

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24年 5月 15日現在

機関番号：34408

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21592621

研究課題名（和文） 種々の血管系疾患に関与する歯周病原性細菌の特定と検証

研究課題名（英文） Specification and verification of periodontal pathogens relate to various vascular diseases

研究代表者

梅田 誠（UMEDA MAKOTO）

大阪歯科大学・歯学部・教授

研究者番号：90193937

研究成果の概要（和文）：歯周病原細菌 *P. gingivalis* および *T. forsythia* に対する病理組織標本中の局在を検索するのに有効なモノクローナル抗体を作成した。免疫染色法で病的歯肉およびアテローム動脈硬化症の標本から歯周病原細菌の局在を確認した。また、スリランカのバージャー病患者の口腔および、罹患血管検体から PCR 法を用いて歯周病原細菌の検出を行った。口腔に近接したリンパ節パラフィン切片標本における歯周病原細菌の存在を、頭頸部癌患者の標本を用いて検出し、明らかにした。これらの歯周病原細菌が、歯肉組織中に侵入し、リンパ節を経由して、血管局所に転移すると考えられた。

研究成果の概要（英文）：The monoclonal antibodies effective for the detection of *P. gingivalis* and *T. forsythia* localized in tissue specimens were prepared. Periodontal pathogen was detected in diseased gingival tissue and atherosclerosis sample by immunohistochemistry. Oral and vascular samples of Buerger disease patients in Sri Lanka were detected periodontal pathogens by polymerase chain reaction method. The existence of periodontal pathogens in formalin-fixed and paraffin embedded lymph nodes proximal to oral cavity was examined from patients with histories of head and neck cancer. These bacteria invaded in gingival tissues might translocate peripheral arteries via lymph nodes.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・歯周治療系歯学

キーワード：血管系疾患、歯周病原細菌、モノクローナル抗体、免疫染色、リンパ節、バージャー病、*P. gingivalis*、*T. forsythia*

1. 研究開始当初の背景

（1）近年、歯周病と血管系疾患との関わりが歯学および医学の両分野で注目されるようになってきた。重度な歯周疾患にお

いては歯周ポケット内に健常者の100倍以上もの細菌が存在し、歯周ポケット内に、*Porphyromonas gingivalis*、*Treponema denticola*などの歯周病原細菌の割合が増

加してくる。これらの歯周病原細菌と宿主との関係により、様々なサイトカインが放出され歯周組織局所の炎症に関わるとともに、同時にこれらのサイトカインによって血管系疾患が引き起こされる可能性が考えられる。また、これらの細菌が血管局所に運ばれ、血管炎などの炎症反応を引き起こし、さらに血栓の形成に関わる可能性がある。血管系疾患には、動脈硬化症、動脈瘤、静脈瘤、バージャー病など様々なタイプがあり、歯周病原細菌の関与についてそれぞれのタイプごとに明らかにする必要があるであろう。

(2) バージャー病に関しては、日本では衛生状態の向上とともに典型的な症例が減少してきている。ところが、他のアジア諸国においていまだ高い罹患率を示しており、より若年で典型的な症例が多く認められる。これを精査することは、歯周病原細菌のバージャー病への関与のメカニズム解明に有効であるとともに、日本のみならずアジア全体のQOLの貢献に役立つと考えられる。

2. 研究の目的

(1) 本研究では、種々の血管系疾患罹患部位において、歯周病原細菌 DNA の存在を確認し、無染色病理標本に対し歯周病原細菌に対する抗体を用いて免疫染色を行い、罹患血管内のそれぞれの歯周病原細菌の局在を明らかにする。

(2) バージャー病に関与する歯周病原細菌に関しては、スリランカからの若い典型的なバージャー病患者口腔内の歯周組織の状態を調べ、唾液および手術時の血管サンプルを採取、細菌を検出し日本の検体と比較検討する。

3. 研究の方法

(1) スリランカにおけるバージャー病患者の歯周病検査および口腔サンプル（唾液）の採取。血管サンプルの採取、現地での検体からの DNA 抽出（病理標本作成）

スリランカにおけるバージャー病患者は、同国のペラデニア大学医学部附属病院外科に来院した 30~35 歳までの典型的なバージャー病の症状を有する 20 名を選ぶ。

バージャー病の確定診断としては、塩野谷の基準（喫煙歴、50 歳以前の発症ただし今回は 30~35 歳以前の発症、膝下動脈以下の閉塞、上肢動脈閉塞か遠心性静脈炎、喫煙以外の粥状硬化リスクファクターの欠如）に合致していることで血管造影および動脈拍動の減弱、足関節-上腕血圧比（ABI）によって確認する。患者は同国の血管外科医である研究

協力者の Channa Ratnatunga 教授によるバージャー病の確定診断を受ける。患者は、外科手術前に口腔内診査および唾液を採取する。

バージャー病と診断された患者は、研究協力者の歯科医 Galketiya Rohan Sirisena および Ruwnpura Pradeep により口腔内診査（歯周病臨床検査）および唾液サンプルの採取を行う。口腔診査の後、患者はバージャー病の手術を受け罹患血管の検体を採取する。罹患血管において、免疫染色用の病理標本を現地で依頼する。

採取した唾液および血管のサンプルは、-80℃の超低温庫に保存し、サンプル中の歯周病原細菌 DNA の抽出は Ruwnpura Pradeep が DNA 抽出キットを用いて行う。

以上の処理をスリランカで行い標本および抽出した DNA を日本に輸送する。

(2) 日本における口腔（唾液）および血管疾患罹患部位からのサンプルの採取

日本における血管疾患患者について、歯科受診を行って、口腔内診査および、唾液サンプルを採取し、後日外科手術時において疾患部位から、罹患血管サンプルを採取する。サンプルの採取後、梅田および大学院生が口腔内サンプル、動脈壁、血栓から細菌 DNA を抽出する。

動脈疾患病変の臨床的評価は、以前より保有している血管エコーなどの無侵襲機器および血管撮影を施行して、病変の進展度を客観的に評価する。さらに、動脈疾患病変における無染病理標本作成を依頼し、モノクローナル抗体による歯周病原細菌に対する免疫染色用の試料とする。

さらに、バージャー病の病変試料を含む血管疾患の試料について、研究協力者としてバージャー病研究所岩井武尚所長からも提供を受け唾液および血管疾患の試料を集める。

(3) 検体からの歯周病原細菌の検出、病理標本における、歯周病原細菌局在の証明

スリランカおよび日本の種々の血管疾患から採取したサンプルについて、目的とする細菌の 16SrRNA 遺伝子の特異的な部分を標的とした PCR 法を用いて検体中に歯周病原細菌遺伝子の存在を確認する。種々の血管疾患ごとに、口腔サンプルと、血管サンプルからの歯周病原細菌の検出の有無について調べ、どの血管疾患罹患部位からの歯周病原細菌 DNA の検出と口腔からの検出の相関が高いか比較する。さらに、採取したサンプルの細菌培養も試みる。

血管サンプルから歯周病原細菌 DNA が検出された罹患血管については、歯周病原細菌に対する免疫染色を行って、血管組織中の細菌の

局在を検索する。

P. gingivalis, *A. actinomycetemcomitans*, *P. intermedia*のそれぞれに対するモノクローナル抗体を用いて、血管病理標本から歯周病原細菌の局在を明らかにする。バックグラウンドの調整等細かな条件設定を行い、検出の精度を上げる。動脈病変部位からPCR法によって歯周病原細菌が検出されたものについては、同時に採取した病理標本において免疫染色による歯周病原細菌の検索を行うが、コントロールとしてPCR法によって検出されなかった標本についても免疫染色を行って比較する。

4. 研究成果

(1) 平成21年度においては、血管疾患罹患部位において従来歯周病原細菌が血管サンプルからPCR法によって検出された49検体のパラフィン切片標本を用いて歯周病原細菌のうち *Porphyromonas gingivalis* および *Tannerella forsythia* の局在をそれぞれのモノクローナル抗体を用いた免疫染色法によって調べた。病理組織標本中でその局在が明らかになったのは、アテローム性動脈硬化症1例のみであったが、動脈硬化病変内の形質細胞に取り込まれた *P. gingivalis* が明らかに検出された。一方、新鮮な動脈標本を用いた場合は、6例中 *P. gingivalis* が2例、*T. forsythia* が3例検出されたことから、標本作製の過程におけるサンプルの劣化が疑われた。処理による劣化によって細菌の検出が困難となった可能性があるが、血管病変中の局在の一端を示した意義は大きいと考えられる。スリランカからのバージャー病のサンプルに関しては、11例を調べたが、そのうち血管病変から *P. gingivalis* が検出されたものは1例、*T. forsythia* が検出されたものは1例と日本でのサンプルより検出率が低い結果になった。また、日本人のバージャー病患者のほとんどから検出された *Treponema denticola* は検出されなかった。同時に送られた唾液サンプルからはそれぞれ6例ずつ検出されていたことから唾液サンプルに比べ菌数が少ないと考えられる血管病変サンプルでは、輸送中の劣化がより強く影響したかもしれない。

(2) 平成22年度においては、口腔から末梢血管へ歯周病原細菌が運ばれても、量的にごくわずかであることから、途中経路として考えられる、頭頸部のリンパ節において歯周病原細菌の検出を検討した。66名の顎顔面部腫瘍患者66名において頭頸部リンパ節からリアルタイムPCR法を用いて歯周病原細菌5菌種の

検出を行った。顎下およびオトガイ下リンパ節サンプルのうち *P. gingivalis* が18%、*T. forsythia* および *P. intermedia* がそれぞれ8%検出された。それぞれの歯周病原細菌の検出と、癌のステータス、抗癌療法、性別との間に有意な相関は認められなかった。このことから歯周病原細菌のリンパ節への移動は、癌のステータス、抗癌療法の違い、性別と関係なく起こったと考えられる。これらの研究によって歯周病原細菌の血管への移動経路の解明の一端が明らかになった。

(3) 平成23年度においては、*P. gingivalis* および *T. forsythia* に特異的でヒト細胞組織内における局在を明らかにできるモノクローナル抗体を用いて、まず、入口の歯周病巣組織における局在の解析を免疫染色を用いて行った。歯周病原細菌に対するモノクローナル抗体だけでは歯肉の病的上皮組織の表面に局在するのか、病的歯肉上皮の細胞組織内部に存在するのか明らかに区別することができなかった。そのため、ケラチノサイトに対するモノクローナル抗体も同時に使用して免疫二重染色を行って、*P. gingivalis* などの歯周病原細菌が歯肉上皮細胞だけでなく、歯肉上皮細胞内部にも存在することを識別できた。これらの所見は、歯周病患者50名以上の歯周外科時に採取した病的歯肉組織を検体として用い、検索することで見出した。歯周病原細菌が形質細胞などに取り込まれている像は見出すことができなかった。今回の研究を通じて、これらの歯周病原細菌が、歯肉組織中に侵入し、リンパ節を經由して、血管局所に転移すると考えられた。

(4) 今回得られた研究成果としては、培養の困難な *T. forsythia* に対する病的組織の局在を明らかにすることのできるモノクローナル抗体を作成することができたことである。これを用い、体の様々な部分におけるこの菌の局在を明らかにすることができ、この菌の血管疾患に対する影響を明らかにする研究が進むことであろう。一方、*T. denticola* および *A. actinomycetemcomitans* に対するモノクローナル抗体の作成も精力的に行ったが、感度、もしくは特異性の点で実用に至るものは作成できなかった。したがって、2菌種において歯周病原細菌の局在を調べることになった。

また、口腔、リンパ節、末梢血管での歯周病原細菌を検出および、免疫染色によって局在を調べることによって、口腔から末梢へのこれらの細菌の転移経路の一端が明らかになった。

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7件)

- ① Iwai T, Sato S, Kume H, Inoue Y, Umeda M, Kagayama T, Hirokawa M. Clinical study of phlebitis migrans and incompetence of the leg's superficial vein in Buerger disease. *Ann Vasc Dis*, 査読有、5巻、No.1、2012、45-51.
DOI : 10.3400/avd.oa.11.00044
- ② Yu KM, Inoue Y, Umeda M, Terasaki H, Chen ZY, Iwai T. The periodontal anaerobe *Porphyromonas gingivalis* induced platelet activation and increased aggregation in whole blood by rat model. *Tromb Res*, 査読有、127巻、2011、418-425.
DOI : 10.1016/j.thromres.2010.12.004
- ③ Notani H, Inoue Y, Sugano N, Jibiki M, Umeda M, Izumi Y. Whole-blood platelet aggregation by *Porphyromonas gingivalis* in patients with peripheral arterial disease. *J Med Dent Sci*, 査読有、58巻、2011、7-14.
<http://www.tmd.ac.jp/english/labs/toshozy>
- ④ Umeda M, Tsuno A, Okagami Y, Tsuchida F, Izumi Y, Ishikawa I. Bactericidal effects of a high-power red light-emitting diode on two periodontopathic bacteria in antimicrobial photodynamic therapy in vitro. *J Invest Clin Dent*, 査読有、2巻、2011、268-274.
DOI : 10.1111/J.2041-1626.2011.00071.x
- ⑤ 岩井武尚、佐藤彰治、久米博子、井上芳徳、梅田 誠、加賀山知子、広川雅之. バージェャー病患者の逍遙性静脈炎、表在静脈弁不全についての考察と新知見. *静脈学*, 査読有、22巻、No.1、2011年、25-31.
<http://www.js-phlebology.org/journal/index>
- ⑥ Chen YW, Nagasawa T, Wara-Aswapati N, Ushida Y, Wang D, Takeuchi Y, Kobayashi H, Umeda M, Inoue Y, Iwai T, Ishikawa I, Izumi Y. Association between periodontitis and anti-cardiolipin antibodies in Buerger disease. *J Clin Periodontol*, 査読有、36巻、2009、830-835.
DOI : 10.1111/J.1600-051X.2009.01467.x
- ⑦ Izumi Y, Nagasawa T, Umeda M,

Kobayashi H, Takeuchi Y, Yashiro R, Hormdee D, Suda T, Ushida Y, WaraAswapati N. Periodontitis and cardiovascular diseases: The link and relevant mechanisms. *Japanese Dental Science Review*, 査読有、45巻、2009、98-108.

DOI : 10.1016/j.jdsr.2009.06.001.

[学会発表] (計3件)

- ① RaJakaruna GA, 梅田 誠、内田佳介、古川あすか、和泉雄一、江石義信. 新規に開発したモノクローナル抗体を用いた歯肉組織中の歯周病原細菌の局在の解明. 第59回国際歯科研究学会日本部会 (JADR)、2011年10月8日、広島.
- ② RaJakaruna GA, 内田佳介、梅田 誠、古川あすか、和泉雄一、江石義信. 新規に開発したモノクローナル抗体を用いた病的歯肉組織中の歯周病原細菌の検出と局在. 第54回秋季日本歯周病学会学術大会、2011年9月24日、下関.
- ③ Rajakaruna GA, Uchida K, Umeda M, Furukawa A, Suzuki Y, Lokman N, Izumi Y, Eishi Y. Detection of periodontal pathogens in gingival tissues using novel Mab. 第58回国際歯科研究学会日本部会 (JADR) 総会・学術大会、2010年11月20日、北九州市.

[図書] (計1件)

- ① 梅田 誠、和泉雄一. 永末書店、ザ・ペリオドントロジー、2009、86-88、265-267.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

梅田 誠 (UMEDA MAKOTO)
大阪歯科大学・歯学部・教授
研究者番号 : 90193937

(2) 研究分担者

井上 芳徳 (INOUE YOSHINORI)
東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・講師
研究者番号 : 70280964

(3) 連携研究者

なし