

図7 病期分類別の骨粗鬆症および椎体骨折の有病率

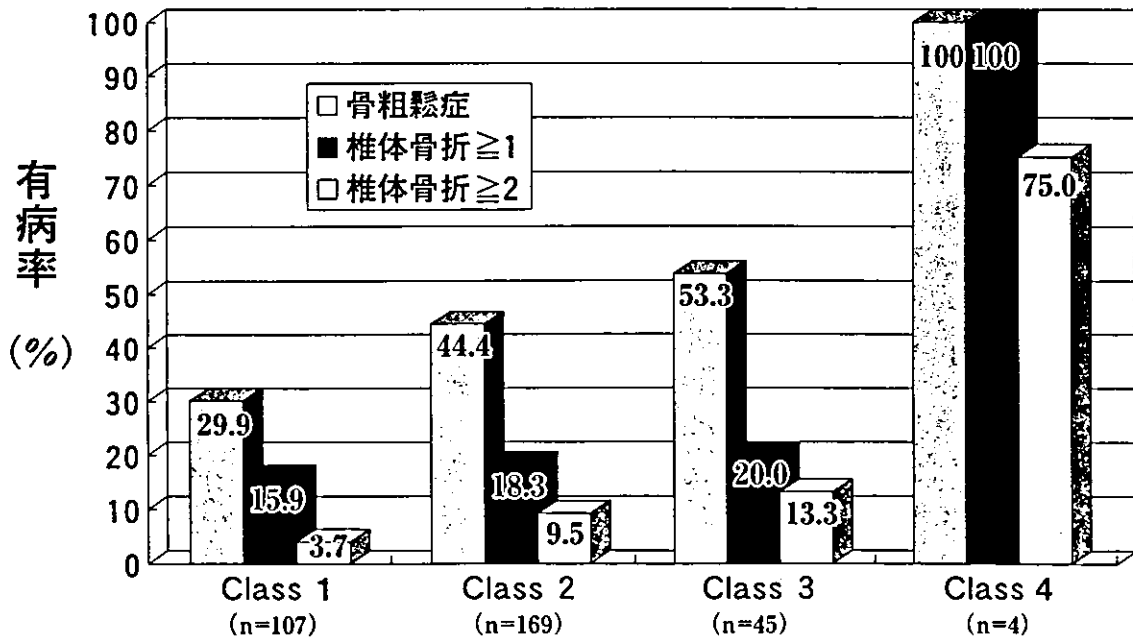


図8 機能障害度分類別の骨粗鬆症および椎体骨折の有病率

考 察

今回当科に通院中の患者で検討した結果、RA 症例の約40%に骨粗鬆症の合併があり、その半数の20%は椎体骨折を有しており、さらにその半数では2椎体以上に骨折がみられた。女性の年代別解析では、加齢につれて骨粗鬆症、

椎体骨折とも増加する傾向があり、年齢の要因が強いことがうかがえる。しかし、日本人女性の骨粗鬆症患者の年代別比率<sup>10)</sup>と比較すると、50歳以降では各年代とも今回示したRA患者における骨粗鬆症有病率が約2倍高いことになる。これは Haugeberg らの報告と一致する<sup>7)</sup>。RA患者に多くみられる骨粗鬆症は単に加齢に

伴う変化ばかりでなく, RA を有するが故にその危険性が高まるといえる。

RA 患者に骨粗鬆症が高率に合併する原因として, ① RA と骨粗鬆症はともに女性に多い疾患であること, ②性ホルモンなど内分泌環境の異常, ③炎症性サイトカインによる骨破壊, ④活動性の低下, ⑤グルココルチコイド使用, ⑥衰弱による低体重, ⑦栄養吸収障害, の7点が考えられる。RA 症例ではこれらの多因子が累積し骨粗鬆症が比較的早期からみられ, 椎体骨折を生ずる確率が高まる。そして, 病期および機能障害度が進むにつれて骨粗鬆症と椎体骨折の有病率は上昇し, 末期 RA の状態に陥っていく。一度椎体骨折を生じると新たな椎体骨折を起こしやすくなるが<sup>9)</sup>, 実際に末期 RA 患者では多重椎体骨折を多く認め, 5 椎体以上の骨折は18例あった。こうした患者は寝たきり生活を余儀なくされるばかりでなく, 死亡率も高まるとの報告もある<sup>9)</sup>。

RA 患者への長期にわたる GC 投与も骨粗鬆症のリスクを高める。今回の検討では GC 投与例は非投与例に比べて有意に骨粗鬆症の有病率が高く, 椎体骨折も多い傾向が見られた。また, GC の総投与量が多いほど, また投与期間が長いほど骨粗鬆症および椎体骨折は増える傾向が見られたが, 両群で統計学的な有意差は認めなかった。GC 投与により GC の副作用としての骨粗鬆症は増えるものの, 一方で GC の抗炎症作用によりサイトカイン産生が減り骨破壊が抑制されたり, また関節炎症状が軽快することにより活動性が向上し骨粗鬆症の発症が抑えられることもあると考えられる。

RA 患者ではいくつかの原因により骨粗鬆症をきたしやすく, その合併症としての椎体骨折は患者の ADL および QOL を著しく障害する要因である。末期 RA の病態のうち, 骨粗鬆症による椎体骨折, 少なくとも多重骨折は早期からの予防的治療により回避し得ると考える。強力な骨吸収抑制剤であるビスフォスフォネートはこれまでのエチドロネートに加えアレンドロネートやリセドロネートも本邦で投与可能となった。これらは原発性骨粗鬆症の椎体骨折抑制

効果を有するのみならず<sup>2)4)6)12)15)</sup>, GC 誘発性骨粗鬆症の椎体骨折も抑えると報告されており<sup>1)3)13)</sup> 大いに期待できる。RA に対してのこうした薬剤の治療効果を検討し, RA 患者の骨粗鬆症予防の戦略を構築することが必要である。

## 文 献

- 1) Adachi, J.D., Bensen, W.G., Brown, J., et al.: Intermittent etidronate therapy to prevent corticosteroid-induced osteoporosis. *N. Engl. J. Med.*, 337: 382-387, 1997.
- 2) Black, D.M., Cummings, S.R., Karpf, D. B., et al.: Randomized trial of alendronate on risk of fracture in women with existing vertebral fractures. *Lancet*, 348: 1535-1541, 1996.
- 3) Cohen, S., Levy, R., Keller, M., et al.: Risedronate therapy prevents corticosteroid-induced bone loss. a twelve-month, multicenter, randomized, double-blind, placebocontrolled, parallel-group study. *Arthritis Rheum.*, 42: 2309-2318, 1999.
- 4) Cummings, S.R., Black, D.M., Thompson, D.E., et al.: Effect of alendronate on risk of fracture in women with low bone density but without vertebral fractures. *JAMA*, 280: 2077-2082, 1998.
- 5) Ensrud, K.E., Thompson, D.E., Cauley, J. A., et al.: Prevention vertebral deformities predict mortality and hospitalization in older women with low bone mass. *J. Am. Geriatr. Soc.*, 48: 241-249, 2000.
- 6) Harris, S.T., Watts, N.B., Genant, H.K., et al.: Effects of risedronate treatment on vertebral and nonvertebral fractures in women with postmenopausal osteoporosis. *JAMA*, 282: 1344-1352, 1999.
- 7) Haugeberg, G., Uhlig, T., Falch, J.A., et al.: Bone mineral density and frequency osteoporosis in female patients with rheumatoid arthritis: results from 394

- patients in the Oslo County Rheumatoid Arthritis Register. *Arthritis Rheum.*, 43 : 522-530, 2000.
- 8) Hochberg, M.C., Chang, R.W., Dwosh, I., et al.: The American College of Rheumatology 1991 revised criteria for the classification of global functional status in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.*, 35 : 498-502, 1992.
- 9) Lindsay, R., Silverman, S.L., Cooper, C., et al.: Risk of new vertebral fracture in the year following a fracture. *JAMA*, 285 : 320-323, 2001.
- 10) 折茂 肇, 杉岡洋一, 福永仁夫, 他: 原発性骨粗鬆症の診断基準—1996年度改訂版一. *日骨代謝誌*, 14, 219-223, 1997.
- 11) 折茂 肇: 原発性骨粗鬆症の診断基準—2000年度改訂版一. *日骨代謝誌*, 18, 76-81, 2001.
- 12) Reginster, J.Y., Minne, H.W., Sorensen, O.H., et al.: Randomized trial of the effects of risedronate on vertebral fractures in women with established postmenopausal osteoporosis. *Osteoporos Int.*, 11 : 83-91, 2000.
- 13) Saag, K.G., Emkey, R., Schnizer, T.J., et al.: Alndronate for the prevention and treatment of flucocorticoid-induced osteoporosis. *N. Engl. J. Med.*, 339 : 292-299, 1998.
- 14) Steinbrocker, O., Traeger, C.H., Batterman, R.C.: Therapeutic criteria in rheumatoid arthritis. *JAMA*, 140 : 659-662, 1949.
- 15) Storm, T., Thamsborg, G., Steiniche, T., et al.: Effect of intermittent cyclical etidronate therapy on bone mass and fracture rate in women with postmenopausal osteoporosis. *N. Engl. J. Med.*, 322 : 1265-1271, 1990.

## ABSTRACT

Osteoporosis and vertebral fractures in the patients with rheumatoid arthritis, as influential complications with impaired daily activities

Hisanori Nakayama, Toshihiro Matsui, Syoji Sugii, Yoshinori Ozawa, Shigeto Tohma

Division of rheumatology, National Sagamihara Hospital

Complications of osteoporosis increase the risk of vertebral fractures (VFs) which could reduce daily activities in patients with rheumatoid arthritis (RA). Though patients suffering from osteoporosis and VFs are not uncommon in RA, the rate of their occurrence in Japan remains unclear. In this study, we investigated the prevalence of osteoporosis and VFs in Japanese patients with RA. We measured bone mineral density (BMD) both of lumbar spine and of femoral neck, and checked thoracic and lumbar VFs in 415 patients with RA (39 men, 47 premenopausal women, and 329 postmenopausal women). As a result, 165 out of all 415 patients (39.8%) were diagnosed as osteoporosis, and the occurrence of osteoporosis in female patients with RA (41.8% ; 157 out of 376 patients) was approximately twice as high as that of primary osteoporosis. None of the premenopausal female patients had osteoporosis. Eight out of 39 male patients (20.5%) had osteoporosis, however, its occurrence was significantly less frequent than in

female patients. VFs were observed in 83 out of 415 patients (20.0%) and, among them, 40 patients (9.6%) had two or more fractured vertebrae. The occurrence of osteoporosis and VFs were more frequent in patients who are older and have longer disease duration of RA, more severe destruction of joints, and lower daily activities. Compared with the patients without use of glucocorticoid (GC), those treated with GC had higher rate of complication of osteoporosis ( $p < 0.001$ ) and of VFs (not significant). These results suggest that prevention of osteoporosis and VFs may improve the daily activities of patients with RA.

# リウマチ性疾患患者にみられる 二次性骨粗鬆症

国立相模原病院リウマチ科

中山久徳

## はじめに

リウマチ性疾患(CTD: connective tissue disease)を有する患者では、関節痛や筋痛に伴う身体活動性の低下、あるいは治療に使われるグルココルチコイド(GC)の影響、また炎症性疾患であることなどから二次性骨粗鬆症をきたすことが多く、これによる脆弱性骨折がよくみられる。こうした骨粗鬆症や骨折は原疾患がコントロールされた後も患者のADLやQOLを著しく損なうため難治性合併症と考えるべきである。しかしこれまで医師も患者もこの合併症に対する認識が乏しく、そのほとんどは加齢現象の一つとして片づけられていた。今や骨粗鬆症による骨折は患者個人の障害にとどまらず、社会的そして経済的に大きな損害であると認知されるようになり、わが国でも骨粗鬆症への関心が高まってきた。加齢や閉経に伴う原発性骨粗鬆症では診断指針も確立し、ビスフォスフォネート(BP)をはじめ各種骨粗鬆症治療薬の効果に関する臨床データも多く報告されている。一方、CTD患者にみられる二次性骨粗鬆症は複数の成因が絡んでおり、病態はより複雑である。GCによる骨粗鬆症に関してはいくつかのガイドラインが提唱されているが、CTDに限った骨粗鬆症の検討は未だ少ない。

以下、CTD患者にみられる骨粗鬆症の臨床実態を自験例を用いて明らかにし、病態生理と予防・治療法について概説する。

## 1. リウマチ性疾患患者における骨粗鬆症および椎体骨折の有病率

CTD患者に骨粗鬆症の合併が多いことは臨床の現場では周知のことであったが、その実態はこれまで明らかにされていなかった。そこで、当科通院中の患者について骨粗鬆症および椎体骨折の有病率を検討した。DXA法にて腰椎および大腿骨近位部の骨密度を測定し得たCTD患者のうち、これまでにホルモン補充療法やBPによる治療歴のない757例を対象とした。女性は684例(20~88歳)、男性は73例(32~84歳)であった。RAの患者は623例(82.3%)と最も多く、以下全身性エリテマトーデス38例(5.0%)、全身性硬化症17例(2.2%)、シェーグレン症候群16例(2.1%)、多発性筋炎・皮膚筋炎14例(1.7%)、リウマチ性多発筋痛症14例(1.7%)がこれに続いた。

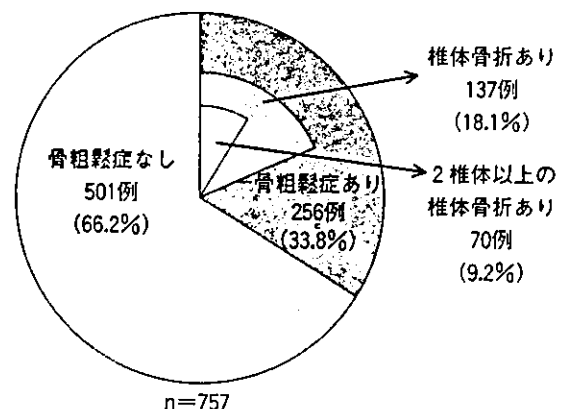


図1 リウマチ性疾患患者における骨粗鬆症および椎体骨折の有病率

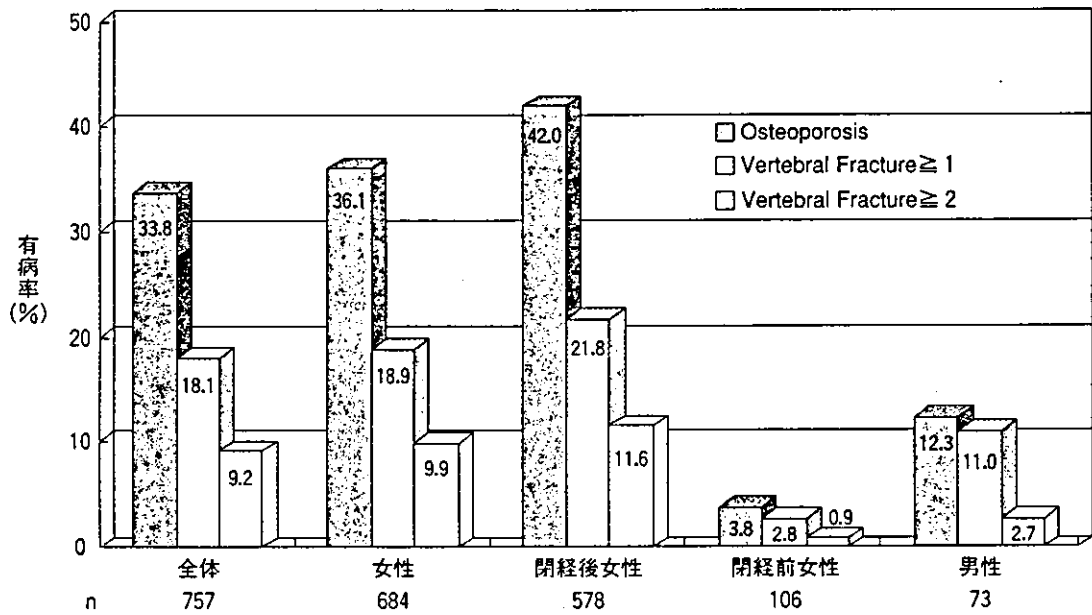


図2 性別、閉経の前後による比較

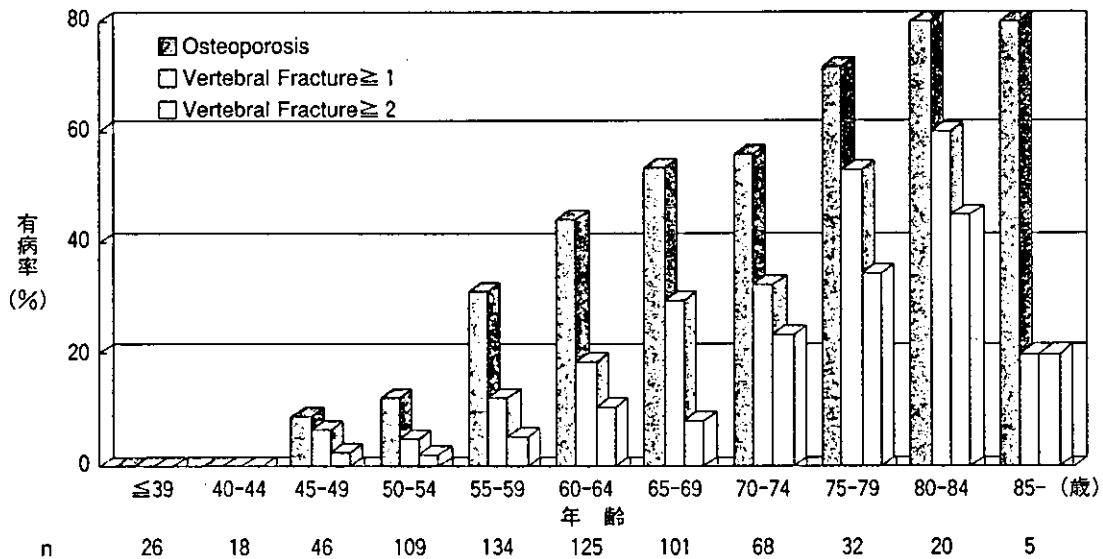


図3 リウマチ性疾患における骨粗鬆症および椎体骨折の年代別有病率(女性)

日本骨代謝学会の原発性骨粗鬆症診断基準<sup>1)</sup>に従うと、757例中256例(33.8%)は骨粗鬆症と診断された。胸腰椎単純X線写真にて椎体骨折の有無を調べたところ137例(18.1%)に圧迫骨折を認め、70例(9.2%)は2椎体以上の多重骨折であった(図1)。骨粗鬆症は女性の36.1%に合併しており、男性(12.3%)の約3倍多くみられた。一方、椎体骨折は男性では

11.0%に認められ、女性では18.9%であり男性の2倍弱にとどまった。CTDにおいても男性は女性に比べて骨粗鬆症の有病率は低いが、骨密度が骨粗鬆症域にまで低下すると女性より圧迫骨折を起こしやすい傾向があるといえる。閉経後女性は42.0%に骨粗鬆症の合併があり、21.8%に椎体骨折を認めた(図2)。

女性の年代別有病率をみると、閉経を迎える

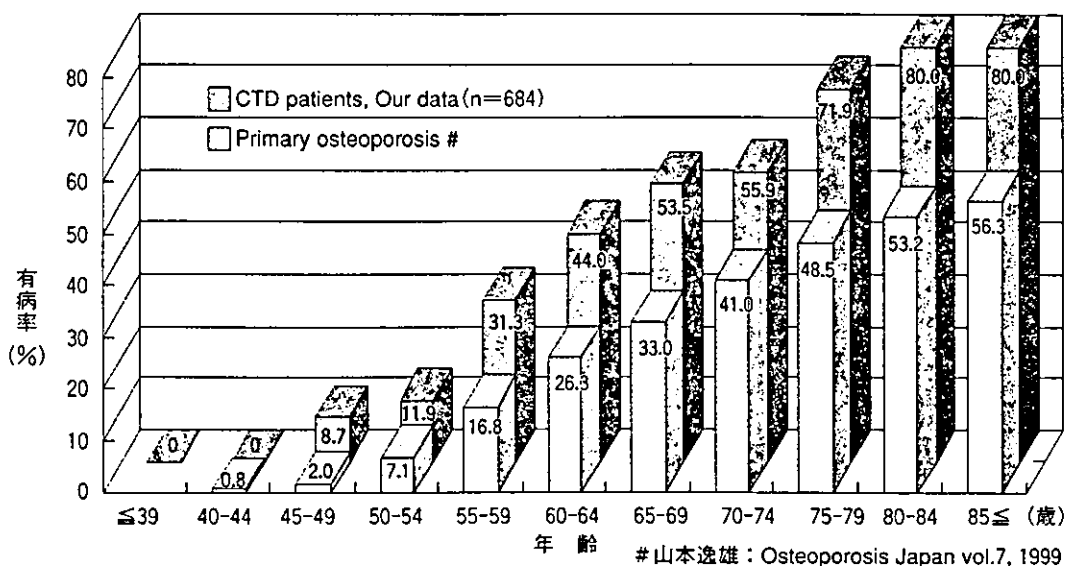
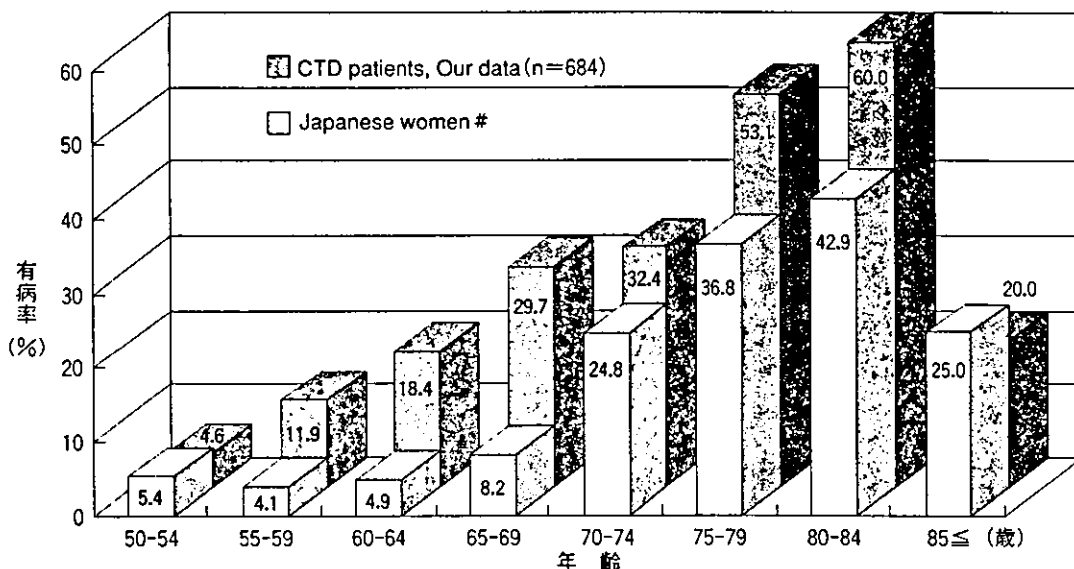


図4 原発性骨粗鬆症との比較(女性)



※ここでの一般女性の椎体骨折は、平均椎体高の3SDをカットオフポイントとして判定している

# Ross PD, Fujiwara S, et al: Int J Epidemiol 24(6): 1171-1177, 1995

図5 一般女性との椎体骨折の有病率の比較

50歳前後より骨粗鬆症や椎体骨折がみられるようになり、加齢とともに有病率は高まった(図3)。山本らが報告した<sup>2)</sup>日本人女性の年代別原発性骨粗鬆症に相当する人口割合と比較すると(図4)、今回検討したCTD患者は各年代とも一般人口に比べて骨粗鬆症の有病率が高いことが明らかである。また、藤原らが報告した<sup>3)</sup>わが国の一般女性の椎体骨折の年代別有病率と

比べても(図5)CTD患者で高率である。このように、CTD患者では、骨粗鬆症や椎体骨折は一般人口に比して各年代とも高頻度でみられる。したがって、CTDにおける骨粗鬆症や椎体骨折は単に加齢に伴う変化のみならず、疾患に特異的な要因により危険性が高まると考えられる。

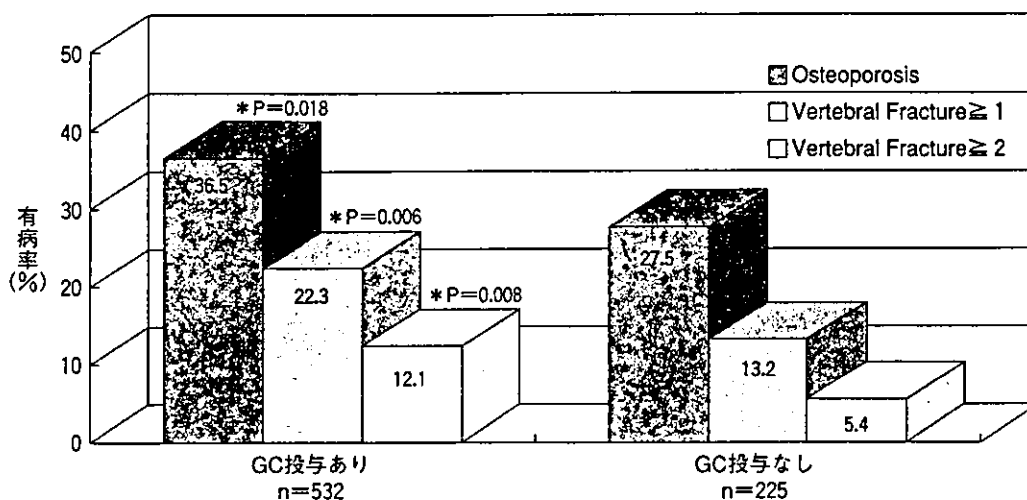


図6 グルココルチコイド投与の有無による骨粗鬆症および椎体骨折の有病率の比較

## 2. グルココルチコイドの影響

GCは532例(70.3%)に投与されており、その平均投与量はプレドニゾン換算5.8mg/日であった。GC投与群では45.1%に骨粗鬆症が合併しており、22.3%に椎体骨折、12.1%に2椎体以上の骨折を認めた。一方、GC投与の有無による骨粗鬆症および椎体骨折の有病率を比較すると図6に示すとおりいずれもGC投与群で有意に高かった。GCの総投与量が多く投与期間が長いほど有病率も高まる傾向を示した。

## 3. 関節リウマチとそれ以外のリウマチ性疾患との比較

RAとRA以外のCTD(nonRA)とを比較したところ(表1)、骨粗鬆症はRA群で35.2%、nonRA群では27.6%でありRA群で多い傾向がみられた。しかし、RA群の平均年齢はnonRA群に比べ有意に高かったため、両群の年齢を補正して再検討したところ、RA群で34.9%、nonRA群では31.0%となり、その差は縮まったものの、RA群で骨粗鬆症合併率が多い傾向は変わらなかった。RA群はnonRA群と比べてGCの使用率は低く、使用量は少ないにもかかわらず、骨粗鬆症の頻度は高かった。

これはRAではGC使用以外の要因、つまり

関節炎による身体活動性の低下やRAの疾患自体でも骨粗鬆症を起こしやすくしていることを示唆する。椎体骨折の有病率は、両群間に殆ど差がみられなかった。

骨粗鬆症を引き起こす危険因子としては、高齢、GC使用、罹患期間が長いこと、疾病がRAであることなどが挙げられるが、ロジスティック回帰分析の結果最も有意な規定因子は年齢であった<sup>1)</sup>。

## 4. リウマチ性疾患にみられる骨粗鬆症の病態生理

CTD患者の多くは関節痛や筋痛を伴い身体活動性の低下を余儀なくされる。これにより骨への力学的負荷は減少し骨は脆くなる。またCTD患者は長期にわたりGCによる治療を受けていることが多く、これも骨の脆弱化に拍車をかける。GCは骨芽細胞の数や機能を低下させ、骨形成を抑制する。また、腸管からのカルシウム吸収を抑え、尿細管でもカルシウム再吸収を抑制する結果、体内のカルシウムバランスは負に傾き、二次性副甲状腺機能亢進症をきたして骨吸収を促進させる。さらにGCは性腺機能を低下させ、骨量を減少させる。

最近の分子生物学を駆使した研究の進歩により、RAにみられる骨破壊のメカニズムが明ら



表1 RA と non RA との比較

Variable	CTD (n = 757)		p value
	RA (n = 623)	non RA (n = 134)	
Age, * years	60.9±9.9	57.4±14.2	0.007
Women, no (%)	561 (90.0)	123 (91.8)	
Premenopausal, no (%)	75 (12.0)	31 (23.1)	
Postmenopausal, no (%)	486 (78.0)	92 (68.7)	
Duration after menopause, * year	13.7±8.5	15.1±10.2	0.140
Men, no (%)	62 (10.0)	11 (8.2)	
Body weight, * kg	51.8±8.6	52.7±9.0	0.276
Duration of disease, * year	15.2±10.5	13.3±11.2	0.697
Osteoporosis, no (%)	219 (35.2)	37 (27.6)	0.108
Vertebral fracture ≥1, no (%)	114 (18.3)	23 (17.2)	0.757
Vertebral fracture ≥2, no (%)	56 (9.0)	14 (10.4)	0.597
Glucocorticoid, no (%)	430 (69.0)	102 (76.1)	0.103
Total PSL equivalent dose, * mg	9256.3±11420.6	12212.2±14906.3	0.032
Duration of administration, * day	1853.2±2204.4	1970.5±2489.0	0.614
Mean PSL equivalent dose, * mg/day	4.9±1.9	41.8±172.4	0.015
Lumbar spine BMD, * g/cm <sup>2</sup>	0.818±0.168	0.845±0.167	0.092
Lumbar spine Z-score, *	-0.2±1.0	-0.2±1.0	1.000
Femoral neck BMD, * g/cm <sup>2</sup>	0.605±0.143	0.658±0.130	<0.001
Femoral neck Z-score, *	-0.4±1.3	0.0±1.2	0.001
Total hip BMD, * g/cm <sup>2</sup>	0.658±0.151	0.729±0.141	<0.001
Total hip Z-score, *	-0.5±1.2	0.0±1.1	<0.001
Metacarpal bone BMD, * mmAL	1.838±0.540	2.215±0.413	<0.001
BAP, * U/L	29.7±11.7	24.6±9.5	<0.001
urinary NTx, * nmoLBCE/mmoL · Cr	63.1±32.5	47.6±22.5	<0.001

\* : mean ± SD

かにされつつある。RANKL (receptor activator of NF- $\kappa$ B ligand) が破骨細胞の分化から活性化までを制御していることが知られていたが、RAではRANKLを過剰に発現させる機序が解明された。以前よりRAではその骨破壊領域に多くの破骨細胞が確認されており通常の骨リモデリングにはみられない別の破骨細胞活性化の機構が存在すると考えられていたが、高柳ら<sup>5)</sup>はRAの滑膜線維芽細胞がRANKLを発現して破骨細胞分化を誘導することを示した。また、滑膜に浸潤したT細胞はマクロファージ系細胞からのTNF- $\alpha$ 、IL-1などの炎症性、骨吸収性サイトカイン産生を亢進させ、滑膜線維芽細胞や骨芽細胞のRANKL発現を促進している。さらには活性化T細胞表面にもRANKLが発現していることが明らかにされた。

このように、RAではRANKLが過剰発現しているが、Tリンパ球から産生され破骨細胞分化に抑制的に働くIFN  $\gamma$ は減少しており、RANKLとIFN  $\gamma$ の均衡は崩されて滑膜での破骨細胞分化が促進すると考えられている<sup>6)</sup>。

## 5. リウマチ性疾患患者の骨粗鬆症および骨折の予防と治療

閉経後骨粗鬆症患者の骨密度増加や新規骨折防止にBPが優れた効果を示すことは多くの大規模臨床試験で立証されている。これはBPが破骨細胞のアポトーシスを誘導し、骨吸収抑制作用を有することによる。前述の通りRAでは破骨細胞の働きが亢進しており、BPはこれを抑える有効な薬剤であるといえる。ステロイド

性骨粗鬆症に対するBPの有用性を示すエビデンスも数多く報告されている。これらを受けて、アメリカリウマチ学会は2001年に改訂した「ステロイド誘発性骨粗鬆症の予防と治療に関するガイドライン」<sup>7)</sup>の中で、プレドニゾン換算で5 mg/日以上を3カ月以上服用している患者では腰椎あるいは大腿骨頸部の骨密度T scoreが-1未満であればBPの投与を開始するよう勧告している。2002年のカナダのガイドライン<sup>8)</sup>においてもステロイド性骨粗鬆症の予防および治療の第1選択薬剤はBPであると明記されており、治療に関してはコンセンサスが得られたとあってよい。但しBPは骨に長期間残存し、胎児への影響も懸念されるため妊娠可能年齢の女性患者へのBPの投与は控えるべきである。現在わが国でもetidronate(ダイドロネル<sup>®</sup>)、alendronate(ボナロン<sup>®</sup>、フォサマック<sup>®</sup>)およびrisedronate(ベネット<sup>®</sup>、アクトネル<sup>®</sup>)の3種類のBPが使えるようになった。当科ではRA患者に対してこれらのBP(etidronateは200mgと400mg間歇投与の2群)とアルファカルシドールおよびコントロールの計6群の薬剤介入効果を比較する前向きコホート研究が進行中である。昨年使用可能となったrisedronate以外の5群は1年以上観察できており、骨代謝マーカーの変動や骨密度の変化および薬剤開始6カ月以降の新規椎体骨折の出現率を比べるとalendronateとetidronate 400mg間歇投与の効果が他群に比べて優れているといえる<sup>9)</sup>。CTD患者の骨粗鬆症や骨折の予防や治療にはBP投与の他に原疾患のコントロールや転倒防止の工夫なども有効である。GCの使用は骨粗鬆症を誘発するが、早期の関節炎に対する適切なGC投与は関節痛を緩和し関節可動域を維持させ身体活動性を向上させ却って骨粗鬆症の発症が抑えられることもある<sup>10)</sup>。近々TNF $\alpha$ などのサイトカインを抑制する生物製剤がRA治療に用いられるようになるが、その機序から骨粗鬆症治療にも有効であろうと期待

されている。

## おわりに

CTD患者の骨粗鬆症および椎体骨折は、医師と患者の双方がこれを重大な合併症であると認識し、早期から予防する意識を持つことによりリスクを回避しうる。骨粗鬆症の検査法や治療法は進歩しており、それらを活用するためのガイドラインも作られている。「骨を折る(骨折する)前に骨を折る」環境は整いつつあるといえる。

## 文 献

- 1) 折茂肇：原発性骨粗鬆症の診断基準 2000年改訂版。日本骨代謝学会誌 18：76-81, 2001
- 2) 山本逸雄：骨粗鬆症人口の推定。Osteoporosis Japan 7(1)：10-11, 1999
- 3) Ross PD, Fujiwara S, et al：Vertebral fracture prevalence in women in Hiroshima compared to Caucasians or Japanese in the US. Int J Epidemiol 24(6)：1171-1177, 1995
- 4) 中山久徳, 萩原太, 當間重人：関節リウマチ患者における骨粗鬆症と椎体骨折の有病率の検討。第47回日本リウマチ学会シンポジウム 12, 2003
- 5) Takayanagi H, Iizuka H, Juji T, et al：Involvement of receptor activator of nuclear factor  $\kappa$ B ligand/osteoclast differentiation factor in osteoclastogenesis from synoviocytes in rheumatoid arthritis. Arthritis Rheum 43：259-269, 2000
- 6) Takayanagi H, Ogasawara K, Hida S, et al：T-cell-mediated regulation of osteoclastogenesis by signaling cross-talk between RANKL and IFN- $\gamma$ . Nature 408：600-605, 2000
- 7) American College of Rheumatology Ad Hoc Committee on Glucocorticoid-Induced Osteoporosis：Recommendations for the prevention and treatment of Glucocorticoid-Induced Osteoporosis 2001 update. Arthritis Rheum 44(7)：1496-1503, 2001
- 8) Jacques P Brown, Robert G Josse, for the Scientific Advisory Council of the Osteoporosis

- Society of Canada : 2002 clinical practice guidelines for the diagnosis and management of osteoporosis in Canada. CMAJ 167(10 suppl) : S1-34, 2002
- 9) 中山久徳, 萩原太, 當間重人: 関節リウマチ患者に対する各種骨粗鬆症治療薬介入の効果(第1報). 第47回日本リウマチ学会ワークショップ, 2003
- 10) 中山久徳, 當間重人: 末期関節リウマチにおける骨粗鬆症および椎体骨折. 臨床リウマチ 14 : 139-147, 2002
- 11) 日本骨粗鬆症学会: 骨粗鬆症の治療に関するガイドライン(2002年度改訂版): Osteoporosis Jpn (10), 2002

実験治療 第671号(2003)別刷

特集：骨粗鬆症の实地診療

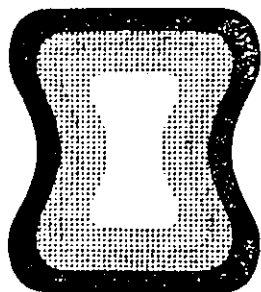
基礎疾患を有する患者さんへの対応  
(リウマチ合併例への対応)

国立相模原病院 リウマチ科

中山久徳

武田薬品工業株式会社

大阪府中央区道修町四丁目1番1号



## ■ 骨粗鬆症の実地診療

# 基礎疾患を有する患者さんへの対応 (リウマチ合併例への対応)

国立相模原病院 リウマチ科

中山 久徳 Hisanori Nakayama

### はじめに

骨粗鬆症は低骨量を呈する代表的な疾患であり、閉経後女性や高齢者にみられる原発性骨粗鬆症と、基礎疾患や薬剤など特定の原因により生じる続発性骨粗鬆症とに大別できる(図1)。骨密度の低下している患者を診るときには原発性骨粗鬆症以外の原因も念頭に置き、その有無を確認することが大切である。

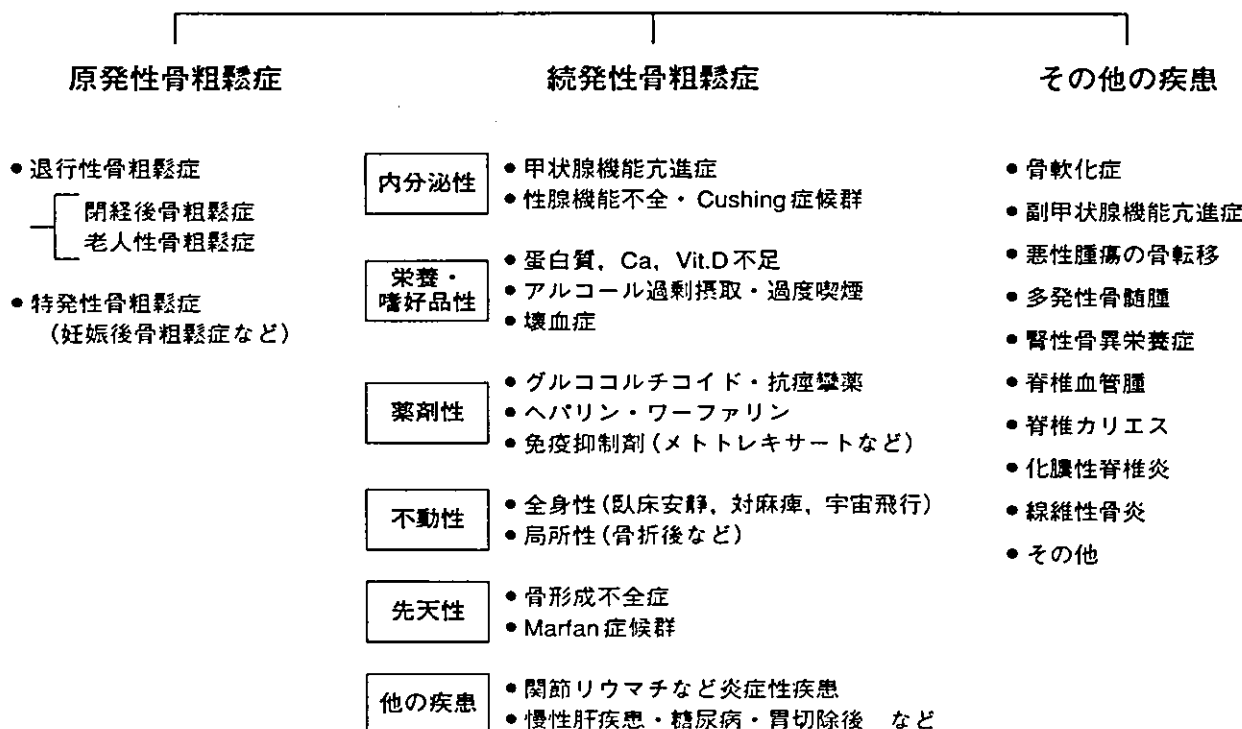
本稿では、続発性骨粗鬆症の中でも頻度が高い関節リウマチ(RA)に伴う骨粗鬆症につ

いて、その臨床的実態や予防・治療法を中心に概説する。

### 関節リウマチ患者にみられる骨粗鬆症

RAは免疫異常を伴う全身性の慢性・炎症性疾患であり、進行性かつ多発性の関節破壊が特徴的である。関節滑膜が病変の主座であり、滑膜の炎症は増殖性変化を伴い、次第に周辺の軟骨や骨を侵食し、関節の変形へと進展していく。また骨粗鬆症もRAにおいて問題となる重要な骨病変(表1)である。

図1. 低骨量を呈する疾患の分類



(原発性骨粗鬆症の診断基準(2000)より、一部改変)

これは傍関節性骨粗鬆症と全身性骨粗鬆症に分けられる。前者はRAの罹患関節にみられる所見であり、発症から数カ月で認められる。全身性骨粗鬆症は炎症性サイトカインの関与のみならず幾つもの原因により引き起こされ、骨折の発生リスクを高める。

RAにみられる骨粗鬆症や脆弱性骨折は、原疾患がコントロールされた後も患者のADLやQOLを著しく損なうため、難治性合併症と考えるべきである。

### 関節リウマチにおける骨粗鬆症の成因

RAでは炎症性サイトカインがRANK-RANKL系を賦活化させ、破骨細胞の分化や活性化が進み、骨吸収が亢進している。

また、RAの治療に使われることの多いグルココルチコイド(GC)は、①骨芽細胞の数や機能を低下させ骨形成を抑制する、②骨芽細胞を介して破骨細胞の機能を亢進させる、③腸管からのCa吸収抑制や尿細管でのCa再吸収抑制の結果、体内Caは欠乏し続発性副甲状腺機能亢進症を来して骨吸収を促進させる、更に④性腺機能を低下させる、ことより骨量を減少させる。

こうした炎症性サイトカインやGCの影響以外にも、RAに伴う骨粗鬆症には表2に掲げた複数の成因が存在し、これらが絡み合い状況をより複雑にしている。

表1. RAにおいて問題となる骨病変

- 骨破壊 → 関節変形
- 骨粗鬆症 ———— I. 傍関節性骨粗鬆症  
II. 全身性骨粗鬆症
- 骨折
- 人工関節のゆるみ
- 移植骨の脆弱性 など

## 関節リウマチ患者にみられる骨粗鬆症および椎体骨折の臨床的実態

### 1. 骨粗鬆症と椎体骨折の有病率(図2)

当科通院中のビスフォスフォネート(BP)投与歴のないRA患者675例について検討したところ、原発性骨粗鬆症診断基準<sup>1)</sup>による骨粗鬆症は35.4%にみられた。

この基準は、原則として腰椎骨密度により骨粗鬆症を判定するものであるが、RA患者における骨粗鬆症診断には腰椎のみでなく、大腿骨近位部の骨密度も考慮されるべきと考えている。

その理由は、①RA患者では腰椎骨密度は椎体骨折のリスクを予想するにはふさわしくない<sup>2)</sup>こと、②GC投与による骨量減少は腰椎より大腿骨頸部で顕著であること、また③腰椎では退行性変化により高齢者ではしばしば骨密度の実勢を反映しないこと、である。

そこで当科では「RA患者では脆弱性骨折を有するかあるいは腰椎、大腿骨頸部または大腿骨近位部全体の骨密度のいずれかがYAMの70%未満であるとき骨粗鬆症と診断する」との独自基準を設けている。これに従うとRA患者のうち360例(53.3%)が骨粗鬆症と診断された。

表2. RAに伴う骨粗鬆症の発症に関する因子

- ① 炎症性サイトカインによる骨破壊 (TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6など)
- ② 身体的活動性の低下、不動 → 力学的刺激の減少
- ③ 治療薬の影響(グルココルチコイドなど)
- ④ 性ホルモンなど内分泌環境の異常
- ⑤ 栄養吸収障害(Ca, Vit.D)
- ⑥ 衰弱による低体重

閉経後女性では62.6%に骨粗鬆症の合併がみられ、閉経前女性と男性の有病率もそれぞれ16.5%、27.3%にも達していた。胸腰椎単純写真にて椎体骨折の有無を調べたところ130例(19.3%)に骨折を認め、67例(9.9%)は2椎体以上の多重骨折であった。

女性の骨粗鬆症および椎体骨折の年代別有病率をみると(図3)、閉経を迎える50歳前後より高まり加齢とともに上昇する。本邦の女性の年代別原発性骨粗鬆症に相当する人口割合<sup>3)</sup>と比較すると、RA患者は各年代とも一般人口に比べて骨粗鬆症の有病率が高いことが明らかである(図3)。またRAにみられる椎体骨折も一般人口の年代別有病率の既報<sup>4)</sup>に比べて高率であった。

このようにRAでは骨粗鬆症や椎体骨折は一般人口に比して各年代とも高頻度でみられる。したがってRA患者にみられる骨粗鬆症や椎体骨折は、単に加齢の影響のみならずRAに絡んだ要因によりその危険性が高まるといえる。また、RAの病期や機能障害度が進むにつれて骨粗鬆症、椎体骨折とも高率にみられるようになり、RAの重症度やADLと

の相関も強かった。

## 2. グルココルチコイドの影響(図4)

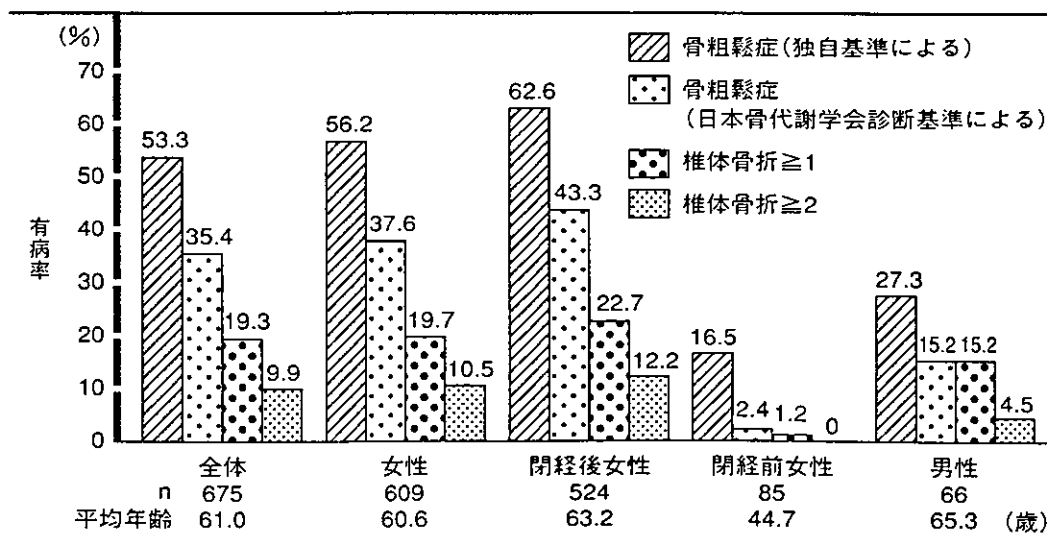
GCは471例(69.8%)に投与されており、その平均投与量はプレドニゾロン(PSL)換算4.8mg/日であった。GC投与群では58.8%に骨粗鬆症(独自基準による)が合併しており、20.0%に椎体骨折、10.0%に2椎体以上の骨折を認め、いずれもGC非投与群に比べ高率であった。

GCの総投与量が算出可能であった症例について調べたところ、PSL換算10g以上では骨粗鬆症および椎体骨折とも有意に高頻度であった。またGC投与期間が長いほど、いずれの有病率も高まる傾向を示した。

## 関節リウマチ患者の骨粗鬆症の予防と治療

RAにおける骨粗鬆症は他の続発性骨粗鬆症と同様に、基礎疾患であるRAの活動性を抑えて骨量減少に歯止めをかける必要がある。このためRAと診断された早い段階から、抗リウマチ薬などを用いた適切な治療を行うことが大切である。

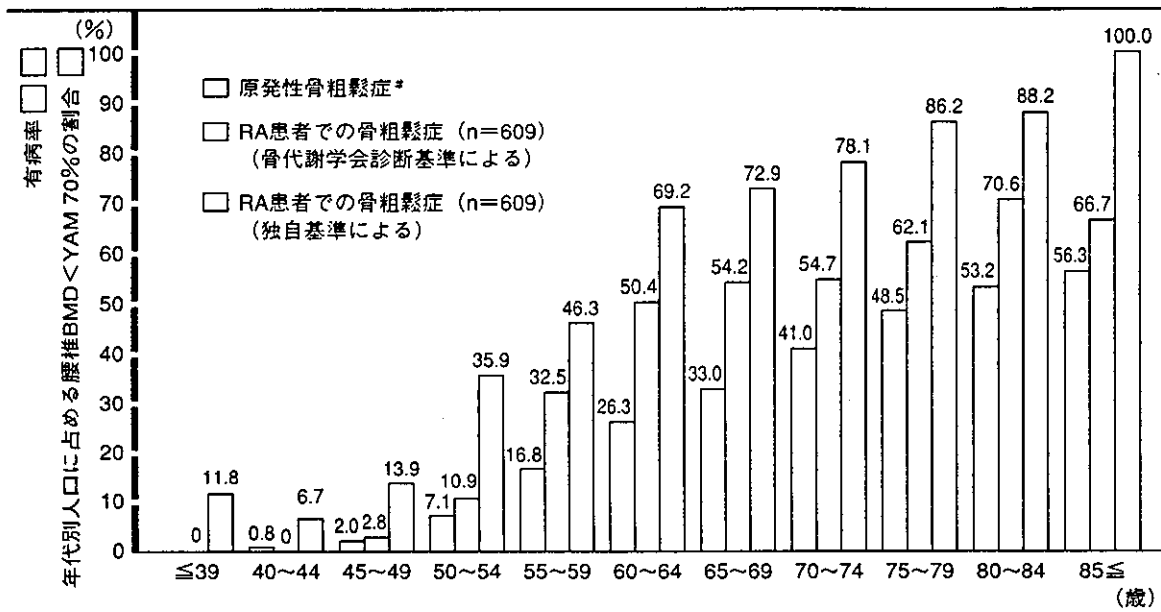
図2. RA患者における骨粗鬆症および椎体骨折の有病率



GCの使用は骨粗鬆症を誘発するが、関節炎に対して少量のGC投与が関節痛を緩和し関節可動域制限を防ぎ身体活動性を向上させることにより、かえって骨粗鬆症の発症を抑

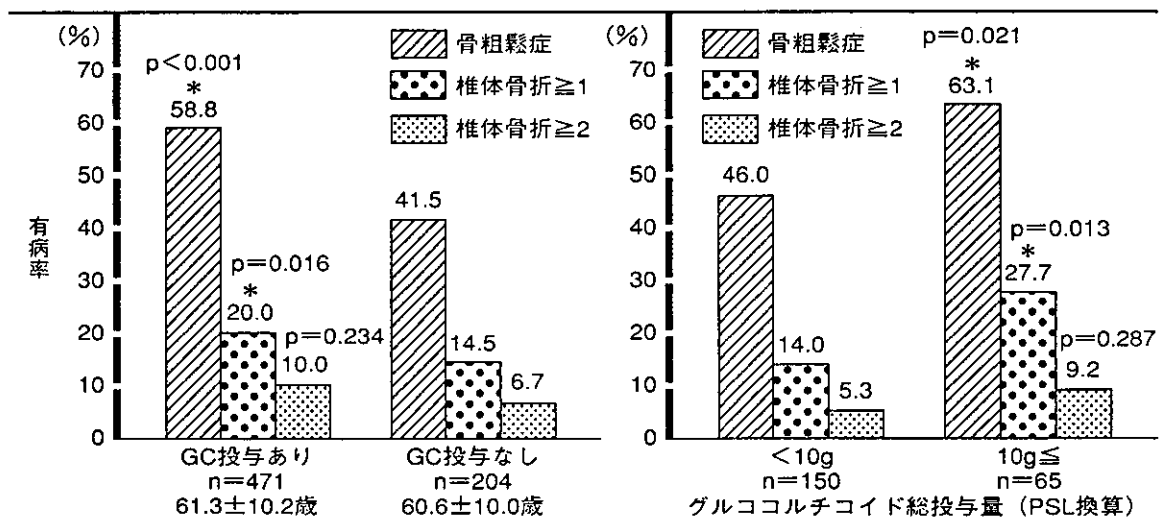
えることもある。しかし、その後の疾患コントロールのためGCの長期投与を余儀なくされることも多く、総投与量の増加に伴い骨粗鬆症のリスクを高める。

図3. 原発性骨粗鬆症との比較(女性)



(\*山本逸雄: Osteoporosis Japan, Vol.7, 1999)

図4. グルココルチコイド投与による骨粗鬆症および椎体骨折の有病率の比較





GC誘発性骨粗鬆症の予防・治療に関しては幾つかのガイドラインが示されている(表3)。新しいガイドライン<sup>5)~7)</sup>ほど治療開始となる対象が広げられており、最新の英国のガイドライン<sup>7)</sup>は、GCを3カ月以上内服中もしくは内服予定の患者で、65歳以上または脆弱性骨折の既往があれば、GCの投与量や骨密度にかかわらず薬物治療を開始すべきと提言している。使用薬剤に関しては、2000年以降の指針では骨折予防効果に強いエビデンス

を有するBPが第一選択薬とされており、既にコンセンサスが得られた治療といえる。ただし、妊婦や授乳婦へのBP投与は避けるべきであり、腎不全患者には減量するなどの配慮が必要である。こうした薬物治療に加えてRA患者には骨折を起こさないように転倒や尻もちの予防策(杖歩行、手すり、椅子の座位を高くするなど)を指導することも重要である。

表3. グルココルチコイド誘発性骨粗鬆症の予防・治療に関するガイドラインの比較

	ACR (Arthritis Rheum ; 39) 1996	UK Consensus Group (J Intern Med ; 244) 1998	Canadian Group (Semin Arthritis Rheum ; 29) 2000	ACR (Arthritis Rheum ; 44) 2001	RCP 2002
対 象	PSL換算 7.5mg/日以上、 6カ月以上服用中、 服用予定	PSL換算 7.5mg/日以上、 6カ月以上服用中、 服用予定	PSL換算 7.5mg/日以上、 3カ月以上服用中、 服用予定	PSL換算 5mg/日以上、 3カ月以上服用中、 服用予定	GCを3カ月以上服用、 または 服用予定 (量は問わない)
指針の特徴	骨密度正常、減少で 指針を分ける	高リスク群 (65歳以上、骨折既往あり PSL換算 $\geq$ 15mg/日以上)、 骨密度減少例に薬物療法	治療前の骨密度に 関係なく予防・治療する 3カ月未満であっても Ca 1.5g + VD 800~1,000IU	薬物治療を 1, 2次予防に分ける 1次: 上記服用予定 2次: 上記服用中	65歳以上または 脆弱性骨折の既往あれば 骨密度、GC投与量に 関係なく薬物治療
骨量減少の 目安	BMD : T score < -1	BMD : T score < -1.5	BMDを薬物療法開始 の指標にしない	BMD : T score < -1	BMD : T score < -1.5
薬物療法の 基本	HRTが基本	性腺機能低下例ではHRT 性腺機能正常例ではBP	1, 2次予防ともBPが 基本	VDを基礎療法 1次予防: BP 2次予防: BP, HRT	BP(英国では GIOに承認)、 活性型VD, HRT, 経鼻カルシトニン
効果判定	BMD測定 1次予防: 6~12カ月ごと 2次予防: 12カ月ごと	BMD測定: 12カ月ごと	BMD測定: 12カ月ごと	BMD測定 1次予防: 6カ月ごと 2次予防: 12カ月ごと	BMD測定 (1~2年以内)、 骨吸収マーカー測定
治療変更を 考慮する基準 (BMDの減少)	治療前より 5%以上減少	治療前より 腰椎: 4%以上減少 大腿骨頸部: 7%以上減少	治療前より 腰椎: 3%以上減少 大腿骨頸部: 6%以上減少	言及せず	言及せず

- 文献 1) 折茂 肇: 日骨代謝誌, 18, 76, 2001.  
 2) Peel N.F., et al.: Ann. Rheum. Dis., 54 (10), 801, 1995.  
 3) 山本逸雄: Osteoporosis Jpn., 7 (1), 10, 1999.  
 4) Ross P.D., et al.: Int. J. Epidemiol., 24 (6), 1171, 1995.  
 5) American College of Rheumatology Ad Hoc Committee on Glucocorticoid-Induced Osteoporosis: Arthritis Rheum., 44 (7), 1496, 2001.  
 6) Brown J.P., Josse R.G., for the Scientific Advisory Council of the Osteoporosis Society of Canada: CMAJ, 167 (10 Suppl.), S1, 2002.  
 7) Royal College of physicians of London: 2002.

## EXTENDED REPORT

# Tartrate resistant acid phosphatase (TRAP) positive cells in rheumatoid synovium may induce the destruction of articular cartilage

H Tsuboi, Y Matsui, K Hayashida, S Yamane, M Maeda-Tanimura, A Nampei, J Hashimoto, R Suzuki, H Yoshikawa, T Ochi

*Ann Rheum Dis* 2003;**62**:196–203

**Objective:** To examine the role of tartrate resistant acid phosphatase (TRAP) positive mononuclear and multinucleated cells in the destruction of articular cartilage in patients with rheumatoid arthritis (RA).

**Methods:** The presence of TRAP positive cells in the synovial tissue of patients with RA was examined by enzyme histochemistry and immunohistochemistry. Expression of mRNAs for matrix metalloproteinases (MMPs) was assessed by the reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) and northern blot analysis. Production of MMPs by mononuclear and multinucleated TRAP positive cells was examined by immunocytochemistry, enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) of conditioned medium, and immunohistochemistry of human RA synovial tissue. In addition, a cartilage degradation assay was performed by incubation of <sup>35</sup>S prelabelled cartilage discs with TRAP positive cells.

**Results:** TRAP positive mononuclear cells and multinucleated cells were found in proliferating synovial tissue adjacent to the bone-cartilage interface in patients with RA. Expression of MMP-2 (gelatinase A), MMP-9 (gelatinase B), MMP-12 (macrophage metalloelastase), and MMP-14 (MT1-MMP) mRNA was detected in TRAP positive mononuclear and multinucleated cells by both RT-PCR and northern blot analysis. Immunocytochemistry for these MMPs showed that MMP-2 and MMP-9 were produced by both TRAP positive mononuclear and multinucleated cells, whereas MMP-12 and MMP-14 were produced by TRAP positive multinucleated cells. MMP-2 and MMP-9 were detected in the conditioned medium of TRAP positive mononuclear cells. TRAP positive mononuclear cells also induced the release of <sup>35</sup>S from prelabelled cartilage discs.

**Conclusion:** This study suggests that TRAP positive mononuclear and multinucleated cells located in the synovium at the cartilage-synovial interface produce MMP-2 and MMP-9, and may have an important role in articular cartilage destruction in patients with RA.

See end of article for authors' affiliations

Correspondence to:  
Dr Y Matsui Department of Orthopaedic Surgery, Osaka University Graduate School of Medicine, 2-2 Yamadaoka, Suita, Osaka 565-0871, Japan; ymatsui@sb4.so-net.ne.jp

Accepted 24 July 2002

Joint destruction in rheumatoid arthritis (RA) is characterised by invasion of the synovium into osteochondral tissue.<sup>1–3</sup> For bone absorption in RA, osteoclasts activated by inflammatory cytokines and chemokines are thought to have a central role, while certain cathepsins and matrix metalloproteinases (MMPs) secreted from osteoclasts seem to be key enzymes.<sup>3–7</sup>

In contrast with bone absorption in patients with RA, cartilage degradation at the cartilage-synovial interface seems to be more complex and involves several types of cells. The cartilage-synovial interface features particular cell types in RA, such as macrophage-like synoviocytes, fibroblast-like synoviocytes, osteoclasts, and chondrocytes.<sup>2</sup> Macrophage- and fibroblast-like synoviocytes that infiltrate into the cartilage seem likely to play a part in the degradation process, because such cells have the potential to produce many kinds of MMPs.<sup>8–11</sup> The chondrocytes in articular cartilage are also thought to be important in its destruction, because the stimulation of such cells by inflammatory cytokines (including tumour necrosis factor  $\alpha$  and interleukin 1) causes the secretion of many MMPs and initiates apoptosis.<sup>12–13</sup>

In the synovium at sites of cartilage destruction in patients with RA, tartrate resistant acid phosphatase (TRAP) positive mononuclear and multinucleated cells are often seen.<sup>14–15</sup> TRAP positive multinucleated cells, such as osteoclasts, can secrete various proteinases,<sup>16</sup> and this type of cell also seems to participate in cartilage destruction. In the growth plate, TRAP positive multinucleated cells are thought to be important in the process of replacing the hypertrophic chondrocyte zone with bone, and they are called chondroclasts.<sup>17</sup> However, the

**Table 1** Characteristics of the patients with RA at the time of surgery

Number of men/women	1/9
Age (years), mean (range)	61.1 (50–70)
CRP (mg/l), mean (range)	27 (9–46)
Disease duration (years), mean (range)	16.2 (1–28)
Number taking NSAIDs	5
Treatment during previous 6 months (number of patients)	
Gold salts	1
Bucillamine	1
Methotrexate	4
Prednisolone	5

CRP, C reactive protein; NSAIDs, non-steroidal anti-inflammatory drugs.

**Abbreviations:** DMEM, Dulbecco's modified Eagle's medium; EDTA, ethylenediaminetetraacetic acid; ELISA, enzyme linked immunosorbent assay; FCS, fetal calf serum; FITC, fluorescein isothiocyanate; G3PDH, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; GM-CSF, granulocyte-macrophage colony stimulating factor; HE, haematoxylin and eosin; MMP, matrix metalloproteinase; PBS, phosphate buffered saline; RA, rheumatoid arthritis; RT-PCR, reverse transcriptase-polymerase chain reaction; SD, standard deviation; SDS, sodium dodecyl sulphate; SSC, saline sodium citrate; TPMoC, TRAP positive mononuclear cells; TPMuC, TRAP positive multinucleated cells; TRAP, tartrate resistant acid phosphatase; TBS, Tris buffered saline

**Table 2** Sequences of PCR primers for MMPs

	Primers (5'-3')		Expected product size bp
	Sense	Antisense	
MMP-1	GGGAACCCTCGCTGGGAGCAAA	GGCCGAGTTCATGAGCCGCAAC	352
MMP-2	CAGCCTGGGACTGCCCTGAT	CAGGCCCTCCGGTCTCTC	400
MMP-3	CCTGGGACGCCAGCAACTGTG	TGCTGGGAAAGCCTGGCTCCAT	425
MMP-7	CCTCAGGAGCGGGAGGCATGA	GTCCTCGCGCAAAGCCAATCA	425
MMP-8	GCCTCGCTGTGGAGTGCCTGACA	GCGAGCCCCAAAGAATGCCAAA	414
MMP-9	GCCATCGCGGAGATTGGGAACC	CGGGGAACATCCGGTCCACCTC	400
MMP-10	ATGCGCAAGCCCAGGTGTGGAG	GCCCCAGGGAGTGGCCAAGTTC	418
MMP-11	CCCTGGCCACTGTACCTCCA	GGCAGCATGGACCGGGAACCTC	393
MMP-12	TGAAAGTGACCGGCAACTGGACA	TGTGCATCCCCTCCAATGCCAGA	370
MMP-13	GCGGGTTCCTGATGTGGGTGA	GGCCGAACATGCGCAGCAAC	390
MMP-14	ATTGCAAGGCGTCCGCGTGT	CGGTATCATCGGGCAGCACAA	398
MMP-15	CAATGAGCGCCTCGGATGGAG	CGTTCACCGTCCGTGCCACCTC	263
MMP-16	GACAGTCCCCACACCGCTCT	TAGGAGGCAAGCCCCGCCAGAA	260
MMP-17	GTGCGCTGTGGCAGCTGACG	AGACGGGGCGCGGGTATCCTTC	403
G3PDH	ACCACAGTCCATCCATCAC	TCCACCACCTGTGCTGTA	450

PCR, polymerase chain reaction; MMP, matrix metalloproteinase; G3PDH, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase.

**Table 3** Amount of TRAP positive cells in the synovium and cartilage-bone interface

Patient	Sex	Age	Synovium	Cartilage-bone interface
1	F	60	418	96
2	F	63	77	410
3	F	57	583	410
4	M	70	1092	538
5	F	50	460	874
6	F	61	102	919
7	F	62	151	543
8	F	68	144	293
9	F	63	471	890
10	F	57	486	217
Average(SD)			398.4 (307.2)	519 (292.4)

TRAP, tartrate resistant acid phosphatase; SD, standard deviation; M, male; F, female.

role of TRAP positive cells in the destruction of articular cartilage has not been well investigated in patients with RA. We suggest that TRAP positive cells in the synovium and cartilage-synovial interface may be related to the destruction of articular cartilage in patients with RA.

To investigate the role of TRAP positive cells in the synovium and cartilage-synovial interface, we examined whether these cells produced MMPs in RA synovium. We also investigated whether mononuclear and multinucleated TRAP positive cells, generated in vitro from peripheral blood monocytes by incubation with RA synoviocytes, had the potential to produce various MMPs and to induce cartilage destruction.

## MATERIALS AND METHODS

### Tissue samples and preparation

Tissue samples, including the cartilage-synovial interface, were obtained during total knee arthroplasty from 10 patients with RA who gave informed consent. The American College of Rheumatology criteria were used for the diagnosis of RA.<sup>18</sup> Table 1 summarises the clinical backgrounds of these patients. After fixation in 4% paraformaldehyde at 4°C for 24 hours, tissue samples were decalcified in 20% EDTA for two hours in a microwave oven (H2800 Microwave Processor; Energy Beam Science Inc, Agawan, MA) at 50°C and then for 22 hours at 4°C.<sup>19</sup> Next, the samples were dehydrated through an ethanol series and embedded in paraffin. Sections (4 µm thick) were cut with a microtome and stained with haematoxylin and eosin (HE) stain, TRAP stain, and immunohistochemical stains.

### Quantification of TRAP positive cells in the synovium and cartilage-bone interface

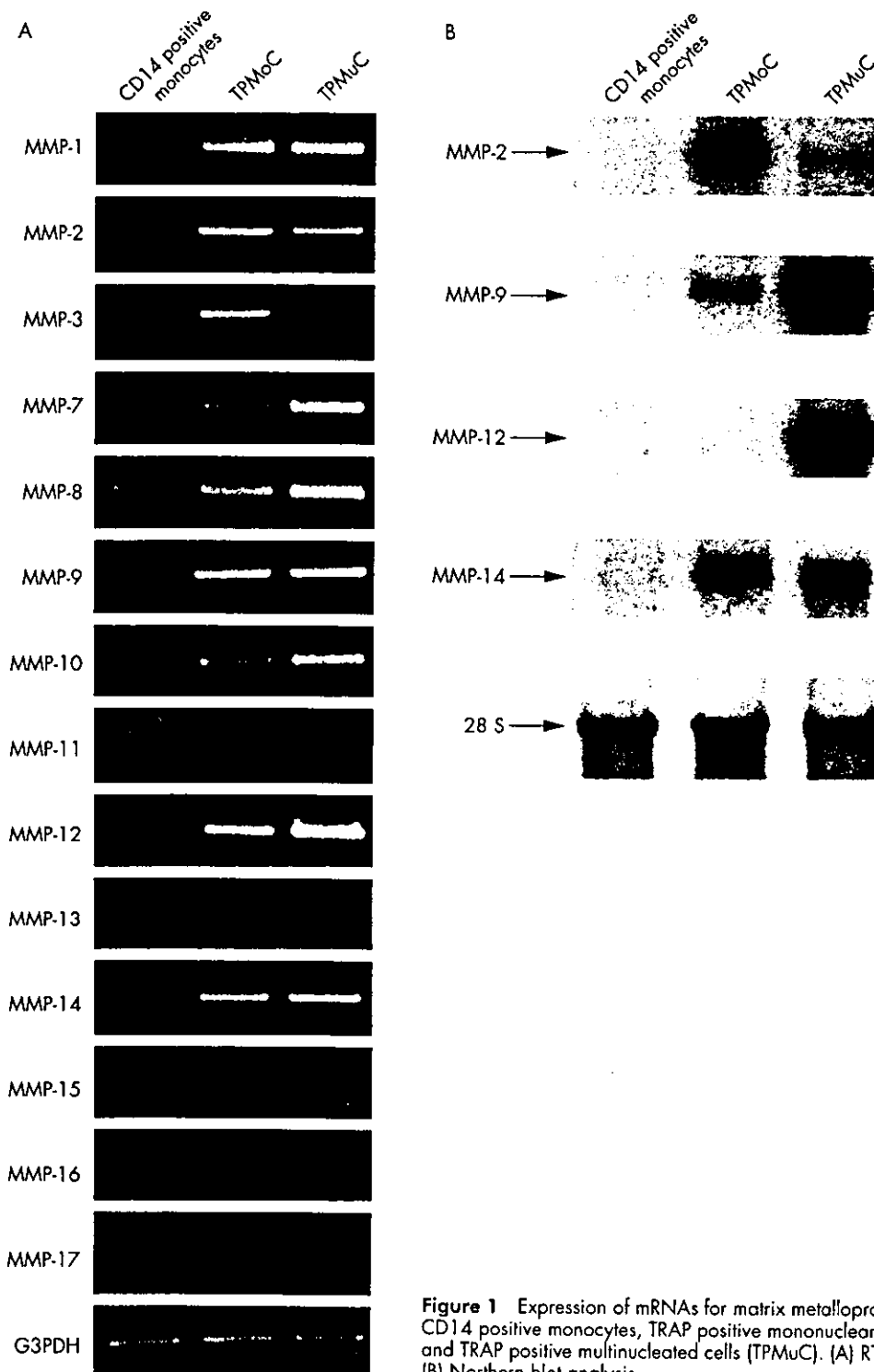
Tissue sections were deparaffinised and TRAP staining was performed using a commercial acid phosphatase leucocyte kit (Sigma, St Louis, MO). In the synovium and at the cartilage-bone interface, five areas (magnification ×100) were randomly observed with an HC2500 image analysis system (Fuji Photo Film, Tokyo, Japan) and the number of TRAP positive cells in each area was counted.

### Generation of mononuclear and multinucleated TRAP positive cells from peripheral blood monocytes by culture with RA synoviocytes

TRAP positive cells were generated as reported previously.<sup>20</sup> Briefly, CD14 positive monocytes were isolated from the peripheral blood of five healthy volunteers and cocultured for four weeks with RA synovial fibroblasts<sup>21</sup> in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; Gibco BRL, Gaithersburg, MD) supplemented with 10% fetal calf serum (FCS; Hyclone, Logan, UT), 100 units/ml of penicillin (Gibco BRL), and 100 µg/ml of streptomycin (Gibco BRL) to produce TRAP positive mononuclear cells. After four weeks, the TRAP positive mononuclear cells became dominant. Over 97% of these cells were TRAP positive and their purity was confirmed cytochemically.<sup>20</sup> These cells differentiated into multinucleated cells after culture in DMEM in the presence of 1 ng/ml of granulocyte macrophage colony stimulating factor (GM-CSF; Genzyme, Cambridge, MA) for five days.

### Reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) analysis

Total RNA was extracted from CD14 positive monocytes, TRAP positive mononuclear cells, and TRAP positive multinucleated cells using a TRIzol RNA isolation kit (Gibco BRL) according to the manufacturer's directions. After treatment with DNase I (Life Technologies, Rockville, MD), single stranded cDNA was synthesised using 3 µg of each RNA sample, 100 ng of random primers, and 200 U of SUPERSRIPT II reverse transcriptase (Gibco BRL) in a total reaction volume of 20 µl. The cDNAs for various matrix metalloproteinases (MMP-1, 2, 3, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17) were amplified by PCR using the primer sets shown in table 2. Amplification was performed with 0.5 U of TaKaRa Ex Taq (Takara, Shiga, Japan) in a total reaction volume of 20 µl containing 1×reaction buffer, 200 µM of each dNTP, and 10 pmol of each primer. The PCR conditions were as follows: initial denaturation for two minutes at 94°C, 30 cycles of 30 seconds each at 94°C and 72°C (annealing at 72°C), and final extension for five minutes at 72°C. A fragment of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (G3PDH) cDNA



**Figure 1** Expression of mRNAs for matrix metalloproteinases by CD14 positive monocytes, TRAP positive mononuclear cells (TPMoC), and TRAP positive multinucleated cells (TPMuC). (A) RT-PCR analysis. (B) Northern blot analysis.

was also amplified as a control. Aliquots of the PCR products were subjected to electrophoresis on 1.5% agarose gels and visualised by ethidium bromide staining. In all experiments, reproducibility was confirmed in triplicate experiments.

#### Northern blot analysis

Total RNA (2 µg) was subjected to electrophoresis on 1% agarose gel containing 2.2 M formaldehyde and then transferred to a nylon membrane by a standard method. Probes were prepared by <sup>32</sup>P labelling with Prime It (Stratagene, La Jolla, CA) using plasmids created with a PCR cloning kit (pGEM-T Easy; Promega, Madison, WI) from the corresponding genes described in table 2. Hybridisation was performed overnight at 65°C as described by Church and Gilbert.<sup>22</sup> After hybridisation, the membranes were sequentially washed twice at 45°C with

6×saline sodium citrate (SSC) plus 0.5% sodium dodecyl sulphate (SDS), twice with 2×SSC plus 0.1% SDS, and twice with 0.2×SSC plus 0.1% SDS. Hybridisation signals were detected with a BAS 2500 BioImage analyser (Fuji Photo Film).

#### Immunocytochemistry

TRAP positive mononuclear cells were suspended in DMEM (Gibco BRL) supplemented with 10% FCS (Hyclone), 100 U/ml of penicillin (Gibco BRL), 100 µg/ml streptomycin (Gibco BRL), and 1 ng/ml GM-CSF (Genzyme), and were seeded at  $2.5 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup> on Lab-Tek chamber slides (Nunc, Inc, Naperville, IL). After incubation for five days, TRAP positive cells were fixed with 4% formaldehyde for 15 minutes and permeabilised using 0.2% Triton X100 for five minutes. Then the cells were sequentially incubated in phosphate buffered