

原著論文

ゾレドロン酸とクロドロネートリポソームの  
併用投与がマウス抜歯窩に与える影響

福岡歯科大学咬合修復学講座冠橋義歯学分野

平野 雅裕

The effects of zoledronic acid and clodronate liposome  
on the healing of tooth extraction sockets in mice

Masahiro HIRANO

Section of Fixed Prosthodontics, Department of Oral Rehabilitation, Fukuoka Dental College

**Key words :** macrophage, osteoclast, wound healing, osteonecrosis

**Abstract :** Osteonecrosis of the jaw (ONJ) is a serious adverse event that occurs predominantly in patients undergoing both antiresorptive and antineoplastic therapies. However, the relationship between the combination of these therapies and the high frequency of ONJ in this particular population of patients remains unclear. The present study aimed to determine the effects of suppression of macrophage and bone resorption on the healing of tooth extraction sockets in mice. The mice were administered with zoledronic acid (ZA) and/or clodronate liposome (CL). The maxillary first molars were extracted three weeks after the initiation of treatment, and wound healing was assessed four weeks post-extraction using microcomputed tomography, flow cytometry, immunohistochemistry, and hematoxylin-eosin staining. ONJ-like lesions were not observed in mice receiving ZA monotherapy, CL monotherapy. However, insufficient healing of the extraction socket and onset of ONJ stage 0 were observed in mice receiving the combination treatment of ZA and CL. Flow cytometry and immunohistochemistry analyses revealed that the ratio of F4/80<sup>+</sup> macrophages was significantly suppressed in mice that were treated with ZA and/or CL. Additionally, ZA monotherapy and the combination treatment of ZA and CL significantly suppressed osteoclastic bone resorption in mice. Interestingly, bone volume was significantly reduced but osteonecrotic area was significantly increased in the extraction sockets of mice receiving the combination treatment of ZA and CL. Therefore, we found that the suppression of macrophages and osteoclastic bone resorption are strongly associated with the healing of extraction sockets in mice.

---

連絡先：平野雅裕，福岡歯科大学咬合修復学講座冠橋義歯学分野，〒814-0193 福岡県福岡市早良区田村2-15-1

Contact information: Masahiro Hirano, Section of Fixed Prosthodontics, Department of Oral Rehabilitation, Fukuoka Dental College, 2-15-1 Tamura, Sawara-ku, Fukuoka, 814-0193, JAPAN

## I. 緒 言

顎骨壊死 (ONJ) は、骨吸収抑制剤を服用している患者が発症する顎骨に特異的な疾患で、発症頻度は少ないが、発症すると壊滅的な病態を示す歯科界の重大な疾患の一つである。ONJ は2003年に初めて症例報告された<sup>1)</sup>が、20年近く経過した現在でもその病因は依然不明なままであり、確立された治療法はない<sup>2-4)</sup>。代表的な骨吸収抑制剤であるビスフォスフォネート製剤 (BP 製剤) の使用方法の中で、悪性腫瘍による高カルシウム血症や骨転移性腫瘍の抑制に用いられる静注投与が、骨粗鬆症における骨折の予防のための経口投与より ONJ の発症率が高く<sup>5)</sup>、特に骨吸収抑制の強いゾレドロン酸 (ZA) で ONJ 発症率が高い。また、2010年以降、破骨細胞のリガンドに対する抗体である、抗 NF- $\kappa$ B 活性化受容体リガンド (抗 RANKL) ヒト IgG<sub>2</sub>モノクローナル抗体、デノスマブによる ONJ も発症している<sup>6)</sup>こともあわせて、まず、骨吸収抑制作用自体が ONJ の発症に関連している可能性が高いと推測されている<sup>7)</sup>。

ONJ の患者では、複数の化学療法やステロイド療法の病歴があることが多い<sup>8,9)</sup>。それらの薬剤が、感染、浮腫および創傷治癒の遅延を助長していると推測され、また免疫抑制作用を持つことを考慮すると、免疫抑制が ONJ の発症を増強させている可能性がある<sup>10-13)</sup>。近年、創傷治癒に関与する炎症細胞の中で単球・マクロファージ系細胞が、創傷治癒の過程において重要な役割を果たしていることが示唆されてきた<sup>14,15)</sup>。実際、マクロファージの数が減少すると、創傷治癒にも重大な影響を及ぼす<sup>16)</sup>。Pazianas らの総説によると、マクロファージの抑制が口腔内の感染防御機能を低下させ、骨壊死を引き起こす可能性があるとしている<sup>17)</sup>。しかしながら、最近の研究において、マクロファージを減少させるクロドロネートリポソーム (CL) の投与を行ったマウスの抜歯窩の治癒は、未投与のマウスの抜歯窩の治癒と違くないことが報告されている<sup>18)</sup>。

そこで、ZA と CL を併用投与することにより、マクロファージの減少が ONJ 発症を増強させると発想した。本研究では、骨吸収抑制とマクロファージの減少が抜歯窩の治癒に与える影響についてマウスを使用して検討した。

## II. 材料と方法

本研究は福岡歯科大学動物実験倫理審査の承認を受け研究を行った (#17010)。

### マウス創傷治癒モデル

実験には体重20g前後の7週齢の C57Bl/6マウス、雌28匹 (各群 = 7匹) を使用した。マウスは暗明サイクル12時間、室温 $23 \pm 1^\circ\text{C}$ に制御された動物飼育室で飼育し、標準的な実験用固形餌と水を自由に摂取可能な状態とした。マクロファージの抑制に Clodronate Liposome (CL, LIPOSOMA, アルムテルダム, オランダ) を用い<sup>19)</sup>、CL のコントロールとしては Saline Liposome (SA, LIPOSOMA) を用いた。破骨細胞の抑制には Zoledronic Acid (Zometa, Dr. Reddy's Laboratories, ハイデラバード, インド) を使用した。CL のみ投与したマウスを CL 群とし、CL と ZA を併用投与したマウスを CLZA 群、SA および ZA を投与したマウスを SAZA 群とした。Control には、生理食塩水 (Saline) のみを投与したマウスを用意し、Ctrl 群とした。CL および SA は1回目に  $6 \mu\text{g/g}$  を、2回目以降は  $4 \mu\text{g/g}$  を腹腔内注射し、全期間を通して3日毎に投与を行った。ZA は  $30 \mu\text{g/kg}$  を1週間に2度、皮下注射にて投与した。Ctrl 群は Saline のみを3日毎に腹腔内注射した。各群、3週間投与を行った後、上顎第一大臼歯の抜歯を先端を鋭利にした歯科用エクスプローラーを用いて行った。抜歯後も継続投与を続け、抜歯4週後に屠殺した (図1)。

### マイクロ CT 撮影および解析

抜歯後1, 2, 3, 4週毎の抜歯窩を含んだ上顎骨および抜歯4週後の脛骨をマイクロ CT (Skyscan-1176, BUKER, ボストン, マサチューセッツ州, アメリカ合衆国) で撮影した。まず、マウスに対して、イソフルランでの吸入麻酔を行った。専用のボックスにイソフルランを充填させ、マウスの体動が消失するまで導入した。その後はマウスの鼻にチューブを装着し、イソフルランを継続投与した。マイクロ CT の X 線源は、 $50\text{kVp}$  および  $500\text{mA}$  に設定した。抜歯後1週から3週は  $18 \mu\text{m}/\text{pixel}$ 、走査角  $0.5^\circ$  の間隔で X 線撮影した。抜歯後4週は  $9 \mu\text{m}/\text{pixel}$ 、走査角  $0.3^\circ$  の間隔で X 線撮影した。抜歯窩と脛骨の対象領域の設定は、脛骨では成長板から  $90 \mu\text{m}$  遠位から遠心方向に  $300 \mu\text{m}$  の範囲の海綿骨とし、抜歯窩では、抜歯窩を目視によって手動で輪郭を形成し、そのエリアを抽出した。撮影像は、CT 解析ソフト

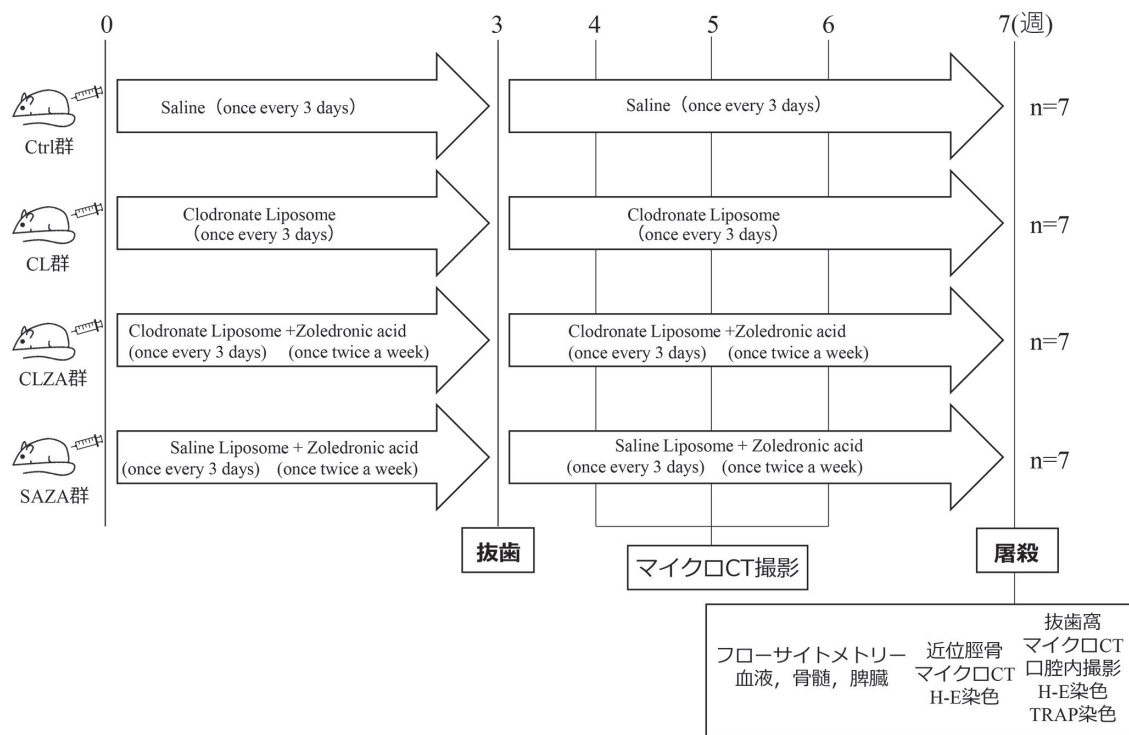


図1 実験計画

各種薬剤は7週間投与を行った。薬物投与3週間後に上顎第一大臼歯の抜歯を行った。全てのマウスを7週間後に屠殺した。Ctrl群：Saline投与群，CL群：Clodronate Liposome投与群，CLZA群：Clodronate LiposomeとZoledronic acid投与群，SAZA群：Saline LiposomeとZoledronic acid投与群。

(CTAn, BUKER) および Date Viewer を用いて、対象領域の骨量 (BV/TV: Bone volume/Tissue volume) を計測した。

#### フローサイトメトリー

抜歯4週後にインフルラン吸入麻酔下で屠殺し、血液、骨髄および脾臓から試料を採取した。血液は心臓穿刺により採取し、脾臓は摘出後メッシュカップを用いて単細胞に分離して取り出し、骨髄は大腿骨から採取した。各試料は調整した赤血球溶解バッファー (155mM NH<sub>4</sub>Cl, 10mM KHCO<sub>3</sub>, 0.1mM EDTA, pH 7.2) で処理して、赤血球を溶解した。それぞれの試料をPBSで2度洗浄し、1 × 10<sup>6</sup>個/100 μl に細胞数を調整した。今回は、F4/80陽性 (+) および Gr-1陰性 (-) である細胞をマクロファージと定義した。F4/80<sup>+</sup>Gr-1<sup>-</sup>マクロファージの判定染色には、PE 結合抗マウス F4/80モノクローナル抗体 (13733, clone T45-2342, eBiosciences, ウォルサム, マサチューセッツ州, アメリカ合衆国) と FITC 結合抗マウス GR-1 (Ly-6G/Ly-6C) モノクローナル抗

体 (14-5931-82, clone RB6-8C5, Invitrogen, カールスバッド, カルフォルニア州, アメリカ合衆国) を用いた。それぞれの試料は、フローサイトメーター (FACS Calibur フローサイトメーター, BD Biosciences, フランクリンレイクス, ニュージャージー州, アメリカ合衆国) で10,000個の細胞を取り出し、ソフトウェア (CELLQuest, BD Biosciences) を用いて分析を行った。

#### 組織学的解析

屠殺後のマウスから脛骨、上顎骨および脾臓を摘出し、4%ホルムアルデヒドで固定した。脛骨および上顎骨では、ヘマトキシリンエオジン (H-E: hematoxylin eosin) 染色および酒石酸耐性酸性ホスファターゼ (TRAP: tartrate-resistant acid phosphatase) 染色を施した。まず、14%エチレンジアミン四酢酸 (EDTA) で脱灰処置を3週間行い、その後パラフィン包埋し、4 μm の厚さの切片を作製した。切片をキシレンで脱パラフィンし、100%から70%エタノールおよび精製水で再水和した。H-E 染色では、Mayer のヘマトキシリン (富

士フィルム和光純薬株式会社, 大阪) およびエオジン (富士フィルム和光純薬株式会社) を用いて染色した。TRAP 染色では, 50mM 酒石酸ナトリウム二水和物 (Sigma-Aldrich, セントルイス, ミズーリ州, アメリカ合衆国), 100mM 酢酸ナトリウム (Sigma-Aldrich), 0.05% ナフトール ASMX リン酸ナトリウム (Sigma-Aldrich), 0.05% Fast Red Violet (Sigma-Aldrich) を用いて行い, Mayer のヘマトキシリン (富士フィルム和光純薬株式会社) で対比染色も施した。脾臓ではマクロファージの F4/80 に対する免疫染色を行った。固定した脾臓をパラフィン包埋し, 4  $\mu\text{m}$  の厚さの切片を作製した。切片をキシレンで脱パラフィンし, 100% から 70% エタノールおよび精製水で再水和後, ラット抗マウス F4/80 抗体 (ab6640, Abcam, ケンブリッジ, イギリス) で抗原抗体反応を行い, 洗浄後, 西洋ワサビペルオキシターゼ酵素標識二次抗体 (ab9705, Abcam) を反応させ, 3,3'-ジアミノベンジジン (Vector Laboratories, バーリンゲム, カナダ) で発色させ, Mayer のヘマトキシリン (富士フィルム和光純薬株式会社) で対比染色を行った。

染色した切片は光学顕微鏡 (ECLIPSE LV150N, Nikon, 東京) で観察した。写真撮影した後, 解析ソフト (Image-Pro Premier, Media Cybernetics, ロックビル, メリーランド州, アメリカ合衆国) で組織形態計測学的に分析した。抜歯窩および脛骨の海綿骨の骨面積 (BA/TA: Bone area/Tissue area), 抜歯窩の破骨細胞数

(細胞数/ $\text{mm}^2$ ), 骨壊死領域および脾臓の F4/80<sup>+</sup>マクロファージの割合 (F4/80<sup>+</sup>マクロファージ/全細胞 (%)) を定量した。脛骨の対象領域は成長板から 90  $\mu\text{m}$  遠位から遠心方向に 300  $\mu\text{m}$  の範囲の海綿骨領域とし, 抜歯窩の対象領域の設定は, 抜歯窩を目視によって手動で輪郭を形成し, そのエリアを抽出した。破骨細胞数は 2 核以上の細胞を定量した。骨壊死領域の割合は, 近心根と遠心根の間で, 骨頂から 500  $\mu\text{m}$  までの歯槽骨の中で, 骨小腔内に骨細胞が欠如している骨の面積を割合とした。

### 統計処理

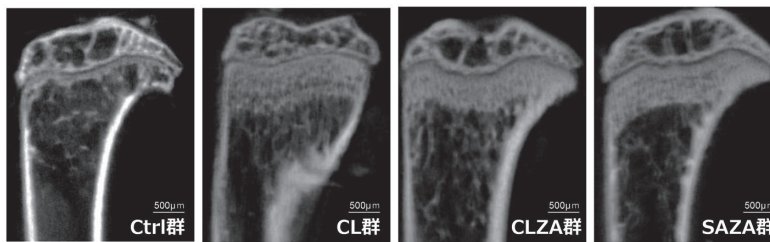
統計分析は, GraphPad Prism version 8.3.1 (GraphPad Software, Inc., ラ・ホーヤ, カルフォルニア州, アメリカ合衆国) を使用し ANOVA および Student's t-test にて行った。有意水準は  $p < 0.05$  とした。

## Ⅲ. 結 果

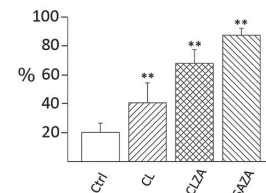
### 1. 近位脛骨の組織形態計測評価

図 2 に薬剤投与 7 週後のマウス近位脛骨のマイクロ CT 画像および H-E 染色像を示した。マイクロ CT 解析から骨量 (BV/TV) は Ctrl 群と比較し, CL, CLZA, SAZA 群で有意に高かった ( $p < 0.01$ )。H-E 染色から骨面積 (BA/TA) も, Ctrl 群と比較し, CL, CLZA, SAZA 群で有意に高かった ( $p < 0.01$ )。

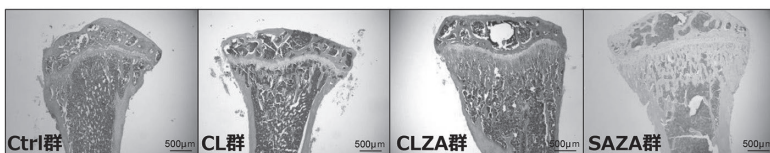
(a) 近位脛骨のマイクロCT画像



(b) マイクロCTの骨量の評価(BV/TV)



(c) 近位脛骨のH-E染色像



(d) H-E染色像の骨面積の評価(BA/TA)

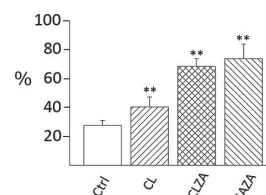


図2 近位脛骨のマイクロCT解析およびH-E染色像

(a) 近位脛骨のマイクロCT画像, (b) マイクロCTの骨量の評価 (BV/TV), (c) 近位脛骨のH-E染色像, (d) H-E染色像の骨面積の評価 (BA/TA)

マイクロCT解析での骨量は Ctrl 群と比較し, CL, CLZA, SAZA 群で有意に高かった。H-E 染色から骨面積は, Ctrl 群と比較し, CL, CLZA, SAZA 群で有意に高かった。\*\* $p < 0.01$ 。(n=7)

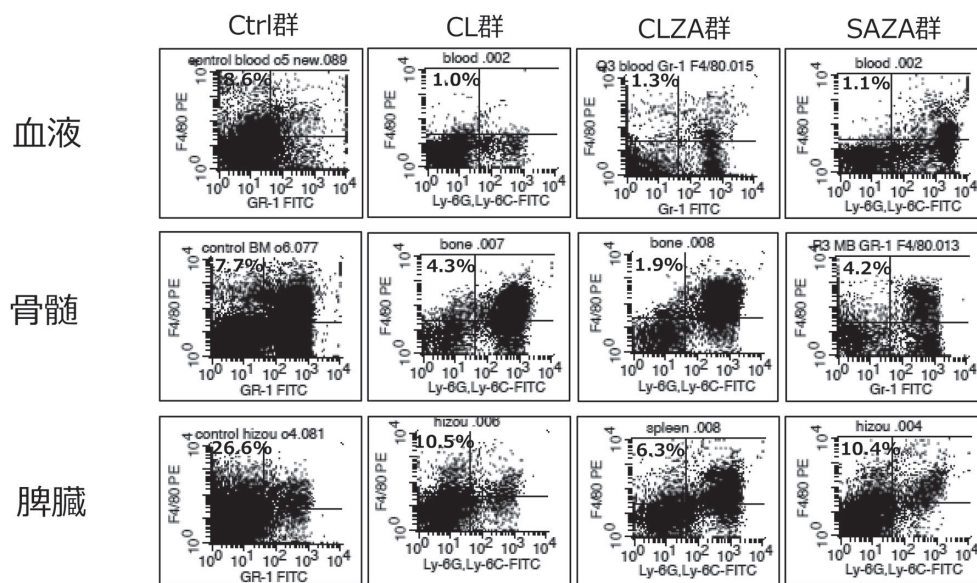
## 2. 血中、骨髄および脾臓におけるマクロファージの抑制

図3に血中、骨髄および脾臓のフローサイトメトリーの結果を示した。F4/80<sup>+</sup>Gr1<sup>-</sup>マクロファージは、血液でCtrl群と比較してCL群、CLZA群、SAZA群で有意に少なかった ( $p < 0.01$ )。骨髄でも、Ctrl群と比較してCL群、CLZA群、SAZA群で有意に少なかった ( $p < 0.05$ ,  $p < 0.01$ ,  $p < 0.05$ )。脾臓でも、Ctrl群と比較してCL群、CLZA群、SAZA群で有意に少なかった ( $p < 0.01$ )。図4に脾臓でのF4/80<sup>+</sup>マクロファージの免疫染色像を示した。免疫染色においても脾臓で、F4/80<sup>+</sup>マクロファージはCtrl群と比較し、CL群、CLZA群、SAZA群で有意に少なかった ( $p < 0.01$ )。

## 3. 抜歯窩の創傷治癒

図5に抜歯窩の1週間ごとのマイクロCT画像と抜歯4週後のマウス口腔内写真を示した。抜歯窩のBV/TVでは、1週目は各群に差は認めなかった。2週目は、Ctrl群 (72.5%) と比較し、CL群 (50.1%), CLZA群 (37.0%) で有意に少なかった。3週目は、Ctrl群 (83.3%) と比較し、CL群 (66.8%), CLZA群 (57.9%) で有意に少なかった。抜歯4週目では、CL群 (93.7%), SAZA群 (96.4%) ではCtrl群 (96.2%) と骨量に有意差は認めなかった ( $p > 0.05$ )。CLZA群 (79.1%) ではCtrl群 (96.2%) と比較し有意に少なかった ( $p < 0.05$ )。口腔内写真では、抜歯創に大きな違いは観察されなかった。

(a) マクロファージの代表的な分布



(b) マクロファージの割合

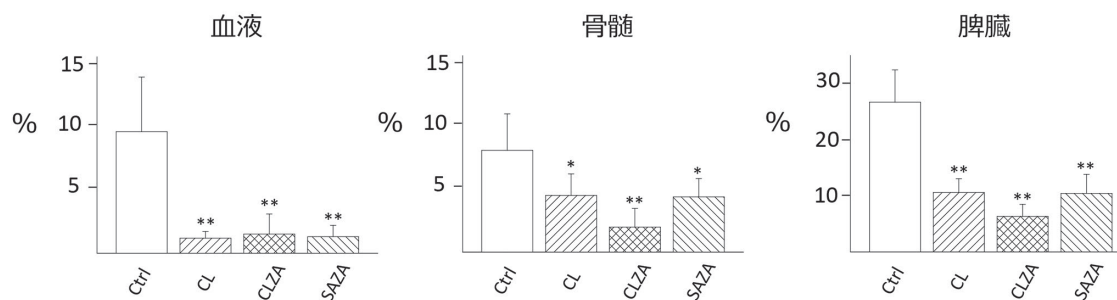


図3 フローサイトメトリーによる血液、骨髄、脾臓でのF4/80<sup>+</sup>Gr1<sup>-</sup>マクロファージの割合

(a) マクロファージの代表的な分布, (b) マクロファージの割合

F4/80<sup>+</sup>Gr1<sup>-</sup>マクロファージは、血液、骨髄および脾臓で、Ctrl群と比較してCL群、CLZA群、SAZA群で有意に少なかった。

\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ . (n=7)

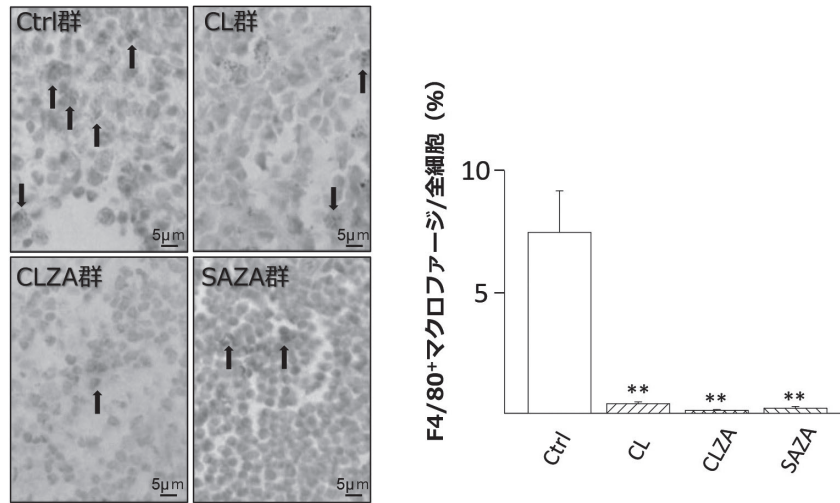


図4 脾臓の免疫染色による F4/80<sup>+</sup>マクロファージの割合  
脾臓での F4/80<sup>+</sup>マクロファージの免疫染色像を示した (矢印)。F4/80<sup>+</sup>マクロファージは Ctrl 群と比較し, CL 群, CLZA 群, SAZA 群で有意に少なかった。\*\* $p < 0.01$ 。(n=7)

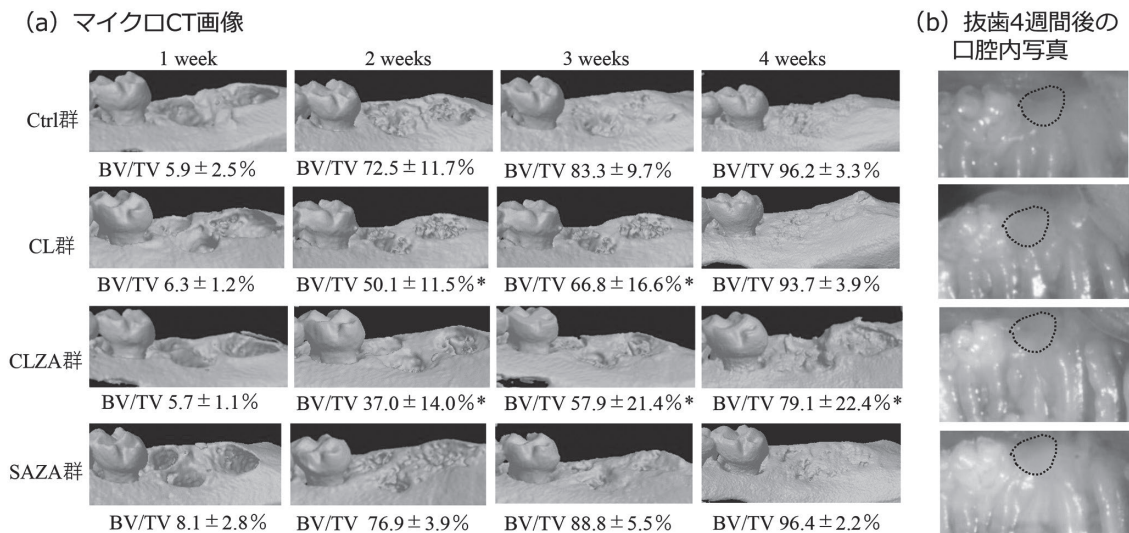


図5 抜歯窩のマイクロ CT 画像と口腔内写真  
(a) 1, 2, 3, 4 週毎のマイクロ CT 画像, (b) 抜歯 4 週間後のマウスの口腔内写真  
抜歯窩の BV/TV では, 1 週目は各群に差は認めなかった。2, 3 週目は, Ctrl 群と比較し, CL 群, CLZA 群で有意に減少していた。4 週目は, Ctrl 群と比較し, CLZA 群で有意に減少していた。\* $p < 0.05$ 。(n=7)

#### 4. 抜歯窩の TRAP 染色

図 6 に抜歯 4 週後の TRAP 染色像と破骨細胞数を示した。破骨細胞数は, Ctrl と比較して, CLZA 群と SAZA 群で有意に少なかった ( $p < 0.05$ )。ZA を投与したマウス抜歯窩で, 破骨細胞数の減少が観察された。

#### 5. 抜歯創の組織形態計測評価

図 7 に抜歯 4 週後の H-E 染色像を示した。H-E 染色像から骨面積と骨壊死領域を定量した (図 7-c, d)。BA/TA では, Ctrl 群と比較して, CLZA 群が有意に少なかった ( $p < 0.05$ )。骨壊死領域は, Ctrl 群では観察されなかった。CL 群ではわずかに壊死領域を認めたが Ctrl 群と比較して有意差を認めなかった ( $p > 0.05$ )。

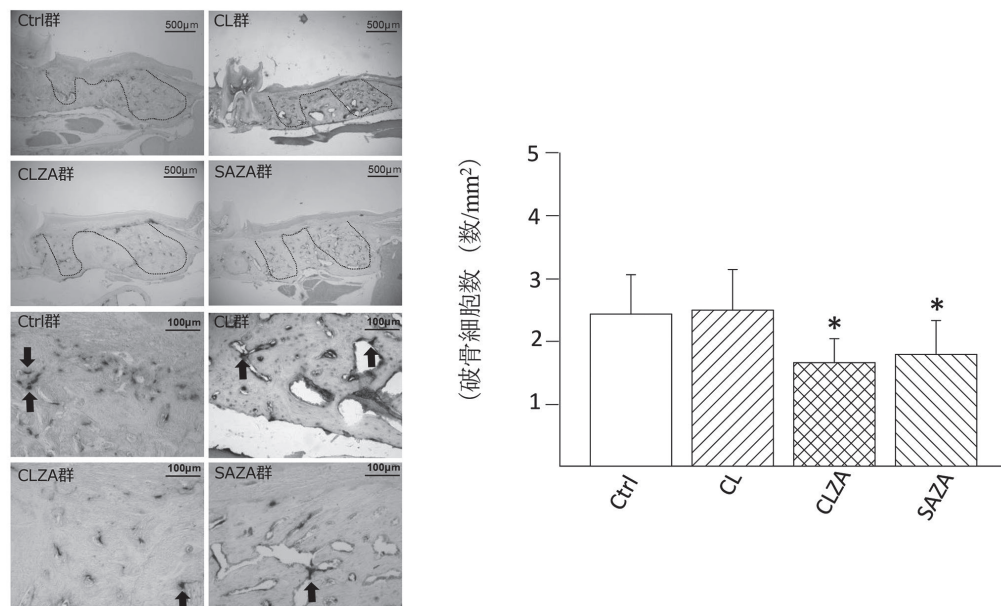
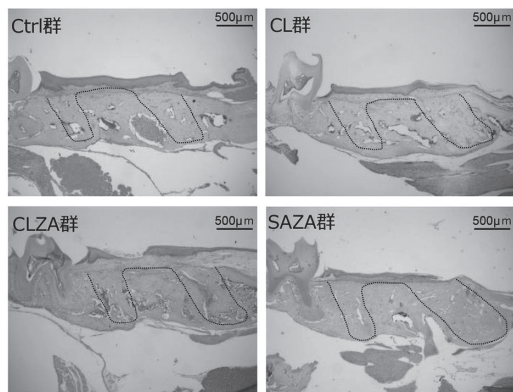


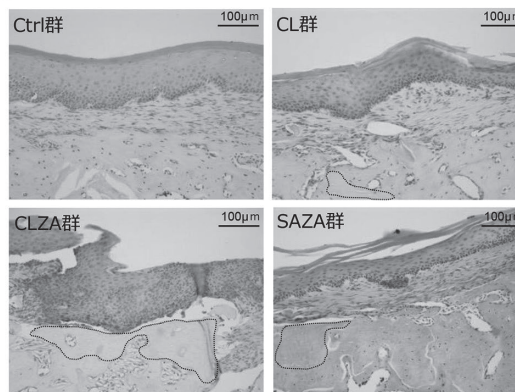
図6 抜歯後4週のTRAP染色像と破骨細胞数

抜歯窩のTRAP染色像を示した。上段はTRAP染色像の弱拡大，下段はTRAP染色像の強拡大を示す。2核以上の破骨細胞を矢印で示す。TRAP染色像内の点線で囲まれた範囲の破骨細胞数(細胞数/mm<sup>2</sup>)の定量を行った。破骨細胞数は、Ctrlと比較して、CLZA群とSAZA群で有意に少なかった。\*p<0.05。(n=7)

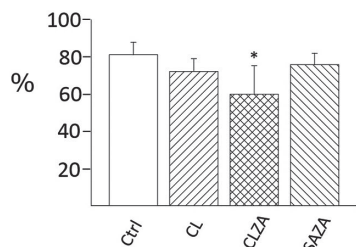
(a) 抜歯4週間後の抜歯窩のHE染色



(b) 抜歯4週間後の抜歯窩のHE染色(骨壊死領域)



(c) H-E染色像の骨面積の評価(BA/TA)



(d) H-E染色像の骨壊死領域

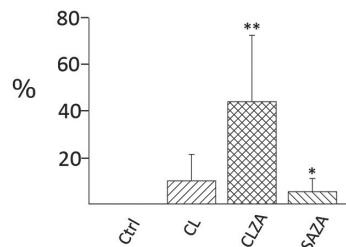


図7 抜歯創の組織形態計測評価

(a) 抜歯4週間後の抜歯窩のHE染色：点線で囲んだ領域に抜歯創を示した。

(b) 抜歯4週間後の抜歯窩のHE染色：点線で囲んだ領域に骨壊死領域を示した。

BA/TAでは、Ctrl群と比較して、CLZA群が有意に少なかった。骨壊死領域は、Ctrl群と比較して、CLZA群が有意に多かった。\*p<0.05, \*\*p<0.01。(n=7)

SAZA 群ではわずかに骨壊死領域を認めた ( $p < 0.05$ )。CLZA 群では、Ctrl 群と比較して、有意に多い骨壊死領域を認めた ( $p < 0.01$ )。

#### IV. 考 察

本研究で、ZA 投与では抜歯後の骨治癒が阻害されなかった実験系で、ZA に加えて、CL を投与すると、抜歯後 4 週で骨露出を認められないものの、骨形成が減少し、骨壊死領域が増加する、いわゆる、ステージ 0 の ONJ に相当する病態<sup>2)</sup>が起きることが示された。CL は非常に半減期が短いために、寿命が短い貪食細胞であるマクロファージに特異的に作用する<sup>20)</sup>。CL は、細胞が高度に密集したり、コラーゲン線維が密集したりする組織では十分に浸透しない可能性が考えられるが、それ以外の組織では十分に浸透すると認識されている。従って、本研究では血液、骨髄および脾臓のマクロファージは減少しており、CL はそれらの組織に十分に浸透している状態であったといえる。

CL 群でも抜歯後 2 週と 3 週に有意な骨形成の減少が認められたことは、マクロファージが骨形成に関わっている可能性を示唆する。In vitro の実験系においては、間葉系幹細胞の分化はマクロファージの共培養によって制御される<sup>21)</sup>ことがわかっている。マクロファージは、炎症期においては M1 ステージのマクロファージが細菌や死んだ細胞などの貪食だけでなく、炎症性サイトカインを分泌することにより、炎症反応を制御する。時間の経過とともに、M2 マクロファージが、異なるサイトカインや成長因子を分泌し、古いマトリックスの分解を止め、血管形成を促し、新しい細胞外マトリックスの形成へと移行させる<sup>22)</sup>。このようにして、マクロファージはその極性の変化によって骨治癒における多機能的な役割を果たしている。すなわち、炎症期に働く M1 マクロファージと創傷治癒期に働く M2 マクロファージが、骨形成に異なる働きをすると推測されている<sup>21)</sup>ことから、CL 単独投与による骨形成の部分的抑制も理にかなった結果と考えられる。実際、CL 単独投与によって、抜歯窩の骨形成が増加するという報告がある<sup>18)</sup>。

ZA 投与ではまったく骨形成が抑制されなかった。これは実験条件にもよると思われるが、ZA がマウスに ONJ を引き起こす確率は 30% であったと報告されている<sup>23)</sup>ように、そもそも ZA はマウスに完全な ONJ を誘導させにくいことが分かっている。CL 単独投与と CL と ZA 併用投与では認められた骨形成の抑制を全く示さ

なかった ZA 単独投与は、CL 単独投与、CL と ZA 併用投与と同様に、血液、骨髄、脾臓中のマクロファージを減少させ、CL と ZA 併用投与と同様に抜歯窩周囲の破骨細胞数を減少させたが、CL と ZA 併用投与で呈した骨壊死をほとんど認めなかった。ZA によってマクロファージが減少した理由は不明だが、ZA はマクロファージの極性に影響し、M1 マクロファージを増加させて炎症の方向に誘導し<sup>24)</sup>、同時に M2 マクロファージを減少させることが ONJ 発症と関連する<sup>25)</sup>と報告されているから、マクロファージに何らかの影響して、その数を減少させたものと考えられる。

ZA 投与では抜歯窩周囲の破骨細胞が減少しているにも関わらず ONJ 様所見を示さず、CL と ZA 併用投与では破骨細胞の減少と ONJ 様所見が認められたことは、ONJ 発症が破骨細胞の機能低下や数の減少だけで起こらない可能性を示唆している。Williams らの報告によれば、ZA 投与によって ONJ を起こす場合は骨の露出と共に、骨壊死と骨形成の抑制を示すが、ZA 投与によっても ONJ を起こさない場合はそれらの所見は全く認められなかった<sup>22)</sup>としている。本研究では、ZA 投与で全く ONJ 様症状を呈さなかったものが、マクロファージを減少させることで、ステージ 0 の弱い ONJ 様症状を現したことは、ONJ の発症に少なくとも免疫システムの乱れなどが寄与しており、マウスですら個体差が出るほど、免疫と骨代謝に関与するシステムが関与していることを暗示しているのかもしれない。今回の CL と同じように、がん治療のための化学療法剤でも ZA との併用投与でマウスの ONJ 症状が増悪する<sup>4)</sup>ことがわかっている。現在、推測されている ZA による ONJ 発症のメカニズムの筆頭は、破骨細胞のアポトーシス<sup>26)</sup>による骨吸収の抑制の結果起きる創傷治癒の遅れである。しかし、これだけでは説明がつかず、制御性 T 細胞の抑制と Th17 細胞の活性化<sup>27)</sup>、M1 マクロファージと M2 マクロファージの割合の変化<sup>24, 25)</sup>、リンパ管形成の阻害<sup>11)</sup>、TRAP 陽性単球の蓄積<sup>28, 29)</sup>など、免疫との密接な関連が推測されている<sup>30)</sup>。本研究結果は、ZA の破骨細胞の抑制のみならず、マクロファージの抑制が加味されると、より ONJ が発症し得ることを示すものである。

#### VI. 結 論

マウスにおいて CL 投与によるマクロファージの抑制、ZA 投与による破骨細胞の抑制が認められた。CL、ZA 単体での投与によるマウス抜歯窩 4 週目に骨量の低下は



認められなかった。一方で、CLとZA両者の投与により、抜歯窩の骨量の低下、骨壊死領域の増加が認められた。以上より、マクロファージの抑制は骨吸収抑制を増悪させ抜歯窩の治癒に影響を与えることが示された。

## 謝 辞

本研究に関して、多角的な助言、指導をいただきました山下潤朗先生、本学咬合修復学講座冠橋義歯学分野松浦尚志教授に感謝の意を評します。

## 参 考 文 献

- Marx RE: Pamidronate (Aredia) and zoledronate (Zometa) induced avascular necrosis of the jaws: a growing epidemic. *J Oral Maxillofac Surg* 2003 ; 61 : 1115-1117.
- 米田俊之, 萩野浩, 杉本利嗣, 太田博明, 高橋俊二, 宗圓聰他: 骨吸収抑制薬関連顎骨壊死の病態と管理: 顎骨壊死検討委員会ポジションペーパー2016. [https://www.jsoms.or.jp/medical/wp-content/uploads/2015/08/position\\_paper2016.pdf](https://www.jsoms.or.jp/medical/wp-content/uploads/2015/08/position_paper2016.pdf)
- Khosla S, Burr D, Cauley J, Dempster DW, Ebeling PR, Felsenberg D, et al: Bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaw: report of a task force of the American Society for Bone and Mineral Research. *J Bone Miner Res* 2007 ; 22 : 1479-1491.
- Hayano H, Kuroshima S, Sasaki M, Tamaki S, Inoue M, Ishisaki A, et al: Distinct immunopathology in the early stages between different antiresorptives-related osteonecrosis of the jaw-like lesions in mice. *Bone* 2020 : 115308.
- Aapro M, Abrahamsson PA, Body JJ, Coleman RE, Colomer R, Costa L, et al: Guidance on the use of bisphosphonates in solid tumours: recommendations of an international expert panel. *Ann Oncol* 2008 ; 19 : 420-432.
- Aghaloo TL, Felsenfeld AL, Tetradis S: Osteonecrosis of the jaw in a patient on Denosumab. *J Oral Maxillofacial Surg* 2010 ; 68 : 959-963.
- Boonyapakorn T, Schirmer I, Reichart PA, Sturm I, Massenkeil G: Bisphosphonate-induced osteonecrosis of the jaws: prospective study of 80 patients with multiple myeloma and other malignancies. *Oral Oncol* 2008 ; 44 : 857-869.
- Herlufson BB, Norman-Pedersen K, Redfors M, Fossa SD: Oral mucosal side effects of cytotoxic chemotherapy of testicular cancer. A retrospective study. *Eur J Oral Sci* 1997 ; 105 : 523-526.
- Vardy J, Chiew KS, Galica J, Pond GR, Tannock IF: Side effects associated with the use of dexamethasone for prophylaxis of delayed emesis after moderately emetogenic chemotherapy. *Br J Cancer* 2006 ; 94 : 1011-1015.
- Schwartz HC: Osteonecrosis of the jaws: a complication of cancer chemotherapy. *Head Neck Surg* 1982 ; 4 : 251-253.
- Kuroshima S, Yamashita J: Chemotherapeutic and antiresorptive combination therapy suppressed lymphangiogenesis and induced osteonecrosis of the jaw-like lesions in mice. *Bone* 2013 ; 56 : 101-109.
- Sung EC, Chan SM, Sakurai K, Chung E: Osteonecrosis of the maxilla as a complication to chemotherapy: a case report. *Spec Care Dentist* 2002 ; 22 : 142-146.
- Lenz JH, Steiner-Krammer B, Schmidt W, Fietkau R, Mueller PC, Gundlach KK: Does avascular necrosis of the jaws in cancer patients only occur following treatment with bisphosphonates? *J Craniomaxillofac Surg* 2005 ; 33 : 395-403.
- Okuno Y, Nakamura-Ishizu A, Kishi K, Suda T, Kubota Y: Bone marrow-derived cells serve as proangiogenic macrophages but not endothelial cells in wound healing. *Blood* 2011 ; 117 : 5264-5272.
- Minutti CM, Knipper JA, Allen JE, Zaiss DM: Tissue-specific contribution of macrophages to wound healing. *Seminars Cell Dev Biol* 2017 ; 61 : 3-11.
- Mirza R, DiPietro LA, Koh TJ: Selective and specific macrophage ablation is detrimental to wound healing in mice. *Am J Pathol* 2009 ; 175 : 2454-2462.
- Pazianas M: Osteonecrosis of the jaw and the role of macrophages. *J Natl Cancer Inst* 2011 ; 103 : 232-240.
- Michalski M.N, Zweifler L.E, Sinder B.P, Koh A.J, Yamashita J, Roca H, McCauley L.K: Clodronate-Loaded Liposome Treatment Has Site-Specific Skeletal Effects. *J Dent Res* 2019 ; 98 : 459-467.
- Kobayashi Y, Kiguchi N, Fukazawa Y, Saika F, Maeda T, Kishioka S: Macrophage-T cell interactions mediate neuropathic pain through the glucocorticoid-induced tumor necrosis factor ligand system. *J Biol Chem* 2015 ; 290 : 12603-12613.
- Van Rooijen, Annemarie Sanders N: Elimination, blocking, and activation of macrophages: three of a kind? *J Leukoc Biol* 1997 ; 62 : 702-709.
- Champagne CM, Takebe J, Offenbacher S, Cooper LF: Macrophage cell lines produce osteoinductive signals that include bone morphogenetic protein-2. *Bone* 2002 ; 30 : 26-31.
- Pajarinen J, Lin T, Gibon E, Kohno Y, Maruyama M, Nathan K, et al: Mesenchymal stem cell-macrophage crosstalk and bone healing. *Biomaterials* 2019 ; 196 : 80-89.
- Williams DW, Lee C, Kim T, Yagita H, Wu H, Park S, et al: Impaired bone resorption and woven bone formation are associated with development of osteonecrosis of the jaw-like lesions by bisphosphonate and Anti-Receptor Activator of NF-κB Ligand Antibody in mice. *Am J Patol* 2014 ; 184 : 3084-3093.
- Kaneko J, Okinaga T, Hikiji H, Ariyoshi W, Yoshiga D, Habu M, et al: Zoledronic acid exacerbates inflammation through M1 macrophage polarization. *Inflamm Regen* 2018 ; 38 : 1-8.
- Zhu W, Xu R, Du J, Fu Y, Li S, Zhang P, et al: Zoledronic acid promotes TLR4-mediated M1 macrophage polarization in

- bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw. *The FASEB J* 2019 ; 33 : 5208-5219.
- 26) Roelofs AJ, Thompson K, Gordon S, Rogers MJ: Molecular mechanisms of action of bisphosphonates: current status. *Clin Cancer Res* 2006 ; 12 : 6222s-6230s.
- 27) Kikui T, Kim I, Yamaza T, Akiyama K, Zhang Q, Li Y, et al: Cell-based immunotherapy with mesenchymal stem cells cures bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw-like disease in mice. *J Bone Miner Res* 2010 ; 25 : 1668-1679.
- 28) Kuroshima S, Sasaki M, Nakajima K, Tamaki S, Hayano H, et al: Transplantation of Noncultured Stromal Vascular Fraction Cells of Adipose Tissue Ameliorates Osteonecrosis of the Jaw-Like Lesions in Mice. *J Bone Miner Res* 2018 ; 33 : 154-166.
- 29) Kuroshima S, Go VAA, Yamashita J: Increased numbers of nonattached osteoclasts after long-term zoledronic acid therapy in mice. *Endocrinology* 2012 ; 153 : 17-28.
- 30) Kuroshima S, Sasaki M, Sawase T: Medication-related osteonecrosis of the jaw: a literature review. *J Oral Biosci* 2019 ; 61 : 99-104.

(令和3年2月17日受付)