

氏名(本籍)	岩下直樹(山梨県)
学位の種類	博士(学術)
学位記番号	甲第74号
学位授与年月日	平成31年3月15日
学位授与の要件	学位規則第3条第2項該当
学位論文題名	伴侶動物の歯周病に関する研究
論文審査委員	(主査) 白井明志 (副査) 浅井史敏 村上賢 加藤行男

## 論文内容の要旨

【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 I b 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、 $1 \times 10^7$  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・侵入能を示すと同時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き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。

1 章の成績：公表済み (Veterinary Microbiology 229:100-109, 2019)

2 章の成績：公表済み (Fundamental Toxicological Sciences 4(1): 23-29, 2017)

## 論文審査の結果の要旨

### 1. 論文内容

本論文は、伴侶動物ネコにおける歯周病リスクを評価する新たな手法を確立することを目的としたものである。申請者は、伴侶動物の主要な歯周病原性細菌 *Porphyromonas gulae* (*P. gulae*) について、ネコから分離・株化した *P. gulae* が、線毛タンパク質 Fim A をコードする *fimA* 遺伝子型から A 型、B 型および C 型の 3 種類に分類されること、そのなかで C 型が最も病原性が高いことを解明した。さらに、一般家庭で飼育されているネコの歯周状態と歯垢サンプル中の *fimA* 遺伝子型の解析より、C 型 *P. gulae* の感染が歯周病重症化の重要なリスクファクターであることを明らかにした。また、イヌにおいて歯周病との合併率が高い口臭の客観的かつ定量的な測定法を確立し、揮発性硫化物 (VSC) が口臭の原因物質であり、歯周病とともに加齢と密接に関連することを示唆した。以上の本研究で得られた成果は、伴侶動物の歯周病リスク評価において、動物の保有する *P. gulae* の *fimA* 遺伝子型解析、ならびに呼気中 VSC 測定が極めて有用であることを示す新しい知見である。

### 2. 論文審査

#### 1) テーマのたて方

申請者は、飼育家族との密接度が高い伴侶動物の歯周病が単なる口腔内の局所的な感染症による慢性炎症ではなく、全身の健康や生活状態に重大な悪影響を及ぼすものであるという認識から、伴侶動物において歯周病リスクを評価する新たな方法を確立することを目的とした。本研究は極めて社会的意義が大きく、独創性かつ明確なテーマである。

#### 2) 研究の背景

ヒトでは *P. gulae* と近縁の *P. gingivalis* が主要な歯周病原性細菌として認識されている。一方、イヌやネコなどの伴侶動物の歯周病原性細菌として *P. gulae* が知られているが、ネコ由来の *P. gulae* の病原性に関わる遺伝子に関する研究はほとんどなされていない。また、伴侶動物と飼い主との関係において口臭が問題となっているが、伴侶動物の口臭の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。このような背景に着目し、申請者は本研究を実施した。

#### 3) 研究の方法

申請者は、ネコの口腔スワブから採取したサンプルから、*P. gulae* を分離、株化した。株化した菌の *fimA* 遺伝子領域を PCR 増幅し、その塩基配列を決定した。さらに、*fimA* 遺伝子型による病原性の差異を評価するとともに、歯周病の重症度との関連についても検索した。また、簡易ガスクロマトグラフを用いてイヌの呼気中における VSC 濃度について測定し、口臭および歯周病との関連について検討した。

#### 4) 研究の結果

本研究で得られた主な成果は以下のとおりである。①ネコ由来 *P. gulae* は、*fimA* 遺伝子配列によっ

て A 型、B 型および C 型の 3 タイプに分類でき、そのなかでも C 型は A 型および B 型よりも歯周細胞に対して最も強い病原性を有し、重篤な歯周病を呈しているネコで多く検出された。②VSC は、イヌにおける口臭の原因物質であり、加齢および歯周病と密接に関連した。

#### 5) 考察と結論

申請者は、本研究で開発し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察した。また、イヌの呼気中 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有用な方法であることを示唆した。

#### 6) 引用論文

十分かつ適切に既報論文が必要な数だけ引用されていた。

本論文の内容と審査会での質疑に対する回答を考慮すると、本研究の立案・実施・論文作成に申請者自らが主体的な役割を担ったこと、背景知識・専門知識を十分有することが認められた。

### 3. 審査結果

以上の点から、本論文は博士（学術）の学位を申請するに十分な価値があると判断した。