

神奈川歯科大学大学院歯学研究科

2016 年度 博 士 論 文

オメガ3脂肪酸の歯槽骨吸収および破骨細胞分化誘
導に対する抑制効果の研究

**Inhibitory Effect of Omega-3 fatty Acid on Alveolar
Bone resorption and Osteoclast Differentiation**

2017 年 1 月 20 日

尾崎 悠

Yu Ozaki

神奈川歯科大学大学院歯学研究科

口腔機能修復学講座

目 次

緒 言	1
実験材料および方法	6
結 果	12
考 察	15
結 論	19
謝 辞	20
文 献	21
付図説明	29
表および図	
表 1	32
図 1	33
図 2-A	34
図 2-B	35
図 3	36
図 4-A	37
図 4-B	38
図 5-A	39

緒 言

近年の日本において、全死亡者数の半分以上を占め三大死因である「悪性新生物」、「心疾患」、「脳血管疾患」は¹⁾、加齢や遺伝的な要因だけでなく、不適切な食生活・運動不足などの生活習慣が深く関与していることが明らかになりつつある²⁾。これら三大疾患のうち心疾患と脳血管疾患の誘発や増悪に関与していると考えられている糖尿病や歯周病を含む生活習慣病は、慢性炎症を基盤病態としており、生体内で誘発された炎症反応が適切に収束されない炎症収束機構の破綻が原因の1つであると考えられている³⁻⁵⁾。歯周病は特定の細菌によって引き起こされる局所的な慢性炎症であり、好中球、マクロファージによって引き起こされる歯肉組織の破壊および歯槽骨吸収を特徴としている。近年、歯周病による組織破壊のほとんどは感染源からの直接的な作用によるものではなく、感染源に対する宿主の免疫応答によって引き起こされる炎症反応が原因であることが明らかになってきた⁶⁾。アスピリンを初めとしたNSAIDsは、アラキドン酸カスケードにおいてシクロオキシゲナーゼの働きを阻害することによってプロスタグランジンの生成を抑制し、抗炎症作用を発揮する⁷⁾。またNSAIDsは、経口投与と局所投与のいずれにお

いても歯周炎に伴う歯槽骨吸収を抑制することが多くの実験から報告されているが⁸⁾、その副作用と長期服用の必要性から実際の臨床応用には至っていない⁶⁾。Golub ら⁹⁻¹¹⁾は、テトラサイクリンが従来考えられていた抗菌作用とは別に、コラゲナーゼ活性を抑制することによって歯周病やリウマチの進行を抑制することを報告している。しかし、これらの薬剤効果は、いずれも一時的なものである上に副作用を伴うことを考えると、歯周病に対する長期予防を目的とした使用には適していない。

炎症反応は本来、生体防御において必要な生理機能であり、自然に収束し組織の修復へと導かれるものである。オメガ (ω) 3 脂肪酸とその代謝産物は炎症反応を適切に「収束期」へと向かわせ、動脈硬化や糖尿病を初めとした慢性炎症疾患への進展を予防する役割を果たすことが報告されている¹²⁾。 ω 3 脂肪酸とは、メチル基末端から数えて 3 位に二重結合をもつ不飽和脂肪酸の総称であり、イコサペンタエン酸 (EPA)、ドコサヘキサエン酸 (DHA) などがこれに含まれる¹³⁾。これに対し、 ω 6 脂肪酸 (メチル基末端から数えて 6 位に二重結合をもつ不飽和脂肪酸) であるアラキドン酸は、プロスタグランジン、トロンボキサン、ロイコトリエンなど活性エイコサ

ノイドの前駆体である¹⁴⁾。これらのエイコサノイドは歯周病を始めとして特に糖尿病、動脈硬化などの病態を悪化させるという報告がある^{15,16)}。

ω3 脂肪酸の摂取は前述の NSAIDs やテトラサイクリンとは異なり顕著な副作用を誘発することなく¹⁷⁾、生体が本来備えている能動的な炎症収束能力を維持することで、抗炎症作用を発揮出来ることで注目されている。歯周治療においてもこれまでの口腔内細菌の除去を中心とした治療から患者の免疫応答の改善を目的とした宿主修飾療法の併用が試みられている⁶⁾。

また、ω3 脂肪酸と起炎性エイコサノイドの基質となる ω6 脂肪酸の摂取比率が動脈硬化や炎症性疾患の予防に大きく影響することが報告されている^{18,19)}。現代の西洋食では、ω3 脂肪酸と ω6 脂肪酸を 1:10 から 1:30 の比率で摂取することが日常となっているが、人類の進化の過程と遺伝的な背景に基づく 1:1 の摂取比率が理想とされており¹⁹⁾、現代の西洋食中心の食事では ω3 脂肪酸の摂取量が著しく不足しているため、多くの生活習慣病を誘発している可能性が示されている。このような ω3 脂肪酸による炎症抑制機構には、様々な説があるが、当初考えられていた炎症抑制機構には、ω3 脂肪酸の

アラキドン酸との競合により活性エイコサノイドの産生が阻害されること、あるいは、EPA 由来のエイコサノイドの活性がアラキドン酸由来のものに比べて弱いことが考えられていた²⁰⁾。近年、強力な抗炎症活性を持つ ω 3 脂肪酸由来の新規化合物であるレゾルビンおよびプロテクチンが同定され、 ω 3 脂肪酸による炎症抑制機構を担う抗炎症性脂質メディエーターとして注目されている²¹⁾。レゾルビンおよびプロテクチンは、それぞれ ω 3 脂肪酸である EPA および DHA 由来の生体内代謝産物であり、酵母ザイモザンで誘導される急性腹膜炎において、好中球の浸潤を抑制し炎症性サイトカインの産生抑制、マクロファージの貪食能およびリンパへの移行を促進することによって、急性炎症の収束を促進する機能を有することが報告されている²²⁾。

ω 3 脂肪酸の中では魚油に多く含まれている EPA や DHA は、歯周炎をはじめとした慢性炎症を主徴とする疾患において、抗炎症作用を呈することが多く報告されている。Naqvi らの報告²³⁾によると、9182 人を対象とした調査で DHA、EPA および α -リノレン酸 (LNA) の摂取量が多いほど歯周病の有病率は低いという結果が報告されている。しかし、Eberhard らは²⁴⁾実験的歯肉炎に対し EPA、

DHA を局所投与したところ炎症抑制効果は見られなかったと報告している。一方、ウサギの歯肉溝に *P. gingivalis* を播種して惹起した歯周炎モデルにおいて、レゾルビン E1 (RvE1) の投与は、歯周局所の炎症を抑え歯槽骨吸収を抑制する働きがあることが報告されている^{19,25)}。これらの報告から、 ω 3 脂肪酸は生体内に吸収され各種の代謝を受けることによって、サイトカイン産生を抑制するなど炎症の収束を促進し、破骨細胞の分化の抑制に影響を与える可能性が考えられる。

本研究では、 ω 3 脂肪酸配合食、 ω 6 脂肪酸配合食および通常食を摂取させたマウスを用いて、摂取脂肪酸の違いによる歯周炎の病態の変化および破骨細胞の分化誘導に与える影響について検討した。さらに、EPA の代謝産物である RvE1 による培養破骨細胞の分化誘導抑制作用について検討し、炎症により惹起される骨吸収に対する ω 3 脂肪酸の抑制効果についての解明を試みた。

実験材料および方法

1. 実験動物

実験動物は、C57BL/6Jc1 マウス（4週令、♂、日本クレア）を使用した。飼育は計60匹のマウスを無作為に ω 3脂肪酸配合食摂取群、 ω 6脂肪酸配合食摂取群、および通常食摂取群に分け、それぞれを *Porphyromonas gingivalis* (*P. g*) 感染群と非感染群に分類し、計6群とした。実験は、室温 $22 \pm 3^{\circ}\text{C}$ に調整した環境で12時間の明暗サイクルで飼育を行った。飼育における給餌と給水は自由摂取とし、定期的に各群の餌の摂取量と体重を測定した。本実験は、「神奈川歯科大学動物実験基準」および「実験動物の飼養および保管並びに苦痛の軽減に関する基準」を遵守した上で行った。またこの実験の実験計画は「神奈川歯科大学動物実験倫理委員会」で審査を受け、承認された。（承認番号:15-026）

2. 飼育飼料

実験群に給餌された ω 3脂肪酸配合食および ω 6脂肪酸配合食飼育飼料はD12450K (Research Diets) をベースとしてMenhaden oil (魚油) を添加したものを ω 3脂肪酸配合食、Sunflower oil (ひまわり油) を添加したものを ω 6脂肪酸配合食とした。また、通常食

には MF (オリエンタル酵母) を使用した。各飼育飼料の脂肪酸組成は、表 1 に示す通りである。飼育飼料は生産の段階で真空パックにて包装され、使用直前まで - 20°C で保管し、飼料に含まれる脂肪酸の酸化によるダメージを防ぐため、48 時間おきに新鮮な餌との交換を行った。

3. 供試菌株および培養条件

P. gingivalis ATCC 33277 株は、ブレインハートインフュージョンブロス (BHI broth; Difco, Detroit, MI, USA) にイーストエキストラクト (5 mg/ml)、ヘミン (5 µg/ml)、およびビタミン K1 (0.5 µg/ml) を添加した培地もしくは 5% ヒツジ脱繊維素血液を含む BHI 血液寒天培地を用いて嫌気条件下 (85% N₂, 10% H₂, 5% CO₂) 37°C で培養した。

4. 実験的歯周炎の誘発

P. gingivalis の感染実験は、図 1 のスケジュールで行った。実験的歯周炎の誘発に先立ち、すべてのマウスは飼育開始 8 日目から蒸留水中に最終濃度 1 mg/ml のスルファメトキサゾールと 200 µg/ml のトリメトプリムを含有した飲料水を 4 日間与えて口腔常在菌を減少させた。その後、抗生物質を含まない蒸留水を 3 日間与えて口腔内

に残存した抗生物質を除去した。その後、PBS で作製した 2.5%カルボキシメチルセルロース (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) 溶液で調整した *P. gingivalis* 菌体浮遊液 (10^9 CFU/ml) を 1 日おきに 3 回、マウス口腔内へ直接接種した。非感染群には、5%カルボキシメチルセルロース溶液のみを与えた。

5. 歯槽骨吸収量の測定

歯槽骨吸収量の測定には、マウス上顎骨の右側を使用した。マウスから採取した上顎骨は 2 気圧で 10 分間加熱後²⁶⁾、3%次亜塩素酸ナトリウム溶液に浸漬して軟組織を除去し、1%メチレンブルー溶液で歯槽骨を染色した後に乾燥させた。さらに、上顎臼歯部のセメントエナメル境から歯槽頂の距離を各サンプルにつき計 7 点測定し、その結果の平均値を歯槽骨吸収量の指標とした²⁷⁾。なお計測は高解像度デジタル計測システム (Digital HD microscope VH-7000; Keyence, Osaka, Japan) を備えた解剖顕微鏡 (40 倍率) を使用し、計測単位は mm に標準化した。

6. 病理組織学的解析

左側上顎骨から第 1~3 臼歯、歯槽骨、その周囲軟組織を含む組織片を一塊として採取し、病理組織標本を作製した。採取した組織片は、

10%ホルマリン (pH 7.4) に一晚浸漬し、0.1 M PBS で洗浄したのち、15% EDTA 30%スクロース溶液を用いておよそ 4 週間かけて脱灰を行った。この組織片を再度、0.1 M PBS で洗浄し、歯牙と薄切面が平行となるよう適切な位置でパラフィンに包埋した。連続した 4 μ m 厚の切片にミクロトームで一片として近遠心方向に薄切して組織標本とした。

染色は、各歯牙において頬舌的に最も中央に位置する切片に対して、酒石酸耐性酸ホスファターゼ (TRAP) 染色を行った。TRAP 染色は TRAP 染色キット (TRAP Staining Kit; コスモバイオ株式会社、北海道、日本) を用いて行った。赤く濃染された細胞 (TRAP 陽性細胞) を破骨細胞と定義した。切片は光学顕微鏡 (ニコン、東京、日本) を用いて、各切片における観察部位を 40 倍率に設定し、歯槽骨吸収と TRAP 陽性細胞の分布の解析を行った。TRAP 陽性で核数 ≥ 3 を呈しているもの破骨細胞として、第一臼歯遠心根に隣接する歯槽骨表面に分布する破骨細胞を観察した。

7. 破骨細胞分化能の解析

各群のマウスから採取した骨髓細胞は Rahman ら²⁸⁾の方法に従い、

破骨細胞に分化誘導した。すなわち飼育開始後、4週目に各給餌群において抽出したマウスの大腿骨から採取した骨髄細胞を macrophage colony-stimulating factor (M-CSF) および receptor activator of NF- κ B ligand (RANKL) の存在下で培養することで破骨細胞への分化誘導を行った。培養は、10%ウシ胎児血清 (HyClone ,USA) を添加した α -MEM (Gibco) 培養液を用いて 1.0×10^6 cells/ml に調製したマウス骨髄細胞を 48 well plate に播種し、100 ng/ml の M-CSF、200 ng/ml の RANKL (Sigma-Aldrich) を添加し 37°C、5%CO₂ 環境下にて 5 日間行った。

また、エイコサペンタエン酸 (EPA) の代謝産物であるレゾルビン E1 (RvE1) による破骨細胞分化抑制効果の検討は、Herrera ら)の方法に従い、通常食を給餌した C57BL/6J マウス骨髄細胞を種々の濃度の RvE1 の存在下で破骨細胞に誘導し行った。すなわち、10%ウシ胎児血清を添加 α -MEM にて調整したマウス骨髄細胞 (1.0×10^6 cells/ml) は 100 ng/ml M-CSF および 100 ng/ml RANKL 存在下で 96 well plate に播種し、終濃度が 0 ng/ml、0.01 ng/ml、0.1 ng/ml、1 ng/ml の RvE1 (Resolvin E1 Sodium Salt; TRC、North York、Canada) を添加し 6 日間培養した。RvE1 は、使用直前に溶媒であるメタノール最終濃度が 1%

以下となるように調製した。

8. 酒石酸耐性酸ホスファターゼ染色

培養終了後、分化誘導を行った破骨細胞を 10% パラホルムアルデヒド溶液で固定し、酒石酸耐性酸ホスファターゼ染色 (TRAP) 染色を行い、3 核以上の TRAP 陽性細胞を破骨細胞としその数を計測した。結果は、平均値±標準偏差で表した。

9. 統計分析

ω3 脂肪酸摂取による歯槽骨吸収抑制作用および ω3 脂肪酸摂取による破骨細胞分化抑制作用に関する統計分析には、多重比較法として Tukey-Kramer test 検定による多重比較を行った。RvE1 による破骨細胞分化抑制作用に関する統計分析には、Dunnett の検定によるコントロール群と実験群の間の多重比較を行った。

結果

1. $\omega 3$ 脂肪酸摂取による歯槽骨吸収抑制作用

通常食を給餌し *P. g* 感染を行った群 (regular *P. g*⁺) における平均歯槽骨吸収量は 0.176 mm であり、通常食 *P. g* 非感染群 (regular *P. g*⁻) の 0.100 mm と比較して有意に高値を示した ($p=0.041$, 図 2-A)。また、 $\omega 6$ 脂肪酸配合食 ($\omega 6$) を給餌した *P. g*⁺ 群 ($\omega 6 P. g⁺) における平均歯槽骨吸収量は 0.169 mm であり、 $\omega 6 P. g⁻ 群の 0.110 mm に比較して有意に高値を示し ($p=0.022$, 図 2-A)、*P. g* 感染による明らかな歯周炎の惹起が認められた。一方、 $\omega 3 P. g⁺ 群における平均歯槽骨吸収量は 0.092 mm であり、 $\omega 3 P. g⁻ 群 (0.093 mm) と比較し両群間に有意な差は認められなかった ($p=1.000$, 図 2-A)。また、 $\omega 3 P. g⁺ 群における平均歯槽骨吸収量は regular *P. g*⁺ 群および $\omega 6 P. g⁺ 群に比較しても有意に低値を示し (regular *P. g*⁺ 群 : $p=0.049$, $\omega 6 P. g⁺ 群 : $p=0.043$, (図 2-A)、 $\omega 3 P. g⁻ 群の歯槽骨吸収量は regular *P. g*⁻ 群と同程度であった。$$$$$$$$

軟組織を除去した上顎骨の歯槽骨吸収像は図 2-B で示すとおりであり、regular *P. g*⁺ 群、 $\omega 6 P. g⁺ 群の歯槽骨吸収は根分岐部まで達し、regular *P. g*⁻、 $\omega 6 P. g⁻ 群と比較して *P. g* 感染による明らかな歯槽骨吸収の増加が認められた。一方で、 $\omega 3 P. g⁺ 群の歯槽骨吸収は $\omega 3 P. g⁻ 群$$$$

とほぼ同程度まで抑制され、*P. g* 感染による歯槽骨吸収の増加は認められなかった。

2. 病理組織学的解析結果

細菌感染による歯槽骨破壊の評価を行うために TRAP 染色を行った。上顎骨脱灰薄切切片の TRAP 染色像を図 3 に示す。歯周炎を惹起させた部位のパラフィン切片は光学顕微鏡を使用し、上顎第一臼歯と上顎第二臼歯の歯間部歯槽骨を 40 倍率で観察した。非感染群の歯槽骨の表面形態はいずれの群もほぼ滑らかな辺縁形態を呈し、わずかな TRAP 陽性細胞、骨吸収窩が同程度に観察された。感染群の TRAP 染色像では regular *P. g*⁺群、ω6 *P. g*⁺群で非感染群と比較して、TRAP 陽性細胞と TRAP 陽性細胞自身が形成した骨吸収窩が顕著に観察され、歯槽骨の表面の辺縁形態は不整を呈していた。しかし、ω3 *P. g*⁺群の感染群で観察された TRAP 陽性細胞、骨吸収窩は非感染群とほぼ同程度に観察されるのみで、歯槽骨表面の辺縁形態は滑らかな状態を維持していた。

3. ω3 脂肪酸摂取による破骨細胞分化抑制作用

ω3 *P. g*⁻群における平均破骨細胞形成数は 84.0 ± 35.7 であり、

regular $P. g^-$ 群の 167.3 ± 44.4 に比較して有意に低値を示した ($p = 0.038$: 図 4-A)。また、 $\omega 3 P. g^+$ 群における平均破骨細胞数は 72.7 ± 9.3 であり、regular $P. g^-$ 群の 167.3 ± 44.4 および $\omega 6 P. g^-$ 群の 148.3 ± 26.8 に比較して有意に低値を示した ($\omega 3 P. g^+$ 群との有意差検定で p 値はそれぞれ $p = 0.017$ および $p = 0.044$, 図 4-A)。

4. RvE1 による破骨細胞分化抑制作用

RANKL および M-CSF で誘導するマウス骨髄細胞の破骨細胞への分化に対する RvE1 の抑制効果を図 5-A に示した。RvE1 無添加では核数 ≥ 3 かつ TRAP 陽性の破骨細胞数は 187.0 ± 4.8 であったが、 0.01 ng/ml、 0.1 ng/ml、 1 ng/ml 濃度の RvE1 添加時の平均破骨細胞数は、それぞれ 111.8 ± 11.0 、 102.0 ± 9.6 、 94.3 ± 11.2 であり、 0.01 ng/ml 以上ではコントロールと比較して有意に破骨細胞数が減少した ($p < 0.01$: 図 5-A)。また、図 5-B に RvE1 無添加および 0.01 ng/ml、 0.1 ng/ml、 1 ng/ml 濃度の RvE1 を添加し、破骨細胞を培養した際の TRAP 染色像を示す。この TRAP 染色像から 0.01 ng/ml、 0.1 ng/ml、 1 ng/ml 濃度の RvE1 を添加した際の破骨細胞は RvE1 無添加と比較して、破骨細胞の融合、多核化が抑制されているのが確認された。

考 察

マウスあるいはラットを使用した実験的歯周炎モデルにおいて、 ω 3 脂肪酸配合食の摂取が歯肉の炎症および歯槽骨吸収を抑制することが報告されている²⁹⁻³¹⁾。本研究においても、 ω 3 脂肪酸配合食、 ω 6 脂肪酸配合食および、普通食で飼育したマウスに *P. g* 感染により実験的歯周炎を惹起させ歯槽骨吸収量を比較したところ、 ω 3 脂肪酸摂取群において顕著な歯槽骨吸収の抑制が認められた(図 2-A)。一方、非感染マウス群間 (regular *P. g*⁻、 ω 3 *P. g*⁻、 ω 6 *P. g*⁻) でのセメントエナメル境から歯槽頂の距離を比較した結果、 ω 3 脂肪酸摂取群におけるセメントエナメル境から歯槽頂の距離は、通常食摂取群と同程度であり、 ω 3 脂肪酸摂取による生理的な骨吸収の抑制は認められなかった。 ω 3 脂肪酸摂取による歯槽骨吸収抑制の作用機序としては、以下の2つの点が考えられる。1点目は、歯周局所において、経口摂取した ω 3 脂肪酸が炎症部位に直接的に作用し、炎症を収束させるか、あるいは、口腔内に接種した *P. g* 菌体に対して抗菌的に作用することによって歯槽骨吸収を抑制した可能性である。2点目は、経口摂取した ω 3 脂肪酸やその代謝産物が、歯周炎部位において炎症または破骨細胞の分化を抑制する可能性である。Bendyk ら³²⁾は、飼料に ω 3

脂肪酸を配合したマウスの口腔軟組織中の EPA および DHA 量が $\omega 6$ 脂肪酸配合食で飼育したマウスと比較して有意に上昇していたことを報告している。また、*in vitro* 実験において $\omega 3$ 脂肪酸である EPA あるいは DHA を 20 μM 、40 μM 、80 μM 濃度で培養破骨細胞に添加することで破骨細胞の分化が抑制されたという報告がある³²⁾。一方で、Eberhard ら²⁴⁾は、EPA あるいは DHA を口腔内の炎症部位に含嗽により投与しても、いずれも炎症抑制作用は認められなかったと報告している。また、Choi, J. S らの報告³³⁾によれば、一日に摂取する飼料中の $\omega 3$ 脂肪酸含有量は、口腔内細菌への直接的抗菌活性能を発揮するには十分ではないと考えられる。本研究においても、給餌した飼料の *P. g* に対する抗菌活性について確認した結果、有意な抗菌活性は認められなかった（結果は示さない）。したがって、本研究における $\omega 3$ 脂肪酸による実験的歯周炎の抑制効果は、食餌により摂取された $\omega 3$ 脂肪酸やその代謝産物が生体内において歯槽骨吸収を抑制した結果であると考えられる。

また、33 日間給餌を続けた各群のマウスから採取した骨髓細胞を、M-CSF および RANKL 存在下で破骨細胞への分化を誘導した結果、 $\omega 3$ 脂肪酸配合食飼育マウスでの分化破骨細胞数は有意に減少してい

た (図 4-A、B)。卵巣摘出ラットを用いた実験において、Nakanishi ら³⁴⁾は、魚油を配合した食事を与えたラットの脛骨中では、破骨細胞の分化に重要な役割を果たす M-CSF および RANK のメッセンジャー RNA の発現が抑制されていたことを報告している。さらなる検討が必要であるが、本研究においても、同様に破骨細胞分化因子の発現が抑制されていた可能性があると考えられる。

Hasturk ら²⁵⁾は、ウサギの *P.g* 感染実験的歯周炎モデルに対し、 ω 3 脂肪酸である EPA の抗炎症性代謝産物である RvE1 を歯周炎局所に投与したところ同部位に炎症抑制および歯槽骨吸収抑制作用を示したことを報告している。したがって、本研究における ω 3 脂肪酸配合食を給餌することによる実験的歯周炎での歯槽骨吸収や破骨細胞分化の抑制作用は、この RvE1 の抗炎症作用が関係しているものと考えられた。そこで、有田らの報告²¹⁾においてマウス腹腔内に惹起させた急性炎症に対し好中球の浸潤抑制が確認された濃度を参考に、培養破骨細胞に RvE1 を 0.01 ng/ml、0.1 ng/ml、1 ng/ml 濃度で添加することによる破骨細胞分化抑制作用について検討した。その結果、炎症の収束期に血管内皮細胞、好中球の酵素によって EPA を基質として生合成される RvE1^{21, 35)}が、抗炎症作用だけでなく、破骨細胞の分化

を抑制することを明らかにした (図 5-A、B)。Gao らは、RvE1 が骨芽細胞の chemokine-like receptor 1 を介して osteoprotegerin (OPG) の産生を促進することで、破骨細胞の分化を抑制すると報告している³⁶⁾。また、Zhu らは、破骨細胞の融合タンパク質である DC-STAMP の発現が BLT1 receptor を介した RvE1 の作用により阻害され、破骨細胞の多核化が抑制されると報告している³⁷⁾。本研究においても RvE1 の破骨細胞の分化抑制には同様の作用が関与したものと考えられる。

骨代謝の調節に関わる ω 3 脂肪酸の代謝産物以外の脂質メディエーターには、 ω 6 脂肪酸代謝産物であるプロスタグランジンおよびロイコトリエンが知られている³⁸⁻⁴¹⁾。プロスタグランジンは、EP4 および EP2 受容体を介して骨芽細胞の RANKL の産生を促進し破骨細胞の分化を促進する。ロイコトリエンは、破骨細胞の BLT1 receptor を介して直接的に分化を促進することが報告されている⁴²⁾。本研究で使用した普通食には必須脂肪酸である ω 6 脂肪酸が 46.8% と高濃度で含有されているため、普通食摂取群と ω 6 脂肪酸摂取群における歯槽骨吸収量および破骨細胞の分化誘導が ω 3 脂肪酸摂取群と比較して有意に上昇したが、この結果は、上記のプロスタグランジンおよびロイコトリエンによる作用が関与している可能性も考えられる (図 4-

A、B)。

結 論

以上の結果から、 ω 3 脂肪酸の摂取により、歯周炎による破骨細胞への分化抑制、および炎症による骨吸収を抑制する可能性が示された。

利益相反

研究に関連して、申告すべき利益相反はない。

謝 辞

指導教官として本研究の実施の機会を与えて戴き、適切なお指導を戴いた三辺正人教授（神奈川歯科大学大学院口腔機能修復学講座歯周病学分野）に深謝の意を表します。また本研究の遂行にあたり、ご指導を賜りました、浜田信城教授（神奈川歯科大学大学院口腔科学講座微生物学分野）並びに、槻木恵一教授（神奈川歯科大学大学院口腔科学講座病理学分野）に深謝の意を表します。最後に本研究の実践および、論文の作成に際し、細部にわたりご指導を戴いた渡辺清子講師（神奈川歯科大学大学院口腔科学講座微生物学分野）、工藤値英子講師（神奈川歯科大学大学院口腔機能修復学講座歯周病学分野）並びに教室員一同に、深く感謝致します。

参考文献

1. 小野暁史, 齋藤重正, (2011), 『平成 22 年簡易生命表の概況』, 厚生労働省.
2. 国立がんセンター, 国立循環器病センター, (2008). 『ビジュアル版 3 大疾病の教科書 がん・心臓病・脳卒中をストップ!』, 三省堂.
3. Briancon-Marjollet A, Monneret D, Henri M, Joyeux-Faure M, Totoson P, Cachot S, Faure P, Godin-Ribuot D. Intermittent hypoxia in obese Zucker rats: cardiometabolic and inflammatory effects. *Exp Physiol* 2016.
4. Couzin-Frankel J. Inflammation bares a dark side. *Science* **330** : 1621, 2010.
5. Inoue A, Arima N, Ishiguro J, Prestwich GD, Arai H, Aoki J. LPA-producing enzyme PA-PLA(1)alpha regulates hair follicle development by modulating EGFR signalling. *The EMBO journal* **30** : 4248-4260, 2011.
6. El-Sharkawy H, Aboelsaad N, Eliwa M, Darweesh M, Alshahat M, Kantarci A, Hasturk H, Van Dyke TE. Adjunctive treatment of chronic

- periodontitis with daily dietary supplementation with omega-3 Fatty acids and low-dose aspirin. *J Periodontol* **81** : 1635-1643, 2010.
7. Vane JR. Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for aspirin-like drugs. *Nat New Biol* **231** : 232-235, 1971.
 8. Williams RC. Host modulation for the treatment of periodontal disease. *Compend Contin Educ Dent* **29** : 160-162, 164, 166-168 passim, 2008.
 9. Golub LM, Lee HM, Lehrer G, Nemiroff A, McNamara TF, Kaplan R, Ramamurthy NS. Minocycline reduces gingival collagenolytic activity during diabetes. Preliminary observations and a proposed new mechanism of action. *J Periodontal Res* **18** : 516-526, 1983.
 10. Golub LM, Ramamurthy N, McNamara TF, Gomes B, Wolff M, Casino A, Kapoor A, Zambon J, Ciancio S, Schneir M, et al. Tetracyclines inhibit tissue collagenase activity. A new mechanism in the treatment of periodontal disease. *J Periodontal Res* **19** : 651-655, 1984.
 11. Golub LM, Wolff M, Lee HM, McNamara TF, Ramamurthy NS, Zambon J, Ciancio S. Further evidence that tetracyclines inhibit collagenase activity in human crevicular fluid and from other

- mammalian sources. *J Periodontal Res* **20** : 12-23, 1985.
12. 有田誠, Serhan CN. 炎症を緩和するケミカルメディエーター. *蛋白質 核酸 酵素* **52** : 348-354, 2007.
 13. 有田誠, 磯部洋輔, (2008), ω 3系脂肪酸由来の抗炎症性代謝物の構造と機能, 『生化学』. **第80巻** : 1042-1046 頁,
 14. Robichaud PP, Poirier SJ, Boudreau LH, Doiron JA, Barnett DA, Boilard E, Surette ME. On the cellular metabolism of the click chemistry probe 19-alkyne arachidonic acid. *Journal of lipid research* 2016.
 15. Xia S, Lu Y, Wang J, He C, Hong S, Serhan CN, Kang JX. Melanoma growth is reduced in fat-1 transgenic mice: impact of omega-6/omega-3 essential fatty acids. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103** : 12499-12504, 2006.
 16. Seaman DR. The diet-induced proinflammatory state: a cause of chronic pain and other degenerative diseases? *Journal of manipulative and physiological therapeutics* **25** : 168-179, 2002.
 17. Wang C, Chung M, Lichtenstein A, Balk E, Kupelnick B, DeVine D, Lawrence A, Lau J. Effects of omega-3 fatty acids on cardiovascular

- disease. *Evidence report/technology assessment (Summary)* 1-8, 2004.
18. Figueredo CM, Martinez GL, Koury JC, Fischer RG, Gustafsson A. Serum levels of long-chain polyunsaturated fatty acids in patients with periodontal disease. *J Periodontol* **84** : 675-682, 2013.
 19. Wan JB, Huang LL, Rong R, Tan R, Wang J, Kang JX. Endogenously decreasing tissue n-6/n-3 fatty acid ratio reduces atherosclerotic lesions in apolipoprotein E-deficient mice by inhibiting systemic and vascular inflammation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **30** : 2487-2494, 2010.
 20. Lands B. Omega-3 PUFAs Lower the Propensity for Arachidonic Acid Cascade Overreactions. *Biomed Res Int* **2015** : 285135, 2015.
 21. Arita M, Bianchini F, Aliberti J, Sher A, Chiang N, Hong S, Yang R, Petasis NA, Serhan CN. Stereochemical assignment, anti inflammatory properties, and receptor for the omega-3 lipid mediator resolvin E1. *J Exp Med* **201** : 713-722, 2005.
 22. Schwab JM, Chiang N, Arita M, Serhan CN. Resolvin E1 and protectin D1 activate inflammation-resolution programmes. *Nature* **447** : 869-874, 2007.
 23. Naqvi AZ, Buettner C, Phillips RS, Davis RB, Mukamal KJ. n-3 fatty

- acids and periodontitis in US adults. *J Am Diet Assoc* **110** : 1669-1675, 2010.
24. Eberhard J, Heilmann F, Acil Y, Albers HK, Jepsen S. Local application of n-3 or n-6 polyunsaturated fatty acids in the treatment of human experimental gingivitis. *J Clin Periodontol* **29** : 364-369, 2002.
25. Hasturk H, Kantarci A, Ohira T, Arita M, Ebrahimi N, Chiang N, Petasis NA, Levy BD, Serhan CN, Van Dyke TE. RvE1 protects from local inflammation and osteoclast-mediated bone destruction in periodontitis. *FASB J* **20** : 401-403, 2006.
26. Darveau RP, Tanner A, Page RC. The microbial challenge in periodontitis. *Periodontology 2000* **14** : 12-32, 1997.
27. Hamada N, Watanabe K, Tahara T, Nakazawa K, Ishida I, Shibata Y, Kobayashi T, Yoshie H, Abiko Y, Umemoto T. The r40-kDa outer membrane protein human monoclonal antibody protects against *Porphyromonas gingivalis*-induced bone loss in rats. *J Periodontol* **78** : 933-939, 2007.
28. Rahman MM, Bhattacharya A, Banu J, Kang JX, Fernandes G. Endogenous n-3 fatty acids protect ovariectomy induced bone loss by

- attenuating osteoclastogenesis. *J Cell Mol Med* **13** : 1833-1844, 2009.
29. Kesavalu L, Vasudevan B, Raghu B, Browning E, Dawson D, Novak JM, Correll MC, Steffen MJ, Bhattacharya A, Fernandes G, Ebersole JL. Omega-3 fatty acid effect on alveolar bone loss in rats. *J Dent Res* **85** : 648-652, 2006.
30. Kesavalu L, Bakthavatchalu V, Rahman MM, Su J, Raghu B, Dawson D, Fernandes G, Ebersole JL. Omega-3 fatty acid regulates inflammatory cytokine/mediator messenger RNA expression in *Porphyromonas gingivalis*-induced experimental periodontal disease. *Oral microbiology and immunology* **22** : 232-239, 2007.
31. Bendyk A, Marino V, Zilm PS, Howe P, Bartold PM. Effect of dietary omega-3 polyunsaturated fatty acids on experimental periodontitis in the mouse. *J Periodontal Res* **44** : 211-216, 2009.
32. Sun D, Krishnan A, Zaman K, Lawrence R, Bhattacharya A, Fernandes G. Dietary n-3 fatty acids decrease osteoclastogenesis and loss of bone mass in ovariectomized mice. *J Bone Miner Res* **18** : 1206-1216, 2003.
33. Choi JS, Park NH, Hwang SY, Sohn JH, Kwak I, Cho KK, Choi IS. The

- antibacterial activity of various saturated and unsaturated fatty acids against several oral pathogens. *Journal of environmental biology / Academy of Environmental Biology, India* **34** : 673-676, 2013.
34. Nakanishi A, Iitsuka N, Tsukamoto I. Fish oil suppresses bone resorption by inhibiting osteoclastogenesis through decreased expression of M-CSF, PU.1, MITF and RANK in ovariectomized rats. *Mol Med Rep* **7** : 1896-1903, 2013.
35. Serhan CN. Resolution phase of inflammation: novel endogenous anti-inflammatory and proresolving lipid mediators and pathways. *Annual review of immunology* **25** : 101-137, 2007.
36. Gao L, Faibish D, Fredman G, Herrera BS, Chiang N, Serhan CN, Van Dyke TE, Gyrko R. Resolvin E1 and chemokine-like receptor 1 mediate bone preservation. *J Immunol* **190** : 689-694, 2013.
37. Zhu M, Van Dyke TE, Gyrko R. Resolvin E1 regulates osteoclast fusion via DC-STAMP and NFATc1. *FASEB J* **27** : 3344-3353, 2013.
38. Raisz LG. Pathogenesis of osteoporosis: concepts, conflicts, and prospects. *J Clin Invest* **115** : 3318-3325, 2005.
39. Suzawa T, Miyaura C, Inada M, Maruyama T, Sugimoto Y, Ushikubi F,

- Ichikawa A, Narumiya S, Suda T. The role of prostaglandin E receptor subtypes (EP1, EP2, EP3, and EP4) in bone resorption: an analysis using specific agonists for the respective EPs. *Endocrinology* **141** : 1554-1559, 2000.
40. Nukaga J, Kobayashi M, Shinki T, Song H, Takada T, Takiguchi T, Kamijo R, Hasegawa K. Regulatory effects of interleukin-1beta and prostaglandin E2 on expression of receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand in human periodontal ligament cells. *J Periodontol* **75** : 249-259, 2004.
41. Liu XH, Kirschenbaum A, Yao S, Levine AC. Cross-talk between the interleukin-6 and prostaglandin E(2) signaling systems results in enhancement of osteoclastogenesis through effects on the osteoprotegerin/receptor activator of nuclear factor-B (RANK) ligand/RANK system. *Endocrinology* **146** : 1991-1998, 2005.
42. Flynn MA, Qiao M, Garcia C, Dallas M, Bonewald LF. Avian osteoclast cells are stimulated to resorb calcified matrices by and possess receptors for leukotriene B4. *Calcif Tissue Int* **64** : 154-159, 1999.

付図説明

表 1. ω 3 脂肪酸配合食、 ω 6 脂肪酸配合食、通常食における脂肪酸組成比

数値は総脂質量に対する質量パーセント濃度を示す。最も一般的な脂肪酸についてのみ配合比率を示し、一部の種類に関しては省略した。

図 1. 実験スケジュール

ω 3 配合食摂取群、 ω 6 配合食摂取群、通常食摂取群のマウスに対し抗菌水を 3 日間、自由摂取させ口腔常在菌を除去した後、マウス口腔内に *P. g* 菌液の接種を計 3 回行った。飼育開始から 33 日目に各群から抽出したマウスの大腿骨から骨髓細胞を採取し、破骨細胞の分化度を比較した。また飼育開始から 57 日目の最終屠殺で上顎骨を採取し、歯槽骨吸収量の比較を行った。

図 2 - A. $\omega 3$ 脂肪酸摂取による歯槽骨吸収抑制効果 (各群 n=6)

各群の平均値 \pm 標準偏差を棒グラフで示す。統計分析は Tukey-Kramer の HSD 検定を用いて分析した (* $p < 0.05$)。

図 2 - B. 軟組織を除去した上顎骨の代表的な写真画像

上段：非感染群、下段：*P. g* 感染群

感染終了から 38 日後に各群のマウスから採取した上顎骨を示す。

歯槽骨の染色はメチレンブルーを用いて行った。

図 3. 上顎第一臼歯遠心根部の病理組織像 (TRAP 染色像)

左から通常食摂取群、 $\omega 3$ 脂肪酸配合食摂取群、 $\omega 6$ 脂肪酸配合食摂取群。上段：非感染群、下段：*P. g* 感染群、Bars : 20 μm 。

図 4 - A. $\omega 3$ 脂肪酸摂取による破骨細胞分化抑制作用 (各群 n=3)

マウス骨髄細胞は RANKL および M-CSF 存在下で 6 日間、破骨細胞への分化誘導を行い TRAP 染色の結果、3 核以上の TRAP 陽性細胞を破骨細胞とした。結果は、平均値 \pm 標準偏差で表している。統計は Tukey-Kramer の HSD 検定を用いて分析した (* $p < 0.05$)。

図 4 - B. 各給餌群のマウス骨髄細胞から分化誘導した破骨細胞の TRAP 染色像

左から通常食摂取群、 $\omega 3$ 脂肪酸配合食摂取群、 $\omega 6$ 脂肪酸配合食摂取群。上段：非感染群、下段：*P. g* 感染群
培養 5 日後に行った TRAP 染色により、濃赤色を呈した細胞が破骨細胞を示している。Bars：200 μm 。

図 5 - A. RvE1 による破骨細胞分化抑制作用（各群 n=4）

結果は平均値 \pm 標準偏差で表している。統計分析は Dunnett の検定を用いて分析した (** $p < 0.01$)。

図 5 - B. RvE1 の添加後に培養した破骨細胞の TRAP 染色像

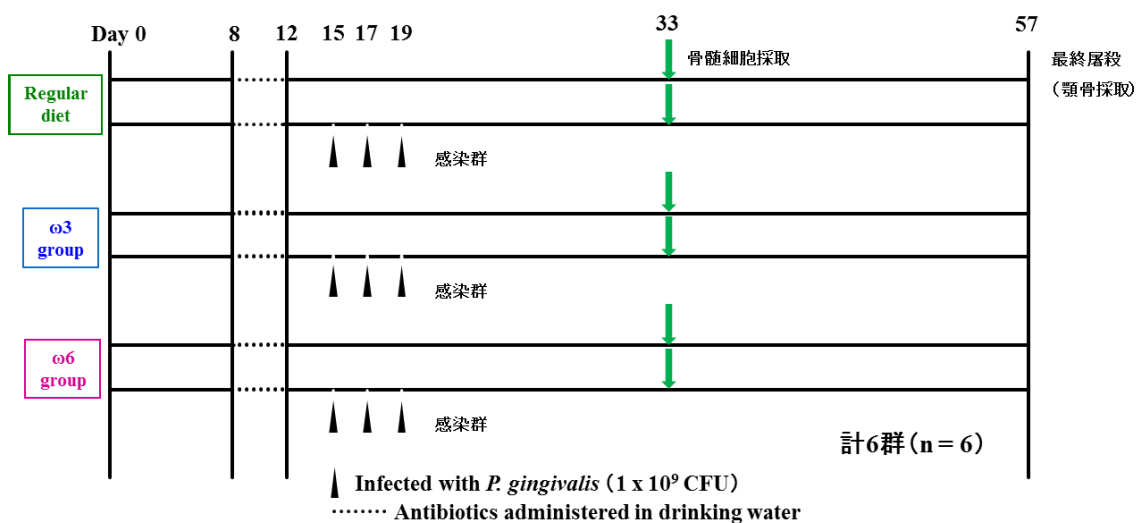
マウス骨髄細胞は RvE1 を最終濃度で 0 ng/ml、0.01 ng/ml、0.1 ng/ml および 1 ng/ml になるように添加し、RANKL および M-CSF で 6 日間、培養した。培養終了後、TRAP 染色により、濃赤色を呈した細胞が破骨細胞を示している。Bars：200 μm 。

表 1. ω 3 脂肪酸配合食、 ω 6 脂肪酸配合食、通常食における脂肪酸組成比

脂肪酸 重量比 (%)	飼料		
	Manharden Oil (ω 3)	Sunflower Oil (ω 6)	Regular diet
14:0 (ミリスチン酸)	6.9		0.4
16:0 (パルミチン酸)	14.3	6.2	14.6
16:1 (パルミトレイン酸)	9.74	0.5	0.7
16:2	1.62		
16:3	1.51		
16:4	1.53		
17:0 (マルガリン酸)	0.38		0.2
18:0 (ステアリン酸)	2.6	4.8	2.6
18:1 (オレイン酸)	9.6	21.9	1.3
18:2n-6 (リノール酸)	1.9	60.2	46.6
18:3 (α -リノレン酸)	1.5	0.5	3.8
18:04	3.1		0.1
20:1	1.5		0.6
20:4n-6			0.2
20:5n-3 (エイコサペンタエン酸)	14.2		1.3
21:05	0.76		
22:01	0.3		0.6
22:5n-3 (ドコサペンタエン酸)	2.8		0.4
22:6n-3 (ドコサヘキサエン酸)	10.26		1.3

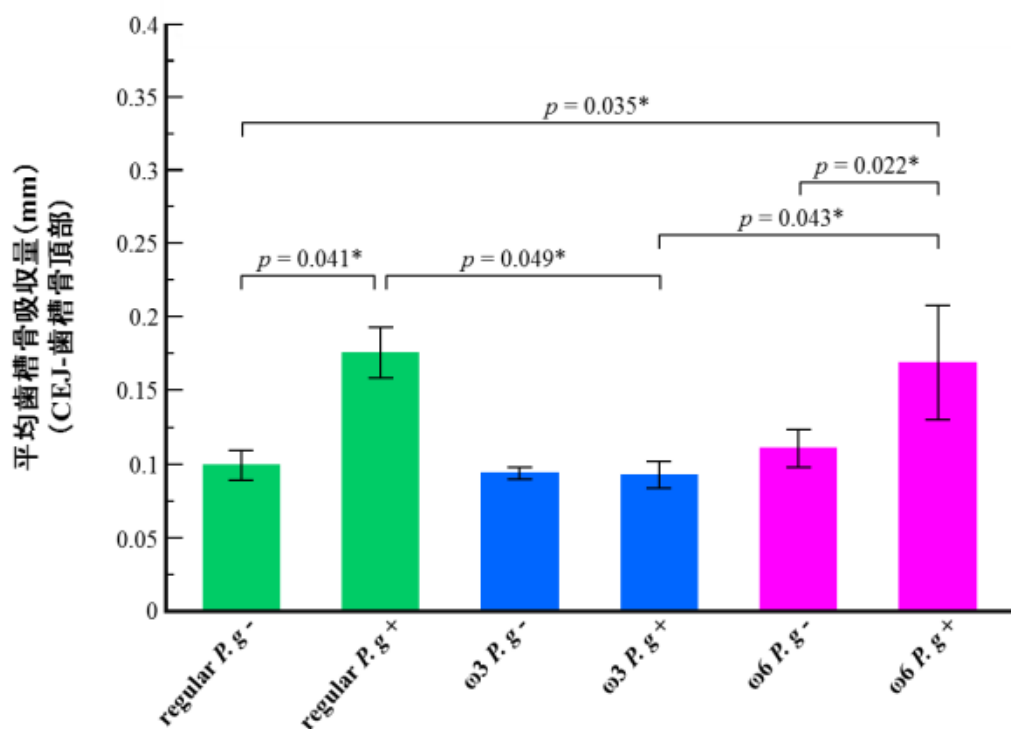
数値は総脂質量に対する質量パーセント濃度を示す。最も一般的な脂肪酸についてのみ配合比率を示し、一部の種類に関しては省略した。

図 1. 実験スケジュール



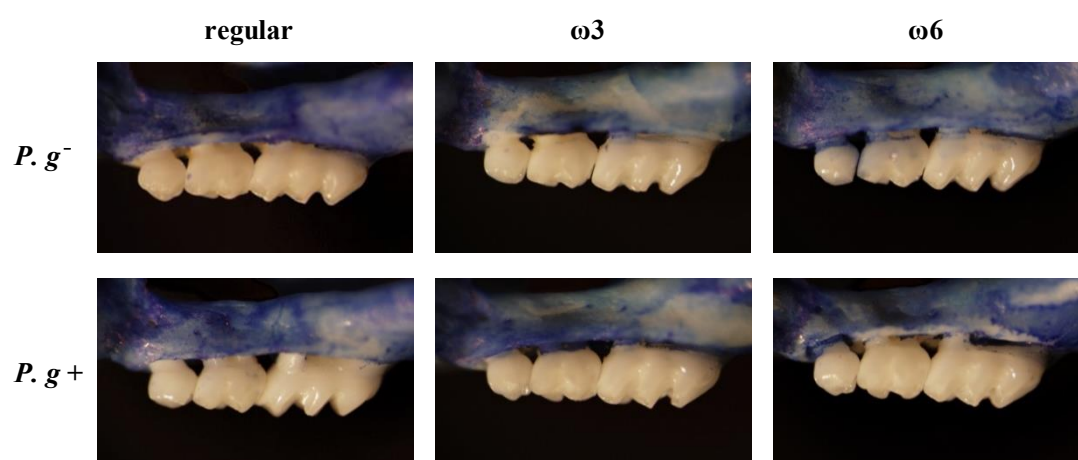
ω3 配合食摂取群、ω6 配合食摂取群、通常食摂取群のマウスに対し抗菌水を 3 日間、自由摂取させ口腔常在菌を除去した後、マウス口腔内に *P. g* 菌液の接種を計 3 回行った。飼育開始から 33 日目に各群から抽出したマウスの大腿骨から骨髓細胞を採取し、破骨細胞の分化度を比較した。また飼育開始から 57 日目の最終屠殺で上顎骨を採取し、歯槽骨吸収量の比較を行った。

図 2-A. ω 3 脂肪酸摂取による歯槽骨吸収抑制効果 (各群 n=6)



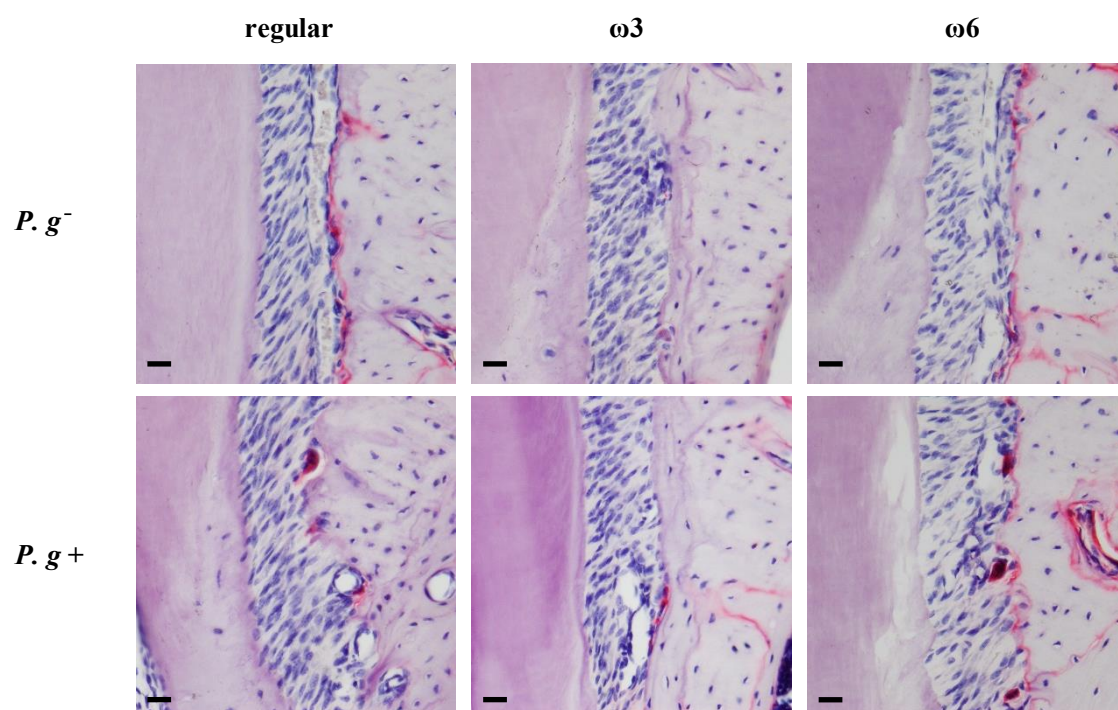
各群の平均値 \pm 標準偏差を棒グラフで示す。統計分析は Tukey-Kramer の HSD 検定を用いて分析した (* $p < 0.05$)。

図 2-B. 軟組織を除去した上顎骨の代表的な写真画像



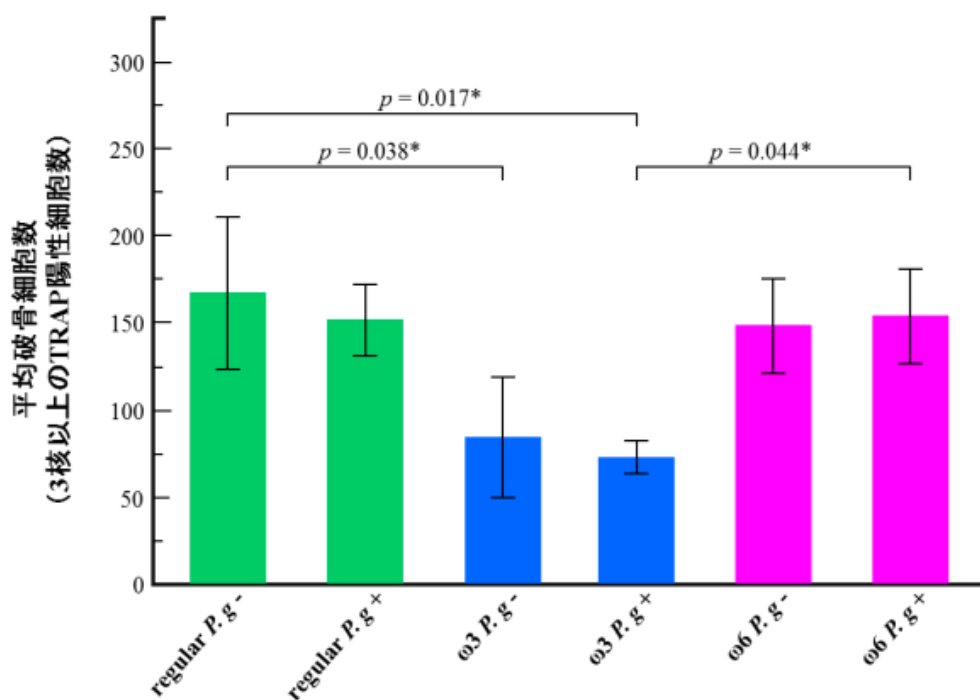
上段：非感染群、下段：*P. g* 感染群
感染終了から 38 日後に各群のマウスから採取した上顎骨を示す。
歯槽骨の染色はメチレンブルーを用いて行った。

図 3. 上顎第一臼歯遠心根部の病理組織像 (TRAP 染色像)



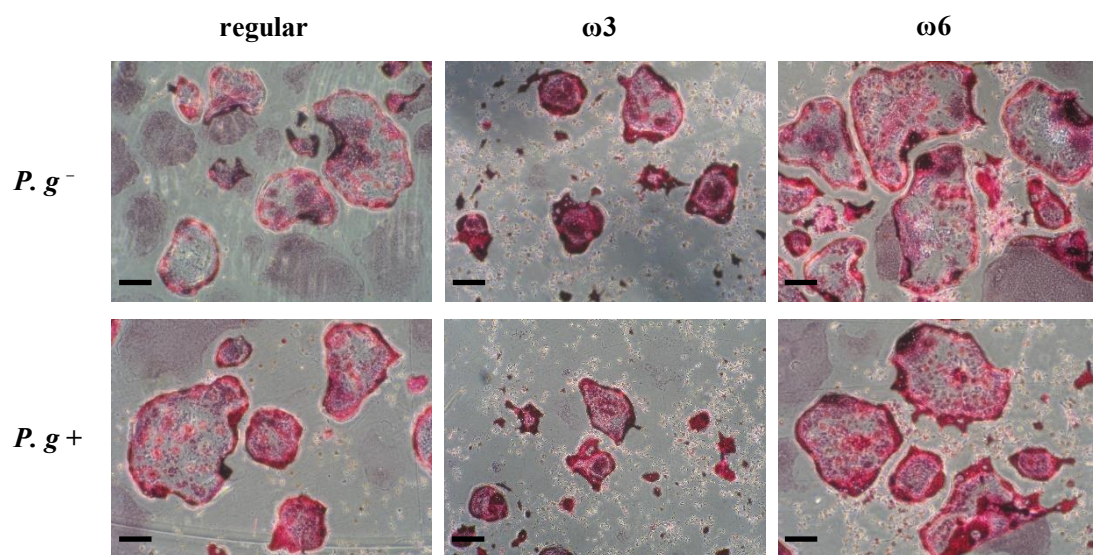
左から通常食摂取群、 $\omega 3$ 脂肪酸配合食摂取群、 $\omega 6$ 脂肪酸配合食摂取群。上段：非感染群、下段：*P. g* 感染群、Bars : 20 μm 。

図 4-A. ω 3 脂肪酸摂取による破骨細胞分化抑制作用 (各群 n=3)



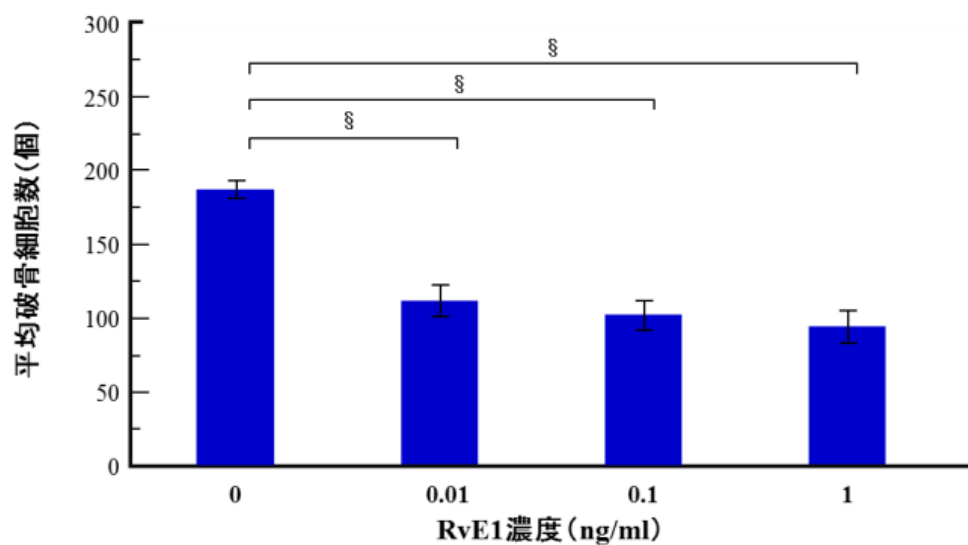
マウス骨髄細胞は RANKL および M-CSF 存在下で 6 日間、破骨細胞への分化誘導を行い TRAP 染色の結果、3 核以上の TRAP 陽性細胞を破骨細胞とした。結果は、平均値±標準偏差で表している。統計は Tukey-Kramer の HSD 検定を用いて分析した (* $p < 0.05$)。

図 4-B. 各給餌群のマウス骨髄細胞から分化誘導した破骨細胞の TRAP 染色像



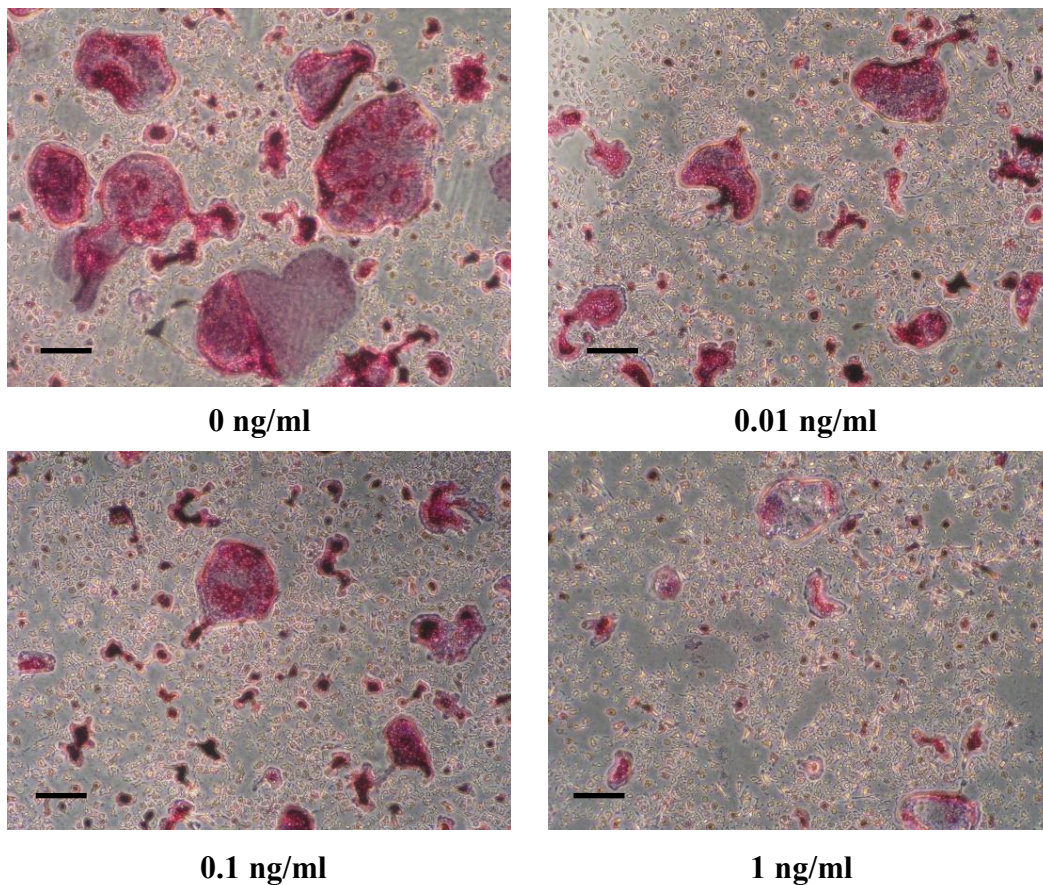
左から通常食摂取群、 $\omega 3$ 脂肪酸配合食摂取群、 $\omega 6$ 脂肪酸配合食摂取群。上段：非感染群、下段：*P. g* 感染群
培養 5 日後に行った TRAP 染色により、濃赤色を呈した細胞が破骨細胞を示している。Bars : 200 μm 。

図 5-A. RvE1 による破骨細胞分化抑制作用 (各群 n=4)



結果は平均値±標準偏差で表している。統計分析は Dunnett の検定を用いて分析した (**p<0.01)。

図 5-B. RvE1 の添加後に培養した破骨細胞の TRAP 染色像



マウス骨髄細胞は RvE1 を最終濃度で 0 ng/ml、0.01 ng/ml、0.1 ng/ml および 1 ng/ml になるように添加し、RANKL および M-CSF で 6 日間、培養した。培養終了後、TRAP 染色により、濃赤色を呈した細胞が破骨細胞を示している。Bars : 200 μ m。