

平成21年 5月 20日現在

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2007～2008

課題番号：19592419

研究課題名（和文） 漢方薬による歯周疾患治療への応用とその作用機序解明

研究課題名（英文） Application of Kampo medicine to periodontal disease treatment and clarification of its mechanisms

研究代表者

王 宝禮 (WANG PAO-LI)

松本歯科大学・歯学部・教授

研究者番号：20213613

研究成果の概要：

歯周病は、歯周病関連細菌の菌体成分（LPS など）刺激によりヒト歯肉線維芽細胞（HGFs）などが炎症性サイトカイン、プロスタグランジン（PG） E_2 などを産生することで生じる慢性炎症疾患である。一般的に歯周病治療は歯石・プラークの除去を行うが、炎症症状が著しい場合には抗炎症薬を投与することがある。しかし、一般的な抗炎症薬は胃腸障害などの副作用がある。抗炎症作用を示す漢方薬、小柴胡湯にはこれら副作用がない。小柴胡湯によるHGFsの炎症性物質産生抑制効果を検討し、明らかにした。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2008年度	1,700,000	510,000	2,210,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・社会系歯学

キーワード：歯周病、LPS、PGE₂、COX-2、小柴胡湯、抗炎症作用

1. 研究開始当初の背景

歯周病は、歯肉縁下に存在するグラム陰性嫌気性菌由来リポポリサッカライド（LPS）などの毒素により発症する慢性炎症疾患である。LPSは歯周組織破壊における主要な病原因子であり、ヒト歯肉線維芽細胞

（HGFs）を歯周病原因菌 *Porphyromonas gingivalis* (*P. g.*)由来のLPSで刺激すると、IL-1、IL-6などの炎症性サイトカイン産生が誘導される。これまでに、HGFsにおいてCD14およびToll様受容体（TLR）4がLPSの受容体として作用し、炎症性サイトカインの産生をコントロールしていることを明らか

にした。また、歯周炎患者の炎症部位から採取したHGFsは、健常者から採取されたHGFsよりもLPS刺激によるサイトカイン産生量が多いことを報告した。これらの反応は、単球・マクロファージで観察される反応と同様であるため、HGFsが単に結合組織としての作用だけではなく、歯周組織における自然免疫担当細胞であることを提唱した。炎症性サイトカインなどは細菌に対する防御反応を誘導するが、過剰な免疫応答により炎症・骨吸収を引き起こす。歯周疾患の治療は、その原因となるプラーク・歯石などを除去することが必須である。また、炎症が著しい場合においては、酸性非ステロイド性抗炎症薬などを全身あるいは局所投与することがある。しかしながら、この副作用として胃腸・肝・造血障害などがあり、患者の負担が大きいことが示唆されている。

漢方薬は数千年にわたる効能・安全性に関する経験に基づいて確立された特有の理論体系として処方される薬物である。患者の症状に応じ、一つの漢方薬で様々な症状を治し、複合的な治療効果が期待できる。また、漢方薬は西洋医学では対処しにくい半健康状態から慢性疾患の様々な症状に対処でき、適切に使えば驚く程の効果があり、副作用も比較的少なく、一人一人に合わせた処方が可能である。漢方薬は医科領域の疾患で使用されることが多いが、歯科領域疾患への適応は少なく、口内炎・歯痛・抜歯後疼痛などに限定されている。

これまでに、歯周病における抗炎症作用を有する漢方薬を用いた治療は、殆ど行われていない。また、漢方薬は一般的な抗炎症薬による胃腸障害といった副作用の軽減を期待させることが考えられる。

2. 研究の目的

一般的な抗炎症薬を用いた歯周病炎症治療に伴う副作用の軽減方法として、漢方薬の適応がある。小柴胡湯は抗炎症作用をもつ漢方薬であり、肺炎、気管支炎、慢性肝炎などの炎症性疾患に対して使用されている。これは、副作用、特に胃腸障害に関する報告はなく、また、投与禁忌として胃腸障害は含まれ

ていない。このことは、小柴胡湯が歯周病における抗炎症薬として実際に使用できることを意味する。そこで本研究では、まず小柴胡湯が歯周病の抗炎症作用を示す可能性があるのかどうかを明らかにするために、*in vitro* 実験系で検討した。

3. 研究の方法

ヒト歯肉片から分離したHGFsを10 ng/mlの *Porphyromonas gingivalis*(*P. gingivalis*)由来LPSで24時間刺激し、培養上清中に産生されたIL-6、IL-8、PGE₂量をELISAにより解析した。また、この系に小柴胡湯を0.1、0.3、1 ng/mlの濃度で同時添加することにより、小柴胡湯の作用を同様に検討した。更に、PGE₂の産生に関わるCOX-1、2の発現をウェスタンブロッティング法により、また、これらの活性について小柴胡湯存在下でHGFs細胞抽出液を用いて検討した。

4. 研究成果

本研究から、以下のことが明らかとなった。

(1) 小柴胡湯は *P. gingivalis* 由来LPS刺激によるHGFsのIL-6、IL-8産生量に影響を与えなかったが(図1、2)、PGE₂の産生量を濃度依存的に減少させた。また、小柴胡湯はHGFsでもともと産生されているPGE₂量に影響を与えなかった(図3)。

(2) 小柴胡湯は *P. gingivalis* 由来LPS刺激によるHGFsのCOX-2発現量を濃度依存的に低下させた(図4)。

(3) *in vitro* 実験系において、小柴胡湯はHGFs由来COX-1の活性に影響を与えなかったが、COX-2の活性を濃度依存的に抑制した(図5、6)。

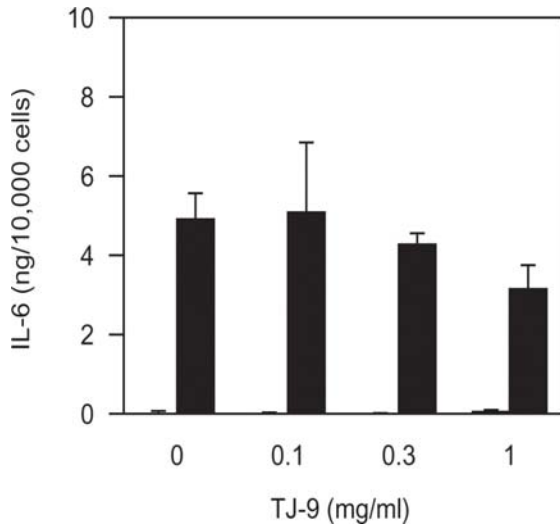


図1 *P. gingivalis* 由来 LPS 刺激により HGFs から産生される IL-6 の小柴胡湯 (TJ-9) による影響. □ : LPS 未刺激、■ : LPS 刺激

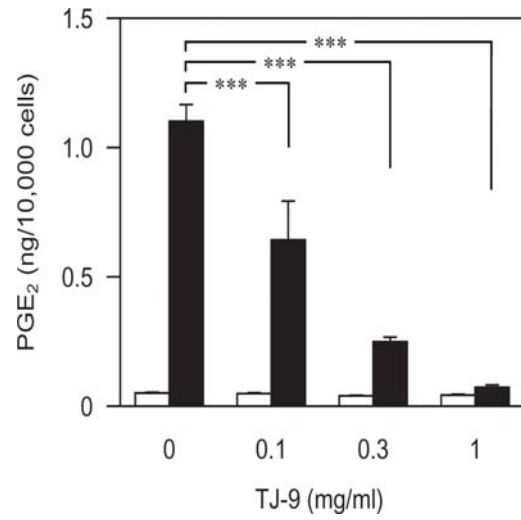


図3 *P. gingivalis* 由来 LPS 刺激により HGFs から産生される PGE₂ の小柴胡湯 (TJ-9) による影響. □ : LPS 未刺激、■ : LPS 刺激、*** $p < 0.001$

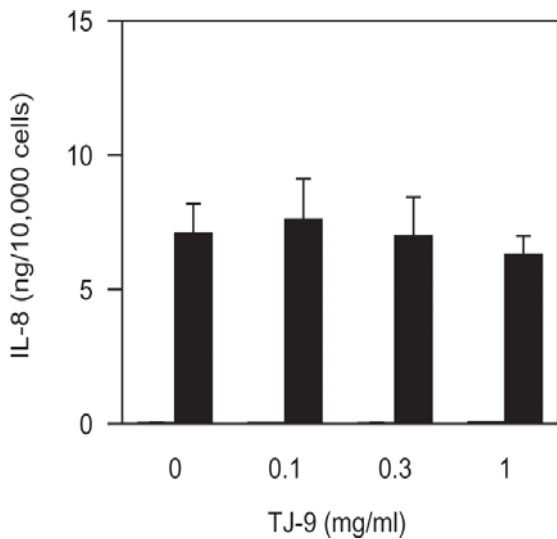


図2 *P. gingivalis* 由来 LPS 刺激により HGFs から産生される IL-8 の小柴胡湯 (TJ-9) による影響. □ : LPS 未刺激、■ : LPS 刺激

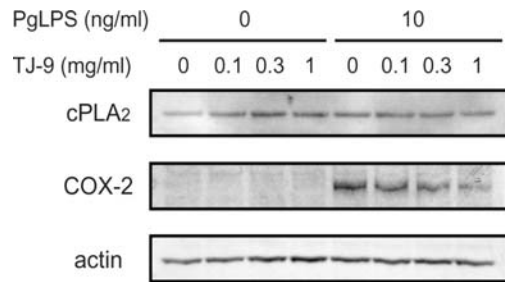


図4 *P. gingivalis* 由来 LPS 刺激による HGFs の COX-2 発現とその小柴胡湯 (TJ-9) による影響.

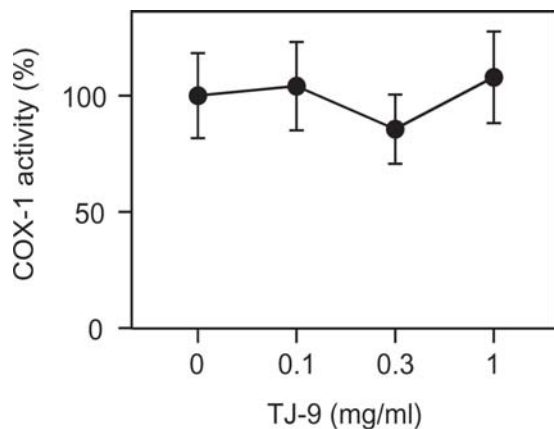


図5 *P. gingivalis* 由来 LPS で HGFs を刺激後、その細胞抽出液を調製し、小柴胡湯 (TJ-9) 添加時の COX-1 酵素活性に及ぼす影響。

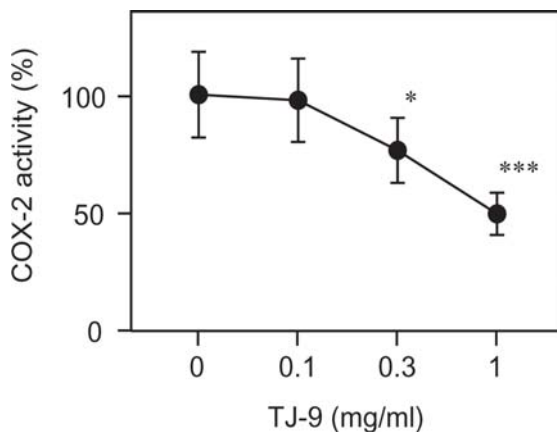


図6 *P. gingivalis* 由来 LPS で HGFs を刺激後、その細胞抽出液を調製し、小柴胡湯 (TJ-9) 添加時の COX-2 酵素活性に及ぼす影響。* $p < 0.05$ 、*** $p < 0.001$

以上の結果から、小柴胡湯は HGFs の COX-2 発現及び活性の両方を抑制することにより PGE₂ の産生を抑制し、抗炎症作用を示すことが示唆された。また、COX-2 を選択的に阻害するため、患者に胃腸障害を生じさせる危険性が少なくなる可能性が示唆された。従って、既に臨床で使用されている小柴胡湯は、歯周病や口腔内疾患における抗炎症薬として使用可能な漢方薬であることが明らかとなった。

現在、他の候補漢方薬として半夏瀉心湯、黄連湯、黄連解毒湯について実験を行っている。これまでに、いずれの漢方薬においても HGFs から産生される PGE₂ 量を低下させるという結果が得られている。今後、更に詳細な漢方薬の作用機序解明と臨床適応を目指した検討を行う必要がある。

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1件)

① Ara, T., Maeda, Y., Fujinami, Y., Imamura, Y., Hattori, T., and Wang, P.-L. Preventive effects of a Kampo medicine, Shosaikoto, on inflammatory responses in LPS-treated human gingival fibroblasts. *Biol. Pharm. Bull.* (2008) 31, 1141-1144, 査読有

[学会発表] (計1件)

① 荒敏昭. ヒト歯肉線維芽細胞を用いた歯周病モデルにおける小柴胡湯の抗炎症作用の解明. 第51回秋季日本歯周病学会学術大会. 2008年10月19日. 愛知県四日市市

6. 研究組織

(1) 研究代表者

王 宝禮 (WANG PAO-LI)
松本歯科大学・歯学部・教授
研究者番号：20213613

(2)研究分担者

今村 泰弘 (IMAMURA YASUHIRO)
松本歯科大学・歯学部・講師
研究者番号：00339136

荒 敏昭 (ARA TOSHIAKI)
松本歯科大学・歯学部・助教
研究者番号：90387423

藤垣 佳久 (HJIGAKI YOSHIHISA)
松本歯科大学・歯学部・助教
研究者番号：80367523

(3)連携研究者