歯根膜のアルカリホスファターゼに関する研究

—精製, 性質, 同定および他組織のアルカリ
ホスファターゼとの比較—

九州歯科大学大学院歯学研究科歯科矯正学専攻 (指導: 佐藤通泰教授)

九州歯科大学 生化学講座 (指導: 野口知雄教授)

山下 喜久

昭和60年12月23日受付

Studies on Alkaline Phosphatase of the Periodontal Ligament

—Purification, Properties, Identification, Comparison
with Alkaline Phosphatases from Other Tissues—

Yoshihisa Yamashita

Department of Orthodontics (Director: Prof. Michiyasu Sato)

Department of Biochemistry (Director: Prof. Tomoo Noguchi)

Two distinct forms of alkaline phosphatase (ALP) are known in most mammalian species, a liver/kidney/bone/placental/dental pulp form (universal form) and an intestinal form. They are clearly discriminated one another by quantitative inhibition with L-homoarginine and levamisole, and by their immunological properties.

The artificial orthodontic movement of tooth has been reported to induce a change in ALP activity of the periodontium. There are few detailed reports on enzymatic and immunological properties of periodontal ligament ALP. In the present study, properties of ALP in the periodontal ligament were compared with those in other tissues.

1. In both domestic rabbits and monkeys (*Macaca fascicularis*), activity of ALP was the highest in the periodontal ligament out of various tissues. The activity in rabbits was 3-fold higher than that in monkeys in the periodontal ligament.

2. A SDS-electrophoretic mobility of periodontal ligament ALP was identical with those of ALP from the pulp and alveolar bone of both rabbits and monkeys. All of ALP from these three tissues were markedly inhibited by L-homoarginine and levamisole. Monkey kidney contained only ALP with a shorter mobility than periodontal ligament ALP. In contrast, rabbit kidney contained two forms of ALP with different mobilities from periodontal ligament ALP: one with a shorter mobility is designated ALP 1 and the other with a longer mobility ALP 2. Monkey kidney ALP and rabbit kidney ALP 1 were markedly inhibited by these two inhibitors but ALP 2 was not.

3. Upon Ouchterlony double diffusion analysis, the anti-human universal ALP serum produced a single connecting band of precipitin between periodontal ligament ALP and

kidney ALP 1, but did not cross-react with kidney ALP 2 in rabbits.

4. Upon Ouchterloney double diffusion analysis, rabbit kidney ALP 2 cross-reacted with the anti-intestinal ALP serum but did not with the anti-human universal ALP serum.

5. On the basis of inhibition studies and immunological properties described above, it is concluded that in rabbits, periodontal ligament ALP and kidney ALP 1 are an universal form and kidney ALP 2 is an intestinal form.

6. ALP of the periodontal ligament differed from kidney ALP 1 only in the carbohydrate structure.

7. Mammalian kidneys (monkey, bovine, pig, dog, rat and guinea-pig) other than the rabbit seemed to contain only an universal form but not to contain an intestinal form, on the basis of inhibition studies.

Key words: *Alkaline phosphatase/Periodontal ligament/Kidney/Isozymes of alkaline phosphatase/Rabbit*

緒 言

Sandstedt (1904, 1905)^{1,2)} が犬の前歯を舌側移動させ牽引側に骨添加, 圧迫側に骨吸収が認められることを報告し, つづいて Oppenheim (1911, 1944)^{3,4)} がヒヒを用いた実験で矯正力の大きさによって歯周組織の反応の様相が異なることや骨の改造機転が歯槽骨の全体に及ぶことを明らかにして以来, 矯正力を加えた際の歯周組織の組織変化については今日まで数多くの報告がある⁵⁻⁸⁾. さらに電子顕微鏡の応用により, 矯正力を働かせると圧迫側の骨芽細胞や線維芽細胞の小胞体やミトコンドリアが膨潤すること⁹⁾, 牽引側では骨芽細胞が粗面小胞体に富み, ミトコンドリアが肥大して多くの分泌顆粒を含むようになること¹⁰⁾ が確認されている. また, 圧迫側の破骨細胞についても多数のミトコンドリアやライゾゾーム, ruffled border などの特徴的な破骨細胞の形態に加え, 多くの異物食胞様構造が認められることが報告されており¹¹⁾, 矯正力が歯周組織の細胞内小器官に与える影響についても明らかになってきた. しかし, 矯正力がどのような機序で歯周組織の骨芽細胞, 破骨細胞, 線維芽細胞をコントロールしているかについては未だ不明な点が多い. 近年, 圧電現象^{12,13)} やプロスタグランディン^{14,15)} を矯正力の first messenger とする仮説¹⁶⁾ が提唱されているが, これらだけで生体の複雑な応答機構を説明することはできない.

最近では, 矯正力が分子レベルで歯周組織にどのような影響を及ぼしているかに注意が払われるようになり,

矯正力が組織の collagen 合成能を高め¹⁷⁾, 合成される collagen の phenotype が Type I から Type III へ変換すること¹⁸⁾ や非 collagen 性の高分子合成能が高まること¹⁹⁾ も報告されている. また, 矯正力により歯周組織の alkaline phosphatase^{20,21)}, acid phosphatase, hyaluronidase 活性が増加し, collagenase, cathepsin D, cathepsin B 活性が短期間の上昇の後に漸次減少すること²²⁾ が明らかにされている. しかし, これらは活性の増減という酵素の一面だけをとらえているにすぎず, 力という物理的因子が細胞の分化や増殖をどのような機序でコントロールしているかを知るにはさらに酵素のタンパク化学的な解析が必要である.

そこで著者は, 歯周組織中の酵素の中でも特に石灰化や collagen 合成に関与すると言われており, 歯牙移動時の歯周組織の改造に大きな影響を与えていると考えられる alkaline phosphatase (以後 ALP と略称) (EC. 3.1.3.1) に着目し, 歯根膜の ALP の酵素化学的解析を試みた. ALP は膜結合性の糖タンパク質であり, タンパク化学的, 免疫化学的にユニバーサルタイプ, 小腸タイプ, 胎盤タイプの 3 種のアイソザイムの存在が確められている^{23,24)}. これらは, L-homoarginine²⁵⁾, levamisole²⁶⁾, L-phenylalanine²⁷⁾ などの特異的阻害剤に対する阻害態度や耐熱性²⁸⁾ を調べることで容易に識別することができる. 歯髄²⁹⁾, エナメル器³⁰⁾, 骨, 肝臓, 腎臓^{31,32)} の ALP がユニバーサルタイプであることは既に明らかにされているが, 歯根膜の ALP がどのタイプのアイソザイムか, あるいは歯根膜に複数

のアイソザイムが存在するか否かについては全く不明である。

また、ALP の生理的機能については、骨の場合有機リン酸エステルから無機リン酸を供給し石灰化に参与している³³⁾と考えられており、腎臓や小腸ではそれぞれ近位尿細管上皮や小腸の粘膜上皮に存在する³⁴⁾ことから膜での物質輸送に関係していると考えられている。しかし ALP は基質特異性が広く *in vitro* でさまざまなリン酸モノエステルを加水分解する³⁴⁾ことから *in vivo* での真の基質が何であるかについては明らかではなく、高い至適 pH を持つ³⁴⁾ことを含めて ALP の生理的機能については不明な点が多く、歯根膜の ALP の生理的機能に関する情報は無い。

今回、矯正力による歯根膜の ALP の誘導機構の解明、ひいては本酵素の生理的機能を明らかにするための一環として、ウサギとカンクイザルについて歯根膜と他組織の ALP の比活性、SDS 電気泳動パターン、阻害態度および免疫学的性質を比較し、興味ある知見を得たので報告する。

実験材料と方法

A. 実験動物と組織

カンクイザル (*Macaca fascicularis*) と日本白色種イエウサギ(以後ウサギと略称)の歯根膜、歯髄、歯槽骨、顎下腺、硬口蓋粘膜、肝臓、腎臓、小腸、脾臓を、さらにウサギの咬筋、舌、舌下腺、およびウシ、ブタ、イヌ(雑種)、ラット、モルモットの腎臓を用いた。各組織は屠殺直後に実験に用いたが、それが不可能な場合は実験に用いるまで -20°C で保存した。

B. 試薬

1-o-methyl- α -glucopyranoside, α -naphthyl phosphate, fast violet B salt, levamisole, L-homo-arginine, insoluble neuraminidase (Type VI-A) は Sigma 社製, Sephacryl S-200, Concanavalin A Sepharose は Pharmacia 社製, Triton X-100, 牛血清アルブミンは半井化学社製, p-nitrophenylphosphate は関東化学社製, DEAE-cellulose は Serva 社製, hydroxylapatite は生化学工業社製のものを用いた。抗ヒト肝・骨型 ALP 血清は Merck 社から、抗牛小腸型 ALP 血清は Cappel 社から購入した。他の試薬は市販の特級を用いた。

C. 各組織のホモジネイトの調製法と ALP の抽出法

1. ホモジネイトの調製法

各組織は 0.25M sucrose を含む 25mM Tris-HCl 緩

衝液 (pH 7.5) で良く洗い、濾紙で軽く水気を取り湿重量を測定した。これに 9 倍量の 25mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.5) を加え、歯槽骨以外の組織は氷冷下で Potter-Elvehjem homogenizer, あるいはワーリングブレンダー (佐久間製作所 500-ACD) を用いてホモジナイズした後、ナイロン布で濾過した。歯槽骨は氷冷下の乳鉢中でできるだけ細く粉碎した後、ナイロン布で濾過した。以上のように調製した濾液を各組織のホモジネイト標品とした。

2. ブタノール抽出法³⁴⁾

各組織のホモジネイト標品に同量のブタノールを加え 4°C で 24 時間攪拌した。これを、100,000 g で 60 分間遠心した後水層を集めた。これを 25mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.5) で透析したものをブタノール抽出試料とした。

3. SDS 抽出法³⁵⁾

各組織のホモジネイト標品と 4% SDS および 20% sucrose 含む 20mM Tris-glycine 緩衝液 (pH 8.3) を 3:1 の割合で混合した。これを 37°C で 1 時間インキュベイトした後、3,000 g で 10 分間遠心し、上清を SDS 抽出試料とした。

4. Triton X-100 抽出法

各組織のホモジネイト標品に 1% Triton X-100 を加え 4°C で 24 時間攪拌した。これを、100,000 g で 60 分間遠心し、上清を Triton 抽出試料とした。

D. ALP の neuraminidase 処理^{36, 37)}

部分精製した家兎の歯根膜および腎臓の ALP (4.8 units/ml) 100 μl を同量の 0.5% Triton X-100 および 1 mM CaCl_2 を含んだ 0.1M Tris-maleate 緩衝液 (pH 5.5) と混合し、agarose に付着した insoluble neuraminidase (0.625 unit/ml) 100 μl と 25°C で 24 時間インキュベイトした³⁹⁾。インキュベイトの後、3,000 g で 5 分間遠心して neuraminidase を沈澱除去し、つづいて上清の緩衝液を Penefsky (1977)³⁹⁾ の方法により 25 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.0) と交換した。

E. ALP 活性の測定法

6 mM 基質 (p-nitrophenylphosphate), 1 mM MgCl_2 , 0.1 mM ZnCl_2 および適当量の酵素液を含む 0.1 M glycine-NaOH 緩衝液 (pH 10.05) 中で 37°C で一定時間反応後、1 N NaOH 0.2 ml で反応を止め 405 nm の吸光度を測定した⁴⁰⁾。1 分間に 1 μmole のリン酸を遊離させる酵素量を 1 unit (U) とした。

F. 阻害剤の効果の判定

ALP の阻害剤として L-homoarginine, levamisole-

Fig. 1 Organ distribution of ALP activity in rabbits and monkeys. Homogenate from each tissue was used as the enzyme source.

PDL : periodontal ligament, Alve. Bone : alveolar bone, Subman. Gl : submandibular gland, Sublin. Gl. : sublingual gland, Pal. Muco. : palatal mucosa, * : not determined, ■ : monkey, □ : rabbit.

le, L-phenylalanine を用いた。阻害率は阻害剤の非存在下での活性を100%として、活性の残存率を%で示した。

G. 電気泳動

1. SDS 電気泳動

各組織の SDS 抽出試料 50 μ l を0.1% SDS を含む7.5% polyacrylamide gel を用い⁴¹⁾, 0.1% SDS を含む20mM Tris-glycine 緩衝液 (pH 8.3) を泳動液として⁴²⁾, 4 mA/gel 定電流で2.5時間泳動を行った。

2. 活性染色

泳動後 0.1M Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.8) 中で α -naphthyl phosphate 0.2mg/ml を基質として反応させ、生じた α -naphthol を fast violet B salt 1 mg/ml と結合させて直接ゲル上に染色させた^{43, 44)}。

H. 酵素の免疫学的同定

Ouchterlony (1949)⁴⁵⁾ の二重拡散法に従い, 25mM veronal 緩衝液 (pH 8.6) を含む1.5% agarose gel を用いた。

I. タンパク質の定量

タンパク質の定量は Lowry (1951)⁴⁶⁾ の方法あるいは Bradford ら (1979)⁴⁷⁾ の方法で行った。標準タンパク質として牛血清アルブミンを用いた。

Fig. 2 SDS-polyacrylamide gel disc electrophoresis of SDS extracts from several tissues of monkeys. After the electrophoresis, gels were subjected to dyeing of ALP activity. PDL : periodontal ligament, Alve. Bone : alveolar bone.

Fig. 3 SDS-polyacrylamide gel disc electrophoresis of SDS extracts from several tissues of rabbits. After the electrophoresis, gels were subjected to dyeing of ALP activity. PDL: periodontal ligament, Alve. Bone: alveolar bone.

結 果

A. ALP の体内分布

ウサギおよびカンクイザルの各組織のホモジネイト標品を用いて ALP の比活性を比較した。Fig. 1 に示すようにウサギでは歯根膜の ALP の比活性は歯槽骨の約 3 倍、歯髓の約 5 倍であり、軟組織では比較的高い活性を持つと言われている腎臓や小腸の約 20 倍もの極めて高い値を示した。他方、カンクイザルの ALP の体内分布はウサギと類似した傾向を示したが、歯根膜においてウサギがカンクイザルよりもはるかに高い比活性を示した。この高い比活性はウサギの歯牙が絶えず萌出し続けていることに起因するものと考えられる。

B. 歯根膜の ALP の性質と同定

1. 各組織の ALP の SDS 電気泳動パターンと比較

ウサギおよびカンクイザルの歯根膜、歯髓、歯槽骨、腎臓の SDS 抽出試料を SDS 電気泳動にかけ、活性染色により泳動パターンを比較した。Fig. 2 に示すようにカンクイザルではいずれの組織を用いても、単一の活性バンドが認められた。歯根膜の ALP は歯髓、歯槽骨

Fig. 4 Inhibition of ALP activities from several tissues of monkeys (A, B) and rabbits (C, D) by L-homoarginine (A, C) and levamisole (B, D). Butanol extract from each tissue was used as enzyme source. ○: periodontal ligament, ●: pulp, △: alveolar bone, ▲: monkey kidney or rabbit kidney ALP 1, ▽: rabbit kidney ALP 2.

のものと同じ位置に泳動されたが、腎臓のものよりわずかに大きな易動度を示した。他方、ウサギでも Fig. 3 に示すように、歯根膜、歯髓、歯槽骨の ALP はいずれも単一の活性バンドを示し、同じ易動度を示した。これに対して腎臓には、カニクイザルの場合とは異なり、易動度が小さい主な活性バンドの他に易動が大きい小さな活性バンドが認められた。以後、前者を ALP 1、後者を ALP 2 とする。両者は DEAE-cellulose クロマトグラフィーで分離することができる (Fig. 13 参照)。従って以後の実験には DEAE-cellulose で分離した ALP 1 と ALP 2 を用いた。

2. L-homoarginine, levamisole, L-phenylalanine の各組織の ALP 活性に対する阻害効果

ウサギ、カニクイザルの歯根膜、歯髓、歯槽骨の Triton 抽出試料と腎臓のブタノール抽出試料を用いて L-homoarginine, levamisole, L-phenylalanine が各組織の ALP 活性に及ぼす影響を調べた。L-homoarginine と levamisole による阻害実験では、Fig. 4 に示すように、カニクイザルの歯根膜、歯髓、歯槽骨、腎臓の ALP はいずれも強い阻害を受け、それぞれ類似した阻害態度を示した。ウサギの場合も、歯根膜の ALP は歯髓、歯槽骨の ALP および腎臓の ALP 1 と同様強い阻害を受け、それぞれ類似した阻害態度を示した。しかし、腎臓の ALP 2 は両阻害剤の影響をほとんど受けなかった。L-phenylalanine による阻害実験では、ウサギの腎臓の ALP 2 は ALP 1 よりも強い阻害を受けた (Fig. 5)。L-phenylalanine は小腸タイプの ALP の強い阻害剤として知られている。

Fig. 5 Inhibition of ALP 1 and ALP 2 activities from rabbit kidney by L-phenylalanine. ALP 1 and ALP 2 were separated by DEAE-cellulose column chromatography of butanol extract as described in Fig. 13. ▲: ALP 1, ▽: ALP 2.

3. 家兎の歯根膜の ALP の部分精製

以上の結果から歯根膜の ALP がユニバーサルタイプのアイソザイムであることが示唆された。そこで、この結果をさらに明らかにするため比較的歯根膜を採取しやすいウサギの歯根膜を用いて ALP の部分精製を試みた。

ステップ 1. Triton 抽出

ウサギ 40羽から歯根膜組織を採取し、これを 0.25M sucrose を含む Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.5) で洗浄した後、濾紙で水気を軽く取り、湿重量 (5.1g) を測定した。次に組織を細切し 38ml の 25 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.5) を加え、氷冷下でワーリングブレンダーを用いてホモジナイズし、Triton X-100 を 1% になるように加え 4°C 下で 24 時間攪拌し、100,000g で 60 分間遠心した。沈澱を 25 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.5) 15ml に懸濁し、同様に Triton 抽出を繰り返した。2 回の抽出液を合わせて Triton 抽出液 (58ml) とした。以下ステップ 2 からステップ 4 までの全操作は 4°C で行った。

ステップ 2. DEAE-cellulose カラムクロマトグラフィー

Triton 抽出液をアミコン XM-50 のメンブランを用いて 12.5ml まで濃縮し、これを同緩衝液で平衡化した DEAE-cellulose のカラム (2.5×25cm) にかけた。カラムを 0.5M NaCl を含む同緩衝液で十分洗った後、1% Triton X-100 および 1M NaCl を含む同緩衝液で ALP を溶出し、活性画分を集めてアミコン XM-50 のメンブランを用いて 5 ml まで濃縮した。

ステップ 3. ゲル濾過

酵素溶液を 0.2% Triton X-100, 0.2M NaCl および 10% グリセロールを含む 10mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.0) で平衡化した Sephacryl S-200 のカラム (2.5×100cm) にかけた。これを同緩衝液を用いて 25ml/h の流速で溶出し、3 ml ずつ分画した (Fig. 6)。活性画分 (65—75) を集め、アミコン XM-50 のメンブランを用いて約 4 ml まで濃縮した。

ステップ 4. Concanavalin A Sepharose カラムクロマトグラフィー

酵素溶液を 1 mM MnCl₂, CaCl₂, 0.5M NaCl, 1% Triton X-100 を含む 20mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.0) で平衡化した Concanavalin A Sepharose のカラム (1×13cm) にかける。吸着しないタンパク質を同緩衝液で十分洗い流した後、150ml の同緩衝液と同量の 0.2M methyl-α-D-glucopyranoside を含む同緩衝

Table 1 Purification of ALP from rabbit periodontal ligament
Details of purification and assay methods are given in the text.

	Total protein	Total activity	Specific activity	Purification	Yield
	mg	units	units/mg	-fold	%
Homogenate	57.1	102.8	1.8	1	100
Triton extract	23.1	77.5	3.35	1.86	75.4
DEAE-cellulose	2.3	23.2	10.1	5.6	22.6
Sephacryl S-200	1.2	19.3	16.1	9.3	18.8
Concanavalin A Sepharose	0.13	11.7	91.3	50.7	11.4

Fig. 6 Sephacryl S-200 gel filtration of ALP from rabbit periodontal ligament. ALP solution from a column of DEAE-cellulose was applied to a Sephacryl S-200 column and eluted as described in the text.

Fig. 7 Concanavalin A Sepharose column chromatography of ALP from rabbit periodontal ligament. ALP preparation from a column of Sephacryl S-200 was applied to a column of concanavalin A Sepharose and eluted as described in the text.

Fig. 8 Ouchterlony double diffusion analysis of ALP from the periodontal ligament, and ALP 1 and ALP 2 from the kidney of rabbits. Immunodiffusion was carried out in 1.5% agarose gel containing 25mM veronal buffer, pH 8.6. Diffusion was allowed to proceed for 48 h at 25°C in a moist atmosphere. The center well contained an antibody against ALP of human universal form. 1 of outer wells contained ALP (0.3 unit) from periodontal ligament, 2 of outer wells ALP 1 (0.3unit) from rabbit kidney and 3 of outer wells ALP 2 (0.3unit) from rabbit kidney.

液による直線的濃度勾配で溶出し、3 ml ずつ分画した (Fig. 7). 活性画分 (6—26) を集めてアミコン XM-50のメンブランを用いて濃縮した. 以上の精製の結果を Table 1 にまとめた.

Fig. 9 SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of neuraminidase treated ALP. ALP preparation partially purified from periodontal ligament and ALP 1 partially purified from the kidney of rabbits were separately subjected to neuraminidase treatment and to SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. After the gel electrophoresis, gels were subjected to dyeing of ALP activity.

4. 歯根膜の ALP の免疫学的同定

Ouchterlony 二重拡散法による歯根膜の ALP の免疫学的同定の結果を Fig. 8 に示す。歯根膜の ALP はステップ3の精製標品を用いた。また腎臓の ALP 1 と ALP 2 はそれぞれ後述の部分精製を行ったものを用いた。この結果、歯根膜の ALP および腎臓の ALP 1 はヒトユニバーサルタイプの ALP に対する抗体と沈降線を形成し、両者は1本の直結した沈降線を形成したが、ALP 2 は抗体と反応性を示さなかった。以上の結果は歯根膜の ALP がユニバーサルタイプであることを示している。さらに腎臓の ALP 1 がユニバーサルタイプであり、ALP 2 が異種のアイソザイムであることも示している。

5. 歯根膜のALPと腎臓の ALP 1 に対する neuraminidase の影響

歯根膜の ALP と腎臓の ALP 1 の糖鎖構造の違いを知るために、neuraminidase 処理前後の両 ALP を、SDS 電気泳動で比較した。歯根膜の ALP および腎臓

Fig. 10 Determination of K_m of ALP from rabbit periodontal ligament for p-nitrophenylphosphate

Fig. 11 Activation of ALP from rabbit periodontal ligament by Zn^{2+} or Mg^{2+} .

○: Mg^{2+} concentration was changed in the absence of Zn^{2+} , ●: Zn^{2+} concentration was changed in the absence of Mg^{2+} , ▲: Mg^{2+} concentration was changed in the constant concentration of Zn^{2+} (0.1 mM).

の ALP 1 を neuraminidase で処理し、処理前後の SDS 泳動パターンを活性染色によって比較した結果を Fig. 9 に示す。歯根膜の ALP はステップ3の精製標品、腎臓の ALP 1 は後述の部分精製標品を用いた。

neuraminidase 処理前では歯根膜の ALP と腎臓の ALP 1 の易動度は異なるが、処理後には同じ易動度を示した。この結果は、歯根膜の ALP と腎臓の ALP 1 の易動度の差が糖鎖構造の違いによることを意味している。

6. 部分精製したウサギ歯根膜の ALP の酵素化学的性質

ウサギの歯根膜の ALP の部分精製標品を用いて p-nitrophenylphosphate に対する K_m , Zn^{2+} や Mg^{2+} イオンによる活性化、至適 pH を調べた。

a. p-nitrophenylphosphate に対する K_m

1 mM $MgCl_2$, 0.1 mM $ZnCl_2$ の存在下, pH 10.95 における p-nitrophenylphosphate に対する K_m は 0.09 mM であった (Fig. 10)。

b. Zn^{2+} , Mg^{2+} イオンによる活性化

pH 10.95 での Zn^{2+} , Mg^{2+} 濃度による ALP 活性の活性化パターンを Fig. 11 に示す。 Mg^{2+} は 1×10^{-3} M, Zn^{2+} は 1×10^{-4} M で最大の活性化を示した。また, Zn^{2+} を 1×10^{-4} M の一定濃度にして Mg^{2+} 濃度を変化させた場合には, Mg^{2+} が 1×10^{-3} M で活性化は最大に達したが, この活性化は Zn^{2+} との相和効果よりもはるかに高かった。

c. 至適 pH

至適 pH の測定は, 反応液中に 2 価の金属イオンとして 1 mM Mg^{2+} と 0.1 mM Zn^{2+} を含む場合, 0.1 mM Zn^{2+} だけを含む場合, 1 mM Mg^{2+} だけを含む場合, 両金属イオンをいずれも含まない場合の 4 つの条件で行った。緩衝液には 0.1 M Tris-HCl (pH 7.5–pH 9.25) および 0.1 M glycine-NaOH (pH 9.25–pH 12.5) を用いた。Fig. 12 に示すように, 両金属イオンを含む系, Zn^{2+} だけを含む系, Mg^{2+} だけを含む系, 両金属イオンをいずれも含まない系の至適 pH は異っておりそれぞれ pH 10.95, pH 10.95, pH 10.25, pH 9.05 であった。

C. 歯根膜の ALP と軟組織の ALP の比較

ウサギの腎臓の ALP 1 が歯根膜の ALP と同様にユニバーサルタイプであるのに対し, ALP 2 が異なるタイプのアイソザイムであることは既に明らかにした。そこで, 歯根膜の ALP と腎臓の両アイソザイムの性質を詳細に比較するためにウサギの腎臓から両アイソザイムの精製を試みた。さらに他の哺乳動物の腎臓の ALP との比較も行った。

1. ウサギの腎臓の ALP の部分精製 ステップ 1. ブタノール抽出

ウサギ 14 羽から腎臓を摘出し, 0.25 M sucrose を含む 25 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.5) で洗浄した後, 水分を濾紙で軽く拭き取り湿重量 (200 g) を測定した。これに 300 ml の sucrose を含まない同緩衝液を加え, 氷冷下でワーリングブレンダーを用いホモジナイズした。以下の操作はすべて 0–4 °C で行った。このホモジネイトを 100,000 g で 60 分間遠心し, 沈澱を同緩衝液 200 ml に懸濁し, これに 200 ml のブタノールを加え, 24 時間攪拌した後, 100,000 g で遠心した。水層を 25 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.0) でブタノール臭が消えるまで透析したものをアミコン PM-10 のメンブランを用いて 40 ml まで濃縮した。

ステップ 2. DEAE-cellulose カラムクロマトグラフィー

濃縮したブタノール抽出液を 25 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.0) で平衡化した DEAE-cellulose のカラム (4 × 20 cm) にかけて, 非吸着性のタンパク質を同緩衝液で十分洗い流した後, 1,700 ml の同緩衝液と同量の 0.5 M NaCl を含む同緩衝液からなる直線的濃度勾配で ALP を溶出した。その結果, Fig. 13 に示すように低い塩濃度で溶出される ALP 1 とこれより高い塩濃度で溶出さ

Fig. 12 pH optima of ALP from rabbit periodontal ligament in the presence or absence of Zn^{2+} or Mg^{2+} . 0.1 M Tris-HCl was used between pH 7.5 and pH 9.25 and 0.1 M glycine-NaOH between pH 9.25 and pH 12.5. ALP was assayed in the presence (O) of Zn^{2+} (0.1 mM) and Mg^{2+} (1 mM), in that (▲) of Zn^{2+} (0.1 mM), in that (△) of Mg^{2+} (1 mM) and in the absence (●) of metal ions.

Fig. 13 DEAE-cellulose column chromatography of rabbit kidney extract. Butanol extract of rabbit kidney was subjected to DEAE-cellulose column chromatography and eluted as described in the text.

れる ALP 2 に分離した。つぎにそれぞれの活性画分を集めて別々にアミコン PM-10 のメンブランを用いて濃縮した。以下両アイソザイムに対して同じ精製をとった。

ステップ 3. ゲル濾過

酵素溶液を 0.2M NaCl, 10%グリセロールを含んだ 10mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.0) で平衡化した Sephacryl S-200 のカラム (2.5×100cm) にかける。同緩衝液で 25ml/h の流速で溶出し 3 ml ずつ分画し、それぞれの活性画分を集めてアミコン PM-10 のメンブランを用いて約 5 ml まで濃縮した (Fig. 14)。

ステップ 4. hydroxylapatite カラムクロマトグラフィー

酵素溶液を 5 mM リン酸カリ緩衝液 (pH 7.5) で平衡化した hydroxylapatite のカラム (2.5×7 cm) にかける。非吸着性タンパク質を同緩衝液で十分洗った後、150ml の同緩衝液と同量の 500 mM リン酸カリ緩衝液 (pH 7.5) からなる直線的濃度勾配で ALP を溶出し、活性画分を集め (Fig. 15), ALP 1, ALP 2 の部分精製標品とした。以上の精製の結果を Table 2 にまとめた。

2. 腎臓の ALP 2 の neuraminidase 処理および免疫学的同定

a. ALP 2 の neuraminidase 処理前後の SDS 電気泳動による比較

歯根膜の ALP と腎臓の ALP 1 が同じユニバーサルタイプのアイソザイムであるにもかかわらず両者の電気泳動パターンが異なる原因が糖鎖構造の違いによることは既に示した (Fig. 8, 9 参照)。しかし、歯根膜の

Fig. 14 Sephacryl S-200 gel filtration of ALP of rabbit kidney. Enzyme solution from a column of DEAE-cellulose was subjected to Sephacryl S-200 gel filtration and eluted as described in the text. A : ALP 1, B : ALP 2.

Fig. 15 Hydroxylapatite column chromatography of ALP of rabbit kidney. Enzyme solution from a column of Sephacryl S-200 was subjected to a hydroxylapatite column and eluted as described in the text. A : ALP 1, B : ALP 2.

Table 2 Purification of ALP 1 and ALP 2 from rabbit kidney
Details of purification and assay methods are given in the text.

		Total protein	Total activity	Specific activity	Purification	Yield
		mg	units	units/mg	-fold	%
Homogenate		12400	1180	0.09	1	100
Particular fraction		4430	1150	0.26	2.9	96.7
Butanol extract		400	660	1.65	18.3	55.7
DEAE	ALP 1	13.4	183	13.7	152	15.4
-cellulose	ALP 2	56.1	478	6.5	72.2	40.4
Sephacryl	ALP 1	1.2	101	87.3	970	8.5
S-200	ALP 2	9.3	235	25.2	280	19.8
Hydroxyl-	ALP 1	0.7	88.6	125	1390	7.5
apatite	ALP 2	4.2	175	41.6	462	14.8

Fig. 16 SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of neuraminidase treated ALP 2. ALP 2 preparation partially purified from rabbit kidney was subjected to neuraminidase treatment followed by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. After the electrophoresis, gels were subjected to dyeing for ALP activity.

ALP と腎臓の ALP 2 の SDS 電気泳動の易動度や各種阻害剤に対する阻害態度が何故異なるかについては不明である。そこでまず歯根膜の ALP および腎臓の ALP 2 の neuraminidase 処理前後を SDS 電気泳動で比較した。この結果, Fig.16 に示すように ALP 2 は neuraminidase 処理によって易動度は変化せず, 歯根膜の ALP の neuraminidase 処理前後のいずれとも

Fig. 17 Ouchterlony double diffusion analysis of ALP 1 and ALP 2 from the kidney of rabbits. Immunodiffusion was carried out in 1.5% agarose gel containing 25mM veronal buffer, pH 8.6. Diffusion was allowed to proceed for 48 h at 25°C in a moist atmosphere. The center well contained an antibody against ALP of a calf intestinal form. 1 of outer wells contained ALP (0.2 unit) from calf intestine, 2 of outer wells ALP 2 (2 units) from rabbit kidney and 3 of outer wells ALP 1 (2 units) from rabbit kidney.

一致しなかった。このことは腎臓の ALP 2 にシアル酸が含まれていないこと, および歯根膜の ALP と腎臓の

ALP 2 の違いが糖鎖構造だけではない可能性を示している。

b. 腎臓の ALP 2 の免疫学的同定

歯根膜の ALP と腎臓の ALP 1 がユニバーサルタイプのアイソザイムであることは既に明らかにした (Fig. 8 参照)。ALP 2 は各種阻害剤に対する阻害態度から小腸タイプのアイソザイムと考えられるが、これまで哺乳動物の腎臓にユニバーサルタイプ以外のアイソザイムが存在するという報告はみられない。そこでウシ小腸タイプの ALP に対する抗体を用いて ALP 2 の免疫学的同定を行った。Fig. 17 に示すように ALP 1 と抗体との間には何らの免疫学的交差性も認められないが、ALP 2 と抗体の間には 1 本の明瞭な沈降線が形成されており ALP 2 が小腸タイプのアイソザイムであることが明らか

かとなった。

3. 腎臓に存在する小腸タイプのアイソザイムの種特異性

以上の結果からウサギの腎臓にはユニバーサルタイプの ALP 1 の他に小腸タイプの ALP 2 が存在することが確かめられた。そこで、ウサギ以外の哺乳動物の腎臓に小腸タイプの性質を示す ALP が存在するか否かを調べた。

a. DEAE-cellulose カラムクロマトグラフィー
湿重量 5 g のカニクイザル、ウシ、ブタ、イヌ (雑種)、ラット、モルモットの腎臓から得たブタノール抽出液をそれぞれ、25 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.0) で平衡化した DEAE-cellulose のカラム (1.5×20cm) にかき、非吸着性タンパク質を十分洗い流した後、150ml

Fig. 18 DEAE-cellulose column chromatography of kidney extracts from monkey (A), bovine (B), pig (C), dog (D), guinea pig (E), and rat (F). Butanol extracts of these kidneys were separately subjected to DEAE-cellulose column chromatography and eluted as described in the text. After the gradient elution with NaCl, the column was further eluted with 1 M NaCl containing 1% Triton X-100.

の同緩衝液と同量の 0.5 M NaCl を含んだ同緩衝液からなる直線的濃度勾配によって ALP を溶出した. その後さらに 1 M NaCl と 1 % Triton X-100 を含む同緩衝液 100ml で ALP を溶出した (Fig. 18).

b. levamisole による阻害効果

上記の DEAE- クロマトグラフィーによって溶出されたそれぞれの活性ピークに対して 3 mM levamisole による阻害効果を調べたところ, すべての活性ピークは 100%阻害を受けた.

考 察

ALP はウサギおよびカニクイザルのいずれにおいても歯根膜が他の口腔組織, 腎臓, 肝臓および小腸より高い比活性を示したが, ウサギの歯根膜はカニクイザルの歯根膜より約 3 倍もの高い比活性を示した. 組織化学的実験では歯周組織の ALP は骨芽細胞, 線維芽細胞, セメント芽細胞, 歯根膜や歯肉の collagen 線維中に存在していると言われている⁴⁸⁾. ウサギの歯根膜に認められる ALP の高い比活性が歯根膜のどのような細胞あるいは部位に由来するかは現在のところ不明である. しかし, ウサギとカニクイザルの同一組織間での ALP の比活性を比較したところ, 歯根膜以外では著明な差が認められなかったことから, ウサギの歯根膜の高い比活性はウサギの歯牙が絶えず萌出し続けていることに起因するものと思われる. このことを裏づけるためにはさらに多くの動物種を用いて, 根完成歯を持つ種と根未完成歯を持つ種の間で ALP 活性の比較を行う必要がある. また, 根未完成歯の萌出を人為的に障害した場合, 歯根膜の ALP 活性がどのように変動するかは興味深く, 今後の研究課題である. ALP は硬組織においてリン酸エステルを加水分解し, 石灰化部位に無機リン酸を供給する³³⁾とともに, mineralization に阻害的に働くと言われているピロリン酸の分解酵素⁴⁹⁾としても石灰化に重要な役割を果たしていると考えられている. 近年, 石灰化部位に基質小胞が発見され, この膜に ALP が局在すること^{50, 51)}が確認されていることから, ALP が間違いなく石灰化に重要な役割を演じているものと思われる. しかし, 石灰化が行われない腎臓, 肝臓, 小腸, 胎盤などの軟組織にも大量の ALP が存在していることから, ALP の存在と石灰化を単純に結びつけることはできない.

ALP にはユニバーサルタイプ, 小腸タイプおよび胎盤タイプの 3 種のアイソザイムの存在が確認されているが, ヒト上科以外の哺乳動物にはこれらのうち, ユニバ

ーサルタイプと小腸タイプの 2 種のアイソザイムだけが存在する⁵²⁾と言われている. そこでまず, 歯根膜の ALP の同定を試みたところ, SDS 電気泳動パターン, L-homoarginine, levamisole に対する阻害態度および免疫学的性質から, 歯根膜の ALP が歯髄や歯槽骨の ALP と同様なユニバーサルタイプであることが明らかになった. なお歯髄²⁹⁾, 骨³¹⁾の ALP がユニバーサルタイプであることは既に報告されている. 他方, 腎臓や肝臓にもユニバーサルタイプの ALP のみが存在することが古くから知られている³²⁾. ところが, カニクイザルの腎臓の抽出液の電気泳動では 1 本の活性バンドだけが認められたのに対し, ウサギの腎臓には ALP 1 と ALP 2 の 2 種のアイソザイムが存在していた. ALP 1 は阻害剤による阻害態度と免疫学的性質がユニバーサルタイプであるのに対し, ALP 2 は小腸タイプの阻害態度と免疫学的性質を示した. ウサギおよびカニクイザルの歯根膜の ALP はカニクイザルの腎臓の ALP, ウサギの腎臓の ALP 1 と同様に L-homoarginine, levamisole に対して強い阻害を受けたが, SDS 電気泳動では歯根膜の ALP の易動度が腎臓の ALP, ALP 1 よりわずかに大きかった. そこで, ウサギの歯根膜の ALP と腎臓の ALP 1 を neuraminidase 処理し, SDS 電気泳動で比較したところ, 両者は共に易動度が処理前に比べて小さくなり, 処理後の易動度が全く等しくなった. このことから歯根膜の ALP と腎臓の ALP 1 の易動度の違いは両者の糖鎖中に含まれるシアル酸の量の差によるものと思われる. シアル酸が ALP の活性を阻害するとの報告があり⁵³⁾, シアル酸の含有量の差が ALP の酵素学的性質にどのような影響を及ぼしているかを知ること, ALP の生理的機能を解明するために今後の重要な研究課題であろう.

今回はさらに, 歯根膜の ALP の部分精製標品を用いて, 至適 pH, p-nitrophenylphosphate に対する Km を測定し, 2 価金属イオンによる活性化についても調べた. ALP は膜結合性タンパク質であるため, 本酵素の精製は膜から酵素を抽出することから始まる. これまで ALP の精製には主にブタノールでの抽出法が用いられていた²⁸⁾が, 予備実験の結果, 歯根膜の ALP の抽出には, 腎臓や小腸などの軟組織化とは異なり, Triton X-100 を用いた方が効果的であったので, 今回は Triton X-100 で抽出を行った. 近年, 骨の ALP もブタノールより Triton X-100 の方が抽出率が高いという報告⁵⁴⁾があり, 歯根膜や骨と腎臓や小腸の間で膜における ALP の存在様式が異なっている可能性がある. また, Triton

抽出後の歯根膜の ALP は Triton X-100 非存在下では DEAE-cellulose や Sephacryl S-200 に強い吸着性を示した。そこで、DEAE-cellulose に本酵素を吸着させ、0.5M NaCl を含んだ緩衝液でカラムを洗った後に、1M NaCl および 1% Triton X-100 を含む同緩衝液で ALP を溶出した。0.5M の塩濃度でも ALP を DEAE-cellulose から完全に溶出できないことから、歯根膜の ALP は強い疎水性タンパク質であると考えられる。このような強い吸着性は腎臓の ALP 1 には認められないことから、糖鎖構造の違いにより ALP の疎水性が変化するものと考えられる。DEAE-cellulose から溶出した活性画分はさらに Triton X-100 存在下で、Sephacryl S-200, Concanavalin A Sepharose で精製を行った。最終標品のタンパク質濃度が非常に低いためウサギの歯根膜の ALP の部分精製標品の正確な比活性は算出できなかった。この標品を用いて 2 価金属 (Zn^{2+} , Mg^{2+}) イオンによる ALP の活性化について調べた。 Zn^{2+} による活性化は $1 \times 10^{-4}\text{M}$ で最大に達した。ALP は Zn^{2+} を含む金属酵素であることが知られている⁵⁶⁾。精製の最終段階で用いた緩衝液には 0.1mM Zn^{2+} 1 mM Mg^{2+} を含んでいることから最終標品は Zn^{2+} で飽和されていると考えられる。しかし、この標品を EDTA などのキレート剤で処理しなくても反応液中の Zn^{2+} 濃度を下げるだけで、 Zn^{2+} 濃度に依存した可逆的な失活を受けることから、歯根膜の ALP は Zn^{2+} とかなり弱い結合をしていると考えられる。また Mg^{2+} も ALP を活性化する 2 価金属イオンとして知られているが、 Mg^{2+} が ALP の酵素成分であるか否かについては統一的な見解がない⁵⁶⁾。 Zn^{2+} を一定の至適濃度 ($1 \times 10^{-4}\text{M}$) にして Mg^{2+} の濃度を増加させると歯根膜の ALP の活性は相乗的に増加した。この結果から、 Mg^{2+} , Zn^{2+} の ALP に対する結合部位はそれぞれ異なっているものと考えられる。ウサギの歯根膜の ALP の至適 pH が pH 9.05 であるという報告があるが、これは今回の反応液中に金属イオンを含まない場合の至適 pH に一致する。しかし、 Zn^{2+} , Mg^{2+} の両金属イオンを反応液に加えた場合には至適 pH は pH 10.95 まで上昇した。基質濃度の変化により至適 pH が変化することは知られている⁵⁷⁾が、金属イオンの影響で至適 pH が変動するという報告はない。p-nitrophenylphosphate は人工基質であることから、以上のような金属イオンの影響が生理的意味を持つとは単純に結論づけることはできない。しかし、金属イオンの濃度の低下に伴って至適 pH が低下する現象は興味深い。

歯根膜の ALP と腎臓の ALP 1 の電気泳動での易動度の違いが恐らくは糖鎖構造の差によることは既に述べた。しかし、ウサギの腎臓の ALP 2 は neuraminidase 非感受性であり、このことは ALP 2 がシアル酸を含有していないか、あるいは糖鎖構造を持たないかのいずれかを示唆しているが、これまで糖鎖構造を持たない ALP は発見されていない。また、ALP 2 は阻害剤による阻害態度、免疫学的性質から小腸タイプのアイソザイムであることが明らかになった。従って、ウサギの腎臓にはユニバーサルタイプと小腸タイプの 2 種のアイソザイムが存在することになる。ウサギの腎臓における ALP 1 と ALP 2 の濃度分布は SDS 電気泳動では ALP 1 が主成分であったのに対して、ブタノール抽出液の DEAE-クロマトグラフィーでは ALP 2 が主成分であるという相反する結果が得られた。この原因は明らかではないが部分精製の回収率から考えると ALP 2 がウサギの腎臓の ALP の主成分と考えられる。現在、すべての哺乳動物の腎臓、肝臓、骨にはユニバーサルタイプのアイソザイムだけが分布していると考えられている⁵³⁾。ヒトの腎臓⁵⁸⁾、肝臓^{59, 60)}に小腸タイプの ALP がわずかに存在するという報告があるが、これらは正常組織のすべてに認められているわけではない。今回、ウサギの腎臓に大量の小腸タイプの ALP が存在することが明らかになった。しかし、他の動物種 (カニクイザル、ウシ、ブタ、イヌ (雑種)、ラット、モルモット) の腎臓には小腸タイプの ALP は検出されなかった。小腸以外の組織でも組織の癌化に伴って小腸タイプの ALP が出現することが知られており⁶¹⁾、発癌機構の点から考えても、ヒトの肝臓や腎臓に低い頻度で検出される微量の小腸タイプの ALP、癌組織に認められる小腸タイプの ALP およびウサギの腎臓の ALP 2 の比較研究は興味深い。

歯根膜の ALP と他組織の ALP を比較し、歯根膜の ALP が歯髄や歯槽骨と同じユニバーサルタイプのアイソザイムであり、腎臓のユニバーサルタイプの ALP 1 とは糖鎖構造が異なることを明らかにした。歯髄の ALP の大部分は sub-odontoblastic-cell に由来する⁶²⁾と考えられている。また、骨芽細胞の ALP は骨基質に接する面よりも反対側の細胞膜に強い活性を示す⁶³⁾と言われている。ラットの歯根膜では、骨に接した面よりもむしろ歯根膜の結合組織中に levamisole 感受性の ALP が認められることが報告されている²¹⁾以上のような組織化学的所見から考えると歯根膜の ALP はもとより歯髄、骨の ALP も石灰化だけに参与していると考え

ることはできない。このような組織化学的手法は ALP の組織内や細胞内の詳細な分布を知るためには有効であるが、この方法は ATPase, ADPase, AMPase などの他のホスファターゼ活性を染色する可能性がある²¹⁾。従って、今後は ALP の抗体を用いた免疫組織学的手法による解明が必要であり、今回の実験結果から歯根膜の ALP の免疫学的染色に腎臓の ALP 1 に対する抗体が使用できるものと考えられる。また、この抗体は歯根膜の ALP 活性の変動を生化学的手法で研究する上でも有効であり、今後矯正学の分野においてもこのような免疫化学的実験の応用が重要な役割を果たすものと考えられる。

結 論

実験的歯牙移動時に歯周組織の alkaline phosphatase (ALP) 活性が変動することが知られているが、歯根膜における ALP の生理的な役割は全く不明である。そこで、歯根膜における本酵素の生理的機能を解明するための一環として、ウサギとカニクイザルについて歯根膜と他組織の ALP の比活性、SDS 電気泳動パターン、各種阻害剤に対する阻害態度、neuraminidase 処理に対する感受性、免疫学的性質を比較して、以下の結果を得た。

1. ALP の比活性は、ウサギおよびカニクイザルのいずれにおいても、歯根膜が他組織よりも高く、ウサギの歯根膜の ALP はカニクイザルのものより約3倍もの高い値を示した。
2. ウサギおよびカニクイザルの歯根膜の ALP は、歯髄、歯槽骨の ALP と SDS 電気泳動の易動度が等しく、これらはすべて L-homoarginine, levamisole により強い阻害を受けた。カニクイザルの腎臓には SDS

電気泳動で歯根膜の ALP よりも易動度が小さな活性バンドのみが認められたが、ウサギの腎臓には歯根膜の ALP より易動度が小さい major の活性バンド (ALP 1) と易動度が大きい minor な活性バンド (ALP 2) が認められた。カニクイザルの腎臓の ALP とウサギの腎臓の ALP 1 は上記阻害剤により強い阻害を受けたが、ALP 2 は阻害をほとんど受けなかった。

3. 部分精製した歯根膜の ALP と腎臓の ALP 1 はヒトユニバーサルタイプの ALP に対する抗体と沈降線を形成し、両者の沈降線は融合した。さらに、両者の SDS 電気泳動の易動度は neuraminidase 処理後に一致した。

4. ウサギの腎臓の ALP 2 はウシの小腸タイプの ALP に対する抗体と沈降線を形成した。ウサギ以外の動物種 (カニクイザル, ウシ, ブタ, イヌ (雑種), ラット, モルモット) の腎臓には levamisole 抵抗性の ALP は認められなかった。

以上の結果から、歯根膜の ALP が歯髄、歯槽骨のものと同一ユニバーサルタイプのアイソザイムであり、腎臓の ALP 1 とは糖鎖構造だけが異なることが明らかとなった。また、ウサギの腎臓にはユニバーサルタイプと小腸タイプのアイソザイムが存在しており、ウサギ以外の哺乳動物の腎臓には小腸タイプの ALP は存在しないことが示唆された。

稿を終るに臨み、本研究に終始御懇切なる御指導、御校閲を賜った恩師、佐藤通泰教授、本学生化学講座、野口知雄教授に深甚なる感謝の意を捧げます。あわせて種々の御協力を戴きました矯正学講座ならびに生化学講座の諸先生方に感謝いたします。

引 用 文 献

- 1) Gianelly, A.A. and Goldman, H.M.: Tooth movement. In: *Biologic basis of orthodontics*. Lea and Febiger, Philadelphia, 1971, 116—124.
- 2) Graber, T.M.: Biomechanical principles of orthodontic tooth movement. In: *Orthodontics*. Saunders Company, Philadelphia and London, 1976, 494.
- 3) Oppenheim, A.: Die Veränderungen der Gewebe, insbesondere des Knochens bei Verschiebung der Zähne. *Österreich Ung. Vjschr. Zahnheilk.* 27: 302—359, 1911.
- 4) Oppenheim, A.: A possibility for physiologic orthodontic movement. *Am. J. Orthod. and O. Surg.* 30: 277—328, 1944.
- 5) Schwarz, A.M.: Tissue changes incidental to orthodontic tooth movement. *Int. J. Orthod.* 18: 331—352, 1932.
- 6) Storey, E. and Smith, R.: Force in orthodontics and its relation to tooth movement. *Aust.*

Dent. J. 56 : 11—18, 1952.

- 7) 滝口弘毅 : 矯正の歯牙移動に伴う歯槽骨の改造機転に関する実験的研究. 日矯誌 17 : 141—156, 1958.
- 8) Reitan, K. : Clinical and histologic observations on tooth movement during and after orthodontic treatment. *Am. J. Orthod.* 53 : 721—745, 1967.
- 9) Rygh, P. : Ultrastructural cellular reactions in pressure zones of rat molar periodontium incident to orthodontic tooth movement. *Acta Odont. Scand.* 30 : 575—593, 1972.
- 10) Hirashita, A. : The aspect of ultrastructural changes of the osteoblasts and surface areas of alveolar bone appearing in experimental tooth movement. *Bull. Tokyo Med. Dent. Univ.* 23 : 245—260, 1976.
- 11) 中村芳樹 : 歯の往復移動を行った際に圧迫側歯槽骨表面に出現する細胞の電子顕微鏡的研究. 8 : 95—123, 1981.
- 12) Zengo, A.N., Pawluk, R.J. and Bassett, C.A.L. : Stress-induced bioelectric potentials in the dentoalveolar complex. *Am. J. Orthod.* 64 : 17—27, 1973.
- 13) Zengo, A.N., Bassett, C.A.L., Pawluk, R.J. and Prountzos, G. : *In vivo* bioelectric potentials in the dentoalveolar complex. *Am. J. Orthod.* 66 : 130—139, 1974.
- 14) Yamasaki, K., Miura, F. and Suda, T. : Prostaglandin as a mediator of bone resorption induced by experimental tooth movement in rats. *J. Dent. Res.* 59 : 1635—1642, 1980.
- 15) Schilling, S.H., Wolf, H.J. and Tashjian, A.H. : Role of the osteoclast in prostaglandin E2 stimulated bone resorption. *Lab. Invest.* 42 : 290—295, 1980.
- 16) Mostafa, Y.A., Weeks-Dybvig, M. and Osdoby, P. : Orchestration of tooth movement. *Am. J. Orthod.* 83 : 245—250, 1983.
- 17) Meikle, M.C., Reynolds, J.J., Sellers, A. and Dingle, J.T. : Rabbit cranial sutures *in vitro*: a new experimental model for studying the response of fibrous joints to mechanical stress. *Calcif. Tissue Int.* 28 : 137—144, 1979.
- 18) Meikle, M.C., Heath, J.K., Hembry, R.M. and Reynolds, J.J. : Rabbit cranial suture fibroblasts under tension express a different collagen phenotype. *Archs. Oral Biol.* 27 : 609—613, 1982.
- 19) 佐藤貞雄 : 家兎歯槽骨細胞の高分子合成に及ぼす矯正力の影響. 神奈川歯学 14 : 190—205, 1979.
- 20) 滝本和男・大西 馨・中川皓文・河田照茂 : 実験的歯牙移動にともなう歯槽骨中のアルカリホスファターゼ活性の変動に関する研究. 日矯誌 24 : 182—186, 1965.
- 21) Lilja, E., Lindskog, S. and Hammarström, L. : Alkaline phosphatase activity and tetracycline incorporation during initial orthodontic tooth movement in rats. *Acta Odontol. Scand.* 42 : 1—11, 1984.
- 22) 亀井照明 : 歯の移動に伴う歯槽骨組織の酵素活性の変化. 神奈川歯学 17 : 514—524, 1983.
- 23) McKenna, M.J., Hamilton, T.A. and Sussman, H.H. : Comparison of human alkaline phosphatase isoenzymes. *Biochem. J.* 181 : 67—73, 1979.
- 24) Seargeant, L.E. and Stinson, R.A. : Evidence that three structural genes code for human alkaline phosphatases. *Nature* 281 : 152—154, 1979.
- 25) Kellen, J.A. and Lustig, V. : Patterns of amino-acid inhibition of alkaline phosphatases as an aid in cancer diagnosis. *Oncology* 25 : 239—248, 1971.
- 26) Van Belle, H. : Kinetics and inhibition of alkaline phosphatase from canines tissues. *Biochim. Biophys. Acta* 289 : 158—168, 1972.
- 27) Fernley, H.N. and Walker, P.G. : Inhibition of alkaline phosphatase by L-phenylalanine. *Biochem. J.* 116 : 543—544, 1970.

- 28) Fishman, W.H. : Perspectives on alkaline phosphatase isoenzymes. *Am. J. Med.* **56** : 617—650, 1974.
- 29) Harada, M., Fukasawa, K., Hiraoka, Y. and Fukasawa, M. : Similarity between alkaline phosphatases from bovine dental pulp and liver. *J. Dent. Res.* **63** : 28—31, 1984.
- 30) 大井田新一郎・曾根正江・佐々木哲 : プタ腎臓のアルカリホスファターゼの精製とその免疫学的性質. 骨代謝 **1** : 195—202, 1983.
- 31) Lehmann, F. : Evidence of three isozymes (placental, intestinal and liver-bone-kidney-type) by lectin-binding affinity and immunological specificity. *Biochim. Biophys. Acta* **616** : 41—59, 1980.
- 32) Goldstein, D.J., Rogers, C.E. and Harris, H. : Expression of alkaline phosphatase loci in mammalian tissues. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **77** : 2857—2860, 1980.
- 33) Robison, R. : The possible significance of hexosephosphoric esters in ossification. *Biochem. J.* **20** : 388—391, 1926.
- 34) Morton, R.K. : The purification of alkaline phosphatases of animal tissues. *Biochem. J.* **57** : 595—603, 1954.
- 35) Tojyo, Y. : A comparison of the alkaline phosphatases of rat dental pulp, bone, kidney, liver and intestine. *Archs Oral Biol.* **28** : 103—107, 1983.
- 36) Moss, D. W., Eaton, R.H., Smith, J.K. and Whitby, L.G. : Alteration in the electrophoretic mobility of alkaline phosphatases after treatment with neuraminidase. *Biochem. J.* **98** : 32C, 1966.
- 37) Butterworth, P.J. and Moss, D. W. : Action of neuraminidase on human kidney alkaline phosphatase. *Nature* **209** : 805—806, 1966.
- 38) Kominami, T., Oda, K. and Ikehara, Y. : Induction of rat hepatic alkaline phosphatase and its appearance in serum. *J. Biochem.* **96** : 901—911, 1984.
- 39) Penefsky, H.S. : Reversible binding of Pi by beef heart mitochondrial adenosine triphosphatase. *J. Biol. Chem.* **252** : 2891—2899, 1977.
- 40) Bergmeyer, H.U., Gawehn, K. and Grassl, M. : Enzymes as biochemical reagents. In : *Methods of enzymatic analysis* (ed. by Bergmeyer, H.U.). Academic Press, New York, 1974, 496—497.
- 41) Ikehara, Y., Takahashi, K., Mansho, K., Eto, S. and Kato, K. : Contrast manifestation of alkaline phosphatase and 5'-nucleotidase in plasma membranes isolated from rat liver and ascites hepatoma. *Biochim. Biophys. Acta* **470** : 202—211, 1977.
- 42) Laemmli, U.K. : Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227** : 680—685, 1970.
- 43) Burstone, M.S. : Histochemical comparison of naphthol AS-phosphates for the demonstration of phosphatases. *J. Nat. Cancer Inst.* **20** : 601—611, 1958.
- 44) Harkness, D.R. : Studies on human placental alkaline phosphatase. *Arch. Biochem. Biophys.* **126** : 503—512, 1968.
- 45) Ouchterlony, O. : Antigen-antibody reactions in gels. *Acta Path. Microbiol. Scand.* **26** : 291—294, 1949.
- 46) Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J. : Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193** : 265—275, 1951.
- 47) Bradford, M.M. : A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72** : 248—254,

1976.

- 48) Marikova, Z. and Kindlova, M. : Alkaline phosphatase in the periodontium of rat molars. *J. Dent. Res.* **51** : 1502, 1972.
- 49) Fleisch, H. and Newman, W.F. : Mechanism of calcification : role of collagen, polyphosphates and phosphatase. *Am. J. Physiol.* **200** : 1296—1300, 1961.
- 50) 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.
- 51) Matsuzawa, T. and Anderson, H.C. : Phosphatases of epiphyseal cartilage studied by electron microscopic cytochemical methods. *J. Histochem. Cytochem.* **19** : 801—808, 1971.
- 52) Goldstein, D.J., Rogers, C. and Harris, H. : Evolution of alkaline phosphatases in primates. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **79** : 879—883, 1982.
- 53) Komoda, T. and Sakagishi, Y. : Inhibition of alkaline phosphatase by sialic acid. *Biophys. Acta* **482** : 79—88, 1977.
- 54) Skillen, A.W. and Rahbani-Nobar, M. : Alkaline phosphatase and ATPase activities of rat bone : separation and characterization. *Calcif. Tissue Int.* **30** : 67—71, 1980.
- 55) McComb, R.B., Bowers, G.N. Jr. and Posen, S. : Structural features. In : *Alkaline phosphatase*, Plenum Press, New York and London, 1979, 194—203.
- 56) Bowers, G.N. Jr. and McComb, R.B. : A continuous spectrophotometric method for measuring the activity of serum alkaline phosphatase. *Clin. Chem.* **12** : 70—89, 1966.
- 57) Boyer, S.H. : Human organ alkaline phosphatases : discrimination by several means including strach gel electrophoresis of antienzyme-enzyme supernatant fluids. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **103** : 938—950, 1963.
- 58) Korngold, L. : The alkaline phosphatases of human liver : an immunochemical study. *Int. Archs Allergy appl. Immun.* **50** : 297—308, 1976.
- 59) Otani, R., Higashino, K. and Yamamura, Y. : A novel alkaline phosphatase, a minor component of normal liver phosphatases. *Clin. Chim. Acta* **82** : 249—258, 1978.
- 60) 東野一彌・波田寿一 : 癌とアルカリホスファターゼ. 代謝 **16** : 215—223, 1979.
- 61) Nuki, K. and Bonting, S.L. : Quantitative histochemistry of the developing hamster tooth : alkaline phosphatase and lactic dehydrogenase. *J. Histochem. Cytochem.* **9** : 117—125, 1961.
- 62) 高橋六一 : ラット歯槽骨の骨形成細胞の電子顕微鏡的研究とくにアルカリ性ならびに酸性ホスファターゼの局在について. 歯科学報 **72** : 1437—1467, 1972.
- 63) 出口敏雄 : 歯の移動に伴う歯周組織の変化に関する組織化学的研究. 日矯誌 **28** : 1—7, 1969.