

氏名(本籍)	白 畑 壮 (宮城県)
学位の種類	博士 (獣医学)
学位記番号	甲第 174 号
学位授与年月日	令和 5 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	<i>Porphyromonas gulae</i> 保有による犬歯周病病態の疫学的調査と歯周病予防薬の効果検討
論文審査委員	(主査) 村 上 賢 (副査) 福 山 朋 季 藤 田 幸 弘

論 文 内 容 の 要 旨

歯周病は、犬や猫などの小型伴侶動物において、罹患率の最も高い感染症であり、その過程で認められる歯垢の付着、歯肉炎および歯周炎は、米国における犬 31,484 頭の調査において、最も重要な健康問題であると結論付けられている。また、2 歳になるまでに猫の 70%、犬の 80%が歯周病を有しており、小型犬・トイ種では特に影響を受けやすいとされている。犬の歯周病は、歯周病原性細菌が歯周ポケットにバイオフィルムを形成し、歯肉の傷害および歯槽骨の融解を引き起こす慢性歯科疾患である。歯周病は多くの歯周病原性細菌が関連しあって形成される疾患であるが、ヒトでは *Porphyromonas gingivalis* (以下、*P. gingivalis*)、*Treponema denticola* および *Tannerella forsythia* の 3 菌種を Red complex と呼び、特に悪性度が高いとされている。一方、犬や猫では、*P. gingivalis* の近縁種である *Porphyromonas gulae* (以下、*P. gulae*) が歯肉溝から分離され、歯周病の発症および増悪に重要な役割を有していることがわかっている。*P. gulae* の菌体表面に存在する線毛を形成する病原蛋白質である分子量 41kDa のフィンブリリンは FimA と呼ばれ、歯への付着や病原性に重要な役割を示すことが判明している。FimA 蛋白質をコードする *fimA* 遺伝子は、A 型、B 型、および C 型の 3 種類のサブタイプに分類され、これらの *fimA* 遺伝子の中で、C 型の *P. gulae* が重度の歯周炎の犬の口腔内で優勢であるため、最も病原性が高いと考えられている。年齢による *fimA* 遺伝子型の推移、*fimA* 遺伝子型と歯周病の重症度および歯周病の臨床的特徴との関連は不明である。また、歯周病は歯周炎および歯槽骨の融解が引き起こされると回復が難しい疾患であり、動物病院だけでなく、飼い主による自宅での予防的デンタルケアの重要度は高い。

そこで本研究では、第1章で日本の小型犬種における *P. gulae* の各 *fimA* 遺伝子型の年齢別保有実態と歯周病態（歯周病スコア）と臨床的兆候（永久歯数）の関連に関する疫学調査を実施し、続いて第2章および3章では、犬の疫学調査に基づいた犬の歯周病予防製品 CPC + Pt 含有製剤（Q-ness マウスクリナー®、株式会社 QIX）の効果について、それぞれ *in vitro* および *in vivo* で調べた。

第1章：犬における *P. gulae* の *fimA* 遺伝子型の保有率と *fimA* 遺伝子型による歯周病悪性度との相関

プリモ動物病院相模原中央、厚木プリモ動物病院、相模大野プリモ動物病院および安田獣医科医院に来院した生後6～211ヶ月齢の歯周病罹患犬225頭（過去6ヶ月以内に抗生物質を使用している症例は検討から除外）を月齢によって生後50ヶ月齢未満（n=50）、50ヶ月齢以上100ヶ月齢未満（n=60）、100ヶ月齢以上（n=115）の3つのグループに分け、*P. gulae* の各 *fimA* 遺伝子型の保有率、歯周病重症度および歯周病態を裏付ける臨床兆候として永久歯数を、*fimA* 遺伝子型間で比較検討した。その結果、225頭全体における *P. gulae* 陽性率は74.6%であり、その割合は加齢に伴って増加した。特に、C型の *fimA* 遺伝子の *P. gulae* を有する犬の割合が、他の遺伝子型と比較して年齢とともに著しく増加（生後50ヶ月齢未満の群で20%、50ヶ月齢以上100ヶ月齢未満および100ヶ月齢以上の群で40%以上）していた。このことから、加齢に伴う歯周病の増加、悪化に関与しているのではないかと推測された。

次に、*P. gulae* の有無での歯周病の重症度スコアを比較すると、すべての年齢層で *P. gulae* 非保有犬と比較し、*P. gulae* 保有犬で歯周病の重症度が高くなっていった。また、遺伝子型間での歯周病の重症度を比較すると、生後50ヶ月齢未満の群において、*P. gulae* 陰性の犬と比較して、A型およびC型の *P. gulae fimA* 保有犬で有意な歯周病の重症度の悪化が観察された。50ヶ月齢以上100ヶ月齢未満の群では、*P. gulae* 陰性の犬と比較して、C型の *P. gulae fimA* 保有犬で有意な歯周病の重症度の悪化が観察された。100ヶ月齢以上の群では、*P. gulae* 陰性の犬と比較して、全遺伝子型の *P. gulae fimA* 保有により、有意な歯周病の重症度の悪化が観察された。そして、C型の *P. gulae fimA* 保有により、どの月齢においても歯周病重症度を有意に悪化させることが確認された。

次に遺伝子型間での永久歯数を比較したところ、50ヶ月齢以上100ヶ月齢未満の群および100ヶ月齢以上の群において、完全な歯列（42本）を持つ犬の数は *P. gulae* 陽性群では年齢とともに減少した。また、100ヶ月齢以上の群において、B型およびC型の *P. gulae fimA* 保有犬で完全な歯列を持つ犬の数は *P. gulae* 陰性の犬と比較して有意に減少した。これらの結果は、*P. gulae* の存在と永久歯の数との間に有意な関連性があることを示していた。傷害を受けた歯周靭帯や歯槽骨は不可逆的であることから、*P. gulae*、特にC型の *fimA* を保有する *P. gulae* の感染防御は歯周病を防ぐために重要であることが強く示唆された。

第2章：塩化セチルピリジニウム、プラチナナノコロイドの *P. gulae* に対する効果検討

ヒト用の歯周病予防薬として利用されているプラチナナノコロイド（以下、Pt）および塩化セチル

ピリジニウム（以下、CPC）に着目した犬の歯周病予防薬の薬効解明を行った。

Pt 製剤の作用機序は、炎症部位での活性酸素を除去し、局所の酸化ストレスを緩和・解消する。このことにより、活性酸素による歯周組織障害および炎症反応が緩和・抑制され、治癒が促進されると考えられる。またバイオフィルム溶解作用も認められているため、組織の修復過程で過剰な異物侵入や白血球浸潤、バイオフィルム下の細菌の定着を抑制する効果も人歯科医療では期待されてきた。また人歯科領域において、CPC は 0.05% CPC 溶液を歯周ポケット内の洗浄することで運動性桿菌、スピロヘータを減少させ、口腔洗浄液（含嗽剤）として使用することでプラークの蓄積の抑制や歯肉炎の改善に効果があるとの報告がある。

そこで、Pt、CPC の *P. gulae* に対する増殖抑制効果、*P. gulae* から産生される口臭原因物質（硫化水素およびメチルメルカプタン）に対する抑制効果、マクロファージ細胞における炎症反応に対する効果を試験管内で検証した。CPC+Pt 含有製剤として Q-ness マウスクリナーを使用し、その推奨使用濃度とされる 1% を実使用濃度として効果を評価した。CPC + Pt 含有製剤の実使用濃度（1%）の *P. gulae* に対する増殖抑制効果の検証では、培養後 4 時間で陰性対照群と比較して有意な *P. gulae* の増殖抑制作用が認められた。CPC + Pt 含有製剤の実使用濃度（1%）の *P. gulae* に対する曝露によって、細菌からの硫化水素産生が陰性対照群と比較して有意に抑制された。さらに、*P. gulae* を曝露したマクロファージ細胞（J774.1 細胞）に実使用濃度（1%）の CPC+Pt 含有製剤を処置した際のサイトカイン（IL-1 β , IL-6, TNF α ）産生量を測定した結果、CPC+Pt 含有製剤曝露により陰性対照群と比較して TNF α 産生の有意な減少が認められた。以上の結果より、CPC+Pt 含有製剤は実使用濃度において、*P. gulae* に対する増殖抑制、硫化水素産生抑制および抗炎症作用を有していることが示された。

第 3 章：CPC, Pt の一般飼育犬の歯周病に対する効果検討

歯周病および口臭の程度が軽度から中等度の犬 15 頭に対して、CPC+Pt 含有製剤を 1 ヶ月間、自由飲水投与した。製剤を適用した前後での口臭スコア、歯垢付着度、歯周病スコア、口腔内総菌数、歯周病菌活性および口腔内チオール濃度の測定を実施した。歯周病菌活性は、BANA 分解活性酵素検査（BANA テスト）により評価した。BANA 分解活性酵素とは、歯周病菌（*P. gulae*, *P. gingivalis*, *Treponema denticola*, *Tannerella forsythensis*）をはじめとする嫌気性細菌から産生される酵素であり、この酵素を測定することで歯周病菌活性を評価した。その結果、CPC+Pt 含有製剤投与の前後で歯周病態および口臭に大きな変化は認められず、すでに歯周病が進行している犬に対する CPC+Pt 含有製剤の効果は低いことが示唆された。

次に CPC+Pt 含有製剤の歯科処置に対する補助効果を調査する目的で、プリモ動物病院相模原中央に来院したスケーリング等の麻酔下歯科処置を実施した犬 50 頭について、歯みがきと CPC+Pt 含有製剤を飲水投与した群（n=15）、歯みがきのみを実施した群（n=16）、CPC+Pt 含有製剤のみを飲水投与した群（n=8）、無処置群（n=11）の 4 群に分け、歯科処置前、処置後 7 日、1 および 3 ヶ月での歯肉炎指数、歯石指数、口臭、口腔内チオール濃度、歯周病菌活性を比較した。歯周病菌活性は N-ベン

ゾイル-DL-アルギニルペプチターゼの酵素活性を ADplit® (アドプリット: 共立製薬株式会社) により測定した。ADplit による歯周病菌活性測定は、BANA 分解活性酵素検査よりも動物病院において簡易的に実施ができ、*P. gulae* から特異的に産生されるトリプシン様酵素である N-ベンゾイル-DL-アルギニルペプチターゼの酵素活性を測定することができる。その結果、歯肉炎指数、チオール濃度および歯周病菌活性が CPC+Pt 含有製剤投与群で無処置群と比較して有意に低下し、歯みがき等のデンタルケアと併用することでその効果は増大することが示唆された。歯科処置後に歯みがき等の物理的なデンタルケアと CPC+Pt 含有製剤を組み合わせることによって、歯周病に対する十分な予防効果がみられることが証明された。伴侶動物の高齢化が進む現代において、歯周病罹患率はますます増加することが予想される。犬における歯科医療において *P. gulae* の *fimA* 遺伝子型の検出と歯周病リスクの評価、および歯周病を予防するために日々のデンタルケア指導は良好な口腔内環境を維持する上で有用な手段であると思われる。

論文審査の結果の要旨

1. 論文内容

本論文は、イヌの歯周病において、その発症や増悪に関連している主な細菌である *Porphyromonas gulae* (*P. gulae*) に注目し、その保有状況や線毛の *fimA* 遺伝子型と歯周病態との関連など疫学調査を行うとともに、イヌの歯周病予防製品など予防処置の効果について、培養した *P. gulae* に対する *in vitro* 評価および実際に疾患しているイヌを用いた *in vivo* 評価を実施して、科学的データに基づいて有用性を示した内容である。

論文は 3 章から構成されている。第 1 章では、日本の小型犬種における *P. gulae* の各 *fimA* 遺伝子型の年齢別保有実態と歯周病態 (歯周病スコア) や臨床的兆候 (永久歯数) に関する疫学調査を実施し、加齢に伴い *P. gulae* の陽性率は増加し、歯周病も増加していたことを示した。特に *fimA* C 型の *P. gulae* 保有犬では歯周病の重症度の有意な悪化や永久歯数の減少を示した。続いて第 2 章では、塩化セチルピリジニウム (CPC) およびプラチナナノコロイド (Pt) に着目した犬の歯周病予防薬の *in vitro* での効果評価を行い、CPC と Pt 含有製剤は実使用濃度において、*P. gulae* に対する増殖抑制、硫化水素産生抑制および抗炎症作用があることを示した。第 3 章では、実際に歯周病に罹患している飼育犬を用いて CPC と Pt 含有製剤や物理的デンタルケアを実施して、歯科処置に対する補助効果を、歯肉炎指数、歯石指数、口臭、歯周病菌活性などを測定して *in vivo* 評価し、デンタルケアおよび CPC と Pt 含有製剤の組合せは、歯周病に対する十分な予防効果がみられることを科学的に示した。本研究の成果は、伴侶動物の高齢化が進む現代において、歯周病罹患率はますます増加することが予想され、イヌの歯周病の発生、進行を理解し、予防する上で有用な知見である。

2. 論文審査

1) テーマの立て方

申請者は、小動物歯科を専門とする伴侶動物病院の臨床獣医師であり、現場で直面している罹患率の高い慢性感染症であるイヌの歯周病について興味をもち、主要な原因菌である *P. gulae* の保有状況や病態の疫学的調査を行い、科学的根拠に基づいたイヌ歯周病の予防的処置を検討し、現場での獣医療への貢献を目指したものである。現場で直面している問題であり、実現可能な明確なテーマが設定されている。

2) 研究の背景

犬の歯周病は、歯周病原性細菌が歯周ポケットにバイオフィルムを形成し、歯肉の傷害および歯槽骨の融解を引き起こす慢性歯科疾患である。歯周病は多くの歯周病原性細菌が関連しあって形成される疾患であるが、イヌでは、ヒト *P. gingivalis* の近縁種である *P. gulae* が歯肉溝から分離され、歯周病の発症および増悪に重要な役割を有していることがわかっている。*P. gulae* の菌体表面の線毛を形成する病原蛋白質であるフィンブリリン (FimA) には、歯への付着や病原性に重要な役割を示すことが判明している。FimA 蛋白質をコードする *fimA* 遺伝子は、A、B、C 型の 3 種類に分類され、このうち重度の歯周炎の犬の口腔内で優勢である C 型が、もっとも病原性が高いと考えられている。しかし、年齢による *fimA* 遺伝子型の推移、*fimA* 遺伝子型と歯周病の重症度および歯周病の臨床的特徴との関連などの詳細は不明である。また、歯周病は歯周炎および歯槽骨の融解が引き起こされると回復が難しい疾患であり、動物病院だけでなく、飼い主による自宅での予防的デンタルケアの重要度は高い。これらの背景を踏まえ、目的に向けて本研究に取り組んでいる。

3) 研究の方法

第 1 章では、動物病院に来院した歯周病罹患犬 225 頭を用いて、月齢によって分類した 3 つのグループについて、PCR による *P. gulae* の各 *fimA* 遺伝子型の保有率、既知の基準に従った歯周病重症度や永久歯数を調べ、*fimA* 遺伝子型間で比較検討した。

第 2 章では、歯周病予防薬として利用されている CPC (歯肉炎改善作用) と Pt (活性酸素除去作用など) の製剤の *P. gulae* への効果をみるため、*P. gulae* 生存率の測定、*P. gulae* から産生される口臭原因物質である硫化水素やメチルメルカプタン濃度のガスクロマトグラフィーによる測定、マクロファージ産生の各種炎症性サイトカイン量の ELISA 法による測定を実施した。

第 3 章では、歯周病罹患のイヌ 15 頭に対して、CPC と Pt 含有製剤の治療効果をみるため製剤を適用した前後での口臭スコア、歯石指数 (視覚評価)、歯肉炎指数 (視覚評価)、口腔内総菌数 (細菌カウンタによる DEPIM 法)、歯周病菌活性 (BANA 分解活性酵素検査) および口腔内チオール濃度 (オーラストリップによる評価) などの測定を実施した。また、スケーリング等を実施したイヌ 50 頭に対し

て、デンタルケアや CPC と Pt 含有製剤の予防効果をみるため、予防処置適用後の上記と同様の評価項目を経時的に測定し、統計解析をした。

このように、研究の目的とテーマにふさわしい複数の研究方法を用いて、分析している。

4) 研究の結果

第 1 章の疫学調査では、*P. gulae* 陽性率は 74.6%であり、その割合は加齢に伴って増加しており、重症度も高くなっていた。特に、*fimA* C 型の *P. gulae* を保有しているイヌは、年齢とともに増加し歯周病重症度を有意に悪化させ、永久歯数も減少させた。第 2 章の *in vitro* 評価では、CPC と Pt 含有製剤の実使用濃度（1%）において、*P. gulae* に対する有意な増殖抑制作用、硫化水素産生の抑制が認められ、*P. gulae* を曝露したマクロファージ細胞からの TNF α 産生の有意な減少が認められた。第 3 章の *in vivo* 評価では、すでに歯周病が進行しているイヌに対する CPC と Pt 含有製剤投与では歯周病態および口臭に改善は認められなかった。一方で、歯科処置後のデンタルケアおよび CPC と Pt 含有製剤投与では、歯肉炎指数、チオール濃度および歯周病菌活性を有意に低下させた。

いずれも十分なデータをまとめて解析している。

5) 考察と結論

第 1 章から、*P. gulae* の存在、特に C 型の *fimA* を保有する *P. gulae* の存在は加齢に伴う歯周病の増加、悪化に関与しており、本菌の感染防御は歯周病を防ぐために重要であると考察した。第 2 章から、CPC と Pt 含有製剤は実使用濃度において、*P. gulae* に対する増殖抑制、硫化水素産生抑制および抗炎症作用を有していることを示した。第 3 章から、CPC と Pt 含有製剤は歯周病の治療効果は認められないものの、デンタルケアおよび CPC と Pt 含有製剤には歯周病に対する十分な予防効果がみられることを示した。イヌの歯周病リスク評価における *P. gulae* の検出とその *fimA* 遺伝子型の同定の重要性、および歯周病を予防するためにデンタルケアなどは良好な口腔内環境を維持する上で有用な手段であると考察している。

いずれも研究結果から明らかになったことを踏まえ、論理的に説明できている。

6) 参考論文

適切な参考文献が必要な数だけ引用されている。

3. 審査結果

本論文の内容、専門分野と発表会での質疑応答に対する適切な回答を考慮すると、博士としての専門知識を十分に有することが認められ、本研究は獣医学上、意義ある業績として高く評価できることから、博士（獣医学）の学位を授与するのに相応しいと判定した。