Kobe University Repository : Kernel

PDF issue: 2025-05-10

# 実験的骨髄炎に関する研究 : マクロライド剤のサイトカイン(IL-6, IL-1B)に対する抑制効果について

麻柄, 真也
吉位, 尚

(Citation)
神戸大学医学部紀要, 58(1/2/3):77-88

(Issue Date)
1997-12

(Resource Type)
departmental bulletin paper

(Version)
Version of Record

(URL)
https://hdl.handle.net/20.500.14094/00177384

# 実験的骨髄炎に関する研究

## －マクロライド剤のサイトカイン（IL-6，IL-1β）に対する抑制効果について－

神戸大学医学部口腔外科学講座（指導：島田桂吉教授）

麻柄　真也，吉位　尚

（平成9年10月13日）

## 要　約

マウス脛骨に作製した実験的骨髄炎におけるRoxithromycin（RXM）のサイトカイン（IL-6，IL-1β）に対する影響について検討した。接種菌株には，*S.pyogenes*または*S.aureus*を使用した。菌接種後1，3，5，7，14，21および28日目に脛骨を摘出し，骨組織内のIL-6，IL-1βをイムノアッセイ法により測定した。また，*S.aureus*によって作製した骨髄炎に対してRXMを5㎎／㎏の用量で経口投与し，IL-6，IL-1βへの抑制効果についても同様に検討した。その結果は以下の如くである。1）骨髄炎局所におけるIL-6は菌接種後早期に高値を示す一方，IL-1βのピークはIL-6よりも遅れて出現し，かつ持続性がみられた。2）接種菌による比較ではIL-6，IL-1βともに*S.pyogenes*群よりも*S.aureus*群の方が高値を示したが，経日的な推移に差はみられなかった。3）骨髄炎に対しRXMを投与すると，骨組織のIL-6に明らかな低下は認められなかったが，IL-1βではRXMによる抑制効果が認められた。4）骨組織のAl-P活性値は，RXM投与群が非投与群よりも高値を示した。5）組織学的にも，RXM投与群では非投与群よりも炎症巣周囲の化骨反応が促進している傾向が認められた。

これらの結果から，RXMは骨髄炎におけるサイトカインの発現を抑制することによって抗炎症効果を示すものと考えられた。

## Ⅰ．緒　言

瀰慢性下顎骨骨髄炎は口腔外科領域における代表的な慢性感染症であるが，抗菌薬が奏効しないために，これまで一般に外科的療法を主体に治療が行われてきた[1~4]。当科では，審美性や機能を考慮して可及的に病巣を掻爬する術式を採用してきたが，術後に再燃することが多く必ずしも満足できる成績ではなかった[2]。

1987年，工藤ら[5]によって瀰慢性汎細気管支炎（DPB）に対しErythromycin（EM）少量長期投与が有効であることが報告されて以来，本疾患[6][7]のみならず慢性副鼻腔炎，滲出性中耳炎など他の難治性慢性感染症の治療にもマクロライド系抗菌剤が広く用いられるようになってきた[8][9]。そこで，我々も瀰慢性下顎骨骨髄炎に対して14員環マクロライド系抗菌薬であるRXMを用いて長期投与を試みたところ，症例数は少ないものの比較的良好な成績が得られつつある[10)~12)]。

現時点でのマクロライドの抗菌力以外の作用としては，1）細菌に対する効果，2）慢性炎症に対する抗炎症効果，3）気道分泌の抑制効果の3つが挙げられる。1）については，緑膿菌などのエラスターゼ産生抑制[13)]，バイオフイルムの破壊・形成抑制[14)15)]などが報告されている。2）については，好中球の遊走能や活性酸素産生の抑制[16)~18)]，リンパ球の増殖や活性化の抑制[19)~21)]，単球・マクロファージの分化促進[22)]や，種々のサイトカイン産生の抑制[7)8)23)~27)]などが知られている。

特にサイトカインは，骨の吸収や添加など骨改造の調節に大きな役割を果たしている生理活性物質であり[28)~39)]，吸収と硬化の混在する骨髄炎ではその抑制が治癒過程に大きく関わってくるものと推測される。しかし，実際に骨髄炎局所でサイトカインがどのように発現し，またマクロライドによっていかに影響を受けるのかについて検討した報告はみあたらない。そこで，著者らは実験的に作製した骨髄炎モデルを用いて，これらの問題点を明らかにしたいと考えた。

実験的骨髄炎は，作製が簡便で再現性が高く，しかも長期間感染が持続するという理由から，上野ら[40)]の報告した脛骨骨髄炎モデルに準じて作製した。また，

Key words：1. Roxithromycin（ロキシスロマイシン），2. Experimental osteomyelitis（実験的骨髄炎），3. Interleukin-6（インターロイキン6），4. Interleukin-1β（インターロイキン1β），5. Al-P（アルカリフォスファターゼ）

炎症性サイトカインのなかでも，特にIL-6，IL-1βは強力に破骨細胞を誘導し[29)~32)]，骨吸収に強く関与している[33)~38)]と考えられていることから，今回はこれらのサイトカインについて骨髄炎局所における発現状況とRXMによる抑制効果の有無について検討したので報告する。

## Ⅱ．方法

1）実験的骨髄炎におけるIL-6およびIL-1βの推移について

1．脛骨骨髄炎モデルの作製

動物は購入後，恒温（22±2℃），恒湿（55±5％）の条件下で1週間以上飼育した体重約25ｇのICR系マウス（5週令雌，日本クレア）を用い，自由摂餌（CE-2，日本クレア），摂水下に実験を行った。

使用菌株は，*Streptococcus pyogenes* S-8（富山化学工業KKより分与）および*Staphylococcus aureus* E-31461（エーザイKKより分与）である。5％羊保存血液寒天培地（Mueller Hinton Ⅱ Agar）で37℃，20時間の前培養後，トリプトソイブイヨンで$10^8$ cfu／mlに調整した均等菌浮遊液を作製した。

あらかじめ，7.0×4.5cmの木枠を作製し，その長径に沿って3号絹糸を張り渡し，3㎜ごとに目盛をつけておいた。これを滅菌，乾燥した後，前述の菌浮遊液20mlをシャーレにとり，その中に45分間浸漬した（Photo 1）。この間，菌液が絹糸の中に均等に侵入するようにプレートシェーカー上で適度に振動を与えた。これを別のシャーレに移し，吸引ポンプで排気しながらデシケータ中で90分間減圧乾燥した後，3㎜巾にハサミで切断し，滅菌シャーレ中に保存しておいた。

エーテル麻酔下にマウス右脛骨内側部に皮切を加え，骨幹端内側部に23G注射針で骨髄腔に達する孔をあけ，ピンセットで前述の3㎜保菌絹糸を骨髄腔内へ挿入した（Photo 2）。穿孔部を周囲の軟組織で覆うことにより，ほぼ完全に骨髄からの出血および接種菌の漏出は防止できた。皮膚の切創は瞬間接着剤（Aron Alpha）で接着した。

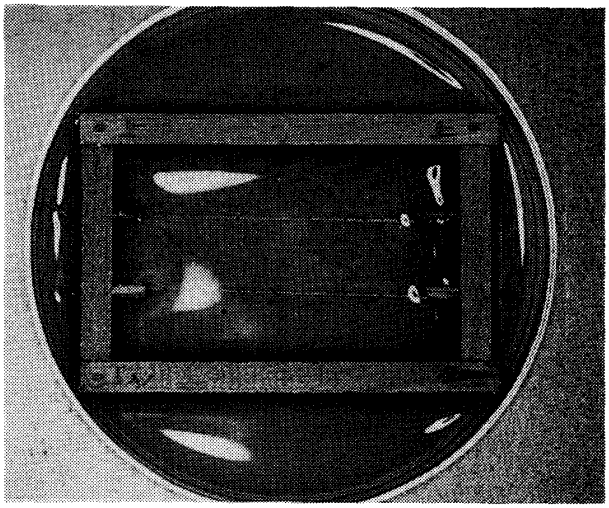

Photo1. The wood frame drawn two silk threads was soaked in trypto-soya broth cultured *S.pyogenes* or *S.aureus*.

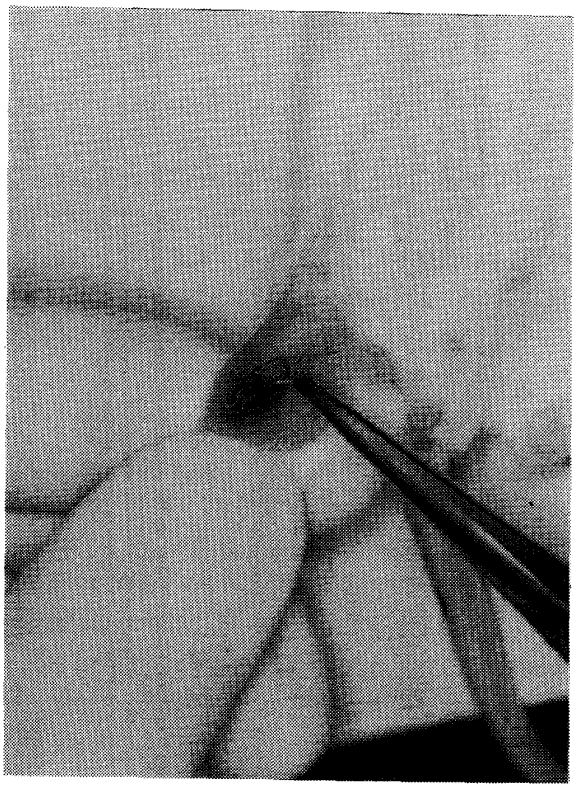

Photo2. Three ㎜ silk thread with *S.pyogenes* or *S.aureus* was inserted into the metaphysis of the right tibia of mice.

2．接種菌数ならびに骨髄内の生菌数測定法

接種菌数については，3㎜巾の保菌絹糸に1mlの生食を加え乳鉢中で十分に磨砕し，生食で10倍の段階稀釈した後，その0.1mlを血液寒天平板上に塗抹して37℃，20時間培養した。翌日，平板上に生じた集落数を数え，稀釈倍数から逆算して接種絹糸中に含まれる生菌数を算定した。

また，骨髄内における生菌数については，菌接種後

7，14，21および28日目に無菌的に摘出した脛骨に，1mlの生食を加えてホモジナイズした後，同様の方法で測定した。

3．IL-6およびIL-1βの測定法

菌接種後1，3，5，7，14，21および28日目の脛骨中のIL-6，IL-1β濃度をイムノアッセイ法により測定し，その推移を検討した。

摘出した脛骨に1／15M PBS（pH7.0）を加えて20倍に稀釈し，これを氷冷しながらホモジナイズした後，遠心分離し（3000×g，4℃，10分間）得られた上清を測定用試料とした。IL-6およびIL-1βの測定にはGenzyme社製ELISA KIT INTERTEST 6-Xおよび1β-Xを使用した。対照群は無菌絹糸を接種した脛骨とし，同様に試料を作製し，測定を行った。

2）マクロライドのIL-6およびIL-1βへの抑制効果について

1．RXMの投与およびIL-6，IL-1βの測定法

RXMのマウス脛骨骨髄炎におけるIL-6およびIL-1βの抑制効果について検討した。

脛骨骨髄炎の作製にあたっては，RXMの抗菌作用を除外するためにMICが100μg／ml以上である*S. aureus*を接種菌株として用いた。

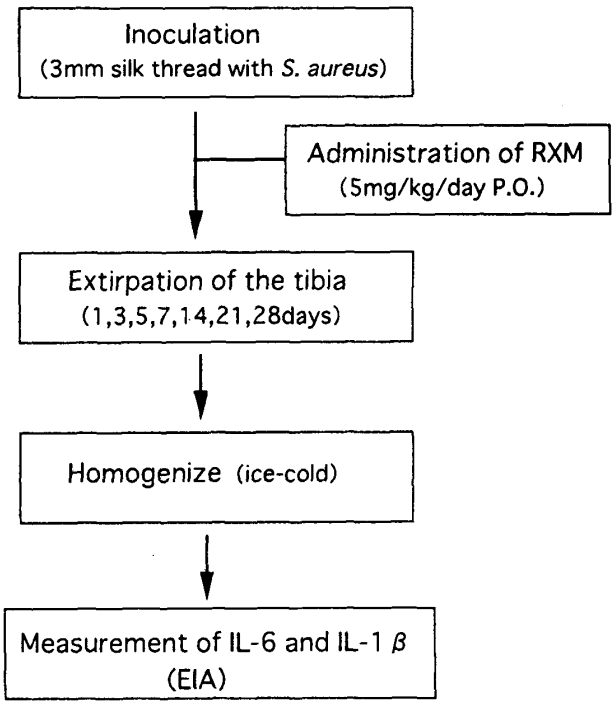


Fig.1 Method（RXM-treated group）

菌を接種した同日より，0.5%カルボキシメチルセルロースに懸濁し0.5mg／mlに調整したRXMを5mg／kgの用量で，1日1回，胃ゾンデ（マウス用経口ゾンデ針0.9×70mm）を用いて28日間経口投与した（Fig. 1）。

投与後1，3，5，7，14，21および28日目に脛骨を摘出し，前述と同様の方法でIL-6およびIL-1βの測定を行い，RXM投与の有無による発現の違いについて検討した。

さらに，各時期において摘出した脛骨の組織切片を作製し，ヘマトキシリン－エオジン染色を行い，病理組織学的にも観察した。

2．アルカリフオスファターゼ（以下Al-P）活性値の測定

病巣部にみられる化骨機転の程度を検索する目的で，Al-P活性の定量を行った。

Al-P活性の定量にはHuggins法[41]を用いた。1，3，5，7，14，21および28日目に摘出した脛骨を秤量した後，3mM $NaHCO_3$を含む0.15M NaCl溶液中で氷冷しながらホモジナイズし，遠沈（2℃，12000×g，15分間）して得られた上清を測定試料とした。0.02Mρ-nitrophenol phosphateを基質液として，波長400nmで吸光度を測定（島津240型分光光度計）し，検量曲線からρ-nitrophenolの濃度（μM／l）を求めた。

尚，得られた結果に対する統計学的処理はStudent's testを用いて検討し，$p<0.05$を有意差ありとした。

## Ⅲ．結　果

1）マウス脛骨骨髄炎モデルにおける生菌数の変化

接種菌数および菌接種後の骨髄炎局所における生菌数変化をTable1に示した。接種菌量は*S. pyogenes*群が平均$4.9\times10^4$ cfu，*S.aureus*群が$4.6\times10^5$cfuであったが，その後28日目までS. pyogenesではおよそ$10^4$～$10^5$cfu，*S.aureus*では$10^5$～$10^6$cfu程度の生菌数が維持されていた。

一方，RXMを投与した場合の*S.aureus*群における生菌数変化については，菌接種後28日間投与を継続しても非投与群との間に差は認められなかった。

2）骨髄炎局所におけるIL-6およびIL-1βの発現

IL-6の推移については，*S.pyogenes*，*S.aureus*群ともに炎症初期の3日目頃までが高く，以後漸減して*S.pyogenes*群は7日目に，*S.aureus*群では21日目に対照群と同程度まで低下した。また，*S. aureus*群は*S.pyogenes*群に比べ2倍程度の高値を

Table 1 The number of bacterium in tibia after inoculation

| | *S.pyogenes* | *S.aureus* | *S.aureus* (RXM+) |
|---|---|---|---|
| at inoculation | $3.5\times10^4$~$7.5\times10^4$ | $3.0\times10^5$~$6.5\times10^5$ | $3.0\times10^5$~$6.5\times10^5$ |
| 7 days | $8.0\times10^4$ ~$1.0\times10^5$ | $1.0\times10^6$ ~$1.5\times10^6$ | $3.0\times10^5$~$5.0\times10^5$ |
| 14 days | $1.0\times10^4$ ~$1.0\times10^5$ | $6.2\times10^5$~$1.9\times10^6$ | $5.2\times10^5$~$9.2\times10^5$ |
| 21 days | $2.0\times10^4$ ~$4.0\times10^4$ | $1.0\times10^5$ ~$2.6\times10^5$ | $2.1\times10^5$~$3.3\times10^5$ |
| 28 days | $1.0\times10^4$ ~$5.0\times10^4$ | $4.5\times10^4$ ~$1.4\times10^5$ | $6.8\times10^4$~$1.6\times10^5$ |

(at inoculation : cfu / one 3mm silk thread, 7~28 days : cfu / one tibia)

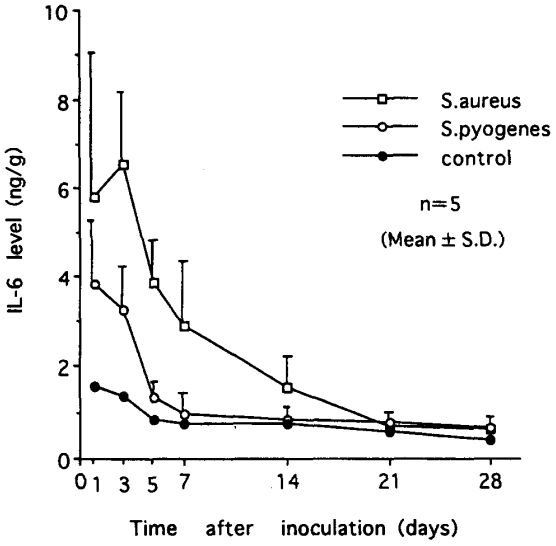


Fig. 2 IL-6 level in osteomyelitis

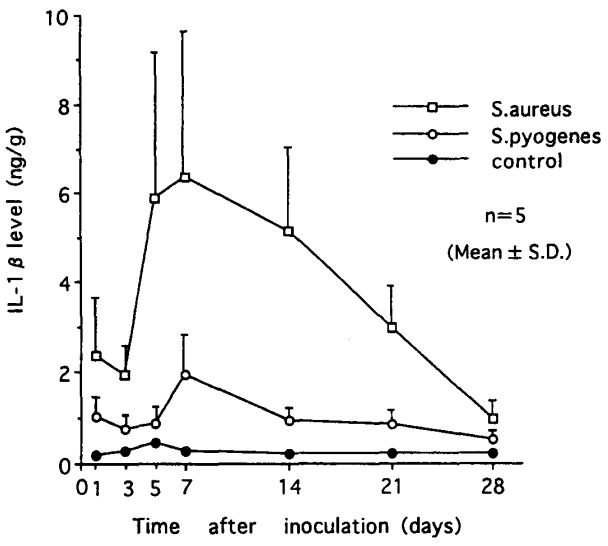


Fig. 3 IL-1β level in osteomyelitis

示したが，経日的な推移の傾向に差はみられなかった (Fig. 2)。

IL-1β のレベルは，*S.pyogenes*, *S.aureus* 群ともに IL-6 よりも遅れて上昇し，そのピークは菌接種後 7 日目にみられた。その後漸減して 28日目には対照群と固レベルまで低下した (Fig. 3)。また，IL-1β も IL-6 同様に *S.aureus* 群の方が高値を示したが，両群の経日的な推移にやはり差は認められなかった。

3) RXM による IL-6 および IL-1β の抑制効果

RXM を *S.aureus* 接種後 28 日目まで連日投与した際の IL-6, IL-1β の推移について非投与群と比較した。

IL-6 については，RXM 投与群の方が全般に非投与群よりもやや低値を示したが，各測定点で両群間に有意差は認められなかった (Fig. 4)。

IL-1β は，RXM 非投与群では 5 日目から 7 日目にピークがみられたのに対して，投与群では 5 日目以後上昇がみられず，28日目まで同程度で推移した (Fig. 5)。統計学的には 7 日目と 14日目において両群間で有意差が認められた ($p<0.05$)。

4）Al-P 活性値について

RXM 投与の有無で，骨髄炎局所の Al-P 活性値の推移を比較した（Fig. 6）。RXM 投与群，非投与群ともにほぼ同様の推移を示したが，RXM 投与群では，非投与群に比べてやや高い値で経過しており，14日目には両者に有意差が認められた（$p<0.05$）。

5）病理組織所見について

*S.aureus* 接種後 3 日目までは，著明に骨髄組織の破壊像がみられ，7 日目には炎症性肉芽組織からなる慢性炎症像が認められた（Photo 3-A）。この時期では，RXM 投与群（Photo 3-B），非投与群（Photo 3-A）ともに炎症病巣での骨新生はほとんどみられなかった。14日目になると RXM 投与群では病巣の周囲に骨形成が認められるようになってくるが，非投与群ではみられなかった（Photo 4-A, B）。

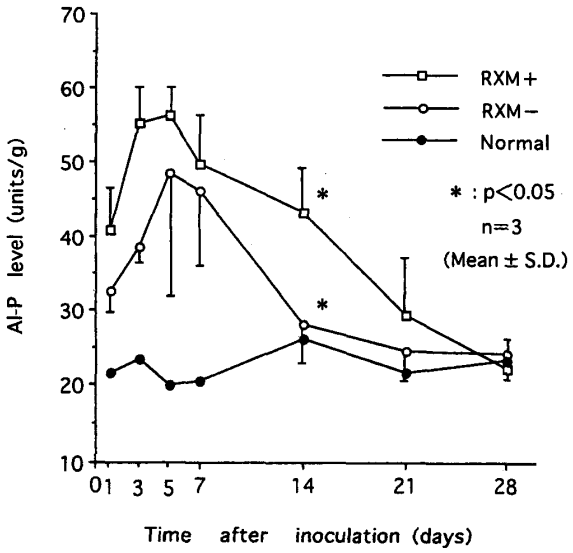


Fig. 6 Al-P level in osteomyelitis

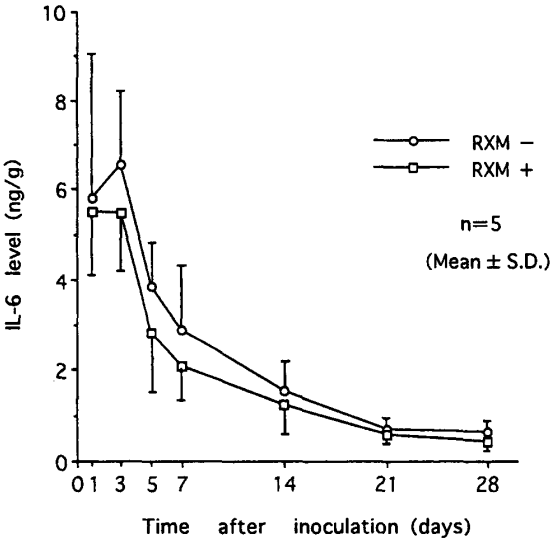


Fig. 4 IL-6 level in osteomyelitis

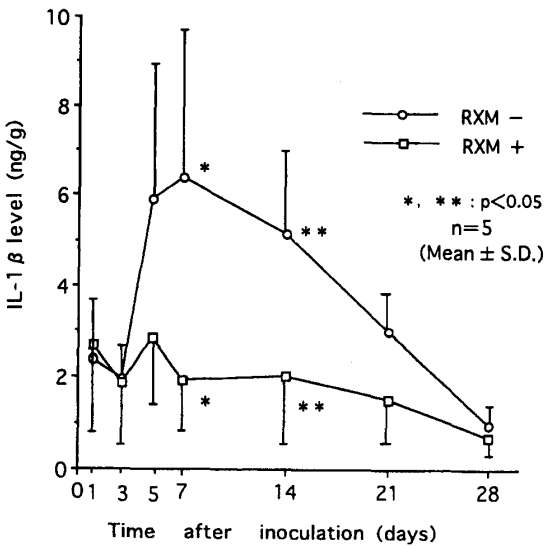


Fig. 5 IL-1$\beta$ level in osteomyelitis

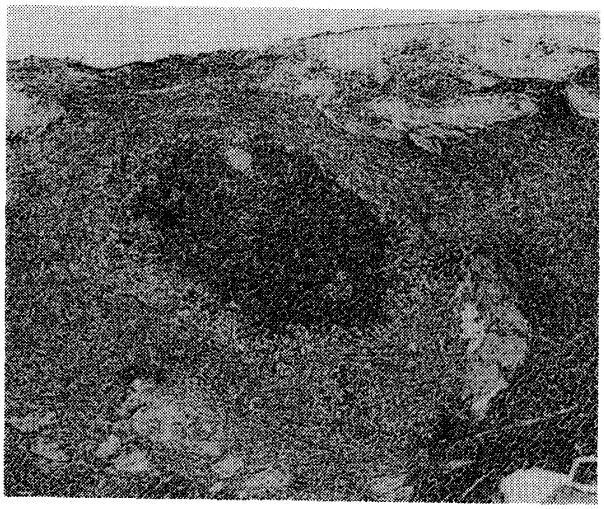

Photo 3-A No treatment group
7 days after inoculation (H.E.,×40)

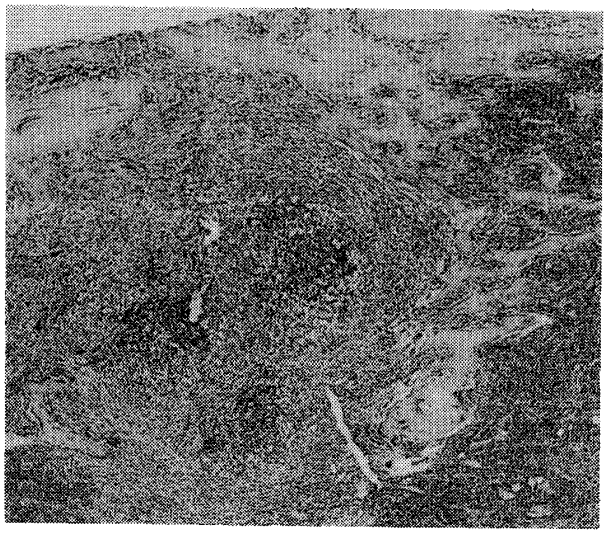

Photo 3-B RXM-treated group
7 days after inoculation (H.E., ×40)

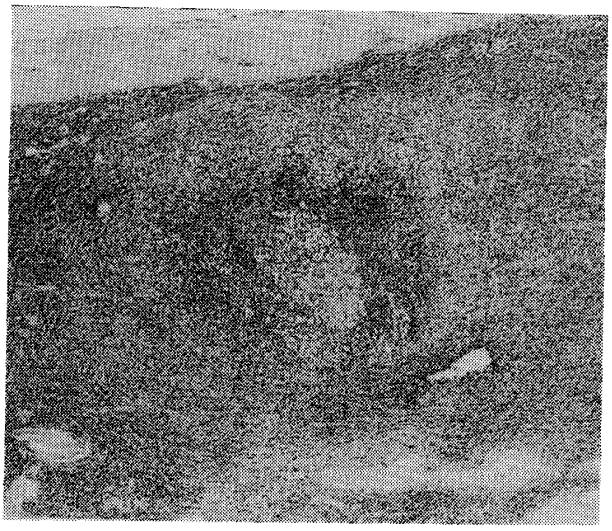

Photo 4-A　No treatment group
14 days after inoculation (H.E., ×40)

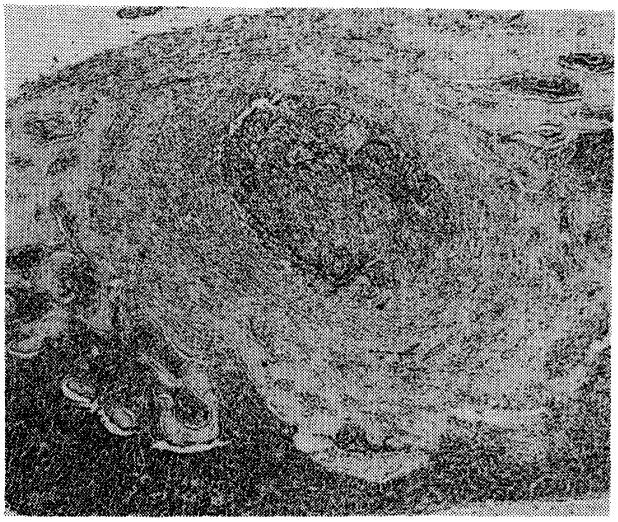

Photo 4-B　RXM-treated group
14 days after inoculation (H.E., ×40)

## Ⅳ. 考　察

瀰慢性下顎骨骨髄炎は，口腔外科領域の最も代表的な慢性感染症であるが，各種抗菌薬が奏効しないため，これまで外科的療法を主体に治療が行われてきた。しかし，術後に何度も再燃を繰り返し，数年から十数年にもわたって持続する難治例が多く，その成績は必ずしも満足できるものではなかった[1)~4)]。特に，骨体部から下顎枝まで広範囲に侵されている症例では，骨体部は治癒しても十分に掻爬できない下顎枝部に病巣が残存し，再燃を繰り返している難治例も多い。この下顎枝部の再燃が難治例における手術療法の問題点である[2)]。

近年，DPBをはじめとする慢性気道感染症に対するマクロライド長期投与の有効性[6)7)]が認められて以来，マクロライドの抗菌力以外の作用が注目されるようになり，他の難治性感染症にも応用されつつある[8)9)]。

我々も瀰慢性下顎骨骨髄炎に対して14員環マクロライド系抗菌薬であるRXMを用いて長期投与を試みたところ，症例数は少ないものの比較的良好な結果が得られ，その成績については既に報告してきた[10)~12)]。

これら難治性感染症に対するマクロライドの作用機序については，まだ疑問な点が多く残されているが，抗菌薬に抵抗性を示すバイオフィルムの破壊・形成抑制など細菌への効果[13)~15)]や，種々の炎症性サイトカインの産生抑制などの抗炎症効果[23)~27)]が知られている。

特にサイトカインは，骨の吸収や添加など骨改造の調節に重要な役割を担っている生理活性物質[28)~39)]であり，骨髄炎ではその発現が治癒過程に大きく関わってくるものと推測される。しかし，実際に骨髄炎局所でサイトカインがどのように発現し，またマクロライドによっていかに影響を受けるのかについては検討されていない。そこで，著者らは実験的に作製した骨髄炎モデルを用いて，これらの問題点を明らかにしたいと考えた。

実験的骨髄炎は，作製が簡便で再現性が高く，しかも長期間感染が持続するという理由から，上野ら[40)]の報告した脛骨骨髄炎モデルに準じて作製した。また，今回はサイトカインのなかでも，特に骨吸収に強く関与すると考えられているInterleukin-6 (IL-6), Interleukin-1β (IL-1β) について，骨髄炎局所における発現状況とRXMによる抑制効果の有無について検討した。

まず，骨髄炎局所におけるIL-6とIL-1βの発現状況について観察したところ，IL-6，IL-1βのレベルはともにコントロールの数倍から十数倍の高値を示した。しかし，IL-6とIL-1βの経日的推移は異なっていた。すなわち，IL-6は菌接種後早い時期にピークに到達したが，炎症の慢性化に伴ってそのレベルは急速に低下していくのに対して，IL-1βのピークはIL-6よりも遅れて出現し，かつ持続性が認められた。

骨髄以外の炎症におけるIL-6とIL-1βの発現に関するこれまでの研究結果をみると，IL-6は急性炎症の推移に応じて発現するとの報告[42)~44)]が多いが，IL-1βについては慢性下気道感染症の気道粘膜でその産生が亢進していたとする報告がみられる[7)]。今回検討した骨髄炎局所におけるIL-6とIL-1βの発現時期も同様の結果であり，IL-6は急性期に，またIL-1βは急性期から慢性期にかけて多量に産生されるようである。

接種菌には，*S.pyogenes* S-8と*S.aureus* E-

31461を使用したが，IL-6，IL-1βともに*S.aureus*群の方が高値を示し，菌種によるサイトカインの発現に差が認められた。*S.aureus*群の方が組織破壊や炎症反応も強いことが想像されるが，この炎症の程度の違いがサイトカインレベルの差に反映されたものと思われる。しかし，菌種は異なってもIL-6とIL-1βの経日的な推移の傾向に差はみられなかった。

次に，RXMによるIL-6，IL-1βに対する抑制効果について検討した。本実験における骨髄炎作製に使用した*S.aureus* E-31461は，RXMのMICが100μg／ml以上の耐性株であるため，抗菌力による影響は無いものと思われたが，実際に菌接種後の骨髄内生菌数を測定しても，菌数の減少は特に認められなかった。

骨髄炎に対しRXMを投与すると，IL-6では軽度の低下がみられたが統計学的には有意差は認められなかった。IL-6に対するマクロライドの影響についての報告は，ヒト正常気管支上皮の培養細胞でEMによるIL-6抑制作用がみられるが[45]，今のところ報告数も少なく今後の検討を待たねばならない。一方，IL-1βにおいては明らかにRXMによる抑制効果が認められた。マクロライドによるIL-1βの産生抑制についての検討は比較的多く，吉田ら[23]は，RXMによって慢性副鼻腔炎患者の鼻分泌液中のIL-1β濃度が低下したと報告し，ヒト末梢血を用いたin vitroの実験ではRXMがIL-1βの産生を抑制したとの報告[24)~26)]がある。これらのIL-1βに対する作用は，我々の結果と一致するものであり，骨髄組織内においてもRXMがIL-1βの産生を抑制することが示された。

IL-1βは，骨改造に関与するサイトカインのなかで，非常に強い骨吸収作用をもつことはすでに述べた通りである。これには，骨髄細胞より破骨細胞を誘導することや，骨芽細胞を刺激してprostaglandin E2（PGE2）の産生を促進すること，collagenaseの産生を助長することなどIL-1βが骨吸収に関与する多くの過程を促進すると考えられている[28)~32)]。また，IL-1βは未熟な骨芽細胞から成熟骨芽細胞への分化を抑えることにより骨形成を抑制しているとする報告もある[39]。骨形成とAl-P活性との関連性[46)~48)]については以前から指摘されているが、黒木ら[39]はIL-1βがヒト骨芽細胞のAl-P活性を抑制したと報告している。従って，RXMによってIL-1βの発現が抑制された場合には，骨吸収が抑制され，相対的に骨添加が促進されるものと考えられる。本モデルにおいても，RXM投与群の方が非投与群よりも高いAl-P活性値を示しており，病理組織学的にも骨形成が促進された所見が確認された。

一方，瀰慢性下顎骨骨髄炎のX線所見は硬化像と吸収像の混在した像が特徴であるが，経過の長い症例ほど全体に硬化像が増強されている。炎症の再燃時には疼痛部位に一致して新たな虫食い状骨吸収像の認められることが多いが，炎症症状の消退に合わせて吸収像が硬化像に変化していくのもX線写真でしばしば観察されることである。このように，炎症の推移に応じて骨破壊と骨添加が交互に進行し，全体として硬化像主体になるものと思われるが，この骨添加は骨髄内に生息する感染巣を封じ込めようとする生体の防御機転によるものとも推測される。

マクロライドの長期投与によって治癒した症例では，このような生体の作用がより増強されているように思われる。すなわち，瀰漫性の吸収像は新たな骨添加により消失し，結果として全般に骨硬化が増強されている。そのためX線的には硬化性骨髄炎のままのように判断される場合もある。

Photo 5に示した症例は，20歳の女性で右側下顎智歯周囲炎を原因とした瀰慢性下顎骨骨髄炎である。病巣は右骨体部から下顎枝まで広範囲にみられるが，RXM投与を開始して2ケ月で症状は消失し，その後3ケ月間継続して投与を終了した。治療後は瀰慢性の骨破壊像は完全に消失したが，顎角部から下顎枝にかけて骨硬化像のかなり増強した所見がみられた。また，Photo 6は50歳の女性で，左側下顎智歯の抜歯後感染が誘因となった瀰慢性下顎骨骨髄炎の難治例である。13年間にわたって各種抗菌薬を投与してきたが，RXMの投与を開始したところ約1ケ月目に症状は軽減し，1年後には炎症の再燃は全くみられなくなった。治療後のX線写真では，やはり左側下顎部の骨硬化は増強しており，新たな骨吸収像もみられなくなった。

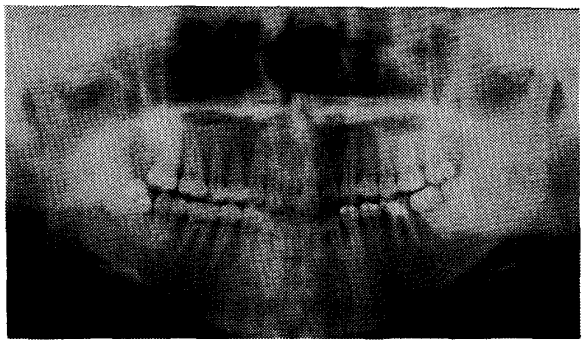

Photo 5-A Panoramic radiograph of a 20-year-old female taken before RXM-treatment showed diffuse radiolucent image in the right mandibular angle and ramus area.

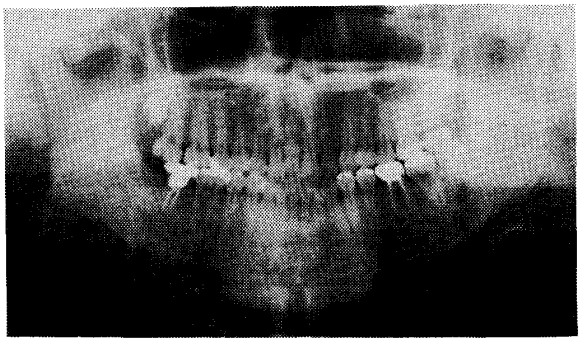

Photo 5-B Sclerotic change in the right mandibular angle and ramus area was observed after treatment.

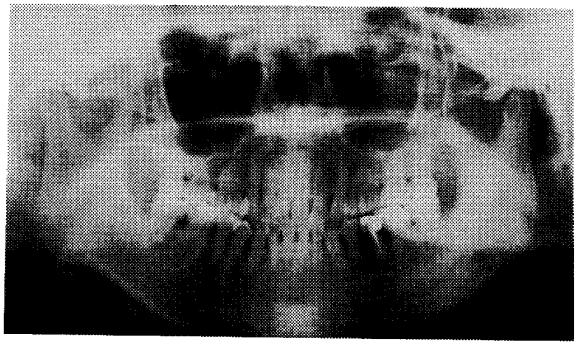

Photo 6-A Panoramic radiograph of a 50-year-old female taken before RXM-treatment showed sclerosis of the left mandible with multiple moth-eaten osteolysis.

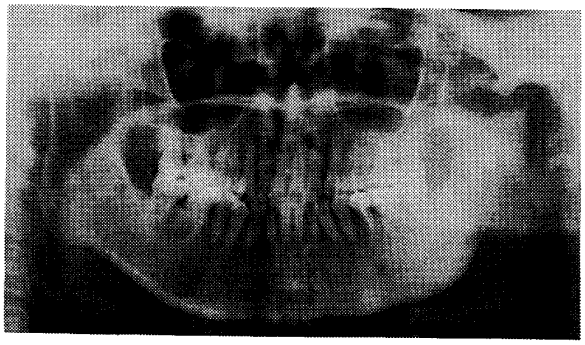

Photo 6-B Remarkable sclerotic change of the left mandible without any osteolysis was seen after treatment, however, the symptoms were completely absent.

このように慢性炎症が抑制されるにつれて骨の添加が亢進するといった生体の防御機転が長期投与における治癒過程であると我々は考えている。従って，今回検討したIL-1βのように強力な骨吸収作用を有するサイトカインがマクロライドによって抑制されることも，本剤が有効に作用する機序として一つの根拠が示されたものと思われる。

ただし，IL-6での抑制がみられなかったことは，他の報告[45]と異なる結果であったが，IL-6が急性炎症の推移と同様に出現することを考慮すると，菌を接種する前からの投与も試みるべきであろう。さらに，投与量や投与回数などの投与方法の違いによる検討も今後の課題である。また，他の薬剤による抑制効果の違いや，骨改造に関連する他のサイトカインについても検討していく必要があるものと考えている。

今後ますます，マクロライドの抗菌力以外の新しい作用機序が解明され，様々な難治性感染症に対してさらに広く応用されていくことが望まれる。

## 謝　辞

稿を終えるにあたり，終始ご懇篤なるご指導とご校閲を賜った神戸大学医学部口腔外科学講座島田桂吉教授に心から感謝申し上げます。また，実験の遂行にあたり，ご協力頂きました感染症グループの諸先生方にもあわせて感謝致します。

本論文の一部は，第39回日本口腔外科学会総会（1993年10月，名古屋），第15回日本歯科薬物療法学会（1996年2月，大阪），第16回日本歯科薬物療法学会（1997年2月，幕張）および第51回日本口腔科学会総会（1997年4月，新潟）において発表した。

## 文　献

1）吉位　尚，吉川朋宏，古土井春吾，桑本聖子，市来浩司，大塚芳基，中尾　薫，島田桂吉：慢性下顎骨骨髄炎に関する臨床的検討－第3報　難治例の外科的療法について－．日口外誌，40：1422，1994.

2）Montonen, M., Iizuka, T., Hallikainen, D., Lindqvist, C.: Decortication in the treatment of diffuse sclerosing osteomyelitis of the mandible. Oral Surg Oral Med Oral Pathol, 75: 5-11, 1993.

3）手島貞一，町田興成，越後成志，斎藤利夫，川村　仁，飯塚芳夫，田中広一，丸茂町子，林　進武：慢性下顎骨骨髄炎の臨床的観察　第1編　臨床統計的考察．日口外誌，24：83-88，1978.

4）浅田洸一：び慢性硬化性下顎骨骨髄炎に関する臨床的・病理組織学的研究．口病誌，45：334-363，1978.

5）工藤翔二，植竹健司，荻原弘一，平山雅清，許　栄宏，木村　仁，杉山幸比古：びまん性汎細気管支炎に対するエリスロマイシン少量長期投与の臨床効果－4年間の治療成績．日胸疾会誌，25：

632-642, 1987.
6）山本正彦：DPBに対するエリスロマイシンの治療効果－二重盲検による検討．厚生省特定疾患「びまん性肺疾患」調査研究班　平成2年度研究報告書，18-20，1991.
7）門田淳一，崎戸　修，河野　茂，阿部　航，白井亮，川上かおる，飯田桂子，森川　透，草野史郎，原　耕平：慢性下気道感染症に対するロキシスロマイシン長期治療－臨床効果とサイトカインにおよぼす影響－．感染症誌，68：27-33，1994.
8）岡本美孝，更級則夫，松崎全成，桃生勝己，松木千加子，東紘一郎，石川和夫，戸川　清，西平茂樹，寺田修久，白鳥浩二，山田昌次，安藤秀樹，相馬譲二，中澤　操，真崎雅和：慢性副鼻腔炎へのロキシスロマイシン療法－単独投与の有効性と作用機序について－．耳鼻臨床，87：997-1005，1994.
9）守田雅弘，原田　保，田村　学，久保　武：滲出性中耳炎へのRXM少量長期投与の効果．耳鼻臨床，89：117-126，1996.
10）麻柄真也，吉位　尚，千田由紀子，藍　恵子，吉岡　歩，山崎隆廣，竹野々巌，中尾　薫，島田桂吉：慢性下顎骨骨髄炎に関する臨床的検討－第4報　難治例に対するマクロライド系抗菌剤の長期連用について－．日口外誌，40：1422，1994.
11）麻柄真也，吉位　尚，美田佳壽彦，吉川朋宏，千田由紀子，古土井春吾，竹野々巌，大塚芳基，中尾　薫，島田桂吉：慢性下顎骨骨髄炎に関する臨床的検討－第5報　薬物療法のみで長期間観察した1難治例について－．歯薬療法，15：221，1996.
12）Yoshii, T., Magara, S., Nakao, K., Shimada, K.: Long term roxithromycin treatment in patients with chronic mandibular osteomyelitis. 19th International Congress of Chemotherapy, July 16-221, 1995, Montreal.
13）増谷喬之，澤木政好，三笠桂一，古西　満，柳生善彦，成田亘啓，播金　収，佐野麗子，宗川義嗣，間瀬　忠，中野　博：Erythromycinによる Pseudomonas aeruginosa の Erastase 産生抑制作用について．感染症誌，63：1212-1214，1989.
14）Kobayashi, H.: Airway biofilm disease: Its clinical manifestation and therapeutic possibilities macrolides. J Infect Chemother, 1: 1-15, 1995.
15）羽柴基之，近藤清隆，小関晶嗣，宮本直哉，馬場駿吉：Roxithromycinの細菌Biofilm産生におよぼす影響．日本耳鼻咽喉科感染症研究会会誌，13：168-174，1995.
16）間宮紳一郎，高木一平，羽柴基之，馬場駿吉，西村　穣：ロキシスロマイシンの好中球機能に与える影響．耳展，38：214-219，1995.
17）Torre, D., Broggini, M., Botta, V., Sampietro, C., Busarello, R., Garberi, C.: In vitro and ex vivo effects of recent and new macrolide antibiotics on chemotaxis of human polymorphonuclear leukocytes. J Chemother, 3: 236-239, 1991.
18）Kamoi, H., Kurihara, N., Fujiwara, H., Hirata, K., Takeda, T.: The macrolide antibacterial roxithromycin reduces bronchial hyperresponsiveness and superoxide anion production by polymorphonuclear leukocytes in patients with asthma. J Asthma, 32: 191-197, 1995.
19）Keicho, N., Kudoh, S., Yotsumoto, H., Akagawa, K. S.: Antilymphocytic activity of erythromycin distinct from that of FK506 or cyclosporin A. J Antibiotics, 46: 1406-1413, 1993.
20）杉山幸比古，北村　諭：肺病変を伴ったSjogren症候群患者の末轄血活性化リンパ球に対するエリスロマイシンの効果．炎症，13：341-344，1993.
21）Mukae, H., Kadota, J., Kohno, S., Kusano, S., Morikawa, T., Matsukura, T., Hara, K.: Increase in activated CD8+cells in bronchoalveolar lavage fluid in patients with diffuse panbronchiolitis. Am J Respir Crit Care Med, 152: 613-618, 1995.
22）Keicho, N., Kudoh, S., Yotsumoto, H., Akagawa, K. S.: Erythromycin promotes monocyto to macrophage differentiation. J Antibiotics, 47: 80-89, 1994.
23）吉田和秀，渡辺徳武，分藤準一，茂木五郎：慢性副鼻腔炎鼻分泌液中サイトカイン濃度に及ぼすロキシスロマイシン（RXM）の影響．耳展，38：290-297，1995.
24）Yoshimura, T., Kurita, C., Yamazaki, F., Shinodo, J., Morishima, I., Machica, K., Sumita, T., Horiba, M., Nagai, H.: Effects of Roxithromycin of proliferation of peripheral blood mononuclear cells and

production of lipopolysaccharide-induced cytokines. Biol Pharmac Bull, 18: 876-881, 1995.

25) 洲崎春海，浅野和仁：ヒト末梢血単核細胞に対するロキシスロマイシン代謝物の作用について．耳展，39：35-40，1996.

26) Arikawa, K.: Suppressive activity of erythromycin in the expression of cytokine mRNA. J Infect Chemother, 3: 33-37, 1997.

27) Konno, S., Asano, K., Kurokawa, M., Ikeda, K., Okamoto, K., Adachi, M.: Antiasthmatic activity of a macrolide antibiotic, Roxithromycin: Analysis of possible mechanisms in vitro and in vivo. Int Arch Allergy Immunol 105: 308-316, 1994.

28) Tawara, T., Shingu, M., Nobunaga, M., Naono, T.: Effects of recombinant human IL-1 $\beta$ on production of prostaglandin E2. Leukotriene B4, NAG, and superoxide by human synovial cells and chondrocytes. Inflammation, 15: 145-157, 1991.

29) Pfeilschifter, J., Chenu, C., Bird, A., Mundy, G. R., Roodman G. D.: Interleukin-1 and tumor necrosis factor stimulate the formation of human osteoclastlike cells in vitro. J Bone Miner Res, 4: 113, 1989.

30) Tamura, T., Udagawa, N., Takahashi. N., Miyaura, C., Tanaka, S., Yamada, Y., Koishihara, Y., Ohsugi, Y., Kumai, K., Taga, T., Kishimoto, T., Suda, T.: Soluble interleukin-6 receptor triggers osteoclast formation by interleukin 6. Proc Natl Acad Sci USA, 90: 11924-11928, 1993.

31) Kurihara, N., Bertolini, D., Suda, T., Akiyama, Y., Roodman, G. D.: IL-6 stimulates osteoclast-like multinucleated cell formation in long term human marrow cultures by inducing IL-1 release. J Immunol 144: 4226-4230, 1990.

32) Ohsaki, T., Takahashi, S., Scarcez, T., Demulder, A., Nishihara, T., Williams, R., Roodman, G. D.: Evidence for an autocrine/paracrine role for interleukin 6 in bone resorption by giant cell tumors of bone. Endocrinology, 131: 2229-2234, 1992.

33) Gowen, M. and Mundy, G. R.:Actions of recombinant interleukin 1 interleukin 2, and interferon-$\gamma$ on bone resorption in vitro. J Immunol, 136: 2478-2482, 1986.

34) Nishihara, T., Ishihara, Y., Noguchi, T., Koga, T.: Membrane IL-1 induces bone resorption in organ culture. J Immunol, 143: 1881-1886, 1989.

35) Kimble, R. B., Hopfer, W., Brownfield, C., Vannice, I. L., Kung, V., Pacifici, R.: IL-1 receptor antagonist (IL-1RA) blocks bone loss in ovariectomized rats by decreasing bone resorption. J Bone Miner Res, 8:122, 1993.

36) Dodge, G. R. and Poole, A. R.: Immunohistochemical detection and immunochemical analysis of type II collagen degradation in human normal, rheumatoid, and osteoarthric articular cartilages and in explants of bovine articular cartilage cultured with interleukin 1. J Clin Invest, 83: 647-661, 1989.

37) Black, K., Garrett, I. R., Mundy, G. R.: Chinese hamster ovarian cells transfected with the murine interleukin-6 gene cause hypercalcemia as well as cachexia, leukocytosis and thrombocytosis in tumor-bearing nude mice. Endocrinology, 128: 2657-2659, 1991.

38) Ishimi, Y., Miyaura, C., Jin, C. H., Akatsu, T., Abe, E., Nakamura, Y., Yamaguchi, A., Yoshiki, S., Matsuda, T., Hirano, T., Kishimoto, T., Suda, T.: IL-6 is produced by osteoblasts and induces bone resorption. J Immunol, 145: 3297-3303, 1990.

39) 黒木健文：ヒト骨膜由来骨芽細胞に対するサイトカインの作用．福岡医誌，85：138-146，1994.

40) 上野博嗣：実験的化膿性骨髄炎に関する研究一時にその作製法を中心として一．日整会誌，48 (5)：291-301，1974.

41) Huggins, C., Morii, S.: Selective adrenal necrosis and apoplexy induced by 7, 12-dimetylbenz(a)antracene. J Exp Med, 114: 741-759, 1961.

42) Steel, D. M. and Whitehead, A. S.: The major acute phase reactants; C-reactive protein, serum amyloid P component and

serum amyloid A protein. Immunol Today, 15: 81-88, 1994.
43) 大賀正一，長嶋貴子，西崎真理，植田浩司：溶連菌感染症におけるサイトカイン，発熱とIL-6の関連性について．臨床体温，14：99-106，1994.
44) Leser, H. G., Gross, V., Scheibenbogen, C., Heinisch, A., Salm, R., Lausen, M., Ruckauer, K., Andreesen, R., Farthmann, E. H., Scholmerich, J.: Elevation of serum interleukin-6 concentration precedes acute-phase response and reflects severity in acute pancreatitis. Gastroenterology, 101: 782-785, 1991.
45) 滝沢　始，大利隆行，伊藤幸治：ヒト気道上皮細胞からの炎症性サイトカインおよびエンドセリンの産生に対するマクロライド剤の作用．Therapeutic Research, 15：4713-4714，1994.
46) 寺延　治：ラットにおける脱灰骨基質による軟骨・骨形成過程の組織学・組織化学的研究．神大医紀，37：1-9，1978.
47) 中尾　薫：慢性下顎骨骨髄炎の基礎的臨床的検討．神大医紀，44：1-26，1983.
48) 伝　春光：慢性下顎骨骨髄炎モデルにおける実験的研究．神大医紀，47：1-16，1986.

# Study on experimental osteomyelitis
## −Suppressive activity of macrolide on cytokine (IL-6, IL-1β)−

Shinya Magara, Takashi Yoshii

Department of Maxillofacial Surgery, Kobe University School of Medicine
(Chief: Prof. Keikichi Shimada)

## ABSTRACT

We investigated the effects of roxithromycin (RXM) on the expression of interleukin (IL)-6 and IL-1β in experimental osteomyelitis of mouse tibia using *S. pyogenes* or *S. aureus*. The level of IL-6 and IL-1β on day 1,3,5,7,14,21 and 28 after inoculation were measured with immunoassay method. The changes of IL-6 and IL-1β level in osteomyelitis by *S. aureus* were estimated after the RXM therapy at a dose of 5mg／kg (P. O.) per day.

The results were as follows: 1) The peak of IL-6 level was observed in 1 to 3 days after inoculation, whereas the level of IL-1β reached its peak in 5 to 7 days and was kept longer than that of IL-6. 2) The level of IL-6 and IL-1β in *S. aureus* group was higher than those in *S. pyogenes* group, however, the change of the level in both group was almost the same. 3) The expression of IL-1β was significantly ($p<0.05$) suppressed in 7 to 14 days by the treatment with RXM, but IL-6 expression was only slightly suppressed. 4) The level of Al-P in RXM-treated group was higher than that in no treatment group. 5) Much more sclerotic change of the bone in the group treated by RXM was observed histologically compared to the control.

These results suggest that RXM acts anti-inflammatory agent by supressing the production of inflammatory cytokine (IL-6, IL-1β) in osteomyelitis.