

動脈疾患における新しい危険因子 - 歯周病菌と動脈病変の関連性について -

栗原 伸久¹ 井上 芳徳¹ 岩井 武尚¹
梅田 誠² 黄 怡² 石川 烈²

要 旨: 血管疾患, 特に腹部大動脈瘤(AAA群, $n=31$)と閉塞性動脈硬化症(ASO群, $n=34$)患者に対して歯周病の有無と病変動脈に対しpolymerase chain reaction法を施行し歯周病菌DNAの有無とその局在性について研究した。両疾患群とも歯周病を有し, とりわけ重症例が多かった。また, 病変動脈から高率に歯周病菌DNAが検出された。また, 歯周病菌DNAはAAA群で全層に認められたのに対しASO群では内中膜にのみ認められ, その局在性に差異を認めた。口腔内慢性感染症である歯周病が血管疾患の形成, 進展に寄与している可能性が示唆された。

(J Jpn Coll Angiol, 2004, 44: 781-786)

Key words: periodontitis, abdominal aortic aneurysm, arteriosclerosis obliterans, periodontopathic bacterial localization

序 言

近年わが国において腹部大動脈瘤(AAA)や閉塞性動脈硬化症(ASO)が増加してきており, その原因を十分に検索することは疾患に対する予防, 有効な治療へとつながりうる。しかしながら, 年齢, 性別, 高血圧(HT), 糖尿病(DM), 高脂血症(HL), 喫煙などの危険因子では十分に説明できず, その他の病因が関与している可能性が指摘されている。1992年以降, *Chlamydia pneumoniae*(*C. pneumoniae*), 歯周病菌をはじめとした全身慢性感染症の病原体が種々の方法(polymerase chain reaction(PCR)法, 免疫染色, 電子顕微鏡など)で病変部動脈検体から検出されるようになってきた。その中で特に歯周病はわが国では他の先進諸国に比べいまだその有病率が高いことより, 今回AAA, ASO手術症例を対象に, 口腔内観察による歯周病の有無とその程度, 病変動脈壁, 血栓に歯周病菌が存在するか否か, さらに 病変血管を内中膜, 外膜に分け歯周病菌の分布に局在性があるか否かを検討した。

¹東京医科歯科大学医歯学総合研究科血管外科

²東京医科歯科大学医歯学総合研究科生体硬組織再生学講座
歯周病学分野

対象と方法

対象は当科で手術を施行した動脈疾患症例65例である。内訳はAAA(AAA群)31例, ASO(ASO群)34例であった。年齢はAAA群71.8歳(52 ~ 80歳), ASO群68.3歳(52 ~ 88歳)であり, 性別はAAA群では男性23例: 女性8例, ASO群では男性28例: 女性6例であった。血管病変は血管撮影, 血管超音波検査, computed tomography(CT)検査で評価した。AAAは最大径4.5cm以上を手術対象とし, 他の急性感染と炎症の影響を除くために, 炎症性動脈瘤, 感染性動脈瘤を除外した。ASO群では潰瘍症例を除外し, FontaineII度, III度の症例を対象とした。

(1)危険因子

年齢, 性別, HT, DM, HL, 喫煙の有無を評価した。HTは, 降圧剤による治療中もしくは収縮期血圧140mmHgもしくは拡張期血圧90mmHgと定義した。DMは, インスリンや血糖降下剤などの糖尿病治療中もしくは空腹時血糖126mg/dlもしくはヘモグロビンA1c値6.5%と定義した。HLは, 高脂血症治療薬内服

2004年3月30日受付 2004年7月30日受理

治療中もしくはコレステロール値 220mg/dlもしくは中性脂肪値 140mg/dlとした。

(2) 歯周病の有無と程度

当院歯周病科を受診し、歯周病専門の歯科医師により歯周病の重症度を歯周ポケットの深さで4段階(重症者:すべての歯周ポケット5mm以上, 中等者:すべての歯周ポケットが2mmより大きくかつ5mm未満, 健常者:すべての歯周ポケットが2mm以下, 無歯顎)に分類した。

(3) 歯周病菌の検索

歯周病菌の検索方法として、今回PCR法を用いて検索した。目的菌種は現在までにわが国で多く認められている7種類の歯周病菌である*Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*), *Treponema denticola* (*T. denticola*), *Tannerella forsythensis* (*T. forsythensis*), *Campylobacter rectus* (*C. rectus*), *Actinobacillus actinomycetemcomitans* (*A. actinomycetemcomitans*), *Prevotella intermedia* (*P. intermedia*), *Prevotella nigrescens* (*P. nigrescens*) に関して検索した。手術中に得られた検体(動脈壁および血栓)を-80°Cに急速冷凍し、分析前に37°Cに加温し検索した。動脈検体を均一化した後、Ashimoto¹⁾らの方法を

参考に細菌の特異的な部位である16S rDNA遺伝子を標的としたプライマーを用い、歯周病菌のDNAをHigh Pure PCR Template Preparation Kit[®](ロッッシュ社製, マンハイム, ドイツ)を用いて検出した。また壁肥厚や硬化性変化がほとんど認められなかった動脈壁10カ所をコントロールとして検討した。

(4) 局在性

血栓内膜摘除術の手技を用いて病変壁を内中膜、外膜の2層に分け、歯周病菌の病変動脈壁内の分布に局在性が認められるか否かをPCR法で調べた。

成 績

(1) 危険因子(Table 1)

HTはAAA群52%, ASO群35%。DMIはAAA群19%, ASO群41%。HLはAAA群39%, ASO群21%。喫煙はAAA群87%, ASO群82%であった。HTはAAA群がASO群と比較して、DMIはASO群がAAA群と比較して有意に高率であった。また喫煙は両群間に有意差はなく、ともに高率であった。

(2) 歯周病の有無, 程度(Table 1)

AAA群は31例全例(100%)に、ASO群では34例中33例

Table 1 Characteristics of patients and grades of periodontal disease in 31 patients (mean age, 71.8 years) with abdominal aortic aneurysm and 34 patients (mean age, 68.3 years) with arteriosclerosis obliterans*

Characteristic	Abdominal aortic aneurysm	Arteriosclerosis obliterans
Sex: M/F	23/8	28/6
Risk factors for vascular disease		
Hypertension	16 (52)	12 (35)
Diabetes mellitus	6 (19)	14 (41)
Hyperlipidemia	12 (39)	7 (21)
Smoking	27 (87)	28 (82)
Past	19 (61)	21 (62)
Current	8 (26)	7 (21)
Grade of periodontal disease		
Healthy	0	1 (3)
Moderate periodontitis	7 (23)	7 (21)
Severe periodontitis	20 (65)	21 (62)
Edentulous	4 (12)	5 (15)

*Values are number (%) of patients. Healthy; attachment loss ≤ 2 mm, moderate periodontitis; attachment loss > 2 mm but < 5 mm, severe periodontitis; attachment loss ≥ 5 mm

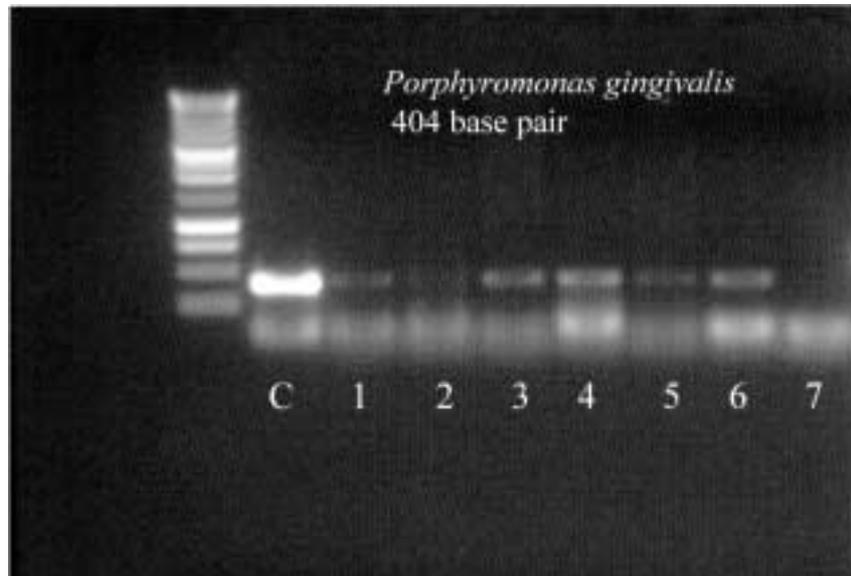


Figure 1 Polymerase chain reaction assay with amplified bands of periodontal bacteria-specific 16S ribosomal RNA for *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*). Lanes 1 to 7 represent results with a specimen of surgically excised diseased arterial wall from a patient with abdominal aortic aneurysm. Lane C is the positive control. Positive bands are present in lanes 1 to 6 for *P. gingivalis*.

Table 2 Presence of periodontal bacteria in arterial atherosclerotic, aneurysmal wall and mural thrombus*

Types of bacteria	Specimens		
	Aneurysmal wall (n=31)	Atherosclerotic wall (n=34)	Mural thrombus (n=16)
All bacteria studied	26 (84)	17 (50)	14 (88)
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	23 (74)	13 (38)	12 (75)
<i>Treponema denticola</i>	17 (55)	12 (35)	5 (31)
<i>Campylobacter rectus</i>	6 (19)	5 (15)	2 (13)
<i>Prevotella intermedia</i>	8 (26)	5 (15)	3 (19)
<i>Tannerella forsythensis</i>	5 (16)	0	0
<i>Prevotella nigrescens</i>	3 (10)	0	0
<i>Actinobacillus actinomycetemcomitans</i>	1 (3)	0	0

*Values are number (%) of specimens. Bacteria were detected by polymerase chain reaction assay.

(97%)に歯周病を認め、かつ歯周ポケット5mm以上の重症例がAAA群65%、ASO群62%と高率に認められた。

(3) 歯周病原因菌の検索

歯周病菌DNAに関してAAA群(大動脈瘤壁: 31例, 壁在血栓16例), ASO群(動脈硬化壁: 34例)の検体を

PCR法にて検索し, AAA群大動脈瘤壁26例(84%), AAA群壁在血栓14例(88%), ASO群動脈硬化壁17例(50%)に, 1種類以上の歯周病菌を認めた(Fig. 1, Table 2)。さらに, ASO群での検体採取部位(吻合部, 主病変)での陽性率を調べてみると, 吻合部28例, 主病変6例であり, それらの陽性率をみてみると吻合部12/28例

(43%), 主病変5/6例(83%)と主病変で陽性率が高い傾向であった。歯周病菌種別では(重複例を含む) *P. gingivalis*と*T. denticola*が高頻度で検出された。コントロール($n=10$)検体では歯周病菌DNAをまったく検出できなかった。

(4)局在性(Table 3)

局在性に関しては, AAA群では全例で歯周病菌DNAが中膜および外膜ともに認められた。一方, ASO群では5例中3例に歯周病菌DNAが中膜のみに認められ, 全例とも外膜には認められなかった。AAA群とASO群の間で歯周病菌DNAの局在性が異なる傾向が認められた。

考 察

慢性感染症と動脈硬化症に関しては, 動脈硬化は幼少時から始まり, さらに感染症で死亡した小児は外傷で死亡した小児に比べて動脈硬化性変化が進行していたとの報告もあり²⁾, 感染と動脈硬化症の関連性が示唆される。特異的感染症と血管疾患に関して, 特に*C. pneumoniae*の報告が数多くなされているが^{3,4)}, 歯周病菌とAAAやASOとの関連についての詳細な報告は少ない。歯周病有病率はわが国では他の先進諸国に比べて高く, 口腔内細菌である歯周病菌は抜歯後だけでなく, 日常生活の咀嚼, 歯磨きの際にも血中へ移行すると言われている。血管内皮細胞はグラム陰性菌をはじ

めとする慢性的な菌血症にさらされている。また歯周病と末梢血管疾患との関係について, Mendez⁵⁾らが動脈疾患の危険因子と歯周病を対象として多変量解析を用いて歯周病が他の危険因子と同等に末梢血管疾患の独立した危険因子となりうると報告している。今回, われわれが検討した症例でも, ASOの1例を除く全例に歯周病を認め, わが国の2001年厚生白書での同世代の有病率82.5%に比べ高く, さらに歯周ポケットが5mm以上の重症歯周病患者がAAA群, ASO群ともに高率であり, 歯周病が血管疾患に寄与している可能性が示唆された。しかし, 最近歯周病の危険因子として喫煙の存在が論じられるようになり, 歯周病が血管疾患の独立した危険因子となりうるかは今後の検討が必要であろう。

動脈病変における歯周病菌の検出法に関して, これまでに免疫染色法とPCR法による報告がある。免疫染色法に関しては, Chiu⁶⁾らが頸動脈内膜摘除術(carotid endarterectomy: CEA)による検体で*P. gingivalis*をポリクローナル抗体により同定している。しかし, ポリクローナル抗体による検出法は他の類似抗原を有する構造物との交差性の問題がある。一方, モノクローナル法による報告は現在までにはなく, 今後の研究が必要と思われる。また, 歯周病菌のDNA検出に関しては, Haraszthy⁷⁾らがCEAで得られた検体を検討し, 高率に検出されたと報告した。今回, 動脈検体をPCR法で検討したところ動脈硬化性病変のみならず, 大動脈瘤壁

Table 3 Localization of periodontal bacteria in arterial wall in arteriosclerosis obliterans and abdominal aortic aneurysm*

Types of bacteria	Aneurysmal wall ($n=5$)		Atherosclerotic wall ($n=5$)	
	Intimal/ medial layer	Adventitial layer	Intimal/ medial layer	Adventitial layer
All bacteria studied	5	5	3	0
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	5	4	3	0
<i>Treponema denticola</i>	5	4	2	0
<i>Campylobacter rectus</i>	3	2	1	0
<i>Prevotella intermedia</i>	0	0	0	0
<i>Tannerella forsythensis</i>	0	0	0	0
<i>Prevotella nigrescens</i>	0	0	0	0
<i>Actinobacillus actinomycetemcomitans</i>	0	0	0	0

*Values are number of specimens. Bacteria were detected by polymerase chain reaction assay; localization within the arterial wall was done with use of thromboendarterectomy.

や壁在血栓のいずれの検体からも高頻度に歯周病菌のDNAが検出された。一方ではコントロール動脈には検出されなかった。コントロール動脈を有する患者も歯周病を有していたことから、動脈硬化性病変の初期段階から影響するのではなく、内皮障害を有する血管に対し作用し病変の進行を促進していく可能性が示唆された。また疾患別でみると、AAA群の検体に比べてASO群検体での検出率は低い傾向にあった。これは大動脈瘤形成がより強く歯周病菌と関わっているか、ASO群では主病変での歯周病菌陽性率が高く、吻合部は動脈硬化病変がより軽度であり、歯周病菌が内皮障害のある部位で影響を及ぼし、動脈疾患形成を促進していく可能性も示唆された。

今回、歯周病原因菌の中で特に*P. gingivalis*が高頻度で検出された。*P. gingivalis*の特徴は、細胞表面に線毛を有しているため、血管内皮細胞への付着と侵入⁸⁾や血栓形成性⁹⁾を有していることである。また、アポプロテインE欠損マウスでの*P. gingivalis*感染により動脈硬化性変化がより進行する¹⁰⁾。さらに歯周組織においては細胞間の結合を破壊していく特徴があり¹¹⁾、これは特にAAAにおける細胞間質の変性に類似しており、今後さらに検討する必要がある。いずれにせよ、歯周病菌、特に*P. gingivalis*と動脈疾患との間には、血液中に存在する歯周病菌が血管内皮に付着、侵入し動脈病変を起こすか、もしくは、すでに硬化性変化を認める病変部位に作用し局所の炎症を誘起し動脈病変を進行させる可能性などが推測される。

局在性を検討してみると、AAA群では歯周病DNAが全層性に認められたのに対して、ASO群では内中膜側のみであった。このことは歯周病菌の侵入経路が少なくとも血管内腔側からであり、*vasa vasorum*ではないことが示唆された。特に動脈瘤では一般に中膜の変性が強く外膜へ進展しやすいことが示唆された。

いまだ未知数のところが多いが、動脈病変部から口腔内局所感染症の病因である歯周病菌DNAが全身のさまざまな部位の末梢血管と腹部大動脈から多種かつ高頻度で検出できたことは歯周病が何らかのかたちで動脈疾患に関わり、影響を及ぼしている可能性は高い。今後はPCR法の定量化に加えて、免疫染色、嫌気培養方法にて歯周病菌の菌量、生菌の有無などを検索する必要がある。

結 論

動脈瘤、閉塞性動脈硬化症65例について、動脈壁、血栓と歯周病菌の関連を検討した。その結果、対象患者のほとんどが歯周病を有し、かつ重症であった。PCR法により検討したところ動脈病変から高頻度で歯周病原菌のDNAが認められた。歯周病は動脈疾患の一危険因子である可能性が示唆された。

文 献

- 1) Ashimoto A, Chen C, Bakker I et al: Polymerase chain reaction detection of 8 putative periodontal pathogens in subgingival plaque of gingivitis and advanced periodontitis lesions. *Oral Microbiol Immunol*, 1996, **11**: 266–273.
- 2) Kaprio J, Norio R, Pesonen E et al: Intimal thickening of the coronary arteries in infants in relation to family history of coronary artery disease. *Circulation*, 1993, **87**: 1960–1968.
- 3) Rasmussen M, Cazzavillan S, Scagnelli M et al: Demonstration of *Chlamydia pneumoniae* in atherosclerotic arteries from various vascular regions. *Atherosclerosis*, 2001, **158**: 73–79.
- 4) Karlsson L, Gnarp J, Naas J et al: Detection of viable *Chlamydia pneumoniae* in abdominal aortic aneurysms. *Eur J Vasc Endovasc Surg*, 2000, **19**: 630–635.
- 5) Mendez MV, Scott T, LaMorte W et al: An association between periodontal disease and peripheral vascular disease. *Am J Surg*, 1998, **176**: 153–157.
- 6) Chiu B: Multiple infections in carotid atherosclerotic plaques. *Am Heart J*, 1999, **138**: S534–S536.
- 7) Haraszthy VI, Zambon JJ, Trevisan M et al: Identification of periodontal pathogens in atheromatous plaque. *J Periodontol*, 2000, **71**: 1554–1560.
- 8) Dorn BR, Dunn WA Jr, Progulske-Fox A: Invasion of human coronary artery cells by periodontal pathogens. *Infect Immun*, 1999, **67**: 5792–5798.
- 9) Imamura T, Banbura A, Pereira PJ et al: Activation of human prothrombin by arginine-specific cysteine proteinases (Gingipains R) from *Porphyromonas gingivalis*. *J Biol Chem*, 2001, **276**: 18984–18991.
- 10) Li L, Messas E, Batista EL Jr et al: *Porphyromonas gingivalis* infection accelerates the progression of atherosclerosis in a heterozygous apolipoprotein E-deficient murine model. *Circulation*, 2002, **105**: 861–867.
- 11) Katz J, Sambandam V, Wu JH et al: Characterization of *Porphyromonas gingivalis*-induced degradation of epithelial cell junctional complexes. *Infect Immun*, 2000, **68**: 1441–1449.

Identification and Different Localization of Periodontopathic Bacteria in Arterial Disease

Nobuhisa Kurihara,¹ Yoshinori Inoue,¹ Takehisa Iwai,¹ Makoto Umeda,² Yi Huang,² and Isao Ishikawa²

Departments of ¹Vascular and Applied Surgery, and ²Periodontology, Department of Hard Tissue Engineering,
Tokyo Medical and Dental University Graduate School, Tokyo, Japan

Key words: periodontitis, abdominal aortic aneurysm, arteriosclerosis obliterans, periodontopathic bacterial localization

Periodontal disease has revealed its association with cardiovascular atherosclerotic lesions. Patients were divided into two vascular groups, 31 abdominal aortic aneurysm (AAA) and 34 arteriosclerosis obliterans (ASO) and classified in four grades by the depth of attachment loss of the teeth (healthy, moderate, severe and edentulous). The diseased artery samples, the mural thrombus, and control specimen were examined for seven putative periodontopathic bacteria using polymerase chain reaction. The localization of periodontal bacteria was evaluated using dissecting technique into the intimal/medial layer and the adventitial layer. Most patients had severe periodontal disease. 84% of arterial lesions were positive in the AAA group and 50% in the ASO group in one or more of the seven bacteria. The bacteria were recognized only at the intimal/medial layer of atherosclerotic wall and in the whole layers of the aneurysmal wall. The result may explain that these bacteria play an active role in the progression of arterial lesions.

(J Jpn Coll Angiol, 2004, **44**: 781–786)