

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 15 日現在

機関番号：24302

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24658229

研究課題名(和文) 歯周病コントロールによる安全安心な養豚体系の確立

研究課題名(英文) Safe management system for pig production with treatment of periodontal diseases

研究代表者

牛田 一成 (Ushida, Kazunari)

京都府立大学・生命環境科学研究科(系)・教授

研究者番号：50183017

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：歯周病は慢性炎症性疾患である。ヒトでは、歯周病罹患によって全身性慢性疾患が増悪化されるほか、歯周病産婦の産子は成長が遅い。高産歴母豚では歯周病を発症している可能性が高いと考えられたため、本研究では繁殖母豚の歯周病罹患実態を調査した。その結果、高産歴母豚の歯茎には顕著な炎症が認められたが、歯槽骨吸収までは認められなかった。歯周病の結果TNF- α 生産が亢進した母豚は、産子のほ乳期生存率が低下した。低産歴母豚(0～2産)の歯茎にも炎症が認められる個体があり、その母豚の産子の成長は劣っていた。本研究から、繁殖成績を向上させるため母豚歯周ケアの重要性が明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Chronic periodontitis is characterized by chronic plaque and calculus accumulation and gingival inflammation. In human, periodontitis is associated with chronic diseases such as diabetes. And periodontal disease in pregnant women may increase the risk for premature delivery and low birth weight infants. In this research, we investigated periodontal diseases in sows and their litter performance. All older sows manifested periodontitis without resorption of the alveolar bone. However, sows manifested periodontitis showed higher plasma TNF- α and their litter survival rates were low. Several younger sows also manifested periodontitis. Growth rate of their litters were low. We concluded that management system for periodontal diseases in swine production should be established.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学

キーワード：養豚 繁殖成績 歯肉炎 炎症性サイトカイン

1. 研究開始当初の背景

歯周病はある種の細菌群が歯周部で繁殖することで引き起こされる慢性の炎症性疾患である。わが国の成人では、その80%がなんらかの歯周病を罹患していると言われている。歯周病は、口腔の疾患ではあるが、その罹患によってAIDSや糖尿病などの全身疾患が増悪する事が疫学調査によって確認されている(落合, 2011)。それに加えてヒトヘルペスウイルス感染症も歯周病罹患で増悪することも示唆された(今井・落合ら, 2011)。ウイルス疾患の増悪メカニズムとして想定されているものは、歯周病菌によって生産される酪酸である。酪酸は、歯周組織に存在するT細胞にアポトーシスを誘導するばかりか、ヒストン脱アセチル化酵素を阻害することで宿主ゲノム中に潜伏しているウイルスゲノムの発現も誘導してしまう。

繁殖候補豚は約1歳から繁殖母豚になり、4~5歳まで飼育される。この間、平均で年2.2回ほど分娩を行い、生涯6~8産を行う。養豚用の試料は、粒子が細かくなっているため、咀嚼の必要が少なく、歯周辺に歯垢として沈着しやすい可能性があるうえ、分娩と哺乳によるカルシウム動員が歯に影響を及ぼすため、高産歴の母豚では、歯の状態に問題があると想像された。

2. 研究の目的

研究構想にあたり、複数の養豚開業獣医師に聞き取り調査をしたところ、歯周病症状を呈する繁殖母豚は存在するという回答を得たことから、母豚の歯周の状態と繁殖成績の関連を検討することにした。本提案では我が国の養豚現場で飼育されている繁殖母豚の、歯周病罹患の実態を調査することを第一の目的とした。平成24年度には低産歴の繁殖母豚を対象として、歯茎炎症と産仔成長との関連について検討した。平成25年度には高産歴の繁殖母豚の歯茎炎症と産仔成長との関連について検討した。

3. 研究の方法

3-1. 低産歴母豚の口腔環境

産歴0~2産の繁殖母豚14頭を供試した。分娩後、産仔のほ乳期間中の生育状況を調査し、離乳後に母豚を剖検した。口腔内を肉眼的に観察し、歯茎の炎症を確認した。赤く柔らかい部位を異常部位として、白く固い部位を正常部位としてmRNA発現用にサンプリングを行い、RNA-laterに各々浸漬した(図1)。出来るだけ炎症部位が採取できるように電気のござりで下顎を切断し、ホルマリンで固定した。また、唾液、血液及び尿を採取し、冷凍保存した。ヒトの歯周病では血清及び唾液中のTNF- α が特徴的に増加するため、歯周病マーカーとして利用されている。そこで母豚歯茎中のTNF- α mRNA発現量をreal-time PCR法で定

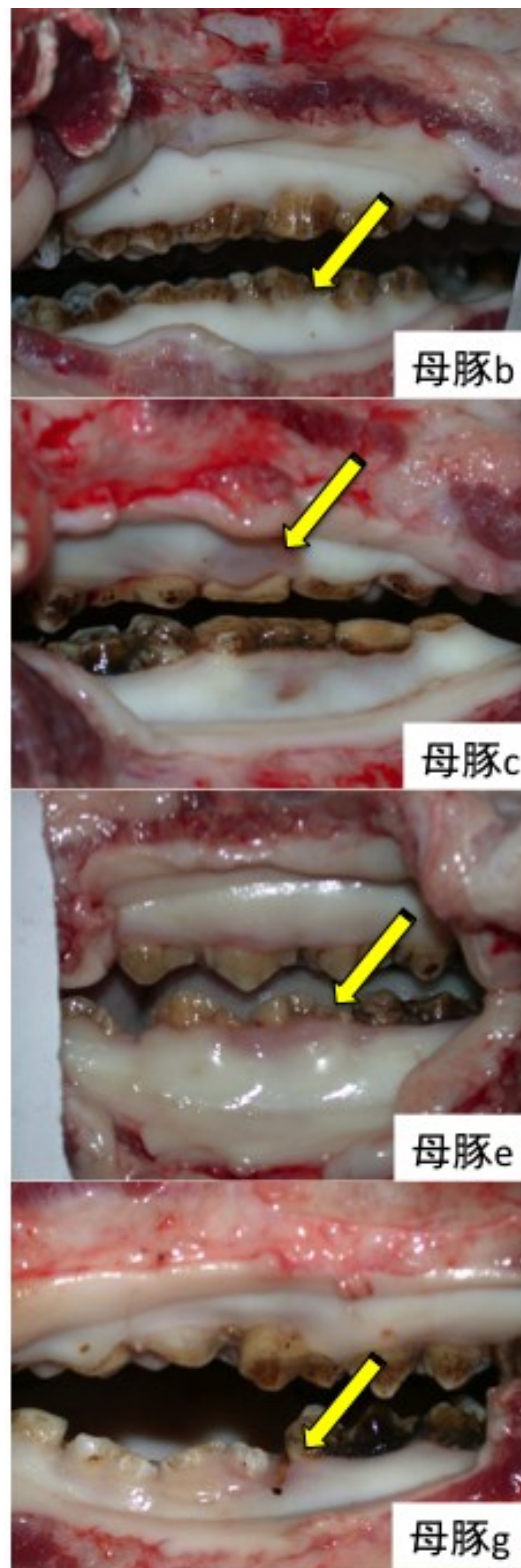


図1 低産歴母豚剖検時の歯茎写真の一例(矢印部を異常部位と判断)

量するとともに、唾液、血液及び尿中のTNF- α 濃度を市販ELISAキットで測定した。さらに歯垢から細菌ゲノムをTsukahara et al(2013)に準拠して抽出し、16S rRNA遺伝子(357f-926r)をターゲットとしたPCRを行った。PCR産物

に対して454FLXを用いたPyrosequencing法でメタ解析を実施した。

ホルマリン固定した下顎は、プランク・リュクロ液で脱灰後、常法によりパラフィン包埋、HE切片を作成し、病理組織学的検査を実施した。

3-2. 高産歴母豚の口腔環境

高産歴（6～11産）母豚7頭を供試した。分娩後、産仔のほ乳期間中の生育状況を調査した。唾液、血液、尿及び乳汁を採取し、冷凍保存した。また、産仔の採血も実施した。離乳後に母豚を出荷して、と畜場で頭部を回収した。口腔内を肉眼的に観察し、歯茎の炎症を確認した。赤く柔らかい部位を異常部位として、白く固い部位を正常部位としてmRNA発現用にサンプリングを行い、RNA-laterに各々浸漬した（図2）。出来るだけ炎症部位が採取できるように電気のこぎりで下顎を切断し、ホルマリン固定を行った。歯垢から3-1と同様に細菌ゲノムを抽出し、PCR後、Pyrosequencing法で菌叢解析を行った。ホルマリン固定した下顎も3-1と同様に病理組織学的検査に供した。唾液、血液、尿、乳汁及び産仔血液中のTNF- α 濃度を3-1と同様に市販LISAキットで測定した。歯茎中のTNF- α mRNA発現をreal-time PCR法で測定した。

4. 研究成果

4-1. 低産歴母豚の口腔環境

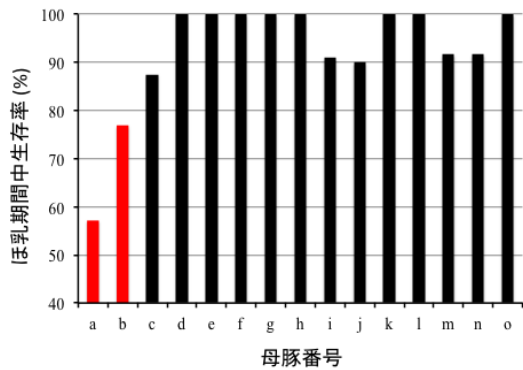


図3 低産歴母豚産仔のほ乳期間中生存率

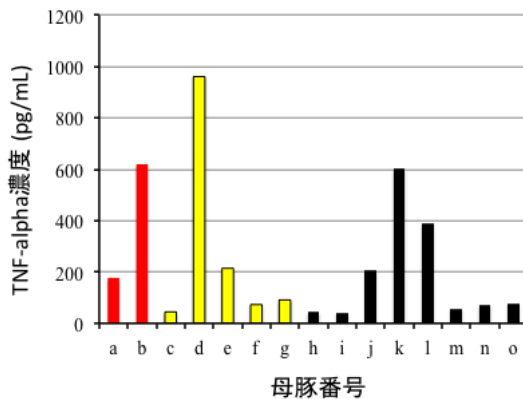


図4 低産歴母豚血清中のTNF-alpha濃度

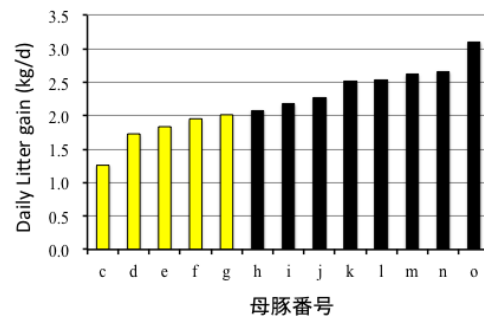


図5 低産歴母豚産仔ほ乳期間中の日増体

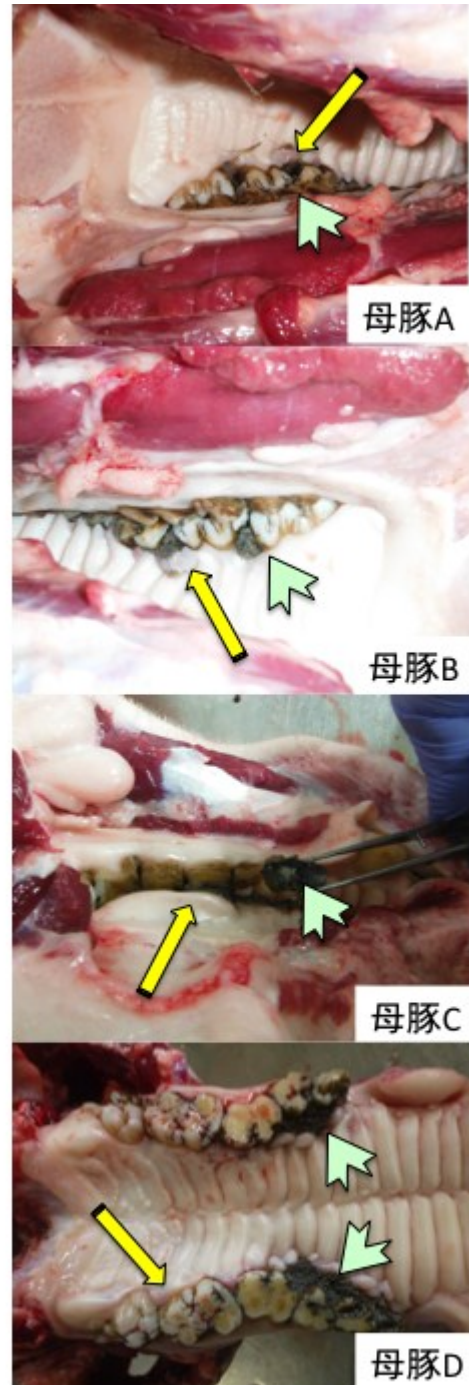


図2 高産歴母豚剖検時の歯茎写真の一例（矢印部を異常部位と判断；矢頭部は大量の歯垢）

供試母豚全頭において、分娩前、分娩中からほ乳期間中を通して、一般的な臨床状態や

飼料摂取量に異常は認められなかった。14頭の母豚の中で、明らかに育成成績の悪い2頭(ほ乳期産仔生存率母豚a, 57%又は母豚b, 77%)は(図3), 歯肉中のTNF- α mRNA発現が顕著に高値を示し, 血清中TNF- α 濃度も中央値(91 pg/mL)よりも高値を示した(図4)。他の12頭のは乳期間中生存率は約90%以上を示したため, 母豚の産仔育成能力の指標として産仔総日増体(kg/d)を選択した(図3)。産仔育成能力の明らかに低い母豚5頭(母豚c~g, 1.26-2.01 kg/d)では, 産仔数が明らかに少ない1頭(母豚f, 産仔数6頭)を除き, 血清中TNF- α 濃度(図4)もしくは歯肉中のTNF- α mRNA発現はが顕著に高値を示した(図6)。

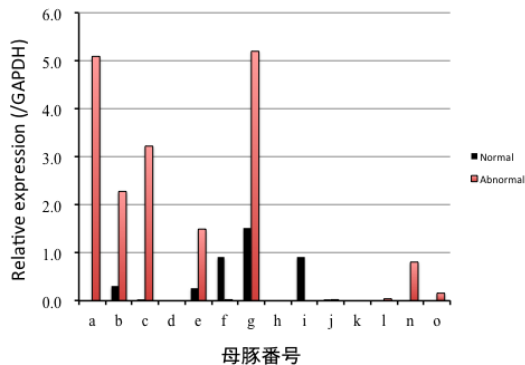


図6 低産歴母豚歯肉正常部位及び異常部位におけるTNF- α mRNA発現

産仔育成成績の高かった半数の母豚(母豚h~n)は歯肉中のTNF- α mRNA発現は検出されないうか検出されても微量であった。一方で, 唾液中と血清中TNF- α 濃度間, 唾液中TNF- α 濃度と歯肉TNF- α mRNA発現間に明確な相関は認められなかった。また, 尿中からTNF- α は殆ど検出されなかった(data not shown)。

産仔育成成績と歯垢細菌構成を検討したところ, 産仔育成能力が低い母豚はBacteroidaceae科及びPorphyromonadaceae科の占有率が高くなる傾向にあった(図7)。

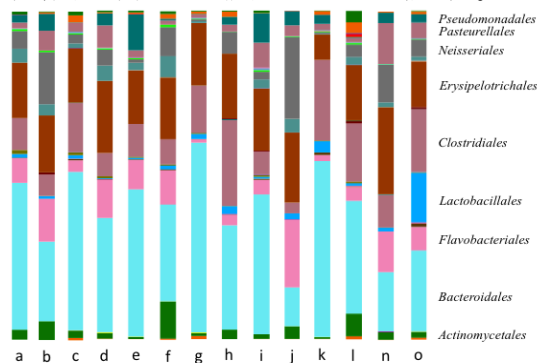


図7 低産歴母豚歯垢内細菌叢解析結果(目レベルで表示)

一方で, 病理組織学的検査の結果, 全母豚の歯肉に炎症性細胞の軽度から重度の浸潤が認められたが, 歯肉TNF- α mRNA発現や産仔育成成績との相関は認められず, また歯槽骨の吸収も認められなかった(図8, 9)。

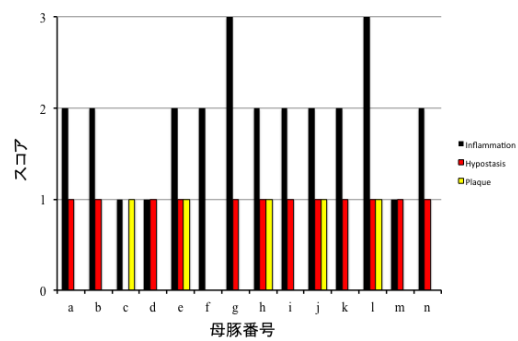


図8 低産歴母豚歯茎の病理組織学的検査
病理スコア: 0, 異常なし; 1, 軽度異常; 2, 中等度異常; 3, 重度異常
歯垢スコア: 0, プラークなし; 1, プラークあり

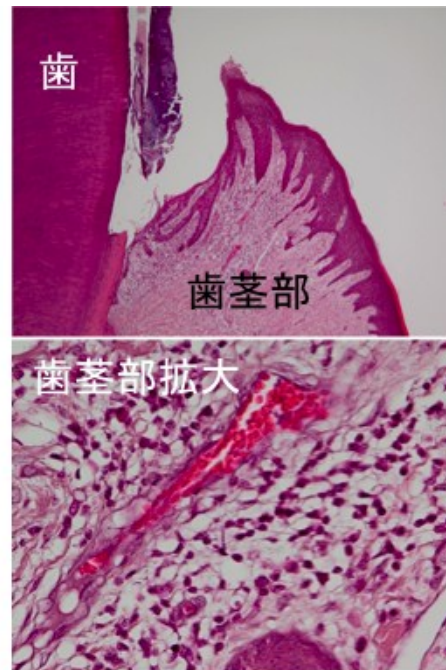


図9 歯茎組織の一例(母豚f)
リンパ球, 形質細胞主体の浸潤
↓
慢性歯肉炎

4-2. 高産歴母豚の口腔環境

供試母豚全頭において, 分娩前, 分娩中からは乳期間中を通して, 一般的な臨床状態や飼料摂取量に異常は認められなかった。

7頭の母豚を産仔のは乳期生存率を元に分類した(図10)。その結果, 著しくは乳期間

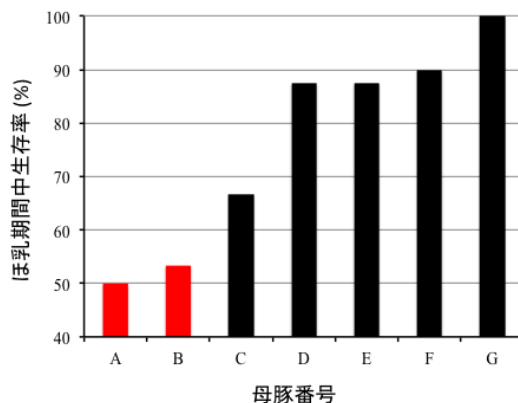


図10 高産歴母豚産仔のは乳期間中生存率

中産仔生存率が低かった2頭の血清及び初乳から高濃度のTNF- α が検出された(図11)。また、初乳中に著しく高濃度(4,000 pg/mL以上)でTNF- α が検出された個体は血清中TNF- α 濃度も高値を示す傾向にあった。一方で、唾液中と血清中TNF- α 濃度間に明確な相関は認められなかった。また、尿中からTNF- α は殆ど検出されなかった。

歯茎組織中のTNF- α mRNA発現を解析し

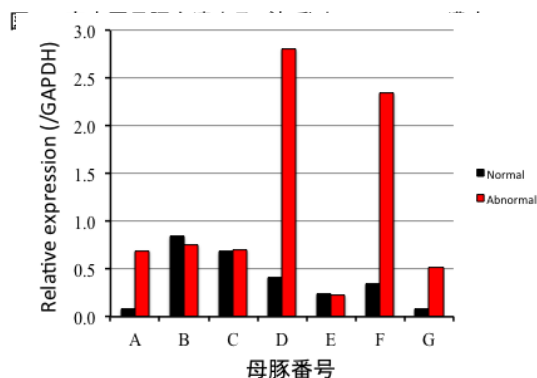
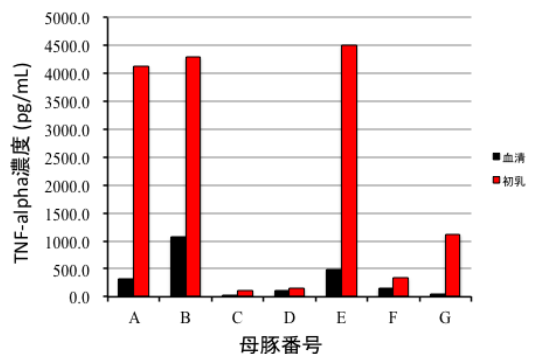


図12 高産歴母豚歯肉正常部位及び異常部位におけるTNF-alpha mRNA発現

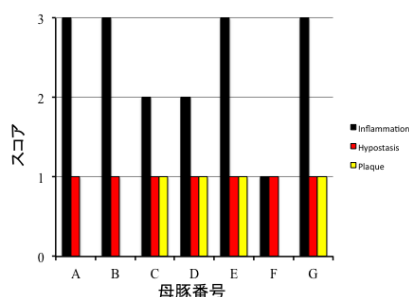


図13 低産歴母豚歯茎の病理組織学的検査
 病理スコア: 0, 異常なし; 1, 軽度異常; 2, 中等度異常; 3, 重度異常
 歯垢スコア: 0, ブラークなし; 1, ブラークあり

たところ、低産歴母豚と異なり高産歴母豚は正常部位として採材した部位についてもTNF- α mRNAは高発現する傾向にあった。一方で、異常部位として採材した部位は清浄部位よりもさらにTNF- α mRNAは高発現しており、歯肉の炎症が起こっていることが示唆された(図12)。

母豚下顎部の病理組織学的検査を行ったところ、全頭の歯肉で炎症性の変化が認められ、産仔生存率が低い母豚歯肉は重度の炎症が起こっていた。一方で、歯肉が重度に炎症を起こしていた母豚についても顕著な歯槽

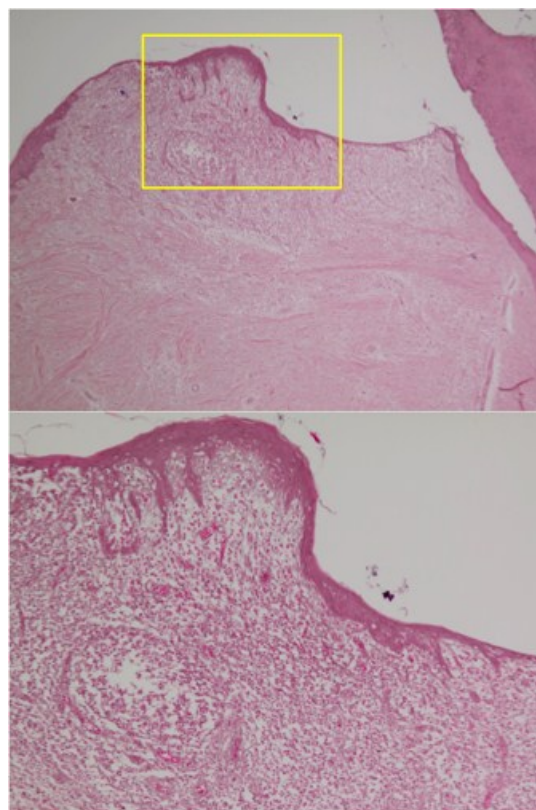


図14 歯茎組織の一例(母豚A)
 重度歯肉炎

骨の吸収は認められなかった(図13, 14)。

初乳中のTNF- α 濃度が顕著に高値を示した4頭は歯肉が重度の炎症を起こしており、歯周の状態と乳汁成分の間に何らかの関連性のあることが疑われた。

産仔のは乳期間生存率を元に口腔内細菌構成の分類を行ったところ、生存率が低かった母豚口腔内には *Odoribacter* 属, *Filifactor* 属, *Phascolarctobacterium* 属, *Fusobacterium* 属, *Treponema* 属が高占有していた。一方で、*Porphyromonas* 属の占有率は低下した(図15)。

高占有した菌群は歯周病患者から頻りに分離される菌群であることから、産仔生存率と口腔内細菌構成との関係が示唆された。また、*Treponema* 属はとくに炎症を惹起させることが知られており、炎症との関連が強く疑われた。

4-3. 総括

高産歴母豚では、骨吸収は起こっていないもの、歯肉炎を発症した母豚中の口腔内細菌構成は歯周病関連菌が高い占有率を示すようになり、血清中及び初乳中TNF- α 濃度が顕著に高値を示し、産仔の生存率に悪影響を及ぼす可能性が示唆された。

また、低産歴母豚では、高産歴母豚と同じく骨吸収は起こっていないものの、歯の抜け替わりによると思われる歯茎炎症は確認でき、TNF- α が歯茎で亢進している個体については、産仔育成率が低下する傾向が認められた。

以上の結果から、経験的に産仔成長が悪化すると考えられている初産~1産、及び高産歴の母豚については、歯茎の炎症が産仔成長悪化の一因となる可能性が示唆された。繁殖

母豚の慢性炎症については、全世界的にも研

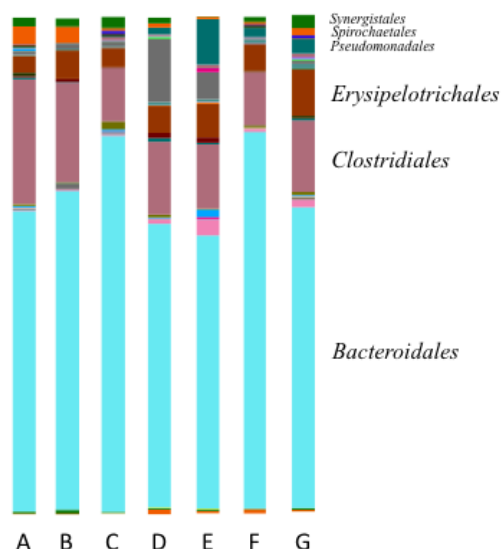


図15 高産歴母豚歯垢内細菌叢解析結果
(目レベルで表示)

究が殆ど行われていない分野であり、本研究結果は今後の養豚産業発展の基礎となる重要な知見であると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 0 件)

〔学会発表〕 (計 0 件)

〔図書〕 (計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

とくになし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

牛田一成 (USHIDA Kazunari)

京都府立大学・生命環境科学研究科・教授

研究者番号：50183017

(2) 研究分担者

塚原隆充 (TSUKAHARA Takamitsu)

京都府立大学・生命環境科学研究科・研究員

員

研究者番号：90562091

井上亮 (INOUE Ryo)

京都府立大学・生命環境科学研究科・講師

研究者番号：70443926