

伴侶動物の歯周病に関する研究

The study on periodontal disease in companion animals

2019年 2月

麻布大学大学院 獣医学研究科

動物応用科学専攻 博士後期課程

動物応用医科学

DA1603 岩下直樹

目次

緒言	・ ・ ・ 4
第一章	・ ・ ・ 6
1. 小序	・ ・ ・ 7
2. 材料と方法	・ ・ ・ 10
3. 結果	・ ・ ・ 19
4. 考察	・ ・ ・ 22
5. 小括	・ ・ ・ 27
6. 図・表	・ ・ ・ 28
第二章	・ ・ ・ 39
1. 小序	・ ・ ・ 40
2. 材料と方法	・ ・ ・ 42
3. 結果	・ ・ ・ 46
4. 考察	・ ・ ・ 49
5. 小括	・ ・ ・ 53
6. 図・表	・ ・ ・ 54
考察および総括	・ ・ ・ 63
参考文献	・ ・ ・ 64

要旨	• • • 73
Abstract	• • • 79
出典	• • • 85
謝辞	• • • 86

緒言

一般的に歯周病は歯周組織の慢性炎症疾患として定義され(Loesche, 1976)、その原因は歯垢内に存在する内因性の細菌の増加を介し、歯周病に関連する病原性細菌が成熟したバイオフィルムを形成すると伴に宿主の細胞を傷害することにある(Loesche, 1976; Theilade, 1986)。歯周病原性細菌はたとえ少数であっても歯周組織の環境を変え、異常な宿主免疫反応を誘発し、歯周病を進展させる(Hajishengallis et al., 2012)。歯周病はイヌやネコなどの小型伴侶動物において最もよくみられる感染症である(Niemice et al., 2008)。

歯周病は歯肉炎と歯周炎の総称であり、歯肉炎は歯周靭帯や歯槽骨などの歯周組織の損失を伴わない炎症反応を特徴とする歯周病の初期段階である(Philstrom et al., 2005)。また、歯肉炎は入念な歯磨きや専門的な歯周ケアにより歯肉は正常な状態に回復しうる(Theilade et al., 1966)。対照的に、歯周炎は歯周病の進行した状態であり、歯周組織の破壊により歯周ポケットが深いことを特徴とし、通常は不可逆性で、時には歯の損失に至ることがある(Philstrom et al., 2005)。

ヒトの歯周病と口臭は正の相関性があると考えられており (Persson et al., 1990; Nakano et al., 2002)、口臭の治療法として歯周ケアが行われているように、歯周病は不快な口臭の原因であると考えられている。口臭は主に口腔内で繁殖する細菌が合成する揮発性の化学物質であり、その中でも硫化水素 (HS)、メチルメルカプタン (MM)、ジメチルサルファイド (DMS) は口臭の主要な原因物質

として知られている (Tonzetich, 1977)。また、これら化学物質は総称して揮発性硫化物 (VSC: Volatile Sulfur Compounds) と呼ばれている。

本研究室は以前より、イヌの歯周病原性細菌 *Porphyromonas gulae* に関する研究成果を報告しているが、ネコの *P. gulae* に関する研究成果は報告できていない。また、本分野におけるネコの歯周病に関する研究報告も少ない。さらに、動物の口臭を測定する方法は未だ確立されていないことから、イヌの口臭に関する研究は少なく、歯周病との関係性も明らかとなっていない。

そこで本研究は、第一章にネコ由来 *P. gulae* の *FimA* 遺伝子型を同定し、病原性を解析することを目的に、第二章にイヌの口臭測定方法を確立し、口臭と歯周病及び年齢との関係性を追究した。

第一章

ネコ由来 *Porphyromonas gulae* の *fimA* タイプの
同定および分子学的特性

1. 小序

ヒトの歯周病に関連した細菌はこれまでに数多く報告されており、その中でも red complex 菌種と呼ばれる *P. gingivalis*、*Treponema denticola*、*Tannerella Forsythensis* は特に重症な歯周病の原因となることで知られている(Socransky et al., 1998)。イヌやネコにおいても、red complex 菌種を含めた歯周病に関連する細菌種が歯肉組織から検出されているが、歯周病の重症度との因果関係は未だ解明されていない(Kato et al., 2011; Booij-Vrieling et al., 2010; Yamazaki et al., 2012)。その一方で、*Porphyromonas gulae* (かつては *P. gigivalis* と類似菌、または、*P. gingivalis* の動物型、と呼称された)は黒色色素を持つグラム陰性嫌気性細菌であり、いくつかの他の病原細菌種とともに、多くの動物種において歯周病と関連している(Fournier et al., 2001)。現在までに、*P. gulae* はイヌ(Kato et al., 2011) およびネコ(Khazandi et al., 2014)の口腔内から検出されている。

P. gingivalis は菌体表層に分子量 41kDa のサブユニットであるフィンブリリンタンパク質 (FimA)の単量体で構成された線毛を有しており、その線毛は歯周病における主要な病原因子として知られている(Yoshimura et al., 1984; Dickinson et al., 1988)。また、*P. gingivalis* の *fimA* 遺伝子は染色体上に独立して存在しており、同じ黒色色素を持つ近縁な菌種においても独特な *fimA* 遺伝子であることから、*P. gingivalis* の病原性の強さは FimA と深い関連があるとされている(Dickinson et al., 1988; Hamada et al., 1994)。小動物では、FimA はイヌから分離さ

れた *P. gulae* において見いだされており (Hamada et al., 2008; Yamasaki et al., 2012)、ヒト由来 *P. gingivalis* の FimA と相同性が高いことが報告されている (Nomura et al., 2012; Yamasaki et al., 2012)。ヒト由来 *P. gingivalis* の FimA は 6 タイプの遺伝子型 (I~V 型および Ib 型) に、イヌ由来 *P. gulae* の FimA は 3 タイプの遺伝子型 (A 型、B 型および C 型) に分類されており、これらの遺伝子型は歯周病の重症度と密接に関連している (Kuboniwa et al., 2010; Yamasaki et al., 2012)。*P. gulae* は歯周上皮細胞に対する細胞毒性や、マウスへ全身性の炎症反応を惹起させるなど、さまざまな病原性を発現する (Lenzo et al., 2016)。3 タイプの FimA 遺伝子型の比較では、C 型の *P. gulae* は A 型および B 型の *P. gulae* よりも病原性が強く、重篤な歯周病を有するイヌから採取した口腔スワブ検体から高い割合で検出される (Nomura et al., 2012; Yamasaki et al., 2012)。

イヌおよびネコは 4 歳で約 80% が歯周病を発症しており (Harvey et al., 1995)、歯周病に罹患するとは全身の健康や日常生活にも悪影響を及ぼす (Cave et al., 2012)。ネコから検出された歯周炎に関連する細菌種に着目した研究はいくつか報告されているが (Booij-Vrieling et al., 2010; Pérez-Salcedo et al., 2011; Pérez-Salcedo et al., 2013; Khazandi et al., 2014; Pérez-Salcedo et al., 2015)、特定の細菌の遺伝子やタンパク質と歯周病との関連については検討されていない。しかしながら、歯周病リスクの高いネコを特定し速やかに適切な処置を行うには、ネコにおける主要な歯周病原性細菌の病原性を調べるのが重要である。本研究では、ネコ由来 *P. gulae* 株を分離し、*fimA* 遺伝子の配列を特定した。また、歯根膜線維

芽細胞を用いて、*P. gulae* 株の各 *fimA* 遺伝子型の病原性を比較検討した。さらに、歯周状態の異なるネコから採取された口腔スワブ検体からの *fimA* 遺伝子型の分布を調べた。

2. 材料と方法

・ *P. gulae* の株化と培養条件

Kato らの方法(Kato et al., 2011)に従って分離した *P. gulae* を Table 1 に示す。デンタルプラークサンプルは、スワブ(Seed-Swab^R γ -1 または 2, 栄研化学、東京)を使用して右側上顎第四前臼歯の歯肉縁から採取し 4°C で保存した後、数日以内に冷蔵で研究室に搬入した。検体は 5%馬血清、ヘミン(50 mg/mL)、メナジオン(5 mg/mL)含有のトリプトチンケースソイ (trypticase soy; TS) 寒天培地 (Becton, Dickinson & Co, Franklin Lakes, NJ, USA) に播種し、37°C で 7~10 日間、嫌気条件下で培養した。細菌を分離する際には、各プレートから最低 4 つのコロニーをランダムにピックアップし、10%グリセリン含有の TS ブロスで-80°C で凍結保存した。それぞれの分析に使用する前に、*P. gulae* 株を CDC 嫌気性菌用血液寒天培地(Becton, Dickinson & Co)に播種し、4~10 日間、嫌気下で培養した。培養後血液寒天培地上に得られたコロニーを採取し、ヘミン(50 mg/mL)およびメナジオン(5 mg/mL)含有の Todd Hewitt (TH)液体培地に加え、嫌気条件下で 1~2 日間の培養後、以下の実験に使用した。

分離した菌株が *P. gulae* であることの確認は、Kato らの方法(Kato et al., 2011)に従い、16S リボゾーム RNA 遺伝子の塩基配列により同定するとともに、*P. gulae* 特異プライマーを用いて増幅が得られることにより確認した。まず、TH 液体培地で培養した *P. gulae* 株から Gentra Puregene Yeast/Bact. Kit B (QIAGEN Inc.,

Valencia, CA, USA) を用いてゲノム DNA を抽出した。このゲノム DNA を鋳型として、16S リボソーム RNA 遺伝子配列上に設計されたプライマー(8UA および 1540R) および *P. gulae* 特異プライマーを用いて PCR 法を行った (Table 2)。

PCR 法による遺伝子の増幅は、TaKaRa Ex Taq[®] (Takara Bio. Inc., Otsu, Japan)を用いて、20 µg/mL の DNA 2 µL およびプライマー(20 µg/mL) 1 µL を含む全量 20 µL で行い、PCR の増幅反応には iCycler サーマルサイクラー(Bio-Rad, Hercules, CA, USA)を使用した。16S リボソーム RNA 遺伝子をもとに設計されたプライマーを使用する PCR サイクルは、95°Cで4分間の熱変性を実施した後、94°Cで30秒間の熱変性、60°Cで30秒間のアニーリング、72°Cで1分30秒間の伸長反応を30サイクル行い、最後の伸長反応は72°Cで7分間行った。*P. gulae* 特異的プライマーを使用した PCR では、95°Cで4分間の熱変性を実施した後、94°Cで30秒間の熱変性、62°Cで30秒間のアニーリング、72°Cで30秒間の伸長反応を30サイクル行い、最後の伸長反応は72°Cで7分間行った。増幅した DNA 断片を分離するために、16S リボソーム RNA 遺伝子の判別では 0.7%のアガロースゲルを、*P. gulae* 特異プライマーを用いた分析では 1.5%のアガロースゲルを用いて電気泳動を行った。ゲルは蒸留水に溶解した臭化エチジウム(0.5 µg/mL)で染色し、UV 照明下で撮影した。

PCR で増幅した 16s リボソーム RNA 遺伝子は、QIAEX ゲル抽出キット (Qiagen, Dusseldorf, Germany)を使用してゲルから抽出後、pGEM-T Easy ベクター(Promega, Madison, WI, USA)へクローニングを行い、Big Dye Terminator v3.1

(Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)、BigDye Xterminator (Thermo Fisher Scientific)および 3130xl Genetic Analyzer (Thermo Fisher Scientific)を使用して塩基配列の解析を行った (Fasmac Co., Ltd, Kanagawa, Japan)。得られた塩基配列は、National Biotechnology Information のデータベースにある BLASTN 2.0.5 プログラム (Biotechnology Information server, National Center, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) を使用して照合した。菌種の同定は、既存の *P. gulae* 株である ATCC 51700 の 16S リボゾーム RNA の塩基配列と 99%以上の合致率であることを確認することにより行った。これらの分析により *P. gulae* と確定した 15 株を以下の実験に使用した。

・ *fimA* 遺伝子の塩基配列解析

P. gulae 分離株の *fimA* 遺伝子の塩基配列を解析するための PCR 法は、ヒト由来 *P. gingivalis* 株の全長 *fimA* 遺伝子配列に基づいて設計されたプライマー (33277-F/R、6/26-F/R および HG564-F/R)を使用した(Table 2)。PCR の増幅反応には TaKaRa Ex Taq[®]を使用し、95°Cで 4 分間の熱変性を実施した後、94°Cで 30 秒間の熱変性、60°Cで 30 秒間のアニーリング、72°Cで 1 分 30 秒間の伸長反応を 30 サイクル行い、最後の伸長反応は 72°Cで 7 分間行った。得られた PCR 産物は 0.7%アガロースゲルを用いた電気泳動で分離し、上記した方法と同様にシーケンスサンプルを作製した。得られた *fimA* 遺伝子の塩基配列は、Yamasaki らの方法(Yamasaki et al., 2012)に従って、塩基配列をアミノ酸配列に変換後、

CLASTAL W (DNA Databank of japan) と Tree View software (<http://taxonomy.zoology.gla.uk/rod/treeview.html>)による近縁種結合法を行うことにより系統樹を作製した。

- ・ヒト歯根膜線維芽細胞(HPdLF)に対する接着及び、侵入の評価

ヒト歯根膜線維芽細胞(HPdLF; Human Periodontal Ligament Fibroblasts)は、10%ウシ胎児血清含有の間質細胞基本培地(Lonza)を使用し、37°C、二酸化炭素濃度 5%で培養した。*P. gulae* の HPdLF 細胞への付着能および侵入能の評価は、Nomura らの方法(Nomura et al., 2013)に従って行った。HPdLF 細胞はコンフルエントになるまで培養後、細胞数を 1×10^5 cell/mL に調整して 24 ウェルプレート (1mL/well)へ播種し、抗生物質非添加の培地を用いて 37°Cで 24 時間培養した。培養液を取り除いた後、抗生物質非添加の培地を用いて約 1×10^7 colony-forming units (CFU)を含む *P. gulae* 菌液 300 μ L を HPdLF 細胞に加えた。付着試験においては、*P. gulae* を嫌気条件下で 37°Cで 1.5 時間反応させた後、1 mL の PBS で 3 回洗浄し、細胞を破壊するために 1 mL の滅菌蒸留水を加えた。侵入試験においては、*P. gulae* を嫌気条件下で 37°Cで 2 時間反応させた後、1 mL の PBS で 3 回洗浄した。その後、細胞表面に付着するすべての *P. gulae* を殺菌するため、ゲンタマイシン(300 μ g/mL)、メトロニダゾール(200 μ g/mL)が溶解した培養液 1 mL を添加し、嫌気下で 37°Cで 3 時間培養した。その後、1 mL の PBS で 3 回洗浄し、細胞を破壊するために 1 mL の滅菌蒸留水を添加した。付着・侵入試験では、

HPdLF 細胞および *P. gulae* を含む滅菌蒸留水を段階希釈し、CDC 嫌気性菌用血液寒天培地に播種し嫌気下で 37°C で 48 時間培養した。細胞に付着または侵入した細菌数は、*P. gulae* を HPdLF 細胞とともに培養し血液寒天培地から復帰した細菌数から、HPdLF 細胞を含まないウェルで *P. gulae* を培養し血液寒天培地から復帰した細菌数を差し引いた値を算出することにより求めた。

HPdLF 細胞に接着した *P. gulae* は、Nomura らの方法(Nomura et al., 2014)に準じて走査型電子顕微鏡で観察した。まず、細菌の付着した HPdLF 細胞を 3%パラホルムアルデヒドで固定し、エタノールで脱水後 *t*-ブチルアルコールで凍結乾燥した。凍結乾燥したサンプルにオスミウムコートを施し、走査型電子顕微鏡(Hitachi S-4800; Hitachi High Technologies Corporation, Tokyo, Japan)を用いて観察した。

・細胞増殖試験

メチルテトラゾリウム (MTT) を用いた細胞増殖試験は、Nomura らの方法(Nomura et al., 2016)を一部改変して行なった。HPdLF 細胞はコンフルエントになるまで培養後、細胞数を 1×10^5 cell/mL に調整して 24 ウェルプレート(1 mL/well)へ播種し、抗生物質非添加の培地を用いて 37°C で 24 時間培養した。培養液を取り除いた後、抗生物質非添加の培地を用いて約 1×10^7 colony-forming units (CFU) を含む *P. gulae* 菌液 300 μ L を HPdLF 細胞に感染させた。嫌気条件下において 37°C で 6 時間培養後、1 mL の PBS で 3 回洗浄し、細胞表面に付着する細菌を死

滅させるためゲンタマイシン(300 µg/mL)およびメトロニダゾール(200 µg/mL)を含有する培養液 1 mL を各ウェルに添加し、37°Cでさらに 18 時間インキュベートした。次に、1 mL の PBS で 3 回洗浄した後、各ウェルに 100 µL の MTT (Sigma-Aldrich Co.)溶液(5 mg/mL)を添加した。37°Cで 4 時間反応後、0.01N の塩酸溶液に溶解したドデシル硫酸ナトリウム(1 mL)を各ウェルに添加し、室温で 5 時間静置することにより細胞を溶解させた。その後、培養液は 96 ウェルプレートに分注し、96 穴マイクロプレートリーダー(Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)を用いて 595nm での吸光度を測定した。細胞の増殖率は、*P. gulae* を感染させていない細胞に対する *P. gulae* を感染させた細胞の割合で計算し、3 回の実験の平均値±標準偏差で表示した。

・ HPdLF 細胞を用いた *in vitro* 創傷治癒試験

HPdLF 細胞を用いた *in vitro* 創傷治癒試験は、Inaba らの方法(Inaba et al., 2004)に従った。HPdLF 細胞は 6 穴トレイでコンフルエントになるまで培養し、滅菌プラスチックチップの先端で細胞にスクラッチを作製した。次に、 2×10^7 CFU 相当の *P. gulae* 株 600 µL を細胞に添加し、37°Cで 2 時間インキュベートした。その後、メトロニダゾール(200 mg/mL)およびゲンタマイシン(300 mg/mL)が溶解した培養液 1 mL を添加し 18 時間インキュベートし、スクラッチの幅からの細胞の回復面積を ImageJ ソフトを用いて解析した。

・ PCR 法を基にした *fimA* 判別方法の開発

イヌ由来 *P. gulae* 分離株の B 型および C 型の *fimA* 遺伝子を検出するプライマー(Nomura et al., 2012, Yamasaki et al., 2012)は、ネコ由来 *P. gulae* の B 型および C 型の *fimA* 遺伝子の判別にそれぞれ使用した。一方で、ネコ由来の *P. gulae* 分離株 10 株のうち 4 株の A 型 *fimA* 遺伝子には、イヌ由来の *P. gulae* 分離株の A 型 *fimA* 遺伝子のリバースプライマーが結合する配列は含まれていたが、フォワードプライマーが結合する配列が含まれていなかった。そこで、ネコ由来の A、B および C 型の *P. gulae* 株の *fimA* 遺伝子の全長の配列を比較することにより A 型株特異的な遺伝子配列を特定し、新たに A 型のフォワードプライマー(Pgufim-AF+)を構築した(Table 2, Supplementary Fig. 1)。PCR 法は TaKaRa Ex Taq[®]を使用し、95°Cで 4 分間の熱変性を実施した後、95°Cで 30 秒間の熱変性、60°Cで 30 秒間のアニーリング、72°Cで 30 秒間の伸長反応を 30 サイクル行い、最後の伸長反応は 72°Cで 7 分間行った。得られた PCR 産物は、1.5%アガロースゲルで電気泳動した。

・ 口腔スワブ検体における *P. gulae* の *fimA* 型の分布

ネコ由来の口腔スワブ検体を用いた分析は、麻布大学動物実験委員会の承認を得た上で実施した。口腔スワブ検体は、健康診断またはワクチン接種のために動物病院に来院したネコ 99 匹 から採取した。口腔スワブ検体を採取したネコの年齢は、0.3~20.5 歳であり平均は 6.4 歳であった。検体を採取する際には、ネ

コの飼い主に本実験の内容を説明し、本実験への了解を得た。口腔スワブ検体は Kato らの方法(Kato et al., 2011)に従って、左上顎第四前臼歯の歯肉縁から採取した。

ネコの歯周状態は左上顎第四前臼歯について、Finch らの方法(Finch et al., 2016)に従ってスコア化した。歯石の蓄積は肉眼的に評価し、0 を「歯石なし」、1 を「歯肉縁の歯に薄く歯石がある」、2 を「中程度の歯石がある」、3 を「かなりの量の歯石があり、歯間に及んでいる」とした。加えて、歯肉スコアも肉眼的に評価し、0 を「歯肉炎なし」、1 を「歯肉縁に微小な炎症がある」、2 を「大きい範囲で炎症が観察され、時に出血を伴う」、3 を「時に出血を伴う重度な炎症が観察され、口内炎を発症している」とした。歯周病の重症度は、歯石指数と歯肉指数の合計値によって評価し、0 を異常なし、1-2 を低度、3-4 を中程度、5-6 を重篤な歯周病とした。各検体から採取した細菌 DNA は抽出後、上述の *P. gulae* に特異的なプライマーを用いて PCR 法を行った。その後、*P. gulae* が陽性の検体は各 *fimA* 遺伝子型に特異的なプライマー(Table 2)を用いて PCR を行い、*fimA* 遺伝子型を判定した。

・統計解析

統計解析には GraphPad Prism 6 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA)を使用した。*In vitro* の実験と動物実験の各群における差異は、Bonferoni's 法で解析した。Fisher の直接確率法は、歯肉炎や歯周炎を発症しているネコと健康な歯

周状態のネコにおいて、*P. gulae* の各 *fimA* 遺伝子型の検出率を比較するために用いた。*P* 値が 0.05 以下の場合に、統計学的に有意差ありとした。

3. 結果

・ *P. gulae* と FimA の分子生物学的性質

ネコ 99 匹の口腔検体から得られた 394 個の細菌のコロニーを 16S リボゾーム RNA 遺伝子解析したところ、*P. gulae*、*Bacteroides pyogenes*、*Pasteurella multocida*、*P. macacae*、*P. circumdentaria* などが多く検出された。これらコロニーのうち、16S リボゾーム RNA 遺伝子塩基配列解析および *P. gulae* 特異的プライマーを使用した PCR 法解析によって、15 コロニーが *P. gulae* であることを確認した。これらの *P. gulae* 分離株の *fimA* 遺伝子の塩基配列を解析した結果、*P. gulae* は A 型、B 型および C 型の 3 タイプの遺伝子型に分類できることが明らかとなった (Table 3)。 *P. gulae* 15 株のうち、A 型が 10 株と最も多く、次いで B 型が 4 株認められ、C 型は 1 株のみであった。A 型 (C04Db3)、B 型 (C13Db2) および C 型 (C26Db4) の *fimA* 遺伝子をもとに推定されたアミノ酸配列は、型によって大きく異なっていた (Fig. 1)。興味深いことに、13 匹中 2 匹のネコからは A 型と B 型の 2 種の *P. gulae* 株が分離された (Table 1, Supplementary Fig. 2)。ネコ由来の *P. gulae* 株の FimA 型の推定アミノ酸配列の多くは、イヌ由来の *P. gulae* 株の FimA 型の推定アミノ酸配列と 99%~100% の高い相同性を示した (Table 4)。しかしながら、ネコ由来の A 型株のうち 4 株 (C04Db3、C05Db10、Yc9b、Yc21a) では、イヌ由来の A 型株のアミノ酸配列との相同性が 95%~96% とやや低い値を示した。イヌおよびネコから分離された *P. gulae* の FimA の推定アミノ酸配

列から作成した系統樹を Fig. 2 に示す。イヌとネコから分離された *P. gulae* の FimA のアミノ酸配列は系統樹上で全体的に混在する傾向が認められたが、イヌ由来の *P. gulae* 株との相同性の低いネコ由来の A 型株の 4 株(C04Db3、C05Db10、Yc9b、Yc21a)ではイヌ由来の *P. gulae* 株を含まず互いに近接していた。

・ HPdLF 細胞への感染に対する *P. gulae* 遺伝子型の影響

HPdLF 細胞に付着した A 型株(C03Db8、C20Db1)および B 型株(C03Db9、C13Db2) の菌数はそれぞれ $2 \times 10^3 \sim 6 \times 10^4$ CFU であり、HPdLF 細胞に侵入した A 型株および B 型株の菌数は $1 \times 10^3 \sim 3 \times 10^3$ CFU であった(Fig. 3A、B)。これに対して、HPdLF 細胞に付着および侵入した C 型株(C26Db4)の菌数は、それぞれ 2×10^5 CFU および 5×10^4 CFU であった。C 型株(C26Db4)およびヒトから分離された歯周病原性が高いとされる II 型の *P. gingivalis* である OMZ314 株は、A 型株および B 型株に比べ有意に高い細胞への付着能および侵入能を示した($P < 0.001$)。また、走査型電子顕微鏡所見から、A 型株および B 型株と比較して、C 型株において多くの菌が細胞に付着している像が確認できた(Fig. 3C)。さらに、細胞増殖試験では、B 型株および C 型株は A 型株ならびに非感染群と比較して強い細胞増殖抑制を示した(Fig. 3D、E)。in vitro 創傷治癒試験においては、いずれの *P. gulae* 株を感染させた場合においても HPdLF 細胞の遊走能の抑制が認められたが、C 型株において最も高い抑制を示した(Fig. 3F、G)。

・口腔検体における *fimA* 遺伝子型の分布

99 匹のネコから採取したほとんどの口腔スワブ検体は、*P. gulae* に特異的なプライマーを用いた PCR 法により *P. gulae* に陽性反応を示した。*P. gulae* 陽性検体については、Fig. 4A に示す各 *fimA* 遺伝子型に特異的なプライマーを使用して *fimA* 遺伝子型を特定した。また、99 匹のネコは歯周病の重症度により、健常 ($n=20$)、軽度 ($n=41$)、中等度 ($n=24$)、重症 ($n=14$) に分類され (Table 5)、加齢と歯周病の重症度との間には正の相関がみられた。Fig. 4B に口腔検体の PCR 法による解析結果の典型例を示す。*fimA* の A 型は、B 型および C 型よりも有意に高い割合で検出された ($P < 0.01$) (Fig. 4C)。さらに、B 型は健常群と比較して中等度群における検出頻度が有意に高く ($P < 0.01$)、C 型は健常群に比べ重症群における検出頻度が有意に高かった ($P < 0.05$) (Table 5)。

4. 考察

歯周病は小型伴侶動物において最もよく見られる口腔疾患である(Niemiec et al., 2008)。近年、ネコにおいて歯周病原性細菌種と歯周病との関連について焦点を当てた研究がいくつか報告されており(Booij-Vrieling et al., 2010; Pérez-Salcedo et al., 2011; Khazandi et al., 2014; Pérez-Salcedo et al., 2015)、*P. gulae* はネコの歯周病と強く関係している(Pérez-Salcedo et al., 2013)。4歳のほとんどのネコは歯周病を患っているという報告があるが(Harvey et al., 1995)、これまでに*P. gulae*の病原因子と歯周状態の関係は明確にされておらず、歯周病のリスクが高いネコを同定することは困難であった。本研究では、ネコから分離した*P. gulae*は、ヒトから分離した*P. gingivalis*およびイヌから分離した*P. gulae*と同様の病原因子であり、歯周状態と関連する菌体表層フィンブリリントタンパクであるFimAをコードする*fimA*遺伝子を保有するのではないかという仮説を立てた。まず、ネコから分離した*P. gulae*株を用いて*fimA*を同定するとともに、遺伝子多型を明らかにするために分子生物学的解析を行った。その結果、ネコから分離した*P. gulae*株は15株すべてが*fimA*遺伝子を保有しており、FimAの推定アミノ酸配列は3タイプの遺伝子型に分類することができた。

分離された15株のネコ由来の*P. gulae*のうち、10株は*fimA*遺伝子がA型であり、4株がB型、そして1株がC型であった。ネコ由来の*P. gulae*株の各FimA型の推定アミノ酸配列は、イヌ由来の*P. gulae*の各FimA型と高い同一性

および類似性を示し、各 *fimA* 遺伝子型の検出頻度はイヌとネコで同程度であった(Yamasaki et al., 2012)。しかしながら、ネコ由来の *P. gulae* 株の A 型のうち 4 株は、系統樹上で独立したクラスターを形成した。このことから、A 型 *P. gulae* 株の中にはネコに特有なアミノ酸配列を有するものがあることが示唆された。

本研究では 15 株の *P. gulae* 株を分離・培養できたが、*Porphyromonas* 属の培養は困難であることから、歯周病における *P. gulae* の病原性に焦点をあてた研究は容易ではない。そこで、ネコの口腔検体から *P. gulae* を分離・培養することなく、口腔検体から抽出した細菌 DNA を用いて *fimA* 遺伝子型を検出する PCR 検出系を確立した。この方法は、*P. gulae* の *fimA* 遺伝子型とその個体の歯周状態との関連性を解析する上で有用であると考えられる。

ネコの口腔検体から各 *fimA* 遺伝子を検出するための PCR 法を確立するにあたり、イヌの口腔スワブ検体の各 *fimA* 型の検出に用いられているプライマーを用いて PCR を行った(Nomura et al., 2011; Yamasaki et al., 2012)。その結果、ネコの A 型 *fimA* 遺伝子の塩基配列を解析したところ偽陽性が検出され (結果未公表)、ネコから分離された A 型株 10 株のうち 4 株では、イヌの A 型 *fimA* 遺伝子をもとに設計されたフォワードプライマーに該当する遺伝子配列が存在しないことが明らかとなった。そこで、本研究ではネコから分離されたすべての A 型 *P. gulae* に共通したフォワードプライマーを新たに設計した。これにより、ネコの口腔検体から A 型 *fimA* 遺伝子を増幅することに成功した。この A 型のフォワードプライマーの塩基配列は、GenBank (<http://www.ddbj.nig.ac.jp/>)に登録され

ているイヌ由来の *P. gulae* のすべての A 型に共通していることから、本研究における A 型、B 型および C 型を検出する各プライマーはネコだけでなくイヌにも使用することができることが示された。

宿主細胞に対する細菌の付着・侵入能は重要な病原因子であり、細菌感染の成立には必要不可欠である(Pizarro-Cerda & Cossart, 2006)。 *P. gingivalis* は菌周組織由来の細胞に付着・侵入能を有するが、*fimA* 遺伝子型が異なると病原性も異なることが報告されている (Nakagawa et al., 2006) 。一方で、*P. gulae* の宿主細胞への付着・侵入能について検討した報告はこれまでに存在していない。本研究において、C 型 *P. gulae* 株は高病原性株として知られる II 型 *P. gingivalis* と同様に、A 型株および B 型株と比較して有意に高い歯根膜線維芽細胞に対する付着・侵入能を有していた。このことから、*P. gulae* の病原性は *fimA* 遺伝子型により異なることが示唆された。本研究では、*P. gulae* 分離株の病原性を評価するために歯根膜線維芽細胞を用いたが、今後は歯肉上皮細胞やネコまたはイヌ由来の歯根膜線維芽細胞など他の細胞株を用いた解析を行う必要があると考えられる。

本研究では、細胞増殖試験および *in vitro* 創傷治癒試験を行い、*P. gulae* の感染に対する HPdLF 細胞の反応についても解析した。細胞増殖試験において、B 型および C 型の *P. gulae* 株は HPdLF の細胞増殖を有意に抑制した。また、*P. gulae* の感染が細胞の遊走能を抑制するかどうかを調べるために *in vitro* 創傷治癒試験を行ったところ、すべての *fimA* 遺伝子型の *P. gulae* 分離株が HPdLF 細胞の遊走を抑制した。特に、C 型 *P. gulae* 株は、A 型株や B 型株に加え高病原性株とし

て知られるⅡ型 *P. gingivalis* 株よりも高い抑制を示した。これらの結果から、*P. gulae* の感染は *fimA* 遺伝子型にかかわらず歯周組織の損傷を誘発する可能性があり、特に C 型 *P. gulae* の感染したネコでは歯周組織の損傷のリスクが高いと考えられる。

ネコの歯周病は加齢に伴い重症化する傾向にあり、これはイヌの歯周病と同様の結果であった(Yamasaki et al., 2012)。イヌでは *P. gulae* の検出率は歯周状態が悪化するほど高くなり、歯周状態が健康なイヌもしくは歯肉炎を発症しているイヌにおける *P. gulae* の検出率はそれぞれ 63.6%と 77.7%であり、歯周炎を発症しているイヌにおける *P. gulae* の検出率は 100%であった(Yamasaki et al., 2012)。これに対して、ネコの *P. gulae* の検出率は歯周状態にかかわらず約 90%であった。これらの結果から、歯周状態に関わらずイヌの口腔と比較してネコの口腔では *P. gulae* が定着しやすいと考えられる。

本研究では、歯石の沈着と歯肉の状態を Finch らの方法(Finch et al., 2016)に従って評価した。歯肉炎と歯周炎を判別するための歯槽骨の損失の評価には歯科用 X 線が有効であるが、歯科用 X 線を撮影するためには全身麻酔を行う必要があり、飼い主への同意を得ることの困難さやネコの身体への負担を考え、本研究では行わなかった。本研究において、*P. gulae* の *fimA* 遺伝子型の検出率と歯周状態との関連性を見出すことができたことから、今後は歯槽骨の損失の評価などのより詳細な解析が行うことが望ましいと考えられる。

ネコの口腔検体において、*P. gulae* の A 型、B 型および C 型の分布率は、そ

れぞれ約 75%、30%および 20%であった。A 型は歯周病の重症度に関係なく高い割合で検出されたが、B 型は中等度の歯周病を有するネコで、C 型は重篤な歯周病を有するネコで高い検出率を示した。このことから、B 型と C 型の *P. gulae* がネコの主要な歯周病原性細菌であることが示唆されるが、重篤な歯周病での C 型の *P. gulae* の検出率は 30%程度に過ぎなかった。

本実験において、ネコの *P. gulae* C 型は強い病原性を持つものの、検出率は他の亜型よりも低いことが判明した。しかし、この理由は今回の実験では解明できなかった。また、*P. gulae* には、マウスの歯周炎モデルにおいて歯槽骨の骨吸収を誘導する RgpA、RgpB、Kgp といったジンジパインを発現する遺伝子を保有するという報告があることから(Lenzo et al., 2016)、今後は *P. gulae* の感染経路や加齢に伴う *P. gulae* 亜型の移り変わり、FimA 以外の病原因子や、重篤な歯周病と関連する可能性のある他の細菌種についても分析を行う必要があると考える。

5. 小括

本研究では、ネコ由来の *P. gulae* の *fimA* 遺伝子型の同定および分類を行った。ネコ由来の *P. gulae* の *fimA* 遺伝子は A 型、B 型および C 型の 3 タイプに分類され、C 型株は歯根膜線維芽細胞に対して強い病原性を示した。一方で、C 型の *P. gulae* は A 型および B 型の *P. gulae* よりも低い検出率を示したが、B 型は中等度の歯周病のネコに、C 型は重篤な歯周病のネコに多くみられることが判明した。また、本実験で確立した口腔検体から *P. gulae* の *fimA* 遺伝子型を分類する分子生物学的手法は、ネコの歯周病リスクを評価することに有用であると考えられた。以上の本研究結果から、*P. gulae* はイヌとネコに共通した重要な歯周病原性細菌であり、FimA の多様性が病原性に関与することが明らかとなり、*P. gulae* の FimA 型の検出は、伴侶動物の歯周病のリスクを予測することに有用であると考ええる。

Table 1

Information regarding cats from which *P. gulae* isolates were recovered in the present study.

Breeds	<i>P. gulae</i> strains	Age (years)	Sex	Periodontal conditions
Japanese bobtail	C03Db8, C03Db9	3	Male	Normal
Japanese bobtail	C04Db3	15	Female	Normal
Japanese bobtail	C05Db10	11	Female	Periodontitis
Mix	C20Db1	6	Female	No information
Scottish fold	C28Db2	9	Male	Gingivitis
Japanese bobtail	C29Db1	10	Female	Normal
Munchkin	YC9b	4	Female	No information
Japanese bobtail	YC18a	8	Female	Normal
Japanese bobtail	YC21a	0	Female	Normal
Mix	YC35p3, YC35a	15	Female	No information
Unknown	C13Db2	12	Female	No information
Mix	YC34p1	11	Female	No information
Japanese bobtail	C26Db4	7	Female	Gingivitis

Table 2

PCR primer used in the present study.

Specific primer set	Sequence (5'-3')	References
Confirmation of bacterial species		
8UA	AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG	Nomura et al. (2006)
1540R	AAG GAG GTG ATC CAG CC	
Detection of <i>P. gulae</i>		
	TTG CTT GGT TGC ATG ATC GG	Kato et al. (2011)
	GCT TAT TCT TAC GGT ACA TTC ACA	
Determination of <i>fimA</i> alignment		
33277-F	TTC ATA CGT CGA CGA CTG CG	Nomura et al. (2012)
33277-R	TTG AGG GTT GAT TAC CAA GT	
6/26-F	AAC TAC GAC GCT ATA TGC AA	Nomura et al. (2012)
6/26-R	TAG ACA AAC TAT GAA AGT T	
HG564-F	GAT TTG CTG CTC TTG CTA TGA CAG CTT GTA	Yamasaki et al. (2012)
HG564-R	TTT AGT CGT TTG ACG GGT CGA AGT	
Specification of <i>fimA</i> type		
Type A <i>fimA</i>		
Pgfm-AF+	TTG TAG AAG GTA ACG CTA CCA TTA GCG TAG	This study
Pgfm-AR ^a	CTT GCC TGC CTT CAA AAC GAT TGC TTT TGG	
Type B <i>fimA</i>		
Pgfm-BF	TAA GAT TGA AGT GAA GAT GAG GGA TTC TTA TGT	Nomura et al. (2012)
Pgfm-BR	ATT TCC TCA GAA CTC AAA GGA GTA CCA TCA	
Type C <i>fimA</i>		
Pgfm-CF	CGA TTA TGA CCT TGT CGG TAA GAG CTT GGA	Yamasaki et al. (2012)
Pgfm-CR	TGT GGC TTC GTT GTC GCA GAA TCC GGC ATG	

^aThe reverse primer was designed in our previous study (Nomura et al. (2012)).

```

C03Db8-A ATGAAAAGACTAAGTTTTCTGTGGGACTTGTGCCTTGTATGACAGCTTGTAAAC 60
C04Db3-A ATGAAAAGACTAAGTTTTCTGTGGGACTTGTGCCTTGTATGACAGCTTGTAAAC 60
*****
Pgfim-AF+
C03Db8-A AAAGACAACGAAGCAGAACCCTTTGTAGAAGGTAACGCTACCATTAGCGTAGTATTGAAG 120
C04Db3-A AAAGACAACGAAGCAGAACCCTTTGTAGAAGGTAACGCTACCATTAGCGTAGTATTGAAG 120
*****
C03Db8-A ACCAGCAATCCGAATCGTGTTCGGGGTTGCAGATGACGAAGCAAAAGTGGCTAAGTTG 180
C04Db3-A ACCAGCAATCCGAATCGTGTTCGGGGTTGCAGATGACGAAGCAAAAGTGGCTAAGTTG 180
*****
C03Db8-A ACCGTAATGGTTTATAATGGAGAACAGCAGGAAGCCATCGAATCAGCCGAAAATGCGACT 240
C04Db3-A ACTGTAA TGGTTTACAAGGGTGTGAGCAGCAGGAAGCCATCAAATCAGCCGAAAATGCAAT 240
*****
Pgfim-AF
C03Db8-A AAGATGAGAAATCAAAATGGTGCAGGCTCACGTACGCTGTCGTAATGGCCAAATACG 300
C04Db3-A AAGGTTGAAAACATCAAATGGTGCAGGCAACGTACGCTGGTCTAATGGCCAAATACG 300
***
C03Db8-A GGAACAATGGATCTGACTGGCAAGACTCTTCAGATGTAAAAGCATTGACAACCTGAAGT 360
C04Db3-A GGTGGAATGGAATGGCTGGCAAGACTCTTCAGAGGTAAGCAATGACAACCTGAAGT 360
**
C03Db8-A ACTGCAGAAAACCAAGAGGCTGCAGGTTTGATCATGACGGCAGAGCCAAAAGCAATCGTT 420
C04Db3-A ACTAAGAAAATCAAGAGGCTGCAGGTTTGATCATGACGGCAGAGCCAAAAGCAATCGTT 420
***
Pgfim-AR
C03Db8-A TTGAAGGCAGGCAAGAACTATATGGATACAATGGAGCCGAGAGGGCAACCACATTGAG 480
C04Db3-A TTGAAGGCAGGCAAGAACTATATGGATACAATGGAGCCGAGAGGGCAACCACATTGAG 480
*****
C03Db8-A AATGATCCTCTTGAGATCAAGCGTGTACATGCTCGCATGGCTTTCACCGAAATTAAGTG 540
C04Db3-A AATGATCCTCTTGAGATCAAGCGTGTACATGCTCGCATGGCTTTCACCGAAATTAAGTG 540
*****
C03Db8-A CAGATGAGCGCAGCCTACGATAACATTTACACATTTGCTCCTGAAAAGATTTATGGTCTC 600
C04Db3-A CAGATGAGCGCAGCCTACGATAACATTTACACATTTACTCCTGAAAAGATTTATGGTCTC 600
*****
C03Db8-A ATTGCAAGAAGCAATCTAATTTGTCGGGGCAACACTCGTGAATGCAGACGCTAATTAAT 660
C04Db3-A ATTGCAAGAAGCAATCTAATTTGTCGGGGCAACACTCGTGAATGCAGACGCTAATTAAT 660
*****
C03Db8-A CTGACAGGTTCTTTGACCACATTTAACGGTGTACACACCTGCCAATATGCCAATGTG 720
C04Db3-A CTGACAGGTTCTTTGACCACATTTAACGGTGTACACACCTGCCAATATGCCAATGTG 720
*****
C03Db8-A CCTGGCTGAGCCGTAATTACGTTGCACCTACCGCAATGCTCCTCAGGGCTTCTATGTA 780
C04Db3-A CCTGGCTGAGCCGTAATTACGTTGCACCTACCGCAATGCTCCTCAGGGCTTCTATGTA 780
*****
C03Db8-A TTAGAAAATGACTACTCAGCTAACGGTGGGACTATTCATCCGACAATCCTATGTGTTTAT 840
C04Db3-A TTAGAAAATGACTACTCAGCTAACGGTGGGACTATTCATCCGACAATCCTATGTGTTTAT 840
*****
C03Db8-A GGCAAACTTCAGAAAACGGAGCCGACCTGGCGGGAGCCGATTTAGCAGTGTCTCAGGCC 900
C04Db3-A GGCAAACTTCAGAAAACGGAGCCGACCTGGCGGGAGCCGATTTAGCAGTGTCTCAGGCC 900
*****
C03Db8-A GCCAATGGGTGGACGAGAAGGCAAGACCTATACCTGTATTGGTAAACTTCAACAGC 960
C04Db3-A GCCAATGGGTGGACGAGAAGGCAAGACCTATACCTGTATTGGTAAACTTCAACAGC 960
*****
C03Db8-A AACAACTATACTTATGACAGCAATTATACGCTTAAGAATAAAAATGAGCGTAACCATAAG 1020
C04Db3-A AACAACTATACTTATGACAGCAATTATACGCTTAAGAATAAAAATGAGCGTAACCATAAG 1020
*****
C03Db8-A TATGATATTAAGCTGACAATCACAGGGCTGGAACAACAATCCCGAGAATCCTATCACA 1080
C04Db3-A TATGATATTAAGCTGACAATCACAGGGCTGGAACAACAATCCCGAGAATCCTATCACA 1080
*****
C03Db8-A GAGTCTGCTCACTTGACGCTACAGTGTACTGTAGCTGAGTGGGTTCTCGTTGGTCTGAG 1140
C04Db3-A GAGTCTGCTCACTTGACGCTACAGTGTACTGTAGCTGAGTGGGTTCTCGTTGGTCTGAG 1140
*****
C03Db8-A GCTACTTGGTAA 1152
C04Db3-A GCTACTTGGTAA 1152
*****

```

Supplementary Fig.1

A

C03Db8	MKKTFFLLGLAALAMTACNKDNEAEPVVEGNATISVVLKTSNPNRAFGVADDEAKVAKL	60
C03Db9	MKKTFFLLGLAALAMTACNKDNEAEPIVEGNATISVVLKTSNPNRAFGVADDEAKVAKL	60

C03Db8	TVMVYNGEQQEAIESAENATKIENIKCGAGSRTLVMANTGTMDLTGKTLADVKALTEEL	120
C03Db9	TVMVYNGEQQEAIKSAENAIKVENIKCGAGSRTLVMANTGGMELAGKTLAEVKALTEEL	120
	***** * ***** * * ***** *****	
C03Db8	TAENQEAGLIMTAEPKAIVLKAGKNYIGYNGAGEGNHIE-NDPLEIKRVHARMAFTEIK	179
C03Db9	TAENQEATGLIMTAE PVDVTLVAGNNYYGYGGTQGGNQISQGTPLEIKRVHARIAFTKIE	180
	***** ***** * * * * * * * * * * ***** * * *	
C03Db8	VQMSAAYDNIYTFAPEKIYGLIAKKQSNLFGATLVNADANYLTGSLTTFNGAYTPANYAN	239
C03Db9	VKMSDSYVNKYNFTPENIYALVAKKSNLFGTSLANSDDAYLTGSLTTFNGAYTPANYTH	240
	* *****	
C03Db8	VPWLSRNYVAPTANAPQGFYVLENDYSANGGTIHPTILCVYKGLQKNGADLAG--ADLA	296
C03Db9	VAWLGRGYTAPSNAPQGFYVLESAY-AQNAGLRPTILCVKGLTKHDGTPLSSEEMTAA	299
	* *	
C03Db8	AAQAANWVDAEGKTYYPVLVNFNSNNYTYDSNYTPKNKIERNHKYDIKLTITGPGTNNPE	356
C03Db9	FNVGWIVANNDPTTYYPVLVNFESNNYTYTGDAVEKKGKIVRNHKFDINLTITGPGTNNPE	359
	***** ***** * * * * * * * * * * *****	
C03Db8	NPITESAHLVQCTVAEWVLVGQNATW	383
C03Db9	NPITESANLNVNCVVAAWKGVVQNVIV	386
	***** * * * * * * * * *	

B

YC35p3	MKKTFFLLGLAALAMTACNKDNEAEPVVEGNATISVVLKTSNPNRAFGVADDEAKVAKL	60
YC35a	MKKTFFLLGLAALAMTACNKDNEAEPIVEGNATISVVLKTSNPNRAFGVADDEAKVAKL	60

YC35p3	TVMVYNGEQQEAIESAENATKIENIKCGAGSRTLVMANTGTMDLTGKTLADVKALTEEL	120
YC35a	TVMVYNGEQQEAIKSAENAIKVENIKCGAGSRTLVMANTGGMELAGKTLAEVKALTEEL	120
	***** ***** * * ***** *****	
YC35p3	TAENQEAGLIMTAEPKAIVLKAGKNYIGYNGAGEGNHIE-NDPLEIKRVHARMAFTEIK	179
YC35a	TAENQEATGLIMTAE PVDVTLVAGNNYYGYDGTQGGNQISQGTPLEIKRVHARIAFTKIE	180
	***** ***** * * * * * * * * * * ***** * * *	
YC35p3	VQMSAAYDNIYTFAPEKIYGLIAKKQSNLFGATLVNADANYLTGSLTTFNGAYTPANYAN	239
YC35a	VKMSDSYVNKYNFTPENIYALVAKKSNLFGTSLANSDDAYLTGSLTTFNGAYTPANYTH	240
	* *****	
YC35p3	VPWLSRNYVAPTANAPQGFYVLENDYSANGGTIHPTILCVYKGLQKNGADLAG--ADLA	296
YC35a	VAWLGRGYTAPSNAPQGFYVLESAY-AQNAGLRPTILCVKGLTKHDGTPLSSEEMTAA	299
	* *	
YC35p3	AAQAANWVDAEGKTYYPVLVNFNSNNYTYDSNYTPKNKIERNHKYDIKLTITGPGTNNPE	356
YC35a	FNAGWIVANNDPTTYYPVLVNFESNNYTYTGDAVEKKGKIVRNHKFDINLTITGPGTNNPE	359
	***** ***** * * * * * * * * * * *****	
YC35p3	NPITESAHLVQCTVAEWVLVGQNATW	383
YC35a	NPITESANLNVNCVVAAWKGVVQNVIV	386
	***** * * * * * * * * *	

Supplementary Fig.2

Table 3*P. gulae* and *P. gingivalis* isolates examined in the present study.

Species	Name	FimA types	Length of <i>fimA</i> (bp)	Accession number of <i>fimA</i>	Reference
<i>P. gulae</i>	C03Db8 ^a	A	1152	LC372924	This study
	C04Db3	A	1152	LC372925	This study
	C05Db10	A	1152	LC372926	This study
	C20Db1	A	1152	LC372927	This study
	C28Db2	A	1152	LC372928	This study
	C29Db1	A	1152	LC372929	This study
	YC9b	A	1152	LC372930	This study
	YC18a	A	1152	LC372931	This study
	YC21a	A	1152	LC372932	This study
	YC35p3 ^b	A	1152	LC372933	This study
	C03Db9 ^a	B	1161	LC372934	This study
	C13Db2	B	1161	LC372935	This study
	YC34p1	B	1161	LC372936	This study
	YC35a ^b	B	1161	LC372937	This study
	C26Db4	C	1167	LC372938	This study
<i>P. gingivalis</i>	OMZ314	II	1044	D17798	Amano et al. (1999)

^{a,b}*P. gulae* isolates were recovered from the same swab specimen.


```

C04Db3-A      MKKTKFFLLGLAALAMTACNKDNEAEPVVEGNATISVVLKTSNPNRVFGVADDEAKVAKL 60
C13Db2-B      MKKTKFFLLGLAALAMTACNKDNEAEPIVEGNATISVVLKTSNPNRAFGVADDEAKVAKL 60
C26Db4-C      MKKTKFFLLGLAALAMTACNKDNEAEPIVETDAT-VSFIIKSGEGRAVGDGLADAKITKL 59
                ***** ** * * * **

C04Db3-A      TVMVYKGEQQEAIKSAENAIKVENI-----KCGAGQRTLVMANTGGMELAGKTLAEVKA 115
C13Db2-B      TVMVYNGEQQEAIKSAENAIKVENI-----KCGAGSRTLVMANTGGMELAGKTLAEVKA 115
C26Db4-C      TAMVYAGQIQEGIKTVEEAGGVLVKEGIQCKSGANRVL--VIVANHDYDLVGKSLDQVEA 117
                * *** * ** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

C04Db3-A      LTTELTKENQEAGLIMTAEPKAIVLKAGKNYIGY-NGAGEGNHIE-NDPLEIKRVHARM 173
C13Db2-B      LTTELTAEQEQEATGLIMTAEPVDTLVAGNNYGY-DGTQGGNQISQGTPEIKRVHARI 174
C26Db4-C      LTTSLTAENQNAQNLIMTGKSAFTIKPGSNHYGYPDGTASDNLVSAGAPLAVTRVHAGI 177
                *** ** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

C04Db3-A      AFTEIKVQMSA-AYDNIYTFPEKIY-----GLIAKKQSNLFGATLVNADANYLTGSL 225
C13Db2-B      AFTKIEVKMSD-SYVNKYNFTPENIY-----ALVAKKSNLFGTSLANSDDAYLTGSL 226
C26Db4-C      -----SFAGVEVNMATQYQNYYSFNPADAKIAALVAKKDSKIFGDPLFSDSKAYLYGVQ 231
                * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

C04Db3-A      TTFNGAYTPANYANVPWLS--RNYVAPTA-NAPQGFYVLENDYSANGGTIHPILCVYGK 282
C13Db2-B      TTFNGAYTPANYTHVAWL--RGYTAPSN-DAPQGFYVLESAY-AQNAGLRPTILCVK GK 282
C26Db4-C      TP-AGLYTPDA--AGETYELEASLNMNYAEGA--GFYVLESKY-DVTNELRPTILCIYGK 285
                * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

C04Db3-A      LQKNGADLAG---ADLAAAQAANWVDAEGKTYYPVLVNFNSNNYTYDNGYTPK-NKIERN 338
C13Db2-B      LTKHDGTPLSSEEMTAAFNAGWIVANNDPTTYYPVLVNFESNNYTYTGDAVEK-GKIVRN 341
C26Db4-C      LLDKDG NPLTGQALTDAINAGFC DNEA--TTYYPVLVNYDNGYIYSGNITQGNKIVRN 343
                * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

C04Db3-A      HKYDIKLTITGPGTNNPENPITESAHLNVQCTVAEWVLVGQNATW 383
C13Db2-B      HKFDINLITGPGTNNPENPITESANLNVNCVVAWKGVVQNVIV 386
C26Db4-C      NHYKITL NITGPGTDTPENPQP VQANLNV TCEVTPWVVVNQAATW 388
                * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

```

Fig. 1. Alignment of the putative amino acid sequences of the type A, B, and C *fimA* genes of the *P. gulae* isolates. Asterisks indicate amino acid residues that are conserved among all three sequences. Dashes indicate gaps when multiple alignments were performed. Alignment was carried out using CLUSTAL W, available from the DNA Data Bank of Japan (<http://clustalw.ddbj.nig.ac.jp>).

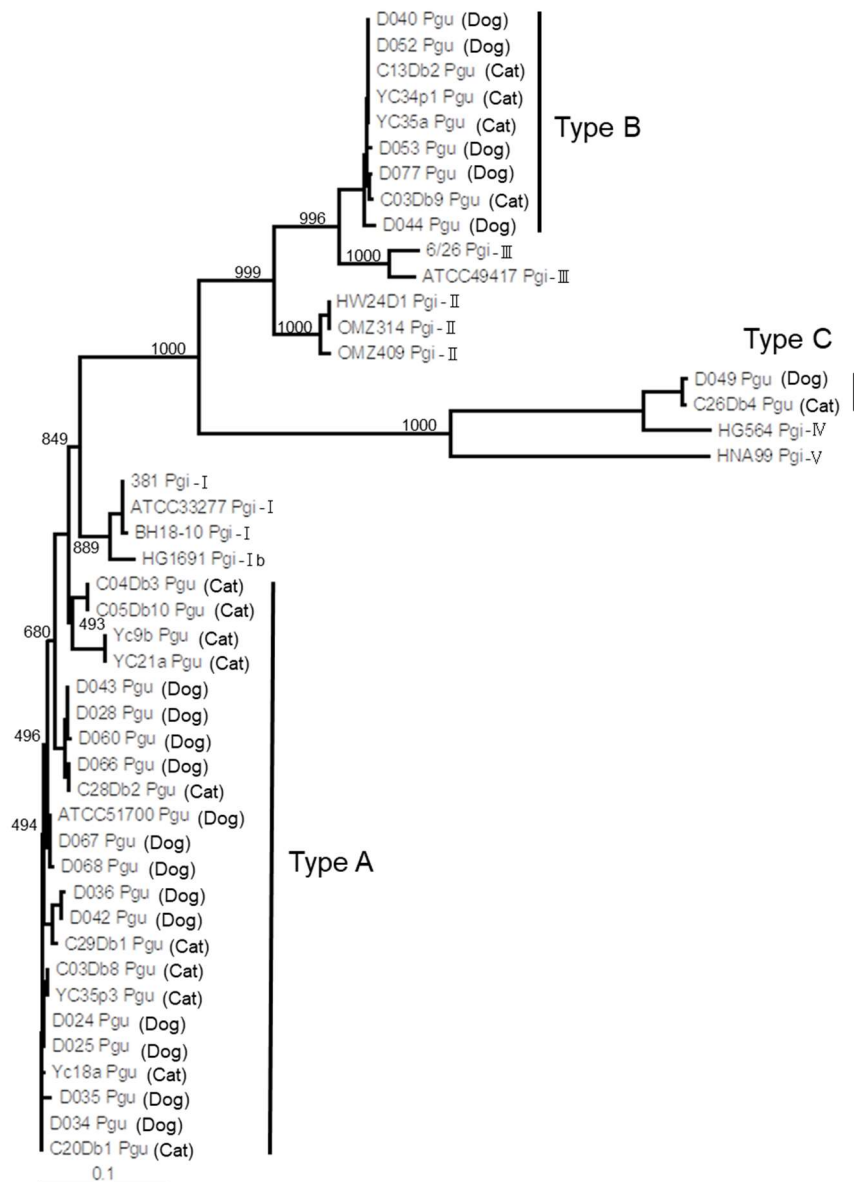


Fig. 2. Evolutionary relationships among *P. gulae* isolates from dogs and cats and *P. gingivalis* isolates from humans based on the putative FimA amino acid sequences. The neighbor-joining method was used to construct the phylogenetic tree using CLUSTAL W (DNA Databank of Japan) and Tree View software (<http://taxonomy.zoology.gla.uk/rod/treeview.html>). Pgu and Pgi indicate *P. gulae* and *P. gingivalis* strains, respectively. The numbers shown on the tree are bootstrap values.

Table 4

BLAST-based identification of proteins with high homology to the putative amino acid sequences of *fimA* genes from cat isolates obtained in the current study.

<i>P. gulae</i> strains (FimA types)	<i>P. gulae</i> strains isolated from dogs with highest similarities			BLAST results	
	Strain Name (FimA types)	Accession number	References	Identity (%)	Similarity (%)
C03Db8 (A)	D024 (A)	BAL46681	Nomura et al. (2012)	382/383 (99)	382/383 (99)
C04Db3 (A)	D060 (A)	BAL46689	Nomura et al. (2012)	368/383 (96)	372/383 (97)
C05Db10 (A)	D060 (A)	BAL46689	Nomura et al. (2012)	368/383 (96)	372/383 (97)
C20Db1 (A)	D034 (A)	BAL46684	Nomura et al. (2012)	383/383 (100)	383/383 (100)
C28Db2 (A)	D066 (A)	BAL46690	Nomura et al. (2012)	383/383 (100)	383/383 (100)
C29Db1 (A)	D034 (A)	BAL46684	Nomura et al. (2012)	379/383 (99)	381/383 (99)
YC9b (A)	D066 (A)	BAL46690	Nomura et al. (2012)	365/383 (95)	371/383 (96)
YC18a (A)	D034 (A)	BAL46684	Nomura et al. (2012)	382/383 (99)	382/383 (99)
YC21a (A)	D066 (A)	BAL46690	Nomura et al. (2012)	365/383 (95)	371/383 (96)
YC35p3 (A)	D024 (A)	BAL46681	Nomura et al. (2012)	382/383 (99)	383/383 (100)
C03Db9 (B)	D077 (B)	BAL46697	Nomura et al. (2012)	385/386 (99)	385/386 (99)
C13Db2 (B)	D053 (B)	BAL46696	Nomura et al. (2012)	385/386 (99)	386/386 (100)
YC34p1 (B)	D053 (B)	BAL46696	Nomura et al. (2012)	385/386 (99)	386/386 (100)
YC35a (B)	D053 (B)	BAL46696	Nomura et al. (2012)	385/386 (99)	386/386 (100)
C26Db4 (C)	D049 (C)	BAM14715	Yamasaki et al. (2012)	386/388 (99)	387/388 (99)

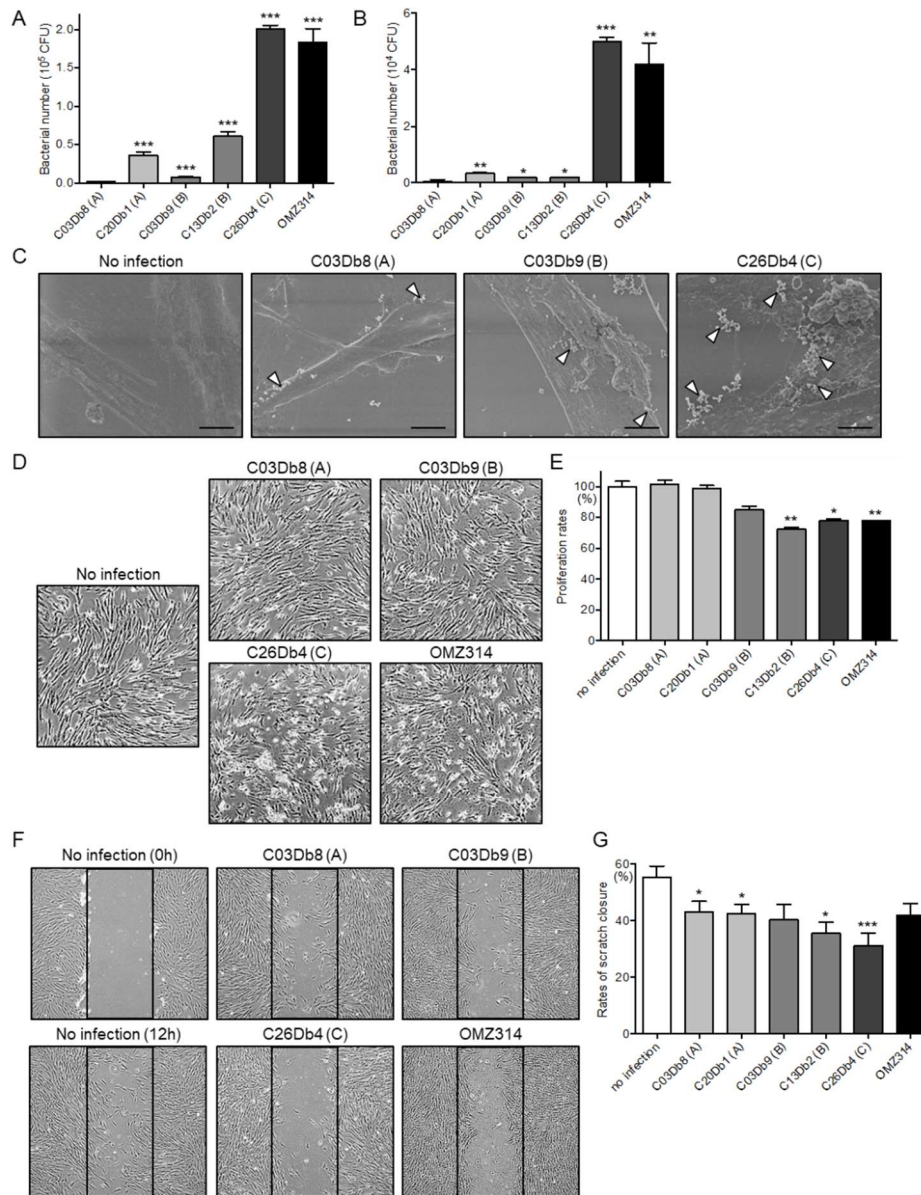


Fig. 3. Effects of *P. gulae* infection on HPdLF cells. Adhesion (A) and invasion properties (B) of *P. gulae* isolates in HPdLF cells (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ versus C03Db8 infection). (C) Representative scanning electron microscopy images showing adhesion of *P. gulae* to HPdLF cells. Bar = 10 μm . (D) Light microscopy images showing morphology of the HPdLF cells infected with *P. gulae* isolates during the cell proliferation assay. (E) Cell proliferation as measured by MMT assay following infection with *P. gulae* isolates. Data are expressed as the relative ratio of infected/uninfected (no infection) cells and are means \pm SD from three independent experiments (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$). (F) *In vitro* wound healing assay using HPdLF cells infected with *P. gulae* isolates. Bars indicate the scratched wound regions at 0 h. (G) Rates of wound closure determined from wound healing assays. Data are expressed as means \pm SD from three independent experiments.

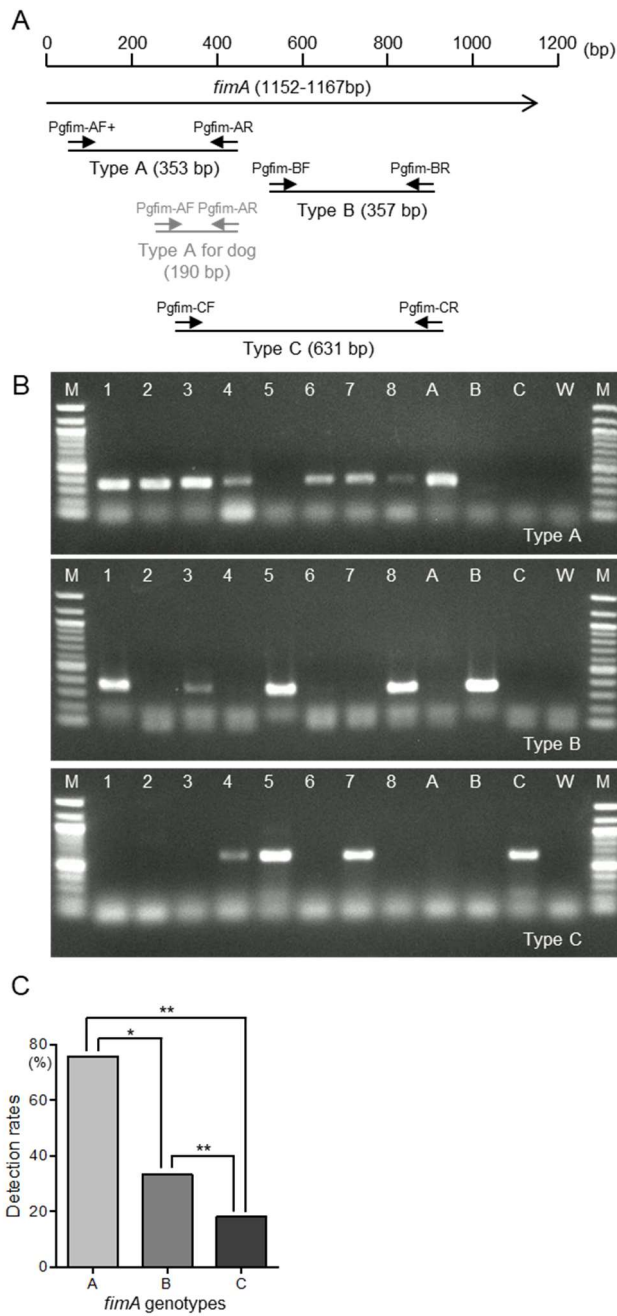


Fig. 4. Primer sets for identification of *fimA* from swab specimens. (A) The locations of the primer sets for detection of *fimA* genotypes. Long arrow indicates the entire length of *fimA*. Short arrows indicate the primer positions. Primers were designed based on the nucleotide alignment of the *fimA* genes. (B) Representative results using swab specimens. Samples in lanes 1–8 are specimens collected from eight different cats. Lanes: M, molecular size marker (100-bp DNA ladder); A, C04Db3; B, C13Db2; C, C26Db4; W, sterile water. (C) Detection rates of *fimA* genes from swab specimens. Significant differences indicated by * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

Table 5

Distribution frequency of *fimA* genotype among *P. gulae*-positive isolates recovered from swab specimens obtained from cats.

	Healthy (n=20)	Mild (n=41)	Moderate (n=24)	Severe (n=14)
Age [mean ± standard deviation]	3.7 ± 0.6	4.7 ± 0.7	7.9 ± 1.1*	12.9 ± 1.4*
<i>P. gulae</i> -positive	18 (90.0 %)	37 (90.2 %)	23 (95.8 %)	12 (85.7 %)
A positive	15 (75.0%)	34 (82.9%)	16 (66.7%)	10 (71.4%)
B positive	4 (20.0%)	11 (26.8%)	15 (62.5%)**	3 (21.4%)
C positive	1 (5.0 %)	8 (19.5 %)	5 (20.8 %)	4 (28.6 %)*
Untypeable	2 (10.0 %)	2 (4.9 %)	0 (0 %)	1 (7.1 %)
Single type	12 (60.0 %)	20 (48.8 %)	12 (50.0 %)	7 (50.0 %)
A	11 (55.0 %)	19 (46.3 %)	6 (25.0 %)	6 (42.9 %)
B	1 (5.0 %)	1 (5.0 %)	5 (20.8 %)	1 (7.1 %)
C	0 (0 %)	0 (0 %)	1 (4.2 %)	0 (0 %)
Multiple types	4 (20.0 %)	15 (36.6 %)	11 (45.8 %)	4 (28.6 %)
A and B	3 (15.0 %)	7 (17.1 %)	7 (29.2 %)	0 (0 %)
A and C	1 (5.0 %)	5 (12.2 %)	1 (4.2 %)	2 (14.3 %)
B and C	0 (0 %)	0 (0 %)	1 (4.2 %)	0 (0 %)
A, B and C	0 (0 %)	3 (7.3 %)	2 (8.3 %)	2 (14.3 %)

* $P < 0.05$ and ** $P < 0.01$ versus the healthy control group.

第二章

簡易ガスクロマトグラフを用いたイヌ口臭の 定量的測定法の確立

1. 小序

口臭は口腔内細菌が産生する硫黄化合物、短鎖脂肪酸、ポリアミン、フェニル化合物といった揮発性の有機化合物が原因である(Sandra et al., 2007)。これら揮発性有機化合物のうち、硫化水素(HS)、メチルメルカプタン(MM)、ジメチルサルファイド(DMS)といった揮発性硫黄化合物(VSC: Volatile Sulfuric Compounds)は特に口臭の原因物質として重要視されている(Tonzatich, 1971; Kazor et al., 2003)。

VSC は含硫アミノ酸であるメチオニンやシステインが細菌に代謝されることで、前者は MM、後者は HS になる(López del Castillo-Lozano et al., 2007)。さらに MM から二次的に生成されるのが DMS である (Higgins et al., 2006)。また、*P. gingivalis*、*T. forsythia* や *T. denticola* といったヒトで知られる歯周病原性細菌は多量の VSC を産生することが報告されている(Persson et al., 1990; Salako & Philip, 2011)。

これまで、ヒトの口臭を評価する際は臭気鑑定士による官能試験が主流であった。しかし、官能試験は定性的で主観的な評価法であるため、口臭の細かな違いは評価できなかった。そのためか、現代においても口臭に関する研究報告は少ない。近年、口臭を測定するために、オーラルクロマが歯科臨床現場に導入されつつある。オーラルクロマは口臭の主成分である HS、MM、DMS を定量的に測定する持ち運び可能な簡易ガスクロマトグラフィーである。

ヒトの口臭と歯周病は加齢に伴い悪化することが報告されている(Villa et al.,

2014)。また、イヌの歯周病も加齢に伴い重症化する(Yamasaki et al., 2012)。このことから、イヌの口臭と歯周病においても正の相関性があり、加齢に伴い口臭に含まれる VSC 濃度が濃くなると予測できるが、未だ動物の口臭を測定する方法が確立されていないこともあり、その詳細は不明である。

以上のことから本研究は、オーラルクロマによるイヌ口臭測定法を確立するとともに、イヌの口臭と年齢及び歯周病との関係性について追究する事を目的として、以下の実験を行った。

2. 材料と方法

【イヌ口臭測定法の確立】

・動物

動物は健康な6匹のビーグル犬(メス2匹、オス4匹、4~11歳)を使用した。すべてのビーグル犬は室温 $21\pm 2^{\circ}\text{C}$ 、湿度 $55\pm 5\%$ 、12時間明暗周期の飼育室で、ゲージ内にそれぞれ飼育した。餌(CLEA dog Diet CD-5M[®]; CREA JAPAN, Inc., Tokyo, Japan)は1日2回与え、一回目は朝10時に、二回目は夕方17時に与えた。給水は水道水を自由飲水させた。すべての実験計画は麻布大学の動物実験委員会で承認された。

・犬の口臭測定

本実験は連続した3日間、食前と食後に口臭の測定を実施した。まず、測定は一日目に官能試験とオーラストリップ(DS pharma Animal Health Co. Ltd, Osaka, Japan)での評価をそれぞれ実施した。官能試験のスコアは一人の評価者による盲検法で実施した。官能スコアは0~3を用い、0は口臭がないこと、1はわずかに口臭を感じる程度に、2は少しの臭い口臭を感じ、3は強い口臭に用いた。オーラストリップは、歯肉を拭うことで、口腔内にあるチオール化合物と反応し、色の違いによって5段階で評価する試験紙である。

- ・オーラルクロマによる VSC の測定

VSC の測定はオーラルクロマ(CHM-2, FIS Inc., Hyogo, Japan)を使用した。犬の呼気サンプルは 1 分間、犬歯と臼歯との間に 1 mL シリンジを挿入し採取した。サンプルを採取する際は、シリンジをゆっくりと 2 回ポンピングし、3 回目の吸引が終わった後に、シリンジはイヌの口腔から抜去した。その後、呼気サンプル(1.0 mL)はオーラルクロマの抽入口に挿入した。測定は自動的にオーラルクロマのデータマネージャーによって行われた。4 分後、測定が終了し、3 種の VSC の濃度はオーラルクロマ内部で描かれた検量線が引かれ、ng/mL もしくは ppb で示された。これらの作業を 3 回行い、その平均値を各個体の口臭値とした。

【イヌの口臭と年齢及び歯周病との関係性】

- ・動物

動物は健康な 43 匹のビーグル犬(メス 19 匹、オス 24 匹、1~16 齢)を使用した。本実験で使用したビーグル犬は以下の条件に当てはまるイヌは除外し、使用した。条件は 1 歳未満、別の実験に使用されている、歯科の予防治療をしている、実験の 3 ヶ月以内に予防接種をしていないことである。ビーグル犬は室温 $21\pm 2^{\circ}\text{C}$ 、湿度 $55\pm 5\%$ 、12 時間明暗周期の飼育室で、ゲージ内にそれぞれ飼育した。餌は市販のドライフードを与えた。給水は水道水を自由飲水させた。すべての実験計画は麻布大学の動物実験委員会で承認された。

・歯周病の評価

歯周病の評価は歯石および歯肉炎を指数で評価した。歯石指数(CI; Calculus Index)は Ramfjord の評価法(スコア 0~3)を使用し、歯石なしをスコア 0、歯石が歯面の 1/3 以下を覆う場合をスコア 1、歯石が歯面の 1/3 以上 2/3 未満を覆う場合をスコア 2、それ以上をスコア 3 とした (Ramfjord, 1967)。歯肉炎指数 (GI; Gingivitis Index) は Loe & Silness の評価法 (スコア 0~3) を一部改良して使用し、歯肉境界部に歯肉炎がない場合をスコア 0、歯肉境界部に発赤が認められるまたは、軽微な歯肉の後退が認められる場合をスコア 1、歯肉境界部に明らかな腫脹を伴う発赤を認めた場合をスコア 2、スコア 2 より強い炎症反応(糜爛、潰瘍、膿瘍など)や歯根部の露出、明らかな歯槽骨の骨吸収が認められる場合をスコア 3 とした(Loe & Silness, 1963)。なお、スコアリングは一人の評価者によって実施した。

・細菌数の測定及び VSC の測定

細菌数の測定は細菌カウンタ(PHC Co. Ltd, Tokyo, Japan)を使用した。VSC の測定はオーラルクロマを使用し、測定方法は上記した方法と同様に行った。

・統計解析

すべての値は平均値±標準偏差で示した。対応のない、または対応のあるスチューデントの t 検定は PRISM 統計ソフト(Graphpad software, San Diego, CA,

USA)を使用して統計解析を行った。本解析は P 値 0.05 以下の場合を統計学的に有意とした。また、相関係数の検定は Pearson の相関係数を使用した。

3. 結果

・官能試験、オーラストリップによる評価

官能試験の結果は2匹のイヌが少しの臭い口臭を感じるスコア2であり、残りの4匹が強い口臭を感じるスコア3であった。オーラストリップの結果はすべてのイヌが平均スコア4.3-5.0であった。これにより、本実験で使用した全ビーグル犬は強い口臭を発していることがわかった。

・オーラルクロマによる VSC の測定

測定は、3日間、午前の給餌前と後に6匹すべてのイヌにおいて実施した。3種すべてのVSCがイヌの呼気中に検出されたが、VSC濃度は個体間で異なっていた(Fig. 1)。3日間の各VSC濃度とその合計値において、有意な差はなかった(Fig. 2)。また、食事の前後のVSC濃度を比較した結果、有意な差は認められなかった(Fig.3)。この結果から、VSCは食餌の影響を受けないと判断した。

・VSC の比較

オーラルクロマ製造販売会社によってヒトが感知しうる各VSCの閾値が提示されており、それらの値はHSが112 ppb、MMが26 ppb、DMSが8 ppbである。6頭すべてのイヌはMM、DMSにおいて、閾値を超えた高い値を持っていた。一方、2頭のイヌのHSは閾値よりも低い値であった。また、HSの値が低い2匹

(#2 と#3)は、官能試験の値もスコア 2 であった (Table 1)。イヌの口臭に含まれる 3 種の VSC の濃度は HS、MM、DMS の順に高値であった。VSC 濃度の合計値に対する各 VSC 濃度の割合は、それぞれ HS が $45\pm 14\%$ 、MM が $31\pm 12\%$ 、DMS が $24\pm 13\%$ であった。これは、HS と MM が人の口臭と同様に、イヌの口臭においても、主要な悪臭原因物質であることを示唆している。

・ VSC 間の相関性

有意な相関 ($P < 0.05$) が VSC の濃度間で確認できた。そして、最も強い相関は HS と MM 間に観察された。相関値は HS と MM 間で 0.5824、MM と DMS 間で 0.5698、HS と DMS 間で 0.4531 であった (Fig. 4)。

・ VSC 濃度と年齢との相関

VSC 濃度と年齢との相関を調査した結果、最も強い相関は HS と年齢間に観察された (Fig. 5)。しかし、この相関に有意差はみられなかった。

・ 歯周病、口臭、細菌数に対する年齢の影響

歯周病、口臭における年齢の影響を調査するため、1-6 歳のビーグル犬 ($n=11$) を Group 1、7-16 歳のビーグル犬 ($n=32$) を Group 2 とし、体重、細菌数、CI、GI、官能試験、HS、MM、DMS、 Σ VSC (HS + MM + DMS) を比較した (Table 3)。その結果、体重と細菌数の測定項目では有意な差が認められなかった。しかし、Group

2 の CI と GI は Group 1 よりも有意な高値を示し、官能試験においても Group 2 は Group 1 より有意な高値を示した。加えて、Group 2 の HS、MM、 Σ VSC は Group 1 よりも有意に高値であった。

・年齢、歯周病、口臭、細菌数の相関性

体重、細菌数、CI、GI、官能試験、HS、MM、DMS、 Σ VSC において、総当たりで相関性を解析した(Table 4)。その結果、体重と DMS はどの項目に対しても有意な相関性が認められなかった。年齢と官能試験の間には中程度から強い有意な相関性が認められた($r = 0.7317$)。また、年齢と HS、MM、 Σ VSC との間には中程度の有意な相関性が認められ($r = 0.4804 - 0.5061$)、年齢と CI、GI との間にも中程度の有意な相関性が認められた($r = 0.6023 - 0.7301$)。その一方で、細菌数と CI、GI、各 VSC との間での相関性は有意ではあるものの弱かった($r = 0.3022 - 0.4018$)。CI、GI、と HS、MM、 Σ VSC との間にはそれぞれ中程度の有意な相関性が認められた($r = 0.3412 - 0.5684$)。各 VSC 間での相関性は HS と MM の間に中程度の有意な相関性($r = 0.7626$)が認められ、HS と MM はそれぞれ Σ VSC との間に有意な強い相関性(HS vs Σ VSC; $r = 0.9852$ 、MM vs Σ VSC; $r = 0.8586$)が認められた。

4. 考察

近年、イヌの室内飼育率が80%以上となり、ヒトとイヌの関係が密接になったことからイヌの口臭がより問題となっている。ヒトの口臭と歯周病には関連性があり(Yaegaki & Sanada, 1992)、歯周病原性細菌はVSCを生成することが知られている(Persson et al., 1990)。しかしながら、イヌの歯周病に関する研究は報告されているものの、動物の口臭を測定する方法が確立されていないこともあり、歯周病と口臭との関連性について未だ詳細は不明である。そこで本章では、ヒト用に開発された呼気中VSC濃度測定用クロマトグラムのイヌの呼気中VSC濃度測定への適用について調査した。

本実験はまず、官能試験とオーラstriップ®による口臭測定を行った。官能試験においては2頭のイヌで中程度の口臭、4頭のイヌで重度の口臭が確認された。オーラstriップテストの結果は全てのイヌでスコア4.3-5.0であり、唾液中の硫黄化合物濃度が非常に高いことがわかった。これらのことから、実験に使用したすべてのイヌは強い口臭を持っていることがわかった。

オーラルクロマ®による測定結果から、イヌの呼気に含まれるVSCの平均濃度は、それぞれHSが190ppb、MMが127ppb、DMSが88ppbであり、HS>MM>DMSの順で高濃度であった。これは健常なヒトの口臭(Avincsal et al., 2016)と比較すると、HSで約10倍、MMで約50倍、DMSで約300倍と非常に高濃度である。官能試験で感知できるVSCの閾値は、HSで112ppb、MMで26ppb、

DMS で 5ppb とされる (Tonzetich & Ng, 1976)。MM と DMS に関しては 6 頭全てのイヌにおいて閾値を上回っていたが、HS においては 2 頭のイヌで閾値を下回っていた。また、この 2 頭のイヌ(#2 と#3)は官能試験において、他の 4 頭よりも低いスコア 2 を示していた個体であった。以上のことから、3 種の VSC はヒトと同様にイヌの口臭の原因物質であることがわかった。さらに、DMS は呼吸器疾患や代謝障害、投薬など口腔外の要因による口臭に関連していることから (Tangerman & Winkel, 2007)、DMS を測定できるオーラルクロマはイヌの口臭から非侵襲的に口腔外の疾患を診断できる可能性が示唆された。

ヒトの口臭は飲食後、口腔内や舌表面への臭気物質の定着により強くなるが (Wáler, 1997)、起床後に VSC は濃度が高く、朝食の前後では差が認められないという報告もある (Snel et al., 2010)。本実験は、呼気中 VSC 濃度の日内変動を調査するために食餌の前後に測定を行い食餌前と食餌後の VSC 濃度を比較したところ、硫化水素及びメチルメルカプタンでは食前に高い傾向が見られるものの、いずれの検体においても有意差は認められなかった。この結果から、食餌はイヌの口臭に大きな影響を及ぼさないことがわかった。

3 種の VSC 濃度間の相関を調べたところ、それぞれの濃度間で有意な相関が認められた。最も強い相関は硫化水素とメチルメルカプタンで認められ、相関係数は 0.5824 であった。硫化水素とメチルメルカプタンはヒトにおいても正の相関性が認められている (Snel et al., 2010)。これらのことから、ヒトとイヌの口腔内細菌叢は類似している可能性があり、イヌ個体間の細菌叢も類似している

可能性が示唆された。それに加え、主要な口腔内細菌叢が 3 つの VSC を生成する共通の代謝経路を有することが考えられた。

次に、VSC 濃度と年齢との相関性を解析した。その結果、最も強い相関は硫化水素と年齢の間で見られたが、有意な差は認められなかった。この結果は今回の実験で使用したイヌの数が少ないことに起因する可能性が考えられた。

ビーグル犬 6 頭を使用した実験において、本実験はオーラルクロマを使用することで、イヌ呼気中 VSC 濃度の測定方法を確立した。そのため、次の実験として口臭、歯周病、年齢との関係性を調査した。ヒトにおいて、口臭は加齢に伴い悪化することが報告されている(Villa A et al., 2014)。また、歯周病は口臭を悪化させ(Tonzetich, 1977; Rosenberg & McCulloche, 1992; Pham et al., 2012)、歯周病は年齢と共に罹患率が高くなるという調査結果もあり (Kortegaard et al., 2008; Hirai et al., 2013)、本研究室の先行研究においてイヌにおいても加齢とともに歯周の罹患率が増加することが報告されている(Hirai et al., 2013)。本実験においても、ビーグル犬 43 頭の CI と GI は年齢との間に正の相関性が認められことから、イヌの歯周病は加齢とともに悪化することが強く示唆された。加えて、官能試験および各 VSC と年齢の間にも正の相関性が認められたことから、口臭も加齢に伴って強くなることが判明した。また、官能試験は各 VSC よりも年齢との相関性が高かったことから、VSC 以外にもイヌの口臭の原因物質があることが考えられた。以上のことより、加齢は口臭と歯周病の重要なリスクファクターであることが判明した。

各 VSC において、DMS はどの測定項目とも相関性が認められなかった。*P. gingivalis* は HS と MM に *A. actinomycetemcomitans* は HS と DMS にそれぞれ正の相関性が認められ、細菌種によって産生する VSC が異なっていることが報告されている (Kuroshita et al. 2010)。このことから、イヌの歯周病菌は DMS をほとんど産生せず、DMS は口臭への影響が少ないことが示唆された。また、ヒトの口臭に含まれる DMS は代謝障害による口腔外および血中由来の口臭の悪化に関与することが報告されている (Tangerman & Winkel, 2007)。このことから、イヌにおいても DMS は特定の疾患と関連して口腔内の濃度が上昇する可能性が考えられた。その一方で、HS、MM、 Σ VSC はそれぞれの間強い正の相関性が認められた。このことから、HS と MM はイヌの口臭の主な原因であることが判明し、HS と MM を産生する *P. gingivalis* と近縁な歯周病原性細菌が口臭の悪化に起因していることが考えられた。

歯周病は歯石を温床とする病原性細菌による感染が原因である (Mandel & Gaffar, 1986; Coignoul & Cheville, 1984; Swati et al., 2016)。また、イヌの歯周病の主な原因として *P. gulae* が知られている。本実験において、CI と GI は HS、MM、 Σ VSC との間に中程度の有意な相関性が認められた。このことから、口臭の悪化に歯周病が関連していることが示唆され、*P. gulae* が VSC を合成している可能性が考えられた。

5. 小括

イヌの呼気中に VSC が検出され、それらの値はヒトが知覚しうる閾値を超えていたことから、VSC はイヌにおいても口臭の原因物質であることがわかった。また、イヌの口臭と歯周病は加齢に伴い重症化し、口臭と歯周病には正の相関があることが判明した。そして、呼気中 VSC 濃度の測定は、イヌの口臭の定量化および歯周病の危険性予測を可能にするのに有用な方法であると考えられる。

Table 1

Background data of the beagle dogs (N=6) used in the present study.

Dog ID	Gender	Age (year)	Body Weight (kg)	Organoleptic score	OraStrip® score
#1	female	4.8	12.0	3	5.0
#2	female	5.3	12.0	2	4.7
#3	male	7.5	14.0	2	4.3
#4	male	7.9	11.0	3	5.0
#5	male	9.1	11.4	3	5.0
#6	male	10.6	12.8	3	5.0

The scores of the organoleptic test and OraStrip® test are the average of 3 determinations.

Table 2

The concentrations of hydrogen sulfide (HS) > methyl mercaptan (MM) > DMS and total VSC (Σ VSC) in oral air from six beagle dogs.

Dog ID	HS (ppb)	MM (ppb)	DMS (ppb)	Σ VSC (ppb)
#1	169 \pm 81	163 \pm 92	77 \pm 28	409 \pm 175
#2	81 \pm 38	53 \pm 31	85 \pm 42	220 \pm 62
#3	63 \pm 24	58 \pm 33	52 \pm 29	173 \pm 59
#4	339 \pm 136	195 \pm 83	94 \pm 51	628 \pm 153
#5	272 \pm 103	197 \pm 139	96 \pm 49	565 \pm 226
#6	387 \pm 187	173 \pm 60	154 \pm 46	714 \pm 242
Average	219 \pm 164	140 \pm 100	93 \pm 51	452 \pm 262

Data are expressed as means \pm SD. The threshold concentrations of malodor for HS, MM and DMS are 118 ppb, 26 ppb and 8 ppb, respectively.

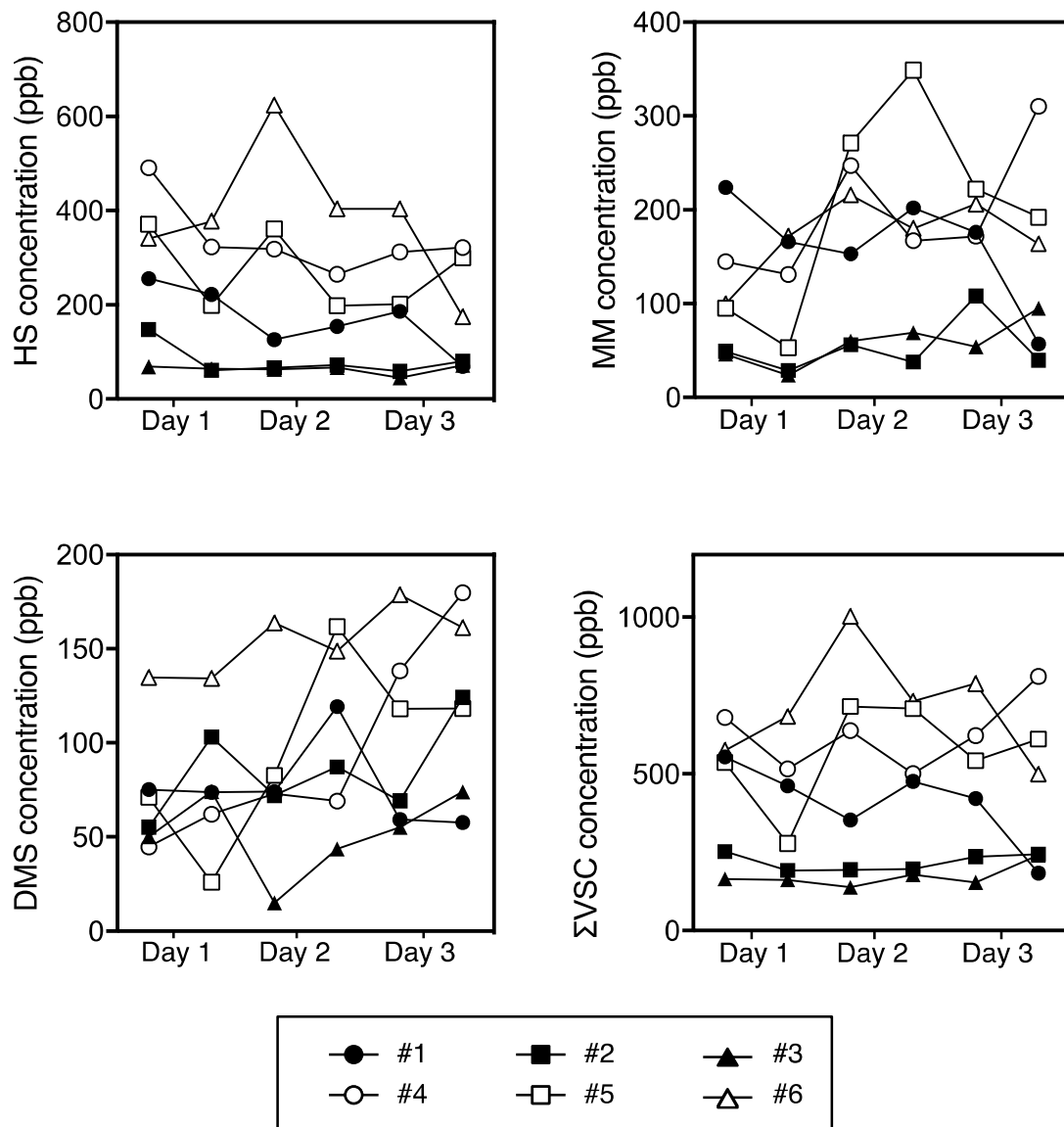


Fig. 1. VSC levels (ppb) in oral air from dogs (N=6) during 3 consecutive days (day 1 – day 3). Data are expressed as means \pm SD. Σ VSC: HS + MM + DMS.

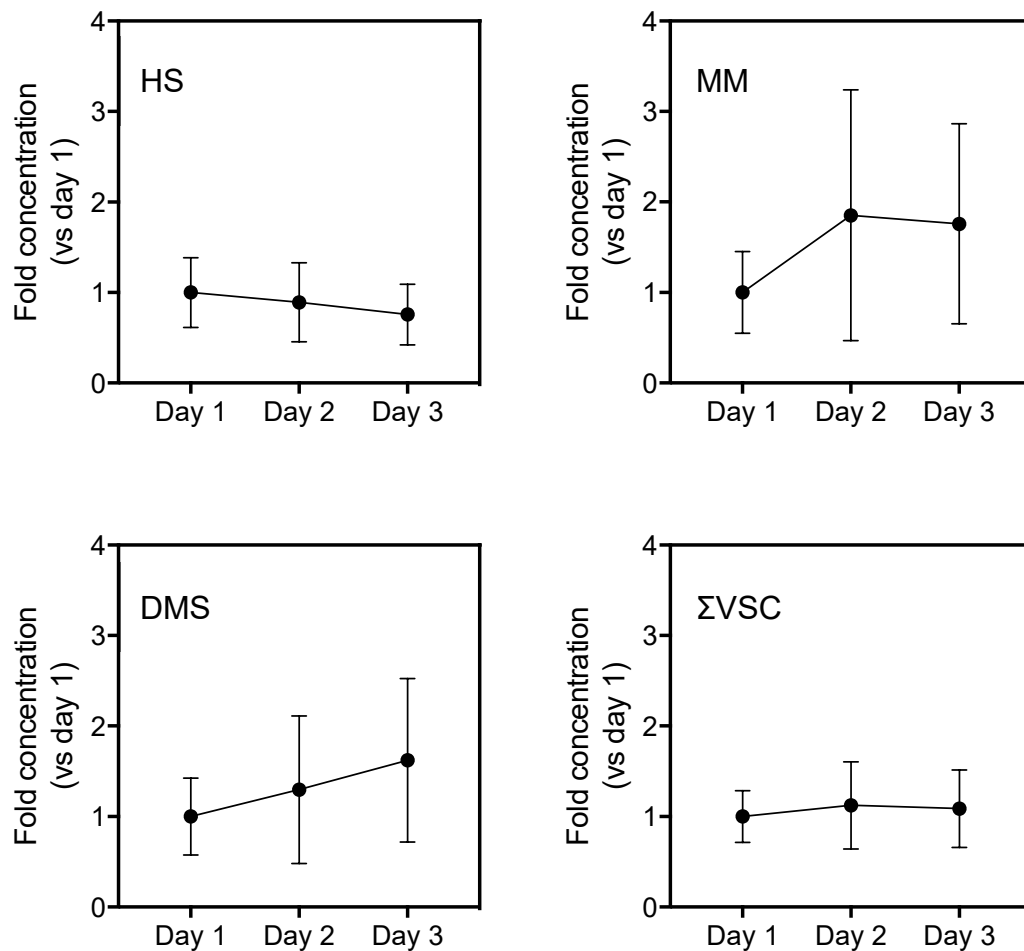


Fig. 2. VSC levels (fold vs. day 1) in oral air from dogs (N=6) during 3 consecutive days (day 1 – day 3). Data are expressed as means \pm SD. The concentration on day 1 was 244 ± 141 ppb for HS, 103 ± 65 ppb for MM, 75 ± 34 ppb for DMS and 422 ± 199 ppb for Σ VSC.
 Σ VSC: HS + MM + DMS.

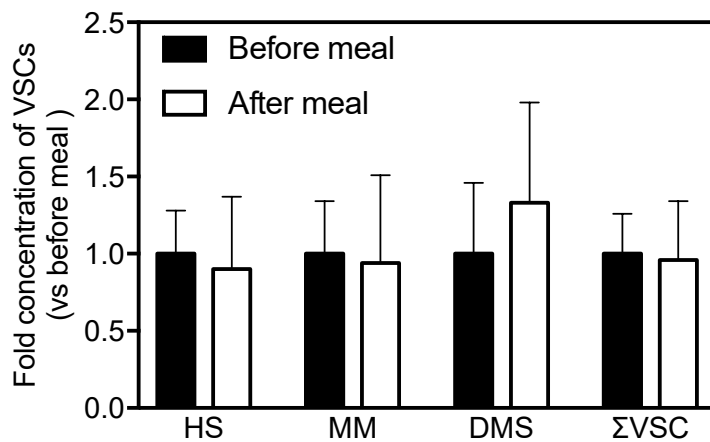


Fig. 3. The influence of meals on VSC (HS, MM, DMS and Σ VSC) levels in dogs (N=6). Measurements were done before and after breakfast (10:00) for 3 consecutive days (day 1 – day 3). Data are expressed as means \pm SD. Σ VSC: HS + MM + DMS.

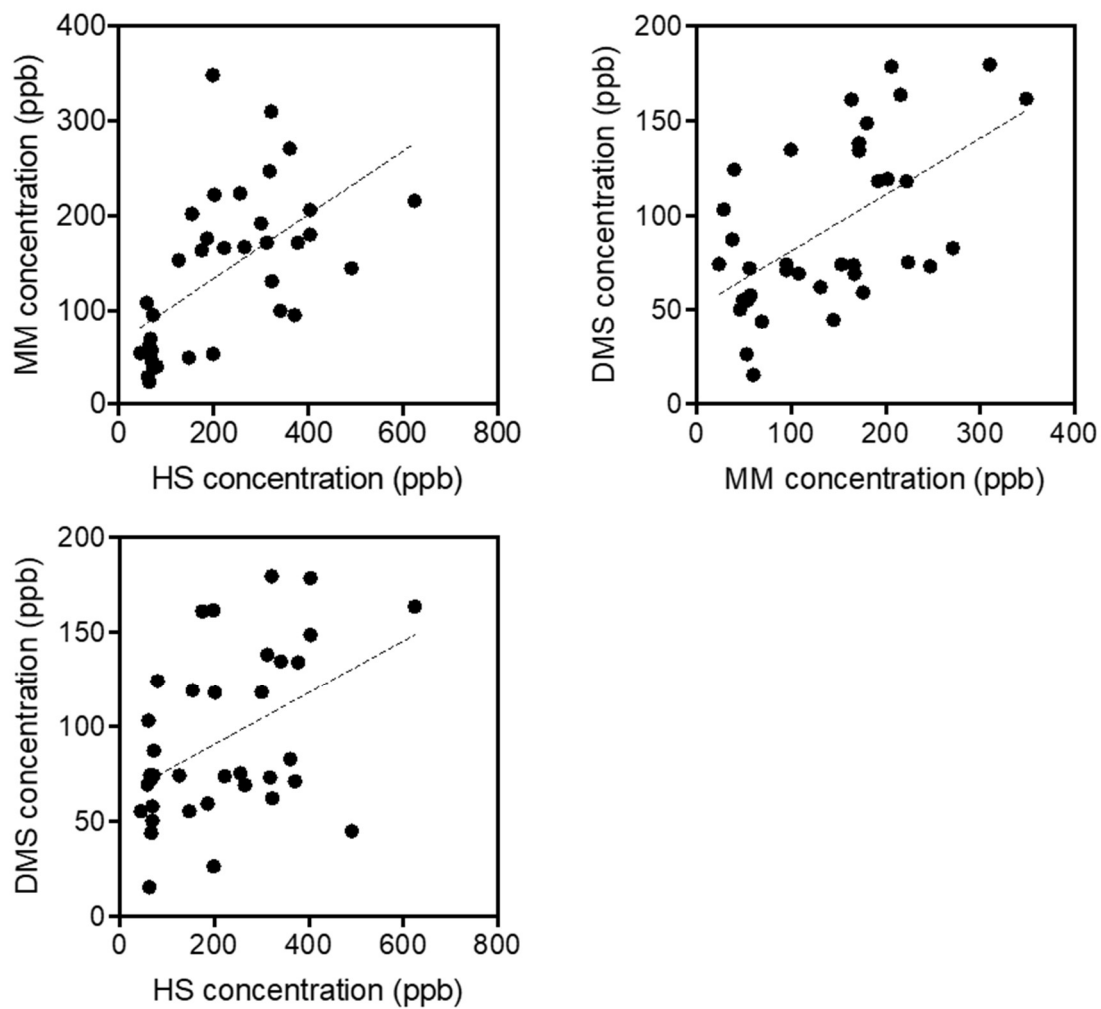


Fig. 4. Correlations between each VSC level.

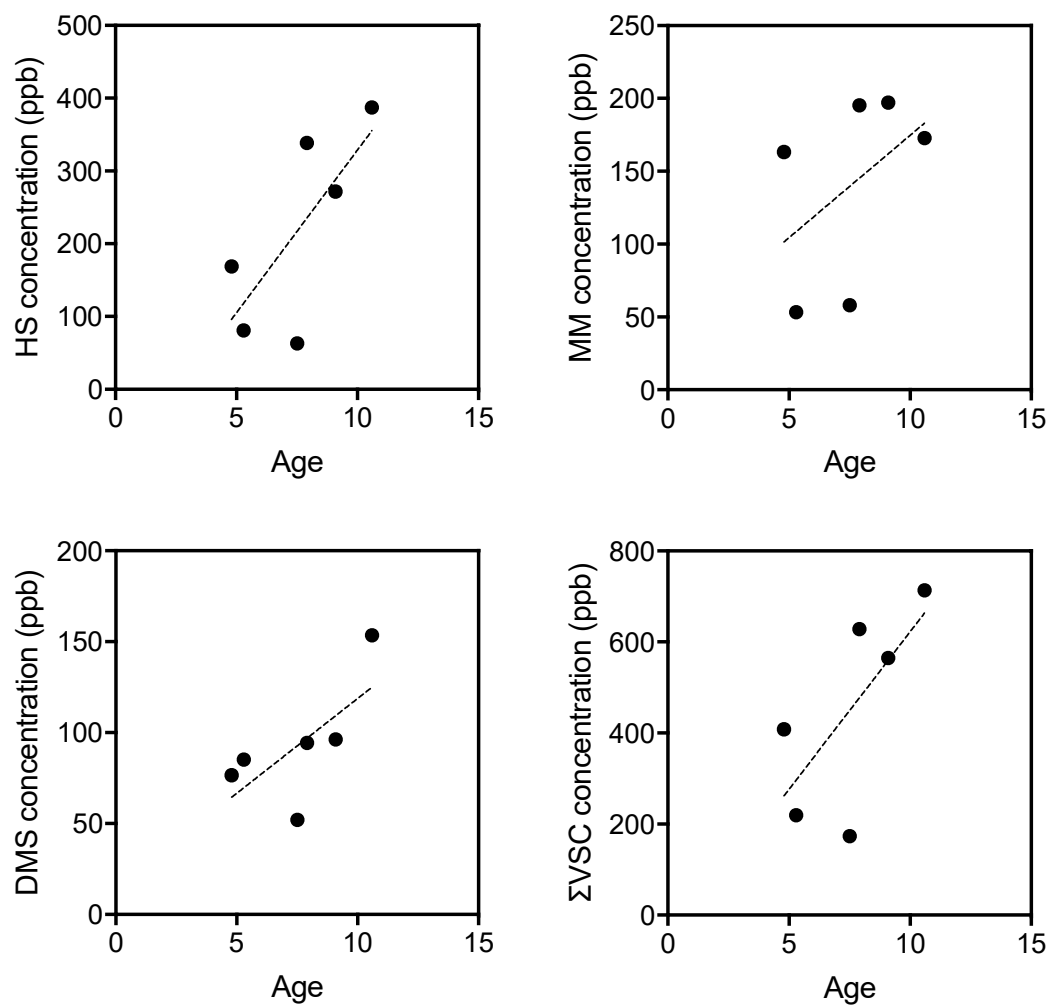


Fig. 5. Correlations with VSC levels and age in dogs. Horizontal axis: dogs' age, vertical axis: levels of VSC. Σ VSC: HS + MM + DMS.

Table 3

Influence of age on clinical parameters

	Group 1 (Age: 1 - 6)	Group 2 (Age: 7 - 16)	P-value
Body weight (kg)	11.4 ± 0.9	12.5 ± 2.2	0.034
Oral bacteria count (10^7 CFU)	3.2 ± 2.5	3.40 ± 2.4	0.16 (NS)*
Calculus index	1.0 ± 0.5	2.1 ± 0.6	0.000004
Gingival index	0.8 ± 0.6	1.8 ± 0.8	0.0003
Organoleptic score	1.5 ± 0.7	2.9 ± 0.3	0.00005
HS (ppb)	108.5 ± 99.2	523.7 ± 509.6	0.000010
MM (ppb)	52.9 ± 41.3	181.7 ± 179.3	0.0005
DMS (ppb)	24.5 ± 16.4	34.5 ± 30.4	0.18 (NS)*
Σ VSC (ppb)	185.9 ± 132.4	739.9 ± 656.3	0.00006

Data are expressed as means ± standard deviation (SD). * No significant difference (P<0.05).

ΣVSC: HS + MM + DMS.

Table 4

Pearson correlation coefficients among clinical parameters

	Age	Body weight	OBC	CI	GI	OS	HS	MM	DMS	ΣVSC
Age	-	-0.0336 NS*	0.2282 NS*	0.7301 (p<0.01)	0.6023 (p<0.01)	0.7317 (p<0.01)	0.4804 (p<0.01)	0.4900 (p<0.01)	0.0910 NS*	0.5061 (p<0.01)
Body weight			-0.0689 NS*	-0.0078 NS*	0.0710 NS*	0.2619 NS*	-0.1067 NS*	-0.2343 NS*	0.0409 NS*	-0.1433 NS*
OBC				0.3134 (p<0.05)	0.3022 (p<0.05)	-0.2401 NS(p>0.05)	0.3478 (p<0.05)	0.4018 (p<0.01)	0.1410 NS*	0.3826 (p<0.02)
CI					0.7372 (p<0.01)	0.6997 (p<0.01)	0.5684 (p<0.01)	0.4648 (p<0.01)	-0.0212 NS*	0.5623 (p<0.01)
GI						0.4955 (p<0.01)	0.4824 (p<0.01)	0.3412 (p<0.05)	0.2657 NS*	0.4756 (p<0.01)
OS							0.3789 (p<0.02)	0.3195 (p<0.05)	0.1261 NS*	0.3837 (p<0.02)
HS								0.7626 (p<0.01)	0.2021 NS*	0.9852 (p<0.01)
MM									0.0471 NS*	0.8586 (p<0.01)
DMS										0.2134 NS*
ΣVSC										-

OBC: oral bacteria count, CI: calculus index, GI: gingival index, HS: hydrogen sulfide, MM: methyl mercaptan, DMS: dimethyl sulfide, VSC: volatile sulfur compounds. *No significant difference (P<0.05). ΣVSC: HS + MM + DMS.

考察および総括

本研究は第一章において、ネコ由来 *P. gulae* の *fimA* 遺伝子型を同定し、その病原性を解析した。その結果、ネコの *P. gulae* はイヌと同様に A、B、C 型の 3 種に分類でき、イヌの *P. gulae* と高い相同性を示したことに加え、A 型にネコ特有の *P. gulae* がいることが示唆された。また病原性の解析では、3 種すべての *P. gulae* は病原性を有しており、そのなかでも C 型の *P. gulae* は特に病原性が強いことがわかった。以上の結果から、*P. gulae* はイヌとネコに共通した重要な歯周病原性細菌であり、FimA の多様性が病原性に関与することが明らかとなった。そのため、*P. gulae* の FimA 型の検出は伴侶動物の歯周病リスクを予測することに有用であることが考えられる。さらに第二章の成績より、ヒトの呼気中の VSC 濃度測定で用いられているオーラルクロマがイヌの呼気中の VSC 濃度測定にも適用出来ることが示された。そして、呼気中 VSC はイヌの口臭原因物質であり、その濃度は年齢および歯周病と密接に関連することが示唆された。

参考文献

- Avincsal, M.O., Altundag, A., Dinc, M.E., Cayonu, M., Topak, M., Kulekci, M., 2016. Evaluation of halitosis using oral Chroma™ in patients with allergic rhinitis. *Eur Ann Otorhinolaryngol Head Neck Dis.* 133(4), 243 246
- Booij-Vrieling, H.E., van der Reijden, W.A., Houwers, D.J., de Wit, W.E., Bosch-Tijhof, C.J., Penning, L.C., van Winkelhoff, A.J., Hazewinkel, H.A., 2010. Comparison of periodontal pathogens between cats and their owners. *Vet. Microbiol.* 144, 147 152.
- Cave, N.J., Bridges, J.P., Thomas, D.G., 2012. Systemic effects of periodontal disease in cats. *Vet. Q.* 32, 131 144.
- C. E. Kazor., P. M. Mitchell., A. M. Lee., L. N. Stokes., W. J. Loesche., F. E. Dewhirst., B. J. Paster., 2003. Diversity of bacterial population on the tongue dorsa of patients with halitosis and healthy patients. *J. Clin. Microbiol.* 41(2), 558 563.
- Dickinson, D.P., Kubinieć, M.A., Yoshimura, F., Genco, R.J., 1988. Molecular cloning and sequencing of the gene encoding the fimbrial subunit protein of *Bacteroides gingivalis*. *J. Bacteriol.* 170, 1658 1665.
- Finch, N.C., Syme, H.M., Elliott, J., 2016. Risk factors for development of chronic kidney disease in cats. *J. Vet. Intern. Med.* 30, 602 610.
- Fournier, D., Mouton, C., Lapierre, P., Kato, T., Okuda, K., Ménard, C., 2001. *Porphyromonas gulae* sp. nov., an anaerobic, gram-negative coccobacillus from the

- gingival sulcus of various animal hosts. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 51, 1179-1189.
- Hamada, S., Fujihara, T., Morishita, S., Takahashi, I., Nakagawa, I., Kimura, S., Ogawa, T., 1994. Molecular and immunological characterization of the fimbriae of *Porphyromonas gingivalis*. *Microbiol. Immunol.* 38(12), 921-930.
- Hamada, N., Takahashi, Y., Watanabe, K., Kumada, H., Oishi, Y., Umemoto, T., 2008. Molecular and antigenic similarities of the fimbrial major components between *Porphyromonas gulae* and *P. gingivalis*. *Vet. Microbiol.* 128, 108-117.
- Harvey, C.E., Thornsberry, C., Miller, B.R., 1995. Subgingival bacteria-comparison of culture results in dogs and cats with gingivitis. *J. Vet. Dent.* 12, 147-150.
- Hajishengallis, G., Lambris, J.D., 2012. Complement and dysbiosis in periodontal disease. *Immunobiology.* 217, 1111-1116.
- Higgins, M.J., Chen, Y.C., Yarosz, D.P., Murthy, S.N., Maas, N.A., Clindemann, D., Novak, J.T., 2006. Cycling of volatile organic sulfur compounds in anaerobically digested biosolids and its implications for odors. *Water Environ Res.* 78(3), 243-252.
- Hirai, N., Shirai, M., Kato, Y., Murakami, M., Nomura, R., Yamasaki, Y., Takahashi, S., Kondo, C., Matsumoto-Nakano, M., Nakano, K. and Asai, F. 2013. Correlation of age with distribution of periodontitis-related bacteria in Japanese dogs. *J. Vet. Med. Sci.* 75, 999-1001.

- Inaba, H., Kawai, S., Kanayama, K., Okahashi, N., Amano, A., 2004. Effect of Enamel matrix derivative on periodontal ligament cells *in vitro* is diminished by *Porphyromonas gingivalis*. J. Periodontol. 75, 858 865.
- Johannes, S., Maurits, B., Bart, S., Wount, N., Albert, T., Edwin, G., Michiel, K., 2011. Volatile Sulphur compounds in morning breath of human volunteers. Archives of oral biology. 56, 29 34.
- Kortegaard, H., Eriksen, T., Baelum, V., 2008. Periodontal disease in research beagle dogs - an epidemiological study. J. Small Anim. Pract. 49, 610 616.
- Kato, Y., Shirai, M., Murakami, M., Mizusawa, T., Hagimoto, A., Wada, K., Nomura, R., Nakano, K., Ooshima, T., Asai, F., 2011. Molecular detection of human periodontal pathogens in oral swab specimens from dogs in Japan. J. Vet. Dent. 28, 84 89.
- Khazandi, M., Bird, P.S., Owens, J., Wilson, G., Meyer, J.N., Trott, D.J., 2014. In vitro efficacy of cefovecin against anaerobic bacteria isolated from subgingival plaque of dogs and cats with periodontal disease. Anaerobe 28, 104 108.
- Kuboniwa, M., Inaba, H., Amano, A., 2010. Genotyping to distinguish microbial pathogenicity in periodontitis. Periodontol 2000. 54, 136 159.
- Lenzo, J.C., O'Brien-Simpson, N.M., Orth, R.K., Mitchell, H.L., Dashper, S.G., Reynolds, E.C., 2016. *Porphyromonas gulae* has virulence and immunological characteristics

- similar to those of the human periodontal pathogen *porphyromonas gingivalis*. Infect. Immun. 84, 2575 2585.
- Loe, H., Silness, J., 1963. Periodontal disease in pregnancy. I Prevalence and severity. Acta Odontol Scand. 21, 533 551.
- Loesche, W.J., 1976. Chemotherapy of dental plaque infections. Oral Sci. Rev. 9, 65 107.
- López del Castillo-Lozano, M., Delile, A., Spinnler, H. E., Bonnarme, P., Landaud, S., 2007. Comparison of volatile Sulphur compound production by cheese-ripening yeast from methionine and methionine-cysteine mixtures. Appl Microbiol Biotechnol. 75, 1447 1454.
- Salako, N.O., & Philip, L., 2011. Comparison of the use of the halimeter and the Oral Chroma™ in the assessment of the ability of common cultivable oral anaerobic bacteria to produce malodorous volatile sulfur compounds from cysteine and methionine. Med Princ Pract. 20, 75 79.
- Nakagawa, I., Inaba, H., Yamamura, T., Kato, T., Kawai, S., Ooshima, T., Amano, A., 2006. Invasion of epithelial cells and proteolysis of cellular focal adhesion components by distinct types of *Porphyromonas gingivalis* fimbriae. Infect. Immun. 74, 3773 3782.

- Nakano, Y., Yoshimura, M., Koga, T., 2002. Methyl mercaptan production by periodontal bacteria. *Int Dent J.* 52 Suppl 3, 217 20.
- Niemiec, B.A., 2008. Periodontal disease. *Top Companion Anim. Med.* 23, 72 80.
- Nomura, R., Naka, S., Nemoto, H., Inagaki, S., Taniguchi, K., Ooshima, T., Nakano, K., 2013. Potential involvement of collagen-binding proteins of *Streptococcus mutans* in infective endocarditis. *Oral Dis.* 19, 387 393.
- Nomura, R., Ogaya, Y., Nakano, K., 2016. Contribution of the collagen-binding proteins of *Streptococcus mutans* to bacterial colonization of inflamed dental pulp. *PLoS One* 11, e0159613.
- Nomura, R., Otsugu, M., Naka, S., Teramoto, N., Kojima, A., Muranaka, Y., Matsumoto-Nakano, M., Ooshima, T., Nakano, K., 2014. Contribution of *Streptococcus mutans* serotype *k* strains interaction with fibrinogen to the pathogenicity of infective endocarditis. *Infect. Immun.* 82, 5223 5234.
- Nomura, R., Shirai, M., Kato, Y., Murakami, M., Nakano, K., Hirai, N., Mizusawa, T., Naka, S., Yamasaki, Y., Matsumoto-Nakano, M., Ooshima, T., Asai, F., 2012. Diversity of fimbrillin among *Porphyromonas gulae* clinical isolates from Japanese dogs. *J. Vet. Med. Sci.* 74, 885 891.

- Pérez-Salcedo, L., Herrera, D., Esteban-Saltiveri, D., León, R., Jeusette, I., Torre, C., O'Connor, A., González, I., González, I.J., 2013. Isolation and identification of Porphyromonas spp. and other putative pathogens from cats with periodontal disease. *Vet. Dent.* 30, 208-213.
- Pérez-Salcedo, L., Herrera, D., Esteban-Saltiveri, D., León, R., Jeusette, I., Torre, C., O'Connor, A., González, I., Sanz, M., 2011. Comparison of two sampling methods for microbiological evaluation of periodontal disease in cats. *Vet. Microbiol.* 149, 500-503.
- Pérez-Salcedo, L., Laguna, E., Sánchez, M.C., Marín, M.J., O'Connor, A., González, I., Sanz, M., Herrera, D., 2015. Molecular identification of black-pigmented bacteria from subgingival samples of cats suffering from periodontal disease. *J. Small Anim. Pract.* 56, 270-275.
- Philstrom, B.L., Michalowicz, B.S., Johnson, N.W., 2005. Periodontal diseases. *Lancet.* 366, 1809-1820.
- Pizarro-Cerdá, J., Cossart, P., 2006. Bacterial adhesion and entry into host cells. *Cell.* 124, 715-727.
- Persson, S., Edlund, M.B., Claesson, R., Carlsson, J., 1990. The formation of hydrogen sulfide and methyl mercaptan by oral bacteria. *Oral Microbiol. Immunol.* 5, 195-201.

- Pham, T.A., Ueno, M., Shinada, K., Kawaguchi, Y., 2012. Factors affecting oral malodor in periodontitis and gingivitis patients. *J. Investig. Clin. Dent.* **3**, 284 290.
- Ramfjord, S.P., 1967. The Periodontal Disease Index (PDI). *J Periodontol.* 38(6), Suppl 602 610.
- Rosenberg, M., McCulloch, C.A., 1992. Measurement of oral malodor: current methods and future prospects. *J. Periodontol.* 63, 776 782.
- Sandra van den Velde., Marc Quirynen., Paul van Hee., Daniel van Steenberghe., 2007. Halitosis associated volatiles in breath of healthy subjects. *Journal of Chromatography B.* 853, 54 61.
- Socransky, SS., Haffajee, AD., Cugini, MA., Smith, C., Kent, RL Jr., 1998. Microbial complexes in subgingival plaque. *J Clin Periodontol.* 25(2), 134 44.
- Tangerman, A., Winkel, E.G., 2007. Intra- and extra-oral halitosis: finding of a new form of extra-oral blood-borne halitosis caused by dimethyl sulphide. *J. Clin. Periodontol.*, 34, 748 755.
- Theilade, E., Wright, W.H., Jensen, S.B., Løe, H., 1966. Experimental gingivitis in man. II. A longitudinal clinical and bacteriological investigation. *J. Periodontal Res.* 1, 1 13.
- Theilade, E., 1986. The non-specific theory in microbial etiology of inflammatory periodontal diseases. *J. Clin. Periodontol.* 13, 905 911.

- Tonzetich, J., 1971. Direct gas chromatographic analysis of Sulphur compounds in mouth air in man. *Arch Oral Biol.* 16(6), 587 597.
- Tonzetich, J., Ng, S.K., 1976. Reduction of malodor by oral cleaning procedures. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 42, 172 181.
- Tonzetich, J., 1977. Production and origin of oral malodor: a review of mechanisms and methods of analysis. *J. Periodontol.*, 48, 13 20.
- Villa, A., Zollanvari, A., Alterovitz, G., Cagetti, MG., Strohmenger, L., Abati, S., 2014. Prevalence of halitosis in children considering oral hygiene, gender, and age. *Int J Dent Hyg.* 12(3), 208 212.
- Wáler, SM., 1997. On the transformation of sulfur-containing amino acids and peptides to volatile sulfur compounds (VSC) in the human mouth. *Eur J Oral Sci.* 105(5Pt2), 534 537.
- Yaegaki, K., Sanada, K., 1992. Biochemical and clinical factors influencing oral malodor in periodontal patients. *J. Periodontol.* 63, 783 789.
- Yamasaki, Y., Nomura, R., Nakano, K., Inaba, H., Kuboniwa, M., Hirai, N., Shirai, M., Kato, Y., Murakami, M., Naka, S., Iwai, S., Matsumoto-Nakano, M., Ooshima, T., Amano, A., Asai, F., 2012. Distribution and molecular characterization of *Porphyromonas gulae* carrying a new *fimA* genotype. *Vet. Microbiol.* 161, 196 205.

Yoshimura, F., Takahashi, K., Nodasaka, Y., Suzuki, T., 1984. Purification and characterization of a novel type of fimbriae from the oral anaerobe *Bacteroides gingivalis*. J. Bacteriol. 160, 949-957.

要旨

【背景】 歯周病はイヌやネコとなどの小型伴侶動物に最もよくみられる感染症であり、歯周組織の慢性炎症疾患として定義される。4歳のイヌおよびネコは約80%が歯周病を発症しており、歯周病は全身の健康や生活状態にも悪影響を及ぼすことが知られている。歯周病は歯垢内に存在する内因性の細菌によって始まり、口腔内細菌の増加を介し、歯周病に関連する病原性細菌が成熟したバイオフィルムを形成することにより発症する。歯周病原性細菌はたとえ少数であっても歯周組織の環境を変え、異常な宿主免疫反応を誘発し、歯周病を進展させる。歯周炎に関連する細菌種がイヌおよびネコから採取された歯周組織検体において検出されている。*Porphyromonas gulae* (かつては *P. gingivalis* 類似菌、または、*P. gingivalis* の動物型、と呼称された) は黒色色素を産生するグラム陰性嫌気性細菌であり、いくつかの他の病原細菌種とともに、多くの動物種において歯周病と関連している。現在までに、*P. gulae* はイヌおよびネコの口腔内から検出されている。

ネコから検出された歯周炎に関連する細菌種に着目した研究はいくつか報告されているが、特定の細菌の遺伝子やタンパク質と歯周病との関連については検討されていない。歯周病リスクの高いネコを判別し、可及的速やかに適切な処置を行うには、ネコにおける主要な歯周病原性細菌の病原性を調べることが重要である。

また、伴侶動物と飼主の関係がより密接になったことから、伴侶動物の口臭が問題となっている。一般に口臭は口腔状態の悪化により口腔内の嫌気性細菌が増加した結果、生成される揮発性硫黄化合物(VSC: Volatile Sulfuric Compounds)が主要な原因物質であると考えられている。標準的な口臭測定法である官能試験は、簡易な方法であるものの客観性に乏しい方法でもあるため、客観的かつ定量的な口臭の測定法の確立が期待されている。

第一章：ネコ由来 *Porphyromonas gulae* の *fimA* タイプの同定および分子学的特性

グラム陰性、黒色色素産生性、偏性嫌気性細菌である *Porphyromonas gulae* は動物の主要な歯周病原性細菌の一つである。菌体表層に形成される線毛は分子量 41kDa の構成タンパク質 *fimbrillin* (または FimA) で構成され、ヒトから分離された *P. gingivalis* においてはじめて同定された。小動物では、FimA はイヌから分離された *P. gulae* において見出されており、ヒト由来 *P. gingivalis* の FimA と相同性が高いことが報告されている。ヒト由来 *P. gingivalis* の FimA は 6 タイプの遺伝子型(I~V型およびIb型)に、イヌ由来 *P. gulae* の FimA は 3 タイプの遺伝子型(A型、B型およびC型)に分類され、これらの遺伝子型は歯周病の重症度と密接に関連している。*P. gulae* は歯周上皮細胞に細胞毒性、マウスに全身性炎症を惹起するなど、さまざまな毒性を発現する。3 タイプの遺伝子型の比較では、C型の *P. gulae* は A型および B型よりも病原性が強く、重篤な歯周病を有するイヌから採取した口腔スワブ検体から高い割合で検出される。ネコから検出さ

れた歯周炎に関連する細菌種に着目した研究はいくつか報告されているが、特定の細菌の遺伝子やタンパク質と歯周病との関連については検討されていない。第一章では、ネコから分離した *P. gulae* の FimA 多様性および病原性を解析し、この多様性が歯周状態に影響を及ぼすか否かを検討した。

【材料と方法】動物病院に来院したネコの歯周組織から口腔スワブを用いて歯垢を採取した後、*P. gulae* を分離、株化した。その後、*fimA* の塩基配列を決定し、アミノ酸配列に基づいた系統樹を作製した。次に、 1×10^7 CFU に調整した *P. gulae* を歯根膜線維芽細胞に感染させ、細胞への付着・侵入能を評価した。また、細胞増殖率、細胞遊走能を評価するため、細胞増殖試験および *in vitro* 創傷治癒試験を実施した。また、一般家庭で飼育されているネコにおける、*P. gulae* の亜型の保有率を調査するため、動物病院に来院したネコから口腔スワブを用いて歯垢を採取し、PCR 法にて亜型を検出した。

【結果】13 匹のネコから分離した 15 株の *P. gulae* が保有する FimA の推定アミノ酸配列は 3 つの異なる遺伝子タイプ（A 型、B 型および C 型）に分類されるとともに、イヌから分離した *P. gulae* の各 3 タイプと 95～100% の高い相同性を示した。C 型分離株は A 型および B 型よりも、歯根膜線維芽細胞への高い付着・侵入能を示すとともに細胞の増殖を有意に抑制し、*in vitro* 創傷治癒試験においてひっかけ傷による空隙が埋まるのを強く抑制した。次に、本研究は PCR 法を基にした *fimA* 遺伝子型の判別方法を確立し、99 匹のネコの口腔スワブ検体を解析した。ネコの口腔スワブ検体において、*P. gulae* の A 型、B 型、C 型の分布率

は、それぞれ約 75%、30%、20%であった。A 型は歯周病の重症度に関係なく高い割合で検出されたが、B 型は中等度歯周病ネコで、C 型は重篤な歯周病ネコで検出率が高かった。

【考察・結論】本章ではネコ由来 *P. gulae* の *fimA* 遺伝子型を同定・分類した。*fimA* 遺伝子は 3 タイプに分類でき、そのなかでも C 型は A 型および B 型よりも検出率が低かったものの、歯周細胞に対して最も強い病原性を示した。本研究で開発された口腔スワブ検体から直接、*P. gulae* の *fimA* 遺伝子型を分類する分子生物学的手法は、ネコの歯周病リスクを評価することに有用であると考えられる。

第二章：簡易ガスクロマトグラフを用いたイヌ口臭の定量的測定法の確立

歯周病のイヌの飼い主が訴える臨床症状として口臭がある。イヌの室内飼育率が本邦では 80%以上となり、ヒトとイヌの関係がより密接になった。口臭の主な原因は歯周病の進行に伴い増殖した歯周病原性細菌が発生させる硫化水素、メチルメルカプタンおよびジメチルサルファイドなどの揮発性硫黄化合物 (VSC) であると考えられている。近年、ヒト歯科医療では半導体センサーを用いた匂いセンサーや簡便な口臭測定器、さらにガスクロマトグラフに基づく VSC 測定器が開発されている。しかし、イヌにおいては口臭の診断は官能試験が一般的である。官能試験は簡易的である反面、客観性に乏しい欠点がある。そのため、口臭の原因となる物質を定量的に測定する方法が望まれている。本章は近年、ヒ

ト用に開発された簡易ガスクロマトグラフであるオーラルクロマ®を使用し、イヌの呼気中における VSC 濃度の測定法を確立し、口臭および歯周病との関連性を調べることを目的とした。

【材料と方法】麻布大学内で飼育されている実験用ビーグル犬を実験に使用した。口臭の測定は官能試験およびオーラルクロマによって行った。官能試験は一人の測定者による判定により口臭スコア (0~3) 付けを行った。歯周状態の評価は歯石と歯肉炎の程度によりスコア (0~3) 付けを行った。呼気中に含まれる 3 種の VSC (硫化水素、メチルメルカプタンおよび硫化ジメチル) の濃度を測定は、イヌの口内にシリンジを差し込んで採取した呼気 1ml をオーラルクロマに注入し、自動測定した。

【結果】ヒトと比較して非常に高濃度の VSC がイヌで検出され、イヌの口内の VSC 濃度は硫化水素>メチルメルカプタン>ジメチルサルファイドの順に高かった。食事摂取前後で VSC 濃度に大きな変化はみられなかった。VSC 濃度は官能試験スコア、イヌの年齢および歯石指標ならびに歯肉炎指標と正の相関がみられた。

【考察・結論】以上の成績より、VSC はイヌにおいても口臭の原因物質であり、加齢および歯周病と密接に関連することが示唆された。呼気中 VSC 濃度の測定は、イヌの口臭の定量化および歯周病の危険性予測を可能にするのに有用な方法と考えられる。

【総括】第一章の成績より、*P. gulae* はイヌとネコに共通した重要な歯周病原性細菌であり、FimA の多様性が病原性に関与することが明らかとなった。そのため、*P. gulae* の FimA 型の検出は伴侶動物の歯周病リスクを予測することに有用であることが考えられる。第二章の成績より、呼気中 VSC はイヌの口臭原因物質であり、その濃度は年齢および歯周病と密接に関連することが示唆された。

Abstract

The Study on periodontal disease in companion animals

Periodontal disease, which is defined as a chronic inflammatory disease of the periodontal tissue, is most frequently observed in small companion animals, such as dogs and cats. Approximately 80% of cats reportedly suffer from periodontal disease at 4 years of age, which affects their overall health and wellbeing. Periodontal disease develops when periodontitis-related bacteria form a mature biofilm through coaggregation with endogenous bacteria in dental plaque. Periodontal pathogenic bacteria are able to alter the environment of the periodontal tissue, even when present at low levels. This can induce an abnormal host immune response that may lead to tissue destruction and establishment of periodontitis. Several periodontitis-related bacteria have been isolated from periodontal tissue specimens collected from dogs and cats. *Porphyromonas gulae* (also known as *P. gingivalis* resemblance bacteria or *P. gingivalis* of animal type) is a gram-negative anaerobic bacterium that produces melanotic pigment and has been implicated as one of the key bacterial species involved in the establishment of periodontal disease in many animal species. At present, *P. gulae* has been isolated from the oral cavities of dogs and cats. Although several investigations have focused on the periodontitis-related bacterial species that have been isolated from cats, the role of specific bacterial genes and

proteins in the development of periodontitis in cats has not yet been investigated. The investigation of the pathogenicity of major periodontal pathogenic bacteria in cats is important and will aid the identification of cats with a higher risk of periodontitis. Early dental treatment can then be implemented to these animals as an effective preventive measure.

Halitosis is another common problem encountered in companion animals and can cause significant problems in the relationship between an affected animal and its owner. It is generally attributed to an increase of anaerobic bacteria in the oral cavity. Volatile Sulfur Compounds (VSC) produced by these bacteria are primarily responsible for halitosis. Organoleptic examination is currently the standard assay used to evaluate halitosis; however, it lacks objectivity. Therefore, the development of an alternative halitosis assay, which is both objective and quantitative, is required.

Chapter 1: Identification and molecular characterization of *P. gulae fimA* types among cat isolates

P. gulae, a gram-negative, black-pigmented, anaerobic bacterium, is one of several major periodontal pathogenic bacteria found in animals. Bacterial fimbrial structures that are formed at the cell surface are composed of FimA, which is a 41-kD a fimbriin subunit protein. FimA was originally identified in *P. gingivalis* cloned from a human. Subsequent studies revealed that FimA is also expressed in bacterial isolates

from companion animals. For example, *P. gulae* FimA, which is highly homologous to *P. gingivalis* FimA, has been identified in bacterial strains isolated from dogs. The FimA from dog *P. gulae* and human *P. gingivalis* have been classified into three (types A, B, and C), and six (types I, Ib, II, III, IV, and V) genotypes, respectively. Each genotype appears to be closely related to severity of periodontal disease. *P. gulae* strains are cytotoxic to human gingival epithelial cells and cause systemic inflammation and toxicity in mice. Studies comparing the relative pathogenic abilities of strains expressing each of the FimA genotypes have suggested that type C *P. gulae* with are the most virulent. Indeed, type C *P. gulae* have been detected at high levels in an oral cavity swab specimen taken from a dog with serious periodontal disease. To date, although some studies have focused on the identification of periodontitis-related bacterial species in cats, none have investigated the roles of specific bacterial genes or proteins in this process. Therefore, in Chapter 1, I analyzed FimA diversity and virulence of *P. gulae* isolated from cats and investigated whether that diversity affects periodontal condition.

P. gulae isolates were identified from samples of tooth plaque collected through oral swabs from the periodontal tissues of cats visiting the animal hospital. The *fimA* nucleotide sequence was determined from each isolated *P. gulae* strain, and a phylogenetic tree was constructed based on putative FimA amino acid sequences. To evaluate the adhesion and invasion properties of each of the *P. gulae* isolates, periodontal ligament fibroblasts (HPdLF) were infected with cultures of each *P. gulae* strain adjusted to a

density of 1×10^7 colony-forming units (CFU). Next, the effect of each strain on cell proliferation and migration was investigated using *in vitro* cell proliferation and wound healing assays. Finally, to investigate the general distribution of *P. gulae fimA* genotypes among cats, oral cavity swabs were taken from cats visiting the animal hospital, and a PCR-based method was used to determine the *P. gulae* genotype present.

The putative amino acid FimA sequences from 15 *P. gulae* isolates obtained from 13 cats were classified into three genotypes (types A, B, and C), and showed 95%–100% identity and similarity to *P. gulae* obtained from dogs. The type C strains exhibited stronger adhesion properties to HPdLF cells and higher invasion rates compared with the type A and type B strains. Furthermore, the wound healing assay revealed that the type C strains significantly inhibited cellular proliferation and the scratch closure of HPdLF cells.

Finally, a PCR-based method for identification of *P. gulae fimA* genotypes was developed and used to analyze 99 oral swab specimens obtained from cats. The distribution rates of *P. gulae* type A, B, and C strains were found to be approximately 75%, 30%, and 20%, respectively. A high level of type A strain was detected regardless of the severity of periodontal disease. However, high levels of type B and C strains were detected in cats affected by moderate and severe periodontal disease, respectively.

In summary, three *fimA* genotype of *P. gulae* isolates derived from cats were identified and classified. The *fimA* genes were classified into three genotypes, type A, B, and C. Although the type C isolates were less prevalent than type A and B isolates, they

were the most pathogenic for HPdLF. Furthermore, the molecular technique used to classify *P. gulae fimA* genotypes developed in this study will be useful to predict the risk of periodontitis development in cats.

Chapter 2: Establishment of a simple gas chromatography method as a quantitative measurement method for dog halitosis.

There is halitosis as the clinical manifestations appealed from dog owners. Room breeding rate of dog was more than 80% in this country and a relation of owner and dog became closer. The primary cause of halitosis is considered to be volatile sulfur compounds (VSC), such as hydrogen sulfide, methyl mercaptan, and dimethyl sulfide produced by pathogenic bacteria, which proliferate as periodontitis progresses. In recent years, dental clinics have quantified VSC using gas chromatography- and semiconductor sensor-based measuring instruments and odor sensors. However, a diagnosis of halitosis in dogs generally relies on organoleptic test. Although organoleptic test is easy to perform it lacks objectivity. Therefore, the development of an alternative halitosis assay, which is both objective and quantitative, is required. The present study aimed to assess the association between oral malodor and periodontitis in dogs.

Laboratory Beagle dogs were included in this study. Oral halitosis was evaluated using an organoleptic test score and OralChroma™ to measure the oral levels of the following VSC: hydrogen sulfide (H₂S; HS), methyl mercaptan (CH₃SH; MM), and

dimethyl sulfide (CH₃SCH₃; DMS)

The frequencies of detected VSC were in the following order: HS > MM > DMS.

No significant change was observed in the levels of VSC before and after food intake. In addition, a significantly positive relationship was revealed between oral malodor and periodontitis, both of which are age-dependent in dogs.

In summary, this investigation suggested that aging is an important factor for oral malodor and periodontitis in dogs. Therefore, the quantification of the level of VSC would be a useful method to predict the probability of a companion animal developing periodontitis.

To conclude, the results presented in Chapter 1 showed that *P. gulae* was the important periodontal pathogenic bacteria common to dogs and cats, and FimA diversity was linked to pathogenicity. It is possible that the identification of the FimA type in a *P. gulae* strain isolated from oral swabs would be useful to predict the periodontitis risk of a companion animal. The data described in Chapter 2 suggested that VSC present in breath air cause canine malodor, and the level of VSC is closely associated with aging and the development of periodontitis in dogs

出典

本論文の一部は、以下に公表した。

1. Naoki Iwashita, Ryota Nomura, Mitsuyuki Shirai, Yukio Kato, Masaru Murakami, Saaya Matayoshi, Tamami Kadota, So Shirahata, Leo Ohzeki, Nobuaki Arai, Junya Yasuda, Hidemi Yasuda, Hiroaki Inaba, Michiyo Matsumoto-Nakano, Kazuhiko Nakano, Fumitoshi Asai: Identification and molecular characterization of *Porphyromonas gulae fimA* types among cat isolates. *Veterinary Microbiology*, 229:100-109, 2019
DOI: 10.1016/j.vetmic.2018.12.018.
2. Naoki Iwashita, Kazutoshi Sugita, Mitsuyuki Shirai, Sayaka Murata, Shiho Yanagisawa, Sumio Goto, Yukihiro Takagi, Fumitoshi Asai: Application of a portable gas chromatograph for quantitative measurement of canine oral malodor. *Fundamental Toxicological Sciences*, 4: 23-29, 2017

謝辞

本論文は麻布大学院 獣医学研究科 動物応用科学専攻 博士後期課程に在籍中の研究成果をまとめたものである。本研究の指導教官である教授 浅井史敏先生には、本研究の実施の機会を与えて戴き、その遂行にあたって終始、ご指導を戴いた。ここに深謝の意を表す。また、同専攻准教授 白井 明志 先生にも本研究の遂行にあたって終始、ご指導を戴いた。ここに感謝の意を表す。同研究科教授 村上賢 先生、並びに、准教授 加藤行男 先生には副査としてご助言を戴くとともに、本研究の遂行にあたってご指導を戴いた。ここに深謝の意を表す。本研究の第一章の実験では、本大学の公衆衛生学第一研究室教授 高木敬彦 先生にはご助言を戴くとともに、本研究の遂行にあたってご指導を戴いた。ここに深謝の意を表す。また、公衆衛生学第一研究室 講師 杉田和俊 先生には本研究の第一章の実験及び、その後の実験につきまして終始ご指導を戴いた。ここに深謝の意を表す。本研究の論文を投稿するにあたり、後藤純雄 先生にはご助言を戴いた。ここに深謝の意を表す。本研究室の学生である村田 彩也香さんには、本研究の遂行にあたり終始、実験をサポートして戴いた。ここに深謝の意を表す。第二章の実験では、大阪大学 歯学部 小児歯科学教室 教授 仲野 和彦 先生には本研究の実施の機会を与えて戴き、その遂行にあたって終始、ご指導を戴いた。ここに深謝の意を表す。大阪大学 歯学部 小児歯科学教室 准教授 野村良太 先生には本研究の遂行に

あたって終始、ご指導を戴いた。ここに深謝の意を表す。岡山大学大学院
小児歯科学分野 教授 仲野道代 先生には本研究の遂行にあたってご助言を戴
いた。並びに、岡山大学大学院 小児歯科学分野 准教授 稲葉裕明 先生にもご
助言を戴いた。ここに深謝の意を表す。本研究を遂行するにあたり、安田獣
医科大学 院長 安田英己 先生をはじめ、荒井延明 先生、安田隼也 先生、そ
の他当院の先生方、並びにプリモ動物病院 白畑壮 先生には臨床現場でのデー
タ及びサンプルを提供して戴いた。ここに深謝の意を表す。また、大阪大学
歯学部 小児歯科学教室の柳澤礼和さん、門田珠実さん、又吉紗綾さんには、
本研究の遂行にあたって終始、実験をサポートして戴いた。ここに深謝の意を
表す。本研究室の学生である佐々木理恵さん、阪根桃子さん並びに、すでに
卒業された阿部信之介さんには、本研究の遂行にあたり終始、実験をサポート
して戴いた。ここに深謝の意を表す。