

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 23 日現在

機関番号：32710

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2017

課題番号：15K15777

研究課題名(和文) 歯周病と認知症の共通リスク因子としての口腔由来エンドトキシンの役割の解明

研究課題名(英文) Elucidation of the role of oral-derived endotoxin as a common risk factor for periodontal disease and dementia

研究代表者

花田 信弘 (HANADA, NOBUHIRO)

鶴見大学・歯学部・教授

研究者番号：70180916

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：ダウン症(DS)者30名と健常者38名の口腔衛生状態の評価、細菌学的検査、免疫学的検査を行い、DS者のアルツハイマー型認知症(AD)発症リスクとの関連を検討した。その結果、血中アミロイド(A₄₂)濃度、Candida albicansの分離頻度、唾液中IL-6、IL-8濃度、PCR、OHI、GI、GBIが健常者(対照群)に比べてDS群で高かった。歯周病菌には両群で有意差が見られなかった。

DS者では、不十分な口腔清掃が原因と考えられる口腔内の炎症を示す臨床所見がみられた。DS者は、血中アミロイド(A₄₂)濃度が高いので、口腔の慢性炎症は健常者以上にAD発症のリスクになると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Amyloid- (A₄₂) concentration in the blood, oral hygiene, periodontopathic bacteria and immunological condition of 30 patients with Down's syndrome (DS) and 38 healthy subjects were examined. Based on the results, we estimated the association of DS with the risk of developing Alzheimer type dementia (AD).

A₄₂ concentration in blood, salivary IL-6, IL-8 concentration, salivary Candida albicans isolation frequency, PCR, OHI, GI, GBI were higher in the DS group than in the control healthy group. There was no significant difference in periodontopathic bacteria between two groups.

Clinical findings showing intraoral inflammation, which is thought to be caused by insufficient oral hygiene, were observed in DS patients. Due to the high concentration of A₄₂ in blood of DS group, it is considered that chronic inflammation of the oral cavity of DS group becomes a risk of AD onset more than healthy subjects.

研究分野：口腔衛生学

 キーワード：ダウン症 血中アミロイド 慢性炎症 歯周病 アルツハイマー型認知症 唾液中IL-6 唾液中IL-8
口腔清掃

1.研究開始当初の背景

ダウン症候群 (DS) は発達と知的の障害を伴う発生頻度の高い染色体異常であり、原因は 21 番染色体の triplication である。特異的顔貌、先天性心疾患、低身長、筋肉の弱さ、白血病、易感染性、甲状腺機能異常、epilepsy、早期老化、難聴、Alzheimer's disease(AD) などさまざまな臨床像を呈する。

近年、DS 者の寿命は医療技術の進歩により、心臓疾患の治療や健康維持が効果を奏し、50 歳以上まで伸びている。近年の報告では、50 歳以上まで生きる DS 者は 75% に達している。しかし、DS 者は 40 歳を過ぎると、AD に類似した神経症状が現れることがある (Arch Neurol. 2011; 68(11): 1461-1466.) (Ann Neurol. 1985 Mar; 17(3): 278-82. Wisniewski KE.)。AD は 65 歳以上の高齢者に多く発症する酸化と感染がシナプスへダメージを与えた結果、misfold されたタンパク質が脳に蓄積されることによって起こる (Henry W. N Engl J Med 2010; 362: 329-44.)

このタンパク質の脳への蓄積は、アミロイド前駆体タンパク質 (Amyloid Precursor Protein : APP) から切り離された Amyloid protein が蓄積することによって (Acta Neuropathol 1991; 83: 81-86.) 脳に plaques を形成し、海馬の萎縮や神経伝達機能の低下を起こす。Amyloid を産生している APP 遺伝子は、Chromosome 21 上に位置している。そのため、DS 者では APP 遺伝子が重複しているため過剰発現していると考えられ、成人の DS 者では AD の早期発症のリスクが健常者 (normal chromosome) よりも高い。

実際に、Wisniewski KE らは、DS 者の脳にある plaques は、non DS 者と比べて 20 から 30 年早くから発現し、臨床的な認知症も少なくとも non DS 者よりも 3 倍多く見られると報告している。

一方、DS は若年より歯周病に罹患しやすく重篤化する。(Reuland Bosma W, et al.

Periodontal disease in Down's syndrome: a review. J Clin Periodontol; 13: 64-73: 1986)²⁾。DS の歯周病は年齢が上がるとともに増加し、16 歳を超えると 58% - 92% の DS 者に歯周病が見られるという (Knocht A et al; Periodontol 2000 2014; 65: 134-48)。歯周病原因菌は幼児期から認められるという報告がある (Atsuo Amano et al. Periodontopathic Bacteria in Children With Down Syndrome. J Periodontol; 71(2): 249-255: 2000) (この原因は、免疫応答の未発達か、歯周組織の脆弱性か、早期老化であるかは未だ不明である)。

DS 者の T-cell の成熟、B-cell の機能に欠陥があり免疫機能は障害されている。さらに活性酸素種が多く酸化機能が発達していることも要因の一つである。

AD と歯周病が関連するという報告は近年増加している。歯周病は慢性炎症であり、Periodontitis と AD が関連する因子には細菌、ウイルスによる炎症、感染が考えられているためである。

細菌やウイルスは、dental plaque のバイオフィルムに存在し、血流や末梢神経を介して直接脳に輸送される可能性がある。(J Alzheimers Dis. 2008; 13: 437-49. Kamer AR) 中枢神経系の炎症のメカニズムとして認知機能に損傷を与えるため AD の発症を誘発している。

また、炎症によって放出されたサイトカインが全身に循環すると、これらの炎症誘発分子は blood brain barrier を通過し、脳に直接アクセスする。その結果、脳内の免疫防御を行うミクログリア細胞が活性化するため増加し、神経のダメージをもたらす。

慢性炎症である歯周病は原因となる細菌が少量しか存在していなくても、毎日の歯磨き、デンタルフロス、食事、歯科治療によって炎症や感染を引き起こしている。

近年、医療技術の進歩により DS の寿命が延

びており、AD を発症する DS 者が増加している。しかし、40 歳以上での認知症の発生確率が高い (J Intellect Disabil Res. 2006; 50(10): 768-77) とされる DS 者にとって、現在までに有効な治療方法はない。

2. 研究の目的

歯周病とアルツハイマー型認知症との関係は深く、歯周病菌のLPSや歯周組織の炎症によって産生されるサイトカイン(IL-1、IL-6、TNF-、CRP)がベータアミロイド(Ab)やタウの産生を増加させ、脳神経の変性を導く (Zhu B, et al. Exp Ther Med. 7: 750-754, 2014.)。アルツハイマー型認知症の発症前後の血清抗体価を調べると歯周病菌、特に*P. gingivalis*の抗体価が上昇している (Sparks Stein P et al. Alzheimers Dement. 8: 196-203, 2012.)。LPS (エンドトキシン) をマウスの腹腔に注入すると脳血管内のblood-brain barrier (BBB) に炎症が起こり、Abの脳への沈着が促進される (Jaeger LB et al. Brain Behav Immun. 23(4): 507-17, 2009.)。LPSをラットに注入すると、海馬から炎症を誘発するサイトカインとアミロイドベータの発現が増加し、慢性疾患でさらに増加する (Leung R, et al. PLoS One. 8: e64971: 2013)。*P. gingivalis*はアルギニン変換酵素 (PAD) を持ち、PADが関節や脳でアルギニンをシトルリンに変換すると組織に炎症をもたらす。ダウン症者は健常者とは違い幼児期から*P. gingivalis*の感染が見られるので、コントロール(兄弟)群と比較して小児期から歯周病菌に由来するLPSとPADの病原性の影響を受けやすい (Kamer AR et al. Alzheimers Dement. 4: 242-50, 2008.)。エンドトキシン血症は、歯周病に限らず中耳炎、外科手術など様々な理由で起きる。しかし、予想に反して健常人の場合、腸管から菌血症が起きない

(Johansson MEV et al. Science 334: 182, 2011) 。これに対して歯周病患者はガムを50

回咀嚼するだけで少なく見積もっても約12万 cfuの細菌が血中に入る (Geerts SO et al. J Periodontol. 73: 73-8, 2002.: Geertsらのデータに基づき研究代表者が計算) 。高齢者では*P. gingivalis*のLPSがアルツハイマー型認知症で死亡した患者の脳からだけ検出されている (Poole S et al. J Alzheimers Dis. 36: 665-77, 2013.) 。歯周病は認知症に限らず多くの生活習慣病の危険因子である。例えば関節リウマチ患者には、シトルリン化した*P. gingivalis*のPADに対する高い抗体価が報告されている。*P. gingivalis*のLPSとPADは特別な病原性を持つようである。更に、「歯を磨かないこと」がエンドトキシン血症の原因である事が米国で報告された。(Wahaidi V Y et al. J Clin Periodontol. 38: 412-417, 2011) 。歯を磨かない被験者は、歯肉組織からLPSが血中に流入してエンドトキシン血症を半数以上が発症し、歯を磨くと全員治癒したのである。別の研究 (Eberhard et al. PLoS ONE 8: e55265, 2013) では、歯を磨かないと動脈硬化のサロゲートマーカーが上昇し、歯を磨くと低下した。この2つの介入研究により、歯磨き不足がエンドトキシン血症を発症させることがわかった。

アルツハイマー型認知症の危険因子の一つは歯周病であるが、直接原因はAPP遺伝子に由来するAbの脳への沈着である。APP遺伝子を重複した染色体を持つ家系は遺伝的に認知症になりやすい (Nat Genet 38; 24-26, 2006) 。APP遺伝子は、21番染色体上にあることから、21番染色体トリソミーのダウン症者はAPPの産生量が多く、認知症の高いリスクを持つ。実際にダウン症児・者の血清Abを測定したところ、対照(兄弟)群と比較して小児期からAbが有意に高かった (Kamer AR et al. Alzheimers Dement. 4: 242-50, 2008.) 。ダウン症はAPP遺伝子重複家系と同様にAPP遺伝子が高発現するため脳内にAbを蓄積しやすいと考えられる。

以上の知見を総合すると、ダウン症者の口腔衛生管理を厳重に実施し、歯周病菌のLPSと*P. gingivalis*のPADの血中流入を防ぐことによって脳血管内の炎症を防ぎ、ダウン症者のアルツハイマー型認知症の発症を予防または先延ばしする事が期待される。

本研究はその知見をダウン症者の福祉に役立てると同時に健常者のアルツハイマー型認知症の発症予防の道を拓く事を目的とする。

3.研究の方法

対象は小児療育病院に通院しているDS(21トリソミー)の患者30名(平均年齢28.0歳)と、同院スタッフ38名(平均年齢31.8歳)で、重篤な疾患や1ヶ月以内の抗生剤使用歴のない、歩行可能である非喫煙者とした。DS群の保護者と、対照群の被検者に研究計画の説明を行ったのち、書面で同意を得た。倫理審査は大学と小児療育病院にて行われ、承認を得た。既往歴、現病歴、常用薬の有無、歯科検診(年1回以上)の有無、1日の歯磨き回数、ADL(Barthel Index、Vitality Index)を問診票にて調査した。

採血は医科定期健診目的で採血する際に2ml追加して行った。遠心分離(4000回転15分)後、血漿を-50度のフリーザーで保管した。A42濃度測定は株式会社LSIメディオンに依頼し、ELISA法で行った。

口腔内診査は1名の歯科医師によってDMF、O'Leary's Plaque control records (PCR)、OHIを測定した。ポケット深さは6点法で行い、PD、GI、GBIを測定した。唾液採取当日は洗口液の使用を禁止し、食事や歯磨き後2時間以上空け、安静時唾液を吸引器で2ml採取した。綿棒を浸漬させう蝕原因菌検査用培地に挿入し、株式会社ビー・エム・エルに輸送し、う蝕原因菌(Mutans Streptococci、Lactobacilli)を培養法にて測定した。残った唾液は遠心分離(4000回転15分)後、上清液を-50度のフリーザーで保管した。上清

液はサイトカイン(IL-6、IL-8、TNF- α)のキットを用いてサンドイッチELISA法で測定した。沈殿した唾液は株式会社ジーシーに輸送し、歯周病原菌5菌種(*Porphyromonas gingivalis*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Tannerella forsythia*, *Treponema denticola*, *Prevotella intermedia*)のDNA定量をリアルタイムPCR法にて測定した。唾液採取前に綿棒にて両側頬粘膜を5往復ずつ擦過し、*Staphylococcus aureus*と*Candida*の培地に塗抹して24~48時間培養(37 $^{\circ}$ C)し、コロニー数をカウントした。A42濃度、口腔内診査、歯周病原菌、う蝕原因菌、サイトカイン濃度の有意差検定にはStudent's t-testを用いた。日和見菌の分離頻度の検定はPearson's chi-square testを用いた。

4.研究成果

DS群の80%が慢性疾患を有しており、対照群(15.8%)と比較して有意に多くみられた($p<0.001$)。歯科定期管理を受けているDS者(76.7%)は対照群(23.7%)よりも有意に多かった($p<0.001$)。ADLのスコアはDS群で有意に低かった($p<0.001$)。図に示すようにDS群のA42濃度の平均(51.4 pg/ml \pm 9.2)は対照群(26.5 pg/ml \pm 4.7)と比較して有意に高かった($p<0.001$)。

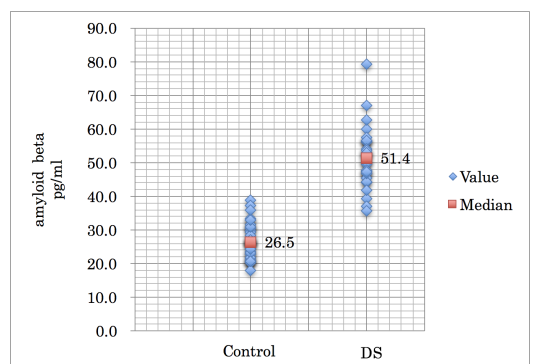


図 DS群と対照群の血漿A42濃度

PCR、OHI、3mm<PD、GI、GBIはDS群で有意に高かった。DMFはDS群で有意に低かった

($p < 0.001$)。歯周病原菌の検出率は、5 菌種すべて両群間に有意差はなかった。総連鎖球菌数中の MS の検出率と *Lactobacilli* の検出比率は DS 群で有意に高かった ($p < 0.001$ 、 $p < 0.001$)。Candida のコロニー数は対照群 (1.1 ± 3.7) と比較して DS 群 (35.2 ± 93.8) で有意に多かった ($p < 0.001$)。DS 群の Candida の分離頻度 (73.3%) は対照群 (13.2%) よりも高かった ($p < 0.001$)。唾液の TNF- α 濃度は両群に有意差はなかったが、IL-6 と IL-8 濃度は対照群と比較して DS 群で有意に高かった ($p < 0.001$ 、 $p < 0.001$)。

DS 者は歯周病が重篤化しやすいといわれているが、本研究においても、口腔内の臨床検査所見は DS 群で高く、両群間に有意差が見られた。DS 群では歯科定期管理を受けていても口腔の炎症を抑制できなかった。DS 者は歯周病菌を多く保有しているという報告も見られるが、本研究においては、対照群と比べて有意な差はなかった。しかし、免疫異常があるとされている DS 者では、他の常在細菌の存在が歯周組織に影響を及ぼして炎症を誘発しているかもしれない。DS 者の歯周病の進行の原因は、歯周病原菌感染症よりもむしろ不十分な口腔清掃と宿主の生体防御能力が低いことが考えられた。血漿 A β 濃度は DS 群で有意に高かった。高い A β 濃度は AD のリスク因子であり、AD の進行速度と生存期間に関連するという報告がある。

総レンサ球菌数中の MS の検出率、総レンサ球菌数と *Lactobacilli* の検出比率は DS 群で高かったが DMF は DS 群が対照群よりも低かった。この結果は、DS 者はう蝕が少ないという過去の研究と一致した。DS 群で定期検診受診率が高いことが、DS 群のう蝕予防に関係しているかもしれない。DS 群の *C. albicans* コロニー数は対照群よりも 33 倍多かった。この原因は DS 者の先天的な免疫異常に起因していると考えられる。*C. albicans* は AD 者の脳内から分離されたという報告があり AD の

リスクになりうる。さらに *C. albicans* は呼吸器感染症原因菌でもあり、口腔ケアは全身のカンジダ症を予防するために重要である。*C. albicans* の検出は DS 者の免疫異常評価に有用な指標となりうると思われる。

唾液 IL-6 と IL-8 濃度は DS 群で高かった。IL-6 は破骨細胞の分化を誘導して歯槽骨を吸収し、IL-8 は好中球の走化性因子として歯周組織の炎症で増加する。そのため、DS 群の歯周組織の炎症のために IL-6 と IL-8 濃度が高かったことが考えられる。DS 者では、不十分な口腔清掃が原因と考えられる口腔内の炎症を示す臨床所見がみられた。DS 者は、血中 A β 濃度が高いので、口腔の慢性炎症は健常者以上に AD 発症のリスクになると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

1 Miki Kosaka, Hidenobu Senpuku, Asami Hagiwara, Yoshiaki Nomura, Nobuhiro Hanada Oral infection, periodontal disease and cytokine production in adults with Down syndrome. *Medical Research Archives*, 5(3): 1-16, (2017).

2 Takatoshi Murata, Ayako Okada, Khairul Matin, Nobuhiro Hanada Generation of a Gene-disrupted *Streptococcus mutans* Strain Without Gene Cloning. *J. Vis. Exp.* (128), e56319, doi:10.3791/56319 (2017).

〔学会発表〕(計 1 件)

1 村田貴俊、花田信弘、遺伝子クローニングを要しないミュータンス連鎖球菌の遺伝子破壊株作製法, 第 59 回歯科基礎医学会学術大会、松本歯科大学(長野県塩尻市) 2017 年 9 月 16 日~18 日。

6 . 研究組織

(1)研究代表者

花田信弘 (HANADA NOBUHIRO)

鶴見大学・歯学部・教授

研究者番号：70180916

(2)研究分担者

野村義明 (NOMURA YOSHIAKI)

鶴見大学・歯学部・准教授

研究者番号：90350587

(3)連携研究者

岡本公彰 (OKAMOTO MASA AKI)

鶴見大学・歯学部・非常勤講師

研究者番号：30116008