

令和 2 年 6 月 8 日現在

機関番号：15201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K11424

研究課題名(和文) 口腔内細菌による眼底出血誘発の可能性とそのメカニズム

研究課題名(英文) Clinical study of examining relation of oral bacteria and fundus bleeding

研究代表者

原 克典 (Hara, Katsunori)

島根大学・学術研究院医学・看護学系・助教

研究者番号：00609323

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：口腔内細菌と眼底出血性病変の関連性について検討を行った。口腔内細菌は、ミュータンス菌およびそのcnm遺伝子、歯周病菌およびそのfim型線毛を有するものについて唾液サンプルからPCR法でその有無を判定した。cnm遺伝子やfim型線毛は、全身疾患の発症に関連があるとされる。眼底出血の原因疾患は、糖尿病網膜症、網膜静脈閉塞症、加齢黄斑変性症などで、特に糖尿病網膜症患者においてcnm陽性、fim陽性比率が高かった。コントロール群も交えた3つの網膜症病期毎のサンプルを集め検討したが、cnm遺伝子陽性ミュータンス菌及びfim型線毛陽性歯周病菌の糖尿病網膜症進展への関与は検出されなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ミュータンス菌のcnm遺伝子と脳内出血、糖尿病と歯周病菌の関連性など口腔内細菌と全身疾患の関連性について様々な分野で報告されている。我々は、今回口腔内細菌と眼底出血をきたす疾患の関連性について調査を行った。様々な眼底出血の中でも、特に糖尿病網膜症患者での関連性を疑い、更なる検討を加えたが、糖尿病網膜症の病期進行と特定の口腔内細菌存在とに、明確な因果関係を認めなかった。今まで、口腔内細菌と眼科疾患の関連性を調査した研究の報告は無いため、今後別の口腔内細菌、眼科疾患の関連性が明らかとなる端緒になればよいと考える。

研究成果の概要(英文)：We examined the association of oral bacteria and the fundus bleeding. The presence of oral bacteria especially about Streptococcus mutans with the cnm gene and Porphyromonas gingivalis with a fim II type fimbria was judged by the PCR method from patients' saliva samples. The factors of these gene and fimbria are related with the onset of systemic disease. The cause of the fundus hemorrhage was diabetic retinopathy, retinal vein occlusion, age related macular degeneration and so on.

We found the rate of the cnm gene and fim fimbria positive higher particularly in the diabetic retinopathy cases. Next, we collected and examined the samples of the three retinopathy stages with control group. Finally, we found no relation with progress of diabetic retinopathy and the existence of cnm gene-positive Streptococcus mutans and fim II fimbria-positive Porphyromonas gingivalis.

研究分野：眼科疾患

キーワード：口腔内細菌 眼底出血 糖尿病網膜症

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

眼底出血は、病名そのものではなく網膜出血や硝子体出血の状態を総称した呼び名である。糖尿病、高血圧、腎臓病などの全身疾患に合併する出血や、外傷性の出血、後部硝子体剥離に伴った出血などその病因も様々で、動脈、静脈、毛細血管と出血部位も様々である。しかし、この眼底出血は一度起こってしまえば、多くの場合視力障害が生じ、患者の QOL を低下させる原因となる。

本研究の共同研究者である和田らは、近年、口腔内の常在菌で脳出血を誘発する特殊な細菌が存在することを世界で初めて報告した(1)。その後、同じ口腔内細菌が、潰瘍性大腸炎、非アルコール性脂肪肝炎(NASH)を誘発することもわかった(2)。実際にこの口腔内細菌の保有者は、脳卒中や潰瘍性大腸炎、NASH を発症する確率が 3~6 倍に高まる可能性が示唆されている。口腔内細菌が脳出血に関与するメカニズムとして、通常、微小血管内皮が損傷を受けた場合、露出したコラーゲン繊維と血小板が反応して止血の方向に向かうが、ある口腔内細菌はこのコラーゲン繊維に付着し血小板の凝集止血を阻害することがわかっている。脳出血を誘発することが証明されたのは、このようなコラーゲン結合タンパクが細胞の表面に存在する特殊な *Streptococcus mutans* (TW295 株) である。

ところで、網膜血管からの出血は、糖尿病網膜症や高血圧などの多彩な全身疾患を基礎に発症する症例が多い。網膜の血管は脳の血管と同様に微小血管であり、出血の発症に前述した特殊な口腔内細菌が関与している可能性がある。

2. 研究の目的

口腔内細菌がいくつかの疾患発症に関与している事が報告されているが、眼科分野においては、いまだ、口腔内の常在菌が眼科疾患の発症に関与しているとの報告はなされていない。本研究では、数多くある眼科的疾患のうち網膜の出血性疾患発症に、特定の口腔内常在菌が関与しているか否かについて調査、研究を行う。もし関与があるならば、眼底出血の発症するメカニズムの一端が解明される可能性がある。

3. 研究の方法

①様々な要因による眼底出血患者およびコントロール患者の唾液サンプルの採取および口腔内細菌の DNA 解析を行う。PCR 法でミュータンス菌 *Streptococcus mutans* (S.m)、歯周病菌 (P.g) を認めるかどうか判定する。更に S.m のうち出血性の全身疾患に関わる *cnm* 遺伝子を有するもの (*cnm*) と、P.g のうち特に病原性が強いと言われる *fim II* 型の線毛を有するもの (*fim II*) であるかどうかを同時に判定した。

②上記で解析した唾液サンプルを使用した次世代シーケンサ解析で、唾液中の口腔内細菌の占有率調査を同時に行ない、疾患の有無により占有率に違いがあるかどうかを調査する。

③糖尿病患者を 3 つの病期に分け (0:網膜症なし群 18 名, A:単純網膜症・増殖前網膜症群 21 名, B:増殖網膜症群 24 名) 糖尿病に罹患していないコントロール群の患者も含め、唾液サンプルの採取および口腔内細菌の DNA 解析を行う。PCR 法でミュータンス菌 *Streptococcus mutans* (S.m)、歯周病菌 (P.g) を認めるかどうか判定する。更に S.m のうち出血性の全身疾患に関わる *cnm* 遺伝子を有するもの (*cnm*) と、

P.g のうち特に病原性が強いと言われる fim II 型の線毛を有するもの (fim II) であるかどうかにも同時に判定した。

4. 研究成果

①様々な要因による眼底出血の患者を 54 名 (H 群), 眼底出血のないものを 53 名 (N 群) の唾液を採取した。眼底出血の原因疾患は, 糖尿病網膜症が 28 名, 網膜静脈閉塞症 16 名, 乳頭出血 5 名, 加齢黄斑変性症 3 名, その他 2 名であった。B 群は, 白内障患者 (眼底疾患なし) 23 名, 白内障・緑内障患者 16 名, 糖尿病患者 4 名, 健康成人 10 名であった。H 群, N 群それぞれのミュータンス菌および cnm 陽性, 歯周病菌および fim II 陽性となった人数を表 1 に示す。H 群 (眼底出血群) と N 群 (非出血群) のデータをみると, いずれも全身疾患に関わる可能性があるミュータンス菌の cnm 陽性 (H 群 32%, N 群 19%), 歯周病菌の fim II 陽性 (H 群 19%, N 群 5%) の検出率が高いことがわかった。

(表 1)

	S.m+	S.m+, cnm+	P.g+	P.g+, fim II +
H 群(N=54)	44	14	37	7
N 群(N=53)	42	8	40	2

次に, H 群の中の糖尿病網膜症患者 28 名を 2 群に分け (DMR A:単純網膜症・増殖前網膜症群 6 名, DMR B:増殖網膜症群 22 名), N 群中の糖尿病患者 (網膜症なし) を DMR 0 として表を作成したものが表 2 である。0 群, A 群, B 群で N 数に差があるが, ミュータンス菌の cnm 陽性率は 0 群 0%, A 群 25%, B 群 32%, 歯周病菌の fim II 陽性率は 0 群 0%, A 群 0%, B 群 33%と糖尿病網膜症ありで, かつその病期が進むにつれて検出率が上昇する傾向であった。

(表 2)

	S.m+	S.m+, cnm+	P.g+	P.g+, fim II +
DMR 0 (N=4)	3	0	4	0
DMR A (N=6)	4	1	4	0
DMR B (N=22)	22	7	15	5

②次世代シーケンサー解析を用い, 107 名の唾液中の口腔内細菌の占有率を調査した。上位 10 位を占めた細菌は, Streptococcus, Veillonella, Neisseria, Fusobacterium, Mannheimia, Bacteroides, Cellulomonas, Gemella, Porphyromonas, Prevotella であった。網膜出血, 硝子体出血の有り無しの等の条件で細菌の占有率に差がでるか検定を行ったが有意な差を認めず, シーケンサー解析で眼底出血に関連のある新たな口腔内細菌の推定はできなかった。

③いくつかの眼底出血の要因のなかでも, 糖尿病網膜症発症とその病期の進行と特定の口腔内細菌 (ミュータンス菌の cnm 陽性, 歯周病菌の fim II 陽性) との関連性をより詳細に調査した。3つの病期の糖尿病患者 (0:網膜症なし群 18 名, A:単純網膜

症・増殖前網膜症群 21 名, B:増殖網膜症群 24 名)と糖尿病に罹患していないコントロール(N:白内障患者群 18 名), について唾液採取後, PCR 法で S.m, P.g を認めるかどうか判定し, 更に cnm 遺伝子を有するもの(cnm)と P.g のうち fim II 型の線毛を有するもの(fim II)であるかどうかにも同時に判定した。結果を表3に示す。ミュータンス菌の cnm 陽性率は N 群 33%, O 群 21%, A 群 26%, B 群 19%, 歯周病菌の fim II 陽性率は N 群 0%, O 群 11%, A 群 0%, B 群 0%であった。ミュータンス菌の cnm 陽性率, 歯周病菌の fim II 陽性率は全ての群間で差を認めなかった。

我々の研究では, 眼底出血の発症に特定の口腔内細菌(ミュータンス菌, 歯周病菌)およびその病原性が高い因子(cnm 陽性, fim II 陽性)の関与の可能性について調査を行ったが, 明確な関与を検出できなかった。同様に, 糖尿病患者において, 糖尿病網膜症の進展(出血性病変)に特定の口腔内細菌が関与している可能性を検証したが, ミュータンス菌およびその cnm 遺伝子, 歯周病菌および fim II 型線毛を有するものの明らかな関与は認めなかった。結果として特定の口腔内細菌が眼底出血病異変に関与する可能性を確認できなかった。

(表3)

	S.m+	S.m+, cnm+	P.g+	P.g+, fim II +
Control (N=18)	15	5	9	0
DMR O (N=18)	14	3	9	1
DMR A (N=21)	19	5	9	0
DMR B (N=24)	16	3	10	0

〈引用文献〉

1. Nakano K, Hokamura K, Taniguchi N, Wada K, Ooshima T. The collagen-binding protein of *Streptococcus mutans* is involved in haemorrhagic stroke. *Nature Communications*. 2:485. doi: 10.1038/ncomms1491.2011.
2. Kojima A, Nakano K, Wada K, Ooshima T. Infection of specific strains of *Streptococcus mutans*, oral bacteria, confers a risk of ulcerative colitis. *Scientific Reports* 2:332. doi: 10.1038/srep00332.2012.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	大平 明弘 (Ohira Akihiro) (00169054)	島根大学・医学部・名誉教授 (15201)	
研究分担者	臼田 春樹 (Usuda Haruki) (30707667)	島根大学・学術研究院医学・看護学系・助教 (15201)	
研究分担者	和田 孝一郎 (Wada Koichiro) (90263467)	島根大学・学術研究院医学・看護学系・教授 (15201)	