

機関番号：13802

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20591683

研究課題名（和文） 歯周病菌による脳梗塞増悪のメカニズム解明

研究課題名（英文） Mechanisms of stroke progression by periodontal bacteria

研究代表者 外村 和也

(Hokamura Kazuya)

浜松医科大学・医学部薬理学・特任助教

研究者番号：90436965

研究成果の概要（和文）：

脳出血モデル動物に口腔内細菌を投与した。そして 24 時間後に麻酔下で生理食塩液による灌流を行い、動物を解剖した。そして厚さ 1mm の脳切片を作製し、脳出血面積をコンピュータ解析した。一般的なう蝕菌およびコラーゲン結合タンパクを有するう蝕菌を投与し、脳梗塞時の脳出血に影響を与える菌を検討した。

その結果、コラーゲン結合能を有する口腔細菌が脳出血を増悪するという結果が得られた。

研究成果の概要（英文）：

It was demonstrated with oral bacteria to mice cerebral hemorrhage model, and 24 hours later, brain tissue harvested 2 mm thickness and analyzed brain hemorrhage area. Administered with general oral bacteria was no effect to the cerebral hemorrhage. However, with collagen binding protein was enhanced cerebral hemorrhage during a stroke.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2009 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：

科研費の分科・細目：

キーワード：脳梗塞、脳出血、口腔内細菌、う蝕、歯周病、全身疾患

1. 研究開始当初の背景

これまで多くの疫学的、臨床的研究により、歯周病と全身疾患との因果関係が指摘されており、特に歯周病の原因菌の一つである *Porphyromonas gingivais* (*P.gingivalis*) に関する研究から、動脈硬化などの心血管病変の発症に深く関与しているといわれていた。このことから口腔内の炎症や傷害に伴い

P.gingivalis が血管内に侵入し、全身に影響をおよぼす可能性は十分に考えられるが、歯周病菌感染者の全てが心血管病変を発症するわけではなかった。歯周病菌感染と心血管病変などの全身疾患発症との関連を示す状況証拠は数多く報告されているが、その詳細な病態発症メカニズムについては依然として不明であった。これらの点を明らかにする

ために、上皮系線維芽細胞や血管内皮細胞などの培養細胞を用いて歯周病菌の細胞内侵入や細胞毒性に関する研究が行われているが、実際の個体やヒトにおける作用との間には大きな隔りがあると考えられる。また、この間隙を埋めるためのモデル動物を用いた検討も殆ど無いのが現状であった。

2. 研究の目的

口腔細菌の感染によって直接的に脳梗塞が発症・悪化するかどうかについて、*in vivo*の動物モデルを用いた系と*in vitro*培養細胞を用いた系で明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

【脳梗塞モデル】

脳梗塞モデル動物に歯周病菌および蝕菌などの口腔内細菌を投与した。そして24時間後に麻酔下で動物を解剖し、厚さ1mmの脳切片を作製した。未染色の脳切片はデジタル画像を得るために撮影し、出血量を定量化した。また2,3,5-トリフェニルテトラゾリウムクロライドで染色し、デジタル画像を撮影した後、脳梗塞面積をコンピュータ解析した。

【脳組織中の口腔内細菌を検出】

脳梗塞後の口腔菌の投与により、口腔菌が脳組織から検出することができるのかをみるため、PCR法にて16S rDNA遺伝子を標的としたプライマーを用い口腔病菌の検出を試みた。

【Matrix Metalloproteinases 9の検出】

脳出血と大きく関わりがあるといわれているMatrix Metalloproteinases 9 (MMP9)の検出をゼラチン・ザイモグラフィ法により行った。実験には上に記した脳出血モデル動物を用いた。

4. 研究成果

この実験において蝕菌の一つであるTW295が脳出血を引き起こすということが明らかとなった(コントロール群の出血量 0.37 ± 0.120 、TW295 $1.73 \pm 0.633 \text{ mm}^2$)。口腔内細菌が新内膜炎や動脈硬化などに関与するという報告はこれまでにあるが、致命的な疾患となる脳出血に関わるという報告はこれまでになく、本研究では口腔内細菌が引き起こす脳出血のメカニズムを解明することを第一優先として以降の研究を進めた。

PCRを用いた検討において、中大脳動脈に損傷を与えた患側のみにおいて、病原性の高い口腔細菌が検出された。健常側においては口腔細菌を検出することができなかった。

脳出血に影響をおよぼす口腔細菌の投与によりMMP9の産生は増加した。

これまで口腔内細菌が全身疾患として心内膜炎に関与するという報告がされているが、我々は初めて蝕菌が脳疾患へ関与するという結果を得た。また、病変部にこの

細菌が付着しており、コラーゲン層に付着することで出血を増悪することを明らかにした。

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4件)

外村和也、梅村和夫、口腔細菌の感染による血管過形成の分子解析
Journal of Periodontal Research、査読有、45、2010、337~344

外村 和也、梅村和夫、口腔細菌が循環器疾患に関わる一分子レベルから臨床まで—
J Pharmacol Sci、査読有、113、2010、110~114

外村和也、梅村和夫、動脈瘤を引き起こす歯周病菌の解析
Oral Dis、査読有、17、2011、370~378

外村和也、梅村和夫、ここまでわかった口腔細菌による全身疾患：最新の研究と臨床治験
Jpn J clin Pharmacol ther、査読無、42、2011、69~70

〔学会発表〕(計3件)

外村和也、梅村和夫、口腔細菌、*S. mutans*は脳出血を増悪させる
日本脳循環代謝学会、2009年11月19日、千里ライフサイエンスセンター(大阪)

外村和也、梅村和夫、ここまでわかった口腔細菌による全身疾患：最新の研究と臨床治験
日本臨床薬理学会、2010年12月2日 京都国際会議所(京都)

外村和也、梅村和夫 脳梗塞治療2つのアプローチ
第84回日本薬理学会年会、平成22年3月24日 横浜

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

特許出願状況(計2件)

名称：高病原性口腔細菌の好感度検出法

発明者：外村和也、梅村和夫

権利者：外村和也、梅村和夫

種類：

番号：特願2009-88239

出願年月日：平成21年3月31日

国内外の別：国内および国外

名称：高病原性口腔細菌による腸炎誘発原因
分子の産生とその高感度検出法

発明者：外村和也、梅村和夫

権利者：外村和也、梅村和夫

種類：

番号：PCT2438HI

出願年月日：平成 22 年 3 月 3 日

国内外の別：国内および国外

○取得状況（計◇件）

〔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・医学部薬理学・特任助教

研究者番号：90436965

(2) 研究分担者

梅村 和夫 (UMEMURA KAZUO)

浜松医科大学・医学部薬理学・教授

研究者番号：40232912

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

