

氏名(本(国)籍)	清水万夢(岐阜県)
主指導教員氏名	岐阜大学 教授 渡邊 一 弘
学位の種類	博士(獣医学)
学位記番号	獣医博甲第608号
学位授与年月日	令和5年3月13日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
研究科及び専攻	連合獣医学研究科 獣医学専攻
研究指導を受けた大学	岐阜大学
学位論文題目	エリスリトールによる犬の歯周病予防効果に関する研究
審査委員	主査 岐阜大学 准教授 柴田 早苗 副査 帯広畜産大学 教授 古林 与志安 副査 岩手大学 教授 山崎 真大 副査 東京農工大学 教授 西藤 公司 副査 岐阜大学 教授 渡邊 一弘

#### 学位論文の内容の要旨

犬の歯周病は歯周病原因菌によって起きる炎症性疾患である。歯垢および歯石中に存在する歯周病原因菌に対する宿主の免疫応答および歯周病原因菌の産生する毒素により、歯槽骨や歯根膜といった歯周組織が破壊される。この歯周組織の喪失は不可逆的であることから、犬の歯周病では治療よりもその病態の進行を予防することが重要である。人では歯周病の予防としてキシリトールが利用されているが、犬に対しては低血糖を引き起こすため、キシリトールを犬に対して使用することはできなかった。近年、人において利用されるエリスリトールはキシリトールと同じ糖アルコールの1種で、口腔内細菌に対する増殖抑制効果が認められている。また、エリスリトールは犬に対する副作用がないことが明らかとなった。本研究ではエリスリトールを用いた犬の歯周病予防を実現させることを目的として、エリスリトールの犬歯周病原因菌に対する効果と臨床症例での効果を検証した。

第1章において、ターゲットとする歯周病原因菌を把握するため、歯周病の犬の口腔内から代表的な歯周病原因菌が存在する黒色色素産生菌の検出を行った。歯周病の犬から歯垢サンプルを血液寒天培地上で嫌気培養を実施した。得られた黒色コロニーのDNAを抽出し、細菌の16SrRNAに対する *Porphyroonas gulae* および *Porphyromonas macacae* に特異的なプライマーとユニバーサルプライマーを用いたPCR およびシーケンス解析により細菌同定を行った。今回得られた黒色色素産生菌の9割以上が *P. gulae* および *P. macacae* であった。*P. gulae* および *P. macacae* を犬歯周病原因菌に対するターゲットとして第2章で検討していくこととした。

第2章では、エリスリトールによる犬の歯周病原因菌の増殖抑制効果を検証した。変法GAM液体培地にエリスリトールを添加して歯周病原因菌を嫌気培養した。液体培地の吸光度を4時間ごとに測定し、*P. gulae* および *P. macacae* の増殖細菌数を間接的に評価した。プレート状態となった24時間培養後の液体培地の吸光度を比較した。エリスリトールを

10%, 5%および 1%含む培地では *P. gulae* および *P. macacae* のいずれにおいてもコントロールに対して細菌数が減少し、エリスリトールは犬の歯周病原菌に対して増殖抑制効果を示した。糖アルコールは無益回路によって細菌のエネルギーを枯渇させ活動を止めると考えられており、エリスリトールの濃度が上昇するほど無益回路がはたらきやすくなることで濃度依存的な細菌増殖抑制が認められたと考えられた。また、Heart Infusion 液体培地を用いて 1%のエリスリトール濃度になるよう調整し、そこへグルコースを添加して同様に *P. gulae* および *P. macacae* を嫌気培養した。その結果、培地中のグルコース濃度が上昇するにつれてエリスリトールの細菌増殖抑制効果は低下し、*P. gulae* ではグルコース濃度が 0.025%以上でエリスリトールの細菌増殖抑制効果は認められなくなった。グルコースは細菌のエネルギー源となる物質である。エリスリトールとグルコースが同時に存在していると、エリスリトールにより無益回路がはたらいても、グルコースにより細菌にエネルギーが供給され、細菌のエネルギーは枯渇しにくくなることが予想される。そのため、グルコース存在下でのエリスリトールの細菌増殖抑制効果は低下したと考えられた。

第 3 章では、エリスリトールの臨床症例の犬に対する効果を検討した。スケーリングを実施した臨床症例に対してエリスリトール含有製品を希釈した飲料水を摂取させて、犬の歯面細菌数および歯垢と歯石の付着の程度を評価した。通常の飲料水を摂取した犬に比べ、この製品を使用した犬のスケーリング後 2~8 週目の歯面細菌数は減少した。また、歯垢と歯石の付着はエリスリトール含有製品を使用した群で抑制された。このことからエリスリトールの効果により、臨床症例の犬においても口腔内細菌の増殖抑制効果が認められることが明らかとなった。歯面細菌が減少したことで歯垢や歯石の付着が抑制されたことに繋がったと考えられた。これらの結果からエリスリトールには犬の歯周病予防効果があると考えられた。また、エリスリトールを飲料水に希釈する方法での口腔内衛生の維持方法も犬において有効であるといえた。

歯周病罹患犬からは歯周病原菌である *P. gulae* および *P. macacae* が数多く検出された。エリスリトールは歯周病原菌である *P. gulae* および *P. macacae* の液体培地中における細菌増殖を抑制した。また、犬に対してエリスリトールを希釈して飲水させることによって、口腔内細菌の増殖抑制効果や歯垢や歯石の付着を抑制する効果を示すことが明らかとなった。エリスリトールは犬の歯周病原菌を減少させるために使用することができる物質であり、エリスリトールを飲料水に希釈して飲用させることは、簡便に実施することのできる犬の歯周病予防になりうる。今までブラッシングなどの口腔ケアの実施が困難であった飼い主とそのペットに対する歯周病予防法の選択肢として利用されていくことを期待している。

## 審 査 結 果 の 要 旨

犬の歯周病では、歯垢および歯石中に存在する歯周病原菌により、歯周組織が破壊される。歯周組織の喪失は不可逆的であるため、歯周病は治療よりも病態の進行予防が重要である。人では歯周病の予防としてキシリトールが利用されているが、キシリトールは犬に対して低血糖を引き起こすため、犬に使用することはできなかった。近年、人で利用されるエリスリトールはキシリトールと同じ糖アルコールであり、人の口腔内細菌に対する増殖抑制効果が認められた。また、エリスリトールは犬に対する副作用を持たないことが明らかとなった。申請者はエリスリトールを用いた犬の歯周病予防の実現を目的として、エリスリトールの犬の歯周病原菌に対する効果および臨床症例に対する効果を検証した。

第一章において、ターゲットとする歯周病原菌を把握するため、歯周病の犬の口腔内

から代表的な歯周病原因菌の検出を行った。特異的なプライマーを用いた PCR およびシーケンス解析により歯周病犬の歯垢サンプルから *Porphyromonas gulae* および *Porphyromonas macacae* 黒色色素産生菌の 9 割以上を占めていることが明らかとなった。

第二章では、エリスリトールによる犬の歯周病原因菌の増殖抑制効果を検証した。エリスリトールを 10%、5% および 1% 含む培地では *P. gulae* および *P. macacae* のいずれにおいてもコントロールに対して細菌数が減少し、エリスリトールは犬の歯周病原因菌に対して増殖抑制効果を示すことが明らかとなった。エリスリトールの濃度が上昇するほど無益回路による細菌の抑制がはたらきやすくなり、濃度依存的な細菌増殖抑制が認められたと考えられた。

第三章では、エリスリトールを臨床症例の犬に用いた場合の歯周病予防効果を検討した。エリスリトール含有製品を使用した犬は、製品を使用しなかった犬に比べてスクレーリング後 2~8 週目の歯面細菌数が減少し、歯垢と歯石の付着の程度が抑制された。このことからエリスリトールの効果により、臨床症例の犬において口腔内細菌の増殖抑制効果が認められることが明らかとなった。

申請者は歯周病犬から得られた歯周病原因菌に対するエリスリトールの細菌増殖抑制効果および実際の犬に対するエリスリトールの歯面細菌数抑制効果、歯垢・歯石の蓄積抑制効果を明らかにした。これらは犬の歯周病予防に際して有益な知見となる成果である。

以上について、審査委員全員一致で本論文が岐阜大学大学院連合獣医学研究科の学位論文として十分価値があると認めた。

#### 基礎となる学術論文

- 1) 題 目 : Erythritol inhibits the growth of periodontal-disease-associated bacteria isolated from canine oral cavity  
著 者 名 : Shimizu, M., Miyawaki, S., Kuroda, T., Umeta, M., Kawabe, M. and Watanabe, K.  
学術雑誌名 : Heliyon  
巻・号・頁・発行年 : 8 (8) : e10224, 2022