ハムスター歯周炎モデルにおける加味清胃散（漢方） の歯槽骨吸収抑制効果

篠原 啓之 石田 浩 小笠原 都
白石 良文 清水 保樹 大谷 理己
西川 聖二 小野 恒子*
三宅 洋一郎* 永田 俊彦

徳島大学歯学部歯科保存学第二講座

（主任：永田俊彦教授）

*徳島大学歯学部口腔細菌学講座

（主任：三宅洋一郎教授）

（平成7年11月10日受付）

Inhibitory Effect of Kamiseii-san (Kampo) on Alveolar Bone Resorption Associated with Experimental Periodontitis in Hamsters

Hiroyuki Shinohara, Hiroshi Ishida, Miyako Ogasawara,
Yoshifumi Shiraishi, Yasuki Shimizu, Masami Ohtani,
Seiji Nishikawa, Tsuneko Ono*,
Yoichiro Miyake* and Toshihiko Nagata

Department of Periodontology and Endodontology
(Chief : Prof. Toshihiko Nagata)

*Department of Microbiology

(Chief : Prof. Yoichiro Miyake)

Tokushima University School of Dentistry
3-18-15 Kuramoto-cho, Tokushima 770, Japan

Kamiseii-san (kampo) has been known to be effective for periodontal disease from ancient times. This study was performed to investigate the effect of kampo on the alveolar bone resorption associated with experimental periodontitis induced with *Actinomyces viscosus* ATCC 15987 in hamsters. The amount of the bone resorption in the experimental animals was about half that in the controls. Kamiseii-san did not display any effect on the

growth of the bacteria either *in vivo* or *in vitro*. These findings suggest that this agent had an inhibitory effect on alveolar bone resorption without affecting the bacteria, and supports the traditional story. While the mechanism of the inhibition still remains unclear, it seems that some indirect action of Kamiseii-san may on alveolar bone metabolism result in inhibition.

Key words : Kampo, Alveolar bone resorption, Periodontitis, Hamster

要旨：漢方的一种である加味清胃散（漢方）は昔から歯周炎に有効であると言われている。今回、ハムスターに *Actinomyces viscosus* ATCC 15987 (Av) を感染させ、歯槽骨吸収を伴う実験的歯周炎を惹起させたモデルを用いて、加味清胃散がこの歯槽骨吸収に対してどのような効果があるかについて検討した。その結果、加味清

胃散投与群では、本剤を投与しない対照群の歯槽骨吸収量の約 1/2 であり著明に吸収抑制効果が認められた。しかしながら、本剤は、*in vivo* および *in vitro* のいずれの実験条件でも、Av 菌に対して静菌あるいは殺菌作用を示さなかった。以上の結果は、古来から伝えられている本剤の歯周炎に対する有効性を支持するものであるが、本実験モデルにおいて、その作用機序は細菌に対する直接的効果でなく、それ以外の機序により歯槽骨代謝に影響を与え吸収抑制が起こったものと考えられる。

索引用語：漢方，歯槽骨吸収，歯周炎，ハムスター

緒 言

歯周組織の炎症の緩解を目的として、テトラサイクリンなどの抗生物質¹⁾，フルルビプロフェンなどの抗炎症剤²⁾，塩化リゾチームなどの酵素製剤³⁾といった合成化学薬剤を全身投与する方法は，歯周疾患に対する化学療法として現在も頻用されている。

漢方薬は，植物より抽出された生薬であり，その組成および作用機序は必ずしも明らかではないが，2 千年以上の長い臨床使用を経て，種々の疾患に対しての薬効が経験的に証明されてきたものが多い。これら漢方薬のなかには，疾患に対する投与効果が動物実験および臨床的に証明された薬剤が多数あり，現在までに数多くの疾患が漢方薬の使用対象となっている。

加味清胃散は黄連，石膏，当帰，地黄，牡丹皮，升麻，麻黄，防風，荊芥の 9 種の生薬を構成成分とする漢方薬である。この中の黄連，当帰，牡丹皮，升麻，麻黄，防風，荊芥の抽出エキスには抗炎症作用があり⁴⁻⁹⁾，古来から歯肉炎や歯周炎に有効であると伝えられてきた。しかしながら，この効能を科学的に立証した報告は現在まで見当たらない。今回著者らは，*Actinomyces viscosus* ATCC 15987 (Av) を感染させ歯槽骨吸収を伴う歯周炎を惹起させたハムスターの実験モデルを用いて，加味清胃散の歯周炎に対する効果について歯槽骨の吸収度を指標として検索するとともに，Av 菌の発育に及ぼす加味清胃散の影響についても調べることにより，本剤の歯周疾患に対する有用性について検討した。

材料および方法

1. 動物および飼料

図 1 に示すように，4 週齢雄性シリアンハムスター（ゴールデンハムスター）15 匹を用い，5 匹ずつ A，B，および C 群の 3 群に分け各群ごとにワイヤーゲージで飼育した。22°C の飼育室で 1 週間粉末飼料 CE-2（日本クレア，東京）を与えて飼育したが，後半 3 日間はあらかじめ口腔常在細菌叢を抑制する目的で，4,000 U/ml ペニシリン G カリウム含有の飲料水を投

与した。3 群のハムスターは，A 群：無処置群すなわち非感染対照群，B 群：実験的歯周炎群すなわち Av 菌感染対照群，および C 群：実験群すなわち B 群の飼料に 0.56% の加味清胃散を添加し投与した群とし，以後 8 週間それぞれの条件下で飼育した。加味清胃散は（株）ツムラ（東京）より供与を受け，その濃度（0.56%）は，体重あたりのヒト投与量と新薬開発の際の基準量を参考にして決定した。なお，飼料は 5 週齢目までは普通飼料である CE-2 を用い，Av 菌感染後から実験終了までの 8 週間はブラークが付着しやすい Diet-2050（28% ショ糖，28% 澱粉含有粉末飼料；日本クレア）で飼育した。

2. 実験的歯周炎モデル

Av 菌の投与によるハムスターの実験的歯周炎の惹起は Kametaka ら¹⁰⁾の方法に準じて行った。すなわち，*Actinomyces viscosus* ATCC 15987 (Av) を Brain Heart Infusion (BHI) 培地 (DIFCO Laboratories, Detroit, USA) にて 37°C で培養し，24 時間後の対数増殖期にある菌を回収し，PBS（－）で約 10¹⁰ CFU/ml になるように菌を調製した。この Av 菌調製液 100 μ l を 5 週齢目より 5 日間，B 群および C 群のハムスターの口腔内に滴下接種し歯周炎を惹起させた。

3. 歯槽骨吸収量の評価

感染後 8 週目に各群のハムスターの下顎骨を摘出した。各下顎骨の軟組織を除去後，Lillie 液（10% ホルマリン，pH 7.0）に 3 日間浸透し固定した。臼歯部歯槽骨の吸収量を評価するために，各下顎骨の舌側面のスライド写真撮影を行った。撮影に際し，咬合平面方向から 20 cm 離れた位置にカメラを設定することによって規格写真を得た。引き続きこのスライド写真を 40 倍拡大スクリーン上に投影し，歯槽骨吸収量を評価するためにセメントエナメル境から歯槽骨骨頂までの距離を計測した。計測部位は各下顎骨の第一臼歯 (M₁) の近心根中央部 (I) と遠心根中央部 (II) および第二臼歯 (M₂) の近心根中央部 (III) と遠心根中央部 (IV) の 4 点とした。

4. 細菌学的試験

加味清胃散の Av 菌に対する抗菌作用の有無を調べるため，Av 菌感染後 8 週目（13 週齢）に B および C

図1 実験スケジュール

群より3匹ずつのハムスターを無作為抽出し、それぞれの下顎右側第一臼歯舌側歯頸部に蓄積したプラークを採取した。次に、採取したプラークを1ml滅菌PBS(-)中に溶解させた後、これをZylber & Jordan¹¹⁾の方法に従って作製したAv菌の選択培地であるCFAT寒天培地にまき、5% CO₂下で3日間培養後コロニー数を測定した。

さらに、*in vitro*における加味清胃散のAv菌発育に及ぼす効果についても調べた。すなわち、96穴プレートを用いてこれに加味清胃散をBHI液で0, 5, 50および500 μg/ml(最大溶解濃度)に調製した培地にAv菌を接種し、37°C, 5% CO₂下で13時間(対数増殖期)から最大18時間(静止期)まで培養した。培養13, 15, 17, 18時間後に分光光度計で培地の吸光度を測定してこれを増殖度の指標とし、各濃度の加味清胃散添加群と非添加群とを比較することにより、加味清胃散のAv菌発育に及ぼす効果を調べた。

5. 統計学的評価

各群間の歯槽骨吸収量、ハムスターのプラーク中の細菌数、および*in vitro*における吸光度の統計学的評価はT検定により判定した。

結 果

1. 加味清胃散投与による歯槽骨吸収量への影響

図2は投与後8週目における各群の歯槽骨の状態を実際の写真で示したものである。B群の実験的歯周炎群ではA群の無処置群に比べ臼歯部歯槽骨の吸収が認められ、とくに、第一臼歯近心根で著明であった。しかしながら、C群の加味清胃散を摂取させた群におい

てはAv菌が接種されているにもかかわらず、B群に比べ歯槽骨吸収が軽度であることがわかる。

各群5匹のハムスター下顎骨(左右併せて10個の歯槽骨)における第一および第二臼歯のセメントエナメル境から歯槽骨頂までの長さを4ヵ所に分けて計測し統計分析したものが図3である。A群のI, II, IIIおよびIVでの平均値と標準誤差値はそれぞれ、 0.46 ± 0.03 , 0.32 ± 0.02 , 0.23 ± 0.01 および 0.25 ± 0.02 mmであるのに対し、B群ではそれぞれ、 1.10 ± 0.07 , 0.75 ± 0.03 , 0.51 ± 0.02 および 0.46 ± 0.03 mmと4点ともにA群に比べ有意に高値を示し、これによってAv菌感染により実験的歯槽骨吸収が惹起されていたことが確認された。一方、Av菌を感染させ加味清胃散を摂取させたC群では、歯槽骨に高さはそれぞれ 0.82 ± 0.09 , 0.56 ± 0.04 , 0.37 ± 0.03 および 0.33 ± 0.04 mmとB群の計測点の値に対して、有意の減少が認められた。これらの値からA群の値を基準値として、C群のB群に対する抑制率を求めると、それぞれ(I)43.9, (II)42.9, (III)50.4, (IV)61.2%であり、C群はB群に対し歯槽骨頂の高さの減少が平均50%であることが明らかとなった。すなわち、加味清胃散はAv菌感染による歯槽骨吸収を約50%抑制したことになる。

2. 加味清胃散によるAv菌増殖への影響

各群5匹のハムスターより任意に3匹選び、プラーク中の細菌をAv菌の選択培地であるCFAT培地に接種した。図4は各培地で発育したコロニー数測定し、これを採取したプラーク中の蛋白量当たりの数で換算したものである。非感染群であるA群におけるコロニー数は、10 CFU/mg蛋白以下であった。一方、

図 2 下顎骨舌側面の歯槽骨吸収像の 1 例
A：非感染対照群 B：感染対照群 C：実験群
第一臼歯近心側の歯槽骨レベルを矢印で示した。

感染群である B 群および C 群でのコロニー数の平均値と標準誤差値はそれぞれ 2120 ± 23 , 2860 ± 40 CFU/mg 蛋白と非常に高い数値を示した。しかしながら、B 群と C 群のコロニー数に差は認められず、C 群すなわち加味清胃散投与群ではプラーク中の Av 菌数は B 群すなわち感染対照群と同様であることが明らかとなった。

図 5 は、*in vitro* における加味清胃散の Av 菌増殖に及ぼす影響を濃度 (5, 50, 500 $\mu\text{g/ml}$) 別に、また対数増殖期 (13 および 15 時間後) と静止期 (17 および 18 時間後) の各時期において調べたものである。いずれの濃度を培地に添加した場合でも対照群と比較して吸光度に差は認められず、このことは、加味清胃

図 3 下顎骨舌側面の歯槽骨レベル
各群 5 匹のハムスターの左右下顎骨の第一及び第二臼歯の近心及び遠心根中央部におけるセメントーエナメル境から歯槽骨頂までを測定した。(各群 10 例の平均値 $\pm$ 標準誤差値)

I：第一臼歯近心根 II：第一臼歯遠心根
III：第二臼歯近心根 IV：第二臼歯遠心根

*：A 群に対して有意差あり ($p < 0.0001$)

**：B 群に対して有意差あり ($p < 0.001$)

図 4 プラーク中の Av 菌数

Av 菌感染 8 週目に各群 3 匹のハムスターの下顎第一臼歯よりプラークを採集し Av 菌の選択培地である CFAT 培地で 3 日間培養し、そのコロニー数をプラーク中の蛋白質質量当たりで表した。(3 例の平均値 $\pm$ 標準誤差値)

A：非感染対照群 B：感染対照群

C：実験群

図5 加味清胃散によるAv菌増殖への影響

0, 5, 50, 500 µg/mlの加味清胃散存在下でAv菌を培養し、対数増殖期から静止期まで培地の吸光度を測定した。(4例の平均値±標準誤差値)

●: 0 µg/ml ○: 5 µg/ml □: 50 µg/ml △: 500 µg/ml

散を培地に添加してもAv菌数に有為な増減は生じなかったことを示している。

考 察

現在、歯周炎の治療薬として全身および局所的に、抗生物質や抗炎症剤が広く応用されているが、自然の生薬を構成成分とし歴史的に古くから用いられている漢方薬は、これら抗生物質や抗炎症剤と比べ薬物耐性や副作用がないことから、もし歯周疾患に効能があるとすればその臨床的意義は高いと考えられる。現在まで漢方薬の歯周治療への試みとして、Hidakaら^{12,13)}によって四逆散と四君子湯のエキスからなる漢方製剤に歯石形成抑制効果があること、元村ら¹⁴⁾によって金銀花および連翹からなる生薬が歯周ポケットへの局所投与で有用性があることなどが報告されている。

今回著者らが用いた加味清胃散は、その構成生薬の多くに抗炎症作用があることが知られており、古くから歯肉炎、歯周炎に効くと伝えられている。本研究は、ハムスターの実験的歯周炎モデルを用いて加味清胃散が歯槽骨吸収に対してどのような影響を与えるかを検討したものである。その結果、Av菌感染と同時に加味清胃散を0.56%含有した食物を8週間摂取させたハムスターでは、歯槽骨吸収が約1/2まで抑制された。この抑制は、加味清胃散が実際に歯槽骨代謝に

影響を与えて骨吸収量の低下を招いたか、あるいは本薬剤が直接Av菌に静菌的に作用した結果によるものであることが考えられる。事実、加味清胃散は混合生薬であり、その構成成分の黄連ペリペリンは黄色ブドウ球菌に対して、牡丹皮のペオノールは大腸菌や黄色ブドウ球菌に対してそれぞれ抗菌作用があることが報告されている^{15~17)}。しかし、Av菌を感染させたB群とC群においては加味清胃散の投与の有無にかかわらずプラーク中の細菌数には差がなかったことから、また、*in vitro*において高濃度の加味清胃散添加でもAv菌の増殖に対する影響は全く認められなかったことから、本実験で認められた加味清胃散による歯槽骨吸収抑制効果は、Av菌に対する加味清胃散の直接的な静菌作用によるものではなかったものと考えられる。従って、加味清胃散の作用はAv菌に対する直接的效果でなく、それ以外の機序により歯槽骨代謝に影響を与え吸収抑制が起こった可能性がある。漢方薬の骨に対する作用は明らかではないが、実際の臨床では骨粗鬆症に対する漢方薬の効果が報告されており、桂枝茯苓丸、当帰芍薬散、八味地黄丸などが適用されている¹⁸⁾。これらはビタミンD₃製剤などと併用して投与されることが多く、併用による効果促進が認められている¹⁸⁾。しかしながら、骨粗鬆症の主たる治療薬はビタミンD₃製剤をはじめカルシトニン、フッ化ナトリウム、エストロゲンなどであり¹⁹⁾、漢方薬はあくまで補助的薬剤として用いられているのが現状で、その作用機序や効果については明確にされていない。

本研究においても、加味清胃散が歯槽骨に対してどのように作用したかは明らかではない。現在、歯周炎の進行に伴い歯槽骨吸収を促進する因子として、炎症性サイトカインであるインターロイキン1や腫瘍壊死因子α、またコラゲナーゼやプロスタグランジンE₂などが挙げられている^{20~23)}。加味清胃散の構成生薬中の牡丹皮のペオノールおよび防風のファルカインジオールにはシクロオキシゲナーゼを阻害しプロスタグランジン類の産生を抑制し^{6,24)}、麻黄エキスにはプロスタグランジンE₂を特異的に阻害する作用がある²⁵⁾ことが報告されている。これらの仲介物質に対して加味清胃散が関与した可能性は十分に考えられるが、その詳細に関してはさらなる解明が必要である。いずれにせよ、本研究において加味清胃散が歯槽骨の吸収を抑制したという結果は、将来、加味清胃散が歯周疾患の治療薬になりうる可能性を示したものと評価できる。

文 献

- 1) Novak, M.J., Polson, A.M. and Adair, S.M. : Tetracycline therapy in patients with early juvenile periodontitis. J. Periodontol., 59 : 366-372, 1988.
- 2) Williams, R.C., Jeffcoat, M.K., Howell, T.H., Rolla, A., Stubbs, D., Teoh, K.W., Reddy, M.S. and Goldhaber, P. : Altering the progression of human alveolar bone loss with the non-steroidal anti-inflammatory drug flurbiprofen. J. Periodontol., 60 : 485-490, 1989.
- 3) 恵比須繁之, 岡田 宏, 今井久夫, 山岡 昭, 宮下元, 長谷川紘司, 泉澤勝憲, 小田 茂, 北村 滋, 木下四郎, 三宮慶邦, 河西一秀 : 歯周疾患に対するレフトーゼ 30 mg 錠の臨床効果. 日歯周誌, 25 : 242-253, 1983.
- 4) 藤村 一, 沢田徳之助, 後藤 実 : 生薬ならびに植物成分の抗炎症スクリーニング. 薬学雑誌, 90 : 782-783, 1970.
- 5) 長 紹元, 高橋 誠, 戸井田貞子, 丁 宗鉄 : 生薬によるアジュバンド関節炎の抑制 (第1報). 生薬学雑誌, 36 : 78-81, 1982.
- 6) 平井愛山, 田村 泰, 古田 尚 : 牡丹皮とプロスタグランジン代謝, 現代東洋医学, 5 : 62-68, 1984.
- 7) 柴田 丸, 山竹美和, 天谷幸子, 福島正子 : 生薬「升麻」の薬理学的研究 (第1報) 北升麻の急性毒性と抗炎症作用. 薬学雑誌, 95 : 539-546, 1975.
- 8) Hikino, H., Konno, C., Takata, H. and Tamada, M. : Antiinflammatory principle of *ephedra herbs*. Chem. Pharm. Bull., 28 : 2900-2904, 1980.
- 9) 山原條二, 松田久司, 渡辺温子, 沢田徳之助, 藤村一 : 生薬の生物活性成分に関する研究 ケイガイの鎮痛および抗炎症作用. 薬学雑誌, 100 : 713-717, 1980.
- 10) Kametaka, S., Miyazaki, T., Inoue, Y., Hayashi, S., Takamori, A., Miyake, Y. and Suganaka, H. : The effect of ofloxacin on experimental periodontitis in hamsters infected with *actinomyces viscosus* ATCC 15987. J. Periodontol., 60 : 285-291, 1989.
- 11) Zylber, L. and Jordan, H. : Development of a selective medium for detection and enumeration of *actinomyces viscosus* and *actinomyces naeslundii* in dental plaque. J. Clin. Microbiol., 15 : 253-259, 1982.
- 12) Hidaka, S., Abe, K. and Liu, S.Y. : A new method for the study of the formation and transformation of calcium phosphate precipitates : effects of several chemical agents and Chinese folk medicines. Arch. Oral Biol. 36 : 49-54, 1991.
- 13) Hidaka, S., Abe, K. and Liu, S.Y. : *In vitro* and *in vivo* evaluations of Chinese traditional (Kampo) medicines as anticalculus agents in the rat. Arch. Oral Biol. 38 : 327-335, 1993.
- 14) 元村洋一, 宮田 隆, 荒木久生, 申 基喆, 杉本博宣, 花澤重正, 北野繁雄, 池田克己 : 生薬の歯周ポケット改善効果に及ぼす影響 (第一報). 日歯周誌 36 : 474-479, 1994.
- 15) 近藤嘉和, 牛嶋峰子 : 数種の Berberinium 塩の腸内常在菌に対する抗菌作用. 生薬学雑誌, 40 : 159-163, 1986.
- 16) Amin, A.H., Subbaiah, T.V. and Abbasi, K.M. : Berberine sulfate : antimicrobial activity, bioassay, and mode of action. Candian J. Microbiol., 15 : 1067-1076, 1969.
- 17) 太田達男, 三橋 進, 佐伯慶隆, 若林清重 : 牡丹皮の主成分ペオノールの虫垂炎起炎菌に対する抗菌作用. 生薬学雑誌, 14 : 100-101, 1960.
- 18) 水野正彦, 太田博明, 神谷直樹, 小山嵩夫, 中村哲郎 : 高齢者疾患の治療 (10) 骨粗鬆症. 漢方医学, 14 : 367-377, 1990.
- 19) 折茂 肇 : 図でみる骨粗鬆症, 第1版, メジカルビュー社, 東京, 1989, 35-41.
- 20) Masada, M.P., Persson, R., Kenney, J.S., Lee, S.W., Page, R.C. and Allison, A.C. : Measurement of interleukin-1 alpha and -1 beta in gingival crevicular fluid : implications for the pathogenesis of periodontal disease. J. Periodontal Res., 25 : 156-163, 1990.
- 21) Yavuzilmaz, E., Yamalik, N., Bulut, S., Ozen, S., Ersoy, F. and Saatci, U. : The gingival crevicular fluid interleukin-1 beta and tumour necrosis factor-alpha levels in patients with rapidly progressive periodontitis. Aust. Dent. J., 40 : 46-49, 1995.
- 22) Fine, D.H. and Mandel, I.D. : Indicators of periodontal disease activity : an evaluation. J. Clin. Periodontol., 13 : 533-546, 1986.
- 23) Offenbacher, S., Odle, B.M. and Van Dyke, T.E. : The use of crevicular fluid prostaglandin E₂ levels as a predictor of periodontal attachment loss. J. Periodontal Res., 21 : 101-112, 1986.
- 24) Baba, K., Tabata, Y., Kozawa, M., Kimura, Y. and Arichi, S. : Studies on chinese traditional medicine "Fang - Feng" (I) Structures and pysical activities of polyacetylene compounds from *Saposhnikovia radix*. Shoyakugaku Zasshi, 41 : 189-194, 1987.
- 25) 三川 潮 : 生薬成分の酵素阻害作用. ファルマシア, 17 : 387-391, 1981.