

令和 3 年 5 月 15 日現在

機関番号：13501

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K17087

研究課題名（和文）超音波とマイクロバブルによるARONJの治療効果の検討

研究課題名（英文）Evaluation of ultrasonic waves and microbubbles treatment to ARONJ

研究代表者

諸井 明德（Moroi, Akinori）

山梨大学・大学院総合研究部・講師

研究者番号：60645141

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,100,000円

研究成果の概要（和文）：家兔を用いた顎骨壊死モデルでは、LIPUSのみ機械的な刺激では腐骨の改善は認めず、未治療なものと同様の所見であった。抗生剤を投与したものでは、炎症所見の減少が肉眼的にも組織的所見からも観察された。しかし、抜歯窩の治癒は得られておらず腐骨の治癒には至っていなかった。抗生剤とLIPUSを併用したものと、それに追加してマイクロバブルを投与したものでは炎症所見の改善の骨新生を認めた。ARONJ治療に抗生剤と共に超音波とマイクロバブルによる機械的刺激を加えることにより効果が促進する可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

骨吸収抑制薬関連顎骨壊死（ARONJ）は、明確な治療法がなく、現在は重症化の後に侵襲を要する外科処置が行われている。治療の要素としては、低侵襲、抗菌作用、骨再生作用が挙げられる。これらの項目を満たすものとして局所へのマイクロバブル投与と超音波治療がある。この治療は人体への侵襲は少なく、局所への抗菌剤増強作用を有し、骨再生の促進作用がそれぞれの分野の研究により明らかにされている。しかし、ARONJへの治療へは応用されていない。この研究成果によりARONJに対して超音波やマイクロバブルによる治療が選択肢と挙げられた。さらに研究・検討されることにより臨床応用が可能となり治療が促進すると考えられる。

研究成果の概要（英文）：In the ARONJ model using rabbits, only LIPUS did not show improvement in the bone by mechanical stimulation, and the findings were similar to those in the untreated group. Antibiotics treatment group, improvement of inflammatory findings was observed. However, the remodeling of the extraction socket was not obtained, and the healing of the bone necrosis was not achieved. Increasing of new bone and improved inflammatory findings was observed in the combination of antibiotics and LIPUS group and antibiotics, LIPUS and microbubbles group. It was suggested that the effect of mechanical stimulation by ultrasonic waves and microbubbles antibiotics may be promoted to ARONJ treatment.

研究分野：骨造成

キーワード：ARONJ マイクロバブル

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

骨粗鬆症または骨転移に対してビスホスホネート系薬剤、ヒト型抗 RANKL モノクローナル抗体製剤が使用されており、良好な効果を得ている。しかし、これらの薬剤の有害作用として使用中または使用後に抜歯などの顎骨への外科的侵襲を加えることにより治癒せずに顎骨が壊死をおこす骨吸収抑制薬関連顎骨壊死がある。病態の発生機序は明確にはされておらず、治療方法として壊死部の洗浄、分離骨の除去、また壊死骨の削合または離断などがあるが治療効果が不確定であることや外科処置部位からのさらなる壊死などが生じ、現在のところ確立した治療方法がない。

超音波はある一定度の周波数異常の音波のことであり、画像診断などにおいて用いられている。また、マイクロバブルは 50 μm 未満の泡のことを示している。共に生体への侵襲はなく使用でき、有害作用も報告されていない。口腔内は常在菌が多数存在しており、細菌感染が生じやすい環境である。細菌感染・コロニー形成に伴い、細菌はバイオフィルムを形成する。バイオフィルムは密閉性と細胞外マトリックスのバリア機能を有しており、抗生物質およびヒト免疫細胞に対して抵抗性を示し、感染の長期化または拡大を引き起こす。このバイオフィルムに対してマイクロバブル投与を病変部へ行い超音波刺激することにより細菌透過性の増加およびバイオフィルム関連遺伝子発現の妨害、すなわち機械的および生化学的メカニズムを介してバイオフィルムに悪影響を及ぼし得ることを示唆されている。その作用機序は、超音波のキャビテーション作用に関連していると考えられている。キャビテーションによりマイクロバブルが形成され、これが近くの細胞膜または内皮層に作用し、細胞の透過性に影響を及ぼすと考えられている。またマイクロバブルによるキャビテーション作用によっては細胞死を引き起こす可能性も示唆されている。また、超音波の波長または出力を調整することにより低出力超音波パルス (LIPUS) を発生することができる。LIPUS は、特殊なタイプの音響パルスエネルギーであり、骨や創傷の治癒を促進する補充療法として使用されている。LIPUS 音響圧力波の伝達と組織への間接的な機械的応力の適用により、骨形成とタンパク質の合成、カルシウムの取り込み、および異なる細胞における DNA 合成を促進することが知られている。また、同様に超音波の刺激を変えることによりマイクロバブル投与部の低出力超音波パルス (LIPUS) が作用を増強し、骨治癒効果が増加する報告されている。これにマイクロバブルを投与することにより、LIPUS の効果が増強することが報告されている。

このようにして超音波とマイクロバブルの併用は、ARONJ の治療の項目に非常に合致する作用を有している。しかし、これまでに ARONJ の治療として使用した報告はなく試みもなされていない。

2. 研究の目的

本研究の目的は、明確な治療法が確立していない ARONJ に対して低侵襲であり抗菌作用並びに骨再生作用の増強が確認されている超音波とマイクロバブルを用いて治療効果を得られるかを調査することである。

ARONJ モデルラットを用いて、顎骨壊死部への超音波とマイクロバブル使用による抗菌作用並びに骨再生の増強作用について評価して明らかにしていく。そのために ARONJ ラットモデルをマイクロバブルによる治療増強したものとその他の治療方法を行い、顎骨壊死部位の骨再生を評価することにより超音波とマイクロバブルの治療効果を判定する。

3. 研究の方法

(1) ARONJ モデルラットの作成：

50 匹のラット (10 週齢/300 g) を用いる。ラットに 4 週間におよび 1 週ごとに 0.06mg/kg のビスホスホネート製剤を腹腔内に投与する。初回投与から 4 週後に右側下顎臼歯部を抜歯する。4 週後に抜歯窩を確認し、骨露出を認めるものを ARONJ モデルラットとして使用する。

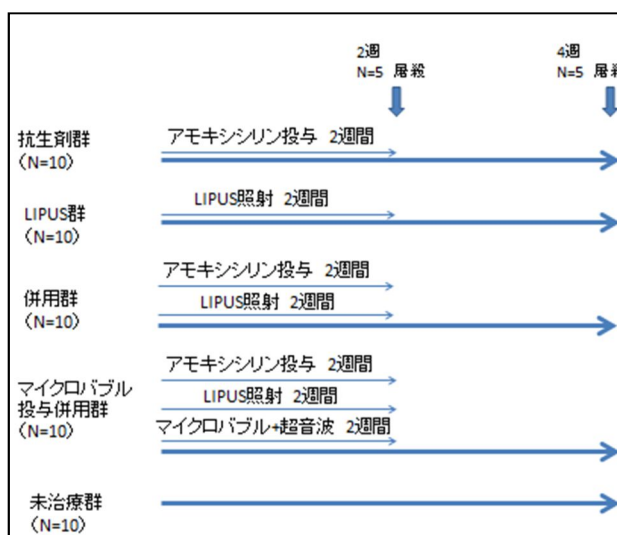
(2) ARONJ への治療と群分け：

ARONJ モデルラットを

- ・ 抗生剤群 (N = 10)
- ・ LIPUS 群 (N = 10)
- ・ 併用群 (N = 10)
- ・ マイクロバブル投与併用群 (N = 10)
- ・ 未治療群 (N = 10)

に区分する。

全ての群において抜歯窩腐骨を一部削合し、創部の閉創を行う。抗生剤群、併用群、そしてマ



イクロバブル投与併用群は 24 時間ごとにアモキシシリン (3mg/kg) の腹腔内投与を 2 週間行う。また、LIPUS 群、併用群、そしてマイクロバブル投与併用群は 24 時間ごとに患部顎骨に LIPUS (周波数: 3.0 MHz, 強度: 240 mW/cm²) を 20 分間の照射を 2 週間行う。マイクロバブル投与併用群は 1ml のマイクロバブルを含む生理食塩水を腐骨部に投与し超音波 (周波数: 1MHz, 強度: 500mW/cm²) を 5 分間照射する。

(3) 標本作製、観察:

各群において術後 2、4 週間経過時にそれぞれペントバルビタールナトリウムによる全身麻酔下に開胸、瀉血し屠殺する。屠殺後に μ CT 撮影を行い 4% 中和ホルマリンにて 2 週間固定する。標本を脱灰液にて 2 週間脱灰しパラフィン包埋を作成し、薄切標本を作成する。評価方法は μ CT による画像評価と組織標本評価により行う。

(4) 画像評価:

屠殺後に μ CT を撮影し、患部の前頭断画像における骨吸収の面積の評価を行う。また、骨質に明確な違いが生じているようであれば、スコアリングをして骨質の評価を行っていく。

(5) 組織評価:

作製した切片から新生骨の形成を計測し、統計的に評価を行う。また、薄切切片をアルカリフォスファターゼ (ALP) 免疫染色とアザン色素法による酒石酸抵抗性酸性ホスファターゼ (TRAP) 染色の二重標識を行う。染色した組織切片画像をコンピューターに入力し、ALP 陽性細胞、TRAP 陽性細胞数を解析ソフトにより数値化して各群間で客観的に比較検討する。これにより骨のリモデリングが行われているかを検討する。

4. 研究成果

(1) ARONJ ラットモデル作成は、当初予定していた手技により作成し、ラットにより投与と実験を開始した。マイクロバブル投与群において抜歯窩の骨露出部位の完全閉創が困難であり、非常に小さいことからマイクロバブルの停滞が困難であると判断した。そのために、ラットから家兎へと実験対象を変更した。

(2) ARONJ 家兎モデル作成を開始し、ラットと同様の投与と抜歯窩を大きくまた操作が容易な第 3、4 小白歯部として作成を行った。家兎では ARONJ モデルの作成の成功率が低下を認めた。

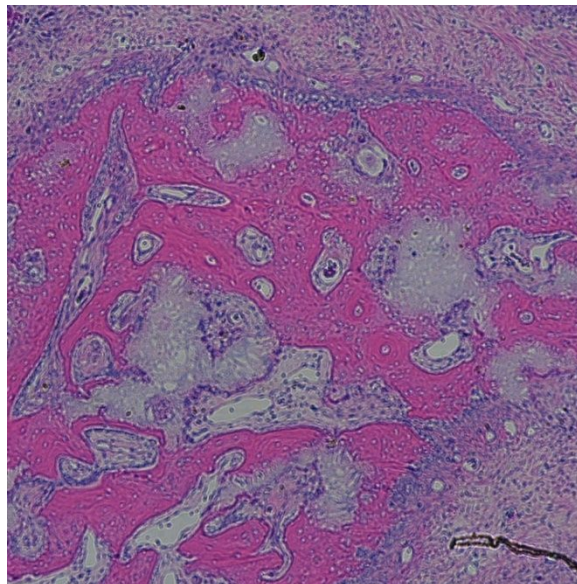
(3) ラットから家兎に対象が大きくなったために μ CT を用いた画像評価は不可能となった。そのために切片作成し、組織評価を施行した。

未治療群と LIPUS 群では、腐骨の形成が改善所見は認めなかった。対象の中には排膿を継続するものがあり、切片でも炎症細胞の浸潤と膿瘍形成が認められた。そのため、骨芽細胞や破骨細胞の骨再生に必要な細胞はほぼ認めなかった。

抗生剤投与群では、炎症細胞は認めず、排膿所見も認めなかった。一方で骨芽細胞や破骨細胞の出現も認めなかった。骨も新生骨の増加はほぼなく、抜歯窩の母骨が上皮に被覆されず露出している所見であった。

併用群とマイクロバブル群では、感染による炎症所見はほぼ認めず、炎症細胞も認めなかった。骨芽細胞や破骨細胞も認められ骨治癒の傾向を認めた。TRAP 染色でも陽性細胞が散見された。しかし、有意な差は 2 つの群では認めなかった。新生骨の増加に関しても 2 つの群で有意な違いは認めなかったが、所見としては、併用群の方が新生骨の増加があったとみられた。ALP 染色では、反応が非常に乏しく陽性細胞を計測することは困難であった。考察としては、マイクロバブルを投与する際に骨造成を行う、細胞や幼弱な骨も洗浄または破壊していた可能性がある。そのため、マイクロバブルを投与した場合に骨新生がやや遅延した所見があった。

ARONJ の治療として併用群とマイクロバブル群は有用であることが示されたが、マイクロバブルは消炎後では骨遅延を認めたことから、消炎前までの投与によりより効果を示す可能性があった。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------