

原田 同意見です。私どもも10年以上にわたり、臨床試験を含めて研究してきましたが、期待していたほどその後の成績は良くなりませんでした。2002年以降は、大腿骨頸部骨折を有意に減らしたという論文は1つしか出ていないと思います。アメリカで発表された論文も、同一人の左右どちらかにプロテクターを着けて、反対側をコントロールするという非常にユニークな方法で行ったのですが、有意性がみられなかったということです(JAMA 2007; 298: 413-422)。

これはシートベルトのように運転するときだけ着ければよいというものではなくて、いつ転ぶか分からないとなると1日中着けていなければいけない。年間17~20%の転倒率の方ですと、途中で使わなくなってしまうので成績は出ません。鈴木先生がおっしゃいましたように、介護施設のなかでも特にリスクの高い方など、対象を絞って使用すれば効果が発揮されると思います。

2005年以降、メタアナリシスやシステムティックレビューが4つぐらい出されています。ナースが常駐しているような介護施設——日本ではいわゆる特別養護老人ホームとか老健がこれに該当すると思うのですが、外国ですと高齢者アパートなどナースがいない所も含めて介護施設に入れる形の試験もありますので、ナースが必要なくらい介護度や健康度に問題のある方がいるような施設だけで解析すると、大腿骨頸部骨折が60%減少したという良好な結果が出ています(J Clin Epidemiol 2007; 60: 336-344)。

最近では日本において、大阪市立大学の小池達也先生による672名の大規模試験が論文になりましたが、これによれば、先ほど鈴木先生がおっしゃいましたように、BMIが低く痩せている方、転倒の既往のある方には

非常に有効で、0.37ぐらいの危険率(hazard ratio)だったと思います(Osteoporos Int; online publication)。

ですから、介護施設のなかでもさらに転倒リスク、骨折リスクの高い方に絞って使用すれば有効性は得られるのではないかと思います。製品自体にまだいろいろ問題があることも明らかです。

最近ではエアセルといまして、体重をゆっくりかけていくと空気が逃げてベチャンコになり、逆に急な衝撃に対しては、空気が抜けずに衝撃吸収に働くというものが出てきています。使用時の違和感や抵抗が少ないということで、何種類か開発が進んでいると思います。あとは、たとえばオムツのようなものと組み合わせた構造など、リスクの高い人に適したデザインや素材で開発が進めば、今後の展望も明るくなると思います。

林 ヒッププロテクターについては、対象をしっかりと選択することが必要であり、コンプライアンスを高めるために製品開発の努力がなされているという現状なのですね。

□ 転倒をめぐる医療係争事例について

林 医療機関内での転倒例が増えますと、患者さんとの医療係争が生じると思われます。寺本先生は脳外科領域で医療係争事例を分析しておられますが、転倒による脳内出血で係争に至る事例がみられますか。

寺本 私どもの脳外科の分野では、転倒を巡る医療係争事例には2通りありまして、1つは院内での転倒です。これは、リスクマネジメントに関して最も多い事例ですね。たとえば急性の硬膜下血腫を生じて、それが元で死亡したり、もしくは神経学的な後遺症を残したりということによる係争です。しかし、

このケースでは転倒そのものが明らかですから、それほど大きく争うことはないかと思えます。

もう1つは、慢性硬膜下血腫の見逃しです。これはCTもしくはMRIを行わなかったということが大きいのですが、検査はしたが見逃したというケースも、少数ですがあります。CTでは脳と同じ等吸収像を呈するため、分かりにくいのです。時間の経過につれて脳室などがシフトしてきても、両側性血腫の場合はやはり分かりにくい。こういう場合は、脳の表面にある脳溝の消失に注意しなければいけないのですが、これも見慣れていないとなかなか難しく、見逃してしまうことがあります。

林 専門医であれば、慢性硬膜下血腫は画像で分かるということですね。

寺本 神経内科、脳外科など神経系統の医師は、もちろん見逃すことはありません。

林 画像で明確な診断がつかないときには、専門医の判断を仰ぐといった連携が必要ですね。

脳外科領域で医療係争事例があるように、整形外科領域においても、大腿骨頸部骨折で見逃しがちなオカルト骨折（潜性骨折）に関して起こっていますし、また大腿骨頸部骨折後の経過が良くないことや、転倒したことそのものが係争になる事例もみられています。

□臨床医の先生方をお願いしたいこと

林 転倒・転落は21世紀にはますます増加し、医療にいろいろな面で関与してくると思われそうですが、最後に、専門とする医師の立場から臨床医の先生方にコメントやアドバイスがありましたらお願いいたします。

寺本 何度か申し上げていますが、高齢者

の場合は、軽い頭部外傷でも一度はCTスキャン等を撮っていただきたいということ、メッセージとしたいと思います。

鈴木 臨床の先生方へのメッセージがどうか分からないのですが、2つ申し上げます。

1つは、今後増えてくる認知症への対策です。先ほど原田先生がご指摘されたとおり、認知症自体が転倒のリスクになりますが、この方々に対する有効な手立ては、現在のところありません。たとえばMMSE(mini-mental state examination: 認知機能検査)でも、軽度の人は転倒を予防する可能性があるらしいのですが、重い方にはないということです。これは大きな問題です。

もう1つは、先ほども述べましたビタミンDです。単に転倒だけではなくサルコペニア(加齢と共に起こる骨格筋量の低下)全体に絡んでいたり、それから、これはたぶん虚弱との関わりだと思いますが、要介護認定を申請したかどうかには差が出るというデータもあります。それから、日本ではまだ予備試験の段階ですが、活性型のビタミンDを投与することによって、筋力やバランス能力が上がったというデータも少しずつ出始めていますので、今後注目しておくべきと思います。

原田 在宅医療がどんどん推進されて、地域での家庭医や主治医の先生方が、その地域の高齢者を守る立場になっておられます。繰り返しになりますが、先ほど申し上げました運動器不安定症という概念を、日本は広いですから北海道から沖縄まで、家庭医の先生方が主役になっていただいて、科を問わず、ぜひ広めていただきたいと思っています。

林 本日は転倒・転落に関して、脳外科、整形外科、疫学のお立場から、さまざまなご示唆をいただきました。ありがとうございます。

座談会



一般診療における 高齢者骨粗鬆症の治療

原田 敦
岡本 純明
三木 隆己
岩本 俊彦

株式会社 ライフ・サイエンス

一般診療における 高齢者骨粗鬆症の治療



原田 敦

(国立長寿医療センター機能回復診療部¹⁾部長)

岡本 純明

(医療法人三洋骨研おかもと内科²⁾理事長)

三木 隆己

(大阪市立大学大学院医学研究科老年内科学³⁾教授)

岩本 俊彦 (司会)

(東京医科大学病院⁴⁾院長, 東京医科大学老年病学講座⁴⁾主任教授)

はじめに

高齢者骨粗鬆症治療の意義

高齢者骨粗鬆症の診断と診断における
問題点

高齢者骨粗鬆症患者の標準的な治療法
と問題点

日常生活での骨粗鬆症予防

おわりに

(敬称略、発言順)

収録 ■ 2008年5月29日/東京會館「八千代」にて

- 1) 〒474-8511 愛知県大府市森岡町源吾36-3
- 2) 〒870-0924 大分県大分市牧1-3-15
- 3) 〒545-8585 大阪府大阪市阿倍野区旭町1-4-3
- 4) 〒160-0023 東京都新宿区西新宿6-7-1

はじめに

岩本 本日は「一般診療における高齢者骨粗鬆症の治療」というテーマで、この領域のエキスパートの先生方にお集まりいただきました。

高齢者の骨粗鬆症は、加齢が骨粗鬆症の危険因子であることから、その頻度は非常に多いと伺っていますが、それに対する予防・治療がまだ十分行き渡っていないという調査結果もあります。本当に治療が必要なのか、治療・予防が不十分な場合、どのような転帰が起り得るのかということを含め、治療の意義についてご意見を頂戴します。

高齢者骨粗鬆症治療の意義

原田 骨粗鬆症治療の最大の意義は、いうまでもなく骨折の予防にあると思います。予防の対象となる骨折は、骨粗鬆症の定義通り脆弱性骨折ですが、もう少し広くとらえれば、高齢者の骨折全般が含まれます。それは高齢者になると活動の質と量が縮小しているため、大部分が軽微な外力といわれる転倒が、それ以下の外力で起こる骨折だからです。そのような状況で、骨粗鬆症は、骨折予防を通じて高齢者の自立を支える大きな力となります。

もちろん、骨粗鬆症は生存寿命にも間接的に影響を及ぼします。それは脆弱性骨折の代表である大腿骨頸部骨折と脊椎骨折がそれぞれ生命予後を悪化させるからです。大腿骨頸部骨折の骨折後死亡リスクは、年齢と健康状態を補正しても骨折のない人より2倍以上高く、男性では特に悪化するとされ、脊椎骨折も生命予後を低下させるといわれています。したがって、例えば、アンドロネートが大腿骨頸部骨折を50%減らし¹⁾、リセドロネートが80歳代女性の脊椎骨折を80%減らすというエビデンスがありますので、診療ガイドラインなどに基づく適切な骨粗鬆症治療の効果によって骨折による生存寿命短縮もそれぞれ改善されるものと考えら

れます。

しかしながら、骨粗鬆症治療の真の意義は、それらの生存寿命の延長にあるのではなく、健康寿命の延長にこそあります。健康寿命は、精神的機能と身体的機能の自立の上に十分なQOLが保たれて成り立つものであると思いますが、一方の基礎である身体的機能の自立を支える大きな柱が骨粗鬆症であるのです。

岩本 すべての高齢者に骨粗鬆症に対する予防が必要になるかということが問題になると思うのですが、骨粗鬆症が起っている可能性を臨床面で見抜く手立てがあれば教えてください。

高齢者骨粗鬆症の診断と診断における問題点

岡本 「骨量減少の把握」が骨粗鬆症診断の基本であり、腰椎や大腿骨の骨量に優るような指標は現在でも他にはないと思います。それは診断と治療の最近の歴史をみても明らかです。的確な骨量の指標である「二重X線吸収法(DXA)」による腰椎や大腿骨の測定が1990年頃に可能になるまでは「骨量のピーク」や「閉経後の急激な骨量減少」は確認されていませんでした。特に本邦ではわずか7～8年前まで「骨粗鬆症は生理的老化であり病気ではない」などの意見が強く主張されていました。「病気でないなら治療も不要」となりますが、そのような非常識な意見が消失したのは確実なDXA骨量測定と薬剤の効果確認のお陰です。薬剤治療の効果も腰椎、大腿骨のDXAで初めて判定可能となり、著効のある薬剤の開発につながりました。また個々の患者さんで「治療が効いているか否か」の反応は「X線像では全く判定できない」ということもDXA測定から証明された訳です。

申し上げたいことは骨粗鬆症は「診断さえつけて薬剤を開始すれば終わり」という疾患ではないということです。診断の後に長い年月の治療が続く、薬剤の効果にも大きな個人差があります。治療の反応が判定できない診断の指標では困るということです。これは血圧や血糖の測



図1

定と同じであり、診断をするときには治療反応を知ることができる指標を測定することが必須です。治療前の値なしで薬剤投与を始めてはいけないのは当然でしょう。

私も他院で薬剤治療を数年間も受けていながら「薬剤の効果がほとんど出ていない」しかも「その後のちょっとした服薬のアドバイスで治療の効果が始まる」という患者さんを多く経験しています。大変なことです。この治療の不良は腰椎骨量で経過を観察しさえすればほとんど防げます。その意味で「腕や指の骨量測定」というのは無力です。数百人の平均をとれば、わずかに治療効果の傾向はわかりますが、非常に信頼性が低いのです。現在の骨粗鬆症の治療では全く用いられていません。ましてや個々の患者さんではスクリーニングにおいても価値が低く治療反応の判定はほぼ無理です。

1990年代は骨量測定から多くの知見が出され解析も進みました。ところが2000年代になって「骨量だけではなく骨質が大事だ」という主張が出始めました。骨量減少と骨折の発生に矛盾があり、それは「骨質のため」という発想です。しかし、現実には診断に使うことが可能な「骨質の指標」は全くありません。そこでリスクファクターが登場してリスクのある方を治療しようという動きがあります。「年齢」とか「痩せ」、「酒、タバコをのんでいるか否か」などのリスクで骨粗鬆症の治療開始を決めようという一種のブームです。しかし、私は、それは非常に危ない風潮だと思っています。高血圧でも糖尿病でも血圧、血糖などの正確な指標をとらえます。酒やタバコをのむか否かで「血圧や血糖が高くても治療をしない」ということはしません。しかも現在、本邦の骨量の診断

基準は世界一低い値なのです。日本での骨減少症例のほとんどが日本以外の国では「治療をすぐ始めるべき骨粗鬆症」となります。

リスクファクターの「痩せ」がなかったら「骨減少症を治療しない」などの判断は非常に非科学的です。信頼性の低い腕や踵の測定によるスクリーニングよりもなお悪い要素をなぜ使うのか、私は、そのような論議は止めて、まず腰椎や大腿骨の測定を重視して治療反応を観察すること、骨折を正しく読影し見つけること、この2つが先決で重要だと思います。

私は10年以上前から強調しているのですが、骨粗鬆症と変形性脊椎症(脊椎OA)は対極の疾患ではなく密接に関連し合併しています。骨質論のもとになった「骨折と骨量の矛盾」は骨粗鬆症に合併する脊椎OAの存在に気がつかないところから多くは起こっています。骨粗鬆症の骨折の後には高率に変形性脊椎症が起こります。骨折がないようにみえる方でも、椎体の終板や関節面に多発性の穿孔が起こり、ここに軟骨が陥入します。骨と骨の間隔が狭まり、変形性脊椎症や変形性関節症(OA)を発症するのです(図1)。脊椎以外の膝などのOAの改善にも骨粗鬆症治療薬は有効ということで、アメリカやヨーロッパでは既に治療も始まっています。

高齢者の生活一般を改善していく上で、骨粗鬆症の骨量の変動や、椎体の骨折、変形に関しては、合併しているOAを認識した上で観察を深めるのが基本ではないでしょうか。

岩本 一般医家でも、腰が痛い、背中が痛い、腰が曲がったということで来られた患者さんに対しては骨粗鬆症を疑って、そういった検査が行われているかと思います。



はらだ あつし
原田 敦先生

昭和52年名古屋大学医学部卒業、同57年名古屋大学医学部整形外科医員、同助手、講師を経て平成元年国立療養所中部病院整形外科医長、同13年9月～同16年3月厚生労働省健康局国立病院部併任、同16年国立長寿医療センター機能回復診療部長、現在に至る。



日本整形外科学会(専門医、代議員)、日本脊椎脊髄病学会(指導医)、日本老年医学会(評議員)、日本骨粗鬆症学会(評議員)、日本リハビリテーション医学会(臨床認定医)、転倒予防医学研究会(世話人)

研究活動：骨粗鬆症、転倒予防、バイオメカニクス、脊椎・脊髄外科

岩本 では、検査をするきっかけとなる危険因子、所見などがあれば、教えてください。

三木 骨折を予防するには、骨折のリスクのある人を骨粗鬆症だと診断し、治療することです。今までは、骨密度と骨折の有無で診断をしていました。最近では、骨折の生じるリスクにも注目が集まっています。

骨粗鬆症の検査をするきっかけの1つは身長低下です。3cmも低下すると、骨粗鬆症の可能性がかなり高くなります。一般には2cmぐらいが境界ではないでしょうか。

骨粗鬆症に伴う骨折の家族歴がある方や、少しの外力による骨折歴がある方は、骨粗鬆症と

しての検診・検査を、腰痛の有無にかかわらず、受けるべきだと思います。

岩本 必要な検査は、先ほどのDXAと単純X線でもよろしいでしょうか。

三木 脊椎のX線検査は必須です。一般の開業医の先生が、脊椎のX線検査なしで骨粗鬆症を診断するのは無茶だと思います。X線さえあれば、診断は可能ではないかと思いますが、ただし、科学性を高めるには、骨密度測定も必要になります。

どの骨密度を測るかということが問題となりますが、腰椎骨密度を測定すると、治療効果が判断できるので便利です。しかし高齢者の場合、腰椎の変形で評価が難しいのです。見かけ上、骨密度が高く測定されてしまうため、大腿骨での測定が必要になります。大腿骨近位部の骨密度測定は診断には高齢者においても役立つのですが、治療しても骨密度が急激に上昇するわけではないので、短期間で治療効果を見ることは難しいと思います。

骨密度の測定は手指でもよいと考えます。Microdensitometry(MD)法、Radiographic Absorptiometry(RA)法などの主に皮質骨が優位な部位ですが診断には問題ありません。

最も普及している超音波については、今のところ基準がありません。

骨粗鬆症の鑑別診断には、血液検査は欠かせません。特に副甲状腺機能亢進症を併発している場合もありますので、血液検査するときはカルシウムとリン、高齢者の場合にはみかけ上の血清異常もあることから、補正カルシウム値が必要となり、アルブミンあるいは総蛋白濃度の測定も必須だと思います。同様に高齢者では、腎機能低下の問題もありクレアチニンも重要になってきます。

尿中のカルシウム、リン、クレアチニンも尿細管の副甲状腺に対する作用を推測することができます。

岩本 その他、骨代謝マーカーなどが保険適応となりましたが、その点についてはいかがですか。

三木 骨代謝マーカーは骨粗鬆症を診断するた

めには全く役に立ちません。骨粗鬆症と診断した後、治療しようか、すまいかと迷うときに骨代謝マーカーを測定し、骨代謝が非常に亢進していれば積極的に治療を行い、あまり亢進していなければ治療を後回しにするというような判断の1つには使えます。

骨代謝マーカーは治療効果の判断に使えます。ただし、治療予定のない骨粗鬆症患者さんの骨代謝マーカーを測定しても意味はありません。代謝マーカーを測定し、骨粗鬆症の診断や鑑別診断をするのも間違いだと思います。

岩本 その他に、こういう症状、所見があれば骨粗鬆症を疑ってかかるというものがあれば、教えていただきたいのですが。

原田 「痩せ」も骨粗鬆症を疑わせる重要な症候です。痩せている方は、脂肪量や筋肉量だけでなく骨量も少なくなっていることはよく知られています。WHOが最近、臨床リスクから10年間の骨折発生率を予測して、骨粗鬆症治療開始の決定をする骨折リスク評価ツール(FRAX)の提唱をしたことは医学界に大きなインパクトを与えています。そこでは骨密度値がなくても、体重と身長から計算されるBody Mass Index(BMI)があれば、骨折発生率が推定できることが示されています。このことから、患者さんに「痩せ」がみられれば、骨粗鬆症の評価を行う大きな理由になると考えられます。

さらに、腰痛を訴える高齢者、特に女性の場合は、新しい椎体骨折や陳旧性の骨折による後彎変形などが疼痛の原因となっていることが多く、骨粗鬆症が基礎疾患になっていることが少なくないので、骨粗鬆症の評価のきっかけとすることは有用で、その際、脊椎のX線撮影をしてその評価をすることはとても重要だと考えます。

既存骨折の評価が骨粗鬆症の重要な項目ですので、脊椎のX線所見は、その診断時に欠かせないものです。話がずれますが、治療効果の判定にも大きな意義をもっています。つまり、骨密度の増減にかかわらず、形態骨折にせよ、臨床骨折にせよ、脊椎X線写真上に新しい骨折が生じなければ、骨粗鬆症治療はうまくいっ

おかもと すみあき
岡本 純明 先生



昭和44年長崎大学医学部卒業、米国防空軍病院にてインターン研修後、長崎大学第一内科入局、講師、医局長、助教授、講師会会長を勤め、平成6年おかもと内科開業、同9年医療法人三洋骨研おかもと内科設立、理事長就任、同14年大分医科大学(現 大分大学医学部)第一内科臨床教授拝命、現在に至る。

日本内分泌学会(代議員)、日本骨代謝学会、日本骨形態計測学会、日本骨粗鬆症学会(評議員)

現在の研究領域：

骨粗鬆症に続発するOAの三次元CT解析
骨粗鬆症指標としての椎体終板穿孔
シュモール集合を基礎とする椎体骨折判定基準
姿勢矯正下腰椎骨量測定

ていると考えることができます。薬剤治療をコンプライアンスよく続けた患者さんでも骨密度が低下してしまうことはよくありますが、そのとき骨密度測定と同時に脊椎X線撮影をして新たな骨折はないことが確かめられれば、治療はうまくいっていると励ますことができるので、患者さんのモチベーション維持にも大きな効果をもたらします。

岩本 X線での骨折の有無、骨密度の若年者平均(Young Adult Mean: YAM(%))で判断されるような指針を一般医家の方も使われているかと思います。そこで、X線での診断のコツを教えてください。

脊椎椎体骨折	8.6
大腿骨頸部骨折	6.7
橈骨骨折	1.0

図2 骨折の生存に対する危険率(文献3より改変引用)

生存に対する危険率は頸部骨折より椎体骨折の方が高い。

2. 骨折の画像診断のコツ

岡本 今まで骨折の中で大腿骨頸部骨折が最も生命を脅かし最も怖いといわれてきたのですが実は椎体骨折が生命リスクの中で最大であると報告されました(図2)¹⁾。薬剤投与についても椎体骨折が1個あれば、骨量の多少にかかわらず骨粗鬆症の治療対象とする考え方はISCDなどで国際的には10年以上も前から勧められています。すなわち他のリスクファクターなどよりもはるかに椎体骨折の診断が重要なのです。ところが現在の椎体骨折の診断は極めて粗雑であり診断基準も不良です。まず椎体の中央が杯状に陥凹するのですが、本来、指導すべきリーダーにその理解が欠けています。未だに中点ポイントインテイングが行われています。読影力の低いリーダーから次の世代へ誤りが再生産されて伝わるという現状があります。骨折線の見落としや椎体縁との混同が非常に多いのです。特に脊椎OAの背後にある骨折はほとんど見落とされています。立体的な椎体解剖を理解した上での読影の訓練がまず第1です。またそのためにも椎体をきちんと正しい方向から撮影をする工夫が大事です。現在胸腰椎のX線は姿勢を考慮せずに、いわゆるブラインドで撮影されています。ところが、まっすぐに立っていても、脊椎の椎体は前後に傾いたり、横にも側弯や回旋の形で傾いているのです。これでは椎体の骨折の判定は極めて難しいのです。

しかも、椎体骨折が起こる機序については、意外にも今まであまり考察されておりません。

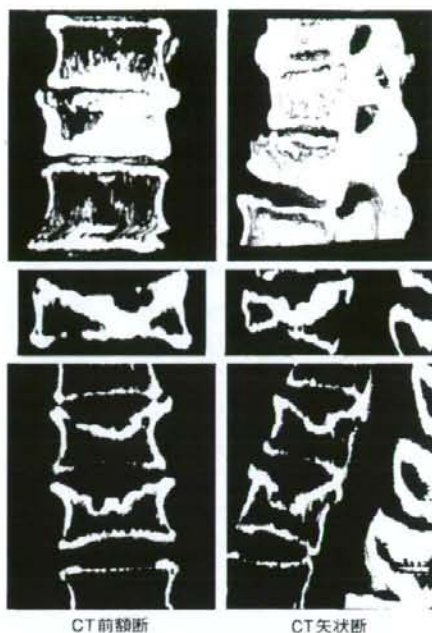


図3 椎体骨折に平坦な陥凹はほとんどない

当科の骨粗鬆症外来でCT施行した1,340例の三次元解析では、椎体骨折の99%でシュモール結節と終板穿孔の集合を認めた。シュモール結節は椎体骨内への椎間板ヘルニアであるが、ほとんどすべての椎体骨折は広義のシュモールと終板穿孔の集合であり、椎体骨内への椎間板ヘルニアといえる。

私どもは魚椎型骨折の本態は、椎間板の軟骨が椎体骨の中へ脱出陥凹したものと考えて発表しました。楔状椎骨折は椎体の縁同士による圧迫から生じますが、その場合も骨内への脱出陥凹の集合をほとんど全例に認めます。椎間板の髄核(図3)がヘルニア脱出により、椎体に入り込んだものはシュモール結節と呼ばれます。骨折椎体は立体CTで眺めると、多発した穿孔と、その周囲が硬化してはじめて認識されるシュモール結節の複合なのです。

病理で認められるシュモール結節を生前のX線と対比した報告では臨床での診断率は約1/300と大変に低いのです。ここに示した図3の骨折線をみれば姿勢補正をしないX線写真での読影率が0.3%に近いことも、よくご理解

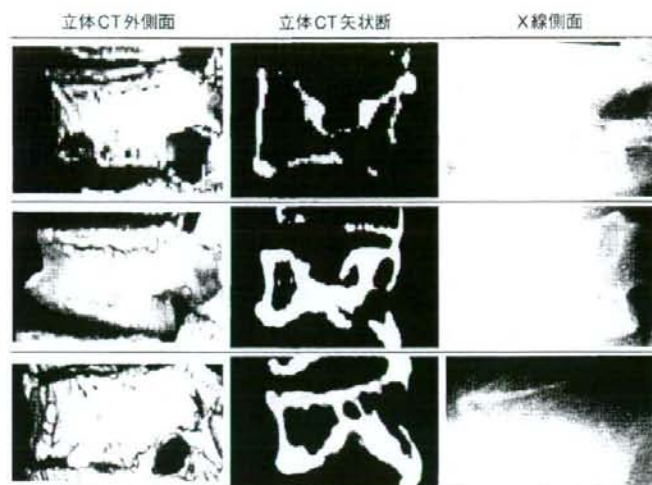


図4

いただけるでしょう。かなり大きなシュモール結節の場合でも、図4に示したように模様のようにしかみえません。特に、周りに脊椎OAがあると、見落とされる率が高いのです。しかし、注意さえすればX線でも読影可能な例は多いのです。高齢者では、脊椎OAと、骨粗鬆症の合併がほぼ全例に認められます。しかし、軟骨の骨内への陥入を見つけようと考えてX線を撮らない限り、その危機を察知することはできません。

岩本 YAMの数値で70%、80%といわれていますが、その判断基準でよろしいのでしょうか。

3. 治療の開始基準

三木 YAM 70%で治療を開始する、しないという問題ではないと思います。あくまでも統計学的手法にて決めただけです。骨密度だけでなく、骨折歴、年齢、家族歴などのリスクファクターを併せて総合的に治療するかを決定します。

最近、10年間の骨折がどれくらい出るかという簡単なソフトがインターネットで利用できるようになりました。極端な場合、年齢と身長と体重を入れればわかるのです。日本では骨密度を測るというのは一般的なので、骨密度を加

えるとさらに精度は高くなります。実際にそのリスクを基に、治療するかしないかを決めることが望ましいと思います。ただし、骨粗鬆症かどうか診断できていない患者さんに、骨折のリスクのみで治療開始するのは問題ではないかと考えます。

岩本 一般医家の先生方は、治療に踏み切るかどうかというところで非常に悩まれて、混乱を生じているかと思っています。

三木 そうですね、そこが一番の問題です。

岩本 治療が必要になった場合、標準的な治療法についてお話しいただき、その中で何か問題点があれば触れていただきたいと思います。

高齢者骨粗鬆症患者の標準的な治療法と問題点

① 高齢者の標準的な治療法

三木 標準的な治療法は、年齢によって変えないとはなりませんが、高齢者については、骨折が一番の問題になります。大腿近位部骨折を防止する必要があります。そのためにはっきりしたエビデンスがあるのは、アレンドロネート、リ



みき たかみ
三木 隆己 先生

昭和 48 年大阪市立大学医学部卒業。同 55 年米国ウイスコンシン大学留学。同 59 年大阪市立大学医学部第二内科助手。平成元年大阪市立大学医学部第二内科講師。同 5 年大阪市立大学大学院医学研究科老年内科学助教授(同老年内科・神経内科副部長)。同 19 年大阪市立大学大学院医学研究科老年内科学教授(同老年内科・神経内科部長)。現在に至る。



日本内科学会(認定医、指導医、評議員)、日本老年医学会(指導医、評議員)、日本骨代謝学会(評議員)、日本骨粗鬆症学会(評議員、監事)、日本骨粗鬆症財団(評議員)など

現在の研究領域：

- (1) 骨粗鬆症の病態評価と病態に基づいた治療法の確立
- (2) アルツハイマー病の早期診断と治療

セドロネートの 2 種類です。これらを第 1 選択薬にすることが基本だと思います。

特にアレンドロネートの場合は、骨吸収抑制作用が強いですから、高齢者の場合には、ビタミン D やカルシウムを併用した方がよいケースがあります。

ビスホスホネート系薬剤が使えない場合は、ラロキシフェンまたはビタミン D を用います。特に、もの忘れがあり空腹時に飲めない場合には、ラロキシフェンやビタミン D の方が使いやすいと思います。

岩本 高齢者ですと、認知症の問題、脊柱変形による逆流性食道炎などの問題がありますが、その点で何かアドバイスはございますか。

三木 今、ビスホスホネート系薬剤は週 1 回薬剤が主流になっています。ですから、介護の方、家族の方が週 1 回だけでも本人のところに出向き薬を飲ませる、介護施設でも週に 1 回であれば面倒をみてくれるようになってきていると思います。

ただし背骨が極端に曲がっている方は逆流性食道炎の問題がありビスホスホネートの投与には慎重であるべきだと思います。

岩本 何かビスホスホネート薬剤の問題点はございますか。

原田 ビスホスホネートは骨折リスクの高い後期高齢者に一番使いたい薬剤です。その意味で脆弱性骨折の治療のために整形外科を訪れた後期高齢者は最もよい適応と思いますが、痛みや虚弱のために朝服用後 30 分坐位を保持できないなどで使用できないことが少なくなく、合併することの多い認知症も服薬状況を悪くします。ラロキシフェンも不動の状態では使えませんので、結局、ビタミン D 製剤やカルシトニンを使用することが多くなります。

950 名程度の脆弱性骨折の治療のために入院している患者さんが、どの程度骨粗鬆症の治療を受けていたかを、全国 7 施設で調べたことがあります。受傷前に骨粗鬆症が治療されていたのは 12% で、これも大変低率ですが、退院時にも 20% までしか上がらず、1 年後には 11% と元に戻ってしまうという結果でした。調査対象になった患者層は、次の骨折リスクが大変に高く、ビスホスホネートをできるだけ使いたいと考えるのですが、うまく処方できていない、継続できていないという実態でした。実際まだ痛くて坐位が長くとれないような時期には処方できず、そのまま次の施設へ移ってしまうという状況があります。これは急性期治療終了後の回復期、慢性期にわたって骨粗鬆症治療の病診連携、病院介護施設連携がうまくいっていないことが主な要因と思いますが、地域連携バスに骨粗鬆症治療を定着させる努力が一層必要と感

ています。

さらに、整形外科が治療を終えてしまうと、通院をやめてしまい、服薬を中止する場合も多く、老年科を中心とした地域で主治医をされる内科の先生方がビスホスホネートやラロキシフェンなどの骨粗鬆症薬剤を積極的に使用していただけるとよいかと思います。

岩本 治療が必要だと診断されながら、実際なかなか治療が思うようにいかないという高齢者が大勢いらっしゃるかと思うのですが、そういった方たちに実際に治療を受けていただいて、それが長期にわたって継続できるような工夫をされていらっしゃいますか。

岡本 私どもは、腰椎、大腿骨の両方の骨量、すなわちベッドタイプの骨量を測定しており、その数値をフォローして、患者さんと相談をします。これが長期治療を達成するにはベストと思っています。たとえば高血圧の方で血圧測定をせずに薬を投与し続けたら患者さんは不安になり半年もしないうちに脱落するでしょう。確実な治療反応は治療継続への何よりの励みだからです。また励みになるものが何もない場合、腰の痛みが取れば服薬を中止してしまうという方もおられます。

腰椎と大腿骨の骨量を測定すると、骨粗鬆症治療薬が本当に効いていることが、はっきりとわかります。服薬方法の指導に特別な工夫をすれば、骨量も顕著に上昇します。腰椎や大腿骨の骨量測定こそが長く治療を続けるキー・ポイントです。

ところで、今までの報告をみますとビスホスホネートを処方した場合、1カ月で脱落率が20%、6カ月で50%という施設もあります。この原因の1つとして、副作用への恐怖があると思います。院外処方の場合、薬剤師が丁寧に服薬指導する中で、消化器系などの副作用を過剰に強調なさることがあります。ビスホスホネート製剤を怖い薬と思って、捨ててしまうのではないのでしょうか。実は消化器系の副作用は大規模スタディで既に否定されています¹⁾。ビス

いわもと としひこ
岩本 俊彦 先生



昭和47年東京医科大学卒業、同年東京医科大学病院内科・老年病学教室臨床研究員、同52年助手、同57年脳血管研究所美原記念病院内科勤務、同62年 Montefiore Medical Center 神経病理部門研究出張、東京医科大学老年病学教室講師、平成5年助教授、同16年主任教授、同19年東京医科大学病院院長、現在に至る。

日本老年医学会(指導医、認定医、評議員)、日本神経学会(専門医)、日本脳卒中学会(評議員、専門医)、日本老年精神医学会(専門医)、日本脈管学会(評議員)など

現在の研究領域: 高齢者脳血管障害の発症機序とその制御、脳血管障害からみた老年症候群の成り立ち、認知症の診断と治療

ホスホネートの消化器症状は薬剤そのものではなく、早朝の飲水と不安の誘導から起こると考えています。私どもの服薬指導では消化器系の副作用がほとんど起こりませんが、この服用法によって薬剤の効果も高まるので少し紹介します。

服用の際の指導では、まず前の晩の食べ物や食道にも歯にも口腔内にも残っているので、歯磨き粉をつけずに歯磨きをします。よくうがいをした後、コップ1/3程度の水(10cc程度の少量の水を6秒おきに5回程度)を飲んでいただき食道や胃を洗浄します。その後、コップ1/3の水で薬剤を飲んでいただきます。さらに薬剤を飲んだ後に5~10分おきに少量の水を5回

ほど飲んでいただくのです。これは逆流性食道炎の症状の改善にも役立つのです。また服用後に注意をしない場合、飲まず食わずで30分過ぎられる方が多いのです。時に、朝食の最初に牛乳を一気飲みする方がいますが、服用後30分で牛乳を一気飲みすると、薬剤の効果が激減するのです。お茶で効果が落ちた例も経験しました。当院では、週に1回のことですから、可能でしたら食事まで1時間30分あけていただくように指導しています。その間に薬剤が溶けた後に胃から送り出されるように水を小まめに飲んでいただいています。この方法で薬剤の効果は著しく上がります。

日常生活での骨粗鬆症予防

岩本 今、お話しされた薬物療法以外に、日常生活の中で骨粗鬆症の進行を抑制できるような指導がありましたら、教えていただけませんか。
三木 薬は服用開始6~12カ月程度は治療効果が判断しやすいのですが、その後の効果が判断しにくくなります。そのときに、運動を頑張ってください。骨を増やすには、いまの段階では一番運動がいいのです。定期的に運動してください。と励ましています。ただ、あまり漠然としているとわからないので「散歩でいいですよ、ただし普通に歩くのではなく、前の人を追い抜くようなスピードで10分間歩いて、それを週3回やってください」といっています。

岩本 食事の面での注意点はありますか。

三木 科学的なエビデンスは十分なサプリメントを飲んでいる患者さんがいらっしやいます。「おいしかったらよいですよ、でも、あまりおいしくないのに高いお金を払ってまでやるのもよく考えてくださいね」といっています。

また、骨が悪いからということ、カルシウムを摂りすぎている方がいます。高齢者をずっと診ていて、最初は原発性骨粗鬆症だと思っていたのですが、数年後、カルシウム値が上昇し、いつの間にか副甲状腺機能亢進症が出てきたというケースがあります。このようなことから、

血液や尿のカルシウムを定期的に測ってもらうように指導をしています。

岩本 お酒、タバコ、コーヒーなどの嗜好品はいかがなのでしょう。

三木 高齢者に禁酒やコーヒーを止めてもらうのは楽しみを奪うようなものです。「お酒を1合程度なら大丈夫です。2合以上飲むと認知症がくるかもしれないから、1合ぐらいにしておいてください」「コーヒー2~3杯ならどうぞ、ただしコーヒーを飲むのなら、十分牛乳を入れて飲んでください」というような指導をしています。嗜好品に関しては、年齢を考えるとあまり強い制限はしていません。

岡本 私は未治療の骨粗鬆症の方には「運動をむしろ控えめに」といっています。寝たきりや無重力状態では不動性骨粗鬆症といわれるとさらに骨粗鬆症が進むのですが「逆は真ならず」です。「運動で骨粗鬆症がよくなる」というのは大変な誤解です。もし運動と日光で骨粗鬆症が治るのならば農村漁村で1日中、日焼けして労働に従事する方は骨粗鬆症がどんどんよくなるはずですが、実際には骨折もOAも多発します。日本人の大腿骨の骨折は意外にも沖縄など南の日照が長い所に多く、逆に北の雪国では骨折がはるかに少ないのです。これは米国でも同じです。北よりも南で日照が長く運動時間が長いほど骨折が多いのです。この点からも腰椎骨量を測定せずに、思いこみで「運動が一番」と勧めるのは大変に危険です。特に腰痛があるときに我慢して運動をするというのは絶対にやってはいけないことと説明しております。膝の悪い方で炎症の極期に階段昇降などを勧めてはならないのと同じです。薬剤治療が効いてくるまで運動を控えめにしても「日常生活で買い物や家事をするだけである程度の負荷がかかっている」ので寝たきりの方は別として不動性の影響は小さいのです。逆に1時間以上のウォーキングや重症の骨量減少があるのにストレッチや重りをつけての強いリハビリ運動などで骨折する方は非常に多く見受けられます。骨量は診察やX線では判定できません。運動メニューを考える場合も、その前にまず「腰の骨量」を測って低け

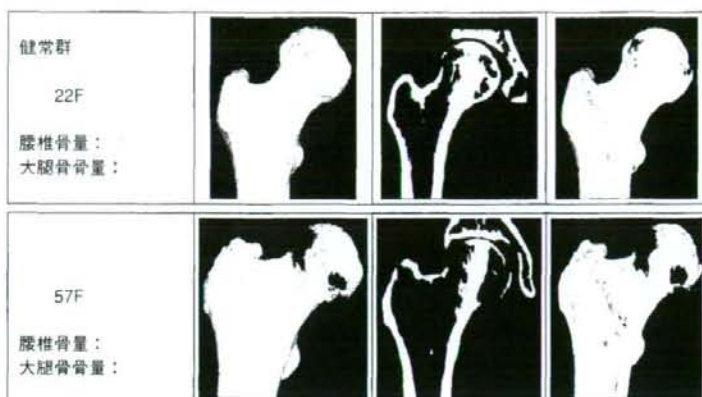


図5

大腿骨の三次元CT像を若年健常女性と比較すると骨粗鬆症女性では骨頭下の骨皮質の消失と主応力骨梁の相対的硬化が顕著である。

れば「半年以上、ビスホスホネート系薬剤などの治療」を受けた後に、少しずつ運動量を増やしていくべきかと思っています。

岩本 転倒のことも含めて、原田先生、いかがでしょうか。

原田 運動療法には確かにそれ自身が転倒・骨折を引き起こすことはないとは思いませんが、やはり、患者さんの運動機能と行われた運動プログラムのミスマッチが問題を起こすのだろうと考えます。患者さんの運動機能をよく評価してそれに合ったメニューを考へてあげれば、そういうことは防げると考えます。そのような配慮をしながら、転倒予防のための運動と骨密度改善のための運動を薬剤治療の有無にかかわらず行うことは非常に大事なことだと思います。

全国の整形外科医2,000名ほどを調査したことがありますが、彼らが高齢者の骨折を予防することに関して、一番有効だと考えていたのは転倒予防策、2番目が運動療法、3番目が骨粗鬆症の薬剤でした。これほど整形外科医は運動を重要視している理由は、扱う高齢者の骨折のほとんどが転倒事故であるため、まず転倒を防ごう、そのためには転倒予防策や運動だと考えるからだだと推察しています。老年科の先生方にも運動療法を少しでも取り入れて下さればと思

います。

岡本先生のおっしゃるように、やり方によっては転倒事故のリスクが伴います。しかしながら、例えば、開眼片足立ち訓練を行う場合であれば、虚弱な方は、最初は両手でつかまりながら片足立ちを始めさせ、慣れてきたら徐々に時間を延ばし、次に片手でつかまりながら行うように変えていきます。この運動で下肢筋力・バランスが改善し、わずかかもしれませんが、大腿骨頸部の骨密度も増えることが期待され、患者さんに薦めています。

この片足立ち訓練は、転倒者数を減らすというエビデンスがあります¹。大腿骨頸部骨折の80~90%、脊椎骨折の50%程度は転倒によるものです。骨折の引き金を引かさないという考えを骨粗鬆症治療にうまく活かしていくことは重要ではないかと考えております。

岡本 10年ほど前には転倒の頻度がWHOでリスクファクターに挙げられていたのですが、今ははずされました。なぜかといえば、500~1,000回の転倒について1個の骨折発生という頻度の低さが示されたためです。運動というのはダブルブラインドの検証が不可能なのですが、転倒防止対策の効率が疑問視されてきたのです。何よりも転倒しても折れないような薬剤治療が

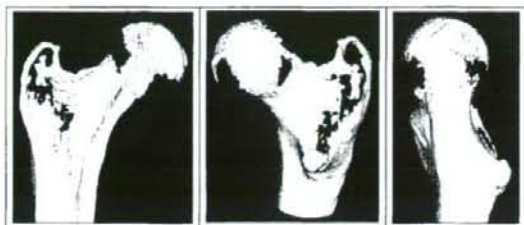


図6

骨粗鬆症女性の大腿骨の三次元CTでは転子間の骨皮質に連続した穿孔像を認める。骨頭下の骨皮質の消失と主応力骨梁の相対的硬化も認められる。

第1とされています。また椎体骨折は「大腿の挙上運動」でも起こります。大腿骨を挙上する大腿筋の起始が第十二胸椎から第二腰椎だからです。すなわち大腿挙上運動の繰り返しで腰椎は強く下方に引かれ椎体骨折も起こります。腰痛体操をやって腰痛が起こるといった皮肉な例も多く経験しました。私は転倒防止の筋トレよりも、繰り返しの大腿挙上を控え、「前屈運動」の草取りや「重い物の持ち上げ」などを禁じる注意の方が、よほど有効と思います。

特にまた薬剤治療なしで運動負荷をした場合には骨粗鬆症患者においてはOAの方を進行させて、みかけ上の骨量増加が起こります。大腿骨の立体CTを示します(図5)。骨頭下部の吸収が強くなると、中央のprimary median trabeculaで支えることになります。Adams Archとも呼ばれるところですが、皮質骨の吸収消失により負荷の分布が変わりキノコ状、あるいは蛇の頭状に中央部で支えることになってしまいます。中央部の骨梁が過剰に増加しても負荷が加わると外側が折れたり変形してしまいます。

転子部骨折についても、骨折線にあたるところに皮質骨の穿孔が起こります(図6)。ビスホスホネートの投与では、本来の皮質骨の回復によって内部のOAにあたる骨梁過剰硬化の減少が起こるのです。ですから、骨折線にあたる部分の骨喪失がはっきり出ている方で、運動を行うということは大腿骨においても骨折の危険が加わるだけでなく、内部のOA硬化が進み、骨量が増えるようにみえるのです。本来はつくべ

きでない内側について、外部の皮質骨が抜けるという悪循環が観察されるのです。ビスホスホネートの投与では骨粗鬆症から起こる不安定性の改善が最も効果的な治療法になります。

このようなことから、大腿骨頸部骨折予防だけでなくOAの進行防止にも、ビスホスホネート系薬剤がベストだと考えます。

岩本 運動の量や質など、まだ検討しなくてはならない点がありますね。

おわりに

岩本 本日は、高齢者の骨粗鬆症について、一般医家の先生方にもわかりやすく、また、明日からの診療にも役立つようなお話をいただきたいということで、それにはどのような検査・治療が必要か、具体的にその場合にどのようなコツや問題点があるかを教えていただきました。

本日はいろいろと有用な情報を提供していただき、ありがとうございました。

文献

- 1) Wells GA et al : Alendronate for the primary and secondary prevention of osteoporotic fractures in postmenopausal women. Cochrane Database Syst Rev Jan 23(1) : CD001155, 2008.
- 2) Boonen S et al : Safety and efficacy of risendronate in reducing fracture risk in osteoporotic women aged 80 and older : implications for the use of antiresorptive agents in the old and oldest old.

- J Am Geriatr Soc **52** : 1832-1839. 2004.
- 3) Cauley JA et al : Risk of mortality following clinical fracture. Osteoporos Int **11** : 556-561. 2000.
 - 4) Bauer DC et al : Upper Gastrointestinal Tract Safety Profile of Alendronate : The Fracture Intervention Trial. Arch Int Med **160** : 517-525. 2000.
 - 5) Sakamoto K et al : Effects of unipedal standing balance exercise on the prevention of falls and hip fracture among clinically defined high-risk elderly individuals : a randomized controlled trial. J Orthop Sci **11**(5) : 467-472. 2006.

p70 S6 kinase negatively regulates fibroblast growth factor 2-stimulated interleukin-6 synthesis in osteoblasts: function at a point downstream from protein kinase C

S Takai¹, Y Hanai^{1,2}, R Matsushima-Nishiwaki¹, C Minamitani^{1,3}, T Otsuka³, H Tokuda^{1,2} and O Kozawa¹

¹Department of Pharmacology, Gifu University Graduate School of Medicine, Gifu 501-1194, Japan

²Department of Clinical Laboratory, National Center for Geriatrics and Gerontology, National Hospital for Geriatric Medicine, Obu 474-8511, Japan

³Department of Orthopedic Surgery, Nagoya City University Graduate School of Medical Sciences, Nagoya 467-8601, Japan

(Correspondence should be addressed to O Kozawa; Email: okozawa@gifu-u.ac.jp)

Abstract

We have previously reported that protein kinase C negatively regulates basic fibroblast growth factor (FGF-2)-stimulated synthesis of interleukin-6 (IL-6), a potent bone resorptive agent, in osteoblast-like MC3T3-E1 cells. To further clarify the mechanism underlying the synthesis of IL-6 in osteoblasts, we investigated whether p70 S6 kinase is involved in the FGF-2-stimulated IL-6 synthesis in these cells. Rapamycin, an inhibitor of p70 S6 kinase, significantly enhanced the FGF-2-stimulated IL-6 synthesis in a dose-dependent manner. Downregulation of p70 S6 kinase by siRNA markedly amplified the FGF-2-stimulated IL-6 synthesis. 12-O-Tetradecanoylphorbol-

13-acetate (TPA), a direct activator of protein kinase C, induced the phosphorylation of p70 S6 kinase. Go6976 and bisindolylmaleimide I, inhibitors of protein kinase C, suppressed the TPA-stimulated phosphorylation of p70 S6 kinase. Additionally, protein kinase C inhibitors markedly reduced the phosphorylation of p70 S6 kinase induced by FGF-2. These results strongly suggest that p70 S6 kinase functions at a point downstream of protein kinase C and limits the FGF-2-stimulated IL-6 synthesis in osteoblasts.

Journal of Endocrinology (2008) **197**, 131–137

Introduction

Interleukin-6 (IL-6), which is a multifunctional cytokine that has important physiological effects on a wide range of functions such as promoting B-cell differentiation, T-cell activation, and inducing acute phase proteins (Akira *et al.* 1993, Heymann & Rousselle 2000, Kwan *et al.* 2004), is one of the most potent osteoclastogenic factors (Ishimi *et al.* 1990, Roodman 1992, Akira *et al.* 1993, Kwan *et al.* 2004). Bone metabolism is strictly regulated by two functional cells, osteoblasts and osteoclasts, responsible for bone formation and bone resorption respectively (Nijweide *et al.* 1986). Bone resorption may be enhanced by the increased local production of inflammatory cytokines such as tumor necrosis factor- α and interleukin-1. In osteoblasts (Helle *et al.* 1988, Ishimi *et al.* 1990, Littlewood *et al.* 1991), it has been reported that bone resorptive agents such as tumor necrosis factor- α and interleukin-1 stimulate the synthesis of IL-6. Thus, accumulating evidence indicates that IL-6 secreted from osteoblasts plays a crucial role as a downstream effector of bone resorptive agents.

Osteoblasts synthesize basic fibroblast growth factor (FGF-2), and FGF-2 is embedded in bone matrix (Baylink *et al.* 1993, Hurley *et al.* 1993). It is well known that FGF-2 expression in osteoblasts is detected during fracture repair (Bolander 1992).

Therefore, there is no doubt that FGF-2 plays a crucial role in fracture healing, bone remodeling, and osteogenesis (Marie 2003). We have previously reported that FGF-2 autophosphorylates FGF receptors 1 and 2 among four structurally related high-affinity receptors in osteoblast-like MC3T3-E1 cells (Suzuki *et al.* 1996). As for IL-6 synthesis in osteoblasts, we have shown that FGF-2 induces IL-6 synthesis in osteoblasts (Kozawa *et al.* 1997a). In addition, we have reported that FGF-2 induces IL-6 synthesis via the activation of p38 MAPK, but also limits the over-synthesis of IL-6 via the activation of protein kinase C pathways (Kozawa *et al.* 1997a, 1999). However, the exact mechanism underlying the IL-6 synthesis in osteoblasts remains to be clarified.

It is well recognized that p70 S6 kinase is a mitogen-activated serine/threonine kinase, which is required for cell proliferation and G1 cell cycle progression (Pullen & Thomas 1997). In osteoblasts, it has been shown that fluoroaluminate upregulates p70 S6 kinase phosphorylation (Susa *et al.* 1997). We have previously reported that p70 S6 kinase plays a role as a negative regulator in platelet-derived growth factor BB-stimulated synthesis of IL-6 in osteoblast-like MC3T3-E1 cells (Takai *et al.* 2007a). With regard to FGF-2 effect on osteoblasts, we recently demonstrated that FGF-2 induces the activation of p70 S6 kinase in osteoblast-like MC3T3-E1

cells, and the activated p70 S6 kinase plays an inhibitory role in the FGF-2-stimulated release of vascular endothelial growth factor (VEGF) through upregulation of stress-activated protein kinase/c-Jun N-terminal kinase, composing a negative feedback loop, in osteoblasts (Takai *et al.* 2007b). However, the exact role of p70 S6 kinase in osteoblasts has not yet been fully elucidated.

In the present study, we investigated whether p70 S6 kinase is involved in the FGF-2-stimulated IL-6 synthesis in osteoblast-like MC3T3-E1 cells. We here show that p70 S6 kinase activated by FGF-2 negatively regulates IL-6 synthesis at a point downstream from protein kinase C in these cells.

Materials and Methods

Materials

Recombinant human FGF-2 and mouse IL-6 enzyme immunoassay (ELISA) kit was purchased from R&D Systems Inc. (Minneapolis, MN, USA). Rapamycin, bisindolylmaleimide I, Go6976, and calphostin C were obtained from Calbiochem-Novabiochem Co. (La Jolla, CA, USA). 12-*O*-Tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA) was purchased from Sigma Chemical Co. Phospho-specific p70 S6 kinase antibodies were purchased from Cell Signaling Inc. (Beverly, MA, USA). Enhanced chemiluminescence (ECL) Western Blotting Detection System was purchased from Amersham Biosciences. Control short interfering RNA (siRNA; Silencer Negative Control no. 1 siRNA) or p70 S6 kinase siRNA (Silencer Pre-designed siRNA, siRNA ID no. 75849, 75755, and 75942) was purchased from Ambion (Austin, TX, USA). siLentFect was purchased from Bio-Rad. Other materials and chemicals were obtained from commercial sources. Rapamycin, TPA, bisindolylmaleimide I, Go6976, and calphostin C were dissolved in dimethyl sulfoxide. The maximum concentration of dimethyl sulfoxide was 0.1%, which did not affect the assay for IL-6 or western blot analysis.

Cell culture

Cloned osteoblast-like MC3T3-E1 cells derived from newborn mouse calvaria (Sudo *et al.* 1993) were maintained as described previously (Kozawa *et al.* 1997b). Briefly, the cells were cultured in α -minimum essential medium (α -MEM) containing 10% fetal calf serum (FCS) at 37 °C in a humidified atmosphere of 5% CO₂/95% air. The cells were seeded onto 35 mm (5 × 10⁴) or 90 mm (5 × 10⁵) diameter dishes in α -MEM containing 10% FCS. After 5 days, the medium was exchanged for α -MEM containing 0.3% FCS. The cells were used for experiments after 48 h. Primary cultured osteoblasts were obtained from the calvaria of newborn (1 or 2 days old) balb/c mice as described previously (Yoshida *et al.* 2004). The cells were seeded onto 90 mm diameter dishes (25 × 10⁴ cells) in α -MEM containing 10% FCS. The medium was changed every 3 days until the cells

reached confluence. Then, the medium was exchanged for α -MEM containing 0.3% FCS. The cells were used for experiments after 48 h.

IL-6 assay

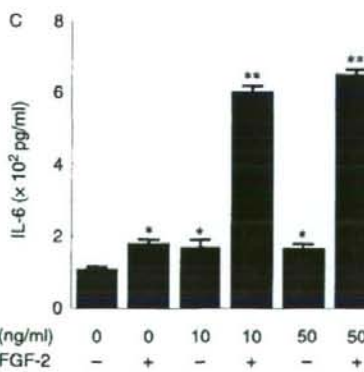
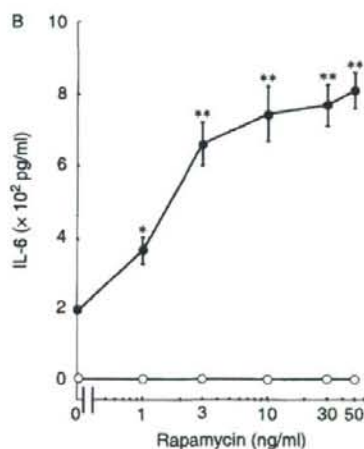
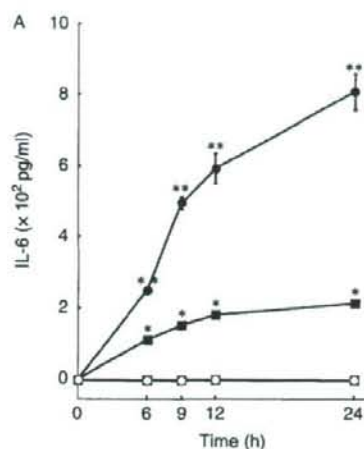
The cultured cells were stimulated by various doses of FGF-2 in 1 ml α -MEM containing 0.3% FCS for the indicated periods. When indicated, the cells were pretreated with rapamycin for 60 min. The conditioned medium was collected at the end of the incubation, and the IL-6 concentration was measured by ELISA kit according to the manufacturer's instruction. The assay kit can detect the mouse IL-6 in the range between 7.8 and 250 pg/ml. When the samples generate values greater than 250 pg/ml, the samples were adequately diluted with calibrator diluent provided with the kit and re-assayed. The absorbance of ELISA samples was measured at 450 nm with EL 340 Bio Kinetic Reader (Bio-Tek Instruments Inc., Winooski, VT, USA).

Short interfering RNA transfection

To knock down p70 S6 kinase in MC3T3-E1 cells, the cells were transfected with control siRNA (Silencer Negative Control no. 1 siRNA) or p70 S6 kinase siRNA (Silencer Pre-designed siRNA, siRNA ID no. 75849, 75755, and 75942, Ambion) using the siLentFect (Bio-Rad) according to the manufacturer's protocol. In brief, the cells were seeded onto 35 mm (1 × 10⁵) diameter dish in α -MEM containing 10% FCS and subcultured for 48 h. After that, the cells were incubated at 37 °C for 48 h with 250 nM siRNA-siLentFect complexes. As a result, we confirmed that siRNA ID no. 75849 had a most prominent effect to silence the p70 S6 kinase among these three siRNAs. The siRNA ID no. 75849 caused ~80% reduction in the p70 S6 kinase levels compared with those of control siRNA (Takai *et al.* 2007b). Then, we used siRNA ID no. 75849 in the experiment of the effect of p70 S6 kinase downregulation on the FGF-2 stimulated IL-6 synthesis.

Western blot analysis

The cultured cells were stimulated by TPA or FGF-2 in α -MEM containing 0.3% FCS for the indicated periods. When indicated, the cells were pretreated with bisindolylmaleimide I, Go6976, and calphostin C for 60 min. The cells were washed twice with PBS and then lysed, homogenized, and sonicated in a lysis buffer containing 62.5 mM Tris-HCl (pH 6.8), 2% SDS, 50 mM dithiothreitol, and 10% glycerol. The cytosolic fraction was collected as a supernatant after centrifugation at 125 000 g for 10 min at 4 °C. SDS-PAGE was performed according to Laemmli (1970) in 10% polyacrylamide gel. Western blot analysis was performed as described previously (Kato *et al.* 1996) using phospho-specific p70 S6 kinase antibodies and p70 S6 kinase antibodies, with peroxidase-labeled antibodies raised in goat against rabbit IgG being used as secondary antibodies. Peroxidase activity on the



polyvinylidene fluoride (PVDF) sheet was visualized on X-ray film by means of the ECL Western Blotting Detection System. The densitometric analysis was performed using Molecular Analyst/Macintosh (Bio-Rad Laboratories).

Statistical analysis

The data were analyzed by ANOVA followed by the Bonferroni method for multiple comparisons between pairs, and $P < 0.05$ was considered significant. All data are presented as the mean \pm S.E.M. of triplicate determinations from three independent cell preparations. Each experiment was repeated three times with similar results.

Results

Effect of rapamycin on the FGF-2-stimulated IL-6 synthesis in MC3T3-E1 cells

We have previously shown that FGF-2 induces the activation of p70 S6 kinase in osteoblast-like MC3T3-E1 cells (Takai *et al.* 2007b). In addition, we have also previously reported that the levels of phosphorylated p70 S6 kinase reached its peak at 45 minutes after the stimulation of FGF-2 and decreased thereafter (Takai *et al.* 2007b). In order to clarify the involvement of p70 S6 kinase in the FGF-2-induced synthesis of IL-6 in MC3T3-E1 cells or not, we examined the effect of rapamycin, a specific inhibitor of p70 S6 kinase (Kuo *et al.* 1992, Price *et al.* 1992), on the FGF-2-stimulated synthesis of IL-6. We have previously showed that FGF-2 induces IL-6 synthesis by MC3T3-E1 cells in a time-dependent manner (Kozawa *et al.* 1997a). Rapamycin, which had no effect on the basal levels of IL-6, significantly amplified the FGF-2-induced synthesis of IL-6 in a time-dependent manner. The amplifying effect of rapamycin was observed at least 6 h after FGF-2 stimulation (Fig. 1A). In addition, the amplifying effect of rapamycin was dose dependent in the range between 1 and 50 ng/ml (Fig. 1B). Rapamycin at 50 ng/ml caused $\sim 300\%$ enhancement in the FGF-2 effect. We next examined the effect of rapamycin

Figure 1 Effect of rapamycin on the FGF-2-stimulated IL-6 synthesis in osteoblasts. (A) Osteoblast-like MC3T3-E1 cells were pretreated with 10 ng/ml rapamycin (circles) or vehicle (squares) for 60 min, and then stimulated by 70 ng/ml FGF-2 (solid symbols) or vehicle (open symbols) for the indicated periods. * $P < 0.0005$, compared with the value of FGF-2 alone. ** $P < 0.0005$, compared with the value of FGF-2 alone. (B) Osteoblast-like MC3T3-E1 cells were pretreated with various doses of rapamycin for 60 min, and then stimulated by 70 ng/ml FGF-2 (●) or vehicle (○) for 24 h. * $P < 0.001$, compared with the value of FGF-2 alone. ** $P < 0.0005$, compared with the value of FGF-2 alone. (C) Primary culture of osteoblasts was pretreated with various doses of rapamycin for 60 min, and then stimulated by 70 ng/ml FGF-2 or vehicle for 24 h. * $P < 0.01$, compared with value of the control. ** $P < 0.005$, compared with the value of FGF-2 alone. (A–C) Each value represents the mean \pm S.E.M. of triplicate determinations from three independent cell preparations. Similar results were obtained with two additional experiments.

in primary cultured mouse osteoblasts. We found that FGF-2 significantly induced IL-6 synthesis also in these osteoblasts. In addition, rapamycin significantly increased the FGF-2-stimulated IL-6 synthesis in the range between 10 and 50 ng/ml (Fig. 1C).

Effect of p70 S6 kinase down regulation on the FGF-2-stimulated IL-6 synthesis in MC3T3-E1 cells

To further confirm the enhancement by rapamycin of IL-6 synthesis, we examined the effect of p70 S6 kinase down-regulation by p70 S6 kinase siRNA on the IL-6 synthesis induced by FGF-2 in osteoblast-like MC3T3-E1 cells. We previously found that p70 S6 kinase siRNA (250 nM) caused ~80% reduction in the p70 S6 kinase levels compared with those of control siRNA (Takai *et al.* 2007b). In the p70 S6 kinase downregulated cells, the basal levels of IL-6 were upregulated while the levels of IL-6 were undetectable in the control siRNA-transfected cells (Fig. 2). The FGF-2-induced levels of IL-6 synthesis in p70 S6 kinase down-regulated cells were markedly enhanced compared with those in the control cells. Downregulation of p70 S6 kinase caused approximately ten times enhancement in the FGF-2 effect (Fig. 2).

Effect of TPA on the phosphorylation of p70 S6 kinase in MC3T3-E1 cells

In our previous studies (Suzuki *et al.* 1996, Kozawa *et al.* 1997a), we have reported that FGF-2 stimulates the activation of protein kinase C through hydrolysis of phospholipase C-induced

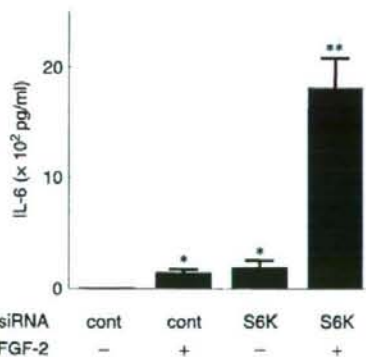


Figure 2 Effect of p70 S6 kinase (S6K) siRNA on the FGF-2-stimulated IL-6 synthesis in MC3T3-E1 cells. The cultured cells were transfected with control siRNA (cont) or p70 S6 kinase siRNA (siRNA ID no. 75849, Ambion; S6K) using the siEntfect according to the manufacturer's protocol. The cells were stimulated by 70 ng/ml FGF-2 or vehicle for 9 h. Each value represents the mean \pm s.e.m. of triplicate determinations from three independent cell preparations. Similar results were obtained with two additional experiments. * $P < 0.0005$, compared with the value of vehicle. ** $P < 0.0005$, compared with the value of FGF-2 with control siRNA transfection.

phosphoinositide and phospholipase D-induced phosphatidylcholine in osteoblast-like MC3T3-E1 cells, and the protein kinase C activation plays an inhibitory role in the FGF-2-stimulated IL-6 synthesis. In order to investigate whether protein kinase C induces p70 S6 kinase activation in MC3T3-E1 cells, we examined the effect of TPA, a direct activator of protein kinase C (Nishizuka 1991), on the phosphorylation of p70 S6 kinase. The stimulation of TPA time dependently induced the phosphorylation of p70 S6 kinase (Fig. 3). The effect of TPA was observed 10 min after the stimulation of FGF-2 and the maximum effect was at 45 min.

Effects of Go6976 or bisindolylmaleimide I on the TPA-induced phosphorylation of p70 S6 kinase in MC3T3-E1 cells

We examined the effect of Go6976, a potent inhibitor of protein kinase C (Martiny-Baron *et al.* 1993), on the TPA-induced phosphorylation of p70 S6 kinase in MC3T3-E1 cells. Go6976 markedly reduced the phosphorylation of p70 S6 kinase (Fig. 4A). The effect of Go6976 was dose dependent in the range between 0.3 and 3 μ M. In addition, bisindolylmaleimide I (30 μ M), another inhibitor of protein kinase C (Toullec *et al.* 1991), almost completely suppressed the TPA-induced phosphorylation of p70 S6 kinase (Fig. 4B). The effect of bisindolylmaleimide I was dose dependent in the range between 3 and 30 μ M.

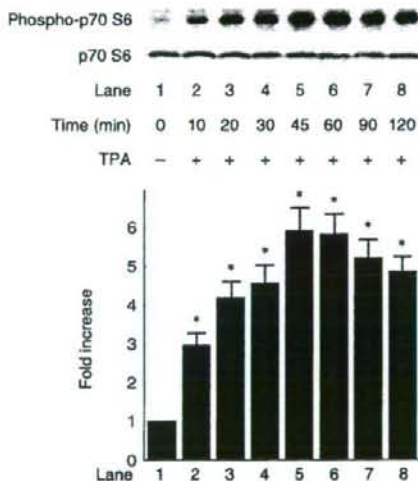


Figure 3 Effect of TPA on the phosphorylation of p70 S6 kinase in MC3T3-E1 cells. The cultured cells were stimulated by 0.1 μ M TPA for the indicated periods. The extracts of cells were subjected to SDS-PAGE with subsequent western blot analysis with antibodies against phospho-specific p70 S6 kinase or p70 S6 kinase. The histogram shows quantitative representations of the levels of FGF-2-induced phosphorylation obtained from laser densitometric analysis of three independent experiments. Each value represents the mean \pm s.e.m. of triplicate determinations from three independent cell preparations. Similar results were obtained with two additional experiments. * $P < 0.0001$, compared with the value of control.