

指導教授氏名	指導役割
(自署)	研究指導, 総括
(自署)	
(自署)	

学 位 論 文 要 旨

岡山大学大学院医歯薬学総合研究科

教育研究分野	歯周病態学分野	身分	大学院生	氏名	高盛 萌可
論文題名 Continuous glucose monitoring reveals periodontitis-induced glucose variability, insulin resistance, and gut microbiota dysbiosis in mice (持続血糖モニタリングによる, 歯周炎誘発性の血糖変動・インスリン抵抗性・腸内細菌叢異常のマウスにおける解明)					
論文内容の要旨 (2000字程度) 【緒言】 糖尿病は、インスリン分泌不全あるいはインスリン抵抗性に起因した、慢性高血糖状態を主徴とする生活習慣病の一つである。現在、日本人の5～6人に1人が糖尿病罹患の可能性を否定できず、糖尿病患者数は年々増加している。糖尿病の6番目の合併症（現在は併存疾患）として口腔疾患である歯周炎が認知されており、重度の歯周炎が存在すると血糖コントロールに悪影響を及ぼすことが知られている。 これまでの糖尿病と歯周炎の相互作用を検討した研究の多くは、血糖管理の検査指標の一つである HbA1c や指先を穿刺して得た血液を用いて測定する自己血糖測定 (self-monitoring of blood glucose; SMBG) を用いて、歯周炎症が血糖値に及ぼす影響を定点的に評価してきた。しかし、最近の糖尿病臨床では、上腕や腹部にウェアラブルセンサーを装着して、随時に血糖値を測定する持続型自己血糖測定 (continuous glucose monitoring; CGM) が用いられ、血糖値の管理を時系列に評価することが主流となってきた。また、糖尿病合併症のリスク評価・管理を行う上で、従来の HbA1c や SMBG ではなく、CGM を用いた評価が重要視され始めている。しかし、口腔疾患である歯周炎が血糖値の日内変動に及ぼす影響は不明である。 そこで本研究では、絹糸結紮歯周炎マウスに CGM を装着して、歯周炎が血糖値の日内変動に及ぼす影響を検討した。 【材料と方法】 歯周炎マウスは通法に従い作製 (C57BL/6J, 9週齢, 雄, 両側上顎第二臼歯に5-0絹糸を結紮) し、マウスの背部を剃毛して、脊柱を避けた部位にCGMセンサー (FreeStyleリブレセンサー, Abbott) を装着して、テーピングで固定した。血糖値の日内変動はCGMセンサー専用レシーバー (Bluetooth, 非接触) を用いて最長14日間連続で測定した。CGMで測定した皮下間質液中の血糖値と血中の血糖値との差異を確認するため、1日1回、マウス尾静脈から採血を行い、SMBG測定器 (FreeStyleプレジジョンネオ, Abbott) を用いて血中血糖値を測定した。 餌はマウスが1日あたり必要とする7gの通常ペレット (Certified Diet, オリエンタル酵母工業) を毎日給餌し、日々の餌の摂取量 (重量) を測定した。 CGMの測定限界である14日間の血糖値の日内変動を測定した後、マウスを安楽死させ、顎骨、血液、肝臓、腎臓および糞便を採取した。そして、歯槽骨吸収量の測定、血清中のTNF-α、インスリン、血清アミロイドA (SAA) の測定 (ELISA法)、肝臓、腎臓の組織学的解析 (HE染色)、糞便よりDNAを抽出し、16S rRNA遺伝子を標的とした腸内細菌叢解析を行った。					

また、歯周炎誘導14日後、糖代謝に及ぼす影響を確認するため、一晩絶食させ、体重10 gあたり0.1 mLのグルコース水溶液を腹腔内注射し、ブドウ糖負荷試験（GTT）を行なった。同様に4時間絶食させ、0.75 unit/kgのヒトインスリンを腹腔内注射し、インスリン負荷試験（ITT）を行なった。

統計解析は、CGMのデータは混合効果モデル（REML法）で解析し、有意差がある場合はBonferroni法で多重比較を行った。体重、摂餌量、ELISA、GTT、ITTの群間比較には、Mann-WhitneyのU検定を用いた。腸内細菌叢解析では α 多様性および相対存在比をMann-WhitneyのU検定で比較し、 β 多様性はPCoA（Bray-Curtis距離）により可視化し、群間差はPERMANOVAで評価した。さらに、LEfSeにより有意差のある分類群を同定し、有意水準は両側検定で $p < 0.05$ とした（承認番号：OKU-2023691）。

【結果】

- ・ CGM値で測定した血糖値と同時刻に実施して測定したSMBG値に差はなく、ヒト用のCGMセンサーがマウスで使用できることを確認した。
- ・ 歯周炎誘導5日目から、1日平均血糖値と日中高血糖状態時間（time above range ; TAR）の割合が対照群よりも高くなり始め、誘導10日目以降で有意に高値を示した（ $p < 0.05$ ）。
- ・ 実験開始時と歯周炎誘導14日目において、両群の体重変化に差はなかった。しかし、餌の摂取量は、歯周炎群では歯周炎誘導11日目以降で有意に減少した（ $p < 0.05$ ）。
- ・ 血清TNF- α は、両群ともに検出限界値以下であった。一方、SAA量と血清インスリン濃度は、歯周炎群において有意に亢進した（ $p < 0.05$ ）。
- ・ 肝臓および腎臓のHE染色像では、両群に組織学的な差はなかった。
- ・ GTTとITTにおいて、歯周炎群で経時的に高値を示すようになり（ $p < 0.05$ ）、インスリン抵抗性が亢進した。
- ・ 腸内細菌叢解析において、歯周炎群では、 α 多様性の低下および β 多様性の変化が観察され、群間解析（Lefse解析）では、インスリン感受性との関連が示唆される*Coprococcus*属の減少と、同じくインスリン抵抗性との関連が示唆される*Lactobacillus*属と*Prevotella*属の増加が確認された。

【考察】

本研究では、マウスにヒト用のCGMセンサーを装着する手法を確立し、歯周炎の進行が血糖値の日内変動に与える影響を評価した。従来の基礎研究では、HbA1cやSMBGによる断片的な評価（定点的）に限られており、小型動物で血糖値の日内変動を解析した報告はない。本研究では、CGMセンサーの測定値の信頼性を確認し、歯周炎による血糖値の日内変動への影響を可視化することに成功した。その結果、歯周炎モデルでは10日目以降に1日の平均血糖値およびTARが有意に増加しており、歯周炎症の進行が血糖値の日内変動に影響を与えることを確認した。その機序として、歯周炎惹起に伴う血清SAAの上昇から推察される全身性炎症の亢進、さらに、腸内細菌叢解析から、歯周炎の進行に伴いインスリン感受性に関連する*Coprococcus*属の減少とインスリン抵抗性に関連する*Prevotella*属および*Lactobacillus*属の増加といった2型糖尿病患者に類似した腸内環境が形成され、インスリン抵抗性が亢進したことに起因すると考える。すなわち、歯周炎の進行に伴う炎症の亢進と腸内細菌叢の乱れ（dysbiosis）が糖代謝異常を惹起する可能性が明らかとなった。

本研究の限界として、使用したCGMセンサーは14日間の装着が限度であり、長期的な評価は現状できない。また、歯周炎症は絹糸結紮による物理的手法で誘導しており、*Porphyromonas gingivalis*などの歯周病原細菌を用いた感染モデルとは異なる炎症応答が生じた可能性がある。今後は、絹糸結紮に加えて、歯周病原細菌を感染させた動物実験モデルによる検討を進めるとともに、中等度から重度の歯周炎患者の血糖値の日内変動を調べる臨床研究を実施することによって、歯周炎が糖代謝に及ぼす影響をさらに検証する必要がある。

【結論】

絹糸結紮歯周炎マウスモデルにおいて、歯周炎症は腸内細菌叢を乱すとともに、インスリン抵抗性を亢進し、血糖値の日内変動に影響を及ぼす可能性が示唆された。