

総 説

硬組織石灰化についての最近の知見

名 和 橙黄雄

岩手医科大学歯学部口腔解剖学第二講座*

〔受付 : 1981年10月14日〕

は じ め に

生体にみられる石灰化は基質タンパク質を合成する細胞の分化と密接に関係している。生体内石灰化組織の大部分は発生学的には中胚葉由来で間葉細胞は骨芽細胞 (Osteoblast), 象牙芽細胞 (Odontoblast), セメント芽細胞 (Cementoblast) に分化し, それぞれ骨組織, 象牙質, セメント質を形成する。他方, エナメル質は外胚葉由来であり, 石灰化組織の発生学的由来の相違は分泌された基質に明らかな違いをもたらす。すなわち, 中胚葉由来硬組織の主要な構造タンパク質はコラーゲンであり, これが不規則にからみ合って石灰塩の沈着物と密に結合しているが, エナメル基質ではコラーゲンが欠如して基質が形成された後はタンパク質の消失をとめないながら成長しタンパク質をほとんど失ない, 石灰化度の極めて高い特殊な硬組織を形成する¹⁾。

今回は歯牙硬組織を中心に一般的な石灰化についての考え方, またその調節機構についてまとめた。石灰化メカニズムについての報告は多数あるが, その本質的機構については十分に解明されていないのが現状である。短期間に本稿をまとめて上げたので, すべての見解を網羅することは不可能で著者の主観的な考え方に流

れる傾向にあると思うが, その中から本流を選んでいただき, 研究の糧にでもなればと思います。

石灰化開始の機構

一般にリン酸カルシウムが沈着することを石灰化と呼んでいる。我々の血液, 組織液中にはカルシウムイオンやリン酸イオンの骨塩がアパタイトに対して常に過飽和の状態にありながら, 何故に石灰化が特殊な部位にのみ限局して生じるのかということは非常に興味のある問題である。多数の論文の観点はこの問題に集中しているが本質的には未解決である。石灰化組織にのみリン酸カルシウムを沈着させる説明として次の仮説がみられる。

1. アルカリホスファターゼ説 (押し上げ機構) (Phosphatase theory)

Robinson (1923)²⁾ によって展開された考え方で, 石灰化組織内にアルカリホスファターゼが発見されたことからこの酵素が有機リン酸から無機リン酸を解離して局所のリン酸イオン濃度を高め, 結果として組織液中のカルシウムと反応して不溶性のリン酸カルシウムを沈着させると考えた。アルカリホスファターゼ活性が石灰化組織の細胞に見られることからこの細胞に積極的な押し上げ機構を求めた。しかしながら

Recent information on the mineralization of hard tissues.

Tokio Nawa

(Department of Oral Anatomy, School of Dentistry, Iwate Medical University, Morioka 020)

*岩手県盛岡市中央通1丁目3-27 (〒020)

Dent. J. Iwate Med. Univ. 6 : 119-129, 1981

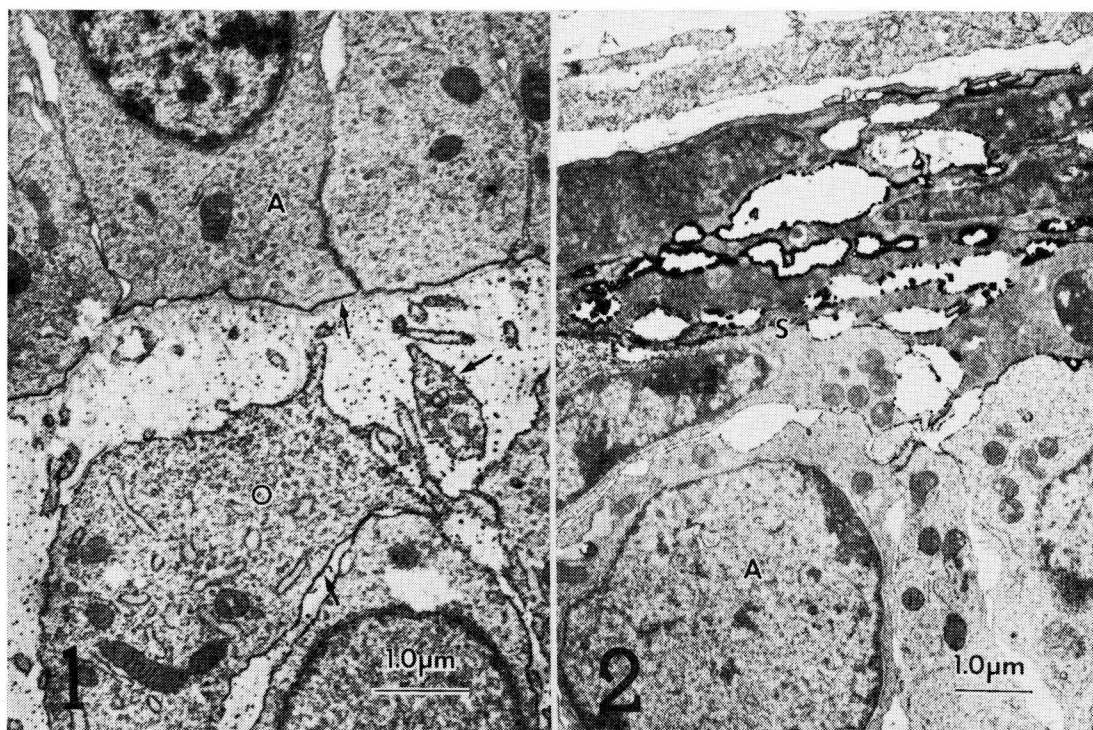


図1 アルカリホスファターゼ活性反応がエナメル芽細胞(A)の遠心端(矢印)と象牙芽細胞(O)の表面(矢印), 基質小胞と思われる所にみられる。(著者原図)

図2 図1と同時期にはエナメル芽細胞(A)の近心端と特に中間層の細胞(S)に強いアルカリホスファターゼ活性がみられる。(著者原図)

アルカリホスファターゼは石灰化しない腎臓や小腸上皮にも強く反応が認められるが、何故これらの組織では石灰化が起らないかをこの仮説だけでは十分に説明することは不可能である。

2. 核形成説 (Epitaxy)

石灰化の開始についてアルカリホスファターゼ説だけでは十分に説明できないので、1960年代になると石灰化の現象は結晶核の形成と結晶の成長の別個の過程として考えられるようになってきた。すなわち、結晶核の形成が整然とした規則的な結晶形成の出発点となり定った方向に成長することを結晶学では *epitaxy* と名付けた。Neuman and Neuman (1958)³⁾ は血清のカルシウムとリン酸イオンがハイドロキシアパタイトに対して過飽和の状態にあるところから局所の基質中に核となる物質が存在し、結晶成長はその核を中心にして行われると考えた。しかしながら核そのものについてはふれて

おらず、現在でも核そのものについては定説がない。in vitro でハイドロキシアパタイトの核として働く物質は多数あるが、核形成物質としては次のものが考えられている。

(1) コラーゲン

Glimcher, Hodge and Schmitt (1957)⁴⁾ は 640\AA の横縞を有するコラーゲン線維が in vitro で石灰化することを報告した。しかしながら、コラーゲンが核形成に有効な物質であるという事実にもかかわらず皮膚とか腱のようなコラーゲン性の組織がなぜ石灰化しないのかという点に関しては十分な解答がなされなかった。この点に関しては石灰化組織と非石灰化組織ではコラーゲンの構造が異なるという考え方と非石灰化組織には抑制因子が存在するという考え方がある。コラーゲン生成時は線維芽細胞および線維表面に高濃度のアルカリホスファターゼが存在するが、Fleish and Neuman (1961)⁵⁾

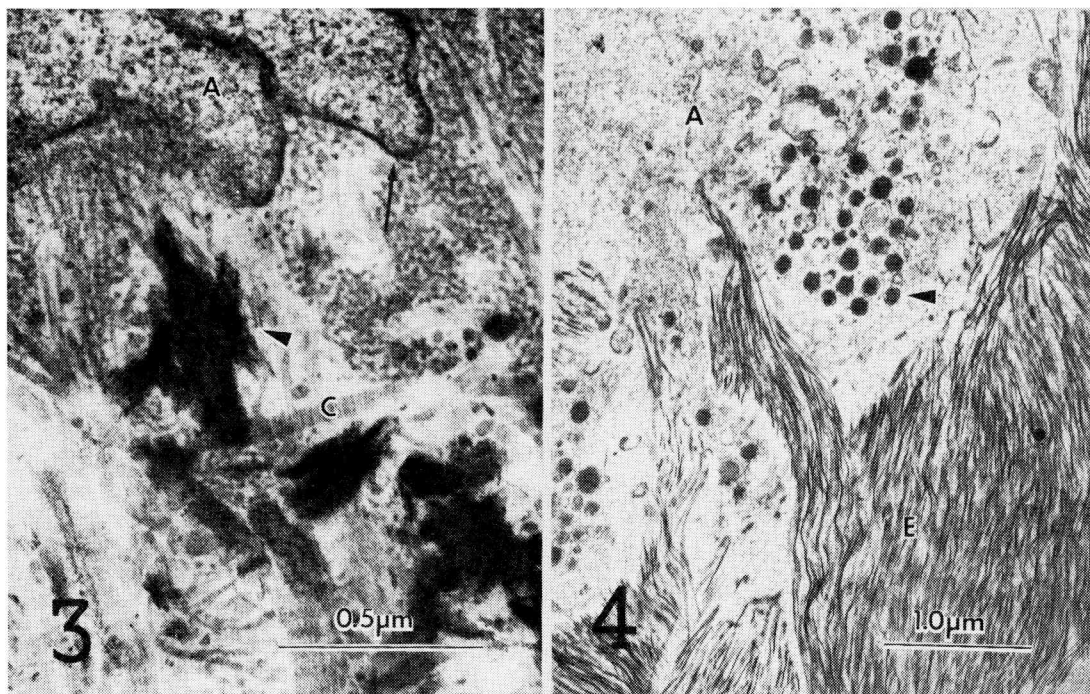


図3 基質には多数のコラーゲン(C)がみられ、一部に石灰化(太矢印)が生じてくる。この時期になるとエナメル芽細胞遠心端(細矢印)でのアルカリホスファターゼ活性は減少してくる。(著者原図)

図4 エナメル質(E)の分泌がはじまるとエナメル芽細胞のアルカリホスファターゼ活性は消失する。トームス突起内に多数の分泌顆粒(矢印)がみられる。(著者原図)

はATP, ピロリン酸が石灰化に対する抑制因子をなし、アルカリホスファターゼはこの抑制因子の除去に働き、結果として石灰化を促進させることを示唆した。しかしながら、この考え方だけで、アルカリホスファターゼとコラーゲンが共存する腸や腎臓で石灰化が生じない理由を十分に説明することはできない。

(2)脂質

Irving (1959, 1963)^{6,7)} は骨や歯の活発な石灰化部位に Sudanblack B に染まる脂質を検出し、脂質が初期石灰化に関与する可能性を示唆した。また Odutuga (1973, 1975)^{8,9)} は脂質を種々の分画に分け石灰化溶液に別々に加えるとリン脂質のみがアパタイトに沈着すると報告している。Sudan 陽性物質がアパタイトの結晶核形成になんらかの役割を演じている可能性が考えられるが、その染色度は石灰化の進行と必ずしも平行するものではなく、将来の高

石灰化部位を示す層では低く、むしろ低石灰化部位に相当する所で高いという報告もあり¹⁰⁾、脂質の役割については現在十分の理解が得られておらず今後の課題と思われる。

3. 基質小胞 (Matrix vesicle)

Bonucci (1967)¹¹⁾, Anderson (1973)¹²⁾ らは軟骨石灰化にともなって基質中に単位膜にかこまれた小胞構造が出現し、小胞内に結晶構造がみられこれを matrix vesicle と名付けた。この小胞の構造は多様で明調なものからライゾーム様まで種々の電子密度がみられる。Thyberg and Friberg (1970)¹³⁾ はこの小胞はライゾーム類似のもので酸ホスファターゼが存在すると報告したが、Ali, Sajdera and Anderson (1970)¹⁴⁾, Matsuzawa and Anderson (1970)¹⁵⁾ は酸ホスファターゼの局在を否定しアルカリホスファターゼとATPaseの局在を報告した¹⁶⁾。その後の研究で小沢と山田

(1973)¹⁷⁾は骨端軟骨基質小胞に強いカルシウム反応を証明し, Simon, Berman and Howell (1973)¹⁸⁾は飢餓ラット軟骨の基質小胞に同様の結晶構造を報告した。また Peress, Anderson and Sajdera (1974)¹⁹⁾は牛胎児骨端軟骨の小胞に石灰化因子の一つと考えられている脂質の含有を報告している。

基質小胞にみられるアルカリホスファターゼはピロホスファターゼ活性を有し, それが石灰化抑制因子であるピロリン酸をオルソリン酸に転換する。すなわち, アルカリホスファターゼはピロリン酸の抑制効果を除き, 同時にオルソリン酸の濃度を増して促進物質にかえてしまうと考えられている。脂質はカルシウムイオンを引きつけ, オルソリン酸もこれを助長し, オルソリン酸はカルシウムをリン酸カルシウムに換えるのに利用される²⁰⁻²²⁾。

基質小胞は骨端軟骨のみならず, 腱骨結合部²³⁾, 骨芽細胞の石灰化²⁴⁾, 象牙質²⁵⁾などについても報告されている。このような基質小胞の発見と小胞が「押し上げ機構」と「核形成」の両役割を演ずるという可能性は石灰化の問題を合理的に解決できる可能性を示唆するものである。しかしながら, 石灰化抑制因子と考えられるピロリン酸は数多くの生化学的反応の中で一種の代謝副産物としてATPから形成され生体のいたる所に存在するし, また, アルカリホスファターゼも生体の小腸, 腎などに存在するが, 何故に石灰化組織にのみ石灰化が生じ, これらの組織では石灰化が生じないのかという根本的な疑問に対しては基質小胞説だけでは十分に説明することができない。脂質の役割についても強固に結合したカルシウムがいかなる方法で脂質から解離するかという説明も十分に解明されていない。

石灰化の開始機構についての概要について記したが, 例えば結晶核形成物質としてはコンドロイチン硫酸²⁶⁾, リンタンパク質²⁷⁾などもあるが, 十分に理解の得られていないものについては意識的に除外した。いずれの仮説にしてもそれだけで十分に石灰化開始を説明できるもので

はなく, あるいは各々が錯綜している可能性も考えられる。

石灰化の調節機構

生体内石灰化の調節機構については血清中のカルシウムとリン酸濃度の維持に働く全身的な因子に関したものが多し。これらの中には小腸のカルシウム吸収に関与するビタミンD, 骨のカルシウム貯蔵ないしは放出に関与する副甲状腺ホルモン Parathormone, 甲状腺のサイロカルシトニン thyrocalcitonin (カルシトニン calcitonin) などが考えられる。これらのホルモンはいずれも独自の機序で標的器官(十二指腸, 骨組織)に影響を与えて血清中のカルシウムとリンの増減に関与する。

1. 副甲状腺ホルモン Parathormone (PTH)

血清カルシウム濃度を増加させるこのホルモンは cAMP の生合成を促進することによって骨や腎に作用する。骨においては骨細胞, 破骨細胞の活性化を介して骨吸収を増大し骨無機質の溶解によって放出される過剰な無機リン酸を調節するために尿管管での無機リン酸の再吸収を阻害して腎臓での無機リン酸の排泄を促進する²⁸⁾。またこのような血清中のカルシウムレベルがPTHの分泌を調節することになる。すなわち血清カルシウムの上昇は分泌を抑制し, 血清カルシウムの低下は分泌を刺激する。

Luben, Wong and Cohn (1976)²⁹⁾は骨の細胞を osteoclast 様の細胞と osteoblast 様の細胞に分けて実験を行い, PTHは osteoblast 様細胞の cAMP を上昇させコラーゲン合成やアルカリホスファターゼ活性を抑制することを報告し, Dietrich et al. (1976)³⁰⁾も PTHが cAMP を介して骨のタンパク合成のうちコラーゲン合成だけを特異的に抑制することをみて, PTHの骨芽細胞 osteoblast に対する直接的作用を明らかにした³¹⁻³³⁾。

一方, 川島, 岩田, 遠藤 (1973) ら³⁴⁾の軟骨組織培養による報告では, PTHは軟骨細胞の増殖を促進し, 同時にその分化機能である軟骨

基質合成活性を促進するが、基質分解系には影響を与えない。すなわち骨組織では骨吸収を促進することによって骨破壊の方向に作用する PTH が類縁の軟骨組織では逆に軟骨を成長させる方向に作用するという、まったく逆の対照的効果をもつことを明らかにした。

また、Parsons and Reit (1974)³⁵⁾ は少量の PTH を内在性カニューレから持続的に供給すると、血清カルシウムは上昇するが組織学的に骨破壊は認められないことから次のように結論した。ホルモン注射による骨破壊は大量投与による病的現象で上皮小体の正常の機能は腎と腸を介して血清中のカルシウム濃度を上昇させて骨の形成を促進することにあると。

他方、骨と同じ硬組織を形成する歯髄については石川、鈴木(1980)³⁶⁾ の *in vitro* の実験があり PTH は歯髄の cAMP を上昇させ、象牙質の形成、とくに石灰化を促進させる可能性が示され、上皮小体摘出ラットの歯髄内カルシウム量が PTH の投与により正常値に回復し、この変動が歯髄内 cAMP 量の変動と相関していることを報告した(図 5)³⁷⁾。同様に下川ら(1979)³⁸⁾ は *in vitro* の実験で PTH がウシ歯髄内の cAMP とアルカリホスファターゼを増加させ、アルカリホスファターゼの増加が cAMP を介していることを示唆した。このように PTH は

in vitro の実験では骨芽細胞には一般に抑制的に作用するのに、歯髄では軟骨細胞同様に促進的に働くことになる。骨のようにカルシウム貯蔵庫としての役割のない歯髄のこのような PTH 反応性はおそらく象牙質の石灰化に関係しているものと思われる。

2. Calcitonin (CT)

甲状腺の旁濾胞細胞から分泌されるカルシトニン calcitonin またはサイロカルシトニン thyrocalcitonin と呼ばれるホルモンは上皮小体と拮抗的に働き骨吸収を抑制することによって骨から血清へのカルシウム溶出を減少させ血清カルシウム値を正常まで低下させる作用がある。^{39), 40)}

その作用機序は完全に解明されていないが、やはり cAMP を介して伝達され、PTH と異なって Ca^{2+} と HPO_4^{2-} の両イオンの腎よりの排泄を促進するといわれている⁴¹⁻⁴⁴⁾。しかし最近の考え方ではカルシトニンは骨に直接作用し、骨吸収を抑えるか、骨形成を増加させるか、あるいは両方の作用を示すと考えられている。

岩田と遠藤(1976)⁴⁵⁾ の軟骨組織(鶏胚大腿骨)の培養結果によるとカルシトニンは軟骨組織に対して長軸成長、乾燥重量、タンパク質、コンドロイチン硫酸のすべての面からみてその

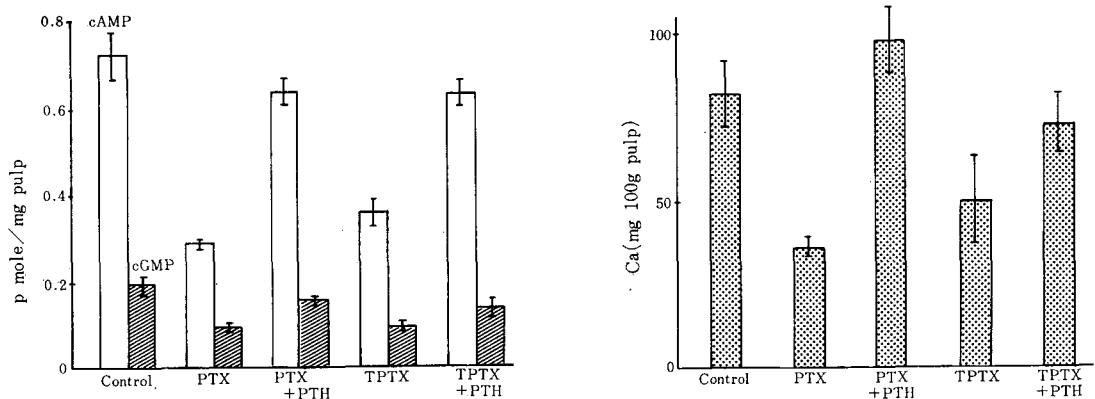


図5 PTH 投与後の cAMP, cGMP, Ca の変化

PTX: 副甲状腺摘出ラット TPTX: 甲状腺, 副甲状腺摘出ラット

PTX, TPTX では cAMP, cGMP, Ca いずれも減少するが PTH 投与により回復してくることを示す。(鈴木・石川・小柳らによる³⁷⁾)

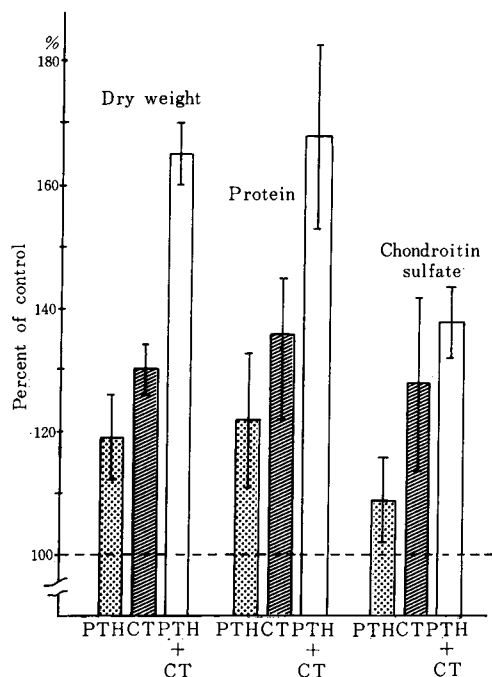


図6 in vitro における鶏胚大腿骨の生長に対する PTH とカルシトニンの成長促進作用について、(岩田, 遠藤らによる⁴⁵⁾)

成長を著しく促進することを報告している。また PTH とカルシトニンを同時投与すると両ホルモンによって相加的な軟骨成長促進効果が示され、軟骨組織においては PTH とカルシトニンは協同して成長に働くという、骨組織の場合とは全く違った役割を果たしている可能性を示唆した(図6)。

一方においては、カルシトニンが鶏胚脛骨の成長を抑制するという報告もみられる⁴⁶⁾。また下村ら(1976)⁴⁷⁾、米田ら(1977)⁴⁸⁾は成長軟骨細胞と静止軟骨細胞では細胞学的性質あるいはカルシトニンに対する反応性に大きな差がみられ、PTH とカルシトニンの成長促進効果は静止軟骨細胞ではみられないことを報告している。同様に岩田と遠藤(1977)⁴⁹⁾は鶏胚大腿骨の in vitro の実験で骨端・中間部・骨幹部に分けると PTH とカルシトニンの顕著な賦活作用は中間部と骨幹部にのみみられ、その作用は相加的であることを示した。また、山本ら(1979)⁵⁰⁾、Cohn and Wong (1978)⁵¹⁾ は骨分離

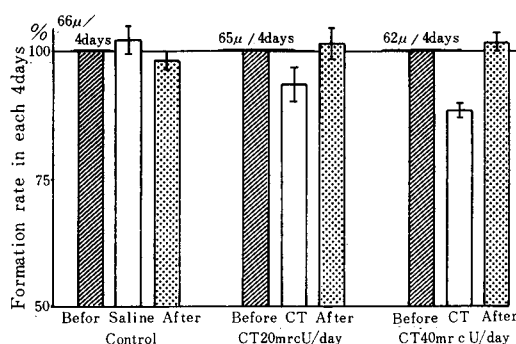


図7 カルシトニン投与前4日間の象牙質の形成量を100%として投与中、投与後の形成量を%で表わした。カルシトニン投与中はいずれも減少し、投与後は回復している。
(東城他らによる⁵²⁾)

細胞の培養から、PTH感受性細胞とカルシトニン感受性細胞がみられ、PTHの作用する受容体および細胞とカルシトニンの作用する受容体および細胞とは異なることを示した。しかしながら同一組織中に両者の細胞群が混在するか否かについては今後の課題である。

東城ら(1979)⁵²⁾はカルシトニンが象牙質石灰化および形成量に対し抑制的に作用することを報告している。また同時に投与量に比例して歯髄内 cAMP が減少することを示している(図7)。上記のようにカルシトニンが骨の新生に働くか否かについては組織培養レベルではかなり明らかになってきたが、歯牙形成にいかに関与するかについては未だ十分な理解が得られていない。

3. ビタミンD₃(活性型ビタミンD₃について) Calciferol

ビタミンD₃はカルシウムおよびリンの代謝に関係し、骨の化骨現象調整作用があり、上皮小体と密接な関係のあることが知られている。ビタミンD₃は小腸からのカルシウムの吸収を促進し、その結果としてリンの吸収を促進させる。カルシウムの腸からの吸収は能動輸送で、ビタミンDは細胞表面の膜透過性に関与してその能動輸送を促進することが報告されている⁵³⁾。ビタミンDは紫外線の照射によって有効となるプロビタミンDが知られD₂(ergosterol—植

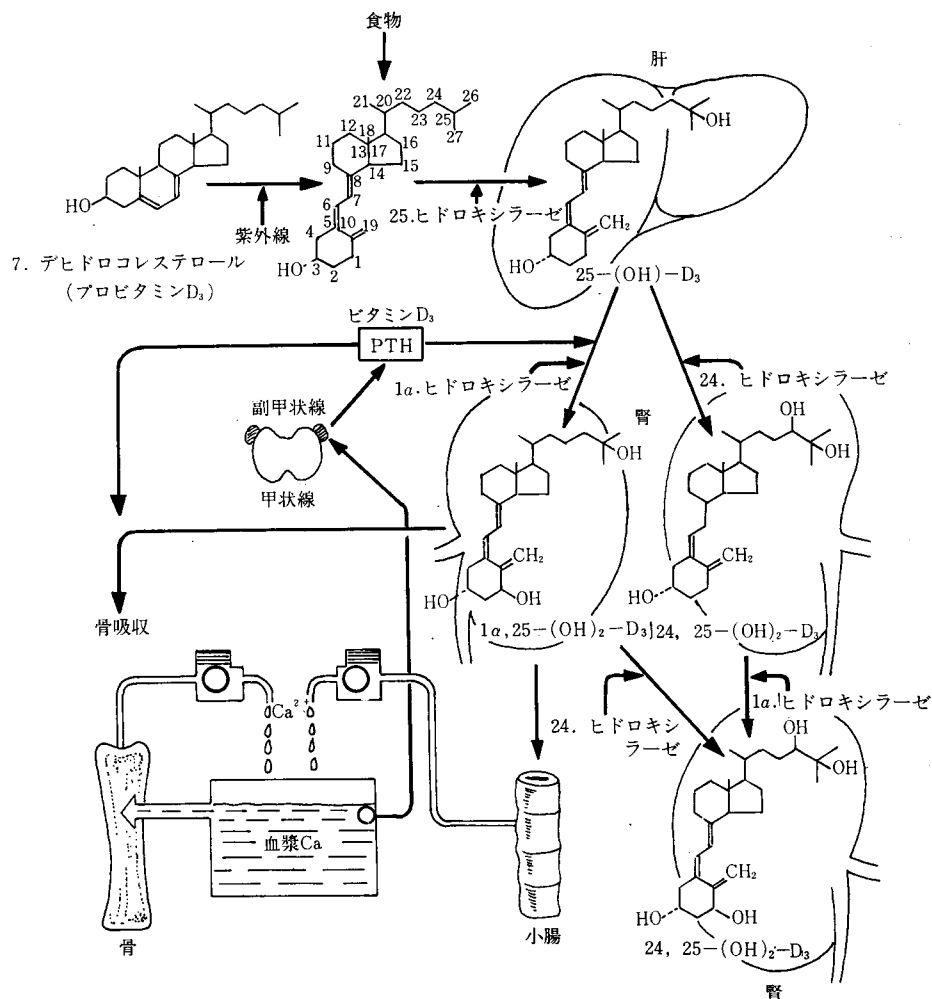


図8 生体内におけるビタミンD₃の代謝経路とその作用を示す模式図
(須田・堀内・尾形らによる⁷⁵⁾)

物体), D₃ (7-dehydrocholesterol) に分けられ, D₁はD₂の中間体にすぎず, D₄以下は生物学的活性はD₃よりはるかに低いといわれている。

近年ビタミンDに関する研究が急速に進みビタミンDがその標的器官(十二指腸, 骨組織)において活性を発現するためには体内でビタミンDの活性化が起きなければならないことが明らかになってきた(図8)^{54, 55)}。すなわち, ビタミンD₃は吸収されると肝臓に運ばれ, 肝細胞の小胞体の25-水酸化酵素によって25位の炭素が水酸化されて25-hydroxycholecalciferol

(25-OH-D₃)になる^{56, 57)}。肝臓で作られ血液中に分泌された25-OH-D₃は腎臓に運ばれ, 1α位と24位の炭素がさらに水酸化され, 1α, 25-dihydroxycholecalciferol [1α, 25-(OH)₂-D₃]と24, 25-dihydroxycholecalciferol [24, 25-(OH)₂-D₃]の二つの代謝産物になる⁵⁸⁻⁶¹⁾。この二つの代謝産物のうちで標的器官でビタミンD作用を発揮するのが1α, 25-(OH)₂-D₃であることが確認されている⁶²⁻⁶⁴⁾。したがって1α, 25-(OH)₂-D₃はビタミンというよりはカルシウム代謝を調節する腎臓のホルモンと考えられるようになってき

た。

$1\alpha, 25-(\text{OH})_2-\text{D}_3$ はそれ自身強い血清カルシウム上昇作用を有するので何んらかの調節機構が必要であり、血清カルシウムレベルによる調節⁶⁵⁾、血清中の PTH レベルによる調節⁶⁶⁾、血清リンレベルによる調節⁶⁷⁾などが考えられている。

Boyle ら (1971)⁶⁵⁾ は $1\alpha, 25-(\text{OH})_2-\text{D}_3$ の合成量は血清カルシウムレベルにより調節されることを明らかにした。すなわち血清レベルが正常ないしそれ以上の時は、 $24, 25-(\text{OH})_2-\text{D}_3$ が生産され、カルシウムが欠乏すると活性型の $1\alpha, 25-(\text{OH})_2-\text{D}_3$ が分泌されたと考えたがその後の研究で、低カルシウムの場合の $1\alpha, 25-(\text{OH})_2-\text{D}_3$ の促進は間接的で PTH 分泌亢進の結果であること、また 1α -水酸化酵素に及ぼす PTH の賦活作用は cAMP を介して行われることが明らかにされてきた⁶⁸⁾。

他方、カルシトニンは高カルシウム血症のときに分泌され血清カルシウムを低下させることが知られているが、Horiuchi ら (1979)⁶⁹⁾ のビタミン D 欠乏、甲状腺・副甲状腺摘出ラットにおける腎の $1\alpha, 25-(\text{OH})_2-\text{D}_3$ 産生に及ぼす PTH・カルシトニンおよび cAMP の効果。

類縁体である $24(\text{R}), 25-(\text{OH})_2-\text{D}_3$ の生

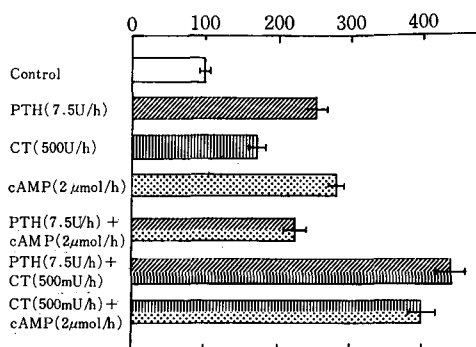


図9 ビタミンD欠乏・甲状腺・副甲状腺摘出ラットにおける腎の $1\alpha, 25-(\text{OH})_2-\text{D}_3$ 産生に及ぼす PTH・カルシトニンおよび cAMP の効果。(堀内・須田による⁷⁶⁾)

体内の役割についてはあまり知られていないが近年になって骨形成に関与する可能性が示唆されてきた^{70,71)}。さらに、PTH, $1\alpha, 25-(\text{OH})_2-\text{D}_3$ と $24(\text{R}), 25-(\text{OH})_2-\text{D}_3$ の共存が骨形成を促進するという報告もみられる⁷²⁾。一方、calvaria の培養ではビタミン D₃ およびその代謝産物は石灰化を促進せず、in vitro のビタミン D の石灰化促進作用は間接的なもので直接、骨の石灰化を促進する可能性は少ないという報告もある⁷³⁾。

最近、森田と山本 (1980)⁷⁴⁾ は単層骨培養の結果から、 $1\alpha, 25-(\text{OH})_2-\text{D}_3$ が PTH の cAMP 産生を抑制することを報告した。この negative feed back 機構は $1\alpha, 25-(\text{OH})_2-\text{D}_3$ が核受体に結合したのちなんらかの機能蛋白の合成を経て、それによって PTH による cAMP 合成の阻害、あるいは cAMP 崩壊の生じる可能性を示唆している。

このように、ビタミン D₃ の調節に関しては未だ残された問題点もあり、それらの詳細については他の総説を参照されたい (図10)^{75,76)}。

以上、石灰化機構の中でも結晶核形成、また血清中のカルシウム、リンイオンの調節に関する因子について概略を記したつもりであるが、特に歯牙硬組織の石灰化機構については研究が少なく十分に網羅することができなかった。骨組織と歯牙の石灰化機構は全く異なるものか、同じものかについては疑論の点だが、本質的にはそれほど異なるものとは思えない。こ

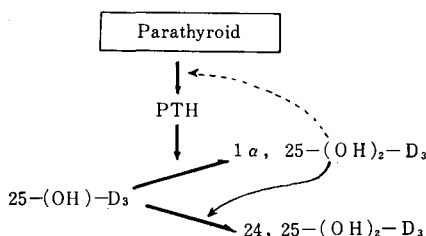


図10 $25-\text{OH}-\text{D}_3$ 代謝の negative feed back control についての PTH と $1\alpha, 25-(\text{OH})_2-\text{D}_3$ の役割を示す模式図。実線は促進を示し、点線は抑制を示す。(須田, 堀内, 尾形らによる⁷⁵⁾)

これらの点に関しては成書⁷⁷⁻⁷⁹⁾なり他の総論^{80,81)}を参考にしていただきたい。

文 献

- 1) 内海順夫・久米川正好・鈴木和夫・中原皓・名和澄黄雄・東 昇平：人の歯の組織学，書林，東京，41-54頁，1980.
- 2) Robinson R. : The possible significance of hexose phosphoric esters in ossification. *Biochem. J.* 17 : 286-293, 1923.
- 3) Neuman W. F. and Neuman M. W. : The Chemical Dynamics of Bone Mineral. Univ. of Chicago Press, 1958.
- 4) Glimcher M. J., Hodge, A. J. and Schmitt, F. O. : Macromolecular aggregation states in relation to mineralization : the collagen-hydroxyapatite system as studied in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 43 : 860-867, 1957.
- 5) Fleisch H. and Neuman W. F. : Mechanisms of calcification, role of collagen, polyphosphates and phosphatase. *Amer. J. Physiol.* 200 : 1926-1300, 1961.
- 6) Irving, J. T. : A histochemical staining method for sites of calcification in teeth and bone. *Arch. oral Biol.* 1 : 89-96, 1959.
- 7) Irving J. T. : The sudanophil materials at sites of calcification. *Arch. oral Biol.* 8 : 735-749, 1963.
- 8) Odutuga, A. A. and Prout, R. E. S. : Fatty acid composition of neutral lipids and phospholipids of enamel and dentine from rat incisor and molars. *Arch. oral Biol.* 18 : 689-697, 1973.
- 9) Odutuga, A. A., Prout, R. E. S. and Hoare, R. J. : Hydroxyapatite precipitation in vitro by lipids extracted from mammalian hard and soft tissues. *Arch. oral Biol.* 20 : 311-316, 1975.
- 10) Suga, S. : Über die beziehung zwischen Mineralisationsgrad und histochemischen Merkmalen der organischen Grundsubstanz in normalen meerschweinchen Dentin. *Dtsch. Zahnärztl. Z.* 20 : 68-83, 1965.
- 11) Bonucci, E. : Fine structure and early cartilage calcification. *J. Ultrastruct. Res.* 20 : 33-50, 1967.
- 12) Anderson, H. C. and Reynolds, J. J. : Pyrophosphate stimulation of calcium uptake into cultured embryonic bones. Fine structure. *Dev. Biol.* 34 : 211-227, 1973.
- 13) Thyberg, J. and Friberg, U. : Ultrastructure and acid phosphatase activity of matrix vesicles and cytoplasmic dense bodies in the epiphyseal plate. *J. Ultrastruct. Res.* 33 : 554-573, 1970.
- 14) Ali, S. Y., Sajdera, S. W. and Anderson, H. C. : Isolation and characterization of calcifying matrix vesicles from epiphyseal cartilage. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 67 : 1513-1520, 1970.
- 15) Matsuzawa, T. and Anderson, H. C. : Phosphatase of epiphyseal cartilage studied by electron microscopic cytochemical methods. *J. Histochem. Cytochem.* 19 : 801-808, 1970.
- 16) Ali, S. Y. and Evans, L. : The uptake of (⁴⁵C) calcium ions by matrix vesicles isolated from calcifying cartilage. *Biochem. J.* 134 : 647-650, 1973.
- 17) 小沢英浩，山田まりえ：軟骨の石灰化についての一考察，歯基礎誌，15 : 244, 1973.
- 18) Simon, D. R., Berman, I. and Howell, D. S. : Relationship of extracellular matrix vesicles to calcification in normal and healing rachitic epiphyseal cartilage. *Anat. Rec.* 176 : 167-180, 1973.
- 19) Peress, N. S., Anderson, H. C. and Sajdera, S. W. : The lipids of matrix vesicles from bovine fetal epiphyseal cartilage. *Calcif. Tiss. Res.* 14 : 275-281, 1974.
- 20) Krane, S. M. and Glimcher, M. J. : Transphosphorylation from nucleoside di- and triphosphate by apatite crystals. *J. Biol. Chem.* 237 : 2991-2998, 1962.
- 21) Fleisch, H. and Bisaz, S. : The inhibitory effect of pyrophosphate on calcium oxalate precipitation and its relation to urolithiasis. *Experimentia.* 20 : 276-277, 1964.
- 22) Fleisch, H., Maerki, J. and Russell, R. G. G. : Effect of pyrophosphate on dissolution of hydroxyapatite and its possible importance in calcium homeostasis. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.* 122 : 317-320, 1966.
- 23) 中原 皓，佐藤千枝子：臍・骨結合部の微細構造・解剖誌，48 : 34-35, 1973.
- 24) 小沢英浩：石灰化組織における Ca の局在と動態—電顕の Ca 検出法を中心に，歯基礎誌，14 : 付125-127, 1972.
- 25) Katchburian, E. : Membrane-bound bodies as initiators of mineralization of dentine. : *J. Anat.* 116 : 285-302, 1973.
- 26) Sobel, A. E. and Burger, M. : Calcification XIV. Investigation the role of chondroitin sulfate in the calcifying mechanism. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.* 48 : 297-306, 1954.
- 27) Butler, W. T. : In the comparative Molecular Biology of Extracellular Matrices. Ed. Slavkin, H. C. p255, Academic Press. 1972.
- 28) Talmag, R. V. and Elliot, J. R. : Influence of parathyroids on intestinal absorption

- of radiocalcium and radiostrontium. *Fed. Proc.* 17 : 160, 1958.
- 29) Luben, R. A., Wong, G. L. and Cohn, D. V. : Biochemical characterization and calcitonin of isolated bone cells : provisional identification of osteoclasts and osteoblasts. *Endocrinol.* 99 : 523-534, 1979.
 - 30) Dietrich, J. W., Canalis, E. M., Maina, D. M. and Raisz, L. G. : Hormonal control of bone collagen synthesis in vitro : effect of parathyroid hormone and calcitonin. *Endocrinol.* 98 : 943-949, 1976.
 - 31) Nagata, N., Sasaki, M., Kimura, N. and Nakane, K. : The hypercalcemic effect of parathyroid hormone and skeletal cyclic AMP. *Endocrinol.* 96 : 725-731, 1975.
 - 32) Wells, H. and Lloyd, W. : Hypercalcemic and hypophosphatemic effects of dibutyl cyclic AMP in rats after parathyroidectomy. *Endocrinol.* 84 : 861-867, 1969.
 - 33) Vaes, G. : Parathyroid hormone-like action of N⁶-2'-O-dibutyladenosine-3' 5' (cyclic)-monophosphate on bone explants in tissue culture. *Nature*, 219 : 939-940, 1968.
 - 34) 川島光太郎, 岩田信二郎, 遠藤浩良 : 副甲状腺ホルモンの軟骨組織成長促進作用. 骨代謝. 6 : 114-117, 1973.
 - 35) Parsons, J. A. and Reit, B. : Chronic response of dogs to parathyroid hormone infusion. *Nature*, 250 : 254-257, 1974.
 - 36) 石川市次郎, 鈴木暲俊 : 副甲状腺ホルモンおよびカルチトニンによる分離した全歯髄および歯髄細胞における cyclic AMP の生成. 骨代謝. 13 : 312-319, 1980.
 - 37) 鈴木暲俊, 石川市次郎, 小柳久子 : 歯髄 cyclic AMP と歯髄カルシウムおよび象牙質石灰化との関連. 骨代謝. 10 : 204-210, 1977.
 - 38) 下川仁弥太, 須藤憲一, 大井田新一郎, 佐藤千恵子, 新井弘子, 佐々木 哲, 角田左武郎 : 歯髄の PTH 反応性について. 骨代謝. 12 : 293-299, 1979.
 - 39) Hirsch, P. F., Geraldine, F. and Munson, P. L. : Thyroid hypocalcemic principle and recurrent laryngeal nerve injury as factors affecting the response to parathyroidectomy in rat. *Endocrinol.* 73 : 244-252, 1963.
 - 40) Johnston, C. C. Jr. and Deiss, W. P. Jr. : An inhibitory effect of thyrocalcitonin on calcium release in vivo and on bone metabolism in vitro. *Endocrinol.* 78 : 1139-1144, 1966.
 - 41) Kenny, A. D. and Heiskell, C. A. : Effect of crude thyrocalcitonin on calcium and phosphorus metabolism in rats. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.* 120 : 267-271, 1965.
 - 42) Wells, H. and Lloyd, W. : Effects of theophylline on the serum calcium of rats after parathyroidectomy and administration of parathyroid hormone. *Endocrinol.* 81 : 139-144, 1967.
 - 43) Willis, J. B. : Determination of calcium in blood serum by atomic absorption spectroscopy. *Nature*, 16 : 249-250, 1960.
 - 44) Rodan, S. B. and Rodan, G. A. : The effect of parathyroid hormone and thyrocalcitonin on the accumulation of cyclic adenosine 3' : 5'-monophosphate in freshly isolated bone cells. *J. Biol. Chem.* 249 : 3068-3074, 1974.
 - 45) 岩田信二郎, 遠藤浩良 : カルチトニンの軟骨組織成長作用. 骨代謝. 9 : 329-332, 1976.
 - 46) Des Marchais, J., Jean, P. and Liskova, M. : Effect of calcitonin on growth of chick cartilaginous bone in vitro. *Clinic. Orthopaed. Related Res.* 82 : 229-233, 1972.
 - 47) 下村 裕, 渡辺林三, 米田俊之, 鈴木不二男 : 分離培養した成長軟骨細胞に対するホルモンおよびビタミンの影響(1)副甲状腺ホルモン, カルチトニン, ビタミンDの影響. 骨代謝. 9 : 114-120, 1976.
 - 48) 米田俊之, 渡辺林三, 下村 裕, 大工原恭, 鈴木不二男 : ラット成長軟骨培養細胞の性質(1). 骨代謝. 10 : 241-245, 1977.
 - 49) 岩田信二郎, 遠藤浩良 : 副甲状腺ホルモンおよびカルチトニンの軟骨細胞賦活作用. 単離軟骨細胞の単層維持培養による研究. 骨代謝. 10 : 247-250, 1977.
 - 50) 山本逸雄, 福永仁夫, 土光茂治, 小西淳二, 森田陸司, 鳥塚莞爾 : カルチトニンの骨に対する作用機序について. 骨代謝. 12 : 385-391, 1979.
 - 51) Cohn, D. V. and Wong, G. L. : The actions of parathormone, calcitonin and 1 α , 25-dehydroxycholecalciferol on isolated osteoclast and osteoblast-like cells in culture (Ed. by Copp, D. H. and Talmage, R. V.). *Endocrinology of calcium metabolism*, Excerpta Medica, Amsterdam, p. 241, 1978.
 - 52) 東城庸介, 石川市次郎, 小柳久子, 鈴木暲俊 : 歯髄のカルシウムと無機燐の代謝および象牙質の石灰化に及ぼすカルチトニンの影響. 骨代謝. 12 : 392-399, 1979.
 - 53) 島菌順雄, 万木庄次郎 : ビタミン(1)研究史を中心として. 共立出版. 東京. 1980.
 - 54) Omdahl, J. L. and DeLuca, H. F. : Regulation of vitamin D metabolism and function. *Physiol Rev.* 53 : 327-372, 1973.
 - 55) 須田立雄 : 1, 25-dihydroxycholecalciferol—その発見・純化・構造決定及び生理学的意義について. ビタミン. 45 : 175-188, 1972.
 - 56) Ponchon, G., Kennan, A. L. and DeLuca, H. F. : "Activation" of vitamin D by the liver. *J. Clin. Invest.* 48 : 2032-2037, 1976.
 - 57) Blunt, J. W., DeLuca, H. F. and Schones,

- H. K. : 25-hydroxycholecalciferol. A biologically active metabolism of vitamin D₃. *Biochemistry*. 7 : 3317-3322, 1968.
- 58) Frasen, D. R. and Kodicek, E. : Unique biosynthesis by kidney of a biologically active vitamin D metabolite. : *Nature*. 228 : 764-766, 1970.
- 59) Holick, M. F., Schonoes, H. K., DeLuca, H. F., Suda, T. and Cousin, S. : Isolation and identification of 1, 25-dehydroxycholecalciferol. A metabolite of vitamin D active in intestine. *Biochemistry*. 10 : 2799-2804, 1971.
- 60) Lawson, D. E. M., Fraser, D. R., Kodicek, E., Morris, H. R. and Williams, D. E. : Identification of 1, 25-dehydroxycholecalciferol, a new kidney hormone controlling calcium metabolism. *Nature*. 230 : 228-230, 1971.
- 61) Holick, M. F., Schones, H. K., DeLuca, H. F., Gray, R. W., Boyle, I. T. and Suda, T. : Isolation and identification of 24, 25-dehydroxycholecalciferol, a metabolite of vitamin D₃ made in kidney. *Biochemistry*. 11 : 4251-4255, 1972.
- 62) Omdahl, J., Holick, M. F., Suda, T., Tanaka, Y. and Deluca, H. F. : Biological activity of 1, 25-dehydroxycholecalciferol. *Biochemistry*. 10 : 2935-2940, 1971.
- 63) Folick, C. A. and DeLuca, H. F. : Metabolism of 1, 25-dehydroxycholecalciferol in the rat. *J. Clin. Invest.* 51 : 2900-2906, 1972.
- 64) Kodicek, E., Lawson, D. E. M. and Wilson, P. W. : Biological activity of a polar metabolism of vitamin D₃. *Nature*. 228 : 763-764, 1970.
- 65) Boyle, I. T., Gray, R. W. and Deluca, H. F. : Regulation by calcium of in vivo synthesis of 1, 25-dehydroxycholecalciferol and 21, 25-dehydroxycholecalciferol. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 68 : 2131-2134, 1971.
- 66) Garabedian, M., Holick, M. F., DeLuca, H. F. and Boyle, I. T. : Control of 25-hydroxycholecalciferol metabolism by parathyroid glands. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 69 : 1673-1676, 1972.
- 67) Tanaka, Y. and DeLuca, H. F. : The control of 25-hydroxyvitamin D metabolism by inorganic phosphorus. *Arch. Biochem. Biophys.* 154 : 566-574, 1973.
- 68) Horiuchi, N., Suda, T., Takahashi, H., Shimazawa, E. and Ogata, E. : In vitro evidence for the intermediary role of 3', 5'-cyclic AMP in parathyroid hormone-induced stimulation of 1 α , 25-dihydroxyvitamin D₃ synthesis in rats. *Endocrinol.* 101 : 969-974, 1977.
- 69) Horiuchi, N., Takahashi, H., Matsumoto, T., Takahashi, N., Shimazawa, E., Suda, T. and Ogata, E. : Salmon calcitonin-induced stimulation of 1 α , 25-dihydroxycholecalciferol synthesis in rats involving a mechanism independent of adenosin 3', 5'-cyclic monophosphate. *Biochem. J.* 184 : 269-275, 1979.
- 70) Ornoy, A., Goodwin, D., Noff, D. and Edelstein, S. : 24, 25-dihydroxyvitamin D is a metabolite of vitamin D essential for bone formation. *Nature*. 276 : 517-519, 1978.
- 71) Kanis, J. A., Cundy, T., Bartlett, M., Smith, R., Heynen, G., Warner, G. T. and Russell, R. G. G. : Is 24, 25-dihydroxycholecalciferol a calcium-regulating hormone in man? *Br. Med. J.* 1 : 1382-1386, 1978.
- 72) 遠藤浩良, 清木 護, 川島光太郎, 成智達之, 橋本喜信 : 骨組織培養法による骨形成の研究——活性型ビタミン D₃ および副甲状腺ホルモンの協同作用. 骨代謝. 13 : 376-380, 1980.
- 73) 鈴木ミチ子, 須田立雄, 佐々木 哲, 久米川正好, 中村敏一 : 培養下におけるビタミン D₃ の各種代謝産物の石灰化促進作用の検討. 歯基礎誌. 15 : 245, 1973.
- 74) 森田陸司, 山本逸雄 : 培養骨細胞に及ぼす副甲状腺ホルモンおよびビタミン D の相互作用. 骨代謝. 13 : 23-28, 1980.
- 75) 須田立雄, 堀内 登, 尾形悦郎 : 腎における活性型ビタミン D の合成とその調節. 蛋白質・核酸・酵素. 12 : 76-86, 1976.
- 76) 堀内 登, 須田立雄 : 腎におけるビタミン D の活性化に及ぼす副甲状腺ホルモンとカルシトニンの役割. 治療学, 4 : 323-330, 1980.
- 77) 荒谷真平, 井尻正二, 桐野忠大, 三村 二, 須賀昭一, 田熊庄三郎, 和田浩爾 : 硬組織研究法. 医歯薬出版. 東京, 1969.
- 78) 河村洋二郎監訳 : ジェンキンス口腔の生理・生化学. 第4版, 医歯薬出版, 東京, 1981.
- 79) 須田立雄, 小椋陽介 : 図説新しいホルモン活性型ビタミン D. 新宿書房, 東京, 1980.
- 80) 小沢英浩 : 硬組織の超微細構造と石灰化. 骨代謝. 8 : 227-265, 1975.
- 81) 永井教之 : 歯牙形成細胞の機能(1)基質形成とその石灰化機構. 細胞. 10 : 406-418, 499-512, 1978.