

指 導 教 授 氏 名	指 導 役 割
印	研究の総括的指導
印	
印	

学 位 論 文 要 旨

岡山大学大学院医歯薬学総合研究科

専攻分野	歯周病態学分野	身分	大学院生	氏名	田井 真砂子
論文題名	歯周病原細菌を原因とするヒトと伴侶動物の犬における人獣共通感染症検査に関する研究				
<p>【緒言】</p> <p>近年、ペットブームやペットセラピーの普及により、伴侶動物を原因とする人獣共通感染症が増加し、社会的な問題となっている。特にイヌは古くからヒトとの関わりが強い動物であり、飼育数が多いだけでなく、ペットの他に盲導犬やセラピードッグとしての役割も果たしており、ヒトにとって重要な伴侶動物である。ヒトとイヌはともに歯周病罹患率が高いため、両者が密な接触を日常生活の中で、歯周病原細菌が交差感染している可能性が考えられる。すでにヒトと伴侶動物のイヌとの間における歯周病原細菌の伝播を示唆する報告があるが、実態は不明な点が多い。</p> <p>そこで本研究では、ヒトで確立されているリアルタイムPCR法を用いた細菌DNA検査およびELISA法を用いた血清IgG抗体価検査を応用し、ヒトとイヌにおける歯周病原細菌の交差感染を調べるための検査法として、それぞれの代表的な歯周病原細菌である<i>Porphyromonas gingivalis</i>および<i>Porphyromonas gulae</i>を対象とした両検査を確立することを目的とした。そのために、両細菌をリアルタイムPCRで特異的に検出するためのプライマーを、またELISAに用いる両細菌の超音波破碎抽出抗原を作製し、その有用性について検討した。</p> <p>【材料と方法】</p> <ol style="list-style-type: none"> 細菌培養：供試菌として、<i>P. gingivalis</i> W83 株および FDC381 株、<i>P. gulae</i> ATCC51700 株を用い、それぞれ 37°C の嫌気条件下で嫌気培養した。 DNA の調製：培養した <i>P. gingivalis</i> W83 株および <i>P. gulae</i> ATCC51700 株から DNA を抽出し、DNA 濃度を細菌 1.0 × 10⁵個/μL 相当になるように調整した。 抗原の調製：<i>P. gingivalis</i> FDC381 株および <i>P. gulae</i> ATCC51700 株の培養液中の菌体を集菌して超音波破碎を行った。遠心分離後の上清を透析し、凍結乾燥して超音波破碎抽出抗原を得た。 抗原投与実験の被験動物・サンプル採取：実験動物のイヌ 7 頭を <i>P. gingivalis</i> 感作群 (A, B, C : n=3) , <i>P. gulae</i> 感作群 (D, E, F : n=3) , 生理食塩水投与群 (G : n=1, 陰性対照) の 3 群に分類し、<i>P. gingivalis</i> 抗原 (1.0 mg/mL) , <i>P. gulae</i> 抗原 (0.1 mg/mL) , 生理食塩水を、それぞれ静脈内に投与した。抗原投与前および投与後に採血を行った。 臨床応用実験の被験動物・サンプル採取：動物病院を受診したイヌ 49 頭を重症度別に健常群 (n=8) , 歯肉炎群 (n=10) , そして歯周炎群 (n=31) に分類し、口腔細菌サンプル (デンタルプラーク) および血液サンプルを採取した。 DNA プライマー：総菌数の定量には、16S rRNA 遺伝子を標的としたユニバーサルプライマーを、<i>P. gingivalis</i> および <i>P. gulae</i> の細菌数の定量には、本研究で設計した、16S-23S rRNA 遺伝子内部転写領域 (ITS) を標的とした各細菌の特異的なプライマーを用いた。 PCR およびアガロース電気泳動：<i>P. gingivalis</i> および <i>P. gulae</i> の DNA と設計したプライマーとの PCR 産物を、5%アガロースゲルを用いて電気泳動した。 リアルタイム PCR：<i>P. gingivalis</i> および <i>P. gulae</i> の DNA と設計したプライマーとでリアルタイム PCR を行い、プライマーの特異性および DNA 検出感度を確認した。また、イヌのデンタルプラーク中の総菌数をユニバーサルプライマーで、<i>P. gingivalis</i> および <i>P. gulae</i> の細菌数を設計したプライマーで定量した。 					

9. DNA塩基配列解析：*P. gingivalis* および *P. gulae* のDNAとそれぞれの特異的なプライマーとでPCRを行った。PCR産物のDNA塩基配列解析を行い、データベースにおける標的DNA塩基配列との相同性を調べた。
10. ELISA：*P. gingivalis* FDC381株抗原および *P. gulae* ATCC51700株抗原に対するイヌ血清を反応させた。波長405/490nmにおける吸光度を測定し、標準曲線をもとに吸光度をELISA unitに変換して抗体価とした。
11. SDS-PAGE：*P. gingivalis* FDC381株抗原および *P. gulae* ATCC51700株抗原(10 μg)をSDS-PAGEで分離した後、0.25% CBBで染色し、タンパク分画を比較した。
12. Western blotting：*P. gingivalis* FDC381株抗原および *P. gulae* ATCC51700株抗原のタンパク質をSDS-PAGEで分離し、PVDF膜に転写した。1次抗体として、イヌの抗原感作前の血清および抗原感作後の血清を反応させ、増強化学発光法によって反応タンパク質を検出した。
13. 統計解析：群間の平均値の差の検定は、Bartlett's testで等分散性の検定を行った後に、3群間の差にはKruskal-Wallis testを、2群間の差にはMann-Whitney U testを用いた。また、両検査の正確度は受信者動作特性曲線を用いて評価した。 $p < 0.05$ の場合を有意差ありと判定した。

【結果】

1. プライマーの特異性とDNA検出感度：設計した *P. gingivalis* プライマーおよび *P. gulae* プライマーは各菌に特異的であった。またリアルタイムPCRでの検出限界DNA数は 10^1 個であった。
2. PCR産物のDNA塩基配列解析：*P. gingivalis* および *P. gulae* のプライマーのPCR産物のDNA塩基配列とデータベース上の標的DNA塩基配列との相同性は、それぞれ97%、99%であった。
3. イヌへの抗原感作および血清IgG抗体価測定による抗原の有用性の検討：抗原投与によって、*P. gingivalis* 感作群(A, B, C)のイヌA, Bでは *P. gingivalis* 抗原、イヌCでは両抗原に対する抗体価が上昇した。*P. gulae* 感作群(D, E, F)の3頭では両抗原に対する抗体価が上昇し、特に *P. gulae* 抗原で上昇が顕著であった。
4. SDS-PAGEおよびWestern blottingによる *P. gingivalis* と *P. gulae* の抗原の比較：SDS-PAGEにおいて、両抗原に共通する50~55 kDaのバンドとその他のサイズのバンドが分離された。Western blottingにおいて、*P. gingivalis* 感作群(A, B, C)のイヌCの抗原感作後の血清では両抗原で、*P. gulae* 感作群(D, E, F)の3頭の抗原感作後の血清では *P. gulae* 抗原で50~55 kDaに明瞭なバンドが検出された。
5. 伴侶動物における細菌DNA数および血清IgG抗体価の歯周病重症度との関連：*P. gulae* の細菌数は健常群と比較して歯周炎群で多かった($p < 0.05$)。*P. gingivalis* および *P. gulae* に対する抗体価は、健常群および歯肉炎群と比較して歯周炎群で高かった($p < 0.05$)。
6. 受信者動作特性曲線による細菌DNA検査および血清IgG抗体価検査の評価：曲線下面積が細菌DNA検査では0.7以下であるのに対し、抗体価検査では0.9以上であった。抗体価検査のカットオフ値から定めた感度は93%以上、特異度は77%以上であった。

【考察】

細菌DNA検査において、*P. gingivalis* および *P. gulae* の特異的なプライマーを作製した結果、リアルタイムPCRで各細菌を特異的にかつ高感度にDNAを検出することができた。

血清IgG抗体価検査において、*P. gingivalis* および *P. gulae* の全菌体の超音波破碎抽出抗原を作製した結果、ELISA法に用いる抗原として有用であった。ただし、両抗原には共通抗原と特異抗原が存在しており、共通抗原による交差反応があることがわかった。

伴侶動物を対象にした両検査の臨床応用において、細菌DNA検査では *P. gingivalis* および *P. gulae* のDNAを特異的に検出することができるが、歯周病重症度の評価に用いる検査としては正確度が低いことがわかった。血清IgG抗体価検査では、*P. gingivalis* 抗原および *P. gulae* 抗原での交差反応があるが、感度と特異度が高いことから歯周病重症度を評価する検査としては有用であると考えられる。

今後は、ヒト(飼い主)とイヌ(伴侶動物)の組を対象に両検査を実施し、ヒトとイヌとの接触度や歯周病の有無との関連があるかを統計解析し、歯周病原細菌の交差感染の実態を調べる。

【結論】

P. gingivalis および *P. gulae* を対象にした、細菌DNA検査および血清IgG抗体価検査を確立することができた。血清IgG抗体価検査はイヌの歯周病検査としても有用である。