骨細胞のカルシウム輸送とそれに及ぼす 金属塩の影響について

山 崎 和

北海道大学歯学部 歯科薬理学教室*

〔受付：昭和53年12月20日〕

抄録：硬組織の石灰化に関する研究は、基質小胞の発見により大きく発展し、石灰化機構における細胞の役割が重要視される様になった。著者はラット胎児及び新生児頭蓋冠の酵素処理により得た骨細胞が、大量のカルシウムを含み且その約30%が交換可能であること、又その出入は一部エネルギー依存性のものであること等を明らかにした。又カドミウム及びマンガンが骨細胞に於けるカルシウムの出入を特異的に抑制することを証明した。これらの成績は骨細胞の石灰化機構における役割及び重金属塩の硬組織に対する為害性の解明に有力な手がかりを得たものと考ええる。

I. 緒 言

石灰化機構に関する学説には、1920年代に Robison によって提出された「リン酸押し上げ説」、1950年代に Neuman によって提出された「matrix 説」の二大学説がある¹⁾。又石灰化の場となる基質高分子物質としては Collagen の他に Proteoglycans, glycoprotein 及び Osteocalcin 等が示唆されている²⁾。これらの考え方では細胞が石灰化機構に於て重要且直接的な役割を演じていると考えられていない。

1928年, Watt³⁾ は骨芽細胞に接した基質に見出される顆粒が、骨形成と密接な関係を有する可能性について初めて言及した。その後、1960年代になって Anderson ら⁴⁻⁶⁾ によって骨端軟骨の基質に小胞 (matrix vesicle) の存在することが電顕によって確められた。この小胞は膜様構造を有し、その内側に大量のリン酸カルシウムの存在することから⁷⁾、この小胞がカルシウムを能動的に取り込み、やがて石灰化の起始点となり得ることが推定された^{8,9)}。

他方1966年 Kashiwa¹⁰⁾ は Glyoxal bis (2-

hydroxy anil) (GBHA) を用いて、骨細胞内にリン酸カルシウムを含む顆粒 (calcium-containing granules) の存在することを示唆した。1969年 Matthews and Martin¹¹⁾ は幼若ラットの腹腔内に⁴⁵Caを注射し、これが骨細胞ミトコンドリア内顆粒に貯えられることを見出した。一方1970年 Lehninger^{12,13)} らは、ミトコンドリアを用いての一連の生化学的研究を行い、ミトコンドリアが能動的にカルシウムを取り込むことを明らかにした。

これら形態学的生化学的研究からそれらの生理的役割及び骨細胞がコントロールしている石灰化の初期段階が次第に明らかとなった。かくて石灰化は基本的には先ず骨細胞のミトコンドリアがエネルギー依存性にカルシウムを集め、Calcium poolを作る。これが細胞外に放出されると、基質小胞がこれを石灰化の場へ運び、基質高分子物質上にこれが次第に沈着して行く過程と理解される様になった¹⁴⁻¹⁵⁾。

そこで石灰化機構に関する研究の焦点も、基質から細胞へと移って来たが、硬組織から細胞を分離する技術が仲々進歩せず、従って骨細胞のカルシウム代謝に関する研究の進歩も遅々たるものが

Calcium movements in bone cells

Kazu YAMAZAKI (Department of Dental Pharmacology; Hokkaido University School of Dentistry, Sapporo)

* 札幌市北区北13条西7丁目 (〒060)

Jap. J. oral Biol. 21: 160-168, 1979.

ある。1964年 Peck ら¹⁶⁾はラット胎児頭蓋冠 (Calvaria) の基質を collagenase 処理することにより、細胞を分離することに成功した。次で1974年 Dziak and Brand¹⁷⁾はこの方法を更に改良し、骨細胞以外の物質を可能なかぎり除去し、骨細胞を用いてのカルシウム輸送に関する研究を可能とした。

そこで石灰化機構の初期段階で主役を演ずると考えられている骨細胞のカルシウム輸送機構がどうなっているのか、又重金属塩がこれにどのような影響を及ぼすのかを知ろうとして本実験を企てたのである。

II. 実験方法

1) 骨細胞の分離: Wistar-King 系ラットの17日~21日目胎児或いは新生児頭蓋冠 (Calvaria) より“骨細胞”を得た。細胞の分離法は Dziak and Brand 法に準じた¹⁷⁾。シリコン処理を行ったピーカーに可及的細片とした6~7個の Calvaria を入れ、これに Crude collagenase (Worthington Biochemical Corporation CLS type II) 及び crude hyaluronidase (Worthington Biochemical Corporation) を加えた。次にこれを37°C で2時間振盪培養 (100 oscillation/min) した。培養終了後これを Tris 緩衝液 (後述) で約4倍に希釈し、直ちにステンレス製支持スクリーン及び35 μ mesh のナイロン網を装置した濾過装置 (Millipore Swinnex-13 poly-propylene filter holder) を用いて debris を除去した。この濾過液から0°C, 700×g 5分間遠心により“骨細胞”を得た。骨細胞は骨組織から分離されるとその形態的特徴を失うので、得られた細胞を形態学的に分類することは困難であるが、その大きさから少なくとも3種類の細胞からなっていると考えられた。そしてそれらの分離は不可能であったので、これらを総称して“骨細胞”とし、これを実験に供した。

2) 骨細胞内カルシウム量の測定: この様にして得られた新鮮な骨細胞約 1×10^6 個を含む液1 ml をピペットで取り、細胞を吸引法により注意深く0.45 μ Millipore filter 上に集めた。吸引は1.5kg/cm² 真空で15秒間行った。この様にして、カルシウムを抽出するため集めた細胞を濾紙と共

に0.1N HCl 2 ml 中に浸漬し、室温に一昼夜放置した。カルシウムは島津 MAF 型蛍光分析器を用いて測定した。その精度は1 μ M 以上であった。尚試料中のリン酸によるカルシウム蛍光の干渉を防ぐため、1% LaCl₃ を^{1/10}量添加した。

3) カルシウム輸送実験: Efflux, Influx 及び Efflux-Influx 連続の3種の実験を行った。

a) Efflux 実験: 骨細胞を GEDTA 溶液 (後述) で、2, 3分洗浄した後、これを遠心法で分離した。次にこれに Ca²⁺-free 溶液 (後述) を加え、15分間の培養を行った。この間に細胞から溶液中に出て来たカルシウム量を“Efflux”とした。

b) Influx 実験: 先ず骨細胞を GEDTA 溶液中で30分間培養後、遠心法により Ca²⁺-depleted cell を分離した。次にこれに CaCl₂ 1.25mM を添加し、その後5分或いは30分間の培養を行った。その間に増加したカルシウムの量を“Influx”とした。尚 Efflux 及び Influx 実験での代謝阻害薬、金属塩等の添加時期は培養開始時とした。

c) Efflux-Influx 実験: GEDTA 溶液中で30分培養後遠心して得た骨細胞を、Ca²⁺-free 溶液の中で15分間培養 (以上 Efflux 実験) した後、CaCl₂ 1.25mM を添加した (Influx 実験)。尚代謝阻害薬、金属塩等を添加する場合は、「前処理」では Ca²⁺-free 溶液中で培養する前に添加し、培養15分後に CaCl₂ 1.25mM を加えた。「同時処理」では Ca²⁺-free 溶液中で15分間培養後、CaCl₂ と同時に添加した。何れの場合も全実験過程を通じ細胞機能の変化は認められなかった。

4) 溶液の組成および作製:

i) 培養溶液

a) カルシウム標準液 (Tris 緩衝液): NaCl 120mM, K₂HPO₄ 3mM, MgSO₄ · 7H₂O 1mM, Tris (hydroxy methyl) aminomethane 20mM, Mannitol 30mM, glucose 2mg/ml, CaCl₂ 1.25mM の組成とした。

b) GEDTA 溶液: カルシウム標準液の組成から CaCl₂ を除き、GEDTA (glycoether-diaminetetraacetic acid) 0.1mM を加えたもの。

c) Ca²⁺-free 溶液: カルシウム標準液の組成から CaCl₂ を除いたもの。以上の溶液は調製後、1

N HCl で pH 7.1 に調整した。

2) 代謝阻害薬

a) CCCP (Sigma 社), DNP (和光純薬): CCCP (Carbonyl cyanide m-chlorophenyl hydrazone) 及び DNP (2, 4-dinitrophenol) はあらかじめ 1 N NaOH でアルカリ性にして溶解後, 1 N HCl で pH 7.1 に調整した。DNP 溶液は使用の都度作製した。

b) Ouabain (Merck 社): Ouabain は 3 mM Tris 弱アルカリ液に溶解した後, 1 N HCl で pH 7.1 に調整した。

c) Rotenone (Sigma 社), Oligomycin (Sigma 社): これらは純アルコールで溶解した。尚 Rotenone は実験直前に作製した。Oligomycin 液は -20°C で保存した。

d) IAA (和光純薬): IAA (iodoacetamide) は水溶液とし, 調製後は冷暗所に保存した。

e) Ruthenium red (和光純薬): $15\mu\text{M}$ で使用した。

3) CaCl_2 , CoCl_2 , MnCl_2 : 何れも水溶液とし, ポリエチレン瓶に入れ冷暗所に保存した。

III. 成 績

1) 骨細胞内カルシウム量及び骨細胞のカルシウム輸送。

本実験で用いた方法により 1 頭蓋冠当り $0.25 \sim 0.35 \times 10^6$ 個の骨細胞が得られた。そのカルシウム量は細胞 10^6 個当り 222nmol , 重量当りでは $136 \pm 10.6\text{m mol/kg wet weight}$ であった。骨細胞を 37°C で Ca^{2+} -free 溶液に浮遊させ培養を行うと, 骨細胞のカルシウム量は 15 分後には 34 % (第 1 図), 30 分後には 44 % の減少を示した。その後は殆んど変化が見られなかった。従って Ca^{2+} -efflux は初めの 15 分間でその約 80 % を完了することが判った。尚 0.5mM CaCl_2 を添加した場合には, 多分 Ca^{2+} -uptake が Ca^{2+} -release を上廻り細胞内カルシウム量は結果的に少しく増加した。次にこのカルシウム 枯渇骨細胞に CaCl_2 1.25mM を添加すると, 骨細胞はカルシウムを迅速に取り込み, 2, 3 分でほぼ, 約 5 分で完全に前値に復した (第 5 図)。以上の実験成績から骨細胞内の交換可能なカルシウム量は全細胞カルシウム量の約 45 %

と計算された。

2) 加熱処理の Ca^{2+} -influx に及ぼす影響

70°C , 3 分間加熱処理を行った骨細胞を用いて実験を行った。efflux は正常細胞のそれに比べ約 8 % 減少したに過ぎなかったが, カルシウム添加によって起る influx は完全に見られなくなった。

3) 凍結・融解処理の Ca -influx に対する影響
骨細胞の凍結と融解を 3 度繰り返した後実験を行った。この場合も efflux はやや促進される傾向が見られるに過ぎないが, influx はほぼ完全に見られなくなった。

第 1 図 Ca^{2+} -efflux の温度依存性

4) カルシウム輸送の温度依存性

第 1 図に見られる如く, 37°C での efflux 実験では 5 分間で 23 %, 15 分間で 35 % の Ca^{2+} -efflux が認められた。そして 25°C , 4°C と培養液の温度が下るに従い, efflux は減少した。尚 4°C の場合にはその時間的経過は直線状となった。influx も 5 分値では 37°C の場合 19 %, 25°C の場合 13 %, 4°C の場合 9 % と, efflux の場合と同様抑制が見られた (第 4 図)。然し 30 分値では 25°C の場合は, 37°C の場合とほぼ同値を示した。このことは 25°C では influx の速度のみが抑制されたこ

第2図 Ca^{2+} -influx の濃度依存性

とを示している。

5) Ca^{2+} -influx の濃度依存性

骨細胞のカルシウムの取り込みは、細胞外液のカルシウム濃度に依存している。そこで培養液のカルシウム濃度を変え、骨細胞の Ca^{2+} -influx を測定した。その結果が第2図に示されている。培養液中のカルシウム濃度の増加に伴い、 Ca^{2+} -influx も増大したが、その関係は正比例ではなかった。この関係を Lineweaver-Burk plot にしたものが内挿図であり、 $K_{0.5}$ は1.2mM を示した。

6) 代謝阻害薬の影響

a) CCCP: 一般に CCCP や DNP の如き脱共役剤は、細胞呼吸によって産生されたエネルギーがイオン輸送や ATP 合成に利用されるのを阻害し、熱発生等によって消費させてしまう作用を有する。使用した CCCP 濃度は $10\mu\text{M}$ で、この濃度はミトコンドリアでのエネルギー転換に対する脱共役或いは細胞機能を障害させる十分なものとされている。第3図に示されている様に CCCP によって efflux は有意なる抑制を受けた。殊に15分値は $3/4$ の値にまで減じた。Influx もまた $3/4$ にまで減じた (第4図)。

b) DNP: 2mM DNP によって efflux は有

EFFLUX: THE DISAPPEARANCE OF CALCIUM FROM BONE CELLS INCUBATED IN THE Ca -FREE TRIS-BUFFER.

第3図 Ca^{2+} -efflux の薬物による抑制

第4図 Ca^{2+} -influx の薬物による抑制

意なる抑制を示した。然し influx の抑制は有意ではなかった。

c) Ouabain: 0.1mM Ouabain によって efflux は影響を受けなかった。influx は有意ではな

いが促進の傾向が認められた。

d) IAA: 10mM でも efflux influx 共に有意なる変化は見られなかった。

e) Oligomycin: 10 μ g/ml でも efflux, influx 共に有意なる変化は認められなかった。

f) Rotenone: 10 μ M で変化は認められなかった。

g) Ruthenium Red: 15 μ M で有意な変化は認められなかった。

7) 金属塩の影響

a) カドミウム: 予備実験に於て CdCl_2 0.1 mM では、骨細胞のカルシウム輸送に及ぼす影響は弱く、他方 1 mM 以上では沈澱が見られたので、本実験では凡て 0.5mM を使用した。第3, 5図に示す如く、efflux 実験に於ては対照では5分値26%, 15分値で40%の骨細胞内カルシウム減少が見られた。他方カドミウム添加により5分値で7%, 15分値で13% ($P < 0.01$) となり、著しい Ca^{2+} -efflux 抑制が見られた。influx 実験では対照は5分値26%増、カドミウム添加では19%増で、influx の抑制は見られたが、それは有意ではなかった。然し efflux が阻止されていることを考慮に入れると、ある程度の influx 抑制も否定は出来なかった (第4図)。然し第5図で見られる efflux-influx 連続実験では、カドミウム前処理によって15分値で僅か6%の efflux を示したに過ぎず、ほぼ完全なる efflux 阻止と見られた。他方 influx はあまり影響を受けないので、細胞内カルシウム量は初値よりむしろ高い値を示した。同時添加の場合には、対照では30%増に対し、24%増と僅かに influx を抑制した。同様な実験を添加するカルシウム濃度を 0.5mM に下げて行った。この場合にも Ca^{2+} -influx に対するカドミウムの抑制作用が明らかでなかった。要するにカドミウムによる Ca^{2+} influx 抑制は本条件下では認められなかった。

b) コバルト: CoCl_2 0.5mM の Ca^{2+} -efflux に対する阻害の程度は、 CdCl_2 の場合とほぼ同程度 (60%, $P < 0.01$) であったが、カドミウムと異なり influx に対しても有意な抑制を示した (20%, $P < 0.05$)。

c) マンガン: 第3, 5図に見られる如く, Mn

第5図 Ca^{2+} -fluxes に対するカドミウム及びマンガンの影響

Cl_2 0.5mM により、40% ($P < 0.05$) の efflux 抑制が見られた。又 influx 実験では50%抑制 ($P < 0.05$) が見られた (図4, 5)。即ちマンガンはカドミウム、コバルトと異なり、influx 抑制が efflux 抑制を上まわった。efflux-influx 連続実験では MnCl_2 0.5mM 添加でも influx 抑制は明らかであり、より高濃度の 2 mM 添加でほぼ完全なる influx 阻止が認められた (図5)。

考 察

以上の実験成績から先ずラット胎児及び新生児の Calvaria を酵素処理して得た骨細胞が、他の細胞の数十倍もの大量のカルシウムを含み、且その40%以上が迅速に交換され得ることが明らかとなった。

ラット Calvaria から得た骨細胞のカルシウム量は細胞10⁶個当り222nmole であった。この値を Levinson and Blumenson 法¹⁸⁾にならい重量換算すると136m mole/kg wet weight となった。Nichols and Rogers¹⁹⁾ はラット骨細胞のカルシウム量は176.6 $\pm$ 8.7m mole/kg と報告している。他方 Dziak and Brand¹⁷⁾ はラット Calvaria 骨細胞を method I-IV で分離し、それぞれ111.5, 35.8, 24.2及び16.8m mole/kg と報告している。従って本法で得た値は Dziak and Brand 法に従って行なわれたが、Nichols and Rogers の得た値に近い。この様に骨細胞のカルシウム量が研究者によりかなり異なった値が得られるのは、各研

究者が使用した骨細胞の種類, その分離法の相違によると考えられるが, 又骨細胞内のカルシウムが容易に交換し得ることもその一因となっているのであろう。以上の如く骨細胞内のカルシウム量には各研究者によってかなりの不一致があるが, それらの値が肝細胞²⁰⁾の2.32~3.3m mole, 神経細胞²¹⁾の0.54mmole, ラット腹水腫瘍細胞¹⁸⁾の1.8m mole, 腎細胞²²⁾の1.45~3.3m mole, HeLa 細胞²³⁾の0.47mmole, 或いは筋肉¹⁹⁾の6.0m moleと較べ著しく大である点では皆一致している。骨細胞内の何処にこの様な大量のカルシウムが存在するかについては, Nichols and Rogers¹⁹⁾はその90%以上が intracellular particles 内にあると報告している。

細胞或いはミトコンドリアのカルシウム輸送に関する実験の多くは放射性カルシウムを用いて行っているが, 本実験では骨細胞は大量のカルシウムを含み, 又その出入は特定の条件下では非常に迅速且活発であろうと予想したので, 骨細胞内のカルシウムの絶対量を測定した。そして骨細胞のカルシウムの約40%が交換可能であることが判った。この値は Dziak and Brand の26%に較べやや大であった。このカルシウムの由来としては当然 Calcium-containing granules が考えられるので, 骨細胞が石灰化の初期に直接関与している, 或いは細胞外液のカルシウム量を調節しているとの仮説を強く支持するものである²⁴⁾。

次に骨細胞でのカルシウムの出入の一部がエネルギー依存性であると考えられる証拠が得られたのでこれについて考察する。

1) Ca^{2+} -efflux: 本実験に於て Ca^{2+} -efflux は初めの15分間でその約80%が完了した。他方0.5mM CaCl_2 を含む培養液中では efflux は, 殆んど見られなかった。これらの実験成績は見掛上骨細胞の Ca^{2+} -efflux が単純なる拡散 (leakage) で行われている様に思われた。然し培養条件を変えて見るとそう簡単でないことが明らかとなった。脱共役剤である CCCP 及び DNP は共に骨細胞の Ca^{2+} -efflux を有意に抑制した。即ち対照実験での Ca^{2+} -efflux が36%であったのに対し, CCCP 処理では28%となり抑制が見られた。従ってその差8%, 全 Ca^{2+} -efflux 量の少なくとも20%が脱共役剤感受性

の efflux と計算された。この成績は赤血球膜でその存在が主張されている Na^{+} - K^{+} Pump と多くの点で類似性を有する Ca^{2+} -“pump” 機構 (ATP-dependent transport) が, 骨細胞膜にも存在する可能性を示唆している。このことは骨細胞でのカルシウム交換が迅速且大量であることを考えれば当然のことであり, 代謝阻害剤が efflux を抑制し得なかったことはその否定事実とはなり得ない²⁵⁾。

他方 Ca^{2+} -efflux には温度依存性が見られた。25°C では37°C の場合の約80%に efflux は減少した。4°C では約35%と著しく減じ, 且 efflux の時間曲線は直線状となった。一般に生体膜には約20°C 附近に相転換点があり, それ以下では膜機能が著しく低下することが知られている。従って4°C では細胞膜でのカルシウム通過が著しく困難となり, 従ってこの条件下では細胞膜の表面に結合しているカルシウムの離脱・放出が主役となると推定された。以上から本実験条件下での骨細胞の Ca^{2+} -efflux は①細胞膜に結合しているカルシウムの離脱, ②単純拡散及び③エネルギー依存性の active なカルシウム遊離の3種の機構から成り立っていることが示唆された^{26,27)}。

2) Ca^{2+} -influx: 本実験に於ける Ca^{2+} -influx は極めて速い現象であった。一般に細胞の Ca^{2+} -influx は electrochemical gradient によるものとされているが, 骨細胞の場合もそれだけであるのか否かの疑問が生じた。Harell²⁸⁾らは骨細胞の Ca^{2+} -influx は細胞外液のカルシウム濃度に依存すると報告している。本実験でもそれは確かめられた。然しその関係は彼の報告と少しく異なり正比例関係にはなかった。外液カルシウム濃度がかなり低く (0.1mM) とともに influx はかなり速く, そして2.4mM 以上になるとそれはほぼ定常状態となった。従って骨細胞の場合は赤血球や神経細胞の場合と異なり, Ca^{2+} -channel を介して入る passive な Ca^{2+} -influx と Ca^{2+} -Carrier の存在するとの説に同調する結果となった^{29,30)}。加熱又は凍結・融解処理を行った骨細胞ではその influx が殆んど全く消失したことも, Ca^{2+} -carrier の変性と云うことで説明が可能となる。

一方脱共役剤である CCCP 及び DNP が influx を約30%抑制したので, Ca^{2+} -influx の場合に

も亦 Ca^{2+} -efflux の場合と同様にエネルギー依存性の influx 機構の存在を考えなければならない³¹⁾。骨細胞膜を通過して入ったカルシウムは、細胞内ではイオン化したままでは 10^{-5}M を越えては存在し得ないのは、他の細胞と同様であろう。従ってカルシウムは細胞内の蛋白質、ATP、核酸殊に RNA 等と結合して存在する。その他骨細胞の場合には granules 及びミトコンドリアが大量のカルシウムを能動的にとり込むことが知られている³²⁾。多量のカルシウムを貯蔵することで知られているミトコンドリアでのカルシウムの active なとり込みは、Lehninger ら¹²⁾によれば、 H^{+} の放出と共役して行われていると云う。従って骨細胞の場合それが脱共役剤の存在によって抑制されることは容易に理解され得る。赤血球及び他の多くの細胞に於て Ouabain 処理により細胞内への Ca^{2+} -influx が増加することが知られている。骨細胞に於ては Ouabain 処理によりカルシウム輸送は有意なる影響を受けなかったのも、多くの興奮性及び非興奮性細胞に於て見られる Ca^{2+} - Na^{+} exchange mechanism は骨細胞には存在しない様に思われた。以上の実験成績から骨細胞の Ca^{2+} -influx は ① Passive diffusion, ② Ca^{2+} -carrier 機構及び ③ 細胞内に入ったカルシウムのエネルギー依存性なミトコンドリア及び他の顆粒への転送機構が関与しているものと推定された。

次に骨細胞に於けるカルシウム輸送に及ぼす重金属塩の影響について考察する。本実験に於て CdCl_2 0.5mM の存在下での骨細胞の Ca^{2+} -efflux は殆んど完全なる抑制を受けた。このカドミウムの Ca^{2+} -efflux 抑制はカドミウムに特異的なものではなく、 Co^{2+} , Mn^{2+} でも Cd^{2+} に比べ軽度ではあったが観察された。Wolff らは 2.5mM の PbCl_2 , HgCl_2 , CdCl_2 , LaCl_3 等が燐酸蛋白を沈澱せしめることを報告している^{33,34)}。そしてその結果として蛋白はカルシウム結合能を失ってしまうと云う。本実験で得られた成績も、カドミウムが細胞膜の特異的蛋白 (例えばカルシウムポンプの activator 或いは modulator) の SH 基での結合により、膜機能の障害をもたらしたと考えることが出来る。そのことはまた細胞膜の Ca^{2+} -“pump” の障害と関連することが十分推定される。 CdCl_2

0.5mM 存在下での Ca^{2+} -efflux が、 4°C 培養実験下でのそれと似ていることも以上の考え方に同調している。

Ca^{2+} -influx はカドミウムにより 27%, コバルトにより 24% 抑制された。その程度は CCCP の 26% 抑制に近い値であるので、これらの間に酵素作用の障害と云う点で類似性のあることが想像される。他方マンガンは influx を 54% を抑制し又それは dose-dependent であった。マンガンは、ミトコンドリアの膜のカルシウムに対し高い親和性を有する部位、即ち high affinity binding site への結合に於て、カルシウムと競合することが報告されている。同様に CCCP や DNP もまたこの部に結合してカルシウムの結合を阻害することが知られている。従って以上の物質の Ca^{2+} -influx 抑制は、これら物質のミトコンドリアに存在するカルシウムの high affinity binding site への結合に於て、カルシウムと競合することが報告されている。従って以上の物質の Ca^{2+} -influx 抑制は、これら物質のミトコンドリアに存在するカルシウムの high affinity binding site への結合のために起った、カルシウムのミトコンドリアへの転送障害の結果であると説明することが出来る。

カルシウムは神経伝達物質の遊離やホルモンの分泌に重要な役割を演じて居り³⁵⁾、又石灰化に於ては主役を演じている。従って重金属塩によってそれらが何等かの障害を受けるであろうことは十分考えられる³⁶⁻³⁸⁾。

結 論

1) ラット胎児、新生児頭蓋冠を酵素処理することにより、1 頭蓋冠当り平均 0.3×10^6 個の骨細胞を得た。分離した骨細胞のカルシウム含量は $222\text{n mole}/10^6 \text{ cell}$ であった。

2) この骨細胞を Ca^{2+} -free・Tris 緩衝液中で培養すると、15分間で細胞カルシウム量は約 30% 減少 (Ca^{2+} -efflux) した。次にこの細胞に CaCl_2 1.25mM を添加すると、5分間で細胞カルシウム量はほぼ初値に復した (Ca^{2+} -influx)。70°C の加熱処理あるいは凍結融解処理により、 Ca^{2+} -influx は完全に消失した。培養液内のカルシウム濃度の増加 (0.1~2.5mM) に伴い、骨細胞の Ca^{2+} -influx

は増大したが、それは正比例関係にはなかった。骨細胞膜を通過して入ったカルシウムは細胞内で骨細胞の Ca^{2+} -efflux 及び Ca^{2+} -influx は実験温度 37°C に対し、 25°C 、 4°C と低温になるに従い著明に抑制された。

3) 骨細胞の Ca^{2+} -efflux 及び Ca^{2+} -influx は CCCP, DNP により抑制された。他方 Ouabain, Oligomycin, IAA, Retenone は Ca^{2+} -fluxes に殆んど影響を及ぼさなかった。

4) カドミウム及びコバルトは Ca^{2+} -efflux を顕著に抑制した。他方マンガンは、 Ca^{2+} -influx を特異的、且完全に阻止した。従ってこれら重金属塩の硬組織に対する為害性が、骨細胞のカルシウム輸送に対する直接的抑制作用と関係がある様に思われた。

御懇篤なる御指導と御校閲を賜った飯田正一教授に深甚の謝意を表します。終始御援助を頂いた教室各位殊に直接実験を御指導、御協力下さいました久田洋博士に深謝致します。

文 献

- 1) NEUMAN, W. F. and NEUMAN, M. W.: 骨の生化学 (荒谷真平訳), 歯葉出版株式会社, 東京, 1960.
- 2) VEIS, A., SHARKEY, M. and DICKSON, I.: Non-collagenous proteins of bone and dentin extracellular matrix and their role in organized mineral deposition. in Calcium-binding proteins and calcium function (Wassetman, R. H. et al., eds.) North-Holland, Amsterdam, p. 409, 1977.
- 3) WATT, J. C.: The development of bone. *Arch. Surg.*, 15: 1017-1046, 1927
- 4) ANDERSON, H. C.: Calcium-accumulating vesicles in the intercellular matrix of bone. in Hard Tissue Growth, Repair and Remineralization. (Ciba Foundation Symposium 11) Elsevier. North-Holland, 1973.
- 5) ANDERSON, H. C.: Vesicles associated with calcification in the matrix of epiphyseal cartilage. *J. Cell. Biol.*, 41: 59-72, 1969.
- 6) ANDERSON, H. C. and SAJDERA, S. W.: Calcification of rachitic cartilage to study matrix vesicle function. *Fed. Proc.*, 35: 148-153, 1976.
- 7) ALI, S. Y. and EVANS, L.: Short communications: The uptake of [^{45}Ca] calcium ions by matrix vesicles isolated from calcifying cartilage. *Biochem. J.*, 134: 647-650, 1973.
- 8) FELIX, R. and FLEISCH, H.: Role of matrix vesicles in calcification. *Fed. Proc.*, 35: 169-171, 1976.
- 9) SLAVKIN, H. C., CROISSANT, R. D., BRINGAS, P., MATOSIAN, P., WILSON, P., MINO, W. and GUENTHER, H.: Matrix vesicle heterogeneity: Possible morphogenetic functions for matrix vesicles. *Fed. Proc.*, 35: 127-134, 1976.
- 10) KASHIWA, H. K.: Calcium in cells of fresh bone stained with glyoxal bis (2-hydroxyanil). *stain. Technol.*, 41: 49-55, 1966.
- 11) MATTHEWS, J., L. MARTIN, J. H. Kennedy, J. W. III. and Collins E. J.: An ultrastructural study of calcium and phosphate deposition and exchange in tissue in Hard tissue growth, repair and remineralization (Ciba Foundation Symposium 11). Elsevier, North-Holland, New York, pp. 187-211, 1973.
- 12) LEHNINGER, A. L.: Role of phosphate and other proton-donating anions in respiration-coupled transport of Ca^{2+} by mitochondria. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 71: 152-1524, 1974.
- 13) BETTS, F., BLUMENTHAL, N. C., POSNER, A. S., BECKER, G. L. and LEHNIGER, A. L.: Atomic structure of intracellular amorphous calcium phosphate deposits. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 72: 2088-2090, 1975.
- 14) HIRSCHMANN, P. N. and NICHOLS G. Jr.: The isolation and partial characterization of a calcium-rich particulate fraction from bone cells. *Calc. Tiss. Res.*, 9: 67-79, 1972.
- 15) ALI, S. Y.: Analysis of matrix vesicles and their role in the calcification of epiphyseal cartilage. *Fed. Proc.*, 35: 135-142, 1976.
- 16) PECK, W. A., BIRGE, S. J. Jr. and FEDAK, S. A.: Bone cells: Biochemical and biological studies after enzymatic isolation. *Science*, 146: 1476-1477, 1964.
- 17) DZIAK, R. and BRAND, J. S.: Calcium transport in isolated bone cells. I. Bone cell isolation procedures. *J. Cell. Physiol.*, 84: 75-84, 1974.
- 18) LEVINSON, C. and BLUMENSON, L. E.: Calcium transport and distribution in ehrlich mouse ascites tumor cells. *J. Cell. Physiol.*, 75: 231-240, 1970.
- 19) NICHOLS, G. Jr. and ROGERS, P.: Bone cell calcium stores: Their size, location, and kinetics of exchange, *Calc. Tiss. Res.*, 9: 80-94, 1972.
- 20) WALLACH, S., REIGENSTEIN, D. and BELLAVIA, J.: Cellular transport of calcium in rat liver. *J. Gen. physiol.*, 49: 743-761, 1966.
- 21) KEYNES, R. and LEWIS, P.: The intracellular calcium content of some invertebrate nerves. *J. Physiol.*, 134: 399-407, 1956.

- 22) BORLE, A. B. : Effects of thyrocalcitonin on calcium transport in kidney cells. *Endocrinology*, 85 : 194-199, 1969.
- 23) BORLE, A. B. : Kinetic analyses of calcium movements in HeLa cell cultures. I. Calcium influx. *J. Gen. Physiol.*, 53 : 43-56, 1969.
- 24) SCARPACE, P. J. and Neuman, W. F. : The blood : Bone disequilibrium. II. Evidence against the active accumulation of calcium or phosphate in to the bone extracellular fluid. *Calcif. Tiss. Res.*, 20 : 151-158, 1976.
- 25) BORLE, A. B. : Calcium metabolism at the cellular level. *Fed. Proc.* 32 : 1944-1949, 1973.
- 26) SCHATZMAN, H. J. and VINCENZI, F. F. : Calcium movements across the membrane of human red cells. *J. Physiol.*, 201 : 369-395, 1969.
- 27) COOPER, P. H. and STANWORTH, D. R. : Characterization of calcium-ion-activated adenosine triphosphatase in the plasma membrane of rat mast cells. *Biochem. J.*, 156 : 691-700, 1976.
- 28) HARELL, A., BINDERMAN, I. and RODAN, G. A. : The effect of calcium concentration on calcium uptake by bone cells treated with thyrocalcitonin (TCT) hormone. *Endocrinology*, 92 : 550-555, 1971.
- 29) LANDRY, Y. and LEHNINGER, A. L. : Transport of calcium ions by ehrlich ascites-tumour cells. *Biochem. J.*, 158 : 427-438, 1976.
- 30) BAKER, P. E. : Transport and metabolism of calcium ions in nerve. *Progr. Biophys. Mol. Biol.*, 241 : 177-223, 1972.
- 31) CARAFOLI, E. and ROSSI, C. S. : The effect of dinitrophenol on the permeability of the mitochondrial membrane. *Biochem. Biophys. Res. Com.*, 29 : 153-157, 1967.
- 32) SCHRAER, R., ELDER, J. A. and SCHRAER, H. : Aspects of mitochondrial function in calcium movement and calcification. *Fed. Proc.*, 32 : 1938-1943, 1973.
- 33) VALLEE, B. L. and Ulmer, D. D. : Biochemical effects of mercury, cadmium, and lead. *Ann. Rev. Biochem.*, 41 : 91-127, 1972.
- 34) WOLFF, D. J., HUEBNER, J. A. and SIEGEL, F. L. : Calcium-binding phosphoprotein of pig brain : Effects of cations on the calcium binding. *J. Neurochem.* 19 : 2855-2862, 1972.
- 35) THORN, N. A., RUSSEL, J. T., TORP-PEDERSEN, C. and TREIMAN, M. : Calcium and neurosecretion. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 307 : 618-639, 1978.
- 36) 久田 洋, 清水信一郎 : 硬組織形成におよぼすカドミウムならびにヒ素の作用の比較研究. 歯基礎誌, 14 : 368-374, 1972.
- 37) 久田 洋, 挽地幹夫, 清水信一郎 : クル病ラット脛骨の石灰化 (*in vitro*) に対するカドミウムの抑制作用について. 歯基礎誌, 17 : 236-241, 1975.
- 38) 山崎 和, 大友 修, 久田 洋 : 磷酸カルシウム形成 (*in vitro*) に対するコバルト・カドミウム・ストロンチウムの影響について (抄録). 歯基礎誌, 17 : 514, 1975.