素の比活性の平均値と標準偏差を Table 1 に示した。コハク酸脱水素酵素の比活性と各画分のタンパク量の関係を表わす相対比活性を Figs. 4 ~ 9 に示した。

ポリトロン操作時間 0.5 分では操作時間 1 分以上に比べて核画分のコハク酸脱水素酵素の比活性は最も高く, 上清 (S_2) 画分の比活性は最も低い。また操作時間 0.5 分と 1 分では核画分の相対比活性がともに大きく, 歯肉組織の破砕が十分ではないことを示唆している。

核画分の比活性は操作時間が長くなるとともに減少傾向を示し, 上清 (S_2) 画分の比活性は操作時間が 2 分で最も低くなり, さらに操作時間を増すと比活性も増加している。相対比活性は操作時間の増加とともに核画分では減少傾向を示すが, ミトコンドリア画分の比活性は操作時間が増加するにしたがって高くなる。操作時間 2 分で最大を示し, 操作時間を 5 分, 10 分と延長するとミト

Table 1 Specific activity of succinate dehydrogenase in subcellular fractions prepared with Polytron homogenate.

time of Polytron homogenate (min.)	fraction		
	nuclear fraction	mitochon. fraction	supernatant (S_2)
0.5	3.21 ± 1.02	1.53 ± 0.43	0.38 ± 0.06
1	1.69 ± 0.66	1.39 ± 0.47	0.56 ± 0.14
1.5	1.38 ± 0.46	2.48 ± 0.42	0.69 ± 0.21
2	1.85 ± 0.61	5.96 ± 1.19	0.41 ± 0.09
5	0.99 ± 0.56	4.65 ± 1.30	0.83 ± 0.11
10	0.80 ± 0.32	2.03 ± 0.64	0.95 ± 0.23

μ mol/min./mg protein

Fig. 4 Relative specific activity of succinate dehydrogenase in subcellular fractions prepared by Polytron treatment for 0.5 min.

Fig. 5 Relative specific activity of succinate dehydrogenase in subcellular fractions prepared by Polytron treatment for 1 min.

Fig. 6 Relative specific activity of succinate dehydrogenase in subcellular fractions prepared by Polytron treatment for 1.5 min.

Fig. 7 Relative specific activity of succinate dehydrogenase in subcellular fractions prepared by Polytron treatment for 2 min.

Fig. 8 Relative specific activity of succinate dehydrogenase in subcellular fractions prepared by Polytron treatment for 5 min.

Fig. 9 Relative specific activity of succinate dehydrogenase in subcellular fractions prepared by Polytron treatment for 10 min.

コンドリア画分の相対比活性は減少している。

Ⅱ. ポリトロンホモジネート操作時間と酸素消費量

ポリトロン操作時間 1 分, 2 分, 5 分にて調製したミトコンドリア画分について, 酸素消費量を測定しその値を Table 2 に表わした. 操作時間 1 分, 2 分, 5 分で調製したミトコンドリアの溶存酸素の変動を 1 分当り 6 mm の速度で記録した測定記録を Figs. 10~12 に示した. 操作時間 1 分での 5 例の平均酸素消費量は内在呼吸で 1.50 n atoms/min./mg protein であり, コハク酸添加によりわずかに増加し, さらに ADP を加えるとやや増加傾向を示した. 操作時間 2 分と 5 分では内在呼吸にコハク酸を添加すると酸素消費量はともに増加する. しかしその増加量は操作時間 5 分が 2 分に比べて 1.4 倍と多く, ADP を加えると抑制傾向を示した (Table 2).

Ⅲ. コラーゲン分解酵素濃度とコハク酸脱水素酵素の比活性

歯肉組織を破碎し呼吸調節能を有するミトコンドリアを調製するにはポリトロンの機械的作用のみでは不十分と考え, コラーゲン分解能を有するコラーゲン分解酵素の酵素作用を利用した. ポリトロン操作時間はコラーゲン分解酵素による歯肉コラーゲンの分解を期待し次の時間を選んだ. ミトコンドリア画分の比活性値が最も高かったポリトロン操作時間 2 分で行うよりもコハク酸脱水素酵素の各画分の比活性と調製ミトコンドリア画分の酸素消費量から歯肉の破碎は十分ではないが脱共役の少ないと考えられる操作時間 1 分間にてポリトロンホモジネートを行った. 0.04%, 0.2%, 1% と 5% 濃度のコラーゲン分解酵素を歯肉ミンス状細片とインキュベーションしたのち分画した核画分, ミトコンドリア画分と上清 (S₂) 画分のコハク酸脱水素酵素比活性を Table 3 に示

Table 2 Respiration of gingival mitochondria.

time of Polytron homogenate (min.)	oxygen consumption (n atoms/min./mg protein)		
	endogenous respiration	succinate respiration	ADP-sti- mulated succinate respiration
1	1.50±0.38	1.65±0.49	1.81±0.52
2	1.34±0.31	1.80±0.28	1.73±0.41
5	1.46±0.49	1.98±0.37	1.89±0.45

Fig. 10 Polarographic tracing of mitochondrial respiration (Polytron 1 min.).

Fig. 11 Polarographic tracing of mitochondrial respiration (Polytron 2 min.).

Fig. 12 Polarographic tracing of mitochondrial respiration (Polytron 5 min.).

Table 3 Specific activity of succinate dehydrogenase in subcellular fractions prepared with collagenase.

amount of collagenase	fraction		
	nuclear fraction	mitochon. fraction	supernatant (S ₂)
control	1.69±0.66	1.39±0.47	0.56±0.14
0.04	0.75±0.12	1.34±0.29	1.07±0.21
0.2	0.25±0.07	2.00±0.43	1.17±0.13
1	0.93±0.27	8.71±2.56	0.49±0.08
5	0.35±0.06	0.69±0.23	1.27±0.28

μmol/min./mg protein

Fig. 13 Relative specific activity of succinate dehydrogenase in subcellular fractions prepared with 0.04% collagenase.

Fig. 14 Relative specific activity of succinate dehydrogenase in subcellular fractions prepared with 0.2% collagenase.

Fig. 15 Relative specific activity of succinate dehydrogenase in subcellular fractions prepared with 1% collagenase.

Fig. 16 Relative specific activity of succinate dehydrogenase in subcellular fractions prepared with 5% collagenase.

した。

0.04%濃度コラーゲン分解酵素にて調製した核画分の比活性と相対比活性は対照に比し低い値となっている。しかし上清 (S₂) 画分は逆に比活性と相対比活性は高くなっているが、ミトコンドリア画分の比活性値は対照とほぼ同じ値である (Table 3, Fig. 13)。ミトコンドリア画分のコハク酸脱水素酵素の比活性は0.2%, 1%と5%濃度で比較すると1%濃度の比活性は0.2%濃度の4倍、5%濃度の10倍以上で、最も高い比活性値が得られ、相対比活性も最大であり上清 (S₂) 画分と核画分の相対比活性はともに最少であった。5%濃度ではその比活性値は大きく低下した (Figs. 14~16)。

Ⅳ. コラーゲン分解酵素濃度と酸素消費量

歯肉ミンス状細片に0.04%, 0.2%, 1%と5%の4種類の濃度の異なるコラーゲン分解酵素で処理しミトコンドリア画分を調製した。ミトコンドリア画分の内在呼吸、コハク酸およびADPを加えた時の酸素消費量の変化をTable 4に示した。

0.04%濃度で調製したミトコンドリア画分の酸素消費量は内在呼吸で2.35 n atoms/min./mg proteinであるが、コハク酸を添加すると1.3倍に増加し、さらにADPを添加すると酸素消費量は抑制された。0.2%調製ミトコンドリア画分のコハク酸添加呼吸量は内在呼吸の1.9倍に増加し、さらにADPを加えるとわずかではあるが酸素消費量の増加がみられた。1%濃度で調製したものではコハク酸を添加することにより内在呼吸の4.2倍に酸素消費量は増加し、ADPを加えるとさらに35%増加した。5%濃度で調製したものでは酸素消費量はコハク酸添加で内在呼吸の2.7倍に増加し、ADPの添加でさらに20%の増加が認められた (Table 4)。

Table 4 Respiration of gingival mitochondria.

amount of collagenase	oxygen consumption (n atoms/min./mg protein)		
	endogenous respiration	succinate respiration	ADP-stimulated succinate respiration
control	1.50 ± 0.38	1.65 ± 0.49	1.81 ± 0.52
0.04	2.35 ± 0.75	3.03 ± 0.86	2.07 ± 0.34
0.2	1.34 ± 0.45	2.52 ± 0.43	2.60 ± 0.44
1	1.19 ± 0.23	4.96 ± 1.21	6.80 ± 1.75
5	0.87 ± 0.35	2.34 ± 0.48	2.83 ± 0.65

コラーゲン分解酵素濃度別に調製した溶存酸素消費量の変化の測定記録を1例ずつ0.04%, 0.2%, 1%と5%をそれぞれ Figs. 17~20 に示した. 0.04%, 0.2%調製ミトコンドリアの例ではコハク酸添加による酸素消費量の増加がみられるが, ADP 添加後は酸素消費量は抑制されている.

1%調製ミトコンドリアはコハク酸存在下で ADP 添加後約6分で酸素消費量の減少が始まった. 一定時間観察したのち再び ADP の添加により再度酸素消費量は増加した. 5%調製ミトコンドリアの酸素消費量は, 1%調製ミトコンドリアに比し少量ではあるが ADP 添加時の酸素消費量は増加し約12分後に酸素消費量の減少が認められ, ADP のリン酸化に2倍の時間を要している (Figs. 19, 20).

V. 歯肉ミトコンドリアの呼吸調節

Chance ら (1955)²⁰⁾ の分類した state 3 は呼吸基質存在下において ADP を添加することにより酸素消費量

Fig. 17 Polarographic tracing of mitochondrial respiration (0.04% collagenase).

Fig. 18 Polarographic tracing of mitochondrial respiration (0.2% collagenase).

Fig. 19 Polarographic tracing of mitochondrial respiration (1% collagenase).

Fig. 20 Polarographic tracing of mitochondrial respiration (5% collagenase).

が増加している状態である. その後呼吸基質存在下で ADP がすべて ATP に変換され酸素消費量が減少した状態が state 4 である. 歯肉から調製したミトコンドリアにおいてはこの state 3 と state 4 はいまだ報告されていない. state 3 と state 4 の酸素消費速度の比が呼吸調節率であり, state 3 の状態で消費された ADP の分子数と酸素原子数との比が ADP/O 比でいずれもミトコンドリアの呼吸機能を表わす. 1%と5%濃度コラーゲン分解酵素を Hanks の溶液中でインキュベーションすることによりコラーゲン分解酵素を作用させポリトロンにて1分間ホモジネートし分画後ミトコンドリアを調製した. そのイヌ歯肉ミトコンドリアに呼吸調節がみられ,呼吸活性は Table 5 に示しているように state 4 で酸素消費量は大きく減少している.

5%調製ミトコンドリアでは ADP/O 比1.35, 呼吸調製率1.65, 1%調製ミトコンドリアでは ADP/O 比1.42, 呼吸調製率1.76となり, 1%コラーゲン分解酵素を用いて調製したミトコンドリアは5%で調製したものに比較して損傷の少ない呼吸調製率のよいミトコンドリアであることが判明した。

Table 5 Respiratory function of gingival mitochondria.

amount of collagenase	oxygen consumption (n atoms/min./mg protein)		ADP/O ratio	respiratory control ratio
	state 3	state 4		
0.04	2.07±0.34	—	—	—
0.2	2.60±0.44	—	—	—
1	6.80±1.75	3.86±1.03	1.42	1.76
5	2.83±0.65	1.71±0.44	1.35	1.65

考 察

歯肉ミトコンドリアのエネルギー代謝における酸化リン酸化や電子伝達を研究することは、歯肉の損傷や歯周病における歯肉組織の反応を理解するために重要であるが、歯肉ミトコンドリアの酸化リン酸化や電子伝達を呼吸調節によって研究された報告はみられない。歯肉の呼吸に関する研究は Glickman ら (1949)²⁵⁾ がヒト正常歯肉と炎症歯肉の酸素消費量を発表している。その後木下 (1959)¹⁵⁾ も歯周病と歯肉の組織呼吸の関連性について研究し、歯肉をホモジネートすると酸素消費量は減少するが、NAD やチトクローム C を添加すれば著しく酸素消費量が増加することを明らかにしている。また鈴木 (1963)²⁶⁾ もラット歯肉ホモジネートの酸素消費量を増加させるにはコハク酸や ATP が有効であると述べている。これらとその後の報告は歯肉スライスや歯肉ホモジネートを用いて呼吸基質の有無における酸素消費量の相違や正常歯肉と炎症歯肉の酸素消費量を比較したものばかりである。

酸素消費量の測定は反応液中の酸素濃度と気相中の酸素分圧の変化を測定する Warburg 検圧法を用いて研究が行われている。この方法はその平衡に時間を要し時間的なずれの中で酸素消費量値を測定するため、連続的な測定記録を得られず酸素の微量測定や呼吸活性の詳細を知るには難点がある。この点に注目した田中 (1954)²⁷⁾ は Warburg 法のように容器を振盪する必要もなく

原理を異にする Oxigraph にて溶存酸素消費量の測定を試みている。この方法は白金と塩化銀の両電極間に2.5秒間加電圧し、その時の溶存酸素量を10秒毎に連続写真撮影することにより、断続的な連続測定の記録を可能にしている。

本研究で酸素消費量の測定に用いた酸素電極法は Chance ら (1955)²⁰⁾ がミトコンドリアの呼吸を測定して広く知られるようになった。原理はポーラログラフ法の一応用であり、溶存物(酸素)が電極で酸化還元を受けることで生じる電解電流の量によって溶質を定量するものである。初期には静止した状態で白金電極を使用していたが、その後、上下振動する電極や、電極を静止させ容器内溶液を回転させる方法を用い酸素濃度の変化を連続的に記録させたが、開放型であり電極も露出したままであったため外部からの酸素の侵入と電極の汚染は防止できなかった。そこで、Hagihara (1961)²⁸⁾ は電極端をポリエチレン膜やテフロン膜で被うことにより電極の汚染を防ぎ、さらに外部からの酸素の侵入を防止する密閉型反応容器を考案した。これらの一連の改良により酸素電極法は安定性と応答性に優れ、連続的な測定記録が得られる方法となった。

歯肉の酸素消費量については、歯肉と他の臓器と比較した報告はないが、酸化還元酵素活性を比較した Eichel ら (1957)¹⁷⁾ の報告がある。その活性は肝の1/10であり、歯髄よりも低く網膜や脈絡膜と同程度に低いと述べており、この点について Theodore ら (1968)²⁹⁾ の歯髄酸素消費量と栢ら (1983)³⁰⁾ の歯肉酸素消費量を比較してみても歯肉の酸素消費量は歯髄より低いようである。また構造タンパクであるコラーゲンを主成分とする歯肉結合組織の酸素消費量は歯肉上皮組織の1/2であり、結合組織が大部分を占める歯肉組織内のミトコンドリア量は他の臓器に比べて少ないことが推察される^{31), 32)}。したがって、歯肉組織呼吸活性が低く、肝臓や心臓のように試料を多量に採取することが困難である歯肉を試料として呼吸活性を測定するには酸素電極装置はもっとも適していると考え今回の実験に使用した。Palmer ら (1977)³³⁾ はポリトロンとタンパク分解酵素を用いミトコンドリアを調製し、機能的にも形態的にも良質のミトコンドリアを得ている。したがって、歯肉よりミトコンドリアを調製するにあたり、肝や心筋で行っている機械的破碎手段であるポリトロンを使用してコラーゲンの破碎を試みた。ポリトロンホモジネートで調製したミトコンドリアは操作時間2分以上でコハク酸脱水素酵素の比活性は高くなり、ポリトロン操作時間1分、2分、5分の内在呼

吸量はほぼ同じであるもののコハク酸添加による呼吸量が増加している。野田(1975)³⁴⁾が紫外線をミトコンドリアに照射して脱共役させた実験では照射紫外線量が多くなると内在呼吸量に変化はないが、コハク酸添加呼吸量が増え酸化的リン酸化反応の脱共役が大きくなると述べている。この野田(1975)³⁴⁾の報告から推察すると著者のポリトロン操作時間が1分、2分、5分と増加するにつれて脱共役が大きくなり、ミトコンドリアの損傷が多くなると思われる。

Rosset ら(1972)³⁵⁾はウシ付着歯肉ホモジネートを用いた実験で内在呼吸にコハク酸を加えると呼吸量は5倍に増加し、内在呼吸にADPを添加すれば呼吸量は同じく5倍になり、また、コハク酸とADPを同時に加えると内在呼吸量の6倍になったと報告している。これは木下(1959)¹⁵⁾の“dilution effect”により内在呼吸が大幅に減少したと考えると、呼吸基質のコハク酸かADPを補給することにより酸素消費量が回復したと考えられる。コハク酸を添加した後にさらにADPを加えることにより酸素消費量の値がいくぶん高いことは、本実験のポリトロン操作1分のみと0.2%コラーゲン分解酵素で調整した2種類のミトコンドリアにおいて内在呼吸の酸素消費量がコハク酸の添加で増加し、その後のADP添加でさらにやや増加している事実とよく似ている。またRosset ら(1972)³⁵⁾はウシ歯肉よりミトコンドリア画分を調製し、ミトコンドリア画分に上清を加えコハク酸を添加すると内在呼吸量が増し、ミトコンドリア画分に上清およびコハク酸を加えた呼吸にADPやNADを添加すればADPで50%、NADで60%呼吸を阻害することを示しており、本実験のポリトロン操作時間2分、5分で調製したミトコンドリアと0.04%コラーゲン分解酵素で調製したミトコンドリアではコハク酸添加により酸素消費量は増加するが、ADP添加で抑制されることと一致する。その理由について彼らは呼吸調節は歯肉ミトコンドリアに存在するが脱共役しているか、もしくは呼吸が進行するにしたがって代謝活性が遅くなる内在調節機構が細胞内に存在しているのではないかと推察しているが、著者はミトコンドリアの損傷が大きいことによるものと考えている。

Ernster(1967)³⁶⁾は骨格筋をポリトロンにて1~2分間ホモジネートしミトコンドリアを調製しており、ポリトロン操作時間2分以上では歯肉ミトコンドリア自身の損傷も大きいことを考慮し、歯肉ホモジネートが不十分であるがミトコンドリアの損傷の少ないと考えられる操作時間1分でコラーゲン分解酵素を用いて実験を行う

こととした。

一般に歯肉コラーゲンを破砕する手段としてポリトロンなどの機械的手段以外に考えると、コラーゲンを60°C以上の熱で刺激することによりコラーゲンの水素架橋を壊すか酸で変性させ、三重らせん構造を変性させてコラーゲン分解酵素以外のタンパク分解酵素で消化することが出来る。しかしこの熱や酸を用いる方法は損傷の少ないミトコンドリアを得るには適当でないと考えコラーゲン分解酵素を利用することにした。コラーゲン分解酵素として *Bacteroides melaninogenicus*³⁷⁾ 由来の酵素は30万のコラーゲン分子を10万と20万に分断するが、*Clostridium histolyticum* 由来のコラーゲン分解酵素は小さなペプチドに直接分断し、かつ市販されており、この酵素を使用することにした。この酵素の作用時はCa⁺⁺存在下が望ましいため、Ca⁺⁺の存在するHanksの溶液中にてインキュベーションをした。萩原ら(1972)³⁸⁾のタンパク分解酵素法では心筋切片にタンパク分解酵素を20分間作用させたのちテフロンにてホモジネートし、さらに20分間使用させている。Ogura ら(1979)⁹⁾は室温にて20分間タンパク分解酵素を作用させ呼吸調節率4.0という共役機能のよい心筋ミトコンドリアを調製している。一方、コラーゲン分解酵素を利用して組織を破砕したものとしては Meharg(1967)³⁹⁾がマウス乳腺からミトコンドリアを調製するため、0.1%コラーゲン分解酵素を37°Cにて60分間作用させており、Sinden ら(1979)⁴⁰⁾も歯肉より線維芽細胞を抽出するため0.05%コラーゲン分解酵素をHanksの溶液中にて60分間作用させている。

著者は、これらの報告を参考にしてコラーゲン分解酵素を効果的に作用させるとともにミトコンドリアへの影響を配慮し20°Cにて20分間作用させた。コラーゲン分解酵素濃度は0.04%からその濃度を上昇させた。

著者の実験結果は、1%と5%コラーゲン分解酵素を作用させポリトロン操作時間1分間にて調製したミトコンドリア画分の呼吸活性測定でChance ら(1955)²⁰⁾の分類によるstate 1, 2, 3, 4を確認できる。しかし、本実験では酸化的リン酸化や共役状態と関連のあるstate 3, state 4を中心に検索するため、stateを表わす順序は肝、心筋等ミトコンドリアの多くの研究と同じようにstate 1, state 3, state 4の順で表わした。5%コラーゲン分解酵素を作用させたものについても呼吸調節が確認できたが、ADP/O比、呼吸調節率とも1%コラーゲン分解酵素を作用させたものに比し低い値であった。5%という高濃度のコラーゲン分解酵素作用が

ミトコンドリアへ影響があるのか、他の因子によるものか不明である。コラーゲン分解酵素1%, ポリトロン操作1分で調製したミトコンドリアでは内在呼吸は $1.19 \text{ n atoms/min./mg protein}$ で 2 mM コハク酸を加えると4.2倍に呼吸量は増加し、さらに $100 \mu\text{M}$ ADP 添加では内在呼吸の5.7倍となっている。

Tyler ら (1967)⁴¹⁾ が測定した心筋ミトコンドリアの呼吸活性は state 3で $253 \text{ n atoms/min./mg protein}$, state 4で 79.1 , ADP/O 比 1.8 , 呼吸調節率 3.2 であり、一方、野田 (1975)³⁴⁾ の肝ミトコンドリアでは, state 3が 52.7 , state 4 12.6 , ADP/O 比 1.8 , 呼吸調節率 3.8 と報告されている。また, Albert ら (1973)⁴²⁾ がヒト線維芽細胞を培養したのちミトコンドリアを調製しその呼吸活性を測定した結果では state 3で 22.4 , state 4が 6.0 , ADP/O 比 1.7 , 呼吸調節率 3.8 となっている。呼吸基質がコハク酸の場合 ADP/O 比が $1.7 \sim 1.8$, 呼吸調節率が $3 \sim 6$ であれば良質なミトコンドリアと言われており、これらの測定結果は長い研究の間分画方法が改良され優れたものである。呼吸活性が肝の $10 \sim 15\%$ と言われる歯肉から著者らが調製したミトコンドリアの呼吸活性 1.42 と呼吸調節率 1.76 はこれからさらに改良されていかななくてはならない。

結 論

イヌ歯肉より呼吸調節能を有する歯肉ミトコンドリアの調製を試みた。歯肉にはコラーゲンが多いため、その破碎にはポリトロンとコラーゲン分解酵素を用いて歯肉を核画分, ミトコンドリア画分, 上清 (S_2) 画分に分画し、各画分のコハク酸脱水素酵素活性を測定した。ま

た、ミトコンドリア画分については酸素電極法にて呼吸活性を測定し、次の結論を得た。

1. 歯肉をポリトロンにて操作時間 0.5 分, 1 分, 1.5 分, 2 分, 5 分と 10 分にて調製したミトコンドリア画分のコハク酸脱水素酵素比活性は操作時間 2 分間のものが最も高かった。

2. ポリトロン操作時間 1 分, 2 分, 5 分間にて調製したミトコンドリア画分の酸素消費量を測定したが、呼吸調節はみられなかった。

3. 0.04% , 0.2% , 1% , 5% コラーゲン分解酵素とポリトロン操作時間 1 分間にて調製したミトコンドリアのコハク酸脱水素酵素比活性は、 1% コラーゲン分解酵素を作用させたものが最も高かった。

4. コラーゲン分解酵素で調製したミトコンドリア画分の呼吸活性を測定したところ、 1% と 5% コラーゲン分解酵素で調製したミトコンドリアに呼吸調節がみられた。

5. ADP/O 比と呼吸調節率は 1% コラーゲン分解酵素で調製したミトコンドリアが 5% のものより高い値であった。

稿を終わるに臨み、本研究に終始御懇切なる御指導と御校閲を賜った恩師 栢 豪洋教授に深甚なる感謝の意を表します。また、教室員諸兄に対し深く感謝致します。

本論文の要旨は第27回秋季日本歯周病学会総会 (昭和59年, 広島市) および、第28回秋季日本歯周病学会総会 (昭和60年, 名古屋市) において発表した。

引 用 文 献

- 1) Hogeboom, G.H., Schneider, W.C. and Palade, G.E.: Cytochemical studies of mammalian tissues. I. Isolation of intact mitochondria from rat liver. Some biochemical properties of mitochondria and submicroscopic particulate material. *J. Biol. Chem.* **172**: 619—635, 1948.
- 2) Schneider, W.C.: Intracellular distribution of enzymes. The oxidation of octanic acid by rat liver fractions. *J. Biol. Chem.* **176**: 259—262, 1948.
- 3) Schneider, W.C. and Hogeboom, G.H.: Intracellular distribution of enzymes. V. Further studies on the distribution of cytochrome c in rat liver homogenates. *J. Biol. Chem.* **183**: 123—128, 1950.
- 4) VonKroff, R.W.: Metabolic characteristics of isolated rabbit heart mitochondria. *J. Biol. Chem.* **240**: 1351—1358, 1965.

- 5) Takeru, I. and Ralph, M.J. : Effects of a nutritional deficiency of unsaturated fats on rat liver mitochondria. *J. Biol. Chem.* **239** : 3201—3208, 1964.
- 6) Chance, B. and Hagihara, B. : Intracellular respiration. Phosphorylating and nonphosphorylating oxidation reactions. In : *International congress of biochemistry*. (ed. by Pregamon, P.). MacMillan. New York, 1963, 3—26.
- 7) Ozawa, K., Seta, K., Araki, H. and Handa, H. : The effect of ischemia on mitochondrial metabolism. *J. Biochem.* **61** : 512—514, 1967.
- 8) Ozawa, K., Seta, K., Takeda, H., Aono, K., Handa, H. and Araki, C. : On the isolation of mitochondria with high respiratory control from rat brain. *J. Biochem.* **59** : 501—510, 1966.
- 9) Ogura, R., Toyama, H., Nagata, O., Ono, T., Shimada, T. and Murakami, M. : Biochemical and scanning electron microscopic properties of mitochondria isolated from rat cardiac muscle. *Kurume Med. J.* **26** : 51—56, 1979.
- 10) Glickman, I., Turesky, S. and Manhold, J. : The oxygen consumption of healing gingiva. *J. Dent. Res.* **29** : 429—435, 1950.
- 11) 川勝賢作・森 昌彦 : 人の口腔歯肉粘膜上皮代謝の組織化学的, 細胞化学的研究. 口科誌 **7** : 128—137, 1958.
- 12) 鎌型 勝 : 歯肉の生理的研究. 歯科医学 **20** : 44—50, 1957.
- 13) 高田嘉定・森 昌彦 : 人歯肉の組織呼吸, 主として酸素消費量について. 日口外誌 **6** : 412—416, 1957.
- 14) Lehninger, A.L. : *The mitochondrion molecular basis of structure and function* Benjamin, New York, 1964, 40—91, 148—149.
- 15) 木下四郎 : 歯肉の呼吸に関する研究. 口病誌 **26** : 99—107, 1959.
- 16) Person, P. and Fine, A. : Reversible inhibition of beef heart cytochrome c oxidase by polyanionic macromolecules. *Science* **132** : 43—44, 1960.
- 17) Eichel, B. and Swanson, A.A. : Oxidative enzyme. I. Succinic dehydrogenase, DPN cytochrome c reductase, cytochrome oxidase and catalase in oral, liver and brain cortex tissues. *J. Dent. Res.* **36** : 581—594, 1957.
- 18) 栢 豪洋 : 歯肉コラーゲンに対する温熱的刺激の影響. 阪大歯誌 **17** : 61—70, 1972.
- 19) 原 洋・香月 司・小野辰也・小倉良平・森園隆昭・村上正浩 : Ultra-Turrax と Proteinase 併用による心筋ミトコンドリアの分離法. 久医会誌 **43** : 333—340, 1980.
- 20) Chance, B. and Williams, G.R. : Respiratory enzymes in oxidative phosphorylation. Kinetics of oxygen utilization. *J. Biol. Chem.* **217** : 383—393, 1955.
- 21) 萩原文二 : 酸素電極法による呼吸測定. 蛋白質核酸酵素 **10** : 1689—1702, 1965.
- 22) Estabrook, R.W. : Mitochondrial respiratory control and the polarographic measurement of ADP : O ratios. In : *Oxidation and phosphorylation* (ed. by Estabrook, R.W. and Pullman, M.E.). Academic Press, New York, 1967, 41—47.
- 23) Veeger, C.D., Vartanian, D.V. and Zeylemaker, W.P. : Spectrophotometric method with $K_3Fe(CN)_6$. In : *Citric and cycle* (ed. by Lowenstein, J.M.). Academic Press, New York, 1969, 81—84.
- 24) Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Far, A.L. and Randall, R.J. : Protein measurement with folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193** : 265—275, 1951.
- 25) Glickman, I., Turesky, S. and Hill, R. : Determination of oxygen consumption in normal and inflamed human gingiva using the Warburg manometric technic. *J. Dent. Res.* **28** : 83—94, 1949.

- 26) 鈴木芳太郎：歯齦呼吸に及ぼす耳下腺ホルモン並びに副腎皮質ホルモンの影響〔会〕。日歯周誌 5：107，1963.
- 27) 田中 明：歯肉の組織呼吸，酸素消費量について。日口外誌 4：293—299，1954.
- 28) Hagihara, B. : Techniques for the application of polarography to mitochondrial respiration. *Biochim. Biophys Acta.* 46 : 134—142, 1961.
- 29) Theodore, C.M. and Alton, K.F. : Effects of heart on oxygen consumption in bovine dental pulp. *J. Dent. Res.* 47 : 798—800, 1968.
- 30) 栢 豪洋・原賀義昭・今村哲也・春岡龍男・上田雄造・秋岡文吾・比嘉宗安・西浦利博・大田康男：イヌ歯肉酸素消費量に関する研究—酸素電極法を用いて—。日歯周誌 25：350—355，1983.
- 31) Derbyshire, J.C. and Mankodi, S.M. : Gingival keratinization with hand and electric toothbrushes. A cytological comparison. *J. Am. Dent. Assoc.* 68 : 255—259, 1964.
- 32) Krikos, G.A. : Histochemical studies of the periodontal ligament in lathyrin rats. *Arch. Oral Biol.* 9 : 415—422, 1964.
- 33) Palmer, J.W., Tandler, B. and Hoppel, C.L. : Biochemical properties of subsarcolemmal and interfibrillar mitochondria isolated from rat cardiac. *J. Biol. Chem.* 252 : 8731—8739, 1977.
- 34) 野田和良：ミトコンドリア呼吸系に及ぼす紫外線照射の影響。久医学会誌 38：879—895，1975.
- 35) Rosett, T., Gangarosa, L.P., Ashbridge, E.L., Belsky, A., Derenzo, G., Elder, H., Pollack, R.L., Sacco, U. and Tan, Y. : Respiration of homogenates and crude mitochondrial fractions of bovine attached gingiva. *Arch. Oral Biol.* 17 : 1543—1550, 1972.
- 36) Ernster, L. : Skeletal muscle mitochondria. In : *Oxidation and phosphorylation* (eds. by Estabrook, R.W. and Pullman, M.E.). Academic Press, New York, 1967, 86—94.
- 37) Gibbons, R.I. and McDonald, J.B. : Degradation of collagenous substrates by bacteroides melaninogenicus. *J. Bacteriol.* 81 : 614—621, 1961.
- 38) 萩原文二・曾根 勇 史：細胞分画法。(佐藤 了・他編)。岩波書店，東京，1972，141—148.
- 39) Mehard, C.W. : Isolation of mitochondria from mouse mammary gland. In : *Oxidation and phosphorylation* (eds. by Estabrook, R.W. and Pullman, M.E.). Academic Press, New York, 1967, 305—310.
- 40) Sinden, P.R.V. and Walker, D.M. : Inflammatory cells extracted from chronically inflamed gingiva. *J. Periodont. Res.* 14 : 467—474, 1979.
- 41) Tyler, D.D. and Gonze, J. : The preparation of heart mitochondria from laboratory animals. In : *Oxidation and phosphorylation* (eds. by Estabrook, R.W. and Pullman, M.E.). Academic Press, New York, 1967, 75—78.
- 42) Albert, J.T.M. and Donald, A.P. : Oxidative phosphorylation in mitochondria isolated from human fibroblasts. *Biochim. Biophys Acta.* 292 : 73—77, 1973.