

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 15 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26463139

研究課題名(和文) 早産・低体重児出産のリスク低減に向けた原因因子の解明に関する包括的アプローチ

研究課題名(英文) The involvement of periodontal pathogens on the risk for preterm low birth weight.

研究代表者

長谷川 梢 (HASEGAWA-NAKAMURA, KOZUE)

鹿児島大学・医歯学域歯学系・助教

研究者番号：00404492

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：妊娠マウスに妊娠8 - 10日目あるいは妊娠13 - 15日目に1日1回、Porphyromonas gingivalis (Pg)、Fusobacterium nucleatum (Fn)、PgとFnの混合(PgFn)を尾静脈から投与した。その結果、Pg、Fn、PgFn混合投与により細菌が胎盤に定着し、胎児の成長発育に影響を及ぼすこと、その影響はGD10-13のほうが、DG8-10よりも大きいことが明らかとなった。また、妊娠期のPg、Fn、PgFn混合感染により胎盤の炎症性物質の上昇し、早産、低体重児出産に影響を及ぼす可能性が示唆され、その影響はFnが最も大きいことが示唆された。

研究成果の概要(英文)：The bacterial solutions (Pg, Fn, or PgFn) or PBS (Control) were injected into the tail vein of pregnant mice once a day from 8 days at gestation to 10 days at gestation or from 13 days at gestation to 15s day at gestation. Our results showed that (i) Pg and Fn injected into the tail vein of pregnant mice stayed in placentas, that (ii) the Pg and Fn in placentas involved with growth and development of fetus, and that (iii) the effects of injection of periodontal pathogens from 13 days at gestation to 15 days at gestation were worse than those from 8 days at gestation to 10 days at gestation. In addition, we suggested that (i) the gene expressions of inflammatory mediators in placentas of mice to which periodontal pathogens were injected were tend to higher than those in placentas of control mice and (ii) the gene expressions of inflammatory mediators in placentas of mice to which Fn were injected were most increased in placentas of mice to which periodontal pathogens were injected.

研究分野：歯周病学

キーワード：歯周病 早産 低体重児出産

1. 研究開始当初の背景

近年の歯周医学の進歩により、歯周病と早産・低体重児出産の関連性が明らかにされつつある。歯周病が早産・低体重児出産に及ぼすメカニズムは、(i)歯周組織で産生された炎症性メディエーターが血流を介して子宮組織に影響を与えること、(ii)歯周病原細菌が口腔内から子宮に移動して、直接子宮内組織に感染することによる影響、の2つが考えられている。子宮内組織に歯周病原細菌が存在することは、現在までに報告されているが(Katz ら、2009 J Dent Res 575-578)、その存在が子宮内組織や妊娠状態に与える影響については明らかになっていない。

我々は、歯周病と早産・低体重児出産との関連性とそのメカニズムを解明することを目的に研究を行っている。疫学的な報告では、2003年にアジアにおいて初めて、日本でも歯周病が早産と関連することを明らかにした(Hasegawa ら、J Periodontol, 2003; 1764-70)。また、メカニズムの解明研究にも着手し、2003年の我々の報告では、切迫早産妊婦の血清中のIL-8とIL-1 β は、正常妊娠妊婦よりも有意に高いことを示した(Hasegawa ら、J Periodontol, 2003; 1764-70)。2010年と2011年には、ハイリスク妊婦の卵膜組織から歯周病細菌である*Porphyromonas gingivalis* (Pg)と*Fusobacterium nucleatum* (Fn)を検出し、歯周病原細菌が子宮内組織に局在していることを報告した。さらには*in vitro*でのPgとFnと絨毛膜細胞との相互作用の結果から、PgやFnは早産に関連する炎症性物質を誘導し、そこにはTLR-2が関わっていることを示した(Hasegawa-Nakamura ら、Journal of Periodontal Research 2011;497-504., Fumi Tateishi ら、Journal of Clinical Periodontology, 2012.417-424)。しかし我々の*in vitro*の結果は生体内の反応を示唆することはできても、実際の生体での役割を解明できていない。

2. 研究の目的

妊娠動物モデルにおいて、歯周病原細菌であるPgとFnが出産に与える影響の解析を目的とした。

3. 研究の方法

(1) 動物

10-13週齢の妊娠ICRマウス(Kyudo Co. Ltd., Tosu, Japan)32匹を用いた。雌のマウスは雄のICRマウスと一晩同じケージで交配させ、翌朝陰に出血が認められたマウスを妊娠マウスとし、その日を妊娠1日目

(GD1)とした。全てのマウスはライトと温度がコントロールされた環境(23 \pm 1 $^{\circ}$ C, 湿度40-70%, 12時間でライトオンオフが切り替え)で、餌と水が自由に摂取できる状態で育てられた。本研究は鹿児島大学動物実験倫理審査の承認を得て行われた(D13013, D14024, D16021)。

(2) 細菌と細菌投与

Porphyromonas gingivalis ATCC33277と*Fusobacterium nucleatum* ATCC10953を用いた。10⁶CFU *Porphyromonas gingivalis* (Pg)または、10⁶CFU *Fusobacterium nucleatum* (Fn)または、10⁶CFUのPgとFnの混合(PgFn)、またはPBS(Control)を100 μ L尾静脈から投与した。投与期間は、妊娠8日目から10日目(ControlGD8-10 (n=4), PgGD8-10 (n=4), FnGD8-10 (n=4), PgFnGD8-10 (N=4))、あるいは妊娠13日目から15日目の3日間(ContGD8-10 (n=4), PgGD13-15 (n=4), FnGD13-15 (n=4), PgFnGD13-15 (n=4))、1日1回投与した。

(3) サンプルの採取と保存

マウスは妊娠8日目に安楽死させ、胎児、胎盤、血液を採取した。胎盤は約30mgをRAN抽出のために、残りをDNA抽出用に-80 $^{\circ}$ Cで保存した。血液は、100 μ LをDNA抽出用に保存後、残りの血液から血清を分離し分析まで-80 $^{\circ}$ Cで保存した。

(4) 細菌分析

胎盤と血液の total DNA は、MasterPure™ Complete DNA and RNA Purification Kit (Epicentre, Wisconsin, USA) を用いて抽出した。Total DNA 中の Pg と Fn の検出は a Taq PCR Core Kit (QIAGEN)を用いて PCR 法で行った。

(5)胎盤における TLR-2, TLR-4, Il-6, IL-8, TNF-a, IL-1b の遺伝子発現分析
胎盤のtotal RNAはRNeasy Mini Kit (QIAGEN, Hilden, Germany)を用いて抽出し、 Super-Script III First-strand Synthesis Super Mix (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) を用いて、cDNAを合成した。TLR-2, TLR-4, Il-6, IL-8, TNF-a, IL-1b の発現は、 QuantiTect SYBR Green PCR Kit (QIAGEN) を用いて行った。

4. 研究成果

表1にGD18日目の胎児の状態を示す。GD13-15のFnあるいはPgFn混合投与により死産が多く認められた。また、DG8-10PgFn混合投与により胎児吸収が多く認められた。

表1. 胎児の状態の比較

injection	first trimester (GD8-10)				third trimester (GD13-15)			
	mother	fetas			mother	fetas		
		normal	death	absorption		normal	death	absorption
Cont	4	58	0	0	4	63	0	0
Pg	4	62	1	0	4	63	4	0
Fn	4	66	2	0	4	36	27	0
Pg and Fn	4	39	2	13	4	46	21	0

表2に胎児の体重の平均値を示す。GD8-10あるいはDG13-15日いずれの細菌投与期間においても、Pg、Fn、あるいはPgFn混合投与はコントロールと比較し胎児の体重が有意に小さかった。いずれの細菌投与においても、DG13-15日の細菌投与における胎児の体重は、DG8-10の投与と比較し有意に小さかった。

表2. 胎児の体重の平均値の比較

	first trimester (GD8-10)	third trimester (GD13-15)	P value (GD8-10 vs GD13-15)
Cont	1590.2±202.2	1600.8±261.5	p=0.072
Pg	1496.6±146.5*	1187.2±306.1*#	P<0.001
Fn	1427.6±143.1*	1380.5±276.6*	P<0.05
Pg and Fn	1481.7±138.0*	1298.7±143.0*	P<0.001

normal fetus only
*p<0.05 vs cont
#p<0.05 vs Fn

表3に、胎盤におけるPgとFnの検出結果を示す。DG13-15の投与で細菌が多く検出され

た。全てのマウスの血液からはどの菌周病原細菌も検出されなかった。

表3. 胎児の体重の平均値の比較

injection	detection of Pg and Fn in placentas							
	first trimester (GD8-10)				third trimester (GD13-15)			
	Pg		Fn		Pg		Fn	
	normal	abnormal	normal	abnormal	normal	abnormal	normal	abnormal
Pg	4/44(62)	1/1	-	-	47/63	3/4	-	-
Fn	-	-	0/46(66)	0/2	-	-	18/36	15/27
Pg and Fn	1/39	1/15	0/39	0/15	3/46	0/21	18/46	14/21

これらのことより、Pg、Fn、あるいはPgFn混合投与により細菌が胎盤に定着し、胎児の成長発育に影響を及ぼすこと、その影響はGD10-13のほうが、DG8-10よりも大きいことが明らかとなった。

図1にDG8-10におけるTLR-2, TLR-4, Il-6, IL-8, TNF-a, IL-1bの遺伝子発現分析の結果を示す。Fnにより若干IL-6, IL-1bの発現が上昇し、PgとFnにより若干TLR2の発現が上昇した。

図1. DG8-10におけるTLR-2, TLR-4, Il-6, IL-8, TNF-a, IL-1bの遺伝子発現分析の結果

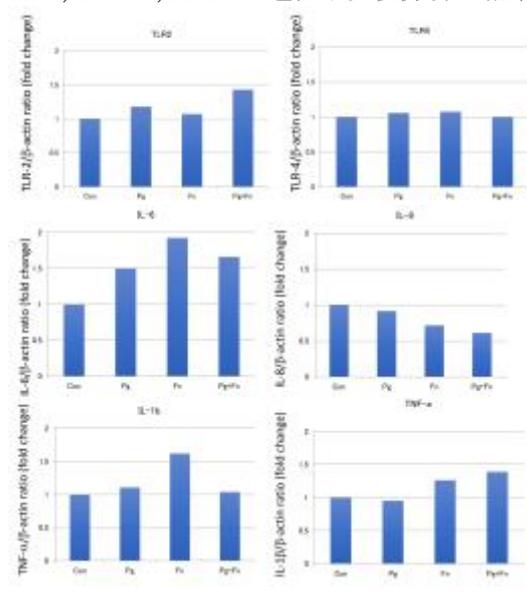
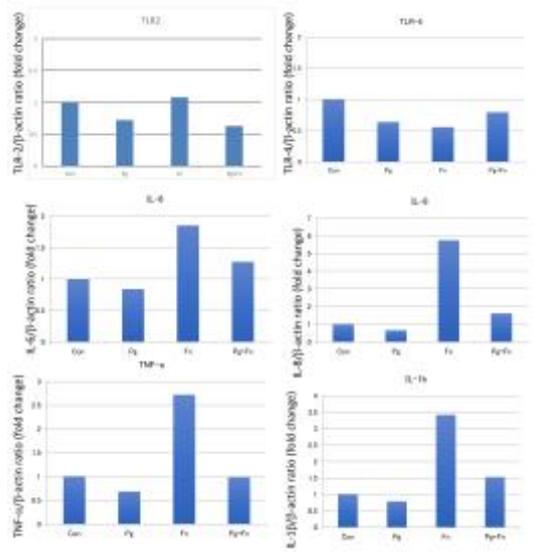


図2にDG13-15におけるTLR-2, TLR-4, Il-6, IL-8, TNF-a, IL-1bの遺伝子発現分析の結果を示す。FnによりIL-6, IL-8, TNF-a, IL-1bの発現が、PgとFnの混合感染によりIL-6, IL-8, IL1bが若干上昇した。

これらの結果より、妊娠期のPg、Fn、PgFn混合感染により胎盤の炎症性物質の上昇し、それにより、早産、低体重児出産に影響を及ぼす可能性が示唆された。その影響は、Fnの影響が最も大きいことが示唆された。

図 2. DG13-15 における TLR-2, TLR-4, IL-6, IL-8, TNF- α , IL-1 β の遺伝子発現分析の結果



本研究の結果は、妊娠期あるいは妊娠前からの口腔内環境改善の重要性を示しており、口腔内環境の改善が、早産・低体重児出産のリスク軽減につながる可能性を示唆している。

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 9 件)

- ① Kozue Hasegawa-Nakamura, Toshiaki Nakamura, Masato Kamitomo Fumi Tateishi, Chikoto Hashiguchi, Kazuya Kawamata, Masayuki Hatae, Kazuyuki Noguchi, Detection of periodontal pathogens in chorionic tissues of pregnant women with abnormal glucose tolerance. 日本歯周病学会誌. in press, 2017. 査読有り
- ② Nakamura T, Shirakata Y, Shinohara Y, Miron RJ, Hasegawa-Nakamura K, Fujioka-Kobayashi M, Noguchi K. Comparison of the effects of recombinant human bone morphogenetic protein-2 and -9 on bone formation in rat calvarial critical-size defects. Oral Investig. in

press, 2017 査読有り

- ③ Nakamura T, Shirakata Y, Shinohara Y, Miron RJ, Furue K, Noguchi K. Osteogenic potential of recombinant human bone morphogenetic protein-9/absorbable collagen sponge (rhBMP-9/ACS) in rat critical size calvarial defects. Clin Oral Investig. in press, 2017. 査読有り
- ④ Morozumi T, Nakagawa T, .. Nakamura T, .. et. al. (37 人中 32 人目) Salivary pathogen and serum antibody to assess the progression of chronic periodontitis: a 24-mo prospective multicenter cohort study. J Periodontal Res. In press, 2016. 査読有り
- ⑤ Takeuchi H, Machigashira M, Takeuchi N, Nakamura T, Noguchi K. The association of periodontopathic bacteria levels in saliva and tongue coating with oral malodor in periodontitis patients. Oral Health Prev Dent, in press, 2016. 査読有り
- ⑥ Shinohara Y, Nakamura T, Shirakata Y, Noguchi K. Bone healing capabilities of recombinant human bone morphogenetic protein-9 (rhBMP-9) with a chitosan or collagen carrier in rat calvarial defects. Dent Mater J. 35:454-60, 2016. 査読有り
- ⑦ Fuchigami S, Nakamura T, Furue K, Sena K, Shinohara Y, Noguchi K. Recombinant human bone morphogenetic protein-9 potently induces osteogenic differentiation of human periodontal ligament fibroblasts. Eur J Oral Sci. 124:151-7, 2016. 査読有り
- ⑧ 野口和行, 中村利明. 様々な歯周病とそ

の治療. 日本歯科医師会雑誌, 68, 33-42, 2015. 査読無し

- ⑨ Shirakata Y, Nakamura T, Shinohara Y, Taniyama K, Sakoda K, Yoshimoto T, Noguchi K. An exploratory study on the efficacy of rat dedifferentiated fat cells (rDFATs) with a poly lactic-co-glycolic acid/hydroxylapatite (PLGA/HA) composite for bone formation in a rat calvarial defect model. *J Mater Sci Mater Med.* 25:899-908, 2014. 査読有り

[学会発表] (計 3 件)

- ① 加藤幸紀、長澤敏行、清水伸太郎、中村梢、野口和行、波多江正紀、柿木博成、古市保志. 正常分娩妊婦における歯周病原細菌と *Bifidobacterium* の分布 第 59 回秋期歯周病学会学術大会 朱鷺メッセ 新潟コンベンションセンター (新潟県 新潟市) 2016 年 10 月 8 日、査読無し
- ② 加藤幸紀、清水伸太郎、長澤敏行、中村梢、野口和行、古市保志. 妊婦と非妊娠女性における口腔微生物叢の解析 第 59 回春期歯周病学会学術大会 かごしま県民交流センター (鹿児島県 鹿児島市) 2016 年 5 月 20 日、査読なし
- ③ 中村梢、立石ふみ、中村利明、淵上佐和子、野口和行、子宮内膜症病変組織における *Porphyromonas gingivalis* の検出, 第 57 回春季日本歯周病学会学術大会総会, 長良川国際会議場 (岐阜県 岐阜市)、2014 年 5 月 23 日、査読無し

[図書] (計 2 件)

- ① 和泉雄一、野口和行、高田 隆、長谷川梢 歯周病と全身の健康 第 2 部 細胞・分子レベルのメカニズム 3) 早産低体重児出産 P96-99 特定非営利活動法人日本

歯周病学会, 医歯薬出版株式会社 2016

- ② 野口和行、中村利明、白方良典. 特殊な歯周病の診断と治療. 日本歯科保存学雑誌, 57, 477-483, 2014.

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

[招待講師]長谷川梢 第 3 回医療支援歯学教育コースワーク 15: 口腔の健康と早産・低体重児出産 (e-learning 用のビデオ撮影並行): 招岡山大学歯学部第 1 講義室 (2016 年 1 月 9 日)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

長谷川梢 (Hasegawa-Nakamura Kozue)
鹿児島大学 医歯学域歯学系・助教
研究者番号: 00404492

(2) 研究分担者

町頭三保 (Machigasira Miho)
鹿児島大学 医歯学総合研究科 歯周病学
分野・客員研究員
研究者番号: 80253897

中村利明 (Nakamura Toshiaki)
鹿児島大学 医歯学域附属病院・講師
研究者番号: 60381183

(3) 連携研究者

野口 和行 (Noguchi Kazuyuki)
鹿児島大学 医歯学域歯学系・教授
研究者番号: 90218298

(4) 研究協力者

波多江 正紀 (Hatae Masayuki)
医療法人聖成会 柿木病院・副院長

上塘正人 (Kamitomo Masato)
鹿児島市立病院 産婦人科・部長

川俣 和弥 (Kawamata Kazuya)
医療法人愛育会 愛育病院・副院長

立石 ふみ (Tateishi Fumi)
医療法人社団忠重会 忠重歯科医院・歯科
医師