

## 歯周ポケットから *Porphyromonas gulae* 及び *Tannerella forsythia* を検出したフェレットの1例

大橋英二<sup>1)†</sup>角田浩之<sup>2)</sup>松本高太郎<sup>2)</sup>

1) 北海道 開業 (あかしや動物病院: 〒089-0535 中川郡幕別町札内桜町112-2)

2) 帯広畜産大学畜産学部 (〒080-8555 帯広市稲田町西2線11)

(2011年8月9日受付・2012年1月13日受理)

### 要 約

3歳の避妊手術済雌フェレットが採食困難を主訴に来院した。右上顎第2及び第3前臼歯周囲に重度歯周炎が認められたため、歯周ポケット深部より検体採材後、歯石除去及び抜歯を行った。人の一般的な歯周病原性細菌8菌種を標的としたPolymerase chain reactionを行った結果、*Porphyromonas gingivalis* 及び *Tannerella forsythia* が陽性を示し、ダイレクトシーケンス法によりそれぞれ364bp及び510bpの配列が得られた。これら配列はそれぞれ、*P. gulae* 及び *T. forsythia* の16S rRNA遺伝子と100%及び99.8%の類似性を示した。フェレットの歯周ポケットから人、犬及び猫と同様の嫌気性菌が分子生物学的に初めて検出された。——キーワード：フェレット，PCR，歯周炎。

----- 日獣会誌 65, 449～451 (2012)

人の歯周病原性細菌は、主として偏性嫌気性菌で構成される [1-3]。それらの細菌は、培養そのものが困難あるいは生育がきわめて遅いなどのために見落とされてきたものが存在した [3]。しかし、近年は培養法に代わりPolymerase chain reaction (PCR) 法による分子生物学的手法が用いられるようになり、人では *Porphyromonas gingivalis* 及び *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* などのグラム陰性嫌気性菌が歯周病原性細菌として代表的であると報告されている [1]。一方、動物の歯周病原性細菌については確定されていないが、犬では *Porphyromonas gulae*, *Porphyromonas salivosa* 及び *Porphyromonas denticanis* が、そして猫では *P. gulae* 及び *Tannerella forsythia* が検出されている [2, 4-6]。フェレットに関しては、実験的に作出した歯周炎の歯周ポケットから採材した膿汁の培養と生化学的反応性に基づき *P. gingivalis*, *Fusobacterium* sp. 及び *Eubacterium* sp. が検出されている [7, 8] が、分子生物学的手法による報告は実験例及び臨床例ともに皆無である。

今回、重度の歯周炎に罹患したフェレットの歯周ポケットから、分子生物学的に人の歯周病原性細菌8菌種の検出を試みたので概要を報告する。

### 材料及び方法

症例は、フェレット、避妊手術済雌、3歳3カ月齢、体重920gで、食欲はあるが食べにくそうな仕草をすることを主訴に著者の動物病院へ来院した。右上顎第2及び第3前臼歯周囲の歯肉の退縮、浮腫、出血及び歯周ポケットからの膿汁の排出が認められ (図1)、同部周囲の触診を極度に嫌った。さらに、口腔内全域に歯石沈着が観察された。その他身体検査上異常所見は認められなかった。X線検査 (図2) では、病変部周囲顎骨の水平吸収像が認められ、血液検査では、総白血球数 ( $19.3 \times 10^9/l$ ) とALT (413 IU/l) が増加していた。以上の所見から重度の歯周炎と診断し、全身麻酔下での膿汁採材及び歯科処置を行った。麻酔はミダゾラム0.2mg/kg、ブトルファノール0.2mg/kg及び塩酸ケタミン5mg/kgの筋肉内投与後に挿管し、イソフルランの吸入により維持した。また、抗生物質 (アンピシリンナトリウム20mg/kg) 及び非ステロイド系消炎鎮痛剤 (メロキシカム0.2mg/kg) を皮下投与した。右上顎第2及び第3前臼歯部の頰側の歯周ポケット深部から綿球径1.9mmの滅菌綿棒 (メンティップ, 日本綿棒株, 埼玉) で検体採取後、歯石除去、口腔内洗浄及び右上顎第2, 3前臼歯の抜歯を行った。両歯ともに軽度に動揺しており、歯

† 連絡責任者：大橋英二 (あかしや動物病院)

〒089-0535 中川郡幕別町札内桜町112-2 ☎・FAX 0155-21-5116 E-mail: tino-mero-coro@netbeet.ne.jp

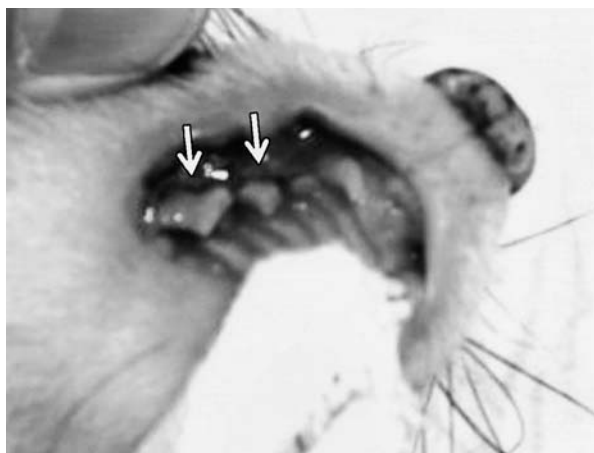


図1 右上顎第2及び第3前臼歯周囲の歯肉の退縮、浮腫、出血及び歯周ポケットからの膿汁の排出が認められる(矢印)。

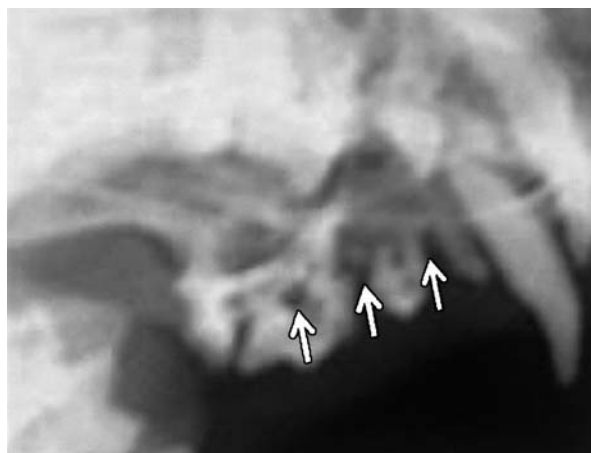


図2 X線像。病変部周囲顎骨の吸収像が認められる(矢印)。

科用エレベーターを使用し、比較的容易に抜歯が可能であった。抜歯窩はラウンド鋭匙で搔爬後、歯科用抗生物質であるテトラサイクリン製剤(オキシテトラコーン歯科用挿入剤5mg, 昭和薬品化工(株), 東京)を挿入し、モノフィラメント合成吸収糸(5-0 PDS II, ジョンソン・エンド・ジョンソン(株), 東京)で歯肉を縫合した。術後10日間、抗生物質(アモキシシリン20mg/kg 1日2回, クリンダマイシン5mg/kg 1日2回)を経口投与した。その後、経過は良好で歯周炎は沈静化し、抜歯部周囲の触診を嫌う仕草が見られなくなった。

**PCR法による歯周病原性細菌の検出:** DNA抽出キット(QIAamp DNA Mini Kit, QIAGEN, Germany)を用いて検体からDNA抽出後、抽出溶液をPCRを行うまで $-30^{\circ}\text{C}$ に保存した。Ashimotoら[1]の方法に基づいて、人の歯周病原性細菌として一般的な*A. actinomycetemcomitans*, *Campylobacter rectus*, *Eikenella corrodens*, *P. gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Prevotella nigrescens*, *T. forsythia*及び*Treponema denticola*に対するPCRを行った。PCR終了後、PCR反応液をエチジウムブロマイド加1%アガロースで電気泳動を行い、紫外線照射下でPCR産物の存在の有無を確認した。予想された長さのバンドが認められたPCR反応液については、確認のためにPCR産物の精製(QIAquick PCR Purification Kit, QIAGEN, Germany)を行った後、ダイレクトシークエンス法にて配列を決定した。決定した配列についてBLASTプログラムにより、類似の配列を検索した(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>)。

## 結 果

歯周病原性細菌特異的PCRでは、*P. gingivalis*及び*T. forsythia*でアガロースゲル上に予想された長さのバ

ンドが認められた。これらのPCR産物の配列を決定したところ、*P. gingivalis*に対するPCR産物では、364bpの配列が得られ、BLAST検索では*P. gulae*の16S rRNA遺伝子(GenBank accession番号, AB547663)と配列が一致した(100%)。また、*T. forsythia*陽性サンプルからは510bpの配列が得られ、BLAST検査の結果、*T. forsythia*の16S rRNA遺伝子(DQ344915)と99.8%(509/510)の類似性を示した。以上の結果から、本フェレット歯周ポケットからの検出菌は*P. gulae*及び*T. forsythia*である可能性が高いと判断された。

## 考 察

今回、フェレットの重度歯周炎の歯周ポケットから、人、犬及び猫と同様の嫌気性菌が分子生物学的に初めて検出された。分子生物学的手法による嫌気性菌の検出は、培養法と異なり検体の保存、輸送、あるいは増殖過程における細菌の死滅、及び培養中のコンタミネーションの影響を受けずに、目的とする細菌の遺伝子レベルでの検索が可能である[3]。Fischerら[7, 8]の報告ではフェレットの実験的歯周炎から*P. gingivalis*が検出されており、犬・猫においても同様の細菌が検出されてきた[5]が、それらの同定法は分子生物学的手法が用いられていなかった。近年の分子生物学的手法の発達により、犬・猫から検出された*P. gingivalis*様の細菌は、DNA配列の違いから*P. gulae*であることが明らかになっており[5, 6]、本症例のフェレットからも*P. gulae*が検出された。したがって、Fischerら[7, 8]の報告によるフェレットからの*P. gingivalis*の検出は、分子生物学的手法を用いたならば、*P. gulae*であった可能性も考えられる。一方、今回検出された*T. forsythia*は、人の歯周病原性細菌の一つであり、同菌は人と猫の共通の菌種であることが分子生物学的に認められ、過度の接触到

よる相互感染の可能性が示唆されている [2]。以上のことから、今後フェレットにおいても、分子生物学的手法による調査が必要であると考えられた。

伴侶動物として飼育されているフェレットにおいて、本症例のように歯周炎に罹患している個体は少なくない [9]。フェレットの歯周炎の病態は人と同様であり [10]、また、犬では歯周炎と心臓及び腎臓の病理組織変化との関連性が報告されている [11]。したがって、フェレットに対するデンタルケアの推奨による健康維持の必要性及び口移しで食事を与えることの危険性など、飼い主に対する啓発が望まれる。

動物の口腔内には常在菌を含めて多種類の細菌が存在するため、今回の検出細菌が本フェレットの歯周炎と関連しているかは断定できない。フェレットの歯周病原性細菌を明らかにするためには、対象菌種を広げた調査及び検出される細菌による実験的歯周炎の作成 [12] が必要であると考えられた。

#### 引用文献

- [1] Ashimoto A, Chen C, Bakker I, Slots J : Polymerase chain reaction detection of 8 putative periodontal pathogens in subgingival plaque of gingivitis and advanced periodontitis lesions, *Oral Microbiol Immunol*, 11, 266-273 (1996)
- [2] Booij-Vrieling HE, van der Reijden WA, Houwers DJ, de Wit WE, Bosch-Tijhof CJ, Penning LC, van Winkelhoff AJ, Hazewinkel HA : Comparison of periodontal pathogens between cats and their owners, *Vet Microbiol*, 29, 147-152 (2010)
- [3] 中澤 太, 星野悦郎 : 口腔由来の糖非分解性嫌気性グラム陽性桿菌とその新しい分類, *新潟歯学会誌*, 30, 71-73 (2000)
- [4] 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)
- [5] 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 (2007)
- [6] Hardham J, Dreier K, Wong J, Sfintescu C, Evans RT : Pigmented-anaerobic bacteria associated with canine periodontitis, *Vet Microbiol*, 20, 119-128 (2005)
- [7] Fischer RG, Edwardsson S, Klinge B : Oral microflora of the ferret at the gingival sulcus and mucosa membrane in relation to ligature-induced periodontitis, *Oral Microbiol Immunol*, 9, 40-49 (1994)
- [8] Fischer RG, Edwardsson S, Klinge B, Attström R : The effect of cyclosporin-A on the oral microflora at gingival sulcus of the ferret, *J Clin Periodontol*, 23, 853-860 (1996)
- [9] 霍野晋吉 : フェレットの疾病, *エキゾチックアニマルの診療指針 vol. 2*, 159-202, インターズー, 東京 (2001)
- [10] Struillou X, Boutigny H, Soueidan A, Layrolle P : Experimental animal models in periodontology, *Open Dent J*, 29, 37-47 (2010)
- [11] DeBowes LJ, Mosier D, Logan E, Harvey CE, Lowry S, Richardson DC : Association of periodontal disease and histologic lesions in multiple organs from 45 dogs, *J Vet Dent*, 13, 57-60 (1996)
- [12] 藤井 彰, 松本裕子, 山根潤一, 姜 桂珍 : 小動物を用いた口腔内実験法, *日薬理誌*, 128, 315-320 (2006)

### *Porphyromonas gulae* and *Tannerella forsythia* Detected from Periodontal Pockets in a Ferret

Eiji OOHASHI<sup>\*†</sup>, Hiroyuki KAKUTA and Kotaro MATSUMOTO

<sup>\*</sup> AKASHIYA ANIMAL HOSPITAL, 112-2 Sakura-machi, Satsunai, Makubetu, Nakagawa-gun, 089-0535, Japan

#### SUMMARY

A 3-year-old spayed ferret presented with a primary symptom of difficulty prehending food. Severe periodontitis in the right maxillary second and third premolar roots were observed. After matter sample was collected from the bottoms of the periodontal pockets, dental scaling, and tooth extraction were performed. The positive presence of *Porphyromonas gingivalis* and *Tannerella forsythia* was observed using a polymerase chain reaction method for identifying 8 common human periodontopathogenic bacteria, with lengths of 364 bp and 510 bp measured by direct sequencing, respectively. The sequences showed 100% and 99.8% similarity to the 16S rRNA gene in *P. gulae* and *T. forsythia*, respectively. This study shows, for the first time, molecular detection in a ferret of anaerobic bacteria from periodontal pockets identical to those found in humans, dogs, or cats.

— Key words : ferret, PCR, periodontitis.

<sup>†</sup> Correspondence to : Eiji OOHASHI (AKASHIYA ANIMAL HOSPITAL)

112-2 Sakura-machi, Satsunai, Makubetu, Nakagawa-gun, 089-0535, Japan

TEL · FAX 0155-21-5116 E-mail : tino-mero-coro@netbeet.ne.jp

*J. Jpn. Vet. Med. Assoc.*, 65, 449 ~ 451 (2012)