

歯周疾患とその病態について*

I 歯肉コラーゲンの代謝

原 耕 二 小 林 幸 男

新潟大学歯学部歯科保存学第2教室 (主任: 小林幸男教授)

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)

(昭和46年10月5日受付)

Periodontal Diseases and Their Dynamic Significance

I. Gingival collagen metabolism in advanced periodontal disease (Periodontosis)

Kohji HARA & Sachio KOBAYASHI

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

Tokuya TAKAHASHI & Hiroyoshi NOHARA

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

緒 論

1949年アメリカ歯周病学会用語委員会は、“歯周症”を次の様に定義している。

歯周症とは、歯周組織の一部に原発性、非炎症性の変性ないし破壊が起こってくる疾患で、臨床的には、まず歯の移動が起こり、続いて歯の弛緩動揺が現われるが、歯肉の炎症々状や歯周ポケットの形成はないか、あってもごく少ない。次いで二次的に炎症を併発し、歯周組織全体の破壊を起こすという様にまとめられている。

Orbanら¹⁾によれば、歯周症は歯周組織が非炎症性の変化を起こしている期間は短いため、臨床的にはほとんどの場合に炎症と、深く速やかに形成される歯周ポケットと、高度の歯槽骨の吸収などによって現わされる複合性歯周炎 (Periodon-

titis complex) を示すといわれる。

若年者に見られる蒙古人様白痴²⁻⁵⁾、掌蹠角化症⁷⁻¹²⁾、周期性好中球減少症^{13,14)} (cyclic neutropenia)、先端疼痛症¹⁵⁾ (Acrodynia)、無カタラーゼ症¹⁶⁾、低ホスファターゼ症^{17,18)} (Hypophosphatasia)、糖尿病¹⁹⁾、ガルゴイリズム^{20,21)} (Gargoylism)などに併発する高度の歯周組織の破壊発生には、これら全身疾患が関与していることは明らかであり歯周症とは異なった鑑別が可能である。

Butler²²⁾、Baer²³⁾らは、全身疾患を持たない健康体の歯周症罹患者について血液検査、尿検査や糖負荷試験を行ない、いずれも異常所見が見られなかったと報告している。

一方、歯周症罹患者の血中クエン酸濃度並びにクエン酸負荷試験で尿中クエン酸濃度が高いこと

* 本論文の要旨は新潟歯学会昭和46年度第2回例会ならびに第14回日本歯周病学会総会において発表した。

を示した常光らの研究²⁴⁾や歯周症罹患者の血中糖蛋白濃度は正常者より高い事を明らかにした Engel らの研究²⁵⁾はともに注目すべき研究である。

しかしながら、いままでのところ歯周症の発生の背景にある画一的な全身的因子を論ずるまでには至っておらない。

臨床的に歯周症は男女ともに見られ、青春期から30歳までの間に最も多く現われるといわれる²⁶⁾。Rao ら²⁷⁾は84名の歯周症罹患者の中、男性は2名のみで残りは圧倒的に20歳から25歳までの女性が多いと報告している。

歯周症で $\frac{2+2}{2+2}$ と $\frac{6|6}{6|6}$ に著明な歯槽骨の吸収が見られる X線写真像は、ごく一般的な辺縁性歯周炎とは異なった特徴を示している^{28,29)}。

Benjamin ら³⁰⁾は、診断上、歯周症の具備すべき条件として、1. 特徴のある垂直性歯槽骨吸収が見られる。2. 罹患は一歯に留まらない。3. 若年者に見られる。4. 全身疾患を持たない健康者が罹患するなどの点をあげている。

最近、Claycomb ら³¹⁾は歯周症様病変が高頻度に見られるモンゴリズム患者において、歯肉のコラーゲン生合成は正常者の歯肉のものとは比べて、はっきりと高い事を報告している。

今回、著者らは、“歯周症”罹患者で歯肉のコラーゲン代謝機能は、ごく一般的な辺縁性歯周炎と対比して、どの様な様相を示すか究明することにした。そのために、まず、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これら罹患歯肉中のコラーゲン合成を比較、検討した。

研究材料と方法

新潟大学歯学部付属病院保存科を訪れた外来患者のうち、X線写真像において特に $\frac{2+2}{2+2}$ ないしは $\frac{6|6}{6|6}$ に強い歯槽骨の吸収が見られ、主に咬合性外傷が原因で発生したとは考えられない垂直性吸収像がその部位に、多発している³⁰⁾10歳代から20歳代の比較的若い女性を“歯周症”罹患者と診断した。これら実験群5名について、全身の内科的一般検査および末梢血液検査、血清学的検査、尿検査並びにブドウ糖負荷試験を行なったところ、特に異常は見られず健康者であった。

対照群には、実験群とほぼ同じ年齢の女性で局所的原因で発生したと思われるごく一般的な辺縁性歯周炎罹患者4名を選んだ。

試料の採取に先立ち、被検歯肉の肉眼的炎症状態を歯肉炎指数³²⁾で評価し、歯周ポケットの深さを測定した。次いで浸潤麻酔後、最初に被検歯肉の中から任意に唇側(頰側)辺縁中央部の歯肉 biopsy を採取し、通法によりパラフィン包埋し、H-E 染色並びに Masson・Goldner 変法染色³³⁾連続切片標本を作製し、歯肉の炎症状態について顕微鏡学的観察を行なった。

次に被検部位のうち歯肉 biopsy 採取部位以外の唇側(頰側)および舌側両面から切除した歯肉について、次の方法に従って生化学的分析を行なった。

表 1

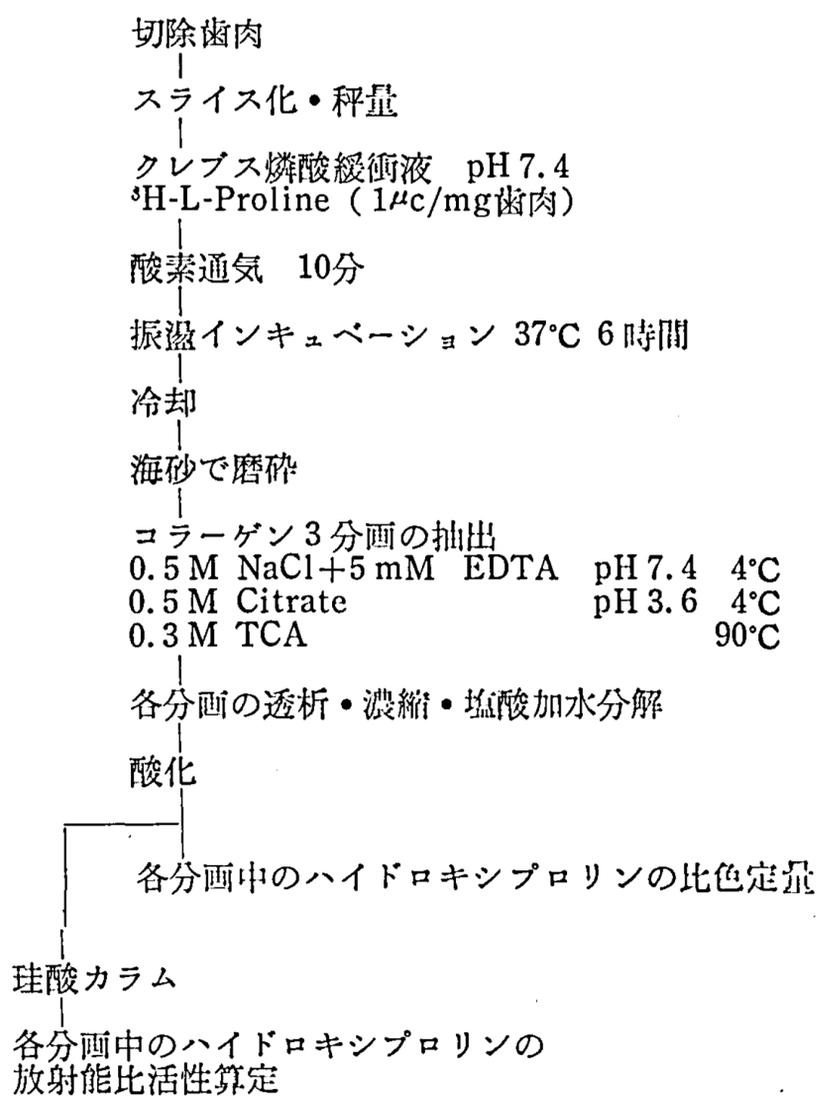


表1に示す様に切除歯肉を、低温室中で、かみそりの刃を用いて約0.5mm厚さのスライスにする。スライスを次いで秤量し、グルコース、アミノ酸混液を添加したクレブス磷酸緩衝液³⁴⁾の入ったワールブルグフラスコに入れ、更にストレプトマイシン・ペニシリン混液(各0.1 mg/ml)およびmg湿

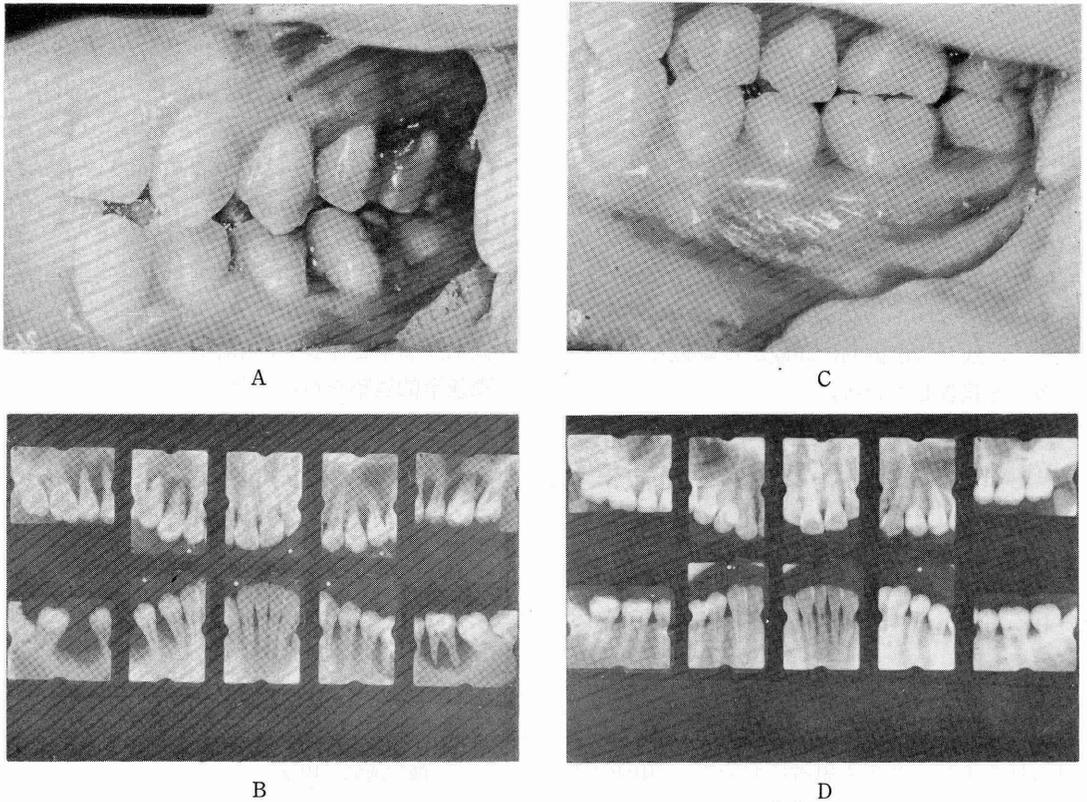


図1 被検者の口腔内写真及び全顎X線写真

- A: 歯周症罹患者の1例(15歳), 被検部位 |4-6| を示す (症例5)。
 B: AのX線写真。
 C: 軽度の辺縁性歯周炎罹患者の1例(21歳), 被検部位 |4-7| を示す (症例4)。
 D: CのX線写真。

重量歯肉当り, $1\mu\text{C}$ の $^3\text{H-L}$ -プロリンを加え, 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6時間振盪インキュベーションを行なった。インキュベーション後, フラスコを冷却し, 内容物を遠心して歯肉スライスを集める。そして, 海砂とともに歯肉を磨碎し, そこへ5mM EDTA を含む0.5M NaCl, pH 7.4を加え, 一晚低温中において, 適時混和してコラーゲンを抽出し, 遠心して上清を得た。同じことを更に2回繰返し, 得られた上清を合わせ, これをNaCl可溶性分画とする。次いで0.5M Na-Citrate, pH 3.6³⁵⁾を用い同様にして, Citrate可溶性分画を得た。これら2種の可溶性コラーゲン分画を抽出した後残余の不可溶性コラーゲン分画に, 0.3M トリク

ロール酢酸 (TCA) を加え, 90°C , 30分間加熱して可溶化し³⁶⁾, 遠心して上清を得た。これを更に2回繰返し合わせた上清を, TCA分画又は不可溶性分画とした。これら3種のコラーゲン分画を水に対して, 充分透析した後, 封管中で, 110°C , 18時間塩酸加水分解を行なった。コラーゲンの分析は加水分解物中のヒドロキシプロリンを Kivirikko らの方法³⁷⁾に従って定量した。又, ^3H -ヒドロキシプロリンの放射能比活性は, Juva と Prockop の方法³⁸⁾により, ピロール化したヒドロキシプロリンを珪酸カラムによって分離し, Packard 社製液体シンチレーションスペクトロメーター 3320型を用いて測定した。シンチレーターはトルエン中に PPO (2,5-diphenyloxazole) を

0.2% 及び Dimethyl POPOP (1,4-bis-2-(4-Methyl-5-phenyl oxazolyl)-Benzene) を0.0007% 含み, トリチウムの測定効率は45~57%であった。又, 珪酸カラムを通じたのピロール回収率は30~55%であった。尚, インキュベーションの方法, およびその後の透析, 放射能比活性の測定などの諸条件はタイム・カーブを求めるなどの予備実験を行なって検討した。

結 果

コラーゲン抽出の程度は, 組織片を直接, 加水分解して算定した全ヒドロキシプロリン量とコラーゲン3分画中のヒドロキシプロリン量の総和を比較して推定した。表2に見る様に全ヒドロキシプロリンの回収率は, 全症例において, 81~100%に達し, ほぼ, 定量的なコラーゲンの抽出

が行なわれたものと考えられる。

mg歯肉当りの全ヒドロキシプロリン量の平均値は, 表2に見る様に, 歯周症群と歯周炎群との間に差はない。又, 分画に分けた, それぞれのコラーゲン中のヒドロキシプロリン量の平均値を比較して見ても, 歯周症群と歯周炎群との間に, 統計学的に有意の差は見られなかった。しかしながら, ここで注目されるのは, 歯周症群中の2例(症例1及び5)において, NaCl 可溶性分画のヒドロキシプロリン量が特に多いことである。

歯肉コラーゲン合成の速さは, ³H-プロリンを前駆体として用い, 6時間 インキュベーション後の歯肉中の ³H-ヒドロキシプロリンの放射能比活性を測定することによって推定している。表3に見る様に, 可溶性分画の比活性は, 不可溶性分画のそれよりも, 10倍から数10倍高く, 従って可溶

表2 歯肉ヒドロキシプロリン量

		実 験 群 (歯 周 症)					
症例	年齢	全ヒドロキシ プロリン量 ($\mu\text{g}/\text{mg}$) [*]	NaCl	3分画ヒドロ キシプロリン量(%) Citrate	TCA	回 収 率 (%)	
1	15	5.9	26.9	0.9	72.2	81	
2	21	8.8	17.2	0.8	82.0	94	
3	22	7.5	6.9	0.9	92.5	100	
4	21	5.2	18.9	3.8	77.3	100	
5	15	4.1	26.7	4.5	68.8	98	
平均値と 標準偏差		6.3 \pm 1.6	19.3 \pm 7.3	2.1 \pm 1.7	78.5 \pm 8.2	94	
		対 照 群 (歯 周 炎)					
症例	年齢	全ヒドロキシ プロリン量 ($\mu\text{g}/\text{mg}$)	NaCl	3分画ヒドロ キシプロリン量(%) Citrate	TCA	回 収 率 (%)	
1	22	9.5	14.9	1.1	85.0	93	
2	27	7.8	13.4	0.4	86.2	99	
3	24	7.3	18.8	1.0	80.2	100	
4	21	7.5	7.0	2.0	91.0	100	
平均値と 標準偏差		8.0 \pm 1.0	13.5 \pm 4.3	1.2 \pm 0.5	85.6 \pm 3.8	98	

$\mu\text{g}/\text{mg}$ *; 歯肉の湿性重量当り

歯肉を2倍量の海砂とともに磨碎し, 可溶性コラーゲンは5 mM EDTA を含む0.5 M NaCl, pH7.4 及び0.5 M Na-Citrate, pH 3.6で抽出した。残余の不可溶性コラーゲンは0.3 Mトリクロール酢酸で90°Cに加熱して抽出した。

表3 ハイドロキシプロリンの放射能比活性
(DPM-³H-Hypro*/ μ g Hypro \cdot 6 hr)

実 験 群 (歯 周 症)						
症例	年齢	全ハイドロキシ プロリン比活性	3分画ハイドロキシプロリン比活性			
			NaCl	Citrate	TCA	
1	15	53.1	145	44.5	19.2	
2	21	31.3	137	42.8	9.1	
3	22	49.2	545	125	11.4	
4	21	43.8	193	13.1	8.9	
5	15	118.1	356	106	26.7	
平均値と 標準偏差		59.1 \pm 30.4	275.2 \pm 223.1	66.2 \pm 42.2	15.0 \pm 6.9	
対 照 群 (歯 周 炎)						
症例	年齢	全ハイドロキシ プロリン比活性	3分画ハイドロキシプロリン比活性			
			NaCl	Citrate	TCA	
1	22	33.2	168	25.2	9.4	
2	27	47.9	291	67.8	10.1	
3	24	22.1	87	20.0	7.1	
4	21	41.8	448	67.2	10.0	
平均値と 標準偏差		36.2 \pm 9.7	248.5 \pm 136.1	45.0 \pm 22.5	9.1 \pm 1.2	

*Hypro; ハイドロキシプロリン DPM; Decay Per Minute

切除歯肉をスライスにし、湿重量 mg あたり 1 μ c の ³H-プロリンとともにアミノ酸混液、グルコースを含むクレブス磷酸緩衝液中で6時間、インキュベーションした。³H-ハイドロキシプロリンはピロール化し、珪酸カラムを用いて分離後、放射能比活性を測定した。

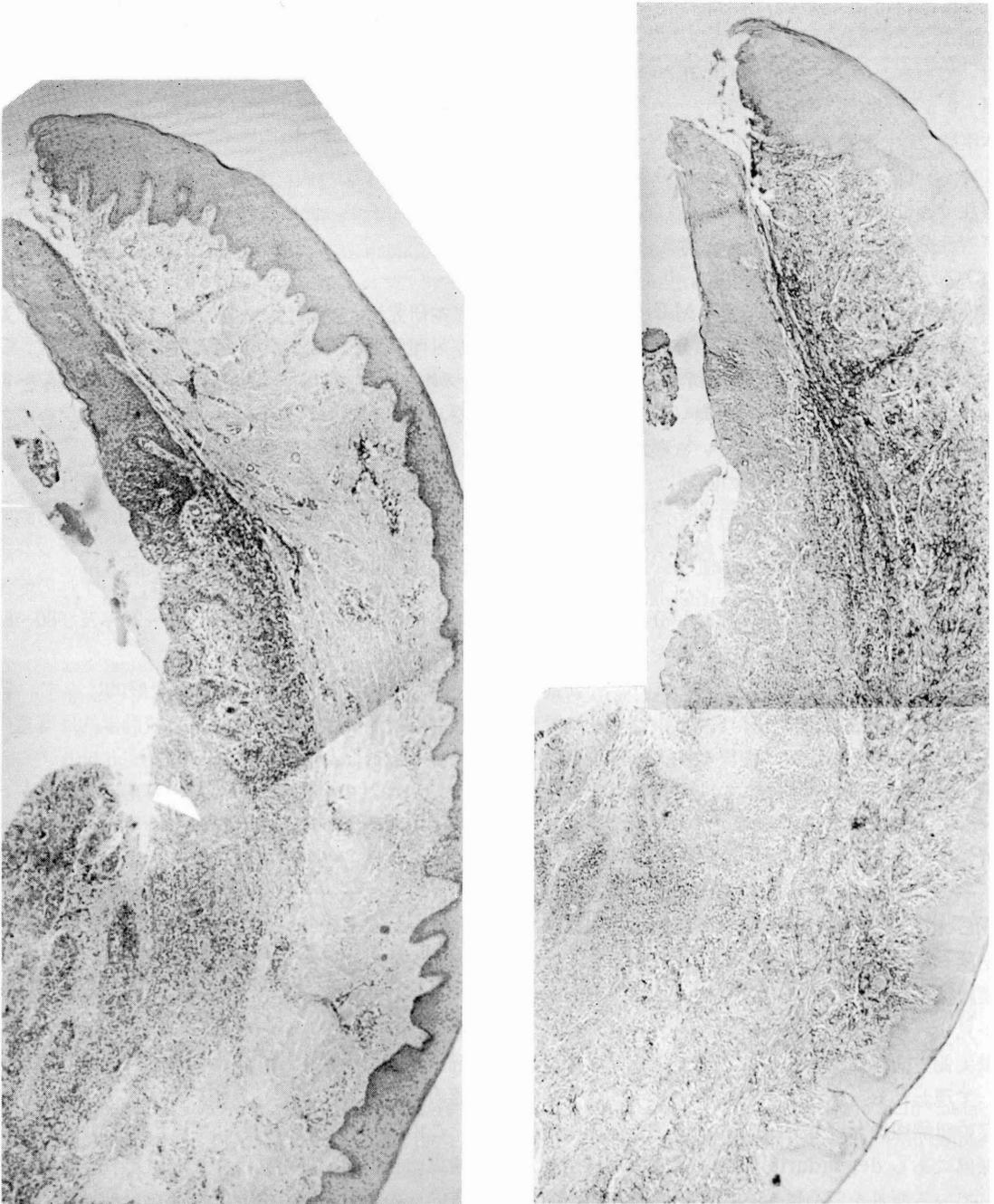
性分画は、より速く合成されることを示唆している。皮膚や肝臓を用いた in vitro³⁹⁻⁴¹⁾ 及び in vivo⁴²⁾ のコラーゲン合成実験において、同様の所見が報告されている。

次いで表3に示しておる様に、未分画のハイドロキシプロリンあるいは可溶性、不可溶性各分画のハイドロキシプロリンの放射能比活性の平均値については、歯周症群、歯周炎群の間でいずれも統計学的に有意の差が認められない。不可溶性分画について見ると、その比活性は、歯周症群、歯周炎群を通じ目立って一定である。しかし、その中で、歯周症群中の2例(症例1及び5)において、群を抜いて高いことが注目される。この歯周症群の2例(症例1及び5)は、歯肉の病理組織学

的検索においても共通して、図2に示す様に特異的な所見を示した。即ち、歯と歯周結合部の強い破壊を思わせるところの、上皮付着の著明な根尖側方向への増殖と、その付近での強度の炎症性細胞浸潤である。

考 按

新鮮な切除歯肉について、そのハイドロキシプロリン量を測定した一例としては Stanton らの報告⁴³⁾がある。それによると歯肉結合織立方ミリメートル当りのハイドロキシプロリン量は、5.29 μ g から 10.10 μ g にわたっている。この値は、本報告における mg 当り 4.1~9.5 μ g とほぼ一致する。著者らは、歯肉コラーゲンの分画抽出を行なうにあ



A

B

図2 歯周症罹患歯肉 biopsy の1例(症例1)

A: H-E染色 ×37

B: Masson・Goldner 変法染色 ×37

A, Bともに上皮付着の著明な根尖側増殖(矢印)とその付近に著明な細胞浸潤がみられる。

たつて、材料及び方法の所で既に述べた様に、Nimni 及び Bavetta らの方法³⁵⁾を一部変更して用いている。原法では、NaCl 可溶性分画は 0.15 M と 0.5 M NaCl 可溶性分画の2つに分けてあるが本実験では、最初より歯肉を 0.5 M NaCl で抽出している。従って本変法で抽出した 0.5 M NaCl 可溶性分画は、原法による 0.15 M 及び 0.5 M NaCl 可溶性分画の2つを含むものと考えられる。原法によると、皮膚のコラーゲンは、0.15 M NaCl 可溶性、0.5 M NaCl 可溶性、0.5 M Citrate 可溶性及び、0.3 M 熱 TCA 可溶性の4分画に分けられ、それらの比率は、ほぼ 5, 15, 10, 70% である。これらの値と、本報告に示した歯肉コラーゲン各分画間の比率は、ほぼ、一致している様に思われる。

歯周症群及び歯周炎群との間では、その全ヒドロキシプロリン量、又各分画中のヒドロキシプロリン量の比率において、統計学的に有意の差は認められない。しかしながら、歯周症群中の2例(症例1及び5)において TCA 分画のヒドロキシプロリンの放射能比活性が群を抜いて高いことが注目される。又、同じ症例において、共通して NaCl 可溶性分画のヒドロキシプロリン量が多い。この因果関係は、換言すれば、不可溶性コラーゲンの一部が破壊されて、可溶性コラーゲン分画に入る為、その中のヒドロキシプロリンが特に多くなったものと考えられる⁴⁴⁾。

一方、Grantら⁴⁵⁾は歯周症の発病と進行過程にみられるところの上皮付着の根尖側方向への増殖と歯-歯周結合との因果関係について、まず歯根膜組織に変性が起こり、次いでセメント質の形成が見られなくなる。その結果、上皮付着が容易に根尖側方向へ移動する。この事がポケット形成として現われると述べている。Kaslick⁴⁶⁾らは歯周症の組織像において、Fullmer の言う歯周組織の深部にある degradation zone にまで炎症が波及している所見を認めておるように、本症例の歯周症群中の症例1と5においても歯-歯周結合の破壊が特に著しい事を示す。この2例に特に強く見られる炎症性浸潤細胞 lysosome 中のコラゲナーゼ⁴⁷⁾などがコラーゲンを分解可溶化する因子の一つとして、働いていることは充分に考えられる。

又、コラーゲンの分解、可溶化の促進に対し、当然これを修復合成する機構の活発化が予想される。

だが一方、著明な細胞浸潤は、既に一次的に起きた歯-歯周結合破壊の結果、二次的に起きたもので、やはり、歯-歯周結合の破壊をもたらす一次的な因子が、他に存在する事も考えられる。

総括及び結論

本研究は、歯周症と診断した症例(実験群)及び対照群として軽度の歯周炎の症例について、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、これら罹患歯肉中のコラーゲン合成のパターンを比較、検討した結果、

1. 歯肉中の全ヒドロキシプロリン量は全症例を通じて、mg 湿重量あたり、4.1~9.5 μ g の範囲にあった。又、可溶性、不可溶性コラーゲン分画中のヒドロキシプロリン含量は、いずれの症例においても、ほぼ、それぞれ 15~20% 及び 80~85% の割合を示した。

尚、歯肉中のコラーゲン量は全般的にみて、実験群と対照群との間において、統計学的に有意の差がみられなかった。

2. いずれの症例においても、可溶性コラーゲン合成の速さは不可溶性コラーゲンのものに較べて、より早いことが認められた。

次いでコラーゲン合成のパターンを実験群と対照群との両者について比較したところ、全般的にみて両者の間に大きな違いがみられなかった。

しかし、実験群中の2例において、特にコラーゲン合成の高まりがみられ、同時にコラーゲン分解の亢進を示唆する可溶性コラーゲン量の増加が認められた。

この2例の組織像においては、共通して、歯-歯周結合の強い破壊を示す上皮付着の著明な根尖方向への増殖とその付近の強度の炎症性細胞浸潤がみられた。

謝 辞

稿を終るにあたり、研究の方法について種々御便宜をおかけ下さいました、東京大学薬学部生理化学教室鶴

藤丞博士, 並びに本研究に対して種々御助力をいただきました, 本学歯科保存学第1及び第2教室と口腔生化学教室員各位に深謝致します。

文 献

- 1) Orban, B. and Weinmann, J. B.: Diffuse atrophy of the alveolar bone(periodontosis). *J. Periodont.*, **13**: 31, 1942, Glickman, I.: *Clinical Periodontology*, 3rd ed., p. 375-377, W. B. Saunders, 1964. より引用.
- 2) Cohen, M. M. et al: Oral aspects of mongolism I. Periodontal disease in mongolism. *O. S. O. M. O. P.*, **14**: 92-107, 1961.
- 3) Brown, R. H. and Cunningham, W. M.: Some dental manifestations of mongolism. *O. S. O. M. O. P.*, **14**: 664-676, 1961.
- 4) Johnson, N. P. and Young, M. A.: Periodontal disease in mongols. *J. Periodont.*, **34**: 41-47, 1963.
- 5) Cohen, M. M. and Winer, R. A.: Dental and facial characteristics in Down's syndrome. *J. Dent. Res.*, **44**: 197-208, 1965.
- 6) Sznajder, N. et al: Clinical periodontal findings in trisomy 21 (mongolism). *J. Periodont. Res.*, **3**: 1-5, 1968.
- 7) Hawes, R. R.: Report of three patients experiencing juvenile periodontosis and early loss of teeth. *J. Dent. Child.*, **27**: 169-177, 1960.
- 8) Coccia, C. T., McDonald, R. E. and Mitchell, D. F.: Papillon - Lefevre syndrome: Precocious periodontosis with palmar - plantar hyperkeratosis. *J. Periodont.*, **37**: 408-414, 1966.
- 9) Perriman, A. O. M.: Papillon - Lefevre syndrome. *Brit. Dent. J.*, **123**: 484-488, 1967.
- 10) Galanter, D. R. and Bradford, S.: Hyperkeratosis palmoplantaris and periodontosis: The Papillon - Lefevre syndrome. *J. Periodont. - Periodontics*, **40**: 40-47, 1969.
- 11) 今川与曹・他: 9歳の少女にみられた掌蹠角化症を伴う歯槽膿漏症の1例について, *日歯膿誌*, **6**: 16-25, 1965.
- 12) 太田紀雄, 白岩昭信, 奥村和道: 若年者に現われた高度の歯槽膿漏症の一例, *愛院大歯誌*, **4**: 76-79, 1966.
- 13) Cohen, D. W. and Morris, A. L.: Periodontal manifestations of cyclic neutropenia. *J. Periodont.*, **32**: 159-168, 1961.
- 14) Shafer, W. G., Hine, M. K. and Levy, B. M.: *A textbook of oral pathology*, 2nd ed. p. 616-618, W. B. Saunders, 1963.
- 15) Golin, R. J. and Pindborg, J. J.: *Syndromes of the head and neck*, p. 21-26, McGraw-Hill, 1964.
- 16) 今川与曹・他: 無カタラーゼ血液症の2例について, *口病誌*, **29**: 22-27, 1962.
- 17) Bruckner, R. J., Rickles, N. H. and Porter, D. R.: Hypophosphatasia with premature shedding of teeth and aplasia of cementum. *O. S. O. M. O. P.*, **15**: 1351-1369, 1962.
- 18) Baer, P. N., Brown, N. C. and Hamner, J. E.: Hypophosphatasia: Report of two cases with dental findings. *Periodontics*, **2**: 209-215, 1964.
- 19) Goldman, H. M. and Cohen, D. W.: *Periodontal therapy*, 4th ed., p. 1027-1028, C. V. Mosby, 1968.
- 20) 原 耕二・他: 16歳の少女にみられた高度の歯周病について, *日歯保誌*, **13**: 227-237, 1971.
- 21) Worth, H. M.: Hurler's syndrome. *O. S. O. M. O. P.*, **22**: 21-35, 1966.
- 22) Butler, J. H.: A familial pattern of juvenile periodontitis (periodontosis). *J. Periodont. - Periodontics*, **40**: 115-118, 1969.
- 23) Baer, P. N. et al: Advanced periodontal disease in an adolescent (periodontosis). *J. Periodont.*, **34**: 533-539, 1963.
- 24) Tsunemitsu, A. et al: Citric acid metabolism in periodontosis. *Arch. Oral Biol.*, **9**: 83-86, 1964.
- 25) Engel, M. B., Laskin, D. M. and Benjamin, J. G.: Elevation of a serum glycoprotein in periodontosis. *J. A. D. A.*, **57**: 830-835, 1958.
- 26) Glickman, I.: *Clinical periodontology*, 3rd ed., p. 372-378, W. B. Saunders, 1964.

- 27) Rao, S. S. and Tewani, S. V. : Prevalence of periodontosis among Indians. *J. Periodont.*, **39**: 27-34, 1968.
- 28) Everett, F. G. and Baer, P. N. : A preliminary report on the treatment of the osseous defect in periodontosis. *J. periodont.*, **35**: 429-435, 1964.
- 29) Baer, P. N. and Gamble, J. W. : Autogenous dental transplants as a method of treating the osseous defect in periodontosis. *O. S. O. M. O. P.*, **22**: 405-410, 1966.
- 30) Benjamin, S. D. and Baer, P. N. : Familial patterns of advanced alveolar bone loss in adolescence (periodontosis). *Periodontics*, **5**: 82-88, 1967.
- 31) Claycomb, C. K. et al : Gingival collagen biosynthesis in mongolism. *J. Periodont. Res.*, **5**: 30-35, 1970.
- 32) Löe, H. : The gingival index, the plaque index and the retention index system. *J. Periodont.*, **38**: 610-616, 1967.
- 33) 佐野 豊著 : 組織学研究法, 第3版, 269-270頁, 南山堂, 1970.
- 34) Green, N. M. and Lowther, D. A. : Formation of collagen Hydroxyproline in vitro. *Biochem. J.*, **71**: 55-66, 1959.
- 35) Nimni, M. E. and Bavetta, L. A. : Collagen defect induced by penicillamine. *Science*, **150**: 905-907, 1965.
- 36) Fitch, S. M., Harkness, M. L. R. and Harkness, R. D. : Extraction of collagen from tissues. *Nature*, **176**: 163, 1955.
- 37) Kivirikko, K. I., Laitinen, O. and Prockop, D. J. : Modifications of a specific assay for Hydroxyproline in urine. *Anal. Biochem.*, **19**: 249-255, 1967.
- 38) Juva, K. and Prockop, D. J. : Modified Procedure for the assay of H³- or C¹⁴- labeled Hydroxyproline. *Anal. Biochem.*, **15**: 77-83, 1966.
- 39) 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.
- 40) Laitinen, O. et al : Collagen metabolism of the skin in Marfan's syndrome. *Clin. Chim. Acta*, **21**: 321-326, 1968.
- 41) Rojkind, M. and DeLeón, L. D. : Collagen biosynthesis in cirrhotic rat liver slices, A regulatory mechanism. *Biochim. Biophys. Acta*, **217**: 512-522, 1970.
- 42) Jackson, D. S. : Connective tissue growth stimulated by carrageenin. *Biochem. J.*, **65**: 277-284, 1957.
- 43) Stanton, G., Levy, M. and Stahl, S. S. : Collagen restoration in healing human gingiva. *J. Dent. Res.*, **48**: 27-31, 1969.
- 44) Schultz-Haudt, S. D. and Aas, E. : Observation on the status of collagen in human gingiva. *Arch. Oral Biol.*, **2**: 131-142, 1960.
- 45) Grant, D. A., Stern, I. B. and Everett, F. G. : *Orban's Periodontics*, 3rd ed., p. 231-232, C. V. Mosby, 1968.
- 46) Kaslick, R. S., Chasens, A. I. and Teaneck, N. J. : Periodontosis with periodontitis: A study involving young adult males. *O. S. O. M. O. P.*, **25**: 327-350, 1968.
- 47) Lazarus, G. S. et al : Human granulocyte collagenase. *Science*, **159**: 1483-1485, 1968.