

平成21年 5 月 12 日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19591476
 研究課題名（和文） 大動脈粥状硬化病巣への歯周病の関与と血小板凝集の影響についての研究
 研究課題名（英文） Relationship between periodontitis and atherosclerotic lesion influenced by 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：

代表的な歯周病菌である *Porphyromonas gingivalis* (Pg 菌) は、血液成分中の血小板と反応し血小板凝集を惹起することが確認された。表皮ブドウ球菌では、血小板凝集はわずかにしか認められず、有意な血小板凝集を惹起しており、電子顕微鏡による観察では血小板に取り囲まれるとともに血小板内に取り込まれる像が観察された。種々の抗血小板薬による反応の変化から、血小板内 Ca^{2+} 移動および Ca^{2+} カルモデユリン依存性のミオシン軽鎖キナーゼ活性化を引き起こし、最終的には MLC リン酸化から GPIIb/IIIa 凝集に至ると推定された。Pg 菌の持続投与により末梢血管とくに下腿動脈領域の小口径動脈に血栓形成を惹起することより、臨床においても歯周病菌により小口径動脈での血栓症が発生しうることが示唆された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科学一般

キーワード：①閉塞性動脈硬化症、②パーリジャー病、③歯周病、④血小板凝集

1. 研究開始当初の背景

閉塞性動脈疾患に対して細菌感染が一定の関与を示すとの報告があるが、歯周病菌が血管内皮細胞や粥状硬化病変に着床し局所で炎症を惹起するのか、歯周病によって惹起された口腔内炎症から血中サイトカインや soluble CD14 が増加し間接的に粥状硬化病巣が進行する機序が推定されている。またバ

ーリジャー病においては、病変が血管内腔と内膜側に限局しており血栓症を基盤とした病態としても矛盾しないことより、歯周病菌が比較的径の細い動脈に血栓形成をきたすことが誘因となっている可能性が示唆されていた。

2. 研究の目的

以上の背景より閉塞性動脈硬化症と Buerger 病の発症原因に関して歯周病菌の関与が示唆されるが、発症部位が異なる、そして発症年齢が大きく異なる点が両者の最大の相違であるが、ともに血小板凝集の関与が示唆された。今回の研究では、①歯周病菌と血小板との凝集反応を検討した。②歯周病菌は、どの血液成分（白血球か血小板か）に付着して運ばれるかを検索した。③歯周病菌による血小板凝集について微細構造および凝集経路を検討した。④ラットの頸静脈より Pg 菌を持続投与した際の下肢動脈での変化を検討した。

3. 研究の方法

- (1) 多血小板血漿を作成し、歯周病菌のひとつである Pg 菌と混和し凝集能を光散乱法で測定した。
- (2) Pg 菌と白血球および多血小板血漿と混和し、一定時間の後に固定し光学顕微鏡にて観察した。
- (3) Pg 菌と多血小板血漿を混和し、一定時間後に固定し Ruthenium red 染色にて血小板表面を染色し、Pg 菌が血小板に取り込まれる過程を電子顕微鏡で評価した。それとともに各種薬剤を添加して血小板凝集を阻害し、血小板の形態変化を検討した。
- (4) ラットの頸静脈より Pg 菌を 2 週間にわたって持続投与し、2 週後および 4 週後に腸骨動脈以下の動脈を採取した。各動脈における Pg 菌 DNA の有無、および動脈内腔の血栓形成や動脈壁の変化を検討した。

4. 研究成果

- (1) 光散乱法による Pg 菌と多血小板血漿との混和による凝集では、直後より小凝集が起こし、2-3 分後より中凝集および大凝集が惹起された。これに対して表皮ブドウ球菌では、小凝集がわずかに認められるのみであった。
- (2) Pg 菌と白血球との混和では、直後より白血球により Pg 菌が貪食されている像が観察されたが、Pg 菌と多血小板血漿との混和では、5 分後から血小板凝集が認められた。
- (3) Pg 菌と多血小板血漿との混和の状態を電子顕微鏡で微細構造を観察したところ、5 分後では血小板の大部分が凝集している像が認められた。Pg 菌の大多数は血小板と血小板の間に存在して取り囲まれる像を呈していたが、一部は血小板内の胞体内に取り込まれていた。Pg 菌と多血小板血漿との混和後に Ruthenium red 染色で血小板表面および開放微小管を染色

した像では、Pg 菌周囲に Ruthenium red 染色陽性と陰性の両者が認められた。以上より、Pg 菌周囲の Ruthenium red 染色陰性像は Pg 菌が活性化血小板に取り込まれた像であると推定した。

- (4) 抗血小板薬による血小板凝集能の変化では、EDTA, Eptifibatide, PGE1, NEM, W-7 のすべてで、中凝集および大凝集は完全に阻止されたが、EDTA 以外では小凝集は $4-6 \times 10^4$ V 認められた。電子顕微鏡による観察では、NEM 以外での抗血小板薬により 5 分後でも円盤状で通常の形態が保持されていたが、NEM では 5 分後に球状に変化し偽足を形成し、10 分後には凝集塊を形成していた。
- (5) Pg 菌を持続静注した群では、2 週後、4 週後にそれぞれ 33%、56% で動脈内血栓形成を認めた。PCR 法による Pg 菌 DNA は、2 週後、4 週後で 73%、22% であった。特に動脈内血栓形成は、4 週後の下腿動脈で 83% と高頻度で観察された。対照群では、血栓形成や Pg 菌 DNA は全く認められなかった。以上より Pg 菌の持続投与により末梢血管とくに下腿動脈領域の小口径動脈に血栓形成を惹起することより、臨床においても歯周病菌により小口径動脈での血栓症が発生しう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 7 件)

- (1) Kurihara N, Inoue Y, Iwai T, Sugano N, Umeda M, Haung Y, Ishikawa I. Oral bacteria are a possible risk factor for valvular incompetence in primary varicose veins. *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 2007; 34: 102-106. 査読：有
- (2) Chen Z, Takahashi M, Naruse T, Nakajima T, Chen Y W, Inoue Y, Ishikawa I, Iwai T, Kimura A. Synergistic contribution of CD14 and HLA loci in the susceptibility to Buerger disease. *Hum Gnt.* 2007; 122: 367-372. 査読：有
- (3) Nakamura N, Yoshida M, Umeda M, Huang Y, Kitajima S, Inoue Y, Ishikawa I, Iwai T. Extended exposure of lipopolysaccharide fraction from *Porphyromonas gingivalis* facilitates mononuclear cell adhesion to vascular endothelium via Toll-like receptor-2 dependent mechanism. *Atherosclerosis.* 2007 Mar 17; [Epub ahead of print] 査読：有

- (4) Chen YW, Iwai T, Umeda M, et al. Elevated IgG titers to periodontal pathogens related to Buerger disease. Int J Cardiol. 2007; 122: 79-81 査読：有
- (5) Kubota T, Inoue Y, Iwai T, Kurihara N, Huan Y, Umeda M. Arterial thrombosis after intravenous infusion of oral bacterium in a rat model. Ann Vasc Surg. 2008; 22: 412-416 査読：有
- (6) Li X, Iwai T, Nakamura H, Inoue Y, Chen Y, Umeda M, Suzuki H. An ultrastructural study of Porphyromonas gingivalis-induced platelet aggregation. Thromb Res. 2008; 122: 810-819 査読：有
- (7) Chen YW, Umeda M, Nagasawa T, Takeuchi Y, Huang Y, Inoue Y, Iwai T, Izumi Y, Ishikawa I. Periodontitis may increase the risk of peripheral arterial disease. Eur J Vasc Endovasc Surg. 2008; 35: 153-158 査読：有

[学会発表] (計 7 件)

- (1) Yi-wen Chen, 梅田 誠、井上芳徳、菅野範英、岩井武尚。バージャー病患者にみられた歯周病菌に対する IgG 抗体価の上昇。厚生労働科学研究費補助金 難治性疾患克服研究事業 難治性血管園に関する調査研究 第 2 回班会議。東京 2007.1.26.
- (2) 岩井武尚、井上芳徳、栗原伸久、梅田 誠、中村裕昭。口腔内弱毒細菌と各種循環器疾患との関連を探る。第 27 回日本医学会総会シンポジウム。大阪。2007.4.6-8.
- (3) 寺崎宏明、井上芳徳、光岡明人、野谷啓之、久米博子、豊福崇浩、遊佐祐子、藤田聡子、工藤敏文、地引政利、菅野範英、中島里枝子、加賀山知子、宮井美恵子、岩井武尚。インドシアニングリーン蛍光測定による新しい局所微小循環評価法。第 48 回日本脈管学会総会。松本。2007.10.26.
- (4) 井上芳徳、Yi-wen Chen、梅田 誠、菅野範英、岩井武尚。バージャー病に関する最新知見と今後の動向。厚生労働科学研究費補助金 難治性疾患克服研究事業 難治性血管園に関する調査研究 第 3 回班会議。東京 2007.12.21.
- (5) 寺崎宏明、井上芳徳、菅野範英。インドシアニングリーン蛍光測定における新しい局所微小循環評価法。第 36 回日本血管外科学会総会。東京。2008.4.16-18.
- (6) 井上芳徳。バージャー病における歯周病の関与—特に血小板凝集の観点から—。

厚生労働科学研究費補助金 難治性疾患克服研究事業 難治性血管園に関する調査研究 第 1 回班会議。東京 2008.7.11

- (7) 地引政利、井上芳徳、梅田 誠、和泉雄一、岩井武尚。バージャー病における歯周病の関与について。厚生労働科学研究費補助金 難治性疾患克服研究事業 難治性血管園に関する調査研究 第 2 回班会議。東京 2009.1.16

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

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)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・助教

研究者番号：90193937

中村裕昭 (NAKAMURA HIROAKI)

埼玉医科大学・医学部・教授

研究者番号：80073021

菅野範英 (SUGANO NORIHIDE)

東京医科歯科大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：60332631

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・医員

研究者番号：50431911

(3) 連携研究者