歯周病の受動免疫療法の開発

—組換え ScFv 抗体, ヒト型抗体の作製—

安孫子宜光*

mini review

JAPANESE JOURNAL OF INFLAMMATION

Development of passive immunization against periodontal disease : Preparations of recombinant ScFv and human type antibodies

The use of immunoglobulin for human *in vivo* treatment has been limited to a great extent by the patient's immune response to non-human antibodies in immunotherapy. Since it is hard to accept the idea in public society that periodontal diseases cause death in humans, the development of safe antibodies in passive immunization is required. Several methods have been developed for the production of safe antibodies such as recombinant single chain Fv (ScFv) and human type antibodies. *Porphyromonas gingivalis*, a Gram-negative anaerobe, appears to be one of the most virulent microorganisms in relation to adult periodontitis. Coaggregation and hemagglutinin factors are important virulent factors in colonization on host tissues. This paper briefly introduces here the methods for preparation of safe immunoglobulins and summarizes our own attempts in preparations of ScFv and human type antibodies which are capable to inhibit the activities of coaggregation and hemagglutinin of *P. gingivalis*.

Rec. 3/13/1988, Acc. 4/16/1998, pp 425~432

Yoshimitsu Abiko

key words : passive immunization, ScFv antibody, human type antibody, periodontal disease

齲蝕と歯周病が歯の喪失原因の多くを占めているが、40歳代以上になると歯周病が喪失原因の第1位となる。特に高齢者にとって食べることは栄養摂取の問題のみならず生きるうえでの楽しみ、基本的欲求の一つであり、高齢者のQOL実現に不可欠な口腔の健康保持が歯周病に脅かされている¹⁾。

歯周病には種々の病型が存在するが、病巣である歯周ポケット細菌叢の研究結果から、各病型の発症に特異的な嫌気性細菌が関与するという歯周

病型-特異病原菌説が提唱されている²⁾。ヒトの歯周病でもっとも多い型は成人性歯周炎であり、主要病原菌として *Porphyromonas gingivalis* (*P. g*) が注目されている。事実、本菌のサル感染実験によって歯周炎を発症することが報告されている³⁾。本菌を標的とした能動免疫療法による歯周病ワクチンの動物実験が行われており、菌体ワクチンによりサル⁴⁾、マウス⁵⁾で効果が認められている。さらに、線毛を利用したコンポーネントワクチンでもラットに対して効果が報告されている^{6,7)}。

能動免疫は、効果的に生体の免疫応答を誘導維持し、感染防御機構を発揮することができる。しかしながら、致死性の感染症に対して周到に準備され安全性が確かめられたはずのワクチンでもま

* Department of Biochemistry, Nihon University School of Dentistry at Matsudo 日本大学松戸歯学部生化学教室

Offprint requests to : Yoshimitsu Abiko, Department of Biochemistry, Nihon University School of Dentistry at Matsudo, 2-870-1 Sakae-cho Nishi, Matsudo, chiba 271-8587, Japan

れに生体に危険な免疫応答を引き起こし、重篤な転帰をきたすことが知られている。歯周病は一般に直接生命を奪う疾患であるとは認知されておらず、能動免疫による歯周病ワクチンのヒトへの実用化は現在の社会的背景を考慮すると非常に困難であると思われる。一方、抗血清や精製抗体を用いる受動免疫療法は感染菌の病原因子を中和することが可能であり、歯周病の初期感染病巣が歯周ポケットという粘膜下でない外部環境であることを考慮すると安全性は高いと考えられる。

一般に開発されている受動免疫療法用抗体は、動物抗血清やマウスモノクローナル抗体(MAb)が多い。動物抗体分子はヒトにとって“異物”であり、人体への動物抗体の反復投与はヒト抗動物抗体を誘導してしまう。その結果、抗体活性の減衰や血中半減期の短縮化を引き起こしたり、アレルギー反応を惹起して、いわゆる血清病を引き起こしてしまう。したがって、致死性疾患と受け取られていない歯周病の受動免疫療法のヒトへの実用化は、特に絶対的な安全を保証する必要がある。歯周病の受動免疫療法の実用化に向けて標的としては、細菌感染の第一歩である歯周組織への付着・定着因子を抑制するのがもっとも効果的であると考えられる。

本稿では、安全性の高い組換え抗体およびヒト型抗体の作製法および *P. g* の定着因子である赤血球凝集因子・共凝集因子活性を抑制できる受動免疫用抗体の作製について紹介したい。

組換えキメラ抗体

標的抗原を認識するマウス MAb を作出し、ハイブリドーマから mRNA を分離精製後、逆転写酵素により cDNA を合成する。この cDNA を鋳型に H 鎖と L 鎖の可変部位である Fv 遺伝子領域を PCR 法で増幅する。つぎに増幅した H 鎖と L 鎖の cDNA 間にスパーサーペプチド (Gly₄Ser)₃ のリンカー DNA を連結する。再度 PCR 法を行い、phagemid ベクターを用いた遺伝子クローニングを行い、phage 外被蛋白質との融合蛋白質として発現させる。つぎに抗原結合能をもつ phage クローンをパンニングし、プラスミドクローンに

変換させる。近年、マウス抗体遺伝子の combination phage library も開発されており、この場合は、抗原 affinity column やパンニング法によって遺伝子クローンをスクリーニングし、phage クローン DNA を鋳型に同様の操作によって Fv-cDNA を増幅する⁸⁾。

この single chain Fv (ScFv) 抗体は、エピトープに結合して病原因子を中和することができるが、さらに抗体依存性細胞媒介性細胞障害 (antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity, ADCC) 活性や補体依存性抗体媒介性細胞障害、complement-dependent antibody-mediated cytotoxicity, CDAMC) 活性を期待するには、ヒトの定常部位遺伝子の発現ベクターに組み込みヒト型化する⁹⁾。Fv がマウス由来ではヒト抗体の産生が惹起されるので、反復投与によって血清病などの発症も危惧されるが、Fv 超可変部位である 3 カ所の相補性決定領域 (complementarity determining region, CDR) を残してヒト Fv 領域と置換した CDR-grafted 抗体も開発されている¹⁰⁾(図 1)。

EBV 感染による B 細胞株の樹立

EB ウイルス (Epstein-Barr virus, EBV) をリンパ球に感染させると潜伏感染状態になり不死化させることができる。この無限増殖性トランスフォーム能の特性を利用して特定抗原に対する B 細胞株の樹立を行い、大量培養することでヒト型 MAb を回収することができる¹¹⁾。しかしながら、実際には目的とするヒト末梢血の B 細胞クローンをスクリーニングできる確率は低く、効率をあげるためにはヒトに対して標的抗原を感作すればよいが、倫理上受け容れられない。また、多くの成人が EBV に感染して EBV に対する抗体を産生しているので、EBV 抗原を発現している感染 B 細胞はキラー T 細胞によって障害を受けてしまう¹²⁾。

これらの問題点を解決するために、免疫不全の SCID (severe combined immunodeficient) マウスを利用してヒトの免疫応答を再現する方法が考案されている¹³⁾。まず SCID マウスにヒト末梢血

図 1 組換え ScFv 抗体の作製

図2 B細胞のEBV感染によるヒト型MAbの作製

リンパ球を移植して生着させた後、標的抗原を免疫して特異B細胞の増殖を誘導する。この移植実験の過程でSCIDマウスのNK細胞がヒト末梢血リンパ球の生着を抑制するので、抗NK細胞抗体や放射線照射によってNK細胞活性を抑制しておく方法が行われている。EBV感染で不死化させたB細胞を標的抗原でパニングしてクローン化し、増殖させて培養液からヒト型MAbを回収する(図2)。

トランスジェニックマウスを応用したヒト型MAbの作製

ヒト型MAbを産生するトランスジェニックマ

ウスの開発が進められている。基本的にはマウス抗体遺伝子ノックアウトマウスをつくり、ヒトの抗体遺伝子を酵母のYACベクターを用いてマウスに導入してトランスジェニックマウスを作製する。得られたマウスを交配させて巨大なヒト抗体遺伝子をマウス内で発現させる。

Greenら¹⁴⁾は、H鎖遺伝子を含む染色体DNA部分を未分化なマウス胚細胞に導入し、受精させた。産まれた仔マウスはヒトH鎖とマウスL鎖をもつようになる。同様の操作をL鎖でも行い、交配することでヒトのH鎖L鎖をもつマウスができる。このトランスジェニックマウスに標的抗原を免疫し、通法のマウスMAbを作製する手順を行えば、ヒト型MAbの量産が可能となる。そして、実際にこのトランスジェニックマウスのtetanus toxin Cを免疫しヒト型抗体の産生を確認している。

P. g 赤血球凝集因子活性を抑制するScFv抗体

P. gは、他の菌周ポケット内細菌にくらべ強い上皮細胞付着能を有し、さらに強い赤血球凝集能を合わせもつことから、本菌の付着因子として赤血球凝集因子が注目されている。P. gは菌体外に外膜由来の小胞vesicleを形成する。このvesicleは、外膜と同じLPS、プロテアーゼ、赤血球凝集因子、共凝集因子をもつ。

筆者らは、P. gが放出するvesicleに強い赤血球凝集活性が存在することから、vesicleを抗原としてマウスMAbの作製を試み、赤血球凝集活性を著明に抑制するMAbの作出に成功した。P. gの赤血球凝集物質については、線毛成分、43, 49 kDa赤血球凝集因子、複数のプロテアーゼ活性をもつ赤血球凝集因子などが報告されている¹⁵⁾。このMAbはP. g菌体の43, 49 kDaのバンドを強く認識し、Moutonらの43, 49 kDa赤血球凝集因子¹⁶⁾と類似したパターンを示し、かつP. g vesicleの赤血球凝集活性を強く抑制した。

そこで、ハイブリドーマmRNAからRT-PCR法によりVH, VL遺伝子を増幅し、リンカーDNAを結合したプラスミドクローンを作製した。得られたE. coliクローンは、約31 kDaの

図 3 マウス MAb, 43, 49 kDa 赤血球凝集因子に対する抗体, ScFv 抗体の Western blot 分析

P. g 菌体に対して, ① Mouton ら¹⁶⁾から供与された抗赤血球凝集因子抗体, ② 筆者らの *P. g* vesicle の赤血球凝集活性を阻害するマウス MAb, ③ ScFv 抗体, で Western blot 分析を行った。

ScFv 蛋白質を periplasm に分泌しており, E-tag 抗体 affinity column で精製後, *P. g* 菌体に対して Western blot 分析したところ, マウス MAb と同様に 43, 49 kDa バンドを認識し, かつ *P. g* vesicle の赤血球凝集活性を阻害した。この Fv 遺伝子の塩基配列から, アミノ酸配列を推定した結果, gene family は, H鎖が VH1, L鎖が V κ 12 と推定された。また, L鎖の可変領域は, influenza virus の赤血球凝集因子に対する抗体の可変領域とホモロジーが認められた¹⁷⁾(図 3)。

成人性歯周炎の重要な原因菌である *P. g* は, 菌体表面の赤血球凝集因子が歯周ポケットへの定着に関与し, 本疾患の発症に寄与するものと考えられている。*P. g* 赤血球凝集活性を阻害する ScFv 抗体によって *P. g* の定着を阻止できれば歯周病の受動免疫に役立てられよう(図 4)。

P. g 共凝集因子活性を抑制するヒト型 MAb

組織に先駆けて定着している比較的病原性の低

Vesicles	+	+
Erythrocytes	+	+
ScFv antibody	+	-
0 μ l		
5 μ l		
10 μ l		
40 μ l		

図 4 ScFv 抗体による赤血球凝集活性の抑制

P. g vesicle の赤血球凝集活性を ScFv 抗体が濃度依存的に阻害した。

い細菌に, 病原性の高い細菌が共凝集することで定着が可能になり, より病原性の高い細菌叢を形成する¹⁸⁾。また, 単一の細菌は, 宿主の免疫作用により殺菌されやすいが, 共凝集した細菌塊は生体の免疫応答から回避できることがある¹⁹⁾。したがって共凝集因子は, 病原細菌の定着に働く重要な病原因子の一つであると考えられる。

筆者らは, 歯周病の血清診断, 歯周病ワクチンの開発を目的として *P. g* の特異抗原蛋白質の量産を試みた。本菌の染色体 DNA ライブラリーを作製し, 菌体に対する抗体でスクリーニングを行って分子量 40 kDa の外膜蛋白質の遺伝子をクローニングした²⁰⁾。リコンビナント 40 kDa 外膜蛋白質(r 40 kDa OMP)を精製してウサギに免疫して抗体を作製し, 40 kDa OMP が免疫学的に *P. g* に特異性が高いことを明らかにした²¹⁾。40 kDa OMP は *P. g* の vesicle にも存在するが, 40 kDa OMP 抗体が, *P. g* vesicle と *Actinomyces viscosus* との共凝集反応を著明に阻害することを見出し, 40 kDa OMP は共凝集因子であることを明らかにした²²⁾。

また, 精製 r 40 kDa OMP に対する抗体を用いて補体系活性化能を調べたところ古典経路, 副経路の補体系を活性化して *P. g* を殺菌できることが判明した²³⁾。歯肉溝浸出液中には IgG と補体系

図5 ヒト型 MAb と r40 kDa OMP の結合
蛍光標識した r40 kDa OMP に抗体が結合することによって変化した蛍光偏光度をプロットした。非特異ヒト抗体は変化させないが、作製したヒト型 MAb (HAb-omp1) は結合によって変化する、このデータから K_d 値が求められる。

成分の存在が知られていることから 40 kDa OMP は、補体系依存性殺菌作用の標的として有用であり、歯周病コンポーネントワクチンの開発に有用であると考えられる。また、r 40 kDa OMP をマウスに免疫して *P. g vesicle* と *Actinomyces viscosus* との共凝集反応を著明に阻害する MAb を作出し²⁴⁾、さらにこのハイブリドーマから組換え ScFv 抗体 phage クローンの作製を行っている²⁵⁾。

つぎにヒトリンパ球の SCID マウスへの移植法と EBV 感染による B 細胞の不死化法を組み合わせ、40 kDa OMP 凝集因子に対するヒト型 MAb の作製を試みた。まず、あらかじめ抗 asialo-GM₁ 抗体で NK cell 活性を抑制した SCID マウスにボランティアから採取した末梢血リンパ球を移入し、r 40 kDa OMP を免疫した。脾臓を摘出してリンパ球を T cell 活性を抑制するために cyclosporine 存在下で培養し、次いで EBV を感染させて不死化させた。r 40 kDa OMP を抗原として用いてパンニング法により分離された B 細胞クローンは IgG₁、IgG₂ サブクラスを産生していた。蛍光標識 r 40 kDa OMP に対して精製抗体を濃度依存的に加えて BEACON fluorescence polarization system を用いて抗体と抗原の相互

図6 ヒト型 MAb による凝集能の抑制

上：Flocculation slide assay

A : *A. naeslundii* (凝集-)

B : *A. naeslundii* + *P. g vesicle* (凝集+)

C : *A. naeslundii* + ヒト型 MAb (HAb-omp1) + *P. g vesicle* (凝集-)

D : *A. naeslundii* + 非特異ヒト抗体 + *P. g vesicle* (凝集+)

下：Radioisotope assay

³H-標識した *A. naeslundii* を菌体に *P. g vesicle* を加え、遠心後の上清画分に残った非凝集菌体量を液体シンチで測定して凝集能を算定した。非特異的抗体は凝集能を変化させないが精製ヒト型 MAb (HAb-omp1) は著明に阻害した。

作用を解析し、 K_d 値を算定したところ約 4.4 nM であり、マウス MAb と近似していた。そして、*A. naeslundii* を ³H-標識し、*P. g vesicle* 依存性の共凝集能に与えるヒト型 MAb の影響を調べたところ共凝集を阻害した²⁶⁾(図5, 6)。

IgG₁抗体は、IgG₂抗体にくらべて補体結合能、Fc受容体を介した貪食細胞結合能が高く、IgG₄はこれらの機能が低いことから、目的に応じてヒト型抗体を使い分けることができる。将来、歯周病受動免疫療法においてヒト血中あるいは組織中に抗体を投与することが可能になるかは臨床応用研究を待たねばならないが、ADCC、CDAMC活性によって病原菌に細胞障害を期待する場合にはIgG₁産生クローンが有用になろう。

これに対して定着因子などの病原因子の中和を主目的とし、細胞性免疫による組織破壊の危険がある場合にはIgG₄サブクラスがよいと考えられる。しかしながら、IgG₄の血中濃度はもっとも低くIgG₄産生B細胞クローンを樹立できる確立は低いと思われる。IgG₁産生クローンなどからFv遺伝子のクローンを行って、ScFv抗体を量産するかFab断片を精製して利用することが必要となろう。

考察と展望

最近、BoothとLehner²⁷⁾は、初期治療を行って*P.g*が歯周ポケットから検出できないことを確認した歯周炎患者の歯周ポケットに、*P.g*菌体に対するマウスMAbを投与することで*P.g*の再定着を抑制できたと報告している。ヒト型抗体は安全性が高く、また組換えScFv抗体もFc部位をもたず、病原因子の機能を抑制するだけで安全性が高いと考えられる。歯周病原菌*P.g*の定着因子として注目されている赤血球凝集因子および共凝集因子の活性を抑制できる組換えScFv抗体、ヒト型抗体を応用してヒトを対象とした受動免疫療法の実現を期待したい。一般に能動免疫療法にくらべて、受動免疫は長期にわたる効果は期待できず反復投与が必要である。したがってヒトを対象に実用化を考えたとき抗体の量産が必要である。

齶蝕に対する受動免疫開発の研究ではウシやトリに齶蝕原因菌の歯面への定着因子を免疫してミルク²⁸⁾や卵黄²⁹⁾に抗体をつくらせ、これら日常の食品を応用する研究も進んでいるが、抗原の精製や動物への免疫など、煩雑な工程が必要であり、依然として問題が残っている。Maら³⁰⁾は、マウス

MAbカップ鎖、IgA-IgGのH鎖のハイブリッド、マウスJ鎖、ラビット分泌小片の各遺伝子が発現するトランスジェニックタバコを作製し、分泌型IgA分子を産生するトランスジェニック植物の開発に成功し、さらにヒト歯面への細菌付着を抑制できたと報告している³¹⁾。将来、有用な抗体遺伝子を日常で食卓にのぼるような野菜などに発現させ機能すれば、「サラダを食べながら齶蝕・歯周病予防」という夢も実現するかもしれない。

歯周病は、社会的には直接生命を奪う疾患であるとは認知されていないが、死の転帰をとった急性歯槽膿瘍患者の病巣と血液から歯周病原菌の*Bacteroides melaninogenicus*が分離されたという報告がされている³²⁾。歯周病原菌と重篤な全身疾患とのかわりあいも議論されていることから、歯周病原菌の病原因子の機能を抑制できる受動免疫療法用の安全な抗体の作製は意義があると考えられる。

本研究は、厚生科学研究費補助金(長寿科学総合研究事業、96 A 2303)、日本大学学術研究補助金(DA96-013)の助成を受けた。

文 献

- 1) 根岸達郎, 大谷 仁: 歯の喪失に伴う変化, 抜歯の原因調査からみた歯の喪失. 日歯医学会誌 17: 14-17, 1998.
- 2) Socransky SS: Present status of studies on the microbial etiology of periodontal diseases. In Host-Parasite Interaction in Human Periodontal Diseases. (ed. Genco RJ, Margenhagen SE), Am. Soc. Microbiol., Washington DC., 1982, p 1-12.
- 3) Holt SC, Ebersole J, Felton J, Brunsvold M, Kornman KS: Implantation of *Bacteroides gingivalis* in nonhuman primates initiates progression of periodontitis. Science 239: 55-57, 1988.
- 4) Persson GR, Engel D, Whitney C, Darveau R, Weinberg A, Brunsvold M and Page RC: Immunization against *Porphyromonas gingivalis* inhibits progression of experimental periodontitis in non human primates. Infect. Immun. 62: 1026-1031, 1994.
- 5) Bird PS, Gemmell E, Polak B, Paton RG, Sosroseno W, Seymour GJ: Protective immunity to *Porphyromonas gingivalis* infection in a murine model. J. Periodontol. 66: 351-362, 1995.
- 6) Evans RT, Klausen B, Genco RJ: Immunization with fimbrial protein and peptide protects against *Porphyromonas gingivalis*-induced periodontal tissue destruction. Adv. Exp. Med. Biol. 327: 255-262,

- 1992.
- 7) Choi JI, 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.* 66 : 391-393, 1998.
- 8) Huse WD, Sastry L, Iverson SA, Kang AS, Alting-Mees M, Burton DR, Benkovic SJ, Lerner RA : Generation of a large combinatorial library of the immunoglobulin repertoire in phage lambda. *Science* 246 : 1275-1281, 1989.
- 9) Morrison SL, Johnson MJ, Herzenberg LA, Oi VT : Chimeric human antibody molecules : Mouse antigen-binding domains with human constant region domains. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81 : 6851-6855, 1984.
- 10) Jolliffe RP, Waldman H, Winter G : Enhancing therapeutic utility through antibody engineering. *Intl. Rev. Immunol.* 10 : 241-263, 1993.
- 11) Duchosal MA, Eming SA, Fisher P, Leturcq D, Baebas CP III, McConahey PJ, Caothien RH, Thoenton GB, Dixon FJ, Burton DR : Immunization of hu-PBL-SCID mice and the rescue of human monoclonal Fab fragments through combinational libraries, *Nature* 355 : 258-262, 1992.
- 12) Henderson E, Miller G, Robinson J, Heston L : Efficiency of transformation of lymphocytes by Epstein-Barr virus. *Virology* 76 : 152-163, 1977.
- 13) Mosier DE, Gulizia RJ, Baird SM, Wilson DB : Transfer of a functional human immune system to mice with severe combined immuno-deficiency. *Nature* 335 : 256-259, 1988.
- 14) Green LL, Hardy MC, Maynard-Currie CE, Tsuda H, Louie DM, Mendez MJ, Abderrahim H, Noguchi M, Smith DH, Zeng Y, David NE, Sasai H, Garza DG, Brenner DG, Hales F, McGuinness RP, Capon DJ, Klapholz S, Jakobovits A : Antigen-specific human monoclonal antibodies from mice engineered with human Ig heavy and light chain YACs. *Nature Genet.* 7 : 13-20, 1994.
- 15) 内藤祐子, 奥田克爾 : *Porphyromonas gingivalis* の生態と付着メカニズム, 医学微生物学の新しい展開, 加藤延夫編, 菜根出版, 1993, p 399-409.
- 16) Mouton C, Bouchard D, Deslauriers M, Lamonde L : Immunochemical identification and preliminary characterization of a nonfimbrial hemagglutination adhesin of *Bacteroides gingivalis*. *Infect. Immun.* 57 : 566-573, 1989.
- 17) Shibata Y, Kurihara K, Takiguchi H, Abiko Y : Construction of a functional ScFv antibody against a hemagglutinin from *Porphyromonas gingivalis*. *Infect. Immun.* 66 : 2207-2212, 1998.
- 18) Ellen RP, Grove DA : *Bacteroides gingivalis* vesicles binds to and aggregates *Actinomyces viscosus*. *Infect. Immun.* 57 : 1618-1620, 1989.
- 19) Ochiai K, Ochiai TK, Kamino Y, Ikeda T : Effect of co-aggregation on the pathogenicity of oral bacteria. *J. Med. Microbiol.* 39 : 183-190, 1993.
- 20) Abiko Y, Hayakawa M, Aoki H, Kikuchi T, Shimatake H, Takiguchi H : Cloning of a *Bacteroides gingivalis* outer membrane protein gene in *Escherichia coli*. *Archs. Oral. Biol.* 35 : 689-695, 1990.
- 21) Kawamoto Y, Hayakawa M, Abiko Y : Purification and immunochemical characterization of a recombinant outer membrane protein from *Bacteroides gingivalis*. *Int. J. Biochem.* 23 : 1053-1061, 1991.
- 22) Hiratsuka K, Abiko Y, Hayakawa M, Ito T, Sashihara H, Takiguchi H : Role of *Porphyromonas gingivalis* 40-kDa outer membrane protein in the aggregation of *P. gingivalis* vesicles and *Actinomyces viscosus*. *Archs. Oral. Biol.* 37 : 717-724, 1992.
- 23) Saito S, Hayakawa M, Hiratsuka K, Takiguchi H, Abiko Y : Complement-mediated killing of *Porphyromonas gingivalis* 381 by the immunoglobulin G induced by recombinant 40-kDa outer membrane protein. *Biochem. Mol. Med.* 58 : 184-191, 1996.
- 24) Saito S, Hiratsuka K, Hayakawa M, Takiguchi H, Abiko Y : Inhibition of a *Porphyromonas gingivalis* colonizing factor between *Actinomyces viscosus* ATCC19246 by monoclonal antibodies against recombinant 40-kDa outer-membrane protein. *Gen. Pharmacol.* 28 : 675-680, 1997.
- 25) Shibata Y, Hiratsuka K, Takiguchi H, Abiko Y : Recombinant phage antibody against *P. gingivalis* outer membrane protein. *J. Dent. Res.* 74 : 974, 1995.
- 26) Abiko Y, Ogura N, Matsuda U, Yanagi K, Takiguchi H : A human monoclonal antibody which inhibits the coaggregation activity of *Porphyromonas gingivalis*. *Infect. Immun.* 65 : 3966-3969, 1997.
- 27) Booth V, Ashley FP, Lehner T : Passive immunization with monoclonal antibodies against *Porphyromonas gingivalis* in patients with periodontitis. *Infect. Immun.* 64 : 422-427, 1996.
- 28) Michalek SM, Gregory RL, Harman CC, Kats J, Richardson GJ, Hilton T, Fille SJ, McGhee JR : Protection of gnotobiotic rats against dental caries by passive immunization with bovine milk antibodies to *Streptococcus mutans*. *Infect. Immun.* 55 : 2341-2347, 1987.
- 29) Hamada S, Horikoshi T, Minami T, Kawabata S, Hiraoka J, Fujiwara T, Ooshima T : 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, 1991.
- 30) MaJ K-C, Hiatt A, Hein M, Vine ND, Wang F, Stabila P, van Dolleweerd C, Mostov K, Lehner T : Generation and assembly of secretory antibodies in plants. *Science* 268 : 716-719, 1995.
- 31) Ma JK, Hikmat BY, Wycoff K, Vine ND, Chargelegue D, Yu L, Hein MB, Lehner T : Characterization of a recombinant plant monoclonal secretory antibody and preventive immunotherapy in humans. *Nat. Med.* 4 : 601-606, 1998.
- 32) Currie WJR, Ho V : An unexpected death associated with an acute dentoalveolar abscess-report of a case. *Br. J. Oral. Maxillo. Surg.* 31 : 296-298, 1993.