

〔原著〕 松本歯学 2 : 12~19, 1976

口腔内 Heparinase 産生性 *Bacteroides* の Endotoxin の生物学的活性

中村 武, 杉中芳幸

松本歯科大学 口腔細菌学教室 (主任 中村 武 教授)

高添一郎, 奥田克爾

東京歯科大学 微生物学教室 (主任 高添一郎 教授)

Biological Activity of Endotoxin from Oral Heparinase-producing *Bacteroides*

TAKESHI NAKAMURA and YOSHIYUKI SUGINAKA

Department of Oral Microbiology, Matsumoto Dental College

(Chief: Prof. T. Nakamura)

ICHIRO TAKAZOE and KATSUJI OKUDA

Department of Microbiology, Tokyo Dental College

(Chief: Prof. I. Takazoe)

Summary

A possible role of oral Heparinase-producing *Bacteroides* which resembles to *Bacteroides oralis* in the character in the etiology of periodontal disease has been emphasized by the authors. This is mainly based on the facts that they possessed heparinase and remarkably increase in number in the local samples of experimental mixed infection by human dental plaque following serial transfer.

The present study dealt with the extraction and characterization of the endotoxin from the cells of the *Bacteroides*.

Three strains which differed from each other in the heparinase activity were grown in Trypticase broth for 5 days anaerobically at 37°C. Harvested cells were washed three times with acetone, dried under CaCl₂ and subjected to extraction. Endotoxin were extracted by phenol-water (1 : 1) according to Westphal method with some modifications. The recoveries of preparation were 7~17% by dry weight basis. Preparations were whitish powder and water-soluble.

Preparations pyrogenicity, Shwartzman reactive activity and cytotoxic activity of the endotoxin were demonstrated. The higher endotoxic activity was observed in the preparation with higher recovery. In the Shwartzman reaction, a positive correlation was found between preparatory activity of the endotoxin and the heparinase activity of the strain.

本論文要旨の一部は、1970年11月28日、第18回IADR日本部会総会（於、東京）で発表した。

（昭和51年3月19日受理）

結 言

口腔細菌の内毒素は歯周疾患の病因に関連して種々検討されている⁵⁾⁷⁾⁹⁾¹⁷⁾¹⁸⁾²⁶⁾。しかし、結合組織中の種々ムコ多糖体を分解する Heparinase 産生性 *Bacteroides* に関するこの領域の研究はない。本菌は、分類学的には、*Bacteroides oralis*²⁾⁸⁾と近似しているが、口腔細菌中で heparinase を保有する唯一の菌種であり、*Bacteroides oralis* とは酵素産生能ないし病原性など種々の点で異っている¹⁰⁾¹¹⁾。Heparinase 産生性 *Bacteroides* は、口腔内に常在性で、歯垢接種による実験感染症局所膿汁および歯周疾患患者病巣で顕著に増量する事が認められる¹⁰⁾¹³⁾。また、本菌は、*Bacteroides melaninogenicus* および *Propionibacterium acnes* との純培養菌混合で、種々の動物に実験感染症を成立せしめ得る感染能を有している²³⁾。これらの事実から、Heparinase 産生性 *Bacteroides* の歯周疾患の発症ないし進行・経過における病原的役割として、これまで基質崩壊に関する本菌の産生酵素が種々検討された。近年、口腔細菌の菌体成分に関する役割は、歯周疾患の免疫学的病因に関連して解析されつつある¹⁾¹⁵⁾¹⁶⁾²⁰⁾²²⁾。本研究は、広範なムコ多糖体分解酵素¹²⁾を保有し、混合感染能を有する Heparinase 産生性 *Bacteroides* の内毒素を抽出し、その生物学的活性について検討した。

実 験 方 法

1. 供試菌株

歯垢接種による実験感染症膿汁より分離した heparinase 活性の強い、Heparinase 産生性 *Bacteroides* NR-1 株、HR-6 株および本活性の弱い TR-L 株の3株を供試した。

2. 内毒素の抽出法

内毒素の抽出法の概略は Fig. 1 に示す如く、Westphal の方法²⁵⁾に準じてフェノール・水法で²⁴⁾抽出した。すなわち、各供試菌の Trypticase broth に formalin (0.05%) を添加した後、遠沈 (15,000×G, 20 min. 4°C) によって集菌し、acetone で3回洗浄後、菌体を CaCl₂ 下で乾燥した。その乾燥菌体 5.0 g に対して、フェノール：水を 1：1 に加え、30 分間攪拌抽出した。water phase を分離し、精製水に対して 4°C、96 時間透析した。透析内液を遠沈し、この上清を micro

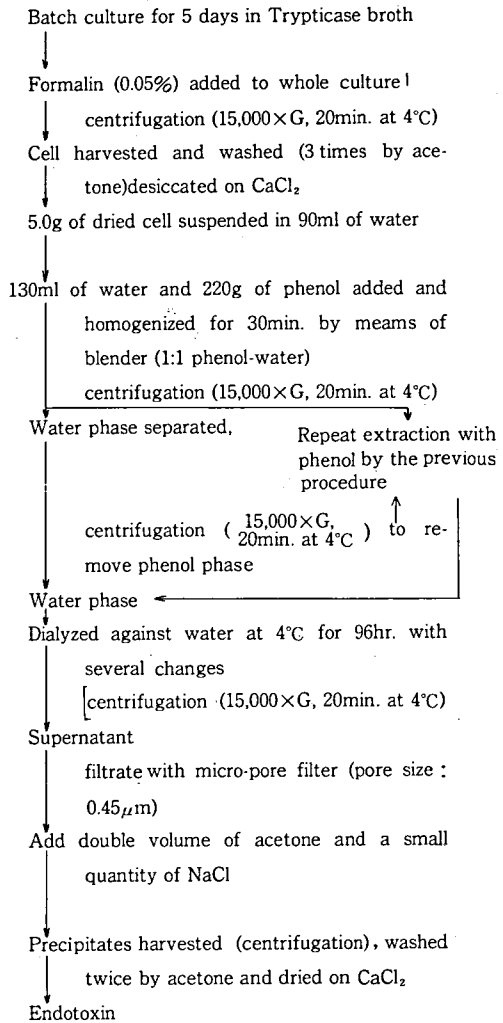


Fig. 1. Extraction procedure of endotoxin from oral Heparinase-producing *Bacteroides*

-pore filter (Millipore Co. pore size 0.45μm) で濾過した。次いで、この試料に2倍量の acetone と少量の NaCl を添加して内毒素を回収した。本標品をさらに acetone で2回洗浄後 CaCl₂ 下で乾燥した。

3. 内毒素の生物学的活性検索

単一注射によるウサギに対する皮内毒性：2 kg 前後のウサギ腹部皮膚を用い、抽出内毒素の 400μg, 200μg, 100μg, 50μg, 25μg を含む溶液 0.2 ml を皮内に接種した。24 時間後、注射部位の発赤炎症部の最長、最短長さを計測 (mm) し、両

者の積の平方根を求めて、lesion index としその活性を表わした。

Shwartzman 反応惹起能力：単一注射によるウサギの皮内反応と同様にウサギ腹部皮膚を用いた。準備注射は各抽出内毒素の40 μ g, 4 μ g, 0.4 μ g, 0.04 μ g 濃度で行った。惹起には、準備注射の24時間後、200 μ g/ml に調整した抽出標品液 1 ml をウサギの耳縁静脈に注射した。反応の強さは、経時的に準備注射部位に発現する出血ないし発赤部について単一皮内注射と同様に lesion index で判定した。また、各内毒素の Shwartzman 反応成立の交差性についても検索した。

発熱性：各抽出内毒素を滅菌生理食塩液に溶かし、ウサギの体重 1 kg 当り 400 μ g を耳縁静脈に接種後、経時的に直腸温を測定した。

各抽出内毒素の発熱最小量は、発熱性物質試験法¹⁴⁾に準じて求めた。すなわち、1組3頭のウサギを使用し、まず各ウサギの安静時直腸温を測定し、体温が安定した時点で平均直腸温を決定した。各抽出内毒素が 0.5 μ g, 5 μ g, 10 μ g, 20 μ g /ml になるよう滅菌生理食塩液で調製し、その 1 ml をウサギ耳縁静脈に接種後、経時的に直腸温を測定し

た。1組3頭中2頭以上が平均体温より0.6 $^{\circ}$ C 以上の上昇を認めたものを発熱陽性と判定した。

抽出内毒素の LD₅₀：体重 20 g 前後の雄マウスを用いて予備実験後、各抽出内毒素標品を発熱性の検索同様、種々の濃度に調製し、マウスの尾静脈に各 0.1 ml を接種し、4 日間観察して LD₅₀ を Behrens-Käber 法²¹⁾で算出した。1 濃度についてマウス 10 匹を使用した。

実験成績

内毒素の抽出回収量

各供試菌株より抽出した、内毒素標品の回収量は、Table 1 に示す如くである。すなわち、NR-1 株、HR-6 株および TR-L 株の acetone 乾燥菌体 4.20 g, 5.00 g, 5.70 g から、それぞれ 0.71 g, 0.47 g, 0.40 g の内毒素標品が得られた。これらの回収量は、乾燥菌体の 7.0~16.9% に当り、本菌群の内毒素含有量は可成り高いものである事を示していた。さらに heparinase 活性の強い菌株程、その回収量の高いことが多く認められている。

いずれの抽出標品も白色粉末として得られ、水に可溶性で、その溶液は高い粘稠性を呈するもの

Table 1. Recovery of endotoxin extracted from oral Heparinase-producing *Bacteroides* by phenol-water extraction.

strain	original cell (acetone-dried)	endotoxin		heparinase activity
		yield	recovery	
NR-1	4.20 g	0.71 g	16.9 %	strong
HR-6	5.00 g	0.47 g	9.4 %	strong
TR-L	5.70 g	0.40 g	7.0 %	weak

Table 2. Lesions produced by the intradermal injection of endotoxin extracted from oral Heparinase-producing *Bacteroides* after 24 hours.

rabbits endotoxin concent.	A	B	C
	NR-1	HR-6	TR-L
400 μ g	(10.8 \times 9.0)	10.0 \times 7.4	9.0 \times 6.8
200 μ g	(10.5 \times 8.2)	9.0 \times 8.4	9.6 \times 7.2
100 μ g	(10.2 \times 7.2)	8.6 \times 6.8	9.0 \times 6.0
50 μ g	8.6 \times 8.4	8.2 \times 6.8	6.0 \times 6.0
25 μ g	7.0 \times 5.8	8.2 \times 6.8	5.8 \times 4.4
control	—	—	—
lesion index average	8.5	8.9	6.8

() : hemorrhage — : negative

であった。

抽出内毒素の生物学的活性

ウサギに対する単一注射の皮内反応は、いずれの抽出内毒素標品も、 $400\mu\text{g}$ ~ $25\mu\text{g}$ まで注射部位に発赤が認められた (Table 2)。また、発赤部の大きさは、一般に接種濃度に比例していた。各菌株から得た内毒素標品の皮内反応における強さを、平均 lesion index で見ると、NR-1 株のそれは、8.5、HR-6 株は 8.9 で両者は近似の値を示し、NR-1 株の内毒素標品では出血像も認められた。しかし、TR-L 株内毒素標品の lesion index は、6.8 で前 2 者に比較して低い値であった。

各抽出内毒素の Schwartzman 反応の成績は、Table 3, Fig.2 に示す如くである。いずれの菌株からの抽出内毒素標品にも Schwartzman 反応発現性が認められた。すなわち、各濃度の準備注射 24 時間後、各当該抽出標品による惹起注射で発赤反応部は、いずれも経時的に発現・増大し、惹起注射 6~8 時間後に最大値を示し、以後経時的に消失した。各菌株からの抽出標品の本反応性を lesion index で見ると、NR-1 株および HR-6 株は

近似して高く、TR-L 株の抽出標品は小さい値であった。すなわち、NR-1 株の内毒素標品は $0.04\mu\text{g}$

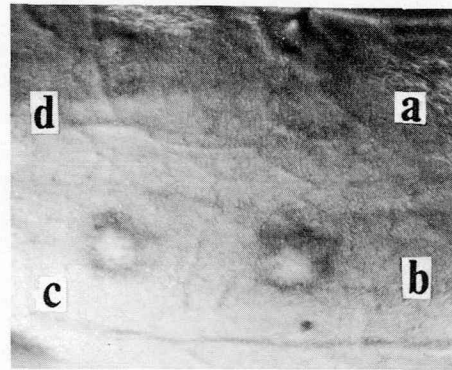


Fig. 2. Schwartzman reaction in rabbit skin produced by Heparinase-producing *Bacteroides* NR-1 strain endotoxin. Areas of skin received preparatory injection of a: $40\mu\text{g}$, b: $4\mu\text{g}$, c: $0.4\mu\text{g}$, d: $0.06\mu\text{g}$ of the endotoxin. Reaction shown in photograph developed 6 hours after provocative intravenous injection by $200\mu\text{g}$ of endotoxin.

Table 3. Schwartzman reaction by minimum endotoxin extracted from oral Heparinase-producing *Bacteroides*.

endotoxin \ hours		before provocation	4	6	8	24
preparat. NR-1 ↑ NR-1 provoocat. ($100\mu\text{g}/\text{kg}$)	$40\mu\text{g}$	—	16.5 ※	17.1	15.0	12.2
	$4\mu\text{g}$	—	12.4	13.5	13.8	12.0
	$0.4\mu\text{g}$	—	9.7	9.9	10.3	9.2
	$0.04\mu\text{g}$	—	—	7.3	8.3	7.8
	cont.	—	—	—	—	—
preparat. HR-6 ↑ HR-6 provoocat. ($100\mu\text{g}/\text{kg}$)	$40\mu\text{g}$	—	8.5	8.8	14.4	4.9
	$4\mu\text{g}$	—	—	7.7	9.3	3.9
	$0.4\mu\text{g}$	—	—	6.5	6.9	3.2
	$0.04\mu\text{g}$	—	—	—	—	—
	cont.	—	—	—	—	—
preparat. TR-L ↑ TR-L provoocat. ($100\mu\text{g}/\text{kg}$)	$40\mu\text{g}$	—	6.9	7.4	7.3	3.5
	$4\mu\text{g}$	—	5.9	6.7	7.1	—
	$0.4\mu\text{g}$	—	—	—	—	—
	$0.04\mu\text{g}$	—	—	—	—	—
	cont.	—	—	—	—	—

— : negative

※ : expressed by lesion index

濃度の準備注射でも、惹起注射6時間後で明らかに発赤が認められ、HR-6 株のそれは $0.4\mu\text{g}$ であった。これに対し、TR-L 株の内毒素標品は、 $4\mu\text{g}$ 以上の準備注射でなければ Shwartzman 反応は発現しなかった。

各抽出内毒素の準備注射に対して異った菌株の内毒素標品でそれぞれ惹起した交差 Shwartzman 反応の成績は、Table 4 に示した。

ウサギ3頭を使用し、各ウサギの反応に対する感受性の個体差を考慮して各内毒素を組合せ、50

μg および $25\mu\text{g}$ の各濃度を準備注射した。24 時間後に、各交差する内毒素標品の $100\mu\text{g}/\text{kg}$ で惹起した。経時的に4時間、6時間、8時間、24時間後の反応を判定し、各内毒素標品の交差反応性を lesion index 平均値で比較した(Table 5)。NR-1 あるいはHR-6 株内毒素標品の準備注射に対して、それぞれHR-6、NR-1 株の抽出標品で惹起しても、その lesion index は、7.8 および 7.5 と高い値を示し、両者には殆んど反応発現性に差異が認められなかった。これに対して、TR-L 株の抽出内毒素

Table 4. Cross reaction of Shwartzman reaction by endotoxin extracted from oral Heparinase-producing *Bacteroides* expressed by lesion index.

after provocat.	preparat. rabbits provocat. concent.	NR-1		HR-6		TR-L	
		A	B	A	C	B	C
		TR-L	HR-6	TR-L	NR-1	HR-6	NR-1
4 hrs	$50\mu\text{g}$	7.4	9.3	7.2	7.8	6.0	6.1
	$25\mu\text{g}$	6.0	6.6	6.0	6.4	5.9	5.0
6 hrs.	$50\mu\text{g}$	7.4	(8.7)	8.2	8.0	8.1	6.0
	$25\mu\text{g}$	5.6	7.9	6.2	6.5	6.5	5.5
8 hrs.	$50\mu\text{g}$	7.9	(9.7)	9.1	8.7	6.0	7.3
	$25\mu\text{g}$	7.2	7.2	8.7	8.9	5.2	6.2
24 hrs.	$50\mu\text{g}$	6.2	7.2	5.1	7.4	5.6	5.5
	$25\mu\text{g}$	4.7	5.5	4.3	5.6	4.8	5.2
total lesion index average		6.6	7.8	6.9	7.5	6.2	5.9

(): hemorrhage

Table 5. Cross reaction of Shwartzman reaction by endotoxin extracted from oral Heparinase-producing *Bacteroides* expressed by total lesion index average.

preparat. provocat.	NR-1	HR-6	TR-L
NR-1 (A)		7.5	5.9
HR-6 (B)	7.8		6.2
TR-L (C)	6.6	6.9	

(): rabbit

標品の準備注射では、NR-1 および HR-6 株のいずれの内毒素標品で惹起しても lesion index 平均値は 5.9~6.2 と最小値を示し、その反応性が弱かった。この成績は、ウサギの感受性個体差によるものではないことが種々の組合せから明らかである。従って、他の生物学的活性の成績と一致して、TR-L 株の内毒素は、Shwartzman 反応発現能力も他の 2 株より弱い。一方、本発現性の強い NR-1 および HR-6 株内毒素標品の準備注射に対して、TR-L 株の抽出標品で惹起した場合は、それぞれ 6.6 および 6.9 という中間的値を示した。すなわち、反応発現能力の弱い内毒素標品で準備注射しても、活性の高いもので惹起すれば本反応が強く発現すること、また、その逆も成立することがわかった。しかし、いずれの菌株からの抽出内毒素標品も反応の程度に差はあるが、反応成立に交差性のあることがわかった。しかも、HR-6 および NR-1 株の内毒素標品は、反応成立に強い交差性を有していた。

各抽出内毒素の 400 μ g/kg 耳縁静脈注射によるウサギ発熱性は Fig. 3 に示す如くである。いずれも注射後 1.0~1.5 時間まで、直腸温の直線の上昇が認められ、40.2~40.5 $^{\circ}$ C を示した。次いで 2 時

間から 2.5 時間後の間で、いずれの内毒素も 0.3~1.0 $^{\circ}$ C の下降経過をとり、さらに 3 時間~4 時間で再び上昇し、以後下降に向い回復した。この成績から、いずれの抽出標品も明らかに発熱性を有すること、また、その経過は 2 相性であることがわかった。HR-6 株の内毒素標品は、注射後 1.0~1.5 時間の第 1 相と 4 時間後に見られる第 2 相の直腸温が 40.5 $^{\circ}$ C で最も高い発熱を示した。HR-6 株の抽出標品は、第 1 相が供試 3 種中最も低い値であったが、第 2 相は NR-1 株標品同様高い発熱を示した。また、TR-L 株の抽出標品は、第 1 相が 40.2 $^{\circ}$ C であったが、第 2 相は 39.7 $^{\circ}$ C でやや低く、その下降経過も早かった。

NR-1 および HR-6 株の抽出標品の最小発熱量は 10 μ g/kg、TR-L 株のそれは 20 μ g/kg であった (Table 6)。TR-L 株の内毒素標品の発熱性は、他の 2 者に比較し弱いといえよう。また、低濃度では他の菌株と同様 2 相性発熱は認められなかった。

Table 6. The minimum pyrogenetic dosis of endotoxin extracted from oral Heparinase-producing *Bacteroides*.

endotoxin	intravenous injection /kg			
	1 μ g	10 μ g	20 μ g	40 μ g
NR-1	—	+	+	+
HR-6	—	+	+	+
TR-L	—	—	+	+

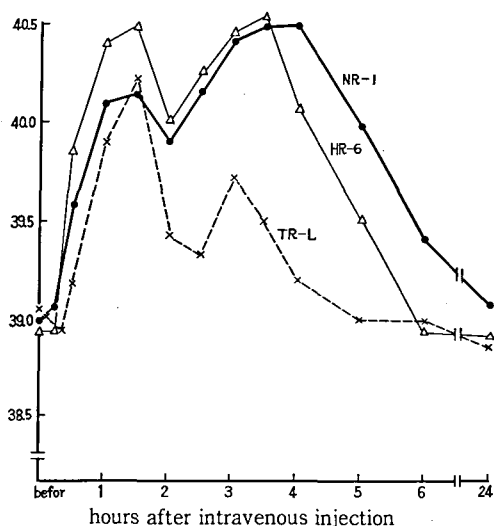


Fig. 3. Pyrogenetic responses of endotoxin (400 μ g/kg) extracted from oral Heparinase-producing *Bacteroides*

マウス尾静脈内注射による LD₅₀ は、Table 7 に示した。NR-1 株の抽出内毒素標品の LD₅₀ は、0.30mg/g で最も小さく、次いで TR-L 株の 0.33mg/g、HR-6 株のそれは 0.38mg/g であった。この成績から、各菌株の抽出標品間にマウスに対する致死毒性の顕著な差異は認められなかったが、抽出内毒素標品は、いずれもマウスを斃すのに 0.30mg/g 以上を要することがわかった。

考 察

一般に口腔内細菌の保有する内毒素の生物学的活性は非常に弱い。Heparinase 産生性 *Bacteroides* から得た内毒素標品のマウス LD₅₀ も 0.30~0.38mg/g と高かった。そしてこの LD₅₀

Table 7. Lethal effect to mice of endotoxin from oral Heparinase-producing *Bacteroides*.

concent. endotoxin	NR-1	HR-6	TR-L
1.0	1 / 10	0 / 10	0 / 10
2.0	2 / 10	1 / 10	1 / 10
4.0	4 / 10	4 / 10	4 / 10
5.0	5 / 10	4 / 10	5 / 10
7.0	9 / 10	8 / 10	9 / 10
10.0	10 / 10	10 / 10	10 / 10
LD ₅₀	0.30 mg/g	0.38 mg/g	0.33 mg/g

death/total 96 hours after injection

は、Hofstad⁵⁾の抽出した *Bacteroides melaninogenicus* 内毒素のそれに近似している。内毒素として弱い活性を保有している事実は、抽出標品の発熱性でも確認された。すなわち、本抽出標品では、内毒素としては、比較的多量の 10 μ g/kg 接種で発熱性が認められた。しかしながら、接種量を増やし 400 μ g/kg にすると、内毒素に特長的な 2 相性の発熱パターンが観察されている。各菌株から抽出した内毒素標品の生物学的活性の比較から、heparinase 活性の強い菌株程その内毒素活性も高い事がわかった。この事実は、本菌の病原性の強弱を考える際に注目しなければならない点であろう。

本菌よりの内毒素の回収率は、菌種の相違はあるにしても、Mergenhausen⁹⁾らおよび本間⁷⁾のそれらに比較してかなり高い。Hofstad⁵⁾の LD₅₀ の所見とはほぼ一致した活性を有する点を考えると、標品の純度のみが回収率の高さに反映されているとはいえないが、フェノール・水抽出法では種々の物質の混入は避け難い事も事実である⁶⁾。現在抽出標品の化学的組成は検討中である。

内毒素は、歯齦嚢局所の細胞に直接毒性を示すばかりでなく⁹⁾、局所粘膜から侵入し¹⁷⁾、局所 Schwartzman 反応の惹起による炎症を機縁付ける¹⁸⁾。さらに mast cell の関与によって内毒素が歯槽骨の吸収を促進する可能性³⁾¹⁹⁾も示されている。一方、歯周疾患の病因論に免疫・病理学的考察¹⁵⁾¹⁶⁾²²⁾が加えられているが、この面でも内毒素は重要な因子である。高い抗原性⁴⁾によってもたらされる免疫学的諸反応ならびに adjuvant 効果による免疫応答の増強などは、すでに多くの注目

を集めている¹⁾。本研究で示された内毒素がこれら諸反応に関与する可能性は、本菌の分布から考えて極めて強い。

内毒素の血管系に対する作用を考える上で、内毒素の補体に対する作用は重要である。補体の関与する障害作用には生体膜の破壊、起炎症作用および血液凝固促進作用などがあるが、これらはいずれも血管透過性の増強に関連すると考えられるからである。中でも血液凝固促進作用は重要なものであろう⁶⁾。歯齦嚢内細菌の産生する内毒素が、歯周局所で補体を活性化すれば、当然アナフィラトキシンが歯周組織に放出される。これは、歯周組織中の mast cell、血小板に作用し、chemical mediator を遊離させる。この一連の炎症性変化の中で、heparin は、血管透過性を亢進し、血流を促進する事によって、生体局所で防禦的に作用すると考えられる。Heparinase 産生性 *Bacteroides* の heparin 分解酵素は、この一連の防禦機構を乱し、局所における炎症の正常な回復を遅らせるものと考えられる。

結 論

Heparinase 産生性 *Bacteroides* は、歯周疾患の進行・経過に重要な役割を有する菌群である。

Heparinase 産生性 *Bacteroides* の 3 株よりフェノール・水抽出法によって、白色粉末の、水に可溶性の内毒素標品を得た。内毒素の回収率は高く、7.0~17.0%であった。抽出内毒素標品は、いずれもウサギ皮膚に毒性を示し、Schwartzman 反応を惹起させた。ウサギでの発熱には、10~20 μ g/kg の内毒素標品を要した。マウスに対する

LD₅₀ も、0.30~0.38mg/g と高かった。抽出内毒素標品の生物学活性は、他の口腔内 gram 陰性菌と同様に低かったが、heparinase 活性の強い菌株の内毒素標品程その活性も高かった。

Heparinase 産生性 *Bacteroides* の歯周組織に及ぼす病原性を、その内毒素活性と heparin 分解酵素活性のかかわり合いの面から考察した。

文 献

- 1) 青野正男, 岡田 宏, (1975) 歯周疾患と細菌内毒素 歯界展望, 46 : 217~223.
- 2) Buchanan, R. Gibbons, N. E. and Co-editors (1974) Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. 8th ed., P 384~404, William and Wilkins Co., Baltimore.
- 3) Hausmann, E., weifeld, N. and Miller, W. A. (1972) Effects of lipopolysaccharides on bone resorption in tissue culture. Calc. Tiss. Res., 9 : 272~282.
- 4) Hofstad, T. (1969) Serological properties of lipopolysaccharide from oral strain of *Bacteroides melaninogenicus*. J. Bacteriol., 97 : 1078~1082.
- 5) Hofstad, T. (1970) Biological activities of endotoxin from *Bacteroides melaninogenicus*. Archs oral Biol., 15 : 343~348.
- 6) 本間 遜, 齊藤和久, 河西信彦, 丹羽 充 (1973) 細菌内毒素, P. 344~402, 講談社サイエンティフィク, 東京.
- 7) 本間 孝 (1969) *Bacteroides melaninogenicus* の内毒素に関する研究. 歯科学報, 69 : 1506~1521.
- 8) Loesche, W. J., Socransky, S. S. and Gibbons, R. J. (1964) *Bacteroides oralis*, Proposed new species isolated from the oral cavity of man. J. Bacteriol., 88 : 1329~1337.
- 9) Mergenhagen, S. E., Hampp, E. G. and Scherp, H. W. (1961) Preparation and biological activities of endotoxin from oral bacteria. J. infect. Dis., 108 : 304~310.
- 10) 中村 武 (1969) 口腔内嫌気性 Heparinase 産生菌に関する研究. 十全会誌, 78 : 509~530.
- 11) Nakamura, T., Suginaka, Y. and Obata, T. (1976) Enzymatic action of oral *Bacteroides* against the dental plaque forming substance from *Streptococci*. Bull. Tokyo dent. Coll., 17 : 107~122.
- 12) 中村 武, 杉中芳幸, 小幡直樹, 青木宣夫 (1975) 混合感染能を有する口腔内嫌気性菌の酸性ムコ多糖体と脂質分解酵素に関する研究. 松本歯学, 1 : 11~21.
- 13) Nakamura, T., Suginaka, Y. and Takazoe, I. (1976) Heparinase activity in lesion of periodontal diseases. Bull. Tokyo dent. Coll., 17 : (in press)
- 14) 日本公定書協会 (1955) 日本薬局方, 第7改正, 第1部解説書, P. 80~85, 広川書店, 東京.
- 15) 奥田克爾, 高添一郎 (1975) アレルギーからみた歯周疾患のなりたち. 歯界展望, 46 : 383~388.
- 16) Ranney, R. R. and Zander, H. A. (1970) Allergic periodontal disease insensitized squirrel monkeys. J. periodont., 41 : 12~21.
- 17) Rizzo, A. A. (1968) Absorption of bacterial endotoxin into rabbit gingival pocket tissue. Periodontics. 6 : 65~70.
- 18) Rizzo, A. A. and Mergenhagen, S. E. (1956) Local Shwartzman reaction in rabbit oral mucosa with endotoxin from oral bacteria. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 104 : 579~582.
- 19) Shapiro, S., Ulmonsky, M. and Scheurer, M. (1968) Mast cell population in gingiva affected by chronic destructive periodontal disease. J. Periodont., 39 : 276~278.
- 20) Socransky, S. S. (1970) Relationship of bacteria to the etiology of periodontal disease. J. dent. Res., 49 : 203~222.
- 21) 高木敬次郎, 小沢 光 (1960) 薬物学実験, P 131~132, 南山堂, 東京.
- 22) 高添一郎 (1973) 歯周疾患の免疫学的病因論, 歯界展望, 41 : 765~770.
- 23) Takazoe, I. and Nakamura, T. (1971) Experimental mixed infection by human gingival crevice material. Bull. Tokyo dent. Coll., 12 : 85~93.
- 24) Tauber, H. and Garson, W. (1959) Isolation of lipopolysaccharide endotoxin. J. Biol. Chem., 234 : 1391~1393.
- 25) Westphal, O., Lüderitz, O. and Bister, F. (1952) Über die Extraktion von Bakterien mit Phenol/Wasser. Z. Naturforschg., 7 : 148~155.
- 26) 吉田千里 (1964) *Spirillum sputigenum* に関する研究. 歯科学報, 64 : 891~911.