

## マウス頭蓋骨由来細胞に対する dexamethasone の影響 —特に $^3\text{H}$ -thymidine, $^3\text{H}$ -proline の取り込みに対する影響について—

永野 弘之

岩手医科大学歯学部歯科矯正学講座

(主任 : 石川富士郎教授)

[受付 : 1988年6月7日]

抄録 : マウス頭蓋骨を用い, *in vitro* で骨片より増殖してきた骨由来の細胞について, dexamethasone と indomethacin の骨由来細胞に対する影響について autoradiography を用いて検討した。まず, 骨片周囲の細胞について alkaline phosphatase 活性と電顕的観察により, 骨原性 (osteogenic progenitor cells) の強い細胞集団の領域を確認してから実験を開始した。

骨由来の細胞の  $^3\text{H}$ -thymidine の取り込みは, dexamethasone により促進されるが generation time への影響はみられなかった。Indomethacin 処理群の  $^3\text{H}$ -thymidine の取り込みは各実験期間ともに増減がみられず, また generation time には遅延的に作用することから, DNA への  $^3\text{H}$ -thymidine の取り込みに対しては抑制的に作用していると思われた。一方, 有意差はみられなかったが,  $^3\text{H}$ -proline の取り込みについては対照群と比較して dexamethasone 群では 6~10時間後に増加がみられたが, indomethacin 群では遅れて10~24時間後に増加する傾向がみられた。

Key words : dexamethasone, indomethacin, autoradiography, osteoblast, tissue culture.

### はじめに

Dexamethasone (DXM) は, glucocorticoid (GC) の一種であり, ミネラルコルチコイド作用のないものと考えられている。近年, この DXM の骨におよぼす影響についてのいくつかの報告がみられるが, 骨に対するその作用機序についてはいまだ十分に解明されていない。GC の骨に対する作用としては, 骨形成細胞に対する直接作用であるとする報告<sup>1~4)</sup>, カルシウム代謝に直接的に作用するとする報告<sup>5, 6)</sup>あるいはまたビタミン D や副甲状腺ホルモンを介しての間接的な結果<sup>7, 8)</sup>であると報告されている。また, GC の特徴として, 投与量によって二面性の作用があるといわれ, *in vitro* の骨

細胞に対しても, 添加する GC の量によって逆の成績が得られる場合もある<sup>9)</sup>。

一般に, GC の過剰投与は骨形成の減少と骨吸収とをまねくと報告されている<sup>4)</sup>。しかしながら *in vitro* では骨吸収を抑制するという報告もみられる<sup>10)</sup>。また, 骨形成に関しては増加させるとする報告<sup>11)</sup>, 逆に減少させるとする報告<sup>1)</sup>などがみられ, これらの報告の中でも GC の量, 作用時間等によっても逆の報告がみられるなど, GC の骨に対する作用を単純に評価するのは仲々困難であるのが現状である。今回著者は, 骨細胞に最も効果的に作用する濃度の DXM と, 類似の作用を有する非ステロイドの indomethacin (IND) を用いて  $^3\text{H}$ -thymidine と  $^3\text{H}$ -proline の取り込みにおよぼす直接的作

The effects of dexamethasone on mouse calvarial bone cells *in vitro*, with special reference to incorporation of  $^3\text{H}$ -thymidine and  $^3\text{H}$ -proline.

Hiroyuki NAGANO.

(Department of Orthodontics, School of Dentistry, Iwate Medical University, Morioka 020)

岩手県盛岡市中央通1丁目3-27 (〒020)

Dent. J. Iwate Med. Univ. 13 : 129-136, 1988

用について検討を試みた。

## 材料と方法

### 培養方法

試料は生後2~3日のddYマウス頭蓋骨を無菌的に取り出し、できるだけ骨膜を除去した後に細切し、培養液の入ったLAB TEK tissue culture chamber/ slide (Miles) に散布し、3日間炭酸ガス培養器で培養を行った。培養液はダルベッコMEM培地(ニッスイ)に100 µg/ml Vitamine C, 10mM β-glycerophosphate, 10%仔牛血清, 60mg/1カナマイシンを添加して用いた。

### 実験方法

10<sup>-7</sup>M DXM (Sigma) と非ステロイド性抗炎症薬として知られている10<sup>-6</sup>M IND(Sigma) を実験群に添加し、対照群には溶媒として用いたアルコールを添加して用いた。薬剤の濃度はTennenbaum and Heershe<sup>10)</sup>の報告にしたがいalkaline phosphatase activity (ALPase) を最も高める濃度とした。培養細胞は実験に先立って、3日間正常培養液で前培養を行い、骨片より単層の細胞が均等に遊走する時期に実験用の培養液と交換して実験を開始した (Fig.1)。

培養細胞は固定後、Burstone 法<sup>11)</sup>によりALPase反応を行った。その結果、骨周囲の10~15層の遊走細胞にALPaseの強い陽性反応が認められた。

これらの結果にもとづき、骨片より遊走した15層以内の細胞に限定して以下の観察を行った。

### オートラジオグラフィ

#### ① <sup>3</sup>H-thymidineによるcumulative labeling

<sup>3</sup>H-thymidine (1 µCi/ml: New England Corp.) を各実験群の培養液中に加えて連続標識を行った。培養後1, 2, 3, 5日に固定し現像後、標識された細胞50個の銀粒子数を計算した。

#### ② <sup>3</sup>H-thymidineによるpulse labeling

<sup>3</sup>H-thymidine (1 µCi/ml) で10時間標識後、新鮮培養液で十分に洗浄し、各実験群の培

養液に置換してさらに、1, 2, 3, 5日間培養を行った。固定、現像後に有糸分裂細胞を計測して標識細胞の割合(分裂指数 mitotic index)を求めた。

#### ③ <sup>3</sup>H-prolineのlabeling

<sup>3</sup>H-proline(1 µCi/ml New England Corp.) で2, 6, 10, 24, 48時間の標識を行い、固定現像後に細胞50個に取り込まれた銀粒子数を計算した。オートラジオグラフィは培養細胞をアルコールで固定した後にNR-M2乳剤(サクラ)を用いてdipping法<sup>12)</sup>にて行い、4日間露出した。現像後、ギームザ染色を行って観察した。

#### ④ 電顕と光顕標本

標本の一部は2.5%グルタルアルデヒド1時間の前固定後、1% OsO<sub>4</sub>で1時間の後固定を行って、通常の方法によりエボン包埋を行い、ガラス面より剝離して電顕観察用の試料とした。光顕用としてはアルコール固定後、ギームザ染色を行って観察した。

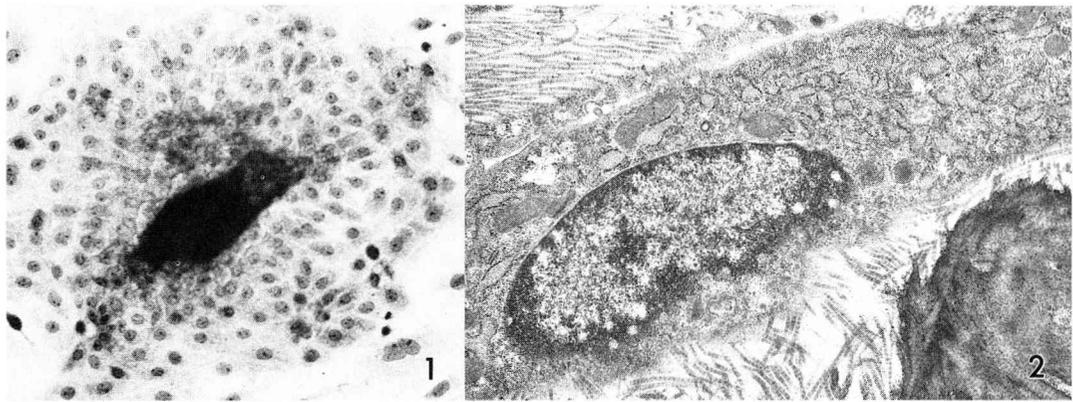
## 結 果

### ① 光顕ならびに電顕的観察

細切した骨片周囲から遊走して来る細胞は均一の形態を保持しており (Fig.1), 強いALPase活性が認められた。電顕的にも (Fig.2) 細胞小器官が発達して、骨細胞に類似していることから、きわめて骨原性の強い (osteoprogenitor cell) 細胞集団からなることが判明した。このような性格を有している細胞集団は培養3日後に、もっとも多く出現し、さらに骨片周囲の15~20層内に局限してみられることから、以下の実験は前培養3日とし、観察部位は骨片の周囲15層以内とした。

### ② <sup>3</sup>H-thymidine cumulative label

Table 1は各々の培養時間における細胞50個の平均銀粒子数を示し、Table 2はこの要因分析表である。この結果、因子A, Bともに1%の危険率で有意差がみられた。Fig.3はこの経過を示したものである。培養各期間でDXM群の取り込みを見ると、取り込みの様相は対照群



**Fig.1** The primary culture of mouse calvarial bone cells. The cells grew as monolayer showing a paving stone-like appearance in morphology.

**Fig.2** Electron micrograph of osteogenic cells. The cells contained a spherical nucleus and abundant intracellular organelle.  $\times 9000$

**Table 1.** Mean grain counts of 50 mononucleate in the osteogenic cells of the mouse calvaria after giving  $^3\text{H}$ -thymidine.

|        | Control          | $10^{-7}\text{M}$ DXM | $10^{-6}\text{M}$ IND |
|--------|------------------|-----------------------|-----------------------|
| 1 day  | 207.9 $\pm$ 63.1 | 289.7 $\pm$ 92.0      | 234.8 $\pm$ 57.8      |
| 2 days | 258.5 $\pm$ 78.9 | 330.6 $\pm$ 91.2      | 226.6 $\pm$ 48.9      |
| 3 days | 188.7 $\pm$ 57.8 | 318.3 $\pm$ 97.2      | 247.7 $\pm$ 85.8      |
| 5 days | 184.9 $\pm$ 52.3 | 240.0 $\pm$ 61.7      | 248.8 $\pm$ 75.5      |

**Table 2.** Factorial design of the data listed in Table 1.

| Factor       | SS        | Df  | Ms          |
|--------------|-----------|-----|-------------|
| A            | 233847.15 | 3   | 77949.05**  |
| B            | 903980.42 | 2   | 451990.21** |
| A $\times$ B | 281130.43 | 6   | 46855.07    |
| R (AB)       | 4985080   | 588 | 8478.0      |
| A B R        | 6404038   | 599 |             |

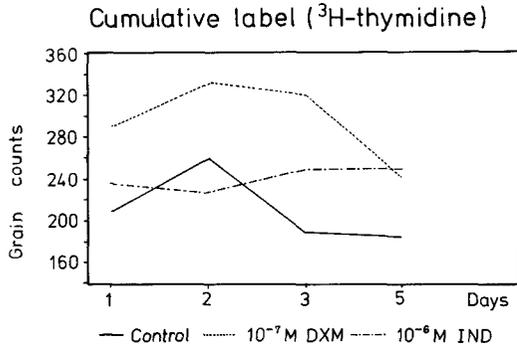
A : days, B : drugs

\*\* : Significant in 1% level of significance.

と同様の傾向を示すが、対照群、IND群よりも明らかに $^3\text{H}$ -thymidineの取り込みは有意に増加を示している。IND群の取り込みは対照群とDXM群のほぼ中間の値を示すが、各実験期間で著しい増減が認められずINDはDNA合成に対して抑制的に作用していることを示唆していると思われる。

③  $^3\text{H}$ -thymidine pulse label

各実験群ともに培養開始前10時間のみ $^3\text{H}$ -thymidine pulse labelを行い、その後は、mediumで数回洗浄して各実験群の新鮮培養液と交換して各時期に固定を行った。分裂細胞中で銀粒子を持っている細胞数を百分率で表示した (Fig.4)。この結果、DXM群では世代時間

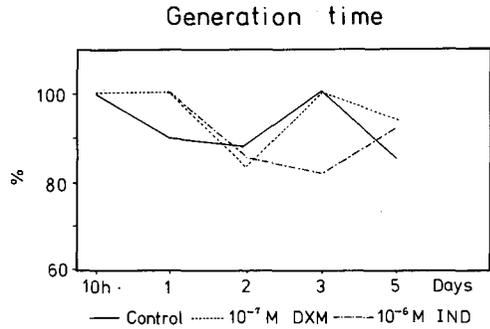


**Fig.3** The effects of DXM and IND on <sup>3</sup>H-thymidine incorporation in mouse calvarial bone cells.

はほぼ対照群と同様であった。それに対して IND 群では世代時間の著しい延長がみられた。

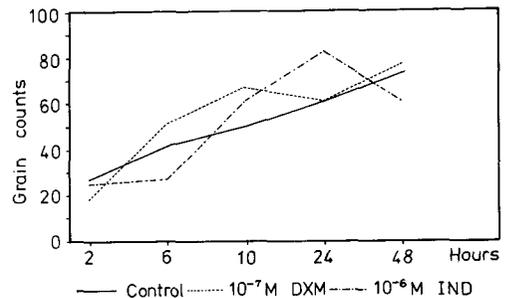
④ <sup>3</sup>H-proline の取り込みについて

経時的に50個の細胞に取り込まれた銀粒子数を Table 3 に示し、その要因分析表を Table 4 に示した。その結果、因子 A に 1% の危険率で有意差がみられた。その経時的な変化を Fig. 5 に示した。経時的には、いずれの群も <sup>3</sup>H-proline の取り込みは増加の傾向を示している。三群の中では DXM, IND が対照群を上回って



**Fig.4** The effects of DXM and IND on generation time in mouse calvarial bone cells.

Cumulative label (<sup>3</sup>H-proline)



**Fig.5** The effects of DXM and IND on <sup>3</sup>H-proline incorporation in mouse calvarial bone cells.

Table 3. Mean grain counts of 50 mononucleate in the osteogenic cells of the mouse calvaria after giving <sup>3</sup>H-proline.

|          | Control     | 10 <sup>-7</sup> M DXM | 10 <sup>-6</sup> M IND |
|----------|-------------|------------------------|------------------------|
| 2 hours  | 26.4 ± 7.9  | 18.5 ± 4.3             | 25.2 ± 12.3            |
| 6 hours  | 41.5 ± 15.6 | 50.3 ± 13.2            | 27.6 ± 7.7             |
| 10 hours | 50.3 ± 13.5 | 66.4 ± 29.9            | 60.2 ± 12.1            |
| 24 hours | 60.9 ± 11.6 | 60.5 ± 12.3            | 81.0 ± 22.0            |
| 48 hours | 73.0 ± 23.6 | 76.6 ± 18.7            | 59.8 ± 18.0            |

Table 4. Factorial design of the data listed in Table 3.

| Factor | SS        | Df  | Ms         |
|--------|-----------|-----|------------|
| A      | 302155.85 | 4   | 75538.96** |
| B      | 670.34    | 2   | 335.17     |
| A × B  | 54409.25  | 8   | 6801.16    |
| R (AB) | 524627.86 | 735 | 713.78     |
| A B R  | 881863.30 | 749 |            |

A : hours, B : drugs

\*\* : Significant in 1% level of significance.

いるが、統計的には有意差はみられなかった。IND 群では初期の取り込みには若干の抑制がみられるが6時間以降にはむしろ取り込みの増加がみられる。DXM 群では6~10時間に他の二群より取り込みの増加がみられる。これに対して対照群では直線的な増加がみられた。この結果、DXM 群では初期の6~10時間に取り込みの増加がみられるがIND 群では後半の24時間に最大の取り込みの増加がみられた。

## 考 察

今回行った細胞培養は、マウス新生仔 calvaria の骨膜を剥離して不必要な細胞をできるだけ除去したのちに細切し、骨片より増殖してきた単層の細胞を実験系として用いた。予備実験でアゾ色素法<sup>11)</sup>による ALPase 反応を行ったところ、骨片を中心に同心円状に強い陽性反応が認められた。その結果、本実験では主として骨片より遊走した15層までの範囲の強い骨原性の性格を有している細胞について観察を行った。

Tennenbaum and Heersche<sup>10)</sup>の骨由来細胞の培養による報告では ALPase は培養3日に増加すること、また移植骨片からの細胞増殖は3日までにほぼ安定してくることなどの理由からいずれの実験群も3日間の前培養を行った後に実験を開始した。Tennenbaum and Heersche (1985)<sup>10)</sup>はニワトリ骨膜の培養における<sup>3</sup>H-thymidine の取り込みについて報告をしており、連続標識では培養とともに対照群に比較して DXM 処理群で標識細胞が増加し、特に培養4~6日で DXM 処理群で著しい増加の見られることを報告している。しかしながら、培養後の細胞の分化の程度によって、DXM の作用が異なり、分化前期の細胞では増殖が著しく促進され、分化した時期の細胞では逆に増殖が抑制されると報告している。また、切片標本では骨に近い細胞ほど分化前期の細胞が多く、DXM の促進効果がみられると報告している。McCulloch and Tennenbaum (1986)<sup>16)</sup>はさらに osteogenic progenitor cell についての研究を進め、DXM 処理群で ALPase 陽性細胞と

<sup>3</sup>H-thymidine label の出現は培養3日に最も高く、4日になるとあまり差がみられなくなることから、DXM は osteogenic progenitor cell の増殖に作用することを示唆している。本研究では骨片から遊走する20層以内の細胞には、強い ALPase 反応が出現することから、この層の細胞は、結果的には osteogenic progenitor cell としての性格を保持している細胞集団であると思われる。さらにまた、銀粒子の計測結果も McCulloch and Tennenbaum 等の見解と一致している。

他方、Canalis<sup>9)</sup>、Chyun<sup>16)</sup>らは逆に GC は細胞増殖に抑制的に作用することを報告している。また Chen<sup>17)</sup>らは培養する細胞の数が少ない時には、GC はその増殖に対して抑制的に作用し、細胞数の多い時には促進的に作用すると報告している。本研究の培養方法とは異なるが、McCulloch and Tennenbaum<sup>16)</sup>らの見解から判断すると彼らの使用した実験材料の細胞集団は heterogenetic であり、また osteogenic progenitor cell の使用時の分化の程度が異なるために違った結果がでたものと思われる。

10時間の pulse labeling では DXM は対照群に比較して多少分裂の遅れはみられるが、ほぼ対照群と同様の世代時間が得られた。Chyun<sup>16)</sup>らは24時間 pulse label した後、24時間後に分裂指数を求め、cortisol は分裂を阻害すると報告している。これらの DNA の減少と<sup>3</sup>H-thymidine の取り込みの減少は、細胞の分裂が阻害され、その結果、細胞の消失が加速されるためであるとしている。しかしながら、本研究の結果からみると DXM 処理により特に著しい世代時間に対する影響は考えられず、Chyun らの分裂細胞阻害の時期は1回目の分裂の終了期にしかすぎないことが明らかである。

DXM と同様の薬理作用を示す非ステロイド性抗炎症薬の IND の<sup>3</sup>H-thymidine の取り込みに対する影響についてみると DXM と対照群のほぼ中間型を示していた。cumulative label では取り込みのピークがみられず、mitotic index ではむしろ世代時間の延長がみられるこ

とから osteogenic progenitor cell には抑制的に作用していると思われる。

加藤と小椋<sup>18)</sup>, Nilsson<sup>19)</sup>らの IND による異所性骨化の実験では骨形成の抑制が報告されている。また Chumbley and Tuncay<sup>20)</sup>は IND による歯の移動の抑制は, IND により prostaglandin の骨吸収作用が抑制された結果である事を示唆している。

<sup>3</sup>H-proline の取り込みについては24時間までは DXM 群で取り込みの増大がみられた。同様の報告が Dietrich<sup>21)</sup>らによりなされ, cortisol, DXM は 3 ~ 48 時間の短期間処理では <sup>3</sup>H-proline の collagen への取り込みは促進されるが96時間になると dose related に collagen への取り込みを抑制すると報告している。Canalis<sup>2)</sup>らも同様の報告をしており, 長期間処理による collagen 合成の抑制は osteogenic precursor cell の減少の結果と考えられている<sup>21)</sup>。

一方, Shull<sup>22)</sup>らは fibroblast を用いた実験で DXM は細胞内・外の type I, type III procollagen を減少させると報告している。また, Dombi<sup>23)</sup>は *in vitro* で高濃度の dexamethasone disodium phosphate は fibrogenesis を抑制するが, 低濃度では対照群と差がみられないと報告している。このような collagen 合成に対する見解の相違は実験方法, DXM の濃度, 実験材料などの差によってもたらされると思われる。

Chen<sup>24)</sup>は培養細胞が confluent になると DXM に対しての反応がみられなくなると報告している。このように細胞の状態, または細胞の種類によって反応性が異なることが考えられるので特に細胞レベルでの実験では, できるだけ同一条件の homogenetic な細胞集団を対象にすることが望ましい。DXM と IND を用いて骨損傷の治癒過程を観察した Satoh<sup>25)</sup>らの報告によると対照群に比較して, いずれも治癒過程には抑制的に作用するが, DXM はカルシウム代謝に作用し, IND ではそのような効果はみられないと報告している。加藤<sup>18)</sup>らは非ステロイド性抗炎症薬として Na-salicylate

と IND による異所性石灰化を観察し, Na-salicylate は Ca 代謝に影響して石灰化を抑制するが, IND は Ca 代謝には関与しないことを報告している。このように, ステロイド性の DXM と非ステロイド性の IND ではその作用機序が異なると思われる。本実験で用いた両薬剤はともに生体内における prostaglandin (PG) の生合成の阻害物質として知られている。しかし, その作用機序は異なり室田 (1986)<sup>26)</sup>は, prostaglandin の総説の中で IND はアラキドン酸カスケートのアラキドン酸から PGG<sub>2</sub> を作る過程で重要な働きをするシクロオキシゲナーゼを抑制するが, DXM は細胞膜リン脂質とエステル結合しているアラキドン酸を分離する際に重要なホスホリパーゼ A<sub>2</sub> を抑制するリポコリンを合成すると報告している。

本研究で得られた DXM と IND の結果の相違はこのような両者の作用機序の相違によって出現した可能性が考えられる。in situ のデータより得られた本実験の結果は, 骨の coupling factor と考えられる prostaglandin の作用ならびに DXM の作用に対して一つの示唆を与えるものと思われる。さらに, DXM は osteogenic progenitor cell としての性格を保持する分化前期の骨由来細胞の増殖と分化に促進的に作用すると考えられる。

## 結 論

1. DXM では細胞の generation time に変化を与えないが, IND では大幅に延長された。
2. <sup>3</sup>H-thymidine の取り込みは DXM により促進されるが, IND では抑制された。
3. <sup>3</sup>H-proline の取り込みは DXM 投与群で 6 ~ 10 時間に増加の傾向が見られたが IND 投与群では初期には低く 24 時間にピークが見られる遅延的效果があった。

以上より, DXM はマウス頭蓋骨由来細胞の <sup>3</sup>H-thymidine と <sup>3</sup>H-proline の取り込みを増加させるが, IND はこれらの取り込みに対して遅延的あるいは抑制的に作用すると思われる。

## 謝 辞

稿を終えるにあたり、御懇篤なる御指導、御校閲を賜った、岩手医科大学歯学部歯科矯正学講座、石川富士郎教授、ならびに同口腔解剖学第二講座、名和橙黄雄教授に深甚なる謝意を表します。

また、終始御指導、御鞭達を頂いた本学口腔解剖学第二講座の立花民子助教授、石関清人講師、坂倉康則講師、藤原尚樹助手に心から謝意を表します。

本論文の要旨は、第33回日本解剖学会、東北・北海道連合地方会（昭和62年9月、札幌）において発表した。

**Abstract :** To investigate the effects of dexamethasone or indomethacin on bone cells, bone cells growing out of minced mice calvariae were used *in vitro*. These cell populations had an intensive alkaline phosphatase activity. Dexamethasone increased the incorporation of  $^3\text{H}$ -thymidine into DNA and had no effect on generation times. Indomethacin indicated a flat incorporation curve of  $^3\text{H}$ -thymidine with a delay in generation times. Indomethacin had a tendency to inhibit DNA synthesis.

On the other hand, when compared with the control group,  $^3\text{H}$ -proline incorporation increased at 6 from to 10 hrs with dexamethasone but with indomethacin it was later at 10 from to 24 hrs. These results suggest that dexamethasone stimulated DNA-synthesis of the osteogenic-progenitor cell was stimulated with dexamethasone, whereas indomethacin inhibited it. But  $^3\text{H}$ -proline incorporation treated with dexamethasone tended to increase at 6 hrs and 10 hrs. Indomethacin has lengthened the generation time and tended to delay  $^3\text{H}$ -proline incorporation.

## 文 献

- 1) Chen, T.L. and Aronow, L.: Glucocorticoid receptors and inhibition of bone cell growth in primary culture. *Endocrinology*. 100 : 619-628, 1977.
- 2) Peck, W.A. : The effects of glucocorticoids on bone cell metabolism and function. *Adv. Exp. Med. Micol.* 171 : 111-119, 1984.
- 3) Lukert, B.P., Higgins, J.C. and Stoskopf, M.M. : Serum osteocalcin is increased in patients with hyperthyroidism and decreased in patients receiving glucocorticoid. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 62 : 1056-1058, 1986.
- 4) Chen, T.L., Hauschka, P.V. and Cabrales, S. : The effect of 1,25-dihydroxyvitamin  $\text{D}_3$  and dexamethasone on rat osteoblast-like primary cell cultures : receptor occupancy and functional expression patterns for three different bioresponses. *Endocrinology*. 118 : 250-259, 1986.
- 5) Hahn, T.J., Halstead, L.R. and Baran, D.T. : Effect of short term glucocorticoid administration on intestinal calcium absorption and circulating vitamin D metabolite concentrations in man. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 52 : 111-115, 1981.
- 6) Caniggia, A., Nuti, R., Lore, F. and Vattimo, A : Pathophysiology of the adverse effects of glucoactive corticosteroid on calcium metabolism in man. *J. Steroid. Biochem.* 15 : 153-161, 1981.
- 7) Hahn, T.J., Halstead, L.R., Teitelbaum, S.L. and Hahn, B.H. : Altered mineral metabolism in 25-hydroxyvitamin  $\text{D}_3$ . *J. Clin. Invest.* 64 : 655-665, 1979.
- 8) Chen, T.L. and Feldman, D. : Glucocorticoid potentiation of the adenosin 3', 5'-monophosphate response to parathyroid hormone in cultured rat bone cells. *Endocrinology*. 102 : 589-596, 1978.
- 9) Canalis, E. : Effect of glucocorticoid on Type I collagen synthesis, alkaline phosphatase activity, and deoxyribonucleic acid content in cultured rat calvariae. *Endocrinology*. 112 : 931-939, 1983.
- 10) Tennenbaum, H.C. and Heershe, T.N.M. : Dexamethasone stimulates osteogenesis in check periosteum *in vitro*. *Endocrinology*. 117 : 2211-2217, 1985.
- 11) Burstone, M.S. : Histochemical demonstration of phosphatase in frozen sections with naphthol AS-phosphates. *J. Histochem. Cytochem.* 9 : 146-153, 1960.
- 12) 永田哲士 : ラジオオートグラフ多量作製簡便法。細胞。14 : 40-45, 1982.
- 13) Jee, W.S.S., Park, H.Z., Roberts, W.E. and Kenner, G.H. : Corticosteroid and Bone. *Am. J. Anat.* 129 : 477-480, 1970.

- 14) Raisz, L.G., Trummel, C.L., Wener, J.A. and Simmons, H. : Effect of glucocorticoids on bone resorption in tissue culture. *Endocrinology*. 90 : 961-967, 1972.
- 15) McCulloch, C.A.G. and Tennenbaum, H.C. : Dexamethasone induces proliferation and terminal differentiation of osteogenic cells in tissue culture. *Anat. Rec.* 215 : 397-402, 1986.
- 16) Chyun, Y.S., Cone, C.M. and Feldman, D. : Cortisol decreases bone formation by inhibiting periosteal cell proliferation. *Endocrinology*. 114 : 477-480, 1984.
- 17) Chen, T.L., Cone, C.M. and Feldman, D. : Glucocorticoid modulation of cell proliferation in cultured osteoblast-like bone cells : differences between rat and mouse. *Endocrinology*. 112 : 1739-1745, 1983.
- 18) 加藤有三, 小椋秀亮 : 実験的異所性石灰化現象におよぼすステロイド性抗炎症薬の影響, 骨代謝, 14 : 29-34, 1981.
- 19) Nilsson, O.S., Bauer, H.C.F., Bronsjo, O.M.D. and Tornkvist, H.M.D. : Influence of indomethacin on induced heterotopic bone formation in rats, importance of length of treatment and of age. *Clinic. Orthopaed. Related Res.* 207 : 239-245, 1986.
- 20) Chumbly, A.B. and Tuncay, O.C. : The effect of indomethacin (an aspirin-like drug) on the rate of orthodontic tooth movement, *Am. J. Orthod.* 89 : 312-314, 1986.
- 21) Dietrich, J.W., Canalis, E.M., Maina, D.M. and Raisz, L.G. : Effects of glucocorticoids on fetal rat bone collagen synthesis *in vitro*. *Endocrinology*. 104 : 715-721, 1979.
- 22) Shull, S. and Cutroneo, K.R. : Glucocorticoids change the ratio of type III to type I procollagen extracellularly. *Collagen. Rel. Res.* 6 : 295-300, 1986.
- 23) Dombi, G.M. : Collagen fibril formation in the presence of dexamethasone disodium phosphate. *Connective tissue Res.* 15 : 257-268, 1986.
- 24) Chen, T.L. and Feldman, D. : Glucocorticoid receptors and actions in subpopulations of cultured rat bone cells. *J. Clin. Invest.* 63 : 750-758, 1979.
- 25) Satoh, S., Kim, T., Arai, T., Maruyama, S., Tajima, M. and Utsumi, N. : Comparison between the effects of dexamethasone and indomethacin on bone wound healing. *Japan. J. Pharmacol.* 42 : 71-78, 1986.
- 26) 室田誠逸, 総説 プロスタグランディン, 口病誌, 53 : 657-667, 1986