

博士論文

糖尿病齧歯類を用いた齧蝕および歯周病
の病理発生に関する形態学的研究

中原 豊

目次

略号および用語の定義一覧	7
緒 言	8
1 糖尿病モデル動物における齲蝕および歯周病変の発生 I : 自然発症糖尿病モデル (WBN/Kob ラット)	16
1.1 序論	17
1.2 材料および方法	19
1.2.1 動物および飼育条件	19
1.2.2 血糖値および尿糖値モニタリング	19
1.2.3 齲蝕および歯槽骨吸収スコアリング : 軟 X 線検査	20
1.2.4 病理組織学的検査	21
1.2.5 統計解析	21
1.3 結果	21
1.3.1 血糖値および尿糖値	21
1.3.2 齲蝕スコア	22
1.3.3 歯槽骨吸収スコア	22
1.3.4 病理組織学的所見	23
1.4 考察	25
1.5 小括	27
2 糖尿病モデル動物における齲蝕および歯周病変の発生 II : 薬物誘発糖尿病モデル (Alloxan 投与ラット)	36
2.1 序論	37
2.2 材料および方法	37
2.2.1 動物および飼育条件	37
2.2.2 糖尿病誘発薬物 (Alloxan) の調整	38
2.2.3 実験デザイン	38
2.2.4 血糖値および尿糖値モニタリング	38
2.2.5 齲蝕および歯槽骨吸収スコアリング : 軟 X 線検査	39
2.2.6 病理組織学的所見	39
2.2.7 統計解析	40
2.3 結果	40
2.3.1 血糖値および尿糖値	40

2.3.2	齲蝕スコア	41
2.3.3	齒槽骨吸収スコア	42
2.3.4	病理組織学的所見	42
2.4	考察	44
2.5	小括	47
3	血糖コントロールが糖尿病モデル動物における齲蝕および歯周病変の発生に及ぼす影響 : Insulin 投与による血糖コントロール	58
3.1	序論	59
3.2	材料および方法	59
3.2.1	動物および飼育条件	59
3.2.2	糖尿病誘発薬物 (Alloxan) の調整	60
3.2.3	実験デザイン	60
3.2.4	血糖値および尿糖値モニタリング	60
3.2.5	齲蝕および歯槽骨吸収スコアリング : 軟 X 線検査	61
3.2.6	病理組織学的検査	61
3.2.7	統計解析	62
3.3	結果	62
3.3.1	血糖値および尿糖値	62
3.3.2	齲蝕スコア	62
3.3.3	歯槽骨吸収スコア	63
3.3.4	病理組織学的所見	64
3.4	考察	66
3.5	小括	69
4	糖尿病モデル動物における齲蝕および歯周病変の関連 : フッ素投与による齲蝕抑制と歯 周病の発生	81
4.1	序論	82
4.2	材料と方法	83
4.2.1	動物および飼育条件	83
4.2.2	糖尿病誘発薬物 (Alloxan) の調整	83
4.2.3	1 型糖尿病モデル (Alloxan 投与ラット) 実験デザイン	84
4.2.4	2 型糖尿病モデル (db/db マウス) 実験デザイン	84
4.2.5	血糖値および尿糖値モニタリング	85

4.2.6	齲蝕の肉眼検査 (db/db マウス)	85
4.2.7	齲蝕および歯槽骨吸収スコアリング : 軟 X 線検査 (AL 投与ラット)	86
4.2.8	病理組織学的検査	86
4.2.9	統計解析	86
4.3	結果	87
4.3.1	血糖値および尿糖値	87
4.3.2	1 型糖尿病モデルにおけるフッ素投与による齲蝕および歯周病変の抑制	87
4.3.3	2 型糖尿病モデルにおけるフッ素投与による齲蝕および歯周病変の抑制	88
4.4	考察	90
4.5	小括	92
	総括	104
	謝辞	112
	引用文献	114

表

Table 1- 1	Incidence and grading of caries in molars of WBN/Kob and F344 rats	28
Table 1- 2	Incidence and grading of ABR in surrounding molars of WBN/Kob and F344 rats	29
Table 1- 3	Incidence of histopathologic lesions surrounding carious molars of WBN/Kob and F344 rats.....	30
Table 1- 4	Incidence of histopathologic lesions surrounding noncarious molars of WBN/Kob and F344 rats.....	31
Table 2- 1	Incidence and grading of caries in molars of non-DM and DM F344 rats	48
Table 2- 2	Incidence and grading of ABR in surrounding molars of non-DM and DM F344 rats	49
Table 2- 3	Incidence of histopathologic lesions in non-DM and DM F344 rats.....	50
Table 2- 4	Incidence of histopathologic lesions surrounding noncarious molars in non-DM and DM F344 rats	51
Table 3- 1	Effect of glycemic control on incidence and grading of caries in molars of male WBN/Kob rats	70
Table 3- 2	Effect of glycemic control on incidence and grading of ABR in surrounding molars of male WBN/Kob rats	71
Table 3- 3	Effect of glycemic control on incidence of histopathologic lesions in male WBN/Kob rats	72
Table 3- 4	Incidence of histopathologic lesions surrounding noncarious molars in male WBN/Kob rats	73
Table 4- 1	Incidence and grading of caries in molars of type 1 DM model (AL-treated F344 rats)	93
Table 4- 2	Incidence and grading of ABR in surrounding molars of type 1 DM model (AL-treated F344 rats)	94
Table 4- 3	Incidence and grading of caries in molars of type 2 DM model (<i>db/db</i> mice).....	95



Figure 0- 1 Diagrammatic representation of the lesion process (PD and caries).....	15
Figure 1- 1 Soft X-ray images of caries and ABR of male WBN/Kob rats	32
Figure 1- 2 Mean caries scores of WBN/Kob and F344 rats	33
Figure 1- 3 Mean scores for ABR of WBN/Kob and F344 rats	34
Figure 1- 4 Histopathological features of caries and ABR of male WBN/Kob rats	35
Figure 2- 1 Macroscopic features of molar caries in AL-induced diabetic F344 rats.....	52
Figure 2- 2 Soft X-ray images of caries and ABR of AL-induced diabetic F344 rats.....	53
Figure 2- 3 Mean caries scores of AL-induced diabetic F344 rats	54
Figure 2- 4 Mean scores for ABR of AL-induced diabetic F344 rats	55
Figure 2- 5 Histopathological features of molar caries of AL-induced diabetic F344 rats	56
Figure 2- 6 Histopathological features of periodontal lesions of AL-induced diabetic F344 rats	57
Figure 3- 1 Study design	74
Figure 3- 2 Change in representative blood glucose levels.....	75
Figure 3- 3 Effect of glycemic control on mean caries scores	76
Figure 3- 4 Effect of glycemic control on mean scores for ABR	77
Figure 3- 5 Soft X-ray images of molar caries and ABR of glycemic control rats.....	78
Figure 3- 6 Histopathologic features of the inflammatory lesions in the mandibular periodontal tissues of glycemic control rats.....	79
Figure 3- 7 Histopathologic features of the inflammatory lesions in the mandibular gingival tissues adjacent to noncarious molars	80
Figure 4- 1 Fluoride suppresses dental caries in AL-induced type 1 diabetic rats	96
Figure 4- 2 Fluoride suppresses ABR in AL-induced type 1 diabetic rats	97
Figure 4- 3 Soft X-ray images of dental caries and ABR in F-treated type 1 diabetic rats.....	98
Figure 4- 4 Fluoride histopathologically suppresses periodontal lesions and dental caries in AL-induced type 1 diabetic rats	99
Figure 4- 5 Histopathological features of periodontal lesions and dental caries in F-treated type 1 diabetic rats.....	100
Figure 4- 6 Fluoride macroscopically suppresses dental caries in type 2 diabetic <i>db/db</i> mice	101
Figure 4- 7 Fluoride histopathologically suppresses periodontal lesions and dental caries in type 2 diabetic <i>db/db</i> mice.....	102
Figure 4- 8 Histopathological features of periodontal lesions and dental caries in F-treated type 2 diabetic <i>db/db</i> mice.....	103
Figure 5- 1 Diagrammatic representation of the lesion process.....	111

略号および用語の定義一覧

略号および用語	定義
ABR	Alveolar Bone Resorption (歯槽骨吸収)
AL	Alloxan (アロキサン)
DM	Diabetes Mellitus (糖尿病)
F	Fluoride (フッ素)
INS	Insulin (インスリン)
PD	Periodontal Disease (歯周病)

緒 言

糖尿病 (Diabetes mellitus, 以後 DM) は、主に炭水化物の代謝調節不全の疾患であり、インスリンの分泌欠乏あるいは作用障害、またはその両方に起因する高血糖状態を特徴とする疾患である。DM 患者における慢性高血糖症は、様々な臓器障害あるいは機能不全を誘発し、DM 合併症として網膜症、腎症、神経障害、心血管疾患あるいは末梢血管疾患等を発症させることが知られている。歯周病 (Periodontal disease, 以後 PD) は DM 患者における第 6 番目の DM 合併症と言われ、臨床上で大きな問題となっている (Löe 1993; Saini et al. 2011)。PD および齲蝕はともに歯科二大疾患と言われているが、特に PD は自覚症状がないため治療によるコントロールは難しく、成人が歯を喪失する最大の原因となっている (Ong 1998)。また、1 型 DM、2 型 DM および妊娠 DM とともに、PD の有病率、重症度、進行度を高めることが臨床研究から明らかになってきており (Shlossman et al. 1990; Emrich et al. 1991; Cerda et al. 1994; Tsai et al. 2002; Kaur et al. 2009; Meenawat et al. 2013; Genco and Borgnakke 2020; Graves et al. 2020; Polak et al. 2020)、PD が DM の合併症の一つである可能性は非常に高いと考えられる。

一方、PD とは病因が異なるが、DM 患者では齲蝕の発生頻度が高いことも報告されている (Taylor et al. 2004)。しかし、ヒトの場合は、ブラッシングの有無や年齢、性別、他の口腔疾患などの様々な複合的要因もあり、高血糖と齲蝕が関係するという報告と (Twetman et al. 2002; Taylor et al. 2004; Tagelsir et al. 2011) DM 患者と非 DM 患者の齲蝕感受性に差がないという相反する報告 (Canepari et al. 1994; Collin et al. 1998; Iughetti et al. 1999; Hintao et al. 2007) とが存在する。

PD は、歯牙の支持組織である歯周組織（すなわち、歯肉、歯周靭帯、歯槽骨）における感染症であり、歯に隣接して形成されるバイオフィルムや歯垢中の *Porphyromonas gingivalis* を主とする病原性微生物叢によって誘発される歯周組織の炎症性疾患を指す。PD には、可逆性（歯肉炎）と不可逆性（歯周炎）の両方の病態が含まれており、歯肉炎は PD の中で最も軽度の初期病変で、口腔衛生の改善により可逆的に治癒する。一方、炎症が歯周組織の深部にまで到達し、歯根膜や歯槽骨の減退・喪失が生じると歯周炎となる。歯周炎では、歯肉と歯根の間に歯周ポケットが形成され、炎症の継続により病変はより深部に広がる。重度の歯周炎になると、歯牙支持組織の減退が高度となり、歯のゆるみ、痛みや不快感、咀嚼障害、最終的には歯の喪失に繋がる（Pihlstrom et al. 2005, Fig. 0-1A）。

一方、齲蝕は、*Streptococcus mutans* を主とする口腔内細菌の作用により生じる歯牙硬組織（エナメル質および象牙質）の崩壊を主とする疾患で、無機質の脱灰と有機質の破壊によってもたらされる。齲蝕の病態は、エナメル質に限局した軽度の初期病変（エナメル質齲蝕）から、病変が象牙質まで及んだ齲窩形成を特徴とする病態（象牙質齲蝕）、最終的に歯髄が露出する歯髄病変まで様々である（Reich et al. 1999）。更に、歯髄病変は歯冠部歯髄から歯根部歯髄へと波及し、歯根尖部の根尖孔を通じて根尖周囲の歯周組織に病変が及ぶと齲蝕は根尖性歯周炎へと発展する（Fig.0-1B）。齲蝕は多因子性の疾患で、その病因については“細菌”，“宿主（歯と唾液）”，“基質（食物）”の3つの要因に“時間”の4番目の要因が加わり、これらが相互作用しあって生じると考えられて

いる。これらの病因の中で、齲蝕発生の主因は細菌（口腔内細菌）の感染であるが、原因菌の条件が揃っていても必ずしも齲蝕が生じるとは限らず、宿主側の因子（誘因）も齲蝕の発生に大きな影響を与える。DMは宿主側の因子の一つとして影響を及ぼし、齲蝕のリスクが高まると考えられている。従って、PDと齲蝕は、病因が全く異なる口腔内疾患である。

現在まで、PDの病態モデルとして、大型の実験動物では、霊長類を用いたモデル（Caton and Kowalski 1976; Weinberg and Bral 1999; Oz and Puleo 2011）およびイヌを用いたモデル（Lindhe and Ericsson 1978; Lindhe and Svanberg 1974; Reddy et al. 1995）が知られている。霊長類やイヌのPDモデルは、ヒトの病態と類似性は高いが、実験期間の長さ、コスト面の高さや飼育上の煩雑さというデメリットを有する。一方、齧歯類はコスト面で安価でハンドリングも容易であるが、自然環境下ではPDに対して耐性で自然発生はほとんどないことも知られている（Struillou et al. 2010）。それ故、齧歯類では結紮糸の臼歯装着やPD病原性細菌の歯肉接種などのPD誘発処置の手技が確立され（Breivik et al. 2000; Nakajima et al. 2006; Verma et al. 2010; Klausen et al. 1991）、多くの齧歯類のPDモデルがヒトのPD研究を補完するために幅広く用いられている。

DM性PDモデルとしては、薬物誘発性DMの霊長類（Jiang et al. 2018）およびイヌ（Javed et al. 2014）が知られており、DMとPDの関連性が明確になっている。一方、齧歯類では自然発症あるいは薬物によりDMを誘発した動物に対して前述のPD誘発処置を行ったモデルを用いて（He et al. 2004; Holzhausen et al. 2004; Lalla et al. 1998; Liu et al. 2006; Pontes Andersen et al. 2006; Mahamed et al.

2005; Watanabe et al. 2008; Kador et al. 2010), 短期間の高血糖状態で PD が増悪する結果が報告されている。しかし, これらの齧歯類を用いた DM 性 PD 研究のいずれも, 歯肉中のサイトカインの変化は認められるものの, DM により PD が増強する形態学的な証拠は殆ど示されていない。その一方, Alloxan (以後 AL) 投与により長期間に亘って高血糖を維持した 1 型 DM ラットでは, 結紮糸装着等の PD 誘発処置無しに, 歯槽骨吸収 (Alveolar bone resorption, 以後 ABR) を伴う重度の歯周炎が自然発症することが報告されている (Claudino et al. 2007; Claudino et al. 2012)。

一方, 齧歯類の齲蝕モデルは確立されており, ショ糖などを含む齲蝕原性飼料の負荷により, 容易に齲蝕を発生させることができる。齧歯類においても, ヒトと同様に DM と齲蝕の関係は長い間不明であり, 齲蝕原性飼料を用いた実験で, DM が齲蝕を増強させる報告とそうでない報告が混在する (Borghelli 1966; Hartles et al. 1958; Nichols et al. 1957)。しかし, 非齲蝕原性飼料を与えた 2 型 DM の *db/db* マウスで, 齲蝕と根尖性歯周炎が進行し, DM と齲蝕に高い相関性があることが明らかになっている (Sano et al. 2011)。

従って, 従来の報告通り, DM 齧歯類で病因が全く異なる齲蝕および PD のいずれもが発症しているのであれば, 両疾患に起因する炎症が歯牙および歯周組織でそれぞれ独立して発現していると考えられる。しかし, DM 齧歯類を用いて, 歯牙および歯周組織における形態変化を連続的に解析した報告は殆どない。そこで本研究では, DM 齧歯類モデルを用い, 高血糖の持続により歯牙および歯周組織にそれぞれ形成される炎症性変化を病理組織学的に解析し, DM

と齲蝕ならびに DM と PD の関連性を調べることにより，DM が直接的に齲蝕発生に関与するか否か，また，DM 齲蝕類で認められる歯周炎が PD であるか否かについて明らかにした。

第一章では，高血糖の持続が歯牙および歯周組織の炎症を増悪させる否かを検証するため，DM を自然発症する雄 WBN/Kob ラットの歯牙および歯周組織を，DM を発症しない雌 WBN/Kob ラットとの比較のもとに解析した。第二章では，薬物誘発による DM モデルを用い，高血糖の持続が歯牙および歯周組織の炎症を発生・増悪させるか否かを検証し，両病態の関連性を解明するため，AL を投与した DM の雌ラットの歯牙および歯周組織を，非 DM 雌ラットとの比較のもとに解析した。第三章では，高血糖の維持が齲蝕および歯周炎の発生・進行に直接的に関与するのであれば，高血糖状態を抑えることで両病変が抑制されることが推定される。そこで，DM を自然発症する雄 WBN/Kob ラットおよび AL 投与により DM 期間を延長させた雄 WBN/Kob ラットに対し，インスリン（以後 INS）投与による血糖コントロールを行い，INS 投与を行わない雄 WBN/Kob ラットとの比較のもとに歯牙および歯周組織における炎症状態を比較解析した。第三章までの研究結果により，DM 齲蝕類に誘発された歯周組織の炎症には，齲蝕による歯牙の炎症が強く影響していることが示唆された。しかし，DM 動物の高血糖状態が PD を誘発し，PD による炎症と齲蝕による炎症が同時に発生している可能性は完全に否定できない。そこで第四章では，1 型 DM として AL 投与雌ラット，2 型 DM として雌雄 *db/db* マウスを用い，それぞれフッ素（以後 F）投与による齲蝕抑制を行い，齲蝕の発生と関連

のない歯周炎即ち PD が実際に高血糖の持続により誘発されているか否かを検証した。

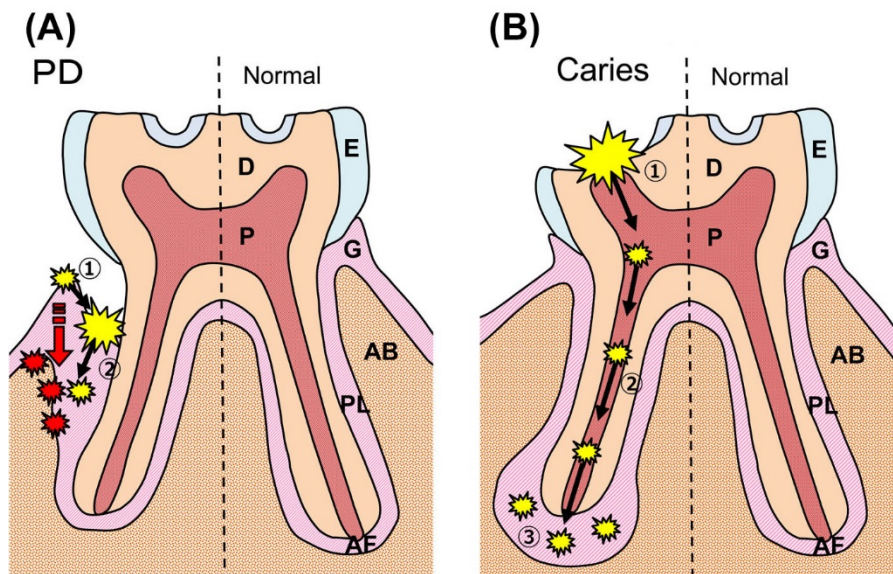


Figure 0- 1 Diagrammatic representation of the lesion process (PD and caries)

(A) : PD 形成過程. 歯肉炎 (①) は PD の中で最も軽度の初期病変で, 炎症が歯周組織の深部にまで到達し, 歯根膜や歯槽骨の減退・喪失 (赤矢印) が生じると歯周炎 (②) となる. (B) : 齲蝕形成過程. 軽度な初期病変であるエナメル質齲蝕から, 病変が象牙質まで及んだ齲窩形成を特徴とする象牙質齲蝕, 最終的に歯髄が露出する歯髄病変 (①) まで様々であり, 更に, 歯髄病変は歯冠部歯髄から歯根部歯髄へと波及し (②), 歯根尖部の根尖孔を通じて根尖周囲の歯周組織に病変が及ぶと齲蝕は根尖性歯周炎 (③) へと発展する

D, 象牙質; P, 歯髄; E, エナメル質; G, 歯肉; AB, 歯槽骨; PL, 歯根膜; AF, 根尖孔.

- 1 糖尿病モデル動物における齲蝕および歯周病変の発生 I
：自然発症糖尿病モデル（WBN/Kob ラット）

1.1 序論

多くの疫学的研究において、DM および血糖コントロール不良が PD の重要な危険因子であることが示唆されており、DM と歯肉炎または歯周炎との関連は広く受け入れられている (Löe 1993; Saini et al. 2011). 2 型 DM は、1 型 DM よりも歯周組織破壊のリスクが高いと考えられており、DM 期間と PD の重症度との明確な関連性が報告されている (Shlossman et al. 1990; Emrich et al. 1991; Cerda et al. 1994; Tsai et al. 2002). また、DM 齧歯類モデルを用いた多くの実験研究において、DM が PD 発生のリスクと重症度を増加させることが示唆されており、薬物誘発 1 型 DM モデルにおいて、非 DM 動物よりも DM 動物で歯周炎の発生率が高い結果が報告されている (Pontes Andersen et al. 2007). 更に、PD 原性細菌を接種した 1 型 DM モデルマウスでは歯槽骨の重度の破壊が誘発され (Mahamed et al. 2005)、インスリン非依存性 DM モデルである Zucker diabetic fatty ラットおよび Goto-Kakizaki ラットでは結紮誘発 PD の発生が増加する報告がある (Liu et al. 2006; Pontes Andersen et al. 2006).

WBN/Kob ラットは、スイスのバーゼル老人病研究所およびドイツのボン大学病理学研究所において長期にわたって繁殖・維持されてきた Wistar 系統の近交系ラットであり、胃癌発生モデル動物として東京大学医科学研究所に導入された (Kobori et al. 1977). その後、1980 年に国立衛生試験所および日本 SLC 株式会社で維持されていた WBN/Kob の雄ラットに DM が発症することが発見され、1985 年に膵内分泌障害による自然発症 DM モデルラットとして確立された (Nakama et al. 1985; Tsuchitani et al. 1985). 雄 WBN/Kob ラットは 10 カ月齢頃

に DM を自然発症し、長期の高血糖状態を維持したまま末梢神経、網膜、ならびに腎臓などに DM 合併症が誘発されるが、雌 WBN/Kob ラットは DM を発症しない。DM 発症後の雄 WBN/KobSlc ラットにおいて、進行した高血糖状態の一般的な続発症として、上行性尿路感染症が認められる。更に、AL を若齢で投与し DM を誘発した雄 WBN/Kob ラットでは、DM 発症前と比較して、消化管の慢性炎症が増強する (Sano et al. 2009a, b)。これらの所見を考慮すると、DM の雄 WBN/Kob ラットでは、口腔組織における感染感受性が増加しており、この感受性の増加によって歯周組織にも炎症が引き起こされる可能性が考えられる。

臨床研究において、DM 患者は齲蝕になりやすいことが示唆されている (Twetman et al. 2002; Taylor et al. 2004; Tagelsir et al. 2011)。一方で、DM 患者と非 DM 患者との間で齲蝕に対する感受性に有意差がないとする研究報告も存在する (Canepari et al. 1994; Collin et al. 1998; Iughetti et al. 1999; Hintao et al. 2007)。また、DM モデルラットにおいても同様に、齲蝕の発生率が高くなる、および齲蝕の発生率に差はないという相反する報告が存在し (Borghelli 1966; Hartles et al. 1958; Nichols et al. 1957)、DM と齲蝕との関連は明確になっていない。齧歯類は、系統により齲蝕感受性が異なり慎重に解析する必要がある。WBN/Kob ラットも齲蝕感受性が高く、雌雄ともに DM 未発症の 5.5 カ月齢までに齲蝕が発生していることが先行研究において明らかになっている (Fukuzato et al. 2009)。

そこで第一章では、長期間 DM を罹患した雄 WBN/Kob ラット、DM 未発症の雌 WBN/Kob ラット、ならびに対照として F344 ラット（齧蝕非感受性）の齧蝕と歯周病変の発生状況を比較することにより、DM の持続で両病変の発生が増悪するかどうかを検討した。

1.2 材料および方法

1.2.1 動物および飼育条件

DM 発症の雄 WBN/Kob ラット（18.7～26.1 か月齢）10 例、DM 未発症の雌 WBN/Kob ラット（20.0～27.4 か月齢）10 例、対照として雄 F344 ラット（18.9～25.4 か月齢）10 例、雌 F344 ラット（18.9～25.7 か月齢）10 例を実験に供した。いずれのラットも日本エスエルシー株式会社から導入し摂南大学薬学部病理学研究室内の specific pathogen free（SPF）動物室において自家繁殖した。動物は SPF 環境下で、室温 20～26°C、湿度 40～70%、12 時間の明暗サイクル（7:00～19:00 までの明期、19:00～7:00 までの暗期）で制御された動物室において、ステンレス床網付きアルミニウム製ケージで飼育し、標準実験動物飼料（CRF-1、オリエンタル酵母工業、東京）および飲水を自由に摂取させた。実験に用いた動物の取り扱いは、摂南大学薬学部動物委員会規約および公益社団法人日本実験動物学会の動物取り扱い規約に準拠して行った。

1.2.2 血糖値および尿糖値モニタリング

尿糖値は、尿試験紙（和光純薬工業株式会社、大阪）を用いて、10 か月齢以降の毎月 1 回、測定時に強制排尿させた新鮮尿について測定した。血糖値は、血糖測定器（グルテスト Pro R、株式会社三和化学研究所、愛知）を用いて、

尿糖値が陽性反応を示した際の尾静脈からの新鮮血および解剖時の新鮮血について測定した。血糖値および尿糖値の測定は午後の一定時刻（13:00～16:00）に実施した。

1.2.3 齶蝕および歯槽骨吸収スコアリング：軟X線検査

観察期間の終了後、塩酸ケタミン（40 mg/kg; ケタラール, 三共, 東京）およびキシラジン（2.0 mg/kg; セラクタール, 日本バイエル社, 東京）の筋注による深麻酔下にて放血安楽死させ上下顎を摘出した。摘出した顎組織は10%中性緩衝ホルマリン（pH 7.4）にて24時間固定後、双眼実体顕微鏡を用いて全臼歯の咬合面、頬舌面、近心面を観察した。肉眼観察後、全顎組織の近遠心面の軟X線写真（35 kV, 2 mA, 4分）を撮影した。撮影した軟X線写真を用いて、下記の基準にて齶蝕および歯槽骨吸収（ABR）をスコア化した。

齶蝕スコア（各臼歯における）：0, 放射線透過性変化なし; 1, 放射線透過領域が歯冠咬合面上の一部のみ; 2, 放射線透過領域が歯冠咬合面上と近遠心面上のいずれかに及ぶ; 3, 放射線透過領域が歯冠表面全体に及ぶ; 4, 放射線透過領域が歯根部表面全体に及ぶ。

ABRスコア（各臼歯歯根周囲の歯槽骨における放射線透過領域の面積）：0, 放射線透過性変化なし; 1, 0.01～0.20 mm²; 2, 0.21～0.40 mm²; 3, 0.41～0.60 mm²; 4, 0.61 mm²を超える。

1.2.4 病理組織学的検査

雄 WBN/Kob ラット全例 (10 例), 雌 WBN/Kob ラット 5 例, F344 ラット雌雄各 5 例の右側上下顎を検査対象とし, 軟 X 線検査後, 各顎組織を 5% EDTA・4Na 溶液で 2 週間 (4°C) 脱灰処理した. 脱灰処理後, 各顎組織を全臼歯が観察できる近遠心面にて切り出しを行い, 常法に従ってパラフィンブロックを作製し, HE 染色を施し, 光学顕微鏡を用いて病理組織学的検査を実施した.

1.2.5 統計解析

齧蝕スコアおよび ABR スコアについては, 各平均スコアを Wilcoxon 順位和検定により雄 WBN/Kob ラットと雌 WBN/Kob ラットの比較, ならびに WBN/Kob ラットと F344 ラットの雌雄で比較を行った. 病理組織学的検査については, カイ 2 乗検定により各群の所見発生率の比較を行った. いずれも有意水準を 5% ($p < 0.05$) とした. 齧蝕スコアおよび ABR スコアの関係について Pearson の相関分析を行った.

1.3 結果

1.3.1 血糖値および尿糖値

DM 発症雄 WBN/Kob ラット全例において, 軽度から重度の高血糖 ($> 200 \text{ mg/dL}$) および高尿糖 ($> 250 \text{ mg/dL}$) が 5.7~10.3 か月持続した. DM 未発症の雌 WBN/Kob ラット, 並びに F344 ラットはいずれも正常値を示した (血糖値, $< 150 \text{ mg/dL}$; 尿糖値, $< 100 \text{ mg/dL}$).

1.3.2 齶蝕スコア

齶蝕は臼歯における放射線透過性病変として検出され、WBN/Kob ラットの
下顎では、歯根部まで病変が達する進行した齶蝕（グレード4）が雌雄ともに
散見された（Table 1- 1, Figure 1- 1）。雄 WBN/Kob ラットにおける下顎平均齶
蝕スコア（1.65）は雌 WBN/Kob ラット（0.80）よりも約2倍高かった（Figure
1- 2A）。雌 WBN/Kob ラットの上顎においては、グレード3の齶蝕臼歯が60本
中2本（3.3%、Table 1- 1）検出されたのみで、平均スコア（0.10）はかなり低
かった（Figure 1- 2）。対照的に、雄 WBN/Kob ラットの上顎では、雌 WBN/Kob
ラットよりも齶蝕がより重症かつ高率に検出され、グレード4の齶蝕臼歯は雌
WBN/Kob ラットの上顎では検出されなかったのに対して、雄 WBN/Kob ラット
の上顎では検出された（Table 1- 1, Figure 1- 1）。雄 WBN/Kob ラットの上顎平均
齶蝕スコア（1.80）は、雌 WBN/Kob ラット（0.10）よりも10倍以上高かった
（Figure 1- 2B）。F344 ラットにおいては、雌雄あるいは上下関係なくすべての
平均齶蝕スコアは0.10未満と低かった（Figure 1- 2）。

1.3.3 歯槽骨吸収スコア

ABRは臼歯根尖部周囲の歯槽骨において放射線透過性亢進像として検出され
た（Figure 1- 1）。雄 WBN/Kob ラットにおける下顎平均 ABR スコア（0.85）
は、雌 WBN/Kob ラットの下顎平均スコア（0.62）の約1.4倍高かった（Figure
1- 3A）。雌 WBN/Kob ラットの上顎においては、グレード1および2の病変が
それぞれ60本中1本（1.7%）検出されたのみであった（Table 1- 2）。対照的
に、雄 WBN/Kob ラットの上顎では、下顎の平均スコアと同等（0.85）であ
り、雌 WBN/Kob ラットよりも ABR がより重症かつ高率に検出され、雌

WBN/Kob ラットの顎平均スコア (0.05) よりも 10 倍以上高かった (Figure 1-3). F344 ラットにおいては, グレード 4 の病変が 1 例の顎 1 本に検出されたが, 残りはグレード 1 の病変が雌雄各 1 本のみであった (Table 1-2).

WBN/Kob ラットにおいて, ABR スコアと齶蝕スコアに高い相関関係 (雄下顎: $r = 0.56, p < 0.001$; 雄上顎: $r = 0.61, p < 0.001$; 雌下顎: $r = 0.72, p < 0.001$; 雌上顎: $r = 0.94, p < 0.001$) が認められた.

1.3.4 病理組織学的所見

病理組織学的に齶蝕の初期病変は, 歯冠表面における象牙質の部分的な浸食として検出された. 中等度に罹患した臼歯では, 齶蝕は象牙質表面から歯髄に到達し, 細菌塊と好中球浸潤を伴う歯髄炎および歯髄壊死に進行していた. 更に重篤な罹患臼歯では, 齶蝕が歯冠全体または歯根まで拡大していた. また, 中等度から重度の齶蝕は高頻度に根尖性歯周炎を伴っていた (Figure 1-4 A, B).

軽度の根尖周囲の病変は, 根尖孔領域における少数の好中球集簇を特徴とし, 歯髄炎および歯髄壊死と共に検出された. 中等度の根尖周囲の病変では, 歯根近辺に肉芽組織で被包化された根尖膿瘍の形成がみられた. 更に重篤な病変では, 根尖性歯周炎が周囲の歯槽骨に波及し, 高頻度に ABR を伴っており, 軟 X 線検査における放射性透過性亢進領域に一致して, 炎症性肉芽組織を伴う歯周結合組織の拡大が認められた (Figure 1-4 A-C).

歯肉組織では, 重度の齶蝕に罹患した臼歯に隣接する粘膜上皮において, 粘膜表層への好中球浸潤を伴う上皮の肥厚および下方伸長がみられた. また, 組

織残渣あるいは被毛片で満たされた歯肉ポケットがしばしば確認された。重度の歯肉炎では、これらの炎症は歯根領域に広がり、歯槽突起を巻き込み（辺縁性歯周炎）、根尖性歯周炎と連続していた（Figure 1- 4 A, B）。

齶蝕および歯周病変の発生率を Table 1- 3 に示した。雄 WBN/Kob ラットにおける各病変の発生率は、雌 WBN/Kob および F344 ラットの発生率よりも有意に高かった（Table 1- 3）。非齶蝕歯に隣接する歯周病変の発生率を Table 1- 4 に示した。非齶蝕歯の周囲には表層歯肉炎以外の病変は検出されず、非齶蝕歯に隣接する表層歯肉炎の発生率は各群通して同等であったが（Table 1- 4）、齶蝕歯に隣接する歯肉炎の発生率は雄 WBN/Kob ラットで有意に高かった（Table 1- 3）。

1.4 考察

WBN/Kob ラットは雌雄ともに齲蝕原性飼料の処置なしに齲蝕を発症する齲蝕高感受性の系統で、3.5 ヶ月齢以降の雌雄 WBN/KobSlc ラットでは下顎臼歯の齲蝕が頻繁に観察されるが、DM 発症前では齲蝕の頻度および程度に雌雄差は認められない (Fukuzato et al. 2009). 本章の結果から、高血糖が長期間持続した雄 WBN/Kob ラットでは、下顎における齲蝕の発生頻度および程度が DM 未発症の雌よりも有意に高く、更に、DM 発症前では 1 例も認められなかった上顎の齲蝕が長期間 DM を持続した動物で高頻度に観察されるようになった。従って、ほぼ 1 年間の高血糖期間が本系統に内在する齲蝕感受性を更に高めた可能性が示唆された。

DM 発症前の WBN/Kob ラットの下顎で認められる齲蝕は、歯冠部から発症して歯根部方向に進行し、炎症は歯髄にまで達する (Fukuzato et al. 2009). 今回、DM 発症後の雄 WBN/Kob ラットにおける臼歯歯根部周囲の炎症は、根尖孔から歯髄炎、更に歯冠部の齲蝕と連続していた。また、雄 WBN/Kob ラットに誘発された辺縁性歯周炎および根尖性歯周炎は正常歯周囲には認められず、ほぼ齲蝕歯と隣接する領域で発現していた。以上の結果から、雄 WBN/Kob ラットにおける齲蝕に起因する炎症は、歯髄炎へ移行し、更にこの炎症は根尖孔を通じ根尖性歯周炎および辺縁性歯周炎へ移行した可能性が高いと考えられた。

DM 未発症の雌 WBN/Kob ラットおよび F344 ラットにおいて観察された歯周病変も齲蝕歯と隣接する領域で発現していたことから、一旦齲蝕を発症すると

DM とは関係なく齲蝕に伴う炎症が歯根部からその周囲組織へ拡大していくと考えられた。従って、雄 WBN/Kob ラットでは DM に起因して増強した齲蝕は、齲蝕とほぼ同頻度で齲蝕歯周囲の歯周病変の頻度を増加させ、更に歯周組織の炎症は歯肉表層へ移行し歯肉炎の頻度も増加させていると考えられた。雄 WBN/Kob ラットで DM 性の歯周病変が発現している可能性を完全に否定はできないが、本系統では DM による齲蝕増悪の影響が強く、DM と PD との直接的な因果関係を証明することは困難であった。

本章の結果から、DM と齲蝕には高い相関性があり、高血糖状態は齲蝕感受性 WBN/Kob ラットの齲蝕を増悪させることが示唆された。また、齲蝕による炎症は、時間の経過と共に歯髄炎から根尖性歯周炎および辺縁性歯周炎へ移行する可能性も示唆された。雄 WBN/Kob ラットでは、高血糖状態が本系統に内在する齲蝕感受性を亢進させ、歯周病変も増悪することが明らかになった。

1.5 小括

齲蝕感受性 WBN/Kob ラットを用いて DM 発症ラットと DM 未発症ラットの齲蝕と歯周病変の発生を比較したところ、DM 発症ラットにおいて齲蝕スコアが高かった。また、DM 発症ラットでは齲蝕スコアと共に ABR スコアおよび歯周病変の発生頻度も高かった。以上の結果から、高血糖状態は齲蝕感受性 WBN/Kob ラットにおいて齲蝕を増悪させ、歯周病変も増悪することが明らかになった。

Table 1- 1 Incidence and grading of caries in molars of WBN/Kob and F344 rats

	Strain	Sex	Caries score				
			0	1	2	3	4
Mandible	WBN/Kob	Male	17 (28.3%)	9 (15.0%)	14 (23.3%)	18 (30.0%)	2 (3.3%)
		Female	39 (65.0%)	3 (5.0%)	11 (18.3%)	5 (8.3%)	2 (3.3%)
	F344	Male	57 (95.0%)	2 (3.3%)	0	1 (1.7%)	0
		Female	59 (98.3%)	1 (1.7%)	0	0	0
Maxilla	WBN/Kob	Male	17 (28.3%)	5 (8.3%)	15 (25.0%)	19 (31.7%)	4 (6.7%)
		Female	58 (96.7%)	0	0	2 (3.3%)	0
	F344	Male	58 (96.7%)	2 (3.3%)	0	0	0
		Female	58 (96.7%)	2 (3.3%)	0	0	0

All groups contained 10 rats and 60 molars.

Table 1- 2 Incidence and grading of ABR in surrounding molars of WBN/Kob and F344 rats

	Strain	Sex	Alveolar bone resorption score				
			0	1	2	3	4
Mandible	WBN/Kob	Male	27 (45.0%)	21 (15.0%)	8 (13.3%)	2 (3.3%)	2 (3.3%)
		Female	42 (70.0%)	9 (5.0%)	2 (3.3%)	4 (6.7%)	3 (5.0%)
	F344	Male	58 (96.7%)	1 (3.3%)	0	0	1 (1.7%)
		Female	60 (100%)	0	0	0	0
Maxilla	WBN/Kob	Male	24 (40.0%)	27 (8.3%)	5 (8.3%)	2 (31.7%)	2 (3.3%)
		Female	58 (96.7%)	1 (1.7%)	1 (1.7%)	0	0
	F344	Male	60 (100%)	0	0	0	0
		Female	59 (98.3%)	1 (1.7%)	0	0	0

All groups contained 10 rats and 60 molars.

Table 1- 3 Incidence of histopathologic lesions surrounding carious molars of WBN/Kob and F344 rats

Strain	WBN/Kob rats		F344 rats		
	Sex	Male	Female	Male	Female
Caries		47 (78.3%) ^{a,b}	7 (23.3%)	3 (10.0%)	0
Pulpitis		39 (65.0%) ^{a,b}	6 (20.0%)	1 (3.3%)	0
Apical periodontitis		32 (53.3%) ^{a,b}	5 (16.7%)	1 (3.3%)	0
Marginal periodontitis		37 (61.7%) ^{a,b}	7 (23.3%)	1 (3.3%)	1 (3.3%)
Gingivitis		54 (90.0%) ^{a,b}	14 (46.7%)	9 (30.0%)	9 (30.0%)

10 male WBN/Kob rats (60 molars) were evaluated; all other groups comprised 5 rats (30 molars).

a: Significant ($p < 0.001$) difference between male and female WBN/Kob rats.

b: Significant ($p < 0.001$) difference between male WBN/Kob and F344 rats.

Table 1- 4 Incidence of histopathologic lesions surrounding noncarious molars of WBN/Kob and F344 rats

Strain	WBN/Kob rats		F344 rats		
	Sex	Male	Female	Male	Female
Pulpitis		0/13	0/23	0/27	0/30
Apical periodontitis		0/13	0/23	0/27	0/30
Marginal periodontitis		0/13	1/23 (4.3%)	1/27 (3.7%)	1/30 (3.3%)
Gingivitis		7/13 (53.8%)	8/23 (34.8%)	7/27 (25.9%)	9/30 (30.0%)

10 male WBN/Kob rats (60 molars) were evaluated; all other groups comprised 5 rats (30 molars).

Incidence of histopathologic lesions did not differ between any groups.

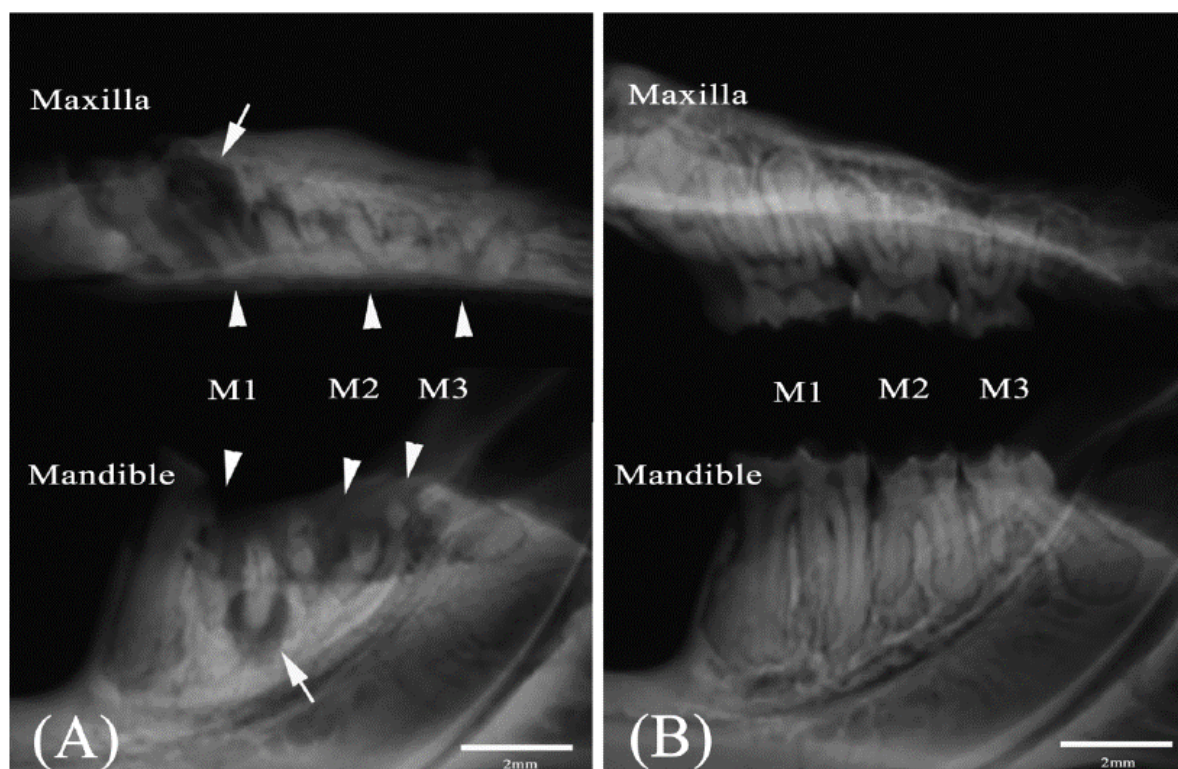


Figure 1- 1 Soft X-ray images of caries and ABR of male WBN/Kob rats

(A) : DM 発症雄 WBN/Kob ラットの 上顎および下顎. 歯冠が完全消失した重度の齲蝕 (矢頭) が認められる. 重度の齲蝕を伴う臼歯の歯根周囲に高グレードの透過性充進領域 (矢印) が認められる. (B) : 雄 F344 ラット (DM 未発症) の正常な上顎および下顎.

M1, 第一臼歯; M2, 第二臼歯; M3, 第三臼歯.

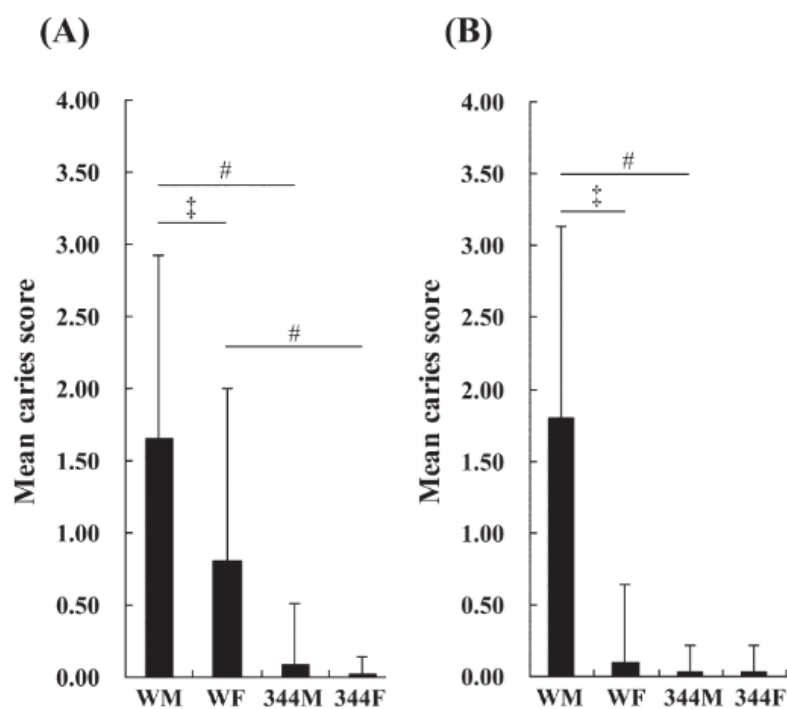


Figure 1- 2 Mean caries scores of WBN/Kob and F344 rats

(A) : 下顎臼歯における平均齲蝕スコア. (B) : 上顎臼歯における平均齲蝕スコア. WM : 雄 WBN/Kob ラット, WF : 雌 WBN/Kob ラット, 344M : 雄 F344 ラット, 344F : 雌 F344 ラット. 雄 WBN/Kob ラットと雌 WBN/Kob ラット間 (‡, $p < 0.001$)および WBN/Kob ラットと F344 ラット間 (#, $p < 0.001$)で有意差あり.

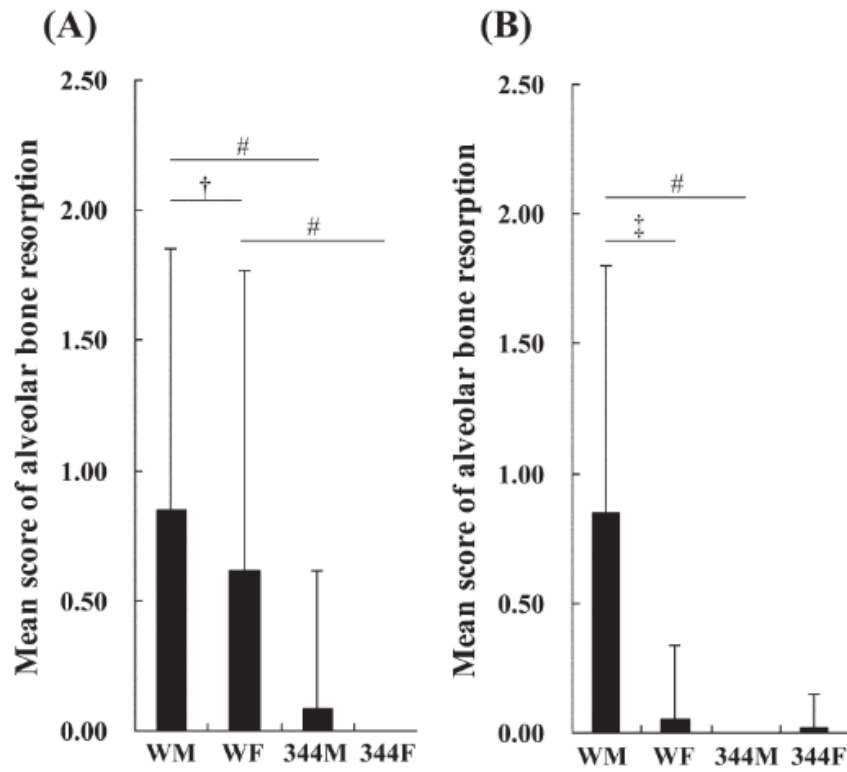


Figure 1- 3 Mean scores for ABR of WBN/Kob and F344 rats

(A) : 下顎臼歯における平均歯槽骨吸収スコア. (B) : 上顎臼歯における平均歯槽骨吸収スコア.
 WM : 雄 WBN/Kob ラット, WF : 雌 WBN/Kob ラット, 344M : 雄 F344 ラット, 344F : 雌 F344
 ラット. 雄 WBN/Kob ラットと雌 WBN/Kob ラット間 (†, $p < 0.05$; ‡, $p < 0.001$)および WBN/Kob
 ラットと F344 ラット間 (#, $p < 0.001$)で有意差あり.

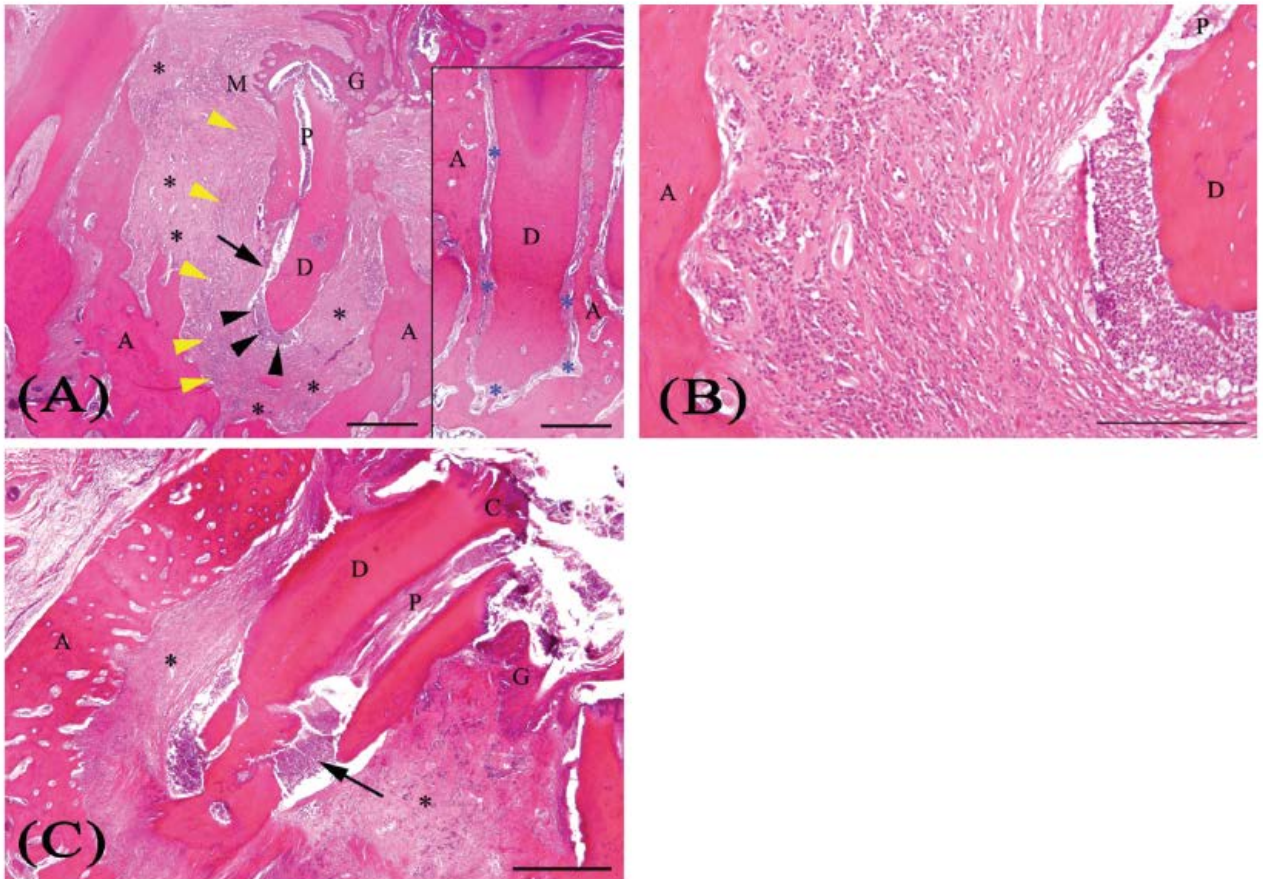


Figure 1- 4 Histopathological features of caries and ABR of male WBN/Kob rats

(A) : Figure 1- 1A (雄 WBN/Kob ラットの軟 X 線写真) の下顎第一臼歯に対応する HE 染色標本組織像. 炎症細胞 (黄色矢頭) を伴う肉芽組織 (*) と歯肉から下方伸長した上皮索が臼歯歯根に沿って認められる (M). 根尖部の微小膿瘍 (黒矢頭) および根尖孔 (矢印) を通じて歯髄から連続する好中球の集簇もみられる. 挿入図は正常な臼歯 (歯根部) とその歯周組織 (*) を示す.

(B) : Figure 1- 4A における根尖領域の拡大像. (C) : 齲蝕および歯髄炎に隣接する根尖部の膿瘍形成 (矢印). 歯根と歯槽骨間の拡大領域における炎症性肉芽組織および線維性結合組織 (*).

A, 歯槽骨; C, 齲蝕; D, 象牙質; G, 歯肉; P, 歯髄. Bar はいずれも 500 μ m.

2 糖尿病モデル動物における齲蝕および歯周病変の発生Ⅱ
：薬物誘発糖尿病モデル（Alloxan 投与ラット）

2.1 序論

第一章において、齧蝕感受性 DM 自然発症ラット用いて DM 発症ラットにおける齧蝕の増悪が確認され、高血糖状態が齧蝕の増悪に関与する可能性が示唆された。

Alloxan (AL) は活性酸素生成を介して膵臓膵島の β 細胞を選択的に傷害する作用を有する。その結果として、多くの動物種において低インスリン血症性の DM を発症させる。通常、ラットは AL の静脈内投与後 24 時間以降に持続的な高血糖を示し、投与初期から病理組織学的には膵島 β 細胞に核クロマチンの濃縮、細胞質の空胞化が見られ、やがて細胞は壊死、消失に至る (Grankvist et al. 1981, Heikkila et al. 1978, Jörns et al. 1999)。

そこで第二章では、薬物誘発の DM 状態においても齧蝕が発生あるいは増悪するかどうかを確認するため、薬物の一般毒性試験等に汎用され齧蝕感受性が低い F344 ラット (Fukuzato et al. 2009; Kodama et al. 2011) を使用して、AL の単回投与により DM を発症させたラットにおける齧蝕の発生状況を調査した。加えて、齧蝕と共に歯周病変についても発生状態を検討した。

2.2 材料および方法

2.2.1 動物および飼育条件

6 週齢の雌 F344 ラット (日本エスエルシー株式会社, 浜松) を購入し実験に供した。動物は SPF 環境下で、室温 20~26°C, 湿度 40~70%, 12 時間の明暗サイクル (7:00~19:00 までの明期, 19:00~7:00 までの暗期) で制御された動物室において、ステンレス床網付きアルミニウム製ケージで飼育し、標準実験

動物飼料（CRF-1，オリエンタル酵母工業，東京）および飲水を自由に摂取させた．実験に用いた動物の取り扱いは，摂南大学薬学部動物委員会規約および公益社団法人日本実験動物学会の動物取り扱い規約に準拠して行った．

2.2.2 糖尿病誘発薬物（Alloxan）の調整

ALの投与量は，動物が長期間生存しDMを持続すると予測される投与量として35 mg/kgに設定し，投与容量が体重1 kgにつき1 mlになるようにアロキサンー水和物（シグマアルドリッチジャパン株式会社，東京）を生理食塩水（大塚製薬株式会社，東京）に溶解した．いずれも用時に調製した．

2.2.3 実験デザイン

無処置群（17例）およびAL投与群（30例）の2群構成で実験を行った．AL投与群には7週齢時にALを尾静脈内から単回投与した．AL投与後13週にAL投与群16例（DM未発症9例，DM発症7例）および無処置群10例を剖検した．また，齧蝕および歯周病変の進行比較のために，AL投与後26週にAL投与群10例（全例DM発症）および無処置群7例を安楽死剖検した．なお，AL投与群の4例が重度の糖尿病によるケトアシドーシスおよび尿路感染が原因の状態悪化のために途中安楽死剖検され検査より除外された．

2.2.4 血糖値および尿糖値モニタリング

尿糖値は，尿試験紙（和光純薬工業株式会社，大阪）を用いて測定時に強制排尿させた新鮮尿について測定した．測定頻度はAL投与後1～3日までの連日，投与後1～3週までの週1回，投与後4週以降は毎月1回測定した．血糖値は，血糖測定器（グルテストE，株式会社三和化学研究所，愛知）を用い

て、AL 投与後 4 週以降の毎月 1 回、尾静脈からの新鮮血および解剖時の新鮮血について測定した。尿糖値および血糖値の測定は午後の一定時刻（13:00～16:00）に実施した。

2.2.5 齲蝕および歯槽骨吸収スコアリング：軟 X 線検査

観察期間の終了後、塩酸ケタミン（40 mg/kg; ケタラール，三共，東京）およびキシラジン（2.0 mg/kg; セラクタール，日本バイエル社，東京）の筋注による深麻酔下にて放血安楽死させ全例の上下顎を摘出した。摘出した顎組織は 10% 中性緩衝ホルマリン（pH 7.4）にて 24 時間固定後，双眼実体顕微鏡を用いて全臼歯の咬合面，頬舌面，近心面を観察した。肉眼観察後，全顎組織の近遠心面の軟 X 線写真（35 kV，2 mA，4 分）を撮影した。撮影した軟 X 線写真を用いて，1.2.3 項記載のスコア基準にて齲蝕および歯槽骨吸収をスコア化した。

2.2.6 病理組織学的所見

全例の上下顎を検査対象とし，軟 X 線検査後，各顎組織を 5% EDTA・4Na 溶液で 2 週間（4°C）脱灰処理した。脱灰処理後，各顎組織を全臼歯が観察できる近遠心面にて切り出しを行い，常法に従ってパラフィンブロックを作製し，HE 染色を施し，光学顕微鏡を用いて病理組織学的検査を実施し，齲蝕および歯周病変について以下の判定基準にてグレード判定した。

齲蝕：-，変化なし；+，象牙質齲蝕が歯冠咬合面に限局；++，象牙質齲蝕が歯髄に及ぶ；+++，齲蝕により歯冠象牙質が崩壊。

歯肉炎：-, 変化なし; +, 軽微ないし軽度の粘膜上皮過形成を伴う粘膜上皮へのわずかな炎症細胞浸潤; ++, 軽度ないし中等度の粘膜上皮過形成を伴う歯肉組織全体に及ぶ炎症細胞浸潤.

辺縁性歯周炎：-, 変化なし; +, 歯頸部に限局した炎症細胞浸潤および歯槽骨頂の骨吸収; ++, 歯根領域にわたる炎症細胞浸潤および歯槽骨吸収.

根尖性歯周炎：-, 変化なし; +, 歯根根尖部に限局した炎症細胞浸潤および歯槽骨吸収; ++, 歯根周囲の広範囲な炎症細胞浸潤および歯槽骨吸収.

2.2.7 統計解析

齶蝕スコアおよび ABR スコアについては, Wilcoxon 順位和検定により各群の平均スコアの比較を行った. 病理組織学的検査については, カイ 2 乗検定により各群の所見発生率の比較を行った. いずれも有意水準を 5% ($p < 0.05$) とした. 齶蝕スコアおよび ABR スコアの関係について Pearson の相関分析を行った.

2.3 結果

2.3.1 血糖値および尿糖値

AL 投与群の DM 発症ラット全例 (17 例) では, 高血糖 ($> 400 \text{ mg/dL}$) および高尿糖 ($> 500 \text{ mg/dL}$) が AL 投与後からモニタリング期間中持続した. AL 投与群の DM 未発症ラット (9 例) では, AL 投与後一時的に血糖および尿糖共に高値を示したが, その後モニタリング期間中はほぼ正常値 (血糖値, $<$

130 mg/dL; 尿糖値, < 100 mg/dL) を示した. 無処置群はいずれの個体も正常値の範囲内であった.

2.3.2 齶蝕スコア

AL 投与 DM 発症ラットにおける齶蝕臼歯の典型的な肉眼的特徴を Figure 2- 1 に示した. 肉眼的には, 齶蝕は主に咬合裂溝で検出され, 初期病変として茶色の孔あるいは部分的な歯冠の欠失として確認された (Figure 2- 1B, C). また, 病変は水平方向に拡大し, 最終的には齶蝕臼歯の歯冠は完全に消失していた (Figure 2- 1C). 一方で, 無処置群および AL 投与群の DM 未発症ラットでは臼歯に肉眼的変化は認められなかった (Figure 2- 1C).

軟 X 線検査における各スコアリングに基づく下顎および上顎臼歯の齶蝕歯の発生率を Table 2- 1 に示した. DM 発症ラット全例で AL 投与後 13 および 26 週間後に齶蝕が上顎および下顎臼歯の放射線透過性病変として検出された

(Figure 2- 2B). 病変は徐々に進行し, AL 投与後 26 週間ではほとんどの下顎臼歯 (91.7%) および上顎臼歯の半数以上 (66.7%) が齶蝕に罹患していた

(Table 2- 1). AL 投与後 26 週間の平均齶蝕スコア (上顎 1.05; 下顎 2.13) は, AL 投与後 13 週間の平均齶蝕スコア (上顎 0.69; 下顎 1.19) よりも有意に高かった (Figure 2- 3). AL 投与後 13 週間および 26 週間共に, 下顎臼歯の齶蝕平均スコアは上顎臼歯の平均齶蝕スコアよりも有意に高かった (Figure 2- 3).

一方で, 無処置群および AL 投与 DM 未発症ラットの臼歯には齶蝕病変は観察されなかった (Table 2- 1, Figure 2- 3).

2.3.3 歯槽骨吸収スコア

軟 X 線検査における各スコアリングに基づく下顎および上顎の ABR を伴う臼歯の発生率を Table 2- 2 に示した。ABR 発生率も齶蝕と同様に、AL 投与 DM 発症ラットで著しく高く、AL 投与後 26 週間では下顎臼歯の約半数 (46.7%) および上顎臼歯の約 4 分の 1 (23.3%) に認められた。ABR は投与後経時的に悪化する傾向にあったが、下顎および上顎共に AL 投与後 13 週間と 26 週間の間に有意差はなかった。下顎の ABR は上顎よりも重篤な傾向があり、投与後 26 週間の下顎の平均 ABR スコア (0.83) は上顎のスコア (0.38) よりも有意に高かった (Figure 2- 4)。一方、無処置および AL 投与 DM 未発症ラットでは、臼歯周囲の歯槽骨に透過性領域は認められなかった (Table 2- 2, Figure 2- 2A)。

DM 発症ラットにおいて、齶蝕臼歯に隣接する領域で ABR が頻繁に観察されたが、非齶蝕臼歯を取り囲む歯槽骨には放射線透過性の変化は認められなかった (Figure 2- 2B)。また、ABR スコアと齶蝕スコアの間には高い正の相関があった (下顎: $r = 0.72, p < 0.01$; 上顎: $r = 0.64, p < 0.01$)。

2.3.4 病理組織学的所見

軽度の齶蝕は、歯冠表面の象牙質における部分的な侵食として検出された (Figure 2- 5B)。中等度の病変では、齶蝕は象牙質表面から歯髄に到達し、細菌コロニー形成と好中球浸潤を伴う歯髄炎あるいは歯髄壊死に進展していた (Figure 2- 5C)。より重篤な病変では、象牙質齶蝕は歯冠全体あるいは歯根まで拡大していた (Figure 2- 5D)。

歯肉組織では、齶蝕臼歯に隣接する粘膜上皮において、好中球浸潤と被毛の嵌入を伴う上皮肥厚および下方伸長が認められた (Figure 2- 6B, C). 重度の病変では、歯肉の炎症が歯槽骨頂を巻き込み、辺縁性歯周炎に発展していた (Figure 2- 6D). 一方で、正常な臼歯に隣接する歯肉組織には異常は認められなかった (Figure 2- 6A). 中等度から重度の齶蝕は通常、中等度から重度の歯肉炎あるいは辺縁性歯周炎、ならびに根尖性歯周炎を伴っていた.

軽度の根尖病変では、少数の好中球が根尖孔領域に集積し、歯髓炎および歯髓壊死と共に認められた (Figure 2- 6F). 重度の病変では、化膿性炎症が周囲の歯槽骨に波及し、軟 X 線検査における透過性領域 (Figure 2- 2B) に対応して、歯周結合組織の領域拡大と ABR を伴っていた (Figure 2- 6G, H).

齶蝕および歯周病変の発生率を Table 2- 3 および Table 2- 4 に示す. DM 発症ラットにおける病変の発生率は、無処置あるいは AL 投与 DM 未発症ラットの病変発生率よりも有意に高かった (Table 2- 3). 非齶蝕歯周囲の歯周病変の発生率を Table 2- 4 に示す. 非齶蝕歯の周囲には、歯肉炎以外の歯周病変は検出されなかった. 非齶蝕歯に隣接する歯肉炎の発生率は各群で同等であったが (Table 2- 4), 齶蝕歯に隣接する歯肉炎の発生率は DM 発症ラットで有意に高かった (Table 2- 3).

2.4 考察

第一章で、齲蝕感受性自然発症 DM モデルである雄 WBN/Kob ラットにおいて、持続的な高血糖状態が本来の齲蝕感受性を増悪することが確認された。今回、齲蝕感受性の低い F344 ラットでは、正常血糖の無処置対照ラットおよび AL 投与非 DM ラットで齲蝕は検出されなかった。これに対して、AL 誘発 DM ラットでは明確な齲蝕の発生が確認され、DM 期間の長期化で齲蝕が経時的に増悪することが明らかになった。従って、第一章および今回の結果から自然発症あるいは薬物誘発の如何に関わらず、高血糖状態が齲蝕を誘発および増悪させることが強く示唆された。また、AL 投与非 DM ラットに齲蝕の発生はなかったことから、AL 自体が齲蝕の発生に及ぼす影響はないものと考えられた。

AL 投与後 13 週目に全ての DM ラットで進行した齲蝕が高頻度に誘発されており、一部の動物では歯冠が完全に消失した重度の齲蝕が認められた。従って、AL 投与後 13 週間より前に齲蝕が発症している可能性が考えられた。更に、AL 投与 26 週間目には、ほぼ全ての下顎臼歯が齲蝕を呈していた。自然発症 DM モデルである *db/db* マウスでは、齲蝕の発生に 20 週間以上が必要であり、雌雄ともに 50 週齢でも齲蝕の発生率は 40%未満であった (Sano et al. 2011) ことから、自然発症 DM モデルと比較して、AL 誘発 DM モデルにおける齲蝕の発生はより均一且つ進行性であると考えられた。

DM モデルにおける齲蝕の正確な病因は明確になっていない。しかしながら、臨床では齲蝕の罹患率の増加は DM 患者の唾液流量の減少に起因している

と考えられている (Moore et al. 2001). 唾液流量の減少は, 創傷治癒の減少およびプラーク形成に重要な役割を果たし (McNamara et al. 1982; Nagy et al. 2001), 唾液分泌物成分の変化はラットとヒトの口腔内細菌叢のプロファイルに影響を与える可能性が示唆されている (Belazi et al. 1998; Mahay et al. 2004; Mata et al. 2004). 一方, DM 動物では通常, 非 DM 動物よりも摂餌量が多いことが知られている (Lee and Bressler 1981, Tesseromatis et al. 2009). 従って, これらの要因が DM 動物における齲蝕の発生および齲蝕関連歯周炎の重症度に関連している可能性が考えられた.

今回, AL 誘発 DM ラットでは軟 X 線検査で ABR スコアと齲蝕スコアの高に高い正の相関が見られ, 病理組織学的に臼歯根先部周辺の炎症が歯髄炎や歯髄壊死を伴っていた. また, 歯周組織の炎症は根尖孔を通して歯髄と連続していた. 更に, 歯周炎は正常臼歯周囲の歯周組織にはみられなかったのに対して, 齲蝕臼歯に隣接する組織には高頻度で観察された. これらの特徴は, 第 1 章で報告した WBN/Kob ラットや *db/db* マウス (Sano et al. 2011; Kodama et al. 2011) などの自然発症 DM モデルの特徴と酷似していた. 従って, 齲蝕由来の炎症性変化は根尖孔を通じて, 齲蝕に伴う根尖性歯周炎が歯周組織に伝播している可能性があると考えられた. 更に, 進行した歯肉炎や歯周炎は DM 動物における異物 (被毛や食渣) の嵌入, 細菌の蓄積, 歯肉および歯周組織の物理的刺激など複数の刺激が原因となっている可能性も考えられた.

本章の結果から, 齲蝕感受性が低い F344 ラットにおいても AL で誘発した DM と齲蝕の高い相関性があり, 持続的な高血糖状態で齲蝕の発生および増悪

が確認された。また、齶蝕による炎症は時間と共に歯髄から齶歯周囲組織および周辺歯肉へ移行する可能性が示唆された。

2.5 小括

薬物誘発 DM ラットにおいても自然発症 DM ラットと同様，高血糖状態と齲蝕および歯周病変の強い相関性が確認されると共に，高血糖状態が長期化すると齲蝕および歯周病変が増悪することが確認された．すなわち，高血糖状態が齲蝕発生の原因となる可能性が示唆された．

Table 2- 1 Incidence and grading of caries in molars of non-DM and DM F344 rats

Groups		Intact		Alloxan		
		Nondiabetic (13W) (n=10)	Nondiabetic (26W) (n=7)	Nondiabetic (13W) (n=9)	Diabetic (13W) (n=7)	Diabetic (26W) (n=10)
No. of animals affected with caries		0	0	0	7 (100%)	10 (100%)
Maxillary molars	No. of examined	60	42	54	42	60
	No. of teeth with caries	0	0	0	17 (40.5%)**	40 (66.7%)**†
	Grade 0	60 (100%)	42 (100%)	54 (100%)	25 (59.5%)	20 (33.3%)
	Grade 1	0	0	0	6 (14.3%)	19 (31.7%)
	Grade 2	0	0	0	10 (23.8%)	19 (31.7%)
	Grade 3	0	0	0	1 (2.4%)	2 (3.3%)
	Grade 4	0	0	0	0	0
Mandibular molars	No. of examined	60	42	54	42	60
	No. of teeth with caries	0	0	0	26 (61.9%)**	55 (91.7%)**††
	Grade 0	60 (100%)	42 (100%)	54 (100%)	16 (38.1%)	5 (8.3%)
	Grade 1	0	0	0	8 (19.0%)	3 (5.0%)
	Grade 2	0	0	0	13 (31.0%)	33 (55.0%)
	Grade 3	0	0	0	4 (9.5%)	17 (28.3%)
	Grade 4	0	0	0	1 (2.4%)	2 (3.3%)

Significant difference from age-matched intact group (**: $p < 0.01$).

Significant difference from diabetic 13 weeks group (†: $p < 0.05$, ††: $p < 0.01$).

Table 2- 2 Incidence and grading of ABR in surrounding molars of non-DM and DM F344 rats

Groups		Intact		Alloxan		
		Nondiabetic (13W) (n=10)	Nondiabetic (26W) (n=7)	Nondiabetic (13W) (n=9)	Diabetic (13W) (n=7)	Diabetic (26W) (n=10)
No. of animals affected with caries		0	0	0	7 (100%)	10 (100%)
Maxillary molars	No. of examined	60	42	54	42	60
	No. of teeth with ABR	0	0	0	5 (11.9%)**	14 (23.3%)**
	Grade 0	60 (100%)	42 (100%)	54 (100%)	37 (88.1%)	46 (76.7%)
	Grade 1	0	0	0	2 (4.8%)	7 (11.7%)
	Grade 2	0	0	0	1 (2.4%)	5 (8.3%)
	Grade 3	0	0	0	2 (4.8%)	2 (3.3%)
	Grade 4	0	0	0	0	0
Mandibular molars	No. of examined	60	42	54	42	60
	No. of teeth with ABR	0	0	0	12 (28.6%)**	28 (46.7%)**
	Grade 0	60 (100%)	42 (100%)	54 (100%)	30 (71.4%)	32 (53.3%)
	Grade 1	0	0	0	4 (9.5%)	14 (23.3%)
	Grade 2	0	0	0	5 (11.9%)	8 (13.3%)
	Grade 3	0	0	0	2 (4.8%)	4 (6.7%)
	Grade 4	0	0	0	1 (2.4%)	2 (3.3%)

Significant difference from age-matched intact group (**: $p < 0.01$).

Abbreviation: ABR, alveolar bone resorption.

Table 2- 3 Incidence of histopathologic lesions in non-DM and DM F344 rats

Groups	Intact				Alloxan					
	Nondiabetic		Nondiabetic		Nondiabetic		Diabetic		Diabetic	
	(13W)	(26W)	(13W)	(26W)	(13W)	(13W)	(13W)	(26W)	(26W)	
(n=10)	(n=7)	(n=9)	(n=9)	(n=7)	(n=10)	(n=10)	(n=10)	(n=10)	(n=10)	
Caries	2/120 (1.7%)	2/84 (2.4%)	2/108 (1.9%)	2/108 (1.9%)	48/84 (57.1%)**	98/120 (81.7%)**				
Pulpitis/ pulp necrosis	1/120 (0.8%)	0/84	1/108 (0.9%)	1/108 (0.9%)	19/84 (22.6%)**	66/120 (55.0%)**				
Gingivitis	39/120 (32.5%)	30/84 (35.7%)	35/108 (32.4%)	35/108 (32.4%)	72/84 (85.7%)**	107/120 (89.2%)**				
Apical periodontitis	0/120	0/84	0/108	0/108	11/84 (13.1%)**	37/120 (30.8%)**				
Marginal periodontitis	1/120 (0.8%)	0/84	1/108 (0.9%)	1/108 (0.9%)	15/84 (17.9%)**	47/120 (39.2%)**				

Significant difference from age-matched intact group (**: $p < 0.01$).

Table 2- 4 Incidence of histopathologic lesions surrounding noncarious molars in non-DM and DM F344 rats

Groups	Intact		Alloxan		
	Nondiabetic	Nondiabetic	Nondiabetic	Diabetic	Diabetic
	(13W) (n=10)	(26W) (n=7)	(13W) (n=9)	(13W) (n=7)	(26W) (n=10)
Pulpitis/ pulp necrosis	0/118	0/82	0/106	0/36	0/22
Gingivitis	38/118 (32.2%)	28/82 (34.1%)	33/106 (32.4%)	12/36 (33.3%)	8/22 (36.4%)
Apical periodontitis	0/118	0/82	0/106	0/36	0/22
Marginal periodontitis	0/118	0/82	0/106	0/36	0/22

No significant difference from age-matched intact group.

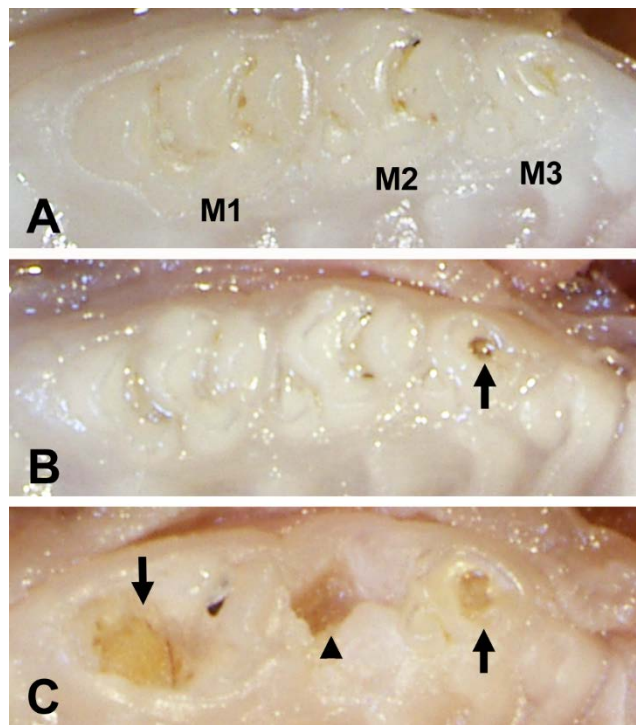


Figure 2- 1 Macroscopic features of molar caries in AL-induced diabetic F344 rats

A : 正常な臼歯. **B** : 齲蝕による第三臼歯の部分的な歯冠の欠失 (矢印). **C** : 齲蝕による第一および第三臼歯の部分的な歯冠の欠失 (矢印) と第二臼歯の完全な歯冠消失 (矢頭).
M1, 第一臼歯; M2, 第二臼歯; M3, 第三臼歯.

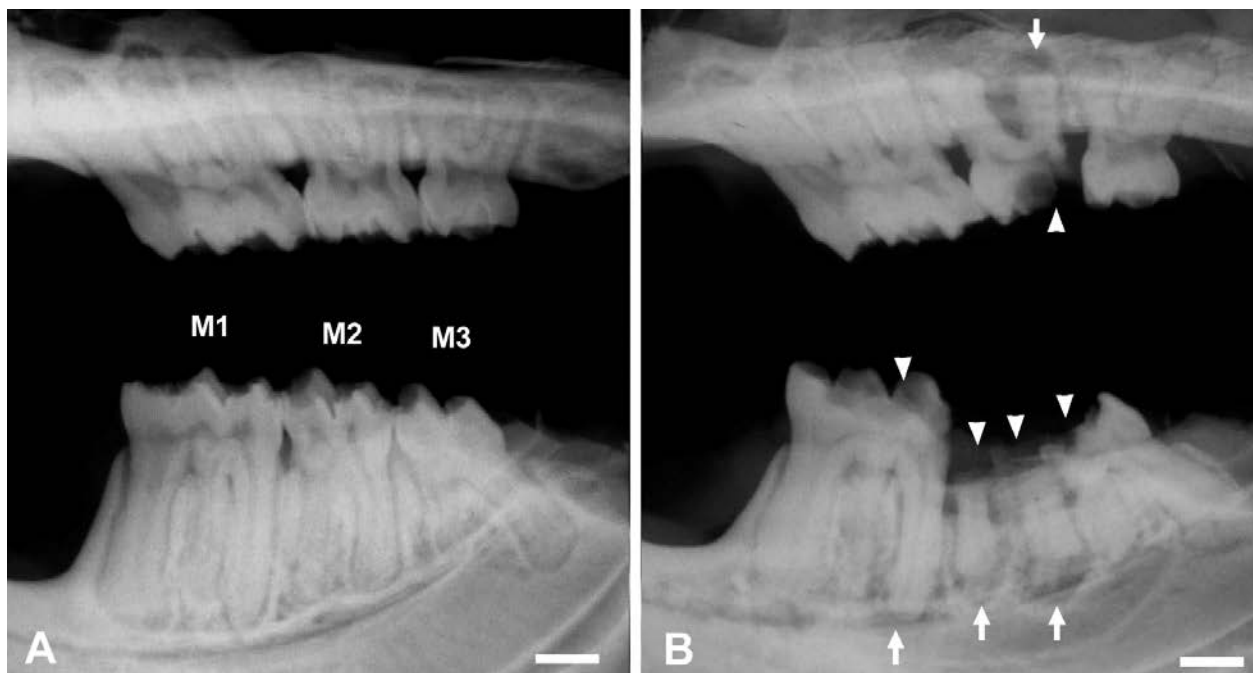


Figure 2- 2 Soft X-ray images of caries and ABR of AL-induced diabetic F344 rats

A : DM 未発症ラット (Alloxan 投与後 26 週) の正常な上顎および下顎. **B** : DM 発症 (Alloxan 投与後 26 週) ラットの上下顎. 肉眼観察の結果に対応して, 歯冠の限局性あるいは広範な透過性充進像 (矢頭) として重度の齲蝕が観察される. 上顎の齲蝕スコアは 0 (M1), 2 (M2), 0 (M3), 下顎の齲蝕スコアは 2 (M1), 4 (M2), 1 (M3). 齲蝕臼歯周囲の歯槽骨において, 歯根根尖部に限局性の透過性充進像 (矢印) が認められる.

M1, 第一臼歯; M2, 第二臼歯; M3, 第三臼歯. Bar はいずれも 2 mm.

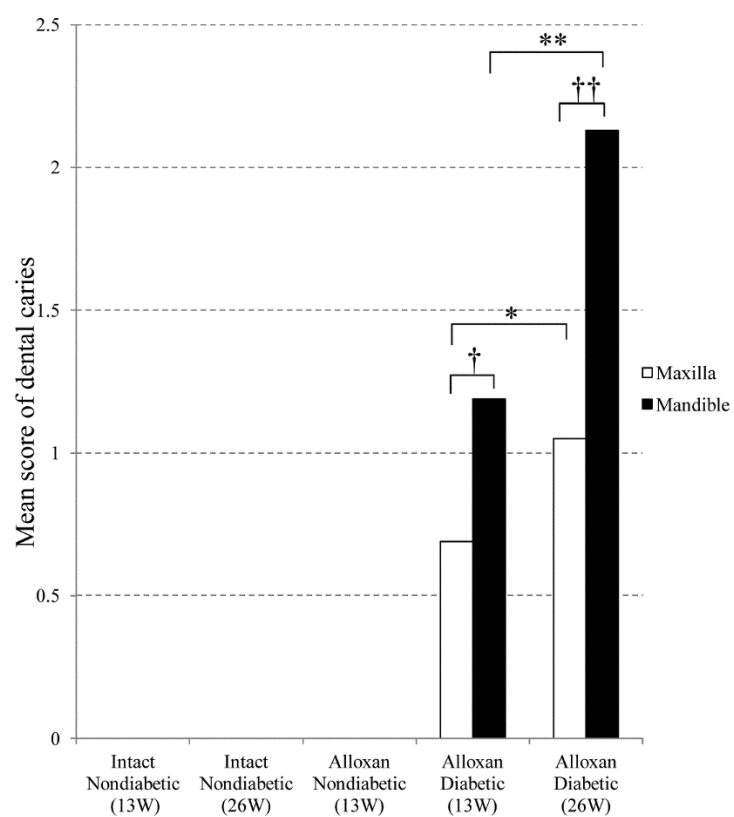


Figure 2- 3 Mean caries scores of AL-induced diabetic F344 rats

DM 発症 13 週ラットと DM 発症 26 週ラット間 (*, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$)および上顎と下顎間 (†, $p < 0.05$; ††, $p < 0.01$)で有意差あり.

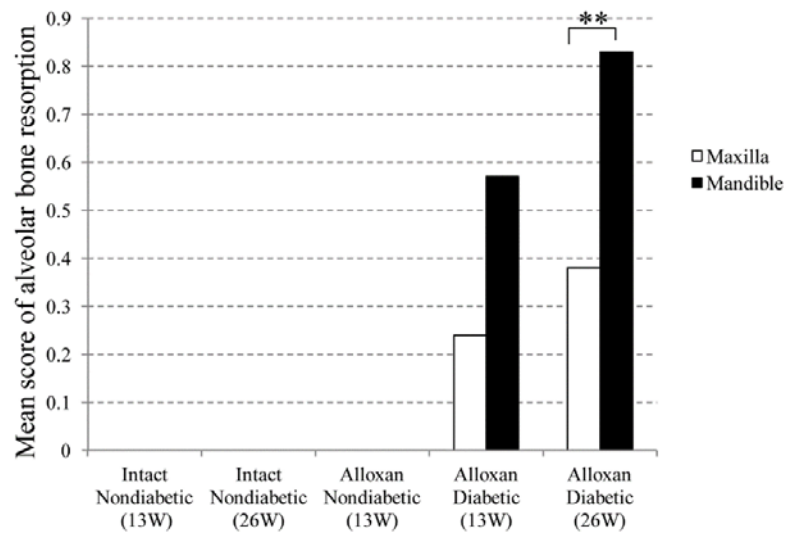


Figure 2- 4 Mean scores for ABR of AL-induced diabetic F344 rats
 DM 発症 26 週ラットの上顎と下顎間 (**, $p < 0.01$)で有意差あり.

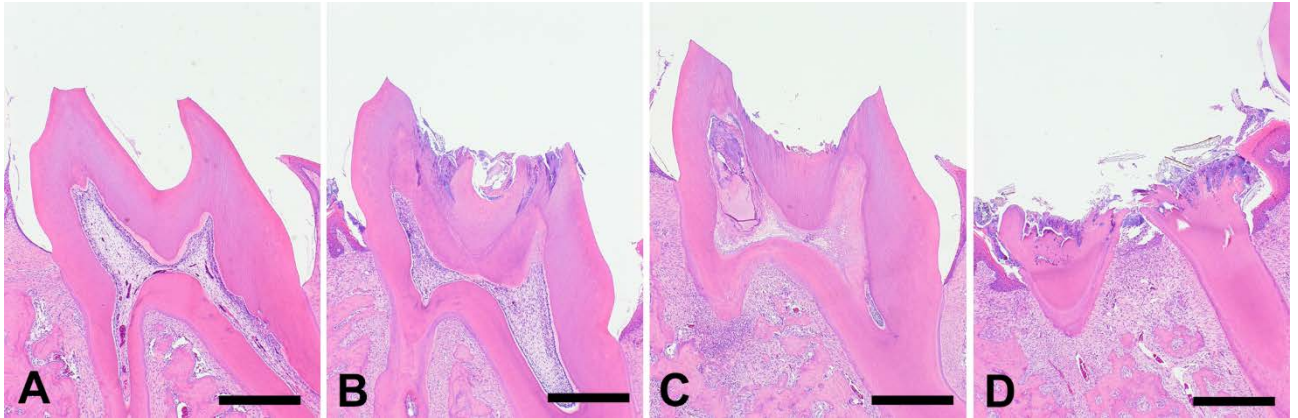


Figure 2- 5 Histopathological features of molar caries of AL-induced diabetic F344 rats

A : 正常な臼歯. **B** : 軽度の齲蝕. 歯冠咬合面に限局した象牙質齲蝕が認められる. **C** : 中等度の齲蝕. 象牙質齲蝕が歯髄におよび歯髄壊死を伴っている. **D** : 重度の齲蝕. 齲蝕により歯冠全体の象牙質が崩壊し歯根部にまで病変が及んでいる. Bar はいずれも 400 μm .

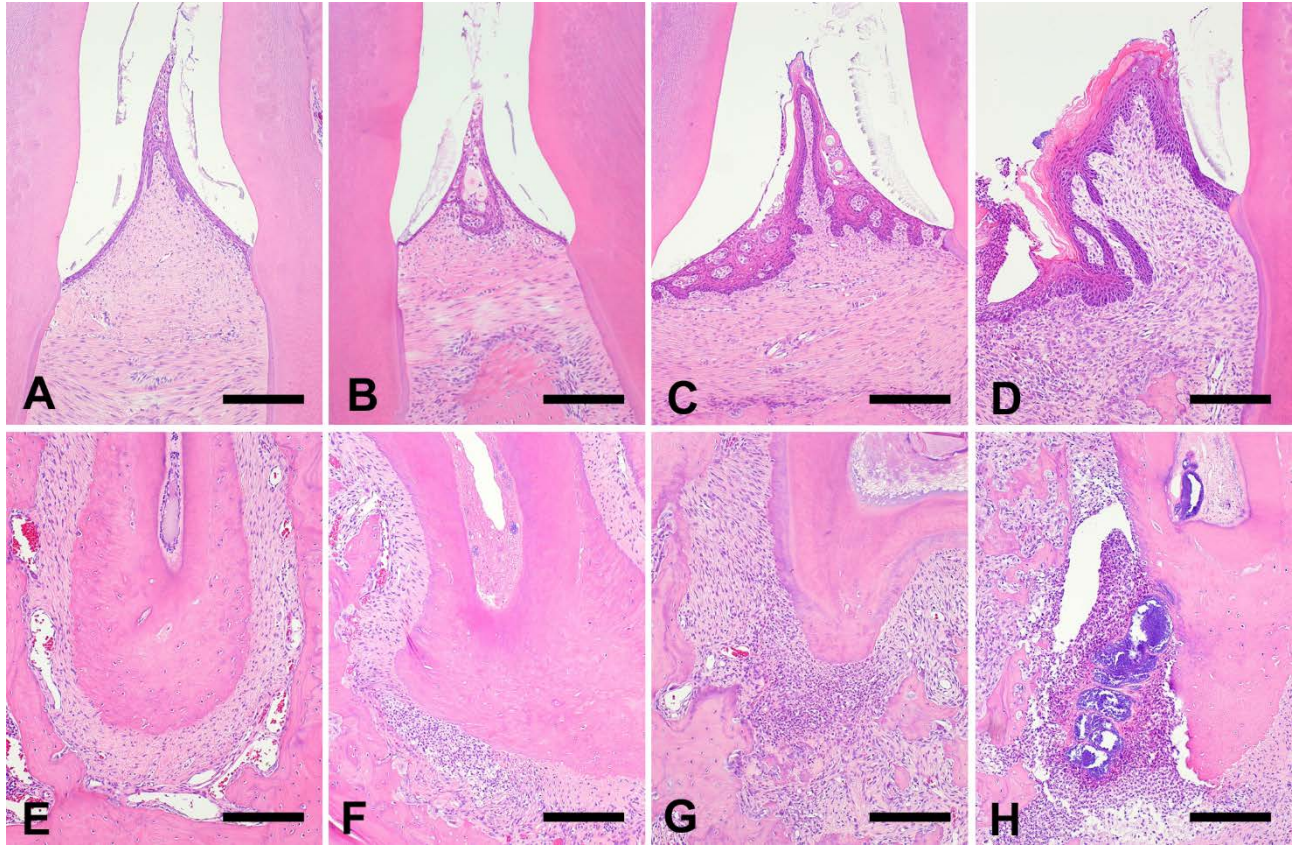


Figure 2- 6 Histopathological features of periodontal lesions of AL-induced diabetic F344 rats

A : 正常な歯肉組織. **B** : 軽度の歯肉炎. 粘膜への被毛の刺入を伴い少数の好中球が粘膜へ浸潤している. **C** : 中等度の歯肉炎. 粘膜への好中球浸潤および被毛の刺入を伴い粘膜上皮の過形成が認められる. **D** : 中等度の歯肉炎および辺縁性歯周炎. 歯肉の炎症が歯根膜におよび歯槽骨頂の骨吸収も認められる. **E** : 正常な歯根周囲組織. **F** : 軽度の根尖性歯周炎. 根尖孔領域における好中球の集簇が認められる. **G** : 中等度の根尖性歯周炎. 根尖部における広範な好中球浸潤と歯槽骨吸収が認められる. **H** : 中等度の根尖性歯周炎と辺縁性歯周炎. 膿瘍形成を伴う根尖部の炎症が歯根周囲の歯槽骨へ拡大し, 辺縁性歯周炎とも連続する. Bar はいずれも 140 μm .

3 血糖コントロールが糖尿病モデル動物における齲蝕および歯周病変の発生に及ぼす影響：Insulin 投与による血糖コントロール

3.1 序論

第一章および第二章において、自然発症および薬物誘発 DM モデル共に DM 発症ラットにおける齲蝕の発生および増悪が確認され、高血糖状態が齲蝕の発生・増悪に関与することが明らかになった。しかし、DM モデルの齲蝕発生に対する血糖コントロールの予防効果を調査した報告はなく、高血糖と齲蝕の直接的な因果関係は不明である。

そこで第三章では、高血糖状態が齲蝕の発生・進行に直接的に関与するのであれば、高血糖状態を抑えることで齲蝕の発生も抑制されることが想定されることから、インスリン投与による血糖のコントロールが齲蝕および歯周病変に及ぼす影響を検討した。

3.2 材料および方法

3.2.1 動物および飼育条件

雄 WBN/Kob ラット（日本エスエルシー株式会社，浜松）を購入し実験に供した。動物は SPF 環境下で、室温 20～26°C，湿度 40～70%，12 時間の明暗サイクル（7:00～19:00 までの明期，19:00～7:00 までの暗期）で制御された動物室において、ステンレス床網付きアルミニウム製ケージで飼育し、標準実験動物飼料（CRF-1，オリエンタル酵母工業，東京）および飲水を自由に摂取させた。実験に用いた動物の取り扱いは、摂南大学薬学部動物委員会規約および公益社団法人日本実験動物学会の動物取り扱い規約に準拠して行った。

3.2.2 糖尿病誘発薬物 (Alloxan) の調整

AL の投与量は、動物が長期間生存し糖尿病を持続すると予測される投与量として 40 mg/kg に設定し、投与容量が体重 1 kg につき 1 ml になるようにアロキサンー水和物 (シグマアルドリッチジャパン株式会社, 東京) を生理食塩水 (大塚製薬株式会社, 東京) に溶解した。いずれも用時に調製した。

3.2.3 実験デザイン

実験デザインを Figure 3- 1 に示した。合計 60 例の雄 WBN/Kob ラットを、無処置 DM 自然発症群 (Intact 群), DM 自然発症後インスリン (INS) を投与した群 (INS 群), AL 投与早期 DM 誘発群 (AL 群), AL 投与早期 DM 誘発後 INS を投与した群 (AL+INS 群) の 4 群 (各群 15 例) に分けて実験を行った。AL の投与は、DM 自然発症前の 15 週齢から 20 週齢の動物に尾静脈内から単回投与した。INS の投与は、3.2.4 項記載の定期的な尿糖値および血糖値モニタリングで高血糖 (> 300 mg/dl) および高尿糖 (> 500 mg/dl) 状態であることを確認後、約 40 日間にわたり最大 2 U/ 24 時間の INS を放出する Sustained Release Insulin Implants (LinShin Canada, Inc., カナダ) を背部皮下に埋植して投与した。INS はラットが再び DM 状態になる度に追加投与した。いずれの動物も 90 週齢時に安楽死剖検を行った。なお、実験期間中に合計 18 例が状態悪化 (重度の DM よるケトアシドーシス, 尿路感染, INS 投与による低血糖, 悪性リンパ腫が原因) のためにそれぞれ途中安楽死剖検し、実験より除外した。

3.2.4 血糖値および尿糖値モニタリング

尿糖値は、尿試験紙 (和光純薬工業株式会社, 大阪) を用いて測定時に強制排尿させた新鮮尿について測定した。血糖値は、血糖測定器 (グルテスト E,

株式会社三和化学研究所，愛知）を用いて尾静脈からの新鮮血および解剖時の新鮮血について測定した．Intact 群および INS 群の尿糖値および血糖値測定は動物が 40 週齢に達してから毎月 1 回測定した．AL 群および AL+INS 群の尿糖値測定は，AL 投与後 1～3 日までの連日，投与後 1～3 週までの週 1 回，投与後 4 週以降は毎月 1 回測定した．AL 群および AL+INS 群の血糖値測定は，AL 投与後 4 週以降の毎月 1 回測定した．尿糖値および血糖値の測定は午後の一定時刻（13:00～16:00）に実施した．

3.2.5 齶蝕および歯槽骨吸収スコアリング：軟 X 線検査

観察期間の終了後，塩酸ケタミン（40 mg/kg; ケタラール，三共，東京）およびキシラジン（2.0 mg/kg; セラクタール，日本バイエル社，東京）の筋注による深麻酔下にて放血安楽死させ全例の上下顎を摘出した．摘出した顎組織は 10% 中性緩衝ホルマリン（pH 7.4）にて 24 時間固定後，双眼実体顕微鏡を用いて全臼歯の咬合面，頬舌面，近心面を観察した．肉眼観察後，全顎組織の近遠心面の軟 X 線写真（35 kV，2 mA，4 分）を撮影した．撮影した軟 X 線写真を用いて，1.2.3 項記載のスコア基準にて齶蝕および歯槽骨吸収をスコア化した．

3.2.6 病理組織学的検査

全例の上下顎を検査対象とし，軟 X 線検査後，各顎組織を 5% EDTA・4Na 溶液で 2 週間（4°C）脱灰処理した．脱灰処理後，各顎組織を全臼歯が観察できる近遠心面にて切り出しを行い，常法に従ってパラフィンブロックを作製し，HE 染色を施し，光学顕微鏡を用いて病理組織学的検査を実施し，齶蝕および歯周病変について 2.2.6 項記載の判定基準にてグレード判定した．

3.2.7 統計解析

齶蝕スコアおよび ABR スコアについては、Wilcoxon 順位和検定により各群の平均スコアの比較を行った。病理組織学的検査については、カイ 2 乗検定により各群の所見発生率の比較を行った。いずれも有意水準を 5% ($p < 0.05$) とした。齶蝕スコアおよび ABR スコアの関係について Pearson の相関分析を行った。

3.3 結果

3.3.1 血糖値および尿糖値

Intact 群では、軽度から重度の高血糖 ($> 200 \text{ mg/dL}$) および高尿糖 ($> 250 \text{ mg/dL}$) が約 40 週持続した。INS 群では、正常血糖 ($< 200 \text{ mg/dL}$) と高血糖の上下変動を繰り返した。すなわち、INS 投与後すぐに 200 mg/dL 以下の正常血糖値を保つが、次の INS 投与まで徐々に血糖値は増加した。また、尿糖値も血糖値と同様の推移を示した。AL 群では、AL 投与後から重度の高血糖および高尿糖が約 75 週持続した。AL+INS 群では、血糖値および尿糖値とも INS 群と同様の推移を示した (Figure 3- 2)。

3.3.2 齶蝕スコア

軟 X 線検査における各スコアリングに基づく下顎および上顎臼歯の齶蝕歯の発生率を Table 3- 1 に示した。齶蝕は歯冠の放射線透過性病変として検出された (Figure 3- 5)。Intact 群では、上顎臼歯の 71.7% および下顎臼歯の 58.3% に齶蝕が認められ、上顎および下顎の平均齶蝕スコアはそれぞれ 2.06 および 1.62 であった。一方、INS 群では、上顎臼歯の 33.3% のみに齶蝕が認められ、上顎の平均齶蝕スコア (1.13) は Intact 群よりも有意に低かった。下顎臼歯の齶蝕

発生率（55.6%）および平均齲蝕スコア（1.26）も、INS 群では Intact 群よりも低い傾向にあったが有意差はなかった。AL 群では、齲蝕発生率および平均齲蝕スコアは Intact 群よりも更に高く、上顎および下顎臼歯の 100%に認められ、上顎および下顎の平均齲蝕スコアはそれぞれ 3.86 および 3.59 であった。対照的に、AL+INS 群では、齲蝕発生率（上顎 41.7%; 下顎 63.3%）および平均齲蝕スコア（上顎 1.08; 下顎 1.77）は AL 群よりも有意に低かった（Table 3-1, Figure 3-3）。

3.3.3 歯槽骨吸収スコア

軟 X 線検査における各スコアリングに基づく下顎および上顎の ABR を伴う臼歯の発生率を Table 3-2 に示した。ABR は Intact 群で頻繁に検出され、上顎および下顎臼歯共にほぼ半数（上顎 50%; 下顎 41.7%）に認められ、上顎と下顎の平均 ABR スコアはそれぞれ 1.04 と 0.82 であった。一方、INS 群では、上顎臼歯の 20.4%のみに認められ、上顎の平均 ABR スコア（0.30）は Intact 群よりも有意に低かった。INS 群における下顎の ABR 発生率（35.2%）および平均 ABR スコア（0.48）も Intact 群よりも低い傾向にあったが有意差はなかった。AL 群では、ABR 発生率および平均 ABR スコアは Intact 群よりも更に高く、上顎および下顎臼歯のほぼ 4 分の 3（上顎 73.1%; 下顎 75.6%）に認められ、上顎および下顎の平均 ABR スコアは 1.33 であった。対照的に、AL+INS 群では、ABR 発生率（上顎 25.0%; 下顎 50.0%）および平均 ABR スコア（上顎 0.43; 下顎 0.85）は AL 群よりも有意に低かった（Table 3-2, Figure 3-4）。

ABR は齲蝕臼歯に隣接する歯槽骨の主に根尖領域で観察された (Figure 3-5A, B). 一方, 非齲蝕臼歯に隣接する歯槽骨には放射線透過性の変化は認められなかった (Figure 3-5B). また, ABR スコアと齲蝕スコアの間には高い正の相関があった (下顎: $r = 0.75, p < 0.01$; 上顎: $r = 0.70, p < 0.01$).

3.3.4 病理組織学的所見

齲蝕および歯周病変の病理組織学的発生率を Table 3-3 に示した. 軟 X 線検査の結果と同様に, 病理組織学的にも両 INS 群で DM による齲蝕および歯周炎の発生率は抑制された. すなわち, 齲蝕病変の発生率は INS および AL+INS 群でそれぞれ 44.4% および 52.5% であり, Intact 群 (72.8%) および AL 群

(100%) の発生率よりも有意に低かった. 全群通して齲蝕病変の多くは中等度から重度であり, 象牙質齲蝕が歯髄炎および歯髄壊死に, あるいは歯冠の完全崩壊にまで進展していた. 多くの齲蝕歯では歯髄炎が根尖孔から根尖組織まで拡大し, 根尖性歯周炎が発症していた (Figure 3-6A, C). 根尖性歯周炎の発生率は, INS および AL+INS 群でそれぞれ 30.6% および 35.0% であり, Intact

(43.3%) および AL (70.5%) 群の発生率よりも有意に低かった. 中等度の根尖性歯周炎では, 炎症が根尖周囲の歯周組織に波及し, 軟 X 線検査における透過性領域に対応して, ABR を伴う歯周結合組織の拡大が認められた (Figure 3-5A, Figure 3-6A). 辺縁性歯周炎の発生率は, 根尖性歯周炎の発生率とほぼ同等

であり, INS (27.8%) および AL+INS (40.8%) 群の発生率は Intact (46.7%) および AL (76.4%) 群よりも有意に低かった. 歯肉炎の発生率も INS

(79.6%) および AL+INS (77.5%) 群では, Intact (84.2%) および AL

(100%) 群よりも有意に低かった.

非齶蝕臼歯に隣接する歯周病変の発生率を Table 3- 4 に示した。歯肉炎以外の歯周病変は、非齶蝕臼歯の周囲ではほぼ検出されなかった (Figure 3- 6B, D)。非齶蝕臼歯に隣接する歯肉炎の発生率は、Intact および INS 群で同等であった (Table 3- 4, Figure 3- 7A, B)。なお、AL 群には非齶蝕臼歯が存在しなかった (齶蝕率 100%) ため、AL および AL+INS 群の比較はできなかった。

3.4 考察

第一章および第二章の結果と同様に、自然発症 DM 群および AL 誘発 DM 群共に高血糖状態は齲蝕の発生率および程度の増加と強く関連していた。第一章における同週齢の DM 未発症雌 WBN/Kob ラット（齲蝕発生率：下顎 30%未満，上顎 4%未満）および F344 ラット（齲蝕発生率：下顎および上顎共に 4%未満）の齲蝕発生率と比較して、本章における DM 発症雄 WBN/Kob ラットの齲蝕発生率ははるかに高かった。また、INS 投与による血糖コントロールで高血糖状態を改善した場合、齲蝕の発生率と程度が自然発症 DM ラットでは軽度（上顎のみ）、AL 誘発 DM ラットでは顕著に（下顎および上顎共に）低かった。従って、高血糖が齲蝕の発生および進行の主な要因であると考えられた。

DM 患者および DM 動物の齲蝕の病因は完全には解明されていない。一方、DM 患者はさまざまな感染症にかかりやすいこと（Sentochnik and Eliopoulos 2005）および DM 動物は細菌や真菌の感染症に特に感受性が高いこと（Saiki et al. 1980; Sano et al. 2009c）がよく知られている。また、INS 治療による良好な血糖コントロールが、DM 患者および DM 動物の感染に対する感受性を低下させることも示唆されている（Lewis et al. 2004; Sano et al. 2009b）。齲蝕は口腔齲蝕原性細菌によって引き起こされる感染症であることを考慮すると（Tanzer 1995）、DM 動物の高血糖状態で低下した免疫システムが INS 治療により改善されたことによって、齲蝕の発生および進行が妨げられた可能性が考えられた。

DM モデル動物においても、DM 患者と同様の PD が誘導されることを示唆する報告がある (Claudino et al. 2007; Claudino et al. 2012; Pontes Andersen et al., 2006; Tesseromatis, 2009). 本章において、DM 発症雄 WBN/Kob ラットで歯周炎および ABR が観察され、これらの病変の発生率は INS 投与した DM ラットでは低かった。一方で、辺縁性歯周炎および ABR の発生率は根尖性歯周炎の発生率と高い相関があった。また、齶蝕のない臼歯周囲にはほとんど歯周炎は認められず、DM 自然発症モデルでは、INS 治療は齶蝕のない臼歯周囲の歯周炎の発症には影響を与えなかった。

第一章および第二章、ならびに本章における病理組織学的結果より、齶蝕由来の炎症性変化は根尖孔を越えて歯根周囲の歯周組織にまで及んでおり、その結果として根尖性歯周炎が発生していることを示している。ヒトでは、齶蝕や外傷によって引き起こされる歯髄感染が原因で歯周炎が発生する (Basavaraj et al. 2010; Shenoy and Shenoy 2010)。実験動物においても、根尖性歯周炎は実験的な歯冠の破壊や歯髄の露出によって生じ、DM ラットにおける根尖部の炎症は非 DM ラットよりも重篤であるという報告がある (Armada-Dias et al. 2006; Kohsaka et al. 1996)。更に、進行した歯肉炎や辺縁性歯周炎は、歯冠の崩壊による歯肉・歯周組織の機械的刺激や異物 (被毛や食渣) の衝撃などの複数の刺激、DM 動物における微生物の蓄積などが原因であると考えられる。これらの結果から、INS による血糖コントロールによる齶蝕の抑制は、DM ラットにおける齶蝕由来の歯周炎を減少させる可能性が示唆された。

本章の結果から、INS 治療による血糖コントロールは自然発症および薬物誘発 DM ラットにおいて、齲蝕および齲蝕関連歯周炎の発生と進行を抑制することが明らかになり、高血糖が齲蝕の発生に影響を与える主要な因子である可能性が示唆された。

3.5 小括

INS 投与による血糖コントロールは自然発症および薬物誘発 DM ラットにおける齲蝕と歯周病変の発生を抑制することが明らかになり、高血糖状態がラットの齲蝕と歯周病変の発生に直接的に関与することが示唆された。

Table 3- 1 Effect of glycemic control on incidence and grading of caries in molars of male WBN/Kob rats

Group		Intact (n=10)	INS (n=9)	AL (n=13)	AL+INS (n=10)
Maxillary molars	No. of examined	60	54	78	60
	No. of teeth with caries	43 (71.7%)	18 (33.3%)**	78 (100%)	25 (41.7%)††
	Grade 0	17 (28.3%)	36 (66.6%)	0	35 (58.3%)
	Grade 1	4 (6.7%)	0	1 (1.3%)	5 (8.3%)
	Grade 2	13 (21.7%)	3 (5.6%)	3 (3.8%)	7 (11.7%)
	Grade 3	13 (21.7%)	5 (9.3%)	2 (2.6%)	6 (10.0%)
	Grade 4	13 (21.7%)	10 (18.5%)	72 (92.3%)	7 (11.7%)
Mandibular molars	No. of examined	60	54	78	60
	No. of teeth with caries	35 (58.3%)	30 (55.6%)	78 (100%)	38 (63.3%)††
	Grade 0	25 (41.7%)	24 (44.4%)	0	22 (36.7%)
	Grade 1	3 (5.0%)	7 (13.0%)	1 (1.3%)	2 (3.3%)
	Grade 2	10 (16.7%)	12 (22.2%)	8 (10.3%)	13 (21.7%)
	Grade 3	14 (23.3%)	7 (13.0%)	13 (16.7%)	14 (23.3%)
	Grade 4	8 (13.3%)	4 (7.4%)	56 (71.8%)	9 (15.0%)

Significant difference from intact group (**: $p < 0.01$).

Significant difference from AL group (††: $p < 0.01$).

Table 3- 2 Effect of glycemic control on incidence and grading of ABR in surrounding molars of male WBN/Kob rats

Group		Intact (n=10)	INS (n=9)	AL (n=13)	AL+INS (n=10)
Maxillary molars	No. of examined	60	54	78	60
	No. of teeth with ABR	30 (50.0%)	11 (20.4%)**	57 (73.1%)	15 (25.0%)††
	Grade 0	30 (50.0%)	43 (79.6%)	21 (26.9%)	45 (75.0%)
	Grade 1	13 (21.7%)	7 (13.0%)	23 (29.5%)	6 (10.0%)
	Grade 2	6 (10.0%)	3 (5.6%)	24 (30.8%)	7 (11.7%)
	Grade 3	7 (11.7%)	1 (1.9%)	7 (9.0%)	2 (3.3%)
	Grade 4	4 (6.7%)	0	3 (3.9%)	0
Mandibular molars	No. of examined	60	54	78	60
	No. of teeth with ABR	25 (41.7%)	19 (35.2%)	59 (75.6%)	30 (50.0%)††
	Grade 0	35 (58.3%)	35 (64.8%)	19 (24.4%)	30 (50.0%)
	Grade 1	11 (18.3%)	14 (25.9%)	30 (38.5%)	16 (26.7%)
	Grade 2	7 (11.7%)	3 (5.6%)	18 (23.1%)	8 (13.3%)
	Grade 3	4 (6.7%)	2 (3.7%)	6 (7.7%)	5 (8.3%)
	Grade 4	3 (5.0%)	0	5 (6.4%)	1 (1.7%)

Significant difference from intact group (**: $p < 0.01$).

Significant difference from AL group (††: $p < 0.01$).

Table 3- 3 Effect of glycemic control on incidence of histopathologic lesions in male WBN/Kob rats

Groups	Intact (n=10)	INS (n=9)	AL (n=13)	AL+INS (n=10)
Caries	78/120 (72.8%)	48/108 (44.4%)**	156/156 (100%)	63/120 (52.5%)††
Apical periodontitis	52/120 (43.3%)	33/108 (30.6%)*	110/156 (70.5%)	42/120 (35.0%)††
Marginal periodontitis	56/120 (46.7%)	30/108 (27.8%)**	116/156 (74.4%)	49/120 (40.8%)††
Gingivitis	101/120 (84.2%)	86/108 (79.6%)	156/156 (100%)	93/120 (77.5%)††

Significant difference from intact group (*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$).

Significant difference from AL group (††: $p < 0.01$).

Table 3- 4 Incidence of histopathologic lesions surrounding noncarious molars in male WBN/Kob rats

Groups	Intact (n=10)	INS (n=9)	AL (n=13)	AL+INS (n=10)
Apical periodontitis	0/42	0/60	0/0	0/57
Marginal periodontitis	0/42	1/60 (1.7%)	0/0	1/57 (1.8%)
Gingivitis	23/42 (54.8%)	38/60 (63.3%)	0/0	30/57 (52.6%)

No significant difference between the groups.

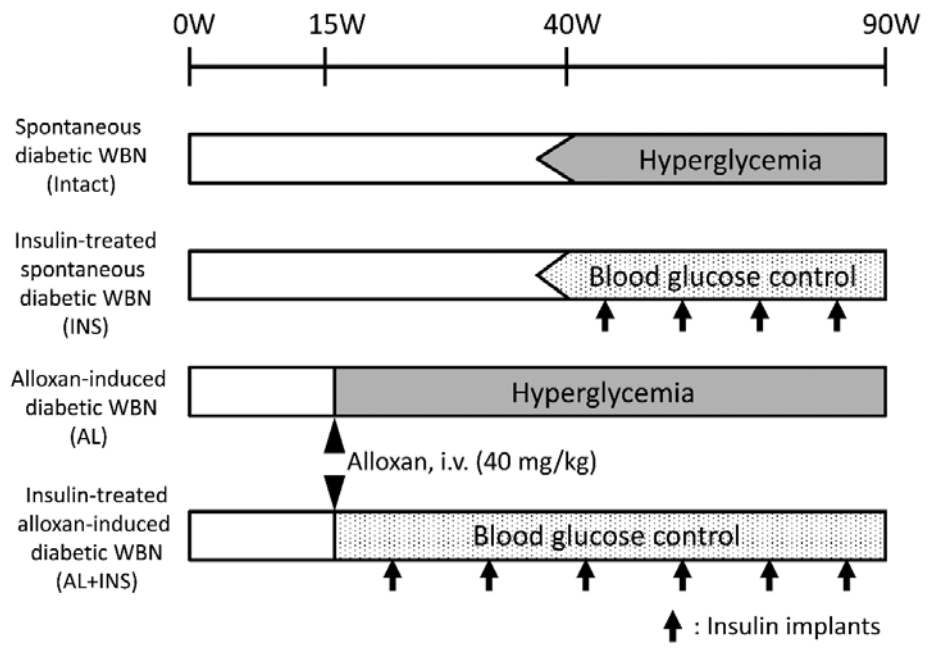


Figure 3- 1 Study design

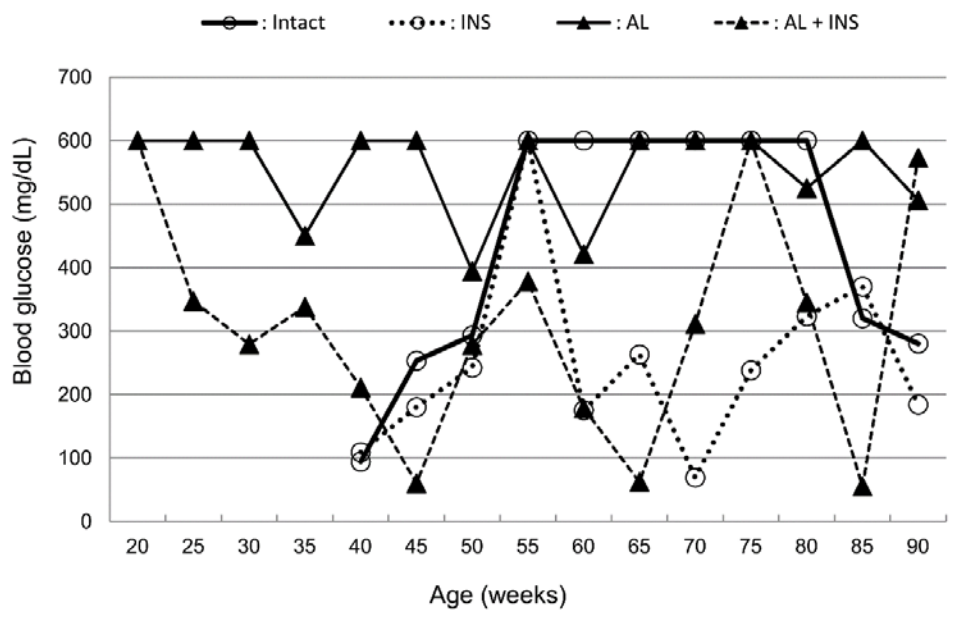


Figure 3- 2 Change in representative blood glucose levels

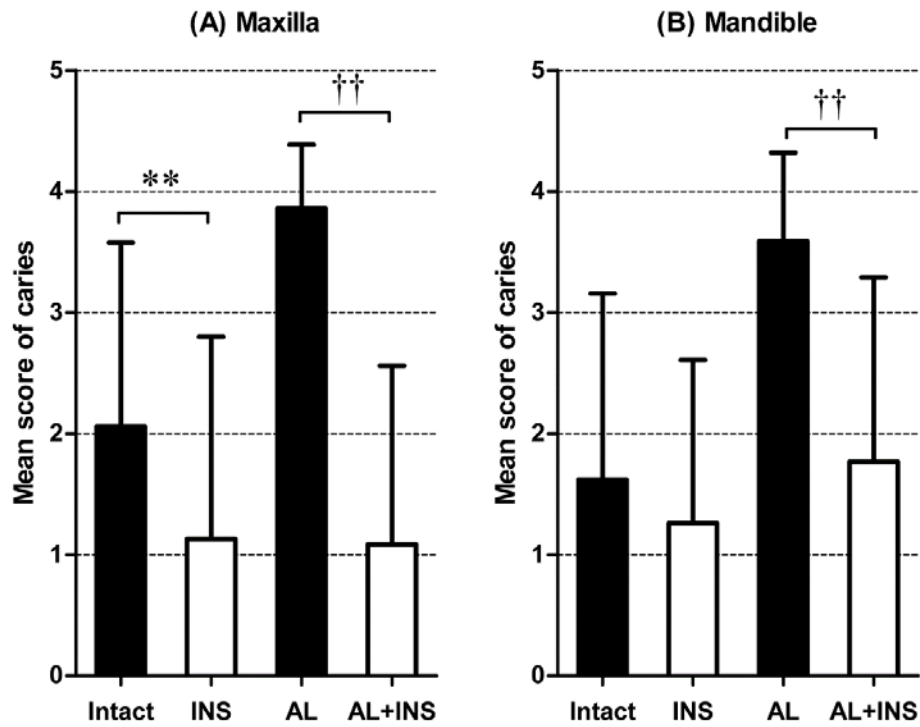


Figure 3- 3 Effect of glyceimic control on mean caries scores

(A) : 上顎臼歯における平均齲蝕スコア. (B) : 下顎臼歯における平均齲蝕スコア. 無処置群と INS 群の間 (**, $p < 0.01$)および AL 群と AL+INS 群の間 (††, $p < 0.01$)で有意差あり.

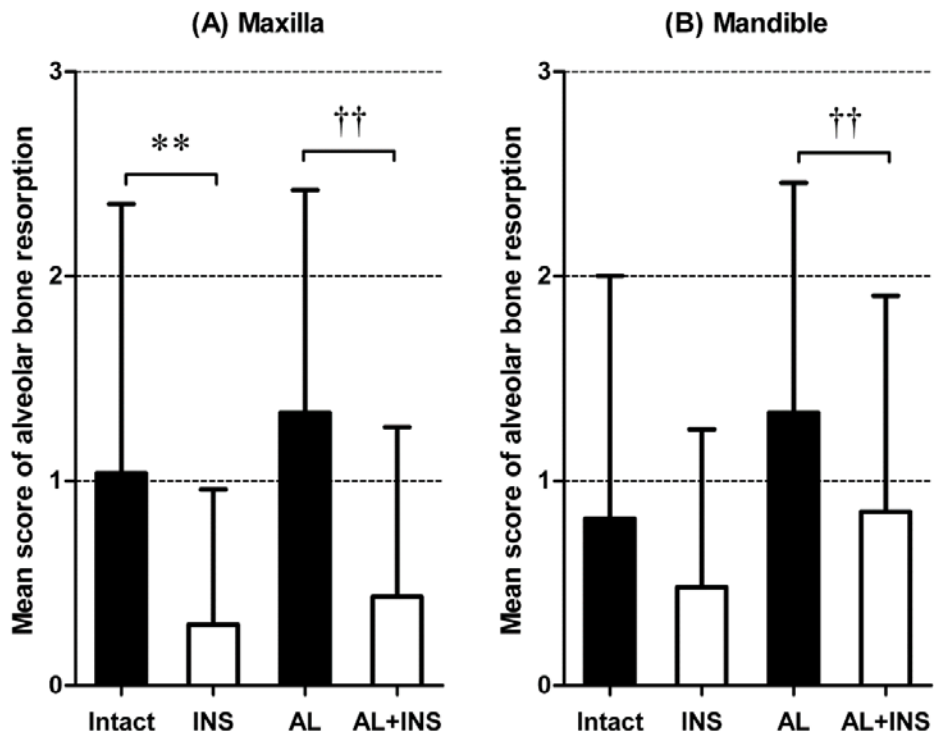


Figure 3- 4 Effect of glycemc control on mean scores for ABR

(A) : 上顎臼歯における平均歯槽骨吸収スコア. (B) : 下顎臼歯における平均歯槽骨吸収スコア. 無処置群と INS 群の間 (**, $p < 0.01$)および AL 群と AL+INS 群の間 (††, $p < 0.01$)で有意差あり.

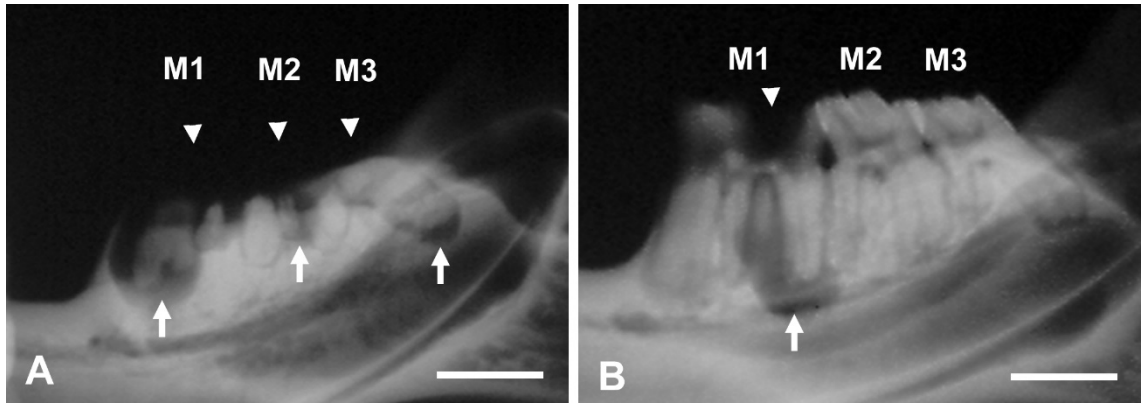


Figure 3- 5 Soft X-ray images of molar caries and ABR of glycemic control rats

A : Insulin 未投与 DM 発症ラット (Intact 群) の下顎. 歯冠部における広範な透過性亢進像を伴う中等度から重度の齲蝕が認められる (矢頭, 全臼歯). 齲蝕臼歯周囲の歯槽骨において歯根根尖部に限局性の透過性亢進領域 (矢印) が頻繁に検出される. **B** : Insulin 投与 DM 発症ラット (INS 群) の下顎. 歯槽骨吸収 (矢印) が齲蝕臼歯 (矢頭, M1) に隣接する領域において認められるが, 非齲蝕臼歯 (M2 および M3) 周囲の歯槽骨には透過性変化がない.

M1, 第一臼歯; M2, 第二臼歯; M3, 第三臼歯. Bar はいずれも 2 mm.

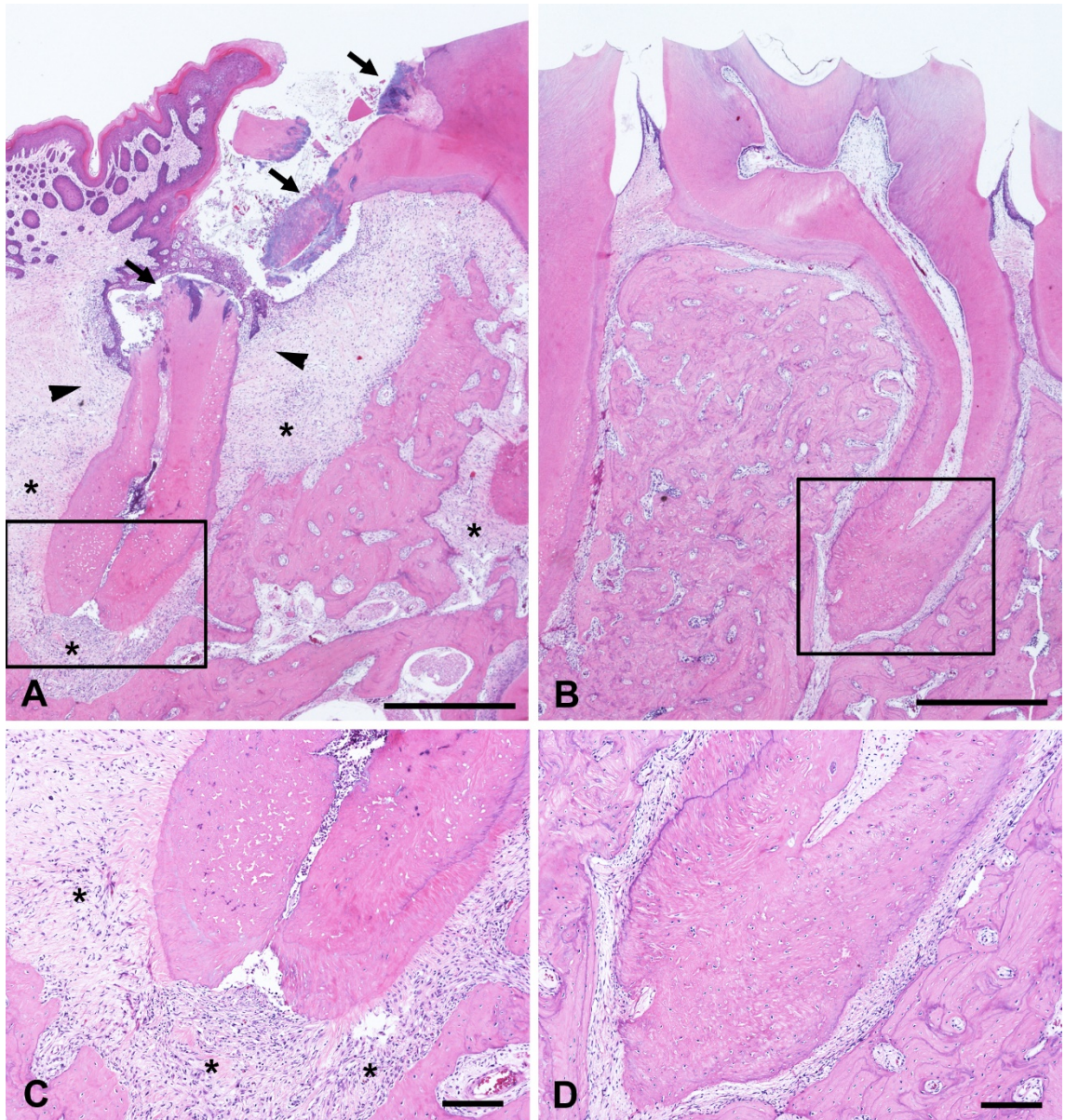


Figure 3- 6 Histopathologic features of the inflammatory lesions in the mandibular periodontal tissues of glycemic control rats

A : Insulin 未投与 DM 発症ラット (Intact 群) の齲蝕臼歯 (矢印) に隣接する歯根周囲組織. 軟 X 線像における透過性領域に対応して炎症性肉芽組織 (*) が歯根周囲に拡大している. 根尖性歯周炎が隣接する辺縁性歯周炎と連続し, 辺縁性歯周炎は歯肉炎と混合している (矢頭). Bar は 500 μm .

B : Insulin 投与 DM 発症ラット (INS 群) の非齲蝕臼歯に隣接する歯根周囲組織. 非齲蝕臼歯における歯根周囲の歯周組織に変化はない. Bar は 500 μm .

C : Figure 3- 6A における根尖領域の拡大像. 歯髓炎が歯根へ広がると共に根尖孔を通じて歯周結合組織に侵入し炎症性肉芽組織に発展している. Bar は 100 μm .

D : Figure 3- 6B における根尖領域の拡大像. 正常な根尖部歯周組織. Bar は 100 μm .

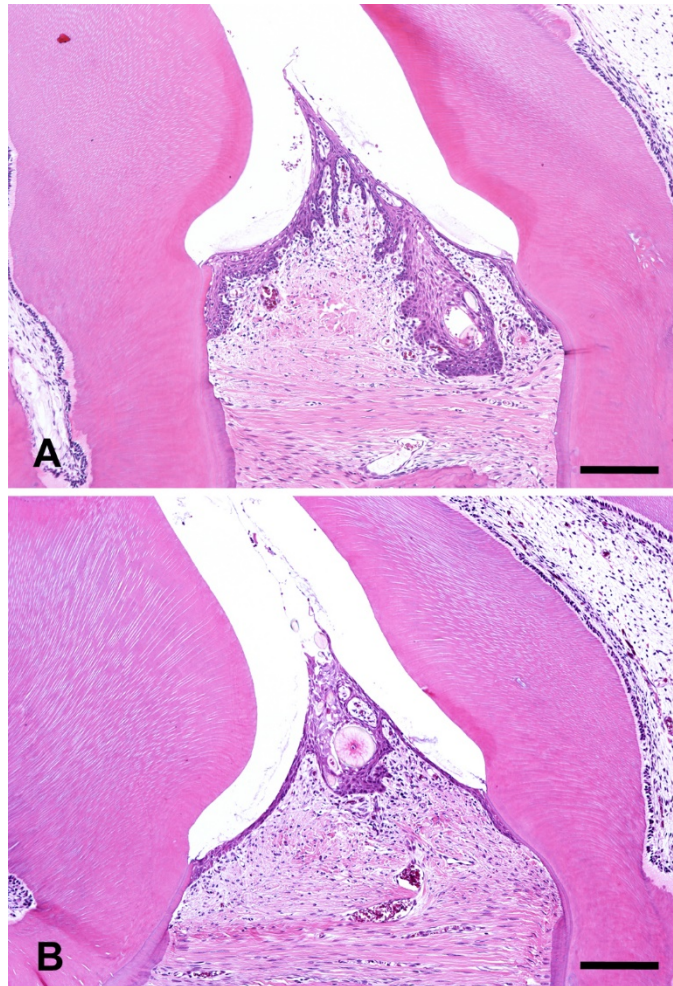


Figure 3- 7 Histopathologic features of the inflammatory lesions in the mandibular gingival tissues adjacent to noncarious molars

A : Insulin 未投与 DM 発症ラット (Intact 群) における非齲蝕臼歯に隣接する歯肉組織. 非齲蝕臼歯の歯周組織は軽度の炎症性変化あるいは概ね正常を示す. **B** : Insulin 投与 DM 発症ラット (INS 群) における非齲蝕臼歯に隣接する歯肉組織. 非齲蝕臼歯の歯周組織に Insulin 投与の影響はない. Bar はいずれも 100 μ m.

4 糖尿病モデル動物における齲蝕および歯周病変の関連
：フッ素投与による齲蝕抑制と歯周病の発生

4.1 序論

DM 患者において PD は、DM の 6 番目の合併症として取り扱われるようになっている。臨床研究では、1 型および 2 型 DM 患者の PD の重症度が非 DM 患者よりも高いことが報告されている (Shlossman et al. 1990; Emrich et al. 1991; Cerda et al. 1994; Tsai et al. 2002; Kaur et al. 2009; Meenawat et al. 2013; Genco and Borgnakke 2020; Graves et al. 2020; Polak et al. 2020)。非 DM 齧歯類モデルを用いた結紮術や PD 原性細菌を歯肉に接種した動物は、通常、ヒト PD の動物モデルとして使用されている (Pontes Andersen et al. 2007)。また、上記の実験操作を行った自然発症または薬物誘発の DM 齧歯類モデルが DM 性 PD モデルとして使用されている。更に、DM ラットでは、実験的処置を行わなくても長期的な高血糖のみで PD が自然発症することも報告されている (Claudino et al. 2007; Claudino et al. 2012)。

DM 発症 *db/db* マウス (Sano et al. 2011) ならびに第 1 章および第 2 章で用いた DM 発症ラットのように、長期高血糖状態の齧歯類において齲蝕が頻繁に発生することが示されており、これらの DM 動物において齲蝕の発生と同時に歯周炎および歯肉炎が進行することも示されている。従って、更にこれらの DM モデルでは、全く異なる病因を持つ PD と齲蝕の両方が発生していることが明らかになっている。しかし、齲蝕が歯周炎と直結しており、齲蝕の重症度や発生率が歯周炎や歯肉炎と高い相関関係にあることが病理組織学的に確認されている。これらの結果は、齲蝕の発生と進行が DM 齧歯類モデルにおける歯周炎の発生に強く関与している可能性を示唆している。しかし、これまでの研究では、DM 動物において高血糖症が直接 PD を誘発する可能性を排除することは

できなかつた。従つて、高血糖がもし DM 動物で PD を直接誘導するのであれば、齧蝕の抑制によつて PD が発生すると考えられる。この仮説に基づき、本章では、AL 誘発 DM ラット（1 型 DM モデル）および DM 発症 *db/db* マウス（2 型 DM モデル）を用いて、ヒトのみならず実験動物においても齧蝕の予防に有効と考えられているフッ素（Fluoride, 以下 F）の投与（Regolati 1975; Larson et al. 1976; Featherstone 1999）で齧蝕を抑制することにより、齧蝕が直接の原因ではない DM 性の PD があるか否かを検討した。

4.2 材料と方法

4.2.1 動物および飼育条件

6 週齢の雌 F344 ラット（日本エスエルシー株式会社，浜松），8 週齢の雄 *db/db* および *db/+* マウス（日本チャールス・リバー株式会社，横浜）を購入し実験に供した。動物は SPF 環境下で，室温 20~26°C，湿度 40~70%，12 時間の明暗サイクル（7:00~19:00 までの明期，19:00~7:00 までの暗期）で制御された動物室において，ステンレス床網付きアルミニウム製ケージで飼育し，標準実験動物飼料（CRF-1，オリエンタル酵母工業，東京），通常飲料水あるいは F（フッ化ナトリウム，和光純薬工業株式会社，大阪）を含んだ飲料水を自由に摂取させた。実験に用いた動物の取り扱いは，摂南大学薬学部動物委員会規約（承認番号：K9-17）および公益社団法人日本実験動物学会の動物取り扱い規約に準拠して行った。

4.2.2 糖尿病誘発薬物（Alloxan）の調整

AL の投与量は，動物が長期間生存し DM を持続すると予測される投与量として 35 mg/kg に設定し，投与容量が体重 1 kg につき 1 ml になるようにアロキ

サンー水和物（シグマアルドリッチジャパン株式会社，東京）を生理食塩水（大塚製薬株式会社，東京）に溶解した．いずれも用時に調製した．

4.2.3 1型糖尿病モデル（Alloxan 投与ラット）実験デザイン

合計 50 例のラットを使用し，AL 投与後通常飲水した群（DM F0 群），AL 投与後 10 ppm の F を含んだ飲料水を与えた群（DM F10 群），AL 投与後 50 ppm の F を含んだ飲料水を与えた群（DM F50 群），無処置で通常飲水した群（non-DM F0 群），無処置で 50 ppm の F を含む飲料水を与えた群（non-DM F50）の 5 群（各群 10 例）に分けて実験を行った．AL 投与群には 7 週齢時に AL を尾静脈内から単回投与した．F 濃度は Regolati 1975 および Larson et al. 1976 の報告において齧蝕を抑制するとされている濃度を設定した．AL 投与群の 7 例が死亡あるいは状態悪化により途中安楽死剖検され，残りの 43 例は 20 週齢時に安楽死剖検を行った．

4.2.4 2型糖尿病モデル（*db/db* マウス）実験デザイン

合計 30 例の *db/db* マウスおよび 40 例の *db/+* マウスを使用した．*db/db* マウスは通常飲水した群（*db/db* F0 群），10 週齢より 10 ppm または 50 ppm の F を含んだ飲料水を与えた群（*db/db* F10 および F50 群）の 3 群（各群 10 例）に分けた．*db/+* マウスは通常飲水した群（*db/+* F0 群），25，50 あるいは 100 ppm の F を含む飲料水を与えた群（*db/+* F25, *db/+* F50, および *db/+* F100）の 4 群（各群 10 例）に分けた．F 濃度は予備検討の結果から齧蝕を抑制することが示された濃度を設定した．8 例の *db/db* マウスおよび 6 例の *db/+* マウスを死亡あるいは

は状態悪化により途中安楽死剖検し、残りの 56 例は 40 週齢時に安楽死剖検を行った。

4.2.5 血糖値および尿糖値モニタリング

尿糖値は、尿試験紙（和光純薬工業株式会社，大阪）を用いて測定時に強制排尿させた新鮮尿について測定した。ラットでは Alloxan 投与後 1～3 日までの連日，投与後 1～3 週までの週 1 回，投与後 4 週以降は毎月 1 回測定した。マウスでは 10 週齢以降毎月 1 回測定した。血糖値は、血糖測定器（グルテスト E，株式会社三和化学研究所，愛知）を用いて，ラットでは Alloxan 投与後 4 週以降の毎月 1 回，マウスでは 10 週齢以降毎月 1 回，尾静脈からの新鮮血および解剖時の新鮮血について測定した。尿糖値および血糖値の測定は午後の一定時刻（13:00～16:00）に実施した。

4.2.6 齲蝕の肉眼検査（db/db マウス）

観察期間の終了後，塩酸ケタミン（40 mg/kg; ケタラール，三共，東京）およびキシラジン（2.0 mg/kg; セラクタール，日本バイエル社，東京）の筋注による深麻酔下にて放血安楽死させ上下顎を摘出した。摘出した顎組織は 10% 中性緩衝ホルマリン（pH 7.4）にて 24 時間固定後，双眼実体顕微鏡を用いて全臼歯の咬合面，頬舌面，近心面を観察し，後述の基準にて齲蝕をスコア化した。齲蝕スコア（各臼歯における）：0，異常なし；1，歯冠部の小孔あるいは小溝；2，歯冠部の孔形成あるいは歯冠の部分欠失；3，歯冠の完全消失。

4.2.7 齧蝕および歯槽骨吸収スコアリング：軟 X 線検査（AL 投与ラット）

観察期間の終了後、塩酸ケタミン（40 mg/kg; ケタラール，三共，東京）およびキシラジン（2.0 mg/kg; セラクタール，日本バイエル社，東京）の筋注による深麻酔下にて放血安楽死させ上下顎を摘出した。摘出した顎組織は 10% 中性緩衝ホルマリン（pH 7.4）にて 24 時間固定後，全顎組織の近遠心面の軟 X 線写真（35 kV，2 mA，4 分）を撮影した。撮影した軟 X 線写真を用いて，1.2.3 項記載のスコア基準にて齧蝕および ABR をスコア化した。

4.2.8 病理組織学的検査

上下顎を検査対象とし，軟 X 線検査後，各顎組織を 5% EDTA・4Na 溶液で 2 週間（4°C）脱灰処理した。脱灰処理後，各顎組織を全臼歯が観察できる近遠心面にて切り出し，常法に従ってパラフィンブロックを作製した。切片には HE 染色を施し，光学顕微鏡を用いて病理組織学的検査を実施し，齧蝕および歯周病変について 2.2.6 項記載の判定基準にてグレード判定した。

4.2.9 統計解析

マウスの肉眼検査による齧蝕スコア，ならびにラットの軟 X 線検査による齧蝕スコアおよび ABR スコアについては，Wilcoxon 順位和検定により各群の平均スコアの比較を行った。マウスの肉眼検査による齧蝕発生率，ラットの軟 X 線検査による齧蝕および ABR 発生率，ならびに病理組織学的検査の所見発生率については，カイ 2 乗検定により各群の比較を行った。いずれも有意水準を 5% ($p < 0.05$) とした。

4.3 結果

4.3.1 血糖値および尿糖値

AL 投与 DM 発症ラットにおいて、全例で重度の高血糖 (>400 mg/dL) および高尿糖 (>500 mg/dL) がモニタリング期間中持続した。AL 未投与 DM 未発症ラットにおいては、全例とも血糖値および尿糖値 (血糖値 <120 mg/dL, 尿糖値 <100 mg/dL) 共に正常であった。DM 発症 *db/db* マウスにおいて、全例で 10 週齢から重度の高血糖 (>400 mg/dL) および高尿糖 (>500 mg/dL) が計画解剖時まで持続した。DM 未発症 *db/+* マウスにおいては、全例ともモニタリング期間を通して正常値 (血糖値 <200 mg/dL, 尿糖値 <100 mg/dL) を示した。

4.3.2 1 型糖尿病モデルにおけるフッ素投与による齲蝕および歯周病変の抑制

軟 X 線検査の結果、F 投与により用量依存的に DM 発症ラットにおける齲蝕の発生が抑制され、DM F50 群では病変はほぼ観察されなかった。一方、F 未投与の DM 発症ラット (DM F0 群) の臼歯の約半数に齲蝕が認められた。更に、DM F10 および DM F50 群の平均齲蝕スコアおよび齲蝕発生率は、DM F0 群よりも有意に低かった。DM 未発症ラット (non-DM F0 および non-DM F50 群) の臼歯には齲蝕病変は観察されなかった (Figure 4- 1, Table 4- 1)。

DM F0 群では、ABR の高い平均スコアと高い発生率が確認されたが、F 投与により齲蝕の抑制と共に ABR も著しく抑制された。DM F10 および DM F50 群の上顎、ならびに DM F50 群の下顎では ABR は全く検出されなかった。DM 未発症ラット (non-DM F0 および non-DM F50 群) では、いずれの臼歯にも ABR は観察されなかった (Figure 4- 2, Table 4- 2)。

更に、ABR は齶蝕臼歯に隣接する根尖領域に検出される特徴があるが (Figure 4- 3A), F 投与 DM 発症ラットの非齶蝕臼歯周囲の歯槽骨には放射線透過性病変は検出されなかった (Figure 4- 3B).

4.3.3 2 型糖尿病モデルにおけるフッ素投与による齶蝕および歯周病変の抑制

2 型 DM マウスにおける F 投与の齶蝕抑制効果は、1 型 DM ラットほど顕著ではなかったが、肉眼的に DM 発症 *db/db* マウスの齶蝕も F 投与により抑制された。齶蝕の進行は F 投与によって大部分は抑制される傾向があり、*db/db* F50 群の平均齶蝕スコアと病変の発生率は *db/db* F0 群よりも有意に低かった。DM 未発症 *db/+* マウス (*db/+* F25, *db/+* F50, および *db/+* F100 群) において一部の臼歯に齶蝕が認められたがその頻度は低く (10%未満), *db/+* F0 群では齶蝕は全く観察されなかった (Figure 4- 6, Table 4- 3).

F 投与は DM 発症マウスにおける齶蝕の組織病変を軽度に抑制し、*db/db* F25 および *db/db* F50 群の発生率は *db/db* F0 群の約半分であった。根尖性歯周炎の発生率は、辺縁性歯周炎の発生率とほぼ同等であり、*db/db* F25 および *db/db* F50 群のこれら 2 つの病変の発生率は、*db/db* F0 群の発生率の約半分で、齶蝕病変の抑制と同様の傾向を示した。歯肉炎は DM 未発症 *db/+* マウス (*db/+* F25, *db/+* F50, および *db/+* F100 群) では各群約 40% と同等に検出された一方で、F 未投与 DM 発症マウス (*db/db* F0 群) の歯肉炎の発生率はこれらのほぼ倍 (約 80%) であった。齶蝕発生率と同様に、歯肉炎の発生率も F 投与により抑制され、*db/db* F25 および *db/db* F50 群で軽度に低かった。もともと齶蝕の発生がわ

ずかな DM 未発症 (*db/+*) マウスでは F 投与においても歯肉炎の発生率に差はなかった (Figure 4- 7).

F 未投与 DM 発症 *db/db* マウス (*db/db* F0 群) において, ABR および辺縁性歯周炎は, 歯髄炎, 根尖性歯周炎, および歯肉炎を伴う中等度の齲蝕と必ず同時に発症していた (Figure 4- 8A-C). 一方で, DM 発症の有無に関わらず, ABR および辺縁性歯周炎は, 非齲蝕臼歯の周囲では検出されなかった (Figure 4- 8D-F). 更に, F 投与により齲蝕を抑制した DM 発症 *db/db* マウスでは ABR および辺縁性歯周炎は, 根尖性歯周炎と共に常に検出された (Figure 4- 8G-I).

4.4 考察

本章では、1型および2型 DM モデルで齶蝕の存在によらず PD が直接誘発されているのであれば、F 投与により齶蝕を抑制した場合でも、歯周組織に PD が独立して出現するのではないかという仮説を立てた。その結果、1型および2型 DM モデルの齶歯類において齶蝕の進行が F 投与により著しく抑制されたことから、F の齶蝕抑制効果は明らかであった。

また、F 投与は齶蝕の抑制に加えて、歯周炎の発生率と重症度を劇的に抑制した。一方で、F を投与していない DM 動物では、齶蝕と共に歯周炎の発生率と重症度が顕著に高かった。特に、高用量の F を投与した DM ラットでは、臼歯周囲の歯周組織に辺縁性歯周炎および ABR は検出されなかった。更に、DM ラットで高頻度に発現していた重度の歯肉炎も F 投与でほとんど観察されず、歯肉炎の発生率は非 DM ラットと同程度に低かった。また、F 投与 DM ラットおよび *db/db* マウスでは、中等度の歯肉炎を伴う辺縁性歯周炎および ABR が一部に残存したが、高濃度の F を投与した DM ラットでは残存しなかった。更に、ABR は、ヒト PD では歯槽骨頂における減少が特徴であるが、1型および2型 DM 齶歯類モデルでは、ABR は主に根尖孔に隣接する歯根先端部で検出され、ABR を伴う歯周炎の部位もヒト PD と DM 齶歯類モデルでは全く異なっていた。これらの事実は、齶蝕由来の炎症が歯根の根尖部から拡大して吻側に進行し、それによって齶蝕由来の炎症が根尖孔を通じて辺縁歯周組織に影響を及ぼす可能性を強く示唆しており、PD 由来の炎症は1型および2型 DM モデルでは発現しなかった可能性がある。これまでの動物実験において、ストレプトゾトシンまたは AL 誘発 1型 DM ラットで、PD 由来の炎症が自然発症するこ

とが報告されている (Claudino et al. 2007; Claudino et al. 2012; Tesseromatis et al. 2009). しかしながら, これらの DM モデルで齶蝕の存在が確認されているが, 辺縁部歯周組織における過度の齶蝕由来の炎症は PD と混同されている可能性がある (Claudino et al. 2007; Claudino et al. 2012).

本章の結果から, AL 誘発 1 型 DM ラットおよび 2 型 DM *db/db* マウスにおいて, F 投与後の歯周炎の発生率および重症度は, 齶蝕の抑制と共に劇的に抑制された. F 投与下の正常臼歯周囲の歯周組織では歯周炎が全く認められず, 残存する歯周炎に包含された臼歯では齶蝕形成過程が明確に認められたことから, 1 型および 2 型 DM 齶歯類モデルにおける歯周炎および歯肉炎は PD に由来するものではなく, 齶蝕に由来するものである可能性が高いと考えられた.

4.5 小括

ALを投与したF344ラット（1型DMモデル）および*db/db*マウス（2型DMモデル）ともにFの齶蝕抑制効果が認められ、F投与DM群の齶蝕スコアとABRスコアは明らかに減少した。また、歯周病変の抑制も認められた。更に、F投与DM動物において齶蝕がない正常な臼歯の歯周組織には歯周病変が認められなかったのに対し、齶蝕を発生した臼歯周囲の歯周組織には歯周病変がみられたことから、齶蝕と歯周病変との連続性も想定された。以上の結果から、F投与で齶蝕を抑制したDM齶歯類モデルにPDは認められず、DM齶歯類モデルにみられる歯周病変は齶蝕に伴う病変であることが明らかになった。

Table 4- 1 Incidence and grading of caries in molars of type 1 DM model (AL-treated F344 rats)

Groups	Fluoride concentration	DM (Diabetic rats)			Non-DM (Nondiabetic rats)	
		0 ppm (F0) (n=7)	10 ppm (F10) (n=8)	50 ppm (F50) (n=8)	0 ppm (F0) (n=10)	50 ppm (F50) (n=10)
Maxillary molars	No. of examined	42	48	48	60	60
	No. of teeth with caries	17 (40.5%)	1 (2.1%)**	0 **	0	0
	Grade 0	25 (59.5%)	47 (97.9%)	48 (100%)	60 (100%)	60 (100%)
	Grade 1	8 (19.0%)	1 (2.1%)	0	0	0
	Grade 2	7 (16.7%)	0	0	0	0
	Grade 3	2 (4.8%)	0	0	0	0
	Grade 4	0	0	0	0	0
Mandibular molars	No. of examined	42	48	48	60	60
	No. of teeth with caries	22 (52.4%)	9 (18.8%)**	3 (6.3%)**	0	0
	Grade 0	20 (47.6%)	33 (81.3%)	45 (93.8%)	60 (100%)	60 (100%)
	Grade 1	9 (21.4%)	8 (16.7%)	3 (6.3%)	0	0
	Grade 2	9 (21.4%)	1 (2.1%)	0	0	0
	Grade 3	3 (7.1%)	0	0	0	0
	Grade 4	1 (2.4%)	0	0	0	0

Significant difference from the DM F0 group (**: $p < 0.01$).

Table 4- 2 Incidence and grading of ABR in surrounding molars of type 1 DM model (AL-treated F344 rats)

Groups	Fluoride concentration	DM (Diabetic rats)			Non-DM (Nondiabetic rats)	
		0 ppm (F0) (n=7)	10 ppm (F10) (n=8)	50 ppm (F50) (n=8)	0 ppm (F0) (n=10)	50 ppm (F50) (n=10)
Maxillary molars	No. of examined	42	48	48	60	60
	No. of teeth with ABR	7 (16.7%)	0 **	0 **	0	0
	Grade 0	35 (83.3%)	48 (100%)	48 (100%)	60 (100%)	60 (100%)
	Grade 1	2 (4.8%)	0	0	0	0
	Grade 2	1 (2.4%)	0	0	0	0
	Grade 3	2 (4.8%)	0	0	0	0
	Grade 4	2 (4.8%)	0	0	0	0
Mandibular molars	No. of examined	42	48	48	60	60
	No. of teeth with ABR	11 (26.2%)	2 (4.2%)**	3 (6.3%)**	0	0
	Grade 0	31 (73.8%)	46 (95.8%)	45 (93.8%)	60 (100%)	60 (100%)
	Grade 1	2 (4.8%)	2 (4.2%)	3 (6.3%)	0	0
	Grade 2	2 (4.8%)	0	0	0	0
	Grade 3	4 (9.5%)	0	0	0	0
	Grade 4	3 (7.1%)	0	0	0	0

Significant difference from the DM F0 group (**: $p < 0.01$).

Table 4- 3 Incidence and grading of caries in molars of type 2 DM model (*db/db* mice)

Groups		<i>db/db</i> (Diabetic mice)			<i>db/+</i> (Nondiabetic mice)			
		0 ppm (F0) (n=7)	25 pm (F10) (n=6)	50 ppm (F50) (n=9)	0 ppm (F0) (n=9)	25 ppm (F25) (n=10)	50 ppm (F50) (n=8)	100 ppm (F100) (n=7)
Maxillary molars	No. of examined	42	36	54	54	60	48	42
	No. of teeth with caries	21 (50.0%)	11 (30.6%)	16 (29.6%)*	0	0	0	2 (4.8%)
	Grade 0	21 (50.0%)	25 (69.4%)	38 (70.4%)	54 (100%)	60 (100%)	48 (100%)	40 (95.2%)
	Grade 1	6 (14.3%)	4 (11.1%)	4 (7.4%)	0	0	0	0
	Grade 2	0	1 (2.8%)	1 (1.9%)	0	0	0	2 (4.8%)
	Grade 3	15 (35.7%)	6 (16.7%)	11 (20.4%)	0	0	0	0
Mandibular molars	No. of examined	42	36	54	54	60	48	42
	No. of teeth with caries	18 (42.9%)	10 (27.8%)	8 (14.8%)**	0	1 (1.7%)	3 (6.3%)	0
	Grade 0	24 (57.1%)	26 (72.2%)	46 (85.2%)	54 (100%)	59 (98.3%)	45 (93.8%)	42 (100%)
	Grade 1	6 (14.3%)	2 (5.6%)	3 (5.6%)	0	0	0	0
	Grade 2	10 (23.8%)	7 (19.4%)	5 (9.3%)	0	1 (1.7%)	3 (6.3%)	0
	Grade 3	2 (4.8%)	1 (2.8%)	0	0	0	0	

Significant difference from the DM F0 group (*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$).

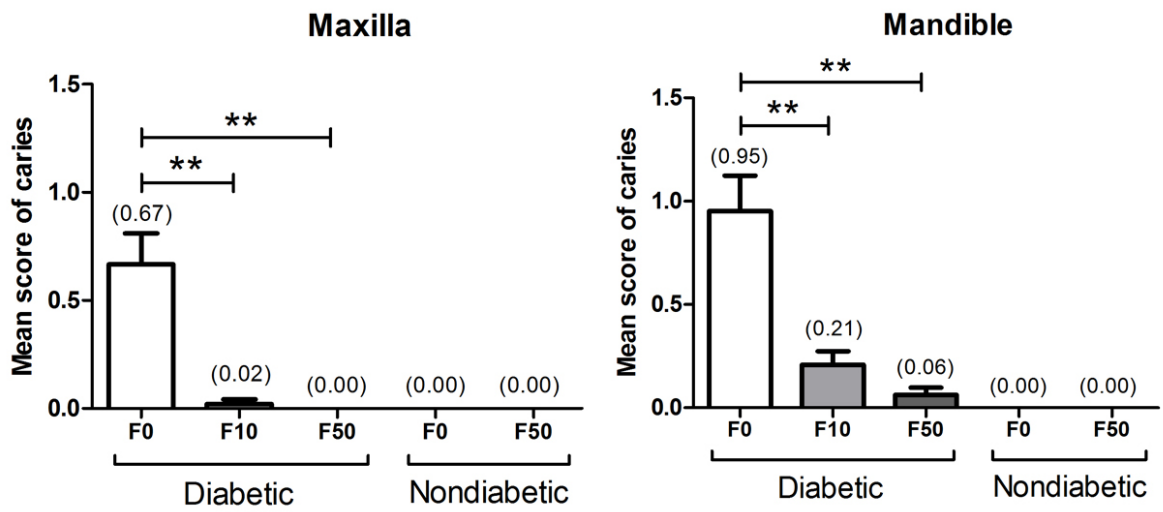


Figure 4- 1 Fluoride suppresses dental caries in AL-induced type 1 diabetic rats

DM 発症ラットおよびDM 未発症ラットにおける上顎および下顎の平均齲蝕スコア。DM 発症 F0 群と DM 発症 F10 あるいは DM 発症 F50 群の間で有意差 (**, $p < 0.01$)あり。

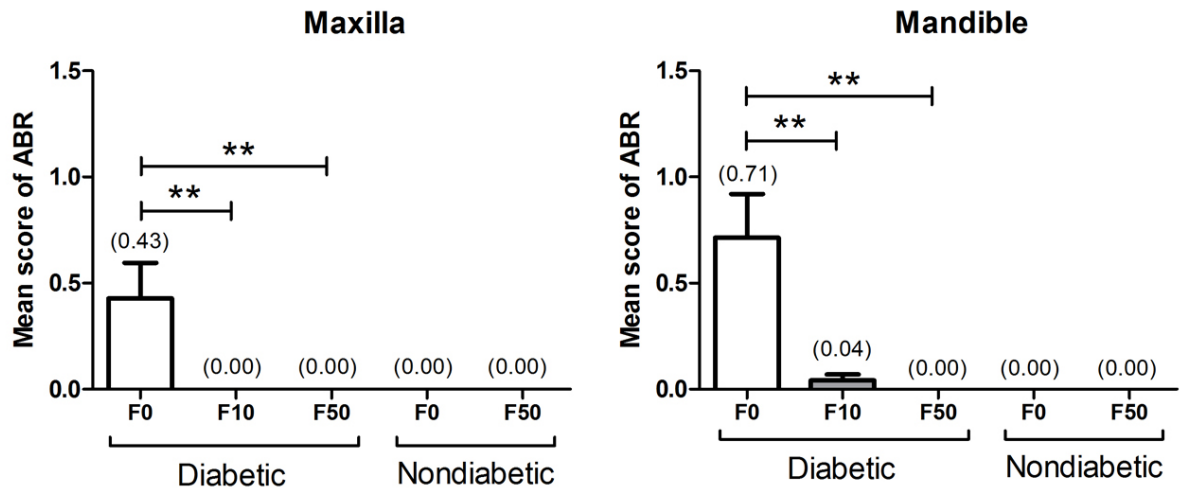


Figure 4- 2 Fluoride suppresses ABR in AL-induced type 1 diabetic rats

DM 発症ラットおよびDM 未発症ラットにおける上顎および下顎の平均歯槽骨吸収スコア。DM 発症 F0 群と DM 発症 F10 あるいは DM 発症 F50 群の間で有意差 (**, $p < 0.01$)あり。

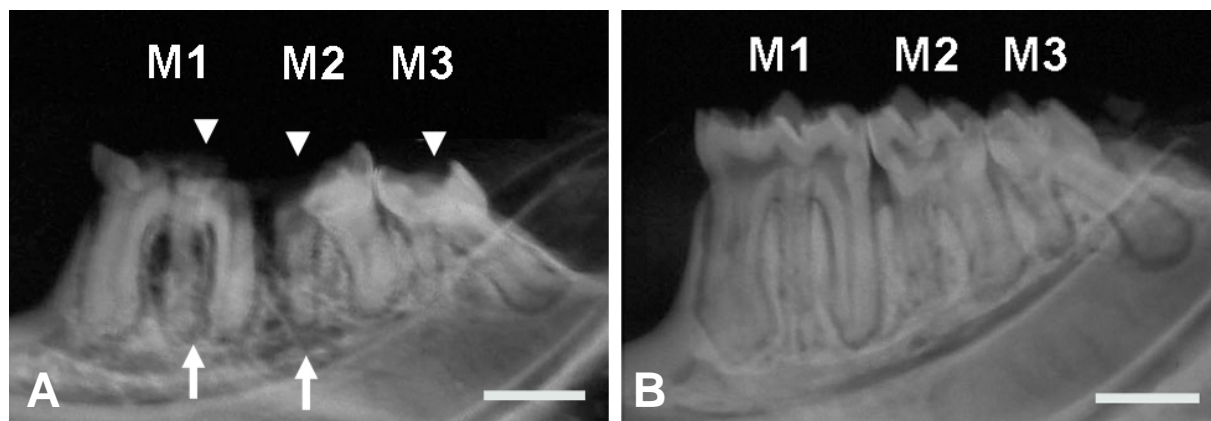


Figure 4- 3 Soft X-ray images of dental caries and ABR in F-treated type 1 diabetic rats

A : F 未投与 DM 発症ラット (DM 発症 F0 群) の下顎. 歯冠部における限局性の透過性亢進領域 (矢頭) として齲蝕が認められる. 歯槽骨において齲蝕臼歯の根尖部に限局性の透過性亢進領域 (矢印) が検出される. **B** : F 投与 DM 発症ラット (DM 発症 F50 群) の下顎. F 投与により齲蝕が抑制され臼歯に異常はなく歯槽骨も正常.

M1, 第一臼歯; M2, 第二臼歯; M3, 第三臼歯. Bar はいずれも 2 mm.

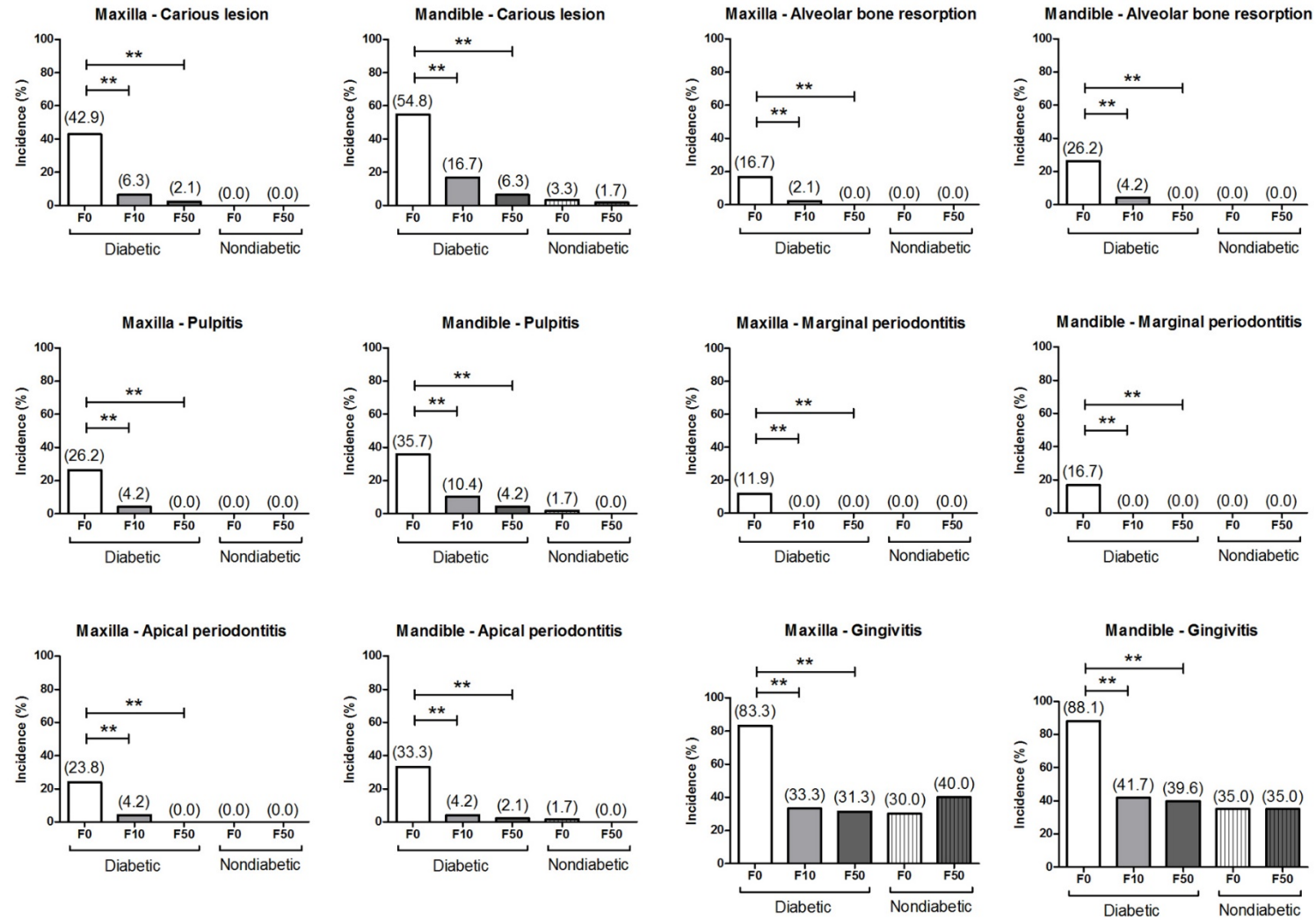


Figure 4- 4 Fluoride histopathologically suppresses periodontal lesions and dental caries in AL-induced type 1 diabetic rats

DM 発症ラットおよび DM 未発症ラットにおける病理組織学的所見の発生頻度. DM 発症 F0 群と DM 発症 F10 あるいは DM 発症 F50 群の間で有意差 (**, $p < 0.01$)あり.

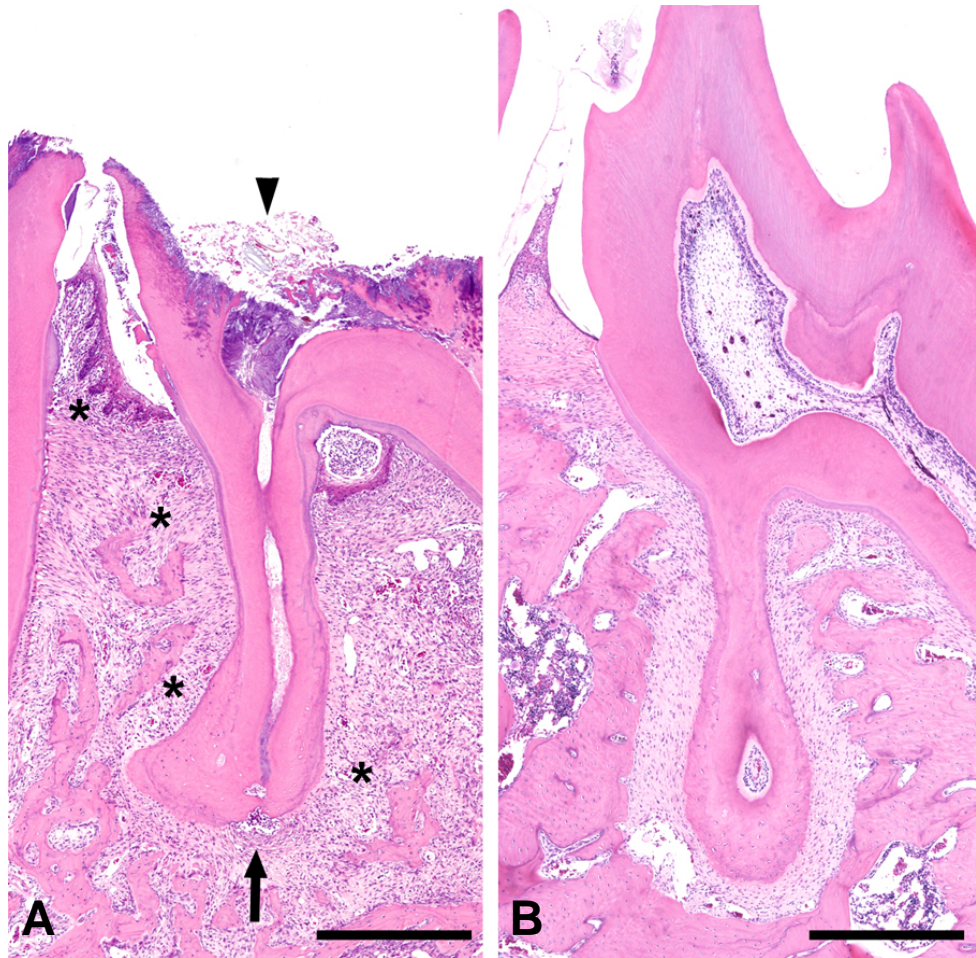


Figure 4- 5 Histopathological features of periodontal lesions and dental caries in F-treated type 1 diabetic rats

A : F 未投与 DM 発症ラット (DM 発症 F0 群) における齲蝕臼歯周囲の歯周組織の炎症. 歯肉炎, 辺縁性歯周炎および歯槽骨吸収 (*) が根尖性歯周炎 (矢印) を伴う中等度齲蝕 (矢頭) と共に認められる. **B** : F 投与 DM 発症ラット (DM 発症 F50 群) における非齲蝕臼歯に隣接する正常な歯周組織. 根尖性歯周炎および辺縁性歯周炎は非齲蝕臼歯周囲では認められない. Bar はいずれも 400 μm .

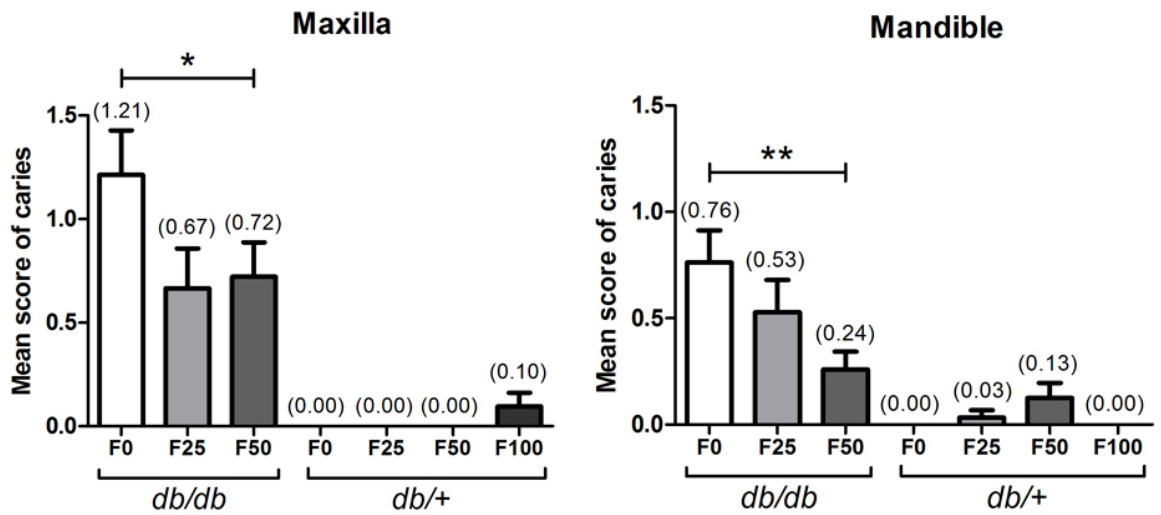


Figure 4- 6 Fluoride macroscopically suppresses dental caries in type 2 diabetic *db/db* mice
 DM 発症 *db/db* マウスおよび DM 未発症 *db/+* マウスにおける上顎および下顎の平均齲蝕スコア. DM 発症 F0 群と DM 発症 F50 群の間で有意差 (*, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$)あり.

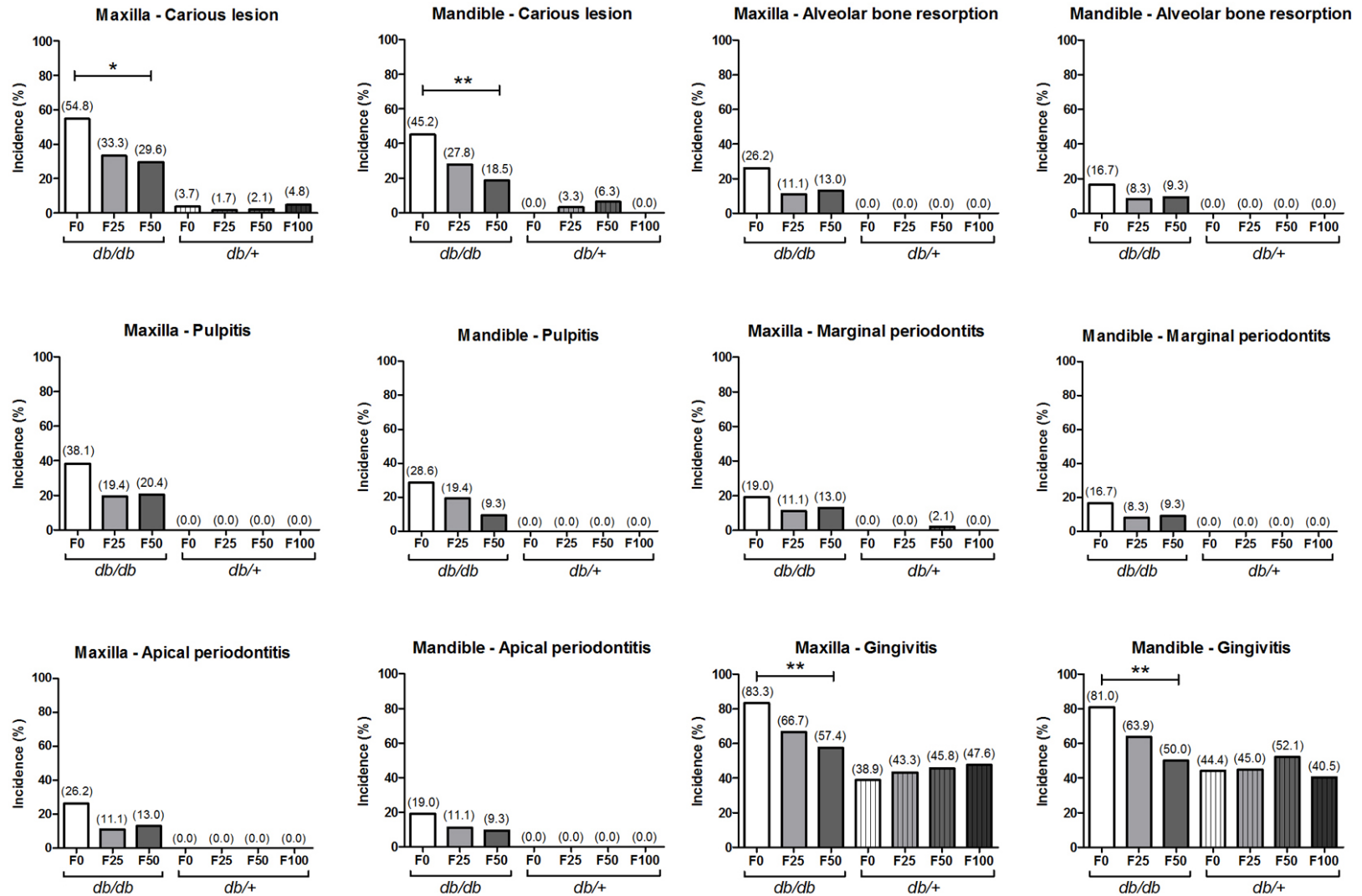


Figure 4- 7 Fluoride histopathologically suppresses periodontal lesions and dental caries in type 2 diabetic *db/db* mice

DM 発症 *db/db* マウスおよび DM 未発症 *db/+* マウスにおける病理組織学的所見の発生頻度. DM 発症 F0 群と DM 発症 F50 群の間で有意差 (*, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$)あり.

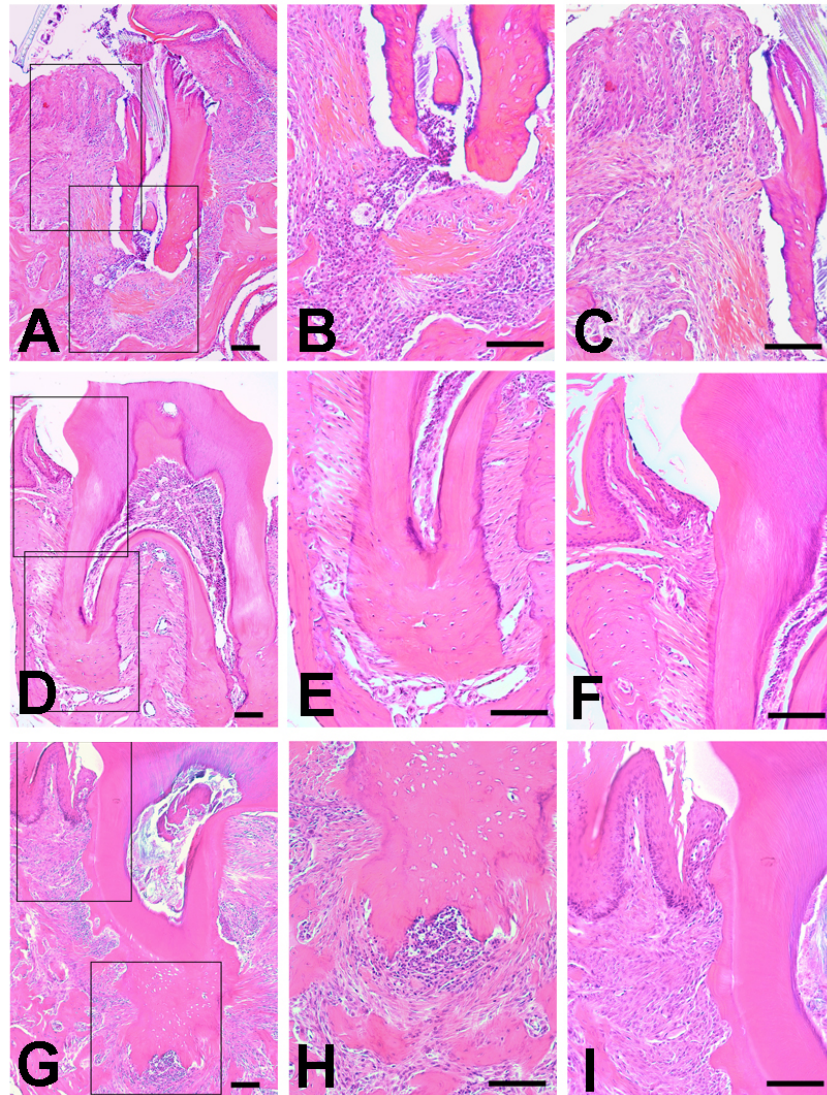


Figure 4- 8 Histopathological features of periodontal lesions and dental caries in F-treated type 2 diabetic *db/db* mice

A-C : F 未投与 DM 発症 *db/db* マウス (*db/db* F0 群) における齲蝕臼歯に隣接する歯周組織の炎症。
A : 歯髓炎を伴う重度齲蝕。歯髓炎が根尖性歯髓炎と連続している。**B** : 歯槽骨吸収を伴う根尖性歯周炎。根尖部の炎症が辺縁組織へ波及している。**C** : 辺縁性歯周炎および中等度の歯肉炎が歯髓炎および根尖性歯周炎を伴う齲蝕に付随して生じている。**D-F** : F 投与 DM 発症 *db/db* マウス (*db/db* F50 群) における非齲蝕臼歯に隣接する正常な歯周組織。**D** : 正常な臼歯と歯周組織。**E** : 正常な根尖組織。**F** : 正常な歯肉および辺縁組織。**G-I** : F 投与 DM 発症 *db/db* マウス (*db/db* F25 群) における齲蝕臼歯に隣接する根尖および辺縁組織の炎症。**G** : 歯髓炎および根尖部の炎症を伴う中等度の齲蝕。**H** : 歯槽骨吸収を伴う根尖性歯周炎。**I** : 根尖性歯周炎と共に歯槽骨吸収を伴う辺縁性歯周炎が認められる。Bar はいずれも 100 μ m.

総括

本研究では、齧歯類の DM モデルでは、高血糖の持続により歯牙および歯周組織でどのような病態が誘発されているかを精査することにより、DM 齧歯類がヒトの PD モデルとして成立するか否かを検討するとともに、PD とは全く病因が異なる齲蝕の発症・増悪が DM とどのように関連しているかについても解析した。

第一章では、高血糖状態が歯牙および歯周組織の炎症を増悪させるか否かを検証するため、齲蝕感受性 WBN/Kob ラットを用いて DM を自然発症した 2 年齢の雄ラットと DM 未発症の雌ラットおよび齲蝕非感受性の雌雄 F344 ラットの歯牙および歯周組織を比較解析した。各群 10 匹の 2 年齢のラットの上下顎全臼歯について、軟 X 線写真を用いて、ABR および齲蝕の観察を行った後、病理組織学的検査を実施した。その結果、約 10 か月齢から DM を自然発症した雄 WBN/Kob ラットでは、ABR と臼歯齲蝕の頻度および重症度は、DM 未発症の雌 WBN/Kob ラットと比較し、著しく高かった。病理組織学的には、歯冠の齲蝕が亢進すると、細菌感染と壊死により、齲蝕が象牙質を貫通し、炎症は歯髄から根尖部の膿瘍形成を伴い、歯周組織にまで広がっていた。これらの炎症性変化は結果として ABR と連続しており、その程度は臼歯齲蝕の程度と非常に高く相関していた。DM 未発症の雌 WBN/Kob ラットの臼歯齲蝕および ABR の頻度および程度も F344 ラットと比較すると有意に高かった。以上の結果から、DM は WBN/Kob ラットの齲蝕を更に増悪させることが明らかとなり、歯周の炎症は齲蝕の二次的な根尖性歯周炎に起因している可能性が示唆された。

第二章では、DM モデルにおいて、薬物誘発による急激な高血糖の上昇と持続が歯牙および歯周組織の炎症を発生・増悪させるか否かを検証するとともに、歯周炎と齲蝕の関連性を解析するため、AL を投与し DM を発症した雌 F344 ラットにおける歯周組織および歯牙を、AL を投与したが DM 未発症ならびに無処置の雌 F344 ラットと比較解析した。AL を 7 週齢の雌 F344 ラットの尾静脈内に単回投与し DM を誘発した。AL 投与後 13 週（DM, 非 DM, 無処置対照）および 26 週（DM, 無処置対照）に安楽死剖検し、上下顎全臼歯について軟 X 線写真を用いて ABR および齲蝕を観察した後、病理組織学的に解析した。その結果、投与後 13 週目で、無処置対照および AL 投与後 DM 未発症の動物では、齲蝕は形成されなかったのに対し、AL 投与 DM ラットでは ABR および齲蝕の急激な進行が確認され、投与 26 週目では 13 週目と比較し両病変のスコアは更に増加した。病理組織学的に、DM ラットでは、臼歯の歯冠で初期の齲蝕が形成されていたが、病変が進行すると炎症は歯髄から根尖部の根尖孔を通して、歯周の結合織に拡がっていた。以上の結果から、薬物誘発における高血糖の上昇は、それと対応する急速な齲蝕発症および歯周炎を引き起こすことが実証され、歯周組織の炎症は齲蝕に起因した二次的な変化である可能性が高いと考えられた。

高血糖が齲蝕および歯周組織の炎症の発生・進行に直接的に関与するのであれば、高血糖状態を抑えることで両病態の発生が抑制されることが推定されたため、第三章では、DM を自然発症する雄 WBN/Kob ラットおよび AL 投与により DM 期間を延長させた雄 WBN/Kob ラットを用い、それぞれインスリン治

療を行い，治療を行わない雄 WBN/Kob ラットとの比較のもとに歯牙および歯周組織における炎症状態を比較解析した．DM を自然発症した雄 WBN/Kob ラットの無処置 DM 群 (intact 群)，DM を自然発症したラットにインスリン治療を行った群 (INS 群)，DM 自然発症前のラットに AL を投与して DM 期間を延長した群 (AL 群)，DM 期間を AL 投与で延長した動物にインスリン治療を行った群 (AL+INS 群) の計 4 群を構成した．AL は，DM 自然発症前の 15 週齢時に静脈内に単回投与した．インスリン治療については，DM 発症から 3 週間後にインスリンペレットを皮下に埋め込み血糖値を抑制した．いずれの動物も 90 週齢時に安楽死剖検し，上下顎全臼歯の ABR および齶蝕について軟 X 線写真を用いた観察を行った後，病理組織学的検査を実施した．その結果，intact 群では，齶蝕と連続する歯周炎がしばしば観察され，DM 期間を延長した AL 群では，更に DM 期間の延長に伴って両病変は明らかに増強した．一方，血糖値の上昇を抑制した INS 群では，インスリン投与による血糖コントロールは齶蝕および歯周炎発症の頻度・程度を明らかに抑制し，AL+INS 群では，インスリン投与による血糖コントロールは齶蝕および歯周炎発症の抑制に著しい効果を示した．以上の結果から，DM ラットにおける血糖コントロールは齶蝕および歯周炎の発生を抑制することが明らかとなり，高血糖状態が齶蝕と齶蝕に関連した歯周炎に直接的に関与していることが示唆された．

第三章までの研究結果より，DM 齶歯類の歯周組織に誘発される炎症は，それに隣接する齶蝕歯牙の炎症が強く影響していることが明らかになった．しかしながら，DM 動物における高血糖状態が，DM 性の PD を誘発し，齶蝕によ

る炎症とともに混在している可能性も完全には否定できない。そこで、第四章では、DM ラット・マウスに F の飲水投与による齲蝕抑制を実施することにより、齲蝕関連性の歯周炎とは異なる DM 性の PD が潜在している可能性があるか否かを調べる目的で、F を投与した DM 動物の歯牙および歯周組織を、F を投与しない DM 動物のそれと形態学的に比較解析した。DM モデルとして AL を投与した F344 ラット（1 型 DM）および *db/db* マウス（2 型 DM）を用い、F 添加水あるいは通常水を飲水させた群をそれぞれ設定した。F344 ラットについては AL 投与後 13 週目、*db/db* マウスについては 30 週齢時に安楽死剖検し、上下顎の全臼歯の歯牙および歯周組織について軟 X 線写真による ABR および齲蝕の観察、ならびに病理組織学的検査を実施した。その結果、両 DM モデルともに F 投与は齲蝕発症を抑制するのみならず、ABR の発生を劇的に抑制した。更に、F 投与を行った DM 動物の少数例では齲蝕を抑制できず明瞭な齲蝕のプロセスが観察され、その齲蝕臼歯の周囲では歯周炎が観察された。これに対し、F 投与で齲蝕が抑制された大多数の DM 動物における正常臼歯の周囲では歯周病変は 1 例も検出されなかった。従って、齲蝕と全く病因の異なる本来の DM 性 PD は 1 型および 2 型 DM 齧歯類では発生しない可能性が高く、DM によって誘発された齲蝕由来の炎症のみが歯髄から根尖部の根尖孔を通じて歯周組織にまで拡散していると考えられた。

以上の研究より、齧歯類を用いた自然発症 DM モデルおよび薬物誘発 DM モデルでは、高血糖の持続により、齲蝕とともに骨吸収を伴う歯周炎が発生・悪化することが明らかになった。これら歯周組織の炎症は隣接する齲蝕臼歯の炎

症と密接に関連しており (Fig. 5-1A), 更に F で齶蝕抑制を行った DM 齶歯類の正常臼歯周囲には, 歯肉・歯周炎は誘発されないことも明瞭に示された

(Fig. 5-1B). これらのことから, DM 齶歯類モデルにみられる歯周病変は齶蝕に伴う病変であることが示唆された (Fig. 5-1C). 従って, DM 齶歯類モデルでは高血糖の持続のみでは PD は発症しない可能性が高いと考えられた.

ヒトの疫学的研究から DM が PD の危険因子であることは明らかになっており, DM と PD の関係を理解するために DM 性 PD モデルの確立は必須である. ヒトの PD は, 歯肉炎から始まり, その炎症が歯根膜に沿って歯根先端部へ進行し, ABR を伴う歯周炎に進行する病態である (Fig. 0-1A). 今回の齶蝕抑制 DM 齶歯類モデルでは, 長期間の高血糖にも関わらず歯肉炎の増悪には至らなかった (Fig. 5-1B). 齶歯類の歯肉に結紮糸装着, LPS 投与あるいは PD 原性細菌の歯肉接種を行うと, 歯肉炎から歯周炎に進行することを考慮すると (Fig. 5-1D), DM 性 PD の発生には高血糖の持続とともに, ある程度の閾値以上の歯肉に対する刺激が必要と考えられる.

更に, 本研究により, DM を自然発症する齶歯類の系統では, 元々の齶蝕感受性を DM が更に悪化させ, 薬物誘発による急激な血糖上昇は齶蝕感受性の低い系統でも重度の齶蝕を早期に発症させることが明らかになった. DM と齶蝕の関連性については, ヒトでも齶歯類でも議論の対象となっているが, DM が齶蝕誘発の危険因子であることは間違いない. DM 患者で齶蝕が増加する機序としては, 唾液や歯肉溝液中のグルコース濃度の上昇あるいは DM による唾液流量の減少によって, 齶蝕原性細菌がエナメル質や象牙質を脱灰する酸を産生

するための基質が増加することで、齲蝕のリスクが高まると考えられている

(Taylor et al. 2004). 従って、DM 齲齒類モデルでの PD 研究には、齲蝕抑制は必須であるが、従来の DM 齲齒類モデルでは齲蝕起因性の炎症についてほとんど解析されておらず、今後、齲蝕の抑制により歯牙の炎症が全く関与しない DM 性 PD モデルを作製する必要がある。近年、DM 患者が急増していることもあり、DM と PD の関係が注目されている。また、DM 性 PD の発症予防あるいは治療法の開発において、適切な DM 性 PD 齲齒類モデルを使用することが不可欠である。本研究の成果は、今後、齲齒類を用いて DM 性 PD 研究に取り組む際に、齲蝕の発生を慎重に管理しなければならない注意点を明らかにし、DM 性 PD の病態を解明する上で重要な指針となると考えられる。

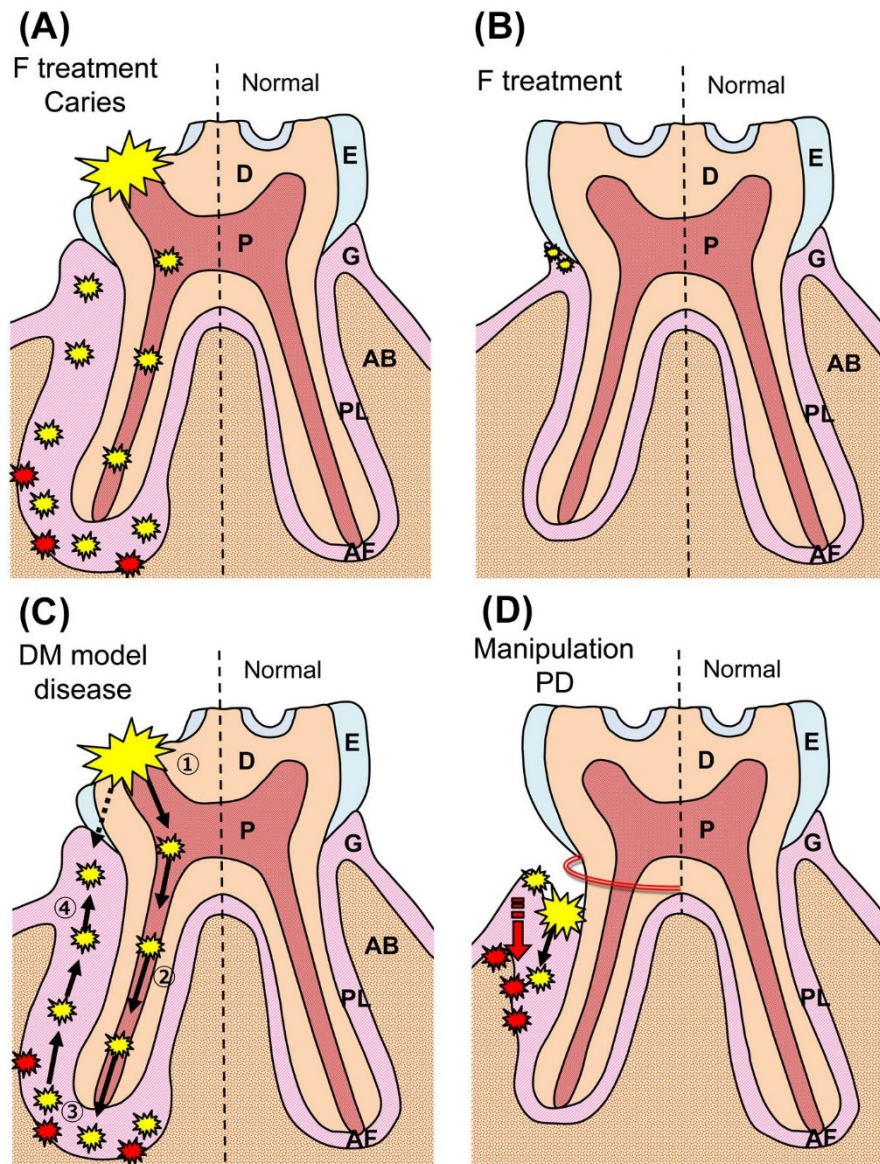


Figure 5- 1 Diagrammatic representation of the lesion process

(A) : DM げっ歯類モデルにおける齲蝕臼歯周囲の歯周炎。F投与で齲蝕を抑制できなかった齲蝕臼歯の周囲において、齲蝕病変と共に歯周炎が認められる。(B) : 非齲蝕臼歯周囲の歯周組織。F投与で齲蝕を抑制した正常臼歯周囲では歯周炎は認められない(生理的に存在する軽微な歯肉炎が認められるのみ)。(C) : げっ歯類モデルにおける齲蝕臼歯周囲の歯周炎形成過程の予想図。歯髓病変(1)まで発展した齲蝕の炎症は、歯冠部から歯根部歯髓へと波及し(2)、根尖孔を通じて根尖周囲の歯周組織に及び(3)、歯根周囲から辺縁歯周組織へ拡散する(4)。(D) : PD誘発処置を伴うヒトPD動物モデルにおけるPD形成過程。歯肉への結紮糸の装着、LPS投与あるいはPD原性細菌の歯肉接種等のPD誘発処置(赤二重線)を施すことにより、ヒトPD病態と同様に歯肉炎から歯周炎(歯根膜および歯槽骨の減退・喪失(赤矢印)を伴う)へと進行する。

D, 象牙質; P, 歯髓; E, エナメル質; G, 歯肉; AB, 歯槽骨; PL, 歯根膜; AF, 根尖孔。

謝辭

本稿を終えるに当たり、本研究の遂行においてご懇篤なるご指導およびご鞭撻を賜りました東京大学大学院農学生命科学研究科獣医病理学研究室 内田和幸 准教授，中山裕之 名誉教授に深甚なる感謝の意を表します。

本研究の機会を与えて頂きました摂南大学薬学部病理学教室 尾崎清和 教授，松浦哲郎 博士，奈良間功 博士に謹んで御礼申し上げます。また，多大なるご協力とご援助をいただいた広島国際大学薬学科病態薬物治療学教室 兒玉安史 准教授，武田薬品工業株式会社 佐野智弥 博士，株式会社LSIM 安全科学研究所 病理研究部のみなさまに感謝致します。

引用文献

Löe, H. (1993). Periodontal disease: the sixth complication of diabetes mellitus. *Diabetes care*, 16(1), 329-334.

Saini, R., Saini, S., & Sugandha, R. S. (2011).: Periodontal disease: The sixth complication of diabetes. *Journal of family and community medicine*, 18(1), 31.

Ong, G. (1998). Periodontal disease and tooth loss. *International dental journal*, 48(S3), 233-238.

Shlossman, M., Knowler, W. C., Pettitt, D. J., & Genco, R. J. (1990). Type 2 diabetes mellitus and periodontal disease. *The Journal of the American Dental Association*, 121(4), 532-536.

Emrich, L. J., Shlossman, M., & Genco, R. J. (1991). Periodontal disease in non - insulin - dependent diabetes mellitus. *Journal of periodontology*, 62(2), 123-131.

Cerda G, J., de la Torre, C. V., Malacara, J. M., & Nava, L. E. (1994). Periodontal Disease in Non - Insulin Dependent Diabetes Mellitus (NIDDM) The Effect of Age and Time Since Diagnosis. *Journal of periodontology*, 65(11), 991-995.

Tsai, C., Hayes, C., & Taylor, G. W. (2002). Glycemic control of type 2 diabetes and severe periodontal disease in the US adult population. *Community dentistry and oral epidemiology*, 30(3), 182-192.

Meenawat, A., Punn, K., Srivastava, V., Meenawat, A. S., Dolas, R. S., & Govila, V. (2013). Periodontal disease and type I diabetes mellitus: Associations with glycemic control and complications. *Journal of Indian Society of Periodontology*, 17(5), 597.

Genco, R. J., & Borgnakke, W. S. (2020). Diabetes as a potential risk for periodontitis:

association studies. *Periodontology* 2000, 83(1), 40–45.

Graves, D. T., Ding, Z., & Yang, Y. (2020). The impact of diabetes on periodontal diseases. *Periodontology* 2000, 82(1), 214–224.

Kaur, G., Holtfreter, B., Rathmann, W. G., Schwahn, C., Wallaschofski, H., Schipf, S., ... & Kocher, T. (2009). Association between type 1 and type 2 diabetes with periodontal disease and tooth loss. *Journal of clinical periodontology*, 36(9), 765-774.

Taylor, G. W., Manz, M. C., & Borgnakke, W. S. (2004). Diabetes, periodontal diseases, dental caries, and tooth loss: a review of the literature. *Compendium of continuing education in dentistry* (Jamesburg, NJ: 1995), 25(3), 179-84.

Twetman, S., Johansson, I., Birkhed, D., & Niderfors, T. (2002). Caries incidence in young type 1 diabetes mellitus patients in relation to metabolic control and caries-associated risk factors. *Caries research*, 36(1), 31-35.

Tagelsir, A., Cauwels, R., Van Aken, S., Vanobbergen, J., & Martens, L. C. (2011). Dental caries and dental care level (restorative index) in children with diabetes mellitus type 1. *International journal of paediatric dentistry*, 21(1), 13-22.

Canepari, P., Zerman, N., & Cavalleri, G. (1994). Lack of correlation between salivary *Streptococcus mutans* and lactobacilli counts and caries in IDDM children. *Minerva Stomatologica*, 43(11), 501-505.

Collin, H. L., Uusitupa, M., Niskanen, L., Koivisto, A. M., Markkanen, H., & Meurman, J. H. (1998). Caries in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology*, 85(6), 680-685.

Iughetti, L., Marino, R., Bertolani, M. F., & Bernasconi, S. (1999). Oral health in children and adolescents with IDDM-a review. *Journal of Pediatric Endocrinology and Metabolism*, 12(5), 603-610.

Hintao, J., Teanpaisan, R., Chongsuvivatwong, V., Dahlen, G., & Rattarasarn, C. (2007). Root surface and coronal caries in adults with type 2 diabetes mellitus. *Community dentistry and oral epidemiology*, 35(4), 302-309.

Borghelli, R. F., Devoto, F. C., Foglia, V. G., & Erasquin, J. (1966). Dental caries in diabetic and prediabetic rats. *Journal of dental research*, 45(4), 1105-1110.

Hartles, R. L., & Lawton, F. E. (1958). Experimental dental caries in the albino rat. The effect of single subcutaneous injections of alloxan on the incidence of dental caries. *British Journal of Nutrition*, 12(3), 286-292.

Nichols, M. S., & Shaw, J. H. (1957). The effect of alloxan diabetes on caries incidence in the albino rat. *Journal of dental research*, 36(1), 68-74.

Reich, E., Lussi, A., & Newbrun, E. (1999). Caries - risk assessment. *International dental journal*, 49(1), 15-26.

Pihlstrom, B. L., Michalowicz, B. S., & Johnson, N. W. (2005). Periodontal diseases. *The lancet*, 366(9499), 1809-1820.

Schou, S., Holmstrup, P., & Kornman, K. S. (1993). Non-human primates used in studies of periodontal disease pathogenesis: a review of the literature. *Journal of periodontology*, 64(6), 497-508.

Madden, T. E., & Caton, J. G. (1994). Animal models for periodontal disease. *Methods*

in enzymology, 235, 106-119.

Haney, J. M., Zimmerman, G. J., & Wikesjö, U. M. (1995). Periodontal repair in dogs: evaluation of the natural disease model. *Journal of Clinical Periodontology*, 22(3), 208-213.

Lindhe, J., and Ericsson, I. (1978). Effect of ligature placement and dental plaque on periodontal tissue breakdown in the dog. *Journal of periodontology*, 49(7), 343-350.

Lindhe, J. and Svanberg, G. (1974). Influence of trauma from occlusion on progression of experimental periodontitis in the beagle dog. *Journal of Clinical Periodontology*, 1(1), 3-14.

Reddy, M. S., Weatherford III, T. W., Smith, C. A., West, B. D., Jeffcoat, M. K., & Jacks, T. M. (1995). Alendronate treatment of naturally - occurring periodontitis in beagle dogs. *Journal of Periodontology*, 66(3), 211-217.

Struillou, X., Boutigny, H., Soueidan, A., & Layrolle, P. (2010). Experimental animal models in periodontology: a review. *The open dentistry journal*, 4, 37.

Breivik, T., Opstad, P. K., Gjermo, P., & Thrane, P. S. (2000). Effects of hypothalamic - pituitary - adrenal axis reactivity on periodontal tissue destruction in rats. *European journal of oral sciences*, 108(2), 115-122.

Nakajima, K., Hamada, N., Takahashi, Y., Sasaguri, K., Tsukinoki, K., Umemoto, T., & Sato, S. (2006). Restraint stress enhances alveolar bone loss in an experimental rat model. *Journal of periodontal research*, 41(6), 527-534.

Evans, R. T., Klausen, B., Ramamurthy, N. S., Golub, L. M., Sfintescu, C., & Genco, R.

- J. (1992). Periodontopathic potential of two strains of *Porphyromonas gingivalis* in gnotobiotic rats. *Archives of oral biology*, 37(10), 813-819.
- Klausen, B., Sfintescu, C., & Evans, R. T. (1991). Asymmetry in periodontal bone loss of gnotobiotic Sprague-Dawley rats. *Archives of oral biology*, 36(9), 685-687.
- Jiang, H., Li, Y., Ye, C., Wu, W., Liao, G., Lu, Y., & Huang, P. (2018). Changes in advanced glycation end products, beta-defensin-3, and interleukin-17 during diabetic periodontitis development in rhesus monkeys. *Experimental Biology and Medicine*, 243(8), 684-694.
- Javed, F., Al - Daghri, N. M., Wang, H. L., Wang, C. Y., & Al - Hezaimi, K. (2014). Short - term effects of non - surgical periodontal treatment on the gingival crevicular fluid cytokine profiles in sites with induced periodontal defects: a study on dogs with and without streptozotocin - induced diabetes. *Journal of periodontology*, 85(11), 1589-1595.
- He, H., Liu, R., Desta, T., Leone, C., Gerstenfeld, L. C., & Graves, D. T. (2004). Diabetes causes decreased osteoclastogenesis, reduced bone formation, and enhanced apoptosis of osteoblastic cells in bacteria stimulated bone loss. *Endocrinology*, 145(1), 447-452.
- Holzhausen, M., Garcia, D. F., Pepato, M. T., & Marcantonio Jr, E. (2004). The influence of short - term diabetes mellitus and insulin therapy on alveolar bone loss in rats. *Journal of periodontal research*, 39(3), 188-193.
- Lalla, E., Lamster, I. B., Feit, M., Huang, L., & Schmidt, A. M. (1998). A murine model of accelerated periodontal disease in diabetes. *Journal of periodontal research*, 33(7), 387-399.

Liu, R., Bal, H. S., Desta, T., Krothapalli, N., Alyassi, M., Luan, Q., & Graves, D. T. (2006). Diabetes enhances periodontal bone loss through enhanced resorption and diminished bone formation. *Journal of dental research*, 85(6), 510-514.

Pontes Andersen, C. C., Buschard, K., Flyvbjerg, A., Stoltze, K., & Holmstrup, P. (2006). Periodontitis deteriorates metabolic control in type 2 diabetic Goto - Kakizaki rats. *Journal of periodontology*, 77(3), 350-356.

Mahamed, D. A., Marleau, A., Alnaeeli, M., Singh, B., Zhang, X., Penninger, J. M., & Teng, Y. T. A. (2005). G (-) Anaerobes- Reactive CD4+ T-Cells Trigger RANKL-Mediated Enhanced Alveolar Bone Loss in Diabetic NOD Mice. *Diabetes*, 54(5), 1477-1486.

Watanabe, K., Petro, B. J., Shlimon, A. E., & Unterman, T. G. (2008). Effect of periodontitis on insulin resistance and the onset of type 2 diabetes mellitus in Zucker diabetic fatty rats. *Journal of periodontology*, 79(7), 1208-1216.

Kador, P. F., Hamada, T., Reinhardt, R. A., & Blessing, K. (2010). Effect of an aldose reductase inhibitor on alveolar bone loss associated with periodontitis in diabetic rats. *Postgraduate medicine*, 122(3), 138-144.

Claudino, M., Ceolin, D. S., Alberti, S., Cestari, T. M., Spadella, C. T., Rubira-Bullen, I. R. F., ... & de Assis, G. F. (2007). Alloxan-induced diabetes triggers the development of periodontal disease in rats. *PloS one*, 2(12), e1320.

Claudino, M., Gennaro, G., Cestari, T. M., Spadella, C. T., Garlet, G. P., & Assis, G. F. (2012). Spontaneous periodontitis development in diabetic rats involves an unrestricted expression of inflammatory cytokines and tissue destructive factors in the absence of

major changes in commensal oral microbiota. *Experimental diabetes research*, 2012.

Fukuzato, Y., Matsuura, T., Ozaki, K., Matsuura, M., Sano, T., Nakahara, Y., ... & Narama, I. (2009). Morphological study on dental caries induced in WBN/KobSlc rats (*Rattus norvegicus*) fed a standard laboratory diet. *Laboratory animals*, 43(4), 376-381.

Sano, T., Matsuura, T., Ozaki, K., & Narama, I. (2011). Dental caries and caries-related periodontitis in type 2 diabetic mice. *Veterinary pathology*, 48(2), 506-512.

Pontes Andersen, C. C., Flyvbjerg, A., Buschard, K., & Holmstrup, P. (2007). Relationship between periodontitis and diabetes: lessons from rodent studies. *Journal of periodontology*, 78(7), 1264-1275.

Kobori, O., Gedigk, P., & Totović, V. (1977). Adenomatous changes and adenocarcinoma of glandular stomach in Wistar rats induced by N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine. *Virchows Archiv A*, 373(1), 37-54.

Nakama, K., Shichinohe, K., Kobayashi, K., Naito, K., Uchida, O., Yasuhara, K., & Tobe, M. (1985). Spontaneous diabetes-like syndrome in WBN/Kob rats. *Acta diabetologia latina*, 22(4), 335-342.

Tsuchitani, M., Saegusa, T., Narama, I., Nishikawa, T., & Gonda, T. (1985). A new diabetic strain of rat (WBN/Kob). *Laboratory animals*, 19(3), 200-207.

Sano, T., Ozaki, K., Kodama, Y., Matsuura, T., & Narama, I. (2009a). Paradoxical effects of a selective cyclooxygenase-2 inhibitor, etodolac, on proliferative changes of forestomach in alloxan-induced diabetic rats. *Experimental and Toxicologic Pathology*, 61(4), 371-380.

Sano, T., Ozaki, K., Kodama, Y., Matsuura, T., & Narama, I. (2009b). Prevention of proliferative changes of forestomach mucosa by blood glucose control with insulin in alloxan - induced diabetic rats. *Cancer science*, 100(4), 595-600.

Sano, T., Ozaki, K., Kodama, Y., Matsuura, T., & Narama, I. (2009c). Effects of the antifungal agent itraconazole on proliferative changes of the forestomach mucosa in alloxan-induced diabetic rats. *Toxicologic pathology*, 37(6), 790-798.

Moore, P. A., Guggenheimer, J., Etzel, K. R., Weyant, R. J., & Orchard, T. (2001). Type 1 diabetes mellitus, xerostomia, and salivary flow rates. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology*, 92(3), 281-291.

McNamara, T. F., Ramamurthy, N. S., Mulvihill, J. E., & Golub, L. M. (1982). The development of an altered gingival crevicular microflora in the alloxan-diabetic rat. *Archives of oral biology*, 27(3), 217-223.

Nagy, A., Nagashima, H., Cha, S., Oxford, G. E., Zelles, T., Peck, A. B., & Humphreys-Beher, M. G. (2001). Reduced oral wound healing in the NOD mouse model for type 1 autoimmune diabetes and its reversal by epidermal growth factor supplementation. *Diabetes*, 50(9), 2100-2104.

Belazi, M. A., Galli - Tsinopoulou, A., Drakoulakos, D., Fleva, A., & Papanayiotou, P. H. (1998). Salivary alterations in insulin - dependent diabetes mellitus. *International journal of paediatric dentistry*, 8(1), 29-33.

Mahay, S., Adeghate, E., Lindley, M. Z., Rolph, C. E., & Singh, J. (2004). Streptozotocin-induced type 1 diabetes mellitus alters the morphology, secretory function and acyl lipid

contents in the isolated rat parotid salivary gland. *Molecular and cellular biochemistry*, 261(1), 175-181.

Mata, A. D., Marques, D., Rocha, S., Francisco, H., Santos, C., Mesquita, M. F., & Singh, J. (2004). Effects of diabetes mellitus on salivary secretion and its composition in the human. *Molecular and cellular biochemistry*, 261(1), 137-142.

Lee, S. M., & Bressler, R. (1981). Prevention of diabetic nephropathy by diet control in the db/db mouse. *Diabetes*, 30(2), 106-111.

Tesseromatis, C., Kotsiou, A., Parara, H., Vairaktaris, E., & Tsamouri, M. (2009). Morphological changes of gingiva in streptozotocin diabetic rats. *International journal of dentistry*, 2009.

Sentochnik, D. E., and Eliopoulos, G. M. (2005). Infection and diabetes. In Joslin's *Diabetes Mellitus* (C. R. Kahn, G. C. Weir, G. L. King, A. M. Jacobson, A. C. Moses, and R. J. Smith, eds.), pp. 1017–33. Lippincott Williams & Wilkins, Boston, MA.

Saiki, O., Negoro, S., Tsuyuguchi, I., & Yamamura, Y. (1980). Depressed immunological defence mechanisms in mice with experimentally induced diabetes. *Infection and immunity*, 28(1), 127-131.

Lewis, K. S., Kane-Gill, S. L., Bobek, M. B., & Dasta, J. F. (2004). Intensive insulin therapy for critically III patients. *Annals of Pharmacotherapy*, 38(7-8), 1243-1251.

Tanzer, J. M. (1995). Dental caries is a transmissible infectious disease: the Keyes and Fitzgerald revolution. *Journal of Dental Research*, 74(9), 1536-1542.

Basavaraj, P., Chandrasheker, K. T., & Khuller, N. (2010). Periodontic-Endodontic

Interrelationship—A Review. *J Oral Health Community Dent*, 4, 4-6.

Shenoy, N., & Shenoy, A. (2010). Endo-perio lesions: Diagnosis and clinical considerations. *Indian Journal of Dental Research*, 21(4), 579.

Armada-Dias, L., Breda, J., Provenzano, J. C., Breitenbach, M., Rôças, I. D. N., Gahyva, S. M. M., & Siqueira Junior, J. F. (2006). Development of periradicular lesions in normal and diabetic rats. *Journal of Applied Oral Science*, 14(5), 371-375.

Kohsaka, T., Kumazawa, M., Yamasaki, M., & Nakamura, H. (1996). Periapical lesions in rats with streptozotocin-induced diabetes. *Journal of endodontics*, 22(8), 418-421.

Regolati, B. (1975). Studies on intermittent fluoride administration. *Helvetica odontologica acta*, 19, 95-130.

Larson, R. H., Mellberg, J. R., Englander, H. R., & Senning, R. (1976). Caries inhibition in the rat by water-borne and enamel-bound fluoride. *Caries research*, 10(5), 321-331.

Featherstone, J. D. (1999). Prevention and reversal of dental caries: role of low level fluoride. *Community dentistry and oral epidemiology*, 27(1), 31-40.