

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 4 年 5 月 31 日現在

機関番号：15501

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K18962

研究課題名（和文）口腔細菌による産婦人科疾患の発症メカニズムの解明

研究課題名（英文）Mechanisms of pathogenesis of obstetric and gynecological diseases caused by oral bacteria

研究代表者

橘 理人（Tachibana, Masato）

山口大学・共同獣医学部・助教（特命）

研究者番号：20636831

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：動物モデルが構築されていないことから、口腔内細菌による産婦人科疾患の発症メカニズムはほとんど明らかにされていない。そこで、本研究では、マウスモデルの構築を企図した。

妊娠マウスを作成し、ポルフィロモナス・ジンジバリスを様々な条件（投与方法、タイミング、菌数、菌株など）で投与し、影響を確認した。その結果、感染により流産することが認められ、また条件によって結果に影響が認められた。

このことは、口腔内細菌が産婦人科疾患に寄与していること、そしてモデル構築の一助になることが考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

口腔内細菌は、近年、全身症状に影響していることが多く報告され、早流産・低体重児といった産婦人科疾患への影響も複数報告されている。その一方で、モデル生物がいない事などから、病原因子、病原メカニズムの詳細な解析はなされていない。

そこで、本研究では感染による流産モデルマウスの構築を試み、その結果、感染により流産が引き起こされることが認められた。本研究によって得られた成果は、マウスモデル構築の一助となり、マウスモデルの存在は、長寿社会および少子化社会である日本にとって社会的要求の高い産婦人科疾患および口腔疾患に関する研究の推進を可能にする。

研究成果の概要（英文）：As no animal models have been constructed, the mechanisms underlying the development of obstetric and gynaecological diseases caused by oral bacteria are largely unknown. Therefore, the present study attempted to construct a mouse model.

Pregnant mice were created and Porphyromonas gingivalis was administered under various conditions (method of administration, timing, number of bacteria, strain, etc.) to check the effects. The results showed that the infection caused abortions and that the conditions affected the outcome.

This suggests that oral bacteria contribute to obstetric and gynaecological diseases and may assist in model building.

研究分野：細菌学

キーワード：口腔内細菌 産婦人科疾患 マウスモデル

## 1. 研究開始当初の背景

近年、次世代シーケンサーなどの遺伝学的解析技術の発展により、口腔内の病原性細菌が歯周病やう蝕といった口腔疾患だけでなく、がんや糖尿病といった全身疾患にも関連していることが多く報告されるようになった。口腔細菌との関連が報告されている全身疾患として、早産・流産・低体重児出産といった産婦人科疾患がある。Offenbacher らの疫学的研究より、歯周病であることは、早産・低体重児出産になる確率が約 8 倍になることが報告されている。また、介入研究も行われており、口腔ケアにより早産・低体重児出産が抑制されたことが報告されている。そして大規模な疫学調査は行われていないが流産との関連も報告されている。流産は全妊娠の 10~15%で起こるといわれている。そして、流産を繰り返す場合を不育症と呼び、出生率の低下が大きな問題となっている現在の日本において解決すべき課題である。不育症の原因として、胎児側、母体側の様々な因子が報告され、クラミジアや梅毒といった感染症も原因の一つである。妊娠期は口腔内環境が悪化しやすいこと、口腔細菌は、比較的容易に全身へと移行すること、妊娠期は感染症に弱く、弱い感染においても重症化することが報告されている。また、抗生物質や免疫を賦活化する薬剤の投与は治療法として推奨されない場合もあり、治療を困難なものにしている。これらのことから、リスクを下げるために、妊娠期の口腔ケアが強く推奨されている。早産・流産・低体重児出産などの産婦人科疾患と歯周病もしくは口腔細菌との関連は多く報告されているが、そのメカニズムに関して不明な点が多いのが現状である。治療法や予防法の構築にメカニズムの解明は必須である。これまでに報告されているものとして、口腔細菌の感染により、TNF- $\alpha$ や IL-1 の産生が増強され、子宮を収縮させる働きのあるプロスタグランジン E2(PGE2) が誘導されることが関連しているというものがある。口腔には 700 種以上の細菌が存在し、複数の菌種が産婦人科疾患に関連すると報告されている。本研究では、口腔細菌として歯周病細菌である *Porphyromonas gingivalis* を用いる。*P. gingivalis* は、産婦人科疾患の患者の羊水や胎盤から多く検出されること、感染により PGE2 の産生を誘導することが知られている。これらのことから、*P. gingivalis* の口腔内での増加、全身への移行、生殖器系への感染などが産婦人科疾患と関連していると考えられている。

このように口腔細菌と産婦人科疾患との関連およびいくつかの発症メカニズムについて報告がなされているが、未だ十分ではない現状にある。その原因として、動物モデルが存在しないことが考えられる。そこで、本研究では、発症メカニズムを明らかにするために動物モデルの作製を企図した。

## 2. 研究の目的

口腔細菌による産婦人科疾患(早産・流産・低体重児出産)の治療法および予防法構築を目指し、発症メカニズムを解明するための動物モデルを作製する。

## 3. 研究の方法

### (1) マウス

動物モデル作製に当たり、使用動物は ICR マウスとした。ICR マウスはこれまでにブルセラ属菌およびリステリア菌の感染性流産モデルとして使用してきたため選択した。ICR マウスは自然流産が少ないこと、および胎児数が安定していることが知られている。また、性成熟する 8 週齢以降のものを用いた。

### (2) 実験スケジュール

発情前期もしくは発情期の雌マウスと雄マウスを夕方以降からケージ内に同居させ、翌朝膣栓の有無を確認した。確認できたものは交配したマウスとして、別ケージに隔離し、確認した日を妊娠 0 日目とした。マウスは交配後約 20 日で出産する。

感染タイミングの検討として、妊娠 0 日目から 17 日目までの間に 1 回、感染もしくは投与し、18 日目に安楽死させ、開腹した。開腹し、胎児の生死を確認した。また、肝臓、脾臓、胎盤、胎児内蔵をサンプリングした。サンプリングした臓器はホモジナイズし適宜希釈後、血液寒天培地に塗布し嫌気培養を行った。培養後、*P. gingivalis* と考えられる黒いコロニーの数を測定した。



### (3) 投与方法

腹腔内投与もしくは尾静脈投与を行った。

### (4) 投与菌数

陰性コントロールとして PBS を用いた。投与菌数は  $10^5 \sim 10^9$  個とした。細菌の調整として、液体培養したものを遠心分離により集菌し、上清を捨てたのち、PBS に攪拌、希釈した。また菌体以外のものとして、遠心分離後の上清を回収しフィルター滅菌し、培養上清とした。投与量は  $100\mu\text{L}$  とした。

## 4. 研究成果

妊娠 ICR マウスへの *P. gingivalis* の投与により、胎児の死亡が認められた。この結果は、口腔細菌の全身移行によって産婦人科疾患が引き起こされるという報告を支持するものであった。一方で、感染による胎児への影響が安定せず、マウスモデルの構築には引き続き検討が必要である。本研究で検討した項目の結果は下記の通りであった。

**感染タイミング:** 妊娠中期以降に感染させた場合において胎児の死亡が高頻度に認められた。

**投与方法:** 尾静脈投与の場合は母マウスの死亡および衰弱が認められた一方で、腹腔内投与の場合は胎児の生死にかかわらず母マウスに異常は認められなかった。どちらの投与方法においても感染 2 日目において臓器 (脾臓・肝臓・胎盤) より *P. gingivalis* を回収することは出来なかった。

**投与菌数:**  $10^9$  個感染させることにより、高頻度に胎児の死亡を引き起こすことが認められた。一方で、PBS および培養上清を投与した場合において、胎児の死亡および母マウスへの異常は認められなかった。

**菌株:** 菌株による胎児への影響に差異が認められた。標準株より強毒株において胎児の死亡が高頻度に認められた。この結果から、口腔内のみならず全身に移行した場合においても強毒株は毒性が高いことが示唆された。個人ごとにリスクが異なることが考えられる。

**遠心分離条件:** 感染菌液の調整時に、遠心分離により集菌する過程があるが、遠心分離の条件をより高速にすることにより、胎児の死亡が認められなくなった。この結果から、通常より高速の遠心分離により細菌に影響があることが示唆された。また、*P. gingivalis* が存在するだけでは胎児に病原性を示さないことも示唆された。

コントロール



感染による胎児の死亡



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------