

平成 30 年 6 月 13 日現在

機関番号：32703

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K11434

研究課題名 (和文) 鶏血藤を用いた歯周病予防薬の開発に関する基礎的研究

研究課題名 (英文) Roles of Jixueteng in therapeutic agents for periodontitis

研究代表者

遠山 歳三 (Toshizo, Toyama)

神奈川歯科大学・歯学部・特任講師

研究者番号：60638906

交付決定額 (研究期間全体) : (直接経費) 3,700,000 円

研究成果の概要 (和文) : 生薬「鶏血藤」の歯周病治療効果について検討する目的で、殺菌作用、抗酸化作用および実験的歯周炎における歯槽骨吸収抑制効果について検討した。その結果、鶏血藤には歯周病原菌に対する殺菌作用および炎症部位に発生するフリーラジカル消去作用、およびP.gingivalis感染により誘導されるマウス歯槽骨吸収を抑制することが明らかになった。以上の結果から、鶏血藤は歯周炎の予防と治療に有効な生薬であることが示唆された。

研究成果の概要 (英文) : We investigated the preventive effects of Jixueteng, Chinese herbal medicine, on periodontitis using mouse experimental periodontitis model induced by P. gingivalis infection. Jixueteng possessed bactericidal effect against P. gingivalis in a dose-dependent manner. In P. gingivalis-infected mice, significant alveolar bone resorption and remarkable reduction in gingival vascular function via oxidative stress were observed. Morphological degeneration of vessels was also observed in the number of vascular networks abnormality of the vascular lumen was caused by P. gingivalis infection. Jixueteng showed a concentration-dependent reactive oxygen species (ROS) scavenging activity. Alveolar bone loss in mice administered Jixueteng with P. gingivalis was significantly lower than that in infection group. Administration of Jixueteng improved gingival microcirculation. These result suggest that Jixueteng may be useful as a therapeutic and preventive agent for bone diseases such as periodontitis.

研究分野：微生物学

キーワード：鶏血藤 歯周炎 殺菌作用 抗酸化作用 歯槽骨吸収抑制 細菌

1. 研究開始当初の背景

歯周病は、歯周組織の破壊と歯槽骨吸収を特徴とするバイオフィルムを形成するデンタルプラーク細菌が原因となる慢性炎症性疾患である。最も歯周病原性の高い細菌は、*Porphyromonas gingivalis*、*Treponema denticola* ならびに *Tannerella forsythia* であるが、なかでも *P. gingivalis* が最も強力な病原性を発揮することが知られている (Amano A; Periodontology 2000, 2010)。1980 年代後半より開始された広汎な疫学的研究から、歯周病と心・血管疾患、糖尿病、早産・低体重児出産、誤嚥性肺炎などの全身疾患との関連性が指摘されることとなり、歯周病はこれら全身疾患のリスクファクターとなる可能性が示唆されている。

歯周組織の炎症は、細菌感染に対抗する宿主の応答として炎症性サイトカイン (IL-1, IL-6, TNF- α) や活性酸素種 (ROS) の産生によって惹起されると考えられているが、これらの過剰な産生はまた、歯周組織破壊や歯槽骨吸収を引き起こし、歯周炎を増悪させていることが近年報告されている (Tomofuji ら, Free Radic Biol Med, 2009)。

歯周病の治療には、歯周病原細菌の排除が必須であるが、デンタルプラークは複数の細菌が形成するバイオフィルムである上、上記の歯周病原細菌は思春期以降の口腔に安定して定着している常在細菌であるため、その完全な除去は非常に困難である。したがって、スケーリングやルートプレーニングによる専門的メカニカル清掃を行ってもなかなか改善が認められない場合は、歯周組織再生誘導や剥離搔爬術などの外科的治療を施さなければならない。このような一般的な歯周病治療に加えて、生薬や植物由来成分によるバイオフィルム形成抑制を施すことは重要であり、近年、多くの研究が行われている。本研究では、単にバイオフィルム形成を抑制するだけにとどまらず、積極的な歯周組織破壊の改善薬を開発することを目的として、*P. gingivalis* に対して抗菌活性の認められた生薬、鶏血藤の活性酸素消去能、歯肉微小循環破壊の抑制ならびに歯槽骨吸収抑制作用について評価する。鶏血藤は、古くから循環改善、鎮痛ならびに血球増産効果の認められる生薬であり、歯科領域では適応されていないが、本生薬の局所的あるいは全身的投与により炎症性疾患の改善薬としての効果は大いに期待できる。

2. 研究の目的

歯周病感染領域における治療としては歯周外科治療や拔牙などの外科処置が主であり、口腔内の血管や歯槽骨喪失に対する内科的アプローチはほとんど行われていない。近年、我々は生薬である鶏血藤が歯周病原細菌を含む口腔常在菌に対する抗菌活性を有すること、および *P. gingivalis* 感染により惹起されるマウス実験的歯周炎における歯槽骨吸

収を抑制することを見出した。鶏血藤は抗菌作用に加え循環改善作用、免疫活性作用など多様な薬理作用を有しており、病巣に対し多面的にアプローチできる可能性に着目し、本研究では「鶏血藤を用いた歯周組織破壊に対する改善効果と歯周病予防薬の開発に関する研究」を目的とした。

3. 研究の方法

本研究は、鶏血藤の歯周組織破壊に対する改善効果と歯周病予防薬をゴールとしている。そのため、申請者らにより確立された電子スピン共鳴 (ESR 法) およびマウス実験的歯周炎モデルを用いる方法を基盤として以下の実験を遂行した。

(1) ESR 法、フォトン検出法を用いた、鶏血藤抽出液の活性酸素消去能の解析
鶏血藤の歯周病モデルマウスに投与する最適濃度についても検討する目的で、ヒドロキシラジカル ($\cdot OH$)、スーパーオキシドラジカル ($O_2\cdot^-$) 消去消去能を *in vitro* X-band RSR 法およびフォトン検出法にて測定した。

(2) 反応性充血測定による *Pg* 感染の歯肉微小循環に対する影響の解析
マウスに歯周病菌である *Porphyromonas gingivalis* (*Pg*) を感染させ、レーザードップラー法を用いて口蓋歯肉を測定用プローブによる 1 分間圧迫解放後の反応性充血をレーザードップラー血流計により測定した。反応性充血測定を行う。測定は 1 週間毎に行い、7 週齢まで経日的変化を解析した。

(3) 反応性充血測定による *Pg* 感染の歯肉微小循環に対する鶏血藤の改善効果の解析
マウスを鶏血藤投与群、歯周病菌である *Porphyromonas gingivalis* (*Pg*) を感染させ、鶏血藤投与群に分け 1 週間毎にレーザードップラー法を用いて *Pg* 感染により破壊された歯肉微小循環が鶏血藤の投与により改善するかを解析した。

(4) 歯周病の進行に伴う歯槽骨吸収量の解析
C57BL/6 を *Pg* 感染後、1 週間毎に反応性充血測定後、ジエチルエーテル麻酔下で断頭し、上顎骨を摘出した。オートクレーブにて乾燥させた後に、骨吸収量を測定し、歯周病の進行と歯肉微小循環障害との関係の分析を行った。

(5) 血管鋳型標本作製による全身の血管の傷害程度の解析

Pg 感染させたモデルの血管に、麻酔下でレジンを注入し、血管鋳型標本作製した。この標本作製することにより、歯周病罹患部位における微小血管などに *Pg* 菌が影響を与える影響、鶏血藤の改善効果を解析した。

4. 研究成果

(1) 鶏血藤抽出液の活性酸素消去能

ヒドロキシラジカル ($\cdot\text{OH}$)、スーパーオキサイドラジカル ($\text{O}_2\cdot^-$) 消去消去能を *in vitro* X-band RSR 法およびフォトン検出法にて測定した結果鶏血藤は 0.025% よりヒドロキシラジカル ($\text{HO}\cdot$) の ESR シグナル強度を強く減弱させ濃度依存的に $\text{HO}\cdot$ 消去活性を示し 10 mM deferoxamine と同等の消去活性を示した。

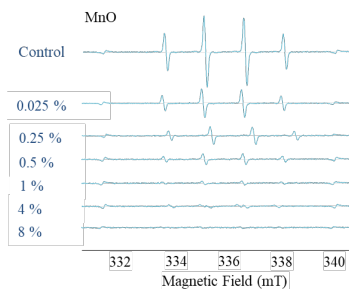


図 1. 鶏血藤のヒドロキシラジカル消去活性

スーパーオキサイドラジカル ($\text{O}_2\cdot^-$) においても 100 U SOD と同等の消去活性を示した。

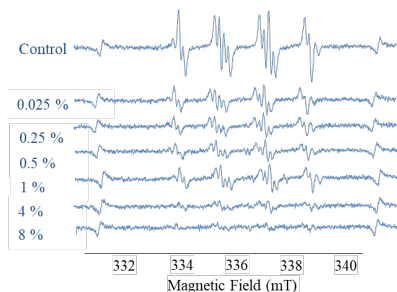


図 2. 鶏血藤のスーパーオキサイドラジカル消去活性

またフォトン検出法を用い、鶏血藤の活性酸素商況活性を各種生薬と比較検討した結果、没食子酸 (*Gallic acid*)、鶏血藤 (*Jixueteng*)、川弓 (*Cnidium officinale*)、丹参 (*Salvia miltiorrhiza*) の水抽出液に $\text{HO}\cdot$ 消去能が認められた。各生薬水抽出液の消去活性は濃度依存性に強いものであった。とくに、8% 鶏血藤は用いた被検生薬の中で最も強い活性酸素消去能を示した。

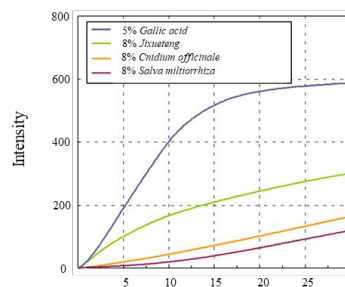


図 3. 鶏血藤と各種生薬の活性酸素消去能の比較

(2) *Pg* 感染の歯肉微小循環に対する影響の解析

マウス実験的歯周炎モデル：C57BL6N マウス 6 週齢 (♂) に *Pg* 生菌を口腔内接種し歯周炎を惹起させた。*Pg* 感染終了後から 1 週間ごとに 6 週間にわたり各群の 6 匹についてレーザードップラー血流計にて口蓋歯肉の血流量の指標として、口蓋歯肉粘膜を圧迫解除後に発生する反応性充血を最大血流量 (Peak)、最大血流量の半減時間 ($T_{1/2}$)、ならびに増加した血流量 (Mass) の 3 つのパラメーターを比較検討した。その結果、*Pg* 感染前ではいずれの実験群でも差異は認められなかった。*Pg* 感染後 7 日目では、Peak, $T_{1/2}$, Mass すべての値が無処置群に比較して顕著に増大していた。

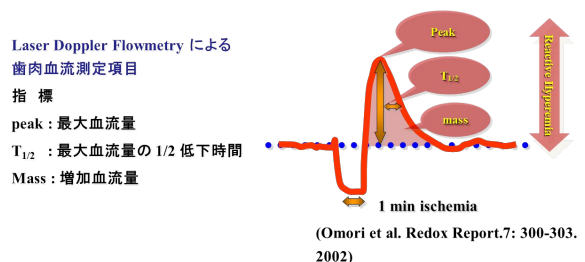


図 4. 反応性充血の概要

(3) *Pg* 感染の歯肉微小循環に対する鶏血藤の改善効果の解析。

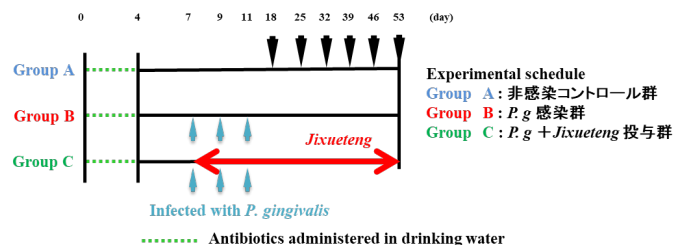


図 5. 実験スケジュール

研究(1)の結果よりマウスに投与する鶏血藤抽出液の濃度を 8% と決定した。

研究(2)同様にマウス実験的歯周炎モデル：C57BL6N マウス 6 週齢 (♂) に *Pg* 生菌を口腔内接種し歯周炎を惹起させた。鶏血藤投与は 8% 濃度に調整した鶏血藤抽出液を *Pg* 接種後より行った。*Pg* 感染終了後から 1 週間ごとに 6 週間にわたり各群の 6 匹についてレーザードップラー血流計にて口蓋歯肉の血流量の指標として、口蓋歯肉粘膜を圧迫解除後に発生する反応性充血を最大血流量 (Peak)、最大血流量の半減時間 ($T_{1/2}$)、ならびに増加した血流量 (Mass) の 3 つのパラメーターを比較検討した。その結果、*Pg* 感染前ではいずれの実験群でも差異は認められなかった。*Pg* 感染後 7 日目では、Peak, $T_{1/2}$, Mass

すべての値が無処置群に比較して顕著に増大していたが、鶏血藤を投与した *Pg* 感染-鶏血藤投与群では、すべての値は無処置群と同様であった。

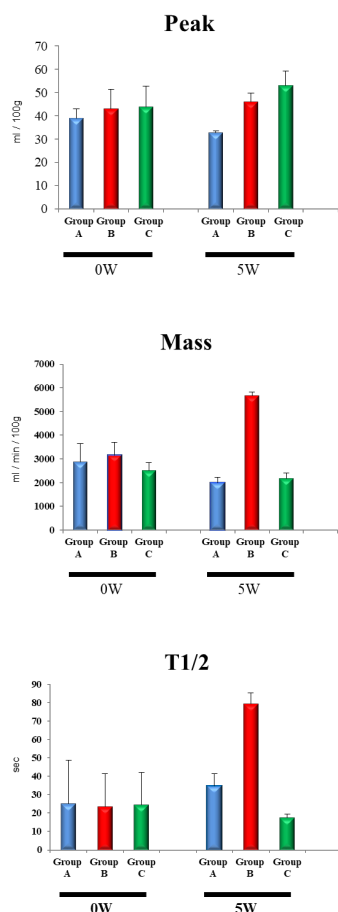


図.6 感染5週目における鶏血藤投与によるパラメーターの変化

(4) マウス実験歯周炎に対する鶏血藤の歯槽骨吸収抑制効果

研究(3)と同様のスケジュールにて感染終了後から1週間ごとに6週間にわたり各群の6匹を抽出・屠殺し、右側頭部について骨格標本作製し、cement-enamel junction (CEJ) から alveolar bone crest (ABC) までの距離をデジタルハイビジョンシステム実体顕微鏡 (×40) を用いて計測した。マウス実験的歯周炎モデルにおいて *Pg* 感染群は、*Pg* 非感染群に比較して歯槽骨吸収量減少が経時的に認められた。一方、*Pg* 感染+鶏血藤投与群では非感染群と同程度の歯槽骨吸収であった。

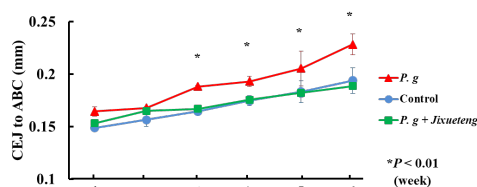


図.7 鶏血藤の歯槽骨吸収抑制作用

(5) マウス実験歯周炎に対する鶏血藤の歯肉微小循環改善効果

Pg 感染させたモデルの血管に、麻酔下でレジンを注入し、血管鑄型標本作製した。この標本作製することにより、歯周病罹患部位における微小血管などに *Pg* 菌が影響を与える影響、鶏血藤の改善効果を解析した。その結果、マウス実験的歯周炎モデルにおいて *Pg* 感染群は、*Pg* 非感染群に比較して歯周組織毛細血管網の破壊による密度減少が経時的に認められた。一方、*Pg* 感染+鶏血藤投与群では、*Pg* 非感染群と同程度の歯周組織毛細血管網の密度が温存されており、密度の減少は認められなかった。

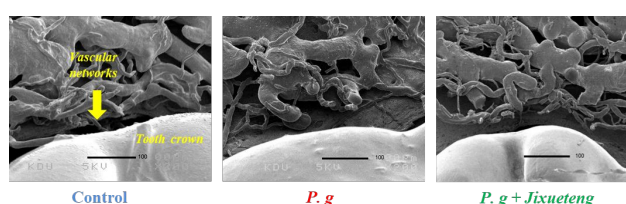


図.8 鶏血藤の歯肉微小循環改善効果

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 8 件)

① Takeda O, Toyama T, Watanabe K, Sato T, Sasaguri K, Akimoto S, Sato S, Kawata T, Hamada N. Ameliorating effects of Juzentaihoto on restraint stress and *P. gingivalis*-induced alveolar bone loss. Archives of Oral Biology. 2014. 59: 1130-1138. 査読有

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0003996914001745#>

② Toyama T, Wada-Takahashi S, Takamichi M, Watanabe K, Yoshida A, Yoshino E, Miyamoto C, Maehata Y, Sugiyama S, Takahashi SS, Todoki K, Lee MC, Hamada N. Reactive oxygen species scavenging activity of Jixueteng evaluated by electron spin resonance (ESR) and photon emission. Natural Product Communications. 2014. 9: 1755-1759. 査読有

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25632478>

③ Sugimoto H, Watanabe K, Toyama T, Takahashi SS, Sugiyama S, Lee MC, Hamada N. Inhibitory effects of French pine bark extract, Pycnogenol®, on alveolar bone resorption and on the osteoclast

differentiation. *Phytotherapy Research*. 2015. 29: 251-259. 査読有
DOI: 10.1002/ptr.5245

④ Yoshida A, Shiotsu-Ogura Y, Wada-Takahashi S, Takahashi SS, Toyama T, Yoshino F
Blue light irradiation-induced oxidative stress in vivo via ROS generation in rat gingival tissue.
12. *J Photochem Photobiol B* 2015 Oct 3;151:48-53. 査読有

⑤ Tanaka Y, Toyama T, Wada-Takahashi S, Sasaki H, Miyamoto C, Maehata Y, Yoshino F, Yoshida A, Takahashi SS, Watanabe K, Lee M-C, Todoki K, Hamada N
Protective effects of (6R)-5,6,7,8-tetrahydro-L-biopterin on local ischemia/reperfusion-induced suppression of reactive hyperemia in rat gingiva.
14. *J Clin Biochem Nutr* 58 (1), 69-75, 2016 doi:10.3164/jcbrn.15-69. 査読有

⑥ Yoshino F, Yoshida A, Toyama T, Takahashi SS, Wada-Takahashi S
 α -Glucosyl hesperidin suppressed the exacerbation of 5-fluorouracil-induced oral mucositis in the hamster cheek pouch
15. *Journal of Functional Foods* 21, 223-231, 2016. doi:10.1016/j.jff.2015.12.008. 査読有

⑦ Funaki S, Tokutomi F, Wada-Takahashi S, Yoshino F, Yoshida A, Maehata Y, Miyamoto C, Toyama T, Sato T, Hamada N, Lee M-C, Takahashi SS
Porphyromonas gingivalis infection modifies oral microcirculation and aortic vascular function in the stroke-prone spontaneously hypertensive rat (SHRSP).
16. *Microbial Pathogenesis* 92, 36-42, 2016 doi:10.1016/j.micpath.2015.12.009. 査読有

⑧ Yoshida A, Sasaki H, Toyama T, Araki M, Fujioka J, Tsukiyama K, Hamada N, Yoshino F
Antimicrobial effect of blue light using *Porphyromonas gingivalis*.
17. *Scientific Report* 7 (5225), 1-9 2017. DOI:10.1038/s41598-017-05706-1. 査読有

〔学会発表〕(計 12 件)

①吉田彩佳, 小椋有香子, 高橋俊介, 高橋聡子, 前畑洋次郎, 宮本千央, 堀 紀雄, 遠山歳三, 秦 光潤, 前谷崇志, 李 昌一, 吉野文彦: 青色 LED 照射がラット口腔領域に及ぼす影響の検討.

第 15 回 日本抗加齢医学会総会 福岡市 2015. 5. 29-31.

② 遠山歳三, 塗々木和男, 高橋俊介, 吉野文彦, 吉田彩佳, 高橋聡子, 渡辺清子, 浜田信城: 実験的歯周炎モデルにおける反応性充血を用いた血管内皮機能評価と生薬「鶏血藤の」内皮機能改善効果の検討.

第 8 回 日本口腔検査学会総会・学術大会 横須賀市 2015.10.3-4

③ 高橋俊介, 杉山秀太, 高橋聡子, 吉野文彦, 吉田彩佳, 前畑洋次郎, 宮本千央, 松尾雅斗, 李昌一, 遠山歳三, 佐藤武則, 渡辺清子, 浜田信城: FMD (Flow Mediated Dilation) による血管内皮機能検査の意義と口腔内への応用の可能性について.

第 8 回日本口腔検査学会総会・学術大会, 横須賀市, 2015.10.3-4

④ 杉山秀太, 高橋俊介, 高橋聡子, 吉野文彦, 吉田彩佳, 前畑洋次郎, 宮本千央, 松尾雅斗, 李昌一, 遠山歳三, 佐藤武則, 渡辺清子, 浜田信城: 2 型糖尿病による歯肉循環調節機能(血管弾性)の変化 - FMD による血管内皮機能検査の口腔内への応用 -.

第 8 回日本口腔検査学会総会・学術大会, 横須賀市, 2015.10.3-4.

⑤ 田中優作, 遠山歳三, 高橋聡子, 佐々木悠, 宮本千央, 前畑洋次郎, 吉野文彦, 吉田彩佳, 高橋俊介, 渡辺清子, 李 昌一, 塗々木和男, 浜田信城: Protective effects of (6R)-5,6,7,8-tetrahydro-L-biopterin on local ischemia/reperfusion-induced suppression of reactive hyperemia in rat gingiva

第 148 回 神奈川歯科大学学会例会 横須賀市 2015.10.8

⑥ 遠山歳三, 塗々木和男, 高橋俊介, 高橋聡子, 吉野文彦, 吉田彩佳, 渡辺清子, 浜田信城: ラット歯肉局所循環調節機構に対する抗酸化生体因子 (BH4) の役割

第 57 回 歯科基礎医学会 新潟市 2015.9.11-13

⑦ 渡辺清子, 平嶺浩子, 遠山歳三, 佐々木悠, 浜田信城 フランス海岸松樹皮抽出物の歯垢形成抑制効果

第 58 回歯科基礎医学会学術大会 札幌 2016.9.24-26

研究者番号： 20308307

⑧ 尾崎 悠, 渡辺清子, 遠山歳三, 宮本阿礼, 佐藤武則, 東 雅啓, 佐々木 悠, 工藤値英子, 浜田信城, 槻木恵一, 三辺正人: オメガ 3 脂肪酸の歯周炎および破骨細胞分化誘導に対する抑制効果の検討
日本抗加齢医学会総会 横浜 2016.6.10-12

⑨ 渡辺清子, 平嶺浩子, 遠山歳三, 佐々木 悠, 浜田信城: フランス海岸松抽出物の歯垢形成抑制効果の検討
第 51 回神奈川歯科大学学会総会 横須賀 2016.12.3

⑩ 吉野文彦, 吉田彩佳, 小椋有香子, 遠山歳三, 高橋聡子, 高橋俊介: ガン化学療法に併発する口内炎に対する糖転移ヘスペリジンの効果
第 51 回神奈川歯科大学学会総会 横須賀 2016.12.3

⑪ 吉田彩佳, 小椋有香子, 高橋聡子, 高橋俊介, 遠山歳三, 吉野文彦: 青色発光ダイオード照射はラット口蓋歯肉の酸化ストレスを亢進する
第 51 回神奈川歯科大学学会総会 横須賀 2016. 12.3

⑫ 渡辺清子, 平嶺浩子, 遠山歳三, 佐々木 悠, 稲葉啓太郎, 浜田信城: フランス海岸松樹皮抽出物による口腔バイオフィルム形成抑制効果の検討。
日本歯周病学会 60 周年記念京都大会 京都 2017.12.16-17

⑬ 遠山歳三, 塗々木和男, 高橋俊介, 吉野文彦, 吉田彩佳, 松尾雅斗, 高橋聡子, 佐々木 悠, 稲葉啓太郎, 渡辺清子, 浜田信城: マウス実験的歯周炎モデルにおける生薬「鶏血藤」の循環改善効果
日本歯周病学会 60 周年記念京都大会 京都 2017.12.16-17

6. 研究組織

(1)研究代表者

遠山 歳三 (TOYAMA Toshizo)
神奈川歯科大学・歯学部・特任講師
研究者番号： 60638906

(2)研究分担者

浜田 信城 (HAMADA, Nobushiro)
神奈川歯科大学・大学院歯学研究科・教授
研究者番号： 20247315

(3)研究分担者

吉野 文彦 (YOSHINO Fumihiko)
神奈川歯科大学・大学院歯学研究科・准教授

(4)研究分担者

高橋 俊介 (TAKAHASHI Shun-suke)
神奈川歯科大学・大学院歯学研究科・教授
研究者番号： 60206810