

## 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)