

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 17 日現在

機関番号：32710
研究種目：若手研究（B）
研究期間：2011～2012
課題番号：23792454
研究課題名（和文） 副作用を軽減する安全で簡便なビスフォスフォネート製剤の投与方法の開発
研究課題名（英文） The development of a new route of administration to relieve the side effects of Bisphosphonates.
研究代表者 船山 ひろみ（FUNAYAMA HIROMI） 鶴見大学・歯学部・助教 研究者番号：00359530

## 研究成果の概要（和文）：

骨吸収抑制薬 bisphosphonate (BP)は、その強い骨吸収抑制作用により骨吸収亢進を伴う疾患に広く応用されているが、インフルエンザ様の炎症反応や消化管傷害などの副作用がある。イオントフォレシス（IOP）は電場を用いて薬剤の経皮的な吸収を増加させる方法で、無痛で、消化管・肝臓での薬物代謝も少ない。本研究で、BPs の IOP によるマウスへの経皮的な投与に成功し、その効果は IOP の通電量、通電時間、BP の濃度に比例して増加する結果を得た。

## 研究成果の概要（英文）：

Bisphosphonates (BPs) have powerful anti- bone-resorptive effects. However, BPs are known to have several undesirable side effects (such as influenzalike fever, gastrointestinal disturbance). Iontophoresis is the one of the electrical methods that have been employed to enhance drug transportation across the skin. Transdermal drug delivery has a number of potential advantages compared with conventional methods: painless, no degradation from passage through the gastrointestinal tract or the liver. BPs were successfully transported through living mouse skin in a dose-, voltage-, and time-dependent manner.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・矯正・小児系歯学

キーワード：ビスフォスフォネート，マウスモデル，イオントフォレシス，顎骨壊死。

## 1. 研究開始当初の背景

(1) BPs の特徴：BPs の強い骨吸収抑制作用は、骨転移性腫瘍や骨粗鬆症などの骨吸収亢進を伴う疾患に広く応用され、現在世界中で約 2 億人の患者に投与されているという。BPs が急性の発熱や消化管傷害などの炎症性副作用を持つことは以前より知られており、経口服用の際にも副

作用に配慮した細かい指示がある。それにも関わらず消化器の不調を訴え治療を断念せざるを得ない患者も多い。近年、予期せぬ顎骨壊死とそれによる顎骨の露出という副作用が続発し、この数年で数千人の発症が確認されるに至っている。発症患者の大部分は骨転移性腫瘍患者（BP の点滴投与）であるが、骨粗鬆症

(錠剤服用)の患者でも発症している。BPは骨ハイドロキシアパタイトに強く結合し、反復投与により“骨に蓄積”するため、現状のまま投与が続けられれば、さらに数万人、数十万人の発症の可能性を否定できない。これまで若年者での顎骨壊死の報告はないが、小児においてもBPは骨形成不全症や小児骨粗鬆症の患者に投与されている。骨形成不全症の患者ではBPのインフルエンザ様副作用による死亡例も報告されている。

- (2) **NBP と non-NBP:** 顎骨壊死は窒素を含むBP(以後NBPと略)により発症し、骨吸収抑制作用が最強のzoledronate(Zol)による発症頻度が最も高い。しかし、pamidronate, alendronate, risedronateなど他のNBPでも発症が確認されている。一方、窒素を含まないBP(以後non-NBPと略)のclodronate(Clo)とetidronate(Eti)による確かな発症例は無い。
- (3) **NBPの炎症・壊死作用と細菌成分による増強:** マウスへのLPSの静脈注射は顎骨にヒスタミン合成酵素(histidine decarboxylase, HDC)を誘導し、この誘導はNBP投与マウスで著しく増強される。NBPの炎症・壊死(マウス耳介モデルで検討)作用は、骨吸収抑制作用とほぼパラレルである。NBPと免疫刺激物質(LPS, IL-1, TNF)は相互に炎症反応を増強し、LPSはNBPの壊死作用も増強する。
- (4) **BP-band:** 成長期マウスへのBPの1回投与は脛骨骨端部にX線低透過帯(BP-bandと呼称)を発現し、その強度は投与したそれぞれのBPの用量に依存する。BP-bandは骨吸収抑制作用を評価する有用な指標となる。
- (5) **NBP と non-NBP の併用効果:** Non-NBPのCloとEtiをNBPと併用投与すると炎症性の副作用が抑制される。CloとNBPの併用投与はNBPの炎症・壊死作用を抑制するが、骨吸収抑制作用は抑制しない。CloはNBPの副作用抑制において、既存の抗炎症薬に勝る。一方、EtiとNBPの併用は、NBPの炎症・壊死作用と骨吸収抑制作用の両方を抑制し、Etiはすでに骨に結合しているNBPと置き換わる。
- (6) **イオントフォレシス(IOP):** イオン化した薬剤が電氣的反発と電気浸透により物質移動を起こす現象で、その作用により、局所麻酔薬などの経皮的な吸収を増加させる方法が知られている。実際に米国の

Iomed社、及びVyteris社から、局所麻酔薬の経皮導入用電極が発売されている。このIOPでは、薬液を担持させた薬物保持層を皮膚に貼付し、電圧をかけることで皮下に麻酔薬を浸透させることができ、すばやく皮下に種々の薬液を浸透させることが可能である。

## 2. 研究の目的

NBPsによる顎骨壊死の機序解明を目指すとともに、イオン導入法(イオントフォレシス:IOP)技術の応用により、副作用を軽減する安全で簡便なBPs製剤の投与方法の開発を試みる。そのため適切な薬剤・通電条件や部位を問わず使用可能な電極など、確実な効果を得るために更なる薬物送達システムの開発を目指し、歯科におけるBPの様々な応用も検討する。

- (1) **マウス耳壊死モデルでの解析:** NBPの壊死作用に関する研究は殆どないが、Schenkら(1986)は、NBPはラットの皮下注射で局所に壊死を起こすが、Cloは起こさないことを報告している。研究代表者は、NBPの壊死作用を解析するモデルとして、マウス耳介への皮下注射を検討した。その壊死作用は、報告されている骨吸収抑制作用とほぼ一致し、この実験系においても、CloとEtiは、壊死に対して強い抑制効果を示し、また、LPSは壊死の発症を増強・促進した。マウス耳介モデルを用いてNBPによる壊死作用の機序解明とIOPによる経皮・経粘膜実験の基礎データを得る。
- (2) **BPの組織への取り込み:** IOPに適したBP溶液の検討を行う。1種の薬剤だけでなく、NBPとnon-NBPの併用投与、抗炎症・鎮痛効果など複数の薬剤を投与出来る可能性を模索する。とくに、NBPとCloの併用は、BPsの強い骨吸収抑制作用を維持し、かつ、投与部位も含めて、炎症性副作用を予防できる可能性が高く、本研究の大きな特徴である。
- (3) **投与部位:** IOPは電気通電により薬剤を送達させるため湿潤環境では技術的困難が伴う。まず、耳や背部の皮膚を対象に研究を実施し、経皮的な安全なBPの全身投与方法を開発する。次いで口腔内環境に準じ粘膜上皮への応用を模索し、歯科治療としての口腔内局所への投与を検討する。アルギン酸電極を試作し、電極となる金属シートとの結合方式、金属イオンの添加による通電特性などの検討も必要である。

### 3. 研究の方法

本研究では、IOP 技術の応用により、副作用を軽減し、より安全で簡便な薬剤担持型電極材料を用いた新しい BPs 製剤の投与方法の開発を目指す。更に NBP と non-NBP 併用薬剤の皮膚吸収性および炎症・壊死作用の抑制効果について検討し、骨吸収抑制作用を發揮できる用量を模索する。

6週齢の雄性 BALB/c マウスの耳介へ試作薬剤担持型電極を用いた実験を行った。今回使用した BPs は、骨吸収抑制作用が最強の NBP の一つである zoledronate (Zol) を使用した。通電装置は、Iomed 社製 phoresor II Auto。脳波測定用コロディオン電極を自作のアダプターにてマウス耳介に固定し、IOP に適した BP 溶液（イオン化、濃度等）、通電条件の検討を行った。耳介の炎症・壊死反応について経時的に観察し、経皮的に投与された BP の全身的骨吸収抑制作用については IOP 投与 3 週後に脛骨を摘出し、BP-band 形成を指標に検討した。

また、これまで研究代表者らが報告した、骨吸収抑制作用は NBP より弱い、NBP の炎症・壊死作用を抑制する効果を持つ non-NBP の一つである clodronate (Clo) と zoledronate の併用投与も検討した。

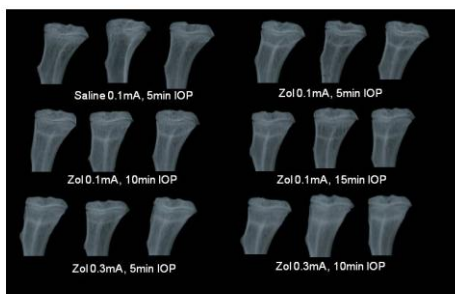
### 4. 研究成果

#### (1) IOP の条件（電流・作用時間）の検討

Zol (10 mM) の IOP による経皮的なマウス耳介への投与により BP-band 形成が認められた。BP-band 形成量は IOP の通電量、通電時間に比例して増加したが、耳介の炎症・壊死反応の頻度も増加した。

#### BALB/c: 6w, ♂, n = 3 iontophoresis (IOP) の条件を検討

Zol 10 mM の濃度で電流および時間を検討。3 週後 tibia 摘出。軟X線撮影。



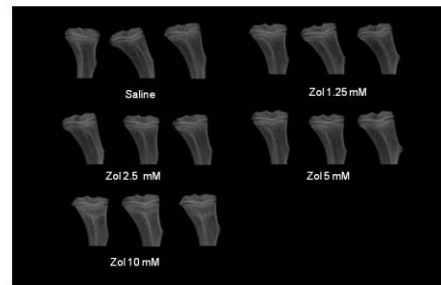
#### (2) Zol の用量依存性の検討

IOP の電流を 0.1 mA、通電時間を5分に固定し、Zol の用量依存性を検討した。BP-band 形成は Zol の濃度 10 mM で認められたが、それ以下の濃度では認められなかった。炎

症・壊死を生じず、安全に骨吸収抑制効果を示す通電条件は 0.1 mA、5 minであり Zol の濃度は 10 mMであった。

#### BALB/c: 6w, ♂, n = 3 Zol の用量依存性を検討

電流を 0.1 mA、時間を 5 min と固定し Zol の濃度を変化させて IOP 投与し、3 週後 tibia 摘出。軟X線撮影。Zol の用量依存性を検討



#### (3) Zol と Clo の併用投与の検討

IOP 投与にてマウス耳介に炎症の起こる条件（電流 0.5 mA、通電時間を5分、Zol 10 mM）で Clo 50 mM の併用効果を検討した。Clo 50 mM の単独投与では、BP-band 形成は認められたが、炎症・壊死は認められなかった。Zol 単独投与でマウス耳介に炎症を生じる条件にて Clo との併用実験を行ったが、明らかな炎症抑制作用は認められなかった

#### BALB/c: 6w, ♂, n = 3 Zol と Clo の併用投与の検討

電流を 0.5 mA、時間を 5 min と固定し Zol および Clo の混合液 (Zol: 10 mM, Clo: 50 mM) を IOP 投与し、3 週後 tibia 摘出。軟X線撮影。



本研究で、IOP を用いてマウス耳介への BP の送達に成功した。IOP による BPs の投与は、研究代表者らがこれまで行ってきた様々な投与方法（静脈内、腹腔内、皮下等）に比べ、炎症性副作用が生じにくいとの印象を得たが、今後、それを確実にするために、マイクロダイアリシスプローブによる薬剤浸透量の測定、また耳介の炎症・壊死反応について経時的に観察し、耳介組織内炎症性サイトカインの動向を探り、免疫組織学的検討を行う必要があると思われる。IOP を用いた経粘膜での BP の送達についても、ポリアニオン性の水溶性多糖類（アルギン酸）を用いた IOP 用電極組合物を用いた経粘膜での実験を予定している。炎症性副作用無く経粘膜投与が可能になれば、歯科での応用の必要性は高い。

現在世界中で約2億人の患者に BP は投与

されている。注射による薬物投与は痛みや恐怖感を伴い組織損傷を引き起こし、経口投与は胃または十二指腸から吸収され肝臓での first pass effect を受けるため薬物の degradation が生じるほか、胃腸障害を引き起こすなどの欠点がある。電場を用いた経皮、経粘膜投与は無痛であり、肝臓での薬物代謝は少なく、医療面・社会面での価値は大きい。また、顎骨壊死の発症の機序が解明出来れば、これらの人々の顎骨壊死の予防と治療に資するとともに、副作用を克服出来れば IOP の経粘膜投与による歯科での局所投与への応用も可能となろう。

#### 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 4 件)

- ① Den X, Oguri S, Funayama H, Ohtaki Y, Ohsako M, Yu Z, Sugawara S, Endo Y. Prime role of bone IL-1 in mice may lie in emergency Ca<sup>2+</sup>-supply to soft tissues, not in bone-remodeling. *Int Immunopharmacol*. 14: 658-664, 2012. (査読有)  
DOI: 10.1016/j.intimp.2012.10.001
- ② Den X, Oguri S, Funayama H, Ohtaki Y, Ohsako M, Yu Z, Sugawara S, Endo Y. Prime role of bone IL-1 in mice may lie in emergency Ca<sup>2+</sup>-supply to soft tissues, not in bone-remodeling. *Int Immunopharmacol*. 14: 658-664, 2012. (査読有)  
DOI: 10.1016/j.intimp.2012.10.001
- ③ Huang L, Kinbara M, Funayama H, Takada H, Sugawara S, Endo Y. The elicitation step of nickel allergy is promoted in mice by microbe-related substances, including some from oral bacteria. *Int Immunopharmacol*. 11: 1916-1924, 2011. (査読有)  
DOI: 10.1038/hr.2012.125.
- ④ 船山ひろみ. 窒素含有 bisphosphonates (NBPs) の炎症・壊死作用と non-NBPs による抑制: etidronate (non-NBP) の NBPs 代用薬としての提案. 有病者歯科医療, 19: 97-109, 2011. (査読無)

[学会発表] (計 8 件)

- ① George Gallos, Hiromi Funayama, Wen Fu, Matthew Siviski, Richard Smiley, Charles W. Emala. Targeting Uterine

Smooth Muscle TMEM16 Calcium Activated Chloride Channels to Suppress Oxytocin Induced Contractions and Calcium Handling. American Society of Anesthesiologists Annual Meeting, October 13-17, 2012, Washington, DC, USA.

- ② Matthew Siviski, Hiromi Funayama, Wen Fu, Richard Smiley, Charles W. Emala, George Gallos. Targeting Uterine Smooth Muscle TMEM16 Calcium Activated Chloride Channels to Suppress Oxytocin Induced Contractions and Calcium Handling. Association of University Anesthesiologists 59<sup>th</sup> Annual Meeting, May 17-19, 2012, Cleveland, Ohio, USA.
- ③ 深瀬直子, 船山ひろみ, 井出正道, 朝田芳信. 口腔内へ異物が迷入した幼児期の 2 症例 一歯頸部に嵌入したプラスチックチューブの除去と予後について— 日本小児歯科学会 50 周年記念大会, 2012 年 5 月 12-13 日, 東京国際フォーラム.
- ④ 宗正 隆明, 伊平 弥生, 船山ひろみ, 成山 明具美, 友廣 忠文, 佐貫 左知緒, 朝田 芳信. 小児の齶蝕象牙質除去に対する Carisolv<sup>TM</sup> の有用性と臨床的予後について. 第 49 回日本小児歯科学会大会, 2011 年 11 月 28-29 日, いわて県民情報放流センター・アイーナ.
- ⑤ 平山 展大, 船山ひろみ, 加藤 靖隆, 宗正 隆明, 朝田 芳信. 歯髓細胞バンクに対する意識調査 ~歯学部附属病院小児歯科患者の保護者を対象に行ったアンケートからの報告~. 第 49 回日本小児歯科学会大会, 2011 年 11 月 28-29 日, いわて県民情報放流センター・アイーナ.
- ⑥ 加藤 靖隆, 船山ひろみ, 平山 展大, 宗正 隆明, 朝田 芳信. 歯髓細胞バンクに対する意識調査 幼稚園の保護者を対象に行ったアンケートからの報告. 第 49 回日本小児歯科学会大会, 2011 年 11 月 28-29 日, いわて県民情報放流センター・アイーナ.
- ⑦ 太田 増美, 船山ひろみ, 田島 格, 加藤 靖隆, 澤屋敷 沙織, 平山 展大, 朝田 芳信. 小児における齶蝕感受性候補遺伝子の SNPs 解析. 第 49 回日本小児歯科学会大会, 2011 年 11 月 28-29 日, いわて県民情報放流センター・アイーナ.
- ⑧ 船山ひろみ, 宗正隆明, 岡田諭, 遠藤康男, 朝田芳信. マウス炎症性サイトカインに対する bisphosphonates の効果. 第 29 回日本骨代謝学会学術集会骨代謝学会,

2011年7月28-30日，大阪国際会議場。

〔図書〕（計1件）

- ① 船山ひろみ，黄 玲，朝田芳信，横地高志，高田春比古，遠藤康男．医学図書出版，菌体成分によるマウスでのショック反応．エンドトキシン・自然免疫研究14 自然免疫と生体防御（日本エンドトキシン・自然免疫研究会 福井 博 他編），2011，p.37-41.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

船山 ひろみ（FUNAYAMA HIROMI）

鶴見大学・歯学部・助教

研究者番号：00359530

(2) 研究分担者

無し

(3) 連携研究者

無し