

プロダクト イノベーション

歯周病原性細菌のバイオフィルムを 鶏卵抗体を用いて制御する

*¹ 株式会社ファーマフーズ, *² 日本大学松戸歯学部
山下裕輔*¹, 金 武祐*¹, 高田和子*², 平澤正知*²

歯周病とバイオフィルム

食べることは、体に栄養を取り込み、健康を維持するために必要な行為である。美味しく食べるには「歯」は欠くことができない。とても大事で、毎日使う身近な歯にもかかわらず、成人の歯が32本（親知らずを含む）であると即座に答えられる方はどれだけいるであろうか。わが国では、1989年に厚生省（現在の厚生労働省）が80歳になっても自分の歯を20本以上保とうと「8020運動」を提唱した。また、2000年には「21世紀における国民健康づくり運動（健康日本21）」が実施され、加齢に伴う成人病、生活習慣がもたらす生活習慣病、それらがオーバーラップしている問題を9つの分野に分類し、その中には「歯の健康」もラインナップしている。オーラルケアは国を挙げて取り組む課題であることがわかる。これらの取り組みのおかげで、2011年には80歳以上で20本以上自分の歯を有する人の割合が38%と良好な結果が得られている⁽¹⁾。しかしながら、裏を返せば、5人に3人は10本以上の歯を失っているのが現状である。歯を失う主な原因は虫歯と歯周病である。特に歯周病は痛みなどの自覚症状がない場合も多く、気づいたときには歯を保つことができない状態になっていることも少なくない。

歯周病は、歯周組織（歯と歯を支える組織）におけるさまざまな病態の総称である。軽度なものでは歯肉の腫れ（歯肉炎）、症状が悪化すると歯周ポケットの拡大、歯周組織の炎症・出血（歯周炎）、歯槽骨（歯を支える骨）の溶解を経て歯の喪失に至る。現在、日本の成人の約80%が歯周病に罹患していると言われている⁽¹⁾。歯磨きをするときに、出血が見られる人は要注意である。一般的な認知度は低いですが、歯周病は、肺炎やコレラなどと同じように、微生物の感染によって起こる感染症であ

り、特に歯周病は複数の歯周病原性細菌が関与しているとされている。これらの細菌は歯と歯肉の間にたまった歯垢の中で生息している。歯垢は、約300種ともいわれる細菌とその代謝物からなる粘性の物質で、歯面を足場に膜状に構成される「バイオフィルム」として近年では認識されるようになった。バイオフィルムは自然界では、たとえば流しなどのヌルヌルがそれにあたり、細菌が水流などから身を守る術となっている。バイオフィルムと歯周病の進行の関係を簡単に説明すると、バイオフィルムが歯と歯肉の隙間に形成されると、細菌の構成成分や酵素（毒素）により歯肉に炎症が起こりポケットの形成が始まる。その後、ポケット内でバイオフィルムが拡大すると、歯肉に浸潤した免疫細胞との相互作用が活発化し、IL-1, TNF- α およびプロスタグランジンE2などの炎症性サイトカインの産生が亢進し炎症が拡大する。さらに、これらサイトカインは、破骨細胞を活性化するため、最終的には歯槽骨の溶解へと進む。バイオフィルム内の細菌は他菌種との共同生活となり、唾液中など単菌で存在するときとは異なり、接着因子などの発現様式が異なることや、細胞外マトリクスに覆われているため、免疫細胞や抗菌物質に対し抵抗性を示す。また、代謝活性が低いことから抗生物質が効きにくいことがわかっている。バイオフィルムはまさに細菌の生存戦略であり、バイオフィルムを物理的に除去すること、ならびにバイオフィルムができないように予防することが歯周病ケアには重要であるとされている。

「100兆」。これは日本の国家予算ではなく、人間が体内に宿す細菌の数であり⁽²⁾、生体細胞のおよそ倍であるから驚くばかりである。この中には、大腸菌などの悪玉菌もいれば、ビフィズス菌などの善玉菌や常在菌がいて、それぞれがバランスを保ちながら腸内、口腔内などで細菌叢を形成する。何らかの理由で悪玉菌優勢の環境

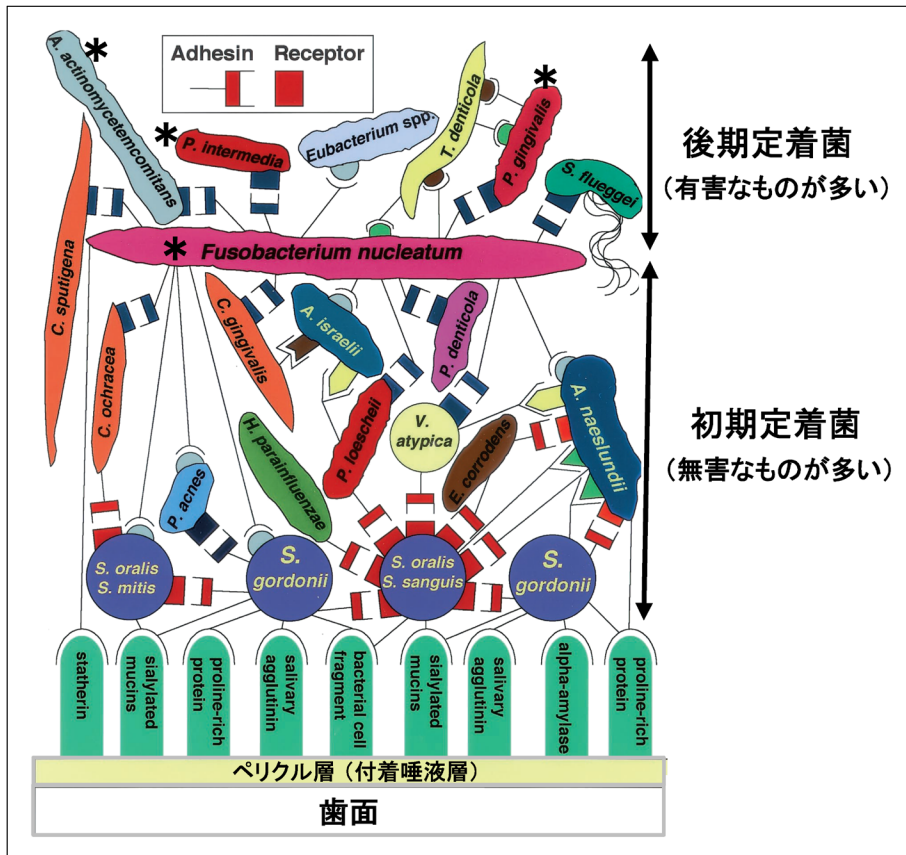


図1 ■ 歯面に定着するバイオフィルムの模式図
 図中、「*」で示した4菌種は鶏卵抗体作製時の抗原に使用した菌種 (Kolenbrander *et al.*⁽³⁾ を改変)

となった場合に、疾病の発症につながる。そのため、細菌叢を良質化することが健康を維持するうえでポイントとなる。

歯の表面に定着する細菌叢を模式的に表したものが図1である。歯の表面にStreptococcus属の連鎖球菌群が定着し、その後、数種の初期定着菌が層をなす。これらの細菌は無害なことが多く、外来性の細菌の口腔内付着を抑制するなどの口腔環境の維持にも関与している。口腔内の清掃が十分になされず、バイオフィルムが成熟すると、Fusobacterium nucleatum (F. n.) を介する形で、後期定着菌群が定着する。後期定着菌には、慢性歯周炎との関連性が強い Porphyromonas gingivalis (P. g.) に代表される歯周病原性細菌が多く含まれる。

この模式図を眺めながら、最も良い理想のオーラルケアは何であるかを考えていると、バイオフィルムを除去し、口腔内の菌数をただ減少させることは本当に良いことであるのかと疑問をもった（もちろん、要治療の歯周病患者は話が別である）。なぜなら、初期定着菌群は有益な役割も担っており、細菌叢の良質化の観点からすると、生存させるべき存在（善玉菌）である。抗菌剤、殺菌剤などを使用すると、歯周病原性細菌（悪玉菌）のみならず、善玉菌もすべて死滅しかねない。「善玉菌であ

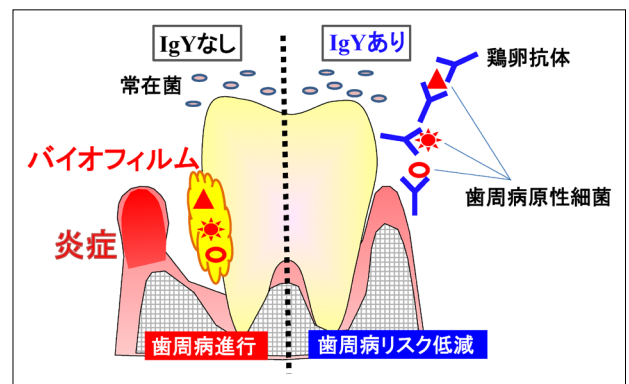


図2 ■ 鶏卵抗体 (IgY) による歯周病原性細菌のピンポイント制御

る初期定着菌や口腔内常在菌に作用せず、歯周病原性細菌のみを抑制すること」が理想のオーラルケアの形であると思われる。それを可能とするイノベティブな機能性素材として鶏卵抗体がある（図2）。

鶏卵抗体 (IgY) とは

鶏卵は、高い栄養価と低価格から消費者にとってたいへん好ましい食品であり、国民一人あたりの鶏卵の消費

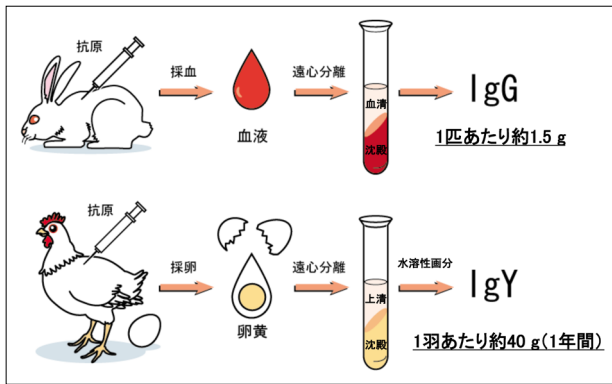


図3 ■ 特異的抗体採取法の比較

量は、メキシコに次いで日本が世界第2位である。このことは日本人が卵をたいへん好むということや、大規模な養鶏システムが整っていることを意味しており、産業上の応用展開にも最適の素材である。

鶏卵は、卵黄、卵白、卵殻膜、卵殻からなり、そして21日間温めることによって生命（ヒヨコ）が誕生するバイオカプセルである。では、どのように卵黄や卵白が生命に変わるのか？ 株式会社ファーマフーズでは、生命誕生の過程を卵から学びながら、新しい卵由来の機能性原料素材開発を進めている。鶏卵には、発生する生命を外的因子（病原性細菌、ウイルスなど）から守るシステムが存在する。たとえば、卵殻、卵殻膜は外的因子が卵内へ侵入することを防ぎ、卵白には抗菌物質のリゾチームが存在する。卵黄には本稿の主演である鶏卵抗体（IgY）が存在しており、これは親鳥から譲り受ける免疫物質である。

そもそも、抗体とは、外部から侵入してくる細菌やウイルス（抗原という）に特異的に結合し、無毒化し排除するタンパク質（Immunoglobulin）であり、生体防御システムの中心的役割を担っている。哺乳動物は胎生期や新生児期には免疫機能が未発達で、抗体産生能力に乏しい。そのため、胎盤や母乳を介して母親から抗体が子に伝えられ、子どもを感染症から守っている。これに対し、胎盤や母乳がない鳥類は、親鳥が獲得した血液中の抗体を、卵黄中に選択的に移行・蓄積させるシステムによりヒヨコに伝える。特に卵黄中の抗体はYolkにちなんでIgYと呼ばれ、哺乳類のIgGクラスに相当する。

従来、特異的抗体は、抗原をマウス、ウサギなどの哺乳動物に免疫し、血液中から調製する方法が一般的である。しかし、全採血を実施しても得られる抗体は少量であり、また使用も研究試薬などに限られている。一方、ニワトリは1年間に約250～300個の卵を産卵し、卵黄液1 mLあたり約10 mgのIgYを含む⁽⁴⁾。そのため、1年

間で得られる抗体量は約40 gとなり、ウサギ30羽分から得られる抗体量に相当する。また、ニワトリは元来鶏病予防の目的でワクチネーションが行われており、連続的な免疫操作もシステム化されている。さらに、大量飼育も容易である。このように、ニワトリの免疫システムを利用することにより、動物の命を犠牲にすることなく特異的抗体を大量かつ安価に生産することが可能である（図3）。

IgYの機能性素材への活用

疾病の予防、緩和を目的とした機能性食品市場の成長は著しい。そのような中、IgYは「食べる抗体」として、新しい機能性食品素材として注目されている。IgYは1種のタンパク質であるが、ほかの食品素材には見られない「特異性」を有する。そのため、目的の病原性細菌（悪玉菌）以外の常在菌など（善玉菌）には何ら影響を与えず、「ピンポイントで効果を発揮」することが可能である。また、抗原抗体反応による「強固な反応性」を有するため、より確実な効果も期待できる。また、卵という日常的に食している素材であるため安全性も高い。さらには液卵・粉卵へ加工することで、ヨーグルトやサプリメントなど、さまざまな食品に配合可能である。

ヒトの口から肛門に至る消化管には、病原性細菌が多く存在する。IgYは食品として通過する消化管こそ最適な仕事場であり、特に口腔内は、ほかの消化管と違い、IgYが消化液による分解を受けることなく、その局所で悪玉菌のみを特異的に標的とすることができる。

歯周病原性細菌バイオフィームIgY

われわれは、歯周病原性細菌の生存戦略とも言える、口腔内付着やバイオフィーム形成を抑止することこそ、歯周病を制御するうえで重要なポイントと考え、常在菌には影響せず、歯周病原性細菌にのみ特異的に機能するようなIgYの開発を試みた。IgY開発において、抗原の選抜（菌種の選抜）は重要なポイントとなる。一般的に歯周病原性細菌と言えは *P. g.* を連想する人が多く、実際に、歯周病の進行においては重要な細菌である。しかし、先にも述べたが、歯周病は複合感染症であり、*P. g.* のみを抑制しても、原因の一部を解消したに過ぎない。そこで、*P. g.* だけでなく、初期定着菌群と後期定着菌群を媒介し、バイオフィーム形成において中心的役割をもつ *F. n.*、これら2菌種を抗原候補とした。特に

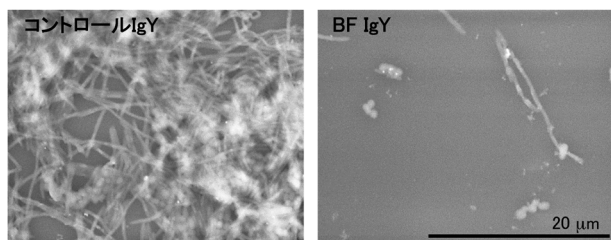


図4 ■ BF IgY添加時の *F. n.*, *P. g.* バイオフィーム形成抑止効果

電子顕微鏡像 (IgY濃度55.6 μg/mLでのウェル上を撮影)。コントロールIgYは、未免疫の通常卵から抽出したIgY。

この2菌間ではさまざまな相互作用があり、共凝集や細胞侵入性の増加、タンパク質発現の変化などの現象が起こり、病原性の増強が示唆されている⁽⁵⁾。

われわれは、まず *P. g.* と *F. n.* の相互作用に注目し、2菌の複合培養で得られる人工的なバイオフィームを抗原として作製した。複合培養することで、それぞれ単菌培養時には発現しない接着因子や病原因子 (実際のバイオフィーム内では発現する因子) の発現を促すことができる。

つづいて、人工的なバイオフィーム抗原を産卵鶏に免疫して、抗歯周病原性細菌バイオフィームIgY (以下、BF IgY) を作製し、種々の効果検証試験を行った。歯周病原性細菌は、口腔内への付着、バイオフィーム形成といった段階を経て嫌気性環境を作り出し増殖し、病原性を発揮する。作製したBF IgYが、このステップごとにどのような抑止効果を有するか、まず、歯周病原性細菌の付着の抑止能を検証した。*P. g.* を種々濃度のIgY溶液中で5分間インキュベート後、十分に洗浄した菌体をプレートに播種し、1時間後、付着した菌体を染色定量した。その結果、BF IgY濃度依存的に菌体のプレートへの付着を防ぐ効果が確認された。この結果は、たとえば、チュアブルなどのIgY含有製品を摂取した場合、IgYの口腔内滞留時間が短時間であっても十分な効果が期待できることを示唆している。

さらに、バイオフィーム形成抑止能を調べるため、*P. g.*, *F. n.* を含む培地中に、①BF IgYあるいは、② *P. g.*, *F. n.* を別々に培養し菌体のみを混合し作製したIgYをそれぞれ種々濃度で添加し、嫌気的条件下で24時間培養した。培養後、バイオフィーム形成量をクリスタルバイオレットを用いた染色定量により測定した。その結果、BF IgYは2菌が形成するバイオフィームを濃度依存的に抑止し (図4)、②のIgYより有意に抑止効果が高いことがわかった⁽⁶⁾。この結果は、IgY作製時の

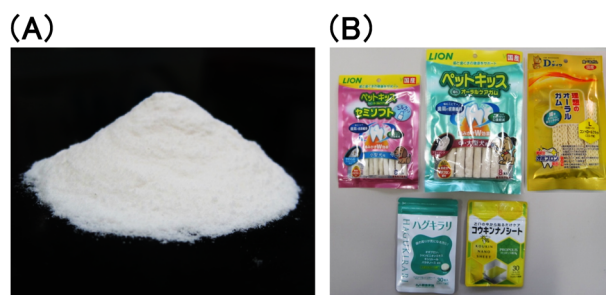


図5 ■ BF IgYを配合したプロダクト

(A) BF IgY含有脱脂卵黄粉末。(B) BF IgY配合の商品群の一例 (上段：ペット用オーラルケアガム、下段：ヒト用オーラルケア食品)。

抗原として菌体を複合培養する優位性を示すものであるが、複合培養によって変動するタンパク質プロファイル解析などは今後の課題である。以上のことから、BF IgYは、歯周病原性細菌の付着を抑える作用、BF形成を抑える作用があることが示された。

上記研究結果を基に、IgYのオーラルケア素材としての実用性をより高めるべく、新たに、歯肉炎とのかわり強い *Prevotella intermedia* (*P. i.*)、侵襲性歯周炎 (30歳以下の若い年齢の人でも発症し、急速に進行する歯周炎) の発症にかかわるとされる *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (*A. a.*) を加えた4菌種からなるバイオフィームを抗原化し、BF IgYを作製した。つづいて、BF IgYのヒトでの効果を検討するため、BF IgYを配合したタブレットを作製し、ボランティア試験を実施した。試験は歯周病原性細菌が検出された20名を対象とした。タブレット1粒あたりのBF IgY含有脱脂卵黄粉の添加量は50 mgとし、朝、昼、夕食後および就寝前に1日4個、2週間、なめて摂取させた。摂取前後に唾液を回収し、唾液中の *P. g.*, *F. n.*, *P. i.*, *A. a.* 菌数を選択培地プレートあるいは特異的プライマーを用いたリアルタイムPCRにより測定した。さらに口腔内の炎症状態を調べるため、唾液中の遊離ヘモグロビンを測定した。その結果、菌数に関しては、摂取2週間で唾液中の総菌数に占める各菌種の割合が、摂取前と比較してそれぞれ約1/2に減少していた。これは細菌叢の良質化を意味する。さらに、遊離ヘモグロビンは約1/7に減少することが確認され、炎症軽減効果も確認された。同時に実施したアンケートの結果では、「口の中のネバネバ感」、「口臭」において、改善したヒトの割合が増加し、自覚症状の改善も認められた。これらのことより、BF IgYは摂取することで歯周病リスクを低減し、口臭低減などの体感をもったオーラルケア素材であることが明らかとなった。

BF IgYを効果的に作用させるには、いかに長時間口腔内に成分を滞留させるかが重要である。しかしながら、滞留時間が延びるほど、味や臭いに関する問題も浮上する。卵臭いオーラルケア食品はなかなか受け入れがたい。味や臭いに関しては、卵黄粉末中のおよそ半分を占める脂質を除いた、脱脂卵黄粉末の形態で製品化することにより解決した。これにより香料など、その他食品原料の風味を損なうことなく配合することが可能となった(図5A)。現在、BF IgYは口腔内で徐放されることを特徴とする、タブレット、ガム、可食フィルム(口腔内に張り付けて使用する食品)などさまざまなオーラルケア食品での開発、商品化がなされている(図5B)。開発商品の拡大に伴いBF IgYの製造量も増えており、数百、数千羽のニワトリに免疫するための抗原(バイオフィルム)も大量に必要となる。実験室で何十枚ものシャーレを用いて歯周病原性細菌を複合培養するわけであるが、歯周病原性細菌は培養時に悪臭を放つ。この悪臭こそ口臭の実態であると開発メンバー全員が身をもって体感し、BF IgYが少しでも消費者の皆様の口臭軽減に寄与できればと願ってやまない。

オーラルケアが求められるのは単にヒトだけではない。ペットについても同じ悩みを抱える。特に日本で飼育されている約1,100万頭のイヌにおいては、2歳以上の80%が歯周病とされ、歯の喪失はもとより、歯周病症状の一つである口臭に関しては、悩みを抱える飼い主も少なくない。われわれは、BF IgYのドッグフードへの実用化を目的とし、動物病院と共同研究を行った。イヌにおける歯周病原性細菌の候補とされる、黒色色素産生細菌とBF IgYが交差反応を示すことを事前に確認した後、イヌ22匹を用い、1日あたり15 mgのBF IgY(脱脂卵黄粉末として)を2週間摂取させる試験を実施した。その結果、飼い主が体感できる程度の歯垢、口臭の減少効果が確認された。現在では、イヌ用ガムへBF IgYが配合されたイヌ用ガムが商品化されており、手軽にオーラルケアできると飼い主からの評価を得ている(図5B)。

おわりに

近年の研究より、歯周病原性細菌、あるいはその内毒素が血管内に入り、血管壁に付着することでアテロームを形成し、血流が悪くなり心筋梗塞や狭心症などにつながることや、歯周組織で産生されたサイトカインなどの炎症メディエーターが糖尿病や早産などに影響することなどが次々と報告されており、今や、歯周病は口腔内だ

けの問題と簡単に語るができない。まさに口は災い(全身疾患)の元である。このような新たな知見は、歯周病予防のニーズが今後ますます高まることを予期させる。本稿では歯周病原性細菌バイオフィルムを制御するための新たな試みとして、歯周病原性細菌の複合培養抗原を用いたIgYの開発例を紹介した。このBF IgYは、歯周病原性細菌の付着、バイオフィルム形成を特異的かつ効果的に抑止する能力があることから、従来の抗菌剤や殺菌剤では困難であった、口腔常在菌を傷つけず病原性細菌特異的に働く作用機序をもつという点では独創的なオーラルケア素材となりうる。引き続き、効果的なIgY作出において、バイオフィルム抗原中のどのような因子が寄与しているのかの解明を進める予定である。

IgY技術は、抗原の選定によりさまざまな抗体が作製可能であるため、その開発ターゲットは尽きるところがない。歯周病とともに口腔2大疾患と言われるう蝕(虫歯)も、バイオフィルム中の *Streptococcus* 属のう蝕原性菌(虫歯菌)が原因であり、IgYの格好のターゲットとなる。虫歯菌IgYに関しても、現在、製薬、食品メーカーに採用され実用化が進んでいる。さらに、本技術はオーラルケアにとどまることなく、日和見感染や耐性菌の出現などで医学的にも問題となっている、黄色ブドウ球菌や緑膿菌のバイオフィルム制御にも応用の可能性を秘めている。この点に関しては医薬品としての効果検証、製剤化など乗り越える課題も多く、今後さらなる研究が必要である。

抗体を食べるという概念は、まだまだ多くの人に浸透していない。BF IgYを配合したオーラルケア製品を世に出し、広く知ってもらい、かつ、歯周病リスクの低減に寄与することこそ、われわれの使命であると考えている。

付記：BF IgYの開発は農研機構生研センター民間実用化研究促進事業の採択課題として実施した。

文献

- 1) 厚生労働省：平成23年歯科疾患実態調査，(2011)。
- 2) J. K. Nicholson, E. Holmes, J. C. Lindon & I. D. Wilson : *Nat. Biotechnol.*, **22**, 1268 (2004)。
- 3) P. E. Kolenbrander, R. N. Andersen, D. S. Blehert, P. G. Egland, J. S. Foster & R. J. Palmer Jr. : *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **66**, 486 (2002)。
- 4) M. Malkinson : *Immunology*, **9**, 311 (1965)。
- 5) S. A. Kinder & S. C. Holt : *J. Bacteriol.*, **175**, 840 (1993)。
- 6) 佐藤冬彦, 伊井野貴史 : 抗体, 及び抗体を含む抗歯周病組成物, 日本国特許第4982629号, 2012。

プロフィール



山下 裕輔 (Yusuke YAMASHITA)
＜略歴＞ 2003年広島大学生物生産学部生物生産学科卒業／2008年同大学大学院生物圏科学研究科博士後期課程修了，博士（農学）／同年株式会社ファーマフーズ研究員／2010年同グループ長／2011年兵庫医科大学地域総合医療学非常勤講師を併任，現在に至る＜研究テーマと抱負＞病原微生物，ウイルスを制御する鶏卵抗体の研究開発と機能性食品への応用展開＜趣味＞うどん作り，ゴルフ，さんずいにとり



高田 和子 (Kazuko TAKADA)
＜略歴＞ 1973年東京薬科大学薬学部薬学科卒業／1982年米国アラバマ大学微生物学研究室研究員／1986年日本大学歯学博士／1994年ドイツマックスプランク研究所研究員／2006年日本大学助教授／2012年同大学教授（松戸歯学部口腔微生物学），現在に至る＜研究テーマと抱負＞口腔内病原菌がどのような変遷を経てヒトに伝播したのか，また，その主要病原因子の獲得過程などの解明＜趣味＞旅行，囲碁



金 武祚 (Mujo KIM)
＜略歴＞ 1970年朝鮮大学理学部生物化学学科卒業／同年京都大学農学部研究員／1979年同大学農学博士／1983年米国カリフォルニア大学バークレー校博士研究員／1998年韓国高麗大学生命工学院教授／1999年株式会社ファーマフーズ代表取締役社長，現在に至る＜研究テーマと抱負＞身近な食品，たとえば，たまご，バナナ，茶に含まれる生理機能＜趣味＞読書，散歩



平澤 正知 (Masatomo HIRASAWA)
＜略歴＞ 1971年日本大学歯学部歯学科卒業／1975年同大学大学院歯学研究科博士課程修了，歯学博士／1977年米国アラバマ大学客員助教授／1990年同大学客員准教授／2003年日本大学教授／2012年同大学名誉教授，現在に至る＜研究テーマと抱負＞天然素材による齲蝕および歯周病予防の研究ならびに齲蝕および歯周病原菌の系統発生＜趣味＞さんずいにとり，ドラクエ