螢光抗体法による歯根尖病巣の免疫病理学的研究 —とくに数種の口腔内常在微生物の局在性について—

岡 下 守 正
おか した もり まさ

大阪歯科大学大学院歯学研究科病理学専攻
大阪歯科大学 口腔病理学教室* (指導 筒井正弘教授)

〔受付：昭和47年9月4日〕

抄録：歯根尖病巣の成立やその過程に口腔内常在細菌や細菌性代謝産物が重要な役割を果していると考えられる。そこで抜歯時歯根尖に附着していた74症例の歯根尖病巣における6種類(*Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Bacterionema*, *Bacteroides*, *Fusobacterium*, *Corynebacterium*)の細菌および細菌抗原の局在を螢光抗体法を用いて検索すると同時に、一般的な組織染色法により病巣を病理組織学的に診断、歯根膿瘍、歯根肉芽腫、歯根嚢胞の3型に分類を行なって種々検討を加えた。その結果、74症例中61症例(82.4%)に各種細菌の菌体もしくは菌体成分と考えられる特異螢光を見出した。歯根膿瘍では41症例中36症例(87.8%)、歯根肉芽腫は23症例中17症例(73.9%)、歯根嚢胞は10症例中8症例(80.0%)の検出頻度であり、螢光陽性部位は病巣中心部よりも少し外側に多く認められる傾向にあり、これらの特異螢光は主に菌塊として、また多型核白血球や大食細胞に貪食された形として見い出された。

緒 言

口腔内の2大疾患と称えられる歯牙齦蝕症や歯周疾患の発症や経過に口腔内常在菌が深い関連性を有することが判明しつつあるが^{1,2)}、歯周疾患のなかでも根尖性歯周疾患は辺縁性歯周疾患とは異なり、その原因が一部辺縁性歯周疾患の他、主として歯牙齦蝕症に継発する歯髄炎、とりわけ抜歯後の感染根管にあり³⁻⁵⁾、歯牙齦蝕症に由来する内因感染症であるとの説が主流を占めている。そして本病巣から連鎖球菌をはじめ、各種の微生物が細菌学的な分離培養法や組織学的な細菌染色法によって検出確認されている⁶⁻¹⁴⁾。しかしこれらの研究方法では培養法や染色法、その他の諸条件の相違によって必ずしもそのdataが一定していないことから、本病巣における細菌の詳細な観察が未

だ完全になされているとはいいい難い現況である。

そこで、私は螢光抗体法^{15,16)}を応用して歯根尖病巣における各種の菌体や、その菌体産物の存在の確認、出現頻度、出現部位などを組織レベルで観察すると同時に病理組織学的な所見をも合わせて総合的に検討を試みたところ興味ある所見を得たので報告する。今回私が検出の対象とした細菌は *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Bacterionema matruchotii* (以上好気性菌) および *Bacteroides melaninogenicus*, *Corynebacterium*, *Fusobacterium* (以上嫌気性菌) の6種類であるが、これらの細菌をあらかじめ純培養し、それぞれの細菌抗原に対する特異抗体から螢光抗体液を作製し、抜去歯に附着した状態で摘出された歯根尖病巣の組織切片上で上記細菌の菌体や菌体産物を検出し、その存在状態および部位について検

A pathological study on chronic apical lesion with the fluorescent antibody technique —Localization of the cellular components of oral bacteria in the human apical lesion—

M. OKASHITA (Department of Oral Pathology, Osaka Dental University, Kyobasi, Higasi-ku, Osaka)

* 大阪市東区京橋1の47 (〒540)

Jap. J. Oral Biol. 14 : 539-559, 1972.

Table 1 Clinical diagnosis and histological appearance in 74 specimens of apical lesions

Case	Age	Sex	Loca- tion	Clinical diagnosis	Histological appearance	Case	Age	Sex	Loca- tion	Clinical diagnosis	Histological appearance
1	54	F	[8]	CAP	AG	38	41	F	[5]	CAP	AA
2	18	F	[7]	CAP	AG	39	45	M	[5]	CAP	AA
3	54	M	[7]	CAP	AA	40	58	M	[7]	CAP	AA
4	54	M	[7]	CAP	AG	41	27	M	[7]	CAP	AA
5	42	F	[7]	CAP	AA	42	28	F	[8]	AAP	AA
6	43	M	[6]	AAP	AG	43	35	F	[5]	CAP	AG
7	33	F	[4]	CAP	AA	44	30	F	[2]	CAP	AG
8	50	F	[6]	AAP	AA	45	25	F	[4]	CAP	AG
9	29	F	[6]	CAP	AA	46	48	F	[2]	AA	AC
10	25	F	[7]	CAP	AA	47	34	M	[6]	CAP	AG
11	41	F	[6]	CAP	AA	48	45	M	[5]	CAP	AA
12	10	M	[6]	CAP	AC	49	48	F	[7]	CAP	AG
13	23	M	[7]	CAP	AA	50	45	M	[4]	CAP	AC
14	23	M	[7]	CAP	AC	51	45	M	[2]	CAP	AG
15	16	M	[6]	AA	AA	52	44	F	[2]	AAP	AG
16	16	M	[6]	AA	AA	53	24	F	[8]	CAP	AA
17	47	F	[2]	CAP	AA	54	38	F	[8]	CAP	AA
18	10	F	[6]	AA	AG	55	35	M	[8]	CAP	AA
19	61	F	[3]	AAP	AC	56	35	M	[8]	CAP	AG
20	22	F	[4]	CAP	AG	57	24	F	[7]	CAP	AA
21	33	M	[4]	CAP	AC	58	24	F	[7]	CAP	AG
22	45	F	[8]	AAP	AG	59	24	F	[8]	CAP	AA
23	14	F	[6]	AAP	AA	60	32	F	[1]	CAP	AA
24	32	F	[1]	AAP	AA	61	62	M	[4]	CAP	AC
25	32	F	[1]	AAP	AG	62	22	F	[1]	AC	AG
26	30	M	[6]	AC	AA	63	45	F	[7]	CAP	AG
27	53	F	[7]	CAP	AC	64	45	F	[7]	CAP	AA
28	26	M	[5]	AC	AC	65	45	F	[7]	CAP	AG
29	20	F	[7]	CAP	AA	66	45	F	[7]	CAP	AA
30	23	M	[6]	CAP	AG	67	45	F	[6]	CAP	AG
31	18	M	[6]	CAP	AA	68	45	F	[7]	CAP	AG
32	18	M	[6]	CAP	AA	69	23	M	[5]	CAP	AA
33	50	F	[4]	CAP	AA	70	40	F	[4]	CAP	AA
34	41	F	[3]	CAP	AA	71	35	F	[7]	AAP	AA
35	46	M	[5]	CAP	AA	72	53	F	[2]	CAP	AA
36	41	F	[7]	AC	AA	73	36	F	[8]	AAP	AC
37	41	F	[1]	AC	AA	74	40	F	[5]	CAP	AA

Note : F, Female ;
M, Male ;
AAP, Acute apical periodontitis ;
CAP, Chronic apical periodontitis ;
AA, Apical abscess ;
AG, Apical granuloma ;
AC, Apical cyst.

素をおこない、本疾病の原因解明の一助とした。

実験材料と実験方法

1. 実験材料

実験に使用した材料は、抜去歯に附着した状態で摘出された歯根尖病巣74症例であり、Table 1は抜歯時の諸状況を表にしたものである。

2. 標本の作製

抜去された歯牙は直ちに4°C, 95%の ethanol に1~2日間浸漬固定し、固定による組織の硬化をまって歯根尖の病巣部分のみを歯牙からとりはずすか、もしくは歯牙の長軸に垂直な面で離断し、これをさらに4°C, 95% ethanol で12時間固定した。次いで4°C, 無水 ethanol で2~3日間脱水, 4°C, xylene I, II, IIIにそれぞれ10分間ずつ浸漬して包埋をおこなった (SAINTE-MARIE, 1962¹⁷⁾)。そして、離断面に平行にあるいは垂直に4~6 μ の厚さの連続切片を作製した。

3. 蛍光抗体液の作製

抗原には *Staphylococcus aureus* 209P, *Streptococcus pyogenes* 089, *Bacterionema matruchotii* X-8, *Bacteroides melaninogenicus* 32-2, *Fusobacterium*, *Corynebacterium* EXC-1 のそれぞれを用い、おのおの体重2500~3000g の健全な雄の家兎に免疫を行なった。その免疫日程および免疫方法は Table 2 に示す通りである。なお、抗原とした各種菌体のうち、*Staphylococcus* と *Streptococcus* は heart infusion broth (Difco) で37°C, 48時間好気培養後、集菌、0.9%生理食塩液で3回洗浄、凍結乾燥を行ない、この乾燥菌体を生理食塩液に浮遊させ1日1回60°C 30分間加熱操作を3日間行なって死菌とした。*Bacterionema matruchotii* は brain heart infusion agar (Difco) に2%の割合の yeast extract (Difco) を加えた培地で7日間好気培養を行ない、生理食塩液9容と0.5% phenol 液1容の混合液に浮遊させ死菌とした。*Bacteroides melaninogenicus* は menadione と hemin を添加した血液寒天培地 (高添ら, 1967¹⁸⁾) に7~14日間黄燐燃焼法 (鈴木ら, 1969¹⁹⁾) で、*Corynebacterium* は *Bacterionema* と同じ培地に7日間 gas pack 法 (BBL) でそれぞれ嫌気培養を行ない、*Bacterionema* と同様の操作で死菌とした。*Fuso-*

bacterium は本学細菌学教室の谷らによってヒトの口腔内より分離されたもので (竹内ら, 1971²⁰⁾)、家兎に対する抗血清の分与を受けた。また、*Bacterionema* と *Bacteroides* は共に東京歯科大学細菌学教室より分与された菌株である (TAKAZOE ら, 1963²¹⁾, 高添, 1954²²⁾)。これらの菌浮遊液は10 mg/ml ないしは20mg/ml とし、同容量の Freund's incomplete adjuvant (Difco) とを混じて1週間に1回家兎の後肢大腿筋に注射、その後は浮遊液のまま耳静脈に注射した (Table 2)。このようにして得た抗血清の Latex 凝集反応による抗体価は、*Staphylococcus* が $\times 1024$, *Streptococcus* が $\times 2048$, *Bacterionema*, *Bacteroides*, *Fusobacterium*, *Corynebacterium* はおのおの $\times 1024$ であった。

以上のようにして作製した抗血清と生理食塩液によって抽出した菌体成分との間に特異的な抗原抗体沈降線が生じることを確認してのち (OUCHTERLONY, 1958²³⁾) (Fig. 1), $\frac{1}{3}$ 飽和硫酸法により globulin を分画し、それに fluorescein isothiocyanate (Baltimore Biological Laboratory, Lot No. 8101445) を標識した (MARSHALL ら, 1958²⁴⁾)。つぎに、0.15M pH 7.2 phosphate buffered saline (以下 PBS と略す) で透析して free の色素を除去し、DEAE cellulose (Brown, 0.88 mEq/g, Lot No. 2245) により精製を行なった (MCDEVITT ら, 1963²⁵⁾)。

4. 蛍光抗体液による染色

蛍光抗体液による染色はすべて直接法でおこなった。すなわち、まず切片標本を xylene I, II, IIIによって脱 paraffin し、つぎに absolute, 95%, 75%, 45%, 40%の各 ethanol を通過させて脱 xylene をおこない、冷却した PBS で洗浄した。そして、あらかじめ遠沈しておいた蛍光抗体液を切片上にピペットで滴下し、温室で1夜 incubate した。翌日、切片を再び PBS でよく洗浄して、glycerine buffered saline (glycerine と PBS を9:1の割合に混合したもの) で封入し、カバーガラスの周囲を無色透明のマニキュアで封鎖し切片の乾燥を防ぎ、すみやかに蛍光顕微鏡で観察した。

5. その他の染色

Table 2 Immunizing procedure

	<i>Staphylococcus aureus</i> 209 P	<i>Streptococcus pyogenes</i> 089	<i>Bacterionema matruchotii</i> X-8	<i>Bacteroides melaninogenicus</i> 32-2	<i>Fusobacterium</i>	<i>Corynebacterium</i> EXC-1
Intramuscular injection (every other week)						
1.	20mg	10	20	20	10	20
2.	20	10	20	20	15	20
3.	20	10	20	20	20	20
4.	20	10	20	20	25	20
Intravascular injection (every other day)						
5.	10mg	20	20	40		20
6.	10	20	20	40		
7.	10	20		40		
8.	10	20		40		
9.	10	20		40		
10.	10	20		40		
11.	10	20		40		

蛍光抗体液で染色した切片に連続する切片に、hematoxylin eosin 染色を施し、また必要に応じて methylgreen pyronine 染色, PAS 染色, Gram 染色などの各染色をおこなって(太田ら, 1969²⁰) その一般病理組織学的所見を検索するとともに、蛍光抗体液による染色所見と比較検討した。

6. 鏡検と写真撮影

蛍光顕微鏡は Nikon SUR-F 型蛍光顕微鏡を使用し、フィルターには東芝 UVD 1 C (光源側) と Kodak Wratten 2 B (接眼側)、光源には東芝 SH 200 超高压水銀灯をもちいた。また一般染色標本の観察は Nikon SUR-Ke 型顕微鏡でおこなった。

写真撮影には Fuji Neopan F (ASA 32), Fujicolor R 100 (ASA 100, daylight type), Kodak Ektachrome-X (ASA 64, daylight type) を使用した。

実験成績

1. 一般染色所見

本病巣摘出時の臨床診断では慢性化膿性根尖性歯周組織炎が最も多く54症例であったが、これらを病理組織学的検索法によって分類すると歯根膿瘍が31症例、歯根肉芽腫が17症例そして歯根嚢胞が6症例であった。なお、臨床的に急性化膿性根尖性歯周組織炎と診断された11症例の病理検査の結

果は歯根膿瘍が5症例、歯根肉芽腫が4症例で、歯根嚢胞は2症例であった。同様に歯根嚢胞と臨床診断されたもの5症例のうち3症例は歯根膿瘍であり、歯根肉芽腫、歯根嚢胞が各1症例であった。また、臨床診断で歯根膿瘍の4症例では病名の一一致したものが2症例で他は歯根肉芽腫、歯根嚢胞が各1症例であった。

以上、74症例の歯根尖病巣を病理組織学的所見にもとづいて^{27,28)}分類してみると、歯根膿瘍が41症例、歯根肉芽腫が23症例そして歯根嚢胞が10症例であった (Table 3)。

これらの歯根尖病巣は一般に幼若肉芽組織と陳旧肉芽組織によって構成されているが、内部に膿瘍腔が存在するものや、病巣の最外層が線維成分に富み角質化した被膜をそなえるものが多く認められた。また、膿瘍の内面には上皮を有する症例がいくつか認められた。

歯根膿瘍と診断した41症例は、膿瘍腔に接し、その主病巣を占める最内層には、主として多型核白血球や大食細胞が、そのほかリンパ球や形質細胞、線維芽細胞などが出現していて、とりわけ形質細胞の浸潤が著明であった。なお、41症例中9症例において上皮の出現をみた。さらにその外層は、線維成分に富み陳旧化した肉芽組織から成っており、最外層では角質化した被膜を有するもの

Fig. 1 Ouchterlony's double diffusion pattern of antisera.

- A, *Staphylococcus aureus* 209P strain ;
 B, *Streptococcus pyogenes* 089 strain ;
 C, *Bacterionema matruchotii* X-8 strain ;
 D, *Bacteroides melanionogenicus* 32-2 strain ;
 E, *Fusobacterium* ;
 F, *Corynebacterium* EXC-1 strain ;
 1, Rabbit anti *Staphylococcus* serum ;
 3, Rabbit anti *Bacterionema* serum ;
 5, Rabbit anti *Fusobacterium* serum ;
 7-11, Saline extract of each antigen ;

- 2, Rabbit anti *Streptococcus* serum ;
 4, Rabbit anti *Bacteroides* serum ;
 6, Rabbit anti *Corynebacterium* serum ;
 12, Saline.

が多かった。

歯根肉芽腫と診断した23症例では、内層部が幼若な肉芽組織から成り、裂隙を有する症例もいくつかあった。その幼若肉芽組織では、形質細胞を主とし、大食細胞や泡沫細胞の認められる症例が多く、なお、様々の大きさの eosin 好性の Russell 小体が出現しており、形質細胞の細胞質内にこれと同様の eosin 好性の小さな硝子滴様のものが認められる症例もあった。また、その周辺部では著しい毛細血管の新生が認められた。

さらにこれより外層に向かうにしたがって線維化傾向が著明となっていて、中にその形態や大きさの不規則な組織肥満細胞が出現している症例も

あった。歯根肉芽腫の中で上皮を有した症例は4例であった。

つぎに、歯根嚢胞と診断した10症例では、上皮でかこまれた腔を有し、その嚢胞腔内には剥離または変性した上皮細胞、滲出細胞などが認められた。また、嚢胞腔や肉芽組織中にはコレステリン結晶による槍状の空隙が認められる症例もあった。そして、この空隙の周囲には多くの極めて大きな異物巨細胞の出現を認めた。

2. 蛍光抗体法による組織染色

以上のように組織学的に分類された本病巣を蛍光抗体法によって検索したところ、抗 *Staphylococcus* 蛍光抗体液による染色では74症例中35症

Table 3 Relationship between clinical diagnosis and histological appearance

Clinical diagnosis	Histological appearance			Total
	Apical abscess	Apical granuloma	Apical cyst	
Acute apical periodontitis	5	4	2	11
Chronic apical periodontitis	31	17	6	54
Apical abscess	2	1	1	4
Apical cyst	3	1	1	5
Total	41	23	10	74

Table 4 Localization of bacterial antigens and their relation to clinical diagnosis

Clinical diagnosis	Number of cases	Total	Number of fluorescein positive cases					
			<i>S. aureus</i>	<i>Str. pyogenes</i>	<i>B. matruchothii</i>	<i>B. melaninogenicus</i>	<i>Fusobacterium</i>	<i>Corynebacterium</i>
Acute apical periodontitis	11	9 (81.8%)	6 (55)	6 (55)	7 (64)	6 (55)	5 (46)	8 (73)
Chronic apical periodontitis	54	45 (83.3)	24 (44)	27 (50)	40 (74)	29 (54)	24 (44)	39 (72)
Apical abscess	4	3 (75.0)	1 (25)	1 (25)	3 (75)	1 (25)	1 (25)	3 (75)
Apical cyst	5	4 (80.0)	4 (80)	4 (80)	4 (80)	4 (80)	4 (80)	3 (60)
Total	74	61 (82.4)	35 (47.3)	38 (51.4)	54 (73.0)	40 (54.1)	34 (45.9)	53 (71.6)

Table 5 Localization of bacterial antigens and their relation to histological appearance

Histological appearance	Number of cases	Total	Number of fluorescein positive cases					
			<i>S. aureus</i>	<i>Str. pyogenes</i>	<i>B. matruchothii</i>	<i>B. melaninogenicus</i>	<i>Fusobacterium</i>	<i>Corynebacterium</i>
Apical abscess	41	36 (87.8%)	24 (58)	26 (63)	32 (78)	29 (71)	19 (46)	33 (80)
Apical granuloma	23	17 (73.9)	5 (22)	6 (26)	14 (61)	5 (22)	9 (39)	12 (52)
Apical cyst	10	8 (80.0)	6 (60)	6 (60)	8 (80)	6 (60)	6 (60)	8 (80)
Total	74	61 (82.4)	35 (47.3)	38 (51.4)	54 (73.0)	40 (54.1)	34 (45.9)	53 (71.6)

例, 抗 *Streptococcus* 蛍光抗体液では38症例, 抗 *Bacterionema* 蛍光抗体液では54症例, 抗 *Bacteroides* 蛍光抗体液では40症例, 抗 *Fusobacterium* 蛍光抗体液では34症例, そして抗 *Corynebacterium* 蛍光抗体液では53症例に特異蛍光を認めた。臨床診断と微生物の局在性との関連性あるいは病理組織診断と微生物の局在性の関連性は Table 4, 5 に示す通りであるが, 総体的にみて, 臨床診断では各種微生物の検出率に大差なかったが, ただ, 慢性化膿性根尖性歯周炎の場合, 抗 *Bacterionema* と抗 *Corynebacterium* 蛍光抗体液に

よる染色陽性症例が他の抗体液の陽性率よりもかなり高かった。病理組織診断では歯根膿瘍, 歯根嚢胞, 歯根肉芽腫の順で検出率が高かった。

これらをさらに詳しく検討してみると, 1種類の蛍光抗体液による染色で蛍光陽性反応を示す症例は他の蛍光抗体液でも蛍光陽性反応を示す場合が多く, 6種類すべてに陽性であったのは24症例, 5種類が9症例, 4種類が4症例, 3種類が6症例, 2種類が13症例, そして1種類のみが陽性なのは5症例であり, 6種の蛍光抗体液全てに陰性なのは13症例であった。

Table 6 Detected microorganisms and their relation to histological appearance

Histological appearance	Number of detected microorganisms							Total
	6	5	4	3	2	1	0	
Apical abscess	16 case(s)	7	2	4	5	2	5	41
Apical granuloma	2	2	2	2	6	3	6	23
Apical cyst	6	0	0	0	2	0	2	10
Total	24	9	4	6	13	5	13	74

6種類すべてに陽性を示した24症例を病理組織診断により分類すると、歯根膿瘍が16症例、歯根嚢胞が6症例で、歯根肉芽腫はわずか2症例であった。同様に5種類陽性の9症例中、歯根膿瘍が7症例、歯根肉芽腫が2症例であり、2種類だけ陽性であった13症例の内訳は、歯根膿瘍が5症例、歯根嚢胞が2症例、歯根肉芽腫が6症例であった。そして1種類だけ陽性を示した5症例は、歯根膿瘍が2症例と、歯根肉芽腫が3症例であった (Table 6)。

抗 *Staphylococcus* 蛍光抗体液、抗 *Streptococcus* 蛍光抗体液、抗 *Bacterionema* 蛍光抗体液、抗 *Bacteroides* 蛍光抗体液、抗 *Fusobacterium* 蛍光抗体液、抗 *Corynebacterium* 蛍光抗体液のいずれの染色でも特異蛍光はそのほとんどが肉芽組織

に浸潤している大食細胞や多型核白血球の細胞質に認められたが (Fig. 2)、膿瘍腔やその周囲の肉芽組織においてはこれら以外に細胞外にも特異蛍光を認めることがあり (Fig. 3)、また一部、腔内の崩壊した細胞にも特異蛍光を認めた (Fig. 4)。

多型核白血球における特異蛍光は、細胞質全体にわたって diffuse にあるいは細胞質内に菌塊を思わせる顆粒状の蛍光として認められ (Fig. 3)、大食細胞においては細胞質の一部分に限局して主に顆粒状に蛍光が認められる場合があった (Fig. 5)。また、食細胞以外の特異蛍光は、菌塊と思われる顆粒状の蛍光であった (Fig. 6)。

以上の蛍光陽性部位を各細菌について検討してみると、Table 7, 8, 9, 10のようであり、その特異蛍光の量的な判定を Table 11に示した。

Fig. 2 Staining with fluorescein-labeled anti *Streptococcus pyogenes* serum (A) and hematoxylin eosin (B). Case No. 58. Specific fluorescence in the cytoplasm of polymorphonuclear leukocytes and macrophages in granulation tissue in apical granuloma (Orig. mag. $\times 400$).

Fig. 3 Staining with fluorescein-labeled anti *Streptococcus pyogenes* serum. Case No. 53.

Specific fluorescence in masses of bacterial cells, and in the cytoplasm of polymorphonuclear leukocytes and macrophages in granulation tissue in apical abscess (Orig. mag. $\times 200$).

Fig. 4 Staining with fluorescein-labeled anti *Staphylococcus aureus* serum (A) and hematoxylin eosin (B). Case No. 10.

Specific fluorescence in the cytoplasm of polymorphonuclear leukocytes and macrophages in abscess lumen in apical abscess (Orig. mag. $\times 400$).

この結果、膿瘍ではいずれの蛍光抗体液による染色でも膿瘍腔内とその周囲の腔に接する幼若肉芽組織に特に強い特異蛍光として認められる症例が圧倒的に多く、多型核白血球や大食細胞の細胞質中に diffuse にあるいは一部分に局限してもしくは顆粒状に認められたり (Fig. 4)、基質には菌塊を思わせる顆粒状の蛍光として認められた (Fig. 3, 6)。また、一部の症例では病巣の中心部からのびている裂隙の最深部と、その附近に局限した細胞浸潤層に認められるものもあり、その他、炎症

のかなり強い 2, 3 の症例では炎症巣が被膜にまで波及し、肉芽組織はもちろんのことその部の被膜内にも特異蛍光が認められた (Fig. 7)。このような症例では肉芽組織における小血管内にも特異蛍光を放つ細胞が認められた (Fig. 8)。

歯根肉芽腫における特異蛍光は、幼若肉芽組織においては歯根膿瘍の場合とほぼ同様の所見を呈していたが、菌塊として細胞外に認められる顆粒状の蛍光はごくわずかであった。しかしながら、いくつかの症例では病巣中心部に特異蛍光が認め

Fig. 5 Staining with fluorescein-labeled anti *Corynebacterium* serum (A) and hematoxylin eosin (B). Case No. 39.
Specific fluorescence in the cytoplasm of macrophages in necrotic lesion of granulation tissue in apical abscess (Orig. mag. $\times 400$).

Fig. 6 Staining with fluorescein-labeled anti *Streptococcus pyogenes* serum. Case No. 53.
Specific fluorescence in masses of bacterial cells, and in the cytoplasm of polymorphonuclear leukocytes and macrophages in granulation tissue in apical abscess (Orig. mag. $\times 400$).

られず、幼若肉芽層の外側、つまり陳旧肉芽層に近い部位において、幼若肉芽組織をとりかこむような状態でかなり強い特異蛍光が認められる症例もあった (Fig. 9)。また、抗 *Bacterionema* 蛍光抗体液、抗 *Corynebacterium* 蛍光抗体液による染色では、幼若肉芽組織だけでなく陳旧肉芽組織においても特異蛍光を認める症例が多かったが、これらは主として単球と思われる細胞の細胞質に diffuse な比較的弱い蛍光として認められた。

なお、泡沫細胞および泡沫細胞の附近では特異蛍光はほとんど認められなかった。

歯根膿瘍と歯根肉芽腫において上皮を有した症例では、上皮組織内に菌塊として認められる場合や上皮細胞の変性が強い場合には上皮細胞間隙に浸潤した多型核白血球にも特異蛍光が認められた (Fig. 10)。

嚢胞における特異蛍光は、いずれの蛍光抗体液でも嚢胞腔内の菌塊や変性した組織物質に、また

Table 7 Localization of bacterial antigens

Case	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Streptococcus pyogenes</i>	<i>Bacterionema matruchotii</i>	<i>Bacteroides melaninogenicus</i>	<i>Fusobacterium</i>	<i>Corynebacterium</i>
1			PO	PE	PE	PO
2	PE	PE	BE, PE, PO	PE	PE	BE, PE, PO
3			PG	BG, PG		PG
4					PE	PE
5	PG	PG	PG	BG, PG		PG
6	PE	PE	PO		PE	PO
7		PG	PG	PG	PG	PG
8	PA, PG	PA, PG	PG	PA, PG		PG
9	PA, PG	PA, PG	PG	PA, PG	PA, PG	PA, PG
10	PA, PG	PA, PG	PG	PG		PG
11	PG	PA, PG	PG	PG	PG	PG
12			PW			PW
13	PG	PG	BG, PG	PG	BG, PG	BG, PG
14	PCa, PEp, PW	PCa, PEp, PW	PCa, PEp, PW	BC, BEp, BW, PCa PEp, PW	PCa, PEp, PW	PCa, PEp, PW
15			PG			PG
16	PA, PG, PCu	PA, PG, PCu	PG	PA, PG, PCu	PA, PG, PCu	PG
17	PA, PG	BA, BG, PA, PG	PG	PA, PG	BA, BG, PA, PG	PG
18						
19	PW	PW	PEp, PW	PW	PW	EEp, PW
20						
21	PW	PW	PCa, PEp, PW	PW	PW	PCa, PEp, PW
22						
23						
24	PA, PG	PA, PG	PA, PG	PA, PG	PA, PG	PG
25			PE, PO			PE, PO
26	BA, BG, PA, PG	BA, BG, PA, PG	PG	BA, BG, PA, PG	BA, BG, PA, PG	PG
27						
28	BEp, BW, PEp, PW	BEp, BW, PEp, PW	PW	BW, PW	PW, PW	PW
29						PG
30			PE			PE
31		PA, PG		PG	PG	
32			PG	PA, PG		
33			PG			PG
34			PG	PG		PG
35			PG	PA, PG		
36	PA, PG	PA, PG	PG	PA, PG	PA, PG	
37	PA, PG	PA, PG, PCu	BA, BG, PA, PG PCu	PA, PG	PA, PG, PCu	PG
38	BG, PG	PG	PG, PCu	PG	PG	PG, PCu
39	BA, BG, PA, PG	BA, BG, PA, PG	PG	PA, PG	BA, BG, PA, PG	PG
40	BA, BG, PA, PG	BA, BG, PA, PG	PA, PG	BA, BG, PA, PG	BA, BG, PA, PG	BA, PA

Table 7 つづき

Case	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Streptococcus pyogenes</i>	<i>Bacterionema matruchotii</i>	<i>Bacteroides melaninogenicus</i>	<i>Fusobacterium</i>	<i>Corynebacterium</i>
41	PG	PG	PG	PG	PG	PG
42						BA,BG,PA,PG
43			PE			PE
44					BE	
45			PO		PO	PO
46			PW			PCa, PEp
47			PO			
48			PG			PG
49	PE	PE	PE, PO			PE, PO
50	BC,PCa,PEp,PW	BC,PCa,PEp,PW	PCa, PEp	PCa, PEp, PW	PCa, PEp, PW	PCa, PEp
51			PE, PO	PE		
52			PE	PE	PE	
53	PG	BG, PG	PG	PG		PA, PG
54	BG, PG	BG, PG	PG	BG, PG	PG	PG
55	BA,BG,PA,PG	BA,BG,PA,PG	BA,BG,PA,PG	BA,BG,PA,PG	BA,BG,PA,PG	BA,BG,PA,PG
56	BE,PE,PO	BE, PE, PO	BE, PE, PO		BE, PE, PO	BE, PE, PO
57	PG	BG, PG	PG	PG	PG	PG
58	PE	PE	PE	PE	PE	PE
59			PG			PG
60						
61						
62						
63			PE			PE
64						
65						
66	BA,BG,PA,PG	PA, PG	PG	PA, PG		PG
67		PE				
68						
69	PA, PG	PA, PG	PG	PA, PG	PA, PG	PG
70						
71	PA, PG	PA, PG		BA,BG,PA,PG		PG
72	PA, PG	PA, PG	PA, PG			PG
73	PW	PW	PW	PW	PW	PW
74						

Note: BA, Bacterial cells in abscess lumen
 BG, Bacterial cells in granulation tissue
 PA, Phagocytes in abscess lumen
 PG, Phagocytes in granulation tissue
 PCu, Phagocytes in capsule
 BE, Bacterial cells in early lesion
 BO, Bacterial cells in older lesion
 PE, Phagocytes in early lesion
 PO, Phagocytes in older lesion

BC, Bacterial cells in cavity
 BEp, Bacterial cells in epithelial tissue
 BW, Bacterial cells in connective tissue wall
 PCa, Phagocytes in cavity
 PEp, Phagocytes in epithelial tissue
 PW, Phagocytes in connective tissue wall

Table 8 Localization of bacterial antigens in apical abscess

Lesion	<i>S. aureus</i>		<i>Str.pyogenes</i>		<i>B. matru-</i> <i>chotii</i>		<i>B. melanino-</i> <i>genicus</i>		<i>Fuso-</i> <i>bacterium</i>		<i>Coryne-</i> <i>bacterium</i>	
	B*	C**	B	C	B	C	B	C	B	C	B	C
Abscess lumen	5 case(s)	16	5	18	2	5	4	16	5	11	3	5
Granulation tissue	7	24	8	26	3	32	7	29	6	19	3	32
Capsule	0	1	0	2	0	2	0	1	0	2	0	1

* Bacterial mass
** Cytoplasm of phagocytes

Table 9 Localization of bacterial antigens in apical granuloma

Lesion	<i>S. aureus</i>		<i>Str.pyogenes</i>		<i>B. matru-</i> <i>chotii</i>		<i>B. melanino-</i> <i>genicus</i>		<i>Fuso-</i> <i>bacterium</i>		<i>Coryne-</i> <i>bacterium</i>	
	B*	C**	B	C	B	C	B	C	B	C	B	C
Early lesion	1 lese(s)	5	1	6	2	10	0	4	2	6	2	9
Older lesion	0	1	0	1	0	9	0	0	0	2	0	7

* Bacterial mass
** Cytoplasm of phagocytes

Table 10 Localization of bacterial antigens in apical cyst

Lesion	<i>S. aureus</i>		<i>Str.pyogenes</i>		<i>B. matru-</i> <i>chotti</i>		<i>B. melanino-</i> <i>genicus</i>		<i>Fuso-</i> <i>bacterium</i>		<i>Coryne-</i> <i>bacterium</i>	
	B*	C**	B	C	B	C	B	C	B	C	B	C
Cavity	1 case(s)	2	1	2	0	2	1	2	0	2	0	4
Epithelial tissue	1	3	1	3	0	4	1	2	0	2	0	5
Connective tissue wall	1	6	1	6	0	7	1	6	1	6	0	6

* Bacterial mass
** Cytoplasm of phagocytes

嚢胞壁に沿った形で変性・崩壊した上皮内やそこに浸潤している多型核白血球に (Fig. 11), さらに肉芽組織の食細胞内や基質にそれぞれ顆粒状に,あるいは細胞質に一部限局して認められた (Fig. 12)。なお, コレステリン結晶が析出していた症例においては特異蛍光を認めることができなかった。

考 察

以上の所見を病理組織学的診断に基づいて検討してみると, 先ず歯根膿瘍では, 炎症症状の激しい場合には細菌の検出率が高く, その存在部位も病巣全体に拡がっており, 血管内にさえも認められた。つぎに歯根肉芽腫と診断した病巣では, 歯根膿瘍のそれに比較して各種微生物の検出率が低

く, たとえ蛍光陽性であってもその蛍光の程度が全体に弱い場合や, 陽性部位が病巣を占める割合が少ない場合が多かった。また歯根嚢胞と診断した症例の8割が蛍光陽性であり, そのほとんどが嚢胞壁を形づくる肉芽組織において食細胞の細胞質に diffuse に見られた。

これらのことから, 歯根尖病巣の成立や, その経過における生体反応に, 細菌あるいは細菌産生物が重要な役割を演じている可能性が十分にうかがえる。また, 歯根尖病巣の中でも治癒傾向にあると考えられている歯根肉芽腫においてもなおかつ細菌あるいはその産生物が存在しており, このことから常に膿瘍などに変化し, 移行する可能性があることを示唆している。

Table 11 Qualitative and quantitative detection of bacterial antigens and their relation to histological appearance

Histological appearance	Fluorescein positive case	Staining degree					
		<i>S.aureus</i>	<i>Str.pyogenes</i>	<i>B.matru- chotii</i>	<i>B.melanino- genicus</i>	<i>Fuso- bacterium</i>	<i>Coryne- bacterium</i>
Apical abscess	No. 3	—	—	+	+	—	+
	5	+	++	+	+	—	+
	7	—	+	+	+	+	+
	8	++	++	+	+	—	+
	9	++	++	++	+	+	++
	10	++	++	+	+	—	+
	11	+	+	+	+	+	+
	13	+	+	+	+	+	+
	15	—	—	+	—	—	+
	16	+	+	+	+	+	+
	17	+	+	+	+	+	+
	24	+	++	+	++	+	+
	26	++	+++	+	++	+++	+
	29	—	—	—	—	—	+
	31	—	+	—	+	+	—
	32	—	—	+	+	—	—
	33	—	—	+	—	—	+
	34	—	—	+	+	—	+
	35	—	—	+	+	—	+
	36	+	+	+	+	+	—
	37	++	++	++	+	+	+
	38	+++	+++	+	+	+	+
	39	++	+++	+	++	+++	+
	40	+++	+++	++	++	+++	++
	41	+	++	++	+	+	+
	42	—	—	—	—	—	+
	48	—	—	+	—	—	+
	53	+	+++	+	+	—	+
	54	+	+++	+	+	+	+
	55	+	++	++	+	+	+
	57	+	++	+	+	+	+
	59	—	—	+	—	—	+
	66	+	+	+	+	—	+
	69	++	++	+	++	++	+
	71	+	+	—	++	—	+
	72	+	+	+	—	—	+
Apical granuloma	1	—	+	+	+	++	+
	2	+	+	+	+	++	+
	4	—	—	—	—	+	+
	6	+	++	—	—	+	+
	25	—	—	+	—	—	+
	30	—	—	+	—	—	+
	43	—	—	+	—	—	+
	44	—	—	—	—	+	—
	45	—	—	+	—	+	+
	47	—	—	+	—	—	—
	49	+	+	+	—	—	+
	51	—	—	+	+	—	—
	52	—	—	+	+	+	—
	56	+++	+++	++	—	+	++
	58	+	++	+	+	+	+
	63	—	—	+	—	—	—
	67	—	+	—	—	—	—
Apical cyst	12	—	—	+	—	—	+
	14	+	+	+	+	+	+
	19	+	+	+	+	+	+
	21	+	+	+	+	+	+
	28	++	++	+	++	++	+
	46	—	—	+	—	—	+
	50	+	++	+	+	+	+
	73	+	+	+	+	+	+

Note: ###, ++, +, and — indicate staining degrees ranging from maximum to negative.

Fig. 7 Staining with fluorescein-labeled anti *Fusobacterium* serum (A) and hematoxylin eosin (B). Case No. 41.

Specific fluorescence in the cytoplasm of polymorphonuclear leukocytes and macrophages in granulation tissue in apical abscess (Orig. mag. $\times 200$).

Fig. 8 Staining with fluorescein-labeled anti *Staphylococcus aureus* serum (A) and hematoxylin eosin (B). Case No. 16.

Specific fluorescence in the cytoplasm of polymorphonuclear leukocytes in capillary of granulation tissue in apical abscess (Orig. mag. $\times 400$).

Fig. 9 Staining with fluorescein-labeled anti *Streptococcus pyogenes* serum (A) and hematoxylin eosin (B). Case No. 56.

Specific fluorescence in the cytoplasm of polymorphonuclear leukocytes and macrophages in early lesion of granulation tissue in apical granuloma (Orig. mag. $\times 200$).

Fig. 10 Staining with fluorescein-labeled anti *Streptococcus pyogenes* serum (A) and hematoxylin eosin (B). Case No. 26.

Specific fluorescence in polymorphonuclear leucocytes and bacterial cells in intracellular and intercellular of the proliferated epithelia in apical abscess (Orig. mag. $\times 400$).

Fig. 11 Staining with fluorescein-labeled anti *Bacterionema matruchotii* serum (A) and hematoxylin eosin (B). Case No. 14.

Specific fluorescence in the cytoplasm of polymorphonuclear leukocytes and macrophages in lining epithelial tissue in apical cyst (Orig. mag. $\times 200$).

Fig. 12 Staining with fluorescein-labeled anti *Bacteroides melaninogenicus* serum (A) and hematoxylin eosin (B). Case No. 14.

Specific fluorescence in the cytoplasm of polymorphonuclear leukocytes and macrophages in lining epithelial tissue in apical cyst (Orig. mag. $\times 400$).

なお、臨床的に慢性化膿性根尖性歯周炎と診断された症例中、抗 *Bacterionema* と抗 *Corynebacterium* 蛍光抗体液による染色陽性率が、他の蛍光抗体液による染色陽性率よりもかなり高かったがその意義の詳細は不明である。

ところで、この歯根尖病巣の成り立ちを回顧してみると、そのほとんどが化膿性歯髄炎や歯髄壊疽などの歯髄疾患、さらにはそれらの不適正な歯内療法に起因することが示唆されている³⁻⁵⁾。なおまた、BRODERICK(1924⁷⁾、APPLETON(1932²⁹⁾、長谷川(1934³⁰⁾、石天(1943³¹⁾、本間(1968³²⁾、寺井(1969³³⁾らは感染根管内のほぼ全症例にある種の細菌の存在を証明している。一方、HEDMAN(1951³⁴⁾の感染根管内と根尖部の病巣における存在細菌の関連性を追究した実験では、82症例中65.8%に両者の細菌の一致を見出し、残りの8.5%は根管だけに細菌が存在し、23%はどちらも無菌的であったと報告している。その他歯根尖病巣内の細菌についての報告は数多くみられるが、その結果は検索者により、また検索法によって区々であるが、ここに先人達の報告のいくつかをあげてみると、細菌学的な分離培養法ではFRASER(1923⁶⁾は120症例中108症例に主として *Streptococcus viridans* を分離し、その他にもいくつかの菌種をあげているし、BRODERICK(1924⁷⁾は100症例より131株の菌を証明し、野口(1960⁹⁾は81症例の全症例から好気的な培養によって186株の細菌を分離し得たと言ひ、GROSSMAN(1959⁸⁾は感染根管の根尖部組織を好気培養したところ、その85.3%は無菌的であったとし、MELVILLE(1967¹⁴⁾は34症例の歯根端切除を行なった根尖病巣中23症例は無菌的であったと述べている。一方、組織学的な細菌染色で、HARNDT(1938¹⁰⁾は50症例の歯根肉芽腫は無菌的であったと報告し、BOYLE(1934¹¹⁾も45症例の歯根肉芽腫や歯根嚢胞のほとんどは無菌的であったと論じ、MÖSE(1954¹²⁾も52症例中45症例は無菌的であったと述べている。また今井(1960¹³⁾は71症例の歯根尖病巣中9症例は組織内に、21症例は嚢胞や膿瘍、裂隙などの組織空隙内に細菌の存在を認めているが、これらの多くは抜歯の際に腔内に入り込んだものと述べている。

以上列举したように、細菌学的な検索と組織学的な検索との間のみならず、おのおのの検索においてもかなりの差がみられるのは、材料の選択や材料採取法だけでなく細菌学的な分離培養法と組織レベルでの検索法との間に種々根本的な問題があるためと考えられる。組織レベルでの細菌染色の応用は、染色法がかなり困難であると同時に、食食された状態にあるものや、散在した菌体の検出などはより一層難かしくなってくることが多く、このために術者によってデータも違ってくると思われる。このことは今井¹³⁾が、組織染色法により細菌を検索した場合、多形核白血球に摂取されたものは容易に見られないと述べていることからもうかがえる。なかでも、細菌染色に最も広く用いられるGram染色にしても、菌体の細胞壁が完全でないと本来の染色性を示さず³⁵⁾、ことに組織内においては各種細胞核も染色され、これらの細胞が崩壊などした際に細菌の判定も難しいものとなってくることは容易に推察できる。筆者もGram染色などの染色を施してみたが、蛍光染色に比してその判定には困難をきわめた。

さて、蛍光抗体法を用いた組織レベルでの細菌抗原の検出報告は数多くみられるが、口腔領域ではヒトの歯肉においてCOURANT(1966³⁶⁾や竹内(1970³⁷⁾、TAKEUCHI(1970³⁸⁾が *Bacteroides melaninogenicus* を、椿本(1967³⁹⁾、1968⁴⁰⁾やTSUTSUI(1967⁴¹⁾らは *Staphylococcus* あるいは *Streptococcus* を、竹内・谷²⁰⁾は *Fusobacterium* をそれぞれみい出している。筆者が本研究で歯根尖病巣に認めた各種細菌の特異蛍光の存在状態は、これらの報告にみられるものと本質的には同様であって、本実験では検出症例が74症例中61症例(82.4%)であった。この成績は検出頻度においてはFRASER⁶⁾らの細菌学的な分離培養による成績に近く、今井¹³⁾らの組織学的な検索とはかなりへだたりがある。ところで、この実験結果において、各菌体間の共通抗原性に関する問題を無視することは出来ないが、筆者がおこなった寒天ゲル内沈降反応の限りでは各々の抗血清と他の抗原との間にはそれぞれ交叉反応は認められなかった。しかしながら、今村(1965⁴²⁾、IMAMURAら(1966⁴³⁾は *Staphylococcus* と *Streptococcus*

を抗原とする蛍光抗体液をそれぞれ作製し、菌体として塗抹標本を染色する場合は問題ないが、菌体成分となった場合に交叉反応があるとしている。事実、筆者も各菌体をラットの歯肉などに接種して交叉染色性を調べてみたが、菌体として細胞外に存在する時は交叉染色性はないが、細胞に貪食されて存在するある時期には *Staphylococcus* と *Streptococcus* の間に交叉染色性を認めた。このことは、ある一種の蛍光抗体液による染色が陽性だからといってその特異蛍光が必ずしもその細菌によるものではないかも知れない。従ってこの事項は、各菌種別に検出率を比較検討する場合十分考慮しなければならないことと考えている。ところが一方、野口⁹⁾は歯根端病巣を分離培養法と組織染色法の両面から存在細菌を詳細に検討し、その局在については、炎症および肉芽組織では処々に集団となって散在し、肉芽腫では周辺に多く、歯根嚢胞では病巣周辺部により多いとしており、筆者の所見とほぼ似かよった結果を得ている。これらのことを考え合わせてみても、本法は分離培養法の盲点である材料採取時の汚染問題などが補なわれるだけでなく、組織学的な検索において従来の細菌染色法では染色判別が困難であった菌体成分までもとらえられるという利点を持ち合わせており、病巣組織内において細菌が病巣の成立あるいは進展過程におよぼす影響をより一層明確にとらえることができると考えられる。

さて、細菌が炎症の原因の主役をなすことは周知のことであり、口腔内の感染症においても常在細菌がとりわけその大きな因子としてあげられている^{1,2)}。今回筆者が用いた細菌についても *Staphylococcus* や *Streptococcus* は多くの化膿性疾患から分離され、streptokinase や hyaluronidase で知られており⁴⁴⁾、*B. matruchotii* は歯石の形成で近年注目され病原性のあることも知られてきている²¹⁾。*B. melaninogenicus* は collagen を分解する collagenase を産生し⁴⁵⁾、辺縁性歯周疾患において注目され^{46,47)}、*Corynebacterium* と共に全身にわたる混合感染症から高頻度に検出され⁴⁸⁾、実験混合感染症においても混合感染の essential factor と言われており(高添ら, 1970⁴⁹⁾)、*Fusobacterium* は fuso-spirochetal infection な

どで知られている^{50,51)}。なかでも鈴木(1966⁴⁰⁾)や上野(1967⁵²⁾)はとくに無芽胞嫌気性菌を重要視している。もちろん、感染症は宿主、寄生体の相互関係によって成立するものであるから、寄生体側の条件はもとより宿主側の条件が臨床症状を左右することもまた当然であり⁵³⁾、歯根尖病巣における immunoglobulin の局在性についても TOLLER (1967⁵⁴⁾、1969^{55,56)}、1970⁵⁷⁾)や木南(1968^{58,59)})によって報告されているが、先にも述べたように、種々の過程を経ていったん細菌が根尖部に到達すると、格好の生息場所となり、炎症を引き起し生体の組織反応と対応して複雑な host-parasite relationship に関連して一定の増悪、治癒を繰り返し、ある時は膿瘍、ある時は肉芽腫というように種々の形、姿をとっているものと推測することができる。

結 論

蛍光抗体法により74症例の歯根尖病巣における *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Bacterionema*, *Bacteroides*, *Fusobacterium*, *Corynebacterium* の検出率と局在性を検討した。

1) 検出率のうちわけは、*Staphylococcus* 35症例、*Streptococcus* 38症例、*Bacterionema* 54症例、*Bacteroides* 40症例、*Fusobacterium* 34症例、そして *Corynebacterium* 53症例で、全体としては61症例に各細菌抗原の存在を示す蛍光が陽性であった。

2) 病理組織診断に基づいて診断すると、歯根膿瘍が41症例あり、そのうち *Staphylococcus* 24、*Streptococcus* 26、*Bacterionema* 32、*Bacteroides* 29、*Fusobacterium* 19、*Corynebacterium* 33症例で全体としては36症例が陽性、同様に歯根肉芽腫23症例中、*Staphylococcus* 5、*Streptococcus* 6、*Bacterionema* 14、*Bacteroides* 5、*Fusobacterium* 9、*Corynebacterium* 12、全体として17症例、歯根嚢胞10症例中、*Staphylococcus* 6、*Streptococcus* 6、*Bacterionema* 8、*Bacteroides* 6、*Fusobacterium* 6、*Corynebacterium* 8で全体として8症例に陽性であった。

3) それらの特異蛍光は、歯根膿瘍では、菌体として膿瘍腔付近の細胞内外に、貪食された状態

で肉芽組織の多型核白血球や大食細胞の細胞質内に認められ、歯根肉芽腫では陳旧肉芽組織近くの幼若肉芽組織において食食細胞に食食された状態で認められる場合が多く、歯根嚢胞では嚢胞壁付近および壁を形成している上皮や肉芽組織に認められた。

4) 以上の結果から、歯根尖病巣の発症や経過に口腔内常在菌が関与していることが十分にうかがえる。

Summary: Clinical and laboratory studies have repeatedly indicated the importance of oral bacteria in the initiation and progression of dental caries, periodontal disease and their sequelae, i.e., periapical lesions. However, localization of these bacteria in human tissue especially in the periapical lesion has remained unclear.

The present study was made to clarify the localization of cellular components of oral bacteria (*Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Bacterionema*, *Bacteroides*, *Fusobacterium* and *Corynebacterium*) with a fluorescent antibody technique and other conventional staining techniques.

Of 74 subjects, 41 were diagnosed as apical abscess, 23 as apical granuloma, and 10 as apical cyst by conventional staining methods. By a fluorescent antibody technique, 61 of 74 subjects were fluorescence positive. Of these 61 subjects fluorescein-labeled anti *Bacterionema*, *Corynebacterium*, *Bacteroides*, *Staphylococcus*, *Streptococcus* and *Fusobacterium* sera proved to be fluorescence positive in 54, 53, 40, 38, 35 and 34 subjects, respectively (Table 5). This specific fluorescence was usually observed as a bacterial mass and 1 or in the cytoplasm of macrophages and in polymorphonuclear leukocytes (Fig. 2, 3). These specific fluorescence were usually seen both in the central necrotic area and granulation tissue of apical abscess (Fig. 4, 5, 6), granulation tissue in apical granuloma (Fig. 9), and intercellular space of connective tissue wall in apical cyst (Fig. 11, 12).

From the above data, it is indicated that the initiation or the process of chronic apical periodontitis is related with oral bacteria.

文 献

- 1) ORLAND, F. J., BLAYNEY, J. R., HARRISON, R. W., REYNIERS, J. A., TREXLER, P. C., ERVIN, R. F., GORDON, H. A. and WAGNER, M.: Experimental caries in germfree rats inoculated with enterococci. *J. Amer. dent. Ass.*, **50** : 259-272, 1955.
- 2) SOCRANSKY, S. S.: Relationship of bacteria to the etiology of periodontal disease. *J. dent. Res.*, **49** : 203-222, 1970.
- 3) 愛知学院大学歯学部: 総合示説 根尖病巣. 日本歯科評論, (327) : 26-37, 1970.
- 4) 石川梧朗, 秋吉正豊: 口腔病理学, 第1版, 367-373頁, 永末書店, 東京, 1969.
- 5) 武井 盈: 歯根端病巣の微生物学. 愛知学院歯学雑誌, **4** : 101-106, 1967.
- 6) FRASER, C. J.: A preliminary report on the relation of *Streptococcus viridans* to periapical infection. *Brit. dent. J.*, **44** : 1350-1356, 1923.
- 7) BRODERICK, R. A.: Dental bacteriology. *Brit. dent. J.*, **45** : 1301-1317, 1924.
- 8) GROSSMAN, L. I.: Bacteriologic status of periapical tissue in 150 cases of infected pulpless teeth. *J. dent. Res.*, **38** : 101-104, 1959.
- 9) 野口 守: 根端病巣の細菌学的研究. 九州歯会誌, **14** : 114-168, 1960.
- 10) HARNDT, E.: Histo-bakteriologische Untersuchungen der erkrankten Zahnpulpa. *Dtsch. Z-M-Khk.*, **5** : 85-101, 1938.
- 11) BOYLE, P. E.: Intracellular bacteria in a dental granuloma. *J. dent. Res.*, **14** : 297-301, 1934.
- 12) MÖSE, J.: Die Bakteriologie des Wurzelkavals und des Granuloms. *Z. f. Stomat.*, **51** :

- 351-353, 1954.
- 13) 今井良雄: 歯根尖病巣の研究. 口腔外科学会雑誌, 6: 63-82, 1960.
 - 14) MELVILLE, T. H. and BIRCH, R. H.: Root canal and periapical floras of infected teeth. *Oral Surg. oral Med. oral Path.*, 23: 93-98, 1967.
 - 15) COONS, A. H. and KAPLAN, M. H.: Localization of antigen in tissue cells. II. Improvements in a method for the detection of antigen by means of fluorescent antibody. *J. exp. Med.*, 91: 1-13, 1950.
 - 16) 浜島義博, 京極方久: 免疫組織学, 第2版, 1-185頁, 医学書院, 東京, 1968.
 - 17) SAINTE-MARIE, G.: A paraffin embedding technique for studies employing immunofluorescence. *J. Histochem. Cytochem.*, 10: 250-256, 1962.
 - 18) 高添一郎, 中村 武, 小幡哲夫: 口腔常在性嫌気性菌群と感染症. 第40回日本細菌学会総会シンポジウム, 臨床細菌学よりみた無芽胞性菌抄録集, 4-9頁, 日本栄養化学, 東京, 1967.
 - 19) 鈴木祥一郎, 上野一恵: 嫌気性菌, 第1版, 15頁, 医学書院, 東京, 1967.
 - 20) 竹内 宏, 谷 明: 歯頸性歯周組織疾患患者の歯肉組織における *Fusobacterium* の局在性. 歯基礎誌, 13: 393-401, 1971.
 - 21) TAKAZOE, I., TAKEUCHI, T. and NAKAMURA, T.: A study of *Bacterionema matruchotii*. *Bull. Tokyo dent. Coll.*, 4: 42-49, 1963.
 - 22) 高添一郎: 口腔内嫌気性菌群の細菌学的研究(第一報) *Bacterium melaninogenicum* について. 歯科学報, 54: 432-437, 442, 1954.
 - 23) OUCHTERLONY, O.: *Handbook of Immuno-diffusion and Immunoelectrophoresis*, 2nd ed., 1-59, Ann Arbor Science Publishers, Michigan, 1968.
 - 24) MARSHALL, J. D., EVELAND, W. C. and SMITH, C. W.: Superiority of fluorescein isothiocyanate(Riggs) for fluorescent antibody technic with a modification of its application. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, 98: 898-900, 1958.
 - 25) MCDEVITT, H. O., PETERS, J. H., POLLARD, L. W., HARTER, J. G. and COONS, A. H.: Purification and analysis of fluorescein-labeled antisera by column chromatography. *J. Immunol.*, 90: 634-642, 1963.
 - 26) 太田邦夫, 畠山 茂: 病理顕微鏡標本の作り方, 第1版, 96, 115, 135, 164頁, 南山堂, 東京, 1969.
 - 27) 小野寅之助: 歯の病理学. 臨床歯科, 京都, 1963.
 - 28) 松宮誠一, 近藤三郎: 根端(尖)病巣の病理. 歯界展望, 18: 795-798, 1961.
 - 29) APPLETON, J. L. T.: A note on the clinical value of bacteriologically controlling the treatment of periapical infection. *Dent. Cosm.*, 74: 798-800, 1932.
 - 30) 長谷川慶蔵: 種々なる状態に於ける感染根管の細菌学的研究. 歯科学報, 39: 1151-1165, 1934.
 - 31) 石天泰三: 腐敗根管特に閉鎖根管内の嫌気性菌に関する研究. 日本口科学会雑誌, 36: 133-165, 1943.
 - 32) 本間 考: 根管内微生物について. 歯科学報, 68: 1029, 1968.
 - 33) 寺井庸祐: 感染根管治療による根管内細菌の消長, 並びに根管充填後の根尖歯周組織のX線の検索. 京大口科紀要, 9: 51-67, 1969.
 - 34) HEDMAN, W. J.: An investigation into residual periapical infection after pulp canal therapy. *Oral Surg. oral Med. oral Path.*, 4: 1173-1179, 1951.
 - 35) 桑原章吾: グラム陰性桿菌とは. グラム陰性桿菌感染症, 第1版, 1-22頁, 第一製薬 K.K., 東京, 1966.
 - 36) COURANT, P. R. and BADER, H.: *Bacteroides melaninogenicus* and its products in the gingiva of man. *Periodontics*, 4: 131-136, 1966.
 - 37) 竹内 宏: 蛍光抗体法による歯頸性歯周組織疾患の免疫病理学的研究. ラットの歯肉に注射された *Bacteroides melaninogenicus* の動態と歯肉組織の反応性. 歯科医学, 33: 386-404, 1970.
 - 38) TAKEUCHI, H., KOMEDA, S., TSUBAKIMOTO, K. and TSUTSUI, M.: Cellular components of *Bacteroides melaninogenicus* in the inflamed human gingiva. *J. Osaka Dent. Univ.*, 4: 123-130, 1970.
 - 39) 椿本九美夫: 蛍光抗体法による歯頸性歯周組織疾患の免疫病理学的研究. とくに歯槽膿漏症患者の歯肉における *Staphylococcus* および *Streptococcus* 抗原の局在性について(1). 歯科医学, 30: 588-601, 1967.
 - 40) 椿本九美夫: 蛍光抗体法による歯頸性歯周組織疾患の免疫病理学的研究. とくに歯槽膿漏症患者の歯肉における *Staphylococcus* および *Streptococcus* 抗原の局在性について(2). 歯科医学, 31: 327-353, 1968.
 - 41) TSUTSUI, M., UTSUMI, N. and TSUBAKIMOTO, K.: Immunohistochemical localization of *Staphylococcal* and *Streptococcal* antigens in inflamed human gingiva. *J. Osaka Dent. Univ.*, 1: 65-72, 1967.
 - 42) 今村貞夫: 細菌アレルギー. アレルギー, 15: 344, 1965.
 - 43) IMAMURA, S. and OFUJI, S.: The demonstration of cellular components of pyococci in the tissues of some skin lesions. *J. invest. Dermatol.*, 47: 177-184, 1966.
 - 44) BURNETT, G. W. and SCHERP: *Oral Microbiology and Infectious Disease*, 3rd ed., 586-647, Williams & Wilkins Co., Baltimore, 1968.
 - 45) GIBBONS, R. J. and MACDONALD, J. B.:

- Degradations of collagenous substrates by *Bacteroides melaninogenicus*. *J. Bact.*, 81 : 614-621, 1961.
- 46) 田中 勝 : *Bacteroides melaninogenicus* の免疫学的研究. 歯科学報, 70 : 1508-1519, 1970.
 - 47) 鈴木祥一郎, 上野一恵 : 臨床材料からの嫌気性菌検査法. 臨床病理, 9 : 392-396, 1961.
 - 48) 鈴木祥一郎 : 無芽胞嫌気性菌感染症について. 日伝病会誌, 40 : 12-18, 1966.
 - 49) 高添一郎 : 歯学微生物学(口腔細菌学談話会編), 第2版, 248-249頁, 医歯薬出版, 東京, 1970.
 - 50) MACDONALD, J. B., SUTTON, R. M., KNOLL, M. L., MADLENER, E. M. and GRAINGER, R. M. : The pathogenic components of an experimental fusospirochetal infection. *J. infect. Dis.*, 98 : 15-20, 1956.
 - 51) 待山弥彦 : 口腔分離の *Fusobacterium* の形態と病原性に関する研究. 久留米医会誌, 34 : 854-867, 1971.
 - 52) 上野一恵 : 常在菌としての嫌気性菌と病原菌としてのきめて. 日細菌誌, 22 : 345-348, 1967.
 - 53) 川喜多愛郎 : 感染論, その生物学と病理学, 第1版, 岩波書店, 東京, 1970.
 - 54) TOLLER, P. A. : Immunoglobulins in cyst fluids. *J. dent. Res.*, 46 : 1283-1284, 1967.
 - 55) TOLLER, P. A. : Protein substances in cyst fluids. *J. dent. Res.*, 47 : 968, 1968.
 - 56) TOLLER, P. A. and HOLBOROW, E. J. : Immunoglobulins and immunoglobulin-containing cells in cysts of the jaws. *Lancet*, 2 : 178-181, 1969.
 - 57) TOLLER, P. A. : Protein substances in odontogenic cyst fluids. *Brit. dent. J.* 128 : 317-322, 1970.
 - 58) 木南文雄 : 蛍光抗体法による歯根尖病巣の免疫病理学的研究. とくに human γ -globulin の局在性について. 歯科医学, 31 : 663-664, 1968.
 - 59) 木南文雄 : 蛍光抗体法による歯根尖病巣の免疫病理学的研究. とくに human γ -globulin の局在性について. 歯基礎誌, 10 : 36-49, 1968.