

東邦大学学術リポジトリ

Toho University Academic Repository

タイトル	Does vitamin D3 prevent the inhibitory effect of vancomycin on osteoblasts ?
別タイトル	ビタミンD3 は、バンコマイシンによる骨芽細胞への阻害効果を防ぐことができるか?
作成者 (著者)	辻, 健太郎
公開者	東邦大学
発行日	2020.03.15
掲載情報	東邦大学大学院医学研究科 博士論文 内容の要旨及び審査結果の要旨. 17.
資料種別	学位論文
内容記述	主査 : 西脇祐司 / タイトル : Does vitamin D3 prevent the inhibitory effect of vancomycin on osteoblasts ? / 著者 : Kentaro Tsuji, Soichiro Kimura, Kazuhiro Tateda, Hiroshi Takahashi / 掲載誌 : Clinical Orthopaedics and Related Research / 巻号・発行年等 : 478(2):420 433, 2020
著者版フラグ	none
報告番号	32661甲第951号
学位記番号	甲第656号
学位授与年月日	2020.03.15
学位授与機関	東邦大学
メタデータのURL	https://mylibrary.toho u.ac.jp/webopac/TD11133052

博士學位論文

論文内容の要旨

および

論文審査の結果の要旨

東邦大学

辻健太郎より学位申請のため提出した論文の要旨

学位番号甲第 656 号

学位申請者 : つじ けん た ろう
辻 健 太 郎

学位論文 : Does vitamin D3 prevent the inhibitory effect of vancomycin on osteoblasts ?

(ビタミン D3 は、バンコマイシンによる骨芽細胞への阻害効果を防ぐことができるか?)

著 者 : Kentaro Tsuji, Soichiro Kimura, Kazuhiro Tateda, Hiroshi Takahashi

公表誌 : Clinical Orthopaedics and Related Research

DOI: 10.1097/CORR.0000000000001060

論文内容の要旨 :

【目的】

脊椎手術を中心に、手術部位感染の予防を目的としたバンコマイシンパウダーの有用性が広く検証されている。しかし、高濃度の局所投与が故に、骨形成の阻害作用が懸念される。また、どの程度の高濃度で、骨形成阻害が生じるかははっきりとしていない。低濃度のバンコマイシンでは、手術部位感染が懸念されるため、骨粗鬆薬で使われる骨形成促進薬の併用薬としての使用は、高濃度バンコマイシンによる骨形成阻害を防ぐ一つの対策となり得る。我々は、骨芽細胞を使用し、バンコマイシンによる骨形成阻害の解析と骨粗鬆症薬として臨床で使用されているビタミン D3 を併用薬として、その有用性について検討した。

【方法】

臨床でのバンコマイシン使用量を想定し、2500、5000、7500 $\mu\text{g/ml}$ のバンコマイシン濃度を設定した。骨芽細胞 (MC3T3-E1) は 10%FBS 入りの α -MEM 培地を用いて 37°C、5%CO₂ の環境下で 72 時間培養し、①バンコマイシンを連続的に投与し、6、24、48、72 時間後の細胞数、細胞形態を評価、②バンコマイシンを添加して 24 時間処理後、バンコマイシンを取り除いて培養を継続し、バンコマイシンを処理してから 1、3、7 日後に細胞数、細胞形態、アルカリフォスファターゼ活性、石灰化について評価した。また併用薬として、0.01 nM のビタミン D3 を使用して同様の評価を行った。遺伝子発現解析には定量的 RT-PCR を用いて評価した。

【結果】

①において、時間依存性・濃度依存性に細胞数が減少した。②からバンコマイシン 2500 および 5000 $\mu\text{g/ml}$ では細胞増殖への影響は限定的だが、バンコマイシン 7500 $\mu\text{g/ml}$ では顕著な細胞障害性を認め、細胞数も有意に低下していた(7日目、control $18.6 \times 10^4 \text{ cells/mL} \pm 1.29 \times 10^4 \text{ cells/mL}$ 、vancomycin at $3.46 \times 10^4 \text{ cells/mL} \pm 0.292 \times 10^4 \text{ cells/mL}$ 、mean difference $-15.1 \times 10^4 \text{ cells/mL} \pm 1.33 \times 10^4 \text{ cells/mL}$ {95% CI, -17.9 to -12.4}; $p < 0.001$)。バンコマイシン 7500 $\mu\text{g/ml}$ の濃度における結果は、この時の骨芽細胞のアルカリフォスファターゼ活性や石灰化も減少していた。一方ビタミン D3 併用群では、バンコマイシン単独群よりも細胞数および細胞障害性が回復した(vancomycin 7500 $\mu\text{g/mL}$; at day 7: vancomycin alone $3.46 \times 10^4 \text{ cells/mL} \pm 0.292 \times 10^4 \text{ cells/mL}$ 、vancomycin + vitamin D3 $10.6 \times 10^4 \text{ cells/mL} \pm 0.900 \times 10^4 \text{ cells/mL}$ 、mean difference $7.13 \times 10^4 \text{ cells/mL} \pm 0.946 \times 10^4 \text{ cells/mL}$ {95% CI, 5.16 to 9.09}; $p < 0.001$)。特にバンコマイシン 7500 $\mu\text{g/ml}$ とビタミン D3 との併用では、アルカリフォスファターゼ活性や石灰化においても、はっきりとした併用効果が確認された。ビタミン D3 は抗菌ペプチドの産生を誘導することが報告されていることから、抗菌ペプチド関連遺伝子の発現を比較したところ、ビタミン D3 との併用において回復する傾向にあった(vancomycin alone 0.885 ± 0.052 、vancomycin + vitamin D3 1.24 ± 0.125 、mean difference 0.355 ± 0.135 {95% CI, -0.020 to 0.730}; $p = 0.058$)。

【考察】

本研究において、臨床でのバンコマイシン使用量を想定した実験を施行し、骨芽細胞に対する細胞障害性を確認することができた。またビタミン D3 は、バンコマイシンによる骨形成阻害を回復するための併用薬として有用であることが確認された。本研究の limitation として、ビタミン D3 は臨床で経口投与しており、創部内にどのようにして投与するか、また今回はビタミン D3 濃度を 0.01nM と限定しており、その他の濃度で検討していないことが挙げられる。今後、更なる検討が必要と考えられた。バンコマイシンの臨床での投与量は、0.5g から 6g と報告されている。骨形成阻害による偽関節の報告はないが、in vitro の研究では、バンコマイシンの骨形成阻害の報告があり、濃度としては、5000 $\mu\text{g/mL}$ であった。本研究では、バンコマイシンを連続投与すると 5000 $\mu\text{g/mL}$ 、7500 $\mu\text{g/mL}$ で、24 時間暴露では、7500 $\mu\text{g/mL}$ で骨形成阻害が生じた。我々の in vitro の研究から、骨芽細胞は、創部内に 3g 以上での長期投与で、細胞毒性が生じることを示した。しかし、バンコマイシンを 24 時間暴露する条件下において、ビタミン D3 を併用すると時間・濃度依存性に細胞増殖を認めた。これは、分化・成熟においても併用効果を見出した。さらにビタミン D3 は、宿主側の抗菌ペプチドの産生を誘導することが報告されていることから、感染予防効果が期待できると考えられた。

【結論】

これまでバンコマイシンの細胞障害性を緩和する薬剤の併用については検討例がなく、バンコマイシンとビタミン D3 の併用薬は、骨形成阻害の有害事象を防ぐ可能性が示された。

1. 学位審査の要旨および担当者

学位番号甲第 656 号	氏 名	辻 健 太 郎
学位審査担当者	主 査	西 脇 祐 司
	副 査	佐 藤 二 美
	副 査	周 郷 延 雄
	副 査	中 川 晃 一
	副 査	内 藤 篤 彦

学位論文の審査結果の要旨 :

手術部位感染予防、とくに脊椎手術、においてバンコマイシンパウダーの有用性が広く検証されているが、一方で高濃度の局所投与による骨形成の阻害作用が懸念される。骨粗鬆薬で使われる骨形成促進薬（ビタミン D3）の併用薬としての使用が、高濃度バンコマイシンによる骨形成阻害を防ぐ一つの対策となり得るのではないかと仮説に基づいて行われた研究である。ここでは、骨芽細胞（MC3T3-E1）を使用し、2500、5000、7500 µg/ml のバンコマイシン濃度を設定した。①バンコマイシンを連続的に投与し、6、24、48、72 時間後の細胞数、細胞形態を評価、②バンコマイシンを添加して 24 時間処理後、バンコマイシンを取り除いて培養を継続し、1、3、7 日後に細胞数、細胞形態、アルカリフォスファターゼ活性、石灰化について評価した。また併用薬として、0.01 nM のビタミン D3 を使用して同様の評価が行われた。遺伝子発現解析には定量的 RT-PCR を用いて評価した。その結果、①において、時間依存性・濃度依存性に細胞数が減少した。②からバンコマイシン 2500 および 5000 µg/ml では細胞増殖への影響は限定的だが、バンコマイシン 7500 µg/ml では顕著な細胞障害性を認め、細胞数も有意に低下していた。バンコマイシン 7500 µg/ml の投与により、骨芽細胞のアルカリフォスファターゼ活性や石灰化も減少していた。一方、ビタミン D3 併用群では、バンコマイシン単独群よりも細胞数および細胞障害性が回復した。特にバンコマイシン 7500 µg/ml とビタミン D3 との併用では、アルカリフォスファターゼ活性や石灰化においても、はっきりとした併用効果が確認された。ビタミン D3 は抗菌ペプチドの産生を誘導することが報告されていることから、抗菌ペプチド関連遺伝子の発現を比較したところ、ビタミン D3 との併用において回復する傾向を認めた。

審査会においては、臨床でバンコマイシンを局所投与する場合の手続き、ビタミン D3 を経口投与した場合どうなるか、どれくらいの期間使用すべきか、実験のバンコマイシン濃度が高すぎないか、分化の抑制に対するビタミン D3 の効果は小さいのではないかと、ビタミン D3 の投与時期についてはどうか、ビタミン D3 併用によりバンコマイシンの抗菌性自体は低下しないか、など多くの質問があり、申請者は自身の研究成果に基づき、適切かつ真摯に回答した。

これまでバンコマイシンの細胞障害性を緩和する薬剤の併用については検討例がなく、本研究においてバンコマイシンとビタミン D3 の併用が、骨形成阻害の有害事象を防ぐ可能性が示されたことは、臨床応用につながる知見として高く評価され、学位授与に十分に値すると審査委員全員の合意が得られた。