

ヒト歯肉スライスにおけるコラーゲン合成

I プロリンのヒドロキシル化*

高橋 徳也 野原 広美

新潟大学歯学部口腔生化学教室 (主任 野原広美教授)

原 耕二 小林 幸男

新潟大学歯学部歯科保存学第二教室 (主任 小林幸男教授)

(昭和47年11月26日受付)

Collagen Biosynthesis in Human Gingival Slices

I. Hydroxylation of Proline

Tokuya TAKAHASHI & Hiroyoshi NOHARA

*Department of Oral Biochemistry, Niigata University School of Dentistry
(Director: Prof. Hiroyoshi Nohara)*

Kohji HARA & Sachio KOBAYASHI

*Department of 2nd Conservative Dentistry, Niigata University School of Dentistry
(Director: Prof. Sachio Kobayashi)*

緒 論

1950年 Klemperer による Collagen diseases 概念¹⁾の確立以来、広義の結合組織の病変が注目を集めて来ている。周知のように、いわゆる結合組織はその内容を大きく細胞成分、基質、線維成分(コラーゲン)の三つに分けて考えられている。それぞれについて形態学的、化学的ないしは物理化学的研究が広く行なわれている。

特にコラーゲンについては、体たん白質の一種として最もその量が多いこと、特異な化学組成を持つことなどから、その構造や代謝に関する研究は数多く、腱、皮ふ²⁾、骨³⁾などの健康組織をはじめとして、granuloma⁴⁾あるいは、いくつかの

遺伝性疾患⁵⁾⁶⁾、老化現象、肝臓の硬化⁷⁾などについて行なわれている。

従来、健康な成熟組織では、そのコラーゲン代謝は、きわめて速度の遅いものとされている。しかしながら炎症性浸潤細胞⁸⁾による結合組織の破壊が見られるところでは、その修復機構の一つとして、コラーゲン合成が比較的活発に行なわれていることが考えられる。外界異物との強度の接触が常におこなわれ、恒常的に炎症像の見られる歯肉⁹⁻¹²⁾もその一例と考えられた。

Claycomb ら⁶⁾はダウン症候群患者歯肉スライスのインキュベーションによって、そこではコラーゲン合成のレベルが特に高いことを認め、歯肉コラーゲン代謝と遺伝病との関連を示唆した。著

*本論文の要旨はその一部を新潟歯学会昭和47年度第2回例会において発表した。

表1 インキュベーション緩衝液組成

Total volume 5 ml/g wet weight tissue			
1. Krebs-Ringer phosphate buffer			pH 7.4
2. Glucose			0.02 M
3. Amino acids			
L-Leu	0.76 mM	L-Arg	0.95 mM
L-Ileu	0.38	L-Lys	1.1
L-Val	0.85	L-Tyr	0.22
L-Met	0.13	L-pro	1.0
L-Thr	0.84		
4. Penicillin G			0.1 mg/ml
Streptomycin			0.1 mg/ml
5. ³ H-L-Proline (G) (740 Ci/mole)			0.2 mCi/ml
³ H-L-Proline final specific activity			157 μ Ci/ μ mole

混液は、歯肉スライスを入れた後、5%の二酸化炭素を含む酸素を10分間通気し、37°Cで1分間100サイクルの振盪インキュベーションを一定時間行った。

者らは臨床的に切除された歯肉のスライスをもちい、³H-プロリンのヒドロキシプロリンへの転換を目安として、成熟ヒト歯肉スライスにおいて、コラーゲン合成がどのように進行するか、また、それに、いくつかの因子がどの程度の影響を与えるかについて調べた。

研究材料と方法

歯肉は新潟大学歯学部付属病院保存科を受診した外来患者から歯周病治療のため切除したものをもちいた。L-Proline-³H(G)はThe Radiochemical Centre, Amersham社製で、放射能比活性、740 mCi/m mol, 純度98% (ペーパークロマトグラフィーによる)のものを使用した。アミノ酸は協和醸酵工業社製、 α, α' -Dipyridylは和光純薬工業社製特級、珪酸はMerck社製のものをもちいた。

切除歯肉片は湿重量で約50~100 mg, これを切除後、直ちに生理食塩水で洗って血液を除き、低温室中(4°C)で手早くかみそりの刃で厚さ約0.5 mmのスライスにした。この際、スライサーは使用しなかった。次いで、スライスは秤量し、mg当り1 μ Ciの³H-プロリンと共に小三角フラスコ中の表1に示すような緩衝液^{13,4)}に入れ、二酸化炭素を5%含む酸素を10分間通気した後、密栓し、37

°Cで振盪インキュベーションをおこなった。三角フラスコは、酸素と歯肉スライスとの接触面積を広くするために、5~10 ml容積のものを使用した。同じ目的のために、振盪は一分間、100サイクルでおこなった。一定時間のインキュベーション後、混液は冷却し、遠心によって上清を除き、歯肉スライスを集めた。

次いで低温室中で、二倍量の海砂とともに、小乳鉢をもちいて、歯肉を均質なペースト状になるまで充分磨砕した後、Nimni, Bavettaらの方法¹⁴⁾によって、歯肉コラーゲンを次のようにして、三種の分画に逐次、抽出した。まづ、100 mg歯肉当り3.0 mlの5 mM EDTA*を含む0.5 M NaCl pH 7.4で磨砕歯肉を遠心管に注意深く洗いこみ、これを一晚低温室において、適時振盪混和し、遠心(14,350 $\times g$, 10分間)して、淡赤色の上清を得る。次いで上記の半量のNaCl液で二回、同様に操作して上清を得る。これらを最初の上清と合せてNaCl可溶性コラーゲン分画とする。更に上と同様にして0.5 M Na-Citrate (クエン酸ソーダ) pH 3.6をもちいて抽出を行い、Citrate可溶性コラーゲン分画を得た。これらの可溶性コラーゲンを抽出した後の沈渣に歯肉100 mg当り3.0 mlの0.3 M トリクロール酢酸(TCA)を加え、90°Cで30分間加熱したのち冷却し、遠心を行って上清

*Ethylenediaminetetraacetate

を得た。更に上記の半量の TCA で二回同様に操作して得られた上清を合せ、これを TCA 分画又は不可溶性コラーゲン分画とした。このようにして抽出した三種のコラーゲン分画は透析膜 (Visking tube) に入れ、流水及び脱イオン水に対し、充分透析した後、一部はそのまま、残余はロータリーエバポレーターを用いて、濃縮し、封管して、6 N 塩酸 2 ml 中で、110°C, 18時間加水分解を行った。

加水分解物中の ^3H -ヒドロキシプロリンの放射能比活性は、Juva と Prockop らの方法¹⁵⁾ に従い、珪酸カラム法で測定した。これは中和した加水分解物をクロラミンTで処理し、ヒドロキシプロリンをピロールにし、これをトルエンを流動相とする珪酸カラムクロマトグラフィーで分離する方法である。カラムの大きさは、約直径 1.5 × 長さ 2.5 cm であった。ヒドロキシプロリンは、Kivirikko らの方法¹⁶⁾ で定量した。たん白質定量は、精製された市販のウシ血清アルブミンを標準として、Lowry らの方法¹⁷⁾ で行った。トリチウム放射能は Packard 社製液体シンチレーションスペクトロメーター 3320型で測定した。使用したシンチレーターは二種あり、それぞれ次のような組成を持ち、測定効率を示した。

トルエンシンチレーターは ^3H -ピロールを、また、ジオキサンシンチレーターは ^3H -たん白質を測定するのに使用した。

1. トルエンシンチレーター

PPO(2,5-Diphenyloxazole).....	2 % w/v
Dimethyl POPOP (1,4-bis-2-(4-Methyl-5-phenyloxazolyl)-Benzene).....	0.0007 % w/v
Toluene	
測定効率	45~57%

2. ジオキサンシンチレーター

PPO.....	0.4 % w/v
Dimethyl POPOP.....	0.01 % w/v
Naphthalene.....	5 % w/v
Dioxane (dist. *).....	75 % v/v
Toluene (dist.).....	20 % v/v
Methanol (G. R. **).....	5 % v/v
測定効率	42~43%

*蒸留ずみ, **特級

結 果

1) インキュベーション時間にもなうプロリンのヒドロキシル化の進行 (実験 1)

同一患者の切除歯肉を前述のようにスライス化し、これらスライスを量的にも質的にもなるべく均等になるように注意しながら、三群に分け、二群をそれぞれ2時間、6時間のインキュベーションを行い、残った一群は全くインキュベーションを行なわなかった。これらの群の各々のコラーゲンヒドロキシプロリンの放射能比活性は図1に実線で示すようである。図1に示すように NaCl 分画, Citrate 分画, TCA分画におけるプロリンのヒドロキシル化の進行が異なることが明らかである。NaCl 分画でもっとも多く、しかも早くヒドロキシル化が行なわれる。しかし、ほぼ、2-3時間で上昇が止る。Citrate 分画では NaCl 分画と、ほぼ同じ挙動をとる。TCA 分画では、前二者と異なり、より少なく、しかし6時間後に到るまで、ほぼ一定の速度でヒドロキシル化が進むように見える。

また、一方、充分透析した後の NaCl 分画中の全たん白質の ^3H -比活性の時間による変化は図1の点線で示すようである。比活性は2時間後ではインキュベーションを行なわなかったものの、ほぼ30倍、さらに6時間後まで、ほぼ直線的に100倍に増加して、更に上昇する傾向を示している。同

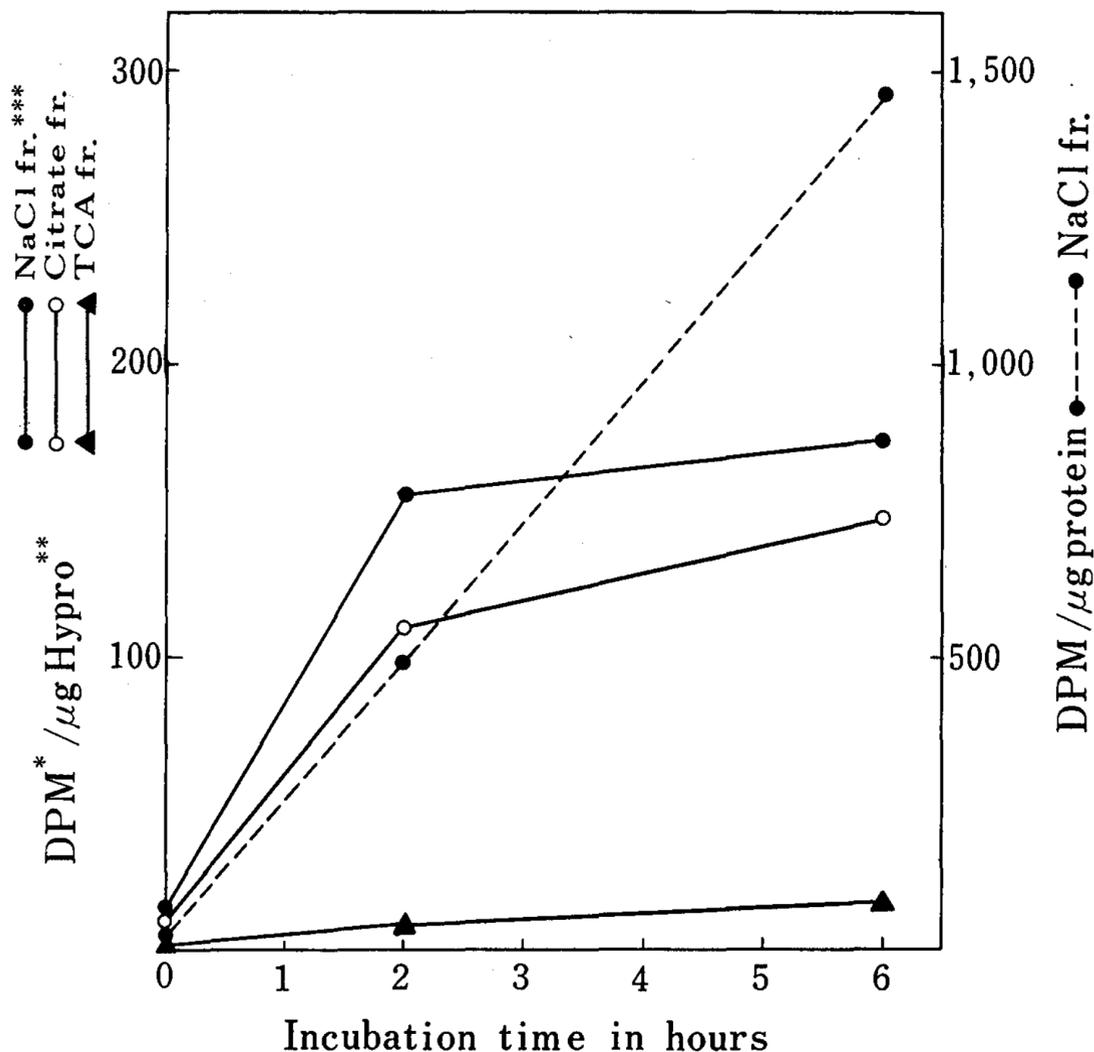


図1 プロリンのヒドロキシル化の時間的経過 (実験1)

*Decay per minute **Hydroxyproline ***fraction

インキュベーション条件は表1と同じ。

じ図1中の、NaCl分画のプロリンのヒドロキシル化の進行とは、その挙動を別に行っていることが明らかである。

2) Chase Experiment (実験2及び3)

一度たん白質に取り込まれた³H-プロリンまたはヒドロキシル化された³H-プロリンが一定時間を経過すると、NaCl, Citrate, TCAの三種のコラーゲン分画間でどのように移動するかを知る目的で、いわゆるChase experiment (追い出し実験)を行った。実験2では第一のスライス群を6時間、第二群を1時間インキュベートした。第三群は同様に1時間インキュベートした後、振盪を中止し、混液を一旦遠心して、上清をのぞき、集めた歯肉スライスに、あたらしく、³H-プロリンを含まないインキュベーション緩衝液を最初の10倍量加えて、酸素通気を10分間行った後、更にインキュベーションを5時間続けた。実験3では

第一のスライス群を2時間、第二群を6時間インキュベーションを行い、第三群は2時間後にインキュベーションを一旦止め、実験2と同様の操作を行って、更にインキュベーションを4時間続けた。実験2及び実験3の結果は表2に示す。mg歯肉当りのヒドロキシプロリン量から推定される各分画の抽出コラーゲン量は、インキュベーション条件が相違しても、ほぼ一定の値を示している。プロリンのヒドロキシル化は、NaCl分画では1時間後から6時間後に到る間に上昇が顕著である(実験2)。しかし、2時間後から6時間後に到る間は、上昇はわづかか(実験1, 図1)、ないしは、やや低下している(実験3)。また、NaCl分画のヒドロキシプロリンのChase experimentによる比活性の低下は著明ではない(実験3)。一方、Citrate分画については、実験1, 2及び3でインキュベーション2時間前後でヒドロキシル化の進行は、ほぼplateauに達することが見られ

表 2 Chase experiments

Exp. 2 Incubation		1 hr.*	6 hr.	1 hr., chase 5 hr.
³ H-Hydroxyproline specific activity DPM/ μ g Hypro	NaCl fr.	13.1 (526)	72.5 (1790)	23.2 (426)
	Citrate fr.	60.5 (920)	47.1 (2260)	13.0 (638)
	TCA fr.	2.75(88.5)	5.30(129)	1.82(47.4)
Hydroxyproline content μ g/mg tissue	NaCl fr.	1.82	2.02	1.72
	Citrate fr.	0.38	0.46	0.47
	TCA fr.	7.69	7.27	8.22
Exp. 3 Incubation		2 hr.	6 hr.	2 hr., chase 4hr.
³ H-Hydroxyproline specific activity DPM/ μ g Hypro	NaCl fr.	22.7 (576)	19.1 (1240)	11.8 (384)
	Citrate fr.	4.6 (293)	3.72 (694)	1.5 (344)
	TCA fr.	1.87(83.5)	5.02 (345)	1.83(73.6)
Hydroxyproline content μ g/mg tissue	NaCl fr.	1.58	1.86	1.95
	Citrate fr.	—	0.52	0.46
	TCA fr.	7.58	7.00	7.25

(): ³H-protein specific activity, DPM/ μ g protein. *Hour.

インキュベーション条件は表1と同じ。その他の詳細は結果の項を参照。

表 3 α, α' -Dipyridyl (1 mM) による阻害効果

Exp. 4 Incubation		6 hr.	6 hr. with α, α' -dipyridyl	Inhibition %
³ H-Hydroxyproline specific activity DPM/ μ g Hypro	NaCl fr.	325	17.7	95
	Citrate fr.	—	14.6	—
	TCA fr.	11.6	0.9	93
³ H-protein specific activity DPM/ μ g protein	NaCl fr.	1960	683	65
	Citrate fr.	1890	577	69
	TCA fr.	236	134	43

インキュベーション条件は表1と同じ。その他の詳細は結果の項を参照。

た。但し、NaCl 分画と異なる点は、Chase experiment において、比活性の低下が著明なことである。最後に、TCA 分画においては、プロリンのヒドロキシル化は6時間後に到る間、ほぼ一定の速度で進行しつづける傾向を示している(実験1, 図1)。Chase experiment における比活性の低下は、ほとんど見られない(実験2及び3)。

3) α, α' -Dipyridyl によるヒドロキシル化の抑制(実験4)

プロリンのヒドロキシル化を、それに必要な2価の鉄イオンとキレート化合物を作って抑制することの知られている、 α, α' -Dipyridyl¹⁸⁾を終濃

度1 mM で用いた結果を表3に示す。表3に示すように、ヒドロキシプロリンの比活性上昇は、たん白質全体の比活性上昇にくらべ、はるかに強く抑制されることが見られる。すなわち、NaCl 分画では抑制剤をもちいると、たん白質全体への³H-プロリンの取り込みは、もちいない場合にくらべ、約 $\frac{1}{3}$ に低下するが、一方ヒドロキシプロリンの比活性は抑制剤をもちいない場合の $\frac{1}{20}$ に低下する。

4) 酸素通気の有無による変化(実験5)

インキュベーションを行う直前の酸素通気を行なわなかった場合、それが、プロリンのヒドロキ

表4 酸素不足による阻害効果

Exp. 5 Incubation		none	6 hr. with aeration	6 hr. without aeration	Inhibition %
³ H-Hydroxyproline specific activity DPM/ μ g Hypro	NaCl fr.	7.2	164	56.6	68
	Citrate fr.	36.3	124	110	13
	TCA fr.	2.2	30.3	21.6	31
³ H-protein specific activity DPM/ μ g protein	NaCl fr.	19.6	1210	478	63
	Citrate fr.	52.0	468	308	38
	TCA fr.	17.2	613	365	41

酸素通気以外のインキュベーション条件は表1と同じ。その他詳細は結果の項を参照。

表5 抽出ヒドロキシプロリン量及び全たん白質量に及ぼすインキュベーションの影響

Incubation		None	6 hr.
Hydroxyproline μ g/mg tissue	NaCl fr.	1.77	1.78
	Citrate fr.	0.19	0.31
	TCA fr.	4.94	4.50
Protein μ g/mg tissue	NaCl fr.	30.5	16.6
	Citrate fr.	0.43	0.31
	TCA fr.	14.1	12.4
Hypro/Protein %	NaCl fr.	5.8	10.7
	Citrate fr.	44.2	100
	TCA fr.	35.3	36.3

インキュベーション条件は表1と同じ。抽出方法は材料と方法の項参照。

シル化, 及びたん白質全体への³H-プロリンの取り込みにどのような影響を与えるかを表4に示した。プロリンのヒドロキシル化とたん白質全体への³H-プロリンの取り込みは, NaCl分画, TCA分画では, ほぼ同程度に阻害されている。

5) コラーゲン三分画に抽出されたヒドロキシプロリン量及び全たん白質量

既に著者等が報告したように¹⁹⁾, 本抽出方法によって歯肉中のヒドロキシプロリンは, ほぼ, 定量的に抽出されている。コラーゲン三分画中のヒドロキシプロリン及びたん白質全体の抽出量は, インキュベーションによって, いくらかの変動を示す。その一例を表5に示す。表5に見るようにヒドロキシプロリンの抽出量はインキュベーションの有無にかかわらず, ほぼ一定であるが, 一方, たん白質全体の抽出量はインキュベーションによって減少し, 可溶性分画, 特に NaCl 分画にお

いて著しく, 6時間のインキュベーションによって抽出全たん白質量は半減している。

考 按

たん白質合成の機構に関しては, 分子生物学の中心的課題の一つとして数多くの研究が行なわれている。アミノ酸レベルからのコラーゲンペプチドの合成には, たん白質一般の合成と同じように, リボゾーム, メッセンジャーRNA, 転移RNA, その他の諸因子等の関与があつて行なわれるものと考えられるが, コラーゲンの場合, その分子の完成は更に, いくつかの特徴的な機序を経ておこなわれることが知られている。すなわち,

1. いわゆる Protocollagen²⁰⁾ の Hydroxylation
 2. Glycosylation²¹⁾
 3. 三重ラセン構造の形成²²⁾
- などである。多くのコラーゲン合成に関する研究

では上記の第一の機序, すなわちヒドロキシル化(多くの場合プロリンのヒドロキシル化)を追求することによって, コラーゲンの合成を推定している。本研究においても, 放射性プロリンをもちい, その一定時間内でのヒドロキシル化の進行をヒドロキシプロリンの放射能比活性の上昇としてとらえ, コラーゲン合成の進行を推定している。

実験1ではインキュベーション時間を追ってプロリンのヒドロキシル化とたん白質全体への³H-プロリンの取り込みの過程を比較しているが, ヒト歯肉中では, この二つの過程が明らかに, その時間的挙動を異にすること, 更に抑制剤, α, α' -Dipyridyl をもちいた実験4によって, プロリンのヒドロキシル化の過程は, たん白質全体の合成とは異なる機作をその中に含むことが確められた。

次に, Chase experiment (実験2及び3)の結果を見ると, Chase (追い出し)による放射能比活性の低下は, たん白質全体では著明ではない(表2)。これに反し, ヒドロキシプロリンの比活性のChaseによる低下は, とくにCitrate分画において著明であり, また, この低下は, 2時間ラベルをして4時間Chaseをした実験3よりも, 1時間ラベルをして5時間Chaseをした実験2に於いて, より顕著であった。これらのことは, Citrate分画中の³H-ヒドロキシプロリンは遷移性(transient)であり, 他のコラーゲン分画(おそらくTCA分画)へ移行することを示唆するものと思われる^{7), 23)}。

一方, TCA分画ではChaseによるヒドロキシプロリンの比活性の低下はほとんど見られない。これはTCA分画がコラーゲンとして成熟し, 不可溶化したものからなること²⁴⁾から当然予想されるところである。

プロリンのヒドロキシル化を同様に *in vitro* で追求した他の研究結果と比較して見ると, 成長期の白ネズミの minced skin をもちいて, Tsurufujiら²⁾が得た結果では中性塩溶液(1.0M NaCl)可溶性コラーゲン分画ではヒドロキシル化は, 8時間あまり進行しつづけていると言う点で, 歯肉スライスにおける場合と異っている。また, 同研

究では, 酸(0.5M 酢酸)可溶性コラーゲン分画では, Chase experimentによって, 早期の明らかな, ヒドロキシプロリンの比活性低下を示し, 歯肉スライスにおけるCitrate可溶性分画と類似の挙動を示している。更に, Rojkindら⁷⁾が四塩化炭素によって, 実験的にひき起した硬化症のネズミ肝スライスをもちいた実験では, 3時間までのインキュベーションで, TCA分画コラーゲンのヒドロキシプロリン比活性は, 本研究の結果と同様に, ほぼ一定の速度で上昇している。しかし, 中性塩溶液(Ringer-NaHCO₃ Buffer)可溶性コラーゲンはインキュベーション1時間後まで上昇してから, かなり急速に低下し, 3時間後では, すでに, 1時間値のほぼ $\frac{1}{4}$ になっている。

以上のことから, インキュベーションによって歯肉スライスに取り込まれたプロリンのヒドロキシル化は, 可溶性コラーゲン分画中では2-3時間, 急速に進行して, plateauに達すること, ヒドロキシル化されたプロリンは更に, 不可溶性のTCA分画へ移行することが推定される。可溶性分画の中でも, Citrate分画はヒドロキシプロリン量そのものが, 少いこともあって, この分画中にヒドロキシル化されたプロリンのとどまる時間は特に短いことが考えられる。一方, NaCl分画でヒドロキシプロリンの比活性の低下がChaseによって著明でないことについては, Citrate分画に比し, ヒドロキシプロリン量がNaCl分画で多いことが, その説明の一つとして考えられる。

次に, インキュベーション直前の酸素通気を, 行なわなかった実験5では酸素不足の状態では, たん白質全体への³H-プロリンの取り込み, 及び³H-プロリンのヒドロキシル化は表4に見るように, ほぼ同程度阻害されている²⁵⁾。このことからプロリンのヒドロキシル化は, 歯肉スライスでは特に高い酸素分圧を必要とする反応ではないことが間接的に推定される。

最後に, 表5に示すように, コラーゲンの抽出は, そのヒドロキシプロリン量から推定して, インキュベーションの継続によって, その総量及び各分画間の量比には大きな変化は見られない。し

かし, NaCl 分画に抽出されるたん白質全体の量は, インキュベーションによって明らかに減少する。これはインキュベーション緩衝液中へ, 特に可溶化しやすい非コラーゲン性のたん白質が失なわれるためと考えられる。

総 括

臨床的に切除されたヒト歯肉スライスにおけるコラーゲン生合成を ^3H -プロリン ($1 \mu\text{Ci}/\text{mg}$ 歯肉) をもちいて, そのヒドロキシル化を目安として調べた。歯肉コラーゲンは可溶性分画 (NaCl 分画, Citrate 分画) および不可溶性分画 (トリクロール酢酸分画) に分けた。

プロリンのヒドロキシル化は, 可溶性分画ではインキュベーション 2-3 時間で進行が止り, 不可溶性分画では, より長い時間進行することが認められた。Citrate 分画のヒドロキシプロリンの遷移性を示唆する, ^3H -ヒドロキシプロリンの著明な比活性低下が, Chase experiment によって認められた。プロリンのヒドロキシル化は酸素不足の状態では, たん白質全体の合成と同程度に, また, キレート剤 α, α' -Dipyridyl によっては, はるかに顕著に阻害されることが認められた。

謝 辞

本研究を行うに際して, 種々御便宜をおはかりいただいた, 本学口腔生化学教室員各位, 並びに歯科保存学第 2 教室員各位, 特に高野恵美子薬学士, また, 放射性同位元素中央研究室室長, 清水泰二教授に深謝いたします。更に併せて東京大学薬学部生理化学教室鶴藤丞博士のご助言をいただいたことを感謝致します。

参 考 文 献

- 1) Klemperer, P.: The concept of collagen diseases. *Am. J. Path.*, **26**: 505-519, 1950.
- 2) 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.
- 3) Vuust, J. and Piez, K. A.: A kinetic study of collagen biosynthesis. *J. Biol. Chem.*, **247**: 856-862, 1972.
- 4) Green, N. M. and Lowther, D. A.: Formation of collagen hydroxyproline *in vitro*. *Biochem. J.*, **71**: 55-66, 1959.
- 5) Laitinen, O., Uitto, J., Iivanainen, M., Hanuksela, M. and Kivirikko, K. I.: Collagen metabolism of the skin in Marfan's syndrome. *Clin. Chim. Acta*, **21**: 321-326, 1968.
- 6) Claycomb, C. K., Summers, G. W., Hall, W. B. and Hart, R. W.: Gingival collagen biosynthesis in mongolism. *J. Periodont. Res.*, **5**: 30-35, 1970.
- 7) Rojkind, M. and Diaz de León, L.: Collagen biosynthesis in cirrhotic rat liver slices. A regulatory mechanism. *Biochim. Biophys. Acta*, **217**: 512-522, 1970.
- 8) Lazarus, G. S., Brown, R. S., Daniels, J. R. and Fullmer, H. M.: Human granulocyte collagenase. *Science*, **159**: 1483-1485, 1968.
- 9) Grant, D. A., Stern, I. B. and Everett, F. G.: Orban's periodontics. 3rd ed., p. 147-194, C. V. Mosby Co., Saint Louis, 1968.
- 10) Goldman, H. M. and Cohen, D. W.: Periodontal therapy. 4th ed., p. 110-166, C. V. Mosby Co., Saint Louis, 1968.
- 11) 秋吉正豊: 歯周組織の構造と病理. 135-264頁, 医歯薬出版, 東京, 1968.
- 12) 今川与曹, 石川 純: 臨床歯周病学. 50-61頁, 医歯薬出版, 東京, 1968.
- 13) Krebs, H. A. und Henseleit, K.: Untersuchungen über die Harnstoffbildung im Tierkörper. *Z. Phys. Chemie*, **210**: 33-66, 1932.
- 14) Nimni, M. E. and Bavetta, L. A.: Collagen defect induced by penicillamine. *Science*, **150**: 905-907, 1965.
- 15) Juva, K. and Prockop, D. J.: Modified procedure for the assay of H^3 - or C^{14} -labeled hydroxyproline. *Anal. Biochem.*, **15**: 77-83, 1966.
- 16) Kivirikko, K. I., Laitinen, O. and Prockop,

- D. J.: Modifications of a specific assay for Hydroxyproline in urine. *Anal. Biochem.*, **19**: 249-255, 1967.
- 17) Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J.: Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**: 265-275, 1951.
- 18) Chvapil, M., Hurych, J., Ehrlichová, E. and Čmuchalová, B.: Effects of various chelating agents, quinones, diazoheterocyclic compounds and other substances on proline hydroxylation and synthesis of collagenous and non-collagenous proteins. *Biochim. Biophys. Acta*, **140**: 339-348, 1967.
- 19) 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.
- 20) Gould, B. S.: Collagen Biosynthesis at the Ribosomal Level. In *International Review of Connective Tissue Research*, ed. Hall, D. A. Vol. 4, p. 52-54, Academic Press, New York and London, 1968.
- 21) Bosmann, H. B. and Eylar, E. H.: Attachment of carbohydrate to collagen. Isolation, purification and properties of glucosyl transferase. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **30**: 89-94, 1968.
- 22) Speakman, P. T.: Proposed mechanism for the biological assembly of collagen triple helix. *Nature*, **229**: 241-243, 1971.
- 23) Jackson, D. S.: Connective tissue growth stimulated by carrageenin. 1. The formation and removal of collagen. *Biochem. J.*, **65**: 277-284, 1957.
- 24) Fitch, S. M., Harkness, M. L. R. and Harkness, R. D.: Extraction of collagen from tissues. *Nature*, **176**: 163, 1955.
- 25) Chvapil, M. and Hurych, J.: Control of Collagen Biosynthesis. In *International Review of Connective Tissue Research*, ed. Hall, D. A. Vol. 4, p. 167-168, Academic Press, New York and London, 1968.