

ビスホスホネート関連顎骨壊死（BRONJ）に対する 新規治療法の開発

神戸大学大学院 医学研究科・医学部 歯科口腔外科
教授 古森 孝英

（共同研究者）

神戸大学大学院 医学研究科・医学部 歯科口腔外科
医員 長谷川 巧実

実験①

はじめに

「下顎骨骨折血腫由来細胞にBP製剤を投与またLIPUS照射を行い、生物学的作用を調べる
ことによるBRONJへのLIPUSの応用」を目的とした研究は、初めに下顎骨骨折血腫由来細胞
(MHC) に対するLIPUSの効果について検討を行った。

下顎骨骨折を生じた場合に形成される骨折血腫中に、多分化能を有するヒト下顎骨骨折血
腫由来細胞 (Mandibular fracture hematoma cells(以下MHC)) が存在し、下顎骨骨折治癒
過程において非常に重要な働きをしていることを過去に報告してきた。また、整形外科領
域で、低出力超音波パルス (LIPUS) が骨癒合を促進することは広く知られており、保険適応
されている。しかし、実際にヒトの下顎骨骨折においてLIPUSがどのように作用し、骨折の
治癒がどのようなメカニズムで促進されるかについて現段階では詳細に解明されていない。

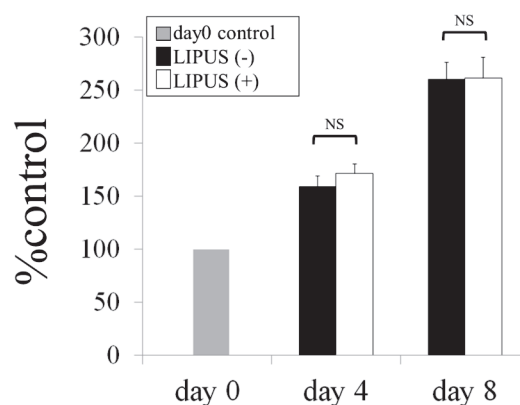
ヒト下顎骨骨折部より採取した血腫を分離培養し、MHCを採取。これを用いてLIPUS照射
群と非照射群において以下の項目について検討を行った。

(図1)

① cell count法を用いた細胞増殖能に
ついて

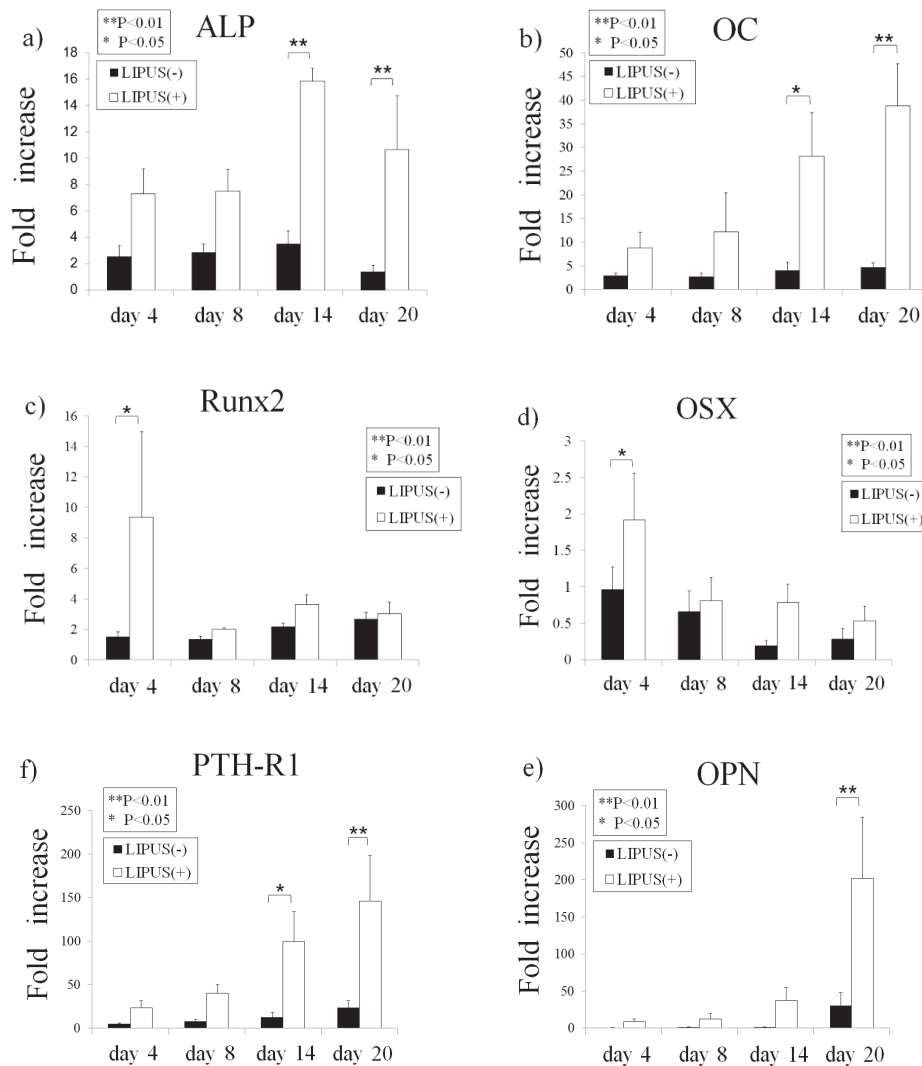
Day0を100%の基準とし、day4, day8
において照射群、非照射群の比較検討を
行なった。

若干のLIPUS(+)群の増加は認めたが、
有意差は認めなかった。(図1)



② real-time PCR法を用いた骨分化能の比較（遺伝子レベル）（図2）

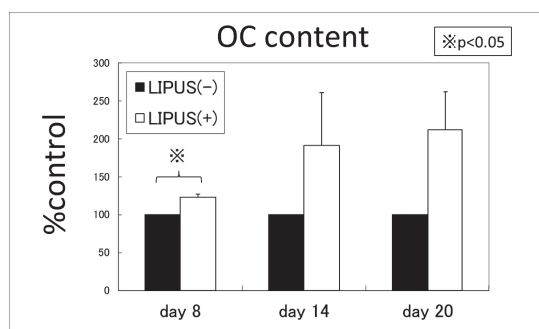
(図2)



6つの項目について調べた。各項目においても時期に差はあるものの照射群の方が有意に上昇した結果となった。(図2)

③ ELIZA法を用いた骨分化マーカー（オステオカルシン）の比較（タンパクレベル）

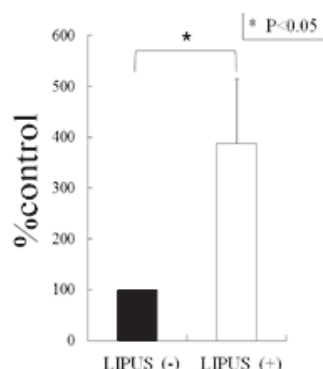
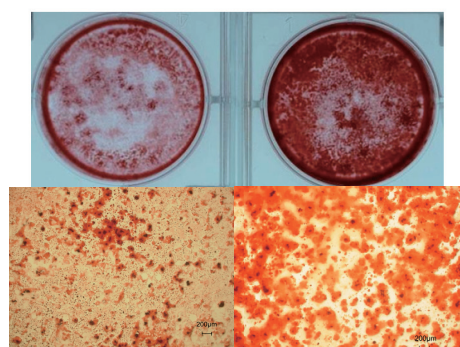
(図3)



Day8においてオステオカルシンの発現に有意差を認めた。(図3)

④アリザリンレッドS染色による骨分化能（骨形成）の比較、エチルピリジウムクロライドによる骨形成の定量化（図4）

（図4）



照射群と非照射群に染色の差を認める。拡大すると骨の結晶の大きさに差を認める。

定量化したグラフにおいても照射群の方が有意な上昇を認めた。（図4）

考 察

Real-time PCR、アリザリンレッド染色で、いずれもLIPUS照射群が有意に高値を示し、MHCの骨分化能はLIPUSによって上昇すると考えられた。cell countでは、有意な差はなく、MHCの増殖能はLIPUSによって影響しないと考えられた。LIPUSは下顎骨骨折治療に有用であることが示唆された。

要 約

5人の下顎骨骨折患者から血腫を採取し、MHCを分離培養し、LIPUS照射群、非照射群に分けて骨分化誘導を行った。control（非照射）群、4日、8日、14日、20日LIPUS照射群に対して、骨分化能および増殖能の比較検討を行った。

結果:real-time PCR、アリザリンレッド染色で、いずれもLIPUS照射群が有意に高値を示し、MHCの骨分化能はLIPUSによって上昇すると考えられた。cell countでは、有意な差はなく、MHCの増殖能はLIPUSによって影響しないと考えられた。結論：今回、我々は初めてLIPUSがMHCの骨分化能を促進することをin vitroで証明した。このことは下顎骨骨折の初期過程において、LIPUSがMHCに作用し、骨癒合などの促進に関与している可能性を示唆している。

文 献

1. Hasegawa T, Miwa M, et al. Mandibular hematoma cells as a potential reservoir for osteoprogenitor cells in fractures. J Oral Maxillofac Surg 2012; 70: 599-607.
2. Hasegawa T, Miwa M, et al. Osteogenic activity of human fracture haematoma-derived progenitor cells is stimulated by low-intensity pulsed ultrasound in vitro. J Bone Joint Surg Br 2009; 91:264-70.

実験②

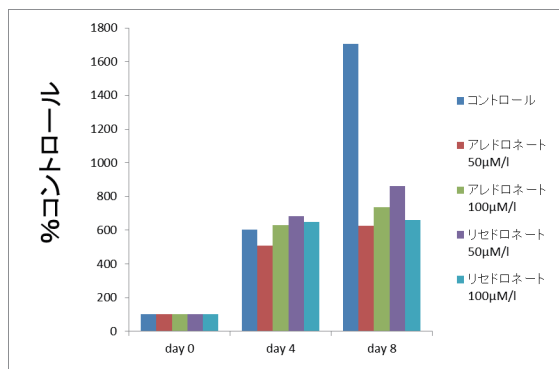
はじめに

「下顎骨骨折血腫由来細胞にBP製剤を投与またLIPUS照射を行い、生物学的作用を調べることによるBRONJへのLIPUSの応用」を目的とした研究は、実験①においてLIPUSの効果は証明した。続いて下顎骨骨折血腫由来細胞（MHC）に対するビスホスホネート製剤の効果について検討を行った。こちらについては現在も継続中である。途中経過を報告する。今回使用したビスホスホネート製剤は第二世代：アレンドロネート、第三世代：リセドロネートの2種類を使用し、まず初めに濃度を $50 \mu\text{M/l}$ と $100 \mu\text{M/l}$ の2種類の濃度で開始した。

ヒト下顎骨骨折部より採取した血腫を分離培養し、MHCを採取。これを用いて以下の項目について検討を行っていく。

途中経過まで報告する。現在；検体数4検体（5～7予定）

① 細胞増殖能



アレンドロネートとリセドロネートにおいて50、 $100 \mu\text{M/l}$ ともに細胞増殖能は抑制された。day8を超えて細胞採取を予定していたが、10日目前後より細胞数が激減したため、検体採取困難になったため、設定濃度を変更し、現在も継続中である。

考 察

細胞培養中、ビスホスホネート製剤投与群については各濃度においても10日目前後で細胞数が激減した。これらの現象はビスホスホネート製剤の細胞への蓄積によるアポトーシスが生じたと考えている。他の論文では、初回時のみ6時間程度の暴露や、低濃度での培養をされていることから、今回の濃度設定が高く、細胞毒性が強く生じたものと考えている。よって、現在ビスホスホネート製剤の濃度100nM/l単位領域で行なっている。

文 献

1. Corrado A, Neve A, Maruotti N, Gaudio A, Marucci A, Cantatore FP. Dose-dependent metabolic effect of zoledronate on primary human osteoblastic cell cultures. Clin Exp Rheumatol. 2010; 28: 873-9.
2. 堂前英資、吉川美弘、鎌田愛子、上野真徳、前田潤一郎、合田征司、池尾隆 ビスホスホネートが骨芽細胞の増殖および遺伝子発現に与える影響 日本再生歯科医学会誌巻 2010; 2: 182-191