

# 骨リモデリングにおける骨芽細胞を介した低濃度一酸化窒素の効果

宮 本 良 治

愛媛大学医学部整形外科

## *The effects of low NO concentrations on bone remodeling in osteoblasts*

YOSHIHARU MIYAMOTO

Department of Orthopaedic Surgery, School of Medicine, Ehime University

### Summary

Recent evidences implicate nitric oxide (NO) as a new, potentially important signaling molecule in the regulation of bone metabolism. In this study, the effects of NO on bone remodeling and fracture repair were investigated.

Bone mineral density (BMD) during fracture healing was measured. Treatment with L-NAME, a NOS inhibitor, significantly inhibited BMD of the fracture site at 4, 5 and 6 weeks after fracture.

Osteoclasts ( $5 \times 10^2$  cells/well) were cultured on dentin slice with osteoblasts ( $2 \times 10^4$  cells/well) for 24 hours and then the pit formation by osteoclast was measured. The addition of 30nM NOC18, a NO donor, significantly increased the area of pit formation.

Rat osteosarcoma cell line (ROS 17/2.8) and cultured rat osteoblasts were exposed to various concentrations of NOC18 (10nM  $\sim$  10  $\mu$ M) for 24 hours. The exposure of low NOC18 concentration (10  $\sim$  30nM) increased in the release of cytokines such as IL-6, IL-1  $\beta$  and IL-4. However, a higher concentration of NOC18 (1  $\mu$ M  $\sim$  10  $\mu$ M) demonstrated less of an effect. Cultured osteoblasts in the presence of 10mM glycerophosphate were exposed to various concentrations of NOC18 (10nM  $\sim$  10  $\mu$ M) for 4 weeks. The addition of 10nM NOC18 increased in areas of calcified nodules.

These findings suggest that a low concentration of NO activates osteoblasts, elevating cytokine release and activating bone formation. The released cytokine stimulates bone resorption of osteoclasts which contributes to bone remodeling. In conclusion, low concentrations of NO are necessary for bone metabolism.

### Key Words

nitric oxide, fracture healing, bone remodeling

### 【緒 言】

一酸化窒素 (nitric oxide, NO) は1980年 Furchgott の内皮由来弛緩因子 (endothelium derived relaxing factor, EDRF) の発見から始まった<sup>1)</sup>。1987年 EDRF が NO であると同定され<sup>2,3)</sup>、以後 NO の生理学的役割と

1999年12月15日受理 2000年2月4日採用

愛媛大学医学部整形外科



病理学的作用について血管内皮を中心とした循環系<sup>11-13)</sup>、中枢神経系<sup>14-16)</sup>、マクロファージを中心とした免疫系で細胞間シグナル伝達物質としての研究が報告されている<sup>17-19)</sup>。近年、骨代謝の領域においてもこの物質が注目され、研究報告が活発になってきている<sup>14-18)</sup>。

骨は、その形態と強度を維持しつつ、血清 Ca 濃度を維持するため、常に吸収と形成を繰り返すモデリングを営んでいる。骨リモデリングは、ホルモン、サイトカインに加え、局所での骨に加わる力学的負荷などによっても調節される複雑な機構である<sup>19-23)</sup>。骨吸収刺激に反応して骨組織からカルシウムを血中に動員しつつ、力学的負荷に応じて必要な部位での骨量や骨強度を維持している<sup>24-26)</sup>。骨は重力に抗して身体を支え、あるいは運動時には筋肉による負荷を受けるなど、常に力学的負荷にさらされているため、無重力状態や長期臥床など、力学的負荷の減弱により著明な骨量の減少を引き起こすことが知られている<sup>26-28)</sup>。力学的負荷は骨量維持に必須であると報告されているが<sup>29)</sup>、その機構については不明な点が多い。力学的負荷が骨形成系および骨吸収系に及ぼすシグナル機序については、近年精力的に解明されつつある。

以前から骨は与えられた応力に応じて骨リモデリングを起こすことが知られていたが<sup>30)</sup>、最近になり骨細胞のネットワークが力学的負荷に骨が反応するための重要な役割を担っていることが解明された<sup>31-33)</sup>。これを期に骨細胞による骨微小管内での fluid flow の感知、その後の NO 放出、プロスタグランジン産生の活性化など、シグナルカスケードが少しずつ明らかとなりつつある<sup>34-37)</sup>。力学的負荷は fluid flow を引き起こし、骨組織中の様々な細胞から骨量維持や骨リモデリングに必要な物質を産生させる重要な役割を演じている。骨芽細胞は骨代謝で中心的役割を果たす細胞であり、Vitamin D<sub>3</sub>、parathyroid hormone (PTH)、growth factors、cytokines などは骨芽細胞に作用して活性化する<sup>38-39)</sup>。また骨吸収を促進するとされている多くの調節因子は直接破骨細胞には作用せず、骨芽細胞に作用して局所調節因子が発現し、放出され、破骨細胞を活性化している<sup>40)</sup>。これらのことから骨リモデリング解明には、力学的負荷が引き起こす fluid flow によって産生された骨代謝調節因子が骨芽細胞に与える効果の研究が必要である。fluid flow で骨芽細胞が NO を迅速に産生することが報告されてから<sup>30,40)</sup>、NO は autocrine、paracrine 的に骨芽細胞に作用する骨リモデリングの最初のシグナルである可能性が示唆されてきた<sup>41)</sup>。そこで、実験的骨折モデルと培養細胞を用いて、骨折治癒過程における NO の役割の解明を試みるとともに、NO の骨リモデリングに対する細胞

間相互作用を生化学的、組織学的に研究した。

#### 【対象および方法】

##### 1) Wistar 系ラットの骨折モデル作製

実験動物には72匹の雌の Wistar 系ラット (5~6 カ月齢)、体重240~280 gを用いた。エチルエーテル吸入と pentobarbital 40 mg/kg の腹腔内注射による麻酔下に、両側の膝関節内側下部に約 5 mm の皮切を加え、脛骨結節部やや内側より径 1 mm のドリル穴を開け、径 0.5 mm、長さ30 mm の stainless wire を近位部より脛骨遠位端まで髓内釘として刺入した<sup>42,43)</sup>。

続いて、麻酔下に膝関節と足関節の midpoint が骨折部となるようにラットを台上に乗せた。この際、骨折をより確実にするため (前脛骨筋が邪魔にならないように) 下腿内側が上になるように体位を固定した。重さ 1 kg の重りを高さ15 cm より落下させ骨折させた (Fig. 1)<sup>44-46)</sup>。骨折部に髓内釘が確実に刺入しているかどうかを再度確認後、皮膚縫合した。

手術後、ラットには自由行動をさせたが、両下腿骨の骨折部には髓内釘が挿入されているために歩行は安定しており、後肢を引きずるような跛行は認めなかった。ラットには、標準固形食及び水を自由に摂取させた<sup>47)</sup>。

##### 2) 薬剤の投与および実験群

NO 合成酵素阻害剤である L-ニトロアルギニンメチルエステル (L-NAME) (Dojindo) を 15 mg/ml の濃度で生食 (0.9% NaCl) に溶解した。薬剤投与は骨折後、毎日腹腔内に投与した。L-NAME 群は L-NAME 60

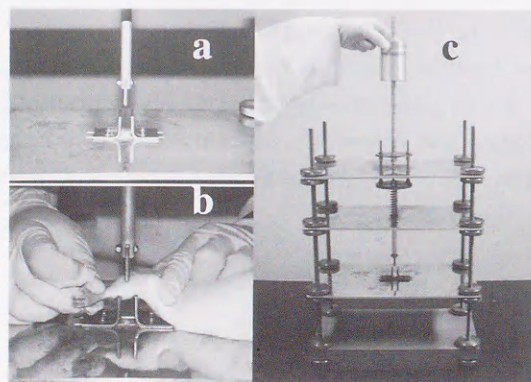


Fig. 1 The system for rat experimental fracture models.  
a: Fracture stage and fracture device.  
b: The hind limb of a rat was placed on the fracture stage and fracture device was attached to medial side of the tibia.  
c: The fracture was performed with the weight dropped from a height of 15 cm.

mg/kg body weight/day をラット腹腔内に注射した。Vehicle 群は生食 5 ml/kg/day の腹腔内注射をした。

##### 3) ラット骨折モデルの軟 X 線撮影による観察

骨折後 1~6 週の各週後に、各々の群から任意に 5 匹づつ標本として選択し、以下の要領で軟 X 線撮影を行った。pentobarbital 麻酔下に心臓脱血にて屠殺後、両側の脛骨と腓骨を筋組織をつけて摘出し、70% エタノールにて固定した。筋組織や骨膜などの軟部組織を丁寧に剥離し、stainless wire を抜去後に軟 X 線撮影装置 (Type SRO-M50, ソフロン) を用いて側面像を撮影した。各週ごとの軟 X 線写真を観察して骨折治癒段階の判定を行った<sup>43,47,48)</sup>。

##### 4) 骨塩量および骨塩密度の測定

軟 X 線撮影の後に骨塩量 (bone mineral content: BMC (mg)) および骨塩密度 (bone mineral density: BMD = BMC (mg)/area (cm<sup>2</sup>)) を dual energy x-ray absorptiometry (DXA) (DCS-600, アロカ) を用いて測定した<sup>49)</sup>。脛骨全体を 20 等分して仮骨の含まれる部分 5ヶ所を骨折部として、その BMD 値を測定し各週にて比較検討した。

##### 5) 血清中 Ca、P、ALP、Osteocalcin 値の測定

pentobarbital 麻酔下に心臓採血にて屠殺し、血清は分離採取して -80°C で保存した。Ca 濃度はカルシウム-HR キット (和光純薬) を用いて測定し、P 濃度は無機リン-HRII キット (和光純薬) を用いて測定した。Alkaline phosphatase (ALP) 活性は p-nitrophenol 法で測定した。osteocalcin は骨芽細胞が分泌する骨特有の基質蛋白であり、非コラーゲン性蛋白の中では最も量が多いため骨形成の指標とされている<sup>50)</sup>。osteocalcin 濃度は ELISA 法により osteocalcin diagnostic kit (Biomedical Technologies Inc.) を用いて測定した。

##### 6) 組織学的標本の作製のための処置

軟 X 線撮影を行わなかったラットは、組織学的および免疫組織学的標本作製のために灌流固定が施された。同様に麻酔後、4°C の novo heparin (10 IU/ml) 添加の Krebs-Ringer 液を下行大動脈から灌流・腹部大静脈より脱血し、続いて 4°C の PLP 固定液 (0.01 M lysine/0.05 M phosphatebuffer に 0.1 M リン酸二水素ナトリウムで pH 7.4 にした液と 8% paraformaldehyde を 3:1 で混合する) 100 ml を灌流し固定した。さらに、同じ 4°C の PLP 固定液で 48 時間浸漬し、後固定を施した。

##### 7) 組織学的標本作製

15% sucrose を含む 0.1 M phosphate buffer (以下 PB, pH 7.3) を用い、4°C、48 時間浸漬後、Björholm 法に準じ、4% EDTA および 2.43% sodium-

cacodylate 混合液 (pH 7.3, 4°C) にて脱灰した<sup>51)</sup>。得られた下腿標本は stainless wire を抜去した後、正中矢状面で二分した。標本は矢状面で 5 μm の切片を作製し、ヘマトキシリン・エオジン (以下 HE) 染色を行った。

##### 8) 骨芽細胞培養

Wistar 系ラット胎生 20 日より calvaria を採取した。4 mM EDTA (PBS で溶解) 37°C、15 分で 2 度処理した後、PBS で洗浄、0.1% collagenase で 37°C、10 分処理し、上清を除去した。次に 0.2% collagenase で 37°C、30 分を 2 度処理し、上清に浮遊した骨芽細胞を回収した。培養骨芽細胞は 10% fetal calf serum (FCS) (Filton) 添加 α-MEM 培養液 (Sigma) で 24 well plate dish (Nunc) 上に培養した。

##### 9) 骨形成能の測定

培養骨芽細胞の NO による骨形成能を評価するため、10 mM β グリセロリン酸 (Wako) 存在下 minimum essential medium (α-MEM) 培養液を用いて、NO donor である NOC18 (Dojindo) を 10 μM から 10 nM まで濃度を希釈して投与した。NO donor を含む培養液は 3 日に一度交換し、4 週間後に Von Kossa 染色をして calcified nodule の面積を画像解析プログラム NIH-image (for Macintosh) にて測定した<sup>52)</sup>。NO donor 非存在下での calcified nodule の面積を 1 とした比率にてそれぞれの NO donor 濃度での calcified nodule の面積を表した。

##### 10) サイトカイン測定

培養骨芽細胞およびラット骨肉腫由来細胞株 ROS 17/2.8 (理化学研究所) を用いた。ROS 17/2.8 細胞は 24 well plate dish (Nunc) 上に 3 × 10<sup>4</sup> cells/well の濃度で播種し、10% fetal calf serum (FCS) (Filton) 添加 α-MEM 培養液 (Sigma) を用いて培養した。培養骨芽細胞も同様に 24 well plate dish (Nunc) 上に 3 × 10<sup>4</sup> cells/well の濃度で播種し、10% fetal calf serum (FCS) (Filton) 添加 α-MEM 培養液 (Sigma) を用いて培養した。24 時間で medium 中に放出されたサイトカイン量は ELISA 法 (ELISA kit, 岩城硝子) を用いて IL-6, IL-1β, IL-4, TNF-α を測定した。放出量は Bradford 法に準じて測定した細胞蛋白量あたりで補正した<sup>53)</sup>。

##### 11) mRNA 測定

IL-6 mRNA の発現を調べるため、semi-confluent 時の培養骨芽細胞に NOC18 を 10 μM から 10 nM まで濃度を希釈して投与した。acid guanidinium phenol-chloroform 法にて、total RNA を抽出した<sup>34,54)</sup>。total RNA を reverse transcriptase にて cDNA を作製し、PCR を施行した。細胞内標準遺伝子として GAPDH にて補



正し、標準化した。IL-6 プライマーは 5'-GACTGATGTTGTTGACGACCCACTGC-3'-TAG C C ACTCCTTCTGTGACTAACT-3' を使用し、GAPDH プライマーは 5'-ACGACATACTCAGCACCAGCATC AC-3'-TGAAGGTCGGTGTGAACGGATTTGG-3' を使用した<sup>36),37)</sup>。IL-6 は熱変性 94°C、アニーリング 60°C、伸長反応 72°C、GAPDH は熱変性 94°C、アニーリング 65°C、伸長反応 72°C で行った。ともに 33 サイクルでは直線的増加部に位置していた。

#### 12) 破骨細胞の培養、共培養系の確立

生後約 10 日齢の日本白色家兎に pentobarbital 溶液を心注し、屠殺後、両側の大腿骨、脛骨、上腕骨、橈・尺骨を採取した。筋肉や骨膜などの付着している組織を取り除いた後に、採取した骨を  $\alpha$ -MEM 培養液中でハサミを用いて細片化した。大きな骨片を除去した後、細胞浮遊液を予め  $\alpha$ -MEM 培養液を含む type I collagen gel (新田ゼラチン) でコーティングしておいた 100 mm culture dish (Corning) に播き、3 時間培養した。この状態の細胞浮遊液は血球成分が混ざっているため、まず PBS と培養液で十分に gel 上を洗浄した後に、0.02% EDTA、0.001% pronase E を加えて室温で 15 分処理し、血球成分を除去した。次に、0.01% collagenase にて室温 5 分処理の後、洗浄して骨芽細胞を回収し、最後まで gel に付着している破骨細胞を 0.1% collagenase にて gel より剥がし回収した。回収した骨芽細胞と破骨細胞を用いて共培養系を確立した<sup>38)</sup>。

#### 13) NO の象牙吸収窩に対する効果

採取した破骨細胞の骨吸収能を調べるため象牙スライス上で培養した。象牙スライスは diamond saw (EXAKT) を用い、150~200  $\mu$ m の厚さに切り、パンチを用いて直径 6 mm の円形に採型し、超音波洗浄後 (Sine Sonic 100, shinmeidai)、約 30 分紫外線にて滅菌したものを使用した。culture medium にて洗浄した後に 96-Well plate の各 well に 1 枚づつ入れ、その上から約  $5 \times 10^3$  個の破骨細胞を含んだ細胞浮遊液を加え、37°C に設定した CO<sub>2</sub> incubator (5% CO<sub>2</sub>) 内で 24 時間培養した。この際 NOC18 30 nM 存在下の NO 投与群とコントロール群の 2 群を作製した。更に破骨細胞数の 10 倍量 (約  $5 \times 10^3$  個/well) の骨芽細胞との共培養、40 倍量 (約  $2 \times 10^4$  個/well) の骨芽細胞との共培養を作製した。培養後、象牙スライス上の細胞成分を除去するため、30 分間の超音波洗浄を行った。次いで 3% グルタルアルデヒド (Wako) および 0.15 M カコジル酸 (Hani) の混合溶液を用いて 10 分間固定し、0.1% トリジンブルー (Merck) および 0.1% ホウ酸 (Wako) の混合溶液にて染色を行った<sup>39)</sup>。吸収窩を光学顕微鏡で観察し、

NIH-image 画像解析装置を用いてその面積を測定した<sup>40),41)</sup>。

#### 14) 統計処理

統計処理は、analysis of variance (ANOVA)、Fischer's protected LSD test を用いて多重比較検定を行った。

なお、この実験は愛媛大学医学部動物実験指針に従い、愛媛大学医学部付属動物実験施設を利用して行った。

### 【結 果】

#### 1 Wistar 系ラットの骨折治癒における L-NAME 投与の影響

##### 1) 軟 X 線撮影による骨折治癒過程の経時的観察

stainless wire の破損を 4 肢認め、以後の検索から除去し、116 肢を検索した。それ以外は骨折後のいずれの時期においても骨折部の転位を認めず、良好な固定と肢位の保持が得られており、偽関節をきたしたものは認められなかった。

Vehicle 群の X 線所見は骨折後 1 週には骨膜の膨隆がわずかに認められるのみで、明らかな仮骨形成はまだ認められなかった。2 週目には架橋型の新生仮骨が出現し始め、3 週目にはほぼ均一な骨塩沈着を示す骨性仮骨を認めるようになった。4 週目より骨性仮骨の増強を認め、5 週目になると骨梁の連続性が認められるようになり、6 週目にはほぼ骨改変が完了している所見を得た。一方 L-NAME 群では 3 週目までは明らかな違いを認めなかった。しかし、4 週目で骨性仮骨量の増強が認められず、5 週目のリモデリングも遅れており、6 週目になってようやく骨梁の連続性が認められるようになった。約 1 週間のリモデリングの遷延を認めた (Fig. 2)。

##### 2) ラット骨折モデルにおける組織学的標本の経時的変化

HE 染色を施した新生仮骨形成部位を経時的に観察した。Vehicle 群の骨折後 1 週目では、骨折部は出血巣が線維性結合組織に置換され、軟骨の形成が認められた。外骨膜性骨化所見も認められ、両側の係留仮骨が接近するように軟骨組織が増殖していた。2 週目には軟骨形成が著明に認められ、軟骨組織が新生骨に置換される、いわゆる内軟骨性骨化が進行していた。また、骨芽細胞で縁取られた新生仮骨形成を著明に認めるようになり、破骨細胞も散見するようになった。3 週目には、徐々に軟骨組織から新生骨への置換が進み、骨膜性骨化は厚みを増してきていた。骨膜性骨化と内軟骨性骨化の連続する所見も認めた。そして破骨細胞は更に目立つようになり、骨改変の始まりを認めた。4~5 週目には、骨改変の所見はさらに進行し、6 週目では新しい皮質骨が骨折部を

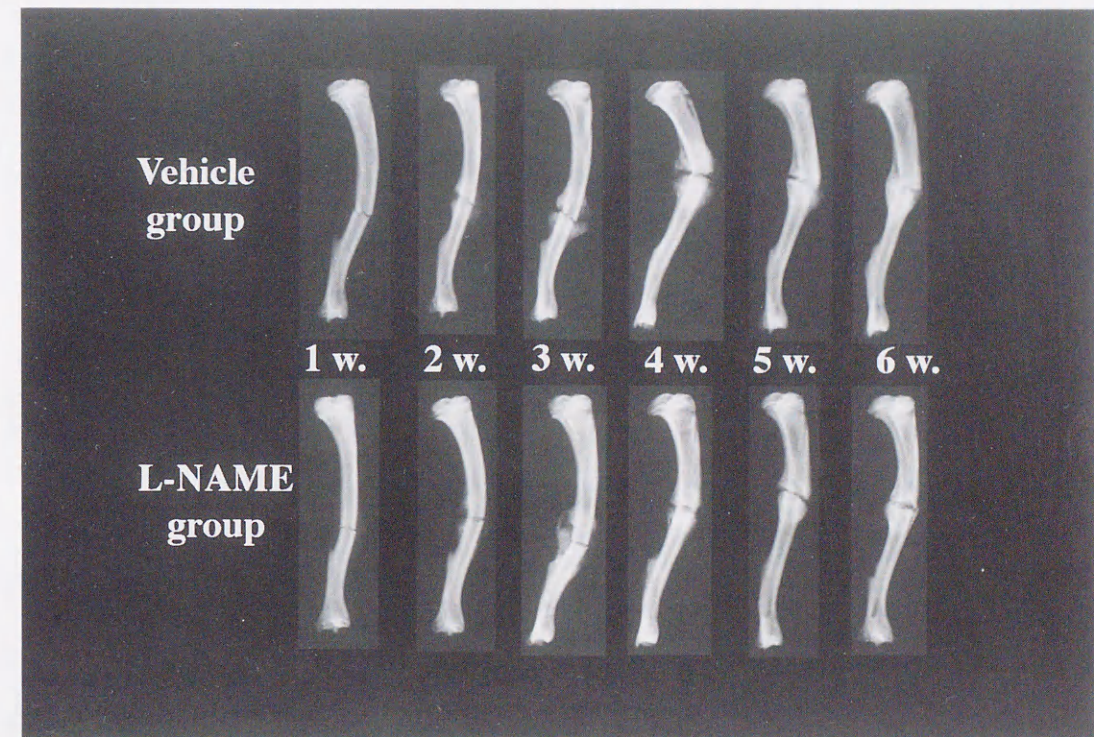


Fig. 2 Soft x-ray Photograph of rat fractured tibiae.

Radiographies of both L-NAME (60mg/kg/day) and vehicle treated rats were taken at the indicated period after the fracture. Treatment of L-NAME inhibited the amount of callus formation at 4, 5 and 6 weeks after the fracture.

覆い、新生原始海綿骨の骨改変もほぼ完了している所見を得た。

一方、L-NAME 投与群においては 2 週目まではほぼ同様の経過をたどり軟骨形成も良好で内軟骨性骨化による新生仮骨形成も認めた。しかし、3 週目になると軟骨形成の面積に比べ内軟骨性骨化中心が少なくその周囲に線維芽細胞様の形態を示す細胞を認めた。破骨細胞により 1 次骨梁が構築され骨芽細胞とのリモデリングで成熟骨梁へと進展する過程に、骨芽細胞の基質産生を含めた石灰化の過程の遅れを認めた (Fig. 3)。5 週目も 1 次骨梁から成熟骨梁へと進展する過程が遅れ、6 週目では骨改変がほぼ完了するはずであるが、L-NAME 投与群ではまだ完全な架橋形成ができておらず、Vehicle 群の 5 週目程度の骨リモデリングの状態であった。

##### 3) 骨折部骨塩密度の経時的変化

骨折部の骨塩密度 (BMD) は、骨折後 1, 2, 3 週は有意差を認めないが、4 週目以降は L-NAME 投与群の方が Vehicle 群より有意に低下していた ( $p < 0.01$ ) (Fig. 4)。

##### 4) 血清中 Ca, P 値の変動

血清 Ca, P 値は正常範囲内を推移し、L-NAME 投与群と Vehicle 群には有意差はなかった (Table 1)。

##### 5) 血清中 ALP 値の変動

Vehicle 群は骨折後 2 週目に最高値を示すが L-NAME 投与群は遅れて 3 週目に最高値に達していた (Fig. 5)。

##### 6) 血清中 osteocalcin 値の変動

1 週目から 3 週目にかけて血清 osteocalcin 値は Vehicle 群、L-NAME 群ともに急速に増加を示した。Vehicle 群が L-NAME 群に比べて高い傾向を認めたが、有意差を認めなかった。4 週目から 6 週目にかけて 2 群ともに増加率は減少したが依然として Vehicle 群がやや高い傾向にあるが有意差を認めなかった (Fig. 6)。

##### 2 共培養系での破骨細胞の骨吸収窩

Control 群と 30 nM NOC18 投与群において共培養の条件を変化させた。NOC18 投与群および control 群は破骨細胞単独培養に比べ共培養系では、骨芽細胞数が増すほど吸収窩が増加した。破骨細胞のみの培養系では、



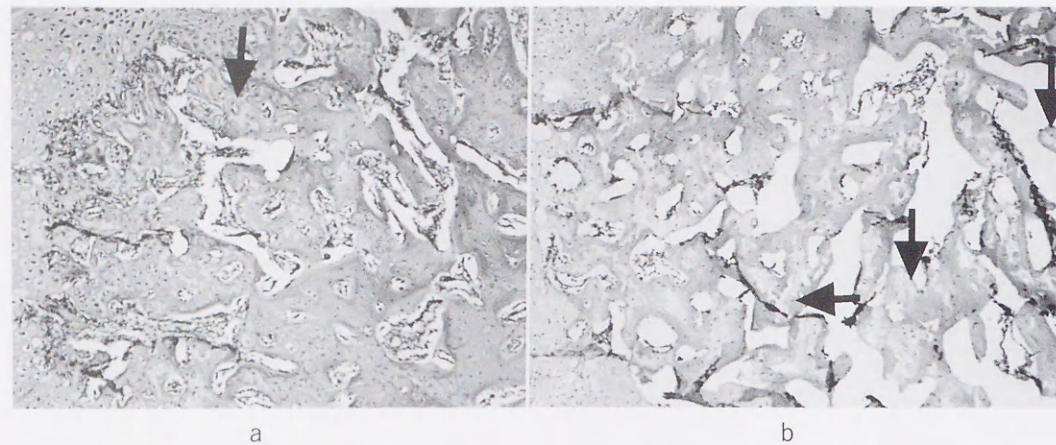


Fig. 3 HE staining of the newly-formed tissue of rat tibia during fracture healing.

The specimens were obtained from vehicle and L-NAME-treated rats perfused intravascularly through descending aorta with PLP solution. Photomicrographs of sagittal sections from tibia at 5 weeks after the fracture showed a transition of immature trabecula into mature trabecula.

a: The photomicrograph from callus of vehicle treated rat showed the immature trabecula (arrow) localized around enchondral ossification (original magnification  $\times 200$ ). The center of the trabecula poorly stained.

b: The photomicrograph from callus of L-NAME-treated rat showed the immature trabecula (arrows) widely extended within the callus (original magnification  $\times 200$ ). This suggests that treatment of L-NAME delayed the production of matrix from osteoblasts and mineralization.

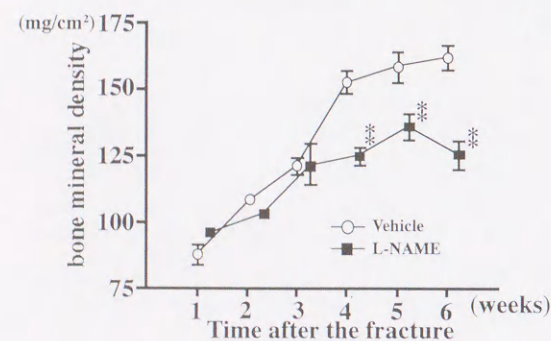


Fig. 4 Time course study of BMD at the fracture site during fracture healing with or without L-NAME.

BMD was measured both L-NAME (60mg/kg/day) and vehicle treated rats at the indicated period after the fracture using DXA. The treatment of L-NAME significantly inhibited the values of BMD at 4, 5 and 6 weeks after the fracture. Data are expressed as mean  $\pm$  S.E. (n = 10).

\*  $p < 0.01$ , significantly different from vehicle group.

NOC18 投与群は control 群と比べ吸収窩の面積には有意差を認めなかった。破骨細胞にその10倍量の骨芽細胞を加えた共培養系においては、NOC18 投与群は control 群より吸収窩の面積が大きい傾向が認められたが有意差を認めなかった。しかし、破骨細胞に40倍量の骨芽細胞を加えた共培養系においては、NOC18 投与群は control 群より有意に吸収窩の面積が増加した (Fig. 7)。

### 3 骨芽細胞における NO の効果

#### 1) NO による骨芽細胞からのサイトカインの放出

培養骨芽細胞において IL-6 放出量は 30 nM, 100 nM の NOC18 投与によって有意に放出量の増加を認めた ( $P < 0.01$ ) (Fig. 8a)。さらに NOC18 投与量を増すと IL-6 放出量は抑制された。ROS 17/2.8 においては 10 nM NOC18 投与によって control より増加する傾向にあるが有意差はなく、さらに NOC18 の濃度上昇につれ放出量は減少し 10  $\mu$ M では control より有意に低下していた ( $P < 0.05$ ) (Fig. 8b)。培養骨芽細胞での IL-1 $\beta$  放出量は 10 nM, 30 nM NOC18 投与により有意に増加した ( $P < 0.05$ ) (Fig. 9a)。さらに NOC18 投与量を増すと IL-1 $\beta$  放出量は抑制された。ROS 17/2.8 においては 10 nM NOC18 投与により control より増加する傾向にあるが有意差はなく、さらに NOC18 の濃度上昇につれ

Table 1 Serum calcium and phosphate were measured after fracture.

Samples were collected from L-NAME (60mg/kg/day) and vehicle treated rats at the indicated period after the fracture. The values of L-NAME-treated group were not significantly different from those of vehicle group. Data are expressed as mean  $\pm$  S.D. (n = 5).

Table 1. Results of serum analysis

(weeks)	L-NAME group		Vehicle group	
	Ca	P	Ca	P
0	11.2 (0.11) mg/dl	8.7 (0.72) mg/dl	11.2 (0.11) mg/dl	8.7 (0.72) mg/dl
1	11.1 (0.25)	8.3 (0.46)	10.4 (0.25)	7.1 (1.10)
2	10.7 (0.32)	6.6 (0.91)	10.4 (0.51)	7.2 (0.85)
3	10.6 (0.25)	6.6 (0.52)	10.3 (0.19)	6.0 (0.44)
4	10.5 (0.18)	8.0 (0.62)	10.7 (0.15)	7.1 (0.43)
5	11.0 (0.87)	7.8 (1.02)	10.5 (0.24)	7.4 (0.81)
6	10.8 (1.13)	8.1 (1.41)	10.6 (0.95)	7.1 (0.80)

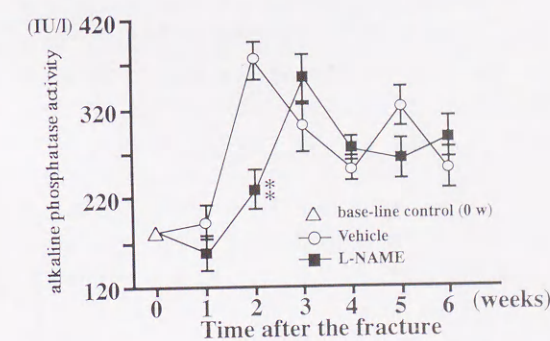


Fig. 5 Serum ALP change after the fracture. Samples were collected from L-NAME (60mg/kg/day) and vehicle treated rats at the indicated period after the fracture. The peak value of ALP was obtained at 2 weeks after the fracture in vehicle treated group and at 3 weeks in L-NAME-treated group. The values of ALP in L-NAME-treated group at 2 weeks after the fracture were significantly lower than those of vehicle group. Data are expressed as mean  $\pm$  S.E. (n = 5).

\*  $p < 0.01$ , significantly different from vehicle group.

放出量は減少し、100 nM 以上の NOC18 投与により control に比べ有意に低下していた ( $P < 0.05$ ) (Fig. 9b)。また、IL-4 放出量は 10 nM, 30 nM の NOC18 投与によって有意に放出量の増加を認めた ( $P < 0.01$ )、さらに NOC18 の濃度上昇につれ放出量は減少し 100 nM, 1  $\mu$ M では control より有意に低下していた ( $P < 0.05$ ) (Fig. 10)。一方、培養骨芽細胞での TNF- $\alpha$  放出量は

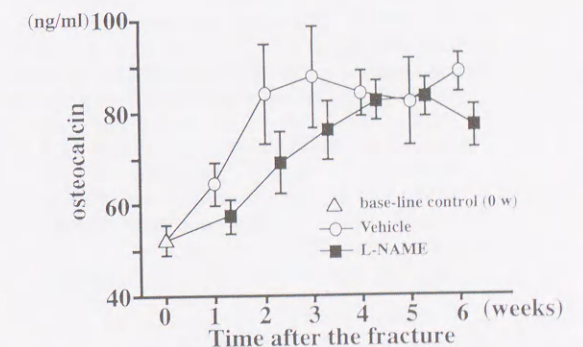


Fig. 6 Serum osteocalcin change after the fracture. Samples were collected from L-NAME (60mg/kg/day) and vehicle treated rats at the indicated period after the fracture. The value of osteocalcin in L-NAME-treated group was not significantly different from those of vehicle group. Data are expressed as mean  $\pm$  S.E. (n = 5).

NOC18 の濃度上昇につれ放出量が減少する傾向があり、10  $\mu$ M では control より有意に低下していた ( $P < 0.05$ ) (Fig. 11a)。ROS 17/2.8 は NOC18 の濃度上昇につれ放出量が減少し、30 nM 以上の NOC18 投与により control に比べ有意に低下していた ( $P < 0.01$ ) (Fig. 11b)。

#### 2) IL-6 mRNA 発現

RT-PCR により IL-6 mRNA 発現量を調べた。PCR 33 cycle では IL-6、GAPDH ともに直線的増加部位であった。GAPDH mRNA 発現量は各 NOC18 濃度で均



一のバンド強度を示し、IL-6 mRNA 発現量は30 nM NOC 18 投与により mRNA が増加していた (Fig. 12)。

### 3) 骨芽細胞の骨形成能の評価

NOC18 非存在下の control における calcified nodule の面積を1とした比率で比較検討した。10 nM の NOC18 投与において control より calcified nodule の面

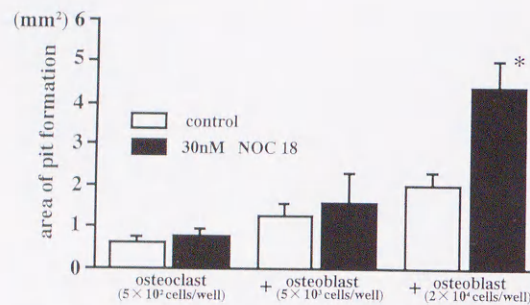


Fig. 7 Area of pit formation by osteoclasts cocultured with various number of osteoblasts.

Cells were cultured on dentin slice with or without addition of NOC18 for 24 hours, then area of pit formation was measured. Addition of 30nM NOC18 significantly increased the area of pit formation in the presence of osteoblasts ( $2 \times 10^4$  cells/well). Data are expressed as mean  $\pm$  S.E. (n=6).

\*p<0.05, significantly different from control.

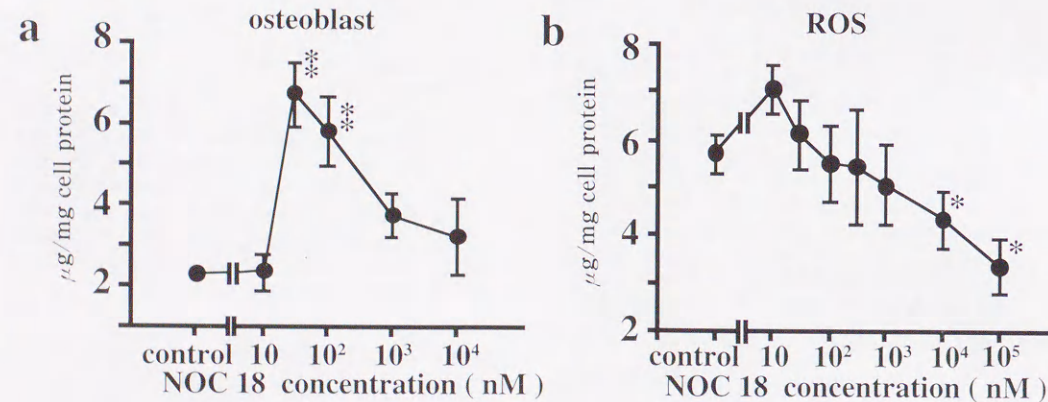


Fig. 8 IL-6 release from cultured rat osteoblasts and ROS (17/2.8) by NOC18 exposure. Cultured cells were exposed to indicated concentration of NOC18 for 24 hours, then IL-6 concentration in the media was measured.

a: Exposure to 30nM and 100nM NOC18 significantly increased IL-6 release from cultured rat osteoblasts in the medium.  
b: IL-6 release from ROS (17/2.8) was dose dependently inhibited by NOC18 addition. Exposure to 10  $\mu$ M and 100  $\mu$ M NOC18 significantly inhibited IL-6 release from ROS(17/2.8) in the medium. Data are expressed as mean  $\pm$  S.E. (N=6).

\* p<0.05, \*p<0.01, significantly different from the control.

積が増加していた。しかし、NOC18 濃度が1  $\mu$ M, 10  $\mu$ M と増加すると control より calcified nodule の面積は有意に低下した (P<0.05) (Fig. 13)。

### 【考 察】

骨芽細胞から産生された NO の影響については、高濃度の NO が ALP 活性を抑制したり<sup>18),62)</sup>、破骨細胞の apoptosis を誘導することが報告されている<sup>17),63)~67)</sup>。低濃度 NO が骨リモデリング維持に必要な細胞間シグナルである可能性を示唆する報告は散見されるが<sup>9),41),68),69)</sup>、NO に引き続きおこる細胞相互間のシグナルや調節因子に関しては明らかになっていない。

正常骨組織における骨リモデリングに NO がどの程度関わっているかを研究するために、L-NAME 投与を行って、骨組織での NO の放出とその効果を減弱させた骨折モデルラットを作製した。骨折の仮骨中における骨形成は、内軟骨性骨化と呼ばれ、軟骨性仮骨への新生血管の進入、破軟骨細胞による軟骨の吸収、骨芽細胞による新生骨の形成という過程を経て完成する。この過程は骨端の成長板における骨形成の過程とよく似ており、骨リモデリングは骨形成的に傾いていると考えられる。そのため NO が骨形成的に作用していれば L-NAME で NO の効果が抑制され、リモデリングの差の確認が可能だと考えられた。実際、骨折後6週目において Vehicle 群では骨癒合が完成しているのに対して、L-NAME 群は骨

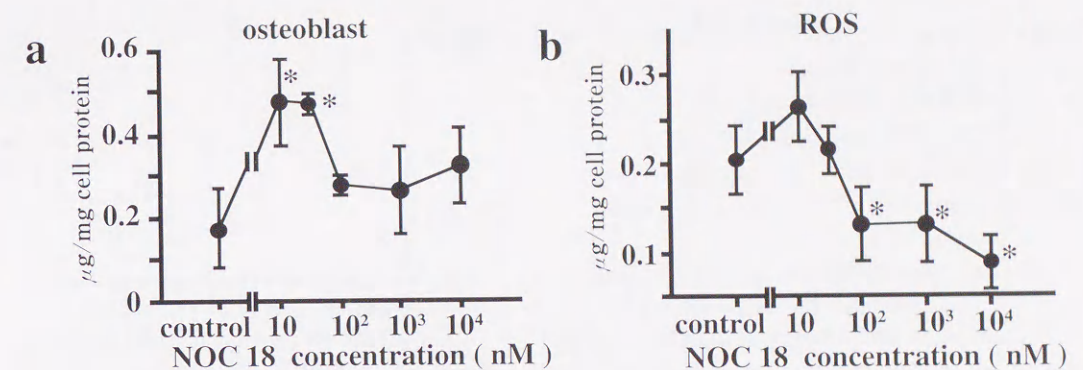


Fig. 9 IL-1 $\beta$  release from cultured rat osteoblasts and ROS (17/2.8) by NOC18 exposure. Cultured cells were exposed to indicated concentration of NOC18 for 24 hours, then, IL-1 $\beta$  concentration in the media was measured.

a: Exposure to 30nM and 100nM NOC18 significantly increased IL-1 $\beta$  release from cultured rat osteoblasts in the medium.

b: Exposure to 10nM NOC18 tended to increase IL-1 $\beta$  release from ROS (17/2.8) in the medium. IL-1 $\beta$  release from ROS (17/2.8) was dose-dependently inhibited by addition of NOC18 greater than 30nM. Exposure to 100nM, 1  $\mu$ M and 10  $\mu$ M NOC18 significantly inhibited IL-1 $\beta$  release from ROS (17/2.8) in the medium. Data are expressed as mean  $\pm$  S.E. (N=6).

\* p<0.05, significantly different from the control.

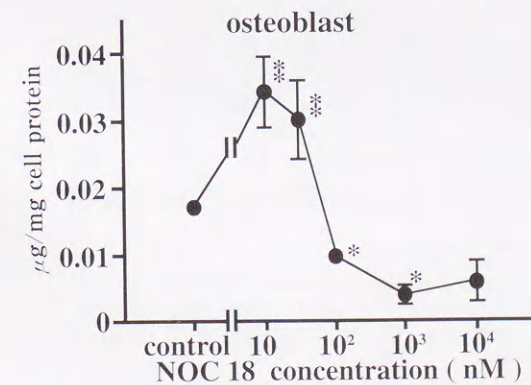


Fig. 10 IL-4 release by NOC18 exposure. Cultured rat osteoblasts were exposed to indicated concentration of NOC18 for 24 hours, then IL-4 concentration in the media was measured. Exposure to 10nM and 30nM NOC18 significantly increased level of IL-4 in the medium. Exposure to 100nM and 1  $\mu$ M NOC18 significantly inhibited level of IL-4 in the medium. Data are expressed as mean  $\pm$  S.E. (N=6).

\*p<0.05, \*p<0.01, significantly different from the control.

癒合が遅れており、リモデリングの差を認めた。

骨折部の軟 X 線写真による分析結果では、L-NAME 群、Vehicle 群ともに3週目では石灰化は未成熟で架橋形成途上の仮骨、すなわち soft callus の状態であり3週目までは特に骨折治癒段階に差を認めなかった。4週目から L-NAME 群は明らかな仮骨量の低下と骨折治癒段階の遅れを示し始めた。仮骨は、成熟骨を形成する mineral 成分と、軟骨および膠原線維等を形成する matrix 成分を含んでいるが、この bone mineral 量を、DXA により骨折部 BMD 値として測定した。この値は軟 X 線所見と一致し、L-NAME 群の BMD 値は Vehicle 群に比べ4週以降は有意に低下し、4週目で13%、5週目で25%、6週目で25%低下していた。組織学的に検討すると、2週目における軟骨基質の形成は L-NAME 群においても良好であった。組織学的に違いを認めるのは3週日以降で、L-NAME 群では破軟骨細胞が出現して、軟骨から骨へ迅速に置換されるのが遅れていた。さらに、骨芽細胞により1次骨梁が構築され、破骨細胞とのリモデリングで成熟骨梁へと進展する過程に、骨芽細胞の基質産生を含めた石灰化の過程の遅れを認めた。

NO には血管拡張作用がよく知られており<sup>70)~72)</sup>、骨折治癒において十分な血流が維持されることは骨折治癒の必要条件と考えられる<sup>73)~76)</sup>。実際、骨折仮骨での NO 合



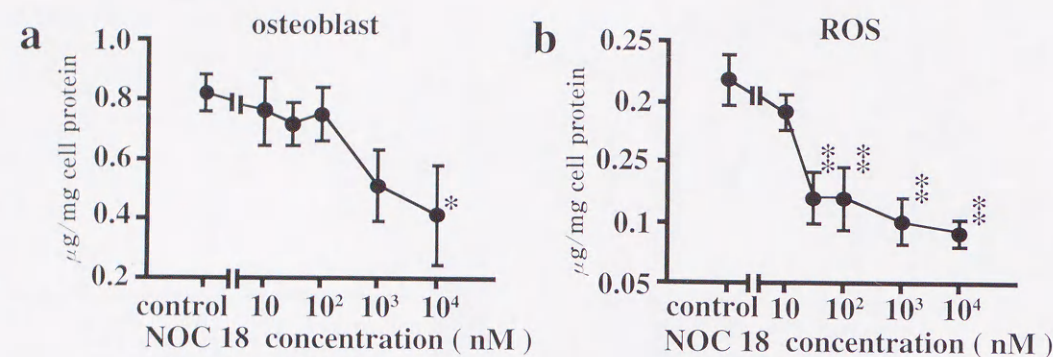


Fig. 11 TNF- $\alpha$  release from cultured rat osteoblasts and ROS (17/2.8) by NOC18 exposure. Cultured cells were exposed to indicated concentration of NOC18 for 24 hours, then TNF- $\alpha$  concentration in the media was measured.

a: TNF- $\alpha$  release from cultured osteoblasts was dose dependently inhibited by addition of NOC18. Exposure to 10  $\mu$ M NOC18 significantly inhibited TNF- $\alpha$  level in the medium. b: TNF- $\alpha$  release from ROS (17/2.8) was dose-dependently inhibited by addition of NOC18. TNF- $\alpha$  release from ROS (17/2.8) was significantly inhibited by addition of NOC18 greater than 30nM.

Data are expressed as mean  $\pm$  S.E. (N=6).

\*p<0.05, (\*\*)p<0.01, significantly different from the control.

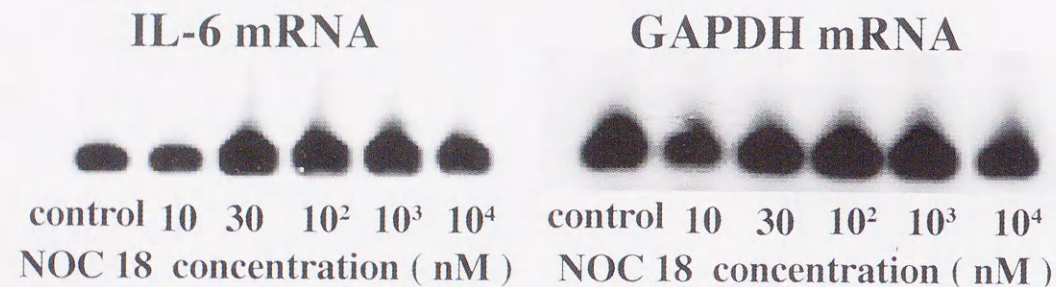


Fig. 12 RT-PCR analysis of IL-6mRNA expression.

Cultured rat osteoblasts were exposed to indicated concentration of NOC18 for 3 hours. Total RNA was obtained by AGPC method, then the PCR of IL-6 and GAPDH were performed in 33 cycles. Exposure to 30nM, 100nM, 1  $\mu$ M NOC 18 increased IL-6 mRNA expression.

成酵素の mRNA を in situ hybridization を用いて検討し、骨折後 1 日目より皮質骨血管内皮での endothelial nitric oxide synthase (eNOS) 発現の報告がある<sup>20</sup>。これは骨折部への血流増加を促進するのに合目的と考えられる。本実験では組織学的に 2 週目まで軟骨基質産生において Vehicle 群、L-NAME 群の間に差を認めず、両群ともに軟骨形成は良好であった。骨折治癒初期における血流量の差は軟骨基質産生にも影響を及ぼすと考えられるが、両群の軟骨基質産生には差を認めず、骨折治癒初期には血流量の影響は少なかった。次に、骨芽細胞の NO による活性化を研究した。2 週目より骨折仮骨内の

骨芽細胞で inducible NOS (iNOS) が強く発現することが報告され<sup>21</sup>、骨折治癒過程で骨芽細胞が活発に NO を産生すると推測されている。また軟骨性仮骨の中で骨芽細胞の出現は骨折後 9 日頃であると報告されている<sup>22</sup>。本研究において骨芽細胞の骨形成マーカーである血清 ALP 値は骨折後 2 週目に有意差を認め、Vehicle 群は L-NAME 群に比べ有意に増加していた。血清 ALP 値は Vehicle 群では骨折後 2 週目に最高値を示し、L-NAME 群では約 1 週間遅れて 3 週目に最高値を示した。同様に骨形成マーカーである血清中の osteocalcin も骨折後 2 週目と 3 週目において Vehicle 群は L-

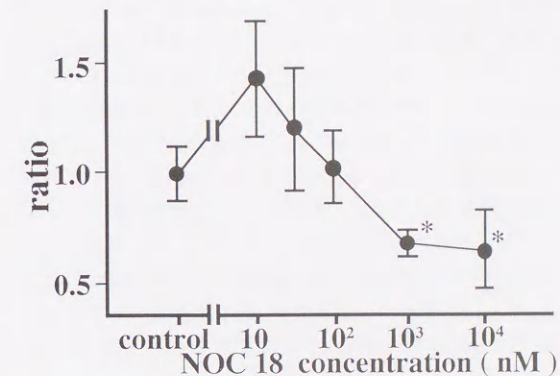


Fig. 13 Area of calcified nodules in cultured osteoblast cells.

Cultured osteoblasts in the presence of 10mM  $\beta$ -glycerophosphate were exposed to indicated concentration of NOC18 for 4 weeks. Data was evaluated for the ratio of the control without NOC18. Addition of 10nM NOC18 tended to increase area of calcified nodules. Addition of 1  $\mu$ M and 10  $\mu$ M NOC18 significantly decreased area of calcified nodules.

Data are expressed as mean  $\pm$  S.E. (N=6).

\* p < 0.05, significantly different from the control.

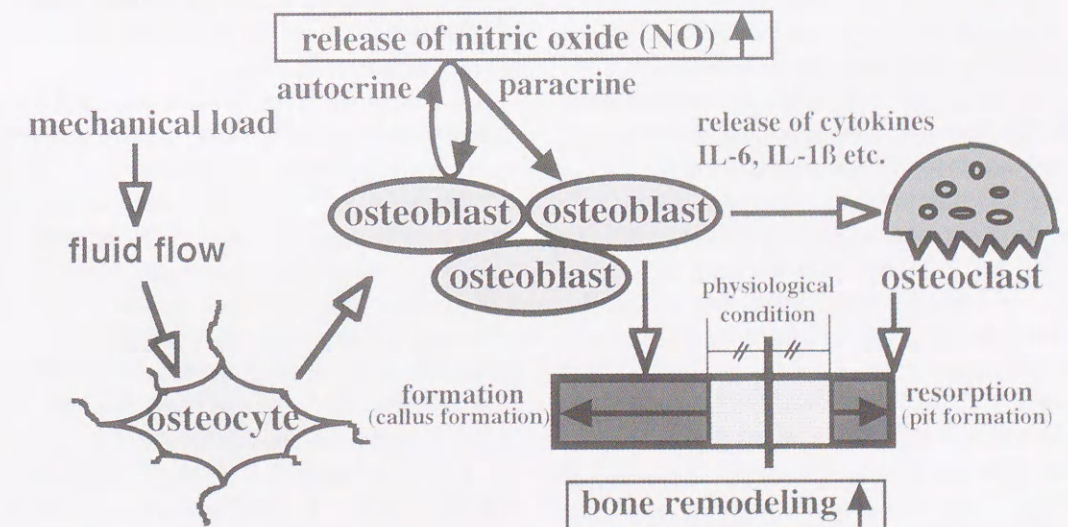


Fig. 14 Schema of presumed mechanism on bone remodeling in this study.

Osteoblasts are activated by mechanochemical transduction from osteocytes and release NO. NO activates osteoblasts by autocrines and/or paracrines. Activated osteoblasts stimulate osteoclastic resorption by release of cytokines and accelerate bone formation by osteoblasts. Both bone formation and resorption are important factors for bone remodeling.



では30 nM NOC18を投与すると、controlに比べ破骨細胞は若干骨吸収窩の面積を増加させるが有意の増加ではなかった。しかし、骨芽細胞 ( $2 \times 10^4$  cells/well) を多くした条件の共培養系では破骨細胞の骨吸収能は30 nM NOC18投与により、controlに比べ骨吸収窩の面積が約2倍に有意な増加を示した。骨芽細胞との共培養で破骨細胞の骨吸収活性が増強されることは諸家の報告があり<sup>81),82)</sup>、本研究においては30 nM NOC 18投与により骨芽細胞を介して骨吸収因子の産生を増強し、破骨細胞の骨吸収活性が増強されることが強く示唆された。

培養骨芽細胞とROS (17/2.8)において、NOC18が10~30 nMの低濃度領域ではIL-6, IL-1 $\beta$ , IL-4の放出量を増加させること、TNF- $\alpha$ の放出量はNOC18投与により濃度依存的に減少することを明らかにした。これらのサイトカインは骨芽細胞にレセプターがあり、骨芽細胞を介して破骨細胞の骨吸収を調節し、IL-4は骨吸収を抑制すること<sup>83),84)</sup>、IL-6, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ は骨吸収を活性化することが報告されている<sup>85)</sup>。本研究においてNOC18投与によるROS (17/2.8)でのIL-4産生は測定限界以下であり、培養骨芽細胞によるIL-4放出量もIL-6放出量の約1/100であった。さらに共培養系において30 nM NOC 18が骨吸収窩の面積を増加させた結果から、骨吸収を抑制するサイトカインであるIL-4はNOによる調節を受けているが、低濃度のNOC 18投与時のIL-4の骨芽細胞に対する影響は少ないと考えられた。また、閉経後estrogen欠乏による骨吸収活性上昇はIL-6, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ の上昇が中心的役割を担っているとの報告がある<sup>86)~89)</sup>。本研究において低濃度領域のNOC 18投与がIL-6, IL-1 $\beta$ 放出量を増加させたことは、共培養で破骨細胞が骨吸収窩の面積を増加させる機序を説明する有力な現象と考えられた。培養骨芽細胞において低濃度領域のNOC 18投与ではTNF- $\alpha$ 放出量はほとんど変化していないため、中心的な吸収性サイトカインの1つではあるが、低濃度領域のNOC 18投与でのTNF- $\alpha$ を介する効果発現の影響は少ないと考えられた。骨芽細胞は吸収性サイトカイン以外にも様々な調節因子を放出しているが<sup>90)~92)</sup>、本研究において培養骨芽細胞が同様に10 nM NOC18という低濃度で、calcified noduleを増加させ、低濃度NOは骨芽細胞に作用し骨形成を促進していることが示唆された。

高濃度NOや高濃度サイトカインが放出される病的状態、いわゆる炎症状態においては臨床上、骨溶解を示すことが多い。しかし、絶えず繰り返される骨リモデリングではfluid flowを感知した骨細胞からの刺激で骨芽細胞がNOを産生することが知られている<sup>34),40)</sup>。この低濃度NOが細胞微少環境でautocrine, paracrine的に

作用して骨芽細胞を活性化していると考えられる。低濃度NOは骨芽細胞から吸収性サイトカインを放出することにより、破骨細胞を活性化し吸収窩の面積を増加させ、その一方で低濃度NOは骨芽細胞の骨形成活性を上昇させることが分かった。これらから、NOは骨形成と骨吸収の両方を活性化させ、骨リモデリングの代謝回転を促進させることが判明した (Fig. 14)。さらにL-NAMEが骨折治癒後期の骨リモデリングを遅延させる結果から、NOは骨折治癒後期のリモデリングに寄与しており、正常な骨折治癒を得るにはNOが必要であることを明らかにした。

### 【結 論】

(1) 実験的骨折モデルにおいてNO合成酵素阻害剤L-NAME (60 mg/kg/day)投与は骨折治癒過程の遅延と4週目以降のBMD値の低下を示した。これによりNOは骨形成、リモデリングに寄与していると考えられた。

(2) 破骨細胞と骨芽細胞の共培養系では、NO供与体であるNOC 18を低濃度投与することにより骨吸収窩面積が有意に増加した。

(3) 培養骨芽細胞とラット骨肉腫由来細胞株 (ROS 17/2.8)において、低濃度領域のNOC 18は吸収性サイトカインであるIL-6, IL-1 $\beta$ を有意に上昇させ、高濃度領域のNOC 18はサイトカイン放出を抑制した。

(4) 培養骨芽細胞において低濃度NOC18投与によりcalcified noduleの面積が増加した。

以上のことから、低濃度NOは骨形成と骨吸収の両方を活性化させ、骨リモデリングの代謝回転を促進させることが分かった。また、骨折治癒においてはNOは骨折治癒後期のリモデリングに寄与していることが判明した。

### 【謝 辞】

稿を終えるにあたり、御指導、御校閲を賜りました、愛媛大学整形外科、柴田大法名誉教授、山本晴康教授に深甚なる謝意を捧げます。また終始適切な御指導をいただきました奥村秀雄先生をはじめ整形外科科学教室の皆様、愛媛大学第二病理学教室宮崎龍彦先生、本学動物実験施設の皆様に心から感謝致します。

尚、本研究の一部は財団法人愛媛県医療財団の御援助をいただきました。

### 引 用 文 献

1. Furchgott RF, Zawadzki JV: The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arte-

rial muscle by acetylcholine. Nature 1980; 288: 373-6.

- Ignarro LJ, Buga GM, Wood KS et al: Endothelium derived relaxation factor produced and released from arteries and veins in nitric oxide. Proc Natl Acad Sci USA 1987; 84: 9265-9.
- Palmer RMJ, Ferrige AG, Moncada S: Nitric oxide release accounts for the biologic activity of endothelium derived relaxing factor. Nature 1987; 327: 524-6.
- Angus JA, Cooks TM: Endothelium-derived relaxing factor. Pharmacol Ther 1989; 41: 303-51.
- Moncada S, Palmer RMJ, Higgs EA: Biosynthesis of nitric oxide from L-arginine: a pathway for the regulation of cell function and communication. Biochem Pharmacol 1989; 38: 1709-15.
- Vallance P, Collier J, Moncada S: Effects of endothelium-derived nitric oxide on peripheral arteriolar tone in man. Lancet II 1989; 997-1000.
- Shibuki K, Okada D: Endogenous nitric oxide release required for long-term synaptic depression in the cerebellum. Nature 1991; 349: 326-8.
- Zorumski CF, Izumi Y: Nitric oxide and hippocampal synaptic plasticity. Biochem Pharmacol 1993; 46: 777-85.
- Dawson VL, Dawson TM, London ED et al: Nitric oxide mediates glutamate neurotoxicity in primary cortical cultures. Proc Natl Acad Sci USA 1991; 88: 6368-71.
- Dawson VL, Dawson TM, Bartley DA et al: Mechanisms of nitric oxide mediated neurotoxicity in primary brain cultures. J Neurosci 1993; 13: 2651-61.
- Kolb H, Kolb-Bachofen V: Nitric oxide: a pathogenic factor in autoimmunity. Immunol Today 1992; 13: 157-60.
- Cho HJ, Xie Q, Calaycay J et al: Calmodulin is a subunit of nitric oxide synthase from macrophages. J Exp Med 1992; 176: 599-604.
- 中野昌康: マクロファージ機能とアルギニン-NO

系. Annual Review 免疫 1993, 中外医学社, 1993: 62-9.

- Evans DM, Ralston SH: Nitric oxide and bone. J Bone Miner Res 1996; 11: 300-5.
- Danziger RS, Zuckerbraun BS, Pensler JM: Role of nitric oxide in the regulation of osteoblast metabolism. Plast Reconstr Surg 1997; 100: 670-3.
- Damoulis PD, Hauschka PV: Cytokines induce nitric oxide production in mouse osteoblast. Biochem biophys Res Commun 1994; 201: 924-31.
- Lowik CW, Nibberring PH, van de Ruit M et al: Inducible production of nitric oxide in osteoblast-like cells and in fetal mouse bone explants is associated with suppression of osteoclastic bone resorption. J Clin Invest 1994; 93: 1465-72.
- Ralston SH, Todd D, Helfrich M et al: Human osteoblast-like cells produce nitric oxide and express inducible nitric oxide synthase. Endocrinology 1994; 135: 330-6.
- Frost M: Tetracycline-based histological analysis of bone remodeling. Calcif Tissue Res 1969; 3: 211-37.
- Parfit M: The quantum concept reexamined in light of recent advances in the cell biology of bone. Calcif Tissue Int 1984; 36: S37-45.
- Frost M: Treatment of osteoporosis by manipulation of coherent bone cell populations. Clin Orthop 1979; 143: 227-32.
- Riggs BL, Melton III LJ: The prevention and treatment of osteoporosis. N Engl J Med 1992; 327: 620-7.
- 松本俊夫: 骨形成と成長因子. 代謝 1991; 28: 27-31.
- Machwata M, Zerath E, Holy X et al: Insulin-like growth factor- I increases trabecular bone formation and osteoblastic cell proliferation in unloaded rats. Endocrinology 1994; 134: 1031-8.
- Machwata M, Zerath E, Holy X et al: Systemic administration of transforming growth factor-beta 2 prevents the impaired bone formation and osteopenia induced by unloading in rats. J Clin Invest 1995; 96: 1245-53.



26. Machwate M, Zerath E, Holy X et al: Skeletal unloading in rat decrease proliferation of rat bone and marrow-derived osteoblastic cells. *Am J Physiol* 1993; **264**: E790-9.
27. Backup P, Westerlind K, Harris S et al: Spaceflight results in reduced mRNA levels for tissue-specific proteins in the musculoskeletal system. *Am J Physiol* 1994; **266**: E567-73.
28. Nakayama K, Kodama Y, Fukumoto S et al: Mechanical unloading reduces cortical bone volume and strength by a decrease in bone formation. *J Bone Miner Res* 1995; **10** (suppl. 1): S247.
29. Heaney RP: Bone mass, the mechanostat, and ethnic differences. *J Clin Endocrinol Metab* 1995; **80**: 2289-90.
30. Wolff J: Das Gesetz der Transformation der Knochen. Berlin: Hirschwald, 1892. In translation: by Maguet P and Furlong R: The Law of Bone Remodeling. Berlin: Springer-Verlag, 1986.
31. Lanyon LE: Functional strain as a determinant for bone remodeling. *Calcif Tissue Int* 1984; **36** (Suppl.): S56-61.
32. Lanyon LE: Osteocytes, strain detection, bone modeling and remodeling. *Calcif Tissue Int* 1993; **53** (Suppl. 1): S102-7.
33. Aarden E M, Burger EH, Nijweide PJ: Function of osteocytes in bone. *J Cell Biochem* 1994; **55** (3): 287-99.
34. Klein-Nulend J, Semeins CM, Ajubi NE et al: Pulsating fluid flow increases nitric oxide (NO) synthesis by osteocytes but not periosteal fibroblasts-correlation with prostaglandin up-regulation. *Biochem Biophys Res Commun* 1996b; **217**: 640-8.
35. Klein-Nulend J, van der Plas A, Semeins C M et al: Sensitivity of osteocytes to biomechanical stress in vitro. *FASEB J* 1995; **9**: 441-5.
36. Somjen D, Binderman I, Berger E et al: Bone remodeling induced by physical stress is prostaglandin E2 mediated. *Biochem Biophys Acta* 1980; **627**: 91-100.
37. Yeh CK, Rodan GA: Tensile forces enhance prostaglandin E synthesis in osteoblastic cells grown on collagen ribbons. *Calcif Tissue Int* 1984; **36** (Suppl.): S67-71.
38. Noda M, Rodan GA: Transcriptional regulation of osteopontin production in rat osteoblast-like cells by parathyroid hormone. *J Cell Biol* 1989; **108**: 713-8.
39. Rodan GA, Martin TJ: Role of osteoblast in hormonal control of bone resorption - a hypothesis. *Calcif Tissue Res* 1981; **33**: 349-51.
40. Johnson DL, McAllister TN, Frangos JA: Fluid flow stimulates rapid and continuous release of nitric oxide in osteoblasts. *Am J Physiol* 1996; **271**: E205-8.
41. Owan I, Burr DC, Turner CH et al: Mechanotransduction in bone: osteoblasts are more responsive to fluid forces than mechanical strain. *Am J Physiol* 1997; **273**: 810-5.
42. Ohta S, Yamamuro T, Lee K et al: Fracture healing induces expression of proto-oncogene c-fos in vivo. *FEBS Lett* 1991; **284**: 42-5.
43. 山本英広: 骨折モデルラットの骨折治癒過程における parathyroid hormone の作用機序. *媛医* 1994; **14**: 42-50.
44. Akhter MP, Raab DM, Turner CH et al: Characterization of in vivo strain in the rat tibia during external application of a four-point bending load. *J Biomechanics* 1992; **25**: 1241-6.
45. Aro HT, Wippermann BW, Hodgson SF et al: Internal remodeling of periosteal new bone during fracture healing. *J Orthop Res* 1990; **8**: 238-46.
46. Hill EL, Turner R, Elder R: Effect of neonatal sympathectomy and capsaicin treatment on bone remodeling in rats. *Neuroscience* 1991; **44**: 747-55.
47. Murooka G, Satoh T, Masuda T et al: Expression and localization of ossification-related factors in fracture healing. Comparative study of experimental union and non-union models. *J Orthop Sci* 1996; **1**: 193-202.
48. Oni OOA: Callus formation during diaphyseal fracture repair. *Orthop Int* 1996; **4**: 269-77.
49. Okumura H, Yamamuro T, Kasai R et al: Immobilization combined with ovariectomy and effect of active vitamin D3 analogues in the

- rat. *Cells and Materials Suppl* 1991; **1**: 125-30.
50. Lian JB, Gundberg CM: Osteocalcin: Biochemical consideration and clinical applications. *Clin Orthop* 1988; **226**: 267-91.
51. Sandberg M, Aro H, Maltimaski P et al: In situ localization of collagen production by chondrocytes and osteoblasts in fracture callus. *J Bone Joint Surg* 1989; **71-A**: 69-77.
52. Sautier JM, Nefussi JR, Frost N: Mineralization and bone formation on microcarrier beads with isolated rat calvaria cell population. *Calcif Tissue Int* 1992; **50**: 527-32.
53. Bradford MM: A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976; **72**: 248-54.
54. Chomczynski P, Sacchi N: Single-step method of RNA isolation by acid guanidium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 1987; **162**: 156-9.
55. Ikeda T, Shigeno C, Kasai R et al: Ovariectomy decreases the mRNA levels of transforming growth factor- $\beta$ , and increases the mRNA levels of osteocalcin in rat bone in vivo. *Biochem Biophys Res Commun* 1993; **194**: 1228-33.
56. Gadiant RA, Otten U: Expression of interleukin-6 (IL-6) and interleukin-6 receptor (IL-6R) mRNAs in rat brain during postnatal development. *Brain Res* 1994; **637**: 10-4.
57. Murwani R, Hodgkinson S, Armati P: Tumor necrosis factor alpha and interleukin-6 mRNA expression in neonatal Lewis rat Schwann cells and a neonatal rat Schwann cell line following interferon gamma stimulation. *J Neuroimmunol* 1996; **71**: 65-71.
58. Okahashi N, Koide M, Jimi E et al: Caspases (interleukin-1 beta-converting enzyme family proteases) are involved in the regulation of the survival of osteoclasts. *Bone* 1998; **23**: 33-41.
59. Alam ASMT, Gallagher A, Shankar V et al: Endothelin inhibits osteoclastic bone resorption by a direct effect on cell motility: Implications for the vascular control of bone resorption. *Endocrinology* 1992; **130**: 3617-24.
60. Boyde A, Jones SJ: Pitfalls in pit measurement. *Calcif. Tissue Int* 1991; **49**: 65-70.
61. 城戸益宗: 破骨細胞による骨吸収における骨芽細胞の役割. *媛医* 1993; **12**: 273-81.
62. Hukkanen M, Hughes FJ, Lee D et al: Cytokine stimulated expression of inducible nitric oxide synthase by mouse, rat and human osteoblast-like cells and its functional role in osteoblast metabolic activity. *Endocrinology* 1995; **136**: 5445-53.
63. Kasten TP, Collin-Osdoby P, Patel N et al: Potentiation of osteoclast bone resorbing activity by inhibition of nitric oxide synthase. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; **91**: 3569-73.
64. MacIntyre I, Zaid M, Towhidul Alam ASM et al: Osteoclast inhibition: an action of nitric oxide not mediated by cyclic GMP. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; **88**: 2936-40.
65. Ralston SH, Ho LP, Helfrich MH et al: Nitric oxide: a cytokine-induced regulator of bone resorption. *J Bone Min Res* 1995; **10**: 1040-9.
66. van't Hof RJ, Ralston SH: Cytokine induced nitric oxide production inhibits bone resorption in mouse bone marrow cultures by inducing apoptosis in osteoclast progenitors (Abstract). *Bone* 1995; **17**: 587.
67. Collin-Osdoby P, Nickols GA, Osdoby P: Bone cell function, regulation, and communication: a role for nitric oxide. *J Cell Biochem* 1995; **57**: 399-408.
68. Pitsillides A, Rawlinson SCF, Suswillo RFL et al: Mechanical strain-induced nitric oxide production by osteoblasts and osteocytes. *J Bone Min Res* 1995a; **10** (Suppl. 1): S217.
69. Riancho JA, Salas E, Zarrabeitia M T et al: Expression and functional role of nitric oxide synthase in osteoblast-like cells. *J Bone Min Res* 1995; **10**: 439-46.
70. Moncada S, Palmer RMJ, Higgs EA: Nitric oxide: physiology, pathology, and pharmacology. *Pharmacol Rev* 1991; **43**: 109-42.
71. Karaki H, Sato K, Ozaki H et al: effects of sodium nitroprusside on cytosolic calcium levels in vascular endothelium and smooth muscles. *J Pharmacol Exp Ther* 1990; **255**:



- 114-9.
72. Yoshida Y, Sun H-T, Cai J-Q et al: Cyclic GMP-dependent protein kinase stimulates the plasma membrane Ca pump ATPase of vascular smooth muscle via phosphorylation of a 240-kDa protein. *J Biol Chem* 1991; **266**: 19819-25.
  73. Luo D-L, Nakazawa M, Ishibashi T et al: Putative, selective inhibitors of sarcoplasmic reticulum Ca pump ATPase inhibit relaxation by nitroglycerin and atrial natriuretic factor of the rabbit aorta contracted by phenylephrine. *J Pharmacol Exp Ther* 1993; **265**: 1187-92.
  74. Rhinelander FW.: Tibial blood supply in relation of fracture healing. *Clin Orthop* 1974; **105**: 34-81.
  75. Davis TR, Wood MB: Endothelial control of long bone vascular resistance. *J Orthop Res* 1992; **10**: 344-9.
  76. McCarthy ID, Andhoga M, Batten JJ et al: Endothelium dependent vasodilatation produced by the L-arginine/nitric oxide pathway in normal and ischemic bone. *Acta Orthop Scand* 1997; **68**: 361-8.
  77. Corbett SA, Hukkanen M, Batten J et al: Nitric oxide in fracture repair. *J Bone Joint Surg* 1999; **81-B**: 531-7.
  78. Jingushi S, Joyce ME, Bolander ME: Genetic expression of extracellular matrix proteins correlates with histologic changes during fracture repair. *J Bone Min Res* 1992; **7**: 1045-55.
  79. 森 孝久: 破骨細胞機能に対する Substance P の効果. *媛医* 1997; **16**: 49-60.
  80. Brandi ML, Hukkanen M, Umeda T et al: Bidirectional regulation of osteoclast function by nitric oxide synthase isoforms. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; **92**: 2954-8.
  81. Takahashi N, Akatsu T, Udagawa N et al: Osteoblastic cells are involved in osteoclast formation. *Endocrinology* 1988; **123**: 2600-2.
  82. Simonet WS, Lacey DL, Dunstan CR et al: Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell* 1997; **89**: 309-19.
  83. Watanabe K, Tanaka Y, Morimoto I et al: Interleukin-4 as a potent inhibitor of bone resorption. *Biochem Biophys Res Commun* 1990; **172**: 1035-41.
  84. Bizzarri C, Shioi A, Teitelbaum SL et al: Interleukin-4 inhibits bone resorption and acutely increase cytosolic  $Ca^{2+}$  in murine osteoclasts. *J Biol Chem* 1994; **269**: 13817-24.
  85. Jilka RL, Hangoc G, Girasole G et al: Increased osteoclast development following estrogen loss: mediation of interleukin-6. *Science* 1992; **257**: 88-91.
  86. Pacifici R, Brown C, Puscheck E et al: The effect of surgical menopause and estrogen replacement on cytokine release from human blood monocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; **88**: 5134-8.
  87. Pacifici R, Rifas L, McCracken R et al: Ovarian Steroid treatment blocks a postmenopausal increase in blood monocyte interleukin-1 release. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; **86**: 2398-402.
  88. Horowitz MC: Cytokines and estrogen in bone: Anti-osteoporotic effects. *Science* 1993; **260**: 626-7.
  89. Girasole G, Jilka RL, Passeri G et al:  $17\beta$ -estradiol inhibits interleukin-6 production by bone marrow-derived stromal cells and osteoblasts in vitro: A potential mechanism for the anti-osteoporotic effect of estrogens. *J Clin Invest* 1992; **89**: 883-91.
  90. Hauschka PV, Mavrakos AE, Iafrafi MD et al: Growth Factors in Bone Matrix. *J Biological Chemistry* 1986; **261**: 12665-74.
  91. Gehron RP, Young MF, Flanders KC et al: Osteoblasts synthesize and respond to transforming growth factor-type  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) in vitro. *J Cell Biol* 1987; **105**: 457-63.
  92. Gehron Robey P: The biochemistry of bone. *Endocrinol Metab Clin North Am* 1989; **18**: 859-902.