原 著

ヒト骨肉腫細胞株 HOS の *in vitro* 培養系 における分化および石灰化

池 田 通

東京医科歯科大学歯学部口腔病理学教室（主任・指導：山本 肇教授）

東京医科歯科大学歯学部口腔細菌学教室（指導：土田信夫教授）

北里大学衛生学部生命科学研究センター超微形態学研究室（指導：二重作 豊教授）

（1987年12月17日 受付）

Differentiation and Calcification of Human Osteosarcoma Cell Line HOS

Tohru Ikeda

Department of Oral Pathology, Faculty of Dentistry, Tokyo Medical and Dental University

(Chief and Director : Prof. Hajime Yamamoto)

Department of Oral Microbiology, Faculty of Dentistry, Tokyo Medical and Dental University

(Director : Prof. Nobuo Tsuchida)

Laboratory of Ultrastructure Research, Life Science Research Center, School of Hygienic Sciences,

Kitasato University (Director : Prof. Yutaka Futaesaku)

To investigate the mechanism of the initiation of calcification, the author tried to make the human osteogenic cell line HOS express osteogenic markers *in vitro*.

When the HOS cells were cultured up to 10 weeks in the culture medium supplemented with 10% fetal bovine serum and 50mg/l of L-ascorbic acid, the cells formed two layers, epithelial-like surface cell layer and collagen-rich inner cell layer. Alkaline phosphatase activities were detected in the cytoplasmic membrane of the cells in the epithelial-like surface cell layer after the cells reached confluency.

When the HOS cells were cultured in the medium further supplemented with 5mM final concentration of β -glycerophosphoric acid disodium salts, calcified substances were formed by the end of the 3rd week. By analytical electron microscopy, the calcified substances were found to be hydroxyapatite crystals.

From these results, it is suggested that the HOS cells possess an osteogenic potential and express osteogenic markers *in vitro*. Further, in this culture system, two distinct vesicular structures, matrix vesicle-like structure and larger vesicular structure, were found as the possible initiation sites of calcification.

I. 緒 言

骨形成における初期石灰化機構はいまだに不明

な点が多く、明確な説明がなされていない。その原因のひとつとして、対象が硬組織または形成過程の硬組織であること、さらに、限られた場所と

時間においてのみみられる現象であるため、組織学的にも生化学的にも扱いがむずかしいという点あげられる。そこで、生体内の生理的骨形成過程をすべて反映していなくても、骨原性細胞の分化の過程で起こる初期石灰化のモデルが容易にかつ安定して得ることができれば石灰化機構の解明にきわめて有用であることから、*in vitro* 培養系での石灰化の研究が盛んに行われるようになった^{1~8)}。初期石灰化が容易にかつ安定して得られるという目的のためには、用いる細胞が樹立細胞株であることが望ましい。この条件を満たし、実際に研究に用いられている細胞に、わが国で樹立された、マウス頭蓋骨の骨原性細胞由来とされる MC3T3-E1 細胞がある⁹⁾。しかし、この種の研究は特定の細胞に限らず、多くの細胞を用いてデータを蓄積しないと危険である。また、できればヒト由来の細胞を用いることが望まれる。

今回著者らは、ヒト骨肉腫細胞株 HOS が、腫瘍細胞でありながらも *in vitro* 培養系で骨原性細胞の分化マーカーを発現し、石灰化物を形成すること、さらに、その過程で起こる初期石灰化像より、初期石灰化機構に関する興味深い所見を見出したのでその詳細について報告する。

II. 実験材料と方法

1. 使用した細胞および培養方法

ヒト骨肉腫由来樹立細胞株 HOS¹⁰⁾ および、HOS に *Kirsten murine sarcoma virus* を感染させ、形質転換した細胞よりクローニングしたウイルス非産生細胞株である KHOS¹¹⁾ (Dr J. S. Rhim より供与) を使用した。

細胞は、10% ウシ胎児血清 (Hyclone 社)、2 mM L-グルタミン (Flow 社)、7.5% 重炭酸ナトリウム水溶液 10ml、および $1\mu\text{g/ml}$ のゲンタマイシン (Sigma 社) を添加したダルベッコ変法 MEM (D-MEM, 日水製薬) 培地 (pH 約 7.0) で増殖させた。増殖中の細胞を通常に従って 0.25% トリプシン-0.02% EDTA 添加 Hanks' 液ではがした後、 2.5×10^4 個の細胞を上記の 10% ウシ胎児血清添加 D-MEM に 50mg/l の L-アスコ

ルビン酸ナトリウム (半井化学薬品) を加えた培養液 1.5ml に浮遊させ、 4.5cm^2 12穴 ウェル (Flow 社) に播き、5% CO_2 インキュベーター (Forma 社) 中で培養した。一部の試料については、さらに 5mM の β -グリセロリン酸二ナトリウム (β -グリセロリン酸, 半井化学薬品) を添加した培養液⁵⁾ 中で同様に培養した。培養液は週 2 回ずつ交換した。培養細胞は、細胞が confluent になった直後の培養 2 日、およびその後は培養 1 週から 10 週まで 1 週毎に位相差顕微鏡および電子顕微鏡観察用試料として供した。

2. 位相差顕微鏡観察用試料の染色

1) アルカリホスファターゼ (ALPase) 活性染色

細胞を生理食塩水で洗浄した後、Burstone の方法¹²⁾ に基づき、 β -ナフチルリン酸ナトリウム (半井化学薬品) を基質、ファストブルー RR 塩をカプラーに用いて行った。

2) カルシウム染色

20% ホルマリン-80% エタノール溶液をウェルに注いで細胞を 10 分間固定した後、蒸留水で十分に洗浄し、Dahl の方法¹³⁾ に基づいてアリザリンレッド S (半井化学薬品) を用いて行った。

3. 電子顕微鏡観察用試料の作製および電顕組織化学染色

ALPase 活性染色を施す試料については、細胞に 2.5% グルタルアルデヒド (BDH 社) 添加 0.05M カコジル酸緩衝液 (pH 7.2) を注ぎ、氷上で 20 分間固定した後、8% ショ糖添加 0.05M カコジル酸緩衝液を加え、ドライアイス・エタノールで凍結させた後、室温で融解させた。染色は Mayahara の方法¹⁴⁾ に基づいて行った。対照には、染色液から ALPase の基質となる β -グリセロリン酸を除いた液で同様の処理を施した試料を用いた。染色後試料は 1% 四酸化オスミウム添加 0.2M カコジル酸緩衝液で洗浄し、その後新しい液にかえて氷上で 1 時間、後固定を行った。固定終了後エタノールにて脱水し、Epon 812 (TAAB 社) を用いて包埋した。

ALPase 活性染色を施さない試料については、

2.5% グルタルアルデヒド添加 0.05M リン酸緩衝液 (pH 7.4) にて 1 時間氷上で固定し、以下リン酸緩衝液を用いて同様に洗浄、後固定を施した後、同様に脱水、包埋を行った。

包埋された試料から、MUM-2 型ウルトラミクロトーム (日立) にダイヤモンドナイフまたはガラスナイフを取りつけて、培養平面に対して 10 度の角度で超薄切片を作製した。作製した超薄切片は、酢酸ウラニル、酒石酸鉛 (水平・黒滝鉛) の二重染色を施し、JEM-100S 透過型電子顕微鏡 (日本電子) で観察した。

4. 光学顕微鏡観察用厚切り切片

電子顕微鏡観察用に包埋された試料の一部は、ガラスナイフを取りつけたウルトラミクロトームで、培養平面に対して 20 度の角度で約 $0.3\mu\text{m}$ 厚の切片に切り出した。0.5% トルイジンプルー染色を施した後、光学顕微鏡を用いて観察した。

5. 電子顕微鏡による分析

1) 電子線プローブ微小部 X 線分析

電子線プローブ微小部 X 線分析用として、グルタルアルデヒド単固定標本を作製し、これより光学顕微鏡観察用厚切り切片と同様に約 $0.3\mu\text{m}$ 厚の切片を切り出した。試料は、EDAX-9100 システム (Philips) を取りつけた JEM-100C 透過・走査型電子顕微鏡を用いて、40KV, 200秒間、290pA ビーム電流の条件で分析した。

2) Debye-Scherrer 環分析

生成された石灰化物の結晶構造を調べる目的で、結晶の Debye-Scherrer 環分析を行った。 β -グリセロリン酸を添加した培養液中で 5 週間から 10 週間培養した HOS 細胞を 2% 次亜塩素酸ナトリウム水溶液中で溶解させ、蒸留水で十分に洗浄した後、沈でん物として残った石灰化物をエタノール中に懸濁した。コロジオン膜マイクログリッドを貼付したグリッド上に懸濁液を一滴滴下し、乾燥させ、分析用試料とした。また対照として、人工ハイドロキシアパタイト結晶粉末をエタノール中に懸濁したものから同様に作製した試料を用いた。分析は、HU-11DS 透過型電子顕微鏡 (日立) を用いて行った。

Ⅲ. 結 果

1. ALPase 活性の発現

HOS 細胞および KHOS 細胞を培養ウェルに播いた後、最長 10 週まで培養した。HOS 細胞では、細胞を播いた 2 日後にほぼ confluent の状態になったが、この時点では ALPase 活性染色を施しても全く染色されなかった。一方、5 週間培養したものでは ALPase 活性が強く染め出された (図 1)。ALPase 活性は、細胞が confluent になった後に出現しはじめ、その後経時的に上昇し、約 5 週で平衡状態にいたることがわかった。またこの結果は、培養液中に β -グリセロリン酸を添加した群でも全く変わりがなかった (図 1)。対照として用いた KHOS 細胞では、5 週間培養したものでも ALPase 活性は全く認められなかった (図 1)。

2. カルシウム沈着物の形成

培養した HOS 細胞および KHOS 細胞について、ALPase 活性染色と並行して Dahl のカルシウム染色を行った。培養液に β -グリセロリン酸を添加した HOS 細胞では、培養開始後約 3 週間でアリザリンレッド S に赤染するカルシウム沈着物が出現し、5 週までに顕著な形成が認められた

図 1 HOS および KHOS 細胞の ALPase 活性およびカルシウム染色所見。ALPase 活性は、培養液中への β -グリセロリン酸添加 (β 印) にかかわらず培養 5 週の HOS 細胞に認められるが、培養 2 日ではまだ活性がみられない。一方、カルシウムは、5 週間培養した β HOS にのみ認められる

図2 β -グリセロリン酸添加培養液中で5週間培養した HOS および KHOS 細胞の、カルシウム染色、位相差顕微鏡所見。HOS 細胞(a)には赤染した、カルシウムを含んだ結節が多数認められるが、KHOS 細胞(b)には全く認められない ($\times 120$)

(図2 a)。 β -グリセロリン酸非添加群および KHOS 細胞では、肉眼および位相差顕微鏡で観察したところカルシウム沈着物は認められなかった(図2 b)。

3. 光学顕微鏡組織所見

電子顕微鏡観察用に包埋された試料の一部から光学顕微鏡観察用の厚切り切片を作製し、0.5% トリジンブルーで染色後、光学顕微鏡を用いて観察した。HOS 細胞では、図3 a, 3 bに示すように上皮様に配列した上層と膠原線維に富んだ下層をもつ、特徴ある二層構造を形成したが、KHOS 細胞では、上皮様に配列した細胞層も膠原線維の形成も認められなかった(図3 c)。

HOS 細胞では下層が特に肥厚した結果結節状になった部分が認められ(図3 a, 3 b)。石灰化物と思われる沈着物がその部分に最もよく認められた(図3 a)。

4. 電子顕微鏡組織所見

1) HOS の上層細胞

上皮様に配列した上層の細胞は互いに隣りの細胞と密接しており、密接している膜面に ALPase 活性が認められた(図4)。また細胞質中に、限界膜をもたない空胞の出現を認めた(図4)が、内容物は明らかにすることができなかった。ALPase 活性は、 β -グリセロリン酸を培養液に添加した群についても添加しなかった群について

図3 電子顕微鏡観察用包埋試料の厚切り切片の光学顕微鏡所見 (ギムザ染色。a: β -グリセロリン酸添加培養液中で5週間培養した HOS 細胞。b: β -グリセロリン酸非添加培養液中で5週間培養した HOS 細胞。c: β -グリセロリン酸添加培養液中で5週間培養した KHOS 細胞。HOS 細胞(a, b)では二層構造が認められるが、KHOS 細胞(c)では認められない。また、 β -グリセロリン酸添加 HOS 細胞(a)では、下層にカルシウムと思われる物質(→印)の形成が認められる ($\times 2200$)

も、全く同様に認められた。

図4 β -グリセリン酸添加培養液中で4週間培養したHOS細胞の電顕組織化学所見。上皮様に配列した上層細胞の互いに接した細胞膜には、ALPase 活性 (ALP) が認められる。下層には、膠原線維 (Co) に囲まれて、島状に細胞集団が存在する。上層細胞の細胞質内には限界膜をもたない空胞 (◀印) の出現がみられる ($\times 2200$)

2) HOS の下層の細胞

下層には、HOS 細胞によって形成された膠原線維が多量に存在し、その間に島状に細胞が散在していた (図4)。これらの細胞のうちには変性または壊死した細胞がしばしば認められ、 β -グリセリン酸添加群においてそれらの細胞を検索したところ、細胞内または細胞周囲に石灰化物および初期石灰化像が見い出された。こうした初期石灰化の石灰化開始部位として、著者らは2種類に分類できる小胞様構造物を認めた。1つは基質小胞様構造物で、直径が $0.3\mu\text{m}$ から $1\mu\text{m}$ ほどの、限界膜に囲まれた小胞様構造物であり、形態学的には今までに報告されている典型的な基質小

胞ときわめて類似したものであった (図5 a, 5 b)。もう1つは直径 $1\mu\text{m}$ から $3\mu\text{m}$ くらいの、前述の基質小胞様構造物より大型の、やはり周囲に限界膜をもった小胞様構造物で、その内部はハイドロキシアパタイトと思われる繊細な結晶によってきわめて均一に満たされているという特徴があった (図6 a, 6 b)。これら基質小胞様構造物および大型小胞様構造物は、図6 aのように同一細胞内に共存することがあった。

5週間以上培養した試料を観察した範囲では、図5, 6に示されるような初期石灰化像から、結晶が成長して膠原線維に沿って伸びている像 (図7) まで、種々の段階の石灰化像が認められた。

図5 基質小胞様構造物の電子顕微鏡所見。a: β -グリセロリン酸添加培養液中で5週間培養したHOS細胞。基質小胞様構造物(◄印)の中およびその周囲に、結晶構造物(←印)の出現を認める。b: 同, 10週間培養試料。結晶構造物の成長により融合した小胞様構造物(←印)を認める。周囲には基質小胞様構造物(◄印)がみられる($\times 10000$)

図6 β -グリセリン酸添加培養液中で4週間培養したHOS細胞で認められた大型の小胞様構造物(◀印)の電子顕微鏡所見。a:変性した細胞の細胞質内には、高電子密度の繊細な結晶構造物に満たされた大型の小胞様構造物(◀印)とともに、基質小胞様構造物(←印)を認める。(×7000) b:拡大すると、結晶構造物に満たされた小胞様構造物には、膜構造(←印)が明らかに認められる(×17000)

図7 β -グリセロリン酸添加培養液中で6週間培養したHOS細胞でみられた、膠原線維 (Co) に沿って伸びている結晶構造物 (◄印) の電子顕微鏡所見 ($\times 23000$)

図8 β -グリセロリン酸添加培養液中で6週間培養したKHOS細胞のALPase活性染色の電顕組織化学所見。HOS細胞でみられたALPase活性、二層構造、および膠原線維の形成は全くみられない。オスミウムに濃染された脂肪滴 (◄印) の出現が認められる ($\times 3800$)

3) KHOS 細胞

ALPase 活性は、電顕組織化学的にも KHOS 細胞では認められなかった。HOS 細胞でみられ

た二層構造は全く形成されず、細胞同士は密接することなく、また、間質には膠原線維の形成が全く認められなかった (図8)。

5. 電子顕微鏡による結晶分析

HOS 細胞によって形成された結晶構造物がハイドロキシアパタイトからなることを確かめる目的で、電子線プローブ微小部X線分析および、Debye-Scherrer 環分析を行った。5 週間培養し

た HOS 細胞によって形成された石灰化物の微小部X線分析では、対照として用いた人工ハイドロキシアパタイト結晶と同様に、カルシウムとリンに著明なピークが検出された（図 9 a, 9 b）。Ca/P 比は平均 1.34 ± 0.05 で、対照の人工ハイド

図9 電子線プローブ微小部X線分析結果。a: β -グリセリン酸を添加した培養液中で5週間培養したHOS細胞で形成された石灰化物。b: 人工ハイドロキシアパタイト結晶粉末

図10 Debye-Scherrer 環分析結果。a: β -グリセリン酸を添加した培養液中で10週間培養したHOS細胞で形成された石灰化物。b: 人工ハイドロキシアパタイト結晶粉末

ロキシアパタイト結晶の平均 1.67 ± 0.11 の値との間に差があった。

Debye-Scherrer 環分析は、5週間から10週間培養した HOS 細胞によって形成された石灰化物を用いて行ったが、対照として用いた人工ハイドロキシアパタイト結晶と環の基本的パターンが一致した (図10a, 10b)。

IV. 考 察

今回著者らは、ヒト骨肉腫細胞株 HOS が *in vitro* 培養系で ALPase 活性の発現能を有すること、さらに ALPase の基質となる β -グリセロリン酸存在下でハイドロキシアパタイトからなる石灰化物を形成することを見出した。また、その初期石灰化部位に、基質小胞と同一と思われる小胞様構造物が認められたことから、HOS 細胞が *in vitro* 培養系で骨原性細胞の分化マーカーを発現し、石灰化物を形成したことが示唆された。さらに、HOS 細胞では、上皮様に配列した上層と膠原線維に富む下層という特徴ある二層構造を形成することを見出した。

ALPase 活性は、細胞を播いた時点では認められず、細胞が confluent の状態になった後にはじめて認められたが、この機序については明らかでない。しかし、同様の現象は MC3T3-E1 細胞において報告されている⁹⁾。電顕組織化学的には、二層の細胞層のうちの上層を形成する上皮様に配列した細胞の、細胞同士が接した膜に主として ALPase 活性が認められた。

一方、初期石灰化像は、変性細胞が多くみられ、膠原線維の豊富な下層に主に認められた。石灰化物を形成した群の培養液には β -グリセロリン酸が添加されているが、これは骨原性細胞に *in vitro* 培養系で石灰化物を形成させる場合に常用される手段^{5,15)}である。石灰化物の形成には、石灰化物を構成するハイドロキシアパタイト結晶の主成分であるカルシウムとリンが必要であるが、一般に培地中にはリンが少量しか含まれていない。そこで、ALPase の基質となる β -グリセロリン酸を培養液に加えることにより、ALPase

活性をもった骨原性細胞が、石灰化物を形成するために十分な量のリンを供給することができると考えられている。HOS 細胞は、培養を続けることにより、膠原線維に富んだ下層が肥厚して重層構造をとるため、直接培養液に接するのは上層を形成する上皮様細胞であると考えられることから、HOS 細胞の *in vitro* 培養系での石灰化物形成には、培養液中の β -グリセロリン酸を基質としてリンを供給する、ALPase 活性をもった上皮様細胞と、石灰化開始部位となる小胞様構造物を供給する、変性細胞を多く含んだ下層が重要な役割をはたしていると推論することができる。

形成された石灰化物は、Debye-Scherrer 環のパターンから判断して、ハイドロキシアパタイト結晶からなることがわかったが、Ca/P の比が平均 1.34 ± 0.05 で、対照として用いた人工ハイドロキシアパタイト結晶の平均 1.67 ± 0.11 の値よりかなり低かった。一般に、骨を同様に分析すると、Debye-Scherrer 環の基本的パターンがハイドロキシアパタイト結晶のものと一致するにもかかわらず、Ca-10/P-6であるハイドロキシアパタイト結晶の理論上の値 1.67 よりもかなり低い値が出るということが知られている¹⁶⁾。そのため、骨を形成するアパタイトがハイドロキシアパタイトではなく、Ca-9/P-6 の α -tricalcium phosphate や、Ca-8/P-6 の octacalcium phosphate であるという仮説も出されており、不明な点が少なくない¹⁶⁾。今回 HOS 細胞で形成された石灰化物の分析値 1.34 ± 0.05 という値は、計算上 Ca-8/P-6 に近いが、Debye-Scherrer 環の基本的なパターンはハイドロキシアパタイト結晶のものと一致した。このように、生体で形成された骨と同様の分析結果が得られたことは興味深い。

対照として用いた KHOS 細胞は、レトロウイルス *Kirsten murine sarcoma virus* の感染によって形質転換した HOS 細胞の subclone¹¹⁾で、今回著者らの検索により石灰化物形成能、ALPase 活性および膠原線維形成能をもたないことがわかった。このことから、ALPase 活性および膠原線維が HOS 細胞の石灰化物形成に重要な役割をは

たしていることが示唆されるとともに、HOS 細胞の β -グリセロリン 酸添加群にのみみられた石灰化物が、何らかの化学反応で非特異的に沈着した人工産物ではなく、骨原性細胞の分化によって引き起こされた現象によってもたらされたものであることが強く示唆された。

さらに今回著者は、HOS 細胞の石灰化開始部位として超微形態学的に 2 種の小胞様構造物、すなわち基質小胞様構造物およびそれより大型の小胞様構造物を、変性または壊死した細胞内ならびに細胞周囲に認めた。

一般に基質小胞は、初期石灰化における石灰化開始部位として広く知られている^{17,18)}が、その形成機序に関してはまだはっきり解明されていない。従来の報告では、基質小胞は細胞質内の一部が、発芽するように細胞膜をかぶって細胞外に排出されるために形成されると考える発芽説 (budding theory) を支持するもの^{19~24)}と、細胞が変性または壊死した結果、小胞様構造物が形成されたと考える説を支持するもの^{25~30)}が多い。今回著者らが見出した基質小胞様構造物は、変性または壊死した細胞の中またはその周囲の細胞残渣の中で認められたことから、後者の機序によって形成されたものと考えられる。また、本研究では石灰化開始部位として基質小胞様構造物以外に、大型の小胞様構造物を認めたが、これと類似した所見は、ミトコンドリア^{27,31)}およびライソゾーム³²⁾においても認められている。

今まで一般的に、細胞の変性、壊死は、変性石灰化などの病的石灰化で重要な役割をはたしている³³⁾といわれてきており、今回著者らが観察した HOS 細胞の石灰化も、特殊な腫瘍細胞の病的石灰化ではないかと指摘される可能性があると思われる。しかし、生理的石灰化においても細胞の変性像がよく認められること^{19,27,29)}および、骨肉腫における骨形成時の石灰化が、基本的には生理的石灰化と何ら異なることのない機構によって起こると考えられている^{34~40)}ことなどから、HOS 細胞の石灰化が、腫瘍細胞だけにみられる特殊な石灰化であるとは考えにくい。今回 HOS 細胞にお

ける初期石灰化で、細胞の変性、壊死像が特に目立った理由として、長期間の培養が細胞の変性、壊死を起こしやすい環境をつくったという可能性、および *in vitro* 培養系では生体内とくらべると膠原線維の形成が少ないため、生体内のように器質化が起こらず、細胞の変性、壊死がそのまま残ってしまう可能性などが考えられた。

以上、ヒト骨肉腫細胞株 HOS が、*in vitro* 培養系において骨原性細胞の分化マーカーを発現して石灰化物を形成すること、および小胞様構造物の出現を伴う初期石灰化像を示すこと、そしてその石灰化物がハイドロキシアパタイト結晶からなることを示したが、特徴的なことは、今回の研究で HOS 細胞によってもたらされたこのような石灰化現象が、生体とは全く異なる *in vitro* 培養系で起こったということである。この石灰化機構が生体内で起こる石灰化とすべて全く同じ機構であるとはいえないが、これまでの結果から、HOS 細胞の初期石灰化は、生体における初期石灰化の一面をきわめて単純に、モデル的に表現していると考えることができる。したがって、HOS 細胞は、初期石灰化の状態を容易に、かつ安定して得られるという条件を満たした細胞であると考えられた。

また、HOS 細胞は、ヒト由来の細胞であることから、BMP (bone morphogenic protein) などの骨誘導因子、および種々の骨細胞増殖因子の精製、分析などの目的に使用できれば、きわめて利用価値が高いと思われる。

さらに、対照として用いた KHOS 細胞は、HOS 細胞に K-ras がん遺伝子をもったレトロウイルスである *Kirsten murine sarcoma virus*⁴¹⁾ を感染させ、形質転換した細胞であることから、今回用いた実験系は、がん細胞の分化を研究するうえでも、がん遺伝子の機能を検索するうえでも、きわめて有用であると思われる。

謝 辞

稿を終えるにあたり、ご指導、ご校閲を賜りました山本 肇教授、終始懇切丁寧なご教授とご校閲を賜り

ました口腔細菌学教室, 土田信夫教授ならびに北里大学衛生学部, 生命科学 研究センター 超微形態学 研究室, 二重作 豊教授に, 深甚なる感謝の意を表するとともに, 種々ご助言, ご援助をいただきました岡山大学歯学部口腔病理学教室, 永井教之教授に深く感謝いたします。

また, 人工ハイドロキシアパタイト粉末を快く供与していただきました, 東京医科歯科大学医用器材研究所無機材料部門, 青木秀希助教授, ならびに種々ご援助をいただきました口腔細菌学教室大学院生, 片山奈知子先生に厚くお礼申し上げます。

なお, 本論文の一部は, 1986年10月第45回日本癌学会総会, 1987年5月日本電子顕微鏡学会第43回学術講演会, 1987年8月第29回歯科基礎医学会総会において発表した。

文 献

- 1) Binderman, I., Duskin, D., Harell, A., Katzir, E. and Sachs, L. : Formation of bone tissue in culture from isolated bone cells. *J. Cell Biol.* 61 : 427-439, 1974.
- 2) Osbody, P. and Caplan, A. I. : A scanning electron microscopic investigation of in vitro osteogenesis. *Calcif. Tissue Int.* 30 : 43-50, 1980.
- 3) Williams, D. C., Border, G. B., Toomy, R. E., Paul, D. C. and Hillman, C. C. Jr. : Mineralization and metabolic response in serially passaged adult rat bone cells. *Calcif. Tissue Int.* 30 : 233-246, 1980.
- 4) Nijwede, P. J., Van Iperan-van Gent, A. S., Kawilaffrang-de Haas, E. W. M., Van der Plas, A. and Wassenaar, A. M. : Bone formation and calcification by isolated osteoblastlike cells. *J. Cell Biol.* 93 : 318-323, 1982.
- 5) Tenenbaum, H. C. and Heershe, N. M. : Differentiation of osteoblasts and formation of mineralized bone in vitro. *Calcif. Tissue Int.* 34 : 76-79, 1982.
- 6) Charrier, B. E., Glorieux, F. H. and Van der Rest, M. : Osteoblasts isolated from mouse calvaria tissue matrix mineralization in culture. *J. Cell Biol.* 96 : 639-643, 1983.
- 7) Auf'mkolk, B. P., Hauschka, P. V. and Schwarz, E. R. : Characterization of human bone cells in culture. *Calcif. Tissue Int.* 37 : 228-235, 1985.
- 8) Robey, P. G. and Termine, J. D. : Human bone cells in vitro. *Calcif. Tissue Int.* 37 : 453-460, 1985.
- 9) Sudo, H., Kodama, H., Amagi, Y., Yamamoto, S. and Kasai, S. : In vitro differentiation and calcification in a new clonal cell line derived from newborn mouse calvaria. *J. Cell Biol.* 96 : 191-198, 1983.
- 10) McAllister, R. M., Gardner, M. B., Greene, A. E., Bradt, C. B., Nicols, W. W. and Landing, B. H. : Cultivation in vitro of cells derived from a human osteosarcoma. *Cancer* 27 : 387-402, 1971.
- 11) Rhim, J. S., Cho, H. Y. and Huebner, R. J. : Non-producer human cells induced by murine sarcoma virus. *Int. J. Cancer* 15 : 23-29, 1975.
- 12) Burstone, M. S. : Histochemical comparison of naphthol AS-phosphates for the demonstration of phosphatases. *J. Natl. Cancer Inst.* 20 : 601-605, 1958.
- 13) Dahl, L. K. : A simple and sensitive histochemical method for calcium. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 80 : 474-479, 1952.
- 14) Mayahara, H., Hirano, H., Saito, T. and Ogawa, K. : The new lead citrate method for the ultracytochemical demonstration of phosphatase (orthophosphoric monoester phosphohydrolase). *Histochemie* 11 : 88-96, 1967.
- 15) Kodama, H., Amagi, Y., Sudo, H., Ohno, T. and Iijima, K. : Culture conditions affecting differentiation and calcification in the MC3T3-E1 cell line. in *Cell Mediated Calcification and Matrix Vesicles*. Amsterdam, 1986, Excerpta Medica, 349-352.
- 16) 須田立雄, 小沢英浩, 高橋英明 : 骨の科学. 東京, 1985, 医歯薬出版, 120-128.
- 17) Anderson, H. C. : Matrix vesicle calcification : Review and update. in *Bone and Mineral Research*, vol. 3, Amsterdam, 1985, Elsevier, 109-149.
- 18) 小沢英浩 : 石灰化機構の微細構造学的所見. 歯基礎誌 27 : 751-774, 1985.
- 19) Bouncci, E. : Fine structure and histochemistry of "Calcifying globules" in epiphyseal cartilage. *Z. Zellforsch. Mikrosk. Anat.* 103 : 192-217, 1970.
- 20) Matsuzawa, T. and Anderson, H. C. : Phosphatases of epiphyseal cartilage studied by electron microscopic cytochemical methods. *J. Histochem. Cytochem.* 19 : 801-808, 1971.
- 21) Glauert, A. M. and Mayo, C. R. : The study of the three-dimensional structure relationships in connective tissue by high voltage electron microscopy. *J. Microscopy* 97 : 83-94, 1972.
- 22) Slavkin, H. C., Trump, G. N., Mensour, V., Matosian, P. and Mino, E. G. : Localization of

- H-2 histocompatibility alloantigens on mouse embryonic tooth epithelial and mesenchymal cell surface. *J. Cell Biol.* 60 : 795-801, 1974.
- 23) Wusier, R. E. : Lipids of matrix vesicles. *Fed. Proc.* 35 : 117-121, 1976.
 - 24) Cecil, R. N. and Anderson, H. C. : Freezefracture studies of matrix vesicle calcification in epiphyseal growth plate. *Metab. Bone Dis. Rel. Res.* 1 : 89-95, 1978.
 - 25) Bonucci, E. and Dearden, L. C. : Matrix vesicles in aging cartilage. *Fed. Proc.* 35 : 163-168, 1976.
 - 26) Kim, K. M. : Calcification of matrix vesicles in human aortic valve and aortic media. *Fed. Proc.* 35 : 156-162, 1976.
 - 27) Yamada, M. : Ultrastructural and cytochemical studies on the calcification of the tendon-bone joint. *Arch. Histol. Jap.* 39 : a347-378, 1976.
 - 28) Bonucci, E. : Matrix vesicle formation in cartilage of scorbutic guinea pigs : Electron microscope study of serial sections. *Metab. Bone Dis. Rel. Res.* 1 : 205-212, 1978dd.
 - 29) Reinholt, F. P., Engfeldt, B., Hjerpe, A. and Jansson, K. : Stereological studies on the epiphyseal growth plate with special reference to the distribution of matrix vesicles. *J. Ultrastruct. Res.* 80 : 270-279, 1982.
 - 30) Kim, K. M. : Role of membranes in calcification. *Surv. Synth. Path. Res.* 2 : 215-228, 1983.
 - 31) Landis, W. J., Paine, M. C. and Glimcher, M. J. : Electron microscopic observations of bone tissue prepared anhydrously in organic solvents. *J. Ultrastruct. Res.* 59 : 1-30, 1977.
 - 32) Thyberg, J. and Freiberg, U. : Electron microscopic enzyme histochemical studies on the cellular genesis of matrix vesicles. *J. Ultrastruct. Res.* 41 : 43-59, 1972.
 - 33) Anderson, H. C. : Calcific diseases : The role of membranes in pathological calcification. in *Cell Mediated Calcification and Matrix Vesicles*. Amsterdam, Excerpta Medica, 355-358.
 - 34) Lee, W. R., Laurie, J. and Tounset, A. L. : Fine structure of a radiation-induced osteosarcoma. *Cancer* 36 : 1414-1425, 1975.
 - 35) Williams, A. H., Shwann, C. P. and Parker, J. W. : The ultrastructure of osteosarcoma. *Cancer* 37 : 1293-1301, 1976.
 - 36) Muhrad, A., Stein, H., Bab, A. and Sela, J. : Fine structure and enzymes of matrix vesicles in osteosarcoma. Possible occurrence of contractile proteins. *Metab. Bone Dis. Rel. Res.* 1 : 227-233, 1978.
 - 37) Sela, J. and Bab, I. A. : The relationship between extracellular matrix vesicles and calcospherites in primary mineralization of neoplastic bone tissue. *Virchows Arch. Path. Anat. Histol.* 382 : 1-9, 1979.
 - 38) Sela, J., Bab, I. A., Muhrad, A. and Stein, H. : Extracellular matrix vesicles in osteogenic neoplasms, An ultrastructural and enzymatic study. *Cancer* 48 : 1602-1610, 1981.
 - 39) Kissane, J. M. (ed) : *Anderson's Pathology*. St. Louis, 1985, Mosby, 1778-1816.
 - 40) Henderson, D. W., Papadimitriou, J. M. and Coleman, M. : *Ultrastructural Appearances of Tumours*. Edinburgh, 1986, Churchill Livingstone, 262-272.
 - 41) Tsuchida, N., Ryder, T. and Ohtsubo, E. : Nucleotide sequence of the oncogene encoding the p21 transforming protein of Kirsten murine sarcoma virus. *Science* 217 : 937-939, 1982.