

1,4-dihydroxy-2-naphthoic acid (DHNA) の

OVX マウスに対する骨吸収抑制効果

喜多 憲一郎

Anti-osteoporosis effects of 1,4-dihydroxy-2-naphthoic acid (DHNA) in

ovariectomized mice

Kenichiro Kita

岡山大学大学院医歯薬学総合研究科

機能再生・再建科学専攻

口腔・顎・顔面機能再生制御学講座

顎口腔再建外科学分野

(主任：飯田征二教授)

本論文の一部は、以下の学会において発表した。

- ・ 第 57 回日本口腔外科学会総会・学術大会 (2012 年 10 月, 横浜)
- ・ 第 66 回日本口腔科学会学術集会 (2012 年 5 月, 広島)
- ・ 18th International Congress of Dento-Maxillo-Facial Radiology (2011 年 5 月, 広島)
- ・ 第 55 回日本口腔外科学会総会・学術大会 (2010 年 10 月, 幕張)

緒言

高齢化社会において骨粗鬆症は年々増加傾向にあり、予防及び治療は骨折の合併症を防止する上で必要不可欠である。骨は常に骨芽細胞による骨形成と破骨細胞による骨吸収のリモデリングを繰り返すことで血中カルシウム濃度を維持し恒常性を保っている。しかし、骨吸収が優位となり骨粗鬆症を発症すると、脊椎や大腿骨の骨折の発生頻度が高くなり、骨折した場合は患者の自立性が損なわれる可能性がある。現に介護が必要となる原因の多くは脳血管障害、関節疾患（骨折・転倒）、認知症であり、骨粗鬆症による大腿骨頸部骨折が寝たきりの大きな原因となっている。

骨粗鬆症は骨強度の低下を特徴とし、骨折リスクが増大した骨格疾患と定義されている。エストロゲン減衰に伴い発症する閉経後骨粗鬆症¹⁾、また関節リウマチ等の自己免疫疾患や臓器移植後の免疫抑制療法に伴い発症するステロイド性骨粗鬆症が存在する^{2,3)}。これらは対象患者数が多く、骨粗鬆症の主体を占めており、骨折好発部位は椎体、大腿骨頸部、上腕骨近位端が挙げられる。

現在、様々な骨粗鬆症治療薬が開発され臨床応用されており、その中でもビスフォスフォネートは強力な骨吸収抑制作用を持つ事から広く臨床の場で使用されている。骨粗鬆症の管理と治療のガイドラインにおいてもビスフォスフォ

ネートの使用が第一選択とされている^{4,5)}。ビスフォスフォネートは生体内で骨に沈着し、破骨細胞がその骨を吸収すると破骨細胞のアポトーシスにより骨吸収抑制作用が働く。しかし、その強力な骨吸収抑制作用でマイクロダメージの蓄積が生じ⁶⁻⁸⁾、大腿骨骨幹部骨折や転子下骨折などの非定型大腿骨骨折の報告がある。また、ビスフォスフォネート使用患者の口腔内観血的処置によってビスフォスフォネート系薬剤関連顎骨壊死(BRONJ)の発症が報告されている⁹⁻¹¹⁾。初期では局所洗浄や抗菌薬投与、後期になれば外科的切除が推奨されているが、治療が困難であることが多い¹²⁾。

骨粗鬆症の管理と治療のガイドラインでは第二選択薬としてはビタミン D、カルシウム、ビタミン K 製剤が有効とされているが¹³⁻¹⁵⁾、これら薬剤の骨吸収抑制作用は微弱であり、他剤併用での使用が多い。骨へのカルシウム定着増強作用を持つビタミン K2 はナフトキノン骨格という構造を持ち¹⁶⁾、同じ骨格を持つ物質に 1,4-dihydroxy-2-naphthoic acid (DHNA) がある。DHNA は *Propionibacterium freudenreichii* ET-3 株の発酵産生物の主成分であり¹⁷⁾、腸内常在菌であるビフィズス菌を特異的に増殖させる因子 (Bifidogenic growth stimulator) であると報告されている¹⁸⁾。経口摂取で整腸作用を持つため潰瘍性大腸炎の治療にも応用されているが¹⁹⁾、骨粗鬆症に対して用いられる事はなかった。松原らは臓器移植後の免疫抑制療法後に発症する骨粗鬆症^{20,21)}に着目

し、マウスに FK506 を投与して作製した骨粗鬆症モデルマウスに DHNA を投与する事で骨吸収が抑制される事を見出した²²⁾。これは DHNA が炎症性サイトカインの産生を抑制したために生じたと考えられている。今回の研究ではステロイド性骨粗鬆症モデルマウスの代わりに閉経後骨粗鬆症モデルマウスを対象として、DHNA、ビタミン K2、リセドロネートを経口投与し、骨吸収抑制効果を比較検討した。

材料ならびに方法

1. 実験動物モデル作製法

実験動物には、8 週齢にて卵巣摘出術および偽手術を施した 9 週齢 ICR 雌性マウス（日本クレア社，東京）を使用し，術後 4 週間の経過観察を行った後に計 50 匹を 10 個体ずつ以下の 5 群に分類した。1.偽手術群（Sham 群），2 薬剤未投与 OVX 群（OVX 群），3. DHNA（30mg/kg/day）（SIGMA-Aldrich-United-States, St. Louis, MO, USA）を投与した OVX 群（DHNA 群），4. ビタミン K2（30mg/kg/day）（SIGMA-Aldrich-United-States）を投与した OVX 群（VK2 群），5. リセドロネート（0.5mg/kg/day）（SIGMA-Aldrich-United-States）を投与した OVX 群（Ris 群）。DHNA 及び

ビタミン K2 は芳香族炭化水素を構造に持ち脂溶性のためミグリオール(ミツバ貿易, 東京) に, リセドロネートは水溶性のため生理食塩水に溶解して 8 週間経口投与した。実験期間中, 飼料は固形飼料 MF (オリエンタル酵母工業社, 東京) と水を常時与えた。投与終了後, エーテル麻酔を行い眼窩下静脈叢より血液を採取した。その後屠殺し左右大腿骨及び第五腰椎を採取し, 左側大腿骨と第五腰椎をエックス線学的観察用, 右側大腿骨を組織学的観察用とした。

なおこの実験は岡山大学動物実験管理委員会の指針に従い, 承認を得た上で行った。

2. マウスの血清生化学的検討法

ヘパリンを加えて凝固を遅延させておいた血液を遠心分離にて血清を分離し, 血清エストロゲン (17 β -Estradiol), 血清アルカリフォスファターゼ (ALP), 血清 Bone morphogenetic protein-2 (BMP-2), 血清オステオカルシン (OC), 血清 Receptor Activator of NF- κ B Ligand (RANKL) 濃度の測定および骨吸収性サイトカインである Interleukin-1 β (IL-1 β), Interleukin-6 (IL-6), Tumor necrosis factor- α (TNF- α) の計測を行った。17 β -Estradiol はエストロゲンアッセイキット (ECOLOGIENA, 日本エンバイオケミカルズ, 東京), ALP はアルカリフォスファターゼアッセイキット (TRACP & ALP Assay Kit, タカラバ

イオ, 滋賀), BMP-2 は BMP-2 アッセイキット (Quantikine BMP-2 Immunoassay, R&D Systems, Minneapolis, USA), OC はオステオカルシンアッセイキット (Mouse Gla-Osteocalcin High Sensitive EIA Kit, タカラバイオ), RANKL は RANK Ligand アッセイキット (Quantikine Mouse RANK Ligand Immunoassay, R&D Systems), IL-1 β , IL-6, TNF- α はサイトカインアッセイキット (Bio-Plex Cytokine Assays, Bio-Rad Laboratories, CA, USA) を用いて検出し, 吸光度をマイクロプレートリーダー (Model 680, Bio-Rad Laboratories) にて計測した。

3. 大腿骨の組織学的検討法

5 群それぞれ 10 個体の大腿骨を摘出し, 右側のみ 4%パラホルムアルデヒドに 24 時間浸漬固定した。固定後 10%エチレンジアミン四酢酸 (EDTA) で 30 日脱灰し, 脱灰後通法に従いアルコール脱水しパラフィン包埋を行った。包埋後 5 μ m のパラフィン切片を作製し, 組織学的検討のためにヘマトキシリン-エオジン染色 (H-E 染色), 破骨細胞の観察のために酒石酸抵抗性酸性フォスファターゼ染色 (TRAP 染色) を行い光学顕微鏡 (キーエンス, 大阪) にて観察を行った。また多核の TRAP 陽性細胞を破骨細胞と考え, 大腿骨遠位骨端部の 100 μ m \times 100 μ m あたりの TRAP 陽性細胞数を計測した。

4. Bone Mineral Density (BMD) 測定及び骨形態計測

第五腰椎及び左側大腿骨は摘出後乾燥させ、マイクロ CT 撮影装置 (R_mCT2, リガク, 東京) にて 10 μ m のスライス幅で撮影を行った。撮影にて得られた結果は骨解析ソフトウェア (TRI/3D-BON, ラトックシステムエンジニアリング社, 東京) にて三次元的構築及び骨形態計測を行い大腿骨と腰椎それぞれに対して Bone Mineral Density (BMD : mg/cc), Bone Volume Fraction (BV/TV : %), Trabecular Thickness (Tb.Th : μ m), Trabecular Number (Tb.N : 1/mm), Trabecular Separation (Tb.Sp : μ m) を測定した。

5. 統計学的検討

結果より得られた全てのデータは一元配置分散分析の後, Tukey-Kramer method による多重比較を行い, 危険率 5% で有意差検定を行った。統計解析には解析ソフトウェア (version 16.0, SPSS, Chicago) を用いた。

結果

1. マウスの血清生化学的検討

各薬剤を8週間投与したマウスから得た血清より, 17 β -Estradiol, ALP, BMP-2, OC, RANKL, IL-1 β , IL-6, TNF- α の計測を行った (図 1)。

17 β -Estradiol は OVX 群, DHNA 群, VK2 群, Ris 群に低下を認めた。OVX 群, DHNA 群, VK2 群, Ris 群は Sham 群と比較し有意差 ($p<0.05$) を認めた。OVX 群, DHNA 群, VK2 群, Ris 群の 4 群間では有意差 ($p<0.05$) を認めなかった。

ALP は DHNA 群, VK2 群, Ris 群に上昇を認め, 中でも DHNA 群が最も高値を示し Sham 群, OVX 群, VK2 群, Ris 群と比較し有意差 ($p<0.05$) を認めた。

BMP-2 は DHNA 群, VK2 群に上昇を認め, DHNA 群は Sham 群, OVX 群, VK2 群, Ris 群と比較し有意差 ($p<0.05$) を認めた。VK2 群は Sham 群と比較し有意差 ($p<0.05$) を認めた。Sham 群, OVX 群, Ris 群の 3 群間では有意差 ($p<0.05$) を認めなかった。

OC は DHNA 群に上昇を認め, Ris 群に低下を認めた。DHNA 群は Sham 群, OVX 群, VK2 群, Ris 群と比較し有意差 ($p<0.05$) を認めた。Ris 群は Sham 群, OVX 群, VK2 群と比較し有意差 ($p<0.05$) を認めた。

RANKL は OVX 群で上昇を認めた。Sham 群, DHNA 群, Ris 群は OVX 群と比較し有意差 ($p<0.05$) を認めた。また Sham 群, DHNA 群, Ris 群の 3 群

間では有意差 ($p<0.05$) を認めなかった。

IL-18, IL-6, TNF- α は OVX 群, VK2 群で上昇を認め, Sham 群, DHNA 群, Ris 群と比較し有意差 ($p<0.05$) を認めた。また Sham 群, DHNA 群, Ris 群の 3 群間では有意差 ($p<0.05$) を認めなかった。

2. 大腿骨の組織学的検討

薬剤を 8 週投与後のマウス大腿骨遠位骨端部を H-E 染色, TRAP 染色により観察した (図 2a)。H-E 染色の結果, OVX 群は Sham 群と比較し, 骨髓腔の拡大により骨量の減少及び骨梁の連続性の消失を認めた。DHNA 群と Ris 群では Sham 群と同程度まで骨量の回復を認めた。OVX 群では多数の TRAP 陽性細胞を認めたが, DHNA 群と Ris 群では TRAP 陽性細胞が減少しており OVX 群と比較し有意差 ($p<0.05$) を認めた (図 2b)。

3. 骨密度測定及び骨形態計測

マウスの左側大腿骨遠位骨端部及び第五腰椎のマイクロ CT 撮影を行い, 三次元的構築及び骨形態計測を行った。大腿骨遠位骨端部の 3D 画像より, OVX 群では Sham 群と比較して皮質骨の非薄化や海面骨の減少に伴う骨梁構造の消失及び空洞化を認めたが, DHNA 群と Ris 群では Sham 群と同程度までの骨量の

回復を認めた (図 3)。

大腿骨遠位骨端部の骨量解析結果を図 4 に示す。BMD では OVX 群と比較し DHNA 群 (20%高), Ris 群 (21%高) において有意 ($p<0.05$) に上昇した。BV/TV では OVX 群と比較し DHNA 群 (379%高), Ris 群 (435%高), において有意 ($p<0.05$) に上昇した。Tb.Th では OVX 群と比較し DHNA 群 (27%高), Ris 群 (18%高), において有意 ($p<0.05$) に上昇した。Tb.N では OVX 群と比較し DHNA 群 (305%高), Ris 群 (317%高) において有意 ($p<0.05$) に上昇した。Tb.Sp では OVX 群と比較し DHNA 群 (78%低), Ris 群 (78%低) において有意 ($p<0.05$) に低下した。またそれぞれの結果において, Sham 群, DHNA 群, Ris 群の 3 群間では有意差 ($p<0.05$) を認めなかった。

第五腰椎の骨量解析結果を図 5 に示す。BMD では OVX 群と比較し DHNA 群 (15%高), Ris 群 (17%高) において有意 ($p<0.05$) に上昇した。BV/TV では OVX 群と比較し DHNA 群 (208%高), Ris 群 (206%高) において有意 ($p<0.05$) に上昇した。Tb.Th では OVX 群と比較し DHNA 群 (16%高), Ris 群 (15%高) において有意 ($p<0.05$) に上昇した。Tb.N では OVX 群と比較し DHNA 群 (114%高), Ris 群 (120%高) において有意 ($p<0.05$) に上昇した。Tb.Sp では OVX 群と比較し DHNA 群 (42%低), Ris 群 (44%低) において有意 ($p<0.05$) に低下した。またそれぞれの結果において, Sham 群, DHNA 群, Ris 群の 3 群間

では有意差 ($p<0.05$) を認めなかった。

考察

閉経後の骨粗鬆症に対して、ビスフォスフォネート治療が多用されているが、副作用として消化管障害、また偶発症として BRONJ 発症のリスクがある。そのため、より安全に使用できる薬剤が求められている。その対策として本研究では、骨粗鬆症治療薬の一つであるビタミン K2 と構造上類似し、生体に無毒である DHNA の骨吸収抑制効果について、卵巣摘出マウスを用いて検証した。骨形態計測による解析から、卵巣摘出により生じる大腿骨と腰椎の BMD の低下、骨量の減少を DHNA はリセドロネートと同程度回復させる事が示された。以上の結果は、DHNA の新たな効果であり閉経後骨粗鬆症に対して有効な効果をもたらす可能性が示唆された。

骨粗鬆症は骨形成と骨吸収によるバランスが崩れ発症するが、骨吸収を担う破骨細胞を活性化するサイトカインとして IL-1 β , IL-6, TNF- α などが挙げられる。IL-1 β は破骨細胞の分化を誘導しないが、RANKL と同様に成熟破骨細胞に直接作用し、骨吸収活性を誘導す^{23,24)}。IL-6 は骨芽細胞に作用し RANKL の発現を促す事により破骨細胞の形成を促進する²⁵⁾。IL-1 または IL-6 ノックアウト

トマウスを用いた実験では、卵巣摘出を行っても骨吸収の亢進及び骨量減少が軽度である事が立証されている^{26,27)}。TNF- α は破骨細胞の前駆細胞である骨髄由来マクロファージに直接作用し破骨細胞への分化を誘導する²⁸⁻³⁰⁾。

骨粗鬆症の発症原因は複数存在するが、臓器移植後の免疫抑制療法に伴い発症するものがある^{20,21)}。免疫抑制剤であるFK506はシクロスポリンと同様にT細胞活性抑制剤に分類されており、FK506をマウスに投与するとT細胞の活性が抑制された状態においても破骨細胞が増加し骨粗鬆症を発症する³¹⁻³³⁾。これは、T細胞活性阻害剤であるFK506を投与すると免疫状態が変化し、T細胞が減少してB細胞が増加することでB細胞の膜上にもRANKLが異常発現し破骨細胞活性を促進したと考えられている^{34,35)}。松原らはFK506投与により作製した骨粗鬆症モデルマウスにDHNAを投与することで、BMDの低下及び骨量の減少を抑制できた事を報告している²²⁾。要因として、FK506投与により増加したIL-18, IL-6, TNF- α などの骨吸収性サイトカインをDHNAが低下させた事で破骨細胞活性を抑制したと考えている。

ステロイド性骨粗鬆症モデル以外に骨粗鬆症のモデルには閉経後骨粗鬆症モデルとしてOVXマウスが広く使用されている。閉経後骨粗鬆症は閉経によるエストロゲン減少により発症し、骨粗鬆症の発症原因の大部分を占めている。人為的な閉経による急激なエストロゲンの減少は高回転型の骨代謝を生じ、骨形

成及び骨吸収の両者が活性化されるが、骨吸収が骨形成を大きく上回るため、結果的に骨量が減少する³⁶⁾。閉経及びOVXによるIL-1 β , IL-6, TNF- α の増加はエストロゲンの補充により抑制される事が報告されている^{25,37-39)}。

骨形態計測及び血清生化学的検討により骨粗鬆症モデルマウスに対するDHNAの効果を評価した結果、OVX群では骨髓腔の拡大により皮質骨の萎縮及び菲薄化を認めたが、DHNA群とRis群では改善が認められた。炎症性サイトカインの産生はDHNA群とRis群で減少した。DHNA群ではIL-1 β , IL-6, TNF- α , RANKLが低下し、ALP, BMP-2, OCが上昇した。これはDHNAが骨吸収を抑制し、骨形成を促進したと考えられる。一方で、Ris群ではIL-1 β , IL-6, TNF- α , RANKL, OCが低下し、ALP, BMP-2には変化が無かった。したがって、リセドロネートは骨吸収も骨形成も抑制したと考えられるが、骨芽細胞に対する効果や骨形成能に関してはまだ確立されていない。

ビスフォスフォネートは骨のリモデリングを抑制し、低回転型骨代謝をひき起こし、骨量を増加させて骨粗鬆症や他の骨代謝疾患の骨折リスクを軽減する事が広く一般的に知られている。今回の結果からも骨リモデリングを抑制したと考えられる。しかし、DHNAはALP, BMP-2, OCの低下を引き起こさなかった。そのため、DHNAには骨リモデリングを抑制する作用は無いと考えられる。このことから、DHNAはBRONJや消化管障害などの副作用を有するリセ

ドロネートの代替薬剤となりうる可能性が示唆された。また DHNA は整腸作用を有しているため潰瘍性大腸炎の治療にも応用されており、毒性試験結果でも安全性が確立されている⁴⁰⁾。

DHNA は FK506 投与による骨粗鬆症モデルマウスだけでなく、閉経後骨粗鬆症モデルマウスに対しても炎症性サイトカインを低下させた。そのため、DHNA の骨吸収抑制効果は炎症性サイトカインを介する効果であることが明らかとなった。また、その骨吸収抑制効果はリセドロネートと同程度であった。これらの事から DHNA は骨粗鬆症に対する治療法となりうる可能性があると考えられる。

結論

DHNA が免疫抑制マウスに対して骨吸収抑制効果を有していたため、一般的に骨粗鬆症モデルマウスと認識されている OVX マウスに対して、既存の治療薬との比較を踏まえて検討を行った。その結果、同様に骨吸収抑制効果を示し、またその効果は既存の第一選択薬であるビスフォスフォネートと同程度であった。今後、骨粗鬆症の新たな治療薬としての可能性が示唆された。

謝辞

稿を終えるにあたり、終始御懇篤なる御指導と御高閲を賜った岡山大学大学院医歯薬学総合研究科顎口腔再建外科学分野飯田征二教授に深甚なる謝意を表します。また懇切なる御指導を頂きました岡山大学病院口腔外科（再建系）山近英樹講師に謹んで感謝の意を表します。さらに貴重な御助力と御助言を頂きました岡山大学大学院医歯薬学総合研究科口腔病理学分野長塚仁教授，辻極秀次准教授，ならびに顎口腔再建外科学分野の諸先生方に厚く御礼申し上げます。

参考文献

- 1) Dick IM, Devine A, Beilby J, Prince RL.: Effects of endogenous estrogen on renal calcium and phosphate handling in elderly women. *Am J Physiol Endocrinol Metab.*, **288**, (2):E430-435, 2005.
- 2) Epstein S, Shane E, Bilezikian JP.: Organ transplantation and osteoporosis. *Curr Opin Rheumatol.*, **7**, (3):255-261, 1995.
- 3) Rodino MA, Shane E.: Osteoporosis after organ transplantation. *Am J Med.*, **104**, (5):459-469, 1998.

- 4) Nawata H, Soen S, Takayanagi R, Tanaka I, Takaoka K, Fukunaga M, Matsumoto T, Suzuki Y, Tanaka H, Fujiwara S, Miki T, Sagawa A, Nishizawa Y, Seino Y.: Guidelines on the management and treatment of glucocorticoid-induced osteoporosis of the Japanese Society for Bone and Mineral Research (2004). *J Bone Miner Metab.*, **23**, (2):105-109, 2005.
- 5) Reginster JY, Felsenberg D, Cooper C, Stakkestad JA, Miller PD, Kendler DL, Adami S, McClung MR, Bolognese MA, Civitelli R, Dumont E, Bonvoisin B, Recker RR, Delmas PD.: A new concept for bisphosphonate therapy: a rationale for the development of monthly oral dosing of ibandronate. *Osteoporos Int.*, **17**, (2):159-166, 2006.
- 6) Burr DB.: Bone quality: understanding what matters. *J Musculoskelet Neuronal Interact.*, **4**, (2):184-186, 2004.
- 7) Cheung RK, Leung KK, Lee KC, Chow TC.: Sequential non-traumatic femoral shaft fractures in a patient on long-term alendronate. *Hong Kong Med J.*, **13**, (6):485-489, 2007.
- 8) Lenart BA, Lorich DG, Lane JM.: Atypical fractures of the femoral diaphysis in postmenopausal women taking alendronate. *N Engl J Med.*, **358**, (12):1304-1306, 2008.
- 9) Bagan J, Blade J, Cozar JM, Constela M, Garcia Sanz R, Gomez Veiga F, Lahuerta JJ,

Lluch A, Massuti B, Morote J, San Miguel JF, Solsona E.: Recommendations for the prevention, diagnosis, and treatment of osteonecrosis of the jaw (ONJ) in cancer patients treated with bisphosphonates. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.*, **12**, (4):E336-340, 2007.

10) Mehrotra B, Ruggiero S.: Bisphosphonate complications including osteonecrosis of the jaw. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program.*, **515**, 356-360, 2006.

11) Yarom N, Yahalom R, Shoshani Y, Hamed W, Regev E, Elad S.: Osteonecrosis of the jaw induced by orally administered bisphosphonates: incidence, clinical features, predisposing factors and treatment outcome. *Osteoporos Int.*, **18**, (10):1363-1370, 2007.

12) Yoneda T, Hagino H, Sugimoto T, Ohta H, Takahashi S, Soen S, Taguchi A, Toyosawa S, Nagata T, Urade M.: Bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw: position paper from the Allied Task Force Committee of Japanese Society for Bone and Mineral Research, Japan Osteoporosis Society, Japanese Society of Periodontology, Japanese Society for Oral and Maxillofacial Radiology, and Japanese Society of Oral and Maxillofacial Surgeons. *J Bone Miner Metab.*, **28**, (4):365-383, 2010.

13) Hidaka T, Hasegawa T, Fujimura M, Sakai M, Saito S.: Treatment for patients with postmenopausal osteoporosis who have been placed on HRT and show a decrease in bone mineral density: effects of concomitant administration of vitamin K-2. *J Bone*

Miner Metab., **20**, (4):235-239, 2002.

14) Meunier PJ, Reginster JY (2003) Design and methodology of the phase 3 trials for the clinical development of strontium ranelate in the treatment of women with postmenopausal osteoporosis. *Osteoporos Int.*, **14**, 66-76, 2003.

15) Sakhaee K, Zisman A, Poindexter JR, Zerwekh JE, Pak CY.: Metabolic effects of thiazide and 1,25-(OH)₂ vitamin D in postmenopausal osteoporosis. *Osteoporos Int.*, **3**, (4):209-214, 1993.

16) Hara K, Akiyama Y, Nakamura T, Murota S, Morita I.: The inhibitory effect of vitamin K₂ (menatetrenone) on bone resorption may be related to its side chain. *Bone*, **16**, (2):179-184, 1995.

17) Okada Y, Tsuzuki Y, Miyazaki J, Matsuzaki K, Hokari R, Komoto S, Kato S, Kawaguchi A, Nagao S, Itoh K, Watanabe T, Miura S.: Propionibacterium freudenreichii component 1,4-dihydroxy-2-naphthoic acid (DHNA) attenuates dextran sodium sulphate induced colitis by modulation of bacterial flora and lymphocyte homing. *Gut*, **55**, (5):681-688, 2006.

18) Kaneko T, Mori H, Iwata M, Meguro S.: Growth stimulator for bifidobacteria produced by Propionibacterium freudenreichii and several intestinal bacteria. *J Dairy Sci.*, **77**, (2):393-404, 1994.

- 19) Suzuki A, Mitsuyama K, Koga H, Tomiyasu N, Masuda J, Takaki K, Tsuruta O, Toyonaga A, Sata M.: Bifidogenic growth stimulator for the treatment of active ulcerative colitis: a pilot study. *Nutrition*, **22**, (1):76-81, 2006.
- 20) Jilka RL, Weinstein RS, Takahashi K, Parfitt AM, Manolagas SC.: Linkage of decreased bone mass with impaired osteoblastogenesis in a murine model of accelerated senescence. *J Clin Invest.*, **97**, (7):1732-1740, 1996.
- 21) Kawaguchi H, Manabe N, Miyaura C, Chikuda H, Nakamura K, Kuro-o M.: Independent impairment of osteoblast and osteoclast differentiation in klotho mouse exhibiting low-turnover osteopenia. *J Clin Invest.*, **104**, (3):229-237, 1999.
- 22) Matsubara M, Yamachika E, Tsujigiwa H, Mizukawa N, Ueno T, Murakami J, Ishida N, Kaneda Y, Shirasu N, Takagi S.: Suppressive effects of 1,4-dihydroxy-2-naphthoic acid administration on bone resorption. *Osteoporos Int.*, **21**, (8):1437-1447, 2010.
- 23) Akatsu T, Takahashi N, Udagawa N, Imamura K, Yamaguchi A, Sato K, Nagata N, Suda T.: Role of prostaglandins in interleukin-1-induced bone resorption in mice in vitro. *J Bone Miner Res.*, **6**, (2):183-189, 1991.
- 24) Jimi E, Nakamura I, Duong LT, Ikebe T, Takahashi N, Rodan GA, Suda T.: Interleukin 1 induces multinucleation and bone-resorbing activity of osteoclasts in the

absence of osteoblasts/stromal cells. *Exp Cell Res.*, **247**, (1):84-93, 1999.

25) Jilka RL, Hangoc G, Girasole G, Passeri G, Williams DC, Abrams JS, Boyce B, Broxmeyer H, Manolagas SC.: Increased osteoclast development after estrogen loss: mediation by interleukin-6. *Science*, **257**, 88-91, 1992

26) Lorenzo JA, Naprta A, Rao Y, Alander C, Glaccum M, Widmer M, Gronowicz G, Kalinowski J, Pilbeam CC.: Mice lacking the type I interleukin-1 receptor do not lose bone mass after ovariectomy. *Endocrinology*, **139**, (6):3022-3025, 1998.

27) Poli V, Balena R, Fattori E, Markatos A, Yamamoto M, Tanaka H, Ciliberto G, Rodan GA, Costantini F.: Interleukin-6 deficient mice are protected from bone loss caused by estrogen depletion. *EMBO J.*, **13**, (5):1189-1196, 1994.

28) Azuma Y, Kaji K, Katogi R, Takeshita S, Kudo A.: Tumor necrosis factor-alpha induces differentiation of and bone resorption by osteoclasts. *J Biol Chem.*, **275**, (7):4858-4864, 2000.

29) Gordon CM, Binello E, LeBoff MS, Wohl ME, Rosen CJ, Colin AA.: Relationship between insulin-like growth factor I, dehydroepiandrosterone sulfate and proresorptive cytokines and bone density in cystic fibrosis. *Osteoporos Int.*, **17**, (5):783-790, 2006

30) Kobayashi K, Takahashi N, Jimi E, Udagawa N, Takami M, Kotake S, Nakagawa N, Kinoshita M, Yamaguchi K, Shima N, Yasuda H, Morinaga T, Higashio K, Martin TJ,

Suda T.: Tumor necrosis factor alpha stimulates osteoclast differentiation by a mechanism independent of the ODF/RANKL-RANK interaction. *J Exp Med.*, **191**, (2):275-286, 2000.

31) Guichelaar MM, Malinchoc M, Sibonga J, Clarke BL, Hay JE.: Immunosuppressive and postoperative effects of orthotopic liver transplantation on bone metabolism. *Liver Transpl.*, **10**, (5):638-647, 2004.

32) Kirino S, Fukunaga J, Ikegami S, Tsuboi H, Kimata M, Nakata N, Nakano M, Ueno T, Mizukawa N, Sugahara T.: Regulation of bone metabolism in immunosuppressant (FK506)-treated rats. *J Bone Miner Metab.*, **22**, (6):554-560, 2004.

33) Smallwood GA, Burns D, Fasola CG, Steiber AC, Heffron TG.: Relationship between immunosuppression and osteoporosis in an outpatient liver transplant clinic. *Transplant Proc.*, **37**, (4):1910-1911, 2005.

34) Dougall WC, Glaccum M, Charrier K, Rohrbach K, Brasel K, De Smedt T, Daro E, Smith J, Tometsko ME, Maliszewski CR, Armstrong A, Shen V, Bain S, Cosman D, Anderson D, Morrissey PJ, Peschon JJ, Schuh J.: RANK is essential for osteoclast and lymph node development. *Genes Dev.*, **13**, (18):2412-2424, 1999.

35) Manabe N, Kawaguchi H, Chikuda H, Miyaura C, Inada M, Nagai R, Nabeshima Y, Nakamura K, Sinclair AM, Scheuermann RH, Kuro-o M.: Connection between B

lymphocyte and osteoclast differentiation pathways. *J Immunol.*, **167**, (5):2625-2631, 2001.

36) Riggs BL.: Pathogenesis of osteoporosis. *Am J Obstet Gynecol.*, **156**, (5):1342-1346, 1987.

37) Kimble RB, Matayoshi AB, Vannice JL, Kung VT, Williams C, Pacifici R.: Simultaneous block of interleukin-1 and tumor necrosis factor is required to completely prevent bone loss in the early postovariectomy period. *Endocrinology*, **136**, (7):3054-3061, 1995.

38) Miyaura C, Kusano K, Masuzawa T, Chaki O, Onoe Y, Aoyagi M, Sasaki T, Tamura T, Koishihara Y, Ohsugi Y, et al.: Endogenous bone-resorbing factors in estrogen deficiency: cooperative effects of IL-1 and IL-6. *J Bone Miner Res.*, **10**, (9):1365-1373, 1995.

39) Pacifici R, Rifas L, McCracken R, Vered I, McMurtry C, Avioli LV, Peck WA.: Ovarian steroid treatment blocks a postmenopausal increase in blood monocyte interleukin 1 release. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, **86**, (7):2398-2402, 1989.

40) Isawa K, Hojo K, Yoda N, Kamiyama T, Makino S, Saito M, Sugano H, Mizoguchi C, Kurama S, Shibasaki M, Endo N, Sato Y.: Isolation and identification of a new bifidogenic growth stimulator produced by *Propionibacterium freudenreichii* ET-3.

Biosci Biotechnol Biochem., **66**, (3):679-681, 2002.

图1.

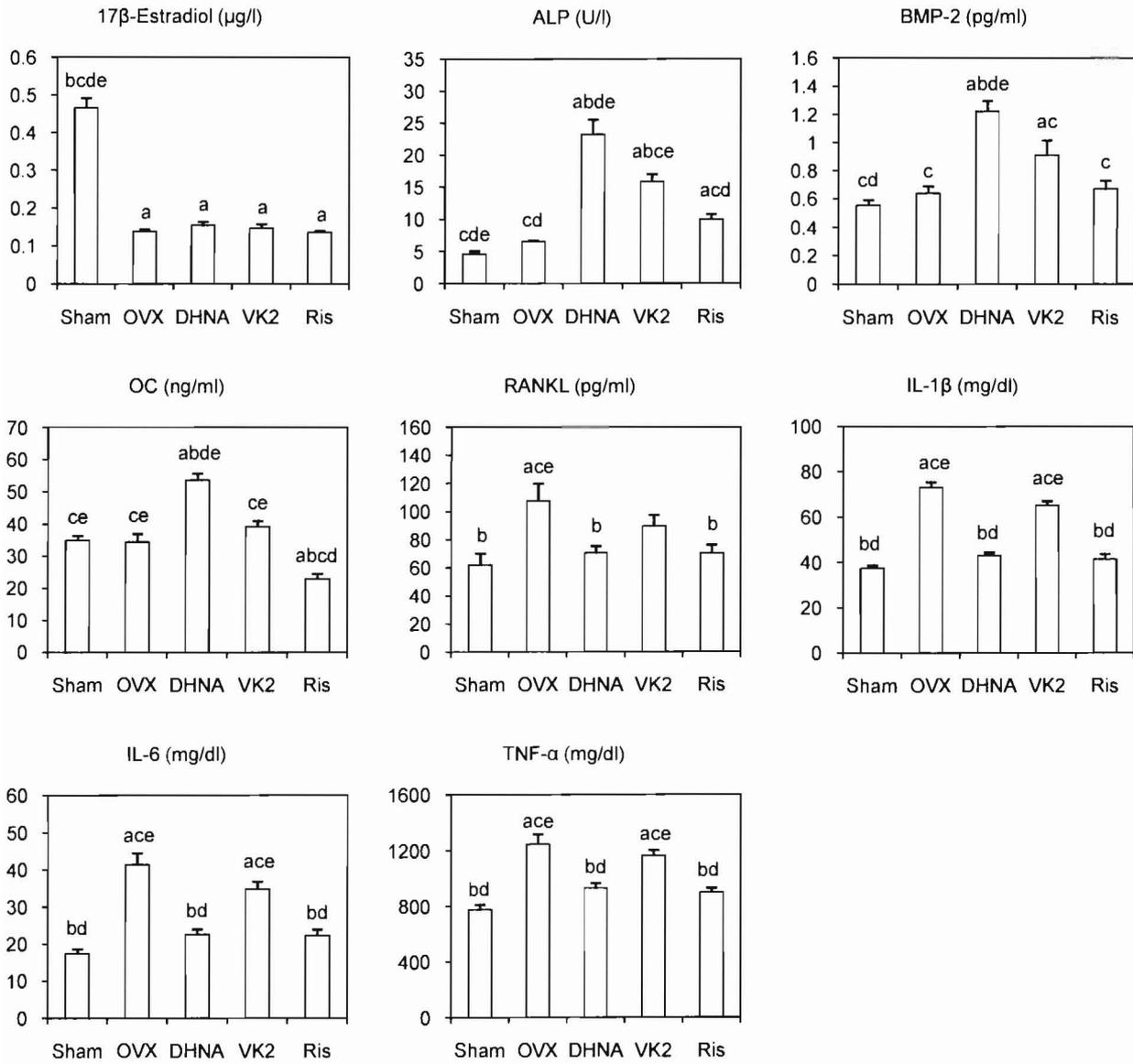


図2.a

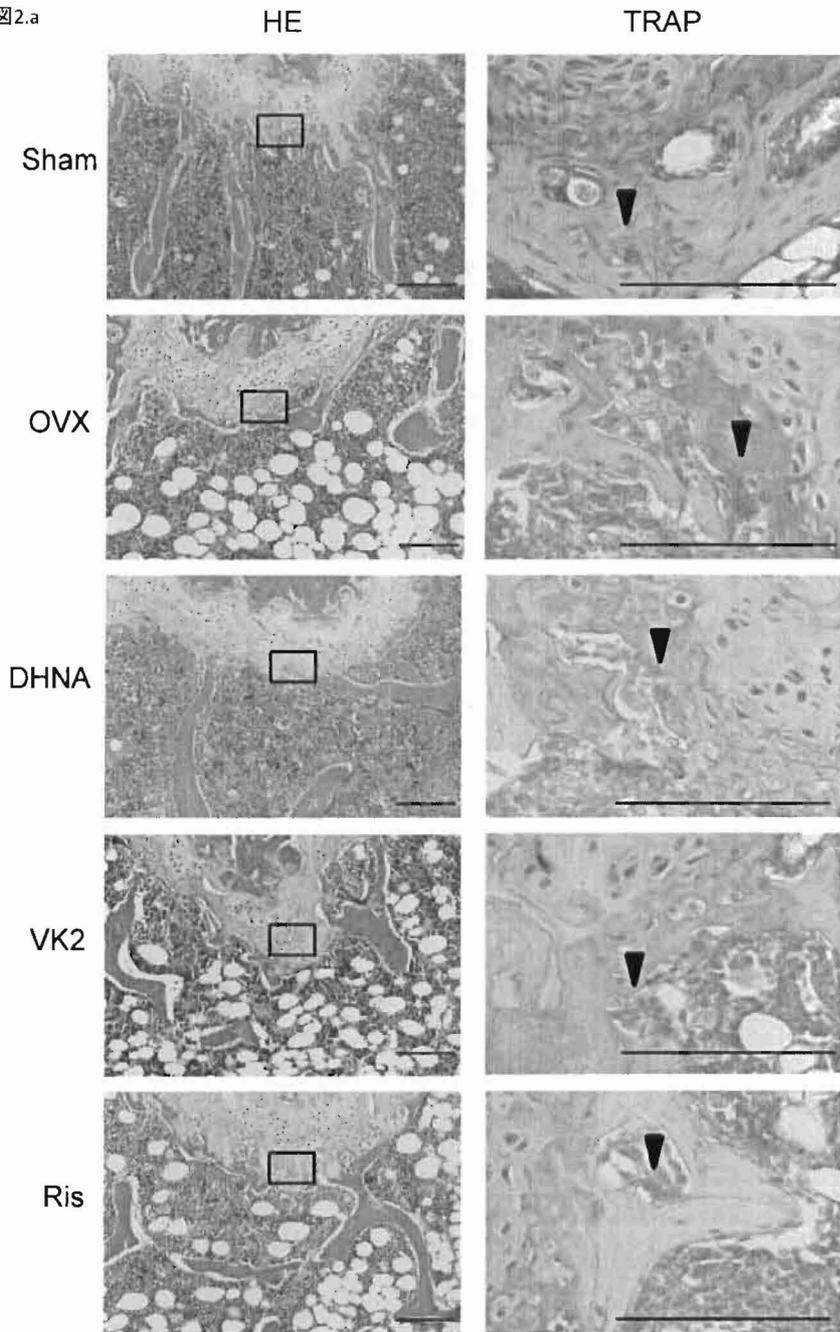


図2.b

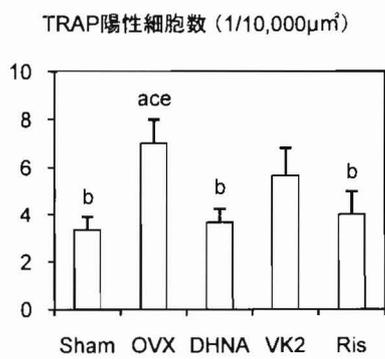
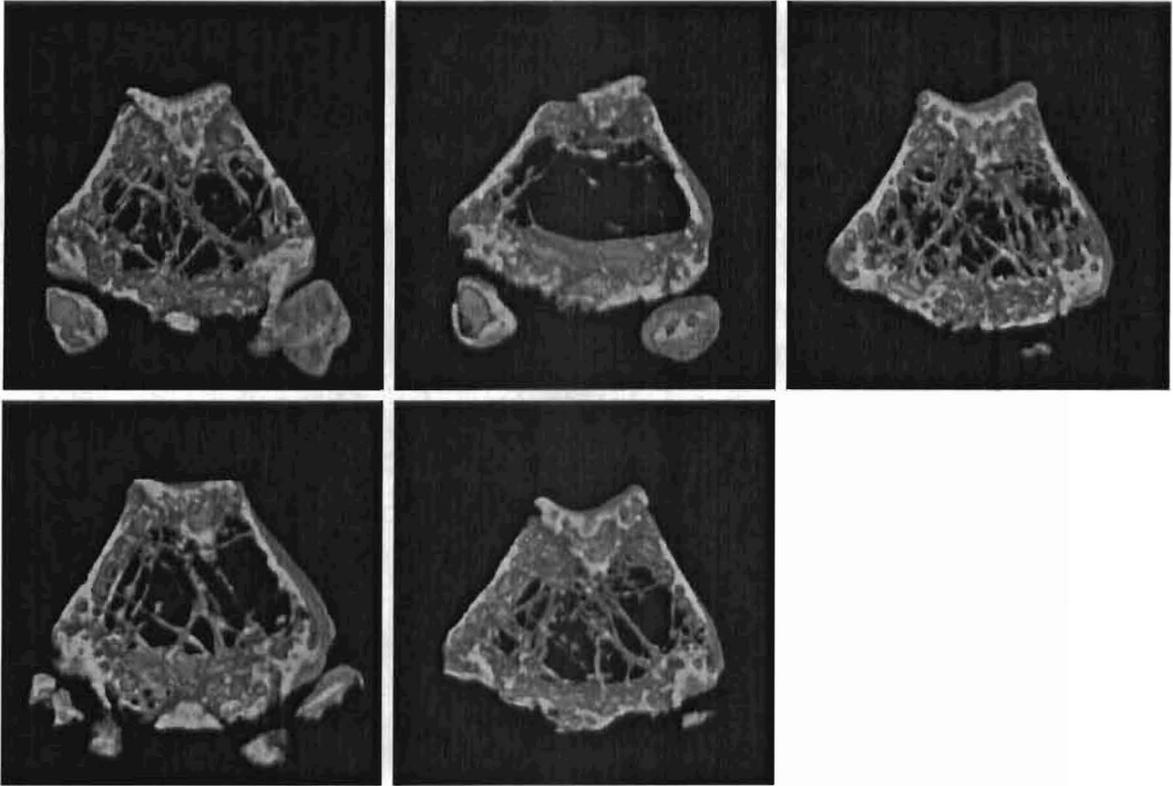


图3.



4.

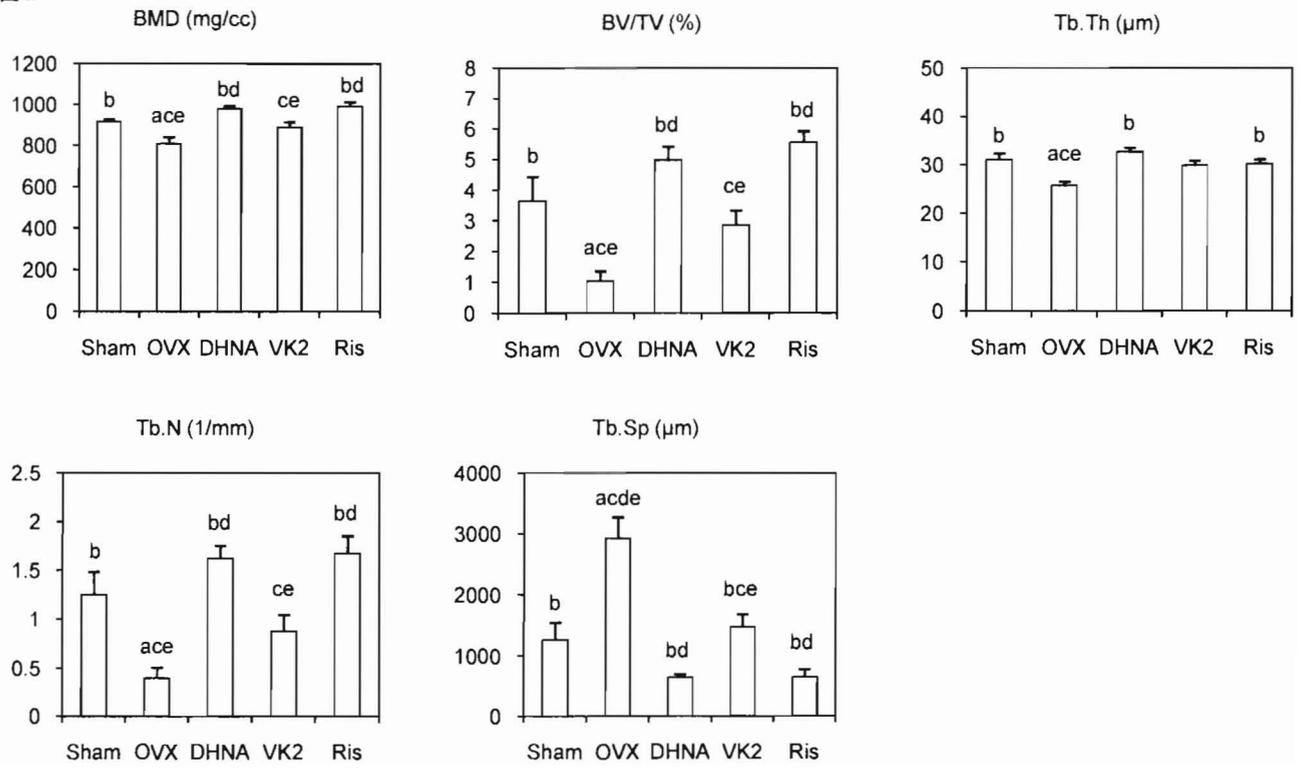


图5.

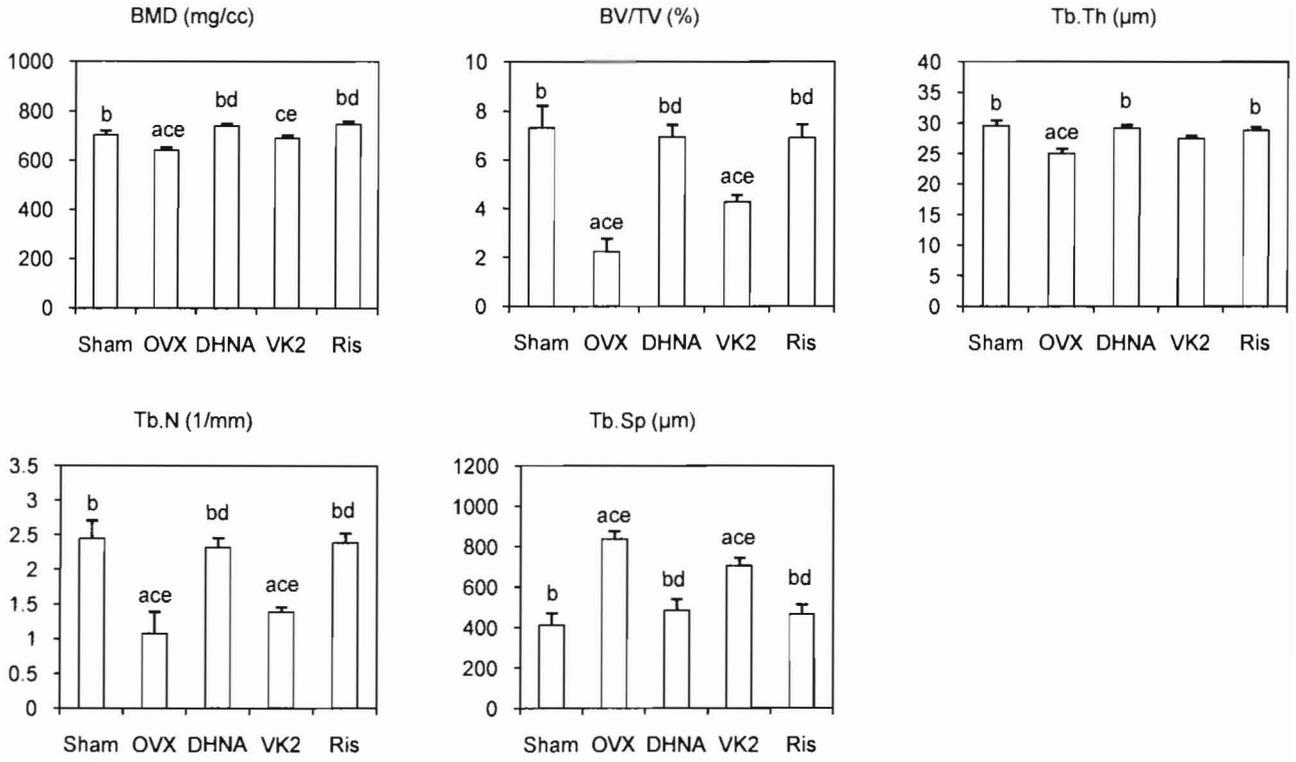


図 1. 血清中の生化学的検討

血清エストロゲン (17 β -Estradiol), 血清アルカリフォスファターゼ (ALP), 血清 Bone morphogenetic protein-2 (BMP-2), 血清オステオカルシン (OC), 血清 Receptor Activator of NF- κ B Ligand (RANKL), Interleukin-1 β (IL-1 β), Interleukin-6 (IL-6), Tumor necrosis factor- α (TNF- α) の計測値を示す。エラーバーは標準偏差を示す。

a : Sham 群と有意差あり, b : OVX 群と有意差あり, c : DHNA 群と有意差あり, d : VK2 群と有意差あり, e : Ris 群と有意差あり ($p < 0.05$, ANOVA / Tukey-Kramer test)

図 2.a 大腿骨の組織学的検討

マウス大腿骨遠位骨端部 H-E 染色の結果, OVX 群は Sham 群と比較し, 骨量の減少及び骨梁の連続性の消失を認めた。DHNA 群と Ris 群では骨量の増加を認めた。TRAP 染色の結果, OVX 群では H-E 染色にて骨梁構造の減少した部位に一致して TRAP 陽性細胞(矢頭)の存在が確認された。(スケールバー: 100 μ m)

図 2.b 大腿骨遠位骨端部の TRAP 陽性細胞数

OVX 群では多数の TRAP 陽性細胞を認めたが, DHNA 群と Ris 群では TRAP 陽性細胞の減少を認め, OVX 群と比較し DHNA 群と Ris 群は有意差を認めた。エラーバーは標準偏差を示す。

a : Sham 群と有意差あり, b : OVX 群と有意差あり, c : DHNA 群と有意差あり, d : VK2 群と有意差あり, e : Ris 群と有意差あり ($p < 0.05$, ANOVA / Tukey-Kramer test)

図 3. 大腿骨のマイクロ CT 画像

大腿骨遠位骨端部の 3D 画像より OVX 群では Sham 群と比較して皮質骨の非薄化や海面骨の減少に伴う骨梁構造の消失を認めたが, DHNA 群と Ris 群では Sham 群と同程度までの骨梁構造の回復を認めた。

図 4. 大腿骨の三次元的骨形態計測

大腿骨における BMD, BV/TV, Tb.Th, Tb.N では, OVX 群と比較し DHNA 群, Ris 群に上昇を認めた。Tb.Sp では, OVX 群と比較し DHNA 群, Ris 群に低下を認めた。Sham 群, DHNA 群, Ris 群の 3 群間では有意差を認めなかった。エラーバーは標準偏差を示す。

a : Sham 群と有意差あり, b : OVX 群と有意差あり, c : DHNA 群と有意差あり, d : VK2 群と有意差あり, e : Ris 群と有意差あり ($p < 0.05$, ANOVA / Tukey-Kramer test)

図 5. 第五腰椎の三次元的骨形態計測

第五腰椎における BMD, BV/TV, Tb.Th, Tb.N では, OVX 群と比較し DHNA 群, Ris 群に上昇を認めた。Tb.Sp では, OVX 群と比較し DHNA 群, Ris 群に低下を認めた。Sham 群, DHNA 群, Ris 群の 3 群間では有意差を認めなかった。エラーバーは標準偏差を示す。

a : Sham 群と有意差あり, b : OVX 群と有意差あり, c : DHNA 群と有意差あり, d : VK2 群と有意差あり, e : Ris 群と有意差あり ($p < 0.05$, ANOVA / Tukey-Kramer test)