

# UVA照射により誘導される正常ヒト線維芽細胞の石灰化に対する 海洋深層水の抑制効果

Suppressive effect of deep seawater on the calcification of  
normal human fibroblasts induced by UVA irradiation

山田勝久<sup>1</sup>・柴田雄次<sup>1</sup>・野村道康<sup>1</sup>・今田千秋<sup>2</sup>

Katsuhisa YAMADA<sup>1</sup>, Yuji SHIBATA<sup>1</sup>, Michiyasu NOMURA<sup>1</sup> and Chiaki IMADA<sup>2</sup>

## Abstract

We have previously reported in this journal that the increase in Ca/Mg ratio and the aging of cells promote calcification of cultured normal human fibroblasts (NB1 cells). In this report, it is suggested that A-wave ultraviolet rays (UVA) induces calcification of NB1 cells even if the Ca/Mg ratio in culture medium is well balanced as 2. Furthermore, we have discovered that deep seawater (DSW) suppresses the calcification induced by UVA irradiation. In addition, suppressive effect of DSW was much higher than that of SSW. From these results, it was suggested that the suppressive effect of DSW on calcification in NB1 cells was caused by specific components included in DSW.

**Key Words:** Calcification, Calcium, Deep seawater, Fibroblast, UVA

## 要 旨

我々は正常ヒト由来培養線維芽細胞（以後、NB1細胞）を用いてCa/Mg比の増加および細胞の老化がNB1細胞の石灰化を促進することを既に報告した。本研究では、培地中のCa/Mg比が2という生理的条件でも、長波長紫外線（UVA）の照射によりNB1細胞は石灰化することを確認した。さらに海洋深層水（以後、DSW）は、UVA照射により誘導されるNB1細胞の石灰化に対する抑制効果を示し、この効果は表面海水（以後、SSW）よりも高いことがわかった。これらの結果から、DSWが有する顕著な細胞石灰化抑制効果は、DSWに含まれる成分が示す特異的な作用である可能性が示唆された。

**キーワード：**石灰化、カルシウム、海洋深層水、線維芽細胞、紫外線A波

## 1. 緒 言

生命の進化において体組織の石灰化は、生物の骨格形成に伴う形態及び生命の維持において重要な意味を持っている。後藤（1997）は、無脊椎動物門の棘皮動物の一種であるウニの発生において、原腸腔をつくる内胚葉の細胞に先立って葉間域に落ち込んだ間葉細胞により骨針が形成される過程に骨形成の

起源を見ることができると述べている。このことは外骨格を持つ無脊椎動物の場合に限った現象と単純に考えることはできない。なぜならば無脊椎動物よりも進化した脊椎動物でも、未分化の間葉細胞が、血液細胞、血管内皮細胞、骨芽細胞、軟骨細胞、脂肪細胞および線維芽細胞等の各種細胞に分化するというウニの場合と同じ発生メカニズムを有しており、骨の中に血液細胞をつくる赤色骨髄が形成され

<sup>1</sup> 株式会社ディーエイチシー（〒106-0047 東京都港区南麻布2-8-21 南麻布MICビル7F）

<sup>2</sup> 国立大学法人東京海洋大学大学院（〒108-8477 東京都港区港南4-5-7）

ること、また老化によって身肢骨のそれが脂肪からなる黄色骨髄に変化することは、血液細胞と骨芽細胞や脂肪細胞が同じ幹細胞由来であることから説明がつくと、先の後藤 (1997) が併せて述べているからである。ヒトの骨格形成における石灰化は、骨格の主体である骨と歯に限定して促される仕組みを獲得している。しかしながら上述の進化的背景からか、骨格や歯以外の生体組織にも石灰化が生じる場合がある。これが異所性石灰化や軟部組織石灰化と呼ばれる病状である。この異所性石灰化については、特に動脈など血管系で生じると虚血性心疾患のように重篤な状態に陥る。この虚血性心疾患の原因については、Karrpanen *et al.* (1978) による食事中的カルシウム／マグネシウム摂取比 (以後、Ca/Mg比) と虚血性心疾患の発症リスクに関する報告が著名である。Ca/Mg比と虚血性心疾患リスクに関する彼らの報告に端を発して、今日では数多くの関連報告をみることができる。例えば、血管における異所性石灰化を研究している塩井 (2010) は、血管においてカルシウム (以後、Ca) の沈着サイトとなるのが血管中膜に存在するエラスチンの老化に伴う断片化物であると述べている。このエラスチンは皮膚において、コラーゲンとともに物理的機能に大きく関与する細胞外マトリックス成分として知られており、加齢に伴い質的、量的に低下すると言われている (旗持, 2008)。細胞外マトリックス成分の質的、量的な劣化は皮膚の物理的機能を低下させる (山羽ら, 2016)。それは皮膚のしわやたるみ、ゴワゴワ感など、外観や感触として誰にでも察知することができる老化現象である。また近年、皮膚の老化において紫外線が大きな影響を与えることがわかってきており、皮膚科学の分野でも光老化という用語が汎用されるようになってきた (Ichihashi *et al.*, 2011)。こうした状況の下、ヒトの軟部組織の石灰化研究において血管に関しての数多くの知見や研究報告は見られるものの、皮膚の真皮に関する石灰化の知見や研究はほとんど見られない。そこで本報では真皮細胞外マトリックス成分の生産を担う線維芽細胞に着目し、真皮にまで到達して光老化の一大因子となるUVAを照射されたNB1細胞が、生理的なCa/Mg比の

条件の下で培養することで細胞の石灰化が誘導されるかどうかについて調査するとともに、UVA照射により誘導される細胞の石灰化に対するDSWの抑制効果についても併せて検討したので報告する。

## 2. 材料と方法

### 2.1 試薬

NaCl (特級, 和光純薬), KCl (特級, 和光純薬), CaCl<sub>2</sub> (特級, 和光純薬), MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O (特級, 和光純薬), メタノール (特級, 和光純薬), PBS (-) (Ca, Mgを含有しない等張リン酸緩衝液, 細胞培養用, 日水製薬), イーグルMEM (細胞培養用, 日水製薬), 3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (生化学用, ナカライテスク, 以後MTT), トリプシン-EDTA (2.5 g/L Trypsin: 1 mM EDTA solution, ナカライテスク), 牛胎仔血清 (Biological Industries Ltd., 以後FBS), DSW (伊豆赤沢, 北緯34°50'19", 東経139°08'11", 深度800 m, 2015年3月30日取水後4°Cで保存), SSW (深度0 m, 2015年3月30日取水後4°Cで保存), 石灰化染色キット (コスモバイオ), ヘキサデシルピリジニウムクロリド水和物 (特級, 和光純薬), Triton X-100 (生化学用, シグマ), UVAランプ (FL15BLB, 東芝)

### 2.2 細胞と培養

NB1細胞 (RGB RCB0222, 理化学研究所バイオリソースセンター) を1枚の培養シャーレ (φ90, 日本ジェネティック) に播種し、コンフルエント状態まで培養後、トリプシン-EDTAを用いてNB1細胞を剥離させて新しい培養シャーレ2枚に継代し、必要に応じて96穴マイクロプレート (培養細胞用, イワキ) に播種して試験に供した。なおNB1細胞の培養は全て37°C, 5%CO<sub>2</sub>の条件で行い、細胞の増殖及び前培養には10% (v/v) FBS含有イーグルMEM培地を用いた。

### 2.3 UVA照射が細胞の石灰化および活性に及ぼす影響

NB1細胞を10% (v/v) FBS含有イーグルMEMに懸

濁し、96穴マイクロプレート（培養細胞用、イワキ）に $2 \times 10^4$ 個/ $200 \mu\text{L}$ /穴になるように播種して2日間前培養した。前培養後、培地を除去して $50 \mu\text{L}$ /穴のPBS（-）で2回洗浄した後、新しいPBS（-） $50 \mu\text{L}$ /穴にすべて置換した。これにUVAランプを並列に設置したスタンドから照射エネルギーが $0.5 \text{ mW/cm}^2$ （UV METER Model UV-340, カスタム）となるように光源から細胞への距離を調整して $0.4$ から $1.2 \text{ J/cm}^2$ の範囲で、 $0.2 \text{ J/cm}^2$ ずつUVA量を変化させて照射した。照射後、10%（v/v）FBS含有イーグルMEMを $100 \mu\text{L}$ /穴、20 mM Ca相当の $\text{CaCl}_2$ 水溶液を $20 \mu\text{L}$ /穴、20 mMマグネシウム（以後、Mg）相当の $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 水溶液を $10 \mu\text{L}$ /穴、PBS（-）を $25 \mu\text{L}$ /穴ずつ各々添加し、これに全量 $200 \mu\text{L}$ /穴になるように精製水を添加して1晩培養した。培養後、石灰化染色キットを用いる山田ら（2016）の方法に準じて石灰化度を測定した。すなわちUVA照射後1晩培養したNB1細胞から培地を除去して、新たに $50 \mu\text{L}$ /穴のPBS（-）を加えて細胞を2回洗浄した後、 $50 \mu\text{L}$ /穴の冷メタノールを添加し、氷冷下、30分間静置して細胞を固定した。固定後メタノールを除去して、 $50 \mu\text{L}$ /穴の精製水で2回、細胞を洗浄した後風乾した。風乾後、石灰化染色キットの操作要領に準じて調製した染色液を $50 \mu\text{L}$ /穴ずつ添加し、室温条件下で30分間静置して染色した。染色後、染色液を除去してキットに付属している洗浄液を調製後、 $50 \mu\text{L}$ /穴ずつ添加して非特異的に染色された色素を洗浄して除去した。これらの操作でCa沈着部が特異的に染色された96穴プレートを室温で十分乾燥させた後、鶴見ら（2009）の方法に準じて10%（v/v）ヘキサデシルピリジニウムクロリド水和物水溶液を $100 \mu\text{L}$ /穴ずつ添加し、 $37^\circ\text{C}$ で1時間色素を抽出した後、 $570 \text{ nm}$ における吸光度（以後、 $\text{OD}_{570}$ ）を測定して石灰化度とした（ $n=8$ ）。上述の操作で測定したUVA未照射における細胞の石灰化度を1.0として、UVA照射により誘導された石灰化度を相対値で示した（ $n=8$ ）。また予め細胞活性残存率の測定用として上述の固定操作を施さず準備しておいた96穴プレートのNB1細胞については、MTT還元法（山田ら、2007）によりマイクロプレートリーダー（モ

デル550, バイオラッド）を用いて $\text{OD}_{570}$ - $\text{OD}_{655}$ の値を測定し（ $n=8$ ）、UVA未照射の細胞活性を100%として活性残存率を測定した。

## 2.4 UVA照射が細胞内アルカリフォスファターゼ（ALP）活性に及ぼす影響

石灰化との相関性が高いことが知られている細胞内ALP活性（山村、1995）について、24穴マイクロプレートにNB1細胞を $1 \times 10^5$ 個/穴播種した以外は、2.3節の操作に準じてNB1細胞を準備し、これに顕著な石灰化が誘導された照射量である $0.8 \text{ J/cm}^2$ のUVAを照射した後、2.3節と同様の操作で1晩培養した細胞内のALP活性を山田ら（2016）の方法に準じて測定した。すなわち培地を除去して $50 \mu\text{L}$ /穴のPBS（-）でNB1細胞を2回洗浄した。これらの穴に10%（v/v）Triton X-100含有PBS（-）を $0.1 \text{ mL}$ /穴ずつ添加して $37^\circ\text{C}$ で1時間インキュベーションを行った後、NB1細胞抽出液を試料溶液として市販キット（ALP活性キット、和光純薬）を用いて測定した（ $n=4$ ）。また先の細胞抽出液の蛋白量は、市販キット（プロテインアッセイキット、和光純薬）を用いて測定し、蛋白量あたりの比活性として補正後、未照射の細胞内ALP比活性を1.0として照射後の相対ALP活性の変化を培養時間ごとに調べた。

## 2.5 DSW添加効果

2.3節と同じ操作で96穴マイクロプレートに準備したNB1細胞について、顕著に細胞の石灰化が観察されたUVA量である $0.8 \text{ J/cm}^2$ を照射後、精製水の代わりにDSWの終濃度が0-2.5%（v/v）となるように添加し、1晩培養後に発現する細胞の石灰化度に及

Table 1. Concentration of various mineral elements contained in DSW and SSW of Izu-Akazawa. Asterisk indicates a significant difference between DSW vs. SSW (\* $p < 0.05$ , Student's *t*-test).

Mineral element	Concentration (mM)	
	DSW	SSW
Na	441.3 ± 12.9	394.6 ± 33.7
K	9.6 ± 1.1	8.5 ± 0.8
Mg	50.9 ± 0.9*	45.0 ± 1.5
Ca	9.5 ± 0.7	8.5 ± 0.7

ぼす影響を調べた。なお、DSWの比較対照にはSSWを添加した ( $n=5$ )。

## 2.6 統計処理

得られたデータは、平均値±標準偏差で表した。なお、データ間の有意差は、二群間の有意差ではStudent's *t* testを、また多重比較の有意差はSteel-Dwass testによりそれぞれ検定した。

## 3. 結果

### 3.1 UVA照射が細胞の石灰化および活性に及ぼす影響

NB1細胞にUVAを照射して1晩培養した結果、細胞活性はUVAの照射量に逆相関して低下した (Fig. 1)。一方、UVA未照射条件において細胞はほとんど石灰化しなかったが、0.4-0.8 J/cm<sup>2</sup>の照射量の範囲において照射量依存的に石灰化度の上昇が認められた。しかしながら0.8 J/cm<sup>2</sup>以上では、照射量依存的な石灰化度の上昇は見られなかった (Figs. 2, 3)。

### 3.2 UVA照射がALP活性に及ぼす影響

2.4節の方法で試験を行ったNB1細胞について、UVA未照射および照射後の培養時間ごとの細胞内ALP活性の変化をFig. 4に示す。0.8 J/cm<sup>2</sup>UVA照射後、2時間培養したNB1細胞はUVA未照射で培養した細胞に比べて細胞内ALP活性の上昇が認められ、4時間後には細胞内ALP活性は有意 ( $p<0.05$ ) に上

昇して最高値を示した。その後高いALP活性は培養6時間後まで持続したが、7時間後には低下し始め、8時間後には未照射の細胞内ALP活性との差異が消失するに至った。

### 3.3 DSW添加効果

2.5節の方法で試験を行ったDSW及びSSWの添加が細胞石灰化に及ぼす影響をFig. 5に示す。UVA照射後にDSWを添加すると、添加濃度依存的にNB1細胞の石灰化が抑制された。一方、比較対照に用い

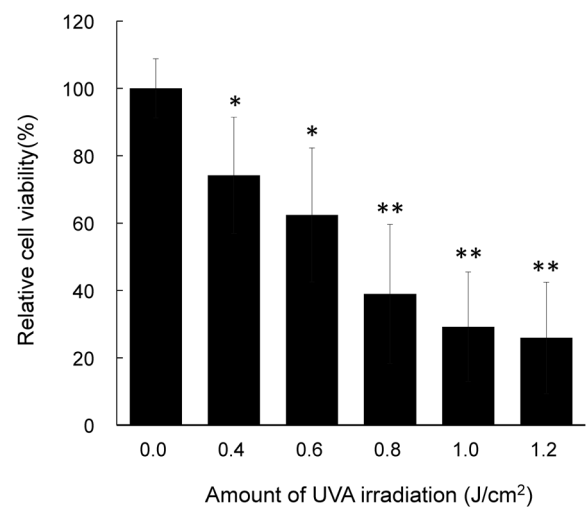


Fig. 1. Effect of UVA irradiation on cell viability of NB1 cells. Cell viability was measured by MTT assay ( $n=8$ , mean±SD). Asterisks indicate a significant difference between the following groups: 0.4 J/cm<sup>2</sup> UVA vs. control; 0.6 J/cm<sup>2</sup> UVA vs. control (\* $p<0.05$ , Steel-Dwass test, ANOVA); 0.8 J/cm<sup>2</sup> UVA vs. control; 1.0 J/cm<sup>2</sup> UVA; 1.2 J/cm<sup>2</sup> UVA vs. control (\*\* $p<0.01$ , Steel-Dwass test, ANOVA).

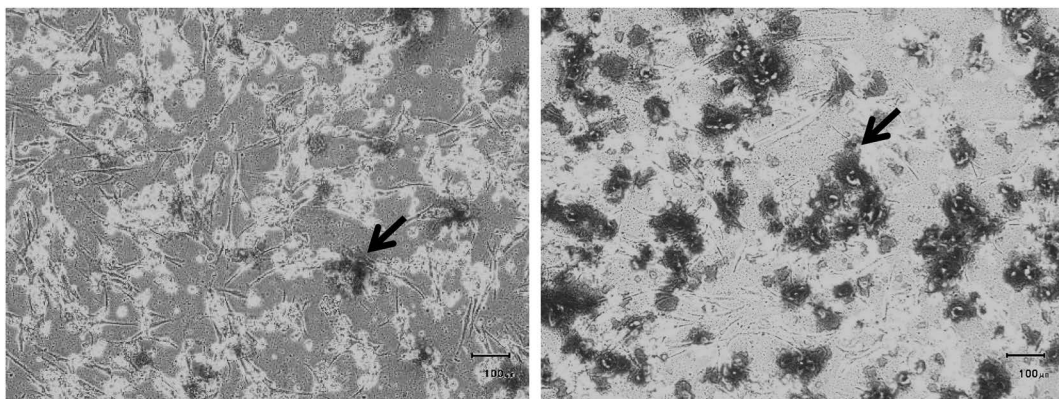


Fig. 2. Comparison of microphotographs of NB1 cells with and without UVA irradiation. All NB1 cells were stained by the calcium stain assay kit after overnight incubation. Left is a microphotograph of NB1 cells not irradiated by UVA. Right is a microphotograph of NB1 cells irradiated by 0.8 J/cm<sup>2</sup> UVA. Arrows indicate the calcified nodule.

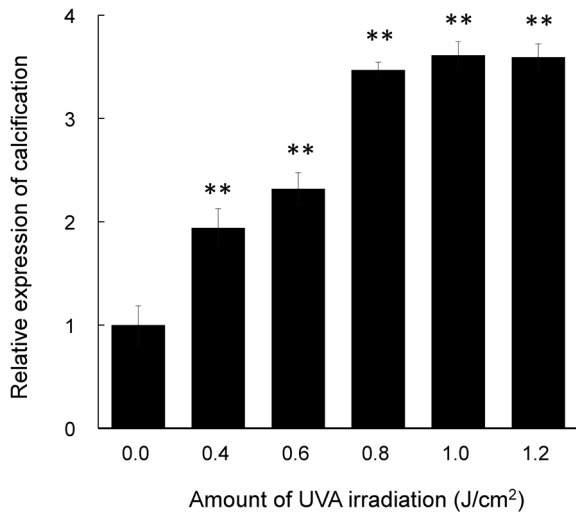


Fig. 3. Effect of UVA irradiation on the calcification of NBI cells. The expression of calcification was measured by the calcium stain assay kit as described in materials and methods. ( $n=8$ , mean $\pm$ SD). Asterisks indicate a significant difference between the following groups: 0.4 J/cm<sup>2</sup> UVA vs. control; 0.6 J/cm<sup>2</sup> UVA vs. control; 0.8 J/cm<sup>2</sup> UVA vs. control; 1.0 J/cm<sup>2</sup> UVA; 1.2 J/cm<sup>2</sup> UVA vs. control (\*\* $p<0.01$ , Steel-Dwass test, ANOVA).

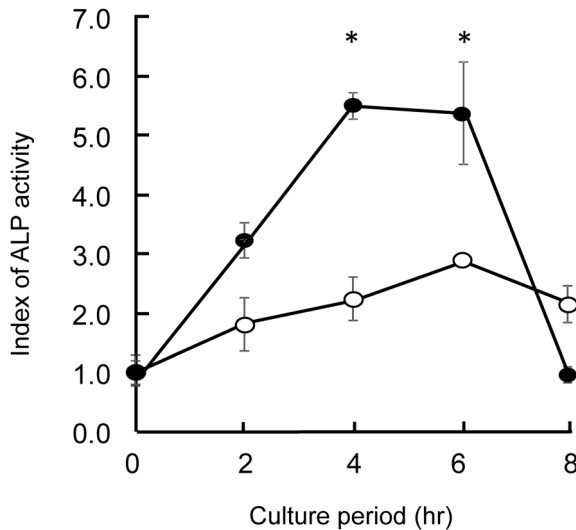


Fig. 4. Comparison of time course of ALP activity in NBI cell with and without UVA irradiation. ALP activity of NBI cell was measured by the ALP assay kit as described in materials and methods ( $n=4$ , mean $\pm$ SD). Asterisks indicate significant differences between with and without UVA irradiation in the following groups: after 4 hour vs. control; after 6 hour vs. control (\* $p<0.05$ , Student's  $t$  test). ●, UVA irradiated; ○, UVA not irradiated.

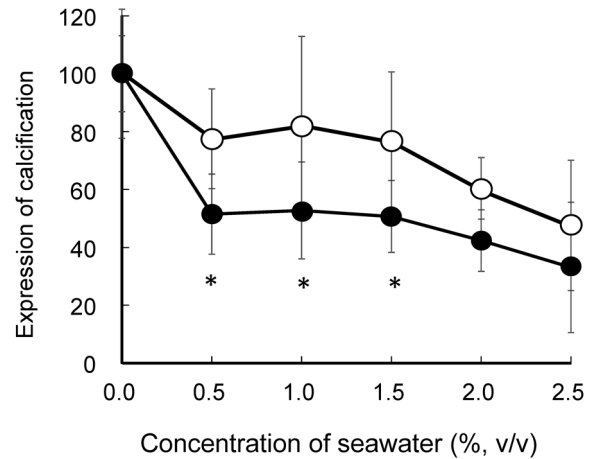


Fig. 5. Supplemental effect of various concentrations of DSW and SSW. The expression of calcification was measured by the calcium stain assay kit as described in materials and methods. ( $n=8$ , mean $\pm$ SD). Asterisks indicate significant differences between DSW and SSW at indicated concentrations (\* $p<0.05$ , Student's  $t$  test). ●, DSW; ○, SSW.

たSSWにも、濃度依存的に石灰化抑制傾向が見られたが、DSWの抑制効果に比べると低かった。

#### 4. 考 察

ヒトの身体にとって海水のミネラル組成は、ヒトの血清成分中のミネラル組成に近似していることが知られており(木村ら, 2001), その中でも地球最後の有望資源として注目されているDSWは、ヒトの健康分野への利用が大いに期待されている(高橋, 2000). 我々はこれまでNBI細胞を用いた研究で、培地中のCa/Mg比の増加が細胞の石灰化を誘導すること、さらに継代回数の増加(いわゆる細胞の老化)に伴って石灰化が顕著化することを報告した(山田ら, 2016). これまで軟部組織の石灰化については、動脈をはじめとした数多くの既往研究がある. Wallin *et al.* (2001) は、活性酸素のストレス負荷が軟組織石灰化を促進することを動物実験により確認している. また坂田(2003)は、ヒトの動脈硬化の原因が酸化ストレスにあることを指摘している. これらの報告から環境要因が石灰化を誘導する可能性が示唆された. そこで本報ではヒトの真皮に存在する線維芽細胞に対する外的環境刺激として紫

外線の負荷を想定し、この環境負荷が皮膚細胞の石灰化を誘導するか否かについての調査を行った。また、Ca/Mg比の増加に伴うNB1細胞の石灰化を抑制することがわかっているDSW (山田ら, 2016) について、UVA照射により誘導される石灰化に対しても抑制効果があるか否かについても検討した。これまでUVAによる皮膚真皮の構造や機能劣化に関しては池谷ら (1999) の報告をはじめ枚挙に暇がないが、UVAと真皮の石灰化に関する研究は見当たらない。こうした背景の下、NB1細胞に種々の照射量のUVAを照射後、培地のCa/Mg比を生理的バランス (Ca/Mg=2) に調整した培地で1晩培養したところ、UVA未照射ではほとんど発現しなかった細胞の石灰化がUVA照射により顕著に誘導されることを見出した。またこのNB1細胞の石灰化現象は、 $0.8 \text{ J/cm}^2$ 以下の照射量では照射量依存的に石灰化度の上昇は見られたが、それ以上照射量を増量しても石灰化度の上昇は見られなかった。このことから、生理的条件下で培養されるNB1細胞でもUVA負荷により石灰化が誘導されることが示唆された。併せて、UVA照射で誘導されるNB1細胞の石灰化の程度には制限因子が存在すると推察された。これまで軟部組織の石灰化においては、Caおよびリン酸の濃度が関係していることが知られていることから (竹谷, 2010)、本報のUVA照射により誘導されるNB1細胞の石灰化においても、これらの成分の濃度が制限因子となっている可能性が考えられる。したがってUVA照射後のNB1細胞を本報よりも高い濃度のCaやリン酸を含有する培地で培養すると、石灰化度がより上昇するかもしれない。また並行して調査したUVA照射が細胞活性に及ぼす影響については、その照射量に逆相関して細胞活性が低下したことから、UVA照射によるNB1細胞の石灰化は細胞活性と逆相関の関係にあることがわかる。齊藤・西山 (2005) は、細胞の老化に加えてMg不足が重なると細胞内にCaが蓄積してアポトーシスを引き起こすと報告しており、本報のUVA照射による石灰化と細胞活性低下の逆相関の関係も、UVA照射により炎症反応が惹起されて細胞内へのCaの流入が促され、細胞内濃度が上昇するに伴い、アポトーシスが始まって細胞活性が

低下したものと推察される (西野・黒澤, 2012)。塩井 (2010) は、血管石灰化においてアポトーシスが石灰化に関与していることはよく知られていると述べており、UVA照射に誘導される細胞の石灰化もアポトーシスとの高い関係が推察される。次に軟部組織石灰化の研究分野において、石灰化と高い相関性を有することが知られている細胞内ALP活性について (山村, 1995)、UVA照射で誘導されるNB1細胞の石灰化との相関を調べた結果、 $0.8 \text{ J/cm}^2$  UVAの照射後2時間という比較的短い培養時間でNB1細胞内ALP活性の上昇が見られ、照射後4-6時間は高い活性を維持したのち、8時間後に活性が急激に低下した。この結果からNB1細胞に対するUVA照射の影響は、まず細胞内のALP活性の上昇を招いてNB1細胞の石灰化が誘導されることがわかった。またこの作用が、照射4-6時間後まで高く維持されることも判明した。最後にUVA照射で誘導されるNB1細胞の石灰化に対するDSWの添加効果を調査した結果、DSWは添加濃度に依存してNB1細胞の石灰化を抑制することが明らかとなった。さらにその抑制効果は、比較対照に用いたSSWよりも高かった。DSWとSSWとの間に見られた石灰化抑制効果の差異については、DSWは塩類含有量も含めて高い安定性が知られているが (高橋, 2000)、SSWは降雨による変動が考えられるので、部分的には各々の水に含まれるMg含有量の相違が推察される (Table 1)。しかしながら、DSW中にはいまだ検出されていない有機物を含めた微量成分の種類と濃度に起因する特異的な相互作用が影響している可能性もあり、海水中に含まれるMg濃度だけでは説明できない可能性も推察される。したがってDSWの石灰化抑制作用の本質成分の究明については今後の課題と考えられる。またUVA照射で誘導されるNB1細胞の石灰化に対するDSWの抑制作用機序の解明にあたり、本報で判明したUVA照射後の早い段階で活性が上昇するNB1細胞内ALP活性に対するDSWの影響について、残念ながら観察する機会を逸した。この点については今後検討する必要があると考えられるが、Ca/Mg比の増加に伴うNB1細胞の石灰化に際して、上昇する細胞内ALP活性をDSWが抑制す

ることをすでに見出していることから(山田ら, 2016), UVA照射後に上昇するALP活性に対してもDSWが抑制的に作用したことにより, 石灰化を抑制した可能性が推察される。最近, 組織石灰化の研究は, 石灰化細胞の骨芽細胞への分化(山口, 1995)やリン酸トランスポーターの発現上昇(齋藤ら, 2008)等の分子生物学的アプローチが盛んに行われている。UVA照射で誘導されるNB1細胞におけるDSWの石灰化抑制効果についても, 分子生物学的なアプローチにより作用機序を解明し, DSWの石灰化抑制作用機序を詳らかにしたいと考えている。

本研究において, 生理的条件のCa/Mg=2であってもUVA照射によりNB1細胞の石灰化が誘導されること。またその石灰化現象の発現に伴って, 細胞活性の指標となるミトコンドリアの機能が低下すること。さらに石灰化に大きく影響することがわかっているALP活性が, UVA照射後の早い段階で上昇すること。そしてUVA照射で誘導される石灰化をDSWが顕著に抑制する現象を見出した。DSWの石灰化抑制効果は, SSWと比較して顕著に高かったことから, DSWはUVA照射で誘導される細胞石灰化に対する制御因子として活用できる可能性が示唆された。

## 参考文献

後藤仁敏(1997)骨の起源と進化. バイオメカニズム学会誌, 21, 157-162.  
旗持 淳(2008)加齢に伴う皮膚の変化. Dokkyo J. Med. Sci., 35, 227-236.  
Ichihashi, M., M. Yagi, K. Nomoto and Y. Yonei (2011) Glycation stress and photo-aging in skin. Anti-Aging Medicine, 8, 23-29.  
池谷宗太・松永由紀子・西山敏夫・福田 寛・高松翼(1999)ヒト皮膚線維芽細胞に対する長期UVA照射の作用. 日本化粧品技術者会誌, 33, 267-276.  
Karppanen, H., R. Pennanen and L. Passinen (1978) Minerals, coronary heart disease and sudden coronary death. Adv. Cardiol., 25, 259-224.  
木村美恵子(2001)海のミネラルと健康. 深層海水

と健康研究会誌, 1, 39-58.  
西野 涼・黒澤 伸(2012)揮発性吸入麻酔薬とリンパ球アポトーシス. Anesthesia 21, 14, 2686-2692.  
齋藤英治・長江慶之・輪千浩史・瀬山義幸(2008)メンケベルグ型動脈硬化症における細胞外マトリックスの発現変動と骨粗鬆症治療薬の影響. 薬学雑誌, 128, 385-392.  
齊藤 昇・西山省二(2005)マグネシウム研究・最近の進歩・老化とマグネシウム. Clinical Calcium, 15, 1791-1798.  
坂田則行(2003)酸化ストレスと動脈障害. 脈管学, 43, 685-689.  
塩井 淳(2010)血管石灰化・リモデリングと糖尿病. 脈管学, 50, 561-567.  
高橋正征(2000)海にねむる資源・海洋深層水. あすなろ書房, 東京, p. 189.  
竹谷 豊(2010)リン酸トランスポーターと心血管疾患. 生化学, 82, 727-729.  
鶴見亜有子・小林 誠・村山怜一郎・臼井通彦・小出容子・山本松男(2009)ヒト歯根膜細胞中に存在するアルカリフォスファターゼ陽性細胞と陰性細胞の特徴. Dent. Med. Res., 29, 28-39.  
Wallin, R., N. Wajih, G. T. Greenwood and D. C. Sane (2001) Arterial calcification: A review of mechanisms, animal models, and the prospects for therapy. Med. Res. Rev., 21, 274-301.  
山口 朗(1995)骨芽細胞の分化と骨再建. 日本硬組織研究技術学会雑誌, 4, 56-58.  
山田勝久・今田千秋・土屋孝弘・宮本勝城・辻 坊裕・小林武志・濱田(佐藤)奈保子(2007)海洋環境より分離された糸状菌培養液の美白素材への応用研究. 日本化粧品技術者会誌, 41, 254-261.  
山田勝久・鈴木正宏・野村道康・柴田雄次・今田千秋(2016)海洋深層水はCa/Mg比の増加による正常ヒト線維芽細胞の石灰化を抑制する. 海洋深層水研究, 17, 1-8.  
山羽宏行・田中 浩・八代洋一・中田 浩(2016)紫外線による真皮線維芽細胞における小胞体機能変化と皮膚光老化との関連性. 日本化粧品学会誌, 40, 87-92.  
山村辰二(1995)培養ヒト歯根膜由来線維芽細胞の石灰化能に対するエストロゲンの作用に関する研究. 広島大学歯学雑誌, 27, 26-37.  
(2017年4月14日受付; 2017年6月22日受理)