

Porphyromonas gingivalis 感染がもたらす全身への影響

—マウス口腔内感染モデルでの検討—

望 月 小 枝 加

日本大学大学院歯学研究科歯学専攻
(指導: 宮崎真至 教授, 菅野直之 准教授)

要旨: 糖尿病と歯周病の関連性における炎症性サイトカインおよび脂質代謝関連因子の役割を明らかにするために、歯周病原細菌感染モデル(歯周病モデル)を2型糖尿病マウスを用いて作製し、検討した。

Porphyromonas gingivalis(*P. gingivalis*)死菌で感作させた糖尿病マウスおよびコントロールマウスの上顎右側第2臼歯の歯肉溝に、*P. gingivalis*生菌を浸漬させた絹糸を結紮し、歯周病モデルを作製した。結紮後、マイクロCT撮影、ELISA法、リアルタイムPCR法および病理組織学的観察を行った。マイクロCTを用いた検討から、糖尿病マウスでは有意な歯槽骨吸収の増加が認められた。ELISA法による血清中TNF- α およびIL-6タンパク量では両マウス間に差は認められなかったが、肝臓でのTNF- α 遺伝子発現が両群ともに0日目と比較して5日目で有意な上昇が確認された。代謝関連遺伝子の発現ではSREBP-1cは糖尿病マウスにおいて5および7日目でコントロールマウスに比べて有意に高く、IRS-2遺伝子発現は、糖尿病マウスにおいて0日目と比較して7および10日目で有意な減少が認められた。本実験の結果から、歯周組織における*P. gingivalis*局所感染が遠隔臓器である肝臓に影響を及ぼしていることが示唆された。

キーワード: 2型糖尿病マウス, 結紮歯周病モデル, 肝臓, 炎症性サイトカイン, 脂質代謝関連因子

緒 言

糖尿病は、インスリン作用の不足によって生じる慢性高血糖状態を主徴とし、これに様々な代謝異常を伴う疾患である。糖尿病における高血糖状態の持続は、特有の合併症を発症しやすく、そのなかでも歯周病は第6の合併症といわれている¹⁾。歯周病は、歯周組織の破壊を伴う炎症性疾患で、わが国では35歳以上の国民の8割が罹患している²⁾。血糖コントロールが不良な糖尿病患者では、過剰な炎症反応あるいは創傷治癒遅延などによって、歯周組織破壊が進行しやすいと考えられている³⁻⁵⁾。一方、歯周組織局所の慢性炎症で産生される炎症性サイトカインは、血流を介して全身に波及し、インスリン抵抗性を惹起するとされており^{6,7)}、糖尿病と歯周病には双方向性の関係があると考えられている⁸⁻¹¹⁾。

糖尿病と歯周病の関係については、介入研究を含む多くの疫学研究がされている。歯周組織破壊は糖尿病患者で有意に多いこと¹²⁻¹⁴⁾、糖尿病を有する歯周病患者では、歯周病治療によって血糖コントロールが有意に改善されたこと¹⁵⁻²⁰⁾などが報告されている。また、糖尿病患者の経過観察を行ったところ、歯周炎を有さない者あるいは軽度の者に比べ、中等度から重度の歯周炎を有する者では死亡率が5倍以上に上昇しており、糖尿病患者では歯周組織の健康を保つことが虚血性心疾患や糖尿病性腎症

などの合併症を予防し、死亡リスクを低減化することにつながるとされている²¹⁾。

また、糖尿病と歯周病との関連性の解明を目的とした動物実験での検討も行われている²²⁻²⁴⁾。西原らは糖尿病マウスを用いて頭頂部への*Porphyromonas gingivalis*(*P. gingivalis*)感染が血糖値および血清レベルでのTNF- α およびIL-6の上昇をもたらすことを示している²⁵⁾。一方、細菌由来のLPSが肝臓への脂肪沈着を助長するとの報告があり²⁶⁾、歯周病が肥満に影響を与える可能性も示唆されている²⁷⁾。そこで本研究では、糖尿病と歯周病との関連を解明することを目的として、炎症性サイトカインおよび脂質代謝関連因子に焦点を当て、糖尿病自然発症型マウスであるKK-Ay/Taマウスを用いて口腔内での歯周病原細菌感染モデル(以後歯周病モデル)を作製し、検討を加えた。

材料および方法

1. 実験動物

実験には、糖尿病マウスとしてKK-Ay/Taマウス20匹およびコントロールマウスとしてC57BL/6マウス20匹、合計40匹(雄性6週齢、日本クレア)を用いた。KK-Ay/Taマウスは、過度の肥満と高血糖などの代謝異常をきたすことから、2型糖尿病モデルとして用いられている^{28,29)}。マウスは、恒温恒湿(23 $\pm$ 2 $^{\circ}$ C, 55 $\pm$ 5%

(受付: 平成27年1月9日)

〒101-8310 東京都千代田区神田駿河台1-8-13

RH), 午前7時点灯, 12時間明暗サイクルの飼育室において, 実験に先立って1週間順化させた。なお, 飼育期間中ラット・マウス用MF固形飼料(オリエンタル酵母工業)と水道水は自由に摂取させた。実験プロトコールは, 日本大学歯学部動物実験委員会の承認(AP12D004)の下で, 動物実験指針に従って行うとともに, 動物の苦痛軽減および使用動物数の低減に努めた。

2. 体重および血糖値測定

マウスの状態の観察, 体重および血糖値測定は経時的に行った。末梢血は歯周病モデル作製から0, 1, 5, 7および10日目において12時間絶食後に尾静脈から採血した。空腹時血糖は, 血糖値測定器(アセンシアブリーズ2, バイエル薬品)を用いて測定した。

3. *P. gingivalis* の培養

P. gingivalis FDC381株は10%ウマ血液添加ブルセラHK寒天培地(極東製薬工業)で37℃, 嫌気(80% N₂, 10% H₂, 10% CO₂)培養した。細菌を対数増殖期に集菌し, 滅菌リン酸緩衝生理食塩水(PBS)で3回洗浄後, 滅菌PBSに懸濁した。細菌数は, 分光光度計(Spectrophotometer U-1100, 日立)を用い, 550 nmで測定し, 菌懸濁液の濁度と, 同菌液を培地に塗抹・培養して得られた形成コロニー数とで作成した検量線を用いて算定した³⁰⁾。

4. *P. gingivalis* の感作および口腔内への接種

P. gingivalis を1%パラホルムアルデヒドで4時間固定し, 滅菌PBS中に浮遊させた。2.5×10⁸個/50 μLに菌数を調整した後, マウス背部皮下に, 1週間毎に3回接種し, 感作を行った。感作開始から4週目に, *P. gingivalis* の生菌(2.0×10⁸個/mL)を含む培養液に絹糸を浸漬し, KK-Ay/TaとC57BL/6マウスの上顎右側第2臼歯の歯肉溝に結紮した。絹糸は1, 3, 5および7日目に結紮状態を確認した後, その都度マイクロブラシ(松風)を用いて菌液を塗布した。歯肉溝への結紮から0, 5, 7および10日後に各群5匹ずつ, 予備麻酔として5%イソフルラン麻酔を吸入させた後, 三種混合麻酔(塩酸メデトミジン0.3 mg/kg, ミダゾラム4 mg/kg, 酒石酸ブトルファノール5 mg/kg)を腹腔内注射し, 全身麻酔を施し, 1/80,000エピネフリン含有2%キシロカイン(デンツプライ三金)で腹部切開部位に局所麻酔を行った。その後, 還流固定に準じた方法によって採血および脱血を行い, 10%中性緩衝ホルマリン液(和光純薬工業)を用いて全身固定して, 上顎骨および肝臓を切除し, 試料とした。

5. 歯槽骨吸収の評価

実験動物用3DマイクロCT(マイクロCT, R_mCT, リガク)を用いて, 接種後0, 5, 7および10日目に上顎右側第2臼歯の撮影を行った。撮影条件はvoxel size 20×20×20 μm, 管電圧90 kV, 管電流100 μA照射時間17秒とした。また, 撮影時は口蓋骨が基準平面(水平面)

と平行で, 正中口蓋縫合が基準平面(垂直面)に平行となるように, マイクロCT内で試料方向を調整した。得られたデータは, i-VIEW(リガク)を用いて解析し, 矢状方向(X)の断層像を観察した。上顎右側第3臼歯近心と第2臼歯遠心のセメント-エナメル境を結び, この基準線から垂直に歯槽骨頂部までの距離を測定し, その距離を歯槽骨吸収量とした^{31,32)}。

6. 血清中TNF-αおよびIL-6タンパク量の測定

血清 tumor necrosis factor-α(TNF-α)および interleukin-6(IL-6)タンパク量はELISA kit(BioSource)を用い, 製造者の指示に従って測定した。マウスTNF-αあるいはIL-6抗体でコーティングされた96穴プレートに, 採血した血液から分離した各血清サンプルおよびbiotin標識マウスTNF-α抗体あるいはIL-6抗体をそれぞれ50 μL加え, 室温で90~120分間反応させた後, washing bufferで4回洗浄した。次いで, 各ウェルにstreptavidin-HRP working solution 100 μLあるいはbiotin標識マウスIL-6抗体を加えて30分間反応後, 再びwashing bufferで4回洗浄した。その後, stabilized chromogen 100 μLを加えて, 30分間呈色反応を行ない, stop solution 100 μLを添加して反応を停止させた。吸光度の測定は, マイクロプレートリーダー(iMark, Bio-Rad)を用いて行い, それぞれ3回繰り返した。

7. 肝臓中TNF-α, IL-6および代謝関連遺伝子の発現

肝臓は, 摘出直後にRNA stabilization reagent(Qiagen)中に浸漬し, 氷中でホモジナイズした後, RNeasy Mini Kit(Qiagen)を用いてトータルRNAの抽出を行った。トータルRNA 5 μgからfirst-strand synthesis kit(Amersham Biosciences)にてcDNAを作製し, リアルタイムPCR法に供試した。TNF-α, IL-6, adiponectin receptor 2(AdipoR2), sterol regulatory element-binding protein-1c(SREBP-1c)およびinsulin receptor substrate-2(IRS-2)に対する特異的プライマーおよびプローブとしてはAssay-on-Demand Gene Expression Products(Applied Biosystem)を用いた。増幅および測定は, ABIPRISM 7700検出システム(Applied Biosystem)を用いて, 50℃ 5分(1サイクル), 95℃ 10分(1サイクル)の加熱後, 95℃ 15秒と60℃ 1分(40サイクル)の条件で行った。発現の強度はハウスキーピング遺伝子であるGlyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase(GAPDH)の増幅量で補正し, 相対的な比率として求めた。

8. 局所感染巣の組織学的観察

還流後の各マウスから結紮を行った第2臼歯を含む領域を切除し, 組織切片作製のために4%パラホルムアルデヒド(和光純薬工業)液中に12時間浸漬することで固定し, 0.5 M EDTA(和光純薬工業)にて脱灰させた後, 通法に従ってパラフィンに包埋した。上顎右側第2臼歯を中心に矢状方向に薄切し, ヘマトキシリン・エオジン

染色を施した後、光学顕微鏡(AHIBS-514, オリンパス)を用いて観察を行った。

9. 統計学的分析

コントロールマウスと糖尿病マウス間の有意差の検定には、Mann-Whitney の *U* 検定を用い、同一マウスにおける 0 日に対する有意差の検定には、Wilcoxon の符号付順位和検定を用いた。また、いずれの検定においてもその危険率を 5% とした。

結 果

1. 空腹時血糖値および体重の変化

糖尿病マウスおよびコントロールマウスともに、実験期間中における有意な血糖値および体重の変化は認められなかった(第 1, 2 図)。

2. 歯槽骨吸収の形態学および組織学的評価

マイクロ CT 画像による歯槽骨の解析では、糖尿病マウスにおいて根尖付近に及ぶ歯槽骨吸収が観察された(第 3 図)。歯槽骨吸収量は、10 日目の糖尿病マウスにおいてコントロールマウスと比較して有意な増加が認められた(第 4 図)。糖尿病マウスでは 5 日目から、コントロー

ルマウスでは 7 日目から、0 日目と比較して有意な歯槽骨吸収量の増加が認められた。

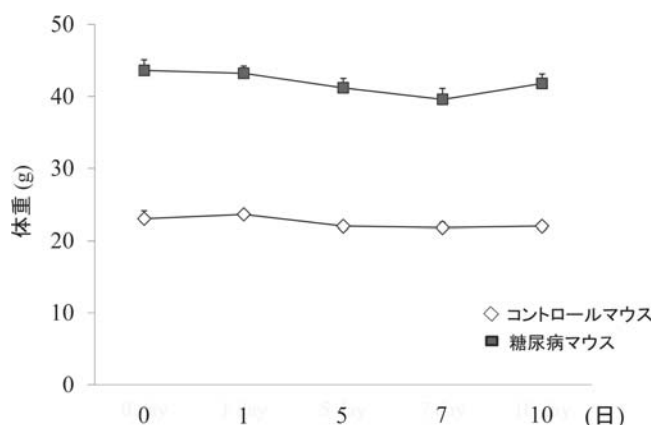
組織学的所見からは、10 日目の糖尿病マウスでコントロールマウスと比較して著明な炎症性細胞の浸潤と歯槽骨吸収が認められた(第 5 図)。

3. 血清中の TNF- α および IL-6 タンパク量

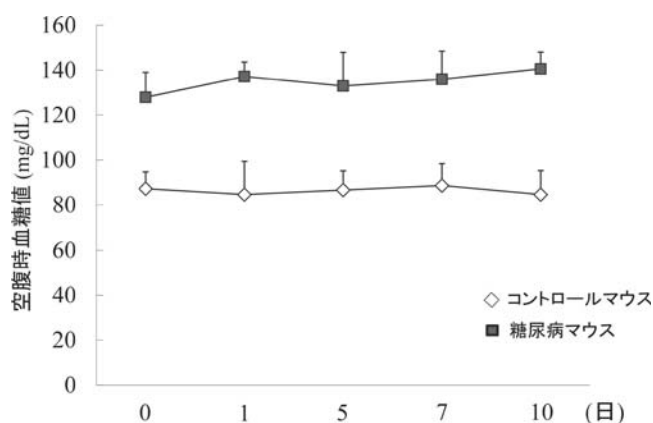
血清中の TNF- α および IL-6 タンパク量は、糖尿病マウスおよびコントロールマウスのいずれにおいても、実験期間中で変化は認められなかった(第 6, 7 図)。

4. 肝臓における TNF- α , IL-6 および代謝関連遺伝子の発現変化

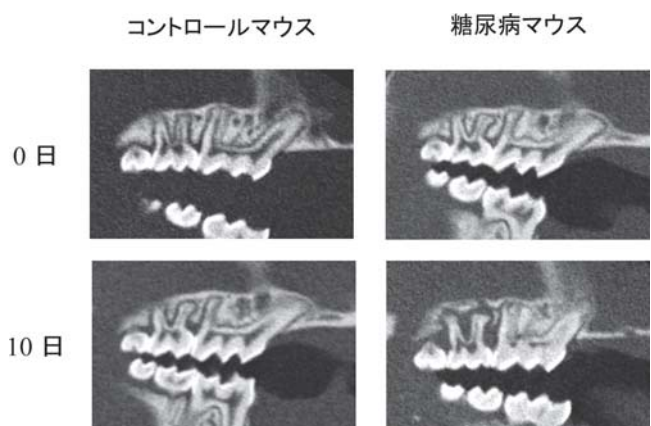
TNF- α 遺伝子の発現は、糖尿病マウスにおいて 0 日目で、コントロールマウスと比較して有意に高かったが、その後、両群間に差は認められなかった。経時的には、両群とも 5 日目に 0 日目と比較して有意な上昇が認められたものの、7 日目以降では有意に低下した(第 8 図)。IL-6 遺伝子の発現は、糖尿病マウスにおいて 0 日目でコ



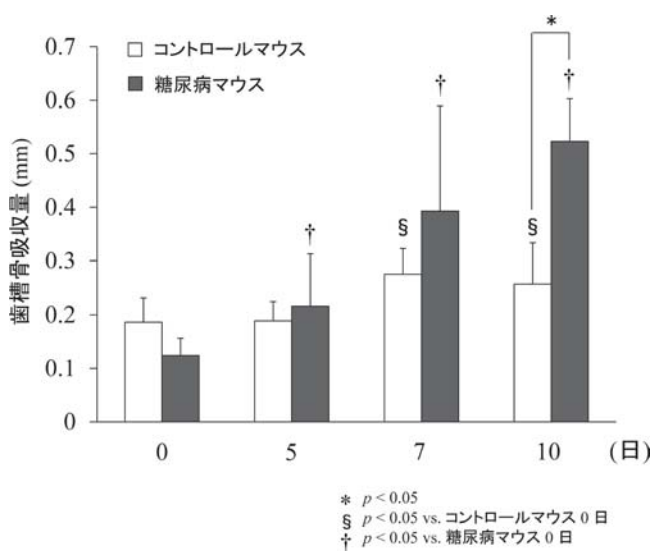
第 1 図 口腔内感染後の体重の変化



第 2 図 口腔内感染後の空腹時血糖値の変化



第 3 図 マイクロ CT 画像による歯槽骨吸収の解析



第 4 図 口腔内感染後の歯槽骨吸収量の変化

コントロールマウス

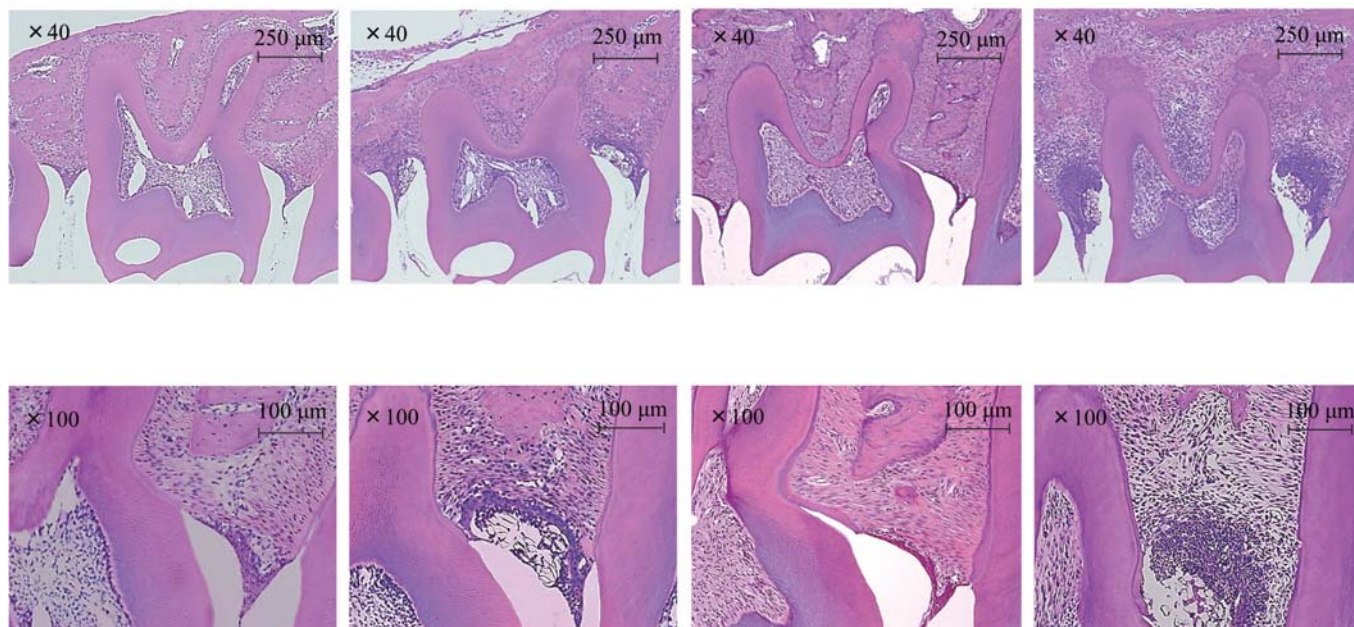
糖尿病マウス

0 日

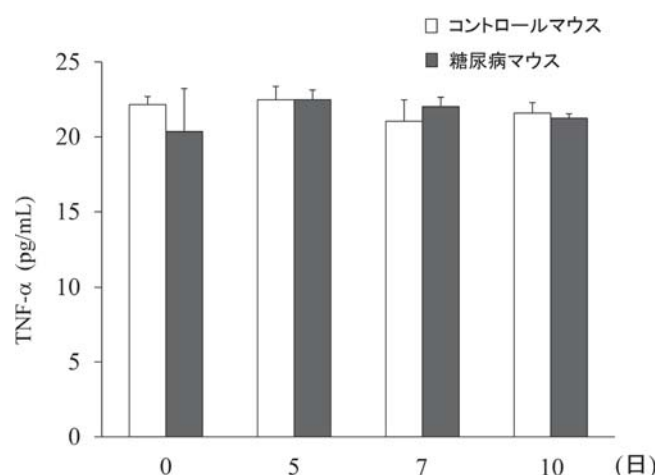
10 日

0 日

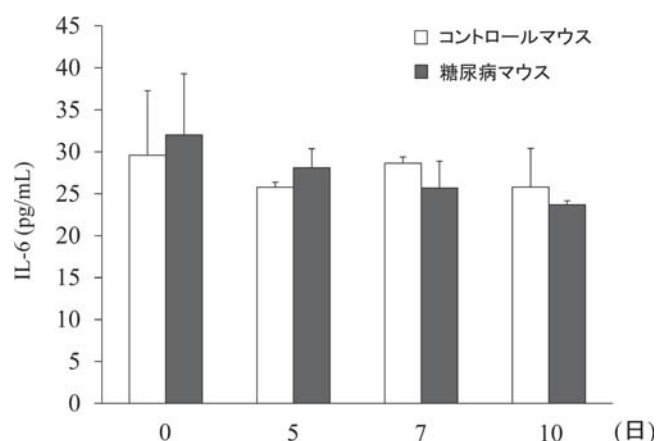
10 日



第5図 口腔内感染部位の組織学的評価



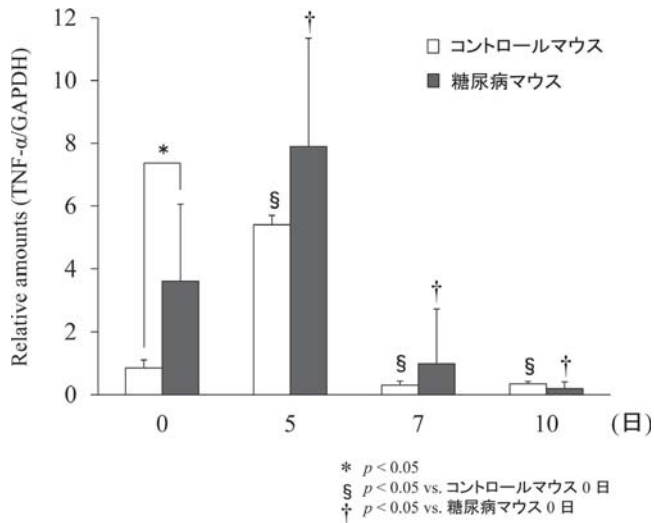
第6図 口腔内感染後の血清中 TNF- α タンパク量の変化



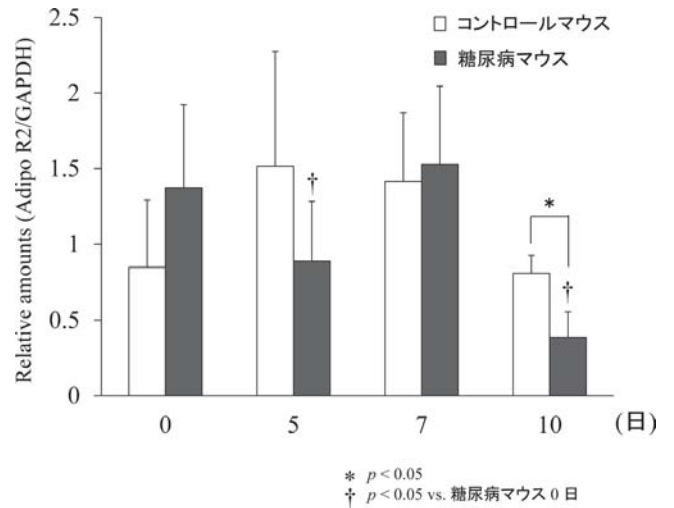
第7図 口腔内感染後の血清中 IL-6 タンパク量の変化

コントロールマウスに比べ有意に高かった。コントロールマウスにおいては5日目で糖尿病マウスと比較して、有意に高かった。経日的には、コントロールマウスで0日目と比較し5日目において有意に上昇し、7日目以降で有意に低下した。糖尿病マウスでは0日目と比較し、7日目以降で有意な低下が認められた(第9図)。Adipo R2 遺伝子の発現は、糖尿病マウスにおいて10日目でコントロールマウスと比較して有意に低下した。経日的には糖尿病マウスで5および10日目において0日目と比較

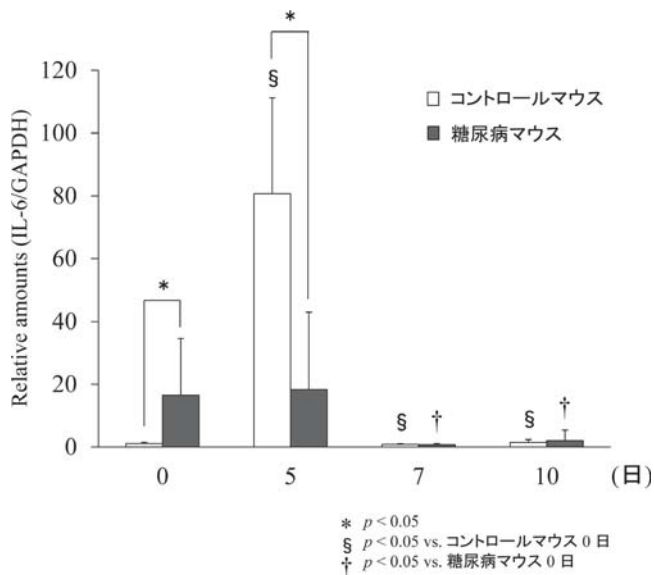
して有意な低下が認められた(第10図)。SREBP-1c 遺伝子の発現は、糖尿病マウスで5および7日目においてコントロールマウスに比べ有意に高くなった。経日的にはコントロールマウスで10日目において0日目と比較して有意な上昇が認められた(第11図)。IRS-2 遺伝子の発現は、糖尿病マウスにおいて5日目以降でコントロールマウスと比較して有意に低下した。経日的にはコントロールマウスで0日目と比較して5日目に有意に上昇し、7日目で有意に低下した。一方、糖尿病マウスでは



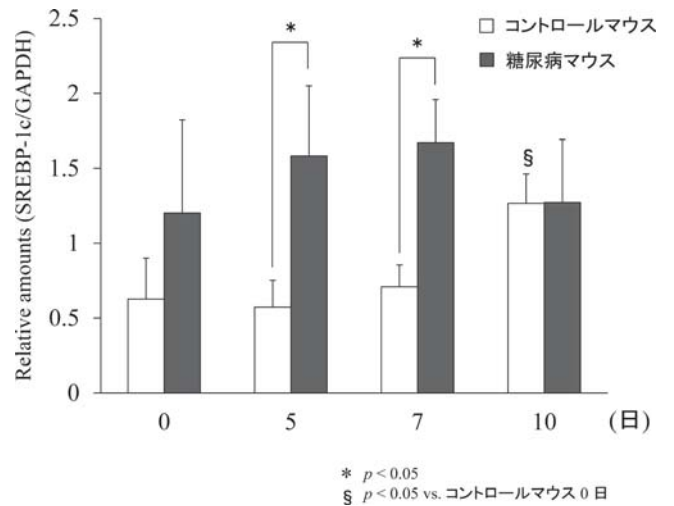
第8図 口腔内感染後の肝臓中 TNF-α 遺伝子発現量の変化



第10図 口腔内感染後の肝臓中 Adipo R2 遺伝子発現量の変化



第9図 口腔内感染後の肝臓中 IL-6 遺伝子発現量の変化

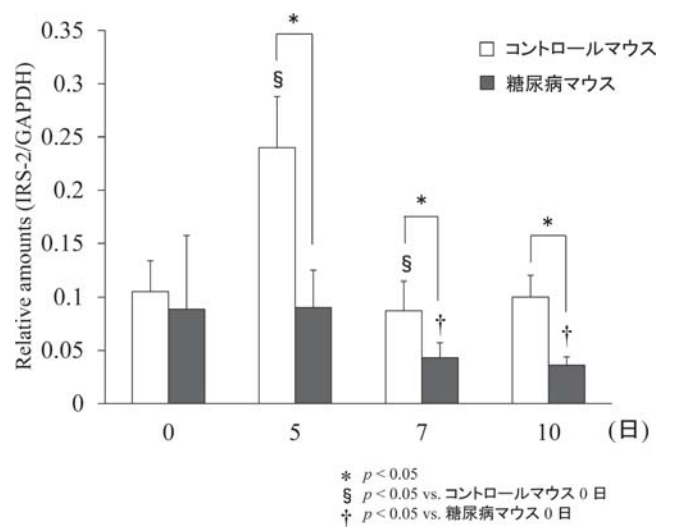


第11図 口腔内感染後の肝臓中 SREBP-1c 遺伝子発現量の変化

0日目と比較して7日目以降で有意な低下が見られた(第12図)。

考 察

本研究では、歯周病モデルを用いて糖尿病と歯周病の相互関係について検討を加えた。Nishihara ら²⁵⁾は、ホルムアルデヒド固定した *P. gingivalis* で感作した糖尿病マウスを用いて、その頭頂部に *P. gingivalis* の生菌を感染させたところ、血糖値の上昇と血清中の TNF-α 量など、全身への顕著な影響があったことを報告している。本研究では、同様の手法によって *P. gingivalis* で感作した糖尿病マウスを用いたが、前述の研究に比べ、接種した菌数が少なかったために、血糖値および血清中



第12図 口腔内感染後の肝臓中 IRS-2 遺伝子発現量の変化

TNF- α 、IL-6 タンパク量に変化が認められなかった。しかし、糖尿病マウスではコントロールマウスと比較して明らかな歯槽骨吸収が認められたことから、本モデルを歯周病と糖尿病の相互関係を検討するために用いることが可能であると考えられた。

本実験の結果から、歯周組織局所に *P. gingivalis* を接種したことによって、血糖値および血清中 TNF- α 、IL-6 タンパク量に有意な変化は認められなかった。しかし、肝臓においては TNF- α および IL-6 遺伝子発現は5日目に上昇した。肝臓の重要な機能のひとつとして、血糖値の調節作用がある。摂食時の血糖値が上昇した際に、過剰な糖をグリコーゲンとして貯蔵するとともに、空腹時などにおいて糖が必要な際にはグリコーゲンを分解して放出するという機能である³³⁾。本実験に用いた歯周病モデルにおける肝臓での TNF- α の上昇は、インスリンの標的器官である肝臓の正常な糖代謝を阻害し、糖尿病の発症や進展に少なからず関与していることを示すものと考えられた。

さらに、肝臓における代謝関連遺伝子の発現を検討したところ、SREBP-1c において糖尿病マウスでは5および7日目でコントロールマウスに比べ有意に高かった。一方、IRS-2 はコントロールマウスで5日目に有意に上昇したものの、糖尿病マウスでは上昇することなく、結紮期間を追うごとに有意に減少した。SREBP-1c は、細胞内のコレステロール合成を制御する転写因子であり、その慢性的な活性化は脂肪合成の増加を惹き起こすことで、脂肪肝の形成に関与する^{34,36)}。さらに SREBP-1c は、IRS-2 プロモーターに直接結合することで、IRS-2 の発現を転写レベルで抑制している³⁷⁾。IRS-2 は、インスリン受容体基質として、インスリンシグナルの伝達因子^{38,39)}として機能していることから、その発現の抑制によってインスリン作用の障害を惹起し、その結果インスリン抵抗性につながると考えられる。一方、コントロールマウスでは0日目と比較して5日目で IRS-2 の上昇が認められた。IRS-2 は IL-6 によってその発現が誘導され⁴⁰⁾、細菌の接種によって誘導された IL-6 が IRS-2 を上昇させ、肝臓での恒常性を保つ機能が作用した可能性がある。Adipo R2 は、肝臓に多く発現して、アディポネクチンの結合によって、脂肪代謝亢進と糖新生抑制が生じる。Adipo R2 の発現は、インスリンによって間接的に抑制されると考えられており⁴¹⁾、本研究の結果における Adipo R2 発現の変動は、実験期間中のインスリンレベルの変化によってもたらされた可能性があると考えられた。Adipo R2 は、糖尿病マウスにおいて10日目でコントロールマウスと比較してその発現が有意に低下し、これによってアディポネクチンの作用不全が生じてインスリン抵抗性を示したものと推測される。このような代謝関連遺伝子の発現の変動は、肝臓での脂肪合成の増加や

インスリン作用の障害をもたらし、歯周病を有する糖尿病患者の脂質代謝異常、脂肪肝の形成あるいは糖尿病の症状の悪化の一因になる可能性が示唆された。

ペリオドンタルメディスンの概念は、1990年代後半に提唱され、以来、多くの疫学データや実験データに基づいて広く認知されている^{42,43)}。この概念に基づけば、歯周病が全身に影響を及ぼすメカニズムの中核をなすものは、歯周局所の炎症因子の産生と歯周ポケット内の潰瘍面からの細菌の侵入である^{44,45)}。本実験に用いたマウス歯周病モデルでは、全身レベルでの著明な変化は認められなかったが、肝臓では糖尿病マウスおよびコントロールマウスのいずれの群においても炎症性サイトカインの遺伝子発現には変化が認められた。このように、全身レベルとしての炎症性サイトカインや血糖値の変化は認められなかったものの、肝臓における遺伝子発現レベルの変化が持続することによって、肝臓疾患、糖尿病、あるいは脂質代謝異常など全身への影響を及ぼす可能性が考えられた。

以上のように、糖尿病を有するマウス歯周病モデルを用いた本研究の結果から、歯周組織局所の *P. gingivalis* 接種は肝臓の遺伝子発現に影響を及ぼすことが示された。

結 論

糖尿病マウスの上顎右側第2臼歯に *P. gingivalis* を浸漬させた絹糸を結紮することで歯周病モデルを作製し、局所の歯槽骨吸収、炎症性サイトカインおよび脂質代謝関連因子を検討した結果、以下の結論を得た。

1. 糖尿病マウスにおいて、コントロールマウスと比較して有意な歯槽骨吸収が認められた。
2. 肝臓における TNF- α 遺伝子の発現は、両群ともに0日目と比較して5日目で有意に上昇した。IL-6 遺伝子の発現は、コントロールマウスにおいて0日目と比較して5日目で有意な上昇が認められた。
3. 肝臓中における SREBP-1c 遺伝子の発現は、糖尿病マウスにおいて5および7日目でコントロールマウスと比較して有意に高くなった。IRS-2 遺伝子の発現は、糖尿病マウスにおいて0日目と比較して7および10日目で有意な減少が認められた。

以上のことから、歯周組織局所の *P. gingivalis* 接種は肝臓の遺伝子発現に影響を及ぼすことが示唆された。

本研究遂行にあたり、格別なるご指導ご鞭撻を賜りました日本大学歯学部歯科保存学第Ⅲ講座 宮崎真至教授に謹んで心より感謝申し上げます。

また本研究を通じ多大なるご協力ご助言をいただきました菅野直之准教授および同講座の皆様へ深く感謝します。

文 献

- 1) Loe H (1993) Periodontal disease. The sixth complication of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 16, 329-334.
- 2) 厚生労働省(2011)平成 23 年度歯科疾患実態調査
- 3) Page RC, Offenbacher S, Schroeder HE, Seymour GJ, Kornman KS (1997) Advances in the pathogenesis of periodontitis: summary of developments, clinical implications and future directions. *Periodontol* 2000 14, 216-248.
- 4) Nassar H, Kantarci A, van Dyke TE (2007) Diabetic periodontitis: a model for activated innate immunity and impaired resolution of inflammation. *Periodontol* 2000 43, 233-244.
- 5) Taylor JJ, Preshaw PM, Lalla E (2013) A review of the evidence for pathogenic mechanisms that may link periodontitis and diabetes. *J Clin Periodontol* 40, S113-S134.
- 6) Colombo NH, Shirakashi DJ, Chiba FY, Coutinho MS, Ervolino E, Garbin CA, Machado UF, Sumida DH (2012) Periodontal disease decreases insulin sensitivity and insulin signaling. *J Periodontol* 83, 864-870.
- 7) Demmer RT, Squillaro A, Papapanou PN, Rosenbaum M, Friedewald WT, Jacobs DR Jr, Desvarieux M (2012) Periodontal infection, systemic inflammation, and insulin resistance: results from the continuous National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES) 1999-2004. *Diabetes Care* 35, 2235-2242.
- 8) Mealey BL, Oates TW (2006) Diabetes mellitus and periodontal diseases. *J Periodontol* 77, 1289-1303.
- 9) Negrato CA, Tarzia O, Jovanović L, Chinellato LE (2013) Periodontal disease and diabetes mellitus. *J Appl Oral Sci* 21, 1-12.
- 10) Chapple IL, Genco R (2013) Diabetes and periodontal diseases: consensus report of the Joint EFP/AAP Workshop on Periodontitis and Systemic Diseases. *J Periodontol* 84, S106-S112.
- 11) Casanova L, Hughes FJ, Preshaw PM (2014) Diabetes and periodontal disease: a two-way relationship. *Br Dent J* 217, 433-437.
- 12) Karima M, Kantarci A, Ohira T, Hasturk H, Jones VL, Nam BH, Malabanan A, Trackman PC, Badwey JA, Van Dyke TE (2005) Enhanced superoxide release and elevated protein kinase C activity in neutrophils from diabetic patients: association with periodontitis. *J Leukoc Biol* 78, 862-870.
- 13) Khader YS, Dauod AS, El-Qaderi SS, Alkafajei A, Batayha WQ (2006) Periodontal status of diabetics compared with non-diabetics: a meta-analysis. *J Diabetes Complications* 20, 59-68.
- 14) Jansson H, Lindholm E, Lindh C, Groop L, Brattahall G (2006) Type 2 diabetes and risk for periodontal disease: a role for dental health awareness. *J Clin Periodontol* 33, 408-414.
- 15) Grossi SG, Skrepicki FB, DeCaro T, Robertson DC, Ho AW, Dunford RG, Genco RJ (1997) Treatment of periodontal disease in diabetics reduces glycated hemoglobin. *J Periodontol* 68, 713-719.
- 16) Faria-Almeida R, Navarro A, Bascones A (2006) Clinical and metabolic changes after conventional treatment of type 2 diabetic patients with chronic periodontitis. *J Periodontol* 77, 591-598.
- 17) Katagiri S, Nitta H, Nagasawa T, Uchimura I, Izumiyama H, Inagaki K, Kikuchi T, Noguchi T, Kanazawa M, Matsuo A, Chiba H, Nakamura N, Kanamura N, Inoue S, Ishikawa I, Izumi Y (2009) Multi-center intervention study on glycohemoglobin (HbA1c) and serum, high-sensitivity CRP (hs-CRP) after local anti-infectious periodontal treatment in type 2 diabetic patients with periodontal disease. *Diabetes Res Clin Pract* 83, 308-315.
- 18) Simpson TC, Needleman I, Wild SH, Moles DR, Mills EJ (2010) Treatment of periodontal disease for glycaemic control in people with diabetes. *Cochrane Database Syst Rev* 12; (5) CD004714.
- 19) Koromantzos PA, Makrilakis K, Dereka X, Katsilambros N, Vrotsos IA, Madianos PN (2011) A randomized, controlled trial on the effect of non-surgical periodontal therapy in patients with type 2 diabetes. Part I: effect on periodontal status and glycaemic control. *J Clin Periodontol* 38, 142-147.
- 20) Engebretson S, Kocher T (2013) Evidence that periodontal treatment improves diabetes outcomes: a systematic review and meta-analysis. *J Periodontol* 84, S153-S169.
- 21) Saremi A, Nelson RG, Tulloch-Reid M, Hanson RL, Sievers ML, Taylor GW, Shlossman M, Bennett PH, Genco R, Knowler WC (2005) Periodontal disease and mortality in type 2 diabetes. *Diabetes Care* 28, 27-32.
- 22) Ishihara Y, Anan H, Yoneda M, Maeda K, Hirofuji T (2007) Susceptibility of type 2 diabetic mice to low-virulence bacterial infection: induction of abscess formation by gingipain-deficient *Porphyromonas gingivalis*. *J Periodontal Res* 42, 253-258.
- 23) Li H, Yang H, Ding Y, Aprecio R, Zhang W, Wang Q, Li Y (2013) Experimental periodontitis induced by *Porphyromonas gingivalis* does not alter the onset or severity of diabetes in mice. *J Periodontal Res* 48, 582-590.
- 24) Cintra LT, Samuel RO, Facundo AC, Prieto AK, Sumida DH, Bomfim SR, Souza JC, Dezan-Júnior E, Gomes-Filho JE (2014) Relationships between oral infections and blood glucose concentrations or HbA1c levels in normal and diabetic rats. *Int Endod J* 47, 228-237.
- 25) Nishihara R, Sugano N, Takano M, Shimada T, Tanaka H, Oka S, Ito K (2009) The effect of *Porphyromonas gingivalis* infection on cytokine levels in type 2 diabetic mice. *J Periodontal Res* 44, 305-310.
- 26) Cani PD, Amar J, Iglesias MA, Poggi M, Knauf C, Bastelica D, Neyrinck AM, Fava F, Tuohy KM, Chabo C, Waget A, Delmée E, Cousin B, Sulpice T, Chamontin B, Ferrières J, Tanti JF, Gibson GR, Casteilla L, Delzenne NM, Alessi MC, Burcelin R (2007) Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance. *Diabetes* 56, 1761-1772.
- 27) Tomofuji T, Ekuni D, Yamanaka R, Kusano H, Azuma T, Sanbe T, Tamaki N, Yamamoto T, Watanabe T, Miyauchi M, Takata T (2007) Chronic administration of lipopolysaccharide and proteases induces periodontal

- inflammation and hepatic steatosis in rats. *J Periodontol* 78, 1999-2006.
- 28) Taketomi, S, Tsuda, M, Matsuo, T, Iwatsuka, H, Suzuoki, Z (1973) Alternations of hepatic enzyme activities in KK and yellow KK mice with various diabetic states. *Horm Metab Res* 5, 333-339.
 - 29) Yamauchi T, Kamon J, Waki H, Terauchi Y, Kubota N, Hara K, Mori Y, Ide T, Murakami K, Tsuboyama-Kasaoka N, Ezaki O, Akanuma Y, Gavrilova O, Vinson C, Reitman ML, Kagechika H, Shudo K, Yoda M, Nakano Y, Tobe K, Nagai R, Kimura S, Tomita M, Froguel P, Kadowaki T (2001) The fat-derived hormone adiponectin reverses insulin resistance associated with both lipoatrophy and obesity. *Nat Med* 7, 941-946.
 - 30) Chae P, Im M, Gibson F, Jiang Y, Graves DT (2002) Mice lacking monocyte chemoattractant protein 1 have enhanced susceptibility to an interstitial polymicrobial infection due to impaired monocyte recruitment. *Infect Immun* 70, 3164-3169.
 - 31) Park CH, Abramson ZR, Taba M Jr, Jin Q, Chang J, Kreider JM, Goldstein SA, Giannobile WV (2007) Three-dimensional micro-computed tomographic imaging of alveolar bone in experimental bone loss or repair. *J Periodontol* 78, 273-281.
 - 32) Maekawa T, Takahashi N, Tabeta K, Aoki Y, Miyashita H, Miyauchi S, Miyazawa H, Nakajima T, Yamazaki K (2011) Chronic oral infection with *Porphyromonas gingivalis* accelerates atheroma formation by shifting the lipid profile. *PLoS One* 6, e20240.
 - 33) Cahill GF Jr (1976) Starvation in man. *Clin Endocrinol Metab* 5, 397-415.
 - 34) Shimano H, Yahagi N, Amemiya-Kudo M, Hasty AH, Osuga J, Tamura Y, Shionoiri F, Iizuka Y, Ohashi K, Harada K, Gotoda T, Ishibashi S, Yamada N (1999) Sterol regulatory element-binding protein-1 as a key transcription factor for nutritional induction of lipogenic enzyme genes. *J Biol Chem* 274, 35832-35839.
 - 35) Shimano H (2001) Sterol regulatory element-binding proteins (SREBPs): transcriptional regulators of lipid synthetic genes. *Prog Lipid Res* 40, 439-452.
 - 36) Karasawa T, Takahashi A, Saito R, Sekiya M, Igarashi M, Iwasaki H, Miyahara S, Koyasu S, Nakagawa Y, Ishii K, Matsuzaka T, Kobayashi K, Yahagi N, Takekoshi K, Sone H, Yatoh S, Suzuki H, Yamada N, Shimano H (2011) Sterol regulatory element-binding protein-1 determines plasma remnant lipoproteins and accelerates atherosclerosis in low-density lipoprotein receptor-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 31, 1788-1795.
 - 37) Ide T, Shimano H, Yahagi N, Matsuzaka T, Nakakuki M, Yamamoto T, Nakagawa Y, Takahashi A, Suzuki H, Sone H, Toyoshima H, Fukamizu A, Yamada N (2004) SREBPs suppress IRS-2-mediated insulin signalling in the liver. *Nat Cell Biol* 6, 351-357.
 - 38) Dong X, Park S, Lin X, Copps K, Yi X, White MF (2006) Irs1 and Irs2 signaling is essential for hepatic glucose homeostasis and systemic growth. *J Clin Invest* 116, 101-114.
 - 39) Thirone AC, Huang C, Klip A (2006) Tissue-specific roles of IRS proteins in insulin signaling and glucose transport. *Trends Endocrinol Metab* 17, 72-78.
 - 40) Awazawa M, Ueki K, Inabe K, Yamauchi T, Kubota N, Kaneko K, Kobayashi M, Iwane A, Sasako T, Okazaki Y, Ohsugi M, Takamoto I, Yamashita S, Asahara H, Akira S, Kasuga M, Kadowaki T (2011) Adiponectin enhances insulin sensitivity by increasing hepatic IRS-2 expression via a macrophage-derived IL-6-dependent pathway. *Cell Metab* 13, 401-412.
 - 41) Tsuchida A, Yamauchi T, Ito Y, Hada Y, Maki T, Takekawa S, Kamon J, Kobayashi M, Suzuki R, Hara K, Kubota N, Terauchi Y, Froguel P, Nakae J, Kasuga M, Accili D, Tobe K, Ueki K, Nagai R, Kadowaki T (2004) Insulin/Foxo1 pathway regulates expression levels of adiponectin receptors and adiponectin sensitivity. *J Biol Chem* 279, 30817-30822.
 - 42) Offenbacher S (1996) Periodontal diseases: pathogenesis. *Ann Periodontol* 1, 821-878.
 - 43) Bansal M, Rastogi S, Vineeth NS (2013) Influence of periodontal disease on systemic disease: inversion of a paradigm: a review. *J Med Life* 6, 126-130.
 - 44) Thoden van Velzen SK, Abraham-Inpijn L, Moorer WR (1984) Plaque and systemic disease: a reappraisal of the focal infection concept. *J Clin Periodontol* 11, 209-220.
 - 45) Page RC (1998) The pathobiology of periodontal diseases may affect systemic diseases: inversion of a paradigm. *Ann Periodontol* 3, 108-120.