

原著

若・高年齢層由来のヒト歯槽骨細胞間の細胞増殖および ホスファターゼ活性の相違

及川栄二¹⁾、鈴木直人¹⁾、大越哲也²⁾、海谷幸利¹⁾、
福岡雅人¹⁾、前野正夫¹⁾、大塚吉兵衛¹⁾

¹⁾日本大学歯学部生化学教室（主任:大塚吉兵衛教授）

〒101 東京都千代田区神田駿河台1-8-13

²⁾武蔵野赤十字病院歯科口腔外科

〒180 東京都武蔵野市境南町1-26-1

（受理：平成6年8月19日）

Differences in Cell Growth and Phosphatase Activities of Human Alveolar Bone-derived Cells Between Young and Old Age Groups

Eiji Oikawa¹⁾, Naoto Suzuki¹⁾, Tetsuya Ogoshi²⁾, Yukitoshi Kaiya¹⁾,
Masato Fukuoka¹⁾, Masao Maeno¹⁾ and Kichibee Otsuka¹⁾

¹⁾Department of Biochemistry, Nihon University School of Dentistry

(Chief: Prof. Kichibee Otsuka)

1-8-13, Kanda-surugadai, Chiyoda-ku, Tokyo 101, Japan

²⁾Department of Oral Surgery, Musashino Red Cross Hospital

1-26-1, Sakaiminami-machi, Musashino-shi, Tokyo 180, Japan

(Accepted for publication: August 19, 1994)

Key words: human alveolar bone; aging; osteoblasts; cell growth; alkaline phosphatase

Abstract: An attempt was made to compare cell growth and three different phosphatase activities between human alveolar bone-derived (HAB) cells from young (13-22 years old) patients and those from older (55-73 years old) patients. HAB cells growing out of individual bone fragments were harvested separately, and subcultured up to the 3rd passage. The growth and phosphatase activities of HAB cells from each individual were determined on days 8, 24 and 40 of culture after seeding. The enzymes determined were alkaline phosphatase (ALPase), acid phosphatase (ACPase) and tartrate-resistant acid phosphatase (TRACPase). Morphologically, the HAB cells used in this study were spindle-shaped in spite of aging. The individual data obtained were averaged within each age group, and the means (SD) of the two groups were compared. Cell growth showed a logarithmic pattern from day 3 in both age groups. The HAB cells from the young age group reached confluence on day 11 of culture, whereas those from the older age group did so on day 21. The replication capacity of HAB cells from the young group was greater than that of cells from the older group. ALPase activity in both groups increased from day 8 to reach a maximum on day 24 of culture, followed by a decrease on day 40. On day 24, HAB cells from the young group showed in approximately 2.2-fold higher ALPase activity than those from the older group. On the other hand, no significant differences were observed in ACPase and TRACPase activities between the two groups between days 8 and 40.

緒 言

高齢化社会を迎え、骨代謝機能の低下による骨粗鬆症を代表とするような疾患の増加が懸念されている。口腔領域においては、細菌あるいは咬合に起因する歯周疾患ではなくても、加齢による生理的な歯槽骨の退縮によって歯の動揺や喪失、あるいは義歯装着に支障をきたすなど、歯槽骨量の維持は、臨床的に重要な課題の一つになっている。

加齢による歯槽骨梁あるいは骨量の減少は、Morgan ら¹⁾ および Papapanou ら²⁾ がそれぞれイヌおよびヒトの歯槽骨量が加齢に伴って減少することを報告し、また Amler³⁾ は、高齢者の抜歯窩の治癒が、低年齢者に比べて遅延すると報告している。しかし、これらの報告はいずれもX線写真やブローピング値を基にして臨床的にあるいは摘出した歯槽骨を用いて組織学的立場から検討されたものである。

加齢に伴う歯槽骨量の減少を骨組織の代謝変動として捉え、歯槽骨に由来する細胞を用いて細胞生物学的に調べた研究としては、Fujikawa ら⁴⁾ が年齢層別のヒト歯槽骨由来細胞の細胞特性を調べ、若年層のアルカリホスファターゼ活性が高齢層に比べて高い値を示すと報告している。しかし、Fujikawa ら⁴⁾ の報告は、分類したグループの年齢層の幅が広く設定されており、若年層と高齢層の年齢が近いことや高齢層の上限が59歳であることなど、加齢による歯槽骨由来細胞の細胞特性の相違を十分に反映しているとは言えない。

そこで著者らは、加齢に伴う歯槽骨代謝の相違を骨形成の面から細胞生物学的に解明するための基礎的実験として、本研究を企図した。年齢10～20歳代および50～70歳代の2つのグループのヒト歯槽骨から個別別に歯槽骨由来の骨芽細胞様細胞（歯槽骨細胞）を培養して集め、細胞形態、細胞増殖およびホスファターゼ活性の経日的変動について比較検討したところ、興味ある知見が得られたので報告する。

材料および方法

1.材料

本実験には、武蔵野赤十字病院歯科口腔外科外来にて、埋伏智歯抜歯時あるいは歯槽堤整形術の際に得られた歯槽骨片（13～73歳の男性4名、女性2名）を材料として用いた。なお、患者には歯槽骨の一部が本研究に用いられることを術前に説明し、同意を得ている。得られた骨片を、リン酸緩衝液（PBS, 日水製薬）溶液で十分に洗浄して血液成分などの付着物を可及的に除いた。次いで、細菌感染を防ぐために骨片を高濃度の抗生物質〔ペニシリン-ストレプトマイシン溶液（Sigma Chemical Co.）；ペニシリン（500 unit/ml）およびストレプトマイシン（500 µg/ml）を α -minimum essential medium（ α -MEM, Gibco Laboratories）溶液に浸し、さらに α -MEM溶液で数回洗浄した。

2.細胞の初代および継代培養法

歯槽骨細胞は鈴木ら⁵⁾の方法に準じて得た。すなわち、歯槽骨片（約2mm×2mm×2mm）を、それぞれ3%コラゲナーゼ（Sigma）溶液で消化（37℃、20分）した後、同容量のウシ胎児血清（FBS, Hyclone）を加えて酵素反応を停止した。ついで、PBSで骨片を数回洗浄し、組織培養ディッシュ（Falcon；Becton Dickinson & Co.）内に静地し、10% FBS、アスコルビン酸（50 mg/ml）および抗生物質〔ペニシリン-ストレプトマイシン溶液；ペニシリン（50 unit/ml）およびストレプトマイシン（50 µg/ml）〕を含む α -MEM溶液中で常法通り5%炭酸ガス雰囲気下で培養し、外生する細胞を歯槽骨細胞とした。なお、13～22歳（若年層、男性1名、女性2名）および55～73歳（高齢層、男性3名）の歯槽骨から得られた各歯槽骨細胞群を、それぞれ低年齢歯槽骨細胞および高齢歯槽骨細胞の2グループに分類した。細胞の継代は、細胞が培養容器内で集密的になった時点で、0.1%トリプシン/5 mM EDTA 溶液（Gibco）で分散し、遠心分離によって細胞を回収し、細胞数約 1×10^4 個/cm²の密度で播き、2～3代継代したものを実験に供した。また、各細胞の増殖状態については、位相差顕微鏡で経日的に観察した。

3.細胞増殖

各細胞を24穴のマイクロプレート (Corning Galss Works) に約 1.5×10^4 個/ウェル (約 7.9×10^3 個/cm²) となるように播き、経日的に0.1%トリプシン/5 mM EDTA 溶液で細胞を分散した溶液から一定量を取り、細胞数カウンター (Colter Electronics Model D, Colter Electronics) を用いて細胞数を測定した。なお、低年齢歯槽骨細胞および高年齢歯槽骨細胞の増殖曲線は、それぞれのグループの平均値から求めた。

4.ホスファターゼ活性の測定

アルカリホスファターゼ (ALPase)、酸性ホスファターゼ (ACPase) および酒石酸耐性酸性ホスファターゼ (TRACPase) 活性測定は、96 穴マイクロプレート上で直接行う Ohshima ら⁹⁾ の方法に準じて行った。

各細胞をマイクロプレートの各ウェルに約 2.5×10^3 個/ウェル (約 8.0×10^3 個/cm²) となるように播き、培養8日目、24日目および40日目にALPase、ACPase およびTRACPase 活性を測定した。

ALPase 活性測定には、8 mM パラニトロフェニルリン酸、10mM塩化マグネシウムおよび 0.1mM 塩化亜鉛を含む 0.1 M グリシン緩衝液 (pH 10.5) を、ACPase 活性測定には、ALPase 活性測定と同濃度の基質を含む 0.1 M 酢酸緩衝液 (pH 4.0) を、また、TRACPase活性測定には、ACPase 活性測定溶液に10mM酒石酸を加えた溶液をそれぞれ100μl ずつウェルに加えた。酵素反応を37℃で60分間行った後、1.0 M 水酸化ナトリウム溶液を100μl 加えて反応を停止した。この間に生成したパラニトロフェノールをタイターテックマルチスキャンプラス (波長405nm, Flow Laboratories) で測定し、ALPase、ACPase およびTRACPase の酵素活性値を求めた。

なお、ホスファターゼ活性の1 unit は、本条件下で1分間に1μmol のパラニトロフェニルリン酸を変化させる酵素量とした。また、本論文での酵素活性値は、細胞数10⁴個当たりのmilli unit (mU) に換算し、各グループの平均値と標準偏差で表した。

5.統計処理

低年齢歯槽骨細胞と高年齢歯槽骨細胞のALPase、ACPase およびTRACPase の各酵素活性値を比較検討する際の統計分析は、Student-t 検定を用いた

成 績

1.細胞形態

細胞形態は、各個人から得られたすべての歯槽骨細胞について位相差顕微鏡を用いて観察した。図1には、両グループの代表例 (低年齢歯槽骨細胞; 13歳女性、高年齢歯槽骨細胞; 73歳男性) を示した。歯槽骨片から外生した低年齢歯槽骨細胞および高年齢歯槽骨細胞は、いずれも初代培養の時点からいわゆる線維芽細胞の形態よりもやや丸みのある紡錘形を呈していた。

なお、これらの細胞形態は、低年齢歯槽骨細胞で8継代目、高年齢歯槽骨細胞では5継代目まで維持していた。

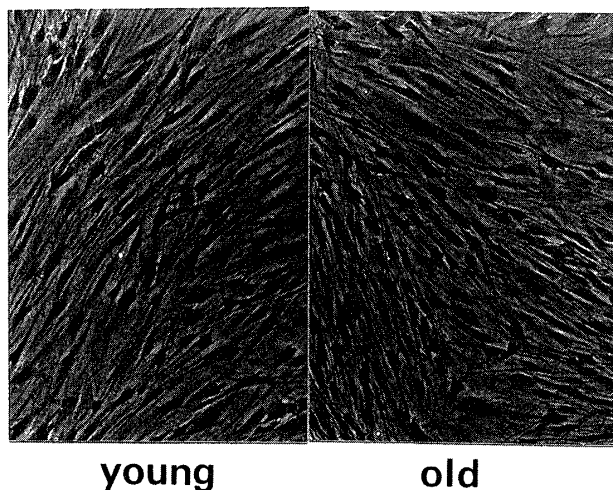


図1 培養24日目の低年齢歯槽骨細胞 (young) および高年齢歯槽骨細胞 (old) の位相差顕微鏡像 (×100)

2.細胞増殖

細胞の増殖曲線は、低年齢歯槽骨細胞および高年齢歯槽骨細胞それぞれのグループの培養日数に伴う細胞数の平均値から求めた (図2)。各細胞とも培養3日目頃から対数増殖期に入り、低年齢

及川栄二ほか：若・高年齢層のヒト歯槽骨細胞の細胞増殖とホスファターゼ活性

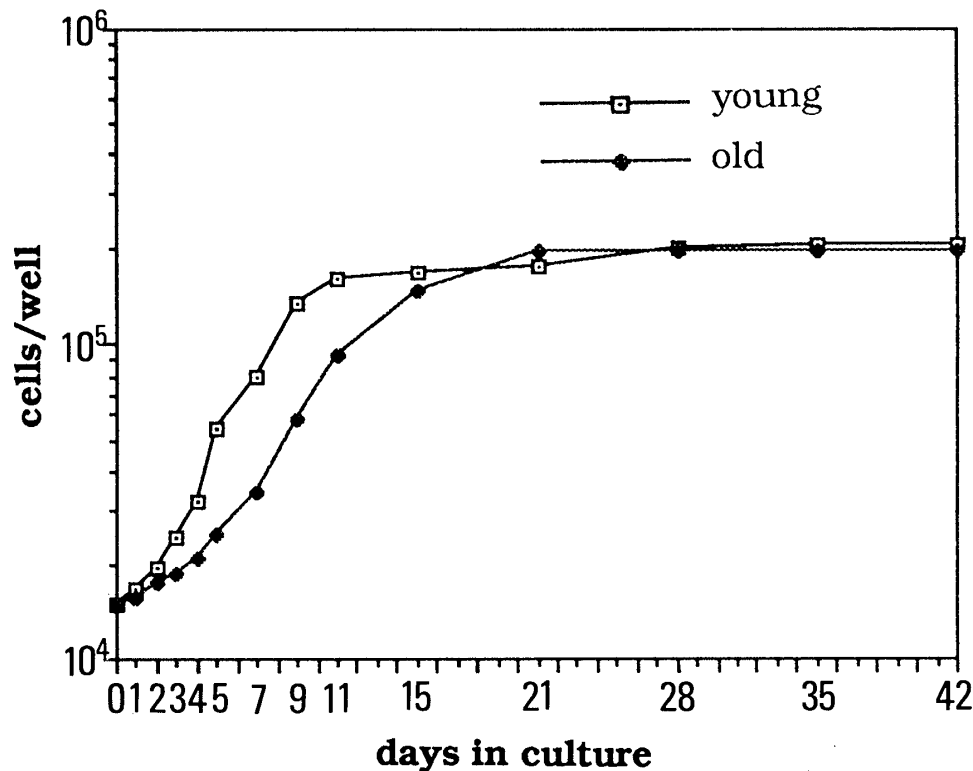


図2 低年齢歯槽骨細胞 (young) および高年齢歯槽骨細胞 (old) の増殖曲線

歯槽骨細胞群は培養 11 日目頃に各個体由来別のほとんどの細胞が定常期に達したが、高年齢歯槽骨細胞群は低年齢歯槽骨細胞に比べて緩やかに増殖し、培養 21 日目になって定常期に達した。

なお、低年齢歯槽骨細胞および高年齢歯槽骨細胞の細胞数倍加時間の平均値は、それぞれ 19.6 ± 0.3 時間および 45.1 ± 0.7 時間であった。

培養 8 日目、24 日目および 40 日目における両グループの 1 cm^2 当たりの細胞数の平均値は、低年齢歯槽骨細胞ではそれぞれ $120,000 \pm 940$ 個、 $190,000 \pm 1,100$ 個および $200,000 \pm 1,300$ 個であり、高年齢歯槽骨細胞ではそれぞれ $43,000 \pm 660$ 個、 $190,000 \pm 1,280$ 個および $190,000 \pm 1,300$ 個であった。

3. アルカリホスファターゼ活性値

低年齢歯槽骨細胞の培養 8 日目、24 日目および 40 日目のアルカリホスファターゼ (ALPase) 活性値は、細胞数 10^4 個当たりでそれぞれ $0.38 \pm 0.07 \text{ mU}$ 、 $5.10 \pm 0.18 \text{ mU}$ および $3.02 \pm 0.12 \text{ mU}$ であった。低年齢歯槽骨細胞の ALPase 活性値は培養 24 日目に最大に達し、40 日目には最大活性値の約 59%

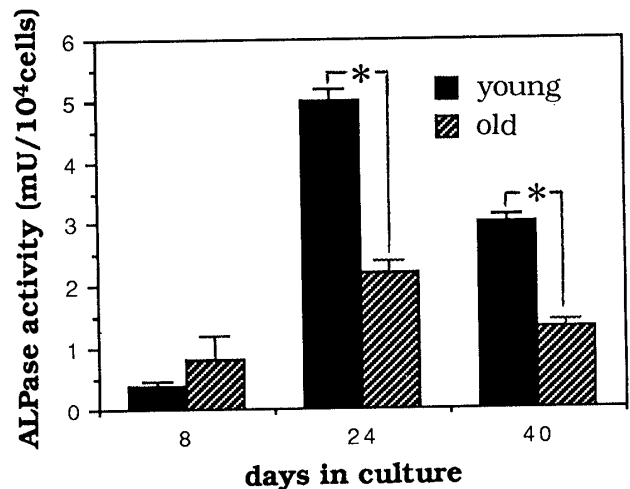


図3 低年齢歯槽骨細胞 (young) および高年齢歯槽骨細胞 (old) の培養 8 日目、24 日目および 40 日目のアルカリホスファターゼ (ALPase) 活性値の経日的変動。

図中のバーは、標準偏差を示す。(* $p < 0.05$)

に低下した。

高年齢歯槽骨細胞の培養8日目、24日目および40日目のALPase活性値は、細胞数 10^4 個当たりそれぞれ 0.28 ± 0.07 mU、 2.34 ± 0.19 mU および 1.32 ± 0.12 mUであった。高年齢歯槽骨細胞のALPase活性値は、低年齢歯槽骨細胞と同様に培養24日目に最大活性を示し、40日目にはその活性値の約56%に低下した。

低年齢歯槽骨細胞のALPase活性値は、培養24日目および40日目において高年齢歯槽骨細胞に比べて有意に高い値を示した。両グループの細胞が最大活性値を示した培養24日目で比較すると、低年齢歯槽骨細胞のALPase活性値は、高年齢歯槽骨細胞より約2.2倍高い値であった(図3)。

4. 酸性ホスファターゼ活性値

低年齢歯槽骨細胞の培養8日目、24日目および40日目の酸性ホスファターゼ(ACPase)活性値は、細胞数 10^4 個当たりそれぞれ 0.61 ± 0.05 mU、 0.95 ± 0.07 mU および 0.82 ± 0.07 mUであった。また、高年齢歯槽骨細胞のACPase活性値は、それぞれ 0.60 ± 0.05 mU、 1.00 ± 0.0 mU および 0.85 ± 0.07 mUであった。なお、両グループの細胞のACPase活性値

には有意な差が認められず、培養日数に伴う活性値の変動もほとんど見られなかった(図4)。また、培養8日目、24日目および40日目の両グループの細胞のACPase/ALPase活性比は、低年齢歯槽骨細胞でそれぞれ1.57、0.19 および0.27、高年齢歯槽骨細胞でそれぞれ0.73、0.43 および0.64であった。

5. 酒石酸耐性酸性ホスファターゼ活性値

低年齢歯槽骨細胞の培養8日目、24日目および40日目の酒石酸耐性酸性ホスファターゼ(TRACPase)活性値は、細胞数 10^4 個当たりそれぞれ 0.32 ± 0.02 mU、 0.53 ± 0.03 mU および 0.58 ± 0.14 mUであった。また、高年齢歯槽骨細胞のTRACPase活性値は、それぞれ 0.38 ± 0.003 mU、 0.54 ± 0.04 mU および 0.72 ± 0.02 mUであった。なお、両グループの細胞のTRACPase活性値には有意な差が認められず、培養日数に伴う活性値の変動もほとんど見られなかった(図5)。また、培養8日目、24日目および40日目の両グループの細胞のTRACPase/ACPase活性比は、低年齢歯槽骨細胞でそれぞれ1.90、1.82 および1.37、高年齢歯槽骨細胞でそれぞれ1.58、1.86 および1.17であった。

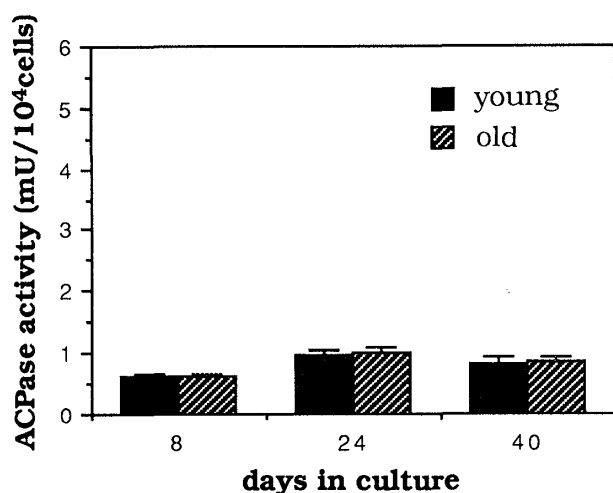


図4 低年齢歯槽骨細胞(young)および高年齢歯槽骨細胞(old)の培養8日目、24日目および40日目の酸性ホスファターゼ(ACPase)活性値の経日的変動。図中のバーは、標準偏差を示す。

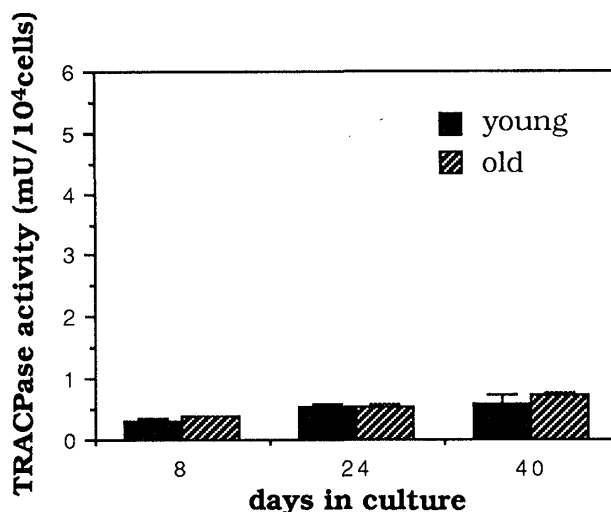


図5 低年齢歯槽骨細胞(young)および高年齢歯槽骨細胞(old)の培養8日目、24日目および40日目の酒石酸耐性酸性ホスファターゼ(TRACPase)活性値の経日的変動。図中のバーは、標準偏差を示す。

考 察

材料として、若年層（13～22 歳）および高齢層（55～73 歳）のヒト歯槽骨を用い、それぞれの骨片から外生した細胞を低年齢歯槽骨細胞および高年齢歯槽骨細胞とし、2～3 代継代したものを実験に供した。

本研究に用いた低年齢および高年齢歯槽骨細胞の形態は、いずれもやや丸みのある紡錘形を呈していた。この結果は、ヒトの歯槽骨由来の骨芽細胞様細胞が線維芽細胞様の形態を呈するという鈴木ら⁵⁾および梅原ら⁸⁾の報告と類似していた。しかし、Suzuki ら⁷⁾の報告にあるウサギの歯槽骨由来の骨芽細胞様細胞が立方形を呈するとの結果とは異なっていた。

低年齢および高年齢歯槽骨細胞の細胞増殖を調べるため、各細胞を 24 穴のマイクロプレートに播き、経日的に細胞数を測定して増殖曲線を求めた。高年齢歯槽骨細胞は緩やかに増殖し、低年齢歯槽骨細胞より 10 日ほど遅れて培養 21 日目頃に定常期に達することが認められ、高年齢歯槽骨細胞の増殖速度はかなり遅いと考えられた。Schneider ら⁹⁾は、若年者（平均 28 歳）および高齢者（平均 80 歳）の皮膚から得た線維芽細胞の細胞増殖を比較し、高齢者に由来する細胞の増殖速度は若年者の約 85% であり、細胞の増殖速度が老化とともに低下すると報告している。また、若年者および高齢者に由来する細胞の継代回数は、それぞれ 45 回および 30 回であり、細胞の継代回数が加齢とともに短縮されると報告し、細胞の増殖速度や継代回数が、細胞老化のマーカーの一つとして有用であることを示唆している。Schneider ら⁹⁾と本実験とでは、用いた細胞や増殖曲線を調べる際の細胞数が異なっており、増殖状態を直接比較することは困難であるが、それぞれの細胞について細胞数倍加時間を計算し、Schneider ら⁹⁾の報告と比較した。その結果、高年齢歯槽骨細胞では低年齢歯槽骨細胞の約 2.2 倍となり、皮膚由来の線維芽細胞の比較値である約 2.3 倍の近似値を得た。また、初代培養時の細胞形態を維持できる高年齢歯槽骨細胞の継代回数（5 回）は、低年齢歯槽骨細胞（8 回）より少ない値であった。歯槽骨細胞の継代回数は、

Schneider ら⁹⁾の報告にある線維芽細胞の約 1/5 という低い値を示したが、これは一般的に機能分化の進んだ細胞の継代は少ないことに起因しているものと考えられる。また、本実験で高年齢歯槽骨細胞の継代回数が低年齢歯槽骨細胞に比べて少なかったことは Schneider ら⁹⁾の報告と同様に、増殖速度や継代回数は加齢の影響を強く受けることが考えられた。

ALPase 活性は、細胞の石灰化物形成能の指標の一つとして考えられ¹⁰⁾、種々の骨芽細胞様細胞は高い ALPase 活性を発揮すると報告されている¹¹⁻¹³⁾。また、骨芽細胞様細胞の ALPase 活性が、培養日数あるいは石灰化物形成に伴って大きく変動することも報告されている^{4,14-16)}。そこで、低年齢および高年齢歯槽骨細胞の ALPase 活性を対数増殖期の培養 8 日目、定常期の 24 日目および 40 日目に測定した。その結果、低年齢歯槽骨細胞の ALPase 活性は、培養 24 日目および 40 日目において高年齢歯槽骨細胞に比べて有意に高い値を示した。とくに両グループの細胞の ALPase 活性が最大値を示した培養 24 日目では、低年齢歯槽骨細胞の ALPase 活性値が約 2.2 倍高い値を示した。Fujikawa ら⁴⁾はヒト歯槽骨細胞を 22～49 歳および 50～59 歳の 2 つのグループに分けて、ALPase 活性を培養 5 日目から 40 日目まで経日的に調べ、全ての時期で低年齢のグループの ALPase 活性値が約 2～3 倍高く、また両グループともに培養 20 日目に活性値が最大になり、その後緩やかに減少すると報告している。Fujikawa ら⁴⁾の報告と著者らとでは、実験に用いた症例数やグループ分けする際の年齢設定は異なっていたが、類似の結果であった。なお、本実験において培養 40 日目に ALPase 活性値が低下した理由としては、個々の細胞の骨芽細胞様細胞活性が低下した、あるいは全細胞中の骨芽細胞様細胞の数が減少したことのいずれかが考えられた。

これらのことから、ALPase 活性は歯槽骨細胞の加齢に伴う細胞表現形質の変化、すなわち石灰化物形成能を推し量るマーカー酵素としてなり得る可能性が示唆された。

鈴木ら¹⁷⁾は、ヒト歯槽骨由来細胞の石灰化物形成に伴う ACPase 活性の変動を経日的に調べ、その酵素活性値は ALPase 活性値に比べて約 1/10 の値を示し、わずかではあるが経日的に減少する傾向が

あると報告している。そこで、低年齢および高年齢歯槽骨細胞のACPase 活性をALPase 活性と同様に、培養8日目、24日目および40日目に測定した。その結果、両グループの細胞間のACPase 活性値に有意な差は認められず、培養日数に伴う活性値の変動もほとんど認められなかった。この結果は、培養日数は異なっているが鈴木ら¹⁷⁾の報告と類似していた。

また、両グループの細胞の培養日数に伴うACPase活性値がほとんど変化しなかったにもかかわらずACPase/ALPase活性比が変化したのは、この活性比を左右しているのがALPase活性値であると考えられた。

一般に、TRACPase 活性は、破骨細胞のマーカー酵素の一つと考えられている¹⁸⁾。鈴木ら¹⁷⁾は、培養14日目のヒト歯槽骨由来細胞のTRACPase 活性値は、ACPase活性値と同様にALPase活性値と比べてきわめて低い値を示すと報告している。そこで、低年齢および高年齢歯槽骨細胞のTRACPase活性を比較したところ、ACPase活性と同様に両グループの細胞ともにTRACPase 活性値に有意な差は認められず、培養日数に伴う活性値の変動もほとんど認められなかった。また、培養8日目、24日および40日目の両グループの細胞のTRACPase/ACPase活性比は、ウサギ歯槽骨細胞を用いた及川ら¹⁹⁾の報告に類似していた。TRACPase活性が、ACPase活性と同様にALPase 活性に比べてきわめて低い値を示したことから、前述の鈴木ら¹⁵⁾と同様に、本実験に用いた低年齢および高年齢歯槽骨細胞は、いずれも骨芽細胞様細胞の表現形質を保持していると考えられた。

本実験結果において、高年齢歯槽骨細胞の細胞増殖能およびALPase 活性は、低年齢歯槽骨細胞に比べて低いことが明らかになった。すなわち、加齢に伴って歯槽骨細胞の骨芽細胞様細胞としての表現形質が変化し、その結果として歯槽骨細胞の骨形成能が低下することが考えられた。Tsujiら²⁰⁾は、ラット骨髄由来の骨芽細胞様細胞が、週齢に伴って石灰化nodule形成およびI型コラーゲン合成量が顕著に減少することを報告し、ALPase活性以外にも石灰化物形成能やタンパク質合成などの表現形質が加齢に伴って変動することを示唆している。そこで、今後この実験系を用いて、石灰化物

形成能やタンパク質合成などの表現形質、骨代謝に関与する種々のホルモンやサイトカインに対する応答性などについても比較検討する必要性が考えられた。

結 論

ヒト歯槽骨細胞の加齢に伴う細胞特性の相違について調べるため、低年齢歯槽骨細胞（13～22歳）と高年齢歯槽骨細胞（55～73歳）の2グループに分けて、細胞形態、増殖曲線およびホスファターゼ活性について比較検討した。

1. 細胞形態は、いずれも紡錘形を呈していた。
2. 細胞増殖は、両グループの細胞ともに培養3日目から対数増殖期に入り、低年齢歯槽骨細胞は培養11日目に、また高年齢歯槽骨細胞は培養21日目に定常期に達した。
3. ALPase 活性値は、両グループの細胞ともに培養24日目に最大値を示し、40日目には急激に減少した。培養24日目の低年齢歯槽骨細胞のALPase活性値は、高年齢歯槽骨細胞より約2.2倍高い値を示した。
4. 両グループの細胞のACPase活性値およびTRACPase活性値にはいずれも有意な差は認められず、培養日数に伴う顕著な変動も認められなかった。

謝 辞

本研究の一部は、平成6年度日本大学歯学部佐藤研究費によってなされた。

文 献

- 1) Morgan J P, Miyabayashi T, Anderson J, and Klinge B: Periodontal bone loss in the aging beagle dog. A radiographic study. J. Clin. Periodontol. 1990 17:630-635
- 2) Papapanou P N, Lindhe J, Sterrett J D, and Eneroth L: Considerations on contribution of ageing to loss of periodontal tissue support. J. Clin. Periodontol. 1991 18:611-615
- 3) Amler M H: Age factor in human alveolar bone re-

及川栄二ほか：若・高年齢層のヒト歯槽骨細胞の細胞増殖とホスファターゼ活性

- pair. J. Oral. Implantol. 1993 19:138-142
- 4) Fujikawa K, Suzuki K, Tanaka K, Ebashi S, Maeno M, Otsuka K, and Murai S (Gold S I, Middel M, and Mutlu S eds.) Characteristics of human alveolar bone derived cells obtained from different age groups. Recent advances in periodontology Volume 1. 413-416 1991 Excerpta medica, Amsterdam New York Oxford
- 5) 鈴木邦治、藤川謙次、岸田 修、高橋健作、村井正大、鈴木直人、前野正夫、大塚吉兵衛、鈴木貫太郎：ヒト歯槽骨由来細胞の細胞特性第1報 ホスファターゼ活性および¹⁴C-Prolineの取り込みについて. 日歯周誌 1991 33:101-109
- 6) Ohshima M, Kuwata F, Otsuka K, Saito R, Sato K, Shioji S, and Suzuki K: Alkaline phosphatase activities of cultured human periodontal ligament cells. J. Nihon Univ. Sch. Dent. 1988 30:208-217
- 7) Suzuki N, Isokawa K, Maeno M, Otsuka K, Toda Y, and Suzuki K: Mineralized bone nodule formation *in vitro* by cell populations from young adult rabbit alveolar bone. Jpn. J. Oral Biol. 1989 31:622-625
- 8) 梅原光司、河田照茂：ヒト下顎骨由来の培養細胞の石灰化に関する研究（その1）. Jpn. J. Oral Biol. 1986 28:565-572
- 9) Schneider E L and Mitsui Y: The relationship between *in vitro* cellular aging and *in vivo* human age. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1976 73:3584-3588
- 10) 須田立雄、小澤英浩：石灰機構（高橋栄明 編：骨の科学）第1版 129-154 1985 医歯薬出版 東京.
- 11) Partridge N C, Alcorn D, Michelangeli V P, Ryan G, and Martin T J: Morphological and biochemical characterization of four clonal osteogenic sarcoma cell lines of rat origin. Cancer Res. 1983 43:4308-4314
- 12) Wlodarski K H and Reddi A H: Alkaline phosphatase as a marker of osteoinductive cells. Calcif. Tissue Int. 1986 39:382-385
- 13) Majeska R J, Rodan S B, and Rodan G A: Parathyroid hormone-responsive clonal cell lines from rat osteosarcoma. Endocrin. 1980 107:1494-1503
- 14) Suzuki N, Inukai M, Suzuki K, Nagai K, Hayashi A, Maeno M, and Otsuka K: Cellular expression of alveolar bone-derived cells following mineralized nodule formation. J. Hard Tissue Biol. 1993 2:28-36
- 15) Gerstenfeld L D, Chipman S D, Growacki J, and Lian J B: Expression of differentiated function by mineralizing cultures of chicken osteoblasts. Devel. Biol. 1987 122:49-60
- 16) Gerstenfeld L D, Chipman S D, Kelly C M, Hodgins K J, Lee D D, and Landis W J: Collagen expression, ultrastructural assembly, and mineralization in cultures of chicken embryo osteoblasts. J. Cell Biol. 1988 106:979-989
- 17) 鈴木邦治、秋山浩教、加藤 孝、小菅一弘、藤川謙次、村井正大、鈴木直人、前野正夫、大塚吉兵衛、鈴木貫太郎：ヒト歯槽骨由来細胞の細胞特性 第3報 石灰化物形成過程とホスファターゼ活性の経日的変動について. 日歯周誌 1991 34:665-672
- 18) 赤津拓彦、永田直一、高橋直之、須田立雄：破骨細胞の調節系. 実験医学 1989 7:1272-1278
- 19) 及川栄二、鈴木直人、大越哲也、鈴木 誠、田村嘉之、長沼 清、前野正夫、大塚吉兵衛：ウサギの歯根膜細胞の石灰化 nodule 形成過程に伴うホスファターゼ活性の変動について. 日大歯学 1993 67:944-953
- 20) Tsuji T, Hughes F J, McCulloch C A G, and Melcher A H: Effects of donor age on osteogenic cells of rat bone marrow *in vitro*. Mech. aging Dev. 1990 51:121-132