

*Candida albicans*によってマクロファージ様細胞から 誘導されるサイトカイン産生に対するalendronateの増強作用

伊 藤 榮 一¹ 玉井利代子² 清 浦 有 祐²

Alendronate Augments Cytokine Production Induced
by *Candida albicans* in Macrophage - like Cells

Eiichi ITO, Riyoko TAMAI¹ and Yusuke KIYOURA¹

Osteoporosis-treating drugs called bisphosphonates (BPs) cause bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws (BRONJ) as an adverse event. While oral bacteria are considered causative agents of BRONJ, we considered the possibility that *C. albicans* is a causative agent. The present study assessed the effects of BPs on *C. albicans*-induced host cell inflammatory cytokine production in the mouse macrophage-like cell line J774.1.

J774.1 cells were cultured for 16 hours in 10% FBS containing RPMI1640 medium in 96 well microplates at 1×10^6 /ml (0.2 ml/well). We added nitrogen-containing bisphosphonate alendronate and cultured for an additional 24 hours. We then added a *C. albicans* suspension, and then cultured the cells for another 24 hours. Levels of the inflammatory cytokines IL-6 and MCP-1 in the culture medium were measured using ELISA kits.

Cells treated with alendronate (100 μ M) prior to heat-killed *C. albicans* (MOI of 10) treatment showed significantly higher IL-6 production compared to cells that were not pretreated with alendronate. However, MCP-1 production did not increase or decrease in response to alendronate treatment. In contrast, when etidronate, a bisphosphonate that does not contain a nitrogen group, was added concurrently with alendronate, alendronate-mediated enhancement of IL-6 production was significantly inhibited.

These results suggest that BRONJ may develop due to the alendronate-mediated enhancement of *C. albicans*-induced host cell inflammatory cytokine production.

Key words : alendronate, *Candida albicans*, bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws, cytokine

緒 言

Candida albicans (*C. albicans*) は口腔常在

真菌であり、特に高齢者の口腔内から分離されることが多い¹⁻³⁾。そのため、高齢者では*C. albicans* による口腔カンジダ症が認められるこ

受付：平成24年3月27日，受理：平成24年4月24日
奥羽大学大学院歯学研究科口腔感染症学専攻¹
奥羽大学歯学部口腔病態解析制御学講座²
(指導：清浦有祐教授)

Department of Oral Infectious Diseases, Ohu University,
Graduate School of Dentistry¹
Department of Oral Medical Science, Ohu University
School of Dentistry²
(Director : Prof. Yusuke KIYOURA)

とが多く、口腔ケアを考える場合に *C. albicans* の口腔内への定着を抑制することが求められる¹⁴⁾。そして、口腔内に定着している *C. albicans* が誤嚥性肺炎の原因菌になることもある⁵⁾。

高齢者は、骨粗鬆症に罹患することが多い^{6~8)}。骨粗鬆症治療薬としては bisphosphonates (BPs) が広く使用されているが、有害事象として BPs 関連顎骨壊死 (bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws, BRONJ) が起こることが知られている^{7,9)}。Tamai らは、BRONJ の発症誘因の一つが口腔細菌に対する宿主の炎症性サイトカイン産生の亢進である可能性を報告している^{10~12)}。実際、BRONJ は拔牙、インプラント手術、歯周外科を契機として起こる。このことから、口腔細菌感染が発症の契機となることが考えられる^{6,7,9,13)}。BRONJ の患部では、複数の細菌からなるバイオフィルムも認められている¹⁴⁾。

BRONJ 患者は、BPs 服用者が高齢者に多いことを反映して高齢者に多く認められる^{6,7)}。高齢者の口腔常在微生物を考えた場合には、口腔細菌の他に真菌である *C. albicans* が重要となる。*C. albicans* は前述のように加齢と共に口腔内から検出される頻度が増加すると共に、口腔カンジダ症を起こすことがある¹⁵⁾。したがって、口腔細菌と同様に BRONJ の発症誘因となることも考えられる。実際に、BRONJ 患者で口腔カンジダ症を併発した症例も報告されている¹⁶⁾。その症例では、*C. albicans* が直接の原因微生物であることは証明されていない。しかし、専門的な口腔ケアの導入でカンジダ症の症状の改善と BRONJ に伴う口腔環境の悪化が改善していたことから、*C. albicans* の関与が疑われる¹⁶⁾。

C. albicans が BRONJ の発症の原因となる場合には、歯周病原性細菌と同様に宿主における過度な炎症性サイトカイン産生が起きると考えられる。そのような時は、細菌の場合とは異なった治療法が必要となる^{6,7,9)}。

C. albicans は、歯周病原性細菌とは菌体構造が大きく異なり、宿主の免疫応答も違ったものになる。そのため、歯周病原性細菌で認められたような BPs による炎症性サイトカインの産生増強が、実際に *C. albicans* でも同様に認められるか

は不明である。我々は BPs が、*C. albicans* に対する宿主の炎症性サイトカイン産生に及ぼす影響をマウスマクロファージ様細胞である J774.1 細胞を使用して調べた。

材料および方法

1. BPs の調整

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、最終濃度を 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; Biowest, Nuaille, France), 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, Carlsbad, CA, USA) 含有 RPMI1640 培地 (Sigma, St. Louis, MO, USA) で希釈して供試した。

2. *C. albicans* 菌体の調整

C. albicans は、口腔カンジダ症のマウスモデルを使用した実験で病原性を発揮することが明らかにされている OH-1 株を使用した。同株を 37°C 好気条件下でサブローデキストロース培地 (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA) によって培養した。16 時間培養後、遠心分離によって培養上清を取り除き、そこに phosphate-buffered saline (PBS) を加えて 5×10^8 /ml になるように調整した。その PBS 溶液を 95°C 30 分加熱処理したものを *C. albicans* 菌体の原液とした。その液を 10% FBS 含有 RPMI1640 培地で希釈して、任意の菌数に調整し、実験に使用した。

3. マウスマクロファージ様細胞 J774.1 細胞

マウスマクロファージ様細胞 J774.1 は理化学研究所バイオソースセンター (茨城) から分与された。細胞は、10% FBS 含有 RPMI1640 培地を用いて、37°C、5% CO₂-95% 湿空气中で継代培養して実験に使用した。

4. *C. albicans* による J774.1 細胞からのサイトカイン産生の誘導

J774.1 細胞は、96well マイクロプレート (BD Biosciences) を使用して 37°C、5% CO₂-95% 湿空气中で培養した。具体的には、細胞を 10%

FBS 含有 RPMI1640 培養液中に浮遊させて $1 \times 10^6/\text{ml}$ とした。各 well に $200 \mu\text{l}$ 分注し、16 時間培養した。その後、無血清 RPMI1640 培地で細胞を 1 回洗浄し、alendronate 含有、もしくは非含有の 10% FBS 含有 RPMI 1640 培地で 24 時間培養した。次に、無血清 RPMI 1640 培地で細胞を 2 回洗浄して培養液中の alendronate を除去した。そして、*C. albicans* 菌液、もしくは対照の培養液を well に $200 \mu\text{l}$ 加えて 24 時間培養した。*C. albicans* の菌量は multiplicity of infection (MOI) 1, MOI 10, MOI 100 の 3 種類の濃度になるようにした。実験に使用した J774.1 細胞の細胞数と *C. albicans* OH-1 株の菌数の比率は、MOI で表した。MOI 1 は細胞数 1 に対して菌数が 1, MOI 10 は細胞数 1 に対して菌数が 10, MOI 100 は細胞数 1 に対して菌数が 100 の割合に調整して培養した。

5. サイトカインの測定

J774.1 細胞の培養終了後に遠心処理し、上清中の interleukin-6 (IL-6) と monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) の含有量をマウス 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。

6. 統計処理

実験結果は、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 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. J774.1 細胞の IL-6 産生に及ぼす alendronate の影響

J774.1 細胞に alendronate を $1 \mu\text{M}$ から $100 \mu\text{M}$ までの濃度で加えて、24 時間培養した。その後、培養液を新たにし、*C. albicans* 加熱死菌を MOI 10 の濃度で添加してさらに 24 時間培養した。培養終了後に、培養上清中の IL-6 量を ELISA 法で測定した (図 1)。*C. albicans* 加熱死菌を加えない場合は、alendronate を $1 \mu\text{M}$ から $100 \mu\text{M}$ までの濃度で加えても、alendronate 非添加と比較して有意な IL-6 の産生は認められなかった。

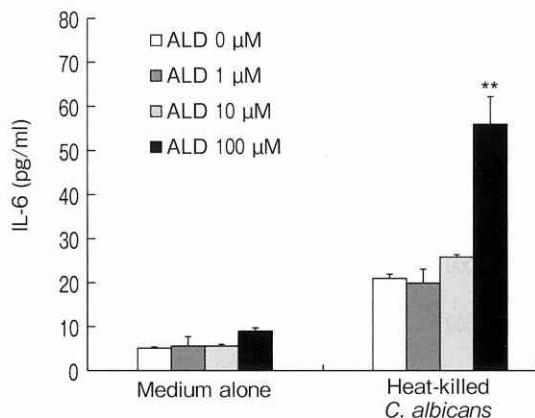


図 1 Alendronate (ALD) 24 時間前処理による *C. albicans* 加熱死菌 (MOI 10) 誘導 IL-6 産生の濃度依存的増加。平均値 \pm SE を示す

** $P < 0.01$, compared with ALD 0 μM .

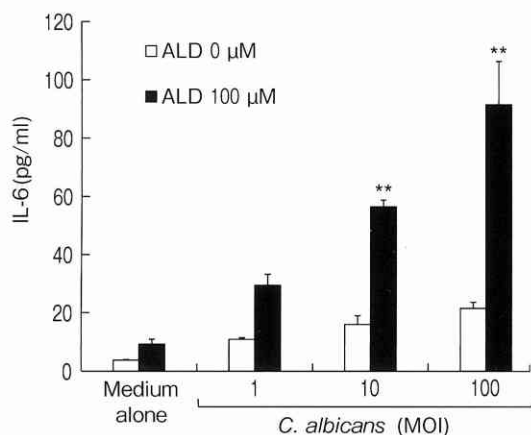


図 2 Alendronate (ALD) 24 時間前処理 ($100 \mu\text{M}$) による *C. albicans* 加熱死菌誘導 IL-6 産生の増加。平均値 \pm SE を示す

** $P < 0.01$, compared with ALD 0 μM .

一方、alendronate を $100 \mu\text{M}$ の濃度で添加後に *C. albicans* 加熱死菌を MOI 10 の濃度で添加して 24 時間培養すると、死菌のみを加えた場合よりも有意に高い IL-6 の産生が認められた。しかし、alendronate の添加量が $10 \mu\text{M}$ 以下では産生増強効果は認められなかった。この結果から、 $100 \mu\text{M}$ 濃度の alendronate は *C. albicans* 加熱死菌による J774.1 細胞からの IL-6 産生を増強するが、alendronate 単独では IL-6 産生を誘導しないことが示された。

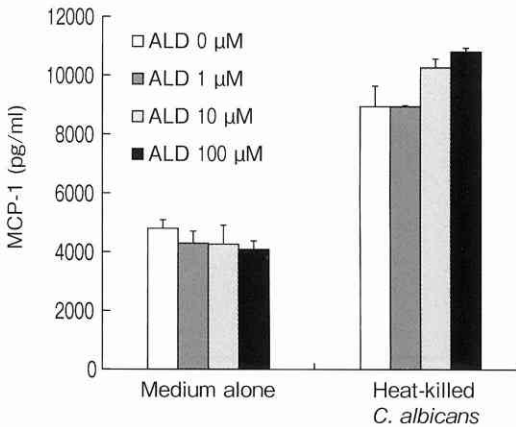


図3 Alendronate (ALD) 24時間前処理が *C. albicans* 加熱死菌 (MOI 10) 誘導 MCP-1 産生に与える影響。平均値±SEを示す

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

2. Alendronate による IL-6 産生増強作用に及ぼす *C. albicans* 加熱死菌数の影響

Alendronate の濃度を $100 \mu\text{M}$ として, *C. albicans* 加熱死菌数を MOI 1 から MOI 100 までの濃度で加えて J774.1 細胞を培養した場合の IL-6 産生を調べた (図2)。 $100 \mu\text{M}$ の alendronate は MOI 10 と MOI 100 の *C. albicans* 加熱死菌によって誘導される IL-6 の産生を有意に増加させたが, MOI 1 では明らかな変化が認められなかった。

3. MCP-1 産生に及ぼす alendronate の影響

IL-6 産生増強作用が alendronate に認められたことから, IL-6 と同様な炎症性サイトカインである MCP-1 の産生も増強されるか否かを調べた。J774.1 細胞に alendronate を $1 \mu\text{M}$ から $100 \mu\text{M}$ までの濃度で加えて24時間培養後, *C. albicans* 加熱死菌を MOI 10 の濃度で添加した。そして, 24時間培養後に培養上清中の MCP-1 量を測定した (図3)。

その結果, MCP-1 の産生は alendronate の有無によっては影響されず, $100 \mu\text{M}$ の添加でも *C. albicans* 加熱死菌による MCP-1 の産生量は増加しなかった。

4. MCP-1 産生に及ぼす *C. albicans* 加熱死菌数の影響

Alendronate の濃度を $100 \mu\text{M}$ として, *C.*

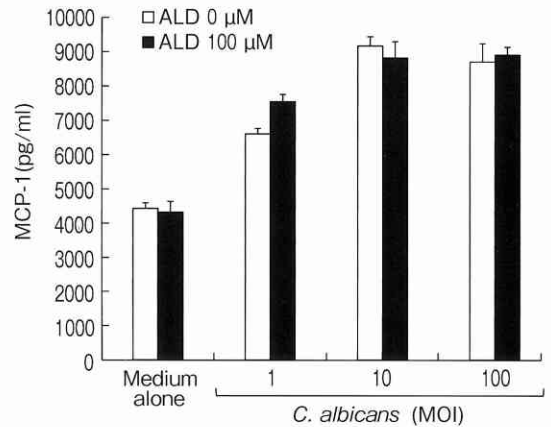


図4 Alendronate (ALD) 24時間前処理 ($100 \mu\text{M}$) が *C. albicans* 加熱死菌誘導 MCP-1 産生に与える影響。平均値±SEを示す

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

albicans 加熱死菌数を変えて J774.1 細胞を培養した場合の MCP-1 産生を調べた (図4)。IL-6 の場合とは異なり, alendronate の有無はすべての MOI における MCP-1 産生に影響を与えなかった。

5. Alendronate による IL-6 産生増強作用に及ぼす etidronate の影響

J774.1 細胞に $100 \mu\text{M}$ の alendronate と共に etidronate を $1 \mu\text{M}$ から $100 \mu\text{M}$ までの濃度で加えて24時間培養後に, *C. albicans* 加熱死菌を MOI 10 の濃度で添加してさらに24時間培養した。培養終了後に培養上清中の IL-6 量を測定した (図5)。

$100 \mu\text{M}$ の etidronate は, alendronate による IL-6 産生増強作用を有意に抑制した。しかし, $1 \mu\text{M}$ および $10 \mu\text{M}$ の濃度の etidronate では IL-6 産生を抑制しなかった。

6. MCP-1 産生に及ぼす etidronate の影響

$100 \mu\text{M}$ の etidronate は alendronate による IL-6 産生増強作用を抑制したので, MCP-1 産生に及ぼす影響も調べた (図6)。 $1 \mu\text{M}$ から $100 \mu\text{M}$ の濃度の etidronate は, J774.1 細胞のすべての培養条件における MCP-1 産生にまったく影響を及ぼさなかった。

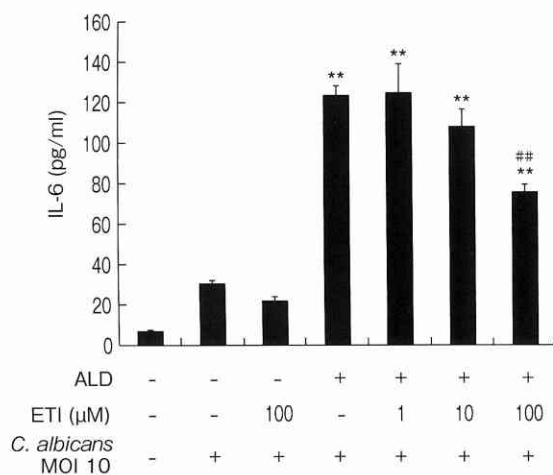


図5 Alendronate (ALD) 前処理による *C. albicans* 加熱死菌 (MOI 10) 誘導 IL-6 産生増加に対するetidronate (ETI) の抑制効果. 平均値±SEを示す

** $P < 0.01$, compared with ALD 0 μ M. ## $P < 0.01$, compared with ALD 100 μ M followed by *C. albicans*.

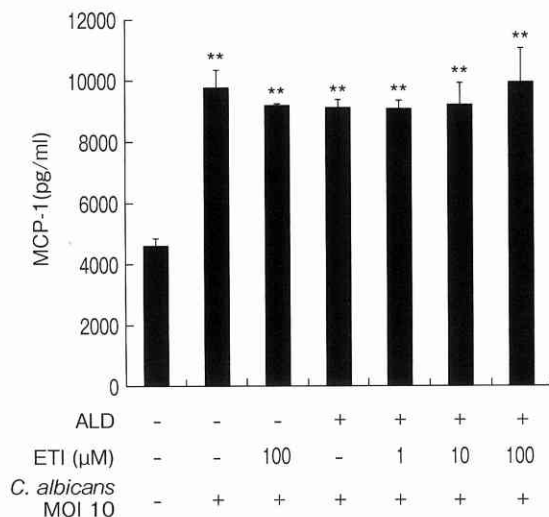


図6 Alendronate (ALD) およびetidronate (ETI) 前処理が *C. albicans* 加熱死菌 (MOI 10) 誘導 MCP-1 産生に与える影響. 平均値±SEを示す

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

考 察

窒素含有 BPs は、細菌の菌体成分やサイトカインの刺激によって宿主細胞からのサイトカイン産生を増強もしくは抑制する。そして、このことが BRONJ の発症誘因の一つとなる可能性が示唆されている^{10-12,17-19}。

Alendronate は、*C. albicans* の刺激による J774.1細胞の IL-6産生は増強したが、MCP-1産生には影響を及ぼさなかった。一方、alendronate を加えて培養した後に、TLR リガンドである lipid A や Pam3CSK4 で J774.1細胞を刺激した場合は、alendronate によって MCP-1 の産生が抑制される¹¹。この異なる結果は、宿主細胞を刺激する微生物の種類や構成成分の違いが alendronate のサイトカイン産生増強作用に大きく影響することを示している。

その理由として、以下のことが考えられる。Alendronate で前処理されてから lipid A や Pam3CSK4 で刺激された J774.1細胞では、細胞内タンパク質である Smad3 が活性化される¹¹。Alendronate による Smad3 活性化の詳細なメカニズムは不明だが、Smad3 の活性化は MCP-1 産

生抑制作用を示すことが明らかにされている^{11,18,20-22}。*C. albicans* の場合は alendronate で前処理しても MCP-1産生が影響されなかった。このことから、lipid A や Pam3CSK4 とは異なって *C. albicans* では Smad3 の活性化が起こらないために MCP-1 産生が抑制されない可能性が考えられる。

しかし、Smad3 の活性化は MCP-1産生の抑制を誘導すると共に IL-6産生は増強することが報告されている^{11,17,20,21}。*C. albicans* による IL-6 の産生は、alendronate によって増強された。Smad3 は、細胞の核内の転写因子と共にサイトカインをコードする遺伝子の転写を調節する^{11,17,20,21}。したがって、Smad3 のみがサイトカイン遺伝子の発現増強や産生増強を担うものではない。Alendronate 前処理 J774.1細胞を *C. albicans* で刺激した場合に Smad3 の活性化以外に IL-6産生が増強されるバイパスが存在すると考えられる。Deng らは、歯周病原性細菌の刺激による IL-6 産生の alendronate による増強作用が caspase-1 の活性化や IL-1 β によって起こる可能性を示唆している¹⁰。

次に、今回の IL-6産生増強を BRONJ の病態と関連させて考える。Alendronate のような窒素含有

BPが、IL-6やIL-1 β のような炎症性サイトカイン産生を増強することは報告されている^{10-12,16-18}。それに対して窒素非含有のBPは、サイトカイン産生増強作用を示さないと共にBRONJの発症にも関与しない^{10,18,22}。したがって、炎症性サイトカイン産生増強作用がBRONJ発症誘因の一つとなる可能性がある。具体的にはIL-6の存在で産生が誘導されるTh17細胞が産生する炎症性メディエーターによる炎症反応の亢進やIL-6が骨壊死の誘因となることである²³⁻²⁶。実際に多くの炎症性疾患の発症にIL-6産生が関わっていることが、報告されている^{27,28}。そして、従来から報告されてきた歯周病原性細菌のみでなく、真菌である*C. albicans*によってもalendronateによるIL-6産生増強が認められた。この結果は、無菌顎患者のように歯周病原性細菌の保有菌数が少ない場合も、サイトカインネットワークが乱れてBRONJが発症する可能性を裏付けるものである²⁹。Alendronateを含む窒素含有のBPを服用する骨粗鬆症患者の多くは、高齢者である。したがって、多数の*C. albicans*が骨粗鬆症患者の口腔内に定着している場合は、それがBRONJの発症リスクとなる可能性がある^{8,30,31}。また、BRONJは悪性腫瘍患者が窒素含有BPを静脈注射で投与されている場合に、発症頻度が特に高率となる³²。そして、悪性腫瘍患者の半数以上の口腔内に*C. albicans*が定着しているとの報告があり、その場合には原因微生物となる可能性が高くなる³³。

一方、etidronateはalendronateと異なって窒素を含有しないBPである³⁴。Etidronateは、alendronateによるIL-6産生増強を濃度依存性に抑制した。この結果は、歯周病原性細菌である*Porphyromonas gingivalis*を用いたDengらの報告と同様であった¹⁰。IL-6と同様な炎症性サイトカインであるIL-1 β 産生のalendronateによる増強も、窒素非含有のBPであるclodronateによって抑制されたとする報告がある¹⁸。この理由としては、clodronateがalendronateの細胞への取り込みを抑制すること、あるいはNF- κ BのDNAへの結合を抑制することが考えられている^{10,18,35,36}。今回、etidronateはalendronateのIL-6産生増強作用は抑制したが、MCP-1産生に

は全く影響しないことから、etidronateはalendronateの細胞への取り込みを抑制している可能性が考えられる。

BRONJは窒素含有のBP服用者で起こり、非含有のBP服用者では報告されていない。この理由の一つに窒素含有のBPが、微生物感染に対する宿主の炎症性サイトカイン産生を増強することが考えられる。さらに、窒素非含有のBPでサイトカイン産生抑制作用が認められたことは、窒素含有BPとの併用投与などを行うことでBRONJの発症を抑制する治療法の有用性を裏付けるものである^{18,22,34}。BRONJの治療は困難であることが多く、さまざまな試みが行われている^{32,37,38}。この併用療法は、実現性と安全性が高いものと考えられる。

文 献

- 1) Uludamar, A., Ozkan, Y. K., Kadir, T., Ceyhan, I. : *In vivo* efficacy of alkaline peroxide tablets and mouthwashes on *Candida albicans* in patients with denture stomatitis. *J. Appl. Oral Sci.* **18** : 291-296 2010.
- 2) Gasparoto, T. H., Vieira, N. A., Porto, V. C., Campanelli, A. P., Lara, V. S. : Differences between salivary and blood neutrophils from elderly and young denture wearers. *J. Oral Rehabil.* **38** : 41-51 2011.
- 3) Meurman, J. H., Pärnänen, P., Seneviratne, C. J., Samaranayake, L. P., Saarinen, A. M., Kari, K. : Prevalence and antifungal drug sensitivity of non-albicans *Candida* in oral rinse samples of self-caring elderly. *Gerodontology* **28** : 246-252 2011.
- 4) Kamagata-Kiyoura, Y., Abe, S., Yamaguchi, H., Nitta, T. : Reduced activity of *Candida* detachment factors in the saliva of the elderly. *J. Infect. Chemother.* **10** : 59-61 2004.
- 5) Abe, Y., Ambe, K., Nakagawa, T., Kamata, M., Kiyoura, Y. : Experimental aspiration pneumonia caused by *Candida albicans* in mice. *Jpn. J. Gerodontology* **21** : 188-193 2006.
- 6) 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.
- 7) 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.
- 8) Iwamoto, J., Miyata, A., Sato, Y., Takeda, T., Matsumoto, H. : Five-year alendronate treatment outcome in older postmenopausal Japanese women with osteoporosis or osteopenia and clinical risk factors for fractures. *Ther. Clin. Risk Manag.* **5** ; 773-779 2009.
- 9) 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.
- 10) 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.
- 11) 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.
- 12) Tamai R., Sugiyama A., Kiyoura Y. : Alendronate regulates cytokine production induced by lipid A through nuclear factor- κ B and Smad3 activation in human gingival fibroblasts. *J. Periodontal Res.* **46** ; 13-20 2011.
- 13) Bedogni, A., Bettini, G., Totola, A., Saia, G., Nocini, P.F. : Oral bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaw after implant surgery : a case report and literature review. *J. Oral Maxillofac. Surg.* **68** ; 1662-1666 2010.
- 14) Sedghizadeh, P. P., Kumar, S. K., Gorur, A., Schaudinn, C., Shuler, C. F., Costerton, J. W. : Identification of microbial biofilms in osteonecrosis of the jaws secondary to bisphosphonate therapy. *J. Oral Maxillofac. Surg.* **66** ; 767-775 2008.
- 15) Tanida T., Ueta E., Tobiume A., Hamada T., Rao F., Osaki T. : Influence of aging on candidal growth and adhesion regulatory agents in saliva. *J. Oral Pathol. Med.* **30** ; 328-335 2001.
- 16) 大西淑美, 平岡慎一郎, 木全正彰, 北村龍二 : 専門的口腔ケアが有用であったビスフォスフォネート系薬剤関連顎骨壊死の1症例. *口腔感染* 症誌 **18-2** ; 19-25 2011.
- 17) Tamai, R., Sugiyama, A., Kiyoura, Y. : Effect of nitrogen-containing bisphosphonates on the response of human peripheral blood mononuclear cells and gingival fibroblasts to bacterial components. *J. Oral Biosci.* **52** ; 268-274 2010.
- 18) Shikama, Y., Nagai, Y., Okada, S., Oizumi, T., Shimauchi, H., Sugawara, S., Endo, Y. : Pro-IL-1 β accumulation in macrophages by alendronate and its prevention by clodronate. *Toxicol. Lett.* **199** ; 123-128 2010.
- 19) Tipton, D. A., Seshul, B. A., Dabbous, M. Kh. : Effect of bisphosphonates on human gingival fibroblast production of mediators of osteoclastogenesis : RANKL, osteoprotegerin and interleukin-6. *J. Periodontal Res.* **46** ; 39-47 2011.
- 20) Spooner, C. J., Guo, X., Johnson, P. F., Schwartz, R. C. : Differential roles of C/EBP β regulatory domains in specifying MCP-1 and IL-6 transcription. *Mol. Immunol.* **44** ; 1384-1392 2007.
- 21) Feinberg, M. W., Shimizu, K., Lebedeva, M., Haspel, R., Takayama, K., Chen, Z., Frederick, J. P., Wang, X. F., Simon, D. I., Libby, P., Mitchell, R. N., Jain, M. K. : Essential role for Smad3 in regulating MCP-1 expression and vascular inflammation. *Circ. Res.* **94** ; 601-608 2004.
- 22) 長崎慶太, 玉井利代子, 清浦有祐 : *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 細胞の IL-6 産生に対する alendronate の増強作用と etidronate の抑制作用. *奥羽大歯学誌* **37** ; 85-92 2010.
- 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). *Allogol. Int.* **57** ; 115-120 2008.
- 25) 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.
- 26) 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.
- 27) 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.
- 28) 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.
- 29) 田島毅士, 中塚健介, 中村大輔: ビスフォスフォネート製剤使用による顎骨壊死を生じた無菌顎患者の1例. 愛知学院大学歯学会誌 **47** ; 315-320 2009.
- 30) Marx, R. E., Cillo, J. E. Jr., Ulloa, J. J. : Oral bisphosphonate-induced osteonecrosis : risk factors, prediction of risk using serum CTX testing, prevention, and treatment. *J. Oral Maxillofac. Surg.* **65** : 2397-2410 2007.
- 31) Yoneda, T., Hagino, H., Sugimoto, T., Ohta, H., Takahashi, S., Soen, S., Taguchi, A., Toyosawa, S., Nagata, T., Urade, M. : Bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw : position paper from the Allied Task Force Committee of Japanese Society for Bone and Mineral Research, Japan Osteoporosis Society, Japanese Society of Periodontology, Japanese Society for Oral and Maxillofacial Radiology, and Japanese Society of Oral and Maxillofacial Surgeons. *J. Bone Miner. Metab.* **28** ; 365-383 2010.
- 32) Kikuri, T., Kim, I., Yamaza, T., Akiyama, K., Zhang, Q., Li, Y., Chen, C., Chen, W., Wang, S., Le, A. D., Shi, S. : Cell-based immunotherapy with mesenchymal stem cells cures bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw-like disease in mice. *J. Bone Miner. Res.* **25** ; 1668-1679 2010.
- 33) Schelenz, S., Abdallah, S., Gray, G., Stubbings, H., Gow, I., Baker, P., Hunter, P. R. : Epidemiology of oral yeast colonization and infection in patients with hematological malignancies, head neck and solid tumors. *J. Oral Pathol. Med.* **40** ; 83-89 2011.
- 34) 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.
- 35) Oizumi, T., Yamaguchi, K., Funayama, H., Kuroishi, T., Kawamura, H., Sugawara, S., Endo, Y. : Necrotic actions of nitrogen-containing bisphosphonates and their inhibition by clodronate, a non-nitrogen-containing bisphosphonate in mice : potential for utilization of clodronate as a combination drug with a nitrogen-containing bisphosphonate. *Basic. Clin. Pharmacol. Toxicol.* **104** ; 384-392 2009.
- 36) Töyräs, A., Ollikainen, J., Taskinen, M., Mönkkönen, J. : Inhibition of mevalonate pathway is involved in alendronate-induced cell growth inhibition, but not in cytokine secretion from macrophages *in vitro*. *Eur. J. Pharm. Sci.* **19** ; 223-230 2003.
- 37) Eckardt, A. M., Lemound, J., Lindhorst, D., Rana, M., Gellrich, N. C. : Surgical management of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw in oncologic patients : a challenging problem. *Anticancer Res.* **31** ; 2313-2318 2011.
- 38) Hoefert, S., Eufinger, H. : Relevance of a prolonged preoperative antibiotic regime in the treatment of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw. *J. Oral Maxillofac. Surg.* **69** ; 362-380 2011.
- 著者への連絡先: 清浦有祐, (〒963-8611) 郡山市富田町字三角堂31-1 奥羽大学歯学部口腔病態解析制御学講座
Reprint requests : Yusuke KIYOURA, Department of Oral Medical Science, Ohu University School of Dentistry 31-1 Misumido, Tomita, Koriyama, 963-8611, Japan