

ヒト胎盤の trophoblast 浸潤に歯周病菌  
*Porphyromonas gingivalis* 培養上清が及ぼす  
影響の研究（要約）

日本大学大学院医学研究科博士課程  
病理系感染制御科学専攻

廣畑 直子

修了年 2016 年

指導教員 早川 智

## 1. はじめに

21世紀の少子高齢化時代に入り、未婚・非婚人口の増加や結婚年齢の上昇に加え、結婚しても不育症や早産・妊娠高血圧症候群などの妊娠合併症に悩む患者は少なくない。妊娠合併症は本人のみならず、次世代の健康にかかわる問題であり産婦人科のみならず複数の連携診療科による全身的な管理が必要である。歯周病は歯科領域において最も重要な疾患の一つであるが、近年、妊婦において妊婦本人や胎児新生児予後に関わる重要な疾患であることが認識されるようになった。

歯周病は、歯と歯肉の境界に形成される細菌性バイオフィーム（プラーク）が原因となり、歯を支持している歯周組織が破壊される慢性炎症である。わが国では成人の約80%が歯周病に罹患しているといわれ(1)、生活習慣病の一つと考えられている。歯周病の病態は、原因となるプラーク中の細菌およびそれらが産生する代謝産物に誘導される宿主の炎症反応であり、歯周病原菌として *Porphyromonas gingivalis* (P.g) や *Prevotella intermedia* などの嫌気性菌が関与する。これらの歯周病原菌の菌体成分や、菌が産生する glycoalyx、LPS、ジンジパイン（タンパク分解酵素）、ロイコトキシンなどの毒素が歯周組織局所の炎症の原因となる。その結果、宿主細胞は歯周組織において持続的かつ過剰な免疫反応を起こし歯周組織の破壊が進行する。歯周病は近年、口腔内局所だけでなく全身の疾患との関連が明らかになってきた。疫学的に、誤嚥性肺炎(2)や細菌性心内膜炎(3)、糖尿病(4)、虚血性心疾患(5)などでは明らかな相関が報告され、歯科的介入による肺炎の減少(6)や耐糖能の改善(7)、虚血性心疾患の状態改善(8)が報告されている。

## 歯周病と妊娠合併症

早産は南アジアやアフリカなどの途上国に特に多くみられるが、先進国でも少なくなく、日本における頻度は約 6%である(9)。早産や胎児発育不全 fetal growth restriction (FGR) は低出生体重の原因となり、成人となった後に耐糖能異常や高血圧、メタボリック症候群などのリスクが著しく高まる(10)。従って、妊婦の適切な治療管理は本人のみならず、次世代の運命をも左右するという大きな意義がある。しかし、歯周病による胎児胎盤傷害のメカニズムについては、不明な点が多く、その解析を私の主たる研究テーマとした。

近年、妊娠高血圧症候群 pregnancy induced hypertension (PIH) については歯周病との強い関連が報告される。PIH 発症原因には妊娠初期の脱落膜へのラセン動脈侵入不全や胎盤の形成異常、また妊娠後期の子宮内圧亢進による血流不全が関与するとされている。Ide ら(11)は、systematic review により歯周病と低出生体重児および早産よりも、歯周病と PIH の方が高い相関があると報告した。最近の報告でも、Desai ら(12)が case control study で歯周病が PIH の極めて高いリスク要因になることを示した (odds ratio (OR): 9.33)。歯周病と早産あるいは PIH の間のオッズ比は、早産については、OR: 2.27 (13) - 4.9 (14)とされており、PIH では OR: 1.88 (15) - 9.33 (12)とされている。

一方、歯周病と妊娠合併症の関連については必ずしも見解の一致をみず、Abati ら(16)、Srinivas ら(17)は、歯周病と妊娠合併症に有意な関連は見られなかったとしている。早産に関する妊娠中の歯科的介入についても賛否両論がある。Offenbacher ら(18)は、妊娠中の歯周病治療が早産予防に効果的であると報告している。一方、Sanz ら(19)は妊娠中に歯科治療を行っても胎児予後に影響しないと報告している。PIH に関する歯科治療の意義については、検索した限りでは報告がみられず、歯周病がいかに胎児胎盤を傷害するかという病態も不明

である。

### 胎盤の機能と構造

胎盤は真胎生、すなわち子宮内で胎児を育てる生物に形成される胎児由来の臓器である。その機能は胎児と母体とのガスならびに栄養物・老廃物の交換であるが、同時に種々のホルモンを産生して妊娠維持に働き、また母体の免疫学的異物認識から胎児を保護する働きがある(20)。とくに霊長類では、絨毛上皮の一部である *cytotrophoblast* が上皮間葉移行 *epithelial mesenchymal transition (EMT)* を起こして *invasive trophoblast* となり(21)、子宮筋層内に深く浸潤してラセン動脈を破壊し、局所に血管洞を形成することで十分な母体血流を担保する。PIH は、先述のように妊娠 20 週以降に発症するが、その発端は妊娠初期におこる栄養膜細胞層分化異常と、不十分な浸潤が原因と考えられている (図 1)。

### 歯周病菌 *P. gingivalis* 由来 LPS による *trophoblast invasion* の抑制

私たち(22)は先に、歯周病の病原菌として最も重要な *P.g* 由来の LPS (PGLPS) がニコチンの存在下でのみ不死化絨毛細胞 HTR-8/SVneo (H8) の浸潤能を強く抑制することを報告した。しかし、禁煙が一般化した現在では、日本で妊婦の喫煙者は 5%程度である。そこで私は口腔局所の細菌、特に *P.g* の産生する可溶性成分が、血行性に胎盤へ到達して胎児胎盤を傷害し、妊娠合併症の発症に関与するという仮説を立て、*trophoblast* の培養系を用いて研究を行った。

## 2. 対象と方法

### 細胞株

ヒト初期不死化絨毛細胞株である H8 は Gil Mor 教授 (Yale 大学医学部産婦人科) から分与されたものを凍結し、必要に応じて溶解・培養した。

### 細菌培養と上清の調製

歯周病菌 *Porphyromonas gingivalis* (ATCC33277) は、日本大学歯学部細菌学講座の落合邦康教授から分与された。2 x 10<sup>9</sup> 個の P.g を 37°C、10% CO<sub>2</sub> の環境で 48 時間嫌気培養した。その後、7 x 10<sup>3</sup> g で 10 分間遠心分離した培養上清を回収し 500μl ずつ分注して -80°C に保存した。

### 細胞傷害性

P.g の培養上清 (P.g sup) が H8 の viability に与える影響を Cell Counting Kit-8 (Dojindo, Tokyo, Japan) を用いて測定した。H8 に P.g sup を加え 37°C、48 時間培養した後、細胞の viability を評価した。

### 浸潤能の評価

H8 の浸潤能に対する P.g sup の影響を BD 社の Matrigel invasion assay (Franklin Lakes, NJ, USA) を用いて評価した。実験方法は製品のプロトコールに従った (図 2)。H8 と同時に P.g sup を各種の濃度で加え、37°C、5% CO<sub>2</sub> の環境で 24 時間培養した後、浸潤細胞を Diff-Quick stain (Sysmex, Hyogo, Japan) で固定・染色し、浸潤細胞数を顕微鏡で測定した。結果は、浸潤指数を

用いて評価した。

## 形態学的観察 光学顕微鏡と電子顕微鏡

H8 は懸垂培養では胚様体（スフェロイド）を形成し、足場非依存的に増殖することが知られている(23)。初期発生における非付着状態での H8 の発育と形態的变化を観察するため、懸垂培養後に光学顕微鏡および電子顕微鏡で検討した。H8 を P.g sup とともに 35mm プレートで 24 時間懸垂培養し、得られたスフェロイドを固定・脱水し、樹脂包埋した。これを 500nm 厚切片にしてトルイジンブルー染色したものを光学顕微鏡で観察した。透過型電子顕微鏡の試料は、厚さ 80nm の超薄切片を作製し、ウラン・鉛の電子染色後、透過型電子顕微鏡 (JEM-1200EX, JEOL, Tokyo, Japan) で観察した。

## マイクロアレイ解析

先に、H8 の網羅的な遺伝子発現の解析により、trophoblast の浸潤に関与する遺伝子群が報告されている (24)。本研究では、P.g sup による浸潤への影響がこれらの遺伝子発現を介するか、あるいは全く別の機構かを解析するため、Agilent SurePrint G3 Human GE 8 x 60K Microarray Ver2.0 (Agilent Technologies, Inc. Santa Clara, CA, USA) を用いて網羅的に解析した。培養と RNA 抽出を行い、RNA の質と量を確認した上で、タカラバイオ株式会社に Agilent Expression Array 解析を業務委託した。

## 免疫組織化学的解析

H8 の形態学的な観察の結果から、P.g sup による H8 の invasion 抑制に形態および機能的な障害が関与していることが考えられる。そこで、EMT のマーカーとして間葉系細胞に発現する Vimentin および上皮系細胞に発現する E-Cadherin を免疫染色で検討した。

## アポトーシスの評価

スフェロイドの形態観察にて、P.g sup によって細胞形態に変化を認めたため、P.g sup が H8 のアポトーシスを誘導するか否かを ApoStrand™ELISA apoptosis detection kit (BIOMOL, Plymouth Meeting, PA, USA) を用いて評価した。

## 統計学的処理

実験の結果は平均±S.D.で示し、有意差検定は Statcel 3 (OMS publishing Inc, Saitama, Japan)を用いて、多重比較検定を行った。P 値が 0.01 未満の場合を統計学的に有意とした。

## 3. 結果

### *P.gingivalis* 培養上清の細胞毒性の検討

H8 を 0.05%から 5%の P.g sup または BHIB 存在下で培養したが、いずれの濃度でも viability に有意な変化は見られなかった。

## *P.gingivalis* の培養上清は H8 の invasion を抑制する

P.g sup は容量依存的に H8 の浸潤を抑制し、陰性コントロールの浸潤指数を 1 とした場合、0.01%P.g sup では 0.82、0.1%P.g sup では 0.47 であった (\*\* $p<0.01$ )。 (図 3)

## 形態学的観察 光学顕微鏡と電子顕微鏡

トルイジンブルーで染色した光顕像では、P.g sup によって H8 のスフェロイド表層の細胞が円形になり、細胞同士の接着が一部途切れ遊離した細胞が見られた。透過型電顕像においても、P.g sup によって H8 のスフェロイド表層の細胞に変化が見られ、陰性コントロールでは細胞間の接着構造と考えられる microvilli が発達していたが、P.g sup を加えた場合 microvilli が退縮し短くなっていた。また、細胞間隙も拡大していた。

## マイクロアレイ解析

H8 に 0.1% P.g sup を 3 時間作用させた結果、対照と比較し 384 遺伝子の発現に 2 倍以上の増減が見られた。このうち、289 遺伝子 (75.2%) は発現増強し、93 遺伝子 (24.2%) は発現減弱していた。具体的には、homeobox4 (HOX4) (x4.08)、 fibromodulin (x3.41)、 alpha-2-macroglobulin (x3.32)、 neural cell adhesion molecule 1 (NCAM1) (x3.19)、 Toll-Like receptor 4 (TLR4) (x2.54)、 TLR6 (x2.12)、 Caspase 7 (x 2.12)、 keratin 71 (x2.08) など trophoblast の分化や細胞接着に関わる遺伝子の発現が増強した一方、母児免疫寛容にかかわると



される IL-10 の発現は減弱した (x -2.3)。

## 免疫組織化学的解析

H8 は Vimentin を構成的に発現し、P.g sup により、その発現が減弱した。  
E-Cadherin の発現は誘導されなかった。

## P.g sup は H8 のアポトーシスを誘導しない

陽性コントロールは吸光度の平均値が  $2.30 \pm 0.27$  で、陰性コントロール:  $0.4 \pm 0.14$ 、BHIB 群:  $0.34 \pm 0.14$ 、0.01% P.g sup 群:  $0.37 \pm 0.15$ 、0.1% P.g sup 群:  $0.38 \pm 0.15$ 、1% P.g sup 群:  $0.38 \pm 0.15$  であった。陽性コントロールに比較して P.g sup の有無に関わらずアポトーシスの誘導に差は見られなかった ( $p < 0.01$ )。

## 4. 考察

歯周病は種々の全身疾患の発症や増悪因子となる。妊娠合併症もそのひとつであるが、発症機序は不明な点が多い。妊娠合併症として早産や FGR に加え、PIH が重要である。P.g の子宮収縮や炎症性サイトカイン誘導に関する研究は少なくないが、PIH とくに絨毛浸潤との関連に着目した研究は PubMed で検索すると世界中で私たちが最初である。

P.g は口腔内常在菌であり、歯磨きや歯科治療で容易に血中に入る(3),(25)。血中に入った菌が直接接触するのは血管内皮細胞と胎盤絨毛細胞だけである。実際、P.g が *in vitro* で絨毛細胞に感染しえることや、胎盤組織において免疫組織化学あるいは PCR で P.g が検出されたという報告もある。しかし、合併症のない正常妊婦由来胎盤でも P.g は一定頻度で検出されており、P.g の局所感染のみが、早産や PIH の原因となるとは考えがたい。私たちの先行研究では、PGLPS はニコチン (1 $\mu$ g/ml) の存在下のみ絨毛の浸潤を抑制しており、ヘビースモーカーにおいてのみ歯周病が絨毛浸潤阻害のリスク因子となることになる。しかし最近、Ha ら(26)は非喫煙妊婦において歯周病と PIH に強い関連があると報告している (OR: 5.56)。このことから、非喫煙者においても歯周病の存在自体が妊娠合併症のリスク因子となることが考えられる。本研究では、0.01 – 1%の P.g sup を用いた。最近、Aagaard ら(27)は、胎盤には独自のマイクロバイオーームが存在し、それが口腔と強い関連があると報告している。彼女らは胎盤のマイクロバイオーームが組織 1g あたり 2 $\mu$ g と極めて微量であるとしていることから、胎盤機能傷害には口腔内細菌がごく少量存在しても影響する可能性がある。

本研究では P.g の産生する可溶性因子が絨毛細胞浸潤を強く抑制することが示唆された。その分子的背景の解明が今後の最大の課題である。P.g sup 添加により keratin や HOX4 のように、細胞構造や絨毛細胞分化に関わる遺伝子発現

が変化した。この知見は trophoblast の浸潤不全に EMT の抑制が関わる可能性を示唆する。そこで免疫組織化学的解析を行ったところ、P.g sup は Vimentin の発現を抑制したが、E-Cadherin 発現には差が見られなかった。間葉系細胞マーカーである Vimentin の発現減弱は P.g sup によって EMT が抑制される傷害可能性を示唆する。電子顕微鏡的には微絨毛の伸展が抑制され、P.g の産生する可溶性因子が絨毛細胞の機能を傷害する可能性が示唆された。Ishii ら(28)は正常胎盤と絨毛癌細胞株において分化段階に特異的な HOX 遺伝子群発現を報告したが、本実験結果は口腔の慢性感染が HOX 発現と絨毛分化に影響を及ぼす可能性を示唆する。

PIH の原因として、妊娠初期におこる栄養膜細胞層分化異常と、不十分な浸潤が考えられているが、浸潤障害を起こす理由のひとつにアポトーシスが考えられている。Di Federico ら(29)、Kadyrov ら(30)は PIH/FGR 胎盤ではアポトーシスが增加していること、Koide ら(31)は絨毛細胞の増殖を示す Ki67 陽性細胞とアポトーシスの増加が共存する repair hyperplasia の状態にあることを報告した。In vitro でも、Inaba ら(32)は、P.g を感染させると trophoblast の細胞周期が傷害されてアポトーシスが增加することを示した。しかし、本研究では、P.g sup は H8 のアポトーシスを誘導しなかった。このことから、PIH 成立後の胎盤でアポトーシスが結果的に生じていても、P.g sup による胎盤形成初期の浸潤障害はアポトーシスとは別の機序で生じる可能性が示唆された。

近年、大規模な臨床研究が行われ、妊婦に対し非外科的歯周病治療であるスケーリング・ルートプレーニングを行っても PLBW は改善しないという結果が報告された(33), (34)。Schwendicke ら(35)はメタ解析で、歯周治療は PTB (OR: 0.79) や LBW (OR: 0.69)の減少に影響しないと報告している。多くの場合、胎児への影響への恐れから、妊婦は妊娠後半期まで歯科的治療を希望せず、歯科

医、産婦人科医もそのような患者の意思を尊重することが多い。しかし、胎盤は妊娠 12 週には基本構造が完成しており、歯周疾患の影響がすでに及んでいる可能性がある。したがって、妊娠の後期や分娩時に胎盤に検出される P.g が積極的に病態に関与しているというよりは、偶発的に血中に入り、検出されている可能性が高い。このことは、正常妊婦でもしばしば胎盤で P.g が検出されるという事実を説明できる。通常の歯科治療が奇形や流産を誘発する可能性はきわめて低いですが、私は本研究結果から、器官形成期である妊娠初期にあえて歯科的介绍を行うよりは、妊娠を希望する女性にはあらかじめ歯科検診を行い、妊娠前に口腔内衛生環境を整えておくことが重要であると考えます。

PIH 予防に関する歯科治療の意義については、現在のところ臨床的研究は皆無である。PIH 発症には妊産婦の遺伝的背景や配偶者との免疫学的適合性など多くの要因が関与する。ハイリスク者に対する低用量アスピリンや減塩食などの予防的介入の可能性が報告されるが、歯科医学的管理は患者本人、胎児双方に何ら不利益をもたらさないことから一考の価値がある。本研究のような基礎的データをもとに歯科医・産科医連携による大規模な疫学的研究を期待したい。

## 5. まとめ

P.g 培養上清中の可溶性成分により、H8 の浸潤が抑制されることが明らかになった。その機序として、EMT の傷害が示唆される。胎盤の形成は妊娠初期に完了するため、妊娠前から歯科的管理を行っておくことが重要であろう。

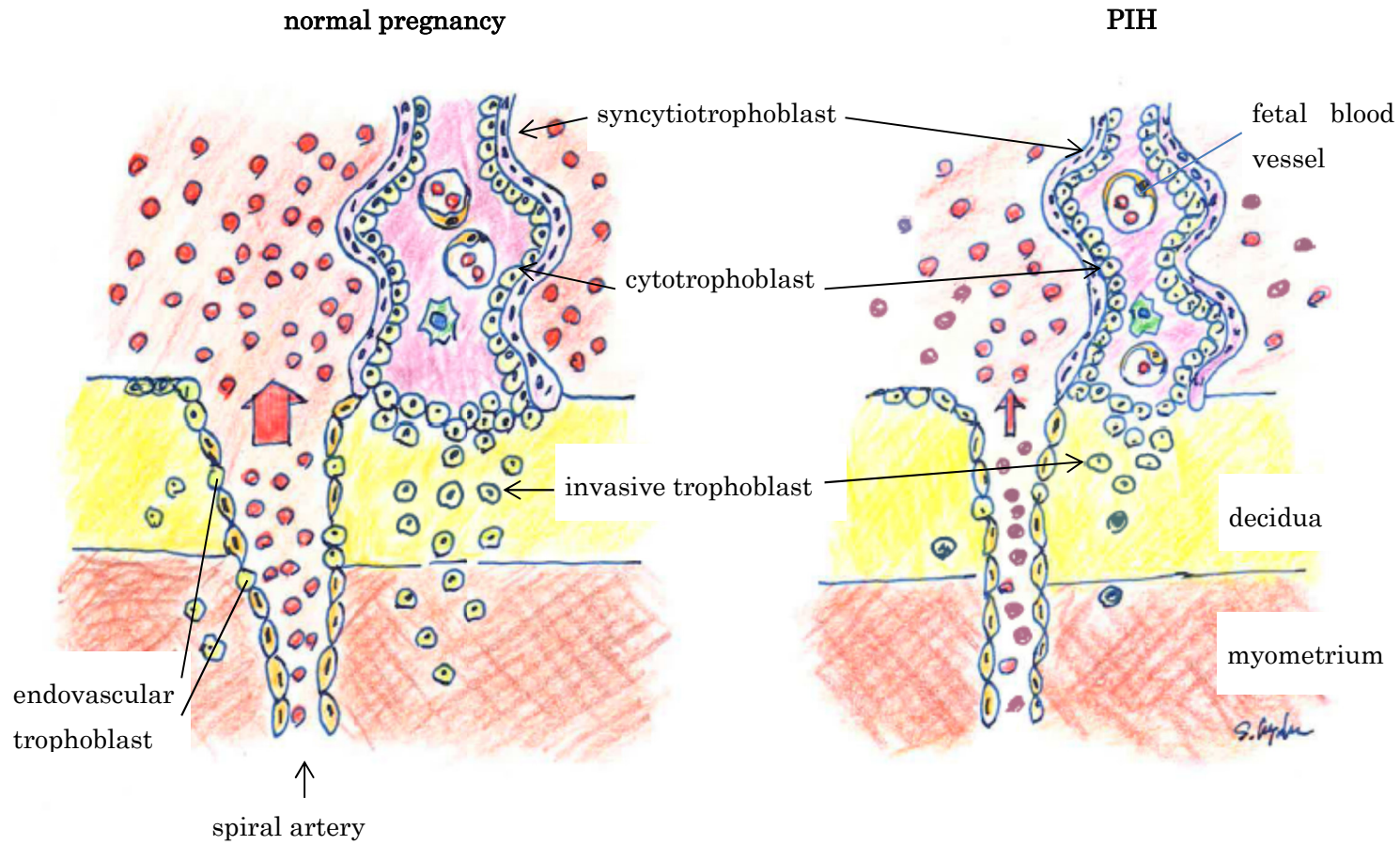
## 6. 今後の展望

今後の課題として、*P.g* が産生するいかなる物質が胎児胎盤を傷害するかという問題がある。

胎盤には独自のマイクロバイームが存在し、それが口腔と強い関連があるとされている(27)。*P.g* 以外にも口腔と胎盤に共通して存在するマイクロバイームの病的意義を検討していきたいと考えている。

図表

図 1 normal と preeclampsia の trophoblast 浸潤



正常妊婦では、栄養膜細胞が脱落膜、子宮筋層まで浸潤し、ラセン動脈の血管内皮細胞を置換する。しかし、PIH 妊婦では、妊娠初期における栄養膜細胞層分化異常と不十分な浸潤により、ラセン動脈でのリモデリングが不十分になり母体血の十分な流入が障害されてしまう。その結果、胎盤還流は低下する。

図 2

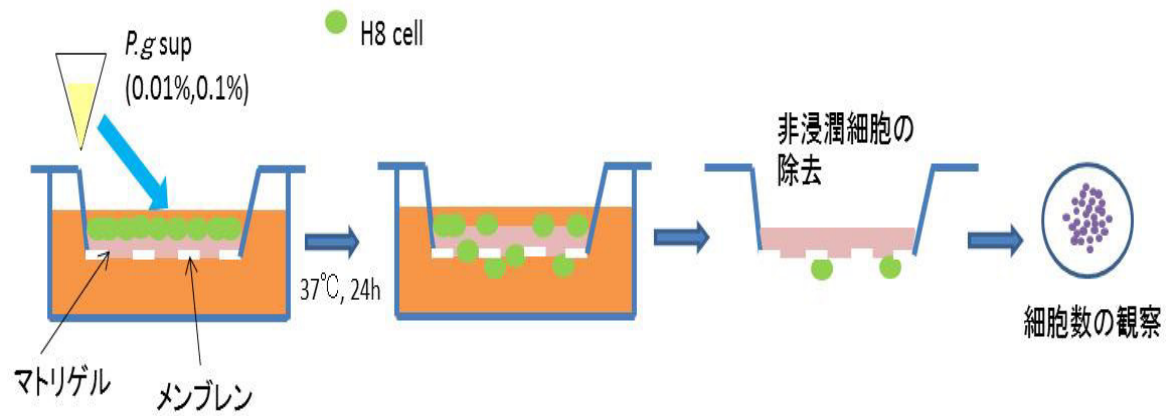
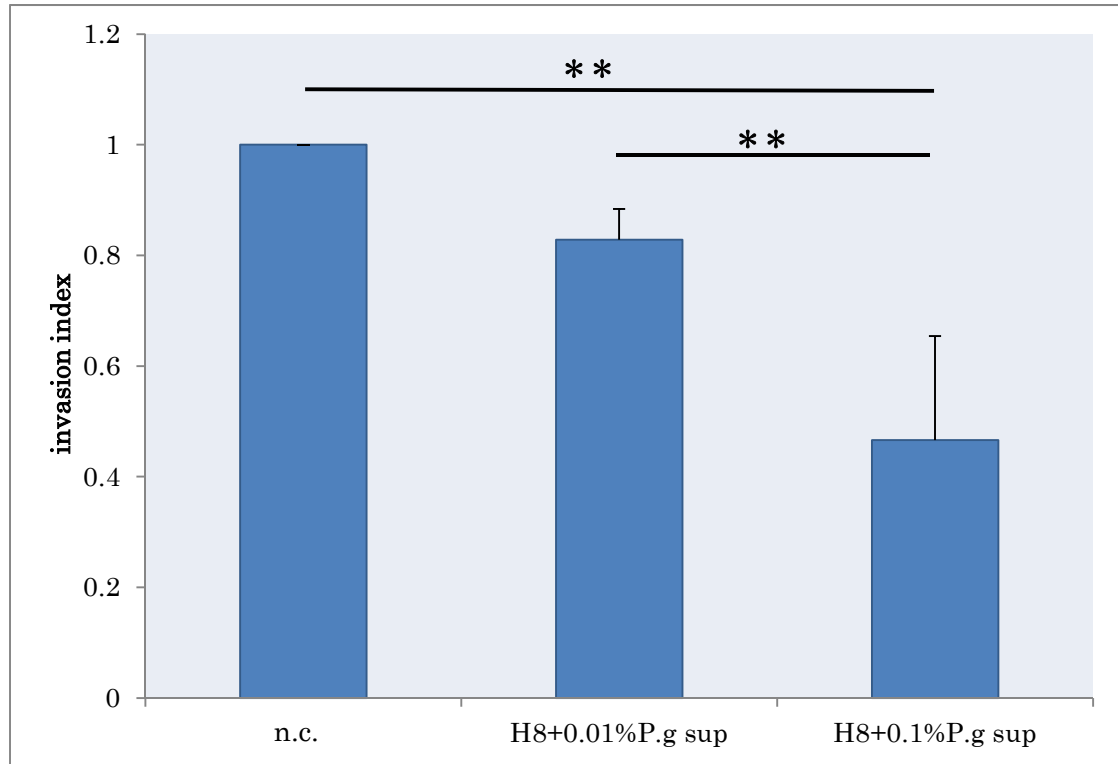


図 2 H8 細胞を P.g sup (0.01%、0.1%) の存在下または非存在下で、BD マトリゲルインベーションチャンバーにて 24 時間共培養した。非浸潤細胞を除去した後 Diff-Quick stain にて浸潤細胞を固定・染色し、顕微鏡で観察を行い、H8 の細胞浸潤能を評価した。

図 3



(\*\*p<0.01)

図 3 H8 を各種濃度の P.g sup の存在下で 24 時間培養し、浸潤能を評価した。P.g sup は容量依存的に H8 の浸潤を抑制した。陰性コントロールの浸潤指数を 1 とした場合、0.01%P.g sup では 0.82、0.1%P.g sup では 0.47 であった。実験は 4 回行い、結果は平均±S.D で示した。\*\*p<0.01.



## 参考文献

1. 厚生労働省 平成 23 年歯科疾患実態調査.  
<http://www.mhlw.go.jp/toukei/list/62-23.html>.
2. Awano S, Ansai T, Takata Y, et al. Oral health and mortality risk from pneumonia in the elderly. *Journal of dental research*. 2008;87(4):334-9.
3. Lockhart PB, Brennan MT, Sasser HC, et al. Bacteremia associated with toothbrushing and dental extraction. *Circulation*. 2008;117(24):3118-25.
4. Ide R, Hoshuyama T, Wilson D, et al. Periodontal disease and incident diabetes: a seven-year study. *Journal of dental research*. 2011;90(1):41-6.
5. Machuca G, Segura-Egea JJ, Jimenez-Beato G, et al. Clinical indicators of periodontal disease in patients with coronary heart disease: a 10 years longitudinal study. *Medicina oral, patologia oral y cirugia bucal*. 2012;17(4):e569-74.
6. Yoneyama T, Yoshida M, Ohru T, et al. Oral care reduces pneumonia in older patients in nursing homes. *Journal of the American Geriatrics Society*. 2002;50(3):430-3.
7. Sun WL, Chen LL, Zhang SZ, et al. Inflammatory cytokines, adiponectin, insulin resistance and metabolic control after periodontal intervention in patients with type 2 diabetes and chronic periodontitis. *Internal medicine (Tokyo, Japan)*. 2011;50(15):1569-74.
8. Offenbacher S, Beck JD, Moss K, et al. Results from the Periodontitis and Vascular Events (PAVE) Study: a pilot multicentered, randomized, controlled trial to study effects of periodontal therapy in a secondary prevention model of cardiovascular disease. *Journal of periodontology*. 2009;80(2):190-201.
9. WHO. Global Health Observatory Data Repository (2015).  
<http://apps.who.int/gho/data/view.main.1730?lang=en>.
10. 佐川 典正. 【胎児発育異常をめぐる諸問題】 胎児発育異常と胎児プログラミング説 (解説/特集). *産と婦*. 2008;75(8): 945-950.
11. Ide M, Papapanou PN. Epidemiology of association between maternal periodontal disease and adverse pregnancy outcomes--systematic review. *Journal of periodontology*. 2013;84(4 Suppl):S181-94.
12. Desai K, Desai P, Duseja S, et al. Significance of maternal periodontal health in preeclampsia. *Journal of International Society of Preventive & Community Dentistry*. 2015;5(2):103-7.
13. Vergnes JN, Sixou M. Preterm low birth weight and maternal periodontal status: a meta-analysis. *American journal of obstetrics and gynecology*. 2007;196(2):135.e1-7.
14. Santos-Pereira SA, Giraldo PC, Saba-Chujfi E, et al. Chronic periodontitis and

pre-term labour in Brazilian pregnant women: an association to be analysed. *Journal of clinical periodontology*. 2007;34(3):208-13.

15. Cota LO, Guimaraes AN, Costa JE, et al. Association between maternal periodontitis and an increased risk of preeclampsia. *Journal of periodontology*. 2006;77(12):2063-9.

16. Abati S, Villa A, Cetin I, et al. Lack of association between maternal periodontal status and adverse pregnancy outcomes: a multicentric epidemiologic study. *The journal of maternal-fetal & neonatal medicine : the official journal of the European Association of Perinatal Medicine, the Federation of Asia and Oceania Perinatal Societies, the International Society of Perinatal Obstet.* 2013;26(4):369-72.

17. Srinivas SK, Sammel MD, Stamilio DM, et al. Periodontal disease and adverse pregnancy outcomes: is there an association? *American journal of obstetrics and gynecology*. 2009;200(5):497.e1-8.

18. Offenbacher S, Lin D, Strauss R, et al. Effects of periodontal therapy during pregnancy on periodontal status, biologic parameters, and pregnancy outcomes: a pilot study. *Journal of periodontology*. 2006;77(12):2011-24.

19. Sanz M, Kornman K. Periodontitis and adverse pregnancy outcomes: consensus report of the Joint EFP/AAP Workshop on Periodontitis and Systemic Diseases. *Journal of periodontology*. 2013;84(4 Suppl):S164-9.

20. T.W. Sadler. 安田峯生 訳. ラングマン人体発生学 第10版 メディカル・サイエンス・インターナショナル, 東京,. 2012:109-10.

21. Vicovac L, Aplin JD. Epithelial-mesenchymal transition during trophoblast differentiation. *Acta anatomica*. 1996;156(3):202-16.

22. Komine-Aizawa S, Hirohata N, Aizawa S, et al. Porphyromonas gingivalis lipopolysaccharide inhibits trophoblast invasion in the presence of nicotine. *Placenta*. 2015;36(1):27-33.

23. Weber M, Knoefler I, Schleussner E, et al. HTR8/SVneo cells display trophoblast progenitor cell-like characteristics indicative of self-renewal, repopulation activity, and expression of "stemness-" associated transcription factors. *BioMed research international*. 2013;2013:243649.

24. Jiang Y, Zhu Y, Shi Y, et al. Downregulation of SPARC expression inhibits the invasion of human trophoblast cells in vitro. *PloS one*. 2013;8(7):e69079.

25. Kinane DF, Riggio MP, Walker KF, et al. Bacteraemia following periodontal procedures. *Journal of clinical periodontology*. 2005;32(7):708-13.

26. Ha JE, Jun JK, Ko HJ, et al. Association between periodontitis and preeclampsia in never-smokers: a prospective study. *Journal of clinical periodontology*. 2014;41(9):869-74.

27. Aagaard K, Ma J, Antony KM, et al. The placenta harbors a unique microbiome. *Science translational medicine*. 2014;6(237):237ra65.
28. Ishii M HS, Satoh K. . Roles of HOX genes in the growth, differentiation and malignant transformation of human trophoblasts. . *Nihon Univ J Med* 1999(41):339-50.
29. DiFederico E, Genbacev O, Fisher SJ. Preeclampsia is associated with widespread apoptosis of placental cytotrophoblasts within the uterine wall. *The American journal of pathology*. 1999;155(1):293-301.
30. Kadyrov M, Kingdom JC, Huppertz B. Divergent trophoblast invasion and apoptosis in placental bed spiral arteries from pregnancies complicated by maternal anemia and early-onset preeclampsia/intrauterine growth restriction. *American journal of obstetrics and gynecology*. 2006;194(2):557-63.
31. Koide K HS, Satoh K, . Increased apoptosis and repair hyperplasia of the villous trophoblasts in preeclamptic placentae. *Nihon Univ J Med*. 2000(42):251-64.
32. Inaba H, Kuboniwa M, Bainbridge B, et al. *Porphyromonas gingivalis* invades human trophoblasts and inhibits proliferation by inducing G1 arrest and apoptosis. *Cellular microbiology*. 2009;11(10):1517-32.
33. Polyzos NP, Polyzos IP, Zavos A, et al. Obstetric outcomes after treatment of periodontal disease during pregnancy: systematic review and meta-analysis. *BMJ (Clinical research ed)*. 2010;341:c7017.
34. Michalowicz BS, Gustafsson A, Thumbigere-Math V, et al. The effects of periodontal treatment on pregnancy outcomes. *Journal of periodontology*. 2013;84(4 Suppl):S195-208.
35. Schwendicke F, Karimbux N, Allareddy V, et al. Periodontal treatment for preventing adverse pregnancy outcomes: a meta- and trial sequential analysis. *PloS one*. 2015;10(6):e0129060.