

ヒト培養歯髓細胞の石灰化能に関する研究

柴 秀 樹

A Study on Calcification Ability of Human Cultured Pulpal Cells

Hideki Shiba

(平成5年1月7日受付)

緒 言

歯髓は、象牙芽細胞、線維芽細胞、未分化間葉細胞などの細胞群とコラーゲン (I型, III型), プロテオグリカンなどの細胞間基質から構成されており, 他の疎性結合組織の構成に類似しているが, その周囲には象牙質という硬組織が存在し, さらに石灰化組織形成能があるという特徴を有している¹⁾. *in vivo* においては歯髓細胞 (線維芽細胞や未分化間葉細胞) は, 象牙芽細胞あるいは象牙芽細胞様細胞に分化し, 齲蝕や窩洞形成などに際して修復象牙質を形成することが知られている^{2,3)}. また, 移植歯髓組織の石灰化⁴⁻⁶⁾ の実験からも歯髓細胞が石灰化組織形成能を有していることが示唆されている。

さて, 臓器非特異型 (肝・骨・腎型) のアルカリホスファターゼ (ALPase) は, 石灰化能を有する骨芽細胞や軟骨細胞の分化および石灰化物形成過程の一指標として用いられている^{7,8)}. ヒト歯髓組織の ALPase も臓器非特異型であることが確認されており⁹⁾, また歯髓細胞の ALPase は, 歯肉細胞に比べて活性レベル¹⁰⁾ および遺伝子発現レベル¹¹⁾ がともに高く, さらに, 歯髓組織の ALPase の分布は, 象牙芽細胞, 象牙芽細胞下層, および歯髓細胞層に存在しており, その活性は, 象牙芽細胞下層が, 象牙芽細胞層より高いと報告されている^{12,13)}. したがって, ALPase と歯髓細胞による石灰化組織形成との関連を明らかにすることは, 歯髓細胞の石灰化能を解析する上で極めて重要で

ある。また, 骨芽細胞や軟骨細胞の分化および石灰化組織形成には各種の成長因子が関与していることが知られており^{8,14-16)}, 歯髓細胞の分化と石灰化物形成にも成長因子が何らかの役割を果たしている可能性がある。

一方, 骨芽細胞や軟骨細胞の石灰化能の解析に培養骨芽細胞や培養軟骨細胞が多く利用されていることから, 培養歯髓細胞の利用もまた歯髓細胞の石灰化能を解析していくうえで有用であると考えられる。しかしながら, 培養歯髓細胞の石灰化能に関する研究はほとんど報告されていない。

本研究では, ヒト培養歯髓細胞を用いて, 石灰化物の形成および ALPase との関連, さらに, ALPase の発現に及ぼす成長因子の影響について形態学および生化学的な分析を行った。

材料ならびに方法

I. 歯髓細胞採取

細胞採取は酵素消化法を用いて行った。すなわち, 便宜抜去等で得られたヒト智歯より無菌的に取り出した健全歯髓を細片とし, 2 mg/ml のコラゲナーゼ (細胞分散用, 和光純薬) を含む分離培地 (25 mM HEPES, 10 mM 炭酸水素ナトリウム, 100 mM 塩化ナトリウム, 3 mM リン酸水素二カリウム, 12 mM マンニトール, 24 mM 塩化カリウム, 1 mM 塩化カルシウム, 0.5% グルコース, 0.2% 牛血清アルブミン, 100 units/ml ペニシリン, 100 µg/ml ストレプトマイシン; pH 7.4) に浸漬し, 37°C, 60分, 振盪して細胞分散を行った。その後, コラゲナーゼ処理により得られた細胞浮遊液から, 組織片や細胞塊を除くため 40 µm のナイロン網 (田中三次郎商店) を通過させ, 遠心 (800 rpm, 室温 5分) により, 細胞を集めた。得られた細胞は, medium A, すなわち10%牛胎児血清

広島大学歯学部歯科保存学第二講座 (主任: 岡本莫教授) 本論文の要旨は平成2年9月の第93回日本歯科保存学会秋季大会, 平成3年4月の第69回国際歯科研究学会, 平成3年11月の第95回日本歯科保存学会秋季大会, 平成4年6月の第25回広島大学歯学会総会において発表した。

(GIBCO), 100 units/ml ペニシリン, 100 $\mu\text{g/ml}$ ストレプトマイシン, 2.5 $\mu\text{g/ml}$ ファンギゾン を添加したダルベッコ変法イーグル培地 (ニッスイ) を用いて培養し (5%CO₂, 95%空気, 37°C), 2~8代継代した細胞を以下の実験に供した。

II. 石灰化物の形成について

1. 培養

上記歯髓細胞 (1.35 $\times 10^5$ /シャーレ) を 35 mm シャーレ (コーニング, 岩城硝子) を用い, 50 $\mu\text{g/ml}$ アスコルビン酸 (以下 Aa と略す) を添加した medium A で培養した。培養12日後に一部の試料に 10 mM β グリセロリン酸ナトリウム (以下 Gly と略す) を添加し, さらに21~28日間培養した。対照としてヒト歯肉細胞を用い同様に検索した。なお培地は2~3日おきに交換した。

2. カルシウムの検出

Dahl の方法¹⁷⁾ に従い, アリザリンレッド染色で, カルシウムの検出を行った。すなわち, 培養歯髓細胞をリン酸緩衝食塩水 (phosphate buffered saline; PBS, ニッスイ) で3回洗浄し, 100%エタノールで20分固定した。蒸留水で洗浄後, アリザリン溶液にて染色を行い, 2分後, 蒸留水で水洗し, 濃塩酸 0.1 ml を含んだ95%アルコール溶液で処理し顕鏡した。

3. 電子線マイクロアナライザーによる定性分析

培養歯髓細胞を2%グルタルアルデヒド (pH 7.4, 4°C) で1時間固定後, 脱水, 臨界点乾燥を行った。続いて金をスパッタコーティングし, さらに導電性塗料で試料台との導通をとり, 電子線マイクロアナライザー (EPMA-8705QH 島津製作所製) にて nodule 様構造物の定性分析を行った。対照としてヒト象牙質も同様に検索した。

4. 透過型電子顕微鏡観察

培養歯髓細胞を2%グルタルアルデヒド (pH 7.4, 4°C) で1時間固定後, カコジル酸ナトリウム緩衝1%オスミウム酸 (pH 7.4, 4°C) にて2時間, 後固定を行い, さらにアルコール上昇系列にて脱水した。続いてエポキシ樹脂に包埋し, 超薄切片を作成後, 酢酸ウラニルにより電子染色を行い, JEM-100S (加速電圧 80 kV, 日本電子社製) 透過型電子顕微鏡で観察した。

III. 石灰化物形成と ALPase との関連

1. 培養

実験IIの歯髓細胞の Aa と Gly に加えて, さらにプレートにコラーゲンをコーティングして, 以下の条件で培養を行った。I型コラーゲンのコーティング24穴

プレート (コーティング(+), 住友ベークライト) または, 非コーティング24穴プレート (コーティング(-), 住友ベークライト) を用い, 50 $\mu\text{g/ml}$ Aa 添加, または非添加の medium A で歯髓細胞 (3 $\times 10^4$ /培養系) を培養した。そして培養開始12日後に, 一部の試料に 10 mM Gly を添加し, その後28日間培養を続行した。またヒト歯肉細胞も同様に培養した。なお培地は2~3日おきに交換した。さらに, 一部については, 0.5 mM N⁶,2'-0-ジブチリルアデノシン-3',5'-サイクリックリン酸 (DBcAMP, SIGMA) を19日目から毎日添加し, その後6日間培養を続けた。

2. 石灰化物形成量の測定

石灰化物形成量の測定には, オルトクレゾールフタレイコンプレクソン (OCPC) 法¹⁸⁾ をもとにしたカルシウム測定キット (和光純薬) を用いた。まず, 培養歯髓細胞を PBS にて, 3回洗浄した後, 0.24 N 塩酸を加え, ラバーポリースマンでプレートより剝離回収し, 6日間脱灰を行った。その後遠心 (3,000 rpm, 20分) し, 上清 50 μl に 5 ml の緩衝液 (0.88 M モノエタノールアミン緩衝液, pH 11.0) を加え十分に攪拌した。そして 0.5 ml の発色試液 (0.63 mM OCPC, 69 mM 8-キノリノール) を添加し, 波長 570 nm における吸光度よりカルシウム量を求めた。

3. ALPase 活性試料の調製

培養歯髓細胞を PBS で3回洗浄後, 1.6 ml の 2.5 mM 塩化マグネシウム, 10 mM トリス塩酸を含む緩衝液 (pH 7.4) を加え, ラバーポリースマンでプレートより剝離回収した。続いて氷冷下で超音波処理 (50 W, 80秒) を行い, 酵素試料液を調製した。なお, 本試料液を用いて DNA の定量にも供した。

4. ALPase 活性の測定

ALPase 活性は, p-ニトロフェニルリン酸を基質とする Bessey-Lowry 法¹⁹⁾ を改良した ALPase 測定キット (和光純薬) を用い測定した。すなわち, 酵素試料液 50 μl に 250 μl の基質緩衝液 (0.1 M 炭酸緩衝液 pH 9.8, 2.0 mM 塩化マグネシウム, 6.7 mM p-ニトロフェニルリン酸二ナトリウム) を加え, 37°C, 30分インキュベートし, 2.5 ml の 0.22 N 水酸化ナトリウムを加えて反応を停止し, 波長 405 nm における吸光度を測定した。酵素活性には, 1分間に生成される p-ニトロフェノール 1 nmol を 1 unit として ALPase 活性を求めた。

5. DNA 量の測定

DNA 量の測定は Labarca & Paigen の方法²⁰⁾ に従った。すなわち, 試料液 400 μl に 0.1 M リン酸水素二ナトリウム, 4 M 塩化ナトリウム, 4 mM エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム (EDTA) を含む緩衝液を

等量加えた。続いて、その混合溶液から 100 μ l をとり、0.1 μ g/ml のビスベンジミダゾール (bisbenzimidazole, H33258, ナカライテスク) 含む 4 ml の緩衝液 (0.05 M リン酸水素二ナトリウム, 2 M 塩化ナトリウム) と反応させた。そして蛍光分光光度計により励起波長 356 nm, 吸光波長 468 nm における吸光度より、牛胸腺 DNA (SIGMA) を標準として DNA 量を求めた。

IV. 成長因子の ALPase の発現に及ぼす影響

1. 培養

歯髓細胞を前述の24穴プレートまたはI型コラーゲンのコーティング 90 mm シャーレ (9.5 \times 10⁵/シャーレ, RNA 抽出用, 住友ペークライト) にて、50 μ g/ml Aa を含む medium A 中で培養した。培養10日後に塩基性線維芽細胞増殖因子 (basic fibroblast growth factor; bFGF, 牛脳由来, R&D System Inc.) あるいはトランスフォーミング増殖因子- β (transforming growth factor- β ; TGF- β , ヒト血小板由来, R&D System Inc.) を添加し、さらに8~12日間培養を続けた。なお、両成長因子は2日おきに添加した。さらに90 mm シャーレ中の培地には、成長因子を培養終了24時間前にも添加した。

2. ALPase 活性と DNA 量の測定

ALPase 活性と DNA 量の測定は実験Ⅲの4, 5と同様に行った。

3. RNA の抽出

90 mm シャーレで培養した細胞を PBS で洗浄後、Cox の方法²¹⁾ の変法を用い、全 RNA を抽出した。続いて、滅菌超純水に溶解後、精製 RNA の確認のために、260 nm および 280 nm の吸光度を測定し、その比が約 2:1 であることを確認し、ノーザンブロット分析に用いた。

4. ノーザンブロット分析

ノーザンブロット分析は、Maniatis²²⁾ らと酒井の方法²³⁾ に準じて行った。すなわち、抽出した 15 μ g の RNA を微量のエチジウムブロマイドと 0.66 M ホルムアルデヒドを含む 1% アガロースゲルで電気泳動を行った。続いて、紫外線照射により同量の RNA が泳動されたことを確認し、ゲルからナイロンメンブレン (Schleicher & Schuell) へ転写した。その後、10分間紫外線を照射することで RNA をメンブレンに固定した。次にハイブリック内にメンブレンを挿入し、ハイブリダイゼーション溶液 (6 \times SSC, 0.5% SDS, 5 \times Denhardt's 溶液, 0.01 M EDTA, 100 μ g/ml 変性したサケ精子 DNA) 5 ml を添加し、68 $^{\circ}$ C でプレハイブリダイゼーションを1時間行った。臓器非特異型の

ALPase のプローベとして、ラット肝臓の ALPase の cDNA (池原征夫教授から供与) をオリゴラベリングキット (Pharmacia LKB Biotechnology) を用い、[α -³²P] dCTP (NEN Research Products) で標識した。さらに、同液を新液に交換した後、ラベルしたプローベを添加し、68 $^{\circ}$ C、一晚ハイブリダイゼーションを行った。ハイブリダイゼーション終了後、メンブレンを 2 \times SSC, 0.5% SDS 溶液にて室温で3回洗浄後、0.5 \times SSC, 0.5% SDS 溶液で 68 $^{\circ}$ C, 60分、最終洗浄を行い、-80 $^{\circ}$ C で X 線フィルム (コダック) に感光させた。

5. 有意差の検定

成長因子存在下と非存在下の比較の検定には t-検定を用いた。

実験結果

I. 初代培養細胞の位相差顕微鏡像

図1に初代培養細胞の位相差顕微鏡像を示した。形態的には線維芽細胞様の間葉系細胞が得られた。

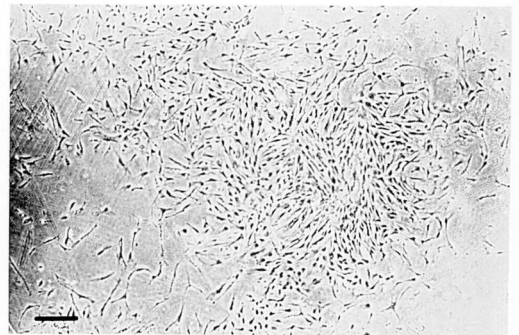


図1 初代培養細胞の位相差顕微鏡像。
バーは 250 μ m.

II. 石灰化物の形成について

1. アリザリン染色

Aa と Gly 存在下の培養33日後の歯髓細胞の位相差顕微鏡像を図2Aに示した。細胞層中に隆起した nodule 様構造物が多数観察された。そこでこれらにアリザリンレッド染色を行ったところ、橙赤色に染色され石灰化物と確認された (図2B)。一方、Aa のみ存在下では、ほとんど石灰化物が観察されないことが多かったが、図3の如く、まれにアリザリンレッド染色陽性を示す nodule 様構造物が観察された。しかしながら、歯肉細胞では、Aa と Gly 存在下の培養40日後でも、アリザリンレッド陽性を示す像は一例も認められなかった (図4)。

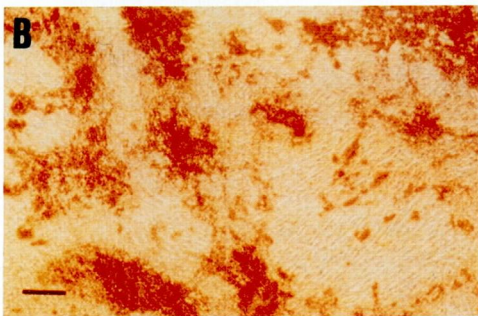
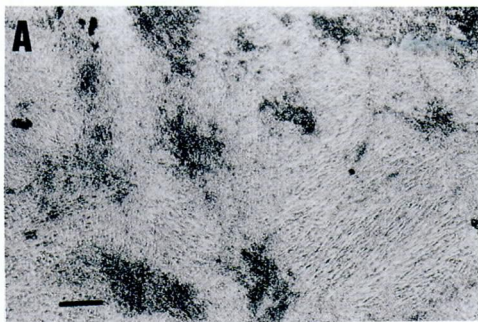


図2 Aa と Gly 存在下の歯髄細胞培養系のアリザリンレッド染色像。培養33日後。バーは 250 μm 。
A. 染色前。
B. 染色後。

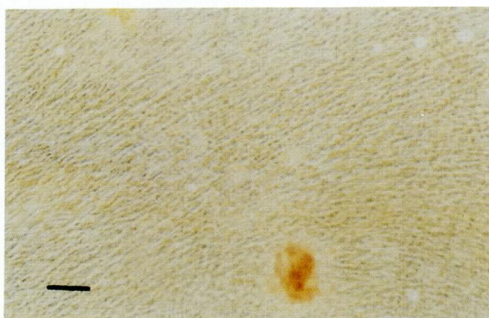


図3 Aa のみ存在下の培養33日後の歯髄細胞。アリザリンレッド染色。バーは 100 μm 。

2. 電子線マイクロアナライザーによる定性分析

Aa と Gly 存在下の培養33日後の歯髄細胞培養系の nodule 様構造物の定性スペクトラムは図5Aに示したように、カルシウムとリンに高いピークが認められた。また、対照のヒト象牙質においても同様にカルシウムとリンに高いピークを示した(図5B)。

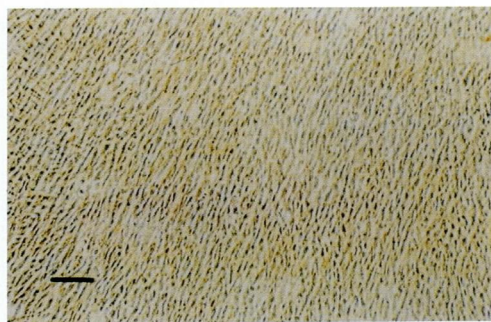


図4 Aa と Gly 存在下の培養40日後の歯肉細胞。アリザリンレッド染色。バーは 250 μm 。

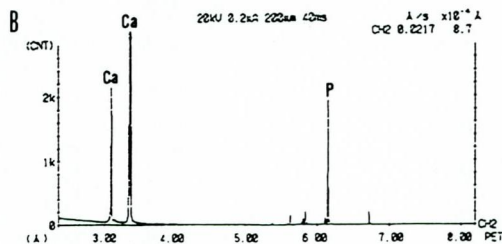
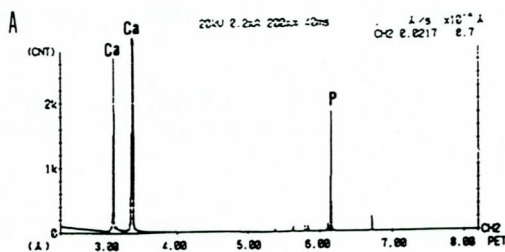


図5 Aa と Gly 存在下の歯髄細胞培養系の nodule 様構造物 (A) とヒト象牙質 (B) の電子線マイクロアナライザーによる定性スペクトラム。培養33日後。

3. 透過型電子顕微鏡による観察

Aa と Gly 存在下の培養33日後の歯髄細胞培養系の nodule 様構造物の透過型電子顕微鏡による観察では、図6Aに示したように、コラーゲン線維間に、円形状ないし楕円形状の針状結晶を含む構造物が認められた。さらに、それらが融合、集積して、また周囲へ石灰化が波及して形成されたと考えられる石灰化塊も観察された(図6B)。

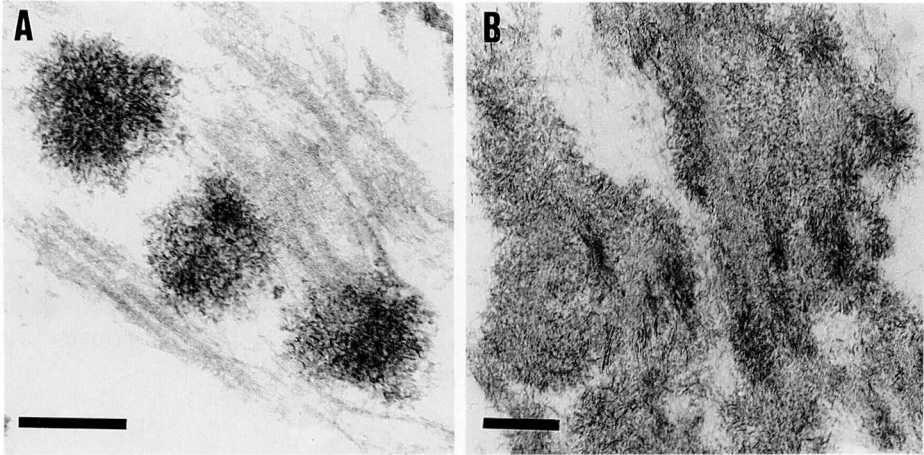


図6 Aa と Gly 存在下の歯髓細胞培養系の nodule 様構造物の透過型電子顕微鏡像。培養33日後。

バーは 250 nm.

A : コラーゲン線維間にある針状結晶を含む円形ないし楕円形状の構造物。

B : 図Aの構造物が融合, 集積, また石灰化が周囲に波及して形成されたと考えられる結晶塊。

Ⅲ. 石灰化物形成と ALPase との関連

1. 各種条件下における ALPase 活性と石灰化物形成

図7に示したように, Aa と Gly の添加, またコラーゲンのコーティングによって ALPase 活性が上昇した。このうち石灰化物の形成が認められたのは, Aa (+) Gly (+) コーティング (-), Aa (-) Gly (+)

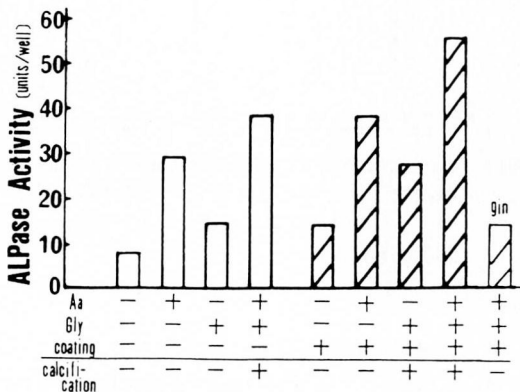


図7 各種条件下における ALPase 活性と石灰化物形成。

培養26日後。

Aa : (50 μ g/ml).

Gly : (10 mM).

コーティング : I 型コラーゲンのコーティング。

gin : 歯肉細胞。

各値は 2 ~ 4 つの培養系の平均値を示す。

コーティング (+), Aa (+) Gly (+) コーティング (+) の 3 グループで, 他の 5 グループでは観察されなかった。なお歯肉細胞では, Aa (+) Gly (+) コーティング (+) で低レベルの ALPase 活性を示した。

2. 石灰化物が形成されたグループのカルシウム量
石灰化物の形成が認められた上記 3 グループのカルシウム量を比較すると, 図8に示したように Aa (+) Gly (+) コーティング (+), Aa (+) Gly (+) コーティング (-), Aa (-) Gly (+) コーティング (+) の順に多かった。なおヒト歯肉細胞では, Aa (+) Gly (+) コーティング (+) の場合でも, 石灰化物は観察されなかった。

3. 石灰化物形成に伴う ALPase 活性と DNA 量の変動について

石灰化物の形成量が最も多く認められた Aa (+) Gly (+) コーティング (+) で石灰化物形成に伴う ALPase 活性と DNA 量の変動について検討した。図9Aに示したように培養系あたりの ALPase 活性は, 12日では低値であるが, その後急激に上昇し26日でピークに達し以後減少した。一方, 細胞基質層のカルシウム含量は, ALPase 活性が最大に達した後, 活性が減少するのに伴い逆に増加した。なお, DNA 量の経時的変動は19日ごろからほぼ一定量を示した (図9B)。したがって, DNA あたりの ALPase 活性も培養系あたりの ALPase 活性の変動と同様の傾向を示し, 26日でピークに達し, 以後減少した (図9C)。

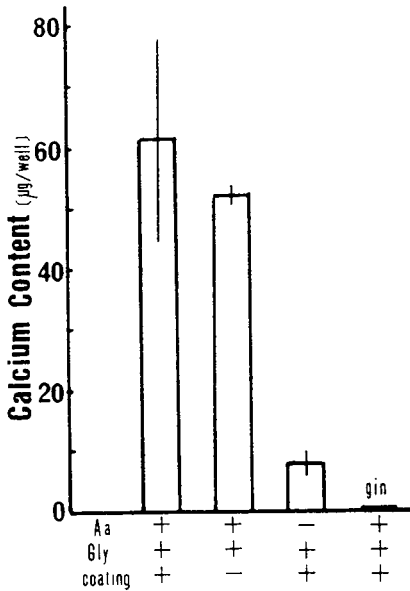


図8 石灰化物の形成が認められたグループのカルシウム量。
培養33日後。
Aa : (50 µg/ml).
Gly : (10 mM).
コーティング : I型コラーゲンのコーティング。
gin : 歯肉細胞。
各値は3つの培養系の平均値 ±SD を示す。

4. 提供者の異なる細胞での石灰化と ALPase 活性の変動

提供者の異なる2種類の培養細胞については、両細胞とも ALPase 活性の上昇から下降への変動に続いて、石灰化物形成量が増加したが、ALPase 活性が早期に上昇した細胞Bの方が細胞Aに比べ石灰化物の形成も早期に開始した(図10A, B)。

5. ALPase 活性と初期石灰化との関係

石灰化物の形成開始には、ALPase 活性の上昇が必要であるか否かを検討するため、Aa (+) Gly (+) コーティング (+) に、0.5 mM DBcAMP を培養19日目より添加したところ、ALPase 活性の上昇と石灰化物の形成が抑制された(図11A, B)。

IV. ALPase の発現に及ぼす成長因子の影響

1. bFGF の影響

(1) ALPase 活性と DNA 量における影響

ALPase 活性に及ぼす各濃度 (0~5 ng/ml) の bFGF の影響を図12に示した。bFGF は 1 ng/ml 以上の濃度において ALPase 活性を抑制し、その効果は 3~5 ng/ml で最大となった。また、bFGF 非存在下では、培養日数とともに ALPase 活性が上昇し、22日の活性は10日の約5倍を示したのに対して、存在下では、活性の上昇が抑制され、22日の活性は10日と比べてほとんど変化がなかった(図13)。なお、bFGF は DNA 量を増加 (25~55%) させた(図14)。

(2) ALPase の mRNA の発現における影響

ALPase の mRNA の発現について、bFGF 非存在下

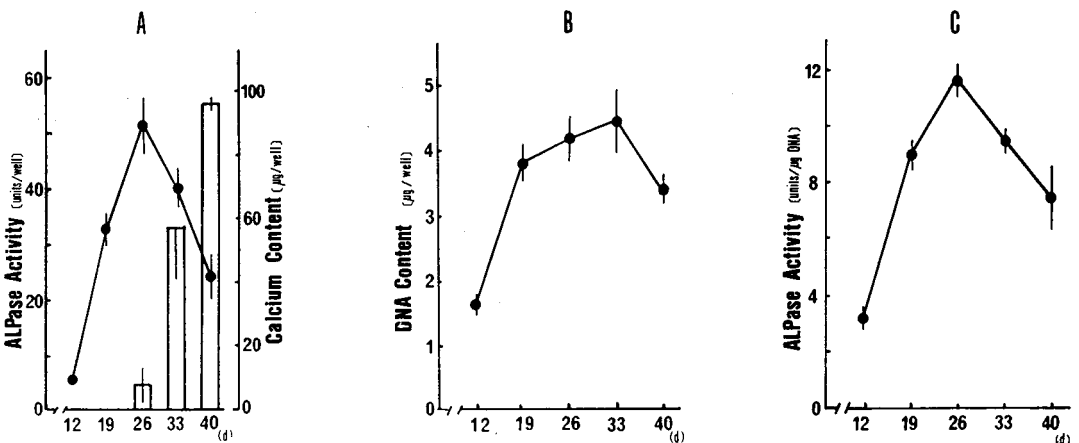


図9 石灰化物形成に伴う ALPase 活性と DNA 量の変動。
A. wellあたりの ALPase 活性(折れ線)とカルシウム量(棒グラフ)。
B. wellあたりの DNA 量。
C. DNA あたりの ALPase 活性。
ALPase 活性と DNA 量は4つの培養系の平均値 ±SD を示す。
カルシウム量は3つの培養系の平均値 ±SD を示す。

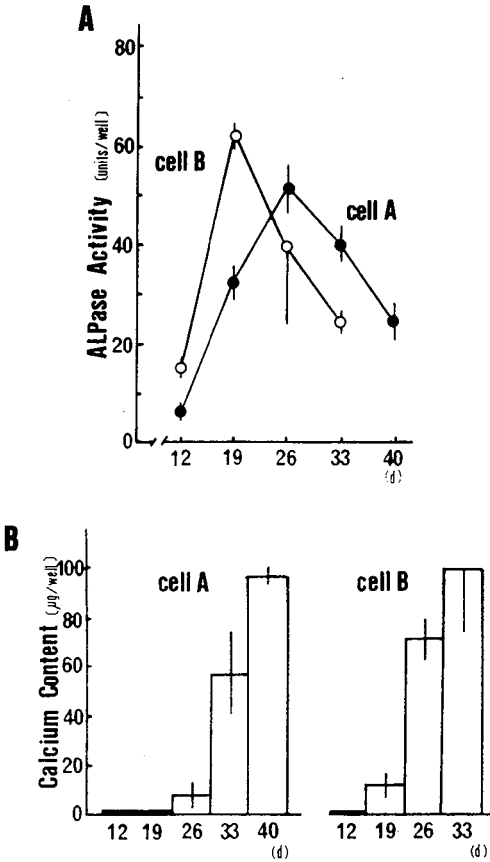


図10 提供者の異なる細胞での ALPase 活性 (A) の変動と石灰化 (B)。ALPase 活性は4つの培養系の平均値 ±SD を示す。カルシウム量は3つの培養系の平均値 ±SD を示す。

の10日と22日および存在下の22日において、ノーザンブロット分析を行った。非存在下の22日における ALPase の mRNA (2.6 kb) の発現は10日の発現より増加した。しかし、bFGF 存在下では発現がほとんど消失した (図15)。

2. TGF-β の影響

(1) ALPase 活性と DNA 量における影響

ALPase 活性に及ぼす各濃度 (0~5 ng/ml) の TGF-β の影響を図16に示した。TGF-β は、低濃度 (0.1 ng/ml) で活性を上昇させ、高濃度で (3~5 ng/ml) 抑制した。ALPase 活性の経時的変化を TGF-β 存在下と非存在下で追跡すると (図17)、低濃度 (0.1 ng/ml) では非存在下に比べ14日では活性にほとんど差は認められないが、18日には活性は約1.5倍に上昇した。一方、高濃度 (5 ng/ml) では18日の活性は逆に50%

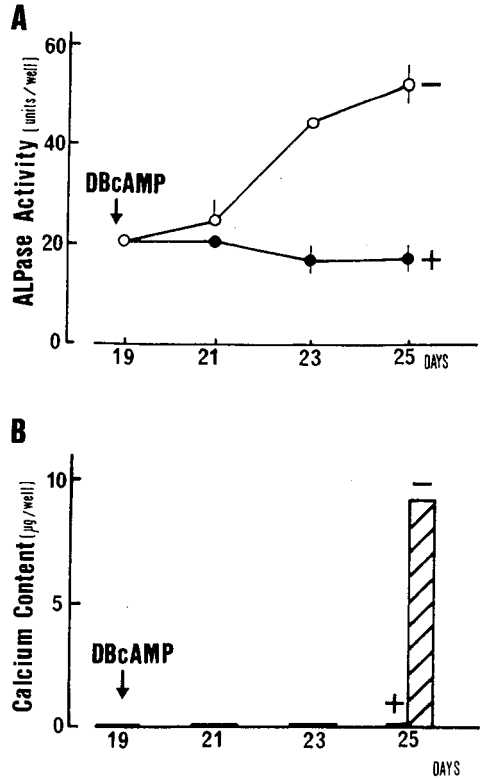


図11 ALPase 活性 (A) と初期石灰化 (B) との関係。DBCAMP : 0.5 mM。各値は4つの培養系の平均値 ±SD を示す。

減少した (図17)。なお、TGF-β は0.1および5 ng/ml の濃度で、DNA 量を少し増加 (15~30%) させた (図18)。

(2) ALPase の mRNA の発現における影響

ALPase の mRNA の発現について、TGF-β 非存在下、低濃度存在下 (0.1 ng/ml)、高濃度存在下 (5 ng/ml) において、培養18日後にノーザンブロット分析を行った (図19)。低濃度では ALPase の mRNA 量が対照より増加した。逆に、高濃度では ALPase の mRNA の発現はほとんど消失した。

考 察

近年、細胞培養法の技術の進歩はめざましいものがあり、培養歯髄細胞を用いて石灰化能を解析することは、歯髄の象牙質形成機序を解明するために有用であると考えられる。しかしながら、これらに関する報告はほとんどなく不明な点が多く残されている。そこで、まず形態学的分析により培養歯髄細胞の石灰化物形成について検討した。

これまでの多くの培養細胞を用いた研究には、石

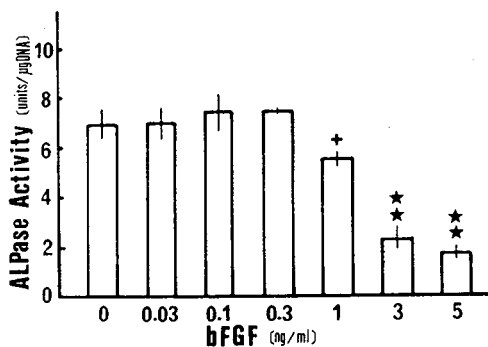


図12 各濃度の bFGF の ALPase 活性に対する影響。bFGF は10日より添加し、8日後に ALPase 活性の測定をした。各値は3つの培養系の平均値 ±SD を示す。
+ P<0.05 * P<0.01 * P<0.001

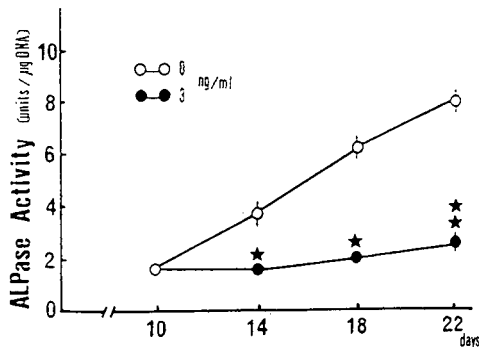


図13 bFGF 存在下および非存在下の歯髄細胞培養系における ALPase 活性の経時的変化。各値は3つの培養系の平均値 ±SD を示す。
* P<0.01 * P<0.001

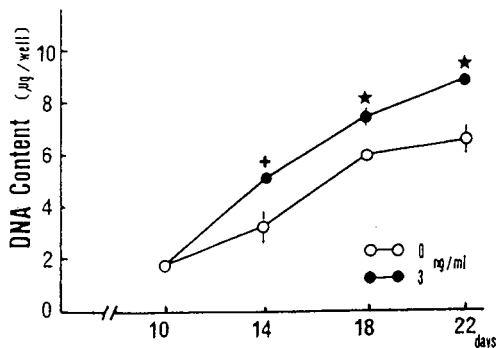


図14 bFGF 存在下および非存在下の歯髄細胞培養系における DNA 量の経時的変化。各値は3つの培養系の平均値 ±SD を示す。
+ P<0.05 * P<0.01

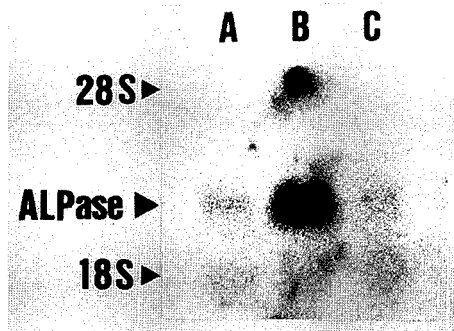


図15 ALPase の mRNA の発現における bFGF の影響。

ノーザンブロット分析。

A. 10日 bFGF 非存在下。

B. 22日 bFGF 非存在下。

C. 22日 bFGF 存在下 (3 ng/ml)。

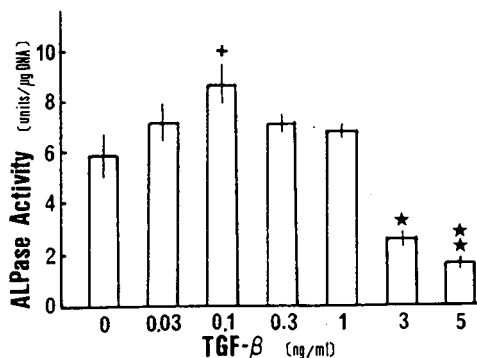


図16 各濃度の TGF-β の ALPase 活性に対する影響。TGF-β は10日より添加し、8日後に ALPase 活性の測定をした。各値は3つの培養系の平均値 ±SD を示す。
+ P<0.05 * P<0.01 * P<0.001

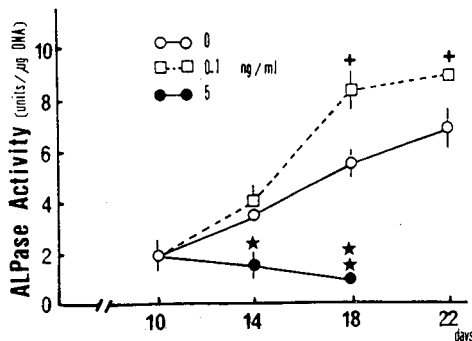


図17 TGF-β 存在下および非存在下の歯髄細胞培養系における ALPase 活性の経時的変化。各値は3つの培養系の平均値 ±SD を示す。
+ P<0.05 * P<0.01 * P<0.001

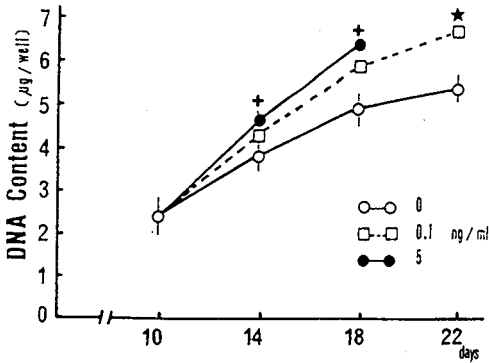


図18 TGF- β 存在下および非存在下の歯髓細胞培養系における DNA 量の経時的変化。
各値は3つの培養系の平均値 \pm SD を示す。
* $P < 0.05$ * $P < 0.01$

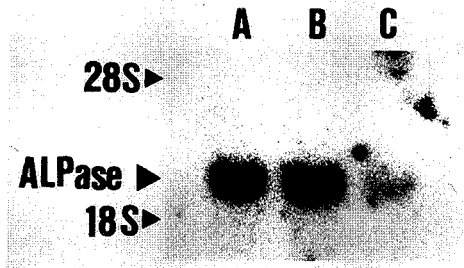


図19 ALPase の mRNA の発現における TGF- β の影響。

培養18日後。

ノーザンブロット分析。

- A. TGF- β 非存在下。
- B. TGF- β 低濃度存在下 (0.1 ng/ml)。
- C. TGF- β 高濃度存在下 (5 ng/ml)。

灰化に重要な役割を果たしていると考えられているコラーゲン合成に必須の因子^{24,25,26)}である Aa (50 μ g/ml) が用いられている。さらに、石灰化を増幅するために有機リン酸を添加している研究は多く、Tenenbaum²⁷⁾らは、培地中の無機リン酸の濃度は生理的レベル (1 mM) に近いが、培地中の有機リン酸の濃度は生理的レベル (10 mM) に比べて低いので、石灰化を引き起こすには培地中に適当レベルの有機リン酸の添加が必要であると報告している。そして、この有機リン酸には、Gly (10 mM) がよく用いられている。実際、骨芽細胞において、Aa 添加のみで石灰化物が形成され²⁸⁻³⁰⁾、さらに Gly の添加によって促進されるなどの報告^{30,31)}がある。一方、Gly の添加なしには石灰化物が形成されないという報告^{27,32,33)}もあり、実験者によって結果がまちまちである。本研究では、Gly 存在下または非存在下で Aa を含む培地

中でヒト歯髓細胞を培養したところ、Aa と Gly の両存在下においてアリザリンレッド陽性の nodule 様構造物が認められた。一方、Aa のみでは、石灰化はほとんど観察されなかった。これらの結果より、本研究での石灰化には Gly の添加が必要であることが明らかとなった。

形態学的分析では、針状結晶を含む円形ないし楕円形の構造物が観察され、さらにそれらが集積または周囲へ石灰化が波及して形成されたと考えられる石灰化塊が認められた。これら一連の像は、象牙質形成初期^{34,35)}や骨芽細胞の培養系^{28,29)}で観察されている基質小胞による石灰化を推察させる所見である。

ALPase は骨芽細胞や軟骨細胞の一指標として用いられており^{7,8)}、機能的には局所で有機リン酸エステルを加水分解し無機リン酸イオン濃度を上昇させるとともに³⁶⁾、結晶毒として知られるピロリン酸を分解して²⁴⁾、石灰化を促進すると考えられている。歯髓組織または歯髓細胞においては、この ALPase 活性¹⁰⁾および mRNA¹¹⁾が高レベルに存在している。歯髓細胞の石灰化における ALPase の研究では、象牙質形成と ALPase 活性の局在との関係について *in vivo* の組織化学的な報告^{2,37)}が見られる。また、培養歯髓細胞の石灰化に関する研究としては、ラット歯髓を象牙質上で Aa, Gly, デキサメタゾンを含む培地で培養したり³⁸⁾、またヒト歯髓細胞をコンドロイチン硫酸を含むコラーゲンスポンジ中で培養し、石灰化物の形成を見た報告³⁹⁾があるものの、これらは ALPase と石灰化物形成の関連についての検討は行っていない。したがって、歯髓細胞の石灰化における ALPase の役割について不明な点が多い。そこで本研究ではまず、Aa と Gly の他に、象牙質や歯髓組織の主要構成成分である I 型コラーゲンをコーティングしたプレートを用いて、ALPase の石灰化に及ぼす影響を検討した。骨芽細胞を用いた場合と同様に、Aa⁴⁰⁾と Gly⁴¹⁾によって ALPase 活性と石灰化が亢進した。またコーティングされたコラーゲンによっても ALPase 活性と石灰化が亢進した。ただし、ALPase 活性は高くても Gly を添加しなければ石灰化物の形成は認められず、逆に Gly が添加してあっても、ALPase 活性が低いと石灰化物は観察されなかった。石灰化物の形成が認められたグループでは、カルシウム含量が多いほど ALPase 活性が高かった。一方、歯肉細胞では Aa(+)/Gly(+)/コーティング(+)でも ALPase 活性は低く石灰化物は形成されなかったので、歯髓細胞培養系での石灰化は、単に物理化学的な現象でなく、細胞の分化機能の発現に関連していることが示唆された。

さて、Aa が添加されていない Aa(-)/Gly(+)/コー

ティング(+)で石灰化がおこったことは興味深い。コラーゲンの存在については、Aa 添加培地にコンドロイチン硫酸を含むコラーゲンスポンジを利用したヒト歯髓細胞の実験では、結晶は新しく合成されたコラーゲンではなく、スポンジ中の既成のコラーゲンに沈着したと報告している³⁹⁾。本研究においてコーティングされたコラーゲンが結晶の沈着の場として直接機能するとは考えにくい。歯髓細胞の分化機能の発現を亢進させると推察される。さらにこのことは、上述した Aa による ALPase 活性の上昇は、細胞自ら形成したコラーゲン基質が、細胞の基質蛋白受容体に結合することによって、細胞内にシグナルが伝達された結果であろうと示唆される。

次に石灰化物形成に伴う ALPase 活性の変動について検討した。骨芽細胞の培養系における ALPase 活性と非コラーゲン性タンパクであるオステオカルシン量の石灰化物形成に伴う経時的变化については、石灰化が開始するまでは ALPase 活性とオステオカルシン量はともに増加するが、石灰化がおこると ALPase 活性は急激に減少し、一方オステオカルシンの蓄積はさらに続く⁴¹⁾。また *in vivo* での象牙質形成時においては、一層の象牙質が形成されると象牙芽細胞の ALPase 活性は減少するものの、象牙質は引き続き形成される³⁷⁾。本研究において、オステオカルシン量の測定は行っていないが、ALPase 活性の石灰化物形成に伴う変動は骨芽細胞の培養系と同様の結果を示した。さらに ALPase 活性の上昇を抑制することにより、初期の石灰化物形成が抑制された。つまり、ALPase 活性が石灰化の開始をおこす重要な役割を担い、その後はコラーゲンとオステオカルシンやオステオネクチンなどの非コラーゲン性タンパクが石灰化物形成に関与している可能性がある。

形態学的に結晶化の開始部位は基質小胞であると示唆されており⁴²⁾、その膜には ALPase 活性が局在して、さらにその活性はアパタイト結晶が析出すると減少または消失する^{37,42,43)}。なお基質小胞の膜と細胞膜の ALPase 活性の局在には、共通性があることが示唆されている^{37,44)}。本研究における形態学的分析は石灰化が進行しているときの所見のみであるので、歯髓細胞の石灰化の初期に基質小胞の ALPase 活性が石灰化に関与していか否かは、現在のところ不明である。

歯髓細胞培養系で形成された nodule 様構造物に関して次のような考え方ができる。第一に、人工的環境が原因でこの nodule 様構造物が形成されたという考えである。第二に、この nodule 様構造物が、*in vivo* の石灰化をある程度反映しているという考えである。象牙質に取り囲まれた環境化では、歯髓細胞は修復象

牙質を形成する^{2,3)}。またラットの歯髓組織を腎臓被膜下や前眼房に移植すると骨や骨様象牙質が形成される⁴⁾。つまり歯髓細胞は、石灰化能力を備えている細胞で、環境がその歯髓細胞の分化を決め分化に対応した硬組織を形成する。培養骨芽細胞は、線維芽細胞様から数石状へ形態が変化し骨を形成する²⁸⁾。一方、今回用いた培養条件において歯髓細胞は、形態的には培養期間中ずっと線維芽細胞様形態であったが、機能的に分化し、電子線マイクロアナライザーの分析により明らかにされたように、ヒト象牙質と同様、カルシウムとリンに高いピークが認められる nodule 様構造物を形成した。生体の環境により近づくため、三次元培養を行ったり、石灰化との関連が認められるタンパク、多糖、糖タンパクなどの細胞外基質を多用することにより、培養歯髓細胞の形態変化がおこり象牙質により類似した組織を形成することができるかもしれない。また nodule 様構造物に関して次の様な考察も可能である。今回用いた培養歯髓細胞は、前象牙芽細胞や象牙芽細胞は未だ分化していない線維芽細胞様形態である。実際、*in vivo* において、歯髓内には、前象牙芽細胞や象牙芽細胞とは無関係に瀰漫性石灰化物が形成される。これには栄養障害によるものと歯髓炎に対する防御機転によるものとして形成される場合がある⁴⁵⁾。本研究の nodule 様構造物は、この線維芽細胞様形態を示す細胞によって形成されたもので、*in vivo* における瀰漫性石灰化物に類似した石灰化物かも知れない。しかしながら、著者は、歯肉細胞では Aa と Gly の存在下においても石灰化物の形成が認められなかったこと、石灰化物の形成時に細胞数が変動しなかったこと、骨芽細胞の培養系と同様、ALPase 活性の上昇から下降への変動に続いて、カルシウム量の増加が認められたこと、さらに石灰化の開始には、ALPase 活性の上昇の必要性が示唆されたことなどから、本歯髓細胞培養系の nodule 様構造物が *in vivo* の石灰化をある程度反映しているという第二の考えを支持したい。

最後に、培養歯髓細胞の ALPase の発現に及ぼす成長因子の影響を調べた。成長因子としては bFGF と TGF- β の二つを選択した。FGF は線維芽細胞の増殖因子として発見されたためこのように命名され、本研究で使用した細胞は線維芽細胞様形態であり、FGF の標的細胞である可能性が強く、FGF の代表として最初に発見された bFGF を用いた。TGF- β については、歯髓細胞には、TGF- β の mRNA が歯肉、歯根膜、骨芽細胞 (A₁₁, ROS17/2.8) と比べて高レベルに発現していること¹¹⁾、そして象牙質に TGF- β が存在すること⁴⁶⁾を考慮した。

ラットや牛の培養歯髄細胞において、bFGF と TGF- β は ALPase 活性を抑制すると報告されている^{47,48}。本研究では、bFGF は ALPase 活性を抑制し、従来の報告と同じ結果を示したが、TGF- β は異なる結果を示し、低濃度で ALPase 活性を上昇させ、高濃度では抑制した。TGF- β は細胞種や培養条件、血清や TGF- β の濃度によって相反する作用を示すことが報告されており^{49,50}、本歯髄細胞培養系では TGF- β の濃度によって ALPase 活性が増加または減少した。一方、軟骨細胞の培養系では、TGF- β は低濃度でも ALPase 活性を上昇させず抑制する⁸。また骨芽細胞では、TGF- β は ALPase 活性を促進するという報告¹⁵と抑制するという報告¹⁶があり一定していない。いずれにせよ、歯髄細胞の応答は二相性である点で興味深い。一方、DNA 量は、bFGF および TGF- β とも増加が認められ、TGF- β の ALPase の発現にみられたような濃度による二相性の作用は観察されなかった。

さらに著者は bFGF と TGF- β の ALPase の発現に及ぼす影響をより明らかにするため、ALPase の mRNA の発現についてノーザンブロット分析を行い検討した。ヒト歯髄の ALPase は臓器非特異型であることが明らかにされているので⁹、ALPase のプローベとしてラット肝臓の ALPase の cDNA を用いた。ラット肝臓の ALPase とヒトの臓器非特異型の ALPase のアミノ酸配列には88%のホモロジーが確認されており⁵¹、さらにヒトの臓器非特異型の ALPase の mRNA は約 2.6 Kb であることが報告されている⁵²。本研究においても ALPase の mRNA は 2.6 Kb 付近に発現していた。このことにより、種の違いによって、ヒト培養歯髄細胞の ALPase の mRNA とラット肝臓の ALPase の cDNA のハイブリダイゼーションが行われにくいという問題はない。bFGF と TGF- β とも ALPase の mRNA の発現は活性レベルと同じ傾向を示していることから、両成長因子による ALPase の発現の調節は mRNA の翻訳の前段階で行われていることが判明した。さらに ALPase と石灰化物形成が密接に関係していることを明らかにしたことから、両成長因子による培養歯髄細胞の石灰化物形成の調節の関与が示唆された。また、成長因子の役割の一つに組織の修復があげられる。実際、bFGF と TGF- β も組織の損傷を修復する場において重要な機能を果たしている^{53,54}。bFGF はマクロファージによって産生され⁵⁵、TGF- β は血小板⁵⁶や象牙基質中⁴⁶に存在するので、歯髄に傷害が加えられると両成長因子は放出され、歯髄細胞の増殖や ALPase の発現を調節することにより修復象牙質の形成に一役を担うものと推察さ

れる。

総 括

培養歯髄細胞の石灰化能を明らかにするため、ヒト培養歯髄細胞を用いて、石灰化物形成および石灰化物形成と ALPase の関連、さらに成長因子の ALPase の発現に及ぼす影響について検討し、以下の結果を得た。

1. 石灰化物の形成では、アスコルビン酸と β グリセロリン酸ナトリウムの存在下で歯髄細胞を培養することにより、アリザリンレッド染色陽性の nodule 様構造物が認められた。電子線マイクロアナライザーによる nodule 様構造物の定性分析ではヒト象牙質と同様に、カルシウムとリンに高いピークを示した。透過電顕による観察では、コラーゲン線維間に針状結晶を含む円形ないし楕円形状の構造物が観察された。さらにその構造物が融合、集積し、また周囲へ石灰化が波及して形成されたと考えられる石灰化塊も観察された。

2. 石灰化物形成と ALPase との関連では、アスコルビン酸、 β グリセロリン酸ナトリウム、コーティング I 型コラーゲンは ALPase 活性を上昇させ石灰化物形成に関与し、さらに石灰化物の形成量が多いほど ALPase 活性は高レベルに達した。次に経時的変化では、ALPase 活性のピーク時にわずかに石灰化物が形成され、その後、活性の減少とともに石灰化物のカルシウム量が増加した。なお、その間の DNA 量はほぼ一定量を示した。さらに ALPase 活性の上昇を抑制すると石灰化も抑制された。

3. ALPase の誘導に及ぼす成長因子の影響では、bFGF は ALPase 活性を濃度依存性に抑制し、その抑制は ALPase の mRNA の発現の低下と関係していた。一方 TGF- β は、低濃度で ALPase の活性と mRNA の発現を増大させ、高濃度でその両者を抑制し、相反する作用を示した。これらより、両成長因子は、ALPase の mRNA 量を調節することにより、活性に影響を与えることが示唆された。

以上、ヒト培養歯髄細胞は、コラーゲン基質と有機リン酸の供給により石灰化物を形成し、その形成には ALPase 活性の上昇が必要など、石灰化物形成と ALPase は密接に関係していることが明らかとなった。また、培養歯髄細胞の石灰化物形成に、bFGF や TGF- β による調節の関与が示唆され、生体内において両成長因子が歯髄細胞による石灰化組織形成の調節を行っている可能性が示された。合わせて、本ヒト歯髄細胞培養系は、歯髄細胞による石灰化能を解析するうえで、有用な実験系であることがわかった。

謝 辞

本研究の御指導および御校閲を賜った本学歯科保存学第二講座岡本莫教授に深甚なる感謝の意を表します。また、本研究遂行上、御指導、御助言を頂いた本学口腔生化学講座加藤幸夫教授ならびに御助言、御校閲を賜った本学予防歯科学講座岩本義史教授に深謝いたします。

また、本研究の遂行、まとめおよび論文の作成上、終始御指導、御助言を頂いた、本学歯科保存学第二講座白川正治助教授、中西恵治学内講師に心から感謝の意を表します。さらに電子線マイクロアナライザーによる定性分析にあたり御指導、御協力下さった広島市工業技術センター福原啓聡技師、ならびに透過型電子顕微鏡による観察にあたり御指導、御協力下さった本学歯科保存学第二講座小川哲次講師、またノーザンブロット分析にあたり御指導、御助言下さった本学口腔生化学講座能城光秀助教授、大山義彦助手、ならびに大阪大学歯学部生化学講座中島和久博士に深謝いたします。さらにラット肝臓 ALPase の cDNA プローブを御供与いただいた福岡大学医学部生化学第二講座池原征夫教授に感謝致します。

最後に本研究を進めるに際し、多大なる御支援をいただいた本学歯科保存学第二講座関係各位に感謝致します。

文 献

- 1) Linde, A.: Cells and extracellular matrices of the dental pulp. *J. Dent. Res.* **64**, 523-529, 1985.
- 2) 相場 剛: 修復象牙質の形成に関する微細構造的ならびに細胞化学的研究. 歯基礎誌 **25**, 299-328, 1983.
- 3) Magloire, H., Joffre, A. and Hartmann, D.J.: Localization and synthesis of type III collagen and fibronectin in human reparative dentin. *Histochemistry* **88**, 141-149, 1988.
- 4) Yamamura, T.: Differentiation of pulpal cells and inductive influences of various matrices with reference to pulpal wound healing. *J. Dent. Res.* **64**, 530-540, 1985.
- 5) Zussman, W.V.: Osteogenic activity of odontoblasts in transplanted tooth pulps. *J. Dent. Res.* **45**, 144-151, 1966.
- 6) 一瀬健二: 歯髄組織の石灰化に関する病理学的研究. ラット移植歯髄による組織学的、組織化学的検討から. 歯基礎誌 **25**, 195-213, 1983.
- 7) Wlodarski, K.H. and Reddi, A.H.: Alkaline phosphatase as a marker of osteoinductive cells. *Calcif. Tissue Int.* **39**, 382-385, 1986.
- 8) Kato, Y., Iwamoto, M., Koike, T., Suzuki, F. and Takano, Y.: Terminal differentiation and calcification in rabbit chondrocyte cultures grown in centrifuge tubes: Regulation by transforming growth factor β and serum factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**, 9552-9556, 1988.
- 9) Goseki, M., Oida, S., Nifuji, A. and Sasaki, S.: Properties of alkaline phosphatase of the human dental pulp. *J. Dent. Res.* **69**, 909-912, 1990.
- 10) 三輪 淳, 中西恵治, 多山和宏, 河口浩之, 玉井和春, 佐藤裕紀, 小川哲治, 白川正治, 岡本莫: ヒト歯髄由来培養細胞に関する研究. 1. 継代後の細胞の動態. 日歯保誌 **32**, 12, 1989.
- 11) 笹栗健一: ヒト歯根膜細胞の細胞外基質蛋白質の発現の特徴について. 歯基礎誌 **33**, 261-274, 1991.
- 12) Yosiki, S. and Kurahashi, Y.: A light and electron microscopic study of alkaline phosphatase activity in the early stage of dentinogenesis in the young rat. *Archs Oral Biol.* **16**, 1143-1154, 1971.
- 13) 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.
- 14) Kato, Y. and Iwamoto, M.: Fibroblast growth factor is an inhibitor of chondrocyte terminal differentiation. *J. Biol. Chem.* **265**, 5903-5909, 1990.
- 15) Pfeilschifter, J., D'Souza, S.M. and Mundy, G.R.: Effects of transforming growth factor- β on osteoblastic osteosarcoma cells. *Endocrinology* **121**, 212-218, 1987.
- 16) Noda, M. and Rodan, G.A.: Type- β transforming growth factor inhibits proliferation and expression of alkaline phosphatase in murine osteoblast-like cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **140**, 56-65, 1986.
- 17) Dahl, L.K.: A simple and sensitive histochemical method for calcium. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **80**, 474-479, 1952.
- 18) Gitelman, H.J.: An improved automated procedure for the determination of calcium in biological specimens. *Anal. Biochem.* **18**, 521-531, 1967.
- 19) Bessey, O.A., Lowry, O.H. and Brock, M.J.: A method for the rapid determination of alkaline phosphatase with five cubic millimeters of serum. *J. Biol. Chem.* **164**, 321-329, 1946.
- 20) Labarca, C. and Paigen, K.: A simple, rapid, and sensitive DNA assay procedure. *Anal. Biochem.* **102**, 344-352, 1980.
- 21) Cox, R.A.: The use of guanidinium chloride in the isolation of nucleic acids. *Methods Enzymol.* **12B**, 120-129, 1968.
- 22) Maniatis, T., Fritsch, E.F. and Sambrook, J.: Molecular cloning. A laboratory manual. Cold

- spring harborlaboratory. 1982.
- 23) 酒井正春：ノーザンブロットとドットブロット分析，バイオテクノロジー実験法シリーズ，遺伝子工学総集編；実験医学（村松正実編），5，11，羊土社，東京，81-87，1987.
 - 24) Fleish, H. and Neuman, W.F.: Mechanisms of calcification: role of collagen, polyphosphates and phosphatase. *Am. J. Physiol.* **200**, 1296-1300, 1961.
 - 25) Jeffrey, J.J. and Martin, G.R.: The role of ascorbic acid in the biosynthesis of collagen. I. Ascorbic acid requirement by embryonic chick tibia in tissue culture. *Biochim. Biophys. Acta.* **121**, 269-280, 1966.
 - 26) Jeffrey, J.J. and Martin, G.R.: The role of ascorbic acid in the biosynthesis of collagen. II. Site and nature of ascorbic acid participation. *Biochim. Biophys. Acta.* **121**, 281-291, 1966.
 - 27) Tenenbaum, H.C. and Heersche, J.N.M.: Differentiation of osteoblasts and formation of mineralized bone *in vitro*. *Calcif. Tissue Int.* **34**, 76-79, 1982.
 - 28) Sudo, H., Kodama, H., Amagai, Y., Yamamoto, S. and Kasai, S.: *In vitro* differentiation and calcification in a new clonal osteogenic cell line derived from newborn mouse calvaria. *J. Cell. Biol.* **96**, 191-198, 1983.
 - 29) Williams, D.C., Boder, G.B., Toomey, R.E., Paul, D.C., Jr. Hillman, C.C., King, K.L., Van Frank, R.M. and Jr. Johnston, C.C.: Mineralization and metabolic response in serially passaged adult rat bone cells. *Calcif. Tissue Int.* **30**, 233-246, 1980.
 - 30) Koshihara, Y., Kawamura, M., Oda, H. and Higaki, S.: *In vitro* calcification in human osteoblastic cell line derived from periosteum. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **145**, 651-657, 1987.
 - 31) Kodama, H., Amagai, Y., Sudo, H., Ohno, T. and Iijima, K.: Culture conditions affecting differentiation and calcification in the MC3T3-E1 osteogenic cell line; cell-mediated calcification and matrix vesicles. (Ali, S.Y., Editor). Elsevier Science Publishers B.V., New York. 297-302, 1986.
 - 32) Ecarot-Charrier, B., Glorieux, F.H., Van Der Rest, M. and Pereira, G.: Osteoblasts isolated from mouse calvaria initiate matrix mineralization in culture. *J. Cell. Biol.* **96**, 639-643, 1983.
 - 33) Bellows, C.G., Auban, J.E., Heersche, J.N.M. and Antosz, M.E.: Mineralized bone nodules formed *in vitro* from enzymatically released rat calvaria cell populations. *Calcif. Tissue Int.* **38**, 143-154, 1986.
 - 34) Eisenmann, D.R. and Glick, P.L.: Ultrastructure of initial crystal formation in dentin. *J. Ultrastruct. Res.* **41**, 18-28, 1972.
 - 35) Bernard, G.W.: Ultrastructural observations of initial calcification in dentin and enamel. *J. Ultrastruct. Res.* **41**, 1-17, 1972.
 - 36) Robison, R.: The possible significance of hexosephosphoric esters in ossification. *Biochem. J.* **17**, 286-293, 1923.
 - 37) 鈴木章則：ラット切歯の舌側象牙質形成に関する微細構造学的ならびに細胞化学的研究。歯基礎誌 **27**, 215-253, 1985.
 - 38) 井上 孝, 陳 盛輝, 下野正基：ラット歯髓, 歯根膜, 骨髄細胞の骨形成能ならびに軟骨誘導に関する実験的研究。歯基礎誌 **33**, 16-25, 1991.
 - 39) Bouvier, M., Joffre, A. and Magloire, H.: *In vitro* mineralization of a three-dimensional collagen matrix by human dental pulp cells in the presence of chondroitin sulphate. *Archs. Oral Biol.* **35**, 301-309, 1990.
 - 40) Sugimoto, T., Nakada, M., Fukase, M., Imai, Y., Kinoshita, Y. and Fujita, T.: Effects of ascorbic acid on alkaline phosphatase activity and hormone responsiveness in the osteoblastic osteosarcoma cell line UMR-106. *Calcif. Tissue Int.* **39**, 171-174, 1986.
 - 41) Gerstenfeld, L.C., Chipman, S.D., Glowacki, J. and Lian, J.B.: Expression of differentiated function by mineralizing cultures of chicken osteoblasts. *Dev. Biol.* **122**, 49-60, 1987.
 - 42) 小澤英浩：石灰化機構の微細構造学的知見。歯基礎誌 **27**, 751-774, 1985.
 - 43) Matsuzawa, T. and Anderson, H.C.: Phosphatases of epiphyseal cartilage studied by electron microscopic cytochemical methods. *J. Histochem. Cytochem.* **19**, 801-808, 1971.
 - 44) Orams, H.J. and Snibson, K.J.: Ultrastructural localization and gradient of activity of alkaline phosphatase activity during rodent odontogenesis. *Calcif. Tissue Int.* **34**, 273-279, 1982.
 - 45) 上野正康：歯髓の退行性病変；図説口腔病理学（田熊庄三郎編）。2版，医歯薬出版，東京，196-209, 1971.
 - 46) Finkelman, R.D., Mohan, S., Jennings, J.C., Taylor, A.K., Jepsen, S. and Baylink, D.J.: Quantitation of growth factors IGF-I, SGF/IGF-II, and TGF- β in human dentin. *J. Bone Miner. Res.* **5**, 717-723, 1990.
 - 47) Liang, R.-F., Nishimura, S., Maruyama, S., Hanazawa, S., Kitano, S. and Sato, S.: Effects of transforming growth factor- β and epidermal growth factor on clonal rat pulp cells. *Archs. Oral Biol.* **35**, 7-11, 1990.
 - 48) Nakashima, M.: The effects of growth factors on DNA synthesis proteoglycan synthesis and alkaline phosphatase activity in bovine dental pulp cells. *Archs. Oral Biol.* **37**, 231-236, 1992.
 - 49) Centrella, M., McCarthy, T.L. and Canalis, E.:

- Transforming growth factor β is a bifunctional regulator of replication and collagen synthesis in osteoblast-enriched cell cultures from fetal rat bone. *J. Biol. Chem.* **262**, 2869-2874, 1987.
- 50) Roberts, A.B., Anzano, M.A., Wakefield, L.M., Roche, N.S., Stern, D.F. and Sporn, M.B.: Type β transforming growth factor: A bifunctional regulator of cellular growth. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**, 119-123, 1985.
- 51) Misumi, Y., Tashiro, K., Hattori, M., Sasaki, Y. and Ikehara, Y.: Primary structure of rat liver alkaline phosphatase deduced from its cDNA. *Biochem. J.* **249**, 661-668, 1988.
- 52) Weiss, M.J., Henthorn, P.S., Lafferty, M.A., Slaughter, C., Raducha, M. and Harris, H.: Isolation and characterization of a cDNA encoding a human liver/bone/kidney-type alkaline phosphatase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**, 7182-7186, 1986.
- 53) Mustoe, T.A., Pierce, G.F., Thomason, A., Gramates, P., Sporn, M.B. and Deuel, T.F.: Accelerated healing of incisional wounds in rats induced by transforming growth factor- β . *Science*. **237**, 1333-1336, 1987.
- 54) Cuevas, P., Burgos, J. and Baird, A.: Basic fibroblast growth factor (FGF) promotes cartilage repair *in vivo*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **31**, 611-618, 1988.
- 55) Baird, A., Mormède, P. and Böhlen, P.: Immunoreactive fibroblast growth factor in cells of peritoneal exudate suggests its identity with macrophage-derived growth factor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **126**, 358-364, 1985.
- 56) Assoian, R.K., Komoriya, A., Meyers, C.A., Miller, D.M. and Sporn, M.B.: Transforming growth factor-beta in human platelets: identification of a major storage site, purification and characterization. *J. Biol. Chem.* **258**, 7155-7160, 1983.