

令和 3 年 6 月 1 日現在

機関番号：11301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2019～2020

課題番号：19K24135

研究課題名(和文)ファイトケミカルを応用した骨粗鬆症患者の骨代謝能改善：基盤技術確立と作用機序解明

研究課題名(英文)Effect of oral administration of phytochemicals on bone formation at tooth extraction sockets in an osteoporotic animal model

研究代表者

穴戸 駿一(Shishido, Shunichi)

東北大学・歯学研究科・助教

研究者番号：20850613

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、骨粗鬆症モデル(卵巣摘出)ラットにおいて、ファイトケミカルの経口投与が抜歯窩(歯槽骨)の治癒に及ぼす影響を評価することを目的とした。7週齢の雌性ラットにおいて卵巣摘出を行い、1週間後に上顎左右第一大臼歯を抜歯した。卵巣摘出の翌日から実験終了時までプロアントシアニジン(100 mg/2.5 mL/kg)を毎日経口投与して、8週間後の抜歯窩の状態をマイクロCTと組織切片で評価した。結果、プロアントシアニジン投与群とコントロール(水投与)群と比較して新生骨量に大きな差はみられず、今回の方法では卵巣摘出ラットにおける抜歯後の新生骨量に対するプロアントシアニジンの効果は確認できなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ファイトケミカル(植物性化学物質)は安全性が高く、一般的な骨粗鬆症治療薬であるビスフォスフォネート製剤とは異なり、副作用を惹起するリスクは低い。そのため、骨粗鬆症患者の歯科治療における新たな医薬品あるいは特定保健用食品となる可能性を秘めており、本研究でその効果を示せば社会的な意義は大きい。また、本研究ではラットの卵巣摘出術+抜歯+ファイトケミカル投与の実験系を用いており、今後様々なファイトケミカルの投与を通してその効果の検討や作用機序の解明を行うことができるため学術的に意義がある。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study was to evaluate the effect of proanthocyanidin, a kind of phytochemicals, on alveolar bone healing of ovariectomized (OVX) rats. Female Wistar rats (7 weeks old) underwent OVX surgery, and their right-and-left upper 1st molars were extracted 1 week after the surgery. In the test group, oral administration of proanthocyanidin (100 mg/2.5 mL/kg) suspended in water was carried out once daily for 9 weeks, while water (vehicle) was administrated for rats in the control group. The maxillae excised from the animals after sacrifice were subjected to micro-computed tomography (CT) and histological analyses. The analyses revealed that there was no difference in the newly formed bone in the tooth extraction socket between test and control groups. Thus, the effect of oral administration of proanthocyanidin on the bone formation at a tooth extraction socket could not be demonstrated by the analytical methods used in the present study.

研究分野：歯科補綴学

キーワード：ファイトケミカル ポリフェノール プロアントシアニジン 卵巣摘出ラット 骨粗鬆症 抜歯窩

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

閉経により女性ホルモンの一種であるエストロゲンが低下すると骨粗鬆症を発症するリスクが増大する。骨粗鬆症は、骨強度が低下する疾患であり歯科用インプラント治療のリスクファクターの一つと考えられている(歯科インプラント治療指針:厚生労働省)。また、骨粗鬆症は抜歯窩の治癒遅延にもつながる(Arioka et al. J Dent Res, 98:450-458, 2019)。従って、骨粗鬆症患者の歯槽骨の骨代謝能(骨治癒能)を改善する技術を確立できれば、骨粗鬆症患者における歯科治療の質の向上に貢献できる。

ファイトケミカル(植物性化学物質)の一種であるイソフラボンは、腸内細菌によってエクオールに代謝されることでエストロゲン様作用を発揮して骨粗鬆症患者の骨代謝能を改善する(Uehara et al. J Clin Biochem Nutr 52:193-201, 2013)。しかしながら、実際に腸内でエクオールが産生されている人は、骨粗鬆症患者の約20%程度(Yoshikata et al. Menopause 26:273-285, 2019)であり万人に有効な方法とは言い難い。そこで我々の研究グループでは、イソフラボンに代わる物質として果物などに多く含まれるプロアントシアニジンに着目して評価を行ってきた。これまでに、卵巣摘出ラットにプロアントシアニジンを経口投与することで、大腿骨の骨量が改善すること、さらに頭蓋骨に作製した骨欠損の治癒が促進されることを発見した(Tenkumo et al. Sci Rep, 10:8812, 2020)。

現在のところ、我々が発見したプロアントシアニジンによる骨粗鬆症ラットの骨治癒促進の作用機序は不明な部分が多い。in vitro 試験においてプロアントシアニジンが骨芽細胞の分化を促進することが示されているが(Park et al. Plos One 7:e51377, 2012)、経口摂取したプロアントシアニジンは小腸ではほとんど吸収されないため、血中に移行せずに大腸に到達する(Habauzit et al. Phytochem Rev 7:313-344, 2008)。従って、in vitro 試験で認められた効果が作用機序の主体であることは考えにくい。

一方、最近の研究では、プロアントシアニジンは腸内細菌叢に影響を及ぼし、代謝異常症候群を改善することが報告されている(Jin et al. J Med Dent Sci 65:45-50, 2018 & J Food Sci 83:1149-1152, 2018)。従って、骨代謝能の改善効果も同様に、腸内細菌叢の作用を介して発揮されていることは十分に考えられる。先行研究の結果を考慮すると、以下の仮説が考えられる。

プロアントシアニジンは大腸の細菌によってエクオールとは異なるエストロゲン様作用を示す物質に代謝されて骨代謝能を改善する、もしくはプレバイオティクスとして腸内細菌叢の構成に影響を及ぼしビタミンDやカルシウムの吸収を促進することで骨代謝の改善に寄与する。

国内外を問わず上記の仮説の実証は行われておらず、本研究による基盤技術の確立を通して、骨粗鬆症患者の歯科医療の向上に貢献する。

2. 研究の目的

本研究では、前述した申請者らのこれまでの発見を発展させて、食物に含まれる安全性の高いファイトケミカルを応用して骨代謝を改善させることで骨粗鬆症患者の歯科治療の質の向上を目指す。具体的には、卵巣摘出による骨粗鬆症モデル動物において、プロアントシアニジンとその他のファイトケミカルの経口投与が抜歯窩(歯槽骨)の治癒に及ぼす影響を比較および評価して歯科応用に最適な基盤技術を確立し、さらにその作用機序を解明することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) ラット抜歯モデルを用いた抜歯窩治癒期間の検討

本研究では、卵巣摘出ラットに対してプロアントシアニジンを経口投与することによって、抜歯窩の治癒がどの程度促進されるのかを評価することを目的とした。従って、実験計画を立てる上で、まずは通常のラット(卵巣摘出なし)において抜歯窩の治癒にかかる期間を正確に把握する必要があった。以上の理由から、実験(1)では、これまでの先行研究を参考にして、抜歯後の治癒期間を変えた3つのグループを設定して動物実験を行った。実験動物として7週齢の雌性Wistarラットを用いた。実験期間中、固形試料(CE-2、日本クレア)と水道水を自由に与えて飼育した。1週間の順化後、8週齢時にすべての個体において上顎左右第一大臼歯を抜歯した。抜歯は、イソフルラン吸入後、塩酸メドトミジン(0.15 mg/kg) + ミダゾラム(2 mg/kg) + 酒石酸ブトルファノール(2.5 mg/kg) 混合麻酔を腹腔内注射し、さらに口蓋粘膜部位にキシロカインで局所麻酔を行い、歯科用探針を用いた方法で行った。動物は、ランダムにGroup 1~3の3群に分け、抜歯窩の治癒を評価するまでの期間は、Group 1: 2週間(n=4)、Group 2: 4週間(n=5)、Group 3: 8週間(n=5)とした。それぞれの期間が経過した後、実験動物を安楽死させて、上顎骨を採取して抜歯窩の治癒状態をマイクロCTにより評価した。得られた結果をもとにして、実験(2)の具体的な実施期間を決定した。

(2) プロアントシアニジンが骨粗鬆症モデルラットの歯槽骨治癒に与える影響

実験動物として6週齢の雌性Wistarラットを用い、ランダムに以下に示す2群(n=3)に分けた; Group 1: プロアントシアニジン投与、Group 2: 水投与。1週間の順化後に、イソフルラン吸入後、塩酸メドトミジン(0.15 mg/kg) + ミダゾラム(2 mg/kg) + 酒石酸ブトルファノール

(2.5 mg/kg) 混合麻酔を腹腔内注射し、麻酔下で卵巣摘出手術を行った(7週齢時)。卵巣摘出手術は、背部の剃毛・消毒後に小切開を入れて腹腔内へアクセスし、リングピンセットを用いて卵巣を体外へ引き出し、卵管との移行部を結紮後に切除した。卵巣切除後は筋層と皮膚の縫合を行った。手術の翌日より Group 1 のラットにプロアントシアニジンの経口投与を開始した。胃ゾンデを用いた方法で水に懸濁したプロアントシアニジン投与を開始した。投与量は先行研究に従って、100 mg/2.5 mL/kg とした。Group 2 のラットには 2.5 ml/kg の水を同じ方法で投与した。プロアントシアニジンあるいは水の投与は実験終了時まで毎日行った。卵巣摘出手術の 1 週間後(8週齢時)にすべての Group のラットにおいて、実験(1)と同様の方法で上顎左右第一大臼歯の抜歯を行った。また、抜歯後の治癒期間は実験(1)の結果をもとに 8 週間とした。治癒期間後に、実験動物を安楽死させて、上顎骨を採取して抜歯窩の治癒状態をマイクロ CT により評価した。また、脱灰病理組織標本を作製し Hematoxylin-Eosin (HE) 染色を行い、組織学的に分析した。

4. 研究成果

(1) ラットを用いた抜歯モデルの確立および治癒期間の検討

マイクロ CT 画像の評価により、抜歯後 2 週間から 8 週間にかけて、抜歯窩に新生される骨の範囲と量が増加することを確認した。2 週間ではまだ大きな骨欠損が残存し、4 週間では抜歯窩は疎な新生骨で満たされ、8 週間で抜歯窩が緻密な新生骨で満たされていた(図 1)。以上の結果から、卵巣摘出を行わない通常のラットにおいて、抜歯窩の十分な治癒に必要な期間は 8 週間であることが示唆された。

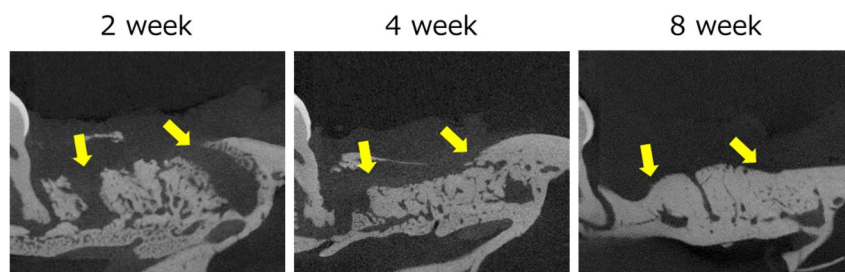


図1 ラット上顎骨のマイクロCT画像
↓: 上顎第一大臼歯の抜歯窩の位置

(2) プロアントシアニジンが骨粗鬆症モデルラットの歯槽骨治癒に与える影響

プロアントシアニジン投与群と対照群ではマイクロ CT 画像の比較では、新生骨の量に大きな差はみられなかった(図 2A)。また、Hematoxylin-Eosin (HE) 染色像での観察により、プロアントシアニジン投与群と control 群で比較して、いずれも緻密な新生骨が観察され、元々存在する歯槽中隔の歯槽骨と抜歯窩の新生骨の境界がはっきりと判別できなかった(図 2B)。今回の結果からは、骨粗鬆症モデルラットの抜歯窩治癒過程後期あるいは治癒後の骨におけるプロアントシアニジンの効果は確認されなかった。

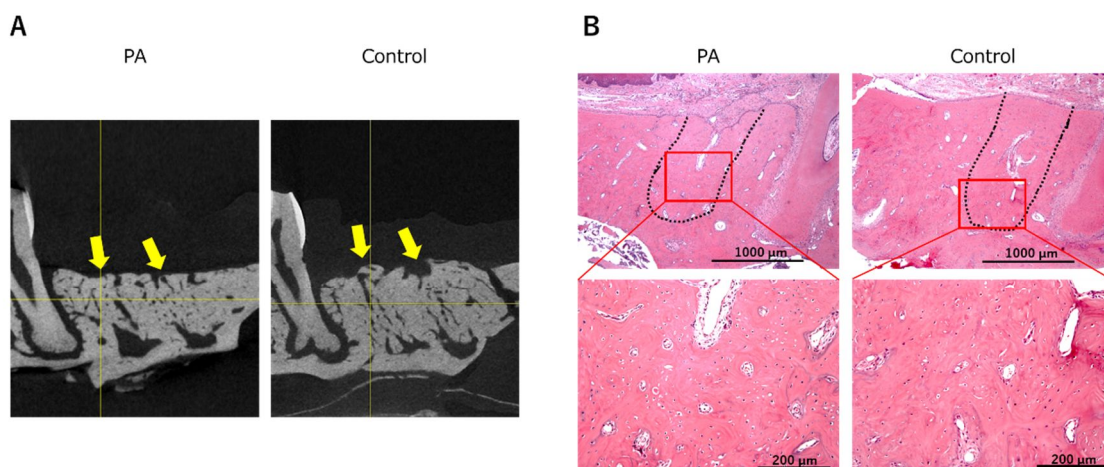


図2 卵巣摘出ラットに対するプロアントシアニジン (PA) 投与の効果
マイクロCT画像の矢印 (↓) およびHE染色画像の点線は抜歯窩の位置を示す

本研究では十分な治癒期間を設定したが、今後はより短期間での実験もを行い、抜歯窩の初期の治癒過程に対するプロアントシアニジン経口投与の効果を確認したいと考えている。また、本研

究ではプロアントシアニジンでのみの検討となったが、実施できなかった他のファイトケミカルを使用した実験も継続していく予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------	---------