Streptozotocin 誘発糖尿病ラットに対する血糖コントロールが 実験的歯周炎に及ぼす影響

2. 無菌飼育ラットにおけるインスリンの効果

加 藤 清

東北大学歯学部歯科保存学第一講座

(指導：堀内 博教授)

(平成 8 年 8 月 5 日受付)

Effects of Blood Glucose Control on Experimental Periodontitis in Streptozotocin-induced Diabetic Rats

2. Effects of Insulin Therapy in Germfree Rats

Kiyoshi Kato

Department of Endodontics and Periodontics, Tohoku University School of Dentistry

4-1 Seiryomachi, Aoba-ku, Sendai 980-77, Japan

(Director : Prof. Hiroshi Horiuchi)

In part one of this report (Kato, 1996), it was suggested that insulin prevented experimental periodontitis in streptozotocin-induced diabetic rats (STZ rats).

This study was designed to evaluate the effect of the glycemic control on the periodontal destruction in germfree (GF) and STZ rats. Thirty-nine GF rats were divided into normal control rats (N-DM), STZ rats (DM), and insulin-treated STZ rats (DM-I). On Day 0, an elastic ring was applied to the right mandibular 1st molar (experimental side). On Day 7, STZ (40 mg/kg) was administered to the DM and DM-I groups to induce experimental diabetes. The rats were given daily intraperitoneal injections of either 0.9% NaCl (N-DM and DM), or 10 I.U. of insulin (DM-I) from Day 10 to Day 28. The periodontal condition was evaluated on Days 14 and 28. Blood glucose levels, the extent of inflammatory change, and quantitative measurement of the alveolar bone area were recorded.

Results obtained were as follows ;

1. Insulin administration was effective in controlling hyperglycemia in GF STZ rats.
2. The blood glucose levels assessed by the glucose hexokinase method were 131 ± 18 (mg/dl) in the N-DM group, 506 ± 89 (mg/dl) in the DM group, and 109 ± 40 (mg/dl) in the DM-I group.
3. The elastic ring insertion induced attachment loss and alveolar bone resorption in GF rats.
4. Inflammatory change was severe in the DM group on Day 14. The inflammatory change in the N-DM and the DM-I groups on Day 14 were mild. On Day 28, there were no differences in the inflammatory changes among the three groups.
5. The alveolar bone area in the N-DM and DM-I groups was significantly larger than that in the DM group on Day 14.

Administration of insulin prevented periodontal destruction caused by mechanical stimulation in diabetic rats, even in the absence of oral microorganisms.

Key words : Diabetes mellitus, Germfree rat, Insulin, Streptozotocin, Experimental periodontitis

要旨:本研究の目的は、口腔内細菌の影響がない状況下において機械的刺激で糖尿病ラットに誘発される実験的歯周炎に、血糖コントロールが及ぼす影響を検索することである。無菌飼育ラットの辺縁歯肉にゴム輪で刺激を加えた後、非糖尿病 (N-DM) 群、糖尿病 (DM) 群および糖尿病-インスリン (DM-I) 群に分けた。14 および 28 日で屠殺し、血糖値の測定 (随時血糖値)、病理組織学的および組織計量学的検索を行った。その結果、1) 無菌飼育のストレプトゾトシン (STZ) 誘発糖尿病ラットにインスリン投与を行うことにより糖尿病症状が改善した。2) 平均血糖値は N-DM 群で 131 ± 18 mg/dl, DM 群で 506 ± 89 mg/dl, DM-I 群で 109 ± 40 mg/dl であった。3) 病理組織学的所見から DM 群では N-DM 群に比較して歯周組織の炎症性変化が高度であったが、DM-I 群では N-DM 群と同程度であった。4) 歯槽骨の面積計測の結果、14 日の歯槽骨吸収量は DM 群 > DM-I 群 $\geq$ N-DM 群であり、分岐部においては DM 群と他の 2 群との間に統計学的有意差があった。以上より、無菌飼育糖尿病ラットにおいて機械的刺激による歯周組織の炎症性変化および損傷の程度がインスリン投与により軽減することが示された。口腔内細菌の影響を受けなくても、糖尿病ラットにおける歯周炎の進展阻止には血糖コントロールが重要な役割を担っていると考えられる。

索引用語:糖尿病, 無菌飼育ラット, インスリン, ストレプトゾトシン, 実験的歯周炎

緒 言

歯肉炎や歯周炎は細菌感染症である。しかしこれら炎症性歯周疾患には細菌以外にも多くの発炎症因子が存在し、それらは局所的因子と全身的因子に大別されている。局所的因子としては主因子とされる細菌以外にも食片圧入、縁下歯石および不適合修復物などによる辺縁歯肉への機械的刺激や外傷性咬合など、また全身的因子としては代謝異常、血液疾患、内分泌異常などが挙げられる。

炎症性歯周疾患はこのようなささまざまな局所的因子および全身的因子が複雑に影響しあって発症・進行していく疾患であり、糖尿病患者における歯肉炎や歯周炎はまさにその典型といえる。そのため糖尿病と炎症性歯周疾患との関連性の検索においては両疾患を修飾する多くの因子を除外あるいは統一できる実験系、すなわちそれぞれの因果関係を捉えやすくする単純な実験系が必要である。

前報¹⁾において著者は、普通飼育の Streptozotocin (以下, STZ) 誘発糖尿病ラットを用い、インスリン投与による血糖コントロールがゴム輪挿入による実験的歯周炎の炎症状態および歯槽骨の吸収状態などにどのような影響を及ぼすのか検討した。そして普通飼育非糖尿病ラットに比べて普通飼育糖尿病ラットでは機械的刺激と口腔内細菌叢に由来する刺激による歯周組織の炎症性変化および損傷の程度が大きいこと、さらにこの実験的歯周炎の程度がインスリンを投与することにより軽減することを明らかにした。

無菌動物を用いると口腔内細菌の影響を排除できるため、歯周組織に対する炎症性因子をさらに単純化できる。本研究の目的は、口腔内細菌の影響がない状況下で機械的刺激による糖尿病ラットの実験的歯周炎

に、血糖コントロールが及ぼす影響について検索することである。すなわち無菌飼育の STZ 誘発糖尿病ラットを用い、ゴム輪挿入による実験的歯周炎にインスリン投与が及ぼす影響について病理組織学的および組織計量学的検索を行うことである。

材料と方法

1. 実験動物

実験には Wistar 系無菌飼育ラット 16~20 週齢 39 匹 (日本クレア, 東京) を用いた。表 1 に示すようにラットを非糖尿病群、糖尿病群、および糖尿病-インスリン群 (以下、それぞれ N-DM 群, DM 群および DM-I 群) に分け、図 1 に示すスケジュールで実験に供した。この間、床敷きの汚染状態とラットの全身状態の観察、並びに体重測定を行った。

飼育については東北大学医学部附属動物実験施設内無菌飼育室で、加藤の方法²⁾にほぼ準じて行った。ビニールアイソレーターはマウス・ラット用 No. 10 (日本クレア, 東京) を用いた。飼料、飲料水、床敷きおよび実験器具には高圧蒸気滅菌処理 (127°C, 45 分) を施した。ビニールアイソレーターの内部、器材の搬入および搬出時のステリロックとスリーブ内については 2% Peracetic acid (過酢酸, 三菱瓦斯化学, 東京) をスプレーガンで噴霧して滅菌した。ビニールア

表 1 動物数

	N-DM 群	DM 群	DM-I 群	
14 日	8	11	10	29
28 日	4	3	3	10
計	12	14	13	39

図1 実験スケジュール

(↑: ゴム輪挿入, ▲: STZ投与, ↑: インスリン投与, ●: 屠殺)

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日本実験動物研究会の方法³⁾に準じて無菌試験を行った。無菌試験用培地には、Thioglycollate Medium without indicator-135 C (BBL, U.S.A.), Cooked Meat Medium (Difco, U.S.A.), Potato Dextrose Broth (Difco, U.S.A.) を用いた。ビニールアイソレーター内の床敷き, swab および新鮮糞を培養対象として無菌状態であることを確認した。実験動物の取り扱い, 東北大学医学部・歯学部の内規に従った。

2. 歯周組織に対する機械的刺激

歯周組織に対する機械的刺激の方法は前報¹⁾に準じて行った。ワイヤー, セパレーター, エラスティックホルダーなどは高圧蒸気滅菌処理 (127°C, 45 分) を施した。小型ゴム輪は実験直前に 2% Peracetic acid の噴霧で滅菌し, アイソレーター内に搬入した。下顎右側第一臼歯歯肉溝に小型ゴム輪を圧入して実験側とし, 反対側の下顎左側第一臼歯には同様な処置は行わず, 対照側とした。

3. 糖尿病の誘発方法およびインスリンの投与方法

ゴム輪挿入から 7 日目, STZ (Sigma, MO, U.S.A.) をクエン酸-クエン酸ナトリウム緩衝液 (pH 4.2) に溶解して 50 mg/ml に調整後, ミリポアフィルター (MILLEX-GV®, 孔径 0.22 μm, 日本ミリポアリミテッド, 東京) にて濾過滅菌を行った。これを滅菌試験管にてアイソレーター内に搬入し, 直ちに 40 mg/kg 腹腔内に投与した。このとき, N-DM 群にはクエン酸-クエン酸ナトリウム緩衝液のみを投与した。STZ 投与 3 日後, すなわちゴム輪挿入 10 日後に 300 mg/dl 以上の高血糖を示した個体のみを DM 群ならびに DM-I 群として実験に供し, DM-I 群にはさらに同日から滅菌試験管にてアイソレーター内に搬入したインスリン (ノボ・ウルトラレンテ MC®, 山之内製薬, 東京) 10 I.U. を 1 日 1 回, 連日腹腔内投与した。このとき, N-DM 群および DM 群には生理食塩水を投与した。なお, インスリンの投与時間についてはラットの摂食行動が暗期 (午後 8 時～

翌日午前 8 時) に活発になることをふまえ, 午後 4 時～午後 6 時とした。

4. 血糖値の測定方法

前報¹⁾と同様にグルコースヘキシキナーゼ法 (タイド®/タイデックス®, マイルス三共, 東京) により, 随時血糖値を測定した。血糖値上昇を確認するためにゴム輪挿入 10 日後に尾部から採取した血液は, 試験管内に入れた後直ちにアイソレーターから搬出し測定に供した。また, ゴム輪挿入 14 日後および 28 日後の屠殺時の採血については Pentobarbital sodium による腹腔内麻酔後にラットをアイソレーターから搬出し, 前報¹⁾と同様に行った。なお, タイド®の血糖値の測定範囲は 10~600 mg/dl であるため, スケールオーバーとして表示された場合にはすべて 600 mg/dl として取り扱った。

5. 病理組織学的検索

前報¹⁾と同様に下顎第一臼歯の近遠心的連続切片を作製し, ヘマトキシリン・エオジン染色を施した。組織標本の観察は前報¹⁾と同様の評価基準に従い, 下顎第一臼歯の近心・遠心歯頸部および分岐部を中心として上皮付着の状況, 炎症性細胞浸潤の程度と範囲, 結合組織線維の走行状態, 歯槽骨吸収の状態などに注目し, 光学顕微鏡にて行った。

6. 組織計量学的検索

前報¹⁾と同様に第一臼歯の近心側, 分岐部および遠心側に測定範囲を設定した。それぞれの測定範囲に含まれる皮質骨および海綿骨の面積を 5 枚の標本について計測し, 各ラットにおける平均値を求めた。

7. 統計学的検索

14 日における 3 群の血糖値および組織計測の結果は多重比較検定 (ポストホック・テスト) を行った。

結 果

1. 全身所見と体重変化

Pentobarbital sodium 麻酔覚醒時にはほぼ全例において全身の立毛が認められたが, 1 日後には消失した。DM 群と DM-I 群において STZ を投与した 24~48 時間後には飲料水の摂取量が増え始め通常のほぼ 2 倍になった。また床敷きが汚れた状態になり, 通常の倍の頻度で床敷きを交換した。しかしながら DM-I 群においてはその後インスリン投与を開始すると飲料水の摂取量も床敷きの状態も N-DM 群と同程度になった。

図 2 に実験期間中の体重変化をゴム輪挿入直前の体重を 100 として示した。各群ともゴム輪挿入後に体重が減少し 2~3% となったが, 5 日にはゴム輪挿入

時の体重に回復した。N-DM 群はその後体重の増加が続き、10 日、14 日および 28 日にはゴム輪挿入時の +5%、+7% および +13% となった。DM 群と DM-I 群では 7 日の STZ 投与後に体重が減少し、10 日にはゴム輪挿入時の -3% となった。DM 群ではその後も体重減少が続き 14 日、28 日にそれぞれ -7%、-13% となった。DM-I 群では 10 日のインスリン投与後体重が増加し、14 日、28 日にそれぞれ +5%、+11% となった。

2. 血糖値

表 2 にゴム輪挿入 14 日および 28 日における平均血糖値と標準偏差を示した。

経時的変化、すなわち 14 日と 28 日の平均血糖値間には、3 群とも大きな変化は認められなかった。群間

図 2 体重変化

(○: N-DM 群, □: DM 群, △: DM-I 群)

では 14 日の N-DM 群と DM 群および DM 群と DM-I 群のそれぞれで有意差 ($p < 0.001$) が認められた。

3. 病理組織学的所見

1) 対照側

(1) 部位別の所見および経時的変化

近心側、遠心側ともに歯周ポケットはみられなかった。炎症性細胞浸潤はみられないか、みられた場合(近心側: 10%, 遠心側: 21%)は上皮直下の血管周囲に少数の多形核白血球(以下, PMN)が観察された。結合組織線維の配列に乱れはなく、歯槽骨吸収はみられなかった。分岐部に炎症性変化は認められず、歯槽骨吸収はみられなかった。

上記の所見には、14 日と 28 日で相違はみられず、経時的変化は認められなかった。

(2) 3 群間の比較

近心側、遠心側および分岐部の炎症性細胞浸潤の程度および範囲、結合組織線維の配列などについて 3 群間で比較したところ相違はみられなかった。

表 2 血糖値測定結果 (mg/dl, 平均値±標準偏差)

	N-DM 群	DM 群	DM-I 群
14 日	127±19	496±79	111±44
28 日	139±14	527±126	106±37

***: $p < 0.001$

a

b

図 3 対照側—DM-I 群—14 日

a: 分岐部, b: 近心側, 歯肉溝底は CEJ に一致している。炎症性細胞浸潤はわずかに上皮下結合組織にみられる。(×50)

表 3 病理組織学的所見（実験側）

近心側	14 日			28 日		
	N-DM 群	DM 群	DM-I 群	N-DM 群	DM 群	DM-I 群
潰瘍形成 (%)	13	27	0	0	0	0
炎症性細胞浸潤の程度	±	+	±	±	±	±
炎症性細胞浸潤の範囲	±	+~#	+	±	±	±
線維の走行の乱れ	±~+	+	±~+	±	±~+	±
分岐部	14 日			28 日		
	N-DM 群	DM 群	DM-I 群	N-DM 群	DM 群	DM-I 群
炎症性細胞浸潤の程度	±	±~+	±	±	±	±
炎症性細胞浸潤の範囲	±	+	±	±	±	±
膿瘍形成 (%)	0	9	0	0	0	0
遠心側	14 日			28 日		
	N-DM 群	DM 群	DM-I 群	N-DM 群	DM 群	DM-I 群
潰瘍形成 (%)	13	27	11	0	33	0
炎症性細胞浸潤の程度	±	+	±~+	±	±	±
炎症性細胞浸潤の範囲	±	+	±~+	±	±	±
線維の走行の乱れ	±	±~+	±	±	±	±

(評価基準)

炎症性細胞浸潤の程度

なし：-, 軽度：±, 中等度：+, 高度：#

炎症性細胞浸潤の範囲（近遠心側）

なし：-, 上皮直下のみ：±, 上皮直下から結合組織まで：+, 歯槽骨周囲まで：#

炎症性細胞浸潤の範囲（分岐部）

なし：-, 一部のみ：±, 広範囲：+, 歯槽骨周囲まで：#

線維の走行の乱れ

正常：-, 軽度の乱れ：±, 不規則：+, 消失：#

なお、以上の対照側の所見は前報¹⁾の普通飼育ラットと同様であった。

2) 実験側 (表 3)

(1) 部位別の所見および経時的变化

全例の近心側、遠心側歯頸部にゴム輪による圧痕があり、歯周ポケットが認められた。歯周ポケット底には一部に潰瘍形成が認められた。潰瘍形成は14日の近心側、遠心側でそれぞれ14%、18%に認められたが、28日には近心側では認められず、遠心側では一例に認められた。炎症性細胞浸潤は、14日の近心側、遠心側では上皮内および上皮下にPMNを主体として軽度～中等度にみられた（近心側：86%、遠心側：97%）。28日には、全例の近心側、遠心側で上皮下にリンパ球を主体とした軽度の炎症性細胞浸潤が認められた。結合組織線維の配列は、14日の近心側、遠心側ともに全例で走行の乱れが認められ、近心側より遠心側の方がその程度にばらつきがみられた。28日には乱れは軽減し、規則的な配列を呈した。全例の近心

側、遠心側でゴム輪の圧痕を取り囲むように走行する結合組織線維が認められた。結合組織線維の消失は14日、28日ともにほぼ全例で認められなかった。破骨細胞を伴う歯槽骨吸収は、14日の近心側、遠心側の歯槽骨頂部にそれぞれ57%、39%の頻度で観察されたが、28日の近心側、遠心側ではほとんど認められなかった。

分岐部では、14日のほぼ全例にPMNを主体とした軽度～中等度の炎症性細胞浸潤が観察され、1例に膿瘍形成が認められた。破骨細胞を伴う歯槽骨の吸収は43%に認められた。28日には、全例でリンパ球を主体とした軽度の炎症性細胞浸潤が血管周囲に局限し、破骨細胞を伴う歯槽骨吸収はほとんど認められなかった。

以上の所見を前報¹⁾の普通飼育ラットと比較すると、特に14日の所見にいくつかの差が認められた。まず、炎症性細胞浸潤の程度が普通飼育ラットより軽度であった。特に歯周ポケット底下に観察された

PMN を主体とした炎症性細胞浸潤に、その傾向が顕著にみられた。また近心側、遠心側および分岐部で破骨細胞を伴った歯槽骨吸収がみられた頻度は、普通飼育ラットに対し無菌飼育ラットの方でほぼ半減していた。さらに無菌飼育ラットでは歯槽骨頂部の吸収の程度が普通飼育ラットに比較して軽度であり、歯周ポケット底から歯槽骨頂部までの距離が短い傾向が認められた。

(2) 3 群間の比較

① 14 日

近心側、遠心側の歯周ポケット底の潰瘍形成の頻度は、DM 群で高い傾向を示したが 3 群間に顕著な差はみられなかった。炎症性細胞浸潤は、DM 群の近心側では歯周ポケット底～歯槽骨頂部におよび PMN を主体とした中等度の浸潤が、また遠心側では結合組織中に中等度の浸潤が認められた（近心側：55%，遠心側：45%）。また DM 群の分岐部では PMN を主体とした軽度～中等度の浸潤があり、1 例に膿瘍形成がみられた。DM 群の所見に対し、DM-I 群の近心側では結合組織中に PMN を主体とした軽度の浸潤が、また遠心側では上皮直下に PMN を主体とした軽度の浸潤が認められた（近心側：50%，遠心側：70%）。分岐部では全例で血管周囲にのみ PMN を主体とした軽度の浸潤がみられた。N-DM 群では DM-I 群とほぼ同様の所見を示したが、遠心側では DM-I 群より軽度であった。結合組織線維の配列は、不規則な走行を示す傾向が DM 群で強かったが、3 群間に顕著な差はみられなかった。破骨細胞を伴う歯槽骨吸収が観察された頻度は DM 群の近心側、遠心側および分岐部でそれぞれ 64%，55%，64% であったのに対し、N-DM 群では 38%，13%，25% であり、DM-I 群では 67%，44%，33% であった。

以上の所見について DM 群と他の 2 群との間の差を普通飼育ラットと比較すると、普通飼育ラットでみられたほどの顕著な差は無菌飼育ラットにはみられなかった。

② 28 日

歯周ポケット底の潰瘍形成は N-DM 群と DM-I 群では認められず、DM 群の遠心側で一例に認められた。炎症性細胞浸潤および結合組織線維の配列には、3 群間に顕著な差はみられなかった。破骨細胞を伴う歯槽骨吸収は 3 群のいずれの部位でもほとんど認められなかった。

4. 歯槽骨における計測面積

1) 対照側 (図 8~10)

(1) 経時的变化

近心側、分岐部および遠心側の歯槽骨における計測

面積については 14 日と 28 日で 3 群とも顕著な差は認められなかった。

(2) 3 群間の比較

近心側、分岐部および遠心側の歯槽骨における計測面積を 3 群間で比較すると、普通飼育ラットの場合と同様に 3 群ともほぼ一定の値を示し顕著な差は認められなかった。

2) 実験側 (図 11~13)

(1) 経時的变化

近心側、分岐部および遠心側の歯槽骨における計測面積については 14 日に対し 28 日の方が増加する傾向が認められた。

(2) 3 群間の比較

近心側、分岐部および遠心側の歯槽骨における計測面積を 3 群間で比較した。

① 14 日

N-DM 群と DM 群間を比較すると近心側、分岐部および遠心側ともに N-DM 群が大きい値を示し、分岐部および遠心側には統計学的有意差が認められた（分岐部 $p < 0.05$ ，遠心側 $p < 0.05$ ）。

DM 群と DM-I 群間を比較すると近心側、分岐部および遠心側ともに DM-I 群が大きい値を示し、分岐部では統計学的有意差が認められた（ $p < 0.05$ ）。

N-DM 群と DM-I 群の間を比較するとほぼ同じ値か、あるいは N-DM 群の方が大きい値を示す傾向がみられたが、いずれの計測面積にも統計学的有意差は認められなかった。

② 28 日

N-DM 群と DM 群間を比較すると近心側、分岐部および遠心側ともに N-DM 群が大きい値を示す傾向がみられた。

DM 群と DM-I 群間を比較すると近心側、分岐部および遠心側ともに DM-I 群が大きい値を示す傾向がみられた。

N-DM 群と DM-I 群の間を比較すると近心側、分岐部および遠心側ともに DM-I 群が大きい値を示す傾向がみられた。

考 察

1. 実験方法について

無菌動物は歯周疾患の研究において多くの利点を有している。その活用法としては① 単一あるいは数種の細菌による感染モデルの作出^{4~6)}、② 歯周組織に影響を及ぼす複雑な炎症性因子の分離、単純化による各々の因子と歯周組織の反応との関連性の検索^{7~11)}、③ 細菌感染の影響を検索するための普通飼育動物と

図 4 実験側—近心側—14 日

- a : N-DM 群, 炎症性細胞浸潤は軽度で, 上皮および上皮下結合組織に局限している。結合組織線維の走行の乱れは軽度。(×50)
- b : DM 群, 炎症性細胞浸潤は中等度であり, 歯槽骨頂部の歯根膜側におよんでいる。結合組織線維は歯槽骨頂部の歯根膜側で一部消失している。(×50)
- c : DM-I 群, 炎症性細胞浸潤は軽度で, 上皮および上皮下結合組織に局限している。結合組織線維の走行の乱れは軽度。(×50)

図 5 実験側—分岐部—14 日

- a : N-DM 群, b : DM 群, c : DM-I 群, 3 群ともに炎症性細胞浸潤は軽度。DM 群では歯冠側の歯根膜腔の拡大が大きい。(×50)

図 6 実験側一近心側—28 日

- a : N-DM 群, 炎症性細胞浸潤は軽度で, 上皮直下に局限している。結合組織線維の走行の乱れは軽度。(×50)
- b : DM 群, 炎症性細胞浸潤は軽度であり, 上皮下結合組織にみられる。結合組織線維の走行の乱れは軽度。(×50)
- c : DM-I 群, 炎症性細胞浸潤は軽度で, 上皮直下に局限している。結合組織線維の走行の乱れは軽度。(×50)

図 7 実験側一分岐部—28 日

- a : N-DM 群, b : DM 群, c : DM-I 群, 3 群ともに炎症性細胞浸潤は軽度。3 群間に大きな差違はみられない。(×50)

図 8 対照側一近心側の計測面積
(平均値±標準偏差)

図 11 実験側一近心側の計測面積
(平均値±標準偏差)

図 9 対照側一分岐部の計測面積
(平均値±標準偏差)

図 12 実験側一分岐部の計測面積
(平均値±標準偏差)

図 10 対照側一遠心側の計測面積
(平均値±標準偏差)

図 13 実験側一遠心側の計測面積
(平均値±標準偏差)

の比較実験¹²⁾などが挙げられる。本研究では実験的歯周炎における糖尿病および血糖コントロールの影響を検索するために複雑な炎症性因子を単純化する必要があった。従って上記の②の活用ができる無菌動物は本研究の目的にかなっていると考えられた。

無菌飼育ラットの歯周組織への局所的刺激の方法については前報¹⁾と同様に色川らの方法⁹⁾に準じて行った。その結果体重変化において普通飼育ラットと異なった点がみられた。つまり、前報¹⁾の普通飼育ラットにおける結果と比較するとゴム輪挿入後の体重の減少が軽度であり、回復するのも早い傾向がみられた。これは施術時および施術後に細菌感染による影響がなかったことに起因すると考えられる。

無菌動物における実験的糖尿病の誘発に関してはこれまでいくつか報告がある。そのうち無菌飼育ラットにおいては色川ら¹³⁾がAlloxan投与による血糖値の上昇を、佐々木¹⁴⁾がSTZ投与による実験的糖尿病の発症を報告している。さらに佐々木¹⁴⁾はSTZ投与による無菌飼育糖尿病ラットの平均血糖値と色川ら¹³⁾がAlloxan投与により得た平均血糖値とを比較検討し、STZの方が比較的安定した高血糖状態を作成できると述べている。本研究のDM群で得られた平均血糖値は 506 ± 89 mg/dlであり、佐々木¹⁴⁾がSTZ投与により得た平均血糖値の 375 ± 30 mg/dlよりも高い値を示した。このような差違が生じた最大の理由として、佐々木¹⁴⁾が血糖値測定機器(測定範囲: 0~399 mg/dl)においてスケールオーバーとして表示された時の血糖値を400 mg/dlとして取り扱ったことが考えられる。

また本研究のDM群を前報¹⁾の普通飼育ラットにおけるDM群と比較すると血糖値の上昇程度についてはほぼ同じ傾向を示したが、無菌飼育ラットの方がSTZ投与後の衰弱の程度や体重減少が軽度であった。このような所見については佐々木¹⁴⁾が同様の報告をしており、原因として細菌感染の有無による全身への影響を挙げている。

本研究では滅菌試験管を用いてインスリンをアイソレーター内に搬入し、前報¹⁾に準じた投与方法で無菌飼育糖尿病ラットに投与した。その結果DM-I群で得られた平均血糖値は 109 ± 40 mg/dlであり、前報¹⁾の普通飼育ラットにおける結果とほぼ同様の結果が得られた。さらに本研究のDM群とDM-I群の平均血糖値間には統計学的有意差が認められることから、無菌飼育糖尿病ラットにインスリン投与を行っても普通飼育糖尿病ラットと同様の血糖降下作用が得られることが明らかとなった。

また前報¹⁾と同様にDM-I群においてインスリン投

与後に自発運動の低下、振戦、痙攣などの低血糖状態を疑わせるような所見を示したものは実験期間を通じて一例もなく、過度の血糖降下を生じなかったことが示唆された。

なお、28日の3群においては、得られた動物数が少なかったために統計処理の対象として適さないと考え、統計学的検索は行わなかった。

2. 病理組織学的所見および歯槽骨における計測面積について

対照側の歯周組織においては3群とも同様に炎症性変化はほとんど観察されず、経時的変化も認められなかった。このような所見は前報¹⁾の普通飼育ラットの対照側での所見とほぼ同様であり、ラットの歯周組織においては炎症性変化が生じにくいことが示唆された。

実験側では実験開始14日において近心側および遠心側に歯周ポケットが形成され、歯槽骨頂部に破骨細胞を伴う骨吸収が観察された。また分岐部歯槽骨においても破骨細胞を伴う骨吸収が認められた。口腔内細菌の影響がない状況でもこれだけの炎症性変化が生じることから、ゴム輪による持続的圧迫刺激は歯周組織に対して高度の刺激になっていることが示唆された。

実験側にみられた炎症性変化は前報¹⁾における普通飼育ラットの同時期の所見に比較して軽度であった。このような差違が生じた理由については局所的因子と全身的因子の両方を考えなければならない。局所的因子としては普通飼育ラットと異なり、無菌飼育ラットでは口腔内細菌が存在しないことが挙げられる。本研究では無抗原飼料を用いていないため、無菌飼育ラットにおいてもオートクレーブを施した飼料や飲料水中の死菌体およびLPSに代表される細菌由来の発炎物質などの存在については否定できない。そのため無菌飼育ラットで炎症性変化が比較的軽度であった最大の理由は細菌感染による影響がなかったためと考えられる。一方全身的因子としては無菌飼育動物において免疫系、特にリンパ系組織が脆弱であるといわれている点が挙げられる。佐々木ら¹⁵⁾は無菌飼育ラットおよび普通飼育ラットに*Escherichia coli*の内毒素を腹腔内に注入したときの抗体産生能について、普通飼育ラットの方が高かったと述べている。また宮川¹⁶⁾は無菌哺乳動物のリンパ節は自然動物のそれに対して重量が少なく発育低調であると述べている。さらに宮川¹⁶⁾は異物に対する生体の防御反応について自然動物では好中球の遊出が強いのに対し、無菌動物では好中球の遊出は低調であることを報告しており、前報¹⁾および本実験における炎症性変化の差違に強く関連していると思われる。無菌飼育ラットにおける歯槽骨頂部の吸収の

程度が普通飼育ラットに比較して軽度であり、歯周ポケット底から歯槽骨頂部までの距離が短い傾向が認められた点についても、同様に考察できる。すなわち、無菌飼育ラットでは細菌感染が生じず、炎症性変化が軽度であるために歯槽骨の吸収が普通飼育ラットほど急速には進行しないと考えられる。従って上記の所見はゴム輪の圧迫に対して歯槽骨が強く抵抗している結果であると思われる。

実験開始14日に対し、28日では炎症性変化は軽減し、歯周組織は修復像を示した。また近心側、分岐部および遠心側の歯槽骨における計測面積についても経時的に増加傾向を示したことから歯槽骨の添加、すなわち歯槽骨の再生が示唆された。歯周組織がこのような修復傾向を示した理由としてはゴム輪の弾性の経時的な低下による辺縁歯肉への圧迫力の減少に加え、細菌感染の影響がなかったことが考えられる。

14日においてN-DM群とDM群を比較するとDM群の方が炎症性変化が高度であった。さらにDM群の分岐部においては一例ではあるが膿瘍形成を伴った高度の炎症性細胞浸潤を認めた。また歯槽骨における計測面積についても分岐部と遠心側でDM群の方が有意に小さく、近心側でも小さい傾向を示した。これは骨吸収の程度がDM群で大きかったことを示す。直接的な圧迫力が加わらない分岐部で高度の炎症性細胞浸潤を認めた点については、ゴム輪挿入により形成された歯周ポケット内に分岐部が露出すると食片圧入、体毛圧入および食物残渣の停滞が最も起こりやすい部位になり得ることが考えられる。無菌飼育糖尿病ラットではこれらの刺激およびゴム輪の持続的圧迫刺激による実験的歯周炎が無菌飼育非糖尿病ラットに比べて進展しやすい状態にあることが示された。

一方DM-I群では炎症性変化はN-DM群とほぼ同程度であった。歯槽骨における計測面積についても遠心側ではN-DM群より小さい値を示したが近心側と分岐部ではN-DM群とほぼ同じ値を示した。さらに分岐部ではDM群との間に統計学的有意差が認められた。これは糖尿病ラットにインスリンを投与することによりゴム輪挿入による骨吸収の程度が軽減することを示している。本実験のように無菌飼育糖尿病ラットにインスリンを投与し、歯周組織における検索を行った研究は今までのところみられない。本実験結果より無菌飼育のSTZ誘発糖尿病ラットにインスリン投与を行うと機械的刺激による炎症性変化および組織損傷の程度が軽減することが明らかとなった。また今実験でみられた実験的歯周炎の進展阻止効果は、口腔内細菌叢やその変化による影響が及んだためのものではないことが示された。

28日になると炎症性変化において3群間に顕著な差は認められなくなった。また歯槽骨における面積計測値は近心側、分岐部および遠心側で3群ともにほぼ同程度の値を示した。前報¹⁾の普通飼育ラットにおいては28日になってもDM群と他の2群との間に統計学的有意差が認められており、この点が本実験における結果と大きく異なっている。このことから糖尿病ラットの歯周組織における修復機転に対しては、細菌感染の有無が強く影響を及ぼすことが示唆された。

細菌以外の刺激で歯周組織に惹起させた炎症を無菌飼育動物と普通飼育動物で比較すると、口腔内細菌の発炎への影響を推測できる。このような観点から実験的歯周炎における炎症性変化や組織の損傷の程度について前報¹⁾と今実験の結果を比較してみると、3群の中で最も大きな差がみられたのはDM群であった。そして普通飼育ラットにおいてDM群と他の2群との間にみられたような大きな差は無菌飼育ラットにおいてはみられなかった。このことから実験的歯周炎の進展においてDM群が口腔内細菌の影響を最も強く受けていたと考えられる。また前述したように歯周組織の修復機転においても、普通飼育ラットのDM群より無菌飼育ラットのDM群の方が修復傾向が強かった。これらのことから、糖尿病ラットでは非糖尿病ラットおよび血糖コントロールを行った糖尿病ラットに比較して細菌感染に対する抵抗力が低下しており、実験的歯周炎の進展および修復機転に対して細菌感染がより強い影響を及ぼすことが示唆された。

前報¹⁾と本実験の結果から、口腔内細菌の有無にかかわらずインスリン投与が糖尿病ラットのゴム輪挿入による実験的歯周炎を軽減させることを明らかにすることができた。インスリン投与が糖尿病ラットに及ぼす影響に関する基礎的研究として、歯肉中のコラーゲン代謝¹⁷⁾および白血球機能¹⁸⁾についての報告があり、それぞれ糖尿病ラットにみられた異常がインスリン投与により改善することを明らかにしている。このような報告や本研究の結果は、糖尿病ラットにおける実験的歯周炎の進展阻止にインスリン投与が重要であることを示している。糖尿病と歯周炎を併発している患者においても歯周炎の進展を阻止するために血糖コントロールの重要性が示唆された。

山田ら¹⁹⁾は糖尿病患者と非糖尿病患者の口腔内診査を行い、糖尿病の諸因子と歯周炎との関連について調査している。その報告の中で耐糖能が重症である群に口腔内所見が正常と判断される者が多くみられ、そのほとんどがインスリン使用者であったと述べている。そしてこれはインスリンを必要とする重症な糖尿病患者では血糖が改善されなくてもインスリンの使用が歯

周炎を改善させることを示唆する結果であると述べている。また神山²⁰⁾は糖尿病患者について同様の疫学的調査を行い、インスリン療法を受けている患者が食事療法のみの患者に比べて歯周ポケット滲出液量が多かったことから、歯周組織の炎症の進展に対し Insulin が何らかの影響を及ぼしている可能性があるとして述べている。このように疫学的分野においてはインスリンの直接的な作用を示唆する報告がみられるが、一致した見解は得られていない。今実験では、インスリン投与による実験的歯周炎の進展阻止効果が血糖値をコントロールしたことによるものなのか、あるいはインスリンの直接的な作用によるものなのかについて明らかにすることができなかった。本研究においても今後は実験的歯周炎の軽減の程度がインスリンの投与量と血糖値のコントロール状態のどちらに強く相関するのかを検討していく必要がある。さらに糖尿病ラットを用い血糖降下剤の投与、食事療法またはそれらの併用などによりさまざまな血糖コントロールモデルを作成し、それらのモデルを用いての検討が必要と思われる。

謝 辞

稿を終えるにあたり、終始御懇切なる御指導、御校閲を賜りました堀内 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きました口腔病理学講座大家 清教授、口腔外科学第一講座茂木克俊教授、口腔細菌学講座高田春比古教授に深謝致します。また、実験にあたって御教示をいただきました遠藤英昭博士、佐々木静治博士、飯山正夫博士、今井 洋博士に感謝致します。最後に種々御協力いただきました歯科保存学第一講座各位に厚く御礼申し上げます。

文 献

- 1) 加藤 清: Streptozotocin 誘発糖尿病ラットに対する血糖コントロールが実験的歯周炎に及ぼす影響 1. 普通飼育ラットにおけるインスリンの効果. 日歯周誌, 38: 421-435, 1996.
- 2) 加藤伊八: 無菌マウスへの歯垢形成性 *Streptococcus mutans* の定着性に関する研究. 一歯周病の実験モデルへのアプローチ. 日歯周誌, 18: 215-224, 1976.
- 3) 前島一淑: 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動物技術. 第一版, 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*. Archs. Oral Biol., 15: 993-996, 1970.
- 5) 新井 聡, 大和田勉, 尾崎 明, 水谷武夫, 前田信子: ノトバイオートマウスによる歯周疾患モデルの検討 第1報 *Actinomyces viscosus* の定着と歯槽骨の吸収. 無菌生物, 23: 85-87, 1993.
- 6) 新井 聡, 大和田勉, 尾崎 明, 水谷武夫, 前田信子: ノトバイオートマウスによる歯周疾患モデルの検討 (第3報) — *Porphyromonas gingivalis* の定着と歯槽骨の吸収—. 無菌生物, 24: 59-62, 1994.
- 7) 梁川誠郎, 福岡康裕, 色川俊則, 石田悦保: 無菌マウスにおける実験的咬合性外傷. 日歯周誌, 21: 66-71, 1979.
- 8) 色川俊則, 石田悦保, 福岡康裕, 米田栄吉, 梁川誠郎, 加藤伊八, 砂田今男: 無菌ラットおよび普通飼育ラットの辺縁歯肉に対する持続的圧迫刺激の影響に関する研究. 日歯周誌, 19: 333-340, 1977.
- 9) 色川俊則: 無菌飼育および普通飼育ラットを用いた歯周組織の損傷と修復に関する研究. 日歯周誌, 23: 233-248, 1981.
- 10) Chang, K.M., Ramamurthy, N.S., McNamara, T. F., Genco, R.J. and Golub, L.M.: Infection with a gram-negative organism stimulates gingival collagenase production in non-diabetic and diabetic germfree rats. J. Periodont. Res., 23: 239-244, 1988.
- 11) 今井 洋: 無菌および普通飼育ラットの実験的歯周炎における歯周組織内への細菌侵入に関する病理組織学的研究. 日歯周誌, 33: 782-798, 1991.
- 12) 西岡政道, 椎谷 亨, 上野健一, 小林千尋, 須田英明: 意図的再植に関する研究—無菌飼育および普通飼育ラットにおける創傷治癒の比較—. 日歯保誌, 38 (秋季特別号): 93, 1995.
- 13) 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.
- 14) 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 2. 無菌飼育ラットを用いた実験. 日歯周誌, 30: 414-427, 1988.
- 15) 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: B 4 endotoxin に対する抗体産生. 日歯周誌, 27: 114-125, 1985.
- 16) 宮川正澄: 無菌動物—医学・生物学への応用—, 第一版, 医歯薬出版, 東京, 1973, 137-187, 245-272.
- 17) Ramamurthy, N.S., Zebrowski, E.J. and Golub, L. M.: Insulin reversal of alloxan-diabetes induced changes in gingival collagen metabolism of the rat. J. Periodont. Res., 9: 199-206, 1974.
- 18) 佐藤則之, 諏訪邦彦, 下村洋之助, 高橋正樹, 清水弘行, 上原 豊, 大島喜八, 小林 功, 小林節雄:

- 糖尿病ラットにおける好中球活性酸素生成能について. 糖尿病, 30: 877-879, 1987.
- 19) 山田弘三, 坂本信夫, 小出忠孝, 古田雄彦: 糖尿病と歯槽膿漏. 糖尿病, 13: 303-311, 1970.
- 20) 神山義信, 蝦名徹哉, 草野郁子, 佐々木俊明, 石川潤一, 八巻恵子, 佐々木静治, 遠藤英昭, 堀内博: 歯周疾患と糖尿病 2. 糖尿病のコントロール状況と歯周疾患の程度. 日歯周誌, 28: 1076-1083, 1986.

連絡先:

東北大学歯学部歯科保存学第一講座
〒980-77 仙台市青葉区星稜町 4-1