口腔細菌のアジュバント効果について

乾 正 明, 川 越 健一郎, 中 田 洋, 佐 野 茂
吉 川 容, 福 田 富 男, 岡 田 宏

九州大学歯学部歯科保存学第一講座

(指導 青野正男教授)

Adjuvant effects of oral microorganisms on the immunological responses

M. INUI, K. KAWAGOE, H. NAKATA, S. SANO, Y. YOSHIKAWA,
T. FUKUDA and H. OKADA

(Department of Endodontics and Periodontics, Faculty of
Dentistry, Kyushu University, Director : Professor M. AONO)

Adjuvant effect of oral microorganisms on the primary immune response to sheep erythrocytes was investigated in CF₁ mice by the direct antibody plaque technique at 2, 4 and 6 days after immunization. An adjuvant effect was detected on day 2 with *Veillonella alcalescens* ATCC 17745, *Fusobacterium fusiforme* HT-40 and *Bacteroides melaninogenicus* 32-2 and a weaker effect was found with the same organisms on day 4. *Actinomyces viscosus* ATCC 15987 showed an adjuvant effect on day 2 only, whilst *Streptococcus mutans* Ingbritt had no effect at any time. None of the organisms had any effect on the antibody response on day 6. But adjuvant effect of *Veillonella* to 7S antibody production on the primary immune response at 6 days after immunization was detected. Moreover, *Veillonella* showed an adjuvant effect to 19S and 7S antibody production on the secondary immune response at 4 days after booster injection. Adjuvant effect on the cellular hypersensitivity to bovine serum albumin was assayed in guinea pigs by skin, corneal and macrophage migration inhibition tests at 3 or 4 weeks after immunization. An enhanced cellular hypersensitivity was not found with *Veillonella*, *Fusobacterium* or *Streptococcus*. With *Bacteroides* and *Actinomyces* an adjuvant effect was detected by skin and corneal tests but not by the migration inhibition test. But with *Actinomyces* an adjuvant effect on the cellular hypersensitivity was detected by skin, corneal and macrophage migration inhibition tests at 2 weeks after immunization.

緒 言

歯垢が最も重要な歯肉炎の発病因子と考えられ (Löe Theilade and Jensen, 1965)¹⁾, とりわけ歯垢の主体をしめる細菌の発炎機構の解明が重要な研究課題の一つとなっている。従来から細菌の酵素作用 (Tynelius-Bratthall and Attstrom, 1972)²⁾ や peptidoglycan 又は lipopolysaccharide 等の細菌の毒性物質 (Schuster, Hayashi and Bahn, 1967³⁾; Snyderman, 1972⁴⁾) および細菌抗原により惹き起こされる免疫反応 (Mergenhagen, Temple and Snyderman, 1970⁵⁾) が発炎機構として重要視され多くの研究報告がなされてきた。

免疫反応による歯周組織の崩壊機構として、補体の関与する体液性免疫反応によるⅢ型の細胞障害パターンと、細胞性免疫反応による標的細胞破壊のⅣ型の細胞障害パターン (Gell and Coombs, 1964)⁶⁾ とが考えられている (Snyderman, 1973)⁷⁾。最近になって歯周病患者において口腔細菌又は歯垢抗原に対する細胞性免疫反応の成立が健康人に比し有意に高く、その際 lymphotoxin や osteoclast activating factor 等の組織障害因子が産生されることが明らかになってきた (Ivanyi, Wilton and Lehner, 1972⁸⁾; Horton, Oppenheim and Mergenhagen, 1973⁹⁾; Horton 等 1972¹⁰⁾)。

歯肉溝には色々な抗原性物質が長期に亘り停留し、漸次生体感作し、体液性ならびに細胞性免疫反応が成立し、歯周組織破壊をもたらす可能性は上述の如くである。この際、これらの免疫反応が歯肉溝常在細菌が介在することにより免疫アジュバント効果が発揮されることが考えられる。もしこのアジュバント効果が影響を与えるならば歯周組織破壊の増悪因子としても重要なものとなる。本論文はこのような観点から口腔細菌の免疫反応増強効果を検討したものである。

実験材料と方法

供試菌株: *Actinomyces viscosus* ATCC 15987, *Bacteroides melanogenicus* 32-2, *Veillonella alcalescens* ATCC 17745, *Fusobacterium fusiforme* H-T 40, および *Streptococcus mutans* Ingbritt の 5 種類の口腔細菌を用いた。

Actinomyces は Brain heart infusion 培地, *Bacteroides* は trypticase-menadione 培地 (Gibbons and Macdonald, 1961)¹¹⁾, *Veillonella* は Rogosa's V 23

培地 (Rogosa and Bishop, 1964)¹²⁾, *Fusobacterium* は thioglycollate-casitone 培地 (Omata and Disraelly, 1956)¹²⁾, *Streptococcus* は Todd-Hewitt 培地で多量の純培養を行い、集菌、Gram 染色を行い他の細菌による汚染のないことを確認し、無菌冷生理的食塩水で洗滌した後、オートクレーブ (120°C, 15 分間) で死菌とし、凍結乾燥して保存した。

アジュバント効果の判定:

1) 体液性免疫反応におけるアジュバント効果の判定には 6 週令の雄性, CF₁ マウスを用いて、羊血球 (SRBC) の無菌生理的食塩水浮遊液 0.2 ml (4×10^8 SRBC を含む) を尾静脈より単独又はアジュバント物質 (前記供試菌の凍結乾燥標品 1 mg) と同時に注射した。感作後 2 日目 (抗体産生上昇期), 4 日目 (ピーク時), 6 日目 (下降期) の一次免疫反応と、感作後 40 日後に SRBC (4×10^8 個) を尾静脈より惹起注射し 4 日目の二次免疫反応における抗体産生を脾細胞 10^6 個あたりの溶血斑形成細胞数 (PFC) で検討し、SRBC 単独注射群とアジュバント物質同時注射群とで比較し、抗体産生増強効果 (アジュバント効果) を以下のようにして算定した。

$$\text{アジュバント比 (A.I.)} = \frac{\text{アジュバント添加群の PFC}}{\text{SRBC 単独群の PFC}}$$

アジュバント物質としてアジュバント効果の明らかな BCG ワクチン (日本 BCG 製造-東京) を positive control として使用し、供試口腔細菌のアジュバント効果を比較検討した。

PFC assay には Jerne 直接法 (Jerne and Nordin, 1963)¹⁴⁾ および間接法 (Dresser and Wartis, 1965)¹⁵⁾ を用いた。尚この際補体は両法ともモルモット血清 (乾燥補体-東芝化学工業-東京) を、間接法における抗 IgG 血清は Anti-mouse IgG rabbit serum (医学生物学研究所一名古屋) を予め至適稀釈倍数を検討の上で利用した。

2) 細胞性免疫反応におけるアジュバント効果の判定には体重 350~500 g の雄性のハートレー系モルモットを用いて、皮膚反応、角膜反応およびマクロファージ遊走阻止試験 (MI 試験) により細胞性免疫反応の成立の有無を検討した。即ち牛血清アルブミン (BSA, Fraction V; Armour Pharmaceutical Co., Kankakee) 又は結晶卵白アルブミン (EAc, Armour) を磷酸緩衝生理的食塩水に 200~1000 γ /ml の割合に溶解し、15,000 r.p.m. 90 分間遠沈後孔径 0.45 μ のミリポアフィルターを通し、等量の下記のアジュバントに油中水型になるようによく混和して抗原液とした。Negative control の

アジュバントとしてフロインド不完全アジュバント (IC FA, Difco), positive control のアジュバントとして結核菌体を含んだフロインド完全アジュバント (CFA, Difco), 実験群として供試口腔細菌を 5 mg/ml の割に含んだ ICFA を用いた。感作はこれらのアジュバント加抗原液をモルモットの前後の足蹠と頸部筋肉内に注射し全量を 1 ml とした。

蛋白抗原を ICFA に混和して感作する場合、感作後 3~14 日に亘り遅延型の皮膚反応、即ち Jones-Mote 型の反応が成立することがあるので (Bast, Simpson and Dvorak, 1971)¹⁶⁾、本実験では ICFA を negative control のアジュバントとして用いている関係上これを避ける意味から感作後 2 週目以降に細胞性免疫反応の諸検討を行った。即ち感作後 2 週目又は 3~4 週目に 10 γ の BSA (又は EAc) を皮内に注射し、6, 24, 48 時間後の発赤径と硬結の程度を測定して (Dupy and Good, 1971)¹⁷⁾、遅延型皮膚反応の成立の有無を判定した。また皮内反応と同時に 10 mg/ml の BSA (または EAc) を角膜内にごく微量 (注射による白濁径が 2 mm 位) 注射し、48 時間後の角膜の混濁の程度を観察した (山村, 1972)¹⁸⁾。更に数日後に腹腔浸出細胞を利用して毛細管法によるマクロファージ遊走阻止試験 (MI 試験, David 等, 1964)¹⁹⁾ を行い細胞性免疫反応の成立の有無を検討した。この際腹腔浸出細胞の培養には 56°C 30 分間補体を非働化した正常モルモット血清を 15% の割に含む TC-199 培地 (千葉血清研究所一千葉) を用いた。また抗原濃度は BSA, EAc とも 50 μg/ml とした。腹腔細胞の遊走阻止率は次のようにして求めた。

$$\text{遊走阻止率} = 1 - \frac{\text{抗原を含む培地における腹腔細胞の 24 時間培養後の遊走面積}}{\text{抗原を含まない培地における腹腔細胞の 24 時間培養後の遊走面積}} \quad (\text{MI 値})$$

実験結果

1) 体液性免疫反応におけるアジュバント効果

SRBC 4×10⁸ 個の感作による一次免疫反応における 19S 抗体産生の増強効果を表 1 に示した。感作後 2 日目 (抗体産生上昇期) において Veillonella, Fusobacterium, Bactroides および Actinomyces はいずれも強いアジュバント効果をもち抗体産生は 4 倍以上に増加された。これらのアジュバント効果は positive control の BCG のそれよりもはるかに高かった。他方 Streptococcus にはこのようなアジュバント効果は認められなかった。感作後 4 日目 (ピーク時期) になると Veillonella, Fusobacterium および Bacteroides のアジュバント効果は減少し、A.I. 約 2 を示し BCG のそれとほぼ同等であった。他方 Actinomyces および Streptococcus にはアジュバント効果は認められなかった。感作後 6 日目 (下降期) になると BCG および総ての供試口腔細菌の 19S 抗体産生におけるアジュバント効果は認められなかった。本実験における感作後 6 日目では 19S 抗体産生が急激に減少し、7S 抗体産生がほぼピークに達する時期と考えられる (Wortis, Tayler and Dresser, 1966)²⁰⁾ ので、次に 7S 抗体産生における増強効果を Veillonella について検討を行った。表 2 に示すように A.I. 1.48 で Veillonella は 7S 抗体についてもアジュバント効果のあることが判明した。

表 1 Adjuvant effect on primary immune response in CF₁ mice detected by direct PFC at the various intervals after immunization with 4×10⁸ SRBC

Adjuvant	day 2 response		day 4 response		day 6 response	
	PFC/10 ⁶ cells±S.E.	A.I.	PFC/10 ⁶ cells±S.E.	A.I.	PFC/10 ⁶ cells±S.E.	A.I.
without	5.9± 0.2 (20)	1.00	243.1± 24.8 (71)	1.00	27.8±3.1 (4)	1.00
BCG	10.5± 1.2 (3)	1.78*	500.5± 80.8 (24)	2.06*	35.6±2.5 (5)	1.27
Veillonella	34.6± 3.1 (5)	5.87*	424.9± 98.1 (10)	1.75*	16.4±3.4 (5)	0.59
Fusobacterium	23.1± 3.7 (5)	3.91*	673.0±112.5 (11)	2.77*	35.6±4.5 (5)	1.27
Bacteroides	43.8±11.1 (5)	7.44*	392.2± 67.1 (10)	1.61*	12.2±3.4 (5)	0.44
Actinomyces	40.6± 7.5 (5)	6.89*	225.1± 33.0 (10)	0.93	39.2±6.4 (5)	1.40
Streptococcus	8.1± 2.3 (5)	1.38	222.1± 43.3 (4)	0.91	25.4±3.4 (5)	0.91

(): number of experimental animals
* : significantly different from controls receiving no adjuvant (P<0.05)
S.E. : standard errors

表 2 Adjuvant effect on primary response in CF₁ mice detected by indirect PFC at 6 days after immunization with 4×10^8 SRBC

Adjuvant	indirect PFC/ 10^6 cells $\pm$ S.E.	A.I.
without	347 $\pm$ 18 (4)	1.00
Veillonella	515 $\pm$ 52 (4)	1.48*

(): number of experimental animals

* : significantly different from control (P<0.05)

SRBC に対する二次免疫反応におけるアジュバント効果を Veillonella について検討した結果、表 3 に示すように 19S および 7S 抗体のいずれにおいても A.I. 2.5 ではば 2 倍の抗体産生の増加が認められた。

2) 細胞性免疫反応におけるアジュバント効果

BSA を抗原として感作後 3~4 週目に BSA に対する細胞性免疫反応の成立の有無を検討した結果 (表 4), ICFA 群では皮膚反応における発赤の程度は皮内注射 6 時間後が頂点で以後その程度を激減し, 48 時間後では殆

んど発赤は認められなかった。また硬結反応もなく典型的な即時型の皮膚反応を示した。更に角膜反応, MI 試験も陰性で, 感作抗原に対する細胞性免疫反応が成立しなかった。一方 CFA 群では, 皮膚反応における発赤が皮内注射 24 時間後で頂点に達し, 48 時間後でも強い発赤が持続し, 硬結反応も総てに認められ, 明らかな遅延型皮膚反応を示した。更に角膜反応および MI 試験も全例陽性で, 細胞性免疫反応が成立していることが明らかであった。他方実験群中の Veillonella, Fusobacterium および Streptococcus 群では皮膚反応はほぼ ICFA 群に一致した即時型を示し, 角膜反応および MI 試験も共に陰性で, 感作抗原に対する細胞性免疫反応の成立は認められなかった。これに反して Bacteroides および Actinomyces 群では皮膚反応における発赤径は皮内注射 6 時間後が最高で 24 時間後もその程度は持続し, 48 時間後にはかなり減退した。更に硬結反応も程度は低いけれども被検 5 例中 Actinomyces 群で 2 例, Bacteroides 群で 1 例に陽性例が認められた。このような例で

表 3 Adjuvant effect on secondary immune response in CF₁ mice detected by direct or indirect PFC at 4 days after booster injection with 4×10^8 SRBC

Adjuvant	without	Veillonella	A.I.
direct PFC/ 10^6 cells $\pm$ S.E.	344 $\pm$ 32 (5)	864 $\pm$ 79 (5)	2.51*
indirect PFC/ 10^6 cells $\pm$ S.E.	845 $\pm$ 64 (5)	2166 $\pm$ 191 (5)	2.56*

(): number of experimental animals

* : significantly different from control (P<0.05)

表 4 Adjuvant effect on cellular hypersensitivity to BSA in guinea pigs detected by skin, corneal and MI tests at 3 or 4 weeks after sensitization

Adjuvant	No. of animal	Skin response					Corneal Response	M.I.±S.E.
		Diameter of erythema (mm)			Induration			
		6 hr.	24 hr.	48 hr.	24 hr.	48 hr.		
ICFA	5	14.0	7.1	2.6	(0)	(0)		0.02±0.01 (0)
CFA	5	12.6	14.6	12.1	(4)	(5)	(5) (4)#	0.47±0.03 (5)*
Veillonella	5	12.1	6.7	2.7	(0)	(0)	(0)	0.03±0.01 (0)
Fusobacterium	5	13.5	6.2	4.4	(0)	(0)	(0)	0.01±0.03 (0)
Bacteroides	5	11.2	10.8	5.4	(1)	(1)	(1) (0)#	-0.04±0.03 (0)
Actinomyces	5	13.1	12.0	8.2	(2)	(2)	(2) (0)#	-0.04±0.02 (0)
Streptococcus	5	16.1	9.8	2.6	(0)	(0)	(0)	-0.02±0.02 (0)

(): number of animal showing positive response

()#: number of animal showing moderate or severe response

* : significantly difference from ICFA (P<0.01)

表 5 Adjuvant effect on cellular hypersensitivity to EAc in guinea pigs detected by skin, corneal and MI tests at 2 weeks after immunization

Adjuvant	No. of animal	Skin response					Corneal response	M.I.±S.E.
		Diameter of erythema (mm)			Induration			
		6 hr.	24 hr.	48 hr.	24 hr.	48 hr.		
ICFA	4	10.5	8.0	2.0	(1)	(0)	(0)	0.05±0.10 (0)
CFA	4	11.0	12.5	9.0	(4)	(4)	(5) (5)#	0.34±0.13 (4)*
Actinomyces	5	11.2	12.6	6.6	(5)	(3)	(5) (2)#	0.23±0.14 (3)

() : number of animal showing positive response
()# : number of animal showing moderate or severe response
* : significantly different from ICFA (P<0.02)

は角膜反応も弱いながら陽性を示した。しかし MI 試験はいずれにおいても全例陰性であった。即ち典型的ではないが皮膚反応が遅延する傾向を示しかつ角膜反応も陽性を示したことから、これらの群においては感作抗原に対する弱い細胞性免疫反応が成立している可能性が推定されたので次に細胞性免疫反応の検討は感作後 1～2 週後に行った方がよいということを考慮して Actinomyces について感作後 2 週目に検討を行った (表 5)。

ICFA 群では即時型の皮膚反応を示し、角膜反応および MI 試験とも陰性であったが、CFA 群では遅延型皮膚反応を示し、角膜反応および MI 試験も陽性であった。一方 Actinomyces 群では皮膚反応は遅延し皮内注射 24 時間後には全例硬結反応が陽性であった。角膜反応も 5 例中 3 例が強陽性、2 例が弱い陽性を示した。一方 MI 試験は 3 例が陽性 (MI : 0.42, 0.29, 0.25) を示したが 2 例は陰性であった。即ち Actinomyces が細胞性免疫反応を誘起するアジュバント効果のあることが確認された。

考 察

Streptococcus mutans 以外の 4 つの供試口腔細菌に体液性免疫反応の一次応答における 19S 抗体産生系におけるアジュバント効果のあること、更に Veillonella に一次応答における 7S 抗体産生系および二次応答における両抗体産生系におけるアジュバント効果のあることが判明した。即ち Actinomyces, Bacteroides, Fusobacterium および Veillonella に一次ならびに二次免疫反応におけるアジュバント効果のあることが推定された。口腔細菌のアジュバント効果の起因する所要性質については現在不明な点が多いが、アジュバント効果を

示した上記口腔細菌のうち Bacteroides (Hofstad, 1970)²¹⁾, Fusobacterium (Kristoffersen and Hoftad, 1970)²²⁾ および Veillonella (Hofstad and Kristoffersen, 1970)²³⁾ は内毒素を産生し、内毒素にアジュバント効果のあることから (Munoz, 1964)²⁴⁾ これら口腔細菌のアジュバント効果は内毒素に起因する可能性を否定することは出来ない。菌垢を抗原として惹起された免疫反応により歯周組織の局所で補体が活性化され歯周組織の崩壊が生じると考える (Shillitoe and Lehner, 1972²⁵⁾; Snyderman, 1972²⁶⁾)⁷⁾ 場合、口腔細菌のアジュバント効果により免疫反応が増強された結果更に組織崩壊が増強されるものと推定される。

結核菌体を含む CFA に BSA に対する細胞性免疫反応を誘起する強いアジュバント効果が本実験においても確認されたが、Fusobacterium, Streptococcus および Veillonella にはこのようなアジュバント効果は認められなかった。他方 Bacteroides および Actinomyces には皮膚反応と角膜反応において弱いながら細胞性免疫反応が確認され、このようにアジュバント効果が弱いながら存在することが推定された。更に Actinomyces につき EAc を抗原として追加検討した結果、明らかに細胞性免疫反応を誘起するアジュバント効果のあることが判明した。小谷等も角膜反応を用いて同様の結果を報告している (小谷等, 1973)²⁶⁾。Horton 等 (1973)⁸⁾ は歯周病患者における菌垢を抗原とする細胞性免疫反応は他の系の細胞性免疫反応とは異り非特異的な mitogen に比較して特異的抗原刺激による場合の方がリンパ球の増殖 (lymphoproliferative response) が著しく低い反面、lymphotoxin の産生においては相違のないことを明らかにした。即ち菌垢を抗原とする細胞性免疫反応系における細胞障害性が強いことを明らかにし、この可能性の

一つとして歯垢抗原の特異性に注目している。即ち Chaparas, Thor and Godfrey (1970)²⁷⁾ が Tuberculin-active carbohydrate で同様の結果を報告していることから、歯垢も carbohydrate-rich な protein-poor な抗原性状を示すことにより同様の結果を得られたものと推定している。一方多糖体を CFA に混和して感作した場合細胞性免疫反応が成立し多糖体が有効な細胞性免疫反応誘起抗原であることを示した報告 (Gerety, Ferraresi and Raffel, 1970)²⁸⁾ や、実験動物 (ハムスター) における歯周病発症細菌として *Actinomyces viscosus* がクローズアップされた (Jordan and Keyes, 1964)²⁹⁾ こと、更に本実験の結果から本菌が他の抗原物質に対する細胞性免疫反応を誘起するアジュバント効果を有していること等を考え合せば、歯垢抗原に口腔細菌がアジュバント効果を発揮しその結果細胞性免疫反応が誘起され歯周組織の崩壊へと発展してゆくという歯周病の一つの発病機構が推定されよう。

結 論

口腔細菌 (*Actinomyces viscosus* ATCC 15987, *Bacteroides melaninogenicus* 32-2, *Fusobacterium fusiforme* H-T 40, *Streptococcus mutans* Ingbritt および *Veillonella alcalescens* ATCC 17745 の体液性免疫反応におけるアジュバント効果を羊血球を抗原としてマウスに感作し惹起される一次および二次免疫反応を脾細胞 10^6 個あたりの溶血斑形成細胞数で算定し、その増強効果を検討した。*Streptococcus* 以外の4つの細菌に一次免疫反応における19S抗体産生系に対するアジュバント効果のあることが判明した。更に *Veillonella* について一次免疫反応における7S抗体産生系と二次免疫反応における両抗体産生系に対するアジュバント効果を検討した結果、いずれにおいてもアジュバント効果のあることが判明した。

一方これらの口腔細菌のBSAに対する細胞性免疫反応を誘起するアジュバント効果の有無をモルモット感作3〜4週後に皮膚、角膜、MI試験等で検討した結果、*Fusobacterium*, *Streptococcus*, *Veillonella* にはこれらのアジュバント効果はなく、*Bacteroides*, *Actinomyces* の数例に皮膚、角膜反応で細胞性免疫反応成立を認めたがMI試験はいずれも陰性であった。そこで更に *Actinomyces* で EAc を抗原として感作2週後に追加検討した結果、明らかに細胞性免疫反応の成立を認め *Actinomyces* に細胞性免疫反応誘起アジュバント効果

があると判定した。

稿を終るに臨み、ご指導とご校閲を賜った青野正男教授に対し深謝致します。なお細菌を供与していただいた以下の諸先生に深謝致します。(Bacteroides-東歯大・高添一郎教授; *Veillonella* および *Fusobacterium*-広歯大・福井一博博士; *Actinomyces*-阪歯大・村山洋二博士; *Streptococcus*-九大歯・井上昌一博士)

本論文の主旨は第15回日本歯周病学会総会(1972年—東京)、第19回日本歯科保存学会総会(1972年—東京)、第2回日本歯周病学会例会(1973年—福岡)および第36回日本歯科保存学会例会(1974年—横須賀)において発表した。

文 献

- 1) Löe, H.E., Theilade, E. and Jensen, S.B.: Experimental gingivitis in man. J. Periodont., 36: 177, 1965.
- 2) Tynelius-Bratthall, G. and Attström, R.: Acid phosphatase, hyaluronidase and protease in crevices of healthy and chronically inflamed gingiva in dogs. J. Dent. Res. 51: 279, 1972.
- 3) Schuster, G.S., Hayashi, J.A. and Bahn, A. N.: Toxic properties of the cell wall of Gram-positive bacteria. J. Bact. 93: 47, 1967.
- 4) Snyderman, R.: Role for endotoxin and complement in periodontal tissue destruction. J. Dent. Res. 51: 356, 1972.
- 5) Mergenhagen, S.E., Tempel, T.S. and Snyderman, R.: Immunologic reactions and periodontal inflammation. J. Dent. Res. 49: 256, 1970.
- 6) Gell, P.G.H. and Coombs, R.R.A.: Clinical aspects of immunology. England, 1964, Blackwell Scientific Publications, 320.
- 7) Snyderman, R.: Immunological mechanisms of periodontal tissue destruction. J. Amer. Dent. Assoc. 87: 1020, 1973.
- 8) Ivanyi, L., Wilton, J.M.A. and Lehner, T.: Cell-mediated immunity in periodontal disease: cytotoxicity, migration inhibition and lymphocyte transformation studies. Immunol. 22: 141, 1972.

- 9) Horton, J.E., Oppenheim, J.J. and Mergenhagen, S.E. : Elaboration of lymphotoxin by cultured human peripheral blood leucocytes stimulated with dental-plaque deposits. *Clin. exp. Immunol.* 13 : 383, 1973.
- 10) Horton, J.E. et al. : Bone resorbing activity in supernatant fluid from cultured human peripheral blood leucocytes. *Science*, 177 : 793, 1972.
- 11) Gibbons, R.J. and Macdonald, J.B. : Degradation of collagenous substances by *Bacteroides melanogenicus*. *J. Bact.* 81 : 614, 1961.
- 12) Rogosa, M. and Bishop, F.S. : The genus *Veillonella*. II. Nutritional studies. *J. Bact.* 87 : 574, 1964.
- 13) Omata, R.R. and Disraely, M.N. : A selective medium for oral *Fusobacteria*. *J. Bact.* 72 : 677, 1956.
- 14) Jerne, N.K. and Nordin, A.A. : Plaque formation in agar by single antibody-producing cells. *Science*, 140 : 405, 1963.
- 15) Dresser, D.W. and Wortis, H.H. : A localized haemolysis in gel method for the detection of cells producing 7S antibody. Use of antiglobulin serum to detect cells producing antibody with low haemolytic efficiency. *Nature*, 208 : 859, 1965.
- 16) Bast, R.C., Simpson, B.A. and Dvorak, H.F. : Heterogeneity of the cellular immune response. II. The role of adjuvant. Lymphocyte stimulation in cutaneous basophil hypersensitivity. *J. exp. Med.* 133 : 202, 1971.
- 17) Dupy, J.M. and Good, R.A. : Passive transfer of delayed hypersensitivity in guinea-pigs: Role of conventional antibody and antigen. *J. Immunol.* 106 : 528, 1971.
- 18) 山村好弘, 免疫化学 (右田俊介編集). 東京, 1972, 中山書店, 254.
- 19) David, J.R. et al. : Delayed hypersensitivity in vitro. I. The specificity of inhibition of cell migration by antigen. *J. Immunol.* 93 : 264, 1964.
- 20) Wortis, H.H., Tayler, R.B. and Dresser, D.W. : Antibody production studied by means of the LHG (localized haemolysis in gel) assay. I. The splenic response of CBA mice to sheep erythrocytes. *Immunol.* 11 : 603, 1966.
- 21) Hofstad, T. : Biological activities of endotoxin from *Bacteroides melanogenicus*. *Archs oral Biol.* 15 : 343, 1970.
- 22) Kristoffersen, T. and Hofstad, T. : Chemical composition of lipopolysaccharide endotoxins from human oral *Fusobacteria*. *Archs. oral Biol.* 15 : 909, 1970.
- 23) Hofstad, T. and Kristoffersen, T. : Chemical composition of endotoxin from oral *Veillonella*. *Acta path. microbiol. scand.* 78 : 760, 1970.
- 24) Munoz, J. : Effect of bacteria and bacterial products on antibody production. *Adv. Immunol.* 4 : 397, 1964.
- 25) Shillitoe, E.J. and Lehner, T. : Immunoglobulins and complement in crevicular fluid, serum and saliva in man. *Archs. oral Biol.* 17 : 241, 1972.
- 26) 小谷尚三他. 種々のグラム陽性細菌および真菌細胞壁並びにその水溶性高分子量成分の免疫アジュバント活性および多発性関節炎誘起能について. 第3回日本免疫学会総会記録. p. 267, 1973.
- 27) Chaparas, S.D. et al. : Tuberculin-active carbohydrate that induces inhibition of macrophage migration but not lymphocyte transformation. *Science*, 170 : 637, 1970. (文献⁸⁾より引用)
- 28) Gerety, R.J., Ferraresi, R.W. and Raffel, S. : Polysaccharide in delayed hypersensitivity. I. Pneumococcal polysaccharide as inducer and elicitor of delayed reactivity in guinea pigs. *J. exp. Med.* 131 : 189, 1970.
- 29) Jordan, H.V. and Keyes, P.H. : Aerobic, gram-positive, filamentous bacteria as etiologic agents of experimental periodontal disease in hamsters. *Archs. oral Biol.* 9 : 401, 1964.