

氏名	永田 千晶
授与した学位	博士
専攻分野の名称	歯学
学位授与番号	博甲第6813号
学位授与の日付	令和5年3月24日
学位授与の要件	医歯薬学総合研究科病態制御科学専攻 (学位規則第4条第1項該当)
学位論文の題目	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
論文審査委員	大原 直也 教授 江國 大輔 准教授 稲葉 裕明 准教授

学位論文内容の要旨

【緒言】

世界保健機構では、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。日本においては、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、不妊は大きな社会問題の一つとなっている。不妊の原因には男性要因と女性要因があるが、不妊の約3割は器質的な異常を確認できない原因不明不妊と報告されており、その原因の追求が望まれる。

近年、歯周病原細菌である *Porphyromonas gingivalis* (Pg) の感染が妊娠成立に悪影響を及ぼす可能性が示唆されている。しかし、実際の不妊治療中女性患者における Pg の感染度は不明であり、歯周感染・炎症が子宮や妊娠に及ぼす影響の分子メカニズムは解明されていない。

本研究では、実際の不妊治療中女性患者における Pg の感染度を調査するとともに、絹糸結紮歯周炎マウスモデルを用いて、歯周感染・炎症が妊娠および子宮に及ぼす影響を組織学的及び免疫学的手法を用いて解析・検討した。

【材料と方法】

1. 臨床研究

2020年1月～2022年4月に生殖医療センター併設協力産科医院を受診した30歳以上45歳未満の経膣分娩で出産した自然妊娠妊婦77名と不妊治療中で原因不明不妊と診断された患者71名を対象とした(岡山大学倫理委員会承認番号:研1909-023)。被験者から末梢血を採取し、分離した血清を用いて、Pg FDC381, SU63, W83の3菌株に対する血清IgG抗体価をELISA法にて測定し、感染度を調査した。統計解析はMann-Whitney U testを用いた。

2. 基礎研究

マウス(C57BL/6J, 雌性, 9週齢)の上顎両側第二臼歯に5-0絹糸を結紮し、週3回Pg W83株(2×10^7 CFU)を絹糸に浸透させて歯周炎症を惹起し、雄性マウスと交配させる群、させない群の2群に分けた。(岡山大学動物実験委員会:OKU-2021680)。

交配させる群は歯周炎誘導開始4週間後、生殖能力に異常がない雄性マウス(C57BL/6J, 9-15週齢)と交配させ、出産数、新生児マウス体重、妊娠期間を調べた。交配させない群は歯周炎誘導開

始2週間後と4週間後に顎骨，血清，子宮を採取した。歯槽骨吸収量とPgに対する血清IgG抗体価（ELISA法）を測定して歯周感染を確認後，子宮の組織学的解析（H-E染色）と制御性T細胞（Treg）の解析（フローサイトメトリー法），血清アミロイドA（SAA）の測定（ELISA法），子宮における炎症性サイトカインや性ホルモン受容体のmRNA発現解析，細菌数の定量（real-time PCR法）を行った。

さらに，有機化学的に合成した抗炎症作用を有する真菌二次代謝産物(+)-terreinを歯周炎誘導開始と同時に週2回腹腔内投与（30 mg/kg）する炎症抑制群を作製し，歯周炎誘導開始4週間後に摘出した子宮を用いて上記手法と同様に解析した。統計解析は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をDunnnett's testで行った。

【結果】

1. 臨床研究

原因不明不妊患者群は自然妊娠妊婦群と比較し，年齢が有意に高かった。また，Pg3菌株に対する血清IgG抗体価がいずれも有意に上昇していた。

2. 基礎研究

歯周炎群は健常群と比較して，出産数と新生児マウスの体重が有意に低下した。歯周炎誘導開始4週間後の子宮は肥大化し，CD45⁺CD4⁺Foxp3⁺細胞（Treg）の割合が増加する傾向を示した。一方，炎症抑制群では，子宮横断面積は健常群と同程度であり，Tregの数，割合ともに差はなかった。

また，歯周炎誘導開始4週間後のマウスでは，健常群と比較し，SAAに変化はなかったが，子宮における*Il-1β*の発現が低下し，*Il-10*や*Foxp3*の発現が上昇傾向にあり，子宮でのプロゲステロン受容体のmRNA発現が低下する傾向を示した。

一方，いずれの群においても子宮内の総菌数に差はなく，Pgは検出されなかった。

【考察】

本研究では，実際に不妊治療を行っている原因不明不妊患者におけるPgの感染度を調査するとともに，絹糸結紮歯周炎マウスモデルを用いて歯周感染・炎症が妊娠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。

まず，臨床研究では，不妊治療中の原因不明不妊患者は自然妊娠妊婦と比較し，Pg3菌株の感染度が高いことが明らかとなった。本臨床研究結果をもとに，Pgの感染と感染に伴う歯周炎症が妊娠に悪影響を及ぼすと考え，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。基礎研究において，歯周炎マウスでは，健常群と比較し，出産数と新生児マウス体重が低下しており，歯周感染・炎症は着床時に子宮に何らかの影響を及ぼすことが示唆された。そこで，歯周感染誘導後の子宮組織の変化を組織学的，免疫学的に検討した。その結果，歯周炎マウスでは子宮が肥大化し，子宮におけるTregの割合が増加する傾向を示した。また，SAAや子宮における総細菌数に差はなかったが，子宮における*Il-1β*の発現が低下し，*Il-10*や*Foxp3*の発現が上昇する傾向を示した。一方，炎症抑制群の子宮は健常群と同程度であり，Tregの数や割合に差はなかった。以上から歯周感染に伴う炎症が子宮組織に上記のような変化を生じさせたと考える。

Tregの割合の増加や子宮の肥大化は，子宮内膜の持続的な炎症を特徴とし，不妊症の原因の一つと

されている慢性子宮内膜炎でも同様に確認されている。慢性子宮内膜炎と歯周炎の関連性は未だ報告されていないが、今回の結果から、Pgの感染に伴う歯周炎症が子宮組織の炎症・肥大化を惹起し、慢性子宮内膜炎様の環境を形成する可能性が示唆された。

本研究の限界として、臨床研究では研究対象者の実際の口腔内の状態は調査できていない。将来的には血清IgG抗体価の上昇を認める患者に対しては歯科検診を受けられる体制を構築することが望まれる。動物実験では、雄性マウスにおける歯周炎マウスとの交配に伴うPgの感染の有無は不明であり、これにより生殖能力へ影響を及ぼした可能性がある。また、今回はTregに着目したが、慢性子宮内膜炎では他の免疫細胞の動態も変化することが知られている。したがって、今後の課題として、歯周炎マウスとの交配後の雄性マウスの歯周炎の有無や、歯周炎マウスにおけるTreg以外の免疫細胞の動態について検討することで、不妊と歯周炎の関連がより明らかとなると考える。

【結論】

歯周感染を伴う炎症は、子宮組織の肥大化やTreg発現や抗炎症性サイトカイン発現を亢進し、免疫寛容バランスを崩すことで子宮の性ホルモン受容体発現を変化させ、不妊をもたらす因子の一つとなる。

論文審査結果の要旨

【緒言】歯周炎が妊娠成立に悪影響を及ぼす可能性が示唆されている。しかし、不妊女性における歯周病原細菌に対する血清抗体価は不明であり、歯周炎が妊娠や子宮に及ぼす影響の分子機構を検討した基礎研究はない。本研究では、臨床研究において不妊治療中女性における歯周病原細菌に対する血清 Immunoglobulin G (IgG) 抗体価を調査し、基礎研究において *Porphyromonas gingivalis* (Pg) 感染絹糸結紮歯周炎モデルマウスを用いて、歯周炎が妊娠や子宮に及ぼす影響を組織学的・免疫学的に解析・検討した。

【方法】臨床研究では、生殖医療センター併設産科医院を受診した自然妊娠妊婦 77 名と不妊治療中女性 71 名から血液を採取し、Pg FDC381、SU63、W83 株に対する血清 IgG 抗体価を ELISA 法にて測定した。

基礎研究では、雌性 Pg W83 株感染絹糸結紮歯周炎モデルマウス（以下、歯周炎マウス）を作製して実験に用いた。歯周炎マウスにおける歯槽骨吸収量と Pg に対する血清 IgG 抗体価を測定した後、妊娠結果（出産数、新生児マウスの体重、妊娠期間）と未交配マウスの子宮組織の変化（子宮横断面積、制御性 T 細胞 (Treg) の動態、サイトカインや性ホルモン受容体の遺伝子発現、総細菌数と Pg 菌数）を調べた。また、炎症抑制モデルとして抗炎症作用のある真菌二次代謝産物(+)-terreicin を歯周炎マウス腹腔内に投与 (30 mg/kg) し、子宮組織の変化を検討した。

【結果】臨床研究では、不妊治療中女性の Pg に対する血清 IgG 抗体価は 3 菌株いずれに対しても、自然妊娠妊婦のものに比較して有意に高かった。

基礎研究では、まず歯周炎マウスにおける歯槽骨吸収量の増加と Pg に対する血清 IgG 抗体価の上昇を確認した。次に、歯周炎誘導4週間後の雌性マウスを雄性マウスと交配させると、健常マウスと比較し、出産数と新生児マウスの体重は有意に低値を示した。そして、未交配の歯周炎マウスの子宮組織を調べると、健常マウスと比較し、子宮横断面積は有意に増加し、Treg の割合は増加する傾向を示した。また、子宮の総細菌数や Pg 菌数に差はなかったが、インターロイキン-1 β の遺伝子発現が有意に低下していた。さらに、プロゲステロン受容体の遺伝子発現は低下する傾向を示した。また、炎症抑制モデルでは子宮横断面積の増加は認めず、Treg の数、割合ともに健常マウスと有意差はなかった。

【考察】子宮の肥大化、Treg の発現亢進、性ホルモン受容体の遺伝子発現変化は、近年不妊症の一因とされる慢性子宮内膜炎で同様に報告されている。本研究結果から、歯周炎は慢性子宮内膜炎様の病態を引起し、不妊病態構築に関与する可能性が示唆された。

本研究では、歯周炎が妊娠に悪影響を及ぼすことを、臨床研究でその可能性を示し、基礎研究で実験的に示すとともに、子宮の肥大化と炎症性サイトカインの発現が関与する可能性を示唆した。得られた結果は新規性に富んでおり、歯周炎が不妊症に及ぼす影響と病態を解明する上で重要な知見である。

よって本審査委員会は、本申請論文に博士（歯学）の学位論文としての価値を認める。