

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 23 日現在

機関番号：30110

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23593068

研究課題名(和文) 歯周病罹患による妊婦の早期低体重児出産と抗リン脂質抗体症候群の発症機構の解明

研究課題名(英文) The study of the association between preterm - low birth weight delivery of the pregnant women with periodontitis and anti-phospholipid syndrome

研究代表者

森 真理 (MORI, MARI)

北海道医療大学・歯学部・講師

研究者番号：30275490

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では歯周病と早産・低体重児出産との関連性、および抗リン脂質抗体症候群患者の歯周病原細菌の感染と抗CL-beta2GPI複合体抗体価の変動について検討した。切迫早産の診断で入院している妊婦を対象に、歯周組織検査を行い、口腔衛生指導を行った。また血清中の抗CL-beta2GPI複合体抗体量の測定と、歯周ポケット中の歯周病原細菌の存在の有無を検討した。歯周治療により歯周組織が改善し、歯周ポケット内の歯周病原細菌と血清中の抗CL-beta2GPI複合体抗体量が減少し、正期産で正常体重児を出産できた妊婦がいたことから、抗リン脂質抗体症候群と歯周病との関連性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：In this study, we investigated whether there is the difference of the amount of anti-CL-beta 2 GPI complex antibodies of the pregnant women of anti-phospholipid syndrome due to the presence or absence of periodontopathic bacterial infection. The pregnant women of threatened premature delivery, received periodontal examination. The amounts of anti-CL-beta 2GPI complex antibodies in the serum were measured. Furthermore, the existence of the periodontopathic bacterium in a subject's periodontal pocket was examined. The periodontal tissue status of the pregnant women of anti-phospholipid syndrome improved by periodontal treatment, the amount of anti-CL-beta 2 GPI complex antibodies in the serum and periodontopathic bacterium in the periodontal pocket decreased. The pregnant woman has given birth to the normal weight child by full term birth. We suggested that there were associations between delivery outcomes and periodontal conditions of the anti-phospholipid syndrome pregnant women.

研究分野：医歯薬学

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 切迫早産 抗リン脂質抗体症候群

1. 研究開始当初の背景

切迫早産は、妊娠 37 週未満に分娩時における子宮収縮や頸管熟化などの分娩兆候がみられるが、まだ出産に至っていない臨床状態をいい、早産(妊娠 22 週以降~37 週未満での出産)(PB)・低体重児出産(新生児の体重が 2,500g 未満での出産)(LB)につながる可能性が極めて高い。切迫早産の原因として絨毛膜羊膜炎、頸管無力症、早期破水、絨毛膜下血腫、多胎妊娠、羊水過多などがあるが、原因不明の場合も多い。

歯周病に罹患した歯周組織ではサイトカインなどが産生され、組織破壊が進行する。一方、早産は感染などを契機とするサイトカインやケモカインを介して誘発されることが報告されている¹⁾。このような早産に関与しているサイトカインが歯周病病巣局所からも産生されることから、歯周病と早産の関連性が注目されている。近年、早産・低体重児出産の妊婦はそうでない妊婦に比較して歯周組織の状態が悪かったとの報告がある²⁾。しかし、日本においては未だ十分に検討されていない。

抗リン脂質抗体症候群は beta-2glycoprotein I に対する自己抗体によって血栓の形成が促進される疾患であり、習慣性の早産や血栓の形成が多く認められる。歯周疾患はグラム陰性桿菌であるいくつかの歯周病原菌を原因とする慢性炎症性疾患であり、軽度の歯肉炎から進展した歯周炎は歯肉結合組織の破壊や歯槽骨吸収を引き起こす。歯周炎は成人が歯を喪失する主因であるとともに心臓血管系疾患、糖尿病、早期低体重児出産などのリスクを上昇させることが知られている。これらの全身疾患のリスクを高める要因として歯周炎患者で血栓の形成が促進されている可能性があることから、抗リン脂質抗体症候群と歯周病との関係が注目されている。我々は歯周病原細菌と beta-2glycoprotein I との分子相同性によっ

て歯周病原細菌に対する抗体が beta-2glycoprotein I に結合して血栓形成を促進する可能性について検討してきた。

Blank らはマウスに抗リン脂質抗体症候群様の病態を誘発できるヒトモノクローナル抗体を用いて、その抗体が beta-2glycoprotein I 上の TLRVYK というペプチドを認識すること、その TLRVYK と相同性を有する様々な細菌をマウスに免疫するとモノクローナル抗体と同様の機能を有する抗体が産生される事を報告した。我々はこの beta-2glycoprotein I 上の TLRVYK と相同性を持つ配列を有する歯周病原細菌が存在する可能性について Swiss plot database で検索した所、既に Blank らが指摘していた *P.gingivalis* の他、*A.actinomycescomitans*、*T.denticola*などが相同配列を有する事を見いだした。そこでこれらの菌の感染が相同ペプチドに対する抗体価を上昇させるか否かについて検討し、*A.actinomycescomitans* 感染によって相同ペプチドに対する抗体価が上昇している事を報告した⁴⁾。さらに血栓の形成を特徴とするバージャー病患者において感染が認められるのと共に相同ペプチドに対する抗体価も上昇していたことも報告している。これらのことから歯周病原細菌の感染に伴い beta-2glycoprotein I との分子相同性を有する歯周病原細菌に対する抗体が産生され、その抗体が beta-2glycoprotein I と反応して血栓形成に関する可能性が示唆される。しかし Blank らのモノクローナル抗体が認識する TLRVYK だけがリガンドとして重要であるかという事については検討されておらず、beta-2glycoprotein I 上の他の部位がより重要な役割を担っている可能性も考えられる。

Yasuda らは beta-2glycoprotein I の第 4 ドメイン上の 247 の Valine/Leucine の変異が日本人の抗リン脂質抗体症候群患者およびループスエリテマトーデス患者における抗リン脂質抗体の反応性に影響することを報告している。またモノクローナル抗体 EY2C9 は抗リン脂質抗体症候群を引き起こすが、この抗体もこの部位を認識する事が明らかとなっている。そこでこの 247 番目からのペプ

チド配列を新たにリガンドとして着目し、その配列と歯周病原細菌との相同性を検索した所、*F.nucleatum* のシャペロン蛋白との相同性が認められた。このことから TLRVYK ペプチドとは別に、EY2C9 をはじめとする抗リン脂質抗体が認識するペプチド配列にも歯周病原細菌は相同性を有しており、歯周炎患者において同様のメカニズムで抗体が上昇している可能性が考えられる。

2. 研究の目的

本研究では、切迫早産妊婦の歯周組織状態を調査し、口腔清掃指導 (TBI) スケーリング (Sc) および PMTC を行い、歯周病と PB・LB との関連性について検討する。さらに抗リン脂質抗体症候群患者を被験者として歯周病原細菌の感染に伴う上記ペプチドの抗体価、歯周病原細菌の有無による抗体価の違い、歯周治療による抗体価の変動等について検討し、実際の疾患における両者の関わりについて明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 歯周組織検査

切迫早産の診断で入院している妊婦を対象に、歯肉炎指数 (GI) プラーク付着率 (PII) 歯周ポケット深さ (PPD)、アタッチメントレベル (PAL)、プロービング時の出血 (BOP) を測定し、1 回目の TBI を行った。入院継続中の妊婦には 1 週後、2 週後に TBI、Sc および PMTC を行い、1 ヶ月後に最初と同じ項目の検査を行った。

出産後、新生児の体重および出産時の妊娠週数、妊娠期間の全身状態の調査を行った。

(2) 生化学的検査

検査時に採血を行い、血清中の IL-1 量と IL-8 量を ELISA キットを用いて測定した。出産後、新生児の体重および出産時の妊娠週数、妊娠期間の全身状態の調査を行った。

(3) 抗 CL・β2GPI 検査

血清中の抗 CL・β2GPI 複合体抗体量を EIA キットを用い測定した。

(4) 歯周ポケット内プラーク中の歯周病原性細菌の検査

患者の最も深い歯周ポケットから、プラークを採取し、細菌サンプルを収集した。*Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (*A. actinomycetemcomitans*), *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*), *Treponema denticola* (*T. denticola*), *Prevotella intermedia* (*P. intermedia*), と *Tannerella forthysia* (*T. forthysia*) のそれぞれに特異的なプライマーを用い、16s ribosomal RNA-based polymerase chain reaction detection method で、歯周ポケット内の細菌の存在を検索した。

4. 研究成果

(1) 歯周組織検査結果

本研究に同意した産科的、内科的に原因不明の切迫早産の妊婦は 37 名であった。2 回目の健診を受け、治療効果の評価が可能な妊婦は 26 名であった。切迫早産妊婦 37 名のうち、PB 妊婦は 12 名 (32.5%)、LB 妊婦は 13 名 (35.1%) であった。治療効果の評価が可能な妊婦 (26 名) では、PB 妊婦は 9 名 (34.6%)、LB 妊婦は 8 名 (30.8%) であった (表 1)。

内科的・産科的に原因不明の切迫早産妊婦	37 名	正常産	25 名 (67.5%)
		早産	12 名 (32.5%)
2 回目の健診を受け治療効果の評価が可能な妊婦	26 名	正常体	24 名 (64.9%)
		重児出産	13 名 (35.1%)
		低体重児出産	8 名 (30.8%)

表 1 研究に参加した妊婦

PB 妊婦では正常産妊婦と比較して初診時の PII が有意に高かった。また LB 妊婦では、正常体重児出産妊婦と比較して、初診時の PII と GI が有意に高かった。また、BOP+ の割合も多い傾向が認められた。

TBI、Sc および PMTC の治療効果の評価が可能であった妊婦 (26 名) では、治療の前後で PII と GI が有意に改善し、BOP+ の割合も減少した。PB 妊婦では正常産妊婦と比較して治療後の結果について、いずれの比較でも有意差は認められなかったが、PII と GI が高い傾向を示した。また LB 妊婦では正常体重児出産妊婦と比較して、治療後の PII が有意に高く、GI も高い傾向が認められた。初診時の血清中のサイトカイン量は、いずれにおいても差は認められなかった。2 回目の IL-8 量は初診時と比較して、PB 妊婦では変化が認められなかったが、正常産妊婦では有意に減少した。

		正常産	早産
初診時	Mean PII	0.52(0.45)	0.98(0.32) ¶
	Mean GI	0.37(0.31)	0.91(0.50) ¶
	Mean PPD(mm)	1.87(0.46)	1.96(0.43)
	Mean PAL(mm)	1.62(0.62)	1.78(0.60)
	Mean BOP+ (%)	13.7(18.9)	18.3(25.5)
	IL-1 (pg/ml)	1.91(1.51)	1.39(0.54)
	IL-8(pg/ml)	16.49(9.93)	20.38(11.89)
	終了時	Mean PII	0.16(0.17)
Mean GI		0.17(0.17)	0.23(0.26)
Mean PPD(mm)		1.67(0.38)	1.75(0.31)
Mean PAL(mm)		1.52(0.55)	1.54(0.71)
Mean BOP+ (%)		4.05(6.7)	3.9(5.1)
IL-1 (pg/ml)		1.48(0.73)	1.46(1.05)
IL-8(pg/ml)		8.51(5.99)	21.22(20.44)

表 2 2 回目の健診可能な正常産妊婦と早産妊婦の比較

mean(SD), Student *t*-test ¶: $p < 0.01$

今回の被験者で初診時に採取した血清中の抗 CL-β 2GPI 複合体抗体が高く、使用したキットの結果から抗リン脂質抗体症候群と

診断可能な切迫早産妊婦は 2 名であった。これらの妊婦の一方の歯周ポケット内からは、初診時に *P. gingivalis*, *T. denticola*, と *T. forsythia* が検出された。さらに、1 ヶ月後の終了時には、一方の切迫早産妊婦では、歯周組織状態が改善し、*T. denticola*, と *T. forsythia* は検出されなくなった。また、血清中の抗 CL-β 2GPI 複合体抗体は減少し、この妊婦は正常産で正常体重児を出産した。もう一方の切迫早産妊婦では初診時に *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, *T. denticola*, が検出された。1 ヶ月後には歯周組織状態は改善し、*A. actinomycetemcomitans*, と *T. denticola*, は検出されなくなったが、抗 CL-β 2GPI 複合体抗体の値はさらに上昇し、早産で低体重児を出産した。

		正常体重児出産	低体重児出産
初診時	Mean PII	0.52 (0.45)	1.04 (0.19)
	Mean GI	0.48 (0.30)	0.96 (0.52) ¶
	Mean PPD(mm)	1.87 (0.43)	1.97 (0.49) ¶
	Mean PAL(mm)	1.64 (0.61)	1.75 (0.65)
	Mean BOP+ (%)	13.3 (18.5)	19.9 (26.7) ¶
	IL-1 (pg/ml)	1.60(1.33)	0.81(0.59) ¶
終了時	IL-8(pg/ml)	14.60(8.09) ¶	15.49(8.83) ¶
	Mean PII	0.15 (0.17)	0.35 (0.36)
	Mean GI	0.17 (0.16)	0.25 (0.28)
	Mean PPD(mm)	1.66 (0.37)	1.77 (0.32)
	Mean PAL(mm)	1.46 (0.62)	1.67 (0.56)
	Mean BOP+ (%)	3.8 (6.5)	4.4 (5.2)
	IL-1 (pg/ml)	1.55(0.74)	1.08(0.71)
	IL-8(pg/ml)	13.13(11.52)	11.42(13.54)

表 3 2 回目の健診可能な正常体重児出産妊婦と低体重児出産妊婦の比較

mean (SD), Student *t*-test ¶: $p < 0.05$, ¶: $p < 0.01$

これまで報告されている研究結果の多くから、歯周病と早産・低体重児出産に相関があるという結論が導かれている³⁾。

本研究においては、切迫早産から PB、あるいは

LBに至った妊婦では、切迫早産から正期産妊婦、あるいは正常体重児出産妊婦に比較して口腔清掃状態が悪かった。またTBI、ScおよびPMTCを行っても、LB妊婦では正常体重児出産妊婦に比較して、歯周組織状態の改善量は有意に少なく、正期産あるいは正常体重児出産妊婦では減少傾向にあった血清中サイトカイン量が、PB妊婦あるいはLB妊婦では増加傾向にあった。これらのことから歯周病と切迫早産およびPB、LBの発現に関係がある可能性が考えられた。また、抗リン脂質抗体症候群患者の歯周病原性細菌の感染にともなう抗CL・β2GPI複合体抗体価の上昇と歯周治療による抗体価の変化は、個体差もあり多様であることが推測された。しかし、歯周治療により歯周組織が改善し、歯周ポケット内の歯周病原性細菌が減少するとともに、血清中の抗CL・β2GPI複合体抗体価が減少し、結果として正期産で正常体重児を出産できた妊婦もいたことから、抗リン脂質抗体症候群と歯周炎には関連が見られることが示唆された。

妊婦が健康な歯周組織を維持することは、口腔内のみならず、全身、そして次の世代のヘルスプロモーションの第一歩としても重要であることが示唆された。

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 Nagasawa T, Shimizu S, Kato S, Nakatsuka Y, Kado T, Hidaka T, Shirai K, Mori M, and Furuichi Y. Host-microbial co-evolution in periodontitis associated with *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* infection. *Journal of Oral Biosciences*, 2014, 58:11-17. 査読あり DOI 10.1016/j.job.2013.10.002

2 森 真理. 新しい歯周組織再生誘導薬について, 北海道医療大学個体差医療科学センター要覧, 2014, 13-16. 査読あり

〔学会発表〕(計 5 件)

1 Toshiyuki Nagasawa, Sintaro Shimizu, Takashi Kado, Tosiaki Komatsu, Tatsuhiko Hidaka, Satsuki Kato, Mari Mori and Yasushi Furuichi. Iron acquisition of *A. actinomycetemcomitans* with JP2 type leukotoxin isolated from Japanese periodontitis patients in Hokkaido 9th Asian Pacific Society of Periodontology Meeting Sep9-10, 2012, Hong Kong

2 長澤敏行, 清水伸太郎, 加藤幸紀, 門 貴司, 日高竜宏, 森 真理, 古市保志. 北海道在住の日本人家族から分離された JP2 タイプの

A. actinomycetemcomitans の特徴 第55回春季日本歯周病学会学術大会、2012年5月 札幌

3 清水伸太郎, 長澤敏行, 門 貴司, 小松寿明, 日高竜宏, 加藤幸紀, 森 真理 古市保志. JP2 型 leukotoxin promoter を有する *A. actinomycetemcomitans* 菌の解析 第55回春季日本歯周病学会学術大会、2012年5月 札幌

4 清水伸太郎, 長澤敏行, 門 貴司, 小松寿明, 日高竜宏, 加藤幸紀, 森 真理 古市保志. JP2 型 leukotoxin promoter を有する

A. actinomycetemcomitans 菌の解析 北海道医療大学歯学会第30回学術大会 2012年3月3日 札幌

5 長澤敏行, 清水伸太郎, 日高竜宏, 門貴司, 加藤幸紀, 森 真理, 古市保志. JP2 型 leukotoxin promoter を有する

A. actinomycetemcomitans 菌の分離と分析 日本歯科保存学会 2011年度秋季学術大会(第135回) 2011年10月20-21日 大阪

〔図書〕(計 3 件)

1 歯周病と早産・低体重児出産、古市保志・森真理、産科と婦人科 診断と治療社、2011年4月1日 第78巻4号 468-474

- 2 歯周病が妊婦に与える影響と口腔内疾患の知識、森 真理 妊産婦と赤ちゃんケア 日総研 2012年3月25日 vol.4 No2 43-48
- 3 妊婦と歯周病 予防は？治療は？ 森真理、BIRTH ペリネイタルナーシング、医学出版、2013/6、52-61

6 . 研究組織

(1)研究代表者

森 真理 (MORI,Mari)
北海道医療大学・歯学部・講師
研究者番号：30275490

(2)研究分担者

長澤敏行 (MAGASAWA,Toshiyuki)
北海道医療大学・歯学部・准教授
研究者番号：90262203

古市保志 (FURUICHI,Yasushi)
北海道医療大学・歯学部・教授
研究者番号：80305143

家子正裕 (IEKO,Masahiro)
北海道医療大学・歯学部・教授
研究者番号：50250436

(3)連携研究者

()

研究者番号：