

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 6 月 6 日現在

機関番号：32622

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2022

課題番号：17K11918

研究課題名(和文) 口腔内細菌の内頸動脈狭窄症に及ぼす影響についての検討

研究課題名(英文) Examination of the influence that oral bacteria gives to carotid arterial stenosis

研究代表者

丸岡 靖史 (Maruoka, Yasubumi)

昭和大学・歯学部・客員教授

研究者番号：80209692

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：口腔細菌とアテローム性動脈硬化症との関連が示唆されている。本研究では内頸動脈狭窄症患者の頸動脈プラークと同一患者の口腔内プラークを用いて、それぞれの細菌叢を16S rRNAメタゲノムシーケンスで網羅的に解析し細菌叢の比較検討を行った。昭和大学病院にて内頸動脈狭窄症のため内頸動脈内膜切除術を行った54例を対象とした結果、頸動脈プラークから検出された菌の86.5%が口腔内プラークからも同様に検出された。また、頸動脈プラーク中の細菌はう蝕原因菌が27.7%、歯周病関連菌が4.7%であり、口腔細菌が直接的または間接的にアテローム性動脈硬化症の病態形成に何らかの関与をもたらしている可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

内頸動脈狭窄症の頸動脈プラークと口腔内プラークを16S rRNAメタゲノムシーケンスで細菌叢を網羅的に検討した。5例の頸動脈プラークより55科78属の多様な細菌叢を認めた。その中から口腔常在菌を86.5%検出された。口腔細菌の慢性的な感染により直接的または間接的にアテローム性動脈硬化症に何らかの関与をもたらしている可能性が高い。口腔細菌叢が内頸動脈狭窄症の発症要因となる可能性もあり、周術期口腔機能管理のプロトコルを確立し、医科・歯科チーム医療推進の必要性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：In this study, we compared the bacterial flora of the atherosclerotic plaque in the carotid artery and dental plaque of patients with internal carotid artery stenosis using 16S ribosomal RNA (16S rRNA) metagenomic sequencing.

Fifty-four patients who underwent internal carotid endarterectomy for internal carotid artery stenosis at the Showa University Hospital. Polymerase chain reaction targeting the 16S rRNA gene detected bacterial DNA in the carotid plaques of 11 cases, of which only five could be further analyzed. The results demonstrated that the microflora of carotid plaques (n=5) contained bacterial species from 55 families and 78 genera. In addition, 86.5% of the bacteria detected in the carotid plaques were also detected in oral plaques. Cariogenic and periodontopathic bacteria accounted for 27.7% and 4.7% of the bacteria in the carotid plaques, respectively. These results suggest that oral bacteria are directly or indirectly involved in the pathogenesis of atherosclerosis.

研究分野：歯科口腔外科

キーワード：口腔内細菌 メタゲノム解析 内頸動脈狭窄症

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

内頸動脈狭窄症は、頸部の頸動脈分岐部に生じたアテローム性動脈硬化を原因とした血管狭窄疾患である。アテローム性動脈硬化が生じる原因の約半分は、高血圧症・脂質異常症・糖尿病・喫煙などが挙げられ、残りは不明である。アテローム性動脈硬化の形成には、血管炎症に伴う内皮細胞障害による単球の集積、血管内皮細胞への接着・侵入、マクロファージから泡沫細胞への分化などにより動脈硬化初期病変が形成されることが必要と考えられている。この動脈硬化の初期病変形成に、口腔内細菌の血管への侵入が深く関与していると従来考えられてきた。代表的な歯周病菌である *Porphyromonas gingivalis* は、血管内皮細胞に作用して単球の浸潤を誘引する ICAM-1 や、単球の血管壁への侵入を誘導する VCAM1-1 などの接着分子を発現させる。さらに、血小板凝集能を持ち血栓を形成するなどの作用を有すると考えられている。このように歯周病菌あるいはその他の口腔細菌が血管において炎症誘導することでアテローム性動脈硬化のプロセスが促進されている可能性がある。口腔内において多数の菌種が細菌叢を形成し、う蝕や歯周疾患の成立には特定病原体が存在すると同時に、共同体となる非病原性細菌の存在が欠かせない。う蝕や歯周疾患のようにこれらの口腔細菌叢の構成異常 (dysbiosis) が誘因で様々な疾患が発症・進展することが示唆されている。アテローム性動脈硬化症も特定の病原体から引き起こされる単一感染症疾患ではない。病態と細菌叢の関係を知るには、病変部に存在する細菌叢を網羅的に解析する必要がある。以前、口腔の嫌気性菌の大半が培養不可能であり、菌名すら特定できてこなかったが、次世代シーケンサーの登場以降、メタゲノム的手法によってようやく全体像の理解が進んできた経緯がある。このことより、次世代シーケンサーのような手法により遺伝子情報を網羅的に解析することで、微生物叢の構成菌種の解析細菌同士の相互作用の解析が必要である。本研究では、内頸動脈狭窄症患者の頸動脈プラークと同一患者の口腔内プラークの細菌叢を 16S rRNA メタゲノムシーケンスで網羅的に解析し、細菌叢が内頸動脈狭窄症の発症要因となるかについて検討を加えた。

2. 研究の目的

本邦での脳血管疾患での死亡患者は 4 位であるが、脳梗塞後の後遺症で要介護状態に至る患者は少なくない。近年アテローム性動脈硬化症などの病変部より口腔内細菌が検出されて、口腔内細菌叢と動脈硬化との関連が注目されているが、その詳細は明らかになっていない。そこで次世代シーケンサーを用いて、内頸動脈狭窄症患者に対して内頸動脈内膜剥離術施行時に摘出したプラークと、口腔内細菌叢をメタゲノム的に解析することで、特異的口腔内細菌に対応した効率的な周術期口腔機能管理のプロトコルを確立し、医科歯科チーム医療の推進を目的とする。

3. 研究の方法

(1)対象： 2016年4月～2018年2月までに昭和大学病院・脳神経外科にて内頸動脈狭窄症のため内頸動脈内膜切除術(CEA)を施行した患者54人を対象とした。対象患者全員から研究同意を得ている。本研究は、昭和大学臨床試験審査委員会(IRB)の承認(承認番号：2015-010)のもと行った。内頸動脈狭窄症の狭窄部位より頸動脈プラークと同一患者より歯頸部から探針を用いて口腔プラークの採取を行った。口腔内プラークは、昭和大学病院歯科で周術期等口腔機能管理における手術前口腔清掃時(手術前日)に採取した。口腔内プラークの採取には、歯肉縁上プラークを滅菌した探針で採取した。全身状態および口腔内状態を把握するために、患者カルテより年齢・性別・既往歴・頸動脈プラークの狭窄率や病理組織所見・口腔内検査・歯科受診歴を収集した。カルテ記載中の、内頸動脈狭窄症の分類の1つである黒内障や片麻痺等の一過性の虚血発作等の自覚症状の有無を基に症候性グループと無症候性グループに分類した。

(2)方法：頸動脈プラークと口腔内プラークサンプルより、前処置、菌体細胞壁の破壊の後、DNA抽出キット(QIAamp UCP Pathogen Mini, Qiagen, Hilden, Germany)を用いてDNAの抽出を行った。PCR反応のため、各DNA溶液1 μ lを鋳型として、Go Taq[®] Master Mix(Promega Co, Ltd, Madison, USA)12.5 μ l、原核生物に特異的な16SrRNAを基にしたUniversal primer(515F:5'-GTGCCAGCMGCCGCGGTAA-3'、806R:5'-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3')を5.0 μ l、滅菌蒸留水を加え全量25 μ lとし用いた。PCR反応を行い、PCR産物を1.2%アガロースで電気泳動し、増幅産物の有無により、細菌の存在を確認した。次にPCRにより細菌の存在が確認できた頸動脈プラークと口腔内プラークのサンプルに対して、あらためて16S rRNA V4領域を増幅し、網羅的シーケンズに供した。次世代シーケンサーは北海道システムサイエンスで実施した。統計解析は、統計ソフトJMP Pro 16.0.0(SAS, 東京, 日本)を使用した。統計処理は、Mann-Whitney U TestとFisher exact testを用いた。統計学的有意水準は5%未満とした。

4. 研究成果

(1)頸動脈プラークの口腔細菌 16S rRNA 遺伝子の検出：頸動脈プラーク54例中から11例(20.4%)でアガロース電気泳動によるPCR増幅産物を認めたことから、細菌の存在が確認できた。次に細菌が存在した患者の頸動脈プラークと口腔内プラークのDNAを次世代シーケンズ解析したところ、5例(9.3%)で次世代シーケンズの解析を行うのに十分な細菌16S rRNA遺伝子配列を検出した。残りの6例中、3例は抽出したDNA量が少なく次世代シーケンズ解析が行えず、3例は次世代シーケンズの結果がStaphylococcus属やOther(defined as unclassified)が90%以上を占めており、口腔細菌叢との関連は低く、以降の解析からは除外した。

(2)対象被験者の特徴と口腔内の特徴：次世代シーケンズ解析から口腔細菌が検出されたグループをDNA(+)群(n=5)、それ以外をDNA(-)群(n=43)とした。DNA(+)群とDNA(-)群の間で、年齢、性別、喫煙、高血圧症、脂質異常症、糖尿病、BMI、症候性の分類、内頸動脈の狭窄率、病理組織に関して有意差は認められなかった。また、症候性群と無症候性の両群にお

いて、年齢 (DNA [+]: 中央値 78 [四分位範囲: 70-80], DNA [-]: 中央値 72 [四分位範囲: 70-80], $P < 0.02$)、喫煙 (オッズ比 [OR]: 4.24, 95% CI: 1.1-15.7, $P < 0.04$) と病理組織所見のうち潰瘍 (OR=5.1, 95% CI: 1.3-19.7, $P < 0.02$) に有意な差を認めた。

全症例のうち症候性グループは 15 名 (31.3%)、無症候性グループは 33 名 (68.7%) であった。症候性グループの 15 例においては、最終発作から 2 週間以内の急性期に分類されるものは認めなかった。症候性グループは、DNA (+) 群が 3 名 (60%)、DNA (-) 群が 12 名 (27.9%) であった。無症候性グループは、DNA (+) 群が 2 名 (40%)、DNA (-) 群が 31 名 (72.1%) を認めた。口腔内所見でも DNA (+) と DNA (-) の両群において有意な差 (5% で判定) が認められなかった。また、症候性・無症候性の両群でも有意差 (5% で判定) は認められなかった。

(3) 頸動脈プラークと口腔内プラークに含まれる細菌叢の次世代シーケンス解析: 内頸動脈狭窄症患者 5 名から得られた頸動脈プラークと口腔内プラークの細菌叢を次世代シーケンスにより解析した。頸動脈プラークからは 55 科 78 属 (平均値 48.0、標準偏差 ± 10.5)、口腔内プラークからは 39 科 57 属 (平均値 45.0、標準偏差 ± 12.3) の細菌が含まれることを認めた (Figure 1A and B)。

科レベルでの解析では、口腔プラークでは、Actinomycetaceae 科, Streptococcaceae 科, Corynebacteriaceae 科, Neisseriaceae 科, Burkholderiaceae 科, Micrococcaceae 科が優勢であり、これら 6 科で 65.6% を占めた。頸動脈プラークでは、Streptococcaceae 科、Actinomycetaceae 科、Lactobacillaceae 科、Corynebacteriaceae 科の順に多かった。口腔で優勢であった 6 科は、頸動脈プラークでは 44.8% を占めていた。また、Lactobacillaceae 科、Enterobacteriaceae 科、Pseudomonadaceae 科、Bacillaceae 科、Oxalobacillaceae 科は頸動脈プラークでのみで検出された (Figure 1A)。次に、同様の解析を属レベルで示す (Figure 1B)。頸動脈プラーク・口腔プラークの両方で、科レベルと同様に、Streptococcus 属、Actinomyces 属、Corynebacterium 属の優勢を認めた。Neisseria 属、Haemophilus 属は頸動脈プラークで次に多く認めた。これらの 5 属は頸動脈プラークで検出された細菌の 46.0% を占めていた。また、頸動脈プラークで検出された細菌の 86.5% が口腔プラークから検出された。更に、今回の結果では、頸動脈プラークから Lachnospiraceae 科や Lautropia 属等の腸内細菌や感染性心内膜炎の原因菌とされる Granulicatella 属、Abiotrophia 属と HACEK グループに含まれる Haemophilus 属、Cardiobacterium 属、Kingella 属が検出された。Neisseriaceae 科は、頸動脈プラークより口腔内プラークで有意に多く検出された ($P = 0.01$)。その他の細菌群において頸動脈プラークと口腔内プラーク間での、検出率に有意差はなかった。

頸動脈プラーク (Figure 1A) と口腔内プラーク検体 (Figure 1B) の個別の細菌叢の組成を症候性群と無症候性群に分け、属レベルで示す。今回のわれわれの結果では、症候性群では 90 属、無症候性群では 54 属の細菌を認め、Shannon Index で細菌の多様性を評価した。3 例の症候性群

の平均値は 13.05(#1: 13.30, #2: 12.84, #3: 13.00)、2 例の無症候性群の平均値は 12.06(#4: 10.91, #5: 13.20)であり、無症候性群において低下が見られた。頸動脈プラークの症候性群では、Corynebacterium 属、Actinomyces 属、Other、Selenomonas 属で約半数を占めていた。頸動脈プラークにおける有症状と無症状の 2 群の比較では、無症状群では Streptococcus 属 (P = 0.1489)、Haemophilus 属 (P = 0.1489) の増加傾向が認められたが、サンプル数 (n = 2) が少なく、有意差は検出されなかった。また、口腔内プラークを有症状群と無症状群に分類したが、両群間に有意な差は認められなかった (Figure 1B)。

(4) 属レベルでのう蝕の原因菌と歯周病原菌の検出頻度: 口腔内プラークと頸動脈プラークから検出された細菌の中から、口腔疾患原因細菌 (う蝕関連菌 3 属、歯周病関連菌 6 属) として抽出し、検体サンプル中における検出頻度を示した。症候性の有無に関わらず、両群からいずれのカテゴリー細菌も検出された。頸動脈プラークのプラークにおいて、う蝕原因および歯周病原因の菌が全体の 27.7% および 4.7% も検出されている。この頻度は、口腔プラークにおけるう蝕原因および歯周病原因の菌の割合とほぼ同様である (29.9% および 6.4%)。頸動脈プラークからは、Streptococcus 属、Actinomyces 属、Veillonella 属などのう蝕原因菌が、Porphyromonas 属、Prevotella 属、Fusobacterium 属などの歯周病原菌よりも優位に検出された。

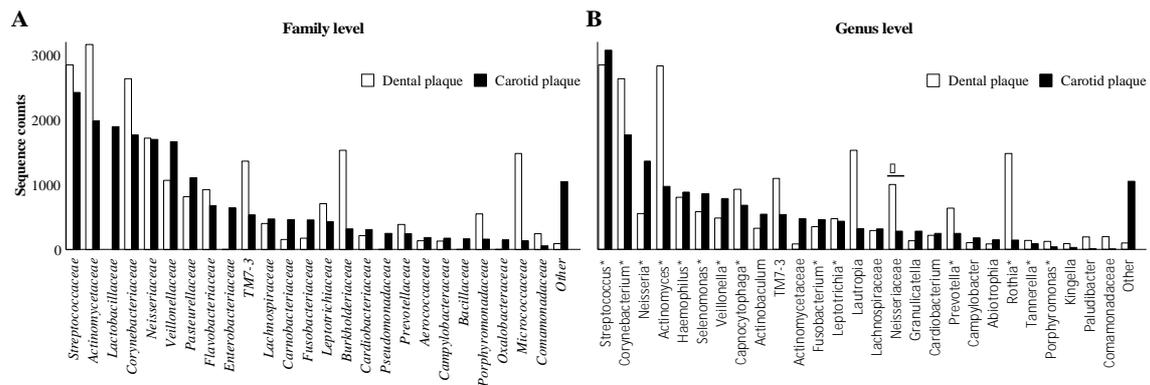


Figure 1 口腔内プラークと頸動脈プラーク 細菌の比較

内頸動脈狭窄症の頸動脈プラークと口腔内プラークを 16S rRNA メタゲノムシーケンスで細菌叢を網羅的に検討した。5 例の頸動脈プラークより 55 科 78 属の多様な細菌叢を認めた。その中から口腔常在菌を 86.5% 検出された。口腔細菌の慢性的な感染により直接的または間接的にアテローム性動脈硬化症に何らかの関与をもたらしている可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	田代 三恵 (TASHIRO Mie) (90555393)	昭和大学・歯学部・講師 (32622)	
研究分担者	マイヤース マイケル (MYERS Michael) (90799652)	昭和大学・その他部局等・講師 (32622)	
研究分担者	松井 庄平 (MATSUI Shohei) (10643702)	昭和大学・歯学部・助教 (32622)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関