初期の歯石についての生物学的研究

第2報 初期の歯石の石灰化能について

新 谷 英 章

東京医科歯科大学第2歯科保存学教室（指導：木下四郎教授）

（昭和45年1月30日受付）

Biological Studies on Early Dental Calculus.

2. Calcifying ability of early dental calculus

Hideaki Shintani

Department of Periodontology, School of Dentistry

Tokyo Medical and Dental University

(Director: Prof. Shiro Kinoshita)

要旨 歯垢や歯石と歯周疾患の発生との間に、臨床的実験および疫学的観察などから、高い相関関係がみられることは明らかである。今日まで数多くの歯垢や歯石についての研究が報告されているが、まだその形成機序や石灰化について不明な点がいろいろと残されている。

本実験は Standardized foil technique を応用して、歯石形成量の個体差は何に起因するのかを解明し、歯石の形成機序についての手がかりを得るために、アイソトープ Calcium-45 をトレーサーとして、初期の歯石の石灰化能について検索した。

臨床的に正常な歯列と歯肉をもつ、被験者5人の下顎中切歯の舌側に規格化した foil を装着し、その上に3日間と6日間に堆積する歯石を集めた。

歯石形成速度は6日間についてだけ調べた。個体間には有意の差がみられたが、2回の期間の間、および左側と右側中切歯の間には有意の差はなかった。

石灰化能については、foil 上に堆積した沈着物を口腔内より取り出すと、ただちに生理的食塩水に保存し、その後 Ca^{45} を含む石灰液中に2時間浸漬し、沈着物の Ca^{45} の取り込み量を Gas flow counter を用いて、5分間測定した。

Ca^{45} は $10\mu\text{c}/\text{ml}$ の濃度のものを用い、浸漬液は Calcifying solution 2cc に Ca^{45} を 0.2cc 混合したものである。

6日間に foil 上に堆積した沈着物の量は個体によって差がみられたが、同一の個体から同じ方法を用いて採取した3日目と6日目の沈着物の石灰化能には個体間の差がみられなかった。しかも、統計学的には両者の間に相関関係が認められなかった。また、3日目の沈着物の Ca^{45} の取り込み量については、3回の期間の間、および下顎の左右中切歯間に有意の差はなかった。

6日目の沈着物の石灰化能は3日目のものより、測定値で約6割増加していた。

以上の結果について、考察を加えた。

緒 言

歯垢や歯石と歯周疾患との間に、臨床的実験¹⁾および疫学的観察^{2) 3)}などから、高い相関関係がみられることは明らかである。したがって、歯垢と歯石の問題は今日でも、なお歯周疾患の病因を考える上に最も重要なものである。今日まで数多くの歯垢や歯石についての研究が報告されているが、まだその形成機序や石灰化 (Calcification) については不明な点がいろいろと残されている。この点を解明するために初期の歯石の石灰化の状態についての質的な研究が多くなされている。すなわち組織学的には光学顕微鏡^{4) 5)}や電子顕微鏡^{6) 7)}によるいくつかの詳細な観察があり、さらに Microradiography⁸⁾やX線回折⁹⁾による報告も行なわれている。しかしながら、歯垢や歯石の形成について、量的にみた研究は必ずしも多くない。これらは歯石中の灰量や無機成分^{10) -13)}を定量的に測定して、石灰化の状態を観察しているのが大部分である。

歯石を定量的に集めるための一方法として Standardized foil technique (foil 法) が考案¹⁴⁾され、この方法によって一定期間に形成される歯石の乾燥重量 (Dry deposit weight) が歯石形成速度 (Rate of calculus formation) と名付けられた¹⁵⁾。歯石形成速度については、個体間に有意の差がみられることが知られており、第1報でも報告した¹⁶⁾。すなわち、成人において同じような生活環境にありながら、歯石の沈着しやすいヒトと沈着しにくいヒトがいることが明らかにされた。

本実験はこの歯石形成量の個体差は何に起因するのかを解明し、歯石の形成機序についての手がかりを得るために試みた。foil 法を応用して歯石を採取し、アイソトープ Calcium-45 を tracer として、初期の歯石の石灰化能について検索した。

実験材料と方法

1. 被験者について

被験者として、臨床的に正常な歯列と歯肉をも

つ、24歳から26歳の東京医科歯科大学歯学部の子学生5人を選んだ。

2. 初期歯石の採取法

歯石を採取する方法として、規格化した厚さ 0.051mm、一辺の長さ 7 mm、表面積約 29mm²の二等辺三角形の foil を応用した (foil 法)。すなわち foil を第1報の如く化学的洗浄、乾燥して、被験者の下顎中切歯の舌側に装着し、foil 上に堆積した沈着物を初期歯石とした。実験期間中その部位への歯ブラシの使用を禁止したが、食事その他の制限は一切与えなかった。

3. 浸漬液 (Incubation solution)

この実験のために使用した Calcifying solution の組成は次のようなものである。

Ca-2mM (CaCl₂)

P-3mM (NaH₂PO₄)

pH は NaOH を用いて、7.1に調節した。この溶液を冷室に保存しておき、各実験の毎に pH の check を行なった。

歯垢の石灰化を in vitro で観察した報告は数多くあり、それに用いた Calcifying solution にもいろいろな組成のものが考えられているが、ここでは上記のものを用いた。これは比較的安定なので、再現性も高く、本実験の目的に適していると考えたためである。

トレーサーとして使ったアイソトープ Calcium-45 は濃度 10 μ c/ml のものを用いた。

浸漬液は Calcifying solution 2 cc に Ca⁴⁵ を 0.2cc 混合したものである。

4. Ca⁴⁵ の測定

Ca⁴⁵ の測定に使用した Gas flow counter は日本無機医理学研究所の製作した counter (2 π 型) で Q ガスを使用し、窓無しで用いた。

測定時間は予備実験から5分間とした。すなわち、5分間に放出したアイソトープの count 数をもって測定値とした。

5. foil 上に堆積した沈着物による Ca⁴⁵ の取り込みについて

5人の被験者の口腔内より foil とともに日齢3日と6日の沈着物を取り出し、ただちに生理的食

塩水に保存した。この沈着物を Ca^{45} の入った浸漬液中に室温で2時間浸漬した。2時間後に沈着物を取り出し、 Ca^{45} を含まない Calcifying solution で洗浄した後に放射能測定用の試料皿に移し、1時間赤外線ランプで乾燥した。乾燥の終わった foil と沈着物を新しい試料皿に移し、沈着物の堆積していない foil の面をセメダインで貼りつけて、gas flow counter に入れて Ca^{45} の放射能を測定した。

日齢3日と6日の foil 上に堆積した沈着物による Ca^{45} の取り込み量をそれぞれ3回と2回測定した。

foil 自身による Ca^{45} の取り込みを観察するために、通常の如く化学的洗浄を施し、乾燥した foil 15枚を Ca^{45} の入った浸漬液に入れ、2時間浸漬を行なった。2時間後に foil を取り出し、同様にして放射能の測定を行ない、その値を対照として表1に示す。

表1 foil 自身による Ca^{45} の取り込み量(5分間)

3443	3870	3914
4506	4942	4925
5440	5497	5824
5953	6568	6952
8584	8999	9018

$$\bar{x}=5895.7\pm1709.8$$

表1のように foil 自身による Ca^{45} の取り込みもみられた。しかし、その値を foil と沈着物による Ca^{45} の取り込みの値と比較すると、1/100以下となり無視できるものと思われる。

6. 浸漬時間

浸漬時間を定めるために、次のような予備実験を行なった。時間を2時間と24時間に定め、foil に堆積した沈着物の Ca^{45} による取り込み量の差を測定した。

3人の被験者の下顎中切歯の舌側に堆積した日齢3日の沈着物を foil 法で採取し、これを浸漬液に入れて、一方を2時間、他方を24時間浸漬し、取り込まれた Ca^{45} を測定した。その値を表2に示す。

表2 foil 上に堆積した日齢3日の沈着物の Ca^{45} の取り込み量(5分間)。“浸漬時間(2時間, 24時間)の違いによる影響”

Time Subjects	2h.	24h.
A	129941 146407	148716 167352
B	113210 99762	112140 86413
C	128841 108140	128324 158403

第1報¹⁶⁾で、下顎前歯の舌側に装着した foil 上に堆積した沈着物には、左右の中切歯間に沈着量の有意差がないことがみられた。

したがって、同一人の左右の沈着物を取り替えて繰り返して2回浸漬を行なった。

この結果から、2時間値と24時間値による著明な差がみられないことがわかったので、浸漬の時間を2時間とした。

7. 歯石の形成速度

初期の歯石の形成量を知るために、次のような観察をした。5名の被験者の下顎中切歯の舌側に、化学的に洗浄をした foil を6日間装着した。6日後に foil を取り出し、110°C で3時間乾燥し、日齢6日の歯石の乾燥重量とした。6日間の実験を2回繰り返して行なった。

結 果

1) 歯石形成速度

下顎中切歯の舌側に堆積した日齢6日の歯石の乾燥重量を表3に示す。

日齢6日の歯石の乾燥重量の平均値とその標準偏差は一歯当たり、右側中切歯が $488.3\pm127.4\mu\text{g}$ 、左側が $572.7\pm185.3\mu\text{g}$ であった。

これらの値について、分散分析法によって調べると、個体間には危険率0.01で有意の差があった。2回の期間の間、および左側中切歯と右側中切歯の間には危険率0.01で有意の差がなかった(表4)。

2) Ca^{45} の取り込み

表 3 下顎中切歯に装着した foil の上に堆積した日齢 6 日の沈着物の乾燥重量 (μg)

Subjects Posi- tions Periods	A ₅		A ₂		A ₃		A ₄		A ₅		Mean	
	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L
I	401	663	498	764	378	329	521	536	714	723	502.4	603.0
	1064		1262		707		1057		1437		1105.4	
II	342	517	532	773	301	211	602	654	544	557	464.2	542.4
	859		1305		512		1256		1101		1006.6	
Mean	371.5	590.5	515.0	768.5	339.5	270.0	561.5	595.0	629.0	640.0	483.3	552.7
	961.5		1283.5		609.5		1156.5		1269.0		1036.0	

下顎中切歯の舌側に装着した foil 上に堆積した日齢 3 日の沈着物による Ca^{45} の取り込み量を個体および期間別に表 5 に示す。

下顎の右側中切歯に装着した foil 上に堆積した日齢 3 日の沈着物に取り込まれる Ca^{45} の測定値とその標準偏差は 1 歯当り 131538 ± 47022 であり、左側のそれは 120386 ± 39348 であった。1 歯当り、平均 125962 ± 42977 だった。個体間に有意

表 4 表 3 の分散分析表

Source of Variation	Df	SS	MS
Subjects	4	315518	78879.5**
L. vs. R. incisors	1	12201.8	12201.8
Sub. x L. vs. R. incisors	4	46397.2	11599.3
Remainder	10	120893	12089.3
	19	495010	26053.2

** PF<0.01

表 5 foil 上に堆積した日齢 3 日の沈着物に取り込まれた Ca^{45} の測定値 (5 分間)

Subjects Posi- tions Periods	A ₁		A ₂		A ₃		A ₄		A ₅	
	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L
I	62181	113350	170594	123461	188230	180512	218387	188010	121346	173031
II	54485	81225	153364	133358	105321	73700	94804	126823	167640	154264
III	101708	65545	111956	80416	157647	100126	95101	114823	160304	97141
Mean	72791	86767	145305	112412	150399	118113	136097	143219	153219	141479

差があるかどうかを分散分析法で調べると、危険率 0.01 で有意の差は認められなかった (表 6)。

3 回の期間、下顎の左、右中切歯間には、危険率 0.01 で有意の差は認められなかった。

なお、測定値の下 2 桁は信頼性が薄いと考えられるので、統計的検定には下 2 桁を四捨五入したものを用いて行なった。

同様に測定した日齢 6 日の沈着物による Ca^{45} の取り込み量を表 7 に示す。これによると、右側中切歯による取り込みは 224517 ± 50251 、左側は 187318 ± 18366 、一歯当り 205917 ± 54924 であっ

表 6 表 5 の分散分析表

Source of Variation	Df	SS	MS
Subjects	4	17122.49	4280.62
L. vs. R. incisors	1	932.98	932.98
Sub. x L. vs. R. incisors	4	2819.62	704.91
Remainder	20	32688.95	1643.45
	29	53564.04	1847.04

た。分散分析法で調べると個体間および左右中切歯間に危険率 0.01 で有意の差は認められなかった。以上の結果から、6 日目の沈着物の Ca^{45} の

表 7 日齢 6 日の沈着物に取り込まれた Ca^{45} の測定値 (5 分間)

Positions \ Subjects	A ₁	A ₂	A ₃	A ₄	A ₅	Mean
Right incisors	222356	184404	180903	305517	229405	224517
Left incisors	129578	202088	164346	160124	280452	187318
Mean	175967	193246	172625	232821	254929	205917

Subjects	D. D. W.	Subjects	日令 3 日の Ca^{45} の 取り込み量	Subjects	日令 6 日の Ca^{45} の 取り込み量
H. S.	(609.5)	F. T.	(159.5)	H. S.	(345.2)
F. T.	(961.5)	T. S.	(257.8)	F. T.	(351.9)
Y. K.	(1156.5)	H. S.	(268.5)	T. S.	(386.5)
Y. S.	(1269.0)	Y. K.	(279.3)	Y. K.	(465.6)
T. S.	(1283.5)	Y. S.	(294.5)	Y. S.	(509.9)

図 1 歯石の乾燥重量 (D.D.W.) と Ca^{45} の取り込み量との関係

取り込み量は 3 日目のものよりも測定値で、約 6 割も増加していた。

3) 歯石の形成量と Ca^{45} の取り込み量との関係

下顎中切歯の舌側に装置した foil に堆積した沈着物の量とその沈着物中に取り込まれた Ca^{45} の値との間の相関関係について検討をした。

3 日と 6 日の沈着物による Ca^{45} の取り込み量と 6 日間に堆積した沈着物の乾燥重量との間の相関係数 r は、それぞれ 0.15, 0.24 となり、この r を検定すると、 $F_{\text{cal}}(\cdot; F_{\text{cal}} = \frac{(N-2)}{1-r^2} \cdot r^2)$ はそれぞれ 0.18 と 0.49 となった。その結果 $F_{\frac{1}{8}}^1(0.05)$, $F_{\frac{1}{8}}^1(0.01) > 0.18, 0.49$ となり、両者の間には有意の相関は認められなかった¹⁷⁾。

歯石の乾燥重量と Ca^{45} の取り込み量との間に、統計学的には相関関係はなかったが、両者の関係を図 1 で示す。

左側に日齢 6 日の乾燥重量の少ない順に個体をならべた。右側に日齢 3 日と 6 日の沈着物による Ca^{45} の取り込み量を少ない順にならべ、左側と右側の対応する個体を線でむすんで図示した。

考 案

歯垢が in vitro で石灰化を起こすかどうかを調べるために、次のような別の予備実験を行なった。

口腔内より取り出した歯垢をスライド・ガラスに塗りつけ、calcifying solution に入れ、37°C で 7 日間培養を行なった。

実験の前後に、同一部位を同培養率の偏光顕微鏡を用いて、石灰化の状態を観察した。図 2 は培養前の状態で、すでに部分的には石灰化がおこっている。図 3 は培養後の状態を示す。複屈折が認められ、白くみえる領域に石灰化がおこっていることが証明された。このような報告は他にもすでいくつかあるが¹⁸⁾、以上の結果から in vitro でも歯垢の石灰化が進むことは明らかであるように思われた。

初期の歯石を定量的に集める方法として、Standardized foil technique が有効なことが第 1 報で分ったので、本実験の資料の採取にもこの方法を応用した。

下顎前歯の舌側に装着した foil 上に、6 日間に堆積した沈着物の乾燥重量は、同じ方法を用いた木下¹³⁾、Marthaler¹⁴⁾、第 1 報¹⁶⁾、Turesky¹⁹⁾らの 7~8 日の値よりも、わずかに低い値だった。この乾燥重量は前報の結果と同様に、個体間に有意の差が認められた。この原因について、いままでの報告から考えられることはすでに第 1 報¹⁶⁾で考察した。

foil 上に、3 日間と 6 日間に堆積した沈着物の Ca^{45} の取り込み量については個体差が認められなかった。

図 2 培養前の菌垢の状態を示す。すでに部分的に石灰化がおこっている。(×70)

図 3 培養後の状態を示す。複雑折した部分が白く見え、石灰化したことを示す。(×70)

さらに、乾燥重量と沈着物による Ca^{45} の取り込み量との間には相関関係はみられなかった。

これらの点について2, 3の考察を加えてみたい。

3日間に堆積した沈着物について Ca^{45} の取り込みを観察したのは、下顎前歯の舌側に堆積する沈着物は2, 3日中に石灰化することが初期の歯石についての研究¹⁰⁾で知られているからである。

すなわち、日齢3日の沈着物中の灰量は、乾燥重量の約41%²⁰⁾であった。

Schroeder¹⁰⁾によると、歯石の形成しやすいヒトでは2日目、すでに Ca ・ P 含有量がかなり高くなることが知られている。

一方、歯石の採取法は異なるけれども、Scharawy²¹⁾は歯石の形成しにくいヒトでは、2日目では灰量が最大になり、それ以後は量的にあまり変化しないことを報告している。

また、celluloid strips に堆積した日齢4日の沈着物は、さらに石灰化液中で培養すると石灰化が進行することが soft X-ray や組織学的な観察により報告¹⁸⁾されている。

以上の報告から、3日目位の歯石にはかなり強い石灰化能があるものと推定された。

したがって、本実験では石灰化能を測定する日をまず3日目とし、続いて6日目の資料で測定した。歯石形成速度は6日目の沈着物で観察した。3日目の乾燥重量を測定して、歯石形成速度を調べることは、測定誤差が大きくなることが明らかにされている¹⁰⁾ので、歯石形成速度は6日目の資料についてのみ測定した。6日目の沈着物の石灰化能の活性が、3日目のものより高くなっていることは興味ある新しい知見であった。

これらは細菌の量や組成および石灰化の核になりうる物質が増加したことによるものと考えられる。

事実、1～2日目の歯垢に球菌や桿菌が多く、2～4日では紡錘菌や線状微生物が多くなり、4～9日目ではスピロヘータおよびラセン菌の占める割合が多くなってくることが報告²²⁾されていることからして、細菌の役割がまず考えられる。し

かし、Schroeder らの観察によると、細菌体の他に細菌体外にも石灰化がおこるらしいこと、および無菌動物にも歯石様物質の沈着がみられる報告^{23) 24)}などから考察すると、単に細菌のみの影響とだけと考えるににくい点もある。

そこで、唾液の影響について考えると、唾液の性状に個体差があることは知られており、唾液と歯石との間に密接な関係があることも報告^{25) 26)}されている。すなわち、in vitro の実験で、歯石様物質が唾液から作られること^{27) 28)}、唾液腺を取った動物に、歯石形成がおこらないこと^{29) 30)}などの報告から推察しても、唾液環境の影響が大きいことが考えられる。Eilberg ら³¹⁾は唾液中の nucleating substance について、 Ca^{45} を用いて実験を行ない、石灰化を誘導する核の存在を暗示している。

6日間に foil 上に堆積した沈着物の量は個体によって差がみられたが、同一の個体から同様にして採取した3日目と6日目の沈着物の石灰化能には個体間の差がみられなかった。しかも、両者の間には統計学的に相関関係が認められなかった。その理由については、資料の浸漬を常温で行なったこと、および石灰化液の影響なども考えられるが、今回の実験では解明できなかった。このことは興味ある問題と思われるので、今後さらに培養条件や石灰化液の組成を変えて追求して行きたい。

本実験は被験者の数が十分であるとは考えにくい、初期の沈着物の石灰化能の活性についてしらべ、1, 2の興味ある結果を得た。このような報告は今までにみられない。

今後は、歯石の沈着しにくいヒトについても、同様な石灰化能を検索し、さらに沈着物の経時的変化による石灰化能の検討を加えて究明したい。

結 論

臨床的に正常な歯列をもち、歯肉炎を有しない5人の男子学生について、下顎中切歯の舌側に規格化した foil を装着し、その上に堆積する歯石を集めて、歯石形成速度と初期の歯石の石灰化能に

ついて観察した。

下顎中切歯の舌側に沈着した日齢6日の歯石の乾燥重量は1歯当り 528.0 ± 161.4 であった。歯石の形成量は個体間に有意の差があった。下顎中切歯の舌側に装着した foil 上に3日および6日間に堆積した沈着物の石灰化能をみるために、沈着物をアイソトープ Calcium-45 を含む溶液中に浸漬し、沈着物の Ca^{45} の取り込み量を Gas flow counter を用いて測定した。

3日間に堆積した沈着物による Ca^{45} の取り込み量と6日間に堆積した沈着物による Ca^{45} の取り込み量とを比較すると、6日目の沈着物の石灰化能は3日目のものより、測定値で約6割高かった。

統計的処理を行なうと、3日目の沈着物による Ca^{45} の取り込み量については個体間に、3回の期間の間に、および下顎の左右中切歯間に有意の差はなかった。6日目の沈着物による Ca^{45} の取り込み量についても、個体間にも有意の差はなかった。下顎中切歯の舌側に堆積した沈着物の石灰化能と乾燥重量との間には相関関係が認められなかった。

稿を終るにさいし、終始御懇篤なる御指導と御校閲を賜った木下四郎教授、歯学部生化学教室の佐々木教授に深く感謝いたします。また御協力いただいたアイソトープ室の藤井技官、当教室の末田武講師、鈴木康司講師、保存学教室の各位に御礼申し上げます。

文 献

- 1) Löe, H., Theilade, E. and Jensen, S. B.: Experimental gingivitis in man. *J. Periodont.*, 36: 177, 1965.
- 2) Russell, A. L.: Epidemiology of periodontal disease. *Internat. dent. J.*, 17: 282, 1967.
- 3) 石川純, 山崎敬介: 野生および飼育ニホンザルの口腔内所見の比較, 日本歯槽膿漏学会誌, 6: 38, 1964.
- 4) Mandel, I. D., Levy, B. M. and Wasserman, B. H.: Histochemistry of calculus formation. *J. Periodont.*, 28: 132, 1957.
- 5) Schroeder, H. E., Lenz, H. and Mühlemann, H. R.: Mineralization centers in early dental calculus by light and electron microscopy. *Helv. Odont. Acta*, 7: 67, 1963.

- 6) Schroeder, H. E.: Two different types of mineralization in early dental calculus. *Helv. Odont. Acta*, 8: 117, 1964.
- 7) Schroeder, H. E., Lenz, H. and Mühlemann, H. R.: Microstructures and mineralization of early dental calculus. *Helv. Odont. Acta*, 8: 1, 1964.
- 8) 増田正樹: Microradiography によるセメント質および歯石の研究, 口病誌, 32: 82, 1962.
- 9) Schroeder, H. E. and Bambauer, H. V.: Stages of calcium phosphate crystallization during calculus formation. *Arch. Oral Biol.*, 11: 1, 1966.
- 10) Schroeder, H. E.: Inorganic content and histology of early dental calculus in man. *Helv. Odont. Acta*, 7: 17, 1963.
- 11) Grøn, P. and van Campen G. J.: Mineral composition of human dental calculus. *Helv. Odont. Acta*, 11: 71, 1967.
- 12) Little, M. F., Casciani, C. A. and Rowley, J.: Dental calculus composition. I. Supragingival calculus: ash, calcium, phosphorus, sodium and density. *J. dent. Res.*, 42: 78, 1963.
- 13) Kinoshita, S. and Mühlemann, H. R.: Effect of sodium ortho- and pyrophosphate on supragingival calculus. *Helv. Odont. Acta*, 10: 46, 1966.
- 14) Marthaler, T. M., Schroeder, H. E. and Mühlemann, H. R.: A method for the quantitative assessment of plaque and calculus formation. *Helv. Odont. Acta*, 5: 39, 1961.
- 15) Mühlemann, H. R. and Schroeder, H. E.: Dynamics of supragingival calculus formation. (Staple: *Advances in oral biology* 1: 175, Academic Press, New York and London, 1964).
- 16) 新谷英章: 初期の歯石についての生物学的研究. 第1報 歯石の採取法, 歯石形成速度および歯石の成分について, 口病誌, 35: 189, 1968.
- 17) 佐久間昭: 生物検定法, 東京, 1964, 東大出版会, 128.
- 18) Wasserman, B. H., Mandel, I. D. and Levy, B. M.: In vitro calcification of dental calculus. *J. Periodont.*, 29: 144, 1958.
- 19) Turesky, S., Gilmore, N. D. and Glickman, I.: Calculus inhibition of topical application of the chloromethyl analogue of Vitamin C. *J. Periodont.*, 38: 2, 1967.
- 20) Mandel, I. D.: Dental plaque: Nature, formation and effects. *J. Periodont.*, 37: 357, 1966.
- 21) Schraway, A. M., Sabharwal, K., Socransky,

- S. S. and Lobene, R. R. : A quantitative study of plaque and calculus formation in normal and periodontally involved mouths. *J. Periodont.*, 37 : 495, 1966.
- 22) Theilade, E., Wright, W. H., Jensen, S. B. and Löe, H. : Experimental gingivitis in man. II. A longitudinal and clinical and bacteriological investigation. *J. Periodont., Res.* 1 : 1, 1966.
- 23) Glas, J. E. and Krasse, B. : Biophysical studies on dental calculus from germfree and conventional rats. *Acta Odont. Scand.*, 20 : 127, 1962.
- 24) Theilade, J., Fitzgerald, R. J., Scott, D. B. and Nylen, M. V. : Electron microscopic observations of dental calculus in germfree and conventional rats. *Arch. Oral Biol.*, 9 : 97, 1964.
- 25) Mandel, I. D. : Histochemical and biochemical aspects of calculus formation. *Periodontics*, 1 : 43, 1963.
- 26) Stanford, J. W. : Analysis of organic portion of dental calculus. *J. dent. Res.*, 45 : 128, 1966.
- 27) Fehr, F. and Brudevold, F. : In vitro calculus formation. *J. dent. Res.*, 39 : 1041, 1960.
- 28) Yankelowitz, S., Weiss, S., Gould, D. H. and Altarelli, V. R. : A method and apparatus for studying in vitro calculus. *J. dent. Res.*, 44 : 648, 1965.
- 29) Kakehashi, S., Baer, P. N. and White, C. : Studies on experimental calculus formation in the rat. VII. Effect of selective desalivation of the major salivary gland. *J. Periodont.*, 35 : 467, 1964.
- 30) Hugoson, A. and Persson, G. : The influence of partial desalivation on periodontal conditions in the white rats. *Odont. Tidskr.*, 74 : 114, 1966.
- 31) Eilberg, R. G., Gould, D. and Sobel, A. E. : Nucreating substance(s) in human saliva. *Nature*, 207 : 304, 1965.