歯頸性歯周組織疾患患者の歯肉組織における *Fusobacterium* の局在性

竹 内 宏
たけ うち ひろし

大阪歯科大学 口腔病理学教室 (主任 筒井正弘教授)*

谷 明
たに あきら

大阪歯科大学 細菌学教室 (主任 佐川寛典教授)*

[受付 : 昭和46年7月5日]

緒 言

口腔内に常在する各種微生物が歯周組織疾患の発因や経過に重要な意義をもっていることは従来より歯垢材料中の細菌叢についての研究¹⁻⁷⁾やこれらの微生物の感受性に関する研究⁸⁻¹²⁾等から考察されてきた。

一方、歯周組織疾患の免疫学的あるいは免疫病理学的研究、とくに蛍光抗体法を応用した実験で歯肉組織にも immunoglobulin の存在すること¹³⁻²⁰⁾が確認されてきたし、また、*Bacteroides melanogenicus*²¹⁻²³⁾, *Staphylococcus aureus*²⁴⁻²⁷⁾, *Streptococcus pyogenes*²⁴⁻²⁷⁾, *Streptococcus salivarius*²⁴⁻²⁷⁾, *Streptococcus mitis*²⁸⁾, *Treponema microdentium*²⁹⁾等が局在することも確認されている。さらに、SCHNEIDER ら³⁰⁾はこの歯肉組織に存在する immunoglobulin とくに形質細胞の細胞質に口腔内のある種の菌体が親和性を示すことを報告し、歯肉組織内に存在する抗体の一部はこれらの微生物の抗原刺激によるものと考えられるようになった。

また、LISTGARTEN³¹⁾や JENSEN³²⁾の報告にもみられるように、Gram-negative bacteria の多くが lipopolysaccharide を産生しこれが抗原となり

得ることが知られているが、今回実験に供した *Fusobacterium* も混合感染症すなわち fusospirochetal infection³³⁻³⁷⁾の役を荷担していると共に、MERGENHAGEN ら³⁸⁾によって endotoxin の抽出もなされている。また、FERRIS³⁹⁾は *Fusobacterium polymorphum* の抗血清と炎症をともなう歯肉組織の抽出液とがタンニン酸処理赤血球凝集反応で反応することを報告しているが、*Fusobacterium polymorphum* の蛍光抗体液で炎症をともなう歯肉組織を検索した結果、それらの菌体や菌体成分あるいはその産生物をみい出すことはできなかったと述べている。

今回、筆者らがヒトの口腔内より分離した *Fusobacterium* の蛍光抗体液を作製し、歯頸性歯周組織疾患患者の歯肉組織50症例を染色し、本菌の菌体および菌体成分あるいはその産生物の検出頻度や局在性等について検索したところ、FERRIS³⁹⁾の報告とは若干異った知見を得たのでその結果を報告する。

実験材料と実験方法

1) *Fusobacterium* の分離・培養

Table 1 に略記しているように、ヒトの唾液を 1 : 1,000あるいは1 : 10,000になるように dilution

Cellular components of *Fusobacterium* in the inflamed human gingiva

H. TAKEUCHI (Department of Oral Pathology, Osaka Dental University) and A. TANI (Department of Microbiology, Osaka Dental University, Kyobashi, Higashi-ku, Osaka)

* 大阪市東区京橋 1-47 (〒540)

Jap. J. Oral Biol. 13 : 393-401, 1971.

Table 1 Preparation of *Fusobacterium*

Dilution saliva (dilution medium)
 ↓
 FM plate (isolation)
 ↓
 for 5 days within
 Brewer's anaerobic jar
 ↓
 Modified FM broth (multiplication)
 ↓
 for 5~14 days
 ↓
 Centrifugation
 ↓
 Freezed dry

Table 2 (FM dilution broth)

Bacto-casitone	15.0g
Bacto-yeast extract	5.0g
l-cystine	0.75g
Sodium chloride	2.5g

Dissolved in 1000ml. of distilled water
 adjust to pH. 7.2

Table 3 FM plate

Bacto-casitone	15.0 g
Bacto-yeast extract	5.0 g
Bacto-dextrose	5.0 g
l-cystine	0.75g
Starch	5.0 g
Sodium chloride	5.0 g
Crystal violet	0.01g
Bacto-agar	15.0 g

Dissolved in 1000 ml of distilled water
 adjust to pH 7.2

Table 4 modified F. M. broth

Casitone	15.0 g
Yeast extract	5.0 g
Dextrose	5.0 g
l-cystine	0.75g
Starch	5.0 g
Sodium chloride	5.0 g

Dissolved in 1000ml. of distilled water
 adjust to pH. 7.2

broth (Table 2) で希釈し、これを分離用培地 (Table 3) に混釈して Brewer anaerobic jar を用いた gas pack 法で 37°C 5 日間嫌気培養し分離した。なお、培養された菌の Fuchsin 染色では Fig. 1 のような形態を呈し、Table 4 のような生物学的性状を示した。

つぎにこれを増菌用培地 (Table 5) に移し、

Table 5 Biochemical reactions

test	reaction
Glucose	+
Maltose	+
Sucrose	+
Lactose	+
Mannitol	+
Inulin	+
Fructose	+
Raffinose	+
Litomas milk	-
Hydrogen sulfide	+
Nitrates	+
Indol	+
Geratin	-

Table 6 Preparation of antigen

Freeze-dried fusobacterium
 ↓
 Added to 5 vol of distilled water
 ↓
 Wet cells
 ↓
 Added to equal vol of distilled water
 ↓
 Cell suspension
 ↓
 Added to equal vol of freund incomplete
 adjuvant
 ↓
 Antigen

Table 7 Immunization schedule

injection	antigen volumes	location	interval of injection
1 st	1 ml	left hip	1 week
2 nd	1.5ml	right hip	1 week
3 rd	2 ml	left hip	1 week
4 th	2.5ml	right hip	

5 日間から 14 日間の培養を繰り返しながら増菌した。

2) 抗原の作製と免疫

凍結乾燥して保存しておいた *Fusobacterium* を 5 倍量の精製水に浮遊させ wet cell とし、さらにこれと等量の精製水を加えて cell suspension とした (Table 6)。つぎにこの cell suspension と等量の Freund の incomplete adjuvant (Difco) とをよく混じたものを Table 7 に示すような方法で家兎の大臀筋に初回 1.0ml, つぎに 1.5ml, 2.0 ml, 2.5ml と 1 週間毎に計 4 回筋肉内注射し、最終注射から 4 週間後に無麻酔下で頸動脈から全採

Table 8 Preparation of antigen

Freeze-dried <i>Fusobacterium</i>
↓ Added to 5 vol of distilled water
Wet cell
↓ Added to equal vol of distilled water
Cell suspension
↓ Ultra sonic digestion 200w. 20min.
Burst cell suspension
↓ Centrifuged at 500r.p.m. 20min.
Supernatant

Table 9 Preparation of fluorescein-labeled antiserum

Rabbit anti serum
↓ Fraction with 1/3 saturated ammonium sulfate
Crude globulin
↓ Dialysis with P.B.S.
Conjugation with fluorescein isothiocyanate
↓ Dialysis with P.B.S.
Elute with DEAE-cellulose chromatography

Table 10 Preparation of gingival biopsies

Human inflamed gingiva
↓
Fixation with 95% cold ethanol
↓ over night
Dehydration with anhydro cold ethanol
↓ over night
Clearing with xylene (3 times)
↓
Paraffin embedding
↓
Section (4 μ)

血し、OUCERLONY の double diffusion 法⁴⁰⁾で32倍の抗体価をもつ抗血清を得た (Fig. 2)。なお、本法に用いた可溶性抗原の作製法は Table 8 に示す通りである。

3) 蛍光抗体液の作製

Table 9 に示すように、MARSHALL ら⁴¹⁾の方法に準じて抗血清を $1/3$ 飽和硫酸法で分画し、得た crude globulin に fluorescein isothiocyanate を conjugate し、DEAE-cellulose column chromatography で非特異因子を除去した。

4) 被検材料

本学歯周病学講座で臨床的に P_2 、 P_3 と診断された歯頸性歯周疾患患者の切除歯肉50症例を切除後即座に95%の冷 ethanol に浸漬して一夜固定し、つぎに無水冷 ethanol でさらに一夜脱水した後、SAINTE-MARIE⁴²⁾の方法で硬 paraffin で包埋し、4 μ に薄切した (Table 10)。

なお、50症例のうち40症例はすでに TAKEUCHI ら²³⁾が報告した *Bacteroides melaninogenicus* の蛍光抗体染色に用いたものと同一症例である。

5) 染色と鏡検

通法により脱 paraffin した歯肉切片を pH 7.2 0.15M phosphate buffered saline でよく洗い、切片周囲の同 buffer を拭きとり、蛍光抗体液を切片上に滴下して染色した。つぎにこれを湿室に入れ室温で一夜染色した後、同 buffer で free の染色液を洗い流し glycerin buffer で封入した。また鏡検には Nikon SUR-Ke 型蛍光顕微鏡を使用した。

実験成績

以上のような方法で歯頸性歯周疾患患者の歯肉組織50症例中11症例に fluorescence positive の結果を得た。これらの特異蛍光を大別すると菌塊と多形核白血球および大食細胞の細胞質の蛍光の3つに分類できた。

菌塊の特異蛍光は内縁上皮組織の col 状の部分や壊死状態を示した内縁上皮組織直下の結合組織に局在し、Fig. 3 のような本菌の塗抹標本とはかなり異り、短桿状や顆粒状の集合塊として認められ、比較的弱い蛍光であった (Fig. 4)。この菌塊の周囲に多形核白血球や大食細胞の特異蛍光を認めた症例はほとんどなかった。

つぎに多形核白血球の細胞質の特異蛍光についてみるとすべて diffuse な蛍光を呈し、顆粒状の蛍光を示すものは認められなかったが、3症例においてかなり多くの多形核白血球が内縁上皮組織中に侵入して強い特異蛍光を発するものがあり (Fig. 5)、これらの各例を hemotoxylin eosin 染色で観察すると角化層が消失し上皮細胞が崩壊したり、細胞間隙が非常に離開しており、かなり強い壊死傾向を示していた。なお Fig. 6 は Fig. 5

Table 11 Localization of *Fusobacterium* in 50 cases of inflamed gingiva

positive case no.	Kinds of fluorescence			localization
	bacterial mass	P.M.N.Ls	macrophages	
1		+		a
2		≡	≡	a
10		≡	≡	b
11	+	+		a
12		≡		a ~ b
13	+			a
17	+			a
18			+	a
21		+		a ~ b
40	+			a
46	≡			a

Other cases were fluorescence negative

と同症例、同部位を拡大したもので特異蛍光を発する多形核白血球が小集団を形成した興味深い所見である。

また、多形核白血球の特異蛍光が結合組織で認められた症例のうち、深層部に認められたのはわずか1症例 (Fig. 7) で、他はすべて内縁上皮直下の結合組織に認められた。

大食細胞の細胞質の特異蛍光は、多形核白血球のように内縁上皮組織中には認められず、ほとんどがその直下の結合組織中に存在した。また、これらの細胞質の特異蛍光も多形核白血球と同様に diffuse なものが多く、顆粒状のものはほとんどなかった (Fig. 8)。

なお、Table 11, Fig. 9 は本蛍光抗体液による染色所見の検出頻度やその局在性を示したものである。

考 察

以上実験結果でも述べたように、50症例中11症例に本蛍光抗体液の染色で fluorescence positive の結果を得た。この結果は TAKEUCHI²³⁾が *Bacteroides melaninogenicus* の蛍光抗体液の染色で得た結果 (45症例中38症例) とはかなりの差があり、特異蛍光を発した多形核白血球や大食細胞も内縁上皮や内縁上皮と外縁上皮との移行部位近の結合

組織の比較的浅い層に局在し、*Bacteroides melaninogenicus* のそのように深い層にはほとんど認めることはできなかった。

一方、3症例において内縁上皮組織の中に比較的多数の多形核白血球の細胞質に特異蛍光を認めたが、このような症例ではその部の上皮組織が壊死状態に陥っており、SUSSMAN⁴³⁾の modified Brown and Brenn stain 等の染色方法を用いて歯肉組織を染色し菌体を染め出した実験でも、壊死を起した上皮組織や結合組織に種々の菌体を見出ししている。このことは、bacterial irritation を始めとする多くの刺激によって生じた壊死状態にある組織中には細菌が容易に侵入し得ることを示唆するものであり、当然これらが歯肉組織あるいはそれ以外の組織に抗原刺激を与えるだろうという推測がおこる。事実 EVANS⁴⁴⁾は *Veillonella* および *Fusobacterium polymorphum* の somatic antigen に対する抗体を証明しているし、ELLISON⁴⁵⁾は *Bacteroides* や *Fusobacterium* の oral strain に反応する沈降抗体を確認している。

緒言でも述べたように、MERGENHAGEN³⁸⁾や本間⁴⁶⁾が口腔内の Gram-negative bacteria から endotoxin を抽出し、これらが皮内接種で壊死作用を生じせしめると共に、発熱作用を有し、さらには有力な抗原物質であることを報告している。GUSTAFSSON⁴⁷⁾や MERGENHAGEN⁴⁸⁾等は歯肉組織中での免疫反応において endotoxin が抗原として重要な役割をもっていることに留意しており、RIZZO⁴⁹⁾は *Fusobacterium polymorphum* や *Salmonella enteritidis* 由来の endotoxin を注射して家兎の歯肉に local shwartzman reaction を惹起せしめると共に、この endotoxin を歯肉嚢内に place し、14時間後に同じ endotoxin を静脈内に注射した結果、歯肉嚢の上皮が健全な場合には直下の結合組織に変化は認められないが、潰瘍をともし歯肉嚢では抗原の吸収を示す強い変化のあることが認められたと述べている。

また、近年 inflammatory agent として complement の存在が注目され、antigen-antibody complex が C₁~C₉ の complement を consu-

mption するのはよく知られているが, endotoxin もまたこの complement を consumption することが MERGENHAGEN ら⁽⁴⁰⁾⁽⁵⁰⁾によって報告されている。

以上のように口腔内に常在する Gram-negative bacteria が細菌学的にも免疫病理学的にも歯頸性歯周疾患の成立機序の1つの鍵になると考えられ, 今回の *Fusobacterium* の蛍光抗体法での実験でも, 菌体や菌体成分あるいはその産生物が侵入する事実を確認することができた。

文 献

- 1) HEMMENS, E. S. and HARRISON, R. W.: Studies on the anaerobic bacterial flora of suppurative periodontitis. *J. infect. Dis.*, 70: 131-146, 1942.
- 2) KRASSE, B.: The proportional distribution of *S. salivarius* and other streptococci in various parts of the mouth. *Odont. Rev.*, 5: 203-211, 1954.
- 3) SOCRANSKY, S. S., GIBBONS, R. J., BORTNICK, D. L., et al.: The microbiota of the gingival crevice area of man. I. Total microscopic and viable counts and counts of specific organisms. *Arch. oral Biol.*, 18: 275-280, 1963.
- 4) SHARAWY, A. M., SABHARWAL, K., SOCRANSKY, S. S., et al.: A quantitative study of plaque and calculus formation in normal and periodontally involved mouths. *J. Periodont.*, 37: 495-501, 1966.
- 5) LOE, H., THELADE, E., JENSEN, S. B., et al.: Experimental gingivitis in man. III. The influence of antibiotics on gingival plaque development. *J. periodont. Res.*, 2: 282-289, 1967.
- 6) CARLSSON, J.: Presence of various types of non-haemolytic streptococci in dental plaque and in other sites of the oral cavity in man. *Odont. Rev.*, 18: 55-74, 1967.
- 7) STUTMAN, M. and GORDON, D. F., Jr.: Improved isolation of anaerobic bacteria from the human gingival crevice. *IADA Program and Abstracts of Papers*, No. 181, 1969.
- 8) BAER, P. N. and NEWTON, W. L.: Studies on periodontal disease in the mouse. III. The germfree mouse and its conventional control. *Oral Surg. oral Med. oral Path.*, 13: 1134-1144, 1960.
- 9) BAER, P. N., NEWTON, W. L. and WHITE, C. L.: Studies on periodontal disease in the mouse. VI. The older germfree mouse and its conventional control. *J. Periodont.* 35: 388-396, 1964.
- 10) KEYES, P. H. and JORDAN, H. V.: Periodontal lesions in the syrian hamster. III. Findings related to an infectious and transmissible component. *Arch. oral Biol.*, 9: 377-400, 1964.
- 11) JORDAN, H. V. and KEYES, P. H.: Aerobic, gram-positive, filamentous bacteria as etiologic agents of experimental periodontal disease in hamsters. *Arch. oral Biol.*, 9: 401-414, 1964.
- 12) DICK, D. S. and SHAW, J. R.: The infectious and transmissible nature of the periodontal syndrome of the rice rat. *Arch. oral Biol.*, 11: 1095-1108, 1966.
- 13) ZWEMER, J. B., MENG, H. M. and NUTTER, R. L.: The immunohistochemical localization of plasma proteins in human gingivae. *J. dent. Res.*, 38: 844, 1959.
- 14) TOTO, P. D., POLLOCK, R. J. and GARGIULO, A. W.: Pathogenesis of periodontitis. *Periodontics*, 2: 191-291, 1964.
- 15) BILLEN, J. R., GRIFFIN, J. W. and WARDRON, C. A.: Investigation for pyronin bodies and fluorescent antibody in 5:5 diphenylhydrazine gingival hyperplasia. *Oral Surg. oral Med. oral Path.*, 18: 773-784,
- 16) COWLEY, G. C.: Immunofluorescence studies in relation to gingival inflammation. *J. dent. Res.*, 44: 1182, 1965.
- 17) BRANDTZAEG, P. and KRAUS, F. W.: Autoimmunity and periodontal disease. *Odont. Tidskr.*, 73: 281-393, 1965.
- 18) BRANDTZAEG, P.: Local factors of resistance in the gingival area. *J. periodont. Res.*, 1: 19-42, 1966.
- 19) HAZEN, S., BEUTNER, E. H. and TRIFTSHAUSER, C.: Correlation of tissue collagenase activity, inflammation and gamma-globulin localization in gingival tissue. *Int. Ass. dent. Res. Abst.* 44 Gen. Meeting, 120, 1966.
- 20) THONARD, J. C., CROSBY, R. C. and DALBOW, M. H.: Detection of IgA immunoglobulins in diseased human periodontal tissue. *ibid.*, 120, 1966.
- 21) COURANT, P. D. and BADER, H.: Bacteroides melaninogenicus and its products in the gingiva of man. *Periodontics*, 4: 131-136, 1966.
- 22) 竹内 宏: 蛍光抗体法による歯頸性歯周組織疾患の免疫病理学的研究—ラットの歯肉に注射された *Bacteroides melaninogenicus* の動態と歯肉組織の反応性—. 歯科医学, 33: 386-404,

- 1970.
- 23) TAKEUCHI, H., KOMEDA, S., TSUBAKIMOTO, K., et al.: Cellular components of *Bacteroides melaninogenicus* in the inflamed human gingiva. *J. Osaka dent. Univ.*, 4: 123-130, 1970.
 - 24) 椿本九美夫: 螢光抗体法による歯頸性歯周組織疾患の免疫病理学的研究, とくに歯槽膿漏症患者の歯肉における staphylococcus および streptococcus 抗原の局在性について (1). 歯科医学, 30: 588-601, 1967.
 - 25) 椿本九美夫: 螢光抗体法による歯頸性歯周組織疾患の免疫病理学的研究, (2) とくに歯槽膿漏症患者の歯肉における staphylococcus および streptococcus 抗原の局在性について. 歯科医学, 31: 327-353, 1968.
 - 26) TSUTSUI, M., UTSUMI, N. and TSUBAKIMOTO, K.: Immunohistochemical localization of staphylococcal and streptococcal antigen in inflamed human gingiva. *J. Osaka dent. Univ.*, 1: 65-72, 1967.
 - 27) TSUTSUI, M., UTSUMI, N. and TSUBAKIMOTO, K.: Cellular components of staphylococci and streptococci inflamed human gingiva. *J. dent. Res.*, 47: 663, 1968.
 - 28) WITTWER, J. W., TOTO, P. D. and DICKER, E. H.: Streptococcus mitis antigen in inflamed gingiva. *J. Periodont.*, 40: 639-640, 1969.
 - 29) 北野繁雄: Treponema microdentium の免疫学的研究. 歯科医学, 29: 487-517, 1966.
 - 30) SCHNEIDER, T. F., TOTO, P. D., GARGIULO, A. W. et al.: Specific bacterial antibodies in the inflamed human gingiva. *Periodontics*, 4: 53-57, 1966.
 - 31) LISTGARTEN, M. A.: Electron microscopic observations on the bacterial flora of acute necrotizing gingivitis. *J. Periodont.*, 36: 328-339, 1965.
 - 32) JENSEN, S. B., THEILADE, E. and JENSEN, J. S.: Influence of oral bacterial endotoxin on cell migration and phagocytic activity. *J. periodont. Res.*, 1: 129-140, 1966.
 - 33) ROSEBURY, T. and FOLEY, G.: Experimental vincent's infection. *JADA*, 26: 1798-1811, 1939.
 - 34) ROSEBURY, T., CLARK, A. R., ENGEL, S. G., et al.: Studies of fusospirochetal infection. I Pathogenicity for guinea pigs of individual and combined cultures of spirochetes and other anaerobic bacteria derived from the human mouth. *J. infect. Dis.*, 87: 217-225, 1950.
 - 35) ROSEBURY, T., CLARK, A. R., TERGIS, F.: Studies of fusospirochetal infection. II Analysis and attempted quantitative recombination of the flora of fusospirochetal infection after repeated guinea pig passage. *J. infect. Dis.*, 87: 226-233, 1950.
 - 36) MACDONALD, J. B., SUTTON, R. M. and KNOLL, M. L.: The production of fusospirochetal infections in guinea pigs with recombined pure cultures. *J. infect. Dis.*, 95: 275-284, 1954.
 - 37) MACDONALD, J. B., SUTTON, R. M., KNOLL, M. L., et al.: The pathogenic components of an experimental fusospirochetal infection. *J. infect. Dis.*, 98: 15-20, 1956.
 - 38) MERGENHAGEN, S. E., HAMPP, E. G. and SCHERP, H. W.: Preparation and biological activities of endotoxins from oral bacteria. *J. infect. Dis.*, 108: 304-310, 1961.
 - 39) FERRIS, R. T.: Immunological properties of human gingiva. *J. periodont. Res.*, (Suppl. 4): 16-17, 1969.
 - 40) OUCHTERLONY, O.: *Handbook of Immuno-diffusion and Immunelectrophoresis*, 2nd ed., 1-59, Ann Arbor Science Publishers, Ann Arbor, 1968.
 - 41) MARSHALL, J. D., EVELEND, W. C. and SMITH, C. W.: Superiority of fluorescein isothiocyanate (Riggs) for fluorescent antibody technique with a modification of its application. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, 98: 898-900, 1958.
 - 42) SAINTE-MARIE, G.: A paraffin embedding technique for studies employing immunofluorescence. *J. Histochem. Cytochem.*, 10: 250-256, 1962.
 - 43) SUSSMAN, H. I., BARTELS, H. A. and STAHL, S. S.: The potential of microorganisms to invade the lamina propria of human gingival tissues. *J. Periodont.*, 40: 210-215, 1970.
 - 44) EVANS, R. T., SPAETH, S. and MERGENHAGEN, S. E.: Bactericidal antibody in mammalian serum to obligatorily anaerobic gram-negative bacteria. *J. Immunol.*, 97: 112-119, 1966.
 - 45) ELLISON, S. A. and MASHIMO, P.: Antibody response in fusospirochetal infections. *IADR Program and Abstracts of Papers*, No. 265, 1968.
 - 46) 本間 孝: Bacteroides melaninogenicus の内毒素に関する研究. 歯科学報, 69: 1506-1521, 1969.
 - 47) GUSTAFSSON, G. T.: Hypersensitivity mechanisms in bacterial inflammation with special reference to periodontal disease. *Acta Pathol. Microbiol. Scand.*, (Suppl 196): 1-45, 1968.

- 48) MERGENHAGEN, S. E., TEMPEL, T. R. and SNYBERMAN, P. : Immunologic reaction and periodontal inflammation. *J. dent. Res.*, 49 : 256-261, 1970.
- 49) RIZZO, A. A. : Absorption of bacterial endotoxin into rabbit gingival pocket tissue. *Periodontics*, 6 : 65-70, 1968.
- 50) MERGENHAGEN, S. E. : Complment as a mediator of inflammation. Formation of biologically-active products after interaction of serum complement with endotoxins and antigen-antibody complexes. *J. Periodont.*, 41 : 202-204, 1970.

Fig. 1 Smear specimen of *Fusobacterium* stained with fuchsin.

Fig. 2 Double diffusion pattern of anti *Fusobacterium*.

Fig. 3 Smear specimen of *Fusobacterium* stained with fluorescein-labeled anti *Fusobacterium* (Orig. mag. $\times 1000$)

Fig. 4 Staining with fluorescein-labeled anti *Fusobacterium* serum. Specific fluorescence in a bacterial mass (Orig. mag. $\times 400$)

Fig. 5 Staining with fluorescein-labeled anti *Fusobacterium* serum. Specific fluorescence in the cytoplasm of polymorphonuclear leucocytes in epithelial tissue (Orig. mag. $\times 200$)

Fig. 6 High power magnification of Fig. 5 (Orig. mag. $\times 400$)

Fig. 7 Staining with fluorescein-labeled anti *Fusobacterium* serum.

Specific fluorescence in the cytoplasm of polymorphonuclear leucocytes in the deep layer of connective tissue (Orig. mag. $\times 200$)

Fig. 8 Staining with fluorescein-labeled anti *Fusobacterium* serum.

Specific fluorescence in the cytoplasm of macrophages (Orig. mag. $\times 400$)

Fig. 9