

機能性卵黄リベチン (Immunoglobulin Yolk : IgY) による口腔ケア

うめだこうじ 梅田浩二*、ラハマン・シヨフイクル*、こだまよしかつ 児玉義勝*、ヌグエン・バン・サー*

はじめに

著者らはこれまでに、口腔感染症微生物（う蝕菌、歯周病菌、カンジダ菌）及び、腸管感染症病原体（ピロリ菌、腸管出血性大腸菌、ロタウイルス等）に対する鶏卵抗体の基礎研究と機能性食品等における有効性検証を含めた応用開発により、製品の実用化と共に多くの国際専門誌で論文発表している^{1~11)}。本誌においても機能性卵黄リベチンとして紹介していただいているが^{12~15)}、歯周病に対する機能性卵黄リベチン (Immunoglobulin Yolk : IgY) の新しい研究結果を紹介する。

リベチンとは、卵黄タンパク質に約30%含まれる卵黄水溶性タンパク質のことであり、 α -、 β -及び γ -リベチンの3種類に分類される。 γ -リベチンは血清 γ -グロブリン(IgG)と同一である。

1. 歯周病と病原因子ジンジパイン

歯周病は口腔内細菌による感染症であり、グラム陰性偏性嫌気性細菌 *Porphyromonas gingivalis* (ジンジバリス菌) は歯周炎の発症・増悪に関わり重要視されている病原性細菌である。また、ジンジバリス菌が菌体表面及び菌体外に産生する強力なプロテアーゼから成るジンジパインは、歯周病の最重要病原因子だけではなく全身性疾患のリスクファクターであることも明らかにされている。ジンジパインには、ペプチド切断部位特異性の異なる Arg-gingipain (Rgp) と Lys-gingipain (Kgp) が存在し、両酵素の相互作用により多様な病原性 (宿主への傷害活性) を示す。

このジンジパインは、歯肉線維芽細胞や血管内皮細胞のコラーゲン等を分解し歯周組織の破壊をする他に、フィブリノーゲンを分解して易出血性も誘導する。さらに、多形核白血球の食菌活性を著しく低下させ、免疫調節に重要なサイトカイン等を分解、不活性化することで生体防御免疫システムを回避し、増殖と炎症が拡大する。

上記以外に、ジンジバリス菌の病原性機能である付着性、定着性、炎症反応、歯垢形成 (口腔細菌との共凝

集) や細胞内侵入性は、これらに関与する菌体外膜上の血球凝集素やヘモグロビン結合タンパク質、LPSがジンジパインと結合した高分子複合体である。さらにジンジパインはこれらのプロセシング酵素としての役割も持つ。

ジンジバリス菌は糖非分解性であるため増殖に必要なペプチド・アミノ酸などのエネルギー・炭素源やヘムの獲得の手段として、ジンジパインによる宿主のタンパク質分解とヘモグロビン分解を必須とする。

また、ジンジパインは血液中の内在性プロテアーゼ阻害剤に不活化されない特性から、活性を持ったまま血流に入るため、各種全身性疾患の病態発現に作用している。これ以外に、ジンジパインの病原性作用や役割は多く報告されており強力で多用な病原因子である。

著者らはジンジパインを標的分子とした抗ジンジパイン卵黄 γ -リベチンを作成した。

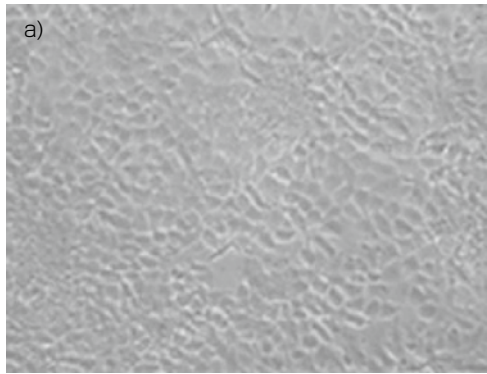
2. ヒト口腔上皮細胞に対する細胞傷害抑制効果

精製ジンジパインを3段階に希釈した系列に抗ジンジパイン卵黄 γ -リベチンを加えて反応した後、その混合物をヒト口腔上皮細胞の単層培養ウエルに移して培養して生細胞数を測定した。その結果、抗ジンジパイン卵黄 γ -リベチンを加えることで細胞傷害活性が有意に抑制された。また、ジンジバリス菌を用いた条件においても、同様に細胞傷害活性が有意に抑制された(図1)。

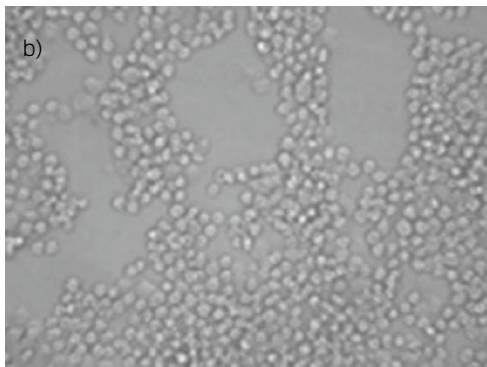
3. ヒト口腔上皮細胞へのジンジバリス菌の付着抑制効果

ジンジパインは、RgpとKgpに分類される。本項では、RgpとKgpの両酵素に対する抗体が必要である研究結果を報告する。抗Rgp IgYと抗Kgp IgYを作製して、それぞれの単独及び抗Rgp IgYと抗Kgp IgYを混合した試料にて評価した。各IgY試料とジンジバリス菌浮遊液を混合し、ヒト口腔上皮細胞の単層培養ウエルに移して培養後、付着菌数を測定した。その結果、コントロールIgYの付着抑制率が5%であったのに対し、抗Rgp IgY及

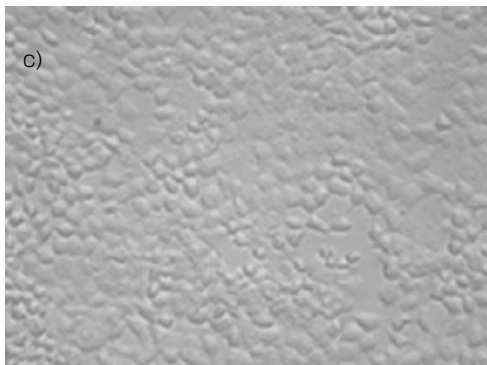
* (株)イーダブルニュートリション・ジャパン



a) PBSコントロール (正常細胞像)



b)ジンジバリス菌+コントロールリベチン
(細胞生存率22%)



c)ジンジバリス菌+抗ジンジパイン卵黄γ-リベチン
(細胞生存率78%)

図1 抗ジンジパイン卵黄γ-リベチンによるヒト口腔上皮細胞に対する細胞傷害抑制効果

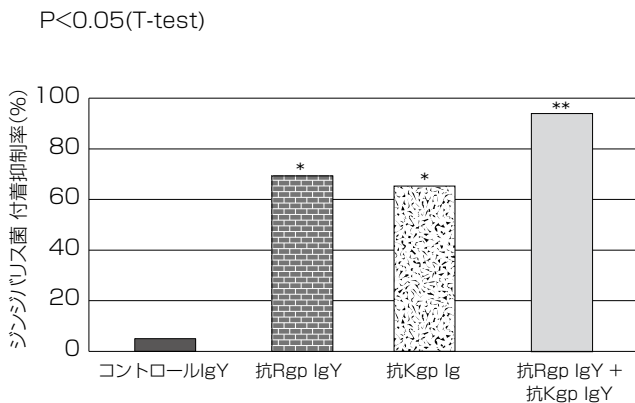


図2 ヒト口腔上皮細胞へのジンジバリス菌の付着抑制効果
コントロールIgYに対して*: P<0.05, **: P<0.01 (T-test)

び抗Kgp IgYの抑制率は各々69.3%及び65.3%と付着抑制率としては不十分であった。しかしながら、2種類のジンジパインに対するIgYの付着抑制率は94%と顕著に向上した(図2)。

抗ジンジパイン卵黄γ-リベチンは、抗Rgp IgY及び抗Kgp IgY活性を含むものである。

4. 歯周病罹患犬を用いた評価試験

中等度の歯周炎症状を呈するビーグル、ミニチュアダックス,キャバリア種計15頭(平均年齢7才、平均体重約8kg)を導入してステンレスケージで個体飼育とし、飼育温度は25℃、昼夜の点灯サイクルは12時間とした。試験開始前1週間から予備飼育を行い、その後無作為に試験群10頭と対照群5頭に割り付けた。

試験群は、抗菌剤ならびに生菌剤を含まない市販ドライペレットフードに抗ジンジパイン卵黄γ-リベチン含有卵黄粉末を1日あたり35 mg/kg体重をふりかけ、対照群は市販ドライペレットフードのみで8週間給与して下記の項目を評価した。臨床スコア判定基準に従って、歯肉充血、歯肉出血、歯肉腫脹、歯肉潰瘍、歯根膜炎、流涎、口臭のスコア判定と歯周ポケットの深さ及び歯石脱落率とした。口腔内診査の対象となる白歯は、上顎右側3本と左側3本および下顎右側3本と左側3本とした。なお、プラークならびに歯石脱落状況の観察をするため、試験開始前及び試験期間中にスクレーピング・ルートプレーニングの施行は実施しなかった。口腔内診査は、試験開始時、4週目および8週目(試験終了時)に実施した¹⁶⁾。

その結果、個体別の各臨床スコアを合計した口腔内臨床合計スコアの平均値は、試験開始4週後より有意な改善が認められた(図3)。各項目とも平均スコアが低下

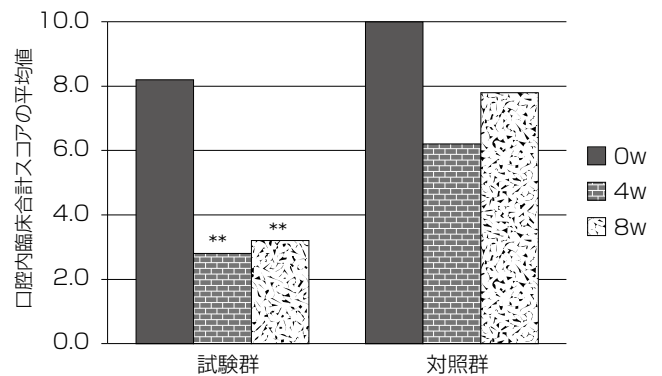


図3 口腔内臨床合計スコアの推移

試験群0wに対して、** P<0.01 (Anova + Tukey test)

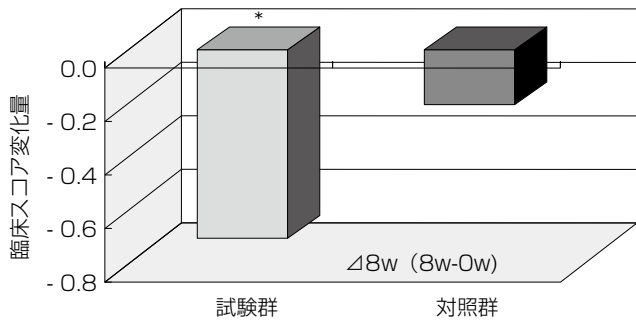


図4-a 歯肉充血 臨床スコア変化量
対照群に対して* : P<0.05 (T-test)

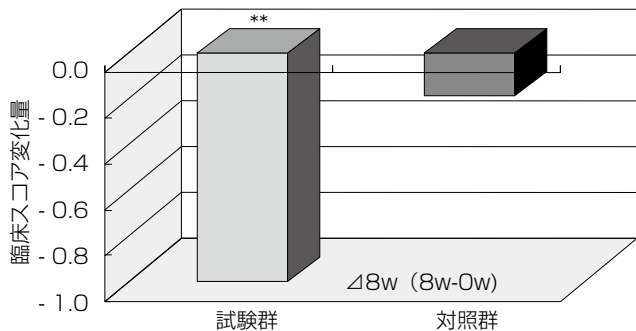


図4-b 歯肉出血 臨床スコア変化量
対照群に対して** : P<0.01 (T-test)

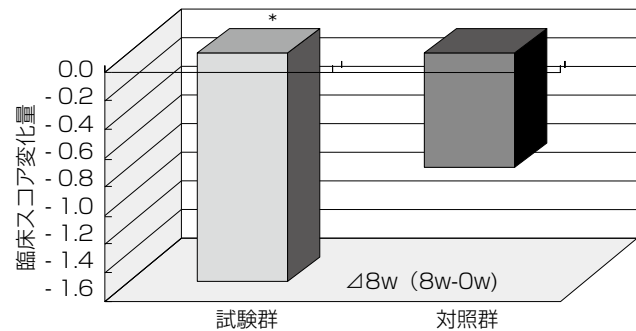


図4-c 歯根膜炎 臨床スコア変化量
対照群に対して* : P<0.05 (T-test)

し、歯肉充血(図4-a)、歯肉出血(図4-b)及び歯根膜炎(図4-c)では有意な差を認めた。

また、試験群10頭のうち3頭では、図5のように強固に付着していた歯石の剥離が確認され、他の7頭でも観察経過に伴って歯石面積が顕著に減少した(図6)。

両群のいずれの個体も試験期間を通じて残餌はなく一般臨床症状に異常や体重増減は認められなかった。

まとめ

抗ジンジパイン卵黄γ-リベチンは、歯周病の病原因子であるジンジパインの多様な病原作用を抑制する。今回記述した研究報告以外に、*P. gingivalis*と*Actinomyces naeslundii*または、*Fusobacterium nucleatum*の共凝集抑制効果を確認している。また、HamadaおよびWatanabe

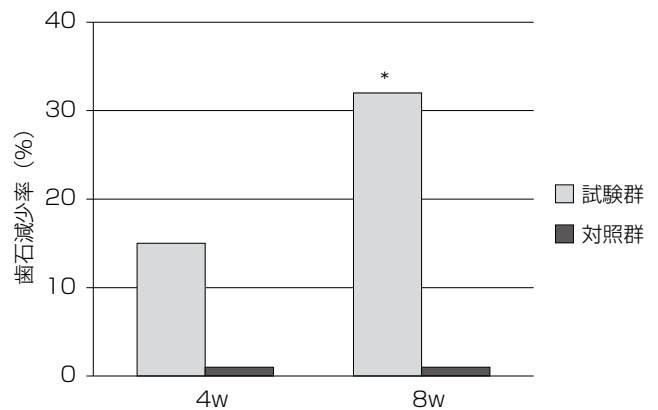


図6 歯石減少率の推移
対照群に対して* : P<0.05 (Chi-square)

は、ジンジパリス菌感染ラットを用いた歯槽骨吸収量の評価系にて抗ジンジパイン卵黄γ-リベチンの投与によって有意に減少することを初めて報告した¹⁷⁾。

抗ジンジパイン卵黄γ-リベチンの作用によるジンジパリス菌の歯肉上皮細胞の付着阻害、共凝集(プラーク形成)阻害、ジンジパインプロテアーゼ活性阻害、細胞傷害抑制、歯槽骨吸収抑制の効果によって、歯肉炎発症、歯垢・歯石形成の第一歩を抑制する予防効果に加えて、歯周炎症状を改善する効果も十分期待される。

歯周病罹患犬を用いた評価試験において、歯石減少効果が確認され、本試験以外の犬評価試験でも同様の効果が認められたことは非常に興味深い。抗ジンジパイン卵黄γ-リベチンの*in vitro*試験結果から想定されるメカニズムは、歯肉溝でジンジパリス菌の細胞付着が抑制→共凝集形成が停滞→バイオフィーム層のひ薄化→歯石構造の部分崩壊→歯面の歯石面積の減少→歯石の脱落と考えられる。

ヒトの歯周病予防は、食後のブラッシングに補助的なマウスウォッシュなどを加えたプラーク除去である。歯ブラシだけでは磨ききれない部位があることや、歯磨きが困難な要介護者等を考慮して、機能性素材を配合したサプリメント、歯磨きペーストやマウスウォッシュなどの製品開発は特に重要である。

歯周病対策の薬剤は、正常細菌叢の減少や薬剤耐性菌の誘導が懸念されるなか、抗ジンジパイン卵黄γ-リベチンは、抗菌性物質と異なり、特異的にジンジパイン分子と結合して各病原作用を阻害する。また、抗Rgp IgY及び抗Kgp IgYを含むポリクローナルIgYであり、特異性に優れかつ多様な病原作用を抑制する機能を有することが最大の特徴である。

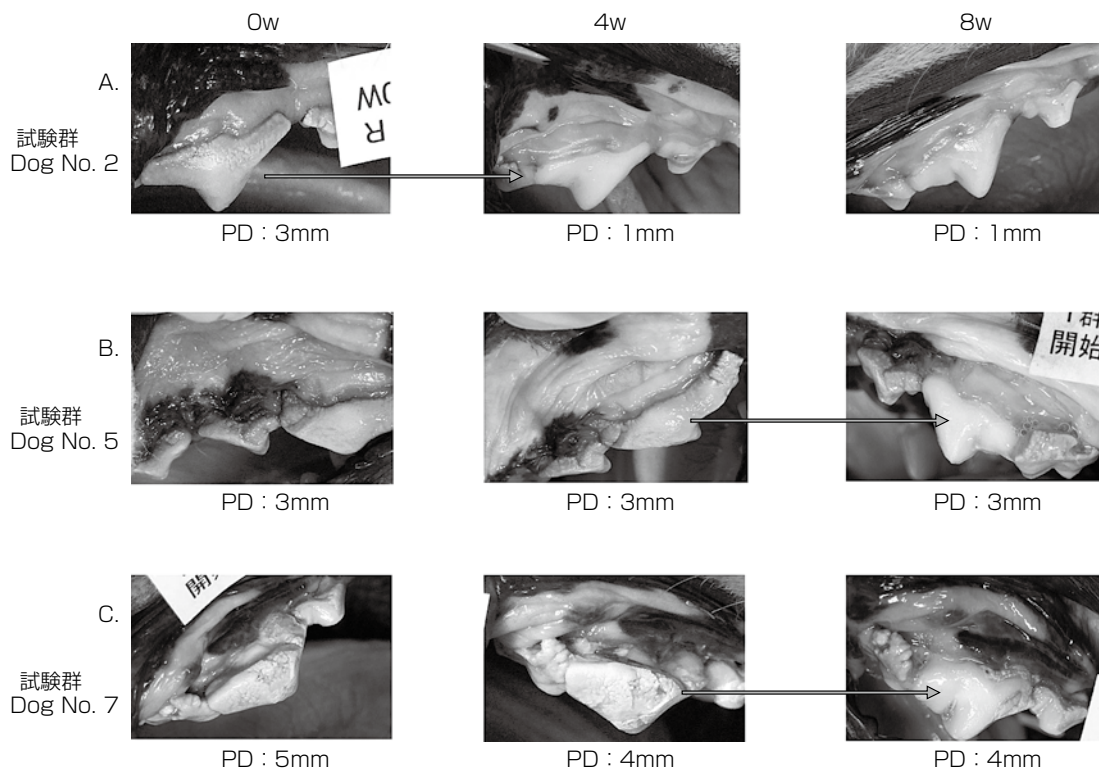


図5 観察経過にともなう歯石脱落様子

《 《 《 《 《 参考文献 》 》 》 》 》 》

- 1) Kruger C, et al.: *Caries Res.* 38,9-14(2004)
- 2) Nguyen SV, et al.: *J Am Dent Assoc.* 142,943-9(2011)
- 3) Yokoyama K, et al.: *Oral Microbiol Immunol*, 22,352-5(2007)
- 4) Yokoyama K, et al.: *J Oral Sci*, 49, 201-6(2007)
- 5) Ibrahim el-SM, et al. *Vaccine*, 26, 2073-80(2008)
- 6) Icatlo FC Jr, et al.: *Gastroenterology*, 119, 358-67(2000)
- 7) Nomura S, et al.: *Helicobacter*, 10, 43-52(2005)
- 8) Suzuki H, et al.: *Aliment Pharmacol Ther*, 20,185-92(2004)
- 9) Neri P, et al.: *PLoS One*. 6, e26526(2011)
- 10) Shofiqur R, et al.: *Vaccine*. 30, 4661-9(2012)
- 11) Shofiqur R, et al.: *Hum Vaccin Immunother*, 14,1039-48(2013)
- 12) 児玉ら: *FOOD style* 21, 10(3),46-48 (2006)
- 13) 磯田ら: *FOOD style* 21,11(2),58-61 (2007)
- 14) 梅田ら: *FOOD style* 21,16(3),48-50 (2012)
- 15) 梅田ら: *FOOD style* 21,17(6), 51-53(2013)
- 16) Shofiqur R, et al.: *Vet. Sci. Develop.* 1:e8, 35-39 (2011)
- 17) Hamada N, et al.: *Proc. 96th. Ann. Meet. Am. Acad. Priodontol.* Poster. No.865759

うめだ・こうじ/Kouji Umeda

(株)イーダブルニュートリション・ジャパン 研究開発部
岐阜大学工学部卒業

ラハマン ショフィクル/Shofiqur Rahman

(株)イーダブルニュートリション・ジャパン 研究開発部
岐阜大学大学院連合農学研究科生物資源科学博士課程修了

こだま・よしかつ/Yoshikatsu Kodama

(株)イーダブルニュートリション・ジャパン 技術顧問
東京大学大学院農学系研究科獣医学専門学博士課程修了

ヌグエン・バン・サー/Sa Van Nguyen

(株)イーダブルニュートリション・ジャパン 代表取締役社長
岐阜大学大学院連合農学研究科獣医学博士課程修了