

氏名	吉田 翔
授与した学位	博士
専攻分野の名称	歯学
学位授与番号	博甲第5507号
学位授与の日付	平成29年3月24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 (学位規則第4条第1項該当)
学位論文の題目	カイコモデルを用いた <i>Porphyromonas gulae</i> FimA の病原性機能の解析
論文審査委員	大原 直也 教授 友藤 孝明 准教授 仲野 道代 教授

学位論文内容の要旨

【目的】

動物由来歯周病原菌 *Porphyromonas gulae* は犬の歯周病変部位から高頻度で検出されるだけでなく、伴侶動物と生活を共にするヒトの歯周病変部位からも検出されることから、歯周病は人獣共通感染症である可能性が示唆されている。*P. gulae* はヒト由来歯周病原菌 *Porphyromonas gingivalis* と同様に線毛を有する。すでに線毛構成サブユニット FimA をコードする遺伝子 *fimA* の塩基配列の違いに基づき A / B / C 型に分類され、線毛タイプ別に病原性を持つ可能性が示唆されている。本研究では、カイコモ感染モデルを用いて、*P. gulae* の線毛が保有する宿主病原性を明らかにした。さらに線毛を標的にした病原性の抑制について着目し、クリンダマイシンや抗線毛抗体が *P. gulae* 線毛による病原性発揮に与える影響について検討した。

【材料と方法】

1. 供試菌株と培養条件

犬由来歯周病細菌 *P. gulae* ATCC51700 株 (A 型線毛保有株)、D040 株 (B 型線毛保有株)、D049 株 (C 型線毛保有株) を供試株とした。組換え線毛タンパクの作製には、大腸菌 BL21 株と DH5 α 株を使用した。

2. 組換え線毛タンパクの作製

線毛遺伝子は、犬のデンタルプラークから抽出した DNA を鋳型として *fimA* タイプ別特異的プライマーを用い、Polymerase Chain Reaction (PCR) 法により増幅し、得られた PCR 産物を GST タンパク発現用ベクター pET42a (+) に挿入したプラスミドを作製した。得られたプラスミドを大腸菌 BL21 株に形質転換し、カナマイシン含有 2 \times Yeast extract-Tryptone (2YT) 培地にて大量培養し、対数増殖期に 1 mM イソプロピル β -D-1-チオガラクトピラノシドを添加し、37 $^{\circ}$ C にて 3 時間培養した。培養後菌体を回収し、菌体を破砕し遠心後上清から目的タンパクを精製した。

3. 抗生物質による *P. gulae* 増殖能抑制の検討

ATCC51700 株、D040 株ならびに D049 株を、最終濃度 0.005~0.4 μ g/ml になるようクリンダマイシン、アンピシリン、メトロニダゾール、ゲンタマイシンを添加した Tryptcase Soy Broth (TSB) 液体培地に培養した。37 $^{\circ}$ C 嫌気条件下で 24 時間培養後、マイクロプレートリーダーを用いて、波長 595 nm で吸光度を測定した。

4. 抗線毛抗体の作製

各線毛タイプ別組換え体線毛タンパク 2mg を含む油中水滴をウサギ背側皮下に注入した。7日後にウサギ背側皮下に注射し、0～6日目に採取した血液から血清を得て抗線毛抗体とした。抗体価は ELISA 法で測定し、最も抗体価の高い3日目の血清を以後の実験に用いた。

5. カイコモデルを用いた病原性の評価

5令のカイコ幼虫に各線毛タイプ別 *P. gylae* (5×10^7 cfu) あるいは組換え体線毛タンパク 50 μ l (5 μ g) をカイコに腹腔内投与し感染させ、その直後にクリンダマイシンまたは抗線毛抗体を腹腔内投与し、37℃のインキュベーター中で10日間飼育し、12時間毎にカイコの生存数を測定した。

6. 統計学的分析

実験データは平均値±標準誤差で示した。有意差検定は、2群比較は Student's-t 検定を、多群比較は分散分析 (カプラン-マイヤー法) を行った後に 事後比較 として log-rank 検定を用いて行い、有意水準を 0.05% に設定し、p 値が有意水準を下回る場合に有意差ありと判断した。

【結果および考察】

C型保有 *P. gylae* 感染群は A型保有株感染群もしくは B型保有株感染群と比較し、早期にカイコの死亡が認められた。同様に、C型組換え体線毛タンパク投与群は、A型ならびに B型組換え体線毛タンパク投与群と比較し、早期にカイコの死亡が認められた。この結果から、C型線毛は高い病原性を有することが示唆された。クリンダマイシンは濃度依存性に *P. gylae* の増殖能を抑制し、特に C型線毛保有株においては 0.4 μ g/ml で 50% 以上の増殖阻害が認められた。アンピシリンも *P. gylae* の増殖能を有意に抑制したが、その抑制効果は、クリンダマイシンの方が有意に強い増殖能の抑制が認められた。一方、メトロニダゾール、ゲンタマイシンは抑制効果が認められなかった。さらに *P. gylae* 感染カイコにクリンダマイシンを投与したところ、C型線毛保有株によるカイコ致死活性を顕著に抑制した。これらの結果から、クリンダマイシンは C型線毛保有株の増殖を特異的に抑制する可能性が示唆された。線毛遺伝子別組換え体線毛タンパクを投与されたカイコに、各線毛タイプ別抗線毛抗体を添加したところ、組換え体 C型線毛タンパク投与群の生存率が顕著に改善された。さらに *P. gylae* 感染カイコモデルに対しても抗線毛抗体は C型線毛保有株感染群の生存率を顕著に回復させた。

以上の結果から、*P. gylae* の病原性は、線毛タンパクに基づく特異的なものであることが示唆された。*P. gylae* が有する線毛を標的とすることで、宿主に対する病原性を抑制し、効果的な治療法の確立へと繋がる可能性が示唆された。近年では *P. gylae* は伴侶動物を飼育するヒト歯周病変部位から検出が認められており、ヒトへの応用を検討する必要があると考えられる。

論文審査結果の要旨

動物由来歯周病原菌 *Porphyromonas gulae* は犬の歯周病変部位から高頻度で検出されるだけでなく、伴侶動物と生活を共にするヒトの歯周病変部位からも検出されることから、歯周病は人獣共通感染症である可能性が示唆されている。*P. gulae* はヒト由来歯周病原菌 *Porphyromonas gingivalis* と同様に線毛を有する。すでに線毛構成サブユニット FimA をコードする遺伝子 *fimA* の塩基配列の違いに基づき A / B / C 型に分類され、本菌が発揮する病原性も遺伝子型により異なる可能性が高い。本研究では、カイコモデル実験を用いて、*P. gulae* の線毛が保有する宿主に対する病原性を明らかにすることを目的とした。さらに線毛を標的とした病原性の抑制について着目し、クリンダマイシンや抗線毛抗体が *P. gulae* 線毛による病原性発揮に与える影響について検討した。

犬由来歯周病細菌 *P. gulae* ATCC51700 株 (A 型線毛保有株)、D040 株 (B 型線毛保有株)、および D049 株 (C 型線毛保有株) を供試株とした。犬のデンタルプラークから抽出した DNA をもとに大腸菌を用いて組換え線毛タンパクを作製した。5 令のカイコ幼虫への生菌感染ならびに組換え線毛タンパクによる刺激により、線毛の型別による病原性の違いを評価した。また、クリンダマイシン、アンピシリン、メトロニダゾール、およびゲンタマイシンを用いて抗生物質による各供試株の増殖抑制能を検討した。さらにクリンダマイシンおよび抗線毛血清による病原性の抑制を 5 令のカイコ幼虫を用いて評価した。有意差検定は、カプラン-マイヤー法により生存率曲線を作成した後に事後比較として log-rank 検定を用いた。また、統計分析には、Student's t-test と log-rank test を用いた。研究結果は以下の内容であった。

1. 各遺伝子型における *P. gulae* および線毛タンパクの病原性

C 型線毛保有 *P. gulae* 株感染群ならびに C 型組換え線毛タンパク投与群は、他群と比較してカイコの死亡が早期に認められた。

2. 各抗生物質による *P. gulae* 増殖抑制

クリンダマイシンは 4 種の抗生物質のうち最も低濃度でかつ濃度依存的に *P. gulae* の増殖を抑制した。特に C 型線毛保有株に対しては顕著であった。

3. クリンダマイシンおよび抗線毛血清によるカイコ生存率の改善

クリンダマイシンは C 型線毛保有株によるカイコ致死活性を顕著に抑制し、同様に各線毛タイプ別抗線毛血清は組換え C 型線毛タンパク投与群の生存率を顕著に改善した。さらに抗線毛血清は、C 型線毛保有株感染群のカイコの生存率を顕著に回復させた。

以上の結果から、C 型線毛が高い病原性を有することが示唆された。またクリンダマイシンは C 型線毛保有株の増殖を顕著に抑制することが明らかになった。クリンダマイシンならびに抗線毛血清は C 型線毛保有株の病原性を抑制したことから、線毛を標的とすることで *P. gulae* の増殖能を抑制し、さらに病原性の発現を抑制できる可能性が示された。本研究の成果は、*P. gulae* が有する線毛を標的とした治療法の確立へと繋がることが期待される。

本論文は、*P. gulae* の線毛が保有する宿主に対する病原性を解明する上で、重要な知見である。よって、審査委員会は本論文に博士（歯学）の学位論文としての価値を認める。