

令和 3 年 4 月 28 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K17277

研究課題名（和文）口腔内細菌による動脈瘤形成機序の解明および新たな予防法の開発戦略

研究課題名（英文）Elucidation of the mechanism and strategies of the new preventive methods on aneurysm formation by oral bacteria

研究代表者

玉原 亨 (Tamahara, Toru)

東北大学・東北メディカル・メガバンク機構・助教

研究者番号：40756235

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：これまで20症例の動脈瘤サンプルが得られ、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の領域を全長増幅して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。さらにPCR法にて動脈瘤内に存在する細菌DNAを増幅する系を確立し、培養法とPCR法では検出能が異なることを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では動脈瘤壁から培養法にて検出された菌とPCR法にて検出された菌の検出能の違いを示すことで、生きた細菌が動脈瘤壁に存在する可能性を示した。培養法でのみ検出された菌は動脈瘤内の存在自体が極めて少ないためPCR法では検出できなかったこと、およびPCR法でのみ検出された菌は動脈瘤内では死んでおり細菌DNAのみ残留していたと考えられる。このことは、これまでPCR法では検出されなかった菌が動脈瘤の発生や進行に関与している可能性を示している。

研究成果の概要（英文）：We have obtained 20 aneurysm samples and successfully cultured the bacteria in 13 cases. Bacterial DNA was extracted from the colonies that appeared, and the full length 16S rRNA region was amplified, finally the bacteria was identified by DNA sequencing. As a result, pathogenic bacteria of periodontal disease was not detected in aortic aneurysms and other aortic diseases, while staphylococcus and Propionibacterium acnes, which are indigenous bacteria of the body surface and oral cavity, was often detected. In addition, we established a system to amplify bacterial DNA in aneurysms by PCR, and showed that the detection ability differs between the culture method and the PCR method.

研究分野：口腔衛生学

キーワード：口腔内細菌 動脈瘤 培養法 16S rRNA

1. 研究開始当初の背景

(1) 口腔内細菌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。口腔内細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なかった。

(2) 我々は心臓血管外科との共同研究をおこない、大動脈瘤手術時に摘出された大動脈瘤壁を直接培養することで口腔内細菌が「生きた」状態で存在しているか検証した。これまで 20 症例のサンプルが得られ、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 シークエンスにて菌名を同定した(図 1)。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。

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(無歯顎)	<i>Propionibacterium acnes</i> 歯垢のみ <i>Propionibacterium acnes</i> 歯垢のみ	
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> 歯垢(テストに違いのこと)

図 1 培養法によって動脈瘤壁から検出された細菌

(3) 培養にて検出されたこれらの菌が口腔由来なのかどうかは明らかにはなっていない。

また、口腔内には 400 種類以上の菌種が存在しており、歯周病菌だけが動脈瘤の形成・進行に関与しているのかも明らかになっていなかった。

2. 研究の目的

(1) 本研究の目的は動脈瘤壁内で生きて検出された細菌が口腔内由来であること、およびその菌が動脈瘤の形成・進行に関与していることを示すことである。

3. 研究の方法

(1) 新たに 5 症例の動脈瘤サンプルを用いて、動脈瘤内の細菌を PCR 法にて検出する方法を検討する。

(2) これまで培養法によって動脈瘤壁から培養が成功した 13 名の動脈瘤サンプルを用いて、培養法にて動脈瘤で検出された菌が PCR 法でも検出できるかどうか検証する(図 2)

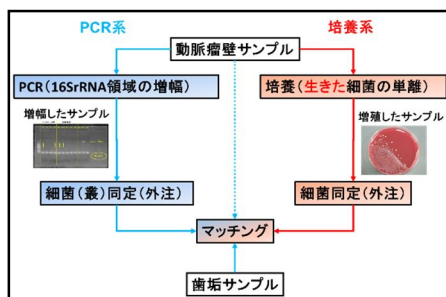


図 2 研究方法の模式図

4. 研究成果

(1) 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、結果として 5 例のサンプルを得た。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。

(2) 得られたサンプルをビーズ破碎した後に細菌 DNA を抽出した。まずサンプル中の細菌 DNA の有無を確かめるために、得られた DNA の 16rRNA を全長エンコードする領域の DNA 増幅を試みた。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細菌 DNA 増幅条件での PCR 法ではバックグラウンドが高く、目的以外のバンドも数多く検出された。増幅サイクルについてもバンドを目視にて確認するためには 35 回以上を要したことから、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、動脈瘤壁の外側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

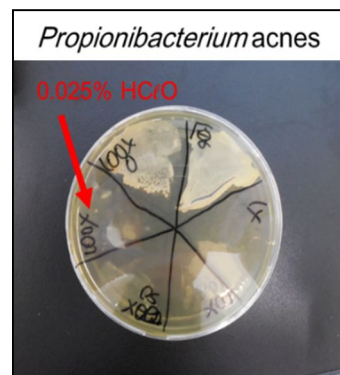


図 3 洗浄至適濃度の検討

することで、生きたグラム陽性および陰性菌を動脈瘤壁外側から完全に除去できることを明らかにした(図4)。今回、コントロール壁では2症例が、動脈瘤壁では2症例の細菌が検出された。

(3) これらの結果を基に、培養が成功した13症例の動脈瘤サンプルからの細菌DNA検出を試みた。検出菌としては、培養法での検出率が高かった *Propionibacterium acnes* を選択した。その結果、6症例で *Propionibacterium acnes* が検出された。PCR法と培養法で検出された菌に違いがある症例については検討が難しいが2つのことが考えられる。一つ目は、培養法でのみ検出された菌は動脈瘤内の存在自体が極めて少なく、PCR法では検出できなかったこと、2つ目はPCR法でのみ検出された菌は動脈瘤内では死んでおり細菌DNAのみ残留していたことが考えられる。

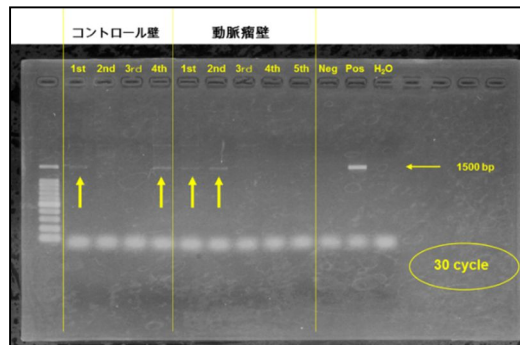


図4 PCR法による動脈瘤内の細菌検出

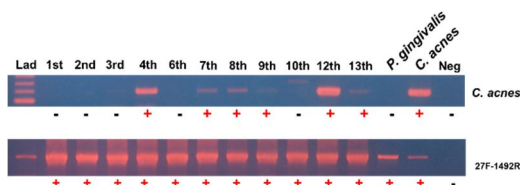


図5 PCR法による動脈瘤内の細菌検出

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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------