

総 説

プラークおよびプラーク関連疾患の解析
(大学院修了者との1999~2001年にわたるプロジェクト研究成果)

竹 内 宏¹⁾ 山 本 宏 治²⁾ 永 原 國 央²⁾
大 友 克 之³⁾ 永 山 元 彦¹⁾ 田 辺 俊 一 郎²⁾
梶 本 忠 保²⁾ 大 橋 静 江²⁾ 山 田 敏 彦⁴⁾
山 本 正 剛⁴⁾ 松 木 な み 子⁴⁾ 作 誠 太 郎⁴⁾

- 1) 朝日大学歯学部口腔病理学講座
- 2) 朝日大学歯学部総合歯科学講座
- 3) 朝日大学歯学部外科学講座
- 4) 朝日大学歯学部大学院修了者

抄録 1999年4月より3年間にわたって大学院卒業者とのプロジェクトを設立し、「プラーク関連疾患の解析」のテーマの下に、①プラークの解析、②齲蝕の解析、③歯周炎の解析、④根尖性歯周炎の解析、⑤歯科インプラント治療の解析という五種類の解析に取り組んだ。それぞれには多様な研究課題あるいは研究分野があるが、今回はとくに基礎的解析を中心的目標とした。

「プラーク関連疾患の解析」の基礎の中の基礎であるプラークそのものについては、歯肉縁上プラークおよび歯肉縁下プラークの形成過程の形態的追跡をテーマとした。このプラーク形成過程はとくにヒトでは殆んど知られていない。これはヒト天然歯面上のプラークをintactな状態でしかも大量に採取することが不可能なことによる。そこで本研究では、天然歯硬組織成分に近縁なcarbonate apatiteを応用し、この薄片をヒト天然歯面に貼り付ける方法(歯肉縁上プラーク)と、3mm以上の歯周ポケットに挿入する方法(歯肉縁下プラーク)の二法でこの問題点を解決した。その結果、歯肉縁上プラークはペリクル形成期、細菌付着期、初期コロニー形成期、前オーガナイズ期、細菌叢変換期、後オーガナイズ期の六期で成熟プラークが完成し、これに対して歯肉縁下プラークはペリクル形成期、細菌付着期、初期コロニー形成期、前オーガナイズ期、後オーガナイズ期の五期にわたることが明らかになった。

両プラークは、ペリクル形成、細菌付着、初期コロニー形成、オーガナイズという形成期は一致していたが、それぞれの形成時期が歯肉縁下プラークでは著しく緩慢に経過し、互いにオーバーラップを見せ、明確な菌叢変換期がないという三つの点で歯肉縁上プラークとは大きく違っていた。またペリクルは、歯肉縁上の場合、唾液成分が関連したのに対し、歯肉縁下のそれは主として歯肉滲出液であり、ペリクル付着細菌については、歯肉縁上では主としてグラム陽性球菌、一部にグラム陽性桿菌であったのに対し、歯肉縁下ではグラム陽性桿菌のみである点でも著しい違いがみられた。さらに、歯肉縁上では菌叢変換前まではこのグラム陽性球菌を中心としてプラークが形成され、それ以降はグラム陽性桿菌が中心であったのに対し、歯肉縁下では終始 initial colonizerのグラム陽性桿菌が主要な細菌の位置を占める点でも異なっていた。なお、両プラーク形成期のinitial colonizerである桿菌が、オーガナイズ期でsecondary colonizerのグラム陰性線状菌と二層性の定常的細菌構築を形成したことは共通していた。

歯肉縁下プラークでは、この二層性の定常的構築が、いわゆるtooth-associated plaqueの主要細菌であり、その表面にグラム陰性球菌群や桿菌群が増殖し、いわゆるepithelium-associated plaqueを形成すると見なし得た。そして、tooth-associated plaque中の細菌叢はとくに二層性構築形成細菌の菌叢が変化しないのに対して、epithelium-associated plaque中の細菌は常に量的・質的変動を反復

し、この量的・質的変動が歯肉炎の発症や経過に関連していることが示唆された。

このような歯肉縁下プラークと歯周炎の発症や経過に関しては、ヒトにおいても実験的歯肉炎の発症実験である程度明らかにされている。しかし、プラーク細菌の形成過程との関係、およびその際の細菌構築との関係といった分野の基礎的データは全く得られていない。そこでこの点を明らかにするために、我々はやはりCAPをヒト歯周ポケットに挿入し、細菌の動向を歯肉炎発症と関連づけて検索した。その結果、歯肉炎は歯肉縁下プラーク形成過程の確立期に、被験者の約50%に発症し、その際のプラークは、tooth-associated plaqueにおいて細菌増殖期に一致するか、あるいはtooth-associated plaque表層に著しい貪食細胞が浸潤し、細菌が殆んど見られないかの二つの状態を示した。この所見は、ある種のepithelium-associated plaque細菌が直接的に歯肉に炎症反応を惹起させる作用のあること、そしてその一過程として浸潤した貪食細胞が同部の細菌を捕食することによって防衛的に作用していること、さらにこれらの貪食細胞の自己融解が二次的に組織破壊性に作用することの三点が示唆された。

齲蝕の継発症である根尖性歯周炎については二つの検索を行った。その一つは、*Actinomyces*を中心とした口腔内細菌の病巣への侵襲の有無と程度、およびこれら細菌の生体組織に与える影響についてであり、もう一つは根管細菌と根尖性歯周炎との関係についてである。病巣内の細菌の検出には培養法等種々あるが、組織レベルでは免疫組織化学的手法が最も妥当である。しかし、病巣の細菌成分が可溶状態である場合にはこれらの方法では検出は不可能に近い。この観点に立てば、これまでの根尖性歯周炎病巣内への細菌侵襲に関するデータはかなり正確性に欠くものと考えられる。そこで今回、この点を解決するために、免疫組織化学的手法だけでなく、病巣からの滲出液のimmunoblot解析法をも検索に加えた。その結果、免疫組織化学的手法では、慢性歯周炎の病巣の少数例が陽性所見を示したのに対し、immunoblot法では、*Actinomyces*抗原および混合細菌抗原ともにさらに多数例に陽性症例を得ることができた。この結果は、従来報告されてきた以上に、急性症例は当然のことながら、慢性症例にも細菌あるいは細菌成分の侵襲例が多いことを示すものであった。また、慢性症例の病巣にはfoam cellの浸潤が往々認められるが、これには*Actinomyces*の影響が大きいと考えられ、この点を明らかにする一助として、本細菌を接種したラット口腔粘膜下の実験的感染症における組織応答を、混合細菌接種ラットを対照として免疫組織化学的に検索した。その結果、*Actinomyces*接種ラットには明らかに多数のmacrophageの浸潤があり、しかも、その中にはfoam cell化しつつある細胞も数多いということが判明し、ひいては、根尖性歯周炎歯周炎のある種のもは*Actinomyces*感染例であることが強く示唆された。

次に、根管細菌と根尖性歯周炎の関係を臨床的立場からも知るために、とくに急性症状を伴う症例の根管からの偏性嫌気性菌のenterococciの同定を行い、また抗生物質感受性を検索した。その結果、症状を認めた例は55例中18例で、そのうち培養陽性例は6例、一方、臨床症状のない例は37例で、そのうち15例は陽性であった。これら細菌はペニシリン系に若干の抵抗性、セファロスポリン系には抵抗性、マクロライド系ではばらつき、テトラサイクリン系には感受性を示した。以上の結果は、本来常在菌でないenterococciが根管内にかなりの比率で混入し、これが難治性の臨床症状発現させるだけでなく、症状のない例では症状発現例に転化する可能性を示し、また、抗生物質の感受性がかなり低いことから、根管治療については新たな考え方とこれに対する処置法を採用する必要のあることが示唆された。

以上のような齲蝕症、歯周炎、あるいは根尖性歯周炎といった代表的なプラーク関連疾患では、往々歯の喪失を伴う。その歯の補綴療法の一つとして歯科インプラント治療がある。我々はこの歯科インプラント治療が口腔の最終的療法とみなし、主として歯科インプラント治療のevidence-based medicine (EBM)を確立することを目的として、動物実験を応用した基礎的研究を行った。実験系は大きく①人工歯根(フィクスチャー)に関する研究、②インプラント支台歯(アバットメント、上部構造体)に関する研究、③Guided Bone Regeneration (GBR)膜に関する研究、④多血小板血漿 (PRP)の4点とした。

①の人工歯根(フィクスチャー)に関する研究では、主にフィクスチャーの表面性状に関わる周囲組織反応の検討を行った。その結果、純チタンおよびチタン合金では、インプラント体周囲での骨のリモデリングが同様であることを確認した。

②のインプラント支台歯に関しては、主にアバットメントの抗菌性、磁性アタッチメント周囲の組織学的検索およびインプラント周囲歯肉溝からの浸出液の分析結果と骨吸収の指標とに関わる検

索を行い、銀成膜による安定した抗菌性を認め、磁性アタッチメント周囲では組織学的に、充血、血管拡張、炎症性細胞浸潤が認められた。また、浸出液の分析では、S-GAGがインプラント周囲の骨吸収の指標になりうる事が示唆された。

③のGBR膜に関する研究では、GBR膜として臨床応用されているGore-Texに銀成膜処理を施すことで、本来のGBR膜としての作用を損なうことなく、抗菌性、抗プラーク形成性が獲得されることが確認された。

④の多血小板血漿 (PRP) に関する研究では、PRPの骨欠損部への応用により、1週目までに類骨の形成が始まり、それには血小板由来成長因子 (PDGF) が大きく関わりを持っていることが示唆された。

キーワード：プラーク形成、齲蝕症、歯周疾患、根尖性歯周炎、歯科インプラント治療

緒 言

口腔疾患の中で最も発症頻度の高い感染症あるいは炎症性疾患のほとんどは、プラーク細菌を原因とする齲蝕症や歯周炎、およびこれらを原疾患とする歯性顎炎や歯性顎周囲炎である。朝日大学歯学部post doctor 研究グループ (PD研とする) は、これら疾患を「プラーク関連疾患」と位置付け、プラーク本態から喪失歯の最終療法にいたる次の五点についてプロジェクト研究を進めた。

- ① プラークの解析
- ② 齲蝕症の解析
- ③ 歯周炎の解析
- ④ 根尖性歯周炎の解析
- ⑤ 喪失歯の最終療法 (インプラント療法) の解析

現在、このすべてを解析し尽くしてはいないが、今回、本学会誌を借りて、これ迄の過去3年間にわたる業績を総説の形で報告する。

1. プラークの解析

「歯あるいは他の口腔の固相面に形成された細菌性凝集」であるプラークは、狭義には歯肉縁上プラークと歯肉縁下プラークに大別され、歯肉縁上プラークは、さらに単に歯冠部エナメル質のみに形成されるcoronal plaqueと、歯冠および歯肉縁部の両部にわたって形成されるmarginal plaqueに分けられている¹⁾。

これらプラーク形成の本態である口腔常在菌の口腔への侵入 (汚染) はまず産道において開始され、以後、授乳や摂食その他の種々の機会に侵入し、その中で口腔に適応性を示すもののみが常在菌としての位置を占める²⁾。生後1日ですでに *Streptococcus salivarius* が定着し³⁾、さらに授乳や摂食によって *Lactobacillus jensentii* や *L. acidophilus* が加わる⁴⁾。細菌はその後あまり著しい増殖をしないが、歯の萌出に伴って再び増量し、その代表的な細菌は *S. sanguis*³⁾ や *Actinomyces naeslundii*⁵⁾ および *Veillonella*⁶⁾ である。歯の萌出当初はグラム陽性細菌が常在菌の主流を占めるが、一部にグラム陰性偏性嫌気性菌も定着する⁷⁾。そして5-7歳の幼児の半数以上に黒色色素産生性グラム陰性嫌気性桿菌が常在し始め⁸⁻¹⁰⁾、またスピロヘータも加わる¹⁰⁾。

以上のように、歯の萌出に伴って口腔常在菌の種類と量が飛躍的に増加し、1mgあたり 1.7×10^{11} オーダーの細菌数に達し、菌種は300-400種に上る^{13,14)}。

近年、プラークに対しても「生物にとって重要な環境的要因の勾配の緩徐な変化が、本来共存し得ない細菌の共存を可能にするマトリックス」と定義されてい

るbiofilmの概念が採用され^{15,16)}、プラークについては、プラークマトリックス内の酸素分圧、pH、栄養と血液成分等の勾配がプラーク内に種々の微小環境を形成し、その環境に適応した細菌が至る所で定着・増殖すると解釈されている¹⁷⁻²⁰⁾。

さらに近年、このようなプラークは口腔内細菌が一定の規律を以って形成されることが次第に明らかにされるようになった。すなわち、細菌は幾つかのsequential phaseを経てプラークを形成し²¹⁻²⁴⁾、それぞれのphaseには数的に優位を示す細菌があつて²⁵⁻²⁷⁾、それらはペリクルへの選択的付着性^{19,28-31)}や異種菌との共凝集性³²⁻³⁴⁾を中心とした秩序を発揮することが見出されている。ひいては、これら秩序はプラーク形成に必須の要因であることを示している。

PD研では、「プラーク関連疾患の解析」の手始めとして、歯肉縁上および歯肉縁下の両プラークの形成過程を *in vivo* で追求し、同時にその過程において、如何なる秩序が内在するのかを主として形態的に探ってみた。

1) 歯肉縁上プラーク形成過程の形態的解析

(1) 材料と方法

このような類の検索を行うには、まず歯肉縁上あるいは縁下プラークを天然歯面からintactな状態で、しかも大量に得ることが必須である。従来、この点を克服するために、種々の代用材を用い、これを口腔内に露出する方法が採られてきた^{23,29,35-40)}。しかし、これら代用材上で形成されたプラークは、天然歯面のそれと

は本質的に異なるという指摘がなされた^{41,42}。また, Lam Watt and Bennick⁴³, Fineら⁴⁴およびRuanら⁴⁵は, エナメル質表面とセメント質表面においてすらタンパク吸着のパターンの異なることを実験的に証明し, このためにNyvadら^{30,31}はこの点を解決するために, 埋伏歯から得た薄片を用いた. PD研でのこの点の解決策としてcarbonate apatite薄片(CAP)をヒト天然歯面に装着する方法を工夫した. CAPはすでに天然エナメル質とほとんど同一の組成より成ることが解析されたDoiら⁶⁴の方法に準じて作成した. その薄片は, 合成時に天然エナメル質のfine defectと類似した構造を示し, 研磨時にperikymataに類似したグループ状構造が生じ, 組成的にも構造的にも天然歯面に近似することがSEMで確認された.

このようなCAPをヒト上下第1大臼歯の頬側および舌側に装着し, 装着後, 1・3・5・10・30分, 1・2・3・4・5・6・7・8・10・12・16・18時間, 1~21日の各日にわたってCAPを歯面から剥離し採取した.

a. プラーク形成のsequential phaseの観察

上記のようにして採取したCAP面上の堆積物をSEMおよびTEMによって観察し, まずプラークの形成過程を検討した.

b. Vertically sectioned SEMによる観察

次に歯肉縁上プラークの形成過程において生じる細菌構築を, 我々がvertical sectioningと名付けたSEM用資料を用いて観察した(V-SEM). 本法は図1Aのような器具を準備し, SEMで観察を終えた試料を試料台から一旦はずし(図1B), これを図1Cのようなレジン台に両面テープで貼り付け, その底部にディスクで溝を入れ(図1D), その溝にチゼルを挿入し(図1E), ハンマーで叩いて図1Fのように分割し, その断面を表面観察する方法で, その像はSEMとTEMの両者の像のgapを埋め, しかも両観察法では捉えることができなかった新たなプラーク構造を知ることができた.

c. 共凝集の様相

プラーク細菌間の共凝集と, その共凝集のプラーク形成の関わりを確認するために, freeze substitution methodによるTEM(F-TEM), および抗ヒト耳下腺唾液タンパクIgG抗体を用いた免疫電顕(I-EM)をも観察に供した.

(2) 観察結果

a. SEMおよびTEMによるsequential phaseの所見

SEMおよびTEMによって, CAP面上の歯肉縁上プラーク形成は図2Aに示すように ①ペリクル形成期, ②細菌付着期, ③初期コロニー形成期, ④前成熟プラーク形成期, ⑤菌叢変換期および⑥後成熟プラーク形成期の六期のsequential phaseにわたった. そして, これら各時期のSEMおよびTEM所見は以下の如くであった.

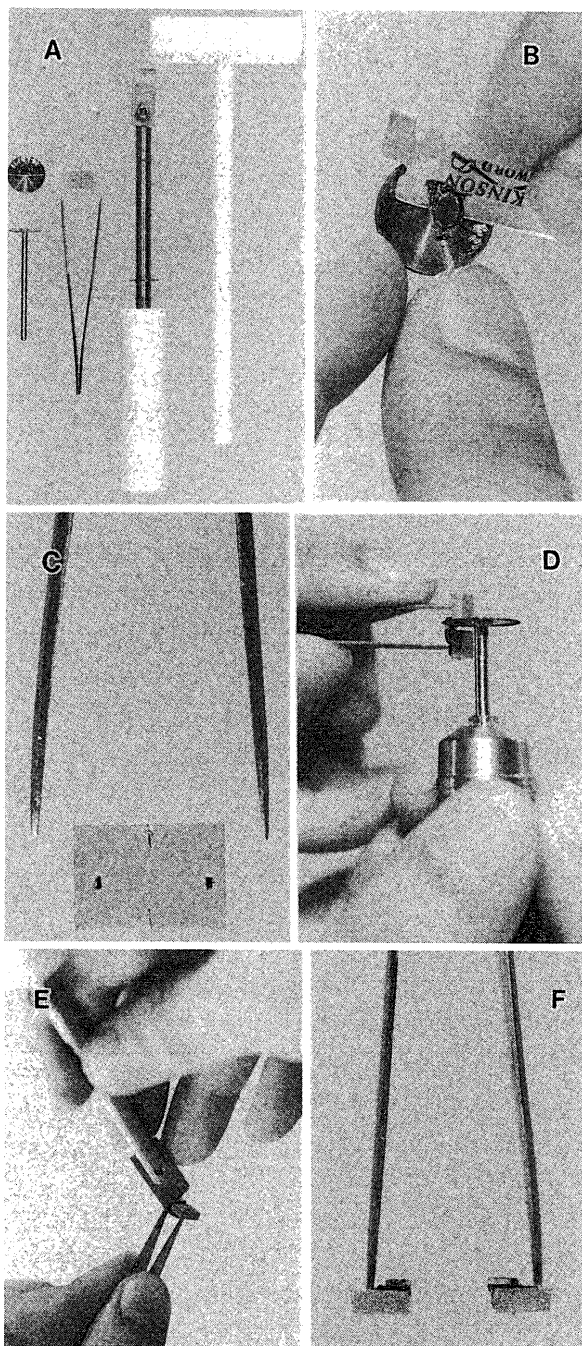


図1 vertical sectioningの術式

A: 本法に用いた主な器具, B: SEM用の試料台からはずした試料, C: レジン台に貼り付けた試料, D: レジン台底部に入れた溝, E: 溝に挿入したチゼル, F: 縦分割にした試料.

a) ペリクル形成期

ペリクル形成はCAP装着1分後からすでに始まり, 少なくとも12時間にわたって続いた. その初期過程(1分後から数分後)はSEMによってのみCAP面上の散在性の小滴として捉えることができ(図2B), TEMでは1時間以上の後に微細線維状, 顆粒状あるいは無構造堆積物として認められた.

b) 細菌付着および初期コロニー形成期

ペリクルへの細菌付着はCAP装着後5分から始まり, 18時間に及んだ. その初期には, SEMでは細菌は

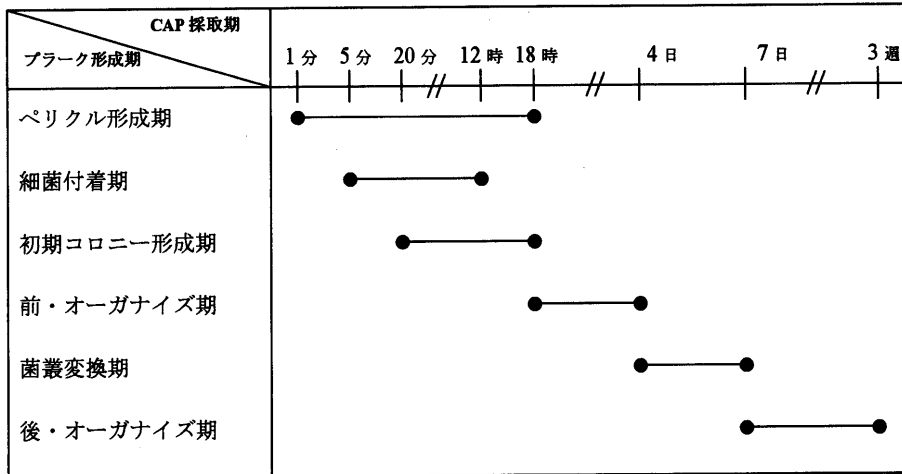


図2 歯肉縁上プラーク形成過程の模式図
A; 歯肉縁上プラークの形成過程図.

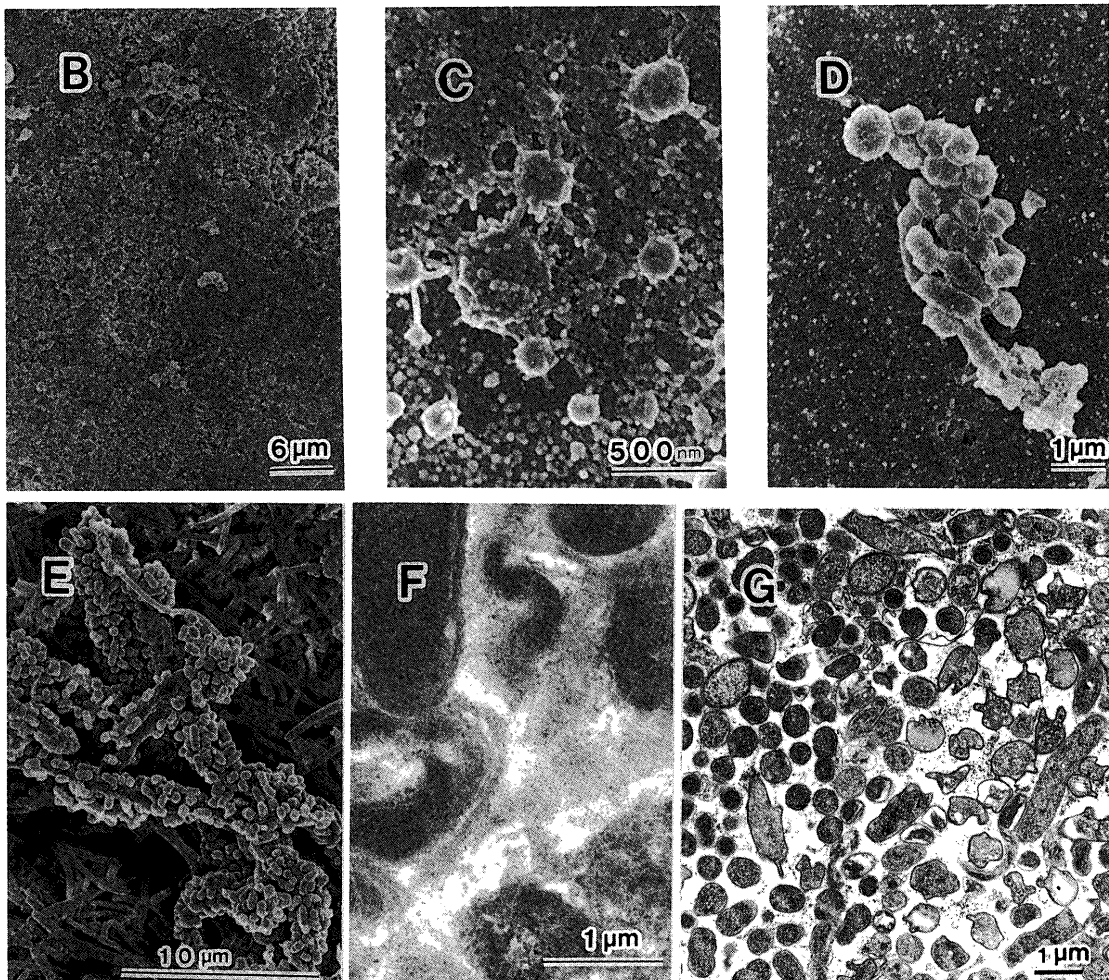


図2 歯肉縁上プラーク形成過程の模式図
B; ペリクル形成, C; ペリクルへの細菌付着, D; initial colonization, E; 前成熟期におけるcorn cob, F; 菌叢変換期, G; 後成熟期の菌叢.

密集した小滴の表面への付着として認められ、細菌表面の突起状の構造物で付着するものが多く認められた(図2C)。TEMではこれら細菌のほとんどはグラム陽性球菌、一部に桿菌の構造を示した。

付着に続くinitial colonizationは主として球菌の分裂・増殖によって行われ、これに対して桿菌の増殖様

式は不明瞭で且つ極めて緩やかであった。そのcolonizationは初期にはCAP面上で散在性に開始され(図2D)、これらに後続の付着細菌によるcolonizationが加わり、コロニーの密度は次第に高くなった。また12時間後では、これらのコロニーの増大の度合いに著しい差が生じ、high growth rate部と、散在性であり増殖

しないlow growth rate部に大別し得た。前者は互いのコロニーが融合してさらに大きくなると同時に前期成熟プラークを形成したのに対し、後者は長期にわたって未成熟プラークのままに停まる傾向を示した。このようなコロニーの形成速度の違いは同一CAP面上にも生じたが、上下第1大臼歯の頬側面に装着したCAP面上にhigh growth rate部が多く、舌側面上に著しく少ないという歯面による違いがより明確に現れた。

c) 前成熟期

CAP装着18時間後頃に、新たな細菌がsecondary colonizerとして増殖を開始した。その主な細菌はグラム陰性紡錘菌であり、一部にグラム陽性ならびに同陰性球菌も混じた。これら細菌は初期にはinitial colonyの表面に、そして次第にその間隙でも増殖し、これに伴ってプラーク中の菌叢は複雑な構造を示すようになり、2日後頃になるとその表面にcorn cobをも形成した(図2E)。

しかし、low growth rate部では、この時期でもinitial colonizerの球菌の層は一層ないし数層で、その表面にわずかに新たな細菌が増殖するのみで、いわゆるim-

mature plaqueの状態に停まった。

d) 菌叢変換期

CAP装着4日から7日頃の間、空胞化や崩壊を起こす細菌を数多く認めるようになった。とくにinitial colonizerである球菌の崩壊が著しく、これに伴って前成熟プラークの構造が損なわれ、corn cobも消退した(図2F)。そしてinitial colonizerとして、新たにTEM像で多形性を示す細菌が増殖し始めた。主なsecondary colonizerであるグラム陰性紡錘菌は崩壊傾向をあまり示すことなく存続した。

e) 後成熟期

約7日後頃から、TEMで多形性を示すinitial colonizerの表面に種々の細菌が再び増殖し始め、新たな成熟プラークが形成された。そのsecondary colonizerは前成熟プラークのそれよりもはるかに雑多であったが、主要細菌はグラム陰性紡錘菌やグラム陰性桿菌であり、紡錘菌と球菌の間でやはりcorn cobが形成された。その後、細菌崩壊とこれに伴う菌叢変換の程度が軽度になり、このような菌叢の構成は21日後でもほとんど変化しなくなった(図2G)。

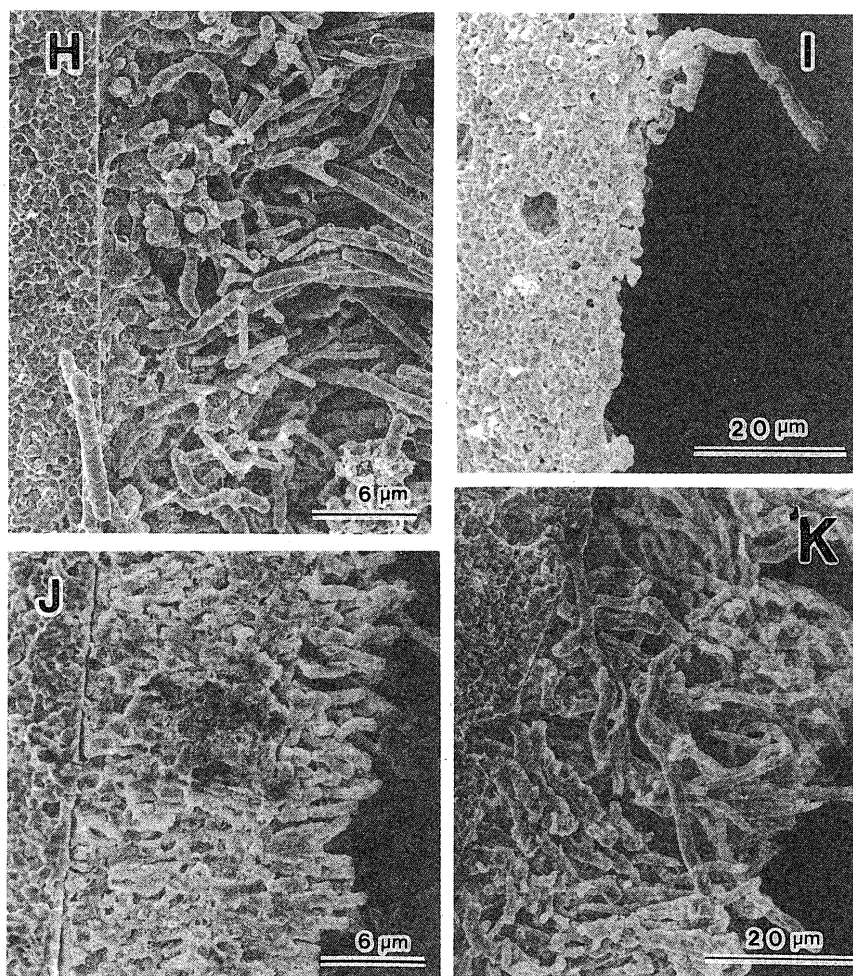


図2 歯肉縁上プラーク形成過程の模式図

H; 前成熟期における球菌と線状菌の二層構造のV-SEM像, I; 桿菌の垂直性増殖のV-SEM像, J; CAP面上に広範に広がった桿菌, K; 桿菌と線状菌の二層構造。

b. V-SEM所見

ペリクル形成期, 細菌付着・増殖期の様相はSEMやTEMの方が容易に観察できたが, 前成熟期になると, SEM像やTEM像では多種多様の細菌が密度高く増殖するという情報のみが得られたのに対し, V-SEMでは, initial colonizerの球菌とsecondary colonizerの線状菌との二層性構造の構成経過を極めて明快地観察し得た(図2H).

菌叢変換期では, TEM像で多形性あるいは多角形を示す細菌の増殖を認めたが, V-SEMでは, これが桿菌でペリクルに沿って水平に, 後に垂直に増殖し(図2I), やがて後期成熟プラークのinitial colonizerになり, CAP面上に広範に増殖して行くことが明らかになった(図2J). また, 後成熟期のSEMおよびTEMでは, 細菌構築が前成熟期以上に多様性を示したのに対し, V-SEM像は予想外に単純で, プラークの大部分はinitial colonizerである桿菌と, secondary colonizerである長大な紡錘菌との2層構造によって占められることが判明した(図2K).

以上のV-SEM所見から, 一見, 複雑な菌叢を示すプラーク中に, 前成熟期では球菌と紡錘菌, 後成熟期では桿菌と紡錘菌との間でそれぞれstable structureが形成されること, そして両structureにおいてsecondary colonizerの紡錘菌が同一菌種であることが明らかになった.

c. F-TEMおよびI-EMによる細菌共凝集の観察

微細な線維構造や膜構造を鮮明に観察することのできる凍結置換法, および抗ヒト耳下腺タンパク抗体を用いた免疫電顕法の両法によって, fibril-mediatedおよびsaliva-mediated共凝集の様相が以下の如く明らかになった.

a) F-TEM所見による共凝集の所見

CAPおよび天然歯面上に21日間にわたって形成されたプラークにおいては, 前成熟期までのプラーク中に線毛の豊富な細菌が多く, 後成熟期では減少する傾向を認めた. これらを大別すると, プラーク中の細菌の線毛は, 細胞壁の全周から均一に出るperitrichous type, 細胞壁の一部から限局性に出るlocalized type, 細胞壁の数カ所から出てperitrichous typeとlocalized typeの中間的な存在を示すmixed typeの3型に大別することができた. 付着期および初期コロニー形成期では, 主要細菌の球菌と桿菌はいずれもperitrichous typeの線毛を有し, それぞれがその線毛によって同種菌体間凝集を行うと同時に, 両菌間の異種菌体間凝集も認められた.

前成熟期では, その開始期(約18時間後)においてグラム陰性紡錘菌が現れ, やがてsecondary colonizerの優位な菌として増殖した. この菌はSEMでも多くの菌と共凝集することが明らかであった(図2L)が, F-TEMでは短いperitrichous typeの線毛を有し, その線

毛がinitial colonizerの球菌とつながるだけでなく, 他のsecondary colonizerともつながり, いわゆるmulti-generic coaggregationを行っていることが観察された(図2M). このような豊富な線毛を持つ細菌群の増殖とそれらによる同種および異種共凝集のために, 前成熟プラークには密な線毛の交織が認められた(図2N).

菌叢交代期には, initial colonizerのグラム陽性球菌を主とする細菌群の変性・崩壊に伴って, 豊富にみられた線毛も消退し, 崩壊を免れた細菌, および新たに現われた細菌群のわずかに線毛を認めるのみになった(図2O).

後成熟期には, グラム陰性球菌や同球桿菌が数多く現れたが, これらはいずれも線毛は密でなく, 異種間の共凝集を行わないものも多くみられた. 従って, この時期の成熟プラークには前成熟プラークでみられたような線毛の交織は密ではなかったが, この中にあって, グラム陰性紡錘菌のみはプラーク中を蛇行しながら垂直方向に伸び出し, プラークの最深部で後成熟プラークのinitial colonizerの桿菌と互いの短い線毛どうしで共凝集を行うだけでなく, 中層部で他の種々の細菌とも線毛による異種共凝集を行い, 前成熟プラークのそれと極めて類似した様相を示した(図2P). さらに, 本菌はプラーク表面においては, グラム陽性球菌や同球桿菌と線毛を介してcorn cobを形成した(図2Q).

以上のように, プラーク細菌の多くは線毛を有し, これらによって互いに同種および異種菌体間の共凝集を行い, とくにプラークに必須とみなし得る細菌群はプラーク形成時期に関係なくfibril-mediated coaggregationを行うことが明らかであった. そしてこれらの所見は, プラーク形成に必須の要件である歯面への固着が, initial colonizerによるペリクルへの選択的付着と, initial colonizerに特異的共凝集を示すグラム陰性紡錘菌, およびこの菌のmultigenic coaggregationによって成立していることを示すものであった.

b) I-EM所見

saliva-mediated coaggregationを確認するために, ヒト唾液タンパクを抗原とする家兎多クローン性抗体(IgG抗体)にcolloidal gold particleを標識し, これを天然歯面上およびCAP面上のプラークに反応させ, 免疫電顕によって唾液タンパクの局在性とプラーク細菌の関係を観察した. その結果, 後包埋法では唾液タンパクの局在を示すcolloidal gold particleは, ペリクルおよびプラークマトリックスに常時認めることができ(図2R), さらに同particleはある種の細菌表面にも認められた(図2S). これを前包埋法でみると, particleは, 細胞壁にみられるものと線毛にも認められるものがあり, その中には菌体間に局在し, 明らかに共凝集に関与しているとみなし得るものがあった(図2T).

また, ある種の細菌では, プラークマトリックス中のparticleに結合するものもみられた.

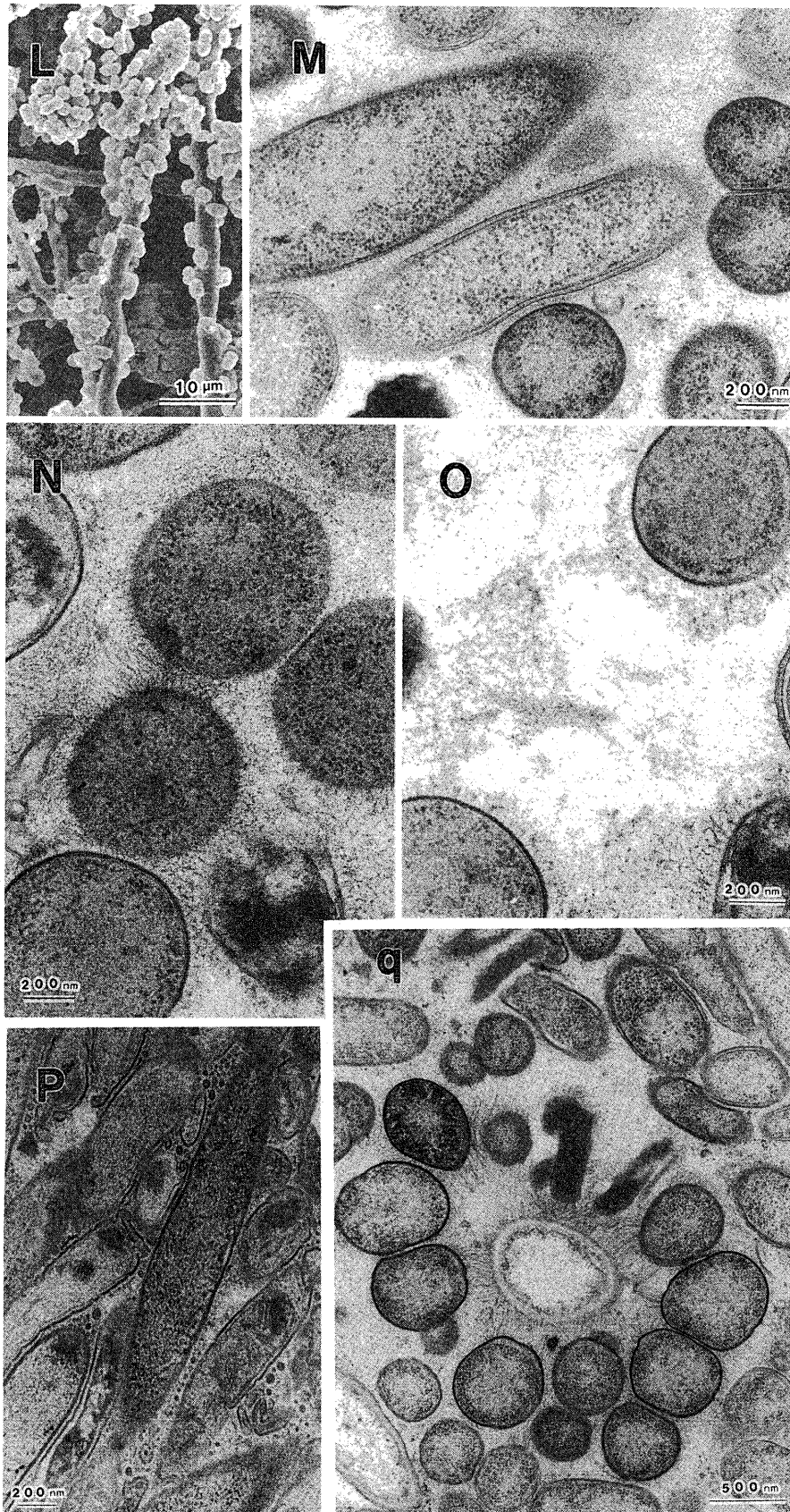


図2 歯肉縁上プラーク形成過程の模式図

L ; グラム陰性紡錘菌のmultigeneric coaggregationのSEM像, M ; 同multigeneric coaggregationのF-TEM像, N ; 前成熟期の密な線毛性共凝集, O ; 菌叢変換機の細菌の線毛, P ; 後成熟期におけるグラム陰性紡錘菌の線毛によるmultigeneric coaggregation, Q ; 後成熟期のプラークにおけるcorn cobのF-TEM像.

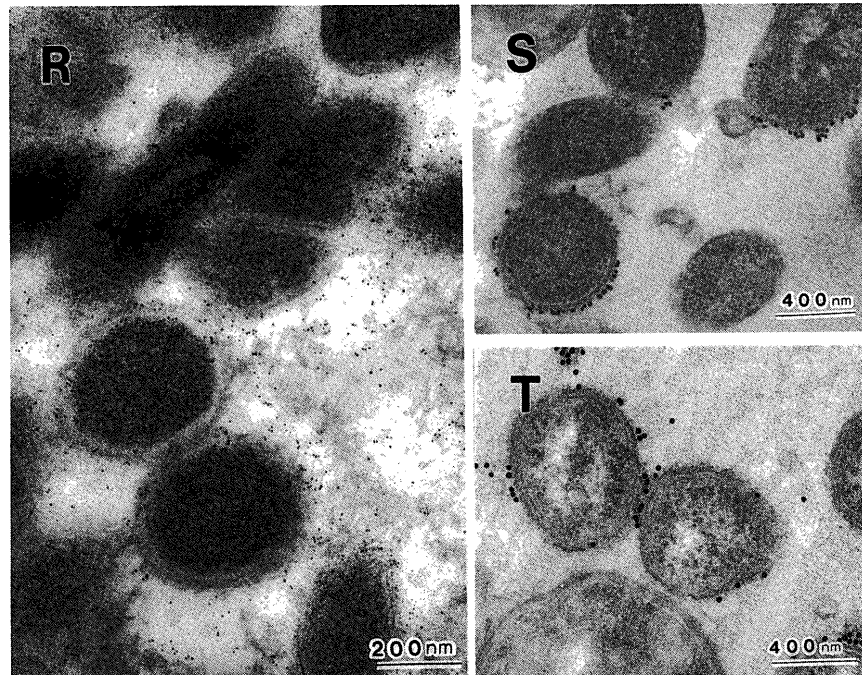


図2 歯肉縁上プラーク形成過程の模式図
R; プラークマトリック中の唾液タンパクのI-EM像, S; 細菌表面に付着した唾液タンパクのI-EM像, T; 唾液介在性共凝集のI-EM像.

これら前および後包埋法による観察によって、唾液タンパクは単にペリクルやマトリックスを形成するだけでなく、直接および間接的に共凝集にも寄与していることが明らかになった。なお、このようなsalivamediated coaggregationは主に同種細菌間でよく認められる傾向にあった。

(3) 考察

CAP面上でのプラーク形成での各sequential phaseの菌叢はNyvad²⁶⁾の総説と本質的に同一であった。

ペリクル形成については、これまでの報告ではペリクル形成は数時間以内とされていた⁴⁷⁻⁵¹⁾が、今回の検索では、CAP装着わずか1分後にすでに形成の徴を認めた。細菌付着は5分後にSEMで捉えることができたが、ほぼ球菌に、また一部に桿菌に限定され、TEMではいずれもグラム陽性菌の菌体膜構造を示した。この所見はペリクル付着細菌には菌種特異性のあることを示し、すでにviridans streptococciやActinomycesであることが証明されている^{18, 52-58)}ことを裏付けている。これら細菌はそれぞれ異なるメカニズムによってヒドロキシアパタイトに吸着するところ⁵⁹⁻⁶¹⁾の唾液由来の高分子糖タンパク(mucin⁶²⁻⁶⁵⁾, α -amylase⁶⁶⁻⁶⁸⁾, SIg^{63, 64)}, lysotyme⁶⁵⁾や低分子糖タンパク(proline-rich proteins⁶⁹⁻⁷¹⁾, cystatins^{63, 68)}, statherin^{72, 73)}に特異的に結合する。すなわち、viridans streptococciはmucin⁷⁴⁻⁷⁷⁾, α -amylase⁷⁸⁻⁸²⁾, proline-rich proteins⁸³⁻⁸⁴⁾に、Actinomycesはproline-rich proteinsとstatherin^{72, 85)}にそれぞれ特異的に結合する。このような菌種特異性は、これらタンパクがレセプターとして機能し、その特異的付着子を両細菌が有していることによる⁸⁷⁻⁸⁹⁾。

その代表的な付着子の1つのレクチンは、ペリクル中の糖タンパクのoligosaccharideに特異的に結合するが、*S. sanguis*はペリクル糖タンパクのsialic acidと結合すること⁹⁰⁻⁹²⁾、同様に、*S. oralis*はsialic acid, galactose, N-acetylgalactosamineにそれぞれ結合性を示すレクチンを有すること⁹⁰⁻⁹²⁾が明らかにされている。一方、*Actinomyces*はタンパク性レセプターと結合する付着子を有している⁹³⁾。

なお、初期付着細菌のペリクルへの付着はイオン結合、疎水結合、ファンデルワールス結合のような非特異的吸着によっても生じるが、その結合力は弱く、唾液によって洗い流されるとみなされ⁹⁴⁾、さらにStaat and Peyton⁹⁵⁾, Busscherら⁹⁶⁾およびCovanら⁹⁷⁾は、初期付着細菌のペリクルへの結合は非特異性イオン結合あるいは疎水結合によって行われ、その結合は可逆的であり、その後、次第に付着子とレセプターとの間の特異的結合に移行し、強固な固着が生じると述べている。Gibbonら⁹⁸⁾やFives-Taylor and Thompson⁹⁹⁾は、これら細菌のペリクルへの特異的付着および共凝集は、一般に菌体表面の付属器、すなわち線毛様構造物を介すること、また、Doyleら¹⁰⁰⁾は、この構造物がペリクルとの不可逆的結合に関与していることを証明している。因みに、streptococciにperitrichous fibrillar structure^{101, 102)}、またActinomycesにfimbriae^{86, 103)}が備わっている。これらの観点に立てば、今回の検索の細菌付着初期より球菌および桿菌ともに突起状構造物で連なっているものが認められた所見は、ペリクル形成後わずか数分後にすでに強固に付着するものがあることを示している。また、これら細菌による初期コロニーは球菌の細胞

分裂が先行し、桿菌は著しく増殖が遅く、そして12時間前後には、その球菌の増殖速度が加速度的になる high growth rateと遅速な low growth rateに分かれた。この現象は菌種ではなく菌面依存性の傾向を示したことから、Simonssonら^{104,105}の説くように、唾液成分や流量の如き化学的要因、ならびに咀嚼や口腔粘膜の運動の如き物理的要因が影響していることが考えられた。

このような球菌を initial colonizerとして、その表層に corn cobを伴う種々の細菌の増殖した前成熟プラークは、4-7日の間で菌叢が著しく変化したが、その最大の原因は Syed and Losche¹⁰⁶や van Palenstein-Helderman¹⁰⁷の報告と同様に、initial colonizerであるグラム陽性球菌の変性・崩壊によることが明らかであった。これに伴って、*Actinomyces*とみなし得る桿菌が優位を占めるに至った。このような細菌崩壊については、Ritz¹⁰⁸はプラーク中の好氣的条件から嫌氣的条件への変換に基づくと考えている。

後成熟プラークでは、前成熟プラークよりもさらに複雑な菌叢構成が観察され、同時に、あまり顕著な菌叢変化を示さなくなった。このような菌叢が変化しない古いプラークの細菌構築を stable structureであるとみなされており²²、Nyvad and Fejerskov¹⁰⁹は、これを形態学的に3型(Type I-III)に分類した。因みに、Type Iは光顕的に球状を呈するコロニーの不規則な集まりが10-80nmの重さのプラークを形成し、TEM像では各コロニーは大きな空胞を有する球形ないし多形性の細菌で形成され、これらコロニーの間隙にグラム陽性球菌が、また最表層にグラム陰性紡錘菌が配列するもの、Type IIは光顕的には特徴的なパターンはなく、TEMで最内層にグラム陽性菌の密集とその表層にグラム陽性および陰性菌の不規則な増殖、さらに corn cobの形成を認めるもの、Type IIIは光顕的には層状構造が明確で、TEMでは最内層にグラム陽性菌、中層に紡錘菌、最表層に corn cobを伴う球菌が配列するものとしている。このような stable structureの形成については、今回のV-SEMはこれら報告とはかなり異なる構造を示した。すなわち、厳密な stable structureはペリクル付着細菌(initial colonizer)とその表層の細菌(secondary colonizer)の2層構造が基本構築であり、前および後成熟プラークの両期に若干異なる構成をなし、前成熟プラークの initial colonizerは球菌であるのに対して後成熟プラークのそれは桿菌で、secondary colonizerは両structureに共通し紡錘菌であった。

さらにV-SEMによって、後成熟プラーク中の stable structureの initial colonizerである桿菌は、出芽様式をとりながら徐々にプラーク表層に向かって増殖し、菌叢変換期に旺盛な増殖性を獲得することや、TEMで往々認められる多形性細菌はこの桿菌の断面であることも明らかになった。因みに、これまでのプラークの

形態学観察によって、8-48時間頃から多角形や多形性を示す細菌が出現することが知られていたものの、その本態については十分に解析されていなかった^{109,110-112}。本菌のTEM像は幅広い二層性細胞壁を有するグラム陽性菌で、カーブを描く細胞分裂と細胞質内の電子透過性の空胞の存在¹¹³で特徴付けられ、その形態学的類似性から *Actinomyces*であると推測された¹¹⁴⁻¹¹⁶。また免疫電顕的観察によっても *A. viscosus* が同定された¹¹⁷が、確定的とはいえない。

以上のように、ペリクルに選択的付着性を示すグラム陽性球菌および桿菌は、単にプラーク全体の initial colonizerであるに留まらず、stable structureの構成要素であり、それぞれに viridans streptococciと *Actinomyces*である可能性が極めて高いと考えられた。そして、両 stable structureに共通する secondary colonizerの紡錘菌は、その外形および両 initial colonizerと共凝集を示す、いわゆる multigeneric coaggregation性などから fusobacteriaの可能性が高い。

このように、initial colonizerと secondary colonizerが明確な層状構造をなすというV-SEMの所見から、両者が緊密な共凝集で繋がっていると考えられたが、この点は今回のF-TEMとI-EMでかなり明確にし得た。元来、共凝集は細菌間が直接的に結合する fibril-mediated coaggregationと唾液タンパクが介在する saliva-mediated coaggregationに大別されてきたが¹¹⁸⁻¹²⁵、F-TEMによって、V-SEMでみることでできた stable structure構成細菌は互いに fibril-mediated coaggregationを行うこと、その secondary colonizerで *F. nucleatum*とみなし得る細菌は、initial colonizerとだけでなく、一菌体の各部で多種類の異種細菌ともこの凝集を行い、corn cobを含む多様なコロニーを形成するという特徴を有することも明らかになった。

一方I-EMの観察では、ある種の細菌表面や線毛様構造物の先端部に唾液タンパクを吸着し、その唾液タンパクの付着を共有することによって saliva-mediated coaggregationを行う細菌も認められたが、多くは同種細菌間共凝集であった。

このような今回のF-TEMおよびI-EMの所見から、過去に報告されてきた bacteria-(fibril-)および saliva-mediated coaggregationの双方のほとんどに線毛様構造物が関与していることが確認でき、例えば initial colonizerである viridans streptococciと *Actinomyces*は互いに共凝集すると同時に、共に secondary colonizerである fusobacteriaとも共凝集することが知られている¹²⁶⁻¹³¹。さらに multigeneric coaggregationを行う fusobacteriaはこの凝集性から、early colonizersと late colonizersをつなぐ架橋的役割を演じているとみなされている^{130,131}。これら fibril-mediated coaggregationの結合は、ペリクル付着のメカニズムと同様にやはりレセプターと付着子による相補的結合とみなされ

ており, *S. sanguis*からは共凝集阻害性ポリサッカライド¹³²⁾, *F. nucleatum*からは39.5kDのポリペプチドやラクトース結合性レクチンがそれぞれ分離され¹³³⁾, そのメカニズムが検索されつつある。

2) 歯肉縁下プラークの解析

歯肉縁上プラークは齲蝕症発症およびその継発症の原因となるだけでなく, 歯肉縁下プラーク形成の出発点になると考えられる。しかし, 直接的な供給源の歯肉溝プラークは元より, 歯肉縁下プラークのプラーク形成過程については, intactなプラークを入手することが不可能に近いため今日に至るまでほとんど知られていない。そこでこの点にアプローチするために, 歯肉溝プラークおよび歯肉縁下プラークの形成過程をヒト抜去歯面上, およびCAP面上のプラークで追求した。

(1) 材料と方法

a. 歯肉溝プラークの観察

ここでいう歯肉溝プラークとは, 歯肉縁上プラークの延長線上にあって, 臨床的に健康とみなし得る歯肉溝内に形成される, いわゆるmarginal plaqueを指している。本プラーク形成過程を*in vivo*で観察するためには, 他の代用材では正確を期し難く, またCAPは挿入し難いため, 最良の被験材料はやはり天然歯面上のプラーク以外にないと考えられた。そこで, 被験材料は, 矯正治療のために便宜抜歯を予定された患歯のプラークを対象とした。採取にあたって十分に趣旨説明を行い, 同意を得たうえでその抜去歯面上のプラークを得た。従って, 対象歯は小臼歯と第3大臼歯に限定された。これら歯に徹底的な清掃を施し, その後, 当該歯のみの清掃停止を依頼し, 1日後から21日後にわたってとくに歯頸部に機械力が加わらないよう注意しつつ抜歯した。抜歯後, 速やかに1日間固定し, 上昇アルコール系列で脱水し, 一旦エポンで包埋した。硬化後, 頬舌的あるいは近遠心的にダイヤモンドディスクで2

分割し, 10%EDTAに浸漬し, 2日間脱灰した。そして脱灰によって生じた空隙を再びエポンで埋め, 超薄切片とし, TEM観察を行った。

b. 歯肉縁下プラークの観察

a) 歯肉縁下プラークの形成過程の観察

3 mm以上の歯周ポケットを有する歯周炎患者(65名)の了解を得て, 歯周ポケット内を徹底的に清掃した後, CAPを同ポケット内に挿入, レジンにて天然歯歯面に固着させ, 1分後から21日後まで約3週間にわたってSEM, TEM, V-SEM観察を行った。

b) 共凝集の観察

剥離プラークを材料にし, F-TEMによる線毛依存性共凝集, およびI-EMによるsaliva-mediatedおよび滲出液介在性共凝集の有無を調べた。

c) ベリクルおよびプラークマトリックスにおける唾液成分と歯肉滲出液の局在

抗ヒト耳下腺唾液タンパクIgG抗体, および抗ヒト血漿タンパクIgG抗体(歯肉滲出液を想定したもの)を用いて, 歯肉縁上プラークの観察と同様に, 免疫電顕法によってベリクルとマトリックスにおける局在状況を検索した。

(2) 観察結果

a. 歯肉溝プラークの形成過程

1日後には, 歯肉溝に一致する歯頸部エナメル質全周にベリクルの形成, およびグラム陽性球菌の付着と増殖を認めた。

2日後には, 球菌の密度は増したが, 他の細菌の増殖の程度は低い傾向を示した(図3 A)。

3日後には, 球菌に加えてグラム陽性多形性菌もわずかに見られたが, いずれの被験材料も歯肉溝のspaceが狭隘なことに起因して, 歯肉縁上プラークのように球菌の柱状増殖, corn cob形成などは見られなく, また, 他菌種の定着・増殖も極めて少なかった(図3 B)。

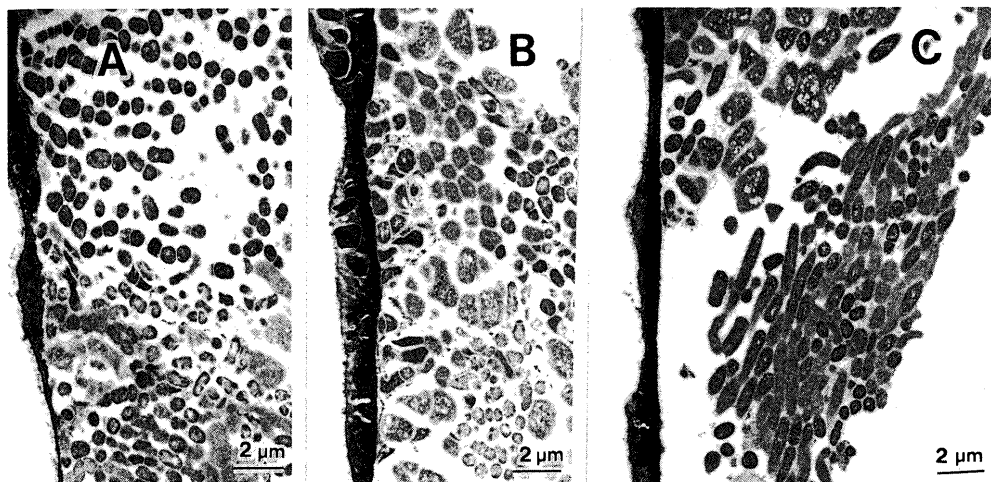


図3 歯肉溝プラークの形成
A; 清掃停止2日後の歯肉溝プラーク, B; 3日後の同プラーク, C; 7日後の同プラーク。

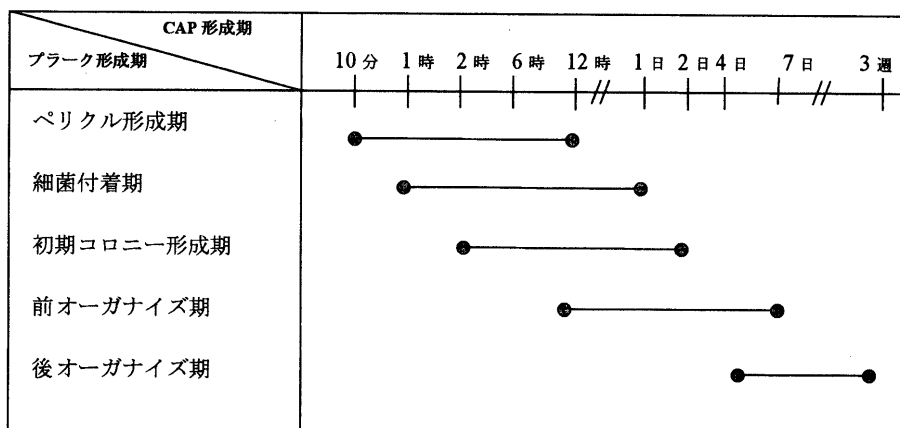


図4 歯肉縁下ブラーク形成過程の模式図
A; 歯肉縁下ブラークの形成過程図。

4日後から以降、球菌に代って多形性菌の増殖が目立つようになり、7日から8日後では、この細菌、あるいは明らかに桿菌の形状を示す細菌が主要な細菌になり、歯肉縁上ブラークでみられたような歯面に対して垂直方向に伸展・成長を示さなく、歯面に並行に重積するように増殖するという特徴を示した(図3C)。

以上のように、21日間の観察では歯肉溝ブラークは3日後頃までは球菌がほとんどで、その後次第に多形性菌や桿菌を混じ、やがてこれら細菌が歯肉溝ブラークの全体を占めるという傾向を示し、歯肉縁上ブラークのinitial colonizerに相当する細菌群だけから成るブラークとみなし得た。

b. CAP面上の歯肉縁下ブラークの形成過程

a) SEMおよびTEM所見

SEMおよびTEMによって、21日間にわたる歯肉縁下ブラークの形成過程は、図4Aのように①ペリクル形成期、②細菌付着期、③初期コロニー期、④前オーガナイズ期、および⑤後オーガナイズ期の5期に分け得た。その区分は歯肉縁上ブラークとはかなり異なり、各時期の進行が緩徐で、そのために互いの時期が著しくオーバーラップするという特徴を示した。

ペリクル様構造物はCAP装着後10-20分後で不鮮明に捉えられ、その後18時間の間に、SEMでは顆粒状物質の散在性の沈着が明確になり、さらにその密度が増大して数珠状になり、これらが網目状に連なるという構造を示した(図4B)(ペリクル形成期)。1時間後頃から歯頸部付近のCAP面において細菌が付着し始めたが、その付着細菌は主として桿菌であった(図4C)(細菌付着期)。これら細菌は2時間後頃より歯頸部付近から根尖方向に向かって徐々に増殖を開始し、桿菌は次第に長大になりつつ大小のコロニーを形成した(図4D)(初期コロニー形成期)。3-4日後には紡錘菌がsecondary colonizeとして増殖し、initial colonizerと二層性構造を形成すると同時に、その表面に新たな細菌を付着・増殖させた(図4E)(前オーガナイズ期)。そして7日後頃に、いわゆる成熟ブラークの形状を示

すようになり、3層以上の表層の細菌はグラム陽性球菌や球桿菌がほとんどで、これら細菌は崩壊と増殖を反復したが、2層目までの構成菌は菌叢変化を示さなかった(図4F)(後オーガナイズ期)。

(b) V-SEM所見

このブラーク形成の推移をV-SEMで観察すると、ペリクル形成期や細菌付着・初期コロニー期には、細菌が散在性あるいは微小コロニーを形成するのみであった。但し、1日頃より、付着細菌の桿菌がCAP表面に沿って単層ないしわずかな数層で拡がり、次第にブラーク表面に向かって増殖した(図4G)。

図4Hは初期コロニー形成期の細菌増殖をV-SEMで捉えたもので、やはり桿菌をinitial colonizerとして、一層ないし二層の菌叢を散在性に形成していた。

initial colonizerの桿菌は垂直性増殖に移行して、数層をなすようになり、4日頃から桿菌と線状菌から成る二層性構造が広範囲にわたり、いわゆるstable structureとして認めることができた(図4I)。なお、それより深部、すなわち根尖側のCAP面ではまだ成熟ブラークではなく、増殖期に一致するブラーク構成を示した。

後オーガナイズ期には、このstable structureの表層に幾つかのコロニーの凝集がみられた(図4J)。そのコロニー数はTEMで予測したほどは多くなかった。これは表層の細菌の崩壊の程度と共に、stable structureとの凝集があまり強くなくvertical section時の離脱が関係した可能性が高い。

これらをF-TEMで見ると、多くの細菌は歯肉縁上ブラークで認められたような細菌表面の微細線維状構造物を持つ細菌が多くみられたが、いわゆるfibril-mediated coaggregationを起こした細菌は表層では少なく(図4K)、stable structure構成菌であるinitialおよびsecondary colonizer間で緊密に認めることができた(図4L)。しかし、I-TEMで見ると、多くの細菌は歯肉縁上ブラークで認められたようなbacteria-induced coaggregationの像は極めて少なく、またplasma protein

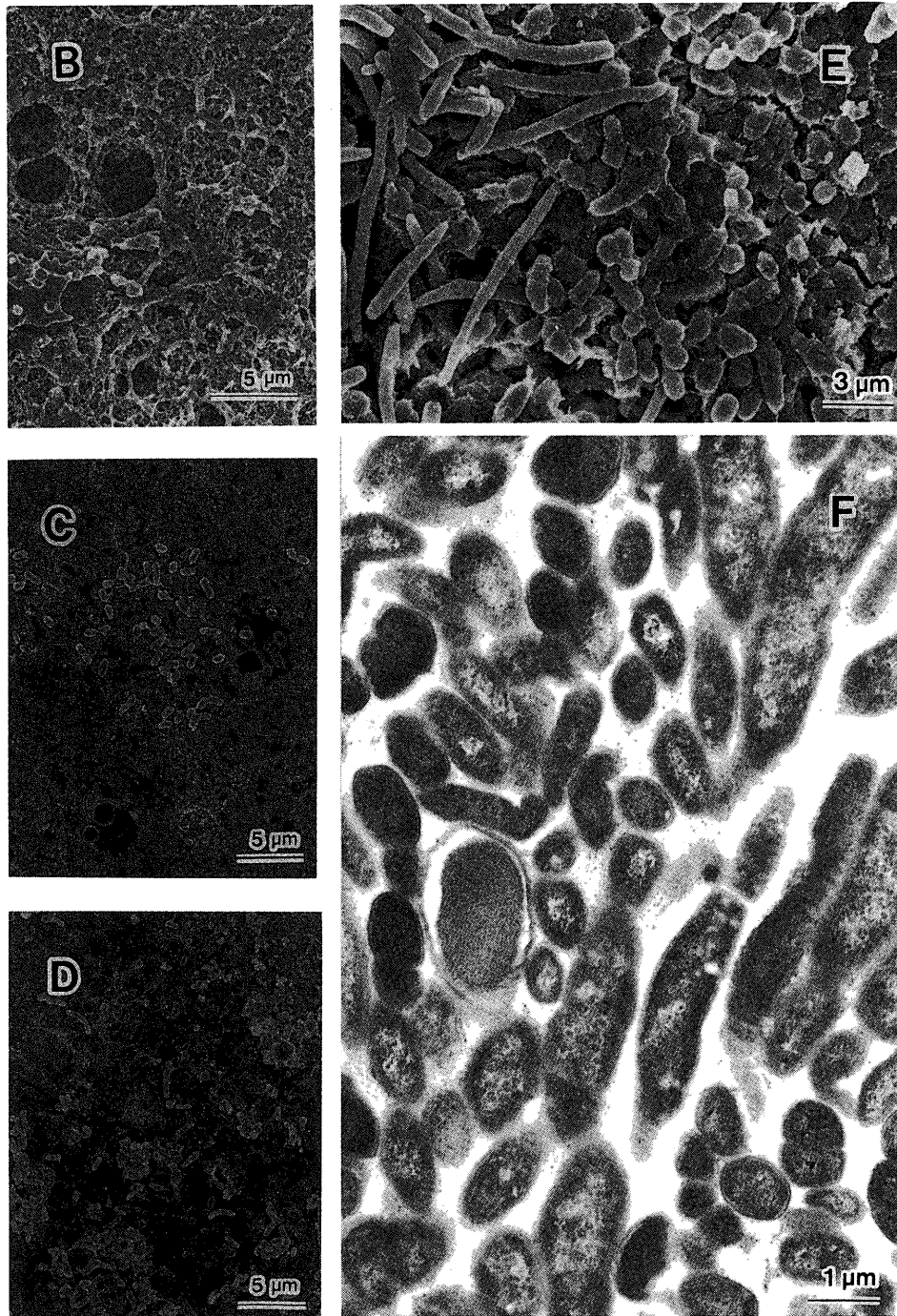


図4 歯肉縁下プラーク形成過程の模式図
 B; 網目状のペリクル, C; ペリクルへの細菌付着, D; 桿菌によるinitial colonization, E; initial colonizer表面への紡錘菌の増殖, F; 後オーガナイズ期のプラーク構造。

-induced coaggregationとみなし得る共凝集像も不明瞭であった。

(3) 考察

参考までに歯肉縁上プラークの形成過程での菌叢の推移を見ると、初期にはviridans streptococci, とくに *S. mitior* や *S. sanguis*, わずかではあるが *A. viscosus*, *A. naeslundii*, *A. odontolyticus* が出現し, 1日後ではプラーク中の菌量は著しく増量するのに対して streptococci は45%に減少し, グラム陰性球菌の *Veillonella* が20%を占め, 3日後では *Actinomyces* が25%を占め

るようになり, また, 嫌気性グラム陰性桿菌も5%に達し, とくに *Haemophilus* が増量すること等が明らかにされている。そしてその後 *Actinomyces* が優位となり, これに伴ってグラム陽性球菌は相対的に減少する。しかし, 今回の検索では, 同じ歯肉縁上プラークでも, 歯肉溝プラークの菌叢の推移は他とはかなり異なることが判明した。すなわち, 今回のヒト天然歯面上の1日から21日の間のTEM検索では, 狭小な歯肉溝内のプラーク形成過程は, 球菌によるペリクルへの付着と増殖, 桿菌あるいは多形性菌への変換という動態のみを

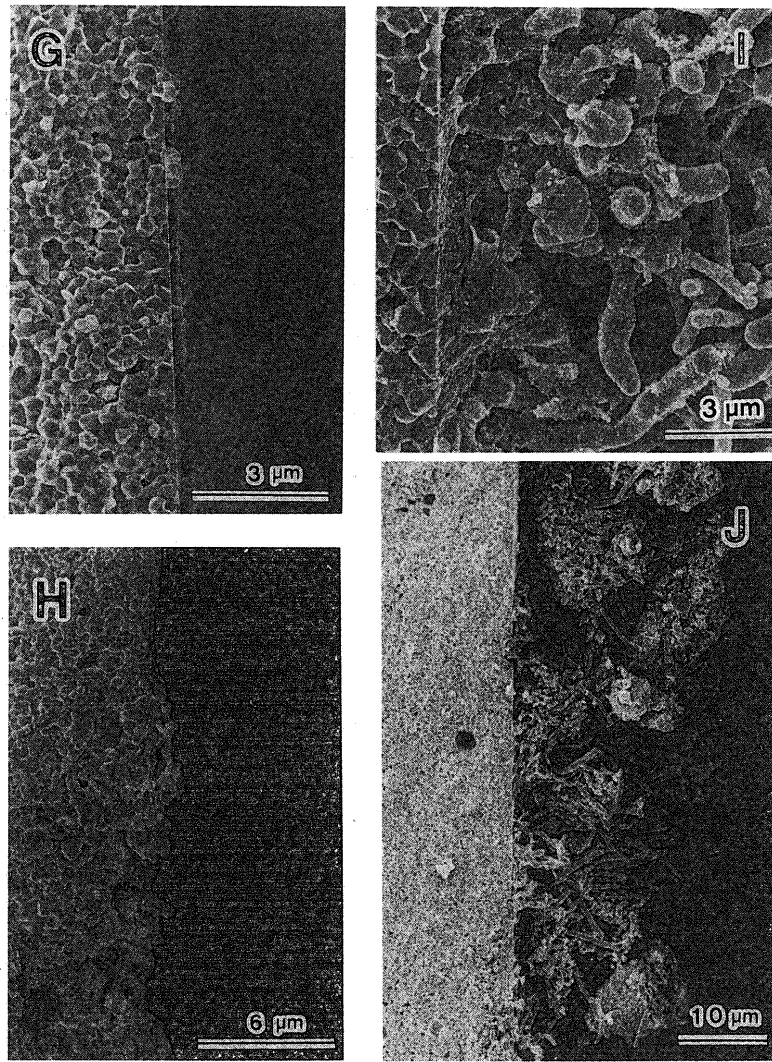


図4 歯肉縁下プラーク形成過程の模式図

G; 垂直性増殖を示す桿菌のV-SEM像, H; コロニー形成期の桿菌のV-SEM像, I; 桿菌と線状菌による二層性のstable structure, J; stable structure表面に形成された他の菌によるコロニー形成.

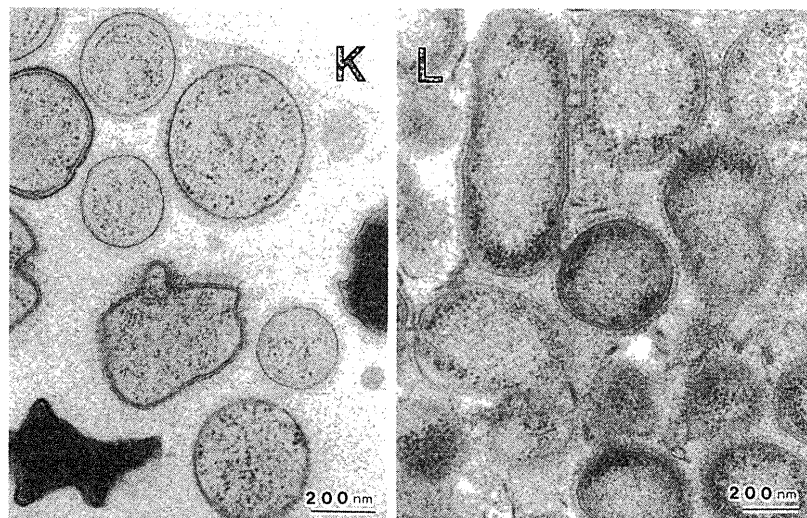


図4 歯肉縁下プラーク形成過程の模式図

K; 表層の細菌の線毛性共凝集, L; stable structure構成菌間の線毛性共凝集.

示し、他の菌種の増殖はほとんどみられなかった。このような所見は、健全な歯肉溝では、清掃を停止した場合、initial colonizerだけが増殖することを明示している。そして、これら細菌はそれぞれviridans streptococciおよび*Actinomyces*とみなして妥当と考えられた。因みにDarveauら¹³⁹⁾の若年者の健全な歯肉縁付近から採取した歯肉溝プラークでは、総菌数は 10^2-10^3 を数え、やはりstreptococciと*Actinomyces*が主体を占めると報告されている。しかし、その15-50%がグラム陰性桿菌であるという報告もみられる^{39,140-145)}。

さて、これら細菌による歯肉縁下プラークへの移行は次のように考えられる。すなわち、歯肉溝プラークは歯肉溝上皮と常に対峙することによって、その上皮破壊とこれに伴う上皮組織のsubclinical gingivitisをまず引き起こし、この炎症反応が付着上皮の歯面に沿った深行増殖と歯面からの剥離、ひいては歯周ポケットの形成につながり、ここに新たなプラークである歯肉縁下プラークが形成されるようになると考えられる。このようなsubclinical gingivitisの起因菌は現在不明である。このようにして形成された歯周ポケットには歯肉縁下プラークが新たに形成されることになる。本プラークは根面齲蝕と歯周炎の原因になることから多くの検索が行われつつある。過去の知見を通覧すると、本プラークは歯肉縁上プラークと本質的に同一の部分と、かなり異なる部分とから成ることが分かる。この歯肉縁上プラークの違いは、ポケット腔内という閉鎖的で嫌気的環境、歯肉滲出液の影響などに起因する¹⁾と考えられる。すなわち、扁性嫌気性あるいはCO₂要求性(capnophilic)グラム陰性桿菌が著しく増え¹⁸⁾、特有のプラーク構造を形成する。この歯肉縁下プラークの構造に関して、Sanz and Newman¹⁾はtooth-associated plaque, epithelium-associatedおよびconnective tissue-associated plaqueの3部より成ること、前者は歯肉縁上プラークと極めてよく似た構造で、歯面に接してグラム陽性線状菌が優位に存在し、根面齲蝕や根吸収、歯石形成に関係すること、後者は歯周ポケット上皮に接し、さらに空間に拡がり、グラム陰性桿菌や球菌、

spirochetesやflagellated bacteriaが主構成細菌であることを提唱している。また、tooth-associated plaqueのグラム陽性線状菌は歯面に接して垂直に伸び出し、密な叢状をなし、表層付近で往々特徴ある共凝集のtest-tube brushを形成する²²⁾。これら細菌の比率は歯周状態によって異なる。軽度の歯肉炎のプラーク中の菌叢はstreptococci-dominated microfloraから脱し¹⁴⁶⁾、*Actinomyces* spp, capnophilicあるいは扁性嫌気性グラム陰性菌の増加が顕著になる^{141,147)}。成人性歯周炎では、菌叢はさらに複雑になり、*Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Fusobacterium nucleatum*, *Bacteroides forsythus*, *Campylobacter rectus*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Eikenella corrodens*, *Eubacterium* spp, *Treponema* sppが増加するとされている¹⁴⁸⁾。そしてこれら細菌の病原性についても多方面から検索されつつあるが、現在もなお不明の部分が多い。

今回のCAPを用いた検索からは、歯肉縁下プラークの形成過程は①ペリクル形成期、②細菌付着期、③初期コロニー期、④前オーガナイズ期、および⑤後オーガナイズ期の五期にわたり、個々の形成期が緩慢に経過しそれ故に著しくオーバーラップすることが判明した。また、本プラークは歯面全体に同時に一様に生じるのではなく、歯頸部から次第に根尖方向に増殖して行くことも特徴の一つであった。前オーガナイズ期までは、プラークはCAP面に密接に関連しつつ形成されることから、tooth-associated plaqueに相当し、第3層の細菌群がepithelium-associated plaqueに相当すること、ひいては、歯肉縁下プラークはまずtooth-associated plaqueが形成され、その後epithelium-associated plaqueが形成されることが明らかになった。換言すれば、tooth-associated plaqueは歯肉縁下プラーク形成のために不可欠のプラークとみなすことができ、このプラーク中にstable structureが形成されることはこのことと深く関係していると考えられる。このstable structureの構成菌の桿菌と線状菌は歯肉縁下プラーク必須細菌ともいい得る。

2. 齲蝕発症の解析

以上のような歯肉縁上プラークおよび縁下プラーク中の細菌がエナメル質、象牙質、セメント質の齲蝕を発症に関係することを報告したのは、1954年および1955年のOrlandらのgerm-free rat^{1,2)}を用いた研究とそのreview³⁾が最初であり、その後、Keyes⁴⁾やFitzgerald⁵⁾がこの点を確立し、さらに一連の動物を用いた齲蝕誘発実験で、ヒトの小窩裂溝齲蝕(mutans streptococci, *S. sanguis*, *S. mitis*, lactobacilli, *Actinomyces*)、平滑面齲蝕(mutans streptococci, *S. salivarius*)、根面齲蝕(mutans streptococci, *Actinomyces*, *S. sanguis*, *S. salivarius*, lactobacilli)のそれぞれから最もよく分

離される各菌⁶⁻⁹⁾は、ノトバイオート実験動物ですべて齲蝕原性を示すことが明らかにされてきた¹⁰⁻¹⁴⁾。そしてFitzgerald¹⁰⁾はノトバイオート動物齲蝕誘発実験から、①細菌は齲蝕発症の必須の原因で、②単一菌で誘発能があり、③これら細菌は酸産生能を有するが酸産生菌すべてが齲蝕原性菌ではないと規定付け、さらに齲蝕誘発能を発揮するstreptococciは菌体外デキストランやレバンを合成する性状を有するが、しかし菌体外多糖産生菌のすべてが齲蝕誘発能を有するとは限らなく、細菌の齲蝕誘発性は多様であって系統立てられないとしている。

また齲蝕発症には、Keyes¹⁾の提唱した細菌、宿主(歯)、基質という3つの一次的要因のみならず、さらに種々の二次的要因が付加されることが次第に明らかにされてきた。例えば、細菌に対する二次的要因として、口腔清掃、唾液タンパク、伝播性など、歯の二次的要因として、フッ化物濃度、炭酸やクエン酸濃度、アパタイトの結晶化度、表面組成など、基質の二次的要因として糖質の種類と濃度、化合物の物理化学的性状などが掲げられている¹⁵⁾。

ところで、歯質の主成分はいうまでもなくapatite、とくにhydroxyapatite(HAP)であり、エナメル質では95%を占めている。HAPは3層の左右対称軸を囲む6層の左右対称軸をなし、その結晶はCa⁺⁺、OH⁻およびPO₄原子より成る6方晶形を呈している。結晶中心部ではhydroxyl groupが3つのCa原子によって囲まれ、hydroxyl groupは結晶安定化に重要である。このようなHAPは結晶周囲の溶媒の濃度、pH、イオン強度に対して限定的な溶解性を示す。しかし口腔内においては、唾液(pH6.8)のCa⁺⁺やPO₄が過飽和状態にあり、このためにエナメル質は結晶性を保つのに都合よくできており、その結果、歯は生涯結晶性を失うことがない。しかしpHが5.5以下になると溶解点に達する。上記の各酸産生菌は、歯の表面局所でこのようなpH低下を生じせしめる。しかし多くの場合、歯質の脱灰はいわゆる表層下脱灰の様式をとる¹⁶⁻¹⁹⁾。この点に対して表層部歯質の高石灰化説²⁰⁻²²⁾と、von BartheldのDonnanの膜平衡理論²³⁾の応用に始まる石灰化説^{24,25)}の両方が提唱され、Moreno and Zahrandik²⁶⁾はプラークから酸が歯質表層に拡散すると一定条件下で相変化が起こり、このために歯質溶解と第2リン酸カルシウム2水塩、およびクロロアパタイトの沈着が生じ、これら3固相と液相間に擬平衡が成立することによって表層下脱灰が生じるという仮説を打ち立てた。

3. 歯周炎発症の解析

歯周炎は「歯槽骨吸収を伴う歯周組織の非特異性炎」と定義され、歯肉縁下プラーク細菌が原因であることが各種動物を用いた実験的歯周炎発症によって明らかにされてきた¹⁻⁴⁾。ヒトにおいても実験的に明らかにされ⁵⁻¹¹⁾、またプラーク細菌の菌量が歯肉炎の重篤度および歯槽骨破骨の程度と相関関係を示すとする報告もある⁵⁻¹⁰⁾。その歯肉縁下プラーク細菌として*F. nucleatum*, *P. gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Campylobacter rectus*, *Eikenella corrodens*, *Leptotrichia* sp. および *Seimonena* sp. があげられ、歯肉炎ではこれらの菌量が10⁴-10⁶に達し、とくに*P. gingivalis*, *Bacteroides forsythus*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans*が関係深いとされている¹⁵⁾。そしてこれら細菌の病原性、すなわち直接的な歯周組織障害性因子として細菌毒素、酵素、アンモニア、硫化水素、インドール、カルボン

酸のような代謝産物が提唱されてきた¹⁷⁻²²⁾。さらに*P. gingivalis*は多くの細胞外性プロテアーゼを分泌することでも知られている^{1,2)}。

それらを見ると、一見、歯周炎についてはよく解明されているようであるが、現実にはその本態は未解決である。その一つとして、最もよく研究されてきた管の原因菌の解析もしかりである。上述のように元々、歯周病原性細菌は種々のタイプの歯周炎において、著しく増量する細菌であり、中には特定の歯周炎に特異的に多く検出される細菌も報告されている¹⁵⁾。しかしこれらの検索はほとんどがscrapelによって採取されたプラークを材料としており、intactな状態とはいえない。さらに、歯周炎の発症や経過にepithelium-associated plaqueが最も関連性が深いことから、この点を考慮しつつ、原因菌を特定するには、一層工夫を

そして、HAP溶解のメカニズムに対しては、まず形態的にみてHAP結晶の長軸(C軸)に沿う中心部がスリット状の孔が優先的に生じ(腐蝕孔)、これが次第に深くなり、遂に結晶中心を貫通すること、さらに腐蝕孔が大きくなり結晶全体が溶解してしまうことが実証された²⁷⁻²⁹⁾。この部はcolumnar Ca部に一致するいわゆるトンネル構造部であり、ここはとくに酸と結合しやすい炭酸イオンなどの置換による格子欠陥の多い部分でもある³⁰⁾。これら知見は、細菌の産生した有機酸はまずHAP結晶の格子欠陥部の酸と反応しやすい原子と結合し、その結晶格子はより安定な反応物を形成することによってHAP結晶格子から抜け出し、これが結晶破壊、すなわち溶出、脱灰につながることを示している。

以上のように、齲蝕については極めて理路整然とした解明がなされてきた。しかし、依然として不明の分野も残されている。その一つとして、齲蝕発症とプラーク形成過程との関係、およびその時点で如何なる細菌が本症発症に最も深く関連しているかという点がある。そこで齲蝕発症の解析についてはこの点を重視し、「平滑面齲蝕発症とプラーク形成過程との関係」という課題を設定した。

材料と方法として、これまでに実験的齲蝕誘発に関する研究が数多くなされてきたが、我々は先のプラーク解析に供したCAPを用いる方法を応用した。すなわち⁴⁵Caを標識したCAPをCAPをイヌの上下第1大臼歯に頬舌的に装着し、同面上でのプラークの形成過程と⁴⁵Caの溶出を血中や尿中で計測し、同時に形態的に検索し、脱灰の有無と程度とを検索した。

さらに両部とも、V-SEMによるapatite結晶の構造の変化、TEMによる結晶内部の構造の変化、微小焦点回析による結晶構造の質的・量的変化をも検討しつつある。

凝らした検索法を駆使する必要がある。そこで、今回、歯周病の解析の一の段階として、志願者の歯周ポケットにCAPを挿入する方法によって、実験的歯肉炎を発症させ、その時のプラークの形成の様相を観察した。

1) 材料と方法

CAP挿入の志願者は成人性歯周炎罹患患者であり、その中から同意を得た患者30名を被験者(年齢40-60歳)とし、歯周ポケットを徹底的に清掃した後、CAPを挿入し、21日間の間に、歯肉の発赤・腫脹が明らかになった時点でCAPを取り出し、その時点のCAP面上のプラークの構成を形態的に観察した。なお、形態的観察は主として光顕的観察およびV-SEM観察で行った。

2) 結果

徹底的なポケット清掃後、すべての患者の被験部の歯肉炎は一旦消失した。その後の21日間のCAP挿入によって、被験部の歯肉に発赤と腫脹が明らかな歯肉炎

が現れたのは30人中17人で、発症時期は10日から以降で、プラーク形成過程でみると、すべてが確立期に一致していた。そしてこの歯肉炎発症例をV-SEMで観察してみると、tooth-associated plaqueはほとんどが桿菌と線状菌とから成る二層性構造、すなわちstable structureで構成され、その構造には変化がないものの、epithelium-associated plaqueでは球菌や球桿菌の著しい増殖を起しつつあるもの(図5 A, B)、および、光顕的観察で多数の貪食細胞の浸出がみられ、中には貪食細胞がプラーク細菌に置き代っている例も認められた(図5 C)。一方、歯肉炎発症をみなかった例は、tooth-associated plaqueの構造は発症例と同一であったが、epithelium-associated plaqueは細菌の増殖はあるものの軽度で、貪食細胞の浸潤例はなかった。

3) 考察

過去に、志願者のブラッシングを停止させることに

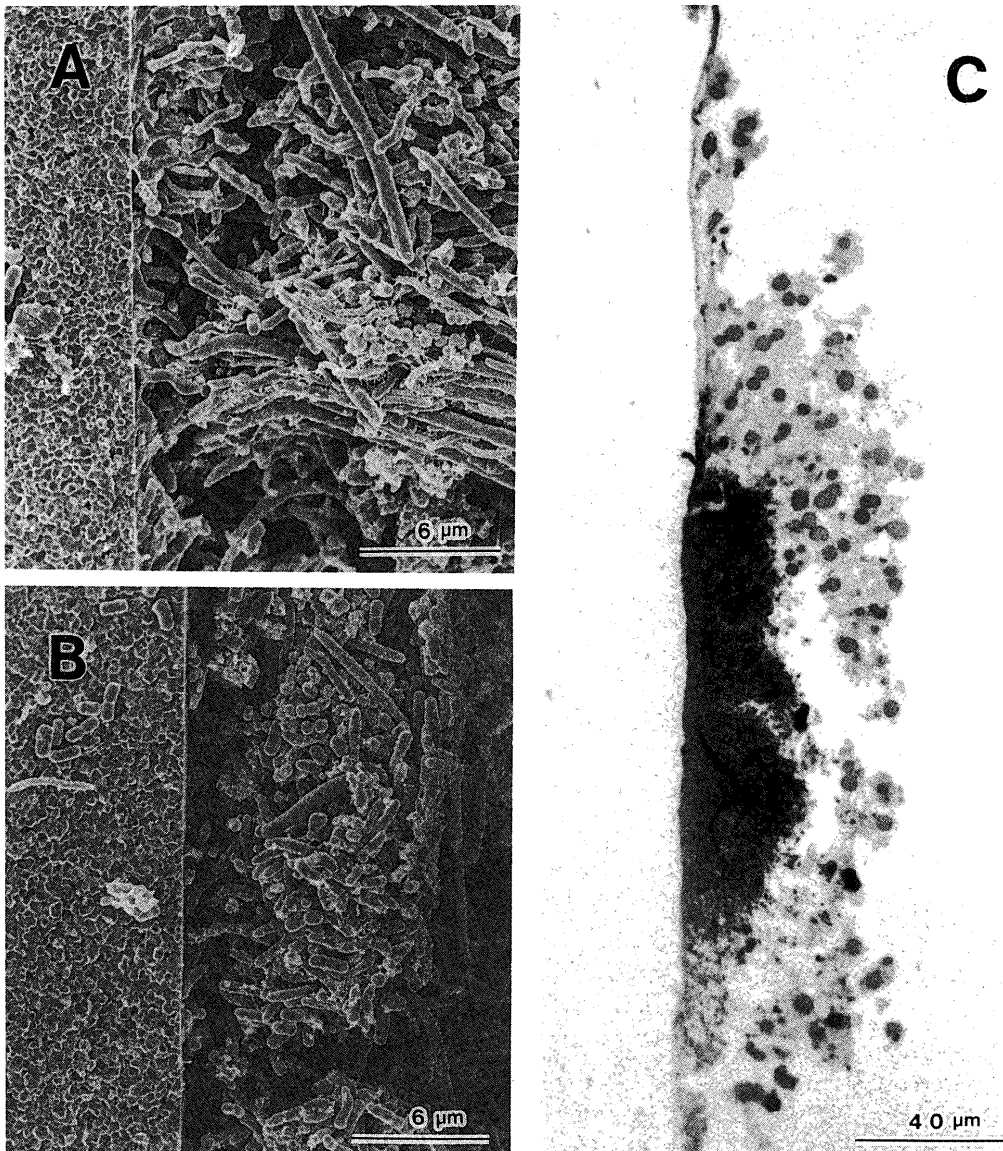


図5 実験的歯周炎発症と歯肉縁下プラーク
 A ; stable structure内に増殖した球菌, B ; stable structure内に増殖した球桿菌,
 C ; epithelium-associated plaque部への著しい貪食細胞の浸出。

よって実験的歯肉炎を惹起させることに成功した報告があった⁵⁻¹¹⁾。本検索のように、すでに歯周炎に罹患している患者において歯周ポケットを徹底的に清掃した例でも、一旦消退した歯肉炎の発症の時期はこれら報告とほぼ一致していた。このことは歯周炎の発症は歯肉縁下プラークの形成過程の特定の時期にほぼ一致することを示している。しかし、これまでの報告ではこの点が不明のままに残されてきた。その最大の理由は、近年、志願者の確保が困難になりつつあることと、前述の如くに歯肉縁下プラークの形成をintactの状態下で追跡できないことの二点に尽きる。

今回、この両問題を克服し、検索を進めることに成功した。とくに後者の問題についてはCAPを用いることによって、歯周炎の初発となる歯肉炎が歯肉縁下プラークの形成の後オーガナイズ期に集中的に発症すること、すなわち、epithelium-associated plaqueの増殖に密接に関係すること、そしてその発症に前後して、同

プラーク部に貪食細胞が著しい浸出を起こし、中にはほとんどの細菌を駆逐してしまう時期のあることが判明した。このような貪食細胞浸出は、後オーガナイズ期のepithelium-associated plaqueに増殖する細菌の中に、強い走化性物質を産生する細菌が存在することを示唆している。しかし、このような例において歯肉炎が消退した例をみることができなかったことから、貪食細胞の浸出は病状進行を軽減させるものの、治癒に導くものではないと考えられ、むしろ好中球の浸出では、それが多量にのぼると自己融解産物が歯周炎を増悪させる可能性も考えられた。

以上のように、本研究によって、歯肉縁下プラークの細菌構築と歯周炎発症の関係が明確化することができた。現在、この時点のepithelium-associated plaque中の細菌を中心としてDNA probeおよびPCR法にて同定を行いつつある。

4. 根尖性歯周炎の解析

根尖性歯周炎は歯髄炎に継発する根尖部の炎症性疾患で、種々の顎炎や顎周囲炎の原病巣にもなるが、漿液性炎や化膿性炎といった滲出性炎だけでなく、歯根肉芽腫や歯根嚢胞の如き増殖性炎や嚢胞性疾患もあって病態は多彩である。このような多彩な病態は、根尖性歯周炎が他の感染性疾患とはかなり異なった組織反応、あるいは組織応答を示す疾患であることを示唆している。また、特殊な組織応答の一つにfoam cellの多数にわたる浸潤があり、このような組織応答は特定の原因菌との関わりが深い。口腔感染症でfoam cellの多数浸潤例は*Actinomyces*によるものがほとんどであることから、根尖性歯周炎においても本菌の関わりが強く示唆され、ひいては根尖性歯周炎の有力な原因菌であることも示唆される。

一方、臨床的および微生物学的立場からみた場合、急性症状を伴う症例の根管からは偏性嫌気性菌が優位に分離され、それらの細菌種は根尖孔よりやや上部に局在し、それらの細菌が症状の発現に強く関与していること、また、enterococciは根管内からよく分離され、これが原因で難治症例に移行することが強く示唆されている。そこで今回、これらの点をさらに詳細に知るために、次の2項目を根尖性歯周炎の研究課題とした。

① 根尖性歯周炎病巣の細菌侵襲とくに*Actinomyces*の侵襲とその組織応答

② 根管内細菌(enterococci)と根尖性歯周炎

1) 根尖性歯周炎病巣の細菌侵襲とくに*Actinomyces*の侵襲とその組織応答

(1) 材料と方法

種々の根尖性歯周炎病巣における口腔内細菌の侵襲の有無と程度を、口腔細菌を抗原として得た抗体を用いてimmunoblotおよび免疫組織化学的手法の両方を

用いて検索した。口腔細菌抗原には純培養した*A. viscosus* (Av)とプラークを出発材料としておよび嫌気的に培養して得た混合細菌を用いた。そして続いてこれら細菌接種による実験的感染症病巣の組織反応を検索し、根尖性歯周炎病巣の組織構造と対比した。

a. 各抗細菌抗体の作製

Av抗体は*Actinomyces viscosus* ATCC15987をYeast extract(Difco, Detroit, MI, USA)を加えたBrain heart infusion broth(Bectin Dickson, Sparks, USA)を用いて嫌気培養したもの、また、混合細菌抗原

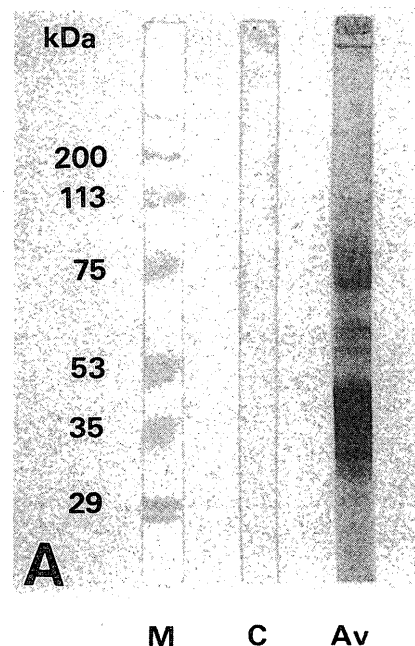


図6 根尖性歯周炎病巣への細菌侵襲
A: *Actinomyces viscosus* ATCC15987のイムノプロット。

は、Brain heart infusion brothにプラークを懸濁させ、好気的および嫌氣的培養したものを等量比で混合して供試した。これらを用いて得られた各家兎抗血清をimmunoblotし、さらにAv固有の抗原を図6 Aのように分子量約45kDaの領域に得ることができた。そこでこの部分のみを採取し、再び家兎に免疫し、抗Av抗体として採用した。

b. 根尖性歯周炎における細菌侵襲

病巣への細菌侵襲を知るために、抗Av抗体を抗混合細菌抗体の二種を用いて、免疫組織化学法ならびにimmunoblot法を採用した。病巣には急性漿液性歯周炎(20例)、急性化膿性歯周炎(20例)、慢性化膿性歯周炎(10例)、歯根肉芽腫(10例)および歯根嚢胞(10例)を供試した。

なお、急性炎の被験材料には歯内療法時にペーパーポイントに付着してきた滲出物を用い、免疫組織化学的検索にはその塗沫標本を、ウェスタンブロットにはその生食懸濁液を用いた。また慢性歯周炎の材料は、免疫組織化学的検索には別出された病巣を10%中性ホルマリン固定後、パラフィン切片とした標本を、ウェスタンブロットには慢性化膿性炎と嚢胞の吸引内容物を用いた。

c. 根尖性歯周炎病巣の組織応答の観察

a) 実験的炎症反応

ラット口腔粘膜下(咬筋部)にAv生食浮遊液、および混合細菌を個別に注射し、それぞれの組織変化を光顕的に経時的観察を行う同時に、抗Av抗体ならびに抗混合細菌抗体を用いて免疫組織化学的にこれら細菌の消長を追及し、さらにラットマクロファージを認識する抗EDIマウスモノクローナル抗体(Serotec, Oxford, UK)を用いて大食細胞を同定した。

b) 根尖性歯周炎病巣の組織応答の観察

(1)の観察に供した滲出液およびパラフィン切片を用いて、リンパ球や大食細胞を含めた炎症性細胞とサイトカインの検出を行った。ヒトマクロファージ検出には抗CD68モノクローナル抗体(いずれもDAKO, 京都)を、サイトカイン検出には抗IL-1 α モノクローナル抗体とTGF- β 1モノクローナル抗体(いずれもSANTA CRUZ Biotechnology, CA, USA)を用いた。

(2) 結果

a. 根尖性歯周炎病巣の細菌の侵襲

免疫組織化学的検索による細菌検出では、混合細菌は慢性化膿性炎で2例、慢性肉芽腫性根尖性炎で0例で、2例はいずれも大食細胞にとり込まれた状態のものであった(図6 B)。これに対して、Av抗原は慢性化膿性炎の5例にその侵襲を認め、そのうち菌体の侵入は2例、大食細胞に取り込まれたものは5例で、2例は両者が同時に認められた。慢性肉芽腫性炎でもAv抗原は3例に侵襲を認めた。一方、急性化膿性歯周炎の塗沫標本の免疫組織化学的検索では、混合細菌の細

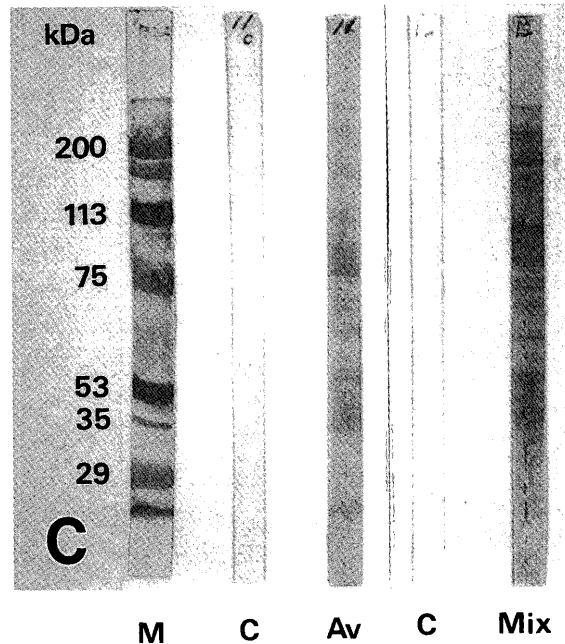
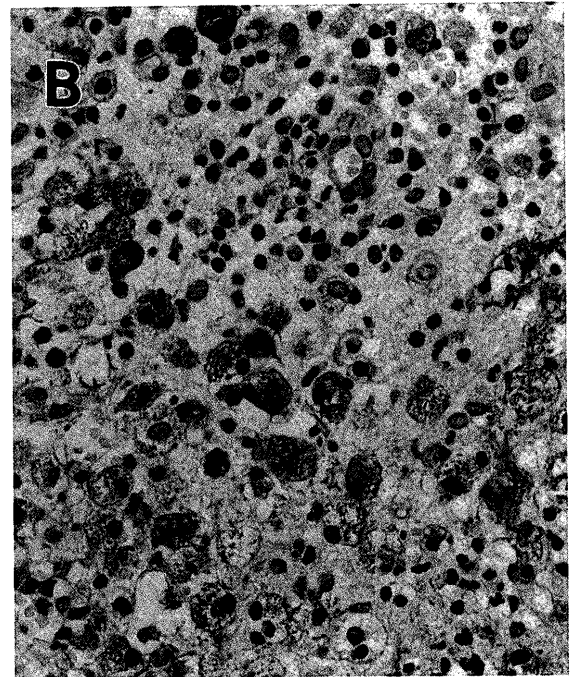


図6 根尖性歯周炎病巣への細菌侵襲
B; 慢性化膿性炎におけるAvの免疫組織化学的所見, C; 混合細菌成分とAv成分の慢性化膿性炎におけるイムノブロット。

菌成分の侵襲は化膿性炎の2例のAv抗原は0例であった。

一方、Immunoblot法では、急性根尖性歯周炎の滲出物には、混合細菌は化膿性炎の3症例に、Av抗原は化膿性炎の5例にその侵襲を示すパターンを認めた。さらに慢性炎病巣からの滲出物では混合細菌は化膿性炎の2例に、Av抗原は化膿性炎の3例と歯根嚢胞の4例にパターンを認めた(図4 C)。

b. 根尖性歯周炎病巣における生体応答

a) 実験的炎症反応

ラット咬筋にAvおよび混合細菌を接種した組織は、

Av接種後1日では、好中球と大食細胞の浸潤を認め、マクロファージ特異抗体であるED1による免疫染色で、菌体は大食細胞と好中球の双方に貪食されていることが明らかであった(図6D)。さらに3日から5日で中心部の好中球、周辺部が大食細胞から構成された膿瘍を認めた。大食細胞の多くは胞体の大きな泡沫状を示した。菌体は膿瘍全体に分布し、好中球や大食細胞に貪食されていたものの、大食細胞による貪食が強い傾向を示した。7日から10日では、膿瘍の周囲はリンパ球や線維芽細胞による肉芽組織による被包化を認め、膿瘍中の菌体は周辺部に存在する大食細胞に貪食され、好中球による貪食はほとんど認めなかった(図6E)。

一方、対照とした混合細菌による病巣では、接種1日後で好中球による膿瘍形成が著しく、大食細胞は周辺部に瀰漫性にわずかに浸潤していた。菌体は主として好中球に貪食され、大食細胞による貪食はわずかであった。7日後では膿瘍の縮小が強肉芽組織の中心に残されるのみであり、大食細胞はAvのそれよりはるかに少なくなった(図4F)。

b) 根尖性菌周炎病巣の組織応答

慢性根尖性菌周炎病巣では、一般的に好中球よりも大食細胞の浸潤が強く、菌体の局在を認める症例では、大食細胞の数的増加が明瞭であった。マクロファージを示すCD68陽性細胞も菌体周囲に集簇していた。また、周囲の肉芽組織中にもマクロファージは広く分布し、泡沫細胞として局在する場合や、時にはコレステリン裂隙の周囲に異物巨細胞として局在する場合もみられた(図6F)。一方、菌根嚢胞のように内腔を裏装する上皮が存在する場合には大食細胞の浸潤は減少傾向を示した。しかし裏装上皮の欠落した部分では例外的に多数の浸潤を認めた。また、リンパ球については、T-cellが大食細胞付近で密度が高まる傾向を示したが、B-cellのは極めて少なかった。さらにIL-1 α の免疫組織化学的検索では、大食細胞に一致してその局在を認めることが多かった(図6G)。TGF- β 1は泡沫細胞に陽性であったが、必ずしも大食細胞系にのみ限局性を示さなかった(図6H)。

(3) 考 察

近年、根尖性菌周炎の報告は極めて少なく、とくに細菌と本疾患の関係については、我々が渉猟する限りにおいて、過去10年間の文献検索では数例を数えるのみである¹⁻⁴⁾。これは本疾患の全容が解明し尽くされたことを意味するものではない。

今回の免疫組織化学的検索では、急性根尖性菌周炎は根管內細菌の根尖部菌根膜への感染によって惹起されることは明らかであったが、慢性根尖性菌周炎でも、検出症例数およびその局在性からみて細菌の関わりが予想外に高いことが判明した。因みに、Baumgartner³⁾はblack-pigmented bacteriaと本症発症の關係に注目し、本症罹患菌の根管から55%の比率で本菌群を検出

し、その30%が*Prevotella nigrekens*, 36%が*Prevotella intermedia*, 9%が*P. gingivalis*, 5%が*Prevotella melaninogenica*であると報告している。周知のように慢性根尖性菌周炎は一端発症すると自然治癒はなく、病巣は肉芽組織を背景にリンパ球、形質細胞、好中球、大食細胞などの炎症性細胞が種々の状態で浸潤し、その所見は旺盛な免疫応答を展開しているかの感を与える。すなわち、侵襲した細菌は抗原としての役割を演じ、病巣は免疫応答の形態的表現である可能性を強く示唆している。

2) 根管內細菌の検索

(1) 材料と方法

a. 対照症例と根管內細菌検査法

歯髓炎中の抜髄症例65例、再根管治療を必要とした症例95例を対象とし、根管內細菌検査を行うに先立って、自発痛・打診痛・根尖部の圧痛・歯肉の腫脹・発赤・根管內浸出液・排膿などの臨床症状の有無を調べた。細菌検査にはチューアースライド嫌気システムを用いた。

b. enterococciの分離・同定

根管内容物をリーマーおよびファイルを用いて採取し、Enterocasal Agar(BBC)選択培地に塗抹し、分離後、グラム染色を行いグラム陽性球菌について、カタラーゼ反応を行いenterococciであることを確認した。すなわち、Lancefieldの血清学的分類のD群抗血清(Difco)とRantylらの方法で作製した抗原とを二重拡散法で反応させ、沈降線が生じたものをenterococciとした。speciesの決定はAPI-step(API system)等を用いて行った。

c. 性状試験

*E. faecalis*の各種性状は、①糖分解性、②bile-esculin平板培地上での発育性と溶血性、③10℃および45℃での発育性、④60℃、30分間加熱後の発育性、⑤pH9.6での発育性、⑥6.5%NaCl brothでの発育性、⑦40%bile存在下での発育性、⑧デンプン、ゼラチン、アルギニン、馬尿酸の加水分解性、⑨telluriteおよび235-triphenyl tetrazolium chloride(TTC)に対する抵抗性、⑩litmus milkの還元性、⑪不溶性グルカンの産生性、⑫SF agar(Difco)上での発育およびbacitracin感受性の12項目から検討した。

a) 糖分解性試験

糖には、mannitol, arabinose, raffinose, melezitose, sorbitol, glycerol, esculin, inulin, lactose, trehaloseを採用した。

糖分解試験は0.5%の割合で各種の糖を加えた糖分解用反流動培地(栄研)に接種後、24時間培養し、紫色から黄色に変色したものを陽性とした。

b) 抵抗性試験

10℃および45℃における発育試験は、TBS 5 mlに供試菌を接種後、各々10℃、45℃に保たれた恒温槽中で培

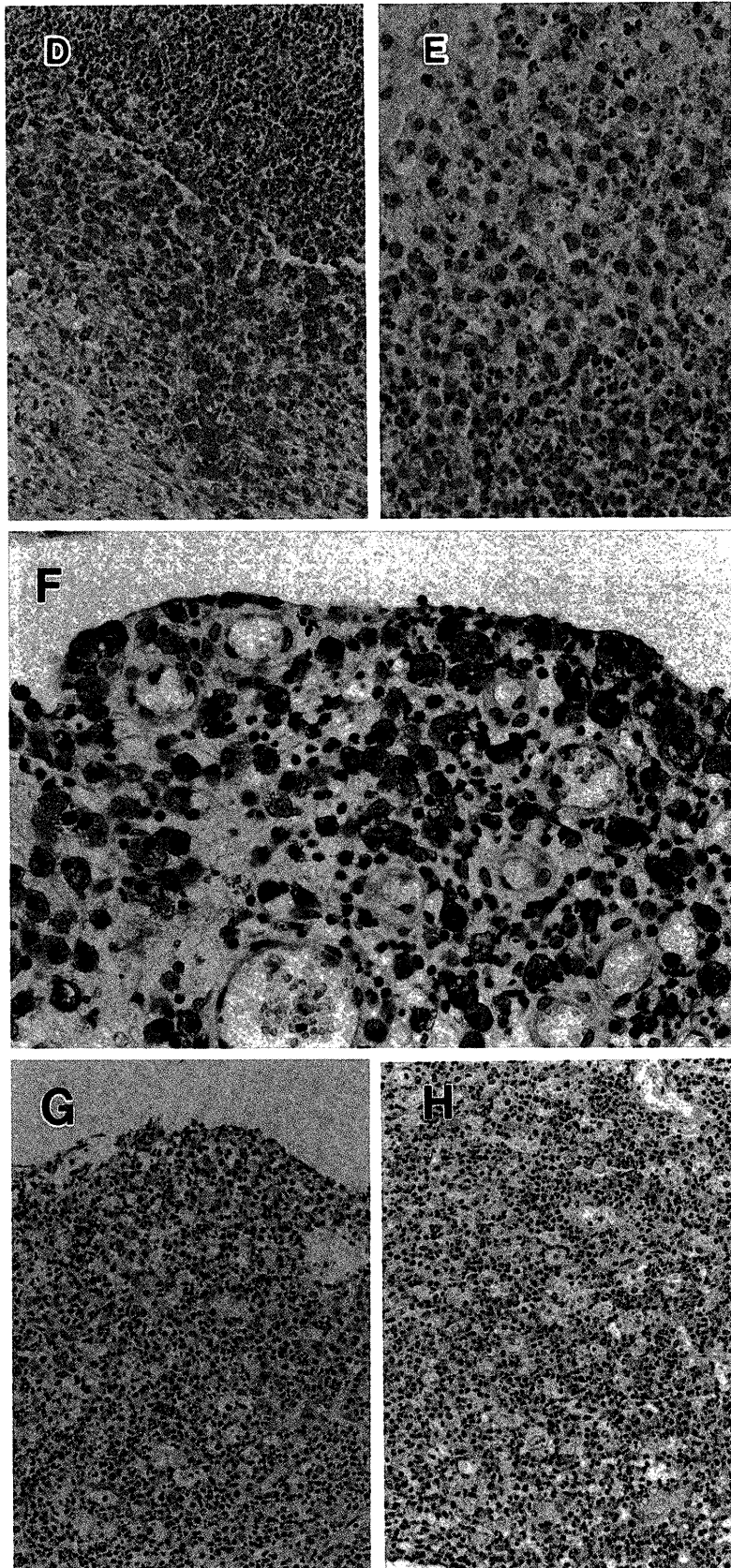


図6 根尖性歯周炎病巣への細菌侵襲
D; Av接種巣のED1陽性マクロファージ($\times 50$), E; 泡沫化しつつあるマクロファージ($\times 50$), F; マクロファージの少ない混合細菌接種等($\times 100$), G; 歯根肉芽腫中のIL-1 α ($\times 50$), H; 歯根肉芽腫中のTGF- $\beta 1$ ($\times 50$).

養し、24時間後に濁度計で測定を行い、濁度が増加したものを陽性とした。

60℃、30分間の加熱抵抗性試験は供試菌を接種したTBSを60℃に保たれた。恒温槽で30分間放置後、37℃で培養を行い、発育の有無は濁度計で測定した。

pH9.6での発育試験は、TBSを1N NaOHでpH9.6に供試材料菌を接種して行った。

6.5%NaCl brothでの発育は6.5%NaClを含むTBS 5 mlに供試菌の一夜賠償液206 μ lを滴下後、37℃で24時間培養し、発育が認められたものを陽性とした。

bile存在下での発育試験は、40%bile培地に供試菌を接種培養後、発育の抑制が認められない菌株を陽性とした。

TelluriteとTTCに対する抵抗性は、Facklamが記載している方法で行った。

c) 加水分解試験

Starch hydrolysisは、Facklamが記載している方法で行った。

アルギニン加水分解性は、供試菌を24時間培養後Nessler試薬を0.25ml加え、黄褐色に変色したものを陽性とした。

馬尿酸加水分解試験は5 mlの馬尿酸塩培地に接種して、35℃で20時間以上培養した後遠心し、よく混和後、10分以内に沈殿物が生じた菌株を陽性とした。

d) Litmus milk還元性試験

5 mlのLitmus milk (Difco)に供試菌を接種後、3日目まで凝固および酸産生による変色を毎日観察し、ピンク色の凝塊を生じたものを陽性とした。

e) 不溶性グルカンの産生性試験

基礎培地と10% sucrose水溶液とを調整し、前者を121℃、15分間滅菌し、後者は濾過滅菌を行った。予め滅菌してある小試験管にそれぞれ2.5mlずつ加えて5% sucrose培地とした。そして3日間培養した後、内容物を洗い流し、管壁に白色の粘着物が残った株を陽性とした。

f) SF agar上での発育試験

SF agar (Difco) 平面上に菌株を塗抹培養後、発育が認められた菌株を陽性とした。

d. 薬剤感受性試験

抗生剤はペニシリン系としてペニシリンG(以下、PCGと略す)、アンピシリン(ABPC)の2種、セファロスポリン系としてセファロチン(CET)、セファキシム(CEX)の2種、テトラサイクリン系としてテトラサイクリン(TC)、マクロライド系としてエリスロマイシン(EM)、その他に化学療法剤のメトロニダゾールを使用した。最小発育阻止濃度(minimum inhibitory concentration, 以下MICと略す)は化学療法学会標準法に準じて、Mueller Hinton培地(Difco)を用いた寒天希釈法で行った。MICは薬剤加平面に100倍希釈した前培養液をマイクロプランター(佐久間製作所)で接種

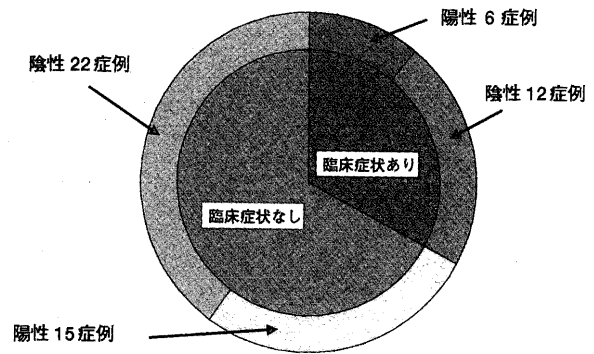


図7 A ; 抜髄菌(55症例)における臨床症状と培養結果との関係

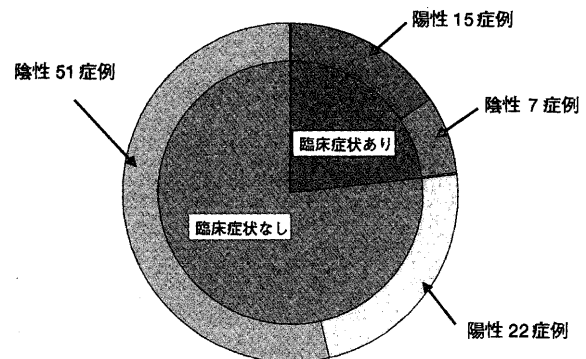


図7 B ; 感染根管治療菌(95症例)における臨床症状と培養結果との関係

し、37℃で24時間賠償後、肉眼でコロニーの発育が全く認められない最小濃度で判定し、力価(μ g/ml)で示した。

(2) 結果

a. 抜髄菌における臨床症状と培養結果との関係

図7Aに示したように、臨床症状を併せた例は55症例中18症例で、そのうち培養陽性の症例は6症例で、培養陰性の症例は12症例であり、陽性率は約20%であった。

一方、臨床症状を伴わなかった症例37例では、培養陽性の例は37症例中15例、培養陰性例は32例であり、陽性例は32%を占めた。

b. 感染根管治療菌における臨床症状と培養結果との関係

図7Bに示したように、臨床症状を認めた症例は22症例であり、認めなかった症例は73症例であった。すなわち、症状を認めた症例のうち、培養陰性は7例であり、抜髄症例の成績と異なった結果を得た。

臨床症状が認められない症例では、73症例中21例が培養陽性であり、51例が培養陰性であった。

c. 物理化学的性状および抗生物質感受性

根尖病巣由来の*E. faecalis*の性状試験のbile-esculin平板培地での発育、45℃での発育、60℃、30分間の耐熱性、pH9.6での発育、40%bile存在下での発育、starch加水分解性、melezitose, trehaloseの発光性、およびSF agar上での発育については、trehaloseの発酵性および

表1 enterococciの抗生物質感受性

	MIC(μg/ml)												
	0.05	0.10	0.20	0.39	0.78	1.56	3.13	6.25	12.5	25	50	100	>100
PCG										6	20		
ABPC						3	23						
CET										1	25		
CEX										8	18		
EM				2	2	5	11	4		2			
TC			7	17	2								
MN													26

SF agar上での発育はいずれの菌株においても共通した性状であった。

血液寒天培地での溶血性については、大部分は非溶血性であったが、2株はβ溶血性を示した。しかし、これらの菌株は継代時には非溶血性に変化した。

Gelatine加水分解は陽性株と陰性株とがほぼ同数であり、TTCに対する抵抗性は2株を除いてすべてが陽性であった。

糖分解性はglycerolおよびlactoseに菌株間で相違が認められ、とくにglycerol発酵性は陽性株と陰性株とが半数ずつであった。

また、bacitracinに対する感受性試験では1株だけが抵抗性を示した。

各種抗生物質に対する感受性は表1に示したように、根尖病巣由来株と口腔常在菌由来株との間には相違は認められなかった。両群ともペニシリン系では、PCGに対しては若干抵抗性を示したが、ABPCのMICは3.13μg/mlを示した。Dahlénらが報告している*E. faecalis*に対するABPCのMICは本実験での値と一致しているが、PCGではMIC90が2.0Ng/mlに対して本実験ではMIC90は50Ng/ml Ng/mlの値を示し、約25倍の抵抗性を示した。

セファロスポリン系に対してはいずれの菌株も抵抗性を示し、Clinical microbiologyのMIC値ともよく一致していた。

マクロライド系のEMに対して、両群とも菌株間でばらつきが認められ、peak値は3.13の値を示したが、

Clinical microbiology記載のMIC値より6倍程度上回っていた。

TCに対しては感受性を示し、peak値は0.39を示し、Clinical microbiologyに記載されている値よりも若干低い値であった。メトロニダゾールのMICは100以上の値を示した。*E. faecalis*は10℃、45℃、pH9.6、6.5% NaClや40%bile存在下で発育し、60℃、30分間の加熱、telluriteやTTCに抵抗性を示した。また、抗生物質感受性にも、ペニシリン系ではPCGに対して、セファロスポリン系ではCET、CEXに対して、それぞれ抵抗性を示した。さらに、*E. faecalis*は他の細菌に対して殺菌的に作用するbacteriocinを産生した。

(3) 考察

根管内細菌、とくにenterococciの検索から、根管治療における細菌検索の位置付けが重要である。一方、その細菌検査も採取部位の違い、根尖部の根管形態によっても結果が異なること、ひいては培養陰性であっても容易な治療によって急性転化の可能性も高いと考えられる。そして*E. faecalis*は、根管内に混入した場合、本菌が生き残り、その結果として根管内の分離頻度が高くなることが示唆された。さらに*E. faecalis*の60%がgelatin液化能を有していただけでなく、25Mg/ml濃度のEMに抵抗性を示した3株は溶血性を有し、同時に形態の異なる3種類のtemperate phageに感染していることから、phage変換やplasmidの伝達の可能性も考えられる。

5. 喪失歯の最終治療(歯科インプラント治療)の解析

以上のようなブラーク関連疾患は、終局的には、歯牙喪失の運命を辿ることになる。歯牙喪失に際して、現在、補綴学的療法を中心に種々の療法が施されているが、PD研では、その最終療法は歯科インプラント治療であるとみなした。すなわち、歯牙喪失顎の最終療法としての本来の目的は、天然歯による口腔全体の形態的・機能的回復に可及的に近似したものであるべきであり、この目的をほぼ全面的に達成し得るには理論的には第3代生歯の萌出や歯胚移植が考えられるが、これが不可能の現在、歯科インプラント治療が唯一この本来の目的に近い療法といえる。

歯科インプラント治療は、すでに三十年前から実施され、この間に多大の進歩を遂げてきた。まず材料面の改善であり、今日、生体に全く為害性の無い材料が開発され、もっぱら人工歯根として頻用されている。また、これを植立させる生体側の顎骨も、インプラント治療に適合させるためにsinus liftを含めて骨添加法が積極的に実施されるに至っている¹⁻⁵⁾。さらに近年、これら骨の再生を促進させる一手段として、血小板由来の成長因子の患者応用等^{6,7)}、本インプラント療法は極めてbiologicalな領域にまで立ち入っている。

このような現状から、これまで行われてきたインプ

ラント療法に関連ある一連の研究も、ここで改めて見直さなければならない段階に突入した。

そこで、今回PD研は、今後の歯科インプラント治療に役立つ基礎的および臨床的研究を目指して、検索を行った。

1) 人工歯根(フィクスチャー)の物理学的および生物学的性状

(1) フィクスチャーの表面性状

a. 表面性状の変化

骨接合(osseointegration)という用語が使われたのは、純チタンインプラントを2回法骨内インプラントとして用いた場合に限ってであった。

このメカニズムも、純チタンは物性的に酸化被膜(TiO₂)を形成しやすく、その酸化膜が生体内で不動態膜となり、カルシウム、リンイオンを吸着することから、酸化膜表面にまで骨形成が進展し、強固な結合状態が得られると予測されたことに由来する。しかし、この結合様式には多くの疑問点がある。例えば、光学顕微鏡的にはチタンと骨組織とは接触しているが、電子顕微鏡レベルでは20~100nmの無構造なタンパク質層が存在するとされている^{8~17)}。

そこでこの疑問点を解決するために次の検索を行った。

a) 材料と方法

インプラント体(フィクスチャー)に市販の純チタン製(Branemark社製)とチタン合金製(STERI-OSS社製)を用い、これを成犬に応用し、埋入前後でのフィクスチャー表面の酸化膜の変化をEPMAにて解析した。また、埋入後のフィクスチャー表面への体液の付着、その体液内でのイオン移動、集積を解析した。

この実験は、これまで述べられていた純チタンを使ったインプラントの生体内での骨結合様式を再確認する事ができると同時に、さらに最良のフィクスチャーの材質を追求する事ができるものである。

b) 結果

明らかに埋入前と埋入後の比較において、埋入後ではフィクスチャー表面の酸化被膜形成が顕著であり、その酸化被膜表面にリン、カルシウムイオンの集積が認められた。

なお、今回実験に供したフィクスチャーは、STERI-OSS社製、Branemark社製のチタン合金および純チタン、機械研磨、スレッドタイプのものであったが、この両者の比較において、酸化被膜形成に優位な差は認められなかった。

c) 考察

本実験の結果において、埋入後ではフィクスチャー表面の酸化被膜形成が顕著であったことは、これまで述べられてきた「生体内、特に体液との接触により純チタン表面で酸化被膜形成がおこる。」ことを裏付けるものであり、市販されているチタン製フィクスチャー間

における差がないことは、材料学的特性が最も大きく影響するものであることを示唆している。

b. 表面性状による周囲組織反応の違い

現在、臨床的には数種類のインプラント材料が使用されている。材料学的には、Hydroxapatite(HA)、純チタン、チタン合金(Ti-6Al-4V)とに分類できる。

これらは材料学的にインプラント体がosseointegrationを得るために工夫がなされているが、臨床的にはHAは長期予後が良くなく、その原因は、インプラント周囲炎が惹起された場合そのコントロールが難しいこと、また、HAコーティングが施されたものでは、そのコーティング層が剥がれることによるとされている。

歯科インプラント治療では、咬合圧をインプラント体が負担することが不可欠であり、長期間良好な予後を得るためには、この条件下においてインプラント体表面での骨のリモデリングが正常に行われなくてはならない。これにはインプラント体表面の材料学的な性状が大きく影響してくる^{18~28)}。また、臨床的にはインプラント体周囲の骨組織には、骨造成(自家骨移植を含む)、上顎洞底挙上術などにより形成された骨組織もある。

PDでは、これらの条件下における、インプラント周囲での骨組織のリモデリングを詳細に検索し、最も適したインプラント材料を追求するとともに、さらにより良いものの究明を行っている。

a) 材料と方法

実験に供したインプラント体(フィクスチャー)は市販されている純チタン、チタン合金、HAコーティング、TPS(チタンプラズマスプレーコーティング)、プラスチック&酸エッチング処理、TiO₂コーティングである(STERI-OSS社製、Branemark社製、3i社製)。

実験動物には成犬を用い、通法に従いインプラント体の埋入から上部構造装着までを行った。そして①正常範囲内での咬合負荷を行わせる群、②過剰な咬合負荷を行わせる群の2群の間のインプラント体表面での骨組織のリモデリングを検索した。なお、咬合圧計測は、インプラント頸部に圧センサーを装着し歪み計測を行うことで評価した。

さらに、骨造成、上顎洞底挙上を行った骨組織での実験系として、③-1骨増生(メンブレンテクニックのみ)部位に埋入する群、③-2骨増生(メンブレン+自家骨移植)部位に埋入する群、③-3骨増生(メンブレン+PRP)部位に埋入する群、③-4骨増生(メンブレン+自家骨移植+PRP)部位に埋入する群、④-1上顎洞底挙上術(自家骨移植)部位に埋入する群、④-2上顎洞底挙上術(自家骨移植+PRP)部位に埋入する群を用い、①の「正常範囲内での咬合負荷を行わせる群」、②の「過剰な咬合負荷を行わせる群」と同様の咬合負荷によるインプラント体表面での骨組織のリモデリングを検索した。

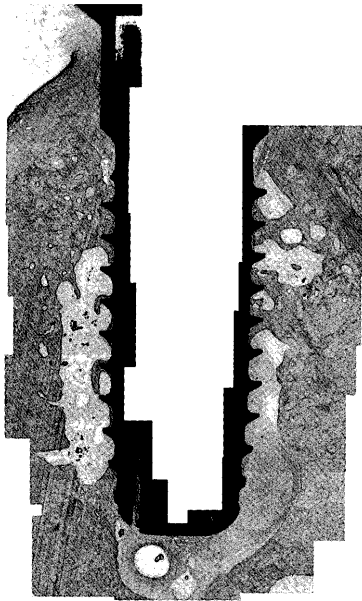


図8 A;チタン合金埋入による骨のリモデリング
(Villanueva bone stain染色×2)



図8 B;チタン合金埋入時の骨のリモデリング。
(蛍光顕微鏡によるラベリング像×2)

b) 結果

実験①の「正常範囲内での咬合負荷を行わせる群」において、純チタンおよびチタン合金では、インプラント体周囲で骨のリモデリングが同様であることを確認した(図8A, B)が、HAコーティングのものでは、インプラント体周囲の骨組織のリモデリング像がほとんど認められなかった。

実験②の「過剰な咬合負荷を行わせる群」では、純チタンおよびチタン合金群では①の結果と比較すると、さらに旺盛な骨のリモデリングが観察されたのに加え、①で起こっているリモデリングよりもインプラント体からやや離れた部位でのリモデリング像が観察された。HAコーティングのものでは、インプラント頸部での骨破壊像が認められ、インプラント体部でリモデリングを行っている部位を観察することができなかった。

実験③-1から③-4および④-1から④-2での、「正常咬合圧負荷実験系」では、純チタンおよびチタン合金群とHAコーティングのものでも良好な骨のリモデリングがインプラント体周囲で観察された。しかし、「過剰な咬合圧負荷実験系」では、HAコーティングのものと純チタンおよびチタン合金との比較において、純チタンおよびチタン合金のインプラント周囲での骨のリモデリング像は多く、HAコーティングのインプラント体周囲で骨破壊像が顕著に認められた。

これらの実験は継続中であり、詳細な結果を得るに至っていないが、HAコーティングインプラントに関しては、材料学的特性が臨床に結びついていないことが確認された。

c) 考察

咬合圧の負荷様式の違いによるインプラント周囲での骨のリモデリングの違いは純チタンとチタン合金で

の差が認められなかったが、これはどちらの材料においても骨組織との接合状態が同じであることを示している。すなわち、インプラント体表面のTiO₂の状態が同様であることを示唆する所見である。また、HAコーティングインプラントの場合は、インプラント頸部での骨皮質との結合が強く、正常咬合圧下でインプラント頸部でのリモデリング像がかろうじて認められる条件下で、インプラント体と骨組織が十分に接合していることを示唆させる所見であった。これは、一旦過剰咬合圧下にさらされた場合、HAと骨組織の接合が強固であるため、周囲骨組織との破壊はHAとチタンとの間で起こり、その応力がインプラント体部に及び、ひいては周囲骨組織のリモデリングがインプラント体部で生じることを示唆している。

一方、骨造成法の違いによるインプラント周囲での骨のリモデリングの違いについてみると、メンブレン単独による骨造成と自家骨移植併用では、メンブレン単独による骨造成群の方が旺盛な骨のリモデリングを起した。これは、インプラントに接する骨組織内の血流の差によるものと考えられた。すなわち、メンブレン単独による骨造成では、末梢血管の再生とともに骨組織形成が旺盛であるのに対し、自家骨(ブロック)移植は、移植骨への血流再開が十分でないため骨組織のリモデリングが円滑でないことによると考えられた。

c. フィクスチャーの形態に関する研究

フィクスチャーの形態に関する研究は、咬合圧を如何に分散し、インプラント頸部への応力集中を如何に避けるかということの追究として行われてきた。これは、応力集中によるインプラント周囲の骨吸収が頸部から起こること、さらにインプラント周囲炎でも同様にインプラント頸部から骨吸収が起こるという事実に

に基づいている。この点に関しては、すでにシリンダータイプのものに比してスレッドタイプ(ネジ型)のものが良いとされ、臨床的データもこれを裏付けている^{17, 21, 29-36)}。

しかし、最近では、種々の形態のものが臨床応用され、それまでのインプラント治療の概念を覆すようになってきた。例えば、インプラント体表面に極端な凹凸を作り、表面積を増加させ、応力集中の面からそれまで最も適しているとされたクラウン/インプラントレシオ(C/I: 歯冠長とインプラント体長の比) 1: 1.5~2を1: 1以下でも予後良好というものが登場している。

しかし、これら表面積を極端に増やした形態を付与しているフィクスチャー使用の是非については、臨床的には大きな問題として取り上げられ、さらに、しっかりとした基礎的実験の裏付けが要求されている。

そこでPD研究では、臨床応用されているすべてのフィクスチャーについて、その応力集中の分析を行うものである。

a) 材料と方法

実験動物として成犬を用い、臨床応用されているすべてのフィクスチャーを通常に従い顎骨に埋入した。3ヶ月後に二次手術を施し、フィクスチャーに垂直、側方外力を加えることにより、顎骨表面、内部の歪みを計測し、その比較検討を行った。

この実験系は、これまで行われていた3次元有限要素法による分析が、*in vitro*によるものであり、実際の生体(顎骨)でなかったため、物性、組成の違いなどによりその結果が直接的に生体のものに適応されなかった、というのに対し、この実験方法では、高精度になった歪み計測装置を顎骨表面、内部およびフィクスチャーに応用し、より臨床に直結したデータが得られるようにした。

最終的には、この実験系でも、さらに良いフィクスチャー形態を追求するところを目的としている。

b) 結果

すべてのインプラントシステムにおいて、インプラント頸部への応力集中は、*in vitro*での実験結果より大きなものになっていた。

その中でも、シリンダータイプのものでその傾向が著明で、次にテーパードタイプ(歯根型)のものとなっていた。スレッドタイプのもので、インプラント頸部への応力集中は最も少ない傾向を示した。

表面性状の違いでは、TPSなどによるコーティングを施されたものは少なく、スレッドタイプの機械研磨などのような滑沢な表面性状のものが高い傾向を示した。

c) 考察

すべてのインプラントシステムにおいて、*in vivo*でのインプラント頸部への応力集中が*in vitro*での実

験結果より大きなものになっていたことは、*in vivo*においては、骨組織は硬さ密度が均一でないということ、さらに骨組織に対する接合状態が異なる事が大きく関与していることが示唆された。また、シリンダータイプ、テーパードタイプのものにその傾向が強いということは、形態的に応力を分散しにくいものであることが示唆される。

d. 形態が予後の良いクラウン/インプラントレシオ(C/I)^{33, 38-40)}に与える影響

この課題に対する研究は、前に述べた“フィクスチャーの形態に関する研究”の結果を受け行いつつある。

a) 材料と方法

すなわち、“フィクスチャーの形態に関する研究”の実験系と同様の方法を使用し、垂直、側方外力を加える際に、アバットメントを取り付け、そのアバットメントの長さを変化させることでクラウン/インプラントレシオ(C/I)を変化させ、c. と同様の検索方法にて周囲骨表面および内部での応力集中を測定、インプラント体の形態の違いによる変化を検討した。

b) 結果

すべてのインプラントシステムにおいて、C/Iが1: 1までの応力集中には差は認められなかった。C/Iが1.5: 1以上になると、シリンダータイプ、テーパードタイプ(歯根型)では、極端なインプラント頸部への応力集中が起こることを認めた。また、スレッドタイプの機械研磨のものでも、C/Iが1.5: 1を越えるとインプラント頸部への応力集中の増加が認められた。C/Iが1.5: 1の時点で特に大きな変化を見せなかったのがTPS, HA, 酸処理, プラスト処理等を施した表面性状を持ったインプラント体であった。

c) 考察

本実験結果から、骨接合を得たインプラント体においては、1. インプラント体の形状、2. インプラント体表面積の順で、C/Iの上昇に対する応力集中が回避できることが示唆された。

2) インプラント支台歯(アバットメント、上部構造体)に関する研究

(1) アバットメントの抗菌性⁴¹⁾

歯科インプラント治療の予後を悪化させる最も大きな誘因は、いうまでもなくインプラント周囲炎と過剰な咬合圧負荷(外傷性咬合)である。

近年、銀イオンの抗菌性に着目し、歯科用材料への応用が試みられ、良好な抗菌性、抗プラーク形成性が報告されている^{42, 43)}。

この実験系では、この中のインプラント周囲炎の一原因である細菌とプラークに対して銀イオン処理したアバットメントが、抗菌性、抗プラーク形成性をどの程度示し、インプラント周囲炎を抑えることができるかを検討した。

a. 材料と方法

表2 アバットメント表面でのブラーク細菌の蓄積状態

分離細菌	Ag	5,000 Å	Control
Facultative			
Anarobes	96.2% (75)*	72.4% (55)	86.6% (71)
G(+)cocci	5.1% (4)	3.9% (3)	2.4% (2)
G(+)rods	50.0% (39)	32.9% (25)	37.8% (31)
G(-)cocci	2.6% (2)	1.3% (1)	4.9% (4)
G(-)rods	38.5% (30)	34.2% (26)	41.5% (34)
Anaerobes	3.8% (0)	27.6% (21)	13.4% (11)
G(+)cocci	(0)	1.3% (1)	(0)
G(+)rods	3.8% (3)	22.4% (17)	6.1% (5)
G(-)cocci	(0)	1.3% (1)	(0)
G(-)rods	(0)	2.6% (2)	7.3% (6)
分離細菌数	78	76	82

実験動物には成犬を用い、通法に従って純チタンスレッドタイプインプラントを埋入、3ヶ月後に2次手術を行いアバットメントの装着を行う、この際、一般的に臨床応用されている純チタン製、チタン合金製と銀イオンをイオン注入法およびアーキオンプレATING法にてアバットメント表面処理したものをを用い非ブラッシング状況下でのブラークの付着状態の検索に加え、アバットメントに絹糸を巻き付けた状況下(自浄性を抑制し、不潔域を拡大させる)でのインプラント周囲組織の変化の検索を行った。

b) 結果

銀イオンの注入法および成膜法に関しては、銀イオン注入チタンのモルホロジー法では、注入量が多くなるにつれ銀コロイドの粒径も大きくなり、そのサイズは数千Åであった。銀イオン注入チタンの注入プロファイル法では、約24%の銀に30nmの深さで濃度のピークが認められた。アーキオンプレATINGによる銀成膜では、密着性に優れ、膜の剥離は認められなかった。また、バイアス電圧を全くかけないと、容易に皮膜が剥離しバイアス電圧の効果が確認された。

銀イオン注入および銀成膜チタンの抗菌性に関する結果では、浸漬法において銀イオン注入および銀成膜チタンのいずれにおいても顕著な抗菌性は認められず、生菌数はコントロールと類似した値を示した。直接法では、銀イオン注入チタンにおいては抗菌性が認められなかった。一方、銀成膜チタンでは、銀イオン注入チタンと異なり抗菌性が確認され、銀成膜5,000Åのチタンで安定した抗菌性を認めた。

銀イオンの溶出性の検索では、銀イオン注入チタンおよび銀成膜チタンから銀の溶出が確認された。銀イオンチタンでは注入イオン量が増すにつれ、銀の溶出量は多くなる傾向にあった。また、1,000~5,000Åの成膜チタンでは膜の厚さに比例して、銀の溶出量は多く認められた。

アバットメント表面でのブラークの蓄積状態は、銀

注入、銀成膜ではブラークの蓄積はほとんど認められなかったのに対し、コントロールではブラークの付着が顕著であった。また、銀注入、銀成膜およびコントロールの三者間で分離細菌に差が認められず、通性嫌気性菌がよく検出され、グラム陽性、陰性桿菌がpre-dominantであった(表2)。

c) 考察

本実験結果から、銀イオンのチタン製アバットメントへの応用は、その応用方法により抗菌性に差が認められた。しかし、歯科インプラント治療に応用されるアバットメントへの銀の応用が、インプラント周囲炎の予防の一助になり得ることが示唆された。

(2) 磁性アタッチメントの周囲組織に対する影響

磁性アタッチメントに関しては、一般的オーバーデンチャーへの応用に始まり、多くの臨床データおよび基礎実験報告がある。また、電磁場刺激あるいは超音波刺激は、骨形成を促進し、難知性骨折(偽関節形成症例)への応用がなされている⁴⁹⁾。しかし、その反面、磁場および電磁波の有害性についても報告され、医療の立場においてもその安全性が懸念されている⁴⁵⁾。

歯科領域でのこれまでの基礎的研究では、磁場および電磁波による影響として血流の増加作用があげられている。しかし、これは正常な組織あるいは生体に対する局所的な影響であり、実際の臨床応用の場では再現性が極めて乏しいとされている^{46~51)}。

そこで、PD研ではフィクスチャーとデンチャーの維持装置として臨床応用がなされている磁性アタッチメントが、インプラント周囲炎を起こした状態においても安全に応用できるか否かを *in vivo* にて再検索した。

a) 材料と方法

実験動物として成犬を用い、純チタンスレッドタイプのインプラント体をマニュアルに従い埋入した後、3ヶ月後に2次手術を行い2週後より磁性アタッチメントを装着した補綴物を固定式として装着させた。さらに、非ブラッシング状態として、ブラークの付着

を誘発しインプラント周囲炎を惹起させ、同形状の上部構造物を装着したコントロール群と比較検討した。

b) 結果

組織学的に、インプラント周囲炎を惹起させ磁性アタッチメントを装着した実験群においてコントロール群との比較において充血、血管拡張、炎症性細胞浸潤が著明に認められた。

c) 考察

本実験結果は、磁性アタッチメントによる磁場の影響により炎症反応の助長が起こったことを示唆している。

臨床的に磁性アタッチメントは義歯タイプの補綴物の維持装置として用いられる。そのため、食渣の停滞が起こりやすく、清掃不良によりプラークの付着が容易に惹起されることが予想される。このことは、臨床的に磁性アタッチメントを装着した補綴物の長期経過症例において、インプラント周囲炎を起こした場合は、炎症を助長し悪化させる要因となることが示唆された。

(3) 上部構造物装着・形態に伴うインプラント周囲ポケットでの浸出液の変化

歯肉溝滲出液の微量成分である硫酸化グリコサミノグリカン(s-GAG)、特にコンドロイチン4硫酸は、活動期の歯周炎時^{52,53)}、矯正の歯牙移動時⁵⁴⁾などに高いレベルを示すとされており、山本らは独自の簡易微量測定法(簡易測定法)を利用し、歯周炎部、健常部の比較を行い、s-GAG量は歯周炎部に有意に高く、歯周炎の治療によりそのレベルは大幅に低下すると報告した⁵⁵⁾。

一方、インプラント周囲溝滲出液中のs-GAGは、結合組織破壊の有力なマーカーと考えられ、術後の歯槽骨吸収の一部を反映していると考えられている^{56,57)}。

PD研では、この簡易微量測定法を用い、歯科インプラント治療におけるインプラント周囲溝滲出液中のs-GAGの変化が歯科インプラント治療の予後判定の指標として有用であるかを検討した。

a) 材料と方法

朝日大学歯学部附属病院口腔インプラント科にて歯科インプラント治療中の患者で、同意の得られ患者に対し、インプラント周囲溝浸出液の採取を行った。採取時期は①歯科インプラント治療希望にて来院した時(初診時)、②①の患者が歯科インプラント治療前の歯周治療終了時、③二次手術後1週目(抜糸時)、④補綴物(暫間)装着時、および装着後1週目、3週間目、2ヶ月目とした。

a) インプラント周囲溝浸出液の採取

インプラント周囲をロールワッテで簡易防湿し綿球で歯肉辺縁のプラークを可及的に除去した後、セルロースアセテート電気泳動膜(セバラックス、常光産業、東京)で作製したペーパーストリップスを歯肉辺縁におき30秒間静置させてGCFを採取した。

b) 測定法⁵⁸⁾

山本らの簡易測定法に従って、セルロースアセテート膜を長さ12mm幅3mmに細切りしペーパーストリップスを作製し、サンプルを各々2 μ ずつストリップス上に貼付した。染色液は0.4M塩酸グアニジン、0.05M塩化マグネシウム、0.25%Triton X100、0.02M硫酸溶液を含む0.2%アルシアンブルー-8GX(ナカライテクス、京都)溶液、pH1.5(ABY染色液)を用いた。サンプルを貼付したストリップスは直ちにABY染色液中に5分間浸漬した。続いてストリップスは洗浄液(染色液からアルシアンブルーを除いた物)中に40分間浸漬して脱色を行い、室温で乾燥した。乾燥したストリップスは、島津二波長フライングスポットスキヤニングデンストメータCS9300(島津製作所、京都)を用いて走査させ、デンストグラムピーク面積値(染色濃度と染色面積の積算値)を計測し、コンドロイチン4硫酸の標準曲線に基づいてプロテオグリカン(PG)量として算出した。

b) 結果

インプラント二次手術後から暫間補綴物装着までの間では、二次手術後はs-GAG量はやや増加し、その後は減少していく傾向にあった。暫間補綴物装着後は1週目よりs-GAG量が急激な増加傾向にあった(表3)。

c) 考察

これまでは本実験結果の一部であるが、二次手術直後のs-GAGの変動および臨床症状、レントゲン所見を加味すると、活発な組織修復を示唆する兆候と考えられた。

しかし、補綴物装着後の症例で歯肉炎指数(GI)の程度が高く、s-GAG量の増加を認めた症例ではインプラント周囲炎の程度を反映しているものと考えられた。

今後、症例を増やし長期観察を行うことで、歯科インプラント治療におけるインプラント周囲溝滲出液中のs-GAGの変化が、予後判定の指標として有用であることが示唆された。

3) GBR膜に関する研究

(1) GBR膜への抗菌性の付与

現在、歯科インプラント治療の長期予後安定のため、最適な部位にフィクスチャーを埋入することは不可欠

表3 インプラント二次手術から以降のs-GAGの浸出量

二次手術後1週目	二次手術後2週目	咬合負荷1週目	咬合負荷1か月目	咬合負荷2か月目
27.982	28.433	11.21		101.121
5.795	23.773	6.551		89.65
	13.835	0.591	28.562	126.477

(ng/site)

となっている。そのために、Gore-Texメンブレン(GBR膜)を応用した骨造成および骨の形態修正が行われている。しかし、日本人の場合、欧米人と比較して歯肉が薄いためGBR膜が、露出することが多く、それに起因する、術後感染が増加してしまう傾向にある⁵⁹⁾。

一方、銀イオンは、その抗菌性が注目されており、PD研で行った2)-(1)の実験系でも、その効果が確認されている。

本実験ではGBR膜に銀コーティングを施し、GBR膜内への細菌の侵入を防止することにより術後感染を減少し、予知性の高いメンブレンテクニックによる骨造成処置を行えるようにすることを目的として、基礎的実験系を行った。

a) 材料と方法

実験2)-(1)で用いたアークイオンプレーティング法にて、バイアス電圧を100~700Vまで変化させ、GBR膜上に銀成膜を作成した(図9 A)。

そして、これを雑種成犬の上顎第一大臼歯の歯冠部頬側面に、実験群として、銀成膜処理を施したGBR膜、コントロール群として未処理のGBR膜(図9 B)を貼り付け、口腔内清掃を中止し、軟飼料を与え24と48時間後にGBR膜を摘出した。取り出したGBR膜は通法に従い固定後、位相作電子顕微鏡にて菌およびプラーク

の付着を観察した。

b) 実験結果

24時間後、未処理群のGBR膜上には、盛んなプラークの形成と多数の球菌が観察された(図9 C)。銀成膜処理群では、少量のプラークの形成と少数の球菌が観察された(図9 D)。

48時間後では、未処理群のGBR膜上には、24時間群より盛んなプラークの形成と多数の球菌が観察された(図9 E)。銀成膜処理群では、24時間放置した状態と同程度の少量のプラークの形成と少数の球菌が観察された(図9 F)。

c) 考察

本検索では、GBR膜をアークイオンプレーティング法にて銀成膜処理することにより、本来のGBR膜としての作用を損なうことなく、抗菌性、抗プラーク形成性が獲得されることが確認され、臨床的に、GBR処置を行った際に、膜露出が起こったとしても、感染の危険性を回避でき、予定していた骨造成をより確実に達成できる可能性が示唆された。

4) 多血小板血漿(PRP)に関する研究

(1) PRPの骨形成に関する実験的研究

PRPは、血小板内の α 粒子に含まれている種々の成長因子を手術部位に応用することによって、その部位

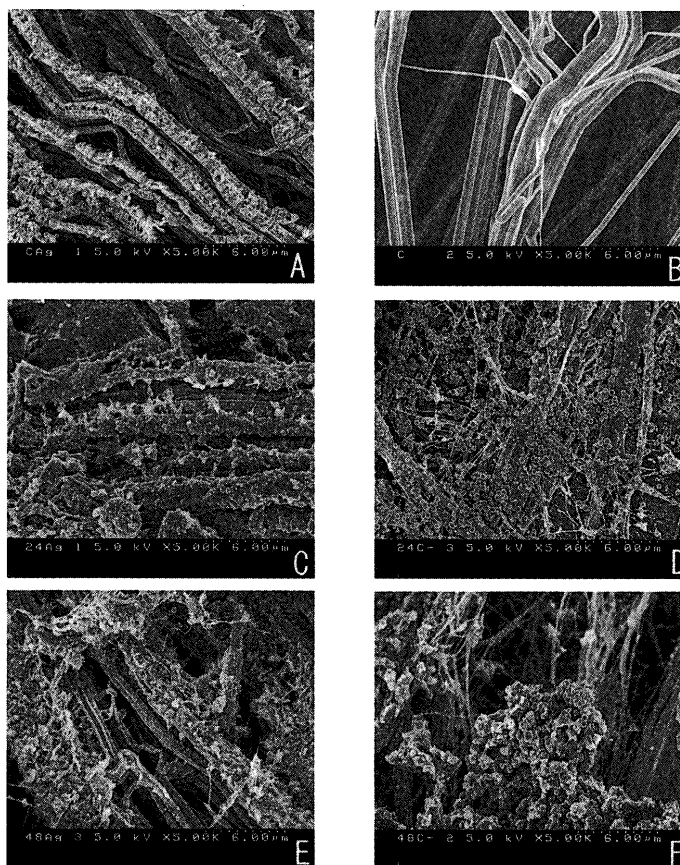


図9 GBR膜への細菌侵入
A ; GBR膜上の銀成膜, B ; 未処理のGBR膜, C ; 未処理GBR膜上の24時間後, D ; 銀成膜上の24時間後, E ; 未処理GBR膜上の48時間後, F ; 銀成膜の48時間後。

の治癒促進が期待され、心臓や脳神経外科領域で最初に応用され始めた。1992年頃には、口腔外科領域における骨移植術でも応用され、創傷治癒促進に加えて、骨組織再生も促進されることが示され⁶⁰⁾、1998年にはMarxら⁶¹⁾が実験的にPRPを骨移植部に応用することで骨組織の成熟を促すことを発表しています。また、Robertらも明らかにPRPを用いない場合よりも骨形成がすみやかで、感染の危険性がほとんどなく、比較的簡単な方法で採取できることから、外傷に対する療法としては極めて論理的であるとしている。しかし、PRP応用による治癒促進、骨形成促進のメカニズムに関して不明な点が多い。

本実験では、人工的骨欠損部にPRPを応用し、PRPによる骨形成メカニズムの詳細を探り、PRPによる骨形成促進作用を追求することを目的として、動物実験を行った。

a) 材料と方法

実験1として、雄性、成犬を用い、4本の両側下顎前臼歯を抜歯し、1か月後に2本の機械研磨のチタンスレッドインプラントを15mm間隔で植立し、両フィクスチャー間に深さ5mmの骨欠損を形成、その骨欠損部に実験動物の血液を用い、Harvest Technology社製のSmart PRePにて作製したPRPを填入し、何も填入しない対照側と、その骨形成を比較した。

標本作製は、手術後1、2、3週後に頸動脈より還流固定を行い下顎骨を一塊として摘出し標本作製を行った。摘出した下顎骨は、ソフトテックスレントゲン撮影を行い、骨欠損部から軟組織のみを注意深く剥離摘

出し、パラフィン包埋し連続切片を作製、HE染色による組織学的観察および組織化学的手法によりオステオカルシン(OC)、オステオネクチン(ON)、オステオポンチン(OP)、PCNA、TGF- β 、PDGFの染色を行った。

実験2は、あとで述べる実験1の結果から、PRP填入により起こる骨組織形成に関与する特定の蛋白質をウエスタンブロッティング法にて同定するために計画した。実験方法は、実験1と同様4本の両側下顎前臼歯抜歯、1か月後に直径3.3mm、深さ10mmの骨窩洞を3か所形成し、実験側の骨窩洞には実験1と同様に作製したPRPを填入し、反対側にはPRPの填入を行わない対照側を設けた。6日目に骨窩洞内組織を注意深く搔爬摘出し、試料とした。

採取した試料の湿重量1.0gを液体窒素中で凍結させ、RIPAバッファー、pH7.4を4ml加えホモジナイザーで均質溶解化させ、遠心して上清を泳動試料とした。

試料を総濃度12%のポリアクリルアミドゲルでSDS-PAGEを行い、泳動後のゲルをニトロセルロース膜に転写した。一次抗体としてanti-PDGF polyclonal antibodyを反応させた後、ペルオキシダーゼを標識し、ナフトール誘導体で発色した。

b) 結果

実験1でのソフトテックス写真で、実験側一週目において両フィクスチャー間にブリッジ状に粒形のX線不透過像を認め、2週目において、実験側、対照側とも母床からの骨形成を思わせる不透過像が観察され、3週目においては、対照側では不透過像中央部が陥凹しているのに対し、実験側ではほぼ骨欠損部全体に水平

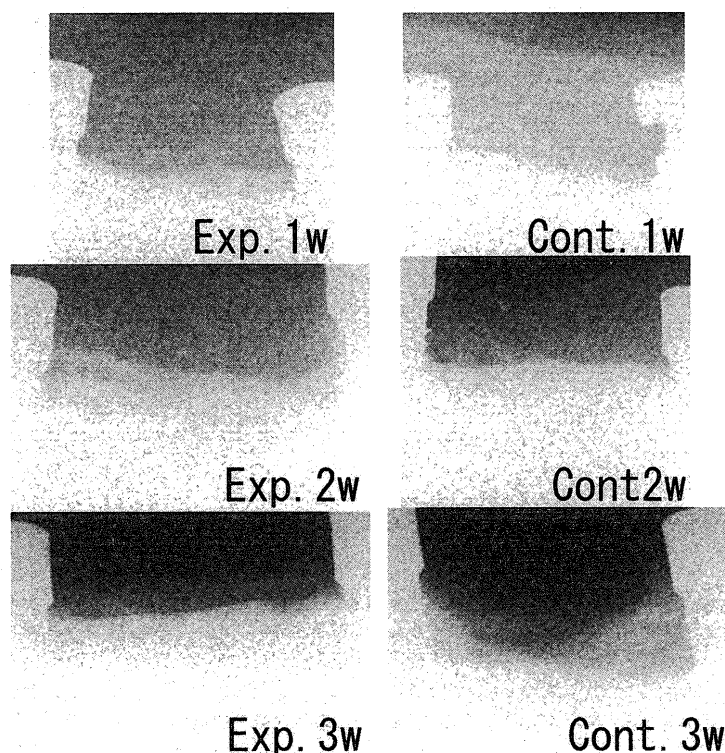


図10 PRP応用による骨欠損部の再生の軟X線像。

表4 PRP応用による免疫組織学的所見

	OC	ON	OP	PCNA	TGF-β	PDGF
対照側	-	+	-	-	+	±
実験側	++	+++	++	+	+	++

註：OC；オステオカルシン，ON；オステオネクチン，OP；オステオポンチン。

的に均一な不透過像の形成が認められた(図10)。

組織学的検索結果では，1週目において実験側では類骨の形成が認められ，免疫組織学的にはOC, ON, OPがその部位において中等度から強陽性所見を示していた。また，PRP自体に含まれているTGF-βには，対照側，実験側での染色性に差がなかったが，PDGFでは，対照側±でマクロファージ様細胞にのみ陽性所見を認めたと，実験側では類骨周囲の骨芽細胞様細胞に陽性反応が現れた(表4)。

ウェスタンブローディング法でのPDGFの定性結果は，6日目で，明らかにPRPの応用によりPDGFが増加し，炎症などにより現れた，マクロファージでのPDGFよりはるかに多いPDGFが存在することが明らかとなった。

c) 考 察

本実験結果から，PRPの応用により，1週目までに類骨の形成が始まり，骨組織形成初期の類骨周囲にPDGF陽性の骨芽細胞様細胞が多数認められた。また，PRP応用6日目において，対照側より多いPDGFが実験側に存在することが，ウェスタンブローディング法にて確認された。

以上から，PRP応用による骨組織形成促進は，PRPに含まれているPDGFが骨芽細胞のPDGF発現を促進することにより起こっていることが強く示唆された。

以上の各検索結果の専門誌への投稿状況は現時点で以下の如く，掲載済が3編，投稿中が5編，投稿予定(論文作成中又は研究続行中)が9編である。

1. ブラークの解析

- 1) Ultrastructural analysis of structural framework in dental plaque developing on synthetic carbonate apatite applied to human tooth surfaces. *Eur J. Oral Sci.* 109 : 249-259, 200, 2001.
- 2) The Ultrastructural Analysis od Dental Plaque on Synthetic Carbonate Apatite applied to Human Teeth. *Cariology Today.* 2 : 1-7, 2002.
- 3) Morphological analysis of the development of subgingival plaque on carbonate apatite applied

to human periodontal pocket. *Eur J. Oral Sci.* 投稿中.

- 4) Development of tooth-associated plaque formation. *Caries today.* 投稿中.
2. 齲蝕発症の解析
 - Correlation between caries and dental plaque in dog. *Caries Research.* 投稿中.
3. 歯周炎の解析
 - Correlation between human gingivitis and development of subgingival plaque forming. *J. Periodont. Res.* 投稿中.
4. 根尖性歯周炎の解析
 - 1) Actinomyces in human apical periodontitis. *Int End. J.* 投稿中.
 - 2) The survival of enterococci in root canal. *Int Endo J.* 投稿予定.
5. 喪失歯の最終治療の解析
 - 1) 表面性状の変化. *Int. J. Oral Maxillofac. Implants.* 投稿予定.
 - 2) 表面性状による周囲組織反応の違い. *Int. J. Oral Maxillofac. Implants.* 投稿予定.
 - 3) フィクスチャーの形態に関する研究. *J. Biomed. Mater. Res.* 投稿予定.
 - 4) 形態が予後の良いクラウン/インプラント レーシオ(C/I)に与える影響. *Int. J. Prosthodont.* 投稿予定.
 - 5) アバットメントの抗菌性. *日口腔インプラント誌.* 14 ; 429~442, 2001.
 - 6) 磁性アタッチメントの周囲組織に対する影響. *Int. J. Prosthodont.* 投稿予定.
 - 7) 上部構造物装着・形態に伴うインプラント周囲ポケットでの細菌層，滲出液，ブラークの変化. *Implant Dent.* 投稿予定
 - 8) GBR膜への抗菌性の付与. *日口腔インプラント誌.* 投稿予定.
 - 9) PRPの骨形成に関する実験的研究. *Int. J. Oral Maxillofac. Implants.* 投稿予定.

文 献

—ブラークの解析に関する引用文献—

- 1) Sanz, M. and Newman, M. G. : Oral Microbiology and Immunity. (Dental plaque and calculus.) (Newman, M. G. and Nisengard), R. Saunders, 367~388.
- 2) Listgarten, M. A. : The structure of dental plaque. *Periodontol.* 2000, 5 : 52~65, 1994.

- 3) Carlsson, J., Grahén, H., Jonsson, G. : Lactobacilli and streptococci in the mouth of children. *Caries Res.* 9 : 333~339, 1975.
- 4) Carlsson, J. and Gothefors, L. : Transmission of Lactobacillus jensentii and Lactobacillus acidophilus from mother to child at the delivery. *J. Clin. Microbiol.*

- 1 : 124~128, 1975.
- 5) Ellen, R. P. : Establishment and distribution of *Actinomyces viscosus* and *actinomyces naeslundii* in the human oral cavity. *Infect.Immun.* **14** : 119~1124, 1976.
 - 6) McCarthy, B. R., Streckfuss, J. L. and Keene, H. J. : The indigenous oral flora of man. I. The newborn to the 1-year old infant. *Arch. Oral Biol.* **10** : 61~70, 1965.
 - 7) Könönen, E., Asikainen, S. and Jousimies-Somer, H. : The early colonization of gram-negative anaerobic bacteria in edentulous infants. *Oral Microbiol Immunol.* **7** : 28~31, 1992.
 - 8) Bailit, H. L., Baldwin, D. C. and Hunt Jr, E. E. : The increasing prevalence of gingival *Bacteroides melaninogenicus* with age in children. *Arch. Oral Biol.* **9** : 435~438, 1964.
 - 9) De Araújo, W. C. and Macdonald, K. S. : The gingival crevice microbiota of preschool children. *J. Periodontol.* **35** : 285~289, 1964.
 - 10) Mackler, S. B. and Crawford, J. J. : Plaque development and gingivitis in the primary dentition. *J. Periodontol.* **44** : 18~24, 1973.
 - 11) Frisken, K. W., Tagg JR., Laws, A. J. and Orr, M. B. : Suspected periodontopathic microorganisms and their oral habitats in young children. *Oral microbial Immunol.* **2** : 60~94, 1987.
 - 12) Mikx, F. H. M., Matee M. I. and Maltha, J. C. : Lehner, T. and Cimasoni, G. (The occurrence of oral spirochetes in relation to age and periodontal disease. The borderland between caries and periodontal disease.) (Geneva), *M'cdecun et Hygiene*, **3**, 391~399, 1986.
 - 13) Wojcicki, C. J., Harper, D. S. and Robinson, P. J. : Differences in periodontal disease-associated microorganisms of subgingival plaque in prepubertal, pubertal and post pubertal children. *J. Periodontol.* **58** : 19~223, 1987.
 - 14) Papanou, P. N., Sellén, A., Wennsröm, J. L., Dahlen, G. : An analysis of the subgingival microflora in randomly selected subjects. *Oral Microbiol Immunol.* **8** : 24~29, 1993.
 - 15) Socransky, S. S. and Haffajee, A. D. : Evidence of bacterial etiology : a historical perspective, *Periodontol 2000*, **5** : 7~25, 1994.
 - 16) Anwar, H., Strap, J. and Costerton, W. : Minireview, Establishment of aging biofilms : Possible mechanism of bacterial resistance to antimicrobial therapy. *Ame. Soc. Microcrobial. Cri. Res. Oral. Biol. Med.*, **5** : 203~248, 1994, **36** : 1347~1351, 1992.
 - 17) Costerton, J., Lewandowski, Z., Caldwell, D., Korber, D. and Lappin-Scott, H. : Microbial biofilms. *Ann. Rev. Microbiol.* **49** : 711~745, 1995.
 - 18) Scannapieco, F. A. : Saliva-bacterium interactions in oral microbial ecology.
 - 19) Marsh, P. D. and Bradshaw, D. J. : Dental plaque as a biofilm. *J. Indust. Microbiol.*, **15** : 169~175, 1995.
 - 20) Beveridge, T., Makin, S., Kadurugamuwa, J. and Li, Z. : Interactions between biofilms and the environment. *FEMS. Microbiol. Rev.*, **20** : 291~303, 1997.
 - 21) Frank, R. M. and Brendel, A. : Ultrastructure of the approximal dental plaque and the under lying normal and carious enamel. *Arch. Oral Biol.*, **11** : 883~912, 1966.
 - 22) Listgarten, M. A. : Structure of the microbial flora associated with periodontaldisease and health in man. A light and electron microscopic study. *J. Periodontol.* **47** : 1~21, 1976.
 - 23) Brex, M., Ronstrom, A., Theilade, J. and Attstrom, R. : Early formation of dental plaque on plastic films. *J. Periodont. Res.*, **16** : 213~227, 1981.
 - 24) Carrassi, A., Santarelli, G. and Abati, S. : Early plaque colonization on human cementum. *J. Clin. Periodontol.*, **16** : 265~267, 1989.
 - 25) Socransky, S. S., Manganiello, A. D., Oram, V. and Van Houte, J. : Bacteriological studies of developing supragingival dental plaque. *J. Periodont. Res.*, **12** : 90~106, 1977.
 - 26) Nyvad, B. : Microbial colonization of human tooth surfaces. *APMIS Suppl.* **32** : 101 : 7~45, 1993.
 - 27) Listgarten, M. A. : The structure of dental plaque. *Periodont. 2000*, **5** : 52~65, 1994.
 - 28) Lie, T. : Ultrastructural study of early dental plaque formation on human tooth surfaces. *Acta Odontol. Scand.*, **37** : 65~72, 1979.
 - 29) Brex, M., Rönström, Theilade, A. and Attsröm, R. : Early formation of dental plaque on plastic films. 2. electron microscopic observations. *J. Periodont. Res.*, **16** : 213~227, 1981.
 - 30) Nyvad, B. and Fejerskov, O. : Scanning electron microscopy of early microbial colonization of human enamel and root surface *in vivo*. *Scand. J. Dent. Res.* **95** : 287~296, 1987.
 - 31) Nyvad, B. and Fejerskov, O. : Transmission electron microscopy of early bacterial colonization of human enamel and root surfaces *in vivo*. *Scand. J. Dent. Res.* **95** : 297~307, 1987.
 - 32) Kolenbrander, P. E. Anderson, R. N. and Moore, L. V. M. : Coaggregation of *Fusobacterium nucleatum*, *selemonas sputigena* with strains from 11 genera of oral bacteria. *Infect Immun.*, **57** : 3194~3203, 1989.
 - 33) Kolenbrander, P. E. and London, J. : Ecological significance of coaggregation among oral bacteria. *Adv. Microb. Ecol.*, **12** : 183~217, 1992.
 - 34) Kolenbrander, P. E. and London, J. : Adhere tomorrow : oral bacterial adherence. *J. Bacteriol.*, **175** : 3247~3252, 1993.
 - 35) Theilade, E. and Theilade, J. : Dental plaque. (Bacteriological and ultrastructural studies of developing dental plaque.) (W. D. McHugh), C. D. Thomson &

- Co., (Dundee), 27~40, 1970.
- 36) Berthold, C. H., C. H., Berthold, P. and Söder, P. Ö. : The growth of dental plaque on different materials. *Swed. Dent. J.*, **64** : 863~877, 1971.
 - 37) Berthold, P. : Formation of salivary coating and dental plaque on two different supporting materials. *J. Periodontol.*, **50** : 397~405, 1979.
 - 38) Lie, T. : Growth of dental plaque on hydroxyapatite splints. *J. Periodont. Res.*, **9** : 135~146, 1974.
 - 39) 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** : 10~25, 1975.
 - 40) Hannig, M. : Transmission electron microscopy of early plaque formation on dental materials in vivo. *Eur. J. Oral Sci.*, **107** : 55~64, 1999.
 - 41) Sönju, 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.
 - 42) Öste, R., Rönström, 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.
 - 43) Lam Watt, S. and Bennick, A. : Composition of enamel and root pellicle from parotid saliva (abstract). *J. Dent. Res.*, **60** : 653, 1981.
 - 44) 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.
 - 45) Ruan, M. S., Di Paola, C. and Mandel, I. D. : Quantitative immunochemistry of salivary proteins adsorbed in vitro to enamel and cementum from caries-resistant and caries-susceptible human adults. *Arch. Oral Biol.*, **31** : 597~601, 1986.
 - 46) 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.
 - 47) Mc Dougall, W. A. : Studies on the dental plaque. I. The histology of the dental plaque and its attachment. *Austr. Dent. J.*, **8** : 261~273, 1963.
 - 48) Armstrong, W. G. : Origin and nature of the acquired pellicle. *Proc. R. Soc. Med.*, **61** : 923~930, 1968.
 - 49) Sönju, T., Christensen, T. B., Kornstad, L. and Rölla, G. : Electron microscopy, carbohydrate analysis and biological activities of the proteins adsorbed in two hours to tooth surfaces in vivo. *Caries Res.*, **8** : 113~122, 1974.
 - 50) Newman, H. N. : The organic-films on enamel surfaces. 2. The dental plaque. *Br. Dent. J.*, **141** : 105~114, 1976.
 - 51) Lie, T. : Scanning and transmission electron microscope study of pellicle morphogenesis. *Scand. J. Dent. Res.*, **85** : 217~231, 1977.
 - 52) Ostrom, C. A., Koulourides, T., Hickman, F. and McGhee, H. J. : Microbial characterization of an experimental cariogenic plaque. *J. Dent. Res.*, **56** : 550~558, 1977.
 - 53) Theilade, E., Thailade, J. and Mikkelsen, L. : Microbiological studies on early dento-gingival plaque on teeth and Mylar strips in humans. *J. Periodont. Res.*, **17** : 12~25, 1982.
 - 54) Lijemark, W. F., Fenner, L. J. and Boomquist, C. G. : In vivo co-localization of salivary pellicle by *Haemophilus*, *Actinomyces* and *Streptococcus* species. *Caries Res.*, **20** : 481~497, 1986.
 - 55) Nyvad, B. and Kilian, M. : Microbiology of the early colonization of human enamel and root surfaces in vivo. *Scand. J. Dent. Res.*, **95** : 369~380, 1987.
 - 56) Cowan, M. M., Taylor, K. G. and Doyle, R. J. : Role of sialic acid in the kinetics of streptococcus sanguis adhesion to artificial pellicle. *Infect. Immun.*, **55** : 1552~1557, 1987.
 - 57) Nyvad, B. and Kilian, M. : Comparison of the initial streptococcal microflora on dental enamel in caries-active and caries-inactive individual. *Caries Res.*, **24** : 267~272, 1990.
 - 58) Look, C. Y., Willcox, M. D. P., Knox, K. W. : Surface-associated properties of Actinomyces strains and their potential relation to pathogenesis. *Oral Microbiol. Immunol.*, **9** : 12~18, 1994.
 - 59) Gibbons, R. J. and van Houte, J. : Bacterial adherence in oral ecology. *Annu. Rev. microbial.*, **29** : 19~44, 1995.
 - 60) Van Houte, J. : Bacterial adherence in the mouth. *Rev. Infect. Dis.*, **5** : 659~669, 1983.
 - 61) Gibbons, R. J. : Adherent interactions which may affect microbial ecology in the mouth. *J. Dent. Res.*, **63** : 378~385, 1984.
 - 62) Fischer, S. J., Prakobphol, A., Kajisa, L. and Murray, P. A. : Experimental radiobabeling of components of pellicle on human enamel and cementum. *Arch. Oral Biol.*, **32** : 50~517, 1987.
 - 63) Al, Hashimi, I. and Levine, M. J. : Characterization of in vivo salivary-derived enamel pellicle. *Arch. Oral Biol.*, **34** : 289~295, 1989.
 - 64) Kajisa, L., Prokobjhol, A., Schiodt, M. and Fishers, S. J. : Effect of plasma on composition of human enamel and cementum pellicle. *Scand. J. Dent. Res.*, **98** : 461~471, 1990.
 - 65) Orstavik, D. and Kraus, F. W. : The acquired pellicle : Immunofluorescent demonstration of specific proteins. *J. Oral Path.*, **2** : 68~76, 1973.
 - 66) Birkhed, D. and Skude, G. : Relation of amylase to starch and lysin metabolism in human dental plaque in vitro. *Scand. J. Dent. Res.*, **86** : 248~258, 1978.

- 67) Dipaola, C., Herrera, M. S. and Mandel, I. D. : Immunochemical study of proteins in human supragingival compared with dental plaque. *Arch. Oral Biol.* **29** : 161~163, 1984.
- 68) Jensen, J. L., Lamkin, M.S. and Oppenheim, F. G. : Adsorption of human salivary proteins to hydroxyapatite. A comparison between whole saliva and glandular salivary secretions. *J. Dent. Res.*, **71** : 1569~1576, 1992.
- 69) Kousvelari, E. E., Baratz, R. S., Burke, B. and Oppenheim, F. G. : Immunochemical identification and determination of proline-rich proteins in salivary secretions, enamel pellicle and glandular tissue specimens. *J. Dent. Res.*, **59** : 1430~1438, 1980.
- 70) Bennick, A., Chan, G., Goodlin, R., Abrams, S., Tustian, D. and Madapollimattam, G. : The role of human salivary acidic proline-rich proteins in the formation of acquired dental pellicle in vivo and their fate after adsorption to the human enamel surface. *Arch. Oral Biol.*, **28** : 19~27, 1987.
- 71) Gibbons, R. J. and Hay, D. I. : Human salivary acidic proline-rich proteins and statherin promote the attachment of *Actinomyces viscosus* LY 7 to apatitic pellicles. *Infect. Immun.*, **41** : 414~417, 1983.
- 72) Gibbons, R. J. and Hay, D. I., Cisar, J. O. and Clark, W. B. : Adsorbed salivary proline-rich protein 1 and statherin; Receptors for type 1 fimbriae of *Actinomyces viscosus* T14V-J1 on apatitic surfaces. *Infect. Immun.*, **56** : 2990~2993, 1988.
- 73) Hay, D. I. : The adsorption of salivary proteins by hydroxyapatite and enamel. *Arch. Oral Biol.*, **12** : 937~946, 1967.
- 74) Johnsson, M., Levine, M. J. and Nancollas, G., H. : Hydroxyapatite binding domains of salivary proteins. *Crit. Rev. Oral Biol. Med.*, **4** : 371~378, 1993.
- 75) Stinson, M. W., Levine, M. J., Cavese, J. M., Prokophol, A., Murray, P. A., Tabak, L. A. and Reddy, M. S. : Adherence of *Streptococcus sanguis* to salivary mucins bound to glass. *J. Dent.*, **61** : 1390~1393, 1982.
- 76) Ligtenberg, A. J. M., Walgreen-Weteerings, E., Veerman, E. C. I., Soet, J. J. D., de Graaff, J. and Amerongen, A. V. N. : Influence of saliva on aggregation and adherence of *Streptococcus gordonii* HG222. *Infect. Immun.*, **60** : 3878~3884, 1992.
- 77) Torres, G. I., Reddy, M. S., Scannapieco, F. A. and Levin, M. J. : Low molecular weight salivary mucin promotes adhesion of *Streptococcus gordonii* to hydroxyapatite. *J. Dent. Res.*, **72** : (Abstr. 207), 1993.
- 78) Douglas, C. W. : The binding of human salivary α -amylase by oral strains of streptococcal bacteria. *Arch. Oral Biol.*, **28** : 567~573, 1983.
- 79) Scannapieco, F. A., Bergey, E. J., Reddy, M. S. and Levine, M. J. : Characterization of salivary α -amylase binding to *Streptococcus sanguis*. *Infect. Immun.*, **57** : 2853~2863, 1989.
- 80) Douglas, C. W. I. : Characterization of the α -amylase receptor of *Streptococcus gordonii* NCTC7868. *J. Dent. Res.*, **69** : 1746~1752, 1990.
- 81) Douglas, C. W. I., Pease, A. A. and Whiley, R. A. : Amylase-binding as a discriminator among oral streptococci. *FEMS Microbiol. Lett.*, **66** : 193~198, 1990.
- 82) Killian, M. and Nyvad, B. : Ability to bind salivary α -amylase discriminates certain viridans streptococcal species. *J. Clin. Microbiol.*, **28** : 2576~2577, 1990.
- 83) Kousvelari, E., Ciardi, J. E. and Bowers, M. R. : Altered bacterial aggregation and adherence associated with changes in rat parotid-gland salivary proteins induced in vivo by β -adrenergic stimulation. *Arch. Oral Biol.*, **33** : 341~346.
- 84) Gibbons, R. J., Hay, D. I. and Schlesinger, D. H. : Delineation of a segment of adsorbed salivary acidic proline-rich proteins which promotes adhesion of *Streptococcus gordonii* to apatitic surfaces. *Infect. Immun.*, **59** : 2948~2954, 1991.
- 85) Clark, W. B., Beem, J. E., Nesbitt, W. E., Cisar, J. O., Tseng, C. C. and Levine, M. J. : Pellicle receptors for *Actinomyces viscosus* type 1 fimbriae *in vitro*. *Infect. Immun.*, **57** : 3003~3008, 1989.
- 86) Nesbitt, W. E., Beem, J. E., Leung, K. P. and Clark, W. B. : Isolation and characterization of *Actinomyces viscosus* mutants defective in binding salivary proline-rich proteins. *Infect. Immun.*, **60** : 1095~1100, 1992.
- 87) Gibbons, R. J., Hay, D. I., Childs III, W. C. and Davis, G. : Role of cryptic receptors (cryptitopes) in bacterial adhesion to oral surfaces. *Arch. Oral Biol.*, **35** (Suppl.) : 107~114, 1990.
- 88) McBride, B. C. and Gisslow, M. T. : Role of sialic acid in saliva induced aggregation of *Streptococcus sanguis*. *Infect. Immun.*, **18** : 35~40, 1977.
- 89) Levine, M. J., Herzberg, M. C., Levine, M. S., Ellison, S. A., Stinton, M. W., Li, H. C. and Van Dyke, T. : Specificity of salivary-bacterial interactions : Role of terminal sialic acid residues in the interaction of salivary glycoproteins with *Streptococcus sanguis* and *Streptococcus mutans*. *Infect. Immun.*, **19** : 107~115, 1978.
- 90) Murray, P. A., Levine, M. J., Reddy, M. S., Tabak, L. A. and Bergey, E. J. : Preparation of sialic acid-binding protein from *Streptococcus mitis* KS32AR. *Infect. Immun.*, **53** : 359~365, 1986.
- 91) Murray, P. A., Levine, M. J., Tabak, L. A. and Reddy, M. S. : Specificity of salivary-bacterial interactions. II. Evidence for a lectin on *Streptococcus sanguis* with specificity for a New Ac (α) 2, 3 Gal (β) 1, 3 GalNAc sequence. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **106** : 390~396, 1982.
- 92) Leung, K. P., Nesbitt, W. E., Fischlschweiger, W., Hay, D. I. and Clark, W. B. : Binding of colloidal gold-

- labelled salivary proline-rich proteins to *Actinomyces viscosus* type 1 fimbriae. *Infect. Immun.*, **58** : 1986~1991, 1990.
- 93) Busscher, H. J., Cowan, M. M. and van der Mei, M. C. : On the relative importance of specific and non-specific approaches to oral microbial adhesion. *FEMS Microbiol. Rev.*, **8** : 199~209, 1992.
- 94) Shibutani, T., Imai, K., Kanazawa, A. and Iwayama, Y. : Use of hyaluronic acid binding protein for detection of hyaluronan in ligature induced periodontitis tissue. *J. Periodont. Res.*, **33** : 265~273, 1998.
- 95) Staat, R. H. and Peyton, J. C. : Adherence of oral streptococci : Evidence for nonspecific adsorption to saliva-coated hydroxyapatite surfaces. *Infect. Immun.*, **44** : 653~659, 1984.
- 96) Busscher, H. J., Uyen, M. H. W. J. C., van Pelti A. W. J., Weekamp, A. H. and Arends, J. : Kinetics of adhesion of the oral bacterium *Streptococcus sanguis* CH3 to polymers with different surface free energies. *Appl. Env. Microbiol.* **51** : 910~914, 1986.
- 97) Covan, M. M., Taylor, G. K. and Doyle, R. J. : Kinetic analysis of *Streptococcus sanguis* adhesion to artificial pellicle. *J. Dent. Res.*, **65** : 1278~1283, 1986.
- 98) Gibbons, R. J., Etherden, I. and Skobe, Z. : Association of fimbriae with hydrophobicity to *Streptococcus sanguis* FC-1 and adherence to salivary pellicles. *Infect. Immun.*, **41** : 414~417, 1983.
- 99) Fives-Taylor, P. M. and Thompson, D. W. : Surface properties of *Streptococcus sanguis* FW213 mutants nonadherent to saliva-coated hydroxyapatite. *Infect. Immun.*, **47** : 752~759, 1985.
- 100) Doyle, R. J., Nesbitt, W. E. and Taylor, K. G. : On the mechanism of adherence of *Streptococcus sanguis* to hydroxyapatite. *FEMS Microbiol. Lett.*, **15** : 105, 1982.
- 101) Hogg, S. D., Handley, P. S. and Embery, G. : Surface fibrils may be responsible for the salivary glycoprotein-mediated aggregation of the oral bacterium *Streptococcus sanguis*. *Arch. Oral Biol.*, **26** : 945~949, 1981.
- 102) Handley, P. S., Carter, P. L., Wyatt, J. E. and Hesketh, L. M. : Surface structures (peritrichous fibrils and tufts of fibrils) found on *Streptococcus sanguis* strains may be related to their ability coaggregate with other oral genera. *Infect. Immun.*, **47** : 217~227, 1985.
- 103) Yeung, M. K. : Conservation of an *Actinomyces viscosus* T14V type 1 fimbrial subunit homolog among divergent group of *Actinomyces* spp. *Infect. Immun.*, **60** : 1047~1054, 1992.
- 104) Simonsson, T., Edwardsson, S. and Glants, P. O. : Biophysical and microbiological studies of "heavy" and "light" plaque formers. *Scand. J. Dent. Res.*, **95** : 43~48, 1987.
- 105) Simonsson, T., Rönström, 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.
- 106) Syed, S. A. and Loesche, W. J. : Bacteriology of human experimental gingivitis : Effect of plaque age. *Infect. Immun.*, **81** : 821~829, 1978.
- 107) Van Palestein Helderma, W. H. : Longitudinal microbial changes in developing human supragingival and subgingival dental plaque. *Arch. Oral Biol.*, **26** : 7~12, 1981.
- 108) Ritz, H. L. : Microbial population shifts in developing human dental plaque. *Arch. Oral Biol.*, **12** : 1561~1568, 1967.
- 109) Nyvad, B. and Fejerskov, O. : Structure of dental plaque and the plaque-enamel interface in human experimental caries. *Caries Res.*, **23** : 151~158, 1989.
- 110) Schroeder, H. E. and De Boever, J. A. : Dental plaque. (The structure of microbial dental plaque.) (W. D. McHugh), C. D. Thomson & Co., (Dundee), 49~70, 1970.
- 111) Newman, H. N. : The gingival border of plaque. Morphological studies in 8 to 15-year old children. *Br. Dent. J.*, **138** : 335~345, 1975.
- 112) Tinanoff, N., Gross, A. and Brady, J. M. : Development of plaque on enamel. *J. Periodont. Res.*, **11** : 197~209, 1976.
- 113) Fine, D. H. and Greene, L. S. : Microscopic evaluation of root surface associations in vivo. *J. Periodont. Res.*, **19** : 152~167, 1984.
- 114) Duda, J. J. and Slack, J. M. : Ultrastructural studies on the genus *Actinomyces*. *J. Gen. Microbiol.*, **71** : 63~68, 1972.
- 115) Lai, C. H. and Listgarten, M. A. : Comparative ultrastructure of certain *Actinomyces* species, *Arachnia*, *Bacterionema* and *Rothia*. *J. Periodontol.*, **51** : 136~154, 1980.
- 116) Tinanoff, N. and Tanzer, J. M. : Bacterial pellicle-like substances and polyphosphate formation by enamel-adherent oral microorganisms. *Pediatr. Dent.*, **1** : 1~6, 1979.
- 117) Berthold, P., Lai, C. H. and Listgarten, M. A. : Immunoelectron microscopic studies of *Actinomyces viscosus*. *J. Periodont. Res.*, **17** : 26~40, 1982.
- 118) Ellen, R. P. and Grove, D. A. : *Bacteroides gingivalis* vesicles bind to and aggregate *Actinomyces viscosus*. *Infect. Immun.*, **57** : 1618~1620, 1989.
- 119) Willcox, M. D. P., Drucker, D. B. and Hillier, V. F. : Cohesion between oral streptococci and *Neisseria pharyngis* on saliva-coated glass, in the presence and absence of sucrose. *Microbios.*, **61** : 197~205, 1990.
- 120) Lamont, R. J., Demuth, D. R., Davis, C. A. Malamud, D. and Rosan, B. : Salivary-agglutinin-mediated adherence of *Streptococcus mutans* to early plaque

- bacteria. *Infect. Immun.*, **59** : 3446~3450, 1991.
- 121) Li, J., Ellen, R. P., Hoover, C. I. and Felton, J. R. : Association of proteases of *Porphyromonas* (Bacteroides) *gingivalis* with its adhesion to *Actinomyces viscosus*. *J. Dent. Res.*, **70** : 82~86, 1991.
- 122) Brady, J., Piacentini, D. A., Crowley, P. J., Oyston, P. C. F. and Bleiweis, A. S. : Differentiation of salivary agglutinin-mediated adherence and aggregation of mutans streptococci by use of monoclonal antibodies against the major surface adhesin P1. *Infect. Immun.*, **60** : 1008~1017, 1992.
- 123) Skopek, R. J., Lijemark, W. F., Bloomquist, C. G. and Rudney, J. D. : Dental plaque development on defined streptococcal surfaces. *Oral Microbiol. Immunol.*, **8** : 16~23, 1993.
- 124) Lamont, R. J., Hsiao, G. W. and Gil, S. : Identification of a molecule of *Porphyromonas gingivalis* that binds to *Streptococcus gordonii*. *Microbiol. Pathol.*, **17** : 355~360, 1994.
- 125) Lamont, R. J. and Lijemark, W. F. : The influence of saliva on interbacterial adherence. *Oral Microbiol. Immunol.*, **9** : 19~24, 1994.
- 126) 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.
- 127) Cisar, J. O., Kolenbrander, P. E. and McIntire, F. C. : Specificity of coaggregations between human oral streptococci and strains of *Actinomyces viscosus* or *Actinomyces naeslundii*. *Infect. Immun.*, **24** : 742~752, 1979.
- 128) Kolenbrander, P. E. and Williams, B. L. : Lactose-reversible coaggregation between oral actinomyces and *Streptococcus sanguis*. *Infect. Immun.*, **33** : 95~102, 1981.
- 129) Kolenbrander, P. E. and Williams, L. V. : Prevalence of viridans streptococci exhibiting lactose-inhibitable coaggregation with oral actinomyces. *Infect. Immun.*, **41** : 449~452, 1983.
- 130) Kolenbrander, P. E., Andersen, R. A. 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.
- 131) Kolenbrander, P. E. : Coaggregation of human oral bacteria: Potential role in the accretion of dental plaque. *J. Appl. Bacteriol. Sympo. Supple.*, **74** : 79~86, 1993.
- 132) Cassels, F. J. and London, J. : Isolation of a coaggregation-inhibiting cell wall polysaccharide from *Streptococcus sanguis* H1. *J. Bacteriol.*, **171** : 4019~4025, 1989.
- 133) Kaufman, J. and Dierienzo, J. M. : Isolation of corn cob (coaggregation) receptor polypeptide from *Fusobacterium nucleatum*. *Infect. Immun.*, **7** : 331~337, 1989.
- 134) Rönström, A., Edwardsson, S. and Attström, R. : Streptococcus sanguis and Streptococcus salivarius in early plaque formation on plastic films. *J. Periodont. Res.*, **12** : 331~339, 1977.
- 135) Theilade, J., Fejerskov, O., Karring, T., Rölla, G. and Melsen, B. : TEM of the effect of sucrose on plaque formation on Mylar and tooth surfaces in monkeys. *J. Dent.*, **61** : 570, 1982.
- 136) Moore, W. E. C., Holdeman, L. V., Smibert, R. M., Good, I. J., Burmeister, J. A., Palcanis, K. G. and Ranney, R. R. : Bacteriology of experimental gingivitis in young adult humans. *Infect. Immun.*, **38** : 651~667, 1982.
- 137) Matsson, L. and Attström, R. : Histologic characteristics of experimental gingivitis in the juvenile and adult beagle dog. *J. Clin. Periodontol.*, **6** : 334~350, 1979.
- 138) Ten Napel, J., Theilade, J., Matsson, L. and Attström, R. : Ultrastructure of developing subgingival plaque in beagle dogs. *J. Clin. Periodontol.*, **12** : 507~524, 1983.
- 139) Darvean, R. P., Tanner, A. and Page, R. C. : The microbial challenge in periodontitis. *Periodontol.* **2000**, **14** : 12~32, 1997.
- 140) Moore, L. V., Moore, W. E., Cato, E. P., Smibert, R. M., Burmeister, J. A., Best, A. M. and Ranney, P. R. : Bacteriology of human gingivitis. *J. Dent. Res.*, **66** : 989~995, 1987.
- 141) 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.
- 142) Gmür, R., Strub, J. R. and Guggenheim, B. : Prevalence of *Bacteroides forsythus* and *Bacteroides gingivalis* in subgingival plaque of prosthodontically treated patients on short recall. *J. Periodont. Res.*, **24** : 113~120, 1989.
- 143) Preus, H. R., Nerud, A., Boysen, H., Dunford, R. G., Zambon, J. J. and Löe, H. : The natural history of periodontal disease. The correlation of selected microbiological parameters with disease severity in Sri Lankan tea workers. *J. Clin. Periodontol.*, **22** : 674~678, 1995.
- 144) Riviere, G. R., Smith, K. S., Tzagaroulaki, E., Kay, S. L., Zhu, X., De-roouen, A. and Adanms, D. F. : Periodontal status and detection frequency of bacteria at sites of periodontal health and gingivitis. *J. Periodontol.*, **67** : 109~114, 1996.
- 145) Slots, J. : Microflora in the healthy gingival sulcers in man. *Scand. J. Dent. Res.*, **85** : 247~254, 1977.
- 146) Savitt, E. D. and Socransky, S. S. : Distribution of certain subgingival microbial species in selected periodontal conditions. *J. Periodont. Res.*, **19** : 111~123,

1984.

- 147) Moore, W. E. C., Holdeman, L. V., Cato, E. P., Smibert, R. M., Burmeister, J. A. and Ranny, R. R. : Bacteriology of moderate (chronic) periodontitis in mature adult humans. *Infect. Immun.*, **42** : 510~515, 1983.

—齲蝕症に関する引用文献—

- 1) Orland, F. J., Blayney, J. R., Harrison, R. W., Reyniers, J. A., Trexler, P. C., Wagner, M., Gordon, H. A. and Lucky, T. D. : Use of the germfree animal technic in the study of experimental dental caries. I. Basic observations on rats reared free of all microorganisms. *J. Dent. Res.*, **33** : 147~174, 1954.
- 2) Orland, F. J. : A review of dental research using germ-free animals. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **78** : 285~289, 1959.
- 3) Keyes, P. H. : The infections and transmissible nature of experimental dental caries. *Arch. Oral Biol.*, **1** : 304~320, 1960.
- 4) Fitzgerald, R. J. and Keys, P. H. : Demonstration of the etiologic role of streptococci in experimental caries in the hamster. *J. Am. Dent. Assoc.*, **61** : 9~19, 1960.
- 5) 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.
- 6) Ellen, R. P., Banting, D. W., Fillery, E. D. : Longitudinal microbiological investigation of a hospitalized population of older adults with a high root surface caries risk. *J. Dent. Res.*, **64** : 1377~1381, 1985.
- 7) 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.
- 8) 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.
- 9) Fitzgerald, R. J. : Dental caries research in gnotobiotic animals. *Caries Res.*, **2** : 139~146, 1968.
- 10) Rosen, S. : Comparison of sucrose and glucose in the causation of dental caries in gnotobiotic rats. *Arch. Oral Biol.*, **14** : 445~450, 1969.
- 11) 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.
- 12) Jordan, H. V., Keyes, P. H. and Bellack, S. : Periodontal lesions in hamsters and gnotobiotic rats infected with actinomyces of human origin. *J. Periodont. Res.*, **7** : 21~28, 1972.
- 13) 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.

- 14) Nikiforuk, G. : Karger. (Understanding dental caries.) (New York), 1985.
- 15) Thewlis, J. : X-ray examination of human teeth. *Br. Dent. J.*, **57** : 457~466, 1934.
- 16) Thewlis, J. : The calcification of enamel and dentine. *Br. Dent. J.*, **62** : 303~313, 1937.
- 17) Soni, N. N. and Brudevold, F. : A microradiographic and polarizing microscopic study of sound enamel. *J. Dent. Res.*, **38** : 1181~1186, 1959.
- 18) Soni, N. N. and Brudevold, F. : Microradiographic and polarized-light studies artificially produced lesion. *J. Dent. Res.*, **39** : 233~240, 1960.
- 19) Darling, A. I. : Studies of the early lesion of enamel caries with transmitted light, polarized light and radiography. *Br. Dent. J.*, **101** : 289~297, 1956.
- 20) Darling, A. I. : Studies of the early lesion of enamel caries. Its nature, mode of spread, and points of entry. *Br. Dent. J.*, **105** : 119~135, 1958.
- 21) Darling, A. I. : Resistance of the enamel to dental caries. *J. Dent. Res.*, **42** : 488~496, 1963.
- 22) Von Barthold, F. : Membrane phenomena in carious dissolution of the teeth. *Arch. Oral Biol.*, **6** : 284~303, 1961.
- 23) 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.
- 24) Silverstone, L. M. : Tooth enamel II. (The influence of acidified organic gels on the enamel surface in vitro.) (Fearnhead), Wright & Sons, (Bristol), 197~206, 1971.
- 25) Moreno, E. G. and Zahradnik, R. T. : Chemistry of enamel substance demineralization *in vitro*. *J. Dent. Res.*, **53** : 220~235, 1974.
- 26) Arends, J. and Jongebloed, W. L. : Mechanism of enamel dissolution and its prevention. *J. Oral. Buccale.*, **5** : 219~237, 1977.
- 27) Jongebloed, W. L., Molenarr, I. And Arnds, J. : Morphology and size-distribution of sound and acid-treated enamel crystallites. *Calcif. Tiss. Res.*, **19** : 109~123, 1975.
- 28) Daculsi, G., Kerebel, B. and Merebel, L. M. : Mechanisms of acid dissolution of biological and synthetic apatite crystals at the lattice pattern level. *Caries Res.*, **13** : 277~289, 1979.
- 29) Moriwaki, Y., Aoba, T., Tsutsumi, S. and Yamaga, R. : X-ray diffraction studies on the lattice imperfection of biological apatites. *J. Osaka Univ. Dent. Sch.*, **16** : 33~45, 1976.

—歯周炎に関する引用文献—

- 1) Johnson, N. W. and Kenney, E. B. : Effects of topical application of chlorhexidine on plaque and gingivitis

- in monkeys. *J. Periodont. Res.*, **7** : 180~188, 1972.
- 2) 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. Periodont. Res.*, **8** : 199~214, 1973.
 - 3) 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.
 - 4) 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.
 - 5) Löe, H., Theilade, E. and Jensen, S. B. : Experimental gingivitis in man. *J. Periodontol.*, **36** : 177~187, 1965.
 - 6) Theilade, E., Wright, W. H., Jensen, S. B. and Löe, H. : Experimental gingivitis in man. II. A longitudinal clinical and bacteriological investigation. *J. Periodont. Res.*, **1** : 1~13, 1966.
 - 7) Löe, H., Theilade, E., Jensen, S. B. and Shiött, C. R. : Experimental gingivitis in man. III. The influence of antibiotics on gingival plaque development. *J. Periodont. Res.*, **2** : 282~289, 1967.
 - 8) Arno, A., Waerhang, J., Lovdal, A. and Schei, O. : Incidence of gingivitis as related to sex., occupation, tobacco consumption, toothbrushing and age. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.*, **11** : 587~595, 1958.
 - 9) Ash, M. M. Jr., Gitlin, B. N. and Smith, W. A. : Correlation between plaque and gingivitis. *J. Periodontol.*, **35** : 424~429, 1964.
 - 10) Lodal, A., Schei, O., Waerhang, J. and Arno, A. : Tooth mobility and alveolar bone resorption as a function of occlusal stress and oral hygiene and age. *Acta Odontol. Scand.*, **17** : 61~77, 1959.
 - 11) Schei, O., Waerhang, J., Lovdal, A. and Arno, A. : Alveolar bone loss as related to oral hygiene and age. *J. Periodontol.*, **30** : 7~16, 1959.
 - 12) Van Palenstein Helderman, W. H. : Total viable count and differential count of *Vibrio (Campylobacter) sputorum*, *Fusobacterium nucleatum*, *Selenomonas sputigena*, *Bacteroides ochraceus* and *Veillonella* in the inflamed and non inflamed gingival crevice. *J. Periodont. Res.*, **10** : 230~241, 1975.
 - 13) Zambon, J. J. : *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in human periodontal disease. *J. Clin. Periodontol.*, **12** : 1~20, 1985.
 - 14) Nitzan, D., Sperry, J. F. and Wikins, T. D. : Fibriolytic activity of oral anaerobic bacteria. *Arch. Oral Biol.*, **23** : 465~470, 1978.
- effect of penicillin treatment. *Scand. J. Infect. Dis.*, **20** : 187~192, 1988.
- 2) Orstavik, D., Kerekes, K. and Molven, O. : Effects of extensive apical reaming and calcium hydroxide dressing on bacterial infection during treatment of apical periodontitis : A pilot study. *Int. Endod. J.*, **24** : 1~7, 1991.
 - 3) Baumgartner, J. C., Watkins, B. J., Bae, K. S. and Xia, T. : Association of black-pigmented bacteria with endodontic infections. *J. Endod.*, **25** : 413~415, 1999.

—インプラント療法に関する引用文献—

- 1) Cosci F, Luccioli M. : A new sinus lift technique in conjunction with placement of 265 implants: a 6-year retrospective study. *Implant Dent.*, **9** : 363~368, 2000.
- 2) Fugazzotto PA. : Sinus floor augmentation at the time of maxillary molar extraction: technique and report of preliminary results. *Int. J. Oral Maxillofac. Implants*, **14** : 536~542, 1999.
- 3) Wheeler SL, Holmes RE, Calhoun CJ. : Six-year clinical and histologic study of sinus-lift grafts. *Int. J. Oral Maxillofac. Implants*, **11** : 26~34, 1996.
- 4) Hotta Y. : Recovery of alveolar bone by the guided bone regeneration technique. *J. Oral Implantol.*, **22** : 138~46, 1996.
- 5) Simion M, Jovanovic SA, Tinti C, Benfenati SP. : Long-term evaluation of osseointegrated implants inserted at the time or after vertical ridge augmentation. A retrospective study on 123 implants with 1-5 year follow-up. *Clin. Oral Implants Res.*, **12** : 35~45, 2001.
- 6) Pietruski JK, Pietruska MD, Stokowska W, Pattarelli GM. : Evaluation of polypeptide growth factors in the process of dental implant osseointegration. *Rocz. Akad. Med. Białymst.*, **46** : 19~27, 2001.
- 7) Kim SG, Chung CH, Kim YK, Park JC, Lim SC : Use of particulate dentin-plaster of Paris combination with/without platelet-rich plasma in the treatment of bone defects around implants. *Int. J. Oral Maxillofac. Implants*, **17** : 86~94, 2002.
- 8) Linder L., Albrektsson T., Branemark P. I., Hansson H. A., Ivarsson B., Jonsson U. : Electron microscopic analysis of the bone-titanium interface. *Acta Orthop. Scand.*, **54** : 45~52, 1983.
- 9) Hanawa T. : Titanium and its oxide film. : (A substrate for formation of apatite.) (Davies J. E.), *The Bone-Biomaterial Interface.*, Univ. of Toronto, (Toronto), 49~61, 1991.
- 10) Albrektsson, T. : *Tissue-Integrated Prostheses. (Osseointegration in Clinical Dentistry.)* Quintessence, (Chicago), 117~128, 1970.
- 11) Albrektsson T., Branemark P. I., Hansson H. A., Kasemo B., Larsson K., Lundstrom I. : The interface zone of inorganic implants in vivo. : Titanium im-

—根尖性歯周炎に関する引用文献—

- 1) Ranta, H., Haapasalo, M., Ranta, K., Kontiainen, S., Kerosuo, E., Valtonen, V., Suuronen, R. and Hovi, T. : Bacteriology of odontogenic apical periodontitis and

- plants in bone. *Ann. Biomed. Eng.*, **11** : 1~27, 1983.
- 12) Albrektsson T., Jacobsson M. : Bone-metal interface in osseointegration. *J. Prosthet. Dent.*, **57** : 597~607, 1987.
 - 13) Kasemo B., Lausmaa J. : Surface science aspects on inorganic biomaterials. *Crit. Rev. Biocompatibility*, **3** : 247~259, 1986.
 - 14) Branemark P. I. : Tissue-Integrated Prostheses. (Introduction to osseointegration.) (Branemark P. I., Zarb G. A. Albrektsson T.), Osseointegration in Clinical Dentistry, Quintessence, (Chicago), 11~76, 1985.
 - 15) Klauber C., Lenz U., Henry P. J. : Oxide thickness and surface contamination of six endosseous dental implants determined by electron spectroscopy for chemical analysis : A preliminary report. *Int. J. Oral Maxillofac. Implants*, **5** : 264~271, 1990.
 - 16) Keller J., Draughn R., Wightman J., Dougherty W., Meletiou S. : Characterization of sterilized CP titanium implant surfaces. *Int. J. Oral Maxillofac. Implants*, **5** : 360~367, 1990.
 - 17) Pilliar R. M. : Overview of surface variability of metallic endosseous dental implants: textured and porous surface-structured designs. *Implant Dent*, **7** : 305~314, 1988.
 - 18) Gottlander M., Albrektsson T. : Histomorphometric studies of hydroxylapatite-coated and uncoated CP titanium threaded implants in bone. *Int. J. Oral Maxillofac. Implants*, **6** : 399~404, 1991.
 - 19) Buser D., Schenk R. K., Steinemann S., Fiorellini J. P., Fox C. H., Stich H. : Influence of surface characteristics on bone integration of titanium implants. A histomorphometric study in miniature pigs. *J. Biomed. Mater. Res.*, **25** : 889~902, 1991.
 - 20) Stefflik D. E., Corpe R. S., Young T. R., Buttle K. : In vivo evaluation of the biocompatibility of implanted biomaterials: morphology of the implant-tissue interactions. *Implant Dent.*, **7** : 338~350, 1998.
 - 21) Smith D. C. : Dental implants. Materials and design considerations. *Int. J. Prosthodont*, **6** : 106~117, 1993.
 - 22) Galante J., Rostoker W., Lueck R., Ray R. D. : Sintered fiber metal composites as a basis for attachment of implants to bone. *J. Bone Joint Surg.*, **55** : 101~114, 1971.
 - 23) Welsh R. P., Pilliar R. M., Macnab I. : Surgical implants : The role of surface porosity in fixation to bone and acrylic. *J. Bone Joint Surg.*, **55** : 963~977, 1971.
 - 24) Luthy H., Strub J. R., Scharer P. : Analysis of plasma flame-sprayed coatings on endosseous oral titanium implants exfoliated in man. : Preliminary results. *Int. J. Oral Maxillofac. Implants.*, **2** : 197~202, 1987.
 - 25) Lemons J. : The Dental Implant. (Dental implant interfaces as influenced by biomaterial and biomechanical properties.) (McKinney RV, Lemons J. E.), Littleton, Co. (PSG), 143~152, 1985.
 - 26) Baier R. E., Meenaghan M. A., Hartman L. C., Flynn H. E., Natiella J. R. : Implant surface characteristics and tissue interaction. *J. Oral Implantol.*, **1** : 594~606, 1988.
 - 27) Hartman L. C., Meenaghan M. A., Schaaf N. G., Hawker P. B. : Effects of pretreatment sterilization and cleaning methods on materials properties and osseointegration of a threaded implant. *Int. J. Oral Maxillofac. Implants*, **4** : 11~18, 1989.
 - 28) Li D. H., Liu B. L., Zou J. C., Xu K. W. : Improvement of osseointegration of titanium dental implants by a modified sandblasting surface treatment: an in vivo interfacial biomechanics study. *Implant Dent.*, **8** : 289~294, 1999.
 - 29) Johansson C., Albrektsson T. : Integration of screw implants in the rabbit : a 1-year follow-up of removal torque of titanium implants. *Int. J. Oral Maxillofac. Implants.*, **2** : 69~75, 1987.
 - 30) Matsushita Y., Kitoh M., Mizuta K., Ikeda H, Suet-sugu T. : Two-dimensional FEM analysis of hydroxyapatite implants : Diameter effects on stress distribution. *J. Oral Implantol.*, **16** : 6~11, 1990.
 - 31) Brunski J. B. : Biomechanical considerations in dental implant design. *Int. J. Oral Implant.*, **5** : 31~34, 1988.
 - 32) Brunski J. B., Skalak R. : Advanced Osseointegration Surgery. (Biomechanical considerations.) (P., Worthington.), I ed., Maxillofacial Region., Quintessence, (Chicago), 15~39, 1992.
 - 33) Brunski J. B. : Tissue Integration in Oral, Orthopedic, and Maxillofacial Reconstruction. (Forces on dental implants and interracial stress transfer.) (W. R., Laney., D. E. Tolman.), Quintessence, (Chicago), 108~124, 1992.
 - 34) Misch C. E. : Implant design considerations for the posterior regions of the mouth. *Implant Dent.*, **8** : 376~386, 1999.
 - 35) Lin S., Shi S., LeGeros R. Z., LeGeros J. P. : Three-dimensional finite element analyses of four designs of a high-strength silicon nitride implant. *Implant Dent.*, **9** : 53~60, 2000.
 - 36) Callan D. H., Hahn J., Hebel K., Kwong-Hing A., Smiler D., Vassos D. M., Wohrle P., Zosky J. : Retrospective multicenter study of an anodized, tapered, diminishing thread implant : success rate at exposure. *Implant Dent.*, **9** : 329~336, 2000.
 - 37) Fugazzotto P. A. : Clinically based implant selection. *Implant Dent.* 1999 ; **8** : 413~420.
 - 38) Weinberg L. A. : Reduction of implant loading with therapeutic biomechanics. *Implant Dent.* 1998 ; **7** : 277~285.
 - 39) Inan O., Kesim B. : Evaluation of effects of restorative materials used for occlusal surfaces of implant-

- supported prostheses on force distribution. *Implant Dent.*, **8** : 311~316, 1999.
- 40) Weinberg L., Kruger B. : A comparison of implant/prosthesis loading with four clinical variables. *Int. J. Prosthodont.*, **8** : 421~433, 1995.
- 41) 田中 正, 山本宏治 : 銀イオンを応用したデンタルインプラント材料の抗菌性. *日口腔インプラント誌*, **14** : 429~442, 2001.
- 42) 大橋静江, 山本宏治, 嶋崎エリサ明美, 青野正男, 小久保 正, 山田 公, 山内淳一 : 銀イオンを注入したSiO₂ファイラーの抗菌性. *日歯保存誌*, **38** : 164~189, 1995.
- 43) Lee I. S., Buchanan R.A., Williams J. M. : Biomedical materials and devices. (Biocorrosion studies of gold and rhodium ion implanted titanium and Ti-6Al-4V alloy.) (J. S. Hanker., B. L. Giammana B.L.), M. R. S. Symp. Pro. 110, Materials Research Soc. (Pittsburgh), 1989.
- 44) 遠藤直人, 高橋栄明 : 電磁場刺激. 鎮目和夫, 藤田拓男, 鈴木不二男監修 ; 骨代謝調節因子, 羊土社(東京), 197~205, 1987.
- 45) Goodman R., Hederson A. S. : Exposure of cell to extremery low frequency electromagnetic fields. relationship to malignancy? *Cancer Cells.*, **2** : 355~359, 1990.
- 46) Smith G. A., Laird W. R., Grant A. A. : Magnetic retention units for overdentures. *J. Oral Rehabil.*, **10** : 481~488, 1983.
- 47) Gillings B. R. : Magnetic denture retention systems : inexpensive and efficient. *Int. Dent. J.*, **34** : 184~197, 1984.
- 48) Pezzoli M., Highton R., Caputo A. A., Matyas J. : Magnetizable abutment crowns for distal-extension removable partial dentures. *J. Prosthet. Dent.*, **55** : 475~480, 1986.
- 49) Highton R., Caputo A. A., Pezzoli M., Matyas J. : Retentive characteristics of different magnetic systems for dental applications. *J. Prosthet. Dent.*, **56** : 104~106, 1986.
- 50) Morikawa M., Kozono Y., Toyada S., Hayashi I. : Attractive forces of Sm-Co magnet systems for stud attachment. *Dent. Mater. J.*, **6** : 156~164, 1987.
- 51) Ichikawa T., Horiuchi M., Wigianto R., Matsumoto N. : In vitro study of mandibular implant-retained overdentures : the influence of stud attachments on load transfer to the implant and soft tissue. *Int. J. Prosthodont.*, **9** : 394~399, 1996.
- 52) 梶川 潔 : イヌの実験的歯周炎における歯肉溝滲出液グリコサミノグリカンについて. *日歯周誌*, **28** : 500~515, 1986.
- 53) Waddington R. J., Langley M. S., Guida L., Iurio G., Labella R., Embery G., Caruso F. : Relationship of sulfated glycosaminoglycans in human gingival crevicular fluid with active periodontal disease. *J. Periodont. Res.*, **31** : 168~170, 1996.
- 54) Waddington R. J., Embery G., Samuels R. H. A. : Characterization of proteoglycan metabolites in human gingival crevicular fluid during orthodontics tooth movement. *Archs. Oral Biol.*, **39** : 361~368, 1994.
- 55) 山本英治, 川畑仁克, 堀木 到, 岩山幸雄 : ヒト歯肉溝滲出液中の硫酸化グリコサミノグリカンの微量定量. *岐歯学誌*, **26** : 43~49, 1999.
- 56) Last K. S., Cawood J. I., Howell R. A., Embery G. : Monitoring of Tubingen endosseous dental implants by glycosaminoglycans analysis of gingival crevicular fluid. *Int. J. Oral Maxillofac. Implants.*, **6** : 42~49, 1991.
- 57) Okazaki J., Gonda Y., Kamada A., Sasaki T., Kitayama N., Kawamura T., Ueda M. : Disaccharide analysis of chondroitin sulphate in peri-implant sulcus fluid from dental implants. *Eur. J. Oral Sci.*, **104** : 141~143, 1996.
- 58) 山本英治, 川畑仁克, 鷹取 司, 古澤 裕, 杉田 基, 馬淵直樹, 白木雅文, 岩山幸雄 : アルシアンブルーによる硫酸化グリコサミノグリカンの微量検出. *岐歯学誌*, **24** : 83~89, 1997.
- 59) Chen Y. T., Wang H. L., Lopatin D. E., O'Neal R., MacNeil R. L. : Bacterial adherence to guided tissue regeneration barrier membranes exposed to the oral environment. *J. Periodontol.*, **68** : 172~179, 1997.
- 60) Ereth MH, Oliver WC Jr, Beynen FM, Mullany CJ, Orszulak TA, Santrach PJ, Ilstrup DM, Weaver AL, Williamson KR. : Autologous platelet-rich plasma does not reduce transfusion of homologous blood products in patients undergoing repeat valvular surgery. *Anesthesiology*, **79** : 540~547, 1993
- 61) Marx RE, Carlson ER, Eichstaedt RM, Schimmele SR, Strauss JE, Georgeff KR. : Platelet-rich plasma : Growth factor enhancement for bone grafts. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.*, **85** : 638~646, 1998.

Analysis of Plaque and Plaque-associated Diseases

HIROSHI TAKEUCHI¹⁾, KOJI YAMAMOTO²⁾, KUNITERU NAGAHARA²⁾,
KATSUYUKI OHTOMO³⁾, MOTOHIKO NAGAYAMA¹⁾, SHUNICHIRO TANABE²⁾,
TADAYASU KAJIMOTO²⁾, SHIZUE OHASHI²⁾, TOSHIHIKO YAMADA⁴⁾,
SEIGO YAMAMOTO⁴⁾, NAMIKO MATSUKI⁴⁾ and SEITARO SAKU⁴⁾

1) Department of Oral Pathology, Asahi University School of Dentistry

2) Department of General and Operative Dentistry, Asahi University School of Dentistry

3) Department of Surgery, Asahi University School of Dentistry

4) Post Graduated Doctor, Asahi University School of Dentistry

Key words : Plaque formation, Dental caries, Periodontal disease, Apical periodontitis, Implant therapy

Abstract This review describes the results both basic and clinical studies on dental plaque and its associated diseases, such as supra-and sub-gingival plaque formation, initiation of dental caries, periodontal diseases and apical periodontitis, and a series of basic examinations of implant therapy which were carried out in a joint study with several post-graduated doctors.

Morphological analysis of dental plaque formation, the starting point of a chain of major infections in the oral cavity, was performed with deposits on a synthesized carbonate apatite thin layer applied both on human tooth surfaces (supragingival plaque), and in human periodontal pockets (subgingival plaque). The morphological studies clarified that the sequential phase of supragingival plaque formation over a 3-week period can be subdivided into 6 phases ; pellicle formation phase, microbial adherence phase, initial colonization phase, pre-organization phase, microflora alteration phase and post-organization phase. Subgingival plaque formation could be subdivided into 5 phases ; pellicle formation phase, microbial adherence phase, initial colonization phase, pre-microbial organization phase and post-microbial organization phase. From the results, it was clear that the sequential phase of dental plaque formation is different between supragingival and subgingival plaque. Immuno-electron microscopy using colloidal gold conjugated antibodies to the human parotid salivary proteins or to human plasma proteins revealed that the main components of supragingival pellicle and subgingival pellicle are salivary proteins and plasma proteins which derived from gingival exudates. SEM and TEM showed that the predominant microbiota which adhere to such pellicle in the supragingival plaque formation were Gram-positive coccoid types and Gram-positive bacillary types, while examination of the microbiota in subgingival pellicle revealed only one genus showing Gram-positive bacillary type. After the adherence to the pellicle, they proliferated on the pellicle as the initial colonizers. These initial colonizers, however, exhibited a difference in a velocity of proliferation. It was observed that the coccoid types proliferated faster than the bacillary types. Thus, the predominant microbiota among the initial colonizers until the microflora alteration phase of supragingival plaque formation were the coccoid types. However, genera of initial colonizers after both the microflora alteration phase of supragingival plaque formation and in all sequential phases of subgingival plaque formation were Gram-positive bacillary types and furthermore, minute investigation of these bacillary cells demonstrated them to be the same genus of microbiota both in supragingival and in subgingival plaque. The formation of stable structure by combination of certain genera of microbiota was a common phenomenon between supragingival and subgingival plaque. The genera of the stable structure composing cells were the coccoid initial and filamentous secondary colonizers in the pre-organization phase of supragingival plaque formation. In the formation of subgingival plaque, such initial and secondary colonizers proliferated on the CAP surface, and other genera of microbiota multiprecated on the superficial layer of the stable structures. In subgingival plaque, therefore, the plaque on the CAP formed by initial and secondary colonizers was

considered to correspond to the so-called tooth-associated plaque, and the plaque on the superficial layer was thought to be epithelium-associated plaque. The microbiota in epithelium-associated plaque consisted of Gram-negative cocci, coccobacilli and spirochetes, and showed a tendency to repeatedly increase and decrease in number. Quantitative and qualitative changes of microbiota in epithelium-associated plaque were considered to be closely related with initiation and progression of periodontal diseases.

In spite of a number of studies concerning periodontal disease, the relationship between the development of subgingival plaque formation and initiation of periodontitis has not yet been clarified. A study to elucidate this most basic question of periodontal disease was performed using CAP which was applied into human periodontal pockets in the same manner as in the procedure to study subgingival plaque formation. Inflammation with swelling and redness of gingiva was seen in about half of 30 volunteers on and after 7 d exposure to the pocket, which corresponded to the sequential phase of the past-organization phase on subgingival plaque formation. The deposits which caused such inflammation showed a remarkable proliferation of microbiota in epithelium-associated plaque. However, in some cases infiltration of phagocytes to the epithelium-associated plaque was observed.

The results obtained from the experimental gingivitis models using CAP indicated that the proliferation of some microbiota in epithelium-associated plaque, which is formed in the establishment phase of subgingival plaque formation, directly destroys the gingival tissue, and the components of phagocytes such as lysosomal enzymes and super-oxide which infiltrated to the periodontal pocket and showed phagocytosis on the microbiota in the epithelium-associated plaque indirectly injury the gingival tissue.

The analysis of the initial phase of dental caries (the initial stage of decalcification of apatite constituting the tooth) is now in progress using Ca^{45} -labeled carbonate apatite thin layer applied to the surface of natural dog teeth. One consequence of dental caries, apical periodontitis, has also become a theme of research. The main analysis of this lesion was focused on clarifying the features of microbial invasion (*Actinomyces* and mixed microbiota) to the lesions of human acute and chronic apical periodontitis by means of immunohistochemistry and immunoblot analysis (Western blot). Specific antigen to *Actinomyces* was prepared from one band (45 kDa) which was found in only *Actinomyces viscosus* ATCC15987 by immunoblot analysis. Antibodies to mixed microbiota were prepared from rabbit antibodies immunized with a mixture of oral microbiota which cultured aerobically and anaerobically in human dental plaque. Immunohistochemical localization of mixed microbiota and *Actinomyces* was demonstrated in 2 of 40 acute cases and in 7 of 30 chronic cases, respectively, while the localization was obscure in the exudates from both acute and chronic lesions. On the other hand, immunoblot analysis detected *Actinomyces* components in 5 acute cases and 7 cases of exudates from acute and chronic lesions, respectively. Mixed microbiota were detected in 3 acute cases and 2 chronic cases. Rat mouth mucosa inoculated with *Actinomyces* cell suspension exhibited a peculiar tissue response with infiltration of macrophages and transformation to foam cells compared to the tissue response in rats inoculated with mixed microbiota. These findings from *Actinomyces* inoculation suggested that some cases of human chronic apical lesions with many macrophages and foam cells are caused by *Actinomyces* invasion.

Enterococci, especially *Enterococcus faecalis*, a parasite in the intestinal canal, were also detected in some cases of the infected root canals with and without clinical symptoms accompanied by acute apical periodontitis. The microbiota in the canals correlated with intractable symptoms such as lasting spontaneous pain and exudations from the canals. Furthermore, the microbiota exhibited a resistance against many kinds of antibiotics. The results obtained from this study indicated that the concept of the endodontic therapy of apical periodontitis must be reconsidered, especially throughout the field of microbiology.

It is well known that plaque-associated diseases as mentioned above cause loss of teeth. The most ideal treatment for restoration of such missing teeth and recovery of the function is to induce the reproducing of natural dentition. Recently, conventional treatment such as bridge and denture work is considering to be insufficient treatment, and dental implant treatment has become the leading strategy for restoration of missing teeth and recovery of function. However, further investigation to establish the predictability of dental implant treatment is necessary, because there remain some uncertain points. In this project, we examined as following four subjects: ① fixtures, ② implant abutments, ③ GBR membranes and ④ PRP.

The study on fixtures was mainly performed concerning the surface characteristics of fixtures. And the

bone tissue remodeling around the implants was clarified to be different between pure titanium and titanium alloy implants.

Studies on the implant abutments such as antibacterial effects of abutments, histological changes around magnetic abutments and analysis of gingival crevicular fluid surrounding abutments were examined.

In the results, silver coating on implant abutments was found to exhibit stable antibiotic effect. Hyperemia, capillary expansion and infiltration of inflammatory cells were observed in the tissue around the magnetic abutments. Gingival crevicular fluid, including S-GAG, was also detected, corresponding to an index for bone absorption around implants. Studies on GBR membrane, especially the antibacterial effects of GBR membrane, were examined. Silver coating on GBR membrane was effective as an antibacterial agent and prevented bacterial plaque formation in addition to the primary function of GBR. PRP was demonstrated to promote the formation of woven bone in a dog's jaw bone. This result strongly suggested that the adaptation of PRP to the operation of fixtures to the jaw bone is useful.