

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 10 日現在

機関番号：32665

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21791832

研究課題名（和文）高脂肪食負荷および細菌感染がSHRSPラットの血圧上昇と脳卒中の発症に与える影響

研究課題名（英文）Continual Gram-negative bacterial challenge accelerates stroke onset SHRSP rats

研究代表者

川戸 貴行 (KAWATO TAKAYUKI)

日本大学・歯学部・准教授

研究者番号：50386075

研究成果の概要（和文）：脳卒中易発症性高血圧自然発症ラットに、慢性感染症を想定してグラム陰性菌体あるいは菌体内毒素（LPS）を継続的に負荷し、脳卒中の発症および酸化ストレスレベルに与える影響を検討した。その結果、菌体あるいはLPSの継続的な接種によって、脳卒中の発症の早期化と症状の重症化、ならびに酸化ストレスの増加が認められた。これらの結果から、脳卒中の遺伝的素因を有する個体における細菌性の負荷は、酸化ストレスを増加させ、脳卒中の発症と症状の重篤化を誘引する可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：This study examined the effects of continual Gram-negative bacterial challenge on stroke onset. Stroke onset occurred significantly earlier in Stroke-prone spontaneously hypertensive rats (SHRSP) injected with a bacterial cell suspension of Gram-negative rods or lipopolysaccharides, as compared to uninjected controls. Paralysis of the hindlimb, piloerection, hypokinesia, and hyperkinesia were observed in lipopolysaccharide-injected SHRSP but not in uninjected controls during stroke onset. The serum levels of NO_x, TBARS, and 8-OHdG increased in lipopolysaccharide-injected SHRSP. These results suggest that continual Gram-negative bacterial challenge induces accelerated stroke onset in SHRSP, probably caused by oxidative stress responses derived from lipopolysaccharides.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	700,000	210,000	910,000
2010年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	416,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：病態科学系歯学・歯科放射線学

キーワード：脳卒中、歯周病、慢性感染症、酸化ストレス、食塩、高脂肪食

1. 研究開始当初の背景

脳卒中は脳の急激な血流障害によって意識障害や運動麻痺を生じる疾患で、一命を取り留めても重度の運動障害が長期にわたっ

て残るケースが多いことから、その予防が重要視されている。脳卒中発症のリスク因子としては、高血圧、糖尿病、脂質代謝異常、喫煙、肥満などの生活習慣に起因するものが大

部分で、その他に急性・慢性感染症などがある。このうち高血圧症と脂質代謝異常は、脳卒中の最大のリスク因子であり、疫学研究だけでなく動物実験でもそれらの密接な因果関係が指摘されている。

近年、歯周病が糖尿病や心血管疾患のリスク因子となることが、疫学研究、動物実験および *in vitro* 研究によって証明されている。一方、脳血管疾患についても、その発症に歯周病が関係することが疫学研究で報告されている。脳卒中は複数のリスク因子が重複した場合に発症率が上昇し、かつ症状が重篤化することが知られている。しかし、脳卒中に関する基礎的研究は単一の因子について調べたものが多く、リスク因子の重複を想定した研究、とりわけ、歯周病をはじめとする慢性感染症をリスク因子として取り入れた *in vivo* 研究はこれまで認められていない。

2. 研究の目的

前述の背景をもとに、本実験では、異なる種類のリスク因子の重複が脳卒中の発症と症状の進展に及ぼす影響を、*in vivo* レベルで解明することを目的とした。脳卒中のリスク因子としては、慢性感染症として臨床で認められることが多い歯周病および尿路感染症、さらに食事性のリスク因子として高脂肪高食塩摂取、および高血圧症を想定した。

3. 研究の方法

本研究では、脳卒中易発症性高血圧自然発症ラット (SHRSP) を用いた。SHRSP は、重度の高血圧症に加え、90%以上の高率で脳卒中を自然発症することから、高血圧症と脳卒中の発症機構の解明や、高血圧関連遺伝子の検索などの研究に用いられている系統である。本研究では、実験動物として SHRSP を用いることで、高血圧を脳卒中の基礎的なリスク因子に設定した。

本研究は、3年間で3つの段階に分けて実施した。

(1) 平成 21 年度

重度の成人性歯周炎や尿路感染症で起きると考えられる頻回な菌血症と高血圧症の重複が、脳卒中の発症に与える影響を調べた。高血圧のリスク因子を有する SHRSP に、慢性辺縁性歯周炎と慢性尿路感染症による頻回な菌血症を想定して、*Porphyromonas gingivalis* と *Escherichia coli* をそれぞれ継続的に接種し、血圧上昇、脳卒中の平均発症日齢および平均生存日齢を調べた。なお、細菌を接種しない群をコントロール群とした。血圧は尾カフ法を用いて毎週、体重は毎日測定した。脳卒中の発症は、急激な体重の増減、四肢の麻痺、立毛、不活発ならびに過敏などの神経症状の発現の有無から推定した。

(2) 平成 22 年度

高血圧症を脳卒中の基礎的なリスク因子

に据え、食事性リスクの負荷と慢性感染症が SHRSP の血圧と脳卒中の発症に及ぼす影響を検討した。予備実験として 1%食塩含有飲料水と普通飼料を与える (高食塩負荷) 条件、普通飲料水と高脂肪飼料を与える (高脂肪負荷) 条件、1%食塩含有飲料水と高脂肪飼料を与える (高食塩高脂肪負荷) 条件および食事性負荷を与えない条件で SHRSP を飼育し、血圧を比較した。次に、本実験として高食塩負荷条件下で SHRSP に感染性の負荷を掛けて、血圧と脳卒中の発症に及ぼす影響を検討した。なお、感染性の負荷としては、*P. gingivalis* と *E. coli* に共通する病原因子であるグラム陰性菌体内毒素 (LPS) を用いた。LPS を静脈内に 1.0 mg/kg 投与する群、0.5 mg/kg 投与する群、およびこれを投与しないコントロール群に分けて SHRSP を飼育し、血圧、脳卒中の発症率および生存率を調べた。血圧測定と脳卒中の発症は、平成 21 年度と同様の方法で推定した。また、死亡した個体から脳を摘出して脳組織を病理組織学的に分析した。

(3) 平成 23 年度

脳卒中の発症に酸化ストレスが大きく関与することに着目し、LPS の継続接種が SHRSP の酸化ストレスレベルに及ぼす影響を調べた。1%食塩含有飲料水による高食塩負荷条件下にて、LPS を継続的に接種して血清を採取し、血清中の一酸化窒素 (NO) の産生量を表す総窒素酸化物量 (NOx)、脂質の酸化ダメージを表す TBARS 量および DNA の酸化ダメージを表す 8-OHdG 量を、それぞれ測定した。なお、LPS 非接種群をコントロールとした。また 12 週齢時には、全ての個体を屠殺し、脳を摘出して脳組織を病理組織学的に分析した。

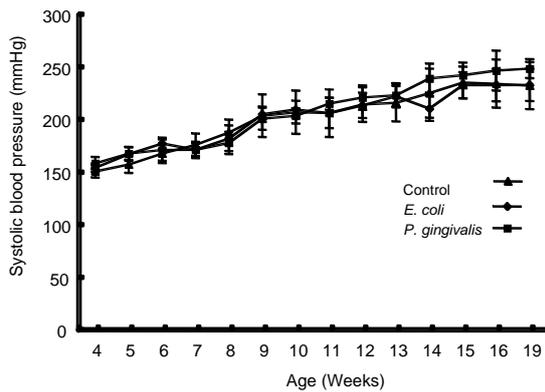
4. 研究成果

(1) 平成 21 年度

P. gingivalis 接種群、*E. coli* 接種群およびコントロール群の平均体重は、4 週齢から 8 週齢まで増加傾向を示し、9 週齢でプラトーに達した。なお、この間、各群の平均体重に著明な差は認められなかった。9 週齢以降、脳卒中を発症した個体では体重の減少傾向を認め、11 週齢以降では全ての群の平均体重は減少傾向を示した。収縮期血圧の平均値は 4 週齢から 11 週齢まで上昇し、12 週齢でプラトーに達したが、各群間に有意差は認められなかった (図 1)。

また、各群の脳卒中発症の平均日齢は、コントロール群 77.5±0.6 日、*P. gingivalis* 接種群 72.8±6.7 日、*E. coli* 接種群 71.8±3.6 日で、菌の接種によって脳卒中の発症が早まる傾向が認められた。また、発症時の症状については、コントロール群ではすべての個体で体重減少もしくは前肢の麻痺が認め

図 1: *P. gingivalis* および *E. coli* 菌体の継続接種が SHRSP の血圧に及ぼす影響



られたのに対し、*P. gingivalis* 接種群および *E. coli* 接種群では、これらの症状に加えて立毛、過敏、不活発などより多くの症状を示す個体が認められた。以上の結果から、*P. gingivalis* および *E. coli* などのグラム陰性菌による頻回な菌血症は、血圧上昇には関与しないものの、脳卒中の発症と発症時の症状の重篤化を招く可能性が示唆された。

(2) 平成 22 年度

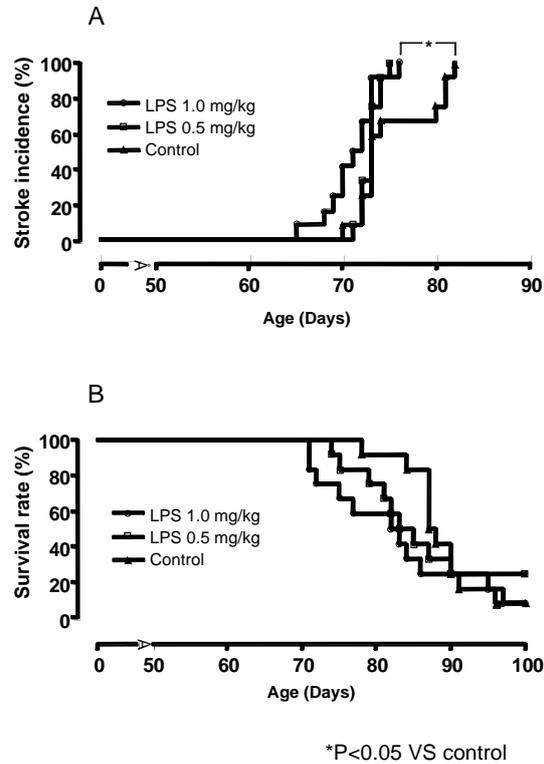
食事性のリスク因子が SHRSP の血圧上昇に及ぼす影響を検討した結果、高食塩負荷の条件および高食塩高脂肪負荷の条件下で飼育した SHRSP の血圧は、食事性負荷を掛けずに飼育した SHRSP の血圧に比べて著しく高い値を示した。一方、高脂肪負荷の条件下で飼育した SHRSP の血圧もまた、食事性の負荷を掛けなかった SHRSP の血圧に比べて高かったものの、その差は、高食塩負荷と食事性負荷を掛けなかった場合を比べた差よりも小さかった。以上の結果から SHRSP の血圧上昇には、食塩負荷が強く影響することが予想された。そこで、食事性のリスク因子としての食塩の負荷、さらに感染性のリスク因子としての LPS の投与が、SHRSP の血圧上昇、脳卒中の発症率および生存率に及ぼす影響を調べた。その結果、SHRSP の血圧は、LPS 投与前の 5 週齢では、コントロール群、0.5 mg/kg LPS 投与群および 1.0 mg/kg LPS 投与群の間に差は認められなかったが、頻回に LPS が投与された 8 週齢では、1.0 mg/kg LPS 投与群の血圧は、コントロール群および 0.5 mg/kg LPS 投与群に比べて僅かに高値を示したものの、有為差は認められなかった (表 1)。

表 1: LPS 投与が SHRSP の血圧に及ぼす影響

	n	5 week (mmHg)	8 week (mmHg)
LPS 1.0 mg/kg	12	155.0 ± 6.33	185.0 ± 9.41
LPS 0.5 mg/kg	12	156.3 ± 6.68	176.2 ± 8.27
Control	12	152.9 ± 10.5	175.3 ± 9.55

また、脳卒中の発症率は、コントロール群に比べて 1.0 mg/kg LPS 投与群で有意に上昇した。(図 2 a)。一方、SHRSP の生存率は、LPS の投与によって低下する傾向が認められたが、各群間に有意差は認められなかった (図 2b)。

図 2: LPS 投与が SHRSP の脳卒中の発症率および生存率に及ぼす影響



さらに、発症時の各群の症状を比較した結果、LPS 投与群では、体重変化、不活発、突然死に加えて、過敏、体毛の立毛、前後肢の麻痺などの様々な症状が認められた。一方、LPS 非投与群の症状は、体重変化と前脚の麻痺のみであった (表 2)。

表 2: LPS 投与が脳卒中の症状に及ぼす影響

Symptoms	Number of symptoms		
	Control	LPS 0.5 mg/kg	LPS 1.0 mg/kg
Decrease in body weight	12	12	10
Paralysis in forelimb	7	9	8
Paralysis in hindlimb	0	1	3
Piloerection	0	1	3
Hypokinetic syndrome	0	2	4
Hyperkinetic syndrome	0	0	1
Sudden death	0	0	2

なお、死亡後に摘出した脳を病理組織分析した結果、出血、梗塞および浮腫などの所見が認められたが、所見の有無および重症度には、LPS 投与の影響は認められなかった。SHRSP は、特別な負荷を掛けることなく脳卒中を自然発症する系統であり、死亡の原因も脳卒中によるものがほとんどである。本研究では死

亡後の脳組織を分析したため、LPS の負荷に関わらず、すべての個体で病理変化が進行していたと考えられた。

以上の結果から、高食塩負荷条件におけるLPS の持続的投与は、SHRSP の脳卒中の発症を早期化させるとともに、発症時の症状を重篤化させる可能性が示唆された。

(3) 平成 23 年度

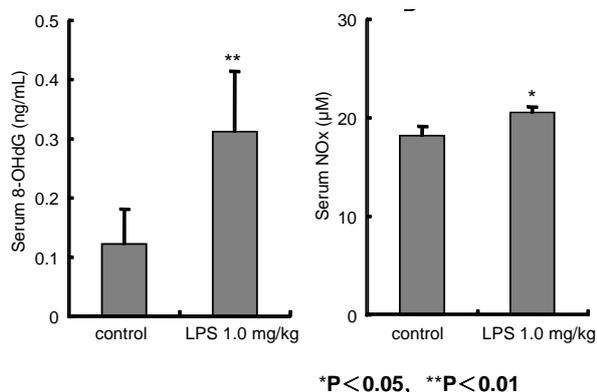
本研究の最終年度では、LPS の継続接種がSHRSP の酸化ストレスレベルに及ぼす影響を調べた。その結果、8 週齢時の血清中の NO_x、TBARS および 8-OHdG 値の平均は、コントロール群に比べて、LPS 投与群で有意に増加した(表 3 および図 3)。

表 3: LPS 投与が SHRSP の血清中の TBARS 値に及ぼす影響

	n	TBARS (nmol/ml)
LPS 1.0 mg/kg	12	9.58 ± 2.03*
LPS 0.5 mg/kg	12	8.21 ± 1.47
Control	12	7.32 ± 1.39

*P<0.05 vs. controls

図 3: LPS 投与が SHRSP の血清中の NO_x 値および 8-OHdG 値に及ぼす影響



また、12 週齢時に摘出した脳の病理組織像では、出血、梗塞および浮腫の所見がコントロール群に比べて LPS 群で多く認められた。

LPS は、マクロファージや好中球の誘導型 NO 合成酵素の発現上昇を介して NO の産生を増加させることが知られている。また、血清中の TBARS および 8-OHdG 値は、脳組織中の酸化ダメージを反映することが動物実験で明らかにされている。本研究結果から、頻回な LPS 接種は、NO の産生を促進し、SHRSP の脂質および DNA の酸化的ダメージを増加させ、脳卒中に伴う脳組織の損傷を増大させる可能性が示唆された。

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 1 件)

- ① Kawato T, Tanaka H, Tabuchi M, Ooshima K, Nakai K, Yamashita Y, Maeno M (2012) Continual Gram-negative bacterial challenge accelerates stroke onset in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. Clin Exp Hypertens, in press.

[学会発表] (計 2 件)

- ① 川戸貴行 (2010 年 10 月 8 日) 慢性炎症が全身に及ぼす影響へのアプローチ～脳卒中モデル動物を用いた実験からの考察～. シンポジウム 5 口腔の健康を考える. 第 59 回日本口腔衛生学会・総会, 朱鷺メッセ, 新潟
- ② 川戸貴行, 山下喜久, 田中秀樹, 田渕正樹, 本橋正史, 前野正夫 (2010 年 10 月 7 日) 継続的な LPS 投与が脳卒中易発性高血圧自然発症ラットの脳卒中発症に与える影響について. 第 59 回日本口腔衛生学会・総会, 朱鷺メッセ, 新潟

6. 研究組織

(1) 研究代表者

川戸 貴行 (KAWATO TAKAYUKI)

日本大学・歯学部・講師

研究者番号: 50386075