硬組織のムコイドについて

第1報 骨ムコイドに関する研究

山 本 宏

東京医科歯科大学歯学部生化学教室 (指導 荒谷真平教授)

Mucoid of Hard Tissue

1. Studies on Osseomucoid

Hiroshi Yamamoto

Department of Biochemistry, School of Dentistry,
Tokyo Medical and Dental University

(Prof. S. Araya)

The analysis of mucoid isolated from the bovine femur has shown that the amounts of N and amino sugar well agree with that of Eastoe's report, but SO_4^{2-} gives a little lower value.

The ultraviolet absorption spectrum of osseomucoid was found to be very similar with that of ordinary simple proteins.

The contained tyrosine and tryptophan calculated from the ultraviolet absorption spectrum showed that the amount of tyrosine was slightly lower than that was chemically determined by Eastoe et al. and tryptophan gave the value of 0.31 % which was not chemically analyzed by Eastoe et al.

According to the study by Tiselius and the filter paper electrophoresis, also in the case of osseomucoid, the Partridge has shown three fractions as shown with the mucoid of cartilage, and it was deduced that they are 1) chondroitin sulfuric acid, 2) probably a kind of protein containing the neutral polysaccharide, 3) something like a compound of the above two components.

緒 言

こゝに硬組織のムコイドというのは硬組織中からとり出される多糖類と蛋白質の複合物乃至は混合物というような意味である。Eastoe ら¹⁾はそのような多糖類と蛋白質の複合物を牛の大腿骨の骨幹部から乾燥重量当り 0.24 % 取り出しているが、実際の骨中の存在量はもう少し多いだろうという²⁾。しかし何れにしても骨中の存在量はそう多いものではなく、20 % 位も存在しているコラー

ゲンに比すれば骨中の有機物としても量的には僅少なものである。しかし軟骨ではコンドロイチン硫酸を主体としたムコイドが約 40 % も存在しており、コラーゲンと同じ位の含量であるという³⁾。歯牙の象牙質から Pincus⁴⁾はムコイドの一つの成分と思われる多糖類を 2.64 % 得、これがコンドロイチン硫酸であるという。しかし Pincus の得た物質の分析値はコンドロイチン硫酸のそれとは余りよく一致してはいないが、Hess, Lee⁵⁾は確かにコンドロイチン硫酸と思われるものを入

の象牙質から0.75%得ており、実際にはこの2, 3倍は存在しているのだらうという。

これらの硬組織のムコイドは普通中性から弱アルカリ性で抽出されるが、殊に適当な塩類の存在下では抽出が容易になる。かくして抽出されたものを弱酸性にするとコンドロイチン硫酸のような酸性多糖類と或る種の蛋白質とが結合して沈澱してくる。普通このようにして得られた多糖類と蛋白質の複合物をムコイドと称しているが、Hisamura⁶⁾は骨のムコイドから2つの分割を得てその一つはコンドロイチン硫酸であり、他の部分はヘキソサミンとガラクトースを含んだ蛋白であると云う。Masamune⁷⁾らは骨ムコイドの中に2種のヘキソサミン即ちグルコサミンとコンドロサミンの存在することを明かにし、Eastoe¹⁾らは更に骨ムコイド中にMannoseのあることを報告している。蛋白部分については昔はコラーゲンの誘導体だと思われていたが、Eastoe¹⁾らは骨ムコイドのアミノ酸組成をしらべ、それがコラーゲンとは異なりオキシプロリンを含まず、グリシン、アラニン、プロリンの含量も少く、ロイシンとチロジンが比較的多いことなどから寧ろ血清蛋白に近いものだという。これらから考えると骨ムコイド中にはコンドロイチン硫酸とガラクトース及びグルコサミンなどを含む糖蛋白質があるらしい。

なお骨ムコイドから得たと同様のものをHisamura⁸⁾は軟骨からも得ているし、Partridge⁹⁾は牛の鼻の軟骨から得たムコイドをTiseliusの電気泳動でしらべて、これにコンドロイチン硫酸と蛋白性の物質及び両者が結合した3種類の分割の存在を認めている。

云う迄もなくこのようなムコイドは硬組織の基質或いはorganic matrixの構成成分の一つとして色々な生理的機能をもっているに違いないが、殊に酸性の多糖類が石灰化に重要な役目を演じているらしいことは多方面からかなり実証されて来ている¹⁰⁾¹¹⁾。またこれらがコラーゲン線維の形成及びその安定化に関係しているらしいことも我々の興味をひく問題である²⁾⁹⁾¹²⁾。

しかしこれらのムコイドの問題をも含めて一般

に硬組織のorganic matrixの生化学的な研究は実は甚だ寥々たる状態で、その生理的な働きについては実証的なものより空想と推測の方が多いような現況である。ことに歯牙のそれについての生化学的な研究は上記のPincus⁴⁾やHess, Lee⁵⁾らによつて漸く端緒が開かれた程度のように思われる。それで著者はその方面の研究を志したが、その第一歩として先ず牛の大腿骨からムコイドを得てこれを研究し、従来報告されている2, 3の事実を確認すると共に紫外線吸収及び電気泳動の研究によつていくらか新しい知見を得たのでこゝに報告する。

実験材料及び実験方法

1) 骨ムコイドの調製

Hawk, Gies¹³⁾の方法をいくらかmodifyして次の如く調製した。牛の大腿骨を求め骨端部を鋸で切り捨て、骨幹部を得、その表面の骨膜などの軟組織を除去し、骨髓もひき抜いて捨て去る。この骨を鉄棒でたゞいて大きく割り碎き、エーテルに浸して脂肪類を除去する。半日から1日後にこのエーテルを更新してなお半日～1日置いて充分脱脂する。この骨片を風乾してJaw crusherで直径0.5 cm位の小片にする。これを更にCoffee millで粉碎して50メッシュを通る位の粉末にする。

こうして得た骨粉に0.3%のHClを加えて脱灰するのであるが、始めは先ず適当量の冷却したHClを加える。するとどンドン脱灰が起りpHはすぐ上つて液の脱灰能は減ずるからpHを時々しらべてpH 6位になつたら液を更新する。余り脱灰が進まなくなつたらこれを氷室に移し、時々液を振盪する。この場合脱灰された粉末は半透明の軟骨様の外観を呈し、液を振盪した後すぐには沈澱しなくなるのでこれを傾斜して他の容器に移し、底に残る未脱灰の骨粉には更にHClを加えて脱灰を進めるようにする。初めの骨粉100 gに対して全量25～30 l位の0.3% HClを使用し、1本の大腿骨の脱灰に5日位を要した。

脱灰の完了したものはこれを遠沈し、蒸留水で

1 回洗つて再び遠沈し、これに飽和の $\text{Ca}(\text{OH})_2$ 液を初めの骨粉 100 g に対して 300~400 cc の割に加えて 1 晩室温で振盪抽出した後、遠心分離する。その上清に 10 % HCl を滴下して pH を 4 にすると沈澱を生ずる。これを遠沈して集めたものが粗製のムコイドである。なお $\text{Ca}(\text{OH})_2$ で抽出した残渣には更に 2 回飽和の $\text{Ca}(\text{OH})_2$ 液を加えて抽出をくり返すと大体抽出されるものは全て出てくるから、これらから得られる粗製ムコイドを全て集める。この粗製ムコイドを 200 cc の飽和 $\text{Ca}(\text{OH})_2$ 液に再び溶かし、この際不溶性のものを遠心除去して上清に 10 % HCl を滴下して pH 4 としムコイドを沈澱させることにより精製する。この精製操作を更に 1 回くり返す。こうして得たムコイドを 50 cc の水に懸濁させてセロファン囊に入れ水道の流水で 1 晩、更に氷室中で蒸留水に対して 1 晩透析してこれを凍結乾燥し、それを塩化カルシウムの入ったデシケーター中に保存した。このムコイドを随時溶かして実験に供した。

2) 窒素の定量

ミクロ・キーエルダール法の Parnas の変法により測定した¹⁴⁾。

3) アミノ糖の定量

大体 Elson-Morgan の原法¹⁵⁾に従つて次の如く行つた。5 mg のグルコサミンをクロ、ホルムを飽和させた水 100 cc に溶かし、その 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 cc を各々目盛つき試験管にとつて水を加えて全量を 1.0 cc とする。各々にアセチルアセトン試薬 1.0 cc を加え 15 分間沸騰した水浴中につける。氷冷後 2.0 cc のアルコールを加え、更に 1.0 cc のエールリッヒ試薬と 5.0 cc のアルコールを追加して室温に 20 分間置く。その後各々 535 $\text{m}\mu$ の吸光度を Spectrophotometer で測定して標準曲線をつくる。但しアセチル・アセトン試薬というのはアセチル・アセトン 0.2cc に 0.5 N Na_2CO_3 10.0 cc を加えたものであり、エールリッヒ試薬というのは 0.8 g の p-Dimethyl-aminobenzaldehyde を 30 cc のアルコールと 30 cc の濃塩酸混合液に溶かしたものである。

一方 5 mg のムコイドに 8 N HCl 5.0 cc を加えて 4 時間煮沸して加水分解し、これを NaOH を入れたデシケーター中に試験管ごとに入れて真空ポンプで吸引して HCl を除き内容を乾燥させる¹⁶⁾。それに 10.0 cc のクロ、ホルム水を加えその 1.0 cc を採つて、標準曲線をつくる時に同時に同様の操作を行つて発色させ、吸光度を測定して標準曲線から試料の濃度を求めた。標準曲線は 1 回求めておけばよいようであるが、おそらくは加温時の状態によつてその値が多少変動するので、著者が数回行つた実験に於てはその度毎に標準曲線を新たに求めるようにした。

4) 硫酸基の測定

EDTA によるキレート滴定法を用いた¹⁷⁾。即ち過剰の一定量の BaCl_2 を試料に加えて硫酸基を沈澱させ、残つた Ba^{++} を EDTA で滴定する方法である。

試薬として次のものを用意する。

i 0.01 M EDTA 滴定液: EDTA 2 Na 塩 3.7 g を蒸留水に溶かし、 NaOH で pH を約 10 とし全量を 1 l とする。標準 CaCl_2 溶液で力価を定める。

ii ドータイト液状ユニバーサル BT(和光)

iii 0.01 M BaCl_2 液

操作: 60 mg のムコイドに 20.0 cc の 8 N HCl を加えて目盛附試験管中で 4 時間加水分解し、後水を加えて全量を 20 cc に補正する。その 2.0 cc をとり蒸留水 10 cc を加え更に NaOH を加えて中和する。これにユニバーサル BT を約 1 cc 加えて EDTA で滴定し、その値を Acc とする。次に加水分解した試料 2.0 cc を別にとり HCl 数滴を加えて煮沸した後、上記の 0.01 M BaCl_2 液を 10.0 cc 加えて更に暫時加熱し中和した後、前と同様に滴定し、その値を Bcc とする。更にこの 0.01 M BaCl_2 液 10.0 cc を EDTA で滴定した数値を Ccc とすると求める硫酸基の mg 数は次の計算によつて得られる。

$$(\text{A} + \text{C} - \text{B}) \times \text{滴定液の力価} \times 0.96$$

但しこゝに得られる値はムコイド 6 mg 中の硫酸基であるから、これに 100/6 を乗じたものが、

硫酸基のパーセントであり、それに更に³²/₉₆を乗じた値が硫酸基のSの含有パーセントである。

5) 紫外線吸収スペクトル及びチロシン、トリプトファンの定量

N/10 NaOH に0.1%の割にムコイドを溶かし、この液の紫外線吸収を10 mmのキュベットで、Spectrophotometer(日立)を用いて測定し、吸収スペクトルを得る。但しこの際の各波長の吸光度には真の吸収によるものゝ他にチンダルの散乱に由来するものも含まれているので、これを補正しなければならない。そのためには320~380 m μ の吸光度を利用する¹⁸⁾。即ちこの領域では蛋白質自身の吸収は先ずないと考えられるから、その部の吸光度は全て散乱に由来するものである。それでこの実測値を次の散乱の式に代入して連立方程式をつくり、この液のnとlog κ を求める。

$$\log E = \log \kappa - n \log \lambda$$

但しこゝに λ は波長、Eはその波長における散乱による吸光度、log κ 及びnはこの物質に特有の定数である。logは全て常用対数である。こうしてこの液のlog κ とnが知られるから、この数値によつて320 m μ 以下の散乱による吸光度を求めることが出来る。それ故これを差引いて実測の吸収スペクトルを補正し、真の吸収スペクトルを得る。

次にチロシンとトリプトファンの定量はMorton, Goodwinによつて次の如く行つた¹⁸⁾¹⁹⁾。

即ち上記のような方法で波長2800 Åと2944 Åの真の吸光度を求めこれを次式に代入してチロシン、トリプトファンの含量を算出するのである。

$$M^{\text{Tyr}} = (0.592 \kappa_{2944} - 0.293 \kappa_{2800}) \times 10^{-3}$$

$$M^{\text{Tryp}} = (0.263 \kappa_{2800} - 0.170 \kappa_{2944}) \times 10^{-3}$$

但しこゝにM^{Tyr}, M^{Tryp}はそれぞれ蛋白1g中のチロシン、トリプトファンのグラム分子量であり、 κ_{2800} , κ_{2944} はそれぞれ2800 Å, 2944 Åにおける真の吸光度である。

6) 電気泳動法

Tiselius法は日立のHT-B型を用い操作は全て電気泳動研究会の標準操作法によつた。緩衝

液はM/20 ヴェロナール(pH 8.6)である。

濾紙電気泳動は小林式を用い、濾紙はSchleicher & SchüllのNo. 2043 aで、緩衝液はpH 8.6のヴェロナール(イオン強度0.06)である。骨ムコイドの5%以上もの濃い懸濁液を塗布した。染色にはAmidoschwarz, Toluidine blue及び過ヨード酸フクシン反応を用いた。

Amidoschwarz染色: Amidoschwarz 10 Bを6.3%の割にメタノール酢酸(メタノール9, 氷酢1)に溶かす。泳動の終つた濾紙を100~110°Cの乾燥器で10分間乾燥し、これを上記の染色液に20分間浸す。これを1%の酢酸水で数回液を更えて洗い、濾紙の地が白くなるようにする。大体1晩位かゝる。とり出して風乾する。

過ヨード酸シッフ反応: Hotchikiss McManus法を²⁰⁾ modifyした。先ず泳動した濾紙を100°C, 20分乾燥、固定する。20%エタノールに5分つけ、液滴を充分落してからそのまゝ0.5%過ヨード酸水溶液に5分間浸す。とり出して充分水洗した後シッフ試薬(後記)に約30分浸す。とり出して液をぬぐい、そのまゝメタ亜硫酸カリ液(後記)に入れて5~10時間放置し、その間時々液をとりかえる。後とり出して風乾する。この際アンモニヤや塩素ガスの発生する部屋は避けねばならない。染色には平たいバットを用いシッフ試薬、亜硫酸液はガラスの蓋をする。濾紙の扱いには竹製のピンセットを用いた。シッフ試薬は次の如く調製した。即ち塩基性フクシン(メルク)1.5gを200 ccの水に充分溶かし(乳鉢を使うと便利)後メタ亜硫酸カリ1.5gを加えて溶かす。更に濃硫酸3 ccを加えてよく攪拌し、容器に蓋をして放置する。暫くするとフキシンの紅色が消褪するから、大体色が消えたらこれに0.5gの活性炭を混じて1分間よく攪拌して直ちに濾過する。濾液に更に濃塩酸2 ccを追加して褐色壘に密栓して保存する。新鮮な溶液は無色透明であるが、液が少々薄紅になるまで繰返し使用出来る。メタ亜硫酸カリ液は1gのメタ亜硫酸カリを200 ccの水に溶かし、これに1 N HCl 10 ccを加えたものである。以上の試薬は全て特級品を用いた。

Toluidine blue 染色: Toluidine blue 500mg を水 1 l に溶解したものをつくる。100°C 10 分乾燥した濾紙をこの液に 20 分浸し、後にこれを水洗する。

実験結果

1) 窒素含有量

骨ムコイド 100 mg を 2% の NaOH 20.0 cc に溶解しその 2.0 cc づつについてマイクロ・キーエルダール法を行つた。7 本の試料について行つた $N/_{50}$ NaOH ($F=1.008$) の適定値は 9.05, 8.98, 8.98, 8.96, 9.00, 8.97, 8.98 cc で盲験値は 10.98 cc であるから、平均値をとつて計算すると N 含量は 11.2% である。

2) アミノ糖含有量

Elson-Morgan 法によつて 5 回行つた実験の結果は 9.6, 9.3, 9.4, 9.3, 9.8% で平均 9.5% である。

3) 硫酸基含有量

実験方法の部に記載したそれぞれの滴定値として 3 回の実験で次のような数値が得られた。A は 0.27, 0.27, 0.27 cc B は 8.96, 8.94, 8.97 cc, C は 8.89, 8.90, 8.89 cc。それでこれの平均値をとれば $A=0.27$ cc $B=8.96$ cc $C=8.89$ cc これから計算すると硫酸基の S 含量は 1.11% となる。

4) 紫外線吸収スペクトル及びチロシン、トリプトファンの含有量

図 1 に示されている A の曲線は $N/_{10}$ NaOH 中の骨ムコイド 0.1% 溶液の実測値である。この中に含まれているチングルの散乱を実験法の部に記載した方法により補正して真の吸収スペクトルを求めたのが B 曲線である。

この吸収曲線において $280m\mu$ の吸光度は 0.226 で $294.4m\mu$ のそれは 0.257 である。これから前の実験方法の部に記した方法によつてチロシン、トリプトファンの含量を求めるとチロシンは 1.68%, トリプトファンは 0.31% となる。

5) 電気泳動

図 2 に示されているのは骨ムコイドの Tiselius

図 1 骨ムコイドの紫外線吸収像

図 2 骨ムコイドの Tiselius 電気泳動

電気泳動図である。屈折計で見ると 0.6% の液で 10 mA, 125 V で 15 分泳動したものである。左は上昇脚、右は下行脚である。こゝに見られるように上昇脚には 3 つの山が認められるが、その一つはかなり移動度が大きく他の 2 つはそれよりずっと遅れて 2 つの峯が連つている。下降脚ではこの 2 つの峯がはつきり分れていない。

図 3 及び 4 は濾紙電気泳動の結果である。

図 3 は 5 mA で 40 分泳動させたもので、左は Amidodschwarz 染色、中は過ヨード酸シッフ反応、右は Toluidine blue の染色である。右図に對と記してあるのは対照として用いた人血清である。図 3 で明かなことは普通蛋白質を染め出すの

図3 骨ムコイドの濾紙電気泳動図

に用いられている Amidoschwarz 染色で骨ムコイドは2つの分割を認める。一つは血清アルブミンより少し移動度の小さいもので、他はこの図ではなお原点に止つているものである。過ヨード酸シッフ反応では大体 Amidoschwarz 染色に見られると同一の分割をそれより薄く染め出している。しかるに Toluidine blue の染色では、前の2つの染色では全く染め出されていない一つの分割を認める。それは血清アルブミンよりかなり大きな移動度をもつもので、この分割は強いメタクロマジーを示して赤く染まっているのである。この他 Amidoschwarz で染つている分割も薄赤く染まっているが、殊に原点の部分は Amidoschwarz では非常に強く染つているにも拘らず Toluidine blue での染りは極めて弱い。

図4は15 mA で70分泳動した場合である。左は Amidoschwarz 染色、右は Toluidine blue 染色である。電流が大きいのので全体にスポットの移動が大きいが、図3で原点に止つていた分割が動き出している。しかもこの分割は Toluidine blue で殆んど染つていないことは非常に興味深い事実である。

図4 骨ムコイドの濾紙電気泳動図

考 按

以上の如き著者の分析値を Eastoe¹⁾ らが同じ牛の大腿骨のムコイドについて報告している値と比較するために両者を対比させたのが表1であ

表1 骨ムコイドの分析値

	著者の実験値 (%)	Eastoe らの 実験値(%)
N	11.2	11.3
硫酸基のS	1.11	1.36
アミノ糖	9.5	9.46
チロシン	1.68	1.98
トリプトファン	0.31	—

る。先ず窒素の含有量であるが、これは Eastoe らの 11.3% に対し著者の値は 11.2% であるから非常によく一致している。このような値はこのムコイドが蛋白質と多糖類の複合物であることから当然期待されるような値である。即ち蛋白質のみ

なら云う迄もなくNは16%位のものであり、又多糖類のコンドロイチン硫酸のみなら3%位のものである。

次に硫酸の含量は著者の値は Eastoe のそれより稍々小さいが、アミノ糖のそれは大体一致している。

チロシンは著者の紫外線吸収から求めた値が Eastoe らの化学的に得た値より稍々小さいまた Eastoe らが化学的には分析していないトリプトファンが紫外線吸収から見ると0.31%含まれている。ことにこのトリプトファンはコラーゲンには殆んど含まれていないものである点で上の事実には注目されていゝものと思われる。

なお骨ムコイドの紫外線吸収スペクトルは普通の単純蛋白質のそれと非常によく似ている¹⁸⁾¹⁹⁾。

骨ムコイドの電気泳動は未だ報告がないようであるが、軟骨のムコイドについては Partridge⁹⁾が1948年に Tiselius でしらべた結果を報告している。その結果によると牛の鼻の軟骨ムコイドは上昇脚に3つの山を示し、下降脚に2つの山を現している。そして彼はその移動度から見て上昇脚に見られる一番先のものはコンドロイチン硫酸であり、最後のものは蛋白で中間のものは蛋白とコンドロイチン硫酸の結合したものだと考えている。しかも軟骨からムコイドを抽出する時に100°C30分というような熱処理を行うとムコイドの抽出量は増加するにも拘らず蛋白とコンドロイチン硫酸の結合物と思われる山は消失してしまうと云う。

このような Partridge の結果と著者の実験結果とを比較するとその所見が甚だ似ていることに気付く。即ち Tiselius では著者の骨ムコイドでも上昇脚に3つの山が見られ、下降脚では2つの山しか認められない。また濾紙電気泳動では Tiselius の上昇脚に相当して3つのスポットを認めることが出来る。しかも Partridge は軟骨ムコイドで一番移動度の大きい部分をコンドロイチン硫酸であると云うが、著者の濾紙上の一歩前のスポットは Amidoschwarz では全く染色されないで Toluidine blue で強いメタクロマジーを呈するところから考えると骨ムコイドでも移動度の一番大き

い分割はコンドロイチン硫酸であると考えて間違いないだろう。

次に2番目のスポットは図4にはつきり示されているように Toluidine blue のメタクロマジーもかなり明かであると同時に Amidoschwarz にもよく染る。Partridge は軟骨ムコイドの Tiselius 電気泳動図で2番目の山をコンドロイチン硫酸と蛋白の結合したものと考えているが、骨のムコイドでもこの2番目の分割は上記のようなその染色性から考えてコンドロイチン硫酸のような酸性多糖類と蛋白質（おそらくは中性多糖類を含む糖蛋白質）の結合したものだだろうと思われる。最後のスポットは Amidoschwarz にはよく染るが Toluidine blue には殆んど染らないから、この分割は蛋白質（おそらくは中性多糖類を含む糖蛋白質）であろうと考えて矛盾はない。但しこの分割と前のコンドロイチン硫酸と結合しているものが全く同一のものであるかどうかは現在のところわからない。

かつて Hisamura は骨ムコイドからカオリンの共存下で酸性で沈澱する部分と可溶性の部分を繰返し分割して6.8gのムコイドから0.95gのコンドロイチン硫酸と1.8gの糖蛋白らしいものを分離した。著者は上記の如く電気泳動により骨ムコイドを3つの部分に分割することが出来たから、これにより今後各分割の一層詳細な研究が期待される。

総 括

1) 牛の大腿骨からムコイドを分離し分析した結果、その窒素及びアミノ糖の含量は Eastoe¹⁾らが報告しているものとよく一致しているが、硫酸基の含有量は稍々少いことが示された。

2) 骨ムコイドの紫外線吸収像をしらべ、これが普通の単純蛋白質のそれとよく似たものであることを認めた。また紫外線吸収からチロシンとトリプトファンの含有量を計算するとチロシンの含量は Eastoe らが化学的に求めたものより稍々小さいが、Eastoe らが化学的に分析していないトリプトファンが0.31%含まれていることを明かに

した。

3) Tiselius 及び濾紙電気泳動による研究からみて骨ムコイドも Partridge⁹⁾ が軟骨ムコイドで示したように3つの分割に分れること、そしてその一つはコンドロイチン硫酸、一つはおそらく中性多糖類を含む蛋白質、他の一つは前2者が結合したようなものであろうと推定された。

稿を終るに臨み終始御懇篤なる御指導御校閲を賜った恩師荒谷教授、並びに小林助教授に深甚なる謝意を表し、併せて本研究に種々の御援助、御協力を頂いた神長助手、佐々木助手、教室員各位に厚く御礼申し上げる次第である。

文 献

- 1) Eastoe, J. E., and Eastoe, B.: The organic constituents of mammalian compact bone, *Biochem. J.* 57: 453, 1954.
- 2) Eastoe, J. E.: The organic matrix of bone. In *The Biochemistry and physiology of bone*, ed. by Bourne, New York, 1956, Academic Press, p. 87, 102.
- 3) Hoppe-Seyler, Thierfelder: *Handbuch d. physiol.- u. pathol.- chemischen Analyse*, Berlin, 1953, 10. Aufl., Springer-Verlag, Bd. 5, p. 640.
- 4) Pincus, P.: A sulphated mucopolysaccharide in human dentin, *Nature* 166: 187, 1950.
- 5) Hess, W. C., and Lee, C.: The isolation of chondroitin sulfuric acid from dentin, *J. Dent. Res.* 31: 793, 1952.
- 6) Hisamura, H.: Carbohydrate in molecule of osseomucoid, *J. Biochem.* 28: 473, 1938.
- 7) Masamune, H., et al: Paper partition chromatograms of sugar components in glucidamins and glycoproteins, *Tohoku J. Exp. Med.* 53: 237, 1951.
- 8) Hisamura, H.: On the carbohydrate moiety of chondromucoid, *J. Biochem.* 28: 214,

1938.

- 9) Partridge, S. M.: The chemistry of connective tissues, I. The state of combination of chondroitin sulphate in cartilage, *Biochem. J.* 43: 387, 1948.
- 10) Dixon, T. F., and Perkins H. R.: The chemistry of calcification. In *The Biochemistry and physiology of bone*, ed. by Bourne, New York, 1956, Academic Press, p. 295.
- 11) 荒谷真平: 口腔生化学, 京都, 1954, 永末書店, p. 115.
- 12) Jackson, D. S.: Chondroitin sulphate as a factor in the stability of tendon. In *Nature and structure of collagen*, ed. by J. T. Randall, New York, 1953, Academic Press, p. 177.
- 13) Hawk, P. B., and Gies, W. J.: Chemical studies of osseomucoid with determination of the heat combustion of some connective tissue glycoproteids, *Am. J. Physiol.* 5: 387, 1901.
- 14) 志賀直他: 生化学実習, 東京, 1954, 南山堂, p. 189.
- 15) Elson, L. A. and Morgan, W. T. J.: A colorimetric method for the determination of glucosamine and chondrosamine, *Biochem. J.* 27: 1824, 1933.
- 16) Johnstone, J. P. et al.: A modification of the Elson and Morgan method for the estimation of glucosamine, *The Analyst* 76: 88, 1951.
- 17) 上野景平: キレート滴定法, 東京, 1956, 南江堂, p. 202.
- 18) Beaven, G. H., and Holiday, E. R.: Ultraviolet absorption spectra of proteins and amino acids. In *Advances in protein chem.* New York, 1952, Academic Press, Vol. VII, p. 319.
- 19) 荒谷真平: 蛋白質の紫外線吸収, 生物化学最近の進歩, 第2集, 東京, 1956, 技報堂, p. 36.
- 20) 市川收: 細胞化学, 東京, 1953, 本田書店, p. 17.