



Title	ラット成長軟骨培養細胞の骨形成能に関する生化学的研究
Author(s)	米田, 俊之
Citation	大阪大学, 1976, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/31540
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

「ラット成長軟骨培養細胞の骨形成能に関する生化学的研究」

大阪大学歯学部口腔外科学第二

米田俊之

1
< 緒言 >

幼若動物の長管骨骨端軟骨部や、骨折修復時の仮骨形成の際などにみられる内軟骨性骨形成過程は、骨の発育・成長・修復などの点からみて最も基本的な形をとるものであって、骨形成に関する多くの重要な問題も内包している。この現象は、軟骨細胞が分裂・増殖して、骨基質を合成・分泌した後、その細胞が肥大化し、石灰化を経て、最終的には、軟骨組織が骨組織に移行する過程である。しかし、この内軟骨性骨形成の機構については、未だ、多くの問題が未解決のまま残されており、中でも柱状構造を呈する増殖層細胞が最大限に肥大化した後、どのような運命をたどるかという点については、今なおいくつかの相反する議論が続けられている。従来は、主として光学顕微鏡を用いた組織学的観察によって、肥大化した軟骨細胞は、diaphysisの面した境界部で変性死滅する、という考えが大勢を占めていた。9) 14) 22) 37) 61) 86) 99) 125) 最近になってこの肥大

軟骨細胞の変性化に疑問を投げる研究者が、つぎつぎに現われるようになった。可成り43)~47) 92)~94)96)97) Holtrop, Silbermannらは、アイソトープによる標識実験並びに電子顕微鏡的検索から、肥大軟骨細胞が骨芽細胞や骨細胞に移行していく可能性を示唆しており、さらに下村および⁸⁷⁾⁹⁰⁾Rayも、“肥大軟骨細胞が骨細胞の前駆細胞である”とするHoltropの実験を追試確認した。このように内軟骨性骨形成過程における成長軟骨細胞の運命については、現在もなお最終的な結論が得られていない。この細胞の骨形成過程における役割、特にその生化学的動態についても、ほとんど明らかではない。

内軟骨性骨形成過程における成長軟骨細胞の重要性を示唆する論文は、臨床的にも実験的にも多数報告されているが、特にLacroixによる成長軟骨片の移植に基づいた組織学的観察はとりわけ骨形成機作に関する多くの問題を提起した。この移植実験は、その後前述のHoltropや下村、Ray並びにBentleyによってもRI

の導入と併せて繰返されてきた。著者もまた、その骨形成機作をさらに詳細に検討するため、成長軟骨細胞（GC）とそれに隣接する静止軟骨細胞（RC）⁸⁸⁾の分離・培養を試みた。つぎに培養細胞の移植実験をおこなひ、その骨形成能を追求した結果、静止軟骨細胞は骨形成能を示さなかったが、成長軟骨細胞は *in vitro* で培養した後でも、*in vivo* に戻すと host 側の細胞成分の関与のもとに著明な骨形成能を発現することを、初めて明らかにした⁹¹⁾¹¹³⁾。

今回著者は、培養細胞の種々の代謝活性を追求し、骨形成機作を生化学的に解析する目的で、両軟骨細胞の、カルキトニン、副甲状腺ホルモン、ビタミンDに対する反応性も、細胞内へのカルシウムのとりこみおよびムコ多糖合成を指標として実験をおこなったので、その結果を報告する。

<材料と方法>

1 細胞培養 軟骨細胞は、体重80g前後

のラット (Sprague-Dawley ♂) 肋軟骨移行部より GC および RC を分離した **図 1**。分離・培養の方法については、すでに詳しく報告したので省略する。^{88) 91) 113)} 実験には、直径 3.5 cm のプラスチックシャーレ (Lux) に 2×10^5 個の細胞を inoculate し、10% 牛胎児血清 (60°C、30分非働化、GIBCO)、 $50 \mu\text{g/ml}$ のアスイルビン^{63) 64)}、 $10 \mu\text{g/ml}$ の α -ケトグルタル酸^{32) 50)} $32,000 \text{ mU/ml}$ のペニシリン、 $40 \mu\text{g/ml}$ のストレプトマイシンおよび $5 \mu\text{g/ml}$ のファンギゾン添加の Ham F12 培地³⁶⁾ (日水製薬) 中で培養した軟骨細胞を用いた。

2 ^{45}Ca の軟骨細胞へのとりこみ 実験には、4日間培養した軟骨細胞を用いた。方法は、Binderman⁶⁾ 等の方法に準じておこなった。すなわち、まず培養液を除き、カルシウムを含まない Earle 溶液²⁸⁾ で 3 回洗った。つぎに、15分間同じ溶液中でプレインキュベートした後、 $1 \mu\text{Ci/ml}$ の $^{45}\text{CaCl}_2$ (New England Nuclear, 8.15 mCi/mg Ca) を含む Earle 溶液 (カルシウム不含) 2 ml を加え、 37°C で反応させた。カルキト =

ン (CT, Armour, 73 MRC U/mg, 山之内製薬 岡崎雅彦氏より) は、 10 mU/ml , 副甲状腺ホルモン (PTH, PTH 活性ペプチド, 1 → 34, Beckman, 2,870 I.U/mg, 蛋白質研究奨励会 林原俊平博士より) は、 $0.1 \mu\text{g/ml}$, ビタミン D は、活性型 の 1 種であることが最近明らかとな^{(40)~(42)(53)}、 1α -ヒドロキシビタミン D_3 (1α -OH- D_3 , 中外製薬 西井易穂博士より) を $0.2 \mu\text{g/ml}$, それぞれ反応液の中に加え^た。反応終了後、Earle 溶液で 5 回洗い、加熱した 1N NaOH 1 ml を加えて細胞と、それに附着している細胞外基質を溶解し、 1N HCl で中和後、液体シンチレーションスペクトロメーター (Aloka) で放射能を測定した。

3 培養軟骨細胞のメタクロマジー プラスチックシャーレ上に直径 6 mm のペニシリンカップを置き、その中に分離した軟骨細胞を 1×10^4 個 inoculate し、培養をおこな^な、³⁾ 培養後 2・5・10・15・20 日目にそれぞれ Green の方法により、トルイジンブルーで染色を施

し、検鏡した。すなわち、0.04%のセキルトリ
 メキルアンモニウムブロマイドを含む5%中
 性ホルマリン中で、一晚ジャーレジと固定し
 た後、染色を妨害するアンモニウムイオンを
 除くため、70%エタノールで洗滌した。そ
 して、0.04%のトリイジンブルー(0.01Mアセテ
 ート緩衝液(pH 4.0)に溶かす)で染色した。
 また細胞数は Sokoloff 等の方法に従って、接眼
 マイクロメーターを用いて算定した¹⁰⁰⁾。

4 $^{35}\text{S}\text{O}_4$ のムコ多糖へのとりこみ 軟骨細胞
 胞は、7日間培養したものを実験に用いた。
 方法は、Solursh 等の方法に従って¹⁰¹⁾ムコ多糖合
 成の最終段階である硫酸エステル化を指標と
 しておこなった。まず培養液を除き、硫酸マ
 グネシウムを含まない Earle 溶液で3回洗った。
 つぎに15分間同じ溶液でプレインキュベー
 トした後、 $2\ \mu\text{Ci}/\text{ml}$ の $\text{Na}_2\ ^{35}\text{SO}_4$ (New England
 Nuclear, $19.6\ \text{mCi}/\text{mmole}$) を含む Earle 溶液(硫
 酸マグネシウム不含) 2 ml を加え、37°C で反
 応させた。CT、PTH および $1\alpha\text{-OH-D}_3$

^{45}Ca とり、その場合と同量を反応液中に加えた。反応終了後、 1mM 硫酸マグネシウムを含む5%トリクロル酢酸を加えて反応を停止させ、ラバーポリスチレン（ガラス棒付ミグムせん）で機械的に軟骨細胞と、それに附着している細胞外基質を剝離し、5%トリクロル酢酸で5回洗滌して、最後に 0.2M トリス・塩酸緩衝液（ $\text{pH} 8.0$ ）に懸濁させ、つぎに、 1mg/ml の濃度になるようにプロナーゼE（料研薬品）を加えて 55°C で10時間消化した後、コンドロイチン硫酸を 3mg 加え、さらに1%セケルポリジニウムクロリド溶液を 0.9ml 加えて酸性ムコ多糖を沈殿させ、 37°C 、1時間放置した。この後、 $3,000\text{rpm}$ で15分間遠心して、生じた沈殿を水で2回洗い、最後に 10ml のシンクレーターに溶かして液体シンクレーションスペクトロメーターで放射能を測定した。

5 タンパク量はLowry等⁶⁵⁾の方法により定量した。

<結果>

1 細胞培養 図2 A、B に培養1週間後の GC および RC を示した。GC は polygonal な形態を保持し、増殖し、細胞外には基質を著明に分泌しており、トリインブルー染色をおこなうと、その基質の部分に顕著なメタクロマジーを認めることができた。これに対して、RC は、線維芽細胞様形態を呈し、また細胞外への基質の分泌も少なく、従ってトリインブルー染色を施してもほとんどメタクロマジーを示さなかった。

2 ^{45}Ca の軟骨細胞へのとりこみ GC のカルシウムとりこみに対する、CT, PTH および $1\alpha\text{-OH-D}_3$ の影響を 図3 に示した。コントロールでは、カルシウムは3時間まで、ほぼ時間と比例してとりこまれるのに対して、CT を加えた場合には、そのとりこみは、30分でコントロールの3時間と同じ量となり、この点でプラトーに達することが分った。すなわち CT より軟骨細胞へのカルシウ

ムのとりにサが促進されたとくなる。

これに対して、PTHを加えた場合には、カルシウムのとりにサは、1時間後から抑制がみられ、3時間後では、コントロールの約50%に抑制された。さらに $1\alpha\text{-OH-D}_3$ の場合は、より強い抑制が起こり、3時間後では、コントロールの約20%まで抑制された。

表1および表2は、GCの ^{45}Ca のとりにサに対するCTならびにPTHの濃度の影響を調べたものである。CTでは、 10mU/ml の濃度からとりにサの促進がみられ、 100mU/ml では、コントロールの約1.5倍に促進された。一方PTHの場合では 0.01ng/ml の濃度から、とりにサの抑制が起こり、 1ng/ml では、コントロールの約50%に抑制された。

同様に $1\alpha\text{-OH-D}_3$ についても濃度による影響を調べてみた。図4とりにサの阻害は、 0.02ng/ml から認められ、 2ng/ml の $1\alpha\text{-OH-D}_3$ を加えることにより、 ^{45}Ca のとりにサは、3時間後でコントロールの約 $\frac{1}{10}$ となった。また

これ以上濃度を上げてても、とりこみはほとんど変化せず、従ってこの濃度で阻害は最大となることが分、 κ 。

つぎにGCと同じ条件下で培養したRCへのカルシウムとりこみに対するCT, PTH, 1α -OH- D_3 の影響を調べた。図5、この図から分かるように、PTH, 1α -OH- D_3 による影響は、全く認められなかつた。またCTはRCの場合でもカルシウムとりこみ速度を促進する傾向にあるが、GCの場合ほど著明ではなかつた。

図6は、両軟骨細胞のカルシウムとりこみを蛋白量当りに換算して比較したものである。この場合GC蛋白量は、平均 $203 \mu\text{g}/\text{シャーレ}$ であり、RCでは平均 $350 \mu\text{g}/\text{シャーレ}$ である。この図より、RCはCT, PTHおよび 1α -OH- D_3 に対してほとんど感受性を示さないのに対して、GCは、促進および阻害とも強く反応することが分、 κ 。

つぎに ^{45}Ca のとりこみが軟骨細胞に特異的

であるか否かを検討する目的で、線維芽細胞として、BHK細胞 (Syrian hamster 由来の株化細胞である BHK 21/WI-2 (大阪大学歯学部佐藤光信博士より)) を用いて、細胞内へのカルシウムとりこみと、それに対するCTの影響を、軟骨細胞の場合と比較した。表3、BHK細胞では、カルシウムのとりこみはGCの $\frac{1}{2}$ 、RCの $\frac{1}{5}$ 程度で、またCTによる促進もまったく認められなかつた。

3 培養軟骨細胞のメタクロマジー 図7
 は培養後10日目のGCを染色したものであるが、細胞外に著明なメタクロマジー、つまり酸性ムコ多糖の分泌が認められた。また細胞の増殖とメタクロマジーとの関係を経時的に調べてみると 図8 細胞数は培養後5日でほぼ2倍となり、10日前後で大体一定となるのに対して、メタクロマジーは培養後14日前後でピークに達し、全細胞の約60%がメタクロマジーを示している。 図9 A は対照として培養後10日目のRCを染色したものであるが、メ

メタクロマジーは、ほとんど認められなかつた。

つぎに上述の培養系にCTを加え、メタクロマジーに対する影響を調べた。すなわち、 10 mU/ml のCTを培養液に加え、培養、染色は前述と同様の方法でおこなった。図10 Bは培養後10日目のGCを染色したものであるが、メタクロマジーは一層顕著となり、ほとんど全ての細胞にメタクロマジーが見られた。この場合の細胞の増殖とメタクロマジーとの関係も調べてみると図8、メタクロマジーは、CTを加えない場合に比べて著明に上昇し、14日前後では全細胞の約90%がメタクロマジーを呈していた。一方RCの場合では、CTを加えても図9 Bに示すように、メタクロマジーには、ほとんど変化が認められなかつた。

4 $^{35}\text{SO}_4$ のムコ多糖へのとりこみ GCおよびRCによって合成されるムコ多糖への $^{35}\text{SO}_4$ のとりこみと、それに対するCT, PTHの

影響を **図11** に示した。GC の場合、実線で示すようにコントロールでは $^{35}\text{SO}_4$ は12時間までほぼ時間に比例してとりこまれ、それ以後24時間まで、ゆるやかにとりこまれた。CT を加えた場合には、6時間までコントロールとほぼ同じとりこみパターンを示すが、12時間でコントロールの約20%、24時間後では約50%のとりこみ増加がみられた。PTH の場合は、さらに強く促進され、12時間後でコントロールの160%増、24時間では100%増のとりこみがみられた。一方RC は、破線で示すように $^{35}\text{SO}_4$ のとりこみはさめて低く、24時間後でもGC の場合の約30%であつた。またCT、PTH および $1\alpha\text{-OH-D}_3$ の影響は全く認められなかつた。

つぎにCT の濃度と $^{35}\text{SO}_4$ のとりこみの関係を調べた。**表4** 1mO/ml からとりこみは促進され、 100mO/ml では、コントロールの約70%のとりこみが上昇した。

同様にPTH の場合では、**表5** に示すよう

に、 $0.01 \text{ } \mu\text{g/ml}$ で、コントロールの約50%の促進がみられ、 $1 \text{ } \mu\text{g/ml}$ では、約4倍にまでとりこみが増加した。

最後に、 $1\alpha\text{-OH-D}_3$ の $^{35}\text{SO}_4$ とりこみに対する影響を調べたが、GC、RC いずれの場合でも、 $1\alpha\text{-OH-D}_3$ によって全く影響を受けなかった。 図12

<考察>

1952年 Moscona⁷¹⁾ が、トリプシンなどの蛋白分解酵素処理と機械的処理とを組み合わせ、ニワトリ胚の肢原基や中腎の細胞を解離することとを試みて以来、同様の方法を用いて、軟骨細胞の解離は多くの研究者によっておこなわれてきた。Kawiak⁵⁵⁾ (1965) は Moscona の方法に改良を加え、トリプシンとコラゲナーゼを併用することによって牛の鼻中隔軟骨から軟骨細胞の分離¹⁶⁾をおこなった。また Cahn¹⁶⁾ (1967a) も軟骨細胞の分離培養法について詳細に報告¹⁹³⁾している。Holtzer⁴⁸⁾ (1960)、Stockdale⁴⁸⁾ (1963)、黒田^{58)~60)} (1963、1964) らはニワトリ胚より軟

骨細胞を分離し、in vitro における種々の動態を観察した。彼等はいわゆる単層培養法を用いて軟骨細胞を培養すると、DNA合成は増加し、細胞分裂は早かくなるが、形態が線維芽細胞様に変化するとともに、基質の合成能が低下し、さらに培養を続けると徐々に軟骨としての性質が失われて行くことを見出した。Holtzerはこのような状態になり、軟骨細胞を“de-differentiated chondrocytes”と呼んだ。これに対して同じ軟骨細胞をペレットの状態^{(12) (19) (22) (23) (103)}で培養すると、DNA合成は低下し、細胞分裂は起こらないが、丸い形態を保持して、基質の合成が活発となることが報告されており、このような状態の軟骨細胞は、“differentiated chondrocytes”と呼ばれている。さらに最近⁽¹⁷⁾になって、培養条件を改良することにより、分化機能を失うことなく、軟骨細胞を培養することが可能であるという報告が現れるようになった。Coon⁽²⁰⁾ (1966)、Cahn⁽¹⁷⁾ (1967b)、Schulman⁽⁸⁴⁾ (1968)、Bryan

(14), (15) (1968 a, b), 渡辺および⁽¹¹⁾岡田 (1969) らは、
 ニワトリ胚を用い、Ham^{(37), (38)} (1967, 1968),
 Sokoloff⁽¹⁰⁰⁾ (1970), Green⁽³¹⁾ (1971) らは、成
 熟したウサギから軟骨細胞を分離し、特定の
 条件下において、軟骨としての性質を保持し
 たままの状態⁽⁶⁸⁾で培養を続けることに成功して
 いる。またヒトの軟骨細胞の分離培養⁽⁶⁸⁾につい
 ても、同様の報告がある。

さて本研究においては、幼若ラットの肋軟
 骨移行部より、成長軟骨細胞層と静止軟骨細
 胞層とを、区別して切り取り、EDTA、ト
 リプシンおよびコラゲナーゼ⁽⁶⁸⁾処理により、軟
 骨細胞を分離した。この方法を用いること
 より、体重80g前後のラット5匹より、成長
 軟骨細胞では $1.5 \sim 2.0 \times 10^6$ 個、静止軟骨細胞で
 は $5.0 \sim 10.0 \times 10^5$ 個の細胞を分離することができ
 た。そしてこのようにして分離した軟骨細胞
 に対して、いわゆる単層培養法をおこなった
 ところ、成長軟骨細胞は、図2Aに示すよう
 に、polygonalな形態を保持し、凝集しながら

増殖することが観察された。また培養後10日
 を経過しても、旺盛なメタクロマジン、つま
 り基質の合成が認められた。図7.8 一方静止
 軟骨細胞は、単層培養をおこなうと、線維芽
 細胞様形態を示し、図2B、基質の合成もほ
 とんど認められなかった。従って成長軟骨細
 胞は、Holtzerのいう“differentiated chondrocytes”
 、静止軟骨細胞は“de-differentiated chondrocytes”
 にそれぞれ相当するものといえるかもしれない。
 しかしこの2種の細胞の相互移行性には
 なお強い疑問がもたれるもので、その点Holtzer
 の概念をそのまま適用するには困難がある。
 すなわちそのひとつの理由として、これまで
 に述べた軟骨細胞の培養に関する報告では、
 この相互移行性が前提となっていて、彼等
 の実験方法によれば、つねに成長軟骨細胞と
 静止軟骨細胞とを区別することを考慮せず、
 両者をまとめて分離しており、単層培養に移
 りると、静止軟骨細胞の方が細胞分裂が活発な
 ため、成長軟骨細胞の存在がめだたなくなり

、全体としては、一見脱分化した軟骨細胞に変化したかのように見えたりすることになるかもしれないと思われる。一方著者が用いた分離培養法により、成長軟骨細胞は、いわゆる単層培養法でも長期間にわたって、軟骨としての性質を失うことなく培養を続けることが可能であることが明らかとなった。このように、細胞学的諸性質（主に形態および増殖能）が全く異なる二種の軟骨細胞、すなわち成長軟骨細胞と静止軟骨細胞とも別個に分離培養することに成功したのは、本研究が最初である。

今後、静止軟骨細胞と成長軟骨細胞とはどのような類縁関係にあるか、ということが細胞起源的に興味ある問題となるであろう。

Coon²⁰⁾ (1966) は、脱分化した軟骨細胞でも、培養液の組成を変えると、可逆的に分化度の高い軟骨細胞⁽¹⁰²⁾に移行し得ると報告している。

また Solursh⁽¹⁰²⁾ (1973) は軟骨細胞の conditioned medium を用いて実験をおこない、その培養液

中に、軟骨細胞自身の分化を促進する因子が含まれていると述べている。その因子の性質についてはまだ明らかではないが、非透析性で、トリプシンや熱に対して感受性の強い、おそらくタンパク様の性質をもつものであろうと考えられている。もしそのような分化促進因子の存在が確実なものであるのならば、今後“細胞分化”の本質を解明する上、これが一つの重要な手がかりを提供するものであると考えられる。

はじめに述べたように、肥大化した軟骨細胞がどのような運命をたどるか？という点については、従来は肥大軟骨細胞は内軟骨性骨化層との境界で変性死滅するという考えが大勢を占めていた。すなわち Bremer⁽¹²⁾ (1944)、Lacroix⁽⁶¹⁾ (1951)、Trueta⁽¹⁰⁵⁾ (1963)、Ham⁽³⁵⁾ (1965)、Bloom⁽⁸⁾ (1968)、Sissons⁽⁹⁷⁾ (1971) らは、主に組織学的観察から、軟骨細胞は基質が石灰化することにより栄養の供給が絶たれ、その結果変性死滅におちいると述べている。そして、

骨髓側から侵入してきて血管系の細胞¹⁰⁵⁾あるいは他の末分化間葉系細胞が骨細胞⁶¹⁾の前駆細胞^{106)~108)}として骨誘導をうけると主張している。それゆえ、Lacroix⁶¹⁾以来、内軟骨性骨形成の機構は骨誘導説によつて説明される⁸⁶⁾ことが支配的であつた。さらに Scott⁸⁶⁾ (1956)、Godman³⁰⁾ (1960)、Brighton¹³⁾ (1973)、Lutfi⁶⁷⁾ (1974)、Crissman²³⁾ (1974)らは電顕的観察にもとづいて上記と同じ結論を報告している。

一方少数ではあるが、Brachet¹¹⁾ (1893)以来、肥大軟骨細胞が骨芽細胞や骨細胞に移行していく可能性を示唆する研究者が現われるようになる。Copenhaver²¹⁾ (1964)、Bevelander⁵⁾ (1970)、Hall³⁴⁾ (1972)、Kalayjian⁵²⁾ (1972)らは組織学的観察から、Kuhlman⁵⁷⁾ (1970)は生化学的見地から、また Kemper⁵⁶⁾ (1962)、Rigal⁸³⁾ (1962)ら以降、内軟骨性骨形成の機構解明に、アイソトープによる標識実験が応用されるようになり、Crelin²²⁾ (1967)はマウスの恥骨原基の組織培養に3H-4ミジ

ンによるオートラジオグラフィを用い、肥大
 軟骨細胞は死滅せず、骨芽細胞や骨細胞に移
 行していくと主張している。さらに Silbermann
 は光学顕微鏡ならびに電子顕微鏡による組織
 学的観察^{92) 96) 97)}、およびアイソトープを用いた標識
 実験^{90) 94)}から同様の説を支持している。近年、以
 上の報告者らに先がけて、この考えに先鞭を
 つけたのは Holtrop^{43) 45)}であるが、彼等は H-4 ミ
 ジンで標識した幼若ラット肋骨の成長軟骨片
 を、別の同系ラットの筋肉内に移植した。こ
 れを2週間後に取り出して、オートラジオグ
 ラフィーを行、たところ、軟骨片の末端に形
 成された新生骨中の多数の骨細胞、骨芽細胞
 に標識が見られたことから、成長軟骨細胞は
 骨細胞の前駆細胞の一つであるといふ考えを提起
 した。その後さらに進んで、電顕的^{46) 47)}にも固定法
 を改良することにより、肥大軟骨細胞は骨化
 する直前まで細胞内小器官がよく発達し、非
 常に活性が高く、変性死滅すると思えま
 いと述べている。さらに下村および Ray^{87) 90)}は Holtrop

の標識実験を追試して標識化に用いた¹¹⁷H-4
 ミジンの量を増し、彼女の観察を一層明確な
 ものとして肯定した。しかしながら、同様の
 方法で、ラサギを用いて移植実験をおこな
 ったBentley¹¹⁸は、骨細胞内に³H-4ミジンの標識
 を認めることができず、彼女の報告に疑問を
 投げている。

このように、肥大軟骨細胞が内軟骨性骨形
 成過程において非常に重要な役割を果たすと考
 えられるにもかかわらず、その内軟骨性骨形
 成過程のメカニズムにおいて演ずる役割につ
 いては未だ充分明らかな説明が得られていな
 い。そこで著者は前述の細胞培養系を用いて
 移植実験をおこなうことにより、これらの点
 を説明しようと試みた。この実験はすでに、
 報告したところ¹¹⁹であるが、本研究の出発点と
 なった重要な背景を成す問題であるので、こ
 こにあらためて論じたい。すなわちまず前述の
 ようにして一週間培養した軟骨細胞に対して
 、0.2%トリプシンと0.2%コラゲナーゼ混合液

(1:2)を37℃、1時間作用させることによりシャーレの底面より遊離させ10%牛胎児血清添加のハムF-12培養液に懸濁¹⁶⁾した。この懸濁液をdiffusion chamber (ミリポアフィルターは孔径0.45 μm、厚さ100 μmのものを使用)内へ0.2 ml、細胞数にして、約5~10万個封入し、Isograftとしてラットの腹腔内へそのchamberを移植した。対照として、何ら操作を加えていない成長軟骨片を培養液と共に封入したchamberを移植した。そして2週間後、および6週間後にchamberを腹腔より取り出し、10%ホルマリンで固定後、10%EDTA溶液で脱灰、パラフィン包埋し、ヘマトキシリン-エオジンで染色した。

2週間後にchamberを取り出した例においてはchamber内は細胞と基質で満たされているが、成長軟骨片(3例)、静止軟骨細胞(5例)および成長軟骨細胞(5例)のいずれも封入した場合においても新生骨形成は全く認められなかった。

6週間後に取り出しに例においては、成長軟骨片を封入移植した場合に**図13**に示すように軟骨片の細胞が旺盛に増殖しているのがみられた。静止軟骨細胞を封入移植した場合では、**図14**に示すように細胞の増殖は比較的少ないが、明らかに軟骨組織が形成されている。**図15**は成長軟骨細胞の場合であるが、細胞の肥大化が著明で、柱状構造の再構成を思わせる像もみられ、明らかに内軟骨性骨形成に傾く傾向を示している。しかし以上いずれの場合にも、骨形成は認められなかった。ところが成長軟骨細胞を封入したchamberで、一例だけフィルターに僅かな破壊がみられたものがあり、このchamber内には著明な骨形成を認めた。**図16**この新生骨は、organotypicなもので、広汎に骨髓腔が形成され、その中に骨芽細胞や破骨細胞などが多数存在している。また新生骨の周囲には島状の軟骨組織の形成も見られた。以上の結果をまとめたのが**表6**である。この結果から成長軟骨細胞が内軟骨

性骨化によつて骨形成に至るには host 側からの細胞成分の関与が必要であるということが分つた。というのは、ここで用いた孔径 $0.45\mu\text{m}$ のミリポアフィルターでは体液成分は通過できるが細胞は通過できず、従つてフィルターが破損したことに伴ひ、chamber 内の細胞成分が侵入したと考えられるからである。そこで次のような実験をおこなつた。すなわち軟骨片を封入した chamber 内に封入移植してから 2 週間後にこの chamber を取り出し、21 ゲージの注射針でフィルターに孔をあけ、再び同一ラットの腹腔内に挿し、それからさらに 4 週間後にこの chamber を取り出した。そして前と同じ方法で組織学的検索をおこなつた。図 17 は成長軟骨片を封入した場合である。フィルターの孔から host の結合織が毛細血管を伴つて chamber 内に侵入しているのがわかる。この組織は、chamber 内を満ち、軟骨片を囲んでゐる。そして軟骨片の末端部で柱状構造細胞が肥大化し、さらにその末端で内軟

骨性骨形成が認められた。図18は静止軟骨細胞を封入した場合である。hostの組織の侵入が認められると同時に、軟骨組織が島状に形成されている。また細胞が2個ずつ対になり、静止軟骨の特徴を再現している。しかし骨形成は認められなかった。図19は成長軟骨細胞を封入した場合である。フィルターの下からhostの組織がchamber内に侵入して来ると同時に典型的な新生骨の形成が認められ、しかも新生骨に一致して両側のフィルターが紡錘状にふくらんでchamber自体の容積を増大している。以上の結果をまとめてみると表7のようになる。すなわち、静止軟骨細胞では、フィルターに孔をあけてhostの組織を導入しても骨形成はおこらなかったが、成長軟骨片では、成長軟骨細胞を封入し、フィルターに孔をあけた場合には、非常に高率に骨形成が認められた。なお、下村およびRay⁸⁹⁾によつてラット大腿筋肉内に軟骨片を移植した場合、成長軟骨では約10日後にそのメソフ

インス側に充分な新生骨形成をみることはでき
るが、静止軟骨のみでは、全く骨形成がお
こらないことが明らかにされている。

これらの移植実験の結果より次のようなこ
とが考察された。

1) 静止軟骨細胞では、観察期間中、骨形
成能が認められなかった。

2) 成長軟骨細胞においては、in vitro で
培養後も、in vivo に戻すと host 側の細胞成
分の関与のもとに著明な骨形成能を発現する
ことを初めて見いだした。しかしながら、こ
れらの実験は新生骨における骨細胞が血管系
細胞やまたは、未分化間葉系細胞が骨誘導を

うけて形成されたものなのか、あるいはまた
肥大細胞が直接移行したもののか、云いかえり
ば内軟骨性骨形成を骨誘導説によつて説明す
るか、軟骨細胞の骨細胞への直接移行によつ
て説明するかについての疑問を充分明らかに
してはいるものではない。この点についてはま
らに各種の実験方法を導入することによつて

明らかになりつつあると考えている。さらにまた、どの細胞が主役を演じているにせよ、このような骨形成に至らしめる因子、例えば Urist⁽¹⁰⁹⁾⁽¹¹⁰⁾ のいう Bone Morphogenetic Protein のような物質の存在についても検討を進めていきたいと思います。

移植実験の結果より成長軟骨細胞は、培養後も骨形成能を保持していることが明らかとなつた。そこで次にこのような骨形成能を発現する成長軟骨細胞の生化学的動態の解析を試す。

生体内のカルシウム恒常性に骨が重要な役割を演じていることには疑問の余地がない⁽⁷⁴⁾。一方カルシウム代謝を調節する因子としては、主にカルシトニン⁽⁷²⁾⁽⁷⁹⁾、副甲状腺ホルモン⁽⁸¹⁾およびビタミンD⁽²⁴⁾⁽²⁵⁾⁽⁷⁵⁾⁽¹⁰⁴⁾があげられているが、これらの因子に関する従来の研究はほとんど骨組織あるいは骨細胞についておこなわれているのみである。しかしながら上記の移植実験の結果より成長軟骨細胞が骨形成能を有することが

明らかとなり、従ってこの軟骨細胞がどのよ
 うなカルシウム代謝パターンを示すか？また
 カルシウム代謝の調節上には基質の合成に
 関して、ホルモンやビタミンに対してどのよ
 うな反応性を示すかということが非常に興味
 ある問題となる。そこでまず、軟骨細胞への
 カルシウムのとりこみと、それに対するカル
 シトニン(CT)、副甲状腺ホルモン(PTH)、ビ
 タミンDの影響について検討した。その結果
 、成長軟骨細胞では、CTによってカルシウ
 ムのとりこみが促進され、PTH、 $1\alpha-OH$
 $-D_3$ によつて逆に強く阻害されるのに対して
 、静止軟骨細胞では、CT、PTH、 $1\alpha-OH$
 $-D_3$ に対してほとんど感受性を示さないとい
 うことが明らかとなり、図6。つぎに軟骨細
 胞と他の細胞として線維芽細胞へのカルシウ
 ムとりこみを比較する目的でおこなつた表3
 に示す実験から、軟骨細胞へのカルシウムと
 りこみが、単なる細胞への吸着ではなく、ま
 た軟骨細胞に特異的にとりこまれるものと考

えられる。Binderman⁶⁾⁷⁾ (1971, 1974) はラット胚の頭蓋骨より分離した骨細胞へのカルシウムとりこみが、CTによって促進され、同じラットの皮膚から分離した線維芽細胞では、カルシウムのとりこみ量も少なく、CTによる影響もみられないと報告している。また彼は、CTによって細胞内へのカルシウムとりこみが増加するということをもとめて、その細胞が骨細胞であると同定しうると述べており、Dzyiak²⁶⁾ (1974) もCTによって骨細胞へのカルシウムとりこみが促進されると報告している。これらの点からみて、成長軟骨細胞と骨細胞とは、まわめて近い類縁関係にあるものと考えられる。さらに成長軟骨細胞へのカルシウムとりこみに対するCT、PTHの影響が直接作用であるか、それとも間接作用であるか？ また、CTによる⁴⁵Caのとりこみ促進が真のとりこみ促進であるか、あるいはカルシウムの代謝回転が抑制された結果によるのか？ という点は今後の問題である。ヒビ

文献的⁹⁾には、Borle (1969)、Harrell (1973) Messer⁷⁰⁾ (1974)らは、CTによるカルシウムとりこみの促進は、細胞内からのカルシウム流出の抑制によるものであると述べている。

つまり、ビタミンDの作用については、in vitroにおいて骨吸収も促進することが知られており、⁸⁰⁾⁸²⁾本研究における実験結果も 1α - $OH-D_3$ により細胞内へのカルシウムとりこみが著しく抑制されることを示している **図4**。一方、生体において、V.Dは内軟骨性骨化を促進するものとして実際にくる病、骨軟化症の治療に用いられている。従って、現段階では in vitro の実験結果と抗くる病性という薬剤効果とを短絡させることには多くの困難があり、特に in vivo では、別の生理的要因も想定せねばならないと考えられる。また 1α - $OH-D_3$ については、最近、 D_3 分子の側鎖にある25位の炭素が水酸化されて $1\alpha,25$ -ジヒドロキシビタミン D_3 の型になって作用を発現するという説が有力であり、⁵³⁾あるいは成長軟骨

細胞にも肝細胞と同じように25-水酸化酵素が存在するのかもしれない。

最近、高分子骨基質の1つとして、また内軟骨性骨形成において、石灰化に重要な意義をもつものとしてプロテオグリカンあるいはグリコサミノグリカン(酸性ムコ多糖)が注目されている。⁽¹⁰⁾⁽¹⁸⁾⁽⁴⁹⁾⁽⁶²⁾⁽⁷⁸⁾⁽⁹⁵⁾⁽⁹⁹⁾⁽¹¹²⁾しかしながら、軟骨での酸性ムコ多糖合成と石灰化との関係については、不明な点が多い。そこで骨形成能を有する成長軟骨細胞と酸性ムコ多糖合成との関係を追求する目的で、培養軟骨細胞に対してトルイジンブルー染色による組織化学的検索をおこなった。その結果は以前にも報告したとおり⁽¹⁴⁾、成長軟骨細胞は著明なメタクロマジーを示すが、静止軟骨細胞ではメタクロマジーがほとんど認められなかつた(図7.8)。ところでメタクロマジー(異染色性)というのは、ある色素で組織を染めるとき、その色素溶液とは異なり色調で染色されることである。酸性ムコ多糖はメタクロマジーを示すが、中性

ムコ多糖はメタクロマジーを示さない。このことから静止軟骨細胞は、酸性ムコ多糖合成能が弱い。成長軟骨細胞は *in vitro* においても旺盛に酸性ムコ多糖を合成・分泌していることが分った。従って静止軟骨細胞よりも成長軟骨細胞の方がより石灰化に重要な役割を果たしていると考えられる。

しかし、静止軟骨細胞はメタクロマジーを示さないが、中性ムコ多糖を合成・分泌している可能性があり、この点については別の方法で検討する必要がある。

CTはその第1の標的臓器が骨であり、従って骨吸収あるいは骨形成に対する影響については、従来多くの研究が報告されているが、ムコ多糖合成に対するCTの効果については、僅かに牛胚の骨細胞グリコサミノグリカン合成⁶⁹⁾に対して調べた Baxter³⁾ (1968)、Martin (1969)らの報告があるのみで、未だ充分明らかではなかつた。そこで上述の培養系にCTを加え、まずメタクロマジーに対する

る影響を調べてみた。その結果、静止軟骨細胞ではほとんど変化が認められなかつたが、**図9B**、成長軟骨細胞では著明にメタクロマジーが増強された。**図10A・B**。このことから、CTは成長軟骨細胞の酸性ムコ多糖合成を促進する因子であること、言い換えれば静止軟骨細胞はCTに対する代謝応答性を欠いているが、成長軟骨細胞はCTに感受性を示すことが明らかとなった。

つぎに、軟骨細胞の酸性ムコ多糖合成と、それに対するCT、PTH、 $1\alpha-OH-D_3$ の影響を定量的に分析するため、その合成の最終段階である硫酸エステル化を指標として実験をおこなった。その結果、培養成長軟骨細胞では、 $^{35}SO_4$ 酸性ムコ多糖へのとりこみは、CT、PTHよりも共に促進されたが、 $1\alpha-OH-D_3$ によつては影響を受けなかつた。**図11・12**。また静止軟骨細胞では $^{35}SO_4$ のとりこみ量は少なく、CT、PTH、 $1\alpha-OH-D_3$ のいずれに対しても、全く反応を示さなかつた。**図11・12**

。先に述べたトルイジンブルー染色によるメタクロマジーは、高分子の硫酸エステル、またはカルボキシル基をもつもの（例えばヒアルロン酸）の特性であり、従ってこの実験結果は、前述の組織化学的検索の結果も定量的に裏づけられることになる。

つとに興味ある問題としては、PTHは骨吸収を促進し、CTはこれを抑制するというようにカルシウム代謝に対して全く相反する作用を有する両ホルモンがともに成長軟骨細胞のムコ多糖合成に関して促進的に作用するという点である。この問題については、川島⁵⁴⁾ (1973)、岩田⁵⁷⁾ (1975)、Martin⁶⁹⁾ (1969)らも同様の結果を報告しているが、CTにより促進されて生成したムコ多糖と、PTHにより合成されたムコ多糖の質について検討を加える必要がある。Luben⁶⁶⁾ (1974)は、PTHにより骨のヒアルロン酸合成が促進されると述べている。また本研究では、ムコ多糖合成の最終段階である硫酸エステル化を指標として

実験をおこなったが、それ以前の多糖合成の段階においてもCTとPTHが同様の効果を示すかどうか？これについては、Hajek³³⁾ (1975)がインシュリンのムコ多糖合成に対する影響について、検討を加えているように、別のアイソトープを指標として実験をおこなう必要がある。

さらに、CTによるカルシウムのとりこみ促進とムコ多糖合成促進、一方では、PTHによるカルシウムのとりこみ阻害とムコ多糖合成促進との間、どのような関連性があるか？つまりSchulman⁸⁵⁾ (1974)が報告しているように、カルシウムとムコ多糖合成との関係についても追求してゆく必要がある。

以上に述べた結果から、同じ軟骨細胞であっても成長軟骨細胞と静止軟骨細胞では、その細胞学的性質、骨形成能、代謝活性、およびホルモンやビタミンに対する応答性のいずれの面でも、全く異なることが明らかとなった。また従来、カルキトニン、副甲状腺ホル

モンおよびビタミンDに関しては、骨組織、あるいは骨細胞のみが研究の対象とされてきたが、本研究によって骨細胞のみならず、成長軟骨細胞もこれらホルモンおよびビタミンに対して、きわめて鋭敏な応答性を示すことが明らかとなった。

これらの事実は、成長軟骨細胞が骨形成に対して重要な役割を有することも明確に示すとともに、成長軟骨細胞と骨細胞との間にもわめて近い類縁関係が存在することも強く示唆するものであると考える。

最後に、ムコ多糖と並んでもう一つの重要な高分子骨基質の成分であるコラーゲンの軟骨細胞による合成と、それに対するCT、PTHの影響について簡単に述べてみたい。これには ^{14}C -プロリンのコラーゲンへのとりこみを指標とした。血清無添加のEagleの最少必須培養液²⁷⁾中で軟骨細胞を37°C、24時間、インキュベートし、Peterkofsky^{76) 77)}の方法に準じて、 ^{14}C -プロリンのコラーゲンへのとりこみを調

べたところ、成長軟骨細胞では、CTKよりとりこみが軽度に促進され、PTHにより抑制された。一方、静止軟骨細胞ではCTKの影響は認められなかったが、PTHによりとりこみは抑制された。また、両軟骨細胞のとりこみ量およびとりこみ速度にはムツ多糖の場合と異なり、ほとんど差は見られなかった。コラーゲン合成に関しては、現在さらに詳細に実験中である。

今後、他のホルモンやビタミンの影響についても検討を加えていく予定である。

<総括>

1 ラット肋軟骨部より、静止軟骨細胞と成長軟骨細胞とも別個に分離培養することに初めて成功した。

2 培養期間中、静止軟骨細胞は線維芽細胞様の外観を呈したが、成長軟骨細胞は軟骨としての性質を失うことなく増殖を続けることが分った。

3 両軟骨細胞内へのカルシウムとりこみ

に対するカルシトニン、副甲状腺ホルモンおよびビタミンDの影響について調べたところ、静止軟骨細胞はこれらの因子に対して、ほとんど感受性を示さなかったが、成長軟骨細胞は、カルシトニンによる促進、副甲状腺ホルモンおよびビタミンDによる抑制共に強く反応することが分った。

4 トルイジンブルーを用いて両軟骨細胞のムコ多糖合成能を、組織化学的に検討したところ、静止軟骨細胞はメタクロマジーをほとんど示さなかったのに対して、成長軟骨細胞は培養期間中、著明なメタクロマジーを示した。またカルシトニンによりそのメタクロマジーは一層増強された。

5 さらに $^{35}\text{SO}_4$ を用いて定量的に両軟骨細胞のムコ多糖合成能と、それに対するカルシトニン、副甲状腺ホルモン、およびビタミンDの影響を調べた。その結果、成長軟骨細胞は、ムコ多糖合成能並びに合成速度が、静止軟骨細胞に比べてはるかに高く、さきの組織

化学的検索の結果を定量的に裏付けることができた。また静止軟骨細胞は、カルシトニン、副甲状腺ホルモン、ビタミンDに対して全く反応を示さなかったが、成長軟骨細胞では、カルシトニン、副甲状腺ホルモンにより、ムコ多糖合成が促進された。しかしながら、ビタミンDに対しては全く感受性を示さなかった。

6 ^{14}C -プロリンを用いて、両軟骨細胞のコラーゲン合成と、それに対するカルシトニン、副甲状腺ホルモンの影響についてを、若干の結果を報告した。

< 謝辞 >

稿を終るに臨み、本研究を始める機会も与えて頂き、終始、熱心な御助力並びに御鞭達を賜、此、生化学講座竹田義朗教授、口腔外科学第二講座川勝賢作教授、口腔外科学第一講座宮崎正教授に深く感謝致します。

なおその間、終始ひとかたならぬ御指導、御教示を頂いた。防衛医大整形外科学講座下村裕教授、本学歯学部生化学講座鈴木不二男助教授、井上秀夫博士並びに、生化学講座諸兄に厚くお礼を申し上げます。

また細胞培養について御教示頂いた佐藤光信博士をはじめとする第一口腔外科学教室の方々、および京都大学理学部生物物理学講座岡田節人教授に心から謝意を表します。

最後に種々の面において貴重な御援助、御助言を頂いた、口腔外科学第二講座教室員諸兄に深謝いたします。

Biochemical studies on osteogenesis by chondrocytes
from growth cartilage of rat rib.

Toshiyuki Yoneda

The 2nd Department of Oral and Maxillofacial
Surgery, Osaka University Dental School, 32
Joan-cho, Kita-ku, Osaka, Japan

The process of replacing cartilage by bone is known as endochondral ossification. During the first stages of conversion into bone, epiphyseal cartilage cells increase their rate of proliferation, enlarge and become hypertrophic. However, the biochemical mechanism of this process, particularly the behavior of hypertrophied chondrocytes is not fully understood, even today.

In the present study, the following experiments were undertaken to investigate the osteogenic potential of cultured chondrocytes isolated from the rib of young rats and their metabolic activities.

Chondrocytes were isolated from growth cartilage (GC) and resting cartilage (RC) of rat rib and cultivated in vitro. GC cells, when grown in Ham's F-12 medium supplemented with 10% fetal calf serum in vitro were found to be polygonal and epithelial-like. They exhibited properties of well-

differentiated cartilage, including the formation of a refractile matrix and metachromatic staining with toluidine blue.

On the other hand, RC cells grown under the same conditions as GC cells were not polygonal but spindle-shaped like fibroblasts and showed less intense metachromasia.

The cultured chondrocytes were placed in Millipore diffusion chambers, which were then implanted into the abdominal cavities of rats for several weeks and prepared for histological analysis. The results indicate that GC cells have a remarkable osteogenic potential, even after cultivation in vitro, whereas RC cells show no osteogenic activity. However, GC cells alone do not form new bone but require the participation of certain host cells to initiate osteogenic differentiation.

Then, the effects of various hormones and vitamins on chondrocytes cultured in vitro were studied to know more detail about their behavior.

Calcium uptake by cultured GC cells, as measured by ^{45}Ca incorporation, was stimulated by calcitonin (CT). Parathyroid hormone (PTH) or 1α -hydroxycholecalciferol (1α -OH- D_3), however, strikingly decreased calcium uptake. On the contrary, calcium uptake by cultured RC cells was only slightly stimulated by CT, but no effect occurred by PTH or 1α -OH- D_3 .

Both CT and PTH stimulated the uptake of $^{35}\text{SO}_4$ into acid mucopolysaccharides synthesized in GC cell culture system. However, RC cells did not respond at all to any of these

hormones or vitamin D in acid mucopolysaccharides synthesis.

Therefore, different epiphyseal zones seem to have striking differences in morphology, osteogenic potentiality, metabolic activity and responsiveness to hormones and vitamin.

Additionally, it was found that not only bone cells but also GC cells are highly sensitive to CT, PTH and Vitamin D.

These findings strongly suggest that GC-chondrocytes have important roles in bone formation and that there is a close relation between growth cartilage cells and bone cells.

1. Abbott, J. and Holtzer, H. (1966): The loss of phenotypic traits by differentiated cells. III. The reversible behavior of chondrocytes in primary cultures. J. Cell Biol. 28, 473-486
2. Abbott, J. and Holtzer, H. (1968): The loss of phenotypic traits by differentiated cells. V. The effect of 5-bromo-deoxyuridine on cloned chondrocytes. Proc. Natl. Akad. Sci. 59, 1141-1151
3. Baxter, E., Fraser, J. R. E., Harris, G. S., Martin, T. J. and Melick, R. A. (1968): Stimulation of glycosaminoglycan synthesis by thyrocalcitonin preparations. Med. J. Australia 1, 216-217
4. Bentley, G. and Greer, R. B. (1970): The fate of chondrocytes in endochondral ossification in the rabbit. J. Bone Jt. Surg. B 52, 571-577
5. Bevelander, G. (1970): Essentials of histology, 6th ed., The C. V. Mosby Co., Saint Louis, P. 54
6. Binderman, I. and Harrell, A. (1971): The effect of thyrocalcitonin on calcium uptake by isolated bone cells. Israel J. Med. 7, 369-370
7. Binderman, I., Duksin, D., Harrell, A., Katzir, E. and Sachs, L. (1974): Formation of bone tissue in culture from isolated bone cells. J. Cell Biol. 61, 427-439

8. Bloom, W. and Fawcett, D.W. (1968): A textbook of histology, 9th ed., W.B. Saunders Co., Philadelphia-London-Toront, P.212-262
9. Borle, A.B. (1969): Effects of thyrocalcitonin on calcium transport in kidney cells. Endocrinology, 85, 194-199
10. Bowness, J.M. (1968): Present concepts of the role of ground substance in calcification. Clin.Orthop. 59, 233-247
11. Brachet, A. (1893): Etude sur la resorption des cartilages et la development des os longschez les oiseaux. Mont. Int.J.Anat.Physiol. 10, 391
12. Bremer, J.L. and Weatherford, H.L. (1944): A textbook of histology, 6th ed., The Blakiston Co., Philadelphia, P.131-138
13. Brighton, C.T., Sugioka, Y. and Hunt, R. (1973): Cytoplasmic structures of epiphyseal plate chondrocytes.; Quantitative evaluation using electron micrographs of rat costchondral junctions with special reference to the fate of hypertrophic cells. J.Bone Jt.Surg. A 55, 771-784
14. Bryan, J. (1968): Studies on clonal cartilage strains. I. Effect of contaminant non-cartilage cells. Exp.Cell Res. 52, 319-326
15. Bryan, J. (1968): Studies on clonal cartilage strains. II. Selective effects of different growth conditions. Exp.Cell Res. 52, 327-337

16. Cahn, R.D., Coon, H.G. and Cahn, M.B. (1967a): Growth of differentiated cells.: Cell culture and cloning techniques. In: Methods in developmental biology, (Wilt, F. and Wessells, N.K., eds.), Thomas Crowell, New York, P. 493-530
17. Cahn, R.D. and Lasher, R. (1967b): Simultaneous synthesis of DNA and specialized cellular products by differentiating cartilage cells in vitro. Proc. Natl. Akad. Sci. 58, 1131-1138
18. Campo, R. and Tourtellotte, C.D. (1970): Protein-polysaccharides of cartilage and bone in health and disease. Clin. Orthop. 68, 182-209
19. Chacko, S., Abbott, J., Holtzer, S. and Holtzer, H. (1969): The loss of phenotypic traits by differentiated cells. VI. Behavior of the progeny of a single chondrocyte. J. Exp. Med. 130, 417-442
20. Coon, H.G. (1966): Clonal stability and phenotypic expression of chick cartilage cells. Proc. Natl. Akad. Sci. 55, 66-73
21. Copenhaver, W.M. (1964): Bailey's textbook of histology, 15th ed., The Williams and Wilkins Co., Baltimore, P. 132
22. Crelin, E.S. and Koch, W.F. (1967): An autoradiographic study of chondrocyte transformation into chondroclasts and osteocytes during bone formation in vitro. Anat. Rec. 158, 473-484

23. Crissman, R.S. and Low, F.N. (1974): A study of fine structural changes in the cartilage-to-bone transition within the developing chick vertebra. Am.J.Anat. 140, 451-470
24. DeLuca, H.F. (1974a): Vitamin D-1973. Am.J.Med. 57, 1-12
25. DeLuca, H.F. (1974b): Vitamin D; the vitamin and the hormone. Fed.Proc. 33, 2211-2219
26. Dziak, R. and Brand, J.S. (1974): Calcium transport in isolated bone cells. II. Calcium transport studies. J,Cell Physiol. 84, 85-96
27. Eagle, H. (1959): Amino acid metabolism in mammalian cell cultures. Science, 130, 432-437
28. Earle, W.R. (1943): Production of malignancy in vitro. IV. The mouse fibroblast cultures and changes seen in the living cells. J.Natl.Cancer Inst. 4, 165-212
29. Fukushima, M., Suzuki, Y., Tohira, Y., Matsunaga, I., Ochi, K., Nagano, H., Nishii, Y. and Suda, T. (1975): Metabolism of 1α -hydroxyvitamin D_3 to $1\alpha,25$ -dihydroxyvitamin D_3 in perfused rat liver. Biochem.Biophys.Res.Comm. 66, 632-638
30. Godman, G.C. and Porter, K.R. (1960): Chondrogenesis studied with electron microscope. J.Biophys.Biochem.Cytol. 8, 719-760
31. Green, W.T.Jr. (1971): Behavior of articular chondrocytes in cell culture. Clin.Orthop. 75, 248-260

32. Gribble, T.J., Comstock, J.P. and Udenfriend, S. (1969): Collagen chain formation and peptidyl proline hydroxylase in monolayer tissue cultures of L-929 fibroblasts. Arch. Biochem. Biophys. 129, 308-316
33. Hajek, A.S. and Solursh, M. (1975): Stimulation of growth and mucopolysaccharide synthesis by insulin treatment of chick embryo chondrocytes in cell culture. Gen. Comp. Endocrinol. 25, 432-446
34. Hall, B.K. (1972): Immobilization and cartilage transformation into bone in the embryonic chick. Anat. Rec. 173, 391-404
35. Ham, A.W. (1965): Histology, 5th ed., J.B. Lippincott Co., Philadelphia and Montreal, P. 373-450
36. Ham, R.G. (1965): Clonal growth of mammalian cells in a chemically defined, synthetic medium. Proc. Natl. Akad. Sci. 53, 288-293
37. Ham, R.G. and Murray, L.W. (1967): Clonal growth of cells taken directly from adult rabbits. J. Cell Physiol. 70, 275-280
38. Ham, R.G. and Sattler, G.L. (1968): Clonal growth of differentiated rabbit cartilage cells. J. Cell Physiol. 72, 109-114
39. Harrell, A., Binderman, I. and Rodan, G.A. (1973): The effect of calcium concentration on calcium uptake by bone cells treated with thyrocalcitonin. Endocrinology, 92, 550-555

40. Haussler, M.R., Zerwekh, J.E., Hesse, R.H., Rizzardo, E. and Pechet, M.M. (1973): Biological activity of 1α -hydroxycholecalciferol, a synthetic analog of the hormonal form of vitamin D_3 . Proc. Natl. Akad. Sci. 70, 2248-2252
41. Holick, M.F., Semmler, E.G., Schones, H.K. and DeLuca, H.F. (1973): 1α -Hydroxy derivative of vitamin D_3 ; a highly potent analog of $1\alpha, 25$ -dihydroxyvitamin D_3 . Science, 180, 190-191
42. Holick, M.F., Kasten-Schraufrogel, P., Tavela, T. and DeLuca, H.F. (1975): Biological activity of 1α -hydroxyvitamin D_3 in the rat. Arch. Biochem. Biophys. 166, 63-66
43. Holtrop, M.E. (1966): The origin of bone cells in endochondral ossification. In: Calcified tissues, (Fleisch, H., ed.) Springer, Berlin-Heidelberg-New York, P. 32-36
44. Holtrop, M.E. (1967a): The potencies of the epiphyseal cartilage in endochondral ossification. Proc. Kon. Ned. Akad. Wet. Ser. C 70, 21-28
45. Holtrop, M.E. (1967b): Factors influencing the growth rate in endochondral ossification. Proc. Kon. Ned. Akad. Wet. Ser. C 70, 29-38
46. Holtrop, M.E. (1972a): The ultrastructure of the epiphyseal plate. I. The flattened chondrocytes. Calc. Tiss. Res. 9, 131-139

47. Holtrop, M.E. (1972b): The ultrastructure of the epiphyseal plate. II. The hypertrophic chondrocytes. Calc. Tiss. Res. 9, 140-151
48. Holtzer, H., Abbott, J., Lash, J. and Holtzer, S. (1960): The loss of phenotypic traits by differentiated cells in vitro. I. Dedifferentiation of cartilage cells. Proc. Natl. Akad. Sci. 46, 1533-1542
49. Howell, D.S., Marquez, J.F. and Pita, J.C. (1971): Current concepts of calcification. J. Bone Jt. Surg. A 53, 250-258
50. Hutton, J.J. Jr. (1967): Cofactor and substrate requirements of collagen proline hydroxylase. Arch. Biochem. Biophys. 118, 231-240
51. 岩田信二郎. 遠藤浩良. (1976): カルシトニンの軟骨成長促進作用. 骨代謝. 9 (印刷中)
52. Kalayjian, D.B. and Cooper, R.R. (1972): Osteogenesis of the epiphyses. A light and electron microscopic study. Clin. Orthop. 85, 242-256
53. Kaneko, C., Yamada, S., Sugimoto, A., Eguchi, Y., Ishikawa, M., Suda, T., Suzuki, M., Kakuta, S. and Sasaki, S. (1974): Synthesis and biological activity of 1 α -hydroxyvitamin D₃. Steroids, 23, 75-92
54. 川島光太郎. 岩田信二郎. 遠藤浩良. (1973): 副甲状腺ホルモン⁹の軟骨組織成長促進作用. 骨代謝. 6, 114-117

55. Kawiak, J., Moskalewski, S. and Darzynkiewicz, Z. (1965): Isolation of chondrocytes from calf cartilage. Exp. Cell Res. 39, 59-68
56. Kember, N.F. (1960): Cell division in endochondral ossification. A study of cell proliferation in rat bones by the method of tritiated thymidine autoradiography. J. Bone Jt. Surg. B 42 824-839
57. Kuhlman, R.E. and McNamee, M.J. (1970): The biochemical importance of the hypertrophic cartilage cell area to endochondral bone formation. J. Bone Jt. Surg. A 52, 1025-1033
58. Kuroda, Y. (1963): Changes in aggregation and differentiation of cartilage cells grown in monolayer cultures. Exp. Cell Res. 30, 446-448
59. Kuroda, Y. (1964a): Studies on cartilage cells in vitro. I. Morphology and growth of cartilage cells in monolayer cultures. Exp. Cell Res. 35, 326-336
60. Kuroda, Y. (1964b): Studies on cartilage cells in vitro. II. Changes in aggregation and in cartilage forming activity of cells maintained in monolayer cultures. Exp. Cell Res. 35, 337-348
61. Lacroix, P. (1951): The organization of bones, J.A. Churchill, London, P. 1-235
62. Larsson, S-E., Ray, R.D. and Kuettner, K.E. (1973): Microchemical studies on acid glycosaminoglycans of the epiphyseal zones during endochondral calcification. Calc. Tiss. Res. 13, 271-285

63. Levenson, G.E. (1969): The effect of ascorbic acid on monolayer cultures of three types of chondrocytes. Exp. Cell Res. 55, 225-228
64. Levenson, G.E. (1970): Behavior in culture of three types of chondrocytes and their response to ascorbic acid. Exp. Cell Res. 62, 271-285
65. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J. (1951): Protein measurement with the folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193, 267-275
66. Luben, R.A., Goggins, J.F., and Raisz, L.G. (1974): Stimulation by parathyroid hormone of bone hyaluronate synthesis in organ culture. Endocrinology, 94, 737-745
67. Lutfi, A.M. (1974): The ultrastructure of cartilage cells in the epiphyses of long bones in the domestic fowl. Acta. Anat. 87, 12-21
68. Manning, W.K. and Bonner, W.M. Jr. (1967): Isolation and culture of chondrocytes from human adult articular cartilage. Arthritis Rheum. 10, 235-239
69. Martin, T.J., Harris, G.S., Melick, R.A. and Fraser, J.R.E. (1969): Effect of calcitonin on glycosaminoglycan synthesis by embryo calf bone cells in vitro. Experientia, 25, 375-376

70. Messer, H.H., Armstrong, W.D. and Singer, L. (1974): Characteristics of calcium uptake by calcitonin-treated mouse calvaria in vitro. Calc. Tiss. Res. 15, 85-92
71. Moscona, A. (1952): Cell suspensions from organ rudiments of chick embryos. Exp. Cell Res. 3, 535-539
72. Munson, P.L. and Gray, T.K. (1970): Function of thyrocalcitonin in normal physiology. Fed. Proc. 29, 1206-1208
73. Nameroff, M. and Holtzer, H. (1967): The loss of phenotypic traits by differentiated cells. IV. Changes in polysaccharides produced by dividing chondrocytes. Devel. Biol. 16, 250-281
74. Nichols, G. Jr. and Rogers, P. (1972): Bone cell calcium stores; The size, location and kinetics of exchange. Calc. Tiss. Res. 9, 80-94
75. Norman, A.W. (1974): 1,25-dihydroxyvitamin D₃; A kidney-produced steroid hormone essential to calcium homeostasis. Am. J. Med. 57, 21-27
76. Peterkofsky, B. and Dieglman, R. (1971): Use of a mixture of proteinase-free collagenases for the specific assay of radioactive collagen in the presence of other proteins. Biochemistry, 10, 988-994
77. Peterkofsky, B. (1972): The effect of ascorbic acid on collagen polypeptide synthesis and proline hydroxylation during the growth of cultured fibroblasts. Arch. Biochem. Biophys. 152, 318-328

78. Plenck, H. Jr. (1973): Changes in the composition of polysaccharides during the fusion of epiphyses in normal and lathyritic rats. Calc. Tiss. Res. 11, 70-77
79. Queener, S. F. and Bell, N. H. (1975): Calcitonin; A general survey. Metabolism, 24, 555-567
80. Raisz, L. G., Trummel, G. L., Holick, M. F. and DeLuca, H. F. (1972): 1,25-dihydroxycholecalciferol: A potent stimulator of bone resorption in tissue culture. Science, 175, 768-769
81. Rasmussen, H., Bordier, P., Kurokawa, K., Nagata, N. and Ogata, E. (1974): Hormonal control of skeletal and mineral homeostasis. Am. J. Med. 56, 751-758
82. Reynolds, J. J., Holick, M. F. and DeLuca, H. F. (1973): The role of vitamin D metabolites in bone resorption. Calc. Tiss. Res. 12, 295-301
83. Rigal, W. M. (1962): The use of tritiated thymidine in studies of chondrogenesis. In: Radioactive isotopes and bone. (McLean, F. C., ed.), Blackwell Oxford, 197-225
84. Schulman, H. J. and Meyer, K. (1968): Cellular differentiation and the aging process in cartilage tissues. Mucopolysaccharide synthesis in cell cultures of chondrocytes. J. Exp. Med. 128, 1353-1362
85. Schulman, H. J. and Opler, A. (1974): The stimulatory effect of calcium on the synthesis of cartilage proteoglycans. Biochem. Biophys. Res. Commun. 59, 914-919
86. Scott, B. L. and Pease, D. C. (1956): Electron microscopy of the epiphyseal apparatus. Anat. Rec. 129, 465-495

87. 下村裕. Ray, R.D. (1973 a): 成長軟骨における肥大細胞の運命.

I. ^3H -thymidineで標識した成長軟骨の移植. 中部整災雑誌, 16, 726-728

88. 下村裕. 米田俊之. 鈴木不二男. (1973 b): 成長軟骨における肥大細胞の運命

II. 軟骨細胞の分離. 中部整災雑誌, 16, 729-730

89. Shimomura, Y. and Ray, R.D.: unpublished data

90. Shimomura, Y., Wezeman, F.H. and Ray, R.D. (1973): The growth cartilage plate of rat rib: Cellular differentiation. Clin. Orthop. 90, 246-254

91. Shimomura, Y., Yoneda, T. and Suzuki, F. (1975): Osteogenesis by chondrocytes from growth cartilage of rat rib. Calc. Tiss. Res. (in press)

92. Silbermann, M. and Frommer, J. (1972a): The nature of endochondral ossification in the mandibular condyle of the mouse. Anat. Rec. 172, 659-667

93. Silbermann, M. and Frommer, J. (1972b): Vitality of chondrocytes in the mandibular condyle as revealed by collagen formation. An autoradiographic study with ^3H -proline. Am. J. Anat. 135, 359-370

94. Silbermann, M. and Frommer, J. (1972c): Further evidence for the vitality of chondrocytes in the mandibular condyle as revealed by ^{35}S -sulfate autoradiography. Anat. Rec. 174, 503-511

95. Silbermann, M. and Frommer, J. (1973): Dynamic changes in acid mucopolysaccharides during mineralization of the

mandibular condylar cartilage. Histochemie, 36, 185-192

96. Silbermann, M. and Frommer, J. (1974a): Ultrastructure of developing cartilage in the mandibular condyle of the mouse. Acta. Anat. 90, 330-346
97. Silbermann, M. and Frommer, J. (1974b): Initial locus of calcification in chondrocytes. Clin. Orthop. 98, 288-293
98. Silbermann, M. and Frommer, J. (1974c): Demonstration and distribution of acidic glycosaminoglycans in mouse secondary cartilage. Light and electron microscopic study. Histochemistry, 38, 85-93
99. Sissons, H.A. (1971): The growth of bone. In: Biochemistry and physiology of bone, (Bourne, G.H., ed.), vol. III, Academic Press, New York, P.145-180
100. Sokoloff, L., Malemund, C.J. and Green, W.T. Jr. (1970): Sulfate incorporation by articular chondrocytes in monolayer culture. Arthritis Rheum. 13, 118-124
101. Solursh, M. and Meier, S. (1972): The requirement for RNA synthesis in the differentiation of cultured chick embryo chondrocytes. J. Exp. Zool. 181, 253-262
102. Solursh, M. and Meier, S. (1973): A conditioned medium factor produced by chondrocytes that promotes their own differentiation. Devel. Biol. 30, 279-289
103. Stockdale, F.E., Abbott, J., Holtzer, S. and Holtzer, H. (1963): The loss of phenotypic traits by differentiated cells. II. Behavior of chondrocytes and their progeny in vitro. Devel. Biol. 7, 293-302

104. 須田立雄. 堀内登. (1973):腎におけるビタミンDの1-水酸化反応とその調節. 代謝, 10, 903-914
105. Trueta, J. (1963): The role of the vessels in osteogenesis. J. Bone Jt. Surg. B 45, 402-418
106. Urist, M.R. and McLean, F.C. (1952): Osteogenic potency and new bone formation by induction in transplants to the anterior chamber of the eye. J. Bone Jt. Surg. A 34, 443-470
107. Urist, M.R. (1965): Bone formation by autoinduction. Science, 150, 893-899
108. Urist, M.R., Dowell, T.A., Hay, P.H. and Strates, B.S. (1968): Inductive substrates for bone formation. Clin. Orthop. 59, 59-96
109. Urist, M.R. and Strates, B.S. (1971): Bone morphogenetic protein. J. Dent. Res. 50(suppl.6), 1392-1406
110. Urist, M.R., Iwata, H. and Strates, B.S. (1972): Bone morphogenetic protein and proteinase in the guinea pig. Clin. Orthop. 85, 275-290
111. 渡辺一雄, 岡田節人. (1969): 細胞分化, IV. 細胞の機能, 続生物物理学講座11巻, 細胞生物物理学研究法II, 吉田書店, 東京, 219-243. 昭44
112. Wuthie, R.E. (1969): A zonal analysis of inorganic and organic constituents of the epiphysis during endochondral calcification. Calc. Tiss. Res. 4, 20-38

13. 米田俊之. 鈴木不二男. 下村裕. (1974): 成長軟骨細胞の osteogenesis
について. 阪大歯誌, 19, 122-129
14. 米田俊之. 鈴木不二男. 藤崎隆司. 下村裕. (1975): 成長軟骨細胞の
骨形成能. 骨・軟骨代謝の生理と病態. 整形外科基礎科学2.
骨・関節の基礎と臨床編, 石野屋, p. 123-133. 昭 50

<脚注>

著者の所属

大阪大学歯学部口腔外科学第二講座
(主任 川勝賢作教授)

本論文の要旨は、第40回中部整形外科・災害外科学会(昭和48年4月 名古屋)、第47回日本整形外科学会(昭和49年4月 神戸)、第28回日本口腔科学会(昭和49年4月 久留米)、第68回大阪大学歯学会例会(昭和49年6月)、第2回骨・関節の基礎と語る会(昭和49年10月 名古屋)および第9回骨代謝研究会(昭和50年8月 東京)において発表した。

< 図の説明 >

図 1 ラット肋軟骨移行部の組織図

Growth Cartilage (GC) : 成長軟骨

Resting Cartilage (RC) : 静止軟骨

図 2 A 培養 1 週間後の成長軟骨細胞、形態

は polygonal で、細胞外には図で白く

見えるように著明に基質を分泌して

おり、トルイジンブルーで染色する

と、その基質の部分に顕著なメタク

ロマジンを認めることができる。

(図 7 参照)

($\times 100$)

B 培養 1 週間後の静止軟骨細胞、形態

は線維芽細胞様で、細胞外への基質

の分泌は少なく、トルイジンブルー

で染色してもほとんどメタクロマジ

ンを示さない。(図 9 参照) ($\times 100$)

図 3 成長軟骨細胞への ^{45}Ca とリニサに対する

カルキトニン、副甲状腺ホルモン

および 1α -ヒドロキシビタミン D_3

の影響。

○—○：コントロール

△—△：カルキトニン (10 mU/ml)

□—□：副甲状腺ホルモン ($0.1 \mu\text{g/ml}$)

×—×： 1α -ヒドロキシビタミン D_3

($0.2 \mu\text{g/ml}$)

図4 成長軟骨細胞への ^{45}Ca とりこみに対する 1α -ヒドロキシビタミン D_3 の影響。

図5 静止軟骨細胞への ^{45}Ca とりこみに対するカルキトニン、副甲状腺ホルモンおよび 1α -ヒドロキシビタミン D_3 の影響。

●----●：コントロール

▲----▲：カルキトニン (10 mU/ml)

■----■：副甲状腺ホルモン ($0.1 \mu\text{g/ml}$)

×----×： 1α -ヒドロキシビタミン D_3

($0.2 \mu\text{g/ml}$)

図6 成長軟骨細胞および静止軟骨細胞への ^{45}Ca とりこみに対するカルキトニン、副甲状腺ホルモンおよび 1α -ヒ

ドロキシビタミンD₃の影響。

成長軟骨細胞

静止軟骨細胞

○—○

コントロール

●---●

△—△

カルキトニン

▲---▲

(10_{mU}/ml)

□—□

副甲状腺ホル

■---■

モン(0.1_{μg}/ml)

×—×

1α-ヒドロキシ

×---×

-ビタミンD₃

(0.2_{μg}/ml)

図7

成長軟骨細胞のメタクロマジー。

10日間培養後、トルイジンブルーで染色。細胞外に黒く染まっているのがメタクロマジーを示している。

(全細胞の約60%)

(×100)

図8

培養軟骨細胞の増殖とメタクロマジー

に対するカルキトニンの影響。

軟骨細胞は直径6mmのペニシリンカ

ップ内に1×10⁴個 inoculate した。

コントロール カルキトニン添加 ($10^{100}/\text{ml}$)

○—○ 細胞数 ●—●

△—△ メタクロマジー ▲—▲

図9 静止軟骨細胞のメタクロマジー。

A 10日間培養後、トルイジンブルーで染色。ほとんどメタクロマジーは認められない。

B 培地にカルキトニン ($10^{100}/\text{ml}$) を加えて10日間培養後、トルイジンブルーで染色。メタクロマジーには変化が認められない。 (×100)

図10 成長軟骨細胞のメタクロマジーに対するカルキトニンの影響。

10日間培養後、トルイジンブルーで染色。

A カルキトニン無添加。 (×40)

B カルキトニン添加 ($10^{100}/\text{ml}$)。メタクロマジーは著明に増加し、カラー写真ではほとんど全ての細胞が赤紫色に染まっていた。 (×40)

図 11

軟骨細胞によって合成されるムコ多糖への³⁵S₄のとり：サに対するカルキトニンおよび副甲状腺ホルモンの影響。

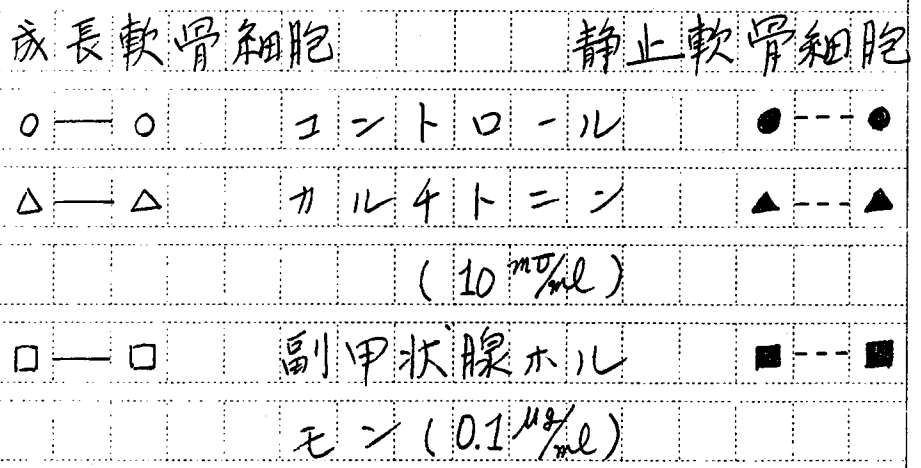


図 12

軟骨細胞によって合成されるムコ多糖への³⁵S₄とり：サに対する1α-ヒドロキシビタミンD₃の影響。

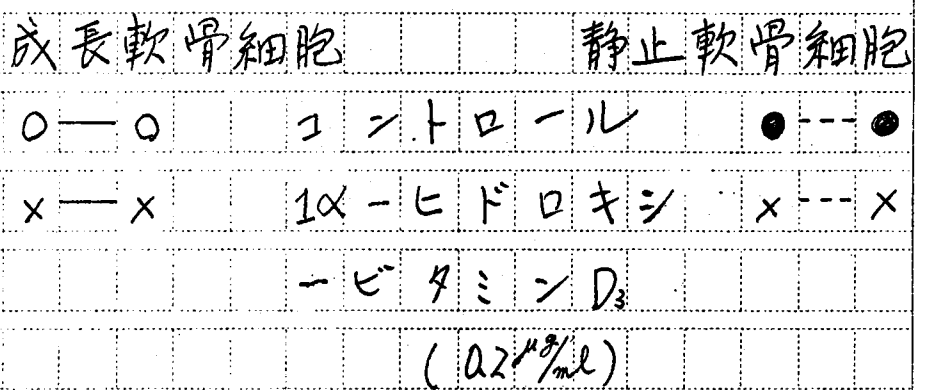


図 13

成長軟骨片、移植後6週間。
軟骨片の細胞が旺盛に増殖している。

図14

静止軟骨細胞、移植後6週間。

(阪大歯誌19巻第1号、米田等論文より引用) (×200)

図15

成長軟骨細胞、移植後6週間。

細胞の肥大化が著明で、柱状構造の再構成を思わせる像も見られる。

(×200)

図16

成長軟骨細胞、移植後6週間

フィルターに破壊が認められ一例。広汎な骨髓腔を伴、典型的な新生骨が見られ、付近には軟骨細胞も存在している。

(×100)

図17

成長軟骨片、移植後6週間

フィルターに孔をあけて移植。図の左下隅に孔が認められ、そこから host の組織が chamber 内に侵入してきていると同時に、旺盛な新生骨形成が見られる。(阪大歯誌19巻1号、米田等論文より引用) (×40)

図18

静止軟骨細胞、移植後6週間。

フィルターに孔をあけて移植。chamber
内に host の組織の侵入が認められ、
軟骨組織が島状に形成されているが、
骨形成は見られない。(×200)

図19

成長軟骨細胞、移植後6週間

フィルターに孔をあけて移植。図の
左下隅に孔が認められ、そこから host
の組織が chamber 内に侵入してきてい
ると同時に、旺盛な新生骨形成が見
られる。(阪大歯誌19巻1号、米田
等論文より引用) (×40)

< 表の説明 >

表 1 1) 37℃で1時間反応させた。軟骨細胞は直径16mmのマイクロウェルプレート (Linbro) に 3×10^4 個 inoculate して、4日間培養したものを用いた。

2) 値は2例の平均値。

表 2 1) 37℃で1時間反応させた。軟骨細胞は直径16mmのマイクロウェルプレート (Linbro) に 3×10^4 個 inoculate して、4日間培養したものを用いた。

2) 値は2例の平均値。

表 3 1) 37℃で1時間反応させた。
2) 軟骨細胞は直径35mmのプラスチックシャーレに 2×10^5 個 inoculate して、7日間培養したものを用いた。

3) BHK細胞は Syrian hamster 由来の株化細胞である BHK 21/WI

(大阪大学歯学部第一口腔外科、佐藤光信博士より分与されたもの)を用いた。

表4

1) 37℃で24時間反応させた。

2) 値は2例の平均値。

表5

1) 37℃で24時間反応させた。

2) 値は2例の平均値。

表6

1) ミリポアフィルターに孔をあけて移植した場合。移植後6週間。

表7

1) ミリポアフィルターに孔をあけて移植した場合。chamberを移植後2週目に、い、ん腹腔より取り出し、21ゲージの注射針でフィルターに孔をあけ、そのchamberを再び同一ラットの腹腔に戻して、さらに4週間移植をおこなった。

图1

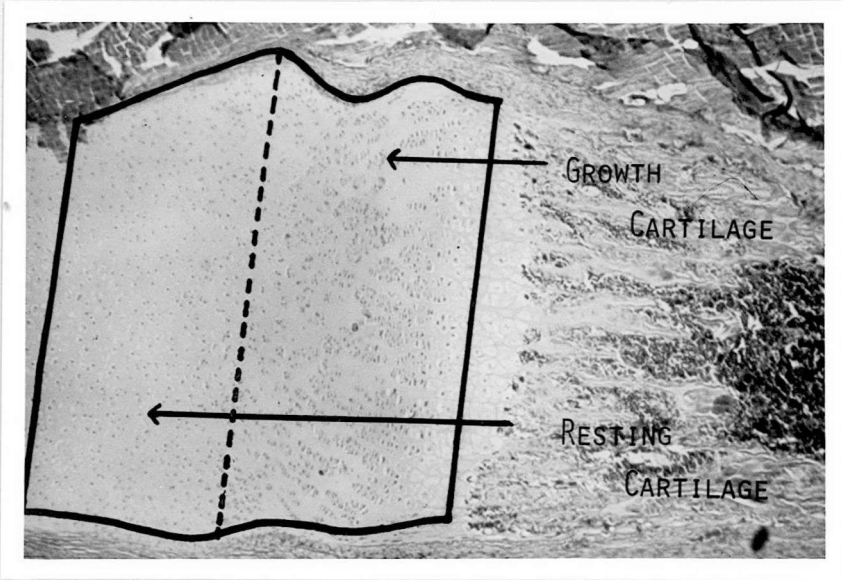


图2A

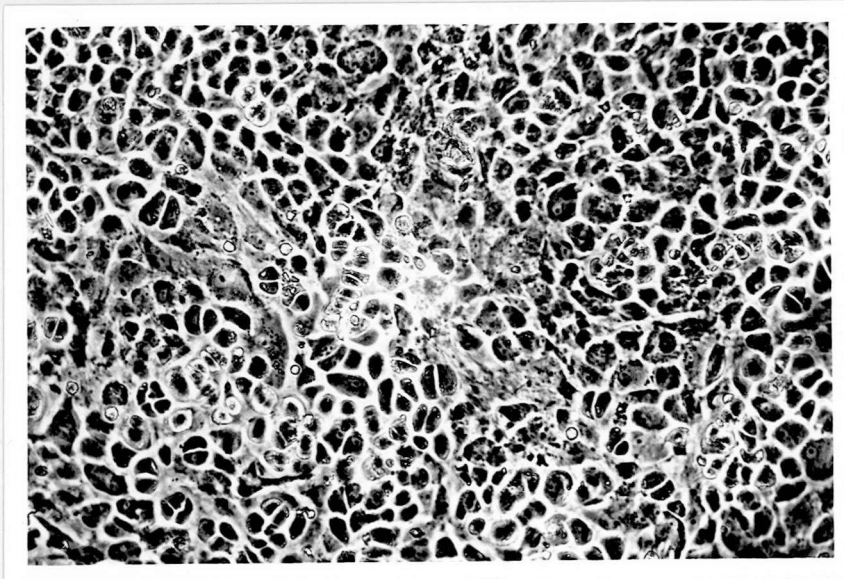


图2B

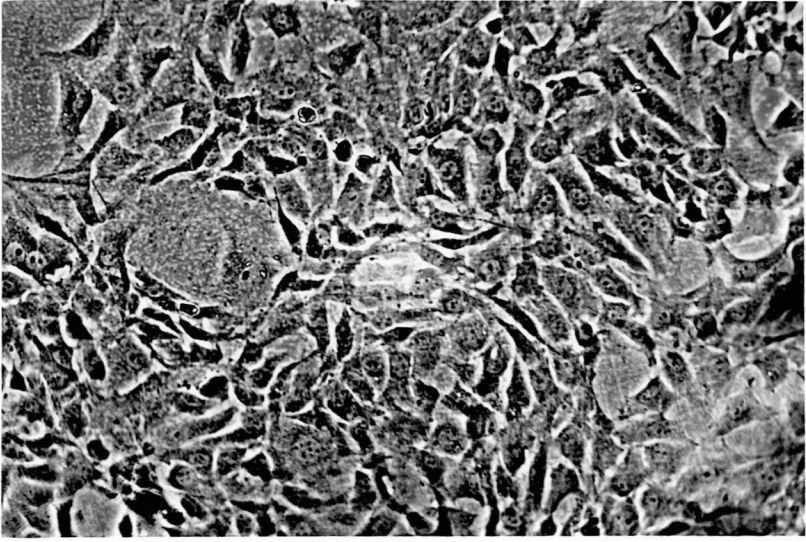
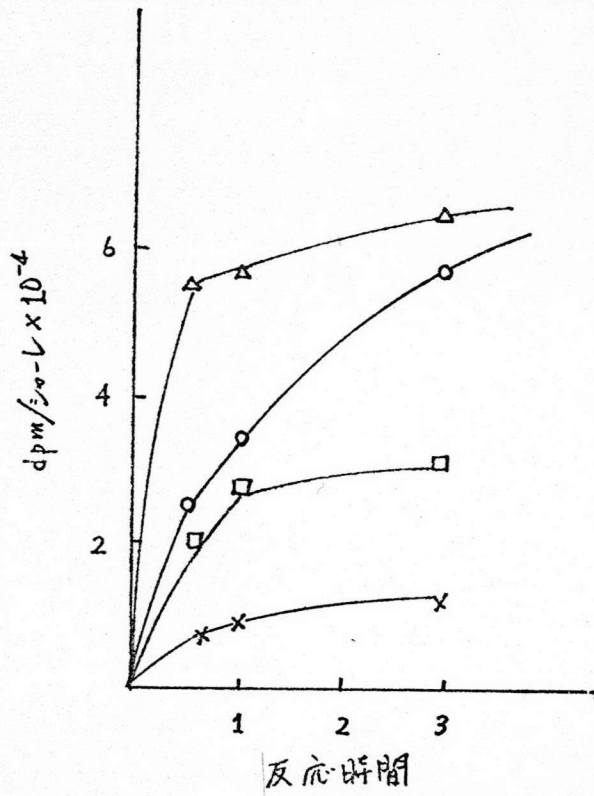


图3



1874

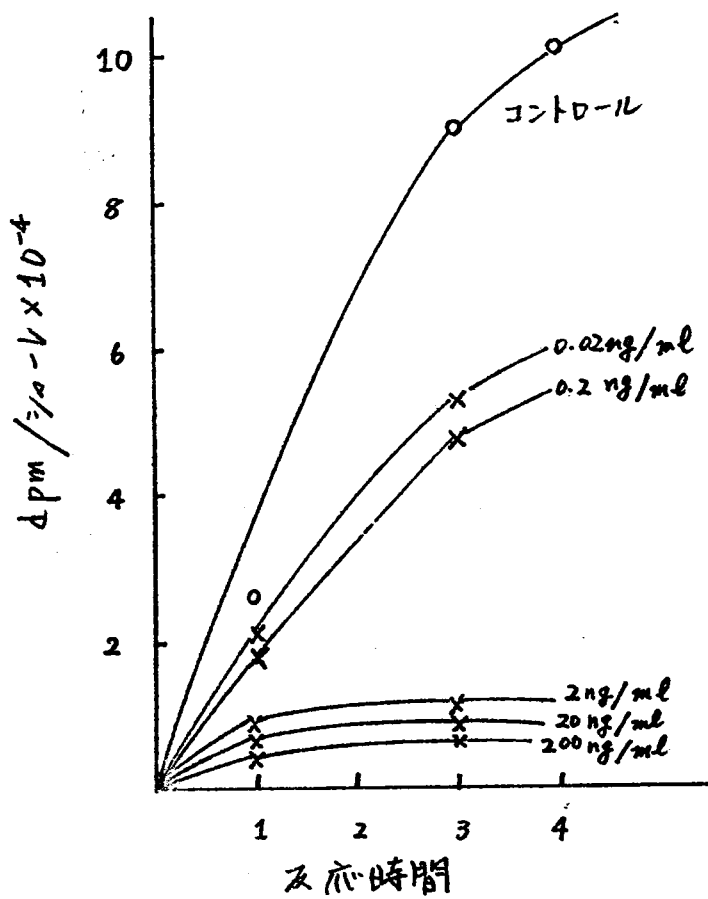


圖5

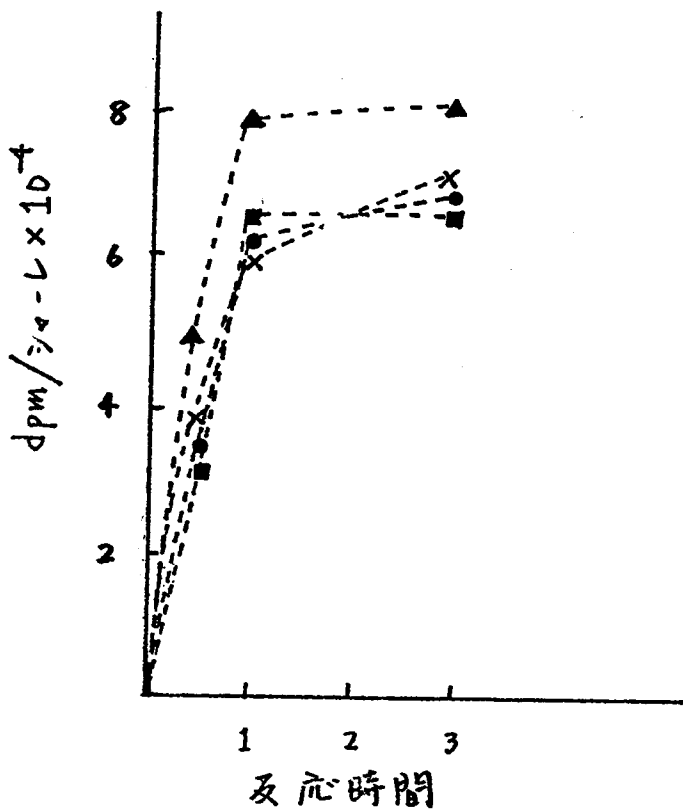


圖6

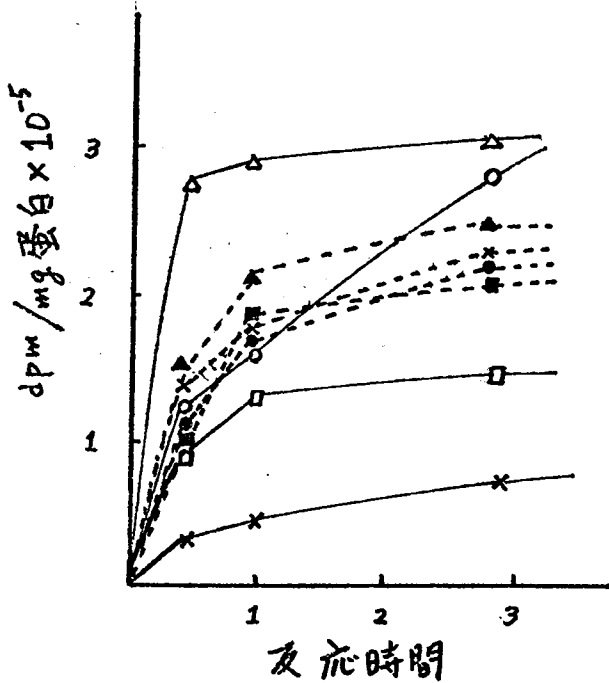


圖7

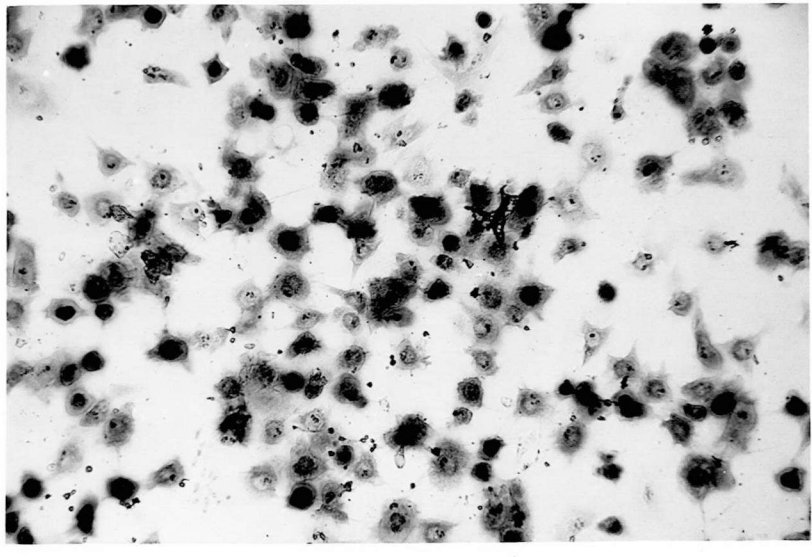
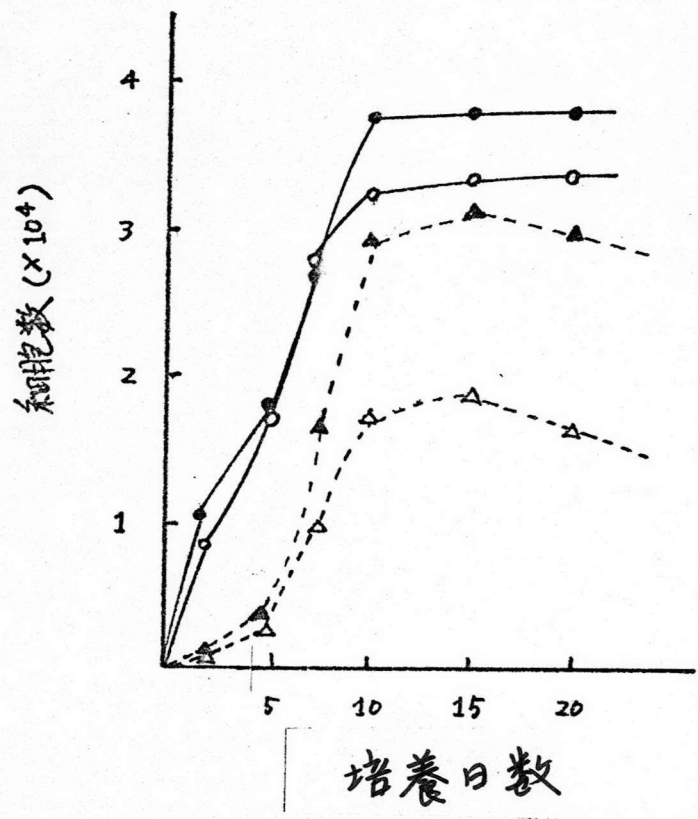
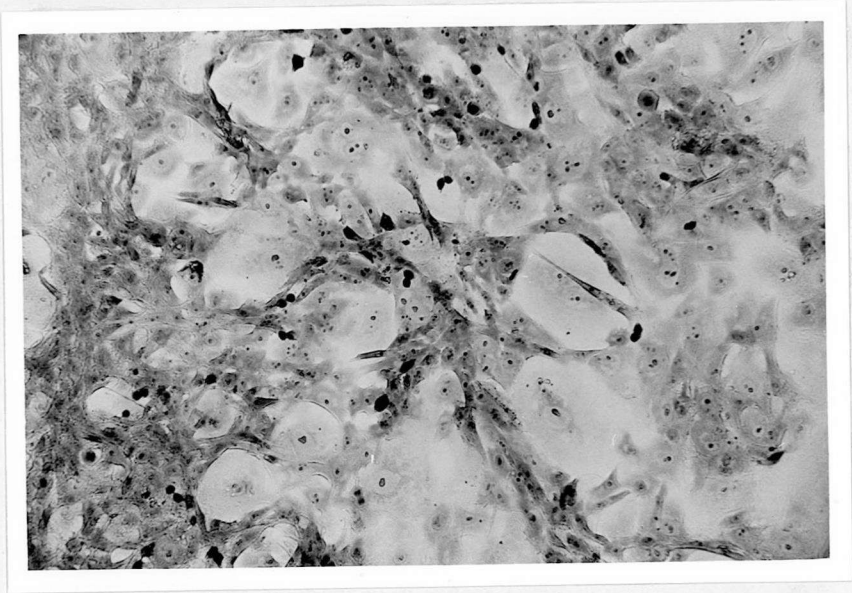


圖8



1279A



1279B

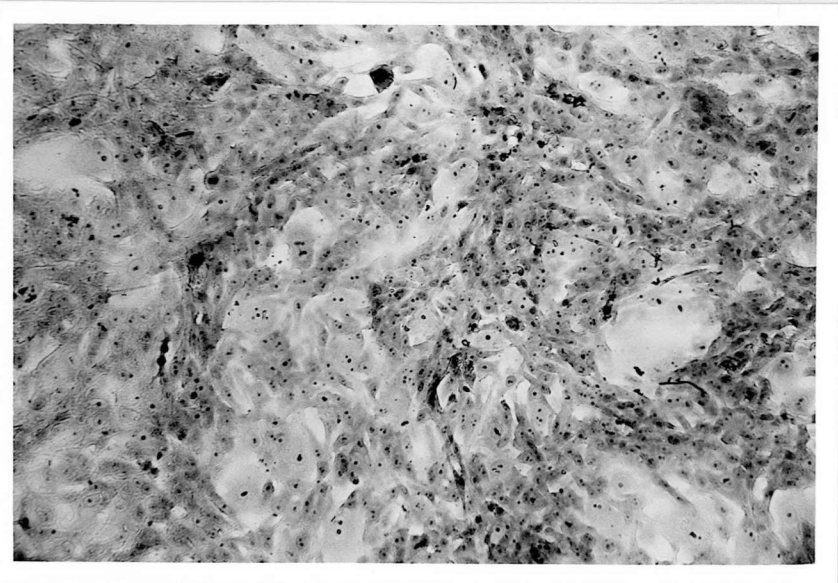


图 10A

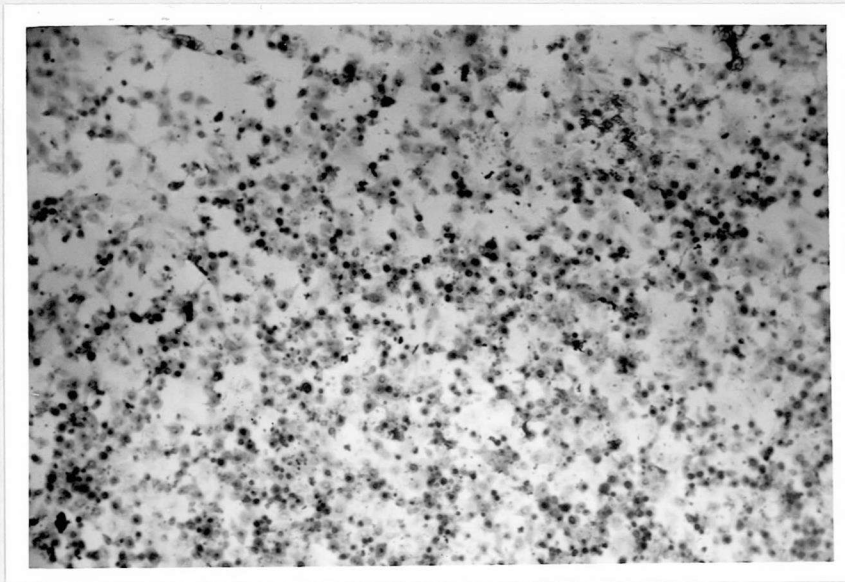


图 10B

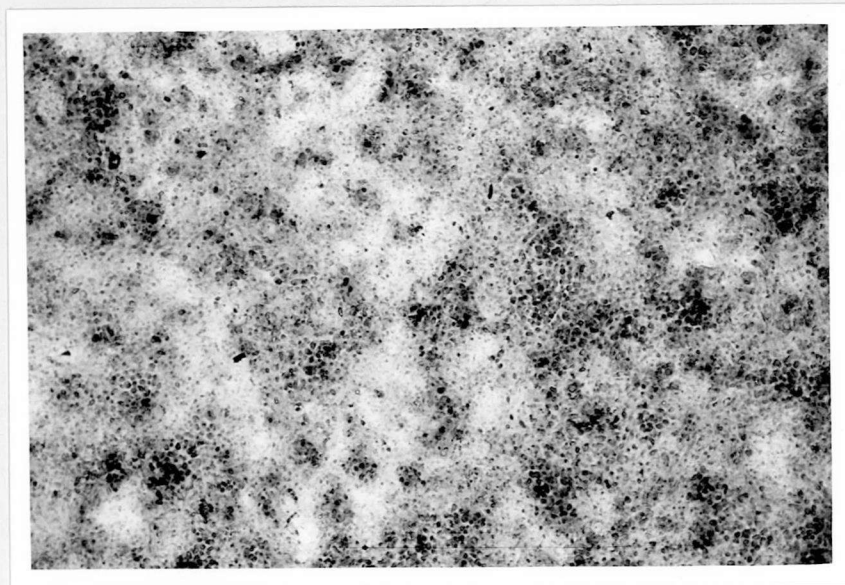


图11

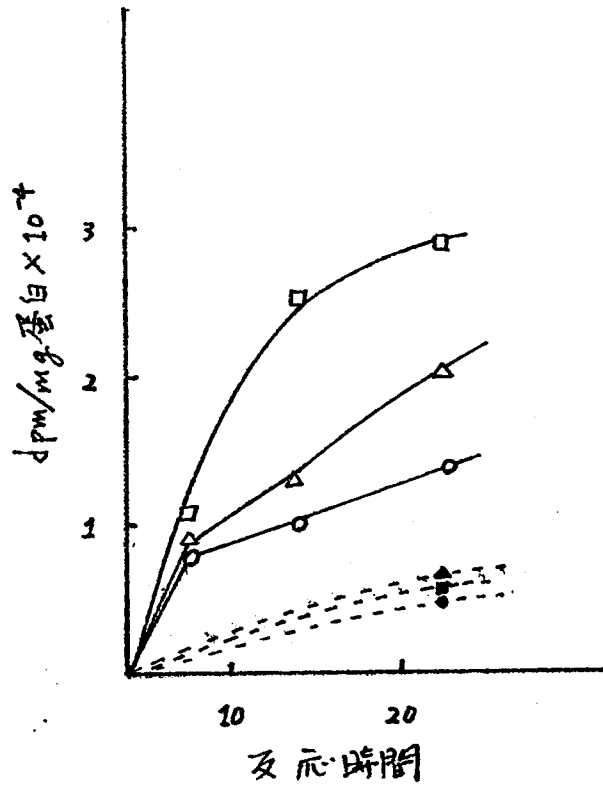


图12

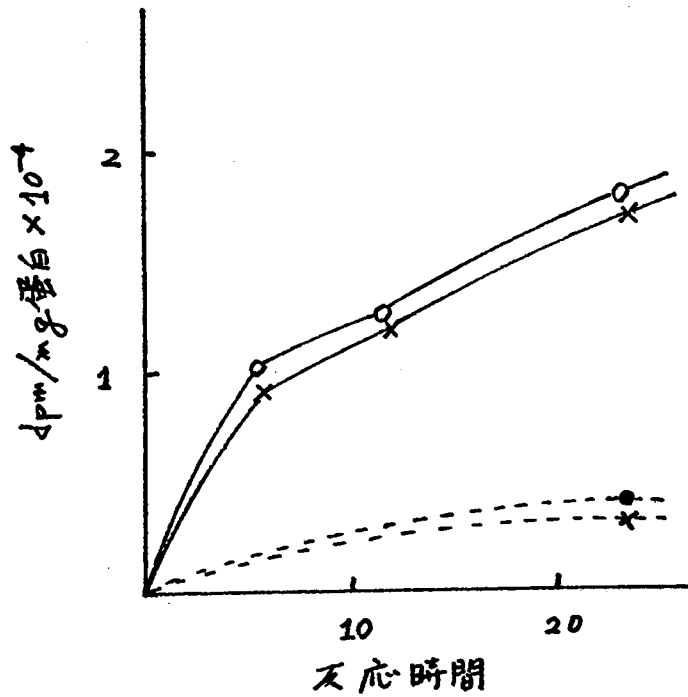


图13

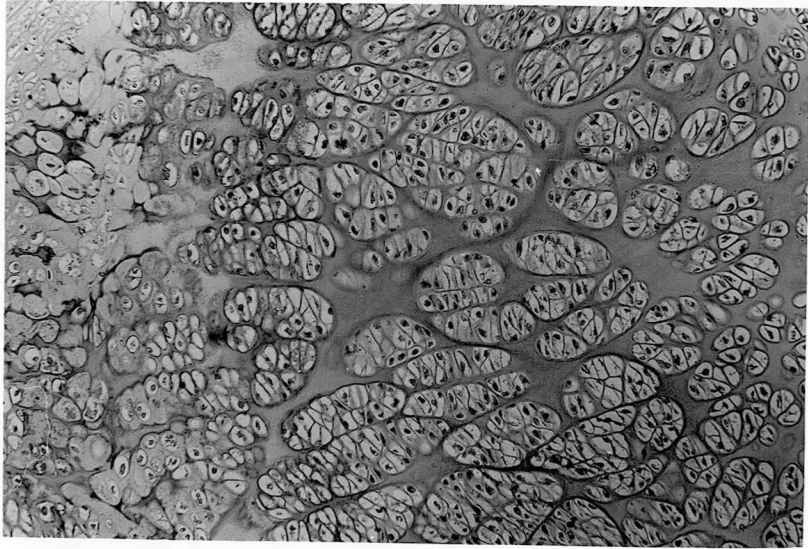


图14

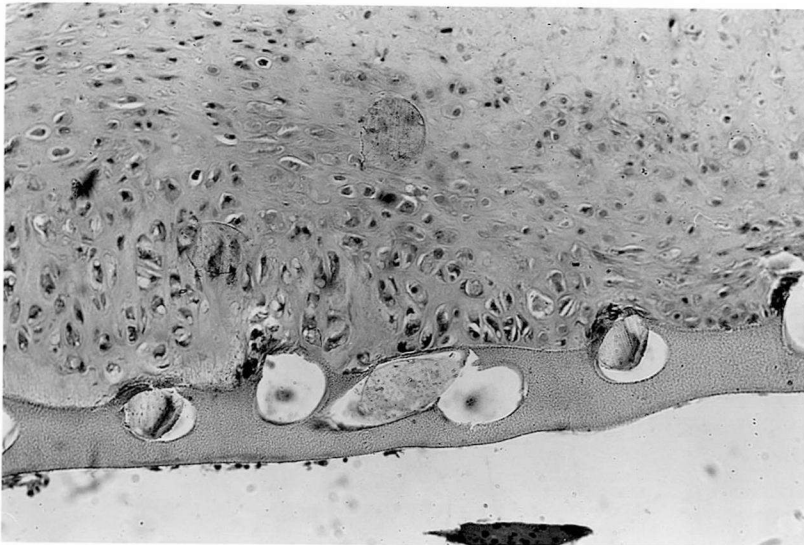


图 15

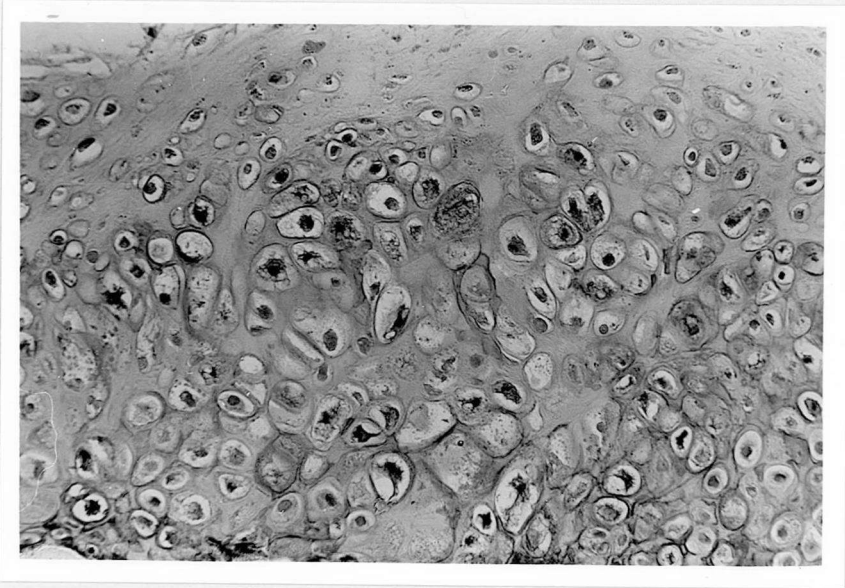


图 16

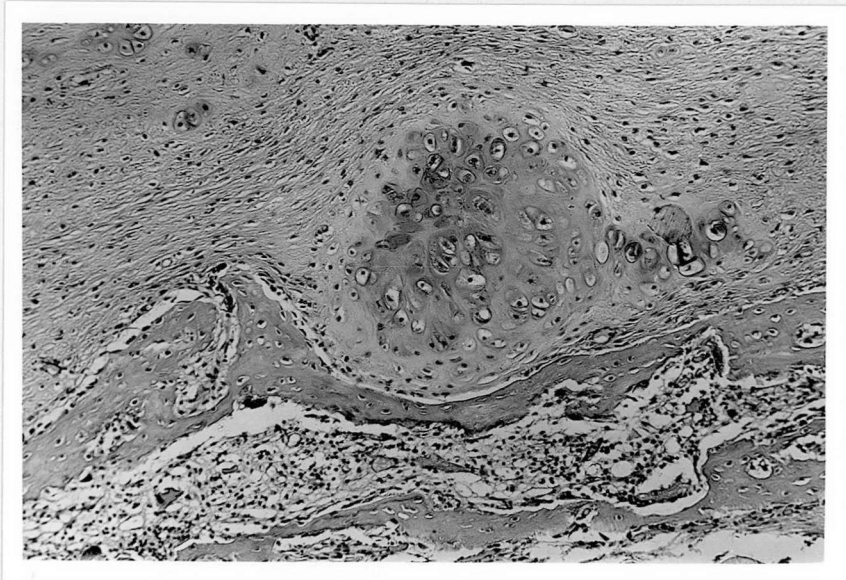


图17

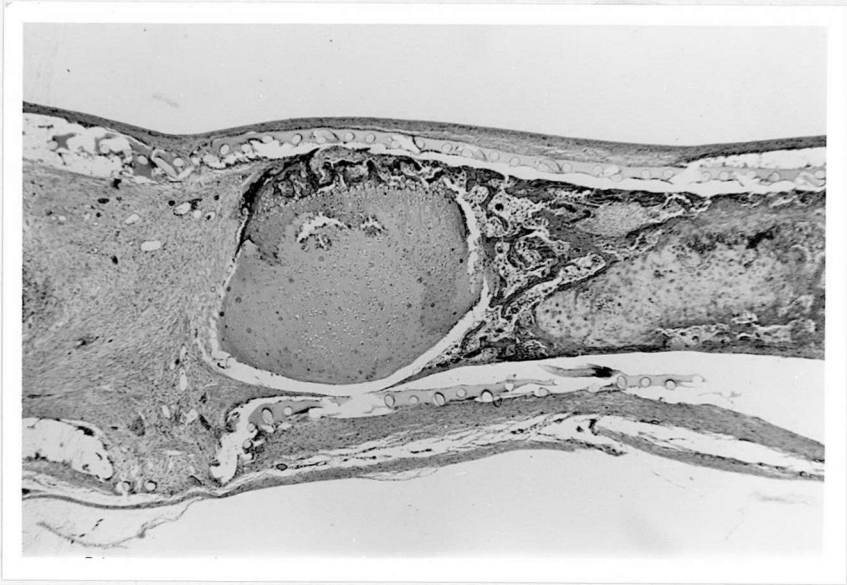


图18

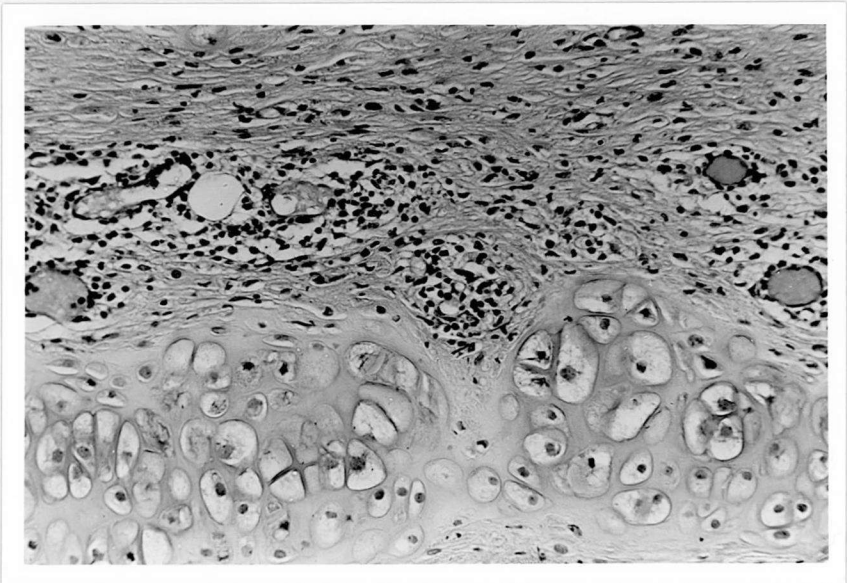
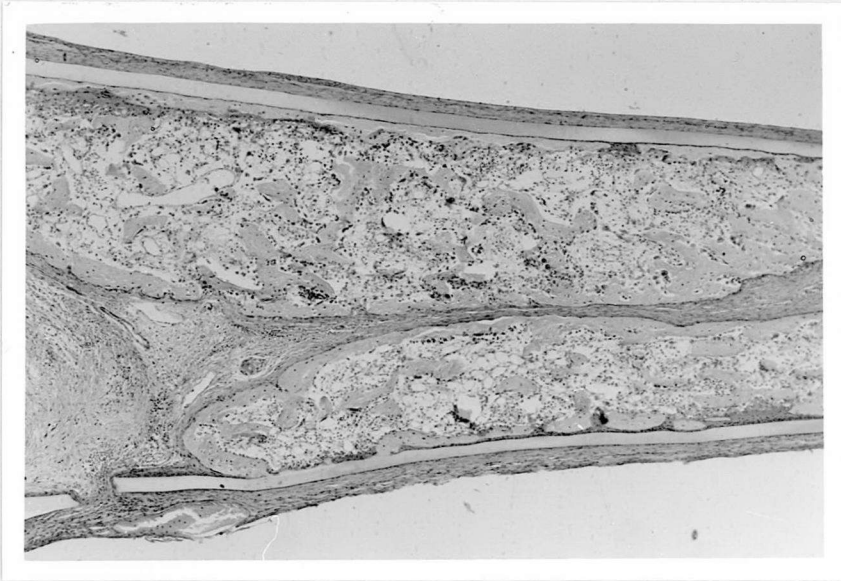


図19



成長軟骨細胞の ^{45}Ca 取り込みに対する
カルシトニンの影響¹⁾

カルシトニン (mU/ml)	^{45}Ca 取り込み ²⁾ (dpm/mg蛋白)	増加率 (%)
0	149,278	100
1	143,712	100
10	196,876	132
100	229,872	154

表1

成長軟骨細胞の ^{45}Ca とりこに対する
副甲状腺ホルモンの影響¹⁾

副甲状腺ホルモン ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	^{45}Ca とりこ ²⁾ (dpm/mg蛋白)	抑制率 (%)
0	149,278	0
0.01	109,773	27
0.1	102,123	32
1	61,961	59

2

培養軟骨細胞およびBHK細胞の ^{45}Ca
とりこに対するカルトニンの影響¹⁾

カルトニン mU/ml	^{45}Ca とりこ (dpm/mg蛋白 $\times 10^{-4}$)		
	成長軟骨細胞 ²⁾	静止軟骨細胞 ²⁾	BHK21/WI-2細胞
0	75.6	31.0	6.5
10	147.8	56.1	5.7

3

成長軟骨細胞における合成エリキム多糖への $^{35}\text{SO}_4$
のトリチウムに対するカルシウムの影響

カルシウム (mU/ml)	$^{35}\text{SO}_4$ トリチウム (dpm/mg 蛋白質)	増加率 (%)
0	3,906	100
1	4,745	121
10	6,065	155
100	6,588	169

4

成長軟骨細胞における合成エリキム多糖への $^{35}\text{SO}_4$
のトリチウムに対する副甲状腺ホルモンの影響

副甲状腺ホルモン ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	$^{35}\text{SO}_4$ トリチウム (dpm/mg 蛋白質)	増加率 (%)
0	3,250	100
0.01	4,930	152
0.1	5,388	166
1	11,873	365

表5

骨形成実験 1¹⁾

材 料	移植した chamber 数	骨形成を認められた chamber 数
成長軟骨組織片	6	0
培養静止軟骨細胞	8	0
培養成長軟骨細胞	8	1 ²⁾

骨形成実験 2¹⁾

材 料	移植した chamber 数	骨形成を認められた chamber 数
成長軟骨組織片	6	5
培養静止軟骨細胞	7	0
培養成長軟骨細胞	6	6

表 7

6