マウスマクロファージの硬組織溶解性に関する研究

諸種硬組織の溶解性と灰化处理の影響について

宮澤 忠蔵 清水 秋雄

東北歯科大学口腔衛生学教室

橋本 勝一 奥村 晴一

東北歯科大学細菌学教室

〔受付：昭和57年9月20日〕

Ca release from hard tissues on the part of mouse macrophages

—The solubility of various hard tissues and
the effect of ash treatment—

Chyuzo Miyazawa and Tokio Shimizu

*Department of Preventive Dentistry, Tohoku Dental University,
Tomita-machi 31-1, Koriyama, 963*

Yoshikazu Hashimoto and Seiichi Okumura

Department of Bacteriology, Tohoku Dental University

[Accepted for publication: September 20, 1982]

Key words: mouse macrophages / hard tissues / Ca release

Abstract: It has been reported that macrophages in the focus of periodontitis participate in the destruction of the periodontal connective tissues and resorption of the alveolar bone. It can be supposed that clarification of the ability and mechanism of bone resorption by macrophages offer a very important clue to the search for prevention of periodontal diseases. Therefore, the solubility of various hard tissues by mouse macrophages was observed in vitro.

Rat long bone that has the crystallinity of apatite, rat alveolar bone, human enamel and synthetic hydroxyapatite were selected as hard tissue samples. The solubility of these samples was compared and the effect of ash treatment was examined.

Solubility of the samples was determined by the atomic absorption method measuring the calcium dissolved in the macrophage culture media.

It was seen that the hard tissues samples were dissolved by macrophages with or without ash treatment. The solubility was found to differ between samples but the solubility did not always correspond to crystallinity of the samples. By ash treatment, the solubility of the samples was increased.

緒 言

歯周炎の発症機転に関しては多岐にわたる知見

福島県郡山市富田町字三角堂 31-1 (〒963)

が集積されているが、未だ明確な説明を得るにいたっていない。しかしながら、歯槽骨吸収が本疾患の大きな要因となっている事実から、その骨吸収機転を知ることが重要である。骨吸収機転に関

連した興味ある知見として、マクロファージ(以下 $M\phi$ と略す)の骨吸収能¹⁻⁴⁾が挙げられ、かつこの骨吸収活性を示す $M\phi$ が歯周炎病巣局所に増加することが報告⁵⁻⁹⁾されている。このことは、 $M\phi$ が歯槽骨吸収に関与していることを示唆しているものと考えられる。そこで、 $M\phi$ の骨吸収能と吸収機転を解析することを目的として、 $M\phi$ による数種類の硬組織溶解性を調べた。まず、対象とした硬組織試料が複数であることと、硬組織の僅かな溶解によっても高濃度の Ca が培養液中に溶出することから、 $M\phi$ による硬組織溶解性を培養液中に増加してくる Ca 量で測定した。また、硬組織側の結晶性や含有有機物量などの物理化学的特性が $M\phi$ の Ca 溶解性にどのような影響をおよぼすかについても検討した。 $M\phi$ の硬組織溶解性を硬組織試料側から観察した成績を報告する。

材料および方法

1. 硬組織材料の調製と結晶性の観察

硬組織試料としてラットの長管骨と歯槽骨、人のエナメル質と合成ハイドロキシアパタイト(以下 HAp と略す)の4種類を調製した。250~290g ラット(雄・雌)の前・後肢と上下顎骨を摘出し、軟組織と軟骨部を可及的に除去した。前・後肢は縦に切断分割して骨髓内容物と骨膜を除き、生理食塩液中で超音波洗浄処理したものを長管骨試料とした。軟組織を除いた顎骨は、近遠心方向に分割して抜歯後、歯根膜と神経組織を分離して、超音波洗浄したものを歯槽骨試料とした。長管骨と歯槽骨は45°C で7日間乾燥後³⁾粉碎し、400mesh($\phi 37\mu$)~500mesh($\phi 25\mu$)の粉末を試料とした。人エナメル質は健全な抜去永久歯からエナメル質を粗分離し、400 mesh~500 mesh に粉碎後、比重選別法¹⁰⁾で1.70以上の比重を有する成分として採取した。HAp は、市販品(生化学工業)を400 mesh~500mesh に粉碎して試料とした。さらに、長管骨と歯槽骨中の有機物が、溶解性にどのようにかかわりあうかを観察する目的で、灰化処理した試料も調製した。灰化方法は磁製ルツボに約50 mg ずつの試料を入れ、電気マッフル炉中で600°C、48時間乾性灰化¹¹⁾を行った。

上記各試料の組成分析として、 Ca 量をけい光

X線分析(理学製, SSA 2)、結晶性の解析をX線回折(理学製, GF 2027)によって測定した。けい光X線分析は、X線管球に Cr 、分光結晶に EDDT、検出器にガスフロー比例計数管を使用し、30KV-40mA、 $CaK\alpha=44.87^\circ$ の条件で測定した。また、X線回折はX線管球に Cu 、検出器にシンチレーションカウンターを使用し、40KV-20mA で測定した。

2. マウス腹腔 $M\phi$ の分離

8~12週齢の C3H/He 雄マウス(チャールス・リバー)の腹腔内に10% proteose peptone (Difco 製)の2ml を注射し、3日後、血清無添加、10mM N-2-Hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethenesulfonic Acid(以下 HEPES と略す)加のイーグル MEM 培地(日水製薬)の15ml でマウス腹腔内を漱ぎながら、滲出腹腔細胞(以下 PEC と略す)を採取した¹²⁾。PEC はイーグル MEM 培地で3回洗浄後、所定細胞濃度に調製し、Multi Well Plate (Falcon)の well ($\phi 17mm$)に1ml ずつ分注後、37°C、 CO_2 インキュベーター中で1時間培養後、非付着性細胞を上清と共に除去した。well には10mM HEPES と5%牛胎児血清加 Ham's medium (Flow Laboratories, Inc.)の1ml を加え、引き続き24時間培養後、再び非付着性細胞を除去した(以下本操作を double-rinse 法と記す³⁾)。付着細胞数の算定は、マイクロメーター(1mm²)により倒立位相差顕微鏡($\times 400$)下で、1well 当り6カ所を計測して行った。付着細胞中の $M\phi$ 数の算定は以下のように行った。すなわち、ウサギガンマグロブリン固着イムノビーズの 10^7 個/ml 懸濁液を Ham's medium で調製し、その1ml を double-rinse 法によって得られた付着細胞に加え、 CO_2 インキュベーターで1時間静置後、0.03%トルイジンブルー・燐酸緩衝生理食塩液(pH 7.0)の0.4ml を加え、白色からピンク色¹³⁾のイムノビーズを捕捉している細胞を倒立顕微鏡下($\times 400$)で計測して行った。その結果、付着細胞中の $M\phi$ の比率は95%以上であった。

3. $M\phi$ 培養系への硬組織試料の添加

各硬組織材料を Ham's medium で0.15mg/ml 濃度に懸濁させ、その1ml を double-rinse 後の

付着細胞に分注して、37°C で CO₂ インキュベーターで培養しながら、経日的に硬組織溶解性を観察した。一検体当たり 4 ~ 6 well を使用し、その成績は平均値で示した。また、硬組織試料添加による Mφ の細胞数と形態変化を、倒立位相差顕微鏡 (×400) で観察した。対照として、培地のみ、硬組織試料を添加した培地、マクロファージ培養系の 3 種類をおいた。

4. Mφ による硬組織試料からの Ca 溶出の測定

Mφ 培養系に添加した硬組織粉末からの Ca 溶出を、Ham's medium 中の Ca 濃度を測定する方法で示した。すなわち、経日的に硬組織—Mφ 培養系の培地を採取し、遠沈 (3000rpm, 20分間) を行い上清を得て、Ca 測定の試料とした。本上清を塩酸と塩化ランタン溶液で適宜希釈し、塩酸の最終濃度を 1 N, ランタン濃度を 1 %¹⁴⁾ にした後、アセチレン—空気フレイムによる原子吸光分析 (島津製, AA-610S) 法によって Ca 濃度を測定した。

結 果

1. 硬組織試料の結晶性と Ca 含有量

本研究で使用した硬組織試料の結晶性と各試料中の Ca 濃度を X 線分析とけい光 X 線分析で測定した。灰化前の X 線回折パターンと Ca 濃度結果を Fig. 1, 600°C で 48 時間の灰化処理を加えた結果を Fig. 2 に示した。灰化前では人エナメル質と HAp にアパタイト結晶のシャープな回折像が認められた。長管骨と歯槽骨はアパタイトの特徴的な (002) および (211) 回折線が認められるものの、回折線の強度も小さく、パターン全体の back ground が高く、かなりの有機物含有を示している。一方、灰化処理した試料では、いずれも明瞭なアパタイトの回折像を示した。なかでも長管骨と歯槽骨の回折像は、灰化処理により明確な変化が認められた。各硬組織の結晶性を定性的に比較すると、HAp と人エナメル質が高く、長管骨と歯槽骨の結晶性は低い。また、試料中の灰化前の Ca 量は、試料によりかなり異なるが、灰化後では 36.6% ~ 38.7% とほぼ近似した値を示した。また、各試料の灰化前・後の恒量値

差から重量の減少率を算出すると、長管骨は 27.5%, 歯槽骨は 26.9%, 人エナメル質は 3.7%, HAp は 3.5% であった。

2. Mφ 培養系の基礎条件

HEPES 添加の Ham's medium で Mφ または Mφ と長管骨粉末を 5 % CO₂ 下で培養したときの pH と培養液中の Ca 濃度の関係を Fig. 3 に示した。medium に緩衝能をもたせないと、CO₂ インキュベーター中では medium pH が低下し、細胞の生育を阻害すること、ならびに硬組織が脱灰を起こす恐れがある。そこで、Ham's medium に 10mM の HEPES を添加することにより、長管骨粉末添加の Mφ 培養系の 6 日培養における medium pH は、7.2 を維持し、なおかつ上清中の Ca 濃度は顕著に増加した。一方、対照とした長管骨粉末のみの培養上清では、Ca の増加が全く認められなかった。これらの経時的な培養に伴う、上清中の Ca 濃度の推移を Fig. 4 に示した。長管骨粉末の存在しない medium の Ca 濃度は Mφ の有無にかかわらず培養期間を通してほぼ一定であり、その濃度はおよそ 22.0 μg/ml であった。しかし、medium に長管骨粉末を添加した場合には、培養開始 1 時間から 1 日目までに、上清中の Ca の減少が認められるが、その後は一定濃度を保持した。この長管骨添加による上清中の Ca の減少量は約 5 μg/ml である。このように長管骨粉末は medium の Ca をわずかに吸着する特性を有していた。上記における実験特性を基礎にして、マウス腹腔細胞を 4.4 × 10⁵ 個/ml に調製し、培養に伴う Mφ 数の推移を観察し、その結果を Fig. 5 に示した。長管骨添加群の Mφ は、培養開始 3 日目頃まで長管骨粉末におおわれており count は困難であるが、4 日目頃になると長管骨粉末が溶解して減少し、Mφ 自身も形態的に伸展することから count が可能になった。経日的測定によって長管骨添加群の Mφ 数は、ほとんど減少しないことが認められた。また、灰化処理群は上記無処理群に比較して、やや Mφ 数が少ない傾向にあるが、両群に有意差は認められなかった。一方、Mφ のみの群は培養日数の経過に伴い Mφ 数が減少し、培養 10 日目では、培養開始時の約半分に減少した。

Fig. 1 X-ray diffraction patterns of apatite powder before ash treatment.

Fig. 2 X-ray diffraction patterns of apatite powder after ash treatment in 600°C for 48 hrs.

長管骨粉末の溶解が、Mφ の生細胞によるものかどうかを検討するため、60°C、10分間の熱処理によって、全 Mφ を死滅させてから、長管骨を添加し培養したときの medium 上清中 Ca の変化を Fig. 6 に示した。本成績は、無処理および灰化処理長管骨を medium 中で培養したときの値 (Fig. 4) に一致し、死滅した Mφ には長管骨溶解能が認められなかった。また3日から10日間 Mφ を培養した上清に長管骨を添加し、培養した場合も Ca の溶出は認められず Fig. 4 ならびに Fig. 6 の成績と同一であった。

以上に示した成績は長管骨粉末添加による me-

dium pH、上清中の Ca 量、Mφ 数の変化ならびに死滅 Mφ の硬組織溶解能の有無についてであるが、歯槽骨、人エナメル質、HAp でも同様の傾向が得られた。

3. 硬組織試料の溶解性

各硬組織試料の Mφ による溶解性ならびに灰化処理した各試料の溶解性を測定した。その結果については、長管骨を Fig. 7、歯槽骨を Fig. 8、人エナメル質を Fig. 9、HAp を Fig. 10に示した。一般に無処理よりも灰化処理した硬組織において、Ca 溶出が多かった。なかでもこの違いは、長管骨と HAp に関しては培養3、6、10日目

Fig. 3 Comparison of Ca concentration and medium pH between cells (4.4×10^5 /ml) and cell-free culture containing long bone powder.

Fig. 4 Concentration of Ca in media to ash and non ash-long bone powder.

Fig. 5 Concentration of macrophage cells in the well during culture.

に、また歯槽骨と人エナメル質に関しては10日目
に同一試料間で有意差が認められた。無処理の

Fig. 6 Inhibition of Ca release from ash and non ash-long bone powder in culture by degradation of cells (2.3×10^5 /ml).

長管骨、歯槽骨、人エナメル質の Ca 濃度曲線は、
培養 6 日から 10 日目にかけて 試料溶解量の減少か
らウェーブする。しかし、灰化処理した試料では
その傾向が見られず、直線的な増加が認められた。

考 察

歯垢を形成する細菌の成分および細菌の産生物
が、歯周組織に破骨細胞^{6,9)}や活性化した $M\phi$ ^{5,7,8,15)}
を滲潤させ、これらの細胞が歯周炎の歯槽骨吸
収を進行させる役割を果していると考えられて
いる。滲潤した $M\phi$ は炎症部位でプロスタグラン
ディン⁷⁾を産生し、その産生物で $M\phi$ は一層活
性化され、多量のコラーゲン分解酵素や中性蛋白
分解酵素など^{16,17)}を合成する。 $M\phi$ によって合成
された酵素が歯肉結合組織や歯槽骨の有機質を
溶解させ^{18,20)}、組織破壊を進行させるものと考え
られている。一方では、 $M\phi$ の骨溶解機転の一
連の研究の中で、 $M\phi$ の細胞自体が骨溶解能にか
かわるという報告がなされた^{3,7)}。すなわち、 $M\phi$
は歯周炎局所に遊出し骨組織にただ単に固着して
いるだけでなく、直接骨吸収に強く関与している
ことが考えられる。そこで $M\phi$ の骨吸収現象を
in vitro の実験系で観察するために種々硬組織を
用いて $M\phi$ の硬組織溶解性を検討した。まず、
骨吸収の機序を in vitro 系で解析するための実験
条件の確立として、 $M\phi$ による硬組織試料の溶解
性を medium 上清中に溶出する Ca で測定する
ことを試みた。本方法では、medium の pH を

Fig. 7 Ca release from ash and non ash-long bone powder by macrophage cells of 5×10^5 per ml.

Fig. 9 Ca release from ash and non ash-human enamel powder by macrophage cells of 5×10^5 per ml.

Fig. 8 Ca release from ash and non ash-alveolar bone powder by macrophage cells of 5×10^5 per ml.

Fig. 10 Ca release from ash and non ash-hydroxyapatite powder by macrophage cells of 5×10^5 per ml.

Mφ の至適 pH に保持することが必要であり、その pH で硬組織の脱灰が生じないことである。これらの条件を満足させるため、HEPES を種々の濃度で添加し検索した結果、10mM が最適であった。この濃度における medium の pH は、Mφ および硬組織試料の有無にかかわらず 7.2~7.3 に維持された (Fig. 3)。また、硬組織のみでは上清中に Ca の増加が全く認められなかった (Fig. 4)。ところが、Mφ と硬組織を共存させると上清中 Ca は有意に増加 (Fig. 3) するが、死滅 Mφ とか Mφ の培養上清液に硬組織を添加した場合は、Ca 増加が認められなかった (Fig. 6)。以上の成績から、Mφ の硬組織溶解能は、生細胞が

硬組織と直接共存する環境下で強く起こるものと考えられる。

硬組織試料としては長管骨、歯槽骨、人エナメル質、HAp を用いたが、Mφ の骨無機質あるいは骨有機質への作用程度を観察するために、灰化処理を加えたものについても溶解性を測定した。硬組織の無機成分は、結晶構造的にアパタイト結晶^{11),21-23)}であるが、結晶性や有機物の含有量が異なることから X-ray 回折像に各試料の特徴が認められた (Fig. 1・2)。試料中の有機物を除くため 600°C で灰化したが、アパタイトは熱処理により結晶性が高まる¹¹⁾とされ、その効果が人エナメル質と HAp に僅かに認められた (Fig. 1・2)。灰

化長管骨と歯槽骨の (002), (210), (211) 回折線強度が顕著に増しているのは、灰化処理により30%近くを占めていた有機物が除かれ、バックグラウンドが安定したことが主な原因と考えられる (Fig. 1・2)。

以上のように有機質の組成や濃度、アパタイトの結晶性の異なる長管骨、歯槽骨、人エナメル質、HAp および灰化処理を加えた各硬組織のいずれも Mφ によって溶解することが認められた (Fig. 7-10)。

Mφ による各硬組織の溶解性を灰化処理の有無で比較すると、灰化処理が高い Ca 溶出を示している (Fig. 7-10)。しかし、これは Mφ の硬組織溶解能が灰化処理試料に大きく作用したのではなく、灰化によって試料中の Ca 濃度が高まった (Fig. 1・2) ことによると考えられる。何故ならば、いずれの場合も 1 well 当り 0.15mg の試料を添加しているので、当然灰化試料中の全 Ca 量は多くなる。従って、無処理試料の溶解量に対し、同じ量かそれ以下の灰化試料が溶解した場合でも、灰化試料の上清に溶出する Ca 量は多くなる。そこで、添加硬組織試料の total Ca 量を、各試料の Ca 濃度 (Fig. 1・2) から算出し、培養に伴って溶出する Ca を total Ca の比率で求めると次の結果が得られた。即ち、培養6日目の長管骨は無処理で79.0%に対し、灰化処理では55.0%となり、両者間に有意差 ($p < 0.001$) が認められた。同様に歯槽骨では51.7%に対し、34.3% ($p < 0.001$)、人エナメル質は35.4%に対し、30.3% ($p < 0.05$)、HAp は43.0%に対し、60.3% ($p < 0.01$) と HAp を除いて、無処理試料の Ca 溶出比率が高いことが認められた。これは灰化されない硬組織試料は、HAp を除き灰化された試料よりも、Mφ によって溶解される速度が速いこ

とを示している。このことは有機物を多く含む硬組織試料程、Mφ の溶解作用を強く受け易いことを示唆している。また、試料別で比較すると高度に結晶化した人エナメル質は、長管骨や歯槽骨より溶解されにくいことが認められた。

以上 Mφ の硬組織溶解性を4種の試料から論じてきたが、有機物を多く含む試料程、溶解速度が速いことは、Mφ の硬組織溶解因子が硬組織の有機質に直接作用¹⁸⁻²⁰⁾していることを裏付けるものと考えられる。一方で、灰化により無機質化した試料や高度に結晶化した有機質を僅かしか含有しないエナメル質さらには有機質を全く含有しない HAp までも、Mφ は比較的容易に溶解してしまう。この事実から、Mφ の骨溶解能は自ら産生する種々の酵素とともに他因子の共存、あるいはこれらを含む複数因子の共存による可能性も十分に考えられる。いずれにしても、Mφ の硬組織溶解因子は、medium 中に拡散されると、その作用が認められにくくなることから、Mφ は硬組織との接触部に破骨細胞のような ruffled border^{24, 25)}を形成して、それが Mφ の骨溶解能を大きく左右しているものと思われる。

結 論

ラット長管骨・歯槽骨、人エナメル質、合成ハイドロキシアパタイトを供試してマウスマクロファージによる硬組織溶解性を観察した。その結果、いずれの試料においてもマクロファージによる溶解が認められた。さらに同試料に灰化処理を加えても溶解が認められた。マクロファージによる各試料の溶解性を比較すると、ラットの長管骨や合成ハイドロキシアパタイトは高く、人エナメル質とラットの歯槽骨は低い傾向が認められた。

抄録：歯周炎病巣におけるマクロファージは、歯肉結合組織の破壊や歯槽骨吸収に関与していると報告されている。そこで、マクロファージの骨吸収能およびその吸収機構を解明することは、歯周疾患の予防法を探る上で重要な手掛りを提供するものと考え、in vitro 系でマウスマクロファージの諸種硬組織の溶解性を観察した。

硬組織試料として、アパタイトの結晶性を有するラットの長管骨・歯槽骨、人エナメル質および合成ハイドロキシアパタイトの4種類とした。試料別の溶解性を比較するとともに、灰化処理による影響についても検討した。試料の溶解性は、マクロファージ培養液中に溶出する Ca を原子吸光分析法で測定した。

その結果、各硬組織試料は、灰化処理の有無にかかわらず、マクロファージによって溶解した。溶解の程度は、試料によって異なるが、必ずしも、各試料の結晶性とは一致しなかった。灰化処理は溶解性を増加させる効果を示した。

文 献

- Mundy, G. R., Altman, A. J., Gondek, M. D. and Bandelin, J. G.: Direct resorption of bone by human monocytes. *Science* **196**: 1109-1111, 1977.
- Kahn, A. J., Stewart, C. C. and Teitelbaum, S. L.: Contact-mediated bone resorption by human monocytes in vitro. *Science* **199**: 988-990, 1978.
- Teitelbaum, S. L., Stewart, C. C. and Kahn, A. J.: Rodent peritoneal macrophages as bone resorbing cells. *Calcif. Tiss. Intl.* **27**: 255-261, 1979.
- Kahn, A. J. and Teitelbaum, S. L.: Endotoxin inhibition of macrophage-mediated bone resorption. *Calcif. Tiss. Intl.* **33**: 269-275, 1981.
- Zachrisson, B. U.: A histological study of experimental gingivitis in man. *J. periodont. Res.* **3**: 293-302, 1968.
- Rifkin, B. R. and Heijl, L.: The occurrence of mononuclear cells at sites of osteoclastic bone resorption in experimental periodontitis. *J. Periodontol.* **50**: 636-640, 1979.
- Löning, Th., Albers, H. K., Lisboa, B. P., Burkhardt, A. and Caselitz, J.: Prostaglandin E and the local immune response in chronic periodontal disease. *J. Periodontal Res.* **15**: 525-535, 1980.
- Charon, J., Toto, P. D. and Gargiulo, A. W.: Activated macrophages in human periodontitis. *J. Periodontol.* **52**: 328-335, 1981.
- Rowe, D. J. and Bradley, L. S.: Quantitative analyses of osteoclasts, bone loss and inflammation in human periodontal disease. *J. Periodont. Res.* **16**: 13-19, 1981.
- Manly, R. S. and Hodge, H. C.: Density and refractive index studies of dental hard tissues. 1. Methods for separation and determination of purity. *J. Dent. Res.* **18**: 133-141, 1939.
- Wheeler, E. J. and Lewis, D.: An x-ray study of the paracrystalline nature of bone apatite. *Calcif. Tiss. Res.* **24**: 243-248, 1977.
- 橋本勝一, 奥村晴一, 宮澤忠蔵, 清水秋雄: マウスマクロファージの硬組織溶解性に関する研究 —マクロファージ誘発法と諸種硬組織の溶解性との関連性について—, 歯基礎誌 **24**: 905-912, 1982.
- 丹羽鞆負, 松尾良信, Yokoyama, M. M., 松井良樹: 免疫実験操作法 VIII 増補版, 2575-2581, 日本免疫学会, 石川, 1979.
- Willis, J. B.: Determination of calcium and magnesium in urine by atomic absorption spectroscopy. *Analytical Chemistry* **33**: 556-559, 1961.
- Nuki, K., Soskolne, W. A., Raisz, L. G., Kornmamm, K. S. and Alander, C.: Bone resorbing activity of gingiva from beagle dogs following metronidazole and indomethacin therapy. *J. Periodont. Res.* **16**: 205-212, 1981.
- Page, R. C., Davies, P. and Allison, A. C.: The role of the mononuclear phagocyte in chronic inflammatory disease. *J. Reticuloendothelial Soc.* **15**: 413-438, 1974.
- Page, R. C., Davies, P. and Allison, A. C.: The macrophage as a secretory cell. *Int. Rev. Cytol.* **52**: 119-157, 1978.
- Deporter, D. A.: Collagen phagocytosis by stimulated mouse peritoneal macrophages in vitro. *J. Periodont. Res.* **14**: 323-331, 1979.
- Sellers, A., Meikle, M. C. and Reynolds, J. J.: Collagenase and collagenase inhibitor levels following changes in bone resorption in vitro. *Calcif. Tissue Intl.* **31**: 35-43, 1980.
- Raisz, L. G., Nuki, K., Alander, C. B. and Craig, R. G.: Interactions between bacterial endotoxin and other stimulators of bone resorption in organ culture. *J. Periodont. Res.* **16**: 1-7, 1981.
- Young, R. A. and Elliot, J. C.: Atomic-scale bases for several properties of apatites. *Arch. oral Biol.* **11**: 699-707, 1966.
- Smith, C. B. and Smith, D. A.: An x-ray diffraction investigation of age-related changes in the crystal structure of bone apatite. *Calc. Tiss. Res.* **22**: 219-226, 1976.
- Eanes, E. D.: Enamel apatite: Chemistry, structure and properties. *J. Dent. Res.* **58**: 829-834, 1979.
- Schofield, B. H., Levin, L. S. and Doty, S. B.: Ultrastructure and lysosomal histochemistry of rat osteoclasts. *Calc. Tiss. Res.* **14**: 153-160, 1974.
- Holtrop, M. E. and King, G. J.: The ultrastructure of the osteoclast and its functional implications. *Clin. Orthop.* **123**: 177-196, 1977.