

Vaccin mot parodontit – en framtida förebyggande åtgärd på 2000-talet?

G Rutger Persson

■ ■ ■ Cirka 10–15 % av den vuxna befolkningen är drabbad av parodontit, vilket gör att denna sjukdom förekommer mer frekvent än många systemsjukdomar. Moderna behandlingsmetoder är som regel tidsödande och dåligt förutsägbara. Den mikrobiologiska etiologin och identifieringen av några betydelsefulla patogena bakterier (*Porphyromonas gingivalis*, *Bacteroides forsythus* och *Actinobacillus actinomycetemcomitans*) samt inflytandet av externa faktorer är avgörande för om parodontit startar och progredierar. Effekterna av interna faktorer hos värdorganismen för sjukdomens svårighetsgrad är mindre väl kända, särskilt eventuella möjligheter hos ett vaccin att motverka parodontit.

Studier på makaker vid University of Washington, Seattle, USA, antyder att aktiv immunisering mot parodontit effektivt kan skydda mot försök att experimentellt framkalla parodontit. Data från vaccinerade djur och kontrolldjur visar att små mängder av etiologiskt betydelsefulla patogener är direkt korrelerade till höga antikropstitrar i serum. Även om fortsatta försök är nödvändiga framstår det som fullt möjligt att utveckla ett effektivt vaccin mot parodontit hos människa.

Nyckelord: immunitet, parodontit, vaccin

Författare

G Rutger Persson, DDS, Odont Dr, Professor vid Department of Periodontics och Department of Oral Medicine, Associate Director vid The Regional Clinical Dental Research Center, University of Washington, Seattle, WA 98195, USA.

Betydelsefulla framsteg inom parodontologisk forskning och dess kliniska tillämpning har resulterat i att det totala antal individer som drabbas av parodontit har minskat under de senaste decennierna. Trots dessa framsteg har åtminstone 10–15 % av den vuxna befolkningen parodontit. Denna slutsats baseras framför allt på epidemiologiska studier, av vilka endast två refereras här [1, 2].

Naturligtvis kan stora variationer föreligga mellan regioner och länder vilket delvis skulle kunna förklaras av skillnader i effektivitet hos olika vårdmodeller. Effektiv förebyggande vård har emellertid haft begränsad spridning och har inte nått alla befolkningsgrupper någonstans i världen.

Parodontit – en folksjukdom

I sitt större medicinska sammanhang är parodontit en sjukdom som är vanligare än flertalet andra systemsjukdomar. Därför är parodontit och behandlingen av parodontit alltså ett omfattande odontologiskt, medicinskt och socialt problem och kommer antagligen att vara så under lång tid framöver. Nuvarande förebyggande åtgärder är tidskrävande och vårdpersonalresurserna räcker oftast inte till. Fortfarande utgör icke-kirurgisk (deuration) och kirurgisk behandling i mer svårbehandlade fall de primära behandlingsformerna.

Behandlingen är tidskrävande och ofta smärtsam, framför allt i samband med det postoperativa förloppet. Ackumulerat över tid kan behandlingen dessutom bli kostsam. I många fall förekommer dessutom recidiv av sjukdomen med ytterligare vårdbehov som följd. Ökningen av antalet äldre individer i samhället gör det vidare sannolikt att de parodontala vårdbehoven kommer att öka.

Antibiotika i kombination med annan parodontal behandling har haft begränsad framgång. Biverkningseffekter, inklusive risken för resistensutveckling, utgör hinder för effektiv antibiotikabehandling av marginal parodontit i större skala. Försök har även gjorts med antiinflammatoriska medel men även här har effekten hittills visat sig vara varierande och oftast av ringa klinisk betydelse.

Tidigare vaccinstudier

Ett flertal av de medicinskt lyckade framstegen har varit relaterade till prevention mot infektionssjukdomar genom förebyggande vaccinering. Kunskapen om humoral immunitet och parodontit har dock varit begränsad. Detta har försvårat arbetet med att utveckla ett vaccin mot parodontit. Vaccinering kvarstår därför alltså som ett utforskat behandlingsområde med potential som framtida förebyggande insats mot parodontit.

Åtminstone fyra olika försök har gjorts med

vaccin mot parodontit. Man har även försökt att vaccinera genom injektion med patientens eget subgingivala plack. Ytterligare försök har gjorts med bakteriemixturer som inkluderar *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* och *Klebsiella pneumoniae* (Goldenbergs vaccin). Försök lär även pågå i Rumänien där *Staphylococcus aureus* används som aktiv vaccinkomponent. Arbeten pågår som kan leda till utveckling av DNA-baserade vacciner.

Syfte

Syftet med denna artikel är att belysa några av de framsteg som gjorts inom parodontologisk forskning i avsikt att kartlägga humoral immunitet och att, i ett långtidsperspektiv, utveckla ett funktionsdugligt vaccin mot parodontit.

Sjukdomsfaktorer vid parodontit

I huvudsak är det tre faktorer som relaterats till utvecklingen av marginal parodontit: *externa faktorer*, *mikrobiella etiologiska faktorer* och *interna värdorganismfaktorer*.

Externa faktorer

Till de externa faktorerna kan räknas sociala och psykologiska faktorer, inklusive stress, samt andra faktorer som kontrollerar vår självuppfattning om hälsa i allmänhet och attityder till vård i synnerhet [3]. Rökning intar här en särställning som en mycket väsentlig riskfaktor. Sambandet mellan försämrad immunitet och rökning är numera väl dokumenterat, bland annat är serumvärdena för speciellt antikroppar av undergruppen IgG2 reducerade hos rökare. Detta kan vara en av förklaringarna till varför rökare är särskilt utsatta för parodontala skador. Det tyder även på att immunfunktioner är betydelsefulla i samband med sjukdomen.

Mikrobiella etiologiska faktorer

Det är numera klarlagt att en grupp anaeroba gramnegativa bakterier är av mycket stor betydelse för utvecklingen av parodontit. Denna grupp inkluderar *Porphyromonas gingivalis*, *Bacteroides forsythus*, *Prevotella intermedia* och *Actinobacillus actinomycetemcomitans* [5, 6]. Särskilt *P. gingivalis* har identifierats som en betydelsefull mikrobiell faktor vid utvecklingen av destruktiv parodontit. Antagligen är *P. gingivalis* en väsentlig och tidig kolonisator som skapar förutsättningar för andra patogener att ingå i den biofilm av mikroorganismer som utvecklar en ekologisk nisch (subgingivalt plack). I åtminstone en djurexperimentell studie på apa (*Macaca fascicularis*) har man kommit nära Robert Kochs postulat – att bevisa sambandet

mellan en patogen bakterie och en sjukdom. Man har exempelvis kunnat påvisa att apor som aktivt blivit infekterade med *P. gingivalis* utvecklade destruktiv parodontit [7]. Ett direkt samband mellan svårighetsgraden hos parodontit och förekomsten av kombinationen *B. forsythus* och *P. gingivalis* i tandköttsfickor har även dokumenterats hos människa [8]. Den polymikrobiella infektionen vid parodontit leder antagligen till symbioseffekter mellan olika mikroorganismer där till slut närvarande bakterier och deras biprodukter blir värdorganismens immunförsvar övermäktigt.

Grundläggande för ett immunsvår är förmågan att identifiera individfrämmande ämnen, så som antigener, och skilja dessa från individegna ämnen. I huvudsak krävs vissa fysikaliska och biokemiska egenskaper hos ett antigen för att stimulera ett immunsvår. Aggregerade högmolekylära antigener ger vanligtvis upphov till kraftigare immunsvår. Vad gäller *P. gingivalis* så har ett flertal antigenfaktorer blivit identifierade. I huvudsak har man koncentrerat sig på att studera polysackarider (K-antigener), lipopolysackarider (LPS), och proteiner (fimbriae, fimbriin, Mr 53 kDa och Mr 67 kDa cellyteproteiner, samt cysteinproteaser). Problemet med polysackarider och LPS är att dessa antigener ger upphov till ett antikroppssvår som inte har tillräcklig minnesfunktion eller att dessa antigener inte är representerade hos samtliga gramnegativa patogener. Av alla de tänkbara antigenkomponenter som har studerats hos *P. gingivalis* är intresset för närvarande störst för två cysteinproteaser (gingipain KGP och RGP). Dessa enzymer svarar för huvuddelen av den trypsinliknande effekten hos *P. gingivalis* och leder till proteolytisk aktivitet, hemagglutination samt aktivering av koagulationsfaktorer. Cysteinproteaser kan även bryta ner extracellulärt matrix samt inhibera och degradera antikroppar.

Interna värdorganismfaktorer

Bland de interna värdorganismfaktorerna är det genetiska inflytandet av stor betydelse. För närvarande är kunskaperna om ärftliga faktorer för parodontit relativt små. Ny information tyder framför allt på att det finns ett antal immuninflammatoriska faktorer som styr det inflammatoriska svaret och att dessa faktorer är genetiskt betingade. Detta kan gälla särskilt för infektioner av gramnegativa anaeroba bakterier som t ex *P. gingivalis*, där framför allt bakterie-LPS sätter igång ett cellulärt inflammatoriskt svar som bryter ner bindväv, inklusive alveolärt ben. Genpolymorfism kan delvis förklara sådana reaktioner [9]. Genpolymorfism för interleukin-1 β , som hör till cytokinerna och som reglerar delar av det inflammatoriska svaret, har associerats med utvecklingen av parodontit

[10]. Interleukin-1 β förekommer i inflammerad bindväv och även i gingivalvätska [11]. Interleukin-1 β fungerar som en styrmekanism för produktionen av prostaglandin E2 (PGE2). Enzymet prostaglandin konverterar arakidonsyra i närvaro av bakterie-LPS till PGE2 som i sin tur stimulerar osteoklastaktivitet med bennedbrytning som slutresultat. Även produktionen av prostaglandin tycks vara genetiskt reglerad [12]. Försök som gjorts att använda antiinflammatoriska medel, t ex NSAID (non steroidal antiinflammatorisk drog; ibuprofen och liknande läkemedel), har inte givit entydiga resultat. För närvarande är det inte möjligt att genom genmanipulation ändra den genetiska koden hos individer som är bärare av sådana "riskgener" för att härigenon minska deras risk för parodontit.

Eventuellt kan sambandet mellan parodontit och andra systemsjukdomar, t ex hjärt-kärlsjukdomar, förklaras som en genetiskt störd hyperaktiv immunreaktion på en infektion av gramnegativa anaeroba bakterier med LPS-kapsel och aktivitet av proteasenzym. Sambandet mellan bakterie-LPS och stimulering av det inflammatoriska svaret är komplext och måste studeras ytterligare. Vaccinering, som mer eller mindre fullständigt leder till eliminering av bakterier, skulle kunna blockera interleukin-1 β och PGE2-aktivitet varvid nedbrytning av vävnaderna inte skulle kunna äga rum.

Humoral immunitet och parodontit

Humoral immunitet

Humorala antikroppar utvecklas som en slutprodukt i en händelsekedja mellan antigen och immunkompetenta lymfocyter och andra celler. Antikroppar bildas huvudsakligen i perifera lymfoida organ som mjälte och lymfkörtlar. I princip binds antigen till makrofager och det är i denna makrofagbundna form som antigenet stimulerar de immunkompetenta cellerna till att utveckla antikroppar. Humorala antikroppar har begränsad livslängd. De immunkompetenta cellerna har dock även förmågan att utveckla ett sekundärt eller ett anamnestiskt antikroppssvår. Olika typer av antikroppar utvecklas av olika immunkompetenta celler. IgG- och IgA-antikroppar utvecklas huvudsakligen av plasmaceller medan små lymfocyter utvecklar IgM-antikroppar. IgG-antikroppar har högre affinitet (binder bättre) till antigen än vad IgM-antikroppar gör medan IgM-antikroppar är betydelsefulla för immunologiska minnesfunktioner.

Sambandet mellan IgG-antikroppar i gingivalvätska och förekomsten av specifika bakterier har studerats [13]. Det visar sig att IgG-antikroppstitervärden i gingivalvätska och förekomsten av *P.*

gingivalis i samma tandköttsfickor är direktrelaterade. Studier av serum från patienter med parodontit har även visat att patienter utvecklar IgG-antikroppar i serum vilka reagerar med bakterieantigener och att dessa patienter oftast har högre ELISA-titervärden (ELISA=enzymlänkad immuno-sorbent assay) än vad som påträffas hos individer som inte har parodontit [14–18]. Samtidigt har andra studier visat att IgG-antikroppstitervärden i serum ökar efter depositionsbehandling. De högsta IgG-titervärdena i serum uppnås omkring två till fyra månader efter behandling. Förändringen är inte permanent; IgG-titervärdena i serum förefaller sjunka till nivåer uppmätta innan behandling startats. Detta inträffar efter cirka åtta till tolv månader [16]. Ett visst mått av humoral immunitet kan således uppnås genom passiv immunisering, däremot är minneseffekten av denna immunisering begränsad. Eftersom många patienter blir stödbehandlade med tre till fyra månaders intervall är det möjligt att IgG-titervärdena i serum till parodontala patogener trots allt kan hållas på en relativt hög nivå. Detta har tyvärr inte studerats men det förutsätter att de patogena bakterierna är närvarande i tandköttsfickorna för att vävnadsinokulation och bakteriemi ska inträffa.

I en studie av det humoral immunsvaret hos 36 individer med ”rapidly progressive periodontitis”, vilka behandlats med deputation, visade det sig att låga IgG-antikroppstitervärden i serum hos 24 individer innan behandling förbättrades medan motsvarande IgG-titervärden i serum hos 12 individer med ursprungligen höga IgG-titervärden i serum sjönk efter behandling. Studier av dessa individer tydde även på att antikroppsfunctionerna hos flertalet patienter förbättrades efter depositionsbehandling [17]. Förändringarna i titervärden tycks äga rum för såväl antigen i egenskap av sonikerade bakterier som för bakterie-LPS samt för specifika bakterieproteiner. Förklaringen till den observerade serumkonverteringen kan vara att deputation leder till en kortvarig bakteriemi som är tillräcklig för att ge en immunisering, dvs att seronegativa individer konverterar till att bli seropositiva. Såväl seronegativa individer som från innan behandling seropositiva individer utvecklar mer funktionsdugliga antikroppar efter deputation.

Andra studier har visat att IgG-antikroppstitervärden i serum i allmänhet sjunker efter depositionsbehandling samtidigt som förekomsten av parodontitpatogener också minskar [18, 19]. IgG-antikroppstitervärden i serum hos patienter med diabetes mellitus tycks däremot inte påverkas i samband med depositionsbehandling samtidigt som effekten av deputation på den parodontala mikrofloran är minimal eller tvärtom leder till förekomst av fler patogener efter behandling jäm-

fört med innan behandling [20]. Avsaknaden av serumantikroppeffekt efter deputation av insulinberoende patienter kan vara en indikation på varför diabetiker utvecklar grav parodontit, dvs de saknar eller har reducerad immunitet mot parodontitpatogener.

Tanken att upprepad depositionsbehandling inte bara avlägsnar subgingivalt plack mekaniskt utan även ska kunna fungera som en passiv vaccinationsmekanism som leder till uppbyggnad av immunkompetenta antikroppar mot parodontitpatogener är högst intressant, men det kräver ytterligare studier.

Humoral immunfaktorer och parodontit

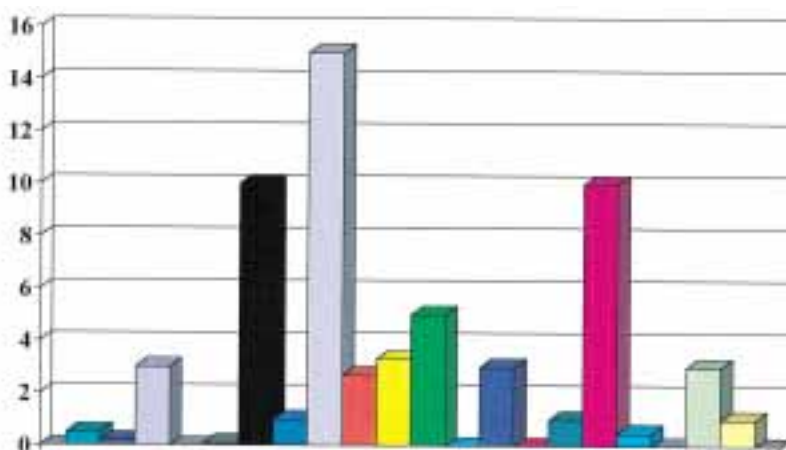
Infektioner lämnar som regel ett visst skydd mot upprepad infektion av samma patogen. Uppenbarligen fungerar inte denna mekanism för patienter med avancerad parodontit. Det är dock möjligt att de som drabbas av lokal juvenil parodontit utvecklar immunitet. Detta kan eventuellt förklara varför den lokala juvenila parodontiten ibland stannar upp efter några år även om behandling inte nödvändigtvis har genomförts.

Aktiv immunisering kan erhållas genom vaccinering. I princip är vaccinprofylax riktad mot en specifik patogen, som exempelvis fallet är vid vaccination mot tetanus. Ett av problemen vid parodontit är att parodontitinfektionen är av polymikrobiell natur, vilket också influerar på vår strävan att utveckla ett vaccin mot parodontit. För att vara effektivt måste därför ett vaccin utvecklas som stimulerar till antikroppsproduktion mot ett flertal antigener vilka representerar de olika patogener som är viktiga för utvecklingen av parodontit. Alternativet skulle vara att vaccinera specifikt mot en patogen, t ex *Porphyromonas gingivalis*. Detta skulle dock kräva att *P. gingivalis* spelar en nyckelroll vid utvecklingen av parodontit, vilket inte nödvändigtvis är fallet.

Frånsett BCG-vaccin (*Bacillus Calmette Guérin*) mot tuberkulos är levande bakterievacciner ovanliga. För att avdödat bakteriematerial ska fungera som antigen och stimulera antikroppsproduktion via cellföremadad immunitet behövs adjuvans av Freund's typ. Att utveckla vaccin mot parodontit baserat på levande bakterier är för närvarande inte aktuellt.

Sedan mitten av 1980-talet har olika forskargrupper dels studerat sambanden mellan förekomst av antikroppar mot parodontala bakterier och parodontit, dels sökt klarlägga effekterna av specifika antigener från bakteriecellväggar med eller utan kapslar [21, 22]. Med undantag för ett projekt [23] har erfarenheterna från en majoritet av hittills publicerade studier av det humoral inflammatoriska svaret pekat mot att antikroppar

Variation av *P gingivalis* (DNA-probe resultat) % av totala bakteriefloran



Figur 1. Procentuell andel (medelvärden) av *P gingivalis* hos var och en av 20 makaker (*Macaca fascicularis*) tydande på betydande variation i bakterieförekomsten (varje stapel representerar en individuell apa).

mot parodontitpatogener eller specifika antigener har en skyddande funktion. De djurmodeller som har använts för sådana försök inkluderar olika arter av apor och råtttdjur. Adekvata krav på en forskningsmodell innefattar att såväl den kliniska och histologiska bilden av parodontit som den mikrobiologiska etiologin är samma hos försöksdjursmodell och människa.

Ligaturinducerad parodontit hos makaker är antagligen den för närvarande bästa försöksdjursmodellen, trots att den har uppenbara nackdelar [24, 25]. Den subgingivala bakteriefloran hos dessa apor inkluderar de flesta av de patogener som finns hos människa [36]. Parodontit förekommer naturligt hos *Macaca fascicularis* även om grav parodontit är relativt ovanlig, gingivitis är däremot mycket vanlig. Bakteriefloren är karakteristisk för parodontit; hos apor med parodontit påträffas oftast en kombination av *Porphyromonas gingivalis*, *Bacteroides forsythus*, *Prevotella intermedia*, *Campylobacter rectus*, *Escherichia corrodens* och *Actinobacillus actinomycetemcomitans*.

Immunsvaret hos Makaker liknar immunsvaret hos människa. En annan fördel med dessa apor är att deras storlek gör det möjligt att använda rutinmässiga parodontala undersökningsmetoder. Bland nackdelarna kan nämnas att *Macaca fascicularis* måste hållas i karantän efter import och testas regelbundet eftersom risken för aids hos apa och andra virusjukdomar, inklusive ebolavirus och herpesvirus utgör betydande hot mot personal som arbetar med dessa försöksdjur. Dessutom måste *Macaca fascicularis* sederas innan det är möjligt att undersöka eller behandla dem oralt.

De etiska frågorna vid djurförsök utgör också del av problematiken kring försöksdjur i allmänhet.

Studier i avsikt att utveckla ett vaccin mot parodontit

Forskning vid University of Washington

En forskargrupp vid University of Washington, Seattle, USA, har sedan 1988 studerat humoral immunitet i samband med parodontit. Studierna som redovisas här sammanfattar de publicerade och icke publicerade resultat som hittills erhållits. Våra studier har varit begränsade till experimentell parodontit hos *Macaca fascicularis* samt till humanstudier i samband med analys av serum från patienter som genomgått parodontalbehandling. Forskningsanslag har erhållits från US Public Health Services (NIH/NIDCR, Washington DC). Samtliga studieprotokoll har i förväg godkänts av IRB (Internal Review Board) för humanstudier och av ACC (Animal Care Committee) för djurförsök vid University of Washington, Seattle, WA, USA.

Den första fråga som måste besvaras för att målet att utveckla ett vaccin mot marginal parodontit skulle kunna förverkligas var om antikroppar i serum mot parodontitpatogener skyddade mot parodontit eller tvärtom, eller om de var av underordnad betydelse. I åtminstone en tidigare publicerad djurstudie hade man påvisat att immunisering med kombinationen *P gingivalis* och *P intermedia* ledde till förhöjda antikroppstitrar men samtidigt också till mer avancerad parodontit [23]. Resultaten av denna studie gav oss anledning att utveckla ett vaccin mot enbart en patogen bakterietyp, nämligen *P gingivalis*, genom att utnyttja ett bakterieisolat hämtat från en parodontitinficerad *Macaca fascicularis* (Pg 5083). Dessutom fö-

reföll det lämpligt att använda formalinavdödad bakterie i kombination med adjuvans (SAF-M) för att stimulera T-cellaktivitet [26]. SAF-M-adjuvans hade tidigare använts i samband med utvecklingen av vaccin mot virusinducerad leukemi hos katt, herpes simplex samt vacciner mot influensavirus. Valet att använda formalinavdödad *P gingivalis* baserades på att det vid denna tidpunkt inte fanns någon kunskap om specifika ytantigener hos *P gingivalis*.

Den andra frågan – huruvida vaccinering med ett vaccin mot *P gingivalis* resulterar i eliminering av *P gingivalis* – var naturligtvis också viktig att besvara. Därför studerade vi mikrofloran hos makaker såväl före som efter vaccinering.

Detaljstudier av mikrofloran, kliniska förhållanden samt antikroppstitrar till *P gingivalis* genomfördes på 20 av aporna. Samtliga hade förekomst av *P gingivalis* medan 9 av 20 också hade *B forsythus*, *P intermedia*, *C rectus* samt *Fusobacterium nucleatum*. Förekomsten av *P gingivalis* varierade kraftigt inom ett och samma djur. Den procentuella medelvärdesförekomsten av *P gingivalis* från en kvadrant återges i figur 1. Ett samband mellan IgG-antikroppstitrar i serum mot *P gingivalis* och förekomsten av *P gingivalis* i bakterieproven konstaterades ($r = -0.54$; $p < 0,05$; Spearmans rangkorrelationstest), dvs högre antikroppstitrar påträffades samtidigt med låga andelar av *P gingivalis* i bakterieproven. Detta tyder på en naturligt förekommande skyddsfunktion hos *Macaca fascicularis* serumantikroppar mot *P gingivalis*.

Den experimentella modellen

Den experimentella modellen begränsades av att parodontit hos *Macaca fascicularis* är relativt ovanlig (< 5 %). För att identifiera och studera 20 djur skulle vi behövt söka bland 400 försöksdjur, vilket skulle ha varit praktiskt omöjligt. Förutsättningarna att identifiera ett antal apor för vaccin-studier med risk för parodontit försvårades dessutom av att diagnostiska test för att bestämma parodontitrisik i princip saknas. Därför valde vi att utnyttja modellen för ligaturinducerad parodontit [21, 23, 24]. Kravet som ställdes var dock att samtliga djur måste åtminstone ha nivåer av *P gingivalis* möjliga att upptäcka i subgingivala plackprov (DNA-probe) samt att försöksdjuren inte hade blivit antibiotikabehandlade under närmast föregående år. Dessutom måste deras naturliga IgG-antikroppstitrar variera mellan 10–25 ELISA-enheter för att vi skulle vara säkra på att försöksdjuren hade förmåga att svara på en infektion av *P gingivalis* med mätbar IgG-antikroppstitr.

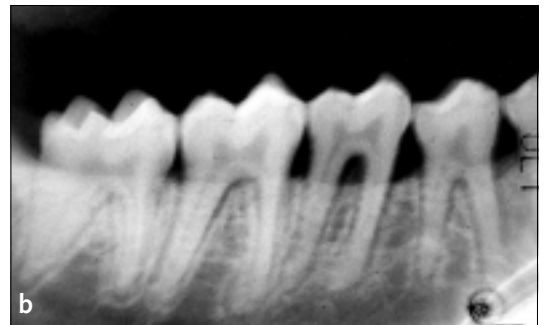
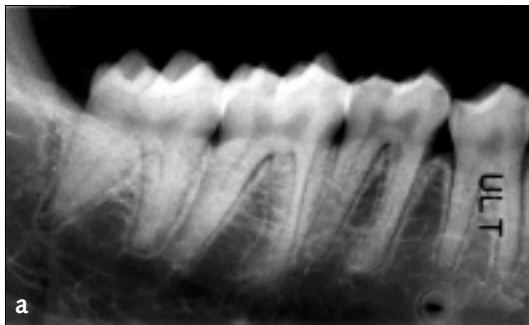
Tio av försöksdjuren vaccinerades med ett vaccin som innehöll formalinavdödad *P gingivalis* och SAF-M-adjuvans. Ytterligare 10 försöksdjur



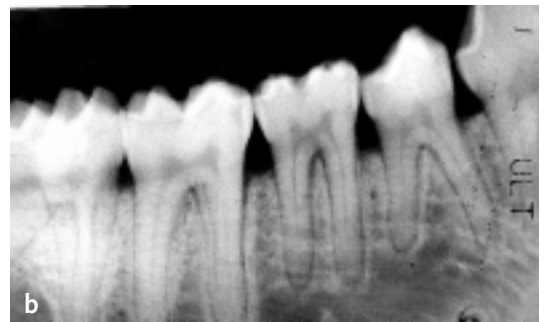
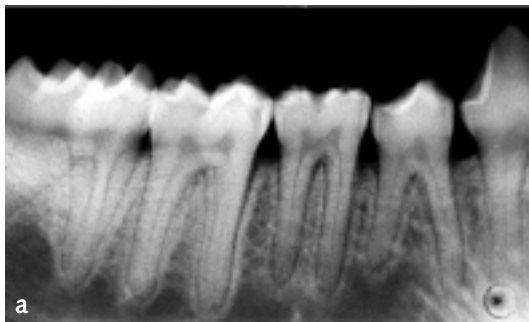
Figur 2a. Exempel på graden av gingival inflammation hos placebo-vaccinerad *Macaca fascicularis* (kontroll). Notera graden av gingival inflammation.

Figur 2b. Exempel på graden av gingival inflammation hos vaccinerad *Macaca fascicularis* (immuniserad). Trots att kliniskt betydande inflammation föreligger kan stor skillnad iaktas jämfört med figur 2a.

immuniserades med ett placebovaccin som enbart innehöll adjuvans. Injektionerna gavs såväl subkutant som intramuskulärt vid början av studien samt upprepades efter 3, 6 och 16 veckor. Vid försökstillfället efter 16 veckor placerades silkeligaturer runt andra och tredje premolarerna samt runt första molarerna i underkåken. Standardiserade intraorala röntgenbilder togs efter 16, 30 och 36 veckor. Ytterligare röntgenbilder togs efter 44 veckor i en liten grupp av 3 vaccinerade djur och 3 kontrolldjur. Röntgenbilderna analyserades för benförlust dels med hjälp av subtraktionsröntgen (CADIA), dels med konventionell benhöjdmätning mellan interproximal benkant och cement-emaljgränsen. Var fjärde vecka efter placeringen av ligaturer samlades gingivalvätska vid förutbe-



Figur 3a,b. Exempel på röntgenologiskt iakttagbar benförlust hos placebovaccinerad *Macaca fascicularis* (kontroll) efter 8 veckor av superinfektion och 28 veckors ligering. Jämförbara röntgenbilder från vecka 16 (a) och vecka 44 (b).



Figur 4a,b. Exempel på röntgenologiskt iakttagbar benförlust hos vaccinerad *Macaca fascicularis* (immuniserad). Notera skillnaden i alveolär benförlust jämfört med figur 3. Jämförbara röntgenbilder från vecka 16 (a) och vecka 44 (b) efter 28 veckors ligering och 8 veckor av superinfektion.

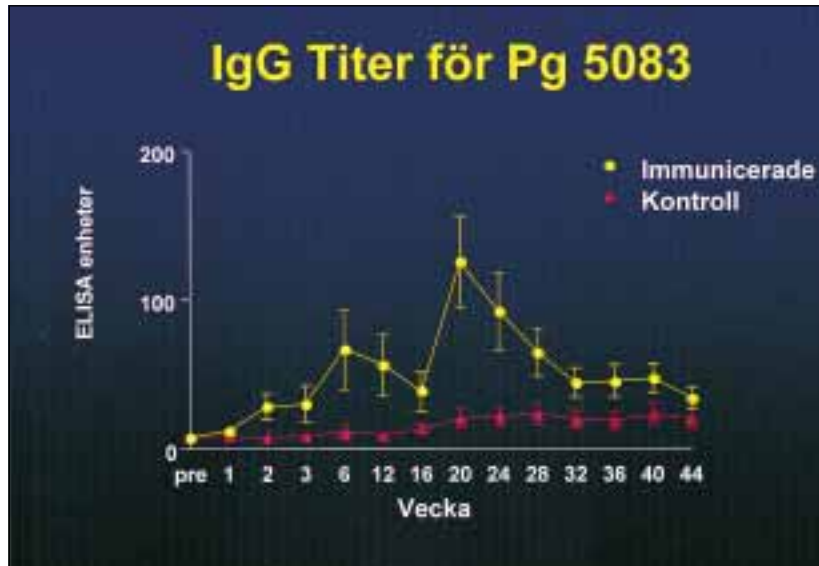
stämda tandtytor. Samtidigt togs bakterieprov, fickdjup samt plack- och gingivalindex. Kliniska mätningar för fickdjup och parodontal fästennivå genomfördes med hjälp av den tryckkänsliga Florida-ficksonden (0,25 N). Gingival- och plackindex registrerades enligt Løe och Silness (1963) respektive Silness och Løe (1964).

Inga biverkningar som skulle kunnat härledas till vaccineringen kunde iaktas hos försöksdjuren. För att ytterligare belysa effekten av immunisering utsattes 6 av försöksdjuren (3 i varje grupp) för aktiv inokulering med *P. gingivalis* efter 36 och 40 veckor. För dessa 6 försöksdjur avslutades studien efter 44 veckor då de också återfördes till huvudkolonin vid The Regional Primate Research Center, University of Washington, Seattle, WA, USA.

Den kliniska bilden

Två kliniska bilder från studiestart och från vecka 36 exemplifierar skillnaden i omfattningen av gingival inflammation mellan ett vaccinerat djur och ett kontrolldjur. De kliniska bilderna demonstrerar tydligt skillnaden i grad av inflammation vecka 36 (fig 2a,b). Blödning vid sondering förekom dock hos huvuddelen av samtliga, såväl vaccinerade djur som kontrolldjur. Röntgenbilder

från vecka 16 och 44 redovisas för ett vaccinerat djur och ett kontrolldjur och illustrerar skillnader i alveolär benförlust (fig 3a,b resp 4a,b). Skillnaden i benförlust var påtaglig men betydligt mer omfattande hos kontrolldjuren som behandlats med adjuvans. Enligt metoden för subtraktionsröntgen var skillnaden statistiskt signifikant vid försökstillfällena efter såväl 30 veckor ($p < 0,05$; t-test) som efter 36 veckor ($p < 0,02$; t-test). Eftersom röntgenanalysen betraktades som särskilt viktig genomfördes subtraktionsanalysen av röntgenbilderna vid University of Texas, San Antonio, USA. Direktmätning av benhöjdsskillnader visade att medelvärden för uppmätta benhöjdsskillnader hos vaccinerade djur och kontrolldjur var 0,4 mm respektive 0,8 mm ($p < 0,03$; t-test). I viss utsträckning svarar ligaturbehandlingen och det mekaniska traumat för benförlust hos såväl vaccinerade djur som kontrolldjur. Det är dock viktigt att komma ihåg att medelvärden för benförlust hos människa med obehandlad parodontit varierar omkring 0,1 till 0,3 mm per år. Längden hos *Macaca fascicularis* tandrötter är ungefär 70 % av rotlängden hos människa. En benförlust av 0,8 mm över den 5-månadersperiod som redovisas för kontrolldjuren är därför betydande.



Figur 5. Medelvärden för ELISA-enheter av IgG-antikroppstitrar i serum hos gruppen vaccinerade (immuniserade) och gruppen placebovaccinerade (kontroll) *Macaca fascicularis*.

Variationen i antikroppstitrar mellan de två grupperna vid olika tidpunkter illustreras i figur 5. Skillnaden i IgG-antikroppstitrar i serum mellan vaccinerade djur och kontroldjur var statistiskt signifikant för samtliga mätillfällen frånsett försöksstart. Det är noterbart att det högsta medelvärdet för antikroppstitern uppnåddes efter 6 veckor och att liknande titervärden uppnåddes efter 24 veckor (143 resp 137 ELISA-enheter). Medelvärdena för antikroppstitern planade ut vid omkring 60 ELISA-enheter eller ungefär 4 gånger högre värden än vid studiens start. Vad gäller skillnaderna i mängden *P. gingivalis* för olika tidpunkter mellan de två grupperna förelåg en icke signifikant trend mot lägre bakteriemängder i den vaccinerade gruppen medan mängden *P. gingivalis* föreföll att öka gradvis hos kontroldjuret [27]. Således resulterade inte vaccinering i att *P. gingivalis* eliminerades från tandköttssickorna. Kompletterande studier har även genomförts av antikropsaktivitet och olika immunglobulinklasser i serum [28].

Sammanfattningsvis kan sägas att förutom ökad IgG-antikroppstitrar, med högsta värden efter 6 veckor, inträffade en ökning av antikroppstitrar i serum även för IgM och IgA och med högsta värden vid samma tidpunkt som för IgG. En signifikant korrelation iaktogs mellan högsta titervärden för IgM och maximalt skydd mot benförlust ($p < 0,05$) medan motsvarande korrelation för IgG närmade sig signifikans ($p < 0,07$). Funktionsstudier av IgG- och IgM-antikroppar (kemoluminescens och opsonerande effekter i närvaro eller avsaknad av komplement) tyder på att huvuddelen av den opsonerande effekten finns hos IgG-titerfraktionen.

Eftersom vaccination inte eliminerade förekomsten av *P. gingivalis* tyder detta på att andra

funktioner än opsonerande egenskaper förklarar varför vaccinering ledde till ett bättre skydd mot benförlust hos de vaccinerade försöksdjuren.

Fortsatta studier vid University of Washington

Ett renframställt proteinvaccin

Ett renframställt proteinvaccin och effekter på prostaglandin E₂-produktionen kan eventuellt förklara effekten av vaccinering. Fortsatta studier har därför ägnats åt varierande bakterieproteiner från *P. gingivalis* (fimbriae, fimbrillin, Mr53 kDa- och Mr 67 kDa-proteiner). Dessa proteiner är inte lämpliga som vaccinkandidater eftersom de endast förekommer i bakterieisolat hos en del *P. gingivalis* och därför inte skulle fungera annat än i en vaccincocktail.

Studier av cysteinproteaserna KGP och RGP har i kaninförsök visat sig ge upphov till korsreaktiva antikropsreaktioner med kapacitet att binda samtliga serotyper av *P. gingivalis* (icke publicerade data). Studier har nyligen avslutats där 5 makaker (*Macaca fascicularis*) vaccinerades med ett renframställt vaccin av *P. gingivalis* cysteinproteas (porphypain-2) och enligt ovan beskrivna forskningsprotokoll. Antikroppstitrar vid de olika tidpunkterna för dessa 5 försöksdjur överensstämde väl med de resultat som redovisats ovan för vaccinet som innehöll hel bakterie (Pg 5083). Vi kunde även konstatera att det förelåg tendens till reduktion av den totala bakteriemängden och dessutom specifikt för *P. gingivalis* men även för *B. forsythus* och för *P. intermedia*. Det som är av speciellt intresse är att en reduktion av bakteriemängden inträffade även för *B. forsythus* och *P. intermedia*, trots att vaccinet framställdes från *P. gingivalis* cysteinprote-

as. Analys av röntgenbilderna från detta experiment tyder på skillnader i benförlust med omkring 1 mm under 20 veckors försöksperiod mellan *Macaca fascicularis* vaccinerade med porphy-pain-2 och motsvarande kontrolldjur, dvs något större skillnad än vad som redovisats ovan. Dessutom kunde vi konstatera att mängden PGE2 i gingivalvätskan från försöksdjur vaccinerade med porphy-pain-2 var signifikant lägre ($p < 0,03$). Sambandet mellan mindre benförlust och mindre mängd PGE2 var även det statistiskt säkerställt ($p < 0,01$). Resultaten från denna studie redovisades vid The 11th International Conference on Periodontal Research i Göteborg den 17–19 juni 1999.

Individens immunsvaret riktas mot egna serotyper hos människa

En serie av studier har även utförts på patienter där man studerat serum under olika betingelser, av vilka en del resultat redan beskrivits [14, 15, 19, 20]. Antigenvariation hos kliniska *P gingivalis*- och *B forsythus*-isolat har studerats från patienter med parodontitdiagnos. Dessa studier tyder klart på att individens immunsvaret i huvudsak riktas mot den egna serotypen av bakterie och inte mot bakterier från andra individer [29]. Däremot tyder studierna på att det finns kluster av bakterier som visar entydig IgG-bindningsprofil. Detta visar att tillräckligt lika proteinantigener finns representerade hos flertalet av de studerade bakterierna. Det är dessa proteiner som kan vara tänkbara som kandidater för ett "rent" vaccin. Vad gäller *B forsythus* finns antigenfaktorer framför allt representerade bland proteiner i 200 kDa-området [29]. Motsvarande resultat har uppnåtts vid studier av IgG-antikroppssvar mot *B forsythus*-isolat från äldre individer med antingen etablerad parodontit eller gingivit. Signifikant högre IgG-titrar i serum till vissa men inte samtliga av *B forsythus* kunde konstateras i parodontitgruppen [30]. Samtidigt kunde studierna identifiera individtypiska *B forsythus*-isolat som tycktes omfatta samma proteinsekvens inom 200 kDa-området.

Sammanfattning

- I Parodontit orsakas av en polymikrobiell infektion som utsätter individen för en utmaning med ett humoralt inflammatoriskt svar.
- II Det inflammatoriska svaret leder antingen till att individen drabbas av parodontit eller att gingivitsvaret inte progredierar till parodontit. Ett flertal studier har påvisat funktionsdugliga IgG-antikroppar mot *P gingivalis*-antigener i serum hos individer som är parodontalt friska medan parodontitdrabbade individer inte tycks utveckla ett funktionsdugligt immunsvaret.

III Depurationsbehandling förefaller kunna ge upphov till att patienter med parodontit serokonverterar och kan utveckla ett funktionsdugligt immunsvaret.

IV Vaccinationsstudier genomförda på *Macaca fascicularis* tyder på att aktiv immunisering, antingen med helcellsbakterie eller renframställt protein som vaccin, resulterar i ett funktionsdugligt immunsvaret. Renframställt vaccin (cysteinproteas) ger ett IgG-immunsvaret med korsreaktiva funktioner och skyddar mot infektion av flera olika typer av parodontitpatogener.

V Produktionen av prostaglandin E2 påverkas av vaccination vilket kan vara en av flera förklaringar till varför vaccinerade försöksdjur inte drabbas av samma mängd benförlust som icke vaccinerade försöksdjur.

Forskargruppen i Seattle har under hösten 1999 påbörjat ytterligare vaccinstudier i syfte att studera effekterna av vaccinering med hjälp av cysteinproteas som aktiv vaccinfaktor. Avsikten är att studera dels IgG-titersvaret i serum men även IgA-titersvaret i saliv. Modellen för studierna är densamma som beskrivits ovan [25, 27]. Under förutsättning att resultaten blir positiva kan nästa steg vara humana vaccinförsök. Särskilt individer som kan tänkas drabbas av tidiga och aggressiva former av parodontit kan då tänkas vara de primära vaccinkandidaterna. Först måste dock riskerna för biverkningar av vaccin studeras hos friska individer.

English summary

Vaccination against periodontitis – a preventive measure for the 21st century?

G Rutger Persson

Tandläkartidningen 2000; 92 (1): 28–38.

Approximately 10–15% of adults are affected by periodontitis, which makes this disease more prevalent than many systemic diseases. Current treatment methods are in general time consuming, not necessarily available to all, and are not always predictable. The microbiological etiology and the recognition of key pathogens (*Porphyromonas gingivalis*, *Bacteroides forsythus*, and *Actinobacillus actinomycetemcomitans*), and the influence of external factors are important for the initiation and progression of periodontitis. The effects of internal host factors on the induction and the severity of the disease and the possibilities of vaccinating against periodontitis are less well known. The purpose of this article is to provide information about what is known about humoral immune factors

and about bacterial antigen factors and the serum antibody responses both in the natural development of periodontitis, and from experimental vaccine studies in animals. Observations in humans and in animals have suggested that elevated serum antibody titres are protective against periodontal infection. The effect of non-surgical debridement can partly be explained as the result of a passive immunisation process and the result of antibody response to the bacteremia induced by mechanical instrumentation. Studies in non-human primates at the University of Washington, Seattle, USA, using formalin-killed whole cell *Porphyromonas gingivalis* plus an adjuvant, as well as work performed using a specific purified antigen (cysteine protease from *P gingivalis*), suggest that active immunisation can provide protection against experimentally induced periodontitis. Microbiological data from immunised and control animals show that low amounts of key pathogens are directly and significantly correlated to high serum antibody titres ($p < 0.05$). Although further studies are needed it appears feasible to develop a vaccine for human use against periodontitis.

Key words: periodontitis; vaccine, immunisation.

Referenser

- Norderyd O, Hugoson A. Risk of severe periodontal disease in a Swedish adult population. A cross-sectional study. *J Clin Periodontol* 1998; 28: 1022–28.
- US Public Health Service, National Institute of Dental Research. Oral health of United States adults: national findings. NIH publ no 87-2868. MD: NIDR.
- Persson RE, Persson GR, Kiyak AH. Periodontal effects of a biobehavioral prevention program. *J Clin Periodontol* 1998; 25: 322–9.
- Quinn SM, Zhang JB, Gunsolley JC, Schenkein JG, Schenkein HA, Tew JG. Influence of smoking and race on immunoglobulin G subclass concentrations in early-onset periodontitis patients. *Infect Immun* 1996; 64: 2500–7.
- Haffajee AD, Socransky SS, Dzink JL, Taubman MA, Ebersole JJ, Smith DJ. Clinical, microbiological and immunological features of subjects with destructive periodontal disease. *J Clin Periodontol* 1987; 58: 314–20.
- Socransky SS, Haffajee AD. The bacterial etiology of destructive periodontal disease: current concepts. *J Periodontol* 1992; 63: 322–31.
- Holt SCJ, Ebersole J, Felton J, Brunsvold M, Kornman KS. Implantation of *Bacteroides gingivalis* in non-human primates initiates progression of periodontitis. *Science* 1988; 239: 55–7.
- Zambon JJ, Grossi S, Dunford R, Haraszthy V, Preus H, Genco RJ. Epidemiology of subgingival bacterial pathogens in periodontal disease. In: Molecular pathogenesis of periodontal disease. Genco et al (eds). Washington DC: American Society of Microbiology, pp 3–12.
- Malo D, Skamene E. Genetic control of host resistance to infection. *Trends Genet* 1994; 10: 365–71.
- Kornman KS, Crane A, Wang HY, di Giovine FS, Newman KG, Pirk FW, Wilson TG, Higginsbottom FL, Duff GW. The interleukin-1 genotype as a severity factor in adult periodontal disease. *J Clin Periodontol* 1997; 24: 72–7.
- Masada M, Persson R, Kenney JS, Lee SW, Page RC, Allison AC. Measurement of interleukin-1 alpha and -1 beta in gingival crevicular fluid: implications for the pathogenesis of periodontal disease. *J Periodont Res* 1990; 25: 156–63.
- Wang S, Sun C, Gillanders E, Wang Y-F, Duffy D et al. Genome scan for susceptibility loci to the complex disorder early onset periodontitis. *J Hum Genet* 1996; 59: abstr 1386.
- Tew JG, Marshall DR, Moore WEC, Best AM, Palcanis UG, Ranney RR. Serum antibody reactive with predominant organisms in the subgingival flora of young adults with generalized severe periodontitis. *Infect Immun* 1985; 48: 303–11.
- Johnson V, Johnson BD, Sims TJ, Whitney CW, Moncla BJ, Engel LD, Page RC. Effects of treatment on antibody titer to *Porphyromonas gingivalis* in gingival crevicular fluid of patients with rapidly progressive periodontitis. *J Periodontol* 1993; 64: 559–65.
- Whitney C, Ant T, Moncla B, Johnson B, Page RC, Engel D. Serum immunoglobulin G antibody to *Porphyromonas gingivalis* in rapidly progressive periodontitis: titer, avidity, and subclass distribution. *Infect Immun* 1992; 60: 2194–200.
- Ebersole JL, Taubman MA, Smith DJ, Haffajee AD. Effect of subgingival scaling on systemic antibody responses to oral microorganisms. *Infect Immun* 1985; 48: 534–9.
- Chen HA, Johnson BD, Sims TJ, Darveau RP, Moncla BJ, Whitney CW, Engel D, Page RC. Humoral immune response to *Porphyromonas gingivalis* before and following therapy in rapidly progressive periodontitis patients. *J Periodontol* 1991; 62: 781–91.
- Aukhill I, Lopatin DE, Syed SA, Morrison EC, Kowalski CJ. The effects of periodontal therapy on serum antibody (IgG) levels to plaque microorganisms. *J Clin Periodontol* 1988; 15: 544–50.
- Horibe M, Watanabe H, Ishikawa I. Effect of periodontal treatments on serum IgG antibody titers against periodontopathic bacteria. *J Clin Periodontol* 1995; 22: 510–5.
- Smith GT, Greenbaum CJ, Johnson BD, Persson GR. Short-term responses to periodontal therapy in insulin-dependent diabetic patients. *J Periodontol* 1996; 67: 794–800.
- Holt SC, Brunsvold M, Jones A, Wood R, Ebersole JL. Cell envelope and cell wall immunization of *Macaca fascicularis*: effect on the progression of ligature-induced periodontitis. *Oral Microbiol Immunol* 1995; 10: 321–33.
- Choi JL, Schifferle RE, Yoshimura F, Kim BW. Capsular polysaccharide-fimbrial protein conjugate vaccine protects against *Porphyromonas gingivalis* infection in SCID mice reconstituted with human peripheral blood lymphocytes. *Infect Immun* 1998; 66: 391–3.
- Ebersole JL, Steffens MJ, Holt SC, Kornman KS. Effect of immunization with *Porphyromonas gingivalis* and *Prevotella intermedia* on disease progression in ligature-induced periodontitis in the non-human primate *Macaca fascicularis*. *Infect Immun* 1991; 59: 3351–9.
- Kornman KS, Holt SC, Robertson PB. The microbiology of ligature induced periodontitis in the cynomolgus monkey. *J Periodont Res* 1981; 16: 363–71.
- Persson GR, Engel LD, Whitney CW, Weinberg A, Moncla B, Darveau R, Houston L, Braham PH, Page RC. *Macaca fascicularis* as a model in which to assess

- the safety and efficacy of a vaccine for periodontitis. *Oral Microbiol Immunol* 1994; 9: 104–11.
26. Allison AC, Byars NE. An adjuvant formulation that selectively elicits the formation of antibodies of protective isotypes and of cell-mediated immunity. *J Immunol Methods* 1986; 95: 157–68.
 27. Persson GR, Engel D, Whitney C, Darveau R, Weinberg A, Brunsvold M, Page RC. Immunization against *Porphyromonas gingivalis* inhibits progression of experimental periodontitis in nonhuman primates. *Infect Immun* 1994; 62: 1026–31.
 28. Houston LS, Lukehart SA, Persson GR, Page RC. Function of anti-*Porphyromonas gingivalis* immunoglobulin classes in immunized *Macaca fascicularis*. *Oral Microbiol Immunol* 1999; 14: 86–91.
 29. Sims TJ, Ali RW, Brockman ES, Skaug N, Page RC. Antigenic variation in *Porphyromonas gingivalis* ribotypes recognized by serum immunoglobulin G of adult periodontitis patients. *Oral Microbiol Immunol* 1999; 14: 73–85.
 30. Schlegel-Bregenzer B, Persson RE, Lukehart S, Braham P, Oswald T, Persson GR. Clinical and microbiological findings in elderly subjects with gingivitis or periodontitis. *J Clin Periodontol* 1998; 25: 897–907.

Medarbetare i olika faser av vaccinprojektet vid University of Washington är Dr Roy C Page (projektledare), Dr Richard Darveau, Dr Sheila Lukehart, Dr Rutger Persson, Dr Tom Sims, Ms Laura Houston, Ms Pamela Braham, samt tidigare även Dr David Engel, Dr Bernard Moncla och Dr Aaron Weinberg.

Adress: G Rutger Persson, Periodontics, Box 357444, University of Washington, Seattle WA 98195, USA. rper@u.washington.edu