

氏名	山崎 由衛		
学位	博士		
専門分野の名称	歯学		
学位授与番号	博甲第4743号		
学位授与の日付	平成25年3月25日		
学位授与の要件	医歯薬学総合研究科社会環境生命科学専攻 (学位規則(文部省令)第4条第1項該当)		
学位論文題目	Distribution and molecular characterization of Porphyromonas gulae carrying a new fimA genotype (新規 fimA 型 Porphyromonas gulae の分布とその分子生物学的特徴)		
学位論文審査委員	大原 直也 教授	仲野 道代 教授	
	前田 博史 准教授		

学位論文内容の要旨

【緒言】

近年、犬をはじめとした伴侶動物と生活をともにする人が増加しており、その口腔ケアに対する関心も高まってきている。犬における歯周病の罹患率は非常に高いとされているが、犬の口腔内における歯周病原細菌の分布に関する研究は少ない。

犬の歯肉溝に存在する *Porphyromonas gulae* は、ヒトにおける主要な歯周病原細菌である *Porphyromonas gingivalis* と類縁菌種であり、その菌体表層に存在する分子量 41kDa のサブユニットであるフィブリリントタンパク (FimA) と、それをコードする *fimA* 遺伝子の配列が明らかになっている。

本研究では、犬における各種歯周病原細菌の分布を検討するとともに、*P. gulae* の FimA と歯周状態との関連を分析することにした。

1. 歯周病原細菌種の検出

犬のデンタルプラーク検体を上顎左側臼歯部頰側より採取後、細菌 DNA の抽出を行い、ヒトにおける主要な歯周病細菌 10 種に *P. gulae* を加えた 11 菌種に特異的プライマーを用いた PCR 法によって、それぞれの菌種の存在を検討した。

2. *P. gulae* 株の分離と *fimA* 配列の特定および分類

26 匹の犬から採取したデンタルプラーク検体を、ヘミンおよびメナジオン含有の血液寒天培地に播種し、7 ~ 10 日嫌気培養することで、*P. gulae* 18 株の分離を行った。そして、*P. gingivalis* における 6 タイプの *fimA* 遺伝子配列を参考に作製したプライマーを使用した PCR 法によって *fimA* 遺伝子全長の増幅を行い、それらの遺伝子配列を決定した。その後、各株の *fimA* 遺伝子配列をもとに系統樹を作製し、*P. gulae* における *fimA* 型分類法を検討した。さらに、各タイプに特異的な遺伝子配列領域にプライマーを設計することで、プラーク検体から簡易的に各タイプを識別できる PCR 検出系の確立を試みた。

3. プラーク検体中の歯周病原細菌種の検出と *P. gulae fimA* 型の分析

プラークサンプルから細菌 DNA を抽出し、11 菌種それぞれに特異的なプライマーを用いた PCR 法によって、各菌種の存在を検討した。また、*P. gulae* が検出された検体に対しては、2. で確立した PCR 系を用いて各 *fimA* タイプの決定を行った。

4. *P. gulae* 分離株の病原性の評価

マウス膿瘍形成モデルとして、40日齢のマウスの背部に 1×10^9 CFU 相当の菌を皮下に投与後2週間にわたって生じる全身性炎症状態をモニターし、各菌株の病原性を評価した。また、口腔扁平上皮癌細胞である SAS 細胞培養細胞を用いて、菌が感染した SAS 細胞における細胞数の変化を、細胞増殖アッセイにより評価した。また、感染した SAS 細胞の細胞遊走能を評価するためにスクラッチアッセイを行った。

【結果】

犬のデンタルプラークでは、ヒトで検出される歯周病原細菌種のうち *Tannerella forsythia* および *Campylobacter rectus* が高頻度で検出された。また、ヒトでは極めて低い頻度でしか検出されない *P. gulae* が高頻度で検出されることが明らかになった。

犬のプラークサンプルから分離した *P. gulae* 18株の *fimA* 配列を特定し FimA の推定アミノ酸配列を基に系統樹を作製したところ、大きく3つのタイプに分類できることが明らかになった。そこで、*P. gulae* 特有の配列を含むタイプを A 型、*P. gingivalis* の *fimA* III 型に近いタイプを B 型とし、*P. gingivalis* の *fimA* IV 型に近いタイプ C 型と定義した。

各タイプの菌の病原性を、マウス膿瘍形成モデルによって評価した結果は、C 型株が最も強い全身炎症を惹起することが示された。また SAS 細胞を用いた分析の結果、C 型株は強い細胞傷害性を誘発することが明らかになった。実際に、歯周炎に罹患している犬のデンタルプラークからは、歯周状態が健全な犬と比較して、*P. gulae* の検出率が有意に高く、C 型含む複数の *fimA* 型の陽性率が有意に高いことが示された。

【考察】

犬の口腔内には、ヒトで検出される歯周病原細菌種が多く存在した。特に、*P. gulae* の存在は犬における歯周病の発症に関連があることが示唆されるとともに、その菌体表層の FimA には多様性があり、特定のタイプが強い病原性を示すことが想定された。

学位論文審査結果の要旨

近年、犬をはじめとした伴侶動物と生活をともにする人が増加しており、その口腔ケアに対する関心も高まってきている。犬における歯周病の罹患率は非常に高いとされているが、犬の口腔内における歯周病原細菌の分布に関する研究は少ない。犬の歯肉溝に存在する *Porphyromonas gulae* は、ヒトにおける主要な歯周病原細菌である *Porphyromonas gingivalis* と類縁菌種であり、その菌体表層に存在する分子量 41kDa のサブユニットであるフィブリリタンパク (FimA) と、それをコードする *fimA* 遺伝子の配列が明らかになっている。

本研究では、犬における各種歯周病原細菌の分布を検討するとともに、*P. gulae* の FimA と歯周状態との関連についても分析した。

研究結果は、以下の内容であった。

1. 犬のデンタルプラーク検体を採取後、細菌 DNA の抽出を行い、ヒトにおける主要な歯周病原細菌 10 種に *P. gulae* を加えた 11 菌種の存在を PCR 法によって検出した。犬のデンタルプラークでは、*Tannerella forsythia* および *Campylobacter rectus* が高頻度で検出されたまた、ヒトでは極めて低い頻度でしか検出されない *P. gulae* が高頻度で検出された。
2. *P. gingivalis* における 6 タイプの *fimA* 遺伝子配列を参考に作製したプライマーを使用した PCR 法により、犬のデンタルプラーク検体から分離した *P. gulae* 18 株の *fimA* 遺伝子全長の増幅を行い、それらの遺伝子配列を決定した。その後各株の *fimA* 遺伝子配列をもとに系統樹を作製し、*P. gulae* における *fimA* 型分類法を検討した。その結果、大きく 3 つのタイプに分類できることが明らかになった。*P. gulae* 特有の配列を含むタイプを A 型、*P. gingivalis* の *fimA* III 型に近いタイプを B 型とし、*P. gingivalis* の *fimA* IV 型に近いタイプ C 型と定義した。
3. *P. gulae* 分離株の病原性の評価を行うために、マウス背部に 1×10^9 CFU 相当の菌株を感染させたマウス膿瘍モデルを用いて、各 *fimA* 型を有する菌株の病原性を評価したところ、C 型株が最も強い全身炎症を惹起することが示された。また、口腔扁平上皮癌細胞である SAS 株化細胞を用いて、菌株感染後の細胞増殖能および細胞遊走能を評価した結果、C 型株は強い細胞傷害性を誘発することが明らかになった。歯周状態が健全な犬と比較して、歯周炎に罹患している犬のデンタルプラーク中の *P. gulae* の検出率が有意に高く、C 型を含む複数の *fimA* 型の陽性率が有意に高いことが示された。

これらの結果から、*P. gulae* の存在は犬における歯周病の発症と関連性があることが示唆された。また、その菌体表層の FimA には多様性があり、その特定のタイプが強い病原性を示すことが示唆された。

以上に基づき、審査委員会は本申請論文に博士（歯学）の学位論文として価値があるものと認めた。