高クエン酸食飼育時にみられる歯周組織の病変に 及ぼす Coenzyme Q 投与の影響

松 村 敏 治* 木 全 正 宏*
常 光 旭** 秋 吉 正 豊***

概要：歯周疾患のなかでも、年齢の割には早期に高度な歯槽骨吸収と萎縮を伴っている患者には糖代謝障害があり、しばしばクエン酸が血液に増量していることが多い。この臨床的事実に基づいて Tanner (1967) は高クエン酸食飼育あるいはクエン酸ソーダ大量注射によつて、動物体内にクエン酸を積極的に蓄積してみる方向で、クエン酸と歯周病変との関連性について追究した。その結果、歯肉充血と歯槽骨の萎縮のほか、骨の吸収および骨髓の線維化が強く出現することを報告した。本研究は Tanner が行なった高クエン酸食で飼育したラットに現われる歯周組織の病変を、血液クエン酸とカルシウムレベルの変動と共に追試してみた。われわれの実験においても、強い歯槽骨の骨多孔症と歯根膜線維の萎縮像が確認できたほか、動物には高クエン酸血症と高カルシウム血症が観察された。このことから、クエン酸の歯周病変に果す全身的な役割の重要性が認識され、更にクエン酸の酸化促進ならびに間葉組織系の賦活作用をもつといわれる Coenzyme Q の全身的投与によつて、これらの歯周病変の発現が予防され軽減される所見をえた。これらの事実は歯周疾患の全身的予防としての Coenzyme Q の意義について、一つの実験的根拠を与えるものである。

Effect of coenzyme Q administration on the periodontal lesions in citrated rats

Toshiharu MATSUMURA, Masahiro KIMATA, Akira TSUNEMITSU
and Masatoyo AKIYOSHI

Citrate may play a role in the transport, mobilization and perhaps deposition of calcium in bone. It is capable of rendering soluble the insoluble calcium salts. Tanner(1967) has observed that citrated rats disclosed severe porosity with alveolar atrophy and myelofibrosis accompanied by bone resorption and hyperemia of the gingiva. This indicated citrates to be directly attributed to loss of alveolar bone and intimately related to advanced alveolar atrophy. This study was designed to confirm the histopathological changes in periodontal tissues in citrated rats and simultaneously to evaluate the calcium and citrate levels in blood. Since it

* 大阪大学歯学部予防歯科学教室（主任：松村敏治教授）

Department of Preventive Dentistry, Osaka University Dental School (Director: Toshiharu Matsumura)

** 広島大学歯学部予防歯科学教室

Department of Preventive Dentistry, Hiroshima University School of Dentistry

*** 東京医科歯科大学難聴研病理部

Institute for the Deaf, Tokyo Medical and Dental University

昭和44年2月24日受付

is known that coenzyme Q which is now generally recognized to have an important role in the electron transport system has a profound influence on the citric acid metabolism, the effect of coenzyme Q on the changes in blood and periodontal tissues found in the citrated rats were also studied.

Male albino rats of the Wistar strain, 5 to 7 weeks old and weighing 120-140 gm. were initially fed on powdered normal diet. All animals were given this diet for two weeks before the beginning of the experiment. The animals were then allotted to two groups; one group continuing with the normal diet and another group with the citrate diet which consisted of 10 gm. of sodium citrate and 10 gm. of citric acid homogenized with 80 gm. of powdered normal diet. Both normal and citrated rats were further assigned to subgroups. One subgroup of both groups served as a control. Animals in the second subgroup of both groups were given the diet added coenzyme Q₇ powder; each subgroup was fed on normal diet contained 0.005% coenzyme Q₇ and citrate diet contained 0.005% coenzyme Q₇, respectively. The experimental period lasted three months. At the end of that time the animals were given water but received no food for 15 to 18 hours before the blood was collected. After the blood collection by heart puncture the animals were stunned by a sudden blow on the head and decapitated. The mandibles were fixed to 10% formalin, and then decalcified in a solution of 5% nitric acid and formalin. They were then imbedded in paraffin, and stained with hematoxylin and eosin. The citric acid content of blood was determined by the method of Ettinger et al. (1952) and the serum calcium by the method of Kingsley and Robnett (1957).

In the citrated rats, marked osteoporosis of the alveolar bone and atrophy of the periodontal membrane accompanied by myelofibrosis were observed. These histopathological findings were alleviated by prolonged administration of coenzyme Q. Hypercitricemia with hypercalcemia found in the citrated animals were also restored to the normal level by coenzyme Q administration.

緒 言

歯周病患者の全身的背景を種々の臨床検査によって詳しく調べてみた結果、高度な歯槽骨吸収と萎縮を伴った症例には糖代謝障害があり、しばしばクエン酸が血液中に増量し、クエン酸の代謝障害がみられることが常光、松村(1963, 1964)^{1,2)}らによつて初めて明らかにされた。その後 Kilgore(1967)³⁾らや Simon(1968)⁴⁾らによつて、この臨床的事実が追試確認された。

さて、クエン酸と歯周病変との関連性について Tanner(1967)⁵⁾はラットを用い、高クエン酸食飼育あるいはクエン酸ソーダ大量注射によつて動物体内にクエン酸を積極的に蓄積してみる方向で動物実験を押し進めた。その結果レントゲン写真上でも歯槽骨に骨萎縮がみられ、更に病理組織学的所見として歯肉充血のほか、歯槽骨の吸収および

骨髓の線維化が出現することを明らかにした。しかしこの動物実験には残念ながら血液におけるクエン酸、カルシウムの分析データもなく、実験動物の体重変化や歯根膜の病変が記載されていない。

本研究は Tanner が行なつた高クエン酸食で飼育したラットに現われる歯周組織の病変を組織学的に検索し、併せて血液中のカルシウム、クエン酸レベルの動態をも追究した。

最近我々の研究グループは細胞間の電子伝達系の構成成分である Coenzyme Q (CoQ と略す) にはクエン酸の酸化促進作用があり、間葉組織系の賦活作用があるという新知見を得た⁶⁻⁹⁾。

それ故、高クエン酸食で飼育した動物に現われる歯周病変と血液クエン酸、カルシウム量の変化に対する CoQ 投与の影響をも同時に調べてみた。

実験材料と方法

体重120~140g のウイスター系雄性ラットを2週間正常食（オリエンタル酵母株式会社より得たMF 粉末食）で準備飼育し、その後下記の4群に分ち飼育実験を開始した。

I. 正常食による飼育群

II. CoQ₇ 添加正常食による飼育群

III. 高クエン酸食による飼育群

IV. CoQ₇ 添加高クエン酸食による飼育群

高クエン酸食は粉末正常食にクエン酸三ナトリウムを10%, クエン酸を10%含むように混合して粉末食を調製した。

CoQ₇ 添加食は正常食粉末および高クエン酸食粉末にそれぞれCoQ₇（武田薬品工業株式会社より試供されたものでイソプレノイド基の側鎖が7つのもの）を0.005%含むように添加した。

実験開始後3ヶ月目に動物を15~18時間絶食させた後、心臓穿刺により採血した。採血後、瀉血致死させ速やかに下顎骨を取出し10%中性ホルマリンに固定し、5%硝酸ホルマリン液で脱灰し、その後通法によりパラフィン包埋してヘマトキシリン・エオジン染色を行なった。クエン酸定量はEttinger(1952)¹⁰⁾らのペンタブロムアセトン法、カルシウムはKingsley and Robnett 法(1957)¹¹⁾によった。

実験結果

体 重

各実験群の体重変化を図1に図示した。

I 群（正常食で飼育した群）とII群（CoQ₇ を添加した正常食で飼育した群）はいづれも実験開始後から徐々に体重が増加した。これに反し、III群（高クエン酸食で飼育した群）とIV群（CoQ₇ を添加した高クエン酸食）で飼育した群はいづれも初期には体重は横ばい状態を続け約1ヶ月後より緩慢な体重増加を示したが、実験終了時の3ヶ月目ではI, II群の約 $\frac{2}{3}$ であった。また、II, IV群の体重増加はそれぞれの対照群であるI, III群に比べやや増加する傾向があつた。

血液クエン酸と血清カルシウム量

図1 体重の変化

I. 正常食飼育群

II. CoQ₇ 添加正常食飼育群

III. 高クエン酸食飼育群

IV. CoQ₇ 添加高クエン酸食飼育群

表1 高クエン酸食飼育時にみられる血液クエン酸と血清カルシウムレベルに及ぼす CoQ₇ 投与の影響

動物群 (例数)	血液クエン酸 mg/100ml	血清カルシウム mg/100ml
I. 正常食飼育(8)	2.0±0.44	10.3±0.97
II. CoQ ₇ 添加正常食飼育(5)	2.2±0.45	10.5±1.18
III. 高クエン酸食飼育(8)	3.4±0.52	12.6±1.41
IV. CoQ ₇ 添加高クエン酸食飼育(7)	2.8±0.43	11.1±1.04

表中の数値は平均値±標準偏差を示す

統計的分析 t 値

動物群	血液クエン酸	血清カルシウム
I 群と II 群との間	0.8	0.3
I 群と III 群との間	5.8*	3.8*
III 群と IV 群との間	2.4§	2.3§

* P<0.01 § P<0.05

表1に示した如く高クエン酸食で飼育した群では血液クエン酸と血清カルシウム共に正常食で飼育した群のそれよりも高く (p<0.01), 高クエン酸, 高カルシウム血症を呈した。

しかし, CoQ₇ を添加した高クエン酸食で飼育した場合にはクエン酸, カルシウム共に正常レベ

ルに近く CoQ_7 投与によつて高クエン酸，高カルシウム血症の改善が認められた ($p < 0.05$)。なお， CoQ_7 を添加した正常食で飼育していても血液クエン酸，血清カルシウムレベルは正常食で飼育した群と比べてみて何ら変動がみられなかった。

病理組織学的所見

歯肉：

正常食で飼育した動物にも歯間乳頭には軽い炎症性変化がみられ，白血球浸潤と歯肉上皮の表在性剝離が認められた。また附着上皮の僅かな肥厚と側方増殖がみられたが根尖方向への増殖はなかった。更に，軽度の充血と炎症性細胞の上皮下結合組織への浸潤などがみられた (写真1)。

一方，高クエン酸食で飼育した動物についても歯間乳頭部は正常食で飼育した動物と同様，軽度の炎症性変化を示した (写真2)。歯肉部の炎症の程度は正常食で飼育した群， CoQ_7 を添加した正常食で飼育した群，高クエン酸食で飼育した群ならびに CoQ_7 を添加した高クエン酸食で飼育した群との間には明らかな差異は認められなかった。

歯根膜：

正常食で飼育した動物の歯根膜は結合組織の発達がよく，歯根膜とセメント質との間に発達した歯根膜線維が形成されていて，その間に線維芽細胞および血管などが存在していた (写真3)。高クエン酸食で飼育した動物では歯根膜の結合組織線維束は進行性の萎縮を示していて，歯根膜線維の太さの減少および疎開が認められた (写真4)。一方， CoQ_7 を添加した高クエン酸食で飼育した動物では歯根膜の結合組織線維束の萎縮は軽度であつて，比較的発達のよい歯根膜線維の存在が認められ，正常食で飼育した群に近い歯根膜の所見を示した (写真5)。

歯槽骨：

正常食で飼育した動物の臼歯の根間中隔は緻密な歯槽骨よりなつていて，内に内腔の狭い骨髓と，ハーヴェイ氏管およびホルクスマン管が認められる (写真6)。高クエン酸食で飼育した動物では，同じ部位の根間中隔は高度な骨多孔症を示していて，その部の骨髓腔ならびにハーヴェイ氏管には

内腔の拡大がみられた。また，歯根膜に近い骨髓腔では中程度の線維化の像がみられた (写真7)。一方 CoQ_7 を添加した高クエン酸食で飼育した場合には，臼歯の根間中隔は比較的緻密な骨質の歯槽骨から出来ていて，骨髓腔およびハーヴェイ氏管の拡大も高クエン酸食のみで飼育した動物におけるよりは軽く，骨多孔症の程度は比較的軽度であつた。しかし，拡大した骨髓腔およびハーヴェイ氏管には線維化がみられ，疎性結合組織でしめられていた (図8)。

考 察

Tanner⁵⁾によれば，高クエン酸食でラットを約14週間飼育すると病理組織学的には歯槽骨の吸収と骨髓腔の線維化，および歯肉の充血が現われると報告している。我々の行なった成績でも歯槽骨の一部に骨髓の線維化を伴つた骨多孔症を確認し得た。更に歯根膜には歯根膜線維の萎縮と疎開がみられた。しかし，歯肉の充血に関しては正常食で飼育した動物にも軽度な歯肉の炎症性変化と歯間乳頭部の充血像があるために，Tanner が指摘した歯肉の充血の所見は高クエン酸食飼育による特徴的变化があるとは言ひ難い。

我々の実験では高クエン酸食で長期間飼育した場合，血中のクエン酸は明らかに増加していた。更にまた血清カルシウムの増加もほぼクエン酸レベルと平行した。かかる分析の結果と Gomori¹²⁾らが既に報告したように，クエン酸を大量投与すれば尿中にカルシウムが増加し，骨格骨には副甲状腺ホルモンの投与の場合にみられるような変化，すなわち骨吸収が亢進するという結果とを考へあわせてみると，投与されたクエン酸が骨に運ばれ，クエン酸のもつキレート作用によつて骨からカルシウムが動員され，その結果骨多孔症という骨変化が誘導されると思われる。

他方，高クエン酸食飼育によつて現われる高クエン酸，高カルシウム血症は CoQ_7 投与によつて防止し得た。この場合ラット一匹当たり一日10g～20g 食餌するとして一日約0.5mg～1mg の CoQ_7 が経口投与されたことになる。

CoQ_7 にはクエン酸の酸化分解を促進せしめる

という本所⁶⁾らの知見から、恐らくハイドロキノンとしての強い還元性によってアコニターゼ活性が賦活される結果、先づクエン酸レベルが正常化され、骨からのカルシウムの動員が少なくなるのであろう。

組織学的検索によれば、高クエン酸血症時では、歯周組織においては骨多孔症をおこすと同時に、歯根膜線維の萎縮をきたしていた。歯槽骨の骨多孔症は吸収窩の存在および骨髓にみられる線維増生などからみて、吸収の亢進によることが充分考えられる。しかし、歯根膜線維の生理的改造機転がまだ充分解明されていない段階では、高クエン酸血症の場合におこる歯根膜線維の数的ならびに太さの減少が如何なる機序によるものであるか明らかになしえない。歯肉には辺縁部の炎症の増強も、上皮付着の深生も、歯肉嚢の深化も、歯肉縁の退縮もみられていない。従つて高クエン酸血症による歯周組織の上記病変が歯肉からの炎症によるものではないことは明らかである。

しかしながら、このような全身性の代謝異常による歯周組織の変化を歯周症とただちに結びつけることについては慎重な考慮が望まれるであろう。というのは、独立した疾患概念としての歯周症の意義はすでに一部の歯周病学者、例えば Björn, Ramfjord, Ash などによって否定されているからである。

次に高クエン酸血症による歯周組織病変に対する CoQ₇ 投与の影響を組織学的所見からみると、高クエン酸血症による歯槽骨の骨多孔症および歯根膜線維の萎縮の発現は CoQ₇ 投与によつて明らかに軽減されることが認められた。一方、投与した CoQ₇ が細胞内のミトコンドリア内に入ること、およびミトコンドリアの呼吸鎖 respiratory chain において CoQ が演ずる重要な役割 (Klingenberg and Kröger, 1967)¹³⁾ とを考えるならば、CoQ₇ が細胞の呼吸鎖に作用して、酸化および燐酸化に好影響を与える可能性が考えられる。CoQ₇ 投与群の歯槽骨には骨芽細胞による活発な骨新生が認められたが、このような骨芽細胞の骨基質形成能の促進に対して CoQ₇ が何らかの好影響を与えたことは考えられる。また、歯根膜線維の萎縮

の軽減も線維芽細胞の線維形成能に対する CoQ₇ の影響の現われと解することも出来るであろう。しかしながら、これらの点については更に今後の研究が必要である。

結 論

ラットを CoQ₇ を含む高クエン酸食餌で飼育した場合は、高クエン酸食餌による歯周組織における歯槽骨の骨多孔症及び歯根膜線維の萎縮の発現が明らかに軽減されると考えられる所見を得た。

本研究に用いた Coenzyme Q₇ は武田薬品工業株式会社より提供して頂いたものであり、その御好意に対して感謝の意を表します。

文 献

- 1) Tsunemitsu, A.: Blood citrates in severe early destructive periodontal disease, *J. Dent. Res.*, 42: 783, 1963.
- 2) Tsunemitsu, A., Honjo, K., Kani, M. and Matsumura, T.: Citric acid metabolism in periodontosis, *Archs. Oral Biol.*, 9: 83, 1964.
- 3) Kilgore, W. G. and Mann, W. V. Jr.: A clinical study of the plasma citrate level as related to diabetes mellitus and alveolar bone loss, *J. Periodont. Res.*, 3: 30, 1967.
- 4) Simon, E., Gedalia, I., Shapiro S. and Margolin, V.: Citrate content of blood and saliva in relation to periodontal disease in man, *Archs. Oral Biol.*, 13: 1243, 1968.
- 5) Tanner, H. A.: The relationship of citrates to periodontal disease, *J. Periodont.*, 38: 242, 1967.
- 6) Honjo, K., Tsukamoto, Y., Nakamura, R., Tsunemitsu, A. and Matsumura, T.: Effect of coenzyme Q₇ on citric acid metabolism in scurvy, *Archs. Oral Biol.*, 11: 543, 1966.
- 7) Tsunemitsu, A. and Matsumura, T.: Effect of coenzyme Q administration on hypercitricemia of patients with periodontal disease, *J. Dent. Res.*, 46: 1382, 1968.
- 8) Tsunemitsu, A., Honjo, K., Nakamura, R., Kani, M. and Matsumura, T.: Effect of ubiquinone 35 on hypercitricemia, *J. Periodont.*, 39: 215, 1968.
- 9) 秋吉正豊, 北野元生, 中村享, 岡静夫, 鈴木公夫: Coenzyme Q₇ の歯周組織の病変におよぼす影響, 第1報, モルモットの歯周組織における壊血病性変化の発生におよぼす Coenzyme Q₇ の影響について. 歯界展望, 32: 767, 1968.

- 10) Ettinger, R. H., Goldbaum, L. R. and Smith, L. H. : A simplified photometric method for the determination of citric acid in biological fluids. *J. Biol. Chem.*, 199 : 531, 1952.
- 11) Kingsley, G. R. and Robnett, O. : New dye method for direct photometric determination of calcium, *Amer. J. Clin. Pathol.*, 27 : 223, 1957.
- 12) Gomori, G. and Gulyas, E. : Effect of parenterally administered citrate on the renal excretion of calcium, *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, 56 : 226, 1944.
- 13) Klingenberg, M. and Kröger, A. : On the role of ubiquinone in the respiratory chain. *Biochemistry of Mitochondria* edited by Slater, E. C., Kaniuga, Z. and Wojtczak, L., 11 pp, Academic Press, London and New York, 1967.

松村論文付図(1)

写真 1 正常食飼育動物

写真 2 高クエン酸食飼育動物

写真 3 正常食飼育動物

写真 4 高クエン酸食飼育動物

松 村 論 文 付 図 (2)

写真 5 CoQ₇ 添加高クエン酸食飼育動物

写真 6 正常食飼育動物

写真 7 高クエン酸食飼育動物

写真 8 CoQ₇ 添加高クエン食飼育動物