



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
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
DOI	<a href="https://doi.org/10.14943/doctoral.k14948">https://doi.org/10.14943/doctoral.k14948</a>
Doc URL	<a href="https://hdl.handle.net/2115/85890">https://hdl.handle.net/2115/85890</a>
Type	doctoral thesis
File Information	KOBAYASHI_Hideyuki.pdf



学 位 論 文

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)

2022年3月

北海道大学

小林 英之



学 位 論 文

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)

2022年3月

北海道大学

小林 英之

## 目 次

発表論文目録および学会発表目録	.....	1 頁
要旨	.....	3 頁
略語表	.....	6 頁
緒言	.....	7 頁
実験方法	.....	10 頁
実験結果	.....	15 頁
考察	.....	24 頁
統括及び結論	.....	28 頁
謝辞	.....	29 頁
利益相反	.....	30 頁
引用文献	.....	31 頁

## 発表論文目録および学会発表目録

本研究の一部は以下の論文に発表した。

1. H. Kobayashi, R. Fujita, S. Hiratsuka, T. Shimizu, D. Sato, H. Hamano, N. Iwasaki, and M. Takahata  
Differential effects of anti-RANKL monoclonal antibody and zoledronic acid on necrotic bone in a murine model of Staphylococcus aureus-induced osteomyelitis  
Journal of Orthopaedic Research 2021 May; doi: 10.1002/jor.25102.

本研究の一部は以下の学会に発表した。

1. 小林英之, 高畑雅彦, 平塚重人, 佐藤大, 清水智弘, 藤田 諒, 太田 昌博, 岩崎 倫政  
急性骨髄炎による骨破壊と修復反応、細菌感染沈静化に骨代謝改善薬はどのような影響を及ぼすか—マウスモデルを用いた実験的検討—  
令和1年10月17-18日  
第34回日本整形外科学会基礎学術集会. 令和1年10月17-18日  
第34回日本整形外科学会基礎学術集会.  
パシフィコ横浜 (横浜市)
2. 小林英之, 高畑雅彦, 平塚重人, 佐藤大, 清水智弘, 藤田諒, 太田昌博, 岩崎倫政  
抗 RANKL 抗体が急性化膿性骨髄炎の骨溶解と腐骨形成に与える影響—マウスモデルによる実験的検討—  
令和2年6月18-20日  
第40回日本骨形態計測学会  
誌面開催 (岡山市)
3. 小林英之, 高畑雅彦, 平塚重人, 佐藤大, 清水智弘, 藤田諒, 太田昌博, 岩崎倫政  
急性骨髄炎に対する抗 RANKL 抗体の使用は, 腐骨量を増やさず骨破壊抑制効果を示す—マウス急性骨髄炎モデル—

令和2年10月9-11日  
第38回日本骨代謝学会学術集会  
神戸国際会議場(神戸市)

4. Kobayashi H, Takahata M, Hiratsuka S, Shimizu T, Sato D, Fujita R, Iwasaki N.  
Comparison of the therapeutic effect of bone-modifying agents for acute osteomyelitis in mice  
February 8-11, 2020  
The Orthopaedic Research Society 2020 Annual Meeting  
Phoenix Convention Center (Phoenix, USA)

## 要旨

【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- $\kappa$ 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  $1 \times 10^8$  CFU 植菌し、骨髄炎を誘発した。植菌直後より、PBS 200 $\mu$ l $\times$ 1/day 皮下投与 (Ctl 群)、Zoledronate 100  $\mu$ g/kg $\times$ 1/month 皮下投与 (ZA 群)、Teriparatide 20 $\mu$ 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- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ ) 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。

## 略語表

本文中および図中で使用した略語は以下のとおりである.

BP	bisphosphonate
BLI	biological
BMM	bone marrow-derived macrophage
BMSC	bone marrow-derived mesenchymal stem cell
Ca	calcium
CFU	colony forming unit
CT	computed tomography
H-E	hematoxylin and eosin
IL	interleukin
PTH	parathyroid hormone
RANK	receptor activator of nuclear factor- $\kappa$ B
RANKL	receptor activator of nuclear factor- $\kappa$ B ligand
SAM	staphylococcus aureus surface-associated material
s.c.	subcutaneous injection
TNF- $\alpha$	tumor necrosis factor- $\alpha$
TRAP	tartrate-resistant acid phosphatase
TPD	teriparatide
ZA	zoledronic acid

## 緒言

### 1. 急性化膿性骨髄炎は急速な骨破壊をきたす疾患である

骨髄炎は骨・関節における血行性感染や細菌感染の直接的な波及によって引き起こされ、急激な骨破壊、骨壊死が生じる疾患である(Lew & Waldvogel, 1997). 血行性感染のうち、小児の骨髄炎は急性の経過をたどることが多いが、早期発見・早期治療ができれば治療成績は比較的良好とされている(Yeo & Ramachandran, 2014). しかし、血行性感染でも糖尿病や透析、がん患者など易感染性宿主に好発する成人の化膿性脊椎炎は、強い疼痛や麻痺により長期にわたる入院加療を必要とし、後遺症を残す患者も少なくない(Kokabu et al, 2017) (図1). 重症糖尿病患者における足部壊疽では、下肢切断術を要することもある(Wiessman et al, 2015). 開放骨折や軟部感染症からの直接的波及によって骨髄炎が発症することもある. 人工関節術後感染による医原性骨髄炎は1~2%の割合で報告されており、発症症例では骨破壊による人工関節のゆるみのため再置換が必要となる(Jorge et al, 2010).



図1. 椎体椎間板炎患者の脊椎コンピュータ断層撮影(CT)矢状断像。骨髄炎により脊椎椎体が虫食い状に骨溶解している。

骨髄炎治療は起炎菌に対する抗生剤治療を主体に行うが、薬剤耐性菌の出現や壊死骨形成から微小環境が悪化し抗生剤の移行性が低下することで治療に難渋することも少なくない(Hawkshead et al, 2009). このような場合、抗生剤治療と並行して外科的な感染組織や壊死組織の除去が行われるが、感染巣の完全な除去は難しく、再発率は1年で30%におよぶと報告されている(Tice et al, 2003). 骨髄炎による骨破壊や腐骨形成は病的骨折や感染性偽関節を引き起こし、身体能力の低下を招くため、早期の感染の鎮静化とともに骨破壊を抑制することが必要であるが、現在のところ抗菌薬投与と外科的な病巣搔爬、骨移植術以外に有用な治療法がないのが現状であり、難治症例では入院期間の延長や繰り返す手術治療による医療コストの増大をもたらしている(Garrido-Gómez et al, 2013; Perry, 1999; Reichert et al, 2009). そのため骨髄炎により引き起こされる骨破壊を予防する効果的な補助治療開発の必要性は大きい。

## 2. 骨髄炎により引き起こされる骨破壊は炎症性骨溶解と骨新生低下を病態とする

骨髄炎の起炎菌としては黄色ブドウ球菌、大腸菌、緑膿菌などがあり、このうち黄色ブドウ球菌が占める割合が大きい(Mackowiak et al, 1978). 黄色ブドウ球菌は菌体外毒素により強い炎症を誘発し、骨破壊を起こす. 炎症性サイトカイン特に IL1 $\beta$ , IL6, TNF- $\alpha$  は骨感染時に血漿や局所で上昇することが知られており(Klosterhalfen et al, 1996; Yoshii et al, 2002), これらのサイトカインは破骨細胞誘導を行う作用を持つ(Ishimi et al, 1990; Pfeilschifter et al, 1989). 破骨細胞は生体内で古い骨基質を吸収し、骨恒常性の維持する多核巨細胞であるが、炎症等によって誘導される病的な破骨細胞の活性化は骨破壊をもたらす(Boyle et al, 2003). さらにブドウ球菌の表面たんぱく質 (SAM) によって破骨細胞誘導が行われることも報告されている(Lau et al, 2006). 一方で TNF- $\alpha$  は骨芽細胞の誘導と骨形成作用を抑制し、黄色ブドウ球菌は骨芽細胞のアポトーシスを誘導する(Alexander et al, 2003; Lacey et al, 2009). 骨芽細胞は骨組織の表面に存在し、骨基質を産生する. 破骨細胞とともに骨代謝において重要な役割を持つ細胞であり、骨芽細胞の減少は骨形成抑制につながる. こうして骨感染時に破骨細胞の誘導と骨形成作用低下が起こり、骨ターンオーバーは骨吸収へ傾き骨破壊が起こるものと考えられている(Marriott, 2013). 実際に関節リウマチに対しても、実臨床で炎症性骨破壊の進行予防目的に骨吸収抑制剤が使用されている(Cohen et al, 2008). それ故、骨髄炎による骨破壊に対する骨吸収抑制薬の使用は有効な補助療法の候補の一つと考えられる.

## 3. 骨髄炎に対する骨修飾薬の効果

現在、実臨床で使用可能な多数の骨粗鬆症治療薬の中で、破骨細胞による骨吸収を強力に抑制する薬剤としてビスフォスフォネート製剤 (BP 剤) と抗 RANKL 抗体がある. BP 製剤は骨ミネラルと結合し、BP 剤の沈着した骨を吸収した破骨細胞に取り込まれ、骨吸収活性を抑制するとともにアポトーシスを誘導する(Roelofs et al, 2006). 過去の研究では、マウス骨髄炎に BP 剤投与を行ったところ、骨破壊抑制効果が得られたと報告されている(Li et al, 2010; Morita et al, 2017). しかし、細菌のバイオフィーム付着の原因となりうる腐骨の増加が確認されており、骨髄炎に対する BP 剤投与が感染の遷延につながる可能性が懸念されている. そのため、実臨床において骨髄炎による骨破壊に対する BP 製剤の適応は承認されていない. 一方骨芽細胞に作用し、骨形成を促進させる薬剤としてテリパラチド製剤 (TPD) がある. TPD はヒト副甲状腺ホルモンの遺伝子組み換えペプチドであり、骨芽細胞の分化誘導と前骨芽細胞の増殖を刺

激する作用を持ち、骨折の治癒促進への使用も期待される薬剤である(Takahata et al, 2012). また、近年の研究で、敗血症モデルにおける過剰な炎症性サイトカインが骨芽細胞死を誘導し、急激な骨量減少とともにリンパ球誘導に重要な働きを示す IL-7 の産生を低下させることが報告され、骨芽細胞は、免疫賦活化因子である IL-7 を介して、免疫機能を維持しているということが明らかにされた(Terashima et al, 2016). 骨髄炎における骨芽細胞機能の低下を PTH 製剤にて改善することは骨形成亢進とともに免疫機能の賦活化による感染治癒への一助となる可能性がある。

#### 4. 抗 RANKL 抗体は BP 剤とは異なり腐骨増加を伴わずに骨破壊抑制効果を発揮する可能性がある

抗 RANKL 抗体は BP 剤とは異なる機序で破骨細胞を抑制する。破骨細胞の分化と活性化には破骨前駆細胞が発現する RANKL 受容体に骨細胞、骨芽細胞などの間質細胞が分泌する RANKL が結合することにより伝達される RANKL-RANK シグナルが必須とされている(Boyle et al, 2003). 抗 RANKL 抗体はこの RANKL-RANK シグナルを阻害することにより破骨細胞の分化・活性化を抑制する。しかしながら、SAM や炎症性サイトカインである IL-1, IL-6, and TNF- $\alpha$  は RANKL 非依存的に破骨細胞の分化を誘導することが報告されている(Azuma et al, 2000; Kobayashi et al, 2000; Kudo et al, 2003; Lau et al, 2006). 腐骨を形成するメカニズムとして、細菌巣に対して、免疫細胞の遊走が起こり、細菌による直接的な作用および炎症性サイトカインにより骨細胞や骨芽細胞のアポトーシスが誘導される。そのため、腐骨周囲では細菌量が多く、局所の炎症性サイトカイン濃度が高いため、非 RANKL 依存性破骨細胞誘導が多く行われるものと考えられる。そのため、抗 RANKL 抗体は腐骨の骨吸収を妨げずに骨破壊を抑制する可能性がある。

#### 5. 本研究の目的

本研究では急性骨髄炎に対する 2 種類の骨吸収抑制薬、BP 剤と抗 RANKL 抗体の骨保護効果をマウスモデルを用いて検証した。また、骨形成促進薬である TPD の効果についても検討した。

## 実験方法

### 倫理規定

本研究は北海道大学における研究倫理審査委員会の承認を得て行った。実施した動物実験はすべて北海道大学動物実験に関する規程に従って実施した。

### 実験動物

Funao らの方法に準じて(Funao et al, 2012), 発光黄色ブドウ球菌マウス急性骨髄炎モデルを作成した。12 週齢雄性 BALB/c マウス(日本クレア, 東京, 日本)に対して, 左膝関節を切開し膝蓋骨を内側へ脱臼させ, 23 ゲージ針で大腿骨顆部に骨孔を作成し, 27 ゲージ針で骨孔内に発光黄色ブドウ球菌(Xen29)を植菌, 骨孔を骨蠟で閉鎖し皮膚縫合を行った(図 2)。Xen29 (Perkin Elmer 社, アメリカ)はルシフェラーゼ遺伝子を発現する細菌株であり, 自発的な発光作用を持つ黄色ブドウ球菌である。発光量は菌量と相関関係にあり, 植菌部の発光量を計測することで縦断的な細菌活動性を観察することを可能とする。



図 2. 実験手技. 左は大腿骨骨髓腔に針を刺入した外見写真. 右は針の穿刺状態を確認するために撮影したマウス膝マイクロコンピュータ断層写真矢状断像。

### 研究デザイン

植菌を受けたマウスを 4 つのグループに分け, コントロール群 (Ctl 群) は PBS(Phosphate buffered saline) 200 $\mu$ l を術翌日から 1 日 2 回皮下投与, ゼレドロン酸群 (ZA 群) はゼレドロネート (ノバルティスファーマ) 100mg/kg を術翌日に 1 回皮下投与, 抗 RANKL 抗体群 (Anti-RANKL 群) は抗 RANKL マウスモノクローナル抗体 OYCI (オリエンタル酵母) 5mg/kg を術翌日 1 回投与, テリパラチド群 (TPD 群) はフォルテオ (日本イーライリリー) 20 $\mu$ g/kg を術翌

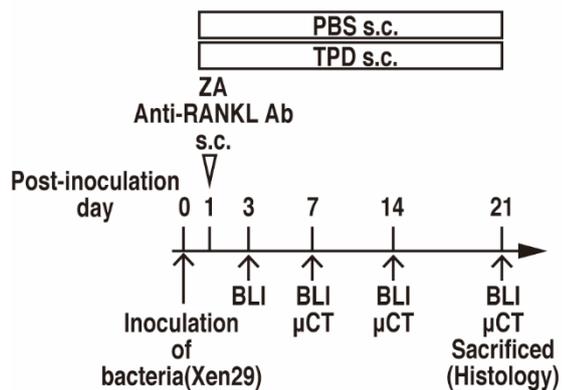


図 3. 実験スケジュール (縦断的観察研究)

日から1日2回皮下投与を行った。薬剤の投与量と投与間隔は過去の文献を参考に決定した(Furuya et al, 2011; Sims et al, 2004)。

術後は3週間縦断的にマイクロコンピュータ断層 (micro-CT) 撮像と患部発光量計測を麻酔下に行った。3週後に心臓採血で血清を回収後、頸椎脱臼にて安楽死させ、両大腿骨を検体として採取した(図3)。

縦断的観察群とは別に植菌後同様に4匹ずつ4つのグループに分け5日後に大腿骨、脾臓、血清を採取する群を作成し、回収した脾臓から摘出した細胞はフローサイトメトリー(FACS)に、血清はCa濃度測定に使用した。

### 全身状態の評価

投与開始後から肉眼的な全身状態を評価した。著明に状態の悪いものは実験群から除外し、安楽死させた。

### 発光イメージングによる縦断的細菌活動観察

感染の経時的変化を評価するために、Caliper LS-IVIS imaging system Lumina II (住商フーマ)を用いた発光イメージング (bioluminescence imaging: BLI) を術後3, 7, 14, 21に縦断的に行った。マウスを麻酔下に仰臥位で設置し、1分間の撮像を行った。細菌発光量を定量化するために、関心領域を植菌部に設定し、Living Image software (version 4.3; Caliper LS Co.)を用いて、発光量に応じて擬色へ変換された画像を撮像し、関心領域内の発光量を計測した。発光量の指標として Total flux (photons/s)を用いた。

### マイクロフォーカス X線断層撮影 (micro-CT)による縦断的骨破壊及び骨構造解析

患側大腿骨をmicro-CT (CT, R\_mCT2; Rigaku, Tokyo, Japan)を用いて1ピクセルあたり10  $\mu\text{m}$ の解像度で術後7, 14, 21日で撮像した。骨破壊の半定量的評価はMirel's scoreのsize項目を用いて分類した。Mirel's scoreのsize項目は骨皮質の破壊割合に応じて3段階に分類され、骨皮質の破壊が1/3未満のものを1, 1/3~2/3のものを2, 2/3を超えるものを3と分類評価した(Mirel, 1989)。術後3週では両大腿骨を撮像し TRI/3D-BON (Ratoc System Engineering 社, Tokyo, Japan)を用いて骨微細構造の解析を行った。これはCTの横断面より関心領域をスライス毎に抽出、3次的に評価するソフトである。大腿骨の測定関心領域は遠位成長板から600  $\mu\text{m}$ 近位の6000  $\mu\text{m}$ とした。評価の指標として骨密度 (bone mineral content/tissue volume: BMC/TV), 骨量 (Bone Volume/ Tissue Volume: BV/TV), 皮質骨厚 cortical bone volume (Ct.V.)を算出した。

### 組織学的検討

術後3週のマウスから採取した両大腿骨を4%パラホルムアルデヒドで固定、10%

EDTA液で脱灰後、ホルムアルデヒドに液浸し、パラフィン包埋切片作成およびヘマトキシエオジン (H-E) 染色, Gram 染色を行った. 植菌部 6000 $\mu$ m 周囲領域の壊死骨の指標として Empty lacunae rate (%)および Necrotic bone area (%)を計測した. 骨小腔内の骨細胞は骨髄炎において偏在化および消失し空胞化 (Empty lacunae) を起こし, 壊死骨となる. Empty lacunae rate は領域内すべての骨小腔と Empty lacunae の比より, Necrotic bone area は領域内皮質骨面積と皮質骨の Empty lacunae が存在する部位の面積の比から算出した. Gram 陽性球菌の数は Church らの半定量法を用いて下記の如く分類し評価した(Church et al, 2000).

grade 1+=rare (bacteria <1/oil immersion field),

grade 2+=few (bacteria=2-10/oil immersion field),

grade 3+=moderate (bacteria=11-50/oil immersion field)

grade 4+=many (bacteria >50/oil immersion field)作製した未染色パラフィン切片を TRAP (酒石酸抵抗性酸フォスファターゼ) およびメチルグリーンで染色, 破骨細胞を観察した. 破骨細胞は酵素組織化学的に強い TRAP 活性を示すため, この酵素は組織染色法による破骨細胞のマーカーとして用いられている. 以下に染色方法の概略を記載する.

• Basic stock incubation medium (下記を混合し, pH5.0 に調整した. )

蒸留水	1000 ml
無水酢酸ナトリウム	9.2 g
L-(+)-酒石酸	11.4 g
氷酢酸	2.8 ml

• Naphtol ether solution

Naphtol AS-BI phosphate	0.1 g
エチレングリコールモノエチルエーテル	5 ml

• 亜硝酸ナトリウム溶液

亜硝酸ナトリウム	1 g
蒸留水	25 ml

• ベーシックフクシン溶液

ベーシックフクシン	1 g
2N 塩酸	20 ml

切片をキシレンに液浸しパラフィンを除去後, 100 %, 95 %, 70 %, 50 %エタノールに順次浸して加水処理を行った. Basic stock incubation medium 150 ml に 1.5 ml の naphtol-ether solution を加え, 37 °C で 1 時間インキュベートした. 新たな Basic stock incubation medium 150 ml に亜硝酸ナトリウム溶液 1 ml とベーシックフクシン溶液 1 ml を混合したものを加え, 切片を溶液内で破骨細胞が赤く染色されるまで 37 °C で 20-40 分間インキ

キューベート後メチルグリーンに液浸し、対比染色を行った。染色された破骨細胞数 (Number of osteoclast: N.Oc), 骨面 (Bone surface: BS), 破骨細胞面 (osteoclast surface: Oc.S), 骨吸収面 (eroded surface) から N.Oc/BS, Oc.S/BS, ES/BS を算出し破骨細胞評価の指標として用いた。画像は BX53 顕微鏡 (オリンパス) で観察し撮像し, ImageJ ソフトウェア (NIH) を使用して組織学的計測を行った。

### 血清骨代謝マーカーの測定

投与した薬剤の影響を調べるために, 植菌後 5 日後に心臓採血を行った。採取した血液は遠心分離機で 4°C, 2000g で 10 分遠心し, 血清のみを抽出した。血清をオリエンタル酵母株式会社に送付し, 血清 Ca 濃度の測定を行った。

### フローサイトメトリー

免疫細胞を定量評価するため, 植菌後 5 日後の脾臓細胞を採取し, フローサイトメトリーを行った (BD FACS Canto™ II, BD Biosciences, Franklin Lakes, New Jersey)。採取した細胞は冷 PBS で懸濁し, 赤血球を破碎後上清を除去, 抗マウス B 細胞のマーカーとして CD45R/B220 抗体 (PE anti-mouse/human CD45R/B220; Biolegend), T 細胞のマーカー CD3 抗体 (FITC anti-mouse CD3 antibody; Biolegend) で氷上にて 30 分間処理し標識した。

### 細胞培養

マウスの大腿骨および脛骨を無菌的に摘出し, 骨髓腔をリン酸緩衝生理食塩水でフラッシュして骨髓細胞を採取した。骨髓細胞を  $\alpha$ -MEM で洗浄後, 0.727%  $\text{NH}_4\text{Cl}$ -0.017% Tris-HCl (pH 7.2)-PBS 溶液で赤血球を除去し, 10% Fetal Bovine Serum (FBS) および M-CSF (50 ng/ml) 含有の  $\alpha$ -MEM で, 浮遊細胞培養用ディッシュ上で 3 日間培養し, 増殖した接着細胞を骨髓マクロファージ (BMM) として用いた。同様にして骨髓細胞を採取し, プラスチック細胞培養ディッシュ上で 2 日間培養後, 浮遊細胞を除去し, コンフルエントとなるまで培養し接着細胞を骨髓間葉系幹細胞 (BMSC) として回収した。BMM と BMSC の共培養による破骨細胞分化培養系は, 48well plate に各細胞  $4 \times 10^4$  cells/well ずつを 10% FBS, 30 ng/ml M-CSF および 10 nM 1,25-dihydroxyvitamin D3 含有  $\alpha$ -MEM を培地として用い播種し, 5 日間培養して行った。炎症環境を模擬した培養系として, 10 ng/ml IL-1 $\beta$  (BioLegend) および 10 ng/ml TNF- $\alpha$  (BioLegend) を培地に加えて培養を行った。壊死骨環境を模擬した BMM 単独での破骨細胞分化誘導には, 10% FBS, 30 ng/ml M-CSF, 10 ng/ml IL-1 $\beta$  および 10 ng/ml TNF- $\alpha$  含有の  $\alpha$ -MEM を培地として用い 5 日間培養した。培養は全て 37°C, 5%  $\text{CO}_2$  下で行い, 培地には 100 IU/ml ペニシリン G (Meiji Seika, Tokyo, Japan), 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  ストレプトマイシン (Meiji Seika) を添加した。培地は, 2 日毎に交換した。

## 統計分析

BLI は非正規分布のデータを対数変換した後，縦断的な分析データ比較のため二元配置反復測定分散分析 (Two Way Repeated Measures ANOVA) と Dunnet test を用いて対照群との有意差検定を行った．連続データの比較には一元的分散分析 (One Way ANOVA) と多重比較に Turkey's multiple comparison test または対照群との多重比較には Dunnet test を行った．半定量的データの比較には Dunn の多重比較検定を用いた Kruskal-Wallis 検定を行った．累積生存率は Kaplan-Meier 法により算出，Log-rank 検定にて有意差検定を行った．判定は P 値 < 0.05 で有意差ありとした．データは  $\text{mean} \pm \text{SEM}$  で表した．

## 実験結果

### 骨修飾薬が骨髄炎による骨破壊に与える影響

Micro-CTを用いて、骨髄炎による骨破壊を縦断的に評価した対照群では経時的に感染部位の骨溶解進行を認めたが、ZA投与群と抗RANKL抗体投与群で対照群と比べて、有意な骨破壊抑制効果を確認した。一方TPDは14日までに骨溶解進行を認めたが、14~21日の間に骨新生により溶解部の修復が見られ、対照群と比較し皮質骨の破壊は有意に低下していた。21日目では、(図4A, B) 21週目の感染部位の骨密度(BMC/TV)はZA、抗RANKL抗体、TPD投与で対照群と比べて有意に高く、骨量(BV/TV)はZA群が対照群に比べて有意差を確認した。

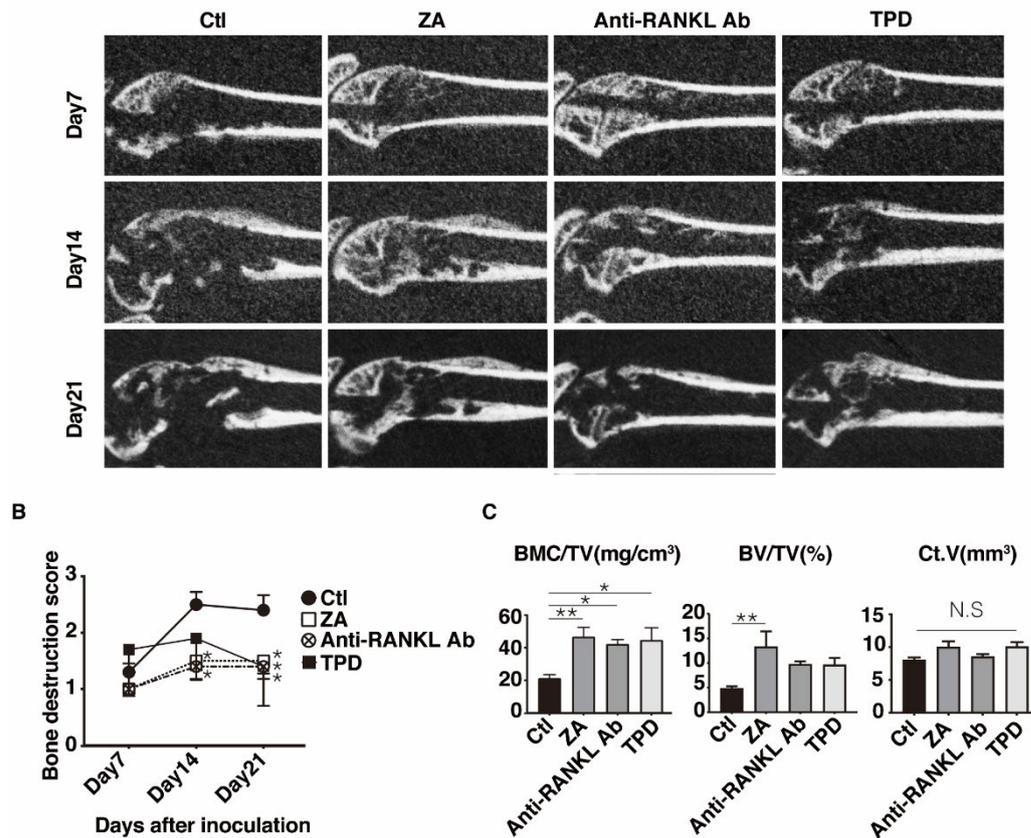


図4. CTによる骨破壊評価. A) 縦断的患側大腿骨遠位矢状断のマイクロCTイメージ. B) 骨破壊の半定量評価. C) 患側大腿骨遠位部の骨微細構造パラメータ. 各群N=8. (Data shown are mean ± SEM).

\*,  $p < 0.05$  vs Ctl, \*\*,  $p < 0.01$  vs Ctl

薬剤の全身性への効果を検証するために健側の大腿骨遠位の骨微細構造を測定した。すべての薬剤投与群で対照群に比べて有意な骨密度 (BMC/TV), 骨量 (BV/TV) の上昇を認めた(図 5)。

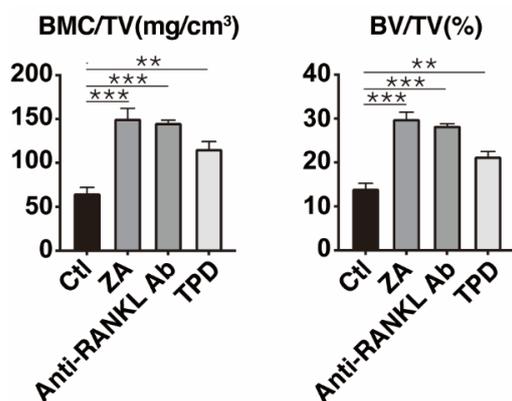


図 5. 健側大腿骨の骨微細構造パラメータ。

すべての薬剤で Ctl と比較し有意に高値となっていた。各群 N=5。

(Data shown are mean  $\pm$  SEM). \*\*, p<0.01, \*\*\*, vs Ctl; p<0.005 vs Ctl

#### 骨修飾薬が骨髓炎の細菌量に与える影響

発光イメージングで細菌量の経時的変化を追跡した。植菌後 14 日まですべての群で経時的に発光量は減衰した。(図 6A, B) しかし, ZA 投与群では 21 日目に低下せず細菌量の低下が遷延した。Repeated Two-way ANOVA による解析では有意な time effect [F(2.545, 68.71)=28.07, p<.0001]と treatment effect[F(3.27)=43.568, p=.0270]を認めたが, interaction effect は認めなかった[F(9.81)=1.016, p=.439]。対照群と抗 RANKL 抗体群, TPD 群ではどの時点でも有意差は見られなかったが, 21 日目の細菌量では対照群に比べて ZA 群で有意に高かった。(p=.0445, Ctl vs. ZA;  $1.23 \times 10^4 \pm 4.19 \times 10^4$  photons/s vs.  $1.88 \times 10^6 \pm 8.66 \times 10^5$  photons/s)。

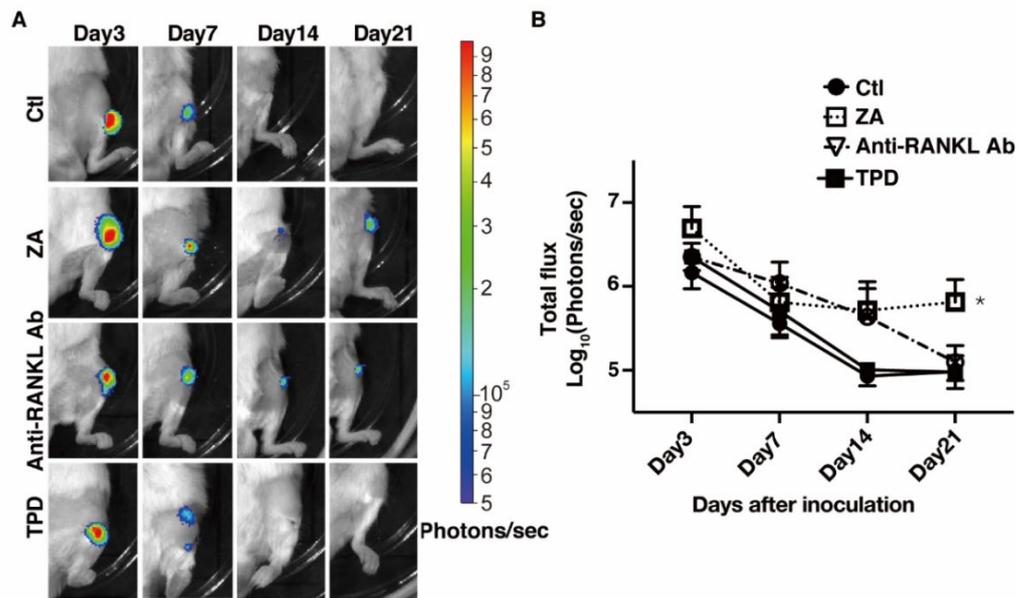


図 6. 細菌量の縦断的評価 A) 各群時系列の発光イメージング画像. B) 縦断的発光量の定量評価. ZA 群で 21 日目の発光量が有意に高い. 各群 N=8. (Data shown are mean  $\pm$  SEM). \*,  $p < 0.05$  vs Ctl

### 骨修飾薬が骨髄炎骨組織に与える影響

感染部位骨組織における骨壊死, 細菌巣, 破骨細胞分化を組織学的に評価した. 腐骨量の比較には Empty lacunae rate を用いて行った. 抗 RANKL 抗体投与群と TPD 群では対照群と比べて有意な腐骨量の増加を認めなかったが, ZA 投与群で腐骨量の有意な増加を認めた (図 7A, B). また, 細菌量の半定量評価において, ZA 群で細菌量が多く, 組織内では多くの細菌が腐骨内に保菌された状態で観察され, 増加した腐骨が細菌巣の温床となっている可能性が示唆された (図 7A, C).

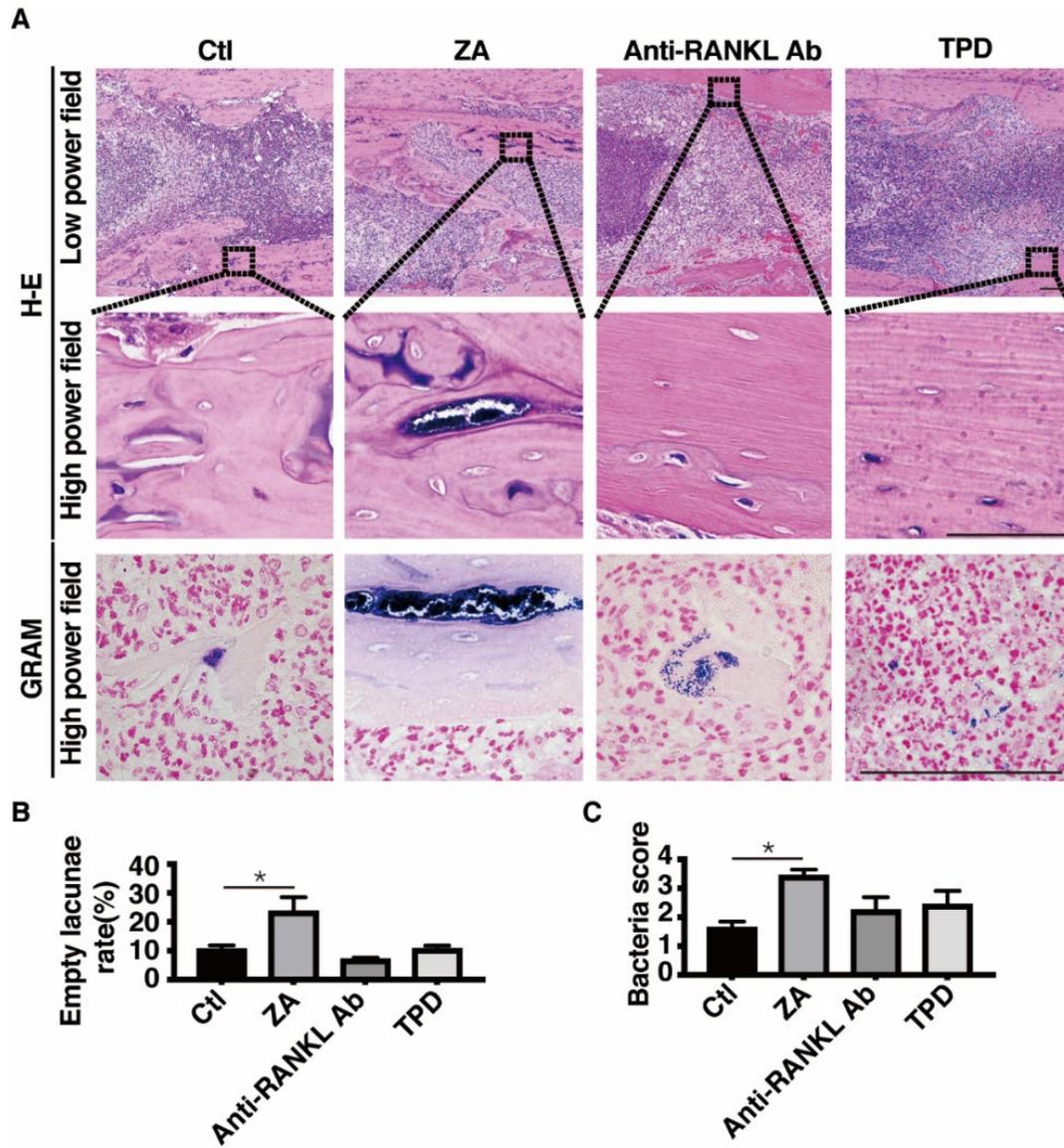


図7.骨代謝修飾薬が骨髄炎組織に及ぼす影響 A) 上段はH-E染色弱拡大, 中段は上段の点線四角内の拡大画像. Empty lacunaeの所見. 下段はGRAM染色強拡大. ZA投与群で腐骨内に大量のGRAM陽性球菌を認める. B) 骨壊死の指標であるEmpty lacunaeが占める割合. ZAで有意に増加していた. C) 細菌量の半定量評価. ZAで有意に高く感染の遷延が示唆された. 各群N=5. (Data shown are mean  $\pm$  SEM). \*,  $p < 0.05$  vs Ctl, \*\*

続いて破骨細胞の活性を評価したところ, ZA投与群では感染部位周囲の破骨細胞の分化は対照群と比べて著明に抑制されていたが, 抗RANKL抗体投与群でも, 対照群と比較し生骨及び壊死骨周囲の破骨細胞分化は抑制されていたが, 腐骨周囲での破骨細胞分化は破骨細胞数と破骨細胞面積においてZA群と比較し有意に高値となってい

た. TPD 投与群では対照群と比べて破骨細胞のパラメータに有意差は認めなかった (図 8A,B).

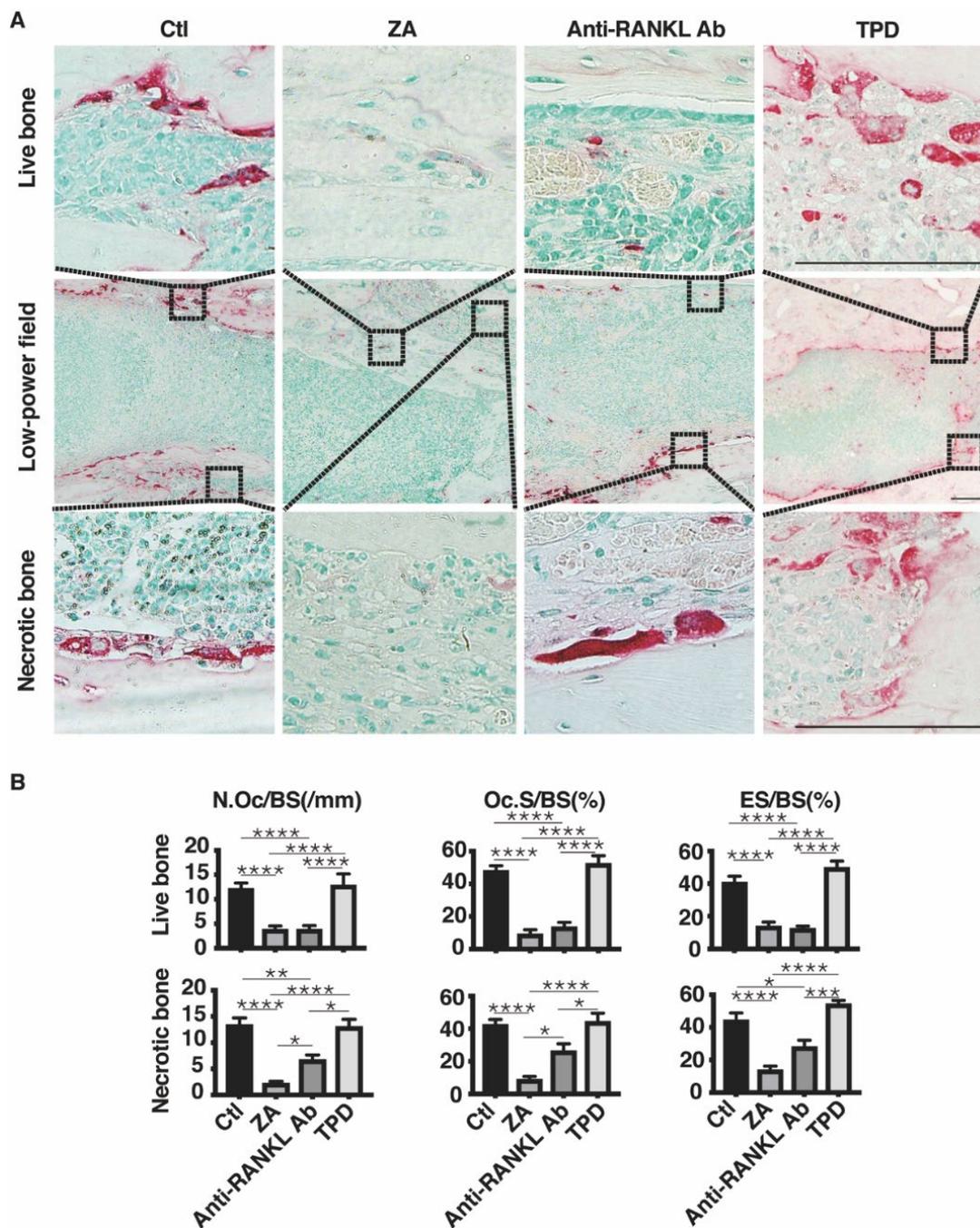


図 8. 骨修飾薬が骨髓炎組織に及ぼす影響 A) 上段は H-E 染色弱拡大, 中段は上段の点線四角内の拡大画像. Empty lacunae の所見. 下段は GRAM 染色強拡大. ZA 投与群で腐骨内に大量の GRAM 陽性球菌を認める. B) 骨壊死の指標である Empty lacunae が占める割合. ZA で有意に増加していた. C) 細菌量の半定量評価. ZA で有意に高く感染の遷延が示唆された. 各群 N=5. (Data shown are mean ± SEM).

\*, p<0.05, \*\*, p<0.01, \*\*\*, p<0.005, \*\*\*\*, p<0.001

## 骨修飾薬が免疫系に与える影響

ZA 投与において感染遷延した原因として免疫系への影響がないかどうかを脾臓細胞のフローサイトメトリーを行い評価した. CD3 陽性細胞および CD45R/B220 陽性細胞の割合は対照群と差はなく, T 細胞, B 細胞免疫系に与える影響はないと考えられた. また TPD が骨芽細胞刺激により免疫賦活効果を及ぼすことが知られており (Terashima et al, 2016), TPD 投与群も評価したが, こちらも対照群と比較して明らかな違いは認めなかった (9A, B).

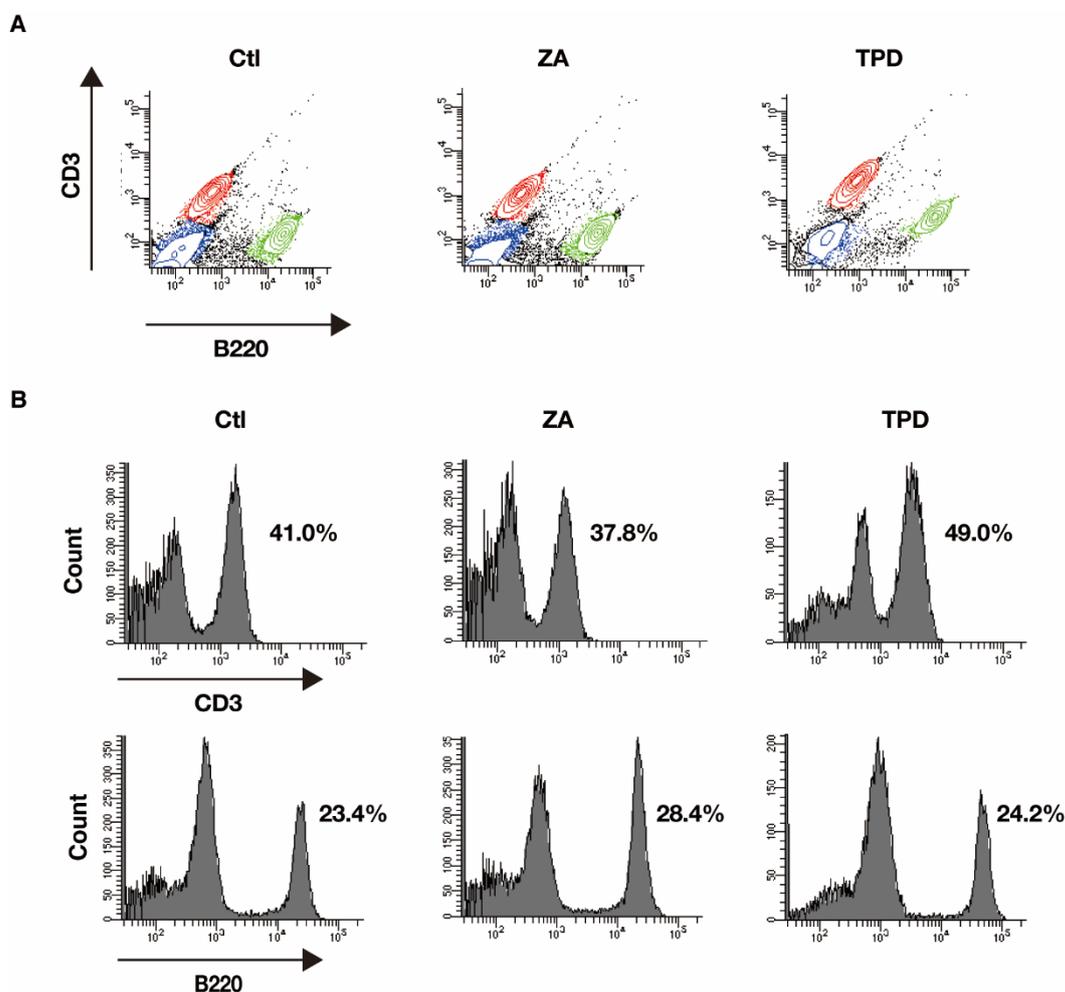


図 9. 骨修飾薬が免疫細胞に及ぼす影響 A) CD3 および B220 で標識した脾臓細胞のフローサイトメトリーの分布. CD3 は T 細胞の B220 は B 細胞のマーカーとして使用. B) フローサイトメトリー法による細胞膜上の CD3 および B220 のヒストグラム. 各群で細胞の割合に明らかな差は見られない.

## TPD が骨髄炎における血清 Ca に与える影響

TPD 投与群は他群と比較して、衰弱死の増加を認めた (生存率 Ctl vs TPD: 90.0% vs 57.143%) (図 10A). TPD は高 Ca 血症が副作用として挙げられ(Hodsman et al, 2005), 血清 Ca 異常は時に死につながる重篤副作用を起こすことがある. 骨髄炎という通常と異なる全身状態・骨代謝環境下にこれらの薬剤を投与し, 血清 Ca の急激な低下を引き起こした可能性を考え, 植菌後 5 日目における血清 Ca 値を検証した. TPD 投与群と対照群で統計学的有意差を認めなかったが, TPD 群において血清 Ca 高値を呈するマウスが 2 例存在した(図 10B).

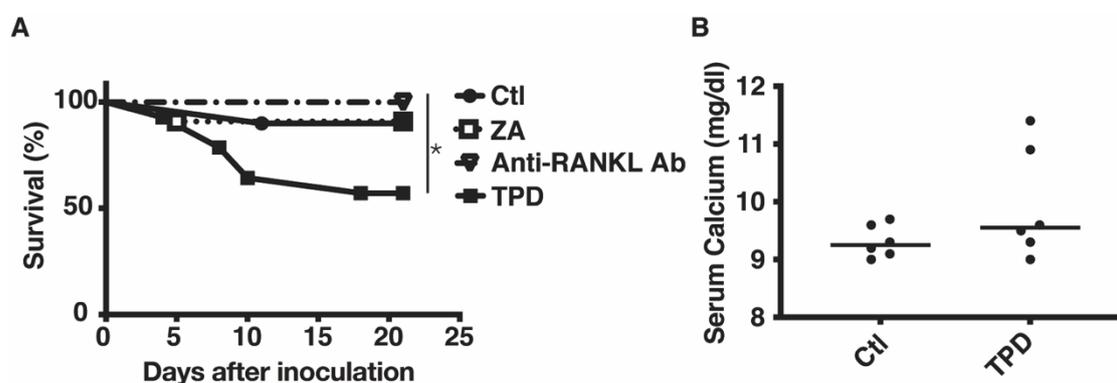


図 10. 骨修飾薬が骨髄炎における血清 Ca 値に与える影響 A) 植菌後からの各治療群での生存率を示す. TPD 投与群で有意に生存率の低下を示す. B) 対照群と TPD 群の植菌後 5 日目の血清 Ca 値.

TPD 群で高い値を示すマウスを認める. \*,  $p < 0.05$

## 炎症性サイトカイン存在下の破骨細胞培養に対して抗 RANKL 抗体とゾレドロン酸が与える影響

組織学的評価において認めた, ZA と抗 RANKL 抗体の破骨細胞への効果の違いを検証するため, 炎症性サイトカイン (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ ) を培地に加え, 炎症性破骨細胞誘導に対する二つの薬剤を加え分化抑制効果を確認した. RANKL を分泌する BMSC と破骨細胞分化能を持つ BMM の共培養は生骨での破骨細胞分化を模擬する. 炎症性サイトカインを共培養の培地に加えることで, 炎症反応を伴う生骨周囲の環境を, また BMM 単独培地に炎症性サイトカインを加え, 炎症を伴う壊死骨周囲の環境を再現した. 共培養に ZA を加えると用量依存効果を認めた. 一方抗 RANKL 抗体はと用量依存効果を認めるが 0.1 $\mu$ g/ml で天井効果を示した (図 11A). 十分な破骨細胞抑制効果が得られる濃度 (1 $\mu$ M ZA および 1 $\mu$ g/ml 抗 RANKL 抗体) で比較すると, 共培養にお

ける ZA と抗 RANKL 抗体は明らかな有意差はないが、炎症性サイトカインを添加した共培養では抗 RANKL 抗体は対照群に比べて、有意な破骨細胞分化抑制効果を示したが、ZA に比べて抗 RANKL 抗体投与したもので有意に多核破骨細胞数の上昇を認めた。一方、炎症性サイトカインを添加した BMM 単独培養条件では、ZA は対照群に比べて有意な破骨細胞分化抑制効果を示したが、抗 RANKL 抗体は対照群と有意差を認めなかった (図 11B)。

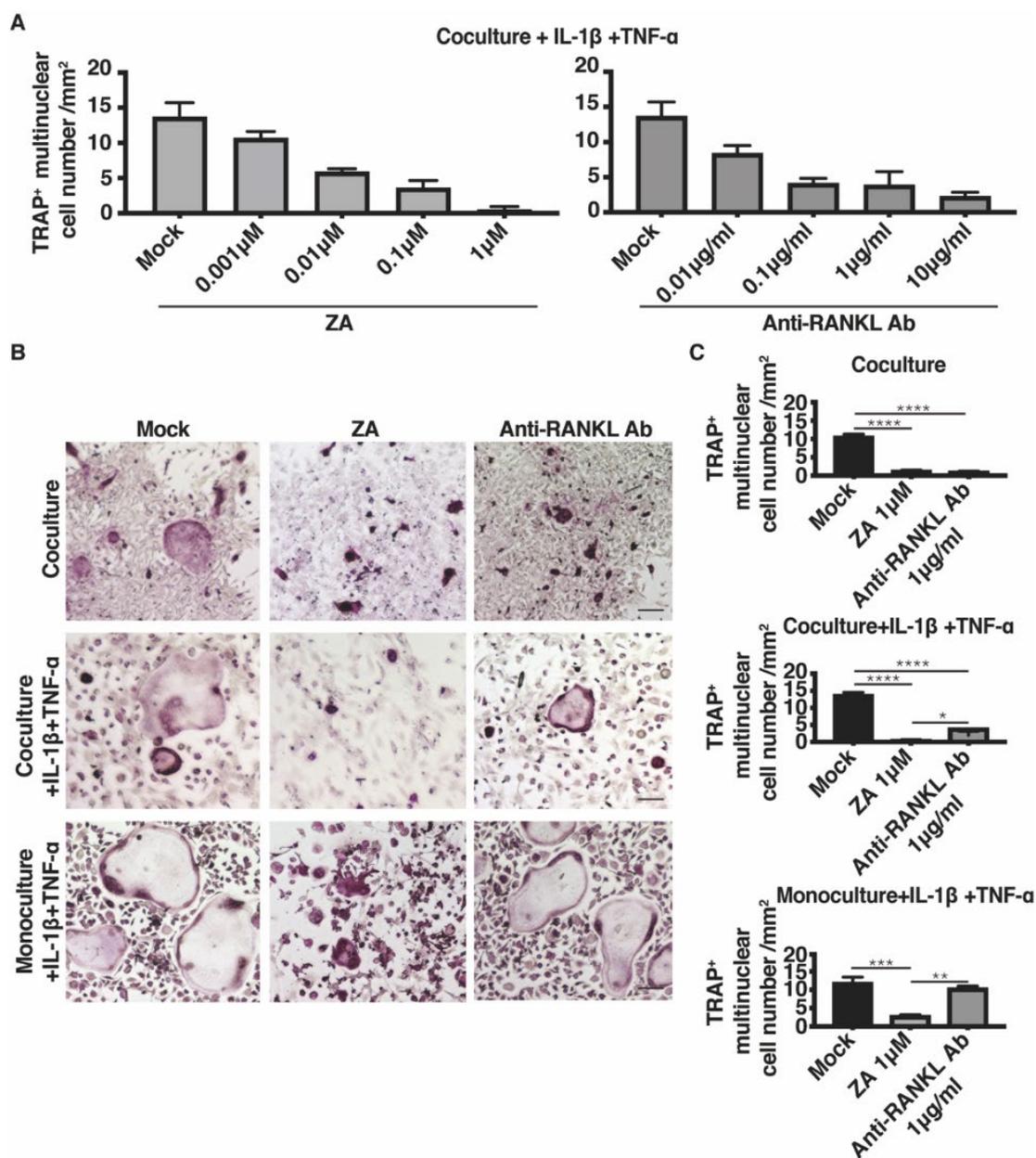


図 11. ZA と抗 RANKL 抗体が炎症性破骨細胞分化に与える影響 A) ZA と抗 RANKL 抗体を添加した炎症性サイトカイン存在下共培養における破骨細胞数. 両薬剤とも用量依存的に破骨細胞形成抑制効果を呈する. B) ZA と抗 RANKL 抗体を加えた破骨細胞分化培養に TRAP 染色を行った. 上段は炎症性サイトカインを加えない BMM と BMSC 共培養, 中段は共培養に炎症性サイトカインを加えたもの, 下段は BMM 単培養に炎症性サイトカインを加えたものを示す. C) 各培養系の単位面積当たりの破骨細胞数. 核を 3 個以上有する TRAP 陽性細胞を多核破骨細胞として計上した. 各群 N=5. (Data shown are mean  $\pm$  SEM). \*\*, p<0.01, \*\*\*, p<0.005, \*\*\*\*, p<0.001

## 考察

本研究の目的は骨髄炎急性期において、骨吸収抑制薬が骨破壊に対して骨保護効果を骨形成促進薬が骨新生促進効果を示すか、またこれらの薬剤が感染そのものに悪影響がないかを明らかにすることである。

本研究において、Micro-CTによる解析から2つの骨吸収抑制薬 ZA と抗 RANKL 抗体はともに骨髄炎が引き起こす骨破壊に対して骨保護効果を持つことが示された。しかしながら、植菌した発光細菌の縦断的発光量観察においての減衰が ZA 投与を行った骨髄炎モデルマウスでは対照群と比較し遷延しており、組織学的所見では、感染の温床となる壊死骨が増加していた。これはビスフォスフォネート製剤であるアレンドロン酸を骨髄炎マウスモデルに投与し、壊死骨増加と High grade な感染を誘発することを示した過去の報告と合致する結果であった(Li et al, 2010)。一方で、抗 RANKL 抗体を投与したマウスでは感染の遷延や壊死骨の増加をきたさなかった。この2つの薬剤の壊死骨に対する効果の違いは、抗 RANKL 抗体を投与したマウスでは、壊死骨周囲に RANKL 非依存性の破骨細胞が形成されることで説明できる。通常、生体内における破骨細胞の分化には骨芽細胞、骨細胞より分泌される RANKL 刺激が必須である(Boyle et al, 2003)。過去の報告から今回使用したマウス用抗 RANKL 抗体投与により生体内破骨細胞分化が抑制されることがわかっている(Furuya et al, 2011)。しかし、抗 RANKL 抗体を投与したマウスでは生骨周囲つまり細菌感染による影響の少ない部位では破骨細胞分化抑制効果を示したが、細菌感染により多くの免疫反応が生じる壊死骨周囲では破骨細胞分化抑制効果は低下していた。このことから壊死骨周囲では RANKL 非依存性の破骨細胞誘導が保たれるため壊死骨吸収に働く一方で、生骨周囲では抗 RANKL 抗体が作用し、炎症性骨破壊の進行を抑制したものと考えられた(図 12)。一方で ZA は炎症性サイトカインによる影響を受けずにすべての破骨細胞を抑制するため、腐骨上の骨吸収も阻害する。ZA が非 RANKL 存在下の破骨細胞誘導を強力に抑制したが、抗 RANKL 抗体は抑制効果を持たないという本研究の細胞培養の実験結果からもこの仮説が支持されるものと考えられた。

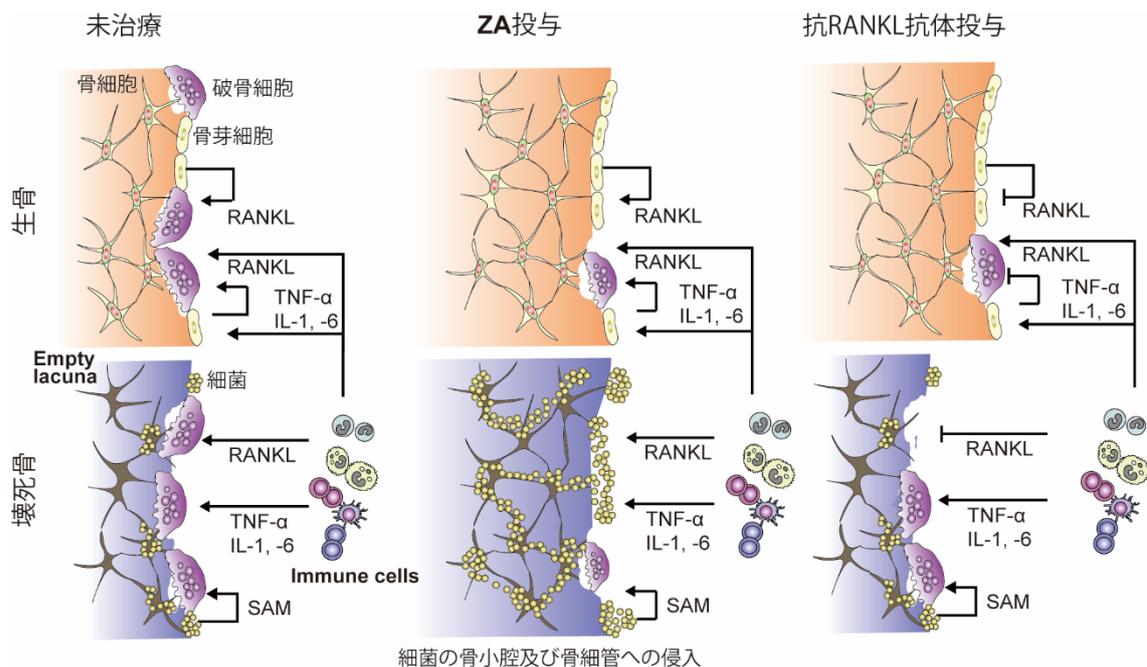


図 12. ZA と抗 RANKL 抗体の作用機序の違いによる壊死骨周囲の破骨細胞に与える影響の違い

骨髄炎慢性化の原因は、壊死骨の Empty lacunae や骨小細管ネットワーク内への細菌の侵入と、壊死骨上でのバイオフィーム形成であると考えられている(Bentley et al, 2017). したがって、破骨細胞による壊死骨の吸収は、骨髄炎の治癒に必要なプロセスと考えられる.壊死骨ではRANKLを供給する骨芽細胞や骨細胞が欠失しているため、その吸収除去には、炎症性サイトカインや SAM などの非 RANKL 破骨細胞誘導重要な役割を果たすことになる. そのため本研究結果から抗 RANKL 療法は、生骨に対しては骨保護効果を発揮し、壊死した骨の除去に対しては影響の少ない有用な補助療法となりうると考えられる.

ヒト抗 RANKL 抗体であるデノスマブは、第 II 相臨床試験において、RA 患者関節の炎症性骨浸食を抑制することが実証されており、炎症性骨破壊の重要な誘導因子として RANKL/RANK シグナルが重要であることが示唆されている(Cohen et al, 2008). このことは抗 RANKL 抗体が炎症性サイトカインによる RANKL 非依存性破骨細胞による炎症性骨吸収を阻害できなかった本研究の結果と矛盾する. しかしながら、この試験の対象者はメトトレキサート療法を併用されており、炎症性サイトカインが RANKL 非依存的に破骨細胞を誘導するには低すぎるレベルに抑制されていた可能性がある. さらに O'Brien らは RANK コンディショナルノックアウトマウスを用いて、K/BxN 血清移入マ

ウスモデルを作成し、RANK が欠損していても、関節炎により骨びらんが生じ、骨を吸収する機能性破骨細胞が存在することを示した(O'Brien et al, 2016). これは炎症部位での RANKL/RANK シグナル非依存性の破骨細胞による骨吸収が起きていることを示しており、抗 RANKL 抗体が骨髄炎の激しい炎症部位における破骨細胞形成および壊死骨吸収を抑制しなかったという我々の発見を支持するものである。

本研究では骨形成促進薬である TPD の効果も検証した。TPD を投与した骨髄炎マウスモデルでは骨破壊は一時的に進行するものの、感染後期においては、対照群と比較して骨新生傾向が認められた。また、発光イメージングによる結果から、感染自然治癒を阻害するような効果は認めなかった。敗血症による骨芽細胞減少が T 細胞、B 細胞の分化抑制に働き、TPD は骨芽細胞分化促進により敗血症による免疫低下を改善させることが報告されている(Terashima et al, 2016). このことから骨髄炎における骨芽細胞減少に対して、TPD が免疫賦活化から感染治癒に有用なのではないかと考えたが、本研究では免疫細胞への影響は確認できなかった。その理由として今回の骨髄炎モデルの感染が自然に減衰していくこと、敗血症と異なり局所的な骨芽細胞減少のため、全身の免疫に与える影響が少ないということが挙げられる。一方で TPD 投与により衰弱死するマウスが増加したが、これは高 Ca 血症による全身状態悪化が原因として考えられた。PTH は血清 Ca 維持に働くホルモンであるが、組み換え PTH である TPD が、骨髄炎による骨代謝回転亢進に拍車をかけ、骨からの Ca 流出を促進し、高 Ca 血症を引き起こしたものと推測された。そのため本研究結果からは、急性期での使用は高 Ca 血症を誘発する可能性があるため控えるべきと考えられた。しかしながら、TPD は感染が落ち着いた慢性期での骨新生効果も期待することができ、前述の骨吸収抑制剤を急性期骨髄炎に使用し、慢性期に TPD を使用することは骨髄炎による骨破壊に対して効果的な使用方法である可能性があり、今後の検証課題となりうる。

本研究の限界点として、第一に今回の骨髄炎モデルに抗生剤を併用していないことが挙げられる。骨髄炎の治療には抗生剤による感染制御が原則である。しかし、黄色ブドウ球菌によるマウス骨髄炎モデルは3週間の経過で自然に感染が減弱し治癒傾向を認めるため、抗生剤投与を行わなかった。第2に今回観察した経過は骨髄炎の比較的急性期の段階を見ており、慢性期における骨新生や骨組織の再構築に骨代謝修飾薬がどのような影響を及ぼすかを検証できていないことがある。臨床において骨髄炎は、慢性化し感染の再燃を繰り返すことが時として問題となる。そのため、骨修飾薬の投与が長期的にどのような影響をおよぼすのかを今後検証する必要がある。第3の限界点として、今回の知見は強い局所炎症を誘発する黄色ブドウ球菌による骨髄炎についてのみ当てはまるということである。今回局所で強い炎症が生じたことにより、

非 RANKL 依存性の破骨細胞誘導が起きたものと考えられるが、骨髄炎の原因菌となる菌は数多く存在し、菌種によっては比較的弱い炎症で発症するものもあるため、すべての骨感染症に対して、今回の抗 RANKL 抗体による選択的な腐骨吸収維持するという結果があてはまらないかもしれない。したがって、臨床での応用のためには慢性骨髄炎モデルでの評価や他の菌種での評価、多剤耐性菌や大型動物での評価が必要であると考えられる。

本研究をまとめると、急性骨髄炎マウスモデルに対する BP 製剤である ZA の投与は骨破壊に対する骨保護効果を有するが、壊死骨増加により細菌感染が遷延する結果となった。一方、抗 RANKL 抗体は骨保護効果を認めるとともに、壊死骨を増やさず感染の遷延も引き起こさなかった。以上の結果から骨髄炎に対するビスフォスフォネート製剤投与は骨髄炎慢性化につながるが、抗 RANKL 抗体は悪影響を最小限に抑え骨髄炎の補助療法として適切であることが示唆された。TPD は骨破壊に対する骨保護効果はないが、感染沈静化後の骨新生促進効果を認めた。しかしながら、TPD 投与により高 Ca 血症をきたすマウスを認めた。以上のことから急性期骨髄炎による骨破壊に対して、抗 RANKL 抗体投与は感染悪化のリスクを来さず骨保護効果を期待できる可能性がある。TPD は急性期の使用で高 Ca 血症による全身状態悪化を引き起こすリスクを伴うことが示唆された。

## 総括および結論

- 骨吸収抑制薬である ZA 投与は骨髄炎マウスモデルの骨破壊を抑制した，腐骨を増加させ感染の遷延に寄与した。
- 同じく骨吸収抑制薬である抗 RANKL 抗体は骨髄炎マウスモデルの骨破壊を抑制したが，ZA と異なり腐骨増加を来さず，感染の自然治癒を阻害しなかった。
- ZA と抗 RANKL 抗体の結果の違いは，2 つの薬剤の作用機序の違いから非 RANKL 依存性破骨細胞によりもたらされたものと考えられた。
- TPD は骨髄炎マウスモデルにおいて，骨破壊部の骨修復を促進したが，高 Ca 血症を引き起こした。

本研究は，骨髄炎が引き起こす骨破壊に対する，骨修飾薬の有効性と安全性に関して検討した。臨床において使用される骨修飾薬の内，骨吸収抑制薬としてビスフォスフォネート製剤，抗 RANKL 抗体がある。本研究では第 3 世代ビスフォスフォネート製剤である ZA を骨髄炎マウスモデルに用いたが，腐骨増加および感染の遷延をもたらした。一方で，抗 RANKL 抗体はそのような有害事象は発生せず，十分な骨保護効果を示したことから，抗 RANKL 抗体が骨髄炎に対する補助治療薬として適切である可能性が示唆された。TPD は本研究で感染自然治癒とともに骨修復が得られたことから，感染治癒後の骨再生目的への適応が期待されるが，高 Ca 血症を来すリスクもあり適応には慎重な検討が必要と考えられる。

実臨床において，骨髄炎は慢性化や感染の再発が懸念される。ビスフォスフォネート製剤は今回壊死骨を増やし，感染遷延化をもたらしたことから，そのリスクを増加させるのではないかと考えられる。しかし，本研究では再発率や長期の骨治癒などを評価しておらず，抗 RANKL 抗体や TPD が骨髄炎の長期経過に悪影響を及ぼす可能性が否定はできない。骨修飾薬が骨髄炎の長期経過化にどのように影響するか，異なる菌種においても本研究結果と同様となるかについては今後の臨床応用に向けての研究課題である。

## 謝辞

本論文は、筆者が北海道大学大学院医学研究院 専門医学系部門 機能再生医学分野 整形外科学教室 博士課程在学中に行った研究をまとめたものです。本研究に関して終始ご指導ご鞭撻を頂きました整形外科学教室教授 岩崎倫政先生および同准教授 高畑雅彦先生に心より感謝いたします。

これまでの研究課程において数々のご指導を賜りました北海道大学大学院医学研究院 専門医学系部門 機能再生医学分野 整形外科学教室の諸先生方および研究にご助力頂きました皆様に心よりの感謝を申し上げます。

利益相反

なし

## 引用文献

Alexander, E. H., Rivera, F., Marriott, I., Anguita, J., Bost, K. L. & Hudson, M. C. (2003) Staphylococcus aureus - induced tumor necrosis factor - related apoptosis - inducing ligand expression mediates apoptosis and caspase-8 activation in infected osteoblasts. *BMC Microbiology*, 3(1), 5.

Azuma, Y., Kaji, K., Katogi, R., Takeshita, S. & Kudo, A. (2000) Tumor necrosis factor-alpha induces differentiation of and bone resorption by osteoclasts. *J Biol Chem*, 275(7), 4858-64.

Boyle, W. J., Simonet, W. S. & Lacey, D. L. (2003) Osteoclast differentiation and activation. *Nature*, 423(6937), 337-342.

Church, D., Melnyk, E. & Unger, B. (2000) Quantitative Gram Stain Interpretation Criteria Used by Microbiology Laboratories in Alberta, Canada. *Journal of Clinical Microbiology*, 38(11), 4266-4268.

Cohen, S. B., Dore, R. K., Lane, N. E., Ory, P. A., Peterfy, C. G., Sharp, J. T., van der Heijde, D., Zhou, L., Tsuji, W., Newmark, R. & Denosumab Rheumatoid Arthritis Study, G. (2008) Denosumab treatment effects on structural damage, bone mineral density, and bone turnover in rheumatoid arthritis: A twelve-month, multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled, phase II clinical trial. *Arthritis & Rheumatism*, 58(5), 1299-1309.

Funao, H., Ishii, K., Nagai, S., Sasaki, A., Hoshikawa, T., Aizawa, M., Okada, Y., Chiba, K., Koyasu, S., Toyama, Y. & Matsumoto, M. (2012) Establishment of a Real-Time, Quantitative, and Reproducible Mouse Model of Staphylococcus Osteomyelitis Using Bioluminescence Imaging. *Infection and Immunity*, 80(2), 733-741.

Furuya, Y., Mori, K., Ninomiya, T., Tomimori, Y., Tanaka, S., Takahashi, N., Udagawa, N., Uchida, K. & Yasuda, H. (2011) Increased Bone Mass in Mice after Single Injection of Anti-receptor Activator of Nuclear Factor- $\kappa$ B Ligand-neutralizing Antibody. *Journal of Biological Chemistry*, 286(42), 37023-37031.

Garrido-Gómez, J., Arrabal-Polo, M. A., Girón-Prieto, M. S., Cabello-Salas, J., Torres-Barroso, J. & Parra-Ruiz, J. (2013) Descriptive analysis of the economic costs of periprosthetic joint infection of the knee for the public health system of Andalusia. *J Arthroplasty*, 28(7), 1057-60.

H, Mirel. (1989) Metastatic disease in long bones. A proposed scoring system for diagnosing impending

pathologic fractures. . *Clin Orthop Relat Res* .

Hawkshead, J. J., Patel, N. B., Steele, R. W. & Heinrich, S. D. (2009) Comparative Severity of Pediatric Osteomyelitis Attributable to Methicillin-Resistant Versus Methicillin-Sensitive *Staphylococcus aureus*. *Journal of Pediatric Orthopaedics*, 29(1), 85-90.

Hodsman, A. B., Bauer, D. C., Dempster, D. W., Dian, L., Hanley, D. A., Harris, S. T., Kendler, D. L., McClung, M. R., Miller, P. D., Olszynski, W. P., Orwoll, E. & Yuen, C. K. (2005) Parathyroid hormone and teriparatide for the treatment of osteoporosis: a review of the evidence and suggested guidelines for its use. *Endocr Rev*, 26(5), 688-703.

Ishimi, Y., Miyaura, C., Jin, C. H., Akatsu, T., Abe, E., Nakamura, Y., Yamaguchi, A., Yoshiki, S., Matsuda, T. & Hirano, T. (1990) IL-6 is produced by osteoblasts and induces bone resorption. *The Journal of Immunology*, 145(10), 3297.

Jorge, L. S., Chueire, A. G. & Baptista Rossit, A. R. (2010) Osteomyelitis: a current challenge. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*, 14(3), 310-315.

Klosterhalfen, B., Peters, K. M., Tons, C., Hauptmann, S., Klein, C. L. & Kirkpatrick, C. J. (1996) Local and systemic inflammatory mediator release in patients with acute and chronic posttraumatic osteomyelitis. *J Trauma*, 40(3), 372-8.

Kobayashi, K., Takahashi, N., Jimi, E., Udagawa, N., Takami, M., Kotake, S., Nakagawa, N., Kinosaki, M., Yamaguchi, K., Shima, N., Yasuda, H., Morinaga, T., Higashio, K., Martin, T. J. & Suda, T. (2000) Tumor Necrosis Factor  $\alpha$  Stimulates Osteoclast Differentiation by a Mechanism Independent of the Odf/Rankl–Rank Interaction. *Journal of Experimental Medicine*, 191(2), 275-286.

Kokabu T, Takahata M, Ishiguro N, Iwasaki N. Long-term prognosis of hematogenous vertebral osteomyelitis: Mortality, quality of life, and pain. *J Orthop Sci*. 2017 Sep;22(5):822-827.

Kudo, O., Sabokbar, A., Pocock, A., Itonaga, I., Fujikawa, Y. & Athanasou, N. A. (2003) Interleukin-6 and interleukin-11 support human osteoclast formation by a RANKL-independent mechanism. *Bone*, 32(1), 1-7.

Lacey, D. C., Simmons, P. J., Graves, S. E. & Hamilton, J. A. (2009) Proinflammatory cytokines inhibit

osteogenic differentiation from stem cells: implications for bone repair during inflammation.

*Osteoarthritis and Cartilage*, 17(6), 735-742.

Lau, Y. S., Wang, W., Sabokbar, A., Simpson, H., Nair, S., Henderson, B., Berendt, A. & Athanasou, N. A. (2006) Staphylococcus aureus capsular material promotes osteoclast formation. *Injury*, 37(2), S41-S48.

Lew, D. P. & Waldvogel, F. A. (1997) Osteomyelitis. *New England Journal of Medicine*, 336(14), 999-1007.

Li, D., Gromov, K., Proulx, S. T., Xie, C., Li, J., Crane, D. P., Søballe, K., O'Keefe, R. J., Awad, H. A., Xing, L. & Schwarz, E. M. (2010) Effects of antiresorptive agents on osteomyelitis : Novel insights on osteonecrosis of the jaw (ONJ) pathogenesis. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1192(1), 84-94.

Mackowiak, P. A., Jones, S. R. & Smith, J. W. (1978) Diagnostic Value of Sinus-tract Cultures in Chronic Osteomyelitis. *Jama*, 239(26), 2772.

Marriott, I. (2013) Apoptosis-associated uncoupling of bone formation and resorption in osteomyelitis. *Front Cell Infect Microbiol*, 3, 101.

Morita, M., Iwasaki, R., Sato, Y., Kobayashi, T., Watanabe, R., Oike, T., Nakamura, S., Keneko, Y., Miyamoto, K., Ishihara, K., Iwakura, Y., Ishii, K., Matsumoto, M., Nakamura, M., Kawana, H., Nakagawa, T. & Miyamoto, T. (2017) Elevation of pro-inflammatory cytokine levels following anti-resorptive drug treatment is required for osteonecrosis development in infectious osteomyelitis. *Scientific Reports*, 7(1), 46322.

O'Brien, W., Fissel, B. M., Maeda, Y., Yan, J., Ge, X., Gravallese, E. M., Aliprantis, A. O. & Charles, J. F. (2016) RANK-Independent Osteoclast Formation and Bone Erosion in Inflammatory Arthritis. *Arthritis & Rheumatology*, 68(12), 2889-2900.

Perry, C. R. (1999) Bone Repair Techniques, Bone Graft, and Bone Graft Substitutes. *Clinical Orthopaedics and Related Research*®, 360.

Pfeilschifter, J., Chenu, C., Bird, A., Mundy, G. R. & Roodman, D. G. (1989) Interleukin-1 and tumor necrosis factor stimulate the formation of human osteoclastlike cells in vitro. *Journal of Bone and Mineral Research*, 4(1), 113-118.

Reichert, J. C., Saifzadeh, S., Wullschleger, M. E., Epari, D. R., Schütz, M. A., Duda, G. N., Schell, H., van Griensven, M., Redl, H. & Hutmacher, D. W. (2009) The challenge of establishing preclinical models for segmental bone defect research. *Biomaterials*, 30(12), 2149-63.

Roelofs, A. J., Thompson, K., Gordon, S. & Rogers, M. J. (2006) Molecular Mechanisms of Action of Bisphosphonates: Current Status. *Clinical Cancer Research*, 12(20), 6222s.

Sims, N. A., Green, J. R., Glatt, M., Schlicht, S., Martin, T. J., Gillespie, M. T. & Romas, E. (2004) Targeting osteoclasts with zoledronic acid prevents bone destruction in collagen-induced arthritis. *Arthritis Rheum*, 50(7), 2338-46.

Takahata, M., Awad, H. A., O'Keefe, R. J., Bukata, S. V. & Schwarz, E. M. (2012) Endogenous tissue engineering: PTH therapy for skeletal repair. *Cell Tissue Res*, 347(3), 545-52.

Terashima, A., Okamoto, K., Nakashima, T., Akira, S., Ikuta, K. & Takayanagi, H. (2016) Sepsis-Induced Osteoblast Ablation Causes Immunodeficiency. *Immunity*, 44(6), 1434-1443.

Tice, A. D., Hoaglund, P. A. & Shoultz, D. A. (2003) Outcomes of osteomyelitis among patients treated with outpatient parenteral antimicrobial therapy. *The American Journal of Medicine*, 114(9), 723-728.

Wiessman, M. P., Liberty, I. F., Segev, R. W., Katz, T., Abu Tailakh, M. & Novack, V. (2015) Clinical characteristics and survival of patients with diabetes mellitus following non-traumatic lower extremity amputation. *Isr Med Assoc J*, 17(3), 145-9.

Yeo, A. & Ramachandran, M. (2014) Acute haematogenous osteomyelitis in children. *BMJ*, 348(jan20 3), g666-g666.

Yoshii, T., Magara, S., Miyai, D., Nishimura, H., Kuroki, E., Furudoi, S., Komori, T. & Ohbayashi, C. (2002) Local levels of interleukin-1 $\beta$ , -4, -6, and tumor necrosis factor  $\alpha$  in an experimental model of murine osteomyelitis due to *Staphylococcus aureus*. *Cytokine*, 19(2), 59-65.