

## 内軟骨性骨化における破(軟)骨細胞機能障害の影響

奥山典子 櫻井裕子 遊佐淳子  
横手優介 伊東博司 山崎 章

### Influence of Functional Disturbance Osteo(chondro)clasts in Endochondral Ossification

Noriko OKUYAMA, Yuuko SAKURAI, Junko YUSA  
Yuusuke YOKOTE, Hiroshi ITO and Akira YAMASAKI

Endochondral ossification is preceded by the vascular invasion into hypertrophic chondrocyte lacunae. Although it has been described that the osteoclasts or chondroclasts are primarily responsible for the breakdown of the transverse septa facing the front of vascular invasion, there are some questions to be clarified in this theory. To address this question, we conducted morphological approach using in vivo model of selectively suppressed osteoclast function by treatment with maximal inhibitory dose of the bisphosphonate incadronate.

Five or 10-day-old mice were given a subcutaneous injection of incadronate at a dose of 1.0 mg/kg for 5 or 10 consecutive days, and then the femur and tibia were excised.

Histologically, the femoral or tibial epiphysis of the incadronate treated mice appeared to be almost the same as untreated control mice, although their metaphysis exhibited a significant increase in thickness. At the epiphyseal end, the vascular invasion into the chondrocyte lacunae was evident. Although TRAP-positive osteoclasts appeared to increase in number and size throughout the metaphysis, only a few mononuclear TRAP-positive cells were found near the epiphyseal-metaphyseal junction, none of which existed at the front of vascular invasion.

Immunohistochemistry demonstrated an intense expression of MMP-9 protein in both cellular component and extracellular matrix at the front of vascular invasion. The expression of VEGF protein was found intensely in the metaphysis and weakly in the hypertrophic chondrocytes in the epiphyseal growth plate.

From the present study, we suggest that the vascular invasion led by MMP-9 and VEGF is primarily responsible for the breakdown of the transverse septa of hypertrophic chondrocytes lacunae and osteoclastic cells are not involved in this phenomenon.

Key words : endochondral ossification, osteoclasts, bisphosphonate, MMP-9, VEGF

#### 緒 言

内軟骨性骨化における骨形成過程では、骨原基

としての軟骨が形成されたのち、その軟骨性原基の中央部に血管が侵入する。侵入した血管はさらに石灰化を開始した軟骨基質間へ伸びていく。つ

いで血管は分枝しながら両端へと伸び、骨幹端に面した軟骨小腔内へ侵入する。侵入してくる血管の周囲には多くの多能性未分化間葉系細胞が付随しており、それらの細胞はのちに骨髄造血系細胞、骨芽細胞、破骨細胞へと分化する。破骨細胞は軟骨基質や骨組織を吸収し、同時に骨芽細胞は骨端軟骨から伸展した石灰化軟骨骨梁に新たな骨組織を添加し、一次海綿骨を形成する<sup>1)</sup>。このように軟骨内への血管の侵入は骨形成過程においてcritical eventであるとみなされる。骨端-骨幹端境界面において、軟骨小腔横隔壁を吸収し血管の侵入を許容するのは、破骨細胞の働きによるものとされているが<sup>2,3)</sup>、その具体的なメカニズムやそれを制御する因子の発現に関しては多くの疑問点が残されている。

Bisphosphonateは破骨細胞活性のinhibitorとしてよく知られており、様々な代謝性骨疾患の臨床的な治療に広く用いられている。現在ではPaget's骨病<sup>4,5)</sup>や悪性の高カルシウム血症<sup>6,7)</sup>、閉経後骨粗鬆症<sup>8)</sup>の治療に効果を示すことが知られており、さらには線維性骨異形成症<sup>9)</sup>や骨形成不全症<sup>10)</sup>、骨関節炎<sup>11)</sup>、関節リウマチ<sup>12,13)</sup>への研究が行われている。Incadronateは側鎖に窒素を含むamino-bisphosphonateであり、破骨細胞活性阻害の分子メカニズムは、少なくとも部分的にはコレステロール合成のメバロン酸経路における酵素阻害に関与していることが知られている。これらのamino-bisphosphonateはゲラニルピロリン酸(GPP)からファルネシルピロリン酸(FPP)への代謝を行うFPP合成酵素を標的とし<sup>14,15)</sup>、その下流の低分子GTP結合タンパクのイソプレニル化を阻害することにより、骨吸収活性の抑制を引き起こすことが報告されている<sup>14,16)</sup>。

本研究では軟骨小腔横隔壁の吸収についての疑問点を明らかにするために、bisphosphonateを投与することによって破骨細胞の機能を阻害したマウスを用いて、組織学的に検索した。

## 材料と方法

### 1. 実験動物

実験動物として、雌雄のB6C3F1マウス(日本チャールスリバー社)またはddyマウス(日本SLC社)を用いた。飼育は奥羽大学歯学部動物実験研究施設(室温23°C、湿度55%)で行った。

破骨細胞阻害剤のamino-bisphosphonateであるincadronate(YM175, 山之内製薬より供与)を生後5日齢から5日間(n=6; B6C3F1)または10日間(n=6; B6C3F1, n=6; ddy), および生後10日齢から5日間(n=6; B6C3F1)または10日間(n=6; B6C3F1), 1 mg/kgを背部皮下に投与した群を実験群(以下incadronate投与群)とし、同等量のリン酸緩衝生理食塩水(以下PBS, pH 7.4)を投与した群を対照群(以下対照群)とした。

### 2. 標本作製

投与終了日の翌日にマウスを断頭し、大腿部および脛部を採取し、軟組織を可能な限り除去したのち、4%パラホルムアルデヒドにて室温で24時間固定を行った。試料はPBSで洗浄後、5% EDTA (pH 7.02) に3~4週間浸漬し、常温脱灰を行った。脱灰試料はパラフィン包埋し、長軸と平行に厚さ4 μmの連続切片を作製した。一部の切片にH-E染色を施し、病理組織学的観察を行った。

### 3. 免疫組織化学

血管内皮細胞成長因子(VEGF)およびMMP-9発現状況の検討のために、抗VEGF抗体および抗MMP-9抗体を用いて免疫組織化学的に検索をした。その検索にはパラフィン切片を用い、labeled-streptavidin-biotin法により行った。切片は内因性ペルオキシダーゼの除去のために0.3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>加メタノールを室温で30分作用させ、次に非特異的反応を防止するため、ロバ正常血清を室温で20分作用させた。100倍希釈したヤギ抗ヒトVEGFポリクローナル抗体(Santa Cruz社)および50倍希釈したヤギ抗ヒトMMP-9ポリクローナル抗体(Santa Cruz社)を一次抗体として室温で60分反応させた。なお、一次抗体をPBSで置換して反応させた標本を免疫組織化学の陰性対照とした。次に、ビオチン標識ロバ抗ヤギIgG(Chemicon社)を二次抗体として室温で30分浸漬したのち、ペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジン(ニチレイ社)を室温で30分反応させ、0.005% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>を添加した0.02% 3, 3'-ジアミノベンチジン・4 HCl/0.05Mトリス塩酸緩衝液pH 7.6(DAB基質キット, ニチレイ社)にて茶色に発色し、ヘマトキシリンにて核染を施し、光学顕微鏡にて観察を行った。

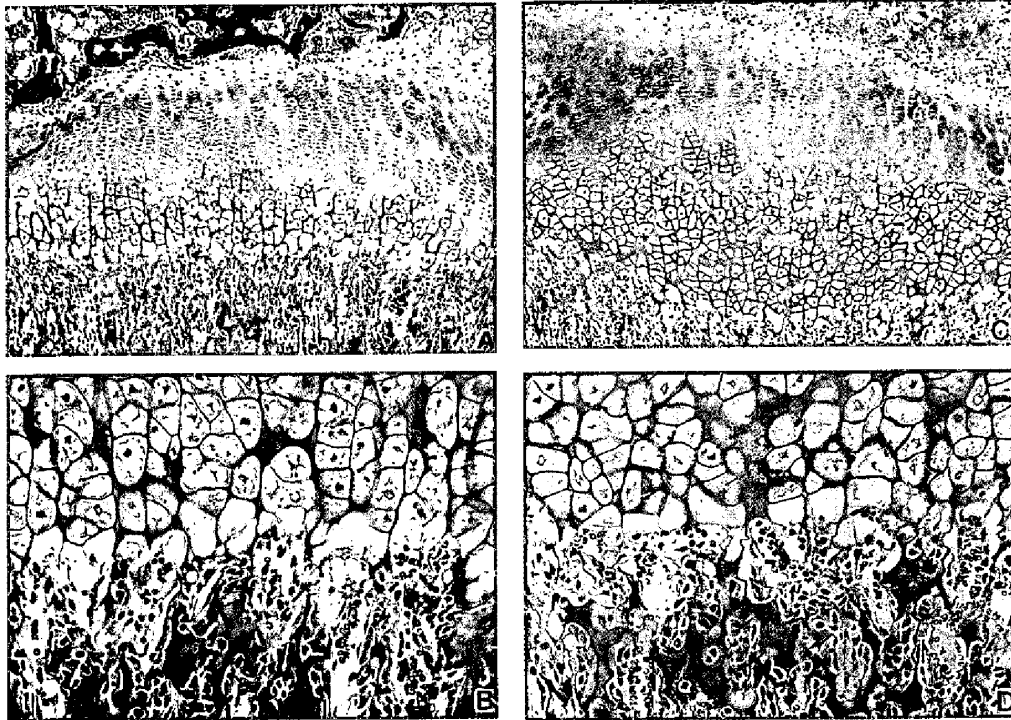


図1 H-E染色

対照群 (A; 低倍率像, B; 高倍率像) incadronate投与群 (C; 低倍率像, D; 高倍率像)

#### 4. 酵素組織化学

破骨細胞および破骨細胞前駆細胞を同定するために、そのマーカーとされている酒石酸耐酸性ホスファターゼ (TRAP) 染色を行った。パラフィン切片は、脱パラフィンののち、0.1M Acetate buffer (pH 5.0) で十分に洗浄した。Naphthol AS-BI phosphate (Sigma社) を基質に用いた酸性ホスファターゼ活性検出反応液に、50mM 濃度でL (+) -sodium tartrate を加えた液 (pH 5.0) に37°Cで30分浸漬した。反応終了後の切片は、さらにヘマトキシリンにて核染を施し、光学顕微鏡にて観察を行った。

### 結 果

#### 1. 組織学的所見

対照群の骨端軟骨組織では静止層、増殖層、肥大層、および石灰化層が一定の厚さで規則正しく配列していた (図1A)。骨幹端では多数の血管が石灰化層の横隔壁を破って軟骨小腔内に侵入しているのが観察された (図1B)。また、吸収されずに残った縦隔壁は骨幹端から伸展し、一次海綿骨を形成していた。一次海綿骨の骨梁は新たに骨芽細胞性骨組織を添加する二次海綿骨へのリモ

デリングが行われており、骨幹側では破骨細胞による骨吸収を受けて消失していた。

対照群に比べてincadronateを投与したマウスでは骨端軟骨の肥大層がやや厚くなっているために全体が肥厚していたが、長軸方向や各層の軟骨細胞は整然と配列しており、対照群との変化が見られなかった (図1C)。骨端軟骨最先端の軟骨小腔横隔壁は消失し、対照群と同様に血管の侵入が認められた (図1D)。軟骨小腔横隔壁の吸収において投与期間の違いによる変化は見られず、どの群も同様に血管の侵入が観察された。しかし、成長板骨端軟骨から伸展した一次海綿骨は著しく伸長しており、二次海綿骨へのリモデリングが行われていなかった (図2)。この所見は、生後5日から10日間投与した群でもっとも顕著であり (図2C)、次いで生後10日から10日間投与群 (図2B) と生後5日から5日間投与群 (図2E)、また生後10日から5日間投与群での効果ももっとも少なかった (図2D)。

#### 2. 酵素組織化学的所見

Incadronate投与群では破骨細胞が阻害されているにもかかわらず、血管の侵入には変化が見られなかったことから、破骨細胞が軟骨小腔横隔壁

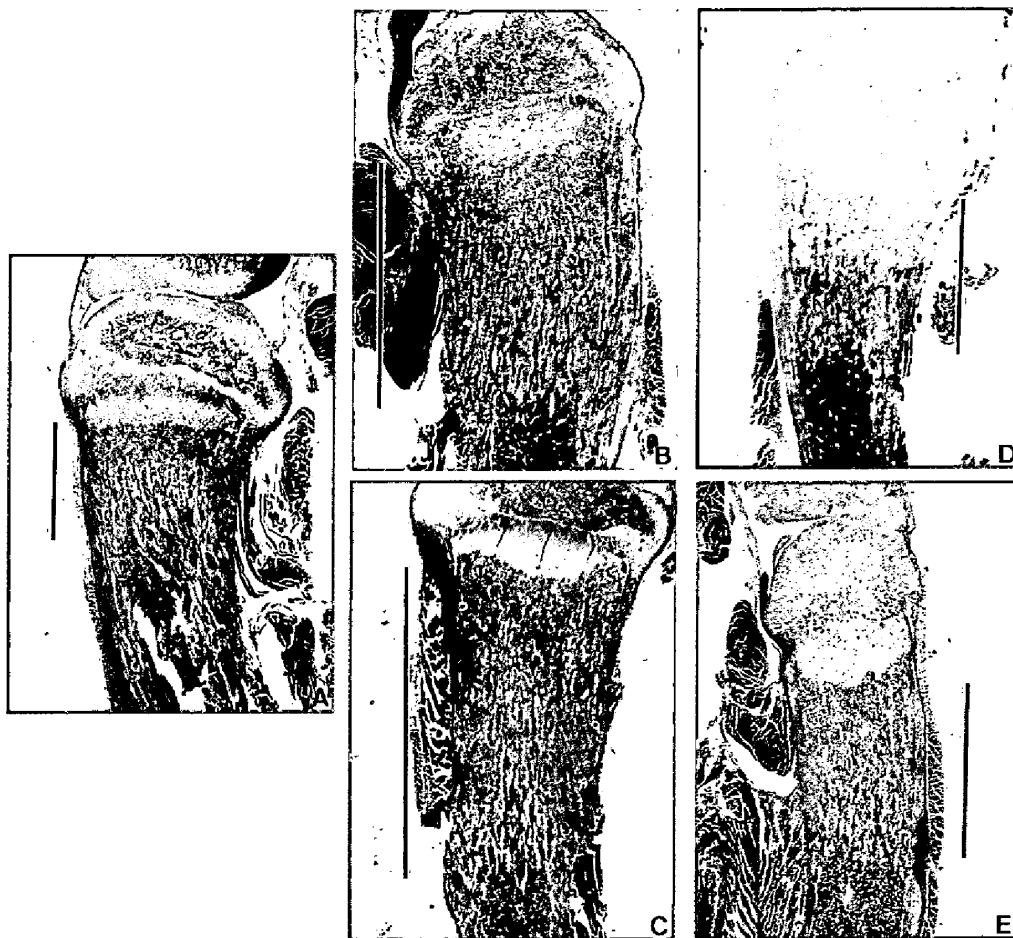


図2 H-E染色；各群における一次海綿骨の伸長

対照群(A) 生後10日から10日間incadronate投与群(B) 生後5日から10日間incadronate投与群(C) 生後10日から5日間incadronate投与群(D) 生後5日から5日間incadronate投与群(E) 図中の縦線は一次海綿骨の長さを示す。

の破壊を行うかどうかを調べるために、破骨細胞の特異的マーカーである酒石酸耐酸性ホスファターゼ (TRAP) 染色を行った。対照群ではTRAP陽性細胞は主に骨幹側の一次海綿骨骨梁の輪郭に沿って観察され、骨端—骨幹端境界面では顕著には見られなかった (図3A)。これらの陽性細胞の多くは大型で多核を示し、吸収活性を持つことが確認された。また、骨端軟骨最先端の横隔壁が吸収された軟骨小腔に近接して、少数の陽性細胞が認められたが、それらのほとんどすべてが単核であり、多くは侵入血管からやや離れて局在していた (図3B)。Incadronate投与群では対照群に比べて全体的に陽性細胞が多く見られ、特に大型の多核細胞の増加が顕著であった (図4A)。また、境界面でも少数の単核細胞が観察されたが、やはり先端部には認められなかった (図4B)。

なお、投与期間の違いによる変化は見られなかった。

### 3. 免疫組織化学的所見

破骨細胞は軟骨小腔の開放に直接的には関与しないことが示唆されたため、骨端において血管の新生、軟骨小腔内への侵入を調節すると考えられているVEGFとMMP-9の免疫染色を行った。対照群、incadronate投与群ともに強いVEGFタンパクの発現が骨幹端と血管内皮細胞に見られ、骨端軟骨成長板では弱く、不規則であった。特に先端部の内皮細胞と思われる細胞が強い陽性反応を示していた (図5A, B)。

MMP-9の免疫染色においても対照群、incadronate投与群ともに骨端—骨幹端境界面を含む一次海綿骨と、軟骨小腔でMMP-9の陽性反応が認められ、特に骨端—骨幹端境界面が強い反応を示した (図6A, 図7A)。また、開放された軟



図3 対照群におけるTRAP染色  
A；低倍率像，B；高倍率像

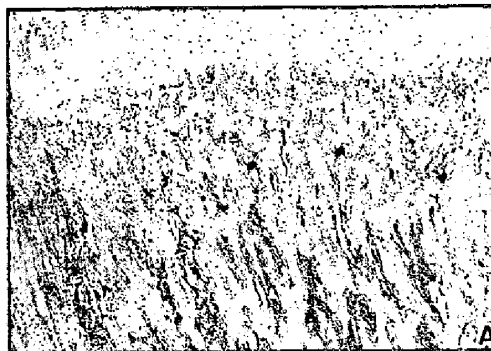


図4 incadronate投与群におけるTRAP染色  
A；低倍率像，B；高倍率像

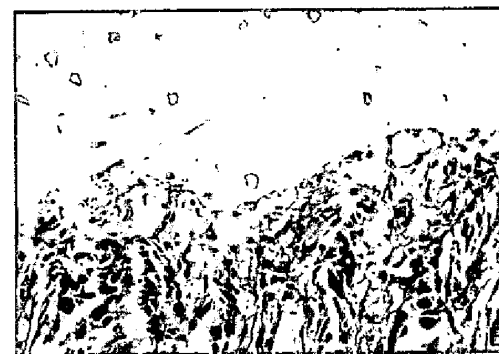
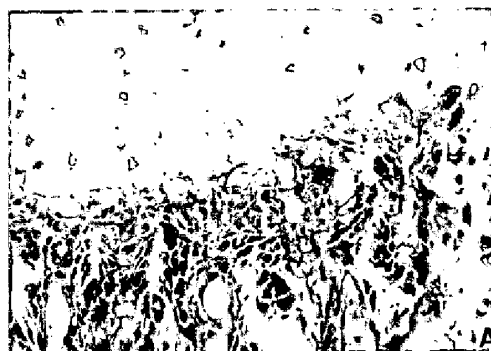


図5 VEGFの免疫染色  
A；対照群 B；incadronate投与群

骨小腔では侵入してきた細胞が陽性反応を示していた（図6B，図7B）。なおVEGF，MMP-9どちらについても投与期間の違いによる変化は見られなかった。

### 考 察

骨端—骨幹端境界面で軟骨小腔内に血管が侵入するためには，軟骨小腔横隔壁の開放が必要であるが，その機能を担う細胞についてはさまざまな説が提唱されており，未だ明確には解明されていない。長年，軟骨小腔横隔壁の吸収，開放は破骨

細胞によるものとされてきた<sup>17,18)</sup>。しかし近年，Nakamuraらは骨芽細胞や破骨細胞の系統とは異なるperivascular cellが非石灰化軟骨マトリックスの吸収に関与すると報告している<sup>19)</sup>。

本研究において破骨細胞の機能を抑制しても，血管侵入に影響がないことが示された。また，Martinらもbisphosphonateの一種であるclodronateを投与したマウスの尾部椎骨において，石灰化軟骨への血管侵入を確認している<sup>20)</sup>。さらに先天的に破骨細胞が出現しない大理石骨病（oc/oc）マウスでも血管の侵入には影響がない

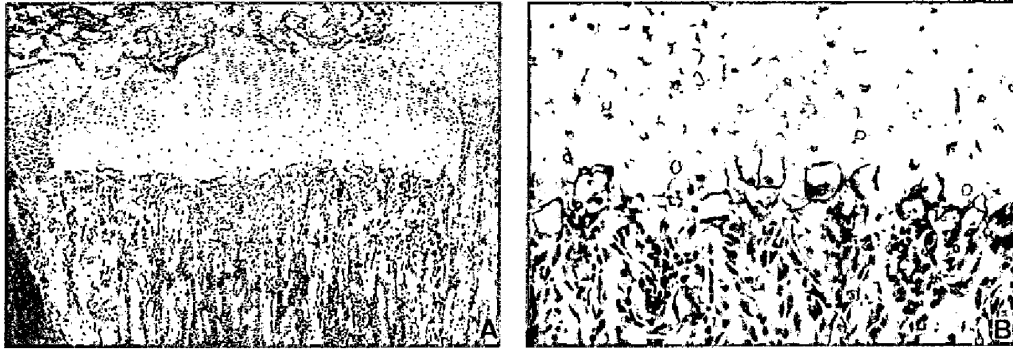


図6 対照群におけるMMP-9の免疫染色  
A; 低倍率像, B; 高倍率像



図7 incadronate投与群におけるMMP-9の免疫染色  
A; 低倍率像, B; 高倍率像

ということが示されている<sup>21)</sup>。これらのことは破骨細胞は軟骨小腔横隔壁の吸収に少なくとも一義的な役割を持たないことを示唆している。したがって骨端—骨幹端境界面付近で観察された大型のTRAP陽性破骨細胞は軟骨小腔が開放されたのちに縦壁を吸収し、一次海綿骨から二次海綿骨へのリモデリングを行うのであって、横隔壁を開放するのは別の細胞であると考えられる。

我々は骨端—骨幹端境界面にある内皮細胞と思われる細胞と軟骨基質で強いMMP-9タンパクの発現を観察した。MMP-9は骨において高く発現するゼラチナーゼであり、軟骨マトリックスを分解することが知られている<sup>22)</sup>。それに加えて血管新生のactivatorを産生するか、もしくはinhibitorを不活性化させることで血管新生を誘導する機能を持つ<sup>23)</sup>。また、マウスにおけるMMP-9欠損が肥大軟骨のアポトーシスと血管新生、骨化を遅らせることが報告されている<sup>23)</sup>。これらのことよりMMP-9が血管侵入のための軟骨小腔の開放を行っている可能性が考えられる。MMP-9発現細胞が破軟骨細胞であるという報告があるが<sup>22-24)</sup>、

血管が侵入する骨端—骨幹端境界面には単核で小型のTRAP陽性細胞しか観察されなかった。加えて今回の結果と同様に、op/opマウスにおいても骨端—骨幹端境界面に強いMMP-9 mRNAの発現が観察されたことから、MMP-9発現細胞が破軟骨細胞である可能性は低いと考えられる。したがって、内皮細胞から分泌されたMMP-9が軟骨小腔横隔壁の吸収を行う可能性がある。一方、MMP-9を発現している細胞は内皮細胞表面のマーカーであるPECAM-1を発現する細胞と一致しないため、内皮細胞ではないという報告もある<sup>23)</sup>。本研究においても骨端—骨幹端境界面のMMP-9発現細胞が内皮細胞であるという証拠を示せなかったため、さらなる検討が必要である。

骨端—骨幹端境界面にある内皮細胞と軟骨基質でMMP-9同様、VEGFタンパクの強い発現が観察された。血管新生因子であるVEGFは肥大軟骨のリモデリングや骨化、血管新生と共役しており、肥大軟骨への侵入にVEGFが必要であることが報告されている<sup>25)</sup>。また内皮細胞だけでなく破骨細胞もVEGFのレセプター、Flt-1を発現しており、

VEGFは破骨細胞の分化を支持できる<sup>25,27)</sup>。しかしVEGFは二次骨化中心において血管形成の初期には発現せず、骨髄腔の形成と血管新生に関与することが報告されている<sup>28)</sup>。今回の観察においても骨端-骨幹端境界面でVEGFタンパクは主として内皮細胞で発現するのに対し、MMP-9は軟骨基質に強い発現が見られた。このことからVEGFは軟骨小腔が開放されたのちにautocrine的に血管侵入を誘導するのであって、軟骨小腔の開放にはMMP-9がより重要であると考えられる。

本研究では破骨細胞の機能を十分に阻害することが目的であったためincadronateを高用量で用いたが、対照群に比べincadronate投与群で長軸方向の成長が有意に抑制された。このことから成長期に大量のbisphosphonateを投与すると成長を阻害する可能性が考えられる。また特発性高ホスファターゼ血症と易骨折を示す男児に大量のpamidronateを投与したとき、骨生検で大理石骨病様の所見が観察された例も報告されている<sup>29)</sup>。またincadronateの投与時期によって海綿骨伸長に差が見られ、成長の初期に長期間投与するほど顕著に観察された。このことから成長期に投与する場合でも、時期によってbisphosphonateの影響の大きさが異なる可能性が考えられる。そのためbisphosphonateは骨の成長が終了したのちに骨吸収抑制剤として用いる場合は問題ないが、成長初期に多用するとなんらかの影響を及ぼすことが懸念される。

## 結 論

1. bisphosphonateで破骨細胞の機能を阻害すると、二次海綿骨へのリモデリングは生じないが、軟骨小腔横隔壁の吸収および骨端軟骨から一次海綿骨への移行に変化は見られなかった。

2. 軟骨小腔横隔壁の吸収に一義的役割を演じるのはMMP-9やVEGFを分泌する内皮細胞であり、破骨細胞は関与しないと考えられる。

本研究は、平成15、16年度文部科学省科学研究費補助金基盤研究(C)(2)研究代表者山崎章(課題番号15591945)の補助を受けて行われた。

本論文の要旨は第40回奥羽大学歯学会(平成17年11月12日 郡山市)において発表した。

## 文 献

- 1) 須田立雄, 小澤英浩, 高橋栄明: 第5章 骨の組織発生と成長. 骨の科学 第1版; 65-75 医歯薬出版 東京 1987.
- 2) Schipani, E., Lanske, B., Hunzelman, J., Luz, A. *et al.*: Targeted expression of constitutively active receptors for parathyroid hormone and parathyroid hormone-related peptide delays endochondral bone formation and rescues mice that lack parathyroid hormone-related peptide. *Proc Natl Acad Sci USA* **94**; 13689-13694 1997.
- 3) Komori, T., Yagi, H., Nomura, S., Yamaguchi, A. *et al.*: Targeted disruption of *Cbfa1* results in a complete lack of bone formation owing to maturational arrest of osteoblasts. *Cell* **89**; 755-764 1997.
- 4) Harinck, H. I., Papapoulos, S. E., Blanksma, H. J., Moolenaar, A. J. *et al.*: Paget's disease of bone: early and late responses to three different modes of treatment with aminohydroxypropylidene bisphosphonate (APD). *BMJ* **295**; 1301-1305 1987.
- 5) Thiebaud, D., Jaeger, P., Gobelet, C., Jacquet, A. F. *et al.*: A single infusion of the bisphosphonate AHPPrBP (APD) as treatment of Paget's disease of bone. *Am J Med* **85**; 207-212 1988.
- 6) Body, J. J.: Bone metastases and tumor-induced hypercalcemia. *Curr Opin Oncol* **4**; 624-631 1992.
- 7) Body, J. J.: Current and future directions in medical therapy: hypercalcemia. *Cancer* **88 Suppl** **12**; 3054-3058 2000.
- 8) Storm, T., Thamsborg, G., Steiniche, T., Genant, H. K. *et al.*: Effect of intermittent cyclical etidronate therapy on bone mass and fracture rate in women with postmenopausal osteoporosis. *N Engl J Med* **322**; 1265-1271 1990.
- 9) Lane, J. M., Khan, S. N., O'Connor, W. J., Nydick, M. *et al.*: Bisphosphonate therapy in fibrous dysplasia. *Clin Orthop* **382**; 6-12 2001.
- 10) Devogelaer, J. P.: New uses of bisphosphonates: osteogenesis imperfecta. *Curr Opin Pharmacol* **2**; 748-753 2002.
- 11) Lehmann, H. J., Mouritzen, U., Christgau, S., Cloos, P. A. *et al.*: Effect of bisphosphonates on cartilage turnover assessed with a newly developed assay for collagen type II degradation products. *Ann Rheum Dis* **61**; 530-533 2002.
- 12) Eggelmeijer, F., Papapoulos, S. E., van Paassen, H. C., Dijkmans, B. A. *et al.*: Clinical and biochemical response to single infusion of pamidronate in patients with active rheumatoid

- arthritis : a double blind placebo controlled study. *J Rheumatol* **21** ; 2016-2020 1994.
- 13) Cantatore, F. P., Acquista, C. A. and Pipitone, V. : Evaluation of bone turnover and osteoclastic cytokines in early rheumatoid arthritis treated with alendronate. *J Rheumatol* **26** ; 2318-2323 1999.
- 14) Fisher, J. E., Rogers, M. J., Halasy, J. M., Luckman, S. P. *et al.* : Alendronate mechanism of action : geranylgeraniol, an intermediate in the mevalonate pathway, prevents inhibition of osteoclast formation, bone resorption, and kinase activation in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA* **96** ; 133-138 1999.
- 15) Dunfold, J. E., Thompson, K., Coxon, F. P., Luckman, S. P. *et al.* : Structure-activity relationships for inhibition of farnesyl-diphosphonate synthase in vitro by nitrogen-containing bisphosphonates. *J Pharmacol Exp Ther* **296** ; 235-242 2001.
- 16) Coxon, F., Helfrich, M. H., Van'tHof, R., Sebt, S. *et al.* : Protein geranylgeranylation is required for osteoclast formation, fusion, and survival ; inhibition by bisphosphonates and GGTI-298. *J Bone Miner Res* **15** ; 1467-1476 2000.
- 17) Schenk, R. K., Spiro, D. and Wiener, J. : Cartilage resorption in the tibial epiphyseal plate of growing rats. *J Cell Biol* **34** ; 275-291 1967.
- 18) Solskolne, W. A. : The osteoclast-endothelium interface during bone resorption in the femurs of young rabbits. *Cell Tissue Res* **203** ; 487-492 1979.
- 19) Nakamura, H. and Ozawa, H. : Ultrastructural, enzyme-, lectin-, and immunohistochemical studies of the erosion zone in rat tibiae. *J Bone Miner Res* **11** ; 1158-1164 1996.
- 20) Martin, M. L. D., Ermond, R. V. B., Gabri, V. D. P., Antoinette, W. *et al.* : Dissociation of angiogenesis and osteoclastogenesis during endochondral bone formation in neonatal mice. *J Bone Miner Res* **17** ; 998-1007 2002.
- 21) 阿部守明 : 大理石骨病マウス (oc/oc) の骨格系の発育異常に関する研究—大腿骨骨幹端における軟骨内骨化の異常について—。奥羽大歯学誌 **24** ; 335-351 1997.
- 22) Vu, T. H. and Werb, Z. : Gelatinase B : structure, regulation, and function. In *Matrix Metalloproteinases*, W. C. Parks and R. P. Mecham, eds. (San Diego : Academic Press) 115-148 1998.
- 23) Vu, T. H., Shipley, J. M., Bergers, G., Berger, J. E. *et al.* : MMP-9/Gelatinase B is a key regulator of growth plate angiogenesis and apoptosis of hypertrophic chondrocytes. *Cell* **93** ; 411-422 1998.
- 24) Engsig, M. T., Chen, Q., Vu, T. H., Pedersen, A. *et al.* : Matrix metalloproteinase 9 and vascular endothelial growth factor are essential for osteoclast recruitment into developing long bones. *J Cell Biol* **151** ; 879-889 2000.
- 25) Jesus, A., Lorena, C., Rosa, S., Milagros, B. *et al.* : Expression patterns of matrix metalloproteinases and Vascular endothelial growth factor during epiphyseal ossification. *J Bone Miner Res* **20** ; 1011-1021 2005.
- 26) Gerber, H. P., Vu, T. H., Ryan, A. M., Kowalski, J. *et al.* : VEGF couples hypertrophic cartilage remodeling, ossification and angiogenesis during endochondral bone formation. *Nat Med* **5** ; 623-628 1999.
- 27) Nakagawa, M., Kaneda, T., Arakawa, T., Morita, S. *et al.* : Vascular endothelial growth factor (VEGF) directly enhances osteoclastic bone resorption and survival of mature osteoclasts. *FEBS Lett* **473** ; 161-164 2000.
- 28) Niida, S., Kaku, M., Amano, H., Yoshida, H. *et al.* : Vascular endothelial growth factor can substitute for macrophage colony-stimulating factor in the support of osteoclastic bone resorption. *J Exp Med* **190** ; 293-298 1999.
- 29) Whyte, M. P., Wenkert, D., Clements, K. L., McAlister, W. H. *et al.* : Bisphosphonate-induced osteoporosis. *N Engl J Med* **349** ; 457-463 2003.

著者への連絡先 : 奥山典子, (〒963-8011) 郡山市富田町字三角堂31-1 奥羽大学歯学部口腔病態解析制御学講座口腔病理学

Reprint requests : Noriko OKUYAMA, Department of Oral Medical Science, Oral Pathology, Ohu University School of Dentistry

31-1 Misumido, Tomita, Koriyama, 963-8611, Japan