

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

岡山大学 大学院医歯薬学総合研究科 病態制御科学専攻

病態機構学講座 歯周病態学分野

田井 真砂子

Study on detection methods for zoonoses  
between humans and companion animal dogs  
caused by periodontopathic bacteria

Department of Pathophysiology - Periodontal Science,

Okayama University Graduate School of Medicine, Dentistry and Pharmaceutical Sciences

Masako Tai

(平成 30 年 12 月 14 日受付)

## 緒言

人獣共通感染症または動物由来感染症は、世界保健機関（WHO）が『ヒトと脊椎動物の間で自然に伝播する疾病あるいは感染症』と定義する感染症である<sup>1)</sup>。世界には、重要なものだけで約 200 種類もの人獣共通感染症があり、その病原体は、寄生虫、原虫、真菌、細菌、ウイルスなど様々で、重篤な症状を引き起こすものも多数存在する。日本では、予防医学の進歩や家畜衛生対策の徹底により、狂犬病やペストなどの致死率の高い感染症は発生がみられなくなった。一方で、近年のペットブームやペットセラピーの普及により室内飼育や高齢等の免疫低下者による飼育が増加したことや、交通機関の発達によりペット動物の移動が増加したことで、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<sup>2,3)</sup>。伴侶動物はヒトに癒しや安らぎを与える存在として重要である<sup>4)</sup>が、その中でも犬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。犬の飼育頭数は 2014 年から減少傾向にあるものの、70 歳代では飼育頭数が維持されている<sup>5)</sup>ことから、高齢化が進む日本では、高齢者と伴侶動物の犬における感染症について考える必要性が高まると考えられる。

高齢化が進んだ日本では 65～69 歳者の歯周病罹患率が 60%と高い<sup>6)</sup>ので、歯科医療の発展によって 80 歳で 20 本の歯を有する 8020 運動の達成者の歯周病罹患率も高いと推定される。一方、犬も歯周病罹患率が非常に高く<sup>7)</sup>、スウェーデンでは歯周病罹患率は 6～8 歳で 82%、12～14 歳で 96%<sup>8,9)</sup>であり、連合王国では動物病院受診理由の第 2 位が歯周病<sup>10)</sup>で、また年齢とともに罹患率が高くなることが報告されている<sup>11, 12)</sup>。

このように、ヒトと犬はともに歯周病罹患率が高いため、両者が密な接触を行う日常生活の中で、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犬との間における歯周病原細菌の伝播を示唆する報告<sup>13, 14)</sup>があるが、その実態には不明な点が多い。様々な歯周病原細菌の交差感染が示唆される中で、本研究では、*Porphyromonas gingivalis* および *Porphyromonas gulae* に注目した。*P. gingivalis* はヒトの代表的な歯周病原細菌<sup>15)</sup>であるが、*P. gulae* はヒト以外の哺乳動物の歯周病変部位から高頻度に検出されるグラム陰性偏性嫌気性桿菌<sup>16, 17)</sup>であり、犬の歯周病の発症・増悪に関与している可能性が報告されている<sup>18)</sup>。また、*P. gingivalis* と遺伝子の相同性が高く、16S rRNA 遺伝子の相同性は 97～98%<sup>16)</sup>、*P. gingivalis* と共通の病原因子である線毛タンパク質<sup>19)</sup>の遺伝子の相同性は 94%<sup>20)</sup>である。さらに、ヒト以外の動物から分離される *Porphyromonas* 属の中で唯一 *P.*

*gingivalis* と同じくジンジパインのリシン・アルギニン特異的タンパク質分解活性を持つ<sup>18)</sup>。*P. gingivalis* と *P. gulae* は遺伝子の相同性が高く病原因子が類似している一方、カタラーゼ活性に関して *P. gingivalis* はカタラーゼ陰性、*P. gulae* はカタラーゼ陽性という違いがある<sup>21)</sup>。ヒトでは歯周病が口腔内だけではなく、全身の健康にも影響を及ぼすことが知られている<sup>22,23)</sup>が、犬でも、全身疾患への影響<sup>24-27)</sup>や、重症化による口腔と鼻腔の貫通<sup>28)</sup>や下顎の骨折などの重篤な症状が生じるため、歯周病は両者にとって看過できない疾患である。したがって、ヒトと犬において、*P.*

*gingivalis* および *P. gulae* を含めた様々な歯周病原細菌の交差感染が生じている可能性がある今、交差感染の実態を把握することは、『人、動物、環境（生態系）の健康は相互に関係しており一つである』という『One Health』の概念<sup>29)</sup>に基づいた

『One Health アプローチ<sup>30)</sup>』の一つとして重要であると考える。

ヒトと犬における歯周病検査について注目すると、ヒトでは通常の歯周病治療の他に、細菌 DNA 検査<sup>31,32)</sup>や、血清 IgG 抗体価検査<sup>33-35)</sup>が確立されている。細菌 DNA 検査は polymerase chain reaction (PCR) 法や PCR 法を改良したリアルタイム PCR 法を用いて歯周病原細菌の感染を DNA レベルで検査するものであり、特にリアルタイム PCR 法では DNA を高感度で定量的に検出することができる。血清 IgG 抗体価検査は enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) 法を用いて細菌感染に対

する免疫応答を抗体価の上昇で検査するものであり、細菌 DNA 検査と比較してサンプル採取において術者の熟練度によって差異が生じない利点がある<sup>36)</sup>。一方、犬では、歯周病原細菌の DNA や線毛遺伝子型、そして酵素活性などを対象にした歯周病の簡易検査が開発されている。飼い主によるブラッシングなどの歯周病予防は難しく、またペットクリニックでの歯周組織検査や治療には全身麻酔が必要であり犬の身体的負担や飼い主の経済的負担が大きいため、犬の歯周病は予防や十分な治療が行われずに重篤化するケースが多い。そのため歯周病の簡易検査はこれらの問題点に対応できるものである。また、宿主因子である犬の免疫応答を対象にした検査としては、歯周病原細菌である *Porphyromonas asaccharolyticus* を対象にした ELISA 法において、歯周炎の犬で抗体価が高いこと証明した研究報告がある<sup>37)</sup>。しかし、これらの検査はいずれもヒトと犬それぞれの歯周病を調べることを目的とした検査であり、歯周病は人獣共通感染症となり得ると捉えてヒトと犬における歯周病原細菌の交差感染を調べることを目的とした簡易検査はない。

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、ヒトと犬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 *P. gingivalis* および *P. gulae* 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、*P. gingivalis* および *P. gulae* を PCR で特異的に検出する増幅 DNA 長が約 300 bp の DNA プライマー<sup>17, 38)</sup>とは異なる、リアルタイム PCR で推奨される増幅 DNA 長が 150 bp 以下のプライマーを、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。

## 材料と方法

### 1. 細菌

#### 1) 細菌培養

供試菌として、*P. gingivalis* W83 株、*P. gingivalis* FDC381 株、そして *P. gulae* ATCC51700 株を用いた。なお、*P. gulae* ATCC51700 株は、岡山大学大学院医歯薬学総合研究科小児歯科学分野から分譲を受けた。*P. gingivalis* W83 株および *P. gingivalis* FDC381 株は、変法 GAM ブイヨン（ニッスイ製薬、東京、日本）で、37°C の嫌気条件下で 12 時間培養し、2～3 回継代を繰り返したものを実験に用いた。*P. gulae* ATCC51700 株は CDC 嫌気性菌用ヒツジ血液寒天培地 (Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, USA) で 4 日間、さらに 5 µg/mL ヘミン (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) および 1 µg/mL メナジオン (Sigma-Aldrich) を添加した Tryptic Soy Broth (Becton, Dickinson and Company) 液体培地で 24 時間、37°C の嫌気条件下で培養し、2～3 回継代したものを実験に用いた。

#### 2) DNA の調製

上記項目 1-1) の *P. gingivalis* W83 株および *P. gulae* ATCC51700 株の培養液 1  $\mu$ L 中の細菌数をセルカウンタープレート (ワトソン, 東京, 日本) で確認し ( $1.8 \sim 2.0 \times 10^6$  個/ $\mu$ L), 培養液 100  $\mu$ L に InstaGene DNA 精製マトリックス (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) を 200  $\mu$ L 添加し, 56°C で 30 分間および 100°C で 8 分間のインキュベートの後, 4°C で  $14,010 \times g$ , 15 分間の遠心分離を行った。DNA を含む上清 (260  $\mu$ L) を回収し, Nuclease-Free Water (QIAGEN, Hilden, Germany) を用いて, DNA 濃度を細菌  $1.0 \times 10^5$  個/ $\mu$ L 相当になるように調整した。

### 3) 抗原の調製

Murayama らの方法<sup>34)</sup>にしたがい抗原を調製した。*P. gingivalis* FDC381 株および *P. gulae* ATCC51700 株培養液中の菌体を, 4°C で  $1,710 \times g$ , 20 分間の遠心分離とリン酸緩衝液 (Phosphate-Buffered Saline : PBS, pH 7.4, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) への懸濁を 2 回, 蒸留水への懸濁を 1 回繰り返して洗浄した後, 凍結乾燥した。その後, 菌体の乾燥物 1.0 g を蒸留水 40.0 mL に懸濁し, 直径 0.18~0.25 mm のガラスビーズ (アズワン, 大阪, 日本) 5.0 g を加え, 氷冷下で超音波発生機 UP-200P (トミー精工, 東京, 日本) を用いて 200 W で 3 分間の破砕を 5 回行った。破砕菌液の一部をフクシンで染色し, 顕微鏡デジタルカメラ DP70 (オリンパス, 東京, 日本)

を用いて倍率 400 倍で 90%以上の菌が破碎されていることを確認した。破碎菌液は 4°C で  $480 \times g$ , 20 分間の遠心分離を行って未破碎菌を除去した後, 上清を 4°C で  $100,000 \times g$ , 1 時間の遠心分離を行い, 上清と沈渣に分別した。得られた上清は, 分子量 3,500 の透析チューブ (日本ジェネティクス, 東京, 日本) を用いて精製水に対して透析した後, 凍結乾燥して超音波破碎抽出抗原を得た。

## 2. 被験動物およびサンプル採取

### 1) 抗原投与実験に用いる動物

被験動物として, 犬 7 頭 (東洋ビーグル, 11~24 ヶ月齢, 体重 9.8~12.2 kg, 雌雄, 北山ラベス, 長野, 日本) を使用し, *P. gingivalis* 感作群 (A, B, C :  $n=3$ ), *P. gulae* 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 群に分類した。上記項目 1-3) で調製した *P. gingivalis* FDC381 株抗原および *P. gulae* ATCC51700 株抗原の乾燥物を生理食塩水 (大塚製薬, 東京, 日本) に溶解し, *P. gingivalis* は 1.0 mg/mL, *P. gulae* は 0.1 mg/mL の濃度に調整した。全ての犬の前肢から血液 10 mL を採取し, 対照血清とした。その後, 各群の犬に調整した抗原あるいは生理食塩水を, 静脈内に 1 週間ごとに計 6 回, 体重 kg あたり 1.0 mL 投与し, 各投与から 1 週間後に採血を行った。6 回の感作後は, 2 週間ごとに 3 回の採血を行った。この抗原投与実

験は、岡山大学動物実験委員会の承認を得た（OKU-2015396）。採取した血液は、4°C で  $1,710 \times g$ 、5 分間の遠心分離を行い、得られた血清は 1 mL ずつ分注して-20°C で保存した。

## 2) 臨床応用実験に用いる動物

研究協力施設の動物病院を受診して麻酔下での処置を必要とした犬のうち、飼い主から研究協力の同意が得られた犬を対象にした。この臨床応用実験は、岡山大学動物実験委員会の承認を得た（OKU-2017598）。犬 66 頭（年齢、犬種、雌雄不等）を、アメリカ獣医歯科学会の提唱する歯周病ステージ分類<sup>39)</sup>によって重症度別に分類し（ステージ：0～4），さらに健常群（ステージ：0），歯肉炎群（ステージ：1），そして歯周炎群（ステージ：2～4）の 3 群に分類した。その後、後述のリアルタイム PCR において、犬の口腔細菌サンプル中の総菌数が検出限界以下となったサンプルは採取時のエラーありと判定し、該当する犬は実験対象から除外し、最終的に 49 頭（健常群： $n=8$ ，歯肉炎群： $n=10$ ，歯周炎群： $n=3$ ）を実験に用いた（図 1）。

犬の口腔細菌サンプルとして、歯肉縁を綿棒で拭ってバイオフィルム（デンタルプラーク）を採取した。綿棒を 1 mL の PBS に懸濁した後に 4°C に保存し、研究室に運

搬後、上記項目 1-2) と同様に InstaGene DNA 精製マトリックスを用いて DNA 抽出を行った。

犬の血液サンプルとして、前肢から血液 3 mL を採取し、StatSpin MP Multipurpose Centrifuge (StatSpin, Norwood, MA, USA) を用いて室温で  $12,000 \times g$ 、3 分間の遠心分離を行った後に  $4^{\circ}\text{C}$  に保存し、研究室に運搬後、 $-20^{\circ}\text{C}$  で保存した。

### 3. DNA プライマー

本実験に用いた 3 種類の DNA プライマーを表に示す。総菌数の定量には、Maeda ら<sup>32)</sup>の嫌気性菌の 16S rRNA 遺伝子を標的にしたユニバーサルプライマーを用いた。*P. gingivalis* および *P. gulae* の細菌数の定量には、NCBI BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) および Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) 7.0.26 (<https://www.megasoftware.net>) を用いて設計した、各細菌に特異的な *P. gingivalis* プライマー (GI) および *P. gulae* プライマー (GU) を用いた。プライマー設計の条件は増幅サイズを 80~150 bp, プライマーサイズを 17~25 塩基, GC 含有量を 40~60%,  $T_m$  値を  $55\sim 65^{\circ}\text{C}$  程度とし、*P. gingivalis* と *P. gulae* の 16S rRNA 遺伝子の相同性が高いため、標的 DNA 配列は 16S-23S rRNA 遺伝子内部転写領域 (ITS)

<sup>40)</sup>とした。理論上の特異的な増幅を AmplifX 1.7.0 (<http://en.bio-soft.net/pcr/AmplifX.html>)

を用いて確認した。

#### 4. Polymerase chain reaction (PCR) およびアガロース電気泳動

鋳型 DNA は、上記項目 1-2) で調製した DNA を用いた。プライマーは、上記項目 3 で設計した 2 種類のプライマーを用いた。PCR 反応は、1  $\mu$ L の鋳型 DNA 溶液を、0.5  $\mu$ L のセンスならびにアンチセンス PCR プライマー溶液（最終濃度 0.2  $\mu$ M）, 12.5  $\mu$ L の 2  $\times$  AmpliTaq Gold<sup>®</sup> 360 Master Mix（Thermo Fisher Scientific）, そして 10.5  $\mu$ L の Nuclease-Free Water とそれぞれ混合して 25  $\mu$ L とし、Veriti 96-Well Thermal Cycler（Thermo Fisher Scientific）を用いて 95°C で 4 分間の 2 本鎖 DNA の変性後、95°C で 30 秒間の熱変性、55°C で 30 秒間のアニーリング、72°C で 30 秒間の伸長反応のステップを 35 サイクル行い、最後は 72°C で 7 分間の伸長反応を行った。なお、陰性対照は Nuclease-Free Water とした。

アガロースゲル電気泳動は、5%アガロースゲル（Agarose S, ニッポンジーン, 東京, 日本）, Tris Acetate EDTA（TAE）緩衝液 {40 mM トリスヒドロキシメチルアミノメタン, 40 mM 酢酸, 1 mM エチレンジアミン四酢酸 (ethylenediaminetetraacetic acid: EDTA, pH 8.0) } , 20 bp DNA Ladder（タカラバイオ, 滋賀, 日本）を用いて、室温,

100 V 定電圧条件下で行った。泳動後のゲルは 1 µg/mL 臭化エチジウム溶液 {ethidium bromide (EtBr) Solution, ニッポンジーン} で染色し, Dolphin-View (Wealtec, Sparks, NV, USA) を用いて, 波長 312 nm の紫外線で DNA を検出した。

## 5. リアルタイム PCR

鋳型 DNA は, 上記項目 1-2) で調製した DNA ( $1.0 \times 10^5$  個/µL ~  $1.0 \times 10^1$  個/µL に 5 段階希釈) および上記項目 2-2) で犬のデンタルプラークから得た DNA を用いた。プライマーは, 表の 3 種類のプライマーを用いた。PCR 反応は, 2.5 µL の鋳型 DNA 溶液を, 0.5 µL のセンスならびにアンチセンス PCR プライマー (最終濃度 0.2 µM) , 12.5 µL の 2 × Power SYBR® Green PCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific) , そして 9.0 µL の Nuclease-Free Water とそれぞれ混合して 25 µL とし, CFX Connect™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad) を用いて 95°C で 10 分間の 2 本鎖 DNA の変性後, 95°C で 15 秒間の熱変性, 60°C で 1 分間のアニーリングと伸長反応のステップを 34 サイクル行った。この反応の際の PCR 産物が発する蛍光量を, CFX Manager™ Software 3.1 (Bio-Rad) にて測定した。1 回の測定はデュプリケートで行った。犬のデンタルプラーク中の総菌数および *P. gingivalis* の細菌数は *P. gingivalis* W83 株の DNA

を，*P. gulae* の細菌数は *P. gulae* ATCC51700 株の DNA を，上記のように 5 段階希釈して作成した検量線をもとに定量した。

## 6. DNA 塩基配列解析

上記項目 3 で設計した 2 種類のプライマーを用いて *P. gingivalis* W83 株および *P. gulae* ATCC51700 株の DNA を PCR で増幅した後，アガロースゲル電気泳動を行った。泳動後のゲルで検出された DNA バンドを切り出し，QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN) を用いて DNA を精製し，DNA 塩基配列を 3130xl Genetic Analyzer (Thermo Fisher Scientific) を用いて解析した。塩基配列解析プライマーとして用いた PCR プライマー部を含めてセンスならびにアンチセンス鎖の両鎖から塩基配列を解析して，全長の DNA 塩基配列を決定した。その後，NCBI GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) データベースにおける *P. gingivalis* および *P. gulae* の標的 DNA 塩基配列と PCR 産物の DNA 塩基配列の相同性を調べた。なお，*P. gingivalis* W83 株には ITS の塩基配列のデータが存在しないため，*P. gingivalis* ATCC33277 株の塩基配列 (accession #AY546475<sup>40</sup>) を比較対象とした。一方，*P. gulae* ATCC51700 株は，同株の DNA 塩基配列 (accession #AY546476<sup>40</sup>) を比較対象とした。

## 7. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

ELISA 法を用いた血清 IgG 抗体価の測定は、Murayama らの方法<sup>34)</sup>を基準に、犬用に改変したものを用いて行った。すなわち、*P. gingivalis* FDC381 株抗原および *P. gulae* ATCC51700 株抗原の乾燥物を Polyoxyethylene (20) Sorbitan Monolaurate (Tween20) 含有リン酸緩衝液 {PBST, pH 7.4, 0.8% (w/v) 塩化ナトリウム, 0.02% (w/v) リン酸二水素カリウム, 0.29% (w/v) リン酸水素二ナトリウム十二水和物, 0.02% (w/v) 塩化カリウム, 0.02% (w/v) アジ化ナトリウム, 0.05% (v/v) Tween20} に溶解して 1.0 mg/mL の濃度に調整し、さらに 50 mM 炭酸-重炭酸緩衝液 {pH 9.6, 0.17% (w/v) 炭酸ナトリウム, 0.3% (w/v) 炭酸水素ナトリウム} に溶解して、最終濃度 10 µg/mL の抗原溶液を調製した。各抗原溶液を 96 Well ELISA Microplates (Greiner Bio-One, Kremsmünster, Austria) の各ウェルに 200 µL ずつ添加し、4°C で 6~8 時間放置して抗原をプレートに固相した。標準血清は、上記項目 2-1) で抗原感作前の全ての犬から得た対照血清を等量混和したものを扱い、PBST で 12.5~51,200 倍に段階希釈した。上記項目 2-1) , 2-2) の被験血清は、PBST で 3,200 倍に希釈した。抗原を固相したプレートを PBST で 3 回洗浄した後、標準血清および被験血清を 100 µL ずつ添加し、37°C で 2 時間反応させた。二次抗体は Alkaline Phosphatase Rabbit Anti-Dog IgG (H + L) (Jackson ImmunoResearch, Philadelphia, PA, USA) を PBST で 5,000 倍に希釈し

たものを用い、プレートに PBST で 3 回洗浄した後、各ウェルに 100  $\mu$ L ずつ添加し、37°C で 2 時間反応させた。発色抗体は、*p*-ニトロフェニルりん酸二ナトリウム六水和物（富士フイルム和光純薬）をジエタノールアミン緩衝液 {pH 9.8, 10% (v/v) 2,2'-イミノジエタノール, 0.01% (w/v) 塩化マグネシウム六水和物, 0.12% (w/v) アジ化ナトリウム} に溶解して 1 mg/mL の濃度に調整したものを用い、プレートを PBST で 3 回洗浄した後、各ウェルに 100  $\mu$ L ずつ添加し、室温で反応させた。吸光度の測定には、モデル 680 マイクロプレートリーダーおよび Microplate Manager<sup>®</sup> Software 5.2.1（ともに Bio-Rad）を用い、12.5 倍希釈した標準血清のウェルの波長 405/490 nm における吸光度が 1.8 に到達した時点の各ウェルの吸光度を測定し、標準血清を段階希釈して得られた検量線（4 パラメーターロジスティック曲線）をもとに吸光度を ELISA Unit（EU）に変換し、抗体価とした。なお、3,200 倍希釈した標準血清と同じ吸光度を示す被験血清の EU を 100 と設定し、標準血清（12.5～51,200 倍希釈）が示す EU 25,600～6.25 の範囲を超える被験血清については、EU 25,600 以上の血清は EU 25,600、EU 6.25 以下の血清は EU 6.25 と示した。1 回の測定はデュプリケートで行った。

## 8. タンパク質解析

## 1) Sodium dodecyl sulfate-poly acrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)

*P. gingivalis* FDC381 株抗原および *P. gulae* ATCC51700 株抗原の乾燥物を PBST に溶解し、タンパク質濃度をウシ血清アルブミンを対照に、BCA 法<sup>41)</sup>で測定し、1.0 µg/µL の濃度に調整した。各抗原 10 µg にドデシル硫酸ナトリウム (sodium dodecyl sulfate : SDS) サンプルバッファー {1.3% (w/v) SDS, 58 mM トリス塩酸緩衝液 (Tris-HCl, pH 6.8) , 6% (v/v) グリセリン, 144 mM 2-メルカプトエタノール, 0.002% (w/v) ブロモフェノールブルー} を加え、95°C で 5 分間煮沸して還元状態にし、4-20% ミニプロテイン® TGX™ プレキャストゲル (Bio-Rad) および泳動緩衝液 {25 mM Tris-HCl, 1.4% (w/v) グリシン, 0.1% (w/v) SDS} を用いた SDS-PAGE にて、室温、150 V 定電圧条件下で分離した。泳動後のゲルの染色には、0.25% クマシーブリリアントブルー染色溶液 {0.25% (w/v) クマシーブリリアントブルー R250, 40% (v/v) メタノール, 7% (v/v) 酢酸} を用いた。

## 2) Western blotting

上記項目 8-1) と同様に、SDS-PAGE で分離した *P. gingivalis* FDC381 株抗原および *P. gulae* ATCC51700 株抗原のタンパク質を、タンク式ブロッティング装置 (Bio-Rad) を用いて転写緩衝液 {1.8 mM Tris-HCl, 1.4% (w/v) グリシン, 20% (v/v) メタノー

ル} 中で、室温、100 V 定電圧条件下で 1 時間、ポリフッ化ビニリデン (polyvinylidene difluoride : PVDF) 膜 (Millipore Corporation, Billerica, MA, USA) に転写した。転写後の PVDF 膜は、2% (w/v) スキムミルク (Becton, Dickinson and Company) を添加した Tween20 含有トリス緩衝食塩水 {T-TBS, pH 7.4, 10 mM Tris-HCl, 150 mM 塩酸ナトリウム, 0.1% (v/v) Tween20} に浸漬し、室温で 1 時間のブロッキングを行った。一次抗体として、上記項目 2-1) の各犬の抗原感作前の血清および抗原感作後の血清のうち *P. gingivalis* および *P. gulae* に対する抗体価が最も高い血清を用いた。一次抗体を 2% (w/v) スキムミルクを添加した T-TBS で 5,000 倍に希釈し、T-TBS で 3 回洗浄し、PVDF 膜を浸漬し、4°C で 12 時間振とうした。二次抗体として、Peroxidase Rabbit Anti-Dog IgG (H+L) (Jackson ImmunoResearch) を用いた。二次抗体も同様に 2% (w/v) スキムミルクを添加した T-TBS で 10,000 倍に希釈し、T-TBS で 3 回洗浄し、PVDF 膜を浸漬し、室温で 1 時間振とうさせた。反応タンパク質の検出は、化学発光基質として Super Signal™ West Dura Extended Duration Substrate (Thermo Fisher Scientific) を用いた増強化学発光 (enhanced chemiluminescence : ECL) 法によって行い、ChemiDoc™ MP Imaging System (Bio-Rad) で化学発光基質のシグナルを検出した。

## 9. 統計解析

細菌 DNA 検査および血清 IgG 抗体価検査において、群間の平均値の差の検定は、バートレット検定で等分散性の検定を行った後に、3 群間の差にはクラスカル・ウォリス検定を、2 群間の差にはマン・ホイットニーの U 検定を用いた。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。全ての統計処理には、R 3.5.1 (R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria) のグラフィカルユーザーインターフェイスである EZR<sup>42)</sup> (自治医科大学さいたま医療センター, 埼玉, 日本) を使用し、 $p < 0.05$  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

*P. gingivalis* プライマーおよび *P. gulae* プライマーの各細菌に対する特異性を PCR 産物のアガロース電気泳動で、特異性と DNA 検出感度をリアルタイム PCR で確認した。アガロース電気泳動では、両プライマーとも標的細菌において目的のサイズのバンド (*P. gingivalis* : 99 bp, *P. gulae* : 87 bp) が検出され、他方の細菌および陰性対照においてはバンドが検出されなかった (図 2)。リアルタイム PCR では、プライマー濃度 0.2  $\mu$ M, アニーリング温度 60°C, 34 サイクルの条件において、両プライマーとも各細菌の DNA を特異的に効率良く増幅し、他方の細菌および陰性対照との非特異反応やプライマーダイマーの生成はなかった。また、検出限界 DNA コピー数は両プライマーともに  $10^1$  個であった (図 3)。

### 2. PCR 産物の DNA 塩基配列解析

*P. gingivalis* プライマーおよび *P. gulae* プライマーの PCR 産物の DNA 塩基配列解析を行い、それぞれのプライマーによって標的 DNA が増幅されているか確認した。

その結果, PCR 産物の DNA 塩基配列と標的 DNA 塩基配列との相同性は, *P. gingivalis* プライマーでは 97%, *P. gulae* プライマーでは 99%であった (図 4)。

### 3. 犬における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

犬に *P. gingivalis* FDC381 株抗原あるいは *P. gulae* ATCC51700 株抗原を投与し, 血清 IgG 抗体価を上昇させ, 両抗原に対する抗体価を ELISA 法で定量した。そして, これらの抗原を用いて抗体価の上昇を確認できるか, すなわち, 抗原が血清抗体価測定に有用であるかを検討した。*P. gingivalis* 感作群 (A, B, C) において, 犬 A, B の抗原感作後の血清では, *P. gingivalis* 抗原に対する抗体価は上昇したが, *P. gulae* 抗原に対する抗体価は変化がなかった。一方, 犬 C の抗原感作後の血清では, 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 頭の抗原感作後の血清では, 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。陰性対照の犬 G では抗体価は上昇しなかった (図 5)。

### 4. SDS-PAGE および Western blotting による *P. gingivalis* と *P. gulae* の抗原の比較

*P. gingivalis* 抗原および *P. gulae* 抗原のタンパク質分画と血清との反応性を SDS-PAGE および Western blotting で比較検討した。*P. gingivalis* 抗原および *P. gulae* 抗原

の SDS-PAGE では、両抗原に共通する 50～55 kDa のバンドが分離された。その他、異なるサイズのバンドがそれぞれの抗原で複数分離された（図 6-①）。

SDS-PAGE で分離された *P. gingivalis* 抗原および *P. gulae* 抗原と各犬の抗原感作前後の血清との反応を Western blotting で検出した。全ての犬の抗原感作前の血清では、バンドは検出されなかったが、犬 A～F の抗原感作後の血清では、両抗原の 40～55 kDa の範囲にバンドが検出された。*P. gingivalis* 感作群（A, B, C）の犬 A において、*P. gingivalis* 抗原では 40～45 kDa および 45～50 kDa の、*P. gulae* 抗原では 50～55 kDa のバンドが検出された。犬 B において、*P. gingivalis* 抗原では 45～50 kDa と 50～55 kDa の、*P. gulae* 抗原では 50～55 kDa のバンドが検出された。犬 C において、両抗原で 50～55 kDa のバンドが検出され、シグナル強さは同等であった。*P. gulae* 感作群（D, E, F）の 3 頭においても、両抗原で 50～55 kDa のバンドが検出され、シグナル強さは、*P. gingivalis* 抗原より *P. gulae* 抗原で強かった。陰性対照の犬 G では、抗原感作前後のいずれの血清においても、バンドは検出されなかった（図 6-②）。

## 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

動物病院を受診した伴侶動物の犬において、*P. gingivalis* および *P. gulae* を対象にした細菌 DNA 検査および血清 IgG 抗体価検査を実施し、歯周病重症度と検査結果の関係を検討した。

細菌 DNA 検査では、デンタルプラーク中の総菌数はユニバーサルプライマーを用いて、*P. gingivalis* および *P. gulae* の細菌数は各細菌のプライマーを用いて、リアルタイム PCR で対象細菌の DNA を定量した。サンプル採取量を統一することができないため、*P. gingivalis* および *P. gulae* の細菌数は総菌数に対する割合（%）で示した。個体別にみると、*P. gingivalis* が検出された個体は少なく、*P. gulae* が検出された個体は歯周炎群で多い傾向があった（図 7-①）。歯周病の重症度で分類した群別に比較すると、*P. gingivalis* の細菌数は歯周病重症度との関係はなく、*P. gulae* の細菌数は健常群と比較して歯周炎群で多かった（図 8-①）。

血清 IgG 抗体価検査では、*P. gingivalis* 抗原および *P. gulae* 抗原に対する抗体価を ELISA 法で定量し、ELISA Unit で示した。個体別にみると、歯周病が重症であるほど、抗体価が高い傾向があった（図 7-②）。群別に比較すると、*P. gingivalis* に対する抗体価および *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（図 8-②）。

なお、細菌 DNA 検査および血清 IgG 抗体価検査の結果を個別別にみると、細菌数と抗体価と間に相関はなかった（図 7-①，②）。

## 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

伴侶動物における細菌 DNA 検査および血清 IgG 抗体価検査の正確度を評価するために、歯周炎群を疾患陽性（ $n=31$ ），健常群および歯肉炎群を疾患陰性（ $n=18$ ）として、両検査の受信者動作特性曲線を作成し、曲線下面積を求めた。また、受信者動作特性曲線からカットオフ値を定め、そのときの感度および特異度を求めた。

細菌 DNA 検査において、*P. gingivalis* および *P. gulae* の総菌に対する割合（%）の受信者動作特性曲線を作成した。*P. gingivalis* では、曲線下面積が 0.417（95%信頼区間：0.298-0.535），カットオフ値が 0.136，感度が 6.5%，そして特異度が 94.4%であった。*P. gulae* では、曲線下面積が 0.67（95%信頼区間：0.483-0.857），カットオフ値が 0.002，感度が 83.9%，そして特異度が 66.7%であった（図 9-①）。

血清 IgG 抗体価検査において、*P. gingivalis* および *P. gulae* に対する抗体価の受信者動作特性曲線を作成した。*P. gingivalis* では、曲線下面積が 0.928（95%信頼区間：0.835-1），カットオフ値が 348，感度が 93.5%，そして特異度が 83.3%であった。*P.*

*gulae* では、曲線下面積が 0.925（95%信頼区間：0.826-1），カットオフ値が 356，感度が 100%，そして特異度が 77.8%であった（図 9-②）。

## 考察

ヒトと伴侶動物の犬における歯周病原細菌の交差感染については、既存の報告<sup>13,14)</sup>があるものの、その実態には不明な点が多い。本研究では、ヒトで確立されている細菌 DNA 検査および血清 IgG 抗体価検査を応用し、*P. gingivalis* および *P. gulae* を対象として、交差感染の実態を調べるための検査法を確立することを検討した。

細菌 DNA 検査の確立では、*P. gingivalis* および *P. gulae* 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作製した。既に PCR で両細菌の DNA を特異的に検出するプライマー<sup>17,38)</sup>があるが、これらは増幅 DNA 長が約 300 bp となる 16S rRNA 遺伝子を標的にしたプライマーである。本研究では、リアルタイム PCR で推奨される増幅 DNA 長が 150 bp 以下となるプライマーの作製を試みたが、*P. gingivalis* および *P. gulae* の 16S rRNA 遺伝子の相同性は 97～98%<sup>16)</sup>と高く、特異性および DNA 検出感度が高いプライマーを作製することが困難であった。しかし、*P. gingivalis* および *P. gulae* の遺伝子の相同性が 16S rRNA よりも低い ITS を標的にすることによって、特異性と DNA 検出感度がともに高いプライマーを作製できた（図 2, 3）。これはリアルタイム PCR を用いた細菌 DNA 検査に有用であると考えられる。

血清 IgG 抗体価検査の確立では、*P. gingivalis* および *P. gulae* の全菌体の超音波破砕抽出抗原を作製し、抗原の有用性および細菌に対する特異性の検討を行った。犬における抗原感作および血清 IgG 抗体価測定では、*P. gingivalis* 抗原および *P. gulae* 抗原を用いた ELISA 法によって、抗原感作による抗体価の上昇を確認することができ、両抗原が血清 IgG 抗体価測定に有用であることが示された（図 5）。感作抗原に対する抗体価だけでなく他方の抗原に対する抗体価も上昇したが、感作抗原でより顕著であった。これは共通抗原による交差反応と特異抗原に対する反応の両方が生じたことを示している。また、*P. gulae* で感作した犬の血清は両抗原に対する抗体価が上昇したのに対し、*P. gingivalis* で感作した犬の血清のうち *P. gulae* 抗原に対する抗体価が上昇しない場合があった。これは、*P. gingivalis* 抗原が *P. gulae* 抗原より多くの特異抗原を有しており、その *P. gingivalis* 抗原の特異抗原に対する抗体が *P. gulae* 抗原を認識しなかったためと推察される。

SDS-PAGE および Western blotting では、*P. gingivalis* 抗原と *P. gulae* 抗原のタンパク質分画および血清との反応性を、SDS-PAGE および Western blotting で比較検討した（図 6-①，②）。抗原感作前の血清においてはバンドが検出されなかったが、*P. gingivalis* で感作した犬の血清において、*P. gingivalis* 抗原で 40～45 kDa、45～50 kDa、そして 50～55 kDa の、*P. gulae* 抗原で 50～55 kDa のバンドが検出され、*P. gulae* で感

作した犬の血清において、*P. gingivalis* 抗原および *P. gulae* 抗原で 50～55 kDa のバンドが検出されたことから、これらのサイズのタンパク質が抗体価の上昇に関与していると考えられる。また、感作抗原だけでなく、他方の抗原でもバンドが検出され、シグナル強度に両抗原で差があった。これは血清 IgG 抗体価の結果と一致しており、SDS-PAGE および Western blotting の結果と合わせると、*P. gingivalis* 抗原および *P. gulae* 抗原には共通抗原と特異抗原が混在していると推察される。Western blotting では *P. gingivalis* 抗原と *P. gulae* 抗原のいずれにおいても 50～55 kDa に反応が見られたが、この分子量の抗原には、53 kDa の外膜タンパク質、53 kDa の線毛タンパク質、そして 51 kDa のジンジパイン単量体などが知られている。*P. gingivalis* の外膜には 53 kDa のタンパク質が存在し、歯周炎患者は健常者と比較してこのタンパク質に対する抗体価が高いことが報告されている<sup>43-45)</sup>。また、線毛タンパク質として *P. gingivalis* および *P. gulae* の 41 kDa のタンパク質がよく知られているが、*P. gulae* では 53 kDa の線毛タンパク質の存在も明らかになっている<sup>46)</sup>。ジンジパインは *P. gingivalis* および *P. gulae* が菌体表面や菌体外に産生するタンパク質分解酵素の 1 つで、Arg-gingipain (Rgp) および Lys-gingipain (Kgp) の 2 つの酵素群から成る。そのうち Kgp は 51 kDa のプロテアーゼドメイン単量体を持つ<sup>47)</sup>。*P. gingivalis* および *P. gulae* に対する抗体価を特異的に定量できる検査を確立するためにも、これらが共通抗原である可能性も

含めて、さらなる検討により共通抗原および特異抗原を特定することが必要と考えられる。

上記で作製したプライマーおよび抗原を用いて伴侶動物の犬を対象に細菌 DNA 検査および血清 IgG 抗体価検査を実施した。そして、その結果が歯周病の重症度を表しているか検討した（図 7, 8, 9）。細菌 DNA 検査では、*P. gingivalis* の細菌数は歯周病の重症度との関係がなく、*P. gulae* の細菌数は歯周炎群で多かった（図 8-①）。したがって、*P. gulae* の細菌数を定量することで歯周病のスクリーニングが可能と考えられる。しかし、受信者動作特性曲線の曲線下面積は小さいので（図 9-①）、検査の正確度は低い。さらに、口腔細菌サンプルの採取方法は臨床に応用しやすい歯肉縁を拭う簡便な方法を採用したためか、総菌数が検出限界以下のため解析対象から除外したサンプルは約 26%もあった（図 1）。すなわち、歯肉縁を拭う方法では *Porphyromonas* 属のような偏性嫌気性細菌を十分に採取できないかもしれない。これを改善するためには、ヒトの検査と同様にペーパーポイントを用いたり<sup>48)</sup>、キュレットを用いたり<sup>12)</sup>して歯肉溝内や歯肉縁下の根面のプラークを採取するなど、獣医臨床の際に困難な方法が必要である。一方、血清 IgG 抗体価検査では、*P. gingivalis* に対する抗体価および *P. gulae* に対する抗体価が歯周炎群で高かった（図 8-②）。また、受信者動作特性曲線の曲線下面積は大きく感度と特異度が高かった（図 9-②）ので、血清 IgG 抗体価検

査は歯周病のスクリーニング検査として有用であると考え。さらに、動物病院では通常診療で採血を行う機会が多く、獣医師であれば容易に確実に血液サンプルを採取することができるので、この意味でも本法はスクリーニング検査に適している。しかし、共通抗原による交差反応がある（図 5, 6）ため、それぞれの細菌に対する抗体価を区別するには、細菌 DNA 検査で細菌を特定することが必要となる。

今後、歯周病原細菌の交差感染の実態を調べるために、ヒト（飼主）と犬（伴侶動物）との組を対象に、本研究で確立した両検査を実施することを検討している。そのためには、ヒトと犬との接触度（接触頻度、飼育形態、食餌の与え方等）および歯周病の有無をアンケートで調べて群分けする。そして、細菌 DNA 検査で *P. gingivalis* および *P. gulae* の感染を、血清 IgG 抗体価検査で各菌に対する抗体価を調べて、両検査結果を群別に統計解析する（図 10）。仮に、接触度が高い群において、ヒトでの *P. gulae* の、あるいは犬での *P. gingivalis* の検出が多く、抗体価が上昇していれば、これらの細菌が交差感染し免疫応答を惹起したと考えられる。また、歯周病有りの群において同様の結果が得られれば、交差感染した細菌が歯周病の発症あるいは進行に関与している、すなわち歯周病が人獣共通感染症となっている可能性があると言える。しかし、歯周病が人獣共通感染症であるかを解明するためには、*P. gingivalis* および *P. gulae* 以外の歯周病原細菌も含めた検査の実施が必要であると考えられる。

人獣共通感染症はあらゆる病原体によって起こり得るが，本研究ではヒトと犬で罹患率が高い歯周病に注目した。そして，歯周病原細菌の交差感染を調べるために，*P. gingivalis* および *P. gulae* を対象にした簡易検査法の確立を検討した。その結果，確立した細菌 DNA 検査および血清 IgG 抗体価検査は，ヒトと犬における歯周病原細菌の交差感染の実態を調べる手段となる可能性が示された。また，血清 IgG 抗体価検査は犬の歯周病検査としても有用であると考えられる。

## 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 抗体価検査は犬の歯周病検査として有用である。

## 謝辞

稿を終えるにあたり，終始御懇篤なる御指導と御校閲を賜った岡山大学大学院医歯薬学総合研究科病態制御科学専攻病態機構学講座歯周病態学分野の高柴正悟教授に深甚なる謝意を表します。様々な面にわたり，終始御指導賜り，貴重な御助言と御協力を下さいました現 厚生労働省医政局経済課医療機器政策室（元 岡山大学病院新医療研究開発センター助教）の伊東孝先生に，また，岡山大学自然生命科学研究支援センター動物資源部門の樫木勝巳教授，平山晴子助教，矢田範夫氏に，深く感謝いたします。DNA プライマーの設計に関して御教示を下さいました岡山大学大学院医歯薬学総合研究科社会環境生命科学専攻国際環境科学講座病原ウイルス学分野の小川寛人助教に，*P. gulae* の分譲を賜り培養に関して御教示を下さいました岡山大学大学院医歯薬学総合研究科小児歯科学分野の仲野道代教授，稲葉裕明准教授に，犬からのサンプル採取にあたり格別のご配慮とご協力を下さいました永原動物病院の永原美治先生，岡山大学大学院医歯薬学総合研究科病態制御科学専攻病態機構学講座歯周病態学分野の田村和也先生に，厚く御礼申し上げます。最後に，本研究を行うにあたり貴重な御助言を下さいました岡山大学大学院医歯薬学総合研究科病態制御科学専攻病態機構学講座歯周病態学分野の諸先生にも厚く御礼申し上げます。

## 表題脚注

岡山大学 大学院医歯薬学総合研究科 病態制御科学専攻 病態機構学講座 歯周

病態学分野

(指導：高柴正悟教授)

本論文の一部は，以下の学会において発表した。

- ・ 第 61 回秋季日本歯周病学会学術大会（2018 年 10 月，大阪）

## 参考文献

- 1) World Health Organization: Joint WHO/FAO Expert Committee on zoonoses second report. 1959.  
  
(「[http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/40435/WHO\\_TRS\\_169.pdf](http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/40435/WHO_TRS_169.pdf)」 2018 年 12 月現在)
- 2) 厚生労働省：愛玩動物の衛生管理の徹底に関するガイドライン 2006.  
  
(「<https://www.mhlw.go.jp/file/06-Seisakujouhou-10900000-Kenkoukyoku/0000155023.pdf>」 2018 年 12 月現在)
- 3) 厚生労働省：動物由来感染症ハンドブック 2018.  
  
(「<https://www.mhlw.go.jp/file/06-Seisakujouhou-10900000-Kenkoukyoku/0000155227.pdf>」 2018 年 12 月現在)
- 4) 富永佳与子，西澤亮治，湯木麻里：「伴侶動物との暮らし」を活用した「高齢者が幸せに暮らせる社会システム」の提案．シニア社会学会エイジレスフォーラム．14，2016.

- (「<http://knots.or.jp/corporation/wp-content/images/2015/09/c064e370978e9b1ada585be789f4a71f.pdf>」 2018 年 12 月現在)
- 5) 一般社会法人ペットフード協会：平成 29 年全国犬猫飼育実態調査。
- (「<https://petfood.or.jp/data/chart2017/index.html>」 2018 年 12 月現在)
- 6) 厚生労働省：平成 28 年歯科疾患実態調査。
- (「<https://www.mhlw.go.jp/toukei/list/62-28.html>」 2018 年 12 月現在)
- 7) Kyllar, M., Witter, K.: Prevalence of dental disorders in pet dogs. *Veterinarni Medicina*, 50, 496-505, 2005
- 8) Larsen, J.: Oral products and dental disease. *Compend. Contin. Educ. Vet.*, 32, E1-E3, 2010.
- 9) Hamp, S.E., Olsson, S.E., Farsø-Madsen, K., Viklands, P.: A macroscopic and radiologic investigation of dental diseases of the dog. *Veterinary Radiol.*, 25, 86-92, 1984.
- 10) O'Neill, D.G., Church, D.B., McGreevy, P.D., Thomson, P.C., Brodbelt, D.C.: Prevalence of disorders recorded in dogs attending primary-care veterinary practices in England. *PLoS One*, 9, e90501, 2014.
- 11) 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, 2003.
- 12) Riggio, M.P., Lennon, A., Taylor, D.J., Bennett, D.: Molecular identification of bacteria associated with canine periodontal disease. *Vet. Microbiol.*, **150**, 394-400, 2011.
- 13) Yamasaki, Y., Nomura, R., Nakano, K., Naka, S., Matsumoto-Nakano, M., Asai, F., Ooshima, T.: Distribution of periodontopathic bacterial species in dogs and their owners. *Arch. Oral Biol.*, **57**, 1183-1188, 2012.
- 14) Gaetti-Jardim, E., Jr., Pereira, M.F., Vieira, E.M., Schweitzer, C.M., Okamoto, A.C., Ávila-Campos, M.J.: Occurrence of periodontal pathogens in ethnic groups from a native Brazilian reservation. *Arch. Oral Biol.*, **60**, 959-965, 2015.
- 15) Mysak, J., Podzimek, S., Sommerova, P., Lyuya-Mi, Y., Bartova, J., Janatova, T., Prochazkova, J., Duskova, J.: *Porphyromonas gingivalis*: major periodontopathic pathogen overview. *J. Immunol. Res.*, **2014**, 476068, 2014.
- 16) Fournier, D., Mouton, C., Lapierre, P., Kato, T., Okuda, K., Ménard, C.: *Porphyromonas gulae* sp. nov., an anaerobic, Gram-negative coccobacillus from the gingival sulcus of various animal hosts. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **51**, 1179-1189, 2001.

- 17) Senhorinho, G.N., Nakano, V., Liu, C., Song, Y., Finegold, S.M., Avila-Campos, M.J.:  
Detection of *Porphyromonas gulae* from subgingival biofilms of dogs with and without  
periodontitis. *Anaerobe*, **17**, 257-258, 2011.
- 18) Lenzo, J.C., O'Brien-Simpson, N.M., Orth, R.K., Mitchell, H.L., Dashper, S.G.,  
Reynolds, E.C.: *Porphyromonas gulae* Has Virulence and Immunological Characteristics  
Similar to Those of the Human Periodontal Pathogen *Porphyromonas gingivalis*. *Infect.*  
*Immun.*, **84**, 2575-2585, 2016.
- 19) Nomura, R., Shirai, M., Kato, Y., Murakami, M., Nakano, K., Hirai, N., Mizusawa, T.,  
Naka, S., Yamasaki, Y., Matsumoto-Nakano, M., Ooshima, T., Asai, F.: Diversity of  
Fimbrillin among *Porphyromonas gulae* Clinical Isolates from Japanese Dogs. *J. Vet.*  
*Med. Sci.*, **74**, 885-891, 2012.
- 20) Hamada, N., Takahashi, Y., Watanabe, K., Kumada, H., Oishi, Y., Umemoto, T.:  
Molecular and antigenic similarities of the fimbrial major components between  
*Porphyromonas gulae* and *P. gingivalis*. *Vet. Microbiol.*, **128**, 108-117, 2008.
- 21) Laliberté, M., Mayrand, D.: Characterization of black-pigmented Bacteroides strains  
isolated from animals. *J. Appl. Bacteriol.*, **55**, 247-252, 1983.

- 22) Kudo, C., Shin, W.S., Sasaki, N., Harai, K. Kato, K., Seino, H., Goke, E., Fujino, T., Kuribayashi, N., Pearce, Y.O., Taira, M., Matsushima, R., Minabe, M., Takashiba, S., Periodontitis and Atherosclerosis Project-Tokyo and Chiba Consortiums.: Effects of periodontal treatment on carotid intima-media thickness in patients with lifestyle-related diseases: Japanese prospective multicentre observational study. *Odontology.*, **106**, 316-327, 2018.
- 23) Shimoe, M., Yamamoto, T., Iwamoto, Y., Shiomi, N., Maeda, H., Nishimura, F., Takashiba, S.: Chronic periodontitis with multiple risk factor syndrome: a case report. *J. Int. Acad. Periodontol.*, **13**, 40-47, 2011.
- 24) Albuquerque, C., Morinha, F., Requicha, J., Martins, T., Dias, I., Guedes-Pinto, H., Bastos, E., Viegas, C.: Canine periodontitis: the dog as an important model for periodontal studies. *Vet. J.*, **191**, 299-305, 2012
- 25) Semedo-Lemsaddek, T., Tavares, M., São, Braz, B., Tavares, L., Oliveira, M.: Enterococcal Infective Endocarditis following Periodontal Disease in Dogs. *PLoS One*, **11**, e0146860, 2016.

- 26) Glickman, L.T., Glickman, N.W., Moore, G.E., Goldstein, G.S., Lewis, H.B.: Evaluation of the risk of endocarditis and other cardiovascular events on the basis of the severity of periodontal disease in dogs. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, **234**, 486-94, 2009.
- 27) Rawlinson, J.E., Goldstein, R.E., Reiter, A.M., Attwater, D.Z., Harvey, C.E.: Association of periodontal disease with systemic health indices in dogs and the systemic response to treatment of periodontal disease. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, **238**, 601-609, 2011.
- 28) 小川祐生, 山本誠也, 大成衷子, 和田慎太郎, 八村寿恵, 網本昭輝: 歯周病に関連した口腔鼻腔瘻の犬 56 例の回顧的検討. 日本獣医師会雑誌, **70**, 313~316, 2017.
- 29) 東京医療保健大学: ヘルスケアコラム.  
(「<http://www.thcu.ac.jp/research/column/detail.html?id=98>」2018 年 12 月現在)
- 30) 厚生労働省: ワンヘルス・アプローチに基づく動物由来感染症対策.  
(「<https://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/0000172990.html>」2018 年 12 月現在)
- 31) 綿城哲二, 苔口進, 宮本学, 前田博史, 藤本千代, 澤田聡子, 澤田弘一, 弘末勝, 清水明美, 片山知子, 杉典子, 西村英紀, 新井英雄, 高柴正悟, 村山洋二.

- 細菌 16S リボソーム RNA 遺伝子を用いた歯周病細菌の同定—PCR 法—. 日歯保誌, 42, 1108-1115, 1999.
- 32) Maeda, H., Fujimoto, C., Haruki, Y., Maeda, T., Koeguchi, S., Petelin, M., Arai, H., Tanimoto, I., Nishimura, F., Takashiba, S.: Quantitative real-time PCR using TaqMan and SYBR Green for *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *tetQ* gene and total bacteria. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, 39, 81-86, 2003.
- 33) 永井淳, 栗原英見, 木下正彦, 松尾美千代, 清水秀樹, 戸田洋子, 野村慶雄, 村山洋二, 苔口進, 加藤慶二郎: 歯周病原性細菌に対する血清抗体価測定のための酵素免疫測定法 (ELISA) の検討. 日歯周誌, 26, 317-328, 1984.
- 34) Murayama, Y., Nagai, A., Okamura, K., Kurihara, H., Nomura, Y., Koeguti, S., Kato, K.: Serum immunoglobulin G antibody to periodontal bacteria. *Adv. Dent. Res.*, 2, 339-345, 1988.
- 35) 永井淳: 歯周病細菌に対する抗体価検査. 日口腔検会誌, 2, 22-36, 2010.
- 36) 工藤直英子, 成石浩司, 久枝綾, 新井英雄, 前田博史, 高柴正悟: 歯周病スクリーニング検査としての歯周病原細菌に対する指尖血漿 IgG 抗体価の有用性. 日口腔検会誌, 1, 13-19, 2009.

- 37) Isogai, H., Isogai, E., Wakizaka, H., Miura, H., Niiyama, M., Yasuda, J., Azuma, R., Ohmi, H., Takano, K.: Detection of serum antibodies of oral *Porphyromonas* (*Bacteroides*) *asaccharolyticus* in dogs: relationship to periodontal disease. *Jpn. J. Vet. Sci.*, **51**, 1239-1241, 1989.
- 38) Kato, Y., Shirai, M., Murakami, M., Mizusawa, T., Hagimoto, A., Wada, K., Nomura, R., Nakano, K., Ooshima, T., Asai, F.: Molecular detection of human periodontal pathogens in oral swab specimens from dogs in Japan. *J. Vet. Dent.*, **28**, 84-89, 2011.
- 39) American Veterinary Dental College (AVDC): Stages of Periodontal Disease.  
(「<https://www.avdc.org/Nomenclature/Nomen-Intro.html>」 2018 年 12 月現在)
- 40) Conrads, G., Citron, D.M., Tyrrell, K.L., Horz, H.P., Goldstein, E.J.: 16S-23S rRNA gene internal transcribed spacer sequences for analysis of the phylogenetic relationships among species of the genus *Porphyromonas*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **55**, 607-613, 2005.
- 41) Smith, P.K., Krohn, R.I., Hermanson, G.T., Mallia, A.K., Gartner, F.H., Provenzano, M.D., Fujimoto, E.K., Goeke, N.M., Olson, B.J., Klenk, D.C.: Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.*, **150**, 76-85, 1985.
- 42) Kanda, Y.: Investigation of the freely available easy-to-use software ‘EZR’ for medical statistics. *Bone Marrow Transplantation*, **48**, 452-458, 2013.

- 43) 諸井英徳 : *Porphyromonas gingivalis* 外膜タンパクの分離精製と白血球に対する遊走活性. 歯科医学, **55**, 141-153, 1992.
- 44) Kurihara, H., Nishimura, F., Nakamura, T., Nakagawa, M., Tanimoto, I., Nomura, Y., Koikeguchi, S., Kato, K., Murayama, Y.: Humoral immune response to an antigen from *Porphyromonas gingivalis* 381 in periodontal disease. *Infect. Immun.*, **59**, 2758-2762, 1991.
- 45) Hongyo, H., Kurihara, H., Koikeguchi, S., Miyamoto, M., Maeda, H., Hayakawa, M., Abiko, Y., Takashiba, S., Murayama, Y.: Molecular cloning and characterization of the gene encoding 53 kDa outer membrane protein of *Porphyromonas gingivalis*. *Microbios*, **92**, 47-57, 1997.
- 46) Oishi, Y., Watanabe K., Kumada, H., Ishikawa, E., Hamada, N.: Purification and characterization of a novel secondary fimbrial protein from *Porphyromonas gulae*. *J. Oral. Microbiol.*, **4**, 19076, 2012.
- 47) 門脇知子, 瀧井良祐, 馬場貴代, 山本健二 : 歯周病とジンジパイン. 日薬理誌, **122**, 37-44, 2003.
- 48) Fujimoto, C., Maeda, H., Koikeguchi, S., Takashiba, S., Nishimura, F., Arai, H., Fukui, K., Murayama, Y.: Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) to the

analysis of microbial communities of subgingival plaque. *J. Periodontal. Res.*, 38, 440-445, 2003.

## 図の説明

図1. 臨床応用実験における被験動物の抽出フローチャート

図2. アガロース電気泳動における*P. gingivalis*プライマーおよび*P. gulae*プライマーの特異性

*P. gingivalis*プライマー (GI) および*P. gulae*プライマー (GU) を用いて (各0.2 μM) *P. gingivalis* W83株および*P. gulae* ATCC51700株のDNAを鋳型 (10<sup>5</sup>DNA/反応) として用いてPCRを行い, PCR産物をアガロース電気泳動した。各プライマーで増幅されたDNA長は, *P. gingivalis*が99 bpおよび*P. gulae*が87 bpであった。電気泳動像は独立した3回の実験の典型像である。

図3. リアルタイムPCRにおける*P. gingivalis*プライマーおよび*P. gulae*プライマーの特異性とDNA検出感度

*P. gingivalis*プライマー (GI) および*P. gulae*プライマー (GU) を用いて (各0.2 μM) *P. gingivalis* W83株および*P. gulae* ATCC51700株のDNAを鋳型 (2.5×10<sup>5</sup>~2.5×10<sup>1</sup>DNA/

反応)として用いてリアルタイムPCRを行った。その結果得られた検量線, 増幅曲線, 解離曲線, 解離ピークの4つのグラフを示す。グラフは独立した3回の実験の典型例である。1回の測定はデュプリケートで行い, その結果は平均値とした。

#### 図 4. PCR 産物の DNA 塩基配列と標的 DNA 塩基配列との比較

*P. gingivalis* プライマー (GI) および *P. gulae* プライマー (GU) の PCR 産物の塩基配列解析を行い, データベースにおける各細菌の標的 DNA 塩基配列と比較した。比較対象は *P. gingivalis* ATCC33277 株および *P. gulae* ATCC51700 株の DNA 塩基配列とした。プライマーごとに, 標的 DNA 塩基配列と PCR 産物の DNA 塩基配列を上下に並べ, 両者が一致する部位を\*で示した。

#### 図 5. 犬における抗原投与による血清 IgG 抗体価の変動

犬A, B, Cに*P. gingivalis* FDC381株抗原, 犬D, E, Fに*P. gulae* ATCC51700株抗原, 犬Gに生理食塩水(陰性対照)を静脈内に1週間ごとに計6回投与し, 各投与から1週間後と, 6回の感作後に2週間ごとに3回の採血を行った。得られた血清中の*P. gingivalis* 抗原および*P. gulae*抗原に対する血清IgG抗体価を定量した。グラフは血清IgG抗体価の経時的変化をELISA Unit (EU) で個体別に示しており, 実線は*P. gingivalis*抗原に対

する抗体価，破線は*P. gulae*抗原に対する抗体価である。なお，EU100以下のグレー領域は，抗体価の上昇なしとみなした。抗体価は，独立した3回の実験の平均値を示し，エラーバーは標準偏差を示す。1回の測定はデュプリケートで行い，その結果は平均値とした。

## 図 6. 抗原の SDS-PAGE 像および Western blotting 像

### ①SDS-PAGE

*P. gingivalis* FDC381株抗原 (gi) および*P. gulae* ATCC51700株抗原 (gu) のタンパク質 (10 µg/ウェル) をSDS-PAGEで分離した。矢印は両抗原に共通して検出された50～55 kDaのバンドを示す。SDS-PAGE像は独立した3回の実験の典型像である。

### ②Western blotting

*P. gingivalis* FDC381株抗原 (gi) および*P. gulae* ATCC51700株抗原 (gu) と犬 (A～G) の抗原感作前後の血清とのWestern blottingを行った (各抗原タンパク質10 µg/ウェル)。各個体のWestern blotting像において，中央マーカの左側は，抗原感作前の血清 (-) を反応させた。右側は，A, B, Cでは*P. gingivalis*感作後の血清 (gi+)，D, E, Fでは*P. gulae*感作後の血清 (gu+)，Gでは生理食塩水投与後の血清 (NS+) を反応させた。矢印 (黒) は両抗原に共通して検出された50～55 kDaのバンドを示す。

矢印（白）は*P. gingivalis*抗原で検出された40～45 kDaおよび45～50 kDaのバンドを示す。Western blotting像は独立した3回の実験の典型像である。

## 図7. 伴侶動物の犬における個体別の細菌DNA検査および血清IgG抗体価検査

### ①細菌DNA検査

犬のデンタルプラーク中の細菌数はリアルタイムPCRで定量した。総菌数はユニバーサルプライマーを用いて、*P. gingivalis*および*P. gulae*の細菌数は各菌のプライマー（GIおよびGU）を用いた。それぞれの細菌ごとに独立した3回の実験を行った。1回の実験はデュプリケートで行い、その結果は平均値とした。グラフの縦軸は、3回の実験の平均値を用いて、総菌数に対する*P. gingivalis*および*P. gulae*の細菌数の割合(%)で示す。横軸は、49頭の犬を歯周病ステージ分類の重症度に沿って個体別に示す。

### ②血清IgG抗体価検査

犬の*P. gingivalis*抗原および*P. gulae*抗原に対する血清IgG抗体価はELISA法で定量した。それぞれの抗原ごとに独立した3回の実験を行った。1回の実験はデュプリケートで行い、その結果は平均値とした。グラフの縦軸は、3回の実験の平均値を用いて、ELISA Unitで示す。横軸は、49頭の犬を歯周病ステージ分類の重症度に沿って個体別

に示す。なお、エラーバーは標準偏差を示す。また、グレー領域はEU100以下の抗体価を示した。

## 図8. 歯周病重症度で分類した群別の細菌DNA検査および血清IgG抗体価検査

### ①細菌DNA検査

図7-①の総菌数に対する*P. gingivalis*および*P. gulae*の細菌数の割合(%)を、歯周病ステージ分類で重症度別に分類した健常群( $n=8$ )、歯肉炎群( $n=10$ )、歯周炎群( $n=31$ )で比較した。グラフは各群の平均値を示し、エラーバーは標準偏差を示す。(\*:  $p < 0.05$ , クラスカル・ウォリス検定/マン・ホイットニーのU検定)

### ②血清IgG抗体価検査

図7-②の*P. gingivalis*抗原および*P. gulae*抗原に対するIgG抗体価を、上記①と同様に健常群( $n=8$ )、歯肉炎群( $n=10$ )、歯周炎群( $n=31$ )で比較した。ボックスプロット中のひげの上端は最大値、下端は最小値を示し、箱の上端は75%値、中央は中央値、下端は25%値を示す。(\*:  $p < 0.05$ , クラスカル・ウォリス検定/マン・ホイットニーのU検定)

## 図9. 細菌DNA検査および血清IgG抗体価検査の受信者動作特性曲線

図7の結果をもとに、歯周炎群を疾患陽性（ $n=31$ ）、健常群および歯肉炎群を疾患陰性（ $n=18$ ）として、*P. gingivalis*および*P. gulae*に対する①細菌DNA検査および②血清IgG抗体価検査の受信者動作特性曲線を作成した。それぞれの受信者動作特性曲線から求められた曲線下面積と95%信頼区間、カットオフ値、感度、そして特異度を示す。また、カットオフ値を基準にして、表のように検査陽性と検査陰性を分けた。表から計算した偽陽性率、偽陰性率、陽性的中率、そして陰性的中率を示す。

図10. ヒト（飼い主）と犬（伴侶動物）を対象にした臨床研究のイメージ図

図1

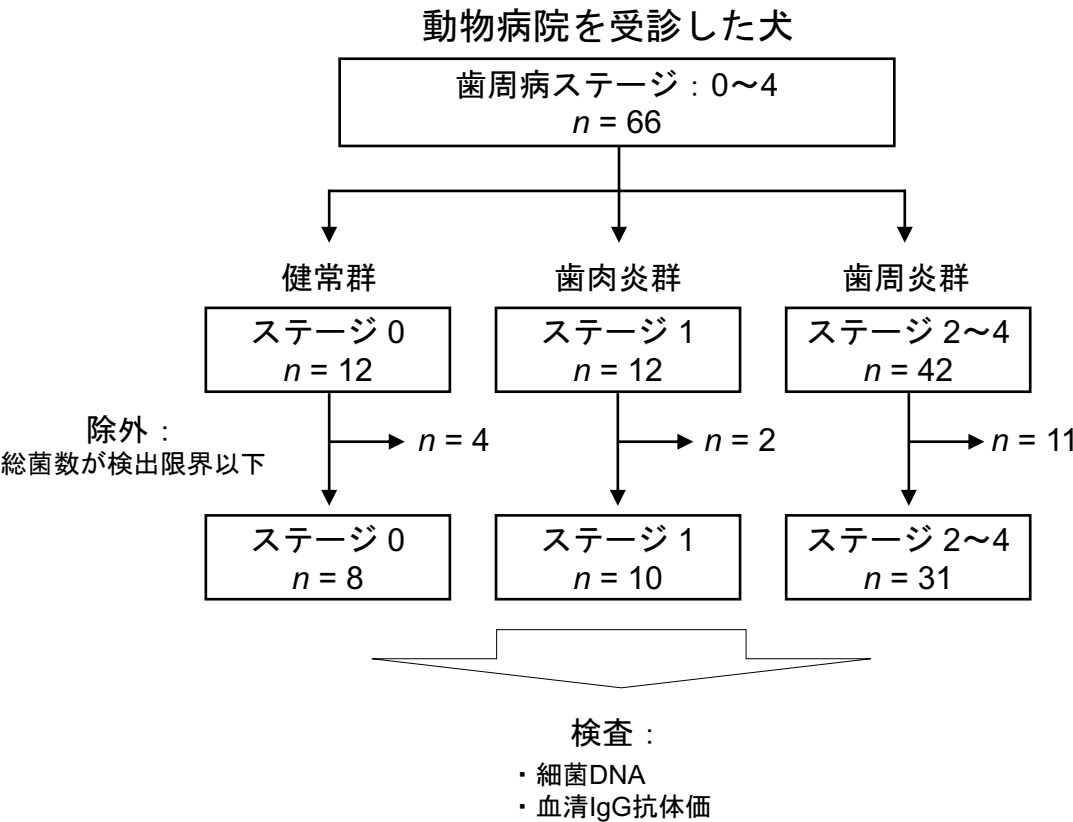
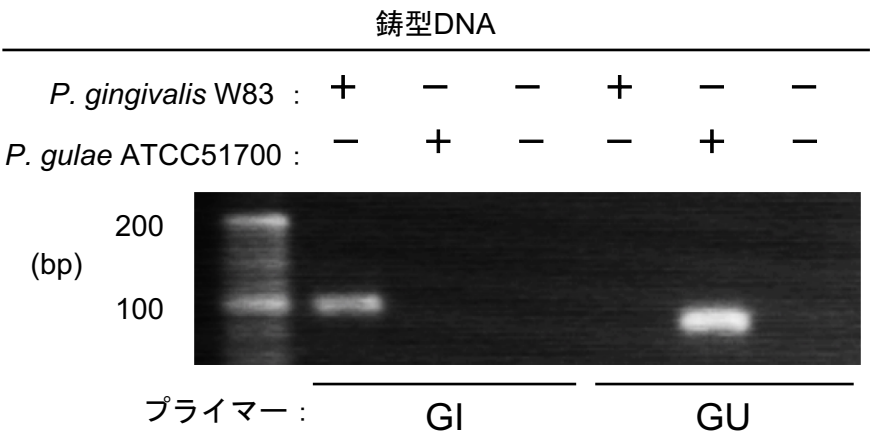
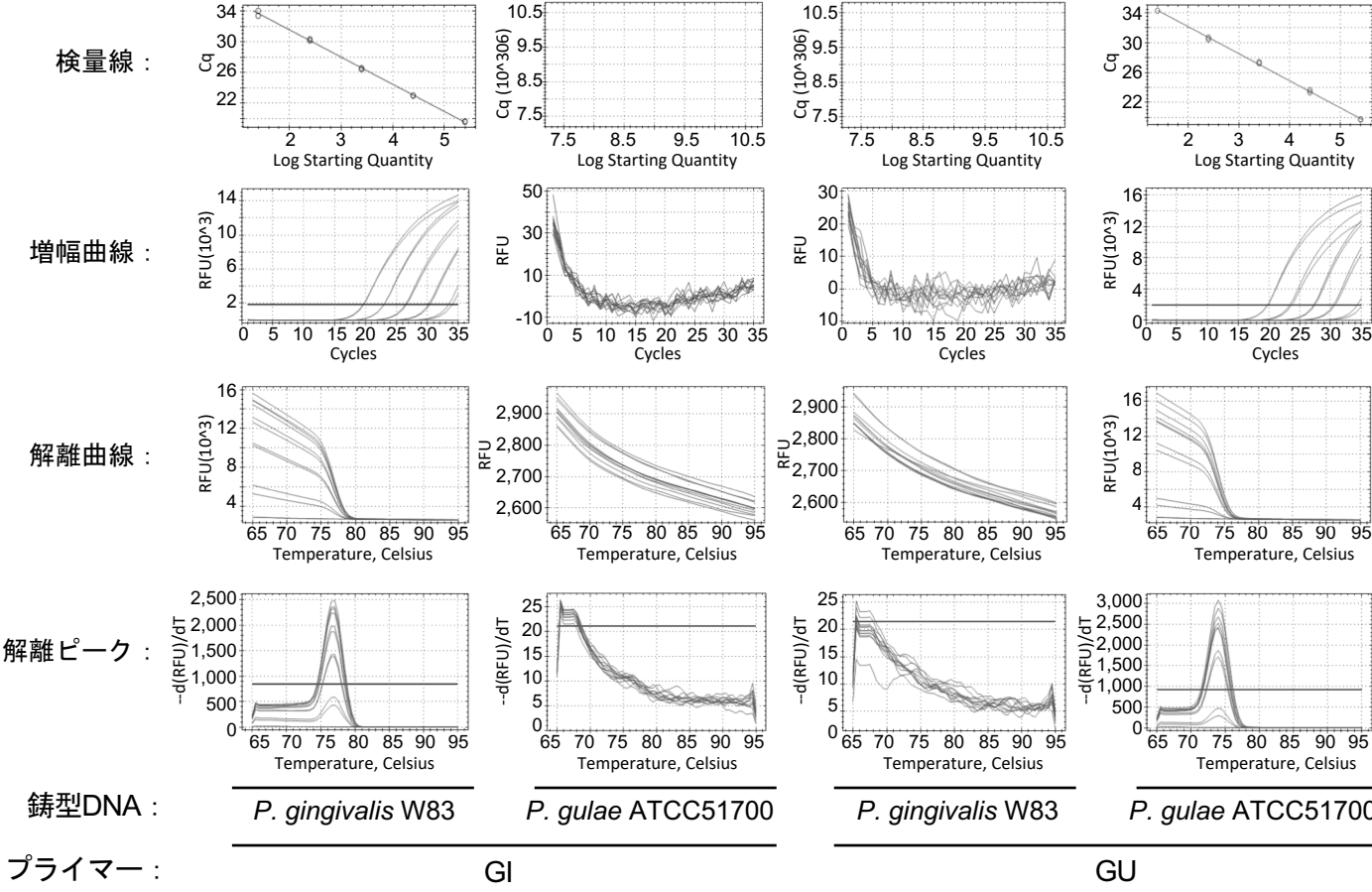


図2





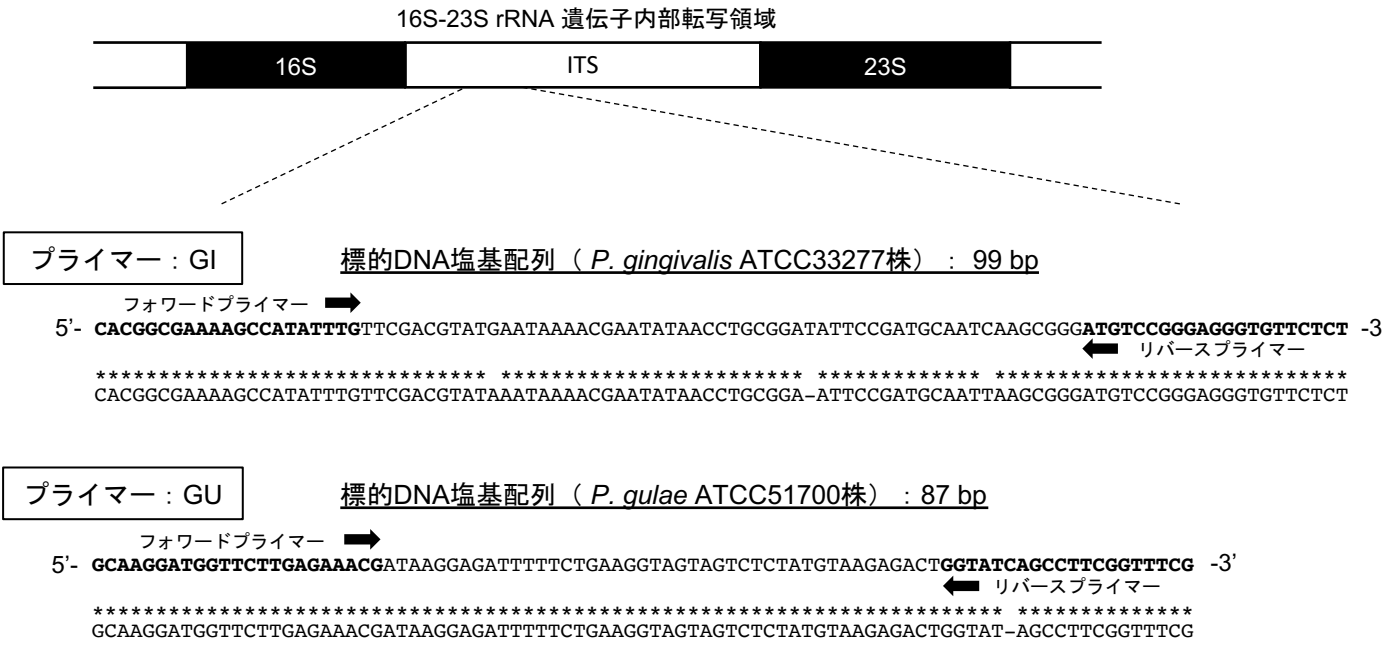
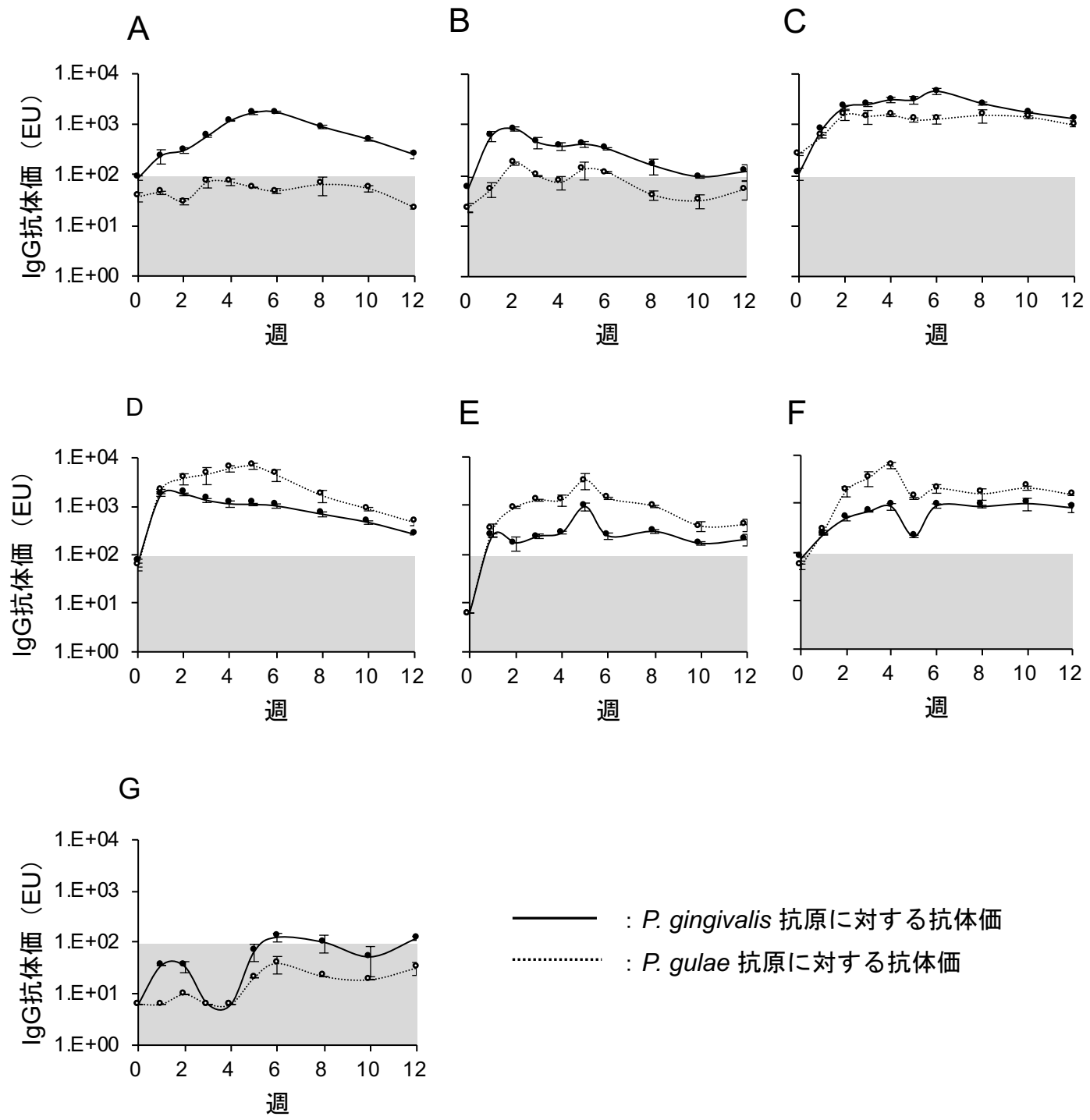
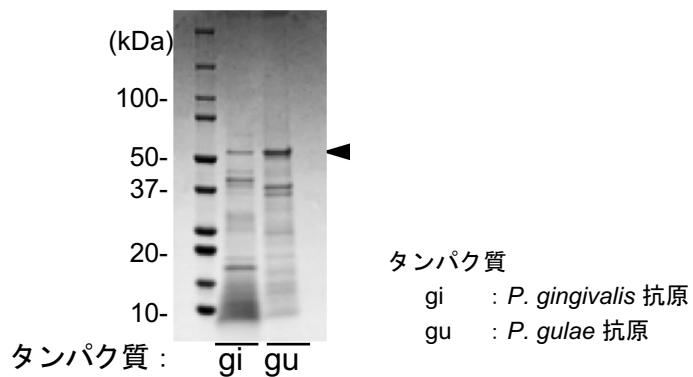


図5



①



②

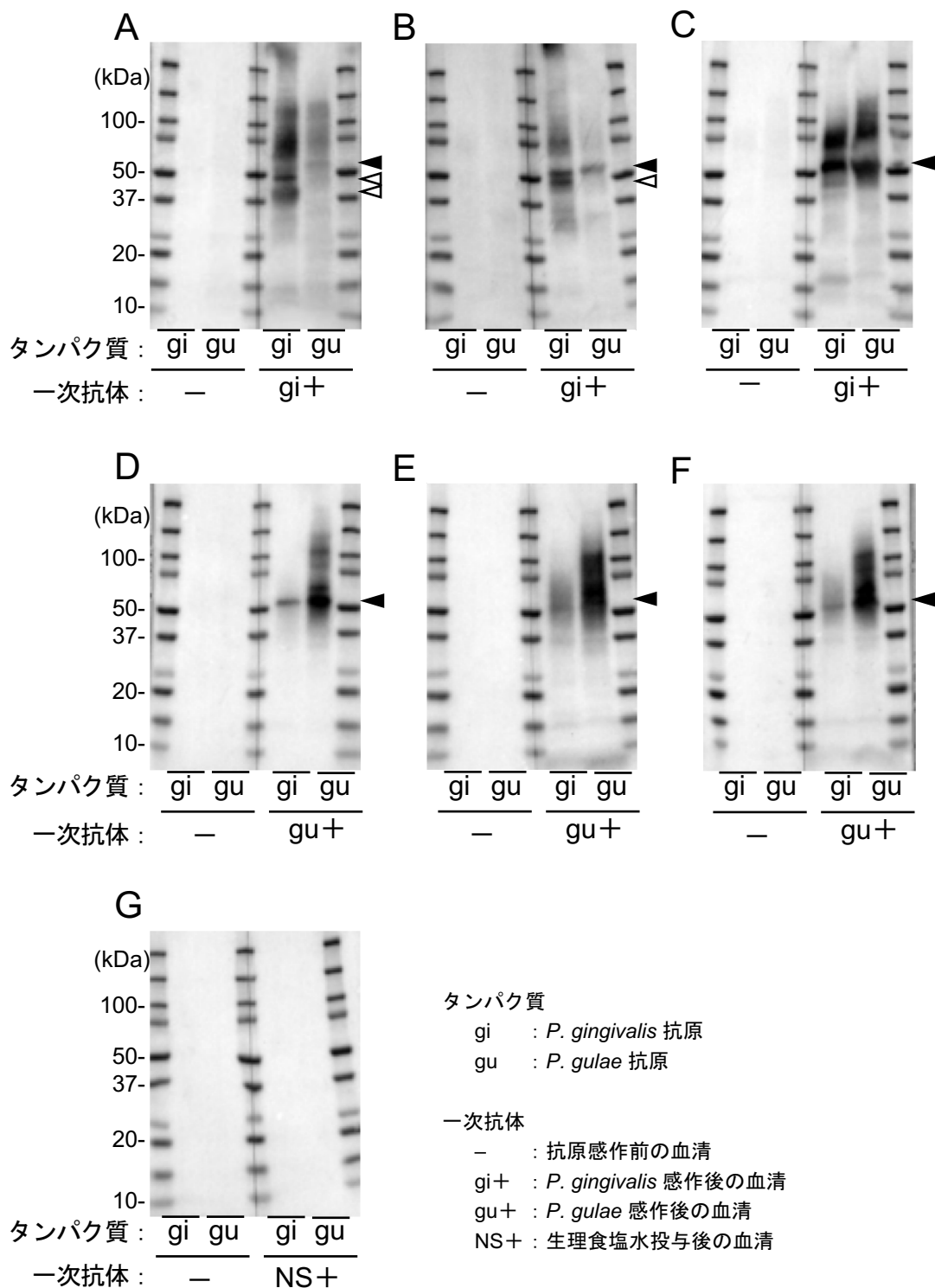
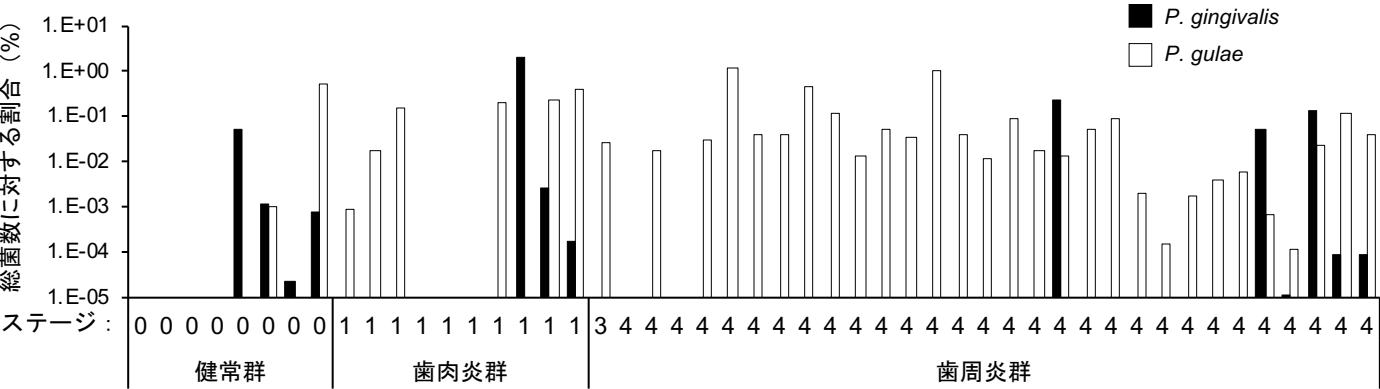
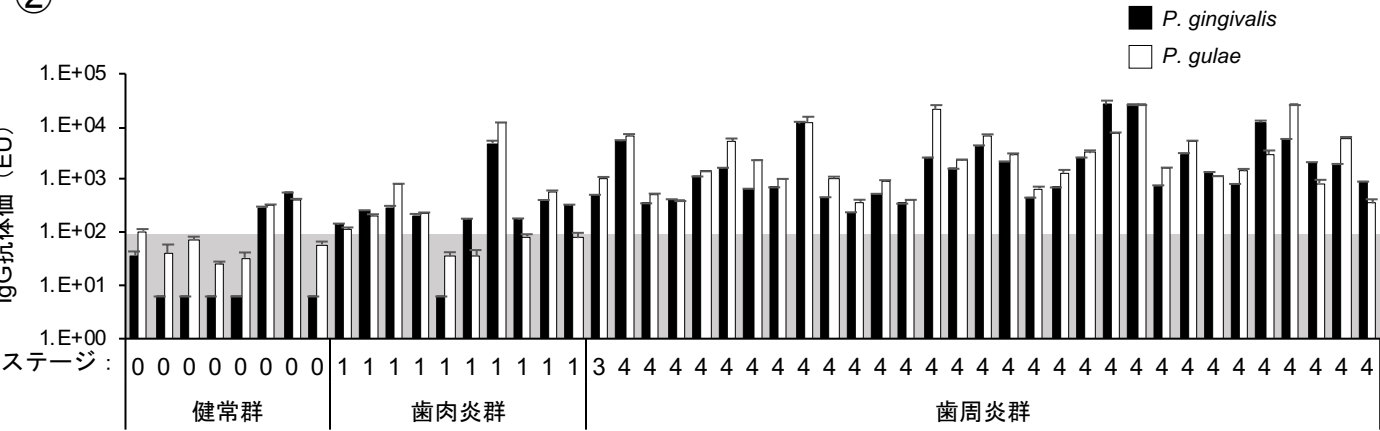


図7

①

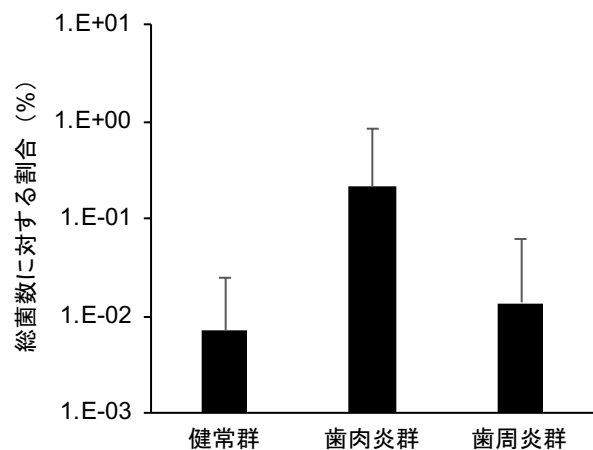


②

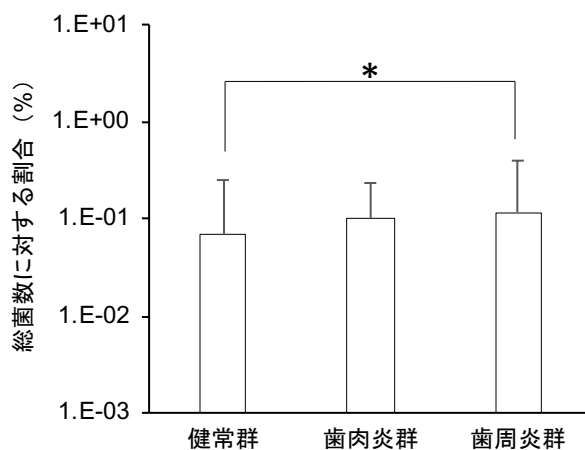


①

*P. gingivalis* の総菌数に対する割合

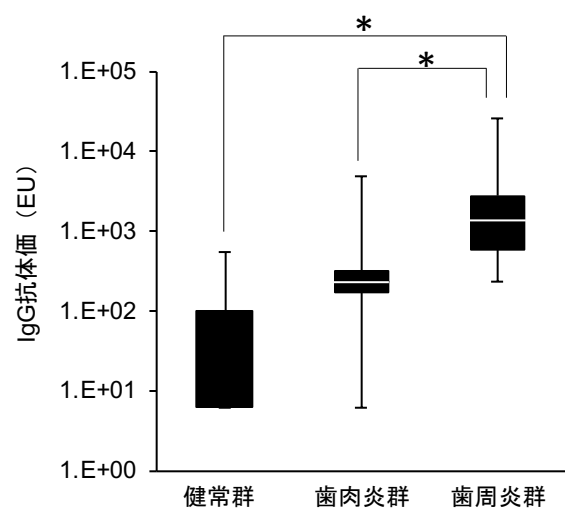


*P. gulae* の総菌数に対する割合

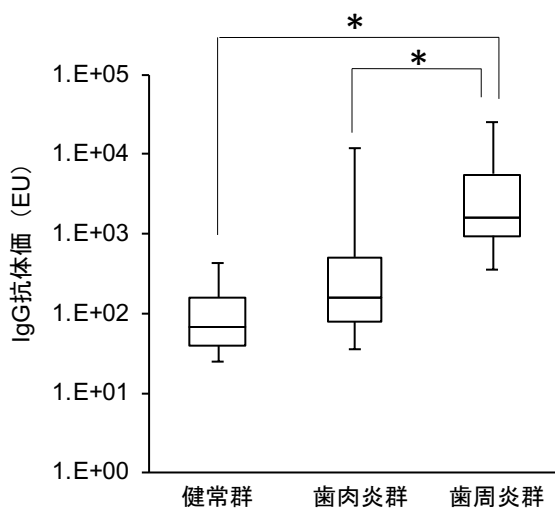


②

*P. gingivalis* に対する抗体価

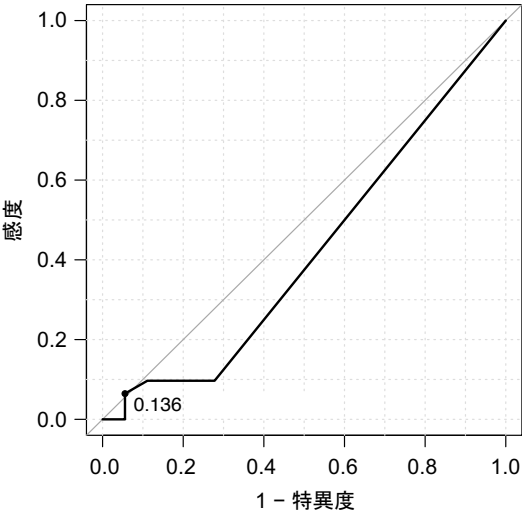


*P. gulae* に対する抗体価



①

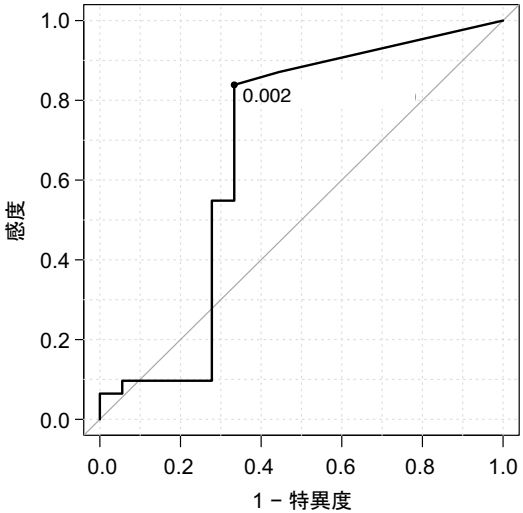
*P. gingivalis* の総菌数に対する割合



曲線下面積：0.417（95%信頼区間：0.298 – 0.535）  
カットオフ値：0.136  
感度：6.5%  
特異度：94.4%  
偽陽性率：25.0%  
偽陰性率：62.2%  
陽性的中率：75.0%  
陰性的中率：37.8%

| <i>P. gingivalis</i> / 総菌 | 歯周炎群 | 健常群<br>歯肉炎群 | 合計 |
|---------------------------|------|-------------|----|
| ≥ 0.136                   | 3    | 1           | 4  |
| < 0.136                   | 28   | 17          | 45 |
| 合計                        | 31   | 18          | 49 |

*P. gulae* の総菌数に対する割合

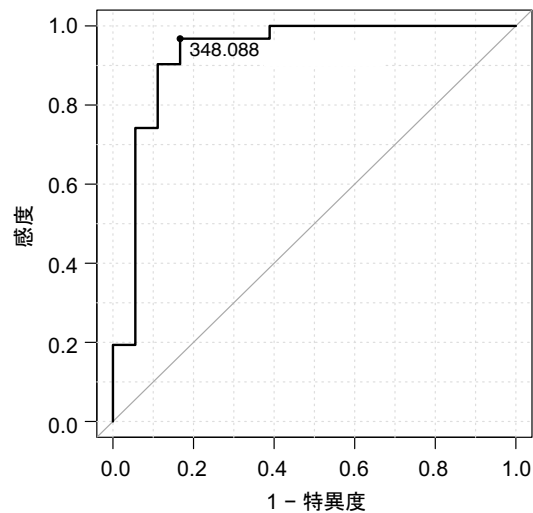


曲線下面積：0.67（95%信頼区間：0.483 – 0.857）  
カットオフ値：0.002  
感度：83.9%  
特異度：66.7%  
偽陽性率：19.4%  
偽陰性率：33.3%  
陽性的中率：80.6%  
陰性的中率：66.7%

| <i>P. gulae</i> / 総菌 | 歯周炎群 | 健常群<br>歯肉炎群 | 合計 |
|----------------------|------|-------------|----|
| ≥ 0.002              | 25   | 6           | 31 |
| < 0.002              | 6    | 12          | 18 |
| 合計                   | 31   | 18          | 49 |

②

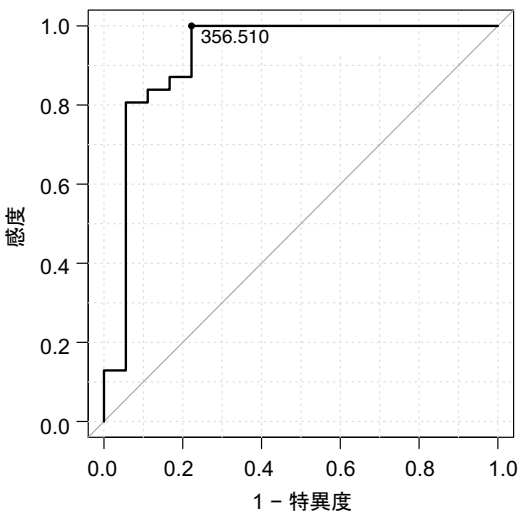
*P. gingivalis* に対する抗体価



曲線下面積：0.928（95%信頼区間：0.835 – 1）  
カットオフ値：348  
感度：93.5%  
特異度：83.3%  
偽陽性率：9.4%  
偽陰性率：11.8%  
陽性的中率：90.6%  
陰性的中率：88.2%

| 血清IgG抗体価 | 歯周炎群 | 健常群<br>歯肉炎群 | 合計 |
|----------|------|-------------|----|
| ≥ 348    | 29   | 3           | 32 |
| < 348    | 2    | 15          | 17 |
| 合計       | 31   | 18          | 49 |

*P. gulae* に対する抗体価



曲線下面積：0.925（95%信頼区間：0.826 – 1）  
カットオフ値：356  
感度：100%  
特異度：77.8%  
偽陽性率：11.4%  
偽陰性率：0%  
陽性的中率：88.6%  
陰性的中率：100%

| 血清IgG抗体価 | 歯周炎群 | 健常群<br>歯肉炎群 | 合計 |
|----------|------|-------------|----|
| ≥ 356    | 31   | 4           | 35 |
| < 356    | 0    | 14          | 14 |
| 合計       | 31   | 18          | 49 |

図10

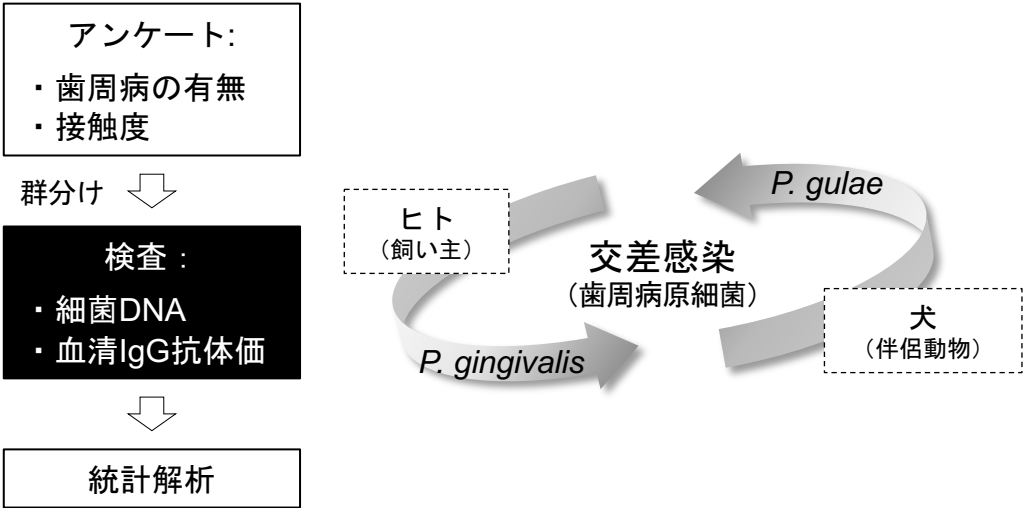


表 リアルタイム PCR 用プライマー

| プライマー  | 塩基配列 (5'-3')                                            | 標的細菌                 | 標的領域 | 増幅 DNA 長<br>(bp) |
|--------|---------------------------------------------------------|----------------------|------|------------------|
| ユニバーサル | F : GTGSTGCAYGGYTGTCGTCA<br>R : ACGTCRTCCMCACCTTCCTC    | 総菌                   | 16S  | 148              |
| GI     | F : CACGGCGAAAAGCCATATTTG<br>R : AGAGAACACCCTCCCGGACAT  | <i>P. gingivalis</i> | ITS  | 99               |
| GU     | F : GCAAGGATGGTTCTTGAGAAACG<br>R : CGAAACCGAAGGCTGATACC | <i>P. gulae</i>      | ITS  | 87               |

GI : *P. gingivalis* プライマー, GU : *P. gulae* プライマー

F : フォワード, R : リバース

16S : 16S rRNA 遺伝子, ITS : 16S-23S rRNA 遺伝子内部転写領域