

S. mutans CA-GTase に対する IgY を用いた経口受動免疫によるう蝕予防

株式会社ゲン・コーポレーション 研究開発部門長 こだまよしかつ 児玉義勝

はじめに

動物は、外部から侵入してくる病原体等の異物に対して「抗体」というたん白質を血液中に産生することにより、自己防御システムを築いている。

哺乳動物の場合、親が獲得した抗体を胎盤や母乳を通して子孫を病原体から守っている。

しかし鳥類は胎盤も母乳も持たないため、親鳥が獲得した血液中の抗体は主に卵黄中に移行蓄積される。この卵黄中の抗体を、卵黄(Yolk)にちなんでImmunoglobulin(=抗体)YolkすなわちIgYと呼ぶ。

1. う蝕はなぜ起こるのか

代表的なバイオフィーム感染症の一つにミュータンス連鎖球菌(Mutans streptococci: MS)による感染症がある。本病は *Streptococcus mutans* (*S. mutans*) と *Streptococcus sobrinus* が相互に関与すると考えられている。口腔に感染した本菌は菌体外膜のたん白成分を介して歯面にある唾液成分と弱く結合する。そこに食品由来のスクロースが供給されると、菌体外膜に局在しているグルコシルトランスフェラーゼ(CA-GTase)によって唾液不溶性グルカンが合成される。このグルカンが歯面に蓄積すると本菌以外に歯周病に関与する細菌群も強く固着し、酸を貯留するグルカンレーヤーが形成される。バイオフィーム内に貯留された酸によりエナメル質は脱灰され、う蝕病変ができあがる。

最近、歯周病疾患との関係で40歳を過ぎた成人で根面う蝕が大きな問題としてクローズアップされている。本病は歯肉が退縮して露出したセメント質とエナメル質の境界部からう蝕が進行するのが特徴とされる。

う蝕の予防対策は口腔清掃後、バイオフィームの形成を抑制するサプリメントの開発が重要な意味を持つ。

2. 鶏はIgYを安価に大量生産できるバイオ工場である

鶏の母子間におけるIgY移行システムは古くから知られている。たとえば、親鳥に抗原を注射すると、それに対応したIgYが体内に作られ卵黄に蓄積される。このシステムを工業的に利用することは可能である。鶏は1年

間に約300個の卵を産む。これをIgY量に換算すると36gとなる。

筆者らは *S. mutans* の外膜に不溶性グルカンを合成するCA-GTaseが存在していることを初めて見出した(特許広報第2598802号)。本酵素は菌体を尿素処理することにより簡単に回収できた。この抗原をアジュバントと混合して乳化した後、鶏に高度免疫して高力価のIgYを得た。

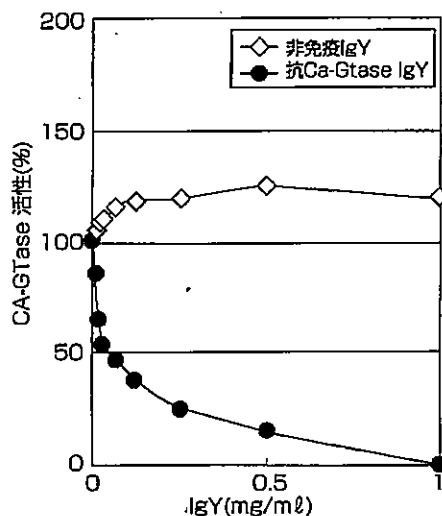


図1 *S. mutans* 由来CA-GTaseによるグルカン合成に対するIgYの抑制効果

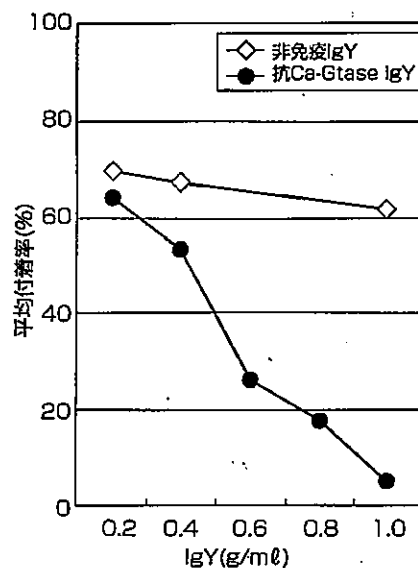


図2 *S. mutans* MT8148Rのスクロース依存性付着能に対するIgYの抑制効果

表1 唾液コーティングHAへのミュータンス連鎖球菌類の付着に対するIgYの抑制効果

	分散液中における付着菌数 (抑制率%)			
	<i>S. mutans</i> MT8148R (c)	<i>S. mutans</i> P-4 (e)	<i>S. mutans</i> SE-11 (f)	<i>S. cricetus</i> ATCC19642 (a)
滅菌水	1,4291 ± 84 ^b (-)	1,219 ± 82 (-)	1,783 ± 400 (-)	959 ± 24 (-)
非免疫 IgY	1,348 ± 123(5.7)	1,077 ± 117(11.6)	1,760 ± 132 (1.3)	941 ± 19 (1.9)
抗 CA-GTase IgY	175 ± 17 (87.8)	157 ± 41 (87.1)	293 ± 59 (83.6)	933 ± 18 (2.7)

a CFU/ml
b 平均 ± 標準偏差

表2 う蝕評価試験

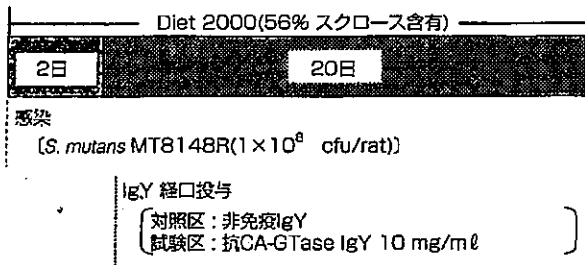


表3 IgYのう蝕抑制効果

試験群	供試ラット(n)	総う蝕スコア	
		平滑部	裂溝部
抗CA-GTase IgY	唾液腺切除 (19)	50.2 ± 6.3 [*]	45.9 ± 2.6 [*]
非免疫IgY	唾液腺切除 (20)	64.2 ± 6.4	50.6 ± 3.2

抗CA-GTase IgYを飲水投与したラットの臼歯におけるう蝕スコア(平均±標準偏差)
^{*}p<0.05

表4 唾液中のミュータンス連鎖球菌数に対するIgYの作用効果

群設定	付着性 <i>S. mutans</i> スコア ^a			総 <i>S. mutans</i> 数 ^b (in log ₁₀)			総嫌気性菌数 ^c (in log ₁₀)		
	試験前	試験後	有意差 ^d	試験前	試験後	有意差 ^d	試験前	試験後	有意差 ^d
抗CA-GTase IgY (n=49)	2.5 ± 1.6 ^d	1.2 ± 1.4	<0.001	3.6 ± 0.9	3.4 ± 0.8	<0.01	7.4 ± 0.5	7.8 ± 0.6	NS
非免疫IgY (n=19)	2.6 ± 1.4	2.8 ± 1.4	NS ^e	3.2 ± 1.2	3.5 ± 0.9	NS	7.2 ± 0.6	7.4 ± 0.6	NS
無処置 (n=31)	2.5 ± 1.6	2.7 ± 1.5	NS	3.7 ± 0.8	3.9 ± 0.9	NS	7.3 ± 0.7	7.5 ± 0.6	NS

付着性*S. mutans*は次のようにスコア化した。コロニーなし：スコア0、1~33 コロニー：スコア1、34~66 コロニー：スコア2、67~99 コロニー：スコア3、100コロニー以上：スコア4

^{a, b, c} それぞれミューカウント、MSB培地、BHI培地に検出した

^d 平均値±標準偏差

^e ウィルコクソンの符号付順位検定による

^f NS: 有意差なし

3 経口受動免疫療法の実験

3-1. in vitro 実験

本IgYは濃度依存的にCA-GTase酵素活性を阻害することにより不溶性グルカンの合成を抑制した(図1)。一方、本IgYはスクロース存在下で*S. mutans* MT8148R株のガラス面への接着を濃度依存的に抑制した(図2)。表1には各血清型のMSがヒト唾液をコートしたハイドロキシアパタイト(HA)への接着阻害効果を示した。血清型c、e、およびfの各菌株は本IgYによって80%以上の阻害活性が観察されたが、*S. cricetus* ATCC19642(a)は阻害しなかった。本IgYは不溶性グルカン合成ばかりではなく歯面への接着も抑制できることが明らかになった。

3-2. ラットを用いたIgYの抗う蝕実験

表2に示したう蝕モデルは唾液腺が切除されているため、唾液分泌が制限されう蝕形成は早い。このような厳しい口腔内環境で本IgYの有効性を評価した。

表3の試験成績から、試験群の平滑面ならびに裂溝部う蝕の病変スコアは対照群のそれと比較して有意に軽減されていた。

3-3. 本IgYを含有するトローチを用いたヒト臨床試験

本試験は北海道医療大学歯学部倫理委員会の承認を受けて、二重盲検法で実施された。被検者の年齢は23歳で99名が参加した。試験群の割付は試験群49名、プラセボ群19名および陰性対照群31名とした。本試験期間を通して、抗生物質の服用者ならびに歯科治療者は除外した。デンタルペーストならびに歯ブラシはフッ素、キシリトールなどを含有しないものを使用した。口腔内清掃は朝と夕の2回とした。また、試験期間中はチーズ、ヨーグルト、ナットウなどの発酵食品の摂取は禁止した。被験物質(トローチ)の摂取回数ならびに摂取期間は1日5回、5日間とし、摂取開始前と摂取終了時に唾

液をサンプリングした。有効性評価は唾液中の接着性 *S. mutans* 菌数、総 *S. mutans* 菌数ならびに総菌数をカウントして摂取前後の菌数の差を検定することによって行った。

表4はその試験成績である。試験群は対照群のそれと比較して接着性 *S. mutans* 菌数 ($p < 0.001$) および総 *S. mutans* 菌数 ($p < 0.01$) との間に有意差が観察され、有効性が検証できた。総菌数では差が認められなかったことから、口腔内細菌叢への影響はないと考えられた。試験群で特に接着性 *S. mutans* 菌数が本IgYの摂取後顕著に減少した理由は不溶性グルカン合成抑制機能と本菌に対する接着阻害機能が相乗的に作用した結果と考えられた。また、IgY含有トローチの摂取期間に副作用等安全性に及ぼす影響は何ら報告されなかった。

おわりに

今後、歯周病との関係で最近注目されている根面う蝕にフォーカスした臨床研究を実施してみたい。

(((参考文献)))

- 1) Hamada S, Kodama Y.: Passive immunity for protection against mucosal infections and vaccination for dental caries. In *Mucosal Vaccines*. Kiyono H, et al. eds., Academic Press, CA.187-197(1996)
- 2) Hamada S, et al.: Oral passive immunization against dental caries in rat by use of hen egg yolk antibodies specific

for cell-associated glucosyltransferase of *Streptococcus mutans*. *Infect. Immune*. 59, 4161-4167(1991)

- 3) Kruger C, et al.: The effects of egg-derived antibodies to glucosyltransferases on dental caries in rats. *Caries Res*. 38, 9-14(2004)

- 4) Chiba I, et al.: Troches containing IgY against GTase of *S. mutans* inhibit its adherence. *J Dent Res*. (2006) (印刷中)



こだま・よしかつ/Yoshikatsu Kodama

1978年 東京大学大学院農学系研究科獣医学専門課程終了、同年 当社免疫研究所、2005年 (株)ゲン・コーポレーション抗体事業カンパニー研究開発部門に転属

専門：細菌学、ウイルス学および感染免疫学

最近の主な研究や活動：1985年 日本獣医学会創設100年記念事業で“粘膜免疫とワクチン開発”を記念出版物に執筆
1985年より 日本獣医学会評議委員

2005年 第11回日本ヘリコバクター学会において“ピロリ菌の接着と接着阻害”と題するスポンサーシンポジウム、ならびに市民公開講座を企画

著書および論文：豚病学第4版(近代出版)分担執筆(1999)、*Mucosal Vaccine* (Academic Press, CA) 分担執筆(1996)、*Clin Diagn Lab Immunol* 5, 578-582(1998)、*J Biol Chem* 273, 18130-18138 (1998)、*Gastroenterology* 119, 358-367(2000)、*Antimicrob Agents Chemother* 44, 2492-2497(2000)、*Vaccine* 23, 232-235(2004)、*Can J Vet Res*. 70, 62-64(2006)