

Porphyromonas gulae 保有による
犬歯周病病態の疫学的調査と
歯周病予防薬の効果検討

**Epidemiological investigation of canine periodontal
pathology caused by *Porphyromonas gulae* infection
and
investigation of the effect of periodontal disease
preventive drug.**

2023年 3月

麻布大学大学院 獣医学研究科

獣医学専攻 博士課程

薬理学

DV1903 白畑 壮

目次

要旨 (和文) -----	3
(英文) -----	10
序文-----	17
第1章 犬における <i>P. gulae</i> の <i>fimA</i> 遺伝子型の保有率と <i>fimA</i> 遺伝子型による歯周病悪性度との相関-----	20
緒言 -----	21
材料および方法 -----	23
結果 -----	28
考察 -----	30
第2章 塩化セチルピリジニウム、プラチナナノコロイドの <i>P. gulae</i> に対する効果検討-----	32
緒言 -----	33
材料および方法 -----	35
結果 -----	37
考察 -----	38
第3章 塩化セチルピリジニウム、プラチナナノコロイドの 一般飼育犬の歯周病に対する効果検討-----	40
緒言 -----	41
材料および方法 -----	42
結果 -----	48
考察 -----	50
総括ならびに結論 -----	53
謝辞 -----	54
参考文献 -----	55
表および図 -----	60
補足資料 -----	78

要旨

歯周病は、犬や猫などの小型伴侶動物において、罹患率の最も高い感染症であり、その過程で認められる歯垢の付着、歯肉炎および歯周炎は、米国における犬 31,484 頭の調査において、最も重要な健康問題であると結論付けられている。また、2 歳になるまでに猫の 70%、犬の 80%が歯周病を有しており、小型犬・トイ種では特に影響を受けやすいとされている。犬の歯周病は、歯周病原性細菌が歯周ポケットにバイオフィルムを形成し、歯肉の傷害および歯槽骨の融解を引き起こす慢性歯科疾患である。歯周病は多くの歯周病原性細菌が関連しあって形成される疾患であるが、ヒトでは *Porphyromonas gingivalis* (以下、*P. gingivalis*)、*Treponema denticola* および *Tannerella forsythia* の 3 菌種を Red complex と呼び、特に悪性度が高いとされている。一方、犬や猫では、*P. gingivalis* の近縁種である *Porphyromonas gulae* (以下、*P. gulae*) が歯肉溝から分離され、歯周病の発症および増悪に重要な役割を有していることがわかってきている。*P. gulae* の菌体表面に存在する線毛を形成する病原蛋白質である分子量 41kDa のフィンブリリンは FimA と呼ばれ、歯への付着や病原性に重要な役割を示すことが判明している。FimA 蛋白質をコードする *fimA* 遺伝子は、A 型、B 型、および C 型の 3 種類のサブタイプに分類され、これらの *fimA* 遺伝子の中で、C 型の *P. gulae* が重度の歯周炎の犬の口腔内で優勢であるため、最

も病原性が高いと考えられている。年齢による *fimA* 遺伝子型の推移、*fimA* 遺伝子型と歯周病の重症度および歯周病の臨床的特徴との関連は不明である。また、歯周病は歯周炎および歯槽骨の融解が引き起こされると回復が難しい疾患であり、動物病院だけでなく、飼い主による自宅での予防的デンタルケアの重要度は高い。そこで本研究では、第 1 章で日本の小型犬種における *P. gulae* の各 *fimA* 遺伝子型の年齢別保有実態と歯周病態(歯周病スコア)と臨床的兆候(永久歯数)の関連に関する疫学調査を実施し、続いて第 2 章および 3 章では、犬の疫学調査に基づいた犬の歯周病予防製品 CPC,Pt 含有製剤 (Q-ness マウスクリナー®、株式会社 QIX) の効果について、それぞれ *in vitro* および *in vivo* で調べた。

第 1 章：犬における *P. gulae* の *fimA* 遺伝子型の保有率と *fimA* 遺伝子型による歯周病悪性度との相関

プリモ動物病院相模原中央、厚木プリモ動物病院、相模大野プリモ動物病院および安田獣医科医院に来院した生後 6~211 ヶ月齢の歯周病罹患犬 225 頭(過去 6 ヶ月以内に抗生物質を使用している症例は検討から除外)を月齢によって生後 50 ヶ月齢未満 (n = 50) 、50 ヶ月齢以上 100 ヶ月齢未満 (n = 60) 、100 ヶ月齢以上 (n = 115) の 3 つのグループに分け、*P. gulae* の各 *fimA* 遺伝子型の保有率、歯周病重症度および歯周病態を裏付ける臨床兆候として永久歯数を、*fimA*

遺伝子型間で比較検討した。その結果、225頭全体における *P. gulae* 陽性率は76.9%であり、その割合は加齢に伴って増加した。特に、C型の *fimA* 遺伝子の *P. gulae* を有する犬の割合が、他の遺伝子型と比較して年齢とともに著しく増加（生後50ヶ月齢未満の群で20%、50ヶ月齢以上100ヶ月齢未満および100ヶ月齢以上の群で40%以上）していた。このことから、*P. gulae* は加齢に伴う歯周病の増加、悪化に関与しているのではないかと推測された。次に、*P. gulae* の有無での歯周病の重症度を比較すると、すべての年齢層で *P. gulae* 非保有犬と比較し、*P. gulae* 保有犬で歯周病の重症度が高くなっていた。また、遺伝子型間での歯周病の重症度を比較すると、生後50ヶ月齢未満の群において、*P. gulae* 陰性の犬と比較して、A型およびC型の *P. gulae fimA* 保有犬で有意な歯周病の重症度の悪化が観察された。50ヶ月齢以上100ヶ月齢未満の群では、*P. gulae* 陰性の犬と比較して、C型の *P. gulae fimA* 保有犬で有意な歯周病の重症度の悪化が観察された。100ヶ月齢以上の群では、*P. gulae* 陰性の犬と比較して、全遺伝子型の *P. gulae fimA* 保有により、有意な歯周病の重症度の悪化が観察された。そして、C型の *P. gulae fimA* 保有により、どの月齢においても歯周病重症度を有意に悪化させることが確認された。次に遺伝子型間での永久歯数を比較したところ、50ヶ月齢以上100ヶ月齢未満の群および100ヶ月齢以上の群において、完全な歯列（42本）を持つ犬の数は *P. gulae* 陽性群では年齢

とともに減少した。また、100ヶ月齢以上の群において、B型およびC型の *P. gulae fimA* 保有犬で完全な歯列を持つ犬の数は *P. gulae* 陰性の犬と比較して有意に減少した。これらの結果は、*P. gulae* の存在と永久歯の数との間に有意な関連性があることを示していた。傷害を受けた歯周靭帯や歯槽骨は不可逆的であることから、*P. gulae*、特にC型の *fimA* を保有する *P. gulae* の感染防御は歯周病を防ぐために重要であることが示唆された。

第2章：塩化セチルピリジニウム、プラチナナノコロイドの *P. gulae* に対する効果検討

ヒト用の歯周病予防薬として利用されている塩化セチルピリジニウム（以下、CPC）およびプラチナナノコロイド（以下、Pt）に着目した犬の歯周病予防薬の薬効解明を行った。

人歯科領域において、CPCは0.05% CPC溶液を歯周ポケット内の洗浄することで運動性桿菌、スピロヘータを減少させ、口腔洗浄液（含嗽剤）として使用することで歯垢の蓄積抑制や歯肉炎の改善に効果があるとの報告がある。またPt製剤の作用機序は、炎症部位での活性酸素を除去し、局所の酸化ストレスを緩和・解消する。このことにより、活性酸素による歯周組織障害および炎症反応が緩和・抑制され、治癒が促進されると考えられる。またバイオフィルム溶解作用も認められているため、組織の修復過程で過剰な異物侵入や白血球浸潤、

バイオフィルム下の細菌の定着を抑制する効果も人歯科医療では期待されてきた。

そこで、犬の歯周病に対する効果を評価するために、CPC, Pt 含有製剤の *P. gulae* に対する増殖抑制効果、*P. gulae* から産生される口臭原因物質（硫化水素およびメチルメルカプタン）に対する抑制効果、マクロファージ細胞における炎症反応に対する効果を試験管内で検証した。CPC, Pt 含有製剤として Q-ness マウスクリナーを使用し、その推奨使用濃度とされる 1% を実使用濃度として効果を評価した。CPC, Pt 含有製剤の実使用濃度（1%）の *P. gulae* に対する増殖抑制効果の検証では、培養後 4 時間で陰性対照群と比較して有意な *P. gulae* の増殖抑制作用が認められた。CPC, Pt 含有製剤の実使用濃度（1%）の *P. gulae* に対する曝露によって、細菌からの硫化水素産生が陰性対照群と比較して有意に抑制された。さらに、*P. gulae* を曝露したマクロファージ細胞（J774.1 細胞）に実使用濃度（1%）の CPC, Pt 含有製剤を処置した際のサイトカイン（IL-1 β , IL-6, TNF α ）産生量を測定した結果、CPC, Pt 含有製剤曝露により陰性対照群と比較して TNF α 産生の有意な減少が認められた。以上の結果より、CPC, Pt 含有製剤は実使用濃度において、*P. gulae* に対する増殖抑制、硫化水素産生抑制および抗炎症作用を有していることが示された。

第 3 章：CPC, Pt の一般飼育犬の歯周病に対する効果検討

歯周病および口臭の程度が軽度から中等度の犬 15 頭に対して、CPC,Pt 含有製剤を 1 ヶ月間、自由飲水投与した。製剤を適用した前後での口臭官能評価、歯垢付着度、口腔内ガス濃度、歯肉炎程度、口腔内チオール濃度および歯周病菌活性の測定を実施した。歯周病菌活性は、BANA 分解活性酵素検査（BANA テスト）により評価した。BANA 分解活性酵素とは、歯周病菌（*P. gulae*、*P. gingivalis*、*Treponema denticola*、*Tannerella forsythensis*）をはじめとする嫌気性細菌から産生される酵素であり、この酵素を測定することで歯周病菌活性を評価した。その結果、CPC,Pt 含有製剤投与の前後で歯周病態および口臭に大きな変化は認められず、すでに歯周病が進行している犬に対する CPC,Pt 含有製剤の治療効果は低いことが示唆された。

次に CPC,Pt 含有製剤の歯科処置に対する補助効果を調査する目的で、プリモ動物病院相模原中央に来院したスケーリング等の麻酔下歯科処置を実施した犬 50 頭について、歯みがきと CPC,Pt 含有製剤を飲水投与した群（n=15）、歯みがきのみを実施した群（n=16）、CPC,Pt 含有製剤のみを飲水投与した群（n=8）、無処置群（n=11）の 4 群に分け、歯科処置前、処置後 7 日、1 および 3 ヶ月での歯肉炎指数、歯石指数、口臭官能評価、口腔内チオール濃度、歯周病菌活性を比較した。歯周病菌活性は N-ベンゾイル-DL-アルギニルペプチターゼの酵素活性を ADplit®（アドプリット：共立製薬株式会社）により測定した。ADplit に

よる歯周病菌活性測定は、BANA 分解活性酵素検査よりも動物病院において簡易的に実施ができ、*P. gulae* から特異的に産生されるトリプシン様酵素である N-ベンゾイル-DL-アルギニルペプチターゼの酵素活性を測定することができる。

その結果、歯肉炎指数、チオール濃度および歯周病菌活性が CPC,Pt 含有製剤投与群で無処置群と比較して有意に低下し、歯みがき等のデンタルケアと併用することでその効果は増大することが示唆された。歯科処置後に歯みがき等の物理的なデンタルケアと CPC,Pt 含有製剤を組み合わせることによって、歯周病に対する十分な予防効果がみられることが証明された。伴侶動物の高齢化が進む現代において、歯周病罹患率はますます増加することが予想される。犬における歯科医療において *P. gulae* の *fimA* 遺伝子型の検出と歯周病リスクの評価、および歯周病を予防するために日々のデンタルケア指導は良好な口腔内環境を維持する上で有用な手段であると思われる。

Abstract

Periodontal disease is the infection with the highest incidence in small companion animals such as dogs and cats, and the plaque buildup, gingivitis, and periodontitis found in the process were concluded to be the most important health problems in a study of 31,484 dogs in the United States. In addition, 70% of cats and 80% of dogs have periodontal disease by the age of two, with small dogs and toy breeds being particularly susceptible. Canine periodontal disease is a chronic dental condition in which periodontogenic bacteria form biofilms in periodontal pockets, causing gingival injury and alveolar bone fusion. Periodontal disease is formed by the association of many periodontogenic bacteria. In humans, *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*), *Treponema denticola*, and *Tannerella forsythia* are considered to be the three species of Red complex and are considered to be particularly virulent. In dogs and cats, *Porphyromonas gulae* (*P. gulae*), a close relative of *P. gingivalis*, has been isolated from the gingival sulcus and is known to have an important role in the development and exacerbation of periodontal disease. Fimbrilin, the pathogenic protein that forms the surface linear hairs of this bacterium, is called FimA. the gene encoding FimA, or the *fimA* gene, is classified into three main subtypes, type A, type B, and type C, and these genotypes are closely related to the severity of periodontal disease. Among these *fimA* genes, the C-type *P. gulae* is considered the most pathogenic because it predominates in the oral cavity of dogs with severe periodontitis. However, the association between *fimA* genotype and clinical features of periodontal disease in dogs remains to be elucidated. The relationship

between *fimA* genotype trends with age, *fimA* genotype and severity of periodontal disease, and clinical features of periodontal disease is unknown. In addition, periodontal disease is difficult to recover from once periodontitis and alveolar bone fusion have been induced. Prophylactic dental care at home by owners is highly important. In this study, an epidemiological survey was conducted in Chapter 1 on the actual age-specific possession of each *fimA* genotype of *P. gulae* in Japanese small dog breeds and the association between periodontal pathology (periodontal disease score) and clinical signs (number of permanent teeth). In Chapters 2 and 3, the efficacy of a canine periodontal disease prevention product CPC and Pt-containing formulation was investigated in vitro and in vivo based on epidemiological studies in dogs.

Chapter 1: Percentage of *P. gulae fimA* genotypes in dogs and correlation of periodontal disease grade by *fimA* genotype.

The subjects were 225 periodontally diseased dogs aged 6-211 months who visited Primo Animal Hospital Sagamihara Chuo, Atsugi Primo Animal Hospital, Sagamiono Primo Animal Hospital, and Yasuda Veterinary Clinic. The dogs were divided into three groups according to their age in months: less than 50 months old (n = 50), between 50 and 100 months old (n = 60), and more than 100 months old (n = 115). The prevalence of each *fimA* genotype in *P. gulae*, the severity of periodontal disease, and the number of permanent teeth as clinical signs supporting periodontal pathology were compared among the *fimA* genotypes. The results showed that the *P. gulae*-positive rate in all 225 dogs was 76.9%, and the percentage increased

with age. In particular, the percentage of dogs with *P. gulae* of the C-type *fimA* gene increased significantly with age (20% in the group less than 50 months of age, and more than 40% in the groups between 50 and 100 months of age and more than 100 months of age) compared to the other genotypes. This suggests that *P. gulae* may be involved in the increase and worsening of periodontal disease with aging. A comparison of the severity of periodontal disease between dogs with and without *P. gulae* showed that the severity of periodontal disease was higher in *P. gulae* positive dogs compared to *P. gulae* negative dogs in all age groups. When comparing the severity of periodontal disease among genotypes, significantly worse severity of periodontal disease was observed in *P. gulae fimA* carrying dogs of types A and C compared to *P. gulae* negative dogs in the <50 month old group. In the group between 50 and 100 months of age, a significant worsening of the severity of periodontal disease was observed with *P. gulae fimA*-bearing dogs of genotype C compared to *P. gulae*-negative dogs.

In the over 100-month-old group, significant worsening of periodontal disease severity was observed with all genotypes of *P. gulae fimA* carriers compared to *P. gulae*-negative dogs. And, possession of *P. gulae fimA* type C significantly worsened periodontal disease severity at all ages. Next, a comparison of the number of permanent teeth among genotypes showed that the number of dogs with complete dentition (42 teeth) decreased with age in the *P. gulae*-positive group in the groups between 50 and 100 months of age and in the group over 100 months of age. In addition, the number of dogs with complete dentition was significantly reduced in the group older than

100 months of age due to the possession of *P. gulae fimA* of types B and C, compared to the *P. gulae*-negative dogs. These results indicated a significant association between the presence of *P. gulae* and the number of permanent teeth. The fact that injured periodontal ligaments and alveolar bone are irreversible also suggests that protection against infection by *P. gulae*, especially those carrying the C-type *fimA* gene, is important to prevent periodontal disease.

Chapter 2: Investigation of the effect of cetylpyridinium chloride and platinum nanocolloids on *P. gulae*

We focused on cetylpyridinium chloride (CPC) and platinum nanocolloids (Pt), which are used as periodontal prophylactics for humans, to elucidate the medicinal effects of these drugs on canine periodontal disease.

In the field of human dentistry, CPC has been reported to reduce motile rods and spirochetes by cleaning periodontal pockets with a 0.05% CPC solution, and to inhibit plaque accumulation and improve gingivitis when used as an oral rinse (mouthwash).

The mechanism of action of Pt also removes reactive oxygen species at the site of inflammation and alleviates/eliminates local oxidative stress. This is thought to alleviate and suppress periodontal tissue damage and inflammatory reactions caused by reactive oxygen species, thereby promoting healing. Since biofilm dissolving action has also been observed, it has been expected in human dentistry to inhibit excessive foreign body invasion, leukocyte infiltration, and bacterial colonization under the biofilm during the tissue repair process.

To evaluate the effects of CPC and Pt-containing preparations on periodontal disease in dogs, the effects of CPC and Pt-containing preparations on growth inhibition of *P. gulae*, inhibition of halitosis-causing substances (hydrogen sulfide and methyl mercaptan) produced by *P. gulae*, and on inflammatory reactions in macrophage cells were examined in vitro. Q-ness Mouth Cleaner was used as the CPC and Pt-containing formulation, and its efficacy was evaluated at the recommended 1% concentration for actual use. Verification of the growth inhibitory effect of the actual concentration (1%) of CPC and Pt-containing preparations on *P. gulae* showed significant inhibition of *P. gulae* growth compared to the negative control group at 4 hours after incubation. Exposure of CPC and Pt-containing preparations to *P. gulae* at the actual concentration used (1%) significantly inhibited hydrogen sulfide production from the bacteria compared to the negative control group. Furthermore, cytokine (IL-1 β , IL-6, TNF α) production was measured when macrophage cells (J774.1 cells) exposed to *P. gulae* were treated with CPC and Pt-containing preparations at the actual concentration used (1%), and a significant decrease in TNF α production was observed after exposure to CPC and Pt-containing preparations, compared to the negative control group. These results indicate that CPC and Pt-containing preparations at actual concentrations have growth inhibition, hydrogen sulfide production inhibition, and anti-inflammatory activity against *P. gulae*.

Chapter 3: Investigation of the effects of CPC, Pt on periodontal disease in domestic dogs.

Fifteen dogs with mild to moderate degrees of periodontal disease and halitosis were given CPC and Pt-containing formulations in drinking water for one month. The sensory evaluation of halitosis, degree of plaque adhesion, oral gas concentration, degree of gingivitis, oral thiol concentration, and periodontal bacterial activity were measured before and after the application of the formulation. Periodontal bacterial activity was evaluated using the BANA-degrading enzyme test (BANA test), which is an enzyme produced by anaerobic bacteria including periodontogenic bacteria (*P. gulae*, *P. gingivalis*, *Treponema denticola*, and *Tannerella forsythensis*). The activity of periodontogenic bacteria was evaluated by measuring this enzyme. As a result, no significant changes in periodontal pathology or halitosis were observed before or after administration of CPC and Pt-containing formulations, suggesting that the therapeutic effect of CPC and Pt-containing formulations on dogs with advanced periodontal disease was low.

Next, we investigated the auxiliary effect of CPC and Pt-containing preparations on dental procedures. Fifty dogs that had undergone dental procedures such as scaling under anesthesia at Primo Animal Hospital Sagamihara Chuo were divided into four groups: a group that received tooth brushing and CPC and Pt-containing formulation in their drinking water (n=15), a group that received only tooth brushing (n=16), a group that received only CPC and Pt-containing formulation in their drinking water (n=8), and an untreated group (n=11). The gingivitis index, tartar index, halitosis, oral thiol concentration, and periodontal bacterial activity were

compared before dental treatment, 7 days, 1 and 3 months after treatment.

Periodontal bacterial activity was determined by measuring the enzymatic activity of N-benzoyl-DL-arginyl peptidase using ADplit®. The ADplit test for periodontal bacterial activity is simpler to perform in animal hospitals than the BANA-degrading enzyme test and can be used to measure the enzymatic activity of trypsin-like enzyme specifically produced from *P. gulae*. The results showed that the degree of gingivitis, thiol concentration, and periodontal bacterial activity were significantly lower in the CPC and Pt-containing formulation group than in the untreated group, suggesting that the combination of CPC and Pt-containing formulations with dental care such as tooth brushing increases the effectiveness of the treatment. The combination of physical dental care such as tooth brushing and CPC and Pt-containing preparations after dental treatment proved to have sufficient preventive effect against periodontal disease.

In today's aging companion animal population, the incidence of periodontal disease is expected to increase. Detection of the *fimA* genotype of *P. gulae* and assessment of periodontal disease risk in dogs, as well as daily dental care instruction to prevent periodontal disease, may be useful tools in maintaining a good oral environment.

序文

歯石や歯肉炎は、米国の犬 31,484 頭の犬において最も一般的な健康問題であったと報告がある (Lund et al., 1999)。また、歯周病は犬や猫などの小型伴侶動物において最もよくみられる感染症である (Niemiec et al., 2008)。2 歳になるまでに猫の 70%、犬の 80%が何らかの歯周病を有しており (Wiggs, 1997; Marshall, 2014)、小型犬・トイ種では特に影響を受けやすいとされている (Hoffmann et al., 1996)。犬の歯周病は、歯周病原菌が歯周ポケットにバイオフィルムを形成し、歯肉の傷害および歯槽骨の融解を引き起こす慢性歯科疾患である (Loesche, 1976; Theilade, 1986)。

歯周病は歯肉炎と歯周炎の 2 段階に分類される。歯肉炎は歯周靭帯や歯槽骨などの歯周組織の損失を伴わない炎症が歯肉に限定されている可逆的な歯周病の初期段階である。また、歯肉炎は歯垢中の微生物によって引き起こされ、歯肉炎の段階であれば、徹底的な歯科予防と一貫したホームデンタルケアによって正常な歯肉の状態に可逆的に回復させることができる (DeBowes, 2010; Loe et al., 1965; Silness et al., 1964)。一方、歯周炎は歯肉炎よりさらに歯周病が進行した状態であり、歯周靭帯、セメント質、歯槽骨の歯のより深い支持構造の炎症性疾患として定義される (Armitage, 1999; Novak, 2006; DeBowes, 2010)。それら歯周組織の進行性の破壊を伴い、通常は不可逆性で、時には歯の損失に

至ることがある(Philstrom et al., 2005)。

歯周病原性細菌は少数であっても歯周組織の環境を変え、異常な宿主免疫反応を誘発し、歯周病を進展させる (Hajishengallis et al., 2012)。ヒトにおいて、*Porphyromonas gingivalis* (以下、*P. gingivalis*) *Treponema denticola* および *Tannerella forsythia* の 3 菌種は Red complex と呼ばれ (Holt et al., 2005)、特に歯周病に関連が深い菌種とされている。3 菌種の中でも、*P. gingivalis* は歯周病において最も重要な細菌として広く認知されており、菌体表面に存在する分子量 41kDa の線毛蛋白である FimA は主要な病原因子の 1 つとして知られている (Amano et al., 1996)。また、ヒト起源の *P. gingivalis* の近縁種である *Porphyromonas gulae* (以下、*P. gulae*) は、犬、猫、熊やコヨーテなどさまざまな動物の歯肉溝から分離され、小型伴侶動物の歯周病と密接に関連していると考えられる (Fournier et al., 2001)。この *P. gulae* の表層に存在する線毛を形成する病原蛋白質であるフィンブリリンは FimA と呼ばれる。FimA をコードする遺伝子すなわち *fimA* 遺伝子は、主に 3 種類のサブタイプの A 型、B 型、および C 型と分類され、これらの遺伝子型は歯周病の重症度と密接に関連している。これらの *fimA* 遺伝子の中で、C 型の *P. gulae* が重度の歯周炎の犬の口腔内で優勢であるため、最も病原性が高いと考えられている。また猫由来の *P. gulae* の *fimA* 遺伝子も A 型、B 型および C 型の 3 タイプに

分類され、C型は歯根膜線維芽細胞に対して強い病原性を示し、B型は中等度の歯周病の猫に、C型は重篤な歯周病の猫に多くみられることが確認されている (Iwashita et al., 2019)。しかし、*fimA* の遺伝子型と犬における歯周病の臨床的特徴との関連は未解明である。

本研究では、各 *fimA* 遺伝子型における *P. gulae* の保有実態と犬歯周病態（年齢、歯周病スコアおよび永久歯数）の関連に関する疫学調査、および犬の疫学調査に基づいた犬の歯周病予防製品の薬効研究を目的に実験を行った。

第 1 章

犬における *P. gulae* の *fimA* 遺伝子型の保有率と

fimA 遺伝子型による歯周病悪性度との相関

緒 言

P. gulae の菌体表面にも *P. gingivalis* と同様に分子量 41kDa の線毛蛋白である FimA が存在する (Hamada et al., 2008)。*P. gingivalis* の *fimA* 遺伝子は I ~ V 型および I b 型の 6 型に分類されるのに対し、犬、猫から分類された *P. gulae* では A 型、B 型および C 型の 3 つの *fimA* 遺伝子型に分類される。*P. gulae* と *P. gingivalis* の各 *fimA* 遺伝子配列から推定したアミノ酸配列を比較した場合、*P. gulae* の A 型は *P. gingivalis* の低病原性とされる I 型に最も類似しており、90% の一致率を有する。また *P. gulae* の B 型は *P. gingivalis* の高病原性とされる II 型および低病原性とされる III 型に類似しており、約 90% の相同性を有する。*P. gulae* の C 型は *P. gingivalis* の高病原性とされる IV 型に最も類似しており、約 90% の相同性を有する (Yamasaki et al., 2012)。このことから *P. gulae* は、A 型が低病原性、B 型が中等度病原性、C 型が高病原性であると予想される。また、*fimA* 遺伝子の中で、C 型の *P. gulae* が重度の歯周炎の犬の口腔内で優勢であるため、最も病原性が高いと考えられている (Nomura et al., 2012; Yamasaki et al., 2012)。

しかし、犬の歯垢中の *P. gulae* の *fimA* 遺伝子型と歯周病の臨床的特徴との関連は未だ解明されていない。

そこで、第 1 章では歯周病罹患犬 225 頭を月齢により 3 つのグループに分け、

採取した歯垢サンプルから *P. gulae* およびその *fimA* 遺伝子型を同定した。検討 1 では、各月齢群における *P. gulae* の *fimA* 遺伝子型の保有率を比較調査した。検討 2 では、*P. gulae* の *fimA* 遺伝子型と歯周病の臨床的特徴との関連を明らかにすることを目的に、歯垢中の *P. gulae* の *fimA* 遺伝子型と犬の歯周病の重症度、永久歯の数との関連性を調査した。

材料および方法

本検討は、麻布大学動物実験委員会の承認（承認番号：200318-1）を得た上で実施した。プリモ動物病院相模原中央、厚木プリモ動物病院、相模大野プリモ動物病院および安田獣医科医院に来院した軽度から重度の歯周病に罹患する生後6～211ヶ月齢の犬225頭を対象とした。その犬種は、トイ・プードル、チワワ、ミニチュア・ダックスフンド、マルチーズ、ミニチュア・ピンシャー、ポメラニアン、ヨークシャー・テリア、パピヨン、ミニチュア・シュナウザー、コッカー・スパニエル、ビーグル、キャバリア・キング・チャールズ・スパニエル、日本テリア、ウィペット、シェットランド・シープドッグ、ミニチュア・プードル、イタリアングレーハウンド、ビションフリーゼ、ウェルシュ・コーギー、シー・ズー、柴犬、チベタン・スパニエル、パグ、ペキニーズ、ジャック・ラッセル・テリア、ノーフォーク・テリア、ノーリッチ・テリア、ウエスト・ハイランド・ホワイト・テリア、雑種であった。また過去6ヶ月以内に抗生物質を投薬している症例は検討から除外した。

検体を採取する際には、犬の飼い主に本調査の内容を説明し、本調査への了解を得た。犬は月齢に基づいて、50ヶ月齢未満（n = 50）、50以上100ヶ月齢未満（n = 60）、100ヶ月齢以上（n = 115）の3つのグループに分けて検討を行った（補足表1）。歯垢を採取するために、マイクロブラシ（Micro Applicator

Fine、フィード株式会社) を用いて、舌や唾液に触れないように注意し、左右の上顎犬歯および上顎第 4 前臼歯の歯肉縁下に直接挿入して採材した。

犬から歯垢を採取した後、この中に存在する細菌の DNA を抽出する。Kato らの方法(Kato et al., 2011) に従い、16S リボゾーム RNA 遺伝子の塩基配列により同定するとともに、*P. gulae* 特異プライマーを用いて増幅が得られることにより *P. gulae* の検出を確認した。この細菌 DNA の中に含まれている *P. gulae* の DNA を鋳型として、*P. gulae* に特異的なプライマーである (5'-ttg ctt ggt tgc atg atc gg-3' (SEQ ID NO: 7) および 5'-gct tat tct tac ggt aca ttc aca-3' (SEQ ID NO: 8)) を使用し、*P. gulae* を検出した。犬の歯垢中の *P. gulae* の *fimA* 遺伝子型をさらに同定した。陽性であったサンプルについて、さらに、A 型の *fimA* 遺伝子に対して特異的なプライマーセット (5'-tga gaa tat caa atg tgg tgc agg ctc acg-3' (SEQ ID NO: 9) および 5'-ctt gcc tgc ctt caa aac gat tgc ttt tgg-3' (SEQ ID NO: 10))、B 型の *fimA* 遺伝子に対して特異的なプライマーセット (5'-taa gat tga agt gaa gat gag cga ttc tta tgt-3' (SEQ ID NO: 11) および 5'-att tcc tca gaa ctc aaa gga gta cca tca-3' (SEQ ID NO: 12))、C 型の *fimA* 遺伝子に対して特異的なプライマーセット ([5'-cga tta tga cct tgt cgg taa gag ctt gga-3' (SEQ ID NO: 13) および 5'-tgt ggc ttc gtt gtc gca gaa tcc ggc atg-3' (SEQ ID NO: 14))、または [5'-gat ttg ctg ctc ttg cta tga cag ctt gta-3' (SEQ ID NO:

19) および 5'-ttt agt cgt ttg acg ggt cga tta cca agt-3' (SEQ ID NO: 20)])

を使用して、PCRにより *P. gulae* の *fimA* 遺伝子型を同定した。

P. gulae の検出の有無とその *fimA* 遺伝子型 A、B、C 型により 4 つのグループに分けて比較検討した。*P. gulae* の *fimA* 遺伝子型を同定の際に、複数の遺伝子型が検出されることがあるため、*fimA* 遺伝子型によるグループ分けは以下のように実施した。Negative は *P. gulae* が検出されなかったグループ、TypeA は *P. gulae* の *fimA* 遺伝子 A 型のみが検出されたグループ、TypeB は *P. gulae* の *fimA* 遺伝子 B 型のみが検出された、もしくは A 型と B 型が検出されたグループ、TypeC は *P. gulae* の *fimA* 遺伝子 C 型のみが検出された、A 型と C 型が検出された、B 型と C 型が検出された、もしくは A 型と B 型と C 型が検出されたグループとした (表 1)。

検討 1 : 各月齢群における *P. gulae* の *fimA* 遺伝子型の保有率の比較

P. gulae の *fimA* 遺伝子型により同定した結果に基づき、各月齢群における *P. gulae* の *fimA* 遺伝子型の保有率を比較検討した。

検討 2 : 各月齢群における *fimA* 遺伝子型間の歯周病重症度と永久歯数の比較

歯周病の重症度と永久歯の数を、各月齢群における *fimA* 遺伝子型間で比較検討した。全身麻酔により歯科 X 線装置での歯周状態の把握と埋伏歯の有無を確認し、永久歯数を測定した。*P. gulae* の分布と *fimA* の遺伝子型を検討 1 と同

様に PCR を用いて決定した。歯周病の重症度ステージ分類は、American Veterinary Dental College の基準に従って評価し、正常（臨床的に正常）、ステージ 1（歯肉炎のみ、アタッチメントロスなし）、ステージ 2（早期歯周炎）、ステージ 3（中等度歯周炎）、およびステージ 4（進行した歯周炎）に分類した（American Veterinary Dental College, 2022.）。

歯周病の重症度ステージ分類は、左上顎第 4 前臼歯に基づいて決定し、その歯が欠歯の場合は最も深刻な影響を受けた歯に基づいて決定した。歯周病の病期と歯数は、平均±平均の標準誤差として表した。従属変数の正規性と分散の均一性は、それぞれシャピロ・ウィルク検定とブラウン・フォーサイス検定によって確認した。歯周病の病期と *P. gulae* の有無の関係は、二元配置分散分析 (Type III 平方和) により分析し、続いて Šidák の多重比較検定を行った。二次的に、歯周病の病期とさまざまな各遺伝子型群との関係を、二元配置分散分析 (Type III 平方和) により分析した後、Dunnett の多重比較検定（陰性群との比較）を行った。永久歯数については、50 ヶ月齢未満の *P. gulae* 陰性群では変動がないため、従属変数を完全な歯列と 42 本未満の歯として確認し、50 以上 100 ヶ月齢未満および 100 ヶ月齢以上の月齢群でロジスティック回帰として分析を行った。統計的有意性は、5%および 1% の確率レベルで推定した (Prism 9、GraphPad Software、カリフォルニア州サンディエゴ)。この研究

のサンプルサイズが適切であることを確認するために、検出力分析も行った。

各月齢群における各遺伝子型間の割合は、カイ二乗検定で分析した。すべての

ANOVA で、因子間に有意な相互作用は認められなかった。

結 果

検討 1: 各月齢群における *P. gulae* の *fimA* 遺伝子型の保有率の比較

犬 225 頭中、173 頭が *P. gulae* 陽性であり、その割合は 76.9%であった。また *P. gulae* 陽性犬のうち *fimA* 遺伝子型における内訳は、TypeA 45 頭 (26.0%)、TypeB 42 頭 (24.3%)、TypeC 86 頭 (49.7%) であった。各月齢群では、50 ヶ月齢未満で *P. gulae* 陰性犬は 21 頭、TypeA 11 頭、TypeB 8 頭、TypeC 10 頭、50 以上 100 ヶ月齢未満で *P. gulae* 陰性犬は 13 頭、TypeA 11 頭、TypeB 9 頭、TypeC 27 頭、100 ヶ月齢以上で *P. gulae* 陰性犬は 18 頭、TypeA 23 頭、TypeB 25 頭、TypeC 49 頭であった。

各月齢群における *fimA* 遺伝子型の保有率の比較 (図 1) では、*P. gulae* 陰性犬の割合は、50 ヶ月齢未満で 42.0%、50 以上 100 ヶ月齢未満で 21.7%、100 ヶ月齢以上で 15.7%であり、年齢とともに割合が減少する傾向が認められた。一方、*P. gulae* 陽性犬の割合は、50 ヶ月齢未満で 58.0%、50 以上 100 ヶ月齢未満で 78.3%、100 ヶ月齢以上で 84.4%であり、年齢とともに *P. gulae* 陽性犬の割合は増加する傾向が認められた。特に、TypeC すなわち C 型の *fimA* 遺伝子の *P. gulae* を有する犬の割合は、50 ヶ月齢未満の群において 20.0%、50 以上 100 ヶ月齢未満の群において 45.0%、100 ヶ月齢以上の群において 42.6%であり、他の遺伝子型と比較してその割合が加齢により著しく増加した。

検討2: 各月齢群における *fimA* 遺伝子型間の歯周病重症度と永久歯数の比較

P. gulae の有無での歯周病の重症度を比較すると、すべての月齢群で *P. gulae* 非保有犬と比較し、*P. gulae* 保有犬で歯周病の重症度が高くなっていた。また遺伝子型間での歯周病の重症度を比較する(図 2)と、生後 50 ヶ月齢未満の群において、*P. gulae* 陰性の犬と比較して、TypeA および TypeC の *P. gulae fimA* 保有犬で有意な歯周病の重症度の悪化が観察された。50 ヶ月齢以上 100 ヶ月齢未満の群では、*P. gulae* 陰性の犬と比較して、TypeC の *P. gulae fimA* 保有犬で有意な歯周病の重症度の悪化が観察された。100 ヶ月齢以上の群では、*P. gulae* 陰性の犬と比較して、全遺伝子型の *P. gulae fimA* 保有により、有意な歯周病の重症度の悪化が観察された。そして、TypeC の *P. gulae fimA* 保有により、どの月齢においても歯周病重症度を有意に悪化させることが確認された。

次に、遺伝子型間での永久歯数を比較 (図 3)したところ、50 ヶ月齢以上 100 ヶ月齢未満の群および 100 ヶ月齢以上の群において、完全な歯列 (42 本) を持つ犬の数は *P. gulae* 陽性群では年齢とともに減少した。また、100 ヶ月齢以上の群において、TypeB および TypeC の *P. gulae fimA* 保有犬で完全な歯列を持つ犬の数は *P. gulae* 陰性の犬と比較して有意に減少した。

考察

*P. gulae*が、犬の口腔から約75～95%の高い割合で検出されたとの報告がある (Kato et al., 2011, Yamasaki et al., 2012)。本検討において、犬225頭中、*P. gulae*陽性犬の頭数は173頭であり、76.9%と高い割合で検出され、過去の報告と同様の結果が示された。ヒトでは加齢にともない歯肉や歯槽骨が減少していき、歯周病罹患者の割合が増加する。犬においてもヒト同様に加齢とともに歯周病が増加し、かつ歯周病原性細菌の種類が増加することが示されている (Hirai N et al., 2013)。本検討において、加齢にともない*P. gulae*陰性犬の割合は減少する一方、*P. gulae*陽性犬の割合は増加する傾向が認められたことから、加齢にともなう歯周病の増加と*P. gulae*との関連性を疑うものであった。特に、C型の*fimA*遺伝子の*P. gulae*を有する犬の割合が、他の遺伝子型と比較して年齢とともに著しく増加したことからも、C型の*fimA*遺伝子の*P. gulae*の存在が加齢にともなう歯周病の増加、悪化に関与しているのではないかと推測された。そのことを確認するために、*P. gulae*の各*fimA*遺伝子型における歯周病の重症度をさらに調査していく必要があった。

私たちの知る限り、歯周病の臨床的特徴としての*P. gulae*の線毛遺伝子型と永久歯の数との関連を検証した最初の疫学研究である。50ヶ月齢以上の月齢群において、*P. gulae*陽性犬では年齢とともに完全な歯列を持つ犬の数は減少し、

100 ヶ月齢以上の群において、*P. gulae* 陰性犬と比較して B 型および C 型の *P. gulae fimA* 保有犬で有意に永久歯数が減少した。これらの結果は、*P. gulae* の存在と永久歯の数との間に有意な関連性があることを示していた。傷害を受けた歯周靭帯や歯槽骨は不可逆的であることから、*P. gulae*、特に C 型の *fimA* を保有する *P. gulae* の感染防御は歯周病を防ぐために重要であることが示唆された。

一方、*P. gulae* は、抗生剤によって治療することが可能であり、犬の歯周病の治療に承認されているクリンダマイシンに *P. gulae* は感受性があることが報告されている。また私たちの過去の研究において、クリンダマイシンと IFN- α 治療を使用した併用療法が歯周病を改善し、犬の *P. gulae* を減らすことを明らかにした (Nomura et al., 2020)。そのことから、犬の歯周病が進行する前に口腔内における *P. gulae* の感染の有無とその遺伝子型の検出を行い、それに対する治療により良好な口腔内環境を維持することができるのではないかと推察された。

第2章

塩化セチルピリジニウム、プラチナナノコロイドの
P. gulae に対する効果検討

緒 言

歯周病を予防するためには予防的デンタルケアが重要となる。歯垢の蓄積抑制および除去を含めた細菌因子のコントロールはデンタルケアとして重要となる。一般的に犬においても歯を磨くといった物理的な歯垢除去がデンタルケアとして有効であるとされる。しかし、犬に対して歯を磨くという行為は、犬の許容としつけを必要とし、すべての犬において実施可能なことではない。その中、デンタルガムや飲水投与での実施可能なデンタルケア製品は多くの犬に対して適応可能であるが、その効果は不明であることが多い。そこで人歯科医療で使用されることが多い、塩化セチルピリジニウム（以下、CPC）およびプラチナナノコロイド（以下、Pt）に着目した犬の歯周病予防製品の薬効解明を行った。薬効調査として、CPC,Pt含有製剤の *P. gulae* に対する増殖抑制効果、匂いに対する効能調査、炎症反応に対する効果を試験管内で検証した。

犬の口臭の原因となる成分は、揮発性硫黄化合物（VSC）が主体であると考えられ、そのVSCの中でもメチルメルカプタン（ CH_3SH ）、硫化水素（ H_2S ）、ジメチルサルファイド [$(\text{CH}_3)_2\text{S}$]が挙げられる。これら3つの物質は犬の不快な口臭の主な原因と考えられている（Iwashita et al., 2017）。VSCを産生する最も一般的に同定されている微生物は、*Fusobacterium* 属、*Treponema* 属、*Porphyromonas* 属、*Bacteroides* などのグラム陰性嫌気性菌と、グラム陽性属

の *Peptostreptococcus* が挙げられる (De Boever et al., 1995)。そこで本検討では、CPC,Pt 含有製剤の *P. gulae* に由来する匂いの効能調査として硫化水素およびメチルメルカプタン濃度を計測した。また *P. gulae* が惹起する歯肉の炎症に対する CPC,Pt 含有製剤の抗炎症作用を調査した。歯周病菌が歯および歯肉に定着し、バイオフィルムを形成すると、歯周病菌および菌体毒素が歯肉を傷害し、歯肉炎や歯周炎を引き起こす。さらに歯周病に起因する歯肉の炎症および歯槽骨の融解は、歯周病菌ないし菌体毒素 (LPS) がマクロファージおよび歯肉上皮細胞に作用する事で惹起される。CPC,Pt 含有製剤の曝露が *P. gulae* によって誘導されたマクロファージ細胞からの炎症性サイトカイン (IL-1 β , IL-6, TNF α) の産生に対してどのような効果を持つかを検討した。

材料および方法

Pt、CPC の *P. gulyae* に対する増殖抑制効果を *in vitro* で検証

P. gulyae を嫌気性菌用ヒツジ血液寒天培地（日本ベクトン・ディッキンソン株式会社）に播種して嫌気条件下で 3 日間培養した後、ウマ溶血液加ブルセラブロス液体培地（極東製薬工業株式会社）にて濁度が 1.0 となるように調整した。*P. gulyae* 懸濁液に CPC,Pt 含有製剤を 0.01%、0.1%、1%もしくは 10%の割合で混合し、5 分間～4 時間 37°C、嫌気条件下で培養した後の細菌生存率を BacTiter-Glo™ Microbial Cell Viability Assay（プロメガ）を用いて測定した。陰性対照群の細菌生存率を 100%とした時の各濃度における CPC,Pt 含有製剤投与群の反応をダネットの多重比較検定によって評価した。

Pt、CPC の *P. gulyae* に由来する匂いに対する効能を *in vitro* で検証

P. gulyae は、増殖抑制試験と同様の方法で培養し、*P. gulyae* 懸濁液に注射用水もしくは 1% CPC,Pt 含有製剤を混合し、集気びんで 5 分間 37°C、嫌気条件下で培養した後の硫化水素およびメチルメルカプタン濃度をガスクロマトグラフィーを用いて測定した。注射用水と比較した際の 1% CPC,Pt 含有製剤による *P. gulyae* の硫化水素、メチルメルカプタン濃度の評価をウェルチの t 検定を用いて行った。

Pt、CPC の *P. gulae* に起因する炎症に対する効能を *in vitro* で検証

P. gulae を曝露したマクロファージ細胞 (J774.1) に CPC,Pt 含有製剤を適用した際に産生される炎症性サイトカイン (IL-1 β , IL-6, TNF α) 量を計測した。マクロファージ細胞は 10%牛胎児血清を添加した RPMI-1640 培地で培養継代し、 1×10^4 cells/well で 96 ウェル培養プレートに播種して、コンフルート状態になるまで 37°C、5%CO₂ 条件下で培養した。*P. gulae* は、増殖抑制試験と同様の方法で培養し、*P. gulae* と濃度 0.01%、0.1%、もしくは 1%の CPC,Pt 含有製剤を細胞に播種後 24 時間の培養液中の IL-1 β 、IL-6、および TNF α を ELISA 法を用いて測定した。陰性対照群と各濃度における CPC,Pt 含有製剤投与群の炎症性サイトカイン量の比較をダネットの多重比較検定によって評価した。

結 果

考察

第3章

塩化セチルピリジニウム、プラチナナノコロイドの
一般飼育犬の歯周病に対する効果検討

緒 言

第 2 章の *in vitro* の検討において、CPC,Pt 含有製剤が歯周病菌の増殖および歯肉の炎症に対して効果があることが明らかとなった。そこで、一般に飼育されている歯周病罹患犬に対して、CPC,Pt 含有製剤がどのような効果を有するかを調査した。第 3 章では CPC,Pt 含有製剤の歯周病への治療効果、予防効果について検討を行った。

検討 1 では歯周病および口臭の程度が軽度から中等度の犬に対して、CPC,Pt 含有製剤を 1 ヶ月間適用し、治験前後での歯周病への治療効果の有無を検討した。検討 2 では麻酔下歯科処置により歯周治療を実施した犬 50 頭について、デンタルケアの有無や CPC,Pt 含有製剤を適応した際の歯周病予防効果について比較検討した。

材料および方法

検討1：本検討は、麻布大学動物実験委員会の承認（承認番号：200318-1）を得た上で実施した。プリモ動物病院相模原中央に来院した歯周病および口臭の程度が弱から中程度の犬15頭に対して、CPC,Pt含有製剤を1ヶ月間適用し、治験前、治験中の7日、14日、21日、28日および治験後の口臭官能評価、治験前、治験後の歯垢付着度、口腔内ガス測定、歯肉炎程度、口腔内チオール濃度、歯周病菌活性の測定を実施した。測定を実施する際には、犬の飼い主に本実験の内容を説明し、本実験への了解を得た。CPC,Pt含有製剤は、Q-nessマウスクリナー®（株式会社QIX）を用いて、CPC 0.01%、PT 1.2%配合原液を100倍希釈して自由飲水投与した。

口臭官能評価は、0：口臭がない、1：軽度の口臭、2：中等度の口臭、3：高度の口臭の4段階で飼い主により評価した。

口臭の測定には、①被験犬より口腔内空気を採取し、歯周病菌により産生される硫化水素およびメチルメルカプタン簡易ガスクロマトグラフィー（オーラルクロマ®：NISSHA エフアイエス）により評価、②口腔内チオール濃度をOraStrip®（オーラストリップ：DSファーマアニマルヘルス）によって評価した。口腔内空気の採取は、犬の口を10秒以上閉じた状態で1 mL シリンジを用いて口腔内ガスを1 mL 採取し、オーラルクロマに添加することで測定した。オ

ーラストリップは、歯肉溝浸出液や唾液に含まれる硫化水素やメチルメルカプタンなどのSH基を有する化合物（チオール）を検出し、0～5の濃度スケールで評価した。試験紙に含まれる検出試薬が検体中のSH基と反応することにより発色する。犬の口唇を持ち上げ、犬の歯と歯肉の境界である歯肉縁に当て、穏やかに滑らせて、試験紙に口腔内の浸出液検体を染み込ませた。そして、10秒後に試験紙の発色と判定シートの色調サンプルと照合し、最も近い色の番号を読み取り、6段階のスコア値として判定した。また高いスコアほど、より高いチオール濃度が検出したことを示している。

歯垢付着度は、0：歯垢の付着なし、1：歯垢が歯面の1/3以下付着、2：歯垢が歯面の1/3～2/3付着、3：歯垢が歯面の2/3以上付着として視覚的に評価した。

歯肉炎程度は、肉眼所見により歯肉の炎症の程度を歯肉炎程度として以下の評価とした。0：正常（歯肉に炎症はなく、健康な歯肉）、1：軽度の炎症（歯肉に色の軽度の変化や腫脹）、2：中等度の炎症（歯肉に発赤、腫脹、光沢がある）、3：高度の炎症（歯肉に著しい炎症、腫脹、潰瘍があり、自然出血の傾向がある）

歯周病菌活性は、BANA分解活性酵素検査（BANAテスト）により評価した。BANA分解活性酵素は、歯周病菌（*P.gulae*、*P.gingivalis*、*Treponema denticola*、*Tannerella forsythensis*）をはじめとする嫌気性細菌から産生される酵素であ

り、歯周病菌および活性を測定することができる。口腔内サンプルは、上顎および下顎の第4前臼歯を中心に歯周を一周するように綿棒で採取し、専用紙および専用プロセッサを用いて測定した。色の変化により0～3で評価した(0: 検出なし、1: 低濃度、2: 中濃度、3: 高濃度)。

検討2: 本検討は、麻布大学動物実験委員会の承認(承認番号: 200318-1)を得た上で実施した。プリモ動物病院相模原中央に来院したスケーリング等の麻酔下歯科手術を実施した犬50頭を対象とした。測定の際には、犬の飼い主に本実験の内容を説明し、本実験への了解を得た上で実施した。対象となった犬の月齢は、14～166ヶ月齢であり、平均は99ヶ月齢であった。麻酔下歯科手術を実施した犬50頭を歯みがきとCPC,Pt含有製剤を飲水投与した群(n=15)、歯みがきのみを実施した群(n=16)、CPC,Pt含有製剤のみを飲水投与した群(n=8)、無処置群(n=11)の4群に分け、歯科手術前、術後7日、術後1ヶ月、術後3ヶ月での歯肉炎程度、歯石指数、口臭官能評価、口腔内チオール濃度、歯周病菌活性(N-ベンゾイル-DL-アルギニルペプチターゼの酵素活性)を比較した(補足表2)。ダネットの多重比較検定を使用して、無処置群と処置群との違いを評価した。

麻酔下歯科手術では、歯石除去(スケーリング)、キュレットージ、ポリッシングを行い、一部歯周病罹患歯に対しての抜歯処置も含まれた。歯みがきは、

歯ブラシもしくはデンタルシートでの物理的な歯垢除去を前提として3日に1回以上の頻度で飼い主によって実施された。デンタルジェルの使用の有無等は限定していない。

CPC,Pt含有製剤は、Q-ness マウスクリナー[®]を用いて、CPC 0.01%、PT 1.2%配合原液を100倍希釈して使用した。

歯肉炎程度は、肉眼所見により歯肉の炎症の程度を歯肉炎程度として以下の評価とした。0：正常（歯肉に炎症はなく、健康な歯肉）、1：軽度の炎症（歯肉に色の軽度の変化や腫脹）、2：中等度の炎症（歯肉に発赤、腫脹、光沢がある）、3：高度の炎症（歯肉に著しい炎症、腫脹、潰瘍があり、自然出血の傾向がある）

歯石指数を以下の評価とした。CI：0 正常（歯石が認められない）、CI：1 軽度の歯石（歯石が歯面1/3以下のみ覆っている）、CI：2 中等度の歯石（歯石が歯面1/3～2/3を覆っている）、CI：3 高度の歯石（歯石が歯面2/3以上を覆っている）

口臭官能評価は、0：口臭がない、1：軽度の口臭、2：中等度の口臭、3：高度の口臭の4段階で獣医師、飼い主により評価した。

口腔内チオール濃度は、OraStrip[®]（オーラストリップ：DSファーマアニマルヘルス）によって評価した。歯肉溝浸出液や唾液に含まれる硫化水素やメチ

ルメルカプタンなどの SH 基を有する化合物（チオール）を検出し、0～5 の濃度スケールで評価した。試験紙に含まれる検出試薬が検体中のチオール（SH）基と反応することにより発色する。犬の口唇を持ち上げ、犬の歯と歯肉の境界である歯肉縁に当て、穏やかに滑らせて、試験紙に口腔内の浸出液検体を染み込ませた。そして、10 秒後に試験紙の発色と判定シートの色調サンプルと照合し、最も近い色の番号を読み取り、6 段階のスコア値として判定した。また高いスコアほど、より高いチオール濃度が検出したことを示している。

歯周病菌活性は N-ベンゾイル-DL-アルギニルペプチターゼの酵素活性を ADplit®（アドプリット：共立製薬株式会社）により測定して評価した。N-ベンゾイル-DL-アルギニルペプチターゼの酵素は、犬の歯周病病巣から高頻度に検出される *P. gulae* から特異的に産生されるトリプシン様酵素である。滅菌綿棒を用いて、犬の上顎犬歯または臼歯を綿棒で歯と歯肉の境界である歯肉縁付近の歯面にしっかりと密着させて 3 回以上拭き、歯又は歯列の遠心から近心に向けて拭いた。検体採取後の綿棒を検体抽出液につけ攪拌し、その綿棒をテストプレートの検査部位に 5 秒間押し当て、その 10 分後に発色液を 1 滴滴下した。3 分後に検体の発色と判定シートの色調サンプルと照合し、最も近い色の番号を読み取り、5 段階のスコア値として判定した。また高いスコアほど、より高い酵素活性を示している。

各検査項目の評価には、無処置群と各処置群との比較をダネットの多重比較検定を用いて行った。

結果

考察

総括ならびに結論

犬における *P. gulae* 陽性率は 76.9% と高い割合で検出され、加齢にともない *P. gulae* 陽性犬の割合は増加する傾向が認められた。*fimA* 遺伝子 C 型を有する *P. gulae* は、犬の歯周病重症度を悪化させ、有意に永久歯数を減少させることが確認された。*fimA* 遺伝子 C 型を有する *P. gulae* は、犬の歯周病重症度、永久歯数に大きな影響を及ぼしているものと考えられる。

本研究では、犬の歯周病態進行において *P. gulae* が主体的な役割を担っていること、さらに CPC, Pt 含有製剤などの *P. gulae* を標的とした歯周病予防薬を適切な歯科処置後に歯みがきと組み合わせることによって、歯周病に対する十分な予防効果がみられることが証明された。

本研究の成果は、犬の歯科医療において *P. gulae* の有無とその *fimA* 遺伝子型の検出、歯周病リスクの評価、そして歯周病予防のための日々のデンタルケア指導は良好な口腔内環境を維持する上で有用な手段であることを示し、さらに効果的な治療や予防法の開発へつながるものと考えられる。

本論文の一部は、以下に公表した。

1. Shirahata S, Iwashita N, Sasaki R, Nomura R, Murakami M, Yasuda J, Yasuda H, Nakajima K, Inaba H, Matsumoto-Nakano M, Nakano K, Uchiyama J, Fukuyama T: Possible association of *fimA* genotype of *Porphyromonas gulae* with the severity of periodontal disease and the number of permanent teeth in dogs. *Front Vet Sci*, in print

謝 辞

本稿を終えるにあたり、本研究の遂行に際して終始ご指導、ご鞭撻を賜りました麻布大学獣医学部獣医学科分子生物学研究室 村上賢教授に深甚なる感謝の意を表します。

本稿作成に際し、懇篤な御指導、御助言を賜りました、麻布大学獣医学部獣医学科薬理学研究室 福山朋季准教授、同研究室 浅井史敏教授、大阪大学 歯学部 小児歯科学教室 仲野和彦教授、広島大学大学院 医系科学研究科 野村良太教授、岡山大学学術研究院 医歯薬学域 仲野道代教授、岡山大学学術研究院 医歯薬学域 小児歯科学分野 稲葉裕明准教授、岡山大学学術研究院 医歯薬学域 内山淳平准教授に深謝の意を表します。

本研究開始当初より、絶えざる御指導と奨励を頂きました麻布大学獣医学部獣医学科薬理学研究室 白井 明志 教授に深謝致します。

最後に研究に際し、御指導・御協力賜り、実験に御協力くださりました、安田獣医科医院 院長 安田英巳先生をはじめ、荒井延明先生、安田隼也先生、麻布大学獣医学部獣医学科薬理学研究室 梶典幸先生、岩下直樹共同研究員、薬理学研究室諸氏の皆様に心から感謝いたします。

参考文献

- Amano, A., Sharma, A., Lee, J.Y., Sojar, H.T., Raj, P.A., Genco, R.J., 1996. Structural domains of *Porphyromonas gingivalis* recombinant fimbriin that mediate binding to salivary proline-rich protein and statherin. *Infect Immun.* 64(5), 1631-1637.
- American Veterinary Dental College. 2022. American Veterinary Dental College Homepage: AVDC Nomenclature. Periodontal Anatomy and Disease. Stages of Periodontal Disease. <https://avdc.org/avdc-nomenclature/>
- Armitage, G.C., 1999. Development of a classification system for periodontal diseases and conditions. *Ann Periodontol.* 4 (1), 1-6.
- Ashley, F.P., Skinner, A., Jackson, R.F., Wilson, R.F., 1984. The effect of a 0.1% cetylpyridinium chloride mouthrinse on the accumulation and biochemical composition of dental plaque in young adults. *Caries Res.* 18, 465-471.
- DeBoever, E.H., Loesche, W.J., 1995. Assessing the contribution of anaerobic microflora of the tongue to oral malodor. *J Am Dent Assoc.* 126, 1384-1393.
- DeBowes, L.J., 2010. Problems with the gingiva. In: *Small Animal dental, oral and maxillofacial disease, a color handbook.* London Manson. 159-181.
- Fournier, D., Mouton, C., Lapierre, P., Kato, T., Okuda, K., Menard, C., 2001. *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.
- Hajishengallis, G., Lambris, J.D., 2012. Complement and dysbiosis in periodontal disease. *Immunobiology.* 217, 1111-1116.

- Hamada, N., Takahashi, Y., Watanabe, K., Kumada, H., Oishi, Y., Umemoto, T., 2008. Molecular and antigenic similarities of the fimbrial major components between *Porphyromonas gulae* and *P. gingivalis*. *Vet Microbiol.* 128(1-2), 108 117.
- Hirai, N., Shirai, M., Kato, Y., Murakami, M., Nomura, R., Yamasaki, Y., Takahashi, S., Kondo, C., Matsumoto-Nakano, M., Nakano, K., Asai, F., 2013. Correlation of age with distribution of periodontitis-related bacteria in Japanese dogs. *J Vet Med Sci.* Jul 31.75(7), 999 1001.
- Holt, S.C., Ebersole, J.L., 2005. *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola*, and *Tannerella forsythia* : the red complex, a prototype polybacterial pathogenic consortium in periodontitis. *Periodontol* 2000. 38, 72 122.
- Hoffmann, T.H., Gaengler, P., 1996. Clinical and pathomorphological investigation of spontaneously occurring periodontal disease in dogs. *J Small Anim Pract.* 37, 471 479.
- Iwashita, N., Nomura, R., Shirai, M., Kato, Y., Murakami, M., Matayoshi, S., Kadota, T., Shirahata, S., Ohzeki, L., Arai, N., Yasuda, J., Yasuda, H., Inaba, H., Matsumoto-Nakano, M., Nakano, K., Asai, F., 2019. Identification and molecular characterization of *Porphyromonas gulae fimA* types among cat isolates. *Vet Microbiol.* 229, 100 109.
- Iwashita, N., Sugita, K., Shirai, M., Murata, S., Yanagisawa, S., Goto, S., Takagi, Y., Asai, F., 2017. Application of a portable gas chromatograph for quantitative measurement of canine oral malodor. *Toxicol Sci.* 4(1), 23 29.
- Kato, Y., Shirai, M., Murakami, M., Mizusawa, T., Hagimoto, A., Wada, K., Nomura, R., Nakano, K., Ooshima, T., Asai, F., 2011. Molecular detection of human periodontal pathogens in oral swab specimens from dogs in japan. *J VET Dent.* 28(2), 84 89.

- Lobprise, H.B., Dodd, J.R., 2019. Wiggs's Veterinary Dentistry Principles and Practice 2nd ed. 82 88.
- Loe, H., Theilade, E., Jensen, S.B., 1965. Experimental gingivitis in man. J Periodontol. 36 177.
- Loesche, W.J., 1976. Chemotherapy of dental plaque infections. Oral Sci. Rev. 9, 65 107.
- Lund, E.M., Armstrong, P.J., Kirk, C.A., Kolar, L.M., Klausner, J.S., 1999. Health status and population characteristics of dogs and cats examined at private veterinary practices in the United States. J Am Vet Med Assoc. 214(9), 1336 1341.
- Marshall, M.D., Wallis, C.V., Milella, L., Colyer, A., Tweedie, A.D., Harris, S., 2014. A longitudinal assessment of periodontal disease in 52 Miniature Schnauzers. BMC Vet Res. 10, 166.
- Milella, L., 2015. The negative effects of volatile Sulphur compounds. J Vet Dent. 32, 99 102.
- Niemiec, B.A., 2008. Periodontal disease. Top Companion Anim. Med. 23, 72 80.
- 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., 2012. Diversity of fimbriin among *Porphyromonas gulae* clinical isolates from Japanese dogs. J. Vet. Med. Sci. 74, 885 891.
- Nomura, R., Inaba, H., Yasuda, H., Shirai, M., Kato, Y., Murakami, M., Iwashita, N., Shirahata, S., Yoshida, S., Matayoshi, S., Yasuda, J., Arai, N., Asai, F., Matsumoto-Nakano, M., Nakano, K., 2020. Inhibition of *Porphyromonas gulae* and periodontal disease in dogs by a combination of clindamycin and interferon alpha. Sci Rep. Feb 20. 10(1), 3113.
- Novak, M.J., 2006. Classification of disease and conditions affecting the

- periodontium. Carranza's Clinical Periodontology. St. Louis, Mo, WB Saunders. 100-109
- Philstrom, B.L., Michalowicz, B.S., Johnson, N.W., 2005. Periodontal diseases. Lancet. 366, 1809 1820.
- Shirai, M., Nomura, R., Kato, Y., Murakami, M., Kondo, C., Takahashi, S., Yamasaki, Y., Matsumoto-Nakano, M., Arai, N., Yasuda, H., Nakano, K., Asai, F., 2015. Distribution of *Porphyromonas gulae fimA* genotypes in oral specimens from dogs with mitral regurgitation. Res Vet Sci. 102, 49 52.
- Silness, J., Loe, H., 1964. Periodontal disease in pregnancy II. Correlation between oral hygiene and periodontal condition. Acta Odontol Scand. 22, 121.
- Theilade, E., 1986. The non-specific theory in microbial etiology of inflammatory periodontal diseases. J. Clin. Periodontol. 13, 905 911.
- Waerhaug, J., 1981. Effect of tooth brushing on subgingival plaque formation. J. Periodontol. 52, 30 34.
- Wiggs, R.B., Lobprise, H.B., 1997. Periodontology, in Veterinary Dentistry, Principals and Practice: Philadelphia, PA, Lippincott – Raven. 186 231.
- Yaegaki, K., 2008. Oral malodorous compounds are periodontally pathogenic and carcinogenic. Japanese Dent Sci Rev. 44(2), 100 108.
- Yamasaki, Y., Nomura, R., Nakano, K., Inaba, H., Kuboniwa, M., Hirai, N., Shirai, M., Kato, Y., Murakami, M., Naka, S., Iwai, S., Matsumoto-Nakano, M., Ooshima, T., Amano, A., Asai, F., 2012. Distribution and molecular characterization of *Porphyromonas gulae* carrying a new *fimA* genotype. Vet. Microbiol. 161(1-2), 196 205.
- Yamasaki, Y., Nomura, R., Nakano, K., Naka, S., Matsumoto-Nakano, M., Asai, F., Ooshima, T., 2012. Distribution of periodontopathic bacterial

species in dogs and their owners. Arch Oral Biol. 57(9), 1183-1188.

岩崎直弥, 伊藤弘, 原良成, 1991. 塩化セチルピリジニウムによる歯周ポケット内洗浄が臨床症状および細菌叢に及ぼす効果について. 日歯周誌. 33(2), 448-457.

岡山峰信, 小城賢一, 宮本有正, 2008. 白金ナノコロイドの抗酸化効果と口腔ケア製品への応用. FRAGRANCE JOURNAL. 6, 26-33.

表および図

表 1 *P. gulae* 線毛遺伝子型によるグループ分け

グループ	検出された <i>P.gulae</i> の線毛遺伝子とその遺伝子型
Negative	線毛遺伝子が検出されない
TypeA	A 型のみ検出
TypeB	B 型のみ検出 A 型と B 型が検出
TypeC	C 型のみ検出 A 型と C 型が検出 B 型と C 型が検出 A 型、B 型と C 型が検出

P. gulae の *fimA* 遺伝子型を同定する際、複数の遺伝子型が検出されることがあり、*P. gulae* の検出の有無と *fimA* 遺伝子型 A、B、C 型により 4 つのグループに分けた。

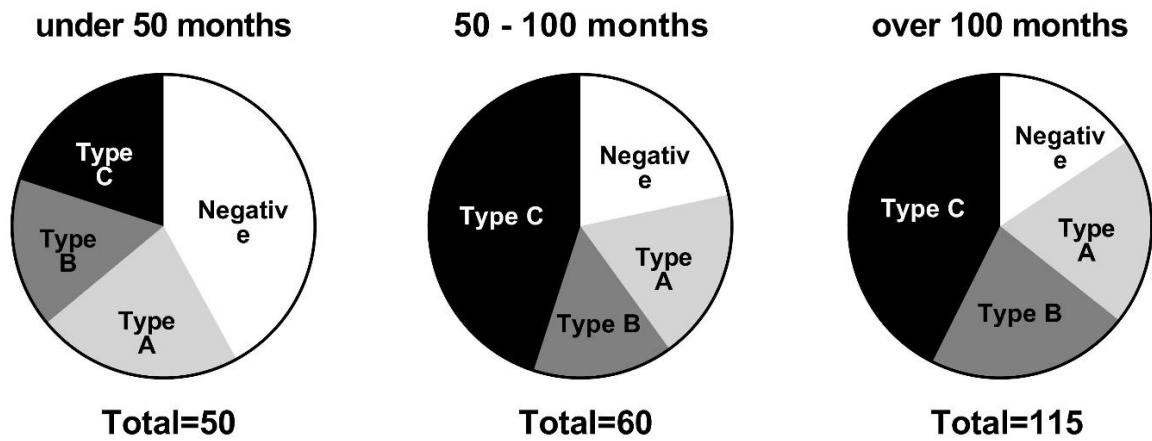


図1 各月齢群における *fimA* 遺伝子型の保有率を比較

左： 50ヶ月齢未満 (Negative:42.0%, A:22.0%, B:16.0%, C:20.0%)

中央： 50以上100ヶ月齢未満 (Negative:21.7%, A:18.3%, B:15.0%, C:45.0%)

右： 100ヶ月齢以上 (Negative:15.7%, A:20.0%, B:21.7%, C:42.6%)

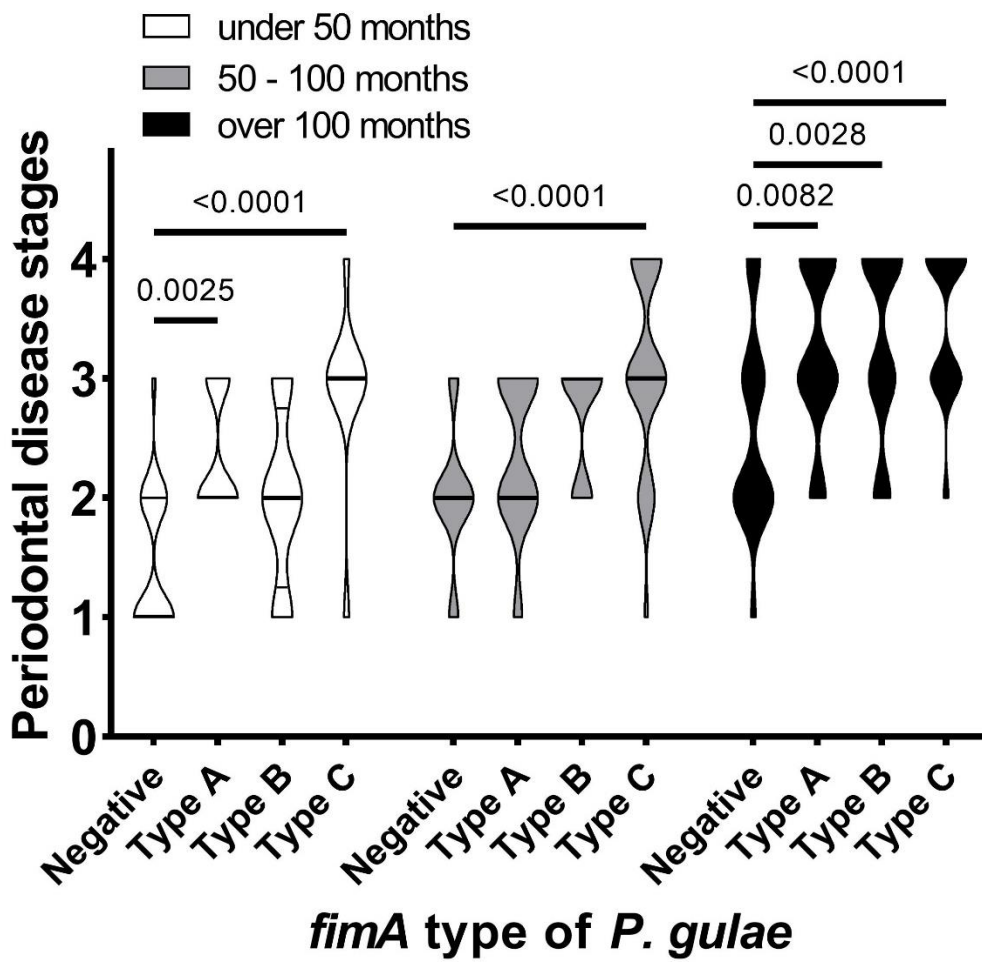


図 2 歯周病重症度と各月齢群における *P. gulae* の *fimA* 遺伝子型との関連
 ダネットの多重比較検定（各遺伝子型群と陰性群間の比較）により評価した。

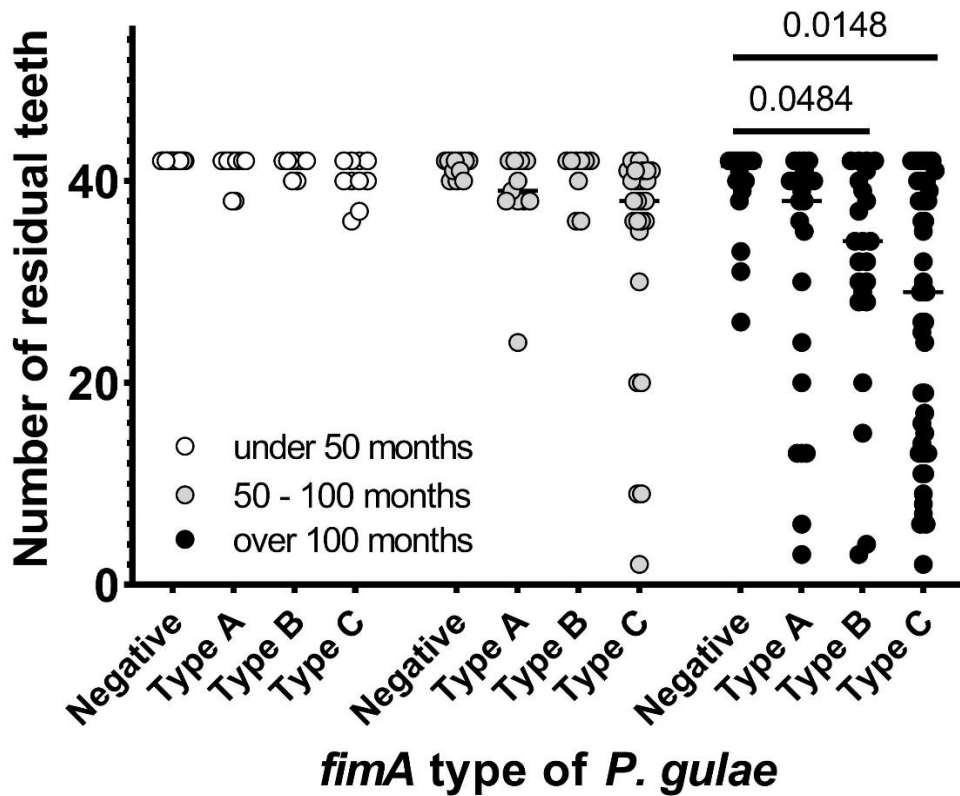


図 3 永久歯数と各月齢群における *P. gulae* の *fimA* 遺伝子型との関連

P. gulae 陰性群 (Negative 群) と各遺伝子群との比較をロジスティック回帰分析により評価した。

50 ヶ月齢未満(左):各遺伝子型群での永久歯数に変化なし。

50 以上 100 ヶ月齢未満の群(中央):*P. gulae* 陽性群において年齢とともに永久歯数が減少した。

100 ヶ月齢以上の群(右):*P. gulae* 陽性群では年齢とともに永久歯数が減少した。

また、TypeB および TypeC の群において、永久歯数が *P. gulae* 陰性群と比較して有意に減少した。

図 4 CPC,Pt 含有製剤による *P.gulae* の増殖抑制作用

図 5.1 培養後 5 分の CPC,Pt 含有製剤の *P.gulae* の匂いに対する効能調査

図 5.2 培養後 5 分,60 分の CPC,Pt 含有製剤の *P.gulae* の匂いに対する効能調査

図 6 CPC,Pt 含有製剤の *P.gulae* に起因するサイトカイン産生の抑制作用

図 7 CPC,Pt 含有製剤による口臭官能評価

図 8 CPC,Pt 含有製剤による歯垢付着度

図 9 CPC,Pt 含有製剤による口腔内ガス濃度

図 10 CPC,Pt 含有製剤による歯肉炎程度

図 11 CPC,Pt 含有製剤による口腔内チオール濃度

図 12 CPC,Pt 含有製剤による歯周病菌活性

図 13 歯石除去処置前後の歯肉炎程度

図 14 歯石除去処置前後の歯石指数

図 15 歯石除去処置前後の口臭官能評価

図 16 歯石除去処置前後の口腔内チオール濃度

図 17 歯石除去処置前後の歯周病菌活性

補足資料

補足表 1 第 1 章 サンプルデータ

Age group	Breeds	Age	Sex	fimA genotype	歯周病スコア	永久歯数
<50	mix	6	♀	(-)	2	42
	mix	8	♀	(-)	1	42
	mix	7	♀	(-)	1	42
	toy poodle	9	♀	(-)	1	42
	toy poodle	6	♂	(-)	1	42
	toy poodle	6	♂	(-)	2	42
	chihuahua	7	♀	(-)	1	42
	yorkshire terrier	8	♂	(-)	3	42
	yorkshire terrier	10	♂	(-)	2	42
	chihuahua	7	♀	(-)	1	42
	mix	8	♀	(-)	1	42
	mix	34	♂	(-)	2	42
	yorkshire terrier	44	♂✓	(-)	2	42
	shih Tzu	8	♀	(-)	1	42
	mix	23	♀✓	(-)	1	42
	toy poodle	24	♀	(-)	2	42
	pomeranian	27	♀✓	(-)	2	42
	tibetan spaniel	8	♂	(-)	1	42
	pug	34	♀✓	(-)	2	42
	maltese	18	♀✓	(-)	1	42
	chihuahua	35	♂✓	(-)	1	42
	chihuahua	35	♀✓	A	2	42
	miniture pinscher	25	♂	A	2	42
	toy poodle	42	♀	A	2	42
	chihuahua	48	♀✓	A	3	38
	yorkshire terrier	34	♀✓	A	3	38
	shiba inu	46	♂✓	A	2	42
	yorkshire terrier	18	♂✓	A	2	42
	chihuahua	27	♂	A	3	42
	toy poodle	49	♂	A	2	42
pekingese	25	♀✓	A	2	42	

	yorkshire terrier	40	♂	A	3	42
	chihuahua	8	♂	B	3	42
	maltese	6	♂	A and B	1	42
	chihuahua	48	♀	A and B	2	40
	toy poodle	48	♀ ✓	A and B	3	42
	toy poodle	10	♀	A and B	2	42
	pomeranian	14	♀	B	2	40
	papillon	49	♀ ✓	A and B	2	42
	unknown	48	♀ ✓	A and B	1	42
	miniature dachshund	23	♂ ✓	C	3	40
	toy poodle	21	♂ ✓	A and C	3	40
	miniature dachshund	45	♀	A and C	3	42
	toy poodle	48	♀ ✓	A and C	4	36
	yorkshire terrier	49	♂	A and C	3	40
	chihuahua	48	♀ ✓	A and C	3	42
	miniature schnauzer	37	♀	B and C	3	42
	pomeranian	33	♀ ✓	C	3	40
	chihuahua	29	♀ ✓	C	1	42
	toy poodle	49	♂ ✓	A,B and C	3	37
50-100	miniature dachshund	64	♀ ✓	(-)	1	42
	miniature poodle	69	♂ ✓	(-)	2	42
	mix	72	♂	(-)	1	42
	mix	51	♂ ✓	(-)	2	42
	toy poodle	57	♂ ✓	(-)	2	42
	toy poodle	73	♂ ✓	(-)	2	40
	mix	90	♂ ✓	(-)	3	40
	maltese	96	♀ ✓	(-)	2	42
	maltese	84	♂ ✓	(-)	2	42
	shih Tzu	90	♀ ✓	(-)	2	41
	toy poodle	67	♂ ✓	(-)	2	42
	mix	99	♀	(-)	3	41
	chihuahua	50	♂ ✓	(-)	2	40
	cocker spaniel	54	♀	A	3	42
	toy poodle	60	♂ ✓	A	2	38
	miniature poodle	69	♀ ✓	A	2	42

toy poodle	73	♀ ✓	A	3	38
chihuahua	76	♀ ✓	A	3	39
toy poodle	67	♀	A	3	38
chihuahua	92	♂	A	3	40
jack russell terrier	84	♂ ✓	A	2	42
toy poodle	82	♀ ✓	A	2	24
miniature dachshund	99	♀	A	2	38
miniature dachshund	52	♀	A	1	42
miniature dachshund	91	♀ ✓	B	3	36
miniature dachshund	80	♀ ✓	A and B	3	42
chihuahua	72	♀	A and B	2	42
toy poodle	98	♂ ✓	A and B	3	42
miniature schnauzer	85	♂ ✓	B	3	40
shiba inu	96	♀ ✓	B	3	36
toy poodle	69	♀ ✓	A and B	2	42
chihuahua	58	♀ ✓	A and B	3	42
welsh corgi	99	♀ ✓	B	2	42
mix	69	♂ ✓	C	4	36
papillon	74	♂ ✓	A,B and C	4	30
pomeranian	79	♂ ✓	A and C	3	36
toy poodle	80	♀	A and C	4	35
toy poodle	72	♂ ✓	B and C	3	36
toy poodle	85	♂	A,B and C	4	2
miniature dachshund	91	♂ ✓	A and C	3	38
bichon frize	95	♀	A,B and C	4	38
japanese terrier	99	♂ ✓	A and C	4	41
yorkshire terrier	98	♂ ✓	C	4	20
toy poodle	74	♀ ✓	A and C	3	38
maltese	71	♀	A and C	2	42
toy poodle	73	♀ ✓	A,B and C	2	40
shetland sheepdog	63	♂ ✓	B and C	3	40
toy poodle	73	♀ ✓	A,B and C	2	40
miniature dachshund	97	♀ ✓	A and C	3	38
jack russell terrier	64	♀	A,B and C	1	42
toy poodle	71	♀	A and C	3	41

	toy poodle	95	♀ ✓	B and C	4	36
	mix	96	♀ ✓	A,B and C	3	40
	whippet	99	♂ ✓	A and C	3	40
	toy poodle	73	♂	A,B and C	4	9
	toy poodle	83	♂	A,B and C	2	41
	toy poodle	64	♀ ✓	A,B and C	3	41
	toy poodle	98	♂	B and C	3	9
	toy poodle	64	♀ ✓	A,B and C	2	41
	pomeranian	91	♂ ✓	C	3	20
≥ 100	toy poodle	101	♂ ✓	(-)	2	42
	chihuahua	123	♂ ✓	(-)	2	42
	miniature schnauzer	130	♂ ✓	(-)	2	42
	chihuahua	132	♂	(-)	4	33
	miniature dachshund	143	♀ ✓	(-)	3	41
	pomeranian	162	♀ ✓	(-)	3	40
	italian greyhound	126	♂ ✓	(-)	3	42
	shiba inu	123	♀ ✓	(-)	2	38
	maltese	108	♀ ✓	(-)	2	42
	pomeranian	134	♀ ✓	(-)	2	40
	mix	108	♂ ✓	(-)	2	42
	chihuahua	120	♂ ✓	(-)	3	42
	west highland white terrier	132	♀ ✓	(-)	1	31
	miniature schnauzer	130	♂ ✓	(-)	2	40
	shiba inu	184	♂ ✓	(-)	3	39
	miniature dachshund	168	♀ ✓	(-)	4	42
	chihuahua	150	♀ ✓	(-)	2	26
	miniature dachshund	148	♀ ✓	(-)	4	42
	toy poodle	105	♀	A	3	24
	pomeranian	105	♀ ✓	A	4	3
	miniature dachshund	117	♀ ✓	A	3	42
	chihuahua	120	♀	A	4	38
	maltese	130	♀	A	2	42
	miniature schnauzer	131	♂	A	4	40
	miniature dachshund	141	♂	A	4	30

miniture pinscher	143	♂ ✓	A	4	13
chihuahua	148	♂ ✓	A	3	36
miniature dachshund	149	♀ ✓	A	4	13
italian greyhound	177	♀ ✓	A	4	6
toy poodle	134	♂	A	3	42
toy poodle	169	♀ ✓	A	3	39
miniature dachshund	132	♂ ✓	A	3	40
cavalier	132	♂ ✓	A	3	20
miniature dachshund	168	♀ ✓	A	2	40
miniature dachshund	108	♂ ✓	A	3	42
toy poodle	142	♀ ✓	A	2	35
miniature dachshund	189	♂ ✓	A	3	40
yorkshire terrier	119	♀	A	2	40
toy poodle	143	♂ ✓	A	3	41
papillon	204	♂ ✓	A	4	13
shetland sheepdog	166	♂ ✓	A	4	38
toy poodle	109	♂ ✓	A and B	3	34
chihuahua	110	♂	A and B	3	40
miniature dachshund	112	♂ ✓	B	4	N/A
toy poodle	115	♀ ✓	B	4	29
miniature dachshund	128	♂ ✓	B	3	30
maltese	129	♂ ✓	B	4	N/A
miniature dachshund	132	♀	B	2	41
toy poodle	136	♀ ✓	B	4	34
miniature dachshund	150	♀ ✓	A and B	3	42
chihuahua	171	♀ ✓	B	3	38
miniature dachshund	186	♀ ✓	B	4	3
chihuahua	180	♂ ✓	B	4	32
toy poodle	126	♂	A and B	4	4
maltese	109	♂	A and B	3	28
miniature dachshund	179	♀ ✓	A and B	3	42
toy poodle	115	♂ ✓	B	4	32
toy poodle	161	♀ ✓	B	2	42
toy poodle	150	♂ ✓	B	4	34
chihuahua	186	♀	B	4	28

jack russell terrier	173	♀ ✓	B	3	37
chihuahua	122	♀ ✓	B	2	42
norwich terrier	112	♀ ✓	B	2	39
miniature dachshund	211	♀ ✓	A and B	4	15
miniature dachshund	128	♂	B	2	30
miniature dachshund	164	♂ ✓	A and B	4	20
mix	104	♂ ✓	A,B and C	4	30
miniture pinscher	105	♂ ✓	A,B and C	4	32
miniature dachshund	105	♀ ✓	A and C	3	38
yorkshire terrier	110	♂ ✓	A and C	2	42
toy poodle	112	♀ ✓	A and C	4	13
toy poodle	112	♀ ✓	A and C	4	15
chihuahua	112	♀	A,B and C	3	35
toy poodle	114	♀ ✓	B and C	3	N/A
shetland sheepdog	132	♂	A and C	4	42
miniature dachshund	105	♂ ✓	A and C	3	38
papillon	104	♀ ✓	A and C	3	42
chihuahua	167	♂ ✓	B and C	3	36
toy poodle	120	♂ ✓	B and C	3	40
norfolk terrier	137	♀ ✓	B and C	3	42
toy poodle	118	♀ ✓	C	4	16
miniature dachshund	119	♀	A and C	4	6
chihuahua	120	♂ ✓	A and C	3	24
pomeranian	121	♀ ✓	A and C	4	13
unknown	121	♂ ✓	A and C	3	6
miniature dachshund	124	♀ ✓	A,B and C	3	42
papillon	125	♀ ✓	C	3	26
pomeranian	127	♀ ✓	C	3	40
toy poodle	129	♂ ✓	B and C	4	29
chihuahua	132	♀ ✓	A and C	2	42
chihuahua	135	♂	A,B and C	4	40
miniature schnauzer	138	♀	A,B and C	4	13
maltese	139	♀ ✓	A,B and C	4	9
yorkshire terrier	149	♂ ✓	A and C	4	11
miniature dachshund	156	♀	A,B and C	4	13

pomeranian	162	♂✓	C	4	2
miniature dachshund	163	♂✓	C	4	26
mix	167	♂✓	A and C	3	N/A
miniature dachshund	175	♀✓	A,B and C	4	8
toy poodle	108	♀✓	A and C	4	14
miniature dachshund	189	♂✓	A,B and C	4	41
beagle	165	♀✓	A,B and C	4	40
yorkshire terrier	189	♀✓	A,B and C	4	38
pomeranian	144	♂✓	C	3	36
miniature dachshund	126	♀✓	C	4	7
chihuahua	116	♂	A and C	4	11
cavalier	128	♀✓	A,B and C	3	19
miniature dachshund	129	♀✓	B and C	2	42
pomeranian	142	♀	C	3	17
unknown	142	♀✓	C	3	39
toy poodle	107	♀	A and C	2	42
chihuahua	136	♀	A and C	3	29
toy poodle	109	♀✓	A,B and C	2	38
cavalier	128	♀✓	A,B and C	4	19
miniature schnauzer	133	♀✓	A,B and C	4	25

♂:雄 ♀:雌 ♂✓:去勢雄 ♀✓:避妊雌

補足表 2 第 3 章 検討 2 サンプルデータ

補足表 3 歯石除去処置前後の歯肉炎程度

補足表 4 歯石除去処置前後の歯石指数

補足表 5 歯石除去処置前後の口臭官能評価

補足表 6 歯石除去処置前後の口腔内チオール濃度

補足表 7 歯石除去処置前後の歯周病菌活性