

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 27 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25670873

研究課題名(和文) 伴侶動物からの歯周病原性細菌の伝播による歯周病悪化メカニズムの解明

研究課題名(英文) Mechanism of aggravation of periodontitis caused by periodontitis-related bacteria transmitted from companion animals

研究代表者

野村 良太 (Nomura, Ryota)

大阪大学・歯学研究科(研究院)・准教授

研究者番号：90437385

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：これまでに、犬とその飼い主との間の歯周病原性細菌の伝播に関する報告はほとんどない。本研究では、犬の主要な歯周病原性細菌として知られている *Porphyromonas gulae* を含むいくつかの歯周病原性細菌種が、犬とその飼い主の両方から検出されることを示した。*P. gulae* には約41kDaの線毛タンパクであるFimAが存在し、A、B、C型に分類される。このうちC型のFimAを保有する *P. gulae* は、僧帽弁閉鎖不全症にも関与していることが示された。

研究成果の概要(英文)：Information regarding transmission of periodontitis-related bacterial species between dogs and their owners is limited. In the present study, we detected periodontitis-related species in both dogs and their owners including *Porphyromonas gulae*, known to be a major bacterial pathogen of periodontitis in dogs. *P. gulae* possesses approximately 41-kDa filamentous appendages (FimA), which have been classified into three major genotypes; A, B, and C. Our results showed that *P. gulae* with FimA genotype C was associated with mitral regurgitation in dogs.

研究分野：歯学

キーワード：歯周病原性細菌 伴侶動物 *Porphyromonas gulae* 犬 FimA 僧帽弁閉鎖不全症 線毛型 伝播

1. 研究開始当初の背景

歯周疾患は人類で最も蔓延している疾患の一つであるが、ヒトと比較して日々のブラッシングが困難な犬では、その罹患率はさらに高いと考えられている。歯周疾患は歯肉に限局した炎症を生じる歯肉炎と歯周組織の不可逆性の破壊を伴う歯周炎に大別される。ほぼすべての犬が歯肉炎に罹患し、半数以上の犬が歯周炎に罹患していると報告されている。一方で、ヒトの歯周疾患は多数の歯周病原性細菌による複合感染症であることが明らかになっているのに対し、歯周疾患に罹患した犬の歯肉溝において棲息する歯周病原性細菌叢に関してはほとんど明らかになっていない。そこで、ヒトの主要な歯周病原性細菌が犬の口腔内にも存在するかどうかを明らかにすることにした。約 140 匹の犬の口腔サンプルから細菌 DNA を抽出し、PCR 法によりそれぞれの菌種の検出を試みたところ、ヒトの歯周病原性細菌の多くが検出されたことから、犬においても複数の細菌種が歯周疾患の発症および進行に関与している可能性が明らかとなった。

これまでに、ヒトにおいて最も歯周病原性が高い細菌の 1 つとして認識されている *Porphyromonas gingivalis* と遺伝学的に高い相同性を有するイヌの主要な歯周病原性細菌である *Porphyromonas gulae* の存在が報告されている。また、*P. gulae* には、*P. gingivalis* の菌体表層に存在する約 41kDa の線毛タンパク質 (FimA) に類似したタンパクが存在することが明らかになっている。これまでに、18 匹のイヌの口腔サンプルから 18 株の *P. gulae* を分離し、これらの *P. gulae* 株から抽出したゲノム DNA を用いて、*fimA* 遺伝子配列を特定した。その結果、*P. gulae* の *fimA* 遺伝子は、アミノ酸配列の違いにより A/B/C 型の 3 種に分類されることが明らかになった。次に、A/B/C 型の線毛型を保有するそれぞれの *P. gulae* 菌株をマウスに感染させることにより、各線毛型を保有する *P. gulae* の病原性の評価を行った。各線毛型のうち、C 型の線毛を発現している *P. gulae* 株をマウスの腹腔より感染させると、体重の著しい減少、腹腔における膿瘍形成および組織壊死、血清 CRP 値の上昇などを認め、その病原性は *P. gingivalis* の中で最も病原性の強い菌株を凌ぐことを明らかにした。

2. 研究の目的

ヒトの歯周病の発症には、歯周病原性細菌の感染によるプラークの形成に加え、宿主の局所的要因、および宿主の全身的要因などが危険因子と考えられてきた。これまでの研究から、ヒトにおける主要な歯周病原性細菌のほとんどが犬からも検出されることを明らかにした。しかしながら、これらの菌の犬とヒトの間における伝播に関する詳細は未だ明らかになっていない。そこで本研究では、犬とその飼い主から口腔サンプルを採取し、

各種歯周病原性細菌の検出頻度を飼い主と犬との接触頻度に着目し、その相関について検討を行いたいと考えた。それにより、飼い主にとっては犬の歯周病原性細菌の存在が、犬にとっては飼い主の歯周病原性細菌の存在が、歯周病の重要なリスク要因となり得ることを示せるのではないかと考えた。本研究では、歯周病原性細菌がヒトと犬との間で伝播する可能性があるかどうかを明らかにすることを目的とした。

犬の最も主要な歯周病原性細菌である *P. gulae* は、ほとんどの犬の口腔内に認められ、*P. gulae* を保有するイヌでは、歯肉炎および歯周炎に罹患し、多量のプラークや歯石が沈着しているものが数多く認められる。ヒトにおいては、歯周病原性細菌と各種の全身疾患に関連が注目されているが、犬における報告はほとんどない。このような背景から、*P. gulae* と犬において最も多く認められる全身疾患の一つである僧帽弁閉鎖不全症との関連に着目し、分析を行うことにした。

P. gulae の約 41kDa の線毛タンパク質は A/B/C 型に分類され、C 型の線毛型を保有する *P. gulae* 菌株が最も強い病原性を有することを明らかにした。しかしながら、その研究は生菌を用いたものであり、線毛タンパク以外の病原性に関与する菌体表層構造物を多く含んでいるため、C 型の線毛そのものが強い病原性を有することを示すには至っていない。本研究では、A/B/C 型のそれぞれの線毛型に分類される *P. gulae* 菌株から、リコンビナント FimA タンパクを精製し、それぞれの FimA タンパクの病原性の評価を行うことにした。

これまで、A/B/C 型のそれぞれの線毛型を保有する *P. gulae* 菌株の病原性の評価をマウスを用いて行ってきた。一方で最近では、様々な菌の病原性の評価にカイコが用いられるようになってきている。カイコはヒトの臓器に相当する器官を持ち生理条件がヒトに近いと考えられており、哺乳動物に代わる試験法として認識されつつある。本研究においても、動物愛護の観点から有益であり、哺乳動物を用いた試験よりも迅速かつ簡便に結果を得ることのできるカイコを用いた *P. gulae* の病原性の評価法を確立したいと考えた。

3. 研究の方法

(1) 犬とその飼い主からの歯周病原性細菌の検出と接触度に関する検討

岡山市内の動物病院とドッグトレーナーに協力いただき、飼い主 123 家族 (2~82 歳の 169 人; 男性 45 名、女性 124 名) と犬 144 匹 (0~14 歳; オス 53 匹、メス 91 匹) の歯肉縁下プラークを綿棒で採取し、滅菌生理食塩水で懸濁した後、DNA 抽出を行った。分析対象とした菌種はヒトの主要な歯周病原性細菌として知られている *Treponema denticola*、*Capnocytophaga ochracea*、*Capnocytophaga*

sputigena、*Prevotella intermedia*、*Prevotella nigrescens*、*Aggregatibacter actinomycetemcomitans*、*Tannerella forsythia*、*Eikenella corrodens*、*Campylobacter rectus*、*Porphyromonas gingivalis*の10菌種と*P. gulae*を加えた11菌種とした。これらの各菌種に対する特異的プライマーを用いたPCR法を行った。さらに、飼い主とその家族に問診を行い、家族と犬との接触頻度を「屋内で飼い頻繁に接触：2B (n=158)」、「屋外で飼い頻繁に接触：2A (n=13)」、「屋内で飼い低頻度で接触：1B (n=13)」、「屋外で飼い低頻度で接触：1A (n=24)」、「接触しない：0 (n=1)」の5群に分類し、検出される菌種との相関関係を分析した。

(2) 僧帽弁閉鎖不全症の犬における*P. gulae* FimA型の分布の特定

アメリカ獣医内科学会の分類およびLevine分類により僧帽弁閉鎖不全症と診断された25匹の犬(6~13歳;オス18匹、メス7匹)と健康な32匹(8~13歳;オス17匹、メス15匹)の犬を対象とした。これらの犬の口腔サンプルから抽出した細菌DNAを1/10、1/100、1/1000に段階希釈した。段階希釈したそれぞれの細菌DNAを鋳型として、*P. gulae*の検出を行った。さらに、*P. gulae*の各種線毛型に特異的な検出プライマーを用いてPCR法を行い、それぞれの犬において有意な線毛型を特定した。

(3) リコンビナントFimAタンパクの精製

犬の歯垢から抽出したDNAを、*P. gulae*のA/B/C型に対応する特異的プライマーを用いたPCR法によって増幅し、タンパク発現用プラスミドPET42a(+)にライゲーションさせ、タンパク発現用大腸菌*Escherichia coli* BL21(DE3)株に形質転換させた。得られた菌をタイプ別(type A/B/C、PET42a(+))にLB液体培地で一定の濁度に達するまで培養後、IPTG(Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside)を加えてさらに培養し、リコンビナントFimAタンパクを産生させた。培養後は菌液中の菌体を超音波で破碎し、遠心分離した後上清のみをGST(Glutathione S-transferase)カラムに通すことでタンパクをグルタチオン溶液に分離・溶出させた。得られた溶液は凍結乾燥後、SDS-PAGEおよびWestern blottingにより、A/B/C型のタンパクの大きさに相当する約75kDaのタンパクが認められることを確認した。

(4) カイコを用いた病原性の評価

5令のカイコ60頭を、A/B/C型のリコンビナントタンパクを感染させる各10頭ずつ、およびA/B/C型のリコンビナントタンパクを含まないPET42a(+)ベクターのみを感染させる10頭、PBSのみを投与する20頭の5群に分けた。各群のカイコに対応するタンパク

の希釈液およびPBSを腹腔内注射した。タンパク投与後のカイコは37℃で12日間飼育し、12時間ごとに生存数を記録した。

4. 研究成果

(1) 犬とその飼い主からの歯周病原性細菌の検出と接触度に関する検討

分析対象とした歯周病原性細菌のうちヒトからは11菌種全てが検出され、犬からは*A. actinomycetemcomitans*を除く10菌種が検出された。ヒトでは*C. sputigena*および*E. corrodens*の検出率が最も高くそれぞれ28.4%と27.8%であった。一方、犬では*T. forsythia*(70.8%)と*C. rectus*(68.1%)が高い検出率であった。また、*P. gulae*はヒトでは10.7%、犬では64.6%検出され、犬の歯周病原性細菌である*P. gulae*がヒトからも検出されることが示された。検出された菌種と接触頻度との相関関係を分析した結果、最も接触頻度の高い2Bグループでは、犬と飼い主の両方で*P. intermedia*と*T. denticola*が有意に高い頻度で検出され、*P. gulae*においても有意に高い頻度で検出された。一方で、2B以外のグループでは検出率と接触度との間に相関関係は認められなかった。

(2) 僧帽弁閉鎖不全症の犬における*P. gulae* FimA型の分布の特定

*P. gulae*は僧帽弁閉鎖不全症罹患群の犬25匹のうち24匹(96.0%)から検出され、健康群の犬32匹のうち30匹(93.8%)から検出された。*P. gulae*が検出されたもののうち、A型の線毛型を有する*P. gulae*は、健康群では53.1%、僧帽弁閉鎖不全症罹患群では20.0%の割合で存在し、健康群では僧帽弁閉鎖不全症罹患群と比較して有意に高い頻度で検出された。B型の線毛型を有する*P. gulae*は、健康群、僧帽弁閉鎖不全症罹患群ともに約12%であり有意差を認めなかった。一方で、C型の線毛型を有する*P. gulae*は、健康群では18.8%、僧帽弁閉鎖不全症罹患群では48.0%の割合で存在し、僧帽弁閉鎖不全症罹患群では健康群と比較して有意に高い頻度で検出された。これらの結果から、C型の線毛を保有する*P. gulae*は犬において僧帽弁閉鎖不全症に関連している可能性が示唆された。

(3) カイコを用いた病原性の評価

A/B/C型のいずれのFimAタンパクを投与したカイコにおいても、非投与群と比較して生存率の低下が認められた。特に、非投与群と比較してB型およびC型のFimAタンパクを投与群では有意に高い病原性を示した。A/B/C型のそれぞれにおいて比較を行うと、A型と比較して、B型およびC型で有意に高い病原性を示した。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者に

は下線)

〔雑誌論文〕(計1件)

1. Hirai N, Shirai M, Kato Y, Murakami M, Nomura R, Yamasaki Y, Takahashi S, Kondo C, Matsumoto-Nakano M, Nakano K, Asai F. Correlation of age with distribution of periodontitis-related bacteria in Japanese dogs. J Vet Med Sci. 75: 999-1001,2013.
2. Takahashi S, Kuratani M, Tanaka M, Ito T, Kanemaki N, Shirai M, Nomura R, Nakano K, Asai F. Measurement of oral counts in dogs by dielectrophoretic impedance. Fund Toxi Sci. (in press).

〔学会発表〕(計2件)

1. Yamasaki Y, Nakano K, Nomura R, Asai F, Matsumoto-Nakano M. Distribution of periodontitis-related bacterial species in dogs in same facility. 2nd Meeting of International Association of Dental Research-Asia Pacific Region. 2013.8.21, Bangkok, Thailand
2. 吉田翔, 山崎由衛, 仲野和彦, 仲周平, 野村良太, 仲野道代 犬とその飼い主における歯周病原細菌の伝播と接触度に関する検討 第52回日本小児歯科学会大会, 2014.5.16, 東京

〔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〕

ホームページ等

<http://web.dent.osaka-u.ac.jp/%7Epedo/research/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

野村 良太 (NOMURA, Ryota)
大阪大学・歯学研究科・准教授
研究者番号: 90437385

(2) 研究分担者

仲野 道代 (NAKANO, Michiyo)
岡山大学・医歯(薬)学総合研究科・教授
研究者番号: 30359848

浅井 史敏 (ASAI, Fumitoshi)
麻布大学・獣医学部・教授
研究者番号: 00511677