

メトホルミン局所投与による歯周炎予防効果の検討

いかみ ひろたか

伊神 裕高

本論文の要旨は，第 200 回朝日大学大学院歯学研究科発表会（2021 年 11 月 5 日，瑞穂市）において発表した．本論文の一部は，第 63 回日本歯周病学会秋季学術大会（2020 年 10 月 16 日，WEB 開催）において発表した．また第 64 回日本歯周病学会秋季学術大会（2021 年 10 月 15 日，名古屋市）において発表した．

緒 言

メトホルミン（MT）は，ビグアナイド誘導体（1，1-ジメチルビグアナイド塩酸塩）であり，2型糖尿病の治療薬として多くの国で糖尿病治療の第一選択薬になっている．MTの作用機序は肝臓の糖新生の抑制，骨格筋・脂肪組織の糖取り込みの促進，腸管からの糖質吸収抑制が報告されている¹⁾．

MTは，血糖のコントロール以外にも有益な作用を持つ．MTの標的分子であるアデノシン一リン酸活性化キナーゼ（AMPK）は，骨芽細胞を活性化し骨量を維持すること²⁾，線維芽細胞のオートファジーを高め肺線維腫症を抑えること³⁾，またAMPKの活性を介してmammalian target of rapamycin（mTOR）シグナル経路を抑制することでMTは組織老化に抵抗するという報告もある⁴⁾．一方MTによるmTORシグナル経路の抑制は，インターロイキン-1 β （IL-1 β ）を含むサイトカインを減少させ炎症抑制に働くことも示されている⁵⁾．

歯周炎に対するMTの作用に関する研究が近年注目され始め，歯周炎を惹起したラット歯槽骨吸収に対しMTが骨吸収抑制効果を示したとする研究⁶⁾や，MTを歯周炎患者のSRP後にポ

ケット内貼付し，歯周ポケットの減少に効果があったとするランダム化比較臨床試験の報告⁷⁾がある．これらの先行研究から炎症性骨吸収や，歯肉への局所投与でも MT は有効であることが明らかになってきている．

しかしながら，歯周炎の発症を MT で予防するという試みはなされていない．そこで本研究では歯周炎の予防に歯肉への MT 局所投与が有効かどうか明らかにすることを目的とした．

材 料 お よ び 方 法

1. 実 験 動 物

本 研 究 は 朝 日 大 学 動 物 実 験 管 理 規 定 に 従 い 朝 日 大 学 動 物 実 験 専 門 委 員 会 の 承 認 を 受 け て 実 施 し た (承 認 番 号 20-023). 加 齢 お よ び 若 齢 マ ウ ス へ の MT 局 所 投 与 の 比 較 に は 60~70 週 齢 (A g e d 群) ⁸⁾ 雄 性 C57BL/6J-A g e d マ ウ ス (日 本 チ ャ ー ル ズ ・ リ バ ー , 横 浜) お よ び 10 週 齢 (Y o u n g 群) 雄 性 C57BL/6J マ ウ ス (日 本 チ ャ ー ル ズ ・ リ バ ー) 各 10 匹 計 20 匹 を 用 い た . ま た 実 験 的 歯 周 炎 に 対 す る MT 局 所 投 与 効 果 の 検 討 に は 60~70 週 齢 雄 性 C57BL/6J-A g e d マ ウ ス (日 本 チ ャ ー ル ズ ・ リ バ ー) 12 匹 を 用 い た .

2. 実 験 ス ケ ジ ュ ー ル

A g e d 群 , Y o u n g 群 と も に 実 験 群 (MT 群) 5 匹 , 対 照 群 (PBS 群) 5 匹 ず つ に 振 り 分 け た (図 1). ま た 実 験 的 歯 周 炎 に 対 す る MT の 効 果 の 検 討 に は MT 群 と PBS 群 と も に 6 匹 ず つ 振 り 分 け た (図 2). 実 験 は 小 動 物 用 麻 酔 器 (F o r a n e Forawick vaporizer, ム ラ コ メ デ ィ カ ル , 東 京)

を用いてイソフルラン（フォーレン，アボットジャパン，東京）を吸入させ鎮静麻醉下（4%導入，2%維持）⁹⁾にて行った．上顎右側第二臼歯部口蓋側歯槽歯肉に実験群では1%MT-PBS溶液（Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA），対照群にはPBSを週3回4週間局所投与した^{10,11)}．口蓋側歯槽歯肉への局所投与はマウスの口腔内の侵襲を最小限に抑えるために30Gの皮下用注射針（BD ロードーズ，日本ベクトン・ディッキンソン，福島）を使用した¹²⁾．MTの投与量は4 μ Lとし¹³⁾，対照群にはPBSを同量投与した．投与終了7日後に屠殺した（図1）．歯周炎モデルでは投与終了後マウスの第二臼歯周囲に歯肉炎を惹起させる目的で5-0絹糸（5-0，アルフレッサ，大阪）を結紮し¹⁴⁾，4日後に屠殺した^{15,16)}（図2）．屠殺後，上顎を摘出し4%パラホルムアルデヒド溶液で固定を行った．

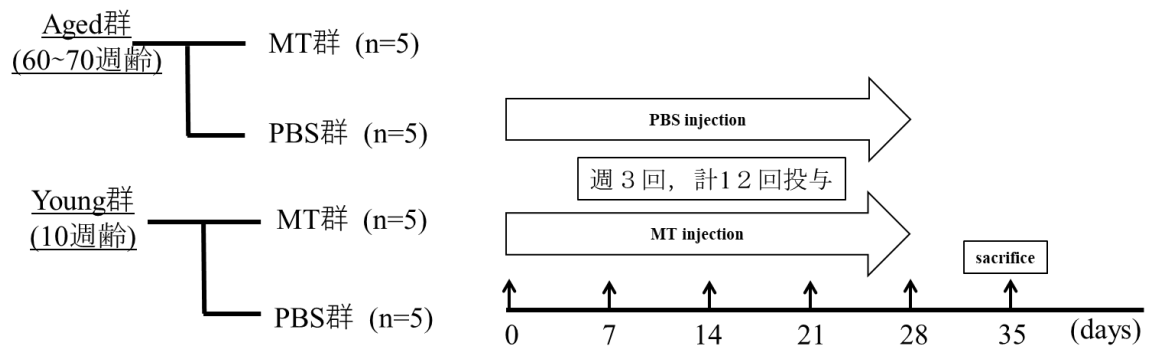


図 1 各マウス群と加齢および若齢マウス歯肉へのMT局所投与の実験スケジュール

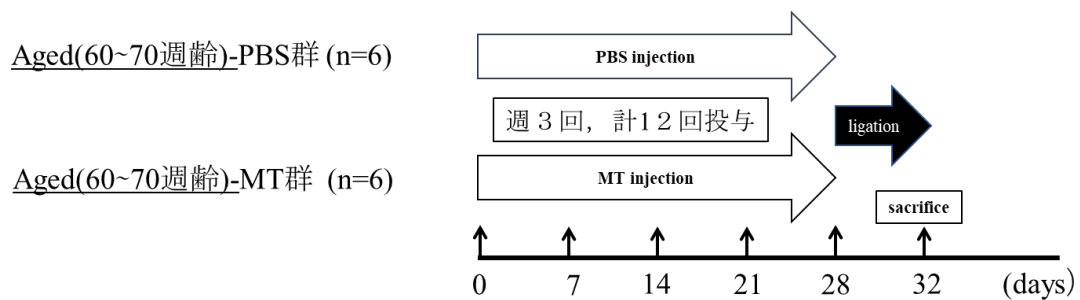


図 2 各マウス群と実験的歯周炎に対するMT局所投与の実験スケジュール

3. 口腔内画像観察

マウスの上顎組織を観察するため，屠殺直後にデジタルカメラ（D5500，装着レンズはAF-S Micro NIKKOR 60mm，NIKON，東京）を使用して倍率1/1.2にて撮影を行った。

4. マイクロ CT 画像観察および計測

上顎は固定後にマイクロ CT 装置 (Scanmate-RB090SS150, Comscan, 横浜) を使用して管電圧 89.0 KV, 管電流 90.0 μ A, 倍率 5.0 倍の設定で断層撮影を行った. 得られたデータはコーンビーム再構成ソフトウェア (ConeCTexpress, コムスキャンテクノ, 横浜) により再構成を行い, 画像解析ソフトウェア (TRIBon, ラトックシステムエンジニアリング, 東京) を用いて上顎骨の形態を 3 次元的に観察した. 結紮により実験的に歯周炎を惹起させたマウスのマイクロ CT 画像より, セメント-エナメル境 (CEJ) から歯槽骨頂までの距離 (CEJ-ABC distance) を画像処理ソフトウェア (Image J, NIH, Bethesda, MD, USA) を用いて森永ら¹⁷⁾の方法に従い計測した. 第二臼歯口蓋側の近心, 中央, 遠心の 3 か所を計測ポイントとし, 測定結果は平均値 \pm 標準偏差で表した.

5. 血清サイトカインの測定

屠殺直前に 60~70 週齢および 10 週齢マウスから心臓穿刺により末梢静脈血液を採取し, 遠心分離機にて血清を調整した. 血清中のサイトカインを ab193660-Mouse Cytokine Antibody Array Membrane (Abcam, Cambridge, UK) を用いて検出した. 検出後のメンブレンはスキャナー (GT-

X970, エプソン, 長野) にて画像を取り込み, 画像処理ソフトウェア (Image J) を用いてスポットの濃度を測定した¹⁸⁾. 各 array 間の抗原-抗体反応の差は, positive control を基準として補正を行った. Array には各サイトカインに対し 2 つのスポットが用意されているため, 各サイトカイン量は 2 つのスポットの平均値とした. 数値は相対的なデンシトメトリー測定 (RDM) を行い, 平均値 ± 標準偏差を表した.

6. マウス歯肉における創傷治癒関連遺伝子発現のリアルタイム PCR 解析

4 週間の MT 局所投与後, 70 週齢および 10 週齢の各群マウスから右側口蓋歯肉を採取し, 歯肉からの全 RNA の分離は林ら方法¹⁹⁾に従い, RNeasy Mini Kit (QIAGEN, Redwood, CA, USA) を用いて RNA を溶出した. 全ての RNA をもとに cDNA 合成キット (RT2 First Strand Kit, QIAGEN) を用いて逆転写を行って相補鎖 DNA (cDNA) を作成した. 得られた cDNA から PROFILER™ PCR Array Mouse Wound Healing Kit (QIAGEN) を用いて創傷治癒関連遺伝子発現の検討を行った. この Kit には 5 種類のハウスキーピング遺伝子 (B2M, HPRT1, RPL13A, GAPDH, ACTB) の他, ポジティブコントロールが含まれ

ており，データの適正化に用いた^{19,20)}．得られた結果を $\Delta\Delta Ct$ 法にて Fold Change 解析を行った (Excel, Ver 2010, Microsoft, Albuquerque, NM, USA)．

7. 組織標本作製

上顎は 10 %中性緩衝ホルマリンで固定し，10 %EDTA (pH 7.4) 溶液で 2 週間脱灰した．通法¹⁹⁾に従い，パラフィン包埋し矢状方向に厚さ 5 μm の組織標本作製した．切片は投与部位付近のものを選び，ヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色²¹⁾，酒石酸抵抗性酸ホスファターゼ (TRAP) 染色²²⁾，アザン・マロリー (AZAN) 染色²³⁾を行った．

8. 組織観察および計測

歯周炎モデルマウスの HE 染色と TRAP 染色後の標本はシステム生物顕微鏡 (BX53, Olympus, 東京) を用いて観察した．HE 染色切片で組織内の炎症性細胞数を計測した．歯槽骨頂から歯冠側の結合組織と接合上皮組織を炎症細胞計測範囲 (mm^2) と，面積あたりの炎症細胞数の定量を行った^{20,24,25)}．類円形の核を有する細胞を炎症性細胞とした．また TRAP 染色切片で組織内の歯槽骨表層における TRAP 陽性細胞の数を計測した．

齒槽骨頂から根尖相当の齒槽突起内側表面を計測する範囲と設定し，齒槽骨表面の長さ（mm）を測定してその骨表面上のTRAP陽性細胞数を測定した^{17,26,27}。

9. 統計学的分析

実験データは平均値±標準偏差で示した．有意差検定は分散分析（ANOVA）を行った後に post-hoc として Tukey 検定を用いて行い有意水準を 5% に設定し， p 値が有意水準を下回る場合には有意差ありと判断した（SPSS Statistics, Ver. 27, IBM, Chicago, IL, USA）．

結 果

1 . M T または P B S を 局 所 投 与 し た マ ウ ス 口 腔 内 画 像 観 察

マウス口腔内画像を図 3 に示す．すべての局所投与部位において周囲の組織に顕著な発赤や腫脹などの炎症性変化は観察されなかった（図 3）．

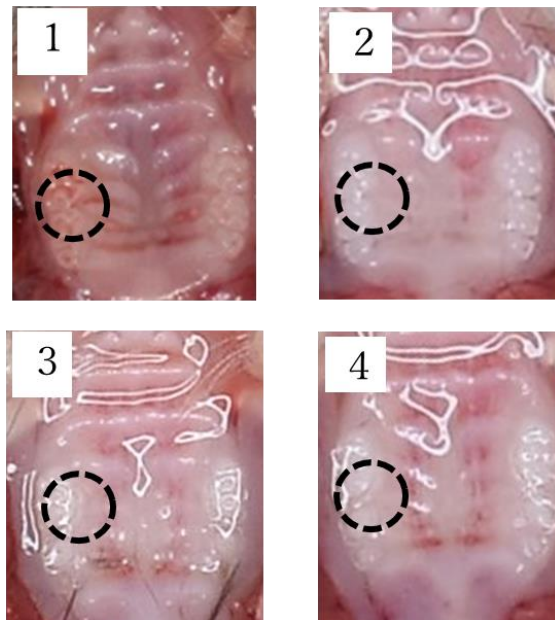


図 3 口 腔 内 画 像

1 : Y o u n g - M T 群 2 : Y o u n g - P B S 群 3 : A g e d - M T 群

4 : A g e d - P B S 群

投 与 部 位 を 破 線 で 示 す ．

2. マイクロ CT 画像観察

マイクロ CT 画像を図 4 に示す．投与部位周囲の臼歯部口蓋側を観察した．Young 群と Aged 群を比べると Aged-MT 群，Aged-PBS 群ともに骨吸収が存在していた（図 4）．

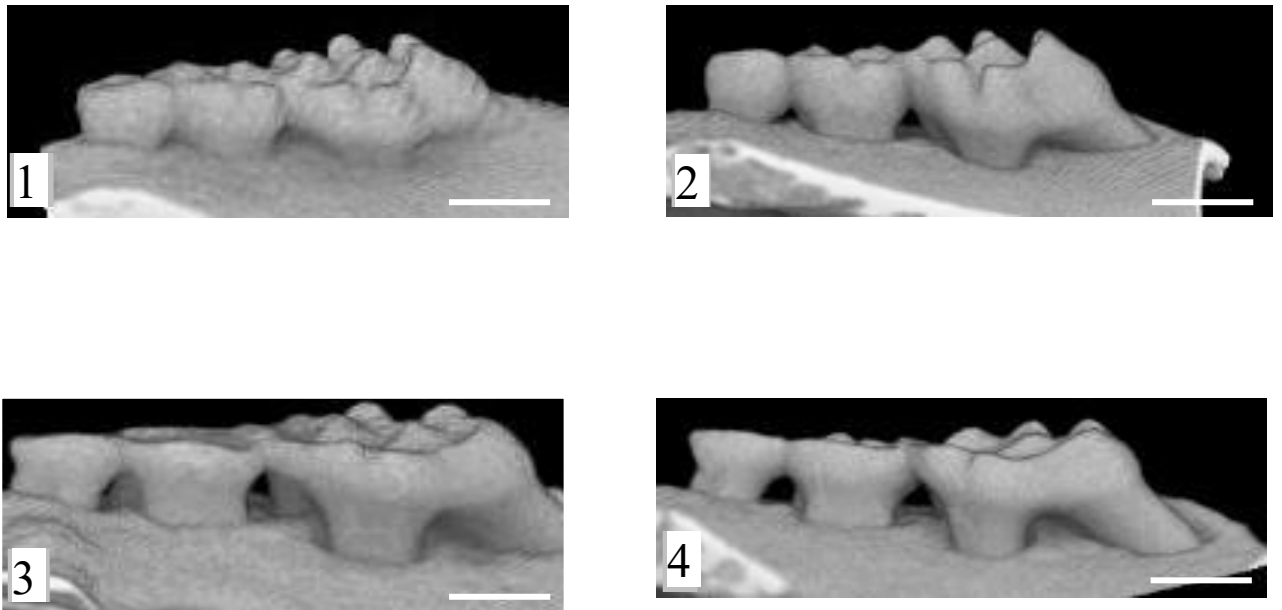


図 4 上顎臼歯部のマイクロ CT 画像

1 : Young-MT 群 2 : Young-PBS 群 3 : Aged-MT 群
4 : Aged-PBS 群 スケールバー : 1 mm

3. 組織学的観察（HE染色）

HE染色組織像を図5に示す．Aged-MT群の投与部位周囲の歯周組織像では，炎症細胞の浸潤，歯肉の付着破壊がAged-PBS群と比較して抑制されているのが観察された（図5）．

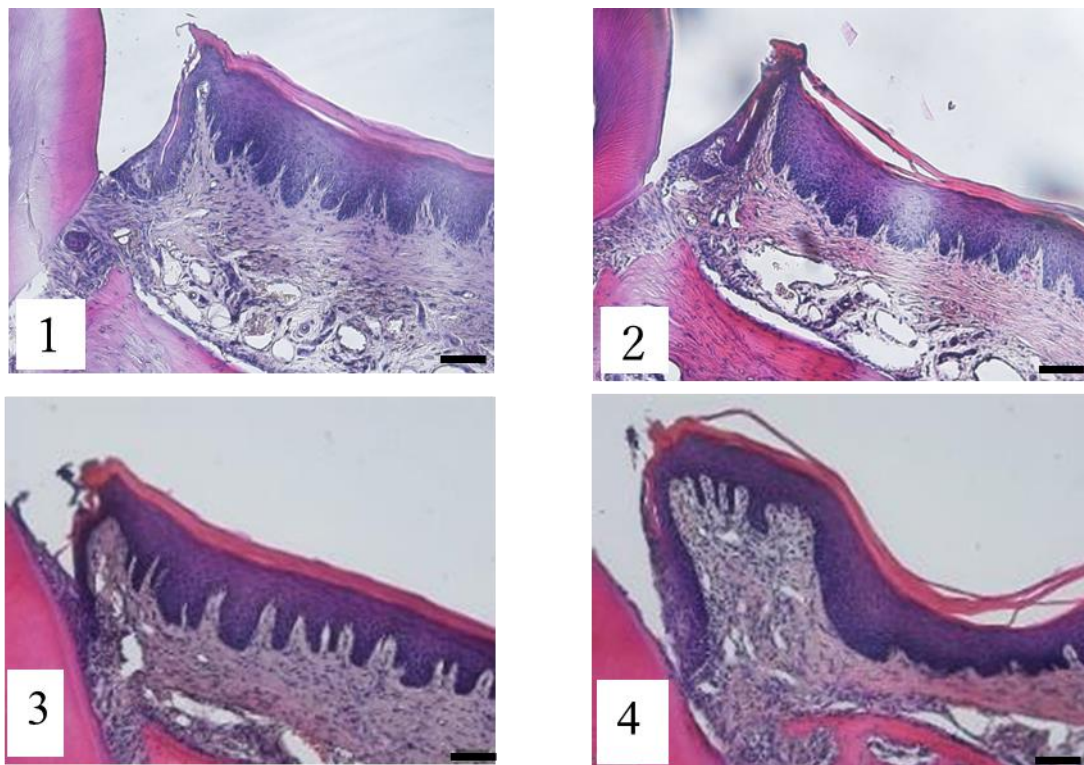


図 5 HE 染色

1: Young-MT 群 2: Young-PBS 群 3: Aged-MT 群

4: Aged-PBS 群 スケールバー : 100 μ m

4. 血清中のサイトカイン測定値

Aged 群のサイトカイン値と平均値 ± 標準偏差を表 1 に示す. Aged-MT 群と Aged-PBS 群を比較していずれの血清中のサイトカインにも有意差は認められなかった.

表 1 検出された血清サイトカイン

Parameters	Aged-MT	Aged-PBS
LIX	0.575 ± 0.045	0.424 ± 0.124 (RDM)
IGFBP-2	0.646 ± 0.080	0.758 ± 0.126 (RDM)
IGF-1	0.639 ± 0.013	0.661 ± 0.084 (RDM)
TCK-1	0.703 ± 0.012	0.749 ± 0.126 (RDM)
ACE	0.745 ± 0.024	0.826 ± 0.103 (RDM)
E-Cadherin	0.962 ± 0.019	0.815 ± 0.093 (RDM)
VCAM-1(CD106)	0.486 ± 0.058	0.507 ± 0.031 (RDM)
MMP-3	0.517 ± 0.017	0.484 ± 0.007 (RDM)

n = 3

5. マウス歯肉における創傷治癒関連遺伝子発現 のリアルタイムPCR解析

各群マウス歯肉における創傷治癒関連遺伝子の発現検討を，リアルタイムPCRアレイを用いて行なった．実験を2回行ったが有意差は認めなかった．結果の例を表2に示す．Aged-MT群でAged-PBS群に対してCxc13，Cxc15，MMP7，Csf3の発現が低下し，Coll α 1，Col4 α 3，TIMP-1，EGFの発現上昇を認めた．

表2 Aged-MT群歯肉組織で発現上昇または発現低下を認めた遺伝子

Genes Over-Expressed in MT vs. PBS	
Gene Symbol	Fold Change
Colla1	2.25
Col4a3	2.55
EGF	2.74
TIMP-1	2.91
Genes Under-Expressed in MT vs. PBS	
Gene Symbol	Fold Change
Csf3	0.06
Cxcl3	0.07
Cxcl5	0.04
MMP7	0.31

n = 2

6. 実験的歯周炎を惹起させたマウス口腔内画像

デジタルカメラ画像を図 6 に示す．結紮部位において MT 群と比較して PBS 群では，歯肉の発赤，歯肉の陥凹など炎症性変化が右側第二臼歯口蓋側歯肉に観察された（図 6）．

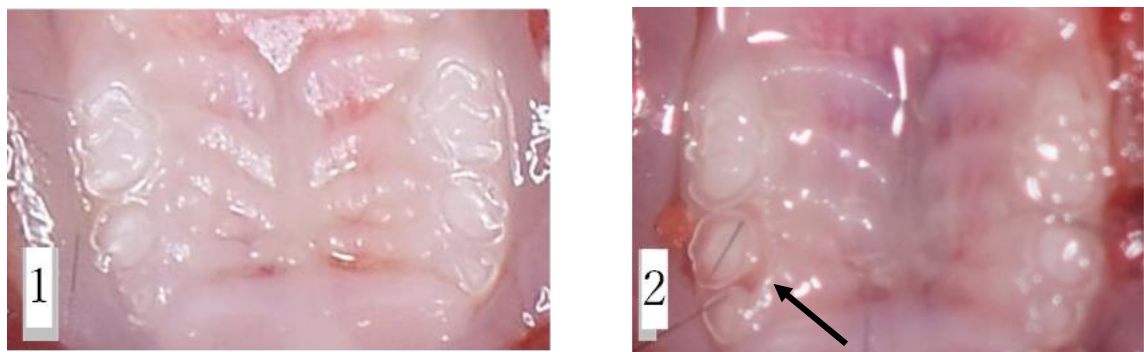


図 6 口腔内写真画像

1：MT 群 2：PBS 群

炎症性変化を矢印で示す．

7. 結紮側，非結紮側での歯槽骨吸収の観察

結紮部周囲の臼歯部歯槽骨のマイクロCT画像を示す．MT群非結紮側，PBS群非結紮側ともに加齢による骨吸収が存在していた．またMT群結紮側，PBS群結紮側ともに第二臼歯周囲の歯槽骨吸収がさらに亢進されていた（図7）．

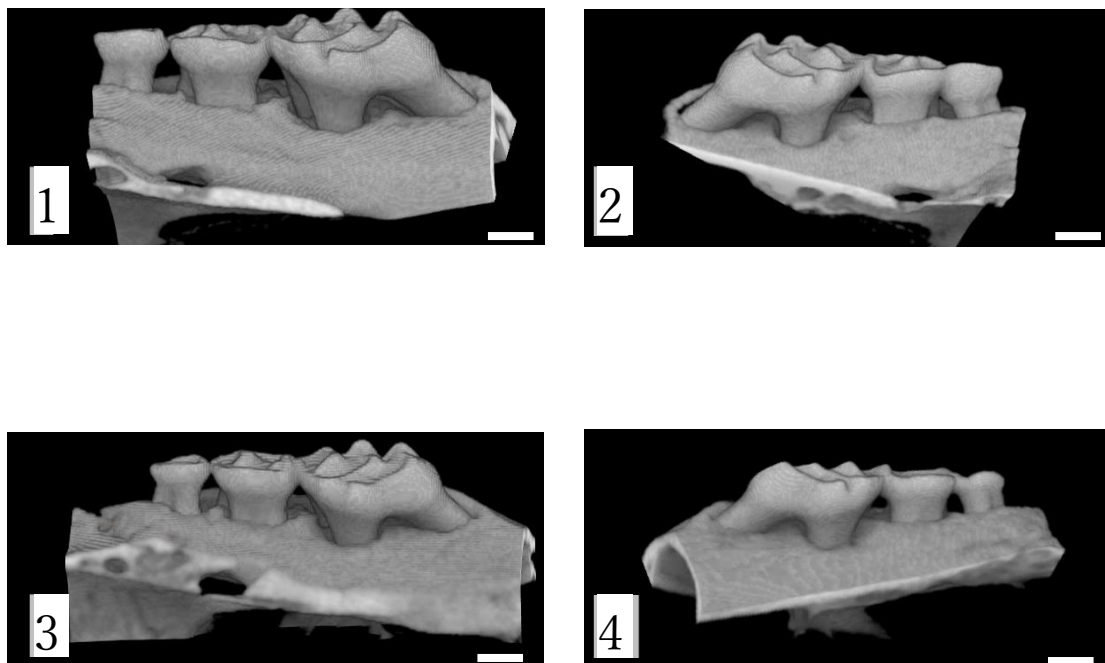


図 7 上顎骨臼歯部のマイクロCT画像

1：MT群結紮側 2：MT群非結紮側

3：PBS群結紮側 4：PBS群非結紮側

スケールバー：1 mm

8. マイクロ CT 画像計測

CEJ から歯槽骨頂までの距離を計測して平均値 ± 標準偏差で表し，各群を比較した．MT 群結紮側は 1.435 ± 0.361 mm，MT 群非結紮側は 1.336 ± 0.183 mm，PBS 群結紮側は 1.570 ± 0.150 mm，PBS 群非結紮側は 1.273 ± 0.029 mm であった．

非結紮側では MT 群と PBS 群を比較して骨吸収量に有意差は認めなかった．また MT 群の結紮側と非結紮側の比較においても骨吸収量に有意差は認めなかった．PBS 群結紮側ではいずれの非結紮側と比較して有意に高い骨吸収量を示した ($p < 0.05$) (図 8)．

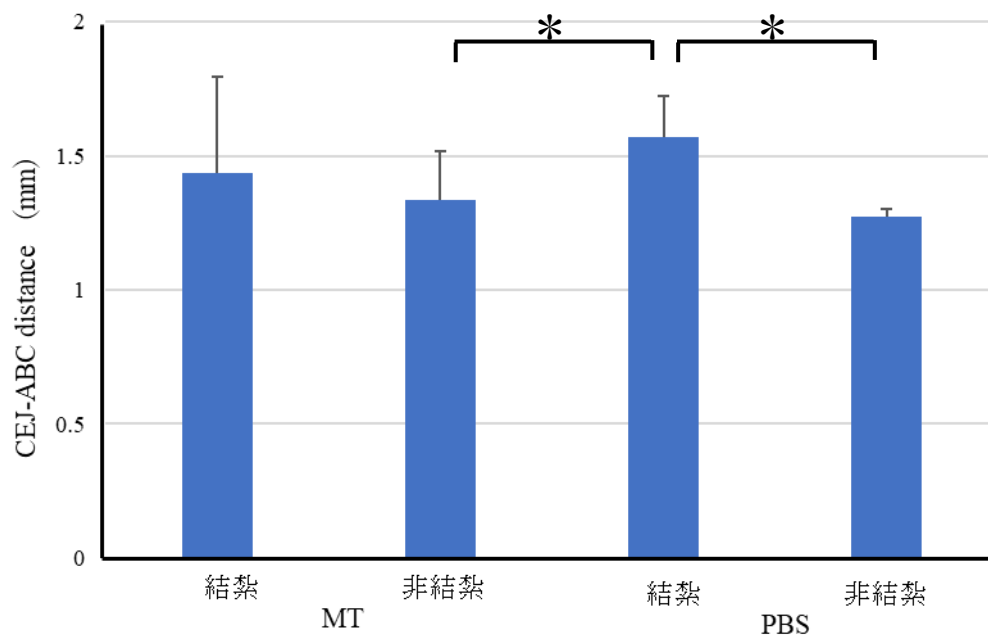


図 8 歯槽骨吸収量 (mm)

n = 6, mean ± SD * 有意差あり ($p < 0.05$)

9. 組織学的観察

1) HE 染色

HE 組織画像を図 9 に示す．結紮側では非結紮側と比較して顕著な歯槽骨吸収，炎症性細胞浸潤や歯周ポケット形成が認められた．PBS 群結紮側と比較して MT 群結紮側では小型円形を示す炎症細胞浸潤や，歯周ポケット形成は軽度であった（図 9）．

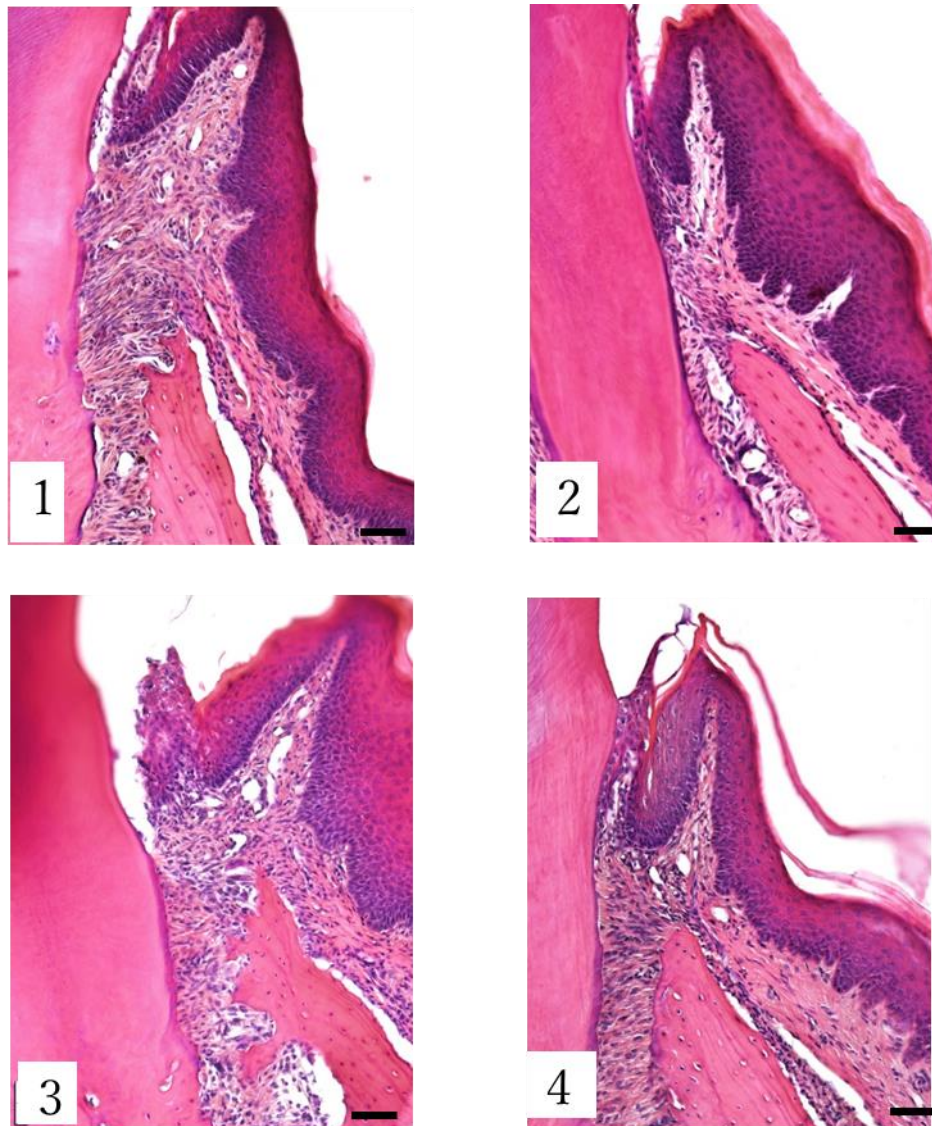


図 9 HE 染色

1 : MT 群 結 紮 側 2 : MT 群 非 結 紮 側

3 : PBS 群 結 紮 側 4 : PBS 群 非 結 紮 側

スケールバー : 50 μ m

2) TRAP 染色

TRAP 染色画像を図 10 に示す． TRAP 陽性細胞は非結紮側に比べて結紮側で多く観察された． MT 群結紮側と PBS-群結紮側を比較すると， MT 群では観察できる TRAP 陽性細胞数は少なかった． 一方非結紮側では MT 群非結紮側， PBS 群非結紮群側ともに TRAP 陽性細胞はほとんど認められなかった（図 10）．

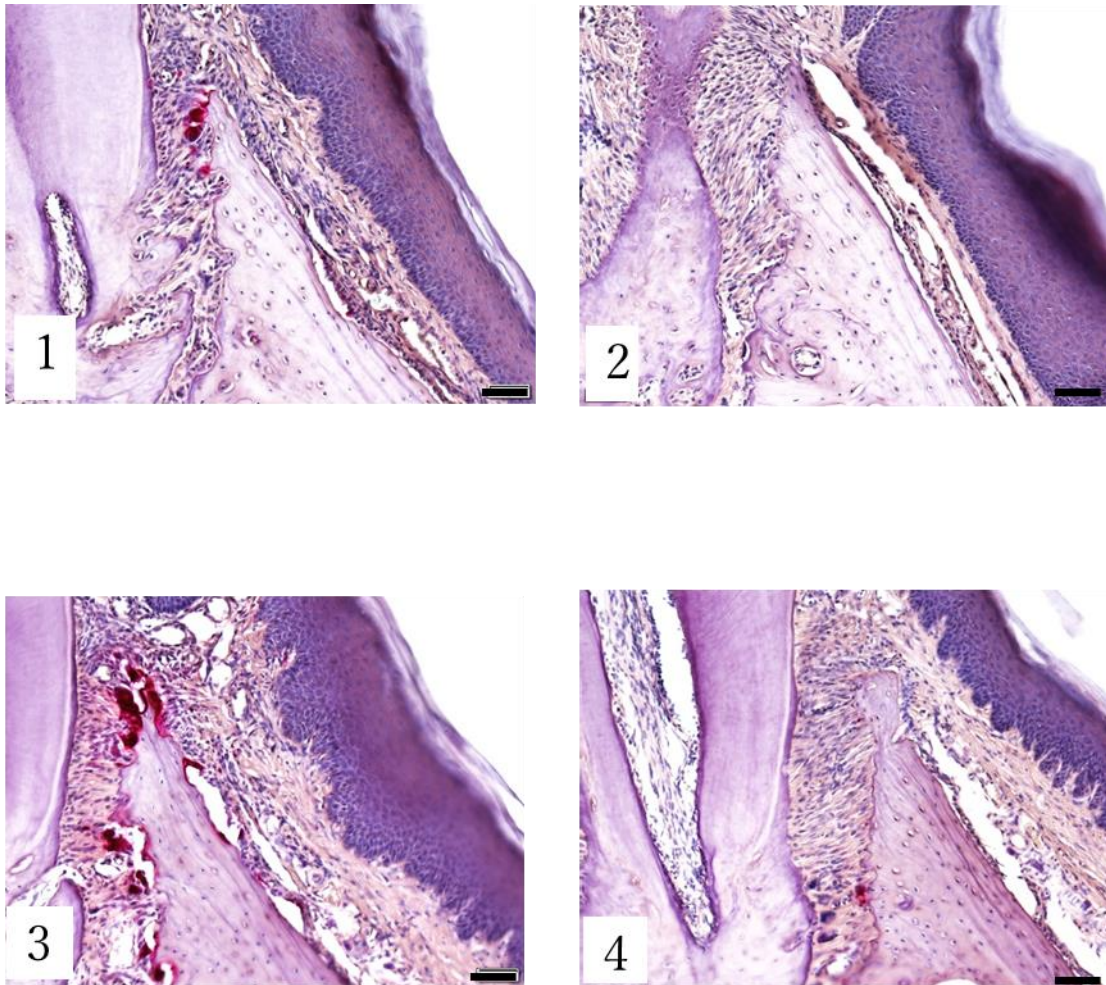


図 10 TRAP 染色像

1:MT 群 結 紮 側 2:MT 群 非 結 紮 側

3:PBS 群 結 紮 側 4:PBS 群 非 結 紮 側

スケールバー : 50 μ m

赤く濃染しているのが TRAP 陽性細胞

3) AZAN 染色

AZAN 染色像を図 11 に示す．PBS 群結紮側では，結紮部周囲から歯槽骨頂にかけて膠原線維の減少と走行の乱れを認めた．MT 群結紮側では、膠原線維の密度は維持され，その走行は正常組織との連続性を保っており，非結紮側とほぼ同密度の膠原線維が観察された（図 11）．

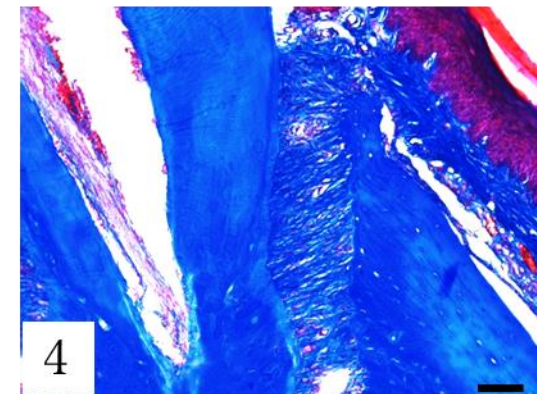
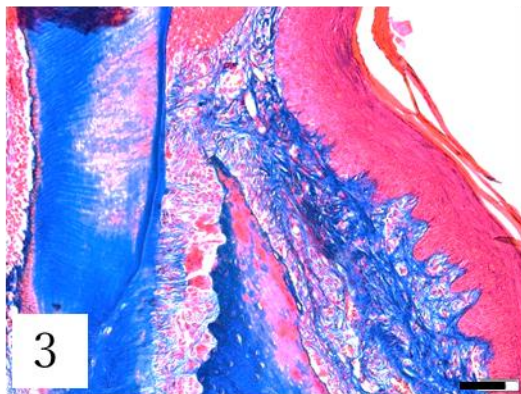
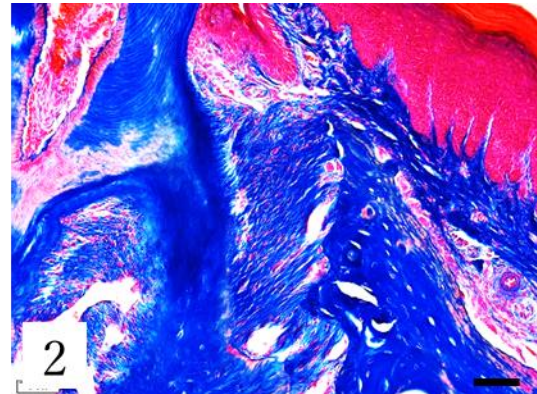
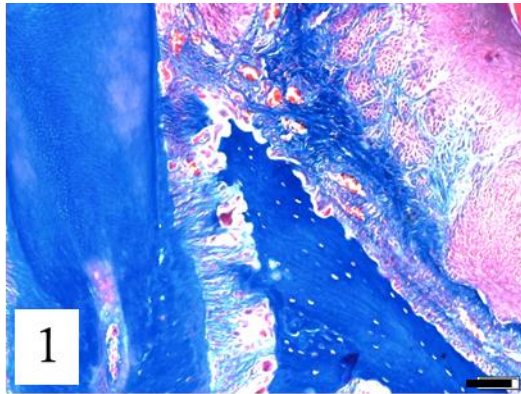


図 11 AZAN 染色画像

1:MT 群 結 紮 側 2:MT 群 非 結 紮 側

3:PBS 群 結 紮 側 4:PBS 群 非 結 紮 側

スケールバー : 50 μ m

10. 組織計測

1) 炎症細胞数の計測

歯槽骨頂から歯冠側の結合組織および接合上皮を計測範囲として測定した。1mm²当たりの小型円形を主体とする炎症細胞の浸潤から炎症細胞数を算定して平均値±標準偏差とした。MT群結紮側では 1.962 ± 0.699 cells/mm²，MT群非結紮側では 1.951 ± 0.639 cells/mm²，PBS群結紮側では 3.267 ± 0.812 cells/mm²，PBS群非結紮側では 2.089 ± 0.750 cells/mm²であった。PBS群結紮側と比較してMT群結紮側，MT群非結紮側，PBS群非結紮側で有意に炎症細胞数の減少を認めた ($p < 0.05$)。非結紮側ではMT群とPBS群を比較して炎症細胞数に有意差は認められなかった (図12)。

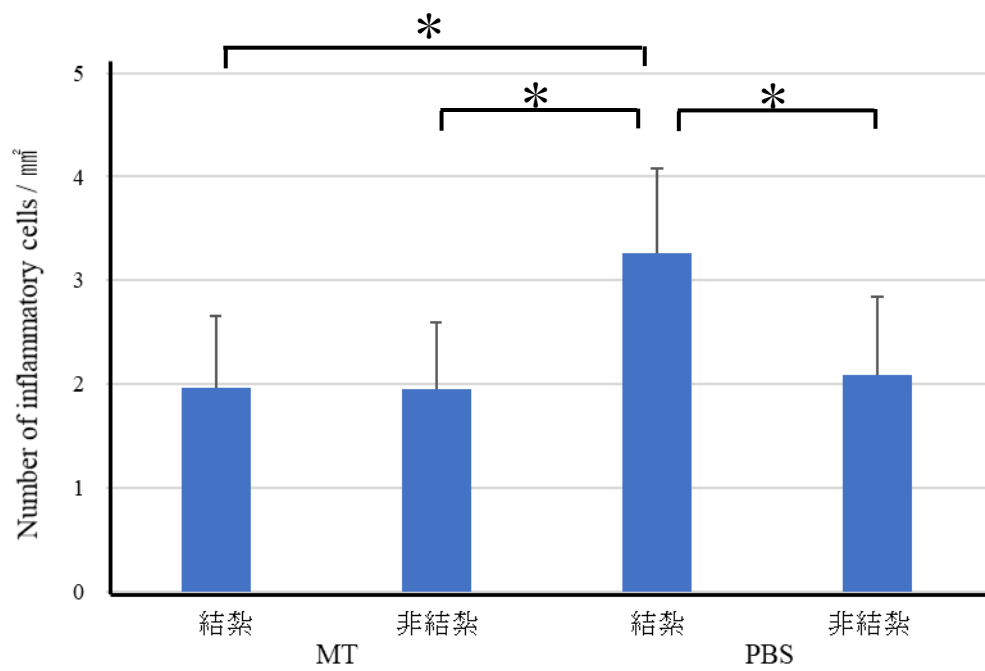


図 12 周囲歯肉結合組織および付着上皮内の炎症細胞数の定量化

$n = 6$, $\text{mean} \pm \text{SD}$ * 有意差あり ($p < 0.05$)

2) TRAP 陽性細胞数の計測

歯槽骨表面の長さを測定して 1 mm あたりの TRAP 陽性細胞の数を算定し平均値±標準偏差とした。MT 群結紮側は 4.96 ± 1.74 cells/mm, MT 群非結紮側は 1.06 ± 1.61 cells/mm, PBS 群結紮側は 10.28 ± 0.72 cells/mm, PBS 群非結紮側は 1.54 ± 0.72 cells/mm だった。PBS 群結紮側は PBS 群非結紮側, MT 群結紮側, MT 群非結紮側と比較して TRAP 陽性細胞数は有意 ($p < 0.05$) に増加していた (図 12)。

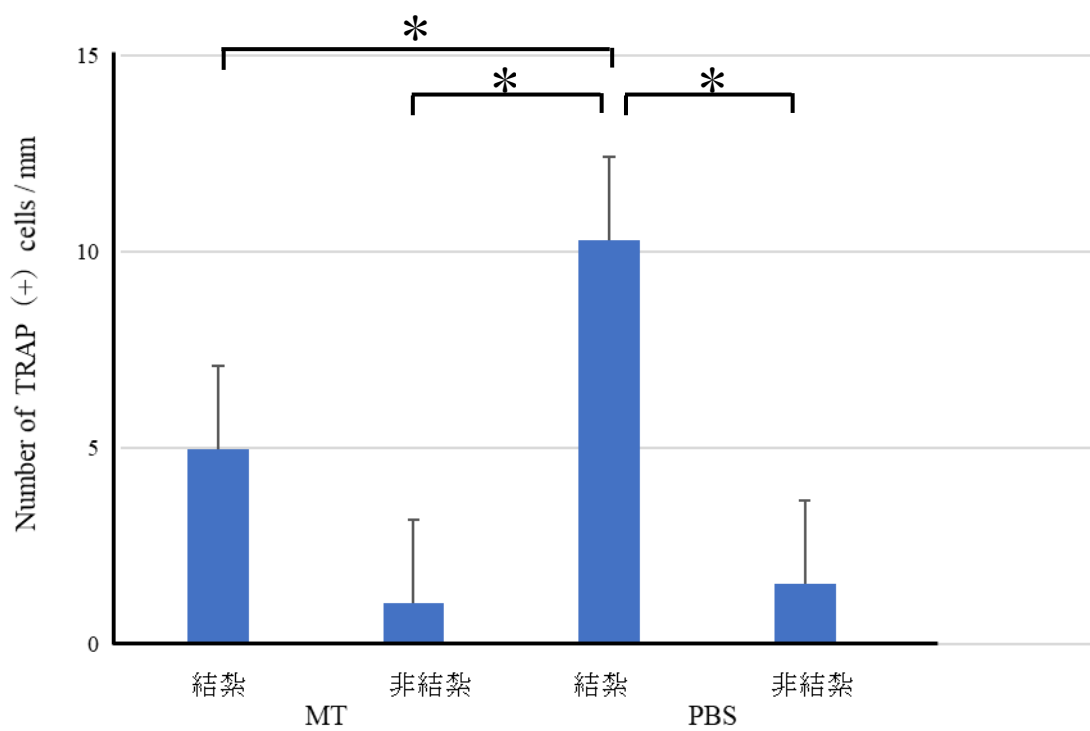


図 12 TRAP 陽性細胞数の計測

$n = 6$, $\text{mean} \pm \text{SD}$. * 有意差あり ($p < 0.05$)

考 察

本研究は MT の上顎臼歯部口蓋側歯槽歯肉への局所投与が，加齢マウス歯周組織に与える影響と実験的歯周炎に対する予防効果について検証することを目的とした．はじめに，マウス上顎第二臼歯口蓋側歯槽歯肉に MT を局所投与するモデルを確立した．歯周炎惹起ではこのモデルを用いて薬剤の局所投与後，上顎第二臼歯に絹糸結紮することで歯周炎を惹起させた．結紮日数は歯周炎初期の 4 日間とした^{15,16)}．MT の使用は経口投与が一般的であるが，皮膚病変での MT 溶液外用²⁸⁾や慢性歯周炎患者を対象に，治療薬として MT を 0.5～1.5 % 配合したゲル状製剤のポケット内投与が歯槽骨吸収抑制に有効か臨床研究も行われている⁷⁾．本研究はマウス口蓋側歯槽歯肉に MT 溶液を局所投与し，その後実験的に歯周炎を惹起させた歯周炎発症予防効果について初めて検討したものである．

その結果，MT 局所投与の有無で血清中のサイトカイン値に有意差が認められないことから，本研究で行った MT 局所投与は全身に影響を及ぼしにくいと考えられた²⁹⁾．

慢性歯周炎の疾患リスクに加齢がある．その理由の一つには，加齢による口腔粘膜バリア機能の

低下がある³⁰⁾。口腔粘膜バリア機能の低下が加齢マウスで顕著になると考え、MTを投与した歯肉組織での創傷治癒関連遺伝子発現を検討した。PBSを投与した対照群と比較してMT群の歯肉組織内ではM-CSF、Cxcl3、Cxcl5遺伝子発現が低下の傾向が認められた。慢性歯周炎の病理組織像では、ポケット上皮細胞間やポケット上皮下結合組織内への好中球浸潤が顕著であることが知られている³¹⁾。M-CSF、Cxcl3、Cxcl5は好中球の遊走や増殖に関わるサイトカイン、ケモカインである³²⁾ことから、今回得られた結果は、MTの投与が慢性歯周炎の発症・進行過程において主要な細胞である好中球の動態に影響することを示唆している。また、創傷治癒関連遺伝子発現の検討でMT群に上昇の傾向が認められた遺伝子群はCOL1A1、COL4A3であった。

COL1A1は歯肉結合組織の線維成分の80%を占めるI型コラーゲンであり、COL4A3は基底膜の構成成分であるIV型コラーゲンである。加齢による歯周組織の変化、特に口蓋歯肉で膠原線維の減少が報告されている³³⁾。MTの投与が歯肉結合組織のコラーゲン線維量や基底膜合成の維持に働くことが示唆された。

以上の結果から、加齢により生じる口腔粘膜の免疫バリア機能低下を、MTの局所投与によって

回復できうるということが推測された．そこで絹糸結紮による歯周炎惹起前に，MTを局所投与することが歯周組織にどのような影響を及ぼすか検討を行った．その結果，PBS群結紮側でPBS群非結紮側，MT群非結紮側と比較して有意な歯槽骨吸収の増加を認めた．MTの局所投与は，本研究で用いた実験的歯周炎モデルのように絹糸に付着したプラークと結紮による機械的刺激の存在下では，それら因子によって誘導される歯槽骨吸収を減弱させることが示唆された．本研究では，歯槽骨吸収量を結紮歯のセメント-エナメル境から歯槽骨頂の距離の和で評価した．しかしながら，加齢による骨密度の低下も考えられるので骨吸収量だけでなく骨密度など骨質に関連するパラメーターでの検討も今後必要と思われる．

組織学的観察による歯周組織での炎症細胞浸潤は，PBS群結紮側でMT群結紮側，MT群非結紮側，およびPBS群非結紮側と比較して有意な増加を認めた．MTの局所投与は，絹糸結紮による歯周炎惹起部位の炎症を軽減させることが明らかとなった．本研究では，ポケット周囲組織のみでの比較であること，浸潤している炎症細胞の質的变化については検討できていない．ヒトの歯周炎初期では好中球が増加し，続いてT細胞，後期には形質細胞およびB細胞が浸潤する．今回は，絹

糸結紮して4日後の歯周組織を観察していることから好中球が炎症細胞の主体と考えられる。今後は、結紮による歯周組織での炎症細胞の質的な検討も併せて行う必要がある。本研究では、PBS群結紮側で歯槽骨吸収量の有意な増加を示した。結紮側における歯槽骨吸収には破骨細胞の誘導を伴うと考え、TRAP染色を行い歯槽骨表面のTRAP陽性細胞数を計測した。その結果、PBS群結紮側でPBS群非結紮側、MT群非結紮側、MT群結紮側と比較して有意にTRAP陽性細胞数が増加した。TRAP陽性細胞数においてMT群結紮側とPBS群結紮側との比較で有意差が認められた理由に、結紮によるプラーク付着に対する組織反応の違いが考えられる。MTの投与により加齢マウス歯肉組織内のケモカイン、サイトカイン産生が抑えられた状態で、プラークが付着し炎症細胞の浸潤で生じる炎症性骨吸収も抑えられた可能性がある。

これまでMTが歯周組織に及ぼす影響として、糖尿病マウスの歯周組織破壊を改善すること^{5,34)}や、高血糖による歯肉組織の老化を改善すること³⁵⁾などが報告され治療への有用性が見出されてきた。本研究ではこれらの報告に加えて、予防的な投与としてMTの歯周治療への応用の可能性すなわち高齢者への歯周病予防としてMT局

所 投 与 の 有 用 性 が 示 唆 さ れ た .

結 論

本研究の目的は，歯周炎の予防に歯肉への MT 局所投与が有効かどうか明らかにすることである．その結果，MT の局所投与により好中球の遊走や増殖に関わるサイトカイン，ケモカインの遺伝子発現は低下し，I 型，IV 型コラーゲン遺伝子発現は上昇を認めた．また加齢マウスに実験的歯周炎を惹起させた実験の MT の投与群では炎症細胞数，TRAP 陽性細胞数の抑制を認め，コラーゲン線維の密度や走行は正常組織に近い状態に維持されていた．

以上の結果より，

1. MT の歯肉への局所投与が，老化に伴う歯周炎の発症の阻止に働く可能性が示唆された．
2. MT の局所投与は炎症細胞浸潤の抑制と歯肉膠原線維の構造維持に働くことで，実験的歯周炎の進行を抑えることが示唆された．

引用文献

- 1) 松本道宏, 満島 勝. メトホルミンの作用機序と効果に関する最新の知見, メトホルミンの肝臓におけるミトコンドリア complex I 阻害依存性作用. 内分泌・糖尿病・代謝内科. 2019; 49: 176-183.
- 2) Bornstein S, Moschetta M, Yawara K, Sacco A, Huynh D, Brooks D, Manier S, Fairfield H, Falank C, Roccaro AM, Nagano K, Baron R, Bouxein M, Vary C, Ghobria IM, Rosen CJ and Reagan1 MR. Metformin affects cortical bone mass and marrow adiposity in diet-induced obesity in male mice. *Endocrinology*. 2017; 158: 3369-3385.
- 3) Rangarajan S, Bernard K and Thannicka VJ. Mitochondrial dysfunction in pulmonary fibrosis. *Ann Am Thorac Soc*. 2017; 14: S383-S388.
- 4) Ehninger D, Neff F and Xie K. Longevity, aging and rapamycin. *Cell Mol Life Sci*. 2014; 71: 4325-4346.
- 5) Zhou X, Zhang P, Wang Q, Ji N, Xia S, Ding Y and Wang Q. Metformin ameliorates experimental diabetic periodontitis

- independently of mammalian target of rapamycin (mTOR) inhibition by reducing NIMA-related kinase 7 (Nek7) expression. *J Periodontol.* 2019; 90: 1032-1042.
- 6) Araújo AA, Pereira ASBF, Medeiros CACX, Brito GAC, Leitão RFC, Araújo LS, Guedes PMM, Hiyari S, Pirih FQ and Júnior RFA. Effects of metformin on inflammation, oxidative stress, and bone loss in a rat model of periodontitis. *PLoS One.* 2017; 28; 12: e0183506.
- 7) Pradeep AR, Patnaik K, Nagpal K, Karvekar S, Guruprasad CN and Kumaraswamy KM. Efficacy of 1 % metformin gel in patients with moderate and severe chronic periodontitis: a randomized controlled clinical trial. *J Periodontol.* 2017; 88: 1023-1029.
- 8) 竹田俊男．老化促進モデルマウス(SAM)の開発その経緯と老化病態の諸特性．日病会誌．1989; 5: 1-6.
- 9) 鈴木直人，金沢貴憲，鈴木豊史，亀井敬泰．経鼻投与．*Drug Delivery System.* 2020; 35: 76-80.
- 10) Pankaj D, Sahu I, Kurian IG and Pradeep AR.

Comparative evaluation of subgingivally delivered 1.2% rosuvastatin and 1% metformin gel in treatment of intrabony defects in chronic periodontitis:a randomized controlled clinical trial. *J Periodontol*. 2018; 89: 1318-1325.

- 11) 井村憲二, 原宜興, 加藤伊八. 内毒素による歯肉の炎症と破骨細胞形成への免疫系の関与についての病理組織学的研究. 日歯周誌. 1993; 35: 625-637.
- 12) Hiyari S, Atti E, Camargo PM, Eskin E, Lusi AJ, Tetradis S and Pirih FQ. Heritability of periodontal bone loss in mice. *J Periodontal Res*. 2015; 50: 730-736.
- 13) Rao NS, Pradeep AR, Kumari M and Naik SB. Locally delivered 1% metformin gel in the treatment of smokers with chronic periodontitis: A randomized controlled clinical trial. *J Periodontal Res*. 2013; 84: 1165-1171.
- 14) Abe T and Hajishengallis G. Optimization of the ligature-induced periodontitis model in mice. *J Immunol Methods*. 2013; 394: 49-54.

- 15) 柴田麻紀．イヌ実験的歯周炎における歯周組織と歯肉溝滲出液のプロテオグリカンの分析．日歯周誌，1995，37：242-254．
- 16) Lee GH, Lin JD, Fong JI, Ryder MI and Ho SP. The adaptive nature of the bone-periodontal ligament-cementum complex in a ligature-induced periodontitis rat model. *Bio Med Res*; doi: 10.1155/2013/876316.
- 17) 森永啓嗣，金山圭一，北後光信，安田忠司，長谷川徹，佐藤匠，清水雄太，辰巳順一．*Porphyromonas gingivalis* 由来 LPS 局所投与が加齢マウスの歯周組織に及ぼす影響．日歯保存誌，2020，63：287-295．
- 18) 堀田敬史，金山圭一，竹内浩子，森永啓嗣，向井景祐，木村洋子，長谷川徹，北後光信，小足周平，佐藤匠，清水雄太，伊神裕高，渋谷俊昭．重度歯周炎患者の血中サイトカインと歯周組織検査値との関係．岐歯学誌，2018，45：123-128．
- 19) 林昌貴，奥田剛，千葉博，長塚正晃，岡井崇．ヒト卵巣癌細胞株における Toll-like receptor シグナルパスウェイの解析．昭和医学会誌，2010，70：211-221．
- 20) 久保田実木子，柳田学，長谷川詩織，森健太，山下元三，山田聡，北村正博，村上

伸也．マウス実験的歯周炎モデルにおけるタバコ煙濃縮物およびニコチンの影響．大阪大学大学院歯学研究科博士論文（未公刊）．2015，3月．

- 21) 末吉徳芳．ヘマトキシリン・エオジン染色．最新染色法のすべて．1版．東京：医歯薬出版；2011：3-8．
- 22) 西村 翼．超短波がラット脛骨チタンインプラントのオッセオインテグレーションに及ぼす影響．顎咬合誌．2012；32：249-256．
- 23) 山田正人，江口正信，水口國雄．アザン染色．最新染色法のすべて．1版．東京：医歯薬出版；2011：12-13．
- 24) Li1 Y, Lu1 Z, Zhang X, Yu H, Kirkwood KL, Lopes-Virella MF and Huang Y. Metabolic syndrome exacerbates inflammation and bone loss in periodontitis. *J Dent Res*. 2015; 94: 362-370.
- 25) Alves EHP, Carvalho ASO, Silva FRP, França LFC, Lenardo DD, Vasconcelos ACCG, Nascimento HMS, Lopes VLR, Oliveira JS and Vasconcelos DFP. Bromelain reduces the non-alcoholic fatty liver disease and periodontal damages caused by ligature-induced periodontitis. *Oral Dis*. 2020;26: 1793-1802.

- 26) Jin J, Zhang X, Lu Z, Li Y, Lopes-Virella MF, Yu H, Haycraft CJ, Li Q, Kirkwood KL and Huang Y. Simvastatin inhibits lipopolysaccharide-induced osteoclastogenesis and reduces alveolar bone loss in experimental periodontal disease. *J Periodontal Res.* 2014; 49: 518-526.
- 27) Gross C, Weber M, Creutzburg K, Möbius P, Preidl R, Amann K and Wehrhan F. Osteoclast profile of medication-related osteonecrosis of the jaw secondary to bisphosphonate therapy: a comparison with osteoradionecrosis and osteomyelitis. *J Transl Med.* 2017; 15: 128-141.
- 28) Ochoa-Gonzalez F, Cervantes-Villagrana AR, Fernandez-Ruiz JC, Nava-Ramirez HS, Hernandez-Correa AC, Enciso-Moreno JA and Castañeda-Delgado JE. Metformin induces cell cycle arrest, reduced proliferation, wound healing impairment in vivo and is associated to clinical outcomes in diabetic foot ulcer patients. *PLoS One.* 2016; 11: e0150900.
- 29) 原田 慎一，山崎由衣，徳山尚吾．脑梗塞治療における新たな可能性を探る；脳血管障害誘導性耐糖能異常の発現における中枢－末梢臓

- 器間連関機構の関与．日薬理誌．2013；142：4-8．
- 30) Hajishengallis G. Aging and its impact on innate immunity and inflammation: implications for periodontitis. *J Oral Biosci.* 2014; 56: 30-37.
- 31) 沼部幸博，梅田 誠，齋藤 淳，山本松男．ザ・ペリオドントロジー．第3版．京都：永末書店；2019：12-14．
- 32) 義江 修．ケモカイン標的療法．日臨免疫会誌．2013；36：189-196．
- 33) 杉原利英．ラット口腔粘膜の加齢的变化に関する組織学的変化．九州歯会誌．1983；37：323-339．
- 34) Zhang P, Wang Q, Nie L, Zhu R, Zhou X, Zhao P, Ji N, Liang X, Ding Y, Yuan Q and Wang XQ. Hyperglycemia-induced inflamm-aging accelerates gingival senescence via NLRC4 phosphorylation. *J Biol Chem.* 2019; 294: 18807-18819.
- 35) Zhou X, Wang Q, Nie L, Zhang P, Zhao P, Yuan Q, Ji N, Ding Y and Wang Q. Metformin ameliorates the NLPP3 inflammasome mediated pyroptosis by inhibiting the expression of NEK7 in diabetic periodontitis. *Arch Oral*

Biol; doi: 10. 1016. 2020; 116: 104763.