Streptozotocin 誘発糖尿病ラットの歯周組織に 対する局所刺激の影響に関する研究

2. 無菌飼育ラットを用いた実験

佐々木 静 治

東北大学歯学部歯科保存学第一講座

(指導：堀内 博教授)

(昭和63年3月16日受付)

The Effect of Topical Stimulation on Periodontal Structure in Streptozotocin Induced Diabetic Rats

2. The Experiment in Germfree Rats

Seiji SASAKI

Department of Endodontics and Periodontics, Tohoku University School of Dentistry, Sendai

(Director : Prof. Hiroshi HORIUCHI)

In my previous report (Sasaki, 1988), results were presented indicating that the diabetic condition produced by the streptozotocin (STZ) hampered the periodontal resilience in conventional (CV) rats. The purpose of this study is to evaluate the effect of diabetes on the periodontal resilience in germfree (GF) rats against continuous mechanical force. A small elastic ring inserted around the cervix of the first molar was used as the stimulation. The rats were maintained in vinylisolators. Experimental diabetes mellitus was induced by a single intra-peritoneal injection of STZ (40 mg/kg).

Histopathological evaluation of teeth and periodontium was made 10, 14 and 28 days after the insertion of the elastic ring. The blood glucose level, the microscopic dimensional analysis of periodontium, the level of epithelial attachment and the height of alveolar bone, and the extent of the inflammatory change were the items observed. The results were as follows :

1. Diabetic condition, i.e. polydipsia, polyuria, hyperglycemia and weight loss, was produced by a single injection of STZ (40 mg/kg) in GF rats.

2. The blood glucose levels assessed by a photo-spectrometer method (Dextrometer®) were 390 ± 20 (mg/dl) in 3 days, 382 ± 27 (mg/dl) in 7 days and 366 ± 31 (mg/dl) in 21 days after the STZ injection. The percentages of rats that exceeded the blood glucose levels of 400 (mg/dl), were 80% in 3 days, 70% in 7 days and 30% in 21 days.

3. Periodontal pockets and experimental alveolar bone resorption were produced by the elastic ring applied around the cervix of the first mandibular molar in GF rats.

4. There was no difference in the histopathological pattern (HPP) on the control side between the diabetic (DM) and non-diabetic (NDM) GF rats.

5. On the experimental side, where the elastic ring was inserted, the bottom of the epithelial attachment was more apical in DM than in NDM. Alveolar

bone resorption in the DM group was significantly more severe than in the NDM group. In the GF rats, there was a significant difference in the extent of the alveolar bone resorption between the DM and NDM group on the mesial side in 10 days and 14 days, and also in the furcation area in 14 days.

Key words : Diabetes mellitus, Germfree rat, Streptozotocin, Experimental periodontitis, Stimulation of elastic ring

要旨 : 本研究の目的は、感染による歯周組織破壊と糖尿病で生じる歯周組織抵抗性の低下を区別し、局所刺激に対する糖尿病の影響を検討することである。無菌飼育 (GF) ラットをストレプトゾトシン (STZ) で血糖値の上昇した群 (DM 群) と対照群 (NDM 群) に分けた。局所刺激後、10 日、14 日および 28 日で屠殺し、血糖値の測定、各測定点間距離の計測および病理組織学的に検討した。結果、1) STZ の単回腹腔内投与で、GF ラットに糖尿病の典型的な症状を作った。2) 血糖値は DM 群で平均 375 ± 30 mg/dl, NDM 群で 121 ± 28 mg/dl であった。3) ポケット底の根尖側移動距離および歯槽骨吸収量ともに、DM 群の方が NDM 群と比較して増大していた。病理組織学的に歯周組織の破壊は DM 群において著明であった。しかし普通飼育における DM 群と NDM 群との差ほど著しいものではなかった。4) 糖尿病 GF ラットでは、持続的圧迫刺激に対して非糖尿病ラットに比較して抵抗性の劣っていることがわかった。

索引用語 : 糖尿病, 無菌飼育ラット, ストレプトゾトシン, 実験的歯周炎, ゴム輪刺激

緒 言

前報¹⁾において著者は、streptozotocin 誘発実験的糖尿病普通飼育ラットの作成について報告し、第1臼歯に持続的圧迫刺激を加えた時の、歯周ポケット形成の程度、歯槽骨の吸収状態および歯周組織の炎症状態などについて検討した。そして非糖尿病普通飼育ラットに比べて、糖尿病普通飼育ラットでは持続的圧迫刺激と口腔内細菌叢に由来する細菌学的侵襲に対して歯周組織の抵抗性が劣っていることを明らかにした。

本研究では、感染による歯周組織破壊と糖尿病で生じる歯周組織の抵抗性の低下とを明確に区別して検討することを目的とした。まず、無菌飼育ラットで実験的糖尿病が作成され得るか否かを検討した。さらに、同ラット歯周組織に、ゴム輪挿入による持続的圧迫刺激を加え、実験的歯周炎を惹起させた時の、歯周組織の状態を糖尿病無菌飼育ラットと非糖尿病無菌飼育ラットとで比較検討することを目的として以下の実験を行った。

実験材料および方法

1. 実験動物

実験には Wistar 系、無菌飼育ラット 16-20 週齢 50

6. The HPP in the GF rats was always less than the pattern in CV rats at each observation period.

7. It was concluded that the periodontal resilience to the continuous pressure stimulation was hampered by the diabetic condition induced by the STZ, even in the absence of oral microorganisms.

Table 1 Number of experimental rats used in this study

	10 days	14 days	28 days	Total
DM group	5	6	14	25
NDM group	6	9	10	25
	11	15	24	50

Fig. 1 Experimental schedule

(↑ : insertion, ↑• : STZ injection, • : sacrifice)

匹 (日本クレア株式会社, 以下 GF 群と略す) を用いた。Table 1 に示す様にラットは、糖尿病群 25 匹および非糖尿病群 25 匹の 2 群に分けた。また、各群ラットは、Fig. 1 に示すようにゴム輪挿入手術後 10 日、14 日、および 28 日の時期に屠殺した。無菌飼育ラットの飼育は東北大学医学部付属動物実験施設内、無菌飼育室で行った。飼育方法は、加藤 (1976) の方法²⁾に従い、アイソ

Fig. 2 Schema showing the location of measurement

- A, D : Distance between the apical termination of the pocket and cemento-enamel junction (CEJ)
 B, E : Distance between the alveolar bone crest and CEJ
 C : Distance between bone and the center of furcation

レーター（日本クレア製マウス・ラット用 No. 10）を用いた。飼料は、ラット・マウス繁殖用固形飼料 MB-2（船橋農場製）を用い、飲料水は水道水を用いた。飼料、飲料水、床敷および実験器具の滅菌は、オートクレーブ（130°C, 2.67 気圧）で 30 分間行った。また、アイソレーターの組み立て、器材の搬入および搬出時のステリルロックおよびスリーブ内の滅菌には、2% Paraacetic acid（過酢酸®，三菱瓦斯化学株式会社製）を用い、スプレーガンを用いて噴霧滅菌を行った。アイソレーター内および実験動物の無菌状態を確認するため、4 週ごとに無菌試験を行った。無菌試験は、日本無菌動物研究会の方法³⁾に準じて行った。無菌試験のための培地は、Thioglycolate Medium without indicator (BBL), Cooked Meat Medium (BBL), Potato Dextrose Broth (DIFCO) を用い、アイソレーター内の床敷、Swab および実験動物の新鮮糞を採取、培養して無菌状態であることを確認した。また、実験期間中を通じて、ラットの飲料水の消費状況、床敷きの状態および全身状態を観察するとともに経目的に体重を測定した。

2. 持続的圧迫刺激の方法

前回報告した方法¹⁾に準じて行った。ワイヤー、セパレーターおよびエラストックホルダーなど器具の滅菌は、オートクレーブにより行った。小型ゴム輪（厚さ 0.9 mm, 外径 2.0 mm, 内径 0.7 mm）は、使用時に調整し、滅菌は、2% Paraacetic acid の噴霧により行い、アイソレーター内へ搬入後、すぐに実験に用いた。

3. 糖尿病の誘発方法および血糖値の測定方法

糖尿病の誘発方法および血糖値の測定方法は、前報¹⁾に準じて行った。アイソレーター内への搬入に際して、streptozotocin (Sigma, 以下 STZ と略す) は、クエン酸-クエン酸ナトリウム緩衝液 (pH 4.2) にて使用の当日に調整し、ミリポアフィルター (MILLEX®, 孔径 0.22 μ m) にて濾過滅菌した後、滅菌試験管 (Falcon®, 2027 tube) に保存し、アイソレーター内に搬入した。STZ は極力早急に、ラットの腹腔内に投与した。STZ 投与ラットのうち、前報と同様に血糖値の上昇したものを、すなわち血糖値 300 mg/dl 以上の値を示したラットを糖尿病群（以下、DM 群と略す）とした。クエン酸-クエン酸ナトリウム緩衝液のみを腹腔内投与したものを非糖尿病群（以下 NDM 群と略す）とした。

血糖値の測定は、前報¹⁾に準じて、比色定量法（デキストロメーター / デキストロスティックスシステム）を用いて行った。ラットは、アイソレーター内でツベルクリンシリンジ（テルモ®, 26 G $\times$ 1/4", 0.45 $\times$ 13 mm), Pentobarbital sodium (Nembutal®, 和光) を用いて、腹腔内麻酔後アイソレーター内より搬出し、その後は普通飼育ラットと同様にして血液を採取し、血糖値を測定した。

4. 各測定点間距離および組織学的検索

前回の方法¹⁾と同様にして行った (Fig. 2)。

5. 統計学的検討

3. および 4. で得られた血糖値および各測定点間距離について、平均値の差の検定を t 検定で行った。

結 果

1. 全身所見と体重変化

Pentobarbital sodium による麻酔および持続的圧迫刺激を加えるためのゴム輪挿入手術後には普通飼育ラット同様、無菌飼育ラットでも皮毛の立毛が見られた。その他の全身所見はゴム輪挿入手術前後で何ら変化は見られなかった。STZ 投与、24~48 時間後から多尿となり床敷は 1 日ですぐ汚れた状態になった。無菌ラットを飼育する場合、これまでは通常 1 ゲージあたり 3~4 匹飼育しており、床敷の交換は、3~4 日に 1 度の割合で行っていたが、DM 群では通常の倍の床敷交換が必要であった。また STZ 投与ラットでは通常の 2~3 倍の水を消費した。全身の衰弱はひどいものの DM 群では普通飼育ラットの同時期のものと比較すると、その程度は軽度であった。

Fig. 3 は、ゴム輪挿入手術前の体重を 100 とした時の体重の変化を示したものである。DM 群および NDM 群ともに、ゴム輪挿入手術時から 2～3 日で 7～8% の体重減少が認められた。しかし、STZ 投与 1～2 日前には、体重は元のレベルにまで回復していた。その後、DM 群では STZ の投与により急激な体重減少が認められ、ゴム輪挿入手術後、10 日、14 日および 28 日では実験開始時のレベルのそれぞれ 6%, 9% および 21% に減少していた。一方、NDM 群では、ゴム輪挿入手術後 10 日、14 日および 28 日の体重は元のレベルよりもそれぞれ 8%, 9% および 12% 増加していた。

2. 血糖値の変化

Table 2 より血糖値の平均および標準偏差は、DM 群の 10 日目で、 390 ± 20 mg/dl, 14 日目で 382 ± 27 mg/dl および 28 日目で 366 ± 31 mg/dl, NDM 群では、それぞれ 116 ± 11 mg/dl, 122 ± 39 mg/dl および 124 ± 21 mg/dl であった。

Fig. 3 Effect of STZ on mean body weight in rats

(●—● : DM group, ○—○ : NDM group,)
(↑ : STZ injection)

DM 群および NDM 群ともに 10 日目と 14 日目、10 日目と 28 日目および 14 日目と 28 日目間では、統計学的有意差は認められなかった。DM 群と NDM 群間について比較してみると、10 日目、14 日目および 28 日目のそれぞれにおいて DM 群の方が有意 ($P < 0.001$) に高かった。

3. 組織標本上における各測定点間距離

1) 対照側

DM 群および NDM 群の対照側、すなわち圧迫刺激を加えなかった左側第 1 臼歯の CEJ と歯肉溝あるいは歯周ポケット根尖側最下端間距離および CEJ と歯槽骨頂間距離、さらに分岐部中央ではセメント質下端と歯槽骨頂間距離を Table 3 に示してある。

(1) 部位による違い

CEJ と歯肉溝あるいは歯周ポケット根尖側最下端間距離は、近・遠心側ともにほぼ同じ値を示した。CEJ と歯槽骨頂間距離は近心側の方が遠心側よりも長い傾向を示した。しかし NDM 群の 28 日目においてのみ統計学的有意差 ($P < 0.01$) が認められただけであった。

Table 2 Comparison of blood glucose level (mg/dl) of STZ treated and nontreated rats after 3, 7 and 21 from administration

	10 days	14 days	28 days
DM group	390 ± 20	382 ± 27	366 ± 31
NDM group	116 ± 11	122 ± 39	124 ± 21

(☆ : significant ($P < 0.001$), N.S. : Not Significant)

Table 3 Histometric measurements in non-inserted side (mm, mean $\pm$ S.D.)

		Mesial		Furcation	Distal	
		A	B		D	E
DM group	10	0.02 ± 0.02	0.45 ± 0.07	0.06 ± 0.01	0.02 ± 0.02	0.34 ± 0.12
	14	0.03 ± 0.01	0.40 ± 0.05	0.06 ± 0.01	0.03 ± 0.01	0.34 ± 0.04
	28	0.07 ± 0.04	0.41 ± 0.04	0.07 ± 0.01	0.04 ± 0.02	0.36 ± 0.07
NDM group	10	0.03 ± 0.02	0.47 ± 0.10	0.07 ± 0.01	0.03 ± 0.02	0.28 ± 0.01
	14	0.03 ± 0.01	0.36 ± 0.02	0.04 ± 0.01	0.01 ± 0.01	0.35 ± 0.07
	28	0.03 ± 0.03	0.40 ± 0.06	0.06 ± 0.01	0.03 ± 0.01	0.25 ± 0.03

A, D : Distance between the apical termination of the pocket and CEJ

B, E : Distance between the alveolar bone crest and CEJ

C : Distance between bone and the center of furcation

Table 4 Histometric measurements in inserted side (mm, mean $\pm$ S.D.)

		Mesial		Furcation	Distal	
		A	B	C	D	E
DM group	10	0.86 $\pm$ 0.13	1.12 $\pm$ 0.22	0.42 $\pm$ 0.22	0.36 $\pm$ 0.12	0.67 $\pm$ 0.08
	14	0.88 $\pm$ 0.11	1.14 $\pm$ 0.09	0.45 $\pm$ 0.16	0.37 $\pm$ 0.06	0.71 $\pm$ 0.11
	28	0.89 $\pm$ 0.14	1.13 $\pm$ 0.12	0.34 $\pm$ 0.15	0.57 $\pm$ 0.15	0.71 $\pm$ 0.12
NDM group	10	0.58 $\pm$ 0.10	0.77 $\pm$ 0.18	0.32 $\pm$ 0.17	0.37 $\pm$ 0.10	0.63 $\pm$ 0.11
	14	0.77 $\pm$ 0.11	0.98 $\pm$ 0.09	0.26 $\pm$ 0.10	0.38 $\pm$ 0.10	0.68 $\pm$ 0.15
	28	0.82 $\pm$ 0.15	1.13 $\pm$ 0.17	0.29 $\pm$ 0.08	0.49 $\pm$ 0.18	0.69 $\pm$ 0.12

A, D : Distance between the apical termination of the pocket and CEJ

B, E : Distance between the alveolar bone crest and CEJ

C : Distance between bone and the center of furcation

(2) 経時的变化

DM 群および NDM 群ともに 10 日, 14 日および 28 日での CEJ と歯肉溝あるいは歯周ポケット根尖側最下端間距離および CEJ と歯槽骨頂間距離, さらに分岐部中央ではセメント質最下端と歯槽骨頂間距離は, ほぼ一定の値を示していた。

(3) DM 群と NDM 群間の比較

CEJ と歯肉溝あるいは歯周ポケット根尖側最下端間距離, CEJ と歯槽骨頂間距離および分岐部中央ではセメント質最下端と歯槽骨頂間距離を DM 群と NDM 群間で比較すると, 両群間に統計学的有意差は認められなかった。

2) 実験側

DM 群と NDM 群における実験側, すなわち持続的圧迫刺激を加えた右側第 1 臼歯の近・遠心側の CEJ と歯肉溝あるいは歯周ポケット根尖側最下端間距離および CEJ と歯槽骨頂間距離, さらに分岐部中央ではセメント質最下端と歯槽骨頂間距離を Table 4 に示す。

(1) 部位による違い

CEJ と歯肉溝あるいは歯周ポケット根尖側最下端間距離は, DM 群, NDM 群ともに近心側の方が遠心側に比較して有意に長い傾向を示した (DM 群 10 日目 $P < 0.01$, 14 日目 $P < 0.001$, および 28 日目 $P < 0.001$, NDM 群 10 日目 $P < 0.05$, 14 日目 $P < 0.001$, および 28 日目 $P < 0.02$)。また, CEJ と歯槽骨頂間距離は, NDM 群 10 日目の値を除いて他は近心側の方が遠心側に比較して有意に長かった (DM 群 10 日目 $P < 0.01$, 14 日目 $P < 0.001$, および 28 日目 $P < 0.001$, NDM 群 14 日目 $P < 0.01$, および 28 日目 $P < 0.01$)。

(2) 経時的变化

DM 群の遠心側において CEJ と歯肉溝あるいは歯周

ポケット根尖側最下端間距離が 10 日目と 28 日目 ($P < 0.05$), 14 日目と 28 日目 ($P < 0.05$) で有意に長かった。DM 群のその他の測定点間距離および NDM 群の測定点間距離では 10 日, 14 日および 28 日と日を追って増大する傾向は認められたものの, 統計学的有意差は得られなかった。

(3) DM 群と NDM 群間の比較

近心側の CEJ と歯肉溝あるいは歯周ポケット根尖側最下端間距離は 10 日目 DM 群が有意 ($P < 0.02$) に長い傾向が認められた。CEJ と歯槽骨頂間距離も DM 群の方が 10 日目 ($P < 0.05$) および 14 日目 ($P < 0.05$) で有意に長かった。

分岐部中央セメント質最下端と歯槽骨頂間距離では, 14 日目で DM 群が有意 ($P < 0.05$) に長かった。

その他の計測値については, DM 群が NDM 群に比較して長い値をとる傾向があったものの, 統計学的有意差は認められなかった。

4. 病理組織学的所見

1) 対照側

(1) 部位による違いおよび経時的变化

近心側では上皮付着の根尖側端が, CEJ より明らかに根尖側にあった例が約 70% に達していたのに対して, 遠心側ではほとんどが CEJ に一致するかあるいはわずかに根尖側にあるのみであり, 上皮の付着は強固であった。近・遠心側とも上皮脚がよく発達しており, 上皮の欠損や潰瘍形成はなかった。炎症性細胞浸潤はほとんどなく, ごく僅かに認められた例であってもその範囲は上皮内および上皮下組織に局限しており, 上皮下の密に配列している結合組織繊維を超えて深部に侵入している例は全く認められなかった。

10, 14 および 28 日と経時的にみても組織像に差はみ

Fig. 4 <対照側, DM 群, 10 日目>

近・遠心側ともに歯肉溝底は CEJ に一致している。炎症性細胞浸潤はみられない (×50)

られなかった。

(2) DM 群と NDM 群間の比較

近・遠心側における上皮欠損の有無、潰瘍形成、結合組織線維の乱れおよび消失、セメント質および象牙質の吸収、骨頂部歯槽骨の吸収を DM 群と NDM 両群の対照側と比較してみても差はみられなかった。分岐部での所見も DM 群と NDM 群間で差はみられなかった。

10, 14 および 28 日と経時的に DM 群と NDM 群間を比較しても組織像に差はみられなかった。

2) 実験側

(1) 部位による違いおよび経時的变化

近・遠心側歯頸部に、ゴム輪の圧迫によって形成された歯周ポケットが認められた。近・遠心側ともポケット底部の上皮は希薄化していた。10 日, 14 日および 28 日の近心側ポケット内縁上皮の一部欠損と潰瘍形成は DM 群では 50% 以上の頻度で認められたのに対して, 遠心側では 22% の頻度で認められたにすぎなかった。上皮組織直下の結合組織の様相は, DM 群および NDM 群とも近心側の変化の方が著明であった。すなわち, 線維の乱れおよび消失を含めた変化が 80% 以上の頻度で認められた。炎症性細胞浸潤の程度は, 10 日および 14 日の近心側の方が遠心側のそれに比べ, 高度～中等度であり, その範囲は大半が結合組織から近心歯槽骨骨頂部にまで及んでいた。28 日の近心側では軽度であり, その範囲も上皮組織直下～結合組織内に及んでいた。10 日, 14 日および 28 日の遠心側では大半が軽度～中等度であり, その範囲は上皮組織直下～結合組織内に及んでいた。

歯周ポケットおよびその付近のセメント質および象牙質の吸収は, 近心側で 68% の頻度で認められたのに対して, 遠心側では 22% にみられたにすぎなかった。歯周ポケット付近に, 膿瘍形成を認めた例は全くなかった。炎症性細胞浸潤によると思われる歯槽骨吸収が認められたのは, 10 日および 14 日の近心側が 30% であったのに対し, 遠心側では 5% であった。近・遠心側とも 28 日のものでは, 歯槽骨吸収を思わせる所見はなかった。

経時的に見ると, 10 日および 14 日では, 好中球とリンパ球を主体とした炎症性細胞浸潤であったものが, 28 日目では炎症性浸潤細胞数が減少し, 線維性組織で修復された像が認められた。

分岐部では全期間を通じて同程度の近心歯根膜腔の拡大と遠心歯根膜腔の狭窄化が認められた。

(2) DM 群と NDM 群間の比較 (Table 5)

DM および NDM 群間には上皮付着の様相および上皮組織の欠損, 潰瘍形成について, 差は認められなかった。結合組織線維の配列 (arrangement of fibers) の乱れおよび消失を比較すると, DM 群の方が上皮結合組織線維の配列の乱れおよび消失が 70% で認められたのに対し, NDM 群では 50% のみであった。炎症性細胞浸潤 (degree of infiltration/extent of infiltration) について見ると, 10 日～14 日の期間では, DM 群では高度～中等度の炎症性細胞浸潤が結合組織から歯槽骨頂部にかけて認められたのに対して, NDM 群では軽度～中等度の, そして一部には高度の浸潤も認められたにすぎず, その範囲は上皮組織直下に局限するものから, 骨頂部付

Table 5 Histological observations

mesial side	10 days		14 days		28 days	
	DM	NDM	DM	NDM	DM	NDM
Arr. of Fib.	+ ~ #	+	+	+	+	+
Deg. of Inf.	+ ~ #	+	+	+	± ~ +	±
Ext. of Inf.	+ ~ #	+	± ~ +	+	± ~ +	± ~ +
Res. of C. and/or D.	+ ~ #	+ ~ #	#	#	#	#
F. of Alv. B. Res.	#	+	-	-	-	-

distal side	10 days		14 days		28 days	
	DM	NDM	DM	NDM	DM	NDM
Arr. of Fib.	+ ~ #	+	±	±	±	±
Deg. of Inf.	± ~ +	± ~ +	+	±	±	±
Ext. of Inf.	± ~ +	± ~ +	± ~ +	±	±	±
Res. of C. and/or D.	±	-	+ ~ #	+	±	-
F. of Alv. B. Res.	±	±	-	-	-	-

furcation area	10 days		14 days		28 days	
	DM	NDM	DM	NDM	DM	NDM
Deg. of Inf.	+ ~ #	± ~ +	+ ~ #	± ~ +	±	±
Ext. of Inf.	+ ~ #	± ~ +	+	±	±	±
F. of Absc. Form.	+	±	+	±	±	±
Res. of C. and/or D.	+	#	#	± ~ +	+	+
F. of Alv. B. Res.	#	+	+	+	+	+
F. of Epith. Mig.	-	-	#	-	+	-

<criteria>

- * arrangement of fibers (Arr. of Fib.)
 - : normal, ± : slight, + : irregular, ++ : disappeared
- * degree of infiltration (Deg. of Inf.)
 - : none, ± : mild, + : moderate, ++ : severe
- * extent of infiltration (Ext. of Inf.)
 - ± : subepithelial area, + : connective tissue ++ : around alveolar crest
- * frequency of abscess formation (F. of Absc. Form.)
 - : none, ± : 1-10%, + : 11-30%, ++ : over 31%
- * resorption of cementum and/or dentin (Res. of C. and/or D.)
 - : none, ± : slight, + : moderate, ++ : severe (presence of dentin resorption)
- * frequency of alveolar bone resorption (F. of Alv. B. Res.)
 - : none, ± : 1-30%, + : 31-50%, ++ : over 51%
- * frequency of epithelial migration (F. of Epith. Mig.)
 - : none, ± : 1-10%, + : 11-30%, ++ : over 31%

近に至るものまで様々であった。28日目では DM および NDM 群とも炎症性細胞浸潤の程度は軽度となりその範囲も上皮直下に限局するものが多かった。

歯周ポケットおよびその付近のセメント質および象牙質の吸収 (resorption of cementum and/or dentin) は NDM 群 (45%) より DM 群 (60%) の方が発現頻度は高かった。

歯槽骨の吸収 (frequency of alveolar bone resorption) について発現頻度は NDM (5%) に対して DM 群 (13%) の方が高かった。

DM 群の分岐部の組織像は, NDM 群に比べて炎症性細胞浸潤の程度が強く, 炎症性細胞による分岐部歯槽骨の吸収が顕著であった。分岐部に膿瘍形成 (frequency of abscess formation) を認めたものは, 全期間を通じて

Fig. 5 <実験側, DM 群, 10 日目>

ゴム輪による圧痕がみられる。炎症性細胞浸潤は高度であり、歯槽骨頂付近にまでおよんでいる。分岐部の歯根面には象牙質にいたる吸収がみられる。(×50)

Fig. 6 <実験側, NDM 群, 10 日目>

ゴム輪による圧痕がみられる。炎症性細胞浸潤は高度であり、歯槽骨頂にまでおよんでいる。(×50)

DM 群では 25%, NDM 群では 10% の頻度であった。

分岐部のセメント質および象牙質の吸収の頻度は DM 群および NDM 群ともに差を認めず、10 日および 14 日目ではおよそ 70% 以上に認められた。28 日目では約 50% に同様の所見があった。

分岐部歯槽骨吸収が歯根長の 1/2 以上に認められたものは、DM 群で 30%, NDM 群では 10% の頻度であった。

DM 群と NDM 群間で歯肉上皮の分岐部埋入、深行

増殖 (frequency of epithelial migration) のみられた例について、その頻度は各々 22% および 6% であった。

考 察

1. 実験方法について

無菌動物を用いればある特定の細菌による感染モデルの作出が可能であり、他の細菌の影響を除外し、単純な実験系で研究することができる。そのためこの実験系は

Fig. 7 <実験側, DM 群, 14 日目>

炎症性細胞浸潤は高度であり、歯槽骨頂付近におよんでいる。分岐部には高度の膿瘍形成がみられる。(×50)

Fig. 8 <実験側, NDM 群, 14 日目>

炎症性細胞浸潤は中等度で、上皮および上皮下結合組織にみられる。(×50)

歯周疾患や歯髄疾患の病因を探究する上で有用であると共に各種歯科材料の生体に対する刺激性を知るうえでも有用である。

歯周疾患に関しては単一細菌で感染させて惹起した実験的歯周炎が古くから研究されており、いわゆる歯周病原性菌としていくつかの細菌が報告されてきた^{4~7)}。

一方、著者ら⁸⁾は、無菌飼育と普通飼育ラットのそれぞれについて *Escherichia coli* 内毒素に対する抗体産生能を比較し、無菌飼育ラットにおいて菌株特異性のあ

ることを確認した。

小林ら⁹⁾は無菌飼育動物を用いて歯髄疾患について、また青木ら¹⁰⁾は材料の刺激性を検討している。

前回の報告¹⁾から普通飼育糖尿病ラットの歯周組織は非糖尿病ラットに比べて、持続的圧迫刺激および口腔内細菌に由来する刺激に対して抵抗性の劣っていることが示され、糖尿病になると特に感染に対する感受性が高くなることが明らかとなったので、感染による歯周組織破壊と糖尿病によって生じる歯周組織の抵抗性の変化を明

Fig. 9 <実験側, DM 群, 28日目>

炎症性細胞浸潤は中等度で、上皮および上皮下結合組織にみられる。分岐部には上皮の埋入、深行増殖がみられる。吸収された歯槽骨部分には線維性組織がみられる。(×50)

Fig. 10 <実験側, NDM 群, 28日目>

炎症性細胞浸潤は軽度であり、上皮下に局限している。分岐部には上皮の埋入、深行増殖はみられない。(×50)

確に区別するため、無菌飼育動物を実験に用いる必要があった。

糖尿病ラットの作成にはまず、STZ (40 mg/kg) の単回腹腔内投与を試みた。多くの研究者によって STZ の静脈内投与が推奨されているけれども、無菌飼育動物の場合には、ビニールアイソレーター内で作業を行う必要上、操作が容易かつ安全な方法であることが必要条件となるので本研究ではあえて腹腔内投与を採用した。

色川ら¹¹⁾は、アロキサン (180 mg/kg) を腹腔内投与し、アロキサン誘発実験的無菌飼育糖尿病ラットに局所刺激を加え、その歯周組織の反応を見ており、実験群 I で 155 ± 16 mg/dl、実験群 II で 286 ± 54 mg/dl、および対照群で 108 ± 6 mg/dl の血糖値を得ている。今回、著者は、糖尿病群 10 日、14 日および 28 日で 390 ± 20 mg/dl、 382 ± 27 mg/dl および 366 ± 31 mg/dl の血糖値を得ており、対照群の血糖値は 116 ± 11 mg/dl、 122 ± 39 mg/dl およ

び $124 \pm 21 \text{ mg/dl}$ であった。本研究で得られた対照群の血糖値では、色川ら¹¹⁾の値とほぼ一致している。しかし実験群について比較すると、色川ら¹¹⁾の実験群の血糖値は今回の値よりも低い。このような差が生じた理由として、用いた薬剤の違いおよび投与条件の差が考えられる。

Rerup ら¹²⁾は、マウス糖尿病に対する STZ とアロキサンとの影響を比較している。そしてアロキサン糖尿病では慢性の高血糖状態であっても体重の回復が見られ、アロキサン投与前の体重以上になるのに対して、STZ 糖尿病ではこうしたことは見られないと報告している。また、実験期間を通じて各々の個体では、血糖レベルが一定値を維持する傾向があるけれども各個体間には血糖値に差が見られると述べており、アロキサン糖尿病と STZ 糖尿病はその発生メカニズムが同一ではなく、さらに、両薬剤の効果に関しては動物の種差のある可能性も指摘している。普通飼育ラットと無菌飼育ラットについては、STZ による血糖値の上昇程度を比較すると、特に差は認められず、同じ傾向を示した。

著者は今回、糖尿病誘発のため、STZ を用い、比較的に安定した高血糖レベルを得た。しかし、クエン酸-クエン酸ナトリウム緩衝液で STZ を溶解する操作を使用直前にすること、およびアイソレーター内へ STZ 液を搬入後直ちにラットに投与することなどを厳守しないと血糖値上昇のみられないことがあり、特にこの点に留意して実験を行った。

体重測定は STZ 投与後 21 日までしか観察していないけれども、Rerup ら¹²⁾の報告と同様に体重の回復は認められなかった。

無菌飼育動物では、各日毎に普通飼育の場合に比較して体重の減少は軽度ではあったけれど、同様の傾向を示した。血糖値は全期間を通じてほとんど差を認めなかった。STZ 投与ラットでは多飲、多尿などの糖尿病症状がすべての個体についてほぼ同じ状態であった。しかし普通飼育 STZ ラットに比べると、死亡率が低く、また、衰弱の程度も軽度であった。この差が生じた原因は細菌感染がないことが最も大きいものであろうと考えられる。

本実験では STZ 投与の 1 週間前にゴム輪挿入手術を行った。これは、普通飼育ラットと無菌飼育ラットのそれぞれについて、STZ 投与時の体重をほぼ同一とするために行った操作である。なぜならば、ゴム輪挿入時の侵襲が普通飼育ラットでは容易であるので少ないのに対し、アイソレーター内で挿入を行う無菌飼育ラット

では狭いスペース、グローブの使用などのため非常に困難であり、侵襲が大きく、体重はより減少する傾向がある。一方、ゴム輪挿入後の体重回復については感染の機会が全くないので普通飼育動物より無菌飼育動物の方がはやい。そのため体重変化は無菌動物の方がゴム輪挿入後、急激な体重減少が起こり、4 日ぐらいで元の状態まで回復したのに対して、普通飼育動物では、ゴム輪挿入後の体重減少が無菌動物の半分であるにもかかわらず、回復には 4～6 日を要した。ゴム輪挿入操作等の要因の影響を平均化することを目的として、予備実験により以上のことを確認し、ゴム輪挿入術後 1 週間で STZ を投与することとした。STZ 投与後の体重の減少は、普通、無菌飼育動物とも同様であったが、その程度は普通飼育動物の方が大きかった。これは、細菌感染による全身衰弱の影響がでたものと考えられる。

2. 各測定点間距離および病理組織所見

色川ら¹¹⁾は、著者と同様の方法で各測定点間距離の計測を行っている。色川ら¹¹⁾はアロキサン (180 mg/kg) を投与し、アロキサン糖尿病ラットを作った後 1 週間経過してから、ゴム輪を下顎第 1 臼歯に挿入し 2 週間後に屠殺している。条件が異なっているため一概に比較はできないが、色川ら¹¹⁾は、上皮付着根尖側移動距離および歯槽骨の吸収量は、3 群間で実験群 II (平均血糖値 $286 \pm 54 \text{ mg/dl}$) において最大値を示したが、近心部上皮付着の根尖側移動距離のみ、対照群との間で有意な ($P < 0.05$) 差が見られただけであったと報告している。その結果から、アロキサン投与による血糖値の上昇によって、歯周組織抵抗性の低下の傾向は示されたものの、糖尿病による影響は顕著なものではなかったと考察している。今回の結果では、近心側の、上皮付着根尖側移動距離については、10 日目では有意な ($P < 0.02$) 差が認められた。また、近心側歯槽骨吸収量について、10 日目および 14 日目で、各々有意な ($P < 0.05$) 差が認められた。さらに、分岐部での歯槽骨吸収においても 14 日目で有意差 ($P < 0.05$) が認められた。そのほかの値については統計学的有意差は認められなかったけれど、DM 群の方が NDM 群に比べて長い値を示した。このように各計測値について色川ら¹¹⁾の報告と比較して差が出た理由として最大のものは、STZ 誘発糖尿病の方がアロキサン投与のものに比べて、安定した高血糖状態を得ることができたことである。また、そのほか初めにゴム輪挿入を行ったことで同処置による変化が最小限にいとめられた結果、バラつきが少なかったことなども理由の 1 つであらうと考えられる。また、色川らは、ゴム輪挿入後

2週間のものしか観察していないが、今回の結果から、根尖側移動距離および歯槽骨吸収について、STZ 投与後初期の、すなわち 10 日および 14 日目での変化が大きかった。この傾向は特に普通飼育ラットで著しく、STZ 投与後すぐに細菌感染を生じ、高度の膿瘍形成を伴った炎症性細胞浸潤の見られた例が DM 群で多かったこととも一致している。これは、ゴム輪挿入手術後長期になるとゴム輪がゆるんでくることの他に、歯周組織の修復作用も発現し、ラット自体の個体差の影響がでくるためと思われる。

病理組織像についてみると、対照側に比較して実験側では、炎症性細胞浸潤の程度および広がりに関して変化が著明であり、そうした所見は普通飼育の場合と同様であった。しかし、実験側の変化について無菌と普通飼育とを比較してみると、明らかに炎症性細胞浸潤の程度および広がりにおいて普通飼育の方が高度であった。興味をひくのは、対照側の所見である。対照側、各測定点間距離について、無菌飼育ラットの値は普通飼育ラットに比べ、分岐部および遠心側での計測値についてはほぼ等しい値を示していたものの、近心側での値は低い値を示していた。また、炎症像を見ても、細菌刺激のない無菌飼育で炎症性変化がある場合、普通飼育動物に比べて炎症性細胞浸潤の程度および広がりとも、普通飼育の場合と同程度か軽度であった。すなわち、実験側両群間での差ほどの変化が、対照側では認められなかった。Schluger ら¹³⁾は、無菌飼育以外の口腔は常に不潔であるにもかかわらず、ヒトの歯周炎に類似した病変を発現させることは難しいと述べている。本実験においても、ラットの場合歯周組織に抵抗性があることを改めて確認した。これは Bissada ら¹⁴⁾の所見と一致している。

実験側では、ゴム輪の持続的圧迫刺激により歯周組織は直接的に障害をうけ脆弱化するとともに、上皮組織に壊死した像も多数認められた。細菌の存在しない状態であっても、これほどの炎症性変化の生じることから、ゴム輪による圧迫刺激は高度の刺激となっていることが予測される。これと共に本実験結果より糖尿病のラットでは歯周組織の抵抗性が弱まっていることが明らかとなった。

分岐部では、炎症性細胞浸潤の高度なものでも、その周囲に被包化する傾向がみられた。また、28 日のものでは、吸収された分岐部歯槽骨のあとに線維性の修復反応が認められたけれども、この所見は普通飼育の場合より頻度が高く、修復機転におよぼす口腔内細菌の影響が全くなかったためであると考えられた。

歯肉上皮の分岐部への埋入、深行増殖は、歯周病変が高度である事を示す徴候である。普通飼育 DM 群および無菌飼育 DM 群では全期間を通じて各々同程度 (22%) の頻度で深行増殖がみられた。しかし、28 日目のみについてみると無菌飼育 DM 群では 17% であったのに対して、普通飼育 DM 群では 33% であった。一方、NDM 群では無菌および普通飼育群ともそうした例は全くみられなかった。この事実は病変の進行に細菌の存在が大きく影響している事を示している。また、NDM 群では上皮の深行増殖が全く認められなかったことから、糖尿病が病変の進行に強く関与している事を示しているものと考えられる。

また、普通飼育ラットと同様に無菌飼育ラットでは歯根膜腔が近心側では拡大し、遠心側では狭窄しており、このことは第 1 臼歯が近心移動していることを意味しているであろう。無菌飼育ラットでも、普通飼育ラットと同様に、部位的にみて近・遠心側よりも分岐部での病変が顕著であった。これは、近・遠心の歯槽頂線維や歯間水平線維と、分岐部歯根膜線維の構造に由来するものであろう。また多根歯の分岐部が一度露出されると、そこに食渣や体毛が停滞し、細菌の影響はないものの機械的刺激が作用しやすくなることにも依っているのかもしれない。

本実験でも、普通飼育の場合と同様、10 日および 14 日では好中球を主体とした炎症性細胞浸潤の後、28 日では、リンパ球、形質細胞および線維芽細胞による線維性組織で修復された像を示した。ただ、普通飼育に比べて、初期では、リンパ球の割合が高く、28 日ではリンパ球や形質細胞が少なかった。無菌飼育動物では、リンパ組織が脆弱であるといわれており、局所刺激に対する炎症反応に、遊出する細胞には変化があるのかもしれない。宮川¹⁵⁾は、無菌動物に対する単純刺激ないし異物刺激に対する生体反応について、自然動物では初期には好中球の遊出のような食作用が著しく、後期には毛細血管の豊富な肉芽形成が認められるのに対して、無菌動物では、遊出細胞は少なく、後期では肉芽系細胞によって異物が被包されると述べている。著者の今回のゴム輪による持続的圧迫刺激に対する反応もこれに一致している。しかし詳細については、炎症を及ぼす刺激方法、ラットの週齢、性差等を考慮にいれて今後検討する必要があると考えられる。

結 論

1. STZ (40 mg/kg) の腹腔内単回投与により無菌飼育 Wistar 系ラットに普通飼育 Wistar 系ラットと同様に多飲, 多尿, 体重減少および高血糖などいわゆる糖尿病の典型的な症状をつくることができた。

2. 比色定量法 (デキストロメーター / デキストロステックスシステム) による DM 群の平均血糖値は, 投与後 3 日, 7 日および 21 日では 390 ± 20 mg/dl, 382 ± 27 mg/dl および 366 ± 31 mg/dl であった。(この測定系で測定不能であったのは各々 3 日で 80%, 7 日で 70% および 21 日で 30% であった。)

3. DM および NDM 群ともにラット臼歯へのゴム輪挿入で歯周ポケットおよび歯槽骨吸収を伴う実験的歯周炎を起こすことができた。

4. ゴム輪挿入をしなかった対照側の, DM 群および NDM 群では炎症性変化および各測定点間距離において両群間に著明な差は認められなかった。

5. 実験的歯周ポケット形成の程度および持続的圧迫刺激による歯槽骨吸収程度は, 各測定点間距離の結果, 明らかに DM ラットのほうが NDM ラットに比べて大であった。また, 普通飼育ラットに比べて無菌飼育ラットでは, 各測定値とも短い傾向がみられた。

6. ゴム輪による持続的圧迫刺激によって, 歯周組織の破壊が NDM 群に比べて DM 群では著明であった。

7. 持続的圧迫刺激による歯周組織の破壊は部位別にみると, 分岐部の変化が最も大きく, 近心側, 続いて遠心側の順であった。

8. 細菌感染の影響が全くない状態においても, 局所刺激に対する歯周組織の抵抗性について, DM 群と NDM 群とは明確な差が見られた。

謝 辞

稿を終えるにあたり, 御指導を賜りました当教室主任の堀内 博教授に謹んで感謝の意を表します。御校閲ならびに有益な御助言をいただいた口腔細菌学講座熊谷勝男教授, 口腔病理学講座大家 清教授に深謝いたします。また, 実験にあたって御協力いただいた口腔細菌学講座清水義信助教授, 色川俊則博士ならびに歯科保存学第一講座の各位に感謝いたします。本稿をまとめるにあたり御尽力いただいた井場たみ子技官および寺島勝彦歯学士に感謝いたします。

文 献

- 1) 佐々木静治: Streptozotocin 誘発糖尿病ラットの歯周組織に対する局所刺激の影響に関する研究. 日歯周誌, 30: 399-413, 1988.
- 2) 加藤伊八: 無菌マウスの歯垢形成性 *Streptococcus mutans* の定着性に関する研究. 日歯周誌, 18: 215-224, 1976.
- 3) 前島一淑: IV無菌試験, 前島一淑, 柏崎 守, 上村文雄, 実験動物のための無菌試験動物技術. 第1版, ソフトサイエンス社, 東京, 1981, 171-179.
- 4) Socransky, S.S., Hubersak, C. and Propas, D.: Induction of periodontal destruction in gnotobiotic rats by a human oral strain of *Actinomyces naeslundii*. Arch. Oral Biol., 15: 993-995, 1970.
- 5) Irving, J.T., Newman, M.G., Socransky, S.S. and Heeley, J.D.: Histological changes in experimental periodontal disease in rats monoinfected with a gram-negative organism. Arch. Oral Biol., 20: 219-220, 1975.
- 6) Johnson, D.A., Behling, U.H., Lai, C.H., Listgarten, M.A., Socransky, S. and Nowotny, A.: Role of bacterial products in periodontitis: Immune response in gnotobiotic rats monoinfected with *Eikenella corrodens*. Infect. and Immun., 19: 246-253, 1978.
- 7) Johnson, D.A., Behling, U.H., Listgarten, M.A. and Nowotny, A.: Role of bacterial products in periodontitis: Humoral immune response to *Eikenella corrodens*. Infect. and Immun., 22: 382-386, 1978.
- 8) 佐々木静治, 飯山正夫, 石川潤一, 遠藤英昭, 神山義信: 無菌飼育および普通飼育ラットを用いた *E. coli* 0111: B4 endotoxin に対する抗体産生. 日歯周誌, 27: 114-125, 1981.
- 9) 小林千尋, 吉田治志, 服部 治, 青木豊明, 加藤伊八: 無菌飼育ラットの歯髄創傷の治癒に関する研究 (第1報). 日歯保誌, 24, 375-381, 1981.
- 10) 青木豊明, 工藤純一, 中島充雅, 村田健博, 楊健新, 久保井啓人, 伊藤修一, 伊藤 健二, 岡村 義亜, 村井正昭, 小林千尋, 砂田今男: 無菌飼育ラ

- ット臼歯露出歯髄におよぼすコンボジットレジンの影響. 口病誌, 54 : 233-240, 1987.
- 11) 色川俊則, 遠藤英昭, 神山義信, 堀内 博 : アロキサン投与無菌飼育ラットの歯周組織に対する局所刺激の影響に関する研究. 日歯周誌, 24 : 336, 1982.
 - 12) Rerup, C. and Tarding, F. : Streptozotocin and Alloxan-Diabetes in mice. *European J. Pharmacology*, 7 : 89-96, 1969.
 - 13) Schluger, S., Yuodelis, R.A. and Page, R.C. : *Periodontal disease*, 1st ed., Lea and Febiger, Philadelphia, 1977, 109-132.
 - 14) Bissada, N.F., Schaffer, E.M. and Lazarow, A. : Effect of alloxan Diabetes and local irritation factors on the periodontal structures of the rats. *Periodontics*, 4 : 233-240, 1966.
 - 15) 宮川正澄 : 無菌動物—医学・歯学への応用—, 第1版, 医歯薬出版, 東京, 1973, 245-272.
-