歯槽骨吸収とホスファターゼに関する研究

平 井 敏 博

東京医科歯科大学歯学部第3補綴学教室 (主任: 林都志夫教授)

(昭和47年10月5日受付)

Phosphatases in alveolar bone resorption

Toshihiro Hirai

3rd Department of Prosthetic Dentistry, School of Dentistry,
Tokyo medical and Dental University
(Director: Prof. Toshio Hayashi)

要旨: 歯を失った後の歯槽骨の吸収機構の解明は義歯の維持, 安定の点から補綴学的にも重要な命題である。硬組織とアルカリ性ホスファターゼ(ALP)の関係は今日まで主に硬組織, 特に骨形成における役割りを中心に報告され, 骨吸収との関連性を検討した報告はほとんどみられない。本研究は ALP によりウシから得た歯槽骨粉末をはじめとする硬組織が溶解されるかどうか, そしてそれは確かに酵素作用であるか否かを確かめる目的で実験, 検討を行なった。

歯槽骨粉末は ALP 添加により特異的な Ca, P の溶出増加が認められた。また温度の影響, 阻害, 賦活剤の影響, Lineweaver-Burk の解析などによりこの溶出反応が酵素反応の特性を良く示した。

ALP の Phosphoprotein phosphatase 作用は認められたが, 微弱であった。

硬組織の無機質は溶け易い分画と溶け難い分画とがあるように思われ, ALP 活性が充分であっても溶け難い分画が比較的多量に存在することがみとめられた。

酸性ホスファターゼによる歯槽骨粉末よりの Ca, P 溶出に及ぼす影響はみられなかった。

I. 結 言

齦蝕, 歯周病など種々の原因で抜歯を行ったあとの治癒過程で, 歯槽骨の吸収は, 個人差があるにしても, 必ず認められる現象である。しかし吸収程度が最も大きい場合でも顎骨体にまで至らないのが普通であるといわれている。この点に関して林¹⁾は歯槽突起部が顎骨体とは生物学的に異った特性を有しているためであると主張しているが, これは歯槽突起部のほとんどの部分が海绵骨で構成されており, 緻密骨に比べてその代謝活性が大きいこと²⁾からみてもその性質のちがいがうなずけると思う。

骨吸収に関与する因子としては種々のレベルでの問題がある。例えば破骨細胞, 炎症性細胞など吸収に働く細胞の問題, 成長あるいは老化に伴うこれら細胞の機能の動態, ホルモンやビタミンの代謝調節の機構などである。さらに骨の成分(無機質および有機基質)の溶解に直接関与していると思われる化学的因子についても未だ完全には明らかにされていない。

骨の無機成分は, エナメル質や象牙質におけると同様にハイドロキシアパタイトであるとされており, これを溶解する働きのあるものとしてこれまで, クエン酸³⁾, 乳酸⁴⁾などなどの有機酸, あるいは炭酸⁵⁾などが想定されてきたが, 未だ確定は

されていない。また有機質の分解に関しては、骨、象牙質ではコラーゲンが主体であるので、コラゲナーゼ⁶⁾が考えられ、さらにリゾソーム性の各種加水分解酵素⁷⁾の役割りが考えられてきている。

いっぽう硬組織が崩壊すると現象として著明なものに齶蝕がある。この場合に働く細菌性の溶解因子についても古くから注目され、骨の吸収の場合のものと対比して検討されてきている。齶蝕の化学的因子については細菌の代謝によってつくられる乳酸が現在最も重視されているが、その他キレーション説⁸⁾、蛋白溶解説⁹⁾なども想定されている。

最近 Kreitzman¹⁰⁾一派は、アルカリ性ホスファターゼ (ALP) によりエナメル質、象牙質、骨が溶解されるという現象を報告し、これが Phosphoprotein Phosphatase として蛋白質に結合した燐酸を加水分解し除去する働きをもち、これによって硬組織が崩壊するものと主張しており、齶蝕や骨吸収における過程であるとしている。

齶蝕の成因にホスファターゼの働きを考えた説としては以前に Csernylei¹¹⁾、Lura¹²⁾ による内因説として提出されたことがあり、柳生¹³⁾によっても報告がなされているが、骨吸収に関してはその関連性を検討した説はみあたらない。

ALP そのものについての研究はこれまで多数の報告があり、肝、骨、腸あるいは胎盤に存在するものについて精製、アイソザイム、阻害、耐熱性など酵素化学的な性質について研究されたものがほとんどである。本教室でも早川¹⁴⁾、芝¹⁵⁾により骨その他の臓器由来の酵素について詳細な報告がなされているが、この酵素の生理的機能、とくに硬組織における役割りについての観点からあまり追求されていなかった。

骨の ALP の意義に関してはこれまでにいくつかの説が主張されてきている。古典的な Robinson¹⁶⁾の局所燐酸濃度上昇による結晶形成促進という考え方や、基質形成に関与する¹⁷⁾という説、Fleish ら¹⁸⁾のピロホスファターゼ説など、いずれも主として硬組織の形成における役割りを演じ

ているものとする立場から考えられてきている。しかしこれに反して、Keitzman らの硬組織溶解に働くという考えはまったく新しい反対の立場からの説であり非常に興味をひくものである。

しかしながら Keitzman らの論文をくわしく検討してみると、硬組織の溶解をみとめたという実験の条件についての基礎的検索が充分でなく、使用した酵素標品にも多くの問題が感じられる。また Phosphoprotein Phosphatase の働きについてもその証拠は乏しいように思われる。

そこで著者は ALP によって骨、象牙質、エナメル質など硬組織の溶解がたしかに起るものであるか、さらに起るとすればその条件の詳細について明らかにしたいと考え、本実験を行ったのである。

II. 実験材料・試薬および方法

1) 硬組織粉末

本実験に使用した硬組織粉末は、歯槽骨粉末をはじめとしてウシから得られたものである。すなわち、材料をまず鉄乳鉢中で砕き、さらにメノウ乳鉢を用いて細粉化した。このようにして得られた歯槽骨粉末、骨粉末、象牙質粉末、エナメル質粉末はいずれも標準篩によって 100~200mesh に篩分けして以後の実験にはすべて基質として使用した。また象牙質、エナメル質の分離には Manly & Hodge の浮遊法¹⁹⁾を用いた。

2) 緩衝液の調整

終濃度がそれぞれ 0.01M 5-5 Diethyl barbitalic acid, および 0.155M KCl 混液を緩衝液として用い、0.5N HCl あるいは KOH にて所定の pH に調整した。この際蒸留水はさらにスリ合せガラスの再蒸留水装置によって精製したものをを用い、又本実験に使用したガラス器具はいずれもこの再精製水で洗浄し、試薬も再精製水によった。

3) Ca, P および Mg の定量

Ca および P の定量には「オルトクレゾールフタレインコンプレキソン法 (和光 Ca テスト)」, 「モリブデンブルー法 (和光 P テスト)」を使用し

日立分光比色計 101型で比色し、検量線より定量した。また Mg^{2+} を ALP の賦活剤として使用した際、 Mg^{2+} の変化量を調べるために「マグネシウムキット-N (日本商事)」を使用し、同比色計にて比色し定量した。

4) 予備実験としての溶出曲線の作製

前記緩衝液中に 50mg/2 ml の割合で硬組織粉末を添加し、37°C 恒温槽中で振とうしつつ 3 時間 incubate した。この間、30 分毎に 1 回 3 秒づつ Mixer にてかくはんした。イキュベーション完了後、混液は東洋濾紙 No. 6 の円型濾紙にて濾過し、その濾液中の Ca および P を前記キットを用いて定量した。これを各 pH について行ない溶出曲線とした。なお濾紙よりの Ca の溶出量は前記キットを使用した比色法で検出されなかった。

5) Alkaline Phosphatase, Acid Phosphatase の添加

本実験に使用した Al-Pase 標品は Calf intestine [MILES 市販, 0.67 units/mg unit—37°C, 1 分間に 1 μ mole のフェノールを遊離する酵素活性量] 由来のもの、Acid-Pase 標品は Wheat Germ [SEIKAGAKU 市販, 12.0 units/mg, unit—37°C, 15 分間に A_{430} が 0.50 増加する酵素活性量] 由来のもので使用直前に所定量だけ緩衝液に溶して使用した。この所定量の酵素液を 0.1 ml とり、硬組織粉末 50mg/緩衝液 2 ml に添加し酵素添加実験とした。

6) Albumin の添加

Al-Pase, Acid-Pase 添加に際し蛋白量の control としてウシ血清アルブミン標品 [和光純薬市販・Cohn Fraction V, 95%以上] を使用した。この所定量を前記酵素添加実験と同様に 0.1 ml 添加した。

7) 溶出に及ぼす阻害、賦活の条件

阻害実験には L-Phenylalanine [第一化学市販特級]、尿素 [和光純薬市販特級]、加熱、賦活剤として $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ [小宗化学市販特級] を用いた。あらかじめ Al-Pase 標品に及ぼす前記阻害、賦活の影響を調べるために Alkaline Phosphatase K-Test [和光純薬] を用い、その阻害、賦活

曲線を求めた。熱阻害ではほぼ活性がなくなる 56°C, 30 分処理 ALP を溶出実験に組み合せた。尿素阻害についてはあらかじめ 3 M 尿素を前記緩衝液中にとかしこみ、これに 2 mg/2 ml の ALP を添加し、また L-Phenylalanine 阻害については終末が 20 mM になるように緩衝液中にとかしこみ、同様にこれに 2 mg/2 ml の ALP を添加して溶出実験を行なった。賦活剤として使用した $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ は終末が 5 mM となるように緩衝液にとかし、これに 2 mg/2 ml の ALP を添加して溶出実験を行なった。

8) Phosphoprotein Phosphatase の測定

使用した Al-Pase 標品の Phosphoprotein Phosphatase 作用を確かめるために casein [和光純薬市販・乳製] を 0.05 N NaOH に 25 mg/2 ml の割合でとかし、これに 1, 2, 4 mg/2 ml の ALP を添加して、遊離する P 量を測定した。なおこの casein 溶液は KOH にて pH 9 に調製した。

III. 実験成績

1) 各 pH における Ca, P の溶出量

歯槽骨粉末 50 mg を pH の異った溶液 2 ml で II—2) に記した条件で処理した際に溶出されてくる Ca および P を定量したところ図 1 の如くであった。pH 7 附近に変曲点を持つ Sigmoid 曲線を示した。溶出された Ca と P の重量比は図 1 に記した通りである。

同一条件下で pH 8 以上のものについて ALP (2 mg/2 ml) を添加すると Ca, P の溶出は増加することが認められた。

緩衝液のみにより溶出された量を差し引いた結果は図 2 の如くで、P に関しては pH による差異はないが、Ca に関しては pH 9 に於いて最大値を示した。また Ca/P 値はアルカリ側ではやはり低い傾向がみとめられた。ALP 2 mg, 3 時間の作用で歯槽骨粉より溶出された Ca および P 量は骨粉中の全 Ca および P に対してそれぞれ 0.85 %, 2.8% であり、また同量の ALP により phenylphosphate より分解される磷酸量の 0.08% に相当した。

図1 pH-Effect on Solubilization

図2 Increase in Solubilization by ALP

2) ウシ血清アルブミンの影響

ALP による Ca, P の溶出が蛋白質を加えたことによる非特異的な作用であるかどうかを確かめる目的で pH 9 の緩衝液にウシ血清アルブミンを加え、この濃度と溶出された Ca, P 量との関係を調べた。その結果は図 3 の如くであった。すなわち 5 mg/2 ml 以下の量ではアルブミンは Ca, P の溶出には殆んど影響がなく、これ以上になると溶出を増加させる傾向が明らかに認められた。

ALP の効果の場合には通常 2 mg/2 ml で調べており、この濃度ではアルブミンはまったく作用がないことが明らかになった。

図3 Effect on Solubilization in various Concentration of Bovine Albumin

図4 Effect on Solubilization in various Concentration of ALP

---- same concentration of albumin pH 9

3) ALP 量と溶出される Ca, P 量との関係

これまでの実験で ALP により骨などより Ca, P が溶出され、これが骨塩の溶解性に対する蛋白質としての効果のみではないらしいことが明らかになったが、次に ALP 量を変えて溶出される Ca, P 量を測定した結果が図 4 である。この際参考のためウシ血清アルブミンによる溶出量を示してある。

図5 Solubilization Velocity of P in various conc. of ALP and Substrate.

図6 Relationship between Substrate Concentration and Solubilized amounts of Ca and P.

—— +ALP
 ---- buffer only

また作用をうける硬組織が異った場合のPの溶出についても調べたのが図5である。その結果では緻密骨を材料としたときの溶出が最も少なく、その他は歯槽骨(海綿骨)、象牙質、エナメル質は同程度の溶出であることが明らかになった。

4) 歯槽骨粉末量と溶出量との関係

歯槽骨粉末量を20mg, 50mg, 80mg と変えたときの ALP および緩衝液のみによる Ca およびPの溶出の状態は図6の如くであった。この結果からは骨粉量を50mg から80mg に増加しても ALP による溶出分はあまり増加していないことが確かめられた。

図7 Solubilization Velocity of P in various conc. of Substrate.
 (alveolar bone powder)

図8 Michaelis Constant of Solubilization
 (alveolar bone)

次に骨粉量を変えた場合、その作用時間を追ってPの溶出を調べた結果は図7の如き曲線が得られた。この結果から、骨粉量が充分ある時は、2時間以後はあまり溶出は増加しなかった。

5) Km について

前述の実験に引き続き歯槽骨粉量を変えてPの溶出の初速度を求め Lineweaver-Burk の法で解析したのが図8である。

この結果から基質になっている骨粉量と反応速度との間にそれぞれの逆数について直線関係が得られたことから、この溶出反応が一応、酵素反応としての性格をもつものであることが認められた。この方法で求められたみかけの Km は55.6 mg であった。

図9 Temperature-Effect on Solubilization

図10 Inhibition and Activation of ALP with several treatments

6) 温度

23°, 37°, 42°C における ALP を加えたとき、緩衝液のみの場合の Ca, P 溶出量の変化は図9の如くであった。酵素のない場合は溶出量は不変であったが、酵素添加のものは 42°C まで温度上昇とともに増加する傾向がみられた。

7) 阻害剤および活性化剤の効果

実験に用いた酵素について phenyl phosphate を基質としたときの ALP 活性 (このときの酵素量は 1 mg/ml) に対する加熱 (56°C), 尿素, L-Phenylalanine の阻害効果および Mg^{++} による活性化の状態は図10に示すであった。すなわち, 56°C 30分加熱で約90%, 3 M尿素で約 50 %, 20 mM L-Phenylalanine で約 60 % の阻害がみとめられ, Mg^{++} による活性化は 5 mM で約25%であった。

次に ALP による骨粉よりの Ca, P の溶出作用に対するこれらの effector の作用についてまとめたものが表1であるが, その結果は 3 M 尿素, 56°C 30分加熱でいづれも 100 %近い阻害となっており, 20mM の L-Phenylalanine による阻害はあまり顕著ではなかった。 Mg^{++} については ALP の存在しない場合でも Mg^{++} 自身によると思われる Ca 溶出作用がかなりの程度にみられたが, ALP による作用を活性化していると思われる傾

表 1 Inhibition Ratio of some Reagents

	Ca mg/dl	%	P mg/dl	%	Mg mg/dl
buffer only	0.9	—	0.8	—	
+ALP	1.7	+189	1.4	+175	
+ 3 M Urea	0.9	-100	0.9	- 89	
+56°C 30min ALP	0.9	-100	0.8	-100	
+20mM L-phenylalanine	1.2	—	1.2	—	
+20mM L-phenylalanine +ALP	1.7	- 64	1.7	- 64	
+ 5 mM Mg^{++} only	3.7	—	0.1	—	13.9
+ 5 mM Mg^{++} +ALP	4.8	+120	0.3	+300	14.1

表 2 Hydrolysis of Phosphate-bond in Casein by ALP

ALP conc.	1mg/2ml	2mg/2ml	4mg/2ml
P			
Casein 25mg/ 2 ml	0.9	4.6	6.3
P 含量 1 % として 12.5mg/dl	7.2%	37%	52%

図11 Repetition of Enzymatic Solubilization with same Substrate

向がややみられた。

8) ALP の Phosphoprotein Phosphatase 作用について

本実験に使用した ALP に Phosphoprotein Phosphatase 作用があるかどうかを調べるため、casein を基質として ALP を 1, 2, 4 mg/2 ml の濃度で作用させ、3 時間 incubate した後、遊離した P を測定した結果は表 2 の如くであった。

この結果より ALP により casein に結合した磷酸が一部加水分解され、溶出されることがわかったがしかし phenyl phosphate を基質とした場合に同じ条件で分解される量の 0.23% に相当し、ごくわずかであることがわかった。

9) 歯槽骨粉末に対する ALP の作用の反復実験

図 7 に示した如く ALP による骨粉よりの溶出

図12 Effect on Solubilization in various Concentration of Acid-Pase (pH 5)
----- same concentration of albumin

量の増加が 2 時間以後はあまり多くないが、これが酵素活性の低下によるものか、または骨粉側の問題であるかを明らかにするために、これまでの方法に従って骨粉に ALP を作用させ、Ca, P の溶出量を測定したのち、骨粉のみを集め再び新しい ALP と溶液を加えて作用させ、この操作をもう一度くりかえして溶出量を測定した結果が図 11 である。

この結果から Ca, P の溶出量はいずれも回数が増えるに従って低下することが認められた。このことは、酵素活性が充分であっても骨粉中には溶出されやすい分画と、されにくい分画とがあることが想像される。

10) Acid Phosphatase (AP) の作用

ALP によりみとめられた骨粉よりの Ca, P 溶出作用が酸性ホスファターゼによってもおこるどうかを確かめる目的で、実験 3 と同様の条件（ただし pH は 5）で行った結果が図 12 である。

この結果は同量のウシ血清アルブミンで行ったと殆んど一致しており、特異的な溶出作用と判断されるような差異はみとめられなかった。

IV. 考 察

骨にはアルカリ性 (pH 9~10) に至適 pH をもつ磷酸エステル加水分解酵素が存在することは古くから知られている。特に 1923 年 Robison が

これを血漿, 各種臓器に多量に発見して以来, この生理的機能については種々の研究者により報告がなされ, 多くの学説が出されている。緒言にも述べたようにまず, 古典的な Robison の局所磷酸濃度上昇説¹⁶⁾より始まる。これは局所のカルシウムと磷酸の濃度が高まるのが石灰化の第1条件であり, これが一定の溶解度積を越すと無機塩の沈澱が起るであろうという考えに沿って, ALP がある種の磷酸エステルを加水分解し, その結果局所的にイオン濃度が高まり, 結晶形成へ進むという考え方である。実際, 軟骨を用いての *in vitro* の石灰化も確かめられたが, 結局基質となるべき有機磷酸を同定できなかったことなど不都合が多くみだされ, その後一部修正され, 解糖の代謝産物からの transphosphorylation という考え方に変ったがその根拠は弱いものであった。

組織化学的研究から ALP が線維形成に, あるいはムコ多糖類の合成に関与しているとする説¹⁷⁾もその機能を明らかにするまではいたっていない。

石灰化に epitaxy の原理をとり入れた Neuman 一派の Fleish¹⁸⁾は *in vitro* の石灰化実験を行ない, ALP の本来の働きはピロホスファターゼであって, 骨塩沈着に阻害的に働くピロリン酸を結晶毒として除く働きにより石灰化を促進していると考え, 後に尿石症の観察などからこれが石灰化及び溶解の調節を行っていることを示唆するまでにいたっている。

以上挙げた ALP の生理的な意義は, 硬組織の石灰化, すなわち形成における役割を主として展開されたものである。

一方 ALP の硬組織溶解作用については, 1950 年代初期 Lura¹²⁾により, あるいは Csernyei¹¹⁾により齶蝕の原因として Phosphatase による無酸脱灰脱が唱えられた。これは柳生により追試され賛美を表されてはいるものの, 柳生の実験も真に ALP の働きによる溶解か否かは実験的根拠も少なく, 説得力に乏しい。

最近 Kreitzman ら¹⁰⁾により ALP が骨吸収に働くという考えが主張されている。彼等は *E. coli*

由来の ALP とラットの下顎骨, 歯牙を用いて, 骨, 歯牙面を走査顕微鏡により観察した結果から, *E. coli* 由来の ALP による脱灰作用をみると, これが Phosphoprotein Phosphatase 作用によるものであろうと想像している。しかし彼等の報告は純酵素的な溶解であるとするにはいまだ不十分で Phosphoprotein Phosphatase 作用の根拠もない。

本報告はこの点をさらに詳しく検討し, とくに酵素作用としての性格を明らかにすることを目的としたものである。

齶蝕原因の追求の方面から酸脱灰説を主張する立場から, エナメル質についてその酸性領域における Ca, P の溶出を研究した報告は数多いが, アルカリ性領域での Ca, P 溶出についてはあまり検討されていない。Nordin²⁰⁾の pH 7.8 での骨粉の溶解性を調べた報告がみられるくらいである。

本実験では ALP を使用したため, その活性がアルカリ性であることからまず pH 10 までの溶出曲線について検討した。酸性での各 pH における溶出曲線では pH 5.5 附近からそれ以下になると急激に溶解性が上昇することが良く知られている。本実験における歯槽骨粉末においても pH の上昇につれて Ca, P の溶出は少なくなった。また pH 9 以上では溶出量の差はあまりみられなかった。

硬組織の主成分であるハイドロキシアパタイトの Ca/P 比は重量比で 2.15 (モル比 1.67) であるが本実験では pH の上昇に従いこの値が 1.0 に近づいている。この傾向の一つの解釈として, アルカリ性混液では KOH によって pH を調整するため, 上清の Ca が不溶性の $\text{Ca}(\text{OH})_2$ となってくることを考慮しなければならない。他方 P は K_2PO_4 となり, これは溶け易く, 結局 Ca/P の値は pH の上昇につれて減少するものと思われる。また酸性領域における比の増大は, HCl にて pH を調整するため, 溶出 Ca が CaCl_2 となり, これが溶け易いためと考えられる。Steel²¹⁾はエナメル質において pH 2 では理論比 2.15 附近に集中す

るが、pH 4.0, 5.0と上昇するにつれて0.38から7.00までばらつきが大きくなり、これをエナメル質の CaCO_3 , および過剰のリン酸塩のためとしている。

ところで酵素添加により溶出された Ca 及び P の Ca/P 比についても溶出される場合には上記と同じ反応が伴うことが考えられるが、酵素非添加の場合の溶出量を差し引いた溶出増加量について Ca/P 比を求めてみることに、むしろ理論比に近い点に本現象の解明についての一つの手がかりがあるとも思われた。

さて、酵素を添加する際には蛋白質そのもののハイドロキシアパタイトに対する影響も検討しておかなければならない。そこで著者はアルブミン純品の添加によって Ca および P の溶出を観察した。図 3 にみられる如く 2.5mg/ml 以上のアルブミンによる溶出効果はきわめて著明であった。Mäkinen ら²²⁾ は 0～5 mg/ml のアルブミン、 γ -グロブリン、ovalbumin 添加はすべて溶出に対して阻害作用があったとしているが、本実験では阻害作用は全くみとめられなかった。アルブミンのみの添加を control として酵素添加による Ca, P 溶出との関係を検討した結果は図 4 の如くであった。すなわち、2.5mg/ml までの酵素添加ではあきらかにその溶出効果が認められた。Ca $\times$ P のイオン積についてみるとこの効果は一層顕著であった。

図 9 にみる如く温度条件の差による溶出量の変化は、酵素添加実験では温度の上昇とともに Ca, P の溶出量は増加した。このことは温度上昇に伴う反応速度の促進を思わせ、酵素による溶出の特性を示しているものといえる。

基質濃度と遊離された P 量との関係は図 6 にみられる如く、一次反応から零次反応へと近づくように思われた。基質濃度、反応時間をさらに細かくとり、Lineweaver-Burk の式の $-\frac{1}{v}$ および $\frac{1}{[s]}$ を函数としてプロットして図 8 の如き直線を得た。この溶出反応が酵素反応としての性格をもつものであると認められた。Km は 55.6mg であり、使用した歯槽骨粉末中の P 量を例に 10% として燐

酸について Km を求めると 0.1mM に相当する。しかし実際には酵素と interact する燐酸はもっと少量であろうから実際の Km はもっと低い値である可能性が考えられる。Moss²³⁾ らは β -ナフチルリン酸を基質として電気泳動的に精製したヒト組織 ALP (主要バンド) の骨及び小腸の Km を求めたところそれぞれ 0.110, 0.090mM と報告している。

さらに本実験の溶出反応が酵素反応であることを確かめるため各種阻害剤及び活性化剤の添加を試みた。ALP の阻害実験はその isoenzyme の同定に関して、各種アミノ酸²⁴⁾、尿素²⁵⁾、ethanol²⁶⁾、加熱²⁷⁾ など古くから行なわれてきている。著者²⁸⁾ も各種疾患別血清の L-Phenylalanine, 尿素, 加熱に対する態度をみたが、本実験に使用した ALP の L-Phenylalanine, 尿素, 加熱に対する阻害実験を行ない、その阻害曲線を作製した。又 Mg^{++} の ALP に対する活性化剤としての働きは知られているところである。その活性化曲線は図 10 にみられる如くであり、骨性 ALP のピロホスファターゼに対する Mg^{++} 活性化曲線ときわめて類似したものではあるが²⁹⁾、ALP 活性についての活性化曲線とは異っており、あるいはウシ小腸 ALP に特有な成績であるかも知れない。以上の effector の作用をまとめた表 1 をみると尿素, 加熱では明らかな阻害がみられる。 Mg^{++} 存在下での溶出 Ca の測定に際しては Mg^{++} 自身による Ca 溶出の効果も考え合さなければならない。 Mg^{++} 添加により Ca の溶出が大幅に増大することの一つの原因として Neuman, Levinskas³⁰⁾ の述べているように水和殻あるいは結晶の表面での Ca^{++} との置換が考えられる。その置換による Ca の溶出増加が ALP 添加によりさらに増加していることをみると Mg^{++} による ALP の賦活作用と考えることもできる。

以上のように、同条件でのアルブミンと ALP 添加の結果、温度の影響、賦活剤の影響、Lineweaver-Burk の解析などより本実験における溶出反応は酵素反応の特性を良く示しているように思われた。

ALP の特徴の一つに基質特異性がきわめて低

いことが挙げられる。グリセロ磷酸、各種糖エステル、ATP など生理的磷酸エステルのほか、フェニール磷酸など多くの合成基質やピロリン酸を加水分解する。本実験に使用した歯槽骨粉末、骨、象牙質、エナメル質粉末は硬組織ではあるがその成分は若干異なり各々 ALP に対しては異った態度を示す可能性も考えられる。そこで各々について添加酵素濃度と遊離する P 量の差を示したのが図5である。緻密骨を除くと3種粉末は同一挙同を示し、骨に比べ ALP の作用を受けやすいものと推定された。この差異の原因については不明であるが、これら P 溶出量を実測値でみると骨粉末も酵素非添加時には他の粉末とほぼ等量の P が測定されている。これからみると骨粉末は酵素添加以前にすでに P の溶出が完了しており、ALP による溶出が起りにくいのではないかと思われた。

以上本実験でみられた ALP による硬組織粉末よりの Ca, P の溶出作用で骨の溶解、あるいは齶蝕など硬組織の分解の機序を説明できるであろうか。

Kreitzman らの一連の実験に関してはその後 Mäkinen³¹⁾により酵素作用では酵素標品中に保存用に添加されている硫酸アンモニウムの影響ではないかとの批判がなされた。これについてはイオン交換の立場で説明を行なっているが、著者はこの硫酸アンモニウムを直接硬組織(骨粉)に添加し、その濃度と Ca, P の溶出量の関係を検討した。図13にみられるようにその効果は著しい。この原因は硫酸アンモニウム $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ は溶液中で加水分解し、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 \longrightarrow 2\text{NH}_4\text{OH} + \text{H}_2\text{SO}_4$ により pH の下降が考えられる。終末濃度 0.05M 硫酸アンモニウムで pH の下降は 0.5 であり、図1からみても Ca 溶出が急激に変化するところである。したがってこの種の実験における硫酸アンモニウムの混在標品での実験結果は信頼性に乏しい。また彼等は ALP による分解の本態が Phosphoprotein Phosphatase によるとしているが、表IIにみられる如くその作用は認められるものの非常に弱く、又組織中の Phosphoprotein の存在

図13 Solubilization with Ammonium Sulfate (initial pH 9)

については質的にも量的にもたしかめられてはいないことなどから、この可能性は少ないと思われる。

それでは、ALP による硬組織よりの Ca, P 溶出の作用をどのように理解したら良いのであろうか。

本実験に使用した歯槽骨粉末をはじめとする硬組織粉末の結晶が全て一様なものであるとは考え難い。図11に見な如く酵素活性が充分であっても骨粉中には溶出されやすい分画とされ難い分画があることが想像された。これらは Pasner³²⁾ らのいう amorphous calcium phosphate と crystalline apatite であると考えられ、又 Neuman³⁾ らのいうしっかりしたアパタイト結晶と外側の水和殻であろうと考えられる。これら溶け易い分画に ALP が作用してその溶出を促進していくように思われる。本実験での II 回目以降の $\text{Ca} \times \text{P}$ 値は I 回目の半分以下になっていることからみても、これらの分画の存在が充分推測される。

骨吸収に際し破骨細胞の出現が多く認められ、これに Acid-Phosphatase (AP) 活性が高いことが知られている⁷⁾。溶解作用には ALP よりむしろこの AP が作用すると考えるのは決して不自然ではないが、図12の如く ALP と同じ実験と比較してその酵素作用を認めることはできず、一応本標品と Ca, P の溶出作用との間には直接の関係はないように思われた。

骨吸収の現象が単に ALP の作用のみによって進行すると考えることは極めて一方的な見方であり、骨吸収と化骨との平衡という面も無視するわ

けにはいかない。例えば腎結石の成因には明らかに ALP の関連がみとめられるが、尿中のピロリン酸はこれを抑制することが *in vitro* でも *in vivo* でも証明されている³³⁾。

著者は本実験に先んじて、化骨実験を行ない、非酵素的石灰化とそれに酵素添加を施した結果を検討報告した²⁹⁾が、その際生体内での石灰化は ALP はむしろ化骨のきっかけをつくり、その後の石灰化がかなり機械的に続くのではないかと推定した。これに対し老人にみられる骨粗鬆症など激しい骨吸収では同時に血清 ALP 活性も著しく上昇しており、このような吸収には明らかに酵素の関連が予想される。本実験により骨塩から ALP により溶出反応がみとめられ、これが酵素反応の性格をもちうることは骨吸収と ALP の関係を理解する上に一つの大きな示唆を与えたものと考ええる。

V. 総 括

抜歯後の歯槽骨の吸収機序を解明する目的で、アルカリ性ホスファターゼによる歯槽骨粉末をはじめとする硬組織粉末に及ぼす溶解作用を検討した。

1) 歯槽骨粉末は ALP 添加により特異的な Ca, P の溶出増加がみとめられた。また温度の影響、阻害・賦活剤の影響、Lineweaver-Burk の解析などにより、この溶出反応が酵素反応の特性を良く示した。

2) ALP の Phosphoprotein Phosphatase 作用は認められたが、微弱であった。

3) 硬組織の無機質は溶け易い分画と溶け難い分画とがあるように思われ、ALP 活性が充分であっても溶け難い分画が比較的多量に存在することがみとめられた。

4) 酸性ホスファターゼによる歯槽骨粉末よりの Ca, P 溶出に及ぼす影響はみられなかった。

稿を終るにあたり、御指導と御校閲をいただきました主任林都志夫教授、生化学教室佐々木哲教授、埼玉医科大学生化学教室坂岸良克教授に心から感謝いたします。また御校閲、御助言くださいました補綴学教室長尾正憲

講師、さらに御協力くださいました中央検査室生化学の方々、当教室松本助教授、山県講師はじめ諸兄に感謝の意を表します。

文 献

- 1) 林都志夫：無歯顎補綴の進歩と混乱，補綴臨床，3：287，1971.
- 2) Honjo, K. et al.: Aconitase and fumarase activity in periodontal tissue. J. Dent. Res. 43：495，1964.
- 3) Neuman, W. F. and Neuman, M. W.: The chemical dynamics of bone mineral. Chicago. 1958, Univ. of Chicago Press. (骨の生化学，荒谷真平訳，医歯薬出版 1960).
- 4) Neuman, W. F. and Dowse, C. M.: The Parathyroids. Illinois, 1961. Charles, C Thomas Publisher. p. 310.
- 5) Forsher, B. K. and Cohn, D. W.: Mechanism of hard tissue destruction. Washiton, American Association for the Advancement of Science p. 577.
- 6) Prophet, A. S. and Atkinson, H. F.: The action of collagenase on carious dentin. Brit. Dent. J. 94：278，1953.
- 7) Vaes, G.: Lysosomes. In biology and pathology. Vol. 1 (ed. Dingle, J. T. and Fell, H. B.) Amsterdam, 1969. North-Holland Pub. Co. p. 217.
- 8) Schatz, A. et al.: Destruction of teeth Organic matter by oral keratinolytic microorganisms. New York State Dent. J. 21：438，1955.
- 9) Gottlieb, B.: Dental Caries. J. Dent. Res. 23, 141, 1944.
- 10) Kreitzman, S. N. et al.: Enzymatic destruction of bone *in vitro*. Nature, 228：575，1970.
- 11) Csernylei.: Palpa phosphatase and dental carious. New York State Dent. J. 17：149，1961.
- 12) Lura, H. E.: New investigation into the cariogenic properties of dental plaque. Arch. Oral. Biol. 6：149，1961.
- 13) 柳生嘉雄：E. H. Lura の無酸蝕蝕成因説の紹介と批判，口腔衛生学会誌，第13巻第2号，57，昭38.
- 14) 早川 巖：歯槽骨の石灰化と吸収に関する研究，口病誌，37，338，1970.
- 15) 芝 燁彦：骨性アルカリ性ホスファターゼ，口病誌，39：215，1972.
- 16) Robison, R.: The possible significance of hexosephoric esters in ossification. Biochem.

- J. 17 : 286, 1923.
- 17) Gossea, W. and Schwabe, M. : Enzymhisto-
chemie des Knochengemebe. Z. Orthopad.
109 : 212, 1971.
- 18) Fleish, H. and Neuman, W. F. : Mechan-
isms of calcification. Amer. J. Physiol. 200 :
1296, 1961.
- 19) Manly, R. S. and Hodge, H. C. : Density,
and refractive index studies on dental hard
tissue. J. Dent. Res. 18 : 133, 1939.
- 20) Nordin, B. E. C. : The solubility of pow-
ered bone. J. Biol. Chem. 227 : 551, 1957.
- 21) Steel, J. : The solution of calcium and pho-
sphorus from intact enamel surface. J. Dent.
Res. 39 : 84, 1960.
- 22) Mäkinen, K. K. et al. : Liberation of phos-
phate from human dental enamel by enzymes.
Caries. Res. 2 : 317, 1968.
- 23) Moss, D. W. : Characterization of tissue
alkaline phosphatase and their partial purifi-
cation by starch-gel electrophoresis. Biochem,
J. 81 : 441, 1961.
- 24) Fishman, W. H. : L-phenylalanin, an organ
specific, stereo-specific inhibitor of human
tissue alkaline phosphatase. Nature. 198 : 685,
1963.
- 25) Bahr, M. and Wilkison, J. H. : Urea as a
selective inhibitor of human tissue alkaline
phosphatase. Clin. Chim. Acta. 17 : 367, 1967.
- 26) Pecoek, A. C. et al. : Ethanol fractionation
of human serum alkaline phosphatase. Clin.
Chim. Acta. 8 : 914, 1963.
- 27) Posen, S. et al. : Heat inactivation in the
study of human alkaline phosphatase. Ann.
Int. Med. 62 : 1234, 1965.
- 28) 平井敏博, 坂岸良克 et al. : 血清アルカリ性ホ
スファターゼアイソエンザイムの阻害と泳動像,
生物物理化学, 15 : 309, 1971.
- 29) 平井敏博, 坂岸良克 et al. : 第44回日本生化学
会 (1971).
- 30) Levinskas, G. J. and Neuman, W. F. : The
solubility of bone mineral. J. Phy. Chem. 59 :
164, 1955.
- 31) Mäkinen, K. K. and Paunio, I. K. : The
pH- dependent liberation of phosphate from
human dental enamel and dentin by ammo-
nium sulfate. Acta. Chem.Scand. 24 : 1541,
1970.
- 32) Termin, Jr. D. and Posner, A. S. : Calcium
phosphate in vitro. Arch. Biochem. Biophy.
140 : 307, 1970.
- 33) King, Jr. J.S. : Current in Renal stone re-
search. Clin. Chem. 17 : 971, 1971.