歯周組織の生化学的研究

歯周組織と他結合組織の蛋白質および糖質の定量による比較

道 ト キ 子

東京医科歯科大学保存学教室 (指導: 今川与曹教授)

東京医科歯科大学生化学教室 (指導: 荒谷真平教授)

(昭和 39 年 10 月 15 日受付)

Biochemical Study of Periodontal Tissues.

Comparison of the Periodontal Tissues with Other Connective Tissues in its Protein and Carbohydrate Component.

Tokiko Michi

Department of Periodontology, School of Dentistry, Tokyo Medical
and Dental University. (Director: Prof. Yoso Imagawa)

Department of Biochemistry, School of Dentistry, Tokyo Medical and Dental University.
(Director: Prof. Shimpei Araya)

I 緒 論

歯周疾患の成り立ちには全身的な諸条件がその背景をなしているであろうが¹⁾, 本質的には歯周組織と呼ばれる特異な機能を有する組織群に限局して現われる疾患である。しかも歯周組織の構造は歯牙が営なむ機能と密接な関係がある。すなわち, 膠原線維により連絡されているセメント質, 歯根膜, 歯槽骨は, 一体となつて歯牙を顎骨に固定し, また二つの硬組織間にある歯根膜は外力の緩衝体ともなっているが, これ等組織は, 歯牙の機能的要請に従つて, 鋭敏にその構造に変化を現わす²⁾。例えば, 対合歯を抜去したラットの歯根膜ではすでに 48 時間でシャーペー線維の減少と萎縮が見られるという³⁾。一方歯肉はその下部の組織を保護し, 外部からの細菌, 毒素の侵入を食止める役割を果している⁴⁾。それ故これらの諸組織はあくまでも相携えて歯牙の働きを支えているものであり, もし歯がなくなればたとえそれ等の組織の一部が残つていても歯周疾患そのものは消滅

することが多い。また実験的にもアロキサン糖尿病ラットの歯周組織の変化は対合歯を抜いた部位に一層著明に現われるという⁵⁾。これらのことはこの部の疾患とその現われ方がその組織の機能と密接に関係したものであることを思わせる。つまり歯周組織の構造あるいはその代謝は他の結合組織に比べて病理的にも生理的にもそれが営んでいる機能をはなはだ鋭敏に反映するものらしい。そういう意味で歯周組織の構造, 代謝が他の結合組織と比べてどのような特異性をもつかを明らかにすることは歯周疾患の成り立ちを考える大きな土台となるのではないかと思われる。

しかし, 元来, 歯周組織がどのような物質から構成されているかについての研究は必ずしも多くはない。歯肉ではふるく脂肪の定量⁶⁾が報告されているし, またグリコーゲンが測定され, それが炎症⁷⁾, 糖尿病⁸⁾にさいして減量するという。桂⁹⁾はラット歯肉の核酸を定量し, 歯肉の核酸含量は骨や口腔粘膜より多いが, 肝, 脾より少なく, 又年齢とともに減少するという。結合組織の基質の定量

については, Engel¹⁰⁾ が人歯肉で水溶性ムコ蛋白が炎症時に増量すると報告しているし, また Schultz-Hautdt¹¹⁾ は人歯肉のコラーゲンを測定し, 不溶性コラーゲンは炎症歯肉でやや減少しているが, 酸性コラーゲン量には変化がみられなかったという。もつとも第 41 回の I.A.D.R. の General Meeting で Constantinos¹²⁾ は正常および炎症時の歯肉から中性可溶性および酸性可溶性コラーゲンを抽出し, そのハイドロキシプロリン, 窒素, アミノ糖を定量したが, コラーゲン含量に大きな差が認められたと報告している。Aas¹³⁾ は diphenylhydantoin の内服により増殖した歯肉(ダイランチン歯肉増殖症)のコラーゲン量を測定し, コラーゲン量は組織の増殖の程度よりも増殖に伴う炎症の程度と相関関係があるといっている。また同時にアミノ糖とムコ多糖類についても検べているがアミノ糖は増殖症の方がわずかに多いようである。Schulzt-Hautdt¹⁴⁾ は人歯肉から中性糖と, ハイドロキシプロリンを約 2% 含む, 蛋白と糖の結合物を取り出し, これが歯肉コラーゲンの生成に関係するものであろうと述べている。さらにこの物質の組織化学的な染色性についても報告している¹⁵⁾。なお第 41 回の I.A.D.R. の General Meeting でこのほか歯肉に 1.41~1.67% の N-アセチルノイラミン酸があつたという報告¹⁶⁾, 歯肉のアミノ酸組成をみたという報告等がなされた¹⁷⁾。歯根膜では斉藤¹⁸⁾ が牛歯根膜の含水量, 蛋白質量を求めており, またこの組織からも再生コラーゲンの得られたことを報告している。さらにまた歯根膜から第 1 燐酸ソーダおよび, McIlvaine buffer でアルカリ性から酸性へと順次抽出を重ね溶出蛋白量はアルカリ側で多いがハイドロキシプロリンは酸性側で漸増するという¹⁹⁾。歯槽骨では, 清水等²⁰⁾ が牛歯槽骨と脛骨について比重, Ca, 燐酸, ハイドロキシプロリン, アミノ糖の比較を行なっている。

一方歯周組織の代謝についての研究は今までは歯肉についてのものが多く, 人およびラット歯肉の呼吸量^{21), 22)} や, 歯肉呼吸量におよぼすホルモン^{23), 24)}, 炎症²⁵⁾, 年齢, その他の因子²⁶⁾ の影響,

さらに呼吸にさいして酸化に利用される物質²²⁾, 脱水素酵素^{27), 28)}, チトクローム酸化酵素^{29), 30)}, チトクローム還元酵素, カタラーゼ³¹⁾, ヒスタミン³²⁾ 等の研究がみられる。歯根膜に関しては, 牛歯根膜について呼吸量を測定し, コハク酸添加で特異的に著しい増加がみられるという報告がある¹⁹⁾。歯槽骨については家兎で ⁴⁵Ca, ³²P の取り込みが脛骨より多いといわれている²⁰⁾。

以上の諸報告から推察されるように歯肉, 歯根膜, 歯槽骨には, それぞれ化学的な組成や代謝の様子にいくらかの特徴的な様相はうかがわれるが, まだまだこれら諸組織の生化学的な特異性を十分明確にはしていない。恐らくそういうものは一つや二つの分析や研究から得られるものではなく, 多数の基礎的なデータの上に築き上げられるものと思われるが, 著者もそのような研究の一つとして次のような実験を行なった。すなわち牛の歯肉および歯根膜から酸性, 中性, アルカリ性で抽出される蛋白質および糖質を分析定量し, これを同じく牛の皮膚ならびにアキレス腱から得られるものと比較していくつかの興味ある知見を得たのである。

II 実験材料および方法

1) 実験材料

牛のアキレス腱, 皮膚, 下顎前歯部歯肉, 同じく歯根膜を使用した。各組織とも採取後氷冷して小指頭大に切り, さらに厚さ 2~3 mm の薄片とした後, 冷アセトンで脱水脱脂し, 次いでエーテルによりさらに十分脱脂し風乾した。風乾後の組織はドライアイスと共に Wiely 氏粉碎機³³⁾ にかけて, 直径 1 mm~0.6 mm の粉末とした。但し歯根膜だけは量が少なかつたため, 風乾後ハサミで半米粒大に細かく切り, 粉碎機にはかけなかつた。

2) 抽出方法

このようにして得た乾燥組織を表 1 に示す方法で抽出した。

i) アキレス腱 50 g, 皮膚 20 g, 歯肉 40 g, 歯根膜 10 g の乾燥組織を各々 20 倍量の 5% トリク

表 1 抽出方法

腱	50g	$\left\{ \begin{array}{l} 1) \text{ 20倍量の 5\% TCA に} \\ \text{浸し 4}^\circ\text{C 一昼夜おく} \\ 2) \text{ 9000rpm, 4}^\circ\text{C で 10 分} \\ \text{間遠心} \\ 3) \text{ 2) で得た残渣について} \\ \text{1), 2) の操作を 2 回く} \\ \text{り返す。} \end{array} \right.$
歯 肉	40g	
皮 膚	20g	
歯根膜	10g	
上清		1) 50倍量の 5% TCA で
3回の抽出 操作で得ら れたものを すべて一緒 にする		2) 洗う。
		3) セロファン囊に入れ透
		析, 3 日間水道水
残渣		20倍量の pH 7.4 Tris- KCl buffer に浸し 4°C 一昼夜おいた後, 9000 r.p.m., 4°C で 10 分間 遠心
		3) で得た残渣について
		3) の操作を 2 回くり返す。
上清		1) 50倍量の pH 7.4 Tris- KCl buffer で洗う。
残渣		2) Tris を加えて pH 8.8 に調整する。
		3) 20 倍量の pH 8.8 の Tris-KCl buffer に浸し 4°C で一昼夜おいた後 9000 r.p.m., 4°C で 10 分間遠心
		4) 3) の残渣について 3) の操作を 2 回くり返す。
上清		
残渣 (すてる)		

各々水道水で 4°C 4 日間透析

ロール酢酸 (TCA と以下省略) に 4°C 1 昼夜浸した。それを 30 分振盪した後, 4°C, 9000 r.p.m. で 10 分間遠心機にかけ上清を分離した。沈渣には分離した上清と同量の 5% TCA を加えて, 1 昼夜おいた後, 前回と同様にして上清を分離した。さらに沈渣についてもう一度同じ操作を行ない, 合計 3 回, 3 日間の操作の後に得た上清を一緒にした。

ii) i) で得た残渣は ガラスフィルターに入れ, 50 倍量の 5% TCA で洗い流した後, セロファン囊に入れて水道水で 3 昼夜透析し, TCA を除いた。

iii) 透析後の組織に, pH 7.4 になるよう Tris-KCl buffer を加え, i) に述べたと同様の方法で抽出

操作を行なった。

iv) 次に iii) の沈渣に pH 8.8 になるよう Tris-KCl buffer を加え, 同じく i) で述べたと同様の方法で抽出操作を行なった。抽出操作後の上清は各々セロファン囊に入れ, 水道水で 4 日間透析した。透析後の水溶液は一部分分析に用い, 一部凍結乾燥した。

3) 定量法

各々の抽出液について, 次の定量を行なった。

i) 窒素含量は micro-Kjeldahl-Parnas 法により測定した。試料を酸化するさいには Cu^{H} を触媒として使用したからいくらか値が低く出ているだろうと思われる。

ii) ハイドロキシプロリン含量は Neuman-Logan 法の Miyoda, Tappel による変法³⁴⁾で測定した。測定のさいには試量と試薬をよく攪拌することと, 反応温度を一定にすることに注意した。

iii) アミノ糖は Elson-Morgan 法の Belcher et al. による変法で³⁵⁾, グルコサミン量として現わした。

iv) アミノ糖, ウロン酸などを除く一般の糖はアンスロン法により測定し, グルコース量として現わした³⁶⁾。

これ等はすべて透析後の水溶液のままで測定し, 別に一定量の水溶液を乾固し重量を定めて, 乾燥重量当りの含有量として計算した。また, 抽出を行なう前の乾燥組織を 105°C で 2 日間乾燥し, さらに 1 日デシケーター内においた後同様に, 窒素, ハイドロキシプロリン, アミノ糖を測定した。なお, ハイドロキシプロリン測定のさいの加水分解条件は, 6 NHCl により 105°C 16 時間で, アミノ糖では 4 NHCl により 105°C, 5 時間で行なった。加水分解物は脱水, 脱塩酸のため減圧で乾固し, その後蒸留水で容器内壁を洗い, さらに減圧乾固を 3 回繰り返したのものについて定量を行なった。

III 実験結果

1) 乾燥組織について

アセトン, エーテル処理で得た, 乾燥組織の窒

表 2 乾燥組織の窒素量, ハイドロキシプロリン, アミノ糖含量

組織名	乾燥組織 1 mg 中の重量 (単位 μg)		
	窒 素	ハイドロキシ プロリン	アミノ糖
腱	159.5 $\pm$ 1.1	123.2 $\pm$ 4.0	5.40 $\pm$ 0.23
皮膚	150.9 $\pm$ 1.1	101.5 $\pm$ 2.8	7.04 $\pm$ 0.44
歯肉	153.4 $\pm$ 0.9	79.9 $\pm$ 2.1	5.11 $\pm$ 0.81
歯根膜	140.1 $\pm$ 0.9	72.5 $\pm$ 1.2	7.25 $\pm$ 0.86

素含量, ハイドロキシプロリン含量, アミノ糖含量は, 表2の如くである。各々同一試料について4回の定量値より得た値であり, 乾燥組織1mg中の含量として単位 μg で表わしたものである。窒素量は腱の値が最も大きく, 歯肉, 皮膚, 歯根膜の順である。腱を100とした時の歯根膜の値はほぼ88で4者の開きは大きくない。ハイドロキシプロリン量も腱の値が最も大きく, 皮膚, 歯肉, 歯根膜の順である。腱を100とした時の歯根膜の値はほぼ60で各組織により含有量の相違はかなり大きい。アミノ糖量は皮膚が最も大きな値を示し, 歯根膜, 歯肉, 腱の順である。皮膚を100とした時の腱の値はほぼ70でやや組織間の開きがある。

2) 抽出物について

各抽出液により抽出された物質の重量は, 表3に示した。これは抽出液の一部を凍結乾燥して得た乾燥物重量から, 総抽出液を凍結乾燥した場合に得られる値を計算して求めた数値である。

各抽出物中の窒素量, ハイドロキシプロリン量は, 何れも各2回の実験の値を, 表4, 表5に示した。アミノ糖量, および中性糖量は, 図1に示されている。なお, ここに示されているTは腱, Hは皮膚, Gは歯肉, Pは歯根膜を現わす(以下の図においても同様)。

表 3 凍結乾燥により得た物質の重量 (単位 mg)

	5 % TCA	pH 7.4 Tris-KCl buffer	pH 8.8 Tris-KCl buffer	合 計
腱	567.0	1056.0	287.5	1910.5
皮膚	236.7	569.0	122.1	927.8
歯肉	479.0	910.0	281.7	1670.7
歯根膜	76.1	561.0	124.9	727.0

表 4 抽出物1mg中の窒素含量 (単位 μg)

	5 % TCA		pH 7.4 Tris-KCl buffer		pH 8.8 Tris-KCl buffer	
腱	11.32	11.58	10.15	10.47	5.35	6.01
皮膚	10.99	11.75	13.19	13.55	4.64	4.80
歯肉	10.26	10.74	11.45	11.65	6.35	6.75
歯根膜	4.13	4.63	15.74	16.94	9.78	10.20

表 5 抽出物1mg中のハイドロキシプロリン含量 (単位 μg)

	5 % TCA		pH 7.4 Tris-KCl buffer		pH 8.8 Tris-KCl buffer	
腱	8.30	8.50	2.71	2.43	0.66	0.60
皮膚	8.05	7.45	2.35	2.45	0.49	0.41
歯肉	7.05	7.65	1.55	1.85	0.58	0.52
歯根膜	0.61	0.65	1.49	1.93	0.76	0.70

図 1 抽出物中のアミノ糖および中性糖含量(重量パーセント)。Tは腱, Hは皮膚, Gは歯肉, Pは歯根膜を現わす(以下同様の略符号を使用)。□ 部分は中性糖, ■ 部分はアミノ糖を示す。

図 2 乾燥組織の蛋白質およびコラーゲン含量、棒グラフの高さは各組織の総蛋白含量を示し、その内の黒い部分はコラーゲン量を示す。

IV 考 察

1) 乾燥組織の組成について

図 2 は乾燥組織の蛋白質およびコラーゲンの重量%を組織別に現わしたものである。蛋白質量は表 2 の窒素からアミノ糖由来の窒素を差引き、蛋白質の窒素含量を 16 % として計算した。コラーゲン量はコラーゲンのヒドロキシプロリン含量を 13 % として計算した。蛋白の占める割合が非常に大きい点は各組織ともに共通である。が、蛋白以外の物質の割合をみると腱 0.4 %、皮膚 5.7 %、歯肉 4.1 %、歯根膜 12.5 % で、歯肉は皮膚とほぼ同じ位であるが、歯根膜は他に比べてかなり大きな値を示している。蛋白以外の物質がほとんど糖であるとすれば歯根膜は他の結合組織より糖成分が多いと推察される。コラーゲン含量は腱、皮膚が約 95 %、78 % であるのに対して、歯肉、歯根膜では約 62 %、56 % である。Schultz-

Haudt¹¹⁾ の人歯肉コラーゲンの測定でも乾燥重量に対し 30 % 前後であり、牛のような口内の刺激が多いと思われる草食動物でも約 60 % であつて、歯周組織のコラーゲン含量は腱、皮膚に比べてかなり少ない。逆にコラーゲン以外の蛋白の占める割合は、腱 4.8 %、皮膚 16.6 %、歯肉 34.3 %、歯根膜 31.7 % で歯周組織ではコラーゲン以外の蛋白質が約 3 分の 1 を占めている。恐らくこれらの蛋白は主として細胞成分、血清等に由来する蛋白ではないかと思われるが、そうだとするとこれらの組織は比較的線維成分に乏しく、細胞に富むものであることが示されているのかもしれない。

しかしここでは、ヒドロキシプロリンの含有量を 13 % としてコラーゲンを計算したが、Bowes et al.³⁷⁾ によれば、牛皮膚コラーゲンで 12.83 %、Eastoe³⁸⁾ による牛皮膚コラーゲンで 14.1 %、Tristram³⁹⁾ による牛皮膚コラーゲンで 14.0 %、Neuman, Logan⁴⁰⁾ による牛皮膚コラーゲンで 13.2、13.3 %、アキレス腱で 13.4 %、その他組織で 13.0~14.4 % であり、エラスチンにも約 2 % のヒドロキシプロリンが含まれるので、図 2 の値はあくまで概算値である。よつて歯周組織がヒドロキシプロリン含量の低いコラーゲンで作られているとすれば、ここで出したコラーゲン含量はもつと大きな値となる。魚類のコラーゲンにヒドロキシプロリン含量の低い例があるし⁴¹⁾、ラットで組織によりコラーゲンのヒドロキシリジン対リジンの割合が異なる等⁴²⁾、組織によりコラーゲンの組成がいくらか異なる例は知られている。また、コラーゲンフィブリルの直径が組織により異なるともいわれているので⁴³⁾、組織によりコラーゲン自体に差があることも考えられるし、さらにコラーゲンといわれるものが化学的組成の多少ずつ異なつた物質の混合物であるとも考えられるので⁴⁴⁾、各組織からコラーゲン全量を抽出して比較しなければ確実なことはいえない。しかし歯肉、歯根膜のコラーゲンが他の組織に比べて、その量が少ないか、歯肉、歯根膜のコラーゲンのヒドロキシプロリン含量が少ないかのどちらかであることは確かである。

アミノ糖測定の際には水解物に着色があつたので、authentic sample は検体の一部に溶かして発色させ、着色物その外の阻害物質による発色の阻害を補正したのではあるが、測定にかなりのばらつきが出た。表2に見られるように、各組織間の差異はあまり認められないが、歯根膜の値が皮膚の値と同じ位大きいのは蛋白以外の物質が、他組織より多いことと併せて注目すべきことであろうと思われる。

2) 抽出物について

図3は5% TCA, pH 7.4 Tris-KCl buffer, pH 8.8 Tris-KCl buffer

による抽出物重量の乾燥組織に対する割合を組織別に現わしたものである。歯根膜の溶出量は7%強で、他の組織の1.6~2倍も多く溶出している。しかも抽出液別にみると、すべての組織がpH 7.4

図3 乾燥組織に対する抽出物の重量パーセント

の Tris-KCl buffer で最もよく溶出しているが、皮膚、歯肉では pH 7.4 の Tris-KCl buffer での溶出量は 5% TCA の2倍前後であるが、歯根膜

図4 抽出物中の蛋白質およびコラーゲン含量

では7倍である。すなわち歯根膜では中性溶液での溶出が他に比べて著しく大きい。しかも材料として使用した乾燥組織の粒子が他の組織に比べてはるかに大きいにもかかわらず、このような結果となつたことは注目してよい事実と思われる。

図4は抽出物中の蛋白質およびコラーゲン含有量を示したものである。表4、表5の平均値から図2と同様にして求めたものである。5% TCA抽出物では腱、皮膚、歯肉が約70%の蛋白を含んでいる。しかもその内の80~90%がコラーゲンであるに反して歯根膜では蛋白質含量が約26%でそのうちコラーゲンは16%程度であり、共にはるかに少ない点が著しい差異である。これに対して、Tris-KCl buffer 抽出では歯根膜の蛋白質含量は他の組織よりは大きい。これは恐らく細胞成分ならびに血清蛋白に由来するものであろう。また Tris-KCl buffer 抽出ではどの組織でも蛋白中に占めるコラーゲンの割合は少ない。

図5はこの溶出した総コラーゲン量を乾燥組織のコラーゲンに対する割合として現わしたものであるが、これでは各組織とも、1.2~1.6%程度に抽出されているわけで、抽出の割合は大した差異がない。しかし歯根膜を除く組織では5% TCAでの溶出率が最も大きいのに反し、歯根膜ではpH 7.4の Tris-KCl buffer での溶出率が最も高い。つまり歯根膜は図3に見られたように他の組

図5 乾燥組織中のコラーゲンに対する総溶出コラーゲンの重量パーセント

図6 乾燥組織中のアミノ糖に対する総溶出アミノ糖の重量パーセント

織より酸性での溶出が少なく、中性、アルカリ性での溶出が一般に多いという傾向がここでも一層著しく認められるのである。

図1は抽出物中のアミノ糖および中性糖の含量を示したものである。中性糖、アミノ糖ともに含量の僅かなものが多いが、皮膚の5% TCA抽出物でのアミノ糖、および歯根膜の5% TCA抽出物での中性糖の重量%が他に比べて大きい。それ故、アミノ糖と糖との比はほとんどのものが0.7~1.8であるのに、5% TCA抽出物の皮膚では0.5であり歯根膜では4である。

図6は図5の如く、乾燥組織のアミノ糖に対する溶出アミノ糖の割合を示したものである。11~18%程度に抽出されており、各組織の間でそれほど大きな差ではないが、歯肉の溶出量がやや少ない。大体アミノ糖は中性で抽出されるものが多いが、皮膚では酸性での溶出量がかなり多く全体の $\frac{1}{3}$ 以上であり、中性、アルカリ性の溶出が他の組織に比べてやや少ない点が注目される。

ここでは酸性の抽出に5% TCAを使用したが生、5% TCA抽出物には、Gabriel⁴⁵⁾が尿から分離した fucomucoid や、Deutsch⁴⁶⁾が血清から

分離した fetuin, Konno⁴⁷⁾が筋コラーゲンから分離した glycine-carbohydrate, Dische⁴⁸⁾の硝子体からの neutral heteropolysaccharide, Banga⁴⁹⁾のアキレス腱からの mucoprotein を含む neutral heteropolysaccharide, Schultz-Haude⁵⁰⁾の皮膚、および歯周疾患患者の歯肉からのヒドロキシプロリンを含む heteropolysaccharide-protein complex 等、糖蛋白や多糖類がある。これらの糖類は中性糖、アミノ糖、シアル酸等で酸性の糖はあまり含まれない。著者の場合はさらに分離精製しないと結論的なことはいえないが、歯根膜以外の組織の5% TCA抽出物はヒドロキシプロリン含量が高いので、ほとんどがコラーゲンで糖蛋白は僅かである。これに対して歯根膜ではヒドロキシプロリン含量が低く、糖含量が他に比べて多いので、コラーゲンは僅かで糖蛋白がかなり存在する可能性が大きい。このような糖蛋白が組織の何を構成し、どんな働きを持つかということは、結合組織については未だよく解っていないが、amorphousな基質として存在しセメントの役割をなすとか⁴⁸⁾、線維と結合しその生合成に関与したり^{48) 50) 51)}、線維の化学的安定性を保つために存在

するのであろう⁴⁹⁾と考えられている。

pH 7.4 の Tris-KCl buffer 抽出物は恐らく血清や細胞の蛋白質が大部分で、その他に僅かの糖蛋白と中性溶コラーゲンとが混っているものと思われる。

pH 8.8 の Tris-KCl buffer 抽出物は、一般にその蛋白質含量がかなり低く、しかも中性糖、アミノ糖含量も少ない。それ故抽出された物質の中にはここで定量しなかつたような物質がかなり存在するのかもしれないし、あるいは定量した物質が実際より意外に少なく測定されたのかもしれない。ここに測定されなかつたものとしてまず考えられるのは、酸性の糖類であるが、これは普通コンドロイチン硫酸のようなものならその量はアミノ糖の約2倍と推定されるのでこれだけでは未だ不足を補うには量が少ない。脂肪の存在も考えられるが、試料調整のさいエーテル処理をしているから可能性は少ない。最後に核酸が考えられる。それ等の中にはリボース、デゾキシリボースのような中性糖もあるが、このアンスロン法では検体の620 m μ における吸光度をグルコース量に換算している。実はアンスロン陽性で620 m μ に最大吸収をもつものは、ヘクソース、6-デオキシヘクソースであり⁵²⁾、ヘクソースでも糖により発色率は非常に異なる⁵³⁾。しかもリボース、デゾキシリボースのようなペントースはアンスロン法では黄色に発色し、620 m μ における吸収は数パーセント程度である⁵²⁾。従つてここに中性糖と称しているものはヘクソース、6-デオキシヘクソースの形のものだけが主であつて、必ずしも真に全ての中性糖を示すものではないからこのような所に上記の矛盾を解く鍵があるのかもしれない*。

結局図1から図6にわたつて比較検討すると、歯肉は皮膚とは量的にいくらかの差異はみられるが本質的にはかなりよく似た組織であることがうかがえる。しかるに歯根膜は腱とは非常にその様子が違っているし、歯肉や皮膚とも異なつた独特のものであることを思わせる。すなわち、この組

織は他の3つの組織に比べて比較的蛋白量が少なく、コラーゲン量も少ない。しかるにこの組織から酸性、中性、アルカリ性で抽出される全物質量は最も多く、ことに中性で溶ける非コラーゲン性の蛋白がはなはだ多い。また酸性で抽出されるコラーゲンは意外に少ないが、アンスロン陽性の中性糖が非常に多く抽出されることも注目される事実である。

V 総 括

1) 牛のアキレス腱、皮膚、歯肉、歯根膜をアセトン、エーテルで処理し、その乾燥組織の窒素、ヒドロキシプロリン、アミノ糖を測定し、窒素から蛋白質量を、ヒドロキシプロリンからコラーゲン量を求めた。蛋白は各々乾燥組織に対し、腱では99.68 $\pm$ 0.69%，皮膚94.31 $\pm$ 0.69%，歯肉95.77 $\pm$ 0.56%，歯根膜87.51 $\pm$ 0.56%でありコラーゲンは腱94.74 $\pm$ 3.08%，皮膚78.05 $\pm$ 2.15%，歯肉61.44 $\pm$ 1.61%，歯根膜55.75 $\pm$ 0.92%であつた。アミノ糖は、腱0.54 $\pm$ 0.02%，皮膚0.70 $\pm$ 0.04%，歯肉0.51 $\pm$ 0.08%，歯根膜0.72 $\pm$ 0.08%であつた。

歯根膜は他の三つの組織に比べて比較的蛋白質量、コラーゲン量が少ないが、アミノ糖含量は皮膚と同じ位多かつた。

2) 1) この乾燥組織を5%トリクロール酢酸、pH 7.4 および pH 8.8 の Tris-KCl buffer で抽出し、その各々について窒素、ヒドロキシプロリン、アミノ糖、アンスロン陽性の中性糖を測定した。歯根膜は3組織中最も抽出量が多く、とりわけ中性で溶ける非コラーゲン性の蛋白がはなはだ多かつた。5%トリクロール酢酸抽出物では歯根膜以外の組織はヒドロキシプロリン含量が高く、ほとんどがコラーゲンであつた。しかし歯根膜ではヒドロキシプロリン含量も、蛋白質含量も比較的 low、それに対してアンスロン陽性の中性糖が非常に多かつた。

pH 7.4 の Tris-KCl buffer では各組織とも非コラーゲン性の蛋白が多く、中性糖、アミノ糖はそう多くなかつた。

(*注：トリプトファン等の反応阻害物質も知られている⁵⁴⁾⁵⁵⁾)。

さらに pH 8.8 Tris-KCl buffer での抽出物は各組織とも、蛋白質、ハイドロキシプリン、中性糖、アミノ糖の含量はいずれもあまり高くない。

3) 以上の結果にもとずき、歯周組織と他の結合組織の比較検討を試みると、歯肉は皮膚にかなり似たものであるが、歯根膜は腱にも皮膚にも似ない独特のものであると思われる。

稿を終るにさいし、終始御懇篤なる御指導、御鞭撻とさらに御校閲を賜った今川教授、荒谷教授に衷心より感謝いたします。なお御助言、御鞭撻を賜った、現在米国に留学されている斉藤先生、ならびに保存学教室、生化学教室の諸先生方に厚く御礼申し上げます。

本研究の一部は、昭和37年11月23日の International Association for Dental Research, Tenth General Meeting of Japanese Division で発表した。

文 献

- 1) Kerr, D. A. : Relations between periodontal disease and systemic disease, J. D. Res., 41 : 302, 1962.
- 2) 秋吉正豊 : 歯周組織の構造と病理. 東京, 昭 37, 医歯薬出版, 90 頁.
- 3) 佐伯誠 : ラットの大白歯の歯周組織における実験的廃用性萎縮の発生過程およびその修復過程について. 口病誌, 26 : 317, 1959.
- 4) Schultz-Haudt, S. D. and Lundquist, C. : The biochemistry of periodontal disease, Int. Dent. J., 12 : 180, 1962.
- 5) Komori, A. : Histological studies of the influence of occlusal function on the periodontal tissues of alloxan diabetic rats, Bull. Tokyo Med. Dent. Univ., 11 : 207, 1964.
- 6) Hodge, H. C. : Gingival tissue lipids, J. Biol. Chem., 101 : 55, 1933.
- 7) Berg, M., Lundquist, G. R., Schram, W. R. and Fordick, L. S. : The glycogen content of gingival tissue, J. D. Res., 26 : 291, 1947.
- 8) Cohen, B. and Fosdick, L. S. : Chemical studies in periodontal disease VI. The glycogen content of gingival tissue in alloxan diabetes, J. D. Res., 29 : 48, 1950.
- 9) 桂暢彦 : 口腔諸組織の核酸含量. 口病誌, 27 : 58, 1960, 27 : 162, 1960.
- 10) Engel, M. B. : Water-soluble mucoproteins of the gingiva, J. D. Res., 32 : 779, 1953.
- 11) Schultz-Haudt, S. D. and Aas, E. : Observation on the status of collagen in human gingiva, Arch. Oral. Biol., 2 : 131, 1960.
- 12) Constantinos, I. and Bhussry, B. R. : Chemical aspects of gingival inflammation, International Ass. for Dent. Res. 41 st General Meeting Program and Abstracts of Papers, p. 48.
- 13) Aas, E. : Hyperplasia gingivae diphenylhydantoinea, Acta Odont. Scan., 21 : 77, Suppl. 34, 1963.
- 14) Schultz-Haudt, S. D., Paus, S. and Assev, S. : Perriodic Acid-Schiff reactive components of human gingiva, J. D. Res., 40 : 141, 1961.
- 15) Schultz-Haudt, S. D., From, S. Hj. and Nordbø, H. : Histochemical staining properties of isolated polysaccharide components of human gingiva, Arch. Oral Biol., 9 : 17, 1964.
- 16) Thonard, J. C. and Blustein, R. : Sialic acid in human gingival tissue, International Ass. for Dent. Res. 41 st General Meeting Program and Abstracts of Papers, p. 47.
- 17) Manhold, J. H., Volpe, A. R. and DeCroce, R. : Amino acid composition of human gingival tissue as determined by paper chromatography, International Ass. for Dent. Res. 41 st General Meeting Program and Abstracts of Papers, p. 48.
- 18) Saito, S. : Biochemical investigation of the periodontal membrane, Bull. Tokyo Med. Dent. Univ., 7 : 385, 1960.
- 19) 斉藤滋 : 歯根膜の生化学的研究, 第2報, 口病誌, 27 : 291, 1961.
- 20) 清水正春, 斉藤滋, 荒谷真平 : 顎骨, 殊に歯槽部の生化学的研究. 歯基礎誌, 4, 21 : 1962.
- 21) Glickman, I., Turesky, S. and Hill, R. : Determination of oxygen consumption in normal and inflamed human gingiva using the Warburg manometric technic, J. D. Res., 28 : 83, 1949.
- 22) 木下四郎 : 歯肉の呼吸に関する研究. 口病誌, 26 : 99, 1959.
- 23) 佐々木哲, 増井康男, 木下四郎, 中井川明, 橘虎雄, 竹中房義 : ラット性周期と歯肉の代謝活性について. 口病誌, 25 : 138, 1958.
- 24) 増井康男, 木下四郎, 佐々木哲, 勝呂安, 梅沢さと : 去勢したラットに対する性ホルモンの歯肉代謝に及ぼす影響. 口病誌, 26 : 270, 1959.
- 25) Manhold, J. H. and Volpe, A. R. : Effect of inflammation in the absense of proliferation on the oxygen consumption of gingival tissue, J. D. Res., 42 : 103, 1963.
- 26) Volpe, A. R., Manhold, J. E. and Manhold, B. S. : Effect of age and other factors upon normal gingival tissue respiration, J. D. Res., 41 : 1060, 1962.
- 27) 増井康男 : 歯肉の脱水素酵素に関する研究. 口病誌, 25 : 142, 1958, 25 : 151, 1958.
- 28) 杉山正彦 : ヒト歯肉の脱水素酵素活性について. 口病誌, 27 : 335, 1960.
- 29) Eichel, B. : Oxidative metabolism of gingiva

- in the metabolism of oral tissues, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 85 : 479, 1960.
- 30) Person, P., Stahl, S. S. and Scapa, S. : Cytochemical and biochemical studies of aerobic oxidative metabolism of human gingiva, *J. D. Res.*, 40 : 304, 1961.
 - 31) Eichel, B. and Swanson, A. A. : Oxidative enzymes. 1. Succinic dehydrogenase, DPN cytochrome C reductase, cytochrome oxidase and catalase in oral, liver and brain cortex tissues, *J. D. Res.*, 36 : 581, 1957.
 - 32) 今川与曹 : 文部省歯槽膿漏症の研究班報告書, p. 65, 1956.
 - 33) 竹中房義 : 皮膚蛋白の研究. 口病誌, 25 : 363, 1958.
 - 34) Miyoda, D. S. and Tappel, A. L. : Colorimetric determination of hydroxyproline, *Anal. Chem.*, 28 : 909, 1956.
 - 35) Belcher, R., Nutten, A. J. and Sambrook, C. M. : The determination of glucosamine, *Analyst* 79 : 201, 1954.
 - 36) 化学の領域増刊号 34, 生化学領域に於ける光電比色法, 各論, 2, 東京, 南江堂, 1958, p. 36.
 - 37) Bowes, J. H., Elliott, R. G. and Moss, J. A. : The composition of collagen and acid-soluble collagen of bovine skin, *Biochem. J.*, 61 : 143, 1955.
 - 38) Eastoe, J. E. : The amino acid composition of mammalian collagen and gelatin, *Biochem. J.*, 61 : 589, 1955.
 - 39) Tristram, G. R. : In "The proteins" (H. Neurath & K. Bailey, eds.) New York, 1953, Academic Press, Vol. 1, Part A, p. 181.
 - 40) Neuman, R. E. and Logan, M. A. : The determination of hydroxyproline, *J. B. C.*, 184 : 299, 1950.
 - 41) Piez, K. A. and Gross, J. : The amino acid composition of some fish collagens: The relation between composition and structure, *J. Biol. Chem.*, 235 : 995, 1960.
 - 42) Piez, K. A. and Linkins, R. C. : The conversion of lysine to hydroxylysine and its relation to the biosynthesis of collagen in several tissues of the rat, *J. B. C.*, 229 : 101, 1957.
 - 43) Harkness, R. D. : Biological functions of collagen, *Biol. Rev. Cambridge Phil. Soc.*, 36 : 399, 1961.
 - 44) Jackson, D. S. and Bentley, J. P. : On the significance of the extractable collagens, *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, 7 : 37, 1960.
 - 45) Gabriel, O., Dain, J., Zinsser, H. H. and Dische, Z. : Fractionation of nondialyzable carbohydrate-protein complexes of the male urine, *Arch. Biochem. Biophys.*, 86 : 155, 1960.
 - 46) Deutsch, H. F. : Fetuin: The mucoprotein of fetal calf serum, *J. B. C.*, 208 : 669, 1954.
 - 47) Konno, K. and Altman, K. I. : Isolation of glycine-carbohydrate residue from muscle collagen, *Nature*, 181 : 995, 1958.
 - 48) Dische, Z., Danilzenko, A. and Zelmenis, G. : The neutral heteropolysaccharides in connective tissue, *Chemistry and Biology of Mucopolysaccharides*. London, Ciba Foundation, Churchill, 1958.
 - 49) Banga, I. and Balo, J. : Isolation of neutral heteropolysaccharide containing mucoprotein from bovine achilles tendon with the aid of collagenmucoproteinase, *Biochem. J.*, 74 : 388, 1960.
 - 50) Schultz-Haudt, S. D. and Eeg-larsen, N. : Heteropolysaccharide-protein complexes of animal skin, *Biochim. Biophys. Acta*, 46 : 311, 1961.
 - 51) Schultz-Haudt, S. D. and Eeg-larsen, N. : Isolation of radioactive hydroxyproline from an apparent heteropolysaccharide-protein complex of animal skin after the administration of ^{14}C -proline, *Biochim. Biophys. Acta*, 51 : 560, 1961.
 - 52) Dische, Z. : In "Methods in carbohydrate chemistry" (R. L. Whistler and M. L. Wolfrom, eds.) New York and London, 1962, Academic Press, p. 488.
 - 53) Dimler, R. J., Schaefer, W. C., Wise, C. S. and Rist, C. E. : Quantitative paper chromatography of D-glucose and its oligosaccharides, *Anal. Chem.*, 24 : 1411, 1952.
 - 54) Seifter, S., Dayton, S., Novic, B. and Muntwyler, E. : The estimation of glycogen with the anthrone reagent, *Arch. Biochem.*, 25 : 191, 1950.
 - 55) Shetler, M. R. : Use of anthrone reaction for determination of carbohydrates in the presence of serum protein, *Anal. Chem.*, 24 : 1844, 1952.