

# 論 文 要 旨

## Detection of *Fusobacterium nucleatum* in chorionic tissues of high-risk pregnant women

### 〔ハイリスク妊婦の卵膜における *Fusobacterium nucleatum* の検出〕

立石 ふみ

#### 【序論および目的】

歯周病と早産・低体重時出産との関連についてこれまで多くの報告があるが、歯周病が早産・低体重児出産に關与するメカニズムは未だ解明されていない。我々は以前に、子宮頸管の短縮や拡張または性器出血といった所見を認める早産のリスクの高い妊婦(ハイリスク妊婦)の子宮内組織(卵膜)において *Porphyromonas gingivalis* (*Pg*)が検出されることを報告し、早産・低体重児出産との関連の可能性を示した。本研究では被験者に正常出産妊婦を追加し、出産前に妊婦の口腔内検査を行うとともに、出産時に得られた卵膜における歯周病原細菌(*Prevotella intermedia* (*Pi*), *Tannerella forsythia* (*Tf*), *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (*Aa*), *Treponema denticola* (*Td*)及び *Fusobacterium nucleatum* (*Fn*))の存在の有無を調べた。さらに、培養ヒト絨毛膜由来細胞を用いて、*Fn* 刺激による分娩関連サイトカインである IL-6 の産生と、出産開始時期の決定に關与するホルモンである Corticotrophin-Releasing Hormone (CRH) の産生への影響を検討した。

#### 【材料および方法】

1. 被験者は正常出産妊婦 15 名、及びハイリスク妊婦 24 名とした。インフォームドコンセント取得後、出産前に歯周組織検査(probing pocket depth (PPD), clinical attachment level (CAL), bleeding on probing (BOP), plaque index (PII), gingival index (GI))及び口腔内サンプル(唾液及び歯肉縁下プラーク)を採取し、出産時に卵膜を採取した。採取したサンプルから DNA を抽出し、*Pi*, *Tf*, *Aa*, *Td* 及び *Fn* の検出を PCR 法を用いて行った。
2. 卵膜より分離培養した絨毛膜由来細胞を用いて、polymyxin B 存在下または非存在下で heat-killed *Fn* にて刺激した。その後、TLR-2 及び TLR-4 の遺伝子発現を real-time PCR 法を用いて解析し、培養上清中の IL-6 量を ELISA 法にて測定した。
3. 絨毛膜由来細胞または、siRNA により toll-like receptor (TLR)-2 または TLR-4 の遺伝子発現を抑制した絨毛膜由来細胞を用いて、*Fn* LPS で刺激、TLR-2 及び TLR-4 の遺伝子発現、培養上清中の IL-6 量及び CRH 量を測定した。

#### 【結 果】

1. ハイリスク妊婦における PPD, CAL, BOP, PII, GI の平均値は正常出産妊婦と比べて有意に高かった。
2. 24 名のハイリスク妊婦のうち、全ての妊婦の口腔内サンプルと 7 名の卵膜サンプルより *Fn* が検出された。*Pi*, *Tf*, *Aa*, *Td* はハイリスク妊婦の口腔内サンプルのいくつかで検出されたが、卵膜サンプルでは検出されなかった。正常出産妊婦の口腔内サンプルのいくつかでは *Fn*, *Pi*, *Tf*, *Aa*, *Td* が検出されたものの、卵膜サンプルからは検出されなかった。
3. 絨毛膜由来細胞を heat-killed *Fn* で刺激すると、培養上清中の IL-6 レベル及び TLR-2 の遺伝子発現レベルが有意に亢進したが、polymyxin B を加えるとその IL-6 レベル及び TLR-2 の遺伝子発現レベ

ルは有意に減少した。

4. 絨毛膜由来細胞を *Fn* LPS で刺激すると培養上清中の IL-6 レベル及び CRH レベルと、TLR-2 の遺伝子発現レベルが有意に上昇した。

5. *Fn* LPS 刺激により上昇した IL-6 レベル及び CRH レベルは、TLR-2 及び TLR-4 遺伝子発現を抑制することで有意に減少したが、TLR-2 遺伝子抑制下と比較して TLR-4 遺伝子抑制下で有意に産生が抑制された。

#### 【考察及び結論】

本研究により、ハイリスク妊婦は正常出産妊婦と比べて歯周組織の状態が悪化していることが明らかとなった。また 29% のハイリスク妊婦の卵膜組織から *Fn* が検出され、それらの妊婦は全て口腔内においても *Fn* が検出されたことから、口腔内の *Fn* が血液を介して卵膜に伝播、局在している可能性を示した。しかし、本研究では子宮頸部や膣からのサンプリングを行っていないため、上行感染の可能性も否定できない。卵膜組織への *Fn* の定着には、母体の免疫反応や、*Fn* の感染量や病原性が関与していると考えられる。

絨毛膜由来細胞において heat-killed *Fn* は IL-6 の産生と、TLR-2 の発現を上昇させるが、その反応は polymyxin B で抑制されることから、*Fn* の作用は主に LPS によるものであることが示された。また *Fn* LPS は、IL-6 及び CRH の産生を誘導し、その経路は TLR-2 及び TLR-4 を介していることが明らかになった。

我々は以前に、*Pg* がハイリスク妊婦の卵膜組織から検出されること、また *Pg* LPS が TLR-2 を介し IL-6、IL-8 の産生を誘導することを報告している。これらのことから、子宮内組織に定着した *Pg* や *Fn* の構成成分である LPS が、TLR-2 または TLR-2 及び TLR-4 を介して分娩の開始に関わるサイトカインやホルモンの発現上昇を促すことにより、妊娠維持機構に影響を及ぼし、出産に影響を与えている可能性が示唆された。

(Journal of Clinical Periodontology, in press)

## 論文審査の要旨

報告番号	総研第 174 号	学位申請者	立石 ふみ
審査委員	主査	於保 孝彦	学位
	副査	松口 徹也	副査
	副査	徳田 雅行	副査
			博士 (医学 (歯学)・学術)
			宮脇 正一
			町頭 三保

**Detection of *Fusobacterium nucleatum* in chorionic tissues of high-risk pregnant women**(ハイリスク妊婦の卵膜における *Fusobacterium nucleatum* の検出)

歯周病と早産・低体重時出産との関連についてこれまで多くの報告があるが、歯周病が早産・低体重児出産に関与するメカニズムは未だ解明されていない。学位申請者らは以前に *Porphyromonas gingivalis* (*Pg*) が卵膜で検出されることを報告し、早産・低体重児出産との関連の可能性を示した。本研究では被験者に正常出産妊婦を追加し、出産前に妊婦の口腔内検査を行うとともに、出産時に得られた卵膜における他の歯周病原細菌 (*Prevotella intermedia* (*Pi*), *Tannerella forsythia* (*Tf*), *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (*Aa*), *Treponema denticola* (*Td*) 及び *Fusobacterium nucleatum* (*Fn*)) の存在の有無を調べた。さらに、培養ヒト絨毛膜由来細胞を用いて、*Fn* 刺激による分娩関連サイトカインである IL-6 の産生と、出産開始時期の決定に関与するホルモンである Corticotrophin-Releasing Hormone (CRH) の産生への影響を検討した。

その結果、本研究で以下の知見が明らかにされた。

- 1) ハイリスク妊婦における PPD, CAL, BOP, PII, GI の平均値は正常出産妊婦と比べて有意に高かった。
- 2) 24 名のハイリスク妊婦のうち、全ての妊婦の口腔内サンプルと 7 名の卵膜サンプルより *Fn* が検出された。  
*Pi*, *Tf*, *Aa*, *Td* はハイリスク妊婦の口腔内サンプルのいくつかで検出されたが、卵膜サンプルでは検出されなかった。正常出産妊婦の口腔内サンプルのいくつかでは *Fn*, *Pi*, *Tf*, *Aa*, *Td* が検出されたものの、卵膜サンプルからは検出されなかった。
- 3) 絨毛膜由来細胞を heat-killed *Fn* で刺激すると、培養上清中の IL-6 レベルが有意に亢進したが、polymyxin B を加えるとその IL-6 レベルは有意に減少した。
- 4) 絨毛膜由来細胞を *Fn* LPS で刺激すると培養上清中の IL-6 及び CRH レベルと、TLR-2 の遺伝子発現が有意に上昇した。
- 5) *Fn* LPS 刺激により上昇した IL-6 及び CRH レベルは、TLR-2 及び TLR-4 遺伝子発現を抑制することで有意に減少したが、TLR-2 遺伝子抑制下と比較して TLR-4 遺伝子抑制下で有意に産生が抑制された。

本研究により、ハイリスク妊婦は正常出産妊婦と比べて歯周組織の状態が悪化していることが明らかとなり、*Fn* が 29% のハイリスク妊婦の卵膜組織から検出された。絨毛膜由来細胞において heat-killed *Fn* は IL-6 の産生と、TLR-2 の発現を上昇させるが、その反応は polymyxin B で抑制されることから、*Fn* の作用は主に LPS によるものであること、また *Fn* LPS は、IL-6 及び CRH の産生を誘導し、その経路は TLR-2 及び TLR-4 を介していることが示された。学位申請者らは以前に、*Pg* LPS は TLR-2 を介し IL-6、IL-8 の産生を誘導することを報告しており、これらのことから、子宮内組織に定着した *Pg* や *Fn* の構成成分である LPS が、TLR-2 または TLR-2 及び TLR-4 を介して分娩の開始に関わるサイトカインやホルモンの発現上昇を促すことにより、妊娠維持機構に影響を及ぼし、出産に影響を与えている可能性が示唆された。

本研究は、歯周病原細菌である *Fn* が早産・低体重児出産に関わる可能性を示した重要な研究である。よって本研究は学位論文として十分な価値を有するものと判定した。

## 最終試験の結果の要旨

報告番号	総研第 174 号		学位申請者	立石 ふみ
審査委員	主査	於保 孝彦	学位	博士 (医学・ <u>歯学</u> ・学術)
	副査	松口 徹也	副査	宮脇 正一
	副査	徳田 雅行	副査	町頭 三保
<p>主査および副査の5名は、平成24年2月14日、学位申請者 立石 ふみ君に面接し、学位申請論文の内容について説明を求めると共に、関連事項について試問を行った。具体的には、以下のような質疑応答がなされ、いずれについても満足すべき回答を得ることができた。</p> <p>質問1) 早産の原因として感染症も挙げられているか? その割合や感染経路は?  (回答) 早産の risk factor である細菌性膣炎の頻度は妊婦の9~23%、絨毛膜羊膜炎は、早産において32.8%、正期産で10%の頻度でおこると報告されており、主に膣や子宮からの上行性の感染が原因であると考えられている。</p> <p>質問2) なぜ今回卵膜の中でも絨毛膜由来細胞を実験に用いたのか?  (回答) 口腔内から血行性に感染した細菌が胎盤から血管が多く存在する絨毛膜に移行している可能性を考えたため。</p> <p>質問3) 上行性感染はどのような検査によって確認することができるか?  (回答) 膣や子宮、卵膜及びパートナーの口腔内からサンプルを採取し、シーケンス解析を行う。</p> <p>質問4) 歯周治療の介入はどの時点で行うのが望ましいと考えているか?  (回答) 歯周治療による一過性の菌血症を考慮すると、出産前に治療を行うべきであると思われる。</p> <p>質問5) 卵膜でFnが検出されたハイリスク妊婦は歯肉炎である率が高かったのはなぜだと考えられるか?  (回答) Fnは軽度の歯肉炎でも検出され、口腔内におけるFnの量や、母体の免疫応答が卵膜への定着に関与しているのではないかと考えている。</p> <p>質問6) 精製度の高いLPSの場合TLR-2、TLR-4どちらか一方を介するというのが一般的だが、今回の結果をどう考えるか?  (回答) 本研究のLPSは市販ではなく共同研究者が精製したものであり、4.8%程度のタンパクが含まれていた。その影響も否定は出来ないが、含有率は微量であるため、結果に大きく影響を及ぼしてはいないと考えている。</p> <p>質問7) LPSのシグナル伝達におけるCD14やMD-2の関与は、絨毛膜由来細胞においてはどうかであったか?  (回答) soluble CD14を含むFBSの濃度を上げることでIL-6の発現が上昇したことから、soluble CD14がLPSのシグナル伝達を促したと考えられる。細胞表面に発現するCD14、MD-2は本研究において確認しなかった。</p> <p>質問8) 卵膜内における他の常在細菌の影響やFnの感染による影響は?  (回答) 正常な膣内では常在菌として乳酸桿菌などが存在しているが出産への影響はないとされている。しかし、常在菌以外の嫌気性菌が侵入、増殖すると炎症反応が引き起こされる。Fnは早産妊婦の羊水中から高頻度で検出される菌であるという報告から、出産へ影響を及ぼしている可能性が考えられる。</p> <p>質問9) Fnの感染経路は血行性のみなのか?  (回答) 本研究では膣や子宮からのサンプル採取を行っていないため上行性感染の可能性は否定できない。</p> <p>質問10) FnはPgと比べて検出率や病原性に違いがあるか?  (回答) ハイリスク妊婦の卵膜からの検出率はFnとPgでほとんど変わらなかった。in vitroにおいては同濃度で刺激を行った場合Fn LPSの方がLPS活性が低かったにも関わらず有意にIL-6の産生を亢進させたため、卵膜組織においてはPgよりFnの方が病原性は高いかもしれない。</p>				

## 最終試験の結果の要旨

質問 11) ハイリスク妊婦で歯周炎の率が高いが、歯周病が早産のリスクを高めていると考えているか、またその逆か？

(回答) 早産妊婦の子宮内組織から歯周病原細菌が検出されるという多くの報告から、歯周病が出産に影響を及ぼしている可能性はあると考えている。

質問 12) ハイリスク妊婦の被験者は今後増やしていく予定か？

(回答) ハイリスク妊婦の中でも原因不明の切迫早産妊婦の被験者数を増やし、正常妊婦と比較検討を行う予定である。

質問 13) CRH は中枢ではなく局所での産生が autocrine で作用しているのか、またサイトカイン産生への影響は？

(回答) 子宮内局所で産生された CRH が paracrine で周囲の細胞に影響を及ぼし、胎盤や胎児へ作用し出産に影響を与えていると考えている。また、CRH レセプター抑制下で LPS 刺激を行った実験において IL-6 の産生量へ影響はなかったため、CRH が絨毛膜由来細胞では IL-6 の産生に関与しているとは考えていない。

質問 14) 細胞は正常出産妊婦数名から採取したのか、早産妊婦の卵膜からの培養は行わなかったか？

(回答) 早産妊婦からの細胞培養は行わず、正常出産妊婦 3 名から細胞を分離培養した。

質問 15) CRH は出産時に中枢性にも産生されるか？

(回答) 出産時には、母体の主に胎盤や卵膜から産生される。

質問 16) *Fn* が原因で死産となった以前の報告で *Fn* が母親の口腔内由来であるとした根拠は？

(回答) 母体の口腔内、及び胎盤と胎児からのみ検出され、腸管や膣からは検出されなかったため。

質問 17) 今回の論文における新しい知見は何か？

(回答) 子宮内組織からの *Pg* 以外の歯周病原細菌の検出は国内で初めての報告であり、歯周病原細菌刺激によって CRH が上昇するという報告は新規の知見である。

質問 18) 歯周組織検査 1/2 顎の選択基準は？

(回答) ハイリスク妊婦が安静な状態を保てる姿勢で測定しやすい上下左右の 1/2 顎を選択した。

質問 19) 唾液は安静唾液か、刺激唾液か？採取時間や咬み方は一定であったか？

(回答) 1 分間各自のリズムでワッテを咬むことで得た唾液を採取し、遠心して得た沈殿物から DNA を抽出した。

質問 20) 今回使用した *Fn* の株の毒性は？また *Fn* は侵入能がある菌なのか？ある場合、細胞侵入に関わる病原因子にはどのようなものがあるか？

(回答) 毒性に関しては、本研究では確認しなかった。*Fn* は細胞への侵入が報告されている。子宮内組織への定着には *FadA* 因子が関与しているという報告があるが、侵入に関与する因子は明らかになっていない。

質問 21) *Fn* が卵膜から検出されなかったハイリスク妊婦においても、早産・低体重児出産が多いがなぜか？

(回答) ハイリスク妊婦は早産に対する産科的リスクが高かったため、卵膜からの *Fn* の検出の有無に関わらず早産・低体重児出産が多いという結果になったと思われる。

質問 22) Heat-killed *Fn* や *Fn* LPS 刺激によって細胞の形態的な変化はなかったか？

(回答) 本実験全てにおいて、刺激による細胞の形態変化はなかった。

質問 23) *Fn* LPS 1 $\mu$ g/ml は *Fn* の菌数どの位に相当するか？

(回答) 一般的な刺激濃度である 1 $\mu$ g/ml で刺激を行ったが、菌数の測定は行わなかった。

質問 24) Figure 4 の TLR の発現は 12 時間でみているが、siRNA 実験は 24 時間でみた理由は？

(回答) 24 時間で観察した LPS 刺激による IL-6、CRH の産生量変化の結果と比較するため。12 時間でも同様の傾向を示すことを確認している。

以上の結果から、5 名の審査委員は申請者が大学院博士課程修了者としての学力・識見を有しているものと認め、博士（歯学）の学位を与えるに足る資格を有するものと認定した。