

令和元年6月21日現在

機関番号：15401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K17350

研究課題名(和文) 歯周病菌抗体価は脳梗塞の発症および転帰を予測できるか？

研究課題名(英文) Serum IgG titers to periodontal pathogens predict 3-month outcome in ischemic stroke patients

研究代表者

青木 志郎 (Aoki, Shiro)

広島大学・病院(医)・助教

研究者番号：10457236

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：歯周病菌抗体価が脳梗塞発症および予後への予測因子になりうるかを検討した。脳梗塞発症と歯周病菌抗体価との関連を検討するため、急性期脳梗患者と脳梗塞既往の無い患者の歯周病菌抗体価を測定し、背景因子や病型を含め比較検討した。その結果、菌種の違いにより脳梗塞病型やリスク因子への関与が異なる可能性が示唆された。次に、急性期脳梗塞患者の転帰と歯周病菌抗体価との関連について検討を行った。年齢や入院時重症度とともに、*Fusobacterium nucleatum*に対する血清抗体価が独立した転帰不良因子として抽出された。血清歯周病菌抗体価は脳梗塞発症および予後予測の有用なマーカーとなりうると思われる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これらの検討により、歯周病菌抗体価が脳梗塞発症および予後予測の有用なマーカーになりうる可能性があること、歯周病菌の菌種により生体に及ぼす影響には違いがあり、菌種の違いを念頭に置いた検討が必要であることが明らかになった。今後は脳梗塞のみならず、脳出血やくも膜下出血などその他の脳血管疾患や、歯周病と関連があるとされている心血管疾患や糖尿病などの症例に対しても歯周病菌抗体価を詳細に検討することにより、発症や症状増悪のメカニズム解明の一助になることが期待される。

研究成果の概要(英文)：A total of 445 patients with acute ischemic stroke (194 female [44.0%], mean age 71.9±12.3 years) were registered in this study. Serum IgG titers of 9 periodontal pathogens (*P. gingivalis*, *A. actinomycetemcomitans*, *P. intermedia*, *P. nigrescens*, *F. nucleatum*, *T. denticola*, *T. forsythensis*, *C. rectus*, *E. corrodens*) were evaluated using the ELISA method. An unfavorable outcome was defined as a 3 or higher on the modified Rankin Scale. The proportion of patients with unfavorable outcome was 25.4% (113 patients). Based on multivariate logistic regression analysis, IgG antibody titers to *F. nucleatum* (odds ratio 7.64, 95% CI 3.54-16.91, $p<0.001$) and numbers of positive for periodontal pathogens (odds ratio 1.20, 95% CI 1.02-1.41, $p=0.03$) were independent predictors of unfavorable outcome in ischemic stroke patients. IgG antibody titers to *F. nucleatum* and numbers of positive for periodontal pathogens were independent predictors of unfavorable outcome in ischemic stroke patients.

研究分野：脳血管障害

キーワード：歯周病菌抗体価 脳梗塞

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

歯周病は日本人成人の80%が罹患していると考えられている疾患である。抜歯に伴う歯周病菌の菌血症により感染性心内膜炎のリスクが高まることは古くより知られているが、近年ブラッシングのみでもこの菌血症が引き起こされていることが指摘されている。これら歯周病菌は動脈硬化薬でもその存在が指摘されており、歯周病菌の mRNA が PCR 法により検出されると報告されている。この細菌感染による炎症が動脈硬化を増強する因子である可能性が示唆されている。Burger 病などの末梢血管障害においては、その関与は確立したものになりつつある。歯周病と脳卒中との関連に関しては、The First National Health and Nutrition Examination Survey and Its Follow-up Study により、9962 例の追跡調査による歯周病のリスクの解析が行われている。その結果、歯周炎において明らかな脳卒中の発症、特に非出血性脳卒中の発症への影響を認めた。しかしながら、これまでの検討はコホート研究が中心であり、歯周病を治療したことにより脳心血管イベントを予防しえたというエビデンスは出されていない。我々は歯周病菌抗体価が脳梗塞患者において高値となっており、特に頸動脈硬化病変を有する症例と、心房細動を有する症例では、異なる歯周病菌に対する抗体価が高値を示していることを報告した(Hosomi et al. Cerebrovascular Disease 2012)。この結果より、異なる歯周病菌がそれぞれ頸動脈硬化病変や心房細動の発症に関わっており、これを通じて脳梗塞の発症に関わっている可能性が示唆された。

事前検討として、当院脳神経内科で急性期脳卒中患者 71 名(男性 47 名女性 24 名、平均年齢 70.6 歳)において、発症後 14 日目までに口腔内細菌数と口腔水分量を測定し、口腔管理を開始した。さらに歯周病菌に対する血清抗体価を ELISA 法により測定した。その結果、有歯顎者 85%のうち 60%が未処置う蝕歯を 1 歯以上有しており、その平均は 2.0 歯と厚生省実態調査と比較して 2 倍高かった。脳卒中急性期における口腔内細菌数は、75%の患者が 1000 万個の正常値を越え口腔環境は不良であったが、口腔管理を継続することで 61%の患者において経時的に細菌数は減少した。また口腔水分量は全ての患者において境界域より低く口腔乾燥を認めたことから、誤嚥リスクの高い急性期において口腔内細菌を原因とする肺炎等の合併症を増加させる可能性が考えられた。さらに歯周病菌血清抗体価の陽性患者は 31%であり、健常成人対照と比較して差異は認めなかったが、17%に複数菌陽性を認め、健常成人の 9%と比較して有意に高かった。また歯周病菌 5 菌体における抗体価陽性患者は陰性患者と比較して、脳卒中機能転帰の指標である 3 ヶ月後 m-RS が不良であった。

2. 研究の目的

歯周病菌抗体価により脳梗塞の転帰を予測し得るものと仮説し、臨床検体によりその仮説を検証することと、その関連性における炎症の影響を検討することを目的とする。さらにこの結果を踏まえ、関連性が示された菌種を脳虚血モデルラットに投与し、基礎実験において歯周病菌感染が脳虚血に及ぼす影響を仔細に検討する。研究期間内に以下のことを明らかにする。

- (1)急性期脳梗塞患者における歯周病菌抗体価 (Pi26511, PgHW24D1, PgSU63, Pg381, Td) を明らかにする。
- (2)対照として非脳梗塞患者の歯周病菌抗体価 (Pi26511, PgHW24D1, PgSU63, Pg381, Td) の測定を行い、脳梗塞患者との違いを比較検討する。
- (3)これらに影響しうる因子として、炎症マーカー (高感度 CRP、TNF- α 、IL-6)、細菌のエンドトキシン (LPS) との関連の検討を行う。
- (4)脳梗塞患者の転帰は発症 3 ヶ月後の modified Rankin scale を用いて評価し、入院時の重症度の指標である NIHSS や年齢、基礎疾患など、これまでに確立している転帰予測因子から独立して、歯周病菌抗体価が有意に転帰に影響する因子であるか否かを検討する。
- (5)これらの検討において脳梗塞転帰との関連が示された菌種を脳虚血モデルラットに投与し、虚血薬に及ぼす影響について組織学的に検討し明らかにする。

3. 研究の方法

急性期脳梗塞患者における歯周病菌抗体価および炎症マーカー、細菌のエンドトキシンを測定し転帰との関連性を検討するとともに、虚血ラットに歯周病菌を投与し組織学的な検討を行う。研究計画の進め方として、

- 1.急性期脳梗塞患者における歯周病菌抗体価 (Pi26511, PgHW24D1, PgSU63, Pg381, Td) 炎症マーカー (高感度 CRP、TNF- α 、IL-6)、細菌のエンドトキシン (LPS) を ELISA 法にて測定する。
- 2.脳梗塞患者の転帰は発症 3 ヶ月後の modified Rankin scale を用いて評価する。
- 3.脳梗塞転帰との関連が示された菌種を脳虚血モデルラットに投与し、組織学的に検討する。

4. 研究成果

(1)歯周病菌抗体価と脳梗塞発症との関連

急性期脳梗塞患者 132 名と脳梗塞既往の無い患者 77 名を前向きに登録し、年齢、性別、リスク因子(高血圧症、糖尿病、脂質異常症、心房細動、飲酒、喫煙)、頸動脈エコーによる頸動脈硬化病変などについて、両群を比較検討した。脳梗塞群に関しては TOAST 分類にて病型分類を行

った。全ての患者の血清を採取し、歯周病の主要な原因菌である *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (Aa)、*Porphyromonas gingivalis* (Pg)、*Prevotella intermedia* (Pi) の IgG 抗体価を ELISA 法にて測定した。同時に高感度 CRP (hs-CRP) 値も測定した。これらの歯周病菌抗体価と脳梗塞のリスク因子、病型、頸動脈硬化などとの関連を統計学的に解析した。歯周病菌抗体価に関しては対数変換した値を解析に使用した。

脳梗塞群の平均年齢は 71.3 歳、非脳梗塞群の平均年齢は 70.7 歳、女性の割合は脳梗塞群で 43.9%、非脳梗塞群では 50.7% で両群間に有意差は認めなかった。脳梗塞群では有意に高血圧症 (62.9% vs 26.0%)、心房細動 (23.5% vs 10.4%)、頸動脈硬化 (37.1% vs 19.5%) を有する割合が高く、非脳梗塞群では糖尿病 (44.2% vs 29.6%) を有する割合が有意に高かった。これらの因子を組み入れた上で多変量解析を行ったところ、脳梗塞群では hs-CRP 値が非脳梗塞群と比較して有意に高値であることが明らかとなり、脳梗塞発症に何らかの炎症の関与が示唆された (coefficient 0.245, 95% CI 0.142-0.347, $p < 0.0001$)。

次に、脳梗塞発症やリスク因子と歯周病菌の菌種による関連の違いについて抗体価を用いて解析を行った。Pi の抗 IgG 抗体価は、アテローム血栓性脳梗塞群で非脳梗塞群と比較して有意に高値であった ($p = 0.0035$)。リスク因子と歯周病菌抗体価との関連について多変量解析を行うと、抗 Pg 抗体価は心房細動の既往と有意に関連し (OR 4.36, 95% CI 1.71-12.10, $p = 0.0017$)、抗 Pi 抗体価は頸動脈硬化病変の存在と有意に関連した (OR 16.58, 95% CI 3.96-78.93, $p < 0.0001$)。アテローム血栓性脳梗塞の発症に関連する因子について多変量解析を行うと、頸動脈硬化病変の存在を因子に加えずに解析した場合、抗 Pi 抗体価は独立して有意に発症に関連していた (OR 23.6, 95% CI 2.65-298.2, $p = 0.008$)。しかしながら、頸動脈硬化病変の存在を因子に加えて解析した場合、抗 Pi 抗体価は有意な発症への関与は認めなかった ($p = 0.107$)。すなわち、抗 Pi 抗体価は動脈硬化を惹起することにより間接的にアテローム血栓性脳梗塞への発症に寄与している可能性が示唆された。

(2) 歯周病菌抗体価と脳梗塞転帰との関連

上記検討により、歯周病菌抗体価が脳梗塞発症に関連している可能性があること、菌種により生体に及ぼす影響が異なることが明らかとなった。一方で、脳梗塞発症後の転帰に対して歯周病菌がどのように関与しているかについて検討した報告はこれまで無かった。そのため事前検討として、急性期脳卒中患者 71 名 (男性 47 名 女性 24 名、平均年齢 70.6 歳) において、入院 3 日以内に血液検査を行い歯周病菌抗体価を測定し、転帰との関連についての解析を行った。その結果、歯周病菌血清抗体価の陽性患者は 31% であり、健常成人対照と比較して差異は認めなかったが、17% に複数菌陽性を認め、健常成人の 9% と比較して有意に高かった。また歯周病菌 5 菌種における抗体価陽性患者は陰性患者と比較して、脳卒中機能転帰の指標である 3 ヶ月後 m-RS が不良であった。この結果を踏まえて、2013 年 1 月から 2016 年 4 月の間で当院および共同研究機関に入院した急性期脳梗塞患者 445 名を前向きに連続登録し、入院時の歯周病菌抗体価や年齢、性別、既往歴 (高血圧症、糖尿病、脂質異常症、心房細動、脳卒中)、脳梗塞病型 (心原性脳塞栓症、アテローム血栓性脳梗塞、ラクナ梗塞、その他の脳梗塞)、入院時 NIHSS などの背景因子と発症 3 か月後の m-RS との関連を統計学的に解析した。全ての患者の血清を入院 3 日以内に採取し、歯周病菌患者において感染率が高いとされる、*Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (AaY4, Aa29523, AaSUNY67)、*Eikenella corrodens* (Ec)、*Fusobacterium nucleatum* (Fn25586, Fn10953)、*Prevotella nigrescens* (Pn33563)、*Prevotella intermedia* (Pi26511)、*Porphyromonas gingivalis* (Type I-V)、*Treponema denticola* (Td)、*Tannerella forsythia* (TfATCC)、*Campylobacter rectus* (CrATCC) の 9 菌種 16 菌種の IgG 抗体価を ELISA 法にて測定した。歯周病菌抗体価に関しては対数変換した値を解析に使用した。3 か月後 m-RS 0, 1 を転帰良好群、m-RS 2-6 を転帰不良群と定義した。

症例の平均年齢は 71.9 歳、女性の割合は 44.0% で、高血圧症の既往を有する患者は 74.4%、糖尿病は 26.6%、脂質異常症は 45.2%、心房細動は 19.8%、脳卒中は 28.5% だった。脳梗塞の病型としては、心原性脳塞栓症が 22.2%、アテローム血栓性脳梗塞が 23.1%、ラクナ梗塞が 20.4%、その他の脳梗塞が 34.2% で、入院時の NIHSS の中央値 [IQR] は 3 [1-6] だった。発症 3 か月後の m-RS 0, 1 の転帰良好群は 65.8%、m-RS 2-6 の転帰不良群は 34.2% であり、転帰に影響する因子について統計学的解析を行った。背景因子に対する単変量解析では、転帰不良群は有意に年齢が高く、女性の割合が高く、心房細動の既往の割合が高く、入院時 NIHSS が高値で、心原性脳塞栓症の割合が高いという結果であった。歯周病菌抗体価に対する単変量解析では、転帰不良群では有意に抗 IgG Fn10953 抗体、抗 IgG Td 抗体、抗 Tf ATCC 抗体、抗 Cr ATCC 抗体の抗体価が高値だった。これらの単変量解析の結果をもとに、転帰不良に関連する因子について多変量解析を行った結果、年齢 (OR 1.02, 95% CI 1.00-1.05, $p = 0.04$)、入院時 NIHSS (OR 1.30, 95% CI 1.22-1.40, $p < 0.0001$)、とともに抗 IgG Fn10953 抗体価 (OR 1.57, 95% CI 1.08-2.33, $p = 0.01$) が独立した有意な因子として抽出された。すなわち、歯周病菌の原因菌の一つである *Fusobacterium nucleatum* に対する血清抗体価が、急性期脳梗塞の予後予測因子として有用である可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 1 件)

青木志郎、脳梗塞発症および予後予測因子としての歯周病菌抗体価の意義、Medical Science Digest、査読無、45 巻、2019、6-9

〔学会発表〕(計 4 件)

青木志郎 他、血清 IgG 歯周病菌抗体価は脳梗塞患者の転帰予測因子となりうる、第 43 回日本脳卒中学会学術集会、2018

青木志郎 他、歯周病菌血清 IgG 抗体価は脳出血患者の 3 ヶ月転帰を予測する、第 43 回日本脳卒中学会学術集会、2018

青木志郎 他、Serum IgG titers of periodontal disease pathogens predicts hemorrhage growth and 3-month outcome in patients with cerebral hemorrhage、International Stroke Conference 2019、2019

青木志郎 他、The severity of cerebral small vessel disease are associated with tooth lost but not with serum titer of periodontal pathogens in acute stroke patients、International Stroke Conference 2019、2019

〔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：

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：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号(8桁)：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。