

平成 28 年 5 月 16 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462155

研究課題名(和文)大動脈瘤形成における歯周病菌関与の解明

研究課題名(英文)Correlation between periodontal bacteria and progression of aortic aneurysm

研究代表者

齋木 佳克(SAIKI, Yoshikatsu)

東北大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：50372298

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：近年、歯周病を始めとする歯科疾患と心疾患や動脈硬化、糖尿病などの慢性疾患との関与が注目されている。本研究では、歯周病菌による大動脈瘤の発生および進展への直接的関与を証明することを目的に、大動脈瘤壁での生菌(“生きた”歯周病菌)の検出と、その生きた歯周病菌による大動脈瘤形成メカニズムの分子レベルでの解析を行ってきた。

これまでに大動脈瘤手術患者の大動脈サンプルを用いて実験を行ってきた。生菌の検出のため、3週間の嫌気培養のうち16sRNA領域をPCRで検出し菌を同定した。結果、歯周病菌は検出されず、Staphylococcus 属やPropionibacterium acnesが検出された。

研究成果の概要(英文)：This study was designed to elucidate the effect of periodontal bacteria on the progression of aortic aneurysm by inspecting the specimens of aortic aneurysm surgery.

So far, several aortic samples were examined of long-term culturing, followed by qPCR of 16sRNA for the identification of the bacterium. As a result, Staphylococcus spp. and Propionibacterium acnes were detected, although periodontal bacteria were not detected.

研究分野：心臓血管外科学分野

キーワード：大血管外科学 大動脈瘤 歯周病

## 1. 研究開始当初の背景

大動脈瘤は薬物等による高血圧治療を行っても、多くの場合年間に 5~10%拡大するとされている。致命的な大動脈瘤の破裂を予防する最も効果的な治療法は、現時点において外科治療であると言わざるを得ない。しかし、胸部を含む大動脈瘤手術の死亡率は 2~9%、手術による重篤な合併症（脳合併症、対麻痺、呼吸不全など）発生率は 10~15%と言われ、他手術に比べ容易なものではない。これらの治療成績から、今後さらに進行する高齢社会において、大動脈瘤の早期発見・進行予防が、患者の QOL 維持のために非常に重要であると考えられる。

歯周病は嫌気性菌である *Porphyromonas gingivalis* (以下 *P. gingivalis* 菌) を代表とする口腔内細菌による慢性細菌性感染症であり、局所の炎症部位から細菌本体が血流に入り、血小板と結合して全身を循環し、各臓器で炎症を引き起こすとされる。特に心血管系の病気との関連性は深く、抜歯後に生じる感染性心内膜炎を始め、最近では冠動脈の動脈硬化巣や大動脈瘤壁のプラーク内から歯周病菌を検出したという報告があり、虚血性心疾患（狭心症・心筋梗塞）や大動脈瘤形成への歯周病の関与が示唆されている。歯周病菌と大動脈瘤に関する研究としては、歯周病菌を動脈硬化モデルのマウスに静脈注射する *in vivo* 実験において、動脈硬化病変の進展および大動脈プラークの拡大が認められたという報告がある。また、歯周病菌を培養大動脈内皮細胞に感染させた *in vitro* 実験で内皮細胞の活性化により炎症性メディエーター（種々のサイトカイン、ケモカイン、細胞接着分子など）の産生が報告され、また以前より歯周病菌の多くが、大動脈瘤を進展させるとされる MMP (matrix metalloproteinase) 発現を促進

する事も報告されている。これらの研究から、歯周病患者において、歯周病菌が全身を循環し菌血症となると、血管内皮細胞障害のより顕著な動脈硬化性の大動脈に侵入し、そこで炎症性メディエーターや MMP の産生を高め、動脈硬化の増悪、瘤化促進の一因となっていると類推できる。しかし、これまでの研究では、少量の嫌気性歯周病菌の検出は困難で、全て PCR 法による DNA/RNA レベル、すなわち歯周病菌遺伝子の検出にとどまっており、歯周病菌が大動脈瘤壁において生きて存在し、積極的な病態の進展の関与を証明するものではないため、前述の歯周病菌による動脈瘤形成機序は仮定の域を出ない。そこで我々は、東北大学大学院歯学研究科予防歯科学分野において確立されている嫌気培養技術を応用し、大動脈瘤壁から直接歯周病菌の培養検出を試み、大動脈瘤壁に歯周病菌が“生きた”状態で存在することを証明し、大動脈瘤増悪への直接的な関与の証明を目的とした。

## 2. 研究の目的

### “生きた”歯周病菌の検出 (In vitro)

- (1) 大動脈瘤患者の口腔内および大動脈瘤壁内に歯周病の原因菌である *P. gingivalis* 菌が存在することを PCR 法にて確認する。
- (2) *P. gingivalis* 菌が大動脈瘤壁内に“生きた”状態で存在していることを嫌気培養法及び蛍光免疫染色法を用いて検証する。
- (3) *P. gingivalis* 菌が、大動脈瘤壁の特定の部位に多く存在するか（大動脈瘤プラーク、大動脈瘤壁（内膜、中膜、外膜））、その局在を検討する。また、術前口腔内の *P. gingivalis* 菌量および歯周病の重症度と、大動脈瘤壁内 *P. gingivalis* 菌検出量との相関関係を考察する。

### 3. 研究の方法

#### (1) PCR 法によるヒト大動脈瘤壁の歯周病菌の存在の確認

##### サンプル採取法

大動脈瘤に対し予定手術を施行する患者（動脈硬化性、解離性、感染性など原因は問わない）に、本研究の同意を得た上で術前口腔内スクリーニングを行う。歯垢を採取し歯周病菌の存在、及び歯周病の重症度評価を行う。

大動脈瘤手術時に摘出したヒト大動脈瘤壁を標本とし、部位別に大動脈プラーク、大動脈瘤壁（内膜、中膜、外膜）に分け、計4カ所からサンプルを採取する。コントロールは手術時に併せて切除した大動脈の瘤化していない部分とする

##### PCR 法による歯周病菌の検出・解析

歯周病菌としては、嫌気性グラム陰性菌で成人の歯周病の原因菌として代表的な *P. gingivalis* 菌を対象とする。摘出した大動脈瘤壁を無菌状態のまま、homogenize 後 RNA を抽出(High Pure PCR Template Preparation Kit)する。*P. gingivalis* 菌の 16S rRNA を encode するプライマー (Forward: 5'-AGG CAG CTT GCC ATA CTG CG-3'; Reverse: 5'-ACT GTT AGC AAC TAG CGA TGT-3') を使用し、60 で、Light Cycler system を使用し、電気泳動で検出する。摘出した大動脈瘤壁及び相対的健康部大動脈壁の *P. gingivalis* 菌陽性率を算出し、さらに *P. gingivalis* 菌が大動脈プラークに存在するのか、大動脈壁（内膜、中膜、外膜）に存在するのかその局在を調べる。

術前に採取した歯垢に関しても同様の Real-Time PCR (Polymerase Chain Reaction) 法を行い、*P. gingivalis* 菌の検出を行う。

術前歯垢内の *P. gingivalis* 菌及び歯周病の重症度と、大動脈瘤壁内 *P. gingivalis* 菌

検出量との相関関係を考察する。

#### (2) 大動脈瘤壁の嫌気培養と蛍光免疫染色による生きた歯周病菌の証明

##### サンプル採取法

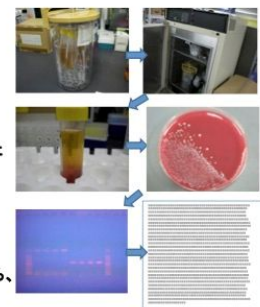
大動脈瘤標本を術野から清潔操作のまま採取し無菌容器に密封し、直ちに嫌気培養に移行する。Real-Time PCR 法で示された、*P. gingivalis* 菌の存在する頻度の高い部位（大動脈プラーク、内膜、中膜、外膜）を手掛かりとして、嫌気培養を行う。標本を清潔に採取できたかどうかは標本の一部に好気性培養を施行することで判定する。

##### 嫌気培養

採取したサンプルは、42 に繫留した液体状の培地(M10 培地)を培養瓶に入れ、ブチルゴム栓で密封し、嫌気状態を作り培養する。組織片のため栄養源は不要である。嫌気状態が作れない場合には酸素吸収・炭酸ガス発生剤を用いたガスパック法で嫌気培養を施行する。培養期間は 10 日間とする。

##### 方法

- ①心臓血管外科手術室にて摘出した動脈瘤片を迅速に液体培地中で嫌気培養を開始する。
- ②最大3週間の長期間培養。
- ③液体培地に濁りが認められたら、細菌の単離を行う。
- ④16SrRNA領域をユニバーサルプライマーを用いてPCR。
- ⑤増幅した断片の塩基配列から、細菌を同定する。



##### “生きた”歯周病菌の検出

嫌気培養後標本を 4%ホルマリンに固定し切片標本とし、抗 *P. gingivalis* 抗体にて蛍光免疫染色を行う。共焦点走査型レーザー顕微鏡を用い増殖した“生きた”*P. gingivalis* 菌を検出する。嫌気培養前の生の大動脈瘤標本に関しても同様に抗 *P. gingivalis* 抗体を用いた“生きた”*P. gingivalis* 菌検出を試みる。

### 4. 研究成果

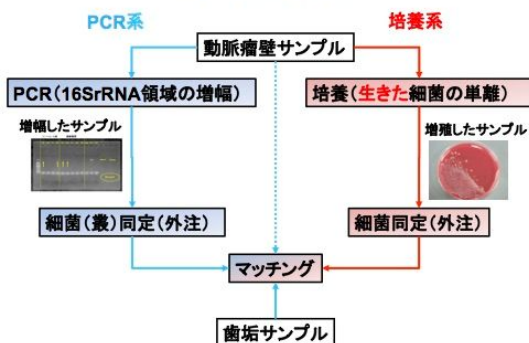
下図の如く、これまでに 13 症例で嫌気培養

を行い、菌の同定に至った。Staphylococcus 属や Propionibacterium acnes が検出された一方で、当初の予測に反して歯周病菌は検出されなかった。これらの検出菌に関しては3週間という長期の培養のため、コンタミネーションの可能性を鑑みて、術直後の摘出検体を培養無しに直接 16sRNA の PCR を行った。この評価系では菌量が少ないため、菌の同定に至ったものは数例のみであったが、これらはいずれも Propionibacterium acnes であり、当初長期培養で検出された acne 菌はやはり有意なものであった可能性が高くなった。

	疾患	菌名
1st	胸部大動脈瘤	<i>Staphylococcus hemolyticus</i>
2nd	胸部大動脈瘤	<i>Propionibacterium acnes</i>
3rd	大動脈瘤乖離	<i>Propionibacterium acnes</i>
4th	大動脈炎症候群	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
5th	弓部大動脈瘤	<i>Staphylococcus sp.</i> <i>Propionibacterium acnes</i>
6th	弓部大動脈瘤	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
7th	弓部大動脈瘤	<i>Acinetobacter baumannii</i>
8th	大動脈弁輪拡張症	<i>Propionibacterium acnes</i>
9th	胸腹部大動脈瘤	<i>Propionibacterium acnes</i>
10th	先天性の大動脈炎	<i>Propionibacterium acnes</i>
11th	胸腹部大動脈瘤(無歯顎)	<i>Propionibacterium acnes</i> 内腔のみ <i>Propionibacterium acnes</i> 内腔と外腔
12th	大動脈弁狭窄症	<i>Propionibacterium acnes</i>
13th	胸腹部大動脈瘤	<i>Propionibacterium acnes</i>

現在、1症例につき長期培養、および培養無し PCR の2系統で菌同定・マッチングを行う方法で症例を集め始めたところである。すなわち、生菌の存在とその妥当性を評価し、また術前に収集した歯垢サンプルと比較する事で大動脈瘤と口腔内疾患との関連性についても、解析を進めている。

### 実験の流れ



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 0 件)

[学会発表](計 0 件)

[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

齋木佳克 (Yoshikatsu Saiki)  
東北大学・医学系研究科・教授  
研究者番号：50372298

#### (2) 研究分担者

川本俊輔 (Shunsuke Kawamoto)  
東北大学・医学系研究科・准教授  
研究者番号：20400244

本吉直孝 (Naotaka Motoyoshi)  
東北大学・医学系研究科・非常勤講師  
研究者番号：40375093

細川亮一 (Ryoichi Hosokawa)  
東北大学・歯学研究科・講師  
研究者番号：40547254

小関健由 (Takeyoshi Koseki)  
東北大学・歯学研究科・教授  
研究者番号：80291128

#### (3) 研究協力者

細山勝寛 (Katsuhiro Hosoyama)  
東北大学・医学系研究科