

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 8 日現在

機関番号：32661

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592074

研究課題名(和文) 動脈硬化病変進行・大動脈瘤増大のメカニズムと歯周病疾患の関与

研究課題名(英文) The contribution mechanism of the periodontal disease to the pathological progression of atherosclerosis and aneurysmal enlargement

研究代表者

塩野 則次 (SHIONO, Noritsugu)

東邦大学・医学部・准教授

研究者番号：70235498

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：「人は血管とともに老いる」というWilliam Oslerの名言が物語るように、加齢に伴う動脈の変化はからだ全体と関係している。歯周病が動脈硬化の進展に関与している、との仮説を検討した。心大血管手術患者で、歯周病の程度及び炎症性サイトカイン(IL-6, MMP9)を測定し動脈硬化所見を検討。大動脈瘤最大径と炎症性サイトカイン及び歯周病病変指数に弱い相関関係を認めた。これは2014年アジア心臓血管外科学会で発表。細菌性心内膜炎の菌種を検討、血液は口腔内細菌に頻繁に暴露されている事が示唆された。これは2013年Clinical & Experimental Cardiology (Chicago) で発表。

研究成果の概要(英文)：As suggested by William Osler's remark "a man is as old as his arteries," pathological changes in arteries with age are thought to be closely related to effects on the body overall.

Hypothesizing that periodontal diseases contributes to the progression of arteriosclerotic lesion, we measured the severity of intraoral lesions and inflammatory cytokines (interleukin-6; IL-6, matrix metalloproteinase 9; MMP9) and investigated intraoperative arteriosclerotic findings for patients who underwent cardiovascular surgery. Correlations were confirmed between the maximum diameter of aortic aneurysms, inflammatory cytokines, and intraoral lesion index. These results were presented at the 2014 Meeting of the Asian Society for Cardiovascular and Thoracic Surgery (Istanbul). An investigation of bacterial strains in bacterial endocarditis suggested that the blood is exposed to intraoral bacteria at a high frequency. These were presented at the Clinical&Experimental Cardiology (Chicago).

研究分野：医学/外科学/ 心臓血管外科学分野

キーワード：動脈硬化 歯周病 感染性心内膜炎 サイトカイン

## 1. 研究開始当初の背景

「人は血管とともに老いる」という William Osler の名言が物語るように、加齢に伴う動脈の病理変化はからだ全体の影響と密接に関係していると考えられている。喫煙、脂質代謝異常、高血圧、糖尿病が4大因子といわれている。さらに最近の知見では、動脈硬化病変の進展に慢性炎症が関与しているとの考えが目玉されている。従来正常範囲と考えられていたCRP値の範囲内であっても比較的高値をしめすものは将来心筋梗塞を発症するリスクが高い。最近では慢性感染症が関与している可能性も報告され、クラミジアニューモニエ、ヘリコバクターピロリ、サイトメガロウイルス、歯周病菌 (*Porphyromonas gingivaris*) などの報告がある。

歯周病菌の *Porphyromonas gingivaris* はジンジバインというプロテアーゼ活性を有し血管内皮細胞に進入する能力を持っているという報告もある。また、慢性炎症が、インスリン抵抗性をひきおこし、糖尿病の進展、高血糖を誘発することが明らかになっている。そこで、口腔内の慢性炎症である歯周疾患が動脈硬化と関連性があるのではないかと考えた。

歯周病は主としてグラム陰性菌によって引き起こされる慢性炎症性疾患である。疫学研究からは単に口腔内の病変にとどまらず全身に影響を及ぼす可能性が示唆されてきた。なかでも、*Porphyromonas gingivaris* (*P. gingivaris*) はジンジバインというシステイン型のプロテアーゼを産生し血管内皮細胞に進入する能力を備えている。実際に、動脈硬化病変である腹部・胸部大動脈瘤組織中から *P. gingivaris* が検出されている。また、血管内皮細胞と *P. gingivaris* あるいはその菌体成分を共培養すると細胞接着分子の上昇、IL (interleukin) - 6、MCP (monocyte chemoattractant protein) - 1 の産生が亢進することが報告されている。大動脈瘤におい

ては、IL-6 が動脈瘤の進展に関与すると示唆されており、血管壁中膜におけるコラーゲン繊維量の変化に関与するMMP (matrix metalloproteinase) が関与していると思われる。

## 2. 研究の目的

従来正常範囲と考えられていたCRP値の範囲内であっても比較的高値をしめすものは将来心筋梗塞を発症するリスクが高い。動脈硬化病変の病理像は慢性炎症であり、CRP自体が動脈硬化の進展に関与している可能性も示唆されている。歯周疾患による慢性炎症が動脈硬化病変の進展に関与している、との仮説を立て、その可能性について検討する。

## 3. 研究の方法

心臓血管外科手術予定患者の術前サイトカイン、口腔内細菌、歯周ポケット細菌を検索する。術前CRP、MMP活性、を測定。

感染性心内膜炎における口腔内細菌の関与 (パイロット調査)

過去の心臓血管外科手術症例のうち口腔内の検索が可能であった症例、感染性心内膜炎の手術症例について retrospective に口腔内病変と動脈硬化病変との検討を行った。

2013年7月より12月までに施行した心臓血管外科手術予定患者の術前サイトカイン、口腔内細菌、歯周ポケット細菌を検索する。術前CRP、MMP活性、を測定。術中検体の培養および病理学的検討した。

## 4. 研究成果

感染性心内膜炎手術症例における口腔内病変細菌の出現頻度；血液は日々、口腔内細菌に暴露されていることが示唆された。

[はじめに] 生活習慣病と歯周病の関係や、口腔内のケアと全身疾患の関心に高い関心が寄せられるようになった。歯周病が心臓

病・動脈疾患や糖尿病のような生活習慣病に影響を及ぼしていることが明らかにされつつある1-4)。歯周病・口腔内病変細菌が直接菌血症に移行し影響するのか、炎症によって産生されたサイトカインが影響しているのか5)あるいはそれ以外の全く異なるメカニズムによる影響なのか、解明されるべき疑問は残る。

【対象および方法】 当院で手術加療した感染性心内膜炎の、口腔内病変の有無、口腔内細菌の培養、血液培養、組織標本の病理学的所見と切除検体培養結果について retrospective に検討した。検討評価可能な31例を対象とした。

【結果】 31例の平均年齢は56.9歳、男性20例、女性11例であった。術前CRP最高値の平均は8.9mg/ml、術前白血球数の平均は8451/mm<sup>3</sup>であった。術前口腔内検査で口腔内病変の有病率は81% (25/31)であった。重症口腔内病変を有する患者は++例で、抜歯等の処置を要したものは++例であった。口腔内病変細菌は Streptococcus 7例、Candida albicans 7例、Prevotella 3例、Staphylococcus 2例、Enterococcus, Klebsiella, Serratia, Bacteroides, Enterobacter がそれぞれ1例ずつ検出された。血液培養では、Streptococcus 17例、Staphylococcus 5例、Enterococcus 3例、Gemella spp. 1例が検出された。抗生剤治療はペニシリンG、広域ペニシリン、あるいは感受性のある抗生剤による治療が行われた。術前抗生剤は平均26.8日施行された。心不全傾向が強い症例6例は緊急あるいは準緊急で手術が施行された。全例弁置換術が施行された。術後血液培養は全例で陰性化した。術死1例(多臓器不全)、病院死1例(肝機能障害)、29例は軽快退院した。遠隔期に3例死亡したがいずれも癌死であった。

切除した病理標本ではグラム陽性球菌8例、グラム陽性桿菌1例、グラム染色不明

の菌集族を4例で認めた。切除した検体(弁組織)の培養では、Staphylococcus 4例、そのうち1例はMRSAであった。Streptococcus 3例、Nisseria 1例が検出された。口腔内細菌と血液培養の菌種が一致したのは4例であった。血液培養の菌種が組織培養または検体標本から検出された症例は10例であった。口腔内細菌-血液培養-検体培養が一致した症例は4例であった。

血液培養と検体培養の一致しない症例は3例であった。異なった2種類の菌種が検体から検出された症例が2例あった。

【考察】 口腔内病変細菌が冠動脈内膜や末梢血管動脈硬化部から検出されたという報告もある6)あるいは口腔内病変部の炎症で産生されたサイトカインなどが標的臓器に影響を及ぼす可能性もある。Humphreyらは、口腔内病変は古典的な危険因子とはべつにそれ自体で冠動脈疾患の危険因子である、と述べている7)また、Nakajimaらは、口腔内病変と冠動脈疾患を関連させる因子としてCRP、tumor necrosis factor (TNF)-、intercellular adhesion molecule (ICAM)-1など炎症性サイトカインや接着分子などの関連を示唆している8)口腔内病変で産生されたサイトカインが血流によってターゲットとなる臓器や血管内膜で障害を及ぼしていると考えている。

今回、31例中4例において口腔内病変細菌と血液培養で検出された菌種が一致した。口腔内病変からの菌血症への移行が示唆された。抜歯、歯周囲外科治療、歯石除去や歯垢クリーニングなどの歯科処置では高頻度で一過性の菌血症が起こることは歯科領域では既によく知られた事である9)キャンディやガムを噛んだだけでも17~51%程度の確率で菌血症が起こるというショッキングな報告もある。口腔内細菌は Streptococcus 7例、Candida albicans 7例、Prevotella 3例、Staphylococcus 2例、Enterococcus,

Klebsiella, Serratia, Bacteroides, Enterobacter がそれぞれ 1 例ずつ検出された。平均 26.8 日の術前抗生剤治療されているため健常者の口腔内細菌の distribution と全く同じとは言い難い。血液培養、切除された検体の培養結果についても同様に抗生剤治療による影響を考慮しなければならない。

血液培養では、Streptococcus 17 例、Staphylococcus, Enterococcus 3 例、Staphylococcus 5 例、Gemella spp. 1 例が検出された。圧倒的に Streptococcus が多かった。口腔内細菌の distribution から推察すると、Streptococcus は口腔内炎症部位で血液中に移行しやすい菌種といえよう。防御機構あるいは毛細血管内皮を侵入する機序が備わっている可能性も否定できない。

切除した病理標本ではグラム陽性球菌 8 例、グラム陽性桿菌 1 例、グラム染色不明の菌集族 4 例を認めた。切除した弁組織の培養では、Staphylococcus 4 例、そのうち 1 例は MRSA であった。Streptococcus 3 例、Nisseria 1 例が検出された。感受性のある抗生剤治療が効果的であれば、菌は死滅するため培養では陰性となることがある。そのような場合、グラム染色で死滅した細菌塊を認めることがある。したがって、検体の培養結果の評価は抗生剤治療による影響がきわめて大きいと考えなければならない。菌が検出されず培養陰性であっても偽陰性の可能性が高い。菌が検出された場合は、その意義は大きい。

口腔内細菌と血液培養の菌が一致したのは 4 例であった。口腔内の細菌種は 200 種以上で、口腔粘膜 1g 乾燥重量あたり 100 億から 1 兆個の細菌が存在していると言われている。したがって、通常状態であっても口腔内には多種類の菌が常に存在していると考えるのが妥当と考えられ、頻回の口腔内培養を行えば血液培養と一致する菌種が検出される確率が高まると予想される。今回の検討で特筆すべ

きことは、血液培養と検体培養の一致しない症例が 3 例あり、切除検体の培養から複数の菌種が検出された症例が 2 例あった点である。術前抗生剤治療が 4 週間前後（平均 26.8 日）施行されていた。つまりこれら 5 症例では、この治療期間のあいだに心筋内膜が少なくとも 2 種類の細菌に暴露された可能性が高いと考えられる。通常、細菌交代現象は口腔内や、腸管内など常在菌が多数存在する臓器で起きうる現象という認識がある。血液は通常は無菌状態と考えられているが、今回の検討では血液が 4 週間の間に 2 種類以上の菌に暴露されていた可能性があるかと推測できる。循環血液は、我々が想像するよりも頻回に細菌に暴露されている可能性が示唆された。Fornerらは、歯科処置あるいは日常行動（Chewing, tooth brushing）の一過性の菌血症について、処置後 30 秒後に菌が検出され 30 分後にはほとんど消失していることを報告している<sup>10</sup>。通常一過性で消失してしまいのであろう。しかし、免疫能が低下している場合や、細菌が補足あるいは固着するような場所が存在するとそこで増殖するのかもしれないが、その過程は不明である。

血流を介して口腔内細菌が末梢血管まで運ばれているということが、日常的に起きているということ強く示唆する所見と考える。血管壁に到達した口腔内細菌が動脈硬化病変にどのようなメカニズムで関与しているのかを解明することが今後の研究課題であろう。

#### 参考文献

- 1) 山崎和久、本田朋之．歯周病が心血管系疾患に及ぼす影響．医学のあゆみ．232（3）176-180．2010
- 2) Dorn BR, Dunn JR WA, Progulske-Fox A. Invasion of human coronary artery cell by periodontal pathogens. Infection and Immunity 67 (11) 5792-5798.1999
- 3) 西村英紀、曾我賢彦．歯周病と糖尿病．医

学のあゆみ . 232 ( 3 ) 167-171 . 2010

4) 和泉雄一、長谷川梢 . 歯周病と早産・低体重児出産 . 医学のあゆみ . 232( 3 )172-175 . 2010

5)Ishihara K, Nabuchi A, Ito R, Miyachi K, Kuramitsu H, Okuda K. Correlation between detection rate of periodontopathic bacterial DNA in carotid artery stenotic plaque and in dental plaque samples. J. Clin. Microbiol. 42.3.1313-1315.2004

6)Roth GA, Moser B, Roth-Walter F, Giacona MB, Harja E, Papapanou PN, Schmidt AM, Lalla E. Infection with a periodontal pathogen increases mononuclear cell adhesion to human aortic endothelial cells. Atherosclerosis 190:271-281,2007

7) Humphrey LL, Fu R, Buckley DI et al: periodontal disease and coronary heart disease incidence: a systematic review and meta-analysis. J Gen Intern Med. 23: 2079-2086,2008

8) Nakajima T, Yamazaki K, : Periodontal disease and risk of atherosclerotic coronary heart disease. Odontology, 97:84-91,2009

9)Durack DT. Prophylaxis of infective endocarditis, Mandel GL, Bennet Je Dolin R, Principal and practice of infectious disease, Charchhill Livingstone, Philadelphia, 200,917-925.

10)Forner L, Larsen T, kilian M, Holmstrup P. incidence of bacteremia after chewing, tooth brushing and scaling in individuals with periodontal inflammation. J Clin Periodontal 33:401-407,2006

動脈瘤に対して慢性炎症と歯周病分類との関係

[はじめに] 動脈硬化病変の進展に慢性炎症が関与しているとの考えが注目されている .

動脈硬化病変の病理像は慢性炎症であり , CRP 自体が動脈硬化病変の進展に關与している可能性も示唆されている . そこで , 歯周病による慢性炎症が動脈硬化病変の一つである動脈瘤との関係を検証した .

[対象と方法] 2013年7月から12月までに手術を施行した動脈瘤症例9例を対象とした . 当院口腔外科の協力により術前に口腔内チェックを施行し , 歯槽骨吸収程度で判定する簡易歯周病分類を用いて歯周病重症度を分類し , 術前のCRP , WBC , IL-6 , MMP9の値との相関を検討した . 統計学的解析は  $p < 0.05$  を有意差とした .

[結果] スペアマン順位相関を用いて歯周病の重症度と WBC には有意な正の相関 ( $r = 0.92$ ) があった . そして , MMP9 と動脈瘤径にも有意な正の相関 ( $r = 0.64$ ) があった . 歯周病の重症度と MMP9 および CRP に正の相関 ( $r = 0.34$ ) が示唆された .

[考察] 歯周病が重症であれば炎症反応も上昇する相関が確認できた . 動脈瘤の大きさと MMP9 には正の相関があり , また , 歯周病の重症度と MMP9 が正の相関が示唆された . このため , 歯周病をより早期に治療することで , 動脈瘤の成長を抑制できる可能性もあると考えられた . 歯周病の重症度と動脈瘤には相関が示唆された .

現在、引き続き動脈瘤と歯周病重症度指数、炎症性サイトカイン、動脈瘤形について詳細に検討中である。

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 2 件 )

1. Shiono N, Fujii T, Katayanagi T, Ozawa T, Kawasaki M, Horie A, Sekiya H, Watanabe Y. Circulatory blood is frequently exposed to periodontal bacteria. Journal of Clinical & Experimental

Cardiology. 4.120.2013 . 査読無

DOI:10.4172/2155-9880S1.0160

2. Shiono N, Fujii T, Kawasaki M, Okuma S, Sasaki Y, Katayanagi T, Masuhara H, Tokuhiko K, Ozawa T, Horie A, Sekiya H, Watanabe Y. Frequency of detection of oral pathogenic bacteria in patients undergoing surgery for infectious endocarditis: Is blood exposed to oral bacteria on daily basis? Journal of Clinical & Experimental Cardiology (an open access journal) 4.245.2013 . 査読有

DOI:10.4172 / 2155-9880.1000254

〔学会発表〕(計 4 件)

1. Katayanagi T, Shiono N, Fujii T, Nunoi Y, Sasaki Y, Okuma S, Sekiya H, Watanabe Y. The reration between the severity of periodontal disease and the aortic aneurysm. 22<sup>nd</sup> Annual Meeting of The Asian Society for Cardiovascular & Thoracic Surgery. Istanbul, Turkey. 2014.4.4  
2 . Shiono N, Fujii T, Katayanagi T, Ozawa T, Kawasaki M, Horie A, Sekiya H, Watanabe Y. Circulatory blood is frequently exposed to periodontal bacteria. 3<sup>rd</sup> International Conference on Clinical & Experimental Cardiology. Chicago, USA, 2013.4.16

3. 塩野則次、原真範、藤井毅郎、大熊新之介、佐々木雄毅、片柳智之、益原大志、小澤司、川崎宗泰、横室浩樹、徳弘圭一、小山信彌、堀江彰久、福井暁子、関谷秀樹、渡邊善則：感染性心内膜炎手術症例における口腔内細菌の出現頻度。第12回日本抗加齢医学会総会。神奈川県横浜市、2012.6.23

4. Shiono N, Fujii T, Katayanagi T, Ozawa T, Kawasaki M, Koyama N, Watanabe Y. : Detection of the periodontopathic bacteria in the blood and

the cardiac tissue among surgical repair case of bacterial endocarditis. 20th Annual Meeting of The Asian Society for Cardiovascular & Thoracic Surgery. Bali, Indonesia, 2012.4.10

〔図書〕 なし (計 件)

〔産業財産権〕 なし  
出願状況(計 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 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕 なし  
ホームページ等

#### 6 . 研究組織

##### (1)研究代表者

塩野 則次 (SHIONO, Noritsugu )  
東邦大学・医学部・准教授  
研究者番号：70235498

##### (2)研究分担者

関谷 秀樹 (SEKIYA, Hideki )  
東邦大学・医学部・准教授  
研究者番号：70267540

渡邊 善則 (WATANABE, Yoshinori )  
東邦大学・医学部・教授  
研究者番号：90210963

片柳 智之 (KATAYANAGI, Tomoyuki )  
東邦大学・医学部・助教  
研究者番号：00385668

##### (3)連携研究者 なし

( )

研究者番号：