

# 歯周病罹患猫におけるグロビゲン<sup>®</sup>PG (卵黄リベチン) の歯周病改善効果

中西信夫 Nobuo Nakanishi, 大原聰美 Satomi Ohara  
(株)京都動物検査センター

## はじめに

近年、優れたペットフードの開発や、ワクチン接種による感染症の予防や治療技術の向上により犬・猫の平均寿命が伸びている反面、高齢に伴う腫瘍疾患、循環器疾患の罹患率の上昇は避けられない。また、犬・猫は、歯のケアがされにくく4歳齢以上では80%以上が口腔内のトラブルを抱えている。口腔疾患の中でも、特に歯周病は注意しなければならない。犬・猫の歯周病の初期症状はヒトと同様に、歯の根元の炎症による赤みや腫脹などの歯肉炎で口臭(腐敗臭)が強くなる。さらに進行すると軽い刺激で歯茎から出血し、歯肉が歯を支えられなくなり歯がグラグラと動くようになる。歯根膜や歯槽骨などの歯周組織に炎症が達すると痛みによって、摂食などの日常生活に影響を及ぼすだけでなく、心臓、腎臓、肝臓などの循環器や代謝器への疾患および免疫力低下にも影響する。

歯周病予防は歯垢を蓄積しないよう、歯垢の除去が基本である。犬においては、多くの啓蒙活動により歯周病対策が普及して飼い主の認知が向上し市場にも対策用品が多く販売されているため、飼い主による歯みがきや、例として歯みがきガムのおやつなどによる予防法が日常化しつつある。しかし猫においては、犬ほど飼い主の歯周病に対する意識や対策用品が普及していないのが現実である。また、猫では飼い主による歯みがきは犬以上に難しいため、歯垢除去の機会が少なく歯周病が進行しやすい。実際、アニコム損害保険(株)「どうぶつ健保」の統計において、猫の手術の請求件数の全体の2割が歯周病、口内炎を治療する目的の手術であり、手術別の順位が1位と報告されている(2位は腫瘍、3位が消化管内異物とづく)。現状の歯周病治療は、ヒトと同様でスケーリング・ルートプレーニングによって機械的にプラークと歯石を除去した後、抗菌薬の投与を行うのが一般的である。これは麻酔下での治療となるため加齢に伴って大きな負担となる。

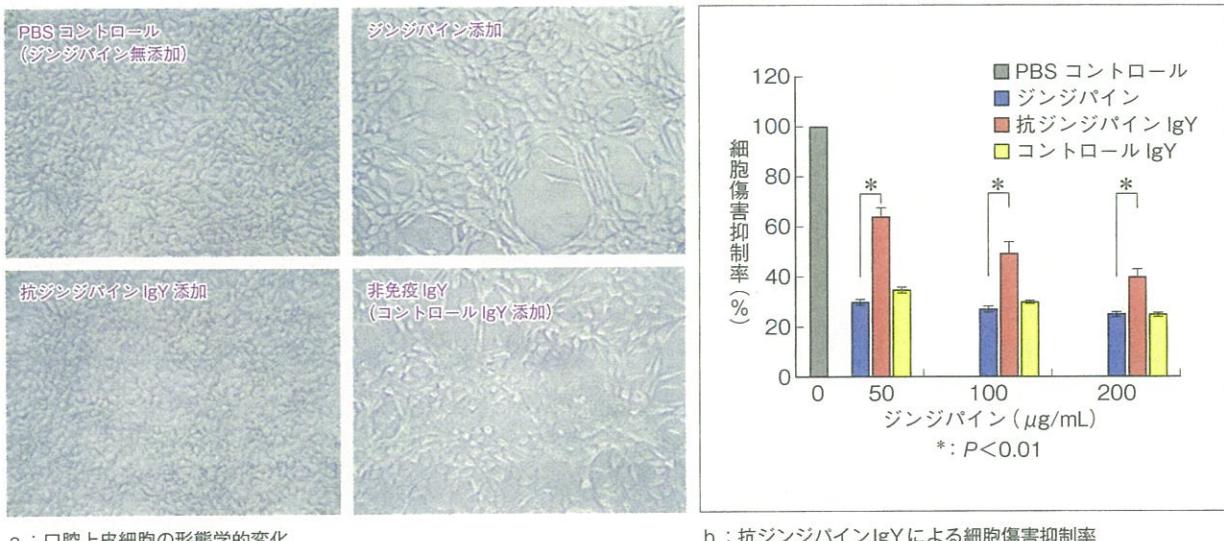
しかし、猫の歯周病は、完治が難しく寿命に大きくかかる

ことから、犬と同様に啓蒙活動と歯周病対策用品の普及などの取り組みがこれまで以上に必要である。(株)イーダブルニュートリション・ジャパンは、ニワトリに歯周病菌が產生する病原因子を接種することで、病原因子に対する特異抗体を卵黄に产生させる技術を開発し、その抗体による歯周病予防効果を実証してきた。また、本誌においても特異抗体を含有する卵黄を配合した犬用ドライフード給与による歯周病罹患犬における改善効果が紹介されている(図1)<sup>1</sup>。今回我々は歯周病罹患猫を対象とした評価試験を実施したので、その結果を紹介する。

## 歯周病の原因について

歯周病は口腔細菌の感染症で歯垢および歯石の蓄積が原因である。歯垢の約70%が細菌で1g中には $10^{11}$ 個が含まれており、その中の一部の細菌が产生する毒素によって炎症が引き起こされる。

歯周病の発症過程は次のとおりである。食事などの食べカスが歯表面や隙間に留まり、それを栄養源として細菌が増殖し、歯表面にバイオフィルム(菌膜)として付着する。付着したバイオフィルムが歯垢の土台となり24時間ほどで歯垢が形成される。そのまま歯垢が付着していると石灰化が進み歯石となり、歯表面に強固に付着する。ヒトとくらべて犬・猫の口腔内はpHが高いため歯石が形成されやすく、一般的に歯垢から歯石への形成は2~3日といわれている。歯と歯茎の隙間の歯周ポケットに形成された歯垢や歯石は除去されにくい上に嫌気性細菌が増殖する環境が整う。嫌気性細菌である*Porphyromonas*属細菌が増殖し、非常に強いタンパク分解酵素を产生する。この酵素が歯周組織を分解する毒素としてはたらき炎症を引き起こす。ヒトの歯周ポケットからは*Porphyromonas gingivalis*が高頻度に分離され、同様に犬・猫では*Porphyromonas gulae*が分離され歯周病の原因菌とされている。



a : 口腔上皮細胞の形態学的変化

b : 抗ジンジパイン IgY による細胞傷害抑制率

図1 抗ジンジパイン IgY による *P. gulae* から精製したジンジパインの細胞傷害抑制率

文献1より引用・改変

## 歯周病の病原因子について

歯周病菌と呼ばれる *Porphyromonas* 属は嫌気性グラム陰性桿菌で、本菌最大の病原因子は菌体外に分泌、菌体外膜に局在しているシステインプロテアーゼからなるジンジパイン (gingipain) であることが明らかにされている。ジンジパインは、非常に強力なタンパク質分解酵素であり、アルギニン特異的タンパク分解酵素 Arg-ジンジパイン (*rgpA* 遺伝子と *rgpB* 遺伝子にコード) とリジン特異的タンパク分解酵素 Lys-ジンジパイン (*kgp* 遺伝子にコード) に分類される。*rgpA* と *kgp* 遺伝子は、プロテアーゼドメインと C 末端に付着因子ドメインがあり、両ドメインが協調しながら以下の歯周病原性機能を発揮する。

- ①コラーゲン、フィブロネクチンなどの細胞間質に存在するタンパク質を分解して炎症を引き起こす。
- ②フィブリノーゲンならびにフィブリリンを分解して血液凝固を阻害して易出血性作用をもつ。
- ③免疫伝達物質のサイトカインの分解および、好中球に対する機能障害を与えて、宿主の免疫防御能を低下させる。
- ④口腔内細菌との共凝集作用をもち、バイオフィルム形成に寄与する。
- ⑤本菌の宿主細胞等への付着因子である線毛について産生機能を有する。

*Porphyromonas* 属菌は、糖非発酵性であるためエネルギー源として、タンパク質やペプチドをジンジパインによって分解して吸収している。また、「鉄(ヘミン)」が必須栄養素であり、主に宿主の血液ヘモグロビンから獲得している。この鉄がないと本菌は増殖能と病原性が著しく低下する。すなわち、本菌がエネルギー源および必須栄養素を獲得するために

は、ジンジパインを産生して宿主の歯周組織および赤血球を破壊しなければならない。さらに強力なプロテアーゼ活性により、免疫防御能を低下させることで貪食細胞による捕食殺菌等などの免疫防御網を潜り抜けていく。よって、このジンジパインが最も重要な病原因子といって過言ではない。

口の中を確認しやすい動物において、歯周病の分かり易い指標である口臭の腐敗臭成分は、揮発性硫黄化合物や揮発性窒素化合物であり、タンパク質を分解しながら本菌が増殖する過程において発生するものである。

## Immunoglobulin Yolk : IgY について

毒ヘビに咬まれたときに治療として抗ヘビ毒血清を用いる。これはヘビ毒を馬に接種して抗ヘビ毒抗体をつくらせて血清を採取精製したものである。ヘビ毒はタンパク質であり、唾液などの消化液(消化酵素)が高度に進化したもので、出血毒はプロテアーゼの作用によってフィブリリンを分解して血液凝固を阻害し、さらに血管壁の細胞を破壊することで出血させる。抗ヘビ毒抗体の作用は、ヘビ毒に瞬時に特異結合して毒素活性や酵素活性を不活化して無毒化する。この抗体と毒素(プロテアーゼ)の作用機序を当てはめて考えて頂きたい。

産卵鶏の雌鶏にターゲットとする抗原を接種することで、鶏の免疫応答により血中に接種した抗原に対する特異抗体が产生される。雌鶏は血中の抗体を卵黄に蓄積させた後に産卵する。この仕組みは、卵から生まれてくる雛に母鶏がもつ免疫抗体を受動させる機能で、哺乳類における初乳を通じて抗体を受動する仕組みと同様である。

ヒト・犬・猫の歯周病菌である *P. gingivalis* と *P. gulae* が共通して産生するジンジパインを産卵鶏の雌鶏に接種すること

で、抗ジンジパイン抗体を多く含有する卵を生産することができる。卵黄中に含まれる抗体を免疫学用語でImmunoglobulin Yolk (IgY) と呼び、IgGに相当する。また、栄養学用語では卵黄 $\gamma$ -リベチンになる。抗ジンジパイン IgYを多く含有する卵黄を回収し低温殺菌した後、スプレードライ製法にて卵黄を粉末化する。(株)イーダブルニュートリション・ジャパンは、この卵黄粉末を機能性原料「グロビゲン®PG」として実用化しており、犬・猫用のドライフード、デンタルガム、顆粒サプリメントなどの機能性フードや歯みがきに配合した製品がすでに普及している。

抗ジンジパイン IgYは、口腔内および歯周ポケット等に生育する本菌の菌体外膜に局在するジンジパインおよび、菌体外に分泌されて遊離しているジンジパインと特異的に結合することでプロテアーゼ酵素活性を不活化する。この不活化により、本菌はタンパク質やペプチドを分解吸収できずエネルギー源を確保できなくなる。また、宿主の歯周組織および赤血球の破壊もできず必須栄養素のヘミンの確保もできなくなり、本菌の代謝が抑えられるため、前文で示した病原性が著しく低下し、歯周病の症状ならびに口臭が改善される。

## 抗ジンジパイン IgYを用いた *in vitro* 評価試験の紹介（図1）

### ● ジンジパインの口腔上皮細胞 (FaDu細胞)に対する細胞傷害抑制効果

児玉らが発表した*in vitro*評価試験を改めて紹介する<sup>1,2</sup>。*P. gulae*菌体から精製したジンジパインを50～200  $\mu$ g/mLに調整し、各々の希釈系列に抗ジンジパイン IgYまたは非免疫 IgY (コントロール IgY) を50 mg/mL加えた混合液を6ウェルのマイクロプレートに単層培養した口腔上皮細胞に接種し、37°Cで60分培養した。その後、各ウェルをPBSで3回洗浄し細胞傷害の程度を観察した。また、トリパンブルー染色を行い、生細胞数を測定してジンジパイン無添加のPBSを接種した陰性対照グループの生細胞数を100%として、各グループの細胞傷害抑制率を求めた。その結果、図1aに示したように、抗ジンジパイン IgY添加とPBSのグループでは細胞傷害は観察されなかった。図1bに細胞傷害抑制率を示した。コントロール IgY添加のグループに対して、抗ジンジパイン IgY添加のグループの細胞傷害抑制率は有意に高く ( $P<0.01$ )、抗ジンジパイン IgYの有効性が確認されている。なお、本稿には記述していないが、FaDu細胞以外の口腔上皮細胞のKB細胞ならびに歯肉細胞のCa9-22細胞を用いて同様の細胞傷害抑制試験を行い、同様の結果であることも確認されている。

## 歯周病罹患猫を用いた*in vivo* 試験

### ● 試験方法および評価項目

本試験は、(株)京都動物検査センターの「動物実験倫理委員会」の承認を受けて実施した。供試猫は、5歳齢以上の口腔内炎を含む歯周病に罹患していて、口臭が確認されたベルシャ、スコティッシュ・フォールド、ブリティッシュ・ショートヘアおよびロシアン・ブルーの6頭を用いた。飼育条件は、開放系畜舎のケージ内60.0×90.0×66.0 (H) cmで各々個体別に飼育し、飼料はドライフード (サイエンス・ダイエット アダルト成猫用：日本ヒルズ・コレガート(株)) を使用した。なお、本飼料は抗菌薬ならびに生菌剤などを含まない。給与量および給与方法は、体重から算出した1日当たりの給与量を朝1回給与した。また、口腔内診査日は終日絶食とした。飲水は自家水道水を自動給水器で自由摂取とした。

評価方法は、抗ジンジパイン IgY含有卵黄粉末を被検サンプルとして0.1%添加した飼料を8週間連続給与した。試験群は無投与対照群を設定せず投与群のみとし、被検サンプルの有効性評価は、各個体の投与開始時と投与開始後4週時および8週時の状態を比較することで行った。下記事項を観察した。

体重測定を投与開始日、投与開始後4週および8週に行い、一般状態の観察として、活力、糞便性状および飼料摂取状況の異常の有無について毎日観察した。飼料摂取状況は、摂取量が給与量の50%以下を異常と判定した。

口腔内診査は、鎮静下で投与開始前日、投与開始後4週および8週に口腔内の観察を行い、表1のスコアに従って左右の歯列を別々に状態を評価し、口臭は判定者3名の平均スコアを口臭スコアとした。

歯周ポケット測定は、投与開始前にプローブを用いて全歯の歯肉溝の深さを測定し、歯周ポケット (歯肉溝の深さ2mm以上) の形成がみられ、その深さが一番深い歯を左右1本ずつ選定し、投与開始後4週および8週に同一歯の歯周ポケットの深さを測定した。

歯垢の測定は、口腔内の観察終了後に歯垢染色液 (DENT.リキッドブラークテスター：ライオン歯科材(株)) を歯の表面に塗布した後、キャニオンスプレーで水を噴霧して残存している染色液を除去してから歯垢付着状態を観察した。歯垢付着状態のスコアは、表2に示した基準により左右各歯における歯垢面積のスコアと厚さスコアの積算値を合計して歯垢スコアとした。

### ● 試験結果

歯肉炎スコアの平均値は投与開始時で5.7であったが、投与開始後4週および8週では各々3.7および2.9と有意な減少が観察された(図2)。充血、出血、腫脹、歯根膜炎の歯

表1 歯肉炎スコア判定基準：中出ら（2004）の方法<sup>3</sup>

臨床症状 観察項目	臨床スコア判定基準			
	0	1（軽度）	2（中度）	3（重度）
歯肉炎スコア：左右それぞれ評価				
歯肉充血	なし	わずかに赤色が認められる	軽度と重度の中間のもの	明らかに強い赤色が認められる
歯肉出血	強く圧迫しても出血しない	強く圧迫するとわずかに出血する	軽く圧迫すると出血する	そっと圧迫しただけでも出血する。または自然出血している
歯肉腫脹	なし	軽度の腫脹が辺縁歯肉に認められる	腫脹が付着歯肉部に及ぶ	激しく腫脹し、歯冠部の一部を被う
歯肉潰瘍	なし	局所に米粒大の潰瘍が認められる	小豆大の潰瘍、または多数の米粒大の潰瘍が認められる	小豆大以上の潰瘍、または多数の小豆大の潰瘍が認められる
歯根膜炎	すべての歯において歯肉溝の深さが2mmより浅い	歯肉溝の深さが2mm以上（歯周ポケット）の歯がある	歯周ポケットが歯槽骨頂部に達している（探子が歯槽骨頂部に入る）歯がある	動搖する歯がある
口臭スコア				
口臭 <sup>1</sup>	なし	わずかにおう	明らかにおう	かなりにおう

口臭は判定者3名の平均スコアを口臭スコアとした

表2 歯垢付着状態のスコア判定基準

項目	歯垢スコア				
	0	1	2	3	4
歯垢の面積	歯垢付着なし	10%以下	10～33%	33～66%	66%以上
歯垢の厚さ	—	0.5 mm未満	0.5 mm以上～1.0 mm未満	1.0 mm以上	—

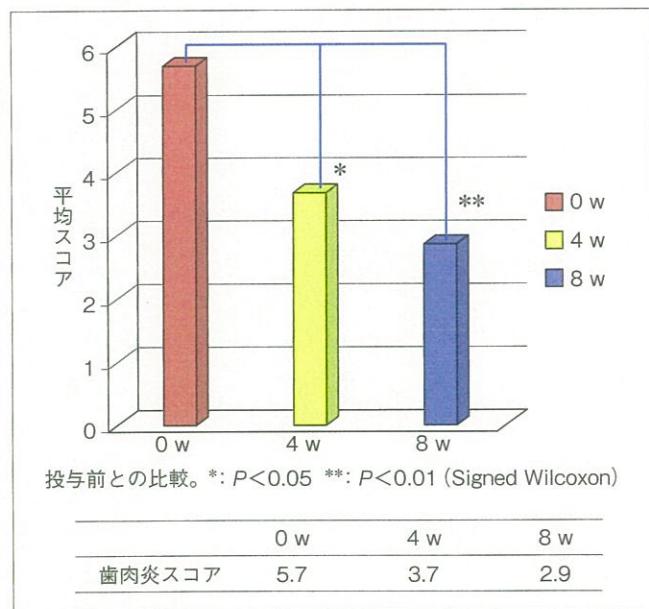


図2 歯肉炎スコアの推移（歯肉の充血、出血、腫脹、潰瘍、歯根膜炎スコアの合計値）

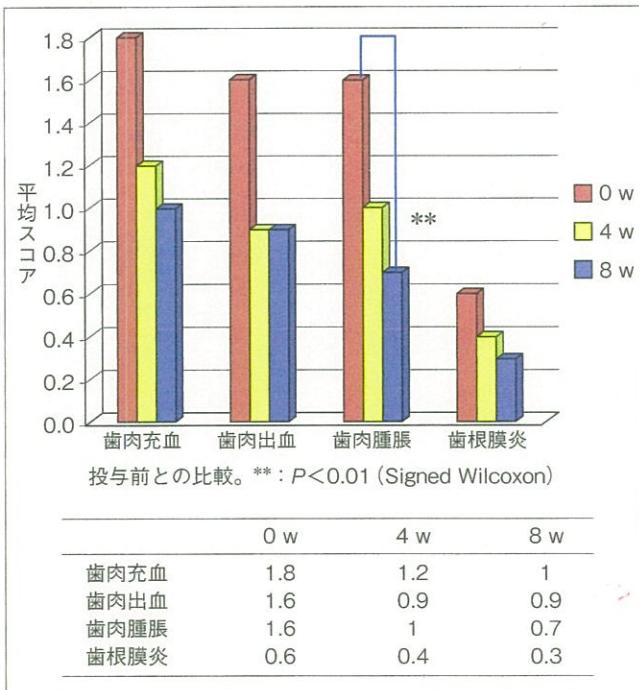


図3 歯肉炎に関する各項目スコアの推移

肉炎に関する各項目別においても、投与期間に伴い減少し、腫脹スコアで有意な改善が認められた（図3）。歯周ポケットの平均測定値は、投与開始時で2.9 mmであったが、投与開始後4週および8週では2.1および1.9 mmと減少し、投

与開始後8週では有意差を認めた（図4）。歯垢スコアにおいても同様に、投与開始前で69.7であったが、経時的な改善より、投与開始後8週目では有意な歯垢除去効果が認めら

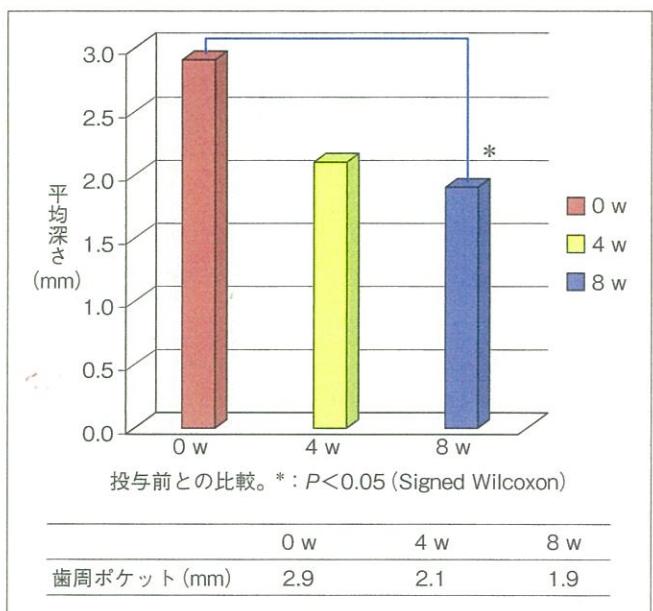
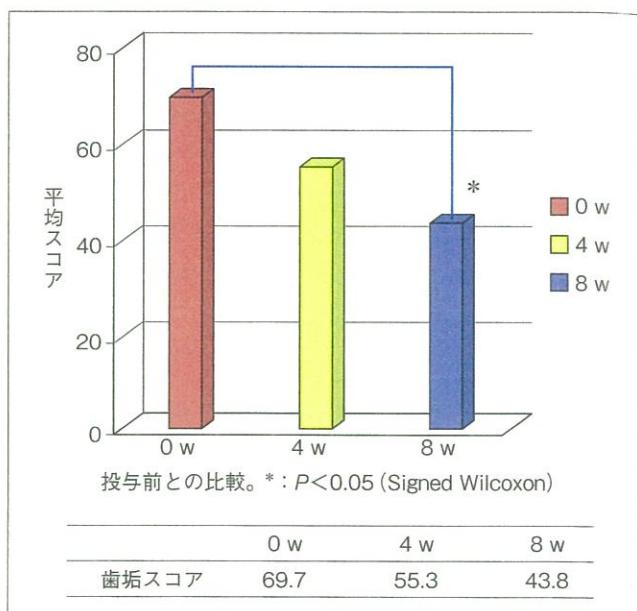


図4 歯周ポケットの深さの推移

図5 歯垢スコアの推移：  
左右各歯の歯垢スコアの積値(面積×厚さ)の合計値

れた(図5)。図6に被検サンプル投与前後の歯垢付着状態を示した。この歯垢スコアの有意な減少は、歯肉炎に対する効果を裏付ける結果であった。口臭の平均スコアについては、投与開始前、投与開始後4週および8週で1.5, 1.8および1.2となり、投与開始後8週でやや減少したものの統計学的な差はみられなかったが、歯垢の減少と歯肉炎に対する効果が明らかなことから、さらなる長期投与により口臭に対する効果も期待できると考えられる。

試験期間中に被検サンプル投与に起因すると思われる副作用は観察されず、安全性に問題はないと思われる。また、被検サンプルを添加した飼料の摂取状況に異常は確認されず、嗜好性もよいことが認められた。

以上のことから、抗ジンジパインIgY含有卵黄粉末を添加したドライフードの給与によって、経時的な歯肉炎改善効果および歯垢除去効果が認められたことから、歯周病罹患猫のQOL向上に期待がもてる結果となった。

## まとめ

歯周病は細菌感染症であるため治療や予防には抗菌薬が用いられるが、正常細菌叢に影響するばかりでなく耐性菌の出現の問題も挙げられる。また、医薬品や医薬部外品ではない動物用のデンタル製品が多く販売されているが、すべての製品で動物における有効性や安全性を裏付ける試験を行っていないのが現状である。特に抗菌性や抗炎症性の成分を配合した製品などで、長期的に使用した場合の影響について検証さ

れていないものもある。加えて、ヒトで安全で有効とされる成分が同じように犬・猫で安全なものとはいえない成分もある。例として、キシリトールは犬・猫において低血糖発作を引き起こす可能性がある。したがって、関与成分とその作用機序、対象動物における有効性と安全性を十分検証したものを犬・猫に給与することが必要である。

今回紹介した(株)イーダブルニュートリション・ジャパンが作製した抗ジンジパインIgYを利用した歯周病改善効果の研究について、菅野らは2009年米国歯周病学会にて高い評価を受けてクリニカルリサーチ賞を受賞されているなど、基礎試験からヒトおよび犬・猫などの伴侶動物への応用にわたり多くの研究報告を行っている<sup>4-8</sup>。

猫は歯周病の罹患率が高く、治療においては猫に大きな負担がかかること、寿命や健康に大きく関係することから、猫が嫌がらず安全な方法で日常的に歯垢除去などの口腔環境を整えることのできる方法が望まれる。グロビゲン®PGは、予防効果および従来治療法との併用にも期待され、安全性や嗜好性に優れた機能性素材である。

## 参考文献

- 児玉義勝, ラハマン・ソフィクル, 梅田浩二, ヌグエン・バン・サー. 歯周病罹患犬に対する卵黄リベチン (Immunoglobulin Yolk : IgY) を利用した経口受動免疫. CAP April, 75-81 (2013).
- Rahman AKM Shofiqur, Umeda K, Kodama Y, et al. Effect of passive immunization by anti-gingipain IgY on periodontal health of dogs. Vet Sci Develop 1 : e8, 35-39 (2011).
- 中出哲也, 横山滋, 綱本昭輝, 奥村融ほか. 犬における歯周病に対する塗酸クリンダマイシン経口投与剤の臨床的効果. 動物抗菌会報 26 (2004).



図6 観察経過に伴う歯垢付着状態の変化

- 4) Yokoyama K, Sugano N, Rahman AK, et al. Activity of anti-*Porphyromonas gingivalis* egg yolk antibody against gingipains in vitro. *Oral Microbiol Immunol* 22, 352-355 (2007).
- 5) Yokoyama K, Sugano N, Shimada T, et al. Effects of egg yolk antibody against *Porphyromonas gingivalis* gingipains in periodontitis patients. *Journal of Oral Science* 49 (3), 201-206 (2007).
- 6) 鹿谷宗司. *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. 神奈川歯学 49-1, 16-23 (2014).
- 7) 栗田典子, 岡田夏樹, 菊沢香織, 湯山真衣. 卵黄抗体 IgY を含むサブリメントを用いた口腔内清浄化の試み. *infoVets* 145, May (2010).
- 8) 児玉義勝, 並木秀男, 小澤智. 新機能抗体開発ハンドブック. pp591-603 (2012).