

岡山医学会雑誌

第95巻1, 2合併号(第1058, 1059号)

昭和58年2月28日発行

ラット切歯象牙質における ^3H -prolineの 取り込みに及ぼすL-azetidine- 2-carboxylic acidの影響

岡山大学歯学部口腔解剖学第1講座

永井 廣・鈴木 一 憲

東北歯科大学口腔解剖学第2講座

須藤 博 子

(昭和57年8月19日受稿)

Key words: 切歯象牙質, オートラジオグラフィー,
proline analogue

結 言

L-azetidine-2-carboxylic acid (L-azetidine) は, L. Fowden によって *Convallaria majalis* の葉から分離抽出された植物イミノ酸で proline の analogue のひとつとして知られている⁵⁾. L-azetidine は鶏胚の軟骨培養において proline と置換してコラーゲンの abnormal polypeptide precursor を形成し, 周囲基質への分泌が抑制されることが報告されている^{14,15)}. また, L-azetidine で5日以上鶏胚を処理すると正常なコラーゲンの産生が遅延し, 胚は脆弱になることも報告されている^{7,8)}. しかし *in vitro* の実験では培地に proline を加えると L-azetidine の作用は抑制されるという¹⁴⁾.

我々は L-azetidine のこのような作用に注目し, *in vivo* における L-azetidine の硬組織形成に及

ぼす影響について検索を行ってきた。L-azetidine はラット胎仔に催奇作用を示し, 特に胎仔の器官形成期早期の投与により, 骨格異常や化骨遅延をひきおこすことが明らかとなった^{9,11)}. 更にラットおよびマウス切歯の象牙質においても L-azetidine 投与により, 組織化学的には一過性にコラーゲン性基質が減少し, 多糖類は逆に増加を示した。このような基質の形成不全により, 石灰化障害もひきおこされることを報告した^{10,13)}. 今回は ^3H -proline と L-azetidine を同時にラットに投与し, ラット切歯における ^3H -proline の取り込みをオートラジオグラフィーとアイソトープの定量によって観察した。

材料ならびに方法

Wistar rat (生後4~5週齢) に, L- ^3H (G)]-proline (5.0 Ci/mmol, New England Nuclear,

Boston, Mass.) (^3H -proline) $50\mu\text{Ci/g}$ と L-azetidine (Sigma Co, St. Louis, Missouri) 1mg/g を同時に腹腔内投与した実験群と, ^3H -proline $50\mu\text{Ci/g}$ を単独投与した対照群を作成した。

1. 組織標本作製

対照群, 実験群いずれも投与後10, 30分, 1, 6, 24時間に Nembutal で麻醉し, 心臓から灌流固定を行った。固定液は 0.1M cacodylate buffer (pH 7.4) で調整した 2% paraformaldehyde と 2% glutaraldehyde 液を使用した。その後, 上顎および下顎切歯を採取し, 10% EDTA (pH 7.4, 4°C) で約1ヶ月脱灰した。上顎切歯はアイソトープの定量に供し, 下顎切歯は更に buffer で洗浄し, 1% 四酸化オスミウムで後固定を行い, アルコールで脱水, Epon 812 に包埋し, 光顕用の 1μ 厚切り切片と電顕用の超薄切片を作成し, それぞれ光顕オートラジオグラフィー, 電顕オートラジオグラフィーの作成に供した。

2. オートラジオグラフィー

光顕オートラジオグラフィー: Epon 包埋した厚切り切片をスライドガラスに貼付し, ディップ法により乳剤を塗布した。使用した感光乳剤はサクラ NR-M₂ (小西六写真工業) である。乳剤は再蒸留水で2倍に稀釈して使用した。暗室内で1時間乾燥後, 乾燥剤をしいた暗箱にスライドガラスを入れ, 密封し, 4°C で2週間露出した。その後 Conidol X で 20°C , 7分現像し, 定着, 水洗の後, トルイジンブルー染色を行った。

電顕オートラジオグラフィー: ガラスペンで印をつけたスライドガラスにコロジオン膜をはり, 印の上に超薄切片をのせ, 二重染色を行う。薄くカーボンを蒸着し, ディップ法により乳剤を塗布した。使用した乳剤はサクラ NR-H₂ (小西六写真工業) で, 再蒸留水で5倍に稀釈した。暗室で1時間乾燥後, 密封保存し, 4°C で4週間露出, conidol X で 18°C 3~4分現像し, 定着の後水洗した。乾燥後コロジオン膜に傷をつけ, 切片の上にメッシュをかぶせて, コロジオン膜を水にうかべて, 紙ですくい乾かして乾燥させた。メッシュは酢酸イソアミルに約5分浸してから, 電子顕微鏡観察に供した。

3. アイソトープの定量

脱灰した上顎切歯は実体顕微鏡下で象牙質と歯髄に分離し, アセトンで脱水後, 更に, 200°C で3時間乾燥し, 乾燥重量を測定した。濃硝酸を加えて加温溶解後, 蒸留水で濃度を一定にして, 各試料から $25\mu\text{l}$ とり, シンチレーターを加えて, 液体シンチレーションカウンターにて ^3H の定量を行った。

結 果

I. オートラジオグラフィーの所見

1) 投与後10分

対照群では早くも象牙芽細胞および象牙前質に grain の分布が認められる。実験群では象牙芽細胞の遠心側の細胞質にごくわずかな grain の分布が認められるのみで, 対照群に比べると著しく少ない (Fig 1a, b)。

2) 投与後30分

対照群では象牙芽細胞および象牙前質に分布する grain の密度が一段と高くなり, 遠心側の細胞質では grain が密集して分布するのが見られる (Fig 2a)。対照群の電顕オートラジオグラフィーでは grain はゴルジ装置に偏在する傾向を示している。grain の分布が認められるゴルジ装置ではゴルジ空胞がよく発達し, 内部に微細線維様構造物を含んでいるものがしばしばみられる (Fig 3a, b)。一方実験群では象牙芽細胞の grain の密度が高くなっているが, 象牙前質はごくわずかの grain が認められるにすぎない (Fig 2b)。電顕的には細胞内に分布する grain はごくわずかで, ゴルジ装置よりも粗面小胞体に分布する傾向を示している。細胞内の形態変化としては, ゴルジ装置でしばしばラメラ構造が不明瞭となり, 滑面小胞体様を呈する像が認められ, ゴルジ小胞の増加も著しい。更にゴルジ空胞内の微細線維様構造物も殆んど認められず, L-azetidine の象牙芽細胞への影響が, 投与後30分で既に見られる。細胞の突起付近では, 細胞質基質に grain の分布が認められる (Fig 4a, b, c)。

3) 投与後1時間

対照群では grain の密度は象牙芽細胞より象牙前質で高くなり, 細胞内の grain は減少しは

じめ、投与後30分の対照群のように密集することはない。実験群では投与後30分とあまり差は認められず、grain は象牙細胞に散在性に分布している。象牙前質にはごくわずかの grain が分布するにすぎない (Fig 5a, b)。

4) 投与後6時間

対照群では grain の大部分が象牙前質に分布し、密度も非常に高くなっている。一部は石灰化前線をこえて象牙質にも分布している。象牙芽細胞内の grain は急速に減少し、ごくわずかの分布を認めるにすぎない。実験群では投与後30分、1時間の場合とあまり変化しておらず、grain の象牙前質への移動は認められない (Fig 6a, b)。電顕的にはゴルジ装置が縮少し、ゴルジ空腔はあまり認められなくなり、粗面小胞体は小胞化を呈し、遊離リボゾームの増加が認められるなど、細胞内の形態的变化が著しい。grain は粗面小胞体に分布することが多く、時にはライソゾーム様 Dense Body に分布することもある (Fig 7)。

5) 投与後24時間

対照群では grain の分布域は象牙前質と象牙質にわたり、象牙質での密度が高くなっている。象牙芽細胞の grain は更に減少している。実験群では象牙前質の grain の密度は投与後6時間よりやや高くなっているが、対照群に比べるとその量は著しく少ない。分布域は L-azetidine による基質の障害線にまで達している (Fig 8a, b)。電顕的にも象牙芽細胞内の grain の量は少なく、粗面小胞体とライソゾーム様 Dense Body にわずかに認められるにすぎない。投与後6時間の場合に比べ、ゴルジ装置もよく発達し、大きなゴルジ空腔も認められるようになり、細胞は明らかに回復していることがうかがわれる (Fig 9)。

II 液体シンチレーションカウンターによる定量結果

対照群での ^3H -proline の取り込みは、歯髄で投与後1時間で最高値に達し、その後漸時減少する。象牙質では投与後1時間の値は歯髄より低いとその後も増加し、投与後6時間で最高値に達する。この時の値は歯髄を上回っている (Fig 10)。

一方実験群では、歯髄での取り込み量が対照群と同様に投与後1時間で最高値に達するが、その後、投与後6時間まであまり変化していない。象牙質でも対照群と同様に、投与後6時間に最高値を示すがその増加は著しくない (Fig 11)。対照群と実験群を比較してみると、歯髄では ^3H -proline の取りこみ量にあまり差は認められないが、象牙質では実験群で著しく低く、対照群の約1/3弱となっている。

考 察

オートラジオグラフィーの所見は L-azetidine がラット切歯の象牙質形成過程において、 ^3H -proline の象牙質基質への取り込みを抑制することを示している。投与後30分のオートラジオグラフィーでは象牙細胞内の grain の密度は対照群でやや高いが顕著な差は認められない。しかし投与後30分以降の基質の grain の密度は対照群で非常に高く、実験群ではごくわずかの grain の分布が認められるにすぎない。また実験群で投与後30分から6時間まで基質の grain の密度はほとんど変わらず、24時間でやや高くなっていることがわかる。このことは ^3H -proline は L-azetidine 投与下で象牙芽細胞には比較的的正常に取りこまれるが、象牙芽細胞から基質への分泌が抑制されることを示すものと思われる。更に液体シンチレーションカウンターによる ^3H -proline の定量において、対照群と実験群では歯髄の取り込み量にあまり差が認められないが、象牙質では著しい差がみられ、オートラジオグラフィーの所見を裏付けする結果が得られた。先の実験によると L-azetidine の影響を受けて象牙芽細胞が最も形態的变化を示すのは投与後6時間であった¹³⁾。今回も投与後30分でゴルジ装置に変化がみられ、6時間後で細胞内の形態的变化が顕著にあらわれている。従って実験群で象牙前質にとりこまれた ^3H -proline は細胞から分泌されたものがそのほとんどを占めているものと考えられる。また、象牙芽細胞に取り込まれた ^3H -proline は基質に分泌されないにもかかわらず、投与後1時間から次第にその量が低下し、24時間後ではごくわずかの grain が細胞内に認められるにすぎなく、おそらく異物とし

て細胞外に排泄されるものと思われる。これは投与後6時間、24時間の電顕オートラジオグラフィの所見でしばしばライソゾーム様 Dense Body に分布する grain が認められることから考えられることである。

L-azetidine が蛋白合成過程において proline と置換するということは *Escherchia coli* の培養において報告されており⁶⁾、更にこの analogue はコラーゲンにとりこまれて abnormal polypeptide precursor を形成することも実証されている^{14,15)}。また L-azetidine はコラーゲンの合成には強く作用するが他の蛋白合成はさほど影響を受けないということも示唆されている¹²⁾。今回の実験で得られたエナメル質のオートラジオグラムをみると、エナメル質においては投与後30分、1、6、24時間いずれの場合も対照群と実験群においてエナメル基質の grain の密度に顕著な差は認められない。ごくわずかに、実験群で密度が低いように思われる程度である (Fig 12a, b)。このようにエナメル質では象牙質ほど L-azetidine によって ³H-proline の取り込みは影響を受けないものと思われる。このことはエナメル質と象牙質の基質のちがいによるものと考えられる。象牙質では有機性基質成分の大部分をコラーゲンが占め、エナメル質ではケラチン様蛋白からなる。その他基礎物質としてエナメル質、象牙質共に酸性粘液多糖類、中性多糖類、脂質などが占めている。従って象牙細胞において L-azetidine は proline と一部置換して異常なコラーゲン前駆物質を形成し、あわせて L-azetidine による細胞の機能低下により、コラーゲン前駆物質の基質への分泌が阻害されたものと考えられる。しかしエナメル質においては L-azetidine が proline の位置にとりこまれても代謝に影響せず、analogue をとりこんだ蛋白は正常に基質に分泌されるものと思われる。エナメル質の場合、ごくわずかに実験群で grain の密度が低いのは、L-azetidine による細胞の機能低下が少なからず影響しているものと思われる。コラーゲンの合成過程において、proline が水酸化されて hydroxyproline ができることはコ

ラーゲンの細胞内通過の必要条件らしく、水酸化が障害されるとプロトコラーゲンが細胞内に蓄積する^{2,3)}ことを考えあわせると、象牙質の場合、L-azetidine が polypeptide にとりこまれることにより、水酸化の過程が障害され、基質への分泌が抑制されるものと思われる。

結 論

Wistar rat を用い、切歯象牙質における ³H-proline の取りこみに及ぼす L-azetidine-2-carboxylic acid の影響について検索した。³H-proline 50 μ Ci/g のみを投与したものを対照として、³H-proline 50 μ Ci/g と L-azetidine-2-carboxylic acid 1mg/g を同時投与し、投与後10分、30分、1、6、24時間に屠殺し、上下顎切歯を採取し、光顕および電顕オートラジオグラムを作成し、上顎切歯については液体シンチレーションカウンターにより、象牙質と歯髄にとりこまれた ³H-proline の定量を行った。

対照群では grain の分布は投与後10~30分で象牙芽細胞に、1~6時間で象牙前質に、24時間では象牙質へと移動している。実験群では投与後30分~6時間で grain の分布状態はほとんど変化を示さず、象牙芽細胞に大部分の grain が分布している。象牙前質にはごくわずかの grain の分布が認められるにすぎない。対照群と比較すると grain の分布密度はかなり低く、液体シンチレーションカウンターによる定量結果においても実験群の象牙質への取り込み量は対照群の約1/3で、歯髄への取り込み量にはほとんど差が認められない。以上の所見から、L-azetidine は象牙芽細胞にとりこまれた ³H-proline の象牙質への分泌を抑制することが明らかとなった。

謝 辞

稿を終えるにあたり本論文の御批評を賜った、岡山大学医学部解剖学第1講座教授大塚長康先生、および重井医学研究所副所長沖垣達先生に感謝の意を表します。

文 献

1. Aydelotte, M.B. and Kochhar, D.M.: Development of mouse limb buds in organ culture: Chondrogenesis in the presence of a proline analogue, L-azetidine-2-carboxylic acid. *Dev. Biol.* **28**, 191—201, 1972.
2. Barnes, M.T., Constable, B.J., Morton, L.F. and Kodicek, E.: Studies *in vivo* on the biosynthesis of collagen and elastin ascorbic acid-deficient guinea pigs. Evidence for the formation and degradation of a partially hydroxylated collagen. *Biochem. J.* **119**, 575—585, 1970.
3. Cooper, G.W. and Prockop, D.J.: Intracellular accumulation of procollagen and extrusion of collagen by embryonic cartilage cells. *J. Cell Biol.* **38**, 523—537, 1968.
4. Galbraith, D.B. and Kollar, E.J.: Effects of L-azetidine-2-carboxylic acid, a proline analogue, on the *in vitro* development of mouse tooth germs. *Arch Oral Biol.* **19**, 1171—1176, 1974.
5. Fowden, L.: Azetidine-2-carboxylic acid: a new cyclic imino acid occurring in plants. *Biochem. J.* **64**, 323—332, 1956.
6. Fowden, L. and M.H. Richmond: Replacement of proline by azetidine-2-carboxylic acid during biosynthesis of protein. *Biochim. Biophys. Acta.* **71**, 459—461, 1963.
7. Lane, J.M., Dehm, P. and Prockop, J.: Effect of the proline analogue azetidine-2-carboxylic acid on collagen synthesis *in vivo*. I. Arrest of collagen accumulation in growing chick embryos. *Biochim. Biophys. Acta.* **236**, 517—527, 1971.
8. Lane, J.M., Parkes, L.J. and Prockop, D.J.: Effect of the proline analogue azetidine-2-carboxylic acid on collagen synthesis *in vivo*. II. Morphological and physical properties of collagen containing the analogue. *Biochim. Biophys. Acta.* **236**, 528—541, 1971.
9. Kambara, K., Sudo, H., Katsuya T. and Nagai, H.: Effect of L-azetidine-2-carboxylic acid on skeletal development in the rat fetus. *J. Tohoku Dent. Univ.* **6**, 11—18, 1979.
10. Nagai, H., Sudo, H., Kambara, K. Kihara, S. and Nagai, N.: Disturbance of dentin formation in rats and mice after administration of L-azetidine-2-carboxylic acid. *Cong. Anom.* **18**, 25—31, 1978.
11. Nagai, H., Kambara, K. Sudo, H., Yokoyama, T., Katsuya, T. and Nagai, N.: Teratogenic effect of proline analogue L-azetidine-2-carboxylic acid on the skeletal system in rats. *Cong. Anom.* **18**, 19—23, 1978.
12. Ruch, J.V., Fabre, M., Karcher-Djuricic and Staubli, A.: The effects of L-azetidine-2-carboxylic acid (analogue of proline) on dental cytodifferentiations *in vitro*. *Differentiation* **2**, 211—220, 1974.
13. Sudo, H., Kambara, K., Katsuya, T. and Nagai, H.: An ultrastructural study of the effect of L-azetidine-2-carboxylic acid on odontogenesis in the rat incisor. *J. Tohoku Dent. Univ.* **5**, 116—130, 1978.
14. Takeuchi, T. and Prockop, D.J.: Biosynthesis of abnormal collagens with amino acid analogues. I. Incorporations of L-azetidine-2-carboxylic acid and *cis*-4-fluoro-L-proline into procollagen and collagen. *Biochim. Biophys. Acta.* **175**, 142—155, 1969.
15. Takeuchi, T., Rosenbloom, J. and Prockop, D.J.: Biosynthesis of abnormal collagens with amino acid analogues. II. Inability of cartilage cells to extrude collagen polypeptides containing L-azetidine-2-carboxylic acid or *cis*-4-fluoro-L-proline. *Biochim. Biophys. Acta.* **175**, 156—164, 1969.

付 図 説 明

Fig 1 投与後10分の光顕オートラジオグラフィー

- a; 対照群, 象牙芽細胞 (od), 象牙前質 (Pd) に grain の分布が認められる。×900
- b; 実験群, 象牙芽細胞 (od) にごくわずかの grain の分布が認められるが象牙前質 (Pd) には認められない。×900

Fig 2 投与後30分の光顕オートラジオグラフィー

- a; 対照群, 象牙芽細胞 (od) の grain の密度が高く, 象牙前質 (Pd) にも多数の grain が認められる。×900
- b; 実験群 象牙芽細胞 (od) に grain が多数分布し, 象牙前質 (Pd) には散在性に grain の分布が認められる。×900

Fig. 3 投与後30分の対照群の電顕オートラジオグラフィー

- a; 象牙芽細胞では grain はゴルジ装置 (GA) に集中して分布している。×10,000
- b; ゴルジ装置 (GA) はよく発達し, ゴルジ空腔 (GV) 内には微細線維様構造物(↑)が認められる。×20,000

Fig. 4 投与後30分の実験群の電顕オートラジオグラフィー

- a; 象牙芽細胞では grain はゴルジ装置 (GA) 周辺の粗面小胞体 (r-ER) に分布している(↑)。×20,000
- b; ゴルジ装置のラメラ構造が不明瞭となり滑面小胞体に様相を呈している。×20,000
- c; 象牙芽細胞の突起部では grain は細胞質基質に分布している(↑)。×20,000

Fig. 5 投与後1時間の光顕オートラジオグラフィー

- a; 対照群, grain の分布域は象牙前質 (Pd) に移動しているが象牙芽細胞 (od) にもまだかなりの grain の分布が認められる。×900
- b; 実験群, grain は主に象牙芽細胞 (od) に分布し, 象牙前質 (Pd) に少量の grain が認められる。×900

Fig. 6 投与後6時間の光顕オートラジオグラフィー

- a; 対照群, grain は象牙前質に偏在している。
- b; 実験群, grain は象牙芽細胞に分布し, 象牙前質にも少量の grain が認められる。

Fig. 7 投与後6時間の実験群の電顕オートラジオグラフィー

象牙芽細胞では粗面小胞体 (r-ER) は小胞化を呈し, 遊離リボソームが増加している。ゴルジ装置は縮小し, Dense Body (GB) にも grain の分布が認められる。×20,000

Fig. 8 投与後24時間の光顕オートラジオグラフィー

- a; 対照群, grain は象牙前質 (Pd) から石灰前線をこえて象牙質 (D) に帯状に分布している。
 - b; 実験群, 主として象牙前質 (Pd) に散在性に grain が分布し, 象牙芽細胞にもごくわずかに分布している。
- 象牙質にはトルイジブルー不染性の障害線が認められる(↑)。×900

Fig. 9 投与後24時間の実験群の電顕オートラジオグラフィー

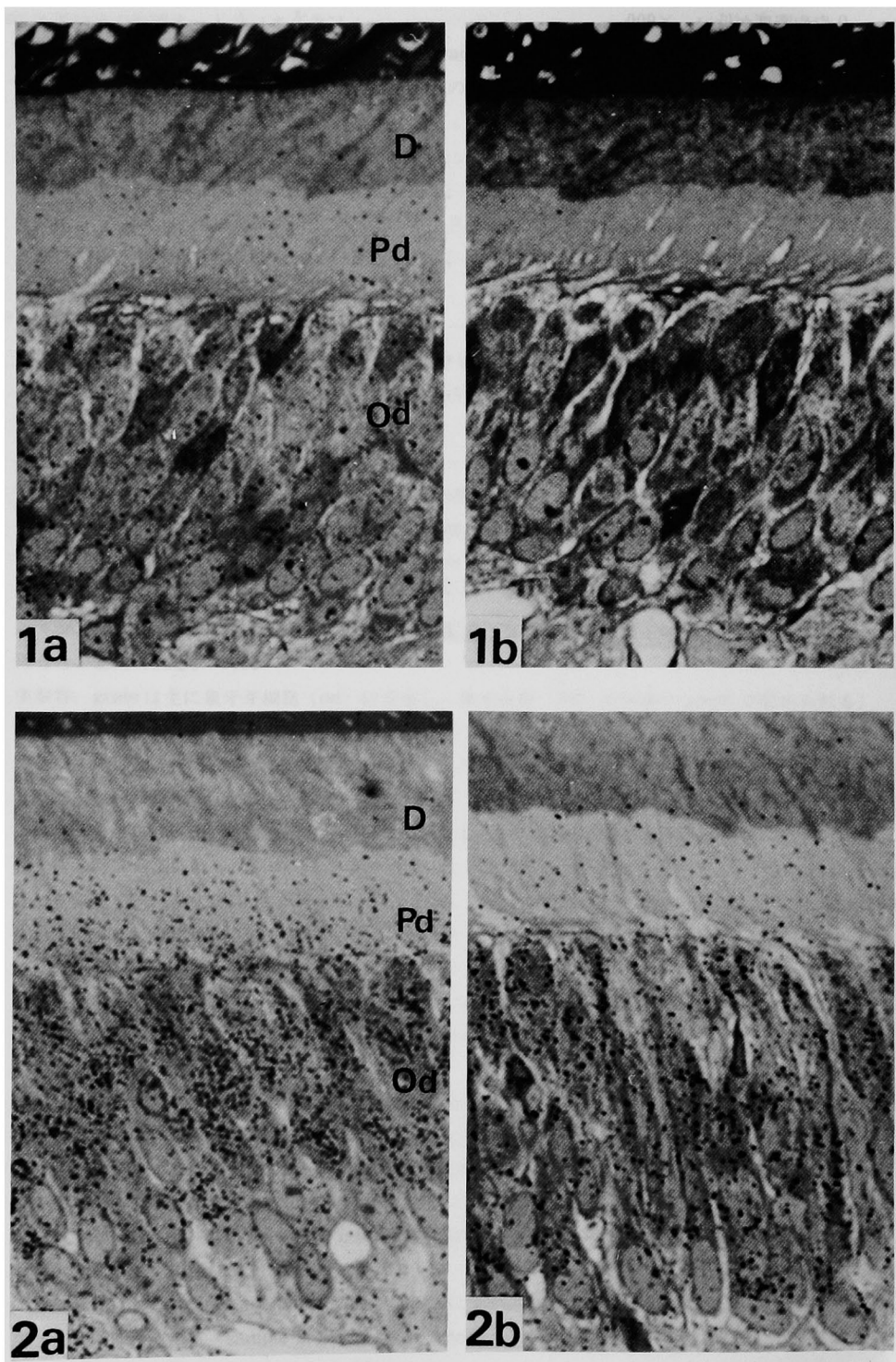
象牙芽細胞ではゴルジ空腔 (GV) のよく発達したゴルジ装置が認められる。粗面小胞体 (r-ER) や Dense Body (DB) に grain の分布が認められる。×20,000

Fig.10 ^3H -proline $50\mu\text{Ci/g}$ 腹腔内投与後10分から24時間における象牙質, 歯髄への取り込みを示す, sample $25\mu\text{l}$ (濃度 $1\text{mg}/1\text{ml}$) あたりの cpm を示す。Fig.11 H^3 -proline $50\mu\text{Ci/g}$ と L-azetidine 1mg/g を同時に腹腔内投与後10分から24時間における象牙質, 歯髄への取り込みを示す, sample $25\mu\text{l}$ (濃度 $1\text{mg}/1\text{ml}$) あたりの cpm を示す。

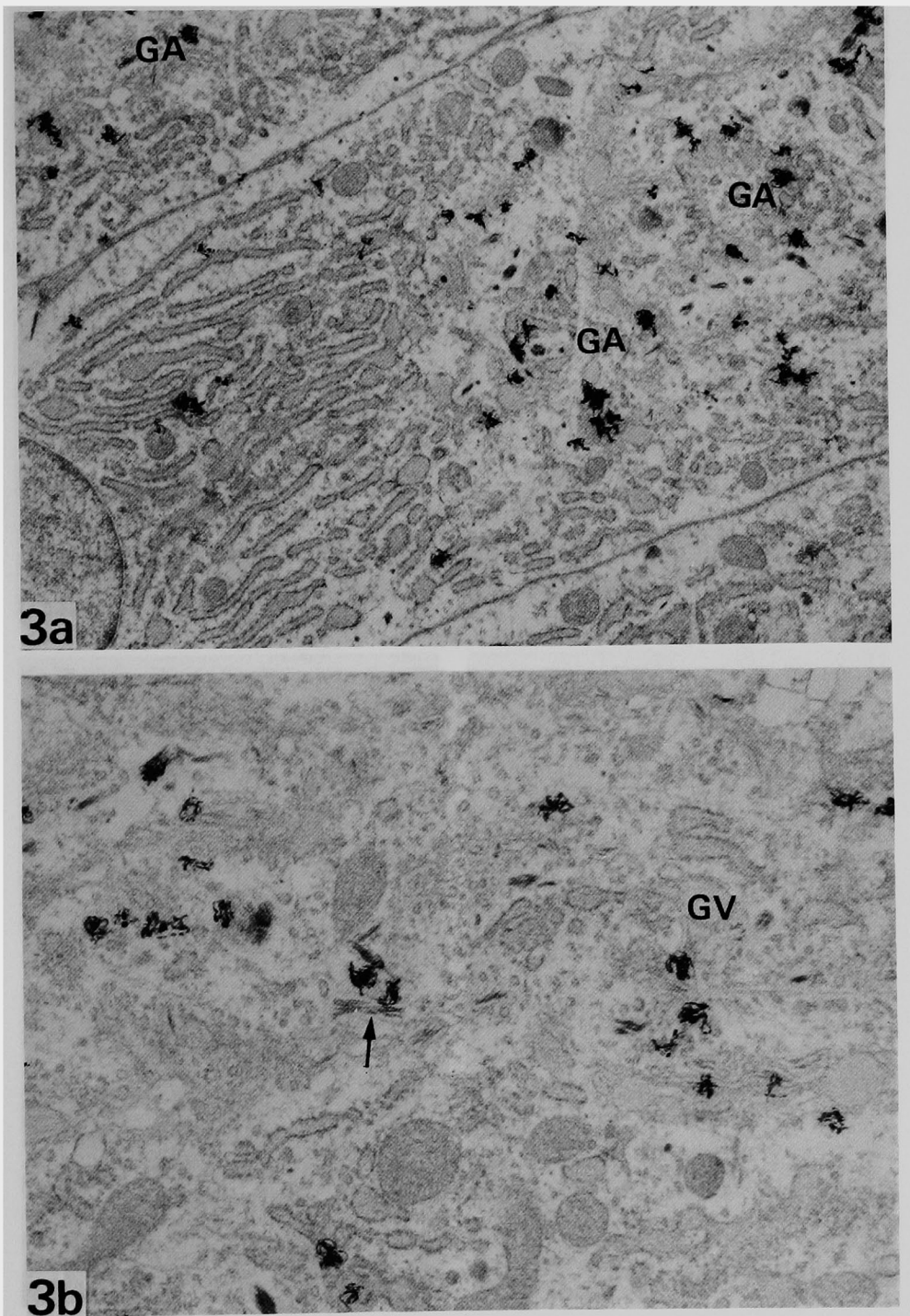
Fig.12 投与後24時間の光顕オートラジオグラフィー

- a; 対照群, エナメル質 (E) の基質全層にわたって均一に grain が分布している. $\times 900$
- b; 実験群, 対照群と同様エナメル質 (E) の基質全層にわたって均一に grain が分布しているが対照群よりやや密度が低い. $\times 900$

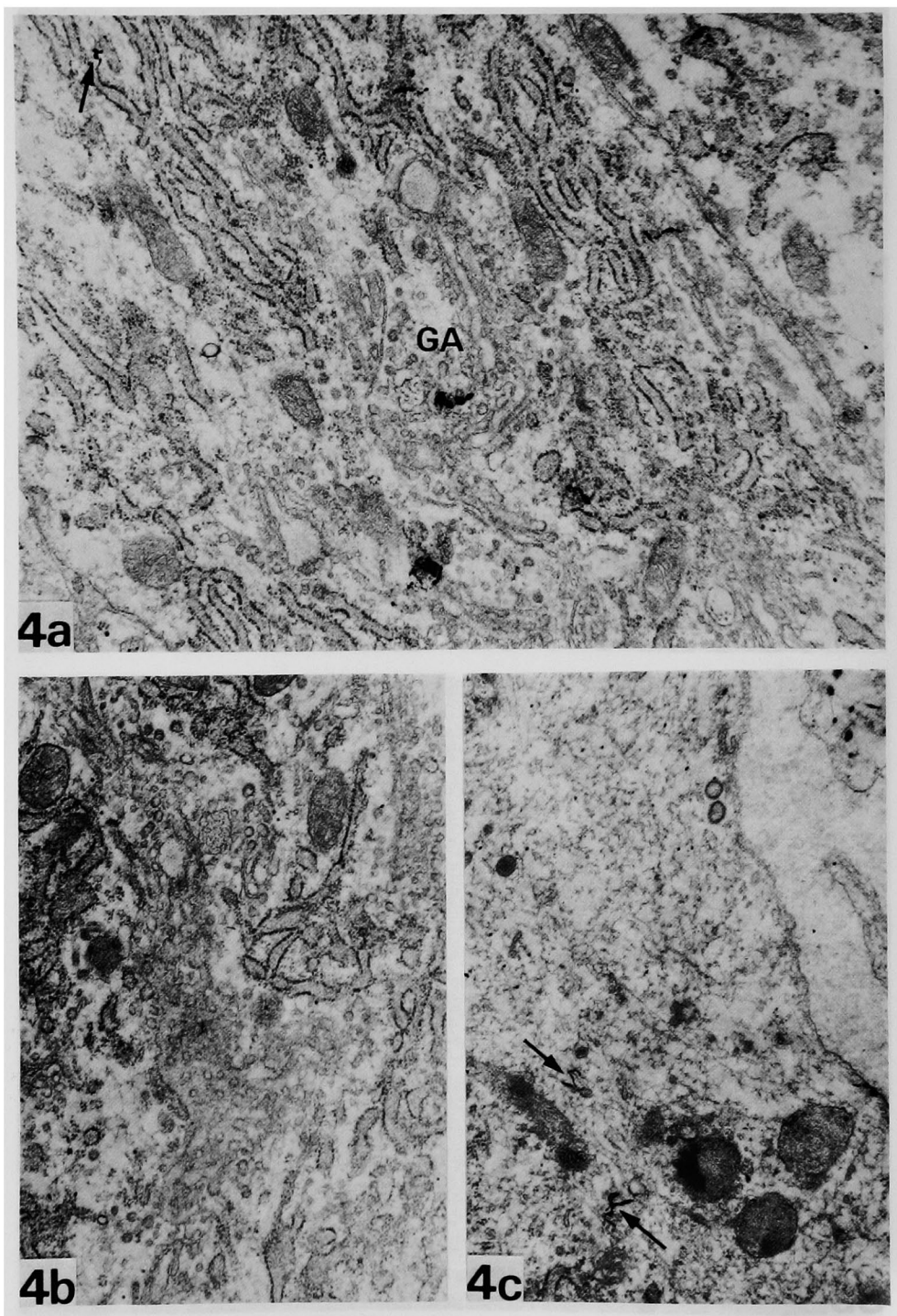
永井 廣他 2 名論文附図



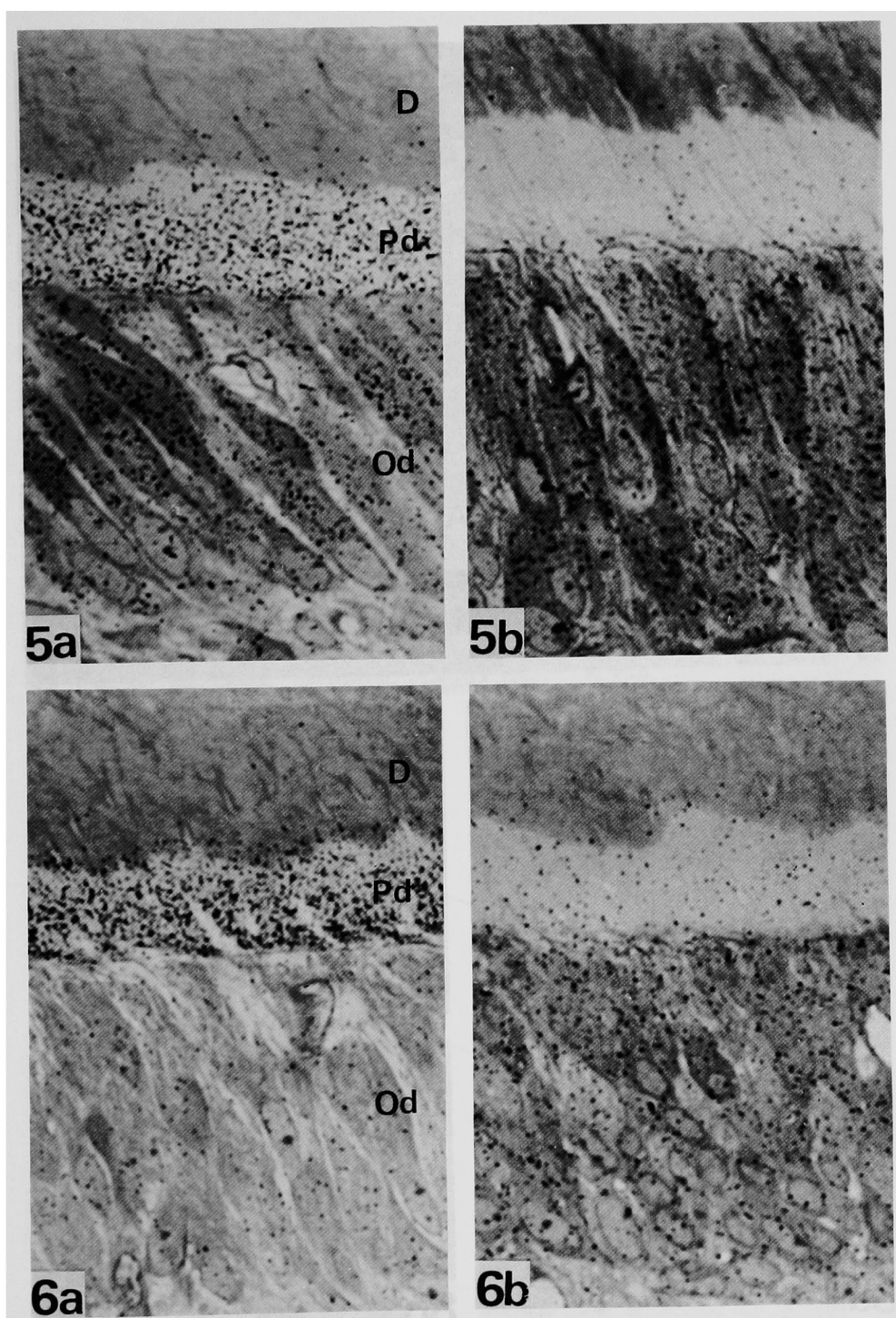
永井 廣他 2 名論文附図



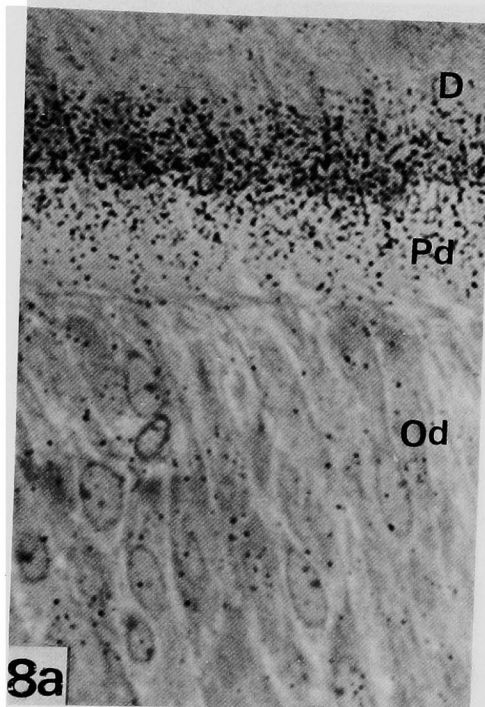
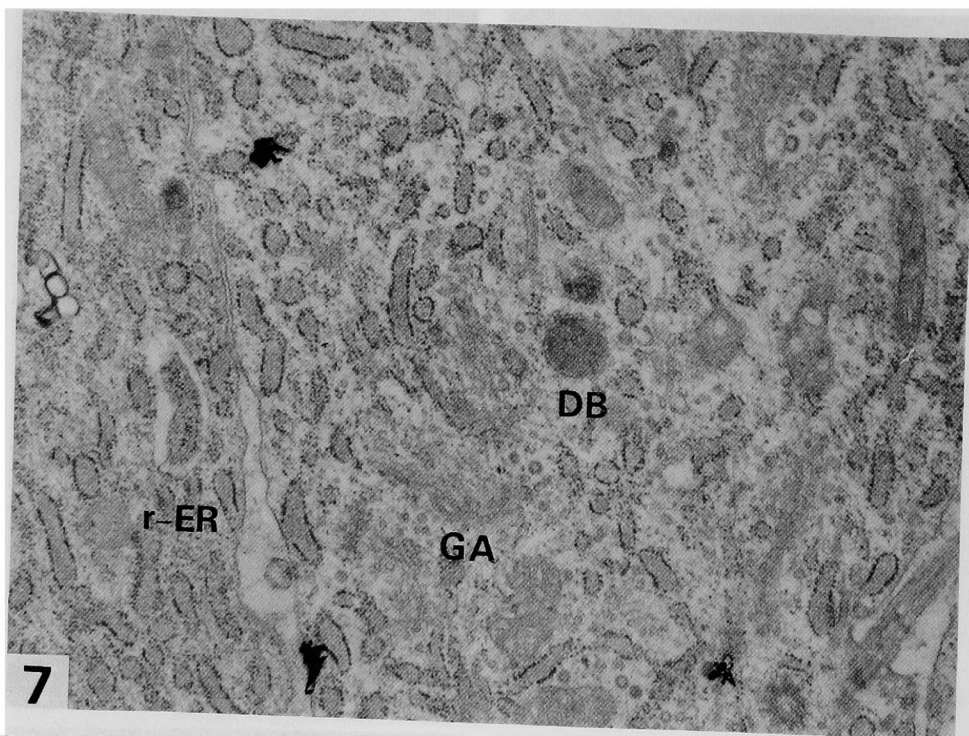
永井 廣 他 2 名 論 文 附 図



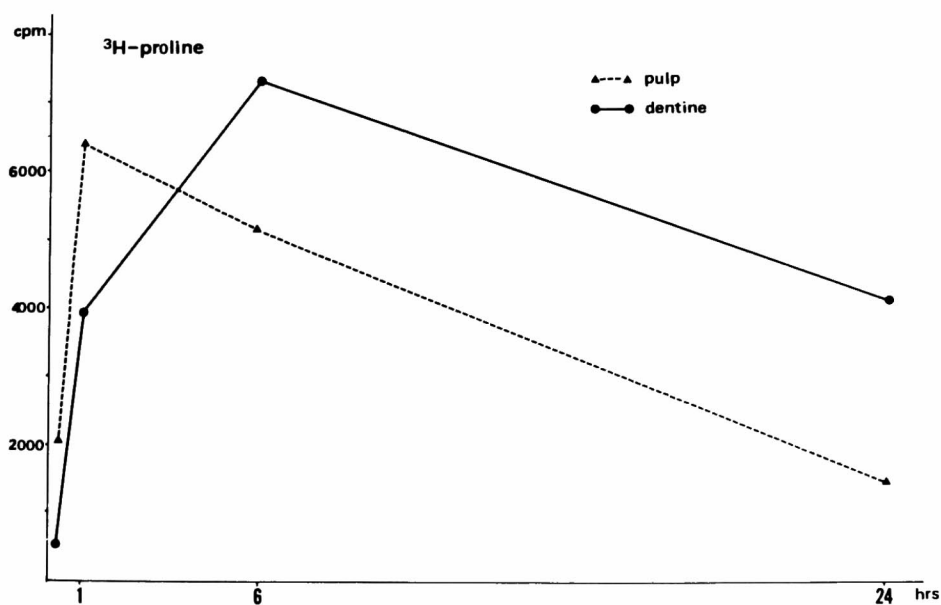
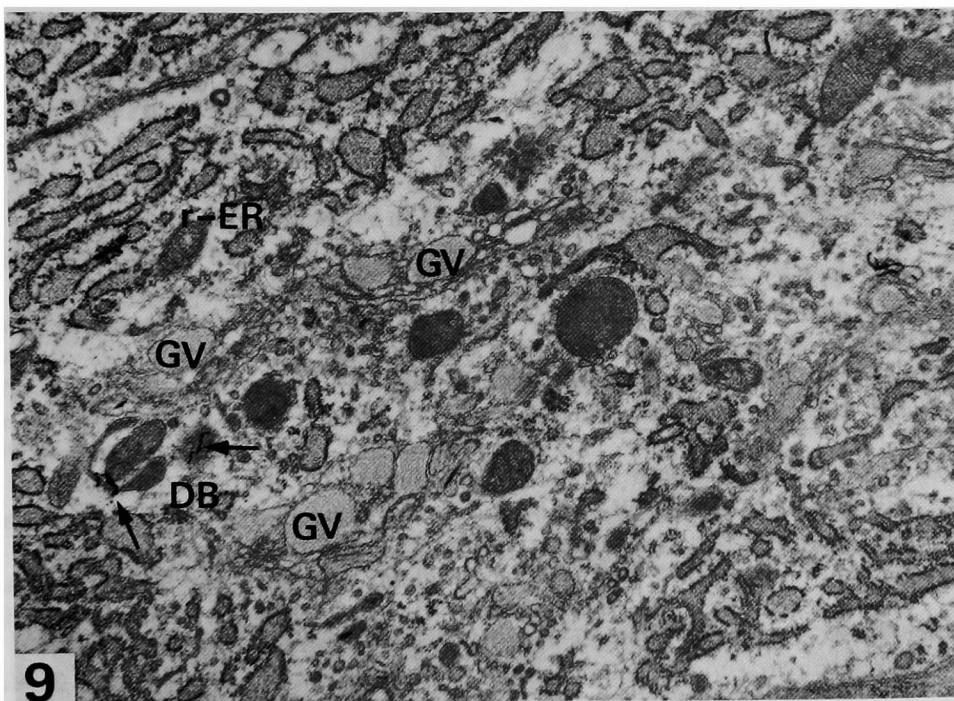
永井 廣他 2 名論文附図



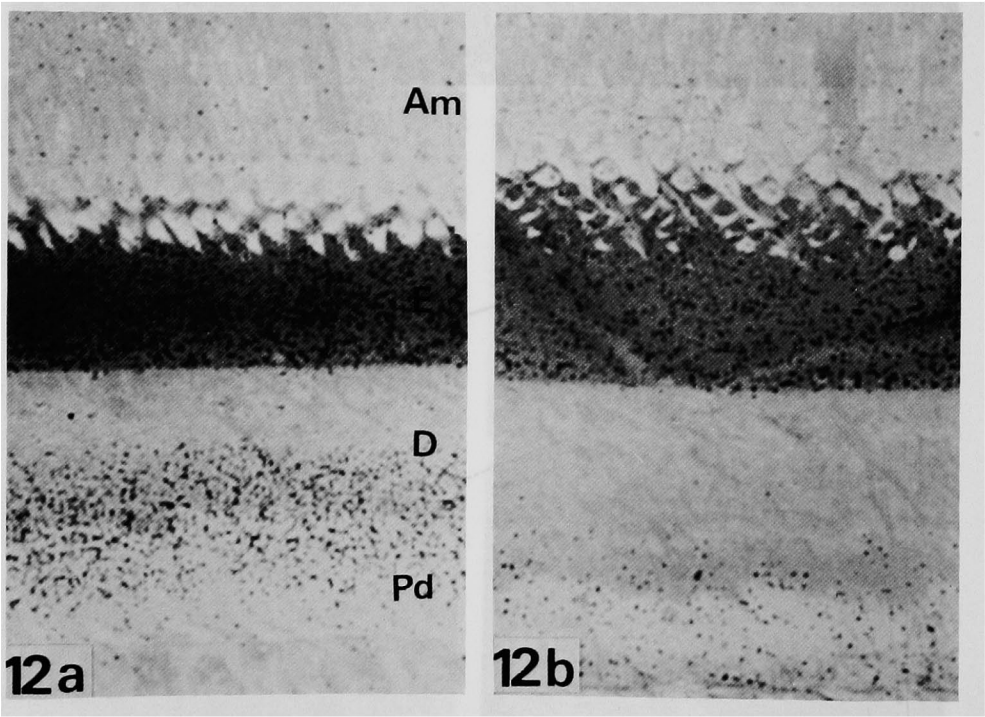
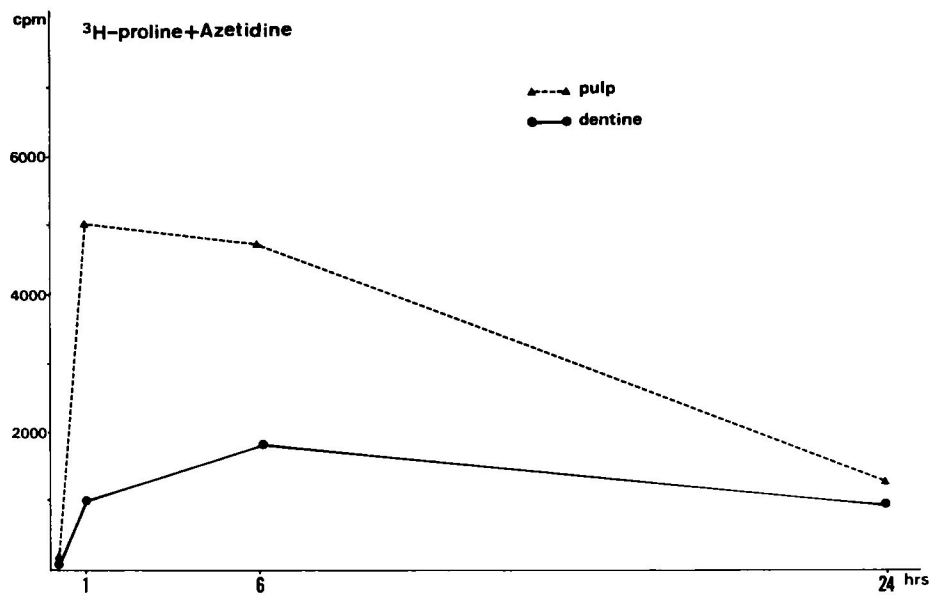
永井 廣 他 2 名 論 文 附 図



永井 廣他 2 名論文附図



永井 廣 他 2 名 論 文 附 図



**The effect of L-azetidine-2-carboxylic acid on ^3H -proline
uptake into rat incisor dentin**

Hiroshi NAGAI, Hiroko SUDO* and Kazunori SUZUKI

The First Department of Oral Anatomy, Okayama University Dental School.

***The second Department of Oral Anatomy, Tohoku Dental University.**

In the present study the effect of L-azetidine-2-carboxylic acid on uptake of ^3H -proline into incisor dentin of young rats is investigated.

For the experiment, ^3H -proline (50mCi/g) and L-azetidine-2-carboxylic acid (1 mg/g) were simultaneously injected into rats. The first rat was killed 10 min, the second one 30 min, the third one 1 hr, the fourth one 6 hr, and the last one 24 hr after the injection. The upper and lower incisors were used for light and electron microscopic autoradiography. In the control, the same procedure was performed but with an injection of 50mCi/g of ^3H -proline only.

Quantitative analysis of ^3H -proline incorporation into dentin and pulp of the upper incisors was done and radioactivity was counted by a liquid scintillation-counter.

In the control group, at 10 and 30 min after the injection, grains were found in odontoblasts. At 1 and 6 hr after the injection, they were distributed in the predentin, and the grains were in the dentin 24 hr after the injection.

In the treated group, on the other hand, grains were found in odontoblasts at 30 min and 6 hr. Moreover, the grains in the treated group were distributed rather sparsely. The result of the quantitative analysis by a liquid scintillation-counter indicated that the amount of ^3H -proline incorporated into dentin in the treated group was about one third of that in the control. No significant difference was found in the pulps between the treated and the control animals.