原 著

歯周病患者の白血球の Nitroblue tetrazolium 還元試験の検討

内田 武志 菊地 貞介 穴村 紳一
春間 由美子 岡本 莫

広島大学歯学部歯科保存学第2講座

(主任: 岡本 莫 教授)

(昭和51年9月18日受付)

Nitroblue Tetrazolium Reduction Test in Periodontal Disease.

Takeshi UCHIDA, Teisuke KIKUCHI, Shinichi, ANAMURA,
Yumiko HARUMA and Hiroshi OKAMOTO

Department of Endodontics and Periodontics, School of Dentistry,
Hiroshima University
(Director: Prof. Hiroshi OKAMOTO)

Sixty patients with various degrees of periodontal disease were studied to determine whether measurement of the reduction of nitroblue tetrazolium dye (NBT) by polymorphonuclear neutrophils was of value in diagnosis in periodontal disease

The following results were obtained.

1. A significant correlation was found between the percentage of NBT-positive cells and the salivary leukocyte count which is the parameter of periodontal inflammation ($p < 0.01$).
2. The percentage of NBT-positive cells, however, did not show a significant correlation with Dunning and Leach's Gingival-Bone count.
3. The rate of NBT-positive cells in blood from the gingiva was higher than that in venous blood. It was testified that this was due to contamination of blood with dental plaque when blood was taken from the gingiva.

The neutrophils were stimulated both by the phagocytosis of oral microorganisms and by endotoxin.

I. 緒 言

歯周病の最も重要な病因は歯垢あるいは歯垢中の細菌であり、歯周病は口腔内細菌の感染症であると考えられるべき証拠は多い^{1~8)}。このような観点から多くの研究者が各種の口腔内細菌に対する歯周病患者の血中抗体価を測定しているが^{9~12)}、病因菌が明らかでない現在、診断法としての意義を持つに至っていない。

Park ら¹³⁾ は細菌感染症の診断法として、nitroblue tetrazolium 還元試験 (NBT テスト), を提唱した。このテストは正常人あるいは非細菌性の疾患患者においては、末梢血白血球のうち少数のみが可溶性の NBT を不溶性の formazan に還元するが、細菌感染症患者の白血球は高率に NBT を還元するという所見に基づくものである。その後、髄膜炎、敗血症など各種の細菌感染症について NBT テストが簡便で有用な診断法であることが確められている^{14~20)}。歯周病も細菌感染症と考えられる

にもかかわらず、歯周病患者の白血球については NBT テストの検討はなされていない。そこで、本研究においては、歯周病患者の感染の実態を明らかにする目的で、患者の白血球の NBT テストを行い、臨床所見と白血球の NBT 還元率の関係を調べるとともに、歯垢および内毒素で刺激した白血球の NBT テストの結果も合わせて検討した。

II. 材 料 と 方 法

1. 歯周病患者における NBT テスト

検査対象：広島大学歯学部付属病院歯周病診療室の外來患者で問診および口腔内診査により口腔内を含む全身的に歯周病およびう蝕以外には感染症に罹患していない 16 才から 72 才までの男 19 名、女 41 名の計 60 名を対象とした。歯周組織の定期検査などのために訪れた臨床的には歯周組織にほとんど炎症を認めなかった被検者も対象者に加えた。

末梢静脈血と歯肉溝を鋭利なスケーラーで擦過して歯肉から出血する血液（歯肉血）をヘパリン処理毛細管で採血し、実験材料とした。

NBT テスト：松田ら²¹⁾の記載にしたがってヘパリン処理ヘマトクリット測定用毛細管（0.8φ×75 mm, Drummond Scientific Co. USA）を 3 等分し、25 mm の第 1 の目盛まで被検血液を吸いあげ、ついで Park ら¹⁾の方法に従って調製した等量の 0.2% NBT 試薬（Grade III, Sigma Chemical Co. USA）溶液を第 2 の目盛まで吸入して、十分に混和ののち湿潤箱中で 37°C、15 分間、ついで室温に 15 分間放置ののち再混和し、塗沫、乾燥、Wright-Giemsa 染色を行い、1,500 倍で鏡検した。判定基準は 100 個の好中球を観察し、明瞭な黒い沈着物の認められる細胞を陽性細胞とし、陽性率を百分率で表わした。

歯周病の評価：歯周組織の炎症の程度は Klinkhamer ら²²⁾の提唱した混合唾液中の白血球数をすでに報告した簡便な方法²³⁾を用いて表わし、さらにこのうち 45 人については口腔内診査、レントゲン診査を行い、Dunning と Leach²⁴⁾の Gingival score, Bone score および Gingival-Bone count により評価した。

NBT 陽性率と上述の歯周病の程度を示す各指数の間の相関係数を算出し、*t* 検定によりその有意性を検討した。

2. 歯垢および細菌、内毒素の添加試験

予備実験において歯肉血では高い NBT 陽性率を示し

たので、これは歯垢中の白血球刺激物質の血液中への混入ではないかと考え、歯垢中の刺激物質と考えられる細菌および内毒素を血液に添加して、NBT テストを実施した。

細菌の分離：歯周病患者の歯牙表面より採取した歯垢を滅菌生食塩水に浮遊し、浮遊液を brain heart infusion agar (Difco Laboratories, USA) にて 37°C、48 時間、好氣的あるいは水素注入嫌気ジャー中で嫌氣的に培養し、コロニー形態、培養条件およびグラム染色により 8 種の細菌を分離した。また brain heart infusion で 37°C、48 時間好氣的に培養し、洗浄、凍結乾燥した *Actinomyces viscosus* (ATCC 15987) をも刺激物質とした。

刺激物質の血液への添加：毛細管の管口部に歯垢、歯垢より分離した細菌あるいは *A. viscosus* をそれぞれ約 0.3 mm³ 添加し、次いで歯垢の提供者または健康な volunteer の静脈血を吸いこみ NBT テストを行った。

大腸菌の内毒素 (lipopolysaccharide B, *E. coli* 026. B6, Difco Laboratories, USA) のリン酸緩衝食塩水 (pH 7.2, PBS) 溶液 1 容と静脈血 2 容を毛細管内で十分に混和し、37°C で 15 分間インキュベーションした後、NBT テストを行った。

同時に、Cherkin²⁵⁾の方法に従い、内毒素の 0.1 M 過酸化水素水溶液および精製水溶液を 100°C、2 時間加熱、または 120°C、20 分間オートクレープし、減圧乾燥後、900 μg/ml の PBS 溶液とし、前述の方法で NBT テストを行い、内毒素の効果を調べた。

NBT テストに対するコルチコイドの影響を調べるため、健康な成人の血液にヒドロコチゾン (Sigma chemical Co., USA) を 35 μg/ml および 70 μg/ml を加え 37°C で 15 分間インキュベーション後、前述の方法に従って 300 μg/ml の内毒素を混和後、NBT テストを行った。なお内毒素のみでヒドロコチゾンを加えない系、および内毒素とヒドロコチゾンのいずれも加えない系を対照とした。

Goldstein ら²⁶⁾の記載に準じて血液中に Mg⁺⁺ および Ca⁺⁺ のキレーターである EDTA (ethylene diamine tetraacetic acid 2Na-salt, 半井化学薬品 K.K., 京都) あるいは Ca⁺⁺ のキレーターである EGTA (ethylene glycol bis (β-amino ethyl ether)-N, N, N', N'-tetraacetic acid, 半井化学薬品 K.K.) をそれぞれ 0.01 M 加えた後、300 μg/ml の内毒素で白血球を刺激した後、NBT テストを実施して Mg⁺⁺, Ca⁺⁺ の影響を調べた。

なお、細菌添加試験、内毒素添加試験については 5 枚

の塗沫標本を作製し、鏡検した。

III. 結 果

1. 歯周病患者における NBT テスト

60 名の対象者は臨床的に歯周組織にほとんど炎症所見を呈さない例から高度の歯周病に罹患している患者まであり、臨床的指標は、Gingival-Bone count, 0.38-5.50, 唾液中白血球数, $2-525 (\times 10^5)$ と幅の広い値を示した。一方、静脈血の NBT 還元率は $10.9 \pm 10.7\%$ と松田ら²¹⁾の健康な成人の NBT 還元率に近い値を示した。歯肉血の NBT 還元率は $35.7 \pm 22.2\%$ を示し、平均値においても、また個々の被検者においても静脈血よりも高い還元率を呈した。静脈血に被検者の口腔より採取した歯垢を少量添加した場合には NBT 還元率は $34.1 \pm 21.0\%$ と歯肉血のそれに非常に近い結果を示した(表 1)。

歯周病の臨床所見と静脈血および歯肉血の NBT 還元率の相関係数を求めると表 2 のごとく、唾液中白血球数を指標として表わした歯周病の程度と静脈血の NBT 還

元率との間には弱いながらも有意の相関関係が認められた ($p < 0.01$)。しかし、Gingival-Bone count あるいは歯肉の浅在性の炎症を主として示す Gingival score および歯肉組織の深部の破壊を示す Bone score を指標とした歯周病の程度と静脈血の NBT 還元率の間にはいずれも有意の相関関係は認められなかった。また、歯肉血の NBT 還元率と歯周病の程度を表わす指標との間には、いずれも有意の相関関係は認められなかった。

2. 細菌添加試験

歯垢から分離した 8 種の菌および *Actinomyces* は白血球を刺激して NBT 還元率の上昇を起こした。62.8% の高い NBT 還元率を呈した好気性のグラム陽性菌の 1 例を除いて、いずれも 20% 前後で菌による刺激効果の差はみられなかった(図 1)。

3. 内毒素添加試験

内毒素の白血球刺激効果を 0.02 ng/ml から $600 \mu\text{g/ml}$ の濃度について調べたところ、 $0.07 \mu\text{g/ml}$ を越えると NBT 還元率の上昇がみられ、 $10 \mu\text{g/ml}$ で最高に達し、Merzbach ら²⁷⁾の結果に類似した成績を得た。

なお、以後の実験にあたっては十分量の内毒素濃度

表 1 Mean and Range of Salivary leukocyte count, Gingival-Bone count, Gingival score, and Percentage of NBT-positive neutrophils from Venous blood and Gingival blood.

	No. of subjects	Mean $\pm$ SD	Range
Salivary leukocyte count	60	$66.2 \pm 74.9^*$	2-525*
Gingival-Bone count	45	2.78 ± 1.44	0.38-5.50
Gingival score	45	1.19 ± 0.58	0.10-2.40
Bone score	45	1.59 ± 1.09	0-3.70
NBT-positive cells			
Venous blood	60	$10.9 \pm 10.7^{**}$	0-40.0**
Gingival blood	60	$35.7 \pm 22.2^{**}$	2-86.0**
Venous blood with dental plaque	60	$34.1 \pm 21.0^{**}$	3-86.0**

* $\times 100,000$, ** %

表 2 Correlation of NBT-positive Neutrophils with Clinical Periodontal Parameters

Clinical periodontal parameters	Percentage of NBT-positive neutrophils from					
	venous blood			gingival blood		
	No. of subjects	Correlation coefficient	Significance	No. of subjects	Correlation coefficient	Significance
Salivary leukocyte count	60	0.38	$p < 0.01$	60	0.24	$p > 0.10$
Gingival-bone count	45	0.14	$p > 0.10$	45	-0.01	$p > 0.10$
Gingival score	45	-0.11	$p > 0.10$	45	-0.09	$p > 0.10$
Bone score	45	0.21	$p > 0.10$	45	-0.05	$p > 0.10$

図 1 NBT-reduction of neutrophils in clinically healthy subjects after in vitro exposure to various oral bacteria. control: unstimulated neutrophils

300 $\mu\text{g/ml}$ で行った。

内毒素を精製水中で 100°C, 2 時間加熱あるいは 120°C で 20 分間オートクレーブすると白血球の NBT 還元率は半減し, 0.1 M 過酸化水素水中で 100°C, 2 時間加熱した場合は, 還元率はさらに低下するが, 内毒素の白血球刺激作用は残存した。しかし, 過酸化水素水中で内毒素をオートクレーブすると内毒素の白血球に対する作用は失われた (図 2)。

図 2 Percentage of NBT-positive neutrophils stimulated by endotoxin treated by 4 different methods: at 100°C for 2 hours or autoclaving at 120°C for 20 minutes in distilled water and in 0.1 M hydrogen peroxide. control: unstimulated neutrophils

ついで, 血液をヒドロコチゾンで 37°C, 15 分間処理した後, 内毒素を添加した場合, 35 $\mu\text{g/ml}$ のヒドロコチゾンで内毒素の刺激効果はほぼ半減し, 70 $\mu\text{g/ml}$ のヒドロコチゾンで処理すると内毒素の作用は約 1/3 に減少した。ヒドロコチゾンは白血球の phagocytosis に伴う NBT 還元を抑制することが報告されている^{28,29)}が, 内毒素による白血球の刺激に対しても抑制することが認められた (図 3)。

図 3 Percentage of NBT-positive neutrophils stimulated by endotoxin after incubation of normal neutrophils with hydrocortisone. control: unstimulated neutrophils

血液中に EGTA を加え Ca^{++} を除いた場合, 内毒素で刺激した白血球の NBT 還元率は, EGTA 処理を行わなかった対照とほぼ同じ値を示した。しかし, EDTA で Ca^{++} と Mg^{++} を共に除くと内毒素の白血球刺激効果はおおよそ 1/3 に減少し, 内毒素を添加しなかった対照値に近づく傾向を示した。このことから内毒素のこの作用の発現には Mg^{++} が必要であることが確認された (図 4)。

図 4 Stimulation of NBT-reduction in normal neutrophils by endotoxin after treatment of blood with 0.01 M EGTA or 0.01 M EDTA. control: neutrophils unstimulated and untreated.

IV. 考 察

歯垢中の細菌が最も重要な歯周病の発病因子であることは周知の事実である。

今回の NBT 還元テストにより歯周病患者の感染の程度を調べた結果、唾液中白血球数で評価した歯周病の程度と静脈血白血球の NBT 還元率の間には有意の相関関係を認めた。細菌性の髄膜炎¹⁶⁾、腹膜炎¹⁷⁾、膿胸¹⁷⁾、結核¹⁵⁾などにおいて病勢の減退とともに NBT 還元率が正常に戻る事が報告されている。唾液中白血球数を指標とすると歯周病においても症状の程度と NBT 還元率の間に相関性が認められたが、その相関性は弱かった。歯周病の程度を Gingival-Bone count でもって評価した場合には NBT 還元率との間に相関性は認められなかった。このような臨床的指数は、病変の広がり、強さを主観的に判断するもので、再現性が低い。またレントゲン写真、ポケットの深さを基に評価する Bone score は歯周病の進行の結果を示していて、病勢を適確に評価できない。このような原因で Gingival-Bone count などと NBT 還元率の間には相関関係が認められなかったのであろう。また他の全身的な急性感染症に比して歯周病は慢性的局所的疾患であるため、急性の全身的感染症にみられるような NBT 還元率の著明な変化は現われなかったものと考えられる。

種々の菌の感染が疑われ、しかも原因菌が明らかでない歯周病のような疾患の場合、NBT テストは感染の判定法として有用と考えられるものの、歯周病の診断法としては十分満足できるものではなかった。

白血球の NBT 還元に関係するものとして、細菌感染以外にも、後述のコルチコイドの服用者は低い NBT 還元率を呈し²⁸⁾、逆に経口避妊薬の服用者の白血球は高い NBT 還元率を示す²⁹⁾ことが知られている。また白血球機能不全症の場合は細菌感染があっても低い NBT 還元率を呈することも知られている^{5,31,32)}。

NBT テストの対象者の除外条件の検討も今後の問題であろう。

感染源に近い歯肉局所の血液は感染の機会が多く、より鋭敏な NBT 還元反応がみられるのではないかと考え、歯肉血について NBT 還元試験を実施したところ、静脈血に比べて高い NBT 還元率を示した。しかし、NBT 還元率と歯周病の程度との間には相関性は認められなかった。また、静脈血に歯垢を添加すると歯肉血とほとんど同じ NBT 還元率を呈した。歯肉外縁上皮を切開して、

歯垢が混入しないように注意を払って得た 3 例の血液を材料に NBT テストを行った場合、同時に行った静脈血の NBT テストの結果と同じく低い NBT 還元率が得られた。これらのことから、歯肉血の高い NBT 還元率は採血の際、混入した歯垢が原因と考えられる。

白血球を刺激して NBT を還元する歯垢中の物質としては細菌自身と内毒素が考えられる。好中球の phagocytosis による NBT 還元と内毒素による NBT 還元とは同一のものか、別の系によるものかは明確にされていない。

細菌としては特定の菌ではなく、グラム陽性、陰性菌とを問わず、phagocytosis によって同じ程度に白血球が刺激され NBT が還元される。菌を phagocytosis した白血球では hexose monophosphate shunt が活性化⁷⁾する。その際 NADH や NADPH の酸化に伴って NBT が還元される。

Goldstein ら²⁶⁾は内毒素の刺激作用について抗補体血清、キレーターおよび補体の alternate pathway の活性化作用を持つ zymosan 等を駆使して、C₅α が白血球を刺激し、NBT の還元、hexose monophosphate shunt の活性化を起こすと報告している。著者らの実験でも内毒素を酸化加熱処理することにより内毒素の刺激作用が失われること、内毒素の白血球の刺激に Mg⁺⁺ が必要であることを認めた。

ハイドロコチゾンで処理した白血球、あるいはハイドロコチゾン投与患者の白血球に細菌を添加しても、phagocytosis の NBT 還元刺激作用は、正常人の白血球あるいはコチゾン処理をしなかった白血球にくらべて弱いことが報告されている^{28,29)}。プレドニゾン投与患者の白血球は内毒素による NBT 還元の刺激効果は正常に比べて減弱する³³⁾。今回の研究でも健康人の白血球をハイドロコチゾンで処理し、内毒素を添加した場合、低い NBT 還元率を呈した。

有用な NADH oxidase の阻害剤であるハイドロコチゾン³⁴⁾に phagocytosis あるいは内毒素による白血球刺激作用に対する抑制効果がみられたことは、phagocytosis の場合も、内毒素の場合も、白血球の NBT 還元には NADH oxidase あるいは NADH oxidase が関与していると考えられることができる。Weissman ら³⁵⁾はハイドロコチゾンは lysosome を安定化させる作用を持つことを報告している。しかし、NADPH oxidase は lysosome 内に含まれているのではなく、膜に結合しているとの証拠があり³⁶⁾、コチゾンの作用は直接的な酵素阻害作用であろう。

白血球のNBT還元反応に影響をおよぼす因子の検討、歯周病患者の症状の変動に伴う NBT 還元率の変化を追跡することにより、NBT テストの臨床的使用の価値が明確にされるであろう。

V. 結 論

歯周病診療室の外来患者 60 名について、それぞれの感染の度合を客観的に判定する方法を確立することを目的に、静脈血白血球の nitroblue tetrazolium (NBT) の還元テストと臨床所見との関連を検索し、以下の結果を得た。

1. 歯周病の程度を評価する指標のうち唾液中白血球数と末梢血白血球の NBT 還元率との間には有意の相関関係が認められた ($p < 0.01$)。しかし、Dunning と Leach の Gingival-Bone count と NBT 陽性率の間には何ら相関関係が認められなかった。

2. 歯肉溝を擦過し、歯肉より出血した血液を材料に NBT テストを実施したところ、静脈血の NBT 陽性率よりかなり高い NBT 陽性率を示した。しかし、唾液中白血球数あるいは Gingival-Bone count との間には相関関係は認められなかった。

3. 歯垢より分離した種々の細菌や *E. coli* の内毒素を *in vitro* で血液に加えると、白血球の NBT 還元率は高くなった。

4. 内毒素を過酸化水素中でオートクレーブするか、血液をあらかじめハイドロコチゾンや EDTA で処理すると、内毒素の白血球刺激作用が抑制された。

稿を終るに臨み、NBT 還元試験法の御指導をたまわった日本大学、河野均也助教授、後藤清氏に感謝いたします。なお、本論文の要旨は第 19 回春季日本歯周病学会において発表した。

文 献

- 1) Russel, A. L. : Epidemiology of periodontal disease. *Int. Dent. J.*, 17 : 282-296, 1967.
- 2) Theilade, E., Wright, W.H., Jensen, S.B. and Löe, H. : Experimental gingivitis in man. *J. Periodontal Res.*, 1 : 1-13, 1966.
- 3) Saxe, S.R., Greene, J.C., Bohannon, H.M. and Vermillion, J.R. : Oral debris calculus and periodontal disease in beagle dog. *Periodontics.*, 5 : 217-225, 1968.
- 4) Jordan, H.V. and Keyes, P.H. : Aerobic, gram-positive filamentous bacteria as etiologic agents of experimental periodontal disease in hamster. *Arch. oral Biol.*, 9 : 401-414, 1964.
- 5) Jordan, H.V. and Keyes, P.H. : Studies on the bacteriology of hamster periodontal disease. *Amer. J. Path.*, 46 : 843-857, 1965.
- 6) Gibbons, R.J., Berman, K.S., Knoettner, P. and Kapsimalis, B. : Dental caries and alveolar bone loss in gnotobiotic rats infected with capsule forming *Streptococci* of human origin. *Arch. oral Biol.* 19 : 559-560, 1966.
- 7) Irving, J.T., Newman, M.G., Socransky, S.S. and Heeley, J.D. : Histological changes in experimental disease in rats mono-infected with a gram-negative organism. *Arch. oral Biol.*, 20 : 219-220, 1975.
- 8) Van der Hoeven, J.S., Mikx, F.H.M., Plasschaert, A.J.M. and Maltha, J.C. : Experimental periodontal disease in rats induced by plaque-forming microorganisms. *J. periodontal Res.*, 10 : 143-147, 1975.
- 9) 内田武志 : 実験的歯周病に関係あるアクチノミセスの酵素的溶解産物の抗原分析とヒト血清中の抗アクチノミセス抗体について、*阪大歯学誌*, 18 : 69-88, 1973.
- 10) Nisengard, R.J. and Beutner, E.H. : Immunologic studies of periodontal disease. *J. Periodontol.*, 41 : 149-152, 1970.
- 11) Kristoffersen, T. and Hofstad, T. : Antibodies in humans to an isolated antigens from oral fusobacteria. *J. periodontal Res.*, 5 : 110-115, 1970.
- 12) Steinberg, A.I. and Gershoff, S.N. : Quantitative differences in spirochetal antibody observed in periodontal disease. *J. periodontol.*, 39 : 286-289, 1968.
- 13) Park, B.H., Fikrig, S.M. and Smithwick, E.M. : Infection and nitroblue tetrazolium reduction by neutrophils. *Lancet.*, 2 : 532-534, 1968.
- 14) Feigin, R.D., Shackelford, P.G., Choi, S.C., Flake, K.K., Franklin, F.A. and Eisenberg, C.S. : Nitroblue tetrazolium dye test as an

- aid in the differential diagnosis of febrile disorders. *J. Pediatrics.*, 78 : 230 : 237, 1971.
- 15) Mandell, G.L. and Fuller, L.F. : Nitroblue tetrazolium dye test : A diagnostic aid in tuberculosis. *Am. Rev. Resp. Dis.* 105 : 123-125, 1972.
 - 16) Humbert, J.R., Marks, M.I. and Hathaway, W.E. : The histochemical nitroblue tetrazolium reduction test in the differential diagnosis of acute infection. *J. Pediatrics.* 48 : 259-267, 1971.
 - 17) 松田重三 : NBT 還元試験の臨床病理学的研究, 臨床血液, 16 : 41-55, 1975.
 - 18) Arrowsmith, W.A. : The nitroblue tetrazolium test and meningitis. *Dev. Med. Child Neurol.*, 15 : 519-521, 1973.
 - 19) Jedrzejczak, W. W., Siekierzynski, M. and Sulek, K. : Evaluation of the usefulness of nitroblue tetrazolium reduction test for detection of bacterial infection in cancer patients. *Neoplasma.*, 22 : 323-328, 1975.
 - 20) Gupta, C.K., Katiyar., Gupta, S.P., Agarwal, K. N. and Sen, P. C. : Nitroblue tetrazolium dye test in septic meningitis. *Indian J. Med. Res.*, 63 : 266-272, 1975.
 - 21) 松田重三, 河野均也, 河合忠, 諏訪京子, 仲面恵美子, 尾山彰子, 星野幸子, 藤井司, 後藤清, 賀屋秀男, 佐藤和身 : 毛細管法による簡便な NBT 還元試験の検討, 医学のあゆみ, 84 : 39-42, 1973.
 - 22) Klinkhamer, J. M. : Quantitative evaluation of gingivitis and periodontal disease, I The orogranulocytic migratory rate. *Periodontics*, 6 : 207-211, 1968.
 - 23) 内田武志, 菊地貞介, 東磨美, 吉賀純子, 二宮順二, 穴村紳一, 岡本莫 : 歯周病の臨床検査としての混合唾液中の白血球数と潜血量の検討. 日歯周誌, 18 : 406-413, 1976.
 - 24) Dunning, J.M. and Leach, L.B. : Gingival-Bone count : A method for epidemiological study of periodontal disease. *J. Dent. Res.* 39 : 506-513, 1960.
 - 25) Cherkin, A. : Destruction of bacterial endotoxin pyrogenicity by hydrogen peroxide. *Immunochimistry*, 12 : 625-627, 1975.
 - 26) Goldstein, I.M., Feit, F. and Weissman, G. : Enhancement of nitroblue tetrazolium dye reduction by leukocyte exposed to a component of complement in the absence of phagocytosis. *J. Immunol.*, 114 : 516-518, 1975.
 - 27) Merzabach, D. and Obedeanu, N. : Standardisation of the nitroblue-tetrazolium test. *J. Med. Microbiol.*, 8 : 375-384, 1974.
 - 28) Chertien, J.H. and Garagusi, V.F. : Corticosteroid effect on phagocytosis and NBT reduction by human polymorphonuclear neutrophils. *Res. J. Reticuloendothel. Soc.*, 11 : 358-367, 1972.
 - 29) Mandell, G.L., Rubin, W. and Hook, E.W. : The effect of an NADH oxidase inhibitor (hydrocortisone) on polymorphonuclear leukocyte bactericidal activity. *J. Clin. Invest.* 49 : 1381-1388, 1970.
 - 30) Norden, C.W. and Reese, R. : Oral contraceptives and NBT test. *N. Engl. J. Med.*, 286 : 254, 1972.
 - 31) Baehner, R.L. and Nathan, D.G. : Leukocyte oxidase : Defective activity in chronic granulomatous disease. *Science*, 155 : 835-836, 1967.
 - 32) Kretscheimer, R.R., López-Osuna, M., De La Rosa L. and Armendarces, S. : Leukocyte function in Down's syndrome quantitative NBT reduction and bactericidal capacity. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 2 : 449-455, 1974.
 - 33) Wantzin, G.L. : The effect of prednisone on the non-stimulated and the stimulated NBT test. *Biomedicine*, 23 : 122-127, 1975.
 - 34) Yelding, K.L. and Tomkins, G.M. : Inhibition of the enzymic oxidation of DPNH by steroid hormones. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 45 : 1730, 1959.
 - 35) Weissmann, G. and Thomas, L. : Studies on lysosome. *J. Clin. Invest.* 42 : 661-669, 1963.
 - 36) Patriarca, P., Cramer, R., Marussi, M., Rossi, F. and Romeo, D. : Mode of activation of granule-bound NADPH oxidase in leukocytes during phagocytosis. *Biochim. Biophys. Acta.* 237 : 335-338, 1971.