

卵巣摘出マウスに対するトレハロースの影響

浜田 節男 五十嵐 栄¹ 長岡 正博¹

宮澤 忠蔵¹ 堀内 登²

Influence of Trehalose on Ovariectomized (OVX) Female Mice

Setsuo HAMADA, Sakae IGARASI¹, Masahiro NAGAOKA¹

Chuzo MIYAZAWA¹ and Noboru HORIUCHI²

Since mice or rats which have had ovary extraction have bone changes similar to those of the mice, rats or women lacking in estrogen, they have been used as an animal control group to examine the reduction of bone density after menopause.

Taking it into consideration that trehalose inhibits calcium from separating from bones, the authors did a 4-week oral administration of trehalose to the mice which had ovary extraction (OVX), and examined the influence of trehalose on the womb, serum components and bones.

There was no significant statistical difference between the OVX and TH (trehalose) administration groups in the womb weight, the concentration of calcium and inorganic phosphorus in the serum, and the length of the femur.

The weight of the femur of the TH group, to which 10 and 50mg/kg of trehalose was given, increased significantly, compared with that of the OVX group. The cortical bone and trabecula of the femur of the trehalose group became thicker and denser than those of the OVX group. These findings suggest that trehalose may be effective in the prevention of osteoporosis after menopause.

Key words : trehalose, OVX, cortical bone, trabecular, μ CT

緒 言

今日、女性の閉経後に女性ホルモン分泌低下による骨粗鬆症が問題となっている。エストロゲンやプロゲステロンなど女性ホルモンは子宮など性器のほかに、骨組織や脂代謝にも影響をおよぼしており、記憶や脳血流と関連があり、女性の更年期の鬱病、頭痛、アルツハイマー病などとの関連

性が報告されている¹⁾。

現在、骨粗鬆症の治療としては食物からのカルシウムの摂取のほか、治療薬²⁾としてはアルファロール (アルファカルシドール・中外)、ロカルトロール (カルシトリオール・ロシュ・杏林) など活性型ビタミンD₃剤、乳酸カルシウム、カルチコール (グルコン酸カルシウム・大日本) などカルシウム製剤、エルシトニン (エルカトニン・

受付：平成15年12月26日，受理：平成16年1月15日
奥羽大学歯学部附属病院薬局
奥羽大学歯学部口腔衛生学講座¹
奥羽大学歯学部口腔生化学講座²

Department of Pharmacy, Ohu University Dental Hospital
Department of Preventive Dentistry, Ohu University School of Dentistry¹
Department of Biochemistry, Ohu University School of Dentistry²

旭化成)など骨吸収抑制剤, ダイドロネル(エチドロネ酸二ナトリウム・住友), オステン(イプリフラボン・武田)などビスホスホネート製剤, ビタミンK₂製剤グラケール(メナテトレノン・エーザイ)などが国内で使用されている。さらに骨形成促進剤としてPTHやSERM(選択的エストロゲン受容体モデュレーター)の治験も進められている。

卵巣摘出したマウスやラットは, エストロゲン欠乏のマウス, ラットや女性にみられる骨変化と類似性があるため, 閉経後の骨量減少に対する動物モデルとして繁用されている³⁻⁶⁾。著者らは骨からのカルシウムの溶出を抑制するとして知られている糖類⁷⁾, 特にトレハロース⁸⁾に注目し, 卵巣摘出したマウスにトレハロースを経口投与して, 子宮, 血清成分および骨への影響について検討した。

方 法

1) 実験動物はICR系雌性マウス4週令(日本クレア(株)・東京)を使用した。

飼育⁹⁾は1群11~16匹で奥羽大学附属動物実験施設内で飼育し, 飲水および餌(日本クレア(株)・東京)は自由に摂取させ, 体重は毎日測定した。

2) 実験スケジュールは図1に示した。マウス8週令目にペントバルビタールナトリウム麻酔下で左右卵巣摘出術(以下OVXと略す)と偽手術(以下Shamと略す)を行った。OVXはペントバルビタールナトリウム(0.5%, 50mg/kg)を腹腔内投与後, 背部毛を除去し, 開腹して卵巣管縫合したのち, 両卵巣を摘出した。縫合後, ペニシリンG6万単位を0.02mL/マウスを皮下投与して飼育用ケージへ戻した。

実験群はOVX後, トレハロース(以下THと略す)を10, 50, 100mg/kgを週6回, 4週間経口ゾンデを用いて投与した(図1)。

OVX群, Sham群およびTH投与群は実験開始4週間後に, 断首して採血, 血清中のカルシウムと無機リン濃度を, 子宮は摘出後, 湿重量をそれぞれ測定した⁴⁻⁶⁾。頭部, 頸骨および大腿骨を摘出してホルマリン水で固定保存した。

3) 乾燥大腿骨重量は左側大腿骨周辺部の軟組

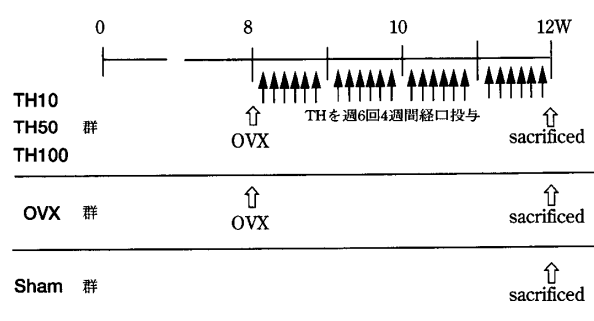


図1 実験方法

織を除いた後, 110°Cで24時間完全に乾燥させた後, 重量を測定した。

4) 血清中のカルシウムはカルシウムCテストワコー, 無機リンはホスファCテストワコーで測定した。

5) 骨の μ CT像は福島県ハイテクプラザ(郡山市), 島津マイクロフォーカスX線テレビ&CTシステムにより撮影, 解析を行った。

6) 実験に使用した薬品

THは林原生物化学研究所(岡山市), ペントバルビタールナトリウムは大日本製薬(株)(大阪市), ペニシリンGは明治製菓(株)(東京都), カルシウムCテストワコーとホスファCテストワコーは和光純薬工業(株)(大阪市)をそれぞれ使用した。

7) 統計処理は一元配置分散分析法で, 群間の比較には多重比較法を用い, 危険率5%未満を有意差とした。解析にはAbacus Concepts Inc.(USA)の統計解析プログラムStatView Ver. 4.51を用いて行った。

結果は平均値±標準偏差(S.D.)で表わした。

成 績

1. 体重の変化

各実験群の実験開始日から実験終了日までの体重推移を図2に示した。

体重はSham群を除いて, 卵巣摘出直後に減少した。その後, 各実験群の体重はOVX術直後の8週令から10週令まで, OVX群, OVX+TH10, 50, 100mg/kg群では, いずれも急激な体重増加が認められた。堀が報告⁶⁾するようにOVX後1週間目より有意に体重が増加していることから,

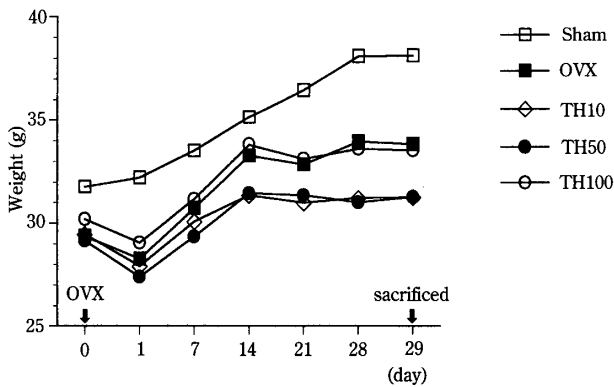


図2 体重推移

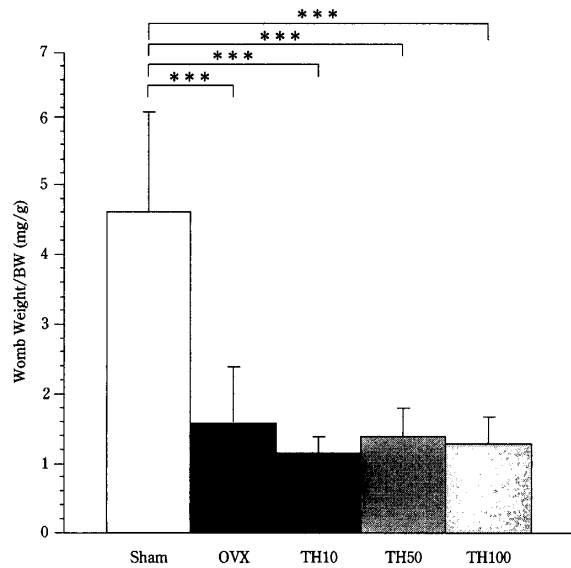


図4 体重あたりの子宮重量

Mean±S.D., Sham vs each group, ***; p<0.001

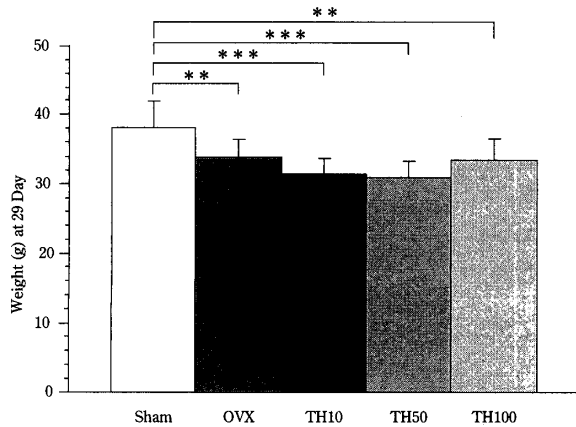


図3 OVX後29日目体重

Mean±S.D., Sham vs each group, **; p<0.01, ***; p<0.001

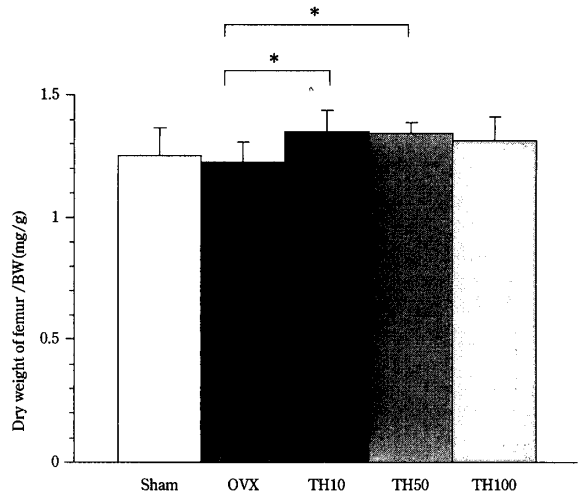


図5 体重あたりの大腸骨乾燥重量

Mean±S.D., OVX vs each group, *; p<0.05

OVX手術が成功したことが確認できた。

実験終了29日目の体重比較を図3に示した。Sham群と各実験群間に統計学的有意差がみられた。しかし、OVX群とOVX+TH投与群間の体重には有意差は認められなかった。

日本クレア(株)データによるICR雌マウスの平均体重は8週令で29g, 12週令で34gとの報告がある。実験に使用したマウスの体重は日本クレア(株)成績の±1σ内にあった。

2. 子宮重量

各実験群の体重あたりの子宮重量を図4に示した。

子宮重量はSham群では175.72±60.17mg, OVX群では53.55±22.58mg, OVX+TH10群では35.31±11.21mg, OVX+TH50群では44.67±

15.50mg, OVX+TH100群では42.88±11.82mgであった。Sham群と各OVX+TH投与群間には統計学的な有意差が認められた (p<0.001)。しかし、OVX群とOVX+TH投与群間の子宮重量には有意差は認められなかった。

体重に対する子宮重量比はSham群では0.46±1.63(%), OVX群では0.16±0.87(%), OVX+TH10群では0.11±0.44(%), OVX+TH50群では0.14±0.67(%), OVX+TH100群では0.13±0.38(%)であった。

日本クレア(株)によるICR雌マウスの子宮の重量は171.27±44.58mgで、体重比では0.6±0.2(%)

表1 乾燥左側大腿骨長さ

実験群	例数	平均値 (mm)	標準偏差 (mm)
Sham	16	14.15	0.57
OVX	15	14.34	1.00
TH10mg/kg	13	14.15	0.69
TH50mg/kg	11	14.45	0.47
TH100mg/kg	12	14.42	0.74

の報告がある。実験に使用したSham群マウスの子宮重量は日本クレア(株)成績とほぼ同程度の値であった。

3. 乾燥左側大腿骨重量

Sham群では 47.54 ± 4.11 mg, OVX群では 41.42 ± 3.19 mg, OVX+TH10mg群では 42.02 ± 3.74 mg, OVX+TH50mg群では 42.04 ± 4.17 mg, OVX+TH100mg群では 43.94 ± 2.62 mgであった。Sham群とOVX群間に危険率0.1%, さらにSham群とTH10mg, 50mg/kg群間に危険率1%で有意差がそれぞれ認められた。

体重あたりの乾燥大腿骨重量を図5に示した。OVX+TH10, 50mg/kg投与群とOVX群に危険率5%で有意差が認められた。

4. 乾燥左側大腿骨長さ

24時間乾燥した左側大腿骨長さを表1に示した。長さは14.15mmから14.45mmで各群間で統計学的有意差はみられなかった。

5. 血清中のカルシウムおよび無機リン濃度

カルシウム濃度はSham群では 9.07 ± 0.47 mg/dL, OVX群では 8.88 ± 0.40 mg/dL, OVX+TH10群では 9.11 ± 0.35 mg/dL, OVX+TH50群では 8.82 ± 0.39 mg/dL, OVX+TH100群では 8.84 ± 0.49 mg/dL, Sham群と各OVX+TH投与群間には統計学的有意差が認められなかった(図6)。

無機リン濃度はSham群では 9.91 ± 0.59 mg/dL, OVX群では 7.87 ± 1.16 mg/dL, OVX+TH10群では 7.12 ± 0.85 mg/dL, OVX+TH50群では 7.76 ± 0.85 mg/dL, OVX+TH100群では 7.46 ± 0.54 mg/dL, Sham群と各OVX+TH投与群間には統計学的有意差が認められなかった。

6. 大腿骨の μ CTによる3次元解析像

Sham群, OVX群および各OVX+TH投与群の μ CTによる3次元解析像を図7に示した。TH投

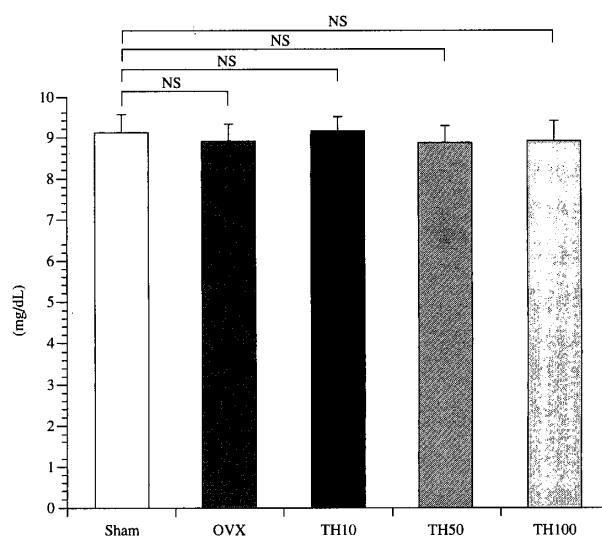


図6 血清カルシウム濃度

Mean \pm S.D., Sham vs each group,
NS; Not significant

与群ではOVX群に比べ, THによって誘導された骨形成が増加していた。特にTH低濃度の10, 50mg/kg投与群の骨形成が顕著である。一方, OVX群ではSham群と比較して著しい骨量の減少を認めた。

7. 大腿骨の皮質骨と海綿骨の μ CT像

μ CT像は各実験群の大腿骨膝蓋面から大腿骨頭方向へスキャンした際の μ CT像を図8に示した。図8は大腿骨遠位骨幹端より1.5mmの位置での μ CT像を示した。OVX群ではSham群と比べて皮質骨量は少なく, 海綿骨量も少なく空隙がみられる。一方OVX+TH群ではOVX群に比べて皮質骨量は多く, 海綿骨は密である。この成績はTHの高濃度よりも低濃度群に強く発現している(図8)。

8. 海綿骨の割合

各実験群の μ CT像から皮質骨を除いた, 骨髓腔に対する海綿骨量の比率を図9に示した。OVX群とSham群, OVX+TH投与群間には危険率0.1%で統計学的有意差が認められる。TH投与により海綿骨量の増加が明らかとなった。低濃度のTH10mg/kg投与群は他のTH投与2群と比較して有意差がみられた。TH10mg/kg投与群の海綿骨は増加していることが図8および図9の成績から明らかとなった。



図7 大腿骨のμCTによる3次元解析像

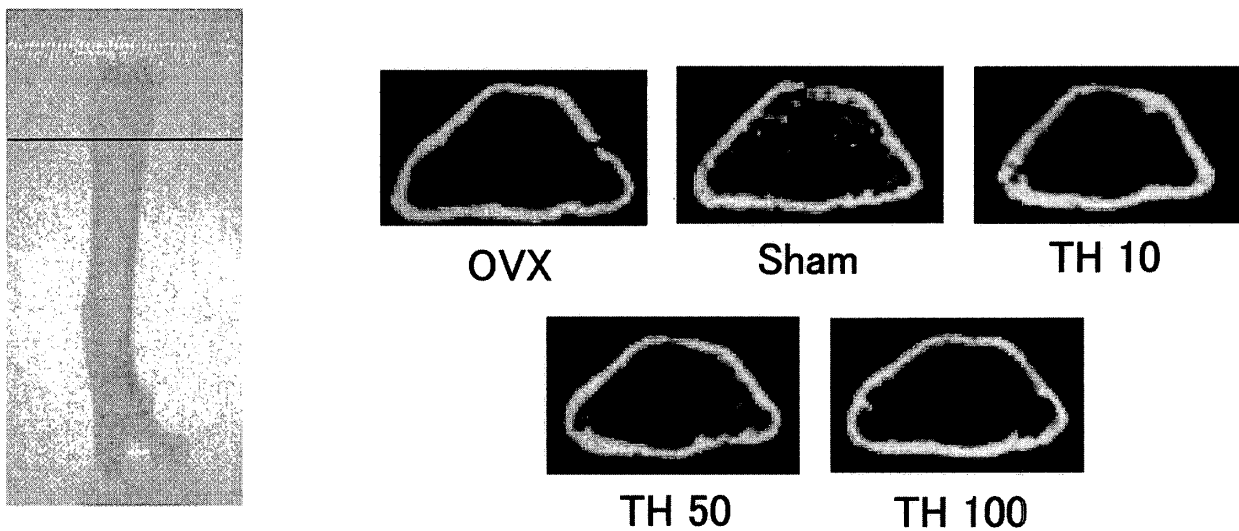


図8 大腿骨の皮質骨と海綿骨のμCT像

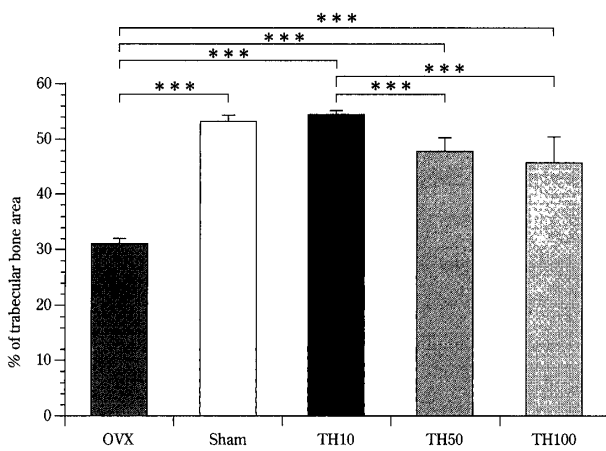


図9 海綿骨の割合

Mean±S.D., OVX vs each group, TH10 vs TH50&TH100, ***; p<0.001

考 察

骨は常に活性化と吸収と形成が起こり、古い骨から新しい骨へとリモデリングされている。人では骨の吸収と形成は30歳代まで平衡が保たれており、40歳以降は骨吸収よりも骨形成が低下するために骨塩量が減少する。女性では閉経後10数年間で骨吸収がより進み、閉経後の骨粗鬆症は転倒による手、腰、脊髄などの骨折を招き、寝たきり生活を余儀なくされたりして日常生活にも支障をきたす。一般的には閉経後の骨粗鬆症の場合には女性ホルモンの投与が、老人性骨粗鬆症の場合には活性型ビタミンD₃の投与が有効である。しかし、

これらホルモン剤やカルシウム製剤には悪心、嘔吐、頭痛、不眠、顔面紅潮、血圧上昇、動悸、腹部不快感、食欲不振、肝臓腎臓障害、関節周囲の石灰化など様々な副作用があらわれる。糖類が骨粗鬆症に対して有効との報告⁷⁾があることから、本実験ではトレハロースに注目して実験を行った。

骨粗鬆症の改善薬として実験に用いたトレハロースはグルコースが2分子結合した非還元性糖質で、甘さはショ糖の半分でカロリーはショ糖と同程度である。トレハロースは1832年にWiggersによって麦芽から発見され、1859年にBerthelotにより抽出分離され、主に茸類や藻類に含まれている。国内のトレハロースは年間3万トンの消費があり、冷凍食品、ヨーグルト、レトルト食品に利用されている。

2003年ファイザー社のLiら¹⁰⁾が合成開発したCP-533,536はマウスの骨形成を促進することや骨折治癒に有効と報告している。この薬剤は直接骨や骨折した部位に注入する方法がとられ、動物実験ではあるがCP-533,536投与で下痢、不眠、フラッシング(顔面紅潮)はみられなかったと報告している。骨粗鬆症患者への薬剤投与は身体への薬剤侵襲の観点から、副作用が少なく、注射による薬剤投与よりも経口投与による方法がより安全であると考え。そこで本実験では経口投与によるトレハロースの投与方法は妥当と考え、薬剤による副作用がなく、食品による骨粗鬆症改善を目的として実験を行った。

経口投与されたトレハロースはショ糖や麦芽糖のように腸で消化吸収され、その後のトレハロースによる骨密度増加のメカニズムについては、今後、骨芽細胞などとの関りについて研究を待たねばならない。

本成績からトレハロースは閉経後の骨粗鬆症予防に有効な一手段である可能性が示唆され、西崎ら⁸⁾の報告と一致した成績が得られた。

OVXにより大腿骨重量や海綿骨量に変化はみられなかったことは文献⁸⁾等により確認されていることである。血清中のカルシウム、無機リン濃度について、TH投与後とOVX群間で統計学的な有意差はみられなかったことは西崎らの報告⁸⁾と一致し、生体の恒常性によるものと考えられる。

まとめ

骨からのカルシウムの溶出を抑制するとして知られているトレハロースに注目し、卵巣摘出したマウスにトレハロースを投与して、子宮、血清成分および骨への影響について検討した。

その結果、子宮重量、血清中のカルシウムおよび無機リン濃度は、OVX群とTH投与群間で統計学的な有意差はみられなかった。

TH10, 50mg/kg投与により大腿骨重量は、OVX群に比べて有意に増加していた。

大腿骨の μ CT像から、海綿骨量をTH投与群とOVX群間で比較すると、TH10mg/kg投与群の方がOVX群よりも海綿骨量は増加していた。

トレハロースは閉経後の骨粗鬆症の予防に有効である可能性が示唆された。

謝 辞

骨の μ CT像の撮影および解析にご協力いただきました、福島県ハイテクプラザ研究員 工学博士橋本政靖氏に感謝いたします。

文 献

- 1) Erben, R. G., Bromm, S. and Stangassinger, M.: Short-term prophylaxis against estrogen depletion induced bone loss with calcitriol dose not provide long-term beneficial effects on cancellous bone mass or structure in ovariectomized rats. *Osteoporos Int* **8**; 82-91 1998.
- 2) 森田 寛, 浦部晶夫, 島田和幸, 灰田美和子ほか: 今日の治療薬解説と便覧2003 (水島 裕編) 第25版; 372-383 南江堂 東京 2003.
- 3) 保坂 努, 和田倫斎, 永野伸郎: マウスを用いた骨粗鬆症モデル. *アニテクス* **5**; 243-246 1993.
- 4) 飯田治三, 福田 茂: ラットの加齢に伴う骨重量および含有成分量の変化. *Exp Anim* **42**; 349-356 1993.
- 5) 奥村秀雄, 山室孝夫, 笠井隆一, 林 泰一ほか: 実験的不働性骨粗鬆症. 骨の定量的分析法 初版; 93-99 西村書店 新潟 1986.
- 6) 堀 正幸: 卵巣摘出(OVX)および甲状腺摘出(TPTX). 骨形態計測ハンドブック 第2版; 127-133 西村書店 新潟 1997.
- 7) Chonan, O., Matsumoto, K. and Watanuki, K.: Effect of galactooligosaccharides on calcium absorption and preventing bone loss in ovariectomized rats. *Biosci Biotech Biochem*

- 59 ; 236-239 1995.
- 8) 西崎泰司, 花谷利春, 新井成之, 池田雅夫ほか：
骨粗鬆症モデルマウスに対するトレハロースの
作用. 医学と生物学 **137** ; 91-96 1998.
- 9) 伊崎勝弘, 浜田佑二, 岡田忠夫：近交系スナネ
ズミの繁殖と生後の発育. 実験動物技術 **20** ;
66-70 1985.
- 10) Li, M., Ke, H. Z., Qi, H., Healy, D. R. *et al.* : A
novel, non-prostanoid EP2 receptor selective

prostaglandin E2 agonist stimulates local bone
formation and enhances fracture healing. *J*
Bone Mine Res **18** ; 2033-2042 2003.

著者への連絡先：浜田節男, (〒963-8611) 郡山市富田町字
三角堂31-1 奥羽大学歯学部附属病院薬局

Reprint requests : Setsuo HAMADA, Department of
Pharmacy, Ohu University Dental Hospital
31-1 Misumido, Tomita, Koriyama, 963-8611, Japan