OUKA
The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	ヒトの歯周ポケットにおける歯周病関連細菌の局在性に関する研究
Author(s)	野杁, 由一郎
Citation	大阪大学, 1998, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.11501/3144186
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

ヒトの歯周ポケットにおける歯周病関連細菌の局在性に関する研究

大阪大学歯学部歯科保存学講座
（指導：恵比須繁之教授）

野杁由一郎

本論文の要旨は，第36回日本歯周病学会春季学術大会（広島，平成５年５月２０日），第36回日本歯周病学会秋季学術大会（東京，平成５年10月15日），第37回日本歯周病学会秋季学術大会（大阪，平成６年10月６日），74th International Association for Dental Research (Sanfrancisco, 1996, March 17) において発表した。

緒　　言

辺縁性歯周炎は歯肉縁上および縁下プラーク細菌により発症する混合感染症(1)であり，特に歯周ポケット内のプラーク細菌は歯周炎の進行や病態形成と密接な関係にあるとされている。Sanzら(2)は歯肉縁下プラークを，歯面付着性プラーク，非付着性プラークおよび上皮関連プラークに分類している。初期プラーク構成細菌である*Actinomyces*属や*Streptococcus*属などのグラム陽性細菌種は，主に歯面付着性プラーク中に棲息しており(3)，スピロヘータやその他のグラム陰性細菌は，既に歯面に定着している細菌群に付着することで定着の足場を見いだし(4)，非付着性あるいは上皮関連プラーク中に棲息している(3)と推察されている。そして，グラム陰性桿菌のいくつかは，歯周病関連細菌あるいは歯周病原性細菌として認知されている(5-8)。

また，歯周炎のある特定の病型にはそれぞれに特異的な病原細菌が関与するという研究結果も多数報告されている(9-12)。例えば，限局型若年性歯周炎の病巣局所からは*Actinobacillus actinomycetemcomitans*が高頻度に検出されるとする報告(10,12)や，成人性歯周炎においては*Porphyromonas gingivalis* (9,13,14)が特に注目されている。さらに，*Prevotella intermedia*(11,14)，*Fusobacterium nucleatum*(15)，*Eikenella corrodens*(12,15)，*Campylobacter rectus*(16)，

Bacteroides forsythus(17)ならびに口腔スピロヘータの1種である*Treponema denticola*(18)なども各種の歯周炎との関わりが報告されている。

従来の*in vivo*系での細菌学的研究結果(8,9,11-16)は，いずれもキュレット，ペーパーポイントあるいは嫌気銃を用いて歯周ポケットから採取したプラーク試料を，培養法あるいはその他の細菌検出法により，分離細菌総数に占める特定細菌の比率を測定するといった分析法で得られたものである。しかし，そのような定量的分析法のみでは，検出された特定細菌の増減がポケット内の環境条件の変化によってもたらされたものか，あるいは特定細菌の増加により歯周組織破壊が生じるのかを明確に立証するのは困難である。さらに，プラーク試料の採取方法や検出方法が異なれば，特定細菌の検出比率も異なるとする報告(19-21)もみられ，特定細菌の検出比率について研究者間で見解の一致を見ていないのが現状である(22)。

一方，歯肉縁下プラークは形態学的にも多くの研究者により検索(23-28)されている。Listgarten(24)は，歯肉縁下プラークを形態的見地から歯面に付着したプラークと付着していないプラークに大別した。また，1970年代中期には，免疫透過電顕法によるプラーク細菌の局在に関する検索結果が報告(29)された。その後，歯周病関連細菌に関する多くの免疫組織学的検索あるいは免疫電顕法による研究(30-32)が行われている。しかながら，歯周ポケット内のプラーク細菌叢の

全貌は，実験手技，特に試料採取の難しさから全く明らかにされていない。硬軟両組織に囲まれた歯周ポケットの構造を破壊せず，歯とその周囲の歯周組織を採取するのは極めて困難である。従って，従来から歯周炎との関連が示唆されている各種の歯周病関連細菌が歯周ポケット内のいずれのプラークに属し，どのような部位に局在しているかといったことについてはほとんど解明されていない。

そこで本研究では，重度歯周炎罹患歯とその周囲歯周組織を一塊として採取し，可及的にヒトの歯周ポケット内細菌叢を保存することにより，プラーク細菌の局在性を検索する実験系を確立し，７種類の歯周病関連細菌の歯周ポケットにおける局在性を免疫組織学的に検索した。

材料および方法

１．被験者および被験歯

徳島大学歯学部附属病院第１保存科を受診した重度歯周炎患者のうち，1)全身的な疾患を有さない，2)過去1年以内に歯周治療の既往がない，3)過去3ヵ月以内に抗生物質等の薬剤投与を受けていない，男性４名と女性３名の計７名（平均49.4歳，32～60歳）を被験者とした。術前診査の結果，保存不可能と診断され，プロービング深さが5㎜以上を有する12歯12部位を被験部位とした。被験者および被験歯の術前所見を表１に示した。なお，被験者全員には本研究に関する説明を十分に行い，本研究の被験者となる同意を得た。

２．試料の採取と調製

歯周ポケット試料の採取方法の１例を図１a，bに示した。黒いラインに沿って切開し、被験部位を周囲歯周組織から完全に離断した後，歯と歯肉組織を一塊として慎重に採取した。試料の採取は，術前プロービングによるプラーク細菌叢への影響を可及的に考慮し，術前診査から３週間以上経過した後に行った。

試料は，採取後直ちに0.1Mカコジル酸緩衝2%パラホルムアルデヒド-2.5%グルタルアルデヒド(pH7.4)溶液中でマイクロウェーブ固定(2,450MHz,500W)を15秒間行い，次いで同固定液(4℃)中で２時間浸漬固定を行った。樹脂ブロッ

クの作製は，Ledecら(33)の方法を改良して行った。すなわち，洗浄後，減圧下(760mmHg)で4℃にて上昇水溶性メタクリル樹脂(2-ヒドロキシエチルメタクリレイト,応研商事,東京)（以下GMAと略す）系列(各1-2週間)により脱水，置換した後，同樹脂に包埋し，紫外線重合(4℃)により樹脂ブロックを作製した。樹脂ブロックよりエナメル質および不要部分を可及的に切除し，同樹脂に再包埋した後，ロータリーミクロトーム(2065 SUPER CUT,Leica Instrument, GmbH.,Germany)にて厚さ2.5μmの連続薄切切片を作製した。

切片の一部は歯周ポケット内細菌叢を総合的に観察するためBrown and Brenn-modified Gram染色(34)（以下Brown-Bren染色と略す）を施し，他の試料は特定細菌の局在性を検索するため酵素抗体法染色を施し，光学顕微鏡(OPTIPHOT-2,NIKON,東京)による観察に供した。図2aは調製した試料の断面像で，図2bは他の試料より得られた標本の，歯周ポケットの全体像である。

3．供試菌株とその培養

Actinomyces viscosus ATCC 19246は木村重信博士（大阪大学，大阪）から，*Campylobacter rectus* ATCC 33238および*Treponema denticol*a ATCC 33520は太田寛行博士(岡山大学,岡山)から，*Porphyromonas gingivalis* 381および*Prevotella nigrescens* ATCC

33563は高添一郎博士（東京歯科大学，千葉）から，*Eikenella corrodens* 1073および*Fusobacterium nucleatum* 1436はDr. S.S. Socransky（Forsyth Dental Center, Boston, USA）から恵与された。上記菌株の培養条件は以下のとおりである。*A.viscosus*は，Brain heart infusion broth（Difco Laboratoties, Detroit, U.S.A.,以下BHIと略す)にて，37℃,24時間培養した。*E.corrodens*は，2mg/mlの硝酸カリウム(和光純薬，大阪)と5μg/mlのヘミン(和光純薬)を含むTryptic soy broth（Difco Laboratoties,以下TSと略す）で，*F.nucleatum*は，0.5μg/mlのL-システイン(片山化学，大阪)を含むTSで，それぞれ37℃,24時間,嫌気的条件下(85%N_2,10%CO_2,5%H_2)にて培養した。*P.gingivalis*および*P.nigrescens*の2菌株は5μg/mlのヘミンおよび1μg/mlのメナジオン(和光純薬)を含むBHIで，37℃,48時間，嫌気的に培養した。*T.denticola*は，12.5mg/mlのBHI，10.0mg/mlのTrypticase pepton，2.5mg/mlのYeast extract,0.5mg/mlのチオグリコール酸ナトリウム(和光純薬)，1.0mg/mlのL-システイン,0.25mg/mlのL-アスパラギン酸ナトリウム(片山化学)，0.25mg/mlのピルビン酸ナトリウム(和光純薬),0.4mg/mlのニコチンアミド(和光純薬)，2.0mg/mlのグルコース(和光純薬),6μg/mlの塩化チアミンピロリン酸(和光純薬)，2mg/mlの炭酸水素ナトリウム(和光純薬)および2%の馬血清(阪大微研,大阪)を混合した培地で，

*C.rectus*は，Ohtaら(35,36)の記載に従って，それぞれ37℃,48時間，嫌気的に培養した。

それぞれの培養終了後，7,000×gで20分間遠心して集菌し，得られた菌体はpH7.2のリン酸塩緩衝生理食塩水で3回，次いで蒸留水で3回洗浄した後，凍結乾燥し，以下の実験に用いた。

4．ウサギ抗血清の調製

C.rectus, *E.corrodens*, *F.nucleatum*, *P.gingivalis*, *P.nigrescens*, *T.denticola*および*A.viscosus*の7種類の細菌に対するウサギ抗血清はOzakiら(37)の方法に従って調製した。すなわち，それぞれの凍結乾燥菌体(10mg)を滅菌生理食塩水1mlに浮遊させ，等量のFreundの完全アジュバンド(Difco Laboratories)と十分に混和し，得られたエマルジョンの計2mlを体重3Kgの雄性ニュージーランドラビット(井上実験動物センター,熊本)の後背部皮下に0.4mlずつ5ヵ所に分けて注射した。2週間後同様に皮下に追加免疫を行い，さらに2週間後ホルマリン処理した菌体を1mg/mlの濃度に滅菌生理食塩水に浮遊させた菌液3mlを静脈内にブースター注射した。初回免疫から5週間後に採血し，血清を分離した後，濾過滅菌を行った。

5．抗血清の吸収

得られた抗血清を用いて酵素抗体法により，それぞれの細

菌種の塗抹標本に免疫染色を施した結果，表２に示すような組み合わせで交差反応がみられた。そこで交差反応がみられた菌株により抗血清を吸収した。吸収操作はZambonら(38)の記載をもとに行った。すなわち，凍結乾燥菌体（20mg）をウサギ抗血清1mlに加え，37℃で1時間浸盪し，さらに4℃にて12時間静置した。そして，7,000×gの遠心により得られた上清を，各特定細菌に対する抗血清として，以下の実験に用いた。

６．酵素抗体法による免疫染色

酵素抗体法による免疫染色は，LSABキット(DAKO CO.,Carpinteria,U.S.A.)およびニューフクシン基質キット(DAKO)を用いて行った。すなわち，20%(v/v)正常ヤギ血清で10分間処理し，1000倍希釈した各々の細菌種に対するウサギ抗血清を1次抗体として室温で１時間反応させた。反応終了後，0.05Mトリス緩衝液(pH7.6，以下TBSと略す)にて5分間3回洗浄し，2次抗体としてビオチン標識抗ウサギ免疫グロブリンを室温で20分間反応させた。TBSにて洗浄後，0.5% (v/v)アルカリフォスファターゼ標識ストレプトアビジンを20分間反応させた。再度TBSにて洗浄後，発色基質(ニューフクシン基質キット，DAKO Corporation)を切片に滴下し，室温で５～10分間反応させ抗原抗体複合物の発色を確認した後，グリセロールゲルに封入して光学顕微鏡による観察に供した。なお，陰性対照として，１次抗体として免疫前

の正常ウサギ血清を用いた免疫染色を行った。図3は，*P.gingivalis* 381の凍結乾燥菌体を標本上に塗抹し，抗*P.gingivalis*抗体で免疫染色した陽性対照の染色像である。

結　　果

１．酵素抗体法による７種類の細菌検出系の特異性

今回調製したそれぞれの細菌種に対する抗血清標品（吸収操作を行ったもの）と種々の口腔内細菌との反応性を酵素抗体法により検討した結果を表３aおよび３bに示した。*P.gingivalis* 381より調製した抗血清は*P.gingivalis* W50 に対しても陽性反応を示した。また，*P.nigrescens* ATCC 33563より調製した抗血清が*Prevotella intermedia* の基準株であるATCC 25611に対しても陽性反応を示した他は，異なる菌種間で交叉反応は認められなかった。

２．歯周ポケット内細菌叢の組織学的観察

歯周ポケット内細菌叢の様相をBrown-Brenn染色を施し観察したところ，歯根および上皮に近接した部位ではプラーク細菌が密に集合しており，両者の間に存在する非付着性プラーク領域では菌体の密集度は比較的低かった。図４はプロービング深さ３mm付近の歯根付着性プラークの拡大像で，密に集合した線状菌と球菌を主体とする細菌が歯根面に対し柵状に配列し，付着していた。図５はプローピング深さ1-2mm付近の非付着性プラーク領域の拡大像で，グラム陽性の球状菌および桿菌等がみられ，同一の形態型の細菌種で小集団を形成していたが，他のコロニーとは密に接触せずルーズ

に付着していた。プロービング深さ3-4mmの上皮付近を観察すると，空胞変性を起こした上皮に近接してグラム陽性および陰性の短桿菌や球状菌が観察された(図６a)。図６bは，他の試料の上皮関連プラークの拡大像で，グラム陰性細菌が密に集合し上皮に付着しており，いくつかの細菌菌体が上皮内で観察された。

ポケット底部付近(プロービング深さ９mm付近)では，線状菌や桿菌がわずかながら存在しており，密に接触せずルーズに付着していた。(図７)。

３．歯周ポケットにおける７種類の歯周病関連細菌の局在性

酵素抗体法染色を施し歯周ポケットにおける７種類の細菌種を検索した結果，それぞれの試料で複数の抗血清に対し陽性反応が認められた（表４）。抗*P.nigrescens*血清に対する陽性反応は，いずれも抗*P.gingivalis*血清陽性試料から検出された。

抗*P.gingivalis*血清による免疫染色では，12試料中９試料から陽性反応が検出された。*P.gingivalis*は，他の細菌種とは異なり小さな凝集塊を形成して歯周ポケット全域に散在して分布していた（図８a）。陽性反応が検出された９試料中６試料では，凝集塊は特に歯周ポケットの中央部からポケット底（プロービング深さ３-10mm）にかけてみられた。さらに，*P.gingivalis*の凝集塊の一部は上皮付近でも検出された（図８b）が，上皮内に侵入した凝集塊は検出されなかっ

た。図９は，*P.gingivalis*の局在性を模式図で示したものである。

抗*P.nigrescens*血清による陽性反応は４試料から検出された。*P.nigrescens*あるいは*P.intermedia*は，全ての陽性試料においてポケット中央部すなわちプロービング深さ３-７ｍｍの上皮側で，大きな凝集塊を形成して局在していた(図10）。図11は，*P.nigrescens*あるいは*P.intermedia*の局在性の模式図である。

抗*C.rectus*血清による陽性反応は，５試料でみられた。*C.rectus*は，ポケット中央部から深部にかけて大きな集団を形成し，歯根付着性プラークあるいは上皮関連プラークのいずれかの領域の局在していた(図12)。図13は，*C.rectus*の局在性の模式図である。大きな凝集塊を形成して局在する傾向は，今回の被験の７菌種の中では*C.rectus*，*P.nigrescens*あるいは*P.intermedia*，および*A.viscosus*にみられた。

抗*T.denticola*血清による陽性反応は，４試料で認められた。*T.denticola*は，ポケット中央部から深部（プロービング深さ４-９ｍｍ)の非付着性プラーク領域から検出された(図14)。その凝集塊の大きさは,他の細菌種とは異なり大小様々であった。図15は，*T.denticola*の局在性の模式図である。

抗*E.corrodens*血清による陽性反応は４試料から検出された。*E.corrodens*は全ての陽性試料において，ポケット中央部から底部（プロービング深さ２-７ｍｍ）にかけて

*P.gingivalis*と同様に小さな凝集塊を形成し散在性に，歯根付着性プラーク領域に局在していた（図16）。図17は，*E.corrodens*の局在性の模式図である。

抗*F.nucleatum*血清による陽性反応は，6試料から検出された。*F.nucleatum*もポケット中央部から深部（プロービング深さ3-9mm）にかけて，*P.gingivalis*あるいは*E.corrodens*と同様に小さな集団を形成して局在する傾向がみられたが，両細菌種の局在とは異なり，非付着性プラーク領域から検出された(図18)。図19は，*F.nucleatum*の局在性の模式図である。

抗*A.viscosus*血清による陽性反応は，5試料から検出された。ポケット内では歯根付着性プラークで検出された。*A.viscosus*は，歯肉縁からポケット深部（プロービング深さ7mm）におよぶ歯根付着性プラーク領域で大きな凝集塊を形成し，分布していた（図20）。また，その凝集塊の大きさはプロービング深さの深化に伴い小さくなる傾向が認められた。図21は，*A.viscosus*の局在性の模式図である。

考　　察

歯周ポケット内のプラーク細菌に対して，これまで*in vivo*における歯周病関連細菌の定量的分析結果(11,22,39-41)や，*in vitro*系での個々の細菌の病原性に関する解析結果(7,42-45)は多数報告されている。しかし，硬組織と軟組織の両者で構成される歯周ポケットに棲息するプラーク細菌を，ありのままの状態で形態学的に観察するのは実験手技の面で非常に困難であり，ヒトの歯周ポケットを保持した状態で歯肉縁下プラークを形態学的に検索した報告は極めて少ない。Saglieら(26)は，歯周ポケットを保持したまま割断した試料を用い，走査型電子顕微鏡(SEM)により歯肉縁下プラークを観察した。しかし，割断しているため非付着性プラークが部分的に剥離しており，さらにSEM観察のため割断面のみの観察となり歯周ポケットの全貌を検索したとは言えない。歯周ポケットを可及的に保存した試料での検索は，成人性歯周炎の歯周ポケット内プラーク細菌と多形核白血球の相互関係を超微細形態学的に検索した山田(46)の研究報告が存在するが，ヒト歯周ポケットにおけるプラーク細菌，特に非付着性プラーク細菌の実態はほとんど解明されていない。

抜去歯を試料として歯根付着性プラークを，また歯周外科処置時に得られた歯肉組織を試料として上皮関連プラークのみを，形態学的に検索した研究は数多く報告(23-28,47,48)されている。Manorら（47）は，上皮関連プラーク領域

の細菌叢は，桿菌，球菌，紡錘菌，線状菌およびスピロヘータからなり，ポケット底部の上皮付近には宿主細胞や細菌由来のフラグメントがまばらに存在していたと報告している。Listgarten（24）は，成人性歯周炎患者の歯肉縁下プラークの歯周ポケット上皮側では，桿菌やスピロヘータが主体をなし，テストチューブブラシのような細菌菌体間の特徴的な凝集形態が認められたとしている。さらに，歯周ポケット底部に局在する細菌種は，歯周炎の進行に深く関与すると考えられることから特に注目を集めてきた(23,25,27,48)。Newman(23)は，最根尖側境界部プラークは不連続でその細菌型は多種多様であり，スピロヘータ，糸状菌，桿菌および球菌が観察されたと報告している。Saglie(48)は，最根尖側部のプラークは，桿菌および糸状菌が優位であったものの，試料によりプラーク構成細菌種は変化に富んでいたと報告している。Frank(27)は，歯周ポケットの最根尖側部プラークには球菌，桿菌および線状菌がルーズに分布していたとしており，歯周ポケット底部の細菌叢についての研究報告は一定していない。本研究でのBrown-Brenn染色による観察結果からは，上皮付近ではグラム陰性の桿菌や球菌が主に観察され，歯周ポケット底付近にはグラム陽性の球菌および桿菌の他グラム陰性の桿菌および糸状菌がルーズに局在しており，総じてFrankの報告(27)と類似していた。

ヒトの歯周ポケットにおける細菌学的研究では，キュレット，スケーラー，ペーパーポイントあるいは嫌気銃を用いて

プラーク試料が採取されている(8,9,11-16)。近年，プラーク試料の採取方法や検出方法が異なれば，特定細菌の検出比率も異なるとする研究結果(19-21)が報告されている。

Renvertら(19)は，スケーラーとペーパーポイントの2種類のプラーク採取方法で得られたプラーク試料について，トータルCFU，スピロヘータおよび*P.gingivalis*，*P.intermedia*，*A.actinomycetemcomitans*，*C.rectus*の4種の特定細菌の検出比率を比較した。その結果，トータルCFUならびにスピロヘータの検出比率は，ペーパーポイント試料の方がスケーラー試料より統計学的に有意に高い値を示し，*P.gingivalis*，*P.intermedia*，*A.actinomycetemcomitans*および *C.rectus*は，採取方法の相違による検出比率に有意差は認められなかった。ペーパーポイント法はより非付着性プラークに対し選択性があり，スケーラーやキュレットは歯根付着性プラーク領域の細菌叢を他の採取方法より多量にサンプリングできると考えられる。本研究では，*T.denticola*は非付着性プラーク領域に，*P.gingivalis*はポケット全域に分布し，*P.nigrescens*あるいは *P.intermedia*は上皮関連プラークに局在しており，それらの3菌種についてはRenvertらの研究結果(19)と同一傾向がみられた。一方，*C.rectus*は本研究では歯根付着性あるいは上皮関連プラークに認められ，スケーラー試料の方がペーパーポイント試料よりも多く検出されると推察されるが，Renvertらの結果(19)では両者に有意差は存在しなかった。

*C.rectus*の検出比率に関するRenvertらの結果(19)と本研究結果との違いを理論的に説明づけることは困難であるが，本研究結果から我田引水的に考えると，*C.rectus*が大きな凝集塊を形成して局在していたため，歯根付着性あるいは上皮関連プラークの表層部に棲息していた*C.rectus*が，ペーパーポイントでも十分に採取できたためではないかと思われる。

培養法では分離された菌株の多くはその種属を決定できるが，一般的にデンタルプラーク試料に存在する細菌の80～90%は死滅しているか培養不可能な細菌であるため，培養して検索できるのはデンタルプラーク細菌の1/10程度であるとも言われている(49)。また，Riviereら(50)は，本研究で用いたLSAB法のようなビオチン増幅システムは蛍光抗体法のような伝統的なシグナルシステムよりかなり感度が高いと述べている。酵素抗体法による免疫染色を行うにあたり，本研究では固定液に2%パラホルムアルデヒド-2.5%グルタルアルデヒド溶液を選択し，GMA樹脂に包埋した。この手法は，BertholdとListgartenの方法(32)を改良したもので，固定液や包埋剤による免疫反応への影響が少ないとされている。彼らは，*A.actinomycetemcomitans*の分布を透過免疫電顕法により検索するために，種々の固定液と包埋剤を組み合わせて観察したところ，*A.actinomycetemcomitans*の検出には2%グルタルアルデヒドとGMA樹脂の使用が最良の組み合わせであったと報告している。

本研究の手法にも潜在的にいくつかの欠点が存在する。第

1に，試料採取中や調整過程での非付着性プラークの漏出である。今回開発した手法では，歯周ポケット内で完全に浮遊しているプラーク細菌の再現は不可能であるが，図4でみられるように，歯根付着性プラーク細菌とルーズに付着している非付着性プラーク細菌は保存されていると考えられる。その一部がいずれかの過程で剥離する可能性も考えられる。しかし，非付着性プラーク領域で観察された細菌は，その様相(図5)から歯根付着性あるいは上皮関連プラークから剥離したり混在してしまった細菌ではなく，試料採取前より同じ部位に棲息していた細菌であると推察される。第2の欠点は，本方法では定量的分析ができないことである。酵素抗体法による免疫組織学的手法は，発色基質が膨潤することや光学顕微鏡の拡大倍率の限界などの問題があり，定量的分析には適していない。本法では大きな凝集塊の数をカウントすることは可能であるが，凝集塊中の細菌菌体の数をカウントすることはできない。本研究でみられた凝集塊の大きさは様々であり，凝集塊中の菌体細胞数も異なっていると考えられる。また，発色基質の膨潤のため，密に凝集した凝集塊中の陽性菌体を鑑別するのはきわめて困難である。この問題を解決するには，免疫電顕法や共焦点レーザー顕微鏡による検索が必要であり，現在その準備を進めている。3番目の欠点として，被験部位が制限されるということが挙げられる。例えば，3根に分岐した上顎大臼歯をポケットを保持した状態で周囲歯周組織とともに採取するのは不可能である。さらに，上顎前

歯部の唇側部は，試料採取後の審美的な問題を考慮しなければならない。最後に，免疫染色に使用した抗血清は，表3a,bに示した菌株でしかその交差反応性を確認しておらず，口腔内に存在する全ての細菌種との交差反応性は検索し得なかった点である。Moore(15)はおよそ250種類の歯肉縁下細菌の存在を示しており，難培養性のスピロヘータ類などを含めると歯周ポケットには300菌種以上の細菌が棲息していると考えられている。今回調べた菌株間での交差反応は抑制できており，それらの菌株相互にはSpecies-specificな関係が成り立っているといえるが，*in vitro*系のように供試する菌株間での交差反応を互いに吸収操作することで完全に解決できる状況と異なり，歯周ポケット内に棲息する他の細菌種との交差性(30)により偽陽性反応がみられる可能性は完全には否定できず，本研究手法による結果を解釈する際に留意すべき点と考えている。

本研究で検索した細菌種は，歯周ポケットにおいて大小さまざまな大きさの凝集塊を形成して検出されたが，それらの凝集塊が同種間菌体凝集により形成されたものか，異種菌体間凝集によるものかは，光学顕微鏡による検索では明らかではない。しかしながら，それぞれの細菌種が示した凝集塊の大きさは，各々の細菌種の歯周ポケット内での定着・増殖様式のメカニズムを解明する上で状況証拠の1つとして大きな意味を持つものと考えられる。著者らが，本研究と同じ手法で調製した試料に免疫組織学的2重染色法を用いて2種類の

細菌の局在関係を検索したところ，*A.viscosus*は*C.rectus*ならびに*E.corrodens*と近接局在関係がみとめられたが，*P.gingivalis*とは近接関係がみられなかった（データ未発表）。Kolenbrander(3,51,52)は，プラーク形成はアドヘシンやレセプターを保持した細菌間の高い特異的作用の結果生じ，それは規則的に行われ，無秩序に行われることはないと述べている。

一方，プラーク細菌の付着には静電気的な結合や疎水性結合による非特異的な付着機構も関与する。さらに近年，医学感染症学の領域では従来より化学療法に対する反応様相が不可解であった難治性の慢性感染症に対して，非特異的増殖機構の１つと考えられる細菌バイオフィルムが関与するバイオフィルム感染症という新しい概念が導入された。この細菌バイオフィルムとは，病巣局所において細菌が産生する菌体外多糖（グリコカリックス）からなる粘液状の隠れ家の中で細菌がコロニー形成した状態をいう。栄養供給の乏しい環境下，例えば川底の石や工業用品に付着した細菌は，純粋に培養された細菌ではみられない菌体外多糖からなるグリコカリックスを産生し，このグリコカリックスを介して非特異的に凝集し棲息していることが，Costertonら(53-55)の研究を中心に1980年代になり明らかにされた。著者ら(56)が歯肉縁下プラーク細菌の定着・増殖と細菌バイオフィルムとの関連をSEMにて検索したところ，全ての被験試料からフィルム様のコロニーがみられ，歯肉縁下プラークの定着・増殖には部分

的に細菌バイオフィルムの形成メカニズムが関与していることが示唆された。しかしながら，歯周ポケット内でいずれの細菌種がバイオフィルムを形成しているか，またそのような非特異的な増殖メカニズムがどの程度歯周ポケット内のプラークの成長に影響をおよぼしているのか，といったことは全く不明であり，今後の研究課題の1つであろう。

*P.gingivalis*は，その病原性と進行性歯周炎患者の歯周ポケットからの検出率の高さゆえに，成人性歯周炎との関連が最も注目されている(9,13,14)。本研究では，*P.gingivalis*はポケット全域から検出され，特に陽性反応がみられた9試料中6試料ではポケット中央部から深部にかけて分布していた。他の被験細菌種でポケット全域から検出されたものはなく，いずれの細菌種も歯周ポケットの特定部位に局在していた。*P.gingivalis*の局在性は非常に特徴的で，他の細菌種に比べ広範囲におよぶものであった。

*P.gingivalis*は，*in vitro*においてハイドロキシアパタイトや上皮細胞に対する付着能，赤血球凝集能あるいは異種細菌との共凝集能を有していることが示されている(57-62)。*P.gingivalis*は，本研究で対象とした他の6菌種の中では，*T.denticola*，*E.corrodens*，*F.nucleatum*および*A.viscosus*の各細菌種との間で共凝集を生じることが*in vitro*系で示されている。*in vitro*系でのそれらの特性を考え合わせると，本研究で示された広範囲におよぶ*P.gingivalis*の局在は，十分に理解し得る結果である。

*Actinomyces*属は，歯面に対し付着能力があり初期プラーク構成細菌の一つと考えられている。*A.viscosus*は，歯肉炎，歯周炎および歯根部齲蝕との関わりが示唆されている(37,63-65)。また，*P.gingivalis*をはじめとする種々のグラム陰性細菌と共凝集することが確認されており(3,51,52,61)，*A.viscosus*の存在がグラム陰性細菌の定着を促進するという報告(62,66)もみられる。*A.viscosus*は，今回5mm以上の歯根付着性プラークからも検出され，ポケット深部のプラーク形成にも関与していることが示唆された。

Ozakiら(37)は，歯冠部および歯根部齲蝕病巣における象牙質侵入細菌を免疫組織学的に検索し，*A.viscosus*の細菌侵入率は歯根部齲蝕において他のいずれの被験供試細菌種よりも有意に高かったと報告している。そして，その侵入率は象牙質の浅層よりも深層の方が高かった。本研究では歯周ポケット内でセメント質が侵襲されているのが観察され(図4)，ポケット内で既に根面齲蝕が発症していた。セメント質侵襲部で*A.viscosus*の陽性反応は検出されなかったが，*A.viscosus*の局在性から推察すると，根面齲蝕の発症や進行にも密接に関わっていることが本研究からも示唆された。

*T.denticola*は，*P.intermedia*とともに急性壊死性潰瘍性歯肉炎の病巣局所から高頻度に検出され，特に歯肉の炎症との関連が取りざたされている(67-69)。Grenier（70）は，*T.denticola*は溶血性ならびに血球凝集能を有することから歯周ポケット内でヘモグロビンを放出させ，ヘミン依存性細

菌である*P.gingivalis*や*P.intermedia*などの細菌種の増殖を助長する可能性があると述べている。本研究でも，*T.denticola*が検出された4試料(試料No.5，8，9，11)からはいずれも*P.gingivalis*が検出され，*in situ*においても両細菌種間の共生関係が示された。また*in vitro*系では，*T.denticola*は上皮細胞へ付着することが示されている(71,72)。本研究では，*P.intermedia*は上皮側から検出され，改めて歯肉炎との関連が示唆されたものの，*T.denticola*は非付着性プラーク領域から検出され，上皮に近接した部位ではあまりみられなかった。一方，同じ運動性細菌である*C.rectus*はポケット中央部から深部の歯根付着性あるいは上皮関連プラークから検出された。*C.rectus*は，歯周炎の活動部位で有意に高く検出されることが示唆されており(16)，本研究に準じた検索方法により*C.rectus*と活動性との関連性を追求することも可能であろう。運動性細菌は，至適環境を求めポケット内を移動して棲息域を確保し，発育・増殖することが可能である。しかし歯周炎の病態の変化と共に歯周ポケットの環境も刻々と変化するため，その棲息部位も変化に富むと考えられる。山田(46)は，スピロヘータの活動が，菌体間マトリックスや異種細菌の影響を受けると考察している。すなわち，スピロヘータは，グラム陰性細菌が優位で菌体間マトリックスが豊富な部位では物理的にその運動性が抑制され，菌体間マトリックスが少なく散在性に細菌が存在するプラークではスピロヘータの運動性が発揮され，

多く観察されると述べている。*T.denticola*に関する本研究の結果は，山田ら(46)の推察の状況証拠となり得るものであろう。

*E.corrodens*は，無菌飼育ラットに単一感染させると歯周組織破壊を引き起こすことが知られている(73,74)。また，異種細菌との共凝集反応や上皮細胞への付着に関する報告もみられる(75,76)。本研究では，*E.corrodens*はポケット中央部から深部（プロービング深さ2-7mm）の歯根付着性プラーク領域から検出された。本菌は通性嫌気性菌であるが，同じ通性嫌気性菌である*A.viscosus*と同様，歯周ポケットの7mmという深い部位からも検出された。また，著者らは前述した免疫2重染色により，*E.corrodens*が，歯周ポケット内で*P.gingivalis*，*A.visucosus*ならびに*S.sanguis*と近接局在関係にあることを見いだしており（データ未発表），*E.corrodens*の定着は異種細菌との相互作用の影響を強く受けているのかもしれない。

本研究で開発した手法は，前述したようないくつかの欠点を有しているものの，歯周ポケット内細菌叢全体を一括して観察できるという，従来の抜去歯や人工歯冠を用いてその表面に付着しているプラークを検索する方法とは異なる利点が存在する。本研究より7種類の歯周病関連細菌は，歯周ポケット内でそれぞれ特徴的な局在性を示すことが明らかとなった。歯周ポケットで活動する細菌種がどのように分布し，いずれの細菌種と関わり合っているかなどを詳細に検索するこ

とは，歯周ポケットにおけるプラークの成長メカニズムを探索しプラーク感染症の病因論を構築する上で重要な課題と考えている。

結　　論

１．ヒトの歯周ポケット内細菌叢を可及的に再現する手法を開発し，７種類の歯周病関連細菌の歯周ポケット内における局在性を検討した結果，各々の菌種がポケット内において特徴的な局在性を示し，それぞれ固有の棲息域を有することが*in situ*において明らかとなった。

２．Brown-Brenn染色で歯肉上皮内に侵入した細菌が観察された。しかし，本研究で検索した７種の特異抗体による免疫染色では，上皮内において陽性反応は認められなかった。

３．*P.gingivalis*は，他の被験細菌種とは異なり小さな凝集塊を形成し散在性にポケット全域で観察されたが，特にポケットの中央部から深部全域に局在する傾向がみられた。

４．*P.nigrescens*あるいは*P.intermedia*は，大きなコロニーを形成して分布していたが，ポケット中央部付近の上皮側に局在しており歯肉の炎症との関連が改めて示唆された。

５．*A.viscosus*は，ポケット浅部から深部におよぶ歯根付着性プラークから検出され，歯周ポケット深部のプラーク形成にも関与していることが示唆された。

6．*T.denticola*は，ポケット中央部から深部の非付着性プラーク領域に局在する傾向がみられた。一方，同じ運動性細菌である*C.rectus*は，ポケット中央部から深部にかけ て大きな凝集塊を形成し，歯根付着性あるいは上皮関連のいずれかのプラーク領域で検出された。

7，*E.corrodens*および*F.nucleatum*はポケット中央部から深部にかけて小集団を形成し分布する傾向がみられたが，*E.corrodens*が歯根側に局在していたのに対し，*F.nucleatum*は非付着性プラーク領域から検出された。

本研究は，徳島大学歯学部歯科保存学第1講座でスタートし，展開した後，大阪大学歯学部歯科保存学講座で終了した。

稿を終えるにあたり，本研究課題を与えられ，ご懇篤なるご指導とご校閲を賜りました前徳島大学歯学部教授で現在大阪大学歯学部歯科保存学講座教授である恵比須繁之先生に心から感謝いたします。

また，本研究の実施にあたり様々なご援助，ご協力をいただきました徳島大学歯学部歯科保存学第1講座および大阪大学歯学部歯科保存学講座の教室員のみなさまに感謝いたします。

参 考 文 献

1. Socransky, S.S. Relationship to bacteria to the etiology of periodontal disease. *J Dent Res,* 1970; 49: 203-222.

2. Sanz, M., Newman, M.G. and Nisengard, R. Periodontal microbiology. In: Carranza, F.A., ed. Glickman's clinical periodontology. Philadelphia: WB Saunders, 1990: 342-372.

3. Kolenbrander, P.E. Surface recognition among oral bacteria: Multigeneric coaggregations and their mediators. *Crit Rev Microbiol,* 1989; 17: 137-159.

4. Gibbons, R.J. and van Houte, J. Bacterial adherence and the formation of dental plaques. In: Beachey, E.H., ed. Bacterial adherence. London: Chapman and Hall, 1980: 63-104.

5. Slots, J. Subgingival micro flora and periodontal disease. *J Clin Periodontol,* 1979; 6: 351-382.

6. Listgarten, M.A. and Helldén, L. Relative distribution of bacteria at clinically healthy and periodontally diseased sites in humans. *J Clin Periodontol,* 1978; 5: 115-132.

7. Slots, J. and Genco, R.J. Microbial pathogenicity. Black-pigmented *Bacteroides* species, *Capnocytophaga* species, and

Actinobacillus actinomycetemcomitans in human periodontal disease: virulence factors in colonization, survival, and tissue destruction. *J Dent Res,* 1984; 63: 412-421.

8. Dzink, J.L, Tanner, A.C.R., Haffajee, A.D. and Socransky, S.S. Gram negative species associated with active destructive periodontal lesions. *J Clin Periodontal,* 1985; 12: 648-659.

9. Slots, J., Hafström, C., Rosling, B. and Dahlén, G. Detection of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Bacteroides gingivalis* in subgingival smears by the indirect fluorescent-antibody technique. *J Periodont Res,* 1985; 20: 613-620.

10. Zambon, J.J. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in human periodontal disease. *J Clin Periodontol* 1985; 12: 1-20.

11. Loesche, W.J., Syed, S.A., Schmidt, E. and Morrison, E.C. Bacterial profiles of subgingival plaques in periodontitis. *J Periodontol,* 1985; 56: 447-456.

12. Mandell, R.L. A longitudinal microbiological investigation of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Eikenella corrodens* in juvenile periodontitis. *Infect Immun*, 1984; 45: 778-780.

13. White, D. and Mayrand, D. Association of oral *Bacteroides* with gingivitis and adult periodontitis. *J Periodont Res*, 1981; 16: 259-265.

14. Tanner, A.C.R., Hoffer, C., Bratthall, G.T., Visconti, R.A. and Socransky, S.S. A study of the bacteria associated with advancing periodontitis in man. *J Clin Periodontol*, 1979; 6:278-307.

15. Moore, W.E.C. Microbiology of periodontal disease. *J Periodont Res*, 1987; 22:335-341.

16. Rams, T.E., Feik, D. and Slots, J., *Campylobacter rectus* in human periodontitis. *Oral Microbiol Immunol*, 1993; 8: 230-235.

17. Socransky, S.S. amd Haffajee, A.D. The bacterial etiology of destructive periodontal disease: current concepts. *J Periodontol*, 1992; 63: 322-331.

18. Loesche, W.L. Periodontal disease and the *treponemas*, In: Jonson, R.C., The biology of the parastic spirochetes. New York: Academic Press, 1976: 261-275.

19. Renvert, S., Wikström, M., Helmersson, M., Dahlén, G., and Claffey, N. Comparative study of subgingival

microbiological sampling technique. *J Periodontol,* 1992; 63: 797-801.

20. Wikström, M., Renvert, S., Dahlén, G. and Johnsson, T. Variance in recovery of periodontitis-associated bacteria caused by sampling technique and laboratory processing. *Oral Microbiol Immunol,* 1991; 6: 102-106.

21. Loesche, W.J., Lopatin, D.E., Stoll, J., van Poperin, N. and Hujoel, P.P. Comparison of various detection methods for periodontopathic bacteria: Can culture be considered the primary reference standard? *J Clin Microbiol,* 1992; 30: 418-426.

22. Slots, J. and Listgarten, M.A. *Bacteroides gingivalis, Bacteroides intermedius* and *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in human periodontal disease. *J Clin Periodontol*, 1988; 15: 85-93.

23. Newman, H.N. The apical border of plaque in chronic inflammatory periodontal disease. *Brit Dent J,* 1976; 17: 105-113.

24. Listgarten, M.A. Structure of microbial flora associated with periodontal health and disease in man. A light and electron microscopic study. *J Periodontol,* 1976; 47:1-18.

25. Vrahopoulos, T.P., Barber, P.M. and Newman, H.N. The apical border plaque in chronic adult periodontitis. An ultrastructural study. I .morphology, structure, and cell content. *J periodontol,* 1992; 63: 243-252.

26. Saglie, R., Carranza, Jr, F.A. and Newman, M.G. The presence of bacteria within the oral epithelium in periodontal disease. I . A scanning and transmission electron microscopic study. *J Periodontol*, 1985; 56:618-624.

27. Frank, R.M. Bacterial penetration in the apical pocket wall of advanced human periodontitis. *J Periodont Res*, 1980; 15: 563-573.

28. Newman, H.N. The approximal apical border of plaque on children's teeth. I .Morphology, structure and cell content. *J Periodontol*, 1979; 50: 561-567.

29. Lai, C-H., Listgarten, M.A. and Rosan, B. Immunoelectron microscopic identification and localization of *Streptococcus sanguis* with peroxidase-labeled antibody: localization of *Streptococcus sanguis* in intact dental plaque. *Infect Immun,* 1975; 11: 200-210.

30. Berthold, P., Lai, C-H. and Listgarten, M.A. Immunoelectron microscopic studies of *Actinomyces viscosus.* *J Periodont Res,* 1982; 17: 26-40.

31. Ogawa, T., Mukai, T., Yasuda, K., Shimauchi, H., Toda, Y. and Hamada, S. Distribution and immunochemical specificities of fimbriae of *Porphyromonas gingivalis* and related bacterial species. *Oral Microbiol Immunol*, 1991; 6: 332-340.

32. Berthold, P. and Listgarten, M.A. Distribution of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in localized juvenile periodontitis plaque: an electron immunocytochemical study. *J Periodont Res,* 1986; 21: 473-485.

33. Ledec, E.H. and Bernhard, W. Recent modifications of the glycol methacrylate embedding procedure. *J Urtrastruct Res,* 1967; 19: 196-199.

34. Lee, G.L. Manual of histologic staining methods of the armed forces institute of pathology. New York: McGraw-Hill, 1968: 222-223.

35. Ohta, H., Gottschal, J.C, Fukui, K.and Kato, K. Aspartate and asparagine as electron acceptors for *Wolinella recta*. *Oral Microbiol Immunol* 1991; 6: 76-80.

36. Ohta, H. and Gottschal, J.C. Microaerophilic growth of *Wolinella recta* ATCC 33238. *FEMS Microbiol Ecol,* 1988; 53: 79-86.

37. Ozaki, K., Matsuo, T., Nakae, H., Noiri, Y., Yoshiyama, M. and Ebisu, S. A quantitative comparison of selected bacteria in human carious dentin by microscopic counts. *Caries Res* , 1994; 28: 137-145.

38. Zambon, J.J., Slots, J. and Genco, R.J. Serology of oral *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and serotype distribution in human periodontal disease. *Infect immun*, 1983; 41: 19-27.

39. Moore, W.E.C., Holdeman, L.V., Cato, E.P., Smibert, R.M., Brumeister, J.A., Palcanis, K.G. and Ranney, R.R. Comparative bacteriology of juvenile periodontitis. *Infect Immun*, 1985; 48: 507-519.

40. Moore, W.E.C., Holdeman, L.V., Cato, E.P., Good, I.J., Smith, E.P., Ranney, R.R. and Palcanis, K.G. Variation in periodontal floras. *Infect Immun*, 1984; 46: 720-726.

41. Slots, J. Bacterial specificity in adult periodontitis. A summary of recent work. *J Clin Periodontol*, 1986; 13: 912-917.

42. Socransky, S.S. and Haffajee, A.D. Microbial mechanisms in the pathogenesis of destructive periodontal disease: a critical assessment. *J Periodont Res*, 1991; 26: 195-212.

43. Finlay, B.B. and Falkow, S. Common themes in microbial pathogenicity. *Microbiol Rev*, 1989; 53: 210-230.

44. Harrington, D.J. Bacterial collagenases and collagen-degrading enzymes and their potential role in human disease. *Infect Immun*, 1996; 64:1885-1891.

45. Daly, C.G., Seymour, G.J. and Kisser, J.B. Bacterial endotoxin: A role in chronic inflammatory periodontal disease ? *J Oral Pathol*, 1980; 9: 1-15.

46. 山田善裕. 成人性歯周炎の歯周ポケット内プラーク細菌と多形核白血球の相互関係に関する超微形態学的研究. 日歯周誌, 1992; 34: 566-580.

47. Manor, A., Lebendiger, M., Shiffer, A. and Tovel, H. Bacterial invasion of periodontal tissues in advanced periodontitis in humans. *J Periodontol*, 1984; 55: 567-573.

48. Saglie R. A scanning electron microscopic study of the relationship between the most apically located subgingival plaque and the epithelial attachment. *J Periodontol,* 1977;48: 105-115.

49. 奥田克爾. プラーク細菌の懲りない面々：デンタルプラーク細

菌の世界. 医歯薬出版, 東京, 1993: 73-107.

50. Riviere, G.R., Smith, K.S., Carranza, Jr.N., Tzagaroulaki, E., Kay, S.L. and Dock, M. Subgingival distribution of *Treponema denticola*, *Treponema socranskii*, and pathogen-related oral spirochetes: Prevalence and relationship to periodontal status of sampled sites. *J Periodontol,* 1995; 66: 829-837.

51. Kolenbrander, P.E. Coaggregation : Adherence in the human oral microbial ecosystem, Dworkin, M., Microbial Cell-Cell Interactions, American Society for Microbiology, Washington D.C., 1991: 303-329.

52. Kolenbrander, P.E., Ganeshkumar, N., Cassels, J. and Hughes, C.V. Coaggregation : specific adherence among human oral plaque bacteria. *FASEB J*, 1993; 7: 406-413.

53. Costerton, J.W., Irvin, R.T. and Cheng, K.J. The bacterial glycocalyx in nature and disease. *Ann Rev Microbiol*, 1981; 35: 299-324.

54. Costerton, J.W. The etiology and persistence of cryptic bacterial infection. A hypothesis. *Rev Infect Dis*, 1984; 6: 608-616.

55. Costerton, J.W., Cheng, K-J, Geesey, G.G., Ladd, T.I., Nickel, J.C., Dasgupa, M. and Marrie, T.J.

Bacterial biofolms in nature and disease.
Ann Rev Microbial, 1987; 41: 435-464.

56. 野杁由一郎，藤中恵子，近藤　妙，尾崎和美，松尾敬志，恵比須繁之．　ヒト歯肉縁下プラークの研究 -プラーク細菌の定着・増殖における細菌バイオフィルムの関与について-. 日歯周誌，1995; 37: 329-336.

57. Amano, A., Sojar, H.T., Lee, J-Y, Sharma, A., Levine, M.J. and Genco, R.J. Salivary receptors for recombinant fimbrillin of *Porphyromonas gingivalis*. *Infect Immun,* 1994; 62:3372-3380.

58. Duncan, M.J., Nakao, S., Skobe, Z. and Xie, H. Interactions of *Porphyromonas gingivalis* with epithelial cells. *Infect Immun,* 1993; 61: 2260-2265.

59. Lamont, R.J., Chan, A., Belton, C.M., Izutsu, K.T., Vasel, D. and Weinberg, A. *Porphyromonas gingivalis* invasion of gingival cells. *Infect Immun,* 1995; 63: 3878-3885.

60. Kinder, S.A. and Holt, S.C. Characterization of coaggregation between *Bacteroides gingivalis* T22 and *Fusobacterium nucleatum* T18. *Infect Immun,* 1989; 57: 3425-3433.

61. 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,* 1991; 70: 82-86.

62. Slots, j. and Gibbons, R.J. Attachment of *Bacteroides melaninogenicus* subsp. asaccharolyticus to oral surfaces and its possible role in colonization of the mouth and periodontal pockets. *Infect Immun*, 1978; 19: 254-264.

63. Lehner, T., Challacombe, S.J., Wilton, J.M.A. and Ivanyi, L. Immunopotentiation by dental microbial plaque and its ralationship to oral disease in man. *Arch Oral Biol,* 1976; 21: 749-753.

64. 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,* 1972; 7: 21-28.

65. Jordan, H.V., Hammond, B.F. Filamentous bacteria isolated from human root surface caries. *Arch Oral Biol* 1972; 17: 1333-1342.

66. Schwarz, S., Ellen, R.P. and Grove, D.A. *Bacteroides gingivalis-Actinomyces viscosus* cohesive interactions as measured by a quantitative binding assey. *Infect Immun,* 1987; 55: 2391-2397.

67. Listgarten, M.A. Electron microscopic observations on the bacterial flora of acute necrotizing ulcerative gingivitis. *J Periodontol*, 1965; 36: 328-339.

68. Courtois, G.J., Cobb, C.M. and Killoy, W.J. Acute necrotizing ulcerative gingivitis. A transmission electron microscope study. *J Periodontol*, 1983; 54: 671-679.

69. Riviere, G.R., Wagoner, M.A., Baker-Zander, S.A., Weisz, K.S., Adams, D.F., Simonson, L. and Lukehart, S.A. Identification of spirochetes related to *Treponema pallidum* in necrotizing ulcerative gingivitis and chronic periodontitis. *N Eng J Med*, 1991; 325: 539-543.

70. Grenier, D. Characteristics of hemolytic and hemagglutinating activities of *Treponema denticola.* *Oral Microbiol Immunol*, 1991; 6:246-249.

71. Olsen, I. Attachment of *Treponema denticola* to cultured human epithelial cells. *Scand J Dent Res*, 1984; 92: 55-63.

72. Keulers, R.A.C., Maltha, J.C., Mikx, F.H.M. and Wolters-Lutgerhorst, J.M.L. Attachment of *Treponema denticola* strains to monolayers of epiyhelial cells of different origin. *Oral Microbial Immunol*, 1993; 8: 236-241.

73. Listgarten, M.A., Johnson, D., Nowotny, A., Tanner, A.C.R, and Socransky, S.S. Histopathology of periodontal disease in gnotobiotic rats monoinfected with *Eikenella corrodens*. *J Periodontal Res*, 1978; 13: 134-148.

74. Irving, J.T., Socransky, S.S. and Tanner, A.C.R. Histological changes in experimental periodontal disease in rats monoinfected with Gram-negative organisms. *J Periodontal Res*, 1978; 13: 326-332.

75. Ebisu, S., Nakae, H. and Okada, H. Coaggregation of *Eikenella corrodens* with oral bacteria mediated by bacterial lectin-like substance. *Adv Dent Res*, 1988; 2: 323-327.

76. Yamazaki, Y., Ebisu, S. and Okada, H. *Eikenella corrodens* adherence to human buccal epithelial cells. *Infect Immun*, 1981; 31: 21-27.

図 1

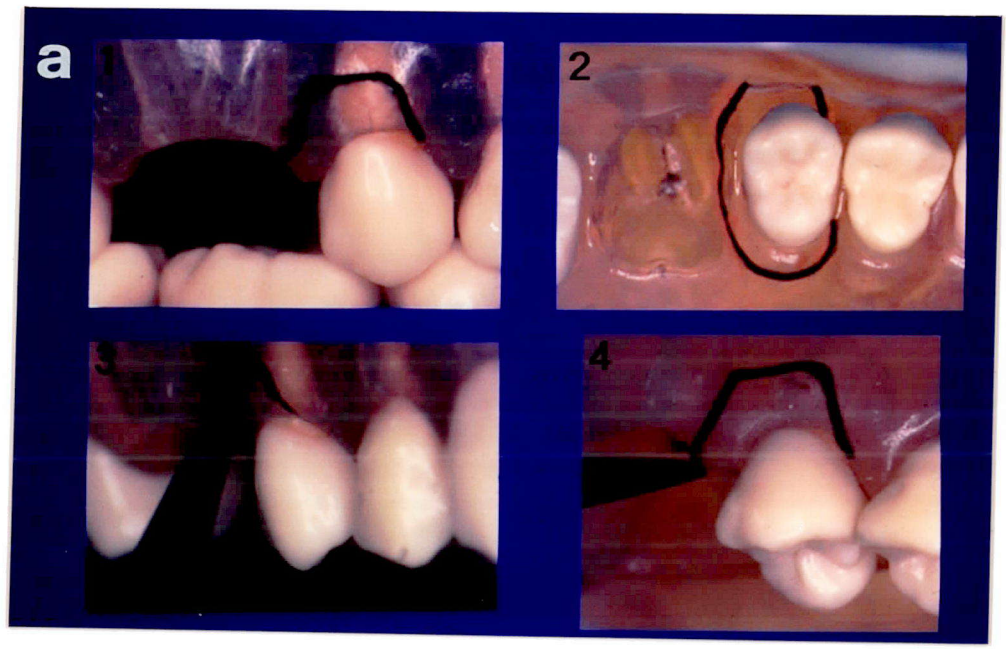

図 1 a,b. ヒトの歯周ポケット試料の採取方法
黒いラインに沿って切開後，被験部位を周囲歯周組織から完全に離断し，歯と歯肉組織を一塊として採取した。

図２

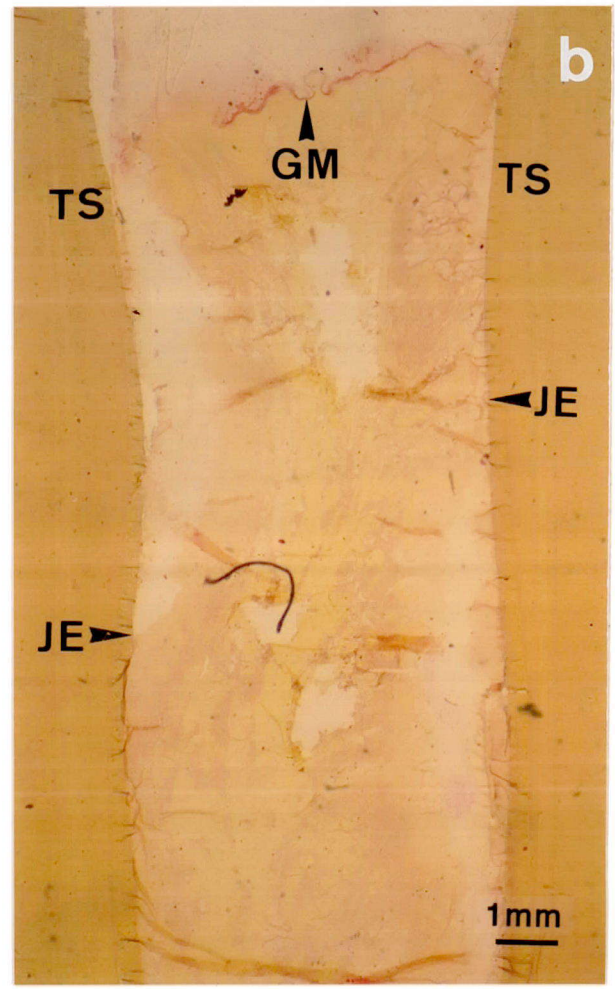

図２ａ．調製した試料 No. 10 の断面像

図２ｂ．試料 No. １,２より得られた標本の歯周ポケットの全体像
(Brown - Brenn 染色)
TS ：歯面，GM ：歯肉縁，JE：ポケット底

図 3

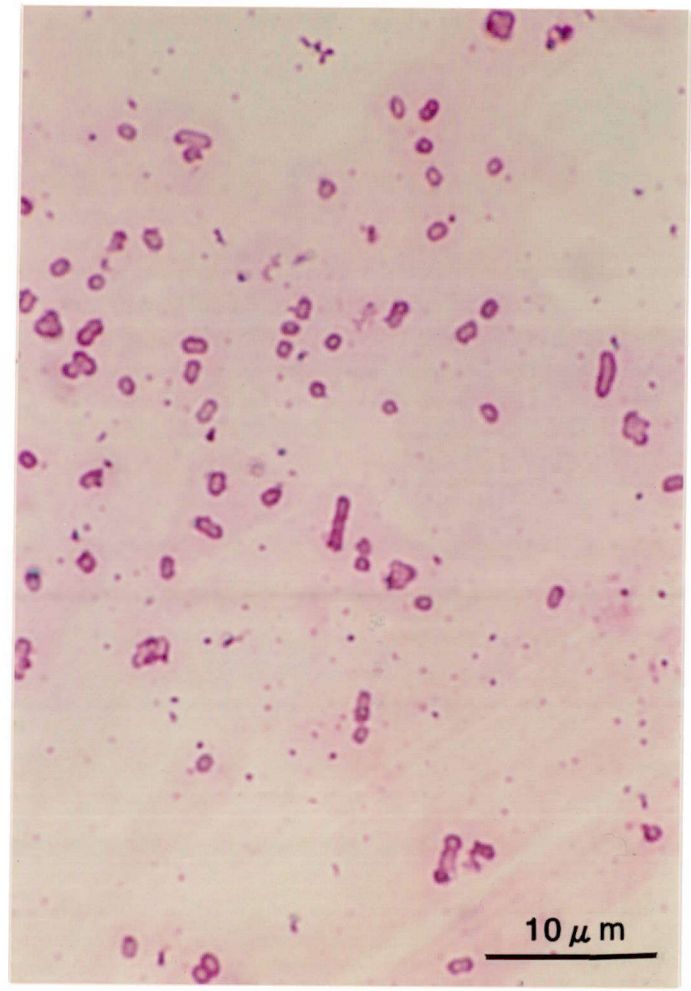

図 3 . *P. gingivalis* 381 凍結乾燥菌体の塗抹試料の抗 *P. gingivalis* 抗体（1000倍希釈）による免疫染色像
明確な赤色の陽性反応が観察される。

図４

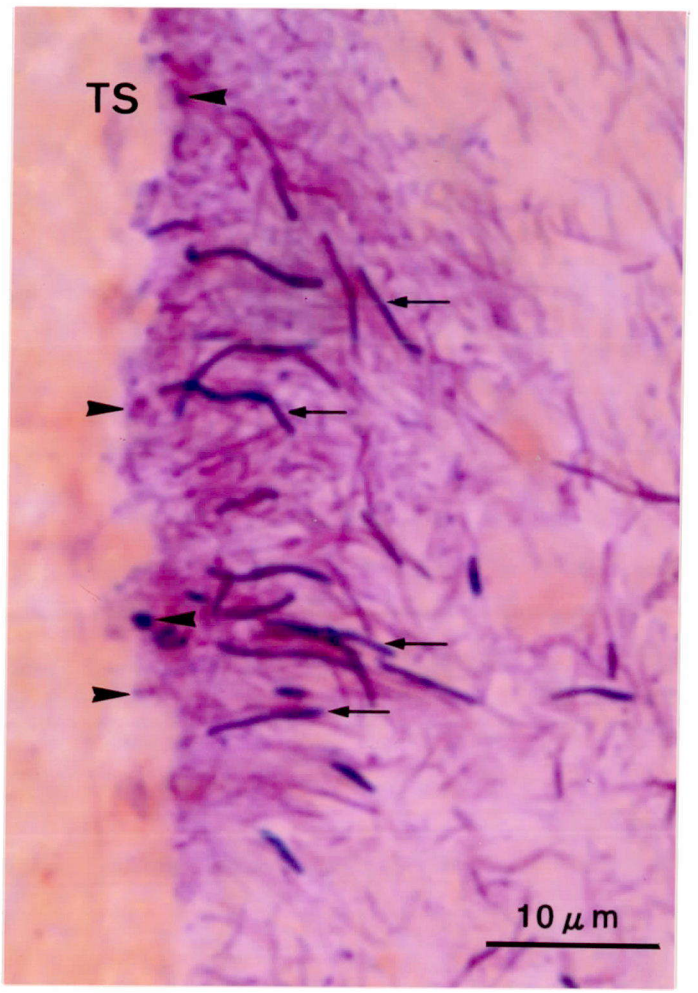

図４．歯根付着性プラークの Brown- Brenn 染色像
密に集合した線状菌（矢印）を主体とする細菌が，歯面（TS）に対し柵状に配列している。グラム陽性の球菌（矢尻）が歯面に接して観察され，セメント質を侵襲している。（プロービング深さ３mm，試料 No. ４）

図 5

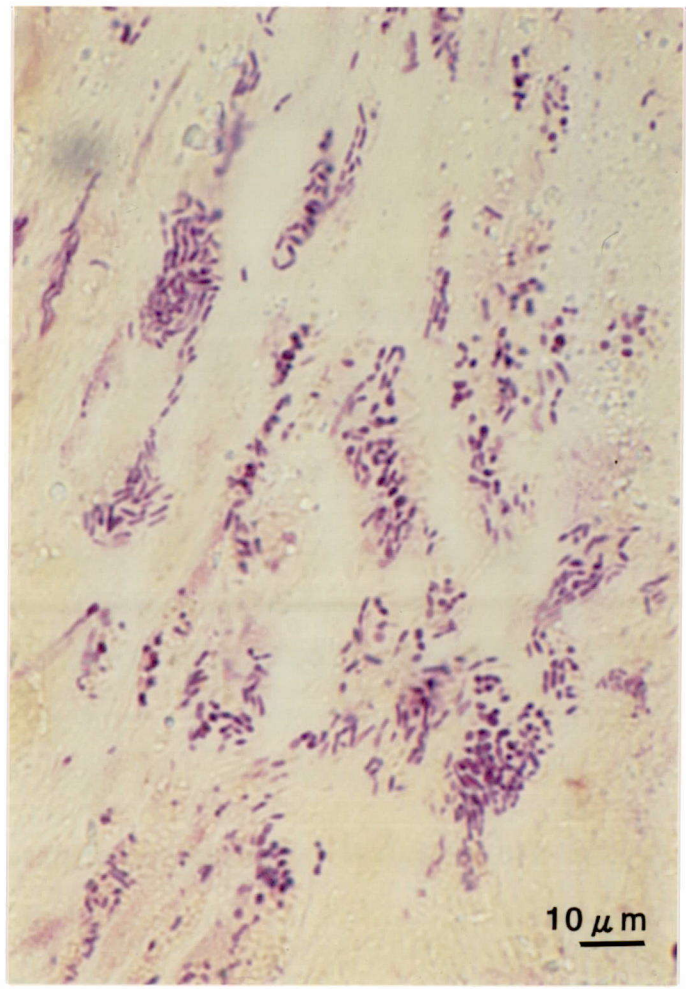

図 5．非付着性プラークのBrown - Brenn 染色像
グラム陽性の球菌および短桿菌が小さなコロニーを形成しているが，他のコロニーとは密に接触せずルーズに付着している。
（プロービング深さ 2 mm，試料 No. 7）

図 6

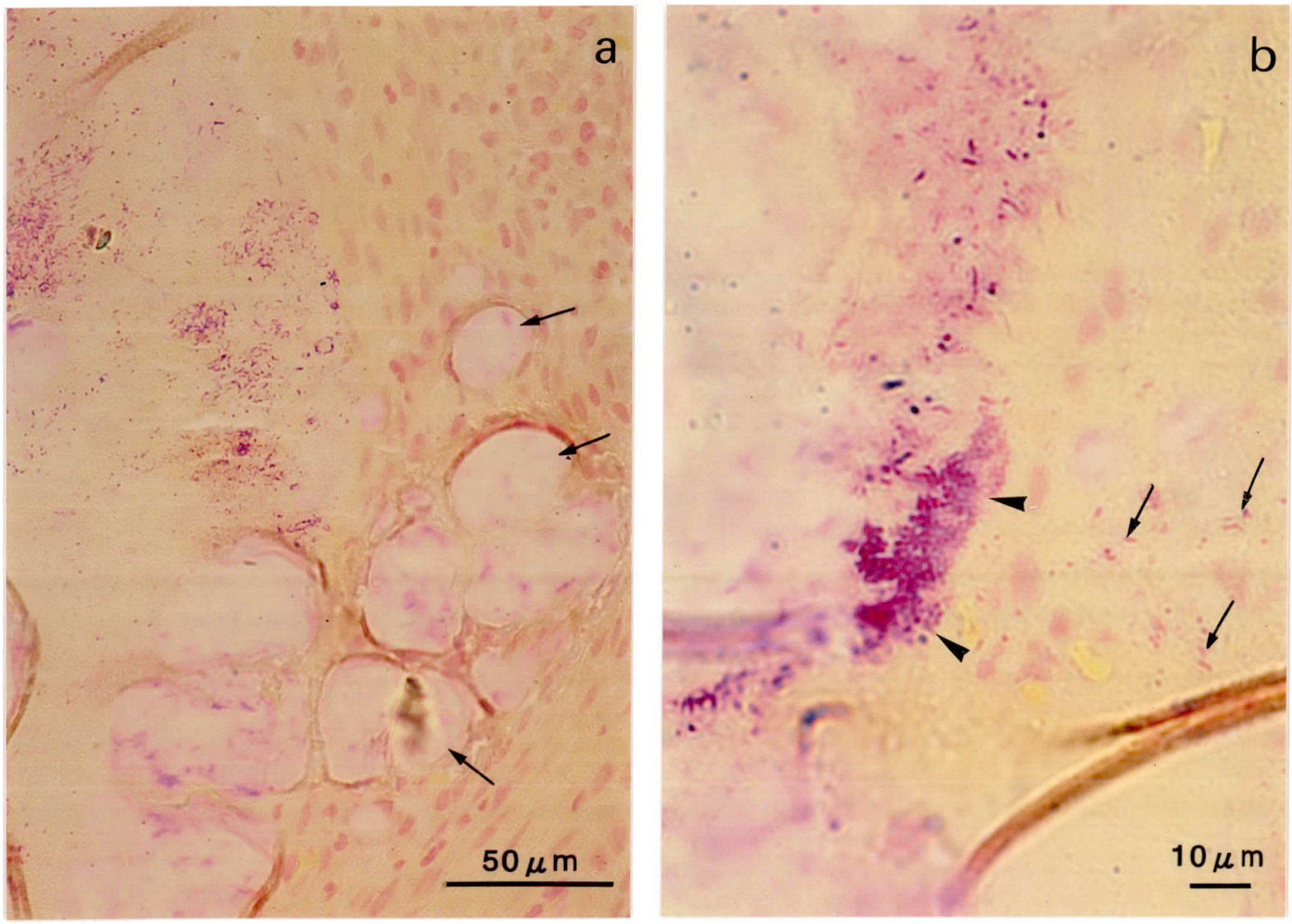

図 6．上皮関連プラークの Brown - Brenn 染色像
a．．空胞変性（矢印）を起こした上皮に近接して細菌のコロニーが観察される。
（プロービング深さ４mm，試料 No. 1）
b．グラム陰性細菌（矢尻）が，密に集合して上皮に付着しており，いくつかの細菌（矢印）は，上皮内に侵入している。（プロービング深さ４mm，試料 No. 2）

図 7

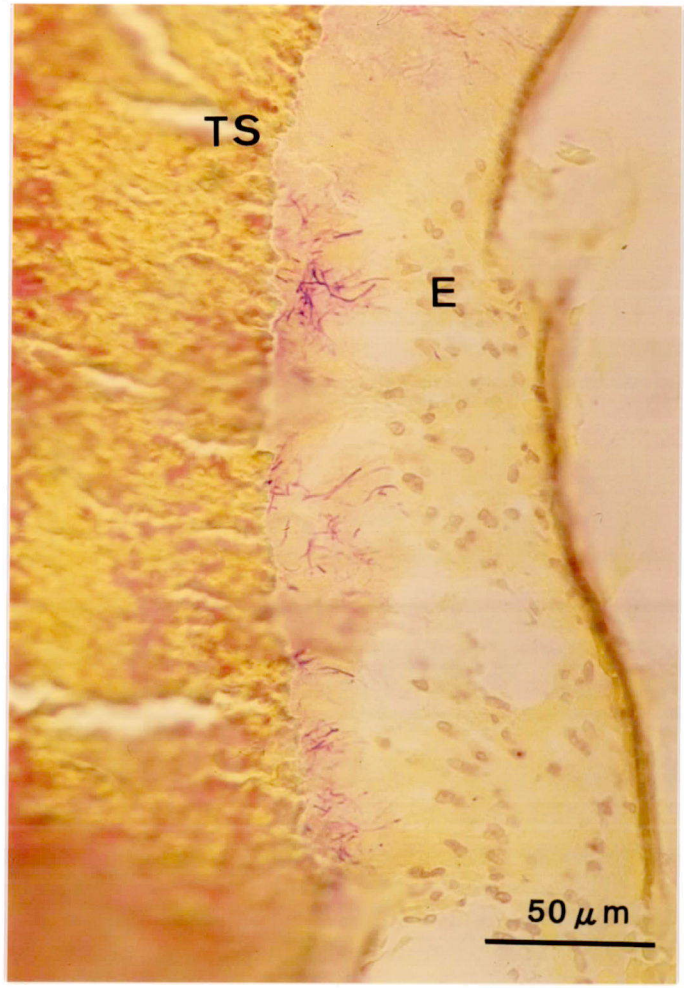

図 7．歯周ポケット底部の Brown - Brenn 染色像
歯面（TS）とポケット上皮（E）の狭い間隙には，線状菌や短桿菌がわずかながら存在し，ルーズに付着しているのが観察される。
（プロービング深さ 9 mm，試料 No. 9）

図 8

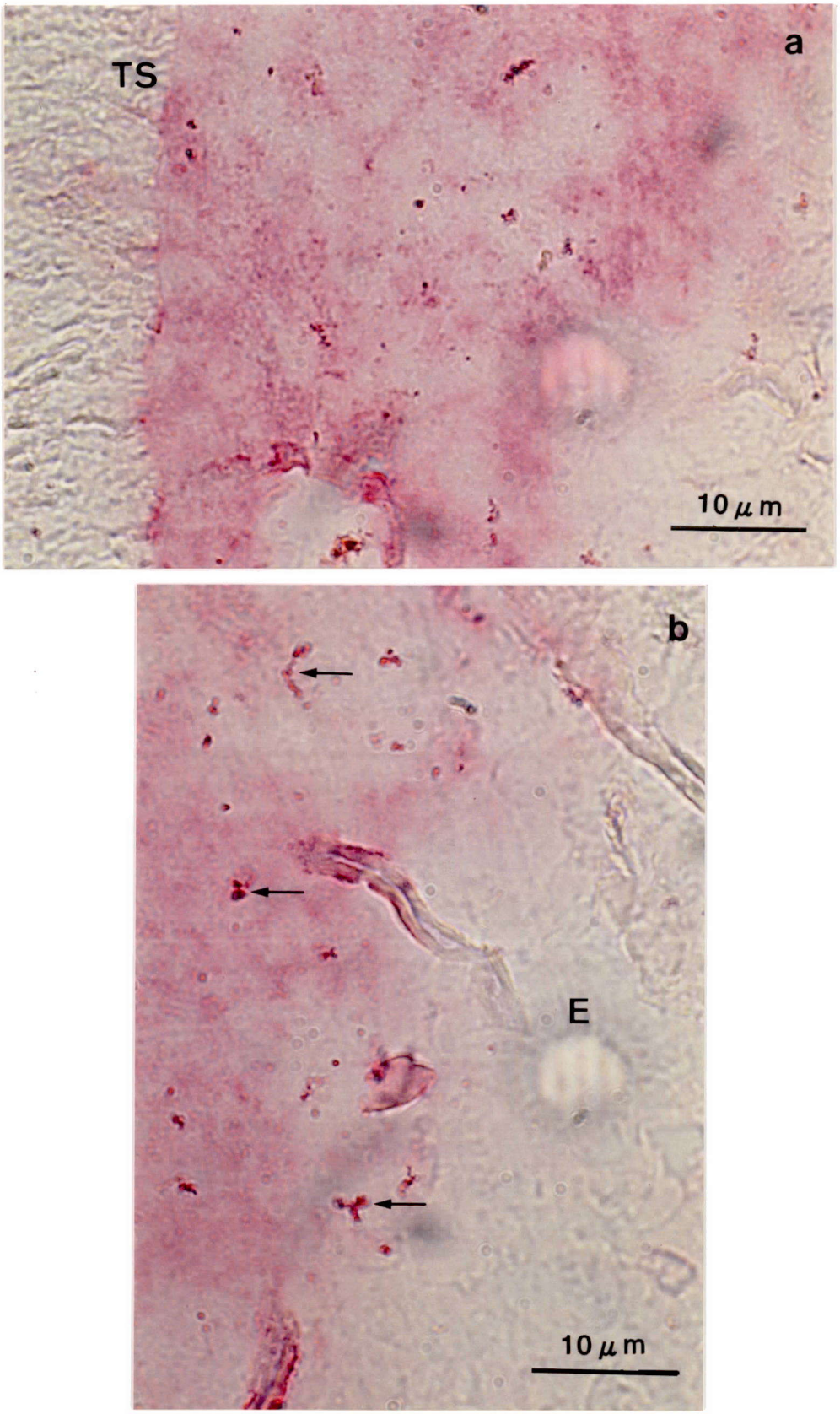

図 8．抗 *P. gingivalis* 抗体による免疫染色像
a．歯根付着性プラーク領域から上皮関連プラーク領域に至る歯周ポケット全域で陽性反応が観察される。（プロービング深さ 6 mm，試料 No. 9）
b．小さな凝集塊（矢印）を形成した *P. gingivalis* が，散在性に上皮（E）に近接して観察されるが，上皮内に陽性反応はみられない。（プロービング深さ 5 mm，試料 No. 8）

図 9

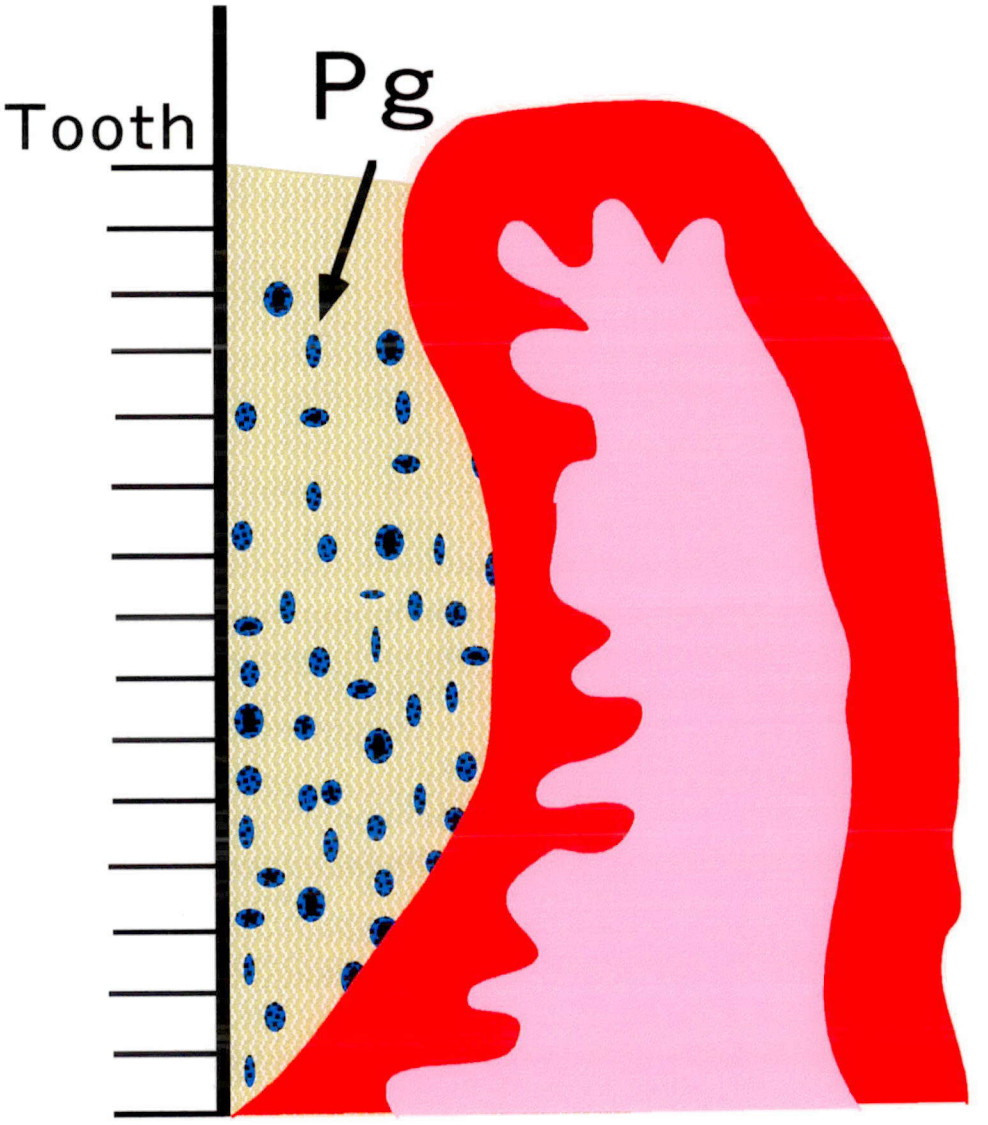

図9．*P. gingivalis*の局在性の模式図

*P. gingivalis*は，小さな凝集塊を形成し散在性に歯周ポケット全域（プロービング深さ 2－10 mm），特にポケット中央部から深部にかけて局在する傾向がみられた。

図10

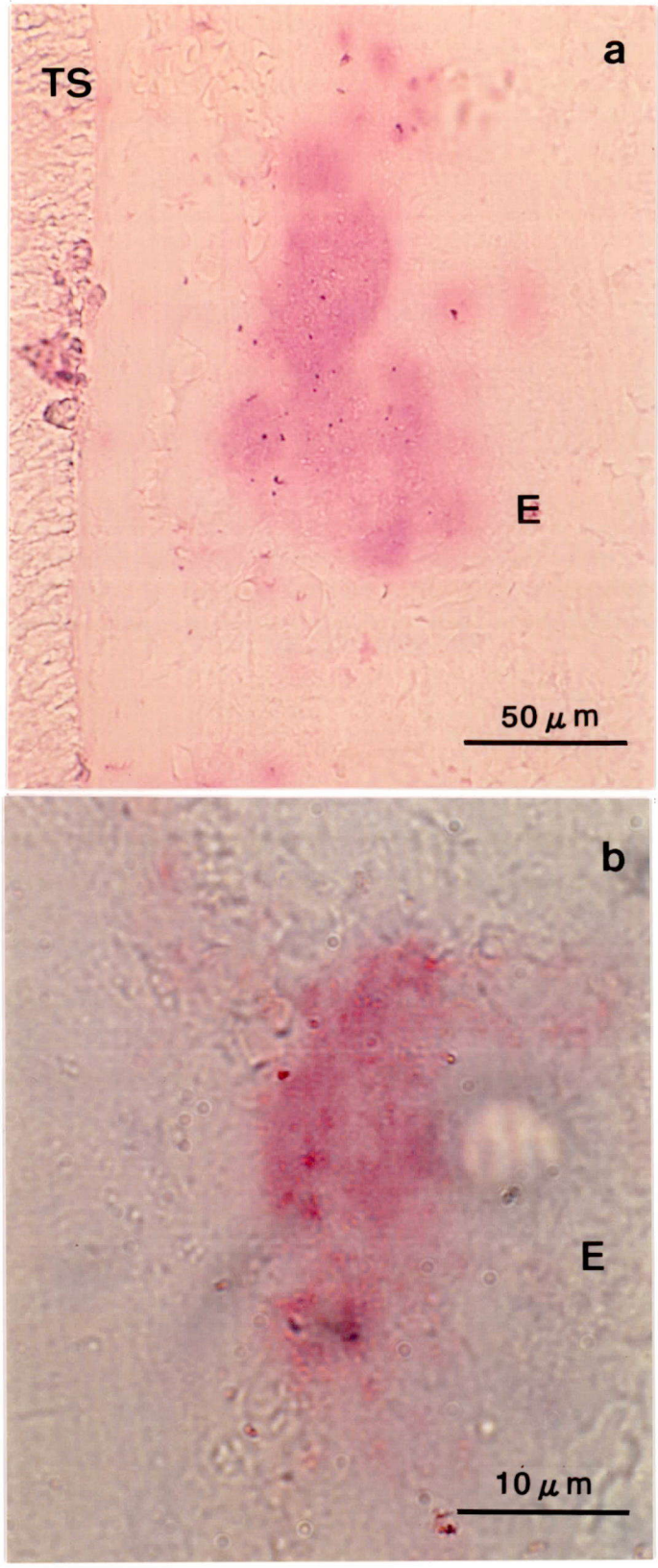

図10. 抗 *P. nigrescens* 血清による免疫染色像
a，b．上皮（E）に近接して大きな陽性反応が観察される。
（a ：プロービング深さ5-6mm，試料 No. 8）
（b ：プロービング深さ4-5mm，試料 No. 11）

図11

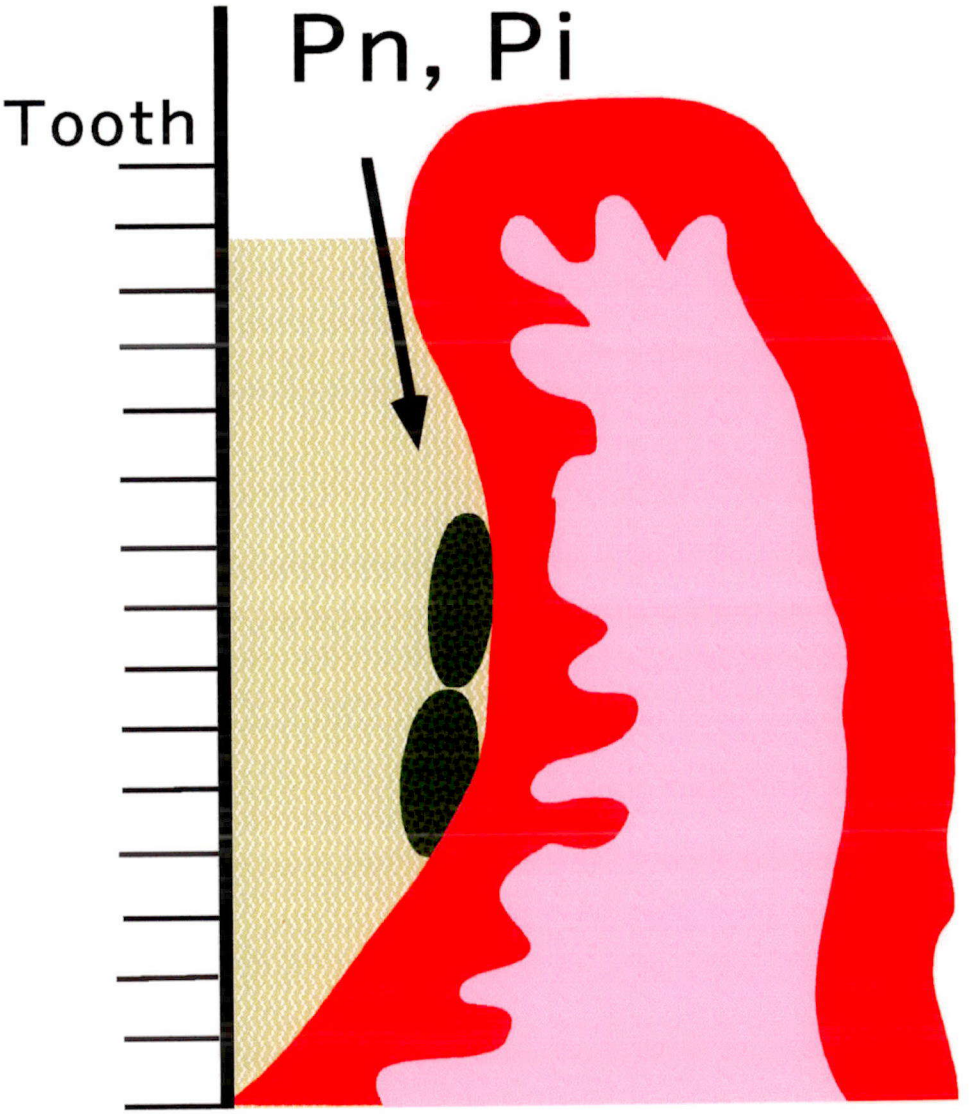

図11 *P. nigrescens*, *P. intermedia* の局在性の模式図
P. nigrescens/ *P. intermedia* は，大きな凝集塊を形成し，ポケット中央部（プロービング深さ 3－7 mm）の上皮関連プラーク領域に局在する傾向がみられた。

図12

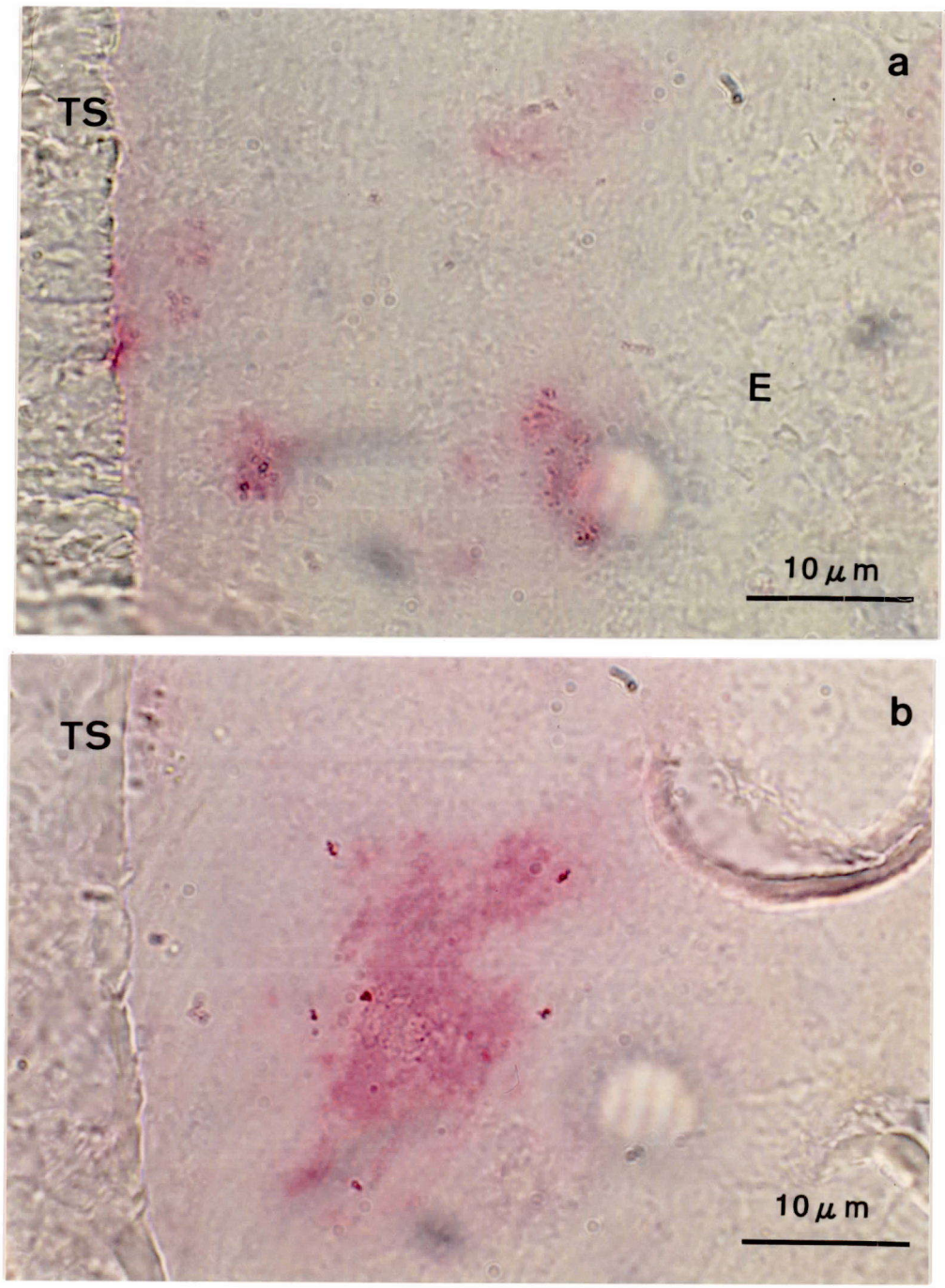

図12．抗 *C. rectus* 血清による免疫染色像
a．歯面（TS）に接した部位や歯根付着性プラーク表層部あるいは上皮（E）に近接した部位に陽性反応が認められる。（プロービング深さ４mm，試料 No. １）
b．歯根付着性プラーク表層部に，大きな凝集塊を形成した *C. rectus* の陽性反応が観察される。
（プロービング深さ５mm，試料 No. ３）

図13

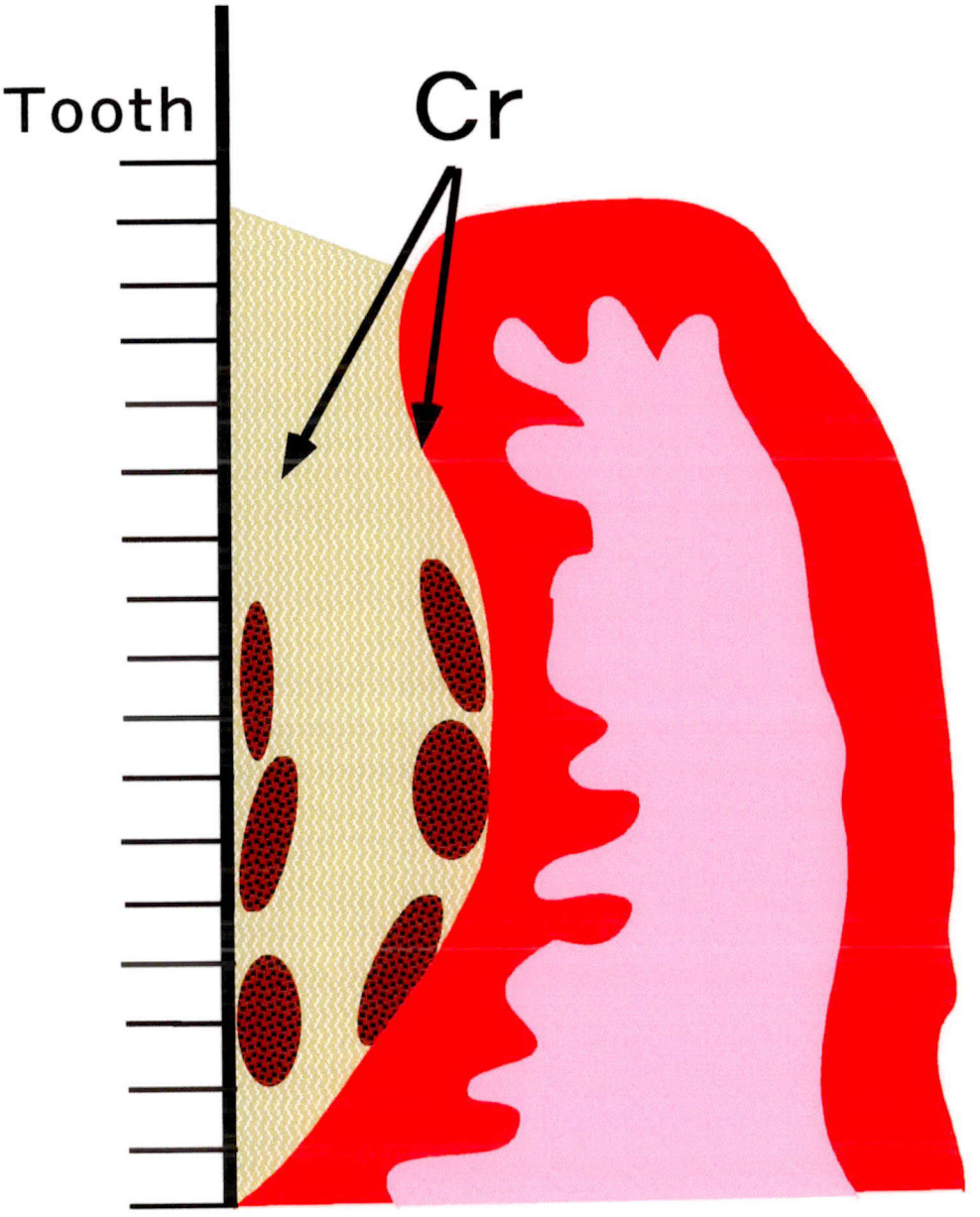

図13．*C. rectus*の局在性の模式図
*C. rectus*は，ポケット中央部から深部（プロービング深さ4－9mm）にかけ，大きな凝集塊を形成し，歯根付着性あるいは上皮関連プラーク領域に局在する傾向がみられた。

図14

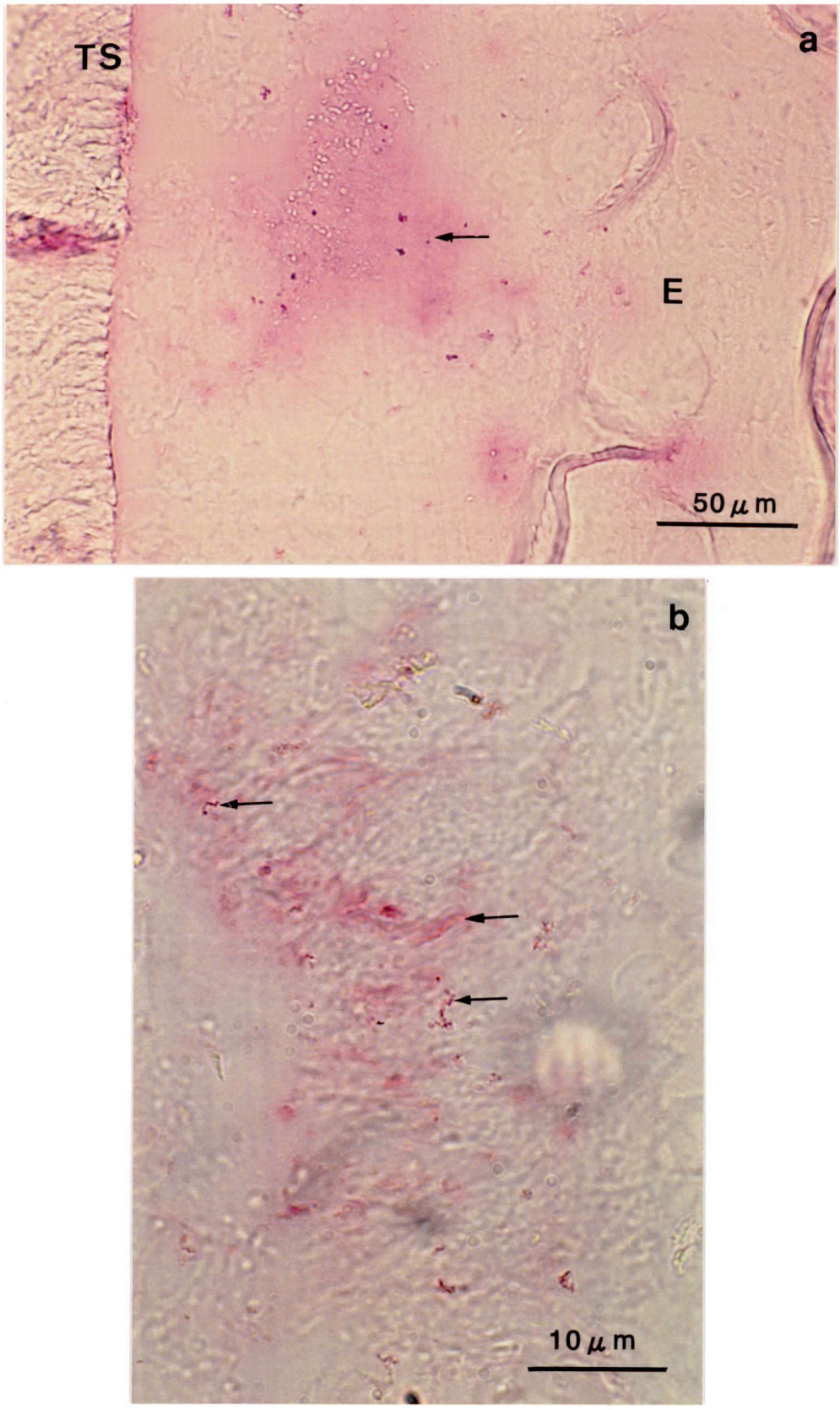

図14．抗 *T. denticola* 血清による免疫染色像
a．非付着性プラーク領域に，大きな陽性反応（矢印）が認められる。TS：歯面，E：上皮
（プロービング深さ5mm，試料 No. 11）
b．非付着性プラーク領域にみられた陽性反応の強拡大像。ラセン状の*T. denticola* 菌体の輪郭（矢印）が観察さる。
（プロービング深さ6mm，試料 No. 5）

図15

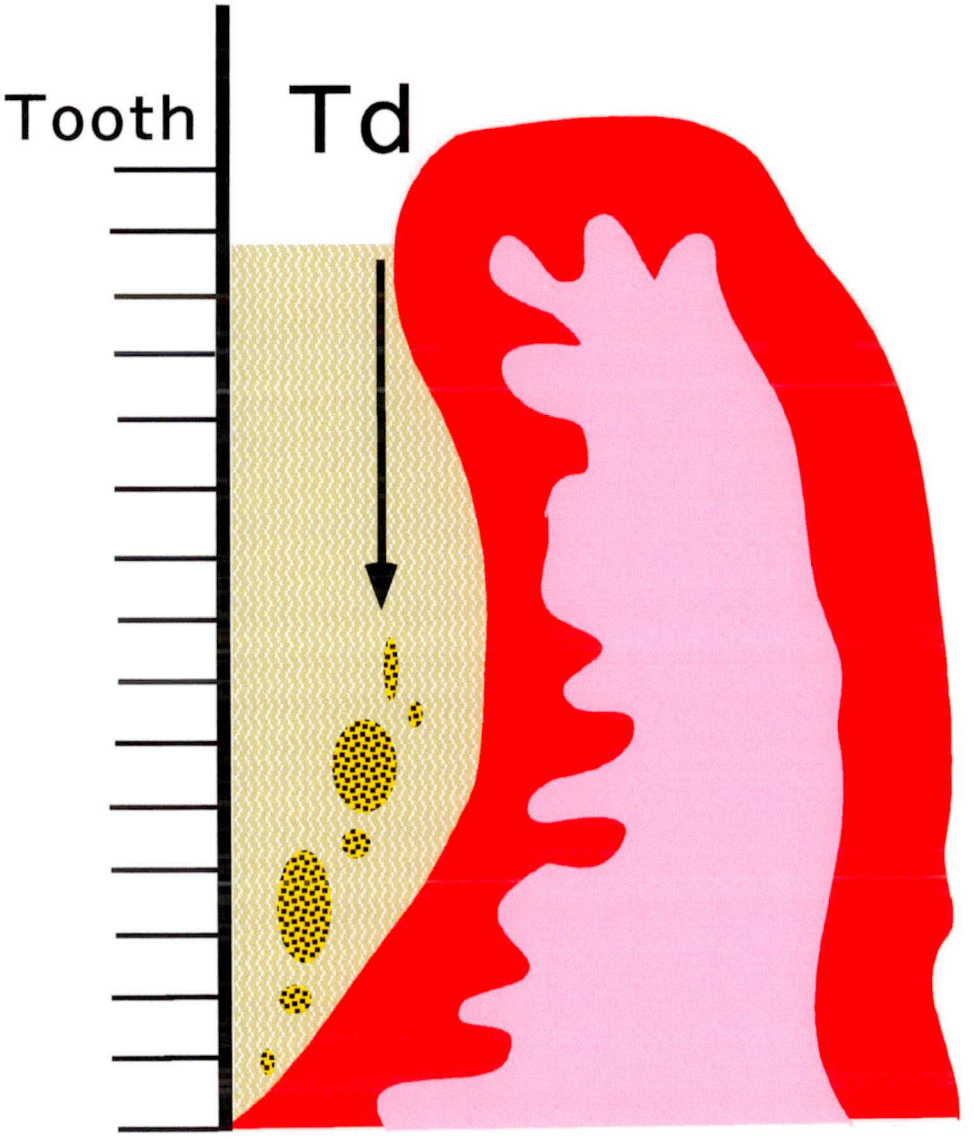

図15．*T. denticola*の局在性の模式図
*T. denticola*は，大小さまざまな凝集塊を形成し，ポケット中央部から深部（プロービング深さ４－９mm）におよぶ非付着性プラーク領域に局在する傾向がみられた。

図16

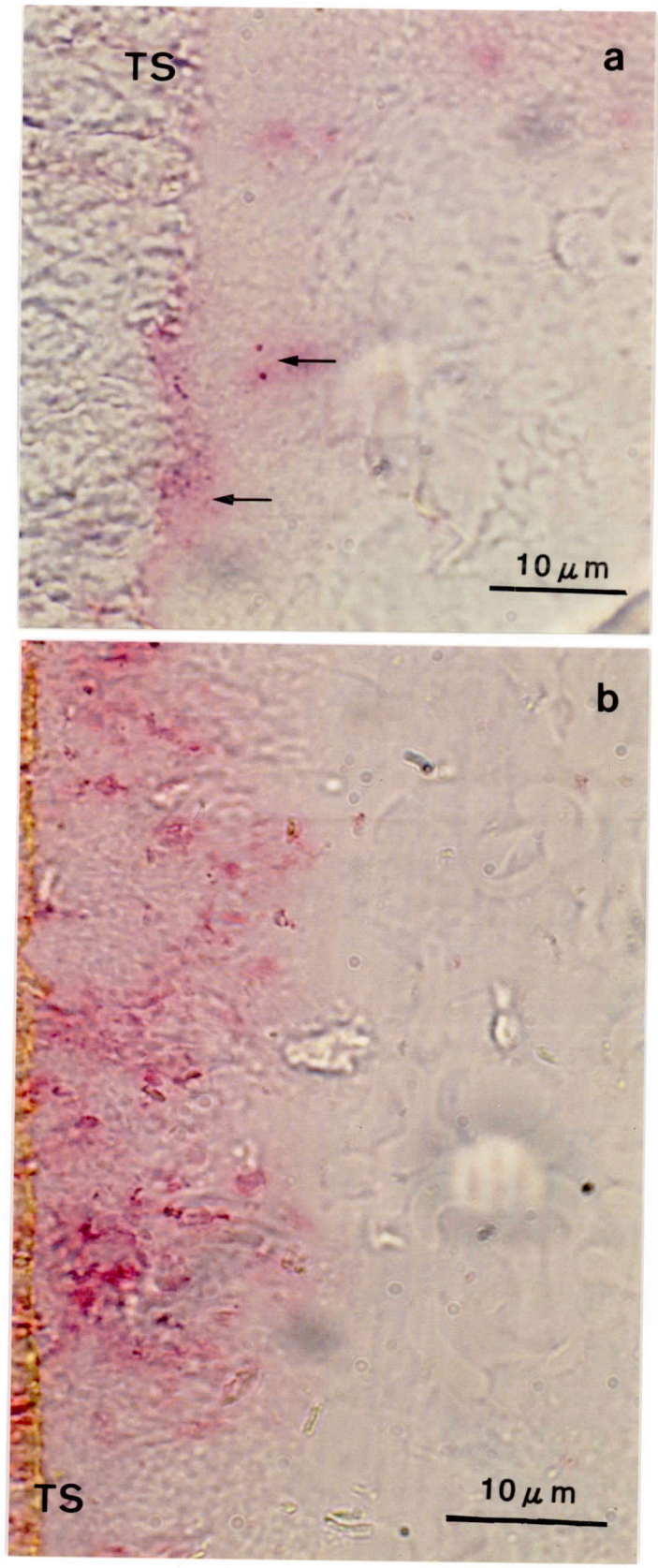

図16．抗 *E. corrodens* 血清による免疫染色像
a．歯面（TS）に接した部位や歯根付着性プラーク表層部に陽性反応（矢印）が観察される。
（プロービング深さ４mm，試料 No. 12）
b．歯根付着性プラーク全層にわたり散在性に小さな陽性反応がみられる。TS：歯面
（プロービング深さ５-６mm，試料 No. ７）

図17

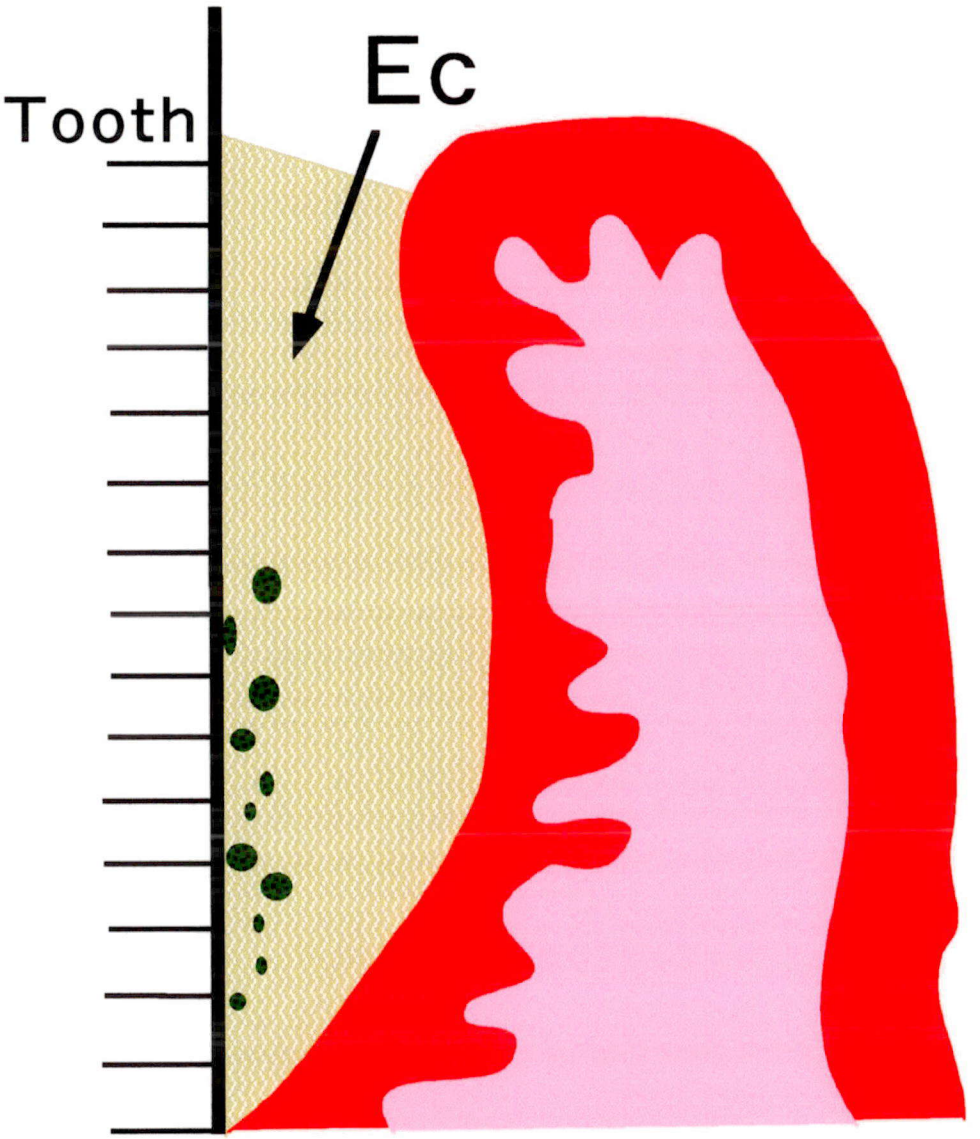

図17．*E.corrodens*の局在性の模式図
*E.corrodens*は，ポケット中央部から深部（プロービン グ深さ２－６mm）にかけ小さな凝集塊を形成し，歯根付着性プラーク領域に局在する傾向がみられた。

図18

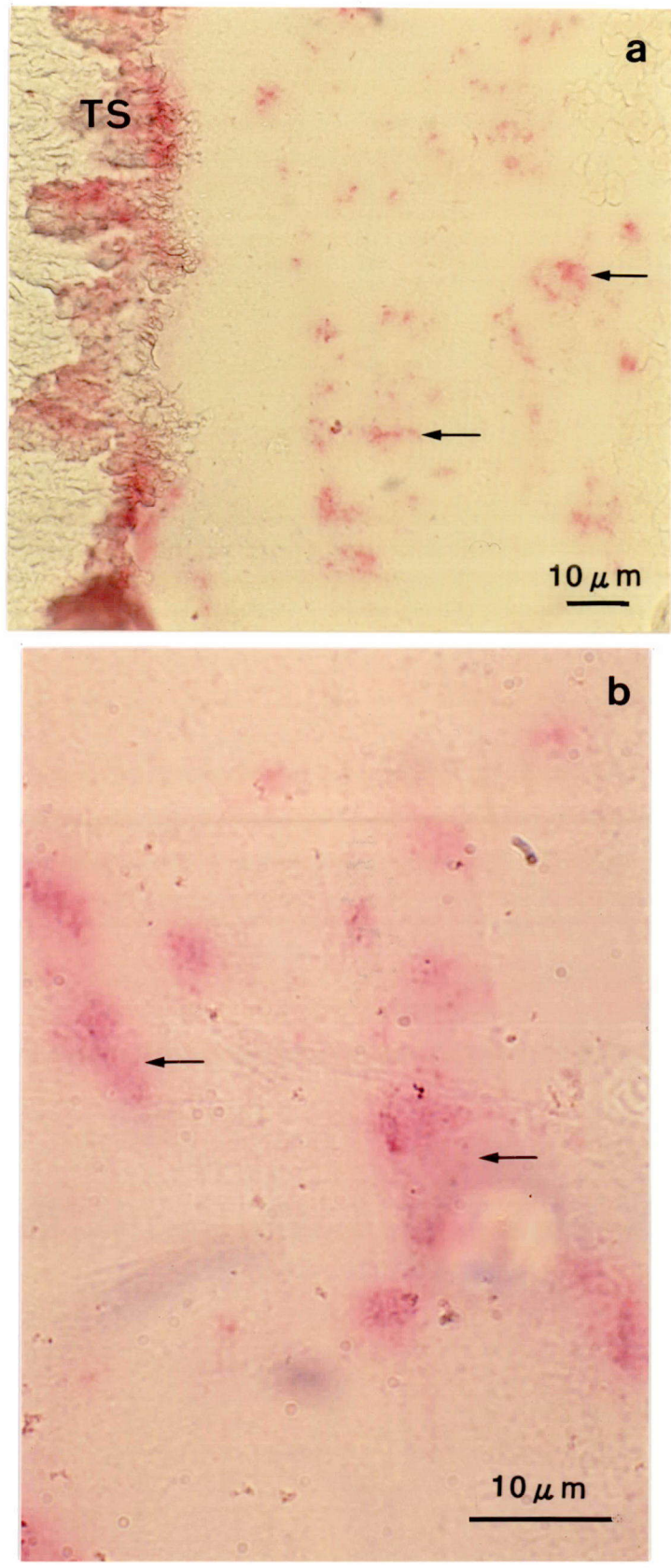

図18．抗 *F. nucleatum* 血清による免疫染色像
a．非付着性プラーク領域に散在性に小さな陽性反応（矢印）が認められる。
（プロービング深さ3-4mm，試料 No. 11）
b．図12 a の陽性反応部の強拡大像。
F. nucleatum が密集せず，小さな凝集塊（矢印）を形成している。（プロービング深さ4mm）

図19

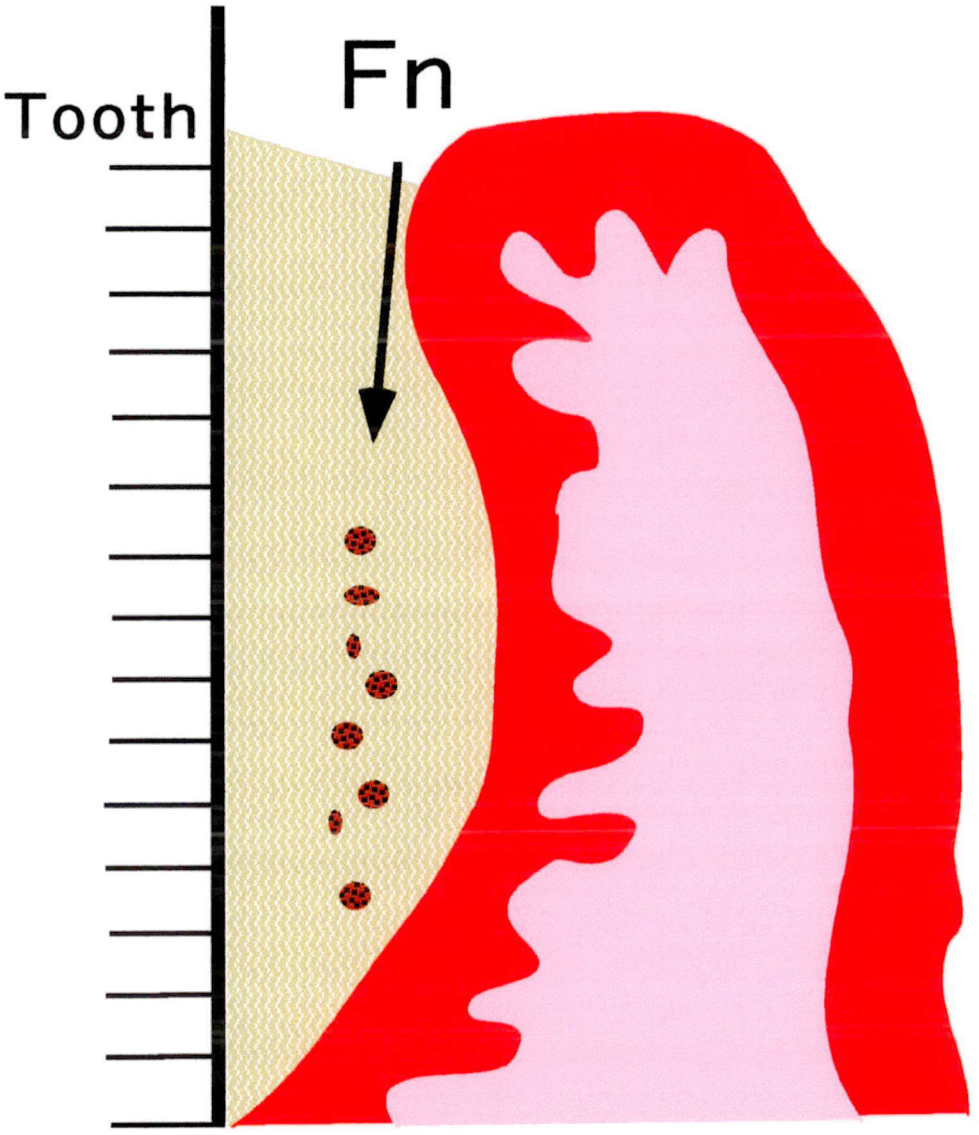

図 19．*F. nucleatum* の局在性の模式図

F. nucleatum は，小さな凝集塊を形成し，ポケット中央部から深部（プロービング深さ 3－9 mm）におよぶ非付着性プラーク領域に局在する傾向がみられた。

図20

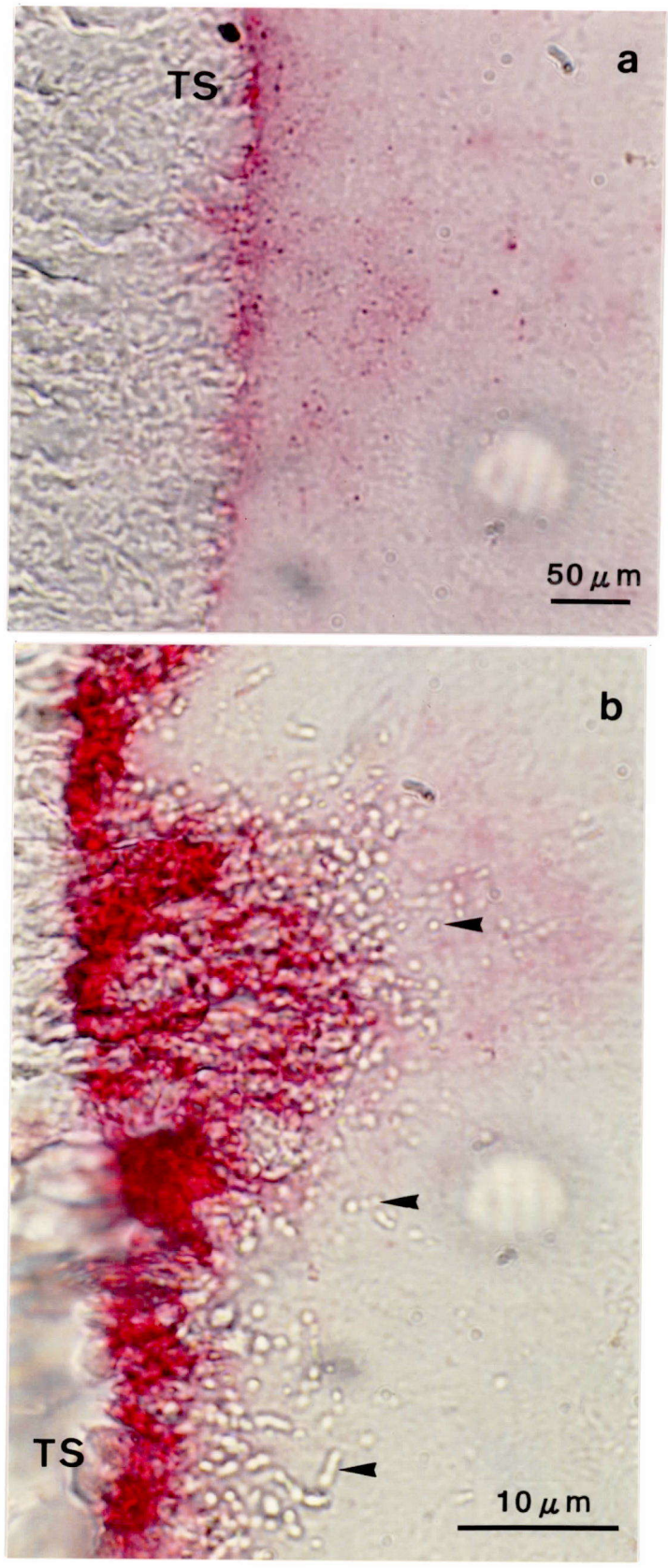

図20．抗 *A. viscosus* 血清による免疫染色像
a．歯根付着性プラーク全域に陽性反応がみられ，特に歯面（TS）に接した部位で強い陽性反応が観察される。（プロービング深さ6 mm，試料 No. 1）
b．歯面（TS）に接した部位や歯根付着性プラーク深層部で，強い陽性反応がみられる。歯根付着性プラーク最表層部では未染色の球菌の輪郭（矢尻）が観察される。（プロービング深さ5 mm，試料 No. 11）

図21

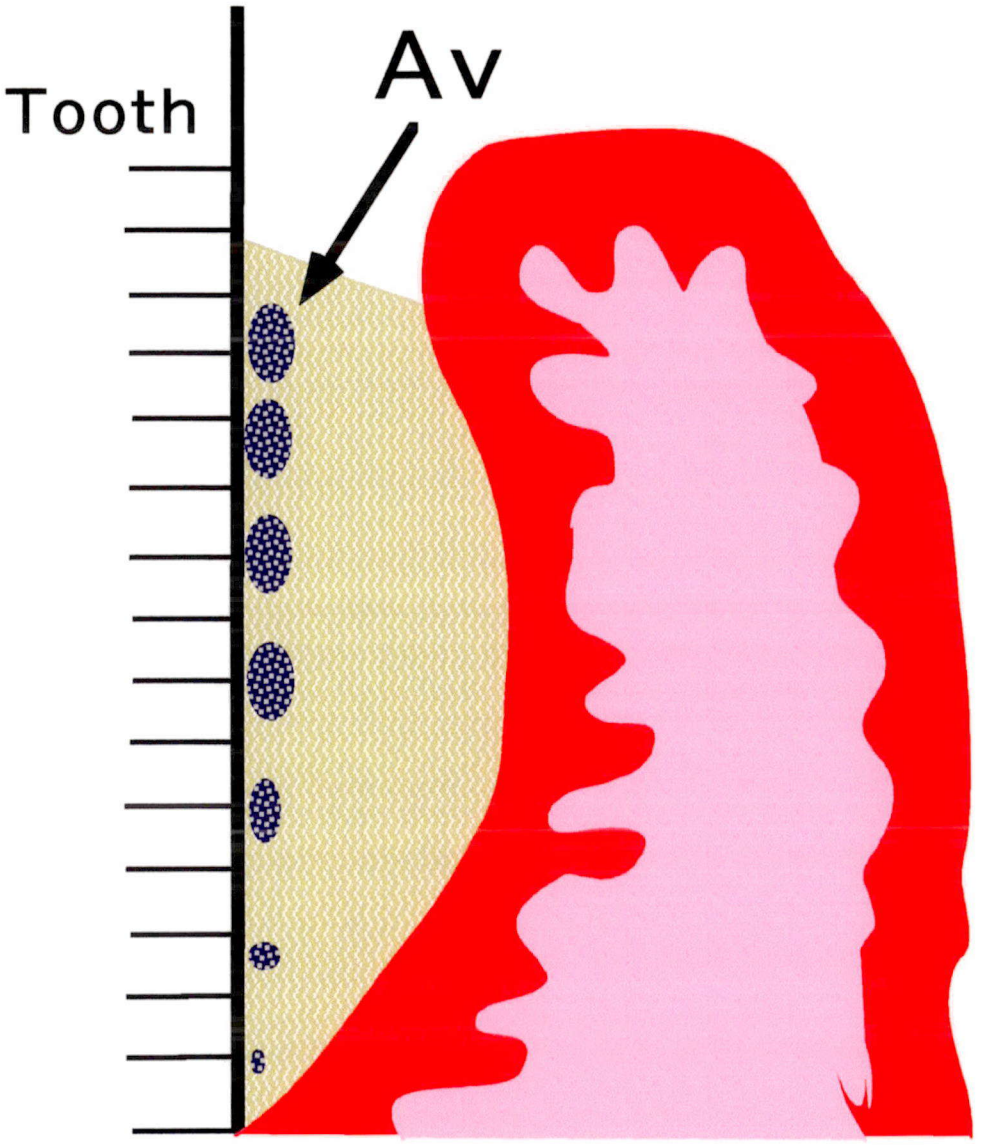

図21．*A. viscosus*の局在性の模式図
*A. viscosus*は，歯肉縁からポケット深部（プロービング深さ7 mm）でみられ，特にポケット浅部から中央部にわたる歯根付着性プラークに局在する傾向がみられた。

表 1

被験者および被験部位の術前所見

患者	性別	年齢	試料No.	被験歯	被験部位	プロービング深さ
a	男	54	1	41	遠心	6-8（mm）
			2	42	近心	5-6
b	男	48	3	41	遠心	6-9
			4	32	近心	8
c	女	32	5	31	近心	7-8
d	女	56	6	22	遠心	5
e	男	49	7	34	近心	8
			8	24	遠心	8-10
			9	43	近心	8-10
f	男	47	10	14	近心	7-10
g	女	60	11	11	遠心	6-10
			12	21	近心	6-8

表 2

抗血清の調製およびその吸収操作に用いた抗血清と細菌の組み合わせ

抗血清の調製に用いた細菌	吸収操作に用いた細菌
Campylobacter rectus ATCC 33238	–
Eikenella corrodens 1073	–
Fusobacterium nucleatum 1436	*P. nigrescens* ATCC 33563
Porphyromonas gingivalis 381	*P. nigrescens* ATCC 33563
Prevotella nigrescens (*intermedia*) ATCC 33563	*P. gingivalis* 381
Treponema denticola ATCC 33520	–
Actinomyces viscosus ATCC 19246	*P. nigrescens* ATCC 33563 *Actinomyces naeslundii* ATCC 12104

ウサギ抗血清 1 ml に，凍結乾燥菌体 20 mg を加え，37 ℃ で 1 時間，続いて 4 ℃ で12 時間吸収操作を行った。

表３ａ

吸収操作後の抗血清と各種口腔内細菌との反応性（１）

細菌名（グラム陰性菌）	抗血清						
	抗Cr	抗Ec	抗Fn	抗Pg	抗Pn	抗Td	抗Av
Porphyromonas gingivalis 381 (Pg)※	−	−	−	+	−	−	−
Porphyromonas gingivalis W50	−	−	−	+	−	−	−
Porphyromonas endodontalis ATCC 35406	−	−	−	−	−	−	−
Prevotella intermedia ATCC 25611	−	−	−	−	+	−	−
Prevotella nigrescens ATCC 33563 (Pn)	−	−	−	−	+	−	−
Prevotella melaninogenica TD−1	−	−	−	−	−	−	−
Actinobacillus actinomycetemcomitans ATCC 29522	−	−	−	−	−	−	−
Campylobacter rectus ATCC 33238 (Cr)	+	−	−	−	−	−	−
Eikenella corrodens 1073 (Ec)	−	+	−	−	−	−	−
Fusobacterium nucleatum 1436 (Fn)	−	−	+	−	−	−	−
Treponema denticola ATCC 33520 (Td)	−	−	−	−	−	+	−

＋：細菌の菌体細胞は LSAB 法により赤色～濃桃色に染色される。

－：細菌の菌体細胞は染色されない。

※：図表中に用いた略称

表３ｂ

吸収操作後の抗血清と各種口腔内細菌との反応性（2）

細菌名（グラム陽性菌）	抗血清						
	抗Cr	抗Ec	抗Fn	抗Pg	抗Pn	抗Td	抗Av
Actinomyces viscosus ATCC 19246 (Av)	−	−	−	−	−	−	+
Actinomyces naeslundii ATCC 12104	−	−	−	−	−	−	−
Lactobacillus casei ATCC 4646	−	−	−	−	−	−	−
Lactobacillus plantarum ATCC 8014	−	−	−	−	−	−	−
Eubacterium alactolyticum ATCC 17927	−	−	−	−	−	−	−
Eubacterium nodatum ATCC 33099	−	−	−	−	−	−	−
Propionibacterium acnes ATCC 11829	−	−	−	−	−	−	−
Peptostreptococcus micros GIFU 7745	−	−	−	−	−	−	−
Staphylococcus aureus FDA 209 P	−	−	−	−	−	−	−
Streptococcus mutans MT 8148	−	−	−	−	−	−	−
Streptococcus sobrinus B 13	−	−	−	−	−	−	−
Streptococcus sanguis ST−3	−	−	−	−	−	−	−

表 4

各試料において陽性反応が検出された抗血清

試料No.	陽性反応が検出された抗血清
1.	抗*P. gingivalis*血清, 抗*P. nigrescens*血清, 抗*C. rectus*血, 抗*A. viscosus*血清
2.	抗*P. gingivalis*血清, 抗*C. rectus*血清, 抗*E. corrodens*血清, 抗*F. nucleatum*血清, 抗*A. viscosus*血清
3.	抗*C. rectus*血清, 抗*F. nucleatum*血清
4.	抗*P. gingivalis*血清, 抗*A. viscosus*血清
5.	抗*P. gingivalis*血清, 抗*F. nucleatum*血清, 抗*T. denticola*血清
6.	抗*E. corrodens*血清, 抗*A. viscosus*血清
7.	抗*P. gingivalis*血清, 抗*E. corrodens*血清
8.	抗*P. gingivalis*血清, 抗*P. nigrescens*血清, 抗*C. rectus*血清 抗*F. nucleatum*血清, 抗*T. denticola*血清
9.	抗*P. gingivalis*血清, 抗*T. denticola*血清
10.	抗*P. gingivalis*血清, 抗*P. nigrescens*血清, 抗*C. rectus*血清
11.	抗*P. gingivalis*血清, 抗*P. nigrescens*血清, 抗*F. nucleatum*血清, 抗*T. denticola*血清, 抗*A. viscosus*血清
12.	抗*E. corrodens*血清, 抗*F. nucleatum*血清