破骨細胞 (osteoclasts) に関する研究

培養骨髓細胞中の破骨細胞の同定とその形態学的特徴

半 澤 和 雄

東北大学歯学部口腔診断・放射線学講座 (指導: 三条大助教授)

[受付: 昭和61年5月31日]

Studies on osteoclasts

Identification and characterization of osteoclasts
in bone marrow cell culture

Kazuo Hanzawa

Department of Oral Diagnosis, Tohoku University School
of Dentistry 4-1, Seiryō-cho, Sendai, 980

(Director: Prof. Daisuke Sanjo)

[Accepted for publication: May 31, 1986]

Key words: Osteoclasts / bone marrow cell culture / morphology

Abstract: In order to identify and characterize osteoclasts morphologically, bone marrow cells were isolated from the long bones of neonatal rats and suspended in Hepes-buffered 199 medium containing 0.1% bovine serum albumin. The cell suspensions were plated on coverslips settled in petri dishes and incubated at 37°C in a humidified air containing 5% CO₂. At intervals after incubation, the adherent cells were stained with May-Grüwald-Giemsa solution and then observed morphologically under the microscope.

In this bone marrow culture, osteoclasts were identified as multinucleated giant cells, and could be classified into two different types by the characteristic morphology of their cytoplasm: the cells with a cytoplasm showing only typical lamellipodia (L-type), those with a lamellipodia, lobopodia, polarity and ruffling activity (P-type).

Almost all osteoclasts which were cultured by this method were dead within 24 hours.

緒 言

骨の生理的および病的吸収は骨組織内の多核巨細胞である破骨細胞 (osteoclast) によって営まれており、その形態、分化に関する研究は電子顕微鏡学的観察¹⁻⁶⁾、酵素組織化学⁷⁻⁹⁾、組織培養¹⁰⁻¹²⁾、細胞培養¹³⁻¹⁹⁾、ラジオアイソトープ^{10,11,20-26)}などを利用して活発に進められている。他方、破骨細胞の機能に対してはプロスタグランジン (PG) I₂, E₁, E₂^{10,16,18,22,24,25)}、カルシトニン

(CT)^{14,15,19)}等の骨吸収への影響などが追究されており、また ⁴⁵Ca ラベル骨を用いてパラサイロイドホルモン (PTH)¹⁰⁾、活性型ビタミンD₃^{10,20,22)}やリンホカインの1つである破骨細胞活性化因子 (osteoclast activating factor, OAF)^{10,21-25)}等による破骨細胞の活性化の解析が進められている。しかし、骨組織そのものを用いる研究では破骨細胞の骨吸収機序の詳細を明らかにすることは難しく、破骨細胞の機能を解析する1つの方法として骨から破骨細胞を選択的に分離し、培養破骨細胞を用いることが考えられる^{14,15,18,19)}。そこで破骨細胞の形態と機能との関係や破骨細胞を活性化す

る因子などについて研究を進めるための第1段階として、本研究においては新生仔ラット長管骨の骨髓細胞を培養し、Chambers ら^{14,15,18,19)}の方法を基にそこに含まれる破骨細胞の培養条件を検討したのち、培養中に認められる破骨細胞の形態について観察した。

実験材料と方法

骨髓細胞の培養条件

生後1~4日のウィスター系ラット (船橋農場) の大腿骨と上腕骨を無菌的に取り出し、周囲軟組織を除去し、20mM Hepes 添加199培養液 (Gibco) 中で両骨端部を切除した。次にこの骨端部より皮下針を挿入し1~2ml の Hepes 199培養液を注入し、骨髓細胞を洗い出した。この細胞を同じ培養液を用い、2000rpm、10分の遠心で2回洗浄してから0.1%牛血清アルブミン (BSA) (Albumin, Fraction V, Boehringer Mannheim) 添加 Hepes 199培養液に 1×10^6 cells/ml の濃度で浮遊させ、直径35mm のプラスチックシャーレを用いて37°C、5% CO₂ インキュベーターで培養した。培養後トリパンブルー染色により経時的に生細胞数と死細胞数を血球計算盤で数え、計算により吸着細胞数と生細胞数を求めた。

尚、骨髓細胞の採取は細胞がガラス面に吸着するのを防ぐために氷冷下で行った。

破骨細胞の判定

骨髓細胞の培養条件と同様に調整した細胞浮遊液150 μ l を、6×32mm 滅菌カバースリップ上に分注したものをガラスシャーレに入れ、37°C、5% CO₂ インキュベーターで培養した。培養後経時的に各々2枚のカバースリップを PBS (phosphate buffered saline, pH 7.4) で洗浄して未吸着細胞を除き室温にて乾燥後、アセトンで20分固定し、May Grünwald Giemsa (MGG) (Merck 社製) 染色を施し、スライドガラスに封入し、染色したカバースリップの全面を光学顕微鏡で鏡検し、破骨細胞を数えた。また、その一部について細胞の大きさ、核の大きさをマイクロメーターを用いて計測した。接眼レンズは10倍、対物レンズは100倍の油浸レンズを使用した。

破骨細胞の形態学的鑑別点として次の5つの基

準を設けた^{11,14,15,27)}。

(1) 2核以上であること。

(2) 板状偽足 (lamellipodia)、分葉状偽足 (lobopodia)、細線維状偽足 (filopodia) のいずれかを有すること。

(3) 核濃縮を認めないこと。

(4) 核、細胞質に融解を認めないこと。

(5) 集合した細胞は除外すること。

なお、同一胞体内に明瞭な核膜を有する2つの核が認められる場合は2核の破骨細胞とした。明らかに細胞が分裂中であって、それぞれの胞体内に核が存在する場合には、これを分裂中の細胞として除外することとしたが、本実験ではこの様な細胞は見当たらなかった。

結 果

1. ラット骨髓細胞の培養

新生ラット長管骨の骨髓細胞を 1×10^6 cells/ml に調整した細胞浮遊液1.5ml を35mm 径のプラスチックシャーレに入れて、5%CO₂ インキュベーターで培養し、培養時間によるシャーレ面吸着細胞と非吸着細胞の数及び生細胞と死細胞の数について調べた。その結果を、Table 1に示した。培養開始時の 1×10^6 個の細胞は 8.5×10^5 個の生細胞と 1.5×10^5 個の死細胞であった。培養1時間で 1.4×10^5 個の吸着細胞が認められたが、吸着細胞には死細胞は認められなかった。この後培養8時間まで吸着細胞の増加も、死細胞の増加も認められず、培養24時間で吸着細胞は 2.9×10^5 個に増加し、かつ非吸着細胞中の死細胞も培養開始から 0.7×10^5 個増加して 2.2×10^5 個になった。しかし吸着細胞中に死細胞は認められなかった。

2. ラット骨髓細胞中の破骨細胞の数的変動

破骨細胞はガラス面に吸着性の細胞である。 1×10^6 cells/ml に調整した骨髓細胞の150 μ l (1.5×10^5 cells) をカバースリップ上で培養し、経時的にカバースリップを取り出し、破骨細胞の数を調べた。4回の実験結果を Table 2に示したが培養1時間で破骨細胞特有の形態を示す細胞が平均9.2個認められた。4時間と8時間培養のカバースリップに見られた破骨細胞の平均数は5.8個と4.8個であり、培養時間とともにカバースリップ

Fig. 1 An osteoclast detected after incubation for 30 min. showing a spherical appearance of $36\ \mu\text{m}$ in diameter and containing 5 nuclei; pseudopodia have not yet spread. May-Grünwald-Giemsa staining; $\times 1000$.

Fig. 3 An osteoclast (1h) of $84\ \mu\text{m}$ in diameter showing characteristic lamellipodia and containing 11 nuclei of about $9\ \mu\text{m}$ in diameter; the central area of cytoplasm is still dense. MGG, $\times 1000$.

Fig. 2 An osteoclast (1h) showing polarized cytoplasm and lamellipodia with intense ruffling activity. MGG, $\times 1000$.

Fig. 4 An osteoclast (1h) containing 8 nuclei with clear membrane structure; the cytoplasm is scattered and slightly stained. MGG, $\times 1000$.

上の破骨細胞数は減少し、培養12時間で平均1.4個の破骨細胞数となった。24時間以後の培養ではカバースリップ上に見られる破骨細胞はほとんどなく、まれに見られた場合でも特有の形態は維持されていない多核巨細胞であった。

3. 培養破骨細胞の形態

カバースリップ上に培養された破骨細胞を経時的に取り出し、MGG染色を施してその形態を調べた。培養開始30分でカバースリップ上に認められる破骨細胞をFig. 1に示したが、多核細胞であるが偽足は見られず、また細胞質の広がりもない。これは骨髓が氷冷下で分離されたため本来の偽足形態を呈する以前のものと考えられる。

Fig. 2に示した破骨細胞は培養1時間後のものであるが分葉状偽足を広げ、その一部は極性を呈し、波打ち膜活性 (ruffling activity) も高い。

Fig. 3 and 4の破骨細胞も培養後1時間のものであり、板状偽足を広げているが、Fig. 3の細胞質は核の周囲に限局し、細胞の大きさは直径約 $84\ \mu\text{m}$ 、核の大きさは $9\ \mu\text{m}$ で最外層には小波状の構造が認められる。Fig. 4は8~9個の核を有し核膜も明瞭になり、核の染色性も変化した、細胞質も全体に拡散している。

Fig. 5に示した破骨細胞は培養2時間後のものであり、8個の核を有しており、空胞が出現している。

Fig. 5 An osteoclast (2 h) containing 8 nuclei and having many small vacuoles in the cytoplasm. MGG, $\times 1000$.

Fig. 7 An osteoclast (16 h) showing a ring morphology with 6 nuclei; the center of cytoplasm was lytic. MGG, $\times 1000$.

Fig. 6 An osteoclast (13 h) containing many vacuoles in the cytoplasm, and 9 nuclei of 8-10 μm and 2 nuclei of 4-5 μm in diameter. MGG, $\times 1000$.

Fig. 8 Two bi-nucleated cells (8 h) contact each other through their pseudopods; showing lamellipodia and lobopodia with polarity and high ruffling activity. MGG, $\times 400$.

Fig. 6は培養後13時間の破骨細胞で9個の直径約9 μm の核が認められるが、その他に2個の直径4~5 μm の核が認められ、多数の空胞が出現している。

Fig. 7は培養後16時間経過したもので、6個の核を有しているが細胞膜は不明瞭であり、細胞質の中心部は融解が進み、核は残存細胞質に引き寄せられ周辺部に存在している。

Fig. 8は培養後8時間の破骨細胞の倍率400倍の写真であり、4核を有し、板状偽足、分葉状偽足を持ち、極性を呈し、波打ち膜活性の高い破骨細胞である。

考 察

破骨細胞に関する研究は種々の手法を用いて行

われ、破骨細胞と骨吸収の関係がしだいに明らかにされつつある。なかでも各種の骨吸収阻止物質や骨吸収促進物質の作用は鋭敏な反応を示す ^{45}Ca ラベル骨を用いた器官培養法を用いて検定されているが、器官培養法では破骨細胞と骨芽細胞との関係などの細胞間相互作用を明らかにすることは困難であり、培養破骨細胞を用いた研究方法が必要になってきた。

しかし、破骨細胞の細胞培養法や培養中の形態的变化については培養条件の違いなどから未解決の点も少なくない。そこで、筆者は始めにラットの長管骨骨髓細胞を用いて、Chambersら^{14,15,18,19)}の方法を基に破骨細胞の培養条件について検討した。

破骨細胞の培養材料として新生仔ラットの長管

Table 1 Cultivation of bone marrow cells obtained from neonatal rat with Hepes-buffered 199 medium containing 0.1% BSA

condition of cells		cell number ($\times 10^5$ cells/ml)					
		incubation time (h)					
		0	1	4	8	12	24
Non-adherent	live	8.5	7.1	6.9	7.1	6.5	4.9
	dead	1.5	1.5	1.5	1.4	1.6	2.2
Adherent	live		1.4	1.6	1.5	1.9	2.9
	dead		0	0	0	0	0

Table 2 Number of osteoclasts per coverslip in culture of neonatal rat bone marrow cells

incubation time (h)	No. of osteoclasts	mean
1	3—22	9.2
4	1—12	5.8
8	2—8	4.8
12	0—3	1.4
24	0—2	0.5

1.5×10^5 cells were incubated on each coverslip and number was average of osteoclasts on two coverslips.

Data are pooled from four culture experiments.

骨を採取し、骨髓に培養液を圧注することにより骨髓細胞を採取した。これを1%牛血清アルブミン加Hepes・199培養液で培養した結果、24時間で90%以上の生存率で骨髓細胞の培養が可能であった。

1時間培養後の骨髓細胞 1.5×10^5 個中の14%, 2.1×10^4 個がカバースリップに吸着する細胞であり、その中の9.2個が破骨細胞であったことから吸着細胞の0.04%が破骨細胞であると考えられる。しかし、Table 2に示したように4回の実験を通してみると培養1時間後の破骨細胞数は3~22個であり、4時間後でも1~12個とバラツキが多く、安定した破骨細胞の採取法を確立する必要がある。また、このようにして培養された破骨細胞の*in vitro*培養系における寿命はリンパ球や単球とは異なり24時間以内であり、Chamberら¹⁴⁾の実験結果とほぼ一致したが、よりよい培養法を求めて現在検討中である。

培養した破骨細胞を形態的に観察すると、培養

30分後のカバースリップの中にはFig. 1に示した球形の破骨細胞が認められたが、このことは分離された破骨細胞がガラス面に定着するまでに30分は必要であり、しかも分離直後の破骨細胞は球形を呈することを示唆しており、その後はFig. 2~8にみられるように培養時間の経過とともに偽足を広げることが考えられ、Bardsleyら²⁸⁾の仮説が破骨細胞の場合にも付合することを示している。

培養した全ての破骨細胞は板状偽足を有しており、その約10%の細胞は分葉状偽足を示し、かつ極性が認められた。そこで板状偽足(lamellipodia)を示す細胞をL型破骨細胞とし、極性(polarity)を有する細胞をP型破骨細胞として分類してみると、波打ち膜活性はL型の1部とP型の全ての破骨細胞に認められた。

1974年、Holtropら²⁹⁾はラット胎児長管骨の器官培養を行い、PTHを加えて前培養した後の破骨細胞のCTとコルヒチンに対する反応の程度をruffled borderとclear zoneを持つ活性化破骨細胞とclear zoneのみを持つ不活性化破骨細胞の割合で検討しているが、全ての破骨細胞がCTやコルヒチンに同じ様に応答しないこと、更に対照群においても活性型と不活性型の破骨細胞が存在することを報告している。

また、Miller³⁰⁾は1977年ウズラのegg-cicleと長管骨内破骨細胞の形態との関係を観察し、卵殻形成期の破骨細胞はruffled borderとclear zoneを持ち活性型の形態を示すが、排卵直後又は卵殻完成以後の破骨細胞は骨組織から離れて存在し、球形を呈し、ruffled borderも認められないことを報告している。

Chamberら¹⁹⁾は1983年の報告の中で、使用す

る CT の濃度によっては、完全に破骨細胞の動きを止める場合もある (CT, 62pg/ml) が, 16pg/ml の CT を用いた場合には、動きを止める破骨細胞の割合は対照群と同じになると述べている。このことは低濃度の CT では、CT に応答して動きを止めるタイプの破骨細胞と、依然として活性を保ち動きを止めないタイプの破骨細胞との2種類の破骨細胞が存在することを示唆している。

また、Zamboniら³¹⁾は1984年ニワトリから分離した、破骨細胞と末梢血中の単球を混合培養し、破骨細胞に融合する単球を観察しているが、その中のある破骨細胞には単球が融合するが、他の破骨細胞では単球が融合することなく、破骨細胞に対し負の走化性を示したことを報告している。

今回分類した破骨細胞のP型とL型の機能的な違いは不明であるが、形態的には活性型と不活性型とその両方を移行する可逆的形態変化を示す移行型などの存在が考えられる。しかし、これらの形態の違いは破骨細胞の成熟、活性の度合い、培養条件や機能との関連においてさらに追究する必要があると思われる。

また、破骨細胞は造血幹細胞由来の単核細胞の融合に始まって多核化することが報告されているが^{32,33)}、今回観察された2核の破骨細胞が連結している像 (Fig. 8) は4核の破骨細胞形成の初期

段階を示している可能性もあり³⁴⁾、今後、種々の骨吸収促進物質を利用して形態と機能との関係などを明らかにしてゆきたいと考えている。

結 論

新生仔ラット長管骨より採取した骨髓細胞を培養し、その中に含まれる破骨細胞を観察して以下の結論を得た。

1. 骨髓細胞の生存率は培養12時間後に84%であったのに対し、その中に含まれる破骨細胞は培養1時間後の9.2個から1.4個に減少し、12時間後の生存率は15%となり、同様に24時間後には5%となった。破骨細胞の寿命は本実験においては約24時間であると考えられるが、その採取法と培養法の改善が必要である。

2. 今回認められた破骨細胞をその偽足形態から分類すると、板状偽足を有するL型と極性を有するP型に分けることができた。

謝辞：稿を終えるにあたり、終始御懇篤なる御指導ならびに御校閲を賜った口腔細菌学講座、熊谷勝男教授、清水義信助教授、口腔診断・放射線学講座、三条大助教授に心から感謝の意を表します。また、種々御協力いただいた両講座の皆様をはじめ公私にわたり御援助下された皆様々に心から感謝の意を表します。

抄録：生後1～4日のラットの長管骨の骨髓にHepes 199培地を圧注して骨髓細胞を取り出し、0.1%牛血清アルブミン添加Hepes 199培地を用いてカバースリップ上に培養し、May-Günwald-Giemsa染色を施し、培養破骨細胞を形態学的に調べた。

骨髓細胞 (1.5×10^5 cells/150 μ l) をカバースリップ上で1時間培養したとき、平均9.2個の破骨細胞が認められたが、培養時間の経過と共にカバースリップ上の破骨細胞数は減少し、24時間後には認められなくなった。

培養された破骨細胞を形態学的に観察すると、培養30分でガラス面に吸着し、1時間で特有の板状偽足、分葉状偽足または波打ち膜活性を示すようになる。形態的には板状偽足のみを示す円形の多核細胞（これをL型破骨細胞とした）が約90%占めていた。残る約10%は分葉状偽足と波打ち膜活性を示し、極性を有する多核細胞（これをP型破骨細胞とした）が認められた。

文 献

- 1) Malkani, K., Luxembourger, M. M. and Rebel, A. : Cytoplasmic modifications at the contact zone of osteoclast and calcified tissue in the diaphyseal growing plate of foetal guineapig tibia. *Calcif. Tissue Res.* **11** : 258-264, 1973.

- 2) 早乙女紘一：破骨細胞形成過程の電子顕微鏡的研究。日整会誌 **48** : 185-202, 1974.
- 3) Luk, S. C., Nopajaroonsri, C. and Simon, G. T., The ultrastructure of endosteum : A topographic study in young adult rabbits. *J. Ultrastruct. Res.* **46** : 165-183, 1974.
- 4) 花岡英弥：骨端軟骨板と隣接骨髓の電顕像。骨代謝 **10** : 7-12, 1977.
- 5) 三浦不二夫、栗原三郎：歯の移動からみた歯槽

- 骨. 齒界展望 61 : 1231-1242, 1983.
- 6) Ejiri, S. : The preosteoclast and its cytodifferentiation into the osteoclast : Ultrastructural and histochemical studies of rat fetal parietal bone. Arch. Histol. Jpn. 46 : 533-557, 1983.
 - 7) Radden, B. G. and Fullmer, H. M. : Morphological and histochemical studies of bone repair in the rat. Arch. Oral Biol. 14 : 1243-1252, 1969.
 - 8) Tatevossian, A. : Effect of parathyroid extract on blood calcium and osteoclast count in mice. Calcif. Tissue Res. 11 : 251-257, 1973.
 - 9) Gay, C. V. and Mueller, W. J. : Carbonic anhydrase and osteoclast : Localization by labeled inhibitor autoradiography. Science 183 : 432-434, 1974.
 - 10) Holtrop, M. E. and Raisz, L. G. : Comparison of the effect of 1,25-dihydroxycholecalciferol, prostagrandin E₂, and osteoclast activating factor with parathyroid hormone on the ultrastructure of osteoclasts in cultured long bones of fetal rats. Calcif. Tissue Int. 29 : 201-205, 1979.
 - 11) Hefley, T. J. and Stern, P. H. : Isolation of osteoclasts from fetal rat long bones. Calcif. Tissue Int. 34 : 480-487, 1982.
 - 12) Burger, E. H., Van der Meer, J. W. M., Van de Gevel, J. S., Gribnau, J. C., Thesingh, C. W. and Van Furth, R. : *In vitro* formation of osteoclasts from long-term cultures of bone marrow mononuclear phagocytes. J. Exp. Med. 156 : 1604-1614, 1982.
 - 13) Zamboni Zalloni, A., Teti, A. and Primavera, M. V. : Isolated osteoclasts in primary culture : First observations on structure and survival in culture media. Anat. Embryol. 165 : 405-413, 1982.
 - 14) Chambers, T. J. and Magnus, C. J. : Calcitonin alters behavior of isolated osteoclasts. J. Pathology 136 : 27-39, 1982.
 - 15) Chambers, T. J. : Osteoblasts release osteoclasts from calcitonin-induced quiescence. J. Cell Sci. 57 : 247-260, 1982.
 - 16) Wong, G. L. and Kocour, B. A. : Differential sensitivity of osteoclasts and osteoblasts that prostagrandin E₁ effects on bone may be mediated primarily through the osteoclasts. Arch. Biochem. Biophys. 224 : 29-35, 1983.
 - 17) Zamboni Zalloni, A., Teti, A., Primavera, M. V., Naldini, L. and Marchisio, P. C. : Osteoclasts and monocytes have similar cytoskeletal structures and adhesion property *in vitro*. J. Anat. 137 : 57-70, 1983.
 - 18) Chambers, T. J. and Ali, N. N. : Inhibition of osteoclastic motility by prostagrandins I₂, E₁, E₂ and 6-oxo-E₁. J. Pathol. 139 : 383-397, 1983.
 - 19) Chambers, T. J. and Moore, A. : The sensitivity of isolated osteoclasts to morphological transformation by calcitonin. J. Clin. Endocrinol. Metab. 57 : 819-824, 1983.
 - 20) Raisz, L. G., Trummel, C. L., Holic, M. F. and Deluca, H. F. : 1, 25-Dihydroxycholecalciferol : A potent stimulator of bone resorption in tissue culture. Science 175 : 768-769, 1972.
 - 21) Horton, J. E., Raisz, L. G., Simmons, H. A., Oppenheim, J. J. and Mergenhagen, S. E. : Bone resorbing activity in supernatant fluid from cultured human peripheral blood leukocytes. Science 177 : 793-795, 1972.
 - 22) Luben, R. A., Mundy, G. R., Trummel, C. L. and Raisz, L. G. : Partial purification of osteoclast-activating factor from phytohemagglutinin-stimulated human leukocytes. J. Clin. Invest. 53 : 1473-1480, 1974.
 - 23) Raisz, L. G., Luben, R. A., Mundy, C. R., Dietrich, T. N., Horton, J. E. and Trummel, C. L. : Effect of osteoclast-activating factor from human leukocytes on bone metabolism. J. Clin. Invest. 56 : 408-413, 1975.
 - 24) Yoneda, T. and Mundy, G. R. : Monocytes regulate osteoclast-activating factor production by releasing prostaglandins. J. Exp. Med. 150 : 338-350, 1979.
 - 25) Yoneda, T. and Mundy, G. R. : Prostaglandins are necessary for osteoclast-activating factor production by activated peripheral blood leukocytes. J. Exp. Med. 149 : 279-283, 1979.
 - 26) Nelson, R. L. and Bauer, G. E. : Isolation of osteoclasts by velocity sedimentation at unit gravity. Calcif. Tissue Res. 22 : 303-313, 1977.
 - 27) 飯島宗一, 影山圭二, 石川栄世, 島峰徹郎 : 組織病理アトラス, 初版, pp. 8-25, 文光堂, 東京本郷, 1982.
 - 28) Bardsley, W. G. and Aplin, J. D. : Kinetic analysis of cell spreading. I. Theory and modeling of curves. J. Cell Sci. 61 : 365-373, 1983.
 - 29) Holtrop, M. E., Raisz, L. G. and Simmons, H. A. : The effect of parathyroid hormone, colchicine, and calcitonin on the ultrastructure and the activity of osteoclasts in organ culture. J. Cell Biol. 60 : 346-355, 1974.
 - 30) Miller, S. C. : Osteoclast cell-surface changes during the egg-laying cycle in

- Japanese quail. J. Cell Biol. **75** : 104-118, 1977.
- 31) Zamboni Zallone, A., Teti, A. and Primavera, M. V. : Monocytes from circulating blood fuse *in vitro* with purified osteoclasts in primary culture. J. Cell Sci. **66** : 335-342, 1984.
- 32) Tinkler, S. M. B., Williams, D. M., Linder, J. E. and Johnson, N. W. : Kinetics of osteoclast formation : the significance of blood monocytes as osteoclast precursors during 1α -hydroxycholecalciferol-stimulated bone resorption in the mouse. J. Anat. **137** : 335-340, 1983.
- 33) Stanka, P. and Bargsten, G. : Experimental study on the haematogenous origin of multinucleate osteoclasts in the rat. Cell Tissue Res. **233** : 125-132, 1983.
- 34) Testa, N. G., Allen, T. D., Laitha, L. G., Onions, D. and Jarret, O. : Generation of osteoclasts *in vitro*. : J. Cell Sci. **47** : 127-137, 1981.