

## ヒトと飼いイヌにおける歯垢中の歯周病原菌の検出

西山 謙三 佐々木 悠 稲葉 啓太郎  
 倉橋 絢子 浜田 信城\*

神奈川歯科大学分子生物学講座口腔細菌学分野  
 (受付: 2021年2月17日, 受理: 2021年3月11日)

## Detection of periodontopathic bacteria in dental plaque of humans and their dogs

Kenzo NISHIYAMA, Haruka SASAKI, Keitaro INABA,  
 Ayako KURAHASHI and Nobushiro HAMADA

Department of Oral Microbiology, Kanagawa Dental University, 82 Inaoka-cho, Yokosuka, Kanagawa 238-8580, Japan

## Abstract

Periodontitis is a chronic disease caused by Gram-negative, bacterial mixed infection. *Porphyromonas gulae* is a black-pigmented anaerobic bacteria associated with canine periodontitis. The properties of *P. gulae* fimbriae were reported to be similar to those of *Porphyromonas gingivalis* fimbriae. The purpose of the present study was to analyze the distribution of oral bacteria in dental plaque samples from humans and their dogs. We investigated whether *P. gulae* has the same ability to adhere to human cells as *P. gingivalis*. The possibility of transmission of *P. gulae* to the human oral cavity was investigated by PCR. In addition, PCR was used to analyze the distribution of *P. gingivalis*, *P. gulae*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Campylobacter rectus*, *Fusobacterium nucleatum*, *Tannerella forsythia* and *Treponema denticola* in dental plaque samples from dogs and their owners. *P. gulae* was able to adhere to human gingival fibroblasts as it was detected in dental plaque samples from humans living with dogs. On the other hand, human-derived bacteria were found in the oral cavity of dogs living with their owners. This study suggests that periodontopathic bacteria can be transmitted between humans and dogs.

\* 責任著者連絡先: 〒 238-8580 神奈川県横須賀市稲岡町 82 番地  
 神奈川歯科大学分子生物学講座口腔細菌学分野  
 浜田信城  
 TEL: 046-822-8867 e-mail: hamada@kdu.ac.jp

## 緒 言

*Porphyromonas gulae* (*P. gulae*) は, イヌの歯肉溝から高頻度に検出される黒色素産生性偏性嫌気性グラム陰性桿菌である。*P. gulae* は, 2001年にさまざまな動物の歯肉溝に生息する新種として報告され, DNA-DNA 相同性データと 16S リボソーム RNA (rRNA) 遺伝子配列の分析により, *P. gulae* が

*Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*) とは異なる菌種であることが報告されている<sup>1)</sup>。イヌの約 80% が 4 歳までにある程度の歯周病を示すと推定されており, 歯周病の重症度は年齢とともに悪化すると報告されている<sup>2)</sup>。また, 1 mm を超えるアタッチメントロスの有病率は 1 歳のイヌで 20% であり, 年齢にもよるが 44 ~ 81% が 4 mm 以上のプロービングポケットの深さを有することが報告されている<sup>3)</sup>。

イヌの歯垢から分離される *Porphyromonas* 属の割合は、5歳では2歳時に比較して約6倍になり、疾患の重症度と相関することが報告されている<sup>4)</sup>。*P. gulae* は、イヌの健康な歯周ポケットよりも歯周病に罹患した部位で検出されることが報告され、イヌ歯周炎に関連する黒色色素産生桿菌は、*Porphyromonas salivosa*, *Porphyromonas denticanis* および *Porphyromonas gulae* であると報告されている<sup>5)</sup>。

*P. gulae* は、菌体表面に2種類の異なる線毛を発現し、それぞれの線毛の分子量が41 kDaと67 kDaであると報告している<sup>6)</sup>。線毛遺伝子 *fimA* によってコードされる *P. gulae* 41 kDa 線毛サブユニットタンパク質 (FimA) は、歯周炎と相関することが知られている<sup>7)</sup>。

*P. gingivalis* は、慢性炎症性疾患である歯周病の原因細菌であることが多数報告されている<sup>8-12)</sup>。細菌の線毛は重要な細胞構造物であり、宿主細胞への付着や侵入に関与し<sup>13-15)</sup>、ヒト歯周組織の炎症を誘発する<sup>16,17)</sup>。また、*P. gingivalis* 線毛は、唾液タンパク質、共生細菌、細胞外マトリックスや宿主細胞などに特異的に結合することが明らかにされ、歯周組織破壊を引き起こす主要な病原因子であると考えられている<sup>18)</sup>。さらに、線毛は、マクロファージや線維芽細胞からの炎症性サイトカインの産生を誘導し、炎症反応の病原因子として働くことが示されている<sup>19)</sup>。

ヒト歯周炎は、*P. gingivalis* を含む、特定のグラム陰性嫌気性細菌のレベルが上昇した歯肉縁下プラークに関連する。細胞への付着能は、歯周炎につながる重要な因子である。特に線毛は、細菌と宿主の間の最初の相互作用を促進する上で重要な役割を果たすことが示唆されている<sup>20)</sup>。*P. gulae* は、イヌ歯周病の主要な病原体でと考えられているが、歯周病における *P. gulae* 線毛の役割については未だ不明な点が多く、*P. gulae* の伝播に関する疫学に関する情報もほとんどない。

口腔内細菌の伝播については、う蝕原性菌である *S. mutans* の母親から子供への伝播が報告されている<sup>21,22)</sup>。歯周病原性細菌である *A. actinomycetemcomitans* についても、polymerase chain reaction (PCR) 法を用いて遺伝子型を調査し、子供が *A. actinomycetemcomitans* 陽性の場合、親からの伝播が起きていると報告している<sup>23)</sup>。一方、*P. gingivalis* の伝播については、一般的に家族間での接触によって起きていることが報告されている<sup>24)</sup>。

本研究では、*P. gulae* 菌体表層に存在する分子量41 kDa タンパク質で形成される線毛が存在し、ヒト口腔への定着に関与する可能性を検討した。また、家

庭内でのヒトとイヌとの間での口腔内細菌の伝播の可能性を調べる目的で、相互の口腔内細菌についてPCR法を用いて歯周病原細菌の存在について検討した。

## 実験材料および方法

### 1. 基準菌株および培養条件

基準菌株として、神奈川歯科大学分子生物学講座口腔細菌学分野保存の *P. gingivalis* ATCC 33277 株および *P. gulae* ATCC 51700 株を用いた。培養にはブレインハートインフュージョン (BHI) プロス (Becton Dickinson Co., NJ, USA) にイーストエストラクト (5 mg/ml) (Becton Dickinson Co.), ヘミン (5 µg/ml) (和光純薬, 大阪, 日本), ビタミン K<sub>1</sub> (10 µg/ml) (和光純薬) を添加した BHI-YHK 培地および 5% ヒツジ脱繊維血を含む BHI-YHK 血液寒天培地を用いて嫌気条件下 (70% N<sub>2</sub>, 15% H<sub>2</sub>, 15% CO<sub>2</sub>) (ANX-1; HIRASAWA, 東京, 日本) 37°C で培養した。

### 2. 電子顕微鏡観察

*P. gulae* 菌体表層と線毛構造物の確認は透過型電子顕微鏡で行った。すなわち、18時間嫌気培養後、遠心集菌した *P. gulae* 菌体をリン酸緩衝生理食塩水 (PBS: 日水製薬, 東京, 日本) (pH 7.4) に懸濁し、カーボンコートしたコロジオン膜 (日新 EM, 東京, 日本) のグリッド上で2% 酢酸ウラニルでネガティブ染色後、JEM-100B 型透過型電子顕微鏡 (日本電子, 東京, 日本) で観察した。

### 3. 付着性試験

ヒト口腔由来のヒト歯肉線維芽細胞 (human gingival fibroblasts: HGFs) を用いて *P. gingivalis* ATCC 33277 株と *P. gulae* ATCC 51700 株のヒト細胞への付着性を検討した。HGFs は、健康な歯肉を患者から採取し、歯肉上皮を0.4% ディスパーゼ II (合同酒清, 東京, 日本) で一昼夜浸漬後、上皮組織と結合組織に分離し培養した。分離した細胞は、4.0 × 10<sup>4</sup> cells/well の密度で24 well 細胞培養用プレート (Corning, NY, USA) に播種し、10% ウシ胎児血清 (FBS: Irvine Scientific, CA, USA) を含む Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) 培地 (Gibco Lab Inc., Grand Island, NY, USA) にて37°C, 5% CO<sub>2</sub> 環境下で約 1.0 × 10<sup>5</sup> cells/well になるまで培養した。1.0 × 10<sup>9</sup> CFU/ml に調整した *P. gingivalis* および *P. gulae* 細菌懸濁液を、感染多重度 (multiplicity of infection: MOI) が10, 100 および1,000 となるよう播種した。90分間インキュベート後、付着していない細菌を取り除くためPBSで2回洗浄し、HGFsを細胞破壊させるため滅菌蒸留水を20分間作用させた。その懸濁液を段階的に希釈し、BHI-YHK 血液寒天培

表 1 特異的プライマーの塩基配列

|                                 | 配列 (5'-3')   | Size (bp) | 参考文献                                |
|---------------------------------|--|-----------|-------------------------------------|
| <i>P. gulae</i>                 | TGC TTG GTT GCA TGA TCG G<br>CAA CGG CAC GCT GAA CG                  | 451       | This study                          |
| <i>A. actinomycetemcomitans</i> | CTA GGT ATT GCG AAA CAA TTT G<br>CCT GAA ATT AAG CTG GTA ATC         | 262       | Nakano K <i>et al.</i> , 2009       |
| <i>C. rectus</i>                | TTT CGG AGC GTA AAC TCC TTT TC<br>TTT CTG CAA GCA GAC ACT CTT        | 598       | Nakano K <i>et al.</i> , 2009       |
| <i>F. nucleatum</i>             | AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG<br>GTC ATC GTG CAC ACA GAA TTG CTG        | 360       | Siqueira JF Jr <i>et al.</i> , 2004 |
| <i>P. gingivalis</i>            | AGG CAG CTT GCC ATA CTG CG<br>ACT GTT AGC AAC TAC CGA TGT            | 404       | Ashimoto A <i>et al.</i> , 1996     |
| <i>T. forsythia</i>             | GCG TAT GTA ACC TGC CCG CA<br>TGC TTC AGT GTC CAG TTA TAC CT         | 641       | Nakano K <i>et al.</i> , 2009       |
| <i>T. denticola</i>             | TAA TAC CGA ATG TGC TCA TTT ACA T<br>TCA AAG AAG CAT TCC CTC TTC TTA | 316       | Ashimoto A <i>et al.</i> , 1996     |

地へ塗抹、培養した。細菌の付着能は総菌数に対する HGFs への付着割合から求めた。ヒト歯肉線維芽細胞の培養は、神奈川歯科大学臨床研究倫理委員会（承認番号第 759 号）の承認を得て実施した。

#### 4. プライマーの作製と特異性の評価

本研究に用いた特異的なプライマーの配列を表 1 に示す。また、*P. gulae* の同定のため、GenBank より入手した *P. gulae* ATCC 51700 株の 16S rRNA 配列から特異的なプライマーを設計した。このプライマーの特異性を評価するため、*P. gingivalis* ATCC 33277 株および *P. gulae* ATCC 51700 株に対し PCR 法を行って確認した。増幅は、TaKaRa PCR Amplification Kit（タカラバイオ株式会社、滋賀、日本）を用いて行い、熱変性 94°C 30 秒、アニーリング 65°C 30 秒、伸長反応 72°C 1 分間を 30 サイクル行った後、72°C で 2 分間伸長させた。PCR 産物は、ローディングバッファー EZ-Vision®（VWR Life Science, PA, USA）を使用して、1.5% アガロースゲルによる電気泳動を行い、AE-6905H Image Saver HR（アト株式会社、東京、日本）で撮影して、遺伝子の増幅バンドの有無を確認した。尚、分子量マーカーには Smart Ladder (0.2-10 kbp)（株式会社ニッポンジーン、東京、日本）を用いた。

#### 5. 被験者と被験犬

被験者と被験犬は、7 家族でヒト 15 名とイヌ 7 匹で、本研究の目的に同意が得られたボランティアである。ヒト 15 名の年齢は、5～82 歳で男性 5 名と女性 10 名であり、イヌの年齢は、2～15 歳でオス 5 匹とメス 2 匹を対象とした。イヌの犬種は、すべてが小型犬でトイプードル、ヨークシャテリアと柴犬であり家

庭内飼育である。ヒトとイヌの口腔内常在細菌を上顎臼歯部から滅菌綿棒を用いて採取した。

家族の構成については、表 2 と表 3 に示した。尚、前もって被験者並びにイヌの飼育者に対してインフォームド・コンセントを得た。本論文では、被験犬が家庭内飼育で家族同様に扱われていることから、イヌを同一家族の一員として表記することとした。被験者と被験犬からの菌垢サンプルの採取は、神奈川歯科大学臨床研究倫理委員会（承認番号第 335 号）の承認を得て実施した。

#### 6. *P. gulae* の検出

*P. gulae* の検出は、ヒトと共に室内で飼われているイヌについて、PCR 法で行った。4 家族の構成は表 2 に示した。即ち、Family A は、イヌ 1 匹とヒト 4 名、Family B は、イヌ 1 匹とヒト 1 名、Family C は、イヌ 1 匹とヒト 2 名、Family D は、イヌ 1 匹とヒト 2 名である。菌垢サンプルからの細菌の染色体 DNA の抽出は、DNA 単離キット（ISOGEN；株式会社ニッポンジーン、東京、日本）を用いて行った。抽出精製した菌垢サンプルの染色体 DNA を TE 緩衝液（株式会社ニッポンジーン）に溶解した。DNA 増幅は、TaKaRa PCR Amplification Kit（タカラバイオ株式会社）を用いて行い、熱変性 94°C 30 秒、アニーリング 65°C 30 秒、伸長反応 72°C 1 分間を 30 サイクル後、72°C 2 分間伸長させた。PCR 産物は、ローディングバッファー EZ-Vision® を使用して、1.5% アガロースゲルによる電気泳動を行い、AE-6905H Image Saver HR で撮影して、増幅バンドの有無を確認した。尚、分子量マーカーには One STEP Ladder 100 (0.1-2 kbp)（株式会社ニッポンジーン）を用いた。

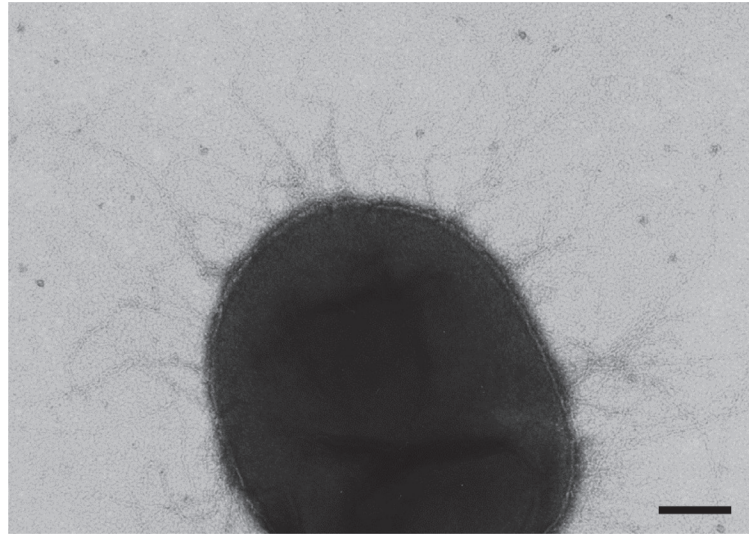


図1 電子顕微鏡像

*P. gulae* ATCC 51700株をネガティブ染色し、透過型電子顕微鏡で観察した。菌体表面に線毛構造が確認された。スケールバー：200 nm。

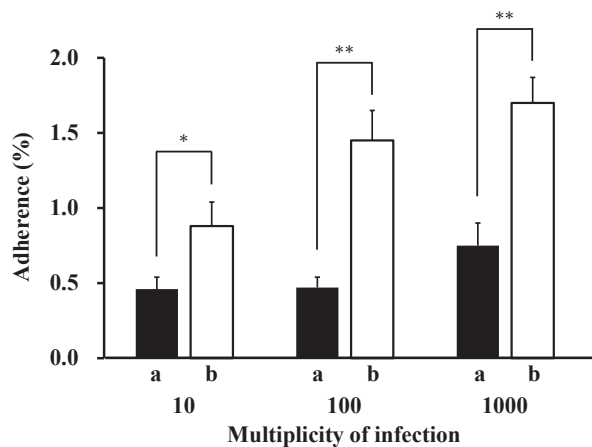


図2 ヒト歯肉線維芽細胞に対する付着性

*P. gulae* ATCC 51700株は、ヒト歯肉線維芽細胞に*P. gingivalis* ATCC 33277株よりも付着し、Multiplicity of infection (MOI) 100で3倍の付着性を示した。

a. *P. gingivalis*; b. *P. gulae*; n=3, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , Welchのt検定

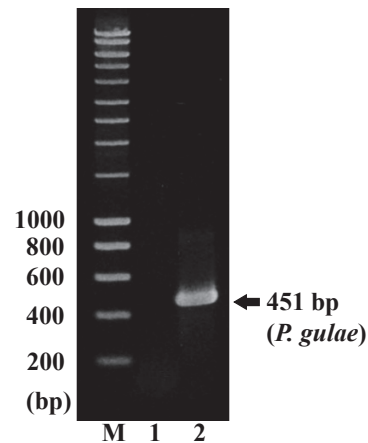


図3 *P. gulae*特異的プライマーの評価

*P. gulae* ATCC 51700株の16S rRNA遺伝子配列から菌種特異的なプライマーを設計し、*P. gingivalis*および*P. gulae*に対してPCRを行った。*P. gingivalis*では遺伝子の増幅は起こらず、*P. gulae*では451 bpの位置に増幅バンドが認められた。M、分子量マーカー；レーン1、*P. gingivalis* ATCC 33277；レーン2、*P. gulae* ATCC 51700。

## 7. ヒト歯周炎関連細菌の検出

イヌおよびその家族のヒトから抽出した口腔内細菌の染色体DNAを用いて、*P. gingivalis*と*P. gulae*を含む以下のヒト口腔常在細菌 *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (*A. actinomycetemcomitans*), *Campylobacter rectus* (*C. rectus*), *Fusobacterium nucleatum* (*F. nucleatum*), *Tannerella forsythia* (*T. forsythia*), *Treponema denticola* (*T. denticola*) の7菌種についてPCR法により検出を行った。菌種特異

プライマーは、これまでに報告されているプライマーを参考にして作製した<sup>25-27)</sup>。使用したプライマーとその詳細は、表1に示した。ヒト由来の菌種の検索を行った3家族の構成は表3に示した。即ち、Family Eは、イヌ1匹とヒト3名、Family Fは、イヌ1匹とヒト2名、Family Gは、イヌ1匹とヒト1名である。

DNA増幅は、TaKaRa PCR Amplification Kitを使用し、プライマーとPCR反応条件は表1に示す文献に従って行った。PCR産物は、ローディングバッ

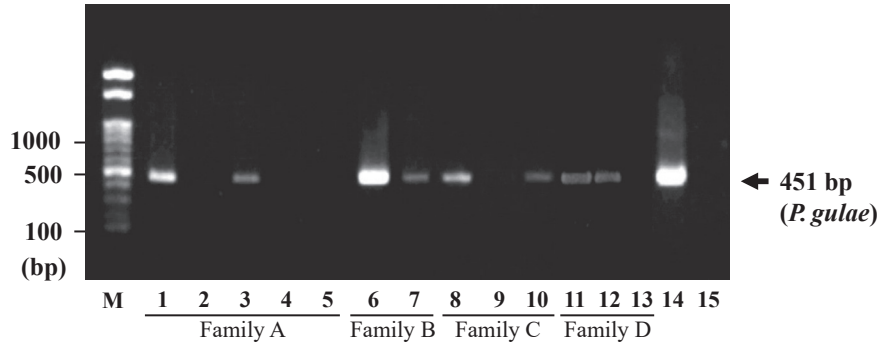


図4 イヌおよびヒトからの *P. gulae* の検出

イヌおよびヒトから滅菌綿棒を用いてプラークを採取し、*P. gulae* 特異的プライマーを用いてPCRを行った。ポジティブコントロールとして *P. gulae*、ネガティブコントロールとして *P. gingivalis* を用いた。*P. gulae* はすべてのイヌと4名のヒトから検出された。M, 分子量マーカー；レーン1, Family A イヌ1；レーン2, Family A ヒト1；レーン3, Family A ヒト2；レーン4, Family A ヒト3；レーン5, Family A ヒト4；レーン6, Family B イヌ1；レーン7, Family B ヒト1；レーン8, Family C イヌ1；レーン9, Family C ヒト1；レーン10, Family C ヒト2；レーン11, Family D イヌ1；レーン12, Family D ヒト1；レーン13, Family D ヒト2；レーン14, *P. gulae* ATCC 51700；レーン15, *P. gingivalis* ATCC 33277。

表2 *P. gulae* の検出

| Lane | Subject            | Gender (Age) | <i>P. gulae</i> |
|------|--------------------|--------------|-----------------|
| 1    | Family A イヌ 1 (TP) | M (6)        | +               |
| 2    | ヒト 1               | F (28)       | -               |
| 3    | ヒト 2               | M (53)       | +               |
| 4    | ヒト 3               | F (33)       | -               |
| 5    | ヒト 4               | M (36)       | -               |
| 6    | Family B イヌ 1 (YT) | M (14)       | +               |
| 7    | ヒト 1               | M (32)       | +               |
| 8    | Family C イヌ 1 (JS) | M (6)        | +               |
| 9    | ヒト 1               | F (62)       | -               |
| 10   | ヒト 2               | F (5)        | +               |
| 11   | Family D イヌ 1 (TP) | F (8)        | +               |
| 12   | ヒト 1               | F (58)       | +               |
| 13   | ヒト 2               | F (32)       | -               |

JS: 柴犬, TP: トイプードル, YT: ヨークシャテリア  
M: male, F: female, +: positive, -: negative

ファー EZ-Vision® を使用して、1.5% アガロースゲルによる電気泳動を行い、AE-6905H Image Saver HR で撮影して、増幅バンドの有無を確認した。

## 8. 統計学的分析

統計学的分析は、Welch の t 検定により、統計解析ソフト エクセル統計 Bellcurve for excel 3.21 (社会情報サービス, 東京, 日本) を用いて行った。有意水準は、 $P < 0.05$  および  $P < 0.01$  とした。

## 結 果

### 1. *P. gulae* 菌体の電子顕微鏡観察

*P. gulae* ATCC 51700 株をネガティブ染色し、透過型電子顕微鏡で観察した結果、菌体表層周囲に線毛構造物が確認された (図1)。

### 2. HGFs に対する付着性

HGFs へ付着した細菌を剥離して生菌数を測定し、総菌数から付着率を求めた (図2)。*P. gingivalis* の HGFs への付着率は、MOI 10, 100, 1,000 でそれぞれ

表3 ヒト口腔常在菌の検出

| Subject<br>Gender (Age)         | Family E          |               |               |               | Family F          |               |               | Family G           |               |
|---------------------------------|-------------------|---------------|---------------|---------------|-------------------|---------------|---------------|--------------------|---------------|
|                                 | イヌ1 (TP)<br>M (6) | ヒト1<br>F (12) | ヒト2<br>F (28) | ヒト3<br>M (53) | イヌ1 (TP)<br>F (2) | ヒト1<br>F (58) | ヒト2<br>F (82) | イヌ1 (YT)<br>M (15) | ヒト1<br>M (31) |
| <i>A. actinomycetemcomitans</i> | -                 | -             | -             | -             | -                 | -             | -             | -                  | -             |
| <i>C. rectus</i>                | +                 | +             | -             | +             | -                 | +             | -             | +                  | +             |
| <i>F. nucleatum</i>             | +                 | +             | +             | +             | +                 | +             | +             | +                  | +             |
| <i>P. gingivalis</i>            | +                 | +             | +             | +             | +                 | +             | +             | +                  | +             |
| <i>P. gulae</i>                 | +                 | +             | -             | +             | -                 | -             | -             | +                  | +             |
| <i>T. forsythia</i>             | +                 | +             | -             | +             | -                 | +             | -             | +                  | +             |
| <i>T. denticola</i>             | +                 | +             | -             | +             | -                 | -             | -             | +                  | +             |

TP: トイプードル, YT: ヨークシャテリア, M: male, F: female, +: positive, -: negative

れ  $0.46 \pm 0.08$ ,  $0.47 \pm 0.07$ ,  $0.75 \pm 0.15\%$  であり, *P. gulae* の付着率は,  $0.88 \pm 0.16$ ,  $1.45 \pm 0.20$ ,  $1.70 \pm 0.17\%$  であり, *P. gulae* の HGFs への付着率は, すべての MOI において *P. gingivalis* の付着率よりも有意に高く, 1.5 ~ 3 倍の値を示した。

### 3. プライマーの特異性と増幅 DNA の検出

*P. gulae* プライマーの特異性は, *P. gingivalis* ATCC 33277 および *P. gulae* ATCC 51700 に対する PCR 産物のアガロース電気泳動で確認した (図3)。アガロース電気泳動では, 標的細菌において目的サイズの単一バンド (451 bp) が検出され, 同属の *P. gingivalis* では DNA 増幅は認められなかった。この結果から, *P. gulae* 特異的プライマーと判断した。

### 4. PCR 法による *P. gulae* の検出

4 家族のイヌおよびヒトからブランク細菌を採取し, *P. gulae* 特異的プライマーを用いて PCR 法を行った。その結果, すべてのイヌと 4 名のヒトにおいて増幅されたバンドが確認された (図4)。その結果, 検査したすべての家族で *P. gulae* に感染したヒトが存在することが確認された。*P. gulae* 特異的プライマーにより, イヌ 4 匹の歯垢細菌中に *P. gulae* が検出され, *P. gulae* が検出されたイヌと室内で生活しているヒトからも *P. gulae* が検出された (表2)。

### 5. PCR 法によるヒト口腔内細菌の検出

ヒト口腔内細菌 7 菌種に対する検出は, 3 家族のイヌおよびヒトから歯垢細菌を採取し, PCR 法を行った。その結果を表3に示す。歯周病に重要とされているグラム陰性桿菌である *F. nucleatum* と *P. gingivalis* は, すべてのヒトとイヌから検出された。*A. actinomycetemcomitans* は, イヌやヒトから検出されず, Family F のイヌは, *F. nucleatum* と *P. gingivalis* 以外の細菌種は検出されなかった。Family E と Family G のイヌでは, *A. actinomycetemcomitans*

以外の細菌種が検出された。イヌ由来の細菌である *P. gulae* は, Family E の 1 名の女性と Family F の 2 名のヒトから検出されず, Family F のイヌからも検出されなかった。Family G では, イヌとヒトから *P. gulae* が検出された。

## 考 察

近年のペットブームにより, 室内飼育や交通網の発達により人と動物の共通感染症が増加し, 社会的な問題になってきている<sup>28)</sup>。現在, 多くの家庭で種々の動物が家族の一員として大切に飼育する家庭が増加している。特に, 都市部では, 住宅事情などを反映して屋内でペットを飼育する事例が多くなり, ヒトとペットとの距離が短縮し, 濃密な関係が作られている。一部の動物は, ペットの範疇を超えて, 人間と生活を共にする親密な関係となり, 人生のパートナー (コンパニオンアニマル) として扱われるようになってきている。したがって, ヒトと動物の間で寝食を共にするような非常に濃厚な接触が成立する場合がある。

ペットフード協会の調査では, 2020年10月現在, 全国のイヌの飼育頭数は, 全国で約 850 万頭飼育され, 日本の世帯数に対する飼育率は 11.85% である。また, 多くのイヌが室内で飼育されており平均寿命は 14.48 歳であるとの報告がある<sup>29)</sup>。このように, 長年, 室内で一緒に生活しているイヌは, ヒトと極めて密接な関係性を有している。日常的にヒトと最も近い距離にいることを考えると, 動物由来の感染症予防の観点から注意しなければならないと考えられる。

本研究では, PCR 法を用いてイヌからヒトへの *P. gulae* 感染とヒトからイヌへの *P. gingivalis* を含めた歯周病原細菌を対象とした感染の実態を検討した。その結果, イヌからヒトへの *P. gulae* の感染が, 4 家族すべてに認められた。これらの家族内で *P. gulae* が

検出されたヒトでは、イヌと口移し等を日常的に行っており、濃厚な接触関係にあることがわかっている。本研究で、同一家族内でのヒトとイヌにおいて、ヒトとイヌの口腔内に常在するさまざまな歯周病原細菌の感染が生じている可能性が示唆された。

厚生労働省の平成 28 年歯科疾患実態調査の概要によると、歯周病（4 mm 以上の歯周ポケットがある）の有病率は、25～34 歳で 32.4%、45～54 歳で 49.5%、65～74 歳で 57.5% と歯周病罹患率が高く、高齢になるにつれ増加し、歯肉出血を有する者の割合は、15 歳以上の年齢階級で 30% を超え、30 歳以上 55 歳未満で 40% を超えている<sup>30)</sup>。イヌの歯周炎は、病罹患率が非常に高く病因や病態がヒトの場合と同様であり、多くのイヌが歯周炎に罹患し、年齢の増加に伴い歯周炎が増悪することが報告されている<sup>31,32)</sup>。また、イヌの歯周炎の有病率と重症度は年齢や犬種などにより異なることが報告されており、5 歳のイヌの歯垢から分離された *Porphyromonas* 属の割合は、2 歳時に比較して約 6 倍であり、歯周病の重症度と相関していることが報告されている<sup>4)</sup>。したがって、ヒトとイヌはともに歯周病罹患率が高く、両者が密な接触を行う日常生活の中で歯周病原細菌が感染している可能性が考えられる。ヒトとコンパニオンアニマル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<sup>33)</sup>は、非常に少ない。本研究では、さまざまな歯周病原細菌の交差感染が示唆される中で、イヌ由来の *P. gulae* とヒト歯周炎に関わる細菌の伝播の可能性について検索した。

*P. gingivalis* はヒトの代表的な歯周病原細菌<sup>34)</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>1,35)</sup>であり、イヌの歯周病の発症と増悪に関与している可能性が報告されている<sup>36)</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>1)</sup>であり、*P. gulae* は、*P. gingivalis* 線毛タンパク質と遺伝子の相同性が 94%<sup>6)</sup>である線毛を菌体表層に保有している（図 1）。この事実から、ヒト細胞を用いて、細胞への付着実験を行った。その結果、*P. gulae* が *P. gingivalis* よりも細胞への付着性が高いことが判明し（図 2）、高い相同性を示す *P. gulae* 線毛タンパク質がヒト口腔への定着において、重要な一つの因子になっていることが示唆された。この結果から、*P. gulae* がヒト口腔内に定着する可能性が示唆された。

ペットからの感染経路として、人間との密接な距離と長い接触時間から、接触、引っ掻き傷、咬傷、などによる直接伝播が多く、糞中の病原体の経口摂取、粉

塵等の吸入感染および節足動物等のベクター（媒介動物）を介した伝播等が考えられる。イヌの感染症として、トキソプラズマ症やキャンピロバクター腸炎などの経口感染することが報告されている<sup>37)</sup>。本研究では、歯周病に関わる口腔内細菌の伝播について、イヌからヒトまたはヒトからイヌへの可能性を検討した。接触感染による病原体の伝播の可能性として、口移し、口や口の周囲を舐めさせる等の行為や同じ寝具の使用などが考えられた。PCR プライマーの特異性は、同属の菌種である *P. gingivalis* ATCC 33277 株の染色体 DNA を用いて検討し、*P. gulae* の特異的プライマーは交差反応を示さないことが確認された（図 3）。この *P. gulae* 特異的プライマーにより、本研究結果では、Family F 以外のイヌすべての歯垢細菌中に *P. gulae* が検出された（表 2, 3）。また、*P. gulae* が口腔に存在するイヌと共に室内で生活しているヒトからも *P. gulae* が検出された。症例数が少なく、検出された *P. gulae* が同一株であるか判明できていないが、家庭内でイヌからヒトへ伝播していると仮定するとイヌとヒトが濃厚に接触していた可能性が示唆された。

ヒト口腔内での歯周病原細菌の検出とイヌに存在するか確認した結果、歯垢中から、多くの歯周病原細菌が Family E の 12 歳の女性からも検出された（表 3）。この家庭で飼育しているイヌにおいても、ヒト由来の歯周病細菌が検出されたことから、この 12 歳女性の口腔内細菌がヒト由来かイヌ由来であるか興味深い点である。この結果から、ヒト口腔内細菌がヒトからヒトだけでなく、ヒトからイヌに伝播後、そのイヌからヒトへ伝播した可能性も考えられた。また、Family F のイヌは、*P. gulae* が検出されず、同一家庭内の 2 名からも検出されていない。一方でヒト由来の細菌種が数種検出されていることから、イヌからの伝播に対する注意が払われており、ヒトからイヌへの伝播については食べ物等を介して伝播した可能性が考えられた。

Socransky ら<sup>38)</sup>は、慢性歯周炎患者の歯肉縁下歯垢の菌種と歯周炎病態との解析から、対象菌種を 5 菌群である Red complex, Orange complex, Yellow complex, Purple complex, Green complex に分け、最も歯周病と深い関わりがあるとされる *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia*, *Treponema denticola* の 3 菌種を red complex と命名した。これら 3 菌種は、歯周病発症と進展に重要な病原因子を保有し、イヌからも検出された（表 3）。口腔疾患は、ヒトだけでなくイヌにおいても確認される疾患である。歯周病は、イヌにも口臭、口腔の痛みや不快感を引き起こすと考えられることから、イヌの口

腔ケアの重要性と共に口を介した感染予防への意識が必要と考えられた。ヒト由来と考えられる歯周病原細菌がイヌの歯垢中から検出されたことから、イヌ口腔でヒト由来の細菌により歯周疾患が発症と進行していることが考えられた。

動物によって媒介される病気が存在することは古くから認識されている<sup>39)</sup>。ペットからの感染に対しては、飼い主や接触者の個人的な衛生習慣の改善によって感染予防効果が得られると考えられる。また、ペットを衛生的な環境下で飼育することも感染症の発生を予防する上で重要と考えられる。今後は、イヌ、ネコをはじめとした従来からのペットのみならず国内外のエキゾチック・アニマルと呼ばれる野生動物等を飼育されるケースが増えることが考えられる。これらの動物を飼育するうえで、感染症に対する正しい知識と衛生管理が重要である。また、ペットは潜在的には種々の病原菌を保有していることを認識し、ペットとの共同生活において、接吻、口移しの餌やりや食器の共有は避け日常的な節度を持った対応が重要であると考えられる。生活様式が変化し、動物とのつきあい方が変わり、気密住宅において、家族の一員として飼養されるペットとの接触の度合いは、かつてなかった程に濃密なものになりつつある。また、社会の高齢化により、抵抗力が減弱したヒトに対する人獣共通感染症への罹患する機会を増加させ、感染者数の増加に繋がるものと考えられる。また、世界に目を向けるとウエストナイル熱や重症急性呼吸器症候群（SARS）などの新興感染症が認められ、これらの感染症の多くが動物に由来すると考えられている<sup>40)</sup>。われわれの身近な存在であるイヌ、ネコなどは潜在的にはさまざまな微生物を無症候性に保菌している可能性が高い。「人と動物の共通感染症」には、同義語として「人畜共通感染症」や「人獣共通感染症」、「ズーノーシス」などの名称がある。1958年に開催されたWHO(世界保健機関)とFAO(国連食糧農業機関)の合同専門家会議で、ズーノーシスは「人と人以外の脊椎動物の間で自然に移行する病気又は感染」と定義されている。公衆衛生の立場からは、「動物由来感染症」と呼ばれている。動物愛護管理法では、動物からヒトへの感染と同様、ヒトから動物へ感染する疾病にも注意を払い、動物の健康と安全を確保すべきとの観点から、「人と動物の共通感染症」と表記することとなっている<sup>25)</sup>。

口腔疾患についても、本研究結果からヒトからイヌへ歯周病原細菌が伝播している可能性が確認されたことから、相互の口腔環境のケアと伝播に関する注意を払う必要が考えられた。今後、更なるヒトとイヌでの口腔細菌種の伝播と歯周病の病態との関わりについ

て、伝播している菌種や菌株の特定を行い、同一家庭内での伝播経路について更なる検討を進めていきたいと考えている。

## 結 論

ヒトとイヌの歯垢を用いて、口腔内細菌の存在についてPCR法を用いて検討した結果、イヌ口腔内に存在する*P. gulae*がヒト口腔に認められ、ヒトの歯周病原細菌がイヌ口腔内から検出された。したがって、ヒトとイヌの口腔内細菌が相互に伝播している可能性が示唆された。

## 利益相反

申告すべき利益相反なし。

## 文 献

1. Fournier D, Mouton C, Lapierre P *et al.*: *Porphyromonas gulae* sp. nov., an anaerobic, Gram-negative coccobacillus from the gingival sulcus of various animal hosts. *Int J Syst Evol Microbiol.* **51**(Pt 3): 1179-1189, 2001.
2. Stepaniuk K: Periodontology. In: Lobprise HB, Dodd JR, editors. *Wiggs's Veterinary Dentistry*. John Wiley & Sons inc., Hoboken. 81-108, 2019.
3. Kortegaard HE, Eriksen T, Baelum V: Periodontal disease in research beagle dogs-an epidemiological study. *J Small Anim Pract.* **49**(12): 610-616, 2008.
4. Allaker RP, de Rosayro R, Young KA *et al.*: Prevalence of *Porphyromonas* and *Prevotella* species in the dental plaque of dogs. *Vet Rec.* **140**(6): 147-148, 1997.
5. Hardham J, Dreier K, Wong J *et al.*: Pigmented-anaerobic bacteria associated with canine periodontitis. *Vet Microbiol.* **106**(1-2): 119-128, 2005.
6. Hamada N, Takahashi Y, Watanabe K *et al.*: Molecular and antigenic similarities of the fimbrial major components between *Porphyromonas gulae* and *P. gingivalis*. *Vet Microbiol.* **128**(1-2): 108-117, 2008.
7. Nomura R, Shirai M, Kato Y *et al.*: Diversity of fimbriin among *Porphyromonas gulae* clinical isolates from Japanese dogs. *J Vet Med Sci.* **74**(7): 885-891, 2012.
8. Genco CA, Van DT, Amar S: Animal models for *Porphyromonas gingivalis*-mediated periodontal disease. *Trends Microbiol.* **6**(11): 444-449, 1998.
9. Lamont RJ, Jenkinson HF: Life below the gum line: pathogenic mechanisms of *Porphyromonas gingivalis*. *Microbiol Mol Biol Rev.* **62**(4): 1244-1263, 1998.
10. Landi L, Amar S, Polins AS *et al.*: Host mechanisms in the pathogenesis of periodontal disease. *Curr Opin*



- Periodontol.* **4**: 3-10, 1997.
11. Zambon JJ: Periodontal diseases: microbial factors. *Ann Periodontol.* **1**(1): 879-925, 1996.
  12. van Winkelhoff AJ de Graaff J: Microbiology in the management of destructive periodontal disease. *J Clin Periodontol.* **18**(6): 406-410, 1991.
  13. Amano A, Nakagawa I, Okahashi N *et al.*: Variations of *Porphyromonas gingivalis* fimbriae in relation to microbial pathogenesis. *J Periodontol.* **39**(2): 136-142, 2004.
  14. Lamont RJ Jenkinson HF: Subgingival colonization by *Porphyromonas gingivalis*. *Oral Microbiol Immunol.* **15**(6): 341-349, 2000.
  15. Yilmaz O, Watanabe K Lamont, RJ: Involvement of integrins in fimbriae-mediated binding and invasion by *Porphyromonas gingivalis*. *Cell Microbiol.* **4**(5): 305-314, 2002.
  16. Amano A: Bacterial adhesins to host components in periodontitis. *Periodontol.* **52**(1): 12-37, 2010.
  17. Hajishengallis G, Wang M, Liang S *et al.*: Subversion of innate immunity by periodontopathic bacteria via exploitation of complement receptor-3. *Adv Exp Med Biol.* **632**: 203-219, 2008.
  18. Nakagawa I, Inaba H, Yamamura T *et al.*: Invasion of epithelial cells and proteolysis of cellular focal adhesion components by distinct types of *Porphyromonas gingivalis* fimbriae. *Infect Immun.* **74**(4): 3773-3782, 2006.
  19. Ozaki K, Hanazawa S: *Porphyromonas gingivalis* fimbriae inhibit caspase-3-mediated apoptosis of monocytic THP-1 cells under growth factor deprivation via extracellular signal-regulated kinase-dependent expression of p21 Cip/WAF1. *Infect Immun.* **69**(8): 4944-4950, 2001.
  20. How KY, Song KP, Chan KG: *Porphyromonas gingivalis*: An overview of periodontopathic pathogen below the gum line. *Front Microbiol.* **7**: 53, 2016. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00053>.
  21. Masuda N, T Shimamoto T, Kitamura K *et al.*: Transmission of *Streptococcus mutans* in some selected families. *Microbios.* **44**(181S): 223-232, 1985.
  22. Ushida N, Ishihara K, Kobayashi N *et al.*: Initial acquisition and transmission of *Streptococcus mutans* from Japanese mothers to children. *Pediatr Dent J.* **19**(1): 98-105, 2009.
  23. Preus HR, Zambon JJ, Dunford RG *et al.*: The distribution and transmission of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in families with established adult periodontitis. *J Periodontol.* **65**(1): 2-7, 1994.
  24. Tuite-McDonnell M, Griffen AL, Moeschberger ML *et al.*: Concordance of *Porphyromonas gingivalis* colonization in families. *J Clin Microbiol.* **35**(2): 455-461, 1997.
  25. Ashimoto A, Chen C, Bakker I *et al.*: Polymerase chain reaction detection of 8 putative periodontal pathogens in subgingival plaque of gingivitis and advanced periodontitis lesions. *Oral Microbiol Immunol.* **11**(4): 266-273, 1996.
  26. Nakano K, Nemoto H, Nomura R *et al.*: Detection of oral bacteria in cardiovascular specimens. *Oral Microbiol Immunol.* **24**(1): 64-68, 2009.
  27. Siqueira JF Jr, Rôças IN: Polymerase chain reaction-based analysis of microorganisms associated with failed endodontic treatment. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* **97**(1): 85-94, 2004.
  28. 環境省：人と動物の共通感染症に関するガイドライン。平成 19 年 3 月。 [https://www.env.go.jp/nature/dobutsu/aigo/2\\_data/pamph/infection/guideline.pdf](https://www.env.go.jp/nature/dobutsu/aigo/2_data/pamph/infection/guideline.pdf)
  29. 一般社団法人ペットフード協会：令和 2 年（2020 年）全国犬猫飼育実態調査 <https://petfood.or.jp/data/chart2020/index.html>
  30. 厚生労働省：平成 28 年歯科疾患実態調査の概要 <https://www.mhlw.go.jp/toukei/list/dl/62-28-02.pdf>
  31. Harvey CE: Periodontal disease in dogs. Etiopathogenesis, prevalence, and significance. *Vet Clin North Am Small Anim Pract.* **28**(5): 1111-1128, 1998.
  32. Weinberg, MA, Bral M: Laboratory animal models in periodontology. *J Clin Periodontol.* **26**(6): 335-340, 1999.
  33. Yamasaki Y, Nomura R, Nakano K *et al.*: Distribution of periodontopathic bacterial species in dogs and their owners. *Arch Oral Biol.* **57**(9): 1183-1188, 2012.
  34. Mysak J, Podzimek S, Sommerova P *et al.*: *Porphyromonas gingivalis*: major periodontopathic pathogen overview. *J Immunol Res.* **2014**: 476068, 2014. doi: 10.1155/2014/476068.
  35. Senhorinho GN, Nakano V, Liu C *et al.*: Detection of *Porphyromonas gulae* from subgingival biofilms of dogs with and without periodontitis. *Anaerobe.* **17**(5): 257-258, 2011.
  36. Lenzo JC, O'Brien-Simpson, NM, Orth RK *et al.*: *Porphyromonas gulae* has virulence and immunological characteristics similar to those of the human periodontal pathogen *Porphyromonas gingivalis*. *Infect Immun.* **84**(9): 2575-2585, 2016.
  37. 高橋 洋：病態の理解 4. コンパニオンアニマルと感染症. 日本内科学会雑誌. **99** (11) : 2682-2688, 2010.
  38. Socransky SS, Haffajee AD, Cugini MA *et al.*: Microbial complexes in subgingival plaque. *J Clin Periodontol.* **25**(2): 134-144, 1998.
  39. Hart CA, Trees AJ, Duerden BI: Zoonoses. *J Med Microbiol.* **46**(1): 4-6, 1997.
  40. 山田章雄：人獣共通感染症. ウイルス. **54** (1) : 17-22, 2004.