

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月15日現在

機関番号：15401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2009～2011

課題番号：21659475

研究課題名（和文）口腔内バイオフィルムの除去が小児糖尿病病態因子に及ぼす影響

研究課題名（英文）

Effect a removal of oral biofilm on pathogenesis factor of child diabetes

研究代表者

香西 克之 (KOZAI KATSUYUKI)

広島大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授

研究者番号：10178212

研究成果の概要（和文）：1型糖尿病キャンプ参加の小児を対象とした経年的調査を行った。2005年と2011年の比較ではBOP+が、96.4%から60%に減少していた ( $p < 0.05$ )。また2011年では2005年に比べ一人あたりBOP数は低い値を示し、HbA1c値の増加に伴いBOP数が増加する傾向を示した。歯周病原細菌である *A.a*, *P.g*, *P.i*, *T.d*, *T.f* の口腔内の細菌検出率には大きな違いはなく、1型糖尿病患者は歯周病の危険因子である *T.f*（検出率約95%）が健常児（検出率80%）に比べ多く定着していた。以上より小児1型糖尿病患者への口腔ケアの重要性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：

Type I diabetes mellitus occurs in an early stage of the childhood. The ratios of BOP+ children decreased from 96.4% to 60% ( $p < 0.05$ ). Also, in the DM group, the number of BOP showed a low value per person as compared with 2005DM group in 2011. Furthermore, we showed the tendency that the number of BOP increased with the increase of the HbA1c level. The intraoral bacteria rate of detection of *A.a*, *P.g*, *P.i*, *T.d*, *T.f* which were periodontal pathogenic bacteria were found little difference. However, as for the rate of detection of *T.f* of the periodontal disease risk factor, *T.f* (approximately 95% of rate of detection) was higher in children with type I diabetes mellitus than healthy child (80% of rate of detection). Oral care for childhood type I diabetes mellitus improved an intraoral inflammatory state and suggested that it is important to the oral care to affection children.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,000,000	0	1,000,000
2010年度	1,100,000	0	1,100,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,000,000	270,000	3,270,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・矯正・小児系歯学

キーワード：小児糖尿病，口腔バイオフィルム，歯周病原細菌，1型糖尿病，HbA1c，小児歯周病

## 1. 研究開始当初の背景

従来、歯科疾患の治療目的は、患者の QOL を高めることであったが、歯科疾患と全身疾患との間に密接な相互関係があることが解明され、疾患自体の改善に口腔ケアすなわち口腔バイオフィルムの除去が重要な役割を果たすことが明らかとなった。特に成人における慢性歯周病に関連して、糖尿病、早期出産・低体重児出産、喫煙、血液疾患との強い因果関係およびその機序が解明されている。一方、我々は4年にわたり地域保健活動の一環として1型糖尿病小児のサマーキャンプに参加して口腔の健康診断および口腔清掃指導を実施し、健常児に比べ歯周疾患の罹患率が高いこと、口腔衛生指導により罹患率が下がることをこれまで報告してきた(鈴木、香西ほか：日本歯科医療福祉雑誌、2005)。その中で興味深いことは、積極的な口腔および歯周組織へのアプローチが、1型小児糖尿病の病態因子の一つである HbA1c 値を下げる傾向を示すことである。さらに日本人小児の2型糖尿病、肥満傾向児 (BMI>25)、メタボリック症候群予備軍の増加、成人生活習慣病の低年齢化などが現実に報告されており、食育からのアプローチに加え、小児歯科学分野からのエビデンスに基づく小児期からのメタボ対策の提言も求められている。(香西、第44回日本小児歯科学会宿題報告、2006)。また、カリフォルニア大学アーバイン校総合臨床研究センターの Galassetti ら(2007)は糖尿病患者の呼気中の硝酸メチル濃度が血糖値に反映することを発見しており、簡易モニタリングへの応用が考えられている。

## 2. 研究の目的

(1) 小児糖尿病児を対象とした病態因子の評価：PMTc や 3DS を含む専門的な口腔ケアによる口腔バイオフィルムの除去と定期的な口腔健診の診査・保健指導の介入により①小児1型糖尿病の病態因子の変動、②歯周病原細菌の分布変化、③歯周病の宿主因子である白血球の走化能、食食能の変化、④歯周状態評価、齶蝕指数の改善を分析し、専門的口腔ケアが全身疾患の病態評価を改善できるか可能性を探る。さらに、そのメカニズムについても検討する。

(2) 実験系における小児1型糖尿病由来歯周炎の発症ならびに特異的増悪因子の検索

①糖尿病モデルマウスを用いて、soluble E-selection, vascular cell adhesion molecule-1(VCAM-1), adiponectin 等の歯周炎感染因子の変動(Lalla E ら、2006)が歯周状態にどのように影響するかを明らかにする。②硝酸メチルが口腔内細菌、上皮細胞に及ぼす影響これらの実験系データにより、口腔内バイオフィルム関連の糖尿病患者の歯周状態の改善、さらには全身状態の病態

因子の改善につながる細胞レベルのエビデンスを確立する。

## 3. 研究の方法

(1) 小児糖尿病児を対象とした臨床研究  
①被験者(30名以上)あるいは保護者への説明と了解およびグループ群分け(香西、鈴木)：平成21-23年度広島市似島サマーキャンプにて行う。歯垢、唾液採取については、研究の目的等を説明し理解していただいたのち承諾書を取り保管する。

Aグループ：バイオフィルム除去群(広島大学病院小児歯科への通院、定期健診が可能)

Bグループ：自宅での自己口腔管理群(遠隔で通院不可能な小児で、口腔衛生指導のみ)

②対象者からのサンプルの採取、口腔内診査、全身(糖尿病)状態の評価(鈴木、光畑)

(a) 小児の唾液、歯垢を林らが開発した歯ブラシ法(Hayashi, F. et al)にて採取する。

(b) 口腔内診査による宿主歯周状態のデータ収集

i) 齶蝕指数(DMFT, dft),

ii) 歯周状態評価：CPI (Community Periodontal Index), CAL (clinical attachment loss),

PI (Periodontal Index), GI (Gingival Index), PDI (periodontal disease index) の各指数で歯周状態の評価を行う。

iii) 口腔清掃状態に関する評価、指数の診査 PI (plaque index), OHI (oral hygiene index), PII (plaque index) の各指数で口腔清掃状態評価を行う。

iv) 唾液要因の検査(唾液分泌量、唾液緩衝能、唾液 pH 値)

v) 全身状態(糖尿病の評価)の診査：小児科のデータと共有。HbA1c, 一般血液検査値、一般身体測定検査、インスリン投与量、罹患期間：HbA1c 値の測定は、日本糖尿病学会の HbA1c 標準品に合わせて測定値を正しく補正することが可能な HPLC 法、免疫学的測定法を用いる。

③細菌の分離(光畑)

歯周病原細菌の DNA 抽出は、Okada, Hayashi らの方法を用いる。まず、歯周病細菌の標準株を用意し、Aa は Brain Heart Infusion 培地で 5%CO<sub>2</sub>, 10%H<sub>2</sub>, 85%N<sub>2</sub> を含む gas-pak jar system で培養する。Pg, Pi は Todd-Hewitt 培地 (hemin, vitamin K 添加), Tf, Td, Cr は非選択血液寒天培地 Tryptic soy agar (hemin, menadione, vitamin K, 綿羊脱線維血) で嫌気ボックス内で 37°C, 48-72 時間培養する。それぞれの菌を系代培養することによって、分離を完了する。標的とする歯周病原細菌の同定は、各菌の primer を用いた PCR 法による。

④Aグループ対象に口腔バイオフィルムの除去、定期的な口腔健診の診査・保健指導の

介入（香西，光畑）

a) PMTC および 3DS (Dental Drug Delivery System) を用いたバイオフィルムの除去：個人ごとに予約を取り，広島大学病院小児歯科診療室で行う。PMTC は歯科衛生士，3DS は上下顎個人トレーを作り，コンクールゲル，フルオールゼリー，イソジンゲルを用いる。3DS は 10 日間とし，1 か月ごとに細菌検査を行いコントロールできているかどうか確認する。

b) 毎月 1 回の定期健診とバイオフィルムの除去：個人ごとに予約を取り，広島大学病院小児歯科診療室で行う。

(2) *in vivo*, *in vitro* の系を用いた実験

①糖尿病マウス作製と糖尿病マウスの歯周における感染状態の確認（光畑）

a) streptozotocin 誘発により 1 型糖尿病マウスを作製。対象として，早期発症，晚期発症により，またそれぞれにおいて，歯周病原細菌の感染時期による歯周状態の変化を記録する。1 群 5 匹とし，離乳後まもなく（早期発症群）と 4 週齢（晚期発症群）時に streptozotocin 投与，1 型糖尿病を発症させる。発症確認後，*P. gingivalis* ATCC33277 株を歯肉溝に接種感染させる。

実験開始 30 日目に安楽屠殺し，片顎臼歯部固定後，切片作製し，反対側臼歯部のセメントエナメル境から歯槽骨頂までの距離を測定し，比較検討する。コントロールも同様に作製するほか，対象として 2 型糖尿病発症を示す肥満マウスにおいても同様の操作を行い，比較検討する。

b) 上記マウスにおいて soluble E-selection, VCAM-1, また adiponectin 等のアディポサイトカインの測定を行う。

②硝酸メチルの細胞・細菌に及ぼす影響について（光畑）

a) 培養細胞を用いて硝酸メチルの及ぼす影響について検討を行う。

ヒト上皮由来培養細胞 Hela cell, Hekt293 cell を用い，硝酸メチルの影響（増殖分化，形態変化など）を調べる。

b) 口腔内細菌に対する硝酸メチルの及ぼす影響について検討を行う。

口腔内細菌として，*P. gingivalis* ATCC33277 株，*S. mutans* に対する硝酸メチルの影響（増殖曲線，内毒素産生能など）について調べる

平成 22 年度以降

(1) A グループ対象の毎月 1 回の定期健診と口腔バイオフィルムの除去の継続（香西，光畑）

(2) 平成 22・23 年度サマーキャンプでサンプル及びデータ採取（光畑）

①対象者からのサンプルの採取，口腔内診査，

全身（糖尿病）状態の評価

②口腔内診査による宿主歯周状態のデータ収集

③全身状態（糖尿病の評価）の診査：小児科のデータも参考として全身病態因子を評価する。

(3) A グループおよび B グループの結果の分析と評価（香西）

①「バイオフィルム除去・定期健診施行」群と「自己口腔管理」群における，口腔状態評価・全身状態，特に糖尿病の病態評価における 1 年前と比較分析する。（下図：事前調査データ）

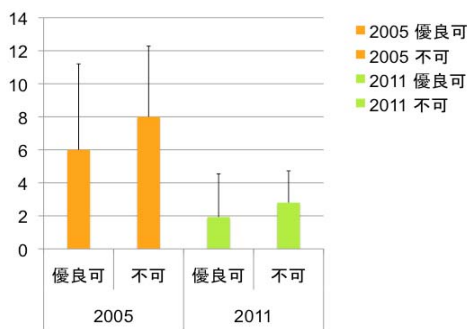
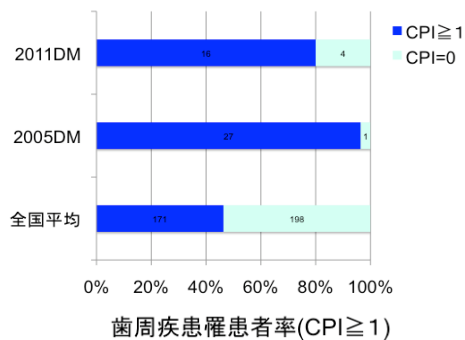
②各個人の歯周病原細菌の分布について PCR 検出法による結果を基に，1 年前と比較する。

③口腔バイオフィルムの除去，定期的な口腔健診の診査・保健指導の介入が，1 型糖尿病小児の病態にどのような改善を示したかを総括し，そのメカニズムについても言及する。

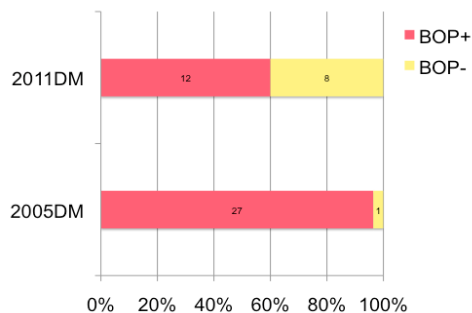
#### 4. 研究成果

1 型糖尿病は幼少期の早期に発症し，成人後は 2 型糖尿病同様の状況を示すことが報告されている。小児歯科では口腔内管理を行うことで糖尿病を発症している患児に対し，全身状態の改善と将来の口腔状態の悪化予防などを目的に早期に介入することが可能である。前年に引き続き行われた 1 型糖尿病キャンプに参加した小・中学生を対象とした調査より，歯周の状態としては前年と同様に骨吸収を認めないものの BOP+率，CPI $\geq$ 1 に関して健常児群より高く，この時期に視覚的変異は認めないものの，将来の歯周疾患悪化危険因子を持っていることが再度確認され，また各参加者より採取したプラークサンプルの PCR 結果よりほとんどの参加者が口腔内に *Tannerella forsythia* (以下 Tf) を持っていることが明らかとなった。

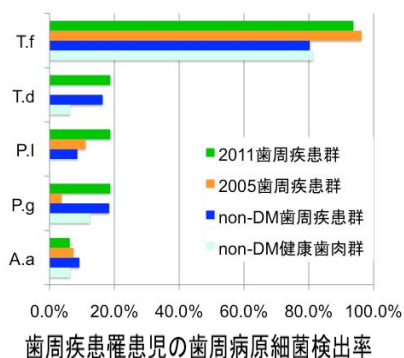
さらに 2005 年と 2011 年の 1 型糖尿病患児の口腔内診査項目を比較したところ，BOP+患児の割合が，96.4%から 60%に減少していた ( $p < 0.05$ )。また 2011 年 DM 群は 2005DM 群に比べ一人あたり BOP 数は低い値を示し，HbA1c 値の増加に伴い BOP 数が増加する傾向を示した。歯周病原細菌である *A. a.*, *P. g.*, *P. i.*, *T. d.*, *T. f.* の口腔内の細菌検出率には大きな違いはないが，1 型糖尿病患児は歯周病のリスクファクターである *T. f.* (検出率約 95%) が健常児 (検出率 80%) に比べ多く定着することが示された。本研究を臨床および口腔保健の観点から考察すると，小児 1 型糖尿病に対する口腔ケアによって口腔内の炎症状態は改善を示したことから，有病児への口腔ケアの重要性が示唆された。なお，動物実験に関しては予備実験の段階で実験モデルの作製がうまくいかず，当初のスケジュールが実施できず，データを得ることができなかった。



Hb(JDS値)別 一人当たり歯肉出血部位数(BOP+数)



歯肉出血のあった者(BOP+)の割合



## 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5件)

①有木美早、光畑智恵子\*、中岡美由紀\*\*、香西克之、1型糖尿病キャンプ参加患児の口

腔内状況の評価、小児歯誌 50:197, 2012. (査読なし)

②鈴木淳司、香西克之、小児領域における歯周疾患を考える(1)歯周疾患の分類、小児歯科臨床 15(2)、49-53、2010. (査読なし)

③鈴木淳司、香西克之、小児領域における歯周疾患を考える(2)歯肉炎と歯周炎の相違、小児歯科臨床 15(3)、37-39、2010. (査読なし)

④林文字子、鈴木淳司、香西克之ほか、広島大学学部・附属学校共同研究機構研究紀要、37、275-278、2009. (査読なし)

[学会発表] (計3件)

①有木美早、光畑智恵子\*、中岡美由紀\*\*、香西克之、1型糖尿病キャンプ参加患児の口腔内状況の評価、第50回日本小児歯科学会、2012. 5. 12、東京国際フォーラム

②Katsuyuki Kozai、Etiology and clinical approach for periodontal disease of children, 九州大学 JICA 研修講演、2010. 6. 1、九州大学

③鈴木淳司、小児の歯周疾患の発症に関する基礎的研究、第47回日本小児歯科学会、2009. 5. 15、大阪大学

[図書] (計1件)

香西克之 (分担執筆)、小児の歯周疾患、155-167、小児の歯周疾患治療、268-276、Pediatric Dentistry (第3版小児歯科学モンゴル語訳)、医歯薬出版、2009.

[その他]

ホームページ等

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

香西 克之 (KOZAI KATSUYUKI)

広島大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授  
研究者番号：10178212

(2) 研究分担者

鈴木 淳司 (SUZUKI JUNJI)

広島大学・大学院医歯薬学総合研究科・准教授  
研究者番号：90263714

(H21)

光畑 智恵子 (MITSUHATA CHIEKO)

広島大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教  
研究者番号：10335664

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：