

宿題報告

骨芽細胞、破骨細胞および骨細胞における相互作用

河田 照茂

徳島大学歯学部歯科矯正学講座



I. はじめに

骨は生体の支持組織であるとともに、生体に必要なカルシウム、リンなどのミネラルを貯蔵、供給する重要な組織である。骨としての機能を遂行していくために一定のバランスを保ちながら骨吸収と骨形成が行われていることは周知の事実である。生体内でのカルシウム代謝には、1) 取り込み口としての小腸、2) 貯蔵所としての骨、3) 排泄口としての腎、の3つの臓器が関与しておりこれらの臓器を標的器官として活性化型ビタミンD₃、副甲状腺ホルモン、カルシトニン等のカルシウム調節ホルモンが相互に関連しあって巧妙に調節を行っている。

歯の支持体である顎骨も常に咀嚼力という間欠力を歯と歯根膜を介して受け、絶えず外界の変化に対応している。そして矯正学的歯牙移動時のメカニカルストレス、また骨整形的な矯正力も同様な経路をたどり、骨の細胞の活発な代謝、すなわち骨改造(骨リモデリング)が行われていることが考えられている。歯の移動の際には歯根膜圧迫側には骨吸収が、牽引側には骨添加が見事にカップリングされている。このカップリングこそが歯の移動の基本的な現象である。しかし、残念なことにどのようなメカニズムによって、この骨吸収と骨添加がカップリングされているかはまだに分かっていないのが現状である。骨の代謝は骨芽細胞をはじめとする骨形成系細胞および破骨細胞などの骨吸収系細胞との共同作用によって調節されていることが知られている。また、近年、これらの細胞と骨基質のなかに埋没している骨細胞の相互作用の重要性もとりあげられるようになってきており、骨に存在するこれらの役割の異なる3種の細胞の相互作用について、最近の知見を整理しまとめたので報告する。

II. 骨芽細胞の形態、機能

骨芽細胞は類骨層を介して骨組織の表面に配列している。そして骨形成を盛んに行っている骨芽細胞は立

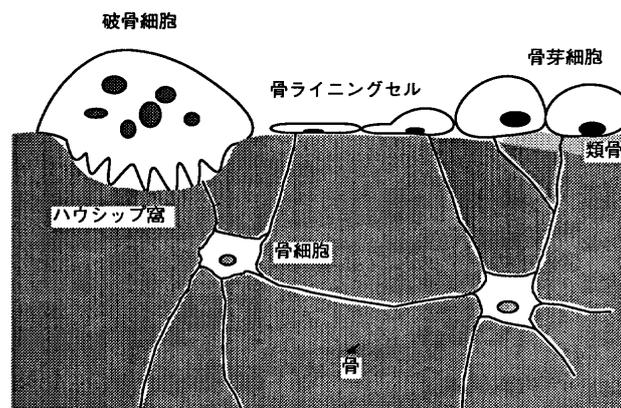


図1 骨の細胞の細胞間ネットワーク

方形ないしは円錐形をしている。塩基好性の細胞質をもっており、粗面小胞体と遊離のリボゾームで占められており活発に蛋白を合成している様子がうかがえる。一方、休止期の不活発な骨芽細胞は扁平な線維芽細胞様を呈しており骨ライニングセルと呼ばれている¹⁾(図1)。この細胞がどのような機能を果たしているかはよく分かっていないが、現在までに分かっている骨芽細胞の機能について述べると、骨芽細胞の重要な機能のひとつに骨基質蛋白の合成がある。

表1に骨芽細胞が産生分泌する骨基質蛋白や成長因子を示している。最も重要なものとして骨の有機成分の90%を占めるI型コラーゲンがある。以下、量的には少ないが非コラーゲン性の蛋白としてオステオカルシン、オステオネクチン、オステオポンチン等があり、これらの蛋白は基質の石灰化調節に関与しているものと思われる。また、骨芽細胞は多くの成長因子やサイトカインを分泌している。Transforming growth factor- β (TGF- β) や Insulin-like growth factor II (IGF-II) など一度、骨基質中に蓄積された後、骨溶解に伴って溶出し活性化されるものであり、そして再び骨芽細胞自身に作用して骨形成を調節する。

たとえば骨組織は血小板と並んで多量の TGF- β を貯蔵しているが²⁾、副甲状腺ホルモンなどによる骨溶解の促進により TGF- β が骨基質から溶出され³⁾、ハ

表 1 骨芽細胞が産生する骨基質蛋白・成長因子・サイトカイン

| |
|---|
| 骨基質蛋白 |
| I型コラーゲン |
| オステオカルシン (Bone Gla protein : BGP) |
| マトリックス Gla 蛋白 (MGP) |
| オステオネクチン |
| オステオポンチン |
| プロテオグリカン |
| 成長因子・サイトカイン |
| Transforming growth factor- β (TGF- β) |
| Bone morphogenetic protein (BMP) |
| Insulin-like growth factor I, II (IGF- I, II) |
| Prostaglandins (PGs) |
| Fibroblast growth factor (FGF) |
| Colony-stimulating factor (CSF) |
| Leukemia inhibitory factor (LIF) |
| Interleukin-1, 6 (IL-1, 6) |
| その他 |
| Sialoproteins |
| Phosphoproteins 等 |

ウシツブ窩の酸により活性化される。これが再びマトリクリン因子として骨芽細胞に作用し、その増殖やコラーゲン合成を促進する⁴⁾。また、骨芽細胞はプロスタグランジンや破骨細胞形成促進因子も産生する。これらは直接体液中に分泌されるものであり、ホルモンや物理的的刺激によって調節を受けている場合が多いものと思われる。

骨芽細胞は基質を石灰化させるという、もうひとつ重要な働きがある。骨の石灰化は骨芽細胞によって形成された基質小胞と呼ばれる石灰化の核となるものが、コラーゲンフィブリルの間隙に観察できる。この基質小胞内のハイドロキシアパタイト結晶が成長して石灰化が進む⁵⁾。図2は石灰化過程を模式的に示している。骨芽細胞より作られる基質小胞が石灰化の核になると考えられている。すなわち血中のカルシウム・リン酸が基質小胞内に蓄積され濃縮されることによってハイドロキシアパタイトへと結晶化され、この結晶はどんどん成長して基質小胞の膜を破り、コラーゲン基質のギャップゾーンと結合してコラーゲンの周囲が石灰化される。このようにして骨芽細胞は基質を石灰化してゆく。

骨芽細胞は骨の形成だけを担っているわけではな

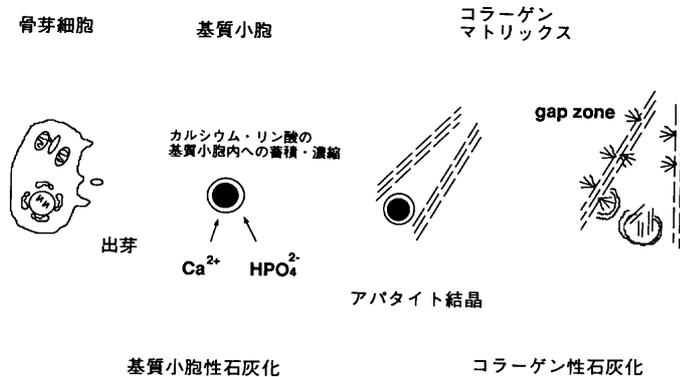


図 2 骨芽細胞による骨石灰化の過程

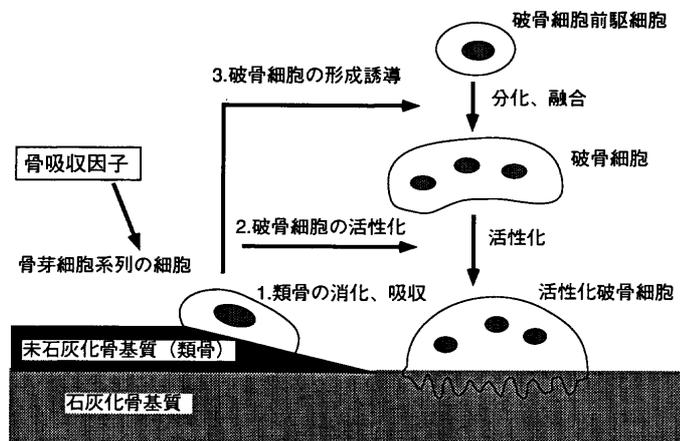


図 3 骨吸収における骨芽細胞の役割

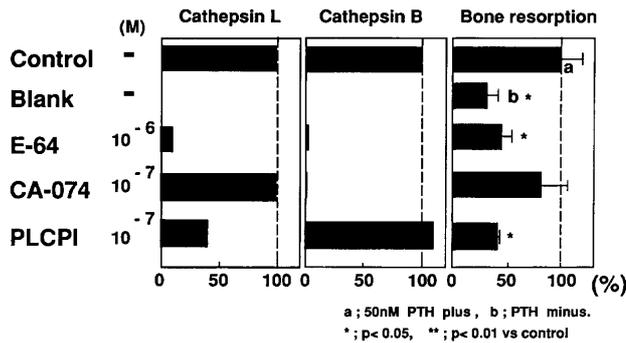


図4 システインプロテアーゼ阻害剤の骨吸収に与える影響

CA-074 でカテプシンBを阻害しても骨吸収は有意に抑制されず、E-64 や PLCPI によってカテプシンLが阻害されると骨吸収が抑制される。

く、骨の吸収にも大いにその役割を演じている。図3に示すように骨芽細胞は破骨細胞と密接に連携しており、骨吸収過程における重要な役目を果たしている。まず、類骨上の骨芽細胞は自ら産生するコラーゲナーゼによって類骨層を分解除去し破骨細胞が石灰化骨基質に接着しやすいような状況をつくる⁹⁾。注目すべきは、この過程を破骨細胞ではなく骨芽細胞が行うことである。そして、副甲状腺ホルモン、活性型ビタミンD₃、インターロイキンのような骨吸収因子に反応して破骨細胞の活性化を促したり、その形成を促進したりする。このように破骨細胞と骨芽細胞の共同作業があっはじめて骨吸収が成り立っている。次に、骨芽細胞と密接な関連のある破骨細胞に内容を移し、最近考えられている両者の相互作用について説明を加える。

III. 破骨細胞の機能

骨吸収の中心的役割である破骨細胞は、大きさが50~100 μm の多核巨細胞であり、骨を吸収している破骨細胞は電子顕微鏡写真で探してみると、隣接する骨にハウシッポ窩といわれる吸収窩を形成している。その内面をみると破骨細胞と骨との接着面にはクリアゾーンとよばれる細胞小器官の無構造な部分がある。この部分が骨に密着することによって吸収窩と外界とを隔絶し、細胞突起よりなる波状縁 (ruffled border) 下で骨吸収を効率よく行えるようにしている。

また、酵素組織化学的には酒石酸耐性酸フォスファターゼ活性を有することが特徴的で、この酵素は破骨細胞のマーカー酵素としてよく実験に利用されている。骨吸収はこの波状縁下で起こり、石灰化骨の鈣質成分をプロトンポンプから放出された酸によって、またコラーゲンなどの有機成分の消化、吸収を各種酵素によって行っている。鈣質成分の研究は古くから行われており細胞内での炭酸脱水素酵素が二酸化炭素代謝を利用してプロトンを生産し⁷⁾、これはプロトンポン

プによって能動的に輸送されている。有機質分解に関しては、水解小体から分泌される酵素によってコラーゲンが分解され、そして酸によるアパタイトの脱灰のあとに続いて有機成分の分解が起こる。この両者が共存してはじめて骨の吸収がおこり、一方が欠けても骨吸収は成立しない。

以前より骨基質分解には破骨細胞由来のコラーゲナーゼによるI型コラーゲンの分解がとりあげられていたが骨吸収窩は強酸性であり、中性領域で至適pHをもつコラーゲナーゼがコラーゲンを分解することは考え難い。また最近ではコラーゲナーゼは破骨細胞にはなく、むしろ骨芽細胞に存在していることなどが免疫組織化学的手法によって証明されている⁸⁾。コラーゲナーゼに代って注目をあびてきたのが水解小体に存在するシステインプロテアーゼであった。われわれの教室でもシステインプロテアーゼに特異的な阻害剤を用いて破骨細胞による骨の有機質成分分解、特に骨コラーゲンの分解に対するカテプシンLの重要性を示唆してきた。

システインプロテアーゼはSH基が活性中心に存在するプロテアーゼの総称である。システインプロテアーゼの代表的なものに、動物ではカテプシンB, L, H, カルシウム依存性プロテアーゼなどがあげられる。微生物由来の低分子化合物であるロイペプチン、E-64は従来より用いられてきたシステインプロテアーゼの特異的阻害剤である。一方、CA-074はE-64の誘導体でカテプシンBに対して特異的に作用する。また、ブタ白血球由来のペプチド [PLCPI] はカテプシンLを非常に特異的に阻害する。これら新しく開発された阻害剤を含めて副甲状腺ホルモンで誘導される骨吸収に与える影響を検討した。以下にその実験内容を要約する。

実験系としては骨片の上に破骨細胞や骨芽細胞を含むラットの骨髄細胞をまき、48時間後の骨片上に形成される吸収窩の面積によって骨吸収活性を評価した。

まず、図4に示すようにE-64でほとんどのシステインプロテアーゼを阻害すると骨吸収は抑制されたが、CA-074でカテプシンBを阻害しても骨吸収は抑制されなかった。しかしPLCPIでカテプシンLを阻害すると骨吸収が濃度依存的に抑制された。すなわち、カテプシンLが骨吸収に影響を与えていることが強く示唆された⁹⁾。また、血液系の細胞で破骨細胞と近縁関係にあり骨吸収能をもたないマクロファージは逆にカテプシンL活性が低いことが分かった。そしてI型コラーゲンを分解する活性はカテプシンLが他のカテプシンより高いこと、また、カテプシンLの至適pHは5.5でハウシッポ窩の酸性環境と合うことなども骨の有機質分解にカテプシンLが関与することを支持している。骨吸収に関与するカテプシンLが破骨細胞由来であることは骨吸収実験の培養上清中に分泌されるカテプシンLがカルシトニンによって産生抑制を受けることにより示唆された¹⁰⁾。このように破骨細胞は酸に

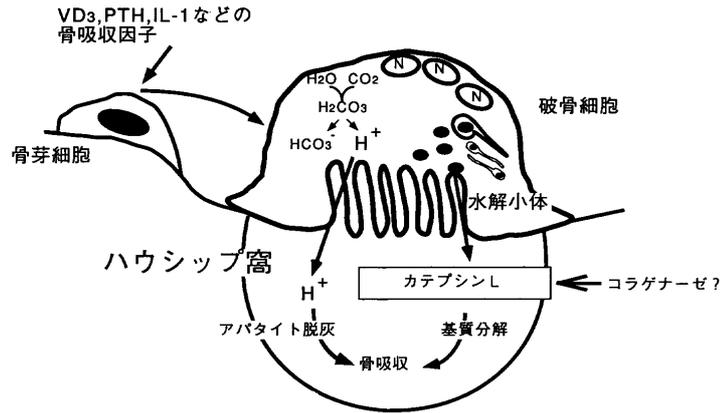


図5 破骨細胞による骨吸収

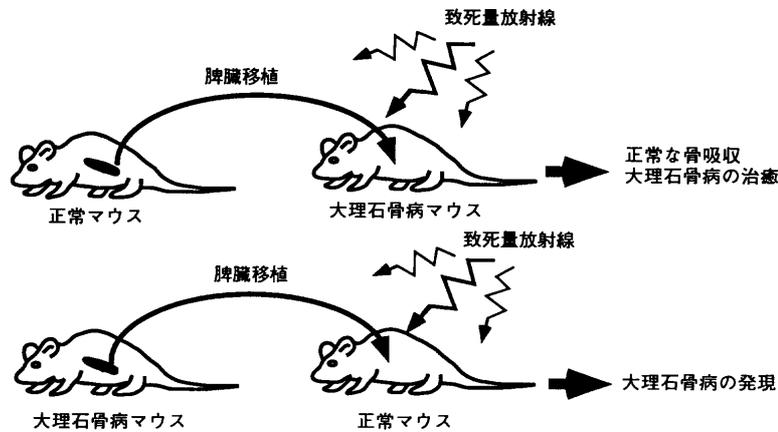


図6 破骨細胞の起源を証明した実験

よるミネラルの脱灰と酵素による基質の分解によって骨を吸収する (図5)。

IV. 破骨細胞の起源

骨吸収の中心的存在である破骨細胞は、骨芽細胞などの間質細胞によって分化を支持されている。それは破骨細胞が血液系細胞の一員であること、多くの血液系細胞の分化が間質細胞による支持を受けていることから明らかである。しかし、1970年代までは破骨細胞と骨芽細胞が同一の細胞系より形成されるとする「一元説」が主流と考えられてきた。すなわち、破骨細胞は骨芽細胞が融合して生じると考えられてきたが、現在ではこの考え方を実証するだけの実験的データに乏しく、この考え方は受け入れられていない。「一元説」に代るものとして破骨細胞と骨芽細胞は異なる起源の細胞であるとする現在の考え方、すなわち「二元説」が考えられるようになってきた。

これは、大理石骨病マウスと正常マウスの脾臓の移植実験などによって明らかになった。破骨細胞の機能異常をともなう大理石骨病マウスに致死量の放射線を照射し正常マウスの脾臓を移植すると、病状が改善し

正常な骨吸収が行われることが示された(図6)¹¹⁾。また、これとは逆に放射線を照射した正常マウスに大理石骨病マウスの脾臓を移植すると正常マウスに大理石骨病が発病する。この研究は、破骨細胞の前駆細胞が造血組織に存在することを示唆するもので、破骨細胞の起源が血液系細胞由来であることの糸口を与えた。現在までにわかっている破骨細胞の形成過程を図7に示すと、破骨細胞形成は血液幹細胞を出発としてあらゆるところから枝分かれする可能性をもっているが、機能的、形態学的に明らかにされていない。

マウス脾細胞から破骨細胞を形成する系を用いて破骨細胞の分化過程を調べてみると、破骨細胞の前駆細胞は、ビタミン D₃ レセプター、副甲状腺ホルモンレセプターを発現し¹²⁾、成熟破骨細胞はこれらレセプターの消失にあいまってカルシトニンレセプターを発現するというレセプター発現と破骨細胞分化の対応も明らかになってきた(図8)。以上のように血液系細胞を起源とする破骨細胞であるが、骨芽細胞とはどのように作用しあっているか興味もたれる。

V. 破骨細胞と骨芽細胞の相互作用

近年、骨改造過程で骨形成系細胞と骨吸収系細胞とが互いに増殖、分化を調節しあう細胞間相互作用について盛んに研究されている。多くの血液系芽球細胞は間質細胞によって支持されていること、そして破骨細胞は間質細胞と接触していることから骨組織中に存在する間質細胞に破骨細胞の形成を促すシグナルがあるのではないかと考えられる。

われわれの教室でもマウスの脾臓細胞から試験管内で破骨細胞を形成させ、この系を用いて骨芽細胞と破骨細胞の相互関係を検討した。この系は破骨細胞の形成過程に骨芽細胞などの他の細胞を含まないことが特

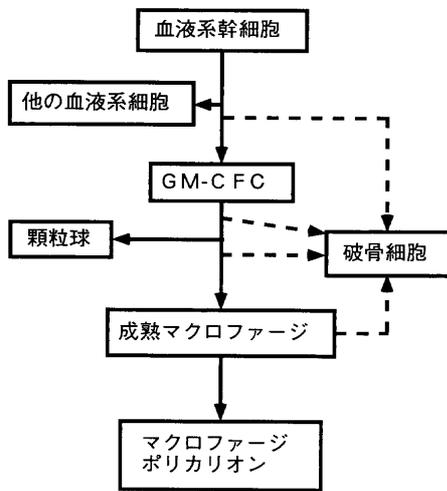


図 7 提唱されている破骨細胞の分化過程
波線矢印に示すところから破骨細胞が分化する可能性がある。
GM-CFC；顆粒球マクロファージ形成細胞

色である¹³⁾。この実験系で形成された多核細胞は、破骨細胞のマーカー酵素である酒石酸耐性酸フォスファターゼが陽性で破骨細胞の機能を抑制するカルシトニンに対するレセプターも存在している。また、血液細胞の増殖を支持する間質細胞と共存培養すると骨を吸収し、破骨細胞の特色を備えている。

骨芽細胞として正常マウス頭頂骨由来の細胞株 MC3T3-E1 細胞を用いた。この MC3T3-E1 細胞を長期間培養し、その培養上清をとり破骨細胞形成に対する影響を検討した¹⁴⁾。増殖期である培養 3 日目の MC3T3-E1 細胞の上清は破骨細胞の形成には影響を与えなかった。しかし、骨芽細胞の分化程度が進んだ培養 60 日目の上清には破骨細胞形成を促進する物質が存在することが分かった(図 9)。また、この破骨細胞促進物質の経日的変化を追ってみると、培養 20 日目よりその性格が現れてくることが分かり、破骨細胞の分化は骨芽細胞の分化状態によって影響されている。

VI. 破骨細胞とサイトカイン

破骨細胞はステロイドホルモンである活性型ビタミン D₃、サイトカインである Interleukin-3 (IL-3)、Granulocyte-Macrophage-colony stimulating factor (GM-CSF) や Macrophage colony stimulating factor (M-CSF) などの作用により分化を調節されている。骨組織には骨芽細胞やその前駆細胞にあたる間質系細胞と破骨細胞や単球などの血液系細胞が共存しており、これらの細胞が局所に形成する微小環境は骨芽細胞や破骨細胞の分化や活性を調節する上で重要な役割を果たしている。そして、この微小環境の形成に重要な役割を果たしているのが局所で産生されるサイトカインである。骨組織においてサイトカインを産生するのは骨芽細胞などの間質系細胞と単球やマクロファージなどの免疫系細胞であることが考えられてい

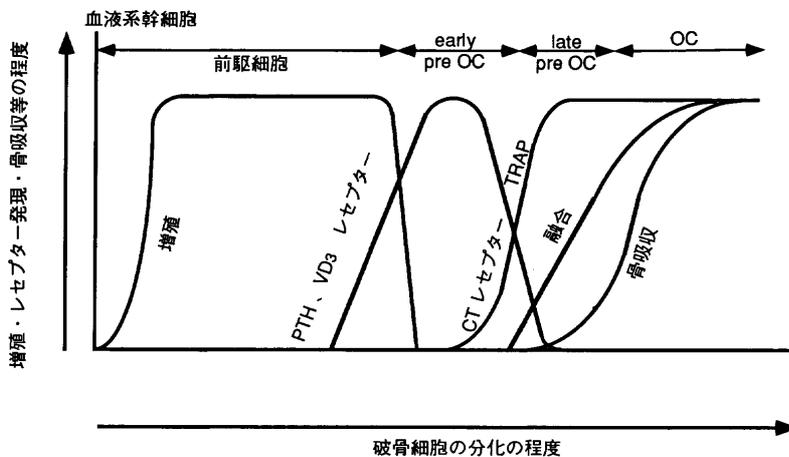


図 8 破骨細胞の分化過程

OC；破骨細胞、TRAP；酒石酸耐性酸フォスファターゼ(破骨細胞のマーカー酵素)、CT；カルシトニン、VD₃；活性型ビタミン D₃、PTH；副甲状腺ホルモン

る。これらの細胞によって産生されるサイトカインは骨のリモデリングを調節している。骨吸収に作用するサイトカインとして骨吸収を促進させるものは、IL-1, 腫瘍壊死因子 (TNF), Leukemia inhibitory factor (LIF), IL-6, M-CSF, TGF- β 等で、骨吸収を抑制させるものは Interferon- γ (IFN- γ), TGF- β (2 面性がある), IL-4 等である。

IL-1 は *in vivo* および *in vitro* においても強い骨吸収活性を示し^{15,16)}, この骨吸収作用の一部は骨芽細胞を介して行われていると考えられている¹⁷⁾。腫瘍壊死因子 (TNF) は IL-1 とほぼ同様な作用を示す¹⁸⁾。LIF はプロスタグランディンを介していることが示唆されている¹⁹⁾。IL-6 は *in vitro* で破骨細胞の前駆細胞から破骨細胞の形成を促進する効果がある²⁰⁾。これらの骨吸収促進因子に対して骨吸収を抑制する作用をもつサイトカイン, すなわち IFN- γ は IL-1 や TNF によって促進された骨吸収を抑制することが知られている^{21,22)}。サイトカインは, 直接あるいは骨芽細胞を介して間接的に破骨細胞へ作用していると考えられる。サイトカインの中で TGF- β は骨基質中に存在し, 破骨細胞が骨を吸収するときに活性型となり²³⁾, 骨吸収におけるカップリングファクターとして注目されている (図 10)。TGF- β は器官培養系において骨の吸収促進, 抑制の両方の活性が報告されており^{24,25)}, 細胞レベルで破骨細胞の活性, 形成における TGF- β の影響を検討した。

マウスの骨髄細胞をあらかじめ用意しておいた骨片上に播き, 形成される骨吸収窩の数を骨吸収活性の指

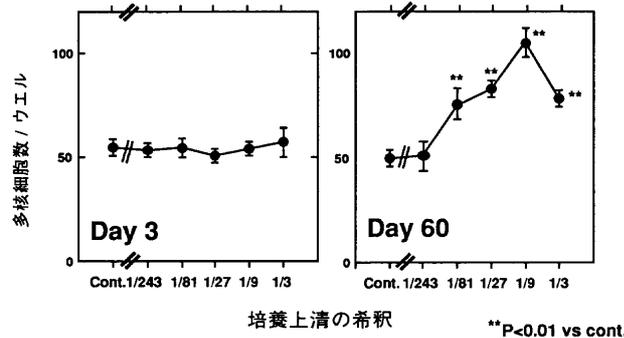


図 9 骨芽細胞の培養上清が多核細胞形成に与える影響

標とした。骨片上の破骨細胞も数え, 一破骨細胞当たりの骨吸収活性を検討した。すると, TGF- β の濃度に依存して破骨細胞の骨吸収活性が抑制されていることが分かった。

次に破骨細胞形成に対する TGF- β の影響について検討を進めたところ, 活性型ビタミン D₃ の存在下で破骨細胞の形成を促進した。この現象をさらに詳しくみるとマウス脾細胞から破骨細胞を形成する実験系では, TGF- β は直接, 多核細胞形成を抑制する一方, 骨芽細胞を介して間接的に破骨細胞形成を促進するということが分かった²⁶⁾。

このように現在では細胞の単離技術が進み細胞レベルでのサイトカインの直接, 間接的影響が検討できるようになった。

VII. 骨細胞の機能

骨細胞は骨組織を構成する細胞中で最も数が多くおよそ 2 万 5 千個の細胞が 1 mm³ の骨中に存在しているといわれている。また骨細胞の特徴的形態である細胞突起は, 骨芽細胞から骨細胞へと分化していくに従ってその長さや数を増加している。これらは隣接する細胞間を連結するだけでなく, 骨表面にも伸びている。骨表面での骨小管の開口部は 100 μ m² 中, 13~16 個に及び外界と骨深部の連絡が密接に行われていることが示唆される。しかし, 現状では骨細胞の機能やリモデリングに対する影響はほとんど分かっていない。

骨中における骨細胞はこのようにギャップジャンクションにより細胞性の網の目構造を形成している。この網の目状のギャップジャンクションは骨基質中の骨細胞と骨表面の骨芽細胞, 破骨細胞との細胞間ネットワークを形成するために不可欠なものであるが, それらを介してどのような情報の伝達を行い, その結果どのようなことがなされているのかいまだ不明な点が多く残っている。

現在までに考えられてきた骨細胞の機能として次の 4 つがいわれている。

- 1) 骨細胞性骨融解による血中カルシウムの流量調節
- 2) サイトカインの分泌

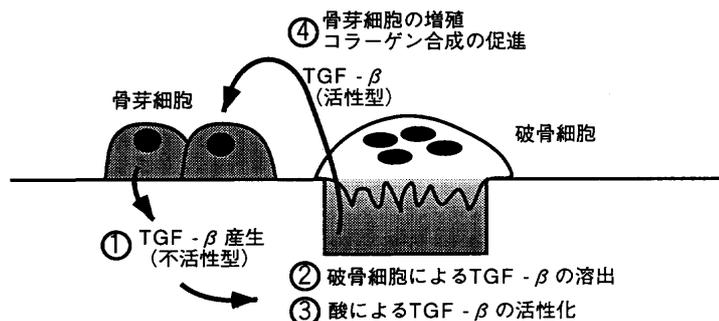


図 10 Transforming Growth Factor- β の作用様式

3) 骨細胞と骨芽細胞のギャップジャンクションを通しての物質の伝達

4) そして歯科矯正学に最も関係あるメカニカルストレスに対する応答などである。

骨細胞に対する研究は組織学的、組織化学的アプローチのみが行われている。これは骨細胞は周囲を硬組織に囲まれているため単離ができず、細胞の生化学的検討はほとんどなされていなかったからである。そこで、われわれはニワトリ胚頭頂骨から均一でしかも高純度な骨細胞群の分離方法を確立した(図11)。

要約すると、骨細胞は16日齢ニワトリ胚頭頂骨より分離し、まず頭頂骨より骨膜を除去し、骨細胞以外の細胞を多く含む骨髓腔および頭頂骨周辺部を切除し、

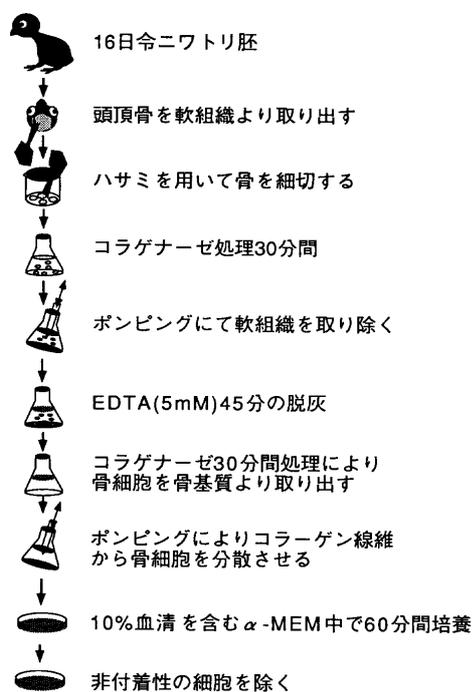


図11 骨細胞の分離法

この骨細胞に富む骨片を1mm角に細切したのちコラゲナーゼ処理を行った。次にリン酸緩衝液、EDTAによる脱灰処理を行った後、再びコラゲナーゼ処理を行い、骨細胞を含むコラーゲン線維の消化を行った。遊離した骨細胞はフィルターを通して純度を高めたのち、10%血清を含む培地中で培養し、接着性の差を利用して線維芽細胞や骨芽細胞を除外した。

単離された骨細胞の特色は、1) 骨芽細胞、線維芽細胞に比べ小さい、2) 細胞突起を四方にだし、星状の形態をしている、3) ギャップジャンクションによりお互いが連結している、4) アルカリフォスファターゼ活性陰性である、5) 骨細胞を認識するモノクローナル抗体 OB7.3 に陽性である。

次に骨細胞と他の骨組織中の細胞との相互作用であるが、破骨細胞の形成過程には骨細胞が直接接触し情報を伝達するか、あるいは液性因子を介した何らかの調節系が存在するはずである。そこでマウスの脾細胞から得られる破骨細胞の前駆細胞と骨細胞を共存培養することにより、形成される破骨細胞の数を検討した。骨細胞と共存させると破骨細胞の形成が促進され、何らかの破骨細胞形成促進因子を産生していることが示唆された。また、共存培養での骨細胞の数を増加させると、破骨細胞形成は骨細胞に比例して増加することが分かった。また、骨細胞の培養上清の影響を検討しても破骨細胞形成促進効果が観察された(図12)。

すなわち、骨細胞は液性因子を介して破骨細胞形成を促進していることが示唆された。また、骨吸収により骨基質から露出した骨細胞がどのような分化をするかを単離した骨細胞を用いて検討した。単離骨細胞の分化過程を骨細胞に対する特異抗体および骨芽細胞のマーカー酵素であるアルカリフォスファターゼの染色性を指標として追ってみた。

データには示していないが、培養2日目までは強く抗体に反応し骨細胞の性格を保持しているが、培養5日目ではアルカリフォスファターゼ活性をもつように

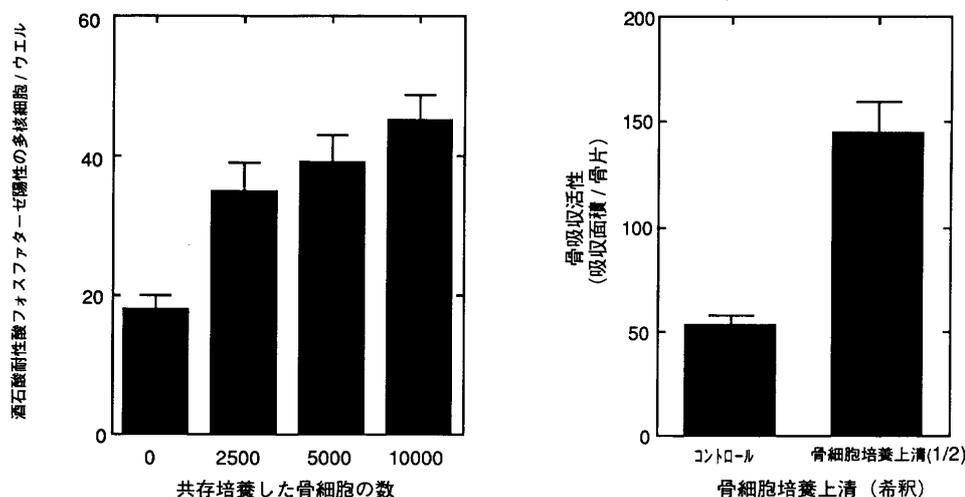


図12 左：骨細胞の破骨細胞形成、右：骨細胞上清の骨吸収活性に及ぼす影響

なり、わずかに骨芽細胞の特色があらわれ始める。培養12日目ではもはや、増殖能をもった骨芽細胞になり始め高いアルカリフォスファターゼ活性をもつようになった。すなわち、骨基質中から露出した骨細胞は未分化な骨芽細胞にまで脱分化して増殖能を獲得し、再び成熟骨芽細胞へと分化し得る。

また、単離した骨細胞の映画で観察するとこれらの様子がさらに明確に分かる。骨細胞同士のギャップジャンクションを通過する物質の移動の様子、単離骨細胞が脱分化し、増殖し、最終的に石灰化する様子が時間の経過とともに観察できる。

VIII. ま と め

われわれは、歯牙移動時におこる骨の吸収と添加のメカニズムが、いまだ未解決な部分を多く残していることを考慮し、研究の第一歩として骨代謝に関わる細胞の検索を試みてきた。骨細胞、骨芽細胞そして破骨細胞は以上のように互いに影響しあい、密接な連携をなしてダイナミックなネットワークを形成している。もちろん、他にもこのネットワークに参加する細胞はたくさんあるが、それらの細胞の機能をひとつひとつ解明して試験管のなかで機能的な骨組織を再構築することが、歯牙移動の非常に複雑なメカニズムを解明する糸口になり得るものと信じている。

文 献

- 1) Miller, S. C., Bowman, B. M., Smith, J. M., *et al.* : Characterization of endosteal bone lining cells from fatty marrow bone sites in adult beagles, *Anat Rec* 198 : 163-173, 1980.
- 2) Seyedin, S. M., Thompson, A. Y., Bentz, H., *et al.* : Cartilage-inducing factor-A. Apparent identity to transforming growth factor- β , *J Biol Chem* 261 : 5693-5695, 1986.
- 3) Pfeilschifer, J. and Mundy, G. R. : Modulation of type β transforming growth factor activity in bone cultures by osteotropic hormones, : *Proc Natl Acad Sci USA* 84 : 2024-2028, 1987.
- 4) Centrella, M. and McCarthy, T. : Transforming growth factor β is a bifunctional regulation of replication and collagen synthesis in osteoblast-enriched cell cultures from fetal rat bone, *J Biol Chem* 262 : 2869-2874, 1987
- 5) Wuthier, R. E. : A review of the primary mechanism of endochondral calcification with special emphasis on the role of cells, mitochondria and matrix vesicles, *Clin Orthop* 169 : 219-242, 1982.
- 6) Sakamoto, S. and Sakamoto, M. : Bone collagenase, osteoblasts and cell-mediated bone resorption, In : Peck We'd Bone and Mineral Research, Annual 4, Elsevier Science Publishers BV, Amsterdam. 49-102, 1986.
- 7) Anderson, R. E., Schraer, H. and Gay, C. V. : Ultrastructural immunocytochemical localization of carbonic anhydrase in normal and calcitonin-treated chick osteoclast, *Anat Rec* 204 : 9-20, 1982.
- 8) Sakamoto, S. and Sakamoto, M. : Biochemical and immunohistochemical studies on collagenase in resorbing bone in tissue culture, *J Periodont Res* 17 : 523-526, 1982.
- 9) Kakegawa, H. Nikawa, T., Tagami K., *et al.* : Participation of cathepsin L on bone resorption, *FEBS Lett* 321 : 247-250, 1993.
- 10) Tagami, K., Kakegawa, H., Kamioka, H., *et al.* : The mechanisms and regulation of procathepsin L secretion from osteoclasts in bone resorption, *FEBS Lett.* 342 : 308-312, 1994.
- 11) Walker, D. G. : Control of bone resorption by hematopoietic tissue, *J Exp Med* 142 : 651-663, 1975.
- 12) Hakeda, Y., Hiura, K., Sato, T., *et al.* : Existence of parathyroid hormone binding sites on murine hemopoietic blast cells, *Biochem Biophys Res Commun* 163 : 1481-1486, 1989.
- 13) Kurihara, N., Suda, T., Miura, Y., *et al.* : Generation of osteoclasts from isolated hematopoietic progenitor cells, *Blood* 74 : 1295-1302, 1989.
- 14) Hiura K., Sumitani K., Kawata T., *et al.* : Mouse osteoblast cells (MC3T3-E1) at different stages of differentiation have opposite effects on osteoblastic cell formation, *Endocrinology* 128 : 1630-1637, 1990.
- 15) Gowen, M., Wood, D. D., Ihrle, E. J., *et al.* : An interleukin 1 like factor stimulates bone resorption in vitro, *Nature* 306 : 378-380, 1983.
- 16) Boyce, B. F., Aufdemorte, T. B. and Garrett, I. R. : Effects of interleukin-1 on bone turnover in normal mice, *Endocrinology* 125 : 1142-1150, 1989.
- 17) 石川啓詞 : Interleukin-1 β の破骨細胞形成に及ぼす影響, *四国歯誌* 6 : 1-12, 1993.
- 18) Kupper, T. S., Ballard, D. W., Chua, A. O., *et al.* : Human keratinocytes containing mRNA indistinguishable from monocyte interleukin 1 α and β mRNA. Keratinocyte epidermal cell-derived thymocyte activity factor is identical to interleukin 21, *J Exp Med* 164 : 2095-2100, 1986.
- 19) Reid, I. R., Lowe, C., Cornish, J., *et al.* : Leuke-

- mia inhibitory factor : A novel bone-active cytokine, *Endocrinology* 126 : 1426-1420, 1990.
- 20) Kurihara, N. Bertolini, D. and Suda, T. : IL-6 stimulates osteoclast-like multinucleated cell formation in long term human marrow cultures by inducing IL-1 release, *J Immunol* 144 : 4226-4230, 1990.
- 21) Gowen, M., Medwin, G. E. and Mundy, G. R. : Preferential inhibition of cytokine-stimulated bone resorption by recombinant interferon gamma, *J Bone Min Res* 1 : 469-474, 1986.
- 22) Takahashi N., Mundy, G. R. and Roodman, G. D. : Recombinant human interferon- γ inhibits formation of human osteoclast-like cells, *J Immunol* 137 : 3544-3549, 1986.
- 23) Oreffo, R. O., Mundy, G. R., Seyedin., S. M., *et al.* : Activation of the bone-derived latent TGF beta complex by isolated osteoclasts, *Biochem Biophys Res Commun* 158 : 817-823, 1989.
- 24) Hattersley, G. and Chambers, T. J. : Effects of transforming growth factor β 1 on the regulation of osteoclastic development and function, *J Bone Min Res* 6 : 165-172, 1991.
- 25) Chenu, C., Pfeilschifter, J. and Mundy, G. R. : Transforming growth factor β inhibits formation of osteoclast-like cells in long-term human marrow cultures, *Proc Natl Acad Sci USA* 85 : 5683-5687, 1988.
- 26) 上岡 寛 : 破骨細胞の形成と活性に及ぼす Transforming growth factor β 1 の影響について, *四国歯誌* 6 : 13-23, 1993.