

神奈川歯科大学大学院歯学研究科
2019年度 博士論文

矯正学的な歯の移動を伴う実験的歯周炎に対する
鶏血藤の効果

2020年2月28日

片山 平
Taira Katayama

神奈川歯科大学大学院歯学研究科
口腔機能修復学講座歯科矯正学

神奈川歯科大学大学院歯学研究科
2019年度 博 士 論 文

矯正学的な歯の移動を伴う実験的歯周炎に対する
鶏血藤の効果

2020年2月28日

片山 平
Taira Katayama

神奈川歯科大学大学院歯学研究科
口腔科学講座
槻木恵一教授 指導

論文内容要旨

矯正学的な歯の移動は、歯周組織内での骨代謝において圧迫側歯槽骨の吸収反応を伴う炎症反応で、歯の移動時に歯周疾患が併発することによって顕著な歯根吸収や歯槽骨破壊、歯肉退縮が生じる。歯科矯正治療は、歯周組織の細菌感染の改善後に行なうことが原則であり、近年では成人患者の歯科矯正治療において、歯周炎治療後に歯列不正の改善を目的に行なう機会が増加している。不正咬合を有する患者では、複雑な形態を呈する矯正装置を口腔内に装着するため、プラークの蓄積と機械的清掃方法の困難さから矯正治療中においても歯周炎に罹患しやすい。従って、矯正治療前だけでなく矯正治療中の歯周疾患予防も重要であり、治療手段の向上と多様化が求められている。

生薬である鶏血藤は、副作用が少なく抗酸化作用や慢性歯周炎の原因となる偏性嫌気性グラム陰性菌*Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*) を含む口腔内細菌に対して優れた殺菌効果を示し、歯槽骨吸収を担う破骨細胞の分化誘導を抑制することが知られている。しかしながら、矯正学的な歯の移動に対する鶏血藤の効果については未だ明らかにされていない。本研究は、矯正装置を装着したラットに歯の移動と実験的歯周炎を誘導させた時の鶏血藤の効果について検討した。

9週齢のWistar系雄性ラットの上顎前歯と上顎右側第一臼歯間に矯正力25gのニッケルチタン製クローズドコイルスプリングをリガチャーワイヤーにて結紮し、上顎前歯部を光重合型レジンにて固定後、歯の移動 (orthodontic tooth movement : OTM) を行なった (OTM群)。その後、1 mg/ml濃度のサルファメトキソゾールと200 µg/ml濃度のトリメトプリムを蒸留水に混和した合成抗菌薬によるラット口腔内常在菌の減少後、歯周病原細菌*P. gingivalis*をラット口腔内に接種し、実験的歯周炎を誘導した (OTM + Pg群)。同時に、8%鶏血藤抽出液 (Jix) を自由給水にて継続的に投与を開始した (OTM + Pg + Jix群)。歯の移動開始から28日後に上顎骨を摘出し、マイクロCTによる上顎右側第一臼歯の近心移動距離と歯槽骨吸収量の計測を行なった。また周囲歯周組織の破骨細胞の出現について酒石酸抵抗性酸フォスファターゼ (TRAP) 染色を用いた病理組織学的検索を行った。

その結果、*P. gingivalis*感染を行なったOTM群 (OTM + Pg群) では非感染群 (OTM群) と比較して、上顎右側第一臼歯の近心移動距離と歯槽骨吸収量が顕著に増加し、特に遠心頬側根の圧迫側においてTRAP陽性の破骨細胞の有意な増加が認められた。一方で、OTM + Pg + Jix群ではOTM + Pg群と比べて歯の移動距離や歯槽骨吸収量および破骨細胞数の減少が認められた。

これらの結果，鶏血藤の投与は，歯の移動を阻害することなく*P. gingivalis*感染による歯槽骨吸収の抑制効果を示すことが明らかとなった。従って，鶏血藤は矯正歯科治療中における歯周病原細菌の感染抑制に貢献することが示唆された。

論文審査要旨

学位申請論文である「矯正学的な歯の移動を伴う実験的歯周炎に対する鶏血藤の効果」は矯正治療中の歯周疾患予防に対する鶏血藤の有効性を検討した論文である。

本研究の目的および背景は以下の通りである。鶏血藤は生薬の一つであり抗菌薬と比較し生体為害作用が非常に少なく、先行研究より歯周病原細菌 *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*) などの偏性嫌気性グラム陰性菌に対して優れた殺菌効果を示すこと、破骨細胞の分化誘導能を抑制して歯槽骨吸収を抑制することが報告されている。本研究は、歯科矯正治療の歯周疾患予防における鶏血藤の有用性を検討する目的で、矯正学的な歯の移動を伴う実験的歯周炎モデルを用い、歯の移動と歯槽骨吸収に対する鶏血藤の影響を検討したものである。鶏血藤などの生薬が矯正学的歯の移動に及ぼす影響、矯正治療中における歯周炎の抑制効果等についての報告は認められず、本論文において実証しようとする研究目的は高く評価できるとともに、今後の歯科臨床に貢献することが明らかであり、意義ある研究と考えられる。

実験動物は9週齢のWistar系雄性ラット20匹で、矯正装置を装着しないControl群、25 gの矯正力を適用し上顎臼歯の近心移動を行ったOTM群、矯正力を適用し*P. gingivalis*を感染させたOTM + Pg群、矯正力を適用し*P. gingivalis*感染後に鶏血藤抽出液 (*Jixueteng* : Jix) を投与したOTM + Pg + Jix群、の4群を設定した。実験の開始時と終了時に撮影したマイクロCT画像を用い、臼歯の近心移動量とCEJ-歯槽骨頂間距離の変化を計測した。一方、組織学的検討として対象歯歯根の圧迫側において、骨吸収の指標としてTRAP陽性の破骨細胞数を観察した。研究テーマに対する研究方法の組み立ては論理的であり、適切な解析手法により実験が行われている。

結果として、*P. gingivalis*感染群であるOTM + Pg群ではOTM群に比べて、対象歯の近心移動量およびCEJ-歯槽骨頂間距離、破骨細胞数の有意な増加を示した。鶏血藤を投与したOTM + Pg + Jix群では、*P. gingivalis*感染によるこれらの変化が抑制された。以上の結果は、適切な方法、統計により導き出された明快な結果であると考えられる。

本研究より、鶏血藤は矯正学的な歯の移動を妨げず、矯正治療中に歯周組織に併発する細菌性炎症のコントロールに有用であることが示唆された。成人矯正治療中における歯周炎の抑制のため、鶏血藤という副作用の少ない薬物の臨床応用の可能性を見出した点は高く評価できる。

本審査委員会は、全ての教育課程を修了し、教育理念に相応しい成果が認め

られ、高度専門職としての豊かな学識を有することが確認された。本研究結果より示された新しい知見は、矯正治療中の歯周疾患予防に対する今後の歯科医療拡大への貢献が期待できるとの結論に至った。

本審査委員会は申請者が博士(歯学)の学位に十分値するものと認めた。

2020年2月28日

主 査：不島 健持 教授

副 査：三辺 正人 教授

副 査：高橋 俊介 教授

目次

緒言	1
実験材料および方法	3
結果	9
考察	11
結論	15
謝辞	16
文献	17
図	
図 1	26
図 2	27
図 3	28
図 4	29
図 5	30
図 6	31
図 7	32
図 8	33
図 9	34

緒 言

歯周炎は歯の動揺や歯肉の腫脹、歯槽骨吸収を主な特徴とする慢性炎症で、デンタルプラーク中の*Porphyromonas gingivalis*などの偏性嫌気性グラム陰性菌の増加が主な原因である)。現在の歯科矯正治療においては成人患者の増加に伴い、歯周炎治療後に歯列不正の改善を目的に矯正治療を行なう機会が増加している)。矯正学的な歯の移動は歯周組織内での骨代謝において圧迫側歯槽骨の吸収反応を伴う炎症性の反応であり、歯の移動時に歯周疾患が併発することによって顕著な歯根吸収や歯槽骨破壊、歯肉退縮が生じることが知られている)。特に成人の患者では、矯正装置の装着によって歯周疾患のリスクが上がるという報告がされている)。従って、歯科矯正治療は歯周組織の細菌性炎症が改善後に行なうのが原則となる。歯周疾患の治療ではスケーラーや歯ブラシによる機械的清掃が主体であるが、不正咬合を有する患者では複雑な形態を呈する矯正装置を口腔内に装着するため、プラークの蓄積と機械的清掃方法の困難さから矯正治療中においても歯周炎に罹患しやすい傾向にある)。従って、矯正治療前だけでなく矯正治療中の歯周疾患予防も重要であり、治療手段の向上と多様化が求められている。

従来、局所的な歯周疾患における治療にはテトラサイクリンなどの局所投与、ポビドンヨードやリステリンなどの殺菌成分を含む消毒薬や含嗽剤が用いられている)。抗菌薬の濫用は、薬剤耐性菌の増加や菌交代症、アレルギーによる副作用が生じることが懸念される)。また、近年では骨粗鬆症治療薬を歯周疾患による歯槽骨吸収の治療に応用することが検討されてきたが、顎骨壊死を引

き起こすことが報告されている)。そこで矯正治療中の歯周疾患予防と治療を目的として、生体為害性がなく矯正学的な歯の移動への影響が少ない創薬が求められている。

天然由来成分である生薬は、従来使用されている抗菌薬などと比較して生体為害作用が非常に少ないことが知られている。生薬は単独での既知の薬効に加え、口腔細菌に対する殺菌効果を持つことが報告されている)。鶏血藤 (*Millettia reticulate*) はマメ科 (*Leguminosae*) の蜜花豆 (*Spatholobus suberectus* DUNN), 香花崖豆藤 (*Millettia dielsiana* HARMS) の茎を乾燥させた生薬で、血流の促進や抗酸化作用を有する他、歯周病原細菌 *P. gingivalis* などの偏性嫌気性グラム陰性菌に対して優れた殺菌効果を示し、破骨細胞の分化誘導能を抑制して歯槽骨吸収を抑制することが報告されている)。そこで本研究は、歯科矯正治療における鶏血藤の有用性を検討する為、矯正学的な歯の移動を伴う実験的歯周炎モデルを用いて評価した。

実験材料および方法

1. 鶏血藤抽出液の調整

本研究では蜜花豆の蔓を乾燥，裁断した鶏血藤刻 (栃本天海堂，大阪) を使用した。鶏血藤の抽出はToyamaらの報告¹⁸⁻²⁰⁾ に従い，1 Lの蒸留水に対して200 gの鶏血藤乾燥茎を加え，95°C，3時間加熱したものを抽出した。この抽出液を原液として，蒸留水で8% w/v濃度に希釈したものを実験に供試した。

2. 供試菌株および培養条件

供試菌は，神奈川歯科大学口腔科学講座微生物感染学分野保有の*P. gingivalis* ATCC 33277 株 (Pg) を用いた。細菌の培養は，ブレインハートインフュージョン (Brain heart infusion: BHI, Becton Dickinson, Sparks, MD, USA) に1.0% ヘミン (富士フィルム和光純薬，大阪)，1.0% ビタミンK₁ (富士フィルム和光純薬，大阪)，および0.5% イーストエキストラクト (Becton Dickinson, USA) を添加したBHI液体培地を用いて，37°C，18時間，嫌気条件下 (80% N₂，10% H₂，10% CO₂) で行ない，実験に供試した。

3. 実験動物

本研究は、神奈川歯科大学実験動物・組み換えDNA管理委員会の承認の下、倫理指針に従って行なわれた(承認番号 18-046)。実験方法の概要を図1に示す。実験には成人の治療を想定し、成熟年齢である9週齢のWistar系雄性ラット20匹を用いた(日本クレア, 東京)。*P. gingivalis*感染や矯正学的な歯の移動(Orthodontic Tooth Movement: OTM)に伴う歯槽骨吸収に対する鶏血藤抽出液(*Jixueteng*: Jix)の効果を解析するため、実験群を各群5匹の計4群に分けた。すなわち非感染群は、矯正装置を装着しない蒸留水投与群(Control群)、矯正装置装着した蒸留水投与群(OTM群)とした。一方、*P. gingivalis*感染群は、矯正装置装着した蒸留水投与群(OTM + Pg群)、矯正装置を装着した鶏血藤抽出液投与群(OTM + Pg + Jix群)として実験を開始した。すべてのラットは食事、飲料水を自由に摂取できるようにし、粉末餌(MF, オリエンタル酵母, 東京)による給餌を行ないながら、室温 $22 \pm 3^{\circ}\text{C}$ 、湿度60%、明暗12時間のサイクルの環境下で飼育した。

4. 実験的歯周炎の誘導

実験的歯周炎の誘導はこれまでの論文報告に従って行なった²⁰⁾。実験開始直後より *P. gingivalis* 感染群に対してラット口腔内常在菌を減少させる目的で、1 mg/ml濃度のサルファメトキソゾール (Sigma-Ardrich, St.Louis, MO, USA) と 200 µg/ml濃度のトリメトプリム (Sigma-Ardrich, USA) を蒸留水に混和した合成抗菌薬を飲料水として4日間自由給水させた後、3日間抗菌薬を含まない蒸留水を与えて口腔内に残存した抗菌薬を除去した。細菌感染は実験開始から8, 11, 13, 15日後の計4回行った。滅菌リン酸緩衝液 (日水製薬, 東京) で作製した5%カルボキシメチルセルロース (carboxymethyl cellulose : CMC, Sigma-Ardrich, USA) 溶液と *P. gingivalis* 菌液の懸濁液 (菌数 : 2.1×10^{11} CFU/ml) を作製, 注射筒に動物経口接種用のゾンデを装着したものをを用いてラット上顎右側臼歯部へ塗布し, 感染群のラット1匹あたり0.5 ml経口接種した。非感染群は5% CMC溶液のみを経口接種した。

5. 矯正学的な歯の移動

ラット口腔内に矯正装置を装着した様子を図2に示す。実験開始から7日後にイソフルラン（富士フィルム和光純薬，大阪）による吸入麻酔とペントバルビタール（共立製薬，東京）の腹腔内投与の併用による全身麻酔下で，ラット上顎前歯と上顎右側第一臼歯間に矯正力25 gを発揮するニッケルチタン製クロースドコイルスプリング（0.25 N，トミーインターナショナル，東京）を直径0.25 mmの結紮線（Ormco，Orange，CA，USA）を用いて結紮固定し，矯正装置として口腔内に装着した。更に結紮後，上顎前歯は歯科用光重合型レジジン（トクヤマデントタル，茨城）にて固定し，矯正学的な歯の移動を開始した。また歯の移動開始と同時に鶏血藤抽出液を自由給水にて実験終了時まで継続して飲水させた。なおControl群，OTM群，OTM + Pg群に対しては鶏血藤抽出液の代わりに蒸留水を継続して飲水させた。

6. マイクロCTを用いた歯の移動距離とCEJ-歯槽骨頂間距離の測定

歯の移動開始から28日後，イソフルランとペントバルビタールを併用した全身麻酔下で両側上顎骨を摘出した。その後，マイクロCT撮影を行ない上顎右側第一臼歯の近心移動距離とセメントエナメル境（CEJ：Cement Enamel Junction）から歯槽骨頂までの距離を計測した。摘出した上顎骨の撮影はScanXmate-L080（コムスキャンテクノ，神奈川）を用い，管電圧80 kV，管電流100 μ A，画像解像

度67.4 $\mu\text{m}/\text{pixel}$ の条件下で行った。上顎右側第一臼歯の近心移動距離とCEJ-歯槽骨頂間距離にはOsirix Lite (ニュートン・グラフィックス, 北海道) を使用し, 前頭断面は頭頂前頭縫合と鼻中隔及び正中口蓋縫合を, 水平断面は正中口蓋縫合を, 矢状断面では矯正装置を装着していない左側臼歯部の咬合平面を用いて決定した。左側臼歯部の咬合平面は水平断面からみて左側臼歯部の中央窩を通り, 矢状断面上にて左側第一臼歯と左側第三臼歯の中央溝を通るように設定した。矯正装置を装着した上顎右側第一臼歯の移動距離は, CT画像上で左側臼歯部にて設定した咬合平面より右側第一臼歯の遠心最大膨隆部と右側第二臼歯の近心最大膨隆部へ垂直な接線を引き, 両線間の最短距離を歯の近心移動距離として計測した (図3)。CEJ-歯槽骨頂間距離の評価はCT画像上で右側臼歯部の咬合平面から各歯根面中央部にて垂線を引き, 垂線上にてCEJと歯槽骨頂の位置を決定後, それらの間の距離を測定した (図4a)。測定箇所は上顎右側第一臼歯近心頬側根の頬側面 (図4b-①), 遠心頬側根の頬側面 (図4b-②), 近心口蓋側根の口蓋側面 (図4c-③)口蓋側中央根の口蓋側面 (図4c-④) 遠心口蓋側根の口蓋側面 (図4c-⑤)での根面中央部にて計5箇所とした。測定値の平均値をCEJ-歯槽骨頂間距離としてミリメートル単位で表し, 平均値と標準偏差を求めた。

7. TRAP染色を用いた病理組織学的検索

マイクロCTによる解析後、上顎骨右側臼歯部の病理組織標本の作製をSatoらの方法により行なった²¹⁾。即ち、摘出した上顎骨を4%パラホルムアルデヒド溶液 (4°C, pH 7.2, 富士フィルム和光純薬, 大阪) にて浸漬固定を行なった後、10% EDTA (4°C, pH 7.2, 富士フィルム和光純薬) を用いて約6週間、脱灰操作を行った。EDTA溶液による脱灰終了後に、上顎右側第一から第三臼歯を周囲組織と共に一塊にて切り出し、パラフィンに包埋し、厚さ4 μm の連続薄切切片を作製した。その後破骨細胞の出現解析を目的として酒石酸抵抗性酸フォスファターゼ (Tartrate-resistant acid phosphatase : TRAP, TRAP staining kit, コスモバイオ, 東京) 染色を行なった。その後、実体顕微鏡 (BX53, OLYMPUS, 東京) 下にて上顎右側第一臼歯遠心頬側根の歯根長全体に対して歯根先端寄り1/3の位置を抵抗中心、歯根歯冠側2/3を圧迫側に設定して染色標本を観察した。破骨細胞の評価は圧迫側にて認められた多核のTRAP陽性細胞数を算出した。

8. 統計学的解析

統計学的解析にはEZR version 1.40 (自治医科大学附属さいたま医療センター, 埼玉) を用いた。得られた実験結果に対してKruskal-Wallis検定を用いた後、事後検定としてSteel-Dwass法による多重比較検定を用い、有意水準5%未満にて統計学的評価を行なった。

結 果

1. 実験動物の体重変化

ラットの搬入時点での平均体重は 303 ± 11 gであった。歯の移動開始から28日経過した時点での各群のラットの体重はControl群が 360 ± 6 gであったのに対して、OTM群は 338 ± 19 g, OTM + Pg群は 329 ± 16 g, OTM + Pg + Jix群は 333 ± 16 gとなり、矯正装置を装着群すべてで同程度の増加が認められた。尚、矯正装置の装着により、矯正装置を装着したラットの平均体重は非装着群の約93%であった。

2. 上顎右側第一臼歯の近心移動量

図5に各群の上顎右側第一臼歯の近心移動距離、図6に各群の上顎右側第一臼歯の近心移動を行なった後のCT画像を示す。未処置であるControl群において歯の移動は認められなかった。非感染群における上顎右側第一臼歯の移動量はOTM群が 0.50 ± 0.14 mmであった。一方、*P. gingivalis*感染群であるOTM + Pg群では 0.80 ± 0.12 mmで、OTM群に比べて約1.6倍に増加した ($p < 0.05$)。一方、OTM + Pg + Jix群における歯の移動量は 0.41 ± 0.12 mmでOTM + Pg群の移動量の半分まで減少し、OTM群と同程度であった ($p < 0.05$)。

3. 上顎右側第一臼歯部のCEJ-歯槽骨頂間の距離

図7に各群上顎右側第一臼歯部のCEJ-歯槽骨頂間の距離を示す。未処置であるControl群では 0.58 ± 0.03 mmであった。非感染群における右側上顎第一臼歯のCEJ-歯槽骨頂間距離は、OTM群が 0.68 ± 0.06 mmとなった。一方、*P. gingivalis*感染群においては、OTM + Pg群は 0.84 ± 0.05 mmを示し、*P. gingivalis*感染によりCEJ-歯槽骨頂間距離は約1.2倍に増加した ($p < 0.05$)。一方、OTM + Pg + Jix群のCEJ-歯槽骨頂間距離は 0.69 ± 0.06 mmでOTM群と同程度であった。

4. TRAP染色を用いた破骨細胞の評価

図8-(2) に各群の上顎右側第一臼歯遠心頬側根のTRAP染色像を、図9に破骨細胞数を示す。歯の移動や*P. gingivalis*感染により上顎右側第一臼歯の圧迫側歯槽骨に多数の破骨細胞の出現が認められた。未処置であるControl群は 1.8 ± 1.9 個、OTM群は 9.0 ± 3.1 個、OTM + Pg群では 35.6 ± 8.8 個となり、OTMや*P. gingivalis*感染により破骨細胞の顕著な増加が認められた ($p < 0.05$)。一方、OTM + Pg + Jix群の破骨細胞数は 12.2 ± 4.9 個となり、OTM + Pg群と比べて有意に減少した ($p < 0.05$)。

考 察

本研究はラットに装着した矯正装置はすべて一つの規格のものを用い、実験における歯の移動に用いる矯正力を統一して行われた。また、Control群のCEJ-歯槽骨頂間の距離は、矯正装置装着や実験的歯周炎の誘導、鶏血藤の投与といった人為的因子の介入による変動がない状態と想定して解析を行なった。

矯正装置の装着直後から実験終了まで実験群ラットの体重とControl群との間に有意差は認められなかった。このことから、実験による動物の成長発育への影響はないと考えられた。

矯正学的な歯の移動は、移動する歯の歯根膜を介して力学的負荷が周囲歯槽骨に加わることにより局所的な歯槽骨の吸収と添加が促進されることで生じる。即ち、歯根の圧迫側歯槽骨では破骨細胞による骨吸収と牽引側では骨芽細胞による骨添加が認められる。本研究の矯正力は歯冠部にかかる為、上顎右側第一臼歯遠心頬側根の歯根長全体に対して歯根先端寄り1/3の位置を抵抗中心とし、歯根長全体のうち歯冠側2/3を圧迫側として設定した。歯の移動では、歯肉溝滲出液を含むあらゆる歯周組織にて様々な炎症性サイトカインが関連していることが既に報告されている。歯槽骨の吸収ではマクロファージ由来の破骨細胞前駆細胞表面の受容体であるReceptor activation of nuclear factor- κ B (RANK) と骨芽細胞のRANK Ligand (RANKL) が結合して破骨細胞の分化が誘導されることにより進行する。それらに加え、インターロイキン (IL)-1, IL-6, 腫瘍壊死因子 (TNF) 等のサイトカインの歯周組織への発現、更には歯周炎病巣において

は歯周病原細菌由来の病原因子によっても骨吸収や歯根吸収が促進されることが知られている)。 *P. gingivalis*は本菌の持つ多彩な病原因子により歯槽骨吸収を誘導し、歯周炎の進行に重要な細菌であることが報告されている)。 実際、 *P. gingivalis*生菌を口腔内へ直接接種することにより、歯周組織破壊を生じる実験的歯周炎モデルが確立され、口腔細菌が持つ病原因子の解明等に利用されている)。 また、臼歯部に絹糸を結紮したラットを用いた報告では、歯の移動時に歯周疾患を誘発させることで歯槽骨や歯根の吸収量が増加することが報告されている)。

*P. gingivalis*感染群であるOTM + Pg群では非感染群に比べて歯の移動距離とCEJ-歯槽骨頂間距離が増加し、TRAP染色像においても粗造な骨辺縁形態と周囲に多数の破骨細胞が認められた (図8-(2))。これは *P. gingivalis*感染が骨吸収促進因子として作用したと考えられ、 *P. gingivalis*感染が骨吸収を促進した結果、歯の移動距離とCEJ-歯槽骨頂間距離が増加した可能性が示唆された。ただし、矯正治療における歯周疾患の発症は、歯周組織破壊による矯正治療の予後まで考慮した場合、大きなリスクになると考えられる。また、本研究では歯冠に力をかけているため、CEJ-歯槽骨頂間距離の増加は、上顎右側第一臼歯の近心移動に伴って傾斜によって生じた、挺出方向への動きが一部含まれる可能性が示唆された。

鶏血藤投与群であるOTM + Pg + Jix群はOTM + Pg群に比べてCEJ-歯槽骨頂間距離が有意に短かった (図7)。このことから本研究における鶏血藤の投与は、 *P.*

*gingivalis*感染によるCEJ-歯槽骨頂間距離の増加を抑制した可能性が示唆された。鶏血藤は、*P. gingivalis*に対して優れた殺菌効果が報告されていることから¹⁹⁾、*P. gingivalis*菌体に作用したものと考えられる。漢方薬の中には*P. gingivalis*のタンパク質分解酵素阻害作用を持つものが報告されており、口腔内への応用によって病原因子に対する阻害作用が期待できると考えられた。鶏血藤にはRANKL存在下で成熟させた破骨細胞の延命を阻害することが認められていることから²⁰⁾、破骨細胞の分化に関与すると考えられた。破骨細胞を標的とするビスフォスフォネート系製剤や抗RANKL抗体製剤は矯正学的な歯の移動を阻害する可能性が指摘されており、鶏血藤はこのような作用は認められなかった。従って、鶏血藤の投与は歯の近心移動距離、CEJ-歯槽骨頂間距離の増加、破骨細胞数の増加を抑制した一方で、健全な歯周組織における矯正学的な歯の移動に対して影響を与えなかったことから、矯正治療中に歯周組織に併発する細菌性炎症のコントロールに有用である可能性が示唆された。現代医療において漢方薬の有用性は認知されつつあり、高血圧や糖尿病などの生活習慣病の改善や口腔内環境の改善に効果のあることが報告されている)。特に鶏血藤はイソフラボンであるホルモノネチン、ゲニステイン、ダイドゼイン、オノニンおよびメディカゴールを含有している。これらの成分は大豆から抽出され、化学構造が女性ホルモンであるエストロゲンに類似し、悪性腫瘍や心血管疾患、骨粗鬆症等に対する効果が知られている)。更に歯科領域において鶏血藤は歯肉の血液循環障害改善効果や抗酸化作用を示すことが報告されており³⁰⁾、歯周組織の炎症抑制

効果が期待できると考えられた。歯周疾患は全身疾患との関連性も注目されており、口腔内環境の改善を図ることで全身状態の改善及び向上を狙った治療も行われている)。従って、全身疾患の既往を持つ歯科矯正治療に対する鶏血藤の適用は口腔内環境と全身状態の両面において臨床的有用性が期待できると考えられた。

結 論

歯科矯正治療における鶏血藤の応用性を検討する為、矯正学的な歯の移動を伴う実験的歯周炎モデルを用いて評価した結果、以下の結論を得た。

1. 実験期間中のラットの健康及び体重変化に鶏血藤投与による影響は認められなかったが、矯正装置を装着したラットの平均体重は、非装着群と比較して約93%であった。
2. 鶏血藤投与によって上顎右側第一臼歯の近心移動が阻害されることはなかった。
3. 鶏血藤投与は、矯正学的な歯の移動や*P. gingivalis*による破骨細胞の出現数を有意に減少させた。
4. 鶏血藤投与は、*P. gingivalis*の感染による上顎右側第一臼歯部にCEJ-歯槽骨頂間距離の増加を有意に抑制した。

謝 辞

稿を終えるに臨み、御懇切なる御指導と御校閲を賜りました神奈川県歯科大学 口腔統合医療学講座 歯科矯正学分野 山口徹太郎教授をはじめに、神奈川県歯科大学 口腔科学講座 微生物感染学分野 浜田信城教授ならびに大阪歯科大学 生理学講座 合田征司教授に深甚なる謝意を表します。また、御校閲と御鞭撻を賜りました神奈川県歯科大学 高度先進医療学講座 歯科矯正学分野 不島健持教授、口腔統合医療学講座 歯周病学分野 三辺正人教授ならびに口腔科学講座 循環制御歯科学・薬理学分野 高橋俊介教授に厚く御礼申し上げます。

更に本研究にあたり終始ご教示を賜りました神奈川県歯科大学 口腔科学講座 佐藤武則先生と神奈川県歯科大学 口腔科学講座 微生物感染学分野教室員ならびに神奈川県歯科大学 口腔統合医療学講座 歯科矯正学分野教室員各位に深甚なる謝意を表します。

利益相反

本研究に関連して、開示すべき利益相反はない。

文 献

1. Lamont RJ, Jenkinson HF: Life below the gum line: pathogenic mechanisms of *Porphyromonas gingivalis*. *Microbiol Mol Biol Rev.* **62**: 1244-1263, 1998.
2. Corbet EF, Leung WK: Epidemiology of periodontitis in the Asia and Oceania regions. *Periodontol 2000.* **56**: 25-64, 2011.
3. Gkantidis N, Christou P, Topouzelis N: The orthodontic-periodontic interrelationship in integrated treatment challenges: A systematic review. *J Oral Rehabil.* **37**: 377-390, 2010.
4. Meikle MC: The tissue, cellular, and molecular regulation of orthodontic tooth movement: 100 Years after Carl Sandstedt. *Eur J Orthod.* **28**: 221-240, 2006.
5. Kirschneck C, Fanghänel J, Wahlmann U, *et al.*: Interactive effects of periodontitis and orthodontic tooth movement on dental root resorption, tooth movement velocity and alveolar bone loss in a rat model. *Ann Anat.* **210**: 32-43, 2017.
6. Yan X, Wang T, Su H: Effects of a self-ligating appliance for orthodontic treatment of severe adult periodontitis. *J Oral Sci.* **61**: 200-205, 2019.
7. Boyd RL, Chun YS: Eighteen-month evaluation of the effects of a 0.4% stannous fluoride gel on gingivitis in orthodontic patients. *Am J Orthod Dentofac Orthop.* **105**: 35-41, 1994.
8. Seymour RA, Heasman PA: Tetracyclines in the management of periodontal diseases: A review. *J Clin Periodontol.* **22**: 22-35, 1995.

9. Gordon JM, Lamster IB, Seiger MC: Efficacy of Listerine antiseptic in inhibiting the development of plaque and gingivitis. *J Clin Periodontol*. **12**: 697-704, 1985.
10. Feres M, Figueiredo LC, Soares GMS, *et al.*: Systemic antibiotics in the treatment of periodontitis. *Periodontol 2000*, **67**: 131-186, 2015.
11. Cunha BA: Antibiotic Side Effects Explained. *Chem Eng News Arch*. **91**: 149-185, 2013.
12. Sato Y, Sakai H, Kobayashi Y, *et al.*: Bisphosphonate administration alters subcellular localization of vacuolar-type H⁺-ATPase and cathepsin K in osteoclasts during experimental movement of rat molars. *Anat Rec*. **260**: 72-80, 2000.
13. Olate S, Uribe F, Martinez F, *et al.*: Osteonecrosis of the jaw in patient with denosumab therapy. *Int J Clin Exp Med*. **7**: 3707-3709, 2014.
14. Li M, Xu Z: Quercetin in a lotus leaves extract may be responsible for antibacterial activity. *Arch Pharm Res*. **31**: 640-644, 2008.
15. Li RW, David Lin G, Myers SP, *et al.*: Anti-inflammatory activity of Chinese medicinal vine plants. *J Ethnopharmacol*. **85**: 61-67, 2003.
16. Lee JH, *et al.*: Immunoregulatory activity by daucosterol, a β -sitosterol glycoside, induces protective Th1 immune response against disseminated Candidiasis in mice. *Vaccine*. **25**: 3834-3840, 2007.
17. Su E, Chen H: Clinical observation on aplastic anemia treated by *Spatholobus suberectus* composita. *Chin J Integr Med*. **17**: 213-215, 1997.

18. Toyama T, Wada-Takahashi S, Takamichi M, *et al.*: Reactive Oxygen Species Scavenging Activity of *Jixueteng* Evaluated by Electron Spin Resonance (ESR) and Photon Emission. *Nat Prod Commun.* **9**: 1755-1759, 2014.
19. 遠山歳三, 李昌一, 澤田智史ほか: 齶蝕ならびに歯周病原菌に対する鶏血藤の殺菌効果. 歯薬療法. **30**: 51-56, 2011.
20. Toyama T, Todoki K, Takahashi Y, *et al.*: Inhibitory effects of *Jixueteng* on *P. gingivalis* -induced bone loss and osteoclast differentiation. *Arch Oral Biol.* **57**: 1529-1536, 2012.
21. Sato T, Watanabe K, Kumada H, *et al.*: Peptidoglycan of *Actinomyces naeslundii* induces inflammatory cytokine production and stimulates osteoclastogenesis in alveolar bone resorption. *Arch Oral Biol.* **57**: 1522-1528, 2012.
22. Kanda Y: Investigation of the freely available easy-to-use software 'EZ' for medical statistics. *Bone Marrow Transplant.* **48**: 452-458, 2013.
23. Takano-Yamamoto T, Takemura T, Kitamura Y, *et al.*: Site-specific expression of mRNAs for osteonectin, osteocalcin, and osteopontin revealed by in situ hybridization in rat periodontal ligament during physiological tooth movement. *J Histochem Cytochem.* **42**: 885-896, 1994.
24. Pavin D, Gluhak-Heinrich J: Effect of mechanical loading on periodontal cells. *Crit Rev Oral Biol Med.* **12**: 414-424, 2001.
25. Takayanagi H: Shared mechanisms and crosstalk between the immune and bone systems. *Nat rev Immunol.* **7**: 292-304, 2007.

26. Rosin DL, Okusa MD: Dangers within: DAMP responses to damage and cell death in kidney disease. *J Am Soc Nephrol.* **22**: 416-425, 2011.
27. Ren Y, Vissink A: Cytokines in crevicular fluid and orthodontic tooth movement. *Eur J Oral Sci.* **116**: 89-97, 2008.
28. Holt SC, Kesavalu L, Walker S, *et al.*: Virulence factors of *Porphyromonas gingivalis*. *Periodontol. 2000.* **20**: 168-238, 1999.
29. Bostanci N, Belibasakis GN: *Porphyromonas gingivalis*: An invasive and evasive opportunistic oral pathogen. *FEMS Microbiol Lett.* **333**: 1-9, 2012.
30. Suzuki M, Toyama T, Watanabe K, *et al.*: Ameliorating effects of *Jixueteng* in a mouse model of *Porphyromonas gingivalis*-induced periodontitis: Analysis based on gingival microcirculatory system. *Nat Prod Commun.* **13**: 1699-1703, 2018.
31. Liao J, Zhao L, Yoshioka M, *et al.*: Effects of Japanese traditional herbal medicines (Kampo) on growth and virulence properties of *Porphyromonas gingivalis* and viability of oral epithelial cells. *Pharm Biol.* **51**: 1538-1544, 2013.
32. Kaipatur NR, Wu Y, Adeeb S, *et al.*: Impact of bisphosphonate drug burden in alveolar bone during orthodontic tooth movement in a rat model: A pilot study. *Am J Orthod Dentofac Orthop.* **144**: 557-567, 2013.
33. Pedrazzi V, Leite MF, Tavares RC, *et al.*: Herbal mouthwash containing extracts of *baccharis dracunculifolia* as agent for the control of biofilm: Clinical evaluation in humans. *Sci World J*, **2015**: 1-6, 2015.

34. Yildiz F: Phytoestrogens in functional foods. 3-5, 210-211, Taylor & Francis Ltd London, 2005.
35. Jonson IT, Williamson G: Phtocmemical functional foods, Woodhead Publishing, 66-68, 2003.
36. Adlercreutz H: Phyto-oestrogens and cancer. *Lancet Oncol.* **3**: 364-373, 2002.
37. Shin YJ, Choung HW, Lee JH, *et al.*: Association of periodontitis with oral cancer: A case-control study. *J Dent Res.* **98**: 526-533, 2019.

付図説明

図1 実験スケジュール

Control：未処置群，OTM：矯正装置装着群，OTM + Pg：矯正装置を装着した *P. gingivalis* 感染群，OTM + Pg + Jix：矯正装置の装着と *P. gingivalis* 感染を行った鶏血藤投与群。各群はn=5で行った。

図2 矯正装置を装着したラット口腔内写真

ラット上顎前歯と上顎右側第一臼歯間にニッケルチタン製クローズドコイルスプリングを装着した。

図3 上顎右側第一臼歯の近心移動距離の計測方法

M1：第一臼歯，M2：第二臼歯，M3：第三臼歯，X：近心移動距離を示す。矯正装置によりM1を近心方向へ牽引した。CT画像上で咬合平面から垂直に接線を引きM1の遠心最大膨隆部とM2の近心最大膨隆部を決定後，両線間の最短距離を移動距離とした。

図4上顎右側第一臼歯における3Dサーフェイスレンダリング像とCEJ-歯槽骨頂間距離の計測方法

aは計測方法，bは上顎右側臼歯部を頬側面，cは口蓋側面から見た像を示す。

bとcに各計測部位①～⑤を示す。①：上顎右側第一臼歯近心頬側根の頬側面，
②：遠心頬側根の頬側面，③：近心口蓋側根の口蓋側面，④：口蓋側中央根の口蓋側面，⑤：遠心口蓋側根の口蓋側面。

M1：第一臼歯，M2：第二臼歯，M3：第三臼歯，Y：CEJ-歯槽骨頂間距離。CT画像上で右側咬合平面から各歯根面中央部にて垂線を引き，線上にてCEJと歯槽骨頂の位置を決定後，それらの間をCEJ-歯槽骨頂間距離とした。

図5 上顎右側第一臼歯の移動距離

Control：未処置群，OTM：矯正装置装着群，OTM + Pg：矯正装置を装着した *P. gingivalis*感染群，OTM + Pg + Jix：矯正装置の装着と *P. gingivalis*感染を行なった鶏血藤投与群，平均値 ± S.D.，n = 5，*p < 0.05，N. S.：有意差なし。

図6上顎右側第一臼歯の近心移動距離計測時における各群のマイクロCT像

A. Control群，B. OTM群，C. OTM + Pg群，D. OTM + Pg + Jix群を示す。画像上の左側へ向かって歯を牽引した。

図7 上顎右側第一臼歯部CEJ-歯槽骨頂間の距離

Control：未処置群，OTM：矯正装置装着群，OTM + Pg：矯正装置を装着した *P. gingivalis* 感染群，OTM + Pg + Jix：矯正装置の装着と *P. gingivalis*感染を行なった鶏血藤投与群，平均値 ± S.D.，n = 5，*p < 0.05，N. S.：有意差なし。

図8 上顎右側第一臼歯遠心頬側根圧迫側における破骨細胞の解析

- (1) 第一臼歯遠心頬側根のマイクロCT像，破線枠は組織像観察部位を示す。画像上の左側へ向かって歯を牽引した。
- (2) 各群のTRAP染色像，A. Control群，B. OTM群，C. OTM + Pg群，D. OTM + Pg + Jix群，矢印：破骨細胞，PL：歯根膜，ab：歯槽骨，c：セメント質，e：エナメル質，pul：歯髄。スケールバー：10 μm，倍率 × 200。

図9 上顎右側第一臼歯遠心頬側根圧迫側の破骨細胞数

Control：未処置群，OTM：矯正装置装着群，OTM + Pg：矯正装置を装着した *P. gingivalis*感染群，OTM + Pg + Jix：矯正装置の装着と *P. gingivalis*感染を行なった鶏血藤投与群，平均値 ± S.D.，n = 5，*p < 0.05，N. S.：有意差なし。

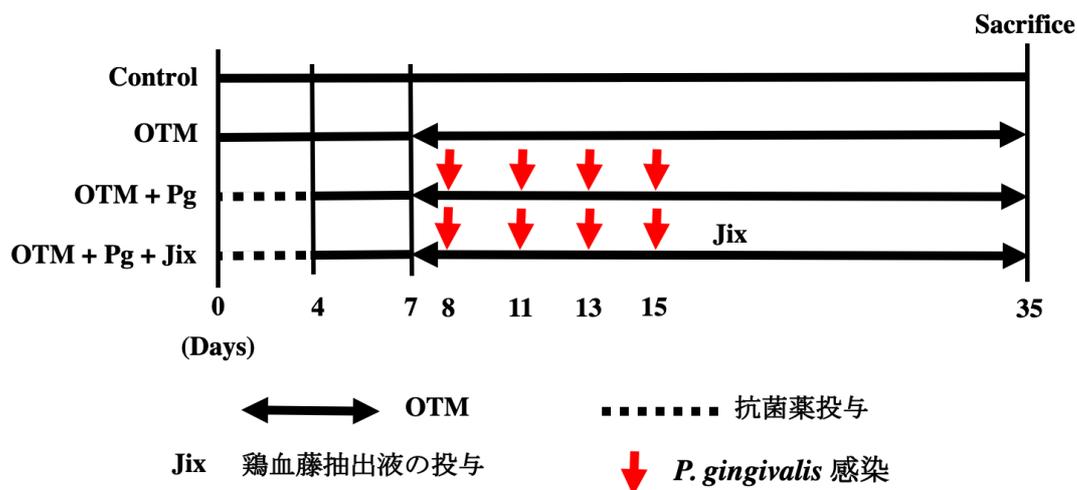


図1 実験スケジュール

Control：未処置群， OTM：矯正装置装着群， OTM + Pg：矯正装置を装着した *P. gingivalis*感染群， OTM + Pg + Jix：矯正装置の装着と *P. gingivalis*感染を行なった鶏血藤投与群。各群はn=5で行った。



図2 矯正装置を装着したラット口腔内写真

ラット上顎前歯と上顎右側第一臼歯間にニッケルチタン製クローズドコイルスプリングを装着した。

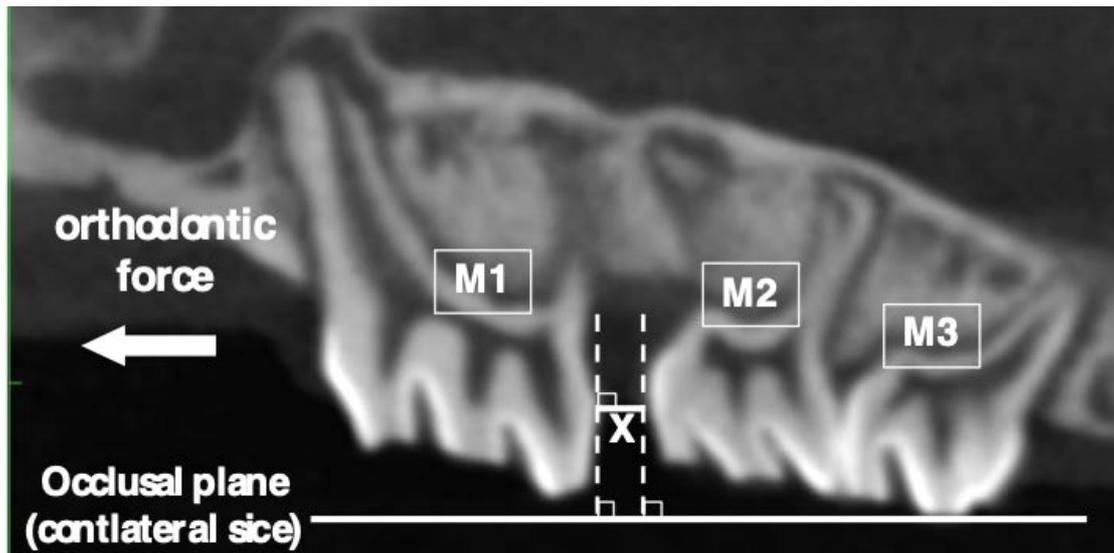


図3 上顎右側第一臼歯の近心移動距離の計測方法

M1：第一臼歯，M2：第二臼歯，M3：第三臼歯，X：近心移動距離を示す。矯正装置によりM1を近心方向へ牽引した。CT画像上で咬合平面から垂直に接線を引きM1の遠心最大膨隆部とM2の近心最大膨隆部を決定後，両線間の最短距離を移動距離とした。

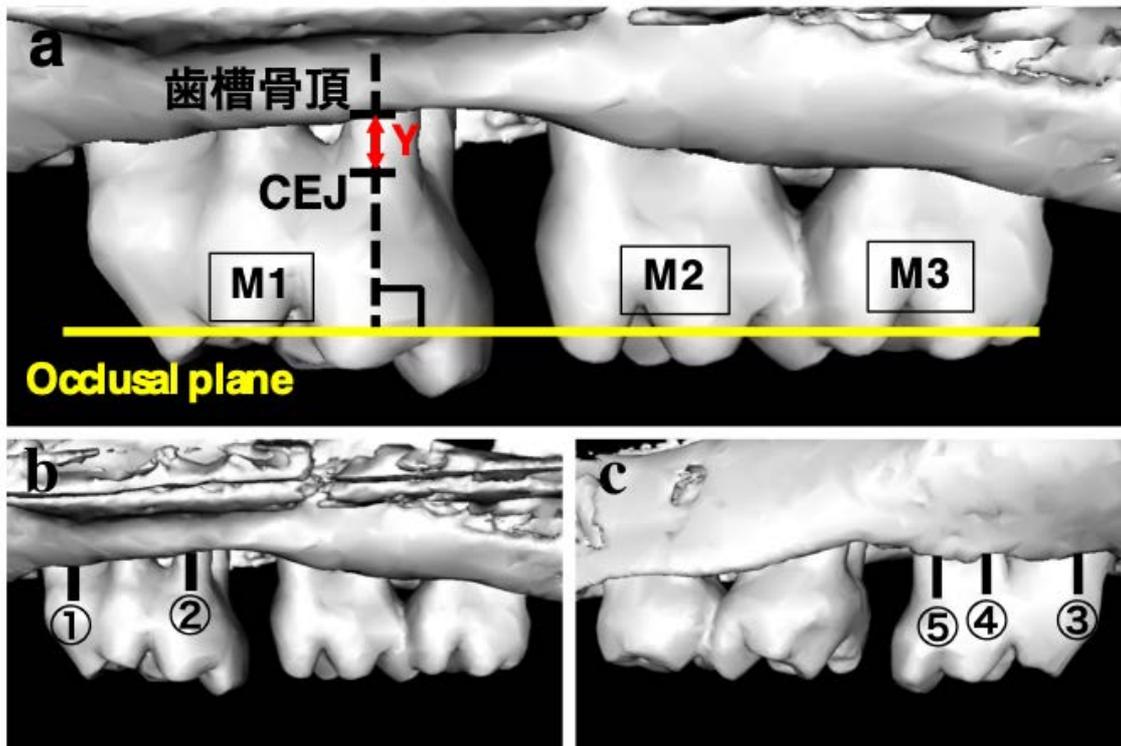


図4上顎右側第一臼歯における3Dサーフェイスレンダリング像とCEJ-歯槽骨頂間距離の計測方法

aは計測方法，bは上顎右側臼歯部を頬側面，cは口蓋側面から見た像を示す。

bとcに各計測部位①～⑤を示す。①：上顎右側第一臼歯近心頬側根の頬側面，
②：遠心頬側根の頬側面，③：近心口蓋側根の口蓋側面，④：口蓋側中央根の
口蓋側面，⑤：遠心口蓋側根の口蓋側面。

M1：第一臼歯，M2：第二臼歯，M3：第三臼歯，Y：CEJ-歯槽骨頂間距離。CT
画像上で右側咬合平面から各歯根面中央部にて垂線を引き，線上にてCEJと歯
槽骨頂の位置を決定後，それらの間をCEJ-歯槽骨頂間距離とした。

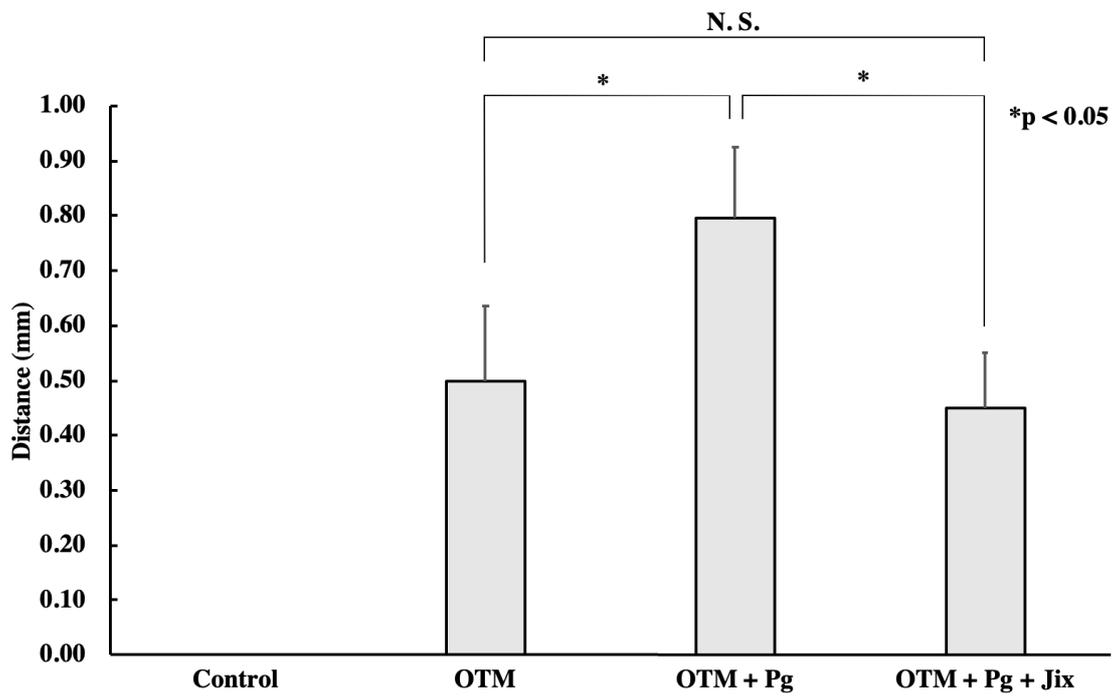


図5 上顎右側第一大臼歯の近心移動距離

Control：未処置群， OTM：矯正装置装着群， OTM + Pg：矯正装置を装着した *P. gingivalis*感染群， OTM + Pg + Jix：矯正装置の装着と *P. gingivalis*感染を行なった鶏血藤投与群。平均値 ± S.D.， n = 5， *p < 0.05， N. S.：有意差なし。

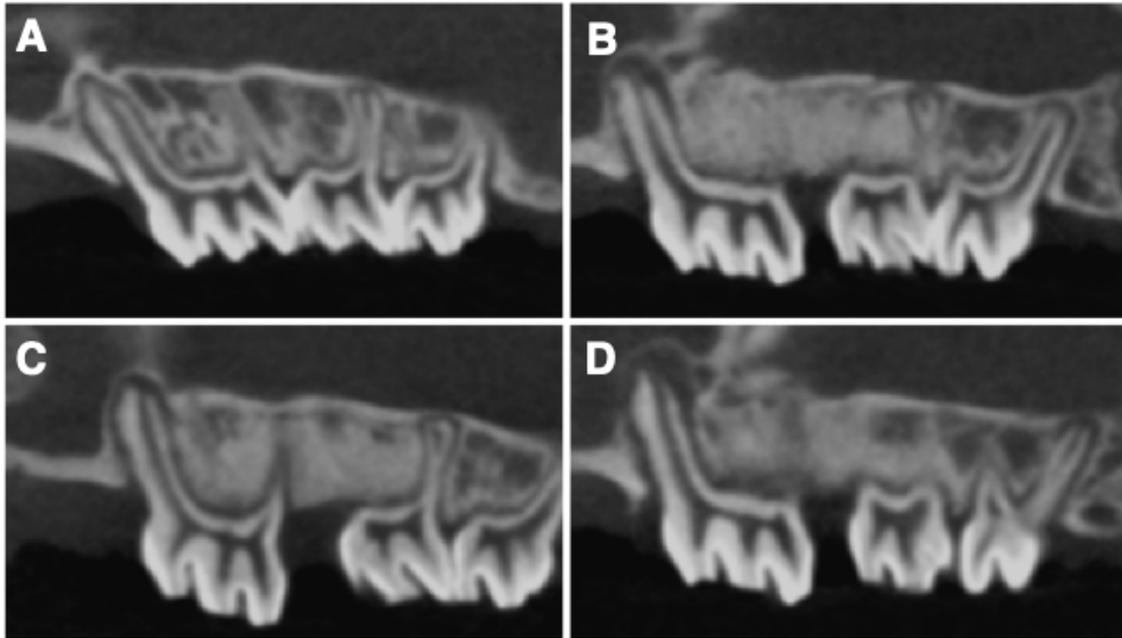


図6 上顎右側第一臼歯の近心移動距離計測時におけるマイクロCT像

A. Control群, B. OTM群, C. OTM + Pg群, D. OTM + Pg + Jix群を示す。画像上の左側へ向かって歯を牽引した。

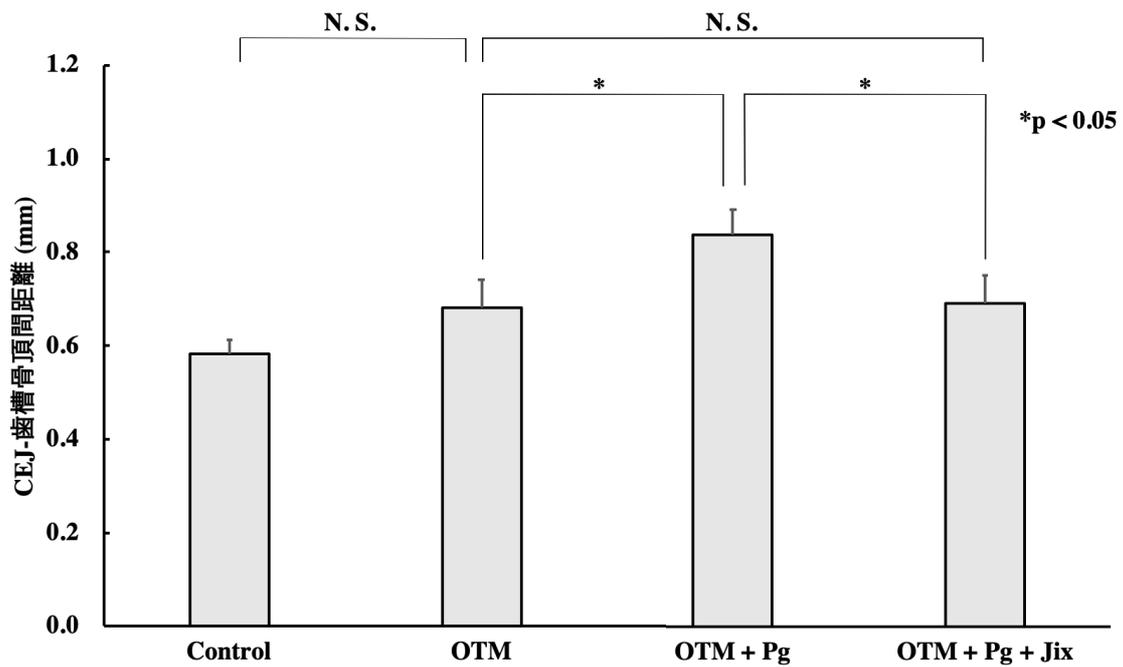


図7 上顎右側第一臼歯部CEJ-歯槽骨頂間の距離

Control：未処置群， OTM：矯正装置装着群， OTM + Pg：矯正装置を装着した *P. gingivalis*感染群， OTM + Pg + Jix：矯正装置の装着と *P. gingivalis*感染を行なった鶏血藤投与群， 平均値 ± S.D.， n = 5， *p < 0.05， N. S.：有意差なし。

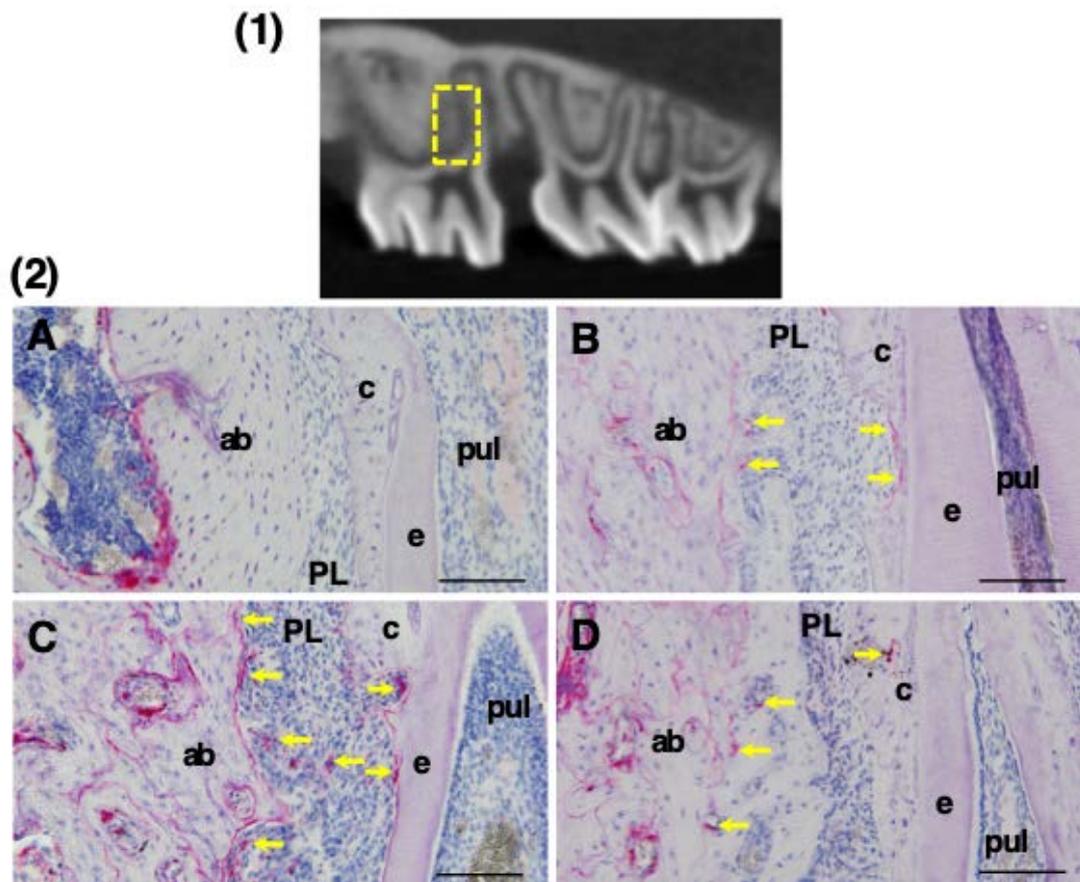


図8 上顎右側第一臼歯遠心頬側根圧迫側における破骨細胞の解析

(1) 第一臼歯遠心頬側根のマイクロCT像，破線枠は組織像観察部位を示す。画像上の左側へ向かって歯を牽引した。

(2) 各群のTRAP染色像，A. Control群，B. OTM群，C. OTM + Pg群，D. OTM + Pg + Jix群，矢印：破骨細胞，PL：歯根膜，ab：歯槽骨，c：セメント質，e：エナメル質，pul：歯髄。スケールバー：10 μ m，倍率 \times 200。

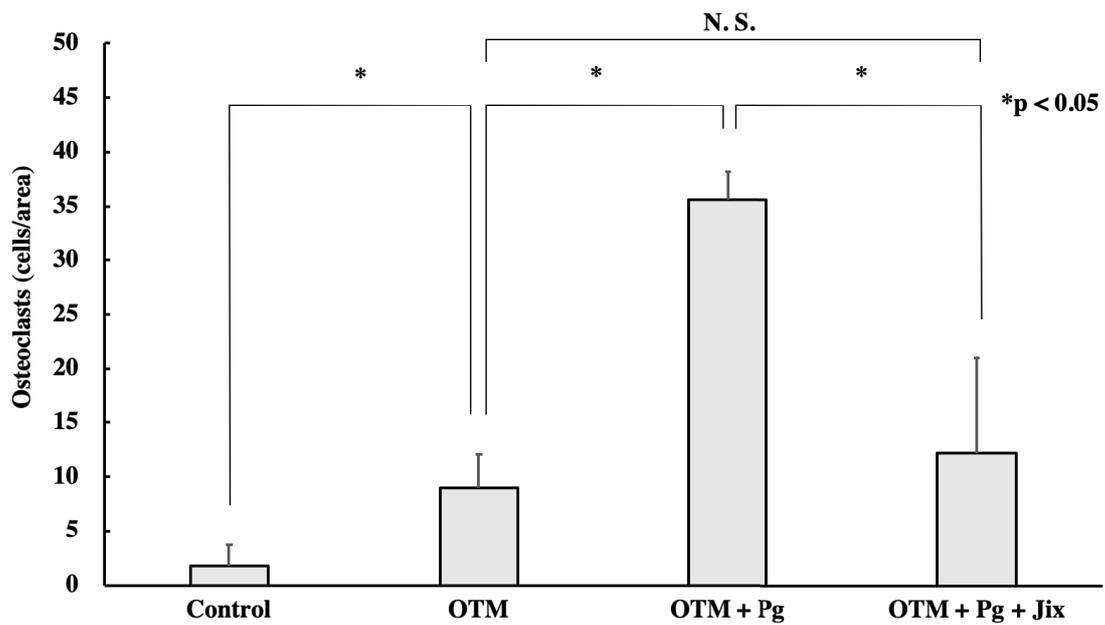


図9 上顎右側第一臼歯遠心頬側根圧迫側の破骨細胞数

Control : 未処置群, OTM : 矯正装置装着群, OTM + Pg : 矯正装置を装着した *P. gingivalis*感染群, OTM + Pg + Jix : 矯正装置の装着と *P. gingivalis*感染を行なった鶏血藤投与群, 平均値 ± S.D., n = 5, *p < 0.05, N. S. : 有意差なし。