

Streptozocin (STZ) 誘導糖尿病ラットにおける歯周病悪化のメカニズム

Aggravation of Periodontitis in Streptozocin-Diabetic Rats

西川 徹

キーワード： 歯周病，糖尿病，一酸化窒素，ニトロチロシン



(にしかわ・とおる)
ICDフェロー
歯科医師

I. 緒言

歯周病は、歯周ポケット内に存在する細菌の感染によって歯周組織が破壊される炎症性疾患である。う蝕とともに歯科における2大疾患とされる歯周病は、特にグラム陰性嫌気性菌である歯周病原細菌や、その代謝産物と生体細胞との相互作用により、炎症反応が亢進する結果、歯肉の炎症や歯槽骨の吸収が進行する。症状が重篤化すると歯は動揺し、支持を失った歯は脱落する。歯周病の進展には炎症性因子や外傷性因子といった局所要因、種々の全的要因、環境的要因などが関与していることが考えられる。近年、全的要因の1つと考えられる糖尿病などの生活習慣病は、疫学を中心に追及され、歯周病と密接に関係していることが明らかにされつつある。

糖尿病はインスリンの作用不足による慢性の高血糖状態を主徴とする代謝疾患群である。現在、糖尿病は益々増加し、我が国における患者数は約890万人、予備群を含めると2000万人を超え、40歳以上の3人に1人が糖尿病あるいはその予備群となっている。合併症も深刻で、糖尿病腎症が原因の透析導入患者数は年間1万6000人に達するなど、様々な背景の下、国も糖尿病対策を疾病対策の中心にすえている。糖尿病合併症は、高度のインスリン作用不足によって起こる急性合併症と、長年の高血糖によって起こる慢性合併症に分類される。歯周病は糖尿病の重大な慢性合併症の1つであり、糖尿病における高血糖状態の持続に起因する好中球の機能不全、コラーゲン合成阻害、歯根膜線維芽細胞の機能異常、終末糖化産物などによる炎症性組織破壊、微小循環障害、過剰な免疫反応などが歯周組織に影響を与え、歯周病を増悪させると考えられている。健常人に比較し、1型および2型糖尿病患者では歯周病の発症率が高く、重症であることが示されている^{3,4)}。Grossiらは、2型糖尿病に罹患したピマ・インディアンを母集団として介入試験を行った。その結果、抗菌薬（ドキシサイクリン）を投与し、歯周治療を行った群では、HbA1c値が1%減少することが示された⁵⁾。日本においても歯周病に罹患した2型糖尿病患者を対象として介入試験が行われている。局所抗菌薬の投与を併用し、歯周病治療を行った群では、

TNF- α の産生量が減少し、インスリン抵抗性が改善することが報告されている⁶⁾。これらより、歯周病が糖尿病の病態悪化になんらかの影響を与えることが示唆される。さらに、歯周病は局所の感染にとどまらず、軽微な慢性炎症として糖尿病の病態に影響を及ぼす可能性が示唆されている⁷⁾。歯周病患者は、絶えず歯周病原細菌が血中に入り込み、単球を活性化し、その単球が体内循環を介して脂肪組織に集積する。その結果、脂肪組織中でTNF- α 産生量が亢進するとともに、IL-6が産生される。TNF- α は肝細胞や脂肪細胞におけるインスリン抵抗性に、IL-6は門脈に流入して、肝細胞からのCRP産生に関与していると考えられている。このように歯周病と糖尿病は双方向性を持っており⁸⁾、不良な血糖コントロールは歯周病を悪化させ、重度の歯周病は糖尿病患者における血糖コントロールに悪影響を及ぼす。そのため、糖尿病患者における歯周病の予防は、良好な血糖コントロールや口腔内の健康の維持のためにも重要である。

一酸化窒素合成酵素 (nitric oxide synthase : NOS) によってL-アルギニンから合成されたnitric oxide (NO) は反応性のガス状メディエーターであり、感染や炎症性反応に関わる。細胞における炎症性メディエーターである誘導型NOS (inducible NOS : iNOS) は細菌感染したマクロファージなどの免疫担当細胞によって産生され、iNOSの誘導は細菌のLPS、炎症性サイトカイン (IFN- γ , IL-1, TNF- α など)、免疫系 (マクロファージや白血球) に反応してNOを産生する。大量に産生されたNOは、直接細胞障害もしくは細胞増殖抑制性反応を経て有害な効果を発揮する。iNOSはほとんどの炎症状態のもとで発現しており、歯周病を発症している歯周組織において増加することが報告されている⁹⁾。NOは血管の調節や血小板凝集の抑制のような生物学的機能において重要な役割を果たすが、同時に高い反応性を有したフリーラジカルであり、過剰な存在はパーオキシナイトライトを産生し、ニトロ化反応により直接細胞障害を惹起することが知られている^{10~13)}。糖尿病患者では網膜、腎臓、末梢神経、心臓など様々な組織においてニトロ化反応産物であるニトロチロシンの増加が認められる^{14~16)}。

今回、糖尿病における歯周病悪化のメカニズムを明

らかにすることを目的に、Streptozocin (STZ) 誘導糖尿病ラットに、実験的歯周炎を惹起し、NO経路を中心に検討した。その結果、糖尿病ラットでは、炎症反応が亢進し、ニトロチロシンが増加していることが明らかとなった。こうした事実は、糖尿病における歯周病の悪化に、ニトロ化ストレスの関与を示唆するものである。

II. 実験材料および方法

1. 実験動物および実験方法

実験動物には5週齢雄性、Sprague-Dawley (SD) ラットを用いた。すべてのラットは、温度 (23 \pm 1.0 $^{\circ}$ C)、湿度 (45 \pm 10%) とともに一定の恒温動物室で、12時間の明暗周期の環境下で、飲料水は水道水を自動供給装置によって与えた。糖尿病はSTZ (60mg/kg) を腹腔内投与し誘導した。STZ投与1週間後に血糖値を測定し、200mg/dl以上のラットを糖尿病ラットとして用いた。

2. 歯周病の誘導

STZ投与2週間後に歯周炎を惹起させる目的で、すべてのラットに以下の処置を行った。ジエチルエーテル全身麻酔下で、上顎右側第二臼歯 (M2) の歯頸部に出来るだけ歯肉に損傷を与えないように縫合用ナイロン糸 (3-0 Surgilon) を全周に巻いて近心口蓋で結紮し、実験側とした (Fig.1)。また、同部反対側のM2は無処置で対照側とした¹⁷⁾。

3. 歯肉における組織血流の測定

歯肉組織における血流はLaser Doppler Blood Flow Meter (FLO-N1, Omega Wave Inc, Tokyo, Japan) を用

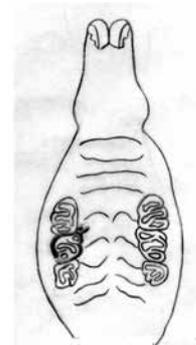


Fig. 1 実験的歯周炎

上顎右側第二臼歯の歯頸部に糸を結紮することにより、実験的歯周炎を惹起させた。右側を実験側、反対側を無処置で対照側とした

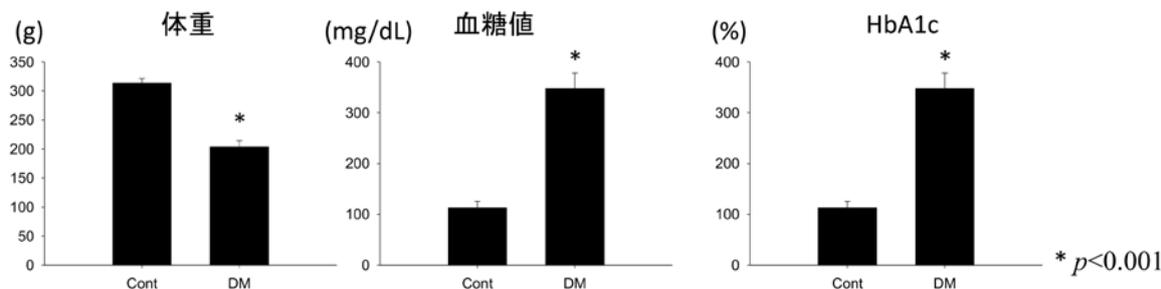


Fig. 2 実験終了時のラットの体重、血糖値、HbA1c

いて測定した。ラットはペントバルビタール (0.5mg/Kg) を腹腔内投与し、レーザープローブを実験側および対照側M2の頬側歯肉の直上に固定し測定した。全ての計測は直腸温を37°Cに維持するために室温25°C、ヒートパッド上で行った。

4. 組織採取

実験的歯周炎作成2週間後に、正常ラット、糖尿病ラットともにペントバルビタール投与 (1.5mg/kg) により屠殺した。遺伝子解析用にM2頬側歯肉を採取し、液体窒素で急速に凍結させ、-80°Cに保った。

5. 歯肉における遺伝子発現

頬側歯肉のtotal RNAは、TRIzol Reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA) を用い、抽出した。Total RNAより、通法に従いSuperscript III RNase H-Reverse Transcriptase (Toyobo, Osaka, Japan) を用いてcDNAを合成した。TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA) およびTaqMan probe (Applied Biosystems) を用い、既法に従い95°C 1分、52°C 1分、72°C 30秒、40サイクルの反応を、ABI Prism 7000 (Applied Biosystems) にて行った。データ解析はCt値の差から相対定量を行う $\Delta\Delta Ct$ 法を用いて行った。内在性コントロールとしてGAPDH特異的プローブ、プライマーを用い¹⁸⁾、TNF- α およびiNOSの遺伝子発現について検討した。

6. 組織学的解析

両側上顎を10%ホルマリン溶液に24時間固定し、その後水洗を行い、液体窒素、イソペンタンを用いて、川本法 (未脱灰凍結切片作成法) に従い専用の包埋剤 (SCEM) で包埋し、切片支持用粘着フィルム (Cryofilm type I)、専用封入剤 (SCMM-R2) を使用し、M2を頬舌方向に、厚さ5 μ で連続組織切片を作製した¹⁹⁾。組織切片はヘマトキシリン・エオジン (H・E) 染色、ニトロクロシン

抗体 (abcam, Cambridge, UK) により免疫組織染色を行った後、光学顕微鏡で観察した。

7. 統計学的解析

全ての値は、平均値 \pm 標準誤差で表し、統計学的解析はone-way ANOVA (Bonferroni correction) を用いて統計学的に検討し、危険率は $p < 0.05$ をもって有意とした。

Ⅲ. 結果

1. 体重、血糖値、HbA1c、血液データ

糖尿病ラットは正常ラットに比較し有意な体重減少を示した (糖尿病群: 222.5 ± 15.5 g、正常群: 313.4 ± 8.1 g、 $p < 0.001$)。

糖尿病ラットは正常ラットに比較し、有意な血糖値およびHbA1c値の上昇を認めた (血糖値: 糖尿病群: 348.0 ± 30.0 mg/dL、正常群: 113.3 ± 12.3 mg/dL、 $p < 0.001$ 。HbA1c: 糖尿病群: 8.0 ± 0.2 %、正常群: 4.1 ± 0.1 %、 $p < 0.001$) (Fig.2)。

白血球数、赤血球数、ヘマトクリット値は両群において、有意差を認めなかった (Table.1)。

2. 歯肉組織血流

糖尿病ラット対照側における血流は正常ラットの対照側に比較し、有意に低下していた (糖尿病群: 9.2 ± 0.7 ml/min/100gtissue、正常群: 13.7 ± 1.0 ml/min/100gtissue、 $p < 0.05$)。歯周炎の惹起は、正常ラット、糖尿病ラットともに対照側に比較し、有意に歯肉組織血流を増加させた (糖尿病群: 18.4 ± 1.1 ml/min/100gtissue、 $p < 0.001$ 。正常群: 18.4 ± 0.8 ml/min/100gtissue)。

Table 1 実験終了時の白血球数、赤血球数、ヘマトクリット値

	正常ラット	糖尿病ラット
白血球数 ($/\mu$ L)	6620 ± 336.7	5433 ± 541.6
赤血球数 ($\times 10000/\mu$ L)	828.0 ± 23.8	850.4 ± 17.7
ヘマトクリット値 (%)	52.5 ± 0.8	56.3 ± 1.3

Table 2 歯肉組織における血流値

歯肉血流 (ml/min/100g tissue)	正常ラット		糖尿病ラット	
	対照側	実験側	対照側	実験側
	13.7±1.0	18.4±0.8 ^b	9.2±0.7 ^a	18.4±1.1 ^c

^ap<0.05 v.s 正常ラット対照側、^bp<0.05 v.s 正常ラット対照側、^cp<0.001 v.s 糖尿病ラット対照側

min/100gtissue、p<0.05) (Table.2)。

3. 歯肉におけるTNF-αおよびiNOS遺伝子発現

正常ラットにおいて、歯周炎の惹起は対照側に比較し、3.4倍の有意なiNOS遺伝子発現の増加を認めた (p<0.01)。TNF-αには増加傾向は認めるものの、有意差は認められなかった。糖尿病ラットでは、歯周炎の惹起は対照側に比較し、TNF-αおよびiNOSともにそれぞれ3.6倍 (p<0.01)、7.9倍 (p<0.01) の有意な増加を認めた。正常ラットおよび糖尿病ラットの実験側で比較した場合、TNF-αとiNOS遺伝子発現は、糖尿病ラットにおいて有意に高く、それぞれ5.2倍、3.8倍の有意な増加を示した (p<0.01,p<0.05) (Fig.3)。

4. 組織学的所見

正常ラットの対照側では、炎症性細胞浸潤は認められないが、歯周炎の惹起により多少の炎症性細胞浸潤を認める。糖尿病ラットでは、歯周炎を惹起することにより、著明な炎症性細胞浸潤の増加を認めた (Fig.4)。

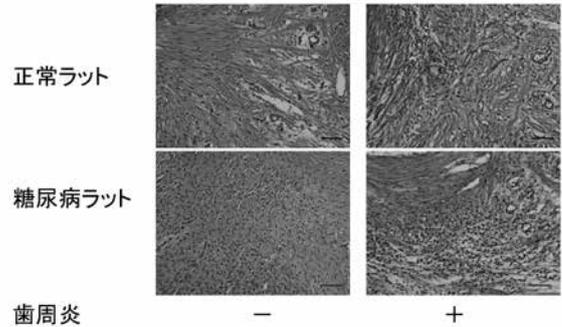


Fig. 4 歯周組織の組織学的評価
ヘマトキシリン・エオジン染色 Bar = 50 μm

5. 歯肉におけるニトロチロシンの発現

糖尿病ラットでは対照側においても、正常ラットの対照側に比較し、歯肉におけるニトロチロシン陽性細胞数は有意に増加していた (p<0.001)。歯周炎惹起により正常ラット、糖尿病ラットともにニトロチロシン陽性細胞数は有意に増加したが (p<0.001)、糖尿病ラットでは、正常ラットに比較し、約3.7倍の著明な増加を認めた。 (p<0.001) (Fig.5, Table.3)。

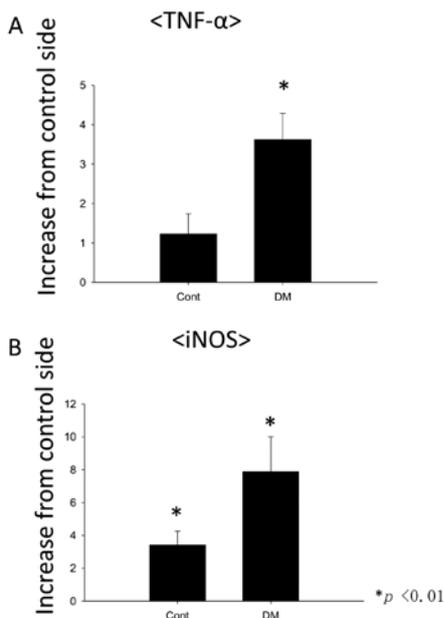


Fig. 3 歯肉組織のTNF-αおよびiNOSの遺伝子発現
A：歯肉におけるTNF-αの遺伝子発現
B：歯肉におけるiNOSの遺伝子発現

Table 3 ニトロチロシン陽性細胞数

ニトロチロシン陽性細胞数	正常ラット		糖尿病ラット	
	対照側	実験側	対照側	実験側
	0.4±0.2	7.9±1.6 ^b	2.1±0.9 ^a	29.1±4.3 ^c

^ap<0.001 v.s 正常ラット対照側、^bp<0.001 v.s 正常ラット対照側、^cp<0.001 v.s 糖尿病ラット対照側

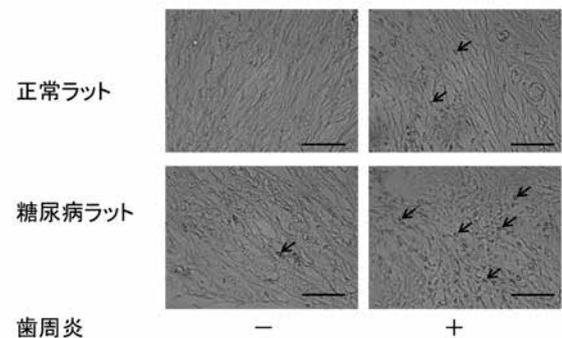


Fig. 5 免疫組織学的染色(ニトロチロシン)Bar = 50 μm
(←) ニトロチロシン陽性細胞

IV. 考 察

本研究により、糖尿病ラットにおいて、正常状態より歯肉の血流が低下していること、また、ひとたび歯周炎が惹起されると、TNF- α 、iNOSといった炎症反応メディエーターの遺伝子発現が著増し、その結果、過剰なNO産生を介したニトロ化ストレスが増加することが明らかとなった。

歯周病と糖尿病の関連は多くの疫学研究や臨床研究がなされ²⁰⁾、歯周病の罹患率や重症度は1型、2型糖尿病患者において増加していることが明らかとされている^{4, 8, 21)}。高血糖が口渴を引き起こし、口腔内の自浄作用を低下させること、歯周病原性細菌が繁殖しやすいこと、白血球の機能低下を招くこと、組織修復力を低下させることなどが、糖尿病患者における歯周病悪化の原因とされてきた。しかしながら、正確なメカニズムは解明されておらず、損傷した好中球の走化性²¹⁾、歯肉溝浸出液におけるグルコース濃度の増加²²⁾、終末糖化産物の生成^{23, 24)}などが考えられている。

今回、本研究に用いたナイロン糸を挿入し、結紮する実験的歯周炎は、プラークの停滞を引き起こし、自然に歯周病を発症する方法に極めて近い動物モデルである²⁵⁾。急性炎症は2日ほどで現れ、その後放置することにより、慢性炎症に移行し、最終的には骨吸収を引き起こす。歯周病の状態は結紮後、慢性炎症に移行したと思われる2週間で評価した。iNOS遺伝子発現は、糖尿病ラットの実験側で著しく増加した。Lohinaiらは、選択的iNOS抑制剤が、ラットにおける実験的歯周炎の骨吸収を改善することを報告した⁹⁾。NOは口腔領域の病変を含めた生物学的過程において広範囲に関連している²⁶⁾。低レベルのNOは組織の恒常性において重要であるが、iNOSの発現上昇は炎症刺激の結果であり、NOを大量に産生する²⁷⁾。NOは高い反応性のフリーラジカルであり、大量のNOは細胞障害を起こし、パーオキシナイトライトなどのヒドロキシラジカルを介してニトロチロシンを産生する。パーオキシナイトライトは、糖尿病ラットにおいて、末梢神経、心臓、脈管構造、網膜など様々な組織で増加しており、組織障害を引き起こすことが報告されて

いる^{28, 29)}。本研究では、糖尿病ラットの実験側において、歯肉組織におけるニトロチロシン陽性細胞数の増加を確認した。これらの結果は、糖尿病を伴う歯周病において、ニトロ化ストレスが重要な役割を果たしていることを示唆している。

糖尿病における微小循環障害は、皮膚、神経、網膜など多くの組織に観察され、糖尿病合併症の病変形成に関与する^{30~33)}。糖尿病網膜症、糖尿病腎症、糖尿病神経障害の3大合併症は高血糖状態の持続に起因する細小血管障害が本態である。細小血管障害は、この3臓器に限ったことではなく全身のすべての細小血管で起こっており、糖尿病状態では、皮膚や胃粘膜などにおける組織血流の低下が報告されている^{34, 35)}。細小血管を支持する基底膜の変化については、網膜や糸球体の細小血管において詳細な検討がなされ、基底膜は慢性高血糖下においては、肥厚および構成成分の変化が報告されている³⁶⁾。高血糖下、あるいは初期の細小血管合併症を伴う血管において、様々な凝固・線溶系異常が報告されているが、その中でもvon Willebrand因子は高血糖そのものに伴う内皮細胞障害により上昇することが報告されている³⁷⁾。また、糖尿病網膜症の初期には、病理学的異常が観察される前から血管透過性の亢進がみられ、これに関わる血管内皮細胞および周皮細胞の機能異常も重要と考えられている^{38, 39)}。さらに、糖尿病患者の血液中には様々なレベルで血管作用性のホルモンの変化が観察されている。糖尿病腎症はその発症前から腎血流量の上昇が観察され、これに心房性ナトリウム利尿ペプチドの関与が想定されている⁴⁰⁾。内皮細胞のカルシウムやアセチルコリンに対する反応性の低下や各種血管収縮ホルモンの異常も報告されている。レニン-アンジオテンシン系による血流異常⁴¹⁾、細胞増殖作用⁴²⁾や、糖尿病患者におけるエンドセリン-1活性の上昇⁴³⁾などである。しかし、これまでに糖尿病状態の歯肉組織血流についての報告はない。本研究の結果は、歯肉における血流が糖尿病ラットにおいて減少するということが明らかにした。上述の糖尿病性細小血管症にみられる基底膜の変化、血管凝固系の異常、血管透過性の異常、血管伸展性と血流異常が糖尿病状態の歯肉組織に複合し、関与していることが考えられる。歯肉血流の回復

は糖尿病患者において歯周病の治療目標の一つとなる可能性を示唆しているが、今後さらなる検討が必要である。

V. まとめ

本研究では、糖尿病に歯周炎を惹起させることによりニトロチロシンが歯周組織において著明に増加することを確認し、ニトロ化ストレスが糖尿病状態の歯周炎の悪化に大きな影響を与える可能性を示唆した。また、糖尿病ラットの歯肉血流が低下していることも明らかになった。これらの現象は他の糖尿病合併症と同様であり^{28, 4)}、糖尿病における歯周炎の進展にニトロ化ストレスが関与している機序を示唆するとともに、ニトロ化ストレスの抑制が、糖尿病に伴う歯周炎の治療戦略となる可能性を提示している。

参考文献

- 1) Haffajee AD, Socransky SS : Microbial etiological agents of destructive periodontal diseases. *Periodontol* 2000 ; 5 : 78-111, 1994.
- 2) Salvi GE, Lang NP : Host response modulation in the management of periodontal diseases. *J Clin Periodontol* ; 32 (Suppl 6) : 108-129, 2005.
- 3) Loe H : Periodontal disease. The sixth complication of diabetes mellitus. *Diabetes Care* ; 16 : 329-334, 1993.
- 4) Nelson RG, Shlossman M, Budding LM, Pettitt DJ, Saad MF, Genco RJ, Knowler WC : Periodontal disease and NIDDM in Pima Indians. *Diabetes Care* ; 13 : 836-840, 1990.
- 5) Grossi SG, Skrepinski FB, DeCaro T, Robertson DC, Ho AW, Dunford RG, Genco RJ : Treatment of periodontal disease in diabetics reduces glycosylated hemoglobin. *J Periodontol* ; 68 : 713-719, 1997.
- 6) Iwamoto Y, Nishimura F, Nakagawa M, Sugimoto H, Shikata K, Makino H, Fukuda T, Tsuji T, Iwamoto M, Murayama Y : The effect of antimicrobial periodontal treatment on circulating tumor necrosis factor-alpha and glycosylated hemoglobin level in patients with type 2 diabetes. *J Periodontol* ; 72 : 774-778, 2001.
- 7) Ryan ME, Carnu O, Kamer A : The influence of diabetes on the periodontal tissues. *J Am Dent Assoc* ; 134 : 34S-40S, 2003.
- 8) Taylor GW : Bidirectional interrelationships between diabetes and periodontal diseases : an epidemiologic perspective. *Ann Periodontol* ; 6 : 99-112, 2001.
- 9) Lohinai Z, Benedek P, Feher E, Gyorfi A, Rosivall L, Fazekas A, Salzman AL, Szabo C : Protective effects of mercaptoethylguanidine, a selective inhibitor of inducible nitric oxide synthase, in ligature-induced periodontitis in the rat. *Br J Pharmacol* ; 123 : 353-360, 1998.
- 10) Radomski MW, Palmer RM, Moncada S : The role of nitric oxide and cGMP in platelet adhesion to vascular endothelium. *Biochem Biophys Res Commun* ; 148 : 1482-1489, 1987.
- 11) Chen K, Pittman RN, Popel AS : Nitric oxide in the vasculature : where does it come from and where does it go? A quantitative perspective. *Antioxid Redox Signal* ; 10 : 1185-1198, 2008.
- 12) Beckman JS, Koppenol WH : Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite : the good, the bad, and ugly. *Am J Physiol* ; 271 : C1424-C1437, 1996.
- 13) Szabo C, Zingarelli B, Salzman AL : Role of poly-ADP-ribose polymerase activation in the vascular contractile and energetic failure elicited by exogenous and endogenous nitric oxide and peroxynitrite. *Circ Res* ; 78 : 1051-1063, 1996.
- 14) Morris BJ, Markus A, Glenn CL, Adams DJ, Colagiuri S, Wang L : Association of a functional inducible nitric oxide synthase promoter variant with complications in type 2 diabetes. *J Mol Med* ; 80 : 96-104, 2002.
- 15) Obrosova IG, Pacher P, Szabo C, Zsengeller Z, Hirooka H, Stevens MJ, Yorek MA : Aldose reductase inhibition counteracts oxidative-nitrosative stress and poly (ADP-ribose) polymerase activation in tissue sites for diabetes complications. *Diabetes* ; 54 : 234-242, 2005.
- 16) Nagareddy PR, McNeill JH, MacLeod KM : Chronic inhibition of inducible nitric oxide synthase ameliorates cardiovascular abnormalities in streptozotocin diabetic rats. *Eur J Pharmacol* ; 611 : 53-59, 2009.
- 17) Takada T, Yoshinari N, Sugiishi S, Kawase H, Yamane T, Noguchi T : Effect of restraint stress on the progression of experimental periodontitis in rats. *J Periodontol* ; 75 : 306-315, 2004.
- 18) Livak KJ, Schmittgen TD : Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-Delta Delta C (T)} Method. *Methods* ; 25 : 402-408, 2001.
- 19) Kawamoto T : Use of a new adhesive film for the preparation of multi-purpose fresh-frozen sections from hard tissues, whole-animals, insects and plants. *Arch Histol Cytol* ; 66 : 123-143, 2003.
- 20) Taylor GW, Borgnakke WS : Periodontal disease : associations with diabetes, glycemic control and complications. *Oral Dis* ; 14 : 191-203, 2008.
- 21) Manouchehr-Pour M, Spagnuolo PJ, Rodman HM, Bissada NF : Impaired neutrophil chemotaxis in diabetic patients with severe periodontitis. *J Dent Res* ; 60 : 729-730, 1981.
- 22) Ficara AJ, Levin MP, Grower MF, Kramer GD : A comparison of the glucose and protein content of gingival fluid from diabetics and nondiabetics. *J Periodontal Res* ; 10 : 171-175, 1975.
- 23) Schmidt AM, Weidman E, Lalla E, Yan SD, Hori O, Cao R, Brett JG, Lamster IB : Advanced glycation endproducts (AGEs) induce oxidant stress in the gingiva : a potential mechanism underlying accelerated periodontal disease associated with diabetes. *J Periodontal Res* ; 31 : 508-515, 1996.

- 24) Katz J, Bhattacharyya I, Farkhondeh-Kish F, Perez FM, Caudle RM, Heft MW : Expression of the receptor of advanced glycation end products in gingival tissues of type 2 diabetes patients with chronic periodontal disease : a study utilizing immunohistochemistry and RT-PCR. *J Clin Periodontol* ; 32 : 40-44, 2005.
- 25) Rovin S, Costich ER, Gordon HA : The influence of bacteria and irritation in the initiation of periodontal disease in germfree and conventional rats. *J Periodontal Res* ; 1 : 193-204, 1966.
- 26) Brennan PA, Thomas GJ, Langdon JD : The role of nitric oxide in oral diseases. *Arch Oral Biol* ; 48 : 93-100, 2003.
- 27) Southan GJ, Szabo C : Selective pharmacological inhibition of distinct nitric oxide synthase isoforms. *Biochem Pharmacol* ; 51 : 383-394, 1996.
- 28) Obrosova IG, Drel VR, Oltman CL, Mashtalir N, Tibrewala J, Groves JT, Yorek MA : Role of nitrosative stress in early neuropathy and vascular dysfunction in streptozotocin-diabetic rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab* ; 293 : E1645-1655, 2007.
- 29) Pacher P, Beckman JS, Liaudet L : Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. *Physiol Rev* ; 87 : 315-424, 2007.
- 30) Rendell M, Bergman T, O'Donnell G, Drobny E, Borgos J, Bonner RF : Microvascular blood flow, volume, and velocity measured by laser Doppler techniques in IDDM. *Diabetes* ; 38 : 819-824, 1989.
- 31) Naruse K, Hamada Y, Nakashima E, Kato K, Mizubayashi R, Kamiya H, Yuzawa Y, Matsuo S, Murohara T, Matsubara T, Oiso Y, Nakamura J : Therapeutic neovascularization using cord blood-derived endothelial progenitor cells for diabetic neuropathy. *Diabetes* ; 54 : 1823-1828, 2005.
- 32) Takagi C, Bursell SE, Lin YW, Takagi H, Duh E, Jiang Z, Clermont AC, King GL : Regulation of retinal hemodynamics in diabetic rats by increased expression and action of endothelin-1. *Invest Ophthalmol Vis Sci* ; 37 : 2504-2518, 1996.
- 33) Kitada M, Zhang Z, Mima A, King GL : Molecular mechanisms of diabetic vascular complications. *J Diabetes* ; 1 : 77-89, 2010.
- 34) Suzuki H, Shimosegawa T, Satoh A, Kimura K, Ohara S, Asaki S, Toyota T. Gastric mucosal blood flow response to stress in streptozotocin diabetic rats : regulatory role of nitric oxide. *J Gastroenterol* ; 32 : 726-733, 1997.
- 35) Fromy B, Abraham P, Bouvet C, Bouhanick B, Fressinaud P, Saumet JL. Early decrease of skin blood flow in response to locally applied pressure in diabetic subjects. *Diabetes* ; 51 : 1214-1217, 2002.
- 36) Spiro RG : Biochemistry of the renal glomerular basement membrane and its alterations in diabetes mellitus. *N Engl J Med* ; 288 : 1337-1342, 1973.
- 37) Muntean WE, et al : Elevation of Factor VIII coagulant activity over Factor VIII coagulant antigen in diabetic children without vascular disease. A sign of activation of the Factor VIII coagulant moiety during poor diabetes control. *Diabetes* ; 34 : 140-144, 1985.
- 38) Sima J, Zhang SX, Shao C, Fant J, Ma JX : The effect of angiotensin on vascular leakage and VEGF expression in rat retina. *FEBS Lett* ; 564 : 19-23, 2004.
- 39) Spranger J, Hammes HP, Preissner KT, Schatz H, Pfeiffer AF : Release of the angiogenesis inhibitor angiotensin in patients with proliferative diabetic retinopathy : association with retinal photocoagulation. *Diabetologia* ; 43 : 1404-1407, 2000.
- 40) Ortola FV, Ballermann BJ, Anderson S, Mendez RE, Brenner BM. : Elevated plasma atrial natriuretic peptide levels in diabetic rats. Potential mediator of hyperfiltration. *J Clin Invest* ; 80 : 670-674, 1987.
- 41) Hsueh WA. Effect of the renin-angiotensin system in the vascular disease of type II diabetes mellitus. *Am J Med* ; 92 : 13S-19S, 1992.
- 42) Weigert C, Brodbeck K, Klopfer K, Häring HU, Schleicher ED. Angiotensin II induces human TGF-beta 1 promoter activation : similarity to hyperglycaemia. *Diabetologia* ; 45 : 890-898, 2002.
- 43) Takahashi K, Ghatei MA, Lam HC, O'Halloran DJ, Bloom SR. Elevated plasma endothelin in patients with diabetes mellitus. *Diabetologia* ; 33 : 306-310, 1990.
- 44) Stavniichuk R, Drel VR, Shevalye H, Vareniuk I, Stevens MJ, Nadler JL, Obrosova IG : Role of 12/15-lipoxygenase in nitrosative stress and peripheral prediabetic and diabetic neuropathies. *Free Radic Biol Med* ; 49 : 1036-1045, 2010.

●抄録● Streptozocin (STZ) 誘導糖尿病ラットにおける歯周病悪化のメカニズム

／西川 徹

〈目的〉糖尿病における歯周病悪化のメカニズムを明らかにすることを目的に、streptozocin (STZ) 誘導糖尿病ラットに、実験的歯周炎を惹起しNO経路を中心に検討した。

〈材料と方法〉糖尿病の誘導は5週齢の雄性Sprague-DawleyラットにSTZ (60mg/kg) を腹腔内投与することにより行った。STZ投与2週間後に上顎右側第二臼歯の歯頸部にナイロン糸を結紮し、実験的歯周炎を惹起し、実験側とした。また、反対側は無処置で対照側とした。実験的歯周炎作成から2週間後に、歯肉組織血流を測定後、ラットを屠殺し、歯肉組織の遺伝子発現解析、組織学的検討を行った。

〈結果〉糖尿病ラット対照側における血流は正常ラットの対照側に比較し、有意に低下していた。歯周炎の惹起は、正常ラット、糖尿病ラットともに対照側に比較し、有意に歯肉組織血流を増加させた。歯肉における遺伝子発現では、正常ラットにおいては、歯周炎の惹起は対照側に比較し、TNF- α 遺伝子発現の増加傾向は認められるものの、有意差はみられなかった。一方、iNOS遺伝子発現は有意な増加を認めた。糖尿病ラットでは、歯周炎の惹起は対照側に比較し、TNF- α およびiNOSともに有意な増加を認めた。組織学的検討においては、正常ラットの歯周炎惹起部位では軽度な炎症性細胞浸潤であったが、糖尿病ラットでは、著明な炎症性細胞浸潤を認めた。さらに、歯肉におけるニトロチロシンの発現について検討を加えると、正常ラットの歯周炎惹起部位でもニトロチロシン陽性細胞を認めたが、糖尿病ラットでは、歯周炎を惹起することにより、ニトロチロシン陽性細胞が有意に増加した。

〈結論〉糖尿病ラットの実験側において、歯肉組織におけるニトロチロシン陽性細胞数の増加が確認され、糖尿病を伴う歯周病において、ニトロ化ストレスが重要な役割を果たしていることが示唆された。さらに、ニトロ化ストレスの抑制が、糖尿病を伴う歯周炎の治療戦略となる可能性を提示している。

キーワード：歯周病，糖尿病，一酸化窒素，ニトロチロシン

Aggravation of Periodontitis in Streptozocin-Diabetic Rats

Toru NISHIKAWA D.D.S., PhD, F.I.C.D.

OBJECTIVE Periodontal disease is highly prevalent and severe in diabetic patients and is considered one of the diabetic complications. To elucidate how periodontitis progresses in diabetes, we have examined an animal model of periodontitis in diabetic rats.

RESEARCH DESIGN AND METHODS Two weeks after the induction of diabetes by streptozotocin, surgical nylon thread was ligated around the cervical portion of the unilateral maxillary second molar (M2) to induce periodontitis. Periodontitis was evaluated 2 weeks after the M2 ligation.

RESULTS Blood flow in the gingiva which was increased in both the normal and the diabetic rats in response to the ligation-induced periodontitis was significantly lower in the control side in the diabetic rats compared with that in the normal rats. Ligation induced severe periodontitis in the diabetic rats, which were apparently shown by the increase of TNF- α and iNOS mRNA expressions and inflammatory cell infiltration in the gingiva and alveolar bone loss in the diabetic rats. The number of nitrotyrosine, a footprint of nitrosative stress, -positive cells was significantly higher in the periodontitis in the diabetic rats by 3.7 folds compared with that in the normal rats. Western blot analysis confirmed that the nitrotyrosine was increased in the periodontitis in the diabetic rats.

CONCLUSION This is the first study to confirm increased nitrosative stress due to periodontitis in diabetic rats. Nitrosative stress may play a crucial role in the progression of periodontitis in diabetic patients.

Key words : Periodontitis, Diabetes, NO, Nitrotyrosine