

*Porphyromonas gingivalis*またはToll-like receptor 2 リガンドが惹起するマウスマクロファージ様細胞 J774.1の IL-6産生に対するalendronateの増強作用と etidronateの抑制作用

長 崎 慶 太 玉井利代子¹ 清 浦 有 祐¹

Alendronate Enhances and Etidronate Inhibits *Porphyromonas gingivalis*-or
Toll-like Receptor 2 Ligand-induced IL-6 Production
by Mouse Macrophage-like J774.1 Cells

Keita NAGASAKI, Riyoko TAMAI¹ and Yusuke KIYOURA¹

Bisphosphonates are synthetic pyrophosphate analogues that inhibit bone resorption and thus are used to treat various diseases associated with increased bone resorption. Bisphosphonates can be divided into two different pharmacological classes based on whether or not they contain nitrogen. Nitrogen-containing bisphosphonates (NBPs), including alendronate, are more potent in inhibiting bone resorption, but have undesirable inflammatory side effects.

The present study examined the effects of alendronate and etidronate, a non-NBP, on IL-6 production by murine macrophage-like J774.1 cells incubated with *Porphyromonas gingivalis* or Pam₃ Cys-Ser-(Lys)₄ (Pam₃ CSK₄). While pretreatment of J774.1 cells with alendronate increased the production of IL-6, pretreatment with etidronate inhibited it. Furthermore, etidronate decreased alendronate-induced IL-6 production by J774.1 cells incubated with *P. gingivalis* or Pam₃ CSK₄. Enhanced IL-6 production by alendronate may promote the development of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws (BRONJ), a side effect of alendronate treatment. In contrast, the findings that etidronate inhibited IL-6 production may explain why BRONJ is not observed in those who do not take NBPs.

Key words : Nitrogen-containing bisphosphonates (NBPs) ; Alendronate ; Etidronate ; Toll-like receptor (TLR) 2 ; Interleukin-6 (IL-6)

受付：平成22年3月3日，受理：平成22年5月18日
奥羽大学大学院歯学研究科歯内・歯周療法学専攻
奥羽大学歯学部口腔病態解析制御学講座口腔細菌学分
野¹
(指導：清浦有祐教授)

Department of Endodontics and Periodontics, Ohu
University Graduate School of Dentistry
Division of Oral Bacteriology, Department of Oral
Medical Science Ohu University School of Dentistry¹
(Director : Prof. Yusuke KIYOURA)

緒 言

Alendronate は、骨吸収抑制薬として広く用いられている窒素含有 bisphosphonates (nitrogen-containing bisphosphonates, NBPs) の一つである¹⁻³⁾。NBPs は強い骨吸収抑制作用を示すが、有害事象として顎骨骨髓炎や顎骨壊死を起こすことが報告されている^{1,4,5)}。NBPs が発症に関与すると考えられる顎骨壊死は、bisphosphonates 関連顎骨壊死 (bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws, BRONJ) と命名されている⁶⁻⁹⁾。BRONJ の発症は悪性腫瘍の治療を目的として NBPs を静脈投与した場合におけるとされていたが、NBPs の錠剤の服用でも発症することが報告されている¹⁰⁾。高齢化社会の進展に伴って NBPs の服用者が増大することが考えられるので、BRONJ の発症メカニズムとその予防法を確立することは、緊急性を要する歯科医学領域の研究課題である。

NBPs が顎骨壊死を起こす詳細なメカニズムは明確にされていない。しかし、NBPs が炎症性疾患の発症に関係するサイトカインの産生に影響することは報告されている^{1,11)}。Deng らは、歯周病原性細菌である *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*) および Toll-like receptor (TLR) 2 のリガンドである Pam3 Cys-Ser-(Lys)₄ (Pam3 CSK4) 刺激によるマウスマクロファージ様細胞である J774.1細胞からの interleukin (IL)-1 β 産生が alendronate によって増強されることを報告した¹⁾。また、NBPs に含まれる pamidronate も炎症性サイトカインの1つである tumor necrosis factor α (TNF- α) のヒト末梢血白血球からの産生を増強する¹²⁾。一方、窒素非含有の bisphosphonates (non nitrogen-containing bisphosphonates, non-NBPs) である etidronate は IL-1 β の産生を増強しない¹⁾。現在までに認められている BRONJ は NBPs 服用者でおきたものであり、non-NBPs 服用者における報告はない。この理由として、サイトカイン産生増強作用の有無が関係している可能性も考えられる。

BRONJ の発症誘因は明確にされていないが、口腔細菌感染は最も重要な因子の一つと考えられ

ている¹²⁻¹⁴⁾。実際、口腔衛生状態が不良な者や抜歯などの歯科治療後に発症することが多い^{6,12,15)}。したがって、口腔細菌感染に対する宿主応答に伴う炎症性サイトカインの産生が NBPs 服用者では増強されるため、炎症反応が増悪して BRONJ がおこる可能性も考えられる。炎症性疾患を増悪するサイトカインとして IL-1 β 以外に IL-6 が注目され、さまざまな疾患との関係が推測されている¹⁶⁻²⁰⁾。本研究では、IL-6 の産生に及ぼす NBPs の alendronate と non-NBPs の etidronate の影響を調べることで BRONJ の発症メカニズムの一部を明らかにすることを試みた。

材料および方法

1. 供試標品

Alendronate (LKT Laboratories, St. Paul, MN, USA) と etidronate (和光純薬工業, 大阪) はリン酸緩衝液で溶解後、水酸化ナトリウム溶液で pH 7 に調整し、最終濃度は 10mM とした。実験に際しては、J774.1細胞の培養に使用した培養液である 10% ウシ胎児血清 (fetal bovine serum, FBS; GIBCO, Carlsbad, CA, USA), 100 U/ml ペニシリンおよび 100 μ g/ml ストレプトマイシン (GIBCO) 含有 RPMI1640 培地 (Sigma, St. Louis, MO, USA) で希釈して供試した。TLR2 リガンドの Pam3 CSK4 (InvivoGen, San Diego, CA, USA) は滅菌蒸留水に溶解し、最終濃度は 1mg/ml とした。溶かしたものを、上記と同様の培養液で希釈して使用した。

2. 細胞培養と細菌

マウスマクロファージ様細胞 J774.1 は東北大学加齢医学研究所医用細胞資源センター (宮城) から分与されたものを供試した。J774.1細胞は、10% FBS 含有 RPMI1640 培地を用いて、37 $^{\circ}$ C、5% CO₂-95% 湿空气中で継代培養し、実験に供した。

歯周病原性細菌である *P. gingivalis* ATCC 33277 は 5 μ g/ml ヘミン (和光純薬) と 1 μ g/ml メナジオン (和光純薬) を添加した GAM ブイヨン (日水製薬, 東京) で 37 $^{\circ}$ C、嫌気条件下で 72 時間培養した。実験に際しては、無血清 RPMI1640 培地で菌を 3 回洗浄後、10% FBS 含有

RPMI1640培地に 1×10^5 CFU/ml となるように調整した。

3. IL-6 産生量の測定

J774.1 細胞の IL-6 産生は, enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) で測定した。すなわち, 10% FBS 含有 RPMI 1640培地で 1×10^6 /ml に調整した J774.1細胞を96穴平底マイクロプレート (Falcon®, BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA) に1穴あたり 2×10^5 /200 μ l を播種した。そして, 37°C, 5% CO₂-95% 湿空气中で16時間培養し, 無血清 RPMI 1640培地で1回洗浄後, alendronate, もしくは etidronate を含んだ10% FBS 含有 RPMI 1640培地で24時間培養した。次に, 無血清 RPMI 1640培地で2回洗浄後, Pam3 CSK4 (10 ng/ml) または *P. gingivalis* (10^6 CFU/ml) を添加した10% FBS 含有 RPMI 1640培地で24時間培養した。培養終了後, 上清中の IL-6量 をマウス ELISA キット (eBioscience, San Diego, CA, USA) を用いて, マイクロプレートリーダー (モデル680; Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA) で測定した。

4. 統計処理

結果は, 平均値と標準誤差を求めて示した。有意差の検定は one-way analysis of variance (ANOVA) を用いた分散分析の後, Bonferroni or Dunn method による多重比較検定を行った。

結 果

1. Alendronate による, *P. gingivalis* または Pam3 CSK4 が誘導する J774.1 細胞の IL-6 産生増強

まず, J774.1 細胞の IL-6 産生に対する alendronate の影響について検討した。alendronate 単独では, J774.1細胞の IL-6産生に変化を与えなかった (図1)。しかしながら, alendronate で前処理した J774.1 細胞の *P. gingivalis* による IL-6 産生は, alendronate で処理しなかった同細胞と比べて, 著しく増加した (図1)。TLR2リガンドである Pam3 CSK4刺激でも, alendronate 前処理で IL-6産生は増加した (図2)。

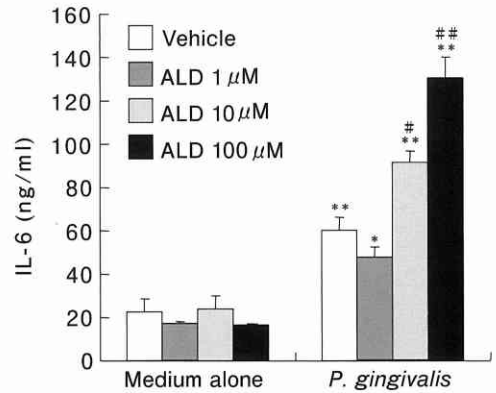


図1 Alendronate (ALD) 前処理による *P. gingivalis* 誘導 IL-6 産生の増加

*P < 0.05 and **P < 0.01, compared with medium alone.
#P < 0.05 and ##P < 0.01, compared with vehicle.

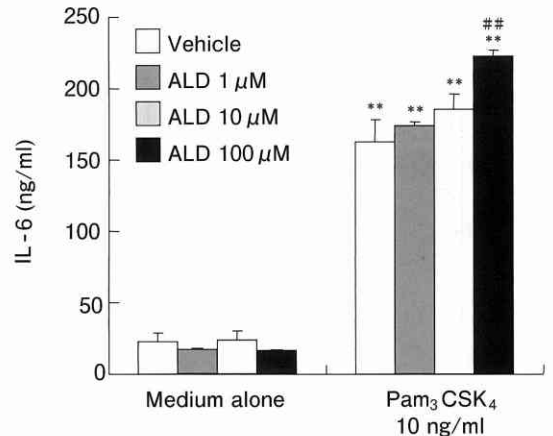


図2 Alendronate (ALD) 前処理による Pam3 CSK4誘導 IL-6 産生の濃度依存的増加

**P < 0.01, compared with medium alone.
##P < 0.01, compared with vehicle.

2. Etidronate による, *P. gingivalis* または Pam3 CSK4 が誘導する J774.1 細胞の IL-6 産生抑制

次に, J774.1 細胞の IL-6 産生に対する etidronate の影響について検討した。Etidronate で前処理した J774.1 細胞の *P. gingivalis* による IL-6産生は, etidronate で処理しなかった同細胞と比べて, 減少した (図3)。Etidronate で前処理した J774.1細胞の Pam3 CSK4による IL-6産生は, etidronate 非処理細胞と比べて, 著しく抑制された (図4)。

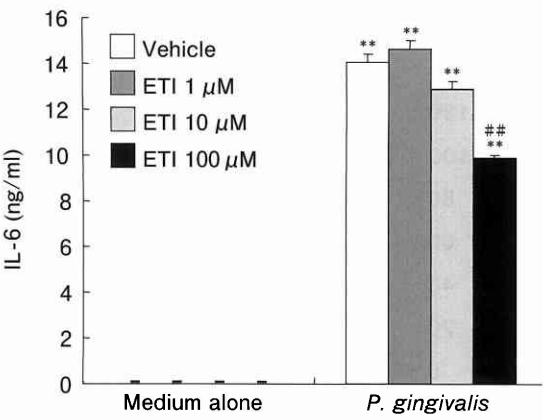


図3 Etidronate (ETI) 前処理による*P. gingivalis*誘導 IL-6 産生の抑制

** $P < 0.01$, compared with medium alone.
$P < 0.01$, compared with vehicle.

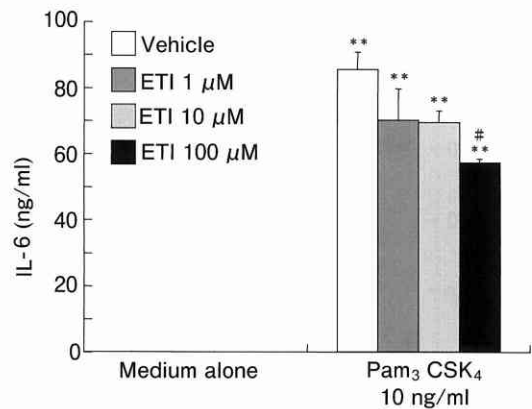


図4 Etidronate (ETI) 前処理によるPam3CSK4誘導 IL-6 産生の抑制

** $P < 0.01$, compared with medium alone.
$P < 0.05$, compared with vehicle.

3. Etidronate による *P. gingivalis* または Pam3 CSK4 が誘導する alendronate 前処理 J774.1 細胞の IL-6 産生抑制

さらに, alendronate 前処理 J774.1細胞の *P. gingivalis* または Pam3 CSK4が誘導する IL-6産生に対する etidronate の抑制効果について検討した。100μM の alendronate で前処理した J774.1 細胞の *P. gingivalis* による IL-6産生は, etidronate を加えると, 有意に抑制された (図5)。加えて, 100μM の alendronate で前処理した J774.1 細胞の, Pam3 CSK4 による IL-6 産生は,

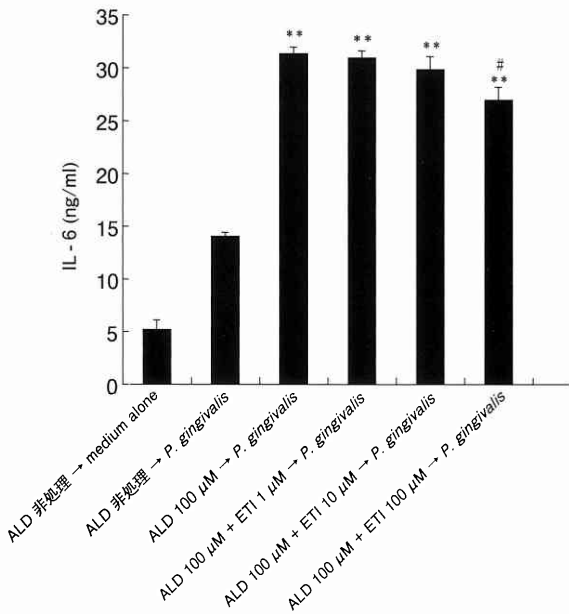


図5 Alendronate (ALD) 前処理による*P. gingivalis*誘導 IL-6 産生増加に対するetidronate (ETI) の抑制効果

** $P < 0.01$, compared with *P. gingivalis*.
$P < 0.05$, compared with ALD 100μM followed by *P. gingivalis*.

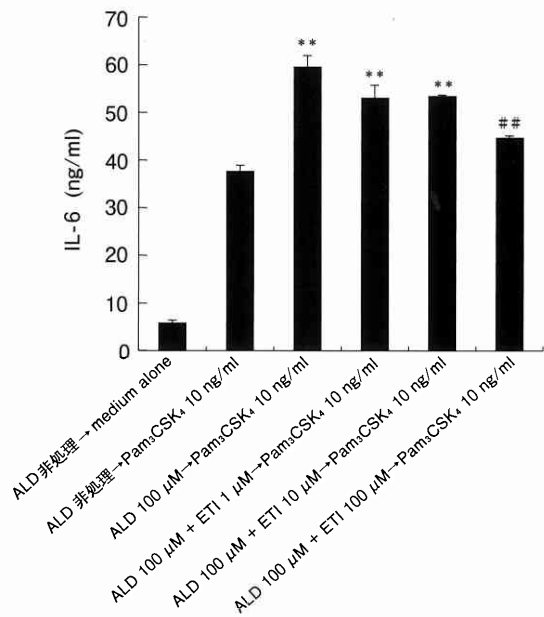


図6 Alendronate (ALD) 前処理による Pam3 CSK4 誘導 IL-6 産生増加に対する etidronate (ETI) の抑制効果

** $P < 0.01$, compared with Pam3 CSK4.
$P < 0.01$, compared with ALD 100μM followed by Pam3 CSK4 10 ng/ml.

etidronate 添加により著しく抑制された（図6）。

考 察

BRONJ の発症誘因として、我々は、炎症性サイトカインの産生増強による顎骨骨髓炎の増悪を考えた。炎症性サイトカンである IL-6 は B 細胞を抗体産生細胞に分化させる因子として発見されたが、現在では関節リウマチ、間質性肺炎、多発性骨髄腫や全身性エリテマトーデスなどの多くの疾患の病態に深く関係することが報告されている¹⁶⁻¹⁹⁾。さらに、骨壊死に関与する可能性も考えられる²⁰⁾。IL-6 の炎症反応における役割として重要なことは、ヘルパー T 細胞集団の中の Th17 の発生と分化に中心的な役割を果たすことである^{21,22)}。Th17 は様々な宿主細胞から炎症性メディエーターを分泌させるサイトカインである IL-17 を産生することで、炎症反応を促進する細胞である^{23,24)}。それに対して、炎症反応を抑制する T 細胞である Treg への native T 細胞からの分化は IL-6 存在下では抑制される²²⁾。したがって、実際のヒトの感染症においても IL-6 が過剰に産生された場合には、炎症反応の進展による組織破壊が強く進行する可能性が考えられる。

今回、代表的な NBP である alendronate が炎症反応を高める IL-6 の産生を増強した。これは、実際の alendronate 服用者でも顎骨組織の感染症がおきた場合には炎症反応の増悪によって、BRONJ が誘発される可能性を示唆している。本実験で使用した歯周病原性細菌の *P. gingivalis* は、歯周病原性細菌として歯周組織からのサイトカイン産生を誘導する。産生されたサイトカインは歯周病だけでなく、全身のさまざまな疾患の発症に関わる可能性が報告されている²⁵⁻²⁸⁾。

P. gingivalis は、宿主細胞の TLR2 を介したシグナル伝達系によって炎症性サイトカイン産生を誘導する²⁹⁾。TLR2 のリガンドである Pam3 CSK4 を alendronate 前処理 J774.1 細胞に加えた場合も、*P. gingivalis* の場合と同様に無処理の細胞と比較して IL-6 産生が増強された。この結果から、TLR2 を介した刺激によっておこる IL-6 産生を alendronate が増強すると考えられる。IL-6 の産生が増強した原因としては、炎症性サイトカイン

の産生に関わる代表的な転写因子である NF- κ B の活性化が考えられるが、alendronate は、J774.1 細胞の Pam3 CSK4 による NF- κ B 活性に変化を与えない^{30,31)}。

一方、Deng らは、歯周病原性細菌が誘導する IL-1 β 産生における alendronate の増強作用が caspase-1 依存であることを報告した¹⁾。さらに、Sanders らは IL-1 β と alendronate が相乗的に IL-6 産生を増強する結果を報告している³²⁾。以上のことから、今回の alendronate 前処理による IL-6 産生の増強は、IL-1 β 依存性である可能性が高い。

Non-NBP である etidronate と IL-6 産生に関しては、大腸菌の内毒素の刺激で骨芽細胞から産生される IL-6 が etidronate で抑制されるという報告がある³³⁾。大腸菌のような腸内細菌の内毒素は、TLR4 リガンドとして作用する。それに対して、*P. gingivalis* の生菌は Pam3 CSK4 と同じく TLR2 を介してサイトカインの産生を誘導する²⁹⁾。今回の実験では、*P. gingivalis* または TLR2 リガンドである Pam3 CSK4 による IL-6 産生に対する etidronate の抑制効果が示された。このことは、TLR2 のシグナル伝達経路に関わるタンパク分子が etidronate の作用で、IL-6 の産生を抑制する可能性を示唆するものである。この経路に関わるタンパク分子としては、TLR の細胞内領域と会合するアダプター分子の MyD88 や転写因子の NF- κ B などが挙げられる³⁴⁾。これらの細胞内タンパク分子の活性化に対する etidronate の作用に関しては、明らかにされていない。

本研究では、*P. gingivalis* または Pam3 CSK4 で誘導される IL-6 産生の alendronate による増強作用が non-NBP の etidronate で抑制された。Alendronate が惹起する炎症反応に対する etidronate の抑制作用に関して、*in vivo* の実験系では報告されているが、サイトカインレベルでの検証はない³⁵⁾。*P. gingivalis* による IL-1 β 産生の alendronate による増強は、etidronate と同様の non-NBP である clodronate で抑制された¹⁾。Etidronate が alendronate による炎症性サイトカイン産生の増強を抑えるという今回の結果は、NBP による炎症性副作用がみられた時に、

etidronate が NBP の代用薬として利用可能であることを示唆している。すでに etidronate をリウマチ治療に用いた場合に、血中に検出される IL-6 量の低下が認められるという報告がある^{36,37)}。今後は、この抑制メカニズムを解明するために細胞内タンパク分子に対する etidronate の作用を詳細に検討する予定である。

炎症性サイトカインの過剰産生以外にも BRONJ がおこる誘因として考えられるものは存在する。NBP は破骨細胞のアポトーシスを引き起こすことで、骨吸収抑制作用を示すが、口腔上皮細胞や歯肉線維芽細胞に対しても、傷害を与えることが報告されている^{38,39)}。このような NBP の細胞傷害作用も発症に関わる可能性がある。

最近、BRONJ の発症と CYP2C のサブファミリーである CYP2C8 の遺伝子多型が BRONJ の発症に関与する可能性が報告されている⁴⁰⁾。CYP は医薬品の代謝に関わる酵素であり、その遺伝子多型によって服用した薬物の代謝が大きく影響を受ける。したがって、BRONJ の発症には NBP の代謝酵素や炎症性サイトカイン関連の遺伝子多型も関与していると考えられる⁴¹⁾。

歯科治療に伴う BRONJ の発症予防策としては、治療前に一定期間 NBP の投与を中止することや口腔清掃の徹底などが推奨されている⁴²⁾。今後は上記の遺伝子の多型性を調べることで、発症リスクの事前予測をおこなえる可能性も考えられるが、検討すべき遺伝子のターゲットを絞らなくてはならない。そのためにも alendronate を始めとした NBP のサイトカイン産生増強の詳細なメカニズムと最も重要なタンパク分子の同定が必要となる。

文 献

- 1) Deng, X., Tamai, R., Endo, Y., Kiyoura, Y. : Alendronate augments interleukin-1 β release from macrophages infected with periodontal pathogenic bacteria through activation of caspase-1. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **235** ; 97-104 2009.
- 2) Canetti, A. C., Colombo, C. E., Chin, C. M., Faig-Leite, H. : Femur bone repair in ovariectomized rats under the local action of alendronate, hydroxyapatite and the association of

alendronate and hydroxyapatite. *Int. J. Exp. Pathol.* **90** ; 520-526 2009.

- 3) Iwamoto, J., Takeda, T., Sato, Y. : Efficacy and safety of alendronate and risedronate for postmenopausal osteoporosis. *Curr. Med. Res. Opin.* **22** ; 919-928 2006.
- 4) Fleisch, H. : Bisphosphonates. Pharmacology and use in the treatment of tumour-induced hypercalcaemic and metastatic bone disease. *Drugs* **42** ; 919-944 1991.
- 5) Lipton, A. : Toward new horizons : the future of bisphosphonate therapy. *Oncologist* **9** ; 38-47 2004.
- 6) Advisory task force on bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws, American Association of Oral and maxillofacial Surgeons : American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons position paper on bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws. *J. Oral Maxillofac. Surg.* **65** ; 369-376 2007.
- 7) Ruggiero, S. L., Dodson T. B., Assael, L. A., Landesberg, R., Marx, R. E., Mehrotra, B. : American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons position paper on bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws - 2009 update. *J. Oral Maxillofac. Surg.* **67** ; 2-12 2009.
- 8) Thumbygere-Math, V., Sabino, M. C., Gopalakrishnan, R., Huckabay, S., Dudek, A. Z., Basu, S., Hughes, P. J., Michalowicz, B. S., Leach, J. W., Swenson, K. K., Swift, J. Q., Adkinson, C., Basi, D. L. : Bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw : clinical features, risk factors, management, and treatment outcomes of 26 patients. *J. Oral Maxillofac. Surg.* **67** ; 1904-1913 2009.
- 9) O'Ryan, F. S., Khoury, S., Liao, W., Han, M. M., Hui, R. L., Baer, D., Martin, D., Liberty, D., Lo, J. C. : Intravenous bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw : bone scintigraphy as an early indicator. *J. Oral Maxillofac. Surg.* **67** ; 1363-1372 2009.
- 10) Sedghizadeh, P. P., Stanley, K., Caligiuri, M., Hofkes, S., Lowry, B., Shuler, C. F. : Oral bisphosphonate use and the prevalence of osteonecrosis of the jaw : an institutional inquiry. *J. Am. Dent. Assoc.* **140** ; 61-66 2009.
- 11) Sauty, A., Pecherstorfer, M., Zimmer-Roth, I., Fioroni, P., Juillerat, L., Markert, M., Ludwig, H., Leuenberger, P., Burckhardt, P., Thiébaud, D. : Interleukin-6 and tumor necrosis factor α levels after bisphosphonates treatment *in vitro* and in patients with malignancy. *Bone* **18** ; 133-139 1996.

- 12) Hellstein, J. W., Marek, C. L. : Bisphosphonate osteochemonecrosis (bis-phossy jaw) : is this phossy jaw of the 21st century? *J. Oral Maxillofac. Surg.* **63** ; 682-689 2005.
- 13) Allen, M. R., Burr, D. B. : The pathogenesis of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw : so many hypotheses, so few data. *J. Oral Maxillofac. Surg.* **67** ; 61-70 2009.
- 14) Junquera, L., Gallego, L., Pelaz, A., Olay, S. : Oral bisphosphonates-associated osteonecrosis in rheumatoid arthritis. *Med. Oral Patol. Oral Cir. Bucal.* **14** ; 292-294 2009.
- 15) Mavrokokki, T., Cheng, A., Stein, B., Goss, A. : Nature and frequency of bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaws in Australia. *J. Oral Maxillofac. Surg.* **65** ; 415-423 2007.
- 16) Hirohata, S., Miyamoto, T. : Elevated levels of interleukin-6 in cerebrospinal fluid from patients with systemic lupus erythematosus and central nervous system involvement. *Arthritis Rheum.* **33** ; 644-649 1990.
- 17) Bataille, R., Barlogie, B., Lu, Z. Y., Rossi, J. F., Lavabre-Bertrand, T., Beck, T., Wijdenes, J., Brochier, J., Klein, B. : Biologic effects of anti-interleukin-6 murine monoclonal antibody in advanced multiple myeloma. *Blood* **86** ; 685-691 1995.
- 18) Xing, Z., Gauldie, J., Cox, G., Baumann, H., Jordana, M., Lei, X. F., Achong, M. K. : IL-6 is an antiinflammatory cytokine required for controlling local or systemic acute inflammatory responses. *J. Clin. Invest.* **101** ; 311-320 1998.
- 19) Hata, H., Sakaguchi, N., Yoshitomi, H., Iwakura, Y., Sekikawa, K., Azuma, Y., Kanai, C., Moriizumi, E., Nomura, T., Nakamura, T., Sakaguchi, S. : Distinct contribution of IL-6, TNF- α , IL-1, and IL-10 to T cell-mediated spontaneous autoimmune arthritis in mice. *J. Clin. Invest.* **114** ; 582-588 2004.
- 20) Okazaki, S., Nishitani, Y., Nagoya, S., Kaya, M., Yamashita, T., Matsumoto, H. : Femoral head osteonecrosis can be caused by disruption of the systemic immune response via the toll-like receptor 4 signaling pathway. *Rheumatology* **48** ; 227-232 2009.
- 21) Bettelli, E., Carrier, Y., Gao, W., Korn, T., Strom, T. B., Oukka, M., Weiner, H. L., Kuchroo, V. K. : Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature* **441** ; 235-238 2006.
- 22) Veldhoen, M., Hocking, R. J., Atkins, C. J., Locksley, R. M., Stockinger, B. : TGF- β in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells. *Immunity* **24** ; 179-189 2006.
- 23) Yen, D., Cheung, J., Scheerens, H., Poulet, F., McClanahan, T., McKenzie, B., Kleinschek, M. A., Owyang, A., Mattson, J., Blumenschein, W., Murphy, E., Sathe, M., Cua, D. J., Kastelein, R. A., Rennick, D. : IL-23 is essential for T cell-mediated colitis and promotes inflammation via IL-17 and IL-6. *J. Clin. Invest.* **116** ; 1310-1316 2006.
- 24) Aranami, T., Yamamura, T. : Th17 cells and autoimmune encephalomyelitis (EAE/MS). *Allergol. Int.* **57** ; 115-120 2008.
- 25) Craig, R. G., Yip, J. K., So, M. K., Boylan, R. J., Socransky, S. S., Haffajee, A. D. : Relationship periodontal disease to the acute-phase response. *J. Periodontol.* **74** ; 1007-1016 2003.
- 26) Wang, P. L., Ohura, K. : *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide signaling in gingival fibroblasts-CD14 and Toll-like receptors. *Crit. Rev. Oral Biol. Med.* **13** ; 132-142 2002.
- 27) Iwai, T. : Periodontal bacteria and various vascular diseases. *J. Periodontal Res.* **44** ; 689-694 2009.
- 28) Martinez-Martinez, R. E., Abud-Mendoza, C., Patino-Marin, N., Rizo-rodriguez, J. C., Little, J. W., Loyola-Rodriguez, J. P. : Detection of periodontal bacterial DNA in serum and synovial fluid in refractory rheumatoid arthritis patients. *J. Clin. Periodontol.* **36** ; 1004-1010 2009.
- 29) Burns, E., Bachrach, G., Shapira, L., Nussbaum, G. : Cutting edge : TLR2 is required for the innate response to *Porphyromonas gingivalis* : Activation leads to bacterial persistence and TLR2 deficiency attenuates induced alveolar bone resorption. *J. Immunol.* **177** ; 8296-8300 2006.
- 30) Pahl, H. L. : Activators and target genes of Rel/NF- κ B transcription factors. *Oncogene* **18** ; 6853-6866 1999.
- 31) Masuda, T., Deng, X., Tamai, R. : Mouse macrophages primed with alendronate down-regulate monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) and macrophage inflammatory protein-1 α (MIP-1 α) production in response to Toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4 agonist via Smad3 activation. *Int. Immunopharmacol.* **9** ; 1115-1121 2009.
- 32) Sanders, J. L., Tarjan, G., Foster, S. A., Stern, P. H. : Alendronate/interleukin-1 β cotreatment increases interleukin-6 in bone and

- UMR-106 cells : dose dependence and relationship to the antiresorptive effect of alendronate. *J. Bone Miner. Res.* **13** ; 786-792 1998.
- 33) Olmos, J. M., De Vega, T., Perera, L., Riancho, J. A., Amado, J. A., González-Macías, J. : Etidronate inhibits the production of IL-6 by osteoblast-like cells. *Methods Find. Exp. Clin. Pharmacol.* **21** ; 519-522 1999.
 - 34) Aderem, A., Ulevitch, R. J. : Toll-like receptors in the induction of the innate immune response. *Nature* **406** ; 782-787 2000.
 - 35) Funayama, H., Ohsako, M., Monma, Y., Mayanagi, H., Sugawara, S., Endo, Y. : Inhibition of inflammatory and bone-resorption-inhibitory effects of alendronate by etidronate. *Calcif. Tissue Int.* **76** ; 448-457 2005.
 - 36) Hasegawa, J., Nagashima, M., Yamamoto, M., Nishijima, T., Katsumata, S., Yoshino, S. : Bone resorption and inflammatory inhibition efficacy of intermittent cyclical etidronate therapy in rheumatoid arthritis. *J. Rheumatol.* **30** ; 474-479 2003.
 - 37) Yamamoto, K., Yoshino, S., Shue, G., Nagashima, M. : Inhibitory effect of bone resorption and inflammation with etidronate therapy in patients with rheumatoid arthritis for 3 years and *in vitro* assay in arthritis models. *Rheumatol. Int.* **26** ; 627-632 2006.
 - 38) Landesberg, R., Cozin, M., Cremers, S., Woo, V., Kousteni, S., Sinha, S., Garrett-Sinha, L., Raghavan, S. : Inhibition of oral mucosal cell wound healing by bisphosphonates. *J. Oral Maxillofac. Surg.* **66** ; 839-847 2008.
 - 39) Scheper, M. A., Badros, A., Chaisuparat, R., Cullen, K. J., Meiller, T. F. : Effect of zoledronic acid on oral fibroblasts and epithelial cells : a potential mechanism of bisphosphonate-associated osteonecrosis. *Br. J. Haematol.* **144** ; 667-676 2009.
 - 40) Sarasquete, M. E., González, M., San Miguel, J. F., García-Sanz, R. : Bisphosphonate-related osteonecrosis : genetic acquired risk factors. *Oral Dis.* **15** ; 382-387 2009.
 - 41) Watanabe, E., Hirasawa, H., Oda, S., Matsuda, K., Hatano, M., Tokuhisa, T. : Extremely high interleukin-6 blood levels outcome in the critically ill are associated with tumor necrosis factor- and interleukin-1-related gene polymorphisms. *Crit. Care Med.* **33** ; 89-97 2005.
 - 42) American Dental Association Council on Scientific Affairs : Dental management of patients receiving oral bisphosphonate therapy : expert panel recommendations. *J. Am. Dent. Assoc.* **137** ; 1144-1150 2006.

著者への連絡先 : 長崎慶太, (〒963-8611) 郡山市富田町字三角堂31-1 奥羽大学歯学部診療科学講座

Reprint requests : Keita Nagasaki, Department of Therapeutic Science, Ohu University School of Dentistry 31-1 Misumido, Tomita, Koriyama, 963-8611, Japan