ブラッシングに伴なう歯周ポケット内細菌叢の変化

佃 宣 和 紺 野 純 一 川 浪 雅 光

内 山 純 一 塚 本 晃 也 木 葉 篤

白 石 ゆかり 石 川 純

北海道大学歯学部歯科保存学第2講座

(主任: 石川 純教授)

(昭和58年6月20日受付)

Effect of Tooth Brushing on the Composition of Subgingival Microbial Flora

Nobukazu TSUKUDA, Junichi KONNO, Masamitsu KAWANAMI,

Junichi UCHIYAMA, Kohya TSUKAMOTO, Atsushi KIBA,

Yukari SHIRAISHI and Jun ISHIKAWA

Department of Periodontology, Hokkaido University School of Dentistry

(Director: Prof. Jun ISHIKAWA)

Toothbrushing is the most fundamental to control periodontal disease. The purpose of this study was to evaluate the effect of toothbrushing alone on the composition of subgingival microbial flora by dark-field microscopy.

Fourteen subjects with periodontal disease were selected for this study. Clinical and microbiological monitoring was carried out before and about 1 month after oral hygiene instruction. With a clean curette, samples of subgingival bacteria were collected from 39 periodontal pockets which could be probed to 4 mm or more, and were examined immediately by darkfield microscopy. On each slide, 200 bacteria were counted and classified on a percentage basis into one of the following categories; (1) coccoid cells, (2)

spirochetes, (3) motile rods and (4) others. For each area sampled, the following clinical criteria were also recorded; (1) gingival index, (2) plaque index, (3) pocket depth and (4) bleeding index.

The results indicated that toothbrushing changes the proportions of certain bacterial forms (coccoid cells and spirochetes). By toothbrushing, the percentage of coccoid cells increased significantly from 14.8% to 34.9%, while spirochetes decreased significantly from 37.3% to 18.7%. No significant changes occurred in motile rods and others. Coccoid cells were negatively correlated with all clinical parameters recorded, while spirochetes were positively.

Key words: Tooth brushing, Subgingival microbial flora, Darkfield microscopy.

要旨: 歯周疾患の治療を成功させるためには、ブラッシングの励行が必要不可欠である。しかしながら歯周炎に対するブラッシングが、歯周ポケット内細菌叢にどのような影響を及ぼすかについていまだ不明な点が多い。そこで今回、主として4~5mmの深さの歯周ポケットをもつ14名の歯周炎患者(被験歯39歯)について、ブラッシング指導を行ない、それに伴うポケット内細菌叢の変化を暗視野顕微鏡を利用して観察した。その結果、ブラッシングを徹底的に行なうことでポケット内細菌叢とくにCoccoid cells, Spirochetesの割合に著明な変化が認められた。すなわちSpirochetesの割合は、ブラッシング指導前37.3%であったものが指導後は18.7%と統計学的に有意な減少を示し、逆にCoccoid cellsでは14.8%から34.9%と有意な増加を示した。

索引用語: ブラッシング, 歯肉縁下細菌叢, 暗視野顕微鏡。

緒 言

歯周疾患の最大の原因が、歯垢-すなわち細菌とその産生物であることは広く知られている。したがってこの疾患の予防や治療には、歯垢の付着を抑制することが必要であり、具体的には合理的なブラッシングが最も効果的、かつ不可欠な方法であると考えられている。口腔内のブラッシングを徹底的に行なうことにより、歯肉縁上に露出したプラークを大幅に除去できるのはもちろんであるが、Waerhaug (1981) は、歯ブラシの毛先が歯肉辺縁を越えて縁下の歯面にある程度まで到達することも可能であると述べている¹⁾。また、歯ブラシによる歯肉への機械的刺激、すなわち歯肉マッサージが、歯周ポケット内細菌叢に何らかの影響を与えとも考えられる。

一方、近年、歯周ポケット内細菌叢、とくにその構成について注目されるようになり、従来の培養的手法ばかりでなくより実用性の高い検索方法が工夫されてきている。たとえば Listgarten と Hellden (1978) は、健康な歯肉溝の細菌叢と病的な歯周ポケット内の細菌叢を暗視野顕微鏡を用いて比較観察し、両者の間に大きな違いがあることを報告している²⁾。それ以来、この暗視野顕微鏡を用いて多くの研究がなされ、その有効性が立証されてきている³⁻⁹⁾。

このような点から、われわれは歯周疾患の患者を対象に、ブラッシングに伴う歯周ポケット内細菌叢の変化を暗視野顕微鏡を利用して観察し、これと同時に、いくつかの臨床的な診査項目の推移を調べ、両者の変化を比較検討したので報告する。

実験材料と方法

1. 実験材料

この実験に用いた患者は、北海道大学歯学部附属病院を受診した歯周疾患患者 14 名（男性 6 名、女性 8 名）で、その年齢構成は 24 歳～70 歳、平均年齢は 42.7 歳であった。患者の選択にあたっては、口腔内に 4 mm 以上の歯周ポケットを有し、以前にブラッシング指導を受けた経験のない者とした。いずれの被験者も問診により、最近 6 ヶ月間に抗生物質を服用しておらず、また現在及び過去において重篤な全身の疾患がないことも確かめた。これら被験者の口腔から 1 人あたり 1～4 歯を選び、総計 39 歯を被験歯として用いた。これらはいずれ

被験歯：39 歯 (14 名)

図 1 実験経過

も 4～7 mm の歯周ポケットを有する歯で、X線写真診査を行なった結果、明らかに歯槽骨欠損の認められたものである。被験歯の内訳は、前歯 18 歯、小臼歯 7 歯、大臼歯 14 歯であり、被験部位はこれらの歯の隣接面頰側寄り、被験歯及び隣在歯には充填物や冠などはなく、歯ブラシの毛先が容易に到達可能な環境であることを条件とした。

2. 実験方法

実験経過は、図 1 に示すように前半 4 週間のコントロール期間と、後半 4 週間のブラッシング期間から成っている。コントロール期間は、ブラッシング指導を行わない場合にポケット内細菌叢に変化が起こるかどうかを確かめる目的で設けられ、実験開始時のベースライン 1 とコントロール期間終了時の 2 において臨床診査及び歯肉縁下プラークの採取を行なった。なお、実験開始時及び終了時では、被験歯 39 歯より試料採取を行なっているが、ベースライン 2 では、便宜上無作為に被験歯 39 歯中 15 歯を選択して調べた。

ブラッシングは、ブラッシング期間開始時にモチベーションを行なった後指導しており、全ての被験者に対して被験歯のみでなく全歯について、1 日 3 回毎食後ソフトナイロンの歯ブラシで行なうこととした。また、プラークチャートを記録し、口腔清掃状態に改善のみられない者に対しては、2～3 回のチェックと再度ブラッシング指導を行なった。ブラッシング方法は、スクラビング法と 1 歯ずつのたてみがき (Individual Vertical Method: I.V.M.) を主体に指導し、一部の症例ではデンタルフロスの指導も行なった。

3. 検索方法

A. 臨床診査

1) Gingival Index (GI) の診査

Löe and Silness (1967)¹⁰⁾ の Gingival Index を用い、各被験部位（近、遠心隣接面）の歯肉の炎症状態を評価した。

表 1 検索項目

A. 臨床診査
1. Gingival Index (Löe & Silness)
2. Plaque Index (Silness & Löe)
3. Pocket Depth
4. Bleeding Index
B. 細菌学的検索

表 3 臨床診査結果（ブラッシング期間）

被験歯：39 歯			
	実験開始時 (ベースライン 1)	実験終了時	P
Gingival Index	1.74±0.44	1.27±0.44	P<0.001
Plaque Index	1.54±0.50	0.79±0.65	P<0.001
Pocket Depth	5.00±0.80	4.44±1.80	P<0.001
Bleeding Index	0.97±0.16	0.74±0.44	P<0.005

- 2) Plaque Index (PI) の診査
Silness and Löe (1964)¹¹⁾ の Plaque Index を用い、各被験部位のプラークの付着状態を評価した。
- 3) Pocket Depth (PD) の診査
ポケット探針 G-26 (Hu-Friedy 社製) を用い、各被験歯とも歯周ポケットの深さを 1 mm 単位で計測し、端数は切り捨てた。
- 4) Bleeding Index (BI) の診査
ポケット内の炎症程度を評価する目的で、Ainamo and Bay (1975)¹²⁾ の歯肉出血指数 (G.B.I.) を用い、ポケット測定を行なった際 30 秒以内にその部位に出血が認められた場合を 1 とし、認められなかった場合を 0 とした。

B. 細菌学的検索

試料の採取に先立って、被験歯の歯肉縁上プラークのみを除去するためにデンタルフロスや綿球などを使用した。ついでキュレットタイプのスクレーパーを組織を傷つけないように歯周ポケット内に注意深く挿入し、歯肉縁下プラークを採取した。この新鮮試料は、Listgarten と Hellden (1978)²⁾ の方法を参考に、ガラス杯内で 0.9% 生理的食塩水（大塚製薬社製）に希釈後ディスポーザブルのツベルクリン反応用注射器（テルモ社製）で吸い上げ 2～3 回のポンピング操作により拡散させ、ただちに暗視野顕微鏡で観察した。同一試料の計測を 2 名の検査

表 2 臨床診査結果（コントロール期間）

被験歯：15 歯			
	ベースライン 1	ベースライン 2	P
Gingival Index	1.87±0.34	1.47±0.50	P<0.05
Plaque Index	1.53±0.50	1.40±0.61	P>0.05 N.S.
Pocket Depth	4.87±0.72	4.60±1.25	P>0.05 N.S.
Bleeding Index	1.00±0	0.87±0.34	P>0.05 N.S.

N.S.: No significance

者がそれぞれ独自に行ない、各人が任意の視野について 100 個ずつの細菌を計測し、最終的には 2 名の平均値を算出した。歯周ポケット内細菌叢を構成する細菌の識別にあたっては、細菌の種類を 4 群、すなわち Coccoid cells, Motile rods, Spirochetes, Others に分け、それぞれの割合を算出し、その結果をブラッシング前後で比較した（表 1）。

実験結果

I. コントロール期間について

1. 臨床診査結果

Gingival Index は、コントロール期間中ベースライン 1 で GI 1 のものが 2 歯であったのが、ベースライン 2 では 8 歯と増加しており、逆に GI 2 のものは 13 歯から 7 歯と減少した（図 2）。またベースライン 1 での GI の平均値は 1.87±0.34 であり、ベースライン 2 では 1.47±0.50 で、両者間には paired t-test により統計学的に有意差（p<0.05）が認められた。しかしながら、その他の Plaque Index, Pocket Depth, 及び Bleeding Index にはベースライン 1 と 2 の間に大きな変化は見られなかった（表 2）。

2. 歯周ポケット内細菌叢の変化

歯周ポケット内細菌叢の構成の割合には、4 週間にわたるコントロール期間の前後で大きな変化は認められなかった（図 3）。すなわち paired t-test により、Motile rods と Others には若干有意差（p<0.05）が認められたが、Coccoid cells, Spirochetes には有意差は認められなかった。

II. ブラッシング期間について

被験歯 39 歯について、ブラッシングによる臨床診査

図 2 臨床診査結果

図 3 歯周ポケット内細菌叢の変化

結果及びポケット内細菌叢の変化を調べるため実験開始時と終了時のものについて比較した。

1. 臨床診査結果

Gingival Index は、ブラッシング前後で GI 2 のものが 29 歯であったのが 10 歯と減少しており、また Plaque Index では、PI 2 のものが 21 歯であったのが 5 歯と減少した。同様に Pocket Depth は、ブラッシング前後でその深さに改善が認められた (図 2)。さらに各 Index 及び Pocket Depth の平均値をブラッシング前後で比較すると、paired t-test により統計学的に有意な減少が認められた (表 3)。

2. 歯周ポケット内細菌叢の変化

Spirochetes の割合は、ブラッシング指導前平均 37.3 %であったものがブラッシング期間終了後は 18.7 %と統計学的に有意な減少 ($p < 0.001$) がみられた。しかしながら Coccoid cells では、14.8 % から 34.9 %と有意な増加 ($p < 0.001$) が認められた。一方, Motile rods 及び Others の割合は、ブラッシング前後で有意な変化は認められなかった (図 3)。

III. 臨床診査項目の変化に伴う細菌叢の変化

被験歯 39 歯についてブラッシングによる臨床症状の変化に注目し、各 Index 及び Pocket Depth の値をブ

図 4 GI の変化と細菌叢との関係

図 5 PII の変化と細菌叢との関係

ラッシング前後で改善の認められた改善群と変化のみでなかった非改善群に大別した。そしてこの両群について歯周ポケット内細菌叢の割合を比較した。

1. Gingival Index と細菌叢との関係

1) 改善群 (21 歯)

ブラッシングにより Index の改善したものについて Coccoid cells はブラッシング前平均 9.9% であったが、ブラッシング期間終了後は 37.6% と統計的に有意な増加 ($p < 0.001$) が認められた。一方、Spirochetes は 42.7% から 18.4% と有意な減少 ($p < 0.001$) が認められた。また、Motile rods 及び Others の割合は、ブラッシング前後で有意な変化は認められなかった。

2) 非改善群 (18 歯)

ブラッシングにより Index の改善が見られなかったものについて Spirochetes はブラッシング前平均 31.0% であったが、ブラッシング期間終了後は 19.1% と統計的に有意な減少 ($p < 0.05$) が認められた。しかしながら Coccoid cells, Motile rods, 及び Others の割合にはブラッシング前後で有意な変化は認められなかった (図 4)。

2. Plaque Index と細菌叢との関係

1) 改善群 (25 歯)

ブラッシング前後の比較において Coccoid cells の割合は、平均 14.0% から 33.9% と有意な増加 ($p < 0.001$) を示し、一方 Spirochetes は 38.3% から 17.8% と有意な減少 ($p < 0.001$) を示した。また Motile rods と Others には有意な変化は認められなかった。

2) 非改善群 (14 歯)

ブラッシング前後の比較において Coccoid cells の割合は、平均 16.1% から 36.8% と有意な増加 ($p < 0.005$) を示し、一方 Spirochetes は 35.5% から 20.4% と有意な減少 ($p < 0.025$) を示した。また Motile rods と Others には有意な変化は認められなかった (図 5)。

3. Pocket Depth と細菌叢との関係

1) 改善群 (21 歯)

ブラッシング前後の比較において Coccoid cells の割合は、平均 12.5% から 34.1% と有意な増加 ($p < 0.005$) を示し、一方 Spirochetes は 42.2% から 18.9% と有意な減少 ($p < 0.001$) を示した。また Motile rods と Others には有意な変化は認められなかった。

2) 非改善群 (18 歯)

ブラッシング前後の比較において Coccoid cells の割合は、平均 17.3% から 36.0% と有意な増加 ($p < 0.005$) を示し、一方 Spirochetes は 31.6% から 18.5% と有意な減少 ($p < 0.05$) を示した。また Motile rods と Others には有意な変化は認められなかった (図 6)。

4. Bleeding Index と細菌叢との関係

1) 改善群 (10 歯)

ブラッシング前後の比較において Coccoid cells の割合は、平均 14.6% から 42.1% と有意な増加 ($p < 0.005$) を示し、一方 Spirochetes は 31.4% から 6.85% と有意な減少 ($p < 0.005$) を示した。また Motile rods と Others には有意な変化は認められなかった。

2) 非改善群 (29 歯)

ブラッシング前後の比較において Coccoid cells の割合は、平均 14.8% から 32.5% と有意な増加 ($p <$

図 6 Pocket depth の変化と細菌叢との関連

0.001) を示し、一方 Spirochetes は 39.3% から 22.8% と有意な減少 ($p < 0.005$) を示した。また Motile rods と Others には有意な変化は認められなかった。

考 察

歯周ポケット内の細菌叢に対するブラッシングの影響については、Listgarten ら (1978)³⁾、Siegrist ら (1982)¹³⁾ の研究があるにすぎず、いまだ十分に実証されていないのが現状である。そこで今回、口腔内に 4 mm 以上の歯周ポケットを有する者 14 名の総計 39 歯について、ブラッシング前後での歯周ポケット内細菌叢を暗視野顕微鏡を用いて比較検討した。

被験者は、中等度から高度の慢性辺縁性歯周炎に罹患し、過去においてブラッシング指導やスケーリング、ルートプレーニングなどの処置を受けた既往がない患者を選んだ。特にスケーリング及びルートプレーニングの既往がないということは重要であり、このことによりブラッシングのみを行なった場合に歯周ポケット内細菌叢にどのような影響が現われるかを調べることができる。

被験歯の選択にあたっては、仮性ポケットを除外し 4 mm 以上の明らかに病的な歯周ポケットを有する歯を選んだ。また、それらの多くは X 線写真診査により、垂直性の骨欠損が認められた。実験を簡便なものとするため、被験部位は試料採取が容易であることや、歯ブラシによるブラッシングが比較的容易であることなどから唇・頬側隣接面付近とした。

ブラッシングによる歯周ポケット内細菌叢の変化を調

べるのが本実験の目的であるが、それに先だって 4 週にわたるコントロール期間を設けた。その理由は、歯周ポケット内においてブラッシング指導を全く行なわない場合の細菌叢の変化と、歯肉縁下プラークを採取するという操作自体が細菌叢に影響を及ぼすかどうかを調べるためである。

本実験では暗視野顕微鏡を細菌学的観察に利用した。暗視野顕微鏡を用いたポケット内細菌叢の観察は数多く報告されており²⁻⁹⁾、細菌を染色したり培養するといった煩雑な手順がいらず、操作も比較的容易である。細菌の分類、その他暗視野顕微鏡の操作などは Listgarten ら (1978)²⁾ の方法に従った。

細菌の計測は 2 名の検査者で行なっているが、両者間のバラツキは実験開始前に細菌の形態に関する見解の統一と、計測の経験を十分に積み重ねることで実験開始時にはほとんどなくなった。本実験では細菌を 4 グループに大別しその割合を算出しているが、ブラッシングの効果判定のための指標としては特に coccoid cells と Spirochetes の割合を重視した。Spirochetes はヒトの抜去歯の歯肉縁下プラークを電顕的に観察した Listgarten (1976)¹⁴⁾ の研究で、歯周ポケット内の根尖側あるいは歯肉側に多く認められたと報告されている。暗視野顕微鏡を利用した数々の研究で、歯周治療による臨床的な改善に伴ない Spirochetes の有意な減少が確認されている^{3-5,7,8)}。また、一方 Coccoid cells は有意な増加傾向を示すといわれている。そこで本実験では、ブラッシングの効果を特に Coccoid Cells と Spirochetes の増減から推測した。

次に実験結果について考察する。ブラッシング指導を行なわなかった約 1 カ月間のコントロール期間で歯周ポケット内の細菌叢は、motile rods や others の細菌群に多少の変化を認めたが、ほとんど術前の細菌叢と変化がなかった。Mousques ら (1980)¹⁵⁾ はプラークを採取する操作によって歯周ポケット内細菌叢に影響を与えるかどうかを調べており、その結果プラーク採取後 3 日目にわずかに変化するが、その後は 3 日目のレベルが実験期間を通じて維持されたと報告している。3 日目に変化が生じた理由として彼らは最初の歯肉縁下プラーク採取時に縁上プラークを除去したことと、プラーク採取という操作が被験者にブラッシングに対する何らかのモチベーション効果を与えたのではないかと述べている。同様に今回のコントロール期間において、Motile rods や Others の細菌群にあるいは GI 値に多少改善が認められたのは、試料の採取や歯周炎であるとの指摘を受けたことなど

で、被験者自身がブラッシングを積極的に行なったためと考えられる。しかしながら、細菌学的な指標として重視した *Spirochetes* や *Coccoid cells* には変化が認められず、ブラッシング指導を行なわない被験者自身のブラッシングでは歯周ポケット内細菌叢にほとんど影響を与えなかったと考えられる。

合理的なブラッシングは、歯周疾患に対して予防のためばかりでなく治療効果も高いことは臨床的に広く認められており¹⁶⁻²¹⁾、その効果はプラーク除去と歯ブラシによる歯肉への機械的刺激(歯肉マッサージ)の両者により得られると考えられる^{20,22)}。歯周炎に対しては、スクーリングやルートプレーニングなどの処置により歯周ポケット内の細菌叢をできるだけ除去し、その後細菌叢がどのように変化していくかに関して種々の方法により研究されている^{4,23-26)}。しかしながら歯周炎に対するブラッシングが、歯周ポケット内の細菌叢にどのような影響を与えるかについてはいまだ不明な点が多い。そこで今回われわれは、スクーリングやルートプレーニングなどの処置をいっさい行っていない被験歯に対して、主として縁上プラークをコントロールするブラッシングのみの効果を検討した。その結果、歯周ポケット内細菌叢とくに *Spirochetes* および *Coccoid cells* に有意な変化が起こることが明らかとなった。それに対してコントロールとしてブラッシング指導をしなかった場合、歯周ポケット内細菌叢に著明な変化は認められなかった。ブラッシングにより歯周ポケット内細菌叢に変化が生じたことは、Listgarten ら (1978)³⁾ の報告とは異なる。しかし彼らの実験では、歯周ポケットの深さは平均 7 mm とかなり深く、それに比べて本実験では 4~5 mm のものが主体であったためにブラッシングが歯周ポケット内細菌叢に影響を与えたと考えられる。このようなことを示唆することとして、本実験においても 6 mm 以上の深い歯周ポケットではブラッシングにより歯周ポケット内細菌叢は影響を受けにくい傾向がみられた。今回、4~5 mm の比較的浅い歯周ポケットの細菌叢に変化がみられたのは、スクラビング法あるいは 1 歯ずつのたてみがき法 (IVM) を主体とした毛先によるブラッシング法を指導したため、歯ブラシの毛先がポケット内に到達可能であったことから、縁上プラークのみならず縁下プラークも一部除去されたためと考えられる。また、歯ブラシの歯肉に対する機械的刺激(歯肉マッサージ)が、歯肉の血液循環を促進することにより歯周ポケット内滲出液の増加の起こることが知られている。これにより滲出液中の各種抗菌物質や賦活化された白血球の遊出が起こり、細

菌叢を変化させたとも考えられる。しかしながら今回の実験ではこの点に関して十分に検討されておらず、さらに今後、ブラッシングとくに歯肉へのマッサージの歯周ポケット内細菌叢に対する影響などについて検討が必要であると考えられる。

次に臨床診査項目の変化とポケット内細菌叢との関連について考察する。今回の実験において臨床的に改善がみられたものは、ポケット内細菌叢とくに *Spirochetes* と *Coccoid cells* の割合に改善が認められた。しかしながら臨床的に改善がみられなかったものでも、多くの場合 *Spirochetes* の割合は減少していた。Lindhe ら (1980)⁶⁾ は、細菌叢の変化が歯周疾患の病態の変化に先行すると報告しているが、彼らが述べているように *Spirochetes* を病態の推移の指標と考えれば、臨床的に改善のみられなかったものでもその後改善が認められるようになるのかもしれない。しかし今回はこれらのことについて実験的な検討を加えておらず、明確な結論は得られなかったが今後興味ある研究課題と考えられる。

総 括

深さ 4~5 mm の比較的浅い歯周ポケットでは、ブラッシングにより主に歯肉縁上プラークをコントロールすることで歯肉縁下の細菌叢に変化が起こることが明らかとなった。とくに *Coccoid cells* と *Spirochetes* の割合は、歯周疾患の病変の進行程度と密接な関係があることが示唆された。今後さらにブラッシングのみならず、スクーリング、ルートプレーニング、歯周外科など、各種の処置前後における歯周ポケット内細菌叢の変化およびポケット内細菌叢と臨床診査項目との関連についても検討を加えていくことを考えている。

文 献

- 1) Wearhaug, J. : Effect of toothbrushing on subgingival plaque formation. *J. Periodontol.*, 52 : 30-34, 1981.
- 2) Listgarten, M.A. and Hellden, L. : Relative distribution of bacteria at clinically healthy and periodontally diseased sites in humans. *J. Clin. Periodontol.*, 5 : 115-132, 1978.
- 3) Listgarten, M.A., Lindhe, J. and Hellden, L. : Effect of tetracycline and/or scaling on human periodontal disease. *Clinical, microbiological,*

- and histological observations. *J. Clin. Periodontol.*, 5 : 246-271, 1978.
- 4) Mousques, T., Listgarten, M.A. and Phillips, R. : Effect of scaling and root planing on the composition of the human subgingival microbial flora. *J. Periodontal Res.*, 15 : 144-151, 1980.
 - 5) Listgarten, M.A. and Schifter, C. : Differential dark field microscopy of subgingival bacteria as an aid in selecting recall intervals : results after 18 months. *J. Clin. Periodontol.*, 9 : 305-316, 1982.
 - 6) Lindhe, J., Liljenberg, B. and Listgarten, M. A. : Some microbiological and histopathological features of periodontal disease in man. *J. Periodontol.*, 51 : 246-269, 1980.
 - 7) Listgarten, M.A. and Levine, S. : Positive correlation between the proportions of subgingival spirochetes and motile bacteria and susceptibility of human subjects to periodontal deterioration. *J. Clin. Periodontol.*, 8 : 122-138, 1981.
 - 8) Rosenberg, E.S., Evian, C.I. and Listgarten, M.A. : The composition of the subgingival microbiota after periodontal therapy. *J. Periodontol.*, 52 : 435-441, 1981.
 - 9) Armitage, G.C., Dickinson, W.R., Jenderseck, R.S., Levine, S.M. and Chambers, D.W. : Relationship between the percentage of subgingival spirochetes and the severity of periodontal disease. *J. Periodontol.*, 53 : 550-556, 1982.
 - 10) Le, H. : The gingival index, the plaque index and the retention index systems. Part II. *J. Periodontol.*, 38 : 610-616, 1967.
 - 11) Silness, J. and Le, H. : Periodontal disease in pregnancy. II. Correlation between oral hygiene and periodontal condition. *Acta Odontol. Scand.*, 22 : 121-135, 1964.
 - 12) Ainamo, J. and Bay, I. : Problems and proposals for recording gingivitis and plaque. *Int. Dent. J.*, 25 : 229-235, 1975.
 - 13) Siegrist, B. and Kornman, K.S. : The effect of supragingival plaque control on the composition of the subgingival microbial flora in ligature-induced periodontitis in the monkey. *J. Dent. Res.*, 61 : 936-941, 1982.
 - 14) Listgarten, M.A. : Structure of the microbial flora associated with periodontal health and disease in man. A light and electron microscopic study. *J. Periodontol.*, 47 : 1-18, 1976.
 - 15) Mousques, T., Listgarten, M.A. and Stoller, N. H. : Effect of sampling on the composition of the human subgingival microbial flora. *J. Periodontal Res.*, 15 : 137-143, 1980.
 - 16) Le, H., Theilade, E. and Jensen, S.B. : Experimental gingivitis in man. *J. Periodontol.*, 36 : 177-187, 1965.
 - 17) Suomi, J.D. and Doyle, J. : Oral hygiene and periodontal disease in an adult population in the united states. *J. Periodontol.*, 43 : 677-681, 1972.
 - 18) 石川 純, 片山 剛, 池田雅彦 : ブラック・コントロールの意義とその効果. *日本歯科評論*, No. 370 : 9-21, 1973.
 - 19) 川崎 仁, 鈴木裕子, 杉井田鶴子 : ペリオ症例に対するブラッシングの効果. *歯界展望*, 47 : 653-664, 1976.
 - 20) 内山純一 : サルの実験的歯肉炎に対するブラッシング効果の臨床的病理組織学的分析. *日歯周誌*, 23 : 249-272, 1981.
 - 21) 大河原神治 : ブラッシングの歯肉に与える影響について. *日保歯誌*, 8 : 305-335, 1966.
 - 22) Hine, M.K. : The use of the toothbrush in the treatment of periodontitis. *J.A.D.A.*, 41 : 158-168, 1950.
 - 23) Waerhaug, J. : Healing of the dento-epithelial junction following subgingival plaque control. II : As observed on extracted teeth. *J. Periodontol.*, 49 : 119-134, 1978.
 - 24) Slots, J., Mashimo, P., Levine, M.J. and Genco, R.J. : Periodontal therapy in humans. I. Microbiological and clinical effects of a single course of periodontal scaling and root planing, and of adjunctive tetracycline therapy. *J. Periodontol.*, 50 : 495-509, 1979.
 - 25) 紺野純一 : 歯周炎患者における歯肉縁下ブラック形成に関する研究—走査型電子顕微鏡による観察—. *日歯周誌*, 25 : 300-323, 1983.
 - 26) Tabita, P.V., Bissada, N.F. and Maybury, J.

E. : Effectiveness of supragingival plaque control on the development of subgingival plaque and gingival inflammation in patients with

moderate pocket depth. J. Periodontol., 52 : 88-93, 1981.