

令和 5 年 6 月 5 日現在

機関番号：14501

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2019～2022

課題番号：19K24093

研究課題名（和文）骨吸収抑制薬関連顎骨壊死における術中感染骨検知液の新規開発

研究課題名（英文）A novel intraoperative infection detecting liquid for medication-related osteonecrosis of the jaw

研究代表者

有本 智美（Arimoto, Satomi）

神戸大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：20841042

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では各種色素の効果を検討し、薬剤関連性顎骨壊死（MRONJ）に対する新規術中感染検出液の開発をした。まず、5種類の色素を用いた予備実験をラットMRONJモデルで実施した。無染色群、アシッドレッド・ブリリアントブルー・フロキシシン・メチレンブルー・ローズベンガル群での視覚的定量評価と組織学的評価から、ブリリアントブルーとフロキシシンを選択した。次にControl、未染色、ブリリアントブルー、フロキシシン群に分け、各染料を塗布し、骨削合した。骨削合8週間、軟組織評価・組織学的分析・マイクロCT分析を行った。その結果、フロキシシンは手術中に壊死した骨と正常な骨の部分を区別できることが分かった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究課題の核心をなす学術的「問い」は、染色液がMRONJの感染骨可視化を可能とするか、正確な術中切除範囲を決定し、病理組織学的に感染骨を除去可能かの2点である。

研究成果の概要（英文）：This study aims to study the effect of various dyes for detecting the infection bone area and then develop a novel intraoperative infection detecting liquid for medication-related osteonecrosis of the jaw (MRONJ). First, we performed preliminary experiment using five dyes by a rat MRONJ model. Rats were randomly assigned into six groups: Undyed, Acid red, Brilliant blue, Phloxine group, Methylene blue and Rose bengal group. Based on visual image and histological results, we selected Brilliant blue and Phloxine. Second, female SD rats were divided between Control groups, Undyed, Brilliant blue, and Phloxine. After establishing the MRONJ condition, we applied each dye. Stained area completely removed and the bone defect was closed suture. We were examined that soft tissue evaluation, histological analysis and micro-computed tomography (CT) analysis. These results indicated Phloxine dyes could distinguish necrotic bone area from normal bone area during surgery.

研究分野：外科系歯学

キーワード：顎骨壊死 う蝕検知液

## 1. 研究開始当初の背景

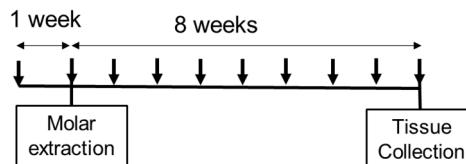
薬剤関連性顎骨壊死(MRONJ)は、骨粗鬆症患者・骨転移を有する癌患者等において使用されるビスフォスフォネート製剤(以下BP製剤)、デノスマブ製剤、血管新生抑制作用を持つ抗がん剤に関連して起こる口腔領域の疾患である。全ての薬剤の顎骨壊死は「感染」が引き金となっており、**感染層の除去は非常に重要**である。BP製剤は臨床的に有効性の高い薬剤であるが、BP系薬剤関連顎骨壊死(BRONJ)が発生し、Stage2以上のBRONJに対しては外科的療法を推奨する傾向にある。しかし、その切除範囲の明確な決定方法は明らかにされておらず、不十分な切除では再発や病巣拡大を引き起こし、逆に再発を危惧しover surgeryとなる場合もあり、患者QOLを著しく低下させる。これらの問題を解決すべく、新しい感染骨染色液を開発し、術中切除範囲の精度と有用性を検討する必要がある。**歯科領域のう蝕では、感染層・無菌層の2層より構成されており、感染層の除去が第一要件**である。しかし以前はMRONJと同様、どこまで感染歯質を除くべきか可視化できず、術者の手指感覚で判断するしかなかった。1973年に開発されたプロピレングリコールをアシッドレッドにて染色したう蝕検知液は感染層に浸透し、色素がコラーゲン線維を染色するため染め分けが可能となり、感染層のみのう蝕除去が可能となった。また、アシッドレッドは口腔内細菌が産生した糖タンパク質で形成されたバイオフィルム-1・6不溶性グルカンを染色し、**歯垢染色液**としても応用されている。本研究課題の核心をなす学術的「問い」は、**染色液がMRONJの感染骨可視化を可能とするか、正確な術中切除範囲を決定し、病理組織学的に感染骨を除去可能かの2点**である。

## 2. 研究の目的

MRONJに対して 歯科臨床に用いられている染色液を応用し、感染骨の可視化を可能とし、正確な術中切除範囲を決定させ、**低リスク・低コストかつ世界中の医療施設においてMRONJ患者に適応可能な新規感染骨染色液の開発**をすることである。

## 3. 研究の方法

### A. ラット顎骨壊死モデルを作成



BP製剤の投与：9週齢メスSprague-Dawley ratを用い、実験群は抜歯7日前・抜歯時にZoledronic acid (ZOL) 80 $\mu$ g/kgを静脈注射し、Control群では同量の生理食塩水を注射する。

抜歯：メドミジン+ミダゾラム+ブトルファノール0.15 + 2 + 2.5 (mg/kg) 腹腔内投与により全身麻酔を施行後、自作の手術台にて開口維持し、左側上下第一・二臼歯に2%リドカイン(1/8万エピネフリン含有) 0.01mlずつ33G注射針にて浸潤麻酔を施行する。自作のラット用ヘーベル・鉗子を使用し左側上顎第一・二臼歯抜歯を施行する。術中の顎部損傷に注意し、出血による気道閉塞対策として吸引器具による吸引を適宜行う。その後、ラウンドバーにて抜歯窩を整形し、5-0ナイロン糸にて閉鎖創とする。抜歯後8週目にペントバルビタールナトリウム200 (mg/kg) 腹腔内投与にて安楽死後、下顎骨を摘出した。顎骨壊死は、抜歯後8週目に露出した骨が持続している状態と定義した。

### B. 感染骨染色液として最適な色素の選択

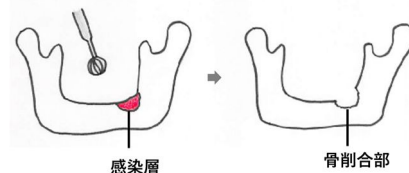
摘出下顎骨へ**染色液5種類** ( )**アシッドレッド群**：ニシカカリエスチェックレッド；日本歯科薬品株式会社，山口，日本 ( )**プリリアントブルー群**：ニシカカリエスチェックブルー；日本歯科薬品株式会社，山口，日本 ( )**フロキシシン群**：クローバー歯垢染め出し液；佐藤歯材株式会社，東京，日本 ( )**メチレンブルー群**：ヴィスタブルー；モリムラ株式会社，東京，日本 ( )**ローズベンガル群**：プロスペック歯垢染色液(ジーシー株式会社，東京，日本)で染色し、各々の商品の使用方法に従い、水洗を行った。

### C. 評価方法

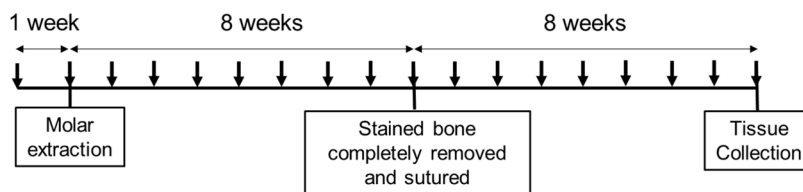
ImageJ (NIH, Bethesda, MD)による視覚的定量評価  
骨露出面積・口腔粘膜腫脹面積の計測を行った。

標本作成・評価：採取組織を4%中性緩衝ホルマリン溶液、24時間にて固定し、10%エチレンジアミン四酢酸、6-8週間にて脱灰。パラフィン包埋後、薄切し Hematoxylin-Eosin(H&E)染色・酒石酸抵抗性酸性ホスファターゼ(TRAP)染色を行った。骨壊死領域は、4個以上の empty osteocyte lacunae や pyknotic osteocytes によって定義した。

$\mu$ X線CT(R\_mCT; Rigaku Corporation, Tokyo, Japan)による三次元的構造解析



#### D. 新規感染骨染色液の精度と有用性の確認



A( )までを同様に行い、新規感染骨染色液にて染色し、染色部は、淡い部分も含めてラウンドバーにて骨削合を行った。骨削合後8週目ペントバルビタールナトリウム 200 (mg/kg) 腹腔内投与にて安楽死後、下顎骨を摘出した。  
臨床所見上の骨髄炎の再燃と考えられる骨露出・口腔内外瘻孔の有無確認し、Cと同様の解析を行い、新規感染骨染色液の精度と有用性の確認を行った。

#### 4. 研究成果

ZOL 投与開始時のラットの平均体重は  $238.7 \pm 22.4\text{g}$ 、抜歯後の平均体重は  $254.2 \pm 20.9\text{g}$  であった。また、抜歯後 8 週間および 18 週間の安楽死後のラットの平均体重は、それぞれ  $319.7 \pm 25.9\text{g}$  および  $325.9 \pm 34.3\text{g}$  だった。このように、抜歯後の処置や歯槽骨手術の有無にかかわらず、すべてのラットで体重が増加した。また本プロトコルは、既存の報告を修正したことにより、私たちの予備実験において、安定的に高頻度骨露出 MRONJ ラットモデルを作成することが確認された。

ラット MRONJ モデルによる 5 種類の色素を用いた予備実験  
摘出下顎骨へ染色液 5 種類 ( ) アシッドレッド群, ( ) プリリアントブルー群, ( ) フロキシシン群, ( ) メチレンブルー群, ( ) ローゼベンガル群により染色を行い、5 種類の色素を用いた  
視覚イメージの定量的評価・組織学的解析を行った、



##### ・ ImageJ による視覚的定量評価

Grayscale intensity の平均は、未染色群  $82.9 \pm 4.7$ 、アシッドレッド群  $61.2 \pm 7.2$ 、プリリアントブルー群  $35.9 \pm 12.1$ 、フロキシシン群  $49.2 \pm 7.2$ 、メチレンブルー群  $56.8 \pm 9.9$ 、ローゼベンガル群  $67.2 \pm 10.1$  でした。

未染色群の grayscale intensity は、プリリアントブルー群 ( $p < 0.01$ )、フロキシシン群 ( $p < 0.05$ ) よりも有意に高かった。また、プリリアントブルー群の grayscale intensity は、ローゼベンガル群 ( $p < 0.05$ ) よりも有意に低かった。

##### ・ 組織学的評価

6~8 週間の脱灰後、アシッドレッド群は他の群に比べ、残存色素が消失した。プリリアントブルーとフロキシシンは骨壊死部の染色は継続し、メチレンブルーとローゼベンガルは染色直後の写真と同様に上顎骨全体を染色した。未染色群では壊死した骨と炎症細胞の浸潤が認められた。アシッドレッド群では、いずれの組織切片でも染色部位は確認できなかった。プリリアントブルー群は、骨壊死部周辺の炎症組織を染色した。フロキシシンおよびローゼベンガル群は、empty lacunae への色素の浸潤を認めた。メチレンブルー群は、骨壊死部から離れた場所を染色していた。視覚的定量評価と組織学的評価から、プリリアントブルーとフロキシシンを選択した。

予備実験の結果により、( ) Control 群, ( ) 未染色群, ( ) プリリアントブルー群, ( ) フロキシシン群の計 4 群において、染色液の精度と有用性の確認を行った。

骨削合 8 週間後、ラットを安楽死した。壊死した骨が露出した面積に有意差はなかった。フロキシシン群の口腔粘膜腫脹面積は、未染色およびプリリアントブルー群に比べ有意に低かった ( $p < 0.05$ )。また、未染色群、プリリアントブルー群の口腔粘膜腫脹面積は、Control 群に比べ有意に高かった ( $p < 0.01$ )。マイクロ CT 解析では、骨治癒指数は Control 群が未染色群より有意に高く ( $p < 0.01$ )、他の群では有意差はなかった。H&E 染色では、未染色群とプリリアントブルー

一群の骨壊死面積が Control 群に比べ有意に高かった ( $p < 0.01$ ). さらに, フロキシシン群の骨壊死面積は, 未染色群に比べ有意に低かった ( $p < 0.05$ ). TRAP 染色では, Control 群の破骨細胞数は, 未染色およびプリリアントブルー群 ( $p < 0.01$ ), フロキシシン群 ( $p < 0.05$ ) よりも有意に多かった.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 有本智美, 長谷川巧実, 重永一輝, 久保将大, 米田亜紀子, 武田大介, 重岡学, 明石昌也
2. 発表標題 高頻度に骨露出を誘発する薬剤関連性顎骨壊死モデルの開発.
3. 学会等名 第67回日本口腔外科学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 重永一輝, 有本智美, 長谷川巧実, 明石昌也.
2. 発表標題 Dual Energy CTによる骨髄イメージングソフトを用いた薬剤関連性顎骨壊死 (MRONJ) の評価.
3. 学会等名 第67回日本口腔外科学会総会
4. 発表年 2022年

〔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
---------	---------