

機関番号：17701
 研究種目：若手研究(B)
 研究期間：2009～2010
 課題番号：21792126
 研究課題名(和文) 歯周病が早産・低体重児出産に与える影響に関する包括的研究
 研究課題名(英文) The study of preterm low birth weight associated with periodontal disease.
 研究代表者
 長谷川 梢 (HASEGAWA KOZUE)
 鹿児島大学・医歯学総合研究科・助教
 研究者番号：00404492

1. 研究成果の概要(和文)：23名のハイリスク妊婦のうち、2名の切迫早産妊婦、2名の多胎妊娠妊婦、2名の前置胎盤妊婦の絨毛膜組織から *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*) が検出された。絨毛膜由来細胞を *P. gingivalis* LPS で刺激すると、培養上清中の IL-6 と IL-8 レベルと TLR-2 の遺伝子発現は有意に上昇したが、TLR-2 遺伝子の発現を抑制することにより減少した。これらのことから、子宮内組織に定着した *P. gingivalis* が TLR-2 を介して、早産に関連する炎症性物質を誘導することにより、早産を引き起こす可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：*P.gingivalis* DNA was detected in chorionic tissues from six out of 23 high-risk pregnant women. Stimulation of chorion-derived cells with *P.gingivalis* LPS significantly increased TLR-2 mRNA expression and induced IL-6 and IL-8 production in chorion-derived cells. *P.gingivalis* LPS-induced IL-6 and IL-8 production was reduced in TLR-2 gene-silenced chorion-derived cells. It is very likely that *P.gingivalis* staying in intrauterine tissues breaks the maintenance of a proper uterine-fetus relationship via TLR-2 by generating pro-inflammatory cytokines, which may cause premature labor.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度			
2007年度			
2008年度			
2009年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2010年度	1,400,000	420,000	1,820,000
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：歯周病学

科研費の分科・細目：歯学・歯周治療系歯学

キーワード：歯周病、早産・低体重児出産、歯周病原細菌、卵膜、炎症性物質

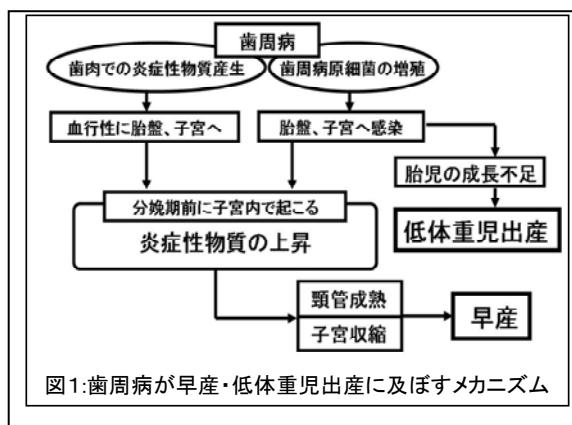
1. 研究開始当初の背景

(1) 近年の歯周医学の発展から、歯周病は、「歯を失う原因となる口腔内の疾患」という

だけでなく、「全身に影響を及ぼす重要な基礎疾患」として位置づけられてきている。歯

周病と関連するとされる疾患のうち、早産・低体重児出産は、1996年に初めて米国のOffenbacherらがその関連性を報告した。その後、世界各国からこのテーマについての疫学研究が多く行われ、2003年以降は歯周病治療の介入研究も報告されている。

(2) 歯周病が早産・低体重児出産に影響するメカニズムは、「歯周病で上昇する炎症性物質の影響」と、「歯周病原細菌の産科器官への伝播の影響」と考えられている(図1)。歯周病で上昇する血清中の炎症性物質が、早期に分娩を誘導するため早産に至ると考えられている。また、血行性に歯周病原細菌が直接産科器官へ伝播・感染すると、子宮内で早期に炎症性物質を上昇させるだけでなく、胎児の成長不全を引き起こし、低体重児出産に至るとされている。



(3) 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ため、鹿児島市立病院産婦人科との共同研究を2001年から行っている。その結果、2003年にアジアにおいて初めて、歯周組織健康状態の悪化と血清中のIL-8、IL-1βの上昇が切迫早産と、*Tannerella forsythensis* の占める割合と血清中のIL-8、IL-1βの上昇が早産と関連することを明らかにした。さらに、2007年は、口腔清掃指導が早産・低体重児出産に及ぼす効果を検討し、正常体重児出産妊婦は低体重児出産妊婦と比較し、歯肉の炎症が有意

に改善していたことを報告した。2007年にLeonらは、切迫早産妊婦の羊水から *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*) が検出されたと報告しており、これらのことから、歯周病原細菌が羊水、さらには子宮内組織に伝播し、出産に影響していることが予想される。しかし、歯周病が早産・低体重児出産に及ぼす影響のメカニズムも解明されていない。

2. 研究の目的

本研究では、(1) ハイリスク妊娠妊婦から採取した子宮内組織での *P. gingivalis* の検出、(2) 子宮内組織から分離培養した絨毛膜由来細胞への *P. gingivalis* lipopolysaccharide (LPS) の影響の検討を行い、歯周病が早産・低体重児出産に与える影響のメカニズムを解明することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 被験者はハイリスク妊娠のため鹿児島市立病院にて入院管理が必要と診断された23名の妊婦を被験者とした。除外基準は、ウイルス疾患、自己免疫性疾患、糖尿病、妊娠性糖尿病、妊娠期間の抗生剤投与の既往とした。妊娠中期に、唾液と歯肉縁下プラークの採取と歯周組織検査 (probing pocket depth (PPD), clinical attachment level (CAL), Bleeding on probing (BoP), plaque index (PII), gingival index (GI)) を行った。同部位に4ミリ以上の PPD と、3ミリ以上の CAL がある歯が2歯以上ある人を歯周炎、歯周炎でない妊婦で BoP が見られた人を歯肉炎とした。出産時に子宮内組織の卵膜を採取した。全てのサンプルにおける *P. gingivalis* の検出は、polymerase chain reaction (PCR) 法を用いて行った。

(2) 正常妊娠妊婦の絨毛膜から絨毛膜由来細胞を分離培養した。分離した絨毛膜細胞、または TLR-2 siRNA を導入し TLR-2 の遺伝子発現を抑制した絨毛膜由来細胞を *P. gingivalis* LPS で刺激した。その後 RNA を抽出し、TLR-2 と TLR-4 の遺伝子発現を RT-PCR 法と real-time PCR 法を用いて解析した。さらに、各細胞の培養上清中の IL-6 と IL-8 レベルを ELISA 法にて分析した

(3) 統計分析は、ANOVA、Bonferroni dunn-test を用いて行った。

4. 研究成果

(1) 臨床研究の結果

被験者の平均年齢は、31歳、残存指数は平均 28.1 本、BOP の平均は、34.3%，PII の平均は 0.7、GI の平均は 0.5 であり、口腔内清掃状態があまり良くなく、歯肉の炎症も多く見られる状態であった。23 人の被験者のうち、歯周炎と診断された人は、9 名であり、そのうち 6 名は切迫早産、2 名は多胎妊娠、1 名は前置胎盤であった。口腔内サンプルから *P. gingivalis* が検出されたのは、23 名中 15 名で、切迫早産妊婦では 7 名、多胎妊娠では 6 名、前置胎盤では 2 名であった。絨毛膜組織から *P. gingivalis* が検出されたのは、21 名中 6 名で (図 2)、そのうち 2 名は切迫早産、2 名は多胎妊娠、2 名は前置胎盤だった (表 1)。

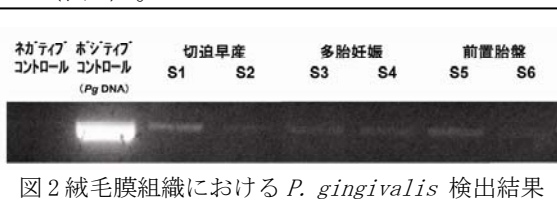


図 2 絨毛膜組織における *P. gingivalis* 検出結果

表 1 絨毛膜で *P. gingivalis* が検出された妊婦の結果

	切迫早産		多胎妊娠		前置胎盤	
	S1	S2	S3	S4	S5	S6
出産時の妊娠週数	36w	34w	36w	35w	32w	33w
歯周病の診断	歯肉炎	歯周炎	歯肉炎	歯肉炎	歯肉炎	歯肉炎
口腔内サンプルのPg検出						
歯肉線下プラーク	+	-	+	+	-	-
唾液	+	-	+	-	-	-

(2) *in vitro* 研究の結果

絨毛膜細胞を *P. ingivalis* LPS で 24 時間刺激すると、培養上清中の IL-6, IL-8 レベルは、濃度依存的に産生が上昇した。*E. coli* LPS で刺激後の培養上清中の IL-6, IL-8 レベルは、コントロールと比較し有意に上昇したが、その影響は、*P. gingivalis* LPS よりも有意に低かった (図 3A, 3B)。

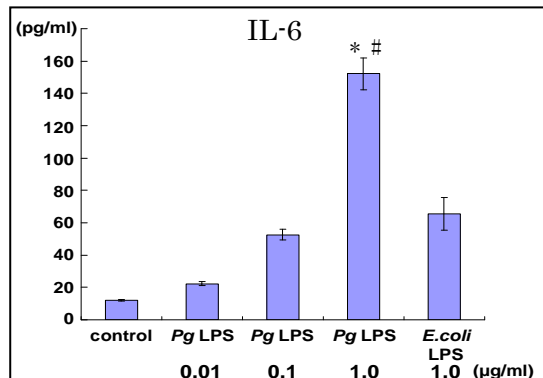


図 3A 絨毛膜細胞への LPS 刺激による培養上清中の IL-6 レベル *: $P < 0.05$; vs control #: $P < 0.05$; vs *E. coli*

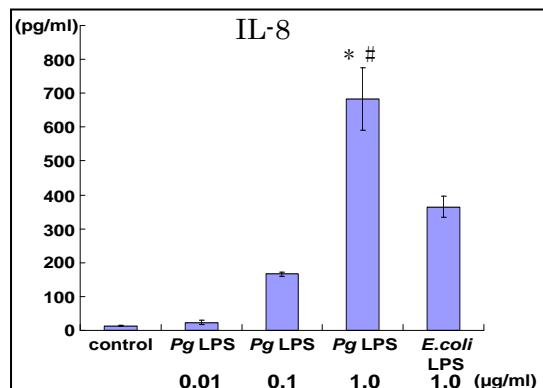


図 3B 絨毛膜細胞への LPS 刺激による培養上清中の IL-8 レベル *: $P < 0.05$; vs control #: $P < 0.05$; vs *E. coli*

絨毛膜細胞を *P. ingivalis* LPS または *E. coli* LPS で 12 時間刺激すると、*P. ingivalis* LPS 刺激により TLR-2 の発現が約 5 倍上昇したが、*E. coli* LPS では発現は変化が認められなかった。また、TLR-4 に関しては、両刺激とも影響を与えなかった (図 4A, 4B)。

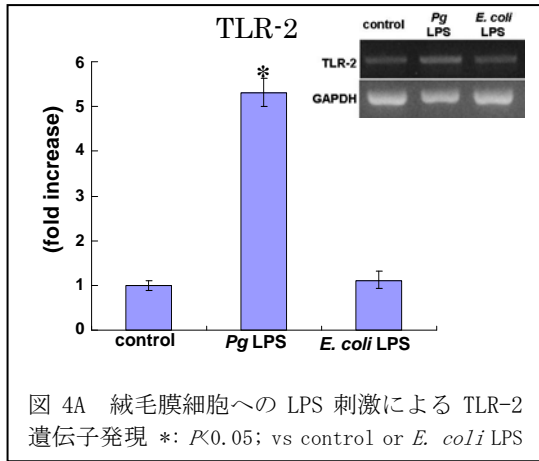


図 4A 絨毛膜細胞への LPS 刺激による TLR-2 遺伝子発現 *: $P < 0.05$; vs control or *E. coli* LPS

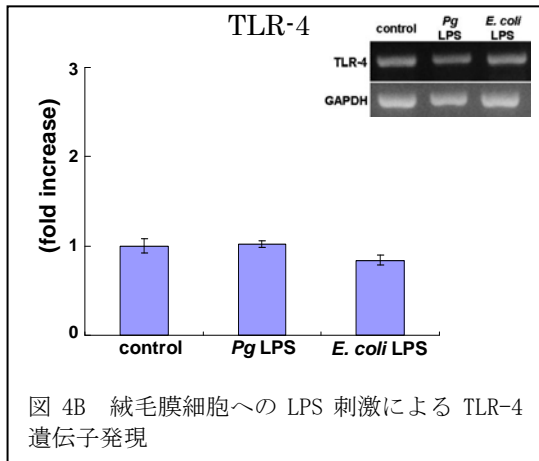


図 4B 絨毛膜細胞への LPS 刺激による TLR-4 遺伝子発現

TLR-2 の遺伝子抑制を行うと、TLR-2 の発現が有意に抑制され、*P. gingivalis* LPS により上昇する TLR-2 の発現は、TLR-2 遺伝子を抑制することで有意に抑制された。TLR-4 を抑制しても TLR-2 の発現には影響しなかった (図 5)。

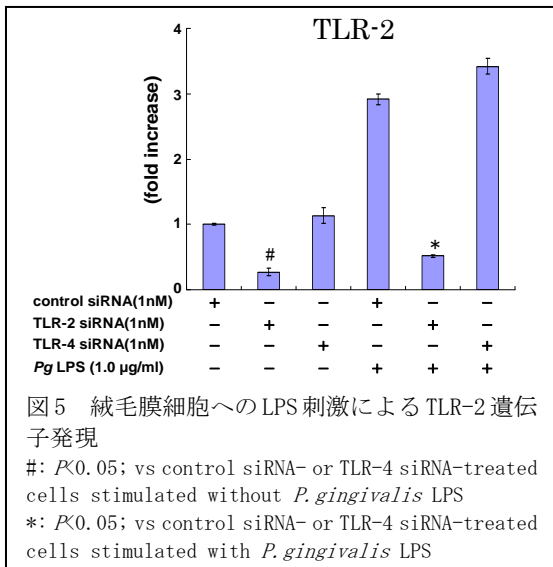


図 5 絨毛膜細胞への LPS 刺激による TLR-2 遺伝子発現

#: $P < 0.05$; vs control siRNA- or TLR-4 siRNA-treated cells stimulated without *P. gingivalis* LPS
*: $P < 0.05$; vs control siRNA- or TLR-4 siRNA-treated cells stimulated with *P. gingivalis* LPS

P. gingivalis LPS により上昇した IL-6 や IL-8 は TLR-2 を抑制することで有意に減少したが、TLR-4 を抑制しても IL-6 や IL-8 の産生に影響を及ぼさなかった (図 6A, 6B)。

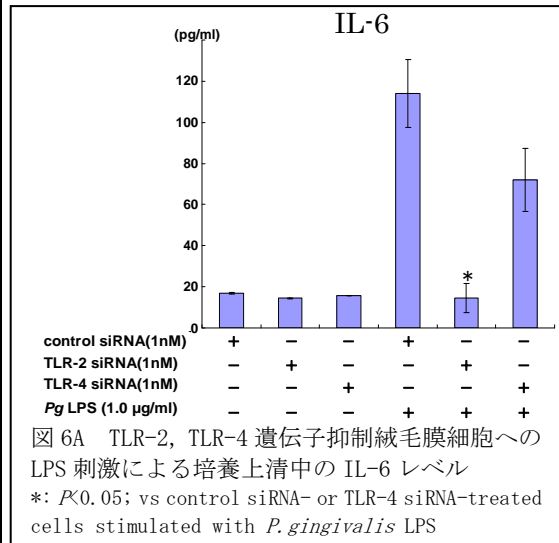


図 6A TLR-2, TLR-4 遺伝子抑制絨毛膜細胞への LPS 刺激による培養上清中の IL-6 レベル

#: $P < 0.05$; vs control siRNA- or TLR-4 siRNA-treated cells stimulated with *P. gingivalis* LPS

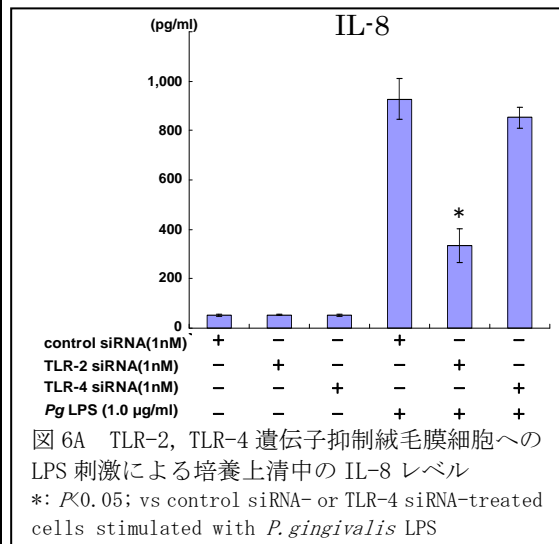


図 6B TLR-2, TLR-4 遺伝子抑制絨毛膜細胞への LPS 刺激による培養上清中の IL-8 レベル

#: $P < 0.05$; vs control siRNA- or TLR-4 siRNA-treated cells stimulated with *P. gingivalis* LPS

(3) まとめ

6名のハイリスク妊婦の絨毛膜組織から *P. gingivalis* が検出された。絨毛膜由来細胞において、*P. gingivalis* LPS は TLR-2 を介して IL-6 と IL-8 の産生を誘導した。これらのことより、子宮内組織に定着した *P. gingivalis* が TLR-2 を介して、早産に関連する炎症性物質を誘導することにより、正常な妊娠維持機構の破綻をきたし、そのことが早産を引き起こす可能性が示唆された。

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2件)

- ① K. Hasegawa-Nakamura, F. Tateishi, T. Nakamura, Y. Nakajima, K. Kawamata, T. Douchi, M. Hatae, K. Noguchi, The possible mechanism of preterm birth associated with periodontopathic *Porphyromonas gingivalis*.、Journal of Periodontal Research、査読あり、2011、in press.
- ② 長谷川梢、立石ふみ、中村利明、中島結実子、野口和行、鹿児島県の妊婦における歯周組織調査、鹿児島県歯科医師会会報、査読なし、Vol.89, No.669, 2010、p8-10.

[学会発表] (計3件)

- ① Kozue Hasegawa, Fumi Tateishi, Toshiaki Nakamura, Yumiko Nakajima, Masato Kamitomo, Kazuya Kawamata, Tsutomu Douchi, Masayuki Hatae, and Kazuyuki Noguchi. The mechanism by which *Porphyromonas gingivalis* is involved in preterm-birth.、96th AAP annual meeting, 2010年10月30日、11月1日(ハワイ(アメリカ合衆国)).
- ② Toshiaki Nakamura, Kozue Hasegawa, Kenji Sakoda, Takashi Matsuyama and Kazuyuki Noguchi. Relationship between human gingival tissues and the renin-angiotensin system.、96th AAP annual meeting, 2010年11月1日(ハワイ(アメリカ合衆国)).
- ③ 長谷川梢、立石ふみ、中村利明、中島結実子、上塘正人、川俣和弥、堂地勉、波多江正紀、野口和行、*Porphyromonas gingivalis*が早産へ関わるメカニズムの

解析、平成22年度日本歯周病学会九州五大学・日本臨床歯周病学会九州支部合同研修会、2010年11月23日(福岡).

[図書] (計1件)

- ① 和泉雄一、古市保志、野口和行、長谷川梢、クインテッセンス出版株式会社、口腔と全身疾患-歯科医療は医学を補完する-、6-4 早産低体重児出産、2010、P156-162

6. 研究組織

(1) 研究代表者

長谷川 梢 (HASEGAWA KOZUE)
鹿児島大学・歯学総合研究科・助教
研究者番号：00404492

(2) 連携研究者

野口和行 (NOGUCHI KAZUYUKI)
鹿児島大学・歯学総合研究科・教授
研究者番号：90218298

堂地勉 (DOUCHI TSUTOMU)
鹿児島大学・歯学総合研究科・教授
研究者番号：60150413

中村利明 (NAKAMURA TOSHIAKI)
鹿児島大学・歯学総合研究科・助教
研究者番号：60381183

中島結実子 (NAKAJIMA YUMIKO)
鹿児島大学・歯学総合研究科・客員研究員
研究者番号：40433081

(2) 研究協力者

波多江正紀 (HATAE MASAYUKI)
鹿児島市立病院・産婦人科・部長

川俣和弥 (KAWAMATA KAZUYA)
愛育病院・副院長

上塘正人 (KAMITOMO MASATO)
鹿児島市立病院・産婦人科・医師

立石ふみ (TATEISHI FUMI)
鹿児島大学・歯学総合研究科・大学院生