原 著

歯周初期治療における *Bacteroides forsythus*, *Porphyromonas gingivalis*,
Actinobacillus actinomycetemcomitans の変動
—— DNA プローブ法と PCR 法による測定 ——

高 松 伸 博

東京医科歯科大学歯学部歯科保存学第二講座（指導：石川 烈教授）

（平成 9 年 9 月 30 日 受付）

The Effect of Periodontal Initial Therapy on Detection Frequency
of *Bacteroides forsythus*, *Porphyromonas gingivalis*,
and *Actinobacillus actinomycetemcomitans*
—— Detection by DNA Probe and PCR Methods ——

Nobuhiro Takamatsu

Department of Periodontology, Faculty of Dentistry, Tokyo Medical and Dental University
(Director : Prof. Isao Ishikawa)

The purpose of this study was to examine microbiological changes after periodontal initial therapy by DNA probe and polymerase chain reaction (PCR) assays in addition to clinical evaluation. Twenty-six periodontitis patients, 10 males and 16 females, were selected. All subjects were treated by scaling and root planing following oral hygiene instruction. Bacterial samples were collected with paper points from a total of 104 sites, 4 sites in each patient, at baseline and after initial therapy. DNA probe analysis was used to monitor *Bacteroides forsythus* and *Porphyromonas gingivalis*. PCR analysis was performed to identify the presence of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. The initial therapy resulted in significant clinical improvements as assessed by clinical parameters including pocket depth, attachment level and bleeding on probing. After the therapy, the detection frequency of *B. forsythus* and *P. gingivalis* was significantly reduced, but the detection frequency of *A. actinomycetemcomitans* did not significantly decreased. These results indicated that initial therapy can bring about elimination of *B. forsythus* and *P. gingivalis* by means of conventional techniques, but not of *A. actinomycetemcomitans*. When complete elimination of these microorganisms was obtained, significant clinical improvement was found. Monitoring the changes of three bacteria may provide a more effective modality.

I. 緒 言

歯周炎は歯肉縁下ポケットにおいて歯-歯周組織への細菌叢の定着と増殖により、発症、進行す

る疾患である。歯肉縁下の細菌叢は 250 種以上の細菌を含むことが知られているが¹⁾、なかでもいくつかの細菌あるいは細菌群がその歯周炎の進行との密接な関連から歯周病原性細菌として認めら

れている。歯周病原性細菌として *Porphyromonas gingivalis*, *Bacteroides forsythus*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Prevotella intermedia*, *Campylobacter rectus*, *Fusobacterium nucleatum* といった細菌が報告されている²⁻¹¹⁾。Renvert ら¹²⁾はいくつかの歯周病原性細菌の除去を指標として歯周治療を行った結果、アタッチメントレベルの改善と *P. gingivalis*, *A. actinomycetemcomitans* の存在の有無に相関が認められ、*C. rectus*, *Eikenella corrodens*, *F. nucleatum* は治療成功の指標とはならなかったことを報告している。また、*Prevotella intermedia* は歯肉縁下の感染のコントロールにおいては根絶することは不可能、または不必要であることを示唆する報告もある¹³⁾。歯周病原性細菌についての多くの研究のなかで、*P. gingivalis*, *B. forsythus*, *A. actinomycetemcomitans* はさまざまな型の歯周炎に非常に強い関連性があると考えられている細菌である¹⁴⁾。

これまでのいくつかの報告^{4,15,16)}では歯周治療における診断、治療法の選択、評価の補助として、たとえば難しい症例に対して、アタッチメントロスの子知に、これらの細菌をモニターすることを勧めている。

歯周治療における初期治療とは原因となる因子の除去を目的とした治療であり、そのなかで最も重要な根面のスケーリング、ルートプレーニングの目的は細菌に汚染されたセメント質の除去、および歯周ポケット内の病原性細菌の完全除去または疾患を誘因しうるレベル以下にまで減少させることである。

これまで *P. gingivalis* や *P. intermedia* のような歯周病原性細菌は、機械的処置により除去、または減少することが報告^{17,18)}されているが *A. actinomycetemcomitans* は除去するのが困難である^{19,20)}という報告もみられる。

一方、*B. forsythus* については初期治療による除去効果についての報告はほとんどなく、その詳細は不明であった。

しかしながら、歯周治療を成功させるにはこれ

ら3種の細菌の除去が欠くことのできない条件であり、スケーリング、ルートプレーニングのほかには外科処置や、抗生剤の全身投与や局所投与によってでもこれらの細菌の除去が必要であることが示唆されてきた。

本研究では、中等度から重度の歯周炎患者において初期治療が成功するか否かについて、従来の臨床評価の基礎となるDNAプローブ法、PCR法を用いて歯周病原菌として最も強く事実として挙げられている3菌種について遺伝子工学的評価により検討を行った。

II. 材料および方法

1. 被験者および被検部位

被験者は東京医科歯科大学歯学部附属病院に来院した患者のなかから、重篤な全身疾患がなく、過去6カ月以内に歯周治療を受けておらず、過去3カ月以内に抗生物質の全身、局所投与を受けていない中等度から重度の歯周炎患者26名(男性10名、女性16名、16~61歳、平均38.5歳、成人性歯周炎11名、早期発症型歯周炎15名)を選択した。

Christersson ら²¹⁾の報告を参考にサンプル採取部位を選択した。サンプル採取(ベースライン)の2週間前に口腔内のポケット深さを6点法により測定を行い、口腔内を上下左右に4分割し、各分画中、最も深い部位を被検部位とした。

2. 臨床診査

ベースライン、および再評価時に以下の臨床パラメータの測定を行った。

1) プロービングポケット深さ

ポケット探針を用い、歯肉縁からポケット底部までの距離を測定し、探針の目盛りの最も近い値を1mm単位で記録した。

2) プロービングアタッチメントレベル

ポケット探針を用い、セメント-エナメル境からポケット底部までの距離を測定し、探針の目盛りの最も近い値を1mm単位で記録した。

3) プロービング時の出血

プロービングポケット深さ、プロービングア

タッチメントレベル測定後の出血の有無を記録した。

3. 細菌サンプル採取

ベースライン, および再評価時に以下の方法で遺伝子工学による細菌検査のための歯肉縁下の細菌サンプルの採取を行った。被検部位を滅菌コットンロールにて簡易防湿後, 歯肉縁上プラークを滅菌綿球にて除去した。その後2本のペーパーポイント (ジョンソンアブソーベントポイント X-Fine: ジョンソンエンドジョンソン, 東京) を歯周ポケット底部まで挿入, 30 秒間静置した後それぞれ滅菌蒸留水 100 μ l (PCR 用), およびサンプルチューブ内の希釈液 (DNA プローブ用) のなかに投入した。

4. 細菌学的検査

1) DNA プローブ法

B. forsythus, *P. gingivalis* の検出には DNA プローブ法を利用した Affirm DP™ Test (Becton Dickinson, Sparks, MD, U. S. A.) を用いた。DNA プローブ法は細菌の持つ DNA の特異的な塩基配列に相補的な塩基配列を有する DNA をプローブとして, 標的となる細菌を検出するものである。これまではプローブの感度, 特異性を高めるため, 放射性同位元素により標識を行っていたこと, 検出まで数日かかること, 特殊な設備が必要であることなどの点から, 日常臨床への応用は困難であった。今回用いたものは Becton Dickinson 社で試作されているもので, チェアサイドで半自動的に *P. gingivalis*, *B. forsythus*, および *A. actinomycetemcomitans* の検出を行う, 非放射性 DNA プローブ法を応用したキットである。このキットはサンプル, 希釈液, 緩衝液, 試薬カセット, プローブ分析カード (PAC), サンプルライシスブロック, Affirm™プロセッサからなる。PAC には細菌特異的なオリゴヌクレオチド DNA プローブを含む3つのビーズ, およびネガティブ, ポジティブコントロールのビーズが埋め込まれている。

歯肉縁下プラークを含むペーパーポイントを Affirm™キットのサンプルチューブ内の希釈液

に投入した後, 緩衝液にて処理し, ボルテックスミキサーにて1分間攪拌, その後, ライシスブロックで85℃で5分間加熱した。サンプルの菌液を試薬カセットの1番目のウェルに加え, PACとともに Affirm™プロセッサにより, 自動処理を行った。1番目のウェルで, 分析物のビーズ上のプローブへのハイブリダイゼーションが起こり, 2番目のウェルでは発色プローブのハイブリダイゼーションが起こる。ハイブリダイゼーションしなかったサンプルは3番目のウェルで洗い流される。4番目のウェルで発色プローブに酵素結合体が結合する。結合しなかった酵素結合体と発色プローブは5番目と6番目のウェルで洗い流される。酵素結合体がビーズ上に結合していれば, 最後の7番目のウェルで酵素基質により青く発色し, ビーズが可視的に青くなれば標的細菌がポジティブであることを示す。ネガティブな結果はサンプル中の標的細菌の核酸の量が検出レベル以下であることを示す。細菌検出感度については10⁵個/サンプル以上で発色が確認された。この検出感度についてはすでに矢野や著者ら²²⁾が報告した。

2) PCR 法

当初, *A. actinomycetemcomitans* についても DNA プローブ法を用いて検出を行ったが上記の10⁵個/サンプルの検出レベルでは陽性のものが非常に少なく臨床応用が不可能と考えられたので *A. actinomycetemcomitans* については PCR 法による検査を Ashimoto ら^{23,24)}の報告に基づいて行った。ペーパーポイントを100 μ l の滅菌水中に投入し, ボルテックスミキサーにて1分間攪拌, 100℃, 10分間加熱した後, 氷冷した。

プライマーとして16S rRNA 配列の一部を用いた。配列は5'-AAA CCC ATC TCT GAG TTC TTC TTC-3', 5'-ATG CCA ACT TGA CGT TAA AT-3'である。5 μ l のサンプルを10×PCR buffer (Promega, Madison, WI) 5 μ l, Taq DNA polymerase (Promega) 1.25 unit, 各 dNTP (Pharmacia LKB, Piscataway, NJ) 0.2 mM, MgCl₂ を1.5 mM 含む reaction mixture に加えた。

表1 ベースライン, 再評価時の臨床パラメータの変化

	ベースライン	再評価
ポケット深さ	5.6±1.9 mm	3.9±2.1 mm **
アタッチメントレベル	5.3±2.3 mm	4.6±2.5 mm *
プロービング時の出血	79/104 部位	54/104 部位**

** : $p < 0.01$, * : $p < 0.05$

表2 ベースライン, 再評価時の細菌検出数

	ベースライン		再評価	
	検出者数(%) (n=26)	検出部位数(%) (n=104)	検出者数(%) (n=26)	検出部位数(%) (n=104)
<i>B. forsythus</i>	26(100%)	81(77.9%)	17(65.4%)	37(35.6%)
<i>P. gingivalis</i>	22(84.6%)	68(65.4%)	13(50.0%)	23(22.1%)
<i>A. actinomycetemcomitans</i>	8(30.8%)	17(16.4%)	5(19.2%)	9(8.7%)

PCR 増幅は DNA thermal cycler (PTC-200, MJ research, Boston, MA) を用いた。PCR の反応温度は, 最初の変性が 95°C, 2 分間, 続いて 36 サイクルの変性(94°C, 30 秒間), プライマーのアニーリング(55°C, 1 分間), 伸長(72°C, 2 分間)の後, 最終ステップ 72°C, 10 分間に設定した。

PCR 産物を 4 V/cm にて Tris-acetate EDTA buffer 中で, 1.5% アガロースゲル電気泳動にて分析した。ゲルは ethidium bromide 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ で染色し, 300 nm 紫外線ライト下で撮影を行った。分子量マーカーとして 1-kb DNA ladder digest (Life Technologies, Gaithersburg, MD) を用いた。

5. 統計処理

ベースラインと再評価時の臨床パラメータの変化について Wilcoxon signed rank test を用いて解析を行った。

ベースラインと再評価時の細菌検出の変化について Wilcoxon signed rank test を用いて解析を行った。

細菌の除去の有無によるポケット深さ, プロービングアタッチメントレベルの変化量の違いにつ

いて, unpaired t-test, Mann-Whitney U test を用いて解析を行った。

III. 結 果

1. 臨床評価

初期治療の期間は平均 8.4 カ月であった。初期治療により, 全被験者のポケット深さ, およびアタッチメントレベルは有意に改善した(それぞれ $p < 0.01$, $p < 0.05$)。また, プロービング時の出血の認められた部位も有意に減少した($p < 0.01$) (表 1)。

2. 細菌検査

前述のとおり, *A. actinomycetemcomitans* の検出には本研究で用いた DNA プローブ法では検出感度が低く, その変動を捉えることは困難と思われるため, PCR 法を用いた。以下に述べる細菌検査結果のすべては *B. forsythus*, *P. gingivalis* については DNA プローブ法, *A. actinomycetemcomitans* については PCR 法によるものである。

被験者 26 名, 全 104 部位における各細菌の検出被験者数, 検出部位数を表 2 に示す。*B. forsythus* はベースラインに 26 名, 81 部位で検出され, 再評

図1 ベースライン, 再評価時の細菌検出率
** : $p < 0.01$

価時では *B. forsythus* は 17 名, 37 部位と有意な検出部位数の減少が認められた ($p < 0.01$)。 *P. gingivalis* はベースラインに 22 名, 68 部位, 再評価時では 13 名, 23 部位と有意な検出部位数の減少が認められた ($p < 0.01$)。 *A. actinomycetemcomitans* ではベースラインに 8 名, 17 部位で検出され, 再評価時では 5 名, 9 部位で検出され, 有意な減少は認められなかった ($p > 0.05$) (図 1)。

表 3 に各細菌の関連性について示す。ベースライン, 再評価時に同一部位に検出された細菌の組み合わせは *B. forsythus* と *P. gingivalis* が最も多く, 次いで *B. forsythus* のみ, 3 菌種とも検出されたものが多かった。 *P. gingivalis* が単独で検出された部位はベースラインの 1 部位のみで, ほかの 2 菌種と存在した部位が多かった。特に *B. forsythus* とともに検出される割合が高く, *P. gingivalis* の検出された部位中, ベースラインで 97.1%, 再評価時で 100% の部位で同時に検出された。

3. 臨床的变化と細菌の変化

ベースラインにそれぞれの細菌が検出された部位における, 再評価時の細菌の検出の有無によるポケット深さの改善量は *B. forsythus* では非検出

表 3 ベースライン, 再評価時の検出細菌の関係

歯周病原性細菌	検出部位数 (%)	
	ベースライン	再評価
<i>A. a.</i> (all †)	17 (16.3%)	9 (8.7%)
<i>A. a.</i> (alone †)	4 (3.8%)	4 (3.8%)
<i>B. f.</i> (all †)	81 (77.9%)	37 (35.6%)
<i>B. f.</i> (alone †)	11 (10.6%)	13 (12.5%)
<i>P. g.</i> (all †)	68 (65.4%)	24 (23.1%)
<i>P. g.</i> (alone †)	1 (0.9%)	0 (0.0%)
<i>A. a.</i> + <i>B. f.</i>	4 (3.8%)	0 (0.0%)
<i>A. a.</i> + <i>P. g.</i>	1 (0.9%)	0 (0.0%)
<i>A. a.</i> + <i>B. f.</i> + <i>P. g.</i>	8 (7.7%)	5 (4.8%)
<i>B. f.</i> + <i>P. g.</i>	58 (55.8%)	19 (18.3%)

† : 全陽性部位, * : 1 菌種のみ陽性
B. f. : *B. forsythus*, *P. g.* : *P. gingivalis*,
A. a. : *A. actinomycetemcomitans*

部位で 2.46 mm, 検出部位で 0.85 mm, プロービングアタッチメントレベルの変化はそれぞれ 1.07, -0.31 mm であり, 再評価時の細菌の非検出部位と検出部位の間でポケット深さ, プロービングアタッチメントレベルの変化に有意な差が認められた (それぞれ $p < 0.01$, $p < 0.05$) (図 2)。

P. gingivalis ではポケット深さの改善量は非検出部位で 2.20 mm, 検出部位で 0.47 mm, プロービングアタッチメントレベルの変化はそれぞれ 0.65, 0.05 mm で, ポケット深さの改善量に非検出部位と検出部位の間で有意な差が認められた ($p < 0.05$) (図 3)。

A. actinomycetemcomitans ではポケット深さの改善量は非検出部位で 2.29 mm, 検出部位で 0.13 mm, プロービングアタッチメントレベルの変化はそれぞれ 1.48, -0.38 mm であり, 再評価時の細菌の非検出部位と検出部位の間でポケット深さ, プロービングアタッチメントレベルの変化に有意な差が認められた (それぞれ $p < 0.05$, $p < 0.05$) (図 4)。

以上のように *B. forsythus*, *P. gingivalis*, および *A. actinomycetemcomitans*, いずれの菌においても術前に検出されていて, 術後検出されなかつ

図2 細菌の除去によるポケット深さ, アタッチメントレベルの改善量 (*B. forsythus*)
 **: $p < 0.01$, *: $p < 0.05$

図4 細菌の除去によるポケット深さ, アタッチメントレベルの改善量 (*A. actinomycetemcomitans*)
 *: $p < 0.05$

図3 細菌の除去によるポケット深さ, アタッチメントレベルの改善量 (*P. gingivalis*)
 *: $p < 0.05$

た部位では有意な歯周組織の改善が認められた。一方、これらの細菌が初期治療後も見いだされた部位では初期治療による改善が認められなかったり、一部では悪化していた。

IV. 考 察

これまでの多くの報告において歯周炎患者において, *B. forsythus*, *P. gingivalis*, *A. actinomycetemcomitans* の3菌種がその病因との強い関連性を示すことが認められている^{2~11)}。

口腔衛生指導, スケーリング, ルートプレーニングを施した中等度から重度の26名の歯周炎患者において, 多くの部位で, ポケット深さやアタッチメントレベルの改善, またプロービング時の出血の消退が認められた。しかしながら, 臨床症状の改善がみられない部位, 悪化した部位も認められた。

本研究ではベースラインにおいて, *B. forsythus* が全被験者から検出され, 全104部位中77.9%の

部位で検出された。この検出頻度は Lai ら⁸⁾の報告と同様であった。しかしながら、Kamma ら²⁵⁾は重度の歯周炎の若い成人における細菌培養法による検出頻度は 53.4%であったと報告している。*B. forsythus* は培養法による検出が困難であり^{25,26)}、DNA プローブ²⁷⁻³¹⁾や蛍光抗体法^{11,32-34)}での検出も多く行われてきた。矢野ら²²⁾の報告では細菌培養法と本研究でも用いた DNA プローブ法による *B. forsythus* の検出の比較を行い、DNA プローブ法を用いた方法のほうが検出感度が高いことを示した。また矢野³⁵⁾は、*B. forsythus* の存在とポケット深さ、プロービング時の出血、骨吸収度との間に相関が認められたことより、本菌の歯周組織破壊における役割、およびその除去の重要性を示唆している。

B. forsythus に対するスケーリング、ルートプレーニングの効果についての報告は少ない。清田³⁶⁾の蛍光抗体法を用いた研究によるとスケーリング、ルートプレーニングにより、5 部位中 3 部位 (60%) で *B. forsythus* が除去されたという。本研究ではベースラインに *B. forsythus* が検出された 81 部位のうち初期治療終了後には 50 部位 (61.7%) が検出限界以下に除去された。このことはスケーリング、ルートプレーニングという機械的処置が *B. forsythus* の除去に効果的であることを示唆するものと思われる。

ベースラインに *P. gingivalis* が検出された部位のうち 97.1%の部位で *B. forsythus* も同時に検出され、初期治療終了後では 100%であった。これは蛍光抗体法を用いた研究で *P. gingivalis* と *B. forsythus* が同時に検出されるという Gmür らの報告¹⁰⁾と一致する。これは両菌種の存在する要求環境が似たものであることを示唆しているのかもしれない。

ベースラインに *P. gingivalis* が検出された 78 部位のうち初期治療終了後には 50 部位 (64.1%) が検出限界以下に除去された。これはスケーラーによる機械的な処置が *P. gingivalis* の除去に有効であるという報告¹⁸⁾とほぼ一致する。

ベースラインに *A. actinomycetemcomitans* が

検出された 8 名のうち、初期治療により *A. actinomycetemcomitans* が検出されなかったのは 3 名 (37.5%) であった。この結果は *A. actinomycetemcomitans* を除去するのが困難であるという多くの報告^{19,20)}と一致する。この細菌については、その組織侵入性が歯周組織破壊において重要な病原性のメカニズムであること^{37,38)}が示唆されている。

細菌の除去と臨床パラメータの変化については *B. forsythus*, *A. actinomycetemcomitans* の除去により、ポケット深さとプロービングアタッチメントレベルの有意な改善が認められた。また *P. gingivalis* の除去された部位ではポケット深さの有意な減少が認められた。

この結果はこれら歯周病原性細菌の除去が臨床症状の改善に重要であることを示唆している。深いポケットや分岐部を含むポケットは十分なスケーリング、ルートプレーニングを正確に行うことが困難なことより³⁹⁻⁴¹⁾、さらなる外科的処置が必要と思われる。Ali⁴²⁾らは歯周外科処置により、*P. gingivalis*, *A. actinomycetemcomitans* などの歯周病原性細菌の検出頻度が減少することを示している。しかしながら、*A. actinomycetemcomitans* は外科処置のみでも完全に除去することが困難であり⁴³⁾、抗生剤の投与が有効であるとする報告⁴⁴⁻⁴⁶⁾もある。

本研究で行ったように 3 種の歯周病原性細菌の変動をモニターすることは、抗生剤の使用も含め、歯周治療でより効果的な方法を探ることができ、より正確な処置を可能にし、臨床効果から予後の判定までもより科学的、客観的な方法になると思われる。これまでの歯周治療においてはこのような細菌学的なパラメータはいっさい用いられず、臨床的なパラメータのみで行われてきた。今回用いたようなチェアサイドにおける DNA プローブ、またはより検出感度の高い PCR 法による細菌検査を治療の一環に加えることが将来可能となるであろう。

謝 辞

稿を終えるにあたり終始ご懇篤なるご指導とご校閲を賜りました本学歯学部歯科保存学第二講座の石川 烈教授に深甚なる感謝の意を表します。また本研究に際しご指導, ご協力いただきました歯科保存学第二講座の諸先生方のご厚意に深謝いたします。

文 献

- 1) Moore, W. E. C., Holdeman, L. V., Cato, E. P., Smibert, R. M., Burmeister, J. A., Palcanis, K. G. and Ranney, R. R. : Comparative bacteriology of juvenile periodontitis. *Infect. Immun.* 48(2) : 507-519, 1985.
- 2) Bragd, L., Dahlén, G., Wikström, M. and Slots, J. : The capability of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Bacteroides gingivalis* and *Bacteroides intermedius* to indicate progressive periodontitis ; a retrospective study. *J. Clin. Periodontol.* 14(2) : 95-99, 1987.
- 3) Dzink, J. L., Socransky, S. S., Ebersole, J. L. and Frey, D. E. : ELISA and conventional techniques for identification of black-pigmented *Bacteroides* isolated from periodontal pockets. *J. Periodont. Res.* 18(4) : 369-374, 1983.
- 4) Slots, J., Bragd, L., Wikström, M. and Dahlén, G. : The occurrence of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Bacteroides gingivalis* and *Bacteroides intermedius* in destructive periodontal disease in adults. *J. Clin. Periodontol.* 13(6) : 570-577, 1986.
- 5) Slots, J. and Genco, R. J. : Black-pigmented *Bacteroides* species, *Capnocytophaga* species, and *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in human periodontal disease ; virulence factors in colonization, survival, and tissue destruction. *J. Den. Res.* 63(3) : 412-421, 1984.
- 6) Tanner, A. C., Haffer, C., Bratthall, G. T., Visconti, R. A. and Socransky, S. S. : A study of the bacteria associated with advancing periodontitis in man. *J. Clin. Periodontol.* 6(5) : 278-307, 1979.
- 7) Dzink, J. L., Tanner, A. C., Haffajee, A. D. and Socransky, S. S. : Gram negative species associated with active destructive periodontal lesions. *J. Clin. Periodontol.* 12(8) : 648-659, 1985.
- 8) Lai, C. H., Listgarten, M. A., Shirakawa, M. and Slots, J. : *Bacteroides forsythus* in adult gingivitis and periodontitis. *Oral Microbiol. Immunol.* 2(4) : 152-157, 1987.
- 9) Haffajee, A. D., Socransky, S. S., Dzink, J. L., Taubman, M. A. and Ebersole, J. L. : Clinical, microbiological and immunological features of subjects with refractory periodontal diseases. *J. Clin. Periodontol.* 15(6) : 390-398, 1988.
- 10) Gmür, R., Strub, J. R. and Guggenheim, B. : Prevalence of *Bacteroides forsythus* and *Bacteroides gingivalis* in subgingival plaque of prosthodontically treated patients on short recall. *J. Periodont. Res.* 24(2) : 113-120, 1989.
- 11) Christersson, L. A., Fransson, C. L., Dunford, R. G. and Zambon, J. J. : Subgingival distribution of periodontal pathogenic microorganisms in adult periodontitis. *J. Periodontol.* 63(5) : 418-425, 1992.
- 12) Renvert, S., Dahlén, G. and Wikström, M. : Treatment of periodontal disease based on microbiological diagnosis. Relation between microbiological and clinical parameters during 5 years. *J. Periodontol.* 67(6) : 562-571, 1996.
- 13) Slots, J., Emrich, L. J., Genco, R. J. and Rosling, B. G. : Relationship between some subgingival bacteria and periodontal pocket depth and gain or loss of periodontal attachment after treatment of adult periodontitis. *J. Clin. Periodontol.* 12(7) : 540-552, 1985.
- 14) Zambon, J. J. : Periodontal disease ; Microbial factors. *The American Academy of Periodontology.* ; Ann. Periodontol. 1. Virginia, 1996, Lansdowne, 879-925.
- 15) Slots, J. and Listgarten, M. A. : *Bacteroides gingivalis*, *Bacteroides intermedius* and *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in human periodontal diseases. [Review] [96 refs] *J. Clin. Periodontol.* 15(2) : 85-93, 1988.
- 16) Wennstrom, J. L., Dahlén, G., Svensson, J. and Nyman, S. : *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Bacteroides gingivalis* and *Bacteroides intermedius* ; predictors of attachment loss? *Oral Microbiol. Immunol.* 2(4) : 158-162, 1987.
- 17) Hinrichs, J. E., Wolff, L. F., Pihlstrom, B. L., Schaffer, E. M., Liljemark, W. F. and Bandt, C. L. : Effects of scaling and root planing on subgingival microbial proportions standardized in terms of their naturally occurring distribution. *J. Periodontol.* 56(4) : 187-194, 1985.
- 18) van Winkelhoff, A. J., van der Velden, U. and de Graaff, J. : Microbial succession in recolonizing deep periodontal pockets after a single course of supra- and subgingival debridement. *J. Clin. Periodontol.* 15(2) : 116-122, 1988.

- 19) Renvert, S., Wikström, M., Dahlén, G., Slots, J. and Egelberg, J. : Effect of root debridement on the elimination of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Bacteroides gingivalis* from periodontal pockets. J. Clin. Periodontol. 17(6) : 345-350, 1990.
- 20) Renvert, S., Wikström, M., Dahlén, G., Slots, J. and Egelberg, J. : On the inability of root debridement and periodontal surgery to eliminate. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* from periodontal pockets. J. Clin. Periodontol. 17(6) : 351-355, 1990.
- 21) Christersson, L. A., Fransson, C. L., Dunford, R. G. and Zambon, J. J. : Subgingival distribution of periodontal pathogenic microorganisms in adult periodontitis. J. Periodontol. 63(5) : 418-425, 1992.
- 22) 矢野和子, 高松伸博, 何 濤, 梅田 誠, 石川烈 : 非放射性 DNA プローブ (Affirm DP®) の歯周病原性細菌の検出能について. 口病誌 63(3) : 482-488, 1996.
- 23) Ashimoto, A., Chen, C., Bakker, I. and Slots, J. : Polymerase chain reaction detection of 8 putative periodontal pathogens in subgingival plaque of gingivitis and advanced periodontitis lesions. [Journal Article] Oral Microbiol. Immunol. 11(4) : 266-273, 1996.
- 24) Slots, J., Ashimoto, A., Flynn, M. J., Li, G. and Chen, C. : Detection of putative periodontal pathogens in subgingival specimens by 16 S ribosomal DNA amplification with the polymerase chain reaction. Clin. Infect. Dis. 20 (suppl 2) : S 304-307, 1995.
- 25) Kamma, J. J., Nakou, M. and Manti, F. A. : Predominant microflora of severe, moderate and minimal periodontal lesions in young adults with rapidly progressive periodontitis. [Journal Article] J. Periodont. Res. 30(1) : 66-72, 1995.
- 26) Dzink, J. L., Socransky, S. S. and Haffajee, A. D. : The predominant cultivable microbiota of active and inactive lesions of destructive periodontal diseases. J. Clin. Periodontol. 15(5) : 316-323, 1988.
- 27) Loesche, W. J., Lopatin, D. E., Stoll, J., van Poperin, N. and Hujoel, P. P. : Comparison of various detection methods for periodontopathic bacteria ; can culture be considered the primary reference standard? J. Clin. Microbiol. 30(2) : 418-426, 1992.
- 28) Lotufo, R. F., Flynn, J., Chen, C. and Slots, J. : Molecular detection of *Bacteroides forsythus* in human periodontitis. Oral Microbiol. Immunol. 9(3) : 154-160, 1994.
- 29) Ali, R. W., Skaug, N., Nilsen, R. and Bakken, V. : Microbial associations of 4 putative periodontal pathogens in Sudanese adult periodontitis patients determined by DNA probe analysis. J. Periodontol. 65(11) : 1053-1057, 1994.
- 30) Ali, R. W., Bakken, V., Nilsen, R. and Skaug, N. : Comparative detection frequency of 6 putative periodontal pathogens in Sudanese and Norwegian adult periodontitis patients. J. Periodontol. 65(11) : 1046-1052, 1994.
- 31) Listgarten, M. A., Wong, M. Y. and Lai, C. H. : Detection of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, and *Bacteroides forsythus* in an *A. actinomycetemcomitans*-positive patient population. J. Periodontol. 66(2) : 158-164, 1995.
- 32) Gmür, R., Werner-Felmayer, G. and Guggenheim, B. : Production and characterization of monoclonal antibodies specific for *Bacteroides gingivalis*. Oral Microbiol. Immunol. 3(4) : 181-186, 1988.
- 33) Gmür, R., Strub, J. R. and Guggenheim, B. : Prevalence of *Bacteroides forsythus* and *Bacteroides gingivalis* in subgingival plaque of prosthodontically treated patients on short recall. J. Periodont. Res. 24(2) : 113-120, 1989.
- 34) Listgarten, M. A., Lai, C. H. and Young, V. : Microbial composition and pattern of antibiotic resistance in subgingival microbial samples from patients with refractory periodontitis. J. Periodontol. 64(3) : 155-161, 1993.
- 35) 矢野和子 : 細菌培養法と DNA プローブによるヒト歯肉縁下細菌叢の *Bacteroides forsythus* の検索とその歯周疾患との関連性について. 日歯周誌 39(1) : 1-11, 1997.
- 36) 清田 築 : 蛍光抗体法による歯周炎局所細菌叢の検討および初期治療の評価について. 日歯周誌 31(1) : 29-42, 1989.
- 37) Saglie, F. R., Marfany, A. and Camargo, P. : Intragingival occurrence of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Bacteroides gingivalis* in active destructive periodontal lesions. J. Periodontol. 59(4) : 259-265, 1988.
- 38) Carranza, F. A. Jr., Saglie, R., Newman, M. G. and Valentin, P. L. : Scanning and transmission electron microscopic study of tissue-invasive microorganisms in localized juvenile periodontitis. J. Periodontol. 54(10) : 598-617, 1983.
- 39) Caffesse, R. G., Sweeney, P. L. and Smith, B.

- A. : Scaling and root planing with and without periodontal flap surgery. *J. Clin. Periodontol.* 13(3) : 205-210, 1986.
- 40) Nordland, P., Garrett, S., Kiger, R., Vanooteghem, R., Hutchens, L. H. and Egelberg, J. : The effect of plaque control and root debridement in molar teeth. *J. Clin. Periodontol.* 14(4) : 231-236, 1987.
- 41) Loos, B., Nylund, K., Claffey, N. and Egelberg, J. : Clinical effects of root debridement in molar and non-molar teeth. A 2-year follow-up. *J. Clin. Periodontol.* 16(8) : 498-504, 1989.
- 42) Ali, R. W., Lie, T. and Skaug, N. : Early effects of periodontal therapy on the detection frequency of four putative periodontal pathogens in adults. *J. Periodontol.* 63(6) : 540-547, 1992.
- 43) Christersson, L. A., Slots, J., Rosling, B. G. and Genco, R. J. : Microbiological and clinical effects of surgical treatment of localized juvenile periodontitis. *J. Clin. Periodontol.* 12(6) : 465-476, 1985.
- 44) Slots, J. and Rosling, B. G. : Suppression of the periodontopathic microflora in localized juvenile periodontitis by systemic tetracycline. *J. Clin. Periodontol.* 10(5) : 465-486, 1983.
- 45) Mandell, R. L. and Socransky, S. S. : Microbiological and clinical effects of surgery plus doxycycline on juvenile periodontitis. *J. Periodontol.* 59(6) : 373-379, 1988.
- 46) Goene, R. J., Winkel, E. G., Abbas, F., Rodenburg, J. P., van Winkelhoff, A. J., and de Graaff, J. : Microbiology in diagnosis and treatment of severe periodontitis. A report of four cases. *J. Periodontol.* 61(1) : 61-64, 1990.