

Title	歯周病予防ワクチンの展望
Author(s)	奥田, 克爾
Journal	歯科学報, 94(8): 713-721
URL	http://hdl.handle.net/10130/2489
Right	

歯周病予防ワクチンの展望*

奥田 克爾

東京歯科大学微生物学講座

Prospect of Vaccine for Periodontal Disease

Katsuji OKUDA

Department of Microbiology,
Tokyo Dental College

はじめに

天然痘、麻疹をはじめとしたいくつかの感染症に一度かかれば二度とかからないことは、昔から洋の東西を問わず経験的に知られていた。その経験に立脚して防御免疫を初めて人為的に成立させることを試みて成功し、人類に大きな福音をもたらしたのは、Jenner (1749—1823)であった。ワクチンという語源は1796年 Jenner が種痘に用いた牛痘(vaccinia)にある。そのお蔭もあってWHOは、1980年に天然痘が地球上からなくなったことを宣言した。その後ウィルスという概念すらなかった時代に Pasteur が狂犬病ワクチンを開発し、19世紀末には Behring と北里が破傷風やジフテリアの毒素で免疫された動物の血液の中にそれぞれの毒素を中和して無毒にしてしまうような抗毒素が産生されることを発見している。

1960年代に入り免疫学の飛躍的な研究の進歩や遺伝子操作技術の進歩などと相俟ってポリオ、風疹、麻疹、日本脳炎、ムンプスそしてB型肝炎ウィルスなどの予防ワクチンが開発された。そして今は、AIDS 予防すなわち HIV 感染予防ワクチン開発に世界の研究者がその鎧を削っている。

歯周病の主な病因として、「歯石」、「プラーク」、「宿主応答」、「特定細菌」、「寄生体と宿主応答の相互作用」が考えられてきた。この変化はそれぞれの時代の研究の裏付けとなる技術や医学・生物学の進歩によってもたらされてきたといえる。歯齦縁下細菌叢を構成する多くの

細菌種の中の特定のグラム陰性菌群こそ、歯周病原菌とされるに至ったが、歯周局所での感染に継起する宿主応答も多彩にその発症と進行に関わっていることも明らかにされた¹⁾。すなわち特定細菌が炎症歯肉組織中で強い免疫原性を発揮し、特異免疫応答を誘導する。局所に分泌される特異免疫グロブリンのクラスやサブクラスさらにその機能を総括して考えてみると、免疫病理学的応答よりもむしろ防御的作用の方が強く起きているようである¹⁾。「歯周病予防ワクチンの開発」というタイトルに私共の研究の目標を設定しその段階で明らかになっていく事実は、歯周病の原因・治療ならびに予防に貢献できるものがあると確信している。

1. 歯周病原菌とは

成人性歯周炎などは、長い時間的経過をとり、増悪と緩解を繰り返しつつ病状が進行する感染症である。さらにその病状の局所には複数の細菌が生息し増加していく。その中で1) 歯周病の症状と特定細菌の消長の関係、2) 特定の細菌を抗生物質で排除した際の症状の好転があるか、3) 宿主の特定細菌に対する免疫応答の有無を調べ⁴⁾、その特定細菌を適切な実験動物の口腔に感染させてみて歯周病が起ることを確認できれば、それが歯周病原菌とすることができる。そのような研究の積み重ねから表1に掲げた細菌種が歯周病原菌としてクローズアップされるに至った。いずれの菌種も通性嫌気あるいは偏性嫌気性のグラム陰性菌群である。私達は^{2,3,4,5,6,7,8,9,10)}それらの菌種が種々の型の歯周病の局所に多いことを明らかにしてきた。表1に掲げた菌種を歯周病原菌とすることに異論を持つ研究者は¹¹⁾、いわゆる

*本論文の要旨は第250回東京歯科大学学会総会(平成5年11月6日,千葉)において発表した。

Kochの条件を完全に満たすものでもなく全体を病原性微生物叢(pathogenic microbiota)として捕らえるべきであろうと主張している。しかし私達は、*Porphyromonas gingivalis*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans* を筆頭にして歯周病原菌と言える証拠を示してきた。両菌種は線毛を持ち歯周局所に定着し得るし^{12,13)}、局所で病原性を発揮する内毒素や蛋白分解酵素を持っている。さらに宿主の防御メカニズムに抵抗したり免疫応答から回避する物質を産生する。またそれらの菌種をサルやイヌに感染させると歯周局所に定着して歯槽骨の吸収を導く事実も示された。さらに近年これらの菌種は家族内感染を起こして歯周病を発症させていることなども明らかにされた。ところが歯周局所に定着してどの位の菌数にまで増加してどれ位の時間で歯周病を発症させるかについてはまだ解明されていない。

2. 歯周病患者の免疫応答

歯周病患者血清中には、*P. gingivalis*^{14,15)}および*A. actinomycetemcomitans*⁶⁾に対するIgG抗体価が上昇する。しかしながら*Prevotella intermedia*や*Treponema denticola*に対する抗体の上昇はほとんどみられない。

歯周病患者の*P. gingivalis*, *A. actinomycetemcomitans*に対するIgG抗体の上昇は^{6,15,16)}、それらの菌種が歯周局所に増加していることを反映するものとして捕らえられ重要視されてきた。しかし私共は^{17,18,19,20,21)}、早くからそれらの応答の中には防御性抗体として作用していることの意義に注目して検討を加えてきた。例えば歯周病患者血清中の*P. gingivalis*に対するIgG抗体は、本菌種の特定菌株の補体媒介性殺菌能を高めることを明らかにした^{17,22)}(図1)。しかしながら過半数の新鮮分離株や病原性株といわれる莢膜保有株に対してはその殺菌能を高めることができなかった。*P. gingivalis*に対する免疫応答はさらにダイナミックに捕えなくてはならないだろう。また本菌種の各表層抗原に対するIgGのサブクラスやその機能例えばオプソニン活性や抗体結合能(avidity)などを調べる必要がある。

A. actinomycetemcomitans 菌種は、その表層抗原多糖によってa,b,cを中心とした複数の血清型が存在する²³⁾。Nakagawaらは⁹⁾思春期の歯齦炎患者が血清b型に対して高いIgG抗体をもち、その特異抗体が歯周局所からの血清b型を排除するように働いている可能性を示した(図2)。本菌種の供試菌株の全部は、抗体依存性補体媒介性殺菌能に抵抗性である。それでは排除は、

Table 1 Periodontopathic bacterial species

<i>Porphyromonas gingivalis</i>
<i>Actinobacillus actinomycetemcomitans</i>
<i>Eikenella corrodens</i>
<i>Bacteroides forsythus</i>
<i>Campylobacter rectus</i>
<i>Prevotella intermedia</i>
<i>Fusobacterium nucleatum</i>
<i>Treponema denticola</i>

どのようなメカニズムによってなされるのであろうか。Saitoらは²⁰⁾、*A. actinomycetemcomitans*の付着因子である線毛抗原に対するIgG抗体の結合力を調べた。成人性歯周炎患者が線毛抗原に高いIgG抗体結合能力価をもつ場合は、本菌種の感染が少ないことを見出した(表2)。すなわち線毛抗原に対するIgG結合抗体は、本菌種の感染を阻止するように作用している可能性を示した。

Campylobacter rectus 菌種の表層抗原であるS-layerは、本菌種の宿主防御機構に対する抵抗因子となっている。成人性歯周炎患者の血清中にはこのS-layerに対する高いIgG抗体が検出される²¹⁾。私共は、S-layerに対する単クローン抗体は、オプソニン活性を示すことも見出ししている(未発表データ)。これらの知見を勘案すると特定の歯周病原菌の莢膜、線毛、S-layerなどに対する抗体が防御作用を持つことは間違いない事実であろう。さらにそれらの抗原が感染予防ワクチン抗原となることを明かにしてくれている。

3. *P. gingivalis* の感染予防

私達は能動免疫あるいは受身免疫によって*P. gingivalis*の感染を防いだり、歯周局所から排除できるかについて結紮糸をしたハムスターを実験動物として用いて検討してきた²⁴⁾。免疫抗原としては、死菌あるいは生菌に加え本菌の付着因子の一つである血球凝集因子を用いた²⁵⁾。また本菌種には病原性の強い菌株すなわち実験動物に接種すると病巣を拡大し動物を殺してしまう株がある²²⁾(表3)。それらの株は菌体表層に網目状の厚い莢膜構造を有する(図3)。その莢膜は57KDaの蛋白抗原を含むため、病原性株の排除を、目標としたワクチン抗原は57KDa蛋白抗原である可能性が高い²⁶⁾。現在、私共は本抗原の抽出・精製を試みている。

あらかじめ死菌体または血球凝集因子をアジュバントと一緒にハムスターを免疫してから臼歯部に結紮糸を

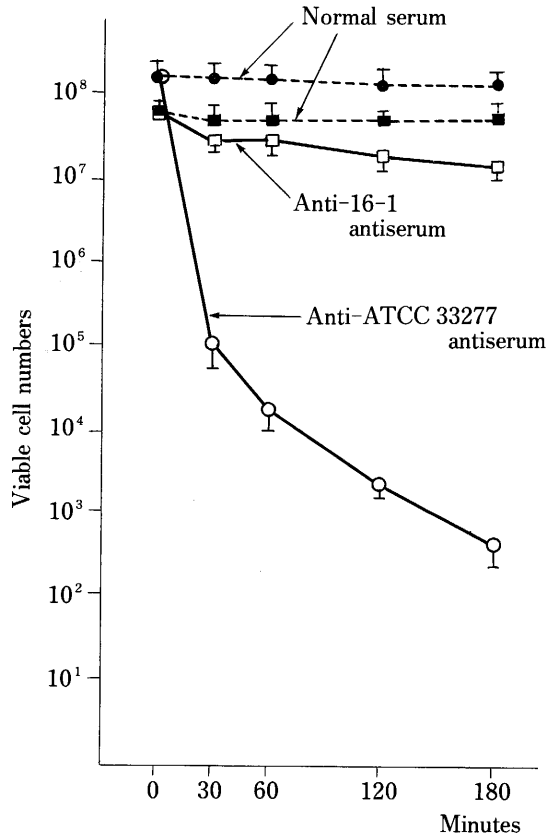


Figure 1 Complement-mediated bactericidal test with *P. gingivalis* strains to rabbit antisera and complement. Each point represents the mean number and standard error obtained from duplicate plates.
 ○—○, ●—●: ATCC 33277, □—□, ■—■: 16-1

し、*P. gingivalis* 381株の生菌を3回口腔内に感染させ、1週間および3週後にその結紮糸に付着している*P. gingivalis*の菌数を算定した実験結果を表4に一括した²⁴⁾。1週間では全菌体免疫群および血球凝集因子免疫群共に*P. gingivalis*が検出された。3週後で、血球凝集因子免疫群の8匹中2匹のハムスターに*P. gingivalis*を検出できなくなったが対照群を含めたいずれの群でも1週間後よりも菌数が増えていた。1週間、3週間ともに免疫群の感染*P. gingivalis*菌数が対照群に比べ少なかった。皮下に*P. gingivalis*免疫することによって誘導される免疫応答は、結紮糸をしたハムスターでは菌の定着を抑えるというよりむしろ増殖を抑制するように働いていることがわかった。さらにあらかじめ*P. gingivalis*全菌体免疫しておいたハムスターの歯周局所の破骨細胞の数と歯槽骨の吸収程度は本菌感染対照群に比べ少ないことも明らかにしている²⁷⁾。

一日で産生される免疫グロブリンの量は、IgAの量がIgGに比べ圧倒的に多い。したがって唾液中に*P. gingivalis*に対する特異的分泌型IgAを産生させる手段が効果的であると考えられることができる。*P. gingivalis*死菌体をハムスターに内服させ、その後の唾液中抗体価を調べた。湿死菌体を10mgづつ1日おきに5回内服させると唾液中抗体価が上昇してきた。これらのハムスターに結紮糸をした後に3回*P. gingivalis*生菌を感染させた。しかし残念ながら免疫群の菌の定着阻害や歯周局所での増加抑制を認めることができなかった²⁴⁾。結紮糸をすることによって唾液中の分泌型IgAの効果をうまく引き出せなかったためかもしれない。次いで私共は²²⁾、BALB/c系マウスに病原性の強い*P. gingivalis* 16-1株の死菌体を内服させ唾液中分泌型IgAの応答を調べてみた。内服は20mgの湿菌体を2週間にわたり8回に分けて行った。他方皮下免疫群はアジュバン

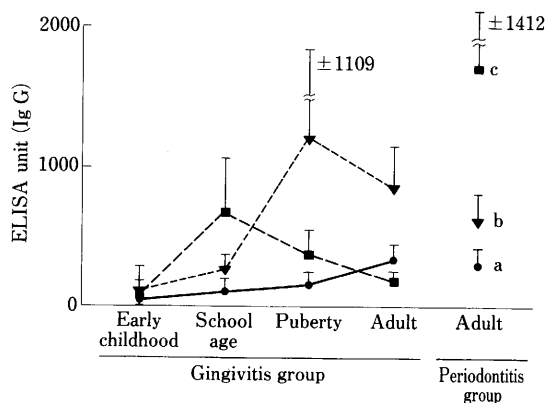


Figure 2 Serum IgG responses of patient groups with gingivitis and periodontitis against 3 serotypes of *A. actinomycetemcomitans*. ●—● : responses to serotype a, ▼····▼ : responses to serotype b, ■····■ : responses to serotype c.



Figure 3 A thin sectioned cells of an invasive *P. gingivalis* 16-1 strain. Fibrillar structure and capsular structure are seen on the outer membrane. Bar=0.2 μm.

Table 2 Serum IgG titers and avidities for the fimbria antigen of *A. actinomycetemcomitans*

Subjects	Titer	AI
Controls(n=10)	116.5 ± 81.2	72.1 ± 18.0
<i>A. actinomycetemcomitans</i> negative (n=18)	677.4 ± 167.2 ^a	59.6 ± 8.2 ^a
<i>A. actinomycetemcomitans</i> positive (n=24)	454.1 ± 111.3 ^a	48.6 ± 7.1 ^a

^a P < 0.05 compared with controls.

Table 3 Types of infection induced by various strains of *P. gingivalis* after subcutaneous injection into BALB/c mice^a

Strain	Spreading inflammation	Gravity abscess	Phlegmonous abscess	No. of deaths / No. of mice tested
ATCC 33277	-	+	-	0 / 8
FDC 381	-	+	-	1 / 6
A7A1-28	+	-	+	3 / 6
W50	+	-	+	2 / 6
W80	+	-	+	2 / 6
16-1	+	-	+	10 / 12

a : The cell suspensions were standardized by means of their optical density at 660nm. A 0.1 ml aliquot was injected subcutaneously in the abdominal skin of BALB/c mice(6 to 8 weeks old, females). The cell numbers of *P. gingivalis* ATCC 33277 and 16-1 were 1.9×10^9 and 1.0×10^9 , respectively.

トと共に 2 mg の湿菌を注射した。最終免疫 7 日後の全菌体に対する分泌型 IgA 応答を図 4 に示した。マウスでも内服免疫で高い分泌型 IgA 応答が起きてくること

が判明した。今後分泌型 IgA を有効に使うことができるか否かについて研究を展開していきたいと考えている。

次に私共は²⁴⁾, *P. gingivalis* の全菌体および血球凝集因子に対するウサギ免疫血清を上述の結紮糸をした本菌感染ハムスターに繰り返し与える受身免疫を実施した。本菌を感染させた後, ウサギ免疫血清100 μ lを同量のグリセリンと混合して一日2回実験ハムスターの口腔内に注入後, ヒトの歯間ブラシで結紮部位を中心にブラッシングした。結紮糸に付着している *P. gingivalis* を1週および3週後に調べた結果を表5に示した。死菌体ならびに血球凝集因子に対するウサギ免疫血清による受身免疫は, 極めて効果的に感染 *P. gingivalis* を排除させることがわかった。歯磨材あるいは含嗽液に *P. gingivalis* に対する特異抗体を加えた場合, それがヒトの歯周局所からの本菌の排除に効果的に働くか否か検討する実験を企画している。

P. gingivalis の感染予防ワクチンを研究目標としているニューヨーク州立大学バッファロー校の歯周病研究センターの Genco 教授のグループ^{28, 29, 30)}と大阪大学歯学部 Hamada 教授グループ^{31, 32, 33)}は, 共に *P. gingivalis* の線毛抗原を用いて先端的な研究を展開している。*P. gingivalis* の線毛に対する免疫応答は遺伝学的な制御を受けてはいるものの経口投与によって高い分泌型 IgA 応答を示すことが明らかにされた³²⁾。また *P. gingivalis* 線毛蛋白の合成ペプチドで免疫して得た抗血清は, *in vitro* で本菌の付着を抑制することも示されて²⁸⁾。さらに本合成ペプチドで免疫した実験動物の歯槽骨の吸収が少ないことも明らかにされている³⁰⁾。彼らは²⁹⁾近い将来, *P. gingivalis* をワクチンで排除できることを確信しているようである。

4. *A. actinomycetemcomitans* の感染予防

Harano ら³⁵⁾は, *A. actinomycetemcomitans* の線毛抗原を抽出し, その54KDa 蛋白質のN末端からのアミノ酸配列を読み取った。この54KDa の線毛蛋白抗原は本菌種に共通する抗原であると思われる。このアミノ酸配列から抗原性の高いと考えたオリゴペプチドを合成した。さらにこの合成オリゴペプチドの分子量を大きくする目的でレジンビーズにリジンを付着させ合成オリゴペプチドを結合させた。本方法で分子量を大きくすることによって抗原性を高めることが可能になりキャリア蛋白と結び付ける必要がなくなった。この分子量を大きくした線毛合成オリゴペプチド抗原をアジュバントと共にウサギに免疫し, 抗血清を得た。このウサギ免疫血清は, *in vitro* で *A. actinomycetemcomitans* が頬粘膜上皮に付着するのを抑制したり, 唾液で被覆したハイド

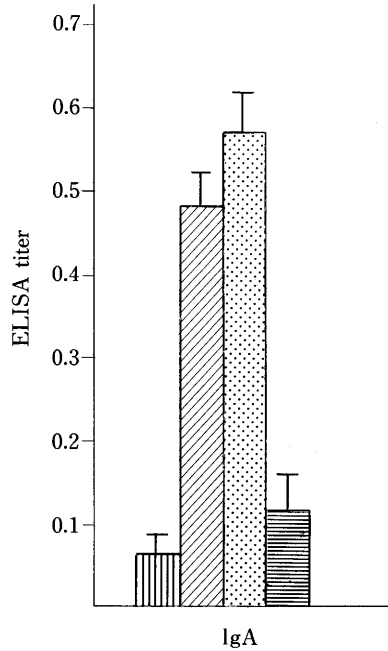


Figure 4 Salivary antibody response in BALB/c mice immunized either orally or subcutaneously with whole cells of *P. gingivalis* 16-1 strain. Two groups of 6 to 10 BALB/c mice (6 to 8 weeks old) were immunized by subcutaneous administration of a total of 2 mg wet weight cells with incomplete Freund adjuvant (▨) and sham-immunized (▧). Two groups of BALB/c mice were immunized by oral administration on days 0,3,5,7,9,11,13, and 14 with a total of 20 mg wet weight cells (▩) and sham-immunized (▨). Antibody levels were determined by ELISA 7 days after the last immunization. IgA levels were expressed at optical density at 490 nm of 2-3 diluted saliva.

ロキシアパタイトビーズに付着するのを抑えた。しかもこの付着抑制は, 当該の菌株だけでなく供試した他の *A. actinomycetemcomitans* 菌株に対しても起きた。

合成ペプチドワクチンは, 副作用が少ないが反対に分子量が小さく抗原性が少ないという欠点を持つ, 私共はレジンビーズにリジンを付着させ, そこに結合させた方法で分子量を大きくさせてその欠点をカバーすることができた。次の研究ステップでは, 実験動物を本抗原で免疫することによって *A. actinomycetemcomitans* の口腔内への定着を抑えるかを調べることである。

Table 4 Effect of subcutaneous immunization against *P. gingivalis* 381R' infection in hamsters with periodontal ligatures

Group	Mean recovery % of <i>P. gingivalis</i> 381R' in total CFU \pm standard deviation	
	1 week	3 weeks
Sham-immunized	11/11 ^a 1.66 \pm 0.42	11/11 7.88 \pm 1.5
Immunized with whole cells	8/8 0.36 \pm 0.20 ^b	7/7 1.80 \pm 0.54
Immunized with hemagglutinin	8/8 0.99 \pm 0.37	6/8 1.14 \pm 0.41 ^c

a : Number of hamsters from which *P. gingivalis* 381R' cells were recovered.

b : Significant difference from sham-immunized group ($p < 0.01$) by non-parametric statistical analysis (Mann-Whitney test).

c : Significant difference from the sham-immunized group ($p < 0.01$).

Table 5 Effect of local passive immunization by rabbit antiserum directed against *P. gingivalis* 381R' infection in ligatured hamsters

Group	Mean recovery % of <i>P. gingivalis</i> 381R' in total CFU \pm standard deviation	
	1 week	3 weeks
PBS	8/8 ^a 2.72 \pm 3.55	8/8 7.17 \pm 6.49
Anti-whole cell serum	8/8 ^b 0.019 \pm 0.30	3/8 0.001 \pm 0.001
Anti-hemagglutinin serum	8/8 0.016 \pm 0.016	2/8 0.0004 \pm 0.0009 ^c

a : Number of hamsters from which *P. gingivalis* 381R' cells were recovered.

b : Significant difference from the PBS group ($p < 0.01$).

c : Significant difference from the PBS group ($p < 0.001$).

5. 内毒素の不活化

歯周病原性グラム陰性桿菌は、内毒素を有する。リポ多糖(LPS)からなる内毒素は、歯槽骨を吸収させ歯齦に炎症を起こし歯周組織の機能を破綻させたり破壊する病原性因子である。ところがLPSはT細胞非依存性抗原であり、抗原性が低いため、歯周局所にこれらの細菌が増加しても患者は内毒素に対する高い免疫応答を示さないため内毒素の活性を中和することができない^{36,37,38}。

Katoらは、*Eikenella corrodens* 菌体でBALB/c系マウスを免疫し本菌のLPSに対する抗体産生細胞と同型マウスミエローマ細胞との融合細胞を作った。次いで本融合細胞産生単クローン抗体をBALB/c系マウスに免疫して、*E. corrodens* LPSイディオタイプ抗体に対する単クローン抗体を作成した。本抗イディオ

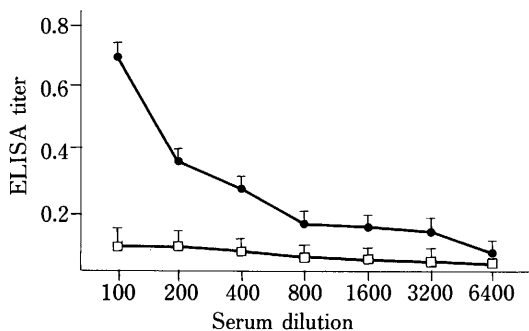


Figure 5 ELISA analysis of the reactivity of sera with lipid A of *E. coli* J5. The anti-lipid A IgG response was analyzed. Mouse antiserum immunized with anti-idiotypic antibody (●—●) and normal mouse serum (□—□).

Table 6 Effect of the immunization with anti-idiotypic antibody on survival of galactosamine sensitized mice injected intraperitoneally with *E. coli* J 5 LPS

Mouse group	LPS (μ g)	No. of survivors/total (%) ^a	
		BALB/c	ddY
Immunized with anti-idiotypic antibody	10	8/8 (100)	ND ^b
	20	5/5 ^c (100)	9/11 ^d (82)
Controls	10	9/10 (90)	ND
	20	1/4 (25)	0/10 (0)

a : D-Galactosamine hydrochloride (10mg per mouse) and *E. coli* J 5 LPS (10 or 20 μ g per mouse) were mixed and injected intraperitoneally into mice. The health of mice was monitored for 10 weeks, and mortality rates were determined at 48h.

b : not done.

c : $p < 0.02$ relative to control value (x 2 test).

d : $p < 0.001$ relative to control value (x 2 test).

イプ抗体は、*E. corrodens* LPSのリピドAと類似した抗原性を発揮した。すなわち *E. corrodens* のLPSのリピドAというT細胞非依存性の抗原を抗イディオタイプ抗体という蛋白抗原に変えることに成功した。

作成した *E. corrodens* LPSに対する抗イディオタイプ抗体をマウスに免疫すると作られる抗体すなわち抗-抗イディオタイプ抗体は、*E. corrodens* のLPSだけでなく大腸菌などのLPSとも反応性を示した(図5)。抽出される細菌性内毒素は、どの菌種のものも類似した生物活性を示すだけでなくリピドA部分などは共通抗原性を持っている。作成した抗イディオタイプ抗体で免疫しておいたマウスにLPSの感受性を高める β -ガラクトサミンを接種した後に大腸菌のLPSを腹腔内に注射した。48時間後のマウスの生存率をみたところ、抗イディオタイプ抗体で免疫したマウスは、LPSの接種に対し抵抗性を示すことを証明することができた(表6)。本実験によって内毒素の毒性を中和する方策を見出す手掛りを得ているが、ヒトに応用するまでには乗り越えなければならない問題が少なくない。

おわりに

現在の新しいワクチンは、1)成分を有効に使ったもの、2)合成ペプチドワクチン、3)抗イディオタイプ抗体の3種類がある。これらに組換えDNA技術が組み込まれている。成分ワクチンとしてよく知られているのは、B型肝炎ウイルス感染予防ワクチンである。本HBs抗原は組換えDNA技術を利用し酵母に作らせたものが使われている。合成ペプチドワクチンとしては、*P. gingivalis* の線毛遺伝子がクローニングされそれに

対応した複数の合成ペプチドが本菌感染予防ワクチン抗原となり得ることが示された。他方抗イディオタイプ抗体は、リピドAや多糖体抗原の代用抗原としての研究が展開されている。

歯周病は単一菌種の感染症でないことから、一菌種のみについてその感染予防が成功したとしてもすべての歯周病を予防できるとは考えていない。しかし現段階で主な歯周病菌である *P. gingivalis* および *A. actinomycetemcomitans* などに焦点をあててその排除に専念する姿勢を保持していくつもりである。両菌種を排除できれば、多くの歯周病の発症や進行を抑えることができるに違いない。

古典的な病原細菌学的手法に加えて幅広い免疫化学的方法や分子生物学的的手法によって歯周病原菌の病原性が解明されてきた。私共は、細胞あるいは分子レベルの分析技術の進歩、特に遺伝子工学や蛋白工学の急速な普及と種々の生体情報伝達物質の構造やメカニズムの解明という近年の科学の進歩を速やかに取り込み、歯周病の予防という目標を掲げて研究を展開していく計画である。

謝 辞

筆者は微生物学を専攻して25年過ぎた。その間、歯周病原菌の病原因子や感染予防ワクチンの可能性を追求してきた。研究成果の一部は、歯周病の診断や治療に応用されたものもあるが予防にはまだ応用されていない。今後予防にも応用される目を夢みて基礎研究をつづけていくつもりである。東京歯科大学学会に発表の機会を与えていただいた学長関根 弘学会長はじめ学会の方々に深く感謝する。また本研究の共同研究者である微生物学講座高添一郎教授、内藤祐子講師、加藤哲男講師、石原和幸助手、山中あゆみ助手、平井 要、金子孝彦、原野耕

一、君塚隆太大学院生、保存学第Ⅱ講座、山田了教授、清田築、中川種昭、木暮隆、斎藤淳助手、小児歯科学町田幸雄教授、藤井弘通講師、中川さとみ助手、横浜市立大・医学部・細菌学奥田研爾教授、ニューヨーク州立バッファロー校 Robert J. Genco 教授、南カリフォルニア大学 Jorgen Slot 教授に深甚なる謝意を表したい。

文 献

- 1) 奥田克爾著(1993年)：デンタルプラーク細菌の世界，医歯薬出版，東京
- 2) Okuda, K., Naito, Y., Ohta, K., Fukumoto, Y., Kimura, Y., Ishikawa, I., Kinoshita, S. and Takazoe, I. (1984) : Bacteriological study of periodontal lesions in two sisters with juvenile periodontitis and their mother, *Infect. Immun.*, **45** : 118~121.
- 3) Okuda, K., Fukumoto, Y. and Takazoe, I. (1988) : Enumeration of cultivable black-pigmented *Bacteroides* species in human subgingival dental plaque and fecal samples, *Oral Microbiol. Immun.*, **3** : 28~31.
- 4) Sasaki, N., Nakagawa, T., Seida, K., Ishihara, K. and Okuda, K. (1989) : Clinical, microbiological and immunological studies of post-juvenile periodontitis, *Bull. Tokyo dent. Coll.*, **30** : 205~211.
- 5) Choi J-I., Nakagawa, T., Yamada, S., Takazoe, I. and Okuda, K. (1990) : Clinical, microbiological, and immunological studies on recurrent periodontal disease, *J. Clin. Periodontol.*, **17** : 426~434.
- 6) Nakagawa, T., Yamada, S., Tsunoda, M., Sato, T., Naito, Y., Takazoe, I. and Okuda, K. (1990) : Clinical, microbiological, and immunological studies following initial preparation in adult periodontitis, *Bull. Tokyo dent. Coll.*, **31** : 321~331.
- 7) Seida, K., Saito, A., Yamada, S., Iahihara, K., Naito, Y. and Okuda, K. (1992) : A sensitive enzymatic method (SK-013) for detection of *Treponema denticola*, *Porphyromonas gingivalis* and *Bacteroides forsythus* in subgingival plaque samples, *J. Periodont. Res.*, **27** : 92~97.
- 8) Nakagawa, T., Yamada, S., Oosuka, Y., Saito, A., Hosaka, Y., Ishikawa, T. and Okuda, K. (1991) : Clinical and microbiological study of local minocycline delivery (Periocline®) following scaling and root planing in recurrent periodontal pockets, *Bull. Tokyo dent. Coll.*, **32** : 63~70.
- 9) Nakagawa, S., Machida, Y., Nakagawa, T., Fujii, H., Yamada, S., Takazoe, I. and Okuda, K. (1994) : Infection by *Porphyromonas gingivalis* and *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and antibody responses at different age in humans, *J. Periodont. Res.* **29** : 9-16.
- 10) Nakagawa, S., Fujii, H., Machida, Y. and Okuda, K. (1994) : A longitudinal study from prepuberty to puberty of gingivitis : Correlation of occurrence of *Prevotella intermedia* and sex hormones, *J. Clin. Periodontol.* (in press)
- 11) Carlsson, J. (1988) : What is a periodontal pathogen? : pp.104~111. In *Periodontology Today* (B. Guggenheim ed.) .Karger, Basel.
- 12) Okuda, K. (1993) : Attachment mechanisms and colonization. pp.140~157. in *BIOLOGY OF THE SPECIES PORPHYROMONAS GINGIVALIS*. Edit. H. N. Shah, D. Mayrand and R. J. Genco, CRC Press
- 13) Naito, Y., Toda, H., Okuda, K. and Takazoe, I. (1993) : Heterogeneity of hydrophobicity and adherence activity of invasive and noninvasive strains of *Porphyromonas gingivalis*, *Oral Microbiol. Immun.*, **8** : 195~202.
- 14) Naito, Y., Okuda, K. and Takazoe, I. (1984) : Immunoglobulin G response to subgingival gram-negative bacteria in human subjects, *Infect. Immun.*, **45** : 47~51.
- 15) Naito, Y., Okuda, K., Takazoe, I., Watanabe, H. and Ishikawa, I. (1985) : The relationship between serum IgG levels to subgingival gram-negative bacteria and degree of periodontal destruction, *J. Dent. Res.*, **64** : 1306~1310.
- 16) Okuda, K., Kato, T., Naito, Y. and Takazoe, I. (1986) : Precipitating antibody against lipopolysaccharide of *Haemophilus actinomycetemcomitans* in human serum, *J. Clin. Microbiol.*, **24** : 844~848.
- 17) Okuda, K., Kato, T., Naito, Y., Ono, M., Kikuchi, Y. and Takazoe, I. (1986) : Susceptibility of *Bacteroides gingivalis* to bactericidal activity of human serum, *J. Dent. Res.*, **65** : 1024~1027.
- 18) Naito, Y., Okuda, K. and Takazoe, I. (1987) : Detection of specific antibody in adult periodontitis sera to surface antigens of *Bacteroides gingivalis*, *Infect. Immun.*, **55** : 832~834.
- 19) Saito, A., Hosaka, Y., Nakagawa, T., Seida, K., Yamada, S. and Okuda, K. (1993) : Significance of serum antibody against surface antigens of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Oral Microbiol. Immun.*, **8** : 146~153.
- 20) Saito, A., Hosaka, Y., Nakagawa, T., Yamada, S. and Okuda, K. (1993) : The relative avidity of serum IgG antibody to the fimbriae antigen of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Infect. Immun.*, **61** : 332~334.
- 21) Kaneko, T. (1992) : Analysis of cell surface

- antigens of *Campylobacter rectus*, Bull. Tokyo dent. Coll., **33** : 171~186.
- 22) Okuda, K. and Kato, T. (1991) : Immunity to infection by periodontopathic bacteria in experimental animals. pp.237~250. in PERIODONTAL DISEASE:PATHOGENS AND HOST IMMUNE RESPONSES Edit. S. Hamada, S. C. Holt and J. R. McGhee, Quintessence Publishing Co., Ltd. (Tokyo)
- 23) Zambon, J. J., Slots, J. and Genco, R. J. (1983) : Serology of oral *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and serotype distribution in human periodontal disease, Infect. Immun., **41** : 19~27.
- 24) Okuda, K., Kato, T., Naito, Y., Takazoe, I., Kikuchi, Y., Nakamura, T., Kiyoshige, T. and Sasaki, S. (1988) : Protective efficacy of active and passive immunizations against experimental infection with *Bacteroides gingivalis* in ligated hamsters, J. Dent. Res., **67** : 807~811.
- 25) Okuda, K., Yamamoto, A., Naito, Y., Takazoe, I., Slots, J. and Genco, R. J. (1986) : Purification and properties of hemagglutinin from culture supernatant of *Bacteroides gingivalis*. Infect. Immun., **54** : 659~665.
- 26) Hirai, K., Kato, T. and Okuda, K. (1994) : A 57KDa protein is a specific antigen in pathogenic strains of *Porphyromonas gingivalis*. (unpublished data)
- 27) Katahira, H., Okuda, K., Moriguchi, M., Naito, Y., Takazoe, I. and Miake, K. (1985) : The effect of immunization on experimental periodontitis induced by inoculation of *Bacteroides gingivalis* in hamsters, Bull. Tokyo dent. Coll., **26** : 127~136.
- 28) Lee, J. Y., Sojar, H. T., Bedi, G. S. and Genco, R. J. (1992) : Synthetic peptide analogous to the fimbriin sequence inhibit adherence of *Porphyromonas gingivalis*. Infect. Immun., **60** : 1662~1670.
- 29) Klausen, B., Evans, R. T. and Genco, R. J. (1993) : Vaccination against *P. gingivalis* in experimental animals. pp. 341~349. in BIOLOGY OF SPECIES *PORPHYROMONAS GINGIVALIS*. Edi. H. N. Shah, D. Mayrand and R. J. Genco. CRC Press.
- 30) Evans, R. T., Klausen, B., Sojar, H. T., Bedi, G. S., Sfintescu, C., Ramaurthy, N. S., Golub, L. M. and Genco, R. J. (1992) : Immunization with *Porphyromonas (Bacteroides) gingivalis* fimbriae protects against periodontal destruction, Infect. Immun., **60** : 2926~2935.
- 31) Ogawa, T., Shimauchi, H. and Hamada, S. (1989) : Mucosal and systemic immune responses in BALB/c mice to *Bacteroides gingivalis* fimbriae administered orally, Infect. Immun., **57** : 3466~3471.
- 32) Shimauchi, H., Ogawa, T. and Hamada, S. (1991) : Immune response gene regulation of humoral immune response to *Porphyromonas gingivalis* fimbriae in mice, Immunology, **74** : 362~364.
- 33) Ogawa, T., Kusumoto, Y., Uchida, H., Nagashima, S., Ogo, H. and Hamada, S. (1991) : Immunobiological activities of synthetic peptide segments of fimbriae protein from *Porphyromonas gingivalis*, Biochem. Biophys. Res. Commun., **180** : 1335~1341.
- 34) Ogawa, T., Mukai, T., Yasuda, H., Shimauchi, M., Toda, Y. and Hamada, S. (1991) : Distribution and immunochemical specificities of fimbriae of *Porphyromonas gingivalis* and related bacterial species, Oral Microbiol. Immunol., **6** : 332~340.
- 35) Harano, K., Yamanaka, A., Kato, T. and Okuda, K. : Molecular biological study of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. J. Dent. Res. (in press)
- 36) Kato, T., Okuda, K. and Takazoe, I. (1988) : Cross-reactive monoclonal antibodies induced by LPS from periodontopathic bacteria, Adv. Dent. Res., **2** : 319~322.
- 37) Kato, T., Takazoe, I. and Okuda, K. (1989) : Structural analysis of lipopolysaccharides from *Eikenella corrodens* by use of murine monoclonal antibodies, Infect. Immun., **57** : 656~659.
- 38) Kato, T., Takazoe, I. and Okuda, K. (1990) : Protection of mice against the lethal toxicity of a lipopolysaccharide (LPS) by immunization with anti-idiotypic antibody to a monoclonal antibody to lipid A from *Eikenella corrodens* LPS, Infect. Immun., **58** : 416~420.