

歯周病患者における抗ジンジパイン鶏卵抗体の 臨床的および細菌学的評価

横山 京介¹ 菅野 直之^{2,3} Rahman AKMS⁴ 嶋田 照子⁵
西原 理恵子⁵ 瀧川 智子⁵ 上重 寛幸² 川本 和弘²
森谷 良智² 伊藤 公一^{2,3}

¹ 日本大学大学院歯学研究科歯科臨床系専攻

² 日本大学歯学部保存学教室歯周病学講座

³ 日本大学歯学部総合歯学研究所高度先端医療研究部門

⁴ ゲン・コーポレーション免疫研究所

⁵ 日本大学大学院歯学専攻応用口腔科学分野

要旨: 歯周病は、国民の大多数が罹患している口腔感染症である。グラム陰性の偏性嫌気性菌である *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*) は、歯周病の最も有力な原因菌であると考えられている。*P. gingivalis* の産生するジンジパインは、口腔環境内で発育増殖していくために不可欠な因子であると同時に、宿主タンパクを広範に分解し宿主免疫機構の破綻をきたす重要な病原因子とされている。そこで本研究では、ジンジパイン抗原を免疫した鶏卵から鶏卵抗体 (IgY-GP) 含有タブレットを調整した。被験者に IgY-GP 含有タブレットを2週間投与し、その前後での臨床的、細菌学的評価を行った。その結果、プロービング時の出血 (bleeding on probing, BOP)、歯周ポケット深さ (probing depth, PD)、最深部 PD およびプラークコントロールレコード (plaque control record, PCR) に顕著な変化は認められなかった。細菌学的評価は投与前後の唾液を採取し、real-time polymerase chain reaction (real-time PCR) 法を用いて総細菌数に対する *P. gingivalis* の割合で求めた。IgY-GP 群では著明な変化は認められなかった。本研究期間中に副作用が認められなかったことから安全性は期待できるが、その効果を明らかにするために、今後研究デザインの検討が必要である。

キーワード: ジンジパイン, IgY, 受動免疫, 歯周病, *Porphyromonas gingivalis*

緒言

歯周病は国民の大多数が罹患している口腔感染症である。近年、歯周病は、糖尿病¹⁾、心臓血管疾患²⁾、低体重児出産³⁾ あるいは誤嚥性肺炎⁴⁾ など全身疾患リスク因子としても注目されているが、歯周病治療では、主として口腔清掃の確立の下に、スケーリング・ルートプレーニングや歯周外科処置といった機械的な原因除去療法が行われているが、予防対策としては、従来からのブラッシングや食生活の改善にとどまっている。現在、歯周病に対する新しい治療法として、歯周病原菌の病原因子をターゲットとした免疫療法や種々の歯周病ワクチンの開発が期待されている。中でも、受動免疫療法は、他の個体や動物が作成した抗体を用いて病原体の病原性を中和する方法で、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。鳥類では、親鳥が獲得した免疫抗体は、卵へと移行し、卵黄抗体 (Immunoglobulin Yolk; IgY) として蓄積される⁵⁾。さらに、IgY は哺乳類の IgG に相当するものであり、哺乳類で得られない抗原に対して特異抗体の産生が可能で⁶⁾、ヒトの補体⁷⁾ やリウマチ因子⁸⁾ と反応しないという優れ

た性質を持っている。ヒトへの臨床応用を考えた場合、抗体の大量調整や価格の点からも、IgY を利用した受動免疫療法が注目されている。

Porphyromonas gingivalis (*P. gingivalis*), *Tannerella forsythensis*, *Treponema denticola* は red complex に分類され、歯周病の進行と密接な関係があると考えられている⁹⁾。中でもジンジパインなどの種々の病原因子を産生する *P. gingivalis* は、歯周病の最も重要な原因菌であると考えられている。

そこで本研究は、鶏に抗原としてジンジパインを免疫して得られる鶏卵抗体 (IgY-GP) タブレットを調整した。全身的に健康な成人に IgY-GP を2週間投与し、投与前と投与開始2週間後に臨床的および細菌学的に評価した。

材料および方法

1. IgY-GP 含有タブレットの作製

P. gingivalis (ATCC 33277) は、10%馬血液添加ブルセラ HK 寒天培地で嫌氣的に培養した¹⁰⁾。対数増殖期に集菌後、10,000 × g 30分、4°C で遠心分離を行い、Tris buffer (0.05 M Tris-1 M CaCl₂, pH 7.5) にて再懸濁させ、

(受付:平成19年1月17日)

〒101-8310 東京都千代田区神田駿河台1-8-13

超音波破碎の間隔を2分間とし、水上で1分間の超音波破碎(150 watts)を6回行った。超音波破碎細胞由来の不溶性物質は、4°C、15分間の10,000 × gで遠心分離し、ジンジパインを抽出した。超音波破碎によって抽出されたジンジパインは、Mono-Q column(Pharmacia)を用いて精製した。ジンジパインをMono-Q columnに注入し、1M NaClを含むTris bufferを流入(60 ml/h)した。Major peakはNaCl溶出の早期に、Minor peakは後期に観察された。ジンジパイン活性の80%がMajor peakで認められ本研究に用いた¹¹⁾。

White Leghorn種の鶏(HyLine W36種、5ヵ月齢;ゲン・コーポレーション免疫研究所)にジンジパイン抗原(1 mg/ml)を接種し、初回免疫から8週間後、同じ方法で追加免疫を行った¹⁰⁾。採卵は卵黄抗体のピークにあたる追加免疫より2週間後に行った。鶏卵抗体粉末は横山ら¹²⁾の方法に従い、卵黄をアルブミンと卵黄膜に分離し、乾燥させ粉末にした。なお、コントロール鶏卵抗体(IgY)は、非感作の鶏卵から作成し、同様に調整した。さらに、鶏卵粉末は、クロロホルム抽出¹³⁾と硫酸アンモニウム沈殿¹⁴⁾を用いて精製し、IgY-GPの特異抗原性は酵素免疫測定法(ELISA)を用いて評価した¹⁵⁾。

IgY-GPタブレットの組成は、IgY-GP、糖質、結晶セルロース、香料、シヨ糖脂肪酸エステルおよび微粒二酸化ケイ素であり、IgY-GPは26%となるように配合した。

2. 被験者

全身的に健康な成人26名に対して予備的診査を行い、抗生物質を3ヵ月以内に投与された者、現在歯科治療中、卵に対する食物アレルギーのある者は除外し、歯肉の腫脹、出血、歯周ポケット形成の歯周病症状を有し、real-time polymerase chain reaction(real-time PCR)法で唾液中に*P. gingivalis*が0.01%以上検出された11名を抽出し、無作為に2群に割り付け、IgY-GP群6名およびIgY群5名で本研究を開始した。研究期間中に抗生物質の投与を受けた2名を除外したことから、男性9名(平均年齢42歳、29-55歳)、IgY-GP群4名およびIgY群5名を被験者とした。本研究の実施に際し、日本大学歯学部倫理委員会の承認を得ており、すべての被験者に研究内容を説明し、書面にて同意を得ている。

3. 投与スケジュール

タブレットは、1回1錠1日3回、毎食後(朝、昼、晩)を目安に2週間投与した。タブレットは、噛まずにゆっくり口腔内で溶かすように指導した。フッ素、キシリトールを含有しない歯磨剤、歯ブラシを配付し、試験期間中に使用してもらった。口腔内診査および唾液の採取は、投与前と投与開始2週間後に実施した。

4. 臨床的評価

口腔内診査は、16、11、24、36、31および44の6歯を対象とし、歯周ポケット深さ(probing depth, PD)は、検

診用ベリオプローブ(YDM)を用いて1歯6点法で計測した。プロービング時の出血(bleeding on probing, BOP)の有無はプロービング30秒後に確認した。口腔清掃状態の指標にはO'Learyら¹⁶⁾のプラークコントロールレコード(plaque control record, PCR)を用いた。

5. 細菌学的評価

採取唾液はパラフィンガムを5分間咀嚼することで分泌される刺激時全唾液1mlとした。リアルタイムPCR法を用いて16SrRNAを測定対象とし、唾液中の総細菌および*P. gingivalis*の菌数を測定した。さらに、総細菌数に対する*P. gingivalis*の割合を算出した。

6. 統計処理

統計処理は、SPSSソフトウェア(SPSS)を用いて分析した。BOP, PD, 最深部PD, PCRおよび総細菌数に対する*P. gingivalis*の割合についての検定は、Mann-Whitney's *U* testを用いてIgY-GPとIgY投与群とを比較し、危険率5%未満を有意差として評価した。タブレット投与前と投与開始2週間後の比較は、Wilcoxon's signed-ranks testを用い、危険率5%未満を有意差として評価した。

結 果

1. 臨床的評価

口腔内診査は、2週間のIgY-GP投与期間の前後で行った。IgY-GP群のBOP(第1図)、PD(第2図)、最深部PD(第3図)およびPCR(第4図)に顕著な変化は認められなかった。IgY群のBOPに有意な減少が認められた($p < 0.05$)(第1図)が、PD(第2図)、最深部PD(第3図)およびPCR(第4図)に顕著な変化は認められなかった。また、IgY-GPおよびIgYタブレット投与において、本研究期間中に全身症状、口腔内の発赤、腫脹および不快症状等の副作用は認められなかった。

2. 細菌学的評価

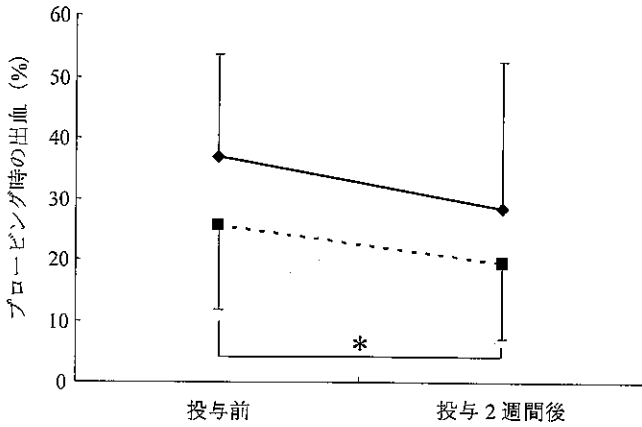
被験者にIgY-GP、またはIgYを2週間投与し、投与前および投与開始2週間後に唾液を採取し、real-time PCR法を用いて総細菌数に対する*P. gingivalis*の割合を算出した。IgY-GP群では、*P. gingivalis*の割合に顕著な変化は認められなかった(第5図A)。その平均値の変化は $0.22 \pm 0.21\%$ から $0.16 \pm 0.14\%$ であった。IgY群は*P. gingivalis*の割合の増加を認めた(第5図B)。その平均値の変化は $0.13 \pm 0.13\%$ から $0.41 \pm 0.40\%$ と有意な増加を示した($p < 0.05$)。

考 察

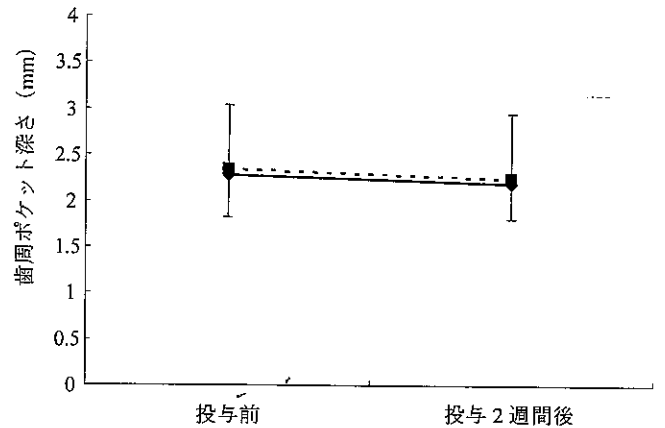
近年、歯周病¹⁷⁻²²⁾あるいは齲蝕^{23,24)}に対する受動免疫研究が行われている。中でも、IgYは鶏卵より作成されるため、遺伝子組み換えや屠殺を行う必要がないうえ、1個の鶏卵から40 mg以上のIgYが精製できるため極めて経

的である²⁵⁾。齧蝕に対するIgYを用いた受動免疫研究は、ラットモデル^{26,27)} およびヒト²⁸⁾ で報告されている。

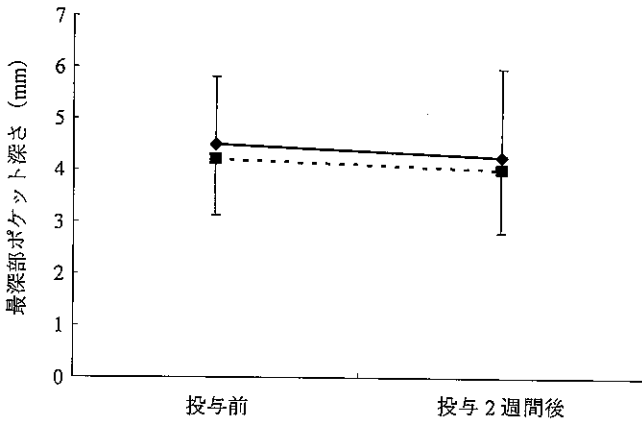
しかしながら、歯周病は、動物モデルの確立が難しく、受動免疫療法の開発は、齧蝕に比べ遅れている²⁹⁾。



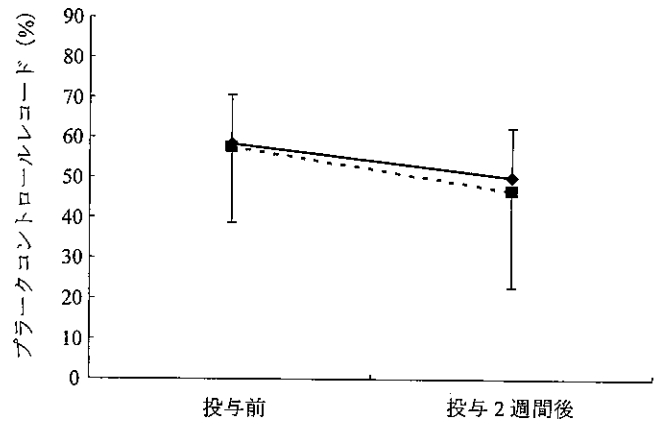
第1図：IgY-GP投与におけるプロービング時の出血の変化
 ●— IgY-GP群(n=4)
 -■- IgY群(n=5)
 * $p < 0.05$



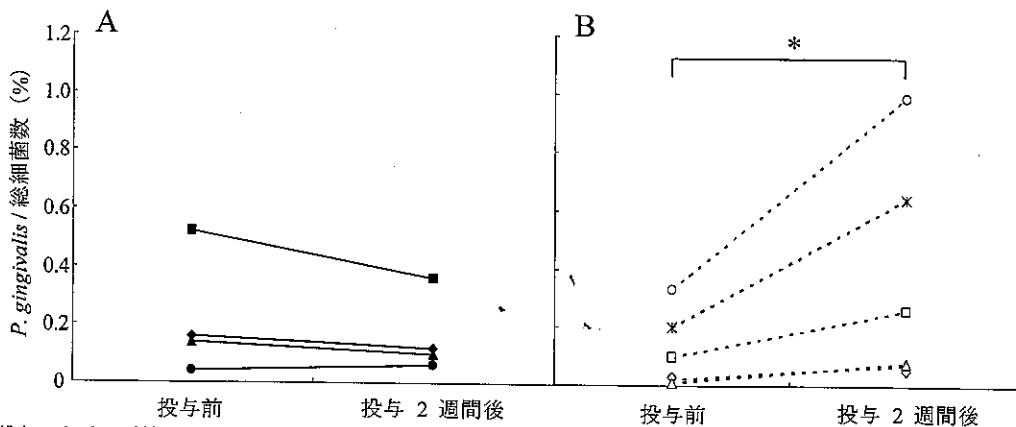
第2図：IgY-GP投与における歯周ポケット深さの変化
 ●— IgY-GP群(n=4)
 -■- IgY群(n=5)



第3図：IgY-GP投与における最深部ポケット深さの変化
 ●— IgY-GP群(n=4)
 -■- IgY群(n=5)



第4図：IgY-GP投与におけるプラークコントロールレコードの変化
 ●— IgY-GP群(n=4)
 -■- IgY群(n=5)



第5図：IgY-GP投与における唾液中の総細菌数に対する*P. gingivalis*の割合の変化
 A：IgY-GP群(n=4)
 B：IgY群(n=5) * $p < 0.05$

グラム陰性偏性嫌気性菌である *P. gingivalis* は、Socransky ら⁹⁾ の分類で最も歯周病の発症や進行に関わりのある red complex に分類され、歯周病の最も有力な原因菌であると考えられている。*P. gingivalis* は、糖分解能を有していないためタンパクをペプチド断片に分解し、これらを菌体内に取り込むことで発育増殖に利用している。従って、*P. gingivalis* の産生するタンパク分解酵素は、宿主の組織を豊富な供給源とし、タンパクを分解してアミノ酸、赤血球からヘムを獲得など、本菌が口腔環境内で発育増殖するのに不可欠な因子と考えられている³⁰⁻³²⁾。また、*P. gingivalis* の病原因子としては、リポ多糖 (LPS)、線毛、赤血球凝集素、溶血素およびジンジパインが報告されている³³⁻³⁶⁾。特に、ジンジパインは、*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最も重要なタンパク分解酵素である³⁷⁾。さらに、ジンジパインは、サイトカイン^{38,39)} および補体機能の不活性化^{40,41)}、CD14 などのマクロファージレセプター⁴²⁻⁴⁴⁾ や CD4、CD8 のような T 細胞レセプターを破壊し⁴⁵⁾、宿主防御機構を破綻させる。*P. gingivalis* は、ジンジパインの作用により、生体から回避し、歯周ポケット内で定着増殖できると考えられている。*P. gingivalis* が、歯周組織深部で観察されるという報告は、本菌が、歯肉上皮細胞による防御機構を通過する可能性を示唆している⁴⁶⁻⁴⁸⁾。これらの研究は、ジンジパインが歯周病とそれに関連する全身疾患の治療法として、最も有力なターゲットであることを示唆している。

本研究では、IgY-GP を 2 週間投与し、投与開始前と投与後で臨床的評価と唾液中の総細菌数に対する *P. gingivalis* の割合を算出した。唾液は簡便に採取することができ、歯周ポケット内の細菌叢を反映しているとされることから、口腔内全体の細菌分布を知る上で有用である⁴⁹⁾。IgY-GP タブレット投与による臨床的および細菌学的評価において顕著な変化は認められなかった。これは、IgY-GP がバイオフィーム環境下ではプラーク深部に浸透しにくいことから、IgY-GP がジンジパインに直接作用することが困難であったと考えられる。本研究から IgY-GP が、その効果を発揮するためには、機械的プラークコントロールを併用しバイオフィームを破壊することの必要性が示唆された。

一方、IgY 投与群においては、BOP は減少したにもかかわらず、*P. gingivalis* の割合の増加が認められた。BOP と *P. gingivalis* の割合は直接的な関係ではなく、環境因子や宿主因子など様々な因子が関わる⁵⁰⁾ ことでこのような結果をもたらしたと考えられる。

本研究期間中に全身症状、口腔内の発赤、腫脹および不快症状等の副作用が認められなかったことから、IgY-GP 投与の安全性は期待できるが、その効果を明らかにするためには、今後研究デザインなどさらなる検討が必要である

と思われる。

文 献

- 1) Grossi SG, Genco RJ (1998) Periodontal disease and diabetes mellitus: a two-way relationship. *Ann Periodontol* 3, 51-61
- 2) Beck JD, Offenbacher S, Williams R, Gibbs P, Garcia R (1998) Periodontitis: a risk factor for coronary heart disease? *Ann Periodontol* 3, 127-141
- 3) Offenbacher S, Katz V, Fertik G, Collins J, Boyd D, Maynor G, McKaig R, Beck J (1996) Periodontal infection as a possible risk factor for preterm low birth weight. *J Periodontol* 67, 1103-1113
- 4) Loesche WJ, Lopatin DE (1998) Interactions between periodontal disease, medical diseases and immunity in the older in individual. *Periodontol* 2000 16, 80-105
- 5) Malkinson M (1965) The transmission of passive immunity to *Escherichia coli* from mother to young in the domestic fowl (*Gallus domesticus*). *Immunology* 9, 311-317
- 6) Camenisch G, Tini M, Chilov D, Kvietikova I, Srinivas V, Caro J, Spielmann P, Wenger RH, Gassmann M (1999) General application of chicken egg yolk antibodies: the performance of IgY immunoglobulins raised against the hypoxia-inducible factor 1 α . *FASEB J* 13, 81-88
- 7) Larsson A, Jonsson L, Sjoquist J (1988) Determination of circulating immune complexes by chicken anti-human C3 and anti-human C1q microELISA. *J Immunol Methods* 113, 93-99
- 8) Gardner PS, Kaye S (1982) Egg globulins in rapid virus diagnosis. *J Virol Methods* 4, 257-262
- 9) Socransky SS, Haffajee AD, Cugini MA, Smith C, Kent RL Jr (1998) Microbial complexes in subgingival plaque. *J Clin Periodontol* 25, 134-144
- 10) Chen Z, Potempa J, Polanowski A, Wikstrom M, Travis J (1992) Purification and characterization of a 50-kDa cysteine proteinase (gingipain) from *Porphyromonas gingivalis*. *J Biol Chem* 267, 18896-18901
- 11) Yun PL, DeCarlo AA, Hunter N (1999) Modulation of major histocompatibility complex protein expression by human gamma interferon mediated by cysteine proteinase-adhesin polyproteins of *Porphyromonas gingivalis*. *Infect Immun* 67, 2986-2995
- 12) Yokoyama H, Hashi T, Umeda K, Icatlo FC Jr, Kuroki M, Ikemori Y, Kodama Y (1997) Effect of oral egg antibody in experimental F18+ *Escherichia coli* infection in weaned pigs. *J Vet Med Sci* 59, 917-921
- 13) Van Nguyen S, Umeda K, Yokoyama H, Tohya Y, Kodama Y (2006) Passive protection of dogs against clinical disease due to Canine parvovirus-2 by specific antibody from chicken egg yolk. *Can J Vet Res* 70, 62-64
- 14) Kuroki M, Ikemori Y, Yokoyama H, Peralta RC, Icatlo FC Jr, Kodama Y (1993) Passive protection against bovine rotavirus-induced diarrhea in murine model by specific immunoglobulins from chicken egg yolk. *Vet Microbiol* 37, 135-146
- 15) Yokoyama H, Peralta RC, Diaz R, Sendo S, Ikemori Y, Kodama Y (1992) Passive protective effect of chicken egg

- yolk immunoglobulins against experimental enterotoxigenic *Escherichia coli* infection in neonatal piglets. *Infect Immun* 60, 998-1007
- 16) O'Leary TJ, Drake RB, Naylor JE (1972) The plaque control record. *J Periodontol* 43, 38
 - 17) Booth V, Ashley FP, Lehner T (1996) Passive immunization with monoclonal antibodies against *Porphyromonas gingivalis* in patients with periodontitis. *Infect Immun* 64, 422-427
 - 18) Booth V, Lehner T (1997) Characterization of the *Porphyromonas gingivalis* antigen recognized by a monoclonal antibody which prevents colonization by the organism. *J Periodontal Res* 32, 54-60
 - 19) Choi J, Borrello MA, Smith E, Cutler CW, Sojar H, Zauderer M (2001) Prior exposure of mice to *Fusobacterium nucleatum* modulates host response to *Porphyromonas gingivalis*. *Oral Microbiol Immunol* 16, 338-344
 - 20) Nakagawa T, Sims T, Fan Q, Potempa J, Travis J, Houston L, Page RC (2001) Functional characteristics of antibodies induced by Arg-gingipain (HRgpA) and Lys-gingipain (Kgp) from *Porphyromonas gingivalis*. *Oral Microbiol Immunol* 16, 202-211
 - 21) Van Tilburg ML, Kozarov EV, Progulsk-Fox A, Brady LJ (2001) The effect of monoclonal antibody and route of immunization on the humoral immune response against *Porphyromonas gingivalis*. *Oral Microbiol Immunol* 16, 153-162
 - 22) Yonezawa H, Kato T, Kuramitsu HK, Okuda K, Ishihara K (2005) Immunization by Arg-gingipain A DNA vaccine protects mice against an invasive *Porphyromonas gingivalis* infection through regulation of interferon-gamma production. *Oral Microbiol Immunol* 20, 259-266
 - 23) van Raamsdonk M, de Soet JJ, de Graaff J (1993) Effect of monoclonal antibodies on the colonization of rats by *Streptococcus sobrinus*. *Caries Res* 27, 31-37
 - 24) Ma JK, Hikmat BY, Wycoff K, Vine ND, Chargelegue D, Yu L, Hein MB, Lehner T (1998) Characterization of a recombinant plant monoclonal secretory antibody and preventive immunotherapy in humans. *Nat Med* 4, 601-606
 - 25) Rose ME, Orlans E, Buttress N (1974) Immunoglobulin classes in the hen's egg: their segregation in yolk and white. *Eur J Immunol* 4, 521-523
 - 26) Hamada S, Horikoshi T, Minami T, Kawabata S, Hiraoka J, Fujiwara T, Ooshima T (1991) 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
 - 27) Smith DJ, King WF, Godiska R (2001) 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
 - 28) Hatta H, Tsuda K, Ozeki M, Kim M, Yamamoto T, Otake S, Hirasawa M, Katz J, Childers NK, Michalek SM (1997) Passive immunization against dental plaque formation in humans: effect of a mouth rinse containing egg yolk antibodies (IgY) specific to *Streptococcus mutans*. *Caries Res* 31, 268-274
 - 29) Abiko Y (2000) Passive immunization against dental caries and periodontal disease: development of recombinant and human monoclonal antibodies. *Crit Rev Oral Biol Med* 11, 140-158
 - 30) Nakayama K, Yoshimura F, Kadowaki T, Yamamoto K (1996) Involvement of arginine-specific cysteine proteinase (Arg-gingipain) in fimbriation of *Porphyromonas gingivalis*. *J Bacteriol* 178, 2818-2824
 - 31) Shi Y, Ratnayake DB, Okamoto K, Abe N, Yamamoto K, Nakayama K (1999) Genetic analyses of proteolysis, hemoglobin binding, and hemagglutination of *Porphyromonas gingivalis*. Construction of mutants with a combination of rgpA, rgpB, kgp, and hagA. *J Biol Chem* 274, 17955-17960
 - 32) Brochu V, Grenier D, Nakayama K, Mayrand D (2001) Acquisition of iron from human transferrin by *Porphyromonas gingivalis*: a role for Arg- and Lys-gingipain activities. *Oral Microbiol Immunol* 16, 79-87
 - 33) Genco CA, Odusanya BM, Potempa J, Mikolajczyk-Pawlinska J, Travis J (1998) A peptide domain on gingipain R which confers immunity against *Porphyromonas gingivalis* infection in mice. *Infect Immun* 66, 4108-4114
 - 34) Lamont RJ, Jenkinson HF (1998) Life below the gum line: pathogenic mechanisms of *Porphyromonas gingivalis*. *Microbiol Mol Biol Rev* 62, 1244-1263
 - 35) Loesche WJ, Grossman NS (2001) Periodontal disease as a specific, albeit chronic, infection: diagnosis and treatment. *Clin Microbiol Rev* 14, 727-752
 - 36) Slots J, Ting M (1999) *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis* in human periodontal disease: occurrence and treatment. *Periodontol* 2000 20, 82-121
 - 37) Potempa J, Pike R, Travis J (1995) 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
 - 38) Mikolajczyk-Pawlinska J, Travis J, Potempa J (1998) Modulation of interleukin-8 activity by gingipains from *Porphyromonas gingivalis*: implications for pathogenicity of periodontal disease. *FEBS Lett* 440, 282-286
 - 39) Banbula A, Bugno M, Kuster A, Heinrich PC, Travis J, Potempa J (1999) Rapid and efficient inactivation of IL-6 gingipains, lysine- and arginine-specific proteinases from *Porphyromonas gingivalis*. *Biochem Biophys Res Commun* 261, 598-602
 - 40) Wingrove JA, DiScipio RG, Chen Z, Potempa J, Travis J, Hugli TE (1992) Activation of complement components C3 and C5 by a cysteine proteinase (gingipain-1) from *Porphyromonas (Bacteroides) gingivalis*. *J Biol Chem* 267, 18902-18907
 - 41) DiScipio RG, Daffern PJ, Kawahara M, Pike R, Travis J, Hugli TE, Potempa J (1996) 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

- 42) Sugawara S, Nemoto E, Tada H, Miyake K, Imamura T, Takada H (2000) Proteolysis of human monocyte CD14 by cysteine proteinases (gingipains) from *Porphyromonas gingivalis* leading to lipopolysaccharide hyporesponsiveness. *J Immunol* 165, 411-418
- 43) Tada H, Sugawara S, Nemoto E, Takahashi N, Imamura T, Potempa J, Travis J, Shimauchi H, Takada H (2002) 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
- 44) Duncan L, Yoshioka M, Chandad F, Grenier D (2004) Loss of lipopolysaccharide receptor CD14 from the surface of human macrophage-like cells mediated by *Porphyromonas gingivalis* outer membrane vesicles. *Microb Pathog* 36, 319-325
- 45) Kitamura Y, Matono S, Aida Y, Hirofujii T, Maeda K (2002) Gingipains in the culture supernatant of *Porphyromonas gingivalis* cleave CD4 and CD8 on human T cells. *J Periodontol Res* 37, 464-468
- 46) Saglie R, Newman MG, Carranza FA Jr, Pattison GL (1982) Bacterial invasion of gingiva in advanced periodontitis in humans. *J Periodontol* 53, 217-222
- 47) Sandros J, Papapanou P, Dahlen G (1993) *Porphyromonas gingivalis* invades oral epithelial cells in vitro. *J Periodontol Res* 28, 219-226
- 48) Andrian E, Grenier D, Rouabhia M (2004) In vitro models of tissue penetration and destruction by *Porphyromonas gingivalis*. *Infect Immun* 72, 4689-4698
- 49) Kaufman E, Lamster IB (2000) Analysis of saliva for periodontal diagnosis—a review. *J Clin Periodontol* 27, 453-465
- 50) Page RC (1998) The pathobiology of periodontal diseases may affect systemic diseases: inversion of a paradigm. *Ann Periodontol* 3, 108-120