

氏名	田井 真砂子		
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5924号		
学位授与の日付	平成31年3月25日		
学位授与の要件	医歯薬学総合研究科病態制御科学専攻 (学位規則第4条第1項該当)		
学位論文の題目	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		
論文審査委員	大原 直也 教授	仲野 道代 教授	島田 康史 准教授

学位論文内容の要旨

論文内容の要旨（2000字程度）

【緒言】

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。

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*Porphyromonas gingivalis*および*Porphyromonas 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、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。

【材料と方法】

1. **細菌培養**：供試菌として、*P. gingivalis* W83 株および FDC381 株、*P. gulae* ATCC51700 株を用い、それぞれ 37°C の嫌気条件下で嫌気培養した。
2. **DNA の調製**：培養した *P. gingivalis* W83 株および *P. gulae* ATCC51700 株から DNA を抽出し、DNA 濃度を細菌 1.0×10^5 個/ μL 相当になるように調整した。
3. **抗原の調製**：*P. gingivalis* FDC381 株および *P. gulae* 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。
4. **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 *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、*P. gingivalis* 抗原 (1.0 mg/mL)、*P. gulae* 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。
5. **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。
6. **DNA プライマー**：総菌数の定量には、16S rRNA 遺伝子を標的にしたユニバーサルプライマーを、*P. gingivalis* および *P. gulae* 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。

7. PCR およびアガロース電気泳動 : *P. gingivalis* および *P. gulae* 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。
8. リアルタイム PCR : *P. gingivalis* および *P. gulae* 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、*P. gingivalis* および *P. gulae* 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 塩基配列との同一性を調べた。
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 405/490 nm 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 塩基配列との同一性は、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。

論文審査結果の要旨

近年、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。伴侶動物の中でも犬は古くからヒトとの関わりが強い伴侶動物であり、ヒトと同様に歯周病罹患率が高い。両者の密な接触によって歯周病原細菌が交差感染し、人獣共通感染症となっている可能性があるが、実態には不明な点が多い。以上の背景を踏まえ、申請者はヒトと犬における歯周病原細菌の交差感染を調べる検査法の確立を検討した。検査法として、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 検査と ELISA 法を用いた血清 IgG 抗体価検査の 2 つの方法を用いた。また検査対象としては、ヒトと犬それぞれの代表的な歯周病原細菌である *Porphyromonas gingivalis* および *Porphyromonas gulae* を選択した。得られた成果は次のとおりである。

細菌 DNA 検査では、広く用いられている 16S ribosomal RNA (rRNA) 遺伝子よりも菌種間で相同性が低い 16S-23S rRNA 遺伝子内部転写領域 (ITS) を標的にすることで、両菌種に特異的なリアルタイム PCR 用のプライマーを設計した。そして、PCR およびリアルタイム PCR で菌種特異性と検出感度を、また PCR 産物の塩基配列解析で標的 DNA の増幅を確認した。

血清 IgG 抗体価検査では、各細菌の全菌体の超音波破碎抽出物を抗原として犬に接種した。そして、各抗原で感作した犬の血清中の各抗原に対する抗体価を ELISA 法で定量した。また、両抗原のタンパク質分画を SDS-PAGE で、抗原と抗原感作前後の血清との反応を Western blotting で確認した。その結果、両抗原の血清 IgG 抗体価検査における有用性が示され、また両抗原に対する交差反応は共通抗原によるものであることが推察された。

作製したプライマーと抗原を用いて、伴侶動物の犬 49 頭を対象に細菌 DNA 検査と血清 IgG 抗体価検査を実施し、両検査結果が犬の歯周病重症度を評価できるかを検討した。その結果、細菌 DNA 検査よりも血清 IgG 抗体価検査の方が犬の歯周病重症度を評価できる可能性が示された。しかし、血清 IgG 抗体価検査では両抗原に対する交差反応があるため、抗体価の上昇がいずれの細菌によるものかを特定するためには、細菌 DNA 検査を同時に実施することが不可欠であると考えられた。今後、飼い主と伴侶動物の犬の組を対象に両検査を実施し、歯周病の有無や接触度と両検査結果の関係を調べることで、両者における *P. gingivalis* および *P. gulae* の交差感染の確認が可能になると期待できる。

以上のように、本申請論文では、*P. gingivalis* および *P. gulae* を対象にした細菌 DNA 検査と血清 IgG 抗体価検査を確立し、さらに伴侶動物の犬における検査の妥当性も確認している。本研究結果は、ヒトと伴侶動物の犬における両細菌の交差感染すなわち歯周病原細菌による人獣共通感染症の実態を解明する一助となる可能性を示すものであり、新規性と重要性が認められる。よって、本審査委員会は、本申請論文に博士（歯学）の学位論文としての価値を認める。