

P. gingivalis ジンジパイン IgY 抗体の
ラット実験歯周炎に対する歯槽骨吸収抑制効果

鹿谷 宗司

神奈川歯科大学感染制御学講座微生物学分野
(受付: 2013年10月18日)The IgY antibody against *P. gingivalis* gingipains inhibits
alveolar bone resorption on rat experimental periodontitis

Souji SHIKAYA

Division of Microbiology, Department of Infection Control Kanagawa Dental University
82, Inaoka-cho, Yokosuka, Kanagawa, 238-8580, Japan

Abstract

Porphyromonas gingivalis has been implicated as an important pathogen in the development of adult periodontitis, and its colonization of subgingival sites is critical in the pathogenic process. The gingipains are cell surface Arg- and Lys-specific proteinases of the bacterium *Porphyromonas gingivalis*, which has been associated with periodontitis, a disease that results in the destruction of the teeth-supporting tissues. The aim of this study was to investigate the efficacy of egg yolk antibody against gingipains (IgY-GP) to the protection alveolar bone loss by *P. gingivalis* in rats. Rats were orally infected with *P. gingivalis* ATCC 33277, which was suspended in 5% carboxymethylcellulose. Each rat received 0.5 ml of the suspension by oral gavage. Then, the IgY-GP and the IgY-Control in 5% carboxymethylcellulose were administered, with each rat receiving 0.5 ml by oral gavage. The upper jaws were used as dry specimens for measuring horizontal alveolar bone loss. The distance between the cement-enamel junction (CEJ) and the alveolar bone crest (ABC) was measured at 14 palatal sites per rat. *P. gingivalis*-infected group showed an increased distance between CEJ and ABC compared to uninfected group, indicating an enhanced alveolar bone loss due to oral infection with *P. gingivalis*. However, administered the IgY-GP group showed a decreased distance between CEJ and ABC compared to *P. gingivalis*-infected group. The IgY-GP could be used for the development of passive immunization against *P. gingivalis*-associated periodontal disease. These findings suggested that the IgY-GP protects *P. gingivalis*-induced alveolar bone loss.

緒 言

Porphyromonas gingivalis (*P. gingivalis*) は、黒色色素産生性のグラム陰性嫌気性桿菌であり、歯周病患者のポケットから高率に分離されること¹⁻⁵⁾、および本菌に対する血清抗体価が歯周炎患者血清において有意に高いこと⁶⁻⁸⁾ から、歯周病発症に関わる有力な細菌の一つとされている⁹⁾。*P. gingivalis* は、唾液成

分¹⁰⁾、頬粘膜細胞¹¹⁻¹³⁾、赤血球¹⁴⁾、フィブロネクチン-コラーゲン複合物質¹⁵⁾ および他の口腔細菌¹⁶⁾ などに付着する性質を有しており、本菌のヒト細胞への付着は、歯周病発症の重要な第一歩であると考えられている¹⁷⁾。更に、糖尿病、心臓血管疾患、低体重児出産および誤嚥性肺炎などの全身疾患リスク因子としても注目されている¹⁸⁻²¹⁾。本菌の病原因子の一つとして、菌体表面および菌体外に強力なプロテアーゼを産

生することが知られているが、なかでもジンジパイン (gingipains) は本菌の産生する主要なプロテアーゼであり、ペプチド切断部位特異性の異なる Arg-gingipain (Rgp) と Lys-gingipain (Kgp) が存在する²²⁻²⁴⁾。これら2つの酵素は、宿主細胞に傷害を与え歯周病に関連する種々の病態を生み出すと考えられている。ジンジパインは単量体として菌体細胞外に分泌されるだけでなく、外膜上では血球凝集素やヘモグロビン結合タンパク質、LPS、リン脂質と結合した高分子複合体としても存在することが知られている。

慢性歯周炎の原因菌が *P. gingivalis* であることは多くの臨床的、実験的研究から明らかにされている。我々の研究室においても *P. gingivalis* をラット口腔に接種することにより歯槽骨の吸収を惹起する実験的歯周炎を用いて、*P. gingivalis* の病原因子の解析を行ってきた²⁵⁾。本研究においては、*P. gingivalis* の産生する酵素であるジンジパインに対する鶏卵抗体 (Immunoglobulin Yolk: IgY) を用いて、ラット実験歯周炎に対する骨吸収抑制効果について検討した。

材料および方法

1. 供試菌株および培養条件

P. gingivalis 33277株は、ブレインハートインフュージョンプロス (BHI, Difco, Detroit, MI, USA) にイーストエキストラクト (5 mg/ml)、ヘミン (5 μg/ml) およびビタミン K₁ (0.5 μg/ml) を添加した培地 (以下BHI液体培地) もしくは5%ヒツジ脱繊維血を含むBHI血液寒天培地 (以下BHI血液平板) を用いて嫌気条件下 (5% CO₂, 10% H₂, 85% N₂) 37°Cで培養した。

2. IgY-ジンジパイン抗体

IgY-ジンジパイン抗体 (IgY-GP) は、株式会社イーダブルニュートリション・ジャパンより分与を受けた。IgY-GPの作製は、White Leghorn種の鶏 (HyLine W36種5カ月齢) にジンジパイン抗原 (1 mg/ml) を接種して初回免疫から8週間後に追加免疫を行なって、卵黄抗体のピークにあたる追加免疫より2週間後に採卵したものを乾燥粉末にした²⁶⁾。コントロール鶏卵抗体 (IgY-Control) は、*P. gingivalis* 非感作の鶏卵から作製し、同様に調製したものをを用いた。

3. IgY-GPによる増殖および酵素活性への影響

BHI液体培地にIgY-GP粉末を最終濃度1%になるように添加した培地にIgY-GP無添加BHI液体培地で一昼夜37°Cで嫌気培養した菌液を1/100量添加した。コントロールとして最終濃度1%のIgY-Controlと鶏卵抗体無添加培地を用いて同量の菌液を接種して培養した。各試験管を嫌気条件下 (5% CO₂, 10% H₂, 85% N₂) 37°Cで培養し、細菌の増殖状態を経時的に吸光度計

(Spectrophotometer DU 800, Beckman Coulter, Brea, CA, USA)により550 nmの波長で培地の濁度を測定した。トリプシン様酵素活性²⁷⁾ は、トリプシン様酵素の合成基質であるN-α-Benzoyl-L-arginine-*p*-nitroanilide (BAPNA) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) 0.1%溶液50 μlと50 μlの0.2 M トリス塩酸緩衝液 (pH 7.8) を混和した反応溶液に *P. gingivalis* 培養菌液の培養上清50 μlを加え37°Cで20分間反応させた後、50 μlの20%酢酸を加えて反応を停止した。遊離した *p*-nitroaniline を波長405 nmで吸光度計 (Spectrophotometer DU 800, Beckman Coulter, Brea, CA, USA) により計測した。測定値を抗体無添加培地で培養した値に対する百分率で算出した。

4. *P. gingivalis* 菌体の凝集反応

IgY-GPによる *P. gingivalis* 菌体の自家凝集性を確認する目的で、一昼夜培養した菌液を15,000 rpmで1分間遠心集菌した菌体をPBSで洗浄後、吸光度1.0 (OD 550 nm) に調整した *P. gingivalis* 菌体浮遊液50 μlと等量の2% IgY-GPを混和し、室温で5分間静置して菌体凝集を観察した。

5. 細胞への付着性

ヒト口腔由来の類上皮癌細胞 (KB)²⁸⁾ を用いて *P. gingivalis* のヒト口腔由来細胞への付着性を検討した。ヒト歯肉上皮細胞は、200 mM L-グルタミンを含むイーグルの最小必須培地 (MEM; GIBCO, Renfrews-hir, United Kingdom) を用いて24穴プレートで5% CO₂ 環境下37°Cにより培養した。*P. gingivalis* 菌体は、BHI液体培地で培養後PBSにて洗浄して10⁹ CFU/mlに調整した。IgY抗体を最終濃度0.002%、0.02%、0.2%、2%になるように菌液に添加して60分間放置後、抗体を作用させた *P. gingivalis* 菌液を10⁵ cells/mlに調整した培養ヒト歯肉上皮細胞に10 μl加えて37°Cで90分間保温して細菌を付着させ、PBSで2回洗浄後滅菌蒸留水を1 ml加えて細胞を破壊して細胞に付着した細菌数をBHI血液平板に塗抹して付着細菌数を測定した。ヒト歯肉上皮細胞へ作用させた菌数に対して歯肉上皮細胞へ付着した菌数から付着率を算出した。

6. 感染実験

P. gingivalis の感染実験は、生後3週齢のSprague-Dawley系のSPFラット (日本エスエルシー、静岡) を用いて1群6匹として行なった (図1)。健康状態を観察後、イオン交換水中に最終濃度1 mg/mlのスルファメトキサゾールと200 μg/mlのトリメトプリムを混合したものを飲料水として1週間与えて口腔常在菌を減少させた後、3日間抗生物質を含まないイオン交換水を与えて口腔内に残存した抗生物質を除去した。その後、PBSで作製した5%カルボキシメチルセルロー

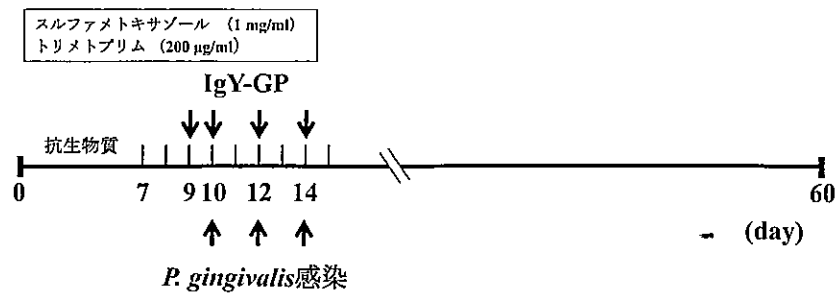


図1 ラットによる *P. gingivalis* 感染実験スケジュール

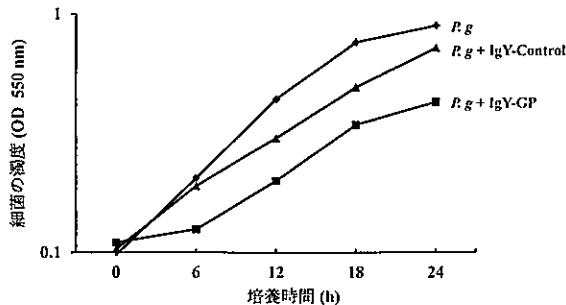


図2 IgY-GPによる *P. gingivalis* 増殖への影響

IgY-GPを添加した培地で発育させることにより、IgY抗体無添加液体培地での増殖と比較して増殖遅延が認められた。

ス (Sigma Chemical, St. Louis, MO, USA) 溶液で調整した *P. gingivalis* 菌体浮遊液 (10^9 CFU/ml) を一日毎に3回、ラット口腔内へ直接接種した。コントロール群には5%カルボキシメチルセルロース溶液のみを与えた。すべてのラットは、食事、飲料水を自由に摂取できるようにし、温度23°C、湿度60%および明暗12時間のサイクルの環境下で飼育した。最終接種日より46日目にすべてのラットをエーテル麻酔下で断頭瀉血により屠殺した。

抗体投与は、最終濃度が1%となるように5% CMC溶液で調整し、*P. gingivalis*接種開始1日前を含む、計4回行った。尚、*P. gingivalis*接種時においては、*P. gingivalis*接種10分後に抗体投与を行った。

7. 歯槽骨吸収の評価

歯槽骨の吸収量は、上顎臼歯部のセメントエナメル境から歯槽骨頂までの距離を両側14箇所測定して行なった。頭蓋骨を2気圧下で10分間加熱後3%次亜塩素酸ナトリウム溶液に浸漬して軟組織を除去後、1%メチレンブルー溶液で歯槽骨を染色乾燥させた試料を実体顕微鏡で40倍の倍率で測定した。14箇所の測定値を平均して個体当たりの骨吸収量とし、それぞれ6匹分の平均値を実験群の骨吸収量としてミリメートルで表し平均値と標準偏差 (SD) を求めた。

8. 統計学的分析

統計分析は、StatView for Windows (Version 5.0, SAS Institute, Cary, NC, USA) を用いて Bonferroni/Dunn にて行なった。尚、統計学的有意水準は5%未満とした。

結 果

1. IgY-GPによる増殖抑制および酵素活性抑制効果

IgY-GPの作用を確認するために、まず *P. gingivalis* の培養への影響を検討した。抗体無添加の培地での増殖と比較して、IgY-GP添加培地で培養した場合に明らかな増殖抑制傾向が認められた (図2)。24時間後における細菌濁度は、抗体無添加培地ではOD 0.9に対して1% IgY-GP添加培地ではOD 0.43であった。この値は、抗体無添加培地で培養した場合の約12時間後に相当する値であった。

グラフの傾きが明らかに異なることから、IgY-GP添加により *P. gingivalis* の増殖に対する抑制効果のあることが判明した。尚、コントロールとして用いた1% IgY-Controlの24時間後の濁度はOD 0.73であった。この結果から、*P. gingivalis*を免疫していないIgY抗体においても *P. gingivalis*の増殖に影響を与えていた。

興味深いことに24時間培養後の試験管を観察すると抗体無添加とIgY-Control添加培地では菌液が均一に培養されているのに対して、IgY-GP添加培地で *P. gingivalis*を培養すると菌体の沈殿が観察された (図3)。24時間経過した時点での細菌増殖とトリプシン様酵素活性の比較を表1に示す。*P. gingivalis*の増殖に関しては1% IgY-GP添加で47.8%に抑制され、1% IgY-Control添加では、80.6%に抑制されていた。この時点でのトリプシン様活性についてもそれぞれ40.8%と91.6%に抑制されていた。IgY-GPが *P. gingivalis* のジンジバイン特異であることから菌体凝集性を検討した (図4)。その結果、菌体をPBSで洗浄した菌体浮遊液に2%濃度のIgY-GPを作用させたところ、5分後に菌体の凝集塊が確認された。

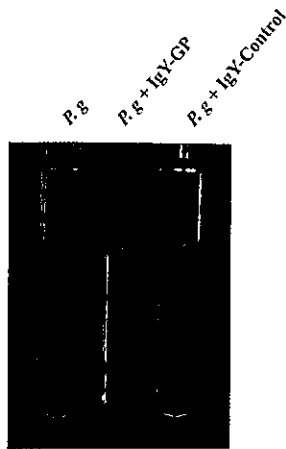


図3 *P. gingivalis* 培養後の状態

IgY-GPを添加した培地で24時間培養後、*P. gingivalis*菌体が沈殿することが観察された。

表1 IgY抗体による増殖とトリプシン様酵素活性の抑制効果

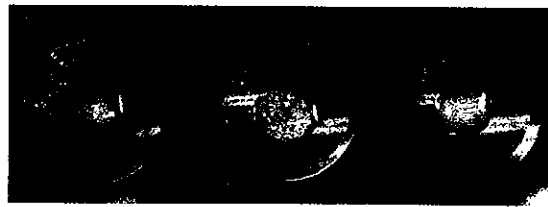
Antibody	Growth (%)	Trypsin activity (%)
<i>P. g</i>	100	100
<i>P. g</i> +IgY-GP	47.8	40.8
<i>P. g</i> +IgY-Control	80.6	91.6

2. *P. gingivalis* 菌体の凝集反応

この現象は、IgY-GP添加培地で培養した時に菌体が沈殿する理由の一つと考えられた。尚、IgY-Controlでは細菌凝集が観察されなかったことから、菌体凝集は*P. gingivalis*に対する特異抗体の作用であり、鶏卵抗体の他の成分による凝集ではないことが判明した。

3. 培養ヒト歯肉上皮細胞への付着性

IgY-GPによるヒト歯肉上皮細胞への付着阻害効果を検討した。*P. gingivalis*のヒト歯肉上皮細胞への付着は、IgY-GPを*P. gingivalis*菌体に作用させた後、ヒト歯肉上皮細胞へ付着させた。IgY抗体を作用させずにヒト歯肉上皮細胞へ付着させた場合は、*P. gingivalis*菌体付着率は0.57%であり、IgY-GPの事前処理により細胞への付着率増加が確認された。0.002%から0.2%までは濃度依存的に付着率が増加し、0.2%で最大付着率となった。抗体濃度2%で細胞への付着率は5.48%に減少し、0.02%濃度と同程度の付着率であった。2% IgY-Controlにおいても付着率2.26%と抗体を作用させない条件に比較して細胞への付着率が増加した(表2)。



PBS IgY-GP IgY-Control

図4 IgY-GPによる*P. gingivalis*菌体の凝集反応
P. gingivalis ATCC 33277株菌体を用いて凝集反応を確認した。PBSとIgY-Controlでは、細菌凝集は認められず、IgY-GPでは明らかな凝集塊が確認された。

表2 *P. gingivalis* 菌体のヒト上皮細胞への付着率

Antibody	Adherence (%)
None	0.57
2% IgY-Control	2.26
0.002% IgY-GP	3.12
0.02% IgY-GP	4.14
0.2% IgY-GP	11.2
2% IgY-GP	5.48

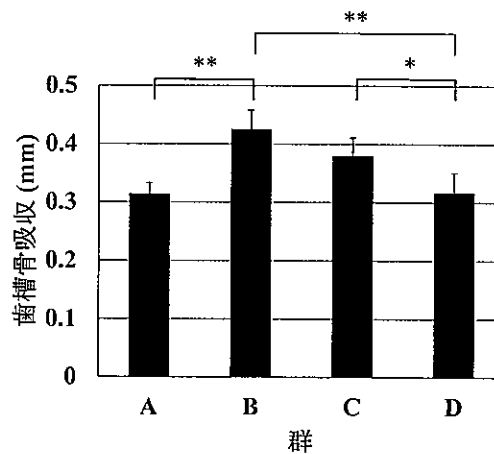


図5 IgY-GPによるラット歯槽骨吸収の抑制
ラット上顎臼歯部のセメントエナメル境から歯槽骨頂までの距離を両側14箇所測定した値を平均して個体当たりの骨吸収量とし、各群6匹の平均値を実験群の骨吸収量として平均値と標準偏差(SD)を求めた。グループBの歯槽骨吸収はグループAに対して有意に認められ*P. gingivalis*感染による骨吸収の増大が確認された($P < 0.01$)。 *P. gingivalis*感染+IgY-GP投与群であるグループDは、*P. gingivalis*感染群であるグループBに比較して有意な骨吸収抑制効果が認められた ($P < 0.01$)。*, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$ 。A, 非感染群; B, *P. g*感染群; C, *P. g*感染+IgY-Control投与群; D, *P. g*感染+IgY-GP投与群。

4. ラット実験的歯周炎に対する歯槽骨吸収抑制効果
 ジンジバインに対するIgY抗体による歯周炎への影響を検討するため、ラットを用いて実験的歯周炎における歯槽骨吸収抑制効果を検討した。*P. gingivalis*感染群 (0.043 ± 0.013 mm) (B) は、非感染群 (0.032 ± 0.014 mm) (A) に比較して顕著な歯槽骨吸収が認められた ($P < 0.01$)。 *P. gingivalis*感染+IgY-GP投与群 (D) は、*P. gingivalis*感染による骨吸収 0.43 ± 0.013 mm から 0.31 ± 0.007 mm に減少し、有意な歯槽骨吸収量抑制効果が認められた ($P < 0.01$) (図5)。 *P. gingivalis*感染+IgY-Control投与群 (C) における歯槽骨吸収抑制は確認できたものの有意差は認められなかった。また、*P. gingivalis*感染後のIgY-GP投与群とIgY-Control投与群とを比較した場合には有意差が認められ ($P < 0.05$)、IgY-GPが*P. gingivalis*感染により生じる歯槽骨吸収を抑制することが確認された。

考 察

本研究は、*P. gingivalis*ジンジバインに対するIgY抗体を用いたラット実験的歯周炎に対する*P. gingivalis*感染による歯槽骨吸収抑制効果を検討したものである。これまでの歯周病治療は、口腔内の細菌数を減少させるため、主として口腔清掃に主眼を置き、従来からのブラッシングが中心である。歯周病予防の新たな試みとして、歯周病原菌の病原因子をターゲットとした歯周病ワクチンの開発が行われている。既に、我々は、*P. gingivalis*の外膜タンパク質である40-kDaのタンパク質に対するヒト型抗体を用いて、ラット実験的歯周炎モデルにより歯周病に対する効果を検討し、ラット歯槽骨吸収抑制効果について報告している²⁵⁾。受動免疫療法は、異種生物等で作製された抗体を用いて病原体の病原性を中和する免疫学的方法である。この受動免疫療法の特徴は、生体に直接抗原を投与しないため安全性が高いと考えられている。特に鳥類では、親鳥の獲得免疫を鶏卵へ移行し、卵黄抗体として蓄積されることから、鶏卵を用いることにより簡便かつ安価に製造が可能である²⁹⁾。

更に、IgY抗体は、哺乳類で得られない抗原に対する特異抗体の産生³⁰⁾、ヒトの補体³¹⁾やリウマチ因子³²⁾と反応しないという優れた性質があることが報告されている。

これまでに歯科領域では、歯周病やう蝕に対する受動免疫研究が報告されている³³⁻³⁸⁾。鶏卵中のIgY抗体は遺伝子組換えや層殺を行う必要がないうえ、1個の鶏卵から40 mg以上のIgY抗体が精製できるため、他の免疫療法に対して安価に応用できる利点がある³⁹⁾。IgY抗体を用いた*Streptococcus mutans*を対象とした

受動免疫に関する報告から⁴⁰⁻⁴²⁾、歯周病原細菌に対する応用が十分可能な免疫療法であると考えられる。

ジンジバインは、*P. gingivalis*の産生するタンパク分解酵素活性の大部分を占める病原因子として最も重要なタンパク分解酵素であり⁴³⁾、宿主タンパク質を分解し、本菌の発育増殖に不可欠な因子である。また、宿主サイトカイン^{44,45)}および補体機能の不活性化^{46,47)}、CD14などのマクロファージレセプター^{48,49)}やCD4、CD8のようなT細胞レセプターを破壊し⁵⁰⁾、宿主防御機構を破壊させて*P. gingivalis*の口腔内定着と増殖に重要な役割を果たしていると考えられている。

今回、ジンジバインを抗原としたIgY抗体のラット実験的歯周炎に対する効果を判定した結果、明らかな歯槽骨吸収の抑制効果が認められた (図5)。

*P. gingivalis*感染による歯槽骨吸収をIgY-GP投与により抑制した理由として、IgY-GPの作用で*P. gingivalis*の増殖抑制と酵素活性が抑制され、さらに菌体凝集により貪食細胞による*P. gingivalis*の排除が効果的に行われたものと考えている。IgY-GPが*P. gingivalis*の増殖に対して抑制的に働く効果が認められ、酵素活性についても細菌の増殖抑制効果が得られたことからトリプシン様酵素活性も抑制された (表1)。IgY-GP添加による*P. gingivalis*の増殖抑制効果については、今後の詳細な検討が必要であるが、ジンジバインによる培地中のタンパク質を栄養源として取り込む過程においてIgY-GPが*P. gingivalis*の産生するジンジバインの働きを抑制し、培地中の栄養を十分に取り込めずに分裂増殖が阻害されたと考えられる。また、IgY-GPが*P. gingivalis*由来のジンジバインに対する特異抗体であることから、*P. gingivalis*菌体の凝集効果が認められた (図4)。この結果は、ヒト歯肉上皮細胞への付着効果を検討した結果 (表2)において、IgY-GPの作用で菌体が凝集した状態で細胞へ付着した結果として*P. gingivalis*菌体の付着量が濃度依存的に増加したのと考えられる。尚、ヒト歯肉上皮細胞への付着において、2%で5.48%に付着量が減少した理由として、抗原抗体反応の最適濃度が原因していると考えている。今回の研究結果において、*P. gingivalis*菌体に抗体を60分間作用後にヒト歯肉上皮細胞へ付着させていることから、ヒト歯肉上皮細胞への付着量の増加が認められたものと考えている。*P. gingivalis*の初期付着には、菌体表面の線毛が重要であり¹¹⁻¹³⁾、細胞への付着性に関しては線毛タンパク質を抗原とした抗体がより有効に作用するのかもしれない。

ピロリ菌感染において、同菌のウレアーゼに対する

鶏卵抗体を含むヨーグルト摂取により、胃内のピロリ菌が有意に減少することが報告されている⁵¹⁾、鶏卵抗体が対象となる病原菌に対して有効に作用し、阻害作用や凝集作用により菌数が減少するものと推測される。本研究結果から、IgY-GPが*P. gingivalis*誘発歯槽骨吸収の抑制に効果を発揮したことは、歯周病における*P. gingivalis*の重要性を再確認し、免疫学的口腔ケアの可能性に対する確証を得るとともに鶏卵抗体が歯周病に対して効果的に作用する可能性が示唆された。

結 論

1. IgY-GPは、*P. gingivalis*の増殖に対する抑制効果が認められ、培養上清中のトリプシン様活性を抑制した。
2. IgY-GP添加により、*P. gingivalis*菌体の凝集塊が確認された。
3. IgY-GP添加により、*P. gingivalis*の凝集に伴って、ヒト歯肉上皮細胞への付着率が高まった。
4. IgY-GPをラット口腔へ投与することにより、*P. gingivalis*感染による歯槽骨吸収の抑制効果が確認された。

以上の結果から、*P. gingivalis*の産生するジンジパインに対する鶏卵抗体は、歯周病に有用な受動免疫療法になり得ることが示唆された。

謝 辞

稿を終えるにあたり、懇篤な御指導と御校閲を賜りました本学感染制御学講座 浜田信城教授に深甚なる謝意を表します。また、適切な御教示と御校閲を賜りました本学口腔科学講座 槻木恵一教授、河田俊嗣教授ならびに歯周組織再生学講座 出口眞二教授に深く感謝の意を表します。さらに、本研究の遂行に対し御理解と御協力を頂きました感染制御学講座の諸先生方に厚く御礼申し上げます。

参 考 文 献

1. Shah HN, Collins MD. Proposal for reclassification of *Bacteroides asaccharolyticus*, *Bacteroides gingivalis*, and *Bacteroides endodontalis* in a new genus, *Porphyromonas*. *Int J Syst Bacteriol* 38: 128-131. 1988.
2. Slots J, Listgarten MA. *Bacteroides gingivalis*, *Bacteroides intermedius* and *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in human periodontal disease. *J Clin Periodontol* 15: 85-93. 1988.
3. White D, Mayrand D. Association of oral *Bacteroides* with gingivitis and adult periodontitis. *J Periodontal Res* 16: 259-265. 1981.
4. Gibbons RJ, Etherden I. Comparative hydrophobicities of oral bacteria and their adherence to salivary

- pellicles. *Infect Immun* 41: 1190-1196. 1983.
5. Childs WC, Gibbons RJ. Selective modulation of bacterial attachment to oral epithelial cells by enzyme activities associated with poor oral hygiene. *J Periodontal Res* 25: 172-178. 1990.
6. Duncan MJ, Nakao S, Skobe Z, Xie H. Interactions of *Porphyromonas gingivalis* with epithelial cells. *Infect Immun* 61: 2260-2265. 1993.
7. Okuda K, Slots J, Genco RJ. *Bacteroides gingivalis*, *Bacteroides asaccharolyticus* and *Bacteroides melaninogenicus* subspecies: cell surface morphology and adherence to erythrocytes and human buccal epithelial cells. *Curr Microbiol* 6: 7-12. 1981.
8. Inoshita E, Amano A, Hanioka T, Tamagawa H, Shizukuishi S, Tsunemitsu A. Isolation and some properties of exohemagglutinin from the culture medium of *Bacteroides gingivalis* 381. *Infect Immun* 52: 421-427. 1986.
9. Naito Y, Gibbons RJ. Attachment of *Bacteroides gingivalis* to collagenous substrata. *J Dent Res* 67: 1075-1080. 1988.
10. Goulborne PA, Ellen RP. Evidence that *Porphyromonas (Bacteroides) gingivalis* fimbriae function in adhesion to *Actinomyces viscosus*. *J Bacteriol* 173: 5266-5274. 1991.
11. Slots J, Gibbons RJ. Attachment of *Bacteroides melaninogenicus* subsp. *asaccharolyticus* to oral surfaces and its possible role in colonization of the mouth and of periodontal pockets. *Infect Immun* 19: 254-264. 1978.
12. Isogai H, Isogai E, Yoshimura F, Suzuki T, Kagota W, Takano K. Specific inhibition of adherence of an oral strain of *Bacteroides gingivalis* 381 to epithelial cells by monoclonal antibodies against the bacterial fimbriae. *Arch Oral Biol* 33: 479-485. 1988.
13. Hanazawa S, Hirose K, Ohmori Y, Amano S, Kitano S. *Bacteroides gingivalis* fimbriae stimulate production of thymocyte-activating factor by human gingival fibroblasts. *Infect Immun* 56: 272-274. 1988.
14. Evans RT, Klausen B, Sojar HT, Bedi GS, Sfintescu C, Ramamurthy NS, Golub LM, Genco RJ. Immunization with *Porphyromonas (Bacteroides) gingivalis* fimbriae protects against periodontal destruction. *Infect Immun* 60: 2926-2935. 1992.
15. Handley PS, Tipler LS. An electron microscope survey of the surface structures and hydrophobicity of oral and non-oral species of the bacterial genus *Bacteroides*. *Arch Oral Biol* 31: 325-335. 1986.
16. Listgarten MA, Lai CH. Comparative ultrastructure of *Bacteroides melaninogenicus* subspecies. *J Periodontal Res* 14: 332-340. 1979.
17. Yoshimura F, Takahashi K, Nodasaka Y, Suzuki T. Purification and characterization of a novel type of

- fimbriae from the oral anaerobe *Bacteroides gingivalis*. *J Bacteriol* **160**: 949-957. 1984.
18. Offenbacher S, Katz V, Fertik G, Collins J, Boyd D, Maynor G, McKaig R, Beck J. Periodontal infection as a possible risk factor for preterm low birth weight. *J Periodontol* **67**: 1103-1113. 1996.
 19. Beck JD, Offenbacher S, Williams R, Gibbs P, Garcia R. Periodontitis: a risk factor for coronary heart disease? *Ann Periodontol* **3**: 127-141. 1998.
 20. Grossi SG, Genco RJ. Periodontal disease and diabetes mellitus: a two-way relationship. *Ann Periodontol* **3**: 51-61. 1998.
 21. Loesche WJ, Lopatin DE. Interactions between periodontal disease, medical diseases and immunity in the older individual. *Periodontol* **2000** **16**: 80-105. 1998.
 22. Curtis MA, Kuramitsu HK, Lantz M, Macrina FL, Nakayama K, Potempa J, Reynolds EC, Aduse-Opoku J. Molecular genetics and nomenclature of proteases of *Porphyromonas gingivalis*. *J Periodontol Res* **34**: 464-472. 1999.
 23. Kadowaki T, Takii R, Yamatake K, Kawakubo T, Tsukuba T, Yamamoto K. A role for gingipains in cellular responses and bacterial survival in *Porphyromonas gingivalis*-infected cells. *Front Biosci* **12**: 4800-4809. 2007.
 24. Travis J, Pike R, Imamura T, Potempa J. *Porphyromonas gingivalis* proteinases as virulence factors in the development of periodontitis. *J Periodontol Res* **32**: 120-125. 1997.
 25. Hamada N, Watanabe K, Tahara T, Nakazawa K, Ishida I, Shibata Y, Kobayashi T, Yoshie H, Abiko Y, Umemoto T. The r40-kDa outer membrane protein human monoclonal antibody protects against *Porphyromonas gingivalis*-induced bone loss in rats. *J Periodontol* **78**: 933-939. 2007.
 26. Yokoyama H, Hashi T, Umeda K, Icatlo FC Jr, Kuroki M, Ikemori Y, Kodama Y. Effect of oral egg antibody in experimental F18+ *Escherichia coli* infection in weaned pigs. *J Vet Med Sci* **59**: 917-921. 1997.
 27. Yonezawa H, Ishihara K, Okuda K. Arggingipain a DNA vaccine induces protective immunity against infection by *Porphyromonas gingivalis* in a murine model. *Infect Immun* **69**: 2858-2864. 2001.
 28. Eagle H. Propagation in a fluid medium of a human epidermoid carcinoma, strain KB. *Proc Soc Exp Biol Med* **89**: 362-364. 1955.
 29. Malkinson M. The transmission of passive immunity to *Escherichia coli* from mother to young in the domestic fowl (*Gallus domesticus*). *Immunology* **9**: 311-317. 1965.
 30. Camenisch G, Tini M, Chilov D, Kvietikova I, Srinivas V, Caro J, Spielmann P, Wenger RH, Gassmann M. General applicability of chicken egg yolk antibodies: the performance of IgY immunoglobulins raised against the hypoxia-inducible factor 1alpha. *FASEB J* **13**: 81-88. 1999.
 31. Larsson A, Jonsson L, Sjöquist J. Determination of circulating immune complexes by chicken anti-human C3 and anti-human C1q microELISA. *J Immunol Methods* **113**: 93-99. 1988.
 32. Gardner PS, Kaye S. Egg globulins in rapid virus diagnosis. *J Virol Methods* **4**: 257-262. 1982.
 33. Hamajima S, Maruyama M, Hijiya T, Hatta H, Abiko Y. Egg yolk-derived immunoglobulin (IgY) against *Porphyromonas gingivalis* 40-kDa outer membrane protein inhibits coaggregation activity. *Arch Oral Biol* **52**: 697-704. 2007.
 34. Abiko Y. Passive immunization against dental caries and periodontal disease: development of recombinant and human monoclonal antibodies. *Crit Rev Oral Biol Med* **11**: 140-158. 2000.
 35. Booth V, Ashley FP, Lehner T. Passive immunization with monoclonal antibodies against *Porphyromonas gingivalis* in patients with periodontitis. *Infect Immun* **64**: 422-427. 1996.
 36. Booth V, Lehner T. Characterization of the *Porphyromonas gingivalis* antigen recognized by a monoclonal antibody which prevents colonization by the organism. *J Periodontol Res* **32**: 54-60. 1997.
 37. Choi J, Borrello MA, Smith E, Cutler CW, Sojar H, Zauderer M. Prior exposure of mice to *Fusobacterium nucleatum* modulates host response to *Porphyromonas gingivalis*. *Oral Microbiol Immunol* **16**: 338-344. 2001.
 38. Nakagawa T, Sims T, Fan Q, Potempa J, Travis J, Houston L, Page RC. Functional characteristics of antibodies induced by Arg-gingipain (HRgpA) and Lys-gingipain (Kgp) from *Porphyromonas gingivalis*. *Oral Microbiol Immunol* **16**: 202-211. 2001.
 39. Rose ME, Orlans E, Buttress N. Immunoglobulin classes in the hen's egg: their segregation in yolk and white. *Eur J Immunol* **4**: 521-523. 1974.
 40. Hamada S, Horikoshi T, Minami T, Kawabata S, Hiraoka J, Fujiwara T, Ooshima T. Oral passive immunization against dental caries in rats by use of hen egg yolk antibodies specific for cell-associated glucosyltransferase of *Streptococcus mutans*. *Infect Immun* **59**: 4161-4167. 1991.
 41. Smith DJ, King WF, Godiska R. Passive transfer of immunoglobulin Y antibody to *Streptococcus mutans* glucan binding protein B can confer protection against experimental dental caries. *Infect Immun* **69**: 3135-3142. 2001.
 42. Hatta H, Tsuda K, Ozeki M, Kim M, Yamamoto T, Otake S, Hirasawa M, Katz J, Childers NK, Michalek SM. Passive immunization against dental plaque for-

- mation in humans: effect of a mouth rinse containing egg yolk antibodies (IgY) specific to *Streptococcus mutans*. *Caries Res* 31: 268-274. 1997.
43. Potempa J, Pike R, Travis J. The multiple forms of trypsin-like activity present in various strains of *Porphyromonas gingivalis* are due to the presence of either Arg-gingipain or Lys-gingipain. *Infect Immun* 63: 1176-1182. 1995.
 44. Mikolajczyk-Pawlinska J, Travis J, Potempa J. Modulation of interleukin-8 activity by gingipains from *Porphyromonas gingivalis*: implications for pathogenicity of periodontal disease. *FEBS Lett* 440: 282-286. 1998.
 45. Banbula A, Bugno M, Kuster A, Heinrich PC, Travis J, Potempa J. Rapid and efficient inactivation of IL-6 gingipains, lysine- and arginine-specific proteinases from *Porphyromonas gingivalis*. *Biochem Biophys Res Commun* 261: 598-602. 1999.
 46. Wingrove JA, DiScipio RG, Chen Z, Potempa J, Travis J, Hugli TE. Activation of complement components C3 and C5 by a cysteine proteinase (gingipain-1) from *Porphyromonas (Bacteroides) gingivalis*. *J Biol Chem* 267: 18902-18907. 1992.
 47. DiScipio RG, Daffern PJ, Kawahara M, Pike R, Travis J, Hugli TE, Potempa J. Cleavage of human complement component C5 by cysteine proteinases from *Porphyromonas (Bacteroides) gingivalis*. Prior oxidation of C5 augments proteinase digestion of C5. *Immunology* 87: 660-667. 1996.
 48. Sugawara S, Nemoto E, Tada H, Miyake K, Imamura T, Takada H. Proteolysis of human monocyte CD14 by cysteine proteinases (gingipains) from *Porphyromonas gingivalis* leading to lipopolysaccharide hyporesponsiveness. *J Immunol* 165: 411-418. 2000.
 49. Tada H, Sugawara S, Nemoto E, Takahashi N, Imamura T, Potempa J, Travis J, Shimauchi H, Takada H. Proteolysis of CD14 on human gingival fibroblasts by arginine-specific cysteine proteinases from *Porphyromonas gingivalis* leading to down-regulation of lipopolysaccharide-induced interleukin-8 production. *Infect Immun* 70: 3304-3307. 2002.
 50. Kitamura Y, Matono S, Aida Y, Hirofujii T, Maeda K. Gingipains in the culture supernatant of *Porphyromonas gingivalis* cleave CD4 and CD8 on human T cells. *J Periodontal Res* 37: 464-468. 2002.
 51. Horie K, Horie N, Abdou AM, Yang JO, Yun SS, Chun HN, Park CK, Kim M, Hatta H. Suppressive effect of functional drinking yogurt containing specific egg yolk immunoglobulin on *Helicobacter pylori* in humans. *J Dairy Sci* 87: 4073-4079. 2004.
-