

平成 30 年 5 月 29 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：15K11275

研究課題名(和文) 予見される口内炎の発症予防・増悪抑制を試みる新規治療マネジメントの検討

研究課題名(英文) Investigation of new treatment management to try to prevent progression and exacerbation of oral mucositis

研究代表者

吉野 文彦 (Fumihiko, Yoshino)

神奈川県大学・大学院歯学研究科・准教授

研究者番号：20308307

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究課題の目的は、抗酸化物質の事前処置による癌化学療法に併発する口内炎の予防・増悪抑制に関わる効果の解析である。今回用いた、水溶性抗酸化物質である ゲルコシルヘスペリジン、および口内炎への効能が表記されている漢方薬である半夏瀉心湯、茵陈蒿湯、黄連湯はすべて良好な活性酸素消去活性を示した。これら抗酸化物質を、抗癌剤処方以前より実験動物に投与することで、口内炎の増悪は有意に抑制された。しかしながら、コントロールと比較し、生じる口内炎の最大面積は抑制されたが、回復期間の短縮は認められなかった。今後は、脂溶性抗酸化物質などの組み合わせも視野に入れ、治療期間の回復を目指す必要性がある。

研究成果の概要(英文)：The aim of this research project is to analyze the effect on prevention / progression of oral mucositis accompanying cancer chemotherapy by antioxidant pretreatment. Alpha-glucosyl-hesperidin which is a water-soluble antioxidant substance and Chinese herbal medicine which is indicated for efficacy to oral mucositis, Hange-shashin-to/Inchinko-to/Oren-to indicated the satisfactory reactive oxygen species scavenging activity. In addition, exacerbation of oral mucositis was significantly suppressed by administering these antioxidants in vivo to experimental animals before prescribing chemotherapy. However, although the maximum area of oral mucositis caused as compared with the control was suppressed, shortening of the recovery period was not observed. From now on, it is necessary to combine with lipid-soluble antioxidants and others to aim for recovery of treatment period.

研究分野：薬理学

キーワード：口内炎 活性酸素 漢方薬 化学療法

1. 研究開始当初の背景

口腔粘膜に生じる潰瘍は、癌治療で使用される化学療法や頭頸部放射線療法に関連した毒性効果の主要な臨床における問題である。国立癌研究所からの推定値は、口腔粘膜炎は、一次化学療法を受けたすべての患者の約40%において、造血幹細胞移植の70~80%で、頭頸部への放射線療法を受けた患者のほぼ100%で起こることを示している。その条件は、全ての消化管の粘膜に影響し、標的組織に依存して口腔や喉の痛み、潰瘍、腹痛、膨張、嘔吐や下痢を引き起こす。とくに、頭頸部癌に対する5-フルオロウラシル(5-FU)のような抗癌剤処置は、口内炎を頻繁に起こすことが報告されている。一般的に、この口内炎はひどい不快感であり、患者が食べたり、飲み込んだり、話したりする能力を弱める。それゆえ、口内炎の予防と制御は、癌治療を継続し、より良い生活の質を持つことに寄与することが可能である。活性酸素種(ROS)は癌や高血圧、心疾患、糖尿病を含む様々な疾患を起こすことで人の健康に影響を与える重要な役割が説明されている。スーパーオキシドやヒドロキシルラジカルのようなROSは、さまざまなメカニズムにおいて脂質過酸化やアポトーシス、DNA障害を引き起こすがよく知られている。さらに、口内炎の発症メカニズムの1つは、粘膜下組織および上皮内のシグナル伝達経路を活性化するROSの発生を放射線療法や化学療法が導いていることが報告されている。5-FUはまた、細胞死のメカニズムにおいて重要な役割を果たしている生体系でROSを生成することが認識されている。加えて、5-FU誘導性口内炎の初期ステージでは過剰なROSが産生され、局所のレドックスバランスが破綻することも報告されている。一方、抗酸化物質の摂取は、体内のROSを効果的に除去することが出来る。このような理由のため、癌に対する放射線や化学療法に併発する口内炎の治療や予防に対して抗酸化物質を用いたROSに対するアプローチが重要である。

2. 研究の目的

従来から存在する口内炎治療法ではなく、一般的に有害作用がほとんど報告されていない水溶性化学物質や、漢方薬である半夏瀉心湯は口内炎治療薬として近年保険適用されており、半夏瀉心湯を含めた漢方薬の抗酸化機能の解析を基盤として、癌化学療法に併発する口内炎予防に果たす役割を解析することを目的とした。

3. 研究の方法

本研究は癌化学療法に併発する難治性口内炎に対する水溶性化学物質や漢方薬の有用性の確立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)法によるROS検出技術を実験基盤とし以下の実験を遂行した。

- (1) ファイトケミカルの活性酸素種消去能の解析: 水溶性化学物質としてこれまで申請者により抗酸化活性を認めた α -グルコシルヘスペリジン(Hsp-G)を用いた。漢方薬には効能に口内炎への適応が表記されている半夏瀉心湯(TJ-14) 茵陳蒿湯(TJ-135) 黄連湯(TJ-120)を用いた。これらのROSに対する抗酸化活性は*in vitro* X-band ESR法を用いてスーパーオキシド、およびヒドロキシルラジカルに対する消去活性を測定した。
- (2) 抗癌剤投与により生成される口内炎モデル動物における活性酸素種の解析: シリアンハムスターに対し抗癌剤として5-FUを60 mg/kgを腹腔内に0日目、2日目に投与し、また2日目にハムスターチークポーチ内に10%酢酸溶液を注入し化学療法薬による口内炎モデルを作成した。なお、口内炎評価として経日的に口腔内をデジタルカメラにて撮影し、画像解析ソフト(Image-J)により潰瘍面積の解析を行った。
- (3) 口内炎モデル動物に対する水溶性抗酸化物質および漢方薬の有効性評価: 上記1にて各両ROSに対して消去能を示し、且つ安価な水溶性抗酸化物質および漢方薬を実験開始5日前より飲料水に添加し自由摂取させ、その後、作成した口内炎に対する有用性を測定した。なお、実験動物に関わる全ての本研究は神奈川歯科大学実験動物倫理委員会の審査・承認を得て行った。

4. 研究成果

- (1) Hsp-GはROSであるヒドロキシルラジカルおよびスーパーオキシドに対して消去活性を示した(図1)。とくに、スーパーオキシドに対してはヒドロキシルラジカルより高い消去活性を示した。

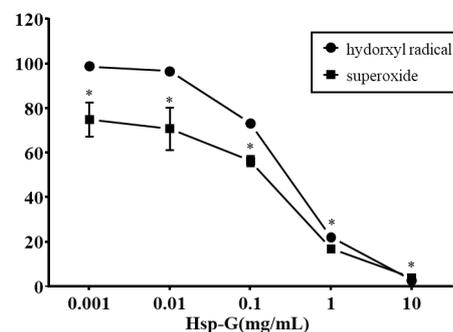
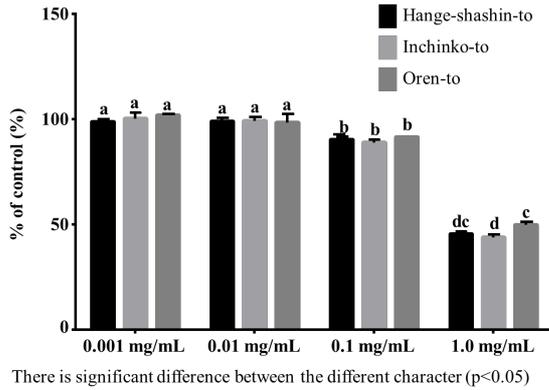


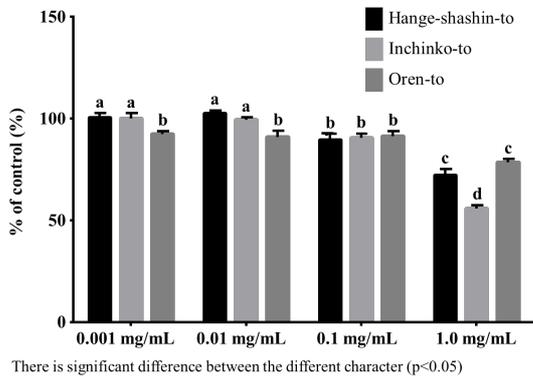
図1. Hsp-GのROS消去活性 (*p<0.05)

また、すべての漢方薬も各ROSに対する消去活性を示した。とくに、ヒドロキシルラジカルに対しては1.0 mg/mLに

において、茵陳蒿湯が黄連湯と比較し優位な消去活性の増加が認められた(図2)。加えて、スーパーオキシドに対して茵陳蒿湯は1.0 mg/mLで最も高い消去活性を示した。しかしながら、0.001 mg/mLおよび0.01 mg/mLの低濃度領域では黄連湯が最も高い消去活性を示した(図3)。



There is significant difference between the different character ($p < 0.05$)
 図2. ヒドロキシルラジカルに対する消去活性



There is significant difference between the different character ($p < 0.05$)
 図3. スーパーオキシドに対する消去活性

(2) *In vivo* における Hsp-G の口内炎に対する効果の検討: 5-FU を投与する 5 前より Hsp-G を自由摂取させた結果, コントロールと比較し, 実験開始 3, 4, 7, 9, 11 日目にて優位な口内炎面積の低下が認められた。しかしながら, 口内炎が完全に回復するまでの期間には有意差は認められなかった(図4)。

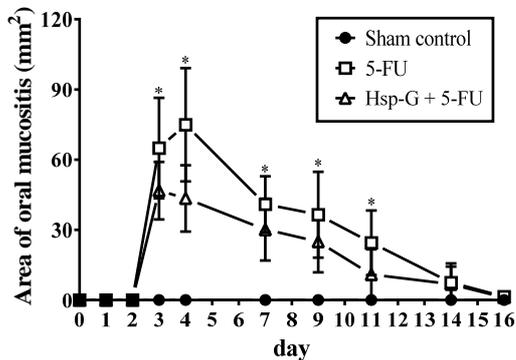


図4. Hsp-G の口内炎に対する効果

(3) *In vivo* における漢方薬の口内炎に対する効果の検討: 5-FU を投与する 5 前より半夏瀉心湯, 茵陳蒿湯および黄連湯を 10 mg/mL で調整し自由摂取させた結果, コントロールと比較し, 実験開始 3, 4 日目にて優位な口内炎面積の低下が認められた(図4)。しかしながら, 口内炎が完全に回復するまでの期間には有意差は認められなかったが, 茵陳蒿湯が他の漢方薬と比較し, わずかに早く回復する傾向が認められた。

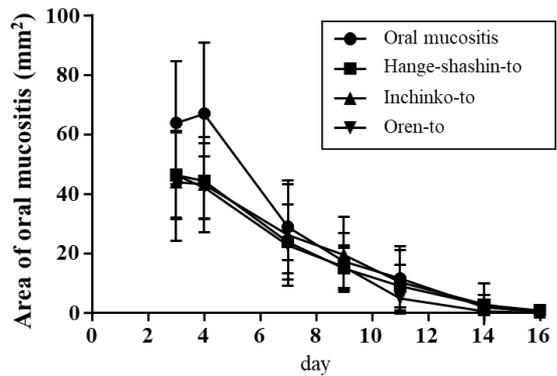


図4. 漢方薬の口内炎に対する効果

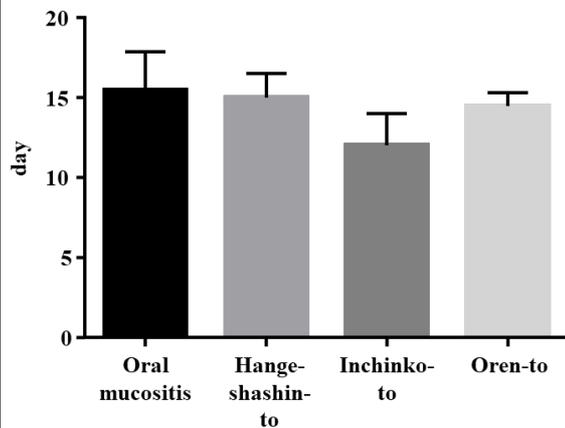


図5. 回復までの日数

Hsp-G のがん化学療法における前投与は 5-FU の抗癌作用に影響を与えず, 副作用として生じる口内炎の増悪を低下させた。これらの結果は, 臨床における 5-FU が及ぼす患者への不利益を軽減する可能性を示している。しかしながら, 今後の課題として抗酸化剤としての Hsp-G の臨床へのフィードバックのための更なるエビデンスの構築が必要である。また, 口内炎に対する効能が表記されている漢方薬だが, 今回の検討ではその全てが口内炎の抑制を有意に抑制してきた。しかしながら, ROS に対する消去作用は *in vitro* では有意差が認められるものの *in vivo* における検討では漢方薬の違いにより抑制に有意差を認めなかった。これまでの我々の報告では, 5-FU に誘導される口内炎の局所では, 多量の抗酸化物質が消費されるため, 経口摂取などの方法で抗酸化物質を摂取するのが望ま

しいことを示してきた。しかしながら，今回のような比較的水溶性が高い抗酸化物質の場合，炎症組織外液における炎症性の ROS を抑制するが，細胞内には分布し難いことが推察されるため，脂溶性抗酸化物質を併用するなど，臨床応用へ向けてさらなるエビデンスの構築が必要であるかもしれない。

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) Yoshida A, Sasaki H, Toyama T, Araki M, Fujioka F, Tsukiyama K, Hamada N, Yoshino F: Antimicrobial effect of blue light using *Porphyromonas gingivalis* pigment. *Scientific Reports*, 7 (5225), 1-9, 2017. DOI:10.1038/s41598-017-05706-1
- (2) Ibi H, Hayashi M, Yoshino F, Tamura M, Yoshida A, Kobayashi Y, Shimizu K, Lee M-C, Imai K, Ogiso B: Bactericidal effect of hydroxyl radicals generated by the sonolysis and photolysis of hydrogen peroxide for endodontic applications. *Microbial Pathogenesis*, 103, 65-70, 2017. doi:10.1016/j.micpath.2016.12.010
- (3) Shirai R, Miura T, Yoshida A, Yoshino F, Ito T, Yoshinari M, Yajima Y: Antimicrobial effect of titanium dioxide after ultraviolet irradiation against periodontal pathogen. *Dental Materials Journal*, 35 (3), 511-516, 2016. doi:10.4012/dmj.2015-406
- (4) Tanaka Y, Toyama T, Wada-Takahashi S, Sasaki H, Miyamoto C, Maehata Y, Yoshino F, Yoshida A, Takahashi S-S, 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. *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition*, 58 (1), 69-75, 2016. doi:10.3164/jcfn.15-69
- (5) 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 S-S: *Porphyromonas gingivalis* infection modifies oral microcirculation and aortic vascular function in the stroke-prone spontaneously hypertensive rat (SHRSP). *Microbial Pathogenesis*, 92, 36-42, 2016. doi:10.1016/j.micpath.2015.12.009
- (6) Yoshino F, Yoshida A, Toyama T, Wada-Takahashi S, Takahashi S-S: α -glucosyl hesperidin suppressed the exacerbation of 5-fluorouracil-induced oral mucositis in the hamster cheek pouch. *Journal of Functional Foods*, 21, 223-231, 2016. doi:10.1016/j.jff.2015.12.008

- (7) Tamaki N, Yoshino F, Fukui M, Hayashida H, Yoshida A, Kitamura M, Iwasaki T, Furugen R, Kawasaki K, Nakazato M, Maeda T, Koikeguchi S, Yamamoto T, Lee M-C, Ito H, Saito T: Relationship among salivary antioxidant activity, cytokines and periodontitis: the Nagasaki Island study. *Journal of Clinical Periodontology*, 42 (8), 711-718, 2015. doi:10.1111/jcpe.12438
- (8) Kobayashi K, Maehata Y, Okada Y, Kusubata M, Hattori S, Tanaka K, Miyamoto C, Yoshino F, Yoshida A, Tokutomi F, Wada-Takahashi S, Komatsu T, Otsuka T, Takahashi S-S, Lee M-C: Medical-grade collagen peptide in injectables provides antioxidant protection. *Pharmaceutical Development and Technology*, 20(2) : 219-226, 2015. doi:10.3109/10837450.2013.860547

〔学会発表〕(計 19 件)

- (1) Yoshida A, Yoshino F: The inhibition mechanism of gingival fibroblast proliferation by blue-light irradiation CED-IADR/NOF Oral Health Research Congress, Vienna, Austria, 2017.
- (2) Yoshino F, Yoshida A, Toyama T : The Effect of α -glucosyl hesperidin on oral mucositis induced by treatment of 5-fluorouracil with acetic acid. CED-IADR/NOF Oral Health Research Congress, Vienna, Austria, 2017.
- (3) 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: マウス実験的歯周病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.
- (4) 吉田彩佳，佐々木 悠，居作和人，小椋有香子，吉野文彦: *Porphyromonas gingivalis* に対する抗菌光線力学療法の基礎的検討 -神奈川歯科大学大学院大講座分野統合型基幹研究 1- 神奈川歯科大学学会 第 52 回総会，横須賀，2017.
- (5) 平野頼是，林 誠，田村宗明，吉野文彦，吉田彩佳，小林慶美，井比陽奈，増淵光暁，小木曾文内: 大気利用プラズマ発生装置を応用した新たな根管消毒法の基礎的検討. 第 18 回日本口腔機能水学会学術大会，千代田区，2017.
- (6) 井比陽奈，林 誠，吉野文彦，田村宗明，吉田彩佳，平野頼是，小林慶美，今井健一，小木曾文内: 超音波分解と光分解によって過酸化水素から生成されるヒドロキシラジカルによる歯内療法条件下における殺菌効果. 第 18 回日本口腔機能水学会学術大会，千代田区，2017.
- (7) 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. 神奈川歯科大学学会 第 51 回総会, 横須賀市, 2016.
- (8) 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. 神奈川歯科大学学会 第 51 回総会, 横須賀市, 2016.
- (9) 遠山歳三, 古屋田泰徳, 藤岡 隼, 佐々木悠, 吉野文彦, 吉田彩佳, 渡辺清子, 佐久間隆章, 今井貴之, 小野善弘, 築山光一, 浜田信城: 赤外自由電子レーザーの口腔細菌に対する殺菌効果の検討. 神奈川歯科大学学会 第 51 回総会, 横須賀市, 2016.
- (10) 平野頼是, 林 誠, 田村宗明, 吉野文彦, 吉田彩佳, 小林慶美, 井比陽奈, 増淵光暁, 小木曾文内: 新規根管消毒法に関する基礎的研究-大気を利用したプラズマ発生装置を使用した根管消毒法の検討-日本日本歯科保存 2016 年度春季学術大会(第 144 回), 宇都宮, 2016.
- (11) Toyama T, Fujioka J, Koyata Y, Sakuma T, Watanabe K, Sasaki H, Yoshino F, Yoshida A, Tsukiyama K, Hamada N: Antibacterial Activity of Infrared Free Electron Laser on Cariogenic Bacteria 95th General session & Exhibition of the IADR, 46th Annual meeting of the AADR and 41th Annual meeting of the CADR San Francisco, CA, USA, 2017.
- (12) Toyama T, Koyata Y, Watanabe K, Yoshino F, Hamada N, Fujioka J, Imai T, Tsukiyama K, Sakuma T, Ono Y: Bactericidal effects of an infrared free-electron laser. American Academy of Periodontology 102nd Annual Meeting, San Diego, CA, USA, 2016.
- (13) Yoshida A, Yoshino F: Study of Blue-light Effect on rat palatal gingiva. 45th Annual meeting of the AADR, Los Angeles, CA, USA. 2016.
- (14) Ibi H, Hayashi, Yoshino F, Yoshida A, Kobayashi Y, Tamura M, Ochiai K, Ogiso B, Lee M: Disinfection for Endodontic Treatment by Ultrasound/LED Activation of H₂O₂. 45th Annual meeting of the AADR, Los Angeles, CA, USA.
- (15) Maehata Y, Miyamoto C, Yoshino F, Ozawa S, Takahashi S-S, Wada-Takahashi S, Yoshida A, Izukuri K, Hata R, Tsukinoki K: Scavenger of reactive oxygen species is effective for the inhibition of angiogenesis and tumor proliferation in human head and neck squamous cell carcinoma cells by regulation gene expression of chemokines. The 13th Asia Pacific Federation of Pharmacologist (APFP) Meeting, Bangkok, Taiwan, 2016.
- (16) 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, 2015.
- (17) 一瀬昭太, 小松知子, 岩崎克夫, 小野弓絵, 水村宗護, 吉野文彦, 吉田彩佳, 宮城 敦, 李 昌一: 嚥下体操がヒト唾液抗酸化能に及ぼす影響 第 148 回 神奈川歯科大学学会例会, 横須賀, 2015.
- (18) 井比陽奈, 林 誠, 吉野文彦, 田村宗明, 吉田彩佳, 李 昌一, 平野頼是, 小林慶美, 落合邦康, 小木曾文内: 新たな根管清掃・消毒法に関する基礎的研究 - 超音波と LED の照射が過酸化水素水の活性酸素種生成に及ぼす影響. 第 142 回 日本歯科保存学会 2015 年度春季学術大会, 北九州市, 2015.
- (19) 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.

〔その他〕

ホームページ等

- (1) 神奈川歯科大学大学院歯学研究科口腔科学講座光歯科医学分野
<http://www.labs.kdu.ac.jp/pmd/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉野 文彦 (FUMIHIKO YOSHINO)
 神奈川歯科大学大学院歯学研究科口腔科学講座光歯科医学分野・准教授
 研究者番号: 20308307