HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	糖尿病モデル動物における間歇的圧刺激による微小血管の形態変化
Author(s)	西川, 瑛亮; 佐藤, 嘉晃; 正満, 健斗 他
Citation	北海道歯学雑誌, 38(2), 140-151
Issue Date	2018-03
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/68794
Type	journal article
File Information	38_02_03_Nishikawa.pdf

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

北海道歯誌　38：140−151，2018.

原　著

糖尿病モデル動物における間歇的圧刺激による微小血管の形態変化

西川　瑛亮　　佐藤　嘉晃　　正満　健斗　　工藤　悠介　　山本　隆昭　　飯田順一郎

抄　録：近年，歯科矯正治療を希望する成人，高齢者が増加しており糖尿病や糖尿病予備軍の患者が矯正治療の対象となる機会が増えている．しかし，高血糖下において矯正力による機械的刺激に対する微小血管の変化について不明な点が多い．高血糖下では血管の脆弱化が生じることから，我々はより短い荷重期間での間歇力に着目した．また，これまで正常血糖下において機械的刺激により毛細血管が毛細血管後細静脈の太さまで拡張すると新たに単球系細胞が血管外へ遊走する場となることは明らかにされている．そこで本研究では，ストレプトゾトシン（以下STZ）誘発糖尿病ハムスターを用いて，高血糖下における間歇力に対する微小血管の変化および血管構造を維持しつつ血管拡張が生じる時間条件を検討した．実験動物としてSTZ非投与ハムスター４匹（非糖尿病群）とSTZ誘発糖尿病ハムスター16匹（糖尿群）を用いた．糖尿病群は荷重を加えないcontrol群と３種類の条件で荷重を加える群の計４群（各群４匹ずつ）に分けた．間歇力として，20秒間のうち１秒間の荷重期間と19秒間の非荷重期間を繰り返す条件をT20群とし，同様の荷重期間でT40，T60群を設定した．それぞれ背側皮膚に独自に考案した任意の時間間隔で圧刺激（100 g/cm^2）を付与できる荷重付与装置付きのdorsal skinfold chamberを装着し，荷重付与群の３群に間歇的荷重を与えた．各群の微小血管の変化を６日間，実体顕微鏡および蛍光顕微鏡で観察し，各群間における相違を比較し，以下の結果を得た．１．control群に比べT20群とT40群において有意に毛細血管径が増大していた．２．T20群が他群に比べ有意に出血傾向が強く，血流が停止している部分を認めた．３．T20群の毛細血管消失率が他群に比べ有意に高かった．これらより，糖尿病ハムスターにおいては，１秒間の荷重付与と39秒間の非荷重付与を繰り返す間歇的矯正力を用いることで歯周組織の血管構造を維持しつつ，毛細血管を毛細血管後細静脈の太さまで拡張させることが示唆された．

キーワード：微小血管，間歇力，糖尿病，矯正力

緒　　言

近年，歯科矯正治療を希望する成人，高齢の患者が増加している[1, 2]．そのような環境の中で，40歳代の約7%，60歳以上の約27%の人に，糖尿病，または糖尿病予備軍が疑われ，さらに増加傾向にあるとされている[3]．従って，今後も糖尿病や糖尿病予備軍である患者が歯科矯正治療を希望する場面は増加すると考えられる．歯科矯正治療では，外力である矯正力を歯周組織に与えるため，微小血管の脆弱化[4] が生じる糖尿病患者において歯周組織の微小血管が健全に維持されることは，安全で効果的な治療のために必須な要素である．糖尿病における主要臓器に関する報告[5–7] は多くあるが，高血糖下において矯正力を想定した機械的刺激に対する歯周組織の微小血管の反応に関しては不明な点が多い．

矯正力には様々な作用様式があるが，いずれにおいても，臨床において厳密に力をコントロールすることは難しく[8]，意図せず部分的に歯周組織を虚血状態にしてしまう可能性がある．持続力により長時間虚血状態となった歯周組織では，変性組織が形成され歯根吸収が生じやすく[9]，それに対して，間歇力は骨組織と歯根膜が再構成されるための休養期間を持つことになるため，最適な移動様式であるという報告がある[10]．そこで，本研究では血流を再環流することにより長時間の虚血状態を回避できる間歇力に着目した．現在，臨床において，間歇力は主として可撤式装置を用いて得られるが，これらは患者自身による着脱を要するため，少なくとも数時間単位での力を歯周組織に与えることになる．しかし，組織に対して３時間毎の間歇力を与えると血流の低下が生じるという報告[11] があり，現在用いられている可撤式装置では，歯周組織へ組織傷害を及ぼす可能性がある．そこで，新たな間歇力の作用様式として，固定式でかつ自動的に間歇力を加えることのできる装置が

〒060−8586 札幌市北区北13条西７丁目
北海道大学大学院歯学研究院　口腔機能学分野　歯科矯正学教室（主任：飯田順一郎 特任教授）

必要であると考えた．また，間歇力の中でも，圧迫力が一定のもとでは一回の圧迫時間が長くなると組織傷害が強くなるという報告[11, 12]があることから，血管壁の脆弱化[4]が生じやすいと言われる高血糖下における矯正治療では，より荷重付与期間が短い間歇力が望ましいと考えた．これまで時間単位，分単位の荷重期間を設定した間歇力に対する血管の変化に関する報告[13, 14]はあるが秒単位の荷重期間を設定した報告はない．そこで，本研究ではより短い荷重期間として１秒という荷重期間を設定し，電流を流すことで収縮する形状記憶合金製のワイヤーを用いて自動的でかつ秒単位での間歇力を発揮できる装置を作製した．また，これまで正常血糖下において機械的刺激を受けた毛細血管が毛細血管後細静脈の太さまで拡張すると新たに単球系細胞が血管外へ遊走する場となるという報告があり[15, 16]矯正力による歯の移動には，歯周組織の毛細血管を拡張させることが重要な要素であると考えられる．

そこで，今回我々は，高血糖下において短時間の荷重付与を繰り返す間歇力を用いることで，不可逆的な組織傷害を引き起こすことなく毛細血管を拡張できるという仮説を立て，糖尿病を誘発したハムスターを用い，より短時間の荷重付与による間歇力に対する微小血管の変化および血管構造を維持しつつ血管拡張が生じる時間条件について検討することを目的とした．

材 料 と 方 法

１．実験動物と荷重条件（表１）

実験動物として，非糖尿病群（以下normal群）には生後６週齢の雄性シリアンゴールデンハムスター４匹，糖尿病群には生後５週齢の雄性シリアンゴールデンハムスター16匹，併せて計20匹を使用した．

次に，糖尿病群の16匹を，荷重を付与しないcontrol群，および荷重付与と非荷重付与をそれぞれ１秒間と19秒間（T20群），１秒間と39秒間（T40群），１秒間と59秒間（T60群）の組み合わせで繰り返す３群の計４群（各群４匹ずつ）に分けた（表１）．実験期間中ハムスターはプラスチックゲージで飼育し，固形飼料，水道水の摂取など，同一の生活条件下で飼育した．

表１　実験群と時間条件

		荷重期間	非荷重期間
非糖尿病群	normal群	荷重付与なし	
糖尿病群	control群	荷重付与なし	
	T20群	1秒	19秒
	T40群	1秒	39秒
	T60群	1秒	59秒

非糖尿病群で荷重付与しないnormal群，糖尿病群のうち荷重付与しないcontrol群，また荷重期間と非荷重荷重期間をそれぞれ１秒と19秒（T20群），１秒と39秒（T40群），１秒と59秒（T60群）で繰り返す荷重付与群の計５群（各群n=4）を設定した．

２．糖尿病誘発

糖尿病の誘発には，膵臓ランゲルハンス島β細胞の萎縮，崩壊をもたらし低インスリン状態にするstreptozotocin（和光純薬工業㈱，大阪，以下STZと略す）投与による方法を用いた[17, 18]．ジエチルエーテルにて吸入麻酔を施し，STZ50 mgを0.05 mlの0.1 Mクエン酸・クエン酸ナトリウム緩衝液（pH4.5）に加えて溶解し，生理食塩水0.95 mlを加えたものを，体重1kg当たり50 mgの割合で腹腔内に投与し，４日後の血糖値が150 mg/dl以上でかつ体重減少を認めたハムスターを糖尿病群として実験に用いた（図１）．血糖値の測定はグルコース・オキシダーゼ法にて糖尿病誘発前およびSTZ投与４日後の荷重装置装着時に尾静脈より血液サンプルを採取し行った．なお，糖尿病群はSTZを投与し，４日後に荷重装置を装着するため，装置装着時にnormal群と同様に６週齢となるように調整した．

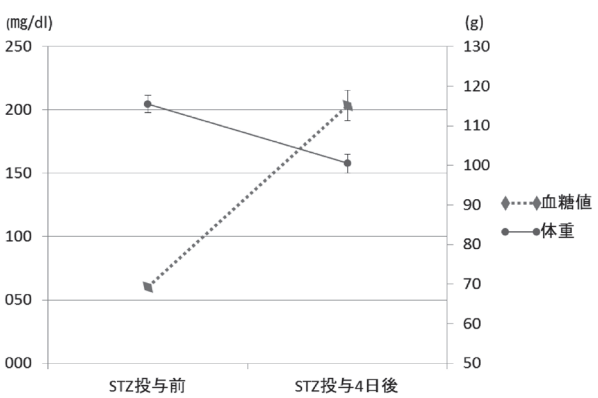


図１　STZ投与前後の血糖値と体重の変化
STZ投与４日後の血糖値が150㎎/dlでかつ体重減少を認めたものを糖尿病群として設定した．

３．実験方法

１）前準備

ハムスターをジエチルエーテル（関東科学株式会社，東京）で全身麻酔導入しチアミラールナトリウム（2.5 %イソゾール®，三菱ウェルファーマ㈱，大阪）の腹腔内注射（2.5 ml/kg body weight（以下b. w.））により維持麻酔を行った．その後，蛍光標識剤を血管内に投与するため外頸静脈にマイクロカテーテル（KN-392 SP8，夏目製作所㈱，東京）を挿入後固定し，実験期間を通して留置した．次いで，マイクロカテーテルよりゲンタマイシン（ゲンタシン注40，MSD㈱，東京）（2㎎/kg b. w.）を投与し，ブプレノルフィン（レペタン注0.3㎎，大塚製薬㈱，東京）（0.01㎎/kg b. w.）を筋肉注射により投与した．

2）微小血管の観察法と荷重付与装置

（図2，3，4，5，6）

微小血管の観察はハムスターの背部皮膚組織を用いた．背部皮膚正中部の毛を刈り取り，背部皮膚を皮下組織同士が相対するように重ねてつり上げ，左側の皮膚および皮下組織を直径15 mmの円形に切除した．これにより二重にした背部皮膚において，組織を切除した側とは反対側の皮下組織が露出され，反対側皮下組織を観察部位とした．皮膚と皮下組織を切除した部位の中央に，直径10 mmの観察窓を開けたアクリル製プレートを，反対側の皮膚に直径2.5 mmの荷重付与装置先端を通す窓を開けたアクリル製プレートを合わせて，両プレートを皮膚で挟んでネジにより４箇所固定した．観察部位である露出した皮下組織表面には直径12 mmのカバーガラスを装着し，これを観察窓とした．これら背部皮膚を挟む観察窓をあけた２枚のアクリル製プレートからなる装置をdorsal skinfold chamber（以下chamber）と呼ぶ（図２）．さらに，荷重付与群においては荷重付与装置先端部として，先端に矯正用リンガルボタン（マイクロロックリンガルボタン，トミーインターナショナル㈱，東京）のベース面とねじを接着させたものと，ばね（東海バネ工業㈱，大阪）を組み合わせ，さらに電流を流すことで収縮する形状記憶合金製のアクチュエータであるバイオメタル（トキコーポレーション㈱，東京）を用い，バイオメタルが収縮することにより背部皮膚に間歇的な荷重がかかるようにし，皮膚切除してない側のアクリルプレートに固定した（図３，４）．リンガルボタンの頭部（直径2.0 mm）はアクリル製プレートにある直径2.5 mmの窓の中央に位置させ，さらに皮膚に対してボタンが垂直に100 g/cm^{2}の荷重が加わるよう調整した．

また，本実験では多種類の荷重条件における間歇力を加えるために，図５に示すようなタイマーIC（NE555P, Texas Instruments Incorporated, Dallas, Texas）を用いた電子基板を作製し，抵抗とコンデンサーの組み合わせを変えることで，設定した荷重条件をコントロールした．なお，図６に示すようにスリップリング（PLR27，日本電産コパル電子㈱，東京）を用いることで銅線がからまらないようにし，ハムスターが自由にケージ内を動けるようにした．

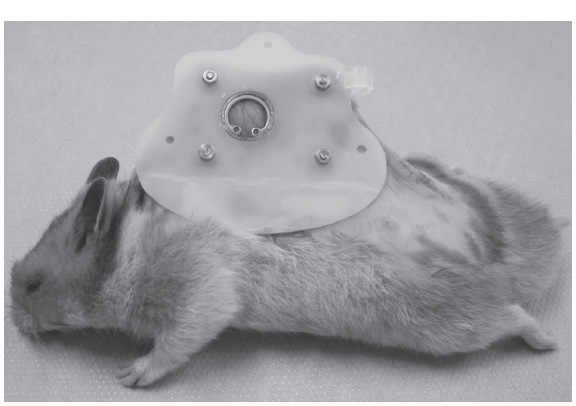


図２　dorsal skinfold chamber
背部皮膚を挟む観察窓をあけた2枚のアクリル製プレートからなる装置をdorsal skinfold chamberと呼ぶ．

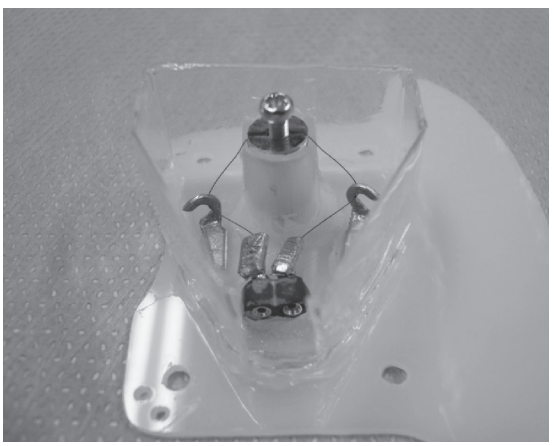


図３　荷重装置
矯正用リンガルボタンのベース面とねじを接着させたものと，ばねを組み合わせ，さらに電流を流すことで収縮する形状記憶合金製のアクチュエータであるバイオメタルを用いた荷重装置を作製した．

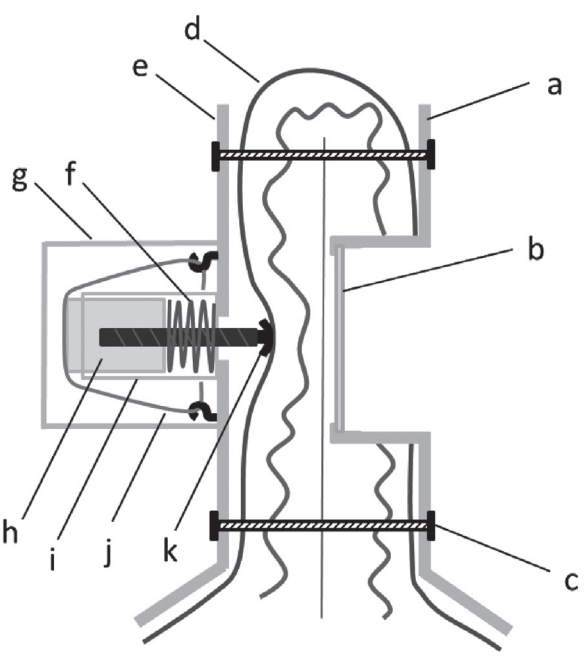


図４　荷重装置付きdorsal skinfold chamberの模式図
a：観察窓を有するアクリルプレート
b：カバーガラス
c：ねじ
d：背部皮膚
e：荷重付与装置を有するアクリルプレート
f：バネ
g：荷重付与装置保護カバー
h：荷重付与装置内筒
i：荷重付与装置外筒
j：アクチュエータ（バイオメタル）
k：荷重付与装置先端部（リンガルボタン）

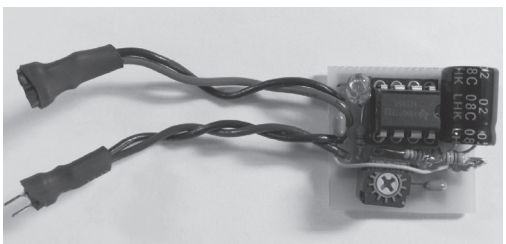


図５　電子基板

電源の入れ替えを自動的に行うためにタイマーICチップを用いた電子基板を作製した．この回路の中で，抵抗とコンデンサーの組み合わせを変えることで時間条件を設定した．

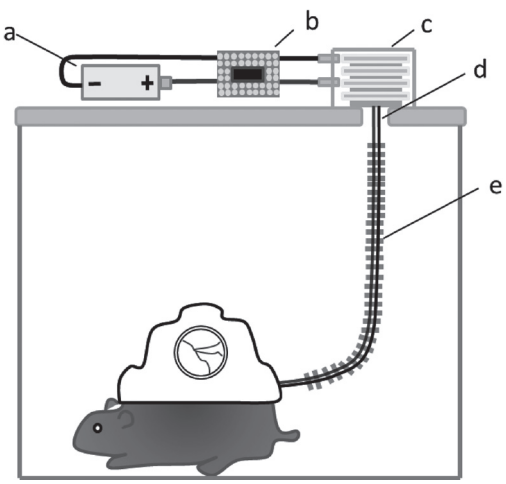


図６　電源と接続

ａ：電池
ｂ：電子基板
ｃ：スリップリング
ｄ：銅線
ｅ：銅線保護カバー

ケージの上に電源，電子基板を設置し荷重装置と電源を銅線でつなぐことで，電源の切り替えを自動で行えるようにした．また，スリップリングを用いることで銅線がからまらないようにした．

３）実験期間中における観察時期（図７）

非荷重群であるnormal群とcontrol群は，chamberを装着し48時間後である０日目を含め，荷重を加えない状態で１日目～５日目まで毎日同時刻に合計６回観察した．また，荷重付与群の３群では，非荷重群と同様に０日目に観察を行った後に荷重付与を開始し，１日目～５日目まで毎日同時刻に合計６回観察した．観察はすべての群において麻酔および手術が微小血管系に影響を及ぼさないようにするため，chamber装着後48時間安静にした後に開始した．

なお実験は北海道大学大学院歯学研究科動物実験委員会が定めた「北海道大学動物実験実施マニュアル」「国立大学法人北海道大学動物実験に関する指針」に従い行った．

４）微小血管の観察

微小血管の観察については，実体顕微鏡（SZ61，オリンパス㈱，東京）およびCCDカメラ（DP22，オリンパス㈱，東京）と落射蛍光顕微鏡（BX50，オリンパス㈱，東京）および蛍光キューブ（U-NIVA2，オリンパス㈱，東京）を用いた．あらかじめ設定した観察時期に，ハムスターを無麻酔，覚醒状態でそれぞれの顕微鏡のステージに取り付けた固定具に留め，さらにchamberを固定した．実体顕微鏡では，倍率を固定（×0.8）し観察窓内を観察開始日（０日目）から５日目までCCDカメラにて撮影した．次に留置してあるマイクロカテーテルから血流の蛍光標識剤としてFITC labeled dextran（mw150000, Sigma chemical, St Louis, Missouri）（以下FITC-dextran）を注入（100 mg/kg b. w.）した後，落射蛍光顕微鏡にて毛細血管の走行および血流を観察した．同時にこの像をCCDカメラ（CS230，オリンパス㈱，東京）で撮影し，コンピューター（Surface, Microsoft, Redmond, Washington）に記録した．撮影はFITC-dextran注入後15分以内に行い，記録した０日目のFITC-dextran像（以下，蛍光像）で確認できる血管の走行と分岐を参考にすることで，０日目と同一の部位および血管であることを同定し観察を行った．なお，本実験における毛細血管の観察は，非荷重群では観察窓中心部の血管を，荷重群では顕微鏡で観察された荷重付与装置としてのリンガルボタン直下の血管を観察した．

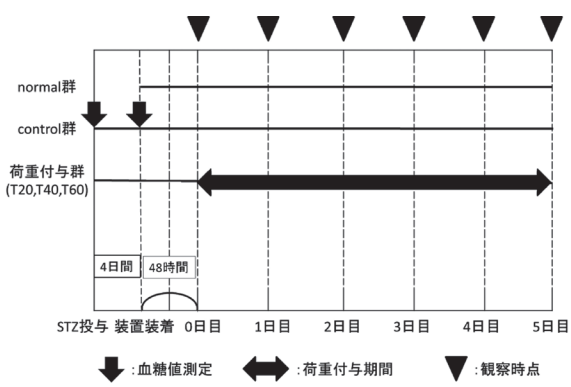


図７　荷重条件と観察時期

normal群は，装置装着し48時間後である０日目を含め，荷重を加えない状態で５日目まで毎日同時刻に合計６回観察した．糖尿病群ではSTZ投与前後に血糖値と体重を確認した後に装置装着し，normal群と同様に合計６回観察しました．なお，荷重付与は０日目観察直後より開始した．

５）出血傾向の評価（図８）

記録した実体顕微鏡像を画像処理ソフト（Adobe Photoshop CC 2014, Adobe Systems Incorporated, San Joe, California）（以下Photoshop）を用いてカラー情報を破棄し256階調のグレースケールにした上で解析した．解析に際しては，chamberにカバーガラスを固定するために用いたリングにある２つの穴の中心を結んだ直線の垂直二等分線を引き，その線と観察窓が交わる２点を結んだ直線の垂直二等分線を引き，４分割された各領域において評価した．各観察時

点における実体顕微鏡像で観察できる微小血管に連続する出血点で，その直径が連続する主要血管径以上で，かつグレー値が主要血管の±10以内の出血点を認めた領域を（＋），その基準を満たす出血点を認めなかった領域を（－）とし，観察窓全体を定量的に評価しすべての群において比較した．評価方法として，（＋）を１点，（－）を０点として，両群の平均値を算出した．群間の検定にはunpaired t検定（JMP® Pro, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA）（以下JMP）を用い，有意水準をp<0.05として有意差を判定した．

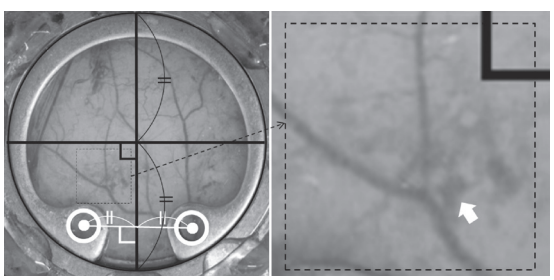


図８　出血傾向の評価方法
chamberにカバーガラスを固定するために用いたリングにある２つの穴の中心を結んだ直線の垂直二等分線を引き，その線と観察窓が交わる２点を結んだ直線の垂直二等分線を引き，４分割された各領域において各観察時点において血管周囲に出血（矢印）を認めたものを（＋）：１点，特に変化を認めなかったものを（－）：０点とし，観察窓全体を評価しすべての群において比較した．

６）毛細血管消失率（図９）

蛍光像において，観察開始時（０日目）と観察終了時（５日目）の２時点において，双方を通じて確認できる分岐部を二箇所選択し，Photoshop上で選択した分岐部と分岐部を直線で結び，その直線に直交する垂直二等分線を引いた．その垂直二等分線と蛍光像の縁との交点を結んだ線分と交わる毛細血管の本数を各群，各時点において計測し観察開始時からの消失率を算出し，各群間の相違について比較した．なお，計測部位数は，各群に70～90本を設定し，群間の検定にはunpaired t検定（JMP）を用い，有意水準をp<0.05として有意差を判定した．

７）毛細血管の走行および血管径の計測

記録した蛍光顕微鏡像より，各時点における毛細血管の走行および直径を観察し，経時的変化および各群間の相違について比較した．なお，血管径の計測に際してはPhotoshopの計測用ツールを用い，毛細血管の長軸に対する垂直距離を毛細血管径とした．計測部位は分岐がなく100 μm以上の長さが観察可能な部位を１単位とし，その１単位の血管における任意の20ヶ所を設定した．検定は観察時期ごとに一元配置分散分析（one-way ANOVA）を行い，Post hoc testとして群間の多重比較にはTurkey-HSD検定（JMP）にて差異を検討し，有意水準をp<0.01として有意差を判定した．

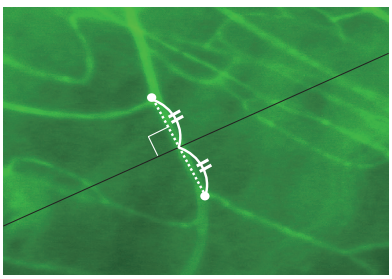


図９　毛細血管消失率の評価方法
蛍光像において，観察開始時と観察終了時の２時点において，双方を通じて確認できる分岐部を二箇所選択し，Photoshop上で選択した分岐部と分岐部を直線で結び，その直線に直交する垂直二等分線を引いた．その垂直二等分線と蛍光像の縁との交点を結んだ線分と交わる毛細血管の本数を各群，各時点において計測し観察開始時からの消失率を算出し，各群間の相違について比較した．

結　　果

１．微小血管および毛細血管の観察

本研究では，微小血管を細動脈，細静脈および毛細血管を含むものとし，毛細血管を直径8 μm未満のものとした[19, 20]．

１）微小血管の変化

図10～14に各群の観察開始時（０日目）から５日目までの実体顕微鏡像を示す．

normal群（図10）では，微小血管が経時的に拡張している部分や１日目をピークに拡張するが，その後縮小し５日目には０日目と近似した太さになる部分を認めた．微小血管は網目状に分布し，全期間と通して血管の分布に著明な変化は認めなかった．

control群（図11）では，経時的に微小血管の拡張傾向を認めた．０日目にすでに出血している部分を認め，さらに観察開始後に新たに微小血管周囲に出血している部分を認めた．

T20群（図12）では，１日目以降全体的に著しい出血傾向を認め，その程度は経時的に強くなっていた．荷重付与直下の血管は１日目より縮小傾向を認め，５日目には貧血帯となり，微小血管の消失を認めた．

T40群（図13）では，微小血管は４日目まで経時的に拡張し，４日目以降はやや縮小した．全期間を通じて出血傾向を認めたが，T20群に比べその程度は弱く，荷重付与直下の貧血帯や微小血管の消失を認めなかった．

T60群（図14）では，微小血管の拡張や出血傾向を認めたが，T20，T40群に比べるとその程度は弱かった．血管の消失は認めず，control群と近似した像を認めた．

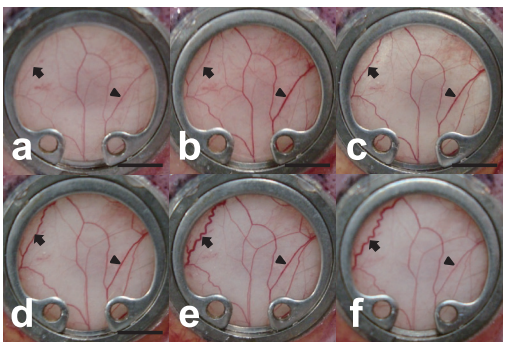


図10　normal群における微小血管の経時的変化（scale bar=3㎜）
a：０日目　b：１日目　c：２日目　d：３日目　e：４日目
f：５日目
微小血管が経時的に拡張している部分（矢印）や１日目をピークに拡張するが，その後縮小し５日目には０日目と近似した太さになる部分（矢尻）を認めた．微小血管は網目状に分布し，全期間と通して血管の分布は著明な変化は認めなかった．

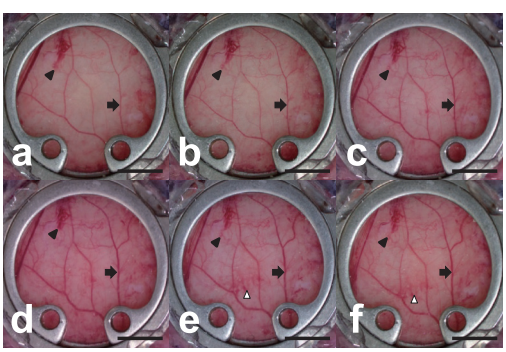


図11　control群における微小血管の経時的変化（scale bar=3㎜）
a：０日目　b：１日目　c：２日目　d：３日目　e：４日目
f：５日目
経時的に微小血管の拡張傾向を認めた（矢印）．０日目より出血している部分（矢尻）や４日目より微小血管周囲に出血している部分（△）を認めた．

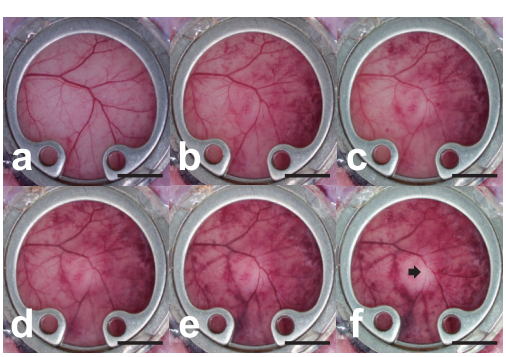


図12　T20群における微小血管の経時的変化（scale bar=3㎜）
a：０日目　b：１日目　c：２日目　d：３日目　e：４日目
f：５日目
１日目以降全体的に著しい出血傾向を認め，その程度は経時的に強くなっていた．荷重付与直下の血管は５日目には貧血帯となり，微小血管の消失を認めた．また，荷重付与直下以外の微小血管では明らかな血管の拡張は認めなかった．

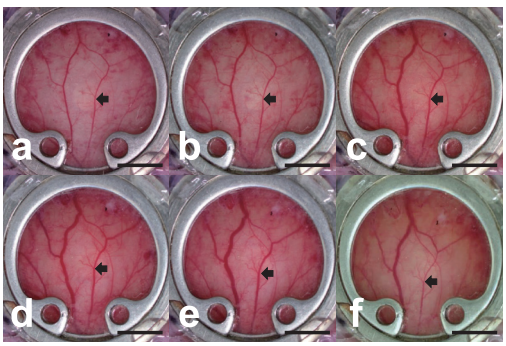


図13　T40群における微小血管の経時的変化（scale bar=3㎜）
a：０日目　b：１日目　c：２日目　d：３日目　e：４日目
f：５日目
微小血管は４日目まで経時的に拡張し，４日目以降はやや縮小した（矢印）．T20群に比べ出血傾向も少なく，荷重付与直下の貧血帯や微小血管の消失も認めなかった．

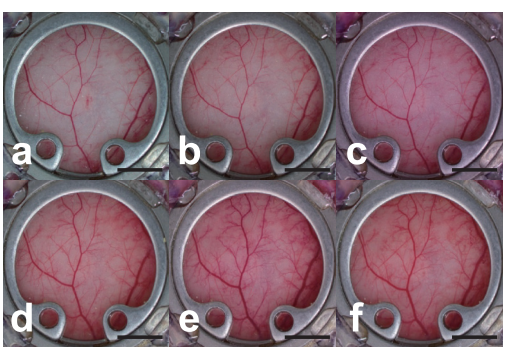


図14　T60群における微小血管の経時的変化（scale bar=3㎜）
a：０日目　b：１日目　c：２日目　d：３日目　e：４日目
f：５日目
微小血管の拡張や出血傾向を認めたが，T20，T40群に比べるとその程度は弱かった．血管の消失は認めず，control群と近似した像を認めた．

２）毛細血管の変化

図15～19に観察開始時（０日目）から５日目までの蛍光像を示す．

normal群（図15）では毛細血管は網目状に分布しており，血管はやや拡張していたが血管の分布や形態には，特記すべき経時的な変化は認められなかった．control群（図16）では，毛細血管はnormal群と同様に網目状の分布を示し，わずかに血管径は拡張していたが，一部で毛細血管の消失を認めた．T20群では，０日目に比して，全ての観察期間で，経時的に毛細血管径の拡張が認められた．さらに，毛細血管よりFITC-dextranが漏出し血管周囲の輝度が上昇していた．５日目まで血流が保たれていた毛細血管は著しく血管が拡張していた（図17-１）．また，血管壁が破壊され著しい血管透過性の亢進あるいは出血が生じ，FITC-dextranの漏出により血管周囲の輝度が上昇し，毛細血管の走行が観察不可能となり，血流が停止している部分を認めた（図17-２）．T40群（図18）では，毛細血管は全般的に拡張しており，また新たな血管の分布も認めた．

T20群とは異なり，血流は停止せず５日目まで毛細血管の走行は観察可能であった．T60群（図19）では，毛細血管は経時的に拡張しており，また毛細血管が消失する部分を認めcontrol群と近似した像を認めた．T40群とは異なり，新たな血管の分布は認めなかった．

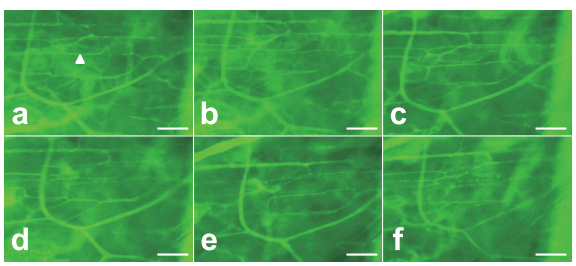


図15　normal群における毛細血管の経時的変化（scale bar=100μm）
a：０日目　b：１日目　c：２日目　d：３日目　e：４日目
f：５日目
毛細血管(矢尻) は網目状に分布しており，血管径はやや拡張していたが血管の分布や形態には，特記すべき経時的な変化は認められなかった．

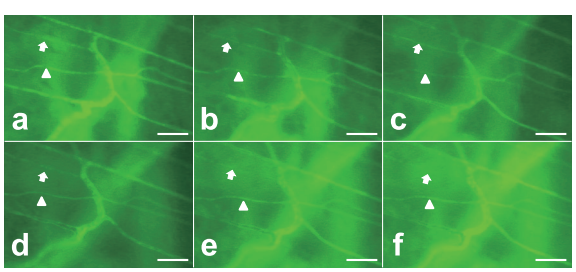


図16　control群における毛細血管の経時的変化（scale bar=100μm）
a：０日目　b：１日目　c：２日目　d：３日目　e：４日目
f：５日目
毛細血管(矢尻)はnormal群と同様に網目状の分布を示し，わずかに血管径は拡張していたが，一部で毛細血管の消失を認めた（矢印）．

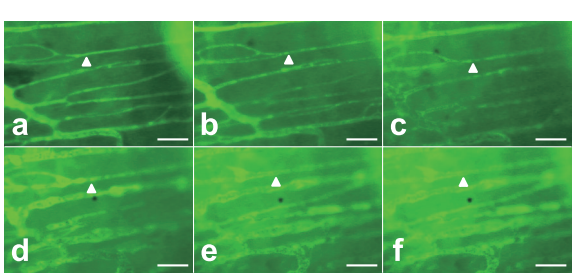


図17-１　T20群における毛細血管の経時的変化（scale bar=100μm）
a：０日目　b：１日目　c：２日目　d：３日目　e：４日目
f：５日目
０日目に比して，全ての観察期間で経時的に毛細血管径の拡張（矢尻）と毛細血管よりFITC-dextranが漏出し血管周囲の輝度が上昇していた．

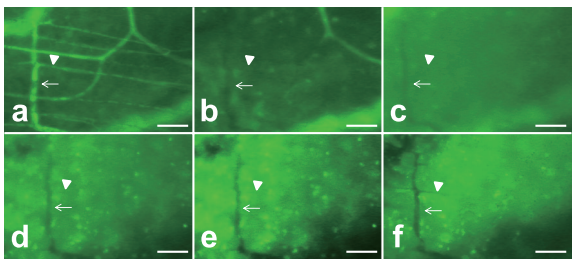


図17-２　T20群における毛細血管の経時的変化（scale bar=100μm）
a：０日目　b：１日目　c：２日目　d：３日目　e：４日目
f：５日目
著しい血管透過性の亢進に伴うFITC-dextranの漏出により血管周囲の輝度が上昇し，毛細血管の走行が観察不可能（矢尻）になり，血流が停止している部分（矢印）を認めた．

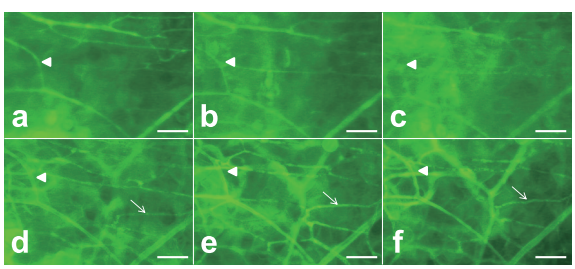


図18　T40群における毛細血管の経時的変化（scale bar=100μm）
a：０日目　b：１日目　c：２日目　d：３日目　e：４日目
f：５日目
毛細血管（矢尻）は全般的に血管径の増大がみられた．また新たな血管の分布（矢印）も認めた．T20群のように，血流は停止している部分は認めなかった．

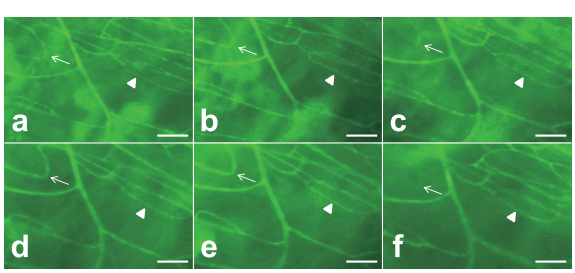


図19　T60群における毛細血管の経時的変化（scale bar=100μm）
a：０日目　b：１日目　c：２日目　d：３日目　e：４日目
f：５日目
毛細血管（矢尻）はcontrol群と同様に網目状の分布を示し，血管径は拡張しており，また毛細血管が消失する部分（矢印）を認めcontrol群と近似していた．

２．毛細血管径の経時的変化

図20に各群，時期における毛細血管の平均直径の変化率を示す．

normal群では，経時的に毛細血管径は微増し，観察開始時の毛細血管径に対して観察５日目では18.1 %の増加率を示した．control群では，同様に経時的に微増していたが，観察５日目では10.0 %の増加率とnormal群より低い値を示した．ただし，両者の間に優位な差は認めなかった．T20群においては，直径は１日目以降全期間を通じて

増大し，１日目18.2 %，２日目34.0 %，３日目47.8 %，４日目59.8 %，５日目70.7 %の増加率となり２日目以降すべての観察期間で，control群と比べて有意に増加していた．また，T60群と比べて４日目，５日目において有意に増加していた．なお，いずれの観察時期においても，T40群との間には有意な差は認めなかった．T40群においては，T20群と同様に全期間を通じて増大し，１日目は14.3 %の増加率でcontrol群に対して有意な差は認めなかったが，２日目には28.0 %，５日目には54.2 %の増加率を示し，２日目から５日目まではcontrol群に対して有意に増加していた．なお，いずれの観察時期においても，T60群との間には有意な差は認めなかった．T60群においてもまた全期間を通じて増加していた．

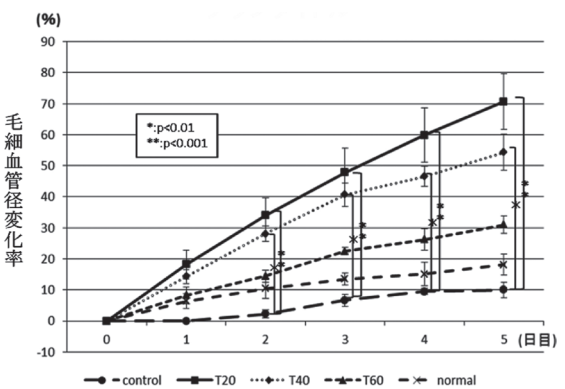


図20　毛細血管径の経時的変化

１日目以降，T20群，T40群は２日目以降control群に対して有意に増加していた．normal群，T60群は増加傾向を認めたが，全期間においてcontrol群と比較して有意な差を認めなかった．

４日目，５日目ではT60群に比べT20群では有意に増加していた．

３．出血傾向（図21）

図21に出血傾向を示す．normal群は１日目から２日目にかけて出血傾向はわずかに増加したが，２日目以降は変化しなかった．control群は３日目まで変化はなかったが，３日目以降は増加した．全期間を通して，normal群に比べてcontrol群では出血傾向が強かったものの有意差を認めなかった．一方，荷重付与群では，１日目以降全期間を通じてcontrol群に比べてT20群が有意に出血傾向が強かった．T40群，T60群においては，いずれもcontrol 群に比べて大きい傾向を示したが有意な差は認めず，さらにT20群に対しても有意な差は認めなかった．

４．消失率（図22）

図22に各群の毛細血管の消失率を示す．T20群は他のすべての群に比して有意に血管消失率が高かった．normal群，control群，T40群，T60群の間に有意な差を認めなかった．

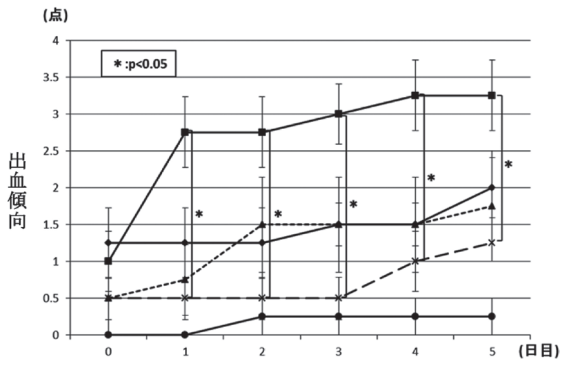


図21　出血傾向

normal群は１日目から２日目にかけて出血傾向は増加したが，２日目以降は変化しなかった．control群は３日目まで変化はなかったが，３日目以降は増加した．全期間を通して，有意差を認めなかったもののnormal群に比べて出血傾向は強かった．荷重付与群では，１日目以降control群に比べてT20群が有意に出血傾向が強かった．

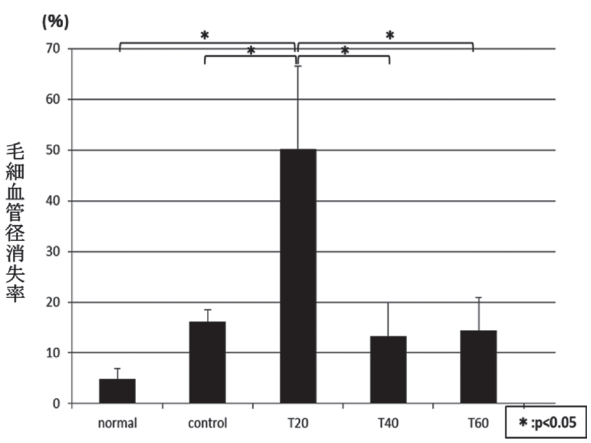


図22　毛細血管消失率

T20群は他のすべての群に比して有意に血管消失率が高かった．normal群，T40群，T60 群は，control群と比して有意な差を認めなかった．

考　　察

１．実験系について

１）荷重期間および荷重の大きさについて

辻ら[11, 12]は３時間の虚血と２時間の再灌流を繰り返す条件下では不可逆的な組織傷害が生じ，圧迫力が一定のもとでは一回の圧迫時間が長くなると組織傷害が強くなると報告している．そこで，我々は血管の脆弱化[4]が生じやすいと言われる高血糖下での矯正歯科治療における間歇的荷重付与は，毛細血管の拡張を引き起こす範囲の中で可及的に短時間であることが望ましいと考えた．これまで，12時間毎の間歇力[13]や，10分間毎の間歇力[14]に対する微小血管の反応についての報告はあるが，秒単位での荷重期間を設定しそれらを検討した報告はない．そこで本研究では，より短い荷重期間として１秒間という荷重期間を設定し

た．また，経皮的な圧迫によって毛細血管を閉塞するには30 g/cm^{2}程度の荷重が必要であり，90 g/cm^{2}程度の荷重を与えると細動脈も閉塞するという報告がある[11, 12]．力の大きさのコントロールが難しいといえる臨床に近い条件下での，間歇力に対する微小血管の反応を検討するために，本研究では持続力として微小血管に付与した際に不可逆的な傷害を引き起こすような荷重を与えることとした．そこで，実体顕微鏡で観察し圧迫部位の全ての血管が閉塞する100 g/cm^{2}の荷重の大きさを設定した．

2）血糖値について

森ら[17]は，３週齢ハムスターを用い，血糖値300 ㎎/dl以上（正常血糖値98±9 ㎎/dl）の個体を糖尿病群とし，またTakatoriら[18]は，８週齢ハムスターを用い，250 ㎎/dl以上（正常血糖値135.9±21.9 ㎎/dl）の個体を糖尿病群として用いているが，いずれの報告も糖尿病発症の診断基準は明確ではない．日本糖尿病学会が勧告している診断法[21]では，経口糖負荷試験で血糖値が200 mg/dl以上（正常域140 mg/dl未満）でかつ口渇，多飲，多尿，体重減少といった糖尿病の典型的症状をいずれか１つ示す場合に糖尿病型と判定してよいとしている．そこで本研究では，この診断法や先述した報告に準じて，STZ投与前の血糖値に対し，２倍以上の血糖値のもの，すなわちSTZ投与前の平均血糖値62 mg/dlに対しSTZ投与後４日目の血糖値が150 ㎎/dl以上でかつSTZ投与前に比べ体重減少を示した個体を糖尿病群として設定した．

2．微小血管の経時的変化について

毛細血管と毛細血管後細静脈は機能的に役割が異なり，毛細血管は酸素や栄養の供給，代謝産物の運搬を主な機能とし，毛細血管後細静脈は血球が血管外へ遊走する場であることから，炎症の際の治癒機転に果たす役割が重要な機能であると考えられている[22]．一方，微小血管の分類について，赤血球の直径が平均7.74 μmであることから毛細血管の直径は8 μm未満であるという報告[20]や直径10 μm以上25 μm未満の毛細血管が毛細血管後細静脈であるという報告[19]がある．工藤ら[16]は機械的刺激を加えた部位の組織において，毛細血管後細静脈に分類される太さまで拡張した毛細血管では白血球のrollingおよびadhesionという毛細血管後細静脈の機能を獲得したと報告している．今回，観察開始日の毛細血管径の実測値平均が6.2 μmであったことからすると，組織学的には，T20，T40群の４，５日目で見られたような拡張した毛細血管は毛細血管後細静脈に相当する太さまで変化し，その機能を獲得していた可能性が示唆される．しかし，T60群ではcontrol群と有意差を認めず，毛細血管後細静脈の機能を獲得する太さまで拡張させるには不十分な条件であったと考える．

糖尿病初期では，網膜細小血管において周皮細胞が変性，脱落し，血管壁の脆弱化が生じ，それにより点状出血が生じ[23]，さらに糖尿病の出血傾向における主な要因は毛細血管抵抗の減弱や易破壊性など血管因子であるという報告[24]がある．本研究では，T20群がcontrol群に比べて有意に出血傾向が高かった．これは，糖尿病による血管壁の脆弱化に加え１秒間の荷重付与により生じた組織傷害が19秒間では十分に回復せず徐々に蓄積することで，血管壁を破壊し出血を増長させた可能性があると推測される．この点，T40群，T60群では，control群と比べて有意差を認めなかったことをふまえると，荷重付与後の非荷重間で組織傷害が回復していた可能性がある．

さらに，T20群では圧迫部直下の微小血管の消失を認め，また毛細血管消失率が他群に比べ有意に高かった．これは，荷重頻度が多いことにより圧迫部直下の血管が長期にわたり虚血状態となり，次第に血流が停止したことで微小血管や毛細血管が消失したと考える．また，高血糖による血管壁の脆弱性により血管透過性が亢進し血管内外の輝度に差が生じなくなったことや，頻回な荷重による炎症の拡大[25]により滲出液が生じ，毛細血管壁の境界が不明瞭になったことも一因である考えられる．これらより，T20群は血管構造が破壊され微小血管を消失させる荷重条件であると考えられる．一方で，T40，T60群はcontrol群に比べ有意な差を認めなかったため，これらの条件では血管構造が維持され微小血管の消失が生じにくいと考えられる．これらに関しては，組織学的な検討も今後必要であると考える．

以上より，糖尿病を誘発したハムスターにおいてT20，T40群における間歇力は毛細血管を毛細血管後細静脈の太さまで拡張させうる荷重条件であるが，T20群では荷重付与直下での微小血管の血管壁の破壊による著しい出血や，それによる血流の停止，微小血管の消失をもたらすことをふまえると非荷重時間が短いと考える．それに対し，T60群では，出血傾向や微小血管の消失は少ないものの毛細血管を毛細血管後静脈の太さまで拡張させるには不十分な荷重条件であったと考える．こうしたことから，本研究ではT40群おける荷重条件が血管構造を維持しつつ毛細血管を毛細血管後細静脈の太さまで拡張させうる条件であったと考える．よって，糖尿病を誘発したハムスターの毛細血管においては，１秒間という短い荷重期間においても十分な非荷重期間を設けないと不可逆的な組織傷害が生じ，また血管構造を維持しつつ毛細血管の拡張を引き起こすには１秒の荷重期間と39秒の非荷重期間を繰り返す間歇力が有効であることが示された．なお，毛細血管は内皮細胞の微細構造をもとに分類[26]されるが，一般的に皮膚の毛細血管は連続型と有窓型を互いに移行する[27]のに対し，歯根膜や歯肉粘膜では有窓型が多く分布しているとされている[26]．これらより，皮膚と歯周組織の毛細血管構造が近似していることから，今回観察された背部皮膚の毛細血管における変

化は，歯周組織でも同様に生じる可能性があると考えられる．

結　　論

糖尿病を有するハムスターにおいては，１秒間の荷重付与と39秒間の非荷重付与を繰り返す間歇的矯正力を用いることで歯周組織の血管構造を維持しつつ，毛細血管が毛細血管後細静脈の太さまで拡張することが示唆された．

謝　　辞

本研究の一部は，文部科学省科学研究費補助金基盤研究㈽25463165および24593072の補助により行った．また実験を行うにあたりご理解，ご協力くださいました北海道大学大学院歯学研究院口腔機能学分野歯科矯正学教室の皆様に心よりお礼申し上げます．

参 考 文 献

1）岩崎万喜子，山本照子，永田裕保，山城　隆，三間雄司，高田健治，作田　守：過去12年間に大阪大学歯学部付属病院矯正科で治療を開始した成人患者の受診状況．日矯歯誌　53 : 696-703, 1994.
2）白賀のり子，上岡　寛，片岡伴記，植田紘貴，安藤涼子，石原嘉人，柳田剛志，村上　隆，黒坂　寛，菅原康代，本城　正，川邉紀章，山城　隆：岡山大学病院矯正歯科における来院患者の実態調査．岡山歯誌　28 : 107-114, 2009.
3）厚生労働省：平成25年国民健康・栄養調査
4）日高秀樹，中島　譲，青木孝彦，原田真理子，鈴木正昭，小杉圭右，原納　優，繁田幸男：糖尿病における末梢血管障害の臨床像における研究．糖尿病　32 : 195-201, 1989.
5）葛谷　健：【糖尿病の新しい診断基準と分類をめぐって】糖尿病の新しい分類と診断基準の概要．プラクティス16 : 259-263, 1999.
6）鈴木　清，滝澤　誠，石田　均：糖尿病骨減少症．日本栄養・食糧学会誌　52 : 35-39, 1999.
7）石田　均：糖尿病性骨減少症の病態生理学的研究．日本栄養・食糧学会誌　62 : 235-243, 2009.
8）Proffit W：プロフィトの現代歯科矯正学，302，クインテッセンス出版，東京，2004.
9）Brudvik P, Pygh P : Transition and determinants of orthodontic root resorption-repair sequence. Eur J Orthod 17 : 177-188, 1995.
10）Oppenheim A : A possibility for physiologic orthodontic movement. Am J Orthodontics and Oral Surg 30 : 277-328, 1944.
11）辻　晋作，舘　正弘，平林慎一：比較的簡便な実験的褥瘡モデルによる褥瘡発生原因の検討（第１報）．褥瘡会誌　4 : 83-87, 2002.
12）辻　晋作，市岡　滋，関谷直美，中塚貴志：Skinfold chamberを用いた実験的褥瘡モデルの開発．褥瘡会誌　5 : 480-486, 2003.
13）廣澤知之，佐藤嘉晃，飯田順一郎：機械的刺激による微小血管系の反応における加齢変化．北海道歯学雑誌　4 : 83-87, 2006.
14）角野晃大，飯田順一郎：機械的刺激の加わった毛細血管後細静脈における単球・多形核白血球の動態変化に関する研究．北海道歯学雑誌　25 : 245-257, 2004.
15）Iida J, Warita H, Nakagawa N, Soma K : White blood cell movement changes in post-capillary venule during intermittent or continuous compressions. Edited by Davidovitch Z, Norton L, Biological mechanisms of tooth movement and craniofacial adaptation, 189-194, Harvard society for the Advancement of orthodontics, Boston, 1996.
16）工藤悠介，佐藤嘉晃，飯田順一郎：機械的刺激による微小血管径の増大に伴う白血球動態の変化．北海道歯学雑誌　30 : 32-41, 2009.
17）森　洋一：ストレプトゾトシン誘発糖尿病ハムスターの齲蝕の重症化に関する研究．口腔衛生学会雑誌　42 : 79-89, 1992.
18）Takatori A, Ishii Y, Itagaki S, Kyuwa S, Yoshikawa Y : Amelioration of the β-cell dysfunction in diabetic APA hamsters by antioxidants and AGE inhibitor treatments. Diabetes Metab Res Rev 20 : 211-218, 2004.
19）Melcher AH : Orban's oral histology and embryology. 223-227, Mosby, St. Lois, 1986.
20）William B, Don WF : A Textbook of HISTOLOGY. 112-116, W.B.SAUNDERS COMPANY, Philadelphia-London-Toronto, 1962.
21）清野　裕，南條輝志男，田嶋尚子，門脇　孝，柏木厚典，荒木栄一，伊藤千賀子，稲垣暢也，岩本安彦，春日雅人，花房俊昭，羽田勝計，植木浩二郎：糖尿病の分類と診断基準に関する委員会報告（国際標準化対応版）．糖尿病　55 : 485-504, 2012.
22）Garter LP, Hiatt JL : 最新カラー組織学，西村書店，2003.
23）渡部大介，高木　均：血管内皮障害から細小血管障害へ．糖尿病　48 : 833-835, 2005.
24）国島　修：糖尿病に関する凝血学的研究．日医大誌　31 : 8-22, 1964.
25）梶　隆一：糖尿病と日和見感染症との関連性について

の基礎的研究．口科誌　37 : 409-424, 1988.
26）磯川桂太郎，稲井哲一朗，中村雅典，山本　仁，渡邊弘樹：組織学・口腔組織学．152-153，わかば出版，東京，2014.
27）池田重雄，荒田次郎，西川武二：標準皮膚科学．14-15，医学書院，東京，1997.

ORIGINAL

Changes of microvascular reactions induced by intermittent mechanical pressure in diabetic hamsters

Eisuke Nishikawa, Yoshiaki Sato, Kento Shoman, Yuusuke Kudo, Takaaki Yamamoto and Junichiro Iida

ABSTRACT : Recently, the number of adults and elderly people seeking orthodontic treatment has increased and we frequently encounter opportunities to treat patients with diabetes and of the diabetic corps. However, regarding tissue changes associated with orthodontic force to move teeth, much is still unclear about differences in the responsiveness of microvasculature to mechanical stimulus for those with hyperglycemia. In this study, we focused on intermittent pressure of shorter loading periods because the fragility of microvasculatures tends to advance in hyperglycemia. Thus far, it is clear that monocyte lineage cells are stimulated to migrate outside of blood vessels when capillaries are dilated to the width of post capillary venules by mechanical pressure in normoglycemia. However, there is no report examining microvascular changes in response to weak pressure stimulation, and in particular intermittent pressure, in hyperglycemia. The purpose of this study is to observe microvascular changes with intermittent pressure and to examine the load conditions under which sufficient vasodilation occurred with vascular structure maintained by streptozotocin-induced diabetic hamsters. Non-diabetic male Syrian golden hamsters (6 weeks old) are termed "normal group" (unloading) and streptozotocin-induced diabetic hamsters (5 weeks old) are divided into "control group" (unloading) and three loading groups. The three loading groups were alternately repeated loading and unloading. The duration for loading/unloading was 1sec/19secs (T20), 1sec/39secs (T40), and 1sec/59 secs (T60). Each animal was fitted with a specially-designed, purpose-built dorsal skinfold chamber with a loading device capable of exerting an intermittent pressure of 100 g/cm^2. Intermittent pressure was applied to the three loading groups. From day 1 until day 5, microvascular changes were observed with a stereoscopic microscope and a fluorescence microscope, and differences between the groups were observed with the following results.

1. Under loaded conditions, capillary diameters for the T20 and T40 groups were significantly higher than for the control group.
2. Under loaded conditions, the T20 group exhibited significantly stronger bleeding tendency than the control group.
3. Regarding disappearance rates of capillaries, the loss rate for the T20 group was significantly higher than for the other groups.

The above results suggest that through the application of intermittent orthodontic force in intervals consisting of one second of pressure followed by 39 seconds of rest, it may be possible to bring about dilation of the capillaries of diabetic hamsters while their structure is maintained in periodontal tissue.

Key Words : microvasculature, intermittent pressure, diabetes mellitus, orthodontic force

Orthodontics, Department of Oral Functional Science, Faculty of Dental Medicine and Graduate School of Dental Medicine, Hokkaido University (Chief : Specially Appointed Prof. Junichiro Iida), Kita 13, Nishi 7, Kita-ku, Sapporo, 060-8586, Japan