黄連を用いた歯周病に対する局所療法の有効性

大塚 秀 春

明海大学歯学部歯周病学講座

(2000年4月1日受理)

Usefulness of Crevicular *Coptidis Rhizoma* Therapy for Periodontal Disease

Hideharu Otsuka

Department of Periodontology, Meikai University School of Dentistry

Accepted for publication 1 April 2000

The aim of this study was to assess the usefulness of *Coptidis Rhizoma* (CR), which is a well-known anti-febrile crude drugs, as a crevicular therapeutic drug for periodontal disease. The anti-inflammatory effect of CR was evaluated in terms of the ability of the drug to inhibit superoxide production and to increase vascular permeability in the back of guinea pigs. In addition, a clinical trial of the application of this drug to the periodontal pockets of 10 patients with adult periodontitis (AP) was performed. Gingival index (GI) and bleeding on probing (BOP) were recorded at the start of treatment (baseline) and at days 1, 7 and 14 after the baseline. The total volume of gingival crevicular fluid (GCF) and the amounts of inflammatory cytokines (interleukin (IL)-1 α and IL-1 β) in the GCF were also measured. CR inhibited superoxide production in a dose-dependent manner, and a significant difference ($p < 0.001$) was found between control and CR (3 mg/ml) treated group. The drug accelerated vascular permeability partly through histamine release, but its effect was diminished within 3 hours. GI and BOP remained lower at all times examined than those at baseline ($p < 0.005$). The GCF volume was significantly lower than the baseline value until 7 days ($p < 0.01$). The GCF IL-1 α level was also significantly lower than the baseline value at all time points ($p < 0.01$), whereas that of GCF IL-1 β was significantly lower only at 14 days ($p < 0.01$). These results suggest that *Coptidis Rhizoma* is a useful drug to inhibit inflammatory response in periodontal tissues, acting partly by inhibiting production of superoxide and IL-1. J. Jpn Soc. Periodontol., 42 : 82~91, 2000.

Key words : periodontal disease, *Coptidis Rhizoma*, anti-inflammatory effect, superoxide production, interleukin-1

要旨 : 本研究は、強い消炎（清熱）解毒作用を有する生薬、黄連の歯周病に対する局所薬物療法剤としての有用性を評価することを目的とした。黄連の抗炎症能は、活性酸素消去能および血管透過性試験から評価した。さらに、黄連の抗炎症能を臨床的に評価する目的で、10名の成人性歯周炎患者の歯周ポケットに黄連を局所投与した。評価項目は、投与直前、投与1日、7日および14日後における歯周炎の臨床指標（gingival index : GI, bleeding on probing : BOP）、gingival crevicular fluid volume : GCF量）およびGCF中のInterleukin-1 (IL-1) α および IL-1 β 量の変動様態である。その結果、黄連は強い活性酸素消去能を有した。また、黄連は投与直後に一過性に血管透過性を亢進させたが、その作用は3時間以内に消失し、この機序にはヒスタミン遊離の影響が示唆された。臨床評価において、黄連は、GI および BOP を投与後14日目まで有意に低下させ ($p < 0.005$)、GCF量を7日目まで有意に低下させた ($p < 0.01$)。また、黄連は、GCF中のIL-1 α 量を投与14日目まで有意に低下させ、IL-1 β 量を14日目後に有意に低下させた ($p < 0.01$)。これらの結果から、黄連は、活性酸素およびインターロイキン1産生を抑制することで、歯周組織の炎症反応を抑制する事が示唆された。

索引用語 : 歯周病、黄連、抗炎症効果、活性酸素、インターロイキン-1

緒 言

歯周治療の目的の1つは、歯根に付着した dental biofilm¹⁾ および細菌由来のエンドトキシンに汚染されたセメント質を機械的に除去することである。しかし、スケーリング、ルートプレーニング、歯周外科など、プラークを機械的に除去する方法は出血による菌血症を誘発するため、歯周炎の急性期や高齢者、免疫不全患者などの易感染性宿主に対して、しばしば薬物療法が適用されてきた。そのような歯周炎に対する薬物療法として、これまで、殺菌消毒薬²⁾ および抗生物質（テトラサイクリン系抗生剤³⁾、ニューキノロン系抗生剤⁴⁾）が応用されてきた。

歯周治療における薬物療法は、歯周ポケットが開放性であるため、局所に薬物の有効濃度を維持するために、全身投与および有効成分を徐放性に長時間作用させることを目的とした局所薬物配送療法（local drug delivery system：LDDS）が行われている⁵⁾。しかし、抗生剤の長期連用は、菌交代現象や MRSA に代表される耐性菌の出現や、さらにアレルギー反応の誘発など医療環境からの問題が多い。LDDS は、使用する薬物が微量で治療効果があることから、日常の臨床で頻用されている^{6,7)}。しかし、抗生剤の持つ本質的な問題が解決された訳ではない。

プラークを機械的に除去する治療が「歯周ポケットの細菌を量的に減少させる」のに対し、抗生物質を用いた薬物療法は「歯周ポケット病巣の細菌叢を変える」事を目的としている。しかし、細菌刺激を受けた宿主細胞から産生される炎症物質によって歯周組織が破壊される事を勘案すれば、歯周病の薬物療法には歯周ポケットの細菌叢を正常に戻す事に加え、歯周炎局所における種々の炎症メディエーター産生を抑制する事が望まれる。つまり、歯周炎の薬物療法には「炎症の制御」という概念を導入すべきであり、その様な観点に立った、歯周炎に対する薬物⁸⁾も注目されてきている。

抗炎症作用を有する薬物には、糖質コルチコイド、アスピリンおよびインドメタシンの他に、副作用が少なく、強い消炎（清熱）解毒作用を有する生薬が知られている。とりわけ、黄連は、強力な抗菌作用および抗炎症作用を併せ持つ植物由来の生薬である⁹⁾。黄連は、腸チフス菌、赤痢菌、淋菌、結核菌、レンサ球菌、大腸菌および真菌に対して広範なスペクトルで抗菌作用を示す¹⁰⁾。歯周病領域においても、元村ら¹¹⁾は、黄連が低濃度でも歯周病原性細菌である *Porphyromonas gingivalis* の発育を阻止すると報告して

いる。さらに、黄連は肉芽形成阻害効果を有する事から¹²⁾、黄連が抗菌および抗炎症作用を併せ持つ薬剤として、歯周炎の薬物療法に使用できるものと考えられる。

歯周炎の進行部位では、好中球由来の活性酸素の生成が組織破壊の重要な要素になる^{13,14)}。したがって、活性酸素の消去能は、抗炎症能を表す有用な指標である。さらに、薬物の抗炎症能は、血管透過性に及ぼす効果からも評価できる¹⁵⁾。しかし、これまでに開発された歯周炎の治療薬剤を活性酸素の消去能あるいは血管透過性に及ぼす効果から評価した研究はない。歯肉の血管透過性が亢進すると、歯肉溝滲出液（gingival crevicular fluid；GCF）量が増加する。GCF 量と歯周炎の炎症度が相関することから、GCF 量は、歯周組織の炎症状態を示す有用な指標と言える¹⁶⁾。とりわけ、GCF 中の interleukin-1（IL-1）量は、歯周炎の疾患活動度と相関するので、歯周組織破壊のリスクを表す有用なメディエーターと考えられている¹⁷⁾。

本研究は、黄連の歯周炎の局所薬物療法剤として応用するための基礎的研究を行ったものである。すなわち、黄連の抗炎症効果は、活性酸素消去能およびモルモットを用いた血管透過性試験から評価した。それらの結果を踏まえ、LDDS として黄連を歯周病患者の歯周ポケットに投与し、歯周炎をどのように抑制し得るかを、歯周炎の臨床指標である GI および GCF 量、および GCF 中の IL-1 α および IL-1 β 量の変動様態から検討した。

材料および方法

1. 生薬の調整

活性酸素生成阻害作用および血管透過性試験には、黄連（*Coptidis Rhizoma*；ツムラ、東京）と活性酸素生成抑制作用がある黄芩¹⁸⁾（*Scutellariae Radix*；ウチダ和漢薬、東京）、黄連の主成分である塩化ベルベリン（Sigma, U.S.A.）および黄芩の主成分であるバイカリン（和光純薬、大阪）を使用した。臨床試験には、黄連を使用した（Table 1）。黄連および黄芩はソックスレー抽出器（柴田科学、東京）を用いて、黄連および黄芩粗切それぞれ 10 g を純水 300 ml に入れ、97°C で 1 時間抽出して調整した。そして、それら抽出液を凍結乾燥したものを実験に使用した。日本薬局方に記された方法¹⁹⁾に準じて、High Performance Liquid Chromatography を用いて、黄連のベルベリン含有量および黄芩のバイカリン含有量をそれぞれ定量した。

2. 活性酸素の定量

活性酸素は、Nitrite-kit 法²⁰⁾を改変して測定した。反応溶液中の濃度は、終濃度とした。すなわち、リン酸緩衝液 (13 mM KH_2PO_4 , 7 mM $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$, 0.1 mM EDTA-2 Na, (pH 8.2)) に 1 mM hydroxylamine hydrochloride (和光純薬, 大阪) および 0.1 mg/ml hydroxylamine-*O*-sulfonic acid (Sigma, U.S.A.) を加えた反応溶液を、96 穴プレート (Falcon, U.S.A.) に入れた後、黄連あるいはベルベリンおよび 1×10^{-3} U/ml xanthine oxidase (オリエンタル酵母, 大阪) および H_2O を添加して、37°C で 30 分間震盪した。その後発色液 (20 ml N-(1-Naphtyl) enediamine dihydrochloride (Sigma, U.S.A.), 2 mM sulfanilic acid (和光純薬, 大阪), 16.7% acetic acid (和光純薬, 大阪) を 96 穴プレートに加え、室温で 30 分間静置した後、各ウェルの 550 nm における吸光度を測定した。本実験では、非特異的発色反応をゼロ補正するために、各群

の測定値 (Bn) から、 H_2O の代わりに 1,000 単位/ml の superoxide dismutase (SOD ; Sigma, U.S.A.) を添加した時の測定値 (A) を引いた値 (Bn-A) を測定値とした。

3. 血管透過性試験

動物実験は、明海大学歯学部動物実験ガイドラインに従って行った。

1) 実験動物

実験動物には、生後 5 週齢、体重 250~310 g の雄性 Hartley 系モルモット (東京実験動物) を用いた。各実験群 (group 1~6) ごとにモルモット 4 匹を用いた。

2) 血管透過性試験

血管透過性試験は、Udaka らの方法²¹⁾に従って行った。その概略を Table 2 に示す。まず、ペントバルビタール (ネンブタール (Abbott Laboratories, U.S.A.) 20 mg/kg を用い、腹腔内に麻酔注射を行った。group 1 から group 4 では、モルモット背部にそれぞれ 50 μl の黄連あるいはベルベリン (3~30 mg/ml) を皮内注射し、その直後あるいは 3 時間後に上腕静脈から 5% Evans blue (Sigma, U.S.A.) を 0.2 ml/kg 注射し、1 時間後に動物を安楽死させた。いずれの実験群でも、Evans blue が背部の毛細血管およびその周囲組織に浸潤した様子を Medical Nikkor (日本光学, 東京) を用いて 1/4 倍大で写真撮影した。撮影した 35 mm のポジフィルムは、8 ビットグレイスケールとしてコンピュータに入力し、NIH image (ver.1.62) ソフトを用いて、各スポットを 2 値化画

Table 1 Berberine content (w/w%) in CR dried treatment

	Lot. 16035421	J.P. standard
Berberine	8.4%	more than 4.2%
Water	5.7%	less than 9.0%
Mineral	1.8%	less than 4.0%
Acid insoluble mineral	0.09%	less than 1.0% (w/w%)

J.P. ; Japan Pharmacopoeia Lot. 16035421 ; Tumura

Table 2 Protocol of vascular permeability assay

Injection/Groupes	1	2	3	4	5	6
Saline	○	○	○	○	○	○
CR (3 mg/ml)	○		○			○
CR (10 mg/ml)	○		○			○
CR (30 mg/ml)	○		○			○
Berberine (3 mg/ml)		○		○		
Berberine (10 mg/ml)		○		○		
Berberine (30 mg/ml)		○		○		
CR (3 mg/ml) + SOD					○	
CR (10 mg/ml) + SOD					○	
CR (30 mg/ml) + SOD					○	
Evans blue	just after	just after	after 3 hours	after 3 hours	just after	just after
Pyrilamine pretreatment						○

CR : *Coptidis Rhizoma*

Pyrilamine : Pyrilamine maleate salt

SOD : Superoxide dismutase

Fig. 1 Experimental design used for evaluation of crevicular *Coptidis Rhizoma* therapy

像に変換した後、Evans blueで染色された皮膚の面積を定量し、血管透過性に及ぼす効果を評価した。group 5では、黄連とSOD 500単位を混合したものを皮内注射した直後にEvans blueを投与し、1時間後に動物を安楽死させた。group 6では、皮内注射の30分前に抗ヒスタミン剤である塩化ピリラミン酸塩 (Sigma, U.S.A.) 50 mg/mlを前投与しておき、黄連投与直後にEvans blueを投与して、1時間後に動物を安楽死させた。

4. 黄連を用いた臨床試験

1) 被験者および被験歯の選択

被験者は、明海大学歯学部附属明海大学病院の歯周病科外来患者のうち、全身疾患を有さず、過去6カ月以内に歯周治療を受けていない男性7名および女性3名の計10名 (平均年齢53.9歳、43~65歳)であった。被験歯には、Probing pocket depth (PPD) 5 mm以上の歯周ポケットを有する臼歯を選択した。なお、術前診査から、被験歯の最深PPD部位を特定しておき、実験期間中、gingival crevicular fluid (GCF) 採取およびBleeding on probing (BOP)の臨床指標の測定は、同一部位で繰り返し行った。また、歯周診査は、術者間の誤差を考慮して同一の術者が行った。なお、あらかじめ文書で試験内容を被験者に伝え、インフォームドコンセントを得てから本実験を行った。

2) 診査およびサンプリング

Fig. 1に臨床試験の概略を示す。薬剤は1回のみ投与した。なお黄連は、その凍結乾燥粉末を最終濃度が10 mg/mlになるようにグリセロール (和光純薬、大阪)に溶解して調整したものをルートキャナルシリンジ (ネオ製薬、東京)に填入して歯周ポケットに注入した。GCFの採取およびGCF量の測定は、薬剤投与の直前をbaselineとし、投与後1、7および14日後の計4回行った。歯周診査のうちGingival Index (GI)²²⁾およびBOPの判定は、baseline、7日後および14日後の合計3回行った。

3) GCFの採取および測定

GCFの採取は、Tsaiら²³⁾によるpaper strips法を用いた。すなわち、スリーウェーシリンジにより術野を乾燥し、被験歯をロールワッテで防湿し、縁上プラークを綿球で可及的に除去し、Perio-paper (PRO-FLOW™, U.S.A.)を歯周ポケット底部に触れるまで挿入し、30秒間放置後、取り出して、GCF量をPeriotron 6000 (Harco, U.S.A.)を用いて測定した。GCF量を測定後、Perio-paperは、セラムチューブに入れ、測定時まで-80°Cで保存した。なお、血液が混入したものは除いた。

4) GCF中のIL-1 α およびIL-1 β 量の測定

Perio-paperを入れたセラムチューブを室温に戻した後、200 ml PBSを加え、ボルテックスで10秒間攪拌して、Perio-paperを取り除き、その上清を実験に供した。IL-1 α およびIL-1 β 量は、Human IL-1 α およびIL-1 β 用enzyme-linked immunosorbent assay kit (Endogen, U.S.A.)を用いて測定した。

5. 統計処理

活性酸素消去能および血管透過性試験の結果の統計学的検定は、Student *t*-testにより行った。臨床試験における薬剤投与前後のGI、BOP陽性率、GCF量およびGCF中のIL-1 α および β 量の検定は、Wilcoxon's matched-paired signed-ranks testにより行った。

結 果

1. 黄連の活性酸素消去能

黄連の活性酸素消去能は、濃度依存性に増強し、その効果は、非添加と比較して、0.3 mg/ml以上の濃度で有意に高かった (Student *t*-test, $p < 0.001$) (Fig. 2)。また、黄連の50%消去量 (EC₅₀)は1.42 mg/mlであった。ベルベリンの活性酸素消去能も同様に濃度依存性に増強し、非添加群と比較して、0.84 mg/ml以上の濃度で有意に高かった (Student *t*-test, $p < 0.001$) (Fig. 3)。また、そのEC₅₀は0.68 mg/mlであった。黄連およびベルベリンのEC₅₀を比較した結果、ベルベリンの方が黄連より低い値を示した (Fig. 4)。

2. 黄連の血管透過性に及ぼす影響

モルモット背部に黄連あるいはベルベリンを皮内注射して、血管透過性を観察した結果 (Table 2, group 1, 2), 黄連は、ベルベリンに比較して血管透過性をより亢進した (Fig. 5)。しかし、皮内注射から3時間経過後にEvans blueを投与した群 (Table 2, group 3, 4)では、黄連が血管透過性に及ぼす効

Fig. 2 Superoxide scavenging activity of *Coptidis Rhizoma* extract.

* : $p < 0.001$, Student *t*-test

Fig. 4 Comparison of superoxide scavenging activity expressed as EC_{50} (mg/ml) among *Coptidis Rhizoma* extract and other 3 plant extracts.

CR : *Coptidis Rhizoma* SOD : Superoxide dismutase
Pyr : Pylamine maleate salt

Fig. 6 Effect of superoxide dismutase or pyrilamine maleate salt on *Coptidis Rhizoma* extract induced vascular permeability in the back of guinea pigs ($n = 4$).

Fig. 3 Superoxide scavenging activity of Berberine.

* : $p < 0.001$, Student *t*-test

Fig. 5 Effect of *Coptidis Rhizoma* extract or Berberine on vascular permeability in the back of guinea pigs ($n = 4$). *Coptidis Rhizoma* extract or Berberine was injected subcutaneously at back and Evans blue was injected from vein immediate or 3 hours later.

The vascular permeability was evaluated from the size of the area stained with the Evans blue.

果はベルベリンのそれと同等であった (Fig. 5)。

次に、黄連の活性酸素抑制作用およびヒスタミン遊離作用が、黄連が示した一過性の血管透過性亢進作用に関わるか否かを評価した。すなわち、黄連に SOD 500 単位を混和したものを投与した群 (Table 2, group 5) あるいは黄連を皮内注射する 30 分前に塩化ピリラミン酸塩を前投与した群 (Table 2, group 6) とで Evans blue で染色された皮膚面積を比較した。その結果、SOD 投与群および非投与群間で有意な差は見られなかった (Fig. 6)。一方、塩化ピリラミン酸塩前投与群では非投与群に比較して、30 mg/ml の

Fig. 7 The GI at (0) baseline, 7 and 14-days during CR therapy.

The mean (square) and standard deviations (bar) are shown (n=10).

*: $p < 0.005$, Wilcoxon's test (baseline versus 7-day, baseline versus 14-day)

Fig. 9 Decline of GCF volume during *Coptidis Rhizoma* therapy.

The GCF volume was measured at the 0 (baseline), 1, 7 and 14-day visits (n=10).

*: $p < 0.01$, Wilcoxon's test (baseline versus 1-day, baseline versus 7-day, baseline versus 14-day)

Fig. 8 Decline of bleeding on probing with at the 0 (baseline), 7-day and 14-day visits. Means (square) and standard deviations (bar) are shown (n=10).

*: $p < 0.05$, Wilcoxon's test (baseline versus 7-day, baseline versus 14-day)

Fig. 10 Decline of GCF IL-1 α concentration following crevicular *Coptidis Rhizoma* therapy (n=10). GCF IL-1 α concentration was measured at 0 (baseline), 1, 7 and 14-day visits.

*: $p < 0.01$, Wilcoxon's test (baseline versus 1-day, baseline versus 7-day, baseline versus 14-day)

濃度で血管透過性が低下する傾向が見られた (Fig. 6)。

3. 黄連の臨床応用

GIおよびBOP陽性率は、baselineに比較して黄連投与14日目まで有意に低下した (Fig. 7, 8)。GCF量は、baselineに比較して黄連投与7日後まで有意に減少し、14日後でも減少傾向を示した (Fig. 9)。GCF中のIL-1 α 量は、baselineに比較して黄連投与14日目まで有意に減少した ($p < 0.01$) (Fig.

10)。GCF中のIL-1 β 量は、黄連投与1日目および7日目までは顕著に変化しなかったが、14日目には有意な低下を示した ($p < 0.01$) (Fig. 11)。

考 察

黄連は、強い消炎（清熱）解毒効果を有する生薬であり、中国医学の伝統薬として使用されてきた。本研究は、黄連を歯周炎の局所治療薬（LDDS）として応用するための基礎的研究を行ったものである。本研究から黄連は、活性酸素消去能を介して抗炎症作用を示

Fig. 11 Decline of GCF IL-1 β concentration following crevicular *Coptidis Rhizoma* therapy (n=10). GCF IL-1 β concentration was measured at 0 (baseline), 1, 7 and 14-day visits.

*: $p < 0.01$, Wilcoxon's test (baseline versus 1-day, baseline versus 7-day, baseline versus 14-day)

すことがわかった。この研究結果を踏まえ、黄連を歯周病患者の歯周ポケットに局所投与したところ、歯周炎の臨床症状を14日目まで有意に抑制した。このことは、黄連が、従来の抗生剤を使用した歯周病の薬物療法の治療概念にあった「細菌叢を変える」事に加え、「炎症を制御する」という概念に基づいた歯周病の薬物療法として利用できる可能性を示唆する。

本研究から、黄連が高い活性酸素消去能を持つことが示された。ベルベリンの活性酸素消去能は一般臨床でも頻用されるジクロフェナクナトリウム²⁴⁾と同程度であった。黄連の活性酸素消去能は黄芩および黄芩中のバイカリンと比較しても高かった (Fig. 4)。黄連の主成分であるベルベリンの活性酸素消去能は黄連のほぼ2倍であったが、黄連の凍結乾燥粉末に含まれるベルベリンの含有率が16.3%であることを考慮すれば、ベルベリン以外の未知の成分が複合的に作用して、強い活性酸素消去能を示したと解釈できる。

本研究では、活性酸素を消去する酵素にSOD²⁵⁾を用いた (Fig. 6)。SODによる抗炎症効果については、三崎ら²⁶⁾によるラットの炎症モデルでは、SODの全身および局所投与のいずれも炎症を抑制した。また、Oyanagui²⁷⁾は、ラットのカラゲニン足浮腫にSODを投与したところ、3時間後に腫脹が軽減した事を報告している。このように、動物実験からも、活性酸素の消去が炎症の抑制につながる事がわかっている。我々の研究でも黄連が10 mg/ml以上の濃度でヒト好中球の活性酸素生成を抑制した。という結果を得て

いる。したがって、強い活性酸素消去能を示す黄連は、歯周ポケットで好中球からの活性酸素産生を抑制することで、歯周炎を緩和あるいは抑制すると考えられる。

活性酸素、特にスーパーオキシドは、チトクロームCの還元、NBTの還元およびエピネフリンの酸化反応を利用して生化学的に検出できる²⁸⁾。しかし、本研究では、黄連の活性酸素消去能をNitrite kitで測定した。この方法は、亜硝酸法²⁹⁾を改良した方法で、チトクロームC法と比較しても、感度に優れ、タンパク障害が少ない³⁰⁾。

薬剤の示す抗炎症効果は、血管透過性からも評価できる。そこで、黄連の血管透過性に及ぼす影響を調べた結果、黄連を皮内注射して3時間後に、Evans blueの静脈内投与を行った群では血管透過性が低下していた (Fig. 5)。この結果は、黄連の血管透過性亢進作用は、一過性で長時間は持続しない事を示す。ベルベリンは、平滑筋に貯留したCa²⁺の遊離を直接ブロックすることにより血管拡張作用を示す³¹⁾。したがって黄連の示した血管透過性の亢進作用には、このベルベリンの血管拡張効果が関わるのかもしれない。しかし、黄連の示す血管透過性の亢進作用はベルベリンと比較して強かったため、ベルベリン以外の成分の作用についても研究を進展させる必要があると考える。

さらに、黄連の強い活性酸素消去能が一過性に血管透過性を亢進させる機序に関与しているか否かを調べた (Fig. 6)。すなわち、黄連単独投与群と黄連にSODを加えて投与した群とで比較したところ、両者でほぼ同等に血管透過性の亢進がみられた。このことから、黄連の血管透過性亢進作用に、活性酸素は関わっていないと解釈した。

次に、黄連の示す一過性の血管透過性亢進に対する、ヒスタミンの関与を検討した結果、ヒスタミン遊離が血管透過性亢進に関与していることがわかった (Fig. 6)。したがって、黄連を投与した際に黄連のどの成分がマスト細胞を刺激してヒスタミンを遊離させたかについても研究を進展させる必要がある。以上の結果から、黄連の示した血管透過性の亢進作用には、活性酸素は介さず、マスト細胞からのヒスタミン遊離が関わるが、その作用は長時間持続しない事が考えられた。

一連の黄連の抗炎症作用に対する結果を踏まえ、臨床的評価を得るため、歯周病患者の歯周ポケットに黄連を投与した結果、GIおよびBOP陽性率はbaseline時に比較して14日目まで有意に低下し、GCF量は7日目まで有意に低下した (Fig. 7~9)。この結果は、黄連が歯周炎の臨床症状を2週間にわたっ

て有意に抑制する事を示すものとして注目される。この黄連の抗炎症作用が、投与1日後に最大であったことは、黄連の血管透過性が長時間持続しなかった結果とも一致する。

臨床試験で用いた黄連の最終濃度は、10 mg/ml に設定した。これは、黄連が活性酸素消去能の試験において、活性酸素を96%消去した濃度であり、約400 SOD単位にあたる。この濃度で黄連が歯周炎を有意に抑制した事から、今後、歯周病治療に用いる薬物を活性酸素消去能から評価する際の gold standard になりうるかもしれない。

ベルベリンは、血糖降下作用³²⁾および止瀉作用を示し、その長期あるいは大量投与は難治性便秘などを引き起こす危険性があるため、細菌性下痢患者には禁忌とされている³³⁾。上記の副作用を考慮して、本研究では、ベルベリン単体を用いた LDDS の臨床試験は行わなかった。

歯周病原性細菌は、*in vitro* でヒト由来の様々な細胞から炎症性サイトカイン産生を誘導する^{34,35)}。とりわけ IL-1 は、プロスタグランジン E₂ (PGE₂) およびコラゲナーゼ産生を誘導することで、局所の炎症を増悪させ骨吸収を促進する^{36,37)}。GCF 中の IL-1 β 量は、GI および PPD のいずれとも相関を示す事が報告されている¹⁷⁾。このことから、黄連の抗炎症効果を評価するために、GI, BOP および GCF 量などの臨床指標に加えて、GCF 中の IL-1 α および IL-1 β 量の動態を調べた。その結果、GCF 中の IL-1 α 量は、黄連投与14日後まで有意に低下した (Fig. 10)。一方、IL-1 β 量は黄連投与14日後に低下した (Fig. 11)。歯周病の重症度と GCF 中の IL-1 α および IL-1 β 量の関係を調べた研究から、歯周病が中等度に進行した部位では、GCF 中の IL-1 α 量が IL-1 β 量より高く、重度の炎症部位では逆に IL-1 β 量の方が高いことが報告されている³⁸⁾。本研究の被験者は、中等度の歯周炎に罹患しており、baseline の IL-1 α 量は、IL-1 β の約6倍であり、過去の報告を支持するものであった (Fig. 10, 11)。しかし、歯周組織では、多種類の宿主細胞が IL-1 β を産生している^{39,40)}、黄連がどの細胞からの IL-1 β 産生を抑制しているかについても研究を進展させる必要がある。一方、歯周組織あるいは GCF に遊走した細胞が破壊され、膜結合型の IL-1 α が GCF に遊離する事を考慮すると、GCF 中の IL-1 α 量は歯周組織破壊のマーカーになるかもしれない。ただし、IL-1 の作用は IL-1 receptor antagonist (IL-1 ra) により制御されている^{41,42)}事からすると、黄連が単に IL-1 産生を抑制しているのか、IL-1 ra 産生を誘導する事で結果的に

IL-1 ra が結合した IL-1 が測定されなかった可能性もある。したがって、黄連の歯周炎に対して示した強い抗炎症作用の機作については IL-1 を含めたサイトカインネットワークの観点から考察すべきであろう。

謝 辞

稿を終えるにあたり、終始ご指導、ご校閲を賜りました宮田 隆教授に深甚なる謝意を表します。研究の御指導をいただいた歯科薬理学講座の田島雅道先生に厚く御礼申し上げます。また御協力を頂きました歯周病学講座の各位に感謝いたします。

本論文の要旨は、第41回春季日本歯周病学会学術大会 (平成10年5月21日) および第41回秋季日本歯周病学会学術大会 (平成10年10月16日) において発表した。

文 献

- 1) Costerton, J.W., Stewart, P.S. and Greenberg, E. P.: Bacterial biofilms: A common cause of persistent infections. *Science*, 284: 1318-1322, 1999.
- 2) Soskolne, W.A., Heasman, P.A., Stabholz, A., Smart, G.J., Palmer, M., Flashner, M. and Newman, H.N.: Sustained local delivery of chlorhexidine in the treatment of periodontitis: A multicenter study. *J. Periodontol.*, 68: 32-38, 1997.
- 3) Ciancio, S.G., Slots, J., Reynolds, H.S., Zambon, J. J. and McKenna, J.D.: The effect of short-term administration of minocycline HCl on gingival inflammation and subgingival microflora. *J. Periodontol.*, 53: 557-566, 1982.
- 4) Yamagami, H., Takamori, A., Sakamoto, T. and Okada, H.: Intrapocket chemotherapy in adult periodontitis using a new control-release insert containing ofloxacin (PT-01). *J. Periodontol.*, 63: 2-6, 1992.
- 5) Ciancio, S.G.: 非外科的療法: AAP 歯周治療法のコンセンサス, アメリカ歯周病学会編, クインテッセンス出版株式会社, 東京, 1992, II 1-15.
- 6) 栗本桂二, 磯島 修, 直良有香, 穴田 高, 小林芳友, 栗原英見, 木下正彦, 野村慶雄, 村山洋二: ミノサイクリンの局所的応用による歯周病治療法 LS-007 至適濃度の比較的検討. *日歯周誌*, 29: 930-936, 1987.
- 7) 村山洋二, 野村慶雄, 山岡 昭, 上田雅敏, 堀 俊雄, 三辺正人, 梅本俊夫, 石川 烈, 浦口良治, 上野一恵, 渡辺邦友, 小川暢也: ミノサイクリンの局所的応用による歯周炎治療法. 軟膏基材との二重盲検比較試験. *日歯周誌*, 30: 206-222, 1988.

- 8) 堀 亘孝, 築谷康二, 上松伸雄, 金森成智, 川居俊雄, 奥田正人, 大藪秀昭, 大石泰孝: 歯周炎・歯肉炎に対するヒノポロン応用の臨床治療成績. 日本歯科評論, 550 : 239-247, 1988.
- 9) 吉井美矢子, 石田裕子, 中田るり子, 西本初博, 成川一郎: 漢方製剤の品質管理に関する研究(第7報) 黄連解毒湯. 家庭薬研究, 12 : 64-67, 1993.
- 10) 桑野重昭: 黄連ならびにその成分の薬理. 生薬誌, 24 : 1-5, 1970.
- 11) 元村洋一, 荒木久生, 申 基結, 宮田 隆: 歯周病関連細菌に対する生薬の抗菌効果. 日歯周誌, 39 : 72-76, 1997.
- 12) 藤村 一, 沢田徳之助, 後藤 實: 生薬ならびに植物成分の抗炎症スクリーニング. 薬誌, 90 : 782-783, 1970.
- 13) Asman, B. : Peripheral PMN cells in juvenile periodontitis. Increased release of elastase and of oxygen radicals after stimulation with opsonized bacteria. J. Clin. Periodontol., 15 : 360-364, 1988.
- 14) 鎮守信弘, 前田勝正, 岩本恭行, 赤峰昭文, 原 宣興, 大賀信之, 谷川圭介, 畠山民子, 青野正男: 多形核白血球の殺菌機能 —とくに辺縁性歯周炎患者末梢血および歯肉溝浸出多形核白血球の活性酸素産生について—. 日歯周誌, 29 : 522-529, 1987.
- 15) Hagihara, Y., Kaminishi, H., Cho, T. and Sakima, T. : Enhancement of vascular permeability by proteinases from *Porphyromonas gingivalis* in guinea pigs. Dentistry in Japan, 29 : 160-166, 1992.
- 16) Simon, B.I., Goldman, H.M., Rubsen, M.P. and Baker, E. : The role of endotoxin in periodontal disease III. Correlation of the amount of endotoxin in human gingival exudate with the histologic degree of inflammation. J. Periodontol., 42 : 210-216, 1971.
- 17) Ilou, L. T., Liu, C. M. and Rossomando, F. : Crevicular interleukin-1? in moderate and severe periodontitis patients and the effect of phase I periodontal treatment. J. Clin. Periodontol., 22 : 162-167, 1995.
- 18) 坪井 誠: 黄芩の生理活性作用(1). フレグランスジャーナル, 88 : 99-102, 1988.
- 19) 日本薬局方解説書編集委員会編: 日本薬局方解説書第13改正, 廣川書店, 東京1996, 1118-1120.
- 20) 大柳善彦: SOD 活性測定亜硝酸法とそのキット化. 炎症 4 : 63-73, 1984.
- 21) Udaka, K., Takeuchi, Y. and Movat, H.Z. : Simple method for quantitation of enhancement vascular permeability. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 133 : 1384-1387, 1970.
- 22) Loe, H and Silness, J. : Periodontal disease in pregnancy. I. Prevalence and severity. Acta Odont. Scand., 21 : 533-551, 1963.
- 23) Tsai, C.C., Ho, Y.P. and Chen, C.C. : Levels of interleukin-1 β and interleukin-8 in gingival crevicular fluids in adult periodontitis. J. Periodontol., 66 : 852-859, 1995.
- 24) Oyanagui, Y. : Inhibition of superoxide anion production in macrophages by anti-inflammatory drugs. Biochem. Pharmac., 25 : 1473-1480, 1976.
- 25) McCord, J.M. and Fridovich, I. : Superoxide dismutase. J. Biol. Chem., 244 : 6049-6055, 1969.
- 26) 三崎広樹, 鈴木 誠, 吉江弘正, 原 耕二: ラットの歯周病原性細菌による炎症及び歯肉の創傷に対する superoxide dismutase 投与の効果. 日歯周誌, 32 : 93-110, 1990.
- 27) Oyanagui, Y. : Participation of superoxide anions at the prostaglandin phase of carrageenan foot-oedema. Biochem. Pharmac., 25 : 1465-1472, 1976.
- 28) 戸恒(中野) 博子: スーパーオキシド O₂⁻ の測定法活性酸素, 二木鋭雄, 島崎幸弘, 活性酸素, 医歯薬出版, 東京, 1994, 86-100.
- 29) Elstner, E.F. and Heupel, A. : Inhibition of nitrite formation from hydroxylammonium-chloride : A simple assay for superoxide dismutase. Anal. Biochem., 70 : 616-620, 1976.
- 30) Oyanagui, Y. : Reevaluation of assay methods and establishment of kit for superoxide dismutase activity. Anal. Biochem., 142 : 290-296, 1984.
- 31) 内炭精一: Berberine の薬理作用知見補遺. 日薬理誌, 53 : 63-74, 1957.
- 32) 新井一郎, 山本剛史, 吉田雅光, 山崎優子, 吉田理恵, 佐藤俊次, 遠藤 徹, 岡田 稔: ベルベリンの血糖下降作用機序. 和漢医薬学雑誌, 14 : 354-355, 1997.
- 33) 日本医療情報センター編, 日本医薬品集, 薬事時報社, 東京, 1992, 1633.
- 34) Gemmell, E. and Seymour, G.J. : Interleukin 1, interleukin 6 and transforming growth factor- β production by human gingival mononuclear cells following stimulation with *Porphyromonas gingivalis* and *Fusobacterium nucleatum*. J. Periodont. Res., 28 : 122-129, 1993.
- 35) Kent, L.W., Rahemtulla, F. and Michalek, S.M. : Interleukin (IL) -1 and *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide stimulation of IL-6 production by fibroblasts derived from healthy periodontally diseased human gingival tissue. J. Periodontol., 70 : 274-282, 1999.
- 36) Gowen, M. and Mundy, G.R. : Action of recombinant interleukin 1, interleukin 2 and interferon- γ on bone resorption *in vitro*. J. Immunol., 136 : 2487-2482, 1986.

- 37) Richards, D. and Rutherford, R.B. : The effects of interleukin-1 on collagenolytic activity and prostaglandin-E secretion by human periodontal-ligament and gingival fibroblast. Arch. Oral Biol., 33 : 237-247, 1988.
- 38) Masada, M.P., Peasson, R., Kenney, J.S., Lee, S. W., Page, R.C. and Allison, A.C. : Measurement of interleukin-1 α and -1 β in gingival crevicular fluid : implications for the pathogenesis of periodontal disease. J. Periodont. Res., 25 : 156-163, 1990.
- 39) Matsuki, Y., Yamamoto, T. and Hara, K. : Localization of interleukin 1 (IL-1) mRNA-expressing macrophages in human inflamed gingiva and IL-1 activity in gingival crevicular fluid. J. Periodont. Res., 28 : 35-42, 1993.
- 40) Takahashi, K., Poole, I. and Kinane, D.F. : Detection of interleukin-1 mRNA-expressing cells in gingival crevicular fluid by *in situ* hybridization. Arch. Oral Biol., 40 : 941-947, 1995.
- 41) Granowitz, E.V., Clark, B.D., Mancilla, J. and Dinarello, C.A., : Interleukin-1 receptor antagonist competitively inhibits the binding of interleukin-1 to the type II interleukin-1 receptor. J. Biol. Chem., 266 : 14147-14150, 1991.
- 42) Page, R.C. : The role of inflammatory mediators in pathogenesis of periodontal disease. J. Periodont. Res., 26 : 230-242, 1991.

連絡先 :

明海大学歯学部歯周病学講座

〒 350-0283 埼玉県坂戸市けやき台 1-1