Streptococcus mutans の白金電極への 吸着に関する研究

山 本 光 人

朝日大学歯学部口腔細菌学講座 (主任: 並河 勇教授)

[受付: 昭和 61 年 5 月 12 日]

Study on the adsorption of *Streptococcus mutans* to platinum electrodes

Mituhito Yamamoto

Department of Oral Microbiology, Asahi University School of Dentistry

(Chief: Prof. Isamu Namikawa)

Hozumi, Hozumi-cho, Motosu-gun, Gifu 501-02, Japan

[Accepted for publication: May 12, 1986]

Key words: *Streptococcus mutans* / bacterial adsorption / dental plaque / dental caries / surface charge

Abstract: The object of this study aimed to investigate the adsorptive properties of a cariogenic *Streptococcus mutans* including six serotypes and a non-oral bacillus *Escherichia coli* using an apparatus designed for the measurement of bacterial adsorption to electrostatically charged platinum electrodes *in vitro*. Quantitative estimation of the bacterial adsorption by electron microscopy and the conditions affecting the bacterial adsorption to platinum electrodes were examined. Morphological differences in the materials adsorbed to the platinum electrodes which had been inserted into a human oral cavity were also examined as an *in vivo* experimental system.

The bacterial cells used were adsorbed more abundantly to positive electrodes than to negative electrodes. The number of *S. mutans* strain HS6 (serotype a) adsorbed to the positive electrodes increased with bacterial concentrations and current intensities up to 300 μ A. The bacterial adsorption to the positive electrodes was promoted by heating the bacterial cells and pretreatment of the electrodes with whole saliva. The bacterial cells of *S. mutans* adsorbed on the positive electrode were desorbed with time from this surface, when the polarity was changed. Scanning electron microscopy showed that in the human mouth the quantity of materials adsorbed on the positive electrodes placed was larger than those on the negative.

Results obtained from *in vitro* and *in vivo* experiments strongly suggest that adsorption of the cariogenic bacterium *S. mutans* to positively charged surfaces of restorative materials or tooth surfaces may play a role in producing the dental plaque associated with dental caries and periodontal disease.

緒 言

ヒト口腔内に生息する多数の細菌が Leeuwenhoek により観察・記録されて以来, Miller の齲蝕発生に関する口腔細菌による化学細

菌説¹⁾ など, これまで多くの研究者は口腔に常在する細菌と口腔疾患との関係に注目して来た。しかし細菌学的成因論に関してはいまだ十分に明らかにされていない面も多い。近年, 嫌気性菌培養技術の進歩によって, 病原性が確認されなかった細菌が齲蝕や歯周病と深くかかわりをもっていることが, 明らかにされつつある。すなわち, 多くの

口腔内常在微生物の中で、齲蝕の惹起あるいはその進展に関与する細菌としては *Streptococcus*^{2,3)}, *Actinomyces*^{4,5)} および *Lactobacillus*^{6,7)} などが、歯周疾患の発症に有力な細菌としては *Bacteroides*⁸⁾, *Fusobacterium*⁹⁾, *Actinomyces*¹⁰⁾ など多種の細菌が知られている。また、嫌気性細菌の分離培養法の不備により見落されていた *Capnocytophaga*¹¹⁾ や *Actinobacillus*¹²⁾ も注目され、歯周疾患誘発におけるこれらの細菌の病原性に関する研究成果が蓄積されつつある。

通常、口腔環境下では、細菌は食物の咀嚼・嚥下運動、唾液流あるいは粘膜細胞剝離などの物理的作用を受けている。また、唾液に含まれている成分であるムチン^{13,14)}、IgA¹⁵⁾ および lysozyme¹⁶⁾ 自体がある種の細菌の口腔内定着を阻害するという報告もある。細菌にとってこのような流動性の激しい特殊環境下において、その病原性を発揮するためには、口腔内の一定の部位、たとえば、粘膜、舌、歯牙あるいは口腔内に装着された保存修復物や補綴物に吸着あるいは付着することによって定着し増殖することが必要条件となっている。事実、齲蝕症や歯周疾患に深く関与すると考えられている *Streptococcus mutans* (以下 S. mutans と略記する)、*Actinomyces naeslundii*、*Eikenella corrodens*、*Bacteroides gingivalis* などの口腔細菌は、口腔内定着の為の手段を保有することが知られている^{13,17-21)}。このような観点から、口腔常在細菌の定着に関して付着あるいは吸着機構を解明することは、口腔疾患の予防と治療の基礎的手段を得るために必須であり、かつ当面の課題ともいえよう。歯面あるいは粘膜表面への細菌の付着現象と吸着現象は、歯垢形成の初期段階において相互に関連を有する。前者は、細菌と口腔組織との結合が細菌の産生する物質に起因する強力な結合である場合を意味することが多く、S. mutans の非溶性多糖体による歯面付着現象がその代表例である^{19,22)}。これに対し、後者は、細菌と口腔内表面との結合がイオン結合、van der Waals 力、水素結合など比較的弱い親和力に基づく結合を意味することが多い。たとえば、歯牙エナメル表層のペリクル（獲得被膜）は、唾液由来のタンパク質や糖タンパク質がイオ

ン結合を主とする結合力によってエナメル質に吸着され形成される例として知られ、また、このペリクル表面に最初に菌体が結合することも吸着現象の例である²³⁻²⁵⁾。Rölla らは、彼らの一連の実験からエナメル質上のペリクル形成および歯垢形成を上記の意味における吸着現象としてとらえている。すなわち、エナメル質、粘膜および菌体の表層は全体として負に帯電しており、唾液中の2価の陽イオン、たとえばカルシウムイオン Ca^{++} を介して細菌が歯牙表面や口腔粘膜に吸着すると考えられている²⁶⁻³²⁾。そして、菌体細胞壁中に存在する陰性に帯電したりポリタイコ酸は、こうした菌吸着をより効果的にするという³³⁻³⁵⁾。

この吸着現象と関連して想起されることは、現在の歯科臨床において金属を主成分とする多種多様の充填物・補綴物が使用され口腔内に装着されている事実である。レンサ球菌の発育に対するアマルガムを主とする歯冠修復物にどのような影響を及ぼしているかを検討した報告³⁷⁻⁴¹⁾もあり、歯科用金属と口腔細菌との関係は歯科臨床面から無視し得ない問題となっている。

これらの歯科用金属の頻用で生じる他の問題は、局部電池の構成である⁴²⁻⁴⁵⁾。すなわち、イオン化傾向の異なる異種金属が接触することにより微小な電池（ガルバニック電池）が形成され、金属の腐蝕あるいは疼痛の原因となることもある。この局部電池の形成は、細菌あるいは唾液成分の歯科用金属表面への付着ないし吸着に関し大変興味深い。陰性に帯電している細菌粒子あるいは唾液成分は、局部電流発生の原因となっているイオン化傾向の小さな金属の方へ移動し吸着し易くなると考えられるのである。このように、歯科用金属表面における歯垢形成の初期段階として、細菌あるいは唾液蛋白質の吸着現象は大変重要と考えられる。細菌の歯科用金属への吸着をこのような観点から検討した報告はきわめて少ない^{46,47)}。

本研究は、このような現状に鑑み、細菌の金属表面への吸着をより詳細に検討することを目的として、S. mutans を供試菌とし、白金線を電極とする菌吸着測定装置を作製し、電極表面に吸着する細菌量の評価法、菌吸着に及ぼす諸条件を検討

した。また *in vivo* 系の1モデル実験として、被験者の口腔内に白金板電極を装着し、金属表面上に吸着する物質の形態学的観察を行い、*in vitro* 実験結果と比較検討した。

実験材料および実験方法

1. 供試菌株

本実験に供試した細菌は、*S. mutans* に属する6株と *Escherichia coli* UKT-B 株 (以下 *E. coli* と略記する) である。*S. mutans* は、HS6株 (a 血清型)、BHT 株 (b 血清型)、GS5株 (c 血清型)、OMZ176株 (d 血清型)、LM7株 (e 血清型) および OMZ175株 (f 血清型) の5株で、いずれも愛知学院大学歯学部微生物学教室から分与されたものである (Table 1)。*In vitro* 系の吸着実験には、HS6株を主として供試した。継代培養は Heart Infusion Agar (Difco) 培地を使用し、実験に際しては、前日に斜面培地に接種し、37°C で一晩培養後、所定の増殖培地である Trypticase Soy Broth (BBL, 以下 TSB と略記する) あるいは5%スクロース添加 TSB に接種した。

2. 供試菌の培養および菌液調製

実験に使用した血清型 a~f に属する各菌株を、5%スクロース (キシダ化学) 添加あるいはスクロース無添加の200~1,000ml の TSB に接種後、好気条件下で 37°C, 18時間攪拌培養を行った。各培養菌液を6,000rpm, 10分 (4°C) の遠沈操作により集菌後、0.1M トリシュー塩酸緩衝液 (pH 7.0) あるいは生理食塩液で2回菌体を洗浄した。得られた菌体を適当量の冷緩衝液あるいは生理食塩液に懸濁し、波長550nm における濁度 (OD₅₅₀ 値) を分光光度計 (日立, 124型) で測定した。こうして得られた均一な菌懸濁液を、トリシュー塩酸緩衝液あるいは生理食塩液で所定の OD₅₅₀ 値になるように菌濃度を調製した。

また、菌吸着におよぼす pH 効果を検討した実験では、スクロース無添加 TSB 培地中で18時間培養した HS6 株菌を供試した。滅菌精製水で2回洗浄し、精製水で再懸濁した菌液の OD₅₅₀ 値を測定後、3つの遠沈管に等量分注し、13,000rpm, 5分間遠沈した。上清の精製水を捨て、各遠沈管

Table 1 Serotypes and strains of *Streptococcus mutans*

Serotype	Strain
a	<i>Streptococcus mutans</i> HS6
b	<i>S. mutans</i> BHT
c	<i>S. mutans</i> GS5
d	<i>S. mutans</i> OMZ176
e	<i>S. mutans</i> LM7
f	<i>S. mutans</i> OMZ175

Fig. 1 Experimental apparatus for measurements of adsorption of *Streptococcus mutans* to a platinum electrode *in vitro*.

Fig. 2 Schematic diagrams of the electric circuit for measuring adsorption of *Streptococcus mutans* to a platinum wire *in vitro*. CVR, an automatic current-voltage regulator; R, resistances; C, glass adsorption chambers; E, electrodes of platinum wires; WB, water bath; BH, breathing holes, and A, an amperemeter.

Fig. 3 Two kinds of glass adsorption chambers with platinum electrodes.

内の菌濃度すなわち OD_{550} 値が 5.0 となるように、0.05M クエン酸-クエン酸ナトリウム緩衝液 (pH 4.0)、0.1M トリス-塩酸緩衝液 (pH 7.0) および 0.05M 炭酸-重炭酸緩衝液 (pH 10.0) をそれぞれ加え、均一な菌懸濁液とし直ちに実験に供した。

3. *In vitro* 系における菌吸着測定装置

供試電極は太さ 0.3mm の白金線 (99.9%, 乾庄貴金属化工) を使用した。菌吸着量の測定を行うための実験装置を Fig. 1 および Fig. 2 に示した。菌吸着測定装置は交流 100V を受電し、1,500V, 200mA の直流に変換する定電圧定電流装置 (常光, PAV-200型)、ガラス製菌吸着反応槽、白金電極および恒温槽 (ヤマト, BT-22型) から成り、電極間電圧あるいは電流を調節するために市販の抵抗器も必要に応じ使用した。ガラス製吸着反応槽は、40ml の菌液で実験を行う大型槽 (高さ 10cm, 内径 2 cm) と 3 ml の菌液で行う小型槽 (高さ 3 cm, 内径 1 cm) の 2 種を使用した。

陽極および陰極の白金線は、シリコン栓に通した防錆性の金属線に接続した (Fig. 3)。両電極間の距離は、大および小型槽でそれぞれ 9.5cm および 6 cm とした。恒温槽は $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ に調節された温浴槽で、ガラス製菌吸着反応槽内部の菌液が完全に水面下に没するようにし垂直に固定した。

Fig. 4 Flat specimen holders for scanning electron microscopy. Flat specimen holders with no specimens (a), five pieces of platinum electrodes (b), and a platinum plate (c).

各反応槽の電極間の電圧あるいは電流値はマルチテスター (日置, 3004型) で測定した。

4. 電極間電位の測定

本実験で使用した菌吸着測定装置における白金電極間の電圧の経時的変化を次のように測定した。すなわち、小型ガラス製菌吸着反応槽内に、菌懸濁用 トリス-塩酸緩衝液 (pH 7.0) あるいは TSB 培養の *S. mutans* HS6 株懸濁液 ($OD_{550} = 5.0$) を 3ml ずつ加えた後、白金電極を挿入し、 37°C 恒温槽内に固定した。通電後少なくとも 3 時間にわたり、電極間電圧変化を、菌吸着実験で頻用した条件下で測定した。なお電圧 50V で抵抗 $200\text{K}\Omega$ を接続した時の初期電流値は $230\mu\text{A}$ であった。

5. 吸着菌数の算定

白金電極表面に吸着した細菌数は、陽極および陰極の先端部分を走査型電子顕微鏡によって観察することにより算定した。すなわち、細菌の吸着反応終了後、電極を静かに蒸留水中に一度浸漬し、自然乾燥後、電極表面を傷つけないように注意しながら、先端から約 5 mm の部分を切り取り、走査型電子顕微鏡観察用水平試料台 (日本電子, 直径 1 cm, 高さ 5mm) (Fig. 4) 上に水平に載せ、ドータイト (Dotite $\times$ C-12, JEOL) でその一部を固定した (Fig. 4b)。乾燥後, Fine Coat

Ion Sputter (日本電子, JEC-1100型)で試料に金蒸着を5~10分間施し, 走査型電子顕微鏡(日本電子, JSM-35C 型)により, 加速電圧25KV, 直接倍率1,000~8,000倍で観察, 写真撮影を行った。電極表面に吸着した菌数測定は, 2,000倍で撮影したネガフィルム上で6区画(1区画=1,000 μm^2)の菌数を算定し, その平均値を吸着菌数とした。

6. 菌体の加熱処理

OD₅₅₀=5.0に濃度調製した HS6株菌液を, ゴム栓で密封した後, 35°C, 50°C, 65°C および 80°C の温浴槽中にそれぞれ10分間加熱後急冷した。

このような温度処理を施した各菌懸濁液の3mlを小型ガラス製菌吸着反応槽に分注し, 電流値230 μA で, 37°C, 60分間通電した場合の菌吸着量を測定した。

7. 唾液による白金電極の前処理

菌吸着におよぼすヒトの全唾液中の成分の影響を検討する目的で, 全唾液による白金電極の前処理を施し, その影響を検討した。すなわち, 口腔内診査の結果, 臨床的に正常で, 健康な男子(年齢41歳)に無菌ガーゼをかませ, 咀嚼運動を通して流出した全唾液を採取し, 3,000rpm, 10分間遠心操作後, その上清をミリポアフィルター(pore size 0.22 μm , Millipore Corp)で濾過したものを供試全唾液とした。唾液3.0mlを別々の小型ガラス製菌吸着反応槽に分注した後, 所定の白金電極を装着し, 電流値230 μA で, 60分間通電した。通電後, ただちに各槽の電極を静かに取りはずし, 前もってトリス-塩酸緩衝液で洗浄済みの TSB 培養 HS6株液(OD₅₅₀=5.0, 3.0ml)中に再び装着した。そして改めて菌吸着反応を 230 μA , 37°Cで60分間行った。なお, トリス-塩酸緩衝液で白金電極を同様に前処理したものを対照とした。唾液処理した陽極表面に吸着した菌数を対照のそれと比較し百分率(陽極百分率)で吸着を表示した。なお, 対照として非通電の白金電極の陽極と陰極も表面観察を行った。

8. 菌吸着におよぼすカルシウムの影響

菌吸着におよぼす2価の陽イオンの影響を検討する目的で, 5%スクロース添加 TSB 中で培養

Fig. 5 Attachment of platinum plates on labial surfaces of left and right upper canine teeth in an *in vivo* adsorption experiment. An electric cell was connected with positive (P) and negative (N) platinum plates. The another plate as control can be seen near the negative platinum plate.

した HS6株を, 所定の塩化カルシウム濃度(2, 4および6 mM)を含有する5%スクロース添加 TSB 中に接種し, 大型ガラス製菌吸着反応槽中で, 230 μA , 37°C, 21時間培養を行った。

9. *S. mutans* の白金線上での集落形成と電気的解離

小試験管(高さ3 cm, 内径2 cm)にシリコン栓をし, この栓に白金線(太さ0.3mm, 長さ2 cm)を通したものを使用した。培地は TSB を用いた。まず, *S. mutans* HS 6株を上記培地で24時間静置培養し, 集菌・洗浄後 10^8 cells/mlの菌懸濁液を調製した。次にこの菌液1 mlを100mlの10%スクロース含有 TSB に接種し, 上記の小試験管に分注し37°Cで静置培養した。2日毎に新鮮培地と交換し9日間連続培養することにより白金線上に集落を形成させた。実験に際しては吸着反応槽中にトリス-塩酸緩衝液を入れ, 集落形成のみられた白金線を陰極として, 陽極には集落形成をさせなかった新しい白金線を用いた。230 μA , 50V, 37°Cで所定の時間(5, 15, 30分)通電し, その電気的解離菌量を測定した。なお上記の操作はすべて無菌的に行った。

10. *Escherichia coli* UKT-B 株の菌吸着実験

*S. mutans*と比較することを目的として, 5%スクロース含有 TSB 中で培養した *Escherichia coli* UKT-B 株の菌吸着実験を, 電流値 230 μA ,

電圧50V, $OD_{550}=5.0$ の条件下で15, 30, 45および60分間行った。

11. *In vivo* 系における吸着実験

2名の健康な被検者(男性I, 36歳および男性II, 41歳)の口腔内の左右の上顎犬歯の唇側面に、白金板(5mm×5mm, 厚さ1mm, 乾庄貴金属化工)をリン酸亜鉛セメント(ハイボンドジンクセメント, 松風社)で装着した(Fig. 5)。その際、白金板の一面(観察面)のみが露出するように同セメントで完全に被覆し、カメラ用アルカリボタン電池(1.5V, LR44型, ナショナル)2個を両白金板に接続した。左側上顎犬歯唇側面に装着した白金板を陽極, 右側上顎犬歯の白金板を陰極とした。対照として陰極に並列に非通電の同大の白金板をセメントで装着した。30~120分の通電時間の間、被検者が装置を装着したまま通常の会話を自由に行わせた。上記の実験条件下で流れる電流値は実験毎に変化し一定ではなかったが、装着直後は100~150 μ Aで30分あるいは120分後では減少し50~70 μ Aであった。実験終了後、白金板の露出面に触れないように注意し口腔外に取り出し、風乾後、前述の電顕観察用水平台上に固定した(Fig. 4c)。各試料に10分間の金蒸着を施した後、各電極表面の吸着物質を走査型電子顕微鏡により観察した。

結 果

1. *In vitro* における白金電極表面への菌吸着実験

1. 電極間電圧の経時的変化

実験に常用した菌吸着条件下における白金電極間の電圧を測定した結果をFig. 6に示す。すなわち、吸着実験開始後3時間以内では、トリスー塩酸緩衝液の場合、白金電極の電圧は、測定開始1~2時間後に、最大0.1V増加した。菌懸濁液の場合、徐々に電圧が増加し、3時間後には0.25Vの電圧増加が測定された。この結果、通電3時間以内では緩衝液や菌懸濁液の抵抗変化は少なく、菌吸着測定実験に大きな影響を与えないと判断された。

2. 菌吸着におよぼす電流値の影響

Fig. 7は一定濃度($OD_{550}=2.0$)のHS6株菌

Fig. 6 Change of electrode potential in a small glass adsorption chamber with a bacterial suspension (closed circles) or a tris-HCl buffer solution (open circles). Initial current intensity, 230 μ A.

液を供試し0~900 μ Aの電流を通電した場合の37°C, 1時間後の白金電極表面に吸着した菌数と、陽極および陰極槽内の菌液のpHを示したものである。陽極では、電流値500 μ Aまで吸着する菌数は増加したが、それ以上の電流値では減少した。また、900 μ Aではほとんど白金陽極表面に菌吸着が観察されなかった。一方陰極では、測定を行ったいずれの電流値においても、非通電時(0 μ A)の白金線の表面と同様、ほとんど菌吸着は認められなかった。また、1時間の菌吸着実験終了直後の各電極の菌液のpHは、陰極では電流値の増加に伴って徐々に上昇し、900 μ AではpH 8.2であった。陽極においては、ほぼ200 μ Aまでの電流値ではpH変化はほとんど認められなかったが、それ以上の電流値ではpH値は急激に低下し、500 μ AではpH 3.0, 900 μ AではpH 1.5であった。したがって、本実験結果から、菌吸着反応は、菌液のpH変化の少ない電流値300 μ A以下で行うべきことが知られた。以下の菌吸着実験は電流値300 μ A以下で行った。

3. 菌吸着におよぼす菌濃度の影響

白金電極表面の面積は一定であるので、その表面に吸着する菌数は限定される。そこで、電極間に流れる電流230 μ Aにおける菌吸着量を、トリスー塩酸緩衝液に懸濁した種々の菌濃度(OD_{550} 値)を示す菌液を使用し比較検討した。同一の菌

Fig. 7 Adsorption of *Streptococcus mutans* strain HS6 to platinum electrodes and pH change at varied current intensities after 1hr. Open circles, number of bacteria adsorbed to positive platinum electrodes; closed circles, number of bacteria adsorbed to negative platinum electrodes. Open and closed triangles indicate pH values of bacterial suspensions in the chambers with positive and negative electrodes, respectively.

濃度であっても、陽極の白金線表面に吸着する菌数は実験の度に若干変化した。TSBで培養したHS6株の菌濃度 $OD_{550}=0.5$ 以下では、吸着する菌はほとんど認められなかったが、それ以上の菌濃度では濃度増加と共に陽極表面に吸着する菌量増加が常に観察された。また、陰極表面には、いずれの菌濃度でも菌吸着量は少なかった (Fig. 8)。Fig. 9は、上述の実験における陽陰極の白金電極表面を示した走査型電顕像である。陰極表面での菌体吸着量は少なく、 $OD_{550}=8.9$ の高濃度の菌液を使用した時においてもほとんど量的増加は認められなかった (Fig. 9h)。*S. mutans* LM7株 (e 血清型) を供試し、HS6株と同様な実験を行った結果を Fig. 10に示す。LM7株においても、陽電極表面に吸着する菌量は、菌濃度 0.5以上では増加する傾向が顕著に認められた。一方、菌濃度 $OD_{550}=5$ 以上の菌液を用いた時には、陰電極表面上にも菌が認められた。

Fig. 11は、TSB培養のHS6株を生理的食塩液に懸濁した時の吸着菌数と懸濁菌濃度— OD_{550} 関係を示したものである。菌吸着量は菌体をトリス—塩酸緩衝液に懸濁した結果 (Fig. 8) とほぼ同様であった。しかし、生理的食塩液を菌

Fig. 8 Relationship between turbidity of bacterial suspension and adsorption of *Streptococcus mutans* strain HS6 to platinum electrodes. Open and closed circles indicate the number of bacteria adsorbed to a positive and negative electrodes, respectively.

懸濁液として使用した場合、電流値が $230\mu A$ であっても、通電時間60分後の両電極の吸着反応槽内のpH値は、陽陰極でそれぞれ3.24および10.46と測定され、陽極側では酸性、陰極側ではアルカリ性であった。この結果、酸性条件は、HS6株の陽極表面への吸着にほとんど影響を与えないことが明らかとなった。しかし、陰極側では強アルカリとなったことから今回の菌吸着実験においては、生理的食塩液は菌懸濁液としては不適当であると判断された。

Fig. 12は、3種類の異なるpH、すなわちpH 4.0、7.0および10.0の緩衝液中に懸濁された同一濃度のHS6株についての白金電極表面に吸着した菌数を比較したものである。いずれのpH液においても、陽極表面に吸着した菌量は陰極表面のそれより多く、また、pH 4.0およびpH 10.0では、pH 7.0における菌吸着量より、それぞれ約4倍および7倍多かった。この場合、pH 4.0の緩衝液中に懸濁されたHS6株は、pH 7.0あるいはpH 10.0の緩衝液の菌懸濁液中とは異なり、よりすみやかに凝集しかつ管底に沈澱した。

4. 菌吸着におよぼす培地の影響

S. mutans が固体の表層に吸着する性質は、細菌の細菌壁の最外層に存在する物質の化学的ある

Fig. 9 Scanning electron micrographs showing the adsorption of *Streptococcus mutans* strain HS6 to the surface of positive (a-f) or negative (g and h) platinum electrodes at different turbidity of bacterial suspensions. Optical density at 550nm of bacterial suspensions are 0.1 (a and g), 1.5 (c), 3.5 (d), 5.5 (e) and 8.9 (f and h). Bar indicates 10 μ m.

いは物理的性質に由来すると考えられる。本菌はスクロースから水溶性あるいは非水溶性の多糖体を菌体外に合成する。そこで、HS6株について、スクロース無添加 TSB および 5%スクロース添加 TSB で培養した菌体を吸着実験に供試した。両培養菌をそれぞれトリス-塩酸緩衝液で洗浄し

た後、同濃度 ($OD_{550}=5.0$) に調製し、230 μ A までの電流値で比較したものが Fig. 13と Fig. 14である。スクロース添加 TSB で培養された HS6株菌の吸着量は、TSB で培養された同菌のそれとほとんど差が認められなかった。特に記さない限り、以下の実験では、TSB で培養した菌

Fig. 10 Relationship between turbidity of bacterial suspension and adsorption of *Streptococcus mutans* strain LM7 to platinum electrodes. Current intensity, 230 μ A at 37°C for 60min. Open and closed circles indicate number of bacteria adsorbed to a positive and a negative electrode, respectively.

Fig. 11 Relationship between turbidity of bacterial suspension and adsorption of *Streptococcus mutans* strain HS 6 suspended in saline. Current intensity, 230 μ A; incubation time, 60 min at 37°C. Open and closed circles indicate the number of bacteria adsorbed to positive and negative electrodes, respectively. Open and closed triangles indicate pH values of a bacterial suspension in the chambers with positive and negative electrodes, respectively.

Fig. 12 Adsorption of *Streptococcus mutans* strain HS 6 suspended in three different types of buffers (pH 4, 7 and 10). Current intensity, 230 μ A for 60min at 37°C. Open and closed circles indicate the number of bacteria adsorbed to positive and negative electrodes, respectively.

Fig. 13 Adsorption of TSB-grown *Streptococcus mutans* strain HS6 to platinum electrodes as a function of current intensity up to 230 μ A. Incubation time, 60min at 37°C; CD₅₅₀, 5.0. Open and closed circles indicate the number of bacteria adsorbed to positive and negative electrodes, respectively.

体を吸着実験に供試した。

5. a~f 血清型株の菌吸着

Table 2は、供試した *S. mutans* の a~f 血清型の各菌株の白金電極に対する吸着能を調べたものである。供試したいずれの血清型株においても、陰極より陽極表面に多数の菌吸着が認められ

Fig. 14 Adsorption of 5% sucrose containing TSB-grown *Streptococcus mutans* strain HS 6 to a platinum up to 230 μ A. Incubation time, 60 min at 37°C. Open and closed circles indicate the number of bacteria adsorbed to positive and negative electrodes, respectively.

Fig. 15 Effect of incubation time on adsorption of TSB-grown *Streptococcus mutans* strain HS 6 to platinum electrodes. Current intensity, 230 μ A at 37°C; OD₅₅₀, 5.0. Open and closed circles indicate the number of bacteria adsorbed to positive and negative electrodes, respectively.

Table 2 Adsorption of different strains of *Streptococcus mutans* to platinum electrodes

Serotype	Strain	Adsorption ^{a)} No. of bacteria / 1,000 μ m ² $\pm$ standard error	
		Positive electrode	Negative electrode
a	HS6	90 $\pm$ 16	5 $\pm$ 2
b	BHT	70 $\pm$ 15	10 $\pm$ 2
c	GS5	79 $\pm$ 7	8 $\pm$ 1
d	OMZ176	71 $\pm$ 18	20 $\pm$ 8
e	LM7	33 $\pm$ 7	0 $\pm$ 0
f	OMZ175	47 $\pm$ 5	0 $\pm$ 0

a) Adsorption after 60min at 37°C; current intensity, 230 μ A; OD₅₅₀ of bacterial suspensions, 3.0.

た。しかし、各血清型間における吸着菌数は LM7 株、OMZ175株がやや少なかった。

6. 菌吸着におよぼす通電時間の影響

Fig. 15は、HS6株の吸着量と通電時間との関係を示したものである。白金電極に吸着する菌量はほぼ1時間で最大値に達し、通電2時間後でもほとんど菌吸着量の増加が認められず、以後徐々に減少し、4時間後の陽電極表面に吸着している菌体量は陰極表面すなわち対照の電極表面上の菌量

と同様の値まで減少した。このことから、本菌吸着実験において、HS 6 株の電極表面への菌吸着に要する通電時間は1時間とした。

7. 極変換の菌吸着におよぼす影響

上述した如く、S. mutans HS6株は陽極の白金電極に吸着することが明らかとなった。そこで、電極に吸着した菌体が、極変換させることにより、どのように吸着量に変化するかを検討した。すなわち、陽極から陰極に変更させることによって陽極表面にすでに吸着している HS 6 株菌体の電極表面からの離脱の有無とその量的変化を検討した。その結果を Fig. 16に示す。電流値230 μ A で通電開始後30分後に、陽極を陰極に、陰極を陽極に極変換を行った。極変換を行った30分後に、陽極および陰極の表面に吸着していた菌量と電極変換を行わなかった対照の電極表面に吸着していた菌量を測定した。Fig. 16から明らかなように、極変換によって、陽電極表面に吸着していた細菌は、陰極に変換すると電極表面から離れ吸着量は、極変換を行わなかった陰極表面の菌量と同じ程度まで減少した。一方陰極から陽極へと極変換した場合、無変換の陽極表面の吸着量と同程度の菌数が測定された。

Fig. 16 Effect of electric polar change on adsorption of *Streptococcus mutans* strain HS 6 to platinum electrodes. Polar change was done after 30 min of incubation (arrow). Solid and dotted lines indicate the number of bacteria adsorbed to unchanged and changed electrodes at following 30 min of incubation, respectively. Open and closed circles indicate the number of bacteria adsorbed to positive and negative electrodes, respectively.

Fig. 17 Adsorption of *Streptococcus mutans* strain HS 6 preheated for 10 min at 35°C, 50°C, 65°C, or 80°C to platinum electrodes after 60 min at current intensity 230 μ A. Open and closed circles indicate the number of bacteria adsorbed to positive and negative electrodes, respectively.

Table 3 Number of *Streptococcus mutans* strain HS6 observed on saliva-treated platinum electrodes

Treatment ^{a)}	No. of bacteria/1,000 μ m ^{b)} (% of positive control)	
	Positive electrode	Negative electrode
Buffer (control)	96(100)	2(2)
Whole saliva	207(216)	5(5)

a) Electrodes were set in tris-HCl buffer, or whole saliva for 60 min at 37°C.

b) Incubation time, 60 min at 37°C; current intensity, 230 μ A.

8. 菌吸着におよぼす菌体の加熱処理の影響

35°C, 50°C, 65°C および 80°C の各温度で 10 分間加熱処理を行った HS6 株について、電極表面への吸着量を測定したものが Fig. 17 である。陰極では、いずれの温度処理においても菌吸着はほとんど認められなかった。しかし、陽電極表面に吸着した菌量を比較すると、菌体処理温度の上昇と共に吸着量は、35°C の場合と比較すると、約 4 倍

量の増加が見られた。なお、いずれの温度においても菌体の加熱処理によって菌の凝集が起らないことが、加熱処理前後の菌懸濁液の濁度を比較することにより確かめられた。

9. 菌吸着におよぼす電極の全唾液による前処理の影響

供試した白金電極を前もって無菌の全唾液に浸し、230 μ A で 60 分間通電し、対照すなわちトリス-塩酸緩衝液の場合と比較した。Table 3 はその結果を示す。唾液処理した非通電電極表面も観察した。60 分の白金電極の唾液による前処理によって、陽極への吸着菌量は増加したが、陰極ではこの傾向は認められなかった。Fig. 18 は、白金電極を 60 分間全唾液で前処理した後、HS6 株の菌吸着反応を 60 分間行った時の各電極表面を示す走査電顕像である。陽極表面には多数の菌体が観察され、また、金属表面あるいは菌体間に細菌細胞とは形態学的に明らかに異なる構造物も観察された (Fig. 18b)。これに対し、対照の緩衝液で処理を施した陽電極表面には吸着細菌以外の特別の構造物は観察されなかった (Fig. 18e)。なお非通電電極表面にはほとんど菌吸着は認められなかった (Fig. 18d, g)。

10. 菌吸着におよぼすカルシウムの影響

Fig. 18 Scanning electron micrographs showing *Streptococcus mutans* strain HS6 observed on the saliva-treated positive platinum electrodes (a and b), a saliva-treated negative platinum electrode (c), a buffer-treated positive platinum electrode (e), a buffer-treated negative platinum electrode (f), and saliva-treated positive platinum electrodes before adsorption experiments (d and g). Bar in a and b indicate $10\mu\text{m}$ and $1\mu\text{m}$, respectively.

Fig. 19は、*S. mutans* HS6株の陽電極表面への吸着におよぼすカルシウムの効果を示したものである。所定濃度の塩化カルシウムを添加した5%スクロース含有TSB中にHS6株の一定量を接種し、 37°C の恒温槽中で21時間通電を行った場合

の結果である。添加した塩化カルシウムの濃度増加に伴ない陽電極に吸着する菌数も増加し、塩化カルシウム濃度6mMでは塩化カルシウム無添加TSB培地での約3倍であった。Fig. 20は、その走査型電顕像を示す。

Fig. 19 Effect of calcium chloride on adsorption of 5 % sucrose containing TSB-grown *Streptococcus mutans* strain HS 6 to a platinum electrode in a growing system for 21hr at 37°C. Open and closed circles indicate the number of bacteria adsorbed to positive and negative platinum electrodes, respectively.

11. 白金線上に形成された *S. mutans* の集落の電氣的解離量

Fig. 21は *S. mutans* の電氣的解離量を経時的に調べたものである。陰極（菌集落形成白金線）では経時的（5, 15, 30分）に *S. mutans* の解離量が増加するのが観察された。また陽極では全く *S. mutans* の付着が観察されなかった白金線表面に菌吸着が認められた。Fig. 22は、その走査型電顕像である。

12. *E. coli* の菌吸着実験

Fig. 23は、供試した *E. coli* UKT-B 株の白金電極に対する吸着量を経時的に調べたものである。*S. mutans* と同様に、陽極では60分まで吸着菌量の増加が認められ、陰極では菌吸着はほとんど認められなかった。Fig. 24はその走査型電顕像である。

Fig. 20 Scanning electron micrographs showing the surface of positive (a-d) and negative (e-h) platinum electrodes in Fig. 19. Concentrations of calcium chloride are 0 mM (a and e), 0.3mM (b and f), 2mM (c and g), and 5.6mM (d and h). Bar indicates 10μm.

Fig. 21 Dissociation of *Streptococcus mutans* strain HS 6 from a platinum electrode. Open and closed circles indicate the number of bacteria adsorbed to a positive electrode and of the bacteria undissociated from a negative electrode, respectively.

II. *In vivo* における吸着実験

In vitro における吸着実験の結果に基づいて、ヒト口腔内における歯垢材料の電氣的吸着実験を行った。すなわち、白金板を電極として口腔内組織液あるいは唾液を介して、最大電流 150 μ A を通電した場合の陽陰両電極表面に吸着あるいは付着する物質を走査型電子顕微鏡により観察した。

1. 実験 I

Fig. 25は、被験者 I の口腔内に電極を装着し30分および120分経過後の各電極表面を示した走査型電顕像である。実験開始30分では、対照の非通電白金板表面には、1 μ m 前後の多数の小顆粒が多く観察された。これに対し、通電した陽極板および陰極板上には、共に顆粒が観察された。しかし、陰極板に観察された顆粒は陽極上のものより大きかったが量的には少なかった。120分後では、陰極および対照の表面は比較的滑らかな被膜様物質が観察されたが、陽極表面には大小の多数の顆粒が観察されるようになり、また量的にも増加した。これらの顆粒が口腔細菌であるか否かは得られた走査型電顕像から判断されなかった。

2. 実験 II

Fig. 26は、被験者 II で行った *in vivo* の吸着実験の結果である。通電時間120分後の両電極表面には吸着あるいは付着物質が観察されたが、物質の形態および集積状態には差異が認められた。すなわち、陽極表面には主として大小の顆粒状の物質が集積しており、不定形の間隙も多く凹凸に富んでいた (Fig. 26, a~c)。一方、陰極上に観察された物質は比較的凹凸は少なく、小さい顆粒の付着あるいは吸着した状態として観察された (Fig. 26 d~f)。

考 察

口腔常在菌の中で、その口腔内定着機構について最もよく研究されているのは、*S. mutans* である。動物あるいはヒト由来の本菌は、スクロース含有飼料を与えられた種々の動物において齲蝕症を誘発することが明らかにされている^{48,49)}。*S. mutans* がスクロースから産生する非水溶性多糖体 (グルカン) の存在が本菌の歯牙平滑面付着と定着に重要であり、糖分解による酸産生能、集落の形態およびマンニット発酵能を有する点が他の口腔内に常在する連鎖球菌、たとえば *Streptococcus sanguis* (*S. sanguis*) や *Streptococcus salivarius* (*S. salivarius*) との差異であると考えられている^{19,50-53)}。

一方、上記の立場とは別に、Clark らは、*S. mutans* を含む5種の口腔細菌のハイドロキシアパタイトに対する吸着能を比較したところ、唾液処理を施したハイドロキシアパタイトに対する菌吸着量は未処理ハイドロキシアパタイトと比較して必ずしも増加すると限らず、*S. mutans*, *S. salivarius*, *Actinomyces naeslundii* の吸着量が減少したこと、また多糖体産生が期待されるスクロース存在下における *S. mutans* のハイドロキシアパタイトへの吸着量が対照のそれより減少することを報告している^{54,55)}。彼らは、細菌のハイドロキシアパタイトへの吸着量は、菌体の吸着力の強さよりむしろ各菌種の吸着を許容する特異的な場所 (site) の数の多少に左右され、唾液処理によってハイドロキシアパタイト上のその場所が減少するのではないかと推測している。

また、Rölla を中心とするグループは、菌体、

Fig. 22 Scanning electron micrographs showing *Streptococcus mutans* strain HS6 adhering on the surface of a colony-formed negative electrode after 0min (a), 5min (b), 15min (c) and 30min (d) of incubation and of a positive electrode after 30min (e) of incubation. Bar indicates 10 μ m.

Fig. 23 Adsorption of *Escherichia coli* strain UKT-B to platinum electrodes. Current intensity, $230\mu\text{A}$; incubation time, 60 min at 37°C . Open and closed circles indicate the number of bacteria adsorbed to positive and negative electrodes, respectively.

無機イオンそして歯牙表層間に働く静電的結合によって細菌の吸着現象を説明しようとしている。すなわち、*S. mutans* 細胞の表面電荷は、陰性に帯電する phosphate を主とする teichoic acid あるいは teichouronic acid などの重合体の存在によると考えている^{33-35,56)}。このことはまた、電気泳動法によっても確認されている⁵⁷⁾。エナメル質表面あるいは唾液中のタンパク質に由来する獲得被膜 (pellicle) も同様に負に帯電しているので^{58,59)}、これら陰性帯電物質を唾液中の2価の陽イオンが、架橋し相互の吸着が起るといふものである。

Van Houte らは、歯垢および唾液中の *S. mutans* 量を、先天的に sucrase 酵素が欠損しているため sucrose を摂取することを禁止されている生後6ヶ月~2.5歳までの児童と同年齢域の正常児とで比較したところ、sucrase 欠損児と正常児との間に有意差は認められないことや⁶⁰⁾、また、スクロース投与ラット群とグルコース投与ラット群の口腔内における *S. mutans* の定着菌数を比較したところ、両者に有意の差がなく、スクロースが存在しなくても本菌が定着できる可能性があるとして報告している⁶¹⁾。

これらの報告は、ヒトあるいは動物の複雑な口

腔環境における歯垢の形成および成熟過程で、*S. mutans* が単一のメカニズムで関与しているのではないことを示唆している。

本実験は、口腔細菌の歯牙平滑面への吸着、付着そして増殖を経て成熟歯垢形成へと進行する一連の過程で、特にその初期段階である細菌細胞の歯牙表面あるいは歯科用金属表面への吸着現象に関する知見を得ることを目的として種々検討を行ったものである。

1. 菌吸着測定法について

細菌細胞は一般に負に帯電していることが知られており、この細胞が固体表面に吸着するためには、歯牙や口腔粘膜、ときには補綴修復物などの表面電荷が問題となる。このような観点から、電極電位の異なる金属を細菌浮遊液中に挿入し、電極電位と菌吸着量について検討した報告は非常に少なく、わずかに安藤³⁹⁾と宮崎^{46,47)}の報告があるにすぎない。最大電極電位プラス0.7Vで純金板に吸着する *S. sanguis* 数を検討した宮崎⁴⁶⁾によれば、少なくとも2時間以内の通電では *S. sanguis* 吸着量は経時的に増加し、電極電位がプラス0.7V値まで増加するに伴って菌吸着量が増加するが、マイナス値では菌吸着量は増加しなかったと報告している。今回供試した白金電極への菌吸着実験において菌吸着量と通電時間との関係は、本実験における至適条件の場合、約1時間の通電時間で最大の菌吸着量を示した (Fig. 15)。宮崎の作製供試した電極電位設定回路では、最高 $20\mu\text{A}$ の電流値、0.7Vの電極電位および $\text{OD}_{550}=0.6$ の菌濃度という条件で吸着実験を行っている。これらの諸条件は、今回の実験で頻用した測定条件、すなわち、電流値 $230\mu\text{A}$ 、電極電圧約4.5V (Fig. 7) および菌濃度 $\text{OD}_{550}=5.0$ と比較すると宮崎の測定条件はほぼ10分の1のレベルである。これらの実験条件の差異は両者の菌吸着測定条件の違い、すなわち供試菌の違い (前者が *S. sanguis* と後者が *S. mutans*)、電極の違い (金と白金)、菌懸濁液の違い (精製水と緩衝液) および吸着菌数の算定法の違い (光顕法と電顕法) などによると考えられる。たとえば、本実験装置で、電極として同径の純金線と白金線で比較したところ、純金線の方により多数の吸着菌が観察さ

Fig. 24 Scanning electron micrographs showing *Escherichia coli* strain UKT-B adsorbed to positive (a-d) and negative (a'-d') platinum electrodes in Fig. 23. a and a', 15min; b and b', 30min; c and c', 45min; d and d', 60min. Bar indicates 10 μ m.

れた(データは示されていない)。いずれにしても、本吸着実験により、中性付近の液で懸濁されたグラム陽性レンサ球菌 *S. mutans* およびグラム陰性桿菌 *E. coli* の細菌表層は負に帯電していることが示唆された。このことは、*S. mutans*, *S. sanguis* および *S. salivarius* の合計 28 株について細菌表層の帯電密度(ゼータ電位)を粒子

微小電気泳動装置を使用して測定した Olsson ら^{57,62)}の報告と一致するもので、同一の菌群に属するものは類似のゼータ電位を示す傾向があり、pH 7.0 ではいずれの菌株も陽極側に移動したという。

本実験装置では、同一の測定条件(同一の培養菌株、菌濃度、通電量など)にも拘らず、実験毎

Fig. 25 Scanning electron micrographs showing the materials absorbed to the surface of platinum plates after 30min and 2hr in *in vivo* experiment I. a-c, 30min; d-f, 2hr; a and d, control; b and e, positive electrodes, c and f, negative electrodes. Bar indicates 10 μ m.

に吸着量の変動が見られた (Fig. 13と Fig. 15)。考えられる理由として、(1) 白金電極の表面がかならずしも物理的に均一でないこと、(2) 全実験を通じて厳密な意味での同一の菌懸濁液の調製の困難なこと、(3) 算定の対象となる6区画(合計6,000 μ m²)の選定から生じる誤差、(4) 連鎖球菌である *S. mutans* 菌を1個と算定する際に生ずる誤差、あるいは(5) 試料作成過程、すなわち通電停止から風乾までの過程で電極に吸着していた菌体の一部脱離する、等が挙げられる。特に、吸着菌量が少ない場合、たとえば陰極表面での菌吸着量の算定時に問題となるように思われた。しかし、使用した菌吸着測定装置では少量の菌液でも菌吸着実験を行うことが可能であり、かつ種々の

吸着条件下で同時に測定を行うことにより陽陰極間をはじめ相互に比較検討し得る点が特徴となっている。菌吸着量の算定には試料の走査型電顕観察を行っているので、結果を得るまでに若干の時間と労力を要するという難点を除けば、算定の簡便さ、ネガフィルムによるデータの記録の容易さに加えて、吸着している菌体の形態学的変化についても観察可能であり、きわめて応用に富む菌吸着量測定装置と思われた。

2. 菌吸着におよぼす諸因子の影響

本実験において、まず、白金電極上に菌体が吸着されるために適する電流値は、トリス-塩酸緩衝液 (pH 7.0) を菌懸濁液として使用した場合、電流値が500 μ A まで菌吸着量が増加し、以後は菌

Fig. 26 Scanning electron micrographs showing the materials adsorbed to the surface of the platinum plates in 2-hr *in vivo* experiment II. a-c, positive electrodes; d-e, negative electrodes. Bars indicate 10 μ m (a and d) and 1 μ m (b, c, e, and f).

吸着量は減した。一方、陽極側の菌液 pH 値は 200 μ A を起える電流値で徐々に酸性を呈し、500 μ A では pH 3 で、陰極側の菌液の弱アルカリとは対照的であった (Fig. 7)。他方、菌懸濁液として生理食塩液を使用した場合、食塩液の電気分解が起きた結果、陽極側は強酸性、陰極側は強アルカリ性を呈したが菌吸着量そのものはトリスー塩酸緩衝液使用時とほとんど変化が認められなかった (Fig. 11)。したがって、菌液の pH 低下が陽極への菌吸着に直接的に影響したとは考えられなかった。極端な pH 低下は、菌体の凝集をもたらし、その結果として菌吸着反応槽の管底に菌が沈澱した。500 μ A 以上の電流値の場合に菌吸着量が減少したのは、陽極表面から気体発生が起き菌吸着を物理的に阻止する程度にまで多量となったためかも知れない。陽極表面において、電流値

500 μ A 前後では肉眼的に気体発生は確認されなかったが、900 μ A では気体発生が確認され、脱分極が影響したものと考えられる。また、菌吸着量に影響を及ぼす要因は、単に電流値のみではなく、通電時間も関係すると思われた。宮崎は最大量の菌吸着量を認めた条件においても、一定の通電時間を越えると、菌体の形態異常、破壊および凝集を観察したと述べている⁴⁶⁾。また、Olsson らは⁶²⁾、*S. mutans* を pH の異なる緩衝液中に浮遊させた時に示す菌表面のゼータ電位を測定したところ、ゼータ電位におよぼす pH 効果は血清型で異なるが、たとえば、本実験で供試した HS6 株と同じ a 血清型に属する AHT 株と OMZ61 株では、pH 低下と共にゼータ電位も直線的に減少すること、すなわち負電荷の減少が認められ、pH 3 付近ではゼータ電位は零になると報告してい

る。したがって、菌懸濁液の酸性化、すなわち、pH 低下をもたらす高い電流値、長時間の通電あるいは激しい電気分解が起こる条件下では HS6 株表面の負荷電量が減少し、菌同志が凝集すると思われる。事実、pH 4.0 のクエン酸緩衝液中の菌体は pH 7.0 および pH 10 の緩衝液中の菌体より短時間で沈澱し大きな凝集塊が観察された。陰極での吸着菌量が pH 4.0 の場合 pH 7 および pH 10 の場合より増加していた (Fig. 12) が、pH 低下による菌体表面の負電荷量の減少を反映していると思われる⁶²⁾。以上の観察から判断して、本実験では、特別の場合を除き菌懸濁液として pH 変動の比較的小ないトリス-塩酸緩衝液 (pH 7.0) を使用し、通電する電流値 300 μ A (約 4.5V) 以下、通電時間は、60 分の条件で菌吸着実験を行ったものである。

本実験では、菌濃度も菌吸着量を左右する重要な因子であった。HS6 株 (a 血清型) も LM7 株 (e 血清型) も共に $OD_{550}=0.5$ (約 4×10^8 CFU/ml) 以下の菌濃度では、陽陰極表面に吸着する菌量は非通電白金表面のそれと同じで非常に少なかった (Fig. 10 と 18)。したがって、負に帯電した細菌粒子が陽極表面に吸着されるためには、単位面積当りの細菌数、つまり細菌密度が菌吸着現象では重要な問題となる。本実験と吸着条件が異なるが、細菌吸着量と細菌密度との関係を示す一例として、Van Houte らの報告⁶³⁾がある。すなわち、彼らは唾液中の *S. mutans* 量と歯牙表面への吸着量の関係を調べ、 10^4 /ml 以上の菌濃度でなければ歯牙表面への菌吸着が検出されなかったと報告している。また、高濃度の菌液、たとえば、 OD_{550} 値が 3 以上の使用時では、陰電極表面にも若干の菌体が観察された (Fig. 8, 10) が、これは濃度効果と呼ばれるべきもので、積極的な意味を有するものと考えられなかった。

培養条件の異なる細菌を吸着実験に供した場合どのような変化が見られるかを一つの指標に実験を行った。菌吸着現象は、細菌の表面電荷に影響を与える菌体表層の物質の質的あるいは量的な影響を受けられると思われる。特に *S. mutans* は、培地中のスクロースから粘性の高い非水溶性の多糖体 (グルカン) を菌体外に産生する性質を有す

る^{50,53,64)}。そこで、スクロースを添加しない TSB 培養および 5 % スクロース添加 TSB 培養した HS6 株の菌体について吸着量を比較した (Fig. 13 と 14)。TSB 中にも微量のスクロースが含まれているとしても¹⁸⁾、5 % スクロース TSB 中では菌体結合型グルカン合成酵素 glucosyltransferase がより多くなる結果、スクロースから多量の菌体結合性非水溶性グルカンを合成することが明らかにされている^{65,66)}。本実験で供試した HS6 株菌の洗浄法では、非水溶性グルカンは除外されていない^{67,68)}。 $OD_{550}=5.0$ の同じ懸濁濃度において、5 % スクロース添加 TSB 培養液中には TSB 培養液中より多量の非水溶性グルカンが含まれていて OD_{550} 値の上昇に寄与すると考えられた、その点を明確にするために、生菌数測定を行った。その結果、 $OD_{550}=1$ での TSB 培養菌数は 1.7×10^8 で、5 % スクロース含有 TSB 培養菌数は 2.1×10^8 と算定され有意の差はなかった。したがって本実験における HS6 株の白金電極への吸着能は電気的な吸着効果によるものが主体であって、一般に歯牙表面への付着に関与しているとされる非水溶性多糖体は大きく影響を与えないと考えられる。なお今後、非水溶性多糖体の吸着現象におよぼす量的な解析が必要とされる。

一般に、細菌の加熱処理により細菌細胞の蛋白質と結合している高分子物質の変性が起きると考えられている。本実験において、加熱処理を施した HS6 株菌の吸着量の増加現象は大変興味深い。しかしながら、この加熱による菌吸着現象は簡単には説明されない。現時点では、菌凝集を伴わない加熱処理菌の吸着量が増加したのは、菌体と電極表面との間の吸着をより容易にする何らかの変化、たとえば、細菌表層の分子の立体配置変化、それに伴う表面電荷増加等の物理化学的变化が起きていると推定されるに過ぎない。文献としては、海生細菌を供試した Fletcher^{6,7)} 腸内細菌を使用した Minato ら⁷⁰⁾ の報告がありいずれも高温条件では付着あるいは吸着量が増加することを述べている。

緑膿菌のポリスチレンシャーレ表面への付着が高温で促進された結果の説明として、次のよう

な3つの点を Fletcher は挙げている⁶⁹⁾。すなわち、(1) 高温では培地あるいは細菌表層の重合分子の粘性が低下すること、(2) 高温条件になると化学吸着 (chemisorption) あるいは溶液中の溶質が物理的吸着を起こすのに都合が良くなること、そして(3) 高温が細菌の生理条件を変える結果、吸着を促進すると述べている。いずれにしても、一般論としての推論の域を出ず実験的な裏付けが今後求められる。

極変換実験結果 (Fig. 16) から、陽電極表面に吸着していた HS6株細菌は、陰電極に変換すると電極表面から離脱すること、反対に、陰極から陽極に変換すると陽極に新たに菌吸着が起ることが明らかとなった。本菌の白金電極表面への吸着および電極からの離脱の可逆性は、宮崎の *S. sanguis* を用いた金電極系の報告と一致する⁴⁶⁾。この実験結果から、*S. mutans* 細菌はその表面電荷に依存した吸着行動を示めることが示唆された。

細菌の付着および吸着現象あるいは歯垢形成におよぼす各種イオンの役割についての研究は少ない。F⁻ や Cl⁻ などの陰イオンは、歯垢の形成におよぼす影響は少ないが^{71,72)}、陽イオンの場合はイオンの種類により異なる。すなわち、Sn⁴⁺, Al³⁺, Mg²⁺ などの陽イオンは、歯垢形成を阻害することが知られている²⁸⁾。これと関連して、抗菌剤の多くが多価陽イオンを含んでいることは興味深い⁷¹⁾。細菌のエナメル質表面への吸着が Ca²⁺ により架橋されるとする立場は、リン酸塩あるいは EDTA, hexametaphosphate などのキレート剤による歯垢形成抑制効果に基づいている^{26,28,34,35,73,74)}。一方、スクロースを含む培地で発育した *S. mutans* 菌表層には多量の非水溶性グルカンが合成蓄積され、負電荷に富む teichoic acid がこのグルカンと結合している⁵⁰⁾。菌増殖系において CaCl₂ 添加量の増加に伴って陽極表面に観察された HS6株菌数の増加が見られた (Fig. 19)が、これは細菌の吸着現象に Ca²⁺ イオンが重要な役割を果していることを示唆している。

今回の菌吸着実験系において、全唾液中に電極を60分間浸した後、新たに HS6株菌体の白金電極への吸着実験を行ったところ、陽極表面に観察

された細菌量は未処理電極表面のそれと比較し増加していた。この場合、陽極表面の細菌を走査型電顕で観察すると、電極表面の細菌分布が不均一であり、かつ細菌が重層して集合している像が認められ、また、菌体より小さい多数の球状ないし桿状の構造物が菌体や陽極表面に観察された (Fig. 18)。このような構造物は少なくとも部分的にせよ細菌相互あるいは細菌の電極表面への吸着 (付着) に関与しているように思われた。電極の唾液処理によって生じたこのような菌体の集合化が、何故陽極にのみ起きたかその理由は現在のところ不明である。Hay らによれば、唾液中の細菌凝集因子は高分子であり、エナメル質と強力に結合する性質があるという⁷⁵⁾。また、*S. mutans* を凝集する唾液因子は同時に細菌の吸着に関与していることも知られている⁷⁶⁾。白金電極の唾液処理によって唾液成分の一部、おそらく糖タンパク質が陽極表面に吸着し、それと HS6株菌体表層のタンパク質あるいは糖タンパク質 (菌体表層レセプターの一種) との特異的結合が結果的に陽極表面への菌付着を高めた可能性がある。今後の詳細な研究が必要である。

3. 歯科修復物と歯垢形成

歯科修復材はその材質により細菌発育を抑制すると報告されている³⁶⁾。また、一度歯冠修復物上に形成された歯垢は修復材の物性の変化をもたらす³⁷⁻⁴¹⁾。したがって、歯科臨床における充填物、補綴物など修復物の重要な評価基準の一つとして、歯垢形成を最少限に抑制する点が挙げられる⁷⁷⁾。しかしながら、各種の修復材に対する細菌の吸着量を、エナメル質に対するそれと比較した *in vivo* 実験結果や⁴⁰⁾、口腔内に装着された修復物表面の歯垢量と天然歯牙表面の歯垢量を比べた実験でも修復物の方が大であるという^{78,79)}。また、レジンやポーセレンなど非金属修復物はもちろん金属含有修復物表面の歯垢成分もエナメル質表面の歯垢成分と同一でない^{37,80)}。このように、齲蝕病変部の修復を目的として装着される保存修復物や補綴物と歯垢との関係は密接である。

口腔内では、歯牙あるいは歯牙上の修復物は唾液と接しているのが常である。咬合や咀嚼運動によって、異種の金属製修復物が接する際、よく間

題とされるのはガルバニック現象である⁴²⁻⁴⁵⁾。この時に発生する電流は歯垢や唾液を良伝導体として局所回路を形成する。従来は、このガルバニック電流の発生は、主として修復物の腐食および疼痛の原因と考えられてきた。しかし、ガルバニック電流の発生現象を、修復物上の歯垢形成と関連させて注目する必要がある。細菌吸着を促進する *in vivo* 実験で確認された電流値と口腔内に発生する電流値は必ずしも同レベルではない⁴⁵⁾。しかし、多くの研究者の試行にもかかわらず、口腔内という複雑な系での歯科修復物間の電位差測定は確立していないのが現状である^{42,81)}。また頻用されている充填物の一種、アマルガムにおいても電圧1.2ボルトのガルバニック電流が発生する^{82,83)}。本実験において、S. mutans は陽電極に吸着することを、またその吸着量は唾液の存在により促進されることを示した。In vivo 実験の一つとして、in vitro 系菌吸着実験とほぼ同レベルの電位差あるいは電流値の条件での電極表面の吸着物あるいは付着物を観察したところ、陽極と陰極との間に形態的差異が認められた。試行された条件では、陽極表面により多量の集積物が観察された。電極に吸着ないし付着している物質の成分分析は行っていない。これらの結果は、修復物によって発生するガルバニック電流（局所回路）の歯垢形成における意味を考察する際に重要な示唆を与えるものである。

結 論

ヒト口腔内の歯牙表面あるいは装着される歯科用金属修復物表面における歯垢形成過程の初期段階である菌吸着現象に関する知見を得ることを目的として、in vitro 系における菌吸着量測定装置を作製し、齲蝕と関連の深い S. mutans の白金電極表面への菌吸着量を種々の条件下で比較検討した。また、非口腔由来のグラム陰性桿菌である E. coli UKT-B 株についても検討した。更に in vivo 系における吸着実験の1モデルとして、ヒト口腔内に白金電極板を一定時間装着し、荷電表面への吸着物質について検討した。その結果以下の結論を得た。

(1) 作製した菌吸着量測定装置による in vitro

吸着実験では、供試した S. mutans a~f 血清型のいずれの菌株においても、吸着菌数は陽性表面で多く観察され、陰極ではほとんど観察されなかった。

(2) S. mutans HS6株による菌吸着実験では、OD₅₅₀=0.5 以下の濃度では陽極への菌吸着は認められず、それ以上では菌濃度増加に伴って増加した。300 μ A を上限として電流値の増加と共に吸着菌数も増加し、通電後1時間で吸着菌量は最大となった。

(3) 陽極表面に吸着した S. mutans HS6株菌は極変換されることによって陰極表面から容易に離脱し、陽極への菌吸着が認められた。

(4) S. mutans HS6株菌の吸着量は、加熱処理により増大した。

(5) 白金電極をヒト全唾液で前処理すると、陽極表面に多くの S. mutans HS6株菌が観察された。

(6) HS6 株菌をカルシウム存在下でスクロース添加培地中で培養するとカルシウム濃度の増加に伴い陽極表面での菌吸着量は増加した。

(7) S. mutans の集落形成した白金板を陰極とし、通電した場合30分の範囲で経時的に解離量は増加した。これに対し、陽極白金板上には通電後30分まで経時的に吸着菌量が増加した。

(8) E. coli の菌吸着現象を観察すると S. mutans と同様に通電60分の範囲で吸着菌数の増加が認められ、陰極ではほとんど菌吸着は認められなかった。

(9) ヒト口腔内に白金電極を装着し、電流値180 μ A 前後で2時間通電後、両電極表面を走査型電顕で観察すると、陽極表面には唾液成分や細菌等の集積が多量に認められた。

謝辞：稿を終わるにあたり、終始ご懇篤なご指導とご校閲を賜りました並河勇教授に深甚なる感謝の意を表します。また実験の進行に際して終始御協力いただきました口腔細菌学講座梅本利彦講師に深く感謝いたします。併せて本実験での供試菌株の供与を賜りました愛知学院大学歯学部微生物学教室に謝意を表します。さらに本実験の技術的援助をいただきました口腔細菌学講座の各位と中央研究施設の森春義、梅原則明両氏に感謝いたします。

抄録：細菌の歯牙および金属表面への吸着現象を検討する目的で、歯牙齲蝕原性連鎖球菌 *Streptococcus mutans* の6血清型および非口腔由来の桿菌 *Escherichia coli* UKT-B 株を供試菌とし、白金電極による菌吸着量測定装置を作製し、吸着菌量の評価および菌吸着に及ぼす諸条件を検討した。また、*in vivo* のモデル実験として、被験者口腔内に白金電極を装着し電極表面に吸着する物質の形態学的差違も検討した。

全ての供試菌は白金の陰極表面より陽極表面に多量に吸着した。*Streptococcus mutans* HS6を用いた吸着実験では、菌濃度および電気量の増加に伴って吸着菌量が増加し、また菌体の加熱処理およびカルシウム処理、白金電極の全唾液処理により陽極表面の吸着菌量が増加した。極変換実験および菌集落形成後の菌解離実験では吸着菌が陰極から解離することが示された。*In vivo* 実験では、陽極表面には陰極より多量の表面集積物が観察された。これらの結果に基づき、口腔内に生息する *S. mutans* の歯牙表面あるいは歯冠修復物への吸着現象の意義を考察した。

文 献

- 1) Miller, W. D. : The microorganisms of the human mouth. The S. S. White Dental Mfg. Co. (Philadelphia), pp. 146-202, 1890.
- 2) Michalek, S., McGhee, J. R. and Navia, J. M. : Virulence of *Streptococcus mutans* ; a sensitive method for evaluating cariogenicity in young gnotobiotic rats. Infect. Immun. **12** : 69-75, 1975.
- 3) Hamada, S., Ooshima, T., Torii, M., Imanishi, H., Masuda, N., Sobue, S. and Kotani, S. : Dental caries induction in experimental animals by clinical strains of *Streptococcus mutans* isolated from Japanese children. Microbiol. Immunol. **22** : 301-314, 1978.
- 4) Socransky, S. S., Hubersak, C. and Propas, D. : Induction of periodontal destruction in gnotobiotic rats by a human oral strain of *Actinomyces naeslundii*. Arch. Oral Biol. **15** : 993-995, 1970.
- 5) Jordan, H. V., Keyes, P. H. and Bellack, S. : Periodontal lesions in hamsters and gnotobiotic rats infected with actinomyces of human origin. J. Periodont. Res. **7** : 21-28, 1972.
- 6) Edwardsson, S. : Bacteriological studies on deep areas of caries dentin. Odontol. Revy **25** [Suppl. 32] : 1-43, 1974.
- 7) Fitzgerald, R. J., Adams, B. O., Fitzgerald, D. B. and Knox, K. W. : Cariogenicity of human plaque lactobacilli in gnotobiotic rats. J. Dent. Res. **60** : 919-926, 1981.
- 8) 奥田克爾(浜田茂幸編) : う蝕と歯周病一研究の進歩, (*Bacteroides gingivalis* の性状と歯周疾患誘発能). 日本歯科評論社 (東京), **1**, pp. 151-183, 1982.
- 9) Neider, M. E. and Weiss, L. : The effects of endotoxin on cell detachment *in vitro*. Arch. Oral Biol. **18** : 499-504, 1973.
- 10) McBride, B. C. and Bourgeau, G. : Dextran induced aggregation of *Actinomyces viscosus*. Arch. Oral Biol. **20** : 837-841, 1975.
- 11) Irving, J. T., Socransky, S. S. and Tanner, A. C. R. : Histological changes in experimental periodontal disease in rats monoinfected with gram-negative organisms. J. Periodont. Res. **13** : 326-332, 1978.
- 12) Holt, S. C., Tanner, C. R. and Socransky, S. S. : Morphology and ultrastructure of oral strains of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Haemophilus aphrophilus*. Infect. Immun. **30** : 588-600, 1980.
- 13) Slots, J. and Gibbons, R. J. : Attachment of *Bacteroides melaninogenicus* subsp. *asaccharolyticus* to oral surfaces and its possible role in colonization of the mouth and of periodontal pockets. Infect. Immun. **19** : 254-264, 1978.
- 14) Williams, R. S. and Gibbons, R. J. : Inhibition of bacterial adherence by secretory immunoglobulin A : A mechanism of antigen disposal. Science **177** : 697-699, 1972.
- 15) Williams, R. C. and Gibbons, R. J. : Inhibition of bacterial adherence by secretory immunoglobulin A : A mechanism of antigen disposal. Science **177** : 697-699, 1972.
- 16) Pollack, J. J., Iacono, V. J., Bicker, H. G., Mackay, B. J., Katano, L. and Taichman, L. B. : The binding, aggregation and lytic properties of lysozyme, In : Microbial aspects of dental caries, (Stiles, M., Loesche, W., and O' Breien, T., ed.), **1** : pp. 325-352, Information Retrieval, Inc., Washington, D. C., 1976.
- 17) Scherp, H. W. : Dental caries : Prospects for prevention. Science, **173** : 1199-1205, 1971.
- 18) Gibbons, R. J. and Van Houte, J. : On the formation of dental plaques. J. Periodontol. **44** : 347-360, 1973.
- 19) Hamada, S. and Slade, H. D. : Mechanisms of adherence of *Streptococcus mutans* to smooth surfaces *in vitro*, In : Bacterial adherence, (Beachey, E. H., ed.) Chapman

- and Hall Ltd. (New Fetter Lane, London), pp. 105-136, 1980.
- 20) Saunders, J. M. and Miller, C. H. : Attachment of *Actinomyces naeslundii* to human buccal epithelial cells. *Infect. Immun.* **29** : 981-989, 1980.
- 21) Yamazaki, Y., Ebisu, S. and Okada, H. : *Eikenella corrodens* adherence to human buccal epithelial cells. *Infect. Immun.*, **31** : 21-27, 1981.
- 22) Jordan, H. V., and Keyes, P. H. : *In vitro* methods for the study of plaque formation and carious lesions. *Arch. Oral Biol.* **11** : 793-801, 1966.
- 23) Ericson, T. : Adsorption to hydroxyapatite of proteins and conjugated proteins from human saliva. *Caries Res.* **1** : 52-58, 1967.
- 24) Oppenheim, F. G., Hay, D. I. and Franzblau, C. : Proline-rich proteins from human parotid saliva. I. Isolation and practical characterization. *Biochemistry* **10** : 4233-4238, 1971.
- 25) Sönju, T., Christensen, T. B., Kornstad, L. and Rølla, G. : Electron microscopy, carbohydrate analyses and biological activities of the proteins adsorbed in two hours to tooth surface *in vivo*. *Caries Res.* **8** : 113-122, 1974.
- 26) Nordbø, H. and Rølla, G. : Desorption of salivary proteins from hydroxyapatite by phytic acid and glycerophosphate and the plaqueinhibiting effect of the two compounds *in vivo*. *J. Dent. Res.* **51** : 800-802, 1972.
- 27) Melvaer, K. L., Helageland, K. and Rølla, G. : A charged component in purified polysaccharide preparations from *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sanguis*. *Arch. Oral Biol.* **19** : 589-595, 1974.
- 28) Rølla, G. and Melsen, B. : Desorption of protein and bacteria from hydroxyapatite by fluoride and monofluorophosphate. *Caries Res.* **9** : 66-73, 1975.
- 29) Rølla, G. : Surface adsorption of fluoride to hydroxyapatite and dental enamel. *J. Dent. Res.* **56** : (Special Issue A : #270), 1977.
- 30) Rølla, G. and Bowen, W. H. : Concentration of fluoride in plaque—a possible mechanism. *Scand. Dent. Res.* **85** : 149-151, 1977.
- 31) Rølla, G. : Effects of fluoride on initiation of plaque formation. *Caries Res.* **11** : 243-261, 1977.
- 32) Rølla, G. and Embery, G. : Sulfated glycoproteins in the acquired pellicle and in plaque from *Macaca fascicularis* demonstrated with labeled sulfate. *Scand. J. Dent. Res.* **85** : 237-240, 1977.
- 33) Rølla, G. : Formation of dental integuments—some basic chemical considerations. *Swed. Dent. J.*, **1** : 241-251, 1977.
- 34) Rølla, G., Oppermann, R. V., Bowen, W. H., Ciardi, J. E. and Knox, K. W. : High amounts of lipoteichoic acid in sucrose-induced plaque *in vivo*. *Caries Res.* **14** : 235-238, 1980.
- 35) Rølla, G. : Role of adherence in the development of dental plaque, In : The borderland between caries and periodontal disease II. (Lehner, T. and Cimaioni, G., eds.) Acad. Press Inc. (London), pp. 227-240, 1980.
- 36) Nunez, L. J., Schmalz, G. and Hembree, J. H. : Influence of amalgam, alloy, and Hg on the *in vivo* growth of *Streptococcus mutans* : III. Effect of specimen age and composition. *J. Dent. Res.* **55** : 1001-1003, 1976.
- 37) Norman, R. D., Nehra, R. V., Swartz, M. L. and Phillips, R. W. : Effects of restorative materials on plaque composition. *J. Dent. Res.* **51** : 1596-1601, 1972.
- 38) Onose, H., Ando, S., Nomoto, S. and Suzuki, K. : Corrosion of dental amalgam in culture media. *J. Dent. Res.* **56** : 1336, 1977.
- 39) 安藤 進 : 歯科用アマルガムの腐食傾向に関する研究—*Streptococcus mutans* による人工歯垢が amalgam 充填物に及ぼす影響, 日歯保誌 **21** : 14-24, 1978.
- 40) 井村三雄 : 歯垢細菌の修復材への付着について—とくに修復材の種類と唾液被膜が *Streptococcus sanguis* の付着菌数におよぼす影響, 日大歯学 **52** : 707-719, 1978.
- 41) 竹村金造, 福原裕三, 藤田 進, 鳥居光男, 土谷裕彦 : 歯冠修復材への口腔レンサ球菌の付着 (*in vitro*)—走査型電子顕微鏡による観察, 日歯保誌 **21** : 388-395, 1978.
- 42) Schriever, W. and Diamond, L. E. : Electromotive forces and electric currents caused by metallic dental fillings. *J. Dent. Res.* **31** : 205-225, 229, 1952.
- 43) Materials for the practicing dentist. (Phillips, R. W., Swartz, M. L. and Norman, R. D., eds.) : The C. V. Mosby Company (London), pp. 93, 1969.
- 44) 最新歯科材料学 (東 節男, 山賀礼一編) : 学研書院 (東京), 第1版, pp. 36-41, 1978.
- 45) Phillips, R. W. : In : Skinner's science of dental materials. 7th ed., W. B. Saunders's Company (Philadelphia, London, Toronto), pp. 289-300, 1973.
- 46) 宮崎為次 : 電極電位が *Streptococcus sanguis* の付着におよぼす影響—純金電極—, 日歯保誌 **22** : 426-432, 1979.
- 47) Onose, H., Miyazaki, T. and Nomoto, S. : Effect of electrical potential on the adherence

- of *Streptococcus sanguis* to gold plate. J. Dent. Res. **59** : 1179, 1980.
- 48) Stoppelaar, J. D., Vanie Houte, J. and Dirks, O. B. : The relationship between extracellular polysaccharide-producing streptococci and smooth surface caries in 13-year-old children. Caries Res. **3** : 190-200, 1969.
 - 49) Gibbons, R. J., Berman, K. S., Knoettner, P. and Kapsinals, B. : Dental caries and alveolar bone loss in gnotobiotic rats infected with capsule forming streptococci of human origin. Arch. Oral Biol. **11** : 549-560, 1966.
 - 50) Gibbons, R. J. and Nygaard, M. : Synthesis of insoluble dextran and its significance in the formation of gelatinous deposits by plaque-forming streptococci. Arch. Oral Biol. **13** : 1249-1262, 1968.
 - 51) Perch, B., Kjems, E. and Ravn, T. : Biochemical and serological properties of *Streptococcus mutans* form various human and animal sources. Acta. Pathol. Microbiol. Scand. **82** : 357-370, 1974.
 - 52) Wood, J. M. and Critchley, P. : The extracellular polysaccharide produced from sucrose by a cariogenic *Streptococcus*, Arch. Oral Biol. **11** : 1039-1042, 1966.
 - 53) Saxton, C. A. : An electron microscope investigation of bacterial polysaccharide synthesis in human dental plaque. Arch. Oral Biol. **14** : 1275-1284, 1969.
 - 54) Calrk, W. B., Bammann, L. L. and Gibbon, R. J. : Comparative estimates of bacterial affinities and adsorption sites on hydroxyapatite surface. Infect. Immun. **19** : 846-853, 1978.
 - 55) Clark, W. B. and Gibbons, R. J. : Influence of salivary components and extracellular polysaccharide synthesis from sucrose on the attachment of *Streptococcus mutans* 6715 to hydroxyapatite surface. Infect. Immun. **18** : 514-523, 1977.
 - 56) Rölla, G., Iverson, O. J. and Bonesvoll, P. : Lipoteichoic acid-the key to the adhesiveness of sucrose grown *Streptococcus mutans*, In. : Secretory immunity and infection (McGhee, J. R., Mesteckey, J., and Babb, J. L. eds), pp. 607-618, Plenum Publishing Corp., (New York), 1978.
 - 57) Olsson, J., Glants, P. O. and Krasse, B. : Electrophoretic mobility of oral streptococci. Arch. Oral Biol. **21** : 605-609, 1976.
 - 58) Bernardi, G., Kawasaki, T. : Chromatography of polypeptides and proteins on hydroxyapatite columns. Biochim. Biophys. Acta. **160** : 301-310, 1968.
 - 59) Bernardi, G., Giro, M. G. and Gaillard, C. : Chromatography of polypeptides and proteins on hydroxyapatite columns : Some new developments. Biochim. Biophys. Acta. **278** : 409-420, 1972.
 - 60) Van Houte, J. and Duchin, S. : *Streptococcus mutans* in the mouths of children with congenital sucrase deficiency. Arch. Oral Biol. **21** : 771-773, 1975.
 - 61) Van Houte, J., Burgess, R. C. and Onose, H. : Oral implantation of human strains of *Streptococcus mutans* in rats fed sucrose or glucose diets. Arch. Oral Biol. **21** : 561-564, 1976.
 - 62) Olsson, J. and Glantz, P. O. : Effect of pH and counter ions on the zeta potential of oral streptococci. Arch. Oral Biol. **22** : 461-466, 1977.
 - 63) Van Houte, J. and Green, D. B. : Relationship between the concentration of bacteria in saliva and the colonization of teeth in humans. Infect. Immun. **9** : 624-630, 1974.
 - 64) 上出正幸 : *Streptococcus mutans* の器壁付着性に関与する菌体外多糖について, 日歯周誌 **20** : 15-30, 1978.
 - 65) Hamada, S. and Torii, M. : Effect of sucrose in culture media on the location of glucosyltransferase of *Streptococcus mutans* and cell adherence to glass surfaces. Infect. Immun. **20** : 592-599, 1973.
 - 66) 渋谷耕治, 古賀敏比古, 井上昌一 : *Streptococcus mutans* の glucosyltransferase の細胞表層への結合におけるグルカンの役割, 歯基礎誌 **20** : 729-737, 1978.
 - 67) Nishizawa, T., Imai, S., Akada, H., Hinoide, M. and Araya, S. : Extracellular glucans produced by oral streptococci. Arch. Oral Biol. **21** : 207-213, 1976.
 - 68) Trautner, K., Gehring, R. and Lohmann, D. : Extracellular glucans synthesized by strains of two types of *Streptococcus mutans in vitro*. Arch. Oral Biol. **23** : 175-181, 1978.
 - 69) Fletcher, M. : The effects of culture concentration and age, time and temperature on bacterial attachment to polystyrene, Canad J. Microbiol. **23** : 1-6, 1977.
 - 70) Minato, H. and Suto, T. : Technique for fractionation of bacteria in ruman microbiol ecosystem. III. Attachment of bacteria isolated from bovine rumen to starch granules *in vitro* and elution of bacteria attached therefrom. J. Gen. Appl. Microbiol. **25** : 71-93, 1979.
 - 71) Skjörland, K., Cjermo, P. and Rölla, G. : Effect of some polyvalent cations on plaque formation *in vitro*. Scand. J. Dent. Res. **86** :

- 103-107, 1978.
- 72) Tinanoff, N. : Screening of nine fluoride mouthrinses for antiplaque properties. *J. Dent. Res.* **56** (Special. Issue A : #138), 1977.
- 73) Rölla, G. : Inhibition of adsorption-general considerations. In : *Microbial aspects of dental caries*, (Stiles, H. M., Loesche, W. L., and O' Brien, T. C. eds.) **2** : pp. 309-324, Information Retrieval Inc., (Washington, D. C.), 1976.
- 74) Rölla, G. : On the chemistry of the matrix of dental plaque, In : *Microbial adhesion to surfaces* (Berkeley, R. C. W., Lynch, J. M., Melling, J., Rutter, P. R., and Vincent, R. eds), pp. 425-439, Ellis Horwood Ltd., (England), 1980.
- 75) Hay, D. I., Gibbons, R. J. and Spinell, D. M. : Characteristics of some high molecular weight constituents with bacterial aggregating activity from whole saliva and dental plaque. *Caries Res.* **5** : 111-123, 1971.
- 76) Kashket, S., Skobe, Z. and Garant, P. R. : Electron microscopic observations of saliva-dependent aggregation of oral streptococci. *Arch. Oral Biol.* **23** : 125-129, 1978.
- 77) 土谷裕彦, 竹村金造 : 保存修復材とプラークとの関係についての今日の問題, *国際歯科ジャーナル***3** : 32-38, 1976.
- 78) Skjörland, K. : Plaque accumulation on different dental filling materials. *Scand. J. Dent. Res.* **81** : 538-542, 1973.
- 79) Weitmann, R. T. and Edmes, W. B. : Plaque accumulation on composite surfaces after various finishing procedures. *J. Amer. Dent. Ass.* **91** : 101-106, 1975.
- 80) Sonju, T. and Glantz, P. O. : Chemical composition of salivary integuments formed *in vivo* on solids with some established surface characteristics. *Arch. Oral Biol.* **20** : 687-691, 1975.
- 81) 野元成晃, 阿野 満, 坂井 実, 赤石哲則, 小林茂樹, 小野 章, 小野瀬英雄 : 口腔内金属の電極電位測定法. *日大歯学***52** : 732-738, 1978.
- 82) von Fraunhofer, J. A. : Corrosion of amalgam restorations. *Brit. Dent. J.* **130**:522-524, 1971.
- 83) Matter, R. S. and Reitz, C. D. : Galvanic degradation of of amalgam restorations. *J. Dent. Res.* **51** : 1546-1551, 1972.