

博士論文の要旨及び審査結果の要旨

|         |                                                                                                                                                                                                                                        |
|---------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 氏名      | 高見澤 圭                                                                                                                                                                                                                                  |
| 学位      | 博士 (歯学)                                                                                                                                                                                                                                |
| 学位記番号   | 新大院博 (歯) 第478号                                                                                                                                                                                                                         |
| 学位授与の日付 | 令和3年3月23日                                                                                                                                                                                                                              |
| 学位授与の要件 | 学位規則第4条第1項該当                                                                                                                                                                                                                           |
| 博士論文名   | Association between serum IgG antibody titers against <i>Porphyromonas gingivalis</i> and liver enzyme levels: A cross-sectional study in Sado Island<br>(血清抗 <i>Porphyromonas gingivalis</i> IgG 抗体価と血清肝機能マーカー値との関連性: 新潟県佐渡市における横断研究) |
| 論文審査委員  | 主査 教授 多部田 康一<br>副査 教授 葭原 明弘<br>副査 教授 寺尾 豊                                                                                                                                                                                              |

博士論文の要旨

学位申請者高見澤 圭氏より提出のあった主論文 (英語) の要旨 (和訳) は以下の通りである。

【目的】 歯周炎患者の血清では、*Porphyromonas gingivalis* に特異的な免疫グロブリン G (IgG) 抗体価が上昇することや、歯周治療により歯周ポケット内の *P. gingivalis* の菌数が減少し、*P. gingivalis* に対する血清 IgG 抗体価が低下すること、また、歯周炎のスクリーニング検査としての抗 *P. gingivalis* IgG 血清抗体価の応用が報告がされている。一方で、近年歯周炎と肝機能低下との関連性の報告がなされるが、抗 *P. gingivalis* IgG 血清抗体価と肝機能の関係を検討した既存の研究は比較的若い成人を対象としていた。そこで長期にわたる持続的感染の影響を考え、高齢者を含む総合病院外来患者を対象として、抗 *P. gingivalis* IgG 血清抗体価と肝機能マーカーの関連性について横断研究を行った。併せて歯周炎と肝機能低下の双方に関連すると報告されている肥満による影響を検討した。

【材料と方法】2008年から2010年の間に新潟県佐渡市佐渡総合病院に来院した外来患者のうち、同意が得られた388名 (男性192名、女性196名、34-89歳、平均年齢68歳) を対象とした。また、除外基準は、歯を有しない患者、B型またはC型肝炎患者、肝硬変患者、透析治療を受けている患者、ステロイドあるいは免疫抑制療法を受けている患者とした。*P. gingivalis* FDC381 超音波破碎抗原に対する血清 IgG 抗体価と肝機能マーカーである血清アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (AST)、アラニンアミノトランスフェラーゼ (ALT) および  $\gamma$ -グルタミルトランスフェラーゼ (GGT) の関連性を多重ロジスティック回帰にて解析した。アウトカムは基準値を超える肝機能マーカー値とし、抗体価は2種類のカットオフポイントを用いて群分けした。すなわち、三分位および抗 *P. gingivalis* IgG 血清抗体価を用いた歯周炎のスクリーニングの報告で検討された6つのカットオフ値 (1.00, 1.68, 3.36, 5.04, 6.72, 8.40) を使用した。また肥満の関連を検討した。

【結果】 年齢、飲酒習慣、喫煙習慣、高血圧症、糖尿病および肥満で調整した多変量解析の結果、女性において抗 *P. gingivalis* IgG 血清抗体価の最高三分位と基準値を超える血清 ALT 高値との間に有意な関連性が認められた (オッズ比 2.8, 95%CI: 1.2-6.4)。また、肥満の有無に関わらず、抗 *P. gingivalis* IgG 血清抗体価カットオフ値 6.72 以上と血清 ALT 高値との間に有意な関連性が認められた。抗 *P. gingivalis* IgG 血清抗体価と肝機能マーカーの関連性に対する肥満の影響は統計学的に有意ではなかった。また、抗 *P. gingivalis* IgG 血清抗体価と高感度 CRP, IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  との間には、肥満の有無に関わらず、有意な相関関係を認められなかった。

【考察】 本研究は、高齢者を含む成人において肝機能マーカーと歯周病原細菌感染の関連性を始めて示した報告である。工藤らの報告では、抗 *P. gingivalis* IgG 血清抗体価 1.68 を歯周炎の有無

のスクリーニングのカットオフ値として採用しており、抗体価 6.72 以上は、より進行した歯周炎の存在を示唆している。一方で、AST は多臓器に分布するのに対し、ALT は特異性の高い肝機能マーカーであり、GGT と異なり非アルコール性肝疾患でも上昇することが報告されている。以上のことから、本研究の結果は女性における重度 *P. gingivalis* 感染と肝機能低下の関連を示唆している。20-59 歳の日本人女性において、歯周炎と血清 AST、ALT、GGT との関連性を示した報告や、39-64 歳の日本人男性において、飲酒習慣と独立した歯周炎と血清 GGT との関連性を示した報告があり、本研究の結果と相違がある。これは本研究では対象者の 85%以上が 60 歳以上であり、病院外来患者であるという違いに原因があると考えられる。歯周炎および脂質異常症が肝機能に影響を及ぼすことや、肥満が歯周炎のリスク因子との報告から、我々は抗 *P. gingivalis* IgG 血清抗体価と肝機能マーカーおよび肥満との間に双方向の関連性があると仮定したが、本研究では肥満と抗体価の関連を認めなかった。また、本研究では抗 *P. gingivalis* IgG 血清抗体価と高感度 CRP および血清サイトカインに関連も認められなかったため、女性における重度 *P. gingivalis* 感染と肝機能低下の関連性のメカニズムについては、今後のさらなる研究が必要である。

#### 審査結果の要旨

本研究の研究テーマの妥当性についての試問を行った。

本研究着想の経緯、先行研究との関連については以下の通りである。代表的な歯周病原細菌である *Porphyromonas gingivalis* に対する血清 IgG 抗体価は、歯周炎の有無、重症度、*P. gingivalis* 菌数の増減と相関を示す。一方で、近年、歯周炎と肝疾患との関連性が報告されている。歯周炎に罹患した非アルコール性脂肪性肝疾患（以下 NAFLD）の患者に歯周治療を行うと、血清 AST および ALT が減少する。NAFLD モデルマウスに *P. gingivalis* を感染させると、脂肪肝と血清 ALT の上昇をもたらす。しかしながら、抗 *P. gingivalis* IgG 血清抗体価と肝機能の関連は明らかにされていなかった。また、歯周炎と肝機能の関係を検討した既存の報告は、いずれも比較的若い成人を対象としていた。さらに、慢性肝疾患の最も一般的なリスク因子である肥満は、歯周炎との関連性も報告されていることから、歯周炎と肝機能の関連に影響を及ぼす可能性がある。そこで、長期にわたる持続的 *P. gingivalis* 感染の肝機能への影響を解明するため、高齢者を含む外来患者を対象として、抗 *P. gingivalis* IgG 血清抗体価と肝機能の関連性を解析し、さらに肥満による影響を検討する本研究を着想した。

研究方法と論旨の展開についての試問をおこなった。

本研究目的のための研究デザインの妥当性については以下の通りである。本研究は横断研究であるため因果関係を証明できないが、高齢者を含む全身疾患を有する成人男女を対象とすることにより、歯周炎による持続的な *P. gingivalis* 感染による全身への影響を判断することができる考えた。また、歯周炎の関与を想定しているため無歯顎者を除外した。本研究の対象者は総合病院外来患者であり、各々の全身状態に応じ必要な検査を行い、そのデータを用いて解析を行っているため、検査値データの有無による選択バイアスが生じている可能性は否定できない。

各解析の統計手法を選択した理由と妥当性については以下の通りである。独立変数として抗 *P. gingivalis* IgG 血清抗体価、アウトカムとして血清肝機能マーカーを選択し、それぞれ名義変数として関連性を解析した。対象者数は男女別にロジスティック回帰分析を実施するに適切な規模であった。各変数の分布は正規分布ではなく、変数間の関係も線型ではないため、三分位および工藤ら (J. Dent. Res. 2012) の抗 *P. gingivalis* IgG 血清抗体価による歯周炎のスクリーニングの報告で検討された 6 つの抗体価 cut-off 候補値を用いた群分けによる名義変数を用いたことは妥当と考える。また、歯周炎、肝機能および両者の関係に影響を及ぼす種々の交絡因子による影響を調整するため、多変量ロジスティック回帰分析を適用した。多変量解析に先立って、抗 *P. gingivalis* IgG 血清抗体価による群分け、および肝機能マーカー値による群分けをした際の特性の群間比較を行うために単変量解析を適用した。肥満が抗 *P. gingivalis* IgG 血清抗体価と肝機能の関連性に与える影響を明らかにするためには、多変量解析で交絡因子として加えるのみでは充分ではないと考え、肥満の有無について層化した。

血清抗体価を歯周炎罹患者の識別に用いる妥当性、抗 *P. gingivalis* IgG 血清抗体価のカットオ

フ値の設定の妥当性は以下の通りである。抗体産生反応には個体差があることや、抗 *P. gingivalis* 抗体の反応抗原は様々あることから、血清抗体価を歯周炎罹患者の識別に用いる場合の精度には限界がある。一方で、工藤らによる、抗 *P. gingivalis* IgG 血清抗体価による歯周炎スクリーニングを検討した報告において、プロ-ビングデプス 4mm, 5mm, 6mm 以上の部位の割合と 6 つの抗体価 cut-off 候補値との関連性についてのデータが示されている。本研究は、この報告と同一集団ではないが、同一の方法で抗体価測定をしており、さらに第 2 三分位数は 6 つの cut-off 候補値よりも大きな値であるため、抗体価の値から重度歯周炎群とそうではない群の 2 群に分けることは適切であり、血清抗体価を歯周炎罹患者の識別に用いることは、本研究の結論においては妥当であったと考える。

歯周炎臨床指標と肝機能の関連にみられる既知検討報告を踏まえて、本検討結果から得られた結果との相違についての考察は以下の通りである。従来の日本人における歯周炎と肝機能の関連性を示した報告では、4mm 以上歯周ポケット深さを有する場合は歯周炎と定義して検討されている。20-59 歳の成人女性を対象とした報告では、AST 高値および ALT 高値と歯周炎との関連性が報告されており、20-59 歳の男性を対象とした報告では、飲酒習慣の有無に関わらず、GGT 高値と歯周炎との関連性が報告される。本研究の結果では、女性において、抗 *P. gingivalis* IgG 血清抗体価の最高三分位 (9.5-109.7)、または抗体価>6.72 の cut-off 値と、血清 ALT 高値との間に有意な関連性が認められている。これらの結果の相違については、本研究の対象者の 85% が 60 歳以上であるという年齢範囲が従来の報告とは異なることや、従来の報告の対象者は健康診断中にリクルートされているのに対し、本研究の対象者は総合病院外来患者であることが、結果に影響を及ぼした可能性があると考えられる。

抗 *P. gingivalis* IgG を測定する方法について、抗原とした 381 株超音波破砕物に IgG を分解あるいは吸着する活性が残存するか否かと調整法の詳細な説明は以下の通りである。*P. gingivalis* 381 株の全菌体を蒸留水に懸濁した後に、プロテアーゼによる IgG の分解を防ぐため、プロテアーゼインヒビターを作用させた後に、氷冷下で超音波破砕することで、分解活性が残らないようにした。その後、遠心し上清画分を回収し、凍結乾燥した。使用時には重炭酸ナトリウム緩衝液にて濃度調整し 96 ウェルマイクロタイタープレートに吸着させた。また、IgG 吸着活性が残存することで、IgG がウェル表面に直接吸着（非特異的結合）し、ELISA で測定される IgG 量が、抗原特異的に結合した IgG 量と、非特異的に結合した IgG 量の和となる可能性がある。この非特異的な結合を防ぐために、コーティングバッファーに牛血清アルブミンを添加し、血清を希釈するバッファーおよび洗浄バッファーに界面活性剤（Tween20）を加えて ELISA を行った。

患者唾液中の抗 *P. gingivalis* IgG および IgA を測定しなかった理由あるいは、測定した場合に得られる知見およびメリットの考察は以下の通りである。本研究は抗 *P. gingivalis* IgG 血清抗体価を用いた歯周炎スクリーニングを検討した工藤らの報告に沿って cut-off 候補値と肝機能との関連性を検討することを目的とし、唾液中の抗 *P. gingivalis* 抗体を測定しなかった。患者唾液中の抗 *P. gingivalis* IgG および IgA は血清抗体価と比較して、歯周局所において *P. gingivalis* に対し作用する抗体の存在を、より反映している。また IgA は唾液中の抗体の主たるクラスであり、歯周炎に対して防御的に働くため、歯周炎と肝機能の関連性を検討する上でも予防や治療に結びつく知見を得る可能性が高い。

本実験で用いた抗原は、口腔あるいは腸管の常在細菌に交差反応しないことが担保されているかの説明および常在細菌との交差反応の可能性がある場合の、既報研究との結果の相違を交差反応の観点を加えての考察は以下の通りである。本研究では、*P. gingivalis* 381 株の全菌体を抗原とし、ELISA にて一次抗体として血清サンプルを反応させているため、抗 *P. gingivalis* IgG 血清抗体価は、歯周組織中の *P. gingivalis* 381 株に対する抗体の産生量だけでなく、口腔あるいは腸管の常在細菌との交差反応で産生された抗体の総和である。既報研究では歯周ポケット深さ 4mm 以上と肝機能の関連性を検討しているのに対し、本研究は、全身で生じた *P. gingivalis* 感染による免疫応答で産生された抗 *P. gingivalis* IgG 血清抗体価と肝機能の関連性を検討しているため、結果に相違が生じた可能性がある。

血清中の抗 *P. gingivalis* IgG 高値と ALT 高値の相関（因果関係）の考察は以下の通りである。本研究においては血清中の抗 *P. gingivalis* IgG 抗体価と血清 IL-1 $\beta$ , IL-6 および TNF- $\alpha$  レベルとの

間に相関が認められなかったため、これらを介した因果関係は考えにくい。一方、マウスにおける *P. gingivalis* 経口投与により、腸管内細菌叢のディスバイオシスが誘発され、その結果として腸管上皮の透過性亢進により、門脈に細菌やエンドトキシンが流入するメカニズムが報告されている。また重度歯周炎患者は毎日  $10^9$  から  $10^{10}$  個の *P. gingivalis* を飲み込んでいるという報告がある。これらより、腸管内細菌叢のディスバイオシスが肝臓に影響を与え、肝臓に特異的な逸脱酵素である ALT が上昇した可能性があると考えられる。また、今回検討していない別のサイトカインを介した影響も考えられる。

抗 *P. gingivalis* IgG が誘導されたにも関わらず、口腔内から *P. gingivalis* が排除されない事象の考察については以下の通りである。*P. gingivalis* が産生するプロテアーゼには、抗体および補体の分解作用および好中球に対する強い障害作用があること、また、バイオフィルムの形成により、抗体や免疫細胞による食作用効果がバイオフィルム表面の細菌にのみ限定され、*P. gingivalis* を含む複数の構成細菌の生存が確保されることから、口腔内から *P. gingivalis* が排除されない可能性が考えられる。

歯周病の病態を評価する上での抗 *P. gingivalis* IgG 血清抗体価の有効性についてについて以下の回答を得た。本研究においては歯周病検査値を欠くため抗 *P. gingivalis* IgG 血清抗体価と歯周炎の病態との関係を直接検証することはできなかったが、本研究と同一の抗 *P. gingivalis* IgG 血清抗体価測定法を用いた工藤らの報告では、抗体価高値が重度歯周炎に対応していた。正確な歯周病検査を行うには十分な時間とスキルが必要であるため、抗 *P. gingivalis* IgG 血清抗体価は、大規模な集団における歯周炎と全身性疾患との関係を判断するのに役立つ。

歯周病と肝機能との関連性の有無についての矛盾する報告の考察は以下の通りである。対象者の年齢、性別、全身状態、環境などの様々な条件が異なることが影響する。本研究は、新潟県佐渡市という限定された環境下の人を対象とし、高齢者を主として含むことにより歯周炎の肝機能に対する長期的影響を捉え、さらに歯周炎と肝機能の関連性に対する肥満の影響をも検討することにより、従来の報告に不足していた知見をもたらした。

本調査においてバイアスは生じているか。もし生じているとしたら調査結果にどのように影響を及ぼしたかの考察は以下の通りである。疫学研究におけるバイアスは系統的要因により生じる誤差であり、選択バイアスと情報バイアスおよび交絡がある。本研究の対象者は病院外来患者で、さまざまな疾患を有しており、その疾患に対して必要な検査を行い、そのデータを用いて解析を行っているため、検査値データの有無による選択バイアスが生じていることが考えられる。そのため抗 *P. gingivalis* IgG 血清抗体価と AST 高値および GGT 高値との関連性が認められなかった可能性がある。

歯周炎と肝機能の関連において肥満はどのように影響していたかの考察は以下の通りである。肥満により IL-6 や TNF- $\alpha$  の血中濃度が上昇し、インスリン抵抗性が高まることで、歯周組織では細菌感染に対し、過剰な宿主応答が惹起され、より重篤な炎症性組織破壊が生じる。一方、肝臓では肝細胞に脂肪が蓄積され、酸化ストレスやミトコンドリア機能低下等が生じ、肝機能が低下することで、逸脱酵素である AST, ALT, GGT の値が上昇する。そのため肥満は歯周炎と肝機能の関連性を強めると予想したが、本研究では有意な影響を認めなかった。本研究対象者においては肥満と血中サイトカインレベルの関連性が明らかでなかったことが一因として考えられる。

本調査を踏まえ、PROST 研究を如何に発展させることができるかについての考えは以下の通りである。歯周炎の臨床検査データも追加されてきており、歯周炎の臨床検査データを用いた臓器関連の視点で行う加齢性疾患と歯周炎との関連性について検討をしていくだけでなく、さらには、前向きコホート研究として歯周炎と肝臓のみならず加齢性疾患との関連性についても検討したいと考える。また、PROST は当初よりゲノムワイド関連解析を計画に含んでおり、歯周炎と加齢性疾患の関連性について遺伝的素因を含む解析を今後あらためて実施する予定である。

オッズ比、および P 値の説明を以下の通り回答した。オッズ比とは、ある事象の生じやすさを群間で比較して示す統計学的な尺度であり、例としてある疾患の罹りやすさを性別で比較する場合、男性を基準とした際に、女性は男性の何倍その疾患に罹りやすいかを示すものがオッズ比である。横断研究においては、女性における有病者数を a、非有病者数を b、男性における有病者

数を  $c$ 、非有病者数を  $d$  としたとき、女性のオッズ比は  $ad/bc$  である。P 値とは、帰無仮説を真とした場合に、実際に観察された、あるいはそれ以上の 2 群の差が観察される確率のことであり、関連性解析においては、A と B に関連性はないという帰無仮説を真とした場合に、実際に A と B に関連性がある確率のことである。言い換えれば A と B の間に関連性があるかのような偏りが偶然に生じる確率が P 値である。

学術的意義に関わる試問を行った。

学術的意義、新規性については以下の通りである。正確な歯周病検査を行うには十分な時間とスキルが必要である。抗 *P. gingivalis* IgG 血清抗体価は、大規模な集団における歯周炎と全身性疾患との関係を検討するために役立つ。本研究の意義は抗 *P. gingivalis* IgG 血清抗体価を用いて、肝機能低下と歯周病原細菌感染との関連性を明らかにすることにある。本研究の新規性は、高齢者を含む成人において肝機能マーカーと歯周病原細菌感染の関連性を示した初めての報告であるという点、また、これにより *P. gingivalis* 感染の肝機能に対する長期的影響を捉え、さらに歯周炎と肝機能の関連性に対する肥満の影響をも検討した点にある。

本研究結果の学術的発展性や応用価値は以下の通りである。女性ける抗 *P. gingivalis* IgG 血清抗体と ALT 高値との関連性の因果関係およびメカニズムに関しては不明である。今後、因果関係が明らかにすることは、歯周炎と肝疾患双方の予防および治療に貢献すると考える。

論文構成・文法・語法において適切に執筆されている。

以上