

長期プラークの電顕的観察

山 田 敏 彦 永 山 元 彦 竹 内 宏

朝日大学歯学部口腔病理学講座

抄録 代表的なbiofilmの1つであるプラークにおいて、1~2週経過したものが齲蝕症や歯周炎の原因になる可能性が最も高い。このような齲蝕原因菌や歯周炎原因菌の個々についてはかなり明らかにされているが、これらがプラーク中においてどのような増殖性を示すのかは十分に知られていない。そこで今回、天然歯エナメル質に極めて類似した組成から成るcarbonate apatite (CAP) 薄膜をヒト大臼歯に装着し、装着後8日から20日間にわたる歯肉縁上プラーク中の細菌の様相について形態学的に検索した。

その結果、CAP面上に形成されたプラークは、同時に行った口腔清掃不良状態のヒト天然歯面のプラークの形態と本質的に変わりのないこと、また、8日以降のいわゆる古いプラークでは、若干の変化はあるものの菌叢は顕著には変化せず、かなりの定常状態を示すことが明らかになった。この中でとりわけ定常状態を示すのは、ペリクル付着細菌であるグラム陽性桿菌(initial colonizer)とその表層に増殖するグラム陰性線状菌(secondary colonizer)であり、それら2菌種はほとんどのプラークにおいて定常的な2層構造をなしていた。さらにこれらの表層にグラム陰性球菌や桿菌が数多くコロニーを形成し、グラム陽性球菌は絶えず増多と消退を反復する傾向を示した。

以上のように、齲蝕症や歯周炎の発症に関係深いとされる時期のプラークは、特定のinitial colonizerとsecondary colonizerが形成するframeworkを中心とした細菌増殖より成ることが明らかにされた。

キーワード: デンタルプラーク, プラーク細菌, 走査電顕, 免疫電顕, 炭酸含有アパタイト

緒 言

プラークには、齲蝕症や歯周炎の病原細菌^{1~13)}のほか、多種類の細菌が生息しているが、プラーク中で旺盛に増殖して量的に優位を占める時期はそれぞれに違いがある。例えば、齲蝕原性細菌はプラーク形成開始より3日前後に、歯周病原性細菌は6日前後以降に旺盛に増殖することが知られている^{14~23)}。しかし、齲蝕症と歯周炎(歯肉炎)の発症はこれら病原性細菌の著しい増殖時期とは必ずしも一致しないようである。この点に関して、Ritz¹⁵⁾やRosan and Lamont²⁴⁾はプラーク形成過程をearly plaqueとmature plaqueに分け、early plaqueは清掃で取り除かれるために病原性発揮の可能性は低く、むしろmature plaqueにおいてその危険性が高まるとしている。また、実験的にvon der Fehr²⁵⁾は、志願者に口腔清掃停止と50%シュクロースによる9日間洗口試験を試みることによって、2~3週間で齲蝕

の発症を、またTheilade *et al.*²⁶⁾は志願者の口腔清掃停止、数日後に歯肉炎の発症を認めている。

このように、口腔の2大疾患である齲蝕症と歯周炎の発症には成熟した古いプラークが深く関わっていることが明らかにされているものの、その実態および形成過程等についての詳細な検索は未だ究められていない。そこで今回、これら疾患の発症時期に一致するヒトの歯肉縁上プラークにおける細菌構成の経時的な変化を形態学的に明らかにすることを目的として、ヒト歯牙表面に8日から20日間にわたって装着したcarbonate apatite (CAP) 薄片上、口腔清掃を停止した志願者の天然歯面上、および口腔内不潔状態下のプラークを3群に分けてそれぞれを電顕的および免疫電顕的に観察した。

材料と方法

1. CAP面上のプラーク観察

天然歯面プラークの形成過程を多くの材料を用いて詳細に検索するには種々の制約があり、十分な結果を

本論文要旨の一部は第125回岐阜歯科学会例会(平成10年11月28日)岐阜において発表した。
(平成14年3月20日 受理)

得ることができない。そこで、この点を解決するために、天然歯エナメル質に最も近い組成を有するCAPを天然歯歯面に装着する方法を試みた。

1) CAP面上プラークの採取

Doi *et al.*²⁷⁾の方法に準じて調製したCAP粉末(C/P = 1)を直径5 mmの円柱棒とし、これを真空パックに密封後、手動水力圧縮機で5分間、2000kgで加圧し、750℃で2時間焼結して最終炭酸重量パーセントが3.0の円柱棒状のCAPを作製した。これを1.0~1.2mmの厚さに切断して研磨後粒子径1 μ mのダイヤモンドスラリー(マルトー, 東京)にて鏡面研磨し、最終厚さを0.70~0.72mmとし、さらに歯面への装着時に咬合干渉を避けるために4.0×3.0mmの楕円形になるように整形した。これを男女志願者20名(年齢20~30歳)の上顎第一大臼歯の頬側および口蓋側歯頸部付近に矯正用接着性光重合レジン(Trans bond, 3M, 東京)で装着した後、同部のみのブラッシング停止を8日~20日間にわたって依頼し、各日に頬側および口蓋側の両面のCAPを剥離することによってプラークを採取した。

2) 電顕観察試料の作製

CAP面上のプラークは透過型電子顕微鏡(TEM, JEM-1200EX, 日本電子, 東京)および走査型電子顕微鏡(SEM, S-4500, 日立, 東京)で観察した。なお, SEM観察は表面だけでなく、切断面からの観察(断面SEM)を加えた。

(1) TEM観察用試料の作製

8日から20日間の各日に採取したCAPを, Karnovsky固定液(4% paraformaldehyde, 0.1% glutaraldehydeを含む0.2M cacodylate buffer, pH7.2)²⁸⁾で室温下にて24時間, さらに四酸化オスmium固定液(1% osmium tetroxideを含む0.2M cacodylate buffer, pH 7.2)で室温下にて4時間固定した後, 上昇アセトン系列で脱水し, 樹脂(EPON 812レジン, TAAB, London, UK)に包埋した。これを10%EDTA(ethylenediamine tetraacetic acid, pH7.2)でCAPを脱灰し, ダイヤモンドナイフ(DIATOME, 日新EM, 東京)を用いて厚さ約70nmの超薄切片とし, 1%(W/V)uranyl acetateと1%(W/V)lead citrateで二重電子染色を施して観察試料とした。

(2) SEM観察用試料の作製

採取したCAPを固定後, TEM用試料作製と同条件で脱水し, acetoneとisoamyl acetateの混合液, ならびにisoamyl acetateで60分間置換して液化二酸化炭素による臨界点乾燥後, 試料にプラチナ蒸着を行った。蒸着したCAPをチゼルで切断し, 断面をイオンコーティングして観察試料とした。

3) 免疫電顕観察試料の作製

(1) 抗体作製

CAP面上に形成されたプラーク細菌の特にペリクル付着細菌を免疫組織化学的に同定するため, mutans

streptococciの*S. mutans*(OMZ 175)ならびにmitis groupの*S. sanguis* (ATCC 10556)と*S. mitis* (ATCC 9811)を, また*Actinomyces viscosus* (ATCC 19246), *A. naeslundii* (ATCC 2104)をそれぞれ0.5%(W/V)Yeast Extractを含む3%(W/V)Tryptic Soy Broth(Becton Dickinson, Sparks, US)にて37℃の嫌気下で3日間培養した後, 遠沈回収して凍結乾燥し, 各細菌の乾燥重量で100mgを生理食塩水5mlに溶解し, これに等量のFreud's incomplete adjuvant(DIFCO, CA, US)を加えて10mg/mlになるように乳濁化し, streptococciと*Actinomyces*属でそれぞれ混合して生後4週, 体重2.5kgのウサギ後肢大腿筋に毎週1回ずつ計4回接種し, 耳静脈より試験採血を行い, 菌属間の交差反応を可及的に吸収後, western blotにて抗体の反応性を調べ(Fig. 1), それぞれのウサギから全採血して血清分離を行い, プロテインAアフィニティークロマトグラフィー(アフィゲルプロテインA MAPS-IIキット, BIO-Rad, CA, US)でIgG画分のみを採取した。

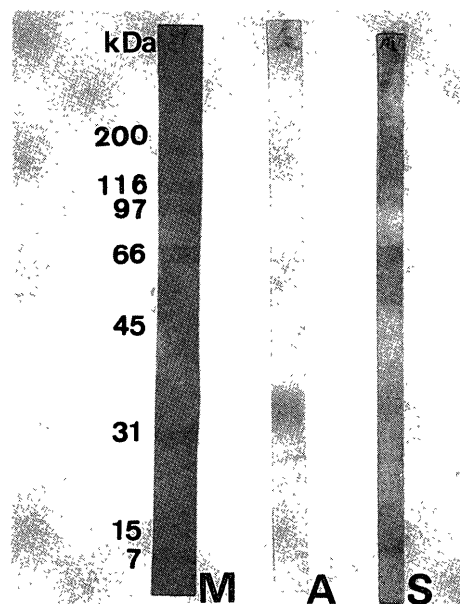


Fig. 1. Western blotting for bacteria

M : molecular weight marker, A : *Actinomyces* strains, B : streptococci (*S. mutans* OMZ 175, *S. sanguis* ATCC 10556 and *S. mitis* ATCC 9811)

(2) 免疫電顕染色

超薄切片を5%(W/V)sodium metaperiodateで7分間エッチングし, 5%正常ヤギ血清で1時間ブロッキングした後, 一次抗体として200倍希釈した各抗細菌抗体を室温で4時間, さらに15nmの粒子径のprotein A/G-gold(British Bio Cell, Cardiff, UK)をリン酸緩衝液で50倍希釈して室温で1時間反応させ, 二重電子染色を行った。

2. 天然歯面上の古いプラークの観察

以上のCAP面上で形成されたプラークが, 天然歯歯面上のプラークと本質的に同一か否かを検討すること

を目的として以下の2群を検索した。

1) 志願者の実験的プラークの採取

20才から30才の本学学生および教職員30名の志願者に8日から20日にわたって口腔清掃停止を依頼し、経口的に上顎第一大臼歯からスプーンエキスカベーターによってプラークを採取した。

2) 清掃不良者のプラークの採取

朝日大学附属病院および一般歯科医院受診者でプラークの堆積が著しい口腔清掃不良者30名の上顎第一大臼歯歯頸部に形成されたプラークを歯科治療前にスプーンエキスカベーターによって採取した。

以上のプラークを採取後、それぞれ2%寒天溶液に包埋して固形化させてから固定後、TEM観察試料を作製した。

結 果

1. CAP面上のプラークの所見

志願者のCAP面上の8日から20日間に至るプラークの動態を経時的にみると、プラークの形成量は頬側で多く、舌側(口蓋側)で少ないという傾向が明らかであった。そしてこれらを断面SEMで観察すると2型の基本的構造に分けることができ、その第I型はペリクル面に球菌、その上層に桿菌、さらに上層を球菌と長桿菌とから成る3層構造をとり、第II型はペリクル面上に桿菌が位置しこれらがそのまま表面に向かって増殖し、最表層は球桿菌が主で、両タイプとも最表層でcorn cobを認める場合もあった。なお、量的には第II型の占める割合が圧倒的に多く、第I型はわずかで、しかも一過性に出現と消長を反復する傾向を示した(Fig. 2)。これを各採取日別に詳細にみると以下のようであった。

1) CAP装着8日および9日後の所見

(1) 頬側

プラーク形成部の幅は平均28 μm であり、SEMでは、プラーク表層で長大な線状菌の増殖が著しく、その表面や間隙に短桿菌や球桿菌の微小コロニー形成を認めた(Fig. 3-A, B)。

断面SEMでは、ペリクルは小球状物質の重積として捉えられ、その表面に桿菌が付着し、垂直性にあるいは波打つように伸び出してその表層の線状菌と2層構造を構成する第II型を示した。そして、その間隙に球菌などのびまん性増殖やコロニー形成を認めた(Fig. 3-C)。

同部をTEMで観察すると、ペリクルはCAPと接する約0.1 μm 程度の厚さのやや電子密度の高い細線維状の構造を呈し、ここに多角形の断面を示す電子密度の高い原形質と電子密度が低く比較的幅広い細胞壁を有するグラム陽性菌が付着していた(Fig. 3-D)。これを断面SEMと照合すると桿菌の断面であることが明らかであった。この付着細菌は表面に向かって垂直性に

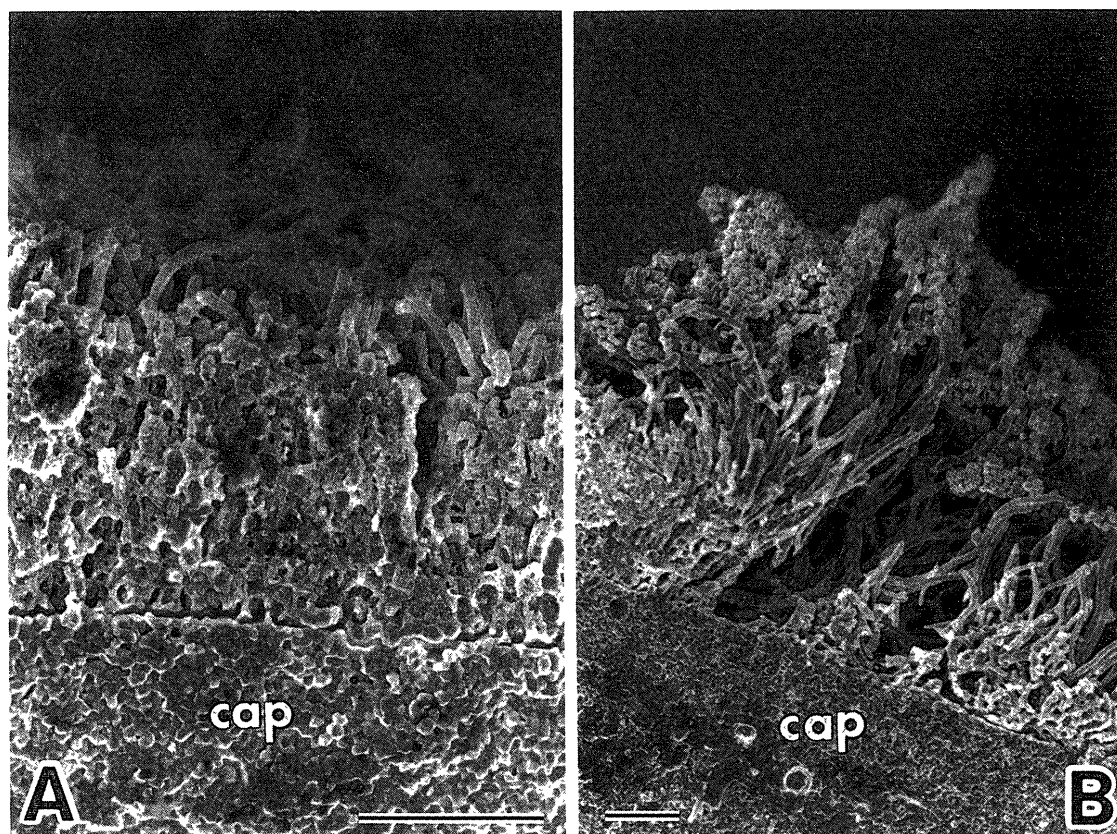


Fig. 2. Plaque formation on carbonate apatite surface by vertical SEM (v-SEM)

A : Type I, B : Type II, Bar : 5 μm , cap : carbonate apatite

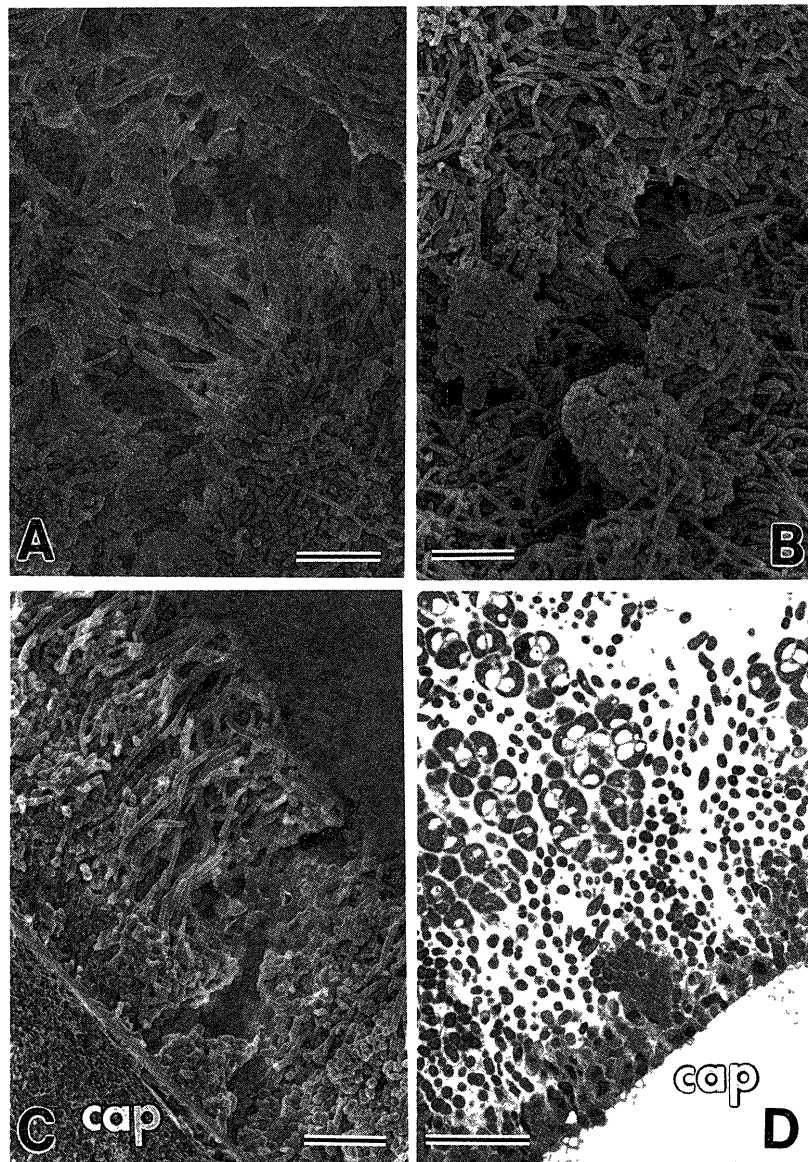


Fig. 3. 8 and 9 days plaque on CAP (buccal aspect)

A : Filamentous bacteria on the plaque surface (SEM), B : Microcolony consisted of rod shape bacteria and cocci (SEM), C : Type II plaque formation (v-SEM), D : Plaque bacteria in a perpendicular to CAP surface (TEM), Bar : 5 μ m, cap : carbonate apatite

増殖し、その所々で、微小コロニーの形成を認めた。その主な細菌はグラム陰性を表現する3層性の細胞壁より成り、それらは細胞壁周辺に電子密度の高い原形質顆粒が密集性に分布した細菌、大型で不定形を呈し原形質内に電子密度がほとんどない類円形の空胞を有する細菌、および小型で電子密度の極めて高い原形質を有する球桿菌の3種類が主であった。これら以外のグラム陽性および陰性細菌はコロニーを形成せず散在性の増殖を示した。

(2) 口蓋側

CAP面上のプラーク形成はSEMでCAP面上を這うように一様に増殖し(Fig. 4-A)、その主要細菌は菌体表面に突起状構造物を有する桿菌で、突起は互いの菌体間あるいはプラーク基質と連絡していた(Fig. 4-B,

C)。

断面SEMでは、形成幅が平均2~10 μ mであり、細菌は単層ないし数層で、頬側にみられたような垂直性増殖を行わず、ペリクル面を這う増殖様式を示した(Fig. 4-D, E)。

TEMでは、CAP面上にほぼ均等な厚さ約0.1 μ mのペリクルの形成を認めたものの、ペリクル付着細菌を初めとする細菌は散在性にしか捉えることができなかった(Fig. 4-F)。

2) CAP装着10日後の所見

(1) 頬側

プラーク形成幅は平均で約12 μ mであり、SEMでは、8日や9日後にみられたような長桿菌表面のコロニーの増加とそれぞれのコロニーの細菌数の増加を顕著に

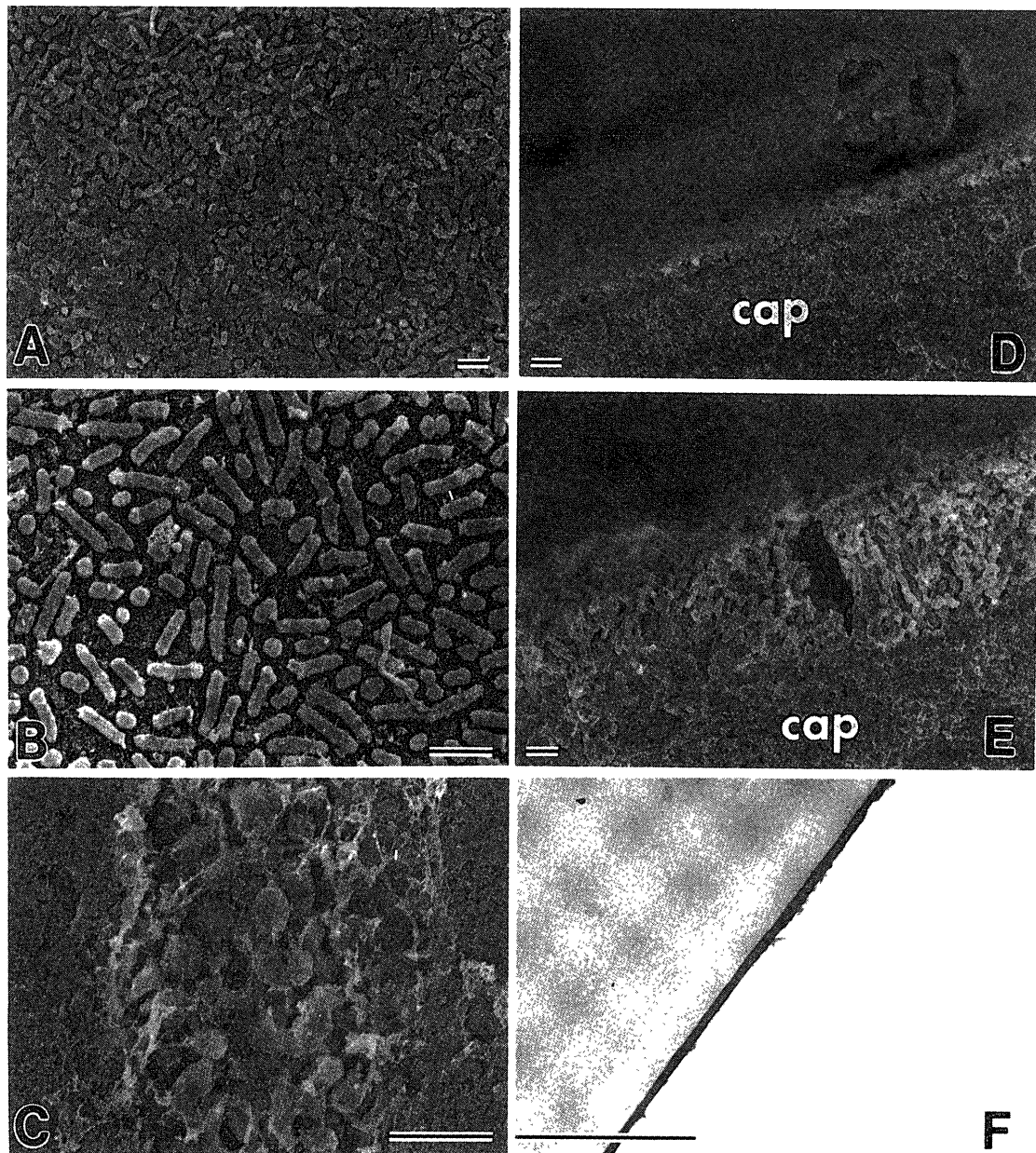


Fig. 4. 8 and 9 days after plaque on CAP (palatal aspect)

A : Plaque bacteria crept along CAP surface (SEM), B and C : Bacterial processes (SEM), D and E : Plaque bacteria crept along pellicle (v-SEM), F : Pellicle on CAP surface (TEM), Bar : 2 μ m, cap : carbonate apatite

認め、部分的にはあらたにグラム陽性球菌の出現をも認めたが、これはコロニーを形成しないでびまん性に増殖する傾向を示した (Fig. 5-A, B)。

断面SEMでは、initial cocolizerとsecondary colonizerの線状菌の2層性構造の表面、および深部にグラム陽性球菌などの凝集とコロニーの形成が認められ (Fig. 5-C)、一部で剥離上皮細胞がプラーク表層を被うように付着していた (Fig. 5-D)。

TEMでは、プラークの深部において、部分的に付着細菌である桿菌の変性や崩壊を認めた。その中にはペリクル付着部から表層のほぼ全域にわたって、原形質を消失して空胞状を呈するものや、全く原形質顆粒を欠くものも認めた (Fig. 5-E)。また、これに伴って同部では8日および9日後で認めたような他菌種のコロニ

ーも消滅し、正常の構造を保った細菌はプラーク最表層の細菌のみであった。

(2) 口蓋側

プラーク形成部の幅は平均5 μ m以下で、同部の表面SEMでは、やはり桿菌が優位であったが、ここに球菌の増殖も目立つようになった (Fig. 6-A, B)。断面SEMでも形成部の細菌は、単層から数層の桿菌と球菌を認めた (Fig. 6-C)。

3) CAP装着11日および12日後の所見

(1) 頬側

プラーク形成部の幅は11日で平均22.5 μ m、12日では平均12.5 μ mであり、SEMでは、長桿菌が数多く、その表面に短桿菌と球菌が混在した増殖と、線状菌と球菌によるcorn cobの形成をも認めた (Fig. 7-A, B)。

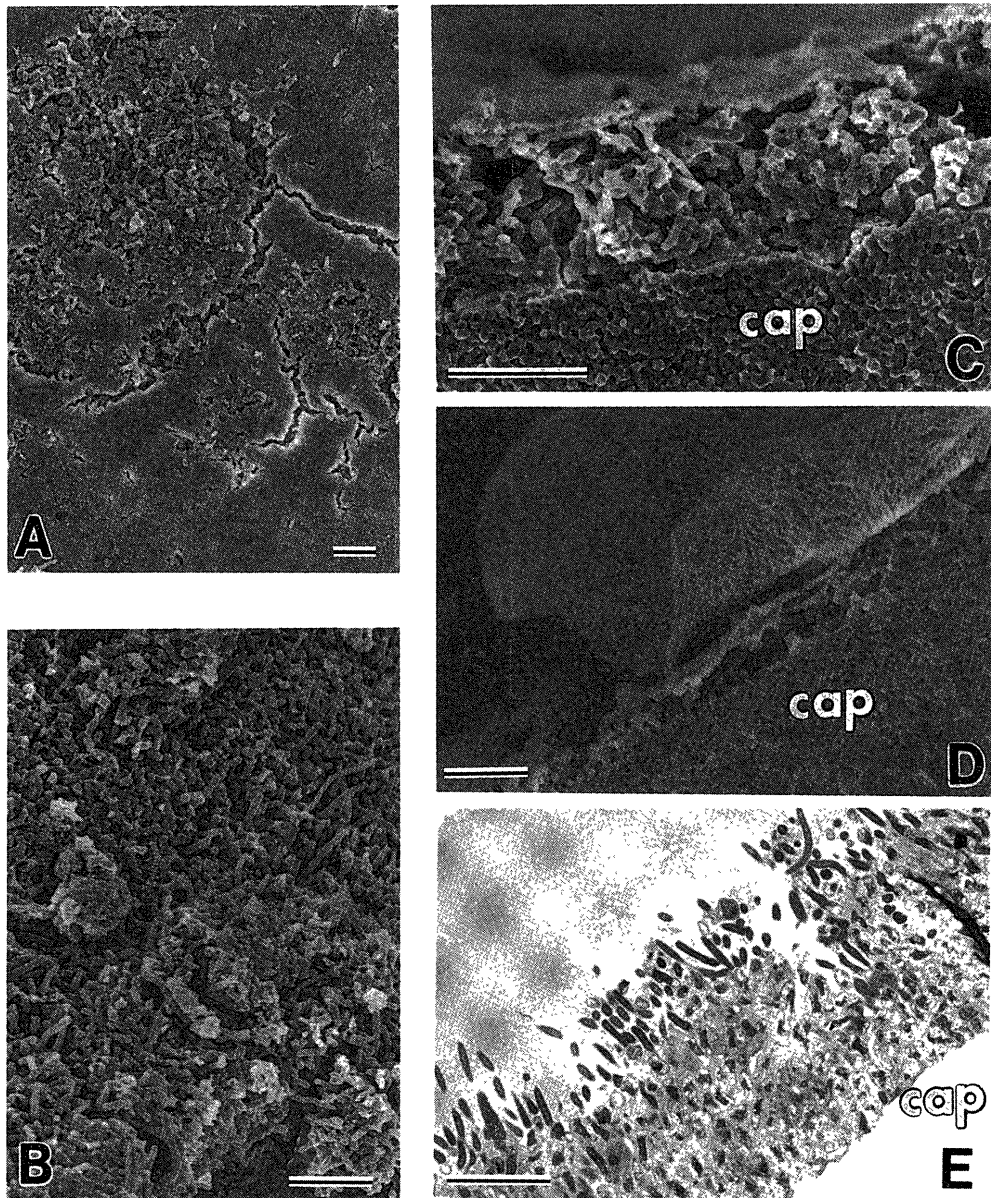


Fig. 5. 10 days after plaque on CAP (buccal aspect)

A : Colony formation (SEM), B : Sparse bacterial proliferation on CAP surface (SEM), C : Bilayered structure of Plaque bacteria (v-SEM), D : Flaked epithelial cells (v-SEM), E : Alteration of bacterial organization on CAP surface, Bar : 5 μ m, cap : carbonate apatite

断面SEMでは、桿菌と線状菌の2層構造がプラークの大部分を占めていたが、これをTEMで観察すると、プラーク内部で10日後に変性・崩壊を呈した桿菌はペリクル付近にわずかに残存し、これに代わって同部にはグラム陽性球菌および球桿菌が出現し、その一部はわずかながら柱状増殖を示した(Fig. 7-C)。

さらに12日では、付着細菌の球菌が再び多角形の形状をなす桿菌に代わっており、この付着細菌はプラーク表層に向かって垂直性増殖を示したものの、その分布密度は疎らであった。そして、その表層に球桿菌のコロニーの形成や線状菌の増殖を認めた(Fig. 7-D)。

(2) 口蓋側

11日ではCAP面上にプラーク形成部と未形成部を認め(Fig. 8-A)、形成部の幅は平均4.5 μ mで、SEM

では、桿菌の優位な増殖と球菌の混在およびマトリックスを認めた(Fig. 8-B)。

12日ではほぼ全面にプラーク形成を認めたが、プラーク形成幅は約0.5 μ mで非薄であった。断面SEMでは、これらがペリクル面にこのような増殖が主であった(Fig. 8-C)。なお、そのペリクル付着細菌となった桿菌にさらに球菌や短桿菌の増殖を認めた(Fig. 8-D)。

4) CAP装着13日および14日後の所見

(1) 頬側

プラーク形成部の幅は13日で平均17.5 μ m、14日で平均2.75 μ mで、SEMでは表層の短桿菌および長桿菌の増殖が著しくなり、逆に12日後で認めたようなcorn cobが消失し、球菌もごくわずかであった(Fig. 9-A)。

断面SEMでは、2層性構造がプラークの主体を占め

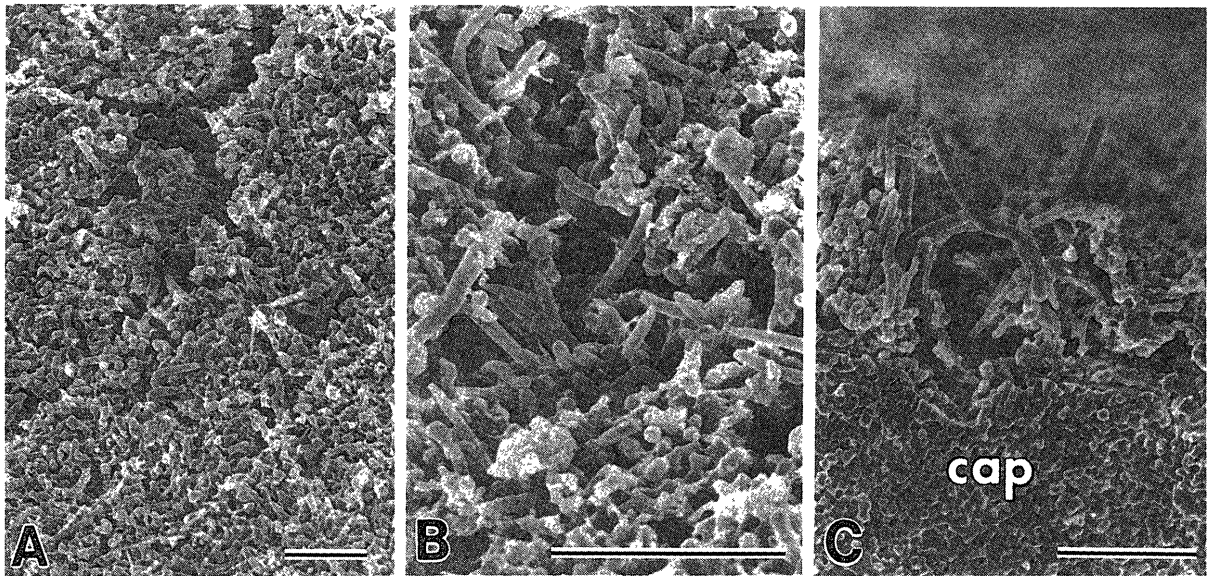


Fig. 6. 10 days after plaque on CAP (palatal aspect)

A : Rod shaped bacteria (SEM), B : Rod shaped bacteria and cocci (SEM), C : Bi- and triple-layer of plaque bacteria (v-SEM), Bar : 5 μ m, cap : carbonate apatite

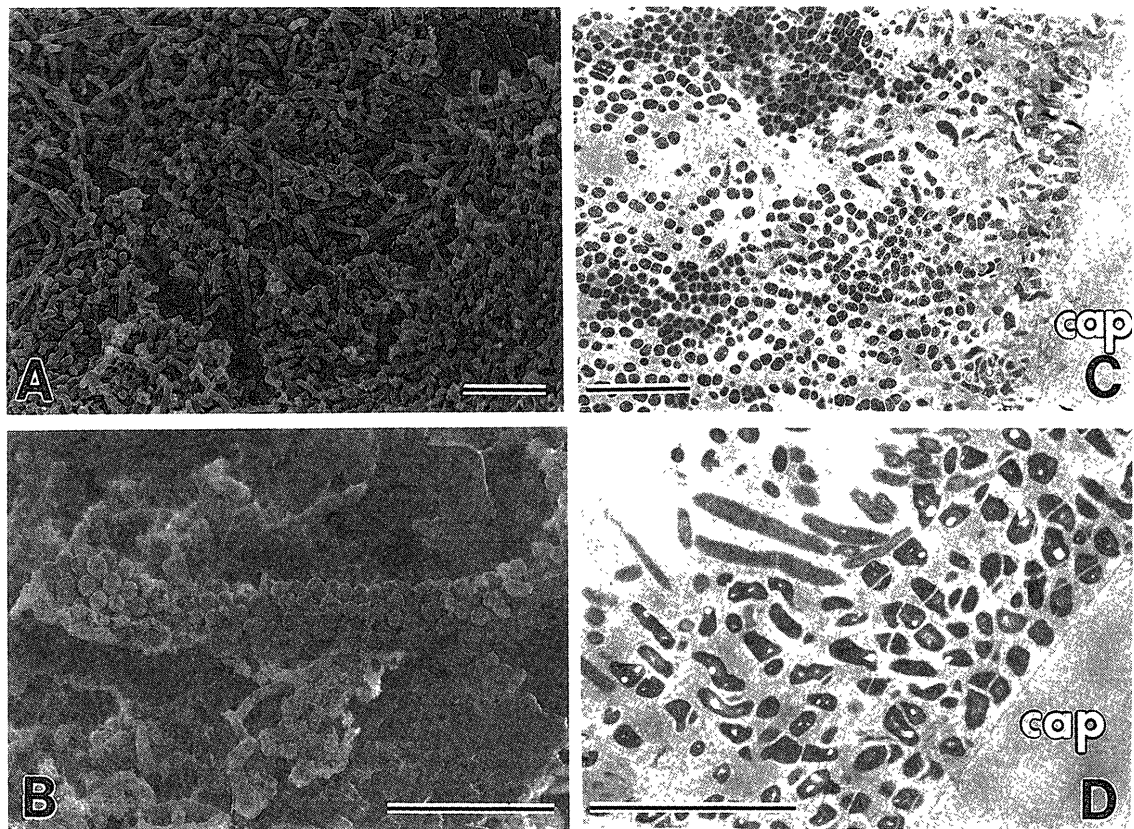


Fig. 7. 11 and 12 days after plaque on CAP (buccal aspect)

A : Rod shaped bacteria and cocci (SEM), B : Corn cob appearance (SEM), C : Perpendicular proliferation of plaque bacteria (TEM), D : Adherence of rod shaped bacteria to pellicle (TEM), Bar : 5 μ m, cap : carbonate apatite

ていたが、これをTEMによって観察すると、付着細菌である桿菌が著しく増殖し、その表層に線状菌の増殖層、さらにその表層のグラム陰性桿菌、球菌を主とする異種菌の増殖層より成る明確な3層構造を認めた (Fig. 9-B).

(2) 口蓋側

プラーク形成がさらに旺盛になり、その幅は13日では平均12 μ m、14日で平均21 μ mに達し、SEMで、長桿菌とこれに付着する球菌の著しい増殖およびcorn cobの形成を認めた (Fig. 10-A, B).

TEMでも旺盛な菌増殖が明らかで、付着細菌は部位によっては桿菌以外に球菌を認めた。桿菌はそのまま

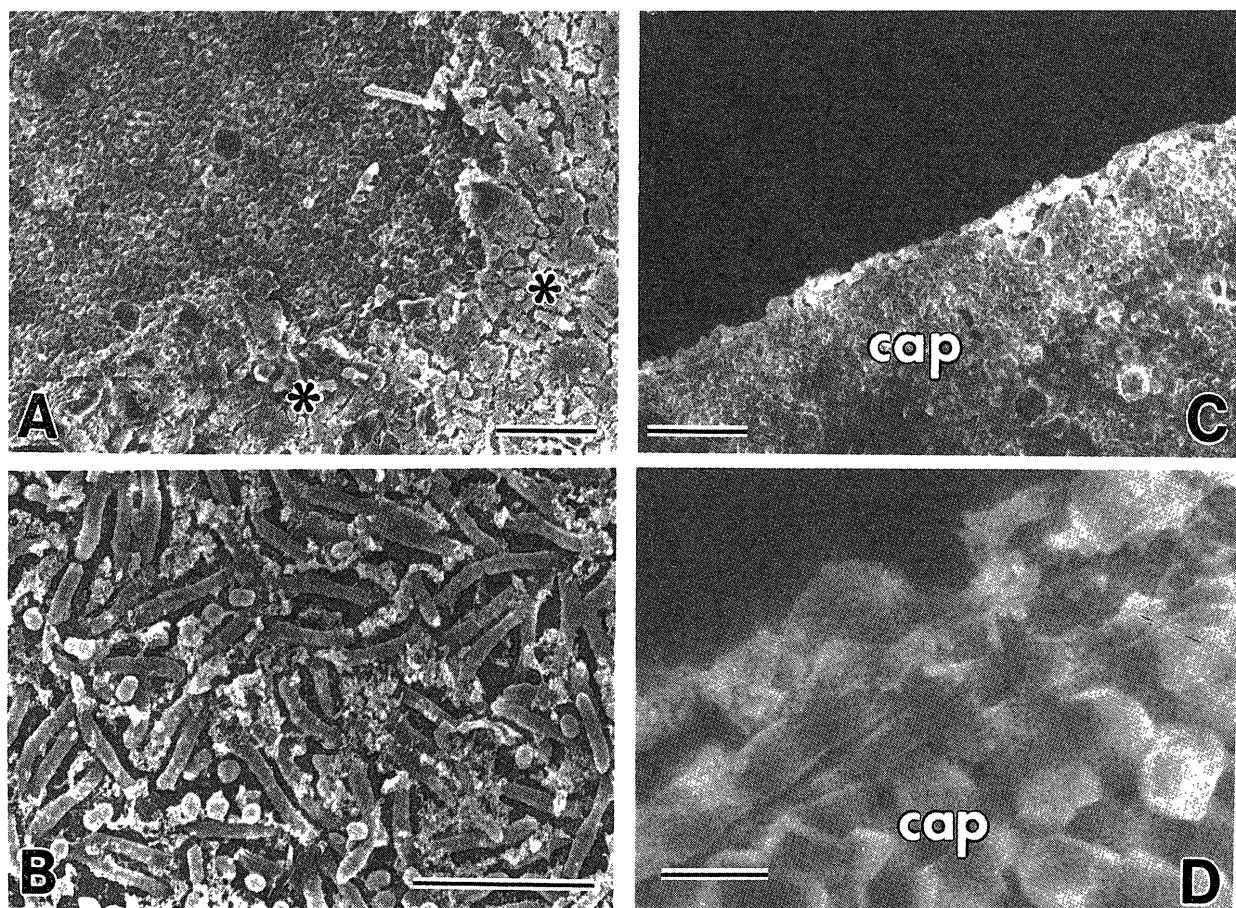


Fig. 8. 11 and 12 days after plaque on CAP (palatal aspect)

A : 11 days plaque formation (*) (SEM), B : High power view of A (SEM), C : 12 days plaque formation (v-SEM), D : Adherent bacteria to pellicle (v-SEM), Bar : $5\text{ }\mu\text{m}$ (A, B, C) ; $0.5\text{ }\mu\text{m}$ (D), cap : carbonate apatite

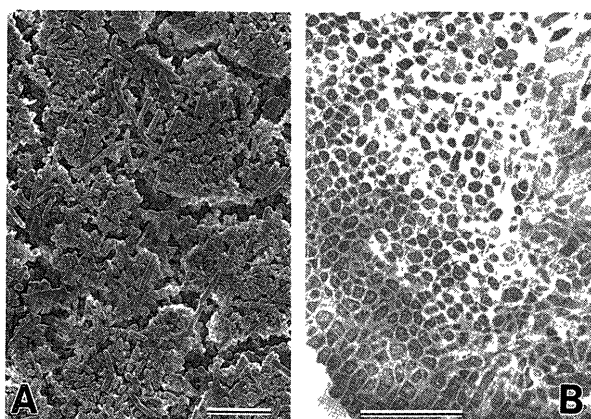


Fig. 9. 13 and 14 days after plaque on CAP (buccal aspect)

A : Short and long rod-shaped bacteria (SEM), B : Bilayered plaque (TEM), Bar : $5\text{ }\mu\text{m}$

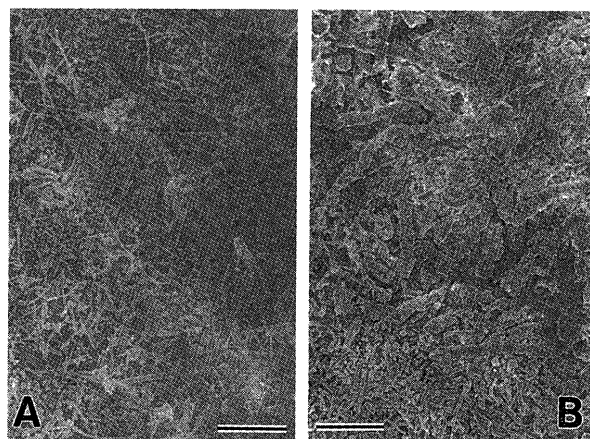


Fig. 10. 13 and 14 days after plaque on CAP (palatal aspect)

A : co-aggregation between rod shaped bacteria and cocci (SEM), B : Corn cob formation (SEM), C : Corn cob in plaque surface (TEM), Bar : $10\text{ }\mu\text{m}$, cap : carbonate apatite

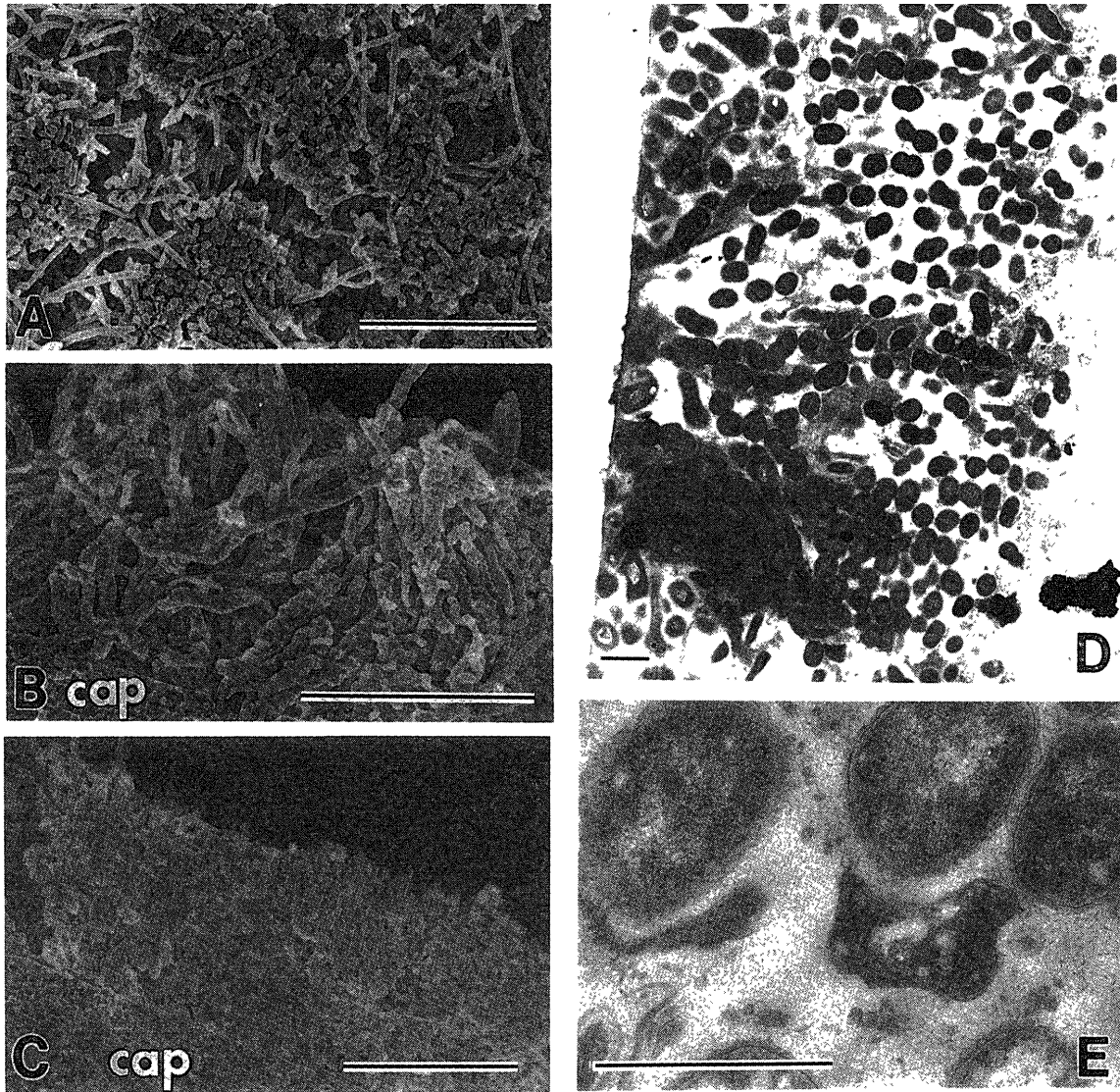


Fig. 11. 15 and 16 days after plaque on CAP (buccal aspect)

A : Filamentous bacteria and cocci (SEM), B : Rod shaped bacteria (v-SEM), C : Plaque bacteria adhered directly to CAP, D : Adherence of cocci (TEM), E : High power view of D (TEM), Bar : 10 μ m (A, B, C) ; 1 μ m (D, E), cap : carbonate apatite

垂直性増殖をなして表層にまで達し、球菌は垂直性増殖し、表層に数種のグラム陽性および陰性球菌、らせん菌のコロニーあるいはその混在を認め、所々でcorn cobの形成を認めた(Fig. 10-C)。

5) CAP装着15日および16日後の所見

(1) 頬側

プラーク形成幅は15日で平均約18.5 μ m, 16日では平均約15 μ mで、SEMでは、14日後にひき続いて線状菌の著しい増殖を認め(Fig. 11-A), またこれら線状菌の間隙に球菌を認めた。一方、断面SEMでは、桿菌の垂直的方向への増殖を認めたが、corn cobは消退し(Fig. 11-B), また、他部において固着した細菌塊が形成されていた(Fig. 11-C)。

断面SEMでは、やはり2層性構造が顕著であったが、TEMでは、付着細菌の桿菌に加えて、その一部に新たにグラム陽性球菌を認めた。これら細菌は表層に向かって垂直性に増殖し、球桿菌は細胞壁表面から微細線

維を出して互いにつながり、またプラーク基質に終わっていた(Fig. 11-D, E)。

(2) 口蓋側

プラーク形成幅は15日で平均約0.5 μ m, 16日では平均約1 μ mであり、SEMで、著しい付着細菌の減少を示す部位を認めた(Fig. 12-A)。この部の断面SEMおよびTEMは、ペリクルのみである部位や、わずかに桿菌の水平性の付着を示す部位が観察された(Fig. 12-B, C)。

6) CAP装着17日および18日後の所見

(1) 頬側

プラーク形成幅は17日で平均約2.75 μ m, 18日では平均約2 μ mであり、SEMで、線状菌の増殖と、その周囲の多数の球菌の凝集と増殖、さらに至る所で長大なcorn cobを認めた(Fig. 13-A)。

断面SEMでは第II型の構造が優位を占め、付着細菌である桿菌の密集性の垂直性増殖と表層部のcorn cob形

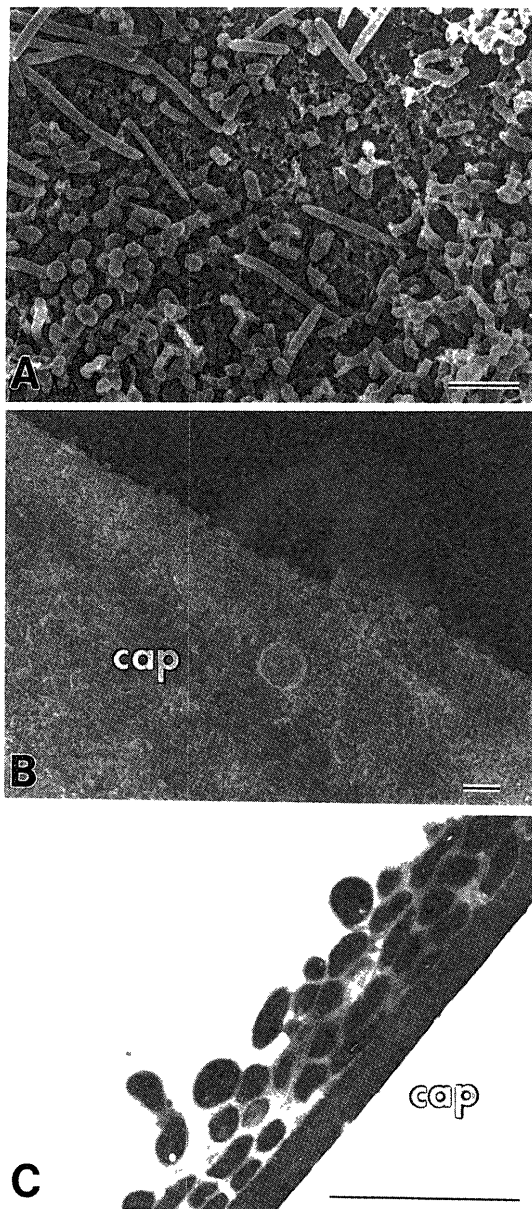


Fig 12 15 and 16 days after plaque on CAP (palatal aspect)

A Diminished number of adherent bacteria (SEM), B A small number of bacteria adhered to the CAP (v-SEM), C Adherent bacteria to pellicle (TEM), Bar . 2.5 μ m, cap carbonate apatite

Fig 14 17 and 18 days after plaque on CAP (palatal aspect)

A Adherence and proliferation of rod shaped bacteria (TEM), B Colony formation of rod shaped bacteria (SEM), C Coaggregation between filamentous and rod shaped bacteria (SEM), Bar 3 μ m, cap carbonate apatite

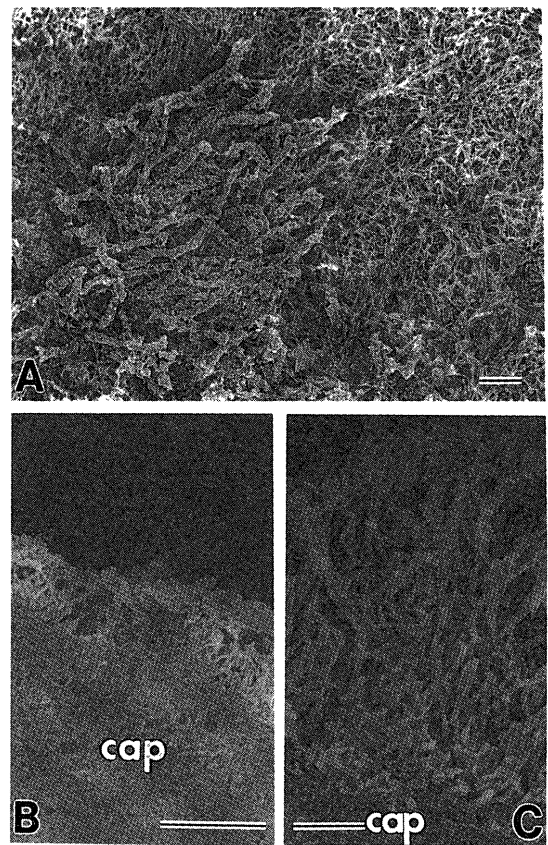
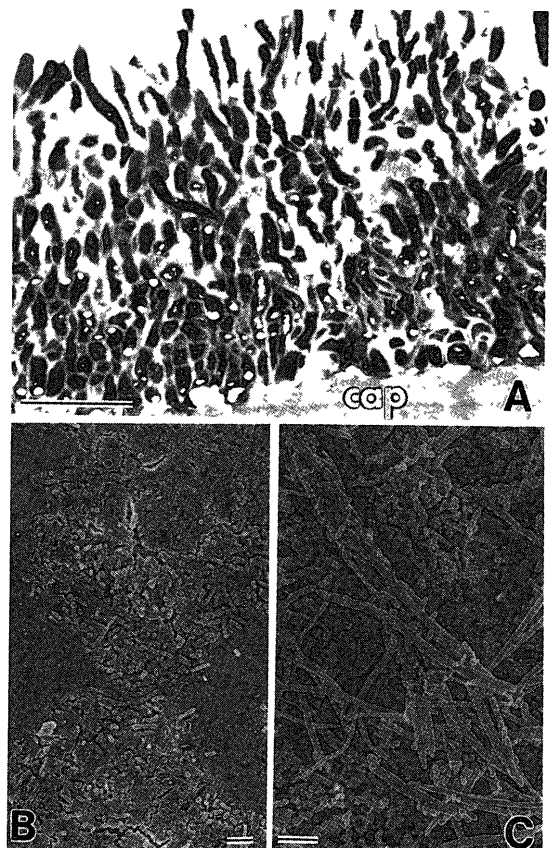


Fig 13 17 and 18 days after plaque on CAP (buccal aspect)

A Corn cob formation with filamentous bacteria (SEM), B Type II plaque and corn cob (v-SEM), C High power view of B (v-SEM), Bar 15 μ m, cap carbonate apatite



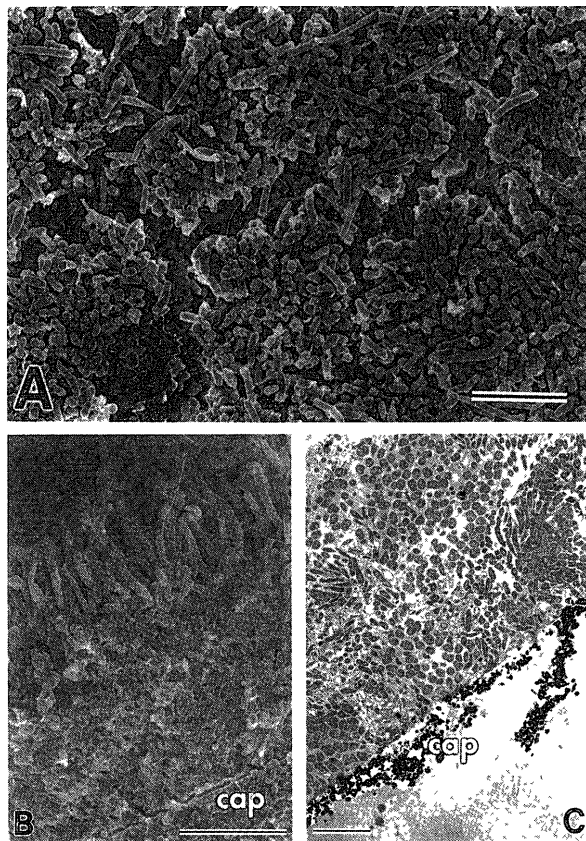


Fig 15 19 and 20 days after plaque on CAP (buccal aspect)

A Adherence and growth of bacilli (SEM),
B Destructive changes in the adherent bacteria (v-SEM), C Adherence and proliferation of bacilli on plaque surface (TEM),
Bar 3 μ m, cap carbonate apatite

成を認めた (Fig 13-B C).

(2) 口蓋側

プラーク形成部と未形成部が再び現れ、プラーク形成幅は17日で平均約0.5 μ m, 18日では平均約8.5 μ mであった。

TEMおよびSEMでは、桿菌の付着・増殖を認め (Fig 14-A, B), さらに線状菌のペリクル面に這う増殖と、その間隙の球菌や短桿菌の増殖を認めた (Fig 14-C)。

7) CAP装着19日および20日後の所見

(1) 頬側

プラーク形成幅は19日で平均約20 μ m, 20日では平均約10 μ mであった。SEMによって、corn cobの消退と短桿菌の新たな増殖を認めた (Fig 15-A)。

断面SEMおよびTEMでは、多くの細菌の崩壊部とこれとは逆の著しい増殖部を同時に認めた (Fig. 15-B, C)。増殖部では、付着細菌は15日および16日後と同様の球桿菌が主となると同時に、多種類の細菌が至る所で種々の形状のコロニーを形成し、8日および9日後でも見られた大型で不定形を呈し、類円形の無構造部

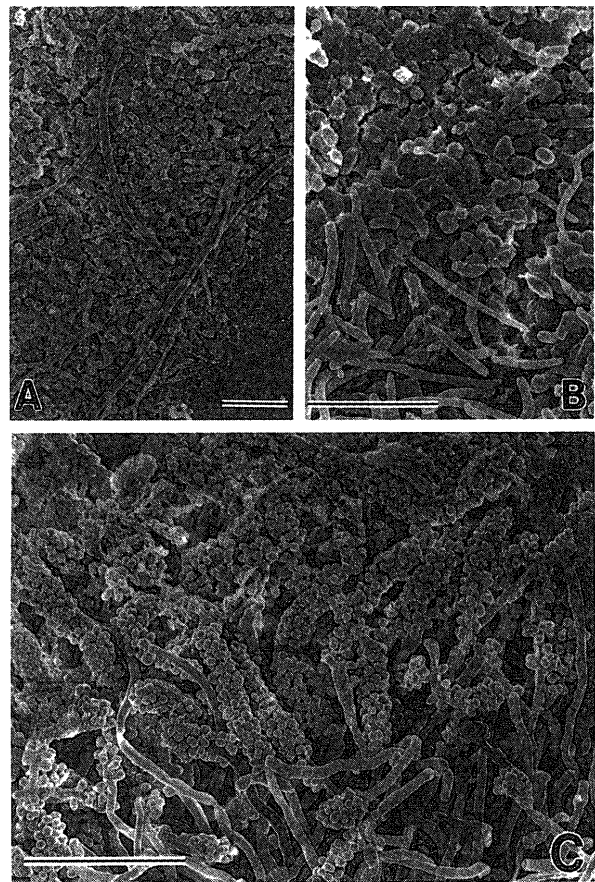


Fig 16 19 and 20 days after plaque on CAP (palatal aspect)

A Sparsely proliferation of bacteria on CAP (SEM), B Plaque surface consisted with heterogeneous bacteria (SEM), C Corn cob formation on plaque surface (SEM), Bar 5 μ m

を有する細菌と非コロニー状の球菌や短桿菌の出現を認めた。

(2) 口蓋側

プラーク形成幅は19日で平均約0.5 μ m, 20日では平均約1.25 μ mで、全体的にプラーク形成は少なく散在性であった。

プラーク形成部のSEMでは、長桿菌と球菌や短桿菌の混在と、多数のcorn cobの形成を認めた (Fig. 16-A, B, C)。

2. CAP面上のペリクル付着細菌の免疫電顕的所見

CAP面上に形成されたペリクルへの付着細菌は8日から20日間にかけては桿菌が主で、一部に球菌であることが観察されたが、これら細菌を、歯肉縁上プラークの主要細菌とみなし得る細菌を抗原として作製したウサギIgG抗体を用いて免疫電顕的に追求してみると、桿菌のほとんどは抗*Actinomyces*抗体に (Fig 17-A), また球菌は3種の抗streptococci抗体に陽性を示した (Fig 17-B)。なお、これらの反応陽性を示す金コロイド粒子は主として菌体膜に局在性を示した。

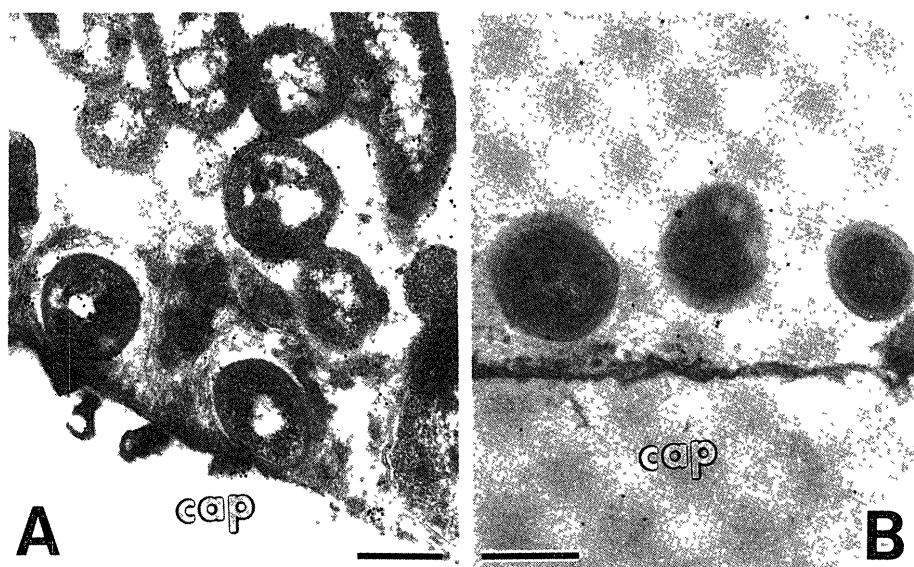


Fig. 17 Immuno-electron microscopy of plaque on CAP for *Actinomyces* strains (A) and streptococci (B), Immuno-gold method (TEM), Bar 0.4 μm , cap carbonate apatite

3. 天然歯面上の実験的プラークの所見

口腔清掃を徹底的に行った後、口腔清掃停止を依頼したヒトのプラークをTEMでみると、8日および10日間では、プラーク最深部(ペリクル側)ではグラム陽性桿菌が主体を占め、これに多形性菌やグラム陽性球菌

を混じていた(Fig. 18-A, B). 15日および20日間では、グラム陽性桿菌に加えて同球菌が増加し、表層では数多くのcorn cobを認めた。

4. 天然歯面上の古いプラークの所見

(1) A群

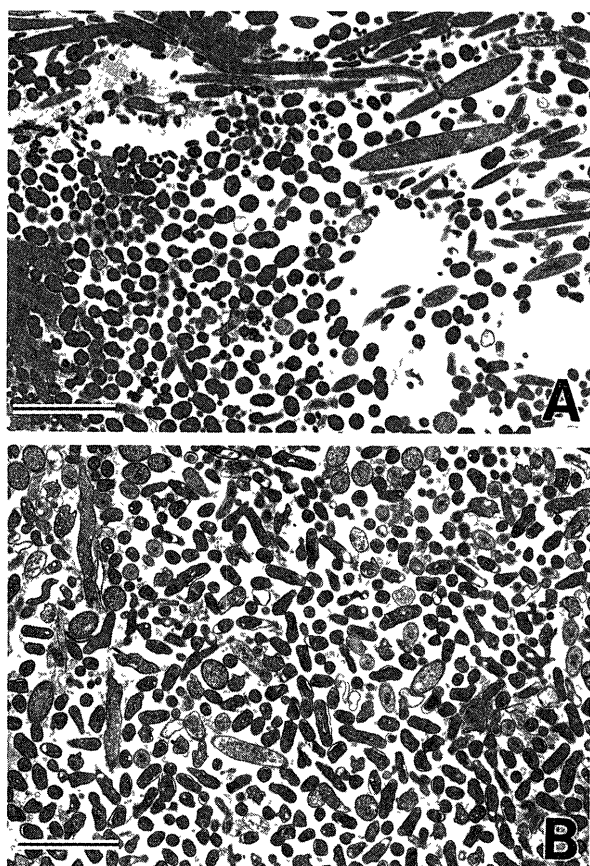


Fig 18 Plaque formation on natural tooth surface
A and B Multiple heterogeneous bacteria (TEM), Bar 4 μm

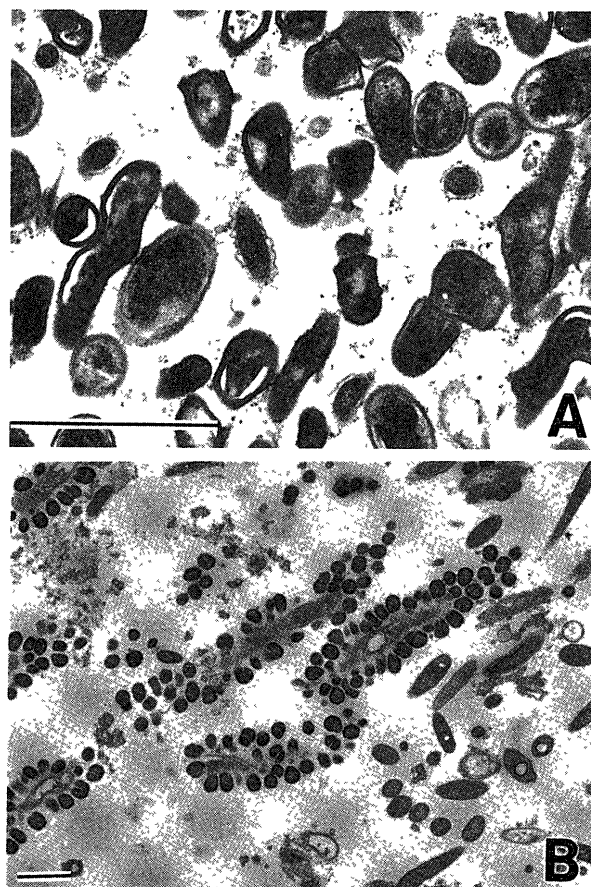


Fig 19 Plaque formation for a prolonged period on natural tooth surface (Group A)
A Destructive change including deformation and vacuolization of bacteria (TEM), B Corn cob formation (TEM), Bar 2 μm

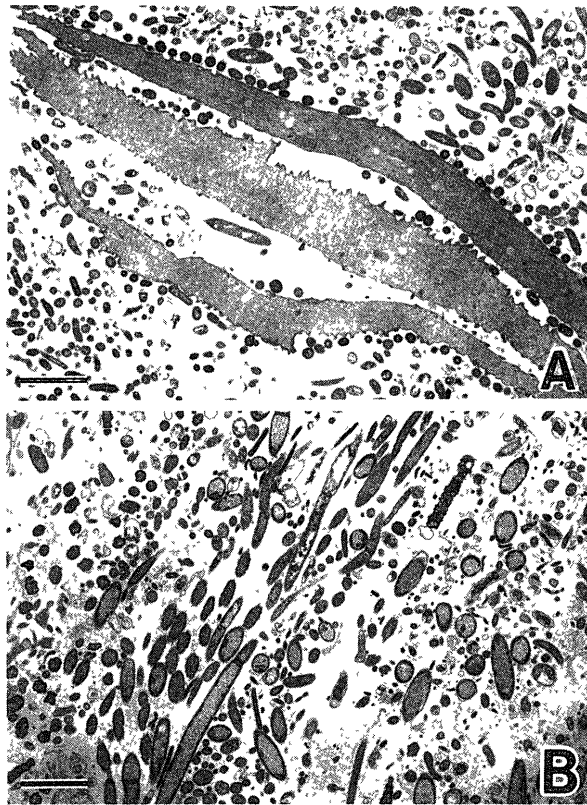


Fig 20 Plaque formation for a prolonged period on natural tooth surface (Group B)

A Saburra and adherent bacteria (TEM),

B Corn cob formation (TEM) Bar 4 μ m

毎日ブラッシングを行っているものの、その方法がプラークを徹底的に除去し得ず、特定の歯面に磨き残しのある群をA群とし、TEM観察では最深部において原形質の豊富なグラム陽性桿菌、空胞状構造を有するグラム陽性桿菌、および原形質顆粒の豊富なグラム陽性球菌が主要細菌として認められた。とくにグラム陽性桿菌が優位を占め、プラーク深部から表面に向かって層状に配列し、球菌はその表層近くで数多く、その一部は桿菌あるいは原形質顆粒に乏しいグラム陰性線状菌のいずれかとのcorn cob形成を認めた(Fig 19-A, B)。

(2) B群

口腔清掃の認識不足でブラッシングをあまり行わないため、全歯面の歯頸部に可視的なプラークを残している群をB群とし、この群にはグラム陽性桿菌が圧倒的に優位で、これに空胞状構造を有するグラム陽性桿菌や球菌が混じり、また、食物残渣と思われる長大な線維束状の物質の周囲に、これを軸として球菌の増殖を認めた(Fig. 20-A)。また、corn cobはA群よりも少なく、全体的に変性や崩壊過程にある細菌も多く認められた(Fig 20-B)。

(3) C群

口腔衛生観念が無く、ブラッシングを行わないため、慢性的にプラーク形成が進行し、歯面全面および歯冠

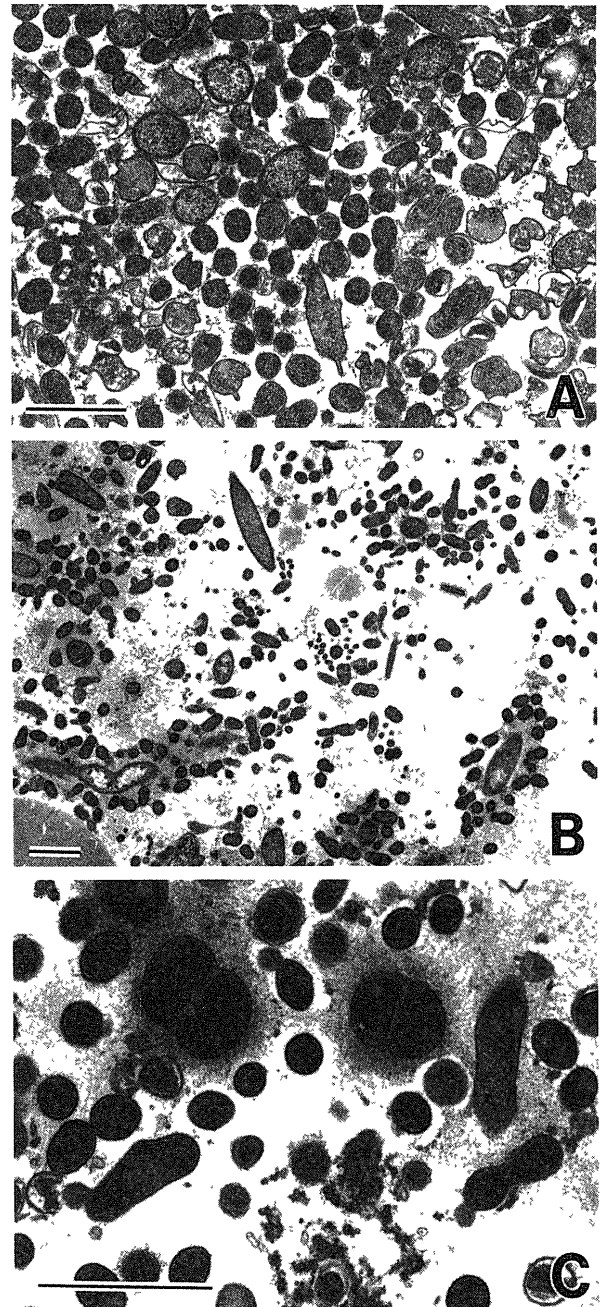


Fig 21 Plaque formation for a prolonged period on natural tooth surface (Group C)

A Plaque formation of cocci and bacilli (TEM), B Corn cob formation (TEM), C

Gram positive cocci with fibrillar appendages (TEM), Bar 1 μ m

補綴物にまでプラークが堆積しているC群では、プラーク中の細菌数が極めて多く、その主要細菌はグラム陽性桿菌および球菌であった(Fig. 21-A)。また、corn cobも多数にわたり、中にはプラーク中層部から表層に突出する長大corn cobも認められた(Fig 21-B)。また、剥離上皮や血球成分を混じり、その上皮表層では細い突起状構造物を有するグラム陽性桿菌および球菌が付着していた(Fig. 21-C)。なお、血球の細胞膜への付着細菌は認められなかった。

考 察

プラーク形成過程の解析の一法として、天然歯面に人工的材料を装着する方法が採用されてきた^{29~36)}が、近年、このような人工の歯牙代用材上のプラークは天然歯面上のプラークとかなり異なることが指摘されている^{37,38)}。ところが、この検索に天然歯を用いることには多くの困難を伴うことが多い。そこで、今回、天然歯エナメル質と極めて類似する組成のCAPをヒトの歯に装着する方法でこれらの問題を解決した。すでにTakeuchi and Yamamoto³⁹⁾によって、CAP面上のプラークの形成過程およびこれに関係する菌種が、本質的に天然歯のそれと変わりのないことが明らかにされている。加えて、その形成過程はペリクル形成期、細菌付着期、前成熟期、菌種変換期、後成熟期の5期にわたり、すべての時期のペリクル付着細菌はグラム陽性球菌ならびに桿菌に限定され、さらに、これら付着細菌の表面に共通したグラム陰性線状菌が凝集し、付着細菌のinitial colonizerと線状菌のsecondary colonizerとの間でいわゆるstructural frameworkを構成することも形態学的に証明している。今回、検索したCAP面上のプラークはTakeuchi and Yamamoto³⁹⁾の提唱する後成熟プラーク形成期と一致するものであるが、8日以上にわたる清掃停止を行った志願者のプラークとの比較によって、細菌構成にほとんど変わりのないことが判明した。また、口腔清掃が劣悪な状態下の古いプラークの3群もそれぞれの細菌構成が8日から20日に至るCAP面上のプラークのいずれかと一致するものであった。従って、プラークの形成過程を詳細に検討するには、CAPをヒト天然歯面に装着する方法が極めて有効であることが再確認された。

このような古いプラークは、一見、歯面全体に形成されるように考えられるが、これをCAP面上でみた場合、同一歯でも歯面によってかなりの形成量に差があることが明らかであった。これにはSimonsson *et al.*^{40,41)}の説くような種々の口腔内の物理・化学的要因が関係していると考えられる。一般に、菌量が多くなればなるほど感染症発症の機会が増加するが、この概念からすると、今回の検索からは菌系感染症は口蓋側に少なく、頬側に多いということになるが、今回は実験的感染症発症については検索していないので、推測の域を出ない。

成熟プラークは、長期にわたって細菌構成の変動がほとんどなく、定常状態を保つとされており⁴²⁾、Listgarten⁴³⁾はこのようなプラーク構造がプラークのstable structureであるとしている。しかし、今回の断面SEM観察では、ペリクル付着細菌である桿菌とその表層の線状菌との組み合わせのみが定常的な細菌構築であることが明らかであった。biofilmとは“生物にとって重要な環境的要因の勾配の緩徐な変化が本来共有し

得ない共存を可能とするマトリックス”と定義され、プラークでは“そのマトリックス内の酸素分圧、pHあるいは栄養・唾液・唾液成分濃度の勾配による種々の微小環境内に適合してそれぞれの細菌がコロニーを形成する”とみなされている^{2,44~48)}が、今回の観察からは限定されたinitialおよびsecondary colonizerによって恒常的なframeworkを形成し、他の細菌が時々刻々に変化することが判明した。このようなinitialおよびsecondary colonizerのframeworkを構成する菌は、これまでの多くの報告知見からすれば*Actinomyces*属と*Fusobacterium*属とみなすことができる^{49~54)}が、確証は得られていない。そこで、プラーク中の主要細菌とみなし得る数種の細菌についてTEMによる免疫電顕的同定を試みた。各抗細菌抗体はほとんどの細菌抗原に交差反応を示し、共通抗原性をそれぞれに有していることが明らかであった。そこで、吸収法によって可及的に共通抗原部分を除去した抗体を用いて観察した。その結果、この時期のペリクル付着細菌の主体を占める桿菌は抗*Actinomyces*属抗体に陽性を示し、時に付着細菌として現れる球菌はstreptococciであることが示唆された。Berthold *et al.*⁵⁵⁾も、免疫電顕的にinitial colonizerの桿菌が*Actinomyces*属としているが、本法による同定には今後monoclonal抗体やDNAプローブ等を用いてさらに正確を期する必要があると考える。また、この所見は、*Antinomies*属やstreptococciがペリクル中のproline-rich proteinsやstatherinに特異的に結合することによってinitial colonizerの立場を確立し、これに続いて*Fusobacterium*属がこの*Actinomyces*属を含めた他菌種とのmultigeneric coaggregationによってsecondary colonizerの地位を獲得するという先人達の多くの報告^{53~59)}を形態的に裏付けるものと考えられた。すなわち、これらの菌種はプラークマトリックスにおいて生じる種々の環境変化に適応し得る性状、あるいは逆に多くの環境変化に耐え得る性状を有することによってframeworkを構築し、さらに*Fusobacterium*属のmultigeneric coaggregationという特性が他の菌種の定着と増殖を支えていると考えられる。*Fusobacterium*属の凝集能は、さらにearly plaqueとlate plaqueの架橋的役割をもなすといわれている^{53,54)}。このようなframeworkを背景として、経時的に種々の細菌の消長を認めたが、古いプラーク中には、過去の実験的発症の報告から類推するに、齦蝕原因菌や歯周炎原因菌(とくに歯肉炎原因菌)が定着・増殖していると予測される^{1~3,13,20~23,60,61)}。これら齦蝕原因菌の多くはグラム陽性球菌や桿菌であり、歯周炎原因菌の多くはグラム陰性桿菌であることから、この細菌形態を指標としてCAP面上の古いプラークをみると、先述のように数的に圧倒的に優位である菌はframework構

成菌であり、続いてその間隙や表層には増殖したグラム陰性球菌および同桿菌であり、グラム陽性球菌はcorn cobを除けば少なく、一過性に散在性の微小コロニーを形成するのみで、Takeuchi and Yamamoto³⁹⁾のいう前成熟プラークでみられたような柱状増殖等の著しい増殖はわずかであった。このような形態的な観察から、ペリクル面に付着すると同時にこの時期に圧倒的に多く、しかも根面齲蝕の原因菌とされている*Actinomyces* 属⁵⁵⁾はエナメル質齲蝕の発症にも関係深いことが示唆された。一方、プラーク表層部ではグラム陰性球菌や桿菌がかなりの量を占めたが、この中に*Porphyromonas gingivalis*が存在し、本菌は歯肉縁下プラークのみならず歯肉縁上プラークにも増殖し⁶¹⁾、同時に歯肉炎発症の主因をなすとされ^{9,10)}、歯肉縁上プラークの延長線上にある歯肉溝プラークにおいて本菌

が遊離歯肉上皮と接し、歯肉炎をひき起こす可能性がある。

以上のように、今回の形態的観察から、齲蝕症や歯周炎の発症に最も関係深いと考えられる8日以降に形成されたプラークは、initial colonizerのグラム陽性桿菌とsecondary colonizerのグラム陰性線状菌によるframeworkと、その表層あるいは間隙に増殖したグラム陰性球菌や同桿菌が主体をなし、グラム陽性球菌は一過性の増殖と消退を示すことが明らかとなった。また、抗細菌ポリクローナル抗体を用いた免疫電顕では、*Actinomyces* 属やstreptococciがinitial colonizerとして、さらに*Fusobacterium* 属はsecondary colonizerとして作用し、プラーク表層に*P. gingivalis*などのグラム陰性桿菌が凝集してくる様相が窺えた。

参考文献

- 1) Listgarten, M A The structure of dental plaque *Periodontol*, 2000, **5** : 52~65, 1994.
- 2) Scannapieco, F A Saliva-bacterium interactions in oral microbial ecology *Crit Rev Oral Biol Med*, **5** : 203~248, 1994.
- 3) Moore, L V, Moore, W E, Cato, E P, Smibert, R M, Burmeister, J A, Best, A M and Rannny, R R Related Bacteriology of human gingivitis *J Dent Res*, **66** : 989~995, 1987.
- 4) Fitzgerald R J, Jordan, H V, Archard, H O, Dental caries in gnotobiotic rats infected with a variety of *Lactobacillus acidophilus* *Arch Oral Biol*, **11** : 473~476, 1966.
- 5) Rosen, S Comparison of sucrose and glucose in the causation of dental caries in gnotobiotic rats *Arch Oral Biol*, **14** : 445~450, 1969.
- 6) Socransky, S S, Hubersak, C and Propas, D Induction of periodontal destruction in gnotobiotic rats by a human oral strain of *Actinomyces naeslundii* *Arch Oral Biol*, **15** : 993~995, 1970.
- 7) Jordan, H V, Keyes, P H and Bellack, S Periodontal lesions in hamsters and gnotobiotic rats infected with actinomyces of human origin *J Periodontal Res*, **7** : 21~28, 1972.
- 8) Huxley, H G The effect of inoculating strains of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sanguis* upon caries incidence and bacterial content of plaque in rats *Arch Oral Biol*, **18** : 1215~1226, 1973.
- 9) Johnson, N W and Kenney, E B Effects of topical application of chlorhexidine on plaque and gingivitis in monkeys Histologic assessment *J Periodontal Res*, **7** : 180~188, 1972.
- 10) Listgarten, M A and Ellegaard, B Experimental gingivitis in the monkey Relationship of leukocyte counts in junctional epithelium, sulcus depth, and connective tissue inflammation scores *J Periodontal Res*, **8** : 199~214, 1973.
- 11) Heijl, L and Lindhe, J The effect of metronidazole on the development of plaque and gingivitis in the beagle dog *J Clin Periodontol*, **6** : 197~209, 1979.
- 12) Gusberti, F A, Syed, S A and Lang, N P Combined antibiotic (metronidazole) and mechanical treatment effects on the subgingival bacterial flora of sites with recurrent periodontal disease *J Clin Periodontol*, **15** : 353~359, 1988.
- 13) Nitzan, D, Sperry, J F and Wilkins, T D Fibrinolytic activity of oral anaerobic bacteria *Arch Oral Biol*, **23** : 465~470, 1978.
- 14) Nyvad, B, Kilian, M. Comparison of the initial streptococcal microflora on dental enamel in caries-active and in caries-inactive individuals *Caries Res*, **24** : 267~272, 1990.
- 15) Ritz, H L . Microbial population shifts in developing human dental plaque *Arch. Oral Biol*, **12** : 1561~1568, 1967.
- 16) 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.
- 17) Slots, J Microflora in the healthy gingival sulcus in man *Scand. J Dent Res*, **85** : 247~254, 1977.
- 18) Savitt, E D and Socransky, S S Distribution of certain subgingival microbial species in selected periodontal conditions *J Periodontal Res*, **19** : 111~123, 1984.
- 19) Moore, W E, 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 Immun*, **42** : 510~515, 1983.
- 20) Syed, S A, Loesche, W J, Pape, H L Jr, Grenier, E Predominant cultivable flora isolated from human root surface caries plaque *Infect Immun*, **11** : 727~731, 1975.
- 21) Ellen, R P, Banting, D W, Fillery, E D Longitudi-

- nal microbiological investigation of a hospitalized population of older adults with a high root surface caries risk *J Dent Res*, **64** : 1377~1381., 1985.
- 22) Keltjens, H. M., Schaeken, M. J., van der Hoeven, J. S., Hendriks, J. C. · Microflora of plaque from sound and carious root surfaces *Caries Res*, **21** : 193~199, 1987.
- 23) Bowden, G. H., Ekstrand, J., McNaughton, B., Challacombe, S. J. Association of selected bacteria with the lesions of root surface caries *Oral Microbiol Immunol*, **5** : 346~351, 1990.
- 24) Rosan, B. and Ramont, R. J. Dental Plaque formation. *Microbes Infect*, **2** : 1599~1607, 2000.
- 25) von der Fehr, F. R. A study of carious lesions produced *in vivo* in unabraded, abraded, exposed, and F-treated human enamel surfaces, with emphasis on the x-ray dense outer layer *Arch Oral Biol*, **12** : 797~814, 1967.
- 26) Theilade, E., Wright, W. H., Jensen, S. B., and Loe, H. Experimental gingivitis in man II. A longitudinal clinical and bacteriological investigation *J Periodontal Res*, **1** : 1~13, 1966.
- 27) Doi, Y., Koda, T., Wakamatus, N., Goto, T., Kamemizu, H., Moriwaki, Y., Adachi, M. and Suwa, Y. Influence of carbonate on sintering of apatites *J Dent Res*, **72** : 1279~1284, 1993.
- 28) Karnovsky, M. J. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy *J Cell Biol*, **27** : 137A~138A, 1965.
- 29) Ronstrom, A., Attstrom, R. and Egelberg, J. Early formation of dental plaque on plastic films 1. Light microscopic observations. *J Periodontal Res*, **10** : 28~35, 1975.
- 30) Brex, M., Ronstrom, A., Theilade, J. and Attstrom, R. Early formation of dental plaque on plastic films 2. Electron microscopic observations *J Periodontal Res*, **16** : 213~227, 1981.
- 31) Skopek, R. J., Liljemark, W. F., Bloomquist, C. G. and Rudney, J. D. Dental plaque development on defined streptococcal surfaces *Oral Microbiol Immunol*, **8** : 16~23, 1993.
- 32) Berthold, C. H., Berthold, P. and Soder, P. O. The growth of dental plaque on different materials. *Sven Tandlak Tidskr*, **64** : 863~877, 1971.
- 33) Berthold, P. Formation of salivary coating and dental plaque on two different supporting materials. An electron microscopic study *J Periodontol*, **50** : 397~405, 1979.
- 34) Lie, T. Growth of dental plaque on hydroxyapatite splints. A method of studying early plaque morphology *J Periodontal Res*, **9** : 135~146, 1974.
- 35) Listgarten, M. A., Mayo, H. E. and Tremblay, R. Development of dental plaque on epoxy resin crowns in man. A light and electron microscopic study *J Periodontol*, **46** : 10~26, 1975.
- 36) Hannig, M. Transmission electron microscopy of early plaque formation on dental materials *in vivo* *Eur J Oral Sci*, **107** : 55~64, 1999.
- 37) Sonju, T. and Glantz, P. O. Chemical composition of salivary integuments formed *in vivo* on solids with some established surface characteristics *Arch Oral Biol*, **20** : 687~691, 1975.
- 38) Oste, R., Ronstrom, A., Birkhed, D., Edwardsson, S. and Stenberg, M. Gas-liquid chromatographic analysis of amino acids in pellicle formed on tooth surface and plastic film *in vivo* *Arch. Oral Biol*, **26** : 635~641, 1981.
- 39) Takeuchi, H. and Yamamoto, K. Structural framework in dental plaque developing on synthetic carbonate apatite applied to human tooth surfaces *Eur J Oral Sci*, **109** : 249~259, 2001.
- 40) Simonsson, T., Edwardsson, S. and Glantz, P. O. Biophysical and microbiologic studies of "heavy" and "light" plaque formers. *Scand J Dent Res*, **95** : 43~48, 1987.
- 41) Simonsson, T., Ronstrom, A., Rundegren, J. and Birkhed, D. Rate of plaque formation-some clinical and biochemical characteristics of "heavy" and "light" plaque formers *Scand J Dent Res*, **95** : 97~103, 1987.
- 42) Nyvad, B. and Fejerskov, O. Structure of dental plaque and the plaque-enamel interface in human experimental caries *Caries Res*, **23** : 151~158, 1989.
- 43) 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.
- 44) Bennick, A. and Connell, G. E. Purification and partial characterization of four proteins from human parotid saliva. *Biochem J*, **123** : 455~464, 1971.
- 45) Fine, D. H., Wilton, J. M. A. and Caravana, C. *In vitro* sorption of albumin, immunoglobulin G, and lysozyme to enamel and cementum from human teeth *Infect. Immun.*, **44** : 332~338, 1984.
- 46) Costerton, J. W., Lewandowski, Z., Caldwell, D. E., Korber, D. R. and Lappin-Scott, H. M. Microbial biofilms *Annu Rev Microbiol*, **49** : 711~745, 1995.
- 47) Marsh, P. D. and Bradshaw, D. J. Dental plaque as a biofilm *J Ind Microbiol*, **15** : 169~175, 1995.
- 48) Beveridge, T. J., Makin, S. A., Kadurugamuwa, J. L. and Li, Z. Interactions between biofilms and the environment *FEMS Microbiol Rev.*, **20** : 291~303, 1997.
- 49) Fine, D. H. and Greene, L. S. Microscopic evaluation of root surface associations *in vivo*. *J Periodontal Res*, **19** : 152~167, 1984.
- 50) Duda, J. J. and Slack, J. M. Ultrastructural studies on the genus *Actinomyces* *J Gen Microbiol*, **71** : 63~68, 1972.
- 51) Lai, C. H. and Listgarten, M. A. Comparative ultrastructure of certain *Actinomyces* species, *Arachnia*, *Bacterionema* and *Rothia* *J Periodontol* **51** : 136~

- 154, 1980.
- 52) Tinanoff, N and Tanzer, J M Bacterial pellicle-like substances and polyphosphate formation by enamel-adherent oral microorganisms *Pediatr Dent*, 1 : 1~6, 1979.
 - 53) Kolenbrander, P E, Andersen, R N and Holdeman, L V Coaggregation of oral *Bacteroides* species with other bacteria central role in coaggregation bridges and competitions *Infect Immun*, 48 : 741~746, 1985.
 - 54) Kolenbrander, P E, Ganeshkumar, N, Cassels, F J, Hughes, C V Coaggregation specific adherence among human oral plaque bacteria *FASEB J*, 7 : 406~13, 1993.
 - 55) Berthold, P, Lai, C H and Listgarten, M A Immunoelectron microscopic studies of *Actinomyces viscosus* *J Periodontal Res*, 17 : 26~40, 1982.
 - 56) Falkler, W A Jr. and Burger, B W Microbial surface interactions reduction of the haemagglutination activity of the oral bacterium *Fusobacterium nucleatum* by adsorption with *Streptococcus* and *Bacteroides* *Arch Oral Biol*, 26 : 1015~1025, 1981.
 - 56) Cisar, J O, Kolenbrander, P E and McIntire, F C Specificity of coaggregation reactions between human oral streptococci and strains of *Actinomyces viscosus* or *Actinomyces naeslundii* *Infect Immun*, 24 : 742~752, 1979.
 - 57) Kolenbrander, P E and Williams, B L Lactose-reversible coaggregation between oral actinomycetes and *Streptococcus sanguis* *Infect Immun*, 33 : 95~102, 1981.
 - 58) Kolenbrander, P E and Williams, B L Prevalence of viridans streptococci exhibiting lactose-inhibitable coaggregation with oral actinomycetes *Infect Immun*, 41 : 449~452, 1983.
 - 59) Kolenbrander, P E, Inoue, Y and Holdeman, L V New *Actinomyces* and *Streptococcus* coaggregation groups among human oral isolates from the same site *Infect Immun*, 41 : 501~506, 1983.
 - 60) 浜田茂幸 医学細菌学(ミュータンスレンサ球菌(mutans streptococci)の細菌学的性状とビルレンス因子), 4 : 271~314, 1984.
 - 61) Socransky, S., Haffajee A The bacterial etiology of destructive periodontal disease current concepts *J Periodontol*, 63 : 322~331, 1992.
-

Long-term Supragingival Dental Plaque : Ultrastructural and Immunohistological Study

TOSHIHIKO YAMADA, MOTOHIKO NAGAYAMA and HIROSHI TAKEUCHI

Department of Oral Pathology, Asahi University School of Dentistry

(Chief : Prof Hiroshi Takeuchi)

1851 Hozumi-cho, Motosu-gun, Gifu pref, 501-0296, Japan

Key words . Dental plaque, Plaque bacteria, Scanning electron microscopy,
Immunoelectron microscopy, Carbonate apatite disk

Abstract *It is known that dental plaque developed over one week has a close connection to the initiation of dental caries and periodontitis. However, the features of microbial habitation in dental plaque, which are considered to induce dental caries and periodontitis, has not been clarified thoroughly*

To clarify the features of microbiota in dental plaque, this study morphologically investigated supragingival dental plaque on a carbonate apatite film applied to human natural tooth surfaces for 8 – 20 days. The morphology of microbial habitation in plaque was confirmed to be identical to that in plaque on human natural tooth surface under poor oral hygiene. Old plaque formed after an 8-day exposure to the oral environment exhibited a tendency for the microbial flora to preserve stationary state, especially two layers consisting of gram-positive bacillary type (initial colonizer) and gram-negative filamentous type (secondary colonizer) without showing remarkable change.

From the above, it was concluded that the dental plaque at the stage regarded to be deeply related to the initiation of oral infections such as dental caries and periodontitis shows a basic arrangement of microbiota formed between bacillary initial and filamentous secondary colonizers and gram-negative cocci and bacilli on the surface of the basic arrangement. These major microbiota were identified as Actinomyces and streptococci (initial colonizer) by immunoelectron microscopy. Fusobacterium (secondary colonizer) and Porphyromonas gingivalis (predominant microbiota on the surface of the basic arrangement) then sequentially accumulate.