

骨へのミネラル沈着機構の解明

新潟大学歯学部口腔解剖学第一講座 小澤英浩

要約

骨石灰化の分子機構を解明することを目的に以下の項目を検討した。

(A) 非石灰化部位における有機質の構造同定

石灰化現象におけるミネラルと有機質の相互関係を解明することを目的として、非石灰化相から石灰化相へと移行する幼弱な骨の有機基質の微細形態を、形態保持の最も優れている急速凍結法を用いて観察するとともに、細胞組織化学を用いてプロテオグリカンなどの有機質の組成を同定した。その結果、プロテオグリカンが石灰化球の結晶と連続する像が観察されたことから、プロテオグリカンが結晶成長の足場になっている可能性が示唆された。また、プロテオグリカンの組成に関しては、幼弱な骨基質に、デコリン、バイグリカン、ベルシカン、コンドロイチン4-硫酸、ケラタン硫酸等が観察され、様々なプロテオグリカンが石灰化におけるカルシウムの保持や集積に関与しているものと推測された。

(B) 石灰化開始部位におけるミネラル集積機構

骨形成部位の石灰化開始機序を解明するため、生後8ヵ月-18ヵ月のラット脛骨骨梁あるいは頭蓋骨内骨膜の微細形態を胎生19.5日と比較して観察した。いずれの時期においても、骨芽細胞と石灰化基質の間に類骨が介在し、そこにはヒドロキシアパタイト結晶と思われる針状結晶を内包する脂質2重膜に囲まれた基質小胞が観察された。以上の結果より、胎仔における初期石灰化部位のみならず成獣ラットにおける骨形成の石灰化においても、基質小胞が関与していることが明らかとなった。

(C) 結晶析出制御機構を担う有機質性結晶鞘の解析

ヒドロキシアパタイト結晶と有機質との相互関係をさらに詳細に解析するために、石灰化球の結晶の内部構造、並びに周囲の有機構造を、微細形態学的、細胞組織化学的に解析した。石灰化球の内部にはヒドロキシアパタイト結晶の集積が観察され、その周囲には有機性の結晶鞘が観察された。この構造は、結晶と密接な関係を保っていることから、石灰化結晶の析出や成長に重要な役割を果たすと考えられ、骨シアロ蛋白やオステオポンチンなどによって構成されていることが明らかとなった。

(D) コラーゲン細線維に対するヒドロキシアパタイト結晶沈着機構の解明

コラーゲン細線維やその他の基質蛋白等に対するヒドロキシアパタイト結晶沈着機構解明の一助とすることを目的として、ヒト永久臼歯の象牙質を集束イオンビーム加工装置で厚さ約100nmに超薄切加工し、加速電圧200KVのエネルギーフィルター透過型電子顕微鏡 (EFTEM) で観察した。象牙質基質には、幅約10nm、長さ50-100nmの針状結晶が集積し、その周囲には結晶鞘と思われる電子透過性構造が観察された。これらの針状結晶は2-3本がside-to-sideで集合し、束を作る傾向を示していた。

EFTEMによるelectro nspectroscopic image法を用いてCおよびCaの局在を観察すると、Cは針状結晶あるいは象牙細管以外の領域に局在が見られ、特に針状結晶の隣接部にはCが多く局在する部位も見られたのに対し、Caは、象牙細管を除く広い領域に局在が見られた。Cは象牙質の有機成分を反映しており、結晶鞘等の構成成分となっていると思われた。Caは結晶の部位以外にも存在し、基質蛋白などと結合して石灰化結晶の形成や維持に関与していると考えられた。

キーワード： 生物学的石灰化、骨、プロテオグリカン、微細形態、エネルギーフィルター透過型電子顕微鏡

本研究課題の目的と意義

骨の石灰化に関する基礎的知見が蓄積する一方、機序解明に必須な、石灰化に伴う分子レベルでの構造変化と微小ミネラル環境の定量的評価に関する情報は、依然、不足している。この原因としては、生理的石灰化現象を忠実に再現できる*in vitro*の系がない事、あるいは、*in vivo*の系においても試料作成中に糖鎖などの不安定な構造が変形したり、ミネラルが流出するため正確な評価ができない事、などが挙げられる。

一方、近年エネルギーフィルター透過型電子顕微鏡 (EFTEM) が開発された。元来、透過型電顕は、透過する電子と散乱する電子のコントラストによって、像を可視化する。透過する電子の一部には、元素の外殻電子と衝突してエネルギーを失う非弾性散乱電子も含まれており、このような非弾性散乱電子は従来の透過型電顕ではノイズの原因となっていた。しかし、EFTEMは、任意の電子エネルギー損失を有する非弾性散乱電子を可視化する事ができるので、電子エネルギー損失量をOeVに設定すると、ノイズの多くが除去され、従来の電顕と比べて高コントラストの画像が得られる。また、各元素は、固有の電子エネルギー損失を有するので、この性質を利用して、特定の電子エネルギー損失を有する非弾性散乱電子を可視化するとTEMレベルで元素をマッピングすることができる。この技術は、従来の元素分析法である、electron probe X ray microanalysisを空間分解能ではるかに凌駕する。申請者の所属機関にもEFTEMの一種であるCarl Zeiss 902が設置されている。申請者らは、平成11年度の貴研究助成を受け、この電顕を用いて石灰化に伴うカルシウム・リンの共在化現象を発見した。すなわち、非石灰化部位においては、カルシウムは主にプロテオグリカンの部位に、リンは主にコラーゲン細線維の領域に局在しており、それぞれが別々の部位に集積しているため石灰化が抑制されている一方、石灰化開始部位においてはカルシウム・リンの共在化が起これ、石灰化が進行することを明らかにした<Hoshi, Ozawa et al J Bone Miner Res 2001>。

本計画では、このカルシウム・リン共在化機構をさらに詳細に検討するため、ミネラル流出や構造変形を防止できる凍結技法を用いて、プロテオグリカンやコラーゲンの分子構造の詳細な解析や、微小ミネラルの詳細な評価を試みる。石灰化に伴うコラーゲンやプロテオグリカンなどの有機成分の分子形態と微小ミネラル環境の変化を厳密に且つ詳細に評価することにより、骨石灰化の分子機構を包

括的に解明することが本研究の目的である。

各研究計画の成果及び進行状況

研究計画の成果及び進行状況に関しては、申請時の研究計画に対応させて、現時点での研究成果を以下に記載した。

(A) 非石灰化部位における有機質の構造同定

[目的] 骨基質はヒドロキシアパタイトと呼ばれるリン酸化カルシウム結晶と様々な有機質によって構成されている。これらの有機質には、骨基質の基調となるⅠ型コラーゲンの他、多く陰性荷電を有するプロテオグリカンや、酸性アミノ酸を豊富に含む非コラーゲン性基質蛋白などが含まれる。骨において石灰化が進行する際には、ミネラルに相互関係を有する有機質が何らかの重要な役割を果たすものと推測される。

本研究では、ミネラルと有機質の相互関係を解明することを目的として、これらの有機基質の微細形態を、形態保持の最も優れている急速凍結法を用いて観察するとともに、細胞組織化学を用いてプロテオグリカンなどの有機質の組成を同定した。

[方法] すべての実験過程は、新潟大学歯学部動物実験委員会の承認を得て行った。エーテル麻酔の後、妊娠19.5日の妊娠ラットから胎仔を摘出し、一部は液体ヘリウムで凍結固定を行い微細形態観察用の試料とし、また一部は、アルデヒド溶液で化学固定し細胞組織化学用とした。微細形態用試料は、オスミウムアセトンで凍結置換を行った後、エポキシ樹脂に包埋し、超薄切の後、透過型電子顕微鏡で観察した。

組織細胞化学は、プロテオグリカンのコア蛋白であるデコリン、パイグリカン、ベルシカンについて、あるいはグリコサミノグリカン鎖（GAG鎖）に関しては、コンドロイチン4-硫酸、コンドロイチン6-硫酸、ケラタン硫酸について、光顕レベルでは凍結切片を用いた酵素免疫法で、電顕レベルではLRGold樹脂を用いたpost-embedding金粒子法を用いて検出した。

[結果と考察] 胎生期頭蓋骨の骨基質では、非石灰化部位から石灰化部位へと移行するに従い、骨芽細胞が分泌した基質小胞内に石灰化結晶が析出し、成長して石灰化球となり、さらに石灰化球が拡大して隣接したコラーゲン細線維を石灰化して最終的には広範な石灰化基質が形成される過程が観察される。

微細形態用試料を透過型電顕で観察すると、初期石灰化部位においては基質小胞や石灰化球周辺には、コラーゲン細線維とプロテオグリカンと思われる細い線維構造のメッシュワークが密に観察された。さらにプロテオグリカンと思われるメッシュワークと石灰化球の関係を詳細に観察すると、プロテオグリカンの線維構造と石灰化球の結晶が連続して観察される部位が見られることから、石灰化球の結晶成長においてプロテオグリカンがその足場になっている可能性が示唆された。

一方、プロテオグリカンの組成に関しては、骨基質、特に石灰化していない類骨に、コア蛋白では

デコリン、バイグリカン、ペルシカンのすべてが観察された。GAG鎖に関しては、コンドロイチン 4-硫酸、ケラタン硫酸が観察されたのに対しコンドロイチン 6-硫酸の局在は見られなかった。免疫電顕で骨におけるGAG鎖の局在を観察したところ、コンドロイチン 4-硫酸、ケラタン硫酸いずれも石灰化球に局在が観察されたが、非石灰化部位のコラーゲン細線維周囲にはコンドロイチン 4-硫酸のみが観察された。このように、石灰化進行部位には様々な種類のプロテオグリカンが局在しており、カルシウムの保持や集積に関与しているものと推測された。

(実験終了、Journal of Electron Microscopy 2001, Hoshi, K, Ozawa H, et al,印刷中)

(B) 石灰化開始部位におけるミネラル集積機構

[目的] 骨組織が軟部組織において新規に形成される機序には、長幹骨における内軟骨骨化と、頭蓋骨の発生等で見られる膜性骨化の2種類がある。これらの骨化は骨格の発生過程で観察され、個体の形態形成に重要な役割を果たす。骨化によって生じた骨は、形成と吸収が異なる場所で生じるモデリングにより発育・成長し、さらに成長が終了した骨においては、恒常的に骨基質の吸収とそれにカップリングした骨形成が起こり、骨のリモデリングがなされる<Frost 1973>。このリモデリング現象は、ヒトや大動物の皮質骨では、破骨細胞とそれに続く骨芽細胞の細胞列からなるBasic multicellular unit (BMU) <Frost 1973>あるいはBone Remodeling Unit (BRU) <Parfitt 1979>により営まれ、その結果、セメントラインに囲まれた特有の層板構造であるオステオンが新たに形成される<Jee, 1983>。オステオン構造を呈さない海綿骨<Jee, 1983>や小動物の骨<Oguro 1989>においても、BMUが観察され、骨吸収を伴う骨形成と、古い骨基質の新しい骨基質への恒常的な置換が観察される。このような、BMUにおける骨形成は、既存の石灰化基質に隣接した部位に形成される点で、内軟骨骨化や膜性骨化と区別される。

内軟骨骨化における軟骨基質あるいは膜性骨化によって作られる骨基質の石灰化機構に関しては、基質小胞の関与が指摘されている<Anderson 1967, Bonucci 1967, Bernard 1969>。元来、基質小胞は、石灰化軟骨の細胞外基質において発見された脂質2重膜に囲まれた直径40-200nm程度の構造で<Anderson 1967, Bonucci 1967>、この小胞構造は頭蓋骨の膜性骨化部位においても観察され<Bernard 1969>、内軟骨骨化においては軟骨細胞が、膜性骨化の場合には骨芽細胞が分泌する事が知られている。基質小胞内にはしばしばヒドロキシアパタイト (HA) 結晶が観察され、そこには石灰化結晶形成成長阻害因子であるプロテオグリカンやピロリン酸の除去に関与するMMP-3 <Shmitz 1996> やアルカリホスファターゼ <Freisch 1961, Matsuzawa, 1971> や、カルシウムの汲み上げに関与するアネキシン <Kirsch 1997> 等が存在することから、初期石灰化におけるHA結晶は最初に基質小胞内に析出すると考えられている。基質小胞内に析出したHA結晶はその後成長を続け、石灰化球を形成し、個々の石灰化球が拡大、癒合して、周囲に存在するコラーゲン細線維等の有機質に沿って伸展し (コラーゲン性石灰化)、連続した石灰化基質の形成に至る。この様な基質小胞は、内軟骨性骨化の軟骨や、頭蓋骨の膜性骨化部位以外にも、骨髄移行部 <Yamada 1976>、象牙質形成部位 <Ozawa 1972, Yamada 1978>、鹿角形成部位 <Sayegh 1974> や、骨折部位 <Lowe 1983>、骨肉腫 <Muhlarad 1978>、動脈硬化

〈Peagle 1969〉、歯石形成〈Vogel 1971〉などの病変部や、BMPにより誘導される骨〈Hoshi 1997〉等においても観察され、広義の硬組織が新規に形成される部位に出現し、石灰化結晶形成の初期過程を制御すると考えられている。

内軟骨骨化あるいは膜性骨化以外の骨形成における石灰化においては、胎生期のニワトリ胚の脛骨類骨のように、骨基質形成が旺盛で、急速な石灰化が進行する部位で観察されており、基質小胞性石灰化が確認されている〈Bonucci 1971、Plumbo 1986〉。しかし、成熟骨に見られる、BMUの骨形成における石灰化機構に関しては、既存の石灰化領域の拡大による石灰化の可能性や、骨芽細胞が新たに分泌する基質小胞を介して石灰化する可能性等が推測されているが、詳細は不明である。本研究では、急速な骨形成が終了した骨形成における石灰化開始機構を明らかにする事を目的として、生後8ヵ月-18ヵ月のラット脛骨骨梁あるいは頭蓋骨内骨膜の微細形態を、成長期の胎生19.5日のものと比較し観察した。

[材料と方法]

標本作製

Diethyl etherによる吸入麻酔とペントバルビタールナトリウム (30mg/kg) の腹腔内投与の後、胎生19日Wistar rat胎仔4匹 (約1.9g)、および成獣Wistar rat 4匹 (8ヵ月2匹、10ヵ月1匹、18ヵ月1匹、640-720g) を、左心室にカテーテルを刺入し、灌流固定をした。固定液には、0.05-0.067Mカコジル酸緩衝液で緩衝した2%パラフォルムアルデヒド・2.5%グルタルアルデヒド混合溶液 (pH7.4) を、胎仔は1匹あたり2ml、成獣は1000ml使用した。灌流固定後、脛骨あるいは頭蓋骨を摘出し、胎仔骨は手動的に、成獣骨はBand saw BS-3000 (Meiwa, Osaka, Japan) を用いて厚さ1mmに薄切し、それぞれの固定液に4℃で12時間浸漬した。洗浄後、一部の試料は4.13%EDTAで脱灰した後、さらに0.1Mカコジル酸緩衝液で緩衝した1%4酸化オスミウム (pH7.4) で後固定した後、上昇エタノール系列および酸化プロピレンで脱水、浸透してPoly/Bed 812 resin (Polysciences, Warrington, PA) に包埋した。

組織学的および組織化学的観察

Microtome、Ultracut UCT (Leika, Wien, Austria) を用いて、Poly/bedに包埋した試料の厚さ1mmに準超薄切し、リン酸カルシウムの局在を同定するためにフォンコッサ染色を行った後に、トルイジンブルー染色を加えるか、もしくはトルイジンブルー染色単独で、光顕で観察した。

微細構造の観察

切片上での脱灰を予防するために、超薄切片の採取の際には、蒸留水の代わりにエチレングリコールを使用して、厚さ60nmの超薄切片を得た。超薄切片はヒドロキシアパタイト結晶を保持するために無染色のまま、あるいは特に脂質二重膜を強調するときには酢酸ウラン、クエン酸鉛の2重染色を行い、カーボンコーティングを施し、透過型電子顕微鏡 (TEM) (JEM-100CX II, JOEL, Tokyo, Japan, or H7100B, Hitachi, Tokyo, Japan) で観察した。

[結果] 生後18ヵ月ラット脛骨の近位を観察すると、成長板は閉鎖しており、骨幹端の骨梁には破骨

細胞が見られ、近接した骨基質表面には楕円形の骨芽細胞が一系列に配列し、破骨細胞から離れるに従って徐々に骨芽細胞は扁平化していった。以降、このような骨芽細胞が円形あるいは楕円形を呈する、基質産生が行われていると思われる部位を観察した。

生後18ヵ月の脛骨骨梁の骨形成部位を非脱灰で観察すると、骨芽細胞とフォンコッサ陽性の石灰化基質の間に、類骨が存在しており、この部位にはトルイジンブルー好性の、顆粒状構造物が観察された。胎生期脛骨骨梁は類骨が豊富で広範な領域に同様なトルイジンブルー好性顆粒状構造物が存在していた。このような領域を、さらにTEM観察すると、いずれの時期においても、顆粒状構造物に一致して基質小胞あるいは石灰化球が認められた。このような基質小胞あるいは石灰化球は、生後18ヵ月に比べ胎生19.5日に密に存在している傾向があった。脂質2重膜に囲まれた基質小胞内にはHAと思われる針状結晶が観察され、基質小胞性石灰化が認められた。

生後18ヵ月齢ラット頭蓋骨の内骨膜においても、骨形成の過程が連続的に観察された。類骨層が豊富な部位においては、光顕レベルでも石灰化球と思われるトルイジンブルー好性顆粒状構造物は観察された。一方、類骨層が非薄化する領域でも、電顕レベルでは、まれに結晶を有する基質小胞が観察され、このような部位でも基質小胞性石灰化が生じることが示唆された。

生後8ヵ月あるいは10ヵ月齢ラット以外の成獣の脛骨骨梁類骨や頭蓋骨の骨形成部においても同様に基質小胞性石灰化が観察された。

[考察] ラット脛骨の骨成長は、1989年にWronskiらにより評価されており、Sprague Dawleyラットでは生後120日で成長速度がプラトーに達し、生後450日で長軸方向の成長はほぼ停止する事が知られている<Wronski 1989>。本研究で用いた成獣ラットにおいても骨成長が鈍化していたと予想され、特に、生後18ヵ月のものはすでに成長板が閉鎖しており、骨成長が停止していた。このような成獣ラットの脛骨骨梁において、破骨細胞による骨吸収から骨芽細胞による骨形成にいたる一連の細胞配列であるBMUが観察され、最高生後18ヵ月の老齢ラットにおいてもBMUによる骨の置換が生じていることが再確認された。さらに、この時期のラット脛骨骨梁における微細構造学的解析から、骨成長が停止した脛骨においても、BMUの骨形成部位を観察すると、基質小胞性石灰化が存在しており、骨基質の石灰化には、既存の石灰化領域の拡大とは別に、骨芽細胞が分泌する基質小胞を介した経路が存在することが明らかとなった。

一方、胎生期ラット脛骨では成長が著しく、骨は盛んにモデリングされていると思われる。したがって、胎生期の脛骨骨梁の骨形成は、BMUにおける骨形成とは異なる機構で誘導され、進行すると予想される。骨梁には基質小胞や石灰化球が密に且つ広範に局在する類骨が豊富に観察された。

しかし、観察された基質小胞は、胎仔、成獣いずれも直径40-200nm程度で、巾約7nmの脂質2重膜に囲まれており、個々の形態には特異的な相違はなかった。胎仔、成獣間の基質小胞あるいは石灰化球の分布の相違は、石灰化が進行する面積の相違を反映していると推測され、HA結晶を内包する基質小胞が石灰化球に成長し、いずれは連続した石灰化基質を形成する事を考えると、細胞が多数の基質小胞を広範な領域に分泌すれば、より広範に且つ急速に石灰化領域を広げる事ができると予想され

る。このように、基質小胞は、石灰化の範囲と速度を制御するために骨芽細胞が分泌する機能構造体であると考えられた。

さらに、成獣ラットの骨形成においては石灰化が進行し、類骨層が非薄化し、石灰化前線様の構造が形成される部位においてもごくわずかではあるが基質小胞が観察され、基質小胞性石灰化が行われていることが示唆された。ラット切歯のdentin形成においては、石灰化が進行し石灰化前線が観察されるようになると、基質小胞が観察されないと報告されている〈Eismann 1972〉。骨基質は、象牙質とは異なり、断続的な添加を繰り返しながら層板構造を形成するため、石灰化過程に対する細胞性制御がより強く働くものと推測された。

成獣で観察される骨形成は、主に破骨細胞による骨吸収の後に、カップリングしている骨芽細胞により行われと思われるが、一部には基質合成を休止しlining cell様となった骨芽細胞が、再度基質合成を開始した際に起こる可能性も否定できない〈Chow 1997〉。破骨細胞は骨あるいは石灰化軟骨の吸収の後、セメントラインを形成する〈Tran Van 1982〉。また、骨芽細胞が基質合成を休止しlining cell様細胞となる場合、類骨が消失し石灰化基質との界面にラミナリミタンスを形成する〈Sherft 1972〉。従って、既存骨へ沈着される骨形成は原則としてセメントライン様構造か、あるいはラミナリミタンス様構造によって境界されると考えられる。一方、これらの構造は、ともにプロテオグリカンやオステオポンチン、オステオカルシン等の非コラーゲン性骨基質の集積を伴う事が知られている〈Schferft 1972, Schaffler 1987, McKee 1992〉。プロテオグリカンやオステオポンチン等の非コラーゲン性骨基質には石灰化結晶形成成長抑制作用があるため〈Chen 1985, Hunter 1996〉、石灰化領域の拡大においてセメントライン様構造やラミナリミタンス様構造は構造上の障害となる可能性が推測される。今後は、ヒトや大動物などのオステオンにおける骨形成の観察をし、さらに、種や部位を広げて骨形成における基質小胞性石灰化の重要性を検証して行く必要がある。

[文献]

- Anderson, H. C. 1967 Electron microscopic studies of induced cartilage development and calcification. *Journal of Cell Biology*, 35: 81-101.
- Bernard, G. W. and D. C. Pease 1969 An electron microscopic study of initial intramembranous osteogenesis. *American Journal of Anatomy*, 125: 271-90.
- Bonucci, E. 1967 Fine structure of early cartilage calcification. *Journal of Ultrastructure Research*, 20: 33-50.
- Bonucci, E. 1971 The locus of initial calcification in cartilage and bone. *Clinical Orthopaedics & Related Research*, 78: 108-39.
- Chen, C.C. and A. L. Boskey 1985 Mechanisms of proteoglycan inhibition of hydroxyapatite growth. *Calcified Tissue International*, 37: 395-400.
- Chow, J. W.M., A.J. Wilson, T.J. Chambers and S. Fox 1997 Mechanical loading stimulates bone formation by activation of bone lining cells. *J Bone Miner Res*, 12: S111.

Fleisch, H. and W. Neuman F 1961 Mechanisms of calcification: role of collagen, polyphosphates, and phosphate. *Am.J. Physiol*, 200:1296-1300.

Frost HM (1973) Bone remodeling and its relationship to metabolic bone disease, Orthopaedic lectures volume III. Charles C Thomas Publisher, Springfield, Illinois

Hoshi, K., N. Amizuka, T. Kurokawa and H. Ozawa 1997 Ultrastructure and immunolocalization of transforming growth factor-beta in chondrification of murineligamentous fibroblasts and endochondral calcification induced by recombinant human bonemorphogenetic protein-2. *Acta Histochem Cytochem*, 30; 3710379

Hunter, G. K., P.V. Hauschka, A.R. Poole, L. C. Rosenberg and H.A. Goldberg 1996 Nucleation and inhibition of hydroxyapatite formation by mineralized tissue proteins. *Biochemical Journal*,

Jee WSS, The skeletal tissues. ed by Weiss L, *Histology, Cell and Tissue Biology*. 5th ed., The MacMillan Press, London, Basingstoke, UK, 1983, PP200

Kirsch, T., H.D. Nah, I.M. Shapiro and M. Pacifici 1997 Regulated production of mineralization-competent matrix vesicles in hypertrophic chondrocytes. *Journal of Cell Biology*, 137: 1149-60.

Lowe, J., I. Bab, H. Stein and J. Sela 1983 Primary calcification in remodeling haversian systems following tibial fracture in rats. *Clinical Orthopaedics & Related Research*

Matsuzawa. T. and H.C. Anderson 1971 Phosphatases of epiphyseal cartilage studied by electron microscopic cytochemical methods. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 19: 801-8.

McKee, M.D., M.J. Glimcher and A Nanci 1992 High-resolution immunolocalization of osteopontin and osteocalcin in bone and cartilage during endochondral ossification in the chicken tibia. *Anatomical Record*, 234: 479-92.

Muhlrad, A, H. Stein, I.A. Bab and J. Sela 1987 Fine structure and enzymes of matrix vesicles in osteosarcoma: possible occurrence of contractile proteins. *Metab Bone Dis Rel Res*, 1: 227-233.

Oguro I, Ozawa H 1989 Cytochemical Studies of the Cellular Events Sequence in Bone Remodeling: Cytological Evidence for a Coupling Mechanism. *J Bone Miner Metab* 7 (1) 30-36

Ozawa, H. and T. Yajima 1972 Ultrastructure and cytochemistry of matrix vesicles in the developing cartilage and tooth germ. *Proc 4th Cong Histochem Cytochem, Kyoto*, 311.

Paegle, R.D. 1969 Ultrastructure of calcium deposits in arteriosclerotic human aortas. *Journal of Ultrastructure Research*, 26:412-23.

Palumbo, C. 1986 A three-dimensional ultrastructural study of osteoid-osteocytes in the tibia of chick embryos. *Cell & Tissue Research*, 246: 125-31.

Sayegh, F.S., G.C. Solomon and R. W. Davis 1974 Ultrastructure of intracellular mineralization in the deer's antler. *Clinical Orthopaedics & Related Research*, 99: 267-84.

Schaffler. M.B., D.B. Burr and R.G. Frederickson 1987 Morphology of the osteonal cement line in

human bone. *Anatomical Record*, 217: 223-8.

Scherft, J.P. 1972 The lamina limitans of the organic matrix of calcified cartilage and bone. *Journal of Ultrastructure Research*, 38: 318-31.

Schmitz; J.P., D.D. Dean, Z. Schwartz, D.L. Cochran, G.M. Grant, R.J. Klebe, H. Nakaya and B.D. Boyan 1996 Chondrocyte cultures express matrix metalloproteinase mRNA and immunoreactive protein; stromelysin-1 and 72 kDa gelatinase are localized in extracellular matrix vesicles. *Journal of Cellular Biochemistry*, 61: 375-91.

Tran Van. P., A. Vignery and R. Baron 1982 Cellular kinetics of the bone remodeling sequence in the rat. *Anatomical Record*, 202:445-51.

Vogel, J.J. and J. Ennever 1971 The role of a lipoprotein in the intracellular hydroxyapatite formation in *Bacterionema matruchotii*. *Clinical Orthopaedics & Related Research*, 78: 218-22.

Wronski, T.J., L., M. Dann, K. S. Scott and M. Cintron 1989 Long-term effects of ovariectomy and aging on the rat skeleton. *Calcified Tissue International*, 45: 360-6.

Yamada, M. 1976 Ultrastructural and cytochemical studies on the calcification of the tendon-bone joint. *Arch Histol Jap*, 39:347-378.

Yamada, M. and H. Ozawa 1978 Ultrastructural and cytochemical studies on the matrix vesicle calcification in the teeth of the killifish, *Oryzias latipes*. *Archivum Histologicum Japonicum Nippon Soshikigaku Kiroku*, 41: 309-23.

(実験終了、*Calcified Tissue International* 2000、Hoshi K, Ozawa H, et alに掲載)

(C) 結晶析出制御機構を担う有機質性結晶鞘の解析

[目的] ヒドロキシアパタイト結晶と有機質との相互関係をさらに詳細に解析するために、石灰化球の結晶の内部構造、並びに周囲の有機構造を、微細形態学的、細胞組織化学的に解析した。

[方法] エーテル麻酔の後、妊娠19.5日の妊娠ラットから胎仔を摘出し、一部は液体ヘリウムで凍結固定を行い微細形態観察用の試料とし、残りは、アルデヒド溶液で化学固定し細胞組織化学用とした。凍結固定を行った試料は、オスミウムアセトンで凍結置換を行った後、エポキシ樹脂に包埋し、超薄切の後、透過型電子顕微鏡で観察した。

組織細胞化学は、骨シアロ蛋白およびオステオポンチンについて、LRGold樹脂を用いた post-embedding 金粒子法を用いて電顕レベルで検出した。

[結果と考察] 非脱灰切片で通常の電顕観察すると、石灰化球の内部には幅10nm長さ100nm程度の電子密の結晶様構造の集積が観察される。それらの結晶様構造を加速電圧300KVの高分解能観察すると、結晶間隔が8.14Åの六角格子が観察され、ヒドロキシアパタイトであることが確認された。この切片を電子染色し、切片上で脱灰すると、結晶に対応する部位が電子明構造として観察され、逆に周囲が電子密として観察される。この幅約10nmの電子密構造は、有機性の結晶鞘と考えられ、結晶と密接な関係を保っていることから、石灰化結晶の析出や成長に重要な役割を果たすと考えられた。

さらに結晶鞘の組成を同定するために、骨シアロ蛋白とオステオポンチンの免疫電顕を行ったところ、両者とも結晶鞘の部位と一致した局在性を示したことから、いずれも結晶鞘の構成要素となっていることが示唆された。

(実験終了、Journal of Electron Microscopy 2001, Hoshi K, Ozawa H, et al, 印刷中)

(D) コラーゲン細線維に対するヒドロキシアパタイト結晶沈着機構の解明

[目的] ヒト象牙質は無機含有量が73%を占め、96%の無機成分を有するエナメル質に比べるとやや低いものの、エナメル質同様、非脱灰試料のまま超薄切し、透過型電子顕微鏡 (TEM) で微細形態を観察するのは困難である (Weatherell 1973)。しかし、近年、ガリウムイオンを照射し、イオンスパッタリングの原理で繊細な加工を行うことができる集束イオンビーム加工装置 (FIB) が開発された。この装置を用いると、ダイヤモンドナイフによる超薄切が困難であった硬い試料でも超薄切加工が可能となる (Ishitani 1996)。FIBは生物材料への応用も試みられており、FIBで超薄切加工したヒトエナメル質を加速電圧200KVのTEMで観察し、エナメル結晶の結晶格子を観察した報告がある (Yaguchi)。しかし、エナメル質に比べやや有機質や水分含有量が多い象牙質に関してはFIBを使用した報告はない。

一方、最近、エネルギーフィルター透過型電子顕微鏡 (energy-filtering transmission electron microscopy, EFTEM) の発達が進んでいる。この電子顕微鏡はさまざまなエネルギーを持った電子線を像にすることができる。すなわち、電子エネルギー損失がOeVの電子線を像にすれば、非弾性散乱電子が除去できるため従来のTEM像より高分解能の像を得ることができ、また元素に固有の電子エネルギー損失を伴った電子線を像にするとその元素をマッピングすることができる (electron energy loss spectroscopic imaging, ESI)。ESIは、生物系の研究ではCaやP等の元素のマッピングに応用されてきたが (Arsenault 1988, Arsenault 1991, Grohovaz 1996)、生物の主要構成元素であるCに関しては、試料を樹脂する樹脂や支持膜に大量のCが含まれているため、ESIが困難であった。近年、二重作らのグループがSiO₂支持膜の作成に成功し、大腸菌のC局在を観察した (Hutaesaku 1999)。一方、象牙質は結晶成分も多く強度があるため、超薄加工が可能であれば無包埋、無支持膜でTEM観察ができ、またCやCaなどのマッピングができると予想された。

象牙質の微細構造や有機質・無機質の相互関係が明らかになれば生物学的石灰化、特にコラーゲン細線維やその他の基質蛋白等に対するヒドロキシアパタイト結晶沈着機構に関する重要な情報が提供できる。本研究では、石灰化機構解明の一助とすることを目的として、非脱灰、無包埋の象牙質にFIB超薄切加工を試み、加速電圧200KVのEFTEMによる高分解能微細形態の観察を行うとともに、ESIによりヒドロキシアパタイトの構成元素であるCaと有機質の主要元素であるCの元素マッピングを行った。

[材料と方法]

標本作製

抜歯後、中性ホルマリンに浸漬し、洗浄後風乾したヒト永久臼歯を用いた。Band saw BS-3000

(Meiwa, Osaka, Japan) を用いて作成した厚さ 1 mm の象牙質切片を、さらに、手動的に厚さ 100 μ m まで研磨した。エナメル象牙質境界付近を巾 1 mm、高さ 0.5 mm にトリミングし、U 字型メッシュにマニキュアで張り付けた。加工あるいは観察時のチャージアップを予防するため厚さ 20 nm 程度に Pt 蒸着した後、FIB 加工観察装置 FB-2000A (Hitachi, Tokyo, Japan) を用いて、象牙質切片を掘削加工した。加速電圧は 30 kV で、粗加工はビーム電流 12 nA、ビーム径 800 nm で行い、厚さ 1 μ m の薄切部を作り、順次ビーム電流、ビーム径を減少させて、仕上げ加工 50 pA、50 nm で、薄切部の両端 2 か所に厚さ約 100 nm の超薄切部を作った (Fig 1 B)。加工に要した時間は、合計 6 時間であった。HF-2000 cold-FE TEM (Hitachi) を用い、加速電圧 200 kV で加工部位を確認した。

微細構造観察および C、Ca の元素マッピング

微細構造は、LEO922 (LEO, Stuttgart, Germany) を用い、加速電圧 200 kV、エネルギーフィルター 0 eV、slit 巾 10 eV で、無染色で観察し、撮影にはイメージングプレート (Fuji film, Tokyo, Japan) を使用した。

C、Ca の元素マッピングはイメージングプレートを用い、slit 巾 10 eV の 2-window 方式で解析した。C は pre-edge を 255 eV、peak を 295 eV、Ca は pre-edge 325 eV、peak 355 eV で撮影し、イメージングプレート上の画像情報は画像解析ソフト Image Guage および L-process (Fuji film) で処理した。EELS スペクトルは、イメージングプレート上に撮影し、Image Guage で測定した。

[結果] FIB で掘削した象牙質超薄切片においては、直径 0.1 mm 程度の終末象牙細管と思われる電子透過構造と、針状結晶の集積が観察された。針状結晶を拡大して観察すると、針状結晶の長さはおおよそ 50 nm から 100 nm に達するものもあった。幅は全長にわたりおおよそ 10 nm で、一定の幅を保っているが、両端部では幅が減少し鈍角を呈していた。結晶周囲には不定形の電子密領域が観察されたが、不定形の電子密領域と針状結晶の境界部には結晶鞘と思われる 1 nm 程度の電子透過領域が存在していた。このような針状結晶は 2-3 本が side-to-side で集合し、束として存在する傾向があった。

C と Ca の ESI を観察すると、C は針状結晶あるいは象牙細管以外の領域に局在が見られ、特に、針状結晶の隣接部には C が多く局在する部位も見られた。Ca は、針状結晶の領域のみならず、象牙細管を除く広い領域に局在が見られた。この部位の EELS スペクトルでは、C と Ca に対応する 295 eV および 355 eV のピークが観察された。

[考察] 本研究では、FIB で加工した約 100 nm の無包埋象牙質超薄切片を用いたが、加工時に生じる熱による著しい損傷はなく、石灰化結晶が明瞭に観察された。また、加速電圧 200 kV の EFTEM を使用することにより、高分解能の画像所見を得ることができた。

Frank らはヒト管間象牙質の石灰化結晶は、幅 36 nm、厚さ 10 nm 程度で、板状の形状を呈していることを記載した (Frank 1978)。Schroeder らも、ヒト管周象牙質では石灰化結晶が長さ 36 nm、幅 25 nm、厚さ 10 nm であったとし、管間象牙質の結晶よりも小型ではあるが、同様に板状結晶を呈していること指摘した (Schroeder 1985)。一方、本研究では、石灰化結晶は、幅約 10 nm、長さ 50-100 nm の針状結晶として観察され、個々の結晶は、2-3 本集合し、平行に走行していた。Arnold らは、象牙質の板状

結晶は、初期に形成された針状結晶が、side-to-sideで癒合してできると考えている〈Arnold 1997〉。集合している針状結晶は、一部で境界不明瞭となる部位はあったが、概して一本一本は明瞭に識別することができ、板状結晶の形成に至る癒合が必ずしも結晶全長で行われる訳ではないと思われた。

歯の無機塩はわずかな混入はあるものの、ほとんどがリン酸カルシウムであるため〈Weatherell 1973〉、観察されたC元素の局在は、有機成分を反映すると考えられる。結晶の周囲にCの局在が見られ、象牙基質に存在するI型コラーゲンやプロテオグリカン、非コラーゲン性基質蛋白〈ten Cate 1985〉などに起因すると思われた。また、Cは結晶にほぼ接した部位より局在している部位もあり、このような部位は結晶鞘と思われる電子透過性構造に相当する。従って結晶鞘もなんらかの有機質性物質より構成されていると思われる。結晶鞘は石灰化結晶に隣接し密接な関係を保つことから、結晶の形成・成長の制御を担っているものと推測された。

一方、Caに関しては、針状結晶の領域やその周囲の不定形電子密領域以外にも広く分布していた。象牙質の基質蛋白には、プロテオグリカン〈Takagi 1990〉のほかオステオカルシン〈de Vries 1988〉やオステオポンチン〈McKee 1996〉、骨シアロ蛋白〈Chen 1993〉などの骨と共通のものや、象牙質に固有のdentine phosphophoryn〈Butler 1997〉などが含まれており、これらの蛋白はCa結合能を有することが知られている。非結晶性のCaの一部はこのような蛋白と結合して保持され、石灰化基質形成におけるCaの集積機構を担うと同時に、石灰化結晶成長における抑制的調節にも関与していると思われた。

[文献]

Arnold, S., U. Plate, H.P. Wiesmann, H. Kohl and H.J. Hohling 1997 Quantitative electron-spectroscopic diffraction (ESD) and electron-spectroscopic imaging (ESI) analyses of dentine mineralization in rat incisors. *Cell & Tissue Research*, 288: 185-90.

Arsenault, A. L., F. P. Ottensmeyer and I. B. Heath 1988 An electron microscopic and spectroscopic study of murine epiphyseal cartilage: analysis of fine structure and matrix vesicles preserved by slam freezing and freeze substitution. *Journal of Ultrastructure & Molecular Structure Research*, 98: 32-47.

Arsenault, A L., B. W. Frankland and F.P. Ottensmeyer 1991 Vectorial sequence of mineralization in the turkey leg tendon determined by electron microscopic imaging. *Calcified Tissue International*, 48: 46-55.

Butler, W.T., H.H. Ritchie and A.L. Bronckers 1997 Extracellular matrix proteins of dentine. *Ciba Foundation Symposium*, 205: 107-15.

Chen, J., C.A. McCulloch and J. Sodek 1993 Bone sialoprotein in developing porcine dental tissues: cellular expression and comparison of tissue localization with osteopontin and osteonectin. *Archives of Oral Biology*, 38: 241-9.

de Vries, I.G., D. Coomans and E. Wisse 1988 Ultrastructural localization of osteocalcin in rat tooth germs by immunogold staining. *Histochemistry*, 89: 509-14.

Frank, R.M. and J.C. Voegel 1978 Dissolution mechanisms of the apatite crystals during dental caries and bone resorption. In: Molecular basis of biological degradative process. R.D. Berlin, H. Herrmann, L.I. H. and T.J. M. eds. Academic Press, New York, pp. 277-311.

Grohovaz, F., M. Bossi, R. Pezzani, J. Meldolesi and F.T. Tarelli 1996 High resolution ultrastructural mapping of total calcium: electron spectroscopic imaging/electron energy loss spectroscopy analysis of a physically/chemically processed nerve-muscle preparation. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 93: 4799-803.

Hytaesaku, Y., T. Akagi and K. Sekiya 1999 A carbon image of a cryosection of Escherichia coli by electron spectroscopic imaging (ESI). Electron microscopy, 34: 145.

Ishitani, T. and T. Yaguchi 1996 Cross-sectional sample preparation by focused ion beam: a review of ion-sample interaction. [Review] [57 refs]. Microscopy Research & Technique, 35: 320-33.

McKee, M.D., S. Zalzal and A. Nanci 1996 Extracellular matrix in tooth cementum and mantle dentin: localization of osteopontin and other noncollagenous proteins, plasma proteins, and glycoconjugates by electron microscopy. Anatomical Record, 245: 293-312.

Schroeder, L. and R.M. Frank 1985 High-resolution transmission electron microscopy of adult human peritubular dentine. Cell & Tissue Research, 242: 449-51.

Takagi, M., H. Hishikawa, Y. Hosokawa, A. Kagami and F. Rahemtulla 1990 Immunohistochemical localization of glycosaminoglycans and proteoglycans in predentin and dentin of rat incisors. Journal of Histochemistry & Cytochemistry, 38: 319-24.

ten Cate. A.R. 1985 Hard tissue formation and destruction. In: Oral histology: development, structure, and function. A.R. ten Cate eds. The C.V. Mosby company, St. Louis, pp. 101-108.

Weatherell, J.A. and C. Robinson 1973 The inorganic composition of teeth. In: Biological mineralization. I. Zipkin eds. John Wiley & Sons, New York, pp. 43-74.

Yaguchi, N., K. Ito, T. Kamino, E. Koike, T. Ichitani Hitachi technical data sheet 95
(実験終了、Journal of Microscopy 2001, Hoshi K, Ozawa H, et al 印刷中)

本研究課題に関連する研究業績

【著書】

江尻貞一、小澤英浩：

硬組織「骨」。走査電子顕微鏡。日本電子顕微鏡学会関東支部会 編
共立出版社、234-237 (447頁) 2000

Amizuka, N., White, J.H., Henderson, J.E., Karaplis, A.C., Fukushi-Irie, M., Sasaki, T., Oda, K., Goltzman, D. and Ozawa, H.:

The bipartite action of parathyroid hormone (PTH)-related peptide (PTHrP) mediating by binding PTH/PTHrP receptor and translocation to nucleolus.

Recent Res. Devel. Endocrinol. 1:233-245, 2000

網塚憲生、佐々木朝代、小澤英浩:

骨原生細胞

カルシウムと骨、朝倉書店 (印刷中)

網塚憲生、渡邊淳一、佐々木朝代、小澤英浩:

カルシトニンの標的組織と作用

カルシウムと骨、朝倉書店 (印刷中)

【総説】

網塚憲生、佐々木朝代、小澤英浩:

副甲状腺ホルモン関連ペプチド遺伝子組み替えマウスの軟骨・骨の異常

医学のあゆみ192 (6) : 740-746、2000

小澤英浩:

一筋の硬組織形態学研究への歩み【硬組織形態学の復権を目指して】

日本骨代謝学会雑誌18 (1) : 1-9、2000

網塚憲生、島村拓也、伊藤将広、佐々木朝代、小澤英浩:

骨転移に関わる細胞群

ホルモンと臨床7 (48) : 11 (585) -20 (594)、2000

星和人、小澤英浩:

骨再生療法: 分子機構からみた最新知見

リサLife Support and Anesthesia 7 (8) : 792-793、2000

Amizuka, N., Henderson, J.E., White, J.H., Karaplis, A.C. Goltzman, D., Sasaki, T. and Ozawa, H.:

Recent studies on the biological action of parathyroid hormone (PTH)- related peptide (PTHrP) and

PTH/PTHrP receptor in cartilage and bone.

Histol Histopathol 15:957-970, 2000

星和人、小澤英浩：

Carl Zeiss製エネルギーフィルター透過型電子顕微鏡

細胞32 (7) : (263) 19- (267) 23, 2000

Hoshi, K., Ejiri, S. and Ozawa, H.:

Ultrastructural, cytochemical, and biophysical aspects of mechanisms of bone matrix calcification.

Acta Anat Nippon 75: 457-465, 2000

Amizuka, N., Ozawa, H. and Sasaki, T.:

The biological action of parathyroid hormone-related peptide (PTHrP) and fibroblast growth factor receptor 3 (FGFR3) on bone and cartilage.

Acta Anat Nippon 75: 415-425, 2000

【原著】

Hoshi, K., Ejiri, S. and Ozawa, H.:

Localizational alterations of calcium, phosphorus, and calcification-related organics such as proteoglycans and alkaline phosphatase during bone calcification.

Journal Bone Miner. Res. 16(2): 289-298, 2001

Sasaki, T., Amizuka, N., Irie, K., Ejiri, S. and Ozawa, H.:

Localization of alkaline phosphatase and osteopontin during matrix-mineralization, in the developing cartilage of coccygeal vertebrae.

Arch. Histol. Cytol. 63(3): 271-284, 2000

Amizuka, N., Fukushi-Irie, M., Sasaki, T., Oda, K. and Ozawa, H.:

Inefficient function of the signal sequence of PTHrP for targeting into the secretory pathway.

Biochemical and Biophysical Research Communications 273: 621-629, 2000

Hoshi, K. and Ozawa, H.:

Matrix vesicle calcification in bones of adult rats.

Calcif. Tissue Int.66: 430-434, 2000

Fukushi-Irie, M., Ita, M., Amaya, Y., Amizuka, N., Ozawa, H., Omura, S., Ikehara, Y. and Oda, K.:

Possible interference between tissue-nonspecific phosphatase with an Arg54→Cys substitution and a counterpart with an Asp277→Ala substitution found in a compound heterozygote associated with severe hypophosphatasia.

Biochemical J.348: 633-642, 2000

Tanizawa, T., Yamaguchi, A., Uchiyama, Y., Miyaura, C., Ikeda, T., Ejiri, S., Nagai, Y., Yamato, H. and Nakamura, T.:

Early reduction in bone formation and elevated bone resorption in ovariectomized rats with special reference to acute inflammation.

Bone (in press)

Watanabe, J., Amizuka, N., Noda, T. and Ozawa, H.:

Cytochemical and ultrastructural examination for the apoptotic odontoclasts induced by the bisphosphonate administration.

Cell & Tissue Res301: 375-387, 2000

Hoshi, K., Ejiri, S. and Ozawa, H.:

Ultrastructural analysis of bone calcification by using energy-filtering transmission electron microscopy. Italian Journal of Anatomy and Embryology (in press)

Hoshi, K., Ejiri, S., Probst, W., Seybold, V., Kamino, T., Yaguchi, T., Yamahira, N. and Ozawa, H.:

Observation of human dentine by focused ion beam and energy-filtering transmission electron* microscopy.

J Microsc (in press)

Hoshi, K., and Ozawa, H.:

Organic components of crystal sheaths in bones

Journal of Electron Microscopy (in press)

Khairul. Matin M.H.M., Nakamura, H., Sato, K., Kusakari, H. and Ozawa, H.:

Effort to maintain alveolar bone mass after tooth extraction: histological analysis of the root socket after rhBMP-2 administration in rat.

Arch. Oral Biol. (submitted)

Fujii, K., Tanaka, Y., Hoshi, K., Nakamura, H., Ozawa, H., and Eto, S.:

Upregulation of ICAM-I and VCAM-I by CD44 cross linking on osteoblasts enhances osteoclastogenesis.

J. Exp. Med. (submitted)

Kawabata, S., Amizuka, N., Hanada, K. and Ozawa, H.:

The histochemical study on bone remodelling in the interradicular septum of aged rats under the orthodontical tooth movement.

Eur. J. Ortho (submitted)

Tanaka, M., Ejiri, S., Kohno, S. and Ozawa, H.:

Region-specific bone mass changes in rat mandibular condyle following ovariectomy.

J Dent Res (submitted)

Takeyama, M., Irie, K., Nakamura, H., Kominami, E., Hanada, K. and Ozawa, H.:

Immunohistochemical demonstration of cathepsin B and L in periodontal ligament (PDL) of rat molar.

J Dent. Res. (submitted)

【訳書】

池亀美華、星和人、西野幾子、柳澤宏信、柴崎伸恭、小澤英浩：

(文献訳) 低骨密度のヒト顎骨における滑面および粗面チタンインプラントの形態計測学的比較
A histometric comparison of smooth and rough titanium implants in human low-density jawbone.

クインテッセンスDental Implantology 7 (1) : 94-96, 2000

星和人、池亀美華、西野幾子、柴崎伸恭、柳澤宏信、小澤英浩：

(文献訳) 骨欠損部におけるバイオگرانとカルシタイトの使用：サルにおける組織学的研究
Use of Bio Gran and Calciite in bone defects : Histologic study in monkeys (Cebus apella) .

クインテッセンスDental Implantology7 (2) : 82-83, 2000

西野幾子、池亀美華、柳澤宏信、小澤英浩：

(文献訳) 培養歯根膜細胞を用いたチタンインプラント周囲への歯根膜形成：パイロットスタディ

Periodontal ligament formation around titanium implants using cultured periodontal ligament cells : A pilot study.

クインテッセンスDental Implantology 7 (5) : 105-109,2000

【その他】

星和人、小守壽文、小澤英浩：

Cbfa1遺伝子欠損マウスの形態学的観察

The BONE 14 (1) : (グラビア)、2000

小澤英浩：

30日間世界1周旅行—素晴らしいノルウェーの船旅—

おやしらず第31号：5-21、2000

小澤英浩：

北緯71° 10' 21" ヨーロッパ最北端 ミレニアムの夜明け

おやしらず第31号：表紙写真

伊藤将広、小澤英浩：

破骨細胞の細胞死

The BONE 14 (2) : (グラビア)、2000

小澤英浩：

骨形態制御機構の解明—元素レベルから器官レベルまで—

平成11年度牛乳栄養学術研究会委託研究報告書:173-188、2000

小澤英浩：

キャンパス歯科事情—現代学生気質—

新聞クイント9月号(57号)：11、2000

網塚憲生、佐々木朝代、小澤英浩、織田公光、入江真理子：

副甲状腺ホルモン関連ペプチドの核小体移行

The BONE 14 (5) : (グラビア)、C2000

【研究会などでの特別講演】

小澤英浩：

新しい芽生えを基にして21世紀の歯科医療を先取りする一骨の形態科学の最前線—新潟大学歯学部
口腔外科・歯科麻酔科同門会公開講演会

2000.7.22 新潟

【国際シンポジウムでの発表】

Lin Gong, Hoshi, K., Ejiri, S., Nakajima, T. and Ozawa, H.:

Effects of YM175 on ectopic bones induced by rhBMP-2 in rats.

Asian science seminar in Okayama 2000. Frontier of molecular biology technology in biological
reconstructive dentistry and medicine. August 27-September 5, 2000

Proceedings of Asian science seminar in Okayama 2000: SYMPO-11-1-1~2, 2000

【国内シンポジウム】

小澤英浩、網塚憲生、伊藤将広、島村拓也：

腫瘍性骨吸収に関する組織細胞化学的所見

第18回日本骨代謝学会、シンポジウム1、2000年7月19日、広島国際会議場、広島プログラム
抄録集 (79) (S1-5)

【国際学会の発表】

Sasaki, T., Amizuka, N., Oda, K. and Ozawa, H.:

Cell-to-matrix interaction for VEGF signal transduction during endochondral bone formation. 22nd
Annual meeting of the American Society for Bone and Mineral Research. Toronto, Canada, Sept, 2000.,
Program and Abstract, Journal of Bone and Mineral Research. Vol.15, S243, 2000.

Amizuka, N., Sasaki, T., Lin, R., Glotzman, D., Henderson, J.E., Ozawa, H. and White, J.E.:

Regulation of vascularization of the chondro-osseous junction by 1,25-dihydroxyvitamin D3 in vivo. 22nd
Annual meeting of the American Society for Bone and Mineral Research. Toronto, Canada, Sept, 2000.,
Program and Abstract, Journal of Bone and Mineral Research, Vol. 15, S206, 2000.

Amizuka, N., Wang, D., Liu, H., Ozawa, H., Goltzman, D., and Henderson, J.E.:

Mice hemizygous for a truncation mutation of the Gli-3 gene demonstrate increased apoptosis in marrow mesenchyme and reduced trabecular bone formation. 22nd Annual meeting of the American Society for Bone and Mineral Research. Toronto, Canada, Sept, 2000., Program and Abstract, Journal of Bone and Mineral Research, Vol. 15, S157, 2000.

Shimamura, T., Amizuka, N., Izumi, N., Nakajima, T., and Ozawa, H.:

The Histological Examination on Osteoclastogenesis and Degradation of Extracellular Matrix Induced by Tumor Cells in Bone Metastasis. 22nd Annual meeting of the American Society for Bone and Mineral Research. Toronto, Canada, Sept, 2000., Program and Abstract, Journal of Bone and Mineral Research, Vol. 15, S350, 2000.

Aso, Y., Amizuka, N., Yamashita, T., Nabeshima, Y., Ozawa, H. and Neda, M.:

Reduction in the number of chondrocyte columns and in the height of prehypertrophic/hypertrophic zone in growth plate temporarily associate with bone phenotypes in klotho mutant mice. 22nd Annual meeting of the American Society for Bone and Mineral Research, Toronto, Canada, Sept, 2000., Program and Abstract, Journal of Bone and Mineral Research, Vol. 15, S468, 2000.

Lin, R., Amizuka, N., Wang, D., Ozawa, H., Goltzman, D., Henderson, J.E. and White, J.H.:

Regulation of markers of chondrocyte differentiation by 1,25-dihydroxyvitamin D3. 22nd Annual meeting of the American Society for Bone and Mineral Research. Toronto, Canada, Sept, 2000., Program and Abstract, Journal of Bone and Mineral Research, Vol. 15, S342, 2000.

Yoshida, K., Yoshida, N., Iwaku, M. and Ozawa, H.:

Immunolocalization of fibronectin during reparative dentinogenesis after direct pulp capping in human teeth, Signalling mechanisms in dentin development, regeneration and repair: from bench to clinic, Nov.10-11, 2000, Thessaloniki Greece

【国内学会での一般口演】

江尻貞一、田中みか子、河野正司、小澤英浩：

マイクロCTを用いた卵巣摘出サル顎骨の構造解析

第105回日本解剖学会総会・全国学術集会、2000年3月29-31日、神奈川

プログラム予稿集 p.78 (132)

池亀美華、星和人、川島博行、小澤英浩：

張力刺激による骨形成促進過程の微細形態学的・組織化学的解析

第105回日本解剖学会総会・全国学術集会、2000年3月29-31日、神奈川
プログラム予稿集 p.80 (142)

星和人、江尻貞一、小澤英浩：

骨石灰化結晶の結晶鞘に関する微細形態学的・細胞化学的解析

第105回日本解剖学会総会・全国学術集会、2000年3月29-31日、神奈川
プログラム予稿集 p.80 (143)

柳澤宏信、星和人、江尻貞一、佐藤光三、小澤英浩：

関節軟骨の修復機構に関する微細形態学的・細胞化学的解析

第105回日本解剖学会総会・全国学術集会、2000年3月29-31日、神奈川
プログラム予稿集 p.80 (144)

網塚憲生、佐々木朝代、小澤英浩：

Gli 2 / Gli 3 遺伝子欠損マウスにおける軟骨内骨化の異常について

第105回日本解剖学会総会・全国学術集会、2000年3月29-31日、神奈川
プログラム予稿集 p.147 (541)

佐々木朝代、網塚憲生、入江一元、江尻貞一、小澤英浩：

マウス尾椎における軟骨内骨化の細胞組織化学的観察

第105回日本解剖学会総会・全国学術集会、2000年3月29-31日、神奈川
プログラム予稿集 p.147 (542)

島村拓也、網塚憲生、中島民雄、小澤英浩：

乳癌転移モデルを用いた骨転移巣形成初期の形態学的検索

第105回日本解剖学会総会・全国学術集会、2000年3月29-31日、神奈川
プログラム予稿集 p.147 (545)

星和人、小澤英浩：

初期石灰化機構に関する形態計測学的解析

第20回日本骨形態計測学会2000年6月23、24日、長崎
日本骨形態計測学会雑誌10 (1) : S31、2000

田澤興平、星和人、川本真一郎、江尻貞一、小澤英浩：

骨細胞性骨溶解の形態学的検討

第20回日本骨形態計測学会2000年6月23、24日、長崎

日本骨形態計測学会雑誌10(1)：S33、2000

佐々木朝代、網塚憲生、小澤英浩：

軟骨内骨化の血管侵入におけるVEGFの局在と細胞・基質間相互作用

第20回日本骨形態計測学会 2000年6月23、24日、長崎

日本骨形態計測学会雑誌10(1)：S34、2000

江尻貞一、田中みか子、豊岡英一、角崎英志、福崎好一郎、宮脇宏彰、宮林信次、馬場則男、河野正司、小澤英浩：

卵巣摘出によるサル顎骨の構造変化— μ CTを用いた2次元・3次元解析—

第20回日本骨形態計測学会 2000年6月23、24日、長崎

日本骨形態計測学会雑誌10(1)：S39、2000

田中みか子、江尻貞一、石田陽子、野中希一、角崎英志、福崎好一郎、宮脇宏彰、河野正司、小澤英浩：

第20回日本骨形態計測学会 2000年6月23、24日、長崎

日本骨形態計測学会雑誌10(1)：S40、2000

星 和人、江尻貞一、小澤英浩：

EELS分析の為の試料作製法とデータの読み方

日本解剖学会関東地方会第10回懇話会、2000年6月24日、東京

プログラム抄録集 p.12

佐々木朝代、網塚憲生、入江一元、江尻貞一、小澤英浩：

マウス尾椎の軟骨内骨化における石灰化とアルカリ性ホスファターゼ、オステオポンチンの局在

平成12年度新潟歯学会第1回例会 2000年7月8日、新潟

プログラム p.17

佐々木朝代、網塚憲生、小澤英浩：

VEGFの局在とMMP-9の基質分解について

平成12年度新潟歯学会第1回例会 2000年7月8日、新潟

プログラム p.18

島村拓也、網塚憲生、新垣 晋、中島民雄、小澤英浩：

腫瘍の骨転移初期における組織破壊の組織学的検討

平成12年度新潟歯学会第1回例会 2000年7月8日、新潟

プログラム p.19

網塚憲生、佐々木朝代、Janet Henderson、小澤英浩：

Gli遺伝子は軟骨原器のパターニングと軟骨内骨化に重要な役割を果たす—多指症を示す

Gli 2 / Gli 3 遺伝子欠損マウスの解析—

第18回日本骨代謝学会 2000年7月19日～22日、広島

日本骨代謝学会雑誌18 (2) : 9、2000

佐々木朝代、網塚憲生、織田公光、小澤英浩：

軟骨内骨化はVEGF集積機構による血管内皮細胞の侵入の誘導とMMP-9の基質分解により行われる

第18回日本骨代謝学会 2000年7月19日～22日、広島

日本骨代謝学会雑誌18 (2) : 11、2000

星 和人、江尻貞一、小澤英浩：

骨の石灰化結晶の析出は、プロテオグリカンやオステオポンチン、骨シアロ蛋白との相互作用により進行する

第18回日本骨代謝学会 2000年7月19日～22日、広島

日本骨代謝学会雑誌18 (2) : 15、2000

池亀美華、星 和人、川島博行、小澤英浩：

張力刺激による頭頂骨縫合部の骨芽細胞分化促進過程の解析

第18回日本骨代謝学会 2000年7月19日～22日、広島

日本骨代謝学会雑誌18 (2) : 32、2000

川口実太郎、東由明、星和人、竹下淳、太田知裕、小澤英浩、竹市雅俊、千坂修、工藤 明：

OBカドヘリン/カドヘリン-11ノックアウトマウスは石灰化基質の形成不全により骨量減少を呈す

第18回日本骨代謝学会 2000年7月19日～22日、広島

日本骨代謝学会雑誌18 (2) : 43、2000

小谷博子、川口 浩、星 和人、岩坂正和、小澤英浩、中村耕三、上野照剛：

強磁場は同一方向に配向したコラーゲン上の骨芽細胞の分化を誘導して骨形成を促進する

第18回日本骨代謝学会 2000年7月19日～22日、広島

日本骨代謝学会雑誌18(2)：57、2000

星 和人、川口 浩、緒方直史、監物新一、門脇 孝、中村耕三、小澤英浩：

IRS-1 遺伝子欠損マウスは早期に骨端軟骨が閉鎖し、老化に類似した骨形態を呈する

第18回日本骨代謝学会 2000年7月19日～22日、広島

日本骨代謝学会雑誌18(2)：82、2000

島村拓也、網塚憲生、中島民雄、小澤英浩：

骨転移における腫瘍性基質分解と破骨細胞形成のメカニズム

第18回日本骨代謝学会 2000年7月19日～22日、広島

日本骨代謝学会雑誌18(2)：157、2000

小野加津広、赤津拓彦、村上健彦、北村竜一、山本通子、網塚憲生、小澤英浩、永田直一、久貝信夫：

マウス乳癌細胞株の骨破壊メカニズムの検討

第18回日本骨代謝学会 2000年7月19日～22日、広島

日本骨代謝学会雑誌18(2)：158、2000

坂倉康則、入江一元、小澤英浩、矢嶋俊彦：

カルシトニン受容体の局在の変化は破骨細胞の分化と骨吸収活性を反映している—免疫組織化学的検討—

第18回日本骨代謝学会 2000年7月19日～22日、広島

日本骨代謝学会雑誌18(2)：192、2000

宮琳、星和人、中島民雄、坂井日出男、監物新一、江尻貞一、小澤英浩：

BMP-2により誘導される異所性骨に対するbisphosphonate YM175の影響

第18回日本骨代謝学会 2000年7月19日～22日、広島

日本骨代謝学会雑誌18(2)：293、2000

柳澤宏信、星 和人、佐藤光三、江尻貞一、小澤英浩：

関節軟骨の軟骨細胞は、自ら基質の形成と分解を行いながら軟骨修復を行う

第18回日本骨代謝学会 2000年7月19日～22日、広島

日本骨代謝学会雑誌18 (2) : 294, 2000

網塚憲生:

軟骨に対する副甲状腺ホルモン関連ペプチド (PTHrP) の二極性の作用機序について

第42回歯科基礎医学会総会、2000年9月30~10月1日、大阪

歯科基礎誌42 (5) : 59, 2000

佐々木朝代、網塚憲生、小澤英浩:

軟骨内骨化の血管侵入の機序における形態学的検索

第42回歯科基礎医学会総会、2000年9月30~10月1日、大阪

歯科基礎誌42 (5) : 66, 2000

網塚憲生、佐々木朝代、小澤英浩:

Gli遺伝子欠損マウスの軟骨内骨化における形態学的解析

第42回歯科基礎医学会総会、2000年9月30~10月1日、大阪

歯科基礎誌42 (5) : 66, 2000

福士一入江真理子、伊藤将広、天谷吉宏、網塚憲生、佐々木朝代、小澤英浩、織田公光:

低ホスファターゼ症を発症する変異組織非特異型アルカリホスファターゼのヘテロ接合体の解析

第42回歯科基礎医学会総会、2000年9月30~10月1日、大阪

歯科基礎誌42 (5) : 110, 2000

渡邊淳一、網塚憲生、小澤英浩:

OCIF遺伝子欠損マウスの歯槽骨ならびに歯根膜における組織学的検索

第42回歯科基礎医学会総会、2000年9月30~10月1日、大阪

歯科基礎誌42 (5) : 112, 2000

江尻貞一、田中みか子、河野正司、小澤英浩:

エストロゲン欠乏によるサル顎骨の構造変化—マイクロCTを用いた解析—

第42回歯科基礎医学会総会、2000年9月30~10月1日、大阪

歯科基礎誌42 (5) : 113, 2000

川本真一郎、江尻貞一、田中みか子、長岡英一、小澤英浩:

PTH持続投与によるラット下顎骨の組織変化

第42回歯科基礎医学会総会、2000年9月30～10月1日、大阪
歯科基礎誌42(5) : 113、2000

池亀美華、星 和人、川島博行、小澤英浩 :

張力刺激により形成促進される骨基質の形態学的解析

第42回歯科基礎医学会総会、2000年9月30～10月1日、大阪
歯科基礎誌42(5) : 117、2000

田辺啓太、吉羽邦彦、吉羽永子、岩久正明、小澤英浩 :

Er : YAGレーザーを用いたラット臼歯窩洞形成後の歯髄反応に関する免疫組織化学的研究

第42回歯科基礎医学会総会、2000年9月30～10月1日、大阪
歯科基礎誌42(5) : 120、2000

濱本宜興、新垣 晋、小澤英浩 :

モルモット臼歯セメント質発生とエナメル上皮細胞のアポトーシス

第42回歯科基礎医学会総会、2000年9月30～10月1日、大阪
歯科基礎誌42(5) : 161、2000

田澤興平、星 和人、川本真一郎、田中みか子、江尻貞一、小澤英浩 :

骨細胞性骨溶解の形態学的検討

平成12年度新潟歯学会第2回例会、2000年11月11日、新潟
プログラム4P

宮 琳、星 和人、中島民雄、新垣 晋、坂井日出男、監物新一、江尻貞一、小澤英浩 :

BMP-2により誘導される異所性骨に対するbisphosphonate YM175の影響

平成12年度新潟歯学会第2回例会、2000年11月11日、新潟
プログラム4P

近藤由香里、池亀美華、入江一元、小澤英浩 :

骨髄組織における間質系細胞ネットワークおよびその破骨細胞形成への関与 : 組織化学的・微細構造学的研究

平成12年度新潟歯学会第2回例会、2000年11月11日、新潟
プログラム4P

細矢明宏、吉羽邦彦、吉羽永子、星 和人、岩久正明、小澤英浩：

ラット臼歯の皮下移植後に形成される歯髄腔内硬組織に関する免疫組織化学的研究

平成12年度新潟歯学会第2回例会、2000年11月11日、新潟

プログラム4P

篠倉恵子、池亀美華、花田晃治、小澤英浩：

ラット臼歯の生理的遠心移動における有細胞セメント質のセメント細胞・セメント芽細胞のオステオポンチンの局在と発現

平成12年度新潟歯学会第2回例会、2000年11月11日、新潟

プログラム4P