

平成 30 年 4 月 27 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09088

研究課題名(和文) 歯周病を介した心筋梗塞の新しい発症メカニズムの検討

研究課題名(英文) Investigation of new onset mechanism of myocardial infarction via periodontal disease

研究代表者

副島 弘文 (Soejima, Hirofumi)

熊本大学・保健センター・准教授

研究者番号：80332881

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：癌患者から得られた顔面動脈のうち一部の顔面動脈に2つの歯周病菌Prevotella intermedia (Pi)とPorphyromonas gingivalisのDNAやmRNAを認めたが、Aggregatibacter actinomycetemcomitansはほぼ検出されなかった。急性心筋梗塞患者の冠動脈内血栓吸引を行い、血栓内からこれら3つの歯周病菌を検出しようとしたが、見つからなかった。歯周病患者を組織因子の値で高値群と低値群に分けて検討した結果、歯周病検診結果から算出された歯周病スコアは組織因子高値群で有意に高かった。またPi抗体価は組織因子高値群で有意に高かった。

研究成果の概要(英文)：Two periodontal bacteria Prevotella intermedia (Pi) and Porphyromonas gingivalis DNA and mRNA were found in some of the facial arteries obtained from oral cancer patients, then, I concluded these two bacteria was found in the artery. Aggregatibacter actinomycetemcomitans was almost not detected. I tried to detect these three periodontal disease bacteria within the thrombus aspirated from coronary of patients with acute myocardial infarction, but I could not find them. Periodontal disease patients were divided into high value group and low value group based on the value of tissue factor. The periodontal disease score calculated from the periodontal disease screening results was significantly higher in the tissue factor high value group. Pi antibody titer was significantly higher in the tissue factor high value group. These data mean that periodontal disease elevates blood coagulant activity and that it may leads to acute myocardial infarction.

研究分野：循環器内科学

キーワード：歯周病菌 歯周病スコア 歯周病抗体価 組織因子 歯周病菌遺伝子 急性心筋梗塞

1. 研究開始当初の背景

(1) 中高年者の口腔機能に関して、自分の歯で物を噛み、多くの人と楽しく会話することの重要性が歯科界だけでなく一般社会においても広く認知されている。歯周病は成人の 80% が罹患するといわれており、中高年者の口腔機能に重大な影響を及ぼし、その QOL を大きく左右するものと考えられている。歯周病はデンタルプラークに起因する感染症であり、主として歯肉炎は歯肉縁上プラークにより、歯周炎は歯肉縁下プラークにより惹起される。近年、我が国において動脈硬化性疾患、特に冠動脈疾患は罹患患者数が増加の一途をたどっていることもよく知られた事実である。最近、動脈硬化が慢性の血管の炎症性疾患であるという概念が提唱され、Lancet 1997;350 (9075):430-6 では *Helicobacter pylori*, *Chlamydia pneumoniae*, *Cytomegalovirus* などの細菌感染が動脈の炎症に深く関与し、虚血性心疾患の発症に関係している可能性が示された。また、歯周病の進行した患者さんにおいて心血管疾患の発症が多いことが患者対照研究である J Periodontol 1996;67:1123-37 にて報告されている。さらに、心筋梗塞の既往のある患者と既往のない患者との患者対照研究である J Clin Periodontol 2004;31(1):19-24 では、歯周病重症度に有意な差があったと報告された。このように、冠動脈病変の形成および急性冠症候群の発症に炎症が関与していることが最近明らかとなったが、炎症の原因として歯周病菌が注目されている。歯周病菌を少量血管内投与して経過観察すると投与しなかった群に比べ投与した群で動脈硬化の進行が速かったと動物実験で報告されている(Circulation 2002;105(7):861-7)。このように口腔内の疾患である歯周病と冠動脈疾患とは、双方とも中高年者の QOL に大きな影響を及ぼすという点においてだけではなく、その原因についても互いに深く関連しあっていると思われる。しかしながら歯周病がどのようにして冠動脈病変の形成に関与しているのか、あるいは心筋梗塞の発症に関連しているのかは不明である。

(2) 急性心筋梗塞をはじめとする急性冠症候群の発症には、冠動脈内に形成される血栓が重要な役割を果たしていることは周知の事実である。本研究者は外因系血液凝固の開始因子である組織因子(Soejima H, 他 Am J Cardiol 1996;78(3):336-40)や冠動脈プラークの炎症を引き起こす monocyte chemoattractant protein-1 (Soejima H, et al, J Am Coll Cardiol 1999;34(4):983-8)が急性心筋梗塞発症に関与していることを報告した。また、血漿組織因子高値は急性冠症候群患者の予後が悪い指標となることも報告している (Soejima H, et al, Circulation 1999;99(22):2908-13)。このように本研究者は虚血性心疾患の発症メカニズムに関して研究を続けてきている。J Pathol 1999;188(2):180-8 では急性冠症候群患者の方向性冠動脈アテローム切除術(Directional Coronary Atherectomy)サンプルを用いた解析で、急性冠症候群患者の冠動脈病変部位にはマクロファージが多く集積し、そのマクロファージ

が組織因子を発現しており、急性冠症候群での血栓形成に深く関与していることが明らかにされた。歯周病の研究として、熊本大学循環器内科入院患者さんに対し歯周病の程度を把握するために歯科受診をしてもらい残存歯数、歯垢の残存程度、歯周ポケットの深さ、歯周組織からの易出血性、歯槽骨の骨吸収を評価してもらっている。歯周病検診の結果から、対照群の患者さんに比し虚血性心疾患を有する患者さんにおいて歯周病の程度が進行していることを報告している (Oe Y, Soejima H, et al, Heart Vessels 2009;24(2):103-7)。また、歯周病菌については歯周病巢内容物の解析(J Periodontol Res 2004;39(6):398-404, J Periodontol 2004;75(8):1084-9)から *Bacteroides forsythus*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Tannerella forsythensis*, *Campylobacter rectus*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Prevotella nigrescens*, *Treponema denticola* などが注目されるようになってきた。冠動脈の一部の遺伝子解析の結果から、多数ある歯周病菌の中から冠動脈疾患に関連あるものとして *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia* などの病原菌が挙げられている (J Periodontol 2007;78(4):677-82)。近年、これらの歯周病菌の抗体価を測定することが可能となり、歯周病の病態との関連性が注目されている。歯周病抗体価は歯周病の進行度に伴い上昇することおよび動脈硬化に関連する因子と相関することを報告している (Hypertens Res 2013;36(9):829-833)。

2. 研究の目的

歯周病の進行した患者さんにおいて心血管疾患の発症が多いこと、心筋梗塞の既往のある患者で歯周病がより重症であったとなど動脈硬化と歯周病の関連性はよく知られている。しかしながら歯周病がどのようにして冠動脈病変の形成や心筋梗塞発症に関与しているのかは十分には解明できていない。本研究は歯周病を介した心筋梗塞の新しい発症メカニズムとして歯周病の冠動脈血栓形成への関与を検討する。

第一の目的は歯周病菌自身が冠動脈血栓の引き金となっていないか確認するために冠動脈血栓からの歯周病菌を検出することである。

第二の目的は循環器内科入院中の本研究参加に同意の得られた患者さんに歯科口腔外科において歯周病の有無および程度を診察していただき、Renvert code 分類によりスコア化して歯周病重症度を評価することである。

第三の目的は歯周病が血栓形成に関与していることを明らかにするために歯周病重症度や歯周病抗体価と凝固活性の関連性を明らかにすることである。

3. 研究の方法

(1) 冠動脈血栓からの歯周病菌検出

心筋梗塞を発症し、緊急入院してきた患者さんに冠動脈造影を行い、血栓があれば通常冠動脈内から血栓吸引がおこなわれる。吸引された血

栓は通常廃棄されるが、それをすぐに凍結保存して後に詳細な検討を行う。収集した冠動脈内血栓を3つに分けて1つは文献より歯周病菌特有のプライマーを準備し *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*,

Aggregatibacter actinomycetemmitans といった歯周病菌の DNA 検索を行う。もう1つは歯周病菌の mRNA の検索を行い血栓内の歯周病菌の有無について検討する。さらに、残りの血栓を用いて免疫化学組織染色を行い冠動脈血栓内の歯周病菌の同定を行う。

(2)循環器内科入院患者における歯周病検診
循環器内科入院中の急性心筋梗塞の患者さんおよび冠動脈形成術を行った狭心症患者さんおよびその他の患者さんにおいて本研究に協力の得られた場合に歯周病の有無および程度を歯科口腔外科において PPRD (periodontal pentagon risk diagram by Renvert S, et al, J Clin Periodontol, 2003)の code 分類によりスコア化して評価する。診察する項目としては、喪失歯数、歯周ポケットの深さが 6mm 以上の歯数、プロービング時の歯周組織から出血した部位の割合、パモントグラフィーを用いて歯槽骨の骨吸収の程度が歯根長の 1/2 以上に達する歯の割合である。これに喫煙本数を加えて各歯周病スコアを算出し、その合計がペリオドンタルリスクスコアとなる。

(3)虚血性心疾患患者では凝固能亢進が認められる。凝固能については血中組織因子レベルを測定し、歯周病重症度と比較検討する。また、歯周病菌のうち *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Aggregatibacter actinomycetemmitans* について ELISA 法を用いて抗体価測定を行う(J Clin Periodontol 2001;28(3):264-9)。循環器内科病棟に入院中の患者さんから末梢血採血を行い、これらの菌体がついたプレートに患者血清を入れて、血清中のその菌に対する IgG 抗体を結合させる。最後に、IgG 抗体に対する抗体を用いて患者さんの各歯周病菌に対する抗体価を測定する。こうして得られた歯周病菌に対する抗体価と歯周病の凝固能との関連性を検討する。

4. 研究成果

(1) 10 人から得られた冠動脈血栓サンプルを用いて *Porphyromonas gingivalis* (Pg), *Prevotella intermedia*(Pi), *Aggregatibacter actinomycetemmitans* (Aa) の特異的 ribosomal RNA, ribosomal DNA, genome DNA を検出し、歯周病菌の存在を確認することを目的とし、各検出試験ともプライマー2組を使用し、一組でも検出できたら陽性と判断することとした。以前の研究では顔面動脈から Pg の ribosomal RNA 陽性者6人、ribosomal DNA 陽性者5人、genome DNA 陽性者4人であった。Pi の ribosomal RNA 陽性者2人、ribosomal DNA 陽性者3人、genome DNA 陽性者3人であった。Aa の ribosomal RNA 陽性者0人、ribosomal DNA 陽性者1人、genome DNA 陽性者0人であった。これらの結果から動脈壁内に歯周病菌は存在すると結論したが、今回

の10人の冠動脈内血栓の検討ではいずれの菌も陽性とはならなかった。そのためそれ以上の追加の検索は行わなかった。免疫組織化学染色を行い血栓内の歯周病菌の同定を試みた。Pg, Pi, Aa それぞれについて検討した。顕微鏡で観察しても歯周病菌は観察できないため、まず歯周病菌に対する抗体を歯周病菌にくっつけてその抗体のついていところが染色されるようにした。そしてその染まり具合で歯周病菌の存在を確認することにした。しかしながら非特異的と思われる染色は認められたが、明らかな歯周病菌の見出しはできなかった。

(2)血液の凝固能を亢進させる血中組織因子レベルは虚血性心疾患患者の予後規定因子であり、脳梗塞患者の予後規定因子でもある。歯周病は心血管疾患を含めた全身性疾患の罹患率や死亡率を増加させる危険因子としてとらえられる歯牙の支持組織の慢性炎症である。歯周病と動脈硬化性疾患の関連性について様々な報告がなされている。歯周病と動脈硬化性疾患との関連性を検討するため歯周病患者の組織因子レベルについて検討した。対象患者は熊本大学循環器内科に入院し、冠動脈造影検査を受けた患者である。組織因子が上昇する炎症性疾患のある患者や急性冠症候群の患者は除外した。入院後歯周病菌 *Prevotella intermedia* (Pi)に対する血清抗体価、血中組織因子抗原レベルを測定する目的で空腹時採血を行った。採血結果を知らない歯科医が次の歯周病検査を行った。1 プロービング時の出血部位の割合 2 歯周ポケットの深さ 6mm の歯の本数 3 欠損歯数 4 歯根長の 1/2 以上の骨吸収のある歯の割合 5 喫煙状況(1年間の喫煙本数)この結果から歯周病スコアを算出した。組織因子の中央値で高値群74人と低値群72人に分けて検討したところ、組織因子高値群で HDL コレステロールが有意に低く、中性脂肪が有意に高かったが、その他の因子に有意な差はなかった。歯周病検診結果から算出された歯周病スコアは組織因子高値群で有意に高かった。また Pi 抗体価は組織因子高値群で有意に高かった。患者背景で差がある因子と歯周病スコアと Pi 抗体価を含めた多変量解析の結果、各因子を調整しても組織因子高値群では歯周病スコアが独立して高値であることがわかった。今回の検討では歯周病があることによって血中組織因子レベルが高値となることがわかった。歯周病は血中の凝固能を亢進させることで虚血性心疾患の発症を促進していると考えられる。

(3) 糖尿病と歯周病の関連性は非常に強く糖尿病患者のほとんどが歯周病であると考えられる。そこで糖尿病患者に対するアスピリンの動脈硬化性疾患一次予防効果を検討するため、動脈硬化性疾患の発症について追跡した The Japanese primary prevention of atherosclerosis with aspirin for diabetes (JPAD) 試験の対象者2536人について検討を行った。JPAD 試験は2002年から開始され、2008年に解析結果を報

告した後、現在もコホート研究として追跡が続いている。動脈硬化は血管の炎症であり、その炎症では白血球が中心となっていることが知られている。心血管疾患の既往のない糖尿病患者において白血球と動脈硬化性疾患の発症に関連があるか検討した。JPAD 試験参加者のうち白血球データの解析が可能であった 2312 人について白血球の上位 75%以上に患者 618 人(高値群)とそれ未満の 1694 人(低値群)に分けて解析した結果である。白血球高値群は低値群の患者に比べて有意に動脈硬化性疾患の発症が多かった(高値群 64 人、低値群 125 人、hazard ratio (HR)=1.44 (95%CI, 1.07-1.92)、Log-rank P=0.015)。動脈硬化性疾患別の検討では、脳卒中および一過性脳虚血発作の発症については有意な差はなかったが(高値群 22 人、低値群 55 人、HR=1.15 (95%CI, 0.70-1.84)、Log-rank P=0.555)、急性心筋梗塞の発症は白血球高値群で有意に多かった(高値群 13 人、低値群 20 人、HR=2.07 (95%CI, 1.04-4.03)、Log-rank P=0.029)。白血球数の高値の糖尿病患者では動脈硬化性イベント発症が増加するが、特に冠動脈疾患でより増加する。動脈硬化性疾患の既往のない糖尿病患者において白血球数も新たな危険因子となる可能性がある。このように糖尿病の患者では炎症を反映する白血球の増加が心血管イベントと有意な関連を示しているが、炎症の原因は歯周病によるところも大きいと考える。

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 0 件)

[学会発表](計 2 件)

1 副島弘文、森本剛、岡田定規、中山雅文、作間未織、上村史朗、金内雅夫、土肥直文、陣内秀昭、杉山正悟、脇昌子、斎藤能彦、小川久雄
白血球数の高値の糖尿病患者では動脈硬化性イベント発症が増加する。JPAD 試験からの報告
第 63 回日本心臓病学会

シンポジウム 9 疫学研究を循環器疾患予防に活かす

2015 年 9 月 19 日

パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)

2 副島弘文、安田修、中山秀樹、辻田賢一

歯周病菌はひと動脈内に認められる

第 65 回日本心臓病学会学術集会

2017 年 9 月 29 日

大阪国際会議場(大阪府・大阪市)

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

副島 弘文(Soejima Hirofumi)

熊本大学・保健センター・准教授

研究者番号: 80332881

(2)研究分担者

()

研究者番号:

(3)連携研究者

()

研究者番号:

(4)研究協力者

()