



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	低カルシウム環境下培養ラット胎児頭蓋冠由来骨形成細胞のミトコンドリア内遊離カルシウムの動向
Author(s)	植松, 敏也
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(歯学)
Dissertation Number	甲第3358号
Issue Date	1994-03-25
DOI	https://doi.org/10.11501/3095157
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/50007
Type	doctoral thesis
File Information	000000272662.pdf



低カルシウム環境下培養ラット胎児頭蓋冠由来骨形成細胞のミトコンドリア内遊離カルシウムの動向

北海道大学大学院歯学研究科 歯科保存学第一講座
植松 敏也

指導, 主任
北海道大学歯学部歯科保存学第一講座
教授 下河辺 宏功

指導
北海道大学歯学部歯科薬理学講座
教授 松本 章

①

190

低カルシウム環境下培養ラット胎児頭蓋冠由来骨形成細胞
のミトコンドリア内遊離カルシウムの動向

Movement of intramitochondrial free calcium of
fatal rat calvarial bone cells cultured in a
low-calcium environment

北海道大学大学院歯学研究科 歯科保存学第一講座

植松 敏也

指導, 主任

北海道大学歯学部歯科保存学第一講座

教授 下河辺 宏功

指導

北海道大学歯学部歯科薬理学講座

教授 松本 章

目次

	頁
I. 緒言	3
II. 材料と方法	7
1.細胞分離	
2.細胞培養	
3.測定方法	
1) 全細胞カルシウム量	
2) 全ミトコンドリア内カルシウム量	
3) 原子吸光法	
4) ミトコンドリア内遊離カルシウム	
(1) 測定	
(2) 計算方法	
5) カフェイン, ライアノジン, ルテニウムレッドの影響	
(1) カフェイン	
(2) ライアノジン	
(3) ルテニウムレッド	
4.形態学的観察	
5.統計学的検定	
III. 結果	14

1.全細胞内カルシウム量	
2.ミトコンドリア分画の形態	
3.全ミトコンドリア内カルシウム量	
4.ミトコンドリア内遊離カルシウム量	
5.カフェイン，ライアノジン，ルテニウムレッドの影響	
(1) カフェイン	
(2) ライアノジン	
(3) ルテニウムレッド	
(4) ライアノジン共存下におけるカフェインによる影響	
(5) ルテニウムレッド共存下におけるカフェインによる影響	
IV. 考察	20
1.全細胞内カルシウム量	
2.全ミトコンドリア内カルシウム量	
3.ミトコンドリア内遊離カルシウム量	
4.カフェイン，ライアノジン，ルテニウムレッドの影響	
V. 結論	29
VI. 謝辞	31
VII. 文献	32
VIII. 付図	

I. 緒言

近年，新医薬品の開発，医療機器，医療技術の進歩により高齢化社会から超高齢化社会に向かって進んでいる。これに伴い，疾病構造にも変化が生じ，循環器系疾患，脳疾患，エイズ，歯周疾患，骨粗鬆症などの骨疾患が増加している。このうちの歯周疾患は，歯周組織に対し歯垢が，主な原因因子となり，局所因子や全身因子により修飾され，炎症を伴って発症し，歯の支持組織である歯槽骨の形成能が抑制され吸収を生ずるものである。同様のことは，歯根嚢胞の増大によっても生じることが知られている¹⁾。骨疾患の一つである骨粗鬆症は，病的に骨量が減少した病態であり，骨の脆弱化により容易に骨折を引き起こす。これら硬組織代謝抑制を伴うと，重大な全身の機能の抑制を生じる疾患を引き起こし，社会的に大きな問題となっており，これまで多くの研究者がこれらの疾患に伴う硬組織代謝抑制の機構解明と予防法の確立に取り組んできた。

硬組織代謝は，細胞機能の観点から骨芽細胞の骨形成機能と破骨細胞の骨吸収機能の平衡がカップリングし，正常な骨の改造が維持されていると考えられる。硬組織代謝抑制の一つの要因としてこの骨芽細胞と破骨細胞の機能に不均衡が生じアンカップリングの状態になり，前者の機能が抑制され，後者の機能が優勢になり発症すると思われる。

したがって、このような骨形成能が抑制された病態を解明するために、そのモデルとして *in vivo*では低カルシウム食飼育²⁻⁴⁾あるいは卵巣摘出実験系^{5, 6)}、*in vitro*では低カルシウム環境実験系を用いることは有用である。

低カルシウム食で飼育した動物では、低カルシウム血症となり、実験的骨粗鬆症の生ずることが報告されている³⁾。また動物にストロンチウムを投与すると、腎における $1, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ の合成⁷⁾および副甲状腺ホルモン分泌⁸⁾の抑制、カルチトニン分泌の増加により低カルシウム血症が生じる。また*in vivo*において低カルシウム状態を誘導すると、象牙質減形成^{9, 10)}、骨端軟骨板の肥大¹¹⁾、骨における類骨の過形成^{10, 12)}など硬組織代謝に異常の発生することが報告されている。

このような報告から歯や骨などの硬組織のカルシウム代謝には、環境のカルシウム濃度が大きく関与していることが推測される。

これまでに、生後一日齢のウイスター系ラットの大腿骨を摘出し、低カルシウム培養液で8日間培養することにより、アルカリ性ホスファターゼ活性・DNA合成・コラーゲン合成能・コンドロイチン硫酸合成能などの亢進や減退が起こることが報告されている^{13, 14)}。また低カルシウム環境下で培養したラット胎児頭蓋冠由来骨形成細胞（骨形成細胞）では、細胞内遊離カルシウム濃度¹⁵⁾あるいは蛋白質リン酸化酵素のプロテインキナーゼC活性の低下が生じ、細胞内情報伝達系に影響を与え

ることが報告されている¹⁶⁾。

さらに低カルシウム環境に陥り、石灰化抑制の生じたラットの脛骨骨端軟骨板では、その軟骨細胞における細胞内カルシウムの貯蔵所の一つであるミトコンドリアに形態学的変化の生じることが報告されている¹⁷⁾。

ミトコンドリアは、一般に酸化的リン酸化の過程を経てATPを産生し、エネルギー供給などの重要な役割を果たしていることが知られている。またミトコンドリアが能動的にカルシウムを取り込むことが知られている^{18, 19)}。硬組織カルシウム代謝との関連においてもミトコンドリアの働きが、報告されている。Brightonら²⁰⁾の細胞化学的研究では、骨端軟骨細胞は増殖層から肥大細胞層へと分化する間に、ミトコンドリア中へカルシウム、リンを貯蔵し、肥大細胞層から石灰化層に至る間に、それらを放出し、基質小胞へ受け渡して石灰化を導くことを強く示唆している。このようにミトコンドリアがカルシウムの貯蔵所としてその制御を行い、正常な細胞機能の維持に深く関わっている。

しかし、低カルシウム環境において培養した骨形成細胞のミトコンドリアにおけるカルシウムならびに遊離カルシウムなどのカルシウム動態に及ぼす低カルシウム環境の影響について検討した報告はほとんど見当たらない。

したがって本研究では、硬組織代謝抑制の機構解明の一環として、骨形成細胞を低カルシウム環境下において培養を行い、その全細胞内カル

シウム量ならびに全ミトコンドリア内カルシウム量を測定した。さらに蛍光指示薬であるFluo 3-AMを用いて、低カルシウム環境下におけるミトコンドリア内遊離カルシウムおよび、それらに対するカフェイン、ライアノジン、ルテニウムレッドの影響について調べ、ミトコンドリア内遊離カルシウムの動向について検索した。

II. 材料と方法

1. 細胞分離

自家飼育による胎生18~21日齢のWistar/Hok系ラット(北海道大学実験生物センター)の頭蓋冠から細胞を分離した。

その細胞分離は、主にDziak ら^{2 1)}の方法に準じて行ったが、Nijweide^{2 2)} およびShlossmanら^{2 3)}の方法も参考とした。

氷冷したヒープス緩衝液(HEPES, 30mM; NaCl, 100mM; MgSO₄, 1mM; KCl, 6mM; グルコース, 2mg/ml; 牛血清アルブミン, 1mg/ml; ペニシリン, 100U/ml; ストレプトマイシン, 100 μ g/mlから成り, pHは7.2に調製した。)に浸漬し、付着軟組織および血管を除去した摘出頭蓋冠を、コラゲナーゼ(Type II, Worthington社)(2mg/ml)を含むヒープス緩衝液20 mlに60~70個となるように移した。これを37℃, 30分間振盪培養を行い、上清を廃棄した。コラゲナーゼを含む新しいヒープス緩衝液を添加し、頭蓋冠を滅菌した眼科用ハサミで細切し、さらに37℃, 90分間振盪培養を行った。

振盪培養で遊離した細胞を含むヒープス緩衝液を、氷冷した溶液で希釈しながら、ステンレス製ならびにナイロン製の網(pore size, 35 μ m)を二重に装着したMillipore Swinnex-13 holderを付けた10 mlの注射筒に移し濾過し、骨形成細胞を含む浮遊液を得た。この浮遊液を750 $\times$ g,

4℃で5分間遠心し、細胞を回収し、実験に供した。

2. 細胞培養

採取した細胞は、牛胎児血清 (ICN Biomedicals社) (10%)、ペニシリン (100U/ml)、ストレプトマイシン (100 μ g/ml) を加えた α MEMで、37℃、95%空気-5%CO₂の気相下で培養した。 α MEMはGibco社の組成表に従い作製した。培養開始日に細胞を、プラスチックペトリ皿 (径、60mm) 当り 1×10^5 個とし、対照群12枚、低カルシウム群12枚に播種した。細胞は、6~7日間正常組成の α MEM培養液 (正常培養液) と正常組成の α MEM培養液のカルシウムを除いた培養液 (低カルシウム培養液) で培養した。培養液のカルシウム濃度は、正常培養液で 1.87 ± 0.05 mM (n=10)、低カルシウム培養液で 0.34 ± 0.02 mM (n=10) とした。

正常培養液で培養した骨形成細胞を対照群、低カルシウム培養液で培養した骨形成細胞を低カルシウム群とした。

両群の培養液の交換は、2日毎に行った。両群の細胞は、培養6~7日目にコンフルエンス (1.8×10^6 個/ペトリ皿) に達したことを確認した後、ラバーポリスマンにて採取し、実験に用いた。

3. 測定方法

1) 全細胞内カルシウム量

両群の細胞 (2×10^6 個) は、750 $\times$ g、5分間、遠心 (18PR-3型、日立社) し、それぞれ、正常ならびに低カルシウム培養液を2mlずつ加え、パ

スツールピペットで十分に均一化した。1.5kg/cm² で15秒間吸引を行いながら、その1mlをミリポアーフィルター (pore size, 0.45 μ m) 上に滴下し、その後Ca²⁺を含まないリン酸緩衝液1mlで洗浄した。また一部は、蛋白質量測定のための試料に供した。

この様にして回収した両群の細胞は、カルシウムを溶出するために、フィルターと共に各々を0.1N HCl 2mlに浸漬し、室温で24時間放置した後、測定に供した。

2) 全ミトコンドリア内カルシウム量

ミトコンドリア分画の調製は、中沢の方法^{2,4)} を改変し、図1に示す方法で行った。

ラバーポリスマンで採取した両群の細胞 (1×10^7 個) を 750 $\times$ g、5分間、遠心洗浄し、その沈殿すなわち両群の細胞に、0.25M 蔗糖溶液を2ml加え、40Wで10秒間の超音波処理 (UD-200型、トミー精工社) を2回行い、懸濁液を得た。この懸濁液は、さらに750 $\times$ gで、10分間遠心した後 上清を5500 $\times$ gにて20分間遠心を行い、粗なミトコンドリアの沈殿を得た。さらに、0.25M 蔗糖溶液を加え懸濁させ、再び5500 $\times$ gで15分間遠心を行うことにより、ミトコンドリア分画を得た。このミトコンドリアに0.1N HCl 1mlを加え、室温で24時間放置し、溶出したカルシウムを測定した。

3) 原子吸光分析法

全細胞内および全ミトコンドリア内カルシウム濃度は、原子吸光分光

光度計 (AA-1475型, Varian社) を用いて測定した。カルシウムの分析線として422.7nmの共鳴線を用い, 空気-アセチレンフレームを使用した。

0.1N HClに浸漬した細胞とミトコンドリアの試料由来のリン酸によるカルシウム蛍光の干渉を防ぐため, 5%LaCl₃を1/10量添加した。蛋白質量は, Lowry法²⁵⁾により測定し, 単位蛋白質量当りのカルシウム量を算定した。

4) ミトコンドリア内遊離カルシウム

(1) 測定

Fluo 3-AM

1-[2-Amino-5-(2'',7''-dichloro-6''-hydroxy-3''-oxy-9''xanthenyl)phenoxy]-2-(2'-amino-5'-methylphenoxy)ethane-N,N,N',N'-tetraacetic acid, pentaacetoxymethyl ester (同仁化学社) で検出した。Fluo 3-AMの化学式は, 図2に示す。両群のミトコンドリア分画は, pH7.4に調整した蔗糖 0.25M, トリス 3mM, Fluo 3-AM 10 μ Mを含む溶液で37 $^{\circ}$ C, 30分間振盪培養を行った。再び, それらを5500 $\times$ g, 20分間遠心し, 蔗糖 0.25M, トリス 3mMの溶液に懸濁させた。Fluo 3-AMの実験時の濃度は10 μ Mとしたが, これはFluo 3-AMの添加濃度と蛍光強度が, 10 μ Mで飽和することを確認したためである。

ミトコンドリア内遊離カルシウムは, 蛍光分光光度計 (F4010型, 日立社) で 37 $^{\circ}$ Cにて励起波長506nm, 蛍光波長526nmで測定した。

(2) 計算方法

両群のミトコンドリア内遊離カルシウム量の計算方法は以下の通りである²⁶⁾。

$$[Ca^{2+}]_{mt} = \frac{F - F_{min}}{F_{max} - F} \times K_d$$

ここで[Ca²⁺]_{mt}はミトコンドリア内遊離カルシウム量, F_{max}はすべてのFluo 3にカルシウムが結合したときの蛍光量, F_{min}はすべてのFluo 3が遊離型のときの蛍光量, Fは誤差要因を補正した測定値, K_dはFluo 3とカルシウムの解離定数である。Fluo 3のカルボキシル基を脂溶性のアセトキシメチルエステル体にしたFluo 3-AMは, ミトコンドリアの懸濁液と混合すると, ミトコンドリアに容易に取り込まれる。ミトコンドリア内のエステラーゼがFluo 3-AMのアセトキシメチルエステル基を切り離し, Fluo 3が再生されるので, ミトコンドリア内遊離カルシウム量の測定が可能となる²⁷⁾。

なお, ミトコンドリア内の解離定数K_dを知ることはできないため, 試験管内のFluo 3のK_d値0.4 μ Mを代用し, 両群のミトコンドリア内遊離カルシウム量を算出した。

5) カフェイン, ライアノジン, ルテニウムレッドの影響

両群のミトコンドリア内遊離カルシウムに対するカフェイン, ライアノジン, ルテニウムレッドの影響については相対蛍光強度(ΔF)の変化により検討した。

(1) カフェイン

無水カフェイン（試薬特級，和光純薬工業社）を水溶液として使用した。0.5mM，5mMならびに50mMのカフェイン溶液を作製した。Fluo 3-AMを負荷したミトコンドリア浮遊液を石英セルに500 μ l 入れ，測定を開始し，Microliter Syringe（Hamilton 社）にてカフェイン0.5mMを10 μ l，5mMを10 μ l，50mMを10 μ l，30 μ l および50 μ l 入れ，それぞれの蛍光強度の変化を経時的に測定した。

(2) ライアノジン

ライアノジン（生化学用，和光純薬工業社）を水溶液として使用した。 2×10^{-5} Mのライアノジン溶液を作製し， 2×10^{-15} Mまでの10倍連続希釈液を調整した。石英セル中の浮遊液に，それぞれの濃度の10 μ l を低濃度から入れた。

(3) ルテニウムレッド

ルテニウムレッド（試薬特級，和光純薬工業社）を水溶液として使用した。 5×10^{-3} Mのルテニウムレッド溶液を作製し，ライアノジンの場合と同様に， 5×10^{-10} Mまでの希釈液を調製した。石英セルにはライアノジンの場合と同様に10 μ l を低濃度から入れた。

4. 形態学的観察

両群の細胞のミトコンドリア分画は，0.1Mカコジル酸緩衝液（pH：7.4）で，洗浄し，Karnovsky^{2,8)}の混合固定液で4℃で12時間浸漬固定，

さらに1%オスミウム酸を含む0.1Mカコジル酸緩衝液（pH：7.4）で2時間，後固定した。固定した標品を0.1Mカコジル酸緩衝液（pH：7.4）で洗浄後，アルコール系列で段階的に脱水し，Quetol812（日新EM社）で包埋した。超薄切片は，ウルトラミクロトーム（MT-2型，ポーター社）を用いて作製し，4%酢酸ウランとReynolds^{2,9)}のクエン酸鉛による二重染色した。ミトコンドリアの膜構造の損傷の有無は，透過型電子顕微鏡（H800型，日立社）で検索した。

5. 統計学的検定

実験結果の統計学的検定は Student's *t*-testにより行った。

Ⅲ. 結果

1. 全細胞内カルシウム量

全細胞内カルシウム量 (図3) は, 低カルシウム群では対照群と比べ, 有意に減少 ($p < 0.001$) しており, その減少率は47%であった。

2. ミトコンドリア分画の形態

透過型電子顕微鏡像によるミトコンドリア分画の形態は, 図4に示す。

対照群ならびに低カルシウム群ともに, 膜構造の損傷はほとんど認められず, その大きさは直径 $0.5 \sim 2 \mu\text{m}$ の円形もしくは楕円形を示し, また内部にはミトコンドリアの特徴であるクリステを有していることが確認された。

これらの観察より, 得られた測定用ミトコンドリアは試料として実験に提供し得るものと認めた。

3. 全ミトコンドリア内カルシウム量

全ミトコンドリア内カルシウム量 (図5) は, 低カルシウム群では対照群と比べ, 有意に減少 ($p < 0.001$) しており, その減少率は46%であった。

4. ミトコンドリア内遊離カルシウム量

Fluo 3-AMを用いて測定したミトコンドリア内遊離カルシウム量 (図6) は, 両群間に有意な差は認められなかった。

5. カフェイン, ライアノジン, ルテニウムレッドの影響

両群のミトコンドリア内遊離カルシウムに与えるカフェイン, ライアノジンおよびルテニウムレッドの影響を検討した。

(1) カフェイン

カフェインは, calcium-induced calcium release (CICR) の促進作用を有している。カフェインの添加によるミトコンドリア内遊離カルシウムの動向について検討した。

Fluo3-AMで負荷した対照群のミトコンドリアに, 種々の濃度のカフェインを経時的に添加したときの蛍光強度の変化を図7に示す。

種々の濃度のカフェインの添加に伴い, 蛍光強度は用量依存的に減少し, ミトコンドリア内遊離カルシウムの減少することが示された。

低カルシウム群でも対照群と同様の変化を示した。

図7における種々の濃度のカフェイン添加に伴う蛍光強度の減少を希釈率により補正し, 対照群と低カルシウム群のそれぞれ飽和した値を100%として相対蛍光強度 (ΔF) に変換を行った。

両群のミトコンドリアに種々の濃度のカフェインを添加したときの ΔF の変化を図8に示す。

ΔF は両群ともカフェイン濃度に依存してミカエリスメンテン型に減少することが認められた。その減少の程度は低カルシウム群で対照群と比べ, 低い傾向を示した。

続いて, 濃度依存性を示した変化を, 二重逆数プロットにより計算し,

最大変化の1/2を与える濃度 ($K_{0.5}$)を、表1に示す。 $K_{0.5}$ は、対照群では $6.0 \times 10^{-5} \text{M}$ 、低カルシウム群では $1.4 \times 10^{-4} \text{M}$ であり、低カルシウム群は対照群と比較し約2倍高い値を示した。

(2) ライアノジン

ライアノジンは、CICRを開口状態に固定することによりカルシウムをカルシウム貯蔵所から放出させ、このことが同時にCICRの阻害作用となることが報告されている³⁰⁾。このような作用を有するライアノジンを用いて両群のミトコンドリア内遊離カルシウムに与える影響を検討した。

Fluo 3-AMで負荷した両群のミトコンドリアに種々の濃度のライアノジンを添加したときの ΔF の変化を図9に示す。

両群とも ΔF はライアノジンの濃度に依存して減少し、S字状曲線を示した。その減少の程度は、低カルシウム群で対照群と比べ、有意

($p < 0.001$)に低いことが示された。 $K_{0.5}$ は、図9から、対照群では $3.0 \times 10^{-16} \text{M}$ 、低カルシウム群では $3.0 \times 10^{-14} \text{M}$ であり、低カルシウム群は対照群と比較し100倍の高値を示した。

ライアノジンの濃度に依存したミトコンドリアからのカルシウム放出のS字状曲線の変化をHillの式³¹⁾を用いて解析し、そのHillプロットを図10に示す。

Hill係数は、図10より対照群では0.64、低カルシウム群では0.14と算出され、両群とも1より小さいことを示した。

この場合、Hill係数はカルシウム放出部位に対するライアノジン結合部位の数、もしくはライアノジン結合部位間の協同性の程度を表しているため、両群のミトコンドリアのカルシウム放出部位において、ライアノジン結合部位間に負の協同性が存在することを示した。すなわち、1個目のライアノジンが結合すると、次のライアノジンの結合が妨げられることを示唆した。特に、その程度は低カルシウム群の方が対照群と比較し、約5倍高いことが認められた。

(3) ルテニウムレッド

ルテニウムレッドは、CICRの阻害作用を有しているが、このルテニウムレッドが両群のミトコンドリア内遊離カルシウムに与える影響を検討した。

Fluo 3-AMで負荷した両群のミトコンドリアに種々の濃度のルテニウムレッドを添加した時の ΔF の変化を図11に示す。

対照群と低カルシウム群のミトコンドリアに、種々の濃度のルテニウムレッドを添加すると、 ΔF は濃度依存的に減少することが示された。対照群では、10nMのルテニウムレッドの投与で、 ΔF の減少の程度が最大となったため、それ以上の濃度は調べなかった。その減少の程度は、低カルシウム群では対照群と比べ、低い傾向を示した。 $K_{0.5}$ は、対照群では $1.7 \times 10^{-8} \text{M}$ 、低カルシウム群では $1.1 \times 10^{-7} \text{M}$ であり、その程度は低カルシウム群の方が対照群と比較し、6倍高いことが認められた。

(4) ライアノジン共存下におけるカフェインによる影響

種々の濃度のカフェインを添加したときにみられた ΔF の変化に対する、ライアノジンの阻害効果について検討した。

ライアノジン共存下で、Fluo 3-AMで負荷した両群のミトコンドリアに種々の濃度のカフェインを添加したときの ΔF の変化を図12に示す。さらに、両群のこの変化に対する $K_{0.5}$ は図13に示す。

対照群では、図12 a に示すように、 $4 \times 10^{-10} M$ 、 $4 \times 10^{-7} M$ ライアノジンの共存下では、カフェインによるミトコンドリア内遊離カルシウムの ΔF の変化の程度が低下することが認められた。同時に、 $K_{0.5}$ は、両濃度のライアノジン共存下で10倍以上増加した(図13)。低カルシウム群では、図12 b に示すように、 $4 \times 10^{-10} M$ 、 $4 \times 10^{-7} M$ ライアノジン共存下で、カフェインによるミトコンドリア内遊離カルシウムの ΔF の変化の程度は低下することが認められた。同時に、 $K_{0.5}$ は、両濃度のライアノジン共存下で6倍以上増加した(図13)。なお、ライアノジン無添加の場合、4mMのカフェイン投与で、 ΔF の減少の程度が最大となったため、それ以上の濃度は調べなかった。両濃度のライアノジンによる ΔF の減少は、両群とも同様の傾向を示した。

(5) ルテニウムレッド共存下におけるカフェインによる影響

種々の濃度のカフェインを添加したときにみられた ΔF の変化に対する、ルテニウムレッドの阻害効果について検討した。

ルテニウムレッド共存下で、Fluo 3-AMで負荷した両群のミトコンドリアに、種々の濃度のカフェインを添加したときの ΔF の変化を図14に示す。さらに、両群のこの変化に対する $K_{0.5}$ は図15に示す。

対照群では、図14 a に示したように、 $1 \times 10^{-10} M$ 、 $1 \times 10^{-8} M$ ルテニウムレッド共存下では、カフェインによるミトコンドリア内遊離カルシウムの ΔF の変化の程度は低下することが認められた。同時に、 $K_{0.5}$ は両濃度のルテニウムレッド共存下で10倍以上増加した(図15)。

低カルシウム群では、図14 b に示したように、 $1 \times 10^{-10} M$ 、 $1 \times 10^{-8} M$ ルテニウムレッドの共存下では、カフェインによるミトコンドリア内遊離カルシウムの ΔF の変化はわずかに減少することが認められた。一方、 $K_{0.5}$ は両濃度のルテニウムレッド共存下で変化が認められなかった(図15)。なお、ルテニウムレッド無添加の場合、4mMのカフェインの投与で、 ΔF の減少の程度が最大となったため、それ以上の濃度は調べなかった。両濃度のルテニウムレッドによる ΔF の減少の程度は、低カルシウム群では対照群と比べ、低い傾向を示した。

IV. 考察

1. 全細胞内カルシウム量

ラット胎児頭蓋冠から得た骨形成細胞のカルシウム量は、対照群では272 nmol/mg protein, 低カルシウム群では145 nmol/mg proteinを示した(図3)が、この値を細胞 10^6 個当りで表すと、対照群では122nmol, 低カルシウム群では65nmolであった。これらを重量換算^{3,2)}するとkg wet weight当り、対照群では87mmol, 低カルシウム群では46mmolとなった。ここで得られた両群の骨形成細胞のカルシウム量は、他の細胞^{3,3-3,7)}の0.47~6.0mmolと比較し、著しく大であり、7倍以上のカルシウムの存在が示された。このカルシウムが多く存在する骨形成細胞を用いた本研究においては、低カルシウム群で、対照群より47%低く、低カルシウム環境により、細胞の正常な機能維持に必要なカルシウムに不足が生じていると考えられる。

2. 全ミトコンドリア内カルシウム量

全ミトコンドリア内カルシウム量は、モルモットの心筋あるいはラットの心筋や肝において0.5-2.0 nmol/mg proteinであることが報告されている^{3,7-4,1)}。本研究から得られた骨形成細胞の全ミトコンドリア内カルシウム量は、対照群では 12.20 ± 2.81 nmol/mg protein, 低カルシウム群では 6.55 ± 2.55 nmol/mg proteinとなり従来の結果より両群とも3倍以

上高い値を示した(図5)。このことは、石灰化能を有する骨形成細胞のミトコンドリアは、多くのカルシウムを保有するという報告^{4,2)}と一致する。一方、低カルシウム群は対照群と比較し、全ミトコンドリア内カルシウム量は、46%低い値を示した。これは、低カルシウム環境に陥ると、正常な細胞機能維持に不足した細胞質内のカルシウムを補うために、カルシウム貯蔵所の一つであるミトコンドリアからカルシウムが放出したことによると考えられる。

3. ミトコンドリア内遊離カルシウム量

ミトコンドリア内遊離カルシウム量は、ミトコンドリアに含まれる全カルシウム量の1%以下であり、細胞内遊離カルシウム量とほとんど濃度勾配はなく、遊離のカルシウムは 10^{-6} M以下と考えられている^{4,3)}。休止細胞における細胞内遊離カルシウム量は、約100 nMであることが報告されている^{4,4, 4,5)}。一方、低カルシウム環境で培養した骨形成細胞の細胞内遊離カルシウム量は、対照群では 98.0 ± 10.2 nM/ 10^6 cells, 低カルシウム群では 21.3 ± 2.8 nM/ 10^6 cellsであり、低カルシウム群が対照群と比較し、有意に低い値を示すことが報告されている^{1,5)}。本研究ではミトコンドリア内遊離カルシウム量は、対照群では 116 ± 28 nM, 低カルシウム群では 118 ± 30 nMであり、両群間に有意な差は認められなかった

(図6)。このことは、正常環境と低カルシウム環境で培養した骨形成細胞におけるミトコンドリア内遊離カルシウム濃度は、同程度に維持され

ていることが認められる。もし、ミトコンドリア内遊離カルシウム量が、細胞内遊離カルシウム量と一致するなら、低カルシウム群のミトコンドリア内遊離カルシウム量はさらに低下するはずであるが、ミトコンドリア内においてはごく一部が遊離したカルシウムとして存在するため、低カルシウム環境においてもミトコンドリア内遊離カルシウム量は、細胞環境のカルシウム濃度に左右されることなく一定に保たれているのかもしれない。しかし、この点については、今後の測定技術の進歩を俟って、さらに検討することが必要と考えられる。

4. カフェイン、ライアノジン、ルテニウムレッドの影響

細胞内において多量のカルシウムを貯蔵しているミトコンドリアのカルシウム代謝調節機構には、いまだ不明な点が多い。このミトコンドリアの物質輸送に関わる膜は、組織学的には外膜、内膜から成っているが、このうち内膜にはカルシウムを取り込む機構が存在し、これは内膜をはさんで存在する電気的および化学的ポテンシャルの差による受動的な輸送である^{4.6)}。一方、その内膜にはカルシウムを外に排出する機構が少なくとも2種類ある。第一はナトリウム／カルシウム交換系であり、第二は水素／カルシウム交換系が知られている。ナトリウム／カルシウム交換系は心筋や脳のミトコンドリアに存在するが、その物性についてはまだ不明である。この交換反応は、ナトリウム勾配に依存し、カルシウム1モルに対してナトリウム2モルが交換される。また肝ミトコンドリアにお

いては水素／カルシウム交換系が報告されている^{4.7)}。

一般に、細胞内小器官である小胞体もカルシウム貯蔵所の一つとして認められている。骨格筋小胞体にはカルシウム自身がカルシウム放出を誘導するCICR機構の存在することが報告されている^{4.8)}。このCICR機構はスキンドファイバーと分離筋小胞体標本を用いて詳細に調べられ、おおむね $1\mu\text{M}$ 以上のカルシウムで活性化されること、アデニンヌクレオチドが促進、 Mg^{2+} や H^+ は抑制作用を及ぼすことなどが明らかにされた^{4.8)}。また、カフェインはCICR機構の最大カルシウム放出速度とカルシウム感受性を促進し、それによって筋肉の収縮を起こすことも示されている^{4.8)}。その他平滑筋^{4.9)}にもCICR機構が存在することが報告されている。

このような報告からCICR機構は、その性質と構造が最もよく調べられている細胞内カルシウム放出機構の一つであると考えられている。前述のCICR機構を調べるために用いられた細胞はすべて興奮性細胞であり、非興奮性細胞にもCICR機構が存在するか否かについては、想定あるいは示唆する報告は数多くみうけられるものの、その存在についてはまだ証明されてはいない。

図8より、カフェイン添加による両群におけるミトコンドリア内遊離カルシウムの減少が認められた。カフェインはCICR機構の最大カルシウム放出速度を促進することから、ミトコンドリアにCICR機構の存在が示唆された。

ライアノジンは、CICRのレセプターに結合し、チャンネルを開口固定すると同時に、ブロッカーであることが知られており³⁷⁾、チャンネルの開口によるカルシウムの放出が示唆される。図9より、 $K_{0.5}$ は、対照群では $3.0 \times 10^{-16} \text{M}$ 、低カルシウム群では $3.0 \times 10^{-14} \text{M}$ であり、低カルシウム群の $K_{0.5}$ は対照群と比較し、約100倍大きかった。すなわちミトコンドリアから同程度の Ca^{2+} を放出させるのに低カルシウム群は対照群より約100倍高いライアノジン濃度を必要とし、低カルシウム環境によりライアノジンに対するミトコンドリアCICRの親和性が低下することが示唆される。この変化をHillの式を用いて解析した。Hill係数は、対照群では0.64、低カルシウム群では0.14と算出され、両群とも1より小さいことが判明した(図10)。これより両群のミトコンドリアのカルシウム放出部位において、ライアノジン結合部位間に負の協同性が存在することが示された。特に、その程度は低カルシウム群において約5倍高く、低カルシウム群のミトコンドリアにカルシウム放出部位に1個目のライアノジンが結合すると、次のライアノジンの結合が妨げられ、この負の協同性は対照群よりさらに強いことを示している。ライアノジンのCICR開口固定の働きから、本研究でミトコンドリアに存在すると推定されたCICR機構に制御されているカルシウム放出機構が、低カルシウム環境において、強く抑制されていると考えられる。

図11より、両群のミトコンドリアに、種々の濃度のルテニウムレッド

を添加すると、 ΔF は濃度依存的に減少することが示され、 $K_{0.5}$ は、対照群では $1.7 \times 10^{-8} \text{M}$ 、低カルシウム群では $1.1 \times 10^{-7} \text{M}$ であり、その程度は低カルシウム群が対照群と比較し、6倍高いことが認められた。ルテニウムレッドは、細胞およびミトコンドリアによるカルシウムの膜透過を阻害する作用を有しているが⁵⁰⁾、このルテニウムレッドによる ΔF の減少の機構については不明である。

図12 a に示すように、ライアノジン共存下において種々の濃度のカフェインを添加したときにみられた ΔF の変化に対する、ライアノジンの阻害効果について検討した。対照群では、 $4 \times 10^{-10} \text{M}$ 、 $4 \times 10^{-7} \text{M}$ ライアノジンの共存下では、 $K_{0.5}$ は、ライアノジン非共存下と比較し、10倍以上増加した(図13)。また図12 b に示すように、低カルシウム群では、 $4 \times 10^{-10} \text{M}$ 、 $4 \times 10^{-7} \text{M}$ ライアノジンの共存下では、 $K_{0.5}$ は、ライアノジン非共存下と比較し、6倍以上増加した(図13)。このことは、ライアノジンのCICRに対する阻害作用を裏付け、骨形成細胞のミトコンドリアにCICRの存在する可能性を強めた。

図14 a に示すように、ルテニウムレッド共存下において種々の濃度のカフェインを添加したときにみられた ΔF の変化に対する、ルテニウムレッドの阻害効果について検討した。対照群では、 $1 \times 10^{-10} \text{M}$ 、 $1 \times 10^{-8} \text{M}$ ルテニウムレッドの共存下において、 $K_{0.5}$ は、ルテニウムレッド非共存下と比較し、10倍以上増加した(図15)。また図14 b に示すように、

低カルシウム群では、 $1 \times 10^{-10} \text{M}$ 、 $1 \times 10^{-8} \text{M}$ ルテニウムレッドの共存下では、 $K_{0.5}$ は、ルテニウムレッド非共存下と比較し、変化は認められなかった（図15）。低カルシウム群では、ルテニウムレッドによる阻害作用は認められなかったが、これはルテニウムレッド非存在下における低カルシウム群のカフェイン添加による ΔF の減少が、対照群と比較し、すでに強く抑制されているためルテニウムレッドの阻害効果が見かけ上、打ち消されてしまったことによると考えられる。しかし、対照群では、 $K_{0.5}$ は、ルテニウムレッド非共存下と比較し、10倍以上増加し、このことは、カフェインとライアノジン共存下における場合と同様にルテニウムレッドのCICRの阻害作用を裏付け、骨形成細胞のミトコンドリアにCICRの存在する可能性をさらに強めた。

これまでミトコンドリアにCICR機構が存在するという報告は、ほとんどみられない。しかし、骨形成細胞のミトコンドリアにおいてカフェイン投与によりカルシウム放出が促進し、ライアノジンとルテニウムレッド投与によりカルシウム放出が阻害されることを示した。しかも低カルシウム環境では、これがより強く阻害された。これらの事実から骨形成細胞のミトコンドリアに、CICR機構に極めて一致したカルシウム放出機構の存在が強く示唆された。しかしこの機構の存在を確認するためには、さらに詳細に検討を加えていく必要がある。

本研究は、*in vitro*であるため、これらの結果を直接*in vivo*硬組織代

謝機構に置き換え、論ずることは困難である。しかし、少なくとも、*in vivo*において低カルシウム環境下に置かれた硬組織代謝機構が、*in vitro*で生じたような影響を受ける可能性が考えられる。今後も骨形成細胞のミトコンドリア内遊離カルシウム*in vitro*の実験系をより改善するとともに、ミトコンドリアからのカルシウム輸送機構に対し、ナトリウム／カルシウム交換系や水素／カルシウム交換系などから多角的に検討を加え、この輸送機構を明らかにし、さらに*in vitro*の結果を*in vivo*において確かめることが必要である。これにより、細胞内小器官であるミトコンドリアの硬組織代謝抑制機構における役割が明らかになると考えられる。

ミトコンドリアは、細胞の生理機能維持のためのエネルギー供給、カルシウム貯蔵、放出など重要な役割を果たしているが、骨形成あるいは骨吸収という骨改造機転にも深く関わりがあると考えられる。本研究の結果と臨床との関連を考え合わせると、硬組織代謝抑制を伴う歯根嚢胞、歯周疾患あるいは骨粗鬆症等の病因の一つは、骨形成と骨吸収の平衡が乱れ、前者の機能が抑制され、後者の機能が優位になることが考えられる。

本研究では、骨形成・骨吸収の平衡の乱れにより、骨形成を抑制する低カルシウム環境下では、確かにミトコンドリアにおけるカルシウム輸送機構に抑制が生じていることが示された。従って、このミトコンドリ

アの抑制された機能を賦活する薬物を投与すれば、前述の臨床上的疾患の進行が抑制され、治療効果を高める一助となりうることが予想される。さらに、ミトコンドリアのカルシウム代謝のなかで骨形成抑制に関わる因子を特定できれば、これら疾患に対する臨床上の予防、診断および治療に大きく貢献すると考えられる。

V. 結論

低カルシウム環境下で培養した骨形成細胞の全細胞内カルシウム量、全ミトコンドリア内カルシウム量、ミトコンドリア内遊離カルシウム量ならびに各種の化学物質を用いてミトコンドリア内遊離カルシウムの動向を検索し、以下の事実が認められた。

1) 低カルシウム環境で培養すると、全細胞内カルシウム量は、対照群と比較し、有意に低下した。

2) 低カルシウム環境下で培養した骨形成細胞の全ミトコンドリア内カルシウム量は、対照群と比較し、有意に低下した。

3) ミトコンドリア内遊離カルシウム量は、両群間に有意差は認められなかった。

4) ミトコンドリア内遊離カルシウムは、両群においてカフェイン、ライアノジン、ルテニウムレッド投与により減少し、それぞれの $K_{0.5}$ は、低カルシウム群において高く、低カルシウム環境下で培養した骨形成細胞のミトコンドリアのこれら化学物質によるカルシウム放出に抑制が認められた。

5) カフェインによるミトコンドリア内遊離カルシウムの減少は、両群においてライアノジン投与により抑制された。その減少の程度は、対照群において大きかった。また、その減少は、ルテニウムレッド投与に

より対照群では抑制されたが、低カルシウム群では抑制が生じなかった。

6) ミトコンドリアのカルシウム放出機構にCICRと思われる機構の存在が示唆された。

7) 低カルシウム環境になると骨の改造に関与する細胞機能に影響し、細胞内情報伝達系に異常が生じることが示唆された。

8) これらの事実から低カルシウム環境下培養骨形成細胞では、全細胞内カルシウム量、全ミトコンドリア内カルシウム量が減少し、ミトコンドリアのCICRにおけるカルシウム放出機構に抑制が発生し、これらが要因となって細胞の機能に抑制が生じることが推測された。

VI. 謝辞

稿を終えるにあたり、御指導御校閲を賜りました主任、下河辺宏功教授に甚大なる謝意を表します。また、終始懇切丁寧な御指導と御教示をいただきました歯科薬理学講座松本章教授に深謝いたします。さらに本研究を行うにあたり、数々の御援助、御協力をいただきました歯科保存学第一講座ならびに歯科薬理学講座の諸先生方に、殊に直接実験を御指導、御協力いただきました久田洋助教授に心より感謝の意を表します。また中央研究部野田坂佳伸技官に心より感謝の意を表します。

本論文は北海道大学審査学位論文であり、この要旨は第5回北海道薬物作用談話会（平成3年8月）、第33回歯科基礎医学会総会（平成3年10月）、第35回歯科基礎医学会総会（平成5年10月）ならびに平成5年度北海道歯学会・秋季学術大会（平成5年11月）において発表した。

VII. 文献

- 1) Harris, M., Jenkins, M. V., Bennett, A. and Wills, M. R.:
Prostaglandin production and bone resorption by dental cysts.
Nature, 245 : 213-215, 1973.
- 2) Harrison, M. and Fraser, R: Bone structure and metabolism in
calcium-deficient rats. J. Endocrin., 21 : 197-205, 1960.
- 3) Salomon, C. D.: Osteoporosis following calcium deficiency in
rats. Calcif. Tissue Res., 8: 320-333, 1972.
- 4) Rosenquist, J. B., Lorentzon, P. R. and Boquist, L. L.
V.: Effect of fluoride on parathyroid activity of normal and
calcium-deficient rats. Calcif. Tissue Int., 35: 533-537, 1983.
- 5) Wronski, T. J., Dann, L. M. and Horner, S. L.: Time course of
vertebral osteopenia in ovariectomized rats.
Bone, 10: 295-301, 1989.
- 6) 中村利孝, 永井由美子: 卵巣摘出によるイヌの骨粗鬆症モデルの作成.
日骨代謝誌, 9: 54-59, 1991.
- 7) Omdahl, J. L. and DeLuca, H. F.: Rachitogenic activity of
dietary strontium. J. Biol. Chem., 247: 5520-5526, 1972.
- 8) Care, A. D., Sherwood, L. M. and Potts, J. T. Jr. : Perfusion

- of the isolated parathyroid gland of the goat and sheep.
Nature, 209 : 55-57, 1966.
- 9) Yaeger, J. A., Hinricksen, C. F. L. and Cohen, M. J.:
Development of the response in rat incisor dentin to injected
strontium and fluoride. Am. J. Anat., 114 : 255-272, 1964.
 - 10) 松本章, 小林恵子, 田中波香: 炭酸ストロンチウム投与ラットの切歯
における石灰化不全象牙質と歯槽骨に発生した異常骨の組織学的並び
に組織化学的研究. 歯基礎誌, 23 : 211-219, 1981.
 - 11) 松本章: 炭酸ストロンチウム投与ラットの脛骨骨端の発育障害と骨端
軟骨基質中の多糖類の消長ならびにこれに対するpapainの抑制効果.
口病誌, 36 : 108-120, 1969.
 - 12) Storey, E. : Intermittent bone changes and multiple cartilage
defects in chronic strontium rickets in rats. J. Bone Joint
Surg., 44B : 194-208, 1962.
 - 13) 松本章, 久田洋: 新生児ラット大腿骨の低カルシウム環境下培養とそ
の中止に伴うアルカリ性ホスファターゼ活性およびコンドロイチン硫
酸合成能の変化. 歯薬療法, 8: 188-193, 1989.
 - 14) Matsumoto, A., Taguchi, H. and Hisada, Y.: Effect of a
low-calcium environment on neonatal rat femora in culture.
Toxic. in Vitro, 5: 51-62, 1991.

- 15) Matsumoto, A. and Hisada, Y.: Intracellular free calcium and phosphatidyl inositol-1,4,5-triphosphate in bone cells cultured in a low calcium environment. JBMM., 10 : 1-7, 1992.
- 16) Matsumoto, A. and Hisada, Y.: Change in protein kinase C activity in rat calvarial bone cultured in a low-calcium environment. Archs. oral Biol., 37 : 695-698, 1992.
- 17) Kazuyuki, S., Hisada, Y., Matsumoto, A. and Takiguchi, R. : Ultrastructural change in chondrocyte mitochondria associated with strontium-induced rickets. Showa Univ. J. Med. Sci., 2:57-62, 1990.
- 18) Lehninger, A. L. : Role of phosphate and other proton-donating anions in respiration-coupled transport of Ca^{2+} by mitochondria. Proc. Nat. Acad. Sci., 71 : 1520-1524, 1974.
- 19) Betts, F., Blumenthal, N. C., Posner, A. S., Becker, G. L. and Lehninger, A. L. : Atomic structure of intracellular amorphous calcium phosphate deposits. Proc. Nat. Acad. Sci., 72 : 2088-2090, 1975.
- 20) Brighton, C. T. and Hunt, R. M.: Mitochondrial calcium and its role in calcification. Clin. Orthop., 100: 406-416, 1974.

- 21) Dziak, R. and Brand, J. S.: Calcium transport in isolated bone cells. I. Bone cell isolation procedures. J. Cell Physiol., 84 :75-84, 1974.
- 22) Nijweide, R. J., Van der Plas, A. and Scherft, J. P.: Biochemical and histochemical studies on various bone cell preparations. Calcif. Tissue. Int., 33 :529-540, 1981.
- 23) Shlossman, M., Brown, M., Shapiro, E. and Dziak, R.: Calcitonin effects on isolated bone cells. Calcif. Tissue Int., 34: 190-196, 1982.
- 24) 中沢 透: ラット肝のミトコンドリア. 佐藤 了編, 細胞分画法, 149-154, 岩波書店, 東京, 1972.
- 25) Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J. : Protein measurement with the folin phenol reagent. J. Biol. Chem., 93: 265-275, 1951.
- 26) Grynkiewicz, G., Poenie, M. and Tsien, R. Y.: A new generation of Ca^{2+} indicators with greatly improved fluorescence properties. J. Biol. Chem., 260:3440-3450, 1985.
- 27) Kao, J., Y. Harootunian, A. T. and Tsien, R. Y. : Photochemically generated cytosolic calcium pulses and their detection by fluo-3. J. Biol. Chem., 264:8179-8184, 1989.

- 28) Karnovsky, M. J. :A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. J. Cell Biol., 27: 137A-138A, 1965.
- 29) Reynolds, E. S. :The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. J. Cell Biol., 17: 208-212, 1963.
- 30) Iino, M., Kobayashi, T. and Endo, M.: Use of ryanodine for functional removal of the calcium store in smooth muscle cells of the guinea-pig. Biochem. Biophys. Res. Commun., 152: 417-422, 1988.
- 31) Segel, I. H. :Biochemical calculations 2nd edition. 303-317, John Wiley & Sons, Inc., Canada, 1976.
- 32) Levinson, C. and Blumenson, L. E. :Calcium transport and distribution in ehrlich mouse ascites tumor cells. J. Cell. Physiol., 75:231-240, 1970.
- 33) Wallach, S., Reizenstein, D. L. and Bellavia, J. V.: The cellular transport of calcium in rat liver. J. Gen. Physiol., 49:743-762, 1966.
- 34) Keynes, R. D. and Lewis, P. R. : The intracellular calcium contents of some invertebrate nerves. J. Physiol., 134 :

- 399-407, 1956.
- 35) Borle, A. B. : Effects of thyrocalcitonin on calcium transport in kidney cells. Endocrinol., 85 : 194-199, 1969.
- 36) Borle, A. B. : Kinetic analysis of calcium movements in HeLa cell cultures. I. Calcium influx. J. Gen. Physiol., 53 : 43-56, 1969.
- 37) Nichols, G. Jr. and Rogers, P. : Bone cell calcium stores : Their size, location, and kinetics of exchange. Calc. Tiss. Res., 9: 80-94, 1972.
- 38) Wendt-Gallitelli, M. F. and Jacob, R.: Rhythm-dependent role of different calcium stores in cardiac muscles: X-ray microanalysis. J. Mol. Cell Cardiol., 14 :487-492, 1982.
- 39) Reinhart, P. H., Van De Pol, E., Taylor, W. M. and Bygrave, F. L. : An assessment of the calcium content of rat liver mitochondria *in vivo*. Biochem. J., 218 : 415-420, 1984.
- 40) Crompton, M., Kessar, P. and Al-nasser, I. :The α -adrenergic-mediated activation of the cardiac mitochondrial Ca^{2+} uniporter and its role in the control of intramitochondrial Ca^{2+} *in vivo*. Biochem. J., 216 : 333-342, 1983.

- 41) Assimacopoulos-Jeannet, F., McCormack, J. G. and Jeanrenaud, B. : Vasopressin and/or glucagon rapidly increases mitochondrial calcium and oxidative enzyme activities in the perfused rat liver. *J. Biol. Chem.*, 261: 8799-8804, 1986.
- 42) Ozawa, H. and Yamamoto, T. : An application of energy-dispersive x-ray microanalysis for the study of biological calcification. *J. Histochem. Cytochem.*, 31 : 210-213, 1983.
- 43) 板野俊文, 松野秀樹, 畠瀬修 : 細胞内カルシウム濃度の調節系. 蛋白質核酸酵素, 31 : 1771-1783, 1986.
- 44) Tsien, R. Y., Pozzan, T. and Rink, T. J. : Calcium homeostasis in intact lymphocytes: Cytoplasmic free calcium monitored with a new, intracellularly trapped fluorescent indicator. *J. Cell Biol.*, 94: 325-334, 1982.
- 45) Williams, D. A., Fogarty, K. E., Tsien, R. Y. and Fay, F. S. : Calcium gradients in single smooth muscle cells revealed by the digital imaging microscope using fura-2. *Nature*, 318: 558-561, 1985.
- 46) Akerman, K. O. and Nicholls, D. G. : Physiological and bioenergetic aspects mitochondrial calcium transport. *Rev.*

- Physiol. Biochem. Pharmacol.*, 95 : 149-201, 1983.
- 47) Azzone, G. F., Massari, S., Rossi, E. and Scarpa, A. : Sites and mechanism of ion binding and translocation in liver mitochondria. *FEBS Symposium*, 17: 301-314, 1969.
- 48) Endo, M. : Calcium release from the sarcoplasmic reticulum. *Physiol. Rev.*, 57: 71-108, 1977.
- 49) Iino, M. : Calcium-induced calcium release mechanism in guinea pig taenia caeci. *J. Gen. Physiol.*, 94: 363-383, 1989.
- 50) Cittadini, A., Scarpa, A. and Chance, B. : Calcium transport in intact ehrlich ascites tumor cells. *Biochim. Biophys. Acta*, 291 : 246-259, 1973.

Ⅷ. 付図

表1

図1～15

試薬	群	K _{0.5}
カフェイン	対照群	$6.0 \times 10^{-5} \text{ M}$
	低カルシウム群	$1.4 \times 10^{-4} \text{ M}$
ライアノジン	対照群	$3.0 \times 10^{-16} \text{ M}$
	低カルシウム群	$3.0 \times 10^{-14} \text{ M}$
ルテニウムレッド	対照群	$1.7 \times 10^{-8} \text{ M}$
	低カルシウム群	$1.1 \times 10^{-7} \text{ M}$

表1 カフェイン，ライアノジン，ルテニウムレッド
によるミトコンドリアからのカルシウム放出に
対する K_{0.5}値

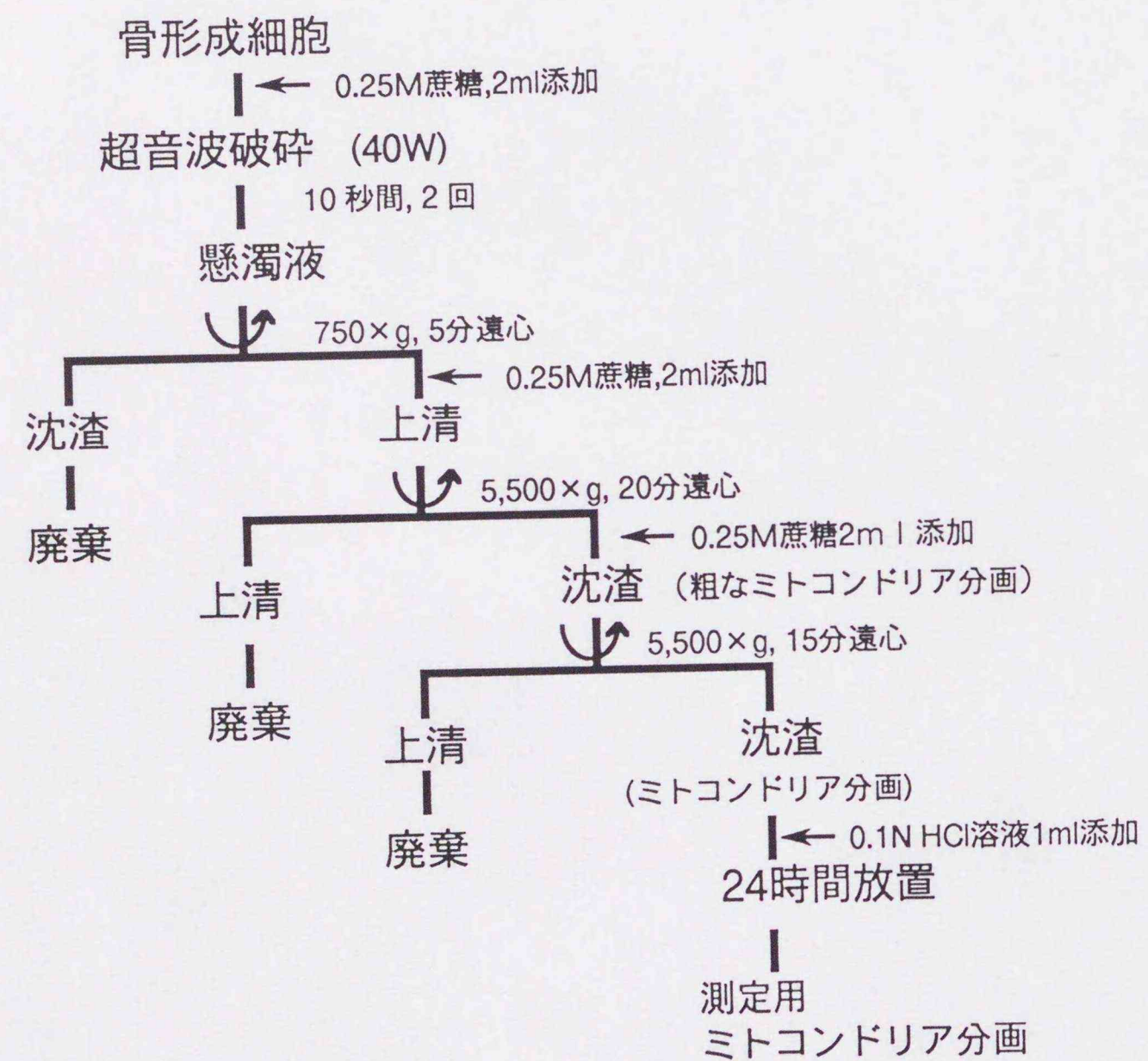


図1 測定用ミトコンドリア分画の調整方法

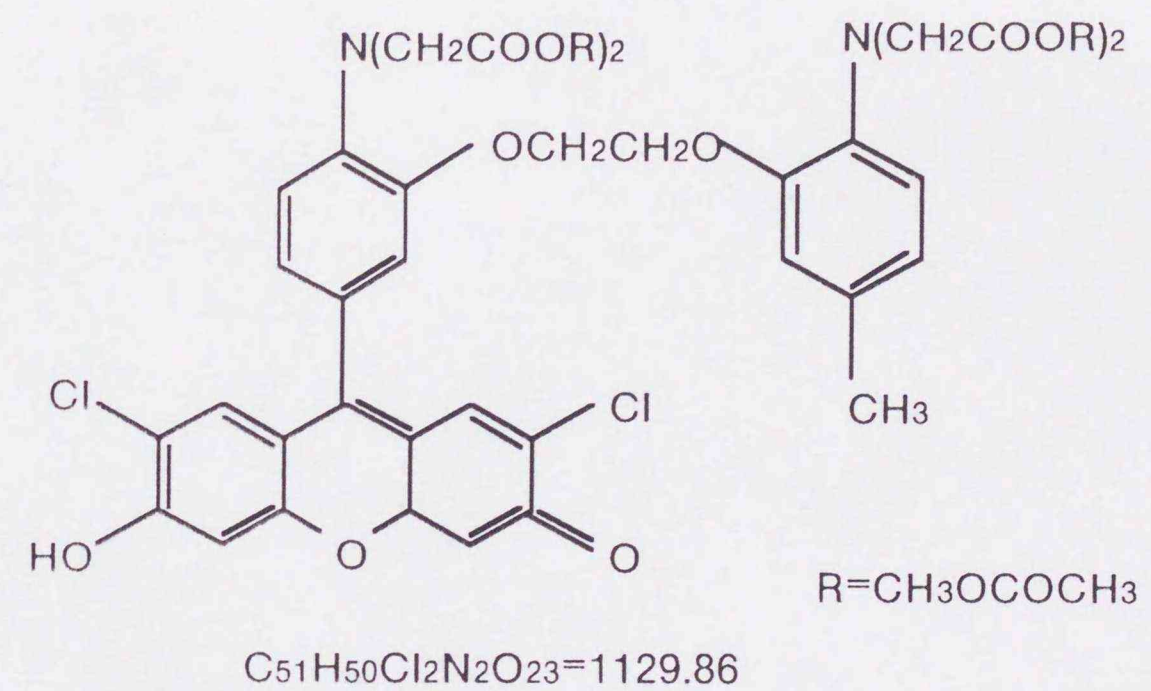


図2 Fluo 3-AMの化学式

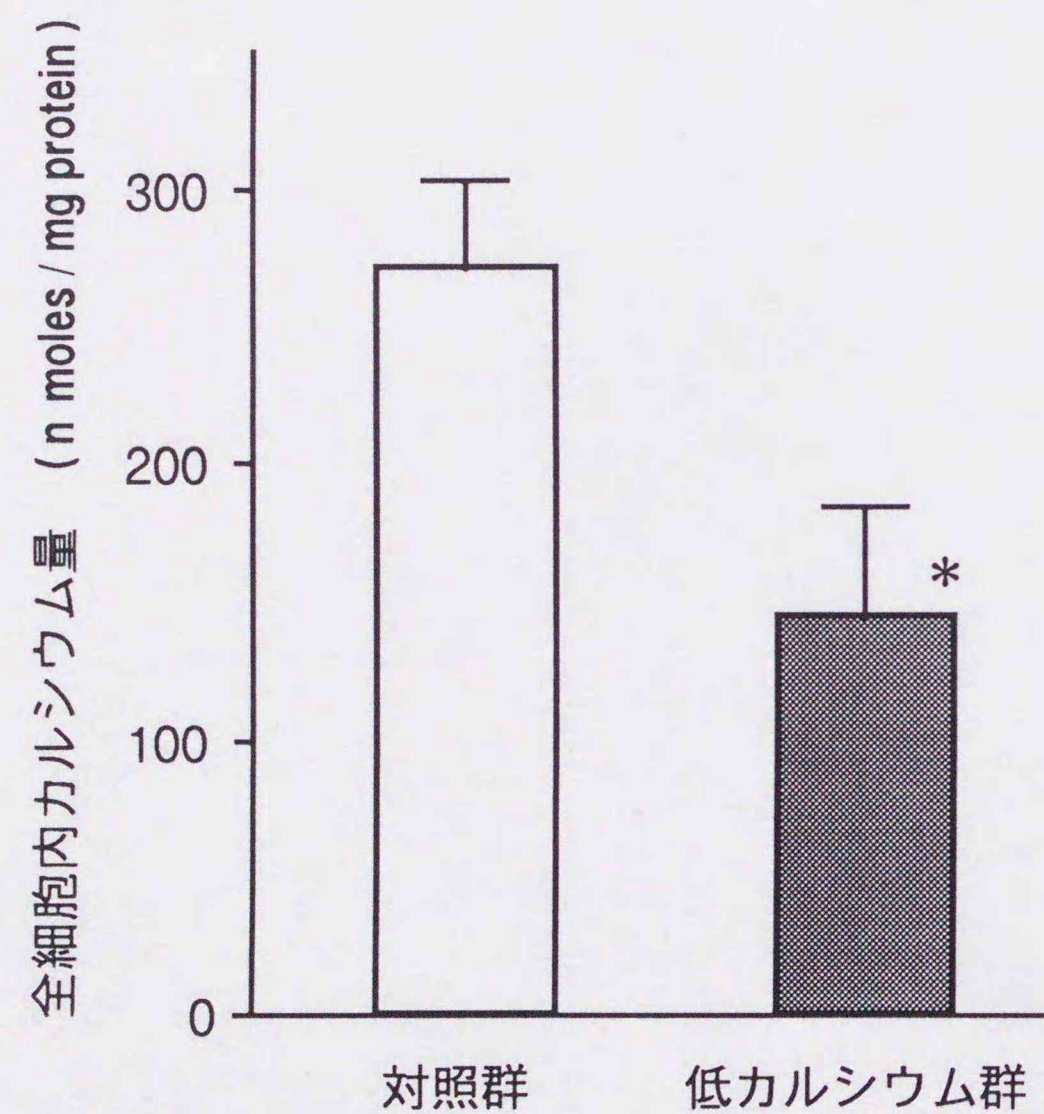


図3 全細胞内カルシウム量
細胞：培養開始後6～7日
ヒストグラムは平均値±標準偏差(n=6)を示している。*：対照値と比較して有意(p<0.001)

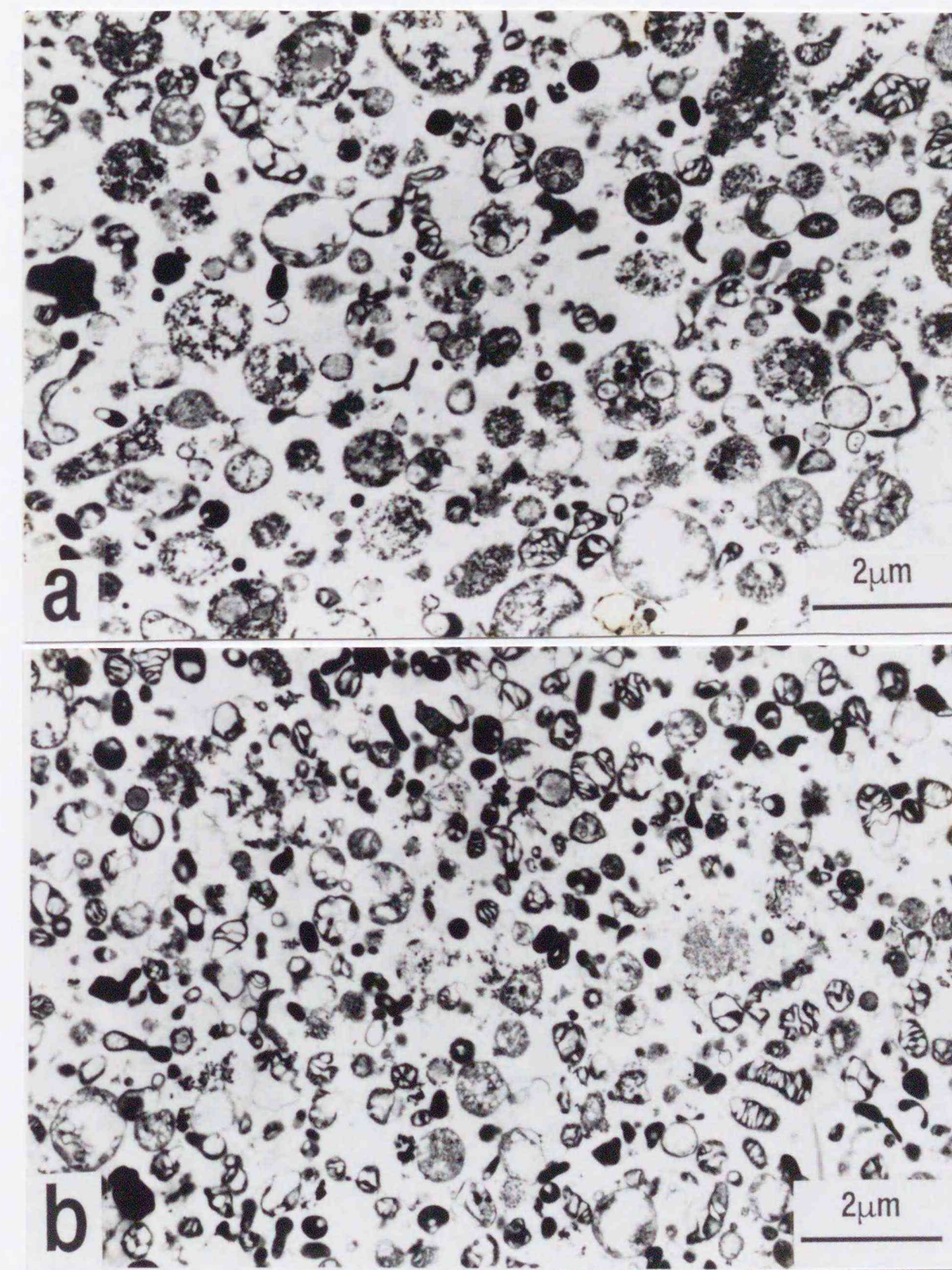


図4 測定用ミトコンドリア分画の電子顕微鏡像
a：対照群，b：低カルシウム群

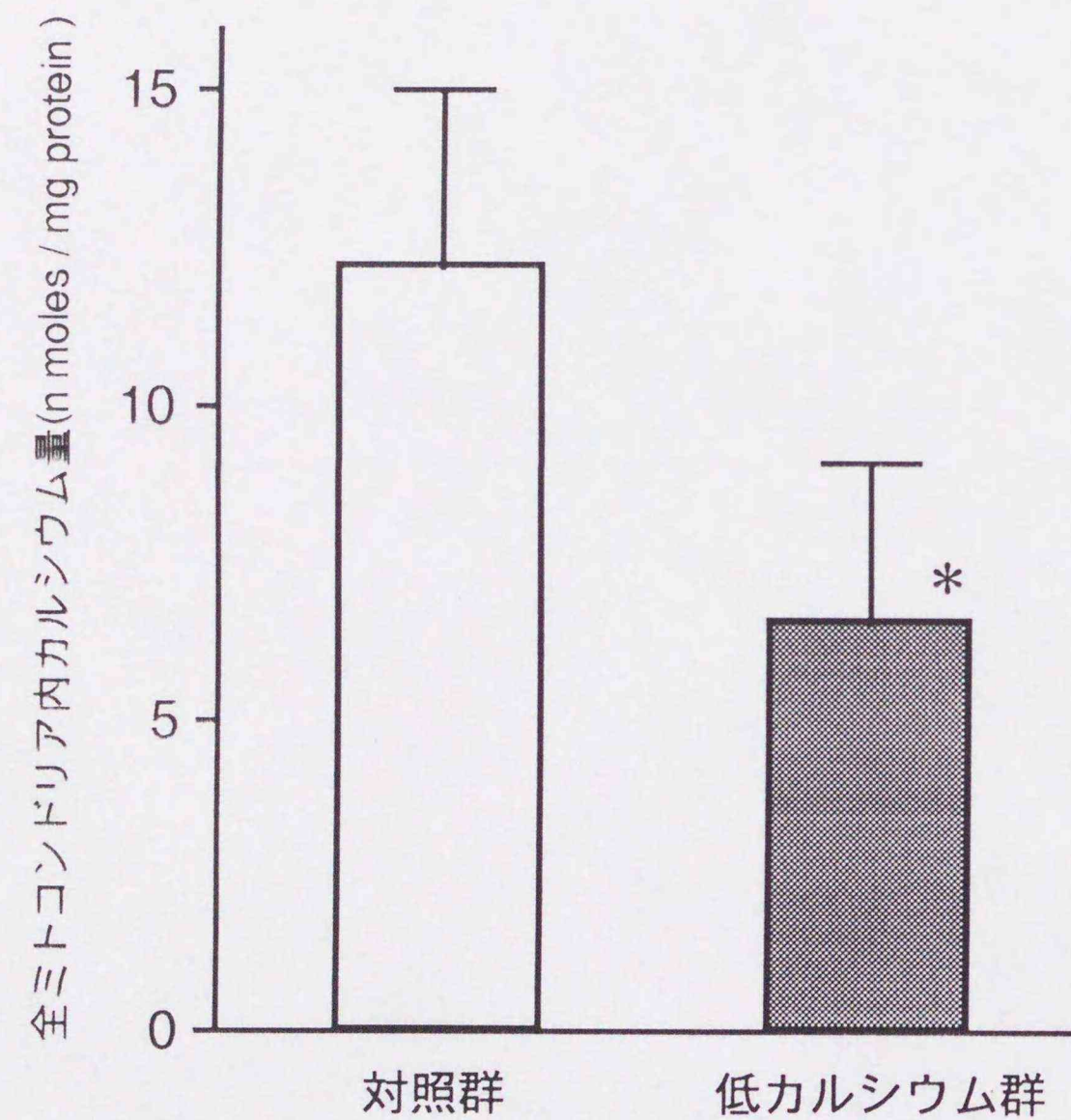


図5 全ミトコンドリア内カルシウム量
細胞：培養開始後6～7日
ヒストグラムは平均値±標準偏差(n=9)を示している。*：対照値と比較して有意(p<0.001)

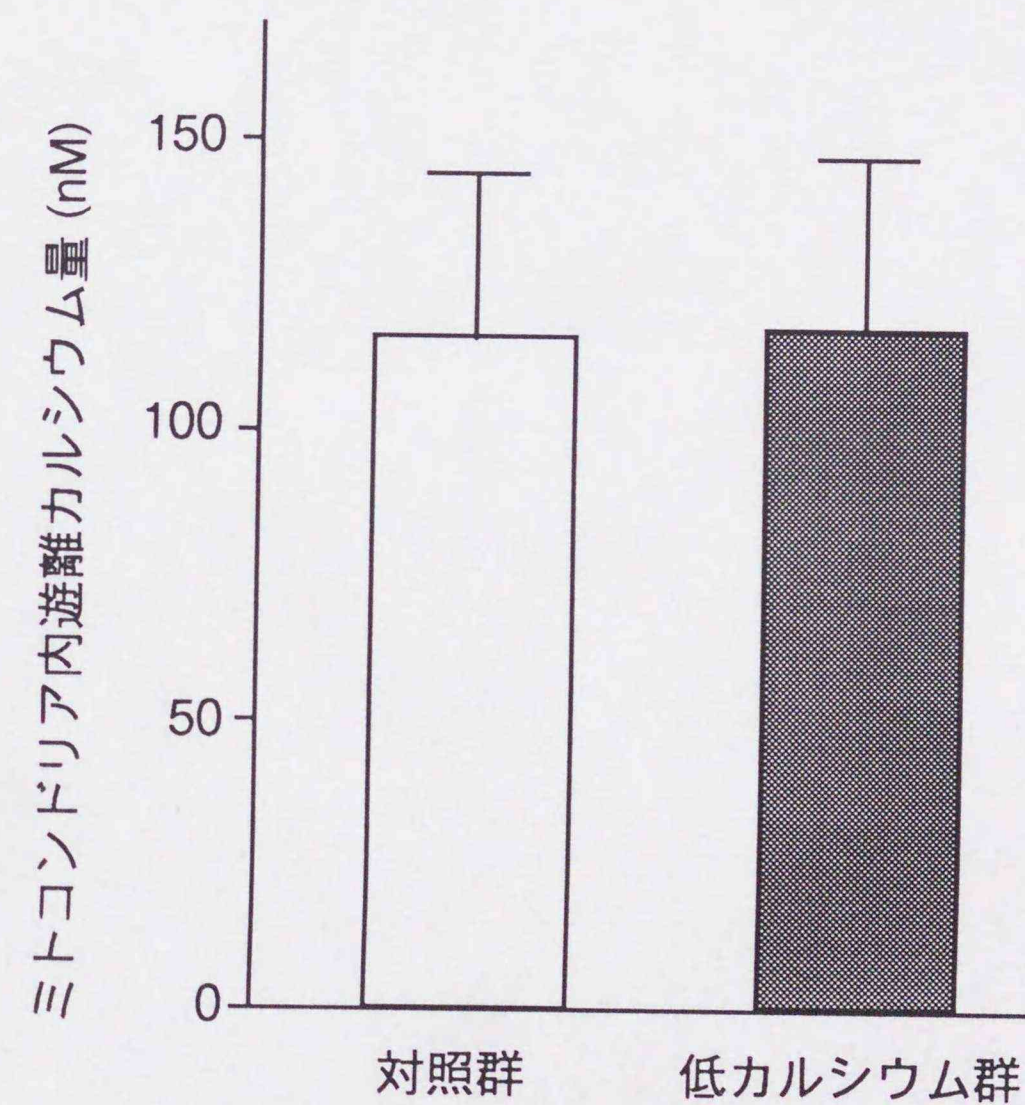


図6 ミトコンドリア内遊離カルシウム量
細胞：培養開始後6～7日
ヒストグラムは平均値±標準偏差(n=8)を示している。

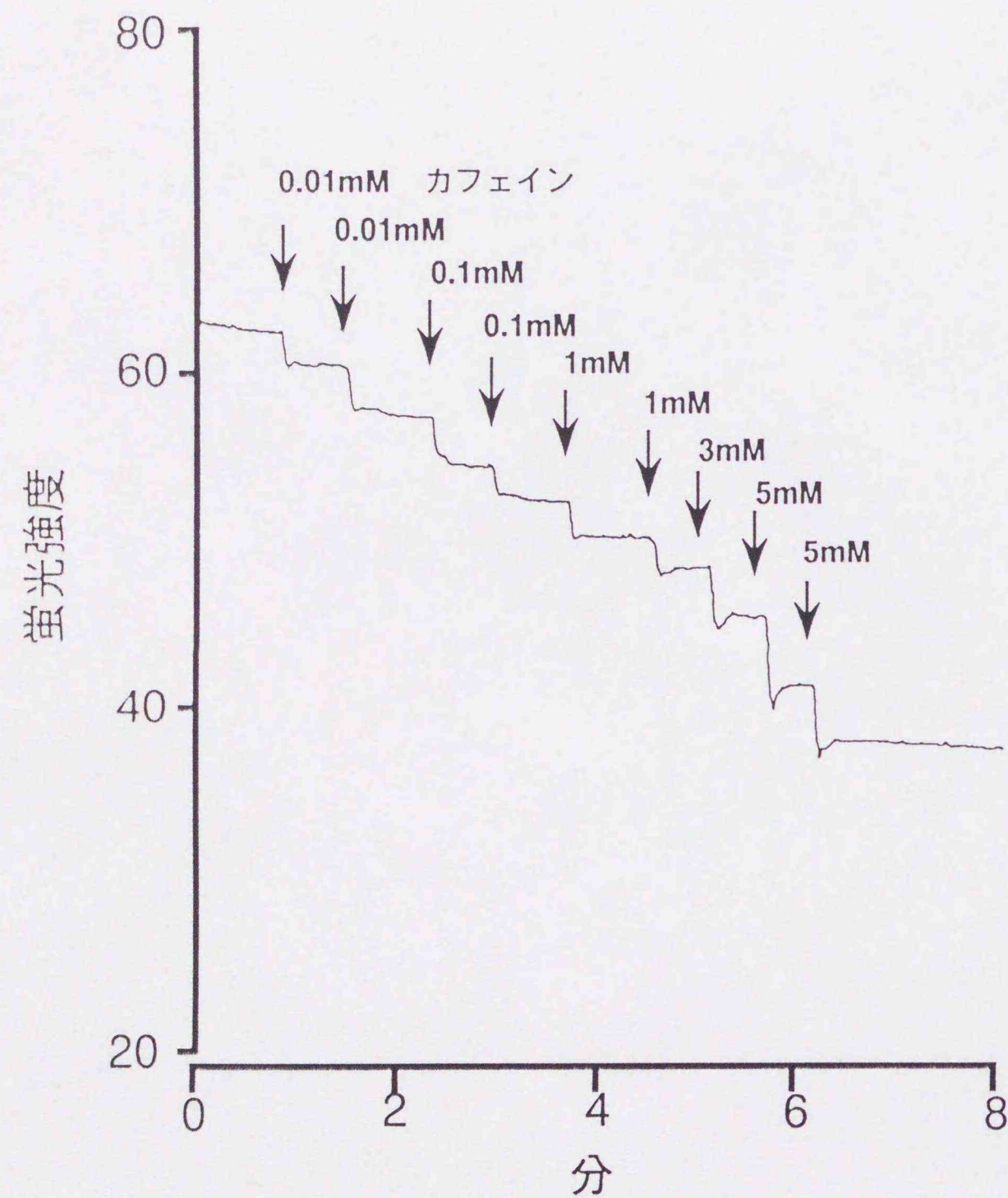


図7 種々の濃度のカフェイン添加による対照群のミトコンドリア内遊離カルシウムの蛍光強度の変化

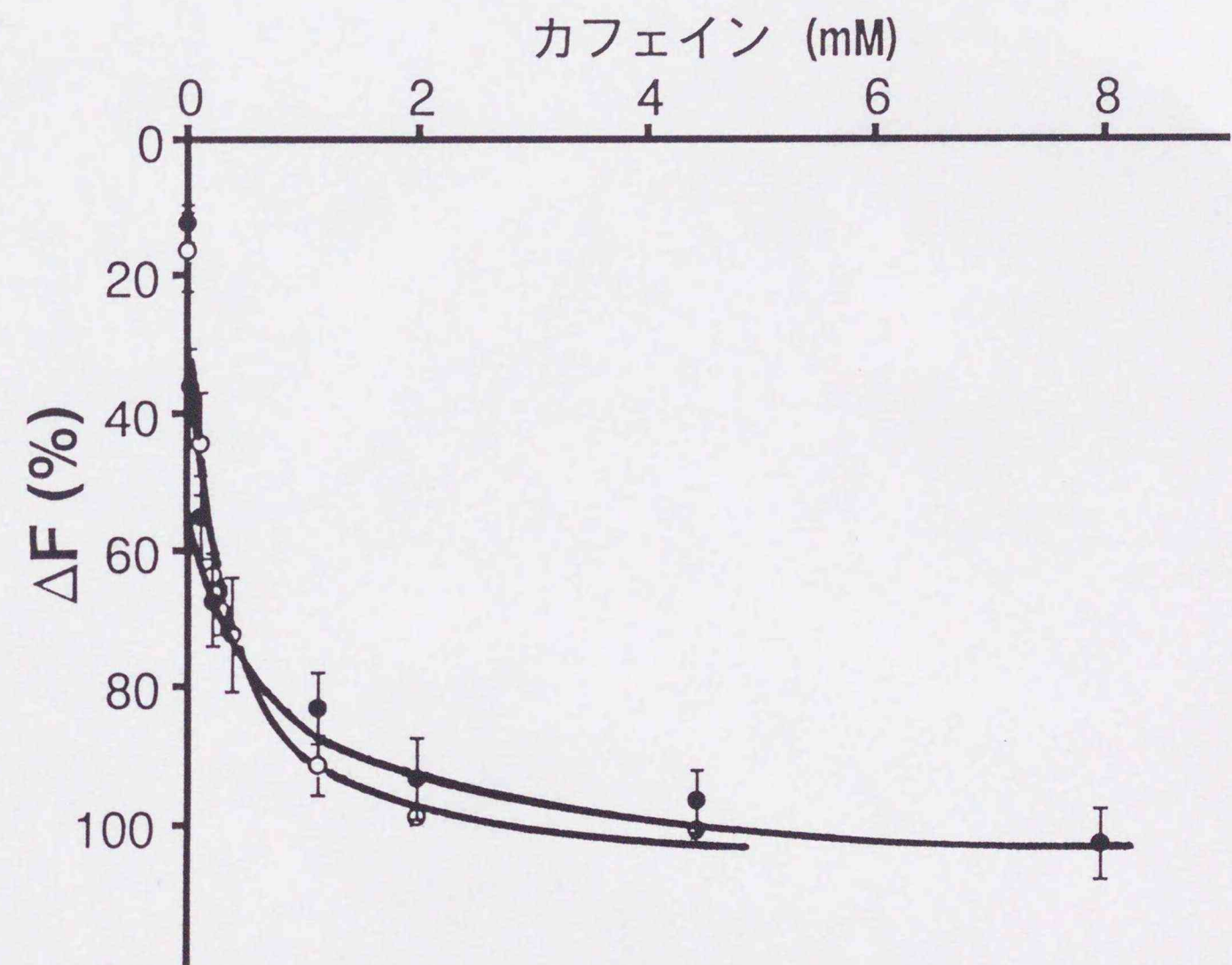


図8 種々の濃度のカフェイン添加によるミトコンドリア内遊離カルシウムの変化
カフェイン濃度(mM)と相対蛍光強度(ΔF)により示す。各点は平均値 $\pm$ 標準偏差($n=3$)を示している。

● : 対照群
○ : 低カルシウム群

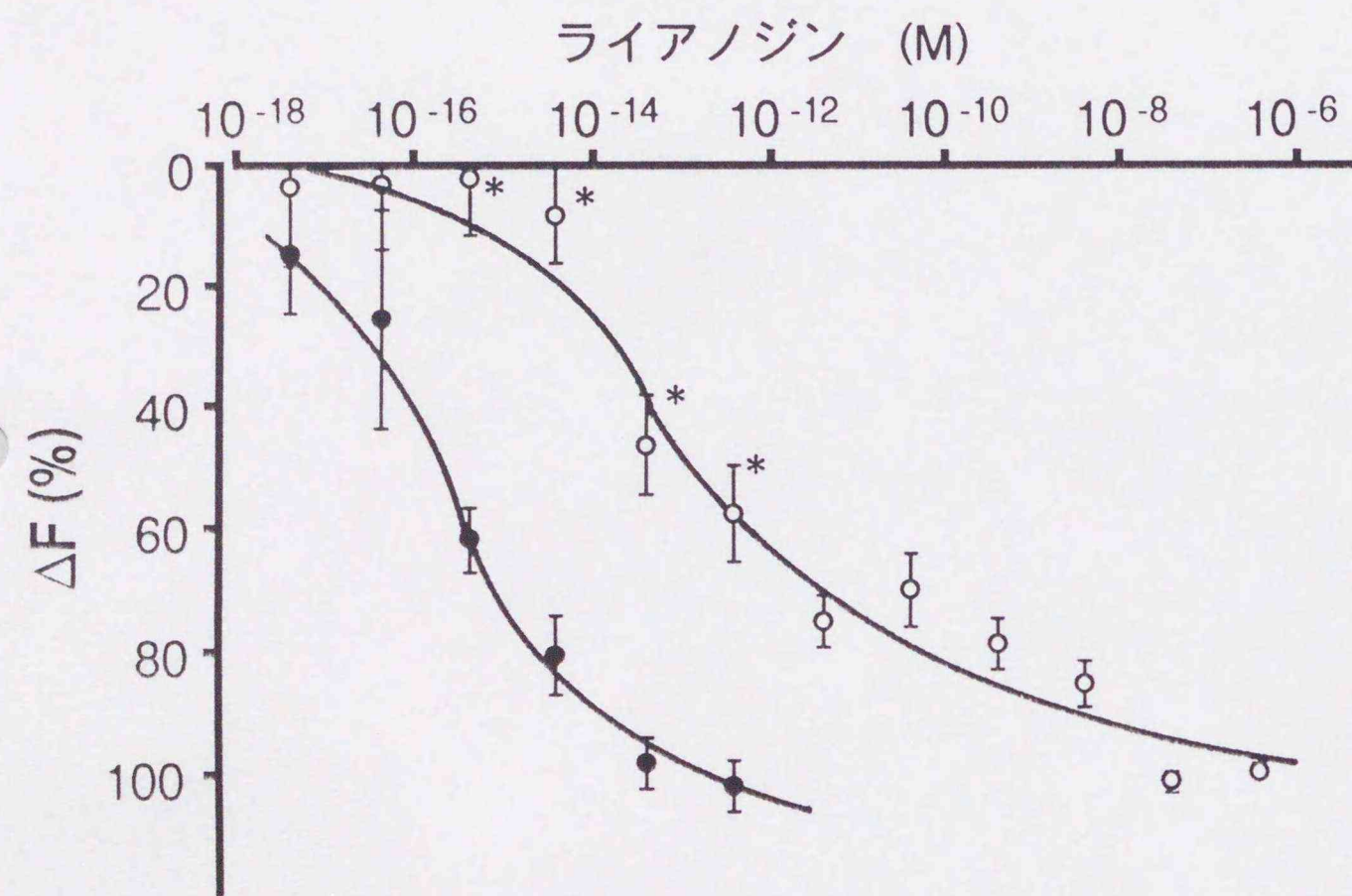


図9 種々の濃度のライアノジン添加によるミトコンドリア内遊離カルシウムの変化
ライアノジン濃度(M)と相対蛍光強度(ΔF)により示す。各点は平均値 $\pm$ 標準偏差($n=3$)を示している。

—●— : 対照群
- -○- - : 低カルシウム群
* : 対照値と比較して有意($p < 0.001$)

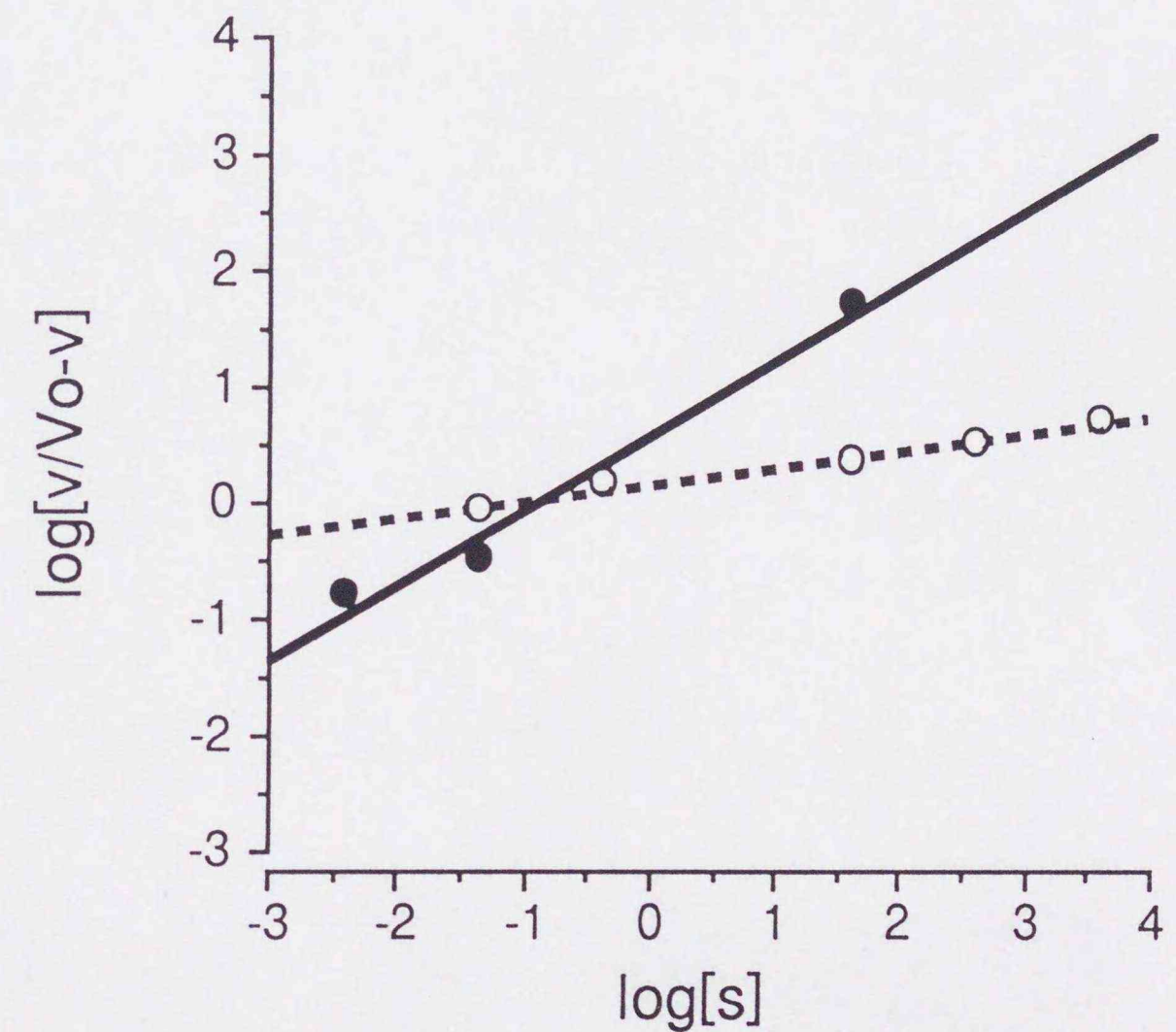


図10 種々の濃度のライアノジン添加によるミトコンドリア内遊離カルシウムのS字状曲線に対するHillプロット

—●— : 対照群
- -○- - : 低カルシウム群

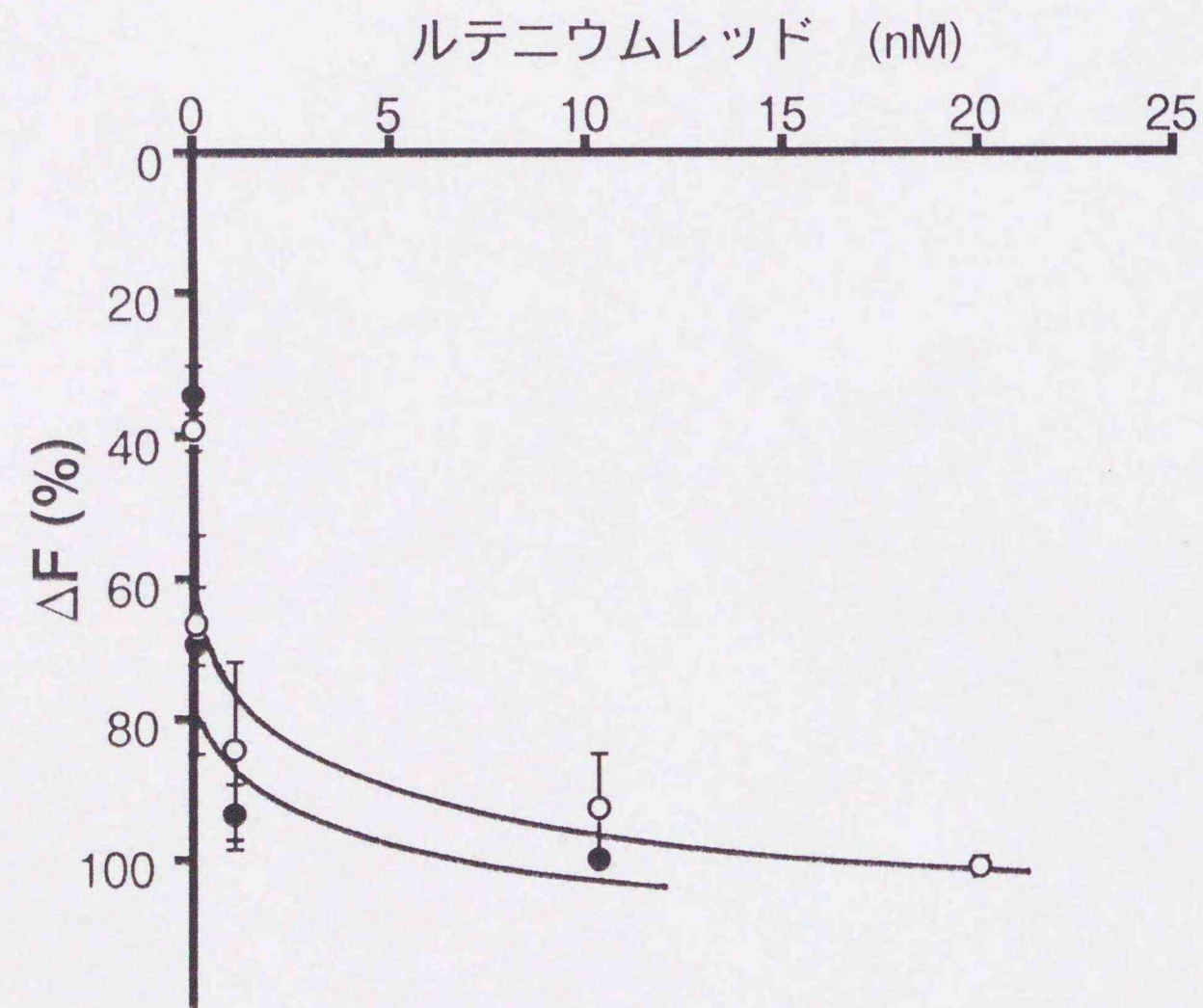


図1-1 種々の濃度のルテニウムレッド添加によるミトコンドリア内遊離カルシウムの変化
ルテニウムレッド濃度(nM)と相対蛍光強度(ΔF)により示す。各点は平均値 $\pm$ 標準偏差(n=3)を示している。

● : 対照群
○ : 低カルシウム群

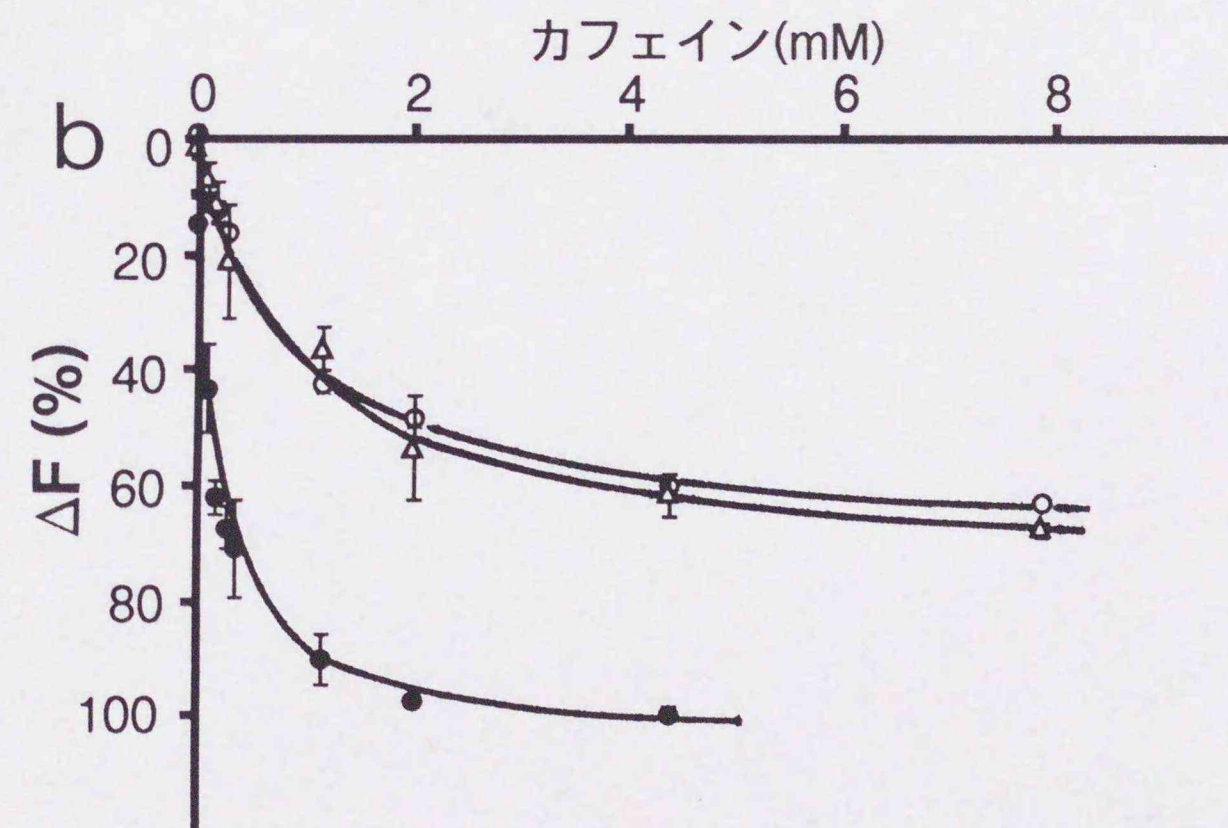
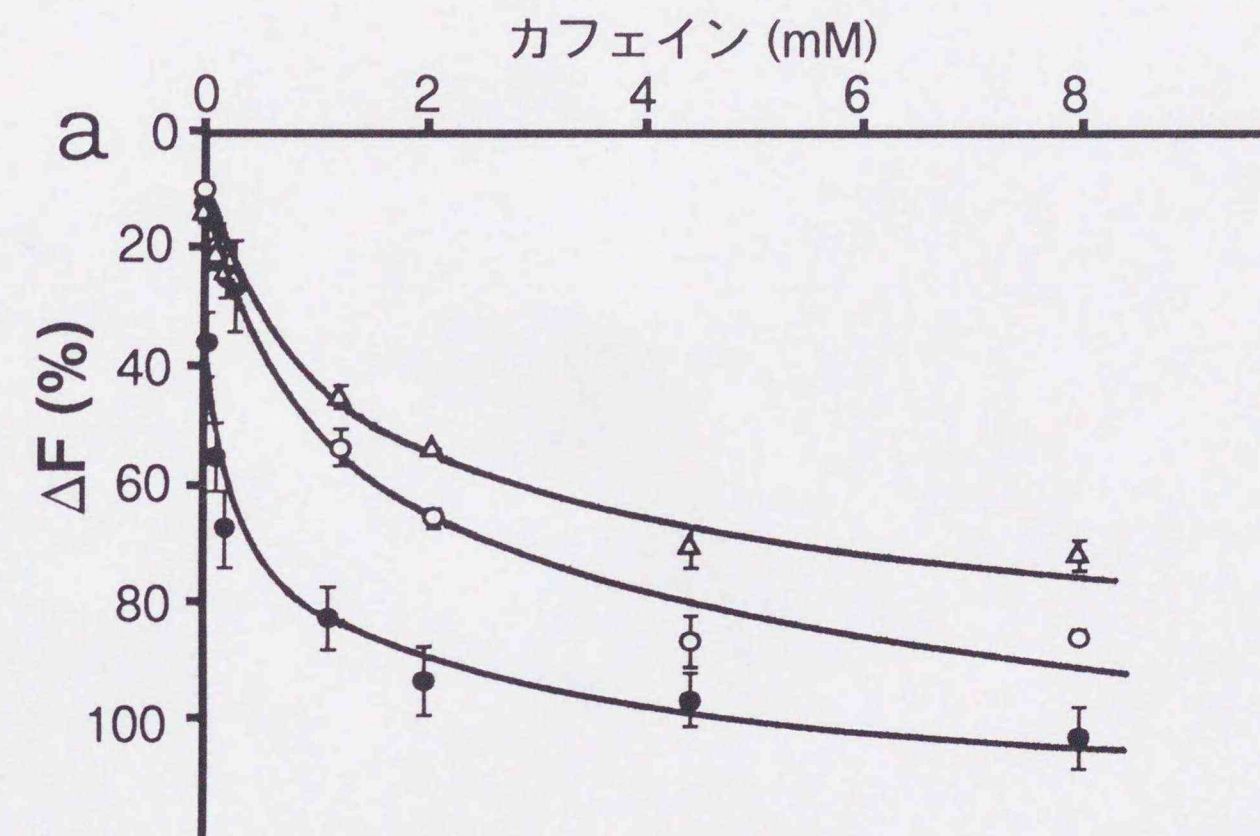


図1-2 ライアノジン共存下においてカフェインを添加したときのミトコンドリア内遊離カルシウムの変化
カフェイン濃度(mM)と相対蛍光強度(ΔF)により示す。

a : 対照群, b : 低カルシウム群
● : ライアノジン非共存下
○ : ライアノジン $4 \times 10^{-10} M$
▲ : ライアノジン $4 \times 10^{-7} M$

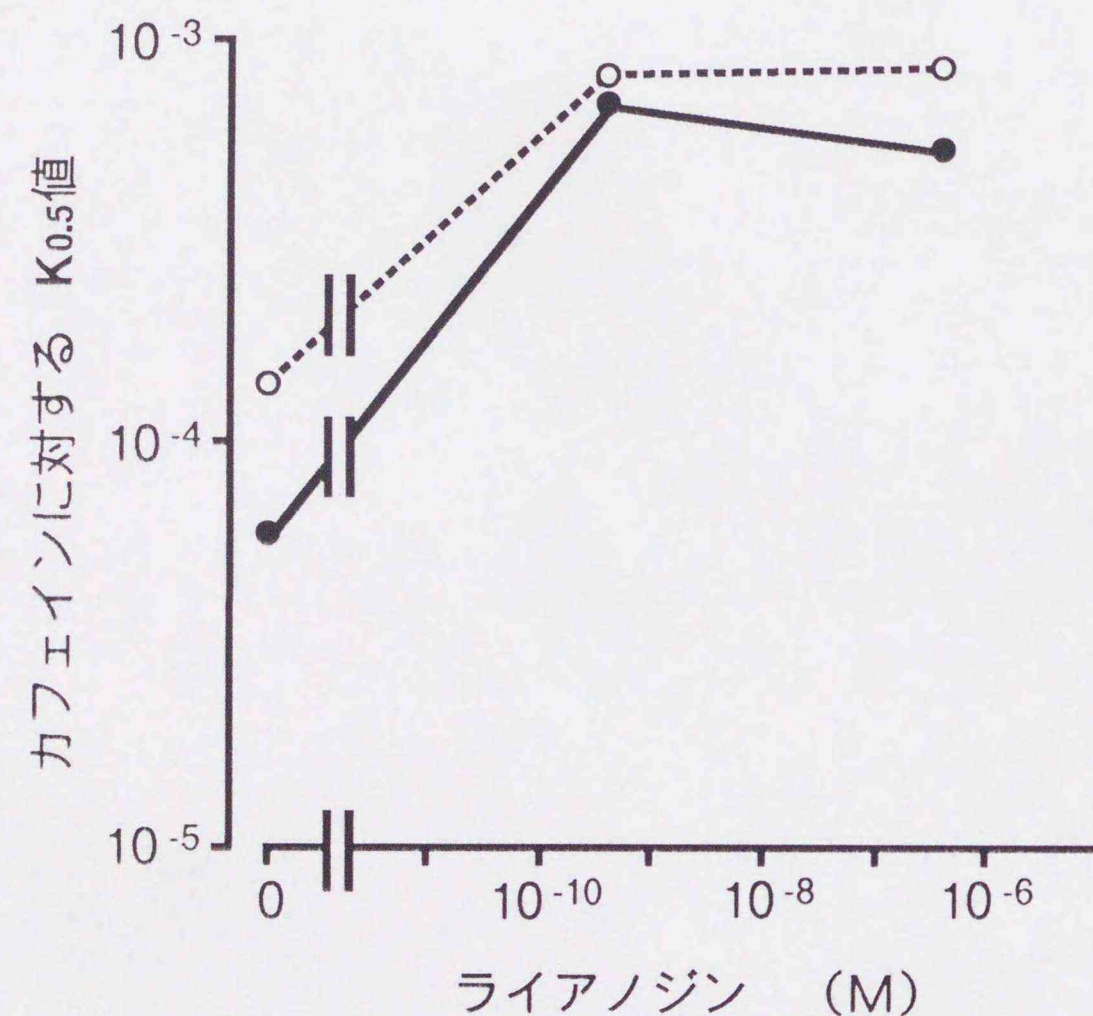


図13 ライアノジン共存下のカフェインを添加したときの $K_{0.5}$ 値

—●— : 対照群
○..... : 低カルシウム群

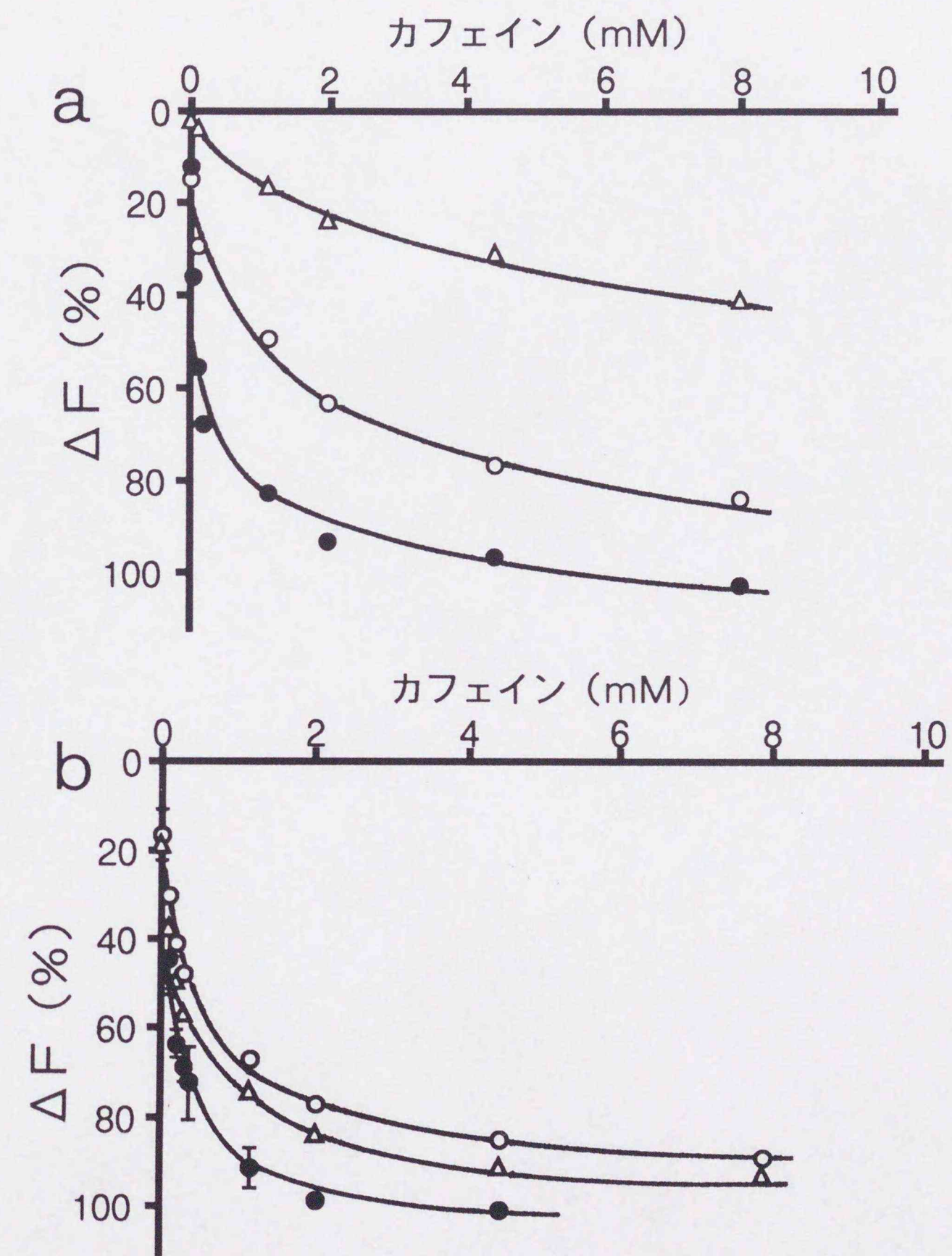


図14 ルテニウムレッド共存下においてカフェインを添加したときのミトコンドリア内遊離カルシウムの変化
 カフェイン濃度(mM)と相対蛍光強度(ΔF)により示す。

a : 対照群, b : 低カルシウム群
 —●— : ルテニウムレッド非共存下
 —○— : ルテニウムレッド $1 \times 10^{-10} M$
 —△— : ルテニウムレッド $1 \times 10^{-8} M$

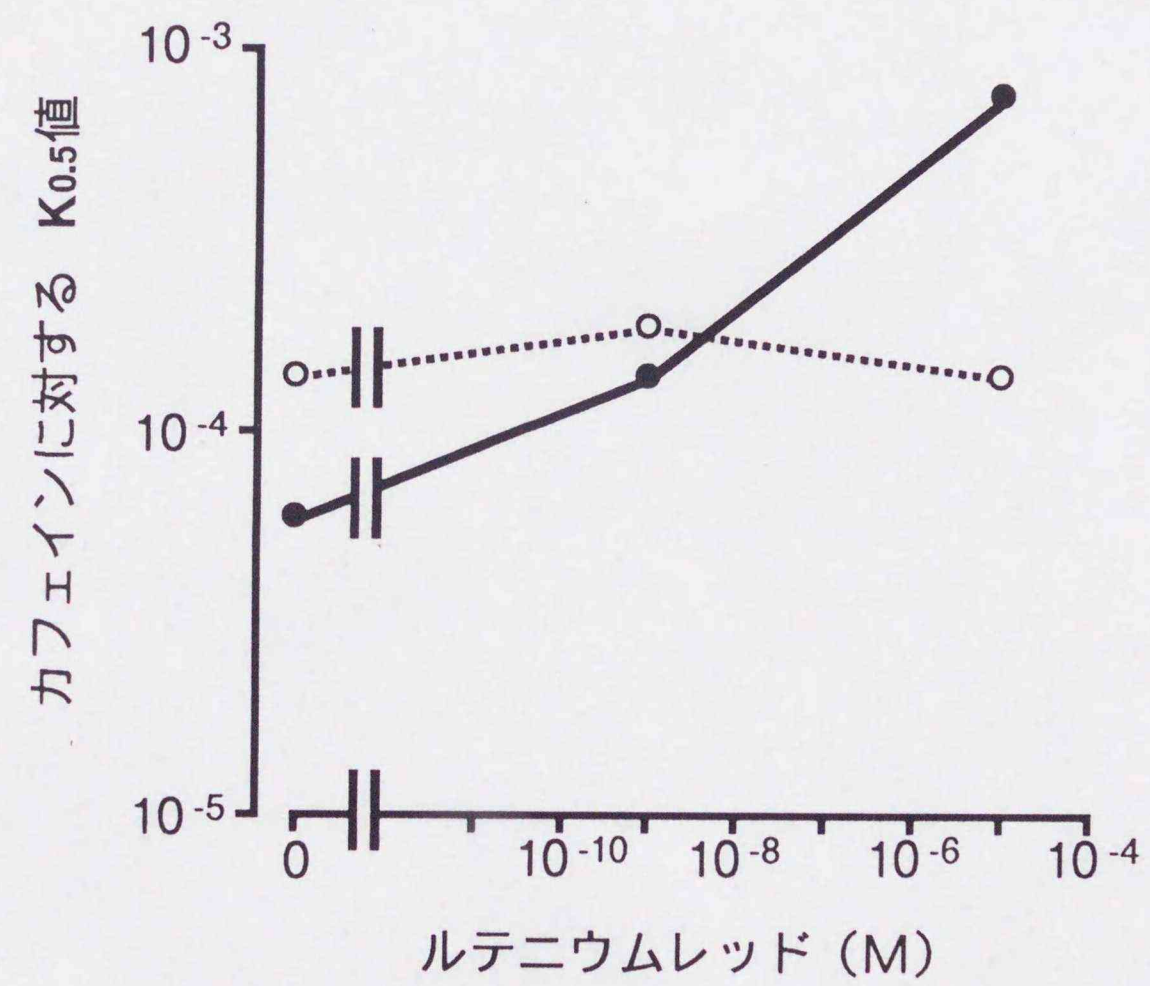


図15 ルテニウムレッド共存下のカフェインを添加したときの $K_{0.5}$ 値

—●— : 対照群
○..... : 低カルシウム群

