

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 8 月 6 日現在

機関番号：27102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K20554

研究課題名(和文)より臨床に近いBRONJラットモデルの作製およびポリミキシンBによる治療法の確立

研究課題名(英文)Development of a rat model of more clinically Bisphosphonate-related -osteonecrosis of the jaw (BRONJ) and Establish a treatment with Polymyxin B for BRONJ

研究代表者

坂口 修 (SAKAGUCHI, OSAMU)

九州歯科大学・歯学部・助教

研究者番号：00734584

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,600,000円

研究成果の概要(和文)：より臨床に近いBRONJラットモデルの作製およびポリミキシンBによる治療法の確立を目的に今回研究を行った。まず8週齢Wistar系雄ラットにゾレドロン酸水和物(ZOL)を4週間皮下注射にて投与を行った。さらに4週間上顎大白歯口蓋側歯肉にA.a(Y-4株)より分離したLPSを局所注射し、歯周炎モデルを作製した。その後、全身麻酔下に上顎の抜歯を行い、4週間後にサンプリングした。パラフィン包埋後、切片をHE染色し観察した。抜歯窩周囲の骨壊死範囲の観察を行った。次にポリミキシンBを抜歯直後に抜歯窩に填入し、骨壊死への影響について観察を行った。ポリミキシンB投与により骨壊死範囲にやや減少傾向を認めた。

研究成果の概要(英文)：The aim of the present study was to develop a rat model of more clinically Bisphosphonate-related -osteonecrosis of the jaw (BRONJ) and to establish a treatment with Polymyxin B (PMB) for BRONJ. First, rats were treated with a subcutaneous injection of Zoledronic acid for 4 weeks. Additionally, rats were received an injection of lipopolysaccharide (LPS) to gingiva around their upper molars for 4 weeks to occur periodontitis. One week after the final injection, Upper molars extraction were done under general anesthesia. All rats were sacrificed after 4weeks and the decalcified paraffin sections were prepared. The sections were stained with hematoxylin-eosin and observed the area of osteonecrosis in alveolar bone around extraction site. Next, rats were received an injection of PLB into the extraction socket as soon as tooth were extracted. After that, the effect of PMB on osteonecrosis were observed. The results showed that PMB might decrease the area of osteonecrosis.

研究分野：口腔外科

キーワード：ビスフォスフォネート BRONJ ビスフォスフォネート関連顎骨壊死 LPS ポリミキシンB ラット

## 1. 研究開始当初の背景

ビスフォスフォネート (BP) は、骨粗鬆症治療の第一選択薬であり、また、悪性腫瘍による高カルシウム血症、固形がんの骨転移や、激しい骨破壊を伴う多発性骨髄腫、その他骨量減少を特徴とする骨疾患や様々な骨の異常に対する治療薬として有用性が証明されており、広く世界中で用いられている。しかしながら、2003 年を皮切りに、BP 製剤を長期間使用している患者で抜歯等の外科処置後に、重大な副作用としてビスフォスフォネート製剤関連顎骨壊死 (以下 BRONJ) の発生が数多く報告されており、年々増加傾向にある。BRONJ 発生リスクにおいて、BP 自体の要因だけでなく、歯周病などの感染や解剖学的特徴といった歯周組織に関連した局所的要因、また、患者における全体的要因、先天的要因、生活習慣等の要因など様々な要因が挙げられる。このように多くの要因を含む臨床例からの解析では、BRONJ の発生機序や病態は解明できず、適切な予防法や治療法の確立は非常に困難と考えられる。また、BRONJ は一旦発症してしまうと難治性であり、制御できずに病的骨折を引き起こし、大規模な外科的処置が必要となる重症化するケースもみられる。患者だけでなく、われわれ臨床医も対応に苦慮しているのが現状であり、早期の病態解明や治療法、予防法の確立が強く望まれている。上記より、遺伝的背景や条件の統一できる BRONJ 動物モデルによる研究は必要不可欠と考えられ、世界中で動物モデルの作製が行われている。BP に関しては、臨床での BRONJ の発症頻度の高さ、骨に対する作用の強さから注射用 BP を用いたものが多い。我々も今までに、がん患者を想定したラットにおける注射用 BP を用いた BRONJ 動物モデルの作製 (Tsurushima H, Sakaguchi O et al. Int J Oral Maxillofac surg 2013) に成功し詳細な検討を重ねてきた。このモデルでは、歯周病原菌 *Aggregatibacter*

*actinomycetemcomitans* (以下: *A.a*) の局所投与により顎骨だけでなく、臨床的には BRONJ が起こらない大腿骨にも骨壊死が起こることを確認しており、臨床的に BRONJ が、顎骨にしか発生しない理由として、歯周病原菌に常に曝されている顎骨の特殊環境によるものである事を世界に先駆けて示し報告してきた。その後、われわれは同様の実験系に *A.a* より抽出したりポポリサッカライド (以下: LPS) を用いて、骨壊死の発生・拡大にグラム陰性菌が持つ LPS が関与していることを示した (Sakaguchi O, et al. Int J Oral Maxillofac surg 2014)。また同教室の吉賀らは LPS と BRONJ について *in vitro* で詳細に検討し報告してきた (Muratsu D, Yoshiga D et al, Plos One 2013)。また、PET による検討でも他の骨髄炎と比較して優位に PET 集積が高い事を認めている。これらの事より、PMB による LPS 刺激による高度な炎症惹起を抑制する事は、BRONJ の拡大防止に非常に重要であるとわれわれは考えている。

## 2. 研究の目的

ビスフォスフォネート (BP) 関連顎骨壊死 (BRONJ) の発生機序・病態は不明な点が多く、治療法・予防法も未だに確立されていない。過去に我々は、BRONJ 様病変ラットモデルを作製し、歯周病原細菌 { グラム陰性桿菌の持つリポ多糖 (LPS) } による刺激が臨床的 BRONJ の発生および増悪因子の一つである可能性を示してきた (Tsurushima H, Sakaguchi O, Int Oral and Maxillofac Surg, 2013)。さらに、LPS を中和するカチオン性ペプチド抗菌薬であるポリミキシン B (PMB) の局所投与による骨壊死に対する作用について検討し報告してきた (Sakaguchi O, Int Oral and Maxillofac Surg, 2014)。そこで今回の研究では、より臨床に近い BRONJ モデルラットに対し、PMB 治療を行い、PMB の治療への有効

性を詳細に評価検討することを目的とする。

歯周病併発 BRONJ モデルラットの作製 歯周病併発 BRONJ モデルラットを用いた PMB の治療効果検討 PMB を用いた BRONJ の新規治療法の確立を目的とする。

### 3. 研究の方法

#### (1) 歯周病併発 BRONJ モデルラット作製

##### 1. ビスフォスフォネート製剤の投与

8週齢 Wistar 系雄ラットを実験に用いた。温度  $22 \pm 1$ 、湿度  $50 \pm 5\%$ 、明暗 12 時間毎に管理された環境動物舎内で 1 週間の予備飼育を行った。0.1 mg/kg/回のゾレドロン酸水和物 (ゾメタ点滴静注用) の皮下注射を 1 週間に 1 回腹部に 4 週間行った。

##### 2. LPS の歯肉への投与

ビスフォスフォネート製剤の投与に併せて上顎大白歯周囲口蓋側歯肉への LPS 局所注射 { 2 $\mu$ l の *A.a* (Y-4 株) より分離し、生食で溶いたもの 10  $\mu$ g/ $\mu$ l を上顎第一・二・三大臼歯口蓋側歯間乳頭部に 33 ゲージの注射針にて注射} による歯周炎誘発法 { Jill E. Rogers, et al. J Periodontol (2007) 78, 550-55 を参考にした } を 1 週間に 3 回を 4 週間行った。

##### 3. 全身麻酔

実験開始から 4 週間後に、ジエチルエーテルで吸入麻酔を行ない、抱水クロラール 3.5mg/kg の腹腔内注射による全身麻酔を施行した。

##### 4. 固定

ラットの手術台として木製板を改造して作製し、四肢をガーゼにて仰臥位で固定した。開口状態を維持するため、同様にガーゼを用いた。

##### 5. 局所麻酔

上顎第一・第二・第三大白歯の口蓋側歯肉に浸潤麻酔 (2% リドカイン液 (1/8 万エピネフリン含有) 0.01ml を 33 ゲージの注射針にて) を施行した。

##### 6. 抜歯

スプーンエキスカベータ (Holeback 3ss) を用いて、歯肉溝に挿入し、歯周靭帯を切断した。それから、第一大臼歯・第二大臼歯、第二大臼歯・第三大白歯の隣接面に挿入し、歯間離開を行い、それから近心方向に持ち上げるように力を加えながら歯の脱臼を試みた。根幹充填用ピンセットを用いて抜去した。術中、頸部の損傷に注意した。

##### 7. 群分け

群分けは、BP 投与 (あり、なし) + LPS 局所投与 (あり、なし) で G1 (BP なし・LPS なし)、G2 (BP なし・LPS あり)、G3 (BP あり・LPS なし)、G4 (BP あり・LPS あり) の全 4 群を設けた。

##### 8. 標本作製・評価

実験開始から 4 週間後、さらに抜歯後 4 週間の経過観察後にラットを屠殺し、標本を採取した。10% 中性緩衝ホルマリン溶液で固定を行った。その後、10% EDTA で脱灰後、パラフィン包埋を行った。6  $\mu$ m で薄切を行い、連続パラフィン切片を作製し、ヘマトキシリンエオジン (H-E) 染色を行った。各群を組織形態学的に比較した。また骨壊死範囲について、画像解析ソフトを用いて測定し、統計学的に検討を行った。

#### (2) 歯周病併発 BRONJ モデルラットを用いた PMB の治療効果の検討

前述した歯周病併発 BRONJ モデルラットと同様の手順で抜歯までを行い、その直後に抜歯

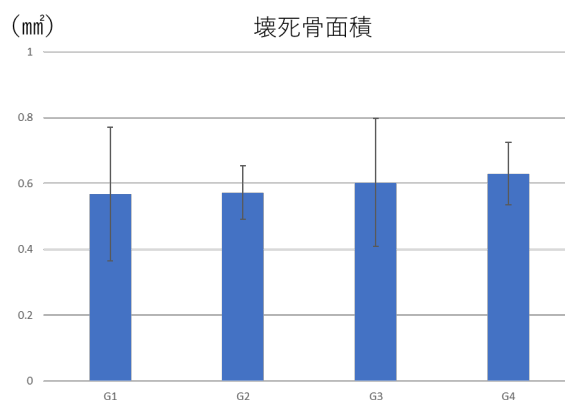
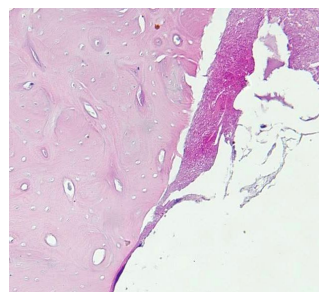
窩に生食に溶いた Polymyxin B (PMB) (500U ; Sakaguchi O, et al. int J Oral Maxillofac surg 2014 を参考に PMB の量を決定) を染み込ませたアビテンを填入し、ボーンワックスにより栓塞した。これを G5 とした。処置後 4 週間の経過観察後にラットを屠殺し、標本を採取した。10%中性緩衝ホルマリン溶液で固定を行った。その後、10%EDTA で脱灰後、パラフィン包埋を行った。6 $\mu$ m で薄切を行い、連続パラフィン切片を作製し、ヘマトキシリンエオジン (H-E) 染色を行った。各群を組織形態学的に比較した。また骨壊死範囲に関して、画像解析ソフトを用いて測定し、統計学的に検討を行った。

#### 4. 研究成果

##### (1) 歯周病併発 BRONJ モデルラット作製

上顎第一・第二・第三大臼歯の抜歯から 4 週間後に 4 群において抜歯窩の観察を行った。抜歯窩の治癒に関して G4 の 1 症例にのみわずかではあるが、骨露出を認めた。残りの群に関しては、明らかな骨露出は認めず、抜歯窩内に肉芽組織の増生を認めた。

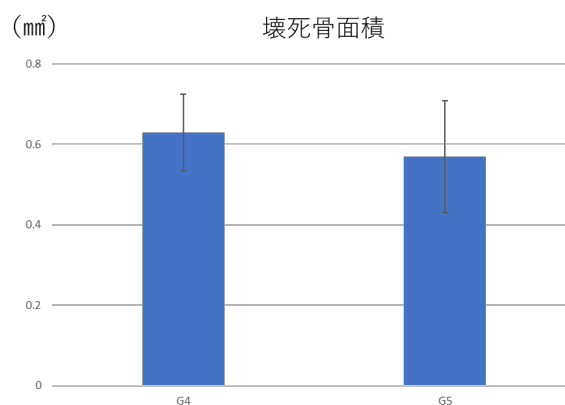
それから標本を作製し、H-E 染色後に観察を行った。LPS 局所注射を行った群 (LPS 投与群) の上顎大臼歯抜歯窩周囲の歯槽骨の状態は、LPS 非投与群のものと比較して骨吸収が進行しているように思われた。また、すべての群で抜歯窩周囲歯槽骨に骨壊死の所見 (骨小腔からの骨細胞の消失) を認めたが、骨壊死範囲としては、ゾレドロン酸水和物 (BP) の皮下注射を行った群; BP 投与群 (G3・G4) は、BP 非投与群 (G1・G2) と比較して大きい傾向を認めたが、統計学的な有意差は認められなかった。抜歯窩内の炎症性細胞浸潤に関しては、染色時に抜歯窩内の組織が剥がれ落ちるケースが多くみられた。観察が可能であったものに関しては、LPS 投与群に多い傾向が認められた。



##### (2) 歯周病併発 BRONJ モデルラットを用いた PMB の治療効果の検討

抜歯窩に PMB を填入した群 (G5) に関しても、同様の評価を行った。抜歯窩の治癒に関しては、明らかな骨露出は見られず、抜歯窩内に肉芽組織の増生が認められた。

骨壊死範囲に関しては G4 と比較して統計学的な有意差はみられなかったが、やや減少傾向を認めた。このことは、PMB が抜歯後の骨壊死発症予防の可能性をわずかではあるが示していると考えられた。



(3)まとめ

今回の研究では、まず LPS の上顎大白歯口蓋側歯肉への局所注射時に刺入部より注射液の漏出をうまくコントロール出来なかった。これに関しては、絹糸を用いた歯周病誘発法を代用することで改善できると考えている。また上顎大白歯抜歯時に歯根破折が起こり、残根状態のままになった症例が多くみられた。そのため、サンプル数が各群 4 症例と少なくなってしまった。本研究で得られた実験結果のばらつきが大きかったことも、抜歯手技が安定・確立できていないことが影響した可能性が考えられた。よって、実験を継続するにあたり、抜歯手技の確立・安定が必要不可欠である。

未だに BRONJ の治療方法は確立されておらず、治療に難渋する症例に遭遇することもあり、早急な病態解明や治療法・予防法が望まれている。今後は実験手技の安定性を高め、データの蓄積を行い、さらなる詳細な検討を行う必要があると考える。骨壊死に関しては、抗 RANKL 抗体製剤（デノスマブ）や血管新生阻害薬による発症例もあり、BP 製剤だけではなく、これらの薬剤についても検討が必要である。また、近年注目されている副甲状腺ホルモン（PTH）製剤（テリパラチド）の骨壊死への影響も併せて検討し、骨壊死に対する予防および治療モデルの確立を目指す必要がある。

5．主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況（計 0 件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年月日：

国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6．研究組織

(1)研究代表者

坂口 修 (SAKAGUCHI OSAMU)

九州歯科大学・口腔内科学分野・助教

研究者番号：00734584

(2)研究分担者

なし ( )

研究者番号：

(3)連携研究者

なし ( )

研究者番号：

(4)研究協力者

なし ( )