

令和 6 年 6 月 9 日現在

機関番号：32703

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2023

課題番号：19K10455

研究課題名（和文）歯周炎発症カニクイザルを用いた病原細菌の特定と細菌伝播経路の解明

研究課題名（英文）Identification of periodontal pathogenic bacteria and elucidation of bacterial transmission pathway using cynomolgus monkey.

研究代表者

平嶺 浩子（HIRAMINE, HIROKO）

神奈川歯科大学・歯学部・講師

研究者番号：30386841

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：歯周炎を発症したサルの病原細菌と考えられる*P. macacae*に着目し、口腔内検査を実施した。老齢サルの歯垢細菌から*P. macacae*は、100%検出され、年齢とともにBPAR検出率も増加することが分かった。同一環境下にあるサルを対象として、加齢と歯周炎の重症度との間に有意な相関性があることを明らかにした。また、*P. macacae*感染によりラット実験的歯周炎モデルを用いて評価し、感染群は、非感染群と比較し明らかな歯槽骨吸収が認められたことにより、*P. macacae*は、歯槽骨破壊を惹起させる病原性を有するサルにおける歯周病原細菌であることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

*P. macacae*は、カニクイザルの歯周ポケットから分離される細菌であるが、分離に関する報告は、非常に少ない。また、飼育環境ならびに遺伝的背景が明らかなサル類の大規模繁殖コロニーを有する集団に対する、口腔や全身に関する検索と研究は、未だ報告はない。本研究は、サルの歯周病罹患状況とその原因細菌の特定と病原因子の解明および原因菌の伝播経路を明らかにし、サル個体への*P. macacae*の感染時期、歯周炎発症時期や伝播経路について解明することは、ヒトとの類似性が高いサルを用いることより、ヒト歯周炎発症の予防と治療に貢献できる。本研究の成果は、ヒト歯周炎の解明の一助となる研究である。

研究成果の概要（英文）： *Porphyromonas macacae* is a pathogenic bacterium in monkeys with periodontitis. Oral examinations and PCR analysis of *P. macacae* were conducted on 148 monkeys at the Primate Medical Research Center of the National Institute of Biomedical Research and Innovation (NIBIO). *P. macacae* was detected in 100% of dental plaque bacteria from aged monkeys, and the detection rate of black pigmented anaerobic rods (BPAR) increased with age. A significant correlation between aging and severity of periodontitis was found in monkeys in the same environment. In addition, the virulence of *P. macacae* was evaluated in a rat experimental periodontitis model induced with *P. macacae* infection. Remarkable alveolar bone resorption was observed in the infected group compared to the uninfected group. These results suggest that *P. macacae* is a periodontopathic bacterium in monkeys with a pathogenic potential to induce alveolar bone destruction.

研究分野：歯周病学

キーワード：歯周炎 *P. macacae* カニクイサル

1. 研究開始当初の背景

これまでの膨大な歯周炎患者の歯肉縁下プラーク細菌に関する疫学調査と研究結果の蓄積から、黒色色素産生嫌気性桿菌である *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*) は、ヒト慢性歯周炎患者の歯周ポケット内から高率に分離され、本菌に対する血清抗体価が歯周炎患者血清において有意に高いことから、現在、歯周炎の最有力病原細菌であると考えられている。また、侵襲性歯周炎の原因細菌である *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (*A. actinomycetemcomitans*) において PCR 法を用いて遺伝子型を調査した結果、家族間で子供が *A. actinomycetemcomitans* 陽性の場合、全てのケースで母子間での垂直感染が起こっていることが報告されている。

Porphyromonas macacae (*P. macacae*) は、*Bacteroides melaninogenicus* subsp. *macacae* として 1980 年に Slots and Genco によってカニクイザル (学名 *Macaca fascicularis*) の歯周ポケットから分離、報告された。現在、*P. macacae* は 1987 年にネコの皮下膿瘍と膿胸から糖非分解性黒色色素産生桿菌 *Bacteroides salivosa* が報告され、1992 年に遺伝子解析の結果、同一菌種として *Porphyromonas macacae* (*P. macacae*) とする方向にあり、カニクイザルに認められた歯周炎の病原細菌と考えられている。

ヒト慢性歯周炎の発症や進行には、*P. gingivalis* のコラゲナーゼやトリプシン様酵素など直接的に組織破壊を引き起こすタンパク分解酵素や免疫細胞の活性化や歯周組織を構成する細胞からサイトカインの産生を惹起する内毒素など、様々な病原因子が関与すると考えられている。菌体表層に存在する線毛も免疫細胞や歯周組織を刺激してサイトカインの産生を誘発する活性の他に、組織細胞への付着を介して本菌の歯周ポケット内へ定着するのに重要な役割を果たしていると考えられている。また、*P. gingivalis* 線毛は、唾液タンパク質、共生細菌、細胞外マトリックスおよび宿主細胞である歯肉線維芽細胞、上皮細胞、内皮細胞に特異的に結合することが報告されており、歯周組織破壊を引き起こす主要な病原因子と考えられている。

本研究では、国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所霊長類医科学研究センターで歯周炎を発症したカニクイザルの病原細菌と考えられる *P. macacae* に着目し、歯周炎罹患状況と黒色色素産生菌の割合と PCR 法により *P. macacae* の検出率を算定すること、*P. macacae* の分離株の病原因子の解明および伝播経路を明らかにすることを目的としている。さらに、*P. macacae* 分離株より線毛タンパク質を単離精製することで、線毛の口腔内定着やサイトカイン産生誘導能と破骨細胞分化誘導能の比較検討を行う。また、国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所霊長類医科学研究センターのカニクイザル全頭検査を進め、口腔疾患状況と飼育環境やグループ間での *P. macacae* の伝播経路の検索により、歯周炎へ移行する際の生態環境の変化を予測する大きな手掛かりを得られ、個体への細菌感染時期と歯周炎の発症時期およびその機序を解明する貴重なデータ収集であり、歯周炎の予防と全身疾患との関連性についても考察したいと考えている。

2. 研究の目的

本研究で対象とする施設内のサルは、誕生後から同一飼育環境下での追跡調査が可能であり、個体への細菌感染時期、集団における歯周病原細菌の伝播に関する研究が行える。ヒト慢性歯周炎の原因細菌である *P. gingivalis* とサルやネコの歯周病原細菌であると考えられている *P. salivosa* 線毛のアミノ酸配列が既に明らかにされている。線毛タンパク質のアミノ酸配列の相違性が低いことが、ヒト歯肉細胞のレセプターへの付着能の違いであり、*P. salivosa* がヒト口腔から検出されない理由と考えられる。サルやネコで高頻度に検出され、それぞれの動物固有の細菌として捉えられてきたが、サルにおける伝播とともに動物種を超えて伝播する可能性も検討できると考えている。そこで、ヒト歯周病原細菌の *P. gingivalis* と *P. salivosa* との相違点を明らかにし、歯周病原因子としての線毛に着目して、口腔内定着機序の解明とヒト口腔への細菌伝播について研究を進めたいと考えている。*Porphyromonas* 属の伝播が確認されることで、これまで明らかにしてきた病原因子としての線毛の役割とともに、異なる動物種の口腔上皮細胞へのレセプターを解明することは、歯周炎の発症機序を明らかにする一助となる。また、これまでの疑似的な動物実験ではないカニクイザルから分離された細菌を用いて、サルを宿主とする世界で初めての歯周炎発症実験モデルを確立することが可能となり、歯周炎の発症やインプラント周囲炎発症のメカニズムの解明に利用できる画期的な歯周炎発症モデルの足掛かりとなる。また、*P. gingivalis* の歯周病原因子についての研究報告は多数あるが、*P. macacae* においては報告がない。本研究の成果は、サルより採取した歯垢分離菌株の性状比較と病原因子の解明、感染時期と歯周炎発症時期や個体間での細菌伝播経路についておよび口腔内定着機序を解明することにより、歯周病学分野の発展に寄与できることが期待される。

3. 研究の方法

本研究では、飼育環境と遺伝的背景が明らかな霊長類センターのカニクイザル全頭 (1600 頭) に対して 2 年毎に行われる健康診断に合わせて口腔内診査を行う。歯周病原細菌の感染時期と

感染経路、歯周炎罹患状況、原因細菌の特定とその病原性について明らかにする。

(1) 被験動物の口腔内診査および歯垢の採取

国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所霊長類医学研究センターの研究倫理審査委員会の承認を得たうえで、口腔内診査(口腔内写真、Plaque Index (PII)、Gingival Index (GI)、Peridontal Index (PI)、歯周ポケット深さ (PPD)、診査時出血の有無 (BOP))を行い、カニクイザル口腔から綿棒を用いて歯垢を採取し、DNAの抽出まで保存する。菌種特異的 PCR プライマーを用いて菌種の存在と鑑別を明らかにする。

(2) DNAの抽出およびPCR法

標準菌株および採取した歯垢細菌のDNA抽出には、ISOPLANT (ニッポンジーン)を用い、マニュアルに従ってDNAを抽出し、-20°Cに保存する。*P. macacae*の伝播を菌種特異的プライマーで用いてPCR法およびReal-time PCR法で検索する。

(3) 感染伝播経路(水平,垂直)の検索

制限酵素切断パターンの比較: 歯垢細菌より抽出したPCR産物のDNA断片を数種の制限酵素で切断後、アガロースゲル電気泳動を行い、エチジウムブロマイドにより染色し、その切断パターンをアガロース電気泳動でバンドの位置を比較検討する。

PCR産物の塩基配列の比較: PCR法で使用したPCR産物のDNAのシークエンスを行い、塩基配列の相違を検索し比較する。

(4) 細菌の分離と性状解析

標準菌株として神奈川県大学保存の *Porphyromonas gingivalis* 381、ATCC 33277、*Porphyromonas gulae* ATCC 51700、*Porphyromonas macacae (salivosa)* ATCC49407を用いる。培養は、BHI-brothに yeast extract (5 mg/ml)、hemin (5 µg/ml)、vitamin K₁ (0.5 µg/ml)を添加した培地に接種し、嫌気ガス(70% N₂, 15% H₂, 15% CO₂)を満たしたAnaerobox内で37°C 18時間培養する。口腔内細菌の分離は、BHI血液寒天培地と *Porphyromonas* 選択培地であるKVLB培地を用いて行う。歯垢を滅菌生理食塩水で希釈後、培地に塗抹して発育集落を増菌培養する。総菌数と黒色色素産生の比率を算出して病態と比較する。また、インドール産生性試験、トリプシン様酵素活性、カタラーゼ反応と一般性状試験用培地にて糖分解性を検査して細菌の同定を行う。分離株は、-80°Cで保存する。

4. 研究成果

本研究では、歯周病原細菌の感染時期と感染経路、歯周炎罹患状況、原因細菌の特定とその病原性について明らかにすることを目的に、(1)飼育環境と遺伝的背景が明らかな霊長類センターのカニクイザル全頭(1600頭)に対して2年毎に行われる健康診断に合わせて口腔内診査を行い、年齢と歯周炎重症度の関連を明らかにすること。(2)歯周炎罹患サルにおける病原細菌の特定ならびに分離菌株の病原因子と伝播経路を明らかにすること。(3)カニクイザルの歯周病原細菌と考えられる *P. macacae*は、歯槽骨吸収に関わる病原性を有しているのかを明らかにすることを目的とした。(3)については、当初の実験計画には含まれないが、新型コロナウイルス感染症による移動制限等のため、サルの口腔内診査へ参加できなかったため、一部予定を変更し計画、研究を進めた。

(1) 被験動物の口腔内診査および歯垢の採取

国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所霊長類医学研究センターの研究倫理審査委員会の承認を得たうえで、被験個体数が同一飼育環境にあるサルをYoung群(5-9歳)、Middle群(10-19歳)、Old群(20-32歳)の3群に分け、口腔内診査(口腔内写真、Plaque Index (PII)、Gingival Index (GI)、Peridontal Index (PI)、歯周ポケット深さ (PPD)、診査時出血の有無 (BOP))を実施した。細菌検査は、口腔内より歯垢を採取し、DNAを抽出しPCR法で *P. macacae*の同定を行った。初年度の調査では、年齢別飼育個体数に偏りがあったため、各群における統計学的解析に必要な個体数を確保し、各群における被験個体数を調整した。サル口腔内の特徴は、う蝕に罹患している個体数は少なく、加齢に伴い多量の歯垢、歯石の付着が認められた。高齢個体では、歯肉に発赤・腫脹、著しい咬耗が認められた。また、歯肉退縮も進行しているため、深い歯周ポケットを有する個体は少なかった。加齢に伴い、PIIはプラーク付着量の増加を認められた。GIは、伴い辺縁歯肉の炎症が多く認められた。PPDは、深い歯周ポケットを有する個体が多く認められた。BOPは、歯肉の炎症が多く認められた。

以上の結果より、施設内サルを年齢階級別に分け、歯周組織検査を行うと加齢と歯周病の重症化との関連が認められた。



図1 カニクイザル口腔内写真(5~31.5歳)

(2) 歯周炎罹患サルにおける病原細菌の特定ならびに分離菌株の病原因子と伝播経路を検討した。カニクイザルの歯周病原細菌と考えられている *P. macacae* の歯周炎罹患状況について PCR 法を用いて検討をしたところ、検出率 (PCR 陽性個体数 / 被験個体数) は、Young 群、Middle 群で約 40%、Old 群では 100% 検出された。歯垢細菌の分離は、BHI 血液寒天培地と *Porphyromonas* 選択培地である KVLB 培地を用いて行った。歯垢を滅菌生理食塩水で希釈後、培地に塗抹して発育集落を増菌培養した。歯垢細菌の総菌数は、Young 群、Middle 群、Old 群の 3 群とも同程度であった。総菌数に対する黒色素産生嫌気性菌 (BPAR) の検出率は、Young 群と比較し Old 群では 5 倍高値を示した。また、採取した BPAR について、以下の性状試験を行った。インドール産生性試験、トリブシン様酵素活性、カタラーゼ反応と一般性状試験用培地にて糖分解性を検査したところ、*P. gingivalis* および *P. macacae* 同定された以外にも同定できなかった BPAR については、現在、解析中である。

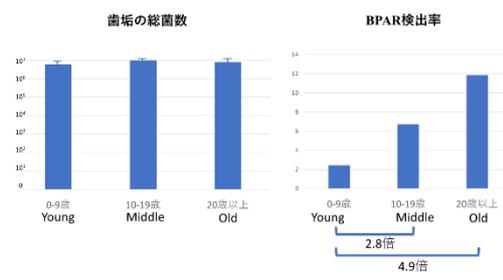


図2 歯垢細菌数と黒色素産生菌(BPAR)検出率

(3) カニクイザルの歯周病原細菌と考えられている *P. macacae* の歯槽骨吸収に関わる病原性について検討した。*P. macacae* の口腔内接種によるラットによる実験的歯周炎モデルを使用し、歯槽骨破壊の状態を比較した。感染群は、

- Porphyromonas macacae* ATCC33141
- Porphyromonas salivosa* ATCC49407
- Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277
- Porphyromonas gulae* ATCC 51700

それぞれの標準菌株を使用した。非感染群は、コントロール群として CMC を接種した。今回行ったラット口腔内へ *P. macacae* を直接投与する感染実験を行った後、歯周炎による歯槽骨破壊の程度をマイクロ CT 解析を用いて比較検討した。非感染群 (Control) よりも感染群 (*P. macacae*) に、明らかに歯槽骨吸収が統計学的にも優位に認められ、また、その他の *Porphyromonas* 属の細菌についても同様の成果を得た。実験的歯周炎モデルを使用した in vivo 実験において、*P. macacae* は、歯槽骨破壊を惹起させるサルにおける歯周病原細菌であることが示唆された。

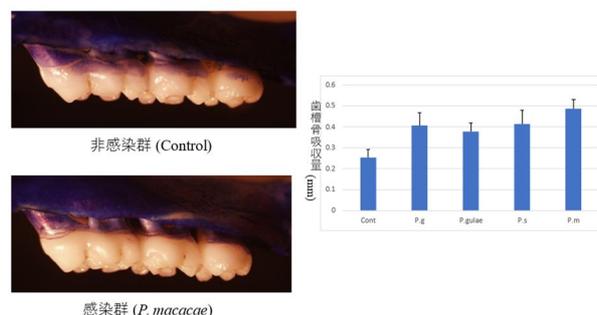


図3 実験的歯周炎モデルを使用した歯槽骨吸収量の評価

<引用文献>

- (1) Genco RJ. Current view of risk factors for periodontal diseases. J Periodontol. 1996;67:1041-1049.
- (2) Slots J, Genco RJ. Bacteroides melaninogenicus subsp. macacae, a New Subspecies from Monkey Periodontopathic Indigenous Microflora. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 1980; 30: 82-85.
- (3) Colombo APV, Paster BJ, Grimaldi G, Lourenco TGB, Teva A, Campos-Neto A, et al. Clinical and microbiological parameters of naturally occurring periodontitis in the non-human primate Macaca mulatta. J Oral Microbiol. 2017; 9: 1403843.
- (4) Fournier D, Mouton C, Lapierre P, Kato T, Okuda K, Ménard C. Porphyromonas gulae sp. nov., an anaerobic, gram-negative coccobacillus from the gingival sulcus of various animal hosts. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 2001; 51: 1179-1189.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Takaharu SONE, Motohiro KOMAKI, Tadashi SANKAI, Hiroko HIRAMINE, Kiyoko WATANABE, Nobushiro HAMADA, Toshiro KODAMA	4. 巻 73
2. 論文標題 Relationship between aging and periodontal disease severity in gauge-raised cynomolgus monkeys (Macaca fascicularis)	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 EXPERIMENTAL ANIMALS	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 曽根崇晴, 小牧基浩, 山海直, 平嶺浩子, 渡辺清子, 浜田信城, 児玉利朗
2. 発表標題 大規模繁殖コロニーのカニクイザルにおける歯周病実態調査
3. 学会等名 第162回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	浜田 信城 (HAMADA NOBUSHIRO) (20247315)	神奈川歯科大学・歯学部・教授 (32703)	
研究分担者	渡辺 清子 (WATANABE KIYOKO) (70148021)	神奈川歯科大学・歯学部・准教授 (32703)	
研究分担者	児玉 利朗 (KODAMA TOSHIRO) (20170269)	神奈川歯科大学・歯学部・特任教授 (32703)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	小牧 基浩 (KOMAKI MOTOHIRO) (30401368)	神奈川歯科大学・歯学部・教授 (32703)	
研究分担者	山海 直 (SANKAI TADASHI) (80300937)	国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所・医薬基盤研究所 豊長類医科学研究センター・再雇用職員 (84420)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関