螢光抗体法による歯周炎局所細菌叢の検討 および初期治療効果の評価について

清 田 築

東京歯科大学大学院歯学研究科歯科保存学第二講座

(指導：佐藤徹一郎教授)

(昭和63年12月19日受付)

A Study of the Microbial Flora of Periodontitis and Monitoring of the Effect of Initial Preparation by Immunofluorescence Microscopy

Kizuku SEIDA

Department of Periodontics, Tokyo Dental College

(Director : Prof. Tetsuichiro SATO)

The effect of initial preparation in adult periodontitis was evaluated by changes in clinical parameters and immunofluorescence microscopic counts of periodontal disease associated bacteria.

Subgingival plaque samples were taken with sterilized paper points from 10 sites of 5 periodontally healthy persons and 44 sites of 23 adult periodontitis patients. Twenty-one diseased sites were periodically examined after plaque control and scaling, root planing. The direct immunofluorescence technique was used to detect *Bacteroides gingivalis*, *Eikenella corrodens*, *Fusobacterium nucleatum* and *Treponema denticola*, *Bacteroides intermedius*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Bacteroides forsythus* and *Wolinella recta* were counted by the indirect immunofluorescence technique.

The proportions of *B. gingivalis*, *B. forsythus*, *F. nucleatum*, *E. corrodens*, *T. denticola* and *W. recta* in

periodontitis lesions were significantly higher than those in healthy sites. The proportions of *B. gingivalis* and *T. denticola* were significantly related to GI, PII, BI and PD, those of *B. forsythus* and *W. recta* to GI, PII and BI, *E. corrodens* to GI and PII, and *F. nucleatum* to BI. Reduced proportions of *T. denticola* were found in samples taken after establishment of proper plaque control. Subgingival scaling and root planing resulted in the reduction of proportions of *B. gingivalis*, *E. corrodens*, *T. denticola* and *B. forsythus* in the samples. The samples from positive bleeding sites contained higher proportions of *B. gingivalis*, *T. denticola*, *B. forsythus* and *W. recta* than did resolved sites.

The present study shows that the immunofluorescence technique which detects *B. gingivalis*, *T. denticola* and *B. forsythus* is useful in monitoring the efficacy of initial preparation.

Key words : Immunofluorescence technique, Monitoring, Subgingival microflora, Initial preparation

要旨：歯周炎患者の歯齦縁下プラーク中のグラム陰性細菌を螢光抗体法を用いて検索し、初期治療による歯周ポケット内細菌叢の変化を検討した。健康者5名(10部位；H群)と患者23名(44部位；P群)からの試料中の*B.*

gingivalis, *B. intermedius*, *A. actinomycetemcomitans*, *F. nucleatum*, *E. corrodens*, *T. denticola*, *B. forsythus*, *W. recta* を検索した。被験部位の *B. gingivalis*, *T. denticola*, *B. forsythus*, *W. recta* の有無がその部位の GI, PII, BI に関連しており、試料中に占める *B. gingivalis*, *T. denticola* の割合はその部位での PD に相関していた。歯齦縁上の plaque control だけでは *T. denticola* の減少のみが有意で、scaling, root planing 後では、*B. gingivalis*, *T. denticola*, *E. corrodens*, *B. forsythus* の減少が有意であった。BI の改善部位と非改善部位間には、*B. gingivalis*, *T. denticola*, *B. forsythus*, *W. recta* の割合に、PD では、*T. denticola* の割合に差がみられた。これらから初期治療効果の判定に蛍光抗体法による局所の *B. gingivalis*, *T. denticola*, *B. forsythus* をモニターする有効性が示唆された。

索引用語：蛍光抗体法，モニタリング，歯齦縁下細菌叢，初期治療

緒 言

近年、歯周疾患の発症と進行に特定の嫌気性グラム陰性桿菌が、深く関与していることが明らかにされてきた¹⁻⁷⁾。また的確な歯周治療によってそれらの菌群が排除されると臨床症状の改善が得られることも明らかにされてきている⁸⁻²⁰⁾。そのような背景から、歯周局所の細菌叢を把握することは、歯周疾患の診断や治療方針、その予後を判定するうえで重要となってきた^{21,22)}。最近まで細菌叢の解析は主として嫌気培養法が用いられてきたが、培養法はかなりの時間を要するうえ特別な培養施設が必要で、臨床的に採用するのは容易でない。一方、歯周ポケット内から採取される試料を観察する暗視野顕微鏡や位相差顕微鏡を用いた方法が確立され、歯周疾患の診査や歯周治療の評価にも導入されている²³⁻²⁷⁾。しかし、この方法では形態と運動性によって大別した細菌群としての消長を把握できるにすぎない。したがって歯周疾患に関連する特定細菌の存在を明確にすることはできない。

これらに対して蛍光抗体法は、検出しようとする細菌に対する特異抗体さえ調製すれば、簡便にしかも迅速に細菌を同定できる利点がある。他方、歯周疾患の原因菌がすべて確定していないという理由から特定細菌のみを標的とした方法を疑問視する説²⁸⁾もある。しかし、歯周治療後、歯周疾患関連性細菌種の消長を調べたり、いわゆる disease activity を特定細菌の存在や増減で捉えることは、客観的な検査法と考えられる。

ところで蛍光抗体法を用いて、歯周治療による臨床症状の推移と歯周炎局所細菌叢の変化に関して、多数の菌種にわたって検索した研究は少ない。本研究は、蛍光抗体法が歯周局所より採取した試料中の対象とする特定細菌を検出する方法として有用であることを明らかにし、歯周初期治療特に plaque control と scaling, root

planing による臨床症状の改善が歯周局所の特定細菌の排除あるいは減少と関連するかどうかを経時的に検討したものである。

材料および方法

1. 被験者および試料採取部位

被験者は、歯周炎患者群 (P 群) と歯周組織が健康な者の群 (H 群) に分けた。なお、P 群は東京歯科大学千葉病院保存科に来院した患者で、辺縁性歯周炎と診断された年齢 28 歳から 51 歳までの男性 14 名、女性 9 名で、少なくとも 5 mm 以上の歯周ポケットの深さを 2 カ所以上有するものとした。また、H 群は年齢 25 歳から 27 歳までの男性 4 名、女性 1 名を選んだ。両群ともに全身の疾患の既往はなく過去 6 ヶ月以内に抗生物質の投与を受けていないことを確認した。

被験部位は原則として 1 名につき 2 部位とし、P 群では全顎のうち最も歯周ポケットの深い 2 部位を選択した。H 群では、両側上顎第一大臼歯近心隣接面部を選択した。また P 群のうち歯周治療にともない経時的に経過を追うことができた 12 名、21 部位を歯周治療群 (T 群) とした。

2. 試料採取時期

被験部位からの試料の採取は、H 群、P 群ともに初診時の臨床診査後、その影響をさけるため約 2 週間後に行った。T 群ではこの時期を第 1 回目の採取期とした (Stage 1)。Plaque control を行い O'Leary の plaque control record²⁹⁾ が 20% 以下となりしかも試料採取部位のブラーク付着状態 (PII) が 1 以下となってから 2 週間経過後を第 2 回目の採取期とした (Stage 2)。Scaling, root planing を行ってから臨床的に歯周組織が安定したと考えられる約 6 週間後を第 3 回目の採取時期とした (Stage 3)。

3. 臨床診査項目

被験部位では Table 1 に示す各臨床診査項目について診査した。Probing depth (PD) は試料採取部位の歯齦縁からポケット底部までの距離を Williams 型プローブを用いて手圧で測定した。Attachment level (AL) はあらかじめ製作したステントを基準にし、初診時のステントからポケット底部までの距離と各時期におけるステントからの距離の変化量として表わした。Bleeding index (BI) は Ainamo & Bay³⁰⁾ の Gingival Bleeding Index (G.B.I.) を参考にし、被験部位を probing した後 30 秒以内に出血したものを 1、しないものを 0 とした。被験部位の歯齦の炎症程度は Løe & Silness の Gingival index (GI)³¹⁾ を、プラークの付着状態は Silness & Løe の Plaque index (PII)³²⁾ の基準によって測定した。

4. 試料採取方法

歯周ポケット内試料は、被験部位の歯齦縁上プラークを滅菌綿球で除去した後、滅菌ペーパーポイント (Johnson & Johnson # 22002) を 3 本、歯周ポケット内に 30 秒間挿入して採取した。直ちにペーパーポイントを直径 0.8 mm のガラスビーズの入った 0.5 ml Reduced tran-

sport fluid (RTF)³³⁾ 入りバイアル瓶に移した。これを 30 秒間 Vortex mixer で分散後、10 μ l ずつ無蛍光スライドガラスにのせて乾燥し、蛍光抗体染色用試料とした。

5. 特異的 FITC 標識抗体および一次抗体の調製法

本研究では調製したウサギ免疫血清は、Table 2 に示す 8 菌種 11 株に対するものである。*Bacteroides gingivalis*, *Bacteroides intermedius*, *Fusobacterium nucleatum*, *Eikenella corrodens*, *A. actinomycetemcomitans* の培養は、Trypticase peptone (BBL Microbiology System) と Yeast extract (Difco Laboratories) の透析外液体培地で、*Treponema denticola* は TYGVS で培養したものを集菌した。*Bacteroides forsythus* と *Wolinella rec-*

Table 1 Clinical parameter

Gingival inflammation	Gingival index (Løe&Silness)
Plaque accumulation	Plaque index (Silness&Løe)
Bleeding on probing	G.B.I. (Ainamo&Bay)
Probing depth	
Attachment level	

Table 2 List of rabbit antisera against gram-negative bacteria associated with periodontal disease

<i>Bacteroides gingivalis</i> 381
<i>Eikenella corrodens</i> FDC 1073
<i>Fusobacterium nucleatum</i> ATCC 25586
<i>Treponema denticola</i> ATCC 33520
<i>Bacteroides intermedius</i> ATCC 25611 and ATCC 33563
<i>Actinobacillus actinomycetemcomitans</i> Y4, ATCC 29523 and SUNY 67
<i>Bacteroides forsythus</i> ATCC 43037
<i>Wolinella recta</i> ATCC 33238

Rabbit antiserum

↓

Enriched by addition of $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ and placed at 4°C

↓

Conjugated fluorescein isothiocyanate

↓

Separated FITC-conjugated antiserum by gelfiltration (Sephadex G-25)

↓

Separated good specific fraction by DEAE-cellulose column chromatography

↓

Concentrated by ultrafiltration

Fig. 1 Preparation of direct fluorescent antibody

〈 Direct method 〉

Aliquot of 10 μ l FITC-conjugate was placed on each smear.
 ↓
 Placed in a moist chamber at room temperature for 60 min.
 ↓
 Washed with PBS-T (0.05%).
 ↓
 Rinsed with PBS.
 ↓
 Slide was mounted with glycerol in PBS (2 : 1).
 ↓
 Fluorescence was checked.

〈 Indirect method 〉

Aliquot of 10 μ l of first antibody was placed on each smear.
 ↓
 Placed in a moist chamber at room temperature for 30 min.
 ↓
 Washed with PBS-T (0.05%).
 ↓
 Rinsed with PBS.
 ↓
 Aliquot of 10 μ l of goat anti-rabbit IgG FITC-conjugate was placed on each smear.
 ↓
 Placed in a moist chamber at room temperature for 45 min.
 ↓
 Washed with PBS-T (0.05%).
 ↓
 Rinsed with PBS.
 ↓
 Slide was mounted with glycerol in PBS (2 : 1).
 ↓
 Fluorescence was checked.

Fig. 2 The direct and indirect immunofluorescent staining methods

ta は、ウサギ血液 10% を含む血液平板培地で発育させたものを集菌した。集めた菌体を PBS (pH 7.2) にて充分洗浄したのち、15 mg/ml となるように懸濁した。これらの調製した免疫用抗原は体重 2.5 kg 前後の白色短耳のウサギ各 3 羽に繰り返し免疫した。7 回目の最終免疫から 1 週間後、心採血した血液より血清を分離した。各菌種に対する複数のウサギ特異血清のうち Ouchterlony 法で抗体価の高かったものを選んだ。*B. gingivalis*, *T. denticola*, *E. corrodens*, *F. nucleatum* に対する 4 種の抗血清は直接蛍光抗体法に供試し、*B. intermedius*, *A. actinomycetemcomitans*, *B. forsythus*, *W. recta* に対する抗血清は間接蛍光抗体法に用いた。

直接法に用いた特異血清への FITC 標識は、川生³⁴⁾の方法に準じて Fig. 1 に示すように行った。まず得られた血清を 33% 飽和硫酸にて塩析し、粗 IgG 画分とした。これに蛋白量 1 mg あたり 0.04 mg になるように fluorescein isothiocyanate (FITC, Sigma) を標識した。遊離色素除去のため Sephadex G-25 (Pharmacia Fine Chemical) にてゲル濾過を行い、更に特異蛍光の強い画分

を得るために DEAE-cellulose (DE-52, Whatman) によるイオン交換クロマトグラフィーを行った。これを限外濾過法により蛋白濃度で 2 から 4 mg/ml になるように調整した。

間接法に用いた抗 *B. intermedius* 血清は、交差反応をなくす目的で ATCC 25611 株と ATCC 33563 株に対する免疫血清を 5 ml ずつ混合した後、*B. gingivalis* 381, ATCC 33277 株, *Bacteroides loescheii* ATCC 15930 株, *Bacteroides denticola* ATCC 33185 株, *Bacteroides melanogonicus* ATCC 25845 株および *Bacteroides corporis* ATCC 33547 株の湿菌体をそれぞれ 10 mg 加えて、4°C で 24 時間吸収させた。

抗 *A. actinomycetemcomitans* ウサギ免疫血清は 3 つの serotype すなわち ATCC 29523 株, Y 4 株および SUNY 67 株に対するものを調製し、各等量を混合して用いた。

各血清の希釈倍率は、PBS を用い *B. intermedius*; 1 : 50, *A. actinomycetemcomitans*; 1 : 30, *B. forsythus*; 1 : 50, *W. recta*; 1 : 50 としたものを 1 次抗体として用

Table 3 The specific staining by direct and indirect fluorescent antibody

antibody for bacteria	Fluorescence reaction											
	B.g 381	B.g 33277	B.i 25611	B.i 33563	A.a Y4	A.a 29523	A.a 67	F.n 25586	E.c 1073	T.d 33520	B.f 43037	W.r 33238
<i>B. gingivalis</i>	+4	+4	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>B. intermedius</i>	—	—	+4	+4	+1	—	—	—	—	—	—	—
<i>A. actinomycetemcomitans</i>	—	—	—	—	+3	+3	+3	—	+1	—	—	—
<i>F. nucleatum</i>	—	—	—	—	—	—	—	+3	—	—	+1	—
<i>E. corrodens</i>	—	—	—	—	—	—	—	—	+3	—	—	—
<i>T. denticola</i>	—	—	—	—	—	—	—	—	—	+3	—	—
<i>B. forsythus</i>	+1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	+4	—
<i>W. recta</i>	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	+3

+4 : brilliant fluorescence with good cell envelope definition, center of cell is dark.

+3 : moderate fluorescence with good cell envelope definition, center of cell is dark.

+2 : faint fluorescence, single cell visible but no definition of cell envelope.

+1 : bare fluorescence, single cell not distinguishable.

— : no staining of bacteria visible.

Positive criteria was set by +4 and +3.

いた。

6. 蛍光抗体染色法

直接法および間接法による蛍光抗体染色は, Mouton ら³⁵⁾の方法に準じて行った (Fig. 2)。直接法では, 染色試料のうゑに各菌種に対する特異的 FITC 標識抗体液を 10 μ l のせ, 湿箱中で室温にて 60 分間反応させた。間接法では, 1 次抗体を 10 μ l ずつ試料のうゑにのせ, 湿箱中で室温で 30 分間反応させた後, PBS-T (0.05% Tween 20) ついで PBS で洗浄した。ついで 2 次抗体として PBS にて蛋白濃度 0.05 mg/ml に調整した FITC 標識ヤギ抗ウサギ IgG 抗体 (Cappel #26923) を 10 μ l で, 室温で 45 分間反応させた。直接法, 間接法ともに染色後 PBS-T ついで PBS で洗浄した後, グリセリン-PBS (2:1) でマウントし, 5 時間以内に落射型蛍光顕微鏡 (Nikon Microphot FX) で検鏡した。

7. 細菌の算定法

採取試料中の総菌数に占める各細菌種の割合は次のようにして算定した。位相差顕微鏡観察 ($\times 1,000$, 油浸) にて 1 視野 (写真撮影用スケール内) に 100 から 200 個程度の細菌が見られる視野を無作為に選択し, 視野中の総菌数をカウント後, 蛍光観察 ($\times 1,000$, 油浸) を行い特異蛍光を示している細菌数をカウントした。3 視野で観察された特異蛍光の菌数をその総菌数で除して各菌種の割合とした。特異蛍光の判定は, Mouton ら³⁵⁾の記載に準じて行った。1 ml あたりの総菌数は Goodson ら³⁶⁾の方法に準じて次のようにして算定した。位相差観察

Table 4 Sampling sites and clinical features

	Healthy group	Periodontitis group
No. of sites	10	44
No. of male	4	14
No. of female	1	9
Mean Age	24.6	40.9
Mean GI	0.1	2.1
Mean PII	0.5	2.1
No. of bleeding sites on probing	0/10	42/44
Mean PD (mm)	2.2	7.4

($\times 1,000$, 油浸) でマイクログリッドスケールを用いて測定した 1 視野の面積で, スライドガラス上の試料 (10 μ l) の平均面積を除した値に各試料の 1 視野あたりの平均総菌数を乗して, 試料 10 μ l あたりの総菌数を得て, これより 1 ml あたりの総菌数を算定した。特に総菌数が多く測定が困難な場合は 10 倍希釈した試料を用いた。

8. 統計学的処理

各群間の臨床的, 細菌学的検査結果の比較には Wilcoxon の順位検定および χ^2 検定を用いた。T 群内の経時的比較には Wilcoxon の符号付順位検定, McNemar 検定を用いた。また, 細菌の検出率と GI, PII, BI の関連性は χ^2 検定, 細菌叢と PD の相関性は Spearman の順位相関を用いた。いずれも危険率 5% を有意水準とした。

Table 5 Changes of clinical parameters following the initial preparation

	Stage 1	Stage 2	Stage 3
Mean GI	2.1±0.4	1.6±0.5*	1.2±0.5*
Mean PII	2.2±0.5	0.8±0.4*	0.5±0.5*
No. of bleeding sites on probing	21	12*	6*
Mean PD (mm)	6.8±1.3	5.8±1.8*	4.3±1.4*
Mean of AL gain (mm)	—	0.0±0.5	0.5±0.7*

Tested by Wilcoxon signed rank test for GI, PII, PD, AL.

Tested by McNemar test for bleeding site.

*: $p < 0.01$

Table 6 Frequency of detection of gram-negative bacteria

Species	Number of detected site (%)	
	Healthy (n=10)	Periodontitis (n=44)
<i>B. gingivalis</i>	1 (10)	42 (95.5)
<i>B. intermedius</i>	7 (70)	30 (68.2)
<i>A. actinomycetemcomitans</i>	0 (0)	11 (25.0)
<i>F. nucleatum</i>	1 (10)	21 (47.7)
<i>E. corrodens</i>	3 (30)	30 (68.2)
<i>T. denticola</i>	1 (10)	42 (95.5)
<i>B. forsythus</i>	0 (0)	20 (90.9)*
<i>W. recta</i>	1 (10)	13 (59.1)*

*: n=22

結 果

1. 蛍光抗体法による特異性試験

グラム陰性菌種 12 株の純培養菌に対する各抗体の特異性試験の結果を Table 3 に示した。若干の交差反応がみられる抗体も存在したが、菌の算定には問題なく良好な反応性を示した。

2. 被験者の臨床的検査所見

H 群と P 群の臨床症状を Table 4 に示した。H 群ではそれぞれの平均値は GI 0.1, PII 0.5, PD 2.2 mm であり, BI が 1 の部位はなかった。P 群では GI 2.1, PII 2.1, PD 7.4 mm であり, BI が 1 の部位は 44 部位のうち 42 部位に認められた。いずれの診査項目でも H 群と P 群の間には有意な差がみられた。

T 群の Stage 1, Stage 2, Stage 3 における臨床所見を Table 5 に示した。GI は初期治療によってそれぞれの Stage で平均 2.1 から 1.6, 1.2 と改善した。PII も 2.2 から 0.8, 0.5 と減少し, BI は BI が 1 の部位が各

Stage で 21 部位から 12 部位, 6 部位と減少した。PD は平均 6.8 mm から 5.8 mm, 4.3 mm と改善した。AL は Stage 3 で平均 0.5 mm の gain がみられた。Stage 2 における AL の変化以外はすべての診査項目で Stage 1 と比較して有意な改善が認められた。

3. 歯齦縁下プラーク試料中のグラム陰性細菌種の検出率

P 群の各細菌の検出率を H 群と共に Table 6 に示した。P 群では 95.5% の部位で *B. gingivalis* と *T. denticola* が, 90.9% の部位で *B. forsythus* が検出された。*A. actinomycetemcomitans* は 25% の部位で, *F. nucleatum* は 47.7% の部位で検出された。

H 群では 70% の部位で *B. intermedius* が, 30% の部位で *E. corrodens* が, 10% の部位で *B. gingivalis*, *F. nucleatum*, *T. denticola*, *W. recta* が検出された。*B. forsythus* および *A. actinomycetemcomitans* は検出されなかった。

T 群での各 Stage ごとの細菌の検出率を Table 7 に示した。T 群では各細菌とも Stage 2, Stage 3 において

Table 7 Frequency of detection of gram-negative bacteria following the initial preparation

Species	Number of detection site (%)		
	Stage 1	Stage 2	Stage 3 (n=21)
<i>B. gingivalis</i>	19(90.5)	18(85.7)	11(52.4)*
<i>B. intermedius</i>	14(66.7)	12(57.1)	9(42.9)
<i>A. actinomycetemcomitans</i>	5(23.8)	4(19.0)	2(9.5)
<i>F. nucleatum</i>	12(57.1)	8(38.1)	9(42.9)
<i>E. corrodens</i>	16(76.2)	7(33.3)**	7(33.3)**
<i>T. denticola</i>	19(90.5)	18(85.7)	16(76.2)
<i>B. forsythus</i> (n=6)	5(83.3)	5(83.3)	2(33.3)
<i>W. recta</i> (n=6)	4(66.7)	3(50.0)	2(33.3)

Tested by McNemar test.

*: P<0.05, **: P<0.01

Table 8 Comparison of mean percentage of gram-negative bacteria in subgingival plaque samples

Species	Mean±S.D. (%)	
	Healthy (n=10)	Periodontitis (n=44)
<i>B. gingivalis</i>	0.26±0.08	3.30±2.63 p<0.01
<i>B. intermedius</i>	0.39±0.28	1.02±1.25 N.S.
<i>A. actinomycetemcomitans</i>	0.0±0.0	0.13±0.26 N.S.
<i>F. nucleatum</i>	0.06±0.20	0.28±0.54 p<0.05
<i>E. corrodens</i>	0.18±0.32	0.60±0.76 p<0.05
<i>T. denticola</i>	0.02±0.07	6.11±7.58 p<0.01
<i>B. forsythus</i>	0.0±0.0	1.01±0.97 p<0.01
<i>W. recta</i>	0.02±0.06	0.34±0.40 p<0.01

Tested by Wilcoxon rank sum test.

N.S.: No significance

Stage 1 と比較して検出率が減少する傾向がみられた。

B. gingivalis は, Stage 1 の 90.5% から Stage 2 の 85.7% へ, さらに Stage 3 の 52.4% へと検出率が低下した。*B. intermedius* も同様に 66.7%, 57.1%, 42.9% と低下した。Stage 2 で検出率が有意に減少したのは *E. corrodens* (76.2% から 33.3%) のみであった。また Stage 3 で有意な検出率の減少を認めたのは *B. gingivalis* (90.5% から 52.4%) と *E. corrodens* (76.2% から 33.3%) の 2 菌種であった。

4. 歯齦縁下プラーク試料中に占めるグラム陰性細菌種の割合

H 群と P 群の各グラム陰性細菌種の割合を Table 8 に示した。H 群と P 群の間で有意な差が認められたのは, *B. gingivalis* (p<0.01), *F. nucleatum* (p<0.05), *E. corrodens* (p<0.05), *T. denticola* (p<0.01), *B. forsythus* (p<0.01), *W. recta* (p<0.01) の 6 菌種であった。

B. intermedius は, H 群で平均 0.39%, P 群で平均 1.02% の割合を示し, *A. actinomycetemcomitans* は, H 群で検出されず P 群で平均 0.13% の割合を示したが本統計学的処理では両群間に有意差はみられなかった。

T 群の歯周治療にともなう細菌叢の経時的変化を Table 9 に示した。Stage 2 で各細菌ともほぼ減少する傾向を示し, 統計学的に有意な減少をみたのは *T. denticola* の 8.19% から 3.16% (p<0.05) のみであった。Stage 3 では各細菌とも顕著に減少する傾向が認められた。特に *B. gingivalis* が 3.35% から 1.33% (p<0.01) に, *E. corrodens* が 0.56% から 0.1% (p<0.01) に, *T. denticola* が 8.19% から 1.87% (p<0.01) に, *B. forsythus* が 1.26% から 0.22% (p<0.05) と有意に減少した。採取試料 1 ml あたりの総菌数は, Stage 1 と Stage 2 では $17.0 \times 10^7/\text{ml}$ と $17.5 \times 10^7/\text{ml}$ と差はなく, Stage 3 では $6.23 \times 10^7/\text{ml}$ と有意 (p<0.01) な減少がみられ

Table 9 Changes of gram-negative bacterial proportion in subgingival plaque samples following the initial preparation

Species	Mean±S.D. (% , n=21)		
	Stage 1	Stage 2	Stage 3
<i>B. gingivalis</i>	3.35± 3.02	2.21 ±1.73	1.33**±1.64
<i>B. intermedius</i>	1.00± 1.33	0.92 ±1.20	0.73 ±1.26
<i>A. actinomycetemcomitans</i>	0.13± 0.29	0.14 ±0.32	0.02 ±0.08
<i>F. nucleatum</i>	0.31± 0.59	0.40 ±0.82	0.23 ±0.36
<i>E. corrodens</i>	0.56± 0.72	0.44 ±0.91	0.10**±0.21
<i>T. denticola</i>	8.19±10.42	3.16*±3.92	1.87**±2.35
<i>B. forsythus</i>	1.26± 1.70	1.00 ±0.55	0.22* ±0.36
<i>W. recta</i>	0.63± 0.62	0.22 ±0.36	0.33 ±0.74
Total cell count ($\times 10^7/\text{ml}$)	17.00±10.61	17.54 ±14.13	6.23**±8.60

Tested by Wilcoxon signed rank test.

* : $p < 0.05$ ** : $p < 0.01$ **Table 10** Relationship between gram-negative bacteria and clinical parameters

Species	χ^2			r_s
	GI	PII	BI	PD
<i>B. gingivalis</i>	32.7**	30.1**	28.4**	0.53**
<i>B. intermedius</i>	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.
<i>A. actinomycetemcomitans</i>	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.
<i>F. nucleatum</i>	N.S.	N.S.	6.7*	N.S.
<i>E. corrodens</i>	9.0*	9.1*	N.S.	N.S.
<i>T. denticola</i>	32.8**	26.1**	28.4**	0.42**
<i>B. forsythus</i>	22.2**	15.1**	20.4**	N.S.
<i>W. recta</i>	8.3*	14.2**	8.2**	N.S.

 χ^2 : Values of Chi-square analysis r_s : Spearman rank correlation coefficient** : $p < 0.01$ * : $p < 0.05$

N.S. : No significance

た。

5. グラム陰性細菌種と臨床症状との関連性

目標とするグラム陰性細菌種と臨床的所見との関係を検討するために、H 群と P 群の 54 部位での各細菌の有無とその部位での GI, PII, BI との関連性を検索した。また総菌数に占める各細菌の割合と PD との相関性も検索した (Table 10)。各部位での各細菌の有無と GI との関係では、*B. gingivalis* ($p < 0.01$) と *E. corrodens* ($p < 0.05$)、*T. denticola* ($p < 0.01$)、*B. forsythus* ($p < 0.01$)、*W. recta* ($p < 0.05$) の 5 菌種に有意な関連性がみられた。

PII は、*B. gingivalis* ($p < 0.01$)、*E. corrodens* ($p < 0.05$)、*T. denticola* ($p < 0.01$)、*B. forsythus* ($p < 0.01$)、*W. recta* ($p < 0.01$) の 5 菌種の存在に有意な関係がみられた。

BI は、*B. gingivalis* ($p < 0.01$)、*F. nucleatum* ($p < 0.01$)、*T. denticola* ($p < 0.01$)、*B. forsythus* ($p < 0.01$)、*W. recta* ($p < 0.01$) の 5 菌種の存在に有意な関係がみられた。

PD と各細菌の総菌数に占める割合との相関性では、*B. gingivalis* ($r_s = 0.534$, $p < 0.01$) *T. denticola* ($r_s =$

Table 11 Comparison between proportions of gram-negative bacteria and Bleeding index

Species	Mean±S.D. (%)		
	Resolved	Unresolved	
<i>B. gingivalis</i>	0.87±1.52	2.39±1.22	p<0.01
<i>B. intermedius</i>	0.81±1.34	1.27±2.01	N.S.
<i>A. actinomycetemcomitans</i>	0.01±0.04	0.04±0.11	N.S.
<i>F. nucleatum</i>	0.15±0.34	0.32±0.34	N.S.
<i>E. corrodens</i>	0.9 ±0.22	0.28±0.51	N.S.
<i>T. denticola</i>	1.46±2.17	3.05±2.58	p<0.05
<i>B. forsythus</i>	0.24±0.44	0.77±0.50	p<0.05
<i>W. recta</i>	0.15±0.28	0.97±0.78	p<0.01

Tested by Wilcoxon rank sum test

N.S. : No significance

Table 12 Comparison between proportions of gram-negative bacteria and probing depth

Species	Mean±S.D. (%)		
	Resolved	Unresolved	
<i>B. gingivalis</i>	1.32±1.63	1.72±1.42	N.S.
<i>B. intermedius</i>	0.78±1.56	2.02±1.35	N.S.
<i>A. actinomycetemcomitans</i>	0.01±0.07	0.04±0.08	N.S.
<i>F. nucleatum</i>	0.24±0.34	0.0 ±0.0	N.S.
<i>E. corrodens</i>	0.11±0.23	0.38±0.76	N.S.
<i>T. denticola</i>	1.62±2.22	3.13±2.45	p<0.05
<i>B. forsythus</i>	0.36±0.44	1.06±0.53	N.S.
<i>W. recta</i>	0.51±0.75	0.73±0.55	N.S.

Tested by Wilcoxon rank sum test

N.S. : No significance

0.421, $p<0.01$) の 2 菌種のみが有意な相関を示した。ほかの 6 菌種は有意な相関を示さなかった。以上の結果から *B. gingivalis* と *T. denticola* は全ての臨床所見と *B. forsythus* と *W. recta* は、PD 以外の臨床所見と関連性が認められた。

6. 初期治療後の臨床所見とグラム陰性菌の割合との関連性

Scaling と root planing によって Stage 1 より臨床所見が改善された群 (R 群) と改善されなかった群 (UR 群) の 2 群にわけ、R 群と UR 群間の Stage 3 におけるグラム陰性菌種の総菌数に占める割合を比較した。なお統計処理の信頼性を増すため T 群の 21 部位にさらに Stage 1 と Stage 3 のみの経過を追うことができた 6 部位を加えた計 27 部位を対象に検索した。R 群の BI は、Stage 1 で BI が 1 の部位が Stage 3 で BI が 0 になっ

た部位として、UR 群は Stage 1, Stage 3 とともに BI が 1 の部位に分けて比較したのが Table 11 である。BI の R 群と UR 群間には *B. gingivalis* ($p<0.01$), *T. denticola* ($p<0.05$), *B. forsythus* ($p<0.05$), *W. recta* ($p<0.01$) の 4 菌種で有意差が認められた。

PD に関しては、R 群を Stage 1 と比較して Stage 3 で減少した部位、UR 群を変化がみられないかまたは増加した部位に分け、その菌叢に占める各菌種の割合を比較した (Table 12)。PD の R 群と UR 群間には、*T. denticola* ($p<0.05$) の割合に有意差を認めた。

考 察

歯周疾患の診断や治療方針さらにはメインテナンスの成否を知るためには、歯周局所の細菌検査が必要となり

つつある²¹⁻²⁶⁾。本研究は、蛍光抗体法の利点を活用して、どの様なグラム陰性菌種がより辺縁性歯周炎に関連するか、また一般的に実施される初期治療の効果を特定の細菌の消長でモニターできるか否かを検討したものである。

蛍光抗体法は、1) 迅速に細菌を同定できる、2) 培養による細菌の同定に比べ簡便である、3) 培養が容易でない菌種たとえば *spirochetes* や *B. forsythus* を検出することができる、4) 増殖能力を失っているために培養法では検出できない細菌を検出することができるなどの利点がある^{39-42,44)}。

直接法は1回の反応系だけで結果を得ることができ、間接法に比べて短時間で細菌を同定できる利点がある。一方、間接法は複数の血清型を持つ細菌に対してはそれぞれに対応した血清の混合血清を用いることができ、特異抗体の調製が容易な利点がある。本研究では、*B. gingivalis*, *T. denticola*, *E. corrodens*, *F. nucleatum* に対して直接法を、*B. intermedius*, *A. actinomycetemcomitans* と、*B. forsythus*, *W. recta* に対しては間接法を用いた。

蛍光抗体法による細菌同定法では、他細菌種との交差反応を防ぐことが重要な課題である。本研究では、血清によっては交差反応を示す菌種で吸収した後、特異性のあることを確認したものを用いた。さらに、細菌の算定にあたっては、同一の形態、大きさのもののみを陽性と判定したため、交差反応性を示したものを陽性と捉えることはほとんどないと考えられる。交差反応性のないものとしては、モノクローナル抗体が理想的である。菌体表面の対応する抗原との反応性が低かったりする欠点をカバーし、この種の研究にモノクローナル抗体を導入することはより有効な手段と考えられる。

また同様に重要な点として、歯齦縁下ブランクの採取法の問題がある。キュレットによる採取は、簡便さからよく用いられるものの出血をきたし易く、また狭くて深いポケット内の試料を採取するのは難しい。ペーパーポイントによる採取は再現性もよく金属器具による酸化作用の影響も少ないが、黒色色素産生性 *Bacteroides* 菌群の検出率が他の方法より大きいという報告^{37,38)}がある。本研究ではこれらの点からペーパーポイント法を用いて、*B. gingivalis* を95.5%の検査部位菌叢中に平均3.3%、*B. intermedius* を68.2%の部位の菌叢中に平均1.02%検出できた。しかし、H群の浅い歯齦溝から試料をペーパーポイントで採取することは容易でなかった。今後は、より採取が確実でかつ再現性のある方法を確立する必要がある。

本研究の結果は全菌数に占める *B. gingivalis* の割合が10%を越える部位はまれであるという間接蛍光抗体法による Slots ら³⁹⁾の報告と一致した。一方、Zambon ら⁴⁰⁾は、間接蛍光抗体法を用いて *B. gingivalis* を検索し、成人性歯周炎患者の43%の部位および健常者の9%の部位が *B. gingivalis* 陽性であったと報告している。さらに、彼らは12歳から65歳までの歯周炎患者を対象とした別の研究で第1大臼歯4本の近心隣接部から採取した試料を pooled sample として *B. gingivalis* を検索し、本菌が菌叢中で2%以上存在する患者は全体の9%で、87%の患者では *B. gingivalis* が検出されないが、それでも0.1から0.9%と極めて少なかったことを報告⁴¹⁾している。Zambon ら⁴⁰⁾の先の研究では細菌叢中1%以上を占めている部位だけを *B. gingivalis* 陽性部位としているために本研究に比べて低い検出率になったと考えている。

A. actinomycetemcomitans は、患者から採取した試料中の25%に平均0.13%の割合で検出することができた。*A. actinomycetemcomitans* は、蛍光抗体法を用いた方法で若年性歯周炎の局所だけでなく成人性歯周炎の歯周ポケット内からも検出ができると報告^{41,42)}されている。本菌種は、選択培地を用いた場合でも他菌種の bacteriocin 等による発育抑制を受けやすく、分離されにくいため蛍光抗体法による検出の方が信頼性が高いと考えられる。

T. denticola は、患者から採取した試料中の95.5%に平均6.11%の割合で検出し、*B. forsythus* は、90.9%の部位に平均1.01%の割合で検出することができた。*T. denticola* の割合は、Umamoto ら⁴³⁾の報告と差はないが、*B. forsythus* の割合は、成人性歯周炎患者から採取した試料の総菌数の平均で15.3%も占めたという Lai ら⁴⁴⁾の報告に比べると1オーダー低い値を示した。*B. forsythus* については、血清学的検討が充分なされていないため、Lai ら⁴⁴⁾の報告と本研究の結果を単純に比較することはできないと考えられる。

Tanner ら¹⁾は、嫌気培養法によって進行性の歯周炎患者から採取した局所試料の細菌叢を検索し、*B. gingivalis* (11.5%)、*F. nucleatum* (19.1%)、fusiform *Bacteroides* (11.0%) が高い割合で存在し、*E. corrodens* (1.8%)、*B. intermedius* (0.81%) はあまり多くないと報告している。Savitt ら²⁾は局所細菌叢の嫌気培養法にもとづく検索から成人性歯周炎患者から採取した試料中の41%に *B. gingivalis* を平均6.9%、29%に *B. intermedius* を平均1.2%、91%に *F. nucleatum* を平均3.4

%, 52% に *E. corrodens* を平均 0.7% 検出できたことを報告している。蛍光抗体法による検索は試料中に存在する標的細菌を鋭敏に検出することができるのに対し、培養法では培地の差や細菌間の拮抗作用によって、ある特定細菌だけが増殖してしまうことも考えられる。そのような理由から、嫌気培養法による成績と本研究の結果を一概に比較することはできないと考えている。

歯周治療を成功に導くには plaque control の成否が重要であることは繰り返し報告⁴⁵⁻⁴⁷⁾されている。しかし、歯齦縁上の plaque control が歯齦縁下の細菌叢にどのような影響を与えるかについては充分には解明されていない。Waerhaug⁴⁸⁾ は、歯齦縁下プラークの形成には歯齦縁上プラークが関与することを示し、Smulow ら⁴⁹⁾ は、5 mm 以上の歯周ポケットを対象にして厳密な歯齦縁上の plaque control を行い、spirochete や *Bacteroides* が減少して歯齦縁下細菌叢が変化することを報告している。佃ら¹⁷⁾ は深さ 4 mm から 7 mm のポケットを対象にして 4 週間以上 plaque control を徹底させると spirochete が有意に減少したと報告している。朴ら¹⁹⁾ は平均の深さ 5.8 mm のポケットを対象にして 4 週間の plaque control 後、統計学的有意差はないものも spirochete, *Bacteroides*, *F. nucleatum* の減少がみられたことを報告している。一方、Listgarten ら⁸⁾ は平均深さ 7 mm のポケットを対象に 25 週間にわたって plaque control のみを行った結果、その細菌叢に有意な変化はなかったと、前述の報告と異なった知見を示している。Beltram ら⁵⁰⁾ も、平均 6.8 mm のポケットを対象に 3 週間にわたる厳密な plaque control を行ったが細菌叢に変化はなかったことを示した。本研究では、Stage 2 で *T. denticola* が有意に減少したが他の細菌の有意な減少はみられなかった。このような差が生じる理由としては試料採取法や細菌の検査法の違い、さらに対象としている検査部位の臨床症状の違いすなわちポケットの深さや歯齦の炎症状態の違いなどが考えられる。

本研究では蛍光抗体法を用いて特定菌種に限って検索したため平均 6.8 mm のポケットでもわずかな菌叢の変化を捉えることができたのかも知れない。さらにこの点については、臨床症状の違いを考慮した蛍光抗体法による詳細な検討が必要であると考えられる。

Scaling と root planing 処置によって臨床症状の改善とともに歯齦縁下細菌叢が変化するという多くの研究報告⁹⁻¹⁶⁾ が示されている。一方、歯齦縁下プラークの質的变化はないという報告³⁶⁾ も見られる。本研究では、scaling, root planing 終了後すなわち Stage 3 での菌叢の

割合を Stage 1 と比較すると *B. gingivalis* ($p < 0.01$), *E. corrodens* ($p < 0.01$), *T. denticola* ($p < 0.01$), *B. forsythus* ($p < 0.01$) の 4 菌種が有意に減少するという結果を得た。したがって scaling, root planing による細菌叢の変化を蛍光抗体法を用いて従来検索できなかった菌種を含めて検索することができた。

また、scaling, root planing による臨床症状の改善と細菌叢の関係を明らかにするために、Stage 3 と Stage 1 を比較して臨床症状が改善した部位 (R 群) と改善しなかった部位 (UR 群) の細菌叢を比較した。BI について R 群と UR 群との間での細菌叢を比較解析したところ、R 群で *B. gingivalis*, *T. denticola*, *B. forsythus*, *W. recta* の細菌叢中における割合が UR 群のそれより有意に低かった。また PD について R 群と UR 群間で比較したところ *T. denticola* のみが R 群で有意に低かった。これらの所見から scaling, root planing による臨床症状の改善程度と特定のグラム陰性菌種の消長が一致することが示唆された。

以上のことから、有意差が多く認められた *B. gingivalis*, *T. denticola*, *B. forsythus* を指標にした蛍光抗体法によって歯周局所の細菌叢をモニターし、初期治療の成否を細菌学的に評価することは有意義と考えられる。

結 論

蛍光抗体法が歯周ポケット内細菌叢の検査法として有用であることを確認したうえで、歯周炎患者の歯周ポケット内グラム陰性菌種の細菌叢と歯周組織が健康な者の局所細菌叢を検索し、さらに初期治療の効果を歯周ポケット内の細菌叢の変化から評価することを試み、次のような結論を得た。

1. P 群では *B. gingivalis*, *F. nucleatum*, *E. corrodens*, *T. denticola*, *B. forsythus*, *W. recta* の細菌叢の割合が H 群に比べ有意に大きかった。P 群での *B. intermedius*, *A. actinomycetemcomitans* の菌叢に占める割合は H 群に比べて大きいものの、統計学的有意差は認められなかった。

2. H 群と P 群の各部位での歯齦の炎症程度 (GI)、プラークの付着状態 (PII) と Probing による出血指数 (BI) はその部位での *B. gingivalis*, *T. denticola*, *B. forsythus*, *W. recta* の有無と関連した。また Probing depth (PD) は *B. gingivalis*, *T. denticola* の菌叢に占める割合と関連した。

3. 歯齦縁上の plaque control によって、平均 PD 6.8

mm の歯周ポケット内の総菌数に占める *T. denticola* の割合は減少したが、他のグラム陰性菌種の割合は減少しなかった。

4. Scaling, root planing によって *B. gingivalis*, *E. corrodens*, *T. denticola*, *B. forsythus* の4菌種の菌叢に占める割合を減少させることができた。

5. Scaling, root planing によって BI が改善しない部位での *B. gingivalis*, *T. denticola*, *B. forsythus*, *W. recta* の菌叢に占める割合は改善した部位に比べて有意に高かった。また、PD の非改善部位での *T. denticola* の割合は改善部位に比べて有意に高かった。

6. 以上より、歯周疾患における細菌検査法として蛍光抗体法が有効であり、また初期治療の効果を細菌学的に評価する方法として特に *B. gingivalis*, *T. denticola*, *B. forsythus* を指標とすることが有用であることが示唆された。

謝 辞

稿を終えるにあたり、ご懇切なるご指導、ご校閲を賜った本学歯科保存学教室第二講座主任佐藤徹一郎教授に深謝致します。並びに、ご懇篤なるご校閲、ご教示を賜った本学微生物学教室高添一郎教授に深謝致します。また、本研究の遂行に際し、終始ご指導、ご鞭撻を賜った奥田克爾助教授に深謝致します。併せて、数々のご協力を戴いた、本学歯科保存学教室第二講座、微生物学教室の各位に厚く御礼申し上げます。

文 献

- 1) Tanner, A.C.R., 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 : 278-307, 1979.
- 2) Savitt, E.D. and Socransky, S.S. : Distribution of certain subgingival microbial species in selected periodontal conditions. J. Periodont. Res., 19 : 111-123, 1984.
- 3) Loesche, W.J., Syed, S.A., Schmidt, E. and Morrison, E.C. : Bacterial profiles of subgingival plaques in periodontitis. J. Periodontol., 56 : 447-456, 1985.
- 4) Moore, W.E.C., Holdeman, L.V., Cato, E.P., Smibert, R.M., Burmeister, J.A. and Ranney, R.R. : Bacteriology of moderate (chronic) periodontitis in mature adult humans. Infect. Im-

mun., 42 : 510-515, 1983.

- 5) Slots, J. : The predominant cultivable microflora of advanced periodontitis. Scand. J. Dent. Res., 85 : 114-121, 1977.
- 6) Slots, J. : Subgingival microflora and periodontal disease. J. Clin. Periodontol., 6 : 351-382, 1979.
- 7) Newman, M.G. and Socransky, S.S. : Predominant cultivable microbiota in periodontosis. J. Periodont. Res., 12 : 120-128, 1977.
- 8) 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.
- 9) 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.
- 10) Mousqués, T., Listgarten, M.A. and Phillips, R.W. : Effect of scaling and root planing on the composition of the human subgingival microbial flora. J. Periodont. Res., 15 : 144-151, 1980.
- 11) 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.
- 12) Singletary, M.M., Crawford, J.J. and Simpson, D.M. : Dark-field microscopic monitoring of subgingival bacteria during periodontal therapy. J. Periodontol., 53 : 671-681, 1982.
- 13) Lindhe, J., Liljenberg, B. and Adielsson, B. : Effect of long-term tetracycline therapy on human periodontal disease. J. Clin. Periodontol. 10 : 590-601, 1983.
- 14) Greenwell, H. and Bissada, N.F. : Variations in subgingival microflora from healthy and intervention sites using probing depth and bacteriologic identification criteria. J. Periodontol., 55 : 391-397, 1984.
- 15) Magnusson, I., Lindhe, J., Yoneyama, T. and Liljenberg, B. : Recolonization of a subgingival

- microbiota following scaling in deep pockets. J. Clin. Periodontol., 11 : 193-207, 1984.
- 16) 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 : 187-194, 1985.
 - 17) 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 : ブラッシングに伴う歯周ポケット内細菌叢の変化. 日歯周誌, 25 : 545-553, 1983.
 - 18) 本城範典 : 歯周初期治療による Advancing periodontitis 患者の歯周ポケット内細菌叢の変動. 歯科医学, 47 : 603-620, 1984.
 - 19) 朴 英樹, 神谷洋行, 奥田一博, 江口泰子, 長谷川栄子, 吉江弘正, 原 耕二 : 歯周ポケット内細菌叢からみた歯周初期治療の効果. 日歯周誌, 26 : 329-338, 1984.
 - 20) 井上純一 : 歯周初期治療による Moderate periodontitis 患者の歯周ポケット内細菌叢の変動. 日歯周誌, 28 : 484-499, 1986.
 - 21) 高添一郎 : 歯周病診断のための臨床検査システムの確立. 歯医学誌, 7 : 86-102, 1988.
 - 22) 村山洋二 : 歯周病の臨床に応用できる嫌気性細菌検査システムの確立. 歯医学誌, 6 : 56-74, 1987.
 - 23) Listgarten, M.A. and Helldén, L. : Relative distribution of bacteria at clinically healthy and periodontally diseased sites in humans. J. Clin. Periodontol., 5 : 115-132, 1978.
 - 24) Listgarten, M.A. and Levin, 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.
 - 25) 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.
 - 26) Listgarten, M.A., Schifter, C.C., Sullivan, P., George, C. and Rosenberg, E.S. : Failure of a microbial assay to reliably predict disease recurrence in a treated periodontitis population receiving regularly scheduled prophylaxes. J. Clin. Periodontol., 13 : 768-773, 1986.
 - 27) Keyes, P.H. and Rams, T.E. : A rationale for management of periodontal diseases : rapid identification of microbial 'therapeutic targets' with phase-contrast microscopy. J. Am. Dent. Assoc., 106 : 803-812, 1983.
 - 28) 高田春比古, 小川知彦, 浜田茂幸 : 歯周病治療と歯肉縁下細菌叢. —細菌学的検査導入の可能性—. 歯科ジャーナル, 26 : 17-28, 1987.
 - 29) O'Leary, T.J., Drake, R.B. and Naylor, J.E. : The plaque control record. J. Periodontol., 43 : 38, 1972.
 - 30) Ainamo, J. and Bay, I. : Problems and proposals for recording gingivitis and plaque. Int. Dent. J., 25 : 229-235, 1975.
 - 31) Loe, H. and Silness, J. : Periodontal disease in pregnancy. I. Prevalence and severity. Acta Odontol. Scand., 21 : 533-551, 1963.
 - 32) Silness, J. and Loe, H. : Periodontal disease in pregnancy. II. Correlation between oral hygiene and periodontal condition. Acta Odontol. Scand., 22 : 121-135, 1964.
 - 33) Syed, S.A. and Loesche, W.J. : Survival of human dental plaque flora in various transport media. Appl. Microbiol., 24 : 638-644, 1972.
 - 34) 川生 明 : 図説蛍光抗体法—その原理と技術および応用, 初版, ソフトサイエンス社, 東京, 1983, 7-14.
 - 35) Mouton, C., Hammond, P.G., Slots, J., Reed, M.J. and Genco, R.J. : Identification of *Bacteroides gingivalis* by fluorescent antibody staining. Ann. Microbiol. (Inst. Pasteur), 132 B : 69-83, 1981.
 - 36) Goodson, J.M., Offenbacher, S., Farr, D.H. and Hogan, P.E. : Periodontal disease treatment by local drug delivery. J. Periodontol., 56 : 265-272, 1985.
 - 37) Kiel, R.A. and Lang, N.P. : Effect of subgingival sampling techniques on periodontal microbiological culturing. J. Dent. Res., 62 : 247, 1983.
 - 38) Tanner, A.C.R. and Goodson, J.M. : Sampling of microorganisms associated with periodontal

- disease. Oral Microbiol. Immunol., 1 : 15-20, 1986.
- 39) Slots, J., Hafström, C., Rosling, B. and Dahlén G. : Detection of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Bacteroides gingivalis* in subgingival smears by the indirect fluorescent-antibody technique. J. Periodont. Res., 20 : 613-620, 1985.
 - 40) Zambon, J.J., Reynolds, H.S., Chen, P. and Genco, R.J. : Rapid identification of periodontal pathogens in subgingival dental plaque. Comparison of indirect immunofluorescence microscopy with bacterial culture for detection of *Bacteroides gingivalis*. J. Periodontol., special issue : 32-40, 1985.
 - 41) Zambon, J.J., Bochacki, V. and Genco, R.J. : Immunological assays for putative periodontal pathogens. Oral Microbiol. Immunol., 1 : 39-44, 1986.
 - 42) Bonta, Y., Zambon, J.J., Genco, R.J. and Neiders, M.E. : Rapid identification of periodontal pathogens in subgingival plaque : Comparison of indirect immunofluorescence microscopy with bacterial culture for detection of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. J. Dent. Res., 64 : 793-798, 1985.
 - 43) Umemoto, T. and Namikawa, I. : Antisera to human oral treponemes and their use for detection of spirochetes in subgingival dental plaques. Jpn. J. Oral. Biol., 29 : 488-492, 1987.
 - 44) Lai, C.-H., Listgarten, M.A., Shirakawa, M. and Slots, J. : *Bacteroides forsythus* in adult gingivitis and periodontitis. Oral Microbiol. Immunol., 2 : 152-157, 1987.
 - 45) Nyman, S., Rosling, B. and Lindhe, J. : Effect of professional tooth cleaning on healing after periodontal surgery. J. Clin. Periodontol., 2 : 80-86, 1975.
 - 46) Nyman, S., Lindhe, J. and Rosling, B. : Periodontal surgery in plaque-infected dentitions. J. Clin. Periodontol., 4 : 240-249, 1977.
 - 47) Rosling, B., Nyman, S., Lindhe, J. and Jern, B. : The healing potential of the periodontal tissues following different techniques of periodontal surgery in plaque-free dentitions. A 2-year clinical study. J. Clin. Periodontol., 3 : 233-250, 1976.
 - 48) Waerhaug, J. : Effect of toothbrushing on subgingival plaque formation. J. Periodontol., 52 : 30-34, 1981.
 - 49) Smulow, J.B., Turesky, S.S. and Hill, R.G. : The effect of supragingival plaque removal on anaerobic bacteria in deep periodontal pockets. J. Am. Dent. Assoc., 107 : 737-742, 1983.
 - 50) Beltrami, M., Bickel, M. and Baehni, P.C. : The effect of supragingival plaque control on the composition of the subgingival microflora in human periodontitis. J. Clin. Periodontol., 14 : 161-164, 1987.
-