原 著

実験う蝕予防の研究

I. Wister 鼠の実験う蝕研究に於ける EDTA—鉛注射による 硬組織内時刻描記法の応用

大 西 正 男* 尾 崎 文 子*

三 村 二** 小 椋 秀 亮** 玉 置 幸 子**

実験動物にう蝕を作って、これに各種の因子を加え、その阻止的あるいは促進的影響を研究することが広く行なわれている。¹⁾ 阻止あるいは促進を判断するためには、実験動物に出来たう蝕の有病率を算出し、それを対照鼠のそれと比較するのが普通の方法である。そして有病率は平均う蝕数²⁾あるいは破壊度^{3) 4)}で表現されている。このとき予め時刻を描記された歯をもつ鼠についてう蝕実験を行うことができれば、う蝕病変が象牙質内へ侵入する速さを算定するのに役立つと思われる。また歯牙形成中のある期間だけ、歯質形成に影響をもつ因子を働かせ、その範囲を即ち因子の働く前後の時刻を現す線で囲んでおくと、う蝕形成作用に対する異常部と普通の部の反応の相違を観察することもできそうである。このことはう蝕に抵抗性の歯質はどうすれば作れるかという予防歯科学上重要な問題を実験的に研究する新しい途を開くものかも知れない。

骨や歯の組織内にマークをつけることのできる因子は沢山ある。トリパン青やアリザリンレッド S を使う生体染色法、Ca⁴⁵、P³²、Sr⁹⁰ を使うオートラジオグラフ法等、これらに関しては Cleall, Perkins, Gilde⁵⁾ の Review に詳しい。上記の目的に対してどの因子を使うべきかを決めるには、

描記された線が明確であること、形成中の歯質のどの部分が描記されたのかよく知られていること、中毒性の少いこと、一度描記された位置が、その後歯質の形成とともに移動しないこと、描記された歯質はう蝕性侵襲に対する抵抗性を変えないこと等であると思う。岡田、三村の考案した⁶⁾ 鉛塩注射による硬組織内時刻描記法は上記の要求をかなり満していると思われる。中毒性に関しては梓沢、小野、三村 (1959)⁷⁾ によって改良された EDTA—鉛法が更に毒性が少なく良いと思われる。本研究では Pb—Na₂—EDTA によってマークされた Wister 鼠の歯がう蝕形成性食餌に対して、抵抗性を変更するかどうかについて観察されている。

I. 材料と方法

純系 Wister 鼠として購入した雄 2 匹と雌 8 匹を相互に交配して生れた仔鼠 143 匹が実験に使用された。分娩があれば生れた同腹仔鼠を雌雄大凡同等になるように 2 群に分け、1 群を EDTA—鉛描記鼠とし、他群を対照鼠とした。実験はすべて室温 23°C、湿度 50% の室で行なわれた。実験期間中に死亡その他の理由で discard したものがあつたために、成績は EDTA—鉛群 62 匹、対照群 54 匹、合計 116 匹に関する実験から得たものである。

生後 10, 12, 14 日令に 0.5% EDTA—鉛溶液を 40mg/kg の割合に皮下注射した。対照鼠には生

* 東京医科歯科大学歯学部予防歯科学教室
(主任：大西正男教授)

** 東京医科歯科大学歯学部歯科薬理学教室
(主任：三村 二教授)

昭和40年9月17日受付

理的食塩水のようなものを注射しなかった。生後3週令までに大凡離乳するので、その後は当教室で6 PMVと呼んでいるう蝕形成性食餌を両群に与えた。水は水道水を自由に与えた。実験食を90日与えた後クロロホルム麻酔で殺し、上下顎を分離し、10%中性ホルマリン中に固定保存した。

6 PMVの組成

砂	糖	600 g
澱	粉	210 g
カゼイン (工業用)		100 g
オリーブ油		30 ml
混合塩		50 g
パンビタン		10 g

混合塩の組成は CaCO_3 544.08 g, MgCO_3 25.00 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 32.80 g, NaCl 69.00 g, KCl 112.00 g, KH_2PO_4 (無水) 212.00 g, $\text{FePO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 20.50 g, $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0.51 g, $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$ 0.31 g, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 1.46 g である。

う蝕の有病率では、12本の臼歯に発見されるう蝕⁸⁾を数え、平均う蝕数で表した。観察は10倍実体顕微鏡下で JIS 規格新 8 号絹針を用いて行った。

EDTA-鉛の描記線を顕出するには岡田、三村の方法に従い、その後ヘマトキシリンで後染色した。鼠の体重測定はう蝕形成性食餌を与える直前から始め、1週間に2回の秤量を90日間続けた。

Fig 1. Frequency distribution of cavities produced in Pb-marked and control Wister rats

II. 成績

両群の平均う蝕数は算術平均で時刻描記鼠群は、8.76、対照群8.50となった。母集団の型が不明なために両方の度数分布に差がないと仮定して χ^2 -testを行ったが、両群の平均う蝕数の差に有意差は認められなかった(図1)。

実験開始直前の体重(W_0)と実験終了時の体重(W)の平均値と標準偏差はそれぞれEDTA-鉛群 $34.0 \pm 5.7\text{g}(W_0)$, $174.8 \pm 64.9\text{g}(W)$ と対照群 $33.0 \pm 7.1\text{g}(W_0)$, $167.5 \pm 67.3\text{g}(W)$ であった。体重の頻度分布は正規分布と見做されたので、2群間の平均 W_0 および平均 W の差の検定を行ったが有意ではなかった。

EDTA-鉛注射群の顕微鏡標本には3臼歯とも象牙質内に3本の黒褐色の線が入っていた(図2)。ただし第一臼歯では歯髄寄りにあり、第三

Fig 2. Showing three Pb-marked lines in the dentin of an upper 3rd molar.

Fig 3. A. Showing disappearing Pb-line at the bottom of a fissure. The surrounding dentin stained differently by hematoxylin.

B. Infectious invasion does not produce any visible disturbance at Pb-lines under a microscope in low dry magnification.

臼歯では反対にエナメル質に近接していた。裂溝底に相当する象牙質部分の鉛線は、時に感染像を認めないのに消失していた(図3A)。また細菌感染をうけている歯細管は非常に深く侵入され、必ずしも隣在している数本が平行して犯されていないので、感染の前線は直線的でなく、その深さを決めることは不可能であった。興味のあることは、感染をうけている部分の鉛線は組織学的には殆んど消失していないことであった(図3B)。もちろん、歯質の破壊が高度になれば鉛線は認められない。

III. 考 察

実験成績から、EDTA一鉛溶液を生後10~14日の幼鼠に40mg/kg宛3回皮下注射しても急性中

毒死することもなく、またその後の成長にも影響なく、更に鉛線により変化した象牙質はう蝕性侵襲に対して促進的でも阻止的でもなかったと考えられる。岡田、三村によれば、鉛の沈着部位はプレデンチンと象牙質の境界であるという⁶⁾このことから鉛線の位置が3種の臼歯で少しずつ片寄っていたことは、三臼歯の石灰化時期がずれているからであると説明できる。そして3本の鉛線の間に挟まれた象牙質は4日間に形成された量に相当する。実験成績と以上の考察からするとう蝕の進行速度を犯された象牙質を形成するのに要する日数で表現できることを本実験の最初に期待したが、歯細管の感染している組織像を見ると、う蝕性変化の最前線を決めることが非常に困難であるために鉛線でう蝕性感染の浸入程度を表わすことは、かなり具体的でないと思われた。しかし鉛線で囲まれた象牙質に表れる組織反応の差異を鉛線の外にある部分の変化と比較することは可能であると思えた。

象牙質に表われた変化と鉛線の関係に対する考察はう蝕病変の本質に関係する重要な問題と考えられるので、実験を追加し、次の論文で述べることにする。

要 約

歯が石灰化中の幼 Wister 鼠に EDTA一鉛を皮下注射すると“鉛線鼠”ができる。この鼠の成長は普通と変らないし、またう蝕形成性食に対して抵抗性でもなく、感受性でもない。この実験的に作られた歯を持つ鼠は歯質内のマークされた鉛線に囲まれた部分とその外圍のう蝕感受性比較研究に使用できると考察された。象牙質の変化と鉛線の関係の重要性が指摘された。

参 考 文 献

1. 大西正男：齲蝕予防の理論，歯界展望，23：550，1960.
2. Cox, G. J., Dodds, M. L., Dixon, S. F. and Matuschak, M. C.: Experimental Dental Caries III, A system of recording corn meal caries

- in rats. *J. Dent. Res.*, **18** : 469, 1939.
3. Shaw, J. H., Schweigert, B. S., McIntire, J. M., Elvehjem, C. A. and Phillips, P. H.: Dental caries in the cotton rat. I. Method of study and Preliminary nutritional Experiments. *J. Nutrit.* **28** : 333, 1944.
 4. Sognnaes, R. F.: Experimental rat caries. II. Location, sequence and extent of carious lesions produced in the norway rat when raised on a generally adequate, finely powdered, purified ration. *J. Nut.* **39** : 139, 1949.
 5. Cleall, J. F., Perkins, R. E. and Gilda, J. E.: Bone marking agents for the longitudinal study of growth in animals. *Arch. Oral Biol.*, **9** : 627, 1964.
 6. 岡田正弘, 三村 二: 鉛塩に依る骨及び歯牙組織新生化部位生体染色法, *口病誌*, **11** : 365, 1937.
 7. 梓沢 博, 小野竜馬, 三村 二: 硬組織の生理及び薬理 (第62報) Pb-Na₂-EDTA を用いる硬組織内時刻描記法の試み, *日薬理誌*, **55** : 30, 1959.
 8. 大西(正), 尾崎: 実験う蝕予防の研究, II. Wistar 鼠に作った糖害う蝕の発生部位と罹患度の表現方式, *口衛誌*, **15** : 3, 1965.

PREVENTION OF EXPERIMENTAL RAT CARIES

I. Tooth marking by EDTA-Pb for the Experimental Caries Study in Wister Rats

BY

Masao ONISI, Fumiko OZAKI

Department of Preventive Dentistry

Tasuku MIMURA, Hideaki OGURA and Sachiko TAMAOKI

Department of Dental Pharmacology

A rat marked in its dentin by some bone or tooth marker during the dentinogenetic studium, being exposed to the caries producing diet after weaning would be useful to estimate the depth of the carious lesion and the effect of factors to influence dentinal calcification. The results from experimental caries produced on this Pb-marked rat will bring some more favor for caries research. Working on such rat tooth, on the other hand, rat dentin marked by Pb injection must not exert any effect on general growth of the rat and developement of the carious lesion.

About half of total 143 Wister rats, obtained from two females and 8 males were injected with aqueous solution of $\text{Pb-Na}_2\text{-EDTA}$ at 10th, 12th, 14th days after birth. After weaning, all animals were challenged by the caries-producing diet, 6PMV, for 90 days. Both groups, Pb-marked and control, were compared with respect of average number of produced occlusal cavities or lesions and body weights. Thereafter, tooth was decalcified in the decalcifying solution saturated with H_2S and sectioned for the microscopic examination.

The slightest differences of average lesions and body weights in both groups at the end of experiment were found but proved to be insignificant by statistical treatment (Fig. 1). Three black lines marked by Pb injection were usually found in dentin under a microscope (Fig. 2). In few cases, however, part of the lead-lines disappeared discontinuously at the bottom of fissure (Fig. 3-A). The deepest front of bacterial invasion of one dentinal tubule reaches extremely profound but at the nearest tubule, it appears almost unaffected. Therefore, instead of primal assumption, the degree of invasion by carious attack could not estimate by these lines. However, this rat could be useful tool for the study of carious lesion and resistance of dentin against cariogenic agents, when they were added during two EDTA-Pb injections.

Much stress was placed on the findings at the lead lines which would not receive any visible affection by bacterial invasion (Fig. 3-B). Final disscussion on this findings will appeared on the succeeding report.