

骨端軟骨板と性ホルモン： アポトーシスとの関連

岡田正道

近畿大学医学部整形外科学教室

抄 録

骨の成長は骨端軟骨板の閉鎖により停止するが、そのメカニズムについては不明であったが、最近この閉鎖に骨端軟骨細胞のアポトーシスが関与することが明らかにされた。本研究では骨端軟骨細胞のアポトーシスに対するエストロゲンとテストステロンの影響について検討した。在来種の白色家兔の成長軟骨板を組織培養し、これら性ホルモンを作用させ、休止・増殖・肥大軟骨層におけるアポトーシス細胞の発現を組織化学的に検索した。その結果、肥大・休止層ではエストロゲンおよびテストステロンによってアポトーシス細胞の発現率が増加された。同様にエストロゲンを家兔に腹腔内投与すると、成長軟骨板におけるアポトーシス細胞の誘導が認められた。また抗ニトロタイロシン抗体を用いてパーオキシナイトライトの発現を免疫組織化学的に検索したところ、エストロゲン刺激で肥大・休止層にパーオキシナイトライトの染色性の増強を認めた。細胞培養系で骨端軟骨板由来の軟骨細胞にエストロゲンを添加し、一酸化窒素の誘導を検討したところ細胞のアポトーシスと一酸化窒素の誘導を認めた。以上の事象より、骨端軟骨板閉鎖のアポトーシス死にエストロゲンも関与し、機序として骨端軟骨板のフリーラジカル産生を誘導し、間接的にアポトーシスに関与していることが考えられる。

Key words : growth plate chondrocyte, apoptosis, estrogen, testosterone, histochemistry

緒 言

性ホルモンは、生殖現象、代謝調節、抗炎症作用、抗ストレス作用などの多彩な生理作用に関与していることが知られている。骨の成長は、特に思春期の骨成長時には、性ホルモンは成長ホルモン、甲状腺ホルモン、副甲状腺ホルモンなどと共に骨成長の制御に掛かっている¹⁾。

骨の長径成長は主として骨端軟骨板において起こる。骨端軟骨板は骨端軟骨から骨髄面に順に休止層 (resting zone)、増殖層 (proliferating zone)、肥大層 (hypertrophic zone) から構成されている。さらにこの3層の下層では間葉系細胞が侵入し、軟骨細胞が吸収・消失した細胞の周囲に骨芽細胞が出現して、骨形成が開始される。近年この骨端軟骨板の閉鎖過程で、軟骨細胞がアポトーシスに陥ることが明らかにされた²⁻⁴⁾。またこの現象に多くの遺伝子や蛋白質の関与も報告され、骨端軟骨板閉鎖の機構についても多くの研究がなされるようになった^{3,5,6)}。しか

し、この骨端軟骨板に対する性ホルモンの作用については依然として不明な点が多く残されている。そこで骨端軟骨細胞に対する性ホルモンの直接的な作用を検討する目的で、エストロゲンとテストステロンを使用し、アポトーシス誘導機構についての関与について検討をおこなった。

われわれは以前より、各種刺激に対する細胞応答に一酸化窒素 (nitric oxide, NO)、活性酸素、NOと活性酸素が反応することで生成されるパーオキシナイトライトなどのフリーラジカルが関与することを報告してきた⁷⁻¹¹⁾。しかしこれまでに骨端軟骨板閉鎖の機構についてフリーラジカルが関与する報告はない。近年、性ホルモンの作用としてフリーラジカルの産生が報告されている^{12,13)}。そこで骨端軟骨板閉鎖におけるフリーラジカルの関与を検討した。

材料及び方法

実験動物

生後10日齢の在来種白色家兔 (井上実験動物, 鹿

兎（兎島）および、5週齢（浜口動物）を用いた。両動物は1週間以上予備飼育し、順調に発育したものを実験に供した。予備飼育期間、実験期間を通して室温 $23\pm 0.5^{\circ}\text{C}$ 、湿度 $50\pm 10\%$ の一定の空調下で飼育した。照明は1日12時間人工照明とし、また飼料はウサギ飼育用固形飼料（ORC-4 北摂産業）を使用した。給水は水道水を使用し飼料とともに自由摂取とした。

軟骨細胞の採取と器官培養

生後10日齢の在来種白色家兎をジエチルエーテル深麻酔下で屠殺し、70%エタノール（和光純薬、大阪）およびポピドンヨード（イソジン、明治製菓、東京）にて消毒後、直ちに脛骨近位および大腿骨遠位の骨端軟骨板を無菌的に採取した。10%ウシ血清添加 DEME (Dulbecco's modified Eagles' medium) にて7日間培養した後、培養液を血清無添加 DEME に代え実験を開始した。

細胞培養

生後10日齢の在来種白色家兎をジエチルエーテル深麻酔下で屠殺し、脛骨近位および大腿骨遠位の骨端軟骨板を摘出した。摘出骨より軟部組織を除去後、10%子牛血清 (fetal bovine serum; FBS: Hyclone Lab. Inc. Logan, USA)、1%ペニシリンを添加した minimum essential medium alpha medium (α -MEM, Gibco, BRL) の入ったビーカー中に採取した。11番メスにて切り出した骨端軟骨板をハサミで細断後、0.2%コラゲナーゼにて酵素処理し成長軟骨細胞を単離した¹⁵⁻¹⁷。これを Falcon (®3002) 60×15 mm 円形培養フラスコ (Becton and Dickson Company, USA) に 1×10^4 個播種し、2~3日毎に培養液を交換し 37°C 、5% CO_2 の飽和水蒸気圧の条件下で培養し、コンフルエント (1.5×10^6 cell/ml) に達するまで培養した。

ホルモン作用

1. $17\text{-}\beta$ estradiol (E2: SIGMA, USA) (1×10^{-8} M), testosterone (和光純薬, 大阪) (1×10^{-8} M) をそれぞれ加えた添加群と非添加群とで6, 24, 48時間インキュベートした後、1週間 $4^{\circ}\text{C}\cdot 10\%$ 中性ホルマリンで浸漬固定した。その後、5% EDTA-2 Na (和光純薬, 大阪) で $4^{\circ}\text{C}\cdot 1$ 週間脱灰後、パラフィン包埋した。
2. 培養5日目の細胞に $17\text{-}\beta$ estradiol (1×10^{-10} M) で刺激を24時間加えた。

免疫組織染色法

1. 包埋した試料よりマイクロトームにて約 $4\mu\text{m}$ の連続切片を作製した。In situ Apoptosis Detection Kits (Takara Co., Ltd, Nagoya, Japan) を用いて TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling (TUNEL) 法を行った¹⁴。すなわち、dUTP-biotin を DNA の断片化によってできた 3'-OH DNA 末端に結合させ FITC 標識した。
2. Annexin V 染色は使用手順 (Trevigen Inc, Gaithersburg, USA) にしたがって行った。具体的には $10\mu\text{l}$ Annexin V-FITC (1 mg/ml) と $10\mu\text{l}$ propidium iodide (2.5 mg/ml) を円形培養フラスコ上の接着細胞に添加し暗所で5~15分培養し上記 TUNEL 法同様 FITC 標識した。

検頭法

1. 共焦点レーザー顕微鏡 (MRC 2400 LSX imaging system; Bio-Rad, Hertfordshire, England) を用いてアポトーシス細胞を検出しカウント、陽性細胞をパーセント表示し、休止、増殖、肥大と各層ごとに比較検討した。
2. Annexin V-FITC Kit (TRZ, USA) を用いてアポトーシス細胞と免疫反応させ発色させ、共焦点レーザー顕微鏡を用いてアポトーシス細胞を検出した。

一酸化窒素 (nitric acid, NO) の測定

培溶液中の NO ガスのほとんどが酸化された状態にあるため、これが還元されないよう、アスコルビン酸を含まない培溶液を用いた。備品のガラス瓶に検体の培溶液 $100\mu\text{l}$ を入れ、ゴム栓で密閉した。アスコルビン酸の飽和水溶液を加え、還元されて発生する NO を専用測定機 (Scholar Tec 社製 FES-450) を用いて測定した。本機での測定法は化学発光法 (chemiluminescence assay) に順じ、NO ガスの直接法が可能である¹¹。NO 量は波形の積分値 (digit) として計算した。生後10日齢のウサギ四肢長幹骨より採取した成長軟骨細胞をシャーレ内に播種し増殖させた。培養5日目の細胞に $17\text{-}\beta$ Estradiol (1×10^{-8} M) で刺激を行い、時間ごとに NO 産生を測定しコントロールと比較検討した。

性ホルモンの in vivo における軟骨細胞への影響処置

生後5週齢 (1.0~2.0 kg) の在来種白色家兎に 17β -estradiol ($30\mu\text{g}/\text{kg}$)、の腹腔内投与を10日間行った後、致死量の sodium pentobarbital (ネンブターール, ダイナボット, Osaka, Japan) を静脈内注射し、麻酔死させた。

骨端軟骨板採取

脛骨近位骨端軟骨板を採取し、前述と同じく、マイクロトームにて約4 μm の連続切片を作製した。

組織学的検索

TUNEL法で免疫染色した後、光学顕微鏡(オリンパス, Tokyo, Japan)での観察を行った。また avidin-biotin-peroxidase complex method (ABC法)でABC試薬(Vector, Lab, Burlingame, U.S.A.)を用いて抗ニトロチロシン抗体(和光純薬, 大阪)でのパーオキシナイトライトの発現を試みた。一次抗体として抗ニトロチロシン抗体(10 $\mu\text{g}/100 \mu\text{l}$)を24時間反応させた後、500倍希釈biotin化二次抗体と30分反応させた。次にABC試薬(Vector, Lab, Burlingame, U.S.)で60分間反応させた。これをDAB-H₂O₂ tris buffer [3, 3, diaminobenzidine 4 HCL (和光純薬, 大阪) 3 mg, 0.05 M tris-HCL-buffer (ph 7.4) 10 ml, 3% H₂O₂ 200 μl]を用いて発色させ、光学顕微鏡(オリンパス, Tokyo, Japan)で各々の標本について組織化学的に観察を行った。

統計処理

各データは平均値 \pm 標準偏差(mean \pm SD)で表し、有意差検定はStudent's t-testを用いた。

結 果

性ホルモンによるアポトーシスの誘導

培養系における検討

1. 器官培養での検討

骨端軟骨板を血清無添加DEMEで24時間培養し、アポトーシスの存在をTUNEL染色にて検討した。骨端軟骨板を軟骨細胞の形態、配列の状態から関節側より順に休止層、増殖層、肥大層に分けた。対照では、休止層および肥大層にTUNEL陽性細胞をわずかに認め、増殖層においてはほとんど認めなかった。エストロゲン(17- β estradiol: 1×10^{-8} M)を添加し24時間培養を行うと、全層にTUNEL陽性細胞が観察されたが主に肥大層を中心にTUNEL陽性細胞が多数観察された。テストステロン(1×10^{-8} M)添加によっても同様の結果を得た(図1-a, b, c)。またTUNEL陽性細胞をカウントし一視野当たりの陽性率を経時的に計測した。無刺激の状態では休止層における陽性率は24時間で $7.1 \pm 1.1\%$ 、48時間で $10.5 \pm 1.0\%$ であった。エストロゲン添加により休止層における陽性率は24時間で $13.2 \pm 4.2\%$ 、48時間で $28.5 \pm 3.0\%$ と増加し、同様にテストステロン添加においても休止層における陽性率は24時間で $8.9 \pm 2.0\%$ 、48時間で $23.5 \pm 2.5\%$ と増加し

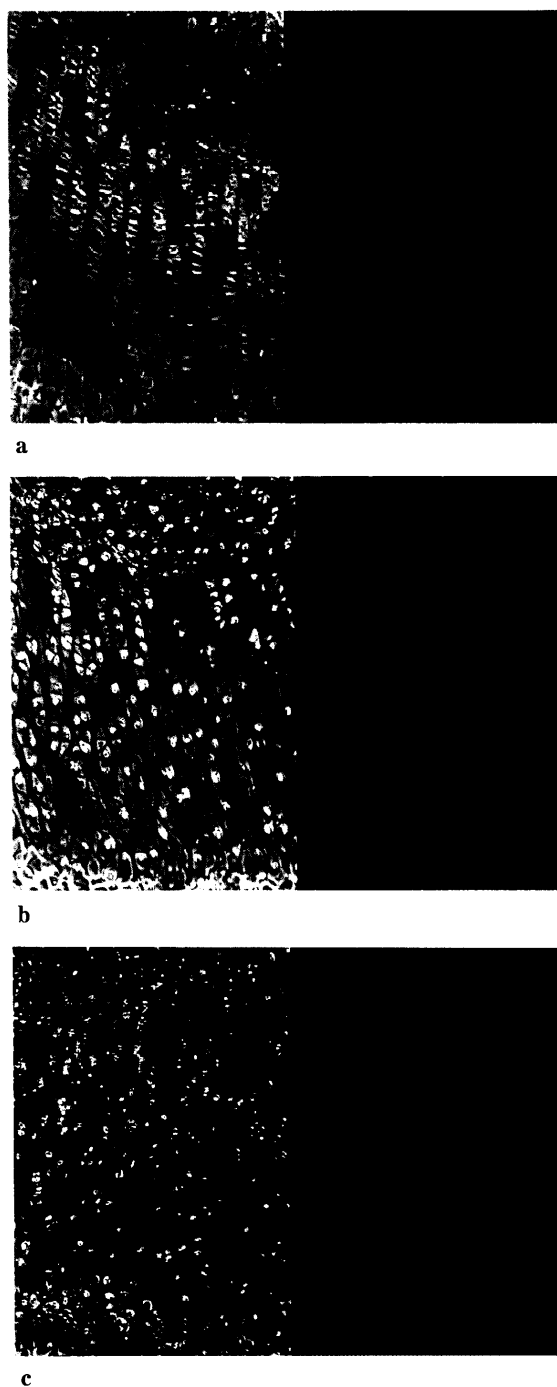


図1 器官培養した骨端軟骨板におけるアポトーシスの誘導
a: control (R: 休止層, P: 増殖層, H: 肥大層), b: エストロゲン投与24時間, c: テストステロン投与24時間後, TUNEL染色を示す($\times 200$)。

た。(図2-a)増殖層においてもエストロゲン添加、テストステロン添加により陽性率は増加したが他の2層と比較して陽性率は低かった。(図2-b)肥大層における陽性率は無刺激の状態では24時間で $9.1 \pm 2.0\%$ 、48時間で $10.8 \pm 1.1\%$ であった。エスト

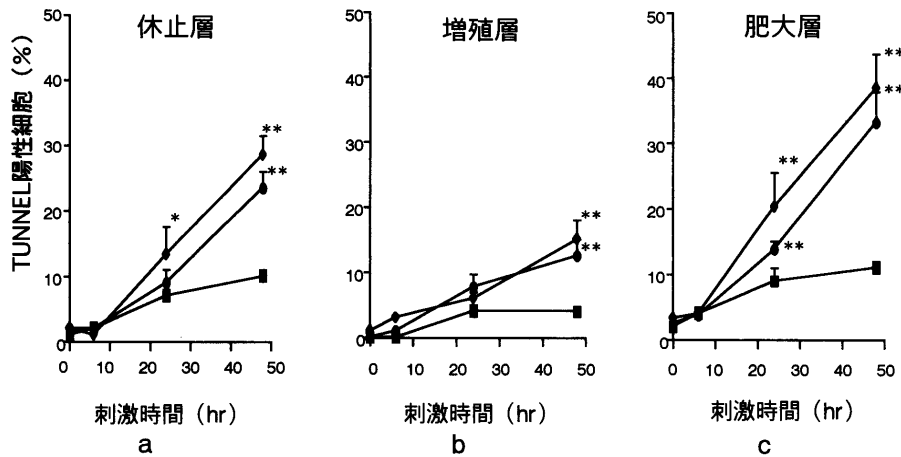
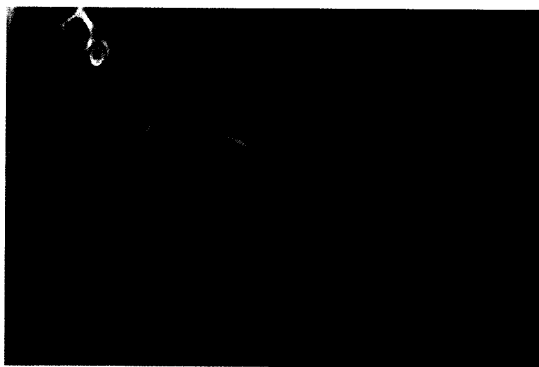
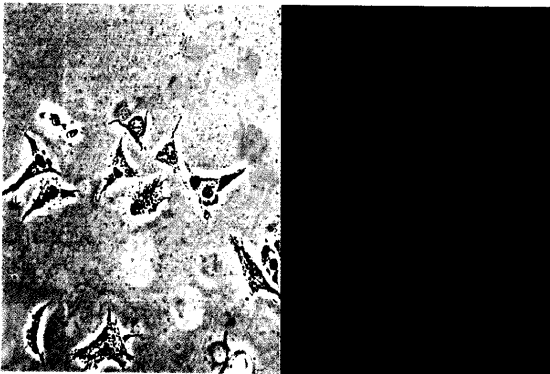


図2 器官培養した骨端軟骨板における層別の TUNEL 陽性率の経時的変化
骨端軟骨板を培養し、それぞれ対照、エストロゲン ($17\text{-}\beta$ estradiol, 1×10^{-8} M) 刺激、テストステロン (1×10^{-8} M) 刺激で 1, 6, 24, 48時間の TUNEL 陽性率を測定した。a: 休止層, b: 増殖層, c: 肥大層における TUNEL 陽性率の経時的変化を示す。
(*: $p<0.05$, **: $p<0.01$ ■—control, ◆—エストロゲン, ●—テストステロン)



a



b

図3 エストロゲンによるアポトーシスの誘導
単離した成長軟骨細胞にエストロゲン ($17\text{-}\beta$ estradiol, 1×10^{-10} M) を添加し、24時間の annexinV 免疫染色。
a: 対照, b: エストロゲン添加 ($\times 200$)。

ロゲン添加により肥大層における陽性率は24時間で $20.1\pm 5.3\%$ 、48時間で $38.5\pm 5.1\%$ と増加した。同様にテストステロン添加において肥大層における陽

性率は24時間で $13.6\pm 1.2\%$ 、48時間で $33.1\pm 4.7\%$ と増加した。(図2-c) TUNEL 陽性細胞数は休止層・肥大軟骨層で有意に増加し、その様式は時間依存性であった。

培養細胞における検討

単離した成長軟骨細胞を 1×10^4 個播種し、培養5日目の細胞にエストロゲン (1×10^{-10} M) で刺激を加え、Annexin V 陽性細胞を検出した。この刺激により、蛍光標識されたアポトーシス細胞が誘導された(図3)。

2. 実験動物における検討

生後5週齢在来種白色家兎でエストロゲン ($30\mu\text{g}/\text{kg}$) およびテストステロン ($1.5\mu\text{g}/\text{kg}$) の腹腔内投与を各10日間行った後、TUNEL 陽性率を比較した。TUNEL 陽性率はコントロール肥大層で $4.2\pm 1.6\%$ 、休止層で $3.2\pm 0.2\%$ であった。エストロゲン刺激においてコントロールと比べ、肥大層と休止層でそれぞれ、 $7.2\pm 1.4\%$ 、 $6.3\pm 0.3\%$ と有意にアポトーシス細胞の増加を認めしたが、テストステロン刺激においては肥大層と休止層でそれぞれ、 $4.1\pm 1.3\%$ 、 $3.4\pm 0.6\%$ と有意な差は得られず、アポトーシスは誘導されなかった。また、増殖層においては有意な差は得られなかった(図4)。

フリーラジカル関与に関する検討

エストロゲンによる NO 産生に及ぼす影響

コンフルエントとなった細胞にエストロゲン (1×10^{-8} M) を作用させ、経時的に培地内に遊離される

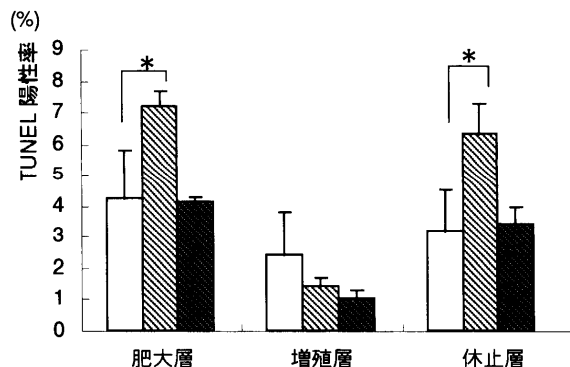


図4 性ホルモン腹腔内投与によるアポトーシスの誘導

生後5週齢家兎にエストロゲン ($17\text{-}\beta$ estradiol, $30\ \mu\text{g}/\text{kg}$) およびテストステロン ($1.5\ \mu\text{g}/\text{kg}$) を10日間腹腔内投与し、脛骨近位骨端軟骨板を採取し、 $4\ \mu\text{m}$ の連続切片を作製した後 TUNEL 法でアポトーシス率を求めた。

□：対照，▨：エストロゲン，▩：テストステロン，*： $p < 0.05$

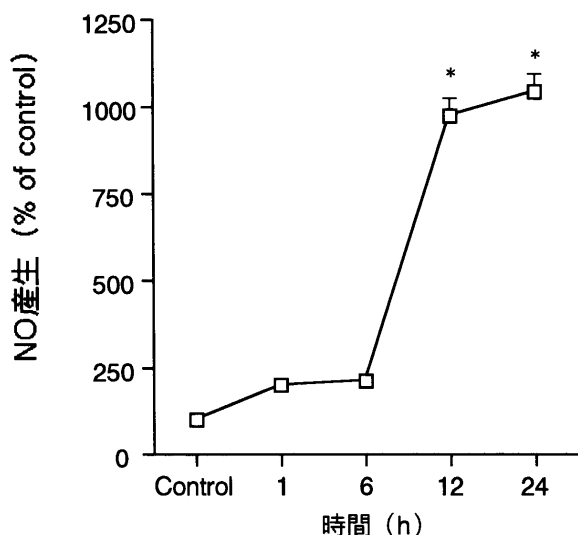
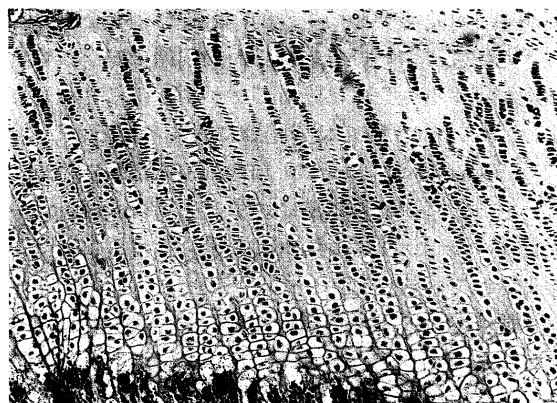


図5 成長軟骨細胞に対するエストロゲンの作用
細胞に $17\text{-}\beta$ estradiol ($1 \times 10^{-8}\ \text{M}$) を作用させ経時的に培地内に遊離される NO 量を測定し比較した。*： $p < 0.05$

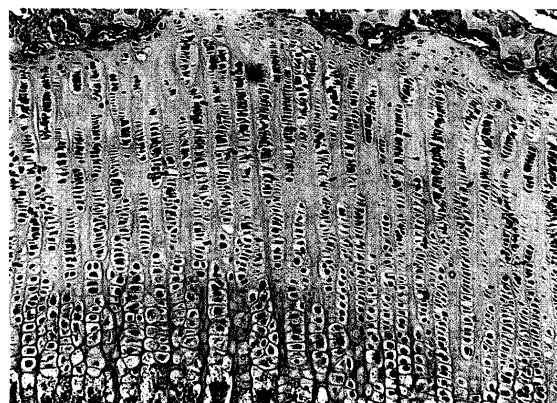
NO 量を測定した。NO 産生量は時間依存性に増加し、12時間で対照の $970.5 \pm 62.5\%$ に達した(図5)。

エストロゲン刺激によるパーオキシナイトライトの発現

パーオキシナイトライトはチロシンをニトロ化する性質を有している。生後5週齢の日本白色家兎にエストロゲン ($30\ \mu\text{g}/\text{kg}$) の腹腔内投与を10日間行った後、脛骨近位骨端軟骨板を採取し抗ニトロチロシン抗体による免疫組織化学的検討を行い骨端軟骨



a



b

図6 エストロゲン刺激による骨端軟骨板におけるパーオキシナイトライトの発現

生後5週齢 (1.0~2.0 kg) の日本白色種ウサギに 17β -estradiol ($30\ \mu\text{g}/\text{kg}$) の腹腔内投与を10日間行った後、脛骨近位骨端軟骨板を採取、 $4\ \mu\text{m}$ の連続切片を作製し抗ニトロチロシン抗体による免疫組織化学的検討を行った。

a. 対照, b. エストロゲン

板全層を比較すると、対照群では肥大層あるいは休止層において血管侵入の認められる周囲組織もしくは血管内血漿成分に染色が認められる。これに対してエストロゲン刺激においてはいずれの層も染色性は増強した。とくに肥大層あるいは休止層の軟骨基質、および核周辺に強い染色を認めた(図6-a, b)。

考 察

骨の成長が骨端軟骨板の閉鎖により停止することは、以前より知られていたがそのメカニズムについては十分に研究されているとは言えない。アポトーシスは、1972年に Kerr らによって提唱された細胞死の概念であり、多細胞生物の発生、分化、組織の細胞代謝過程でみられる、あらかじめプログラムされた細胞死である。また、DNA 断片化を介し細胞死を導く。これは個体を維持するために遺伝子によっ

て制御された必要かつ生理的、能動的な死である¹⁸。近年の研究において骨端軟骨板の閉鎖に先立ち軟骨細胞がアポトーシスに陥ることが明らかにされた。また、エストロゲンの軟骨組織に対する作用として、17- β estradiol が protein kinase-C 活性を調節していること¹⁹ や軟骨組織に対する 17- β estradiol の影響が vitamin D3 の代謝に影響を受けること²⁰ が報告されている。

本研究では、まず骨端軟骨板の器官培養系を用いてエストロゲン、テストステロンのアポトーシス誘導作用について TUNEL 法にて検討した。対照では休止層および肥大層に TUNEL 陽性細胞を認め、増殖層においても TUNEL 陽性細胞を認めるが休止層および肥大層に比べ、TUNEL 陽性率は低かった。エストロゲン、テストステロン添加にて主に休止層および肥大層で TUNEL 陽性率は増加し、この結果、器官培養系ではエストロゲン、テストステロンにより肥大層および休止層で軟骨細胞のアポトーシスが誘導されることが明らかになった。

次に細胞培養系における検討を行うにあたり、軟骨細胞にエストロゲンを反応させ、蛍光標識 annexin V とヨウ化プロピジウムを用いてアポトーシスの検出を行った。アポトーシスの早期には、細胞膜のリン脂質の非対称性が失われ、通常は細胞膜内層に存在する phosphatidylserine が細胞膜外層に露出される。annexin V は phosphatidylserine に高い親和性を持つタンパク質で、細胞膜外層に露出した phosphatidylserine と結合する。アポトーシス早期細胞では annexin V の結合は観察されるが、細胞膜は保たれているため、ヨウ化プロピジウムは DNA と結合できない。一方、アポトーシス後期/ネクロシス細胞の場合には、細胞膜の構造が崩壊するため annexin V とヨウ化プロピジウムの結合が観察される。この結果軟骨細胞のアポトーシスが誘導された。

次にこの現象を *in vivo* で確認するために、家兎にエストロゲンおよびテストステロンの腹腔内投与を各10日間行った後、各刺激が骨端軟骨に及ぼす影響をみるため TUNEL 陽性細胞数を計測した。エストロゲン刺激においてコントロールと比べ、肥大層と休止層で有意にアポトーシス細胞の増加を認めたが、テストステロン刺激においては有意な差は得られず、アポトーシスは誘導されなかった。近年、骨芽細胞や破骨細胞と同じく軟骨組織におけるエストロゲン、テストステロンレセプターの存在が報告された²¹⁻²²。しかし今回テストステロンでアポトーシスが誘導されなかったことは、生体内でのテストステロン濃度やその受容体数、受容体結合後の情報伝達機構などが培養細胞の条件と異なることが推察さ

れ、今後の検討を必要とする。

そこで本研究ではエストロゲンを中心にこの作用機序についてフリーラジカルに着目し検討した。まずエストロゲンの NO 誘導作用の有無について検討した。成長軟骨より単離した細胞において、エストロゲンは明らかに NO を誘導した。これまでに、エストラジオールが芳香族化合物でありヒドロキノンの酸化体であるキノンと活性酸素を産生し、そのフリーラジカルが関節軟骨細胞の cytotoxicity を調節していること¹³ やラット肝臓において活性酸素の産生を増加させるとの報告がされている²⁴ が成長軟骨細胞における NO の誘導については報告はない。従来、NO は低分子であり半減期が短いことより、生体内での役割を検討することは困難であった。近年になって種々の臓器においてその重要性が注目されるようになった。われわれの研究室ではウシ関節軟骨器官培養系を用いて、interleukin-1 (IL-1) が NO を誘導することを明らかにし、これを介して軟骨のプロテオグリカン合成抑制を惹起することを¹⁰、また、関節軟骨細胞においてメカニカルストレスによって NO が誘導されることを報告した¹¹。また Oh らは軟骨細胞における IL-1 がパーオキシナイトライドを誘導し軟骨のプロテオグリカン合成抑制を惹起することを報告している⁷。これらは軟骨細胞における現象であるが、本研究においてはエストロゲンレセプターを刺激すると、NO 産生の増加を認めた。したがって骨端軟骨板においても分化過程においてエストロゲンにより NO が誘導され、これがアポトーシス誘導に関与する可能性が示唆された。

パーオキシナイトライドは NO と活性酸素が反応することにより合成されるフリーラジカルである。そこでエストロゲン刺激によるパーオキシナイトライドの発現をみるため抗ニトロチロシン抗体による免疫組織化学的検討を行った。その結果、主に肥大軟骨細胞層において強い染色性が認められた。つまり休止層・肥大軟骨細胞層でパーオキシナイトライドが誘導され、これはエストロゲン刺激でアポトーシスが誘導された層と一致した。肥大軟骨のアポトーシスは血管侵入の生じる前の段階で起こることが明らかとされており⁴ 血管侵入を誘導する一つの要因と考えられている。

以上のことから骨端軟骨板においてエストロゲン刺激による軟骨細胞層のアポトーシスにフリーラジカルが関与する可能性が示唆された。骨端軟骨板において軟骨細胞のアポトーシス死による閉鎖のメカニズムについてはまだまだ不明な点が多いが、性ホルモンが成長軟骨細胞においてアポトーシスを誘導

することが確認され、また、その作用機序としてエストロゲンがNOを誘導し、その結果パーオキシナイトライトが産生され、最終的に骨端軟骨板の成長軟骨細胞のアポトーシスが誘導されることが示唆された。

本研究の結果から病的な低身長や異常な骨の発育抑制のメカニズムとエストロゲンの関係を明らかにすることにより、その病像をよりよく理解することを可能にする。延いては治療に応用、適用出来る可能性のある知見と考えられる。

謝 辞

稿を終えるにあたり、御指導、御校閲を賜りました浜西千秋教授に深謝致します。また、本研究に御協力いただいた教室の方々に心から感謝致します。

本論文の要旨は第14回日本整形外科学会基礎学術集会（平成12年9月、京都）において発表した。

文 献

- Gilsanz V, Roe TF, Gibbens DT, Schulz EE, Carlson ME, Gonzalez O, Boechat MI (1988) Effect of sex steroids on peak bone density of growing rabbits. *Am J Physiol* 416-421
- Aizawa T, Kokubun S, Tanaka Y (1997) Apoptosis and proliferation of growth plate chondrocytes in rabbits. *J Bone Joint Surg* 79-B: 483-486
- Gibson G (1998) Active role of chondrocyte apoptosis in endochondral ossification. *Microsc Res Tech* 43: 191-204
- Gibson GJ, Kohler WJ, Schaffler MB (1995) Chondrocyte apoptosis in endochondral ossification of chick sterna. *Dev Dyn* 203: 468-476
- Aizawa T, Kokubun S, Kawamata T, Tanaka Y, Roach HI (1999) c-myc protein in the rabbit growth plate changes in immunolocalisation with age and possible roles from proliferation to apoptosis. *J Bone Joint Surg Br* 81: 921-925
- Amling M, Neff L, Tanaka S, Inoue D, Kuida, Weir E, Philbrick WM, Broadus AE, Baron R (1997) Bcl-2 lies downstream of parathyroid hormone-related peptide in a signaling pathway that regulates chondrocyte maturation during skeletal development. *J Cell Biol* 136: 205-213
- Oh M, Fukuda K, Asada S, Yasuda Y, Tanaka S (1998) Concurrent generation of nitric oxide and superoxide inhibits proteoglycan synthesis in bovine articular chondrocytes: involvement of peroxynitrite. *J Rheumatol* 25: 2169-2174
- Miyagi I, Kikuchi H, Hamanishi C, Tanaka S (1998) Auto-destruction of the articular cartilage and free radical mediators. *J Lab Clin Med* 131-2: 146-150
- Fukuda K, Dan H, Takayama M, Kumano F, Saito M, Tanaka S (1996) Hyaluronic acid stimulates proteoglycan synthesis in bovine articular cartilage in the presence of interleukin-1. *J Pharmacol Exp Ther* 27: 1672-1675
- Fukuda K, Kumano F, Takayama M, Saito M, Ohtani K, Tanaka S (1995) Zonal difference in nitric oxide synthesis by bovine chondrocytes exposed to interleukin-1. *Inflamm Res* 44: 434-437
- 斎藤政克 (1994) 培養軟骨細胞代謝に対する周期的牽引の影響. *近畿大医誌* 19: 521-535
- Thibodeau PA, Paquette B (1999) DNA damage induced by catecholestrogens in the presence of cappeer (II): generation of reactive oxygen species and enhancement by NADH. *Free Radic Biol Med*: 1367-1377
- Tsai CL, Chang LY, Chow KC, Chan WK, Chen YL, Lu FL (1998) Catalase prevents estradiol-induced chondrocyte cytotoxicity. *Life Sci* 62: 1147-1152
- Gavrieli Y, Sherman Y, Ben-Sasson SA (1992) Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J Cell Biol* 119: 493-501
- Corvol MT, Dumontier MF, Rappaport R (1975) Culture of chondrocytes from the proliferative zone of epiphyseal growth plate cartilage from prepubertal rabbits. *Biomedicine* 23: 103-107
- Nilsson A, Lindahl A, Eden S, Isaksson OGP (1989) Demonstration of growth hormone receptors in cultured rat epiphyseal chondrocytes by specific binding of growth hormone and immunohistochemistry. *J Endocrinol* 122: 69-77
- Jouve JL, Mottet V, Cottalorda J, Frayssinet P, Petit P, Bollini G (1998) Reimplantation of growth plate chondrocyte cultures in central growth plate defects: Part 1. Characterization of cultures. *J Pediatr Orthop B*: 7-2: 167-173
- Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR (1972) Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implication in tissue kinetics. *Brit J Cancer* 26: 239-257
- Sylvia VL, Hughes T, Dean DD, Boyan BD, Schwartz Z (1998) 17β -estradiol regulation of protein kinase c activity in chondrocytes is sex-dependent and involves nongenomic mechanisms. *J Cell Physiol* 176: 435-444
- Schwartz Z, Finer Y, Nasatzky E, Soskolne WA, Dean DD, Boyan BD, Ornoy A (1997) The effects of 17β -estradiol on chondrocyte differentiation are modulated by vitamin D3 metabolites. *Endocrine* 7: 209-218
- Ben-Hur H, Thole HH, Mashiah A, Insler V, Berman V, Shezen E, Elias D, Zuckerman A, Ornoy A (1997) Estrogen, progesterone and testosterone receptors in human fetal cartilaginous tissue: Immunohistochemical studies. *Calcif Tissue Int* 60: 520-526
- Kennedy J, Baris C, Hoyland JA, Selby PL, Freemont AJ, Braidman IP (1999) Immunofluorescent localization of estrogen receptor- α in growth plates of rabbits, but not in rats, at sexual maturity. *Bone* 24: 9-16
- Nasatzky E, Schwartz Z, Soskolne WA, Brooks BP, Dean DD, Boyan BD, Ornoy A (1994) Evidence for receptors specific for 17β -estradiol and testosterone in

chondrocyte cultures. *Connect Tissue Res* 30 : 277-294
24. Chen J, Li Y, Lavigne JA, Trush MA, Yager JD (1999)
Increased mitochondrial superoxide production in rat

liver mitochondria hepatocytes, and HepG2 cells following estradiol treatment. *Toxicol Sci* 51 : 224-235