成人性歯周炎の歯齦縁下プラークにおける *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola* の局在に関する免疫組織化学的検索

木 暮 隆 司

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：山田 了教授)

(平成4年3月3日受付)

An Immunohistochemical Study on the Distribution of *Porphyromonas gingivalis* and *Treponema denticola* in Subgingival Plaque with Adult Periodontitis

Takashi KIGURE

Department of Periodontics, Tokyo Dental College

1-2-2, Masago, Mihama-ku, Chiba-shi 261, Japan

(Director : Prof. Satoru YAMADA)

The purpose of this study was to characterize the distribution of *Porphyromonas (Bacteroides) gingivalis* and *Treponema denticola* on root surface-associated microbial plaque with adult periodontitis. Fourteen extracted teeth from nine patients with advanced periodontitis were investigated. Microscopic evaluation was facilitated by dividing that portion of the root exposed to the periodontal pocket into 0-2 mm, 2-4 mm, 4-6 mm, and apical one-fourth areas. Immunohistochemical studies using rabbit antisera against *P. gingivalis* and *T. denticola* showed that the microorganisms occurred predominantly in the deep

pocket zones larger than 4 mm. Eventually cells of *T. denticola* were found in the superficial layers of the subgingival plaque. Cells of *P. gingivalis* were located beneath these layers. In the pockets zones of more than 6 mm, corresponding to the bottoms of the periodontal pockets, *P. gingivalis* and *T. denticola* were distributed virtually throughout the subgingival plaque. High concentrations of *P. gingivalis* and *T. denticola* were observed to coexist in subgingival plaque samples of the deeper pocket areas suggesting that they might play an important role in the progress of adult periodontitis.

Key words : *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola*, Immunohistochemical study, Human subgingival plaque, Adult periodontitis

要旨：本研究目的は、成人性歯周炎の根面の歯齦縁下プラークにおける *Porphyromonas (Bacteroides) gingivalis*, *Treponema denticola* の分布状態を検討することである。重度歯周炎患者9名から採取した抜去歯14歯を歯齦縁から根端側方向に0-2 mm, 2-4 mm, 4-6 mm, 6 mm以上の部位に分けて、光学顕微鏡並びに電子顕微鏡にて観察した。*P. gingivalis*, *T. denticola* に対するウサギ免疫血清を用いて免疫組織化学的に検索した結果、両菌種共に4 mm以上の深い部位のプラークに著明に検出された。プラーク最表層には *T. denticola* が、その直下には *P. gingivalis* の集簇が認められた。また6 mm以上の歯周ポケット底部付近に相当する部位では、両者はプラーク全域に検出され、*P. gingivalis* が存在する周囲には *T. denticola* の局在が観察された。以上の結果から、*P. gingivalis*, *T. denticola* は共存関係をもって歯周ポケットの深い部位に存在し、歯周炎の進行に重要な役割を担って

本論文の要旨は、第34回春季日本歯周病学会総会(1991年5月16日)および第243回東京歯科大学学会例会(1991年6月8日)において発表した。

いることが示唆された。

索引用語: *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola*, 免疫組織化学的検索, ヒト歯齦縁下プラーク, 成人性歯周炎

緒 言

歯周疾患の発症と進行に嫌気性グラム陰性桿菌やスピロヘータが関与していることが明らかにされてきた^{1,2)}。*Porphyromonas (Bacteroides) gingivalis* は、宿主細胞への付着能が強く³⁾、歯周炎局所から高頻度に分離される^{4,5)}。本菌種は、内毒素を保有しコラゲナーゼなど種々の酵素^{6,7)}を産生し、組織破壊に関与する代謝産物などの病原性因子⁸⁾を持つことなどから歯周炎の有力な原因菌とされている。さらに近年、*P. gingivalis* の検出は、active あるいは inactive の病態をとらえるモニターとして有用であることが Slots ら⁹⁾や Dzink ら¹⁰⁾によって報告されている。

一方スピロヘータは、重度歯周炎の歯周ポケット内で優位であるという報告^{11,12)}や歯周治療に伴うスピロヘータの減少と症状の改善には相関のあることが報告^{13,14)}されるなど、歯周疾患の発症と進行における病原性が明らかにされてきた。また口腔内スピロヘータの分類学的位置付けも確立してきた。口腔内スピロヘータは、嫌気培養の発達や DNA の相同性、GC 比を指標とした遺伝学的研究の進歩に伴い、その形態学的特徴¹⁵⁾よりもむしろ個々の菌体の生化学的特徴による分類が重要視されるようになった。Smibert ら^{16,17)}は、新しい分類学的基準にそって *Treponema denticola*, *Treponema vincentii* の他に *Treponema socranskii* や *Treponema pectinovorum* の菌種を報告した。このうち *T. denticola* は、トリプシン様酵素活性¹⁸⁾や線維芽細胞抑制因子^{19,20)}などの病原性を有することが示された。また Shenker ら²¹⁾や石原²²⁾は、*T. denticola* には免疫応答を抑制する因子のあることを明らかにしている。これら研究成果から、*T. denticola* の歯周ポケット内の増減もまた歯周炎の病態を知る細菌学的指標になり得ることが提案されている。

歯周ポケット内の細菌叢の検索は、培養、蛍光抗体法といった種々な方法で行われてきた。Loesche ら²³⁾や Seida ら²⁴⁾は、*P. gingivalis* や *T. denticola* のトリプシン様酵素活性を利用し局所での両菌種の存在を迅速に検索できることを報告している。また Savitt ら²⁵⁾は、歯周ポケット内細菌叢に占める特定細菌の検出を

DNA プローブ法を用いて行っている。これら従来の一連の検索は、間接的に歯周ポケット内細菌叢に占める特定細菌の存在や割合を調べるものである。一方、そのような歯周病原性細菌が実際にどのように歯周ポケット内のプラークに分布しているかについては、直接検索することが必要である。歯周局所での歯周病原性細菌の局在を明確にすることは、それら細菌の定着メカニズムさらには歯周組織破壊がどのようにして生じているかを解明する上で重要である。

Berthold ら²⁶⁾は、peroxidase を用いて歯齦縁上プラーク中の *Actinomyces viscosus* を検出した結果、これら細菌は多形態性を成してプラーク表層や下層で分布していることを示した。また Berthold と Listgarten²⁷⁾ は、若年性歯周炎における抜去歯根面の歯齦縁下プラーク中の *Actinobacillus actinomycetemcomitans* を検索し、その菌体をプラーク最根端側部で検出している。しかしながら、これらヒト細菌叢に関する免疫組織化学的検索は、その方法論に主眼が置かれており、ヒト歯齦縁下プラークにおける他の歯周病原性細菌の検討は未だ十分には行われていない。

本研究は、成人性歯周炎の歯齦縁下プラークにおける *P. gingivalis* と *T. denticola* の分布を免疫組織化学的に検索し、両菌種の歯周病原性について考察したものである。

材料及び方法

1. 被験者及び被験歯の選択

被験者は東京歯科大学千葉病院保存科に来院し、成人性歯周炎と診断された患者を対象とした。歯周炎罹患歯に対し、まず予め以下に示す臨床的診査項目について診査をした。

1) 歯周ポケットの深さ

Williams 型プローベ (山浦, 東京) を用いて約 20 g の手圧にて 6 点法で測定, mm 単位で表示した。

2) 歯齦の炎症程度

Löe & Silness の Gingival index²⁸⁾ を準用した。

3) プロービング後の出血の有無²⁹⁾

プロービング後 30 秒以内に出血したものを (+), 出血しないものを (-) と評価した。

4) 歯槽骨の吸収程度

Schei ら³⁰⁾の Bone loss を用いた。

5) 歯の動揺度

0~3 の4段階で評価した。

診査の結果、保存不可能と診断された歯周炎罹患歯で、以下に示す条件を満たした歯周炎患者9名(男性5名、女性4名、年齢39-59歳)から得られた14歯の歯齦縁下プラークを被験材料として用いた。なお試料作製上検索する部位は1歯1根面のプラークとした。

a) 歯周ポケットの深さが6mm以上を有する歯

b) 過去6ヵ月以内に抗生物質等の薬物投与を受けていない者

c) 過去において歯周治療の既往がない者

d) 全身性の重篤な疾患を有さない者

なお患者には予め本研究の主旨を説明し承諾を得た上で実験に供した。

2. 標準菌株に対する免疫組織化学的検索

1) 供試菌株及び培養方法

免疫組織化学的染色における control reaction 及び cross reaction に用いた菌株は9菌種14株である。*P. gingivalis* FDC 381株, *Prevotella melaninogenica* (*Bacteroides melaninogenicus*) ATCC 25845株, *Prevotella intermedia* (*Bacteroides intermedius*) ATCC 25611株, ATCC 33563株, *Fusobacterium nucleatum* ATCC 25586株は, Trypticase soy agar (BBL Microbiological Systems, Cockeysville, U.S.A.) に menadione (0.5 µg/ml), hemin (5 µg/ml) を加えた血液平板培地で3日間嫌気培養した。*T. denticola* ATCC 35404株, ATCC 35405株, ATCC 33520株, ATCC 33521株, *T. socranskii* subsp. *socranskii* ATCC 35536株, *T. socranskii* subsp. *buccale* ATCC 35534株, *T. socranskii* subsp. *paredis* ATCC 35535株, *T. vincentii* ATCC 35580株, *T. pectinovorum* ATCC 33768株は, TYGVS 培地³¹⁾を用い3~7日間嫌気培養をした。培養菌体は遠沈(12,000×g, 20分)によって集菌後, 0.05 M リン酸緩衝液(以下PBSと略す)で十分洗浄し供試した。

2) 試料及び標本作製方法

培養菌体は, 0.05 M リン酸緩衝 4% paraformaldehyde と 0.2% glutaraldehyde の混合液(pH 7.2, 4°C)中で6時間固定した。固定後0.05 M PBS 中で24時間洗浄し, 遠沈した後, 2% Bacto-agar(Difco, U.S.A.)に1次包埋した。1mm³の大きさに細切し, 低温(-35°C)下で上昇エタノール系列にて脱水した。その

後低温包埋剤 Lowicryl® K 4 M^{32,33)} (Chemische Werke Lowi GmbH, Germany) に置換後, ゼラチンカプセル No. 00 (EM Science, U.S.A.)を用いて2次包埋した。重合は, D.S.K. TUV-200 (堂阪イーエム, 京都)を用いて-35°C下で2日間紫外線重合し, さらに室温で2日間重合し試料を作製した。重合の完了した試料は, 超ミクロトーム(LKB 2088 Ultratome® V, Sweden)を用いてガラスナイフにて1µの薄切切片を作製し, 光学顕微鏡的検索に用いた。光学顕微鏡的検索後, 検索部位を決定しダイヤモンドナイフ(DIATOME, Switzerland)にて超薄切片を作製し, formval-carbon coated Ni grid (VECO, Holland)に載せた。光学顕微鏡用切片及び電子顕微鏡用切片は, それぞれ以下に示す方法で免疫組織化学的染色を行った。

3. ヒト歯齦縁下プラークの免疫組織化学的検索

1) 試料の採取及び試料作製方法

試料採取は, 臨床診査後3週間以上経過した後に行った。まず被験歯部位には, Epinephrine 1/80,000 含有 2% Lidocaine 1.8 ml (歯科用キシロカインカートリッジ®, 藤沢薬品工業, 大阪)にて浸潤麻酔を施した後, 検索対象の根面には歯齦縁に相当する位置に No. 440 ダイヤモンドポイント(松風, 京都)を用いてノッチを付与した。抜歯操作は, Listgarten³⁴⁾の方法に準じて行い, 前述の培養菌体の試料作製過程に準じて試料を作製した。すなわち, 抜歯後根面に付着した血餅等は出来る限り保持し, 根面に付着したプラークを4% paraformaldehyde と 0.2% glutaraldehyde の混合固定液中に浸漬後, PBS 中で浸漬洗浄, 上昇エタノール系列にて脱水, Lowicryl® K 4 M に歯全体を包埋し, 紫外線重合を施した。

2) 標本作製方法

重合の完了した試料は, 図1に示すように切片を作製した。すなわち, ダイヤモンドディスク UTD(松風, 京都)を用いてノッチ形成部位より歯根膜付着最歯冠側部までを根端側方向に約2mmの間隔, 幅約1mmに切り出した。本実験における群分けは, 0-2 mm のブロックから得られた切片をA群, 2-4 mm のブロックからの切片をB群, 4-6 mm のブロックからの切片をC群, 6 mm 以上のブロックからの切片をD群とした。細切したブロックは, さらに歯の長軸方向と平行に無作為に約1mmの範囲で部位を選択した。次に, 光学顕微鏡による検索のためガラスナイフにて1µの薄切連続切片を作製した。その後, 切片はアルブミンスラ

図 1 切片作製方法

イドガラスに貼付し、以下に記述する Immunogold-silver staining (以下 IGSS と略す) 法^{35,36)}に従い免疫組織化学的染色を施した。

電子顕微鏡の検索に関しては、光学顕微鏡の検索における IGSS 法による染色結果が得られた後、同検索部位をさらにトリミングし、ダイヤモンドナイフにて超薄切片を作製した。その後、以下に示す免疫組織化学的染色を施した。

4. 免疫組織化学的観察

1) 1次抗体及び特異標識抗体の調整

1次抗体には *P. gingivalis* FDC 381株、*T. denticola* ATCC 33520株の全菌体に対するウサギ免疫血清を用いた。*T. denticola* に対する免疫血清は、交差反応をなくす目的でウサギ免疫血清 1ml あたり *T. socranskii* subspecies の3菌株、*T. vincentii* 及び *T. pectinovorum* の湿菌体をそれぞれ 10mg 加えて、4℃で24時間吸収した。*P. gingivalis* 及び *T. denticola* に対する抗体の最適希釈倍率は checker board 法³⁷⁾により判定し、0.1% BSA を加えた PBS を用いて希釈し光学顕微鏡の検索では *P. gingivalis*、*T. denticola* とも 1:640 で、電子顕微鏡的検索では *P. gingivalis* 1:160、*T. denticola* 1:320 で用いた。

2次抗体には、colloidal gold 標識ヤギ抗ウサギ IgG 血清 LM (particle size 5nm)、EM (particle size 15nm) (BioCell, England) を用い、希釈倍率は光学顕微鏡 1:100、電子顕微鏡 1:40 で使用した。

2) 免疫組織化学的染色法

光学顕微鏡における免疫組織化学的染色法は、図2に示すごとく IGSS 法を用いて行った。すなわち薄切

薄切	1μ切片(アルブミンスライドガラス)	
前処理	5%正常ヤギ血清	20分
1次抗体	ウサギ抗 <i>P. gingivalis</i> 血清 1:640 ウサギ抗 <i>T. denticola</i> 血清 1:640	1時間
洗浄	0.05M PBS-0.05% Tween 20 (pH 7.2)	1時間
2次抗体	Colloidal gold 標識ヤギ抗ウサギ IgG 血清 particle size 5nm 1:100	1時間
洗浄	0.05M PBS-0.05% Tween 20 (pH 7.2) 蒸留水	1時間
IGSS	Silver enhancing kits	8-15分
洗浄		

図 2 光顕における IGSS 法による染色過程

した 1μ 切片を 5% 正常ヤギ血清 (TAGO, U.S.A.) にて 20 分間処理した後、1次抗体を 30 μl ずつ切片におき、室温にて 1 時間反応させた。次いで 0.05% Tween 20 (和光純薬工業、大阪) 加 PBS (以下 PBS-T と略す) で洗浄、2次抗体を同様に 1 時間反応させた。PBS-T 及び蒸留水で洗浄後、Silver enhancing kits (BioCell, England) にて 8~15 分間処理した。十分な発色を確認後、蒸留水で洗浄した。なお切片の洗浄以外の操作はすべて moist chamber 内で行った。Counter stain は 0.1% トルイジン青 (pH 7.2) で行い、光学顕微鏡にて観察した。

電子顕微鏡における免疫組織化学的染色は、Immunocolloid 法³⁸⁾を用いて行った(図3)。すなわち、超薄切片を 5% 正常ヤギ血清にて 20 分間処理後、1次抗体を 2 時間、PBS-T を用いて 1 時間洗浄し、そして 2 次抗体を 2 時間反応させた。その後 PBS-T 及び蒸留水にて 1 時間洗浄し、酢酸ウラン・クエン酸鉛二重染色を施した。試料は、日立 H-600 透過型電子顕微鏡 (日立製作所、東京) にて加速電圧 75 kV で観察、撮影した。

なお、光学並びに電子顕微鏡の検索共に negative control として、1次抗体に正常ウサギ血清を用いて染色した。

5. 画像解析処理

IGSS 法により染色を施した光学顕微鏡における連続薄切切片を Nikon OPTIPHOT 並びに MICRO-

超薄切	Formval-carbon coated Ni grids	
前処理	5%正常ヤギ血清	20分
1次抗体	ウサギ抗 <i>P. gingivalis</i> 血清 1:160 ウサギ抗 <i>T. denticola</i> 血清 1:320	2時間
洗浄	0.05M PBS-0.05% Tween 20 (pH 7.2)	1時間
2次抗体	Colloidal gold 標識ヤギ抗ウサギ IgG 血清 particle size 15nm 1:40	2時間
洗浄	0.05M PBS-0.05% Tween 20 (pH 7.2) 蒸留水	1時間
2重染色	酢酸ウラン	4分
	クエン酸鉛	3分

図3 電顕における Immunocolloid 法による染色過程

FLEX UFX-II (日本光学工業, 東京) にて観察, 写真撮影した。得られたカラーフィルム写真をカラー TV カメラ KY-M 280 (ビクター, 東京) にて画像を読みとり, 多目的画像処理装置 SPICCA II (東芝エンジニアリング, 東京) より色彩抽出法による2値画像処理を行った。*P. gingivalis* は赤色に, *T. denticola* は黄色に表示し, それぞれの画像をフィルムレコーダー CIR-310 (日本アビオニクス, 東京) を用いて撮影した。その後, *P. gingivalis*, *T. denticola* が表示されたそれぞれのカラースライドをカラーコピーPIXEL (キャノン, 東京) を用いて OHP シートに拡大コピーし, 2枚の像を1枚に合成し検索を行った。

結 果

1. 臨床所見

本実験に用いた被験歯14歯における臨床症状は, 表1に一括表示した。検索に用いた歯は, 上顎小臼歯2歯, 上顎大臼歯7歯, 下顎前歯1歯, 下顎小臼歯1歯, 下顎大臼歯3歯であった。また, 各歯における検索部位は, 舌・口蓋側面2歯, 近心側面12歯, 唇・頬側面及び遠心側面はなかった。歯周ポケットの深さは, 6mmが2歯, 7mmが4歯, 8mmが4歯, 9mmが1歯, 10mmが3歯であり, 歯齦の炎症程度は2ないし3であった。また, プロービング後の出血の有無はすべて陽性(+)であった。実験に供した歯の歯槽骨の吸収は70%以上で, 動揺度も2ないし3と顕著で保存

表1 患者別臨床所見

No	被験者	年齢	性別	部位	PD	GI	BOP	BL	M
1		42	M	2 舌側	8	2	+	80	3
2				6 近心側	7	2	+	80	2
3		42	M	7 近心側	8	2	+	70	3
4		40	M	5 近心側	7	2	+	70	3
5				6 近心側	10	2	+	80	2
6				7 近心側	10	3	+	80	3
7		46	F	5 口蓋側	8	2	+	80	2
8		39	M	5 近心側	6	2	+	70	3
9				6 近心側	7	2	+	60	3
10		50	F	6 近心側	10	2	+	70	2
11				7 近心側	8	2	+	70	2
12		59	F	7 近心側	7	2	+	70	2
13		44	F	7 近心側	6	2	+	80	3
14		42	M	6 近心側	9	2	+	90	3

PD: 歯周ポケットの深さ (mm)

GI: 歯齦の炎症程度

BOP: プロービング後の出血の有無

BL: 歯槽骨の吸収程度 (%)

M: 歯の動揺度

不可能と診断した。

根面の細菌叢検索にあたり, 根面に付与したノッチ形成部位より根表面に付着している歯根膜付着最歯冠側の範囲を検索した。その結果, 検索範囲が6mm以内が4歯, 8mm以内が7歯, 10mm以内が3歯であった。

2. 抗体の特異性試験

P. gingivalis FDC 381 株に対するウサギ免疫血清並びに colloidal gold 標識ヤギ抗ウサギ IgG 血清を当該培養菌体に作用させた結果, 菌体は多数の colloidal gold で標識された。この電子密度の高い15nmのparticleは, 菌体の表層に一致して標識されており, 菌体の内部にはほとんど認められなかった(図4)。同様な方法で, 他の黒色色素産生性嫌気性桿菌種での培養菌体に対しても行ったが, colloidal gold の付着は認められなかった(表2)。

抗 *T. denticola* ATCC 33520 株ウサギ免疫血清で同様に当該の培養菌体を作用させ colloidal gold で標識した結果, colloidal gold は, 軸糸を中心とする菌体表層に標識されていた(図5)。*T. denticola* ATCC

図 4 Colloidal gold で標識した *P. gingivalis* FDC 381 株 (×30,600)

図 5 Colloidal gold で標識した *T. denticola* ATCC 33520 株 (×34,600)

表 2 抗体の特異性試験

標準菌株	抗体	<i>P. gingivalis</i> FDC 381	<i>T. denticola</i> ATCC 33520
<i>P. gingivalis</i> FDC 381		+	—
<i>P. intermedia</i> ATCC 25611		—	—
<i>P. intermedia</i> ATCC 33563		—	—
<i>P. melaninogenica</i> ATCC 25845		—	—
<i>F. nucleatum</i> ATCC 25586		—	—
<i>T. denticola</i> ATCC 35404		—	+
<i>T. denticola</i> ATCC 35405		—	+
<i>T. denticola</i> ATCC 33520		—	+
<i>T. denticola</i> ATCC 33521		—	+
<i>T. socranskii</i> subsp.			
<i>buccale</i> ATCC 35534		—	—
<i>paredis</i> ATCC 35535		—	—
<i>socranskii</i> ATCC 35536		—	—
<i>T. vincentii</i> ATCC 35580		—	—
<i>T. pectinovorum</i> ATCC 33768		—	—

+: 強陽性

+: 弱陽性

—: 陰 性

35404, ATCC 35405, ATCC 33521 株菌体も, 本 *T. denticola* 供試抗体によって多くの colloidal gold で標識された。本供試抗体で *T. socranskii*, *T. vincentii*, *T. pectinovorum* の培養菌体を染色したが, colloidal gold で標識されず, 交差反応性は認めなかった (表 2)。

なお, 光学顕微鏡レベルでの IGSS 法においても褐色ないし黒褐色の染色は, 同菌種培養菌体にのみ認められた。

3. 光学顕微鏡所見

1) A 群

根表面の歯齦縁下プラークにおける黒褐色に染色される *P. gingivalis* は, わずかに点在して認められた (図 6 a, b)。この部位におけるプラークの層は薄く, 表層から下層にかけて主にトルイジン青に濃染される線状の菌が根面に対して直角に柵状を成して配列していた。同一連続切片に抗 *T. denticola* 血清にて免疫組織化学的染色を施したところ, *T. denticola* の存在を示す黒褐色の染色はほとんど認められなかった (図 6

図 6 A群 IGSS 法による染色像

- a : *P. gingivalis* (黒褐色) はほとんど認められない (×160)。
 b : a の画像解析 *P. gingivalis* (赤色)
 c : *T. denticola* (黒褐色) はほとんど認められない (×160)。
 d : c の画像解析 *T. denticola* (黄色)
 e : b, d の画像合成像
P. gingivalis, *T. denticola* の特異な位置的関係は認められない。

c)。しかし色彩抽出法により *T. denticola* を黄色に表示したところ、*T. denticola* は、*P. gingivalis* と異なりプラーク表層部に点在するのが確認できた (図 6 d)。

P. gingivalis と *T. denticola* の分布のお互いの位置的关系を確認するために、同一画面上で処理した結果、この群では *P. gingivalis* 及び *T. denticola* はわずかにあり、両者の局在に關係は認められなかった (図 6

図 7 B群 IGSS 法による染色像

- a : *P. gingivalis* (黒褐色) はプラーク表層よりやや下層で認められる (×100)。
 b : a の画像解析 *P. gingivalis* (赤色)
 c : *T. denticola* (黒褐色) はプラーク最表層に集簇している (×100)。
 d : c の画像解析 *T. denticola* (黄色)
 e : b, d の画像合成像
T. denticola はプラーク最表層に集簇し、*P. gingivalis* はその下層で散在性に認められる。

e)。

2) B群

この群での歯齦縁下プラークは、A群に比べ層の厚さを増しているものが多かった。*P. gingivalis* を示す黒褐色に染色された菌体は多く、表層よりやや下層部で带状に存在し、大小の塊状を成して散在していた (図 7 a)。色彩抽出法により画像処理を施したところ、*P.*

図 8 C群 IGSS 法による染色像

- a : *P. gingivalis* はプラーク表層からやや下層にかけて層状を成して存在している (×50)。
- b : a の画像解析 *P. gingivalis* (赤色)
- c : *T. denticola* はプラーク最表層で層状を成して存在している (×50)。
- d : c の画像解析 *T. denticola* (黄色)
- e : b, d の画像合成像
プラーク表層部において, *T. denticola* が集簇する直下には *P. gingivalis* が集簇している。

gingivalis を示す赤色に見える菌体は, 図 7 a における黒褐色の存在する位置に一致して, 表層よりやや下層部に散在性に分布していた (図 7 b)。

T. denticola を示す黒褐色に染色される菌体は, プラーク表層部に認められ凝集した大きな細菌塊として存在していた (図 7 c)。色彩抽出法でも *T. denticola* を

図 9 D群 IGSS 法による染色像

- a : *P. gingivalis* (黒褐色) はプラーク全域にわたって散在している (×80)。
- b : a の画像解析 *P. gingivalis* (赤色)
- c : *T. denticola* (黒褐色) はプラーク全域にわたって散在している (×80)。
- d : c の画像解析 *T. denticola* (黄色)
- e : b, d の画像合成像
プラーク全域にわたり *P. gingivalis*, *T. denticola* は, 近接して存在している。

示す黄色点の凝集を確認することができた (図 7 d)。

この部位のプラークにおける *P. gingivalis* と *T. denticola* の存在を同一画面で検索した結果, 特徴的な位置的関係は認められなかった。*P. gingivalis* はプラークの表層よりやや下層部に多数散在性に認められ, *T. denticola* は *P. gingivalis* とは距離をおいてプラークの表層部に塊状を成して分布していた (図 7 e)。

図 10 A群 プラーク表層部の *P. gingivalis* 染色像

線状や紡錘状の菌の束状配列が認められ、グラム陽性あるいはグラム陰性と思われる細菌が混在している。colloidal gold の付着は認められない ($\times 7,300$)。

3) C群

この群においては、根表面に形成されたプラークの層は厚みを増して、表層部には test-tube brush 様の細菌塊も認められた。また、付着したプラークから離れた部位にも、小さな塊状を成す細菌が認められた。さらに、周囲には多数の白血球も認められた。

IGSS 法により染色された *P. gingivalis* と *T. denticola* の菌体は、A群、B群に比べ多く観察された(図 8 a, c)。 *P. gingivalis* は、プラークの表層よりやや下層で帯状を成して集簇し、根面に近い部位では散在性に分布していた(図 8 b)。 *T. denticola* は、プラーク最表層部を覆う様に層状を成して存在していた(図 8 d)。

この部における両菌種の分布関係は、 *T. denticola* が集簇するプラーク直下に *P. gingivalis* が連なるように集簇する特徴が認められた(図 8 e)。

4) D群

この群の歯齦縁下プラークは、根面から菌体が密に凝集して存在する細菌塊と鬆粗に分布する細菌塊とが

混在して観察された。IGSS 法で黒褐色に染色され、それを画像処理した像からも *P. gingivalis* と *T. denticola* は、プラーク全体にわたり多数認められた(図 9 a, b, c, d)。

色彩抽出法により両菌種の位置的関係を検索したところ、 *P. gingivalis* を示す赤色点、 *T. denticola* を示す黄色点は、多くの場合近接して混在していた。また一部では、赤色点、黄色点は一致して分布する特徴が認められた(図 9 e)。

4. 電子顕微鏡所見

光学顕微鏡によって *P. gingivalis*, *T. denticola* の存在が認められた部位に関して、光学顕微鏡標本と同一標本下で電子顕微鏡を用いて観察した。

1) A群

この部における歯齦縁下プラーク表層部は、様々な細菌から構成されていた。すなわち、線状の菌や紡錘状の菌など細菌は根面に対して垂直的に分布し、直線状に配列しているのが観察された。さらにそれら周囲には、球菌か桿菌の区別しにくい細菌が多数存在し、

図 11 B群 プラーク表層部の *P. gingivalis* 染色像
 種々な細菌が混在する中で *P. gingivalis* は散在性に認められる (矢印) ($\times 6,000$)。
 挿入図: □の拡大像, colloidal gold で標識された *P. gingivalis* ($\times 26,600$)

図 12 B群 プラーク表層部の *T. denticola* 染色像
 細菌が鬆粗に分布する中で *T. denticola* は散在性に認められる (矢印)。
 グラム陰性と思われる菌体を多く認める ($\times 7,000$)。
 挿入図: □の拡大像, colloidal gold で標識された *T. denticola* ($\times 38,600$)

図 13 C群 プラーク表層部の *T. denticola* 染色像

プラーク最表層部は *T. denticola* (T.d) により占められており、その下層では球桿菌様の菌体が集簇している。test-tube brush 様の細菌塊 (B) (×4,600)

スピロヘータの散在も確認できた。また細胞壁の形態からグラム陽性と思われる菌やグラム陰性菌と思われるものが混在していた (図 10)。

P. gingivalis, *T. denticola* に対する抗体で処理したところ, colloidal gold を付着する菌体は, わずかに検出されるのみであった。

2) B群

光学顕微鏡的検索で *P. gingivalis*, *T. denticola* が検出された部位の歯齦縁下プラークは, 個々の細菌が鬆粗に配列し分布していることが確認できた。A群に比較して, グラム陽性と思われる菌体は少なく, グラム陰性と思われる菌体は多数観察された。また紡錘状の菌や大型の菌が一部に認められた。

P. gingivalis に対する抗体で標識された菌体は散在性に分布することが認められ, colloidal gold は, 菌体の表層に多く観察された (図 11)。

T. denticola に対する抗体で標識された菌体は, 散在性に多数観察された。*T. denticola* を標識した colloidal gold は, 主に菌体の軸系に付着していた (図 12)。

3) C群

歯齦縁下プラーク表層よりやや下層に密に集簇する細菌の大きさ及び染色性はまちまちであった。プラークの表層には, 層を成して多くのスピロヘータが存在していた。これらスピロヘータの多い層には, 大型で紡錘状の菌体の散在も認められた。さらに所々に鞭毛

図 14 C群 プラーク最表層よりやや下層部の *P. gingivalis* 染色像
スピロヘータ (S) が存在する直下には *P. gingivalis* (P.g) の集簇を認める (×6,300)。
挿入図：□の拡大像, colloidal gold で標識された *P. gingivalis* (×17,300)

図 15 C群 プラーク最表層部の *T. denticola* 染色像
T. denticola (T.d) の著明な集簇を認める (×5,300)。
挿入図：□の拡大像, colloidal gold で標識された *T. denticola* (×22,600)

図 16 a D群 プラーク中層部の *T. denticola* 染色像
T. denticola はランダムに配列している (×7,300)。

を有する菌体が認められた。一部では、線状の菌を芯とする test-tube brush 様の細菌塊が認められた。この部位のプラークを *P. gingivalis* 及び *T. denticola* に対する抗体で標識した結果、表層には *T. denticola* が多く、その下層には *P. gingivalis* が多く局在することが認められた (図 13)。

表層よりやや下層に位置するプラークには、*P. gingivalis* に対する抗体で標識された菌体が高密度に存在し、部分的にはほとんどが colloidal gold 標識の菌体で占められていた。また周囲には、菌体の表層に colloidal gold を付着させないグラム陰性と思われる菌体や大型で紡錘状の菌体が、数は少ないものの隣接して存在しているのが観察された (図 14)。

プラーク表層部に局在する colloidal gold で標識された *T. denticola* は、他の細菌をほとんど混在させていなかった。付近に紡錘状の菌あるいは線状の菌から成る test-tube brush 様の形態をした菌の集団が観察された。部分的には、*T. denticola* 菌体の縦断像あるいは横断像が示され、それら部位で同じ方向の菌体が密集していることがわかった。標識された *T. denticola* 菌体周囲には、軸糸の構造物も観察された (図 15)。

4) D群

この部位における歯齦縁下プラークを構成する細菌は、菌の大きさ、染色性、細胞壁や外膜構造さらには

図 16 b 図 16 a □ の拡大像
T. denticola (T.d) に近接し、グラム陰性桿菌と思われる菌体を認める (×29,300)。

菌の配列などまちまちであった。*T. denticola* に対する抗体で標識された菌体は、優位を占め、グラム陰性桿菌と思われる菌体が混在していた (図 16 a, b)。一

図 17 D群 プラーク中層部の *P. gingivalis* 染色像

P. gingivalis (P.g) の菌体周囲に多数のスピロヘータ (S) を認める (×24,000)。

図 18 D群 プラーク中層部の *P. gingivalis* 染色像

colloidal gold は *P. gingivalis* (P.g) の菌体及び周囲の vesicles (V) にも標識されている (×24,000)。

方, *P. gingivalis* に対する抗体で標識された菌体も多数存在していた。標識された *P. gingivalis* 菌体周囲には, 多数のスピロヘータが観察された(図 17)。この部位のプラークでは, *P. gingivalis* と *T. denticola* が混在する傾向があった。さらにこの部位のプラークは, 豊富な菌体間物質で占められていた。Colloidal gold は, *P. gingivalis* 菌体表層に認められるばかりでなく, 菌体周囲に認められる vesicles にも一部付着しているのが観察された (図 18)。

考 察

P. gingivalis は, その精製抗原によりいくつかの serotype に分類されることが明らかにされている^{39,40)}。しかし *P. gingivalis* は, 本菌種に共通する多くの抗原を有することが示されている⁴¹⁾。著者が本実験で用いた *P. gingivalis* FDC 381 株に対する抗血清は, 他の serotype に属する菌株とも交差反応性のあることが確認されている²⁴⁾。また, 供試したこの抗血清は, 免疫組織化学的に他の菌種と交差反応性を示さず, 本菌種に特異的な抗体であることが確認できた。本研究では, *T. denticola* ATCC 33520 株の全菌体に対す

るウサギ免疫血清は, 他の口腔内 *Treponema* 菌種との交差反応を避ける目的で, 口腔内の他の *Treponema* 全菌体を用いて吸収操作を行った。調整した *T. denticola* ATCC 33520 株に対する抗血清は, 他の菌種と反応性を示さず, 本菌種に特異的な抗体であることを確認した。

光学顕微鏡的検索に用いた IGSS 法は, 電子顕微鏡的検索に比較して強く標識される傾向を示した。この方法は, 歯齦縁下プラーク中のどの部位に *P. gingivalis* 及び *T. denticola* が局在しているかを観察し比較検討する上で有効な方法であることを確認することができた。

Saglie⁴²⁾ は, 歯周ポケット内における最根端側部のプラークを走査型電子顕微鏡を用いて形態学的に観察しているが, 歯周ポケットの深さによる違いを考慮していない。また Douglass ら⁴³⁾ も同様に, 8-12 mm の歯周ポケット内のプラークの細菌の形態について, 歯冠側部, 中央部, 根端側部に分け, 成人性歯周炎患者と若年性歯周炎患者を比較検討しているが, 歯周ポケットの深さによる詳細な検討がなされていない。歯周炎の進行程度によって歯周ポケット底部の環境は異な

り、それに伴い細菌叢が変化することが十分に考えられる。本研究では深さ別に検討を加え、歯周ポケットの深さが異なる歯周ポケット底部における *P. gingivalis* と *T. denticola* の検出傾向は明らかに異なることを見出した。すなわち、6 mm の深さの歯周ポケット底の細菌の形態や分布は、10 mm の歯周ポケットを有する歯の歯齦縁から 4-6 mm 付近の歯周ポケット内細菌のそれらと類似していた。この知見は、歯周ポケットの深さがその細菌叢に強く影響を与えていることを示唆するものであろう。

ヒト歯周ポケット内細菌叢の培養学的検索において、Tanner ら⁴⁾は、*P. gingivalis* は歯周ポケットの浅いものに比較し深いもので多く検出されることを示している。White と Mayrand ら⁵⁾も、*P. gingivalis* を中心とする黒色色素産生性嫌気性桿菌群は、歯周ポケット 4 mm 未満のものに比較して 6 mm 以上の歯周ポケットでは有意に多いことを示している。一方、暗視野顕微鏡にてスピロヘータの細菌叢中に占める割合を検索した Armitage ら¹¹⁾は、歯周ポケットの深さやアタッチメントロスの増加に伴いその割合が増加することを報告している。Evian ら¹²⁾もスピロヘータの割合は、歯周ポケットの深さに比例して増加することを示している。また Simonson ら⁴⁴⁾は、*T. denticola* には血清型の異なる株が存在していることを明らかにすると共に、*T. denticola* ATCC 33520 serovar c に対するモノクロナール抗体を調整、ELISA にて歯齦縁下細菌叢を検索した。その結果、6 mm 以上の歯周ポケットを有するサンプルでは 4-6 mm の歯周ポケットを有するサンプルの 2 倍量の検出結果が得られたことを報告した。両菌種の分布に関する本研究結果は、これらの知見と一致していた。すなわち、根面の歯齦縁下プラークにおける *P. gingivalis* と *T. denticola* の分布状態を検索した結果、歯周ポケットの歯齦縁部に近い部位では、両菌種共ほとんど検出されなかった。そして歯周ポケットの深さが増すにつれ、両者は増加することが明らかとなった。

Listgarten³⁴⁾ は、病型別に根面に付着したプラークを透過型電子顕微鏡にて検索し、成人性歯周炎の最根端側部には、線状の菌は少なく、小型の細菌が方向性を有さず細菌塊を形成しているのを明らかにしている。また、多数のグラム陰性桿菌とスピロヘータの存在をプラーク表層部に認めている。また Newman⁴⁵⁾ は、走査型電子顕微鏡を用いて根端側部のプラーク中に test-tube brush 形態を成す細菌塊や表層部を被覆

するスピロヘータを観察している。著者の研究結果は、形態学的にはほぼ今までの知見と一致した所見であった。さらに、本研究において抜去歯のプラークを直接免疫組織化学的方法で検索したことによって、*P. gingivalis* と *T. denticola* が存在している部位は、歯周ポケット底部では浮遊したプラーク全域に、他の部位では歯齦組織に近い部分に局在していることを明らかにした。また、スピロヘータの大部分が *T. denticola* であることを明確にした。すなわちこのことは、paper point 等を用いて歯周局所からサンプリングしてくる培養法などでは得られなかった歯齦縁下プラーク中における *P. gingivalis*、*T. denticola* の分布を明確にし、病因論における両菌種の役割が大きいことを示唆した。

深い歯周ポケットでは、表層に *T. denticola* が存在し、その下層に *P. gingivalis* が存在する傾向を明らかにした。また歯周ポケット底部では、*P. gingivalis* と *T. denticola* の両菌種が近接して局在していることを明らかにした。歯周ポケット内への細菌の定着に関与する因子として、女川ら⁴⁶⁾は、*P. gingivalis* の菌体が *T. denticola* の菌体と強い共凝集活性を有していることを明らかにしている。また Grenier⁴⁷⁾は、*T. denticola* は溶血性並びに血球凝集性を有することから、歯周ポケット内でヘモグロビンを放出させ、ヘミン依存性細菌である *P. gingivalis* などの増殖を助長する可能性のあることを述べている。さらに黒色色素産生性嫌気性桿菌群は代謝産物として有機酸を産出するが、これら代謝産物が *Treponema* の増殖に関与していることも考えられる。本研究により、この両菌種が複雑な歯周ポケット内の環境下で共存関係を保つことができることを示したと言えよう。

歯周ポケット底部で *P. gingivalis* と *T. denticola* が優位に存在している部位には、菌体間に多数の vesicles が観察された。Vesicles は、多くのグラム陰性桿菌群によって産生されることが報告されている⁴⁸⁾。Deslauriers ら⁴⁹⁾は、*P. gingivalis* が産出する vesicles には lipopolysaccharide が存在することを明らかにしている。また Smalley ら⁵⁰⁾は、病原性の強い *P. gingivalis* 菌株の vesicles は type I collagen を破壊する活性が強いことを明らかにしている。両菌体の歯周組織破壊性の病原性に加えて、深い歯周ポケット底部に存在する vesicles も、歯周炎の進行に深く関与していることが考えられる。

本研究は、歯齦縁下プラークにおける *P. gingivalis*,

T. denticola の分布状態について明確にした。歯齦縁から 4-6 mm 部位より明らかに検出され、歯周ポケットの深さが増すに従いその検出量も増加するという研究結果は、臨床的にも与える情報は大きいものと考えられる。Waerhaug⁵¹⁾ は、スケーリング操作において 3 mm 以上の歯周ポケットになると器具の到達性は不完全になり、さらに残存した部位から細菌叢は再形成される可能性を示している。また、松尾⁵²⁾ も歯周ポケットの深さが 5 mm 以上になるとスケーリング・ルートプレーニングの効果は期待できないと報告している。多様な病原性を有する *P. gingivalis*, *T. denticola* が歯周ポケット底部に優位に生息していることを明らかにした本知見は、深い歯周ポケットを有する歯周治療における両菌種の排除の困難さを示唆したものと言える。

結 論

本研究は、進行した成人性歯周炎における歯齦縁下プラーク中の *P. gingivalis*, *T. denticola* の分布状態を検討する目的で行った。

研究対象は、歯周ポケット 6 mm 以上を有する成人性歯周炎罹患抜去歯とした。歯齦縁相当部位より根端側方向に 0-2 mm, 2-4 mm, 4-6 mm, 6 mm 以上の 4 部位に分けて、免疫組織化学的に、また画像解析を用いて検索した。

1. 0-2 mm の根面の歯齦縁下プラークでは、グラム陽性あるいはグラム陰性と思われる球桿菌様の菌体が混在し、線状や紡錘状の菌体は束状を成して配列していた。この部では、*P. gingivalis*, *T. denticola* はほとんど認められなかった。

2. 2-4 mm の歯齦縁下プラークでは、細菌は比較的鬆粗に分布しており、0-2 mm のプラークに比べグラム陰性と思われる菌体の出現は高くなっていた。*P. gingivalis* はプラークの表層よりやや下層に、*T. denticola* は表層部に散在していた。

3. 4-6 mm の歯齦縁下プラークでは、細菌は密に形成され、その表層はスピロヘータが存在し、その下層ではグラム陰性と思われる菌体で占められていた。*T. denticola* は、これらプラーク表層を覆うように層状に存在していた。また *P. gingivalis* は、*T. denticola* が局在する直下に集簇して存在していた。

4. 6 mm 以上の歯齦縁下プラークでは、菌体が密に凝集して存在する細菌塊と鬆粗に分布する細菌塊と

が混在していた。多数のグラム陰性と思われる菌体やスピロヘータによって占められ、多量の菌体間物質も認められた。*P. gingivalis*, *T. denticola* は、これらプラーク全域にわたって多数検出され、*P. gingivalis* が検出された菌体周囲には多数の *T. denticola* が集簇していた。

以上の結果から、成人性歯周炎において *P. gingivalis*, *T. denticola* は、共存関係をもって歯齦組織に近い歯齦縁下プラーク表層や歯周ポケット深部で優勢に存在し、歯周炎の進行に重要な役割を担ってい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第二講座主任山田 了教授に深謝致します。並びに、ご懇切なるご校閲、ご教示を賜った本学微生物学講座奥田克爾教授に深謝致します。また、本研究遂行に際し、数々のご指導、ご助言を頂いた石原和幸博士、清田 築博士に感謝致します。併せて、数々のご協力を頂いた、本学歯科保存学第二講座、微生物学講座の各位に厚く御礼申し上げます。

文 献

- 1) Dzink, J.L., Tanner, A.C.R., Haffajee, A.D. and Socransky, S.S.: Gram negative species associated with active destructive periodontal lesions, J. Clin. Periodontol., 12: 648-659, 1985.
- 2) 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.
- 3) Okuda, K., Slots, J. and Genco, R.J.: *Bacteroides gingivalis*, *Bacteroides asaccharolyticus*, and *Bacteroides melaninogenicus* subspecies: cell surface morphology and adherence to erythrocytes and human buccal epithelial cells. Curr. Microbiol., 6: 7-12, 1981.
- 4) 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.
- 5) White, D. and Mayrand, D.: Association of oral *Bacteroides* with gingivitis and adult periodontitis. J. Periodont. Res., 16: 259-265, 1981.
- 6) Robertson, P.B., Lantz, M., Marucha, P.T., Kornman, K.S., Trummel, C.L. and Holt, S.C.: Collagenolytic activity associated with *Bacteroides* species and *Actinobacillus actinomycetemcomitans*.

- J. Periodont. Res., 17 : 275-283, 1982.
- 7) Uitto, V-J., Haapasalo, M., Laakso, T. and Salo, T. : Degradation of basement membrane collagen by proteases from some anaerobic oral microorganisms. Oral Microbiol. Immunol., 3 : 97-102, 1988.
 - 8) 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. Dent. Res., 63 : 412-421, 1984.
 - 9) 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 : 570-577, 1986.
 - 10) 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 : 316-323, 1988.
 - 11) 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.
 - 12) Evian, C.I., Rosenberg, E.S. and Listgarten, M.A. : Bacterial variability within diseased periodontal sites. J. Periodontol., 53 : 595-598, 1982.
 - 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 : 540-552, 1985.
 - 14) 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.
 - 15) Listgarten, M.A. and Socransky, S.S. : Electron microscopy as an aid in the taxonomic differentiation of oral spirochetes. Arch. Oral Biol., 10 : 127-138, 1965.
 - 16) Smibert, R.M., Johnson, J.L. and Ranney, R.R. : *Treponema socranskii* sp. nov., *Treponema socranskii* subsp. *socranskii* subsp. nov., *Treponema socranskii* subsp. *buccale* subsp. nov., and *Treponema socranskii* subsp. *paredis* subsp. nov. Isolated from the human periodontia. Int. J. Syst. Bacteriol., 34 : 457-462, 1984.
 - 17) Smibert, R.M. and Burmeister, J.A. : *Treponema pectinovorum* sp. nov. Isolated from humans with periodontitis. Int. J. Syst. Bacteriol., 33 : 852-856, 1983.
 - 18) Laughon, B.E., Syed, S.A. and Loesche, W.J. : API ZYM system for identification of *Bacteroides* spp., *Capnocytophaga* spp., and spirochetes of oral origin. J. Clin. Microbiol., 15 : 97-102, 1982.
 - 19) Boehringer, H., Taichman, N.S. and Shenker, B. J. : Suppression of fibroblast proliferation by oral spirochetes. Infect. Immun., 45 : 155-159, 1984.
 - 20) Weinberg, A. and Holt, S.C. : Interaction of *Treponema denticola* TD-4, GM-1, and MS25 with human gingival fibroblasts. Infect. Immun., 58 : 1720-1729, 1990.
 - 21) Shenker, B.J., Listgarten, M.A. and Taichman, N. S. : Suppression of human lymphocyte responses by oral spirochetes : a monocyte-dependent phenomenon. J. Immunol., 132 : 2039-2045, 1984.
 - 22) 石原和幸 : 免疫応答に及ぼす口腔 *Treponema* の影響. 歯科学報, 88 : 1833-1845, 1988.
 - 23) Loesche, W.J., Syed, S.A. and Stoll, J. : Trypsin-like activity in subgingival plaque. A diagnostic marker for spirochetes and periodontal disease? J. Periodontol., 58 : 266-273, 1987.
 - 24) Seida, K., Saito, A., Yamada, S., Ishihara, K., Naito, Y. and Okuda, K. : A sensitive enzymatic method (SK-013) for detection of *Treponema denticola*, *Porphyromonas gingivalis* and *Bacteroides forsythus* in subgingival plaque samples. J. Periodont. Res., 27 : 86-91, 1992.
 - 25) Savitt, E.D., Strzempko, M.N., Vaccaro, K.K., Peros, W.J. and French, C.K. : Comparison of cultural methods and DNA probe analyses for the detection of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Bacteroides gingivalis*, and *Bacteroides intermedius* in subgingival plaque samples. J. Periodontol., 59 : 431-438, 1988.
 - 26) Berthold, P., Lai, C.-H. and Listgarten, M.A. : Immunoelectron microscopic studies of *Actinomyces viscosus*. J. Periodont. Res., 17 : 26-40, 1982.
 - 27) Berthold, P. and Listgarten, M.A. : Distribution of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in localized juvenile periodontitis plaque : an electron immunocytochemical study. J. Periodont. Res., 21 : 473-485, 1986.
 - 28) Löe, H. and Silness, J. : Periodontal disease in pregnancy. I. Prevalence and severity. Acta Odontol. Scand., 21 : 533-551, 1963.
 - 29) Ainamo, J. and Bay, I. : Problems and proposals for recording gingivitis and plaque. Int. Dent. J., 25 : 229-235, 1975.
 - 30) Schei, O., Waerhaug, J., Lovdal, A. and Arno, A. : Alveolar bone loss as related to oral hygiene and age. J. Periodontol., 30 : 7-16, 1959.
 - 31) Ohta, K., Makinen, K.K. and Loesche, W.J. : Purification and characterization of an enzyme produced by *Treponema denticola* capable of hydrolyzing synthetic trypsin substrates. Infect. Immun., 53 : 213-220, 1986.

- 32) Armbruster, B.L., Carlemalm, E., Chiovetti, R., Garavito, R.M., Hobot, J.A., Kellenberger, E. and Villiger, W.: Specimen preparation for electron microscopy using low temperature embedding resins. *J. Microsc.*, 126 : 77-85, 1982.
- 33) 村田長芳, 菅沼龍夫, 津山新一郎, 鈴木信太郎: 新水性樹脂 Lowicryl K4M 簡便包埋法とその超薄切片染色法への応用. *細胞*, 17 : 217-220, 1985.
- 34) 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.
- 35) 堤 寛: その他の光顕的免疫組織化学, 渡辺慶一, 中根一穂, 酵素抗体法, 学際企画, 東京, 1985, 102-121
- 36) Springall, D.R., Hacker, G.W., Grimelius, L. and Polak, J.M.: The potential of the immunogold-silver staining method for paraffin sections. *Histochemistry*, 81 : 603-608, 1984.
- 37) Taylor, C.R.: 齋藤 脩, 水口國雄: 免疫病理診断法, 基礎と実際, 医学書院サウンダース, 1987, 23-42.
- 38) Faulk, W.P. and Taylor, G.M.: An immunocolloid method for the electron microscope. *Immunochimistry*, 8 : 1081-1083, 1971.
- 39) Fisher, J.G., Zambon, J.J., Chen, P. and Genco, R. J.: *Bacteroides gingivalis* serogroups and correlation with virulence. *J. Dent. Res.*, 65 : 817 (Abstract), 1986.
- 40) 石川恵理子, 熊田秀文, 梅本俊夫: *Bacteroides gingivalis* の血清型分類およびグループ特異抗原の精製. *歯基礎誌*, 31 : 647-655, 1989.
- 41) Okuda, K., Ohta, K., Kato, T., Takazoe, I. and Slots, J.: Antigenic characteristics and serological identification of 10 black-pigmented *Bacteroides* species. *J. Clin. Microbiol.*, 24 : 89-95, 1986.
- 42) Saglie, R.: A scanning electron microscopic study of the relationship between the most apically located subgingival plaque and the epithelial attachment. *J. Periodontol.*, 48 : 105-115, 1977.
- 43) Douglass, K.D., Cobb, C.M., Berkstein, S. and Killoy, W.J.: Microscopic characterization of root surface-associated microbial plaque in localized juvenile periodontitis. *J. Periodontol.*, 61 : 475-484, 1990.
- 44) Simonson, L.G., Goodman, C.H. and Morton, H. E.: Quantitative immunoassay of *Treponema denticola* serovar c in adult periodontitis. *J. Clin. Microbiol.*, 28 : 1493-1496, 1990.
- 45) Newman, H.N.: The apical border of plaque in chronic inflammatory periodontal disease. *Brit. Dent. J.*, 141 : 105-113, 1976.
- 46) 女川瑞夫, 山中あゆみ, 石原和幸, 内藤祐子, 高添一郎, 奥田克爾: *Porphyromonas gingivalis* の共凝集性. *歯基礎誌 (補冊)* 33 : 106, 1991.
- 47) Grenier, D.: Characteristics of hemolytic and hemagglutinating activities of *Treponema denticola*. *Oral Microbiol. Immunol.*, 6 : 246-249, 1991.
- 48) Woo, D.D.L., Holt, S.C. and Leadbetter, E.R.: Ultrastructure of *Bacteroides* species: *Bacteroides asaccharolyticus*, *Bacteroides fragilis*, *Bacteroides melaninogenicus* subspecies *melaninogenicus*, and *B. melaninogenicus* subspecies *intermedius*. *J. Infect. Dis.*, 139 : 534-546, 1979.
- 49) Deslauriers, M., ní Eidhin, D., Lamonde, L. and Mouton, C.: SDS-PAGE analysis of protein and lipopolysaccharide of extracellular vesicles and sarkosyl-insoluble membranes from *Bacteroides gingivalis*. *Oral Microbiol. Immunol.*, 5 : 1-7, 1990.
- 50) Smalley, J.W., Birss, A.J. and Shuttleworth, C.A.: The degradation of type I collagen and human plasma fibronectin by the trypsin-like enzyme and extracellular membrane vesicles of *Bacteroides gingivalis* W50. *Arch. Oral Biol.*, 33 : 323-329, 1988.
- 51) Waerhaug, J.: Healing of the dento-epithelial junction following subgingival plaque control. II : As observed on extracted teeth, *J. Periodontol.*, 49 : 119-134, 1978.
- 52) 松尾良平: スケーリング, ルートプレーニングの歯肉縁下歯根面における器具操作の効果について. *日歯周誌*, 25 : 80-97, 1983.

連絡先:

東京歯科大学歯科保存学第二講座

〒261 千葉市美浜区真砂1丁目2番2号