

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 6 日現在

機関番号：32703

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25460704

研究課題名(和文) 糖尿病性血管障害は口腔から予見できるか？ 歯肉微小血流による非侵襲的評価法の確立

研究課題名(英文) The establishment of the noninvasive assessment method of diabetic angiopathy by the gingival microcirculation

研究代表者

高橋 俊介 (Takahashi, Shun-suke)

神奈川県大学・大学院歯学研究科・准教授

研究者番号：60206810

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：生活習慣病の多くは、まず末梢血管障害が生じます。この血管障害と口腔内循環との関連を調べるため、糖尿病動物モデルの歯肉血管機能を測定しました。糖尿病により歯肉血管機能は低下し、この低下は歯周病により悪化しました。歯周病による歯槽骨吸収量は、糖尿病により増大しました。また、腎系球体は、糖尿病により血管網の減少や管腔の変性が、さらに歯周病により、血管壁の破綻が観察されました。加えて、糖尿病、歯周病による歯肉血管障害への酸化ストレスの関与が証明されました。これらは、糖尿病による末梢血管障害が口腔内にも生じており、歯肉血流量を指標に簡便に生活習慣病のリスクのスクリーニングができることを示しています。

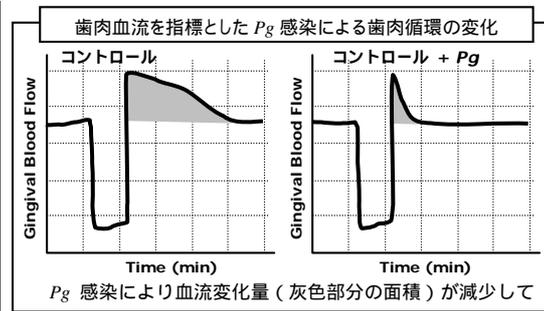
研究成果の概要(英文)：In common lifestyle-related diseases, peripheral vascular disorder occurs in the early stage. We measured a gingival vascular function of the diabetes animal model to examine an association between this vascular disorder and intraoral circulation. The gingival vascular function was reduced by diabetes, and this reduction deteriorated by periodontal disease. The alveolar bone resorption due to periodontal disease was enhanced by diabetes. Alternatively, in glomerule, reduction of the vascular plexus and luminal degeneration occurred by diabetes, and the rupture of the vascular wall was observed more by periodontal diseases. In addition, we demonstrated participation of the oxidative stress in gingival vascular disorder due to diabetes and periodontal disease. Above these results suggest that they cause peripheral vascular disorder due to diabetes in the oral cavity. In the near future, we may easily screen the risk of life-style related diseases by gingival blood flow.

研究分野：循環薬理学

キーワード：生活習慣病 糖尿病性血管障害 歯肉微小循環 非侵襲的評価方法 反応性充血

1. 研究開始当初の背景

全身疾患と口腔との関連性が社会的に問題視され、歯周病も糖尿病の合併症として認知されるようになった。糖尿病性合併症は、網膜や腎臓などの微小血管より障害され、自覚症状が無いまま重症化する血管硬化性疾患である。この糖尿病による血管障害が、歯肉の微小血管でも生じていることは、糖尿病患者の歯周病が重篤化しやすいことから推察できる。現在、この合併症による微小血管障害を早期に捉える検査法として、前腕部反応性充血が用いられている。しかし、駆血、検査薬の動脈注射等の熟練した操作が必要なベッドサイドで行う方法である。そのため、患者自身の自覚がない初期の血管障害を歯肉微小血流を用いて簡便に捉える方法は、チェアサイドで行うことが可能で、医科、歯科臨床において非常に有用である。近年、この糖尿病性合併症に、活性酸素種 (ROS) の関与が多数報告されている (Penumetcha M., *et al.* Atherosclerosis, 2012, Hulsmans M., *et al.* The FASEB Journal, 2011 他多数)。したがって、ROS 研究が酸化ストレスを介した糖尿病性血管障害解明への有効な手段となる。これまで申請者は循環機能に対する ROS の影響について報告し (Redox Rep, 2008, Life Sci, 2002, Pflügers Archiv, 1999, Antioxid Redox Signal, 1999 等)、さらに、研究分担者の高橋聡子は ROS による摘出血管の収縮機能の抑制を報告している (Eur J Pharmacol, 1997)。さらに、申請者は、歯肉の微小血管にレーザードップラー法を応用し、歯肉血流量の非侵襲的測定法を確立している (Redox Rep, 2002)。これらの方法により、微小血管反応を詳細に検討し、歯肉血管と全身の血管障害を関連付けて機能的に解析できる。また、当研究室では、**2 型糖尿病モデルラット (Goto-Kakizaki rat: GK) での ROS の産生増加を確認し、さらに歯周病原細菌である Porphyromonas gingivalis (Pg) の感染動物での歯肉血流の調整機能の変調(上図灰色部**



分)を確認している。しかし、これらの結果を関連付けるメカニズムの解明には至っていない。このように、GK に Pg を感染させた動物モデルを用いることにより、歯肉血管と糖尿病性血管障害との関連性と、ROS の役割解明のための素地が整った。申請者は、全身の健康と口腔の健康に対する社会の意識を高めるために必要なエビデンスの確立を求め、また、未だ明らかにされていない、「歯肉微小血管と糖尿病性血管障害との関連性」を解明することの必要性に着目し、標記課題を着想するに至った。

2. 研究の目的

本研究課題では糖尿病性血管障害に焦点を絞り、口腔の血管反応を測定系として「**歯肉微小血管と糖尿病性血管障害との関連性メカニズムの解明**」を目的とし、臨床応用の基盤となる科学的エビデンスに基づく非侵襲的血管評価法の確立を目指す。

3. 研究の方法

本研究の到達目標は「**歯肉微小血管障害と糖尿病性血管障害との関連性の解明**」とエビデンス探求である。そのため、*in vivo*, *in vitro* の実験系を駆使した以下の実験プロトコルを構成した。

- (1) 歯肉血流量測定による糖尿病の歯肉微小血管に対する影響の解析
- (2) 歯肉血流量測定による糖尿病と Pg 感染の歯肉微小血管に対する影響の解析
- (3) 骨吸収量測定による糖尿病と歯周病の進行との関連の解析
- (4) 摘出血管の等尺性張力変化測定による血管機能の解析

- (5) 血管鋳型標本作製による血管の障害程度の解析
- (6) ESR を用いた活性酸素種 (ROS) の測定による口腔領域の酸化ストレスの解析
- (7) 結果に基づき、糖尿病性血管障害と歯肉微小血管に関わる歯周病の関連性を証明する。

平成 25 年度：

(1) 歯肉血流量測定による糖尿病の歯肉微小循環に対する影響の解析

体重、血糖値を測定後、レーザードップラー法を用い、2 型糖尿病モデルラット (GK) の歯肉血流量を測定し、糖尿病が歯肉微小循環にどのような影響を及ぼすか解析した。

コントロールラット (Wistar Rat:Ws) の体重測定後、口蓋歯肉を測定用プローブにより 1 分間圧迫、解放後の血流変化をレーザードップラー血流計により測定する (Omori Y, Takahashi S-S., *et al.* Redox Report, 2002)。その後、測定部位に下記薬を血管機能検査薬として粘膜適用させ、詳細な血管機能解析を行う。測定は、2 週間毎、生後 7 週～30 週齢まで経日的変化を追った。

- ・ アセチルコリン: 内皮細胞機能検査薬
- ・ ニトログリセリン: 血管平滑筋機能検査薬

GK でも同様の測定を行い、糖尿病の歯肉微小血管への影響を解析した。

(2) 歯肉血流量測定による *Pg* 感染の歯肉微小循環に対する影響の解析

糖尿病モデルラット (GK)、コントロール群に歯周病菌である *Porphyromonas gingivalis* (*Pg*) を感染させ、レーザードップラー法を用いて *Pg* 感染による歯肉微小循環への影響を解析した。

コントロールラット (Wistar Rat:Ws) の口腔内に *Pg* 菌を感染させ (Ws+*Pg*)、(1) と同様、歯肉血流量測定を行う。測定は 2 週間毎に行い、30 週齢まで経日的変化を追った。

GK に *Pg* 感染させ (GK+*Pg*)、同様の測定を行い、*Pg* 感染による歯肉血流量の変化を測定した。

Pg 感染モデル作成法、骨吸収量測定法は、研究分担者である浜田信城 (神奈川歯科大学・教授) が確立しており、代表者含め当研究室ですでに *Pg* 感染ラットを用いた実験を開始している (Toyama T, Takahashi S-S., Lee M-C., Hamada N. *et al.* Archives of Oral Biology, 2012 等)。

平成 26 年度以降：(1)、(2)の測定を継続し、25 年度と同じ糖尿病、歯周病のモデル動物を用いた。

(3) 骨吸収量測定による糖尿病と歯周病の進行との関連の解析

全身麻酔下でモデル動物の下顎骨を摘出し、オートクレーブにて乾燥後、実体顕微鏡下で骨吸収量を測定する。歯周病による骨吸収と糖尿病との関係を解析した。

(4) 摘出血管の等尺性張力変化測定(マグヌス法)による血管機能の解析

モデル動物の舌動脈等、口腔領域の血管摘出し血管の等尺性張力変化を測定した。ノルアドレナリンによる最大収縮確認後にアセチルコリン、ニトログリセリンで内皮依存性の血管弛緩反応を観察し、さらに血管平滑筋の弛緩反応を確認した。これらにより、糖尿病や *Pg* 感染の血管への影響を機能的に解析した。また、これら血管機能への ROS 消去剤による影響を解析した。これらのは、研究分担者である高橋聡子 (神奈川歯科大学・講師) がその手法を確立している (Wada-T. S. *et al.* European Journal of Pharmacology, 1997 等)。

(5) 血管鋳型標本作製による全身の血管の障害程度の解析

モデル動物の血管鋳型標本作製した。歯肉などの口腔領域を電子顕微鏡下で観察し、糖尿病や *Pg* 菌の影響を形態学的に解析した (Matsuo M., *et al.* Microscopy Research and

Technique, 2002 等)。この解析は、松尾雅斗(神奈川県歯科大学・教授)が中心となって行った。レジン は 全身に注入されるため、眼球、腎臓等も常に観察し、合併症による全身的血管障害の進行の形態学的に解析した。

(6) 電子スピン共鳴法 (ESR 法)を用いた ROS の測定による酸化ストレスの解析

ESR 法を用い口腔領域の酸化ストレスを評価する。方法論はすでに李昌一(神奈川県歯科大学・教授)が確立している。麻酔したモデル動物に ESR 検出可能なスピンプローブ剤 (3-calbamoyl-2,2,5,5-tetramethylpyrrolidine-1-yl-oxyl; carbamoyl-PROXYL) を投与後、歯肉を摘出し、プローブ剤と活性酸素種との反応(プローブ剤減衰速度)から各臓器内の酸化ストレスを評価した (Yoshino F., Lee M-C., et al. Archives of Oral Biology, 2012 等)。

4. 研究成果

糖尿病モデルにおいて、口蓋部歯肉の反応性充血を指標とした歯肉循環調節機能は血管内皮および平滑筋機能抑制を介して経日的に低下した。この低下は、上顎臼歯部歯肉への歯周病菌の *Porphyromonas gingivalis* (*P.g*) 感染によりさらに増大した。同様に上顎の歯槽骨吸収量は *P.g* 感染により増加し、この増加は *P.g* 感染糖尿病モデルで有意に増大した。

腎障害は糖尿病の合併症として知られている。その腎系球体の血管鑄型標本を走査型電子顕微鏡により形態学的に観察した。その結果、糖尿病モデルでは血管網の減少や管腔の変性が見られた。さらに *P.g* 感染した糖尿病モデルではこれらに加え、樹脂の血管外漏出が観察された。同様に糖尿病による合併症が生じる網膜の血管網でも、血流を測定した口蓋部歯肉の血管網でも同じ結果が観察された。このことから、腎臓、網膜だけでなく、口腔内歯肉の血管網にも糖尿病性末梢循環障害が生じていることが考えられる。これにより、糖尿病患者の口腔粘膜は易感染性で、

糖尿病患者の歯周病罹患率が高いことの一因となっていることが示唆される。

また、L-band 電子スピン共鳴法により、これら糖尿病、歯周病罹患による歯肉循環障害への酸化ストレスの関与が証明された。これらの結果は、糖尿病による全身循環系への影響が口腔内にも波及していること、そして、これらの病態の進行に活性酸素種による酸化ストレスが関与していることを示している。その結果、口腔内循環調節機能を低下させ歯周病の進行を速めている可能性が示唆された。これらのことは、現在医科領域で臨床応用されている血流依存性血管拡張反応 (FMD) によるベッドサイド血管内皮機能検査法 (保険適用済: 区分番号 D207 体液量等測定) と同様な原理で、全身の血管内皮機能が口腔内の循環でも評価可能であろうことを示している。具体的には、直径 3 mm、長さ 3 cm 程度のレーザー Doppler 法による血流測定用プローブによる口蓋部歯肉の反応性充血 (FMD) は、全身の血管内皮機能評価の指標になりうること、つまり、歯科臨床で用いられている歯科用ユニットを含め、チェアサイドでの生活習慣病のリスクが簡便にスクリーニング(診断でなく)ができる可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 10 件他)

Funaki S, Tokutomi F, Wada-Takahashi S, Yoshino F, Yoshida A, Maehata Y, Miyamoto C, Toyama T, Sato T, Hamada N, Lee M-C, Takahashi S-S: *Porphyromonas gingivalis* infection modifies oral microcirculation and aortic vascular function in the stroke-prone spontaneously hypertensive rat (SHRSP). *Microbial Pathogenesis*, **92**, 36-42, 2016. DOI: 10.1016/j.micpath.2015.12.009, 査読あり / 謝辞記載あり

Matsuo M, Okudera T, Takahashi S-S,
Wada-Takahashi S, Maeda S, Iimura A:
Microcirculation alterations in experimentally
induced gingivitis in dogs. *Anatomical
Science International*, 92:112-117 2016. DOI:
10.1007/s12565-015-0324-8, 査読あり / 謝
辞記載あり

Tanaka Y, Toyama T, Wada-Takahashi S,
Sasaki H, Miyamoto C, Maehata Y, Yoshino F,
Yoshida A, Takahashi S-S, Watanabe K, Lee
M-C, Todoki K, Hamada N: Protective effects
of (6R)-5,6,7,8-tetrahydro-L-biopterin on
local ischemia/reperfusion-induced
suppression of reactive hyperemia in rat
gingiva. *Journal of Clinical Biochemistry and
Nutrition*, **58** (1), 69-75, 2016. DOI:
10.3164/jcfn.15-69, 査読あり / 謝辞記載あ
り

Yoshino F, Yoshida A, Toyama T,
Wada-Takahashi S, Takahashi S-S: α -glucosyl
hesperidin suppressed the exacerbation of
5-fluorouracil-induced oral mucositis in the
hamster cheek pouch. *Journal of Functional
Foods*, **21**, 223-231, 2016.

doi:10.1016/j.jff.2015.12.008, 査読あり
Saita M, Kaneko J, Sato T, Takahashi SS,
Wada-Takahashi S, Kawamata R, Sakurai T,
Lee MC, Hamada N, Kimoto K, Nagasaki Y:
Novel antioxidative nanotherapeutics in a rat
periodontitis model: Reactive oxygen species
scavenging by redox injectable gel suppresses
alveolar bone resorption. *Biomaterials*,
76,292-301, 2016. 査読あり

Shimada S, Todoki K, Omori Y, Toyama T,
Matsuo M, Wada-Takahashi S, Takahashi SS,
Lee MC: Contribution of nitrenergic nerve in
canine gingival reactive hyperemia. *Journal
of Clinical Biochemistry and Nutrition*. 56(2):
98-104, 2015. DOI: 10.3164/jcfn, 査読あり

Tokutomi F, Wada-Takahashi S, Sugiyama S,
Toyama T, Sato T, Hamada N, Tsukinoki K,
Takahashi SS, Lee MC: *Porphyromonas
gingivalis*-induced alveolar bone loss is
accelerated in the stroke-prone spontaneously
hypertensive rat. *Archives of Oral Biology*.
60(6): 911-918, 2015. DOI:
10.1016/j.archoralbio 査読あり

Hidaka K, Miyamoto C, Wada-Takahashi S,
Saita M, Kawata A, Kawamata R, Maehata Y,
Minabe M, Takahashi SS, Mikuni-Takagaki
Y.: Humoral response to therapeutic
low-intensity pulsed ultrasound (LIPUS)
treatment of rat maxillary socket after the
removal of a molar tooth. *International
Journal of Analytical Bio-Science*, 3: 17-24.
2015. 査読あり / 謝辞記載あり

Sugimoto H, Watanabe K, Toyama T,
Takahashi SS, Sugiyama S, Lee MC, Hamada
N: Inhibitory effects of French pine bark
extract, Pycnogenol®, on alveolar bone
resorption and on the osteoclast
differentiation. *Phytotherapy Research*,
29(2):251-259, 2015. DOI: 10.1002/ptr.5245,
査読あり

Toyama T, Wada-Takahashi S, Takamichi M,
Watanabe K, Yoshida A, Yoshino F,
Miyamoto C, Maehata Y, Sugiyama S,
Takahashi SS, Todoki K, Lee
MC, Hamada N: Reactive oxygen species
scavenging activity of *Jixueteng* evaluated by
electron spin resonance (ESR) and photon
emission. *Natural Product
Communications*, **9**(12): 1755-1759, 2014.
査読あり / 謝辞記載あり

〔学会発表〕(計7件他)

Saita M, Kaneko J, Sato T, Takahashi SS, Wada-Takahashi S, Kawamata R, Sakurai T, Lee MC, Hamada N, Kimoto K, Nagasaki Y: Reactive oxygen species scavenging by redox injectable gel suppresses alveolar bone resorption in a rat periodontitis model. 第25回日本 MRS 年次大会 国際セッション, 横浜, 2015.3.11-14

船木誠子, 徳富文彬, 高橋聡子, 吉野文彦, 吉田彩佳, 前畑洋次郎, 宮本千央, 遠山歳三, 佐藤武則, 浜田信城, 李 昌一, 高橋俊介: Alteration of oral vascular function in Porphyromonas gingivalis infection and/or stroke model. 神奈川歯科大学学会 50 周年記念総会, 横須賀, 2015.12.5.

田中優作, 遠山歳三, 高橋聡子, 佐々木悠, 宮本千央, 前畑洋次郎, 吉野文彦, 吉田彩佳, 高橋俊介, 渡辺清子, 李 昌一, 塗々木和男, 浜田信城: Protective effects of (6R)-5,6,7,8-tetrahydro-L-biopterin on local ischemia/reperfusion-induced suppression of reactive hyperemia in rat gingiva. 第148回神奈川歯科大学学会例会, 横須賀, 2015.10.8.

遠山歳三, 塗々木和男, 高橋俊介, 吉野文彦, 吉田彩佳, 高橋聡子, 渡辺清子, 浜田信城: 実験的歯周炎モデルにおける反応性充血を用いた血管内皮機能評価と生薬「鶏血藤の」内皮機能改善効果の検討. 第8回日本口腔検査学会総会・学術大会, 横須賀市, 2015.10.3-4.

高橋俊介, 杉山秀太, 高橋聡子, 吉野文彦, 吉田彩佳, 前畑洋次郎, 宮本千央, 松尾雅斗, 李 昌一, 遠山歳三, 佐藤武則, 渡辺清子, 浜田信城, 児玉利朗: FMD (Flow Mediated Dilatation) による血管内皮機能検査の意義と口腔内への応用の可能性について. 第8回日本口腔検査学会総会・学術大会, 横須賀市, 2015.10.3-4.

杉山秀太, 高橋俊介, 高橋聡子, 吉野文彦, 吉田彩佳, 前畑洋次郎, 宮本千央, 松尾雅斗, 李 昌一, 遠山歳三, 佐藤武則, 渡辺清子, 浜田信城, 児玉利朗: 2型糖尿病による歯肉循環調節機能(血管弾性)の変化 - FMD による血管内皮機能検査の口腔内への応用 -. 第8回日本口腔検査学会総会・学術大会, 横須賀市, 2015.10.3-4.

遠山歳三, 塗々木和男, 高橋俊介, 高橋聡子, 吉野文彦, 吉田彩佳, 渡辺清子, 浜田信城: ラット歯肉局所循環調節機構に対する抗酸化生体因子(BH₄)の役割. 第57回歯科基礎医学会学術大会, 新潟, 2015.9.11-13

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高橋俊介 (TAKAHASHI, Shun-suke)
神奈川歯科大学・歯学研究科(研究院)・准教授
研究者番号: 60206810

(2) 研究分担者

高橋聡子 (TAKAHASHI, Satoko)
神奈川歯科大学・歯学研究科(研究院)・講師
研究者番号: 30301592

(3) 研究分担者

松尾雅斗 (MATSUO, Masato)
神奈川歯科大学・歯学研究科(研究院)・教授
研究者番号: 30190416

(4) 研究分担者

浜田信城 (HAMADA, Nobushiro)
神奈川歯科大学・歯学研究科(研究院)・教授
研究者番号: 20247315

(5) 研究分担者

李 昌一 (Lee, Chang-il)
神奈川歯科大学・歯学研究科(研究院)・教授
研究者番号: 60220795