

〔原 著〕

メラトニンの経口投与が骨代謝に及ぼす影響

政所 明弘*, 中出 修**, 服部 裕歩**, 賀来 亨**, 五十嵐清治*

*北海道医療大学歯学部小児歯科学講座
**北海道医療大学歯学部口腔病理学講座

*(主任：五十嵐清治教授)
**(主任：賀来 亨教授)

Effects of oral administration of melatonin on bone metabolism

Akihiro MANDOKORO*, Osamu NAKADE**, Yuho HATTORI**,
Tohru KAKU** and Seiji IGARASHI*

*Department of Pediatric Dentistry, School of Dentistry,
Health Sciences University of Hokkaido
**Department of Oral Pathology, School of Dentistry,
Health Sciences University of Hokkaido

*(Chief : Prof. Seiji IGARASHI)
**(Chief : Prof. Tohru KAKU)

Abstract

We have recently demonstrated that melatonin stimulates proliferation and type I collagen synthesis of normal human osteoblastic cells *in vitro*. We have further shown that daily I.P. injection of melatonin could increase cancellous bone mass in young growing mice *in vivo*, indicating that melatonin may possess beneficial effects on bone.

The present study was to determine the effects of oral administration of melatonin on bone *in vivo*. In addition, we examined the effects of melatonin (1 to 500 μ M) on osteoclastic activity using dentin-resorption-pit assay formed *in vitro* and the results were as follows.

1. Oral administration of melatonin (0.1 or 1 %) did not significantly affect the body weight of the mice.
2. Oral melatonin did not cause any pathological changes in several internal organs including hearts, lungs, liver, kidneys and spleen in mice.
3. Oral melatonin did not significantly affect either length or width of femur or tibia in mice.

4. Bone histomorphometric analyses of the proximal tibia indicated that oral melatonin significantly increased the cancellous bone volume.
5. Oral melatonin significantly decreased the bone formation parameters such as osteoblast surface and osteoid volume and at the same time it significantly decreased the resorption parameters such as resorption surface and osteoclast number.
6. Melatonin (25 to 500 μ M), *in vitro*, caused dose-dependent reduction in number of resorption pits formed by osteoclasts derived from bone marrow cells but not those formed by purified rabbit osteoclasts.

These results indicate for the first time that oral administration of melatonin could increase cancellous bone mass in young growing mice, most likely by suppressing bone resorption through indirect modulation of osteoblastic secretory factors.

Key words : Melatonin, Oral administration, Bone metabolism.

I. 緒 言

高齢化社会を迎え、骨粗鬆症や歯周病など、骨吸収の病的進行を伴った疾患の増加が、今や社会問題となっているが¹⁾、その治療薬あるいは治療法に関しては未だ確立されているとは言いがたい¹⁾。一方、松果体からの分泌物であるメラトニンは、動物の日内リズム²⁾やある種の動物の季節周期による繁殖活動に関与すると言われているが³⁾、さらに最近では抗腫瘍作用⁴⁻⁸⁾、抗酸化作用⁹⁾、抗うつ作用¹⁰⁾など臨床的に注目すべき作用が次々と報告されてきており、その作用の多さには、驚くべきものがある。しかしながら、メラトニンが骨代謝に及ぼす影響^{11,12)}に関してはほとんど明らかにされていない。その一方で、メラトニンの分泌量の低下が骨粗鬆症の発症と関連する可能性を示唆する疫学的報告^{2,13)}がいくつか見受けられている。すなわち、メラトニンの分泌は加齢とともに減少するが^{2,13)}、骨粗鬆症の発症は加齢とともに増加すること、また閉経により、メラトニンの分泌は顕著に減少するが^{2,13)}、閉経を境に、骨粗鬆症の発症は急増すること、また運動によりメラトニンの分泌が上昇するが^{2,13)}、運動は骨粗鬆症の発症を予防するな

どの報告である。われわれの研究グループはこれらの報告に着目し、メラトニンの分泌低下が骨粗鬆症の発症に関わっており、メラトニンの補充療法が骨粗鬆症の予防や治療に有効となるとの仮説を立て、メラトニンの骨に及ぼす研究に着手した。その結果、メラトニンには*in vitro*において、正常ヒト骨芽細胞の細胞増殖およびタイプIコラーゲン合成促進作用があることを発見した¹²⁾。さらにメラトニンの腹腔内注射が成長期のマウスの骨吸収を抑制し、骨量を増加させる作用があることを報告したが¹⁴⁾、メラトニンの経口投与が骨に及ぼす影響に関してはいまだ十分な検討を行っていない。

本研究は成長期マウスにおけるメラトニンの口腔内投与がマウスの骨組織に注射の場合と同様な骨量増加作用が得られるかどうかを調べる目的で行われた。加えて、*in vitro*においてメラトニンの骨吸収に及ぼす効果についてウサギ骨髄由来破骨細胞様細胞の培養系を用いたdentin pit assay¹⁵⁾により検討を行った。

II. 材料および方法

1. 実験動物およびメラトニンの投与方法

動物は、18匹の3週齢の体重12~15gのddy

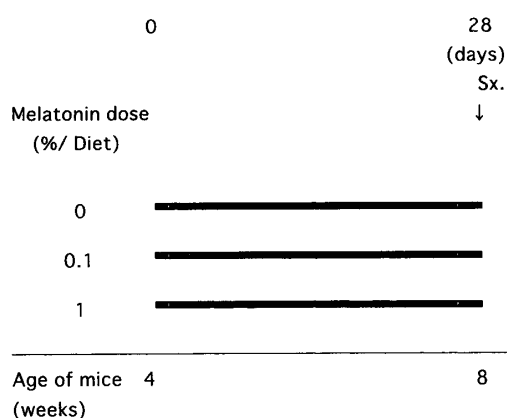


Fig. 1 Experimental protocol for oral administration of melatonin.

系雄性のマウスを三協ラボサービスから購入し、本学動物実験センターにて1週間飼育し、4週齢となった時点で実験に用いた。実験開始時、どの動物にも特に異常は認められなかった。18匹を6匹ずつ3群 (Group 1-3) に分け、Group 1はコントロール群とし、通常の粉末の飼料 (オリエンタル酵母社製) を自由に与えた。Group 2, 3には通常の粉末飼料に各々メラトニン (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) を0.1, 1%混ぜたものを自由に与え、実験群とした。投与期間は4週間とした (Fig. 1)。水は自由摂取、室温22-24°C、湿度55-60%、照明時間は明暗12時間周期で実験終了まで飼育を行った。

なお、骨の形態計測のための蛍光標識は屠殺の5日および3日前に各々、tetracycline hydrochloride (テトラサイクリン, Sigma Chemical Co.) を体重1kg当たり20mg腹腔内注射により行った¹⁶⁾。

2. 体重測定および諸臓器重量測定

体重は実験開始時から一週間ごとに測定した。またエーテル麻酔下で瀉血により、屠殺後、速やかに諸臓器 (肝, 腎, 脾) を摘出、その重量を測定した。

3. 諸臓器の病理組織学的検討

肝臓, 腎臓, 脾臓の重量測定後、速やかに中性緩衝10%ホルマリンに1週間以上固定後、通法に従い、厚さ約4 μ mのパラフィン薄切標本を作製し、ヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色を施し、メラトニンが及ぼす諸臓器の病理組織学的影響について検討した。

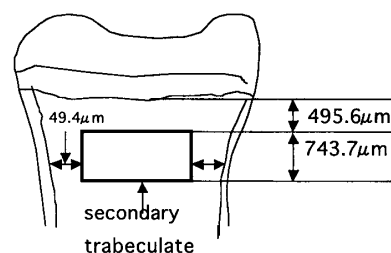


Fig. 2 The area of bone histomorphometry of secondary trabeculate of the tibia.

4. 骨形態計測

1) 海面骨骨形態計測

屠殺後、速やかに脛骨を摘出し、70%エタノールにより1週間以上固定した。その後、Exact社製 (Otto Herman, Nordersted, Germany) 硬組織切断機 (BS 3000) を用い近位端を切断した。切断した脛骨近位端はVillanueva bone stain液において一週間ブロック染色を施した後、上方エタノール系列にて脱水後、メチルメタクリレート樹脂包埋した。樹脂硬化後、Polycut-S Microtome (Reichert-Jung, Heidelberg, Germany) を用い、脛骨近位端の前頭断中央部で厚さ約5 μ mの非脱灰薄切標本を作成した。計測領域は骨端軟骨から495.6 μ m以上遠心に離れた幅743.7 μ mの二次海綿骨領域で、周囲の緻密骨から49.4 μ m以上離れた内方の領域とした (Fig. 2)。メラトニン投与が海綿骨の構造に及ぼす影響を検討するためのパラメーターとして Trabecular thickness (Tb. Th, μ m), Trabecular bone volume (BV/TV, %) が計測された。骨形成あるいは骨吸収に及ぼす影響に関するパラメーターとして、

Osteoid volume (OV/TV, %), Osteoid surface (OS/BS, %), Osteoblast surface (Ob.S/BS, %), Osteoclast surface (Oc.S/BS, %), Number of osteoclasts (N.Oc/BS, %), Bone formation rate (BFR/BS, $\text{mm}^3/\text{mm}^2/\text{year}$), Mineral apposition rate (MAR, $\mu\text{m}/\text{day}$) を計測した¹⁶⁾.

2) 緻密骨形態計測

70%エタノールにより固定した脛骨を、Exact社製硬組織切断機 (BS 3000) を用い脛骨骨幹中央部を約3 mmの幅で切断した。切断した骨断片はVillanueva bone stain液において一週間浸すことにより、ブロック染色を施した後、上方エタノール系列にて脱水を行い、メチルメタクリレート樹脂包埋した。樹脂硬化後、Exact社製硬組織研磨機 (MG 4000) を用い、脛骨骨幹中央横断面における厚さ約30 μm の非脱灰研磨標本を作製した。メラトニン投与が緻密骨の構造に及ぼす影響を検討するためのパラメーターとして、Cortical area (mm^2), Marrow area (mm^2), Cortical width (μm) を用い、計測した。また外骨膜性の骨の石灰化速度への影響を調べる目的でPeriosteal MAR ($\mu\text{m}/\text{day}$) を、また内骨膜性の骨の石灰化速度への影響を調べる目的でEndocortical MAR ($\mu\text{m}/\text{day}$) を計測した¹⁷⁾。

5. in vitroにおけるメラトニンによる骨吸収に及ぼす効果 (Pit assay)

メラトニンのin vitroにおける破骨細胞の骨吸収に及ぼす作用を検討するためにKakudoら¹⁵⁾の方法に従い、dentin sliceを用いたpit assayにより検討した。なお、細胞は骨髄間質細胞あるいは単離された破骨細胞の両方において検討した。動物は10日齢の日本白色ウサギを用い、脛骨、大腿骨、上腕骨などの長管骨を摘出し、可及的に軟組織を取り除き、培養液中で、ハサミを使って、小片にミンスした。次に、数

秒のvortexにより、細胞を遊離させ、2分間静置し、骨片を沈殿させたのち、上清を集めて、2分間の遠沈を2回行った。得られた骨髄間質細胞生存細胞をカウントし、これをあらかじめ96wellの培養プレートに直径6 mm, 厚さ1 mmのdentin slice上に各 1×10^5 個播種し、メラトニン非存在下あるいは存在下において48時間培養し、メラトニンが既存の破骨細胞を含む骨髄間質細胞の骨吸収能に及ぼす影響について調べた。骨髄間質細胞をさらにコラーゲンゲル上に 1×10^8 個巻き、washingと0.001% pronase処理および0.01%のcollagenase消化を行い、破骨細胞以外の血液由来細胞および間質細胞を取り除いた。最後に0.1%の高濃度のcollagenaseで破骨細胞を遊離させ、培養液中でsuspendさせ、それを1 well当り、細胞200個ずつdentin slice上に置き、上記と同様にメラトニン非存在下あるいは存在下において48時間培養、メラトニンが単離破骨細胞の骨吸収能に及ぼす影響を調べた。培養終了後、dentin slice上の綿棒でワイプすることにより、表面の細胞を除去し、酸性ヘマトキシリンに3分浸すことにより、吸収窩を染色し、顕微鏡下で吸収窩の数をカウントした。

6. 走査型電子顕微鏡による吸収窩の観察

培養終了後、dentin slice上の綿棒でワイプすることにより、表面の細胞を除去後、0.1Mリン酸緩衝グルタルアルデヒド中で2時間固定後、1%オスミウム酸中で1時間後固定を行った。上昇エタノール系列で脱水後、ブチルアルコールに浸し、低圧下でブチルアルコールを蒸発させ、dentin sliceを乾燥させた。その後、パラジウムコーティングし、JEOL社製走査型電子顕微鏡 (JSM-35CF) で観察した¹⁵⁾。

7. 統計処理

各グループ間の有意差検定は、One-way analysis of variance (ANOVA) により評価し

た。またメラトニン投与群とコントロール群との有意差検定はFisher's PLSD testにより行った。なお、危険率が0.05以下の場合を有意差ありとした。

III. 結 果

1. 体重に及ぼす影響

実験開始時から終了時までの4週間において、メラトニンの口腔内投与(0.1および1%/食餌)は、コントロールに比べ、マウスの体重に統計学的有意差を及ぼさなかった(Table 1)。

2. 臓器の重量および病理組織像に及ぼす影響

4週間のメラトニン投与後、諸臓器(肝臓、腎臓、脾臓、心臓)の重量を検討した結果、メラトニンの口腔内投与(0.1%および1%/食餌)は、ともに諸臓器の重量にコントロールとした統計学的有意な影響をもたらさなかった(Table 2)。また、メラトニンの口腔内投与は病理組織学的検討においても特にメラトニン投与による病的変化を示さなかった(データは未提示)。

Table 1 Effect of oral administration of melatonin on body weight

Duration of treatment(w)	Melatonin dose (% of Diet)			p#
	0	0.1	1	
0 (start)	24.10±0.31	24.00±0.52	24.13±0.44	NS
1	32.00±0.64	31.28±0.71	30.72±0.29	NS
2	34.93±0.70	35.35±0.99	34.85±0.56	NS
3	38.05±1.21	38.05±1.27	37.02±0.68	NS
4	39.47±1.01	39.72±1.26	38.35±1.20	NS

Values are mean ± SEM. # Differences across groups by ANOVA ; NS : not significant. No significant differences among groups were observed by ANOVA and Fisher's PLSD.

Table 2 Effect of oral administration of melatonin on weight of internal organs

Organs	Melatonin dose (% of Diet)			p#
	0	0.1	1	
Liver	1.70±0.04	1.68±0.07	1.67±0.03	NS
Kidneys	0.82±0.03	0.78±0.01	0.79±0.02	NS
Spleen	0.39±0.01	0.40±0.01	0.40±0.02	NS
Heart	0.43±0.01	0.43±0.01	0.43±0.01	NS

Values are mean(gm) ± SEM. # Differences across groups by ANOVA ; NS : not significant. No significant differences among groups were observed by ANOVA and Fisher's PLSD.

Table 3 Effect of oral melatonin on length and width of tibia in young growing mice

Melatonin Doses(%)	Tibia(mm)					p#
	Length Total	Width				
		Proximal	Midshaft	Distal		
0	18.75±0.21	3.20±0.10	1.85±0.08	3.22±0.07	NS	
0.1	18.53±0.17	3.37±0.07	1.95±0.02	3.23±0.10	NS	
1	18.73±0.21	3.30±0.08	1.95±0.06	3.32±0.08	NS	

Values are mean(mm) ± SEM. # Differences across groups by ANOVA ; NS : not significant. No significant differences among groups were observed by ANOVA and Fisher's PLSD.

3. 骨および大腿骨の長径および幅径に及ぼす影響

Table 3 に示すように, メラトニンの口腔内投与は脛骨の長径および幅径に有意な影響を及ぼさなかった。また大腿骨の長径および幅径に有意な影響を及ぼさなかった (Table 4)。

4. 形態計測

1) 海綿骨

脛骨の近位端における海綿骨非脱灰薄切標本において, メラトニンの経口投与 (0.1-1%/食餌) による明らかな海綿骨量の増加が認められた (Fig. 3)。しかしながら, 同部のテトラサイクリンの二重標識による蛍光顕微鏡像においてはコントロール群とメラトニン投与群の間に明らかな差異は認められなかった (Fig. 4)。これらの組織像から骨の形態計測を行い, その結

果を Table 5 にまとめた。Tb.Th (骨梁幅) に関しては, 1%/食餌のメラトニンの投与においてコントロールに比べ, 有意に増加させた (30.78±1.19 vs. 36.72±1.93, $p < 0.05$ by Fisher's PLSD)。しかしながら, 0.1%/食餌のメラトニンの投与においては, 有意な作用は認められなかった。また BV/TV (骨量) においては, コントロールに比べ, メラトニンの口腔内投与 (0.1および1%/食餌) は, 有意な増加をもたらした (7.95±0.66 vs. 10.15±0.55, $p < 0.05$ by Fisher's PLSD および 7.95±0.66 vs. 11.3±0.79, $p < 0.01$ by Fisher's PLSD)。一方, メラトニンの口腔内投与は, OV/TV (類骨量), OS/BS (類骨面), Ob.S/BS (骨芽細胞面) などの骨形成パラメーターおよび MAR (骨石灰化速度) を有意に減少させ ($p < 0.01$ by ANOVA), 同時に Oc.S/BS (破骨細胞面) およ

Table 4 Effect of oral melatonin on length and width of femur in young growing mice

Melatonin Doses(%)	Length Total	Femur Width			p#
		Proximal	Midshaft	Distal	
0	18.75±0.21	3.47±0.10	1.85±0.08	3.22±0.07	NS
0.1	18.53±0.17	3.73±0.08	1.95±0.02	3.23±0.10	NS
1	18.73±0.20	3.61±0.06	1.95±0.06	3.32±0.08	NS

Values are mean(mm) ± SEM. # Differences across groups by ANOVA ; NS : not significant. No significant differences among groups were observed by ANOVA and Fisher's PLSD.

Table 5 Effect of oral administration of melatonin on the tibial metaphyseal bone histomorphometric parameters

	Melatonin dose (% of Diet)			p#
	0	0.1	1	
Tb.Th(μm)	30.78±1.19	30.82±1.09	36.72±1.93***	<0.05
BV/TV(%)	7.95±0.66	10.1 ±0.55***	11.3 ±0.79**	<0.01
OV/TV(%)	0.15±0.02	0.07±0.01	0.11±0.02***	<0.01
OS/BS(%)	19.42±2.46	7.35±1.15*	15.88±1.82	<0.001
Ob.S/BS(%)	6.28±0.73	1.13±0.60*	3.32±0.69**	<0.001
Oc.S/BS(%)	3.76±0.89	3.25±0.34	2.10±0.38***	<0.05
N.Oc/BS	2.06±0.22	1.45±0.13***	1.14±0.19**	<0.01
BFR/BS (mm ³ /mm ² /year)	0.16±0.02	0.12±0.01	0.14±0.01	NS
MAR(μm/day)	1.67±0.03	0.72±0.05	0.62±0.05	<0.001

Values are mean ± SEM. # Differences across groups by ANOVA ; NS : not significant. Significantly different from vehicle control group by ANOVA and Fisher's PLSD : * $p < 0.005$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.05$.

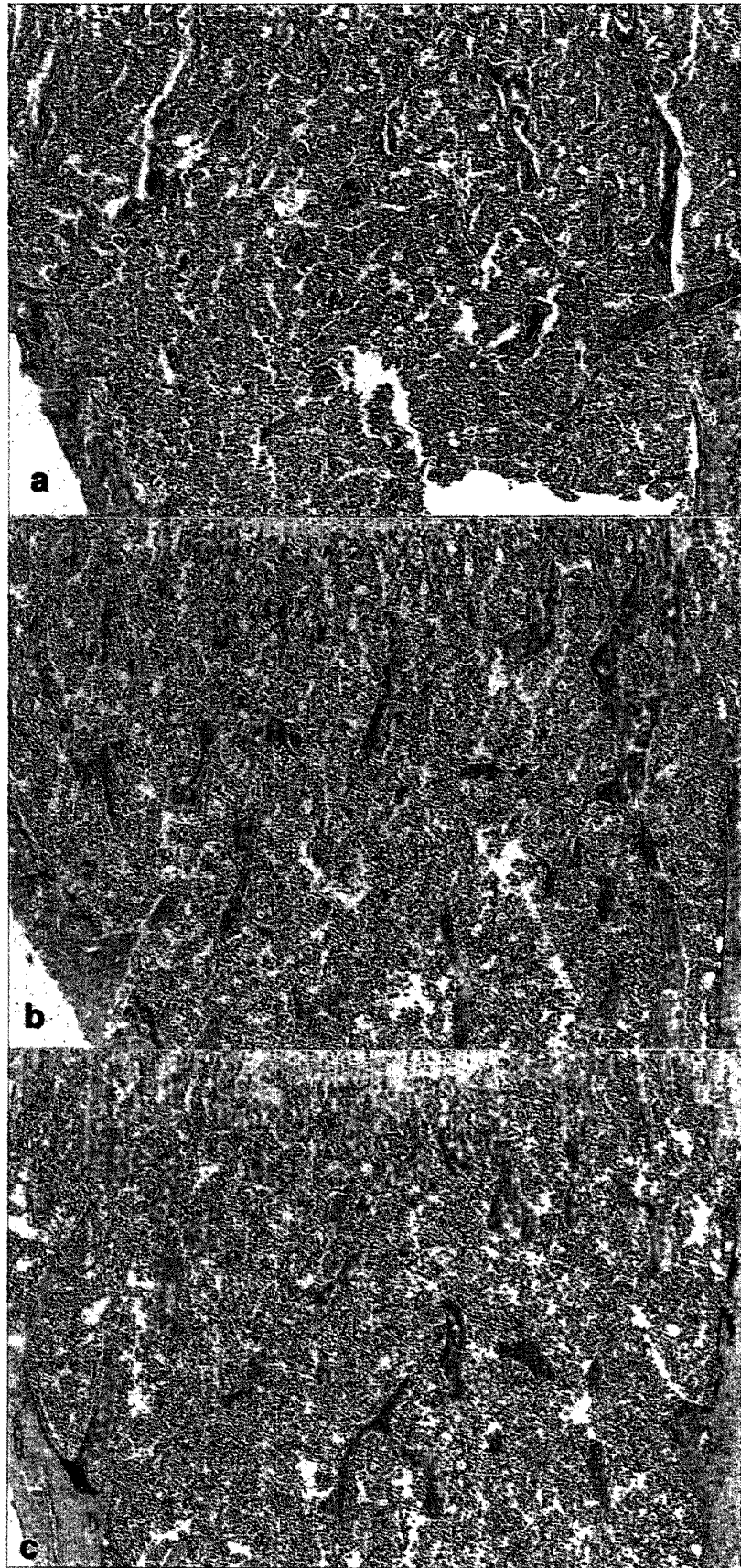


Fig. 3 Undecalcified sagittal sections of proximal metaphysis of tibia (Villanueva-Goldner's stain, X 100).
a ; 0 % melatonin/diet. b ; 0.1 % melatonin/diet. c ; 1 % melatonin/diet.

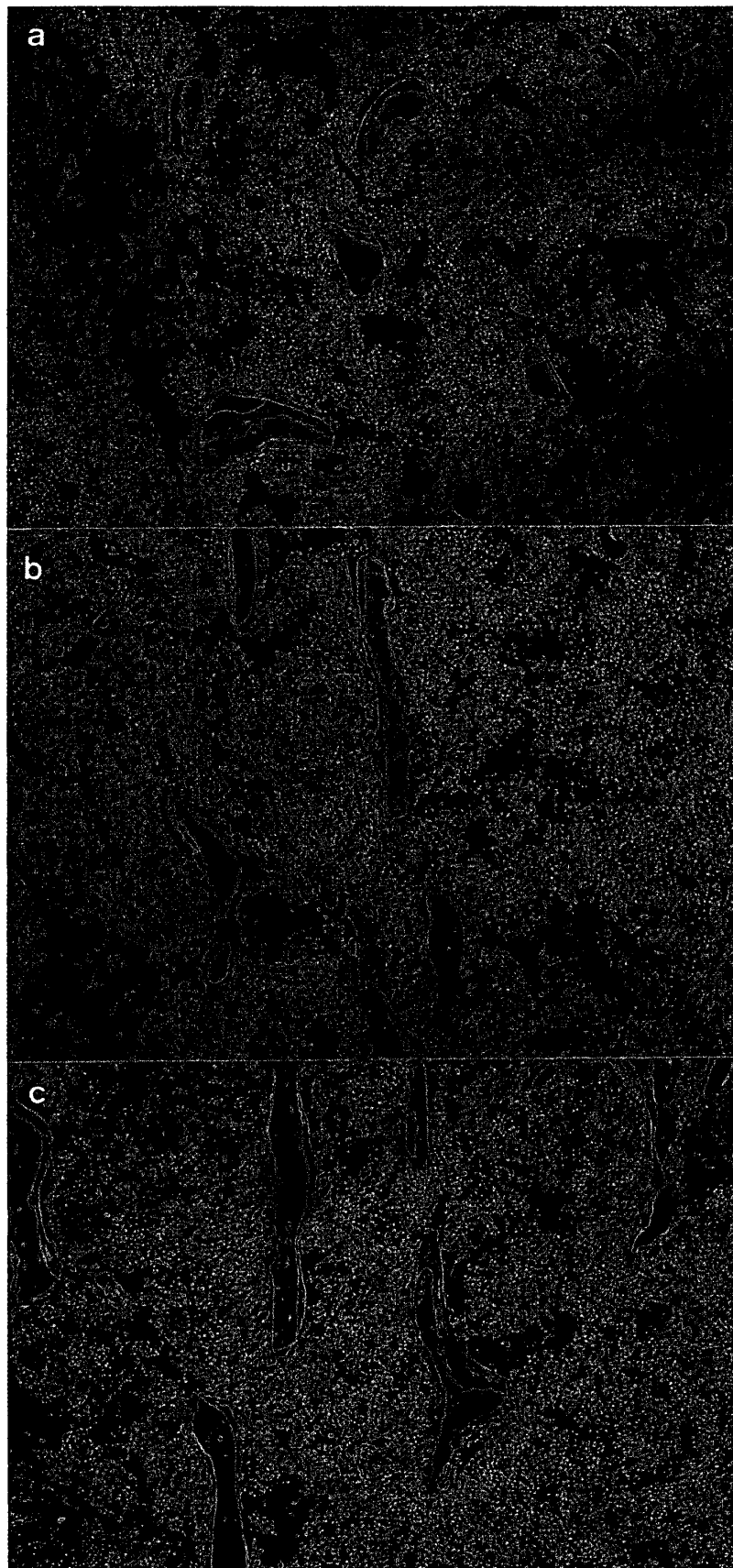


Fig. 4 Fluorescent microscopic features of undecalcified sagittal sections of proximal metaphysis of tibia (X 250).
a ; 0 % melatonin/diet. b ; 0.1 % melatonin/diet. c ; 1 % melatonin/diet.

びN.Oc/BS (破骨細胞数) など骨吸収パラメータを有意に減少させた ($p < 0.01$ by ANOVA). BFR (骨形成速度) に関しては, メラトニンの口腔内投与はコントロールに比べ, 減少傾向を示したが, 統計的有意差は認められなかった.

2) 緻密骨

Fig. 5 および Table 6 に示すように, メラトニンの口腔内投与はコントロールに比べ, Cortical area (緻密骨面), Cortical width (緻密骨幅) および Marrow area (緻密骨面) を増加させる傾向を示したが, 統計的有意差は認められなかった. 一方, メラトニンの口腔内投与は, Periosteal MAR (外骨膜性骨石灰化速度) を有意に増加させ (1.282 ± 0.082 vs. 1.670 ± 0.104 , $p < 0.001$ by Fisher's PLSD および 1.282 ± 0.082 vs. 1.638 ± 0.105 , $p < 0.001$ by Fisher's PLSD), Endocortical MAR (内骨膜性骨石灰化速度) に関してもわずかに増加傾向を示したが, 統計学的有意差は認められなかった.

5. Pit assay

Table 7 に示すように単離破骨細胞を用いた実験においては, メラトニンの添加は, 破骨細胞の吸収能の指標であるピット数に有意な作用は及ぼさなかった. しかしながら, 骨髄間質細胞を用いた培養系においては $25-500 \mu\text{M}$ の範囲で, pit 数を有意に減少させた ($p < 0.001$ by ANOVA). この骨髄間質細胞におけるメラトニンによる破骨細胞の吸収能抑制作用は走査型顕微鏡による観察においても明らかであった (Fig. 6).

Table 7 Effects of melatonin on dentin-resorbing activity of isolated osteoclasts or bone-derived stroma cells

Melatonin (μM)	Number of pits	
	Isolated osteoclasts	Stroma cells
0	121.5 ± 4.1	114.8 ± 3.8
1	117.8 ± 4.3	109.5 ± 4.3
10	120.0 ± 4.1	105.7 ± 3.3
25	121.5 ± 3.8	$97.3 \pm 2.9^*$
50	120.5 ± 3.4	$88.7 \pm 4.2^*$
100	121.3 ± 2.6	$81.8 \pm 4.2^*$
250	113.8 ± 4.3	$73.2 \pm 3.7^*$
500	114.8 ± 2.9	$65.5 \pm 3.9^*$
p#	NS	< 0.001

Values are mean \pm SEM. # Differences across groups by ANOVA; NS: not significant. Significantly different from vehicle control group by ANOVA and Fisher's PLSD: $*p < 0.05$.

Table 6 Effect of oral administration of melatonin on the tibial diaphyseal bone histomorphometric parameters

	Melatonin dose (% of Diet)			p#
	0	0.1	1	
Cortical area (mm^2)	0.636 ± 0.011	0.661 ± 0.015	0.692 ± 0.065	NS
Marrow area (mm^2)	0.338 ± 0.021	0.352 ± 0.024	0.368 ± 0.033	NS
Cortical width (μm)	0.229 ± 0.004	0.231 ± 0.008	0.238 ± 0.011	NS
Periosteal MAR ($\mu\text{m}/\text{day}$)	1.282 ± 0.082	$1.670 \pm 0.104^*$	$1.638 \pm 0.105^*$	< 0.05
Endocortical MAR (%) ($\mu\text{m}/\text{day}$)	1.508 ± 0.106	1.5553 ± 0.104	1.592 ± 0.129	NS

Values are mean \pm SEM. # Differences across groups by ANOVA; NS: not significant. Significantly different from vehicle control group by ANOVA and Fisher's PLSD: $*p < 0.05$.

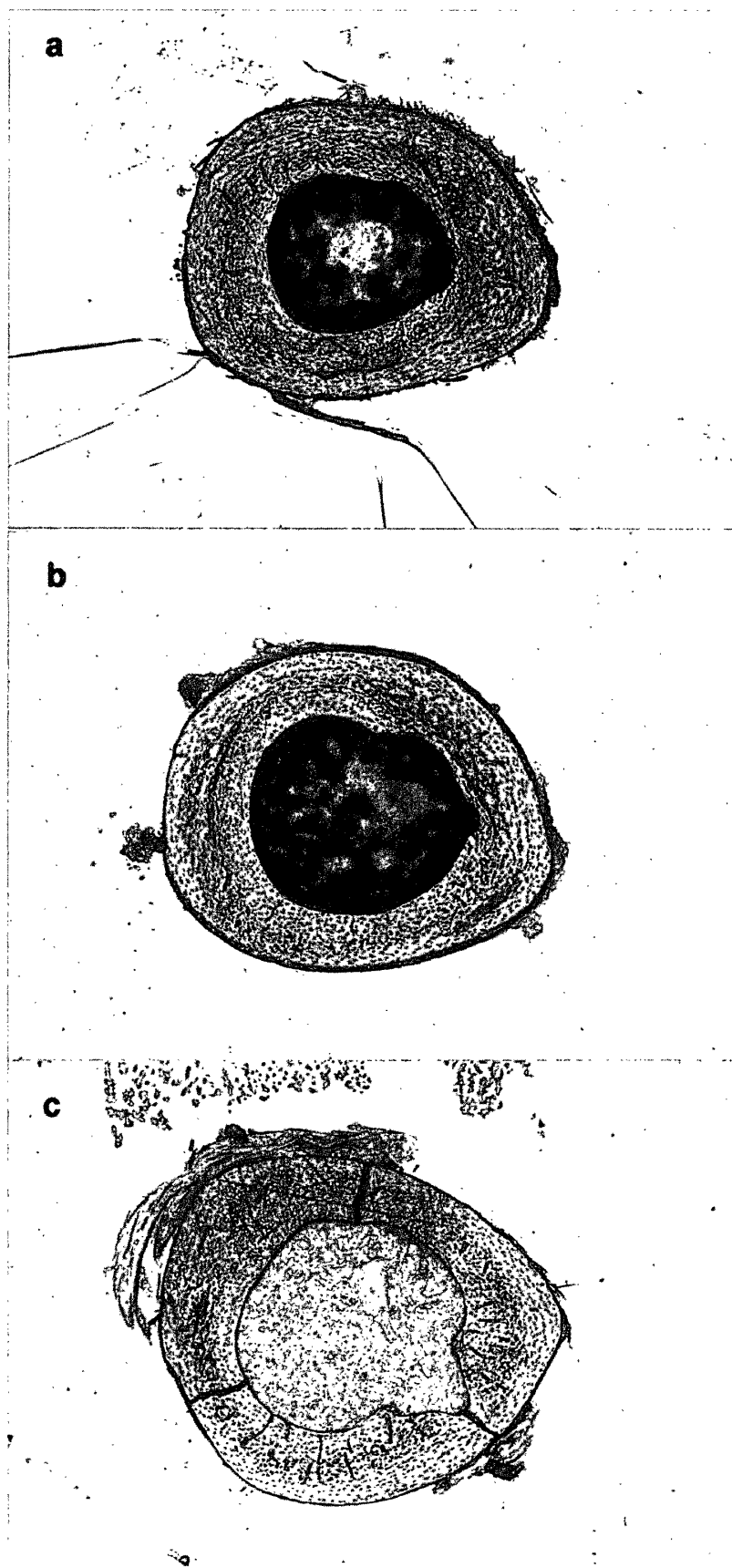


Fig. 5 Undecalcified transverse sections of midshaft of tibia (Villanueva stain, X 100). a ; 0 % melatonin/diet. b ; 0.1 % melatonin/diet. c ; 1 % melatonin/diet.

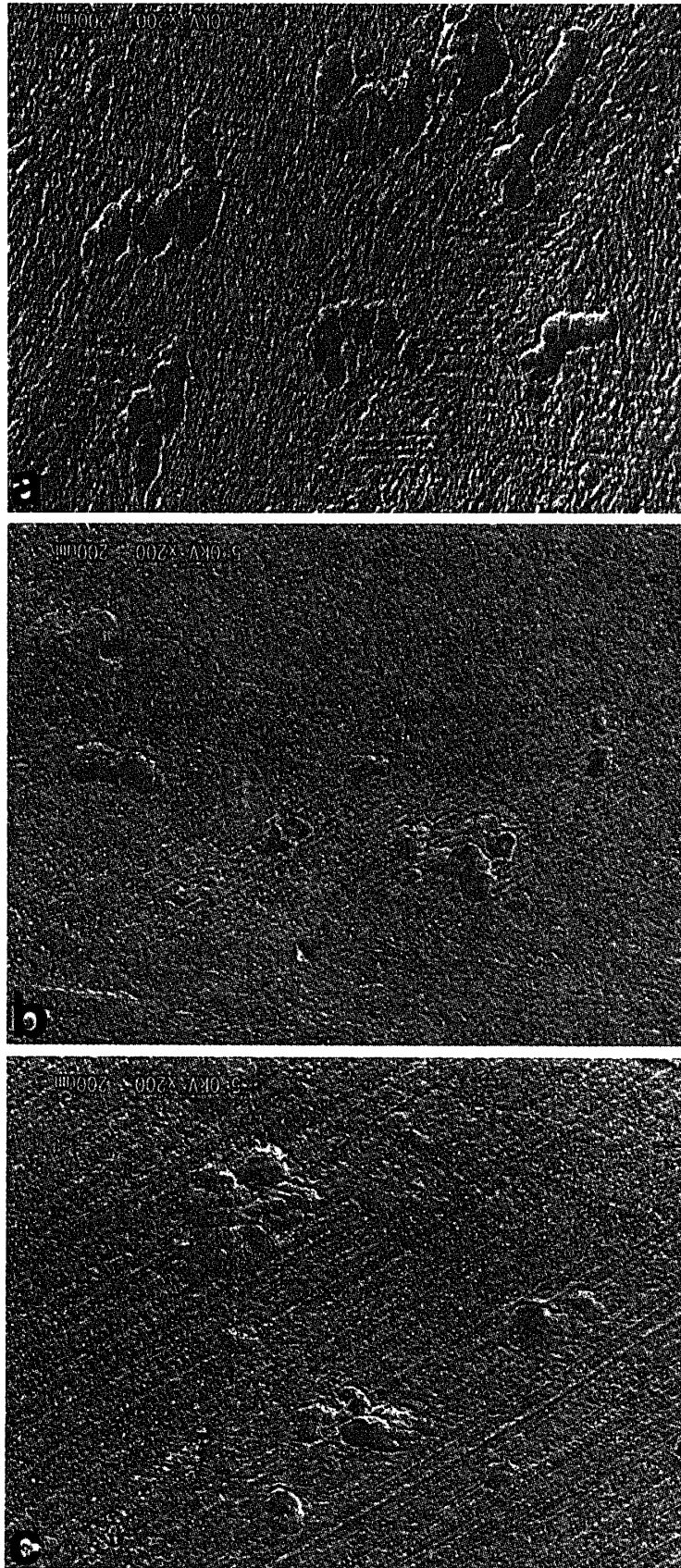


Fig. 6 Scanning electron micrographs of pits on dentin slices. Rabbit bone-derived stroma cells were treated with either vehicle or an indicated concentration of melatonin on dentin slices for 48 h.
 a ; Vehicle control., b ; Melatonin 25 μ M., c ; Melatonin 100 μ M.

IV. 考 察

1. 体重, 諸臓器の重量および病理組織像に及ぼす影響

メラトニンの動物実験における副作用の報告に関して, Nakadeら¹⁴⁾は, 本実験と同様の成長期マウスを用いた実験系において, メラトニンを腹腔内に1, 5および50mg/kg b.w./day投与し, メラトニンの投与は特に, 体重や病理組織学的所見に影響を及ぼさなかったと報告している. 一方, Lourdesら¹⁸⁾はヒトに10mgのメラトニンを28日間経口投与し, 患者の自覚作用をもとに, その副作用について検討しているが, 特に副作用は認められなかったと報告している. 本実験においては, メラトニンを食餌に0.1-1%混ぜ, 自由に与えたが, これはNakadeら¹⁴⁾のメラトニンの腹腔内投与の量を基準にし, 経口投与の場合, 腹腔内投与よりも, 体内への吸収率が, 10倍低いことを想定し, このように設定した. 本実験においては, 一日当たりの各マウス食餌の摂取量が約4gで(データ示さず), この間の体重が24-40gであったことから, 摂取したメラトニンの用量は100-1666mg/kg/dayの経口投与に相当し, Lourdesら¹⁸⁾のヒトにおける報告と比較しても, かなりの高濃度を長期間投与したことになる. それにも関わらず, 本実験においては, Table 1および2に示すように実験開始時から終了時までの4週間において, メラトニンの口腔内投与(0.1および1%/食餌)は, コントロールに比べ, マウスの体重諸臓器の重量にコントロールとした統計学的有意な影響をもたらさず, また, メラトニンの口腔内投与は病理組織学的検討においても病的変化を示さなかった(データ示さず)ことから, 本実験の結果も過去の報告同様, メラトニンの安全性の高さを示唆するものであると思われる.

2. 脛骨および大腿骨の長径および幅径に及ぼす影響

Nakadeら¹⁴⁾は前述の報告の中で, メラトニンの腹腔内投与は成長期マウスの脛骨および大腿骨の長径および幅径に特に有意な影響を及ぼさなかったと報告している. 本実験においてもTable 3および4に示すように, メラトニンの口腔内投与は成長期マウスの脛骨および大腿骨の長径および幅径に有意な影響を及ぼさなかったから, メラトニンは成長期の骨の外形を明らかに変化させるほどの大きな変化を骨組織には及ぼす物質ではないことが示された.

3. 形態計測

脛骨の近位端における海綿骨形態計測において, 1%/食餌のメラトニンの投与はコントロールに比べ, Tb.Th(骨梁幅)を有意に増加させたが, 0.1%/食餌のメラトニンの投与においては, 有意な作用は認められなかった. 一方, Nakadeら¹⁴⁾は, 腹腔内投与した実験において, 体重1kg当たり, 5および50mg/dayのメラトニンの腹腔内投与はコントロールに比べ, 脛骨の近位端における海綿骨のTb.Th(骨梁幅)を有意に増加させたが, 1mg/dayと比較的低濃度で投与した場合は, 骨梁幅を増加させる効果は認められなかったと報告している. これらの結果を考え合わせると, メラトニンの骨梁幅を上昇させる効果は比較的高濃度においてのみ, 認められる傾向があると思われたが, その機序に関しては, 今回の形態計測の分析からは明らかにできず, 今後の課題と考えられた. 一方, BV/TV(骨量)に関して, Nakadeら¹⁴⁾は, 腹腔内投与した実験において, 体重1kg当たり, 5および50mg/dayのメラトニンの腹腔内投与はコントロールに比べ, 脛骨の近位端における海綿骨のBV/TVを有意に増加させたと報告している. 本実験においても, コントロールに比べ, メラトニンの口腔内投与(0.1および1%/

食餌)は、BV/TVの有意な増加をもたらすことを明らかにした。これらのことから、メラトニンには投与方法に関わらず、比較的安定した骨量増加作用があることが示唆された。

骨形成のパラメーターに関して、本研究ではメラトニンの口腔内投与は、OV/TV(類骨量)、OS/BS(類骨面)、Ob.S/BS(骨芽細胞面)などの骨形成パラメーターを有意に減少させたのに対し、腹腔内投与した研究¹⁴⁾においては、体重1kg当たり、1および50mgで投与された場合、コントロールに比べ、有意な効果は認められなかったが、5mgで投与された場合、OV/TV(類骨量)、OS/BS(類骨面)、Ob.S/BS(骨芽細胞面)などの骨形成パラメーターいずれも増加させ、結果にdiscrepancyが生じている。これらの結果の違いはメラトニンを一定時間に腹腔内注射した場合と今回の実験のように投与時間を限定せず経口投与させたという投与方法の違いを反映しているものと考えられるが、詳細な機序に関しては今後、メラトニンの血中レベルの変動の相違などの検討を含め、さらなる検討を要すると思われる。

一方、メラトニンの投与が骨吸収パラメーター及ぼす影響に関しては今回の経口投与した場合も腹腔内投与した場合¹⁴⁾も、メラトニンはOc.S/BS(破骨細胞面)およびN.Oc/BS(破骨細胞数)を有意に減少させたことから、メラトニン投与は比較的安定して骨吸収を抑制する作用があることが、示唆された。

緻密骨の形態計測に関して、メラトニンの口腔内投与は、腹腔内投与の場合¹⁴⁾と同様にコントロールに比べ、Cortical area(緻密骨面)およびMarrow area(骨髄面)をわずかに増加させる傾向を示したが、統計的有意差は認められなかった。これまで、メラトニンには放射線治療などによる骨髄の機能抑制を防止する作用があると報告されてきたが、メラトニン投与による骨髄面の増加傾向はメラトニンの骨髄賦活作

用を反映している可能性も考えられ、興味深く、メラトニンが加齢に伴う骨髄の機能低下を防止できるかどうかなど、今後、検討が必要と思われる。

4. Pit assay

メラトニンのin vitroにおける破骨細胞の骨吸収に及ぼす作用を検討するためにdentin sliceを用いたpit assayにより検討したところ、本研究において、骨髄間質細胞を用いた培養系においてはメラトニンの添加は、25-500 μ Mの範囲で有意に破骨細胞の吸収能の指標であるピット数を減少させるが(Table. 7)、単離破骨細胞を用いた実験においては、このようなメラトニンの破骨細胞の吸収能抑制作用は認められないことが明らかになった(Table. 7およびFig. 6)。これらの結果から、メラトニンの破骨細胞の吸収抑制作用は、破骨細胞に対する直接的な抑制作用ではなく、間質細胞を介した間接的作用であることが、考えられたが、詳細な作用機序に関しては現在、分子レベルで検討中であり、今後の課題と思われた。

V. 結 論

口腔内投与のメラトニンは、成長期マウスの海綿骨量を増加させる作用があり、その作用は主として、骨吸収抑制作用によるものであることが明らかにされた。また、pit assayの結果から、メラトニンの骨吸収抑制作用は破骨細胞への直接的な作用ではなく、骨芽細胞を介した間接的作用であることが示唆された。本研究の成果はメラトニンの経口投与による補充療法が、骨における吸収抑制効果による骨量の増加をもたらす可能性を示唆した最初の実験的報告であり、歯科医学のみならず、整形外科領域などの医学領域の発展に寄与する可能性が示された。

VI. 文 献

1. Kanis J.A., Gluer C.C. : An update on the diagnosis and assessment of osteoporosis with densitometry. Committee of Scientific Advisors, International Osteoporosis Foundation. *Osteopors. Int.* **11** : 192-202, 2000.
2. Armstrong, S.M., Redman J.R. : Melatonin : a chronobiotic with anti-aging properties? *Med. Hypotheses* **34** : 300-309, 1991.
3. Lincoln G.A., Almeida O.F., Arendt J. : Role of melatonin and circadian rhythms in seasonal reproduction in rams. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* **30** : 23-31, 1981.
4. Blask, D.E., S.M. Hill S.M., Pelletier D.B. : Oncostatic signaling by the pineal gland and melatonin in the control of breast cancer. In : *The Pineal Gland and Cancer*, Gupta, D., Attanasio, A, and Reiter, R.J. (eds.), Brain Research Promotion, London, pp.195-206, 1988.
5. Gilad, E., H. Matzkin H., Zisapel, N. : Interplay between sex steroids and melatonin in regulation of human benign prostate epithelial cell growth. *J. Clin. Endocrinol.* **82** : 2535-2541, 1997.
6. Hill, S.M., Blask D.E. : Effects of the pineal hormone melatonin on the proliferation and morphological characteristics of human breast cancer cells (MCF-7) in culture. *Cancer Res.* **48** : 6121-6126, 1988.
7. Lissoni, P., Barni S., Ardizzoia A., Tancini G., Conti A., Maestroni G. : A randomized study with the pineal hormone melatonin versus supportive care alone in patients with brain metastases due to solid neoplasms. *Cancer* **73** : 699-70, 1994.
8. Marshall K.A., Reiter R.J., Poeggeler B., Aruoma O.I., Halliwell B. : Evaluation of the antioxidant activity of melatonin in vitro. *Free Rad. Biol. Med.* **21** : 307-315, 1996.
9. Reiter, R.J., Tang L., Garcia J.J., Munoz-Hoyos A. : Pharmacological actions of melatonin in oxygen radical pathophysiology. *Life Sci.* **60** : 2255-2271, 1997.
10. Terman J.S., Terman M., Lo E.S., Cooper T.B. : Circadian time of morning light administration and therapeutic response in winter depression. *Arch. Gen. Psychiatry.* **58** : 69-75, 2001.
11. Roth J.A., Kim B.G., Lin W.L., Cho M.I. : Melatonin promotes osteoblast differentiation and bone formation. *J. Biol. Chem.* **274** : 22041-22047, 1999.
12. Nakade O., Koyama H., Arijii H., Yajima A., Kaku T. : Melatonin stimulates proliferation and type I collagen synthesis in human bone cells in vitro. *J Pineal Res.* **27** : 106-110, 1999.
13. Carr, D.D.B., Reppert S.M., Bullen B., Skrinar G., Beitins I., Arnold M., Rosenblatt M., Martin J.B., McArthur J.W. : Plasma melatonin increases during exercise in women. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **53** : 224-225, 1981.
14. Nakade O., Koyama H., Ochi M., Arijii H., Kaku T., Takada J., Nishi M., Matsuyama T. : Melatonin increases tibial bone mass in young growing mice. *Bone* **23**(suppl.) : S585, 1998.
15. Kakudo S., Miyazawa K., Kameda T., Mano H., Mori Y., Yuasa T., Nakamura Y., Shiokawa M., Nagahira K., Tokunaga S., Hakeda Y., Kumegawa M. : Isolation of highly enriched rabbit osteoclasts from collagen gels : a new assay system for bone-resorbing activity of mature osteoclasts. *J. Bone Miner Metab.* **14** : 129-136, 1996.
16. Saino H., Matsuyama T., Takada J., Kaku T., Ishii S. : Long-term treatment of indomethacin reduces vertebral bone mass and strength in ovariectomized rats. *J. Bone Miner. Res.* **12** : 1844-1850, 1997.
17. Mashiba T., Burr D.B., Turner C.H., Sato M., Cain R.L., Hock J.M. : Effects of human parathyroid hormone (1-34), LY333334, on bone mass, remodeling, and mechanical properties of cortical bone during the first remodeling cycle in rabbits. *Bone.* **28** : 538-547, 2001.
18. de Lourdes M., Seabra V., Bignotto M. Pinto L. R., Tufik S. ; Randomized, double-blind clinical trial, controlled with placebo, of the toxicology of chronic melatonin treatment.. *J. Pineal Res.* **29** : 193-200, 2000.
19. Vijayalaxmi, Meltz M.L., Reiter R.J., Herman T.S. : Melatonin and protection from genetic damage in blood and bone marrow : whole-body irradiation studies in mice. *J. Pineal Res.* **27** : 221-225, 1999.