

— 紹 介 —

硬組織石灰化機構に関する最近の超微形態学的知見

小 沢 英 浩

新潟大学歯学部口腔解剖学第1教室（主任：小沢英浩）

（昭和55年6月28日受付）

The Advanced Ultrastructural Aspects of Hard Tissue
Mineralization Processes

Hidehiro OZAWA

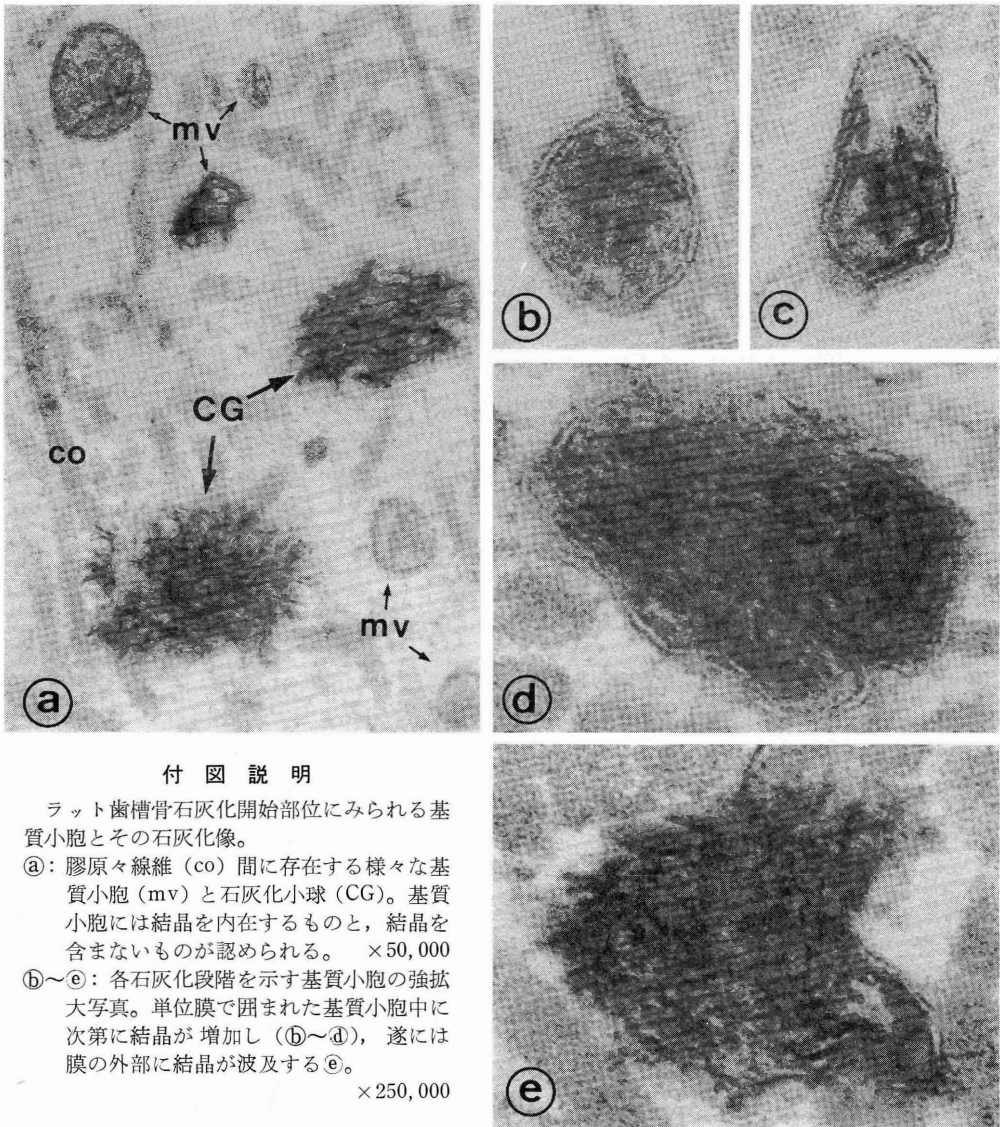
*First Department of Oral Anatomy, Niigata University School of Dentistry
(Director: Prof. Hidehiro Ozawa)*

骨や歯など硬組織の形成、石灰化あるいは吸収機構に関する超微形態学的研究は近年急速に発展し多くの注目すべき報告がみられるが、ここでは特に生物学的石灰化 Biological Mineralization 機構に関する最近の知見について簡単に紹介する。

生体内で骨や歯など特定の組織のみにカルシウムやリンが沈着し結晶化するが、その機構はなお謎につつまれており、多くの研究者の興味をそそっている。石灰化機構に関する研究は歴史的には1930年代のRobisonによるアルカリホスファターゼ説、1950年代のNeumanらのエピタキシー説を経て、1970年代に到りAnderson, Bonucciらの基質小胞説へと発展し今日に及んでいる。しかしながらこれらの諸説はいずれも石灰化機構を説明するための必要十分な説とは言えず、ここに生物学的石灰化機構の複雑性が窺える。その一因として、生物学的石灰化現象が石灰化開始時にみられるような、石灰化部位の設定、Ca, Pの局所への集積、結晶化、石灰化量（速度）の調節といった一連の極めて細胞学的な因子の強い部分と、一旦結晶が形成されるとその後の結晶成長や結晶成熟化にみられるような物理化学的、鉱物学的な因子の強い部分とが混然一体をなしてい

ることが挙げられる。この複雑な石灰化機構に対してRobisonの説は細胞による石灰化機構（押し上げ機構）を強く打ち出したものであったが、細胞の制御下にある有機基質に対する考察が足りず、一方のNeumanらの説は細胞外基質の構造との関連性（触媒機構）のみにとらわれすぎ、石灰化開始機構に対する細胞の役割を軽視し過ぎたためにともに自己矛盾に陥入り、石灰化機構を完全に説明し得る説とはなり得なかったのである。Andersonらの基質小胞説はその点押し上げ説と触媒説を共に満足させることのできる説で、Uristらの三相局所機構説に類似し、しかもあくまでも細胞学的な一貫性を持っているところにその特徴がある。以下、この10年来脚光をあび続けている基質小胞説^{1)~5)}について簡単に説明しよう。

基質小胞とは、細胞により形成され細胞外基質中に遊離して局在する生体膜で囲まれた直径30 nm-300 nm位の多様な形態を示す小胞構造物である。これらの小胞は多くの場合その内部に結晶構造を析出させ、そこに石灰化開始部位を設定する。内部結晶は次第に増加し、遂には結晶で満され、小胞膜は不明瞭になり、小胞は消失する(図)。基質小胞はこのような一連の形態学的変化の過程をたどるために、石灰化のinitiatorとして一躍



付 図 説 明

ラット歯槽骨石灰化開始部位にみられる基質小胞とその石灰化像。

- ①: 膠原々線維 (co) 間に存在する様々な基質小胞 (mv) と石灰化小球 (CG)。基質小胞には結晶を内在するものと、結晶を含まないものが認められる。×50,000
- ②~⑤: 各石灰化段階を示す基質小胞の強拡大写真。単位膜で囲まれた基質小胞中に次第に結晶が増加し (②~④), 遂には膜の外部に結晶が波及する⑤。

×250,000

注目を集めるようになったわけである。また、基質小胞の膜は強いアルカリホスファターゼ (Al-Pase), ATPase, ピロホスファターゼ (PPase) 活性を持つことが生化学的⁶⁾, 細胞化学的⁷⁾に明らかにされ Robison のアルカリホスファターゼ説を再びこの基質小胞によって甦らせた。これらの酵素活性の局在は基質小胞の石灰化機構に対して, Ca の小胞内への能動的な取り込みに関与するとする説⁸⁾と, 元来石灰化毒として結晶化を抑制しているピロリン酸を除去し, 同時に遊離のリ

ン酸イオン濃度を押し上げて石灰化を導くとする説⁹⁾, つまり Fleisch & Neuman (1961) の石灰化における抑制除去説に相当する説を生み, 現在なお両者は相対している。いずれにしても, この酵素は石灰化に対してリン酸イオンを供給しながら石灰化を律速している可能性は強い。基質小胞はまた, 高濃度の酸性リン脂質を含んでおり, この脂質と Ca が結合し安定化している可能性が示唆されている (Wurthier, 1968)¹⁰⁾。この考えは Irving (1963) によって提唱された石灰化機

構に対する脂質説に対応でき、事実、基質小胞は Irving のいう脂質可染部位に一致して局在している。基質小胞がある種のタンパク分解酵素を含んでいるであろうことは水解小体に対する形態類似性からも、また細胞化学的に酸性ホスファターゼ活性やアリルサルファターゼ活性を検出した Thyberg ら (1972)¹¹⁾の研究からも指摘されていた。しかし Ali ら (1970)⁶⁾の分離した基質小胞にはそのような酵素活性は検出されず、さらに細胞化学的研究でもそれらの酵素活性の局在を否定する研究も報告され、問題点を残したまま今日に及んでいる。しかし、Katsura ら¹²⁾(1980)の collagenase で分離した基質小胞には明らかに強い proteinase の活性が検出され、proteoglycan の加水分解に作用し、石灰化の促進に関与するであろうことが推論されている。すなわち、基質小胞内に最初の結晶が析出する頃には、細胞から遊離して存在する基質小胞はすでに膜の新生能を失っているために膜の透過性が変化し、水分の消失を招くと共に、小胞内部への Ca, P の入り込みを容易にして引き続いての結晶化を促すが、その結果、結晶は増加、増大し、小胞内部を満たして遂には膜を破って外部へ延び出すようになる。この際、小胞内部に含まれていると考えられているタンパク分解酵素も活性化され、小胞外へ放出されるのであろう。従ってそれらは近接する膠原線維周囲の proteoglycan を分解して除去し、より石灰化し易い状態を作り出し、石灰化の波及を容易にするという仮説を導びくことができる。この仮説は酢酸鉛法を用いた電顕的観察によっても確かめられつつあり (Ozawa et al., 1980)¹³⁾、さらにこの方法は石灰化基質小胞に接した膠原原線維上に生ずる結晶が膠原原線維の横紋上に沿って配列し、主として 640Å の主帯に沿って石灰化が進行することを Ca の代りに沈着した鉛が明らかに示している。この鉛実験の結果は従来 Neuman らのエピタキシー説の中軸をなす膠原原線維中の核、または種付け部位を電顕的に明らかにしたものと考えられるが、今後更に詳細な検討がまたれるところである。

基質小胞が細胞から形成されることはすでに触

れたが、どのような分泌形態により形成されるかはいまだ明確でない。しかし多くの形態学的・生化学的所見は基質小胞の膜が細胞膜に由来し、発芽性に分泌されるであろうことを示唆している。すなわち、単なる形態類似性のみならず、酵素細胞化学的⁷⁾、免疫細胞化学的類似性¹⁴⁾、凍結割断法による膜内粒子の類似性¹⁵⁾、さらに膜の marker enzyme である 5'-nucleotidase の活性など生化学的な類似性⁶⁾も発芽説を支持している。しかしながら、どの硬組織においても基質小胞の形態は多様性に富み、また上述のごとく酵素活性の相違をみても全てが細胞膜の発芽によるとは考えられない。従って、ER-Golgi-Lysosome 系によって作られた基質小胞の開口分泌形態^{16,17)}や、生理的な細胞の死に由来する全分泌形態¹⁸⁾も基質小胞の形成機序の1つとして指摘されており、多様な基質小胞の機能の分析とともに基質小胞の由来に関しては今後の研究課題の1つとして残されている。

基質小胞はかくして骨芽細胞や象牙芽細胞等硬組織形成細胞によって膠原線維や多糖体等の有機基質とともに細胞外に分泌され、石灰化開始部位を設定するが、硬組織細胞はこれらの機能の他に石灰化と関係してミネラルの輸送や調節機構にも積極的な役割を演じている可能性が指摘されている。すなわち、Kashiwa (1970) はグリオキサルビス法により光顕的に細胞内の Ca を染め出し、硬組織細胞には著しく Ca が多量に含まれていることを示唆し、Nichols (1972) らも生化学的に 50-100倍以上もの Ca が硬組織細胞に含まれているとしている。電顕的にも Ca は主として mitochondria, Golgi, ER, 核などに局在することが報告されており、特に mitochondria 中の Ca は異った方法を用いても共通した所見として認められている^{19,20,21)}。骨端軟骨においては、mitochondria 中の Ca の変動が基質小胞性の石灰化開始時期に一致して認められ、mitochondria による Ca の取り込み、石灰化に際しての Ca の放出、その Ca の基質小胞への移動ならびに結晶化という一連の関係が強く示唆されている²²⁾。これは Lehninger による Ca の micropacket 説

を支持するものであるが, mitochondria 中に Ca がどのような形で存在するのか, 放出された Ca がいかにして基質小胞へ運ばれるのか, また果してそれらの Ca は石灰化に直接使用されうるものであるのかなどについては定量的な方法論も導入して今後更に検討を要すると考えられる。

^{45}Ca の電顕オートラジオグラフィーによる所見も ^{45}Ca が細胞内に取り込まれ, 経時的に細胞外へ出ていくことは明らかにしたものの^{23,24)}, 細胞内に取り込まれた ^{45}Ca が石灰化に関与しているという直接的な証拠はなにもない。今後細胞による石灰化調節機構の解明にもより定量的な形態学的検索方法を取り入れて行う必要がある。

以上のごとく, 硬組織石灰化機構に関する研究は, 基質小胞の発見を契機によりやうく新たな方向へ向けて出発しようとしている段階であり, 口腔領域の硬組織諸疾患を解明するためにも, 硬組織吸収機構の解明とともに今後一層の研究が待たれるところである。

参 考 文 献

- 1) 小沢英浩: 硬組織石灰化機構と基質小胞. 歯科ジャーナル, **4**: 215-238, 1976.
- 2) 小沢英浩: 硬組織石灰化とその微細構造—象牙質石灰化を中心に. 歯界展望, **50**: 223-234, 1967.
- 3) 小沢英浩: 基質小胞と石灰化 (第9回河口湖カンファレンス「カルシウム代謝と骨疾患」藤田拓男, 尾形悦郎, 佐々木哲編) 医歯薬出版, pp.1-25, 1977.
- 4) 小沢英浩, 山田まりえ, 矢嶋俊彦: 基質小胞石灰化に関する微細構造学的, 細胞化学的研究. (第10回国際解剖学会硬組織シンポジウム記録「硬組織の形成と石灰化」Roy, V. Talmage, 小沢英浩編) 社会保険出版社, pp. 9-57, 1978.
- 5) 金沢 徹: 硬組織石灰化の機構—とくにその初期過程について—. 歯科基礎医誌, **19**: 1-18, 1977.
- 6) Ali, S. Y., Sajdera, S. W. and Anderson, H. C.: Isolation and characterization of calcifying matrix vesicles from epiphyseal cartilage. Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A., **67**: 1513-1520, 1970.
- 7) Matsuzawa, T. and Anderson, H. C.: Phosphatases of epiphyseal cartilage studied by electron microscopic cytochemical methods. J. Histochem. Cytochem., **19**: 801-808, 1971.
- 8) Ali, S. Y. and Evans, L.: The uptake of [^{45}Ca]-calcium ions by matrix vesicles isolated from calcifying cartilage. Biochem. J., **134**: 647-650, 1973.
- 9) Felix, R. and Fleisch, H.: Role of matrix vesicles in calcification. Federation Proc., **35**: 169-171, 1976.
- 10) Wuthier, R. E.: The role of phospholipids in biological calcification. Distribution of phospholipase activity in calcifying epiphyseal cartilage. Clin. Orthop., **90**: 191-200, 1973.
- 11) Thyberg, J. and Friberg, U.: Ultrastructure and acid phosphatase activity of matrix vesicles and cytoplasmic dense bodies in the epiphyseal plate. J. Ultrastr. Res., **33**: 554-573, 1970.
- 12) Katsura, N., Sakata, M., Fujiwara, T., Kawamura, M. and Tomita, K.: Degradation of cartilage proteoglycan by matrix vesicles. J. Dent. Res., **59**(B): 920, 1980.
- 13) Ozawa, H., Yamada, M., Yamamoto, T. and Ejiri, S.: Finestructural observations on the location of lead and calcium in the calcifying dentin. J. Dent. Res., **59**(B): 937, 1980.
- 14) Slavkin, H. C., Trump, G. N., Mansour, V., Matosian, P. and Mino, W. G.: Localization of H-2 histocompatibility alloantigens on mouse embryonic tooth epithelial and mesenchymal cell surfaces. J. Cell Biol., **60**: 795-801, 1974.
- 15) Russell, N. A., Cecil and Anderson, H. C.: Freeze-fracture studies of matrix vesicle calcification in epiphyseal growth plate. Metab. Bone Dis. & Rel. Res., **1**: 89-95, 1978.

- 16) 小沢英浩, 山田まりえ, 高野吉郎, 山本敏男, 内田 隆: 骨端軟骨における基質小胞の形態と細胞化学的特徴について. 解剖誌, 印刷中.
- 17) Takagi, M., Kasahara, H. and Toda, Y.: Freeze-fracture images of matrix vesicles of epiphyseal cartilage and non-calcified tracheal cartilage. *J. Electron Microsc.*, **28**: 165-175, 1979.
- 18) Yamada, M.: Ultrastructural and cytochemical studies on the calcification of the tendon-bone joint. *Arch. histol. jap.*, **39**: 347-378, 1976.
- 19) 小沢英浩, 山本敏男: 硬組織石灰化機構の研究とEDXの応用, *細胞*, **11**: 438-446, 1979.
- 20) Ozawa, H., Yamamoto, T., Yamada, M. and Uchida, T.: Frozen ultrathin sections for X-ray microanalysis of rat tooth germs. *J. Dent. Res.*, **58**(B): 1016-1018, 1979.
- 21) Ozawa, H.: Elemental analysis of calcifying hard tissues by analytical electron microscopy. *J. Electron Microsc.*, **29**: 75-76, 1980.
- 22) Brighton, C. T. and Hunt, R. M.: Mitochondrial calcium and its role in calcification. Histochemical localization of calcium in electron micrographs of the epiphyseal growth plate with k-pyroantimonate. *Clin. Orthop. and Related Res.*, **100**: 406-416, 1974.
- 23) Matthews, J., Martin, J. H., Lynn, J. A. and Collins, E. J.: Calcium incorporation in the developing cartilagenous epiphysis. *Calcif. Tiss. Res.*, **1**: 330-336, 1968.
- 24) Nagai, N. and Frank, R. M.: Electron microscopic auto-radiography of ^{45}Ca during dentinogenesis. *Cell Tiss. Res.*, **155**: 513-523, 1974.