

学位申請論文

歯周感染・炎症が妊娠や子宮組織に及ぼす影響の 免疫学的検討

岡山大学 大学院医歯薬学総合研究科 病態制御科学専攻
病態機構学講座 歯周病態学分野

永田 千晶

Immunological Investigation of the Effects of Periodontal Infection and Inflammation on Pregnancy Outcome and Uterine Tissue

Department of Pathophysiology - Periodontal Science,
Graduate School of Medicine, Dentistry and Pharmaceutical Sciences, Okayama University

NAGATA Chiaki

(令和4年12月9日受付)

緒言

世界保健機関（World Health Organization : WHO）では、不妊症は男性または女性の生殖系の疾患で、12 カ月以上避妊をせずに定期的に性交渉を行っているにも関わらず妊娠に至らない状態と定義されている¹⁾。不妊症は世界的に増加してきており、推定 4,800 万組のカップルが不妊症という報告もある²⁾。日本において、不妊を心配したことがある夫婦の割合は3組に1組を超え、子供のいない夫婦では55.2%にのぼる³⁾。また、実際に不妊検査や治療を受けたことがある夫婦は全体で18.2%であり、子供のいない夫婦では28.2%と報告されている³⁾。このように、近年、日本では不妊治療の件数は増加傾向にあり、2017年には全新生児の約6%にあたる5万6千人が体外受精によって誕生している⁴⁾。一方で、不妊症の治療を希望する夫婦にとって、不妊治療は身体的苦痛、精神的な落ち込み、さらに経済的な負担などの悩みとなるため、不妊は大きな社会問題の一つとなっている⁵⁾。

不妊の原因には、男性要因と女性要因があり、WHOによると、男性要因が24%、女性要因が41%、男女共の要因の場合は24%と報告されている⁶⁾。不妊要因として、男性では、精巣機能不全、射精機能障害、そして精路通過障害があげられる。女性では、卵巣機能不全、多嚢胞性卵巣症候群、子宮内膜症、子宮筋腫、子宮内膜ポリープ、そして慢性子宮内膜炎がある。男女両方では、性腺機能低下症、高プロラクチン血症、線毛機能障害、嚢胞性線維症、感染、全身疾患、そして生活習慣が関連している⁷⁾。一方、排卵機能、卵管の通過性、さらには精液分析などの検査をしても、不妊治療を

希望するカップルの 10～30%は不妊の原因が特定されないという報告がある^{8,9)}。このように不妊検査をしても明らかな原因が見つからない不妊は、原因不明不妊と定義されている¹⁰⁾。近年、原因不明不妊の病態として、子宮内膜における制御性 T 細胞 (regulatory T cell: Treg) の発現低下や機能低下が示唆されている^{11,12)}。すなわち、着床・妊娠を維持するためには子宮内膜における Treg の働きを中心とした免疫寛容が必要であると報告されている¹³⁾。さらに、Treg の細胞数の減少や機能低下は人工授精の度重なる失敗、再発性流産、そして子癩前症と関連がある¹³⁾とされる一方で、Treg の割合の増加は、不妊の原因の一つと考えられている慢性子宮内膜炎と関連があるといった報告¹⁴⁾もある。

不妊のリスクファクターとして、年齢、喫煙、肥満、痩せ、さらにはストレスなどが報告されており¹⁵⁾、近年では不妊と口腔内の慢性炎症性疾患である歯周炎との関連も報告されている^{16,17)}。歯周炎は口腔常在細菌叢のバランスの乱れによって生じる慢性炎症性疾患である。すなわち、歯肉溝部に形成されたバイオフィルムの成熟に伴い、*Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*) をはじめとした歯周病原細菌が増加することによって常在細菌叢が変化することにより生じる¹⁸⁾。そして、宿主免疫反応が惹起されるとともに、免疫細胞や歯肉線維芽細胞が腫瘍壊死因子 (tumor necrosis factor: TNF) $-\alpha$, インターロイキン (interleukin : IL) -1β , さらに IL-6 などの多様な炎症性サイトカインを産生することによって、免疫細胞が一層活性化され、免疫・炎症反応が遷延化する¹⁹⁾。その結果、歯周組織破壊が深部にまで波及し、歯槽骨の吸収が進行する²⁰⁾。

女性不妊と歯周炎の関連については、唾液中に検出される *P. gingivalis* に対する immunoglobulin (Ig) A や IgG 抗体価が高い女性では、抗体価が低い女性に比べて妊娠率が低下するという報告²¹⁾や、歯周炎に罹患している女性では、妊娠を希望したのち実際に妊娠が成立するまでの平均期間が、歯周炎に罹患していない女性と比較して、有意に延長するという報告¹⁵⁾がある。また、原因不明不妊患者では、う蝕や歯周炎の罹患率が高いといった報告²²⁾もある。一方、男性不妊と歯周炎の関連については、歯石の沈着や歯肉からの出血がある歯周炎男性では、精子欠乏症や精子無力症といった生殖機能の低下を伴う疾患を有する割合が高いことが明らかになっている²³⁾。このように臨床疫学研究において歯周炎と不妊症の関連性が複数報告されているものの、実際の不妊治療中患者における *P. gingivalis* に対する血清 IgG 抗体価などをはじめとした歯周炎の指標や罹患状況は不明であり、不妊症と歯周炎を結びつける分子メカニズムは未だ不明である。

そこで本研究では、不妊症と歯周炎の関係を分子レベルで検討するために、臨床研究として、不妊治療中患者と自然妊娠妊婦の間で *P. gingivalis* に対する血清 IgG 抗体価を比較した。また、基礎研究として、*P. gingivalis* 感染絹糸結紮歯周炎マウスモデルを用いて、歯周組織での感染と炎症が妊娠結果や子宮に与える影響を、組織学的および免疫学的に検討した。

材料と方法

1. 臨床研究

1) 研究対象者

2020年1月から2022年4月の期間に三宅医院産科ならびに三宅医院生殖医療センターを受診した有歯顎者で、本研究の参加同意が得られた30歳以上45歳未満の自然妊娠妊婦99名および不妊治療中患者98名を対象とした。自然妊娠妊婦群では経膈分娩で出産した77名を抽出し、不妊治療中患者群では原因不明不妊と診断された患者71名を解析対象とした(図1)。本横断研究はSTROBE声明に従い、岡山大学倫理委員会の承認を得た後に、研究開始前に十分な説明を行い、全ての研究対象者から書面による同意を得た(岡山大学倫理審査委員会 承認番号 #1909-023)。同意取得後に3.0 mLの末梢血液を採血し、遠心分離(4 °C, 1,710 × g, 5分)により血清を分離し、-30 °Cで保管した。

2) 酵素結合免疫吸着測定法を用いた歯周病原細菌に対する血清抗体価検査

酵素結合免疫吸着測定法(Enzyme-Linked Immunosorbent Assay: ELISA)検査を用いた*P. gingivalis*に対する血清IgG抗体価は、大山らの方法²⁴⁾に準じ測定した。細菌抗原は*P. gingivalis* FDC381, *P. gingivalis* SU63, そして*P. gingivalis* W83の3菌株を用い、Murayamaらの方法²⁵⁾に従って調整した超音波破碎抽出抗原を使用した。前述の抗原の乾燥物を polyoxyethylene sorbitan monolaurate (Tween 20) 含有りん酸緩衝液(phosphate-buffered saline: PBS) {PBS with Tween 20: PBST, pH 7.4, 0.8% (w/v) 塩化

ナトリウム, 0.02% (w/v) リン酸二水素カリウム, 0.29% (w/v) リン酸水素二ナトリウム十二水和物, 0.02% (w/v) 塩化カリウム, 0.02% (w/v) アジ化ナトリウム, 0.05% (v/v) Tween20} に溶解して 1.0 mg/mL の濃度に調整し, さらに 50 mM 炭酸-重炭酸緩衝液 {pH 9.6, 0.17% (w/v) 炭酸ナトリウム, 0.3% (w/v) 炭酸水素ナトリウム} に溶解して, 最終濃度 10 µg/mL の抗原溶液を調整した。各抗原溶液を 96 well ELISA Microplate (Greiner bio-one, Kremsmünster, Austria) の各ウェルに 100 µL 添加し, 4 °C で 6~8 時間放置して抗原をプレートに固相した。標準血清は全身疾患および喫煙歴のない 25~29 歳の男女 5 名の血清を等量混和したものをを用い, PBST で 12.5~51,200 倍に段階希釈した。被験者から採取した血清は, PBST で 3,200 倍に希釈した。抗原を固相したプレートを PBST で 3 回洗浄した後, 標準血清ならびに被験血清を 100 µL ずつ添加し, 4 °C で 6~8 時間反応させた。二次抗体は Alkaline Phosphatase AffiniPure F (ab') Fragment Goat Anti-Human IgG (H+L) (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, USA) を PBST で 5,000 倍に希釈したものをを用い, プレートを PBST で 3 回洗浄した後, 各ウェルに 100 µL 添加し, 37 °C で 2 時間反応させた。発色基質は, *p*-ニトロフェニルりん酸二ナトリウム六水和物 (富士フイルム和光純薬, 大阪, 日本) をジエタノールアミン緩衝液 {pH 9.8, 10% (v/v) 2,2'-イミノジエタノール, 0.01% (w/v) 塩化マグネシウム六水和物, 0.12% (w/v) アジ化ナトリウム} に溶解して, 1 mg/mL の濃度に調整したものをを用い, プレートを PBST で 3 回洗浄した後, 各ウェルに 100 µL 添加して, 室温で反応させた。吸光度の測定には, iMark Microplate Reader および

Microplate Manager Software 6.3（ともに Bio-Rad, Hercules, CA, USA）を用い、12.5 倍希釈した標準血清のウェルの波長 405/490 nm における吸光度が 1.6 に到達した時点の各ウェルの吸光度を測定し、標準血清を段階希釈して得られた検量線（4 パラメーターロジスティック曲線）をもとに吸光度を ELISA Unit (EU) に変換した。なお、3,200 倍希釈した標準血清と同じ吸光度を示す被験血清の EU を 100 と設定し、標準血清（12.5～51,200 倍希釈）が示す EU25,600～6.25 の範囲を超える被験血清については、EU25,600 以上の血清は EU25,600 とし、EU6.25 以下の血清は EU6.26 とした。さらに、抗体価を $\{(各サンプルの EU) - (健常者血清の EU の平均値) / 2 \times (健常者血清の標準偏差)\}$ で標準値化した。1 回の測定はデュプリケートで行った。

2. 基礎研究

1) 雄性マウスの生殖機能の確認

9 週齢の C57BL/6J 野生型マウス（日本クレア社，東京，日本）を使用し、同じケージ内に雌と雄を 1 匹ずつ入れ、1 週間交配させた。1 週間の交配期間後、雄性マウスをケージ内から取り出した。腹部が肥大化して妊娠の兆候を認めた雌性マウスと交配した雄性マウスには生殖機能に異常はないと判断し、次項で示す歯周炎マウス（雌性）との交配に用いた。妊娠した雌性マウスは出産を確認した 1 日後に二酸化炭素ガスを用いて安楽死させた。また、新生児マウスは個体数と体重を測定後、断頭にて安楽死させた。前述の妊娠した雌性マウス（正常）は健常群として歯周炎マウスの陰性対照とした。また、雄性マウスをケージに入れた日を妊娠 0 日目とした。

2) *P. gingivalis* W83 感染絹糸結紮歯周炎マウスモデルの作製

9 週齢の C57BL/6J 野生型雌性マウスを使用し, Abe らの方法²⁶⁾を一部改変して *P. gingivalis* W83 感染絹糸結紮歯周炎マウスモデル (以下, 歯周炎マウス) を作製した (図 2)。すなわち, PBS で希釈した塩酸ケタミン 100 mg/kg と塩酸キシラジン 10 mg/kg を腹腔内注射してマウスに全身麻酔を行った後, 上顎両側第二臼歯歯頸部に 5-0 絹糸を結紮した。さらに, OD600=0.8 (1.0×10^8 CFU/mL) に調整した *P. gingivalis* W83 株の菌液 200 μ L を週 3 回絹糸に浸透させ, 歯周組織に感染させて炎症を誘導した。

歯周炎マウス群は, 歯周炎誘導 4 週間後に雄性マウスと交配させる群, 交配させない群の 2 群に振り分けた。一方で, 歯周炎誘導開始と同時に真菌二次代謝産物である (+)-terrein を週 2 回 (30 mg/kg), 4 週間腹腔内投与を行った炎症抑制群を作製した。なお, (+)-terrein は Mandai らの報告²⁷⁾に基づき, 有機化学的に合成し, 天然由来の(+)-terrein と分子構造および生理活性が同じであることを確認したものをを用いた。

歯周炎誘導後に交配させる群は, 歯周炎誘導から 4 週間経過後, 1 ケージにつき雌性歯周炎マウス 1 匹と 2-1) 項で妊娠機能に異常がないことを確認した雄性マウス 1 匹を入れて交配させた。雄性マウスをケージに入れた日 (妊娠 0 日目) から 1 週間経過後, 雄性マウスをケージ内から取り出した。雌性マウスは出産の 1 日後に二酸化炭素ガスを用いて安楽死させた。新生児マウスは個体数, 体重を測定後, 断頭にて安楽死させた。また, 妊娠の兆候がないマウスは, 同群における最後の出産日から 1 週間

後に未妊娠と判断し、二酸化炭素ガスを用いて安楽死させた。

歯周炎誘導後に交配させない群は、歯周炎誘導の2週間後と4週間後に、二酸化炭素ガスを用いて陰性対照である健常群と同時に安楽死させた。安楽死後に、血清、上顎骨、そして子宮を採取した。子宮の試料採取に関しては、試料を採取する部位や量の違いによる測定結果への影響を最小限にするため、解析ごとに部位と長さを揃えて採取した（図2-(c)）。全ての動物実験はARRIVEガイドラインに従い、岡山大学動物実験委員会の承認（OKU-2021680）の下で実施し、specific-pathogen-free環境下で飼育を行い、実験期間中にマウスが死亡した場合は、実験結果から除外した。

3) 歯周炎による歯槽骨吸収の確認

Abeらの方法²⁶を用いて、骨標本の作製と歯槽骨吸収度の解析を行った。すなわち、採取したマウスの頭部をオートクレーブ（LSX-500，トミー精工，東京）にて121℃，2気圧で20分間処理後，軟組織を除去した。その後，30%過酸化水素（ナカライテスク，京都，日本）で漂白し，次亜塩素酸ナトリウム水溶液（ナカライテスク）で中和した後，エオジン（武藤化学株式会社，東京，日本）で5分間，メチレンブルー（Merck KGaA, Darmstadt, Germany）で10秒間染色した。十分に乾燥した後，実体顕微鏡（SZ-LW61 T2：オリンパス，東京，日本）にて骨吸収度を測定した。測定は，第一臼歯の遠心口蓋側裂溝，遠心口蓋側咬頭，第二臼歯の近心口蓋側咬頭，口蓋側裂溝，遠心口蓋側咬頭，そして第三臼歯の口蓋側咬頭の6点において，セメントエナメル境（cement enamel junction：CEJ）から歯槽骨頂（alveolar bone crest：ABC）までの垂直的距離を

それぞれ測定し、歯牙ごとに垂直的距離の平均をとり、骨吸収度を算出した。また、片顎を1サンプルとして測定し、歯牙が脱落したサンプルは計測から除外した。

4) *P. gingivalis* W83 に対する血清 IgG 抗体価の測定

血清 IgG 抗体価の測定は、1. 臨床研究 2) 酵素結合免疫吸着測定法を用いた歯周病原細菌に対する血清抗体価検査の項と同様の手技で測定した。すなわち、抗原を固相化後、マウス血清を 100 μ L ずつ添加して反応させた。二次抗体は Alkaline Phosphatase-conjugated Affinipure Goat Anti-Mouse IgG (H+L) (Proteintech Group, Inc, Rosemont, IL, USA) を PBST で 1,000 倍に希釈したものをを用いた。発色基質添加後、室温で 20 分反応させ、吸光度を測定した。1 回の測定はデュプリケートで行い、血清 IgG 抗体価は吸光度で示した。

5) 子宮の組織学的解析

健常群と非妊娠の歯周炎マウス群から採取した子宮の一部を、4%パラホルムアルデヒド溶液 (pH 7.4 : 富士フィルム和光純薬) に 24 時間浸漬して組織固定を行った。固定した組織はエタノール系列で脱水後にパラフィン包埋してブロックを作製し、5 μ m 間隔で薄切し、パラフィン切片を作製した。作製したパラフィン切片を、キシレン (ナカライテスク) を用いて脱パラフィンを行った後、無水エタノール (富士フィルム和光純薬) から 70%エタノールにスライドガラスを段階的に浸漬させて再水和を行った。その後、ヘマトキシリン・エオジン (Hematoxylin-Eosin : H-E) 染色を行った後、70%エタノールから無水エタノールにスライドガラスを段階的に浸漬させて脱水

を行い、キシレンに浸漬させてカバーガラスと Mount-Quick（大道産業株式会社，東京，日本）を用いて封入した。スライドガラスを乾燥させた後，光学顕微鏡（BX-50：オリンパス）下にて組織像を観察した。

6) フローサイトメトリー法による子宮組織における Treg の定量

健常群と非妊娠の歯周炎マウス群から子宮を 1 cm 摘出した。Collagenase Type 4 Powder（Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA）と DNaseI（Sigma Aldrich, St. Louis, MA, USA）を溶解した Roswell Park Memorial Institute 1640 Medium（RPMI 1640 培地，Sigma-Aldrich）に採取した組織を浸漬し，BioMasher[®]II（ニッピ，東京，日本）を用いて組織を粉碎後，37 °C で 100 rpm，55 分間振盪した。そこに 0.5 M エチレンジアミン四酢酸（ethylenediaminetetraacetic acid：EDTA）（Thermo Fisher Scientific）を添加し，さらに 37 °C で 5 分間震盪させた。その後，RPMI 1640 培地を 3 mL で懸濁し，70 μm のセルストレイナー（Corning, Corning, NY, USA）に通して細胞懸濁液を濾過した。細胞懸濁液を 320 × g，4 °C で 6 分間遠心分離し，上清を吸引除去した。そこに，抗 CD16/32 抗体（Clone 93；BioLegend, San Diego, CA, USA）を 5%ウシ血清アルブミン（BSA；Sigma Aldrich）含有 PBS で 100 倍希釈して添加し，4 °C で 10 分間反応させた。その後，細胞表面マーカーを染色するために，BSA 含有 PBS で 1/100 の濃度に希釈した抗体を添加して，4 °C，暗所で 60 分間反応させた。抗体は，APC 標識抗マウス CD45 抗体（0.2 mg/mL，Clone I3/2.5；BioLegend）と FITC 標識抗マウス CD4 抗体（0.5 mg/mL，Clone GK1.5；BioLegend）を用いた。PBS を 1 mL 添加して攪

拌後, $320 \times g$, 4°C で 6 分間遠心分離し, 上清を吸引除去した。その後, Cyto Fast Fix/Perm solution (BioLegend) を $150 \mu\text{L}$ 添加し, 暗所条件下, 室温で 20 分間反応させ, 細胞の固定と細胞膜の穿孔を行った。PBS を 1 mL 添加し, 攪拌後, $320 \times g$, 4°C で 6 分間遠心分離し上清を吸引除去した。さらに, 細胞内マーカーを染色するために, BSA 含有 PBS で 1/100 の濃度に希釈した抗体を添加して, 常温, 暗所で 20 分間反応させた。抗体は, PE 標識抗マウス FOXP3 抗体 (0.2 mg/mL , Clone MF-14 ; BioLegend) を用いた。Cyto Fast Perm/Wash solution (BioLegend) を 1 mL 添加して攪拌後, $320 \times g$, 4°C で 6 分間遠心分離し, 上清を吸引除去した。また, Cell staining buffer (BioLegend) を添加して攪拌後, $320 \times g$, 4°C で 6 分間遠心分離し, 上清を吸引除去した。上記手順で染色した細胞を, 最終的な細胞溶液が $300 \mu\text{L}$ になるように PBS で希釈し, MAQsquant Analyzer (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany) を用いてフローサイトメトリー法で解析した。本研究では, $\text{CD45}^+\text{CD4}^+\text{FOXP3}^+$ 細胞を Treg と定義した。

7) 子宮組織における遺伝子発現の解析

歯周炎誘導の 2 週間後と 4 週間後のマウスから子宮組織を採取し, 遺伝子発現量の変化を real-time reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) 法で定量解析した。子宮組織採取後, 直ちに RNA の安定作用のある RNAlater (Thermo Fisher Scientific) に浸漬し, 下記処理を行った。

(1) RNA の抽出

RNA は、シリカ膜への吸着を利用した RNeasy Mini Kit (QIAGEN, Venlo, Netherland) を用いて抽出した。なお, RNA 抽出過程で混入する DNA は, Kit 内の gDNA Eliminator スピンカラム (QIAGEN) を使用して除去した。RNA の濃度と純度は, Nano Drop 2000 (Thermo Fisher Scientific) を用いて 260 nm と 280 nm の波長での吸光度とその比を用いて測定した。全ての RNA の純度は, 260/280 の値が 1.8~2.2 の間であることを確認した。

(2) 逆転写反応

抽出した全 RNA から SuperScript™ IV VILO Master Mix (Thermo Fisher Scientific) を用いて逆転写を行った。すなわち, RNA 濃度を調整した溶液 16 μ L と, VILO Master Mix 4 μ L を混合し, 全量 20 μ L とした。これを 25 °C で 10 分間熱処理し, オリゴ dT プライマーをアニーリングした。そして, 42 °C で 60 分間熱処理し, mRNA の逆転写産物である cDNA を合成した。その後, 85 °C で 5 分間の加熱で逆転写酵素を不活化した。

(3) real-time RT-PCR 法

PCR 反応は, cDNA 合成後の反応液, 表 1 に示したセンスならびにアンチセンス PCR プライマー (10 μ M), 2 \times Power SYBER Green PCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific), そして RNase-free Water と混合し, 95 °C で 10 分間の 2 本鎖 DNA の変性の後, 95 °C で 15 秒, 60 °C で 1 分のステップでアニーリングと伸長反応を 60 サイクル行った。この反応は 7300 Fast Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific)

を用いて行い、その際に PCR 産物である 2 本鎖 DNA に結合する蛍光色素である SYBR Green 1 が発する蛍光量を SDSv1.X with RQ Software (Thermo Fisher Scientific) にて測定した。*Il-6*, *Tnf- α* , *Il-1 β* , *Il-10*, *Foxp3*, *Progesterone Receptor*, *Estrogen Receptor 1*, *Estrogen Receptor 2* の mRNA 発現量は、*Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase* (*Gapdh*) の mRNA 量を内部対照として、比較 Ct 値法²⁸⁾にて定量した後、相対発現量として示した。なお、*Il-6*, *Tnf- α* , *Il-1 β* , *Il-10*, *Foxp3*, *Progesterone Receptor*, *Estrogen Receptor 1*, *Estrogen Receptor 2* および *Gapdh* のプライマーは、オンラインソフトウェアである Primer3 plus (<https://www.primer3plus.com/>) を用いて、増幅サイズ 70~200 bp, プライマーサイズ 20~22 塩基, GC 含有量 45~55%, Tm 値 58~60 °C の条件で合成し、NCBI primer-BLAST (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) を用いて目的遺伝子の特異的な増幅を Web アプリケーション上で確認した。また、プライマーの合成はユーロフィンジェノミクス株式会社 (東京, 日本) に委託した。

8) 血清アミロイド A (serum amyloid A : SAA) 濃度の定量

歯周炎誘導 2 週間後と 4 週間後のマウスの心臓から新鮮血液を採取し、 $875.17 \times g$, 4 °C で 10 分間遠心分離を行い、血清を採取した。マウスにおける全身の炎症性マーカーである SAA について、ELISA 法を用いて濃度を定量した。Mouse SAA ELISA Kit (Tridelata Development Ltd, Kildare, Ireland) を用い、マイクロプレート上の各ウェルに、ホースラディッシュ・ペルオキシダーゼ (horseradish peroxidase : HRP) 標識抗 SAA 抗体を添加した。さらに、Diluent buffer で 200 倍希釈した血清と 0.062, 0.125, 0.250,

0.500 µg/mL に希釈したスタンダードを各ウェルに添加し、37°C で 1 時間反応させた。

Wash buffer で 4 回洗浄後、発色基質として 3, 3', 5, 5'-テトラメチルベンジジン (3, 3', 5, 5'-Tetramethylbenzidine : TMB) を添加し、室温で 15 分反応させた。その後、発色反応停止液を加え、iMark Microplate Reader および Microplate Manager Software 6.3 (ともに Bio-Rad) を用いて 450 nm の波長における吸光度を測定した。

9) 子宮組織における細菌 DNA の定量

歯周炎誘導 2 週間後と 4 週間後のマウスから子宮組織を採取し、子宮組織中の総菌数と *P. gingivalis* の細菌数を real-time PCR 法で定量解析した。子宮組織採取後、採取した子宮組織を Tris-EDTA Buffer (ニッポン・ジーン, 東京, 日本) 400 µL に浸漬し、BioMasher[®]II (ニッピ) を用いて組織を粉碎後、下記処理を行った。

(1) DNA 抽出

フェノール/クロロホルム/イソアミルアルコール (25 : 24 : 1) (ナカライテスク) を 400 µL 添加し、転倒混和後、11,000 × g, 25 °C で 15 分間遠心分離した。分離した水相, 中間相を 300 µL 採取し、Phase Lock Gel, Heavy, 2 mL (フナコシ, 東京, 日本) に入れ、22,808 × g, 4 °C で 5 分間遠心分離し、水相のみを採取した。

DNA の濃度と純度は、Nano Drop 2000 を用いて 260 nm と 280 nm の波長での吸光度とその比を用いて測定した。全ての DNA の純度は、260/280 の値が 1.7~1.8 の間であることを確認した。

(2) real-time PCR 法

表 1 にセンス, アンチセンス PCR プライマーとプローブの配列を示す。総菌数の定量には, Maeda ら²⁹⁾の 16S rRNA 遺伝子の V6-V7 領域を標的としてその上下流の保存領域に設定したユニバーサルプライマーを用い, 蛍光色素は SYBR Green 1 を使用した。また, *P. gingivalis* の定量には, Boutage ら³⁰⁾の 16S rRNA 遺伝子の V4 領域に設定した TaqMan プローブとプライマー (Thermo Fisher Scientific) を使用した。総菌数の定量は, 2. 基礎研究 7) 子宮組織における遺伝子発現の解析 (3) real-time RT-PCR 法の項と同様の手技で測定した。すなわち, 9)–(1)項で抽出した DNA 溶液をセンスならびにアンチセンス PCR プライマー (10 μ M), 2 \times Power SYBER Green PCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific), そして Nuclease-Free Water (QIAGEN) と混合し測定した。

P. gingivalis の定量には, 9)–(1)項で抽出した DNA 溶液をセンスならびにアンチセンス PCR プライマー溶液 (10 μ M), 2 倍希釈した TaqMan プローブ (10 μ M), TaqMan Fast Advanced Master mix (Thermo Fisher Scientific) と混合し, 50 $^{\circ}$ C で 2 分間 Uracil-DNA Glycosylase 処理をしてキャリーオーバーした増幅産物を除去し, 95 $^{\circ}$ C で 20 秒ポリメラーゼを活性化させた後, 95 $^{\circ}$ C で 3 秒, 60 $^{\circ}$ C で 30 秒のステップで DNA の変性, アニールリング, 伸長反応を 45 サイクル行った。この反応の際の PCR 産物が発する蛍光量を 7300 Fast Real-Time PCR System で測定し, 1 回の測定はデュプリケートで行った。なお, 総菌数と *P. gingivalis* の細菌数は *P. gingivalis* W83 株の DNA を 5 段階希釈して作成した検量線をもとに定量した。

3. 統計処理

P. gingivalis 3 菌株に対するヒト血清 IgG 抗体価の検定には Mann-Whitney *U* test を用いた。また、2 群間の検定には Student's *t*-test を用い、3 群間の差の検定には one-way analysis of variance (one-way ANOVA) を用い、さらに多重比較検定は Dunnett's test で行った。統計処理には、GraphPad Prism9 (GraphPad Software Inc, San Diego, CA, USA) を用いて検定を行い、 $P < 0.05$ を有意差ありと判定した。

結果

1. 不妊治療患者における，*P. gingivalis* に対する血清 IgG 抗体価の測定

1) 被験者の選択

本臨床研究には，自然妊娠妊婦群 101 名，不妊治療患者群 100 名が集められた。自然妊娠妊婦群は，30 歳未満の被験者 1 名，研究不同意者 1 名を除外した 99 名を対象とした。また，出産転帰不明者 1 名，血清サンプル量が不十分だった 1 名，出産状況が不明であった 1 名を除外し，出産方法で分類したところ，経膈分娩妊婦が 77 名，帝王切開で出産した妊婦が 17 名，吸引分娩で出産した妊婦が 2 名であった。不妊治療患者群では，30 歳未満の被験者 1 名，通院中断により情報収集が不十分となった被験者 1 名を除外した 98 名を対象とし，不妊原因が明らかであるか，原因不明不妊であるかで分類したところ，器質的原因のある患者が 27 名，原因不明不妊が 71 名であった。本研究では，より自然に近い出産形態である経膈分娩妊婦 77 名（自然妊娠妊婦群）と原因不明不妊女性 71 名（不妊治療患者群）について解析を行った（図 1）。

2) 被験者背景

自然妊娠妊婦群と原因不明不妊女性の背景について調査した（表 2）。原因不明不妊患者群では，自然妊娠妊婦群と比較し，年齢が有意に高かった（ $P < 0.05$ ）。また，原因不明不妊患者 71 名について，不妊期間は 1 年未満が 28.2%（20 名），1 年以上 2 年未満が 18.3%（13 名），2 年以上が 42.3%（30 名），不妊治療ステージは，タイミング法が 45.1%（32 名），人工授精が 23.9%（17 名），生殖補助医療が 28.2%（20 名）であ

った。

3) *P. gingivalis* に対する血清 IgG 抗体価の比較

P. gingivalis FDC381, SU63, W83 に対する血清抗体価を測定し比較した (図 3)。原因不明不妊患者群では、自然妊娠妊婦群と比較し *P. gingivalis* FDC381 ($P = 0.0433$), SU63 ($P = 0.0054$), そして W83 ($P = 0.0005$) に対する血清 IgG 抗体価が有意に上昇していた。

2. 歯周炎マウスにおける、歯周感染・炎症が妊娠・出産に及ぼす影響の検討

1) 歯槽骨吸収の評価

歯周炎マウスにおける歯周炎の惹起を確認するため、歯槽骨吸収量を測定した (図 4-(a))。健常マウス群では、いずれの個体も歯牙は脱落していなかったが、感染期間が 2 週間の歯周炎マウス群では 9 匹中 6 匹で、4 週間の群では 16 匹中 14 匹で 1 本以上の歯牙が脱落していた。また、歯周炎マウス群では健常群と比較し、いずれの歯牙でも歯槽骨吸収が有意に進行した (2 週間: 第一臼歯 $P = 0.0005$, 第二臼歯 $P < 0.0001$, 第三臼歯 $P < 0.0001$, 4 週間: 第一臼歯 $P < 0.0001$, 第二臼歯 $P < 0.0001$, 第三臼歯 $P < 0.0001$)。

2) *P. gingivalis* に対する血清 IgG 抗体価の比較

歯周炎マウスにおける *P. gingivalis* の感染を確認するため、*P. gingivalis* に対する血清 IgG 抗体価を測定した (図 4-(b))。歯周炎誘導 2 週間後 ($P = 0.0165$), 4 週間後 ($P = 0.0006$) とともに、健常群と比較し、歯周炎マウス群では *P. gingivalis* に対する血清 IgG

抗体価は有意に上昇した。

3) 妊娠・出産状態の比較

歯周炎マウスと健常マウスにおける妊娠・出産状態を比較した (図 5)。歯周炎マウス群では、健常群と比較し、平均出産数が有意に減少 (5.3 匹 vs 7.8 匹, $P = 0.0004$, 図 5- (a)) し、新生児マウスの平均体重は有意に低下した (1.26 g vs 1.32 g, $P = 0.0381$, 図 5- (b))。一方、妊娠期間に差はなかった (22.3 日 vs 21.8 日, $P = 0.6693$, 図 5- (c))。

4) 子宮横断面積の比較

肉眼所見において、歯周炎マウスの子宮に肥大化を確認したため、子宮の横断面積を計測し比較した (図 6)。歯周炎誘導 2 週間後の歯周炎マウスの子宮は、健常群と比較し、肉眼的に大きさに変化はなく、子宮横断面積に差はなかった (7.31 mm^2 vs 8.18 mm^2 , $P = 0.6364$)。一方、歯周炎誘導 4 週間後の歯周炎マウスの子宮は、健常群と比較し、肥大化しており、子宮横断面積は有意に増加していた (11.75 mm^2 vs 6.713 mm^2 , $P = 0.0067$)。また、歯周炎誘導開始とともに抗炎症薬(+)-terrein を投与した群では、健常群と比較し、子宮横断面積に差はなかった (6.54 mm^2 vs 6.71 mm^2 , $P = 0.9960$)。

5) 子宮組織における Treg の検討

着床や妊娠の維持には Treg による免疫寛容が重要である¹³⁾。そこで、子宮組織における Treg 数や割合を検討した (図 7)。歯周炎誘導 4 週間後の歯周炎マウス群では、健常群と比較し、子宮における Treg ($\text{CD4}^+\text{CD45}^+\text{FOXP3}^+$) の数に差はなかった (平均値: 195.5 個 vs 125.1 個, $P = 0.4376$) が、全細胞数に対する Treg の割合は増加する

傾向を示した（平均値：3.29% vs 1.85%, $P=0.0578$ ）。一方、歯周炎誘導開始とともに (+)-terrein を投与した群では、健常群と比較して、Treg 数（平均値：196.5 個 vs 125.1 個）、割合（平均値：1.54% vs 1.85%）ともに差はなかった。

6) 子宮組織におけるサイトカインと Foxp3 の遺伝子発現量の比較

子宮組織における炎症反応の状態を検討するため、子宮組織における炎症性サイトカイン (*Il-6*, *Tnf- α* , *Il-1 β*), 抗炎症性サイトカイン (*Il-10*), そして Treg のマーカーの一つである *Foxp3* の mRNA 発現量を比較した (図 8)。歯周炎誘導 2 週間後では、健常群と比較し、*Il-6*, *Tnf- α* , *Il-1 β* , *Il-10*, そして *Foxp3* の mRNA 発現量に差はなかった ($P > 0.05$)。一方、歯周炎誘導 4 週間後では、*Il-1 β* の mRNA 発現量が有意に低下していた ($P = 0.0407$)。また、*Il-10* や *Foxp3* の mRNA 発現量は増加する傾向を示した (それぞれ $P = 0.1102$, $P = 0.1391$)。

7) 血清アミロイド A (SAA) 濃度の比較

歯周炎マウスにおける全身の急性炎症の有無を確認するため、マウスにおける全身の炎症性マーカーである SAA の濃度を測定した (図 9)。その結果、歯周炎誘導の 2 週間後と 4 週間後ともに健常群と比較し、SAA 濃度に変化はなかった。

8) 子宮組織における細菌量の比較

子宮における細菌叢の変化は不妊に影響を及ぼす³¹⁾とされているため、子宮組織における総細菌数と *P. gingivalis* 菌数を測定した (図 10)。歯周炎誘導 2 週間後、4 週間後ともに、健常群と比較し、子宮組織において総細菌数に差はなかった ($P > 0.05$)。

また、いずれの群の子宮組織からも *P. gingivalis* は検出されなかった。

9) 子宮組織におけるプロゲステロン受容体およびエストロゲン受容体の mRNA 発現量の比較

性周期を司るホルモンであるエストロゲンおよびプロゲステロンの受容体 (*Progesterone receptor*, *Estrogen receptor 1*, および *Estrogen receptor 2*) の mRNA 発現量を比較した (図 11)。歯周炎誘導 2 週間後のマウスの子宮では、健常群と比較し、*Progesterone receptor*, *Estrogen receptor 1*, および *Estrogen receptor 2* の mRNA 発現量に差はなかった ($P > 0.05$)。一方、歯周炎誘導 4 週間後のマウスでは、健常群と比較し、*Progesterone receptor* の mRNA 発現量が低下する傾向を示した ($P = 0.0659$)。

考察

本研究では、不妊治療を行っている原因不明不妊女性における *P. gingivalis* に対する血清 IgG 抗体価を調査するとともに、*P. gingivalis* W83 感染絹糸結紮歯周炎マウスモデルを用いて、歯周組織の感染・炎症が妊娠・出産や子宮組織に及ぼす影響を免疫学的・組織学的に検討した。

臨床研究では、不妊治療中の原因不明不妊女性と自然妊娠妊婦の *P. gingivalis* 3 菌株に対する血清 IgG 抗体価を測定したところ、原因不明不妊女性は自然妊娠妊婦と比較し、*P. gingivalis* 3 菌株に対する血清 IgG 抗体価はいずれも高いことが明らかとなった (図 3)。被験者背景を比較すると、原因不明不妊女性では自然妊娠妊婦より年齢が

有意に高かった（表 2）。不妊原因の一つとして、加齢による卵胞の減少³²⁾や染色体異常^{33,34)}によって妊娠率が低下することが知られており、不妊治療を希望する患者層は比較的高齢となるため、原因不明不妊女性群では加齢による妊孕性の低下の影響も否定できないと考える。フィンランドの臨床研究において、*P. gingivalis* に対する唾液中の IgG と IgA 抗体が高い女性では妊娠率が低いことが報告²⁾されており、本研究結果と一致している。*P. gingivalis* 以外の歯周病原細菌の一つである *Fusobacterium nucleatum* の感染は、早産との関連性³⁵⁾が示唆されている。また、多嚢胞性卵巣症候群患者では、*P. gingivalis* に加え、*Prevotella intermedia* や *Streptococcus oralis* の血清 IgG 抗体価が上昇する³⁶⁾という報告があり、不妊治療中女性における他の口腔内細菌に対する血清 IgG 抗体価については今後さらに詳細な検討が必要であると考えられる。

臨床研究の結果から、*P. gingivalis* の感染と感染に伴う歯周組織の炎症が妊娠に悪影響を及ぼすと考え、*P. gingivalis* W83 感染絹糸結紮歯周炎マウスモデルを用いた基礎研究を実施した。*P. gingivalis* の感染と早産・低体重児出産の関連については、歯髓感染マウスモデルを用いた研究成果が報告されている³⁷⁾。しかし、絹糸結紮歯周炎マウスモデルを用いて *P. gingivalis* の感染が妊娠・出産に及ぼす影響を検討した研究報告は調べた限りなかった。そこで、絹糸結紮歯周炎マウスモデルにおいて、絹糸結紮と絹糸への *P. gingivalis* 投与により歯槽骨吸収と *P. gingivalis* の感染が生じていることを確認した後（図 4）、歯周組織の炎症が妊娠・出産の結果に影響を及ぼすかを検討した。*P. gingivalis* W83 感染絹糸結紮歯周炎マウスモデルでは、出産数と新生児マウス

体重が健常群と比較し、有意に低下した（図 5）。特に、出産数が減少したことに着目し、*P. gingivalis* W83 感染絹糸結紮歯周炎マウスモデルでは、着床の段階で母体マウスの子宮に変化が生じていると考え、歯周炎誘導後の子宮組織を組織学的、免疫学的に検討した。

歯周炎誘導 2 週間後では、子宮組織に変化は見られなかったが、4 週間後では子宮が肥大化していた（図 6）。子宮の横断面を H-E 染色にて観察すると、歯周炎誘導 4 週間後では子宮横断面積は有意に増加していた。また、子宮において、着床・妊娠に重要な働きがある Treg の割合が歯周炎誘導 4 週間後で有意に増加していた。これらの所見は、近年に不妊症との関連が指摘されている慢性子宮内膜炎でも同様に確認されている¹³⁾。

慢性子宮内膜炎は子宮内膜での持続的な炎症の継続を特徴とする疾患であるが、無症状で経過するため、近年まで疾患として認知されていなかった³⁸⁾。膣からの上行性の細菌感染が主原因とされており、治療には抗菌療法が用いられる。そして、抗菌治療によって妊娠成績や体外受精の成績が向上するという報告がある^{39,40)}。しかし、明確な診断基準や治療ガイドラインは未だ定められておらず、その詳細な病態は不明である。慢性子宮内膜炎患者では、子宮の浮腫^{41,42)}や子宮内膜における Treg の増加¹⁴⁾が報告されている。子宮内膜炎ラットモデルを用いた研究においても、子宮の肥大化⁴³⁻⁴⁵⁾が報告されており、今回の結果と同様の所見を呈する。ただし、これらの報告においては、慢性子宮内膜炎患者の膣内細菌の移植⁴³⁾や子宮角への *Escherichia coli* の投与

44, 45)といった子宮への直接的な細菌感染を生じさせている。本研究では、細菌感染は歯周組織に限局しており、子宮への介入は行っていないことから、これらの動物モデルとは異なり、歯周組織における遠隔的な感染・炎症が子宮に波及したと考え、子宮における細菌量や炎症性・抗炎症性サイトカインの mRNA 発現量を測定した。

P. gingivalis W83 感染絹糸結紮歯周炎マウスモデルの子宮における総細菌数は、*P. gingivalis* W83 の感染期間に関わらず、ほぼ検出限界値以下であり、*P. gingivalis* も検出されなかった。現在ではヒトの泌尿生殖器には、ヒト細菌叢全体の約 9%が存在する⁴⁶⁾とされている。女性生殖器の細菌叢は、膣から卵巣にかけて徐々に変化して、細菌数は減少する一方で、細菌の多様性は増加することが明らかとなっている^{47, 48)}。子宮腔内においては、細菌数は膣内の 100~10,000 分の 1 程度^{47, 49)}であり、子宮腔内には少量の細菌叢が存在している。これら生殖器での細菌叢の変化は、生殖器機能に变化を及ぼす可能性があり、膣に含まれる *Lactobacillus* 属の割合が小さい患者では人工授精の成功率が低い⁵⁰⁾ことや、子宮内膜において *Lactobacillus* 属優位の細菌叢を持つと着床率、妊娠率、妊娠継続率、さらには生児出産率が増加することが示唆されている^{31, 51)}。一方、ヒトの胎盤には細菌叢は存在しないとする説⁵²⁾もあるが、子宮内膜の試料の採取では膣や子宮頸部に細菌が混入する可能性があるため、子宮内膜細菌叢の細菌構成については未だ統一した見解は得られていない⁵³⁾。本研究の結果において、子宮から細菌は検出されなかった。これは、子宮内膜細菌叢が非常に少量であることに加え、子宮の構造がマウスとヒトで異なり、細菌数が少ないとされる

卵巣に近い部分で試料を採取したため、生殖器内に存在する細菌が十分量得られなかった可能性が考えられる。

また、子宮内膜炎ラットモデルでは子宮において炎症性サイトカインである TNF- α や IL-1 β の mRNA 発現が亢進する^{43,45)}ことが報告されている。本研究において、*P. gingivalis* W83 を 4 週間感染させた歯周炎マウスでは、IL-1 β の mRNA 発現は低下し、抗炎症性サイトカインの IL-10 や Treg のマーカーである Foxp3 の mRNA 発現が上昇する傾向にあり、子宮での炎症が抑制される可能性が示唆された。これらの研究結果の相違は、子宮内膜炎ラットモデルでは細菌を直接子宮に投与することで子宮内に感染が生じ、急性炎症が惹起されていることに起因するものと考えられる。また、血清中の SAA 量は歯周炎マウスと健常群マウスに差がなかったことから、*P. gingivalis* W83 感染絹糸結紮歯周炎マウスにおける炎症は歯周組織に限定して生じている可能性が高い。再発性流産や着床不全の既往のある慢性子宮内膜炎患者では血液中の IL-6 や CRP などの炎症性マーカーの上昇はみられないといった報告⁵⁴⁾もあり、慢性子宮内膜炎の病態に必ずしも全身性の炎症が関与するとは限らないと考える。

今回、炎症抑制群として歯周炎誘導開始と同時に抗炎症作用を有する(+)-terrein を投与した群を設定し、歯周炎マウスモデルとの比較を行った。(+)-Terrein は真菌 *Aspergillus terreus* から二次代謝産物として分離された分子量 154.16 の低分子化合物である⁵⁵⁾。天然物の(+)-terrein はバイオフィーム形成抑制効果⁵⁶⁾や歯髄炎症の抑制効果⁵⁷⁾などが報告されており、今回は有機化学的に合成した(+)-terrein²⁷⁾を使用した。こ

の合成 (+)-terrein はヒト歯肉線維芽細胞における IL-6 誘導性の血管内皮細胞増殖因子 (vascular endothelial growth factor : VEGF) 分泌の抑制効果²⁷⁾, ヤヌスキナーゼ 1 (Janus activated kinase : JAK1) のリン酸化阻害による IL-6 誘導性マクロファージコロニー刺激因子 (macrophage colony stimulating factor : M-CSF) 分泌の抑制効果⁵⁸⁾, そして *P. gingivalis* W83 感染絹糸結紮歯周炎マウスモデルにおける血清中の TNF- α 濃度と歯周組織中の TNF- α の mRNA 発現の抑制効果⁵⁹⁾が報告されている。抗炎症作用のある(+)-terrein を投与すると, 子宮の肥大化が生じず, Treg の存在比率は健常群と同程度になったことに加え, 子宮における細菌数に変化がなかったことから, 今回の子宮における変化は歯周組織の細菌感染に起因する炎症によって惹起されたものと考ええる。

本研究では歯周炎マウスにおける性ホルモン受容体の mRNA 発現量を検討し, プログステロン受容体の mRNA の発現が減少する傾向を認めた (図 11)。子宮内膜炎動物モデルにおいては, 子宮におけるエストロゲン受容体の mRNA 発現量が低下するといった報告⁴⁴⁾がある。慢性子宮内膜炎患者においては, エストロゲン受容体やプロゲステロン受容体の発現が上昇することによって, 子宮内膜の成熟が遅くなり, 受容性に影響を与えると考察されている⁶⁰⁾。しかし, これらに関する研究の報告は少なく, ヒト由来の子宮内膜サンプルを用いた更なる検証が必要である。

本研究の限界として, 臨床研究では原因不明不妊女性では自然妊娠妊婦と比較し, 年齢が高いことがわかっているが, 多変量解析を行っていないため, 年齢による影

響は考慮されていない。また、患者背景として教育歴や経済的背景などの因子は調査できていないため、更なる情報収集が必要と考える。また、本研究は同意取得時の一時点のみで試料を採取しており、出産前後の抗体価の変化や不妊治療患者群での妊娠転帰との相関は不明である。さらに今回は単施設での臨床研究であるため、今後多施設にわたる経時的な観察が望まれる。また本研究では、原因不明不妊女性において *P. gingivalis* に対する血清 IgG 抗体価の上昇を確認したが、研究対象者の口腔内の状態（歯周炎の進行度など）は詳細に調査できていないため、被験者の歯周感染・炎症の程度は不明である。実際の不妊治療の現場においては歯周炎と不妊との関連は認知されておらず、不妊治療中女性が不妊治療の一環として歯科を受診するには未だ至っていない。そのため、本研究では比較的簡便に実施できる血液検査を用いて、歯周病原細菌に対する血清 IgG 抗体価をスクリーニングした。歯周病原細菌に対する血清 IgG 抗体価と歯周炎の進行には相関関係がある^{61,62}とされており、不妊治療中患者にとっては血液検査の一環として検査を受けられる利点がある。将来的には、歯周病原細菌に対する血清 IgG 抗体価の上昇を確認した不妊治療中患者に対しては、歯科での精密検査を勧奨するといった不妊治療体制の中に歯科が関与する機会が創生されることが望まれる。基礎研究では、女性不妊の因子に着目して実験を行ったが、近年では歯周炎と男性不妊の関連性⁶³も報告されている。交配に使用した雄性マウスは、事前に別の雌性マウスと交配させ、生殖能力に異常がないかを確認しているが、交配期間中に歯周炎マウスと同居させているため、雄性マウスへの歯周病原細菌の感染が否定で

きず、雄性マウスの生殖機能に変化が生じている可能性もある。今後は、歯周炎マウスとの交配後の雄性マウスにおける歯周病原細菌の感染の有無についても検討する必要があると考える。また、本研究では、子宮において不妊に強く関連する免疫細胞として、今回は Treg に着目して研究を進めた。全身および子宮での免疫学的変化は、妊娠の維持と同様に着床にも影響を及ぼす⁶⁴⁾。また、複数回にわたる流産や人工授精の失敗を経験した慢性子宮内膜炎患者では、非慢性子宮内膜炎患者と比較し、子宮における CD68⁺マクロファージ、CD83⁺成熟樹状細胞、および CD8⁺T 細胞の割合が有意に増加していることが報告されている¹⁴⁾。したがって、これら他の免疫細胞の変化についても、今後検討していく必要があると考える。さらに、歯周炎の惹起により子宮の肥大化や炎症性サイトカインの遺伝子発現に変化が起こる機序は、本研究では明らかにされていない。今回の基礎研究は、原因不明不妊女性では *P. gingivalis* に対する血清 IgG 抗体価が高いという臨床研究の結果を元に、マウスを用いて *P. gingivalis* 感染を伴う歯周炎を再現した。過去の報告において、早産であった妊婦の臍帯や胎盤から *P. gingivalis* が有意に検出されており、妊娠時の有害事象との関連性が示唆されている⁶⁵⁾。今回の研究では、歯周炎マウスの子宮において *P. gingivalis* の DNA は子宮組織では検出されなかったが、*P. gingivalis* の感染の有無が子宮組織の変化に関与しているかについてはさらなる検討が必要である。

結論

原因不明不妊女性では経膈分娩妊婦と比較し、*P. gingivalis* に対する血清 IgG 抗体価が上昇していた。また、*P. gingivalis* W83 感染絹糸結紮歯周炎マウスモデルにおいて、子宮組織は肥大化し、炎症性サイトカインの mRNA 発現が変化することによって、妊娠、出産に悪影響を及ぼす可能性が示唆された。

謝辞

稿を終えるにあたり、終始御懇篤なる御指導と御校閲を賜った岡山大学学術研究院医歯薬学域歯周病態学分野の高柴正悟教授に心から感謝いたします。そして、様々な面にわたり貴重な御助言と御協力を下さいました、岡山大学病院歯科・歯周科部門の大森一弘講師、岡山大学学術研究院医歯薬学域病理学（免疫病理）の大原利章助教、ならびに歯周病態学分野の諸先生に厚く御礼申し上げます。また、臨床研究の実施にご協力を賜った三宅医院の三宅貴仁院長およびスタッフの皆様に厚く御礼申し上げます。

表題脚注

岡山大学 大学院医歯薬学総合研究科 病態制御科学専攻 病態機構学講座 歯周病

態学分野

(指導：高柴正悟教授)

本論文の一部は、以下の学会において発表した。

- 第 64 回春季日本歯周病学会学術大会 (2021 年 5 月：オンライン)
- 第 64 回秋季日本歯周病学会学術大会 (2021 年 10 月：オンライン)
- 第 28 回日本歯周病学会学術総会 (2021 年 11 月：大阪)
- 第 65 回秋季日本歯周病学会学術大会 (2022 年 9 月：仙台)
- 日本歯科保存学会 2022 年度秋季学術大会 (第 157 回) (2022 年 11 月：岡山)

引用文献

1. Organization, World Health. International Classification of Disease 11th Revision. <https://icd.who.int/en>. (accessed 2022.12.9.)
2. Mascarenhas, M. N., Flaxman, S. R., Boerma, T., Vanderpoel, S. and Stevens, G. A.: National, regional, and global trends in infertility prevalence since 1990: a systematic analysis of 277 health surveys. *PLoS Med.*, **9**: e1001356, 2012.
3. 国立社会保障・人口問題研究所. 『現代日本の結婚と出産：第15回出生動向基本調査（独身者調査ならびに夫婦調査）報告書』（全体版）. https://www.ipss.go.jp/ps-doukou/j/doukou15/NFS15_reportALL.pdf (accessed 2022.12.9.)
4. 厚生労働省. 令和2年度子ども・子育て支援推進調査研究事業 不妊治療の実態に関する調査研究報告書. <https://www.nri.com/-/media/Corporate/jp/Files/PDF/knowledge/report/mcs/20210408.pdf?la=ja-JP&hash=A6B75461B5B0CDE8FEDCDBC6BE4578514F8235FA> (accessed 2022.12.9.)
5. 厚生労働省: 『不妊のこと、1人で悩まないで』- 「不妊専門相談センター」の相談対応を中心とした取組に関する調査- 報告書全文. 2018. https://www.mhlw.go.jp/iken/after-service-20180119/dl/after-service-20180119_houkoku.pdf (accessed 2022.12.9.)
6. Kubo, H: Epidemiology of Infertility and Recurrent Pregnancy Loss in Society with Fewer Children., *Japan Med Assoc J.* **52**: 23-28, 2009.
7. Vander Borcht, M. and Wyns, C.: Fertility and infertility: Definition and epidemiology. *Clin. Biochem.*, **62**: 2-10, 2018.
8. Collins, JA. and Crosignani, PG.: Unexplained infertility: a review of diagnosis, prognosis, treatment efficacy and management. *Int J Gynecol Obstet.* **39**: 257-275, 1992.
9. Esteves, S. C., Schattman, G. L. and Agarwal, A., Definitions and Relevance of Unexplained Infertility in Reproductive Medicine, *Unexplained Infertility.*, 3-5, 2015.
10. Zegers-Hochschild, F., Adamson, G. D., Dyer, S., Racowsky, C., de Mouzon, J., Sokol, R., Rienzi, L., Sunde, A., Schmidt, L., Cooke, I. D., Simpson, J. L. and van der Poel, S.: The International Glossary on Infertility and Fertility Care, 2017. *Fertil. Steril.*, **108**: 393-406, 2017.
11. Diao, L. H., Li, G. G., Zhu, Y. C., Tu, W. W., Huang, C. Y., Lian, R. C., Chen, X., Li, Y. Y., Zhang, T., Huang, Y. and Zeng, Y.: Human chorionic gonadotropin potentially affects pregnancy outcome in women with recurrent implantation failure by regulating the homing preference of regulatory T cells. *Am. J. Reprod. Immunol.*, **77**: 2017.
12. Jasper, M. J., Tremellen, K. P. and Robertson, S. A.: Primary unexplained infertility is associated with reduced expression of the T-regulatory cell transcription factor Foxp3 in endometrial tissue. *Mol. Hum. Reprod.*, **12**: 301-8, 2006.
13. Robertson, S. A., Care, A. S. and Moldenhauer, L. M.: Regulatory T cells in embryo implantation and the

- immune response to pregnancy. *J. Clin. Invest.*, **128**: 4224-4235, 2018.
14. Li, Y., Yu, S., Huang, C., Lian, R., Chen, C., Liu, S., Li, L., Diao, L., Markert, U. R. and Zeng, Y.: Evaluation of peripheral and uterine immune status of chronic endometritis in patients with recurrent reproductive failure. *Fertil. Steril.*, **113**: 187-196 e1, 2020.
 15. Hart, R., Doherty, D. A., Pennell, C. E., Newnham, I. A. and Newnham, J. P.: Periodontal disease: a potential modifiable risk factor limiting conception. *Hum. Reprod.*, **27**: 1332-42, 2012.
 16. Machado, V., Lopes, J., Patrao, M., Botelho, J., Proenca, L. and Mendes, J. J.: Validity of the association between periodontitis and female infertility conditions: a concise review. *Reproduction*, **160**: R41-R54, 2020.
 17. Ludovichetti, F. S., Signoriello, A. G., Gobbato, E. A., Artuso, A., Stellini, E. and Mazzoleni, S.: Can periodontal disease affect conception? A literature review. *Reprod Fertil*, **2**: R27-R34, 2021.
 18. Hajishengallis, G., Liang, S., Payne, M. A., Hashim, A., Jotwani, R., Eskan, M. A., McIntosh, M. L., Alsam, A., Kirkwood, K. L., Lambris, J. D., Darveau, R. P. and Curtis, M. A.: Low-abundance biofilm species orchestrates inflammatory periodontal disease through the commensal microbiota and complement. *Cell Host Microbe*, **10**: 497-506, 2011.
 19. Graves, D.: Cytokines that promote periodontal tissue destruction. *J. Periodontol.*, **79**: 1585-91, 2008.
 20. Hajishengallis, G. and Chavakis, T.: Local and systemic mechanisms linking periodontal disease and inflammatory comorbidities. *Nat. Rev. Immunol.*, **21**: 426-440, 2021.
 21. Paju, S., Oittinen, J., Haapala, H., Asikainen, S., Paavonen, J. and Pussinen, P. J.: *Porphyromonas gingivalis* may interfere with conception in women. *J. Oral Microbiol.*, **9**: 1330644, 2017.
 22. Yildiz Telatar, G., Gurlek, B. and Telatar, B. C.: Periodontal and caries status in unexplained female infertility: A case-control study. *J. Periodontol.*, **92**: 446-454, 2021.
 23. Prager, N., Pasztor, N., Varnagy, A., Kozinszky, Z., Barath, Z., Gorzo, I. and Radnai, M.: Idiopathic male infertility related to periodontal and caries status. *J. Clin. Periodontol.*, **44**: 872-880, 2017.
 24. 大山秀樹, 岡本慎治, 西村英紀, 新井英雄, 高柴正悟, 村山洋二: 歯周病原性細菌に対する血清 IgG 抗体を測定することによって集団検診で若年性歯周炎患者を検出する方法に関する研究. *岡山歯誌*, **20**: 181-191, 2001
 25. Murayama, Y., Nagai, A., Okamura, K., Kurihara, H., Nomura, Y., Kokeguchi, S. and Kato, K.: Serum immunoglobulin G antibody to periodontal bacteria. *Adv. Dent. Res.*, **2**: 339-45, 1988.
 26. Abe, T. and Hajishengallis, G.: Optimization of the ligature-induced periodontitis model in mice. *J. Immunol. Methods*, **394**: 49-54, 2013.
 27. Mandai, H., Omori, K., Yamamoto, D., Tsumura, T., Murota, K., Yamamoto, S., Mitsudo, K., Ibaragi, S., Sasaki, A., Maeda, H., Takashiba, S. and Suga, S.: Synthetic (+)-terrein suppresses interleukin-6/soluble interleukin-6 receptor induced-secretion of vascular endothelial growth factor in human gingival fibroblasts. *Bioorg. Med. Chem.*, **22**: 5338-44, 2014.
 28. Livak, K. J. and Schmittgen, T. D.: Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*, **25**: 402-8, 2001.
 29. Maeda, H., Fujimoto, C., Haruki, Y., Maeda, T., Kokeguchi, S., Petelin, M., Arai, H., Tanimoto, I., Nishimura, F. and Takashiba, S.: Quantitative real-time PCR using TaqMan and SYBR Green for *Actinobacillus*

- actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, tetQ gene and total bacteria. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, **39**: 81-86, 2003.
30. Boutaga, K., van Winkelhoff, A. J., Vandenbroucke-Grauls, C. M. and Savelkoul, P. H.: Comparison of real-time PCR and culture for detection of *Porphyromonas gingivalis* in subgingival plaque samples. *J. Clin. Microbiol.*, **41**: 4950-4, 2003.
 31. Moreno, I., Codoner, F. M., Vilella, F., Valbuena, D., Martinez-Blanch, J. F., Jimenez-Almazan, J., Alonso, R., Alama, P., Remohi, J., Pellicer, A., Ramon, D. and Simon, C.: Evidence that the endometrial microbiota has an effect on implantation success or failure. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, **215**: 684-703, 2016.
 32. te Velde, E. R. and Pearson, P. L.: The variability of female reproductive ageing. *Hum. Reprod. Update*, **8**: 141-154, 2002.
 33. Fragouli, E., Alfarawati, S., Goodall, N. N., Sanchez-Garcia, J. F., Colls, P. and Wells, D.: The cytogenetics of polar bodies: insights into female meiosis and the diagnosis of aneuploidy. *Mol. Hum. Reprod.*, **17**: 286-95, 2011.
 34. Kuliev, A., Zlatopolsky, Z., Kirillova, I., Spivakova, J. and Cieslak Janzen, J.: Meiosis errors in over 20,000 oocytes studied in the practice of preimplantation aneuploidy testing. *Reprod. Biomed. Online*, **22**: 2-8, 2011.
 35. Han, Y. W., Redline, R. W., Li, M., Yin, L., Hill, G. B. and McCormick, T. S.: *Fusobacterium nucleatum* induces premature and term stillbirths in pregnant mice: implication of oral bacteria in preterm birth. *Infect. Immun.*, **72**: 2272-9, 2004.
 36. Akcali, A., Bostanci, N., Ozcaka, O., Ozturk-Ceyhan, B., Gumus, P., Buduneli, N. and Belibasakis, G. N.: Association between polycystic ovary syndrome, oral microbiota and systemic antibody responses. *PLoS One*, **9**: e108074, 2014.
 37. Ao, M., Miyauchi, M., Furusho, H., Inubushi, T., Kitagawa, M., Nagasaki, A., Sakamoto, S., Kozai, K. and Takata, T.: Dental Infection of *Porphyromonas gingivalis* Induces Preterm Birth in Mice. *PLoS One*, **10**: e0137249, 2015.
 38. Kitaya, K., Takeuchi, T., Mizuta, S., Matsubayashi, H. and Ishikawa, T.: Endometritis: new time, new concepts. *Fertil. Steril.*, **110**: 344-350, 2018.
 39. Vitagliano, A., Saccardi, C., Noventa, M., Di Spiezio Sardo, A., Saccone, G., Cicinelli, E., Pizzi, S., Andrisani, A. and Litta, P. S.: Effects of chronic endometritis therapy on in vitro fertilization outcome in women with repeated implantation failure: a systematic review and meta-analysis. *Fertil. Steril.*, **110**: 103-112 e1, 2018.
 40. Xiong, Y., Chen, Q., Chen, C., Tan, J., Wang, Z., Gu, F. and Xu, Y.: Impact of oral antibiotic treatment for chronic endometritis on pregnancy outcomes in the following frozen-thawed embryo transfer cycles of infertile women: a cohort study of 640 embryo transfer cycles. *Fertil. Steril.*, **116**: 413-421, 2021.
 41. Cicinelli, E., Resta, L., Nicoletti, R., Zappimulso, V., Tartagni, M. and Saliani, N.: Endometrial micropolyps at fluid hysteroscopy suggest the existence of chronic endometritis. *Hum. Reprod.*, **20**: 1386-9, 2005.
 42. Guo, G. L., Chen, S. Y., Zhang, W., Zhang, C. and He, L.: Diagnosis value of hysteroscopy for chronic endometritis. *Clin. Exp. Obstet. Gynecol.*, **40**: 250-2, 2013.
 43. Wang, J., Li, Z., Ma, X., Du, L., Jia, Z., Cui, X., Yu, L., Yang, J., Xiao, L., Zhang, B., Fan, H. and Zhao, F.: Translocation of vaginal microbiota is involved in impairment and protection of uterine health. *Nat Commun.*

- 12: 4191, 2021.
44. Han, S., Cicek, A. F., Tokmak, A., Yildirim Ustun, T., Ercan Gokay, N., Uludag, M. O. and Demirel, M. A.: Effects of Resveratrol on Receptor Expression and Serum Levels of Estrogen and Progesterone in the Rat Endometritis Model. *Reprod. Sci.*, **28**: 2610-2622, 2021.
 45. Zhao, C., Bao, L., Qiu, M., Feng, L., Chen, L., Liu, Z., Duan, S., Zhao, Y., Wu, K., Zhang, N., Hu, X. and Fu, Y.: Dietary Tryptophan-Mediated Aryl Hydrocarbon Receptor Activation by the Gut Microbiota Alleviates *Escherichia coli*-Induced Endometritis in Mice. *Microbiol Spectr*, **10**: e0081122, 2022.
 46. Peterson, J., Garges, S., Giovanni, M., McInnes, P., Wang, L., Schloss, J. A., Bonazzi, V., McEwen, J. E., Wetterstrand, K. A., Deal, C., Baker, C. C., Di Francesco, V., Howcroft, T. K., Karp, R. W., Lunsford, R. D., Wellington, C. R., Belachew, T., Wright, M., Giblin, C., David, H., Mills, M., Salomon, R., Mullins, C., Akolkar, B., Begg, L., Davis, C., Grandison, L., Humble, M., Khalsa, J., Little, A. R., Peavy, H., Pontzer, C., Portnoy, M., Sayre, M. H., Starke-Reed, P., Zakhari, S., Read, J., Watson, B. and Guyer, M.: The NIH Human Microbiome Project. *Genome Res.*, **19**: 2317-23, 2009.
 47. Chen, C., Song, X., Wei, W., Zhong, H., Dai, J., Lan, Z., Li, F., Yu, X., Feng, Q., Wang, Z., Xie, H., Chen, X., Zeng, C., Wen, B., Zeng, L., Du, H., Tang, H., Xu, C., Xia, Y., Xia, H., Yang, H., Wang, J., Wang, J., Madsen, L., Brix, S., Kristiansen, K., Xu, X., Li, J., Wu, R. and Jia, H.: The microbiota continuum along the female reproductive tract and its relation to uterine-related diseases. *Nat Commun*, **8**: 875, 2017.
 48. Koedooder, R., Mackens, S., Budding, A., Fares, D., Blockeel, C., Laven, J. and Schoenmakers, S.: Identification and evaluation of the microbiome in the female and male reproductive tracts. *Hum. Reprod. Update*, **25**: 298-325, 2019.
 49. Mitchell, C. M., Haick, A., Nkwopara, E., Garcia, R., Rendi, M., Agnew, K., Fredricks, D. N. and Eschenbach, D.: Colonization of the upper genital tract by vaginal bacterial species in nonpregnant women. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, **212**: 611 e1-9, 2015.
 50. Koedooder, R., Singer, M., Schoenmakers, S., Savelkoul, P. H. M., Morre, S. A., de Jonge, J. D., Poort, L., Cuyper, W. J. S. S., Beckers, N. G. M., Broekmans, F. J. M., Cohlen, B. J., den Hartog, J. E., Fleischer, K., Lambalk, C. B., Smeenk, Jmjs, Budding, A. E. and Laven, J. S. E.: The vaginal microbiome as a predictor for outcome of *in vitro* fertilization with or without intracytoplasmic sperm injection: a prospective study. *Hum. Reprod.*, **34**: 1042-1054, 2019.
 51. Kyono, K., Hashimoto, T., Kikuchi, S., Nagai, Y. and Sakuraba, Y.: A pilot study and case reports on endometrial microbiota and pregnancy outcome: An analysis using 16S rRNA gene sequencing among IVF patients, and trial therapeutic intervention for dysbiotic endometrium. *Reprod. Med. Biol.*, **18**: 72-82, 2019.
 52. de Goffau, M. C., Lager, S., Sovio, U., Gaccioli, F., Cook, E., Peacock, S. J., Parkhill, J., Charnock-Jones, D. S. and Smith, G. C. S.: Human placenta has no microbiome but can contain potential pathogens. *Nature*, **572**: 329-334, 2019.
 53. Reschini, M., Benaglia, L., Ceriotti, F., Borroni, R., Ferrari, S., Castiglioni, M., Guarneri, D., Porcaro, L., Vigano, P., Somigliana, E. and Uceda Renteria, S.: Endometrial microbiome: sampling, assessment, and possible impact on embryo implantation. *Sci. Rep.*, **12**: 8467, 2022.
 54. Kushnir, V. A., Solouki, S., Sarig-Meth, T., Vega, M. G., Albertini, D. F., Darmon, S. K., Deligdisch, L.,

- Barad, D. H. and Gleicher, N.: Systemic Inflammation and Autoimmunity in Women with Chronic Endometritis. *Am. J. Reprod. Immunol.*, **75**: 672-7, 2016.
55. Raistrick, H. and Smith, G.: Studies in the biochemistry of micro-organisms- The metabolic products of *Aspergillus terreus* Thom. A new mould metabolic product-terrein. *Biochem. J.*, **29**: 606-11, 1935.
56. Kim, B., Park, J. S., Choi, H. Y., Yoon, S. S. and Kim, W. G.: Terrein is an inhibitor of quorum sensing and c-di-GMP in *Pseudomonas aeruginosa*: a connection between quorum sensing and c-di-GMP. *Sci. Rep.*, **8**: 8617, 2018.
57. Lee, J. C., Yu, M. K., Lee, R., Lee, Y. H., Jeon, J. G., Lee, M. H., Jhee, E. C., Yoo, I. D. and Yi, H. K.: Terrein reduces pulpal inflammation in human dental pulp cells. *J. Endod.*, **34**: 433-7, 2008.
58. Yamamoto, S., Omori, K., Mandai, H., Nakayama, M., Nakagawa, S., Kobayashi, H., Kunimine, T., Yoshimura, H., Sakaida, K., Sako, H., Ibaragi, S., Yamamoto, T., Maeda, H., Suga, S. and Takashiba, S.: Fungal metabolite (+)-terrein suppresses IL-6/sIL-6R-induced CSF1 secretion by inhibiting JAK1 phosphorylation in human gingival fibroblasts. *Heliyon*, **4**: 2018.
59. 佐光秀文: 真菌二次代謝産物(+)-terrein は絹糸結紮歯周炎マウスモデルにおいて炎症性骨吸収を抑制する. *岡山歯誌*, **39**: 2019.
60. Mishra, K., Wadhwa, N., Guleria, K. and Agarwal, S.: ER, PR and Ki-67 expression status in granulomatous and chronic non-specific endometritis. *J. Obstet. Gynaecol. Res.*, **34**: 371-8, 2008.
61. Kudo, C., Naruishi, K., Maeda, H., Abiko, Y., Hino, T., Iwata, M., Mitsunashi, C., Murakami, S., Nagasawa, T., Nagata, T., Yoneda, S., Nomura, Y., Noguchi, T., Numabe, Y., Ogata, Y., Sato, T., Shimauchi, H., Yamazaki, K., Yoshimura, A. and Takashiba, S.: Assessment of the plasma/serum IgG test to screen for periodontitis. *J. Dent. Res.*, **91**: 1190-5, 2012.
62. Hirai, K., Yamaguchi-Tomikawa, T., Eguchi, T., Maeda, H. and Takashiba, S.: Identification and Modification of *Porphyromonas gingivalis* Cysteine Protease, Gingipain, Ideal for Screening Periodontitis. *Front. Immunol.*, **11**: 1017, 2020.
63. Bieniek, K. W. and Riedel, H. H.: Bacterial foci in the teeth, oral cavity, and jaw-secondary effects (remote action) of bacterial colonies with respect to bacteriospermia and subfertility in males. *Andrologia*, **25**: 159-162, 1993.
64. Aghaeepour, N., Ganio, EA, Mcilwain, D, Tsai, AS, Tingle, M, S, Van Gassen, DK, Gaudilliere, Q, Baca, L, McNeil, R, Okada, MS, Ghaemi, D, Furman, RJ, Wong, VD, Winn, ML, Druzin, YY, El-Sayed, C, Quaintance, R, Gibbs, GL, Darmstadt, GM, Shaw, DK, Stevenson, R, Tibshirani, GP, Nolan, DB, Lewis, MS, Angst and B., Gaudilliere: An immune clock of human pregnancy. *Sci immunol*, **2**: eaan2946, 2017.
65. Vanterpool, S. F., Been, J. V., Houben, M. L., Nikkels, P. G., De Krijger, R. R., Zimmermann, L. J., Kramer, B. W., Progulsk-Fox, A. and Reyes, L.: *Porphyromonas gingivalis* within Placental Villous Mesenchyme and Umbilical Cord Stroma Is Associated with Adverse Pregnancy Outcome. *PLoS One*, **11**: e0146157, 2016.

図の説明

図 1. 臨床研究における患者の選択

自然妊娠妊婦 101 名，不妊治療患者 100 名を募集した。

自然妊娠妊婦群では，30 歳未満 1 名，研究参加不同意 1 名を除外した。30 歳以上 45 歳未満の研究同意者 99 名のうち，出産転帰不明者 1 名，測定に必要な血清サンプル量が足りなかった 1 名，出産状況が不明であった 1 名を除いた 96 名を出産方法で 3 群に分けた。

不妊治療患者では，30 歳未満 1 名，通院を中断して情報収集が不十分だった 1 名を除いた 98 名を不妊の原因が不明か否で 2 群に分けた。

図 2. 動物実験のタイムスケジュールと方法

9 週齢の C57BL/6 野生型雌性マウスの上顎両側第二臼歯歯頸部に 5-0 絹糸を結紮し，さらに，*P. gingivalis* W83 株の菌液を絹糸に浸透させ，歯周組織に炎症を誘導した。

(a) 歯周炎が妊娠・出産に及ぼす影響の検討

歯周炎誘導 4 週間後に，事前に別の雌性マウスと交配させて生殖能力に異常がないことを確認した雄性マウスをケージに入れ，1 週間交配させた。1 週間経過後，雄性マウスをケージから取り除き，出産を確認した翌日に雌性マウスを安楽死させた。安楽死後，出産数，新生児マウスの体重，妊娠期間を記録した。

(b) 歯周炎が子宮組織に及ぼす影響の検討

歯周炎誘導 2 週間後と 4 週間後に雌性マウスを安楽死させ、各種組織を採取し、解析を行った。また、歯周炎誘導開始と同時に抗炎症作用のある(+)-terrein を投与した炎症抑制群を作製し、歯周炎マウス群との比較を行った。

(c) 子宮サンプルの採取方法

サンプルを採取する部位や量の違いによる測定結果への影響を最小限にするため、4 部位のサンプルを採取し、解析した。

(d) (+)-Terrein の構造式

図 3. 自然妊娠妊婦と原因不明不妊患者の *P. gingivalis* に対する血清 IgG 抗体価の比較

経膈分娩妊婦 (n = 77) と原因不明不妊患者 (n = 71) を対象に *P. gingivalis* 3 菌株に対する血清 IgG 抗体価を測定した [(a) *P. gingivalis* FDC381, (b) *P. gingivalis* SU63, (c) *P. gingivalis* W83]。統計解析には Mann-Whitney *U*-test を用いた。

図 4. 歯槽骨吸収と *P. gingivalis* に対する血清 IgG 抗体価

健常マウスと歯周炎マウスの骨吸収量 {セメントエナメル境 (cement enamel junction : CEJ) から歯槽骨頂 (alveolar bone crest : ABC) までの垂直的距離 CEJ-ABC} と *P. gingivalis* に対する血清 IgG 抗体価を測定した。データは平均値 ± 標準偏差で示し、統計解析には Student's *t*-test を用いた。

(a) 骨吸収量の比較

上顎右側第一臼歯から第三臼歯までの口蓋側を撮影したものを示す。Abe ら²³⁾の

手法を一部改変し測定した。各群の歯牙ごとの歯槽骨吸収量をグラフに示す（2週間サンプル，健全群：n=18，歯周炎群：n=10，4週間サンプル，健全群：n=22，歯周炎群：n=9）。

(b) 抗 *P. gingivalis* 血清 IgG 抗体価の比較

血清 IgG 抗体価を吸光度で示す（2週間サンプル，健全群：n=7，歯周炎群：n=7，4週間サンプル，健全群：n=7，歯周炎群：n=7）。

図 5. 歯周炎マウスにおける妊娠・出産の変化

健全マウスと歯周炎マウスの妊娠・出産結果を比較した。データは平均値 ± 標準偏差で示し，統計解析には Student's *t*-test を用いた。

(a) 総出産数（健全群：n=15，歯周炎群：n=7）

(b) 新生児マウスの体重（健全群：n=117，歯周炎群：n=37）

(c) 妊娠期間（健全群：n=15，歯周炎群：n=7）

図 6. 歯周炎マウスの子宮の変化

子宮を H-E 染色後に変化を観察した。

(a) サンプル採取時のマウス子宮の写真と子宮横断面 H-E 染色画像

白色バー：1.0 cm，黒色バー：500 μm

(b) 子宮の横断面積の測定法

図に示した式を用いて近似した。黒色バー：500 μm

(c) 子宮横断面積の比較

データは平均値 ± 標準偏差で示し，統計解析には 2 週間サンプルは Student's *t*-test を用い，4 週間サンプルは one-way ANOVA と Dunnett's test を用いた（2 週間サンプル，健全群：n=9，歯周炎群：n=9，4 週間サンプル，健全群：n=11，歯周炎群：n=16，炎症抑制群：n=4）。

図 7. 歯周炎マウスの子宮の Treg 発現の変化

子宮組織中の Treg 数をフローサイトメトリーで解析した。

(a) Treg の定義

生活細胞かつ CD45⁺細胞をゲーティングし，縦軸を CD4，横軸を Treg のマーカーである Foxp3 とした。十字の右上のゲートを Treg とした。

(b) 子宮組織における Treg の数と総細胞数に対する Treg の割合

フローサイトメトリー解析結果からデータを平均値 ± 標準偏差で示し，統計解析には one-way ANOVA と Dunnett's test を用いた（健全群：n=7，歯周炎群：n=12，炎症抑制群：n=4）。

図 8. 歯周炎マウスの子宮の炎症性および抗炎症性サイトカイン遺伝子と Foxp3 の mRNA 発現の変化

mRNA 発現量を real-time PCR で解析した。

Il-6, *Tnf-α*, *Il-1β*, *Il-10*, *Foxp3* の mRNA 発現量を，内在性コントロールとして *Gapdh* を使用して補正し，相対発現量を y 軸に示す。

データは平均値 ± 標準偏差で示し，統計解析には Student's *t*-test を用いた（2 週間サ

ンプル, 健常群 : n = 4, 歯周炎群 : n = 4, 4 週間サンプル, 健常群 : n = 4, 歯周炎群 : n = 4)。

図 9. 歯周炎マウスの血清アミロイド A (SAA) 濃度の変化

濃度を ELISA 法で定量した。

データは平均値 ± 標準偏差で示し, 統計解析には Student's *t*-test を用いた (2 週間サンプル, 健常群 : n = 5, 歯周炎群 : n = 5, 4 週間サンプル, 健常群 : n = 4, 歯周炎群 : n = 4)。

図 10. 歯周炎マウスの子宮の細菌数の変化

細菌数を real-time PCR で定量した DNA 量で示した。

データは平均値 ± 標準偏差で示し, 統計解析には Student's *t*-test を用いた (2 週間サンプル, 健常群 : n = 4, 歯周炎群 : n = 4, 4 週間サンプル, 健常群 : n = 4, 歯周炎群 : n = 4)。ND : not detected

図 11. 歯周炎マウスの子宮の性ホルモン受容体の mRNA 発現の変化

子宮組織のプロゲステロン, エストロゲンの受容体 (*Progesterone receptor, Estrogen receptor 1, Estrogen receptor 2*) の mRNA 発現量を real-time PCR で解析した。

データは平均値 ± 標準偏差で示し, 統計解析には Student's *t*-test を用いた (2 週間サンプル, 健常群 : n = 4, 歯周炎群 : n = 4, 4 週間サンプル, 健常群 : n = 4, 歯周炎群 : n = 4)。

表の説明

表 1 real-time PCR 法で用いた PCR プライマー

Gene	Direction	Primer sequence	Product Size (bp)	Annealing temperature (°C)
<i>Il-6</i>	forward	5'-GGATGTCTGTAGCTCATTCTGC -3'	118	60
	reverse	5'-CATCAGTCCCAAGAAGGCAAC -3'		
<i>Il-1β</i>	forward	5'-ACTACAGGCTCCGAGATGAAC-3'	145	60
	reverse	5'-TTGTCGTTGCTTGGTTCTCC -3'		
<i>Tnf-α</i>	forward	5'-GGATGAGAAGTTCCCAAATGGC -3'	149	60
	reverse	5'-GGTTGTCTTTGAGATCCATGCC-3'		
<i>Il-10</i>	forward	5'-CAACATACTGCTAACCGACTCC-3'	105	59
	reverse	5'-AGACAAGTTACCCAGCTC-3'		
<i>Gapdh</i>	forward	5'-TGCTGAGTATGTCGTGGAGTC -3'	96	59
	reverse	5'-TGGGGCATCACTTCTACCAG -3'		
<i>Foxp3</i>	forward	5'-AATATGCGACCCCTTTCACC-3'	129	60
	reverse	5'-GTGGTTTCTGAAGTAGGCCGAAC-3'		
<i>Progesterone Receptor</i>	forward	5'-ACAAAATTCTCGACAGCTTGC-3'	129	60
	reverse	5'-CTGGGCAGCAATAACTTCAGAC-3'		
<i>Estrogen Receptor 1</i>	forward	5'-TGCACCATTGACAAGAACCG-3'	122	60
	reverse	5'-TGCTTCAACATTCTCCCTCCTC-3'		
<i>Estrogen Receptor 2</i>	forward	5'-AGAACACACCTTGCCTGTAAAC-3'	149	59
	reverse	5'-CACCGTAATGATACCCAGATGC-3'		
Universal	forward	5'-GTGSTGCAYGGYTGTCGTCA-3'	148	59
	reverse	5'-ACGTCRTCCMCACCTTCCTC-3'		
<i>P. gingivalis</i>	forward	5'-GCGCTCAACGTTTCAGCC-3'	68	60
	reverse	5'-CACGAATTCCGCCTGC-3'		
	probe	5'-CACTGAAGTCAAGCCCGGCAGTTTCAA-3'		

表 2. 患者背景

項目	自然妊娠群 n=77	原因不明不妊患者群 n=71	P-value
年齢（歳）	33	34	0.0296
年齢分布（歳）			
30-34	53	40	
35-40	22	24	
>40	2	7	
不妊期間（年）			
1年未満		20	
1年以上2年未満		13	
2年以上		30	
期間不明		8	
不妊治療ステージ			
タイミング法		32	
人工授精		17	
生殖補助医療		20	
通院中断		2	