

**歯周炎をコントロール**

# 歯周炎



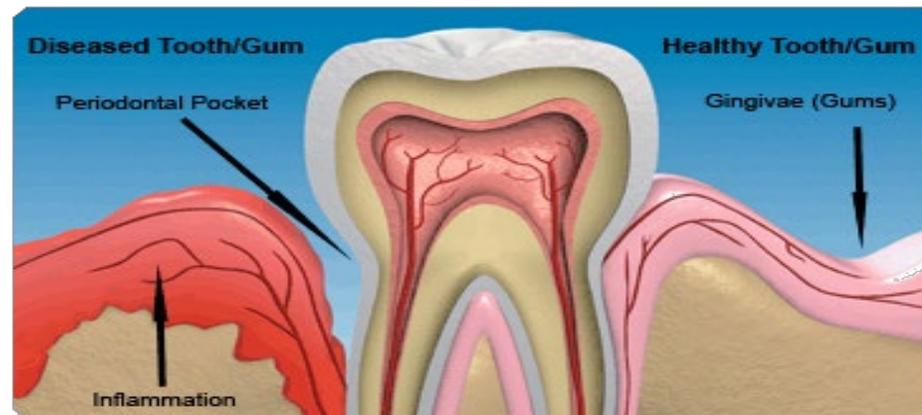
健康な歯茎と歯



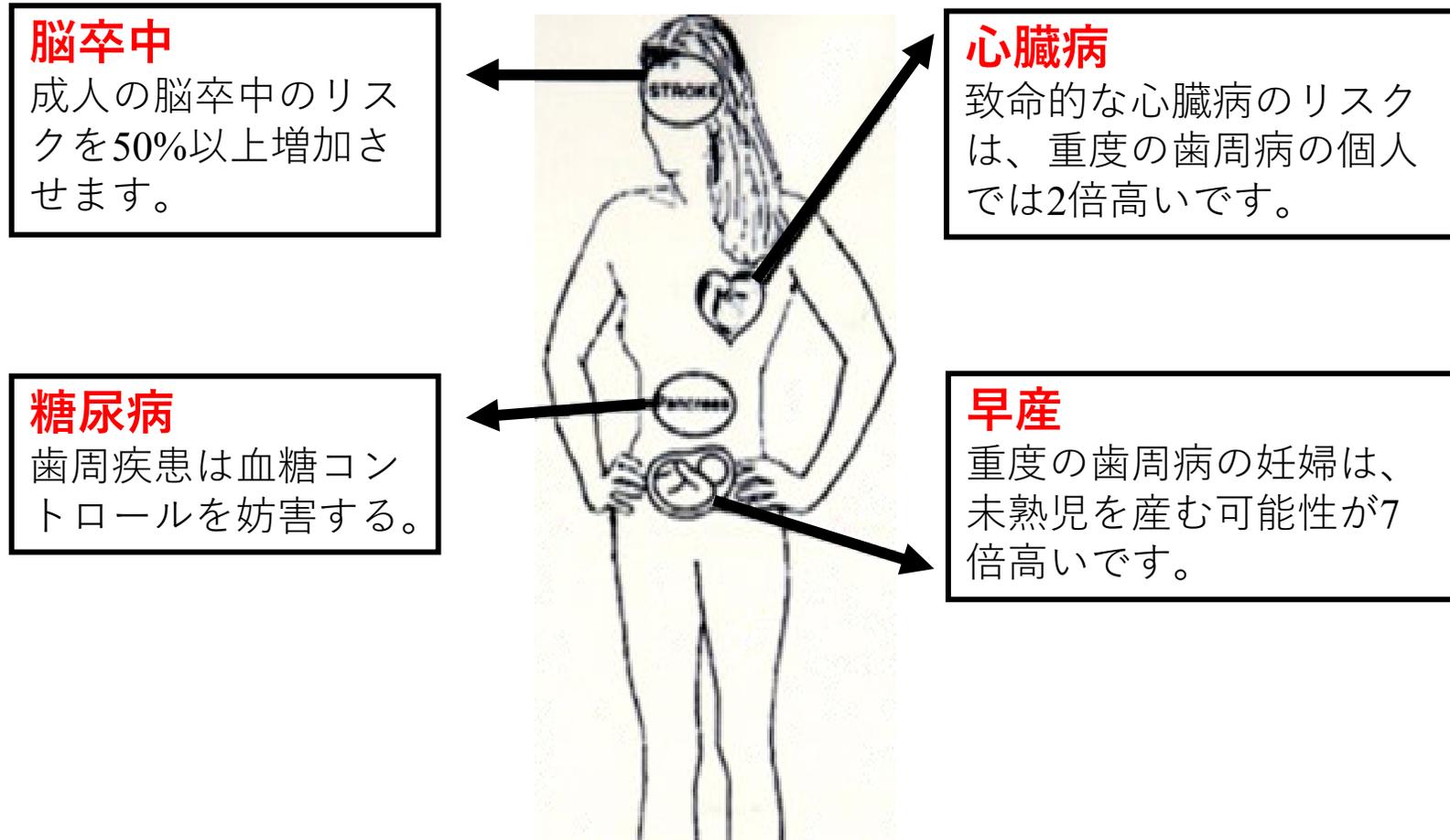
中等度歯周炎



進行歯周炎



# 歯周炎は全身性疾患と関連している

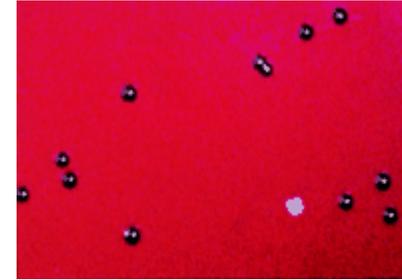


出典:国立歯科頭蓋顔面研究所および米国心臓協会

# 主な病原菌

## *Porphyromonas gingivalis*

- グラム陰性
- 嫌気性
- 血液寒天上の黒光沢のある滑らかなコロニー



**ジンジパインは*P. gingivalis*の主な病原因子です**

## ジンジパインの機能

- 様々な組織やシステムに損傷を与える (細胞間タンパク質、免疫細胞およびサイトカイン、フィブリンおよびフィブリノーゲンなど).
- *P. gingivalis*が宿主細胞に侵入するのを助けます(細胞侵入).
- *P. gingivalis*がバイオフィルムを形成する他の細菌と凝集するのを助けます。
- 全身効果を引き起こす血液に吸収する (心臓病、早産など)

特異的 IgY (PG) には、*P. gingivalis* のジンジパインに対する特異的 IgY が含まれています。

# 抗ジンジパインIgYを用いたインビトロ試験

1. ジンジパインプロテアーゼに対する活性阻害
2. ジンジパインの口腔上皮細胞に対する細胞傷害抑制
3. ヒト歯肉上皮細胞に対する *P.gingivalis* の付着抑制
4. *P.gingivalis* と *A.naeslundii* との共凝集抑制
5. *P.gingivalis* の増殖遅延

# 1. インビトロ試験: ジンジパインプロテアーゼに対する活性阻害

## 試験方法: ELISA系で評価

1. *P.gingivalis*(ATCC33277)及び  
*P.gulae*(ATCC51700)菌体から精製したジンジパイン: 50~400mg/ml
2. 抗ジンジパイン(*P.gingivalis*由来)IgY、非免疫IgY(コントロール): 50mg/ml
3. 4°C・60分反応

**結果:** 非免疫IgYに対して、抗ジンジパイン(*P.gingivalis*由来)IgYは、*P.gingivalis*及び*P.gulae*由来ジンジパインのプロテアーゼ活性を有意に抑制した( $p < 0.01$ )。

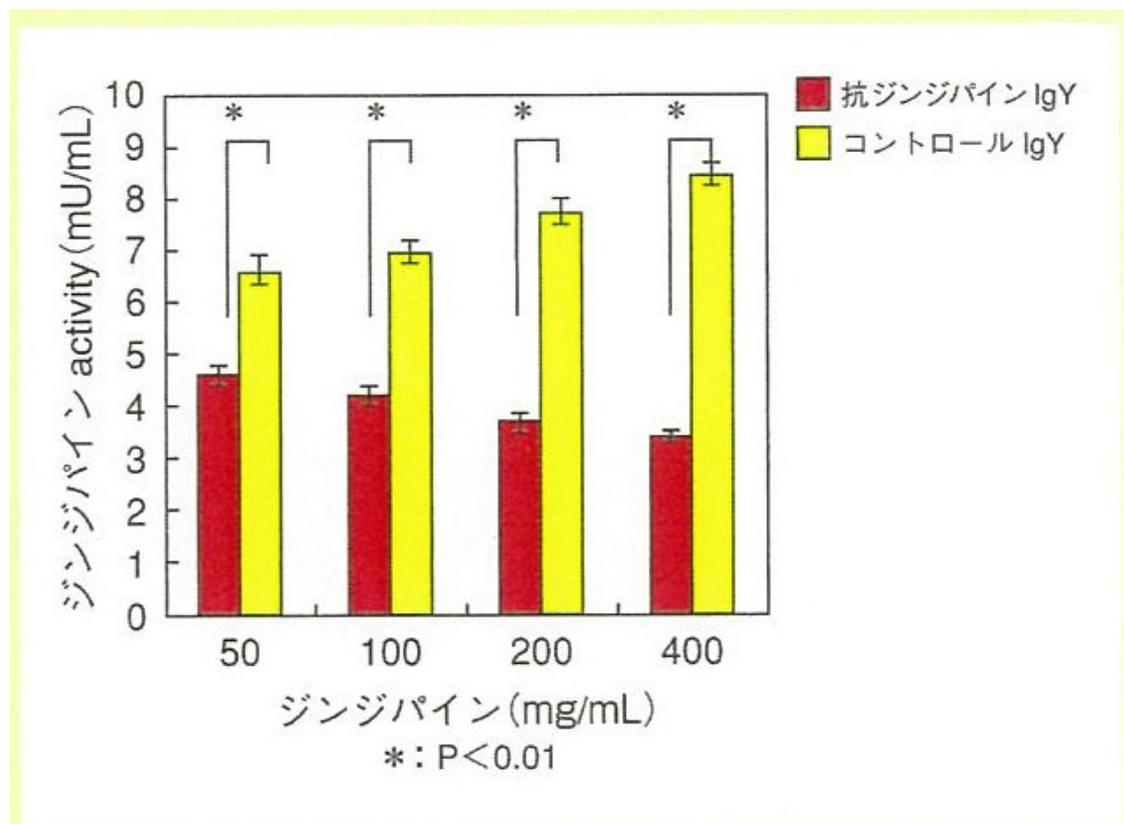
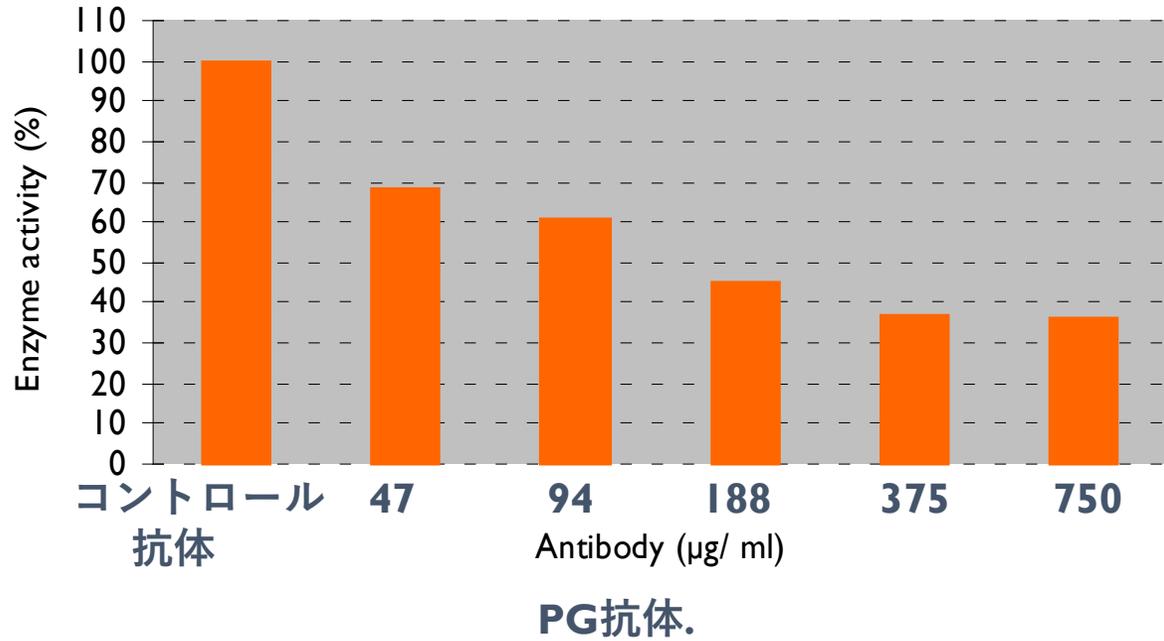
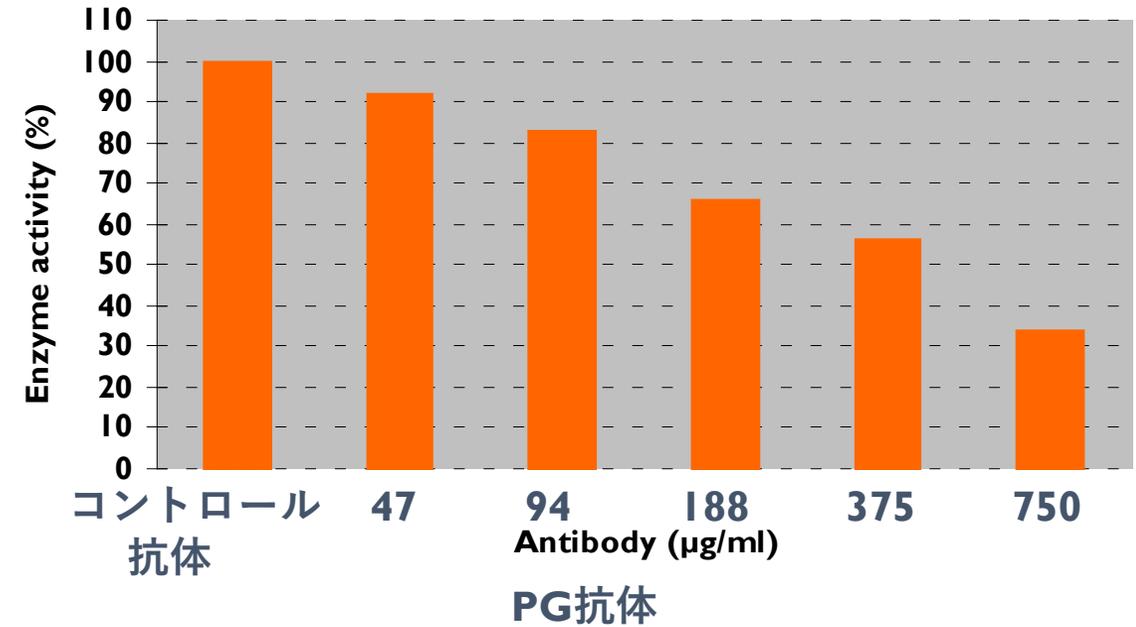


図2 抗ジンジパインIgYによるイヌ由来*P. gulae*から精製したジンジパインプロテアーゼ活性の抑制

酵素阻害アッセイ (*P. gingivalis* ジンジパイン)



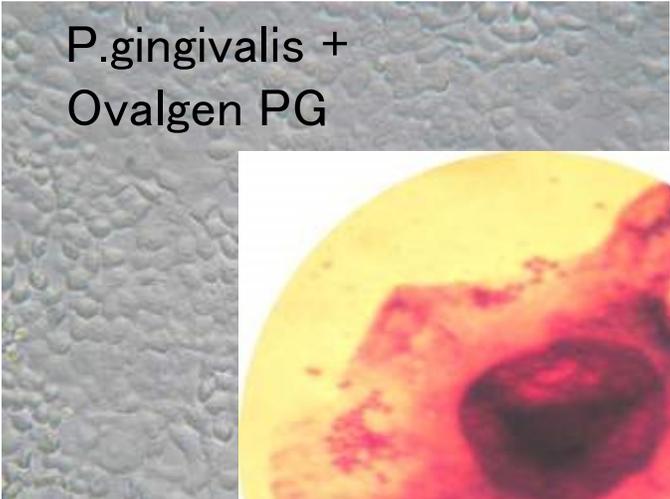
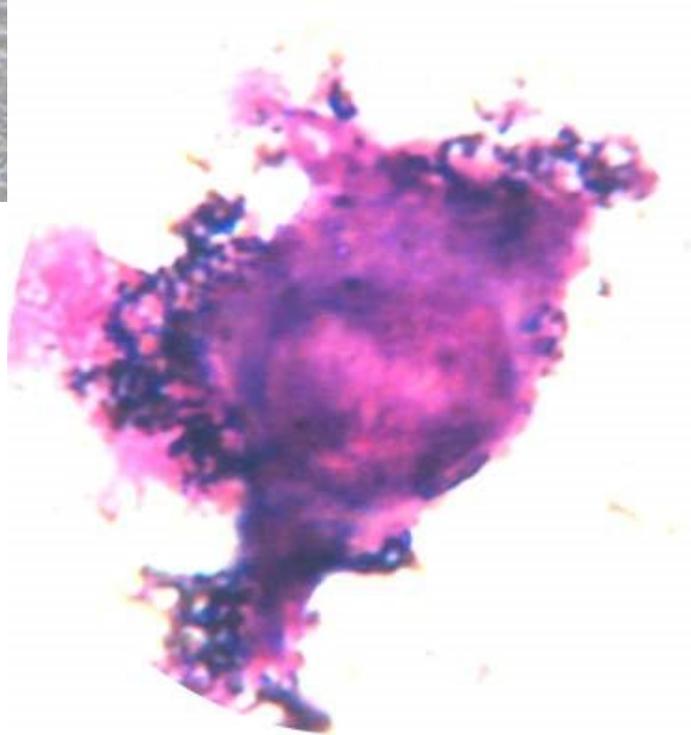
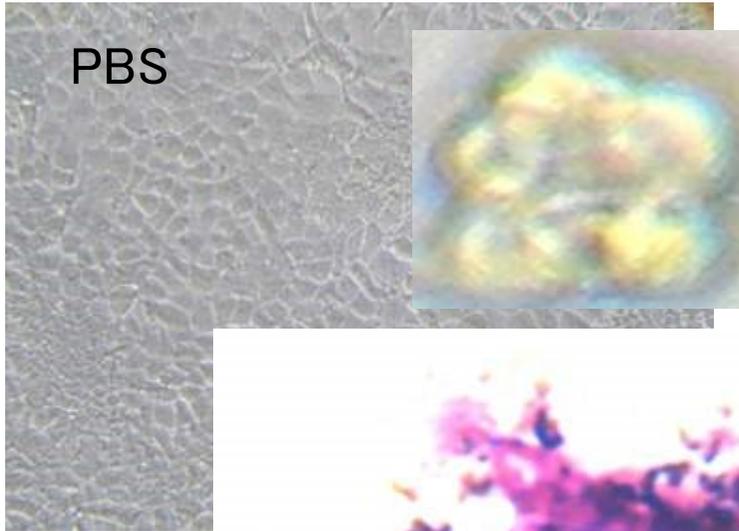
酵素阻害アッセイ (*P. gulae* ジンジパイン)



## 2. インビトロ試験: *Porphyromonas gingivalis* に対する 特異的IgY(PG)のインビトロ阻害効果

- 材料:**
- ヒト歯肉上皮細胞(KB細胞株)
  - *P.gingivalis* 株 ATCC 33277
  - 抗*P.gingivalis* IgYおよび非免疫IgY

- 方法:**
- 融合単層が形成されるまで、24 ウェルプレートで KB 細胞を増殖させます。
  - *P.gingivalis* を IgY サンプルと混合し、37 C で 1 時間培養し、細胞に加え、37 °C で 2 時間培養します。
  - 洗浄して死んだ細胞を取り除き、生きている細胞の数を数えます。



# 結果:細胞損傷抑制

サンプル	合計細胞数	<u><i>P.gingivalis</i>感染後の保護率:</u> 生きている細胞数 (%)	
PG	15.8	2.2	<b>14</b>
PG +コントロールIgY	14.8	4.1	<b>28</b>
PG + 特異的 IgY (PG)	15.9	<b>13.7</b>	<b>86</b>

(生きている細胞の数x 10<sup>4</sup>)

### 3. インビトロ試験: *P.gingivalis*の細胞付着抑制

#### 試験方法：ヒト歯肉上皮細胞で評価

1. ヒト歯肉上皮細胞
2. 抗ジンジパインIgY、非免疫IgY(コントロール)
3. *P.gingivalis*(ATCC33277)菌浮遊液
4. 37°C・120分培養
5. 各ウェルをPBSで洗浄し、付着している細菌数をカウントした。

表1 抗*P.gingivalis*ジンジパインIgYによるヒト歯肉上皮細胞への付着抑制率

抗ジンジパイン IgY	<i>P.gingivalis</i> 菌数		細胞付着抑制率 (%)
	添加前	添加後	
PBS(コントロール)	$1.6 \times 10^5$	$4.3 \times 10^3$	2.7
非免疫 IgY	$1.5 \times 10^5$	$8.1 \times 10^3$	5.4
抗 RgP IgY	$1.4 \times 10^5$	$9.7 \times 10^{4*}$	69.3
抗 KgP IgY	$1.5 \times 10^5$	$9.8 \times 10^{4*}$	65.3
抗 KgP+RgP IgY	$1.6 \times 10^5$	$1.5 \times 10^{4**}$	93.8

PBS コントロールに対し, \*: P<0.05, \*\*: P<0.01

**結果：**非免疫IgYの付着抑制率はわずか5%程度であったのに対して、抗Rgp及び抗Kgp IgYの抑制率はそれぞれ69%及び65%でしたが、2種類のIgYを混合すると付着抑制率は94%と顕著に向上した(p<0.01)。

# 4. インビトロ試験: *P.gingivalis*と*A.naeslundii*との共凝集抑制

## 試験方法：共凝集抑制で評価

1. *P.gingivalis* 5菌株の培養液
2. *Actinomyces naeslundii* 菌の浮遊液を加える
3. 抗ジンジパインIgY、非免疫IgY(コントロール)
4. 室温・60分培養
5. 遠心分離(60rpm・30分)
6. 凝集の程度を測定

**結果：**抗ジンジパインIgYは全ての下で共凝集を抑制したが、コントロールIgYはこのような抑制効果は観察されなかった。*Fusobacterium nucleatum*を用いた実験でも、抗ジンジパインIgYはこの共凝集を抑制した。

表2 *P.gingivalis* 菌株と *Actinomyces naeslundii* との共凝集抑制

供試 <i>P.gingivalis</i> 菌株	抗 <i>P.gingivalis</i> ジンジパイン IgY	非免疫 IgY
FDC381	1	2
GAI7802	1	2
ATCC33277	0	3
ATCC49417	1	2
ATCC53977	1	2

共凝集の判定は、Kolenbrander, PE と Cisar, JO の判定方法によって実施した

0：菌体浮遊液に凝集を認めない

1：菌体浮遊液は全体が濁っているが、わずかに凝集している

2：菌体浮遊液はなお濁っているが、部分的に凝集している

3：菌体浮遊液はわずかな濁りを残すが、全体が凝集している

4：菌体は大きな凝集塊を形成し、浮遊液の上清は透明

## 5. インビトロ試験: *P.gingivalis*の増殖抑制

### 試験方法：菌の増殖で評価

1. *P.gingivalis*(ATCC33277)菌
2. ブレンハートインヒュージョンブローにイーストエキストラクトとヘミンとビタミンK1を添加した培地で培養
3. BHI培地に、抗ジンジパインIgY又は非免疫IgY(コントロール)を1%添加
4. 37°C・24時間培養
5. 各液体培地の細菌数をカウントした。

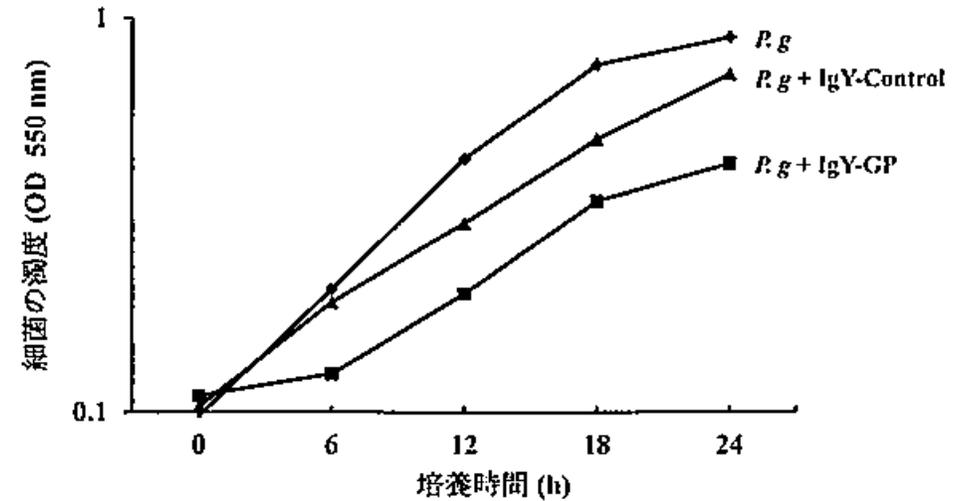


図2 IgY-GPによる*P.gingivalis*増殖への影響  
IgY-GPを添加した培地で発育させることにより、IgY抗体無添加液体培地での増殖に比較して増殖遅延が認められた。

# インビトロ試験のまとめ

- 歯石形成は、歯肉溝内で *P.gingivalis* 菌が増殖して歯肉上皮細胞に付着⇒共凝集⇒プラーク形成⇒バイオフィルムに成熟⇒カルシウム・リン酸塩の浸入⇒バイオフィルムの石灰化⇒歯石形成の過程をたどる。したがって、抗ジンジパインIgYは歯石形成過程の第一歩を抑制する可能性がある。
- 特異的IgY(PG)はジンジパイン活性を阻害し、*P.gingivalis* 菌による細胞へのダメージを抑制する。
- 特異的IgY(PG)は、他の菌が産生するジンジパインに対して交叉反応性を示す。
- 特異的IgY(PG)は、*P.gingivalis* 菌の増殖を遅延させる。

# ラットによるインビボ試験

# ラットによる歯槽骨吸収抑制試験

(神奈川歯科大学)

試験動物：3週齢のラット：1群6匹

試験群：A: 非感染

B: 感染（未治療）

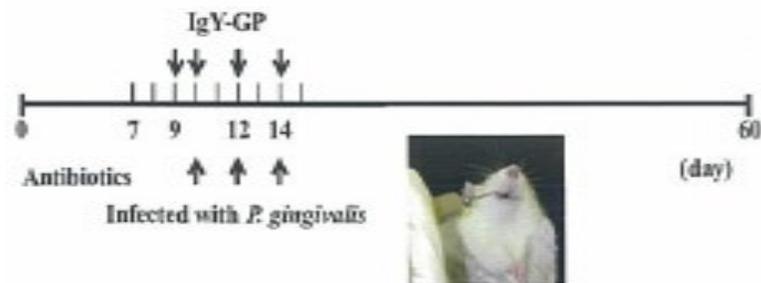
C: 感染（コントIgYで治療）：4回投与

D: 感染（特異的IgY(PG)で治療）：4回投与

感染：*P.gingivalis* 菌を1日置きに3回

飼育期間：最後の感染後、46日目まで

歯槽骨吸収量の評価：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測定。

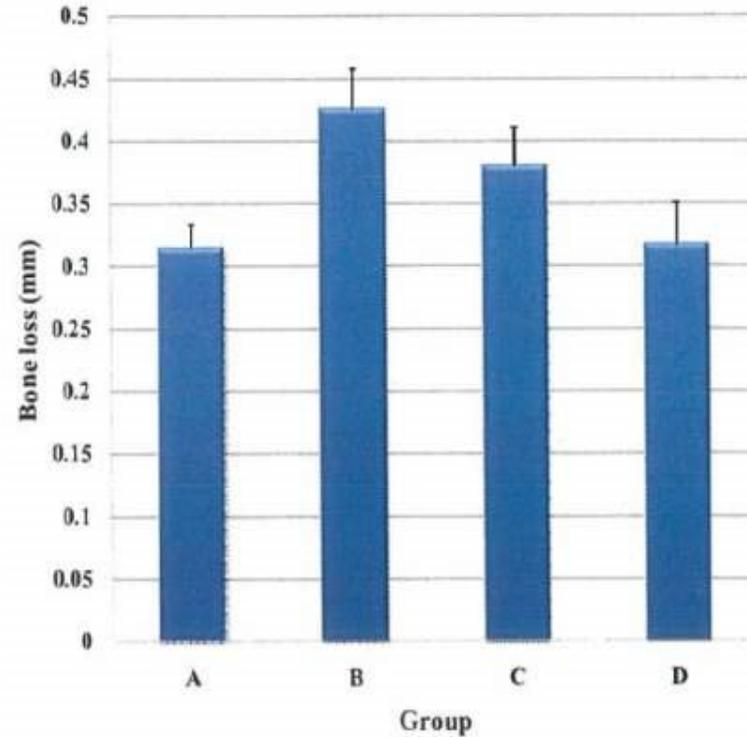


## 結果

*P.gingivalis*を投与した群は、明らかに日投与群に比較して有意に骨吸収量の増加がみとめられた。また、抗体の投与により有意に骨吸収の抑制が認められ、抗ジンジパイン鶏卵抗体を投与した群では*P.gingivalis*非接種群と同程度の骨吸収量であり、*P.gingivalis*接種による骨吸収がほぼ完全に抑制された。



Measurement of bone loss in an upper jaw.



## 歯槽骨吸収量の評価(mm)

- A: 非感染
- B: 感染、未治療
- C: 感染、コントIgYで治療
- D: 感染、特異的IgY(PG)で治療

## 結論

*P.gingivalis*のジンジパインに対する鶏卵抗体の口腔内投与により、*P.gingivalis*に感染によるラット歯槽骨吸収が抑制された。

# 試験1：ヒトボランティアを用いた臨床試験

# 試験1: 抗ジンジパインIgY含有タブレットを用いたヒトボランティア臨床的試験

- 被験者: 唾液中にジンジバリス菌陽性者24名
  - テストタブレット群: 12名
  - プラセボコントロール群: 12名
- タブレット:
  - (1) テストタブレット: 1錠あたりAnti-gingipain IgY (50mg) を含む。
  - (2) プラセボタブレット: 1錠あたりPG非感作のIgY (50mg) を含む。
- 摂取方法: 1回2錠、1日3回(毎食後)、8週間投与
- 検査項目:
  - (1) 口腔内診査: 歯周ポケットの深さ(PD)、歯ぐきの出血割合(BOP)
  - (2) 細菌学的評価: 唾液中の*P. gingivalis*菌数、総細菌数(PCRインベーター法)

鶏卵抗体タブレット (Ovalgen PG) を  
1日3回・8週間舐めた患者24名の歯周病治療試験

		総菌数 ( $\times 10^6/10\text{ul}$ )	<i>P.gingivalis</i> ( $\times 10^3/10\text{ul}$ )	<i>P. gingivalis</i> rate (%)
Ovalgen PG	0 week	92 ± 22	130 ± 253	0.33 ± 0.69
	8 weeks	167.7 ± 88	68 ± 122	0.05 ± 0.09
対照	0 week	70.6 ± 34	70 ± 126	0.17 ± 0.35
	8 weeks	138 ± 96	51 ± 78	0.09 ± 0.19

P < 0.05

## 試験2: 特異的IgY(PG)含有歯科用ゲルの臨床試験

- 試験サンプル: 20mgの特異的IgY(PG)/シリンジを含む中性ゲル

- ボランティア: 歯周炎患者5名



- 試験方法: スケーリングとルート プレーニング (SRP) 後にポケットにジェルを1回塗布します。スケーリングとSRPのみで処理されたコントロールポケット。

- 試験パラメータ: (試験前と試験4週間後に確認する)

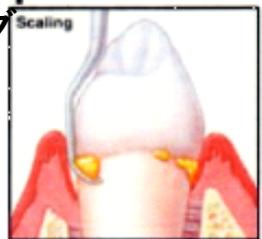
(1) 口頭検査: プロービング深さ (PD)、プロービング上の出血 (BOP)。

(2) 細菌: 歯周ポケット内の *P.gingivalis* と総細菌の数 (リアルタイムPCRによる)。

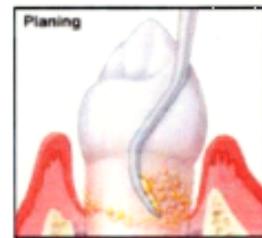
# コントロール歯

(口の右半分)

スケーリング

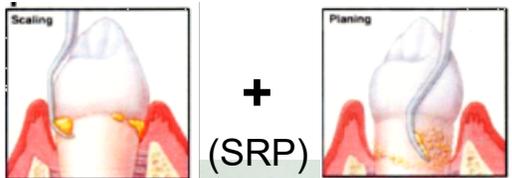


ルートプレーニング  
(SRPのみ)  
+



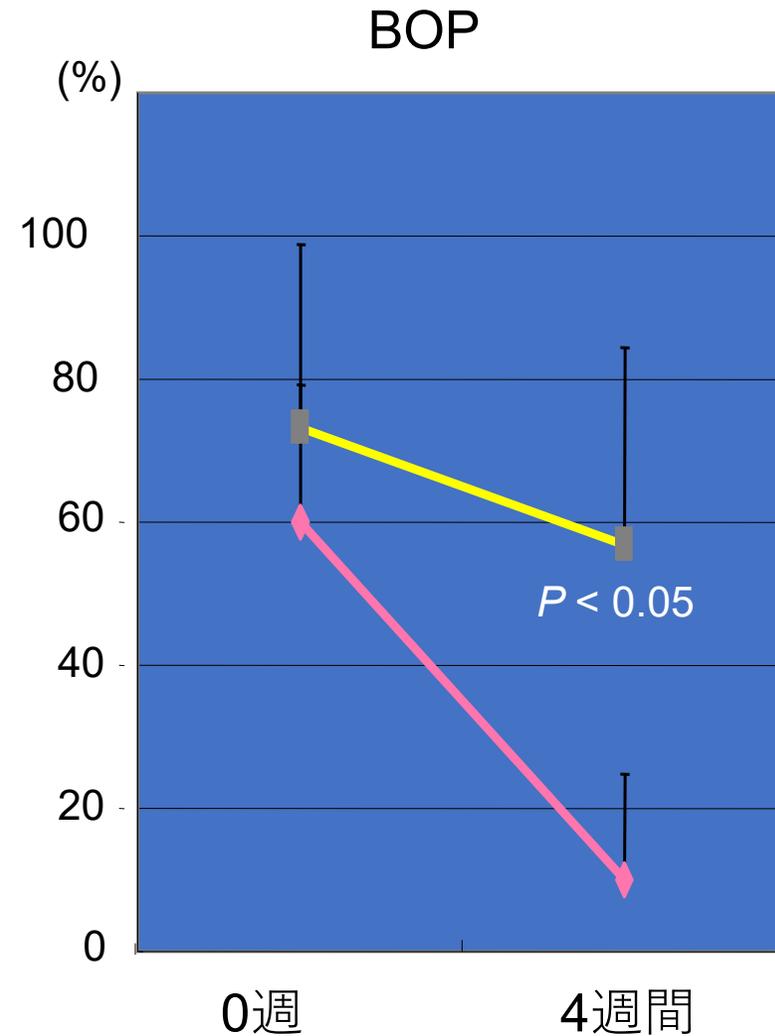
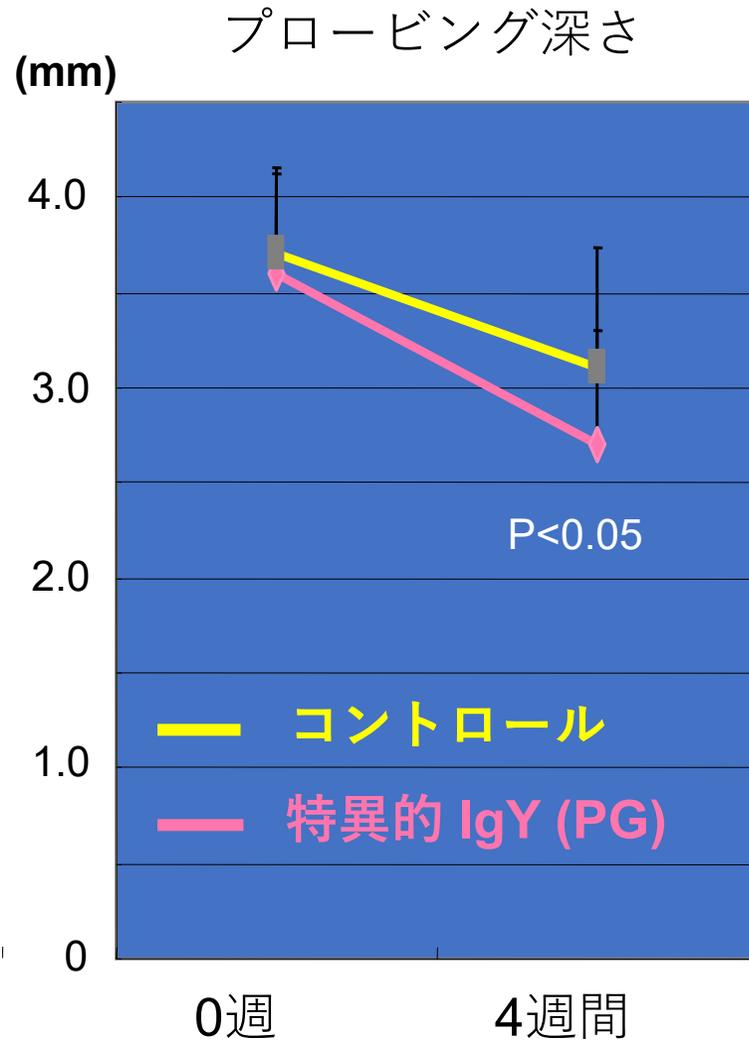
# テスト歯

(口の左半分)

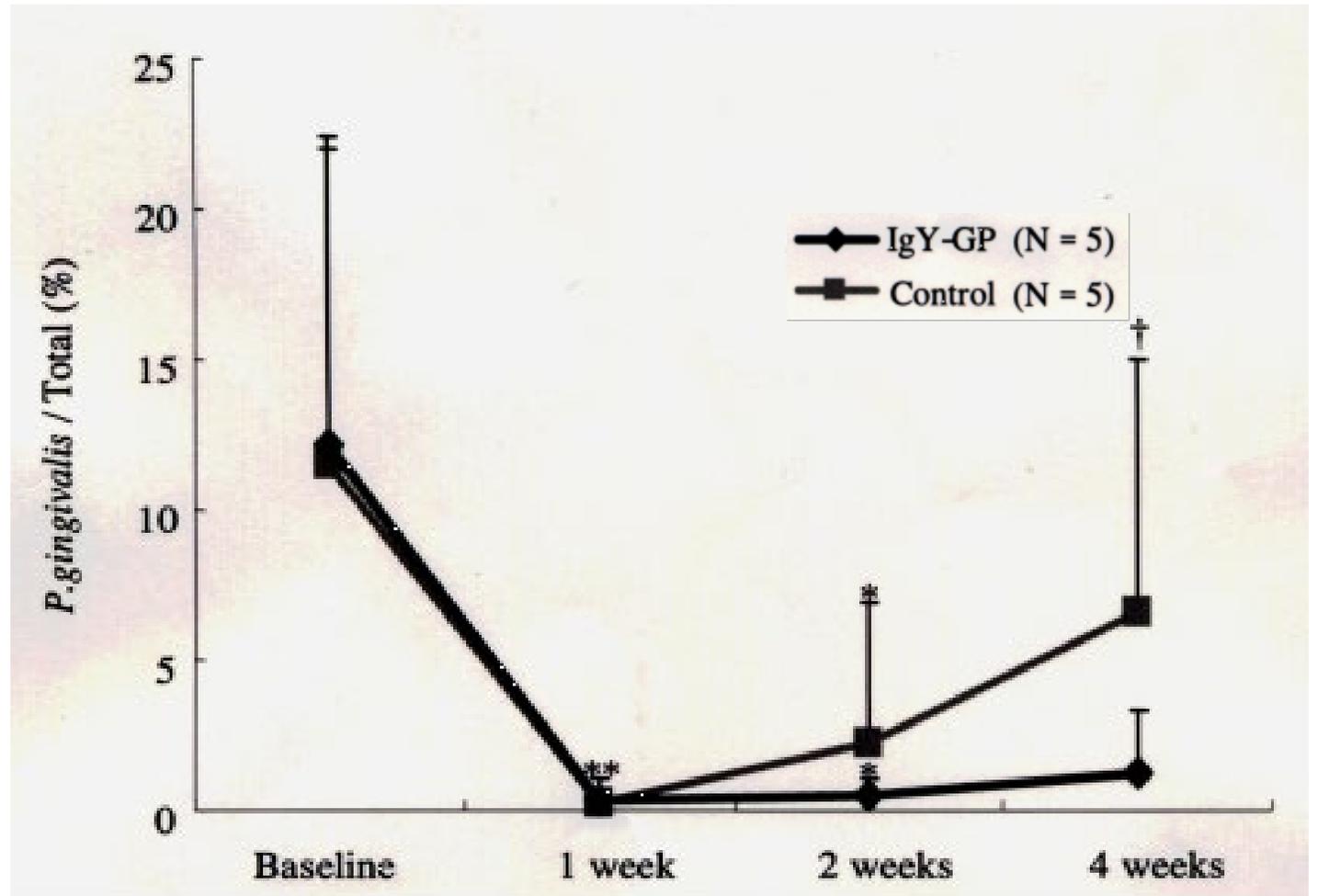


特異的IgY(PG)ゲルで満たされた歯根管シリンジ

# 口腔内試験



結果:歯周ポケットにおける*P.gingivalis*の比率



Wilcoxon signed-rank test \*  $P < 0.05$   
Mann-whitney U test †  $P < 0.05$

# 備考

- 特異的IgY(PG)は歯周炎の発症を防ぐことができます。
- より良い効果を達成するために、IgYは歯周ポケットに簡単に到達する必要があります。ゲル、チューインガムなどは、製品の最も適した形態の1つである。

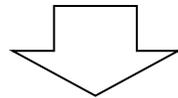
# 過去2年間の実績

- 歯周炎治療者数: 128
  - 中程度の歯周炎を有する患者: 48
  - PCRによる*P.gingivalis*の検査: 20
  - 他の方法で調べる: 101
  - 全陽性患者数: 83
- 治療中に特異的IgY(PG)を使用している患者: 83



# コメント

- 治療中に特異的IgY(PG)を使用すると:
  - 歯周骨の迅速な回復
  - 炎症が少ない
  - 非常に困難な症例でも良好な予後



抗生物質をIgYで完全に置き換える