

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 2 日現在

機関番号：13802

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592120

研究課題名(和文) 口腔細菌と破裂脳動脈瘤の関連性

研究課題名(英文) Relevance of oral bacteria and ruptured cerebral aneurysm

研究代表者

外村 和也 (Hokamura, Kazuya)

浜松医科大学・医学部・助教

研究者番号：90436965

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)：口腔細菌と破裂脳動脈瘤の関連性を経時的に病態モデルを用いて評価するにあたり、本研究ではマウス脳動脈瘤モデルを作製し、臨床用磁気共鳴イメージング装置(MRI)によって動脈瘤の形成、成長および破裂を検出できるかを検討した。MRIの撮影には3-T MRIおよび内径40 mmのサドル型コイルを用いた。MRIで動脈瘤の疑われたすべてのマウスは、解剖時動脈瘤の形成をみとめた。またT2強調画像で低強度領域の位置は解剖時における動脈瘤のくも膜下出血のものと一致した。本研究ではマウスにおいて非侵襲的かつ経時的に脳動脈瘤の形成およびくも膜下出血の有無を可視化することができた。

研究成果の概要(英文)：We studied intracranial aneurysm in a mouse model of dynamic, pathological remodeling of cerebral arteries to demonstrate the feasibility of detecting aneurysm formation, growth, and rupture using conventional magnetic resonance imaging (MRI). For mouse cerebral vessel imaging, it was used conventional 3-T MRI and a saddle coil. We used nonenhanced magnetic resonance angiography (MRA) to detect intracranial aneurysm formation and T2-weighted imaging to detect subarachnoid hemorrhage. In all mice with aneurysms, it was able to detect aneurysm formation, and location of the low-intensity area matched that of aneurysmal subarachnoid hemorrhage after euthanasia. We showed the feasibility of using conventional 3-T MRI for the serial imaging of mouse cerebral arteries with aneurysms and subarachnoid hemorrhages. These imaging methods without using highly specialized imager will be a useful tool for researchers in the field of stroke.

研究分野：脳循環

キーワード：脳動脈瘤 口腔細菌 S. mutans

1. 研究開始当初の背景

脳出血や脳梗塞などに代表される「脳卒中」は、癌や心疾患に次いで高い死亡率であり、日本人の3大死亡原因の一つである。また、脳卒中が発症した場合、死亡に至らなくても重篤な後遺症が残る場合が多く、以後のQuality of Life (QOL) を最も下げる疾患として知られている。それ故に脳卒中の発症を予防することは、医療全体において非常に重要である。我々は口腔細菌に由来する全身疾患発症の可能性を明らかにするため、2007年から「口腔細菌による全身疾患解明プロジェクト」を設け、大阪大学歯学部研究者らとチームを組んで研究を進めてきた。このプロジェクトで口腔細菌による動脈硬化・血管肥厚の誘発メカニズムを解明し、その成果を学会シンポジウムならびに学術雑誌に報告している。この過程で我々は、ある種の口腔細菌が出血性脳卒中を引き起こす可能性を見出した。これまで病原性の口腔細菌として「う蝕(むし歯)」原因菌である *Streptococcus mutans* (*S. mutans*) や「歯周病」原因菌である *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*) などが知られているが、脳卒中への関連性は知られていなかった。我々はこのうちの *S. mutans* の中に、脳出血を誘発する特殊な菌株が存在することを世界で初めて発見した。実際にこの菌の保菌者は、脳出血のリスクが約4倍に高まる可能性も示された。動物実験からヒトでの解析まで詳細に行った我々の報告は、非常に大きな反響を呼び、新聞各紙にも取り上げられた。さらには510例におよぶ脳卒中患者の唾液サンプルを用いた病型の解析結果から、破裂脳動脈瘤患者は未破裂脳動脈瘤患者と比較し、コラーゲン結合タンパクを菌の表面に持つ *S. mutans* 保菌率が非常に高いことを見いだした。

2. 研究の目的

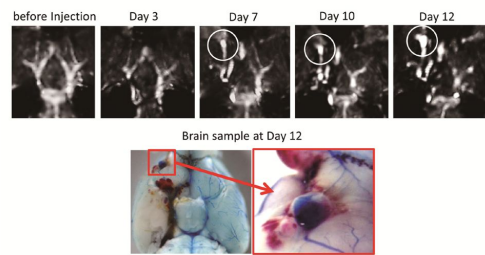
マウスを用い脳動脈瘤モデルを確立し、また脳動脈瘤の経時的変化を非侵襲的に可視化する。そして我々が見出した頭蓋内出血を増悪する *S. mutans* をマウス脳動脈瘤モデルに適用し検討を行う。

3. 研究の方法

実験の一週間前に片腎を摘出したマウスの頭蓋骨に直径1mm程度の穴を開け、脳底のくも膜下腔にプロテアーゼであるエラスターゼ35mIUを注入した。また、背部皮下にはデソキシコルチコステロンを埋め込み、さらに実験期間中は飲水として1%食塩水を与え高血圧を誘導した。

MRIの撮影には3-T MRI (GEヘルスケア) および内径40mmのサドル型コイル(高島製作所)を用いた。脳動脈瘤の検出には3D-time of flightによるMR angiography、そしてくも膜下出血の検出にはT2強調による撮影を行

MR angiographyの結果1

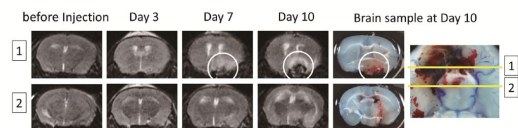


った。

4. 研究成果

以下にマウス脳動脈瘤の経時変化を示す。動物への処置前にはウィリス脳動脈輪、脳底動脈および中大脳動脈がきれいに描出されている。その後エラスターゼを脳底くも膜下腔へ投与することによって血管の内弾性板が破壊され、その結果7日目より右側中大脳動脈遠位に脳動脈瘤が観察された。その後経時的にその動脈瘤は進展し、12日目にマウスは神経症状を示した。解剖の結果(2段目)

T2強調画像の結果

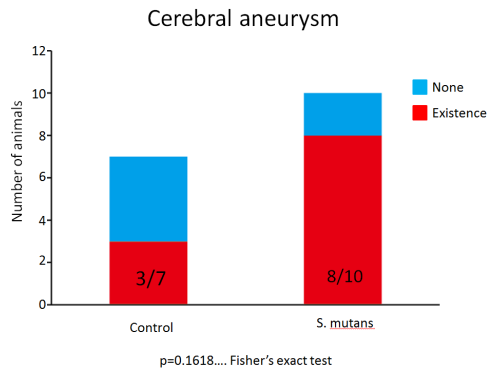


MRIで描出された瘤とほぼ同じ場所に動脈瘤を観察することができた。

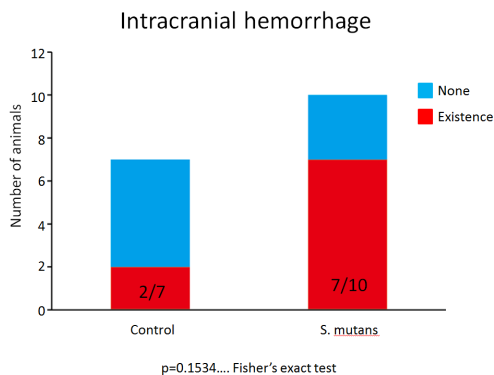
T2強調画像によるくも膜下出血の観察では、脳底部に動脈瘤が破裂することによって形成される部位がみられ、この頭蓋内出血も経時的に観察することができた。また、出血においても解剖によりMRIと相関性のある結果を得ることができた。

臨床用の3T MRIシステムに変更を加えず、マウス脳動脈瘤を可視化することができた。

長径約1cmのマウスの脳血管の微細な変化を臨床用MR装置を用いて同一個体にて経時的変化を観察することができた。本法に必要な機材はマウス用のサドルコイルだけである。また、画像収集時間は短時間で、動物への負担は軽いものだった。さらに侵襲的な血管カニューレの挿入、そして造影剤を必要としないため本研究において麻酔およびMRスキャンに関係する死亡例はなかった。



コラーゲン結合タンパクを菌の表面に持つ S. mutans をマウス脳動脈瘤モデルに投与し観察を行ったところ上図のように対照群を比べて脳動脈瘤を発症する傾向が得られた。



さらにコラーゲン結合蛋白陽性 S. mutans は脳動脈瘤を破裂させ、くも膜下出血を呈する動物を増加させる傾向にあった。

Onset timing by MRI observation

Group	Series	Animal No.	Cerebral Aneurysm	Intracranial hemorrhage
Control	8	3	7	7
		6	-	-
		10	-	-
	9	11	-	-
		5	7	-
		8	7	7
TW295	8	12	-	-
		2	-	-
		4	10	10
		7	7	7
		9	7	7
	9	12	14	10
		6	-	-
		7	3	7
		11	3	7
		13	2	2
16	10	-		

MRI の観察によりコラーゲン結合蛋白陽性 S. mutans によりいつ脳動脈瘤およびくも膜下出血が発症したのかをまとめたものが上図である。本研究結果では例数が十分ではないが、コラーゲン結合蛋白陽性 S. mutans によって脳動脈瘤および頭蓋内出血の発症が早期に誘導されている可能性が示唆された。

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 1 件)

Successful serial imaging of the mouse cerebral arteries using conventional 3-T magnetic resonance imaging

Hiroshi Makino, Kazuya Hokamura, Takahiro Natsume, Tetsuro Kimura, Yoshinobu Kamio, Yasuhiro Magata, Hiroki Namba, Takasumi Katoh1, Shigehito Sato1, Tomoki Hashimoto and Kazuo Umemura

Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism advance online publication 29 April 2015; doi: 10.1038/jcbfm.2015.78

〔学会発表〕(計 2 件)

Serial imaging of mouse cerebral arteries using a conventional 3T MRI - a feasibility study using a mouse model of intracranial aneurysm. H. Makino, K. Hokamura, T. Natsume, T. Kimura, Y. Kamio, T. Katoh, S. Sato, T. Hashimoto, K. Umemura. 9th World Stroke Congress, Istanbul.

The success of visualizing cerebral aneurysms in mice using a conventional 3 tesla MRI

臨床用 3 テスラ MRI を用いてマウスの脳動脈瘤を可視化することができた

外村 和也、牧野 洋、夏目 貴弘、木村 哲朗、神尾 佳宣、梅村 和夫. 第 88 回日本薬理学会年会、名古屋

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 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 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
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

外村和也 (HOKAMURA Kazuya)
浜松医科大学・医学部・臨床医学教育学講座・特任助教
研究者番号：90436965

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

梅村和夫 (MEMURA Kazuo)
浜松医科大学・医学部・薬理学講座・教授
研究者番号：40232912

和田孝一郎 (WADA Koichiro)
島根大学・医学部・薬理学講座・教授
研究者番号：90263467