

分担課題:慢性感染症による不育症の解析

研究分担者 早川 智 日本大学部病態病理学系微生物学分野教授

研究要旨

生殖器外の慢性感染症は病原微生物の直接毒性以外に、炎症性サイトカインの産生を介して胎児胎盤を傷害する。一方、寄生虫感染症は疫学的に習慣流産の抑制因子となる可能性がある。本年度、我々は 1) 歯周病の胎児胎盤への影響 2) 寄生虫由来抗原による習慣流産治療薬の開発を中心に研究を行った。その結果、歯周病の原因菌として最も頻度の高い *Porphyromonas gingivalis* の LPS(PG-LPS)は単独では絨毛細胞を傷害せず、NK 細胞の活性化を介して絨毛を傷害すること、一方、若年性歯周病の病原菌である *Actinobacillus actinomycetemcomitans* には直接傷害性が見られた。興味深いことに PG-LPS は suboptimal のニコチンやカフェインの存在下で不死化絨毛細胞株の浸潤を抑制した。寄生虫の実験では、rD i A g は典型的な不育症モデルである CBAXDBA マウスの系で、流産率を 1/4 に抑制した。感染とこれに伴う慢性炎症応答、寄生虫の宿主免疫修飾作用の研究から不育症診療に新たな解析と治療法の展望が開ける可能性がある。

I 歯周病と流早産

A. 研究目的

母体のコントロール不良の歯周病は、早産や胎児発育遅延 (IUGR) による低出生体重の原因となると考えられている。また近年、歯周病は慢性尿路感染や細菌性膣症とともに妊娠高血圧症候群の重要なリスク因子としても注目されている。その機序として、歯周病起因菌 *Porphyromonas gingivalis* などによる胎盤の直接的傷害のほかに、母体免疫系の活性化による寛容の破綻が想定されている。我々は先に、*P. gingivalis* や *Actinobacillus actinomycetemcomitans* による直接の絨毛細胞傷害はみられないが、これらが NK 細胞を活性化し、絨毛癌細胞株 BeWo に対する Foaming 誘導による細胞傷害の原因になることを明らかにした。一方、歯周病妊婦では喫煙やカフェイン飲料の大量摂取など他のハイリスク行動を取る患者が多いことも指摘されている。*P. gingivalis* による胎盤機能障害を *in vitro* で検討するため以下の実験を行った。

B. 研究方法

不死化初期浸潤絨毛細胞株 HTR8 は RPMI 1640 培地に 10% fetal bovine serum、100 Uml⁻¹ penicillin、100 Uml⁻¹ streptomycin、10mM

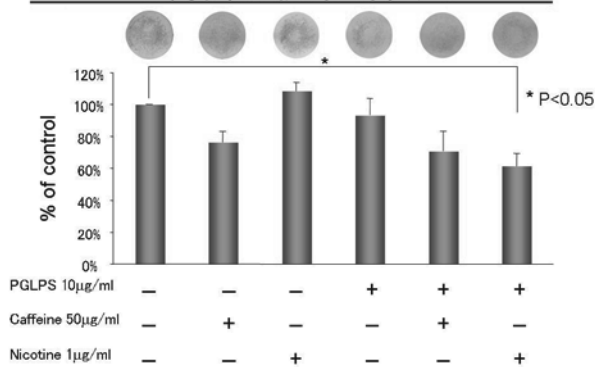
HEPES、100μM non-essential amino acid、1mM sodium pyruvate を添加した培地で培養した。細胞の浸潤能は matrigel assay で検討した。各種濃度の *P. gingivalis* 由来 LPS (PGLPS) を添加し、さらに、カフェインあるいはニコチンを添加し、浸潤に与える影響を検討した(倫理面への配慮)

本研究は培養細胞を用いた基礎的研究であり特に倫理委員会への申請は行っていないが、*P. gingivalis* は BSL2 の病原微生物であり、バイオリスク管理委員会の登録と認可を受けた。

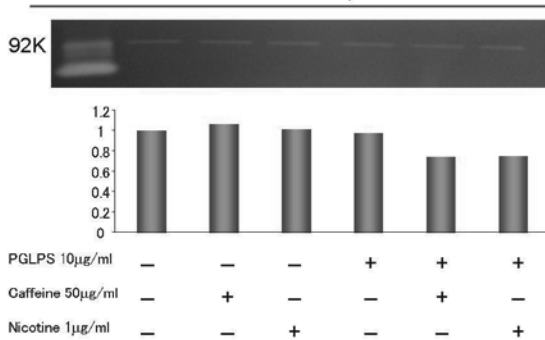
C. 研究結果

PGLPS は 0.1-10 μg/ml までの濃度で HTR8 の浸潤を抑制しなかったが、ニコチン 1μg/ml との共存下では有意に浸潤を抑制した(図)。カフェインもしくはニコチン単独刺激では浸潤抑制は軽度であり、歯周病と他の生活因子の相乗作用が推定された。MMP-9 の発現は PG-LPS とカフェインもしくはニコチンの存在下で強く抑制された。

PGLPSはニコチンの存在下で
栄養膜細胞浸潤を抑制する



PGLPSはニコチン、カフェインの存在下で
MMP9の発現を抑制する



D. 考察

P. gingivalis の菌体成分が子宮内に到達した場合、PGLPS 単独では trophoblast の子宮筋層への浸潤に影響を与えないが、喫煙やカフェイン飲料の過量摂取が相乗的に作用し浸潤を抑制する可能性がある。これら複数の因子が、母体血管改築による胎児胎盤血流の担保を阻害し、早産、IUGR、妊娠高血圧症候群のリスクとなる可能性が示唆された

一般的な歯周疾患の進行は緩慢であるのに対し、早期発症性歯周炎は若年者や30歳代で急速な歯周組織の破壊がみられるのが特徴である。なぜ、破壊が起きるのかは、まだ完全には解明されていないが、病原体(細菌)の毒性と、宿主の遺伝的感受性が関与する可能性がある、歯周病の妊娠合併症への関与はまだ、確定的な結論を得ていないが、我々の研究結果より若年性歯周病は単独で、最近の直接毒性により、成人型の歯周病はニコチンやカフェイン摂取など他の要因が相乗的に作用する可能性がある。

II 寄生虫抗原による習慣流産抑制

A. 研究目的

マラリアやインフルエンザなどの全身的感染症、CMV,クラミジア,グラム陰性桿菌などによる局所的な感染症が、流早産の原因となることは論を俟たない。しかし、途上国では寄生虫疾患が多い一方、同種免疫異常による不育症の患者は稀である。医療アクセスや現地医療機関の診断能力の問題はあるとしても、アレルギー疾患同様に Hygiene hypothesis が成立する可能性がある。寄生虫の立場からすると、自らが宿主による拒絶を免れると同時に、妊娠を継続させることで次の世代の新たな宿主を生み出すことは理にかなっている。同種免疫異常の治療として従来、夫リンパ球による免疫療法が広く行われてきたが、感染症や自己抗体の誘導などの副作用や、さらに治療効果の確実性の点より、近年は行われないう傾向にある。それに代わる治療としてイムノグロブリン大量投与療法が行われている。しかし、前者はエビデンスはあるものの非常に高額とな点や重症感染症や血小板減少性紫斑病など重篤な状態に適応となるイムノグロブリンという限られた医療資源を人命に直接関わらず、また緊急性のない不育症に大量に使用するという医療倫理的問題がある。一般には悪玉である感染症にかかわる因子、特に寄生虫由来物質を習慣流産治療に使用するというアイデアは我々独自のものであるが rDiAg は既に精製され、I型糖尿病やMSモデルマウスなど TypeI 免疫応答による疾患動物における治療効果が報告されて本研究では妊娠免疫における効果を動物で検討するため以下の実験を行った。

B. 研究方法

Clark らによって免疫機序による不育症モデルとして報告され、すでに確立した DBA/2J オス X CBA/J メスの mating を行い、以下の方法で rDiAg の免疫調節作用と流産予防効果の有無を判定した。

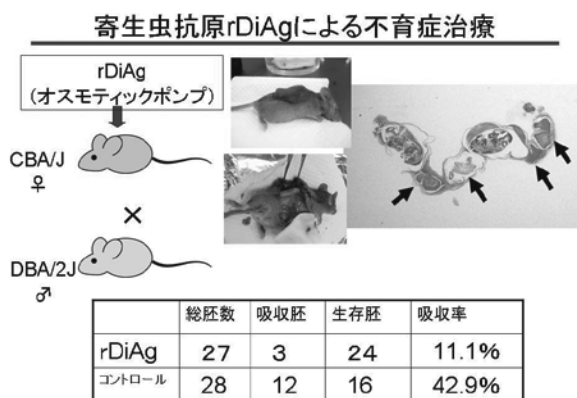
- 1) 予め、8-10週の CBA/J メス背部皮下に無菌的にオスモティックポンプ植え込み手術を行い、1-30 µgの rDiAg を投与した。
- 2) DBA/2J オスと mating を行い、膣栓確認で交尾を判定した
- 3) 妊娠 13 日目に屠殺し、生存胎仔数と吸収胎仔数を判定した
- 4) 胎盤・脱落膜の組織学的検討と、サイトカイ

ンの定量を行った。
(倫理面への配慮)

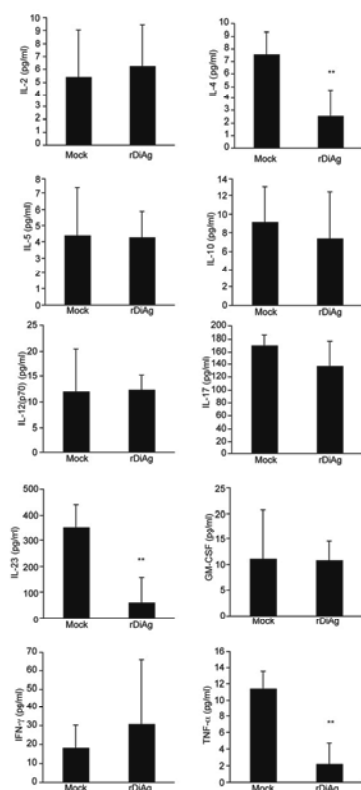
日本大学動物実験委員会の承認を得た。

C. 研究結果

非投与群の DBA/2J オス X CBA/J メスの胎児吸収は、42.9%であったが、rDiAg 投与により 11.1%まで減少した。



血中サイトカインの解析では IL-4, IL-23, TNF- α が有意に減少し、IL-17 は減少傾向を見たが有意差はなかった。他の type 1 (IL-2, IFN- γ) type2 (IL-5, IL-10) サイトカインは変動しなかった。



D 考察 寄生虫由来抗原 rDiAg は習慣流産モデルマウスで統計的に有意に妊娠予後を改善した、その機序は従来知られていた Th2 の誘導ではなく、Th1,Th2 ともに抑制する新たな機構があると考えられた

E. 結論

I.II の結果より、口腔をはじめとする全身の慢性感染に伴う炎症応答は流産の病態に關与する可能性が示唆された、寄生虫の宿主免疫修飾作用の研究から不育症診療に新たな治療法の展望が開ける可能性がある。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Komine-Aizawa S, Yamazaki T, Yamazaki T, Hattori S, Miyamoto Y, Yamamoto N, Haga S, Sugitani M, Honda M, Hayakawa S, Yamamoto S Influence of advanced age on Mycobacterium bovis BCG vaccination in guinea pigs aerogenically infected with Mycobacterium tuberculosis. Clin Vaccine Immunol. 2010 Oct;17(10):1500-6.
- 2) Negishi M, Izumi Y, Aleemuzzaman S, Inaba N, Hayakawa S. Lipopolysaccharide (LPS)- induced Interferon (IFN)-gamma production by decidual mononuclear cells (DMNC) is interleukin (IL)-2 and IL-12 dependent. Am J Reprod Immunol. 2011 Jan;65(1):20-7.

2 学会発表

- 1) Shihoko Komine-Aizawa, Yasuyuki Izumi, and Satoshi Hayakawa The therapeutic potential of the recombinant antigen from *Dirofilaria immitis* (rDiAg) for immune mediated pregnancy loss. 14th International Congress of Immunology. Workshop 26 Aug 2010 Kobe

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Komine-Aizawa S, Yamazaki T, Yamazaki T, Hattori S, Miyamoto Y, Yamamoto N, Haga S, Sugitani M, Honda M, <u>Hayakawa S</u> , Yamamoto S	Influence of advanced age on Mycobacterium bovis BCG vaccination in guinea pigs aerogenically infected with Mycobacterium tuberculosis.	Clin Vaccine Immunol.	17(10)	1500-6	2010
Negishi M, Izumi Y, Aleemuzzaman S, Inaba N, <u>Hayakawa S</u> .	Lipopolysaccharide (LPS)- induced Interferon (IFN)-gamma production by decidual mononuclear cells (DMNC) is interleukin (IL)-2 and IL-12 dependent.	Am J Reprod Immunol.	65(1)	20-7	2011