

令和 5 年 4 月 12 日現在

機関番号：32513

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K09996

研究課題名(和文)閉経女性における歯科インプラント成功率の改善：骨結合強化の新規技術の確立

研究課題名(英文)Improvement of success rate of dental implant in menopausal women: Development of novel technology for enhancing bone-implant osseointegration

研究代表者

庭野 吉己(NIWANO, Yoshimi)

秀明大学・看護学部・教授

研究者番号：40375184

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：プロアントシアニジン(PA)を食事摂取することを想定し、卵巣摘出ラットに混餌投与し挿入歯科インプラントの骨結合強度を検討した。しかし、抜歯時の残根、挿入インプラントの不十分な初期固定など手技上の問題点が露呈した。そこで卵巣摘出マウスに混餌投与し、骨代謝に対する影響を検討したが、強制経口投与で確認された骨密度の改善効果は得られなかった。文献検討を行い、強制経口投与の場合は、PAの大部分が大腸まで到達し、腸内細菌叢との相互作用等で有用な効果を発揮するが、混餌投与では、少量ずつが順次口腔・胃を経て大腸に到達するため、唾液タンパク、胃液、膵液の影響を受け、大腸での効果が発揮できなかつたと推察した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

プロアントシアニジン(PA)は、これまで更年期モデルとして用いた卵巣摘出動物での強制経口投与試験成績から、高齢の女性の骨粗鬆症予防へ活用できる可能性が示唆されている。しかし、本研究では食事からPAを摂取する場合には、その効果は大幅に減弱する可能性を示唆する成績を得た。従って、PAの骨代謝改善作用を介した閉経期女性の歯科インプラントの骨結合強度改善作用を引き出すには、サプリメントのような形態で摂取する必要があると推察される。今後の研究で課題を明確にし、応用につなげていく。

研究成果の概要(英文)：We tried to assess effects of dietary proanthocyanidin (PA) on osseointegration of dental implants in ovariectomized (OVX) animals. Firstly, PA-containing food pellets were given to OVX rats with dental implants. However, we could not get enough primary fixation of dental implants, so that we failed to assess osseointegration. Secondly, to confirm beneficial effect of dietary PA on bone metabolism, PA-containing food pellets were given to OVX mice. Unlike the gavage administration, bone density was not improved. Lastly, to discuss why dietary PA failed to improve bone metabolism, we intensively surveyed literature. In the case with gavage-administered PA, a large amount of PA could reach the large intestine where PA could exert beneficial effects by interacting with gut microbiota. By contrast, in the case with dietary PA, it is speculated that only a small portion of PA continuously reach the large intestine, resulting in lack of enough interaction with gut microbiota.

研究分野：生化学、細胞生物学、生理学、薬理学、歯科学

キーワード：歯科インプラント 骨粗鬆症 閉経女性 骨結合強度 ポリフェノール プロアントシアニジン

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 骨粗鬆症患者における歯科インプラント治療の問題点

歯科インプラント治療は、歯周病などで歯を喪失した患者が対象となるため、中年層や高齢者層の患者が中心となり、女性の骨粗鬆症患者も多く含まれる。特に女性においては50歳前後で閉経による女性ホルモン(エストロゲン)の急激な枯渇に伴い、閉経後10年ほどの間に骨量は著しく減少し、骨粗鬆症へと進行する。歯科用インプラント治療において骨粗鬆症は、骨結合の獲得およびその維持に対するリスクになると考えられており(歯科インプラント治療指針:厚生労働省)、骨粗鬆症患者に対する予後良好なインプラント治療の提供は歯科医療の重要課題の一つである。

(2) プロアントシアニジン(PA)による各種代謝調節機能

PAの生体機能調節機能発現の詳細なメカニズムはわかっていない。申請者らの研究では卵巣摘出マウスにおいて腸内細菌叢におけるFirmicutes門/Bacteroidetes門の比がPA摂取により改善されており、それを介したと想定される耐糖能改善や脂肪蓄積抑制作用を報告してきた。加えて、申請者らは卵巣摘出動物において、減少する大腿骨の骨密度(骨粗鬆症)の改善や頭蓋冠に作成した骨欠損の再生の促進、さらには脛骨に挿入したインプラントのオッセオインテグレーションの促進を見出してきた。これらの結果より、PAが歯科インプラント埋入後の骨治癒を改善し、骨結合強度の向上をもたらすことが期待される。その作用機序として腸内細菌叢を介した以下の生化学的反応を引き起こす可能性を仮説として考えている；(1) PAが腸内細菌叢により代謝され、代謝産物が直接あるいはイソフラボンの1種であるエクオールなどの産生増強を介してエストロゲン様作用を発揮する、(2) PAおよびその代謝物が短鎖脂肪酸の合成を促進し、管腔内pHを低下させ、カルシウムの吸収を上げる、(3) PAおよびその代謝物あるいは変化した腸内細菌叢が腸管内のセロトニンレベルを減少させ、骨形成を促進する。これらの仮説は、抗酸化活性を介さないポリフェノールの新たな活用法の提案と言える。

2. 研究の目的

「プロアントシアニジン(PA)の経口投与が、骨粗鬆症を惹起したラットの口腔に挿入したインプラントの骨結合強度を改善する」という学術的仮説を検証するとともに作用機序の解明を目的とする。

3. 研究の方法

(1) 卵巣摘出ラット口腔内に埋入したチタン製インプラントの除去トルクおよび病理組織学的分析

7週齢雌性Wistar系ラットを以下の4群に分け、手術および被験物質投与を行う；偽手術+通常飼料、偽手術+プロアントシアニジン(PA)混餌飼料、卵巣摘出+通常飼料、卵巣摘出+PA混餌飼料。順化飼育期間後に卵巣摘出を以下の方法で実施する；1)ラット背部の剃毛と消毒を行う、2)剃毛した部位の中央部に約2cmの皮膚切開入れる、3)腎臓を触知できる部位で約1cmの小切開(左右両側)を入れて腹腔内にアプローチする、4)リングピンセットを用いて卵巣(および付着している脂肪)を体外に引き出す、5)子宮と卵管の間を縫合糸で結紮して卵巣を切除する、6)切開部を縫合する。卵巣摘出術の翌日よりPA混餌飼料(PA 0.2%配合)あるいは通常飼料を与える。卵巣摘出術の1週間後に上顎の左右第一大臼歯を抜歯する。抜歯後8週間の治癒期間を設け、その後チタン製のミニスクリュー(インプラント)を上顎第一大臼歯部に埋入する。埋入4週後に動物を安楽死させて、下記の分析を行う；1)マイクロCT分析、2)非脱灰研磨標本を用いた分析、3)脱灰標本を用いた病理組織学的分析、4)骨結合強度分析(インプラント除去トルクの計測)。

(2) 卵巣摘出マウスにおける骨組織、大腸細胞増殖および糞便Firmicutes門/Bacteroidetes門比(F/B比)の分析

8週齢雌性C57BL/6Jマウスを以下の4群に分け、手術および被験物質投与を行う；偽手術+通常飼料、偽手術+PA混餌飼料、卵巣摘出+通常飼料、卵巣摘出+PA混餌飼料。順化飼育期間後に卵巣摘出を上記ラット試験と同様の手順で実施する。卵巣摘出術の翌日よりPA混餌飼料(PA 0.2%配合)あるいは通常飼料を与える。卵巣摘出術の1および2か月後に糞便を採取する。3か月後に糞便を採取後、動物を安楽死させ、下記の分析を行う；1)子宮重量測定、2)大腿骨マイクロCT分析、3)大腸BrdU免疫染色、4)糞便F/B比。

(3) PAの骨代謝に関する文献検討

上記(1)および(2)で仮説を支持する結果が得られなかったため、その理由を探る目的も兼ね、関連文献を精査し、総説論文としてまとめ、投稿した。まずポリフェノールが卵巣摘出動物において抗骨粗鬆症効果を発揮した論文を中心にその機序を考察した。次にポリフェノールのげっ歯類腸内細菌叢への影響が各種代謝性疾患の改善とどのように関連するかを文献的に精査・考察した。最後にPAの消化管内動態を介した代謝的運命に関しての文献を精査し、経口摂取されたPAがどのような経路・機序で骨粗鬆症を含めた各種代謝性疾患を改善するかを総括的に考察した。

4. 研究成果

(1) 卵巣摘出ラット口腔内に埋入したチタン製インプラントの除去トルクおよび病理組織学的分析

混餌投与試験のため、並びに抜歯およびインプラント挿入の影響をみるため、摂餌量と体重を経時的に測定した（図1:体重）。抜歯後の摂餌量の減少は認められなかったが、インプラント挿入後は全群で摂餌量は減少した。しかし、挿入1週間後には挿入前の摂餌量に回復した。摂餌量には群間で大きな差を認めなかった。PA投与群では150 mg/kg/day前後を経口摂取していることが確認された。体重は、卵巣摘出群では偽手術群よりも増加の程度は大きかったが、PA混餌投与の影響はみられなかった。また抜歯およびインプラント挿入による体重の大きな減少は認められなかった。試験最終日と挿入インプラントのトルクを測定したが、大部分のインプラントが脱落しており、トルクを測定できたのは3か所のみであった（データ省略）。なお、卵巣摘出の指標として試験最終日の子宮重量を測定したが、PA群および通常飼料(CE-2)群とも明らかに委縮しており（図2）、卵巣摘出手術には問題はなかったと考えられる。抜歯およびインプラント挿入については、前者は残根せずに抜歯することの難しさ、後者は初期固定を得ることの難しさがあることが判明し、今回の試験では手技の確立が課題であることが明白になった。

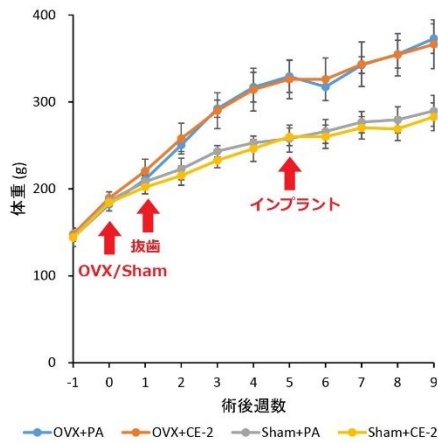


図1 ラット試験 - 体重の経時的推移 -
CE-2: 通常飼料、OVX: 卵巣摘出、Sham: 偽手術

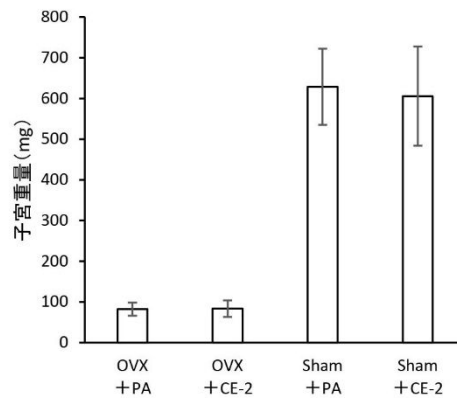


図2 ラット試験 - 子宮重量 -
CE-2: 通常飼料、OVX: 卵巣摘出、Sham: 偽手術

(2) 卵巣摘出マウスにおける骨組織、大腸細胞増殖および糞便 Firmicutes 門/Bacteroidetes 門比の分析

混餌投与試験のため、摂餌量と体重を経時的に測定した（図3:体重）。摂餌量には群間で大きな差を認めなかった。PA投与群では300 mg/kg/day前後を経口摂取していることが確認された。体重は卵巣摘出により増加したがPA摂取による体重増加抑制は認められなかった。なお、卵巣摘出の指標として試験最終日の子宮重量を測定したが、PA群および通常飼料(CE-2)群とも明らかに委縮しており（図4）、卵巣摘出手術には問題はなかったと考えられる。大腿骨マイクロCT解析は、大腿骨遠位端の成長板からの距離0.2~1.0 mmの範囲で計測した（図5）。骨密度の結果を図6に示す。卵巣摘出により骨量は減少したが、PA摂取による影響は認められなかった。

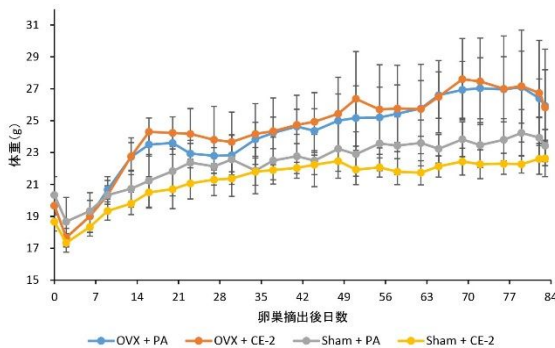


図3 マウス試験 - 体重の経時的推移 -
CE-2: 通常飼料、OVX: 卵巣摘出、Sham: 偽手術

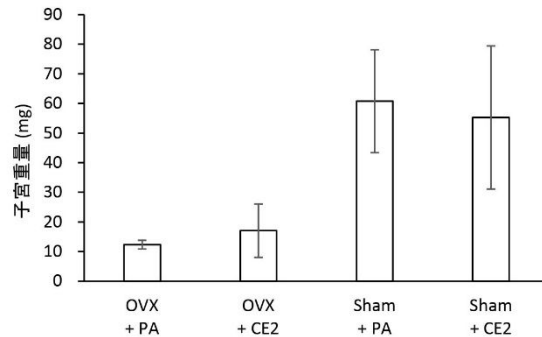


図4 マウス試験 - 子宮重量 -
CE-2: 通常飼料、OVX: 卵巣摘出、Sham: 偽手術

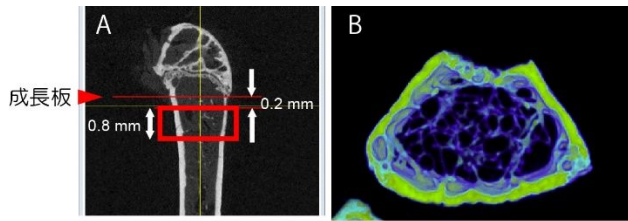


図5 大腿骨マイクロCT解析部位 (A) およびCT画像の1例 (B)

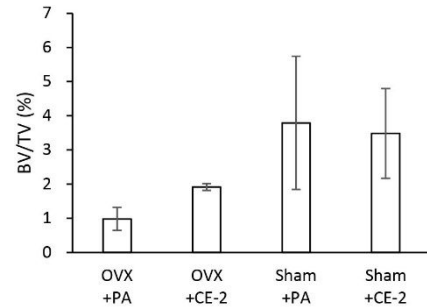


図6 大腿骨マイクロCT解析による骨密度計測結果
CE-2：通常飼料、OVX：卵巣摘出、Sham：偽手術

PAの腸管に対する影響として、腸管上皮細胞の細胞分裂に及ぼす影響を合わせて検討した。大腸の縦断面にBrdU免疫組織染色を行い、BrdU陽性細胞率を求めた(図7)が、各群間で大きな差は認められなかった。腸内細菌叢に対する影響として糞便中F/B比を求めたが、すべての時点で各群間に大きな差は認められなかった(結果の図等省略)。

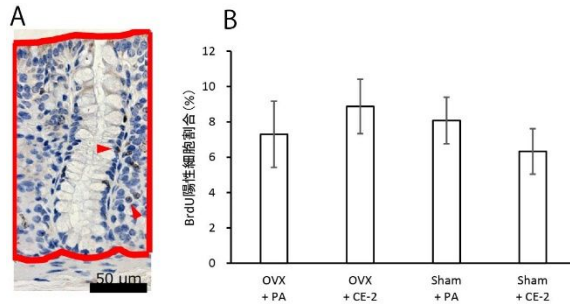


図7 大腸BrdU免疫組織染色例 (A, 赤線内をカウント) およびBrdU陽性細胞割合 (B)
CE-2：通常飼料、OVX：卵巣摘出、Sham：偽手術

(3) PAの骨代謝に関する文献検討

卵巣摘出動物においてポリフェノールが抗骨粗鬆症効果を発揮した論文から、以下のメカニズムを想定した。レスベラトロールのようなSIRT1活性化作用を有するものはreceptor activator of NF- κ B ligand (RANKL)の阻害を介して骨吸収を抑制するとともにWntシグナル経路の活性化を介して骨形成を促進する(図8)。抗酸化・抗炎症ポリフェノールの場合は、エストロゲン欠乏によりマクロファージのNF- κ Bが活性化し、活性酸素種(ROS)による酸化ストレス増大と炎症性サイトカインにより骨吸収が亢進するが、この亢進を抗酸化および抗炎症作用により抑制することで抗骨粗鬆症効果を発揮すると考察した(図9)。

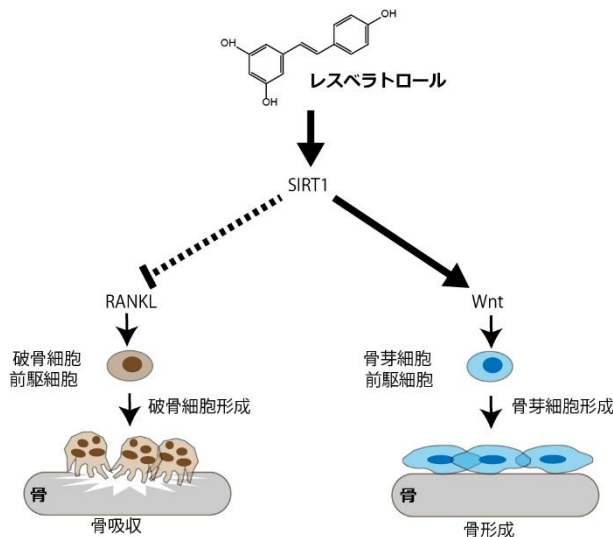


図8 レスベラトロールの想定抗骨粗鬆症機序
Niawano Y et al. Antioxidants (Basel), 11:217, 2022 より改変引用

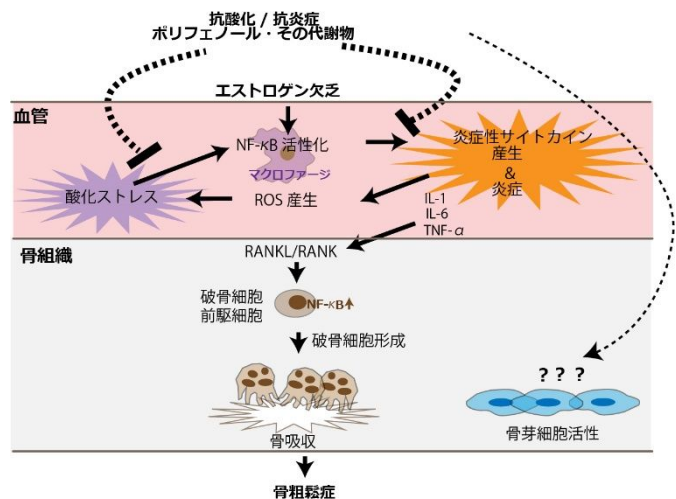


図9 抗酸化/抗炎症ポリフェノールの想定抗骨粗鬆症機序
Niawano Y et al. Antioxidants (Basel), 11:217, 2022 より改変引用

次にポリフェノールのげっ歯類代謝性疾患モデルでの腸内細菌叢への影響を介した有益な効果に関する論文を精査し、その機序を考察した。抗酸化ポリフェノール/その代謝物はlipopolysaccharide (LPS)産生菌を制御し、かつ腸管上皮細胞のタイトジャンクション強化を介して腸管バリア機能を増強することで血中LPS濃度を低下させること、さらにF/B比の低下も加わり、各種代謝性疾患を予防・改善させる可能性を示した(図10)。

最後にPAを経口摂取した時の生体内運命に関する論文を精査し、PAの作用機序を考察した。ま

ず口腔内で唾液による分解、タンパクとの複合体形成などの影響を受け、胃液および胆汁でも軽度ではあるが分解される(図11)。そういう影響を免れたPA母化合物は、大腸においてLPS産生細菌を低下させるとともに、酪酸産生菌の増加、*Akkermansia muciniphila*の増加などを介して腸管のバリア機能を回復させ、炎症状態を改善することが期待される(図12)。

以上の文献検討結果を3報の総説にまとめ投稿した。

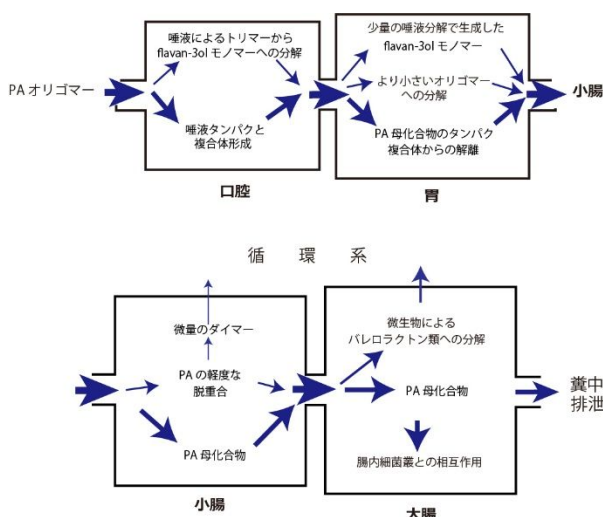


図11 経口摂取されたPAの消化管内動態
Niwano Y et al., Antioxidants (Basel), 12(1): 17, 2023 より改変引用

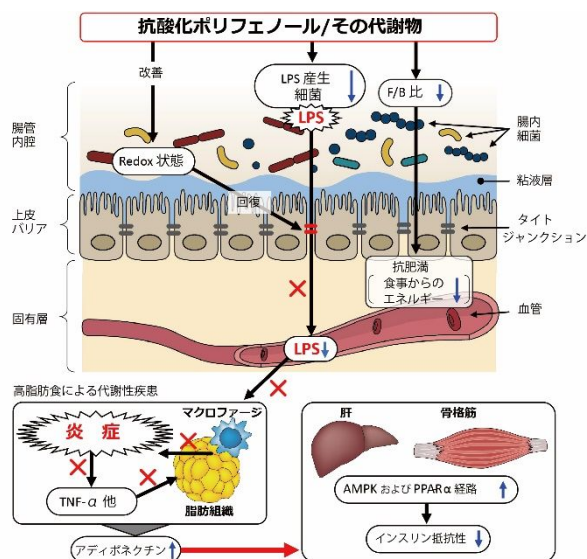


図10 抗酸化ポリフェノールによる高脂肪食負荷代謝性疾患モデル改善の想定作用機序ー腸内細菌叢の関与ー
Niwano Y et al., Curr Issues Mol Biol, 44(3):1353-1375, 2022 より改変引用

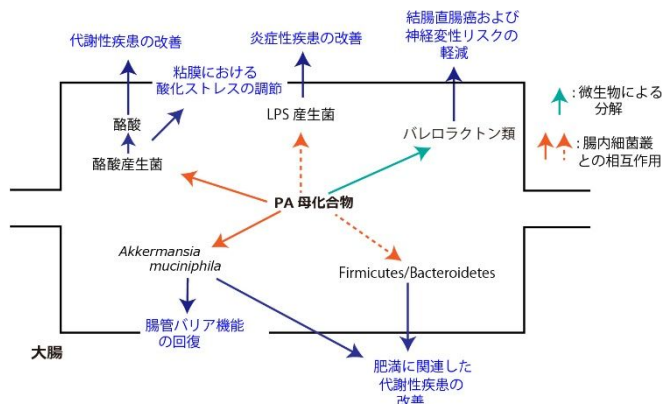


図12 PAの有用作用における腸内細菌叢の関与
Niwano Y et al., Antioxidants (Basel), 12(1): 17, 2023 より改変引用

(5) まとめ

本研究ではPAを豊富に含む食品を食事として摂取したときの骨代謝改善を介した歯科インプラントと歯槽骨の骨結合強度を検討することを目的としたが、今回のラット試験では挿入したインプラントの脱落例が多く、PAの影響をとらえることができなかった。脱落の原因は、大部分のインプラントで初期固定が得られていなかったことであると考えられる。埋入時の問題点は把握できたので、再度検討する予定である。卵巣摘出マウスでのPA強制経口投与試験では骨代謝改善作用を確認しているが、今回の混餌投与試験では骨代謝改善作用は確認できなかった。混餌投与の場合でもPAの摂取量は強制経口投与試験と同等以上であったことは確認している。効果が確認できなかった原因を探る目的で文献的検討を行った結果、口腔内でPAが部分的に分解されることや唾液タンパクと複合体を形成することが混餌投与での効果を減弱させる一因であることが考えられた。加えて、強制経口投与の場合は、一度にPAが胃内に入り、その大部分が大腸まで到達し、そこで腸内細菌叢との相互作用等で有用な効果を発揮する。それに対して混餌投与の場合は、少量ずつが順次口腔・胃・小腸を経て大腸に到達することになり、少量のため唾液タンパク、胃液、胆汁の影響をより受けやすく、大腸での効果が発揮できなかったのではないかと推察した。したがって、PAの効果を引き出すためには、食事として摂取するのではなくサプリメントのような形態で直接胃内に投与するような方法が効果的であると考えている。今後の検討課題としたい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Niwano Y, Kohzaki H, Shirato M, Shishido S, Nakamura K	4. 巻 11
2. 論文標題 Anti-osteoporotic mechanisms of polyphenols elucidated based on in vivo studies using ovariectomized animals	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Antioxidants (Basel)	6. 最初と最後の頁 217
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/antiox11020217	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Niwano Y, Kohzaki H, Shirato M, Shishido S, Nakamura K	4. 巻 44
2. 論文標題 Putative mechanisms underlying the beneficial effects of polyphenols in murine models of metabolic disorders in relation to gut microbiota	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Curr Issues Mol Biol	6. 最初と最後の頁 1353-1375
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cimb44030091	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Shirato M, Nakamura K, Tenkumo T, Niwano Y, Kanno T, Sasaki K, Lingstrom P, Ortengren U	4. 巻 27
2. 論文標題 Inhibition of tooth demineralization caused by Streptococcus mutans biofilm via antimicrobial treatment using hydrogen peroxide photolysis	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Clin Oral Investig	6. 最初と最後の頁 739-750
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00784-022-04821-2	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Niwano Y, Kohzaki H, Shirato M, Shishido S, Nakamura K	4. 巻 12
2. 論文標題 Metabolic fate of orally ingested proanthocyanidins through the digestive tract	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Antioxidants (Basel)	6. 最初と最後の頁 17
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/antiox12010017	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Nakamura K, Tenkumoto T, Aobulikasimu A, Shirato M, Shishido S, Kanno T, Niwano Y, Sasaki K, Asou Y
2. 発表標題 Improvement of bone health condition by oral administration of proanthocyanidin-rich grape seed extract in ovariectomized animals
3. 学会等名 The 30th International Conference on Polyphenols (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Shishido S, Miyano R, Nakashima T, Matsuo H, Iwatsuki M, Nakamura K, Taro Kanno, Egusa H, Niwano Y
2. 発表標題 A reaction mechanism of photo-oxidation process of catechin in relation to its bactericidal activity
3. 学会等名 The 30th International Conference on Polyphenols (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 穴戸駿一, 宮野怜, 中島琢自, 松尾洋孝, 岩月正人, 中村圭祐, 菅野太郎, 江草宏, 庭野吉己
2. 発表標題 カテキンの光酸化反応機構の解明および 活性酸素を介した 殺菌活性評価
3. 学会等名 日本ポリフェノール学会 第 15 回学術集会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

秀明大学看護学部教員紹介 https://www.shumei-u.ac.jp/staff/5587 researchmap https://researchmap.jp/read0121384/ ResearchGate https://www.researchgate.net/profile/Yoshimi-Niwano
--

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
研究分担者	穴戸 駿一 (SHISHIDO Shunichi) (20850613)	東北大学・歯学研究科・助教 (11301)	
研究分担者	中村 圭祐 (NAKAMURA Keisuke) (30431589)	東北大学・歯学研究科・准教授 (11301)	
研究分担者	神崎 秀嗣 (KOHZAKI Hidetsugu) (60807345)	秀明大学・看護学部・教授 (32513)	

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		
スウェーデン	Institute of Odontology	University of Gothenburg	