歯周病菌の静脈内投与による血管病変動物モデルの検討

猪狩 公宏¹ 井上 芳徳¹ 寺崎 宏明² 岩井 武尚²

●要 約：【背景】*Porphyromonas gingivalis* (Pg)や *Treponema denticola* (Td)などの歯周病菌と末梢血管疾患の関連性が指摘されており，静脈内に直接口腔内細菌を注入し，反応がおこるかを観察した．【材料と方法】ビーグル犬の静脈内に口腔内細菌としてPg菌，Td菌を注入し，その後静脈および血液を採取し，光学顕微鏡による病理学的検査とPCR法を用いた菌の検出を試みた．【結果】血液からはPCR法で菌を検出できず，またTd菌を投与した静脈からは菌を検出できなかったものの，Pg菌を投与した静脈からは菌を検出できた．病理学的検査では，Td菌，Pg菌ともに，濃度依存性に静脈内および周囲に炎症性変化を確認することができた．【結語】静脈に選択的に口腔内細菌を投与することで，これまで論じられている歯周病と末梢血管疾患を含めた全身疾患との関連を直接的に実験，観察しうる可能性がある．

●索引用語：口腔内細菌，末梢血管疾患，歯周病

静脈学 2015；26(1)：41-46

はじめに

口腔内感染，歯周病と数々の全身疾患の関連性に関しては，これまで多くの報告がなされている¹⁾．とくに心血管疾患と歯周病の関連に関しては報告が多数あり，冠動脈疾患においては冠動脈内粥状病変から²⁾，大動脈瘤では瘤壁や瘤内血栓から^{3,4)}，さらにはBuerger病においては閉塞した血管から⁵⁾，閉塞性動脈硬化症においても閉塞した血管壁から⁶⁾，歯周病の原因菌であるいわゆる歯周病菌が検出されてきた．これらの病態は歯周病菌が口腔内から菌血症状態となることで体循環に入り，菌が直接的に標的

組織を傷害したり，菌に由来するリポ多糖(lipopolysaccharide; LPS)や各種炎症性メディエーターを介して標的組織を傷害するとされている^{7,8)}．しかしながら，歯周病菌の直接的な標的組織の傷害に関しては仮説にとどまっており⁹⁾，実際に歯周病菌が標的組織，具体的には血管内に投与された際に起こる反応に関してはいまだ不明である．

今回われわれは，これまで仮説とされてきた歯周病菌が血管内において直接的な反応を起こすのか，歯周病菌の標的組織障害モデルを作製し，その反応を検証することを目的とした．

対象と方法

実験には生後3年齢のビーグル犬(雄，約8kg)を用いた．当科での閉塞性動脈硬化症症例において，動脈壁から検出された歯周病菌として多かった菌種が[§]*Porphyromonas gingivalis* (Pg)，*Treponema denticola*

1 東京医科歯科大学血管外科

2 つくば血管センター

受付：2014年8月18日 受理：2014年11月25日

doi: 10.7134/phlebol.14-19

Fig. 1 The experimental image of bacteria inoculations. We injected the oral bacteria through each 3 leg veins, with different dose of bacteria, and 1 for control with normal saline.

Pg, *Porphyromonas gingivalis*; *Td*, *Treponema denticola*; CFU, colony forming unit

(*Td*)であったことから⁶⁾、実験に際しては口腔内細菌として単離培養された *Pg* 菌および *Td* 菌を投与することとした。全身麻酔下にビーグル犬の四肢の静脈を露出し、中枢および末梢で静脈を確保の後結紮し、1匹には濃度の異なる *Pg* 菌(3.63×10^7 CFU(colony forming unit)/ml, 2.90×10^8 CFU/ml, 3.63×10^9 CFU/ml)およびコントロールとして生理食塩水を、もう1匹にも同様に濃度の異なる *Td* 菌(1.88×10^6 CFU/ml, 1.88×10^8 CFU/ml, 1.88×10^9 CFU/ml)およびコントロールとして生理食塩水を 23G の針を用いて、1 ml ずつを結紮した静脈内に注入した(**Fig. 1**)。

注入後、*Td* 菌投与群では2週間後に、*Pg* 菌投与群では4週間後に、それぞれ口腔内細菌を注入した静脈および循環血液を採取した(**Fig. 2**)。 *Pg* 菌投与群の採取を4週間としたのは、当科で以前、ラットにおいての実験で *Pg* 菌を投与した際に、2週間後より4週間後で、より血管内の変化が顕著であったためである¹⁰⁾。採取した血液および静脈は、High Pure PCR template Preparation Kit(ロッシュ社製、ドイツ)を用いたポリメラーゼ連鎖(polymerase chain reaction;

PCR)法にてそれぞれの菌種のデオキシリボ核酸(deoxyribonucleic acid; DNA)の検出を行い⁴⁾、さらに静脈は hematoxylin-eosin(HE)染色での光学顕微鏡による病理組織学的観察を行った。静脈の炎症の程度は、静脈壁の1/3周性以内に炎症細胞浸潤が起こる：軽度(Mild)、1/3から2/3周性に炎症細胞浸潤が起こる：中等度(Moderate)、2/3周性以上に炎症細胞浸潤が起こる：重度(Severe)と定義した。

結 果

口腔内細菌を注入した静脈の採取に際して、生理食塩水を注入したコントロール肢では容易に採取が可能であったが、口腔内細菌を注入した肢の採取に際しては周囲との炎症性変化が強く、採取に難渋した。

Td 菌を投与したビーグル犬では、コントロールを含めいずれの肢でも静脈から PCR 法にて菌を検出することはできなかった。さらに採取した血液からも PCR 法にて菌を検出することはできなかった。 *Pg* 菌を投与したビーグル犬では、採取した血液からは

Fig. 2 The experimental image of harvesting. Leg vein (a) and blood samples (b) were collected two or four weeks after injection. The leg vein was examined microscopically, and the cultured according to the polymerase chain reaction method to detect bacterial deoxyribonucleic acid (DNA). We also cultured blood sample for DNA detection.

Table 1 The inoculations of bacteria and the results of the detection of DNA and microscopic findings

No.	Location of leg	Bacteria, Concentration (CFU/ml)	Detection of DNA by PCR		Microscopic reactions
			Blood	Leg vein	
1-1	U, Rt	Normal saline, Control	–	–	–
1-2	U, Lt	<i>Td</i> , 1.88×10^6	–	–	mild
1-3	L, Rt	<i>Td</i> , 1.88×10^8	–	–	mild
1-4	L, Lt	<i>Td</i> , 1.88×10^9	–	–	moderate
2-1	U, Rt	Normal saline, Control	–	–	–
2-2	U, Lt	<i>Pg</i> , 3.63×10^7	–	+	moderate
2-3	L, Rt	<i>Pg</i> , 2.90×10^8	–	+	moderate
2-4	L, Lt	<i>Pg</i> , 3.63×10^9	–	+	severe

DNA, deoxyribonucleic acid; PCR, polymerase chain reaction; U, upper; L, lower; Rt, right; Lt, left; CFU, colony forming unit; *Pg*, *Porphyromonas gingivalis*; *Td*, *Treponema denticola*

PCR 法にて菌を検出しなかったが、肢静脈に関しては、コントロールである生理食塩水を注入した静脈からは PCR 法にて菌を検出しなかったものの、*Pg* 菌を注入した静脈からは PCR 法にて菌を検出し得た (Table 1)。

さらに HE 染色では、いずれの菌種においても生理食塩水を注入した静脈には炎症性の変化を認めなかったものの、口腔内細菌を注入した静脈には炎症性の変化を認めた。これは投与した菌の濃度依存性に反応が強く、歯周病菌感染に伴う炎症性変化が示

唆された。血管壁、とくに内膜は肥厚しており、さらに静脈内腔に一部ヘモジデリンの沈着を伴う血栓の形成を認めた (Fig. 3)。

考 察

末梢血管疾患に対する歯周病の関与に関してはこれまでも多くの報告がなされている。閉塞性動脈硬化症に関しては疫学的調査により、高血圧症や脂質異常症と同等で、相対危険率は 1.77 とされている¹¹⁾。一方で閉塞性動脈硬化症とならび、末梢動脈

Fig. 3 The microscopic findings of leg vein with injection of *Porphyromonas gingivalis* solutions.

a: The intima (black bar), media and adventitia (white bar) are thick due to inflammatory reactions, and perivascular tissue are changed to fibrosis (hematoxylin-eosin stain $\times 20$).

b: In the lumen of injected leg vein, organized thrombi with hemosiderin (white arrow) are recognized, and the interruption of smooth muscle cell (black arrow) occurs just at the injection site (hematoxylin-eosin stain $\times 40$).

疾患として体表的疾患である Buerger 病に関しては疫学的調査は乏しいものの、両疾患において数々の検討がなされている。閉塞性動脈硬化症においては、粥状硬化巣に菌周病菌が共凝集し、菌が血管内皮細胞に付着し、第 X 凝固因子を活性化して血栓傾向を生じ、さらには菌表面の Hgp44 という接着因子が IgG を介し血小板の Fc γ RIIa と血小板凝集を惹起する、といった機序が報告されている¹²⁾。すなわち、閉塞性動脈硬化症においては、まず粥腫形成などの内膜傷害が先行し、これに菌周病菌が介在することで病態を形成することになるが、これは動物実験でも同様の報告がある。Zhang ら¹³⁾は、バルーンを用いて動脈内膜に傷害を起こしたラビットに *Pg* 菌を投与することで、*Pg* 菌非投与群に比べて有意に内膜肥厚が起こったと報告している。Buerger 病においては、一般的に内膜に粥状硬化性変化をもたず、動脈の膜構造が比較的保たれるのが特徴であることから、菌周病菌による血栓形成が病態形成に関与する可能性が示されている⁵⁾。当科で以前、*Pg* 菌と血液成分を白血球成分と血小板成分とに分けて混和実験を行ったところ、*Pg* 菌は白血球には比較的容易に貪食されるものの、血小板においては、まず血小板の表面に付着し、血小板内の空胞内に取り込まれ、さらに *Pg* 菌の血小板への付着、取り込みが増加した。よって *Pg* 菌が血小板の活性化と凝集を引き起

こし、血栓形成を起こしうることをしめすことができた¹⁴⁾。これはラットを用いた実験でも証明されている。ラットの頸静脈に持続的に *Pg* 菌を注入できるように皮下ポンプを埋め込み、2 週間持続注入後から 2 ないし 4 週間後の肢動脈における *Pg* 菌の DNA の検出および肢動脈の病理組織学的検索を行うと、PCR による *Pg* 菌 DNA の検出および動脈壁構造が保たれた状態での動脈内の血栓形成を確認することができた¹⁰⁾。

本実験でも、先の実験のごとく血管内に菌周病菌を投与することによる、血管との反応を観察した。本実験においても菌周病菌は通常の培養方法では同定することが困難であることから¹⁵⁾、これまでの研究と同様に PCR 法による菌の検出を行った^{16, 17)}。今回の実験がこれまでと異なる点としては、これまで菌周病菌が体循環を介して標的血管に到達するために、観察された反応が菌周病菌の血管壁への直接の作用なのか、もしくは体循環を介することで、各種炎症性メディエーターを介した全身の反応が関与しているのか、それを明確に区別することができなかった。よって、本実験では体循環を介さない反応をみるために、菌周病菌を注入する血管を中枢および末梢で結紮し、体循環から隔離した状態で、菌周病菌の血管への直接的反応を観察した。これにより病理組織学的に静脈内に形成された血栓を観察する

ことができ、また歯周病菌により血管内膜の肥厚が起ることを確認することができた。

さらに本研究では、*Pg* 菌と *Td* 菌の検出および反応に差がみられたことは興味深い。まず菌の検出に関しては、動脈硬化性疾患においては *Pg* 菌の検出率が高いとされているが⁴⁾、Buerger 病においては *Td* 菌の検出率が高いとされている⁵⁾。疾患によっても歯周病菌の検出率に関しては差があり、また採取した組織によっても検出率が異なることから、本研究での歯周病菌の検出率が異なると考えることができる。また *Td* 菌よりも *Pg* 菌においてより強い反応が認められた点に関しては、まず菌の検出率が関与している可能性がある。*Td* 菌は検出できなかった一方で、*Pg* 菌の検出率が高かったことから、*Pg* 菌はより長時間、静脈と反応を起こしていた可能性が考えられる。また *Pg* 菌の血小板との反応が *Td* 菌に比べて強いことも¹⁴⁾、本研究での菌種による反応の差が起こったことと関連があると考えられる。

結 論

今回われわれは、ビーグル犬を用いて静脈内に歯周病菌を直接投与することで、これまでに仮説として考えられていた、歯周病菌と血管との直接的反応を観察することができた。今後はこの実験をもとに、組織に選択的に歯周病菌を投与、注入する工夫をすることで、これまでに仮説として考えられている、血管以外の、歯周病菌と関連があるとされている諸臓器との直接的な反応を観察し、歯周病菌と全身疾患との関連性を解明する一助となりうると考える。

利益相反

著者全員に開示すべき利益相反はありません。

文 献

- 1) Seymour GJ, Ford PJ, Cullinan MP, et al: Relationship between periodontal infections and systemic disease. *Clin Microbiol Infect* 2007; **13** (Suppl 4): 3–10
- 2) Ishihara K, Nabuchi A, Ito R, et al: Correlation between detection rates of periodontopathic bacterial DNA in coronary stenotic artery plaque and in dental plaque samples. *J Clin Microbiol* 2004; **42**: 1313–1315
- 3) Nakano K, Nemoto H, Nomura R, et al: Detection of oral bacteria in cardiovascular specimens. *Oral Microbiol Immunol* 2009; **24**: 64–68
- 4) Kurihara N, Inoue Y, Iwai T, et al: Detection and localization of periodontopathic bacteria in abdominal aortic aneurysms. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2004; **28**: 553–558
- 5) Iwai T, Inoue Y, Umeda M, et al: Oral bacteria in the occluded arteries of patients with Buerger disease. *J Vasc Surg* 2005; **42**: 107–115
- 6) Chen YW, Umeda M, Nagasawa T, et al: Periodontitis may increase the risk of peripheral arterial disease. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2008; **35**: 153–158
- 7) Chen YW, Nagasawa T, Wara-Aswapati N, et al: Association between periodontitis and anti-cardiolipin antibodies in Buerger disease. *J Clin Periodontol* 2009; **36**: 830–835
- 8) Chen YW, Iwai T, Umeda M, et al: Elevated IgG titers to periodontal pathogens related to Buerger disease. *Int J Cardiol* 2007; **122**: 79–81
- 9) Iwai T, Umeda M, Inoue Y: Are there any objections against our hypothesis that Buerger disease is an infectious disease? *Ann Vasc Dis* 2012; **3**: 300–309
- 10) Kubota T, Inoue Y, Iwai T, et al: Arterial thrombosis after intravenous infusion of oral bacterium in a rat model. *Ann Vasc Surg* 2008; **22**: 412–416
- 11) Meurman JH, Sanz M, Janket SJ: Oral health, atherosclerosis, and cardiovascular disease. *Crit Rev Oral Biol Med* 2004; **15**: 403–413
- 12) Naito M, Sakai E, Shi Y, et al: Porphyromonas gingivalis-induced platelet aggregation in plasma depends on Hgp44 adhesin but not Rgp proteinase. *Mol Microbiol* 2006; **59**: 152–167
- 13) Zhang MZ, Li CL, Jiang YT, et al: Porphyromonas gingivalis infection accelerates intimal thickening in iliac arteries in a balloon-injured rabbit model. *J Periodontol* 2008; **79**: 1192–1199
- 14) Li X, Iwai T, Nakamura H, et al: An ultrastructural study of Porphyromonas gingivalis-induced platelet aggregation. *Thromb Res* 2008; **122**: 810–819
- 15) Iwai T: Periodontal bacteremia and various vascular diseases. *J Periodont Res* 2009; **44**: 689–694
- 16) 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
- 17) Toyofuku T, Inoue Y, Kurihara N, et al: Differential detection rate of periodontopathic bacteria in atherosclerosis. *Surg Today* 2011; **41**: 1395–1400

Abstract

An Experimental Model of Peripheral Vascular Disease Originating from Intravenous Injection of Oral BacteriaKimihiro Igari,¹ Yoshinori Inoue,¹ Hiroaki Terasaki,² and Takehisa Iwai²¹ Division of Vascular Surgery, Department of Surgery, Tokyo Medical and Dental University² Tsukuba Vascular Center and Buerger Disease Research Institute**Key words:** oral bacteria, peripheral vascular disease, periodontitis

Background: The purpose of this study was to observe the direct reactions that occur between peripheral vascular and oral bacteria, such as *Porphyromonas gingivalis* (*Pg*) and *Treponema denticola* (*Td*). **Materials and Methods:** Beagle dogs were given direct injections of *Pg* and *Td* in different doses. Each leg vein was exposed, and the exposed vessels were ligated at the proximal and distal sites, with the injection of bacteria diluted with sterile saline. The collected vascular tissue was examined microscopically, and the vascular tissue and blood were cultured according to the polymerase chain reaction (PCR) method in order to detect bacterial DNA. **Results:** No genes of the injected bacteria were detected in the *Td* inoculation samples collected two weeks later with the blood and vascular tissue. The *Pg* gene was also not detected in the blood samples collected four weeks later, although it was detected in the vascular tissue using the PCR method. The microscopic findings showed that inflammatory reactions in the perivascular tissue were increased in a dose-dependent relationship to the injected bacteria, as expected. **Conclusions:** We found a direct reaction between oral bacteria and vascular tissue. Further studies are needed to investigate the correlations between oral bacteria and systemic diseases.