

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25年 5月 10日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22591399

研究課題名（和文） 動脈疾患における歯周病の関与と血小板凝集の影響について

研究課題名（英文） An association between peripheral artery disease and periodontal pathogen relating with platelet aggregation

研究代表者

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

研究成果の概要（和文）：

当科では歯周病の主要な原因菌の一つである *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*) は多血小板血漿 (PRP) においてヒト血小板凝集を惹起することを報告している。今回、末梢動脈疾患を有する (PAD) 患者と健常対象群における Pg による全血での血小板凝集反応を検討したが、PAD 群ではコントロール群と比較して、*P. gingivalis* により有意に高い血小板凝集反応を示し、その反応は下肢虚血が重度なほど亢進していた。また血小板凝集反応は Pg 菌に対する IgG 抗体値と正の強い相関を示した。Fc γ RIIb/IIIa (CD32) の抗体 (CD32 抗体) による血小板凝集反応の影響に関しては、CD32 抗体の投与により、Pg 菌による血小板凝集が消失した群、変化しなかった群、低減した群に分類された。また CD32 抗体投与後に血小板凝集が惹起された (5ohm 以上) 場合には Pg を添加しても凝集が惹起されず、血小板凝集が軽度のみ惹起された (1-3ohm) 場合には Pg 添加による血小板凝集能は抑制されなかったことより、CD32 抗体と Pg 菌の間で競合阻害が起きたと推定された。重度の歯周病を有する症例では歯磨きなどにより一過性の菌血症となった際には血小板凝集が惹起されると推定され、Pg が血小板活性化により PAD の増悪に関与していることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：

We reported that *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*) induced human platelet aggregation. Platelet aggregation using whole blood was assessed between patients with peripheral artery disease and normal volunteers. *P. gingivalis* induced platelet aggregation increased in PAD patients than normal control, which showed higher in patients with Fontaine III/IV compared with Fontaine II, and exhibited positive correlation with IgG titer for *P. gingivalis*. Fc γ RIIa/IIIb (CD32) antibody pretreatment resulted PAD patients in three categories including complete abolishment, partial suppression, and full reaction of Pg induced platelet aggregation. When platelet aggregation was induced sufficiently after CD32 antibody pretreatment (more than 5 ohm), Pg did not induce additional

platelet aggregation. In contrast, Pg induced platelet aggregation was not suppressed when slight upregulation was shown (less than 1-3 ohm), suggesting that CD32 antibody and Pg induced platelet aggregation competitively. Platelet aggregation was induced after tooth brushing in patients with severe periodontitis. It was suggested that *P. gingivalis* involved in PAD aggravation by platelet activation.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-----------|---------|-----------|
| 2010年度 | 1,300,000 | 390,000 | 1,690,000 |
| 2011年度 | 1,200,000 | 360,000 | 1,560,000 |
| 2012年度 | 500,000 | 150,000 | 650,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,000,000 | 900,000 | 3,900,000 |

研究分野：医学

科研費の分科・細目：外科

キーワード：歯周病、血書版凝集能

1. 研究開始当初の背景

末梢動脈疾患(peripheral artery disease: PAD) は、末梢動脈の粥状硬化巣による狭窄、および破綻の結果形成される閉塞血栓により引き起こされる疾患である。PAD に対する歯周病菌の関与は従来から報告されており、動脈壁から rDNA が検出されるとともに、最近では動脈硬化性プラークから歯周病菌が検出されている。

2. 研究の目的

当科では歯周病の主要な原因菌の一つである *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*) は多血小板血漿 (PRP) においてヒト血小板の凝集能を有することを報告しており、PADの病因に一定の役割を担っていることが推測される。今回、PAD患者におけるPgによる全血での血小板凝集反応、およびFcγRIIb/IIIa抗体による血小板凝集反応の影響について検討した。

3. 研究の方法

①PAD患者と健常対象群におけるPgによる全血での血小板凝集反応

PAD患者群30例と健常対照群30例において *P. gingivalis* による全血での血小板凝集反応およびIgG抗体価を測定した。

②FcγRIIb/IIIa (CD32)の抗体 (CD32抗体) による血小板凝集反応の影響

動脈疾患(31例)から全血4.5mlを採取し、3.8%クエン酸Na (0.5ml) 添加し、この500μlにphosphate buffered saline (PBS) 500μlを混和し希釈検体を作成した。

希釈検体に歯周病菌(Pg菌)を 10^4 - 10^5 個/100μLを加えImpedance

Aggregometer (Model 591TM)を使用し電氣的インピーダンス値の変化を計測し、血小板凝集能を12分間にわたって測定した。希釈検体に血小板上に存在する受容体FcγRIIb/IIIa (CD32)の抗体 (CD32抗体) : 1.0μg (50μL)を添加し同様に24分間にわたって計測した。希釈検体にab1.0μg (50μL)を添加し同様に12分間計測した後、

Pg(10^4 - 10^5 個/100μl)を投与しさらに12分間にわたって計測した。

4. 研究成果

①PAD患者と健常対象群におけるPgによる全血での血小板凝集反応

*P. gingivalis*を加えてから12分間の電氣的インピーダンス値の変化は、

PAD群で 10.2 ± 4.8 (5.1-14.3) ohm、コントロール群で 6.0 ± 3.0 (0.2-10.8) ohmであった。PAD群ではコントロール群と比較して、*P. gingivalis*により有意に高い全血血小板凝集反応を示した。Fontaine分類別では、Fontaine II度： 9.1 ± 4.6 ohm に対して、Fontaine III/IV度： 11.4 ± 3.0 ohm と、Fontaine III/IV度で高値であった。またPAD患者の中で歯牙を有する18名について、全血血小板凝集反応とIgG抗体価の相関に関して検討したところ、相関係数は0.7で正の強い相関を認めた。

②Fc γ RIIb/IIIa (CD32)の抗体 (CD32抗体)による血小板凝集反応の影響

- 1) 12分後の血小板凝集能変化は 9.4 ± 2.7 ohmであり、
- 2) 12、24分後の血小板凝集能変化は 13.6 ± 4.9 ohm、 5.8 ± 4.8 ohm、
- 3) 24分後の血小板凝集能変化は 3.3 ± 2.2 ohmであった。

以上より、CD32抗体を投与した12分後にPgを添加してCD32抗体の血小板凝集に及ぼす影響を検討したが、CD32抗体の投与により、Pg菌による血小板凝集が消失した群、変化しなかった群、低減した群に分類された。また、CD32抗体を投与した24分後の抵抗値が5ohm以上の症例では、Pgを添加しても血小板凝集が惹起されず、血小板凝集能が軽度のみ惹起された症例(1-3ohm)では、Pg添加による血小板凝集能は抑制されなかった。以上からCD32抗体を十分量投与すると競合阻害が起こったと推定した。

健康人のPgに対する血小板凝集能は軽度に惹起されたのみであった。血小板上にある受容体Fc γ RIIb/IIIa (CD32)とCD32抗体の反応が良好な症例では、Pg添加による血小板凝集能が抑制されたことよりCD32抗体とPgの間で競合阻害が起きたと推定された。重度の歯周病を有する症例では歯磨きなどにより一過性の菌血症となった場合には血小板凝集が惹起され

ると推定され、Pgが血小板活性化によりPADの増悪に関与していることが示唆された。

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17件)

- ① Igari K, Jibiki M, Kudo T, Sugano N, Inoue Y. Drainage Surgery Followed by Postoperative Irrigation with Gentian Violet for Prosthetic Graft Infection Caused by Methicillin-resistant Staphylococcus aureus. Eur J Vasc Endovasc Surg. 2010;19: [Epub ahead of print]
- ② Kume H, Inoue Y, Mitsuoka A, Sugano N, Morito T, Muneta T. Doppler ultrasonography-aided early diagnosis of venous thromboembolism after total knee arthroplasty. Eur J Vasc Endovasc Surg. 2010;40:664-8.
- ③ Mitsuoka A, Inoue Y, Kume H, Sugano N, Morito T, Muneta T. Discrimination of types of venous emboli using Doppler ultrasound. Ann Vasc Surg. 2010;24:721-7
- ④ 地引政利, 井上芳徳, 工藤敏文, 菅野範英, 稲垣 裕, 磯部光章, 岸野充浩. 一時的な大静脈フィルターの適応. 静脈学 22: 17-24. 2011
- ⑤ 猪狩公宏、豊福崇浩、内山英俊、小泉伸也、米倉孝治、工藤敏文、地引政利、菅野範英、井上芳徳. 当科における末梢動脈疾患に対するマゴット療法の検討. 脈管学. 2011. 51: 209-213
- ⑥ 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. 2011; 58: 7-14
- ⑦ Kangmin Y, Inoue Y, Umeda M, Terasaki H, Chen Z, Iwai T. The periodontal anaerobe porphyromonas gingivalis induced platelet activation and increased aggregation in whole blood by rat model. Thromb Res. 2011; 127: 418-425
- ⑧ Toyofuku T, Inoue Y, Kurihara N, Kudo T, Jibiki M, Sugano N, Umeda M, Izumi Y. Differential detection rate of periodontopathic bacteria in atherosclerosis. Surg Today, 2011; 41: 1395-1400
- ⑨ Jibiki M, Inoue Y, Kudo T, Toyofuku T. Aortic Aneurysm Requiring Suprarenal Cross-Clamping. Ann Vasc Dis. 2011; suppl. S4-7
- ⑩ 猪狩公宏、工藤敏文、豊福崇浩、西澤真人、内山英俊、小泉伸也、米倉孝治、地引政利、菅野範英、井上芳徳. 多分節の下肢閉塞性動脈病変に対する一期的ハイブリッド血行再建術の検討. 日血外会誌 2012;21:589-593.
- ⑪ 猪狩公宏、田中顕太郎、工藤敏文、豊福崇浩、地引政利、井上芳徳. 重症虚血肢に対する下肢血行再建術、持続陰圧吸引療法と遊離筋皮弁術による集学的治療. 日血外会誌 2012;21:757-761.
- ⑫ Igari K, Kudo T, Onishi I, Toyofuku T, Jibiki M, Inoue Y. Angiolymphoid Hyperplasia with Eosinophilia Presenting as an Ulnar Artery Pseudoaneurysm. EJVES Extra 2012;23:e9-e10.
- ⑬ Igari K, Kudo T, Toyofuku T, Jibiki M, Inoue Y. Multidisciplinary Approach to a Peripheral Arteriovenous Malformation. EJVES Extra 2012;23:e11-e13.
- ⑭ Jibiki M, Inoue Y, Kudo T. Conservative treatment for isolated superior mesenteric artery dissection. Surg Today. 2012 Aug 26. [Epub ahead of print]
- ⑮ Jibiki M, Inoue Y, Kudo T, Toyofuku T. Surgical procedures for renal artery aneurysms. Ann Vasc Dis. 2012;5(2):157-160.
- ⑯ 地引政利、工藤敏文、豊福崇浩、猪狩公宏、内山英俊、小泉伸也、米倉孝治、西澤真人、井上芳徳. 腎動脈遮断を要する腹部大動脈瘤手術. 日血外会誌 2012;21:659-662.
- ⑰ 地引政利、工藤敏文、豊福崇浩、井上芳徳. 塩酸サルポグレラートによる末梢動脈閉塞症に対する微小循環の改善. J Jpn Coll Angiol 2012;52:243-246.
- [学会発表] (計 23 件)
- ① Koizumi S, Kudo T, Jibiki M, Sugano N, Inoue Y. *Porphyromonas gingivalis* make platelet aggregate in whole blood. The 11th Annual Congress of Asian Society for Vascular Surgery. Kyoto. 2010.6.29-7.2.
- ② Toyofuku T, Inoue Y, Sugano N, Jibiki M, Kudo T, Uchiyama H, Yonekura K, Koizumi S, Igari K, Kagayama T. Preoperative Duplex Ultrasound Scanning for planning revascularization at the infrapopliteal artery. The 11th Annual Congress of Asian Society for Vascular Surgery. Kyoto. 2010.6.29-7.2.

- ③ Kudo T, Inoue Y, Sugano N, Jibiki M, Yonekura K, Toyofuku T, Uchiyama H, Koizumi S, Igari K. Mycotic Aneurysm: 10-Year Single Center Experience. The 11th Annual Congress of Asian Society for Vascular Surgery. Kyoto. 2010.6.29-7.2.
- ④ Igari K, Yonekura K, Uchiyama H, Koizumi S, Toyofuku T, Kudo T, Jibiki M, Sugano N, Inoue Y. Surgical strategy for prosthetic graft infection. 第 6 回日独血管外科学会. Leipzig. 2010.8.26-28.
- ⑤ 地引政利. バージャー病における歯周病の役割. 第 23 回血管外科歯周病の会. 東京. 2010.11.16.
- ⑥ 菅野範英、猪狩公宏、内山英俊、小泉伸也、米倉孝治、寺崎宏明、豊福崇浩、工藤敏文、地引政利、井上芳徳. 当科における重症虚血肢に対する治療方針と治療成績. 第 110 回日本外科学会. 名古屋. 2010.4.10
- ⑦ 米倉孝治、井上芳徳、菅野範英、地引政利、工藤敏文、寺崎宏明、豊福崇浩、光岡明人、野谷啓之、内山英俊、小泉伸也. インドシアニングリーン蛍光測定法を用いた重症虚血肢評価法 第 110 回日本外科学会総会. 名古屋. 2010.4.8-10.
- ⑧ 地引政利、工藤敏文、菅野範英、豊福崇浩、猪狩公宏、内山英俊、小泉伸也、米倉孝治、井上芳徳. 腎動脈上腹部大動脈遮断を必要とした腹部大動脈瘤の成績. 第 41 回日本心臓血管外科学会. 東京. 2011.2.25.
- ⑨ 豊福崇浩、井上芳徳、猪狩公宏、内山英俊、小泉伸也、米倉孝治、工藤敏文、地引政利、菅野範英. 吻合部抹消側への血管拡張術による、下腿・足関節バイパス術の長期的か依存の為の工夫. 第 39 回日本血管外科学会, 那覇, 2011.4.20-22.
- ⑩ 米倉孝治、寺崎宏明、猪狩公宏、内山英俊、小泉伸也、豊福崇浩、工藤敏文、地引政利、菅野範英、井上芳徳、Mauri Lepantalo. ICG 蛍光測定法を用いた局所微小循環の評価. 第 39 回日本血管外科学会, 那覇, 2011.4.20-22.
- ⑪ Inoue Y, Sugano N, Jibiki M, Kudo T. Treatment strategy and clinical results for critical limb ischemia. 第 111 回日本外科学会, 2011.
- ⑫ Igari K, Yonekura K, Uchiyama H, Koizumi S, Toyofuku T, Kudo T, Jibiki M, Sugano N, Inoue Y, Iwai T. Differential diagnosis of Buerger disease. 1st Japanese-Thai Buerger Disease Forum Oral presentation. Chiang Mai, Thailand. 2011.6.17-19.
- ⑬ Koizumi S, Chen Z, Takahashi M, Naruse T, Nakajima T, Chen YW, Inoue Y, Ishikawa I, Iwai T, Kimura A. Synergistic contribution of CD14 and HLA loci in the susceptibility to Buerger disease. 1st Japanese-Thai Buerger Disease Forum. Oral presentation. Chiang Mai. 2011.6.17-19.
- ⑭ Igari K, Kudo T, Nishizawa M, Uchiyama H, Koizumi S, Yonekura K, Toyofuku T, Jibiki M, Inoue Y. Outcomes following endovascular abdominal aortic repair both within and outside of instructions for use. 12th Annual Congress of Asian Society for Vascular Surgery and 6th Asian Venous Forum Poster presentation. Taipei, Taiwan. 2011.9.29-10.2.
- ⑮ Nishizawa M, Igari K, Uchiyama H, Koizumi S, Yonekura K, Toyofuku T, Kudo T, Jibiki M, Inoue Y. Assessment of Coil embolization to Visceral Artery

- Aneurysms. The 12th Annual Congress of Asian Society for Vascular Surgery. Poster presentation. Taipei. 2011.9.29-10.2
- ⑩ Miyai M, Kagayama T, Nishizawa M, Igari K, Uchiyama H, Koizumi S, Yonekura K, Toyofuku T, Kudo T, Jibiki M, Inoue Y. Vascular laboratory. The 12th Annual Congress of Asian Society for Vascular Surgery. Poster presentation. Taipei. 2011.9.30-10.2
- ⑪ Nakashima R, Miyai M, Kagayama T, Toyofuku T, Kudo T, Jibiki M, Inoue Y, Usui A. The usefulness of the post-exercise common femoral artery doppler waveform and peak systolic velocity. The 12th International Congress of the Asian Vascular Society. Oral presentation. Taipei. 2011.9.29-10.
- ⑫ Uchiyama H, Inoue Y. Outcome of coil embolization for internal iliac artery in patients with endovascular abdominal aortic aneurysm repair. Asian Chapter Congress International Union of Angiology. Beijing. 2011.10.20-22.
- ⑬ Inoue Y, Jibiki M, Kudo T, Toyofuku T. Critical limb ischemia. Diagnosis and treatment. 2011 Asian Chapter Congress of the International Union of Angiology. Oral presentation. Beijing. 2011.10.21-22
- ⑭ Inoue Y, Jibiki M, Kudo T, Toyofuku T. Treatment fo pararenal and juxtarenal abdominal aortic aneurysm. 2011 Asian Chapter Congress of the International Union of Angiology. Oral presentation.

Beijing. 2011.10.21-22

- ⑮ Inoue Y, Jibiki M, Kudo T, Toyofuku T. Bypass surgery and endovascular treatment for occlusive arterial disease. 2011 Asian Chapter Congress of the International Union of Angiology. Oral presentation. Beijing. 2011.10.21-22
- ⑯ 井上芳徳. 重症虚血肢に対する治療戦略-血管内治療の中期成績をふまえて-. 第112回日本外科学会. パネルディスカッション. 幕張. 2012.4.12-14.
- ⑰ 地引政利. 閉塞性動脈硬化症における歯周病感染による血小板凝集能. 第112回日本外科学会. ポスター. 幕張. 2012.4.12-14.

〔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

http://www.tmd.ac.jp/medhospital/medical_treat/kekkan-geka.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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

(2) 研究分担者

梅田 誠 (UMEDA MAKOTO)

大阪歯科大学 教授

研究者番号：90193937

地引政利 (JIBIKI MASATOSHI)

東京医科歯科大学 医学部附属病院 助教

研究者番号：50422481

工藤敏文 (KUDO TOSHIFUMI)

東京医科歯科大学 医学部附属病院 助教

研究者番号：50431911

(3) 連携研究者