

令和 4 年 6 月 13 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K07957

研究課題名(和文)シヌクレイノパチー前駆症状に関する口腔微生物神経毒の定量的検討

研究課題名(英文)Quantitative evaluation of prodromal symptoms of synucleinopathy and neurotoxins from oral bacteria

研究代表者

小澤 鉄太郎(Ozawa, Tetsutaro)

新潟大学・医歯学総合病院・特任教授

研究者番号：10377153

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：シヌクレイノパチーの前駆症状の発症に口腔微生物により産物される神経毒が関与することを明らかにするため、早期シヌクレイノパチー患者の嗅覚機能ならびに自律神経機能を評価し、さらに神経毒を産生する歯周病原細菌の数を唾液中で測定した。発症4年以内の早期パーキンソン病患者23例(平均年齢71.6歳)の唾液中P. intermedia, P. gingivalis, T. denticola, F. nucleatumはコントロールと比較し明らかに増多していた(Mann-Whitney U test)。それら歯周病原細菌数と嗅覚低下ならびに自律神経障害の重症度との間に相関は見られなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、早期パーキンソン病患者の唾液中歯周病原細菌が明らかに増えている結果が得られた。今後は唾液中歯周病原細菌の増多とシヌクレイン蓄積との関連性を検討する必要があると考えられた。パーキンソン病患者では発症早期においても、上肢の細かく素早い動きが障害されるため歯磨きが雑になり、口腔衛生の維持が困難になって歯周病原細菌が増えやすい環境になる可能性は大いにある。パーキンソン病の進行に伴ってさらに歯周病原細菌は増え続け、進行期には歯周病の増悪とさらには誤嚥性肺炎の重症化にもつながる可能性がある。今後は、歯周病原細菌がパーキンソン病患者の予後にどのような影響をもたらすかの検討が必要と考えられる。

研究成果の概要(英文)：This study was aimed to investigate the relationship between the prodromal symptoms of synucleinopathy and neurotoxic functions of oral bacteria. We quantitatively evaluated the severity of hyposmia and autonomic dysfunction of patients with early stage of Parkinson's disease. We also measured the number of periodontopathic bacteria in the saliva in those Parkinson's disease patients. The results showed that the numbers of P. intermedia, P. gingivalis, T. denticola, and F. nucleatum in the saliva were significantly increased in patients with Parkinson's disease than those in control subjects. There were no correlation between the numbers of such periodontopathic bacteria in the saliva and the severity of hyposmia as well as autonomic dysfunction in patients with Parkinson's disease.

研究分野：臨床神経学

キーワード：パーキンソン病 シヌクレイン 口腔微生物 嗅覚障害 自律神経障害

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

アルファシヌクレインの神経系への蓄積は、パーキンソン病を含む神経変性疾患（シヌクレイノパチー）の発症に強く関与する。パーキンソン病では、アルファシヌクレインは病初期に嗅覚神経路に蓄積し嗅覚障害の原因となる。さらに嗅覚神経路の病変がさらに広範囲の中枢神経系へ進展すると考えられており、嗅覚障害の同定はパーキンソン病の早期診断に有用である可能性が指摘されている[1]。さらに嗅覚神経路の神経細胞保護は、運動症状の発症前における病態修飾療法になり得ると考えられる。

嗅神経は環境のにおい分子に直接暴露される。鼻腔や口腔に生息する微生物は、ヒトの生活史の大部分において鼻腔粘膜や嗅神経への化学的なストレスを与えていると想定できる。具体的な例として、歯周病原細菌である、*P. intermedia*, *P. gingivalis*, *T. forsythensis*, *T. denticola*, *F. nucleatum*らは、揮発性神経毒である硫化水素ならびにメチルメルカプタンを産生している（表1）[2]。

表1. 主な歯周病原細菌と揮発性神経毒産生能（*ヒト血清で7日間培養の産生量、文献2より）

歯周病原性細菌	硫化水素産生量*	メチルメルカプタン産生量*
<i>P. intermedia</i>	>200 $\mu\text{mol/l}$	閾値以下
<i>P. gingivalis</i>	>200 $\mu\text{mol/l}$	>200 $\mu\text{mol/l}$
<i>T. forsythensis</i>	20-100 $\mu\text{mol/l}$	1-10 $\mu\text{mol/l}$
<i>T. denticola</i>	>200 $\mu\text{mol/l}$	20-100 $\mu\text{mol/l}$
<i>F. nucleatum</i>	20-100 $\mu\text{mol/l}$	1-10 $\mu\text{mol/l}$

これらの揮発性神経毒は局所の粘膜透過性を亢進させ組織障害をもたらすと考えられており[3]、鼻腔へ到達すれば嗅神経の障害に、また嚥下や吞気によって食道へ到達すれば腸管神経を経て自律神経障害に波及する可能性がある。

2. 研究の目的

本研究では、シヌクレイノパチーの前駆症状として知られる嗅神経障害と自律神経障害の発症に口腔微生物により産物される神経毒が関与することを明らかにするため、早期シヌクレイノパチー患者の嗅覚機能ならびに自律神経機能を評価し、口腔微生物神経毒である硫化水素とメチルメルカプタン濃度を口腔内で測定する。さらに神経毒を産生する主な歯周病原細菌の数を唾液中で測定する。それらの定量的評価により、早期シヌクレイノパチー患者の嗅覚低下と自律神経障害の重症度は、口腔微生物神経毒の増加と相関するかを明らかにする。

3. 研究の方法

発症4年以内でYhar 2度までのパーキンソン病（PD）患者23例（男14例、女9例、平均年齢71.6歳）対照は健康人11名（男5例、女6例、平均年齢56.3歳）。研究の実施に当たっては新潟大学地域医療教育センター魚沼基幹病院の倫理委員会の承認を経て、被験者より書面での同意を得た。自律神経障害の評価は、Schellong試験による起立性低血圧の評価、MIBG心筋シンチグラフィ、自覚的な自律神経症状質問票（SCOPA-AUT）を施行した。嗅覚の評価には、12種類のおいスティックを用いた検査法であるodor stick identification test for Japanese (OSIT-J)を用いた。検査の手順は以下の通りである。冷蔵保存した臭いスティックを

検査の1時間前に冷蔵庫から取り出し、1)スティックのキャップを外し先端を出す。2)長方形の薬包紙(5.25cm×10.5cm)の片側内面中央部にある直径約2cmの円内全体にスティックを塗布する(5回程度円を描くように円内を塗りつづす)。3)スティックを塗布した部分を内側にして二つ折りにする。4)薬包紙の臭い提示試料の円部分を親指と人指し指で挟み、円をすりつづすように5回程度すり合わせてから開き、被験者に嗅いでもらう。5)被測定者は感じた臭いを4つの選択肢の中から選んで回答する(4つの中からどうしても選べない場合には「分からない」、無臭であると感じた場合には「無臭」と回答する)。この1)~5)の手順を12種類の臭いスティックで繰り返した。

口腔内の歯周病原細菌が産生する硫化水素ならびにメチルメルカプタン濃度は、口腔内の空気1mlを採取し、半導体ガスクロマトグラフィー器機(OralChroma™)を用い測定した。口腔内の空気の採取方法は、まず1mlのディスプレイシリンジを被験者に前歯で銜てもらい、口唇を閉じ1分間鼻で静かに呼吸するよう命じ、1分経過後にシリンジ内に1mlの気体を吸引し採取した。硫化水素ならびにメチルメルカプタンを産生する歯周病原細菌(表1)である、*P. intermedia*、*P. gingivalis*、*T. forsythensis*、*T. denticola*、*F. nucleatum*の細菌量は、採取した唾液10μlを用い定量した(インベーター法、BMLに委託)。唾液の採取は、1ヶ月以内に抗菌薬の投与を受けていないことを前提とし、直近の歯磨きから5時間経過した時点で行った。

統計学的処理では、SPSS Statistics version 27 (IBM)にて、唾液中の各歯周病原細菌数(コピー/10μl唾液)と、硫化水素ならびにメチルメルカプタン濃度の相関を検討した。さらに唾液中の各歯周病原細菌数(コピー/10μl唾液)と、嗅覚低下、起立性低血圧、MIBG心筋シンチグラフィーでの集積低下、ならびに自覚的な自律神経症状の程度との相関を検討した。

4. 研究成果

PDとコントロールの唾液中における口腔内総菌数の平均はPDで4801739(コピー/10μl唾液)、コントロールで3890909(コピー/10μl唾液)であった。上記5種の歯周病原細菌の他に侵襲性歯周炎の病原細菌とされる*A. actinomycetemcomitans*についても定量したが、唾液中で検出可能であったのはPDで2例、コントロールは0例であり、この細菌数については両群の比較は困難であった。*P. intermedia*の菌数の平均はPDで1949(コピー/10μl唾液)、コントロールで9(コピー/10μl唾液)であった。*P. gingivalis*の菌数の平均はPDで1809(コピー/10μl唾液)、コントロールで41(コピー/10μl唾液)であった。*T. denticola*の菌数の平均はPDで817(コピー/10μl唾液)、コントロールで15(コピー/10μl唾液)であった。*T. forsythensis*の菌数の平均はPDで316(コピー/10μl唾液)、コントロールで216(コピー/10μl唾液)であった。*F. nucleatum*の菌数の平均はPDで113978(コピー/10μl唾液)、コントロールで40974(コピー/10μl唾液)であった。両群の分散をMann-Whitney U testで比較すると、*P. intermedia*($P=0.034$)、*P. gingivalis*($P=0.048$)、*T. denticola*($P=0.031$)、*F. nucleatum*($P=0.007$)で有意差あり、PDで明らかに増多している結果であった。

PDにおける口腔内の硫化水素濃度の平均は171.5 ppb、メチルメルカプタン濃度の平均は93.8 ppbであった。口腔内の硫化水素濃度ならびにメチルメルカプタン濃度と、上記の歯周病原細菌数との間に相関は認められなかった。

歯周病原細菌数と嗅覚低下、起立性低血圧、MIBG心筋シンチグラフィーでの集積低下、ならびにSCOPA-AUTにて評価した自覚的な自律神経症状の程度との間にも相関は見られなかった。

本研究では唾液中の歯周病原細菌がPD患者で明らかに増多している結果が得られたが、唾液中

の歯周病原細菌数と口腔内の硫化水素濃度ならびにメチルメルカプタン濃度、さらには唾液中の歯周病原細菌数と嗅覚低下ならびに自律神経障害の重症度との間に相関は無い結果となった。歯周病原細菌の採取法は、歯周ポケット内に直接ペーパーポイントを挿入して採取する方法と、唾液を採取する方法がある。本研究では侵襲の無い唾液採取を選択したが、唾液中に含まれる菌数は実際に口腔内に存在する菌数を必ずしも直接的に反映していなかった可能性は否定できない。この方法論における制限は本研究の結果に影響した可能性があると考えられる。唾液中の歯周病原細菌数と嗅覚低下ならびに自律神経障害の重症度との間に相関は見られず、本研究の結果をもって、歯周病原細菌とシヌクレイノパチー前駆症状との関連を議論することは難しい。しかし、PD患者の唾液中にこれほどの歯周病原細菌が存在することは、PDの診療に大きなインパクトを与える事実であることは間違いない。

PD患者では発症早期においても、上肢の細かく素早い動きが障害されるため歯磨きが雑になり、口腔衛生の保持が困難になって歯周病原細菌が増えやすい環境であった可能性は大いにある。PD発症後の運動症状の結果として歯周病原細菌の増殖が生じるとすれば、疾患の進行に伴って歯周病原細菌はさらに増え続け、進行期における歯周病の増悪とさらには誤嚥性肺炎の重症化にもつながるものと考えられる。今後は、歯周病原細菌がPD患者のQOLならびに予後にどのような影響をもたらすかの検討が必要と考えられる。

引用文献

- [1] Doty RL. Olfactory dysfunction in Parkinson disease. *Nat Rev Neurol* 2012;8:329-39.
- [2] Persson S, Edlund MB, Claesson R, Carlsson J. The formation of hydrogen sulfide and methyl mercaptan by oral bacteria. *Oral Microbiol Immunol* 1990;5:195-201.
- [3] Ng W, Tonzetich J. Effect of hydrogen sulfide and methyl mercaptan on the permeability of oral mucosa. *J Dent Res* 1984;63:994-7.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 0件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 小澤鉄太郎	4. 巻 94
2. 論文標題 延髄と消化管ペプチド：シヌクレイノパチーでの考察	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 脳神経内科	6. 最初と最後の頁 166
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 小澤鉄太郎	4. 巻 45
2. 論文標題 シヌクレイノパチーにおける腸脳軸の障害	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Medical Sceince Digest	6. 最初と最後の頁 58-61
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 小澤鉄太郎	4. 巻 37
2. 論文標題 シヌクレイノパチーの腸脳軸障害	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 BIO Clinica バイオクリニカ	6. 最初と最後の頁 77-80
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 小澤鉄太郎
2. 発表標題 臨床医から見た消化管栄養感知と迷走神経機能
3. 学会等名 第72回日本自律神経学会総会
4. 発表年 2019年

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------