

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 25 日現在

機関番号：16101

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22792090

研究課題名（和文）ビスホスホネート系薬剤関連顎骨壊死の発症予測マーカーの検索

研究課題名（英文）An investigation of predictive marker of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw.

研究代表者

美原 智恵（MIHARA CHIE）

徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・助教

研究者番号：70403748

研究成果の概要（和文）：ビスホスホネート系薬剤（BP s）関連顎骨壊死（BRONJ）は最近よく報告されている BP s 投与による副作用である。多くの研究者が BRONJ の発症機構の解明および発症予測を行おうと試みているが、いまだ詳細は不明である。本研究では BRONJ の発症予測マーカーを同定することを目的とし、BRONJ 発症過程における形態学的観察および血液生化学的観察を実施したが、予測マーカーを同定することは不可能であった。

研究成果の概要（英文）：Osteonecrosis of the jaw (BRONJ) is well-reported side effect of bisphosphonate (BPs) use. Many researchers are trying to clarify the process of BRONJ appearance and to find a predictive marker of BRONJ. But they are not known exactly. The purpose of this investigation is to find a marker to predict BRONJ appearance by morphological analysis and biochemical analysis at process of BRONJ formation. We could not find a predictive marker of BRONJ.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2011年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：歯周治療学

科研費の分科・細目：歯学・歯周治療系歯学

キーワード：歯学、ビスホスホネート、顎骨壊死

1. 研究開始当初の背景

ビスホスホネート系薬剤（BP）は骨吸収抑制作用を有し、現在、骨粗鬆症の第一選択薬であり、血管新生抑制作用も有することから、癌の骨転移予防薬としても用いられている（*J Dent Res 86:1013-1021, 2007*）。その有用性から BP は今後ますます使用頻度の増加が予想される。申請者は以前、その骨吸収抑制作用に注目し、実験的歯周炎モデルラットに BP の 1 つであるアレンドロネートを全

身投与し、歯槽骨吸収が抑制されるという歯周治療学にとって有益な結果を得た（*日歯周誌 47:153-160, 2005*）。

しかし、前の有益な結果に反して、近年 BP 投薬患者に生じる BP 関連顎骨壊死（BP related osteonecrosis of jaw: BRONJ）の発症が次々と報告されている。BRONJ の典型的症状は疼痛、感染、長期に渡る骨露出があげられる。BP 投与患者では歯周外科治療や抜歯により BRONJ を発症させるリスクが増

加すると報告されており (*Clin Calcium 19:100-108, 2009*)、BP の服用が必要になった患者は事前に歯科検診を受け、必要な外科処置を完了しておくことが推奨されている。

しかし実際の臨床では BP 服用中の患者でも歯周外科治療や抜歯などの処置が必要な症例に多く遭遇する。このような場合、低リスクの場合はほとんどのケースで外科処置しても問題ないとされるが、BRONJ の発症をおそれ、エビデンスも乏しいまま必要薬剤の休薬を行ったり治療を必要以上に避ける傾向がある。それは BRONJ が、ごく最近認識された病態であり、発症機構等にいまだ不明な点が多いことが原因であると考えられ、早急な解明が必要とされる。

そこで申請者はまず、骨欠損の治癒における顎骨と軀幹骨との違いを、骨の露出時間にあると考えた。BP は血管新生阻害作用も有するため (*Oral Diseases 14:277-285, 2008*) 血餅への新生血管の伸入が遅れ、治癒が遅延することが BRONJ 発症につながると予想される。さらに申請者は生体の血管新生の指標となる血管新生バイオマーカーにも注目している。血管新生バイオマーカーとは、医科では癌の予後の判断材料として研究が進んでいる。血液中に循環している内皮細胞は、抗がん剤のような血管新生阻害薬の治療の奏功を判断する材料になるとの報告がある (*Cancer, 15, 2346-2354, 2009*)。また同様に、血管内皮細胞の基底膜を構成する XVIII 型コラーゲンの C 末端フラグメントであるエンドスタチンは血管新生阻害作用を有するが、担癌時や創傷治癒時には血中濃度が上昇することが分かっている。つまり、BRONJ 発症ラットは血管新生が低下し、血液中の血管新生マーカー量も減少している可能性がある。

2. 研究の目的

BRONJ 発症モデルを用い、特に血管新生に注目して経時的に病態を把握し、血中のマーカーとなる物質を探索することで、将来的には BRONJ 発症のリスクの予測および発症予防につなげることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 実験的 BRONJ モデルの作成

Sonis ら (*Oral oncology, 45, 164-172, 2009*) の方法に従い、BRONJ モデルを作成した。すなわち、11 週齢の SD 系雌性ラットを用い、20 日間デキサメタゾン (DX) (1mg/kg) を皮下投与し、その間 7 日目毎にゾレドロネート (ZA) (7.5 μ g/kg) を皮下投与した後、右側上顎臼歯全てを抜去し、14 日間飼育した。DX はデカドロン注射液 (MSD 株式会社、東京) ZA はゾメタ点滴静注用 (ノバルティスファーマ株式会社、東京) を用いた。BRONJ を発症する ZADX 群、発症しない ZA 群、DX

群、CONT 群の 4 群とし、抜歯 3 日後に血液を、14 日後のラットから上顎骨、顎骨、血液を採取した (図 1)。

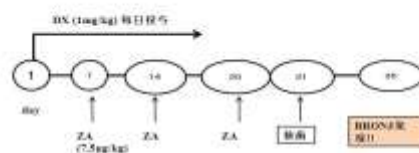


図 1 : 実験スケジュール

(2) 体重測定

薬剤および抜歯がラットの全身状態に及ぼす影響を調べる為に実験開始 1、7、14、21、28、35 日目に体重測定を行った。

(3) 脛骨近心端海綿骨の骨梁構造解析

投与した薬剤が奏功しているかどうかを調べるために、全身の骨代謝が反映されやすい脛骨近心端二次海綿骨において、Wada ら (*J Bone Miner Metab, 24, 199-205, 2006*) の方法に従い、骨梁構造解析を行い、薬剤が全身的に作用しているか確認を行った。すなわち採取した脛骨を 4%中性緩衝ホルマリン液 (和光純薬工業株式会社、大阪) に 3 日間固定して水洗した後、脛骨近心端から 2.5mm から 5.3mm の領域についてマイクロ CT (日立メディコ) を用いて 50kV の管電圧、100 μ A の管電流でエックス線を照射し、14 μ m 幅で 201 スライス of 断層撮影像を得た。それらを 3 次元構築したのち、骨梁解析ソフト TRI3Dbon (ラトックシステムエンジニアリング、東京) を用いて 3 次元的に骨梁構造解析を行った。また、脛骨近心端から 5.3mm の部位の断層撮影像上で、皮質骨の厚さを計測した。



図 2 : 計測範囲

(4) 抜歯窩の観察および新生骨の割合の算出

抜歯窩を肉眼的に観察した後、4%中性緩衝ホルマリン液 (和光純薬工業株式会社、大阪) にて 3 日間固定し、水洗し、マイクロ CT を用いて撮影し、3 次元画像を得た。Hikita らの報告に従い、抜歯窩における新生骨の割合を算出した。本研究では一部改変し、第一、第二、第三臼歯の抜歯窩を構成する

個々の抜歯窩について図3のように1から12まで番号をあてがい、個々の抜歯窩における新生骨の平均を顎骨における新生骨の割合とした。

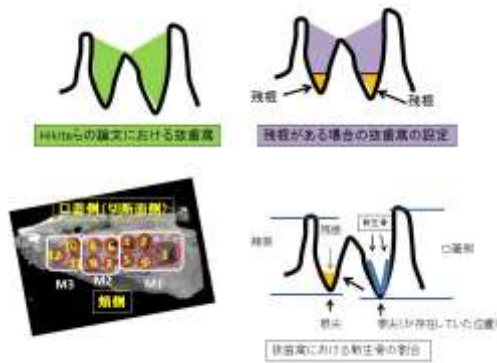


図3：抜歯窩の設定

(5) 血液中エンドスタチン濃度の測定

抜歯後3および14日目に採血を行い血漿を分離した。血漿中に含まれるエンドスタチン濃度について、ELISAキットを用いて測定を行った。

(6) 統計分析

各群における計測値は平均値±標準偏差で示した。統計処理は対応の無いt検定で行い、 $p < 0.05$ で有意差ありと判定した。

4. 研究成果

(1) 体重測定

CONT群と比較して、ZA投与群において、ZAによる体重への影響は認められなかった。DXを投与したDX群とZADX群では、薬剤の投与と同時に両群とも体重の減少が認められた。DXの投与を止めると、DXの体重は大きく回復したが、ZADX群の回復は軽度であった。

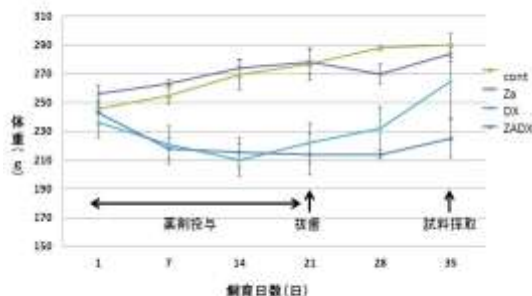


図4：薬剤および抜歯が体重におよぼす影響

以上の結果から、薬剤は全身的な効果を認めていると推察された。

(2) 脛骨近心端の骨梁構造解析および皮質骨の厚さの計測

図2の四角形で示す領域について骨梁構造解析を行った結果、骨密度はCONT群と比較してZA群で有意な減少が認められた(図5A)。しかし、骨表面積比はCONT群とZA群間で有意差は認められず、DX群に対してZA群で有意な上昇が認められたのみであった(図5B)。骨梁の厚さはZA群と比較してDX群で有意な上昇が認められた(図5C)。骨梁数および骨梁間隙は、どの群間においても有意差を認めなかった(図5D、E)。骨梁中心間距離はCONT群と比較してDX群で有意な増加を認めた(図5F)。

二次海綿骨の骨梁構造解析では、各指標を関連付けるような統一した結果が得られなかった。この理由として海綿骨が全身の骨代謝の影響を一番最初に受けることにあると考えた。本試料は薬剤投与を中止して14日後に採取した試料であった。つまり、実験開始21日間の薬剤投与が骨に及ぼした効果は、その休薬期間(14日間)の骨のリモデリングによって、マスキングされた可能性があった。そこで、海綿骨に次いで全身の骨代謝の影響が現れる皮質骨に注目した。皮質骨厚さはCONT群と比較してZA群では有意差を認めなかったが、CONT群と比較してDX群およびZADX群は有意な減少を認めた。DX群とZADXを比較するとZADX群で有意な減少の抑制が認められた(図5G)。以上の結果から、薬剤は全身的に奏功したと考えられた。

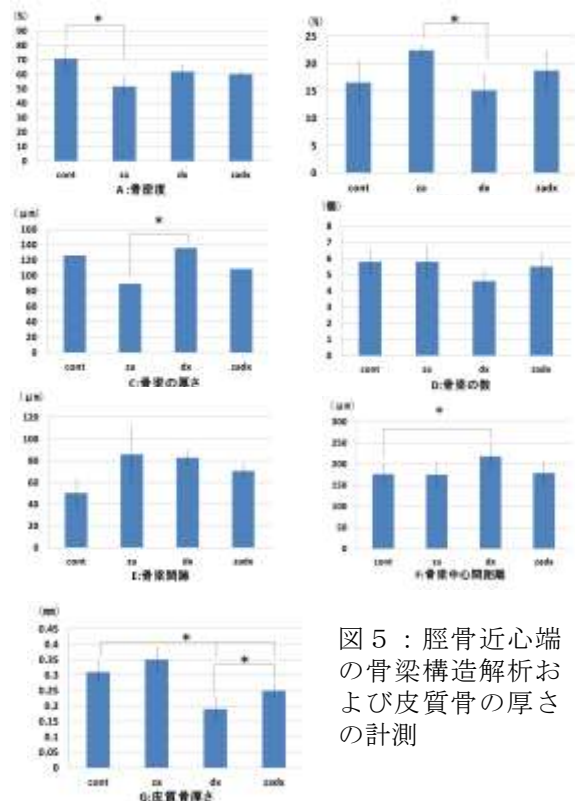


図5：脛骨近心端の骨梁構造解析および皮質骨の厚さの計測

(3) 抜歯窩の観察および抜歯窩における新生骨の割合の算出

抜歯直後の顎骨および抜去した歯を示す。ラットは第一、第二、第三、計3本の臼歯を有する(図6)。

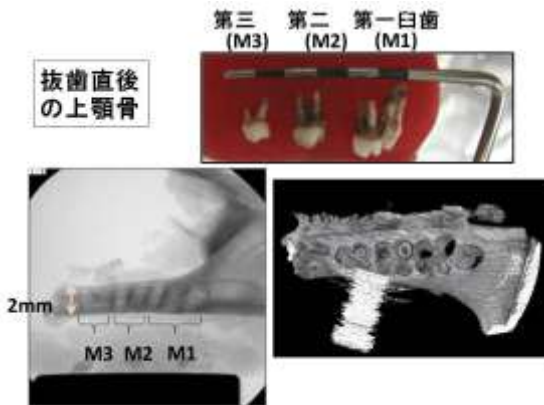


図6：抜歯直後の抜歯窩および臼歯

抜歯後14日目の肉眼像ではCONT群に比較してZA、DX、ZADX群では治癒が遅れているように見えた(図7)。CONT群で抜歯窩での骨の改変が進んでいるのに対して、ほかの3群では、ほとんど変化が認められなかった(図8)。抜歯窩における新生骨をCT画像の濃度から描出したところ、4群のうち、ZA群で最も新生骨が多いように見えた(図9)。抜歯窩における新生骨の割合を算出したところ、4群のうち、ZA群が最も新生骨の割合が多い結果となった(図10)。



図7：抜歯14日後の上顎骨の肉眼像

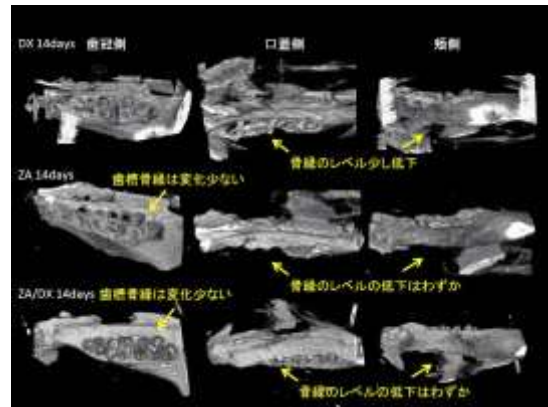
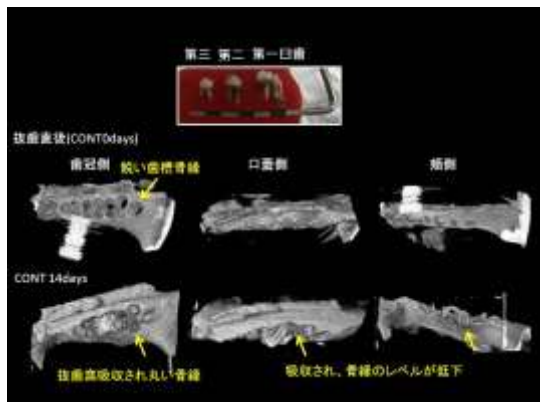


図8：抜歯後14日目の上顎骨のマイクロCT像

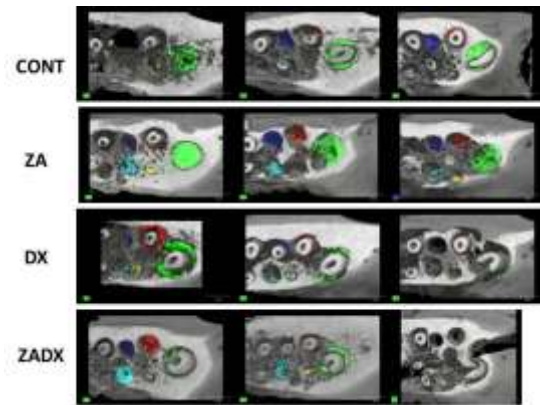


図9：抜歯後14日目の抜歯窩における新生骨

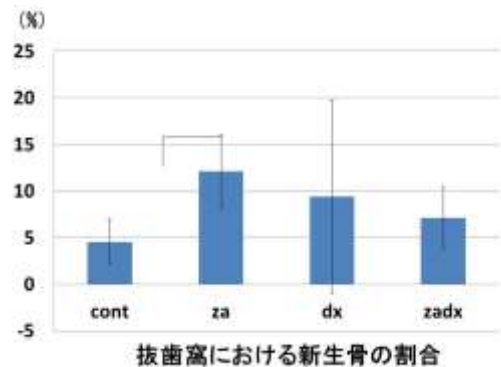


図10：抜歯後14日目の抜歯窩における新生骨の割合

(4) 血液中エンドスタチン濃度の決定

抜歯3日目および14日目においても、同一群内での計測値の幅が大きく4群間に有意な差は認められなかった(表1)。

3 day	cont	27.6	142	74	29.2	34	
	za	38	34	30.8			
	dx	38	77.6	25.2			
	zadx	31.2	43.6	36	33.2	25.2	
14 day	cont	183.2	50.4	74	33	64.8	
	za	24.8	20.4	32	35.6	26	33.6
	dx	66.4	30.6	25.2			
	zadx	104	37.2	13.4	56.8		

単位 (× 10³ng/ml)

表 1 : 血液中エンドスタチン濃度の測定結果

以上の結果から、顎骨壊死発症時における発症マーカーを同定することは不可能であった。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 1 件)

1. K. Tokunaga, H. Seto, H. Ohba, C. Mihara, H. Hama, M. Horibe, S. Yoneda, T. Nagata Topical and intermittent application of parathyroid hormone recovers alveolar bone loss in rat experimental periodontitis. J Periodont Res 2011, 46: 655-662 査読有
DOI:10.1111/j.1600-0765.2011.01386.x

[学会発表] (計 0 件)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

なし

6. 研究組織

(1) 美原 智恵 (MIHARA CHIE)

徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス
研究部・助教
研究者番号：70403748

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし