

백서의 난소제거술후 발생한 골조송증에 대한 Calcitonin의 효과

연세대학교 의과대학 정형외과학교실

이환모 · 한수봉 · 박병문

= Abstract =

Effect of Calcitonin on Osteoporosis Induced by Ovariectomy in Rats

Hwan Mo Lee, M.D., Soo Bong Hahn, M.D. and Byeong Mun Park, M.D.

Department of Orthopaedic Surgery, Yonsei University College of Medicine, Seoul, Korea

The effects of the calcitonin were determined on osteoporosis induced in the rat by ovariectomy. 90 rats were ovariectomized at the beginning of the study and 30 rats had sham-operation. Sham-operated 30 rats(group I) had no injection. In group II(30 rats), 0.5cc of normal saline was injected intramuscularly 4 times a week for 16 weeks. In group III(30 rats), 2.5MRC unit/kg of (Asu^{1,7})-eel calcitonin was injected intramuscularly 4 times a week for 16 weeks after ovariectomy. All the rats were killed at the 16th week after the experiment. Sections of the femoral shaft were stained for Villaneuva bone stain and evaluated histomorphometrically. Ovariectomy produced decreased weight of the femur and significant increase in medullary area and periosteal bone formation were occurred.

The increase in medullary area resulted from an increase in osteoclast number and size. In contrast, treatment of ovariectomized rats for 16 weeks with calcitonin prevented the increase in medullary area and the decrease of trabecular bone in ovariectomized rat. Also the activity of osteoclast was inhibited by calcitonin treatment. The result indicated that, in the ovariectomized rat, calcitonin had an effect of inhibition of bone resorption but did not have a definite effect of new bone formation.

Key Words : Osteoporosis, Ovariectomy, Calcitonin, Rat.

서 론

과학 및 의학의 발달로 인간의 평균수명은 연장되어 노인병학이 의업에 종사하는 사람들에게 큰 관심분야로 등장하였으며 그중 노인성 골조송증은 중요한 노인성 질환의 하나이고 특히 여성에게는 50세 이후부터 급격한 해면골의 감소가 나타난다고 되어있다²⁾. 골조송증은 골 구성성분의 양적감소를 주된 병변으로 하는 대사성 골질환으로 그 원인은 여러가지가 있으나 근본 병인은 골형성과 골흡수의 불균형이라

본 논문은 1990년도 연세대학교 의과대학 교수 연구비로 이루어진 것임.

고 알려져 있다^{14,15)}.

이들 원인에 대하여 calcium제제, phosphate제제, estrogen제제, vitamin-D 및 calcitonin의 투여에 의한 치료가 시행되고 있으며 이중 calcitonin은 파골세포의 calcitonin수용체에 직접 작용하여 골흡수를 방지한다고 알려져 있고, 특히 골조송증에 동반되는 요배통에 대하여 우수한 효과를 보이는 것으로 보고되고 있다^{1,8,13)}.

그러나 Singh과 Jowsey¹⁹⁾는 골조송증에 대한 calcitonin의 치료효과가 적절치 않다고 보고하였으며 골조송증에 대한 calcitonin의 치료기전도 확실하게 알려져 있지 않다. Calcitonin이 직접 뼈에 작용하여 피질골과 해면골의 두께 및 양을 증가시켜서^{4,5,9,11)} 미세골절을 방지하

여 통증의 호전이 일어나는지 아니면 다른 약리작용에 의하여 통증이 개선되는지는 아직 논란의 여지가 많다^{12, 16, 18}). 이에 저자들은 백서에서 난소제거후 발생한 골조송증에 대하여 calcitonin이 직접적으로 뼈의 질량 및 부피를 증가시키는지 연구한 결과 몇가지 결론을 얻었기에 이에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 실험재료

실험동물로는 성숙한 암컷 백서(몸무게 200-250g) 90마리를 이용하여 실험하였다. 실험기간동안 동일한 온도와 습도의 사육실에서 동일한 배합사료(신촌사료주식회사, 김포군, 경기도, 대한민국)로 사육하였으며, 다음과 같이 3군으로 대별하였다.

제1군: 가장 수술(sham-operation)군, 30마리

제2군: 양측 난소제거술+생리식염수 투여군, 30마리

제3군: 양측 난소제거술+calcitonin투여군, 30마리

2. 수술 및 투약방법

백서의 복강내에 25mg/kg의 pyrimidinetrione(Entobar[®])(한림제약, 서울특별시, 대한민국)을 주사하여 마취하였다. 1군은 양측 옆구리를 면도하고 약 2cm의 피부절개후 바로 봉합하였으며 2, 3군은 양측에서 난소를 제거한 후 근육, 피부를 바로 일차 봉합하였다. 술후 1군은 아무것도 투여하지 않았고 2군은 1주일에 4차례 생리식염수를 0.5cc 근육주사하였으며 3군은 1주일에 4차례(Asu^{1,7})-eel-calcitonin(Toyo Jozo Co., Tokyo, Japan)을 2.5MRC unit/kg으로 근육주사하였다. 투약기간은 모두 술후 16주간이었다.

3. 관찰방법

16주후 실험동물을 모두 절식사 시켰으며 난소가 완전히 제거되었는지 확인하기 위하여 복강절개후 자궁을 적출하여 무게를 잴으며, 이후 10% formalin용액에 3일간 고정하고 파라핀에 포매한 후 5 μ m의 두께로 표본을 만들고 H-E염색하여 관찰하였다. 희생후 양측 대퇴골과 경골을 적출하고 우측 대퇴골은 골막분리후 1:1 chloroform methanol용액에 담가 지방을 제거하고 110°C 건조기에서 12시간 동안 건조

한 후 무게(dry weight)를 측정하였다.

좌측 대퇴골은 골간부에서 1cm의 골편을 절취하였으며 이 뼈조각을 75%알콜에 고정한 후 탈수과정을 거쳐서 Villanueva²²⁾ 골염색액에 3일간 침적하여 염색하고, 비탈회 상태에서 methylmethacrylate acryl resin에 약 2주간 포매하였다. 포매된 시편은 crystal cutter(Maruto Instrument Co., Tokyo, Japan)를 사용하여 200 μ m두께로 횡단면 박절하였으며, speed lapping machine(Maruto Instrument Co., Tokyo, Japan)으로 약 30 μ m까지 갈아낸후, 다시 수작업으로 10-20 μ m두께로 연마하여 표본을 제작하였다.

제작된 표본은 Analytical Measuring System사의 영상자료분석기를 이용하여 대퇴골 간부 횡단면에서 전체횡단면적(cross-section area), 피질골면적(cortical bone area) 및 골수강면적(medullary area)을 측정하였으며 골수강 면적에서 골소주(trabecular bone)의 면적비를 구하였다. 우측 경골의 근위 골간단부에서 1cm의 골편을 절취하여 10% formalin용액에 수일간 고정하고 탈회용액(5% formic acid, 8.5% HCl, 7% AlCl₃의 혼합용액)에서 약 10일간 탈회한 후 통상의 조직처리 과정을 거쳐 파라핀에 포매하였다. 5 μ m의 두께로 표본을 만들고 H-E 염색하여 Howship's 소강에 있는 파골세포를 400배 확대 소견에서 확인한 후 파골세포의 숫자와 면적을 영상자료 분석기를 이용하여 측정하였다.

결 과

1. 체중의 변화

난소 제거술전에 각군의 체중은 1군 220 \pm 18g, 2군은 219 \pm 20g, 3군은 223 \pm 12g으로 각군간에 통계적으로 차이가 없었으나 16주후의 체중은 1군 312 \pm 13g, 2군 382 \pm 27g, 3군 321 \pm 31g으로 1군과 3군사이에는 통계적 의의가 없었으나 2군은 1, 3군보다 체중 증가율이 크게 나타나, 난소 절제술만 시행한 군이 다른군에 비해 성장속도가 빨랐다(Table 1).

2. 자궁의 변화

육안적으로는 2군과 3군 모두 자궁의 부피가 감소되어 있었으며, 각 군간의 자궁무게(wet weight)는 가장수술군이 0.81 \pm 0.14g, 2군이 0.21 \pm 0.03, 3군이 0.25 \pm 0.02g으로 2군과 3군 모두 가장수술군에 비해 현저한 차이를 나

Table 1. The effects of ovariectomy and calcitonin on body weight and growth rate in rats

Group	Weights		Growth rate (g/day)
	Start(g)	Final(g)	
Sham-operation	220±18	312±13	0.82±0.1
Ovariectomy + Saline	219±20	382±27*	1.45±0.2*
Ovariectomy + Calcitonin	223±12	321±31	0.87±0.1

Values are expressed as mean±S.D., *p<0.01

Fig. 1-A. Microphotography of the uterus in sham-operated group. Intact myometrium and proliferative stage of the endometrium were seen(H-E stain, ×40).

타냈다. 조직학적 소견으로 2군과 3군 모두 1군에 비해 자궁근 및 자궁내막의 위축 소견이 있어 hypoeostrogenic 상태임을 알 수 있었다(Fig. 1).

3. 대퇴골의 무게

대퇴골의 무게(dry weight)는 1군 415±15mg, 2군 281±21mg 및 3군 323±27mg으로 saline 투여군에 비해 calcitonin투여군에서 대퇴골의 무게가 유의있게 높았으나 가장수술군에 미치지 못하였다(Table 2).

4. 비탈회 표본에서 각군간의 조직형태적 측정치(Histomorphometric parameter)비교

골수강면적은 난소절제술후 생리식염수 투여군에서 다른 군에 비해 유의있게 증가하였으나, 전체횡단면적과 피질골면적은 각군간에 차이가 없었다. 골소주의 면적비는 1군에서는 16.2±1.7%이며 2군에서는 6.2±0.7%, 3군에서는 12.4±1.7%로 2군에서 1군이나 3군에 비해 유의있는 감소율을 보였다(Table 3).

Fig. 1-B. Microphotography of the uterus 16 weeks after ovariectomy in the rat. Atrophic changes of myometrium and endometrium were noted(H-E stain, ×40).

Table 2. Dry weight of the femur in each group

Group	Dry weight(mg)
Sham-operation	415±15**
Ovariectomy + Saline	281±21
Ovariectomy + Calcitonin	323±27*

Values are expressed as mean±S.D.,

*p<0.05, **p<0.01.

5. 탈회표본에서 각군간 파골세포의 숫자 및 크기비교

난소절제술후 생리식염수 투여군에서는 가장수술군과 calcitonin투여군에 비해 파골세포의 수가 각각 362%와 239%가 증가하였으며, 파골세포의 크기는 187% 및 144%증가하여 calcitonin투여군이 생리식염수 투여군보다 파골세포의 활성도가 떨어지긴 하였으나 가장수술군에 미치지 못하는 못하였다(Table 4).

고 찰

골조송증은 폐경기 이후 여성에 있어 중요한 공중보건상의 문제점으로 대두되고 있으며 이로 인한 골절은 유병율과 사망율이 높아 치료에 많은 어려움이 따른다¹⁵⁾. 이런 골조송증의 원인으로서는 estrogen결핍, vitamin-D결핍, 부갑상선 호르몬 과잉, 칼슘의 섭취부족이나 장에서의 흡수능력저하등이 있으며⁶⁻⁸⁾. 원인에 따라 여러가지 치료방법들이 시도되었다.

백서에서 실험적으로 골조송증을 유발한 것은 Saville¹⁷⁾이 처음이며 백서에서 난소를 제거

Table 3. The effects of ovariectomy and calcitonin on histomorphometric bone parameters in rats

Group	Medullary area(mm ²)	Cross-section area(mm ²)	Cortical bone area(mm ²)	Trabecular bone(%)
Sham-operation	0.90±0.03	3.18±0.06	2.28±0.09	16.2±1.7**
Ovariectomy + Saline	1.15±0.05*	3.45±0.05	2.31±0.06	6.2±0.7
Ovariectomy + Calcitonin	0.95±0.04	3.14±0.07	2.19±0.05	12.4±1.7*

Values are expressed as mean±S.D., *p<0.05, **p<0.01.

Table 4. The effects of ovariectomy and calcitonin on osteoclasts in rats

Group	Osteoclast no.(cell/mm)	Osteoclast area(μm ²)
Sham-operation	2.7±1.1**	141±15**
Ovariectomy + Saline	9.8±1.5	265±17
Ovariectomy + Calcitonin	4.1±0.9*	183±14*

Values are expressed as mean±S.D., *p<0.05, **p<0.01.

하면 피질골과 해면골의 교체(turnover)가 증가하며 골조송증을 일으키므로 난소를 절제한 백서는 골조송증의 연구시 가장 많이 사용되는 실험동물이 되었다^{3,17,20}.

Calcitonin은 Hirsch등¹⁰에 의해 설치류의 갑상선에서 분비된다고 밝혀졌으며, 그후 포유류 뿐 아니라 어류, 조류, 양서류의 새후선에도 존재하는 것으로 알려졌으며 현재는 몇가지 종류의 구조가 밝혀졌다. Calcitonin은 골조송증의 치료제로서 오래동안 사용되어 왔으나 그 이전에 대하여는 아직 논란이 많다. Hayashi등⁹과 Mazzuoli등¹³은 calcitonin이 골흡수를 감소시키고, 골형성을 증가시킴으로서 통증을 없앨 수 있다고 하였으나 Riggs와 Melton¹⁵은 calcitonin이 부갑상선 호르몬의 분비를 억제하여 그 효과를 나타낸다고 하였다. 그러나 전이성 암환자에서 calcitonin을 투여한 결과 통증해소가 빨리 나타나는 점으로 보아 calcitonin이 prostaglandin E₂와 thromboxane A₂의 분비를 억제하고, 혈청내의 β-endorphin농도를 증가시킴으로서 중추신경계에서 진통효과를 나타낸다는 이론도 있어왔다^{12,16,18}. (Asu^{1,7})-eel-calcitonin은 뱀장어 calcitonin의 치환제로서 뱀장어 calcitonin의 모든 생리적 작용을 가지고 있으면서 연어나 뱀장어의 calcitonin보다 포유류의 체내에서 더 늦게 분해되는 특징이 있으므로²⁵ 본 실험에서 사용하였다.

Hayashi등⁹은 백서에서 난소제거후 calci-

tonin투여군이 대조군과 비교하여 체중이나 대퇴골의 길이 및 폭 등이 차이가 없다고 하였으나 Turner등²¹은 백서에서 난소를 제거하면 성장속도가 증가하여 체중이 증가한다고 하였으며 본 실험에서도 난소절제후 생리식염수 투여군이 다른군에 비해 더 많은 체중증가를 나타내어 Turner등²¹의 보고와 같은 결과를 나타냈다. 체중이 증가하면 뼈의 교체현상(turnover)에 영향을 미칠 수 있다고 하였으나³, estrogen 결핍에 의한 뼈의 조직학적 변화가 각군간의 체중의 차이에 의해서 발생했다고 생각하기는 어렵다.

백서에서 난소제거술이 성공적으로 되었는지 알기 위하여는 혈청내에서 estrogen의 농도를 측정하는 것이 정확하나 본 실험에는 자궁의 변화를 관찰함으로써 간접적인 난소절제술의 효과를 판정하였다. 자궁은 자궁내막 및 자궁근이 모두 estrogen에 의존적이며 estrogen은 난소에서만 분비되므로 난소가 제거되면 자궁은 위축 소견이 나타난다. 본 실험 2, 3군의 모든 예에서 1군과 비교해 자궁의 무게가 감소하였으며 자궁의 위축소견이 나타나 난소제거술이 성공적으로 이루어 졌다는 점을 알 수 있었다.

Jowsey¹¹는 돼지 calcitonin을 매일 0.5-5.0 MRC unit/kg로 고양이에게 주사하여 골조송증시 발생하는 골흡수를 예방할 수 있다고 하였으며, Hayashi등⁹은 calcitonin의 용량에 따라 효과가 다르게 나타나며, 유효용량은 매주 4차례 2.5 MRC unit/kg나 5.0 MRC unit/kg의 calcitonin주사가 백서에서 유발된 골조송증에 효과가 있다고 보고하여 본 실험에서도 2.5 MRC unit/kg의 calcitonin을 사용하였다.

Calcitonin 처치군에서 생리식염수 투여군보다 대퇴골의 무게(dry weight)가 커진것은 간접적으로 골형성이 증가되었다는 것을 알 수 있어 Hayashi등⁹의 보고와 일치하였다. 각군간의 조직 형태적 측정치를 비교한 결과 난소절제술 시행후 생리식염수 투여군에서는 가장수

술군과 calcitonin투여군보다 전체 횡단면적은 각각 108%와 109%가 증가하였으나 통계적인 의미는 없었으며, 골수강면적은 각각 127%와 121% 증가하였다. 위와같은 현상은 난소절제 후 피질골의 교체현상이 증가하나, 골막에서는 특히 골형성이 증가하고 골내막에서는 골형성보다 골흡수가 주로 증가한다고 생각할 수 있어 Wronski등²⁴⁾의 보고와 일치하였다. Turner 등²¹⁾은 백서에서 난소절제후 경골의 성장판이 자극을 받아 길이도 길어진다고 하였으나 본 연구에서는 대퇴골의 길이는 각 군간에 큰 차이가 없었다. 전체적인 횡단면적이 생리식염수 투여군에서 다른 군보다 증가하였으나 대퇴골의 무게가 감소한 현상은 골수강 면적이 같이 증가하였으므로 실제적인 피질골 면적은 큰 차이가 없었으며, 골소주의 면적에서는 생리식염수 투여군이 가장수술군 및 calcitonin투여군과 비교했을 때 각각 62%와 50% 감소하였기 때문인 것으로 생각된다. 그러므로 난소절제후 골막에서는 골형성이 증가하나 골내막에서는 골흡수가 골형성보다 증가하는 속도가 빠르다고 생각할 수 있으며 파골세포의 숫자 및 면적도 생리식염수 투여군에서 다른군 보다 증가하여 위의 현상을 뒷받침하였다.

Wase등²³⁾은 calcitonin투여후 전체적인 골의 질량이 증가하였다고 보고하였으나 위의 현상이 골형성의 증가로 인한 것인지 또는 골흡수의 방지에 의해서인지 밝히지 못하였다. Mazzuoli등¹³⁾은 연어의 calcitonin을 이용하여 인체에서 연구한 결과 calcitonin은 골흡수를 방지할 뿐만아니라 골형성도 증가시킨다고 하였으나 Hayashi등⁹⁾은 백서를 이용한 실험에서 calcitonin은 파골세포에 의한 골흡수를 억제함으로써 교체현상(turnover)을 정상화시키는 것이 골형성 자체가 증가되는 것은 아니라고 하였다. 본 실험에서는 tetracycline을 이용하여 골형성의 정도를 직접 측정하지 않았으므로 어느 주장이 맞는지 확실히 규명하지는 못하였다. 그러나 본 연구에서 백서의 난소제거술후 calcitonin을 투여한 군은 생리식염수를 투여한 군보다 골소주면적이 증가하였으며 파골세포의 수 및 면적이 감소하였으나 가장 수술군의 결과에는 미치지 못하였으므로 calcitonin이 골흡수를 억제하는 작용은 있으나, 골형성작용에는 큰 영향을 미치지 못하는 것으로 생각된다. 결과적으로 calcitonin은 난소를 제거한 백서에서 뼈의 질량감소를 억제하는 효과가 있으나 실질

적인 뼈의 질량을 증가시킨다고 보기는 어려우며, 골조송증환자에서 calcitonin에 의한 진통효과는 파골세포에 의한 골흡수작용방지 뿐만아니라 중추신경계에 작용하는 다른 약리작용^{12, 16, 18)}에도 기인한다고 생각한다.

요약 및 결론

성숙한 암컷 백서 90마리를 가장수술군(1군, 30마리), 난소제거술 후 생리식염수 투여군(2군, 30마리) 및 난소제거술 후 calcitonin투여군(3군, 30마리)으로 나누어 실험하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 체중증가율은 난소제거술 후 생리식염수 투여군이 가장 컸다.
2. 대퇴골의 무게(dry weight)는 1군 415 ± 15 mg, 2군 281 ± 21 mg 및 3군 323 ± 27 mg이었다.
3. 비탈회 표본에서 골수강면적의 크기는 2군, 3군, 1군 순이었고, 전체 횡단면적은 2군, 1군, 3군의 순이었으며 골소주 면적은 1군, 2군, 3군의 순이었다.
4. 탈회 표본에서 파골세포의 수는 2군에서 1군 및 3군에 비해 각각 362%와 239% 증가하였으며 파골세포의 크기도 각각 187% 및 144% 증가하였다.

이상의 결과로 미루어 보아 백서에서 난소제거술후 calcitonin의 투여는 골흡수를 방지하는 효과가 있으나 골형성을 직접적으로 증가시키는 효과는 현저하지 않은 것으로 생각된다.

참 고 문 헌

- 1) 김남현, 이환도, 허갑범, 이현철: 골다공증 환자에 대한 Elcatonin의 효과. -이중맹검법에 의한 연구-. 대한내분비학회잡지, 6(1): 51-57, 1990.
- 2) 용석중, 임승길, 허갑범, 김남현, 박병문: 한국인 성인 남녀의 골밀도. 대한의학협회지, 31(12): 1350-1358, 1988.
- 3) Aitken, J.M., Armstrong, E. and Anderson, J.B.: Osteoporosis after oophorectomy in the mature female rat and the effect of estrogen and/or progesteron therapy in its prevention. J. Endocrinol., 55: 79-87, 1972.
- 4) Alexandre, C., Chappard, D., Caulin, F., Bertrand, A., Palle, S. and Riffat, G.: Effect of one-year administration of phosphate

- and intermittent calcitonin on bone-forming and bone-resorbing cells in involutional osteoporosis: A histomorphometric study. *Calcif. Tissue Int.*, 42: 345-350, 1988.
- 5) Baylink, D., Morey, E. and Rich, C.: Effect of calcitonin on rates of bone formation and resorption in the rat. *Endocrinol.*, 84: 261-269, 1969.
 - 6) Canalis, E., McCarthy, T. and Centrella, M.: Growth factors and the regulation bone remodelling. *J. Clin. Invest.*, 81: 277-281, 1988.
 - 7) Gallagher, J.C., Riggs, B.L. and Eisman, J.: Intestinal calcium absorption and serum vitamin-D metabolites in normal subjects and osteoporotic patients. *J. Clin. Invest.*, 64: 729-736, 1979.
 - 8) Gruber, H.E., Ivey, J.L., Baylink, D.J., Mathews, M., Nelp, W.B., Sison, K. and Chestnut, C.H. III.: Long-term calcitonin therapy in postmenopausal osteoporosis. *Metabolism*, 33: 295-303, 1984.
 - 9) Hayashi, T., Yamamuro, T., Okumura, H., Kasai, R. and Tada, K.: Effect of (Asu¹⁻⁷)-eel calcitonin on the prevention of osteoporosis induced by combination of immobilization and ovariectomy in the rats. *Bone*, 10: 25-28, 1989.
 - 10) Hirsch, P.F., Gauthier, G.F. and Munson, P.L.: Thyroid hypocalcemic principle and recurrent laryngeal nerve injury as factors affecting the response to parathyroidectomy in rats. *Endocrinol.*, 73: 244-252, 1963.
 - 11) Jowsey, J.: Effect of long-term administration of porcine calcitonin in development of dietary osteoporosis in cats. *Endocrinol.*, 85: 1196-1201, 1969.
 - 12) Kessel, C. and Worz, R.: Immediate response of phantom limb pain to calcitonin. *Pain*, 30: 79-87, 1987.
 - 13) Mazzuoli, G.F., Passeri, M., Gennari, C., Minisola, S., Antonelli, R., Valtorta, C., Palumneri, E., Cervellini, G.F., Gonnelli, S. and Francini, G.: Effects of salmon calcitonin in postmenopausal osteoporosis: A controlled double-blind study. *Calcif. Tissue Int.*, 38: 3-8, 1986.
 - 14) Raisz, L.G.: Local and systemic factors in the pathogenesis of osteoporosis. *N. Eng. J. Med.*, 318: 818-828, 1988.
 - 15) Riggs, B.L. and Melton, L.J. III.: Involutional osteoporosis. *N. Eng. J. Med.*, 314: 1676-1686, 1986.
 - 16) Roth, A. and Kolaric, K.: Analgesic activity of calcitonin in patients with painful osteolytic metastases of breast cancer. *Oncol.*, 43: 283-287, 1986.
 - 17) Saville, P.D.: Changes in skeletal mass and fragility with castration in the rat: A model of osteoporosis. *J. Am Geriatr. Soc.*, 17: 155-166, 1969.
 - 18) Schiraldi, G.F., Soresi, E., Locicero, S., Harari, S. and Scoccia, S.: Salmon calcitonin in cancer pain: Comparison between two different treatment schedules. *Int. J. Clin. Pharmacol. Therapy Toxicol.*, 25: 229-232, 1987.
 - 19) Singh, M. and Jowsey, J.: Failure of calcitonin to prevent disuse osteopenia: An experimental study in rabbits. *J. Endocrinol.*, 87: 183-186, 1970.
 - 20) Tabuchi, C., Simmons, D.J., Fausto, A., Russell, J.E., Binderman, I. and Avioli, L. V.: Bone deficit in ovariectomized rats. *J. Clin. Invest.*, 78: 637-642, 1986.
 - 21) Turner, R.T., Wakley, G.K., Hannon, K.S. and Bell, N.H.: Tamoxifen prevents the skeletal effects of ovarian hormone deficiency in rats. *J. Bone Mineral Res.*, 2(5): 449-459, 1987.
 - 22) Villanueva, A.R.: A bone stain for osteoid seams in fresh unembedded, mineralized bone. *Stain Technol.*, 49: 1-8, 1974.
 - 23) Wase, A.W., Solewski, J., Rickes, E. and Dimich, A.: Action of thyrocalcitonin on bone. *Nature*, 214: 388-389, 1967.
 - 24) Wronski, T.J., Lowry, P.L., Walsh, C.C. and Ignaszewski, L.A.: Skeletal changes in ovariectomized rats. *Calcif. Tissue Int.*, 37: 324-330, 1985.
 - 25) Yamauchi, H., Shiraki, M., Otani, M., Matsuo, M. and Orimo, H.: Stability of (Asu¹⁻⁷)-eel calcitonin and eel-calcitonin in vitro and in vivo. *Endocrinol.*, 24: 281-285, 1977.