原

著

ローダミン-アルブミン複合体によるウサギ切歯象牙質の 蛍光ラベリングに関する研究

大 谷 啓 一 安 井 みちよ 小 椋 秀 亮

東京医科歯科大学歯学部歯科薬理学講座（主任：小椋秀亮教授）

（1993年9月28日 受付）

Fluorescent Labelling of Rhodamine-labelled Albumin in Rabbit Incisor Dentine

Keiichi Ohya, Michiyo Yasui and Hideaki Ogura

Department of Dental Pharmacology, Faculty of Dentistry, Tokyo Medical
and Dental University (Director : Prof. Hideaki Ogura)

Incorporation of rhodamine-labelled serum albumin (R-ALB) into the developing dentine was investigated by fluorescent microscopy. Male Japanese white rabbits were injected with R-ALB at a dose of 50 mg/kg and the undecalcified section of the incisor dentine was obtained 11 days after the injection. The orange-red fluorescent labelling of R-ALB was observed in the internal dentine. The labelling consisted of several periodic stripes and decreased its intensity toward the predentine-dentine junction. Serum concentration of R-ALB rapidly decreased after the injection and 10% of the initial value was present after 12 hours. The concentration gradually decreased thereafter. No relationship was observed between the fluorescent labelling pattern and the change in the concentration of serum R-ALB. These results suggest that R-ALB fluorescent labelling is related to the diurnal dentine formation by the odontoblasts in the rabbit incisor.

I. 緒 言

血漿中のタンパク成分が、骨や歯の基質成分として存在していることは、よく知られているが、その生理的意義は不明な点が多い。小椋は常時発育を続けるウサギの切歯に蛍光色素を標識した血漿タンパクが取り込まれる現象を初めて明らかにし、血漿タンパクが象牙質の石灰化機構になんらかの重要な役割を果たしている可能性を指摘した¹⁻³⁾。また、血漿タンパクは縞模様を呈して象牙質に沈着することから、その沈着は象牙質の概日

性縞模様の形成^{4,5)}と密接な関連を有している可能性を示唆した。さらに¹²⁵Iラベル血漿アルブミンのウサギ切歯象牙質への取り込みを観察したところ、¹²⁵Iラベル血漿アルブミンは象牙前質—象牙質境に沈着し、象牙質の形成とともに徐々に深部へと移行することが明らかにされた^{6,7)}。しかし、投与された血漿タンパクの血中における変動と、象牙質への沈着様式との関係ならびにその沈着様式の詳細については不明な点が多い。

そこで今回、血漿タンパクの硬組織形成機構における役割を解明する目的で、血漿蛋白の主要構

成分であるアルブミンがウサギ切歯象牙質へ取り込まれる様式について、蛍光標識アルブミンをトレーサーとして用いた検索を行った。

II. 材料および方法

蛍光色素標識アルブミンの作製は Fothergill の方法により行った⁸⁾。ウサギアルブミン (Sigma, USA) を用い、これにテトラエチル・ローダミン (Lissamine Rhodamine B 200, Imperial Chemical Industries, Ltd., England, 以下ローダミン) を結合させ、未結合のローダミンをゲル濾過 (Sephadex G-25, ファルマシア) により除去したのち、限外濾過 (ダイアフロー・メンブレン PM 10, アミコン) を行って濃縮し、さらに透析を行い、得られた標識タンパクを凍結乾燥し、これをローダミン-アルブミン複合体として用いた。得られたローダミン-アルブミン複合体は無標識のウサギアルブミンとともに、高速液体クロマトグラフィー (HPLC, 800 シリーズ, 日本分光) を用いたゲル濾過 (Superose 12 HR 10/30, ファルマシア) によりクロマトグラフィーを行い、蛍光強度 (励起光 550 nm, 蛍光 600 nm) あるいは 280 nm の吸収度を指標にローダミンとの結合程度を調べた。

実験には体重約 3 kg の雄性日本白色ウサギ 10 羽を用い、午前 6 時点灯、午後 8 時消灯の規則的な明暗サイクルのもとで飼育した。飼料は標準の固形食 (RC 4, オリエンタル) を与えた。実験開始日に、実験群のウサギに生理食塩液に溶解したローダミン-アルブミン複合体 50 mg/kg を静脈内注射した。対照群のウサギには、実験群に投与したローダミン-アルブミン複合体の溶液と同程度の蛍光強度を有するローダミン溶液を作製し、これを静脈内注射した。

血液中のローダミン-アルブミン複合体の経時的な濃度の変化を調べる目的で、ローダミン-アルブミン複合体投与後 1 分, 12, 24, 36, 48, 60, 72 時間にウサギの耳静脈より採血を行い血漿を分離した。得られた試料中のローダミン-アルブミン複合体の濃度を、HPLC を用いたゲル濾過クロ

マトグラフィーにより定量した。

ウサギは実験開始後 11 日目にクロロホルム麻酔下に放血、屠殺し、ただちに下顎骨を取り出してホルマリン、グルタルアルデヒド混合固定液にて浸漬固定した。固定終了後、下顎切歯を注意深く取り出し、未包埋のまま約 80~100 μm の横断未脱灰研磨切片を作製し、光学顕微鏡、蛍光顕微鏡 (Axiophoto, Carl Zeiss, Germany) による観察を行った。また、象牙質上にみられるローダミン-アルブミン複合体の蛍光ラベリング線の蛍光強度の変化を顕微蛍光測光装置 (MPV2, Leitz Wetzlar GmbH, Germany) を用いて計測した。

III. 結 果

作製したローダミン-アルブミン複合体と未標識のウサギアルブミンの HPLC によるクロマトグラフィーの比較を行った。280 nm における分光検出器の吸光度によるウサギアルブミンの溶出パターンと蛍光検出器によるローダミン-アルブミン複合体の溶出パターンはほぼ一致しており (図 1), ローダミンを標識したことによりクロマトグラフィーでのアルブミンの出現位置などに変化は認められなかった。

図 1 ローダミン-アルブミン複合体と未標識ウサギアルブミンの HPLC によるクロマトグラフィー
ローダミン-アルブミン複合体は蛍光強度 (fluorescent intensity, 励起光 580 nm, 蛍光 600 nm) を計測し、未標識アルブミンは分光検出器による 280 nm の吸光度 (UV ABS) を計測した

図2はローダミン-アルブミン複合体の静脈内注射後における血漿中の経時的な濃度変化を示している。血漿中のローダミン-アルブミン複合体の濃度は、投与直後より急速に減少し投与後12時間で約1/10となった。その後、ローダミン-アルブミン複合体の減少は緩慢となったが、投与後72時間においても血漿中に検出することが可能であった。また対照としてローダミン溶液のみを投与したウサギの血漿中の蛍光強度は投与後1分のみ認めることができたが、その後は計測することができなかった。

ウサギ下顎切歯の横断切片を用いてローダミン-アルブミン複合体の沈着の様相を観察したところ、投与されたローダミン-アルブミン複合体の橙赤色の蛍光ラベリングは、象牙質上の歯髄側約1/4の部位に強い蛍光を示した後、歯髄側方向に沿って蛍光強度を徐々に減少しながら沈着していた(図3, 4)。その蛍光ラベリングパターンは象牙質上に明帯と暗帯よりなる縞模様を示し、これが交互に明暗を繰り返しながら沈着する像が観察

図2 ローダミン-アルブミン複合体投与後のウサギの血中濃度の経時変化
●：ローダミン-アルブミン複合体を投与したウサギ，○：ローダミンのみを投与したウサギ

図3 ウサギ下顎切歯横断切片の光顕像(a)と同一切片の象牙質形成部位の蛍光顕微鏡による拡大像(b)
m：近心側，d：遠心側，E：エナメル質側，L：舌側

された(図4)。この縞模様状の蛍光ラベリングの沈着パターンは遠心、近心、舌側において明瞭に認められるが、エナメル質側においては他の部位と比較して不明瞭であった(図3)。またローダミン溶液のみを投与した対照群のウサギの象牙質上に蛍光ラベリングを認めることはできなかった。

象牙質上に観察された縞模様状の蛍光ラベリングの蛍光強度を、顕微蛍光測光装置により解析すると、ローダミン-アルブミン複合体は数個のピークを形成しながらその蛍光強度を減衰して行くことが明らかとなった(図5)。すなわちローダミン-アルブミン複合体の蛍光強度は、投与後すぐに上昇しピークに達した後、2回目のピークまではほぼ一定のレベルを維持するが、3回目の蛍光ピークで急速に低下し、約1/2程度に減少した後、蛍光強度の減少はゆるやかにテーリングを示すようになり、数個のピークを繰り返し示しながら減衰し

図4 ウサギ下顎切歯横断切片の蛍光顕微鏡像の強拡大像
写真上のラインに沿って蛍光強度の計測を行った。7条の蛍光による縞(黒丸)が観察できる。D：象牙質，P：歯髄

図5 図4の蛍光顕微鏡像にて計測した蛍光強度(fluorescent intensity)の変化

ていった。各ピークが形成された時間的關係を推察すると、2回目までのピークは投与直後1日に形成されたものであり、3回目が投与2日目、4

回目が投与3日目となり順次この関係でローダミン-アルブミン複合体は沈着するものと思われる。したがってローダミン-アルブミン複合体の象牙質上での蛍光ラベリングは、投与後の日数の経過とともに徐々に減弱し、さらにそのパターンに周期性を示すことが明らかとなった。

IV. 考 察

今回作成したローダミン-アルブミン複合体は、共有結合により蛍光色素がアルブミンに結合していると考えられ、その結合は強固であって変性や解離を受けにくいものと思われる。HPLCによるクロマトグラフィーにおいても、未標識のアルブミンのタンパク成分の吸光ピークとローダミン-アルブミン複合体による蛍光ピークはほぼ一致して出現した。このことは、ローダミンのアルブミンに対する特異的な結合と、アルブミンのクロマトグラフィー上での挙動などの性質がローダミンの結合により変化しないことを示していると考えられる。免疫電気泳動法を用いた検索により、ローダミン-アルブミン複合体の免疫特性等に関しても変化が起きないことが明らかにされている^{6,7)}。したがって蛍光標識を行ったローダミン-アルブミン複合体は、未標識のアルブミンと同じ性質を有しているものと考えられる。

ウサギの切歯象牙質にローダミン-血清タンパク複合体が取り込まれて橙赤色の蛍光ラベリングを示すことは、すでに小椋により詳細に報告されている¹⁻³⁾。それによると血清タンパク-ローダミン複合体は常時発育を続けるウサギの切歯象牙質に沈着して明瞭なラベリング線を形成した後、さらに数条の概日性縞模様状のラベリングパターンを呈しながら徐々にその蛍光強度を減弱してゆくとされている。今回観察したウサギ象牙質上のローダミン-アルブミン複合体による蛍光ラベリングパターンもほぼ同様の所見を示した。また、小椋はウサギにローダミン-血清タンパク複合体を投与した場合と、ローダミン-アルブミン複合体を投与した場合の象牙質の蛍光ラベリングパターンを比較すると、ほぼ同様の沈着パターンを示す

ことから、主にアルブミンが主体となって象牙質に取り込まれると推察している³⁾。しかし、その蛍光強度はローダミン-血清タンパク複合体を投与した場合のほうが比較的強いことから、他の血漿タンパク成分も象牙質に沈着する可能性を示唆している。生化学的あるいは免疫組織化学的に象牙質の有機成分中の血漿タンパクを分析した報告では、アルブミン以外にトランスフェリン、イムノグロブリンの存在や $\alpha 2\text{HS- glycoprotein}$ が高濃度に蓄積していることが認められている⁹⁻¹²⁾。したがって、アルブミン以外のタンパクが、ローダミン-血清タンパク複合体を投与した場合の蛍光強度の増加に関与していると考えられる。またローダミン溶液のみを投与したウサギでは蛍光ラベリング像がみられなかったことから、蛍光色素単独で象牙質に沈着したり、あるいは投与された蛍光色素が血液中でタンパク成分と結合して象牙質に沈着するようなことは起こらないと思われる。

ウサギ象牙質上に沈着したローダミン-アルブミン複合体のラベリングの蛍光強度を顕微蛍光測光装置により観察すると、投与後の日数経過に伴い数個の小さな蛍光ピークを示しながら減弱してゆき、投与後7～8日目ではほぼ蛍光は認められなくなった。ローダミン-アルブミン複合体がこのようなラベリングパターンを示すことから、投与したローダミン-アルブミン複合体の血液中における動態が象牙質上の変化に関連する可能性も考えられた。しかし、ローダミン-アルブミン複合体投与後の血中濃度を計測してみると、投与後72時間で投与直後の約1/20となったが(図2)、同じ時間における象牙質上のラベリング線の蛍光強度は最初のラベリング線の約1/4(図4)であり、血中濃度とラベリングの蛍光強度の変動は一致しなかった。また象牙質における蛍光強度の変化でみられるような小さなピークの出現は、血液中のローダミン-アルブミン複合体の減衰曲線には認められなかった。したがって、象牙質上の蛍光ラベリングの縞模様状の変化が、血液中のローダミン-アルブミン複合体の動態を反映したものであるとは考えにくい。

図3の光顕像において観察できるように、ウサギ切歯象牙質上には周期的な層線形成があることが知られている。岡田、三村は酢酸鉛注射による硬組織内時刻描記法を用いて、ウサギ切歯象牙質にみられる縞模様の形成が日周期性であり、hematoxylinにより淡染される層は昼間に、濃染される層は夜間に形成されることを初めて明らかにした^{4,5)}。今回観察されたローダミン-アルブミン複合体の蛍光ラベリングの縞模様はこの層線形成と関連するものと思われる。今回の実験で、ローダミン-アルブミン複合体による縞模様形成の経時的な変化を明らかにすることはできなかったが、酢酸鉛による時刻描記法を応用した予備的観察により、縞模様の明帯が夜間形成され、暗帯は昼間形成される結果を現在得ている¹³⁾。したがってローダミン-アルブミン複合体による蛍光ラベリングの縞模様形成は、象牙芽細胞の概日性の周期的な機能変化による象牙質の石灰化進行過程を間接的に反映しており、象牙質の石灰化の進行とアルブミンの沈着との間になんらかの密接な関係が存在していると考えることが妥当であろう。

アルブミンなどの血漿タンパク成分は骨や歯のnon-collagenous タンパクとして有機性基質に存在することが明らかにされている¹⁴⁾。これらタンパクは肝臓などの臓器により生成され、それが血液を介して石灰化の生じている部位に取り込まれるものと考えられている¹⁵⁾。また、その存在様式は無機質成分と結合して存在するとの報告¹⁶⁻¹⁸⁾と、有機性基質に親和性を有して存在するとの報告がある^{19,20)}。小椋はローダミン-血清タンパク複合体の沈着した象牙質をEDTAやformic acidで脱灰しても、その蛍光は消失しないが、ethylene-diamineによる処理、あるいはhyaluronidase処理により蛍光が消失することを示した³⁾。また、guanidineとEDTAを用いて有機性基質の抽出を行うと、アルブミンは無機質成分に親和性のある分画と、有機性基質の分画の両方に存在し、さらに不溶性コラーゲンと結合していた²¹⁾。したがってアルブミンは石灰化の進行とともに象牙質内に沈着し、無機質成分であるCaと結合して存

在するとともに、さらにかなりの部分が有機性基質の構成成分の一つとして、酸性ムコ多糖類やコラーゲンに親和性を有しながら存在している可能性が考えられる。

アルブミンの硬組織における生理的存在意義はなお不明であるが、アルブミンは血液中のCaの主要な結合タンパク²²⁾であることから、石灰化機構におけるCaの輸送担体としての機能が推察されている。また、Ca-P結晶のアパタイトへの変換をアルブミンが阻害^{23,24)}することから、石灰化の進行過程における調節因子として機能しているのではないかと考えられている。今回の実験結果においてローダミン-アルブミン複合体が縞模様を呈して象牙質に取り込まれる像が観察されたことから、概日リズム様式に従って象牙芽細胞の行っている周期性の象牙質形成、特に石灰化の進行とアルブミンはなんらかの密接な関係があるのではないかと考えられる。

V. 結 論

ウサギアルブミンに蛍光色素であるローダミンを結合させ、ローダミン-アルブミン複合体を作製し、ウサギに投与したところ、ローダミン-アルブミン複合体は象牙質に明瞭な橙赤色の蛍光ラベリング線を形成して沈着した。その蛍光ラベリング線は周期性の縞模様を呈し、歯髄側方向に向かって徐々に蛍光強度を減少してゆく像が観察された。以上の結果より、概日リズム様式に従って象牙芽細胞が行っている象牙質の石灰化の進行と、ローダミン-アルブミン複合体の沈着との間に密接な関連のあることが示唆された。

文 献

- Ogura, H., Okada, H., Miki, M. and Mimura, T.: Preliminary study of incorporation of fluorochrome-labeled homologous serum protein into the developing dentin matrix. *J. Dent. Res.* 49: 681, 1970.
- 小椋秀亮: Tetraethyl rhodamine-血清蛋白複合体の投与による象牙質基質の生体染色. *日本薬理学雑誌* 67: 178 P-179 P, 1971.
- 小椋秀亮: 歯の層線形成リズム-家兎切歯象牙質の日周期性縞模様の形成に関する実験的研究一. *Biological Mineralization Newsletter* 8: 28-33, 1972.
- Okada, M. und Mimura, T.: Zur Physiologie und Pharmacologie der hartgewebe. I. Mitteilung: Eine vitalfärbungsmethode mit bleisalzen und ihre anwendung bei der untersuchungen über die rhythmische streifenbildung der harten zahn-gewebe. *Journal of Medical Sciences IV. Pharmacology.* XI: 166*-170*, 1938.
- 岡田正弘, 三村 二: 鉛塩ニヨル骨及ビ歯牙組織新生石灰部位ノ生体染色法. *口病誌* 11: 366-367, 1937.
- Kinoshita, Y. and Ogura, H.: Study on incorporation of homologous serum albumin into the developing rabbit incisor. *Bull. Tolyo Med. Dent. Univ.* 26: 131-137, 1979.
- Kinoshita, Y.: Incorporation of serum albumin into the developing dentine and enamel matrix in the rabbit incisor. *Calcif. Tissue Int.* 29: 41-46, 1979.
- Fothergill, J.: Fluorochromes and their conjugation with proteins. *Narin, R. C., Fluorescent protein tracing, Edinburgh and London, 1969, Livingstone, 5-34.*
- Thomas, M. and Leaver, A. G.: Identification and estimation of plasma proteins in human dentine. *Archs. Oral Biol* 20: 217-218, 1975.
- Ashton, B. A., Holing, H. J. and Triffitt, J. T.: Plasma proteins in human cortical bone: Enrichment of the α 2HS-glycoprotein. *Calcif. Tissue Res.* 22: 27-33, 1976.
- Takagi, Y., Shimokawa, H., Suzuki, M., Nagai, H. and Sasaki, S.: Immunohistochemical localization of α 2HS glycoprotein in dentin. *Calcif Tissue Int.* 47: 40-45, 1990.
- Okamura, K.: Localization of serum albumin in dentin and enamel. *J. Dent. Res.* 62: 100-104, 1983.
- 安井みちよ, 大谷啓一, 小椋秀亮: 血漿アルブミンのウサギ象牙質への取り込に関する研究. *日本薬理学雑誌* 98: 23, 1991.
- Mbuyi, J. M., Dequeker, J., Bloemmen, F. and Stevens, E.: Plasma proteins in human cortical bone: Enrichment of α 2HS-glycoprotein, al acid-glycoprotein, and IgE. *Calcif. Tissue Int.* 34: 229-231, 1982.
- Triffitt, J. T., Gebauer, U., Ashton, B. A. and Owen, M.: Origin of plasma α 2HS-glycoprotein and its accumulation in bone. *Nature* 262: 226-227, 1976.
- Owen, M. and Triffitt, T.: Extravascular

- albumin in bone tissue. *J. Physiol.* 257 : 293-307, 1976.
- 17) Owen, M., Triffitt, T. and Melick, R. A. : Albumin in bone. in *Hardtissue growth, repair and remineralization*. Ciba Foundation Symposium 11 : 263-293, 1973.
- 18) Triffitt, J. T. and Owen, M. : Preliminary studies on the binding of plasma albumin to bone tissue. *Calcif. Tissue Res.* 23 : 303-305, 1977.
- 19) Termine, J. D., Belcourt, A. B., Conn, K. M. and Kleinman, H. K. : Mineral and collagen-binding proteins of fetal calf bone. *J. Biol. Chem.* 256 : 10403-10408, 1981.
- 20) Lipp, W. : Blood serum proteins and the mineralization of bone ground substances. *Histochemie* 9 : 339-353, 1967.
- 21) 大谷啓一, 澄川万紀, 小椋秀亮 : ミニポンプを用いたローダミン B-アルブミン複合体のウサギ象牙質への取り込に関する研究. *口病誌* 60 : 222, 1993.
- 22) Toffaletti, J. and Bowers, G. N. : The possible physiologic importance of calcium complexes : An opinion. *Clinica. Acta.* 97 : 101-105, 1979.
- 23) Blumenthal, N. C., Betts, F. and Posner, A. S. : Effects of carbonate and biological macromolecules on formation and properties of hydroxyapatite. *Calcif. Tissue Res.* 18 : 81-90, 1975.
- 24) Meyer, J. L. and Fleisch, H. : Determination of calcium phosphate inhibitor activity. *Mineral Electrolyte Metab.* 10 : 249-258, 1984.