

妊娠中の耐糖能低下が母体の口腔内および新生児の 頭蓋顎顔面成長発育に与える影響

—— 渡一平¹⁾・パイワッタナヌパン ジュティボーン¹⁾・許瑞瑾¹⁾・井上カタジナアンナ²⁾・青山絵美奈¹⁾・小野卓史¹⁾

妊娠糖尿病 (gestational diabetes mellitus; GDM) は様々な周産期合併症を引き起こし、将来糖尿病を発症するリスクが高いことが知られているが、顎口腔領域に出現する合併症については母児ともにその理解が少ないのが現状である。そこで妊娠中の耐糖能低下が出生児の頭蓋顎顔面領域の成長発育に与える影響を総合的に理解し頭蓋顎顔面口腔領域に生じる妊娠糖尿病合併症の発症機序の一端を解明することを目的として研究を行った。妊娠糖尿病モデル動物における解析の結果、妊娠糖尿病出生仔の頭蓋顎顔面成長発育に影響を与え、特に妊娠前からの耐糖能低下 (糖尿病合併妊娠) はより深刻な影響を与えることが示唆された。

Various studies showed that gestational diabetes mellitus (GDM) causes various perinatal complications as well as it increases the putative risk of diabetes in the future. However, GDM-related complications developed in craniofacial region have been less understood in both mother and children. In order to understand the GDM influence on craniofacial growth or oral health, we used diabetic pregnant rats and their offsprings as animal models. Our data showed that GDM had a retardant effect on craniofacial growth of newborn rats. Moreover, glucose intolerance developed before pregnancy seemed to have a more severe effect on craniofacial growth of newborn than the GDM acquired during the pregnancy.

*Ippei Watari ¹⁾, Jutiporn Privatananupunt ¹⁾, Hsu Jui-Chin ¹⁾, Katarzyna Anna Podyma-Inoue ²⁾, Emina Aoyama ¹⁾, Takashi Ono ¹⁾

1) 東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科 咬合機能矯正学分野

2) 東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科 硬組織生化学分野

1) Department of Orthodontic Science, 2) Department of Biochemistry, Graduate School of Medical and Dental Sciences, Tokyo Medical and Dental University

【緒言】

妊娠中の高血糖を引き起こす妊娠糖尿病 (gestational diabetes mellitus; GDM) は、肩甲難産や新生児低血糖をはじめ様々な周産期合併症を引き起こすが、妊娠中は糖負荷試験で糖尿病型に達しない程度の軽い耐糖能低下でも母児ともに異常をきたしやすく、糖尿病と同様に厳格な血糖コントロールが必要であり、また将来糖尿病を発症するリスクが高いことが知られている¹⁾。一方、妊娠中の耐糖能低下によって顎口腔領域に出現する合併症については、母児ともにその理解が少ないのが現状である。母体に対する妊娠糖尿病の合併症としては、歯周病の重症化とそれに伴う早産のリスク増加が、また出生児に対する合併症としては顎顔面の硬組織成長障害がよく知られているが、どちらもその詳細な病態に関しては不明点が多い²⁾。また出産の高齢化等に伴って妊娠糖尿病の患者数は今後ますます増加することが予想さ

れ、その結果、合併症はより複雑にそして高頻度になっていくものと考えられる。このような背景のもと、妊娠中の耐糖能低下が母体の口腔内および出生児の頭蓋顎顔面領域の成長発育に及ぼす影響を、免疫・発生・内分泌・代謝学的側面から総合的に理解し、母児双方の頭蓋顎顔面口腔領域に生じる妊娠糖尿病合併症の発症機序の一端を解明することを本研究の目的とした。

【材料及び方法】

実験動物

7週齢 Wistar 系ラット (雌性) を無作為に Control 群と、妊娠前食餌性誘発型糖尿病モデル (糖尿病合併妊娠群 Pregnancy in diabetec: PD) および妊娠後食餌性誘発型肥満モデル群 (妊娠糖尿病モデル群 Gestational Diabetes Mellitus: GD)、に分け、Control 群には通常食餌 (CE - 2 日本クレア) を与え、PD 群には妊娠前 (2週間前) より継続して高脂肪食を与えたのち Mating を行

Fig. 1 出生仔の外観と血糖値



い、GD 群には Mating を行い妊娠した後に高脂肪食 (HFD32 日本クレア) を与えた。Control 群から誕生した仔を CY 群、PD 群から誕生した仔を PDY 群、GD 群から誕生した仔を GDY 群とした。誕生した各群の仔は離乳後、通常食餌を与えて飼育を行った。

硬組織 X 線解析

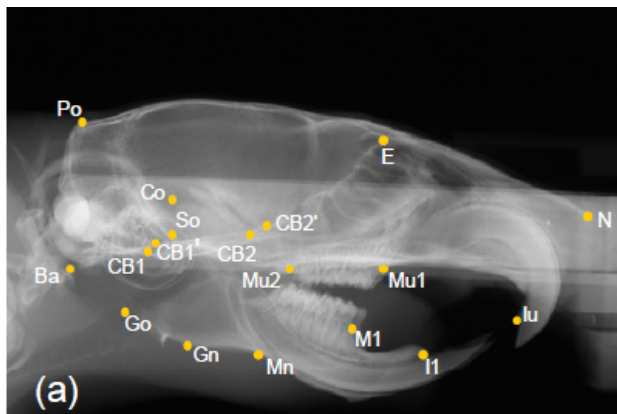
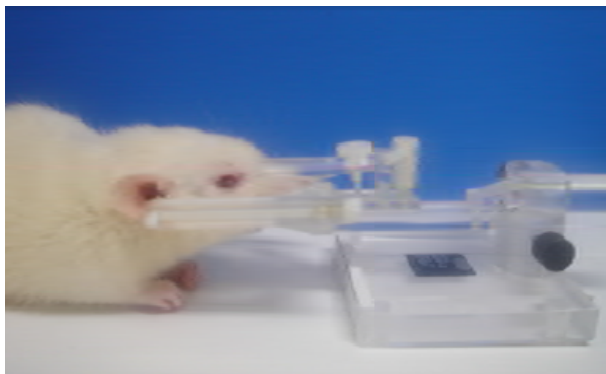
7 週齢 CY 群、PDY 群ラットおよび GDY 群 (雄、雌) において、深麻酔下にて頭部を固定し (SGP-3, Narishige, Japan)、頭部 X 線規格写真 (Soft X, SOFTEX, Japan) を撮影後、Abbassy et al. の方法に従って Cephalometric 分析を行った (Fig. 2)³⁾。また頭部を摘出後、マイクロ CT 撮影を行い硬組織 (頭蓋骨、上下顎骨、歯) の精査を行った (Fig. 3)。Cephalometric 分析によって得られたデータについて、PDY 群、GDY 群、CY 群の各

2 群間において t 検定を行った。

組織学的解析 (唾液腺 GIP 免疫染色)

さらに唾液腺 (耳下腺、顎下腺、舌下腺) を摘出し 10% 中性緩衝ホルマリン溶液にて一晩 4℃ にて浸漬固定を行い通法に従ってパラフィン包埋した。GIP (Glucose-dependent insulintropic polypeptide) の免疫染色は three-step biotin peroxidase 法 (Vectastain Universal Quick kit) を用いて行った。耳下腺、顎下腺、舌下腺それぞれの組織から 5 μ m の連続パラフィン切片を作製し、脱パラフィン後、各切片を sodium citrate buffer (pH=6.0) で洗浄、0.3% H₂O₂ メタノールで 20 分処理した後、抗 GIP (YII-Y103-EX, 1:1000, Cosmo Bio, Japan) ウサギ一次抗体で 4℃ のインキュベーションチャンバーで一晩インキュベートした。その後、ビオチン化ユニバーサル二次抗体

Fig. 2 頭部X線規格写真とCephalometric分析の各計測点



Neurocranium

Po-N: total skull length
Po-E: cranial vault length
Ba-E: total cranial base length
So-E: anterior cranial base length
Ba-CB1: occipital bone length
CB1'-CB2: sphenoid bone length
Ba-So: posterior cranial base length
Po-Ba: posterior neurocranium height

Viscerocranium

E-N: nasal length
Mu2-Iu: palate length
CB2-Iu: midface length
E-Mu1: viscerocranial height

Mandible

Go-Mn: posterior corpus length
M1-I1: anterior corpus length
Co-I1: total mandibular length
Co-Gn: ramus height

Transverse X-ray

Go1-Go2: Bigonial width
C1-C2: Maximum cranial width
P1-P2: Palatal width
Z1-Z2: Bizygomatic width

を室温で10分作用させ、streptavidin-peroxidase complexで5分間反応させた。DAB発色により免疫陽性部位を確認し、ヘマトキシリンで対比染色を行った。光学顕微鏡により組織像を観察し、デジタルカメラで撮影を行った。

【結果】

血糖値（尾静脈）について

妊娠モデル動物の血糖値（出産後3週齢）は、Control群（ 129.3 ± 15.0 mg/dl）、GD群（ 215.8 ± 44.8 mg/dl）、PD群（ 247.0 ± 54.5 mg/dl）であった。また出生仔の血糖値については、4週齢の雄CY群（ 71.0 ± 5.0 ）、GDY群（ 204.7 ± 22.4 mg/dl）、PDY群（ 218.5 ± 43.7 mg/dl）、7週齢の雄CY群（ 98.2 ± 15.8 mg/dl）、GDY群（ 145.2 ± 22.7 mg/dl）、PDY群（ 181.3 ± 7.8 mg/dl）であった。またGDY群ラットはCY群と比較して毛並みが悪いなど特徴的な外観を呈していた（Fig. 1）。

頭部X線解析について

Cephalometric 分析

7週齢におけるCY群、GDY群、PDY群のCephalometric分析の結果をtableに示す。Neurocranium（神経頭蓋/脳頭蓋）、Viscerocranium（顔面頭蓋）、Mandibule（下顎骨）の各計測領域において、CY群に比較してGDY群、

PDY群の値が有意に小さい部位が存在しており、頭蓋顎顔面領域の硬組織劣成長が認められた。また、GDY群とPDY群間でも有意差が認められ、糖尿病合併妊娠の出生仔であるPDY群にはより大きな硬組織成長障害が認められた。

マイクロCTによる頭蓋顎顔面解析

7週齢CY群、GDY群、PDY群におけるマイクロCT解析（3D構築画像および上下顎骨画像解析）の結果、頭蓋顎顔面骨および歯に関して欠損、形態異常などの大きな硬組織異常は認められなかった（Fig. 3）。

唾液腺組織学的解析について

7週齢CY群、GDY群における唾液腺（顎下腺）GIP免疫染色の結果をFig. 4に示す。CY群、GDY群ともに顎下腺の導管細胞においてGIPの発現が認められたが、GDY群ではGIP陽性細胞数が少なく、免疫染色による染色強度も低下している傾向が認められた。

【考察】

妊娠糖尿病とは『妊娠中に初めて発見または発症した糖尿病に至っていない糖代謝異常であり、妊娠時に診断された明らかな糖尿病、いわゆる糖尿病合併妊娠はふくめないもの』と定義され、日本では2010年の診断基準の改訂に伴いそれまで2.92%であった妊娠糖尿病の頻度は4.1倍の12.08%となりこれに糖尿病合併妊娠を加えると、約15%の妊婦が耐糖能異常を診断される状況となっている⁴⁾。臨床統計的な先行研究では、糖尿病合併妊娠および妊娠糖尿病により新生児において唇顎口蓋裂や頭蓋骨早期癒合症など頭蓋顎顔面領域の先天異常発生率が上昇することが報告されているが⁵⁾、その詳細なメカニズムの解明には至っていない。このような背景のもと本研究では妊娠糖尿病が出生児に与える影響を検討する目的で動物実験を行った。糖尿病合併妊娠モデルおよび妊娠糖尿病モデルについて、PD群およびGD群の血糖値より両群ともに耐糖能低下状態にあったと考えられるが、PD群の血糖値は247 mg/dlとよ

Fig. 3 マイクロCT(SMX 100CT)による頭部硬組織3D構築画像と上下顎骨画像解析(TRI/3D-Bone, RATOC System)の一例



り深刻な糖尿病状態であったと考えられる。出生仔に関しては4週齢PDY群およびGDY群ともに血糖値が200 mg/dlを超えており、耐糖能低下が疑われる。7週齢PDY群およびGDY群の血糖値は200 mg/dlを下回るものの、血液生化学検査（データ未掲載）から軽度の腎機能低下が認められた。

Cephalometric 分析の結果、7週齢PDY群およびGDY群において頭蓋顎顔面各部位に劣成長が認められ、妊娠糖尿病によって膜内骨化/軟骨骨化の両者に硬組織成長障害が出現した可能性が考えられる。またPDY群はGDY群に比較してより高度な劣成長をきたしており、母体における妊娠前からの耐糖能低下は出生児により深刻な影響を与える可能性が示された。一方、従来よりヒトにおいて妊娠糖尿病母体の児の先天異常や糖代謝異常などの合併症は女兒に現れやすいことが報告されている。今回の結果では血糖値やCephalometric 分析の結果、雄により大きな影響が表れていたが詳細は不明である。また本研究の

結果からは縫合部異常、顎裂、歯の欠損や形態異常は確認されなかったが、臨床統計と比較すると分析個体数が少なく今後より詳細な検討が必要であると思われる。我々は成長期のI型糖尿病が頭蓋顎顔面成長発育に与える影響について検討してきたが、妊娠糖尿病による出生児にも同様の影響が出現する可能性が示唆された⁶⁾。また、糖尿病合併妊娠に比べて軽度な耐糖能低下状態である妊娠糖尿病においても出生児に明らかな成長障害生じる可能性があり、妊娠糖尿病の早期発見、治療の重要性が本研究からも明らかとなった。

一方、唾液は口腔内の健康およびQOLの維持向上において極めて重要な役割を果たしており、糖尿病によって唾液腺に形変化が起こることも知られている。我々は、主に十二指腸のK cellで分泌される消化管ホルモンで、膵臓の β cellからのインスリン分泌を促進するGIP (Glucose-dependent insulintropic polypeptide) のラット唾液腺（耳下腺、顎下腺、舌下腺）での発現と局在を明らかにしてきた⁷⁾。今回の顎下腺 GIP 免疫染

Table 1. 出生仔のCephalometric 分析（7週齢）

Comparison of skeletal cephalometric measurements for pregnancy conditions in each sex														
Linear measurements	CY ♂		GDY ♂		PDY ♂		CY ♀		GDY ♀		PDY ♀			
	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD		
Neurocranium														
Po-N	45.14	0.5	44.65	0.54	44.38	0.24	b**	43.65	0.57	43.05	0.84	42.49	0.44	b**
Po-E	26.05	0.42	26.55	1.07	25.77	0.38		25.03	1.03	25.11	0.94	24.71	0.42	
Ba-E	28.86	0.43	28.93	0.86	28.74	0.41		28.15	0.91	28.14	0.52	27.14	0.92	
So-E	18.68	0.12	18.73	0.54	18.06	0.29	b**, c*	18.19	0.45	18.09	0.44	17.17	0.63	b*, c*
Ba-CB1	8.09	0.45	8.4	0.47	8.74	0.24	b**	8.18	0.56	8.33	0.23	7.96	0.53	
CB1'-CB2	7.51	0.09	7.33	0.16	7.07	0.17	a*, b***, c*	7.09	0.11	7.14	0.18	6.86	0.19	b*, c*
Ba-So	10.5	0.5	10.64	0.55	11.06	0.31		10.27	0.67	10.51	0.14	10.32	0.46	
Po-Ba	11.17	0.15	10.96	0.38	10.69	0.37		11.22	0.34	10.84	0.31	10.6	0.25	b**
Viscocranium														
E-N	19.36	0.49	18.62	0.79	19.1	0.59		19.08	0.71	18.29	0.28	18.19	0.71	
Mu2-lu	20.82	0.25	20.29	0.44	20.15	0.21	a*, b***, c*	20.33	0.09	19.99	0.38	19.57	0.65	
CB2-lu	24.77	0.07	24.11	0.55	23.91	0.23	a*, b***	23.97	0.19	23.61	0.51	23.16	0.29	b***
E-Mu1	10.89	0.21	10.72	0.24	10.09	0.26	b***, c**	10.04	0.35	10.04	0.18	9.92	0.3	
Mandible														
Go-Mn	11.67	0.45	11.31	0.39	11.73	0.65		11.03	0.46	9.89	0.31	10.02	0.28	a**, b**
M1-I1	5.003	0.26	5.24	0.3	4.9	0.41		4.85	0.34	4.56	0.31	4.92	0.4	
Co-I1	24.76	0.85	24.8	0.98	23.24	0.72	b**, c**	23.01	0.33	22.8	0.32	22.54	0.83	
Co-Gn	12.23	0.33	11.73	0.45	10.8	0.18	b***, c**	10.97	0.36	10.86	0.35	10.52	0.35	

a: comparing between CY and GDY

b: comparing between CY and PDY

c: comparing between GDY and PDY

*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001

色の結果、CY群と比較してGDY群ではGIPの局在や染色強度に明らかな違いが認められ (Fig. 4) ことより、唾液腺においても妊娠糖尿病の影響が出現する可能性が考えられる。唾液腺におけるGIPの機能など不明な点も多いが今後詳細に検討する必要があると考えられる。

生活習慣の欧米化や出産の高齢化に伴って妊娠糖尿病の患者数は今後ますます増加することが予想され、合併症はより複雑に高頻度になっていくものと考えられる。母体の健康と福祉の向上のみならず出生児の健やかな成長の観点からも、妊娠糖尿病の早期発見、早期治療が極めて重要である。

【結論】

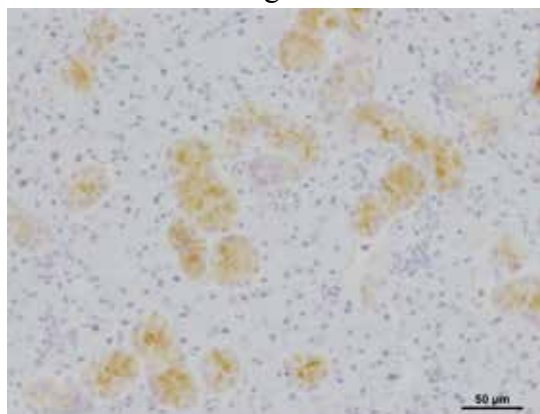
妊娠糖尿病は頭蓋顎顔面成長発育に影響を与え、特に妊娠前からの耐糖能低下 (糖尿病合併妊

娠) はより深刻な影響を与えることが示唆された。

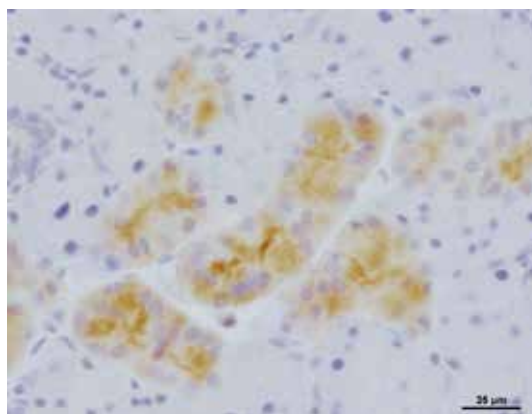
【文献】

- 1) Bellamy L. et al., Lancet 2009; 373: 1773-9
- 2) 平松祐司 他, 月刊糖尿病 医学出版 2011; 10: 104-112
- 3) Abbassy MA. et al., Arch Oral Biol. 2008; 53: 819-25
- 4) 杉山 隆 他, 糖尿病と妊娠. 2006; 6: 7-12
- 5) Correa A. et al., Am J Obstet Gynecol. 2008; 199: 237. e1-9
- 6) Abbassy MA. et al., Type 1 Diabetes. Chapter 15 INTECH 2013
- 7) Privatananupunt J. et al., Acta Histochem. 2013; in press

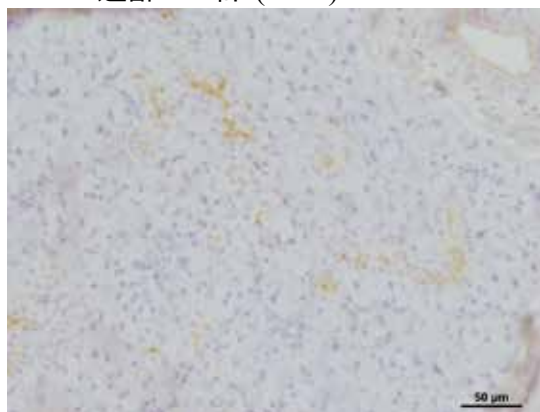
Fig. 4 唾液腺 (顎下腺) におけるGIP免疫染色



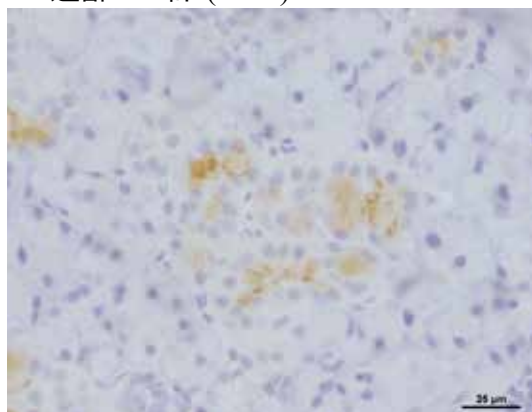
7週齢 CY群 (x200)



7週齢 CY群 (x400)



7週齢 GDY群 (x200)



7週齢 GDY群 (x400)