

機関番号：37104

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20592214

研究課題名 (和文) 口腔内細菌をターゲットとした急性冠症候群の新しい治療法開発

研究課題名 (英文) Development of the treatment for acute coronary syndrome by dental bacteria elimination

研究代表者

佐々木 健一郎 (KEN-ICHIRO SASAKI)

久留米大学・医学部・助教

研究者番号：70320190

研究成果の概要 (和文)：

急性冠症候群 (ACS) 患者 174 例から採取した冠動脈内サンプル (冠動脈血およびプラーク) の 58% に歯周病の代表的起炎菌 *P. Gingivalis* の DNA が検出され、同菌から分泌される蛋白分解酵素 Gingipain の活性価もプラーク内で高値を示していた。歯周病治療介入によって同酵素によるプラーク破裂による ACS 発症を防ぎ、将来の主要心血管イベント発生を抑制させる新たな治療概念の誕生が示唆されたが、平均観察期間 14.8 ヶ月の患者予後調査において、治療 6 カ月後の主要心血管イベント発生率と採取サンプル内 *P. Gingivalis* 陽性検出歴に統計学的相関性は認められなかった。

研究成果の概要 (英文)：

In 174 patients with acute coronary syndrome (ACS), the DNA of *P. gingivalis*, which is a representative responsible bacterium for periodontal disease (PD), was detected in 58% of the sample including the coronary artery blood and the atherosclerotic plaque. Moreover, the activity of Gingipain, which is a protease from the bacterium, increased in the plaque. Although we speculated that the treatment of PD can prevent the protease-induced plaque rupture for ACS and thereby reduce the major adverse cardiac event, the detection of the bacterium in the sample did not influence to the event rate at 6 months after the onset of ACS in the prognosis research for average 14.8 months.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
平成 20 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
平成 21 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
平成 22 年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：虚血性心血管病に対する経皮的カテーテル治療および血管新生療法の開発

科研費の分科・細目：歯学・病態科学系歯学・歯科放射線学

キーワード：①虚血性心臓病 ②急性冠症候群 ③動脈硬化 ④血管内プラーク ⑤歯周病菌 ⑥感染 ⑦炎症 ⑧歯周病治療

1. 研究開始当初の背景

最近、歯周病菌への慢性感染が動脈硬化の

進展や虚血性心臓病の発症に関与することが報告されている (J Cardiovasc Risk 1999,

Circulation 2003)。歯周病は成人の75%に認められ、さらにその約20-30%が重度歯周病であることが報告されている。これまでの研究で、急性冠動脈症候群（ACS）は冠動脈プラークの破裂で発症することが報告されているが、この破裂に関する詳しい機序は未だ不明である。歯周病の起炎菌の一つ Porphyromonas Gingivalis (P. Gingivalis) からは特異的蛋白分解酵素 Gingipain が分泌されているが、この酵素は冠動脈狭窄部のプラークを破裂させ、ACS を発症させているかもしれない。循環器学と歯科口腔外科学という全く異なる診療フィールドの知見をリンクさせる新たな着眼点で ACS 発症のメカニズムを検証した研究は国内外において見受けられない。

2. 研究の目的

歯周病起炎菌の一つ P. Gingivalis への冠動脈内局所感染もしくは全身性感染が ACS 発症に関与するか否かについて、ACS 発症者から採取した検体による *in vitro* 実験で初期検証した後、さらにその後の治療介入と予後調査を行うことで ACS 発症予防における歯周病治療の重要性を最終検証する。

3. 研究の方法

(1) 当院入院中の ACS (不安定狭心症・急性心筋梗塞) 患者に対してカテーテルによる経皮的冠動脈形成術 (PCI) を行った後、インフォームドコンセントが得られた患者において、その治療対象血管内から冠動脈血とプラークを採取。末梢動脈血も同時に採取し、これら3つのサンプルを用いて以下の実験を行う。冠動脈内プラークの採取は PCI 施行の際に使用される汎用型血栓吸引カテーテルを用いて行う。

- ① PCR 法による P. Gingivalis DNA 検出
- ② 電子顕微鏡による P. Gingivalis の観察
- ③ Z-Phe-Arg-MCA 分解活性測定法に特異的阻害剤使用を併せた、Gingipain 活性価測定
- ④ 高感度 CRP や炎症性サイトカインの血中濃度を ELISA 法等で測定

(2) ACS に対する初期治療を受けた後の患者予後を主要心血管イベント発生に注目し、前向き調査する。初期治療の時期に歯周病菌が検出された患者については、歯周病治療介入群と非治療介入群の2群間で予後評価を行い、ACS 再発予防における歯周病治療介入の役割を検証する。

4. 研究成果

冠動脈内から吸引採取したプラークをヘマトキシリン・エオジン染色したところ、赤血球、多核白血球、血小板、泡沫細胞、コレス

テリン、フィブリン成分が観察された(図1)。さらに免疫学的染色では CD68 陽性細胞(マクロファージ)も観察され、採取されたサンプルが動脈硬化巣のプラークであることが確認できた。

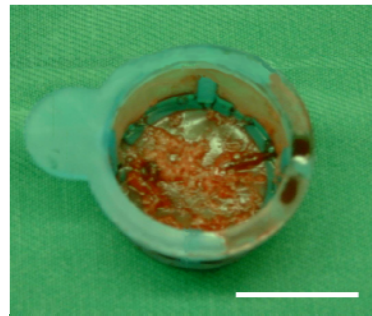


図1

冠動脈閉塞または狭窄部プラーク付近から吸引採取した冠動脈内サンプル。赤白色の泥状物が白線は2cm。

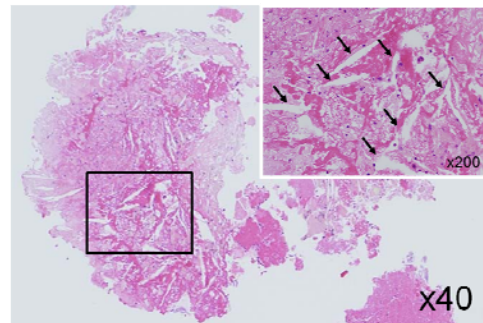


図2

吸引プラークのヘマトキシリン・エオジン染色写真。矢印はコレステリン裂隙を示す。

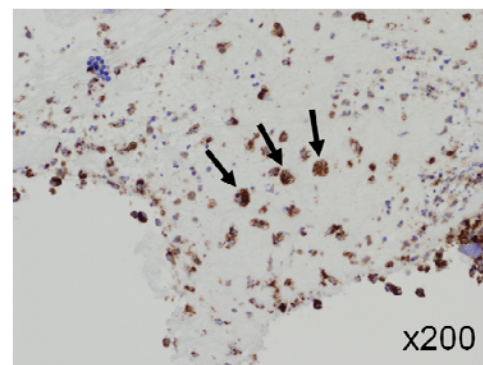


図3

吸引プラークの CD68 抗体免疫染色写真。矢印は CD68 陽性マクロファージを示す。

ACS 患者連続 174 例 (年齢 : 65.8 ± 11.5) から同時採取した冠動脈血、冠動脈内吸引物 (冠動脈狭窄部プラーク含む)、末梢動脈血全サンプルにおいて、対象患者の 38.1% に P.

Gingivalis DNA が検出された。また、冠動脈内サンプル（冠動脈血および吸引物）においては、対象患者の 58.8% に同 DNA が検出され、末梢動脈血からの検出率 29.4% よりも有意な高検出率を示していた ($p < 0.05$)。

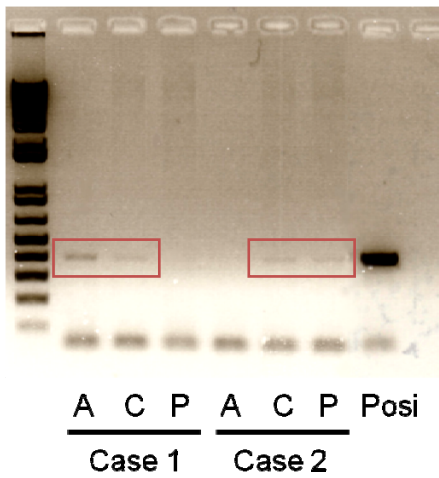


図 4
PCR 法を用いた採取サンプル内 P. Gingivalis DNA の検出。代表的な対象患者 2 名における各 3 つのサンプルを示す。Case 1 ではレーン A、C に、Case 2 ではレーン C、P に該当 DNA を認める。

- A: 冠動脈内より吸引したプラーク
- C: 冠動脈血
- P: 末梢動脈血
- Posi: ポジティブコントロール

電子顕微鏡を用いた組織観察では P. Gingivalis を観察することはできなかったが、P. Gingivalis が分泌する特異的な蛋白分解酵素 Gingipain の活性価が同プラーク内では高値を示していた。

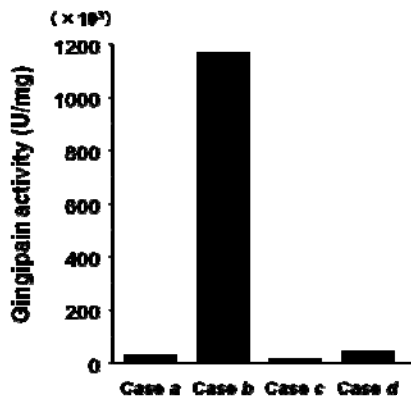


図 5
吸引プラーク内における gingipain 活性価。対象患者 4 名のプラークサンプルを示す。Case d では著しい活性価の上昇を認めた。

同菌検出例では、非検出例に比べ、高感度 CRP および interleukin-6 の血中濃度が共に有意に上昇していた (各 $p < 0.05$)。以上の結果から、冠動脈プラークへの P. Gingivalis 感染は冠動脈プラーク局所の炎症性変化だけでなく、全身性の炎症変化も同時にもらしており、同菌が分泌する Gingipain がプラーク破裂をもたらした結果、ACS を発症させている可能性が示唆された。これは歯周病治療で ACS 発症を防ぎ、将来の主要心血管イベント発生を抑制させる新たな治療概念誕生の可能性を示唆するものと考えた。

しかし、平均観察期間 14.8 ヶ月の患者予後調査においては、治療 6 カ月後の主要心血管イベント発生率と冠動脈局所性もしくは全身性 P. Gingivalis 検出歴との間に統計学的相関性は見出されなかった。今回の研究では ACS 初期発症および ACS 治療後における歯周病治療歴（除菌療法を含む）の状況調査をテレフォン・インタビューで実施している。対象患者からの詳細かつ十分な情報提供が得られなかった事例もあり、ACS 再発予防における歯周病治療介入が重要であるか否かについての統計学的検証が十分に実施できなかった。さらに今回の追跡予後調査は ACS 初期発症時における P. Gingivalis 検出陽性患者にのみ実施しており、統計学的評価を行う上でその評価対象者数が少なかったことが統計学的に有意な疾患関連性を示さなかった可能性もある。以上より、歯周病の罹患と ACS 発症およびその後の心血管イベント発症における関連性は現時点では不明であったが、今後も本研究への参加登録を継続し、評価対象患者数を増やしながら長期に渡る前向き調査を実施する予定である。同様の視点で予後調査を行っている研究報告は国内外の学会発表や論文発表において未だ見当たらない。本研究の継続で「歯周病への積極的な治療介入」が ACS 発症予防因子として証明されれば、世界的に大きな注目を浴びることが予想される。

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 0 件)

〔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

平成20～21年度

香月 与志夫 (YOSHIO KATSUKI)

久留米大学・医学部・助教

研究者番号：10389249

平成22年度

佐々木 健一郎 (KEN-ICHIRO SASAKI)

久留米大学・医学部・助教

研究者番号：70320190

(2) 研究分担者

平成21年度

佐々木 健一郎 (KEN-ICHIRO SASAKI)

久留米大学・医学部・助教

研究者番号：70320190

平成21～22年度

外山 康行 (TOYAMA YASUYUKI)

久留米大学・医学部・助教

研究者番号：40412506

(3) 連携研究者

筑波 智子 (TSUKUBA TOMOKO)

九州大学・歯学研究科（研究院）・助教

研究者番号：70336080