



| | |
|--------------|---|
| Title | 歯周組織の酸性ムコ多糖体に関する研究 |
| Author(s) | 宗本, 健一 |
| Citation | 大阪大学, 1969, 博士論文 |
| Version Type | VoR |
| URL | https://hdl.handle.net/11094/29895 |
| rights | |
| Note | |

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

歯周組織の酸性ムコ多糖体に関する研究

宗 本 健 一

A Study on Acid Mucopolysaccharides in Periodontal Tissues

Kenichi MUNEMOTO

(昭和43年3月30日受付)

序 言

結合組織は基本的には、線維、細胞、基質の3成分により構成され、存在する臓器により特異的な構成様相を呈している。酸性ムコ多糖体 (AMPS) はその中の基質の1成分で、比較的研究の進んでいる成分である。その構造、分布などに関する知見は、Meyer 一門の業績によるところが大きく、現在8種類のAMPSが知られている^{1,2)}。また、その生合成、代謝などに関する研究はDorfmanらにより発展し、内分泌、糖尿病との関係、年齢変化、炎症、創傷治癒、線維化などにおける病態生理学的意義が追求されてきた³⁾。

一般に、結合組織は体細胞と血流との間にあって、単に支持組織としてのみならず、栄養補給、老廃物廃棄などの物質流通の場として働くため、その物質透過性により体細胞の代謝を調節していると考えられている⁴⁾。この関係は、歯肉における上皮と結合組織の関係においても同様であると考えられる。横溝によれば⁵⁾、歯周組織が正常な機能を維持するためには上皮付着部の健全が重要であり、しかも、歯肉は食物摂取、細菌増殖などによる外的刺激にさらされていて、その上皮は破壊されやすい状態にあるといわれている。歯肉の結合組織がこの上皮付着の耐性を大きく左右し、また、一度上皮が破壊され炎症が発生したときには、その進行程度を決める重要な因子の一つとなるであろうことは容易に予測されることである。さらに、歯周組織の結合組織成分は、それ自身、歯牙の固定という機能を負担しているために、その失調はより直接的に機能の脱落を惹起せしめる可能性が大きい。このように、歯周組織の結合組織は歯周組織疾患の発生、進行に対して重要な鍵を握っていると同時に、その炎症性変化が疾患の主体となっているといえる⁶⁾。

歯周組織の結合組織成分のうち、コラーゲンに関しては生化学的研究も多く⁷⁻¹¹⁾、教室の岩山¹²⁾も、モルモット歯肉のコラーゲン合成能が極めて高いという興味ある結果を報告している。しかし、AMPSについては組織化学的研究

大阪大学歯学部口腔治療学講座 (主任 横溝一郎教授)

本論文の要旨は第22回日本歯科保存学会 (1967年2月26日 大阪) において発表した。

が大部分であり、しかも、歯周組織疾患との関連については一定の見解が得られていない¹³⁾。他方、AMPSに関する生化学的研究では、Schultz-Haudtら¹⁴⁾が人歯肉から多糖体を抽出し、その組織化学的染色性を検討した報告、およびAas¹⁵⁾がゼランチン増殖歯肉からAMPSを抽出し、ヒアルロン酸/コンドロイチン硫酸比を測定した成績以外はほとんどみるべきものがない。すなわち、歯肉においてすらAMPSの定量成績はほとんど報告されておらず、また、AMPS組成における組織の特徴—近隣組織との比較などに関する知見は全く知られていない。このような実情は、AMPSの分離、定量にはかなり大量の材料を要し、少量の材料しか得られない歯周組織での研究が困難であることに起因するものと考えられる。とくに歯根膜では、分析に必要な材料の採集が一層困難であり、ために、歯根膜のAMPSの生化学的研究はこれまで全く行なわれてない。

しかし、結合組織の病態と関連して他の領域で得られた知見からして、歯周組織病変の研究においてAMPSの役割を追求することは、その病態解明の一助としてきわめて重要である。従って著者はまず、歯肉、歯根膜などの歯周組織のAMPSの構成を明らかにし、さらに、他の口腔粘膜 (歯槽粘膜) のそれと比較検討し、もって、歯周組織疾患におけるAMPSの推移および代謝などの研究の礎としたいと考え、本実験を行なった。

実験材料と方法

1 実験材料

実験材料としては、屠殺場にて入手し、ドライアイス冷凍下に運搬した、それぞれ10頭分、10頭分、6頭分の牛の下顎骨からなる試料I、II、III、から採取し、肉眼的に健全な歯槽粘膜、歯肉、歯根膜を使用した。歯槽粘膜および歯肉は、臼歯部から手術器具を用いて切り取り、鋏で可及的小さく細切してアセトンで脱脂、脱水した後、風乾した。歯根膜は、軟組織を除いた顎骨を槌打破砕して歯牙をとり出し、歯髓を除いてから歯牙に付着したままの状態であセトンで乾燥させ、歯根膜以外の部分にシリコン (信越化学, KC-88) を塗布、乾燥したものを材料とした。

コンドロイチン硫酸 (ChS)-A および ChS-C は生化学

工業より供与されたものを用い、またヘパリンは和光純薬製のものを使用した。

2. 抽出方法

歯槽粘膜および歯肉は、乾燥材料 3g を 0.005M 塩酸システインおよび 0.005M EDTA・2Na を含む 0.1M 酢酸緩衝液 pH 5.5¹⁵⁾、60ml に浮遊させ、パパイン (E. Merck AG) 60mg を加えて 60°C、24時間振盪消化した。ついで、4N NaOH で pH を 7.8 にし、トリプシン (E. Merck AG) 90mg とチモール少量を加えて、さらに 37°C、48時間消化した。歯根膜は乾燥歯牙 200g を上記酢酸緩衝液 200ml、パパイン 60mg で消化した後、歯牙をとり除き、トリプシン 60mg を加えて前と同様に消化した。そして、以後は三者を同様に取扱った。すなわち、消化液の 1/4 容をヒドロキシプロリンおよびヘキササミン定量用に使い、残りの 3/4 容にトリクロル酢酸を終末濃度が 10% になるように加え、0°C、30分放置後、7000×g、15分遠沈して沈渣を除いた。上清は 8N NaOH で中和してから 1 晩流水に対して透析し、さらに脱塩水に対して 12 時間透析した。この内液を約 10ml に減圧濃縮し、ウロン酸をおよそ 0.5mg/ml の濃度に含むようにした。

3. 分画方法

1) セチルピリジニウムクロライドによる AMPS の分画

Schiller らの方法¹⁵⁾により、前記抽出液に 0.035M になるように 1M NaCl を加え、さらに 10% セチルピリジニウムクロライド (CPC) を加えてその終末濃度が 0.5% になる

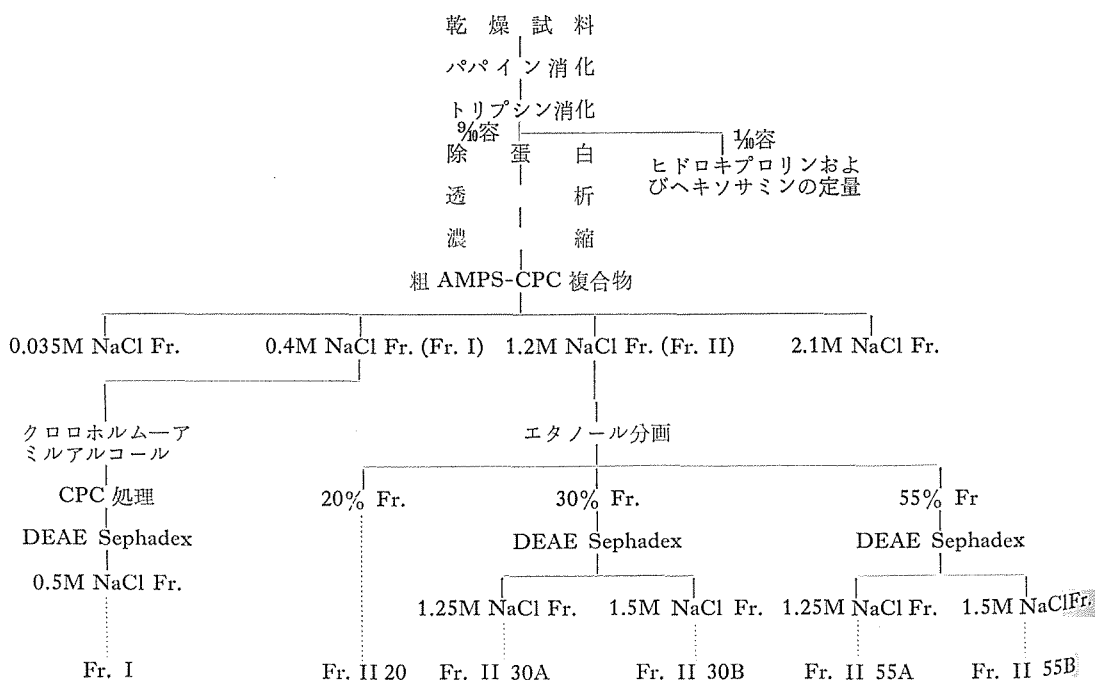
ようにした。十分攪拌した後、37°C、1 時間インキュベートして AMPS-CPC complex を形成させた。これに Celite 535 約 200mg を加え、ガラス棒でよく攪拌した後、700×g、15分遠沈して上清を分離した。沈渣には、ほぼ上清と同量の 0.1% CPC を含む 0.03M NaCl を加え、同様にして再び上清を分離した。そして、これら二つの上清を合わせて 0.035M NaCl 画分とした。ついで沈渣は 0.4M NaCl、1.2M NaCl (いずれも 0.1% CPC を含む) で各々 3 回、さらに 2.1M NaCl で 2 回同様の操作によって抽出した。各 NaCl 濃度における抽出液はプールし、そのウロン酸の定量を行なった。以上の抽出、分画操作は各試料について各々 3 回ずつ実施した。操作の概略は表 1 に示した。

2) 1.2M NaCl 抽出画分 (Fr. II) のエタノール分画

上記抽出実験 3 回分の、すなわち、歯槽粘膜および歯肉は 9g、歯根膜は歯牙重量 600g から得られた Fr. II を合わせて、これに 3 倍量の 99% エタノールを加えて 4°C に 1 日放置した後、遠沈して沈澱物を集め、これを再び少量の 1% 酢酸ソーダー溶液に溶解した。不溶性残渣を遠沈によって除去した後、上清にエタノールを 3 倍量加えて AMPS を沈澱させ、これを 99% エタノールおよびエーテルで洗滌した後、乾燥粉末とした。その重量を秤量した後、これを 5% 酢酸カルシウム—0.5N 酢酸溶液に 0.5% 溶液として溶解し、Meyer の方法¹⁶⁾に従って 20%、30%、55% エタノール画分に分けた。20% 画分および 55% 画分はさらに 1% 酢酸ソーダー溶液に溶解後、再沈澱を行なった。

3) DEAE-Sephadex A-25 カラムクロマトグラフィー

表 1 酸性ムコ多糖体の抽出および分画操作



0.4M NaCl 抽出画分 (Fr. I) の精製のため、また Fr. II の30%画分 (Fr. II 30) ならびに55%画分 (Fr. II 55) をさらに分画するために、Schmidtの方法¹⁷⁾に従って実施した。ただし、カラムは Cl^- 型 DEAE-Sephadex A-25 (Pharmacia, Sweden) $1.5 \times 25\text{cm}$ とし、また Fr. II 30 および Fr. II 55 の分画のためには、樹脂を 0.01N HCl を含む 0.5M NaCl で平衡させ、いずれも 0.01N HCl を含む 1.0M, 1.25M, 1.5M および 2.0M NaCl 各 30ml で順次溶出し、5ml ずつ分取した。

4. 分析方法

1) ヒドロキシプロリン：6N HCl, 120°C , 3時間、封管中でオートクレーブにより加水分解¹⁸⁾、 P_2O_5 および NaOH を入れた真空デシケーター中で乾固させ、脱塩水に溶解して Neuman and Logan の方法¹⁹⁾により定量した。

2) ヘキサロン酸：Dische の方法²⁰⁾に従い、カルバゾール反応により定量した。

3) ヘキソサミン：4N HCl, 100°C , 15時間封管中で加水分解し、Boas の方法²¹⁾に従って Dowex-50 \times 12 カラムを通して妨害物質を除いた後、Svennerholm の方法²²⁾により定量した。ただし、分離した AMPS のヘキソサミンの定量に際しては、Dowex カラムを通す操作は省略した。

4) 硫酸：4N HCl, 100°C , 15時間加水分解後、Dodgeon らのベンチデン法²³⁾によって定量した。

5) ヘキソサミンのペーパークロマトグラフィー：各 AMPS 画分を 4NHCl, 100°C , 15時間加水分解した後、Boas の方法²¹⁾によりヘキソサミン画分を得た。これを乾固させた後少量の水に溶解し、Stoffin and Jeanloz の方法²⁴⁾に従ってヘキソサミンをペントースに転換し、上昇法により展開し、硝酸銀で発色させた。

6) セルロースアセテート膜電気泳動：セパラックス (富士写真フィルムK.K.) を使用し、ベロナール緩衝液 pH 8.6, $\mu=0.07^{25)}$ 、または 0.1M ギ酸緩衝液 pH 3.0 により、泳動条件は定電流 0.3mA/cm, 45-60分とした。染色は、トルイジンブルーを用いる Schultz-Haudt らの方法¹⁴⁾に従った。

7) ヒアルロニダーゼ消化試験：牛睾丸ヒアルロニダー

ゼ (360 USP units/mg, Sigma Chemical Co.) の酵素作用により AMPS の受ける変化を i) Silbert の方法²⁶⁾により分子量の低下を指標として検討した。ただし、Sephadex G-75 の $0.9 \times 20\text{cm}$ のカラムを用い、0.05M NaCl で流出させて 1ml ずつ分取した。ii) 木村らの方法²⁷⁾に準拠し、メタクロマジー能の変化から検討した。ただし、Beckman 分光光度計 DK-2 型により連続吸収スペクトルを記録し、極大吸収の移動を検討した。

8) 赤外吸収スペクトル分析：KBr ミクロ錠剤法により、日立 EPI-S₂ 型赤外分光光度計および NaCl プリズムを用いてスペクトルを記録した*。

成 績

1. ヒドロキシプロリン、ヘキソサミンおよびウロン酸の定量成績

AMPS を抽出した材料について、コラーゲン量としてのヒドロキシプロリンと、基質糖蛋白質および AMPS 成分の指標としてのヘキソサミン、ならびに粗 AMPS のウロン酸を定量した (表 2)。その結果、歯槽粘膜および歯肉では、ヒドロキシプロリンの組織重量当りの含量は 4~5%, ヘキソサミンのそれは、約 0.5%, また、AMPS 量としてのウロン酸含量はヘキソサミンの約 1/3 であった。ヘキソサミンおよびウロン酸の対ヒドロキシプロリン比をみると、いずれも歯根膜が最大で、歯肉、歯槽粘膜の順に低くなった。すなわち、単位ヒドロキシプロリン重量当りのヘキソサミン含量およびウロン酸含量は、歯根膜が最高であった。

2. セチルビリジニウムクロライド (CPC) による AMPS の分画定量

粗 AMPS を CPC により分画して得た 4つの画分についてウロン酸の定量を行なった。表 3 に示すごとく、乾燥組織 1g 当りの AMPS としてのウロン酸量は、0.4M NaCl 画分 (Fr. I) では歯槽粘膜と歯肉との間に著差はないが、1.2M NaCl 画分 (Fr. II) では、歯肉においては歯槽粘膜の 2 倍以上であった。Schiller ら¹⁵⁾によれば Fr. I はヒアルロン酸 (HA) 画分であり、Fr. II はコンドロイ

表 2 歯周組織中のヒドロキシプロリン、ヘキソサミン、および酸性ムコ多糖体の含量

| | Hydroxyproline (mg) | Hexosamine (mg) | Hexosamine Hydroxyproline (%) | Hexuronate as AMPS (mg) | Hexuronate Hydroxyproline (%) |
|----------|------------------------|--------------------|-------------------------------------|-------------------------------|-------------------------------------|
| 歯 槽 粘 膜* | 50.7 \pm 1.5 | 4.65 \pm 0.38 | 9.2 | 1.48 \pm 0.07 | 2.9 |
| 歯 肉* | 41.4 \pm 0.4 | 5.25 \pm 0.12 | 12.7 | 1.71 \pm 0.15 | 4.1 |
| 歯 根 膜† | 46.1 \pm 3.5 | 6.59 \pm 0.92 | 14.3 | 2.23 \pm 0.13 | 4.9 |

*: 乾燥組織 1g 当りの量

†: 乾燥歯牙 100g 当りの量

大阪大学医学部中央研究室に依頼した。

表3 CPC による歯周組織の酸性ムコ多糖体の分画成績

| | NaCl Concentration (M) | | | | |
|-------|------------------------|------------|-------------|------|------------|
| | 0.035 | 0.4 (Fr.I) | 1.2 (Fr.II) | 2.1 | Fr.I/Fr.II |
| 歯槽粘膜* | 0.49±0.03 | 0.90±0.03 | 0.35±0.05 | 0.01 | 2.57 |
| 歯肉* | 0.47±0.02 | 0.67±0.08 | 0.83±0.07 | 0.02 | 0.81 |
| 歯根膜† | 0.80±0.06 | 0.55±0.03 | 1.24±0.15 | 0.05 | 0.44 |

* : 乾燥組織 1g 当りのウロン酸量 (mg)

† : 乾燥歯牙 100g 当りのウロン酸量 (mg)

チン硫酸 (ChS) 画分であるから, HA 含量は両組織にはほぼ等しく, また ChS は歯槽粘膜より歯肉に多いことが解った。

また, この両画分の比 (Fr. I/Fr. II) に注目すると, 歯槽粘膜では2以上であるのに反し, 歯根膜では逆に1/2以下となり, また歯肉は両者の中間の値を示した。すなわち, 3組織は全く異った HA/ChS 比を示すことが明らかになった。

つぎに, Fr. I および Fr. II の対ヒドロキシプロリン比 (%) をヒストグラムとして図1に示した。

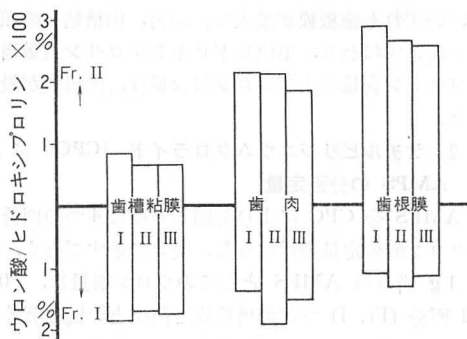


図1 Fr. I および Fr. II の対ヒドロキシプロリン比 (%)
I, II, III は試料番号を示す。

それによると, Fr. I の対ヒドロキシプロリン比は3組織間で差異が少ないのに反して, Fr. II のそれは差異が大である。すなわち, 単位ヒドロキシプロリン重量当りの含量としてみれば, 3組織間の Fr. I/Fr. II 比の差異は, 主として ChS 画分の差によることになる。歯周組織の Fr. II の対ヒドロキシプロリン比は, 歯槽粘膜のそれに比して著しく高く, 歯肉では2.5~3.3倍, 歯根膜では3.4~4倍であった。

なお, 0.035M NaCl 画分は AMPS を含まないとされているため, また, 2.1M NaCl 画分は微量成分であるため, 今回は検討を加えなかった。

3. コンドロイチン硫酸画分 (Fr. II) のエタノール分

画

CPC 分画法による Fr. II は, ChS 画分であるが, この中には ChS-A, ChS-B, ChS-C などの混在が予想されるので, さらにエタノール分画を行なった結果を表4に示

表4 コンドロイチン硫酸画分のエタノール分画

| | Ethanol Concentration (%) | | |
|-------|---------------------------|---------|----------|
| | 20 | 30 | 55 |
| 歯槽粘膜* | 5.6±0.7 | 3.7±0.5 | 3.4±0.3 |
| 歯肉* | 10.9±0.7 | 4.2±0.4 | 11.8±1.3 |
| 歯根膜† | 5.2±0.3 | 4.8±0.5 | 15.2±1.4 |

* : 乾燥組織 9g 中に含まれる量 (mg)

† : 乾燥歯牙 600g 分の歯根膜に含まれる量 (mg)

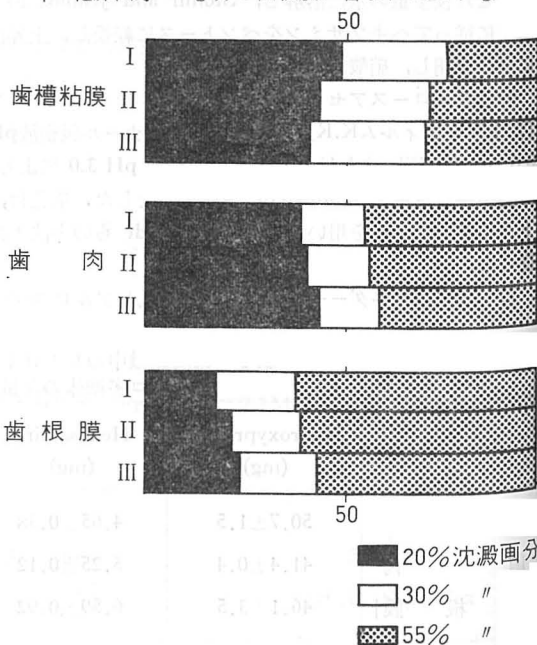


図2 Fr. II (ChS 画分) のエタノール分画により得られた各画分の重量による比率
I, II, III は試料番号を表す。

した。

また、各画分の全体の重量に対する割合を図2に示した。単位組織重量当りの各画分の含量は、歯肉では、20%画分 (Fr.II 20) および55%画分 (Fr.II 55) とともに歯槽粘膜に比して著しく高く、Fr.II 20 は約2倍、Fr.II 55 は約3倍であった。また各画分の重量による比率を比較すると、歯槽粘膜では3画分がほぼ同じ割合に存在するが、歯肉では、Fr.II 20 : Fr.II 55 が 1 : 1、Fr.II 30 はそれぞれの $\frac{1}{2}$ 以下という組成であった。歯根膜では Fr.II 55 が主成分で、Fr.II 20 および Fr.II 30 は、いずれもその $\frac{1}{2}$ 以下でおおよそ 1 : 1 の割合であった。

後の同定結果によると、Fr.II 20 は ChS-B、Fr.II 30 は ChS-B と少量のヘパリン硫酸、Fr.II 55 は ChS-A と ChS-C であることが解ったので、その結果をもとにすると、ChS 画分の中では歯槽粘膜では ChS-B が、歯根膜では ChS-A と ChS-C の混在成分が主成分であり、歯肉は両者の中間の組成を示しているといえる。

4. Fr. II 30 および Fr. II 55 の DEAE-Sephadex A-25 カラムクロマトグラフィー

セルロースアセテート膜電気泳動によると、粗 AMPS および CPC 分画法による Fr. II においては僅かに認められていたのであるが、エタノール分画法により得た Fr. II 30 では、HA に相当するバンドと ChS に相当するバンドの中間の移動度を示すバンドが顕著に認められるようになり、また、Fr.II 55 においては ChS に相当するバン

ドがかなりの広がりをもっていたので (図3), この両画分に対し DEAE-Sephadex A-25 によるカラムクロマトグラフィーを行なった。その結果、Fr.II 30 の場合は 1.25 M NaCl で溶出される画分 (Fr.II 30A) と 1.5M NaCl で溶出される画分 (Fr.II 30B) の2画分に分れた。その1例を図4に示した。

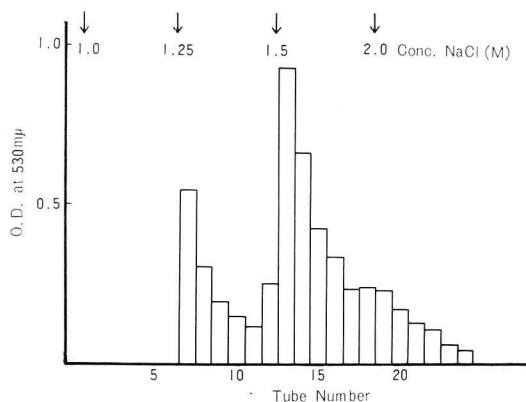


図4 Fr.II, 30 の DEAE-Sephadex A-25

カラムクロマトグラフィー

試料 16mg を 1.5×25 cm カラムに添加し、段階的溶出を行ない、5ml ずつ分取した。AMPS 量はカルバゾール反応により定量した。

これらの画分は、電気泳動法によると、Fr.II 30B は ChS に相当する単一のバンドを示したが、Fr.II 30A は単一ではなく、ヘパリン硫酸と考えられる成分の他に、なお ChS に相当する成分を含むことが解った。そこで、Fr.II 30A の再クロマトグラフィーを行なった結果、その 1.25M NaCl 画分からは ChS に相当する成分はほとんど除外された。また、Fr.II 55 の場合も 1.25M NaCl 溶出画分 (Fr.II 55A) と 1.5M NaCl 溶出画分 (Fr.II 55B) の2画分に分れた。そして電気泳動の結果、前者の移動度は後者のそれより僅かに小であった。

5. Fr. I の精製

Fr. I にはなお蛋白質などの混在が考えられたので、0.5 M 錯酸緩衝液 (pH 4.5) に溶解し、これと等量のクロロホルム-アミールアルコール (1 : 1) を加えて振盪した後、遠沈してゲル状変性物を除く操作²⁸⁾を変性物がなくなるまで繰返した。ついで、この溶液を脱塩水に対して十分透析した後、NaCl 濃度を 0.04M にして CPC と 37°C、2 時間反応させた。生じた沈澱物を集め、これを 0.04M NaCl で2回洗滌した後、0.5M NaCl に溶解した。不溶解性残渣は遠沈によって除き、上清に3倍量のエタノールを加えて AMPS を沈澱させ、白色粉末を得た。収量は出発重量の約 $\frac{1}{2}$ であった。引き続いて、さらに精製のため、DEAE-Sephadex A-25 カラムクロマトグラフィーを行なった。

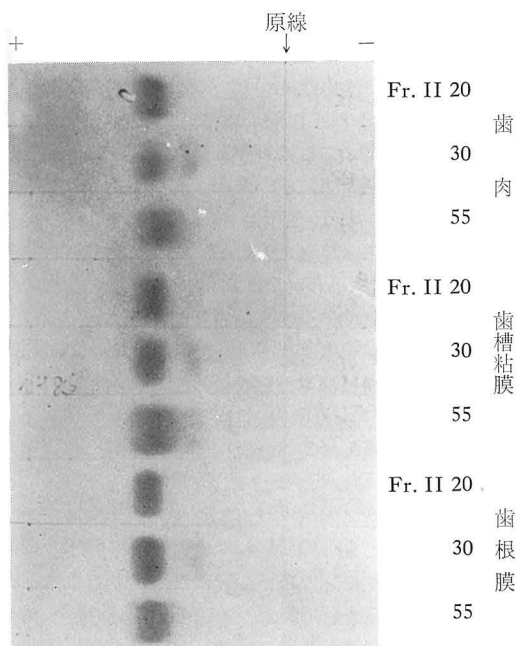


図3 エタノール分画後の Fr. II のセルロースアセテート電気泳動像
緩衝液：ペロナル緩衝液 pH 8.6
電流：0.3mA/cm, 泳動時間：45分

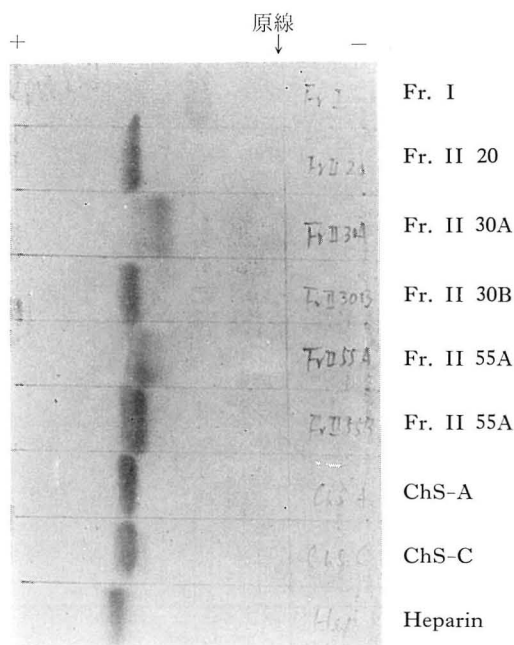


図5 AMPS 画分のセルロースアセテート電気泳動像
緩衝液：ペロナール緩衝液 pH 8.6
電流：0.3mA/cm, 泳動時間：60分

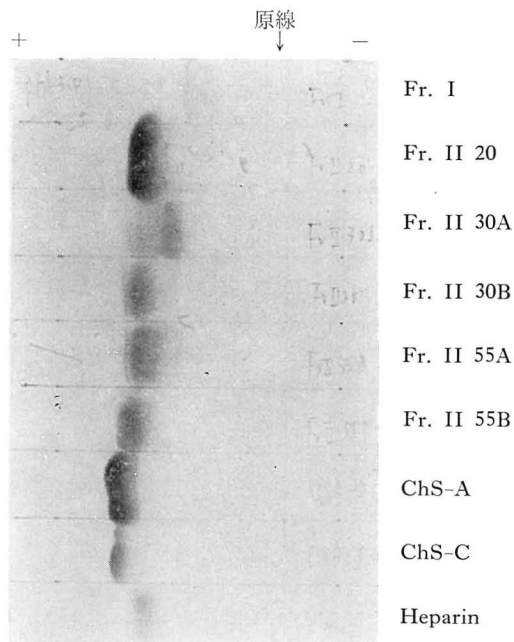


図6 AMPS 画分のセルロースアセテート電気泳動像
緩衝液：ギ酸緩衝液 pH 3.0
電流：0.3mA/cm, 泳動時間：60分

その結果, 1.25M NaCl で溶出される部分も少量認められたが, 大部分の AMPS は 0.5M NaCl で溶出された。こ

れは, Fr. I が大部分 HA からなることを示すものである。以後の分析には 0.5M NaCl で溶出された画分を使用した。

6. 各画分の同定結果

以上のごとく, CPC 分画, エタノール分画, ならびに DEAE-Sephadex A-25 カラムクロマトグラフィーによって得られた 6 画分 (Fr. I, Fr. II 20, Fr. II 30A, Fr. II 30B, Fr. II 55A, Fr. II 55B) から AMPS をエタノールで沈澱させ, 乾燥粉末として後, 分析に供し, 次のごとき成績を得た。

1) セルロースアセテート膜電気泳動

被験試料を 0.5% 水溶液として, ペロナール緩衝液およびギ酸緩衝液により電気泳動した結果を図 5 および図 6 に示した。いずれの画分もトルイジンブルーによりメタクロマジーを示し, 赤紫に染色された。

いずれの緩衝液においても Fr. II 20, Fr. II 30B, Fr. II 55B はほぼ同じ移動度を示し, 最も陽極側に泳動された。しかし, これらの移動度は標準試料として用いた ChS-A および ChS-C のそれよりやや小さく, また, Fr. II 55A の移動度はさらに小さかった。Fr. II 30A の主要部分および Fr. I の移動度は, それぞれヘパリン硫酸および HA のそれに一致するものと思われる。

2) ヒアルロニダーゼ消化試験の成績

各画分に対するヒアルロニダーゼの酵素作用の影響を, 分子量の変化についてはゲル濾過法により, またメタクロマジー能の変化については可視部連続吸収スペクトルによって検討した。Fr. I のパターンを図 7 および図 8 に掲げた。ゲル濾過法によると, 酵素添加を行なわなかった対照では, ウロン酸は流出量 4ml から 9ml の間で検出されたが, ヒアルロニダーゼを作用させた場合は 10ml から 18ml の間で検出された。これは, 酵素作用により分子量の低下をきたしたことを意味する。また, トルイジンブルーによる吸収スペクトルでは, 酵素添加を行なわない場合は, 570 mμ 付近にあった極大吸収が, 酵素を添加した場合には 640 mμ 付近に認められた。これは, AMPS が酵素作用を受け, メタクロマジー能を失ったことを意味する。

これら二つの成績により検討した結果, Fr. I および Fr. II 55B は完全に酵素分解を受けたが, Fr. II 20, Fr. II 30A および Fr. II 30B はほとんど酵素分解を受けなかった。Fr. II 55A は大部分消化性であるが, 非消化性の AMPS も混在していた。

3) ヘキシサミンのペーパークロマトグラフィー

図 9 に示すごとく, Fr. I および Fr. II 30A のヘキシサミンはグルコサミンであった。ただし, 後者にはガラクトサミンも一部含まれていた。その他の画分のヘキシサミンは, すべてガラクトサミンであった。

4) 化学組成

各画分の化学組成とヒアルロニダーゼ消化性などをまとめて表 5 に示した。Fr. I は硫酸を含まず, ウロン酸：ヘ

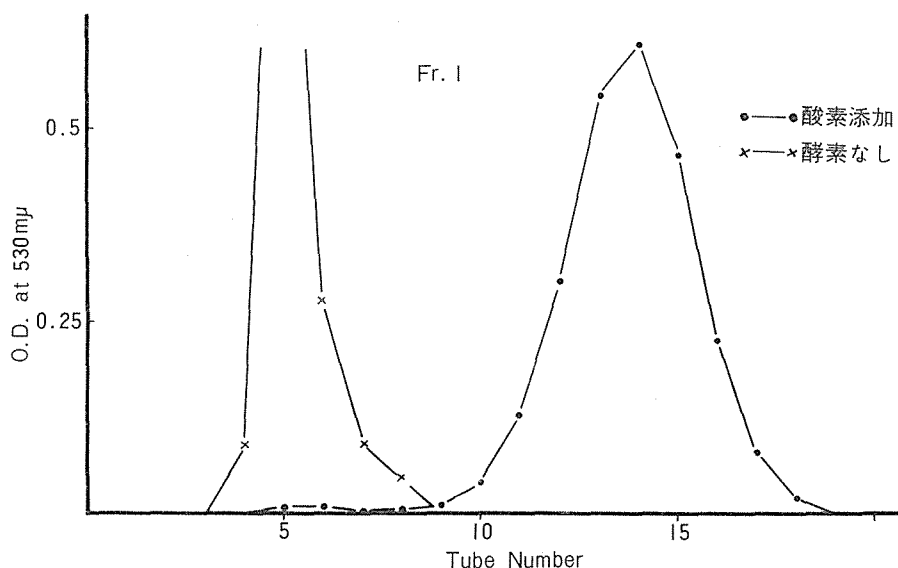


図7 Fr. I のヒアルロニダーゼ消化液の Sephadex G-75 ゲルカラムからの溶出パターン

反応組成: 0.2M NaCl 加 0.1M 酢酸緩衝液 1ml, Fr. I 1mg, ヒアルロニダーゼ 1mg, 反応条件: 37°C, 15時間, ゲルカラム: 0.9×20cm 1ml分取

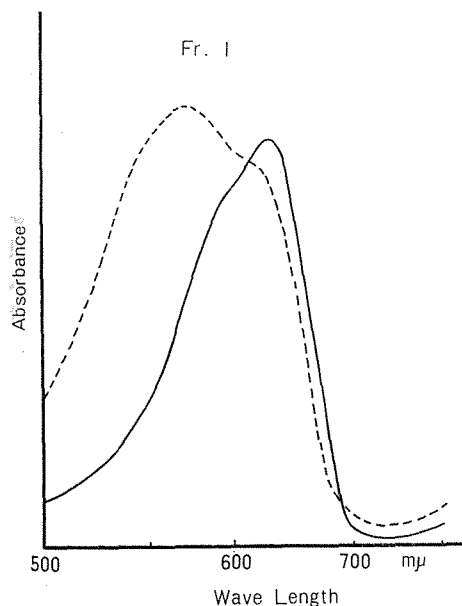


図8 Fr. I のメタクロマージ能に対するヒアルロニダーゼの影響
——酵素消化,酵素なし
Fr. I のヒアルロニダーゼ消化液にトリイジンブルーを加え吸収スペクトルを記録した。

キソサミンはほぼ 1:1 で HA の分析値に一致した。Fr. II 20 および Fr. II 30B は、ヘキソサミンに比してウロン酸の値が相当に小さいこと、ヒアルロニダーゼ非消化性である点などから主成分は ChS-B である。Fr. II 55A

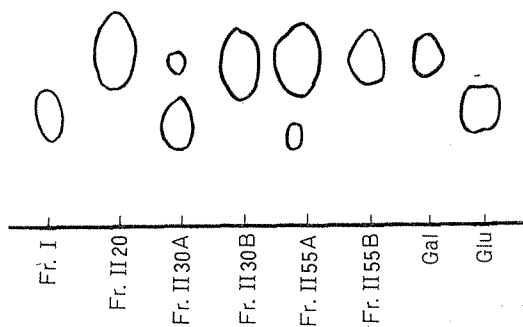


図9 ヘキソサミンのペーパークロマトグラフィ

Gal: ガラクトサミン, Glu: グルコサミン
各画分の加水分解物から分離したヘキソサミンを、ニンヒドリン分解の後上昇法により展開した。

および Fr. II 55B は、ChS-A または ChS-C、ないしはそれらの混合物と考えられるが、前者の硫酸値はかなり低い。Fr. II 30A はウロン酸の値が高いこと、ヘキソサミンの大部分がグルコサミンであること、硫酸を有する点などからみて、ヘパリン硫酸の分析値に類似している。

5) 赤外吸収スペクトル

各画分の赤外吸収スペクトルを図10に掲げた。いずれの

表5 酸性ムコ多糖体画分の化学組成

| Fraction | Hexuronate | Hexosamine | SO ₄ ⁻ | Hexosamineの種類 | Hyaluronidase 消化 |
|----------|------------|------------|------------------------------|---------------|------------------|
| I | 1.91 | 2.13 | 0 | Glucosamine | + |
| II 20 | 0.84 | 1.82 | 1.89 | Galactosamine | — |
| II 30A | 2.07 | 1.49 | 0.98 | Glucosamine | — |
| II 30B | 1.00 | 1.48 | 1.69 | Galactosamine | — |
| II 55A | 1.60 | 1.53 | 0.52 | Galactosamine | ± |
| II 55B | 1.59 | 1.47 | 1.47 | Galactosamine | + |

数値は試料 1mg 中の μ mole 数を表す。

画分にも 1615cm^{-1} のカルボキシル基, また, 1555cm^{-1} および 1375cm^{-1} のアセチルアミノ基による吸収²⁹⁾が認められた。しかし, 硫酸による 1240cm^{-1} の吸収は Fr. I には認められず, Fr. I のスペクトルは HA のそれに一致した^{30,31)}。Fr. II 55A および Fr. II 55B には 1240cm^{-1} の吸収の他に, 硫酸がガラクトサミンの 4' に結合することによる 855cm^{-1} の吸収と, 6' に結合することによる 820cm^{-1} の吸収³²⁾の両方が認められることは, この両画分は, ChS-A と ChS-C の混合物であることを示唆する。その他, Fr. II 20, Fr. II 30B は ChS-B^{27,33)} に, また, Fr. II 30A はヘパリチン硫酸^{30,34)}にほぼ一致するパターンを示した。

以上の化学分析および赤外吸収スペクトルの結果からみて, Fr. I は HA, Fr. II 20 と Fr. II 30B の大部分は ChS-B, Fr. II 30A はヘパリチン硫酸と少量の混在物で

あることがわかった。また, Fr. II 55B は ChS-A と ChS-C の混在物, Fr. II 55A は硫酸値の低い同じ混在物と考えるのが妥当であると思われる。

最後に以上の同定成績をもとにして, 各組織の AMPS 組成をまとめると表 6 のようになる。ただし, HA 量はウロン酸量に $2.27 \times$ 材料の量を乗じて算出した値³¹⁾によった。

表6 歯周組織の酸性ムコ多糖体組成

| | HA | ChS-B | ChS-A & ChS-C | ヘパリチン硫酸 |
|------|-----|-------|---------------|---------|
| 歯槽粘膜 | +++ | ++ | + | 微量 |
| 歯肉 | ++ | ++ | ++ | 微量 |
| 歯根膜 | + | ++ | +++ | 微量 |

+++ , ++ , + は成分の大きさの順序を示す。

歯槽粘膜では HA が主成分で, ChS-B が第 2 成分として ChS の大部分を占め, 歯肉では, HA, ChS-B, および ChS-A & ChS-C がほぼ同じ割合に存在し, また, 歯根膜では, ChS-A & ChS-C が主成分で, ChS-B がこれに次ぎ, HA は第 3 成分であった。ヘパリチン硫酸はどの組織にも微量成分として存在することが明らかになった。

考 察

1. 抽出法および定量法について

近年, AMPS の抽出には温和な方法が適用されるようになり, 結合組織においては, 大部分の AMPS が蛋白質と結合した状態で存在することが明らかになった⁴⁾。しかし, 結合組織はそのホモジュネート調整が困難であるため, このような方法を AMPS の定量的実験に応用する試みはほとんど行われていないようである。また, AMPS の同定のためには, これをできるだけ純粋な形で抽出することが重要であり, このような目的のためには, アルカリ抽出, 組織消化による抽出などが行われてきた。収量の面からいえば, 組織消化によるものが良いと思われる。

牛の歯肉は角化した上皮が厚く, ホモジュネートの作製が困難であり, また, 歯根膜の採取には, 歯根部から掻きとるという複雑な手間がかかる上に収量もよくないため,

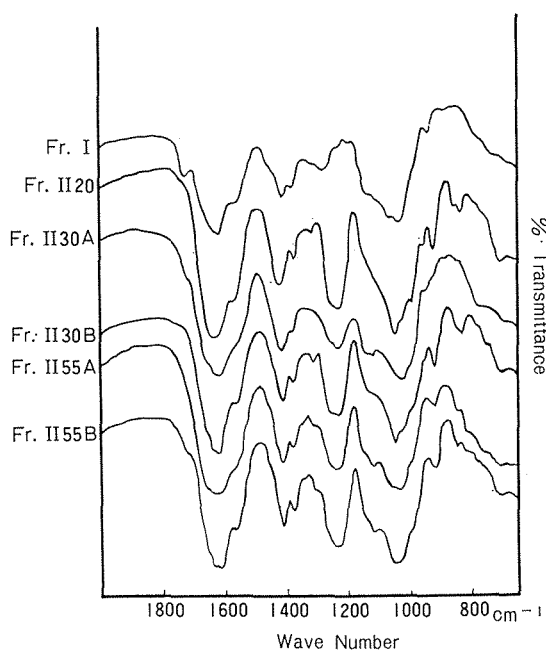


図10 酸性ムコ多糖体画分の赤外吸収スペクトル

AMPS の同定と定量的検討を同時に行なわんとする本実験では、材料の調整方法に考慮を払った。すなわち、歯肉および歯槽粘膜の場合は、細切したアセトン乾燥材料から抽出したのであるが、歯根膜の場合には、これを歯牙に付着したままの状態を乾燥させ、蛋白消化酵素により液化させた。この際、歯根膜以外の部分にシリコンを塗布し、不必要な成分が抽出されるのを防いだ。歯根膜を液化した後歯牙を除き、その後は他の2組織と同様に、Schiller らの方法¹⁵⁾を他の文献³⁵⁾を参考に改変した方法により AMPS を抽出した。歯根膜はそのものの自体の重量が不明であるため、組織間の AMPS の組成の比較のためには、コラーゲン量の指標としてのヒドロキシプロリン量を測定して、ヒドロキシプロリンに対する比率に注目した。ちなみに、結合組織成分の研究では、コラーゲンとの関連において検討された文献が多い³⁵⁻³⁸⁾。

② 粗 AMPS の分画方法には、エタノール分画^{1,16)}、セチルピリジニウムクロライド¹⁵⁾、または、セチルトリメチルアンモニウムブロマイド³⁹⁾による分画、それぞれのカラムを用いる方法^{40,41)}、その他、電気泳動法⁴²⁾や陰イオン交換体^{15,17,43)}によるカラムクロマトグラフィーなどがある。今回の実験では、材料の量の制約ならびに組織の皮膚に対する類似性などから、HA と ChS が主成分をなすことが推察されること、予備実験で、ChS を Gardell の方法⁴⁰⁾によりセルロースカラムクロマトグラフィーを行なった結果、溶解度の異なる2~3成分の混在が予想されたことなどから、第1段階として、Schiller らの CPC 分画法¹⁵⁾を3回試み、それぞれの画分の定量を行なった後に3回分のChSを集めて、Meyer のエタノール分画法¹⁶⁾により ChS-A、ChS-B、ChS-C の分離を試みた。そして、セルロースアセテート膜電気泳動の結果少量のヘパリチン硫酸の混在が考えられたので、これを DEAE-Sephadex A-25 カラムによって分離した。

2. 同定結果について

以上の分画操作により6画分が得られたので、これらを精製した後同定した。Fr. I は硫酸を含まず、ヘキソサミンとしてグルコサミンを含み、ヒアルロニダーゼ消化性であるところからヒアルロン酸であるといえる。Fr. II 20, Fr. II 30B, Fr. II 55A, Fr. II 55B はガラクトサミンおよび硫酸を含むので、全てコンドロイチン硫酸であるが、Fr. II 20 はカルバゾール反応によるウロン酸値がヘキソサミン値の $\frac{1}{2}$ と低いこと、ヒアルロニダーゼ非消化性であることなどから ChS-B であり⁴⁴⁾、Fr. II 30B も同じような性質を示すところから大部分は ChS-B であるが、少量の混在成分があるものと考えられる。Fr. II 55A, Fr. II 55B はヒアルロニダーゼ消化性であり、赤外吸収スペクトルで 855cm^{-1} 、 820cm^{-1} の両方に吸収を認める点で、ChS-A と ChS-C の混在物であると思われる。しかし、両画分とも電気泳動では標準試料の ChS-A、ChS-C より移動度が小さく、また、Fr. II 55A は硫酸値が相当小さ

いようである。Mathews⁴⁴⁾によれば、ChS-A、ChS-C の pK' は同値であり、ChS-B のそれより小さいので、 $\text{pH}3$ で電気泳動すると、ChS-A の易動度は ChS-B のそれより大であるという。しかるに、著者の得た Fr. II 55A は ChS-B よりもむしろ易動度が小であった。これは、主として硫酸含量の差に基づくものと考えられる。最近このような硫酸値の低い ChS-A、ChS-C、また逆に硫酸のヘキソサミンに対するモル比が1以上の ChS が次々と報告され、ChS が最近までいわれてきたような均一な物質ではないことが指摘されている⁴⁾ので、Fr. II 55A, Fr. II 55B の2画分は、一応 ChS-A と ChS-C の混合物であると判定した。Fr. II 30A は電気泳動で2成分からなることが窺われるが、グルコサミンを主成分とし、ヒアルロニダーゼ非消化性であること、電気泳動度、赤外スペクトルの比較などから、主成分はヘパリチン硫酸であると考えられる³⁰⁾。DEAE-Sephadex A-25 による再クロマトグラフィーにもかかわらず、完全に分離できなかったのは、硫酸値の低い ChS が混在するためであろうと考えられる。

一般に AMPS には硫酸含量の他に、分子量の違いなどによる molecular heterogeneity が知られ、AMPS 相互の完全な分離はなかなか得られにくいようである。今回の実験でも完全な分離はできなかったが、一応 HA, ChS-A, ChS-B, ChS-C、ヘパリチン硫酸を同定できたといえよう。

AMPS は、トルイジンブルー、アルシアンブルーなどの塩基性色素によるメタクロマジー法、コロイド鉄法などによって組織化学的に検出される⁴⁵⁾。森⁴⁶⁾は、人歯肉において、ヒアルロニダーゼを併用して HA を証明し、Stahl ら⁴⁷⁾、渡辺⁴⁸⁾、Quintarelli⁴⁹⁾ はポリサッカラーゼ消化性および非消化性のムコ多糖体の存在を報告している。Schultz-Haudt ら¹⁴⁾は、人歯肉から多糖体を抽出して濾紙電気泳動法により分離し、その中で AMPS である HA, ChS-B, ChS-A, ChS-C は PAS 染色では染まらず、トルイジンブルーでメタクロマジーを示すことを報告している。著者の得た画分は、いずれも電気泳動像、可視部連続吸収スペクトルからみて、メタクロマジーを示すものであった。そして、Schultz-Haudt らにより同定された AMPS の他に、硫酸値の低い ChS や、少量ではあるが、ヘパリチン硫酸が分離された。

3. 定量成績について

ヒドロキシプロリンの定量は蛋白消化による液化後に行なったが、予備実験で、この過程で変動がないことを確認した。歯槽粘膜、歯肉では非常に良好な測定成績が得られたが、歯根膜では、3回の反復実験の間でかなり変動がみられた。これは、出発材料を歯牙の重量によったため、付着している歯根膜量そのものに差があったことに原因があると思われる。この傾向は、ヘキソサミンや AMPS の定量成績にもみられるからである。ヒドロキシプロリン含量を13%としてコラーゲン量を計算すると、歯肉の値は、

Schultz-Haude⁷⁾が人の歯肉で報告した結果とはほぼ一致する。しかし、道⁸⁾が牛の下顎前歯部歯肉で得た値より相当小さいようである。

歯肉のヘキサミンの値は約0.5%で、道の値⁸⁾とはほぼ一致する。ヒドロキシプロリンとの比は歯根膜が一番大きく、歯槽粘膜は最小であった。また、同じ傾向が総AMPS量としてウロン酸を定量した成績にもみられた。この生物学的意義の一部は、歯根膜が線維芽細胞に富み、反応性の高い組織であるという組織学的所見⁵⁰⁾に基づいて説明できると思われる。すなわち、結合組織では幼若なほどヘキサミン/ヒドロキシプロリン比が高く、またAMPS/ヒドロキシプロリン比も高いという一般的傾向が認められているのである⁵¹⁾。しかし、それにも増して、歯槽粘膜が被覆組織であり、歯根膜が靱帯的機能を担う組織であるという、機能-構造の差異を反映するものであろう。

CPC分画による0.4M NaCl分画(HA)と1.2M NaCl分画(ChS)の構成比が、組織により異なることは注目値する。すなわち、ウロン酸によって定量した場合、歯槽粘膜ではHAがChSの2倍以上であるのに反し、歯根膜ではHAがChSの1/2以下と少い。そして、歯肉におけるHA/ChS比0.8は、Aas¹¹⁾が人デランチン増殖歯肉で得た値とはほぼ一致する。また、ヒドロキシプロリン当りの量として比較すると、とくにChS分画の差が著明となり、歯根膜のそれは歯槽粘膜の3.4~4倍であった。ChS分画をさらにエタノール分画すると、ChS-B分画(20%および30%分画)、ChS-A & ChS-C分画(55%分画)ともに歯槽粘膜より歯肉に多く、とくにChS-A & ChS-C分画は約3倍であった。そして、ChSの構成比をみると、歯槽粘膜ではChS-Bが主成分であるのに反し、歯根膜ではChS-A & ChS-Cの混在成分が主成分であり、歯肉はその中間の組成で、両者がほぼ1:1であることが明らかとなった。

HAの重量をウロン酸量に換算係数2.27、および材料の量に乗じて算出する³¹⁾と、歯槽粘膜では18.5mg、歯肉では13.7mg、歯根膜では7.5mgとなるので、HAとChSの重量比率をみる事ができる。30%分画は大部分ChS-Bと考えられるので、歯槽粘膜のHA:ChS-Bはおおよそ2:1ということになる。牛、豚、人などの成熟体の皮膚では、HAとChS-BがAMPSの主要な成分で、胎児や幼若動物ではHAがChS-Bより著しく多く、また、ChS-Cも相当含有されていることが報告されている^{1, 36, 52)}ので、歯槽粘膜は若い皮膚と似たAMPS構成を示すものと考えられる。歯根膜は、ChS-A & ChS-CおよびChS-Bを主要な成分として含み、HAを第3成分とする点では、Meyerの分類によるgroup Vの結合組織である腱、心臓弁膜などと相似している¹⁾が、歯根膜の機能構造からみてよく理解できる。また、歯肉は被覆組織としての性格と、靱帯としての機能を有するが、AMPS構成も歯槽粘膜と歯根膜との中間構造を示しているものと解釈されよう。しかし、Meyerらによると、ここに引用した組織ではChS-Aは報

告されておらず、その点、ChS-AとChS-Cとが混在するという今回の成績は異なるものである。ヘパリン硫酸は、3組織いずれにも含有されていたが、微小成分であるため今回は定量できなかった。

結 論

牛の歯槽粘膜、歯肉および歯根膜について、いくつかの結合組織成分を測定し、AMPSを抽出分離して、次の結論を得た。

1. 歯槽粘膜および歯肉では、単位組織重量当りの含有量はヒドロキシプロリン4~5%、ヘキサミン0.5%、またAMPS量としてのウロン酸はヘキサミンの約1/2であった。また、単位ヒドロキシプロリン当りのヘキサミン量およびウロン酸量はいずれも歯根膜が最大で、ついで歯肉、歯槽粘膜の順であった。

2. AMPSをCPCにより分画し、カルバゾール反応によって定量すると、歯肉のChS含量は歯槽粘膜の2倍以上であった。また、HA/ChS比は歯槽粘膜は2以上であり、歯根膜では1/2以下であった。歯肉はその中間の値を示した。単位ヒドロキシプロリン当りの量では、HAのそれは組織間で差が小さく、ChSのそれは差異が大であった。すなわち、後者は歯槽粘膜に比して、歯肉では2.5~3.3倍、歯根膜では3.4~4倍の高さを示した。

3. ChS分画をさらにエタノール分画すると、歯槽粘膜のChSの主成分はChS-Bであり、歯根膜ではChS-AとChS-Cの混合物が主成分であった。歯肉はその中間の組成を示した。

4. DEAE-Sephadex A-25カラムクロマトグラフィーにより、さらに2分画を得て同定した結果、いずれの組織にもHA、ChS-B、ChS-A、ChS-C、ヘパリン硫酸などが存在することが明らかになり、また、ChS-AとChS-Cの混在成分には硫酸含量の低いものが存在することがわかった。

5. 生物学的な結論として、各組織はそれぞれ特異的なAMPS構成を有し、その組成からみて歯槽粘膜は皮膚に、歯根膜は腱に類似し、歯肉は両者の中間の組成を有することが解った。

稿を終るに臨み、終始ご懇篤なるご指導とご校閲を賜った横溝一郎教授に深甚なる謝意を表するとともに、ご教示、ご校閲をいただいた生化学教室竹田義朗教授に深く感謝いたします。また種々ご助言、ご教示をいただいた九州大学歯学部青野正男教授、教室の岩山幸雄博士、ならびにご協力下さった教室員各位に厚く御礼申し上げます。

文 献

- 1) Meyer, K., Davidson, E., Linker, A. and Hoffman, P. (1956): The acid mucopolysaccharides of connective tissue. *Biochim. Biophys. Acta* **21**, 506-518.
- 2) 長井 靖(1964): 結合組織の生化学, 代謝 **1**, 488-494

昭和39

- 3) Dorfman, A. (1963): Polysaccharides of connective tissue. *J. Histochem. Cytochem.* **11**, 2-13.
- 4) 鶴見膠一 (1966): 結合組織の酸性ムコ多糖体の生化学綜合臨床 **15**, 1863-1870 昭41.
- 5) 横溝一郎 (1954): 歯槽膿漏症, 成因に関する実験的検討 **3**, 歯界展望 **11**, 274-287 昭和29.
- 6) 秋吉正豊 (1962): 歯周組織の構造と病理, 医歯薬出版東京, 183-186 昭和37
- 7) Schultz-Haudt, S. D. and Aas, E. (1960): Observations on the status of collagen in human gingiva. *Arch. Oral. Biol.* **2**, 131-142.
- 8) 道 トキ子 (1964): 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, 口病誌 **31**, 92-101. 昭39
- 9) Saito, S. (1960): Biochemical investigation of the periodontal membrane. *Bull. Tokyo Med. Dent. Univ.* **7**, 385-396.
- 10) Flieder, D. E. (1962): Cytochemistry of human oral mucosa; Determination of phospholipids, protein-bound hexoses, mucoproteins, collagenous, and non collagenous protein. *J. Dent. Res.* **41**, 112-116.
- 11) Aas, E. (1963): Hyperplasia gingivae diphenylhydantoinea. *Acta Odont. Scand.* **21**, suppl. 34, 77-108.
- 12) 岩山幸雄 (1966): 歯肉におけるコラーゲンの生合成, 阪大歯学誌, **11**, 71-78 昭41.
- 13) Schultz-Haudt, S. D. (1965): Connective tissue and periodontal disease. in *International review of connective tissue research* (Hall, D. A. editor). Academic Press, New York, Vol. 3 77-89.
- 14) Schultz-Haudt, S. D., From, S. Hj. and Nordbo, H. (1964): Histochemical staining properties of isolated polysaccharide components of human gingiva. *Arch. Oral Biol.* **9**, 17-25.
- 15) Schiller, S., Slover, G. and Dorfman, A. (1961): A method for the separation of acid mucopolysaccharides: Its application to the isolation of heparin from the skin of rats. *J. Biol. Chem.* **236**, 983-987.
- 16) Meyer, K., Linker, A., Davidson, E. A. and Weissman, B. (1954): The mucopolysaccharides of bovine cornea. *J. Biol. Chem.* **205**, 611-616.
- 17) Schmidt, M. (1962): Fractionation of acid mucopolysaccharides on DEAE-Sephadex anion exchanger. *Biochim. Biophys. Acta* **63**, 346-348.
- 18) Pashley, D. H., Claycomb, C. K. and Summors, G. W. (1966): Liberation of hydroxyproline from gelatin by acid hydrolysis. *Anal. Chem.* **15**, 154-156.
- 19) Neuman, R. E. and Logan, M. A. (1950): The determination of hydroxyproline. *J. Biol. Chem.* **184**, 299-306.
- 20) Dische, Z. (1947): A new specific color reaction of hexuronic acids. *J. Biol. Chem.* **167**, 189-198.
- 21) Boas, N. F. (1953): Method for the determination of hexosamines in tissue. *J. Biol. Chem.* **204**, 553-563.
- 22) 泉 邦彦 (1960): アミノ糖の分離定量法, 蛋白質, 核酸, 酵素 **5**, 555-558. 昭35.
- 23) Dodgeson, K. S. and Spencer, B. (1953): Studies on sulphatases. 5 The determination of inorganic sulfate in the study of sulphatases. *Biochem. J.* **55**, 436-440.
- 24) Stoffin, P. H. and Jeanloz, R. W. (1954): Identification of amino sugars by paper chromatography. *Arch. Biochem.* **52**, 373-379.
- 25) 小川恕人 (1966): セルロースアセテート膜電気泳動法臨床病理, 臨時増刊, 特集第11号 46-63 昭41.
- 26) Silbert, J. E. (1964): Incorporation of ^{14}C and ^3H from labelled nucleotide sugars into a polysaccharide in the presence of a cell-free preparation from cartilage. *J. Biol. Chem.* **239**, 1310-1315.
- 27) 木村 篤, 渡辺禎子, 長井 靖 (1964): プタ胃ムチン中の酸性ムコ多糖体に関する研究 (I), 生化学 **36**, 460-466, 昭39
- 28) Jeanloz, R. W. and Forchilli, E. (1950): Studies on hyaluronic acid and related substances. *J. Biol. Chem.* **186**, 495-511.
- 29) 幸塚悠一 (1964): 角膜多糖類の分離と同定 (I) 日眼紀, **15**, 323-331 昭39.
- 30) 木村 篤, 渡辺禎子, 長井 靖, 鶴見膠一 (1965): プタ胃ムチン中の酸性ムコ多糖体に関する研究 (II) 生化学 **37**, 419-424 昭40
- 31) Szabo, M. M. and Roboz-Einstein, E. (1962): Acidic polysaccharides in the central nervous system. *Arch. Biochem. Biophys.* **98**, 406-412.
- 32) Hoffman, P., Linker, A. and Meyer, K. (1958): The acid mucopolysaccharides of connective tissue. III The sulfate linkage. *Biochim. Biophys. Acta* **30**, 184-185.
- 33) Mathews, M. B. (1958): Isomeric chondroitin sulfates. *Nature*, **181**, 421-422.
- 34) Schiller, S. (1959): Mucopolysaccharides of estrogen stimulated chick oviduct. *Biochim. Biophys. Acta* **32**, 315-319.
- 35) Tanaka, Y. (1963): Studies on the pathological

- change of acidic polysaccharides. Part I Changes of acidic polysaccharides in experimental liver cirrhosis of rat. *Kurume Med. J.* **10**, 112-129.
- 36) Loewi, G. (1961): The acid mucopolysaccharides of human skin. *Biochim. Biophys. Acta* **52**, 435-440.
 - 37) Clausen, B. (1963): Influence of age on chondroitin sulfates and collagen of human aorta, myocardium and skin. *Lab. Invest.* **12**, 538-542.
 - 38) Delauney, A. and Basin, S. (1964): Mucopolysaccharides, collagen and non fibrillar proteins in inflammation. in *International review of connective tissue research* (Hall, D. A., editor). Academic Press, New York, Vol. 2, 301-325.
 - 39) Korn, E. D. (1959): The isolation of heparin from mouse mast cell tumor. *J. Biol. Chem.* **234**, 1325-1329.
 - 40) Gardell, S. (1957): Separation of mucopolysaccharides on a cellulose column. *Acta Chem. Scand.* **11**, 668-675.
 - 41) Antonopoulos, C. A., Borelius, E., Gardell, S., Hamnstrom, B. and Scott J. E. (1961): The precipitation of polyanions by long-chain aliphatic ammonium compounds. IV Elution in salt solution of mucopolysaccharide-quaternary ammonium complexes absorbed on a support. *Biochim. Biophys. Acta* **54**, 213-226.
 - 42) Schiller, S., Mathews, M. B., Jefferson, H., Ludwig, J. and Dorfman, A. (1954): The metabolism of mucopolysaccharides in animals. I Isolation from skin. *J. Biol. Chem.* **211**, 717-724.
 - 43) Ringertz, N. R. and Reichard, P. (1960): Chromatography on Ecteola of sulfate containing mucopolysaccharides. *Acta Chem. Scand.* **14**, 303-311.
 - 44) Mathews, M. B. (1959): Macromolecular properties of isomeric chondroitin sulfates. *Biochim. Biophys. Acta* **35**, 9-17.
 - 45) 佐野 豊 (1965): 組織学研究法, 南山堂, 東京, 459-467 昭40.
 - 46) 森 昌彦 (1956): 歯肉の炭水化物に関する組織学的研究. *口科誌* **5**, 14-23 昭31
 - 47) Stahl, S. S., Sandler, H. C. and Suben, E. (1958): Histochemical changes in inflammatory periodontal disease. *J. Periodont.* **29**, 183-191.
 - 48) 渡辺文磨 (1959): 歯周組織疾患の病理組織学的ならびに組織化学的研究, *口外会誌* **5**, 241-251, 昭34.
 - 49) Quintarelli, G. (1960): Histochemistry of gingiva. Preliminary investigations of the mucopolysaccharides of connective tissue. *Arch. Oral Biol.* **2**, 277-284.
 - 50) 秋吉正豊 (1962): 歯周組織の構造と病理, 医歯薬出版, 東京, 90-134, 昭37
 - 51) 吉川政巳 (1964): 老化と結合組織, *代謝* **1**, 501-505, 昭39.
 - 52) Loewi, G. and Meyer, K. (1958): The acid mucopolysaccharides of embryonic skin. *Biochim. Biophys. Acta* **27**, 453-456.