

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 8 月 23 日現在

機関番号：30110

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26463142

研究課題名(和文)Gingipain活性阻害剤の歯周病治療および歯周医学関連疾患治療への応用

研究課題名(英文)Effects of anti-gingipain drugs on periodontal diseases and systemic diseases related to periodontal medicine.

研究代表者

古市 保志(Furuichi, Yasushi)

北海道医療大学・歯学部・教授

研究者番号：80305143

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)： ナタマメはマメ科の植物であり、古くから膿とり豆として知られ、漢方薬として使用されてきた。本研究では、In vitro におけるナタマメ抽出物(SBE)の抗炎症作用、マウス実験的歯周炎に対するSBEの効果、マウス実験的歯周炎とマウス実験的RAの関連性、実験的歯周炎・RA併発マウスに対するSBEの効果、に関する検討を行った。その結果、SBEの飲用によって歯槽骨の吸収が抑制されたこと、また歯周炎と関節リウマチの併発動物実験モデルにおいて関節炎の進展と歯槽骨の吸収が抑制されたことが明らかにされた。SBEが炎症性サイトカインの産生を抑制し歯周炎や関節リウマチの発現・進行を抑制する可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)： Sword Beans have been known as antipyretic agent and used as folklore medicine. In this study, we investigated anti-inflammatory effects of SBE, effects of SBE on ligature induced alveolar bone destruction, association between experimental periodontitis and rheumatoid arthritis, and effects of SBE on experimental periodontitis and rheumatoid arthritis. It was found out that intake of SBE as a drinking water reduced the alveolar bone resorption in the experimental periodontitis model rats and prevented alveolar bone resorption and inflammatory responses in the joints in experimentally induced periodontitis and rheumatoid arthritis model mouse. These effects would partly explained by the inhibitory effects of SBE on cytokine production of immunologic cells.

研究分野：歯周治療学

キーワード：歯周炎 関節リウマチ 動物実験 なた豆抽出物 炎症性サイトカイン

## 1. 研究開始当初の背景

近年、歯周炎と全身の様々な疾患あるいは状態との関連性が報告されている。それらの疾患・状態として、糖尿病、動脈硬化症とそれに続く虚血性心疾患(狭心症、心筋梗塞など)、誤嚥性肺炎、関節リウマチ、早産・低体重児出産が注目を集めている。

歯周炎は、細菌感染によって歯周組織に炎症を生じ、様々なサイトカインを産生し、歯槽骨吸収に至り、そのまま放置すると歯の喪失につながる疾患である。関節リウマチ (RA) は、自己免疫による炎症反応によって骨吸収が生じると考えられている。このように歯周病と RA は発生部位が異なるが局所の慢性炎症と骨吸収が主体である点で類似しており、その相関と効果的な治療法について、世界各国で様々な研究が行われている (Detert et al. *Arthritis Res Ther.* 2010;12(5):218)。

一方、ナタマメ(sword beans) はマメ科の植物であり、古くから膿とり豆として知られ、漢方薬として使用されてきた。我々は、以前の報告で、ナタマメ抽出物 (Sword Bean Extracts: SBE) が、生体細胞に障害を起こさない濃度で *Porphyromonas gingivalis* (*P. g.*) に抗菌作用を示し、*P.g.*の病原因子の一端を担っているプロテアーゼ(Kgp, Rgp) 産生を抑制し、*P.g.*感染によるラット実験的歯周炎における歯槽骨吸収を抑制することを明らかにしている (Nakatsuka et al. *J Periodontal Res.* 2014)。

## 2. 研究の目的

本研究では、歯周炎と関節リウマチの関連性、SBE の抗炎症効果を検索するために、

- 1) In vitro における SBE の抗炎症作用、
- 2) マウス実験的歯周炎に対する SBE の効果、
- 3) マウス実験的歯周炎とマウス実験的 RA の関連性、

- 4) 実験的歯周炎・RA 併発マウスに対する SBE の効果、  
に関する検討を行った。

## 3. 研究の方法

- 1) 炎症性サイトカイン産生に与える効果 : LPS 刺激 THP-1 細胞から産生される TNF- $\alpha$  と、IL-1 $\beta$  に対して各種濃度の SBE が与える影響を ELISA 法によって評価した。
- 2) マウス実験的歯周炎に及ぼす効果 : Balb/c 系雌性マウス 10 週齢の左右上顎第二臼歯に 5-0 絹糸を結紮し、実験的歯周炎モデルを作製した。5 週齢時から SBE を経口投与、結紮 3 週後に賭殺し、歯槽骨吸収量の測定によって、マウス実験的歯周炎に及ぼす効果を評価した。また血清中 CRP 濃度を比較・検討した。
- 3) 歯周炎と RA の関連性 : SKG 系雌性マウス 6 週齢時にマンナンを腹腔内投与して関節炎を誘導し、さらに 10 週齢時に 5-0 絹糸を結紮し歯槽骨吸収を誘導した。結紮 3 週後に賭殺、関節炎の程度と歯槽骨吸収量を測定することによって歯周炎と RA の関連性を検討した。
- 4) SKG 系雌性マウス 6 週齢時にマンナンを腹腔内投与して関節炎を誘導し、さらに 10 週齢時に 5-0 絹糸を結紮し歯槽骨吸収を誘導した。5 週齢時から SBE を経口投与し、結紮 3 週後に賭殺し、関節炎の程度と歯槽骨吸収量の測定によって、実験的関節炎および実験的歯周炎に及ぼす効果を評価した。また血清中 CRP 濃度を比較した。

## 4. 研究成果

- 1) LPS 刺激 THP-1 細胞からの TNF- $\alpha$  および IL-1 $\beta$  の産生は、250  $\mu\text{g/ml}$  あるいは 500  $\mu\text{g/ml}$  の SBE の投与によって抑制されることが明らかにされ

た。

- 2) 実験的歯周炎モデルにおいて、SBE 投与群はコントロール群と比較して歯槽骨吸収量が有意に減少していた。血清中 CRP 濃度は、歯周炎群と比較して歯周炎 + 2000 µg/ml SBE 群で有意に低かった。
- 3) 歯周炎 + RA 群の関節炎の程度は、RA 群と比較して関節炎スコアにおいて有意に高い値を示した。また、歯周炎 + RA 群は、歯周炎群と比較して歯槽骨吸収量は有意に大きい値を示した。血中 CRP 濃度は、コントロール群と比較して歯周炎群と RA 群で有意に高く、歯周炎 + RA 群はそれら 2 群より有意に高い値を示し、歯周炎群と RA 群の間では有意な差は認めなかった。
- 4) 歯周炎群と比較して歯周炎 + SBE 群では、歯槽骨吸収量が有意に小さかった。また歯周炎 + RA+SBE 群は、歯周炎群および歯周炎+RA 群より歯槽骨吸収量が有意に小さかった。血中 CRP 値は、最も高い値を示した歯周炎+RA 群より歯周炎+RA+SBE 群で有意に小さい値を示した。

我々の以前の in vitro 研究および in vivo 研究の結果において、SBE は *P.g.* に対する抗菌作用を有し、抗菌作用を呈する濃度では歯周組織細胞に為害性は少ないことを明らかにしている。また、SBE が *P.g.* 口腔内投与によって誘発されたラット歯周炎モデルにおける歯槽骨の吸収を抑制したことを明らかにしている (Nakatsuka et al. J Periodontal Res. 2014)。

今回の研究課題では、SBE の抗炎症作用に着目し、In vitro におけるサイトカイン産生に対する抑制作用を評価し、SBE は IL-1 や IL-6 の産生を抑制することを明らかにした。この結果から、SBE は、我々の以前の研究で示された生体に障害性のない濃度で、抗菌作用、抗プロテアーゼ作用、のみならず抗炎症作用を有する可能性が示された。

次に、歯周炎と関節リウマチの相関に着目しその動物実験による検証を行った。その結果、関節リウマチに罹患したラットに歯周炎を惹起すると、関節炎の状態はさらに悪化し、血中の CRP 濃度も上昇していた。このように歯周炎への罹患は、関節リウマチの状態を悪化させることが示され、これは既報の他の研究結果と一致するものである (Kaur et al, J Dent Res. 2013)。さらに、今回の研究では、SBE 飲用による絹糸結紮歯周炎および歯周炎と関節リウマチの併発モデルに対する SBE 飲用の効果を検証した。その結果、SBE 飲用によって、SBE 非飲用群と比較して、歯周炎群における歯槽骨の吸収量、歯周炎と関節リウマチ併発群における歯槽骨吸収と関節炎、および歯周炎群、関節リウマチ群と歯周炎・関節リウマチ併発群において血中 CRP 値が低下していたことが示された。このように、SBE の引用は、歯周炎、あるいは歯周炎と関節リウマチの併発に対して、それぞれの発現と進展を抑制する可能性が示唆された。これらの in vitro と動物実験の結果から、SBE は、歯槽骨の吸収を抑制し、また歯周炎と関節リウマチ併発に対して歯槽骨吸収と関節炎の発現・進展を抑制する可能性が示唆された。また、それらの作用は、SBE の有する炎症性サイトカインの産生抑制作用に一部起因する可能性が示された。今後、SBE の歯周炎と関節リウマチに対する効果を検証するために臨床研究の遂行が待たれる。

#### 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. Nakatsuka Y, Nagasawa T, Yumoto Y, Nakazawa F & Furuichi Y. Inhibitory effects of sword bean extract on alveolar bone resorption induced in rats by *Prophyromonas gingivalis* infection. J Periodontol Res. 2014, 49:801-809.

[学会発表] (計5件)

1. Furuichi Y. Possible administration of sword

bean extract for the prevention of periodontal disease. The 5<sup>th</sup> research week international symposium of oral medicine. 17<sup>th</sup> May, 2015, Taipei.

2. 松本光生、中塚侑子、清水伸太郎、加藤幸紀、日高竜宏、古市保志. ナタマメエキスの細胞障害性と炎症に対する効果について。第58回日本歯周病学会秋季大会、12nd Sep. 2015, Hamamatsu

3. 松本光生、中塚侑子、清水伸太郎、加藤幸紀、日高竜宏、古市保志. 歯周病と関節リウマチに対するナタマメエキスの効果に関する研究、第23回日本歯科医学会総会、21 Oct. 2015, Fukuoka

4. 松本光生、中塚侑子、白井要、清水伸太郎、加藤幸紀、日高竜宏、安彦善裕、古市保志. ナタマメエキスが実験的歯周炎モデルに対して及ぼす効果についての検索、第59回日本歯周病学会秋季大会、7<sup>th</sup> Oct. 2016, 新潟

5. Matsumoto K, Nakatsuka Y, Shirai K, Kato S & Furuichi Y., Ligature-induced periodontitis exacerbates rheumatoid arthritis in SKG rats. General Session of IADR, 24<sup>th</sup> Mar. San Francisco.

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
出願年月日:  
国内外の別:

取得状況(計0件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
取得年月日:  
国内外の別:

〔その他〕  
ホームページ等

6. 研究組織  
(1)研究代表者

古市保志 (FURUICHI, Yasushi)  
北海道医療大学・歯学部・教授  
研究者番号:80305143

(2)研究分担者

加藤幸紀 (KATO Satsuki)  
北海道医療大学・歯学部・講師  
研究者番号: 50281283

中塚侑子 (NAKATSUKA Yuko)  
北海道医療大学・歯学部・助教  
研究者番号: 50281283

(3)連携研究者

(0)

研究者番号:

(4)研究協力者

(0)