ヒト歯肉における in vitro でのコラーゲン合成*

— ^{14}C -プロリンを用いた光顕的オートラジオグラフィ —

根 津 雄 一

新潟大学歯学部歯科保存学第二教室

(指導: 原 耕二教授)

(昭和53年5月9日受付)

Autoradiographic Study of Collagen Biosynthesis in Human Gingival Explants

by

Yuhichi Nezu

Department of Periodontology and Endodontics

Niigata University School of Dentistry

(Director: Prof. Kohji Hara)

Five gingival biopsy specimens were obtained from maxillary or mandibular anteriors of each patient with periodontal disease. The weighed specimens were incubated with Krebs-Ringer phosphate buffer containing different kinds of amino acids and $3\mu\text{Ci}$ of ^{14}C -labeled proline, for 0, 30 minutes, 1, 2 and 4 hours at 37°C in an atmosphere of O_2 . After the specimens incubated were immersed in 3 ml of 60 mM cold proline solution, they were fixed in 10% formalin immediately. The paraffin sections were made (5μ) and stained with hematoxylin-eosin. The autoradiographs were taken and collagen synthesis was assessed by counting the silver grains per unit area in the apex of sulcular epithelium and the center of lamina propria.

With an increase in the incubation time there was an increase in the counts of silver grain from sulcular epithelium, fibroblastic cells and collagen fibers. Possible explanation for the discrepancy in silver grain counts with time between fibroblastic cells and collagen fibers was discussed.

緒 論

歯周病の進行とともに、歯肉組織中には様々な程度に炎症性細胞が浸潤するようになり、同時に結合組織線維は質的乃至は量的に著しく変化する。やがて歯周ポケットが形成される。一般に、歯周病の発生ならびに進行に細菌が主要な役割をなすことは知られている。歯周病に関連して生ずる結合組織の変化の様相とかメカニズムをあきらかにすることは、極めて重要な問題である。

Hara ら¹⁾は、さきに歯周手術後に採取した歯肉滲出液中のヒドロキシプロリンを定量しており、それによる

と歯周手術後1ヵ月のヒドロキシプロリン量は術前と変わらず、術後6ヵ月のものよりは増加している。歯肉滲出液中のヒドロキシプロリンを含む物質の分子量は20万以下であるという Paunio の報告²⁾から、歯肉滲出液中には塩可溶性乃至は不溶性コラーゲンの分解産物の存在することが推定される。さらに本教室の原沢³⁾は、ヒト歯肉片を歯肉切除前、切除後1ヵ月及び6ヵ月の3回に亘り採取し、経時的に歯肉コラーゲンの変動を生化学的ならびに組織学的に追求した。その結果、切除後1ヵ月の歯肉はコラーゲン合成が活発におこなわれている段階で、コラーゲン成熟化に伴う組織の修復は未だ終了しておらず、切除後6ヵ月になると完了することを示

唆している。すでに原と高橋^{4,5)}らは ^3H -プロリンのヒドロキシル化を目安として、ヒト歯肉スライスにおけるコラーゲン合成のパターンおよびキレート剤による合成の抑制効果を観察している。

そこで本研究は、ヒト歯肉のコラーゲン生合成の局在性をより明確にするために、 ^{14}C -プロリンをトレーサーとして、*in vitro* で歯肉片を培養後、光顕のオートラジオグラフィー観察をおこなった。

研究材料と方法

新潟大学歯学部付属病院保存科外来に来院した歯周病患者5名（男性2名、女性3名）を被検者を選び、歯周手術にさきだち、各被検者の上顎または下顎前歯唇側5ヵ所から歯肉片を採取し研究材料とした。研究材料は肉眼的にみて出来る限り軽度な歯肉炎を有する歯肉片を使用することに心がけた。

採取した歯肉片は直ちに秤量後、湿重量で 13.75～64.58 mg の範囲にある歯肉片を 0.3 ml のインキュベーション緩衝液に浸漬し、1 分間酸素通気後密栓し、37°C 恒温槽中で1分間約 60 回の割合で振盪するインキュベーションをおこなった。インキュベーション緩衝液は表1に示すように、Radiochemical Centre 社製 L-[U- ^{14}C] プロリン 10 $\mu\text{Ci}/\text{ml}$ (最終放射能比活性 8.85 $\mu\text{Ci}/\mu\text{mol}$) と各種アミノ酸を含む Krebs-Ringer 磷酸緩衝液、pH 7.4 を使用した。

同一患者から採取した5コの歯肉片は、0, 30 分, 1, 2, 4 時間と時間別インキュベーションのための使い分けをした。所定の時間だけインキュベーション後、直ちに

氷水中で5分間冷却し、コラーゲンの合成を停止させた。さらに取り込まれずに歯肉片表面に付着したとみられる ^{14}C -L-プロリンを洗滌する目的で、10 倍濃度のプロリンを含む Krebs-Ringer 磷酸緩衝液中で1分間ずつ3回歯肉片を洗滌した。次いで 10% 中性ホルマリンで固定後、通法により 5 μ 厚さのパラフィン連続切片を作製し、H-E 重染色をおこなった。これら標本は乾燥後フジ原子核乾板 ET-2F を用い、ストリップ法により 4°C 暗箱中で2週間露光のオートラジオグラフィー標本作製した。時間別インキュベーションして作製したこれらオートラジオグラフィー標本の中から、それぞれ任意に5枚ずつを選んだ。 ^{14}C -L-プロリンの取り込みを観察する部位は、図1の枠内で示したように歯肉溝上皮の根尖側端近くと、その位置より口腔上皮側に延長した固有層のほぼ中央部の結合組織繊維芽細胞性細胞と結合組織繊維に決めた。観察部位を中心に一定の条件下で顕微鏡撮影し、最終的に 1,100 倍に引き伸ばした写真を作製した。図2に示すごとく、写真上で上述の観察部位につき直径 10 mm の円を5ヵ所とり、円中に含まれる銀粒子数を計測し、5ヵ所の合計値を以て部位別活性値とみなした。なお活性値の算定の際には必ずバックグラウンド計数を差引いている。この活性値は、写真上で

図1 歯肉オートラジオグラフィー標本における銀粒子数の測定部位

a : 歯肉溝上皮根尖側端, b : 固有層中央部

表1 インキュベーション緩衝液の組成

1. Krebs-Ringer phosphate buffer	pH 7.4
2. Glucose	0.02M
3. Penicillin G	0.1mg/ml
Streptomycin sulfate	0.1mg/ml
4. Amino acids : (in mM)	
L-Leu	0.76
L-Thr	0.84
L-Ileu	0.38
L-Arg	0.95
L-Val	0.85
L-Lys	1.10
L-Met	0.13
L-Tyr	0.22
L-Pro	1.00
5. ^{14}C -L-Proline *	10 $\mu\text{Ci}/\text{ml}$
^{14}C -L-Proline final specific activity	8.85 $\mu\text{Ci}/\mu\text{mol}$

* The Radiochemical Centre, Amersham, England

直径 10 mm の円は標本上で径が 9.1μ でその面積は $65.0 \mu^2$ となり、従って $65.0 \times 5 \mu^2$ の面積中の銀粒子数ということになる。

一方、2時間インキュベーション後作製した標本にコラゲナーゼ処理を施してから、前述の方法に従ってオートラジオグラフィー標本を作製した。コラゲナーゼは Washington 社製細菌性コラゲナーゼ・タイプ3を使用し、0.033 M 磷酸緩衝液中 pH 7.4 で 0.5% 溶液を作製し、これを標本に 48 時間作用させた。

結 果

1) 歯肉溝上皮細胞における ^{14}C -プロリンの取り込み

表2, 図3より, 細胞への ^{14}C -プロリンの取り込みはインキュベーション2時間までは直線的に増加し, 以後著明な増加は認められない。なお0時間インキュベーションにおける活性値は, ほとんど0を示した(図4, 5)。

2) 歯肉結合組織線維芽細胞性細胞における ^{14}C -プロリンの取り込み

表3, 図6に示すように線維芽細胞性細胞の ^{14}C -プロリン取り込み量は, 歯肉溝上皮細胞の値にくらべて30分, 1, 2, 4時間値のいずれも約半分ぐらいである。取り込みは2時間まで直線的に増加し, その後の増加がわずかであることは, 歯肉溝上皮細胞の場合と同じであった(図7)。

3) 結合組織線維における ^{14}C -プロリンの取り込み

表4, 図8に示すように, この取り込みは線維芽細胞性細胞への取り込みよりさらに少く, それの約 1/2 程度の活性を示しており, 4時間後までほぼ直線的に増加する(図7)。

4) コラゲナーゼ処理標本の ^{14}C -プロリンの取り込み

図9, 10はコラゲナーゼ処理を施したオートラジオグラフィー標本を示したもので, それによると歯肉溝上皮細胞内の銀粒子は, コラゲナーゼ未処理のものと同くらべ

表2 ^{14}C -プロリンの取り込み, 歯肉溝上皮細胞
インキュベーション時間

症例		0	30min	1h	2	4
I	Mean	3.4*	18.4	78.2	70.6	188.0
	S.E.	3.4	10.0	18.0	15.4	19.5
II	Mean	15.2	38.0	113.2	285.4	292.0
	S.E.	10.2	12.5	33.4	20.3	20.8
III	Mean	2.8	59.2		180.8	188.4
	S.E.	2.1	12.9		13.7	20.6
IV	Mean	3.2		39.8	145.0	154.2
	S.E.	2.3		8.7	17.8	25.3
V	Mean		6.2	9.6	53.0	
	S.E.		2.5	2.4	19.7	

* 銀粒子数

図3 歯肉溝上皮細胞における ^{14}C -プロリンの取り込み

表 3 ¹⁴C-プロリンの取り込み，線維芽細胞性細胞
インキュベーション時間

症例		0	30min	1h	2	4
I	Mean	0.4 *	7.6	16.0	18.8	52.4
	S.E.	0.4	5.0	3.7	5.7	5.0
II	Mean	0.2	1.2	17.4	64.0	58.6
	S.E.	0.2	1.2	6.8	17.3	14.7
III	Mean	3.0	10.8	23.8	39.2	54.8
	S.E.	2.1	7.1	10.0	6.1	14.8
IV	Mean	0.2	3.2	11.4	32.8	58.6
	S.E.	0.2	1.7	2.1	3.5	17.6
V	Mean	1.6	3.2	2.8	13.8	31.8
	S.E.	0.8	2.5	1.2	2.5	10.2

* 銀粒子数

表 4 ¹⁴C-プロリンの取り込み，結合組織線維
インキュベーション時間

症例		0	30min	1h	2	4
I	Mean	0*	0	8.2	8.0	25.8
	S.E.	0	0	4.9	3.1	4.4
II	Mean	0	0	3.6	23.0	22.4
	S.E.	0	0	3.6	8.1	10.6
III	Mean	0	4.2	6.8	17.6	25.4
	S.E.	0	4.2	4.0	3.8	11.8
IV	Mean	0.6	0.4	3.2	21.2	38.4
	S.E.	0.4	0.4	1.0	2.6	12.8
V	Mean	0.6	1.4	1.4	2.4	11.6
	S.E.	0.6	0.6	0.5	1.4	3.9

* 銀粒子数

図 6 結合組織の線維芽細胞性細胞における¹⁴C-プロリンの取り込み

て著明な変化はみられなかつた。一方，線維芽細胞性細胞には未だ銀粒子がみられたが，結合組織線維では銀粒子がほとんど消失している。

考 察

本研究は，ヒト歯肉におけるコラーゲンの生合成を¹⁴C-プロリンをトレーサーとして in vitro 組織培養を行い，オートラジオグラフィー標本を作製し，光顕的に検索した。部位別に¹⁴C-プロリンの取り込みの経時的変動を定量的にしらべる目安として，オートラジオグラ

フィー写真上に現れた歯肉溝上皮細胞，線維芽細胞性細胞，結合組織線維中の銀粒子数を測定し，時間別に比較検討した。

コラーゲンは，動物の結合組織を構成する蛋白質であり，動物の含有する全蛋白質中の約 1/3 を占める。そのアミノ酸組成は，全アミノ酸残基のうち約 1/3 がグリシン，約 1/4 がプロリン及びヒドロキシプロリンであることが知られている⁶⁾。そのうちヒドロキシプロリンは，ヒドロキシリジンとともにコラーゲンに特異的なアミノ酸であるとされており，コラーゲン中のアミノ酸の約 13.4%⁷⁾を占めるために，従来よりコラーゲン生合

成の研究はプロリンのヒドロキシル化を目安として行われている⁸⁾。放射性プロリンを動物に与えた場合、コラーゲン中にアイソトープは取り込まれるが、ヒドロキシプロリンを与えた場合、コラーゲンには取り込まれない⁶⁾。このことから、プロリンは細胞内に取り込まれたのち、ペプチド合成過程で水酸化を受けることによりヒドロキシプロリンとなり、コラーゲン分子に取り込まれる⁹⁾。このようにコラーゲン合成—成熟—破壊の過程でみられる一連の turnover の変動を測定するばかりでなく、コラーゲン生合成の局在性を知るために、放射性プロリンまたはグリシンを使用したオートラジオグラフィが用いられてきた^{10,11)}。

本研究で組織培養液として用いた Krebs-Ringer 磷酸緩衝液は、すでに高橋ら⁵⁾が培養液として使用しており、³H-プロリンをトレーサーとして生化学的にヒト歯肉スライスのコラーゲン生合成を研究した。その結果、中性塩可溶性分画のプロリンのヒドロキシル化は2～3時間で進行が止まり、一方中性塩不溶性分画では、より長い時間ヒドロキシル化が進行すると報告されている。同様に Krebs-saline serum substrate を用いて、成長白ネズミの minced skin のコラーゲン生合成をしらべた Tsurufuji¹²⁾ らの研究は、塩可溶性コラーゲンが8時間ほとんど一定の割合で形成されることをみている。また Schneir¹³⁾ ともラットの口蓋粘膜を使用して5時間の in vitro の培養を行つた結果、コラーゲン生合成には年齢依存性があり、成長期のラットがより高いコラーゲン

合成率をもつことを報告している。

本研究は、¹⁴C-プロリンを使用した in vitro の実験であり、in vivo 実験ほど放射性物質を投与後長時間観察するわけにはゆかず、これら先人の報告を参考にしてインキュベーション時間を最高4時間までとした。その4時間までの線維芽細胞性細胞及び結合組織線維に取り込まれる放射性ラベルは、Ross^{10,14,15)} らの in vivo 実験結果とほぼ似た傾向を示した。

本研究は、放射能活性の測定法として、倍率1,100倍の写真上で線維芽細胞と推定できるものについて核を含めて、直径10mmの円を描き、その中に含まれる銀粒子数を計測した。しかも5カ所の円は、お互いになるべく離れた位置にあるものを選び、結合組織線維についても同様に線維芽細胞と対比させて、なるべく離れた部位を選んだ。次に0時間インキュベーションを行い銀粒子をしらべたが、組織中には有意な銀粒子数はみられなかったこと、また各標本ともバックグラウンド計数が少なかったことは、インキュベーション後におこなった組織表面に付着した¹⁴C-プロリンの洗滌が十分であったこと、従ってインキュベーション後にみられる銀粒子は、コラーゲン中への¹⁴C-プロリンの取り込みに基づくこと及びオートラジオグラフィ作製のための露出時間が適当であったことを示している。

コラーゲンは、線維芽細胞によって産生されることは周知の事実である。Ross^{10,14,15)} らは、モルモットの創傷における線維芽細胞のコラーゲンの合成過程を、電顕

図8 結合組織線維における¹⁴C-プロリンの取り込み

的オートラジオグラフィーで観察している。それらによると、モルモットの腹腔に注射投与された ^3H -プロリンは、最初、線維芽細胞質中の粗面小胞体（rER）に取り込まれる。銀粒子は時間の経過とともに減少し、やがてゴルジ装置への取り込みが増加してくる。さらに1時間から4時間ぐらい経過すると、細胞質周辺とか細胞外コラーゲン原線維に、銀粒子の増加がみられるようになり、代わりに細胞内の銀粒子数が減少する。本研究での線維芽細胞に関する放射能活性の時間的変動をみると、30分より2時間まで増加する。その後2時間より4時間までの増加の割合は非常に減少する。一方、結合組織線維では線維芽細胞の取り込み開始より30分の遅れがみられるが、4時間までその活性は直線的に増加する。即ち、線維芽細胞内の銀粒子の減少分だけ、結合組織線維に取り込まれることを示唆している。このことはRoss^{14,15)}らのいう細胞内で合成されたコラーゲンの、細胞外に分泌される過程が、歯肉コラーゲンにも存在することをin vitro 実験で証明したことになる。生化学的に歯肉コラーゲンの塩可溶性分画における放射能比活性は、腱、皮膚、スポンジ肉芽組織のコラーゲンよりも高く、塩不溶性分画コラーゲンは、スポンジ肉芽組織を除いて、他の組織よりも比活性は高い⁸⁾。この形成まもないトロポコラーゲンは、分子内及び分子間の架橋結合によって次第に成熟する。一般に歯肉は皮膚や腱など他の組織に比べて、塩可溶性分画から不溶性分画への移行がより活発である¹⁶⁾といわれる。一方、原沢³⁾がおこなった切除後のヒト新生歯肉コラーゲンの研究によると、切除後1ヵ月目の歯肉は切除前にくらべて塩不溶性コラーゲン量ははるかに少く、この時期ではコラーゲンの成熟化が未だ終了しておらないことを示している。

本研究では、特異的に歯肉溝上皮細胞に ^{14}C -プロリンの高い取り込みがみられた。上皮細胞にコラーゲン合成能があるとの報告があり¹⁷⁻²⁰⁾、とするとこの高い取り込みは歯肉溝上皮細胞が、コラーゲン性蛋白乃至はプロリンを含む非コラーゲン性蛋白の両者を産生分泌しているものと思われる。歯肉溝上皮細胞がプロリンを含む非コラーゲン性蛋白を産生していたのは、コラゲナーゼ処理をした標本を観察した場合、上皮細胞内の銀粒子は消失せず、はっきり存在するからである。また、できるだけ純粋なコラゲナーゼで処理を行ったあと²¹⁻²³⁾、線維芽細胞や結合組織線維に取り込まれた銀粒子の存在をしらべた。結果は線維部分のラベルはほとんど消失したが、線維芽細胞には銀粒子が未だ残っていた。Carneiro²⁴⁾らは骨芽細胞、象牙芽細胞、歯根膜線維芽細胞に取り込

まれた ^3H -プロリンのラベルは、コラゲナーゼ処理で約半分は消失するが、残り半分の銀粒子は存在することからコラーゲン以外の蛋白も存在すると報告している。このようにコラーゲン蛋白はコラゲナーゼ処理によって消失することからみて、本研究におけるコラゲナーゼ処理後に存在する銀粒子は、非コラーゲン性蛋白の存在を示すものと考えたい。

総括ならびに結論

本研究は、 ^{14}C -プロリンをトレーサーとしたときの、歯肉への取り込みの部位別経時的変動を、光顕的オートラジオグラフィーで検索した。研究材料は、本学付属病院保存科外来に来院した歯周病患者5名を対象として、上・下顎いずれか前歯部を歯周手術する際、長さ5 mm×2 mm 巾ぐらゐの歯肉片を5検体同時に採取し、直ちに秤量後、L-[U- ^{14}C]プロリンを10 $\mu\text{Ci/ml}$ と各種アミノ酸を含む Krebs-Ringer 燐酸緩衝液(pH 7.4)で浸漬し、0, 30分, 1, 2, 4時間と時間別に振盪インキュベーションをおこなった。固定後、通法に従い5 μm のパラフィン連続切片を作製、H-E 重染色をおこなったあと、ストリップ法による2週間露光のオートラジオグラフィー標本を作製した。測定部位は歯肉溝上皮の根尖側端部と、その位置と平行した固有層中央部の結合組織線維芽細胞性細胞ならびに結合組織線維と定め、顕微鏡写真上で単位面積当りの銀粒子数を算定し、部位別活性値とみなした。

その結果

1) 歯肉溝上皮細胞における ^{14}C -プロリンの取り込みは、2時間までほぼ直線的に増加する。さらに4時間まで増加するが、その傾向は2時間までのものよりはるかに弱くなる。

2) 線維芽細胞性細胞における ^{14}C -プロリンの取り込みは、歯肉溝上皮にくらべて少い。取り込みは2時間まで直線的に増加する。さらに4時間まで増加するが、その傾向は2時間までのものより弱い。

3) 結合組織線維における ^{14}C -プロリンの取り込みは、線維芽細胞性細胞よりも少く、4時間後までほぼ直線的に増加する。以上2), 3)を合せ考えてみると、銀粒子は線維芽細胞性細胞内の減少分だけ、結合組織線維に取り込まれることが推定される。

4) コラゲナーゼ処理を施したオートラジオグラフィー標本から、歯肉溝上皮細胞ならびに線維芽細胞性細胞には未だ銀粒子がみられたが、結合組織線維では銀粒子

がほとんど消失している。このようにコラゲナーゼ処理後に存在する銀粒子は、プロリンを含む非コラーゲン性蛋白の存在を示すものと思われる。

謝 辞

稿を終るにあたり、終始御懇篤なる御指導と御校閲を賜りました原 耕二教授に心から感謝申し上げます。また本研究の遂行に際し懇切丁寧な御教示ならびに御助言を賜りました新潟大学放射性同位元素中央研究室室長清水泰二教授、本学口腔生化学教室野原広美教授ならびに高橋徳也助教授、口腔解剖学第一教室小沢英浩教授に謹んで感謝の意を表します。さらに放射性同位元素の面から御助力いただきました本学放射線取扱主任者水野 敏助手に厚く御礼申し上げます。最後に本研究に御援助および御協力いただきました本学歯科保存学第二教室員一同に深謝いたします。

本研究の一部は 1977 年（昭和 52 年度）文部省科学研究費一般研究 C 課題番号 257474 の補助で行われたことを付記する。

* 本論文の要旨は昭和 52 年 5 月第 20 回春季日本歯周病学会ならびに昭和 52 年 12 月第 25 回 IADR 日本部会総会において発表した

文 献

- 1) Hara, K. and Takahashi, T. : Hydroxyproline content in gingival exudate before and after periodontal surgery. *J. Periodont. Res.*, 10 : 270-274, 1975.
- 2) Paunio, K. : On the hydroxyproline-containing components in the gingival exudate. *J. Periodont. Res.*, 6 : 115-117, 1971.
- 3) 原沢正昭 : 歯肉切除後における新生ヒト歯肉コラーゲンの形態学的及び生化学的分析. *日歯周誌*, 19 : 205-219, 1977.
- 4) 原 耕二, 小林幸男, 高橋徳也, 野原広美 : 歯周疾患とその病態について I. 歯肉コラーゲンの代謝. *新潟歯学会誌*, 1 : 22-30, 1971.
- 5) 高橋徳也, 野原広美, 原 耕二, 小林幸男 : ヒト歯肉スライスにおけるコラーゲン生合成 I. プロリンのヒドロキシ化. *新潟歯学会誌*, 2 : 18-26, 1972.
- 6) 野田春彦, 永井 裕, 藤本大三郎 編 : コラー

ゲン 化学, 生物学, 医学 一, 南江堂, 東京・京都, 1975.

- 7) Schultz-Hautd, S.D. and Aas, E. : Observations on the status of collagen in human gingiva. *Arch. Oral Biol.*, 2 : 131-142, 1960.
- 8) Page, R.C. : Macromolecular interactions in the connective tissues of the periodontium. *Developmental Aspects of Oral Biology*, Slavkin, H.C. and Bavetta, L.A. (eds), Academic Press, New York and London, 1972, p. 291-308.
- 9) Udenfriend, S. : Formation of hydroxyproline in collagen. *Science*, 152 : 1335-1340, 1966.
- 10) Ross, R. and Benditt, E.P. : Wound healing and collagen formation. *J. Cell Biol.*, 15 : 99-108, 1962.
- 11) Carneiro, J. : Synthesis and turnover of collagen in periodontal tissues. Use of radioautography in investigating protein synthesis, Leblond, C.P. and Warren, K.B. (eds), Academic Press, New York and London, 1965, p. 247-257.
- 12) Tsurufuji, S. and Ogata, Y. : Biosynthesis of collagen in skin minces in relation to the mechanism of the formation of insoluble collagen. *Biochim. Biophys. Acta*, 104 : 193-199, 1965.
- 13) Schneir, M., Furuto, D. and Berger, K. : Collagens of oral soft tissues. *J. Periodont. Res.*, 11 : 235-241, 1976.
- 14) Ross, R. : Studies of collagen formation in healing wounds. *Advances in biology of skin*. Vol. 5, Montagna, W. and Billingham, R.E. (eds), Pergamon Press, London and New York, 1964, p. 144-164.
- 15) Ross, R. and Benditt, E.P. : Wound healing and collagen formation. *J. Cell Biol.*, 27 : 83-106, 1965.
- 16) Page, R.C. and Ammons, W.F. : Collagen turnover in the gingiva and other mature connective tissues of the marmoset. *Arch. Oral Biol.*, 19 : 651-657, 1974.
- 17) Hay, E.D. and Revel, J.P. : Autoradiographic studies of the origin of the basement lamella

- in ambystoma. *Develop. Biol.*, 7 : 152-168, 1963.
- 18) Green, H. and Goldberg, B. : Synthesis of collagen by mammalian cell lines of fibroblastic and nonfibroblastic origin. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 53 : 1360-1365, 1965.
 - 19) Cohen, A.M. and Hay, E.D. : Secretion of collagen by embryonic neuroepithelium at the time of spinal cord-somite interaction. *Develop. Biol.*, 26 : 578-605, 1971.
 - 20) Hay, E.D. and Dodson, J.W. : Secretion of collagen by corneal epithelium. *J. Cell Biol.*, 57 : 190-213, 1973.
 - 21) Mandl, I., MacLennan, J.D. and Howes, E.L. : Isolation and characterization of pro-
 - teinase and collagenase from C1. histolyticum. *J. Clin. Invest.*, 32 : 1323-1329, 1953.
 - 22) Nagai, Y. : Collagenase digestion of collagen. *J. Biochem.*, 50 : 486-492, 1961.
 - 23) Seifter, S. and Harper, E. : The collagenase. *The Enzymes*, 3rd edit., Boyer, P.D. (ed), Academic Press, New York and London, 1971, p. 649-697.
 - 24) Carneiro, J. and Leblond, C.P. : Suitability of collagenase treatment for the radioautographic identification of newly synthesized collagen labeled with ^3H -glycine or ^3H -proline. *J. Histochem. Cytochem.*, 14 : 334-344, 1966.

図 2 測定部位の拡大

A : 歯肉溝上皮細胞, B-a : 結合組織の線維芽細胞性細胞,
B-b : 結合組織線維, 倍率 $\times 1,100$

図 4 0時間インキュベーション後のオート
ラジオグラフィー写真, 倍率 $\times 42$

図 5 歯肉溝上皮のオートラジオグラフィー写真

A：0時間インキュベーション，銀粒子はほとんどみられない。B：1時間インキュベーション，わずかではあるが銀粒子がみられる。C：2時間インキュベーション，かなりの銀粒子がみられる。D：4時間インキュベーション，著明な銀粒子数の増加がみられる，倍率 $\times 2,100$

図 7 結合組織の線維芽細胞性細胞ならびに結合組織線維の
オートラジオグラフィー写真

A : 0 時間インキュベーション, まったく銀粒子はみられない。B : 1 時間
インキュベーション, 線維芽細胞性細胞にはわずかに銀粒子がみられるが, 結
合組織線維にはほとんど銀粒子がみられない。C : 2 時間インキュベーショ
ン, 線維芽細胞性細胞ならびに結合組織線維には, あきらかに銀粒子がみられ
る。D : 4 時間インキュベーション, C より銀粒子数の増加がみられる,
倍率 $\times 2,100$

図 9 コラゲナーゼ処理歯肉溝上皮オートラジオグラフィー写真
A：コラゲナーゼ未処理。B：コラゲナーゼ処理後，銀粒子は未だ存在する。倍率 $\times 2,100$

図 10 コラゲナーゼ処理歯肉結合組織オートラジオグラフィー写真
A：コラゲナーゼ未処理。B：コラゲナーゼ処理後，線維芽細胞性細胞の一部には銀粒子がみられるが，結合組織線維には銀粒子がまったく存在しない，倍率 $\times 2,100$