

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 27 日現在

機関番号：11301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2015～2016

課題番号：15H06050

研究課題名(和文) 歯周病菌による動脈瘤形成に関する研究

研究課題名(英文) relation with between periodontal bacteria and aneurysms

研究代表者

玉原 亨 (Tamahara, Toru)

東北大学・大学病院・助教

研究者番号：40756235

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：得られた動脈瘤サンプルをビーズ破碎した後にDNAを抽出し、得られたDNA溶液をPCR法を用いて16rRNAをエンコードする領域のDNA増幅を試みた。結果として、得られたDNA溶液は細菌のDNAだけではなく動脈瘤壁のDNAも混ざっているため、アニーリング温度を検討し55.7℃に設定すると増幅サイクル30回において単一のバンドが検出された。さらに、動脈瘤に付着する血液中の細菌のDNAを除去するためには、培養前の動脈瘤サンプルを次亜塩素酸にて洗浄することで、生きたグラム陽性および陰性菌を動脈瘤壁から完全に除去できることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：We extracted DNA from the aneurysms samples after beads crush was performed to them. We obtained the DNA solution which tried the DNA amplification of the region that encoded 16rRNA using PCR with obtained DNA solution. As a result, We obtained the DNA contained with not only the bacterial DNA but also the aneurysms wall, we examined annealing temperature, and single band was detected in 55.7 degrees Celsius in 30 times for an amplification cycle when we set it and, furthermore, determined what could completely remove the gram-positive and negative bacteria which lived in what we washed with hypochlorous acid with aneurysms sample before the culture from aneurysms wall to be aneurysmal, and to remove bacterial DNA in the blood which attached.

研究分野：予防歯科

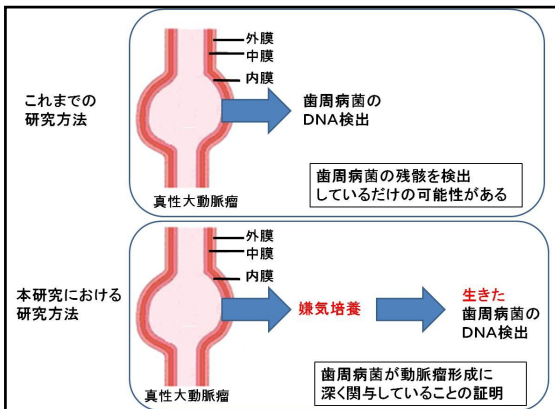
キーワード：歯周病 動脈瘤

1. 研究開始当初の背景

歯周病が大動脈瘤の発生および病態の進行に深く関わっていることが強く示唆されている。歯周病菌による直接的な大動脈瘤壁への感染とそれに引き続く炎症がその本質であると考えられているが、これまでの報告は大動脈瘤壁に歯周病菌が存在していることをPCR法や免疫染色法にて確認しているのみであった。この方法では血行性に動脈瘤に流れ着いた歯周病菌の残骸を検出している可能性が否定できていない。

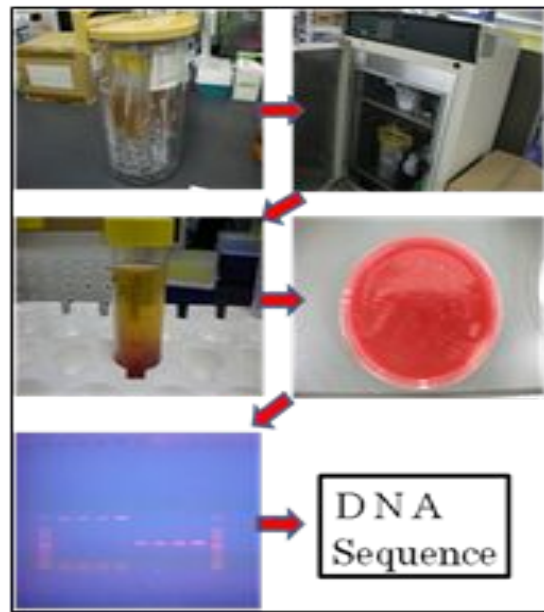
2. 研究の目的

そこで我々は心臓血管外科との共同研究により、大動脈瘤手術時に摘出した標本から大動脈瘤壁に歯周病菌が存在することの確認に加え、嫌気培養を施行しその歯周病菌が「生きた」状態で存在することを証明することを目的とした。



3. 研究の方法

本研究のパイロットスタディとして、大動脈瘤だけではなくその他の大動脈疾患において切除された動脈壁もサンプルとし、切除部の健常な部分をコントロールとして、その場所で生きている細菌を探索した。これまで20症例のサンプルが得られ、サンプルはガスパック嫌気培養法を用いて2日間液体培地にて嫌気培養した。その後血液寒天培地に移し10日間培養し、13症例で細菌の分離培養に成功した。現れたコロニーから細菌のDNAを抽出し、16S rRNAの領域を増幅してDNAシーケンスにて菌名を同定した。



その結果、大動脈瘤およびその他大動脈疾患から歯周病菌は検出されず、体表や口腔の常在菌である *staphylococcus* 属や *Propionibacterium acnes* の検出率が高かった。また、健常部の大動脈壁からも *Propionibacterium acnes* が検出された。

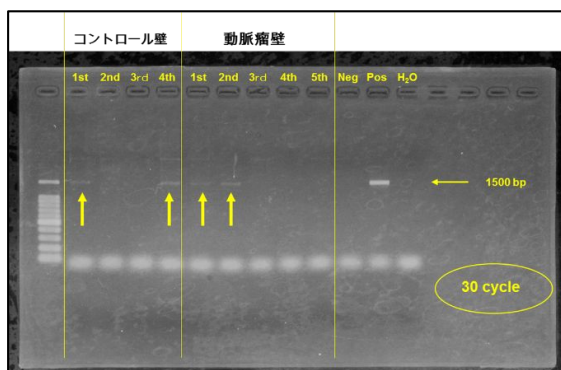
	疾患	菌名(テスト)	菌名(コントロール)
1st	胸部大動脈瘤	<i>Staphylococcus hemolyticus</i>	
2nd	胸部大動脈瘤	<i>Propionibacterium acnes</i>	
3rd	大動脈瘤垂離	<i>Propionibacterium acnes</i>	
4th	大動脈炎症候群	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	
5th	弓部大動脈瘤	<i>Staphylococcus sp.</i> <i>Propionibacterium acnes</i>	
6th	弓部大動脈瘤	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	
7th	弓部大動脈瘤	<i>Acinetobacter baumannii</i>	<i>Propionibacterium acnes</i>
8th	大動脈弁輪拡張症	<i>Propionibacterium acnes</i>	<i>Propionibacterium acnes</i>
9th	胸腹部大動脈瘤	<i>Propionibacterium acnes</i>	
10th	先天性の大動脈炎	<i>Propionibacterium acnes</i>	
11th	胸腹部大動脈瘤(無菌頸)	<i>Propionibacterium acnes</i> 内層のみ <i>Propionibacterium acnes</i> 内層と外層	
12th	大動脈弁狭窄症	<i>Propionibacterium acnes</i>	
13th	胸腹部大動脈瘤	<i>Propionibacterium acnes</i>	<i>Propionibacterium acnes</i> 異なるテストに違いのこと

そこで、術中および研究中の細菌のコンタミネーションを疑い、*Propionibacterium acnes* について各サンプルのDNA配列を調べたところ、各サンプル間において配列が異なる部分が認められたことから異なるクローンの細菌株であることが示された。よって術中および研究中の細菌のコンタミネーションは可能性が低いと考えられた。今回の一連の実験により動脈瘤壁もしくは周囲には生きた細菌が存在していることが示された。問題となったのは、その生きた細菌が歯周病菌ではないこと、動脈瘤の壁なのか血中なのか

どこにいるのかわからないこと、ガスパック法では嫌気度が甘いこと、好気培養によるコントロールも必要であること、そして歯周病菌に特異的な培地ではないことであり、多くの実験手法の改善が必要であることがわかった。

4. 研究成果

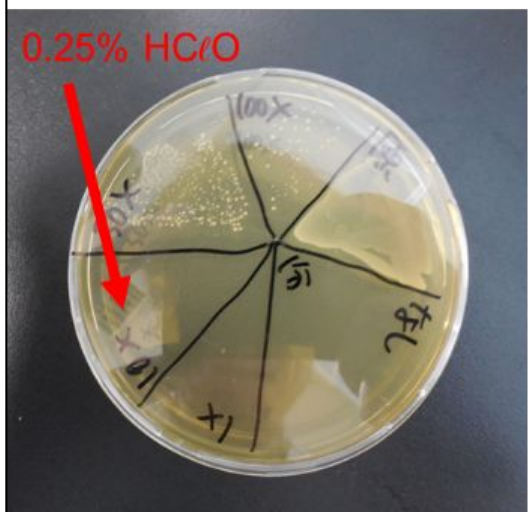
サンプル採取については心臓血管外科により摘出された動脈瘤壁およびコントロール壁を清潔な状態でそれぞれ-80 に凍結保存していただき、結果として5例のサンプルを提供していただいた。そのうち1例については動脈瘤壁のみでありコントロール壁はなかった。続いて、得られたサンプルをビーズ破砕した後にDNAを抽出した。まずサンプル中の細菌のDNAの有無を確認するために、得られたDNA溶液をPCR法を用いて16rRNAをエンコードする領域のDNA増幅を試みた。結果として、得られたDNA溶液は細菌のDNAだけではなく動脈瘤壁のDNAも混ざっているため、これまで報告されている条件でのPCR法ではバックグラウンドが高く、増幅サイクルについても35回以上を要することから、コンタミネーションの可能性を否定できなかった。そこで、アニーリング温度を検討し、55.7 に設定すると増幅サイクル30回において単一のバンドが検出された。



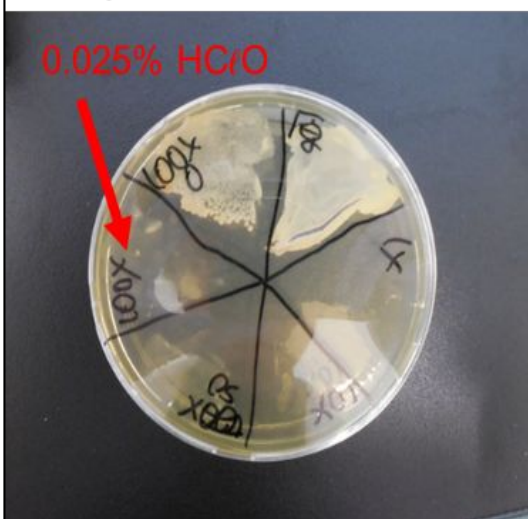
さらに、動脈瘤に付着する血液中の細菌のDNAを除去するためには、培養前の動脈瘤サンプルを次亜塩素酸にて洗浄することで、生きたグラム陽性および陰性菌を動脈瘤壁か

ら完全に除去できることを明らかにした。

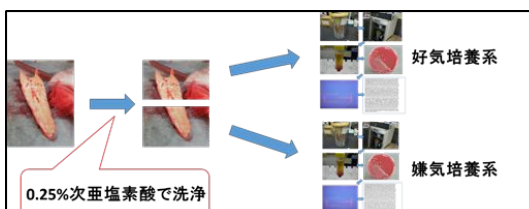
Staphylococcus epidermidis



Propionibacterium acnes



今後の実験については、上記実験にて明らかとなったように0.25%の次亜塩素酸にて動脈瘤サンプルをウォッシュした後に培養することで、より正確に動脈瘤に存在する細菌を検出することが可能であると考えられる。



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)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

玉原 亨 (Tamahara, Toru)

東北大学・大学病院・助教

研究者番号：40756235