



Title	急性骨髄炎に対する骨吸収抑制薬による骨保護効果と安全性に関する研究 [論文内容及び審査の要旨]
Author(s)	小林, 英之
Description	配架番号 : 2690
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第14948号
Issue Date	2022-03-24
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/85761
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	KOBAYASHI_Hideyuki_abstract.pdf, 論文内容の要旨



学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称 博士 (医 学) 氏名 小林 英之

学位論文題名

急性骨髄炎に対する骨吸収抑制薬による骨保護効果と安全性に関する研究
(Study on the osteoprotective effect and safety of antiresorptive agents
in acute osteomyelitis)

【背景と目的】化膿性骨髄炎は、血行性あるいは汚染創からの細菌浸潤によって骨髄に感染巣を形成し、炎症と骨破壊をきたす疾患である。治療は抗菌薬による起因菌の制圧が基本原則であるが、耐性菌や微小環境の悪化により抗生剤治療に難渋し、骨破壊の拡大や度重なる壊死骨のデブリードメントによる骨欠損が生じることがある。こうした症例では技術的に高度な骨再建術を要し、入院期間の延長や医療コスト増大をもたらす。骨破壊の抑制や骨再生を促すような補助療法は重症化の抑制や治癒期間短縮を期待できる可能性がある。骨髄炎による骨破壊は、炎症によって誘導された破骨細胞による病的骨吸収亢進が原因である。破骨細胞による骨吸収を強力に阻害する薬剤としてビスフォスフォネート (BP) 製剤と抗 receptor activator of nuclear factor- κ B ligand (RANKL)抗体があり、実臨床においても骨粗鬆症や関節リウマチによる炎症性骨破壊抑制に使用されている。しかし、過去の報告では BP 製剤はマウス骨髄炎モデルにおいて骨破壊抑制効果を示すが、壊死骨を増加させることが報告されている。一方、抗 RANKL 抗体の骨髄炎に対する効果はまだわかっておらず、BP 製剤と抗 RANKL 抗体では異なる作用機序で骨に作用することから抗 RANKL 抗体では壊死骨増加を来さない可能性がある。また骨形成促進剤であるテリパラチド (TPD) は骨芽細胞刺激を行うことで、骨形成および免疫賦活化に寄与することが知られており、骨髄炎における骨破壊部の骨新生、感染制御に寄与する可能性がある。そこで本研究では、マウス骨髄炎モデルを用いて、急性細菌性骨髄炎に対する BP 製剤、抗 RANKL 抗体及びテリパラチド (TPD) が与える影響を実験的に調査した。

【材料と方法】12 週齢雄性 BALB/c マウスの左大腿骨骨髄腔に膝から遺伝子組み換え発光黄色ブドウ球菌 Xen29 (PerkinElmer 社) を 1×10^8 CFU 植菌し、骨髄炎を誘発した。植菌直後より、PBS 200 μ l \times 1/day 皮下投与 (Ctl 群)、Zoledronate 100 μ g/kg \times 1/month 皮下投与 (ZA 群)、Teriparatide 20 μ g/kg \times 2/day 皮下投与 (TPD 群)、Anti-RANKL monoclonal antibody 5mg/kg \times 1/month 皮下投与 (Anti-RANKL 群) のいずれかを行い、植菌後 3、7、14、21 日に縦断的に Bioluminescent Imaging (BLI) とマイクロ CT で評価した。植菌後 21 日で安楽死させ、組織学的評価 (H-E 染色, GRAM 染色, TRAP 染色) を行った。免疫へ与える影響を評価するため植菌後 5 日目にマウスを安楽死させ、血清 Ca 濃度の計測を行い、回収した脾臓細胞からフローサイトメトリーを行った。ZA と抗 RANKL 抗体の炎症性破骨細胞分化へ与える効果を評価するために、骨髄マクロファージと骨髄由来間葉系幹細胞の共培養に炎症性サイトカイン (TNF- α , IL-1 β) を培地に添加および骨髄マクロファージに炎症性サイトカインを添加した破骨細胞分化アッセイを行った。

【結果】マイクロ CT で皮質骨骨破壊評価では、ZA 群、Anti-RANKL 群で Ctl 群と比較し骨破壊が有意に抑制された。TPD 群では 14 日目まで Ctl 群と同様に骨破壊が進行したが、21 日目には骨新生による骨修復が行われた。感染の指標である細菌の発光強度は Ctl 群、Anti-RANKL 群および TPD 群で感染後 3 日をピークに経時的に減少したが、ZA 群では発光の減衰が遷延し 21 日後にも Ctl 群と比較し有意に高値が維持された。病理組織学的には、H-E 染色から ZA 群で Ctl 群と比較して腐骨量の有意な増加を認めたが、Anti-RANKL 群では腐骨量の有意な増加は見られなかった。Gram 染色で ZA 群において細菌量が有意に高く、腐骨内に細菌巣が形成されている所見を認めた。TRAP 染色による破骨細胞数評価で ZA 群は Ctl 群と比較して全領域で破骨細胞数が有意に少なかった。一方、Anti-RANKL 群では生骨部で Ctl 群と比較し強い破骨細胞分化抑制効果を認めたが壊死骨周囲の破骨細胞分化が見られ、ZA 群より破骨細胞数が有意に少なかった。フローサイトメトリーによる B 細胞、T 細胞の割合は Ctl 群、ZA 群、TPD 群で明らかな差は見られなかった。TPD 群で衰弱死するマウスが多く、血清 Ca 高値を示すマウスを認めた。細胞培養では RANKL 存在下での炎症性破骨細胞分化を ZA および抗 RANKL 投与で有意に抑制した。しかし、非 RANKL 依存性破骨細胞誘導に対して、ZA は同様に強い誘導阻害効果を発揮するが、抗 RANKL 抗体は全く効果がないことを確認した。

【考察】先行研究と同様に BP 製剤である ZA は急性化膿性骨髄炎による骨破壊を抑制したが、感染の温床となる壊死骨の吸収も阻害することにより感染の治癒遅延をもたらす可能性が示唆された。一方、抗 RANKL 抗体は RANKL を介した破骨細胞誘導を強力に抑制することができるが、炎症性サイトカインによる非 RANKL 依存性破骨細胞誘導は抑制しない。そのため、RANKL の主要ソースである骨細胞や骨芽細胞が死滅した壊死骨は破骨細胞による骨吸収がすすむが、周囲の健全骨は保護されるという結果につながったものと推測される。このことから、抗 RANKL 抗体は感染を悪化させることなく、骨髄炎による骨破壊を抑制する新規の補助療法になりうる可能性が示唆された。TPD は骨新生促進作用が期待できる反面、骨吸収亢進による高 Ca 血症のリスクがあり、急性期の使用は注意を要することが示唆された。本研究結果は急性骨髄炎に対する薬剤の効果を見たものであり、骨髄炎の中には亜急性、慢性の経過をたどるものもある。これらの薬剤が慢性骨髄炎に対してどのような影響をおよぼすかも重要な関心事であり、将来の課題である。

【結論】ZA および抗 RANKL 抗体の投与は骨髄炎マウスモデルにおける骨破壊を抑制した。しかし、ZA では生骨のみならず壊死骨の骨吸収も強力に阻害した結果、細菌感染の温床となる腐骨が増加し、感染の遷延をもたらした。一方、抗 RANKL 抗体は生骨周囲の破骨細胞分化を抑制するが、壊死骨周囲の炎症性破骨細胞分化抑制効果が弱く、壊死骨の増加を来さなかった。すなわち、骨髄炎における骨破壊抑制に対して、BP 製剤は感染を遷延させる可能性があり、抗 RANKL 抗体は感染を遷延させることなく骨保護効果を示す可能性が示唆された。TPD は骨髄炎による骨破壊抑制効果はないが、骨修復効果を認めた。しかしながら、高 Ca 血症リスクのため慎重な適応を要することが示唆された。