

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 29 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591051

研究課題名(和文) 動脈硬化巣での原因歯周病菌の検出と同定による虚血性心疾患予防へのアプローチ

研究課題名(英文) Approach to prevention of ischemic heart disease by detection and identification of periodontal bacteria in atherosclerotic plaques

研究代表者

副島 弘文 (Soejima, Hirofumi)

熊本大学・保健センター・准教授

研究者番号：80332881

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：進行した歯周病を有する人では歯周病菌あるいは歯周病菌が出す毒素が時に歯肉内の血液循環に入り込んでおり、血流により全身へ運ばれた歯周病菌や毒素が動脈局所に作用して動脈硬化巣の形成を促進する。本研究では歯周病菌の動脈硬化プラーク形成への関与を検討した。歯周病菌の動脈から検出の検討において、顔面動脈から3種類の歯周病菌を検出した。それらの歯周病菌に対する抗体価の血中濃度が歯周病の重症度と相関していた。また、血中抗体価の上昇は全身の炎症反応とも関連していた。さらに歯周病抗体価は患者の血圧とも関連していることがわかった。これらのことは動脈硬化および虚血性心疾患と歯周病との関連性を裏付けることになる。

研究成果の概要(英文)：Periodontal bacteria and toxins released from periodontal bacteria enter into blood circulation of the gingiva of people with advanced periodontal disease, and periodontal bacteria and toxins is carried to the whole body by the blood flow, then periodontal bacteria and toxins facilitate formation of atherosclerotic plaques. We investigated the involvement of atherosclerotic plaque formation of periodontal bacteria in this study. In the detection of periodontal bacteria from the artery, we detected three different kinds of periodontal bacteria from the facial artery. Blood antibody titer against the periodontal bacteria was correlated with the severity of periodontal disease. The degree of increase in the antibody titer was related to the inflammatory reaction of whole body. We have found that blood antibody titer is associated with the patient's blood pressure. These support the relevance of arteriosclerosis and ischemic heart disease and periodontal disease.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・循環器内科学

キーワード：歯周病 動脈硬化巣 歯周病菌 虚血性心疾患

1. 研究開始当初の背景

(1)冠動脈病変の形成および急性冠症候群の発症に炎症が関与していることが最近明らかとなったが、炎症の原因として歯周病菌が注目されている。中高年者の口腔機能に関して、自分の歯で物を噛み、多くの人と楽しく会話することの重要性が歯科界はもちろん一般社会においても広く認識されている。成人の80%が罹患するといわれる歯周病は中高年者の口腔機能に重大な影響を及ぼし、そのQOLを大きく左右するものと考えられている。歯周病はデンタル・プラークに起因する感染症であり主として歯肉炎は歯肉縁上プラークにより、歯周炎は歯肉縁下プラークにより惹起される。一方、近年我が国において動脈硬化性疾患、なかでも冠動脈疾患は罹患患者数が増加の一途をたどっている。動脈硬化が慢性の血管の炎症性疾患であるという概念が提唱されるに至り、Lancet 1997;350(9075):430-6では*Helicobacter pylori*、*Chlamydia pneumoniae*、*Cytomegalovirus*などの細菌感染が動脈の炎症に深く関与し、虚血性心疾患の発症に関係している可能性が示された。また、患者対照研究であるJ Periodontol 1996;67:1123-37では、歯周病の進行した患者さんにおいて心血管疾患の発症が多いことが報告されている。さらに、心筋梗塞の既往のある患者と既往のない患者との患者対照研究では歯周病重症度に有意な差があったと報告された(J Clin Periodontol 2004;31(1):19-24)。動物実験では、歯周病菌を少量血管内投与して経過観察すると投与しなかった群に比べ投与した群で動脈硬化の進行が速かったと報告されている(Circulation 2002;105(7):861-7)。このように口腔内の疾患である歯周病と冠動脈疾患とは、双方とも中高年者のQOLに大きな影響を及ぼすという点においてだけでなく、その原因についても互いに深く関連しあっていると思われる。しかしながら歯周病がどのようにして冠動脈病変の形成に関与しているのかは不明である。

(2)本研究者らは虚血性心疾患の発症メカニズムに関して研究を続けてきている。急性心筋梗塞をはじめとする急性冠症候群の発症には、冠動脈内に形成される血栓が重要な役割を果たしていることは周知の事実であるが、本研究者らは外因系血液凝固の開始因子である組織因子(Soejima H, 他 Am J Cardiol 1996;78(3):336-40)や冠動脈プラークの炎症を引き起こす monocyte chemoattractant protein-1 (Soejima H, et al, J Am Coll Cardiol 1999;34(4):983-8)が急性心筋梗塞発症に関与していることを報告した。また、血漿組織因子高値は急性冠症候群患者の予後が悪い指標となることも報告している(Soejima H, et al, Circulation 1999;99(22):2908-13)。急性冠症候群患者の方向性冠動脈アテローム切除術(Directional Coronary Atherectomy)サン

ルを用いた解析で、急性冠症候群患者の冠動脈病変部位にはマクロファージが多く集積し、そのマクロファージが組織因子を発現しており、急性冠症候群での血栓形成に深く関与していることが明らかにされた(J Pathol 1999;188(2):180-8)。歯周病の研究として、熊本大学循環器内科入院患者さんに対し歯周病の程度を把握するために歯科受診をしてもらい残存歯数、歯垢の残存程度、歯周ポケットの深さ、歯周組織からの易出血性、歯槽骨の骨吸収を評価してもらっており、対照群の患者さんに比し虚血性心疾患を有する患者さんにおいて歯周病の程度が進行していることを認めている(Oe Y, Soejima H, et al, Heart Vessels 2009;24(2):103-7)。また、歯周病菌については歯周病巣内容物の解析から *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Tannerella forsythensis*, *Bacteroides forsythus*, *Campylobacter rectus*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Prevotella nigrescens*, *Treponema denticola* などが注目されるようになってきた(J Periodontol Res 2004;39(6):398-404, J Periodontol 2004;75(8):1084-9)。冠動脈の一部の遺伝子解析の結果から、多数ある歯周病菌の中から冠動脈疾患に関連あるものとして *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia* *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* などの病原菌が挙げられている(J Periodontol 2007;78(4):677-82)。最近、これらの歯周病菌の抗体価を測定することが可能となった。

2. 研究の目的

本研究は歯周病菌を介した虚血性心疾患の発症メカニズムとして歯周病が全身の炎症および動脈硬化プラーク形成に関与しているかを検討すること、歯周病菌を動脈硬化プラークから検出すること、さらに歯周病菌に対する抗体価測定の有用性を検討することを目的とする。

(1)患者さんの歯周病の程度を把握し入院時の検査所見から炎症の程度および動脈硬化や虚血性心疾患との関連を検討する。

(2)歯周病の原因菌である *Prevotella intermedia*, *Porphyromonas gingivalis*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* の血中抗体価を入院患者さんで測定し、歯周病の程度や虚血性心疾患の病態との関連について明らかにする。

(3)収集した顔面動脈を3つに分けて1つは歯周病菌のDNA検索、もう1つは歯周病菌のmRNAの検索を行い動脈内の歯周病菌の有無について検討する。残りの標本を用いて組織染色を行い動脈組織内の歯周病菌の同定を行う。

(4)冠動脈形成術を施行された患者さんに使用されたバルーンに付着した破砕された冠動脈プラーク内容物に歯周病菌が含まれて

いるか否かについて明らかにする。

3. 研究の方法

(1)冠動脈疾患の重症度の検討

歯科口腔外科の患者さんは術前検査として冠動脈 CT を施行されたり、循環器へコンサルトされたり、心臓に関連する所見の把握が可能である。循環器内科入院患者さんの多くは心臓カテーテル検査および心電図検査、心臓超音波検査と入院時一般採血検査を受けるため心臓および心臓以外の所見が把握可能である。歯科口腔外科入院患者さんおよび循環器内科入院患者さんの入院時採血所見および心電図、心臓超音波、冠動脈造影所見および冠動脈 CT 所見から動脈硬化および虚血性心疾患の病状を把握する。

(2)循環器内科および歯科口腔外科入院患者における歯周病検診

循環器内科入院中の虚血性心疾患患者さんで本研究に協力の得られた患者さんの歯周病の有無および程度を歯科口腔外科において PPRD (periodontal pentagon risk diagram by Renvert S, et al, J Clin Periodontol, 2003)の code 分類によりスコア化して評価する。診察する項目としては、喪失歯数、歯周ポケットの深さが6mm以上の歯数、プロービング時の歯周組織から出血した部位の割合、パモントグラフィーを用いて歯槽骨の骨吸収の程度が歯根長の1/2以上に達する歯の割合である。これに喫煙本数を加えて各歯周病スコアを算出し、その合計がペリオドンタルリスクスコアとなる。

(3)顔面動脈からの歯周病菌検出

歯科口腔外科にて腫瘍切除の際に顔面動脈が切除される。通常は廃棄される組織であるが、患者さんの同意を得て無菌的に収集し、すぐに凍結保存する。収集した顔面動脈を3つに分けて1つは文献より歯周病菌特有のプライマーを準備し *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* といった歯周病菌の DNA 検索を行う。もう1つは歯周病菌の mRNA の検索を行い動脈内の歯周病菌の有無について検討する。残りの組織を用いて免疫組織化学染色を行い動脈組織内の歯周病菌の同定を行う。

(4)血中歯周病原菌抗体価の検討

歯周病菌のうち *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* について ELISA 法を用いて抗体価測定を行う (J Clin Periodontol 2001;28(3):264-9)。循環器病棟に入院中の患者さんから末梢血採血を行い、これらの菌体がついたプレートに患者血清を入れて、血清中のその菌に対する IgG 抗体を結合させる。最後に、IgG 抗体に対する抗体を用いて患者さんの各歯周病菌に対する抗体価を測定する。こうして得られた歯周病菌に対する抗体価と歯周病の重症度との関連性を検討する。

(5)冠動脈形成術使用済バルーンからの歯周病菌検出

冠動脈造影にて有意な冠動脈狭窄を呈し、虚血所見を有する患者さんを対象に冠動脈形成術が施行される。冠動脈形成術を施行された患者さんから同意を得られた場合、使用済みバルーンを回収し、冷凍保存して本研究に利用する。冠動脈形成術に際し、粥種は破綻し冠動脈プラーク内容物の一部はバルーンに付着しているとされている。このバルーン付着物に歯周病菌の遺伝子が含まれていないかを検討する。解凍後バルーンの付着物を洗浄して回収し、polymerase chain reaction により歯周病菌遺伝子の検出を行う。

4. 研究成果

(1)冠動脈に50%以上の狭窄を有する127人の虚血性心疾患の入院患者(平均年齢68歳、男性93人)さんにおいて歯周病検診により歯周病スコアが得られた。また、採血検体から ELISA 法にて *Porphyromonas gingivalis* に対する抗体価を測定した。動脈硬化の指標として脈圧、平均血圧および脈派伝搬速度を測定した。*Porphyromonas gingivalis* に対する抗体価の中央値で分け抗体価高値群と低値群に分けた。117人(92.1%)が降圧薬を使用していたが抗体価高値群と低値群では降圧薬使用状況に差がなかった。ペリオドンタルリスクスコアは抗体価高値群で有意に高く ($P=0.0003$)、両者は有意に相関していた ($r=0.32$, $P=0.0003$)。各歯周病スコアの中でもプロービング時の出血部位の割合や歯周ポケットの深さ6mm以上の歯数、歯根長の1/2以上の骨吸収のある歯の割合から得られる歯周病スコアも同様に抗体価高値群で有意に高かった。抗体価高値群と低値群には年齢差があったがこれらの結果は重回帰分析にて年齢を補正しても変わらなかった。収縮期血圧も抗体価高値群で有意に高く ($P=0.0030$)、歯周病抗体価と有意に相関していた ($r=0.212$, $P=0.017$)。脈圧、脈派伝搬速度も抗体価高値群で高い傾向にあり、これらは年齢で調整してもその傾向に変わりはなかった。これらの結果から *Porphyromonas gingivalis* に対する血中抗体価の上昇は進行した歯周病の存在を示すだけでなく動脈硬化や高血圧の進展も予測させると結論した。

(2)虚血性心疾患の患者さん 215 人(平均年齢 67 歳、男性 130 人)において歯周病検診により歯周病スコアが得られた。また、採血検体から ELISA 法にて *Prevotella intermedia* に対する抗体価を測定した。炎症反応の指標として高感度 CRP を測定し、高感度 CRP の値 0.1 mg/dl 以上の高 CRP 群と 0.1 mg/dl 未満の低 CRP 群に分けて検討した。両群間の患者背景に有意な差はなかった。歯周病スコアとしては歯根長の1/2以上の骨吸収のある歯の割合から得られるスコアが高 CRP 群で有意に高かった。また、その他のスコアも高 CRP 群で高い傾向にあり、ペリオドンタル

ルリスクスコアは有意に高CRP群で高く、CRPの対数値と有意な相関関係を示した ($r=0.178$, $P=0.0095$)。Prevotella intermediaに対する抗体価は高CRP群で有意に高かった ($P=0.012$)。これらの結果から Prevotella intermedia に対する血中抗体価の上昇は進行した歯周病の存在を示すだけでなく、全身の炎症反応にも関連していると結論した。

(3) 27人から得られた動脈サンプルを用いて Porphyromonas gingivalis (Pg), Prevotella intermedia (Pi), Aggregatibacter actinomycetemcomitans (Aa) の特異的 ribosomal RNA、ribosomal DNA、genome DNA を検出し、歯周病菌の存在を確認することを目的とし、各検出試験ともプライマー2組を使用し、一組でも検出できたら陽性と判断した。Pgの ribosomal RNA 陽性者6人、ribosomal DNA 陽性者5人、genome DNA 陽性者4人であった。Piの ribosomal RNA 陽性者2人、ribosomal DNA 陽性者3人、genome DNA 陽性者3人であった。Aaの ribosomal RNA 陽性者0人、ribosomal DNA 陽性者1人、genome DNA 陽性者0人であった。ribosomal RNA、ribosomal DNA、genome DNA のうち2つ以上検出されたものを陽性者とする、Pgは4人、Piは3人、Aaは0人であった。Piが検出された3人はPgを検出できた4人に含まれていた。これらの結果から動脈壁内に歯周病菌は存在すると結論した。

最後に免疫組織化学染色を行い動脈組織内の歯周病菌の同定を試みた。Pg、Pi、Aaそれぞれについて検討してみた。顕微鏡で観察しても歯周病菌は観察できないため、まず歯周病菌に対する抗体を歯周病菌にくっつけてその抗体のついているところが染色されるようにした。そしてその染まり具合で歯周病菌の存在を確認することにした。しかしながら抗体の特異度が高くないためか非特異的と思われる染色が多く認められ結論を出すことはできなかった。

(4) 冠動脈形成術を施行された患者さんに使用されたバルーンに付着した破砕された冠動脈プラーク内容物に歯周病菌が含まれているか否かについて明らかにするために50人の使用済みバルーンを無菌的に回収し、凍結保存した。Porphyromonas gingivalis、Prevotella intermedia、Aggregatibacter actinomycetemcomitans の有無について検討した結果、Porphyromonas gingivalis は17人で検出された。Prevotella intermedia は1人で陽性、Aggregatibacter actinomycetemcomitans は5人で陽性であった。このように、冠動脈形成術を施行された患者さんに使用されたバルーンに冠動脈プラーク内容物の歯周病菌が付着していると結論した。

総括

以上述べてきた結果から、歯周病菌が動脈壁内に存在し、冠動脈プラーク内に存在するのは明らかであると思われる。Porphyromonas gingivalis および Prevotella intermedia はその抗体価と歯周病の進展度との相関も良好で歯周病進展度を推測するマーカーとしても有用である。また、これらの抗体価は血圧や動脈硬化指標および全身の炎症反応との相関がよくこの2つの歯周病菌は動脈硬化進展に関与しているものと思われる。動脈硬化は炎症が大きく関与しているとされているが、その炎症の一部は歯周病により引き起こされていると考えられる。

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 Hanaoka Y, Soejima H, Yasuda O, Nakayama H, Nagata M, Matsuo K, Shinohara M, Izumi Y, Ogawa H. Level of serum antibody against a periodontal pathogen is associated with atherosclerosis and hypertension. Hypertension Research (査読あり) 36、2013年、829-833、DOI: 10.1038/hr.2013.46.

[学会発表](計 2件)

1 副島弘文、花岡洋介、安田修、小川久雄 全身の炎症反応は歯周病重症度と関連し、歯周病重症は冠動脈病変の程度に関連している、日本心臓病学会、2012.9.16、ANA クラウンプラザ金沢

2 副島弘文、花岡洋介、安田修、小川久雄 歯周病菌に対する血清抗体価は歯周病進行度だけでなく虚血性心疾患と関連する 日本心臓病学会、2011.9.24、神戸ポートピアホテル

[図書](計 0件)

[産業財産権]

出願状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0件)

名称：
発明者：

権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

副島 弘文 (Soejima Hirofumi)

熊本大学・保健センター・准教授

研究者番号：80332881

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：