原 著

唾液による齲蝕活動性迅速判定法としての Resazurin Disc の変色特異性

眞 木 吉 信* 山 本 秀 樹* 松 久 保 隆*
高 江 洲 義 矩* 渋谷 睦** 木 下 雄 一**
斉 藤 齊** 田 中 文 夫** 浅 見 邦 明**

概要：従来から種々の齲蝕活動性試験が提唱されてきたが、これらの試験法は細菌培養やその判定に高価な装置と比較的長時間を要する欠点があった。本研究は唾液中細菌が、培養や機器を要せずに resazurin の色調を短時間（15分間）で変化させることに着目した Resazurin Disc 法について種々検討を行ったものである。

S. mutans をはじめとする齲蝕原性菌および混合唾液を検体として Resazurin Disc の処方を検討した結果、0.0275% resazurin sodium salt, 0.2% PVA, 10% sucrose からなる調製 disc が最も鋭敏な色調変化を呈した。この反応は32-37°C, 15分間で青紫色→紅紫色→紅色と変化し、最終的には白色（脱色）を呈するようになる。このような変色には特定の生菌が一定量以上の菌数で存在することが必要であり、特に、*S. mutans*, *S. mitis*, *S. faecalis*, *S. aureus*, *L. casei* および *B. subtilis* のグラム陽性菌群において著明な色調変化が認められた。さらに、この disc の変色段階は唾液中の *S. mutans* および *Lactobacilli* の菌数と関連性のあることが認められた。次に、resazurin の変色原理を、細菌ならびに混合唾液検体について検討した結果、resazurin 溶液の可視部および蛍光スペクトルは、化学的に還元した溶液の吸収スペクトルと一致し、酸による変色のスペクトルとは異なるものであることを確認した。このことは細菌または唾液による resazurin の変色が、酸産生による pH の低下に基づくものではなく、還元作用による反応であることを示唆している。

索引用語：Resazurin Disc, 変色特異性, 唾液, 齲蝕活動性試験

緒 言

齲蝕の発病性と口腔内環境因子および宿主因子との関係を調べるために、一般に“齲蝕活動性試験¹⁻³⁾”と総称されてきた種々の評価方法が、従来から数多く報告されてきた。

現在、わが国では齲蝕活動性試験として、カリオス

タット^{4,5)}のように歯垢を検体とした方法や、Snyder test⁶⁾, ST メディア⁶⁾, および MSBB⁷⁾等の唾液を検体としたものなどが知られているが、これらの試験法はいずれも培養装置を必要とし、判定に24~72時間と比較的長時間を要する。これに対して Green⁸⁾, Rapp⁹⁾, 中村ら¹⁰⁾は pH 指示薬および酸化還元指示薬として古くから広い分野で利用されている resazurin^{11,12,13)}を用

* 東京歯科大学口腔衛生学教室（主任：高江洲義矩教授）

** 昭和薬品化工（株）研究所

Specific Color Reaction of Resazurin Disc by Saliva as A Rapid Caries Activity Test

Yoshinobu MAKI, Hideki YAMAMOTO, Takashi MATSUKUBO Yoshinori TAKAESU, Mutsumi SHIBUYA, Yuichi KINOSHITA, Hitoshi SAITO, Humio TANAKA, Kuniaki ASAMI

* Department of Preventive and Community Dentistry Tokyo Dental College (Director: Prof. Yoshinori TAKAESU)

** Showa Yakuhin Kako Co., LTD. Research Institute.

昭和58年5月7日受付

いて、短時間で齲蝕活動性を判定し得る方法を報告している。

Green は唾液の酸化還元能を緩衝液中で resazurin を用いて検討し、齲蝕現症との相関を認めている⁸⁾。Rapp はパラフィンワックス刺激唾液の reductase 活性を resazurin を用いて検討し、15分後の色調変化と齲蝕活動性との関連性を明らかにし、Fifteen minute caries test として報告している⁹⁾。中村らは sucrose ならびに sodium azide を含む resazurin 溶液(緩衝液なし)での菌垢による色調の変化から齲蝕活動性を判定する S-3105 (サンテスター®)を開発している^{10,14)}。

われわれは、Kanazawa and Kuramata¹⁵⁾による resazurin の感受性 disc 法への応用に着目し、混合唾液を用いた齲蝕活動性迅速判定のための Resazurin Disc 法(RD 法)を報告した¹⁶⁾。本研究の目的は、迅速に齲蝕活動性を判定するために、Resazurin Disc の処方を決し、一定の反応条件を選択すること、Resazurin Disc の変色段階と唾液中各種細菌数との関係を明らかにし、さらに resazurin の特異的な変色機構を明らかにすることにある。

実験材料および方法

1. Resazurin Disc の処方

1) Resazurin Disc の調製

Resazurin Disc (以下 RD と略す)は Table 1 に示したように resazurin sodium salt (東京化成), polyvinyl alcohol (PVA, P<1,500, 日本合成化学), および炭素源を加えた処方で溶液を調製し、直径8mmの円形の濾紙片にこの溶液を含浸し乾燥させたものである。なお、炭素源としては、sucrose (三晃製薬), glucose (岩城製薬), fructose (東京化成), maltitol (東京化成), coupling sugar-C (林原生物化学研究所) および xylitol (東京化成)を使用した。

2) 供試菌株

供試した菌株は、Table 2 に示した9菌種12菌株である。菌数の調整は McFarland の濁度法に準じた。

3) 被検菌液の調製

供試菌株は Trypticase soy broth (BBL) で 37°C 48 時間培養を行い、3,000rpm 15分間遠沈後上清を除し、pH 6.98 BMG (1 l 中 sodium chloride 8.5g, potassium phosphate monobasic 300mg, sodium phosphate dibasic 600mg および gelatin 100mg を含む) 30ml で懸濁し、4回洗浄後ブイヨンにて McFarland 3 (9 × 10⁸CFU/ml 大腸菌換算) に希釈した。

ヒト混合唾液は食後3時間以上経過後、午前11時に約5ml 採取し、ただちに実験に供した。

4) RD 法の判定基準

被検液約30μl をガラスキャピラリーで RD に接種し、直径30mmの透明塩化ビニルフィルム2枚ではさんで通気を遮断し、37°C で15分間加温した。その後ただちに RD の検液接種面の色調の変化を標準色調表を用いて、－：変化なし、＋：わずかに紅紫色に変化、++：紅紫色～紅色に変化、+++：紅色～白色(脱色)に変化したものの4段階に判定した。

2. 標準菌株による RD の変色特異性の検討

1) 菌株による変色

Table 3 に示した17菌種37標準菌株を用いて、1-3)の方法に準じて菌数を 9 × 10⁸ CFU/ml に調整し、RD Lot No. R05 に接種し、菌種による変色特異性を観察した。

2) RD の変色と *S. mutans* Ingbritt 株菌数との関係

RD 変色性のヒト由来の代表的菌株として *S. mutans* Ingbritt 株を用いて菌数と変色の程度との関係を検討した。1-3)の方法に基づき菌数を 9 × 10⁸ CFU/ml に調整した broth を2, 10, 20および100倍にブイオンを加えて希釈し、RD Lot No. R05 に接種した。

3) RD の変色に及ぼす温度条件と反応時間の検討

反応温度27°C, 32°C および37°C, 反応時間5分, 10分, 15分および30分に条件を設定し、供試菌株として、*S. mutans* Ingbritt 株, *P. aeruginosa* ATCC 27853 株および *L. casei* IAM 1045 株を使用し、その菌数を 9 × 10⁸ CFU/ml に調整し RD Lot No. R05 に接種し変色反応条件の検討を行った。

4) 菌体の各種処理条件と RD の変色

供試菌株として *S. mutans* PS-14 株, *S. mutans* Ingbritt 株, *S. faecalis*, ATCC 29212 株を用い、前2者は Trypticase soy broth で6時間 (pH 6.2), 後者はブイオンで一夜培養 (pH 6.4) し、それぞれ 9 × 10⁸ CFU/ml に菌数を調整し、RD Lot No. R05 で++と判定されることを確認して菌液試料とした。また RD で++と判定されるヒトの唾液を試料として用いた。これらの試料を以下に示す方法で処理し、処理後 RD に再度接種した。

- i) pore size 0.45μm メンブランフィルター (millipore) にて濾過後の濾液
- ii) 13,000rpm 15分間遠心分離後の上清
- iii) ホルマリン添加 (10v/v %)

iv) 塩酸テトラサイクリン添加 (2,000 μ g(p)/ml)

v) 60°C 30分間加温

なお、各処理後の試料の生菌の有無を確認するために、処理液を Trypticase soy broth に接種した。

3. ヒト混合唾液中の生菌数と RD の変色

RD Lot No. R05 で、卅, 卅, +および-と判定された成人被験者各群 3~6名の唾液中 *S. mutans*, *Lactobacilli*, 総レンサ球菌数および総菌数を測定し、RD の判定結果と唾液中生菌数との関係を検討した。唾液試料は食後3時間以上経過した混合唾液を採唾し、一部を RD 判定に供し、残余の試料をただちに各段階に希釈して細菌数測定に供試した。

S. mutans 数測定には Mitis Salivarius agar (Difco) に20% sucrose および0.2U/ml bacitracin を添加した MSB agar¹⁷⁾, 総レンサ球菌数測定には Mitis Salivarius agar を使用し、培地上に50 μ l を塗布拡散し、37°C 24時間嫌気培養後、室温で好氣的に24時間放置し菌数を計測した。*Lactobacilli* 数測定には, Rogosa SL agar (Difco) を使用し、唾液試料1ml を混釈後37°C 72時間嫌氣的に培養した後、菌数測定を行った。混合唾液中総菌数測定には BCY 培地¹⁸⁾ の変法を用いた。培地は H₂O 1l 当たり、GAM 寒天培地 (ニッスイ) 74g, Casitone (Difco) 4g, Yeast extract (Difco) 5g, Cystein HCl (東京化成) 0.5g を加え pH 7.2 とした後滅菌 (121°C 15分間) し、5%脱線維馬血液 (日本生物材料センター) を添加したものである。この培地を10ml 分注した平板に唾液試料50 μ l 滴下し、塗布拡散後37°C 24時間嫌気培養し、24時間好気培養後、総菌数を計測した。

4. 各種酸による RD 変色の検討

RD の処方中に含まれる resazurin は pH 指示薬としても使用されている。そこで Table 7 に示した11種類の酸を用いて各 pH 溶液を調製し、RD Lot No. R05 に接種し変色の pH 域を観察した。すべての酸溶液は0.1N とし、0.1N sodium hydroxide にて pH を調整した。

5. Resazurin 変色原理の検討

resazurin の水溶液は青紫色を呈し、その最大吸収スペクトルは600~605nm の範囲にある。この水溶液の色調は pH の低下および還元作用で変色し、添加した検体により異なる。resazurin は Fig. 1 に示したように、還元されて resorufin (紅紫色) に、さらに最終的には hydroresazurin (脱色) になることが知られており、この resorufin は蛍光物質であることも判明している。そ

Fig. 1 Oxidation-reduction process of resazurin

こで RD の変色原理を明らかにするために、resazurin 溶液 (resazurin sodium salt 0.006mg/ml, sucrose 100 mg/ml, pH 6.5) を酸 (lactic acid), 還元剤 (sodium bisulfite), 各種菌株およびヒト混合唾液を用いて変色させ、可視部吸収スペクトル (対照: 精製水400~700nm), 蛍光スペクトル (Excitation spectral bandwidth 15nm, Emission 550~630nm, spectral bandwidth 4 nm) を測定した。各スペクトルの測定には、分光光度計 (日立 200-20形), 分光蛍光光度計 (島津 RF-501 形) を使用した。

1) 酸による resazurin 溶液の変色

0.1N lactic acid および0.1N sodium hydroxide で pH 6.47, 5.74, 4.80, 3.72および2.38に調整した resazurin 溶液の各スペクトルを測定した。

2) 還元剤による resazurin 溶液の変色

還元剤として sodium bisulfite 1 mg/ml を添加した resazurin 溶液の各スペクトルを測定した。

3) 混合唾液による resazurin 溶液の変色

RD で卅, +および-と判定されたヒト混合唾液1ml を resazurin 溶液に加え20ml とし、37°C 15分間加温後ただちに氷水中で冷却し、3,000rpm 10分間遠心分離し上清の各スペクトルを測定した。

4) 標準菌株による resazurin 溶液の変色

S. mutans PS-14株, *S. mutans* Ingbritt, 株, *S. faecalis* ATCC 29212株, *S. aureus* ATCC 25923株, *S. epidermidis* ATCC 12228株, *E. cloacae* ATCC 23355株, *L. casei* IAM 1045株, *B. subtilis* ATCC 6633株, *E. coli* INHJ 株, *P. aeruginosa* ATCC 27853株, *K. pneumoniae*, ATCC 10031 株, *C. albicans* の10菌種11菌株について1-3) の方法に準じて培養ならびに BMG 洗浄を行い、各々 resazurin 溶液に懸濁した (9 $\times$ 10⁷ CFU/ml)。この懸濁液は、37°C 15分間加温後ただちに氷水中で冷却し、3,000rpm 10分間

遠心分離し上清の各スペクトルを測定した。

5) Resazurin 溶液の変色に与える菌数の影響

S. mutans Ingbritt を培養、洗浄し 3×10^8 , 3×10^7 および 3×10^6 CFU/ml として resazurin 溶液に懸濁した。37°C 15分間加温後ただちに氷水中で冷却し、3,000rpm 10分間遠心分離し上清の各スペクトルを測定した。

実験結果

1. Resazurin Disc の処方の決定

Table 1 に示した各種処方で試作した RD Lot No. R01~R11 の被験液による変色の判定結果を Table 2 に示した。供試菌株による RD の変色については、*S. mutans*, *S. faecalis*, *S. aureus*, *L. casei* および *B.*

Table 1 Preparation of Resazurin Discs with various compositions.

Lot No.	R01	R02	R03	R04	R05	R06	R07	R08	R09	R10	R11
Prescription											
Resazurin sodium % salt	0.0275	0.0275	0.00275	0.01375	0.0275	0.0275	0.0275	0.0275	0.0275	0.0275	0.0275
PVA %	—	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
Sucrose %	—	—	10	10	10	—	—	—	—	—	—
Glucose %	—	—	—	—	—	10	—	5.24	—	—	—
Fructose %	—	—	—	—	—	—	10	4.76	—	—	—
Maltitol %	—	—	—	—	—	—	—	—	10	—	—
Coupling sugar-C %	—	—	—	—	—	—	—	—	—	10	—
Xylitol %	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	10

Table 2 Color reaction* of Resazurin Discs to bacterial strains and human mixed saliva

Lot No.	R01	R02	R03	R04	R05	R06	R07	R08	R09	R10	R11
Strains**											
<i>S. mutans</i> PS-14	++	++	++	++	++	+	##	++	++	+	+
<i>S. mutans</i> Ing	+	+	##	++	##	++	++	##	+	+	—
<i>S. faecalis</i> ATCC 29212	+	+	##	##	##	##	##	##	##	##	##
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	++	++	##	++	##	##	##	##	##	##	##
<i>S. epidermidis</i> ATCC 12228	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>E. cloacae</i> ATCC 23355	+	+	—	—	—	—	—	++	##	—	—
<i>L. casei</i> IAM 1045	+	++	+	+	++	+	+	+	+	+	+
<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	++	++	++	##	##	##	##	##	##	##	++
<i>E. coli</i> NIHJ	—	—	—	—	—	—	—	—	++	—	—
<i>R. aeruginosa</i> ATCC 27853	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>K. pneumoniae</i> ATCC 10031	—	—	—	—	—	—	—	++	—	##	—
<i>C. albicans</i>	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
subjects*** sex age											
H. S. male 34yr	++	++	##	##	##	++	++	##	##	++	++
K. O. male 25yr	+	++	++	++	++	++	++	##	++	+	—
Y. T. female 28yr	—	—	+	+	+	+	+	+	+	+	—
Y. M. male 27yr	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

* Color reaction score of Resazurin Disc

— : blue, + : bluish violet, ++ : reddish violet, ## : red or colorless

** 9×10^8 CFU/ml

*** Color change with approx. 30 μ l of the mixed saliva.

Table 3 Color reaction of Resazurin Discs prepared with representative strains

Strains, No.	(serotype)	pH*	RD**
<i>S. sanguis</i>	ATCC 10557	6.2	—
<i>S. mitis</i>	ATCC 9811	6.2	++
<i>S. salivarius</i>	ATCC 9759	6.0	—
<i>S. mutans</i>	AHT(a)	6.2	++
	OMZ(a)	6.4	++
	BHT(b)	6.4	+++
	107P(b)	6.4	+++
	PS-14(c)	6.2	++
	JC-2(c)	6.4	+++
	Ing(c)	6.2	+++
	B-13(d)	6.4	+++
	OMZ 176(d)	6.2	+
	AT-10(e)	6.0	+
	LM-7(e)	6.0	+
	OMZ 175(f)	6.2	++
	QP50-1(f)	6.4	+++
	6715(g)	6.2	++
<i>S. faecalis</i>	K1R(g)	6.2	+++
	ATCC 14506	6.4	+++
	ATCC 29212	6.0	+++
<i>S. aureus</i>	ATCC 6538P	6.4	+++
<i>S. epidermidis</i>	ATCC 12228	6.4	—
<i>E. cloacae</i>	ATCC 13047	6.4	—
	ATCC 23355	6.4	—
	ATCC 29249	6.2	—
<i>L. acidophilus</i>	IAM 1043	6.2	—
<i>L. bulgicus</i>	IAM 1120	6.4	—
<i>L. brevis</i>	ATCC 8287	6.2	—
<i>L. casei</i>	IAM 1045	6.4	++
<i>B. subtilis</i>	ATCC 6633	6.2	+++
<i>E. coli</i>	ATCC 25922	6.2	—
	NIHJ	6.2	—
	K12	6.2	—
<i>P. aeruginosa</i>	ATCC 9721	6.4	—
	ATCC 27853	6.4	—
<i>K. pneumoniae</i>	ATCC 10031	6.2	—
<i>C. albicans</i>		6.2	—

* pH of the medium after overnight incubation

** Color reaction observations were based on the McFarland 3(9×10^8 CFU/ml)

subtilis との反応において明らかな変色が認められた。処方中に炭素源を含むものは、変色の程度が強い傾向を示した。ただし、xylitol の場合は炭素源を含有しない処方と同様な傾向を示した。PVA 添加の変色に与える影響は微弱なものであった。この11種の処方中で、*S. mutans*, *L. casei* およびヒト混合唾液に対して最も鋭敏な変色の差を示した処方は Lot No. R05 であった。

2. 標準菌株による RD の変色特異性の検討

1) 菌株による変色

Table 3 に示したように、*S. mitis*, *S. mutans*, *S. faecalis*, *S. aureus*, *L. casei* および *B. subtilis* に特異的な変色が観察された。

2) RD の変色と *S. mutans* Ingbritt 株菌数との関係

Table 4 は *S. mutans* Ingbritt 株を用いて、生菌数と RD の判定結果を比較したものである。McFarland 3 の濁度の100倍希釈 (9×10^8 CFU/ml) とした時に初めて—(マイナス)と判定された。

3) RD の変色に及ぼす温度条件と反応時間の検討

Table 5 は温度条件と反応時間の変化に伴う RD の判定結果を示したものである。*S. mutans* Ingbritt 株は 32°C および 37°C 15 分間加温で変色がピークに達し、その後加温を継続することにより紅色から脱色するまでの緩慢な変色過程が進行した。*P. aeruginosa* ATCC 27853 株はいずれの条件においても変色が認められなかった。*L. casei* は 32°C および 37°C 15 分間加温である程度の変色は見られたが、ピークに達したのは 37°C 30 分間加温の条件であった。

4) 各種処理後の菌体による RD の変色

各種処理後の菌液試料ならびに混合唾液試料を RD に接種したところ、すべて変色は認められず、—(マイナス)と判定された。また、各処理後の試料を Trypticase soy broth に接種しても生菌の発育は観察されなかった。

3. ヒト混合唾液中の生菌数と RD の変色

混合唾液中の *S. mutans*, *Lactobacilli*, 総レンサ球菌および総菌数と RD の判定結果を Table 6 に示した。RD の各変色段階とそれぞれの菌数との間には関連性が認められた。*Lactobacilli* および総レンサ球菌の場合は、RD が—から+++へと変化するにつれて、ほぼ10倍のオーダーで菌数の増加が認められた。総菌数についても同様の傾向が見られた。*S. mutans* 数については、RD の判定が—・+の群と++・+++の群の2つの群間で大きな差異が認められた。

Table 4 Color reaction of Resazurin Discs with *S. mutans* Ingbritt at various concentrations of cells

Dilution (CFU/ml)	1 (9.0×10^8)	2 (4.5×10^8)	10 (9.0×10^7)	20 (4.5×10^7)	100 (9.0×10^6)
Strains, No.					
<i>S. mutans</i> Ing	‡‡	‡‡‡	‡‡	+	—

Table 5 Comparison of color development of Resazurin Discs for incubation times and temperatures.

Strains, No.	incubation time(min.)	RD color reaction*		
		27° C	32° C	37° C
<i>S. mutans</i> Ing	5	—	—	+
	10	—	+	‡‡
	15	‡‡	‡‡‡	‡‡‡
	30	‡‡	‡‡‡	‡‡‡
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	5	—	—	—
	10	—	—	—
	15	—	—	—
	30	—	—	—
<i>L. casei</i> IAM 1045	5	—	—	—
	10	—	—	+
	15	+	+	‡‡
	30	+	‡‡	‡‡‡

* 9×10^8 CFU/ml

4. 各種酸による RD 変色の検討

pH を調整した各種酸による RD の pH 変色域を Table 7 に示した。酸の種類により変色域は異なっているが、いずれの酸においても変色開始の pH は 5.5 以下であり、明瞭な変色が観察されたのは pH 5.0 以下であった。また、これらの酸による変色の色調は、菌株ならびに唾液による変色の色調と異なる黄紅色を呈した。

5. Resazurin 変色原理の検討

1) 酸による resazurin 溶液の変色

pH 6.47, 5.74, 4.80, 3.72 および 2.38 における resazurin 溶液の可視部吸収スペクトルと pH 6.47 および 2.38 における resazurin 溶液の蛍光スペクトルを Fig. 2 に示した。可視部において、初期 pH 6.47 で $\lambda_{\max}$ 603nm にあった resazurin の吸収は、pH が低下するに従って消失し、525nm 付近に弱い吸収が観察された。また、蛍光においても同様に pH 6.47 λ_{em} 630nm にあった蛍光が pH の低下とともに消失した。

2) 還元剤による resazurin 溶液の変色

Sodium bisulfite (NaHSO_3) 添加により還元された

resazurin 溶液の可視部吸収スペクトルと蛍光スペクトルを Fig. 3 に示した。可視部において $\lambda_{\max}$ 603nm にあった resazurin の吸収は、 NaHSO_3 の添加により消失し、 $\lambda_{\max}$ 573nm に resazurin の還元体である resorufin の吸収が認められた。蛍光においても同様に λ_{em} 630nm の resazurin の蛍光が消失し、 λ_{em} 590nm に resorufin の強い蛍光が観測された。

3) 混合唾液による resazurin 溶液の変色

RD で—, + および ‡‡ と判定された混合唾液添加の resazurin 溶液の可視部吸収スペクトルと蛍光スペクトルを Fig. 4 に示した。RD ‡‡ の試料では可視部において、還元剤添加のスペクトルと同様な $\lambda_{\max}$ 573nm の吸収が認められ、蛍光においても還元剤添加のスペクトルと同じ λ_{em} 590nm に強い蛍光が観察された。RD で+と判定された試料では、可視部においては、resazurin 由来の 603nm と resorufin 由来の 573nm の吸収が同時に見られ、蛍光においても、resazurin 由来の 630nm と resorufin 由来の 590nm に弱い蛍光が観察された。RD で— (マイナス) と判定された試料では、resazurin 由来の可視部 $\lambda_{\max}$ 603nm および蛍光 λ_{em} 630nm に変化は認められなかった。

なお、いずれの唾液添加 resazurin 溶液においても、各スペクトル測定後の pH は唾液添加直後の pH と比較し殆ど変化がなく、pH 6.0 以下に低下することはない。

4) 標準菌株による resazurin 溶液の変色

10 菌種 11 菌株の各添加 resazurin 溶液の可視部吸収スペクトルおよび蛍光スペクトルを Fig. 5-a~d に示した。*S. mutans*, *S. faecalis*, *S. aureus*, *L. casei* および *B. subtilis* は可視部ならびに蛍光スペクトルともに還元剤および唾液の結果と同様な resorufin 由来の $\lambda_{\max}$ 573 nm の吸収と λ_{em} 590 nm の強い蛍光が観測された。

5) Resazurin 溶液の変色に与える菌数の影響

S. mutans Ingbritt 株を 3×10^6 , 3×10^7 および 3×10^8 CFU/ml 添加した resazurin 溶液の可視部吸収スペクトルおよび蛍光スペクトルを Fig. 6 に示した。菌数の増加とともに還元体である resorufin 由来の可視

Table 6 Relationship between the score of Resazurin Discs and bacterial numbers.

Subjects (sex, age)	RD*	<i>S. mutans</i> (CFU/ml)	<i>Streptococci</i> (CFU/ml)	<i>Lactobacilli</i> (CFU/ml)	Total organisms (CFU/ml)
H. S (m, 34)	##	7.10×10^4	5.84×10^8	2.72×10^8	1.60×10^9
T. H (m, 28)	##	2.43×10^5	9.83×10^8	6.30×10^8	4.73×10^{10}
A. M (m, 25)	##	4.32×10^4	9.07×10^8	3.03×10^8	2.30×10^9
Y. S (m, 36)	##	1.53×10^5	6.03×10^8	9.33×10^8	3.90×10^9
S. H (m, 26)	##	8.83×10^4	2.57×10^8	8.67×10^8	7.81×10^8
Y. T (m, 32)	##	3.33×10^4	4.02×10^8	1.73×10^8	1.05×10^9
average		1.05×10^5	2.10×10^9	5.30×10^8	4.49×10^9
K. O (m, 25)	++	1.49×10^5	2.22×10^8	7.77×10^8	9.33×10^8
K. K (f, 24)	++	8.10×10^3	1.17×10^8	4.50×10^8	8.67×10^8
A. K (f, 24)	++	2.93×10^4	8.87×10^7	2.40×10^5	5.47×10^8
average		6.21×10^4	1.43×10^8	4.17×10^8	7.82×10^8
Y. H (f, 24)	+	3.90×10^2	1.65×10^7	2.57×10^5	8.33×10^7
H. Y (f, 28)	+	2.64×10^3	6.03×10^6	4.93×10^4	2.30×10^7
Y. T (f, 28)	+	7.80×10^2	2.55×10^7	1.43×10^5	4.60×10^7
S. Y (f, 31)	+	1.93×10^3	1.10×10^7	1.65×10^4	7.70×10^7
average		1.44×10^3	1.48×10^7	1.16×10^5	5.73×10^7
I. S (f, 26)	—	4.03×10^3	1.39×10^7	1.26×10^8	4.03×10^7
T. O (m, 29)	—	2.40×10^2	1.50×10^6	4.93×10^8	6.30×10^8
Y. M (f, 27)	—	1.80×10^3	4.70×10^6	2.39×10^4	2.97×10^7
S. I (m, 23)	—	5.87×10^2	7.50×10^5	3.77×10^3	3.07×10^6
F. T (m, 46)	—	5.27×10^3	4.14×10^6	9.70×10^2	3.00×10^7
average		2.39×10^3	5.00×10^6	6.97×10^3	2.19×10^7

* Color reaction score

Table 7 Color reactions of Resazurin Discs caused by various acids with different pH ranges

pH	1.0	2.0	3.0	4.0	5.0	6.0
Acids (0.1 N.)						
Hydrochloric acid			-----			
Sulfuric acid			-----			
Phosphoric acid			-----			
Formic acid			-----			
Acetic acid			-----			
Propionic acid			-----			
Lactic acid			-----			
Pyruvic acid			-----			
Fumaric acid			-----			
Succinic acid			-----			
Citric acid			-----			

部 573nm の吸収および 590nm の蛍光が出現し, resazurin 由来の可視部 603nm の吸収および 630nm の蛍光が消失した。

考 察

齦蝕活動性試験として開発した RD 法は, 約 30 μ l という比較的微量の混合唾液を試料とし, 32~37°C で 15 分間反応後の RD の変色状況で齦蝕活動性を判定できるという, きわめて迅速で簡易な方法である。特に反応温度については 32~37°C の温度域でほぼ同様な判定成績が得られることから, 37°C の恒温槽をかならずしも必要とせず, ヒトの体温で十分な反応温度が得られることが確認された。臨床応用を考慮した時には, RD を 15 分間上腕部内側に貼付して判定することで, 適切な条件設定となる¹⁰⁾。また, この条件設定は Rapp の test の 15 分後の判定区分, すなわち Blue, Orchid, Red, Colorless の 4 段階にほぼ一致する⁹⁾。

齦蝕活動性試験を実施するに際して, 被験者から得られる検体としては, 歯垢と唾液が最も頻繁に用いられる

Fig. 2 Peak shift and variation of visible and fluorescence spectrum of resazurin at various pH values.

Fig. 3 Peaks of visible and fluorescence spectrum of chemically reduced resazurin

が、いずれの検体を用いるのが有力かということについては一概には言えない。病因論的にみて、齲蝕の発現部位に密接に関与しているのは歯垢であるが、その試料を定量的に得るのは容易ではない。さらに、齲蝕の疫学解析資料^{19,20)}からみて、発病性の高い菌種・歯面を試料採取の対象菌として決定し、萌出後歯牙年齢に合わせた適切な時期に歯垢を採取することが望ましいことにな

る。

われわれは、混合唾液を検体として試料採取し、唾液中の菌またはその他の因子による変化を定量的に検出することを目的として、齲蝕発病性との関連を検討してきた。唾液を検体として用いる特色としては、(1) 採唾が容易であること、(2) 定量的に採取が可能であること、(3) 歯垢中の齲蝕原性菌の分布は菌種・歯面によって一様ではないのに対し、唾液は比較的均一な微生物叢を持つこと、(4) 唾液中の微生物のレベル、特に *S. mutans* に関しては、歯垢中のレベルを反映していること²¹⁻²³⁾、などが挙げられる。しかしながら、採唾の条件設定には、刺激の程度や採唾時期、さらに乳幼児での採唾法など今後検討を要する点が少なくない。

ヒト混合唾液による RD 反応と唾液中の *S. mutans*, *Lactobacilli*, 総レンサ球菌数および総菌数との関係を RD の変色段階に基づいて調べたところ、RD のスコアとこれらの菌群とは高い関連性のあることが判明した (Table 6)。また、37 種の標準菌株による RD の変色特異性の検討成績でも、*S. mutans* および *Lactobacilli* との関連性が示された (Table 3)。この結果は、重度齲蝕群で、*S. mutans*, *Lactobacilli* が多く検出されるという報告^{24,25)}と考え合わせ、RD による判定成績が齲蝕活動性の実態に深くかかわっていることを示唆するものである。

本実験に供試した菌株のうち、RD 変色性のものはす

Fig. 4 Relationship between peak shift of visible and fluorescence spectrum of resazurin and Resazurin Disc score of saliva.

べてグラム陽性菌であった。また予備的な検討においても、グラム陽性の *Actinomyces* が RD を変色するのに対して、グラム陰性の *Bacteroides* は変色しなかったことが確認されている。このように resazurin が特異的かつ短時間でグラム陽性菌群により変色されることは注目すべき現象であると考え。グラム陽性と陰性は、周知のごとく細胞膜の構造に違いがあり、RD の変色はこれらの相違に由来するのかも知れない。あるいは、RD の変色には一定量以上の生菌が必要で (Table 4)、生菌を除去または殺菌した後の培養液では変色が認められないことから、グラム陽性菌群の菌体膜付着酵素あるいは菌体内還元酵素が変色に関与しているとも推測される。

中村ら¹⁰⁾は齶触活動性試験液 S-3105 の検討において、resazurin の色調変化と pH の低下が併行するとして、resazurin 溶液の色調変化は細菌の酸産生量の指標となるとしている。そこで、RD の変色と pH の関係を検討するために、無機および有機酸 11 種類による RD 変色の pH 域を調べたところ、酸の種類により多少異なるが、いずれの酸においても変色をきたすのは pH 5.5 以下で、特に明瞭な変色は pH 5.0 以下において観察された (Table 7)。さらに、その変色の色調は、菌あるいは唾液による変色とは異なるものであった。次に、菌ならびに唾液を検体として、10% sucrose を含む resazurin 溶液を 37°C で 15 分間培養し、pH の低下を確認したところ、変色は認められたが、pH 変化は殆どなく、終始 pH 7.0 付近にあった。以上の結果より、RD の変色は pH、換言すれば酸産生以外の因子によるものと推測された。

Resazurin は pH 指示薬として用いられている一方、Fig. 1 に示した還元反応による変色過程が知られている。そこで resazurin 溶液の酸による変色と化学的に還元した場合の変色を、それぞれの溶液の吸収スペクトルの変化で比較したところ、pH による変色と還元による変色は、視覚的にも吸光度測定によるスペクトルの上からも明らかに異なることが判明した。次に、混合唾液ならびに RD 感受性菌を添加した resazurin 溶液の吸収スペクトルを比較したところ、両者は化学的に還元した溶液のスペクトルと良く一致した。このことは、唾液ならびに菌による変色は、明らかに還元作用によるものであることを示している。

供試菌株のうち、*S. mutans*, *S. aureus*, *S. faecalis*, *L. casei* および *B. subtilis* が特異的に還元剤と同様のピークを示したことは、RD の菌種による変色試験の結果と一致している。さらに resazurin 感受性菌の

Fig. 5-a, b Peaks of visible and fluorescence spectrum of resazurin caused by microorganisms.

Fig. 5-c, d Peaks of visible and fluorescence spectrum of resazurin caused by microorganisms.

Fig. 6 Peak shift of visible and fluorescence spectrum of resazurin caused by various CFU of *S. mutans* Ingbritt.

菌数とスペクトルの変化を観察すると、吸光度は菌数の増減により変動することが明らかになった。この事実は口腔内における唾液中 *Streptococci* ならびに *Lactobacilli* の菌数の多少による RD の変色段階の相違に一致している。

Resazurin が還元されて生成した resorufin は蛍光物質であり、その蛍光の強度は resorufin の濃度に比例する。本実験で得られた検液の可視部の吸光度と蛍光の強度との相関は、 $r=0.987$ と高い値を示したことから、可視部の吸光度を肉眼による判定と考えた場合、RD の変色の判定が、resazurin の還元の程度を判定しているものと考えられる。

RD は resazurin sodium salt, PVA および炭素源としての糖を種々の濃度で含ませ、乾燥させた濾紙片であるが、菌株による判定結果から、試作 Lot No. R05 (0.0275 % resazurin sodium salt, 0.2% PVA, 10% sucrose) が最も鋭敏な色調の変化を呈した。37°C 15分という条件で、標準菌株および混合唾液による RD の変色特異性をみた時に、resazurin sodium salt の濃度依存性は今回の結果からは認められなかった。PVA は増粘剤・糊剤や皮膜形成剤として医薬品に多く利用されている物質であるが、溶液の浸透圧を上昇させることから浸透圧形成剤としても使用されている²⁶⁾。Resazurin の変色に菌体内酵素が関与しているとすれば、PVA を添加することによりこれが溶出して resazurin の変色に影響を及ぼすことになると考えたが、本実験結果からは PVA 添加の有無の間には若干の差異が認められたにとどまった。これに対して、糖質添加の有無が変色に与える影響については、xylitol を除いて明らかな差異が認められ、糖質が変色の感度を増強するものと考えられた。使用糖質の中でも sucrose は菌および唾液を検体とした場合に、最も顕著な変色性を示した。さらに、本法に使用した resazurin 含有 disc は、保存安定性に優れており、操作も容易で、比較的低コストで供給することができる利点を有している。

なお、今回実験に供試した菌株のうち、RD 変色性のものはすべてグラム陽性菌であったことおよび RD 変色性の標準菌株とその菌の混合唾液中における菌数分布の検討などについて、今後、より詳細に究明する必要があると考える。また、

S. mutans, *Lactobacilli* および *Actinomyces* 等の齲蝕原性菌に対する特異的な感受性の向上を検討することも重要と思われる。本法と口腔内の齲蝕症状および進行性との関連、さらに、その予測性に関しては、カリオスタット®, ST メディア®, MSBB をはじめとする従来の齲蝕活動性試験を含めて、園児・学童ならびに成人での野外試験を現在継続し、その有用性を検討中であり、今後報告する予定である。

結 論

齲蝕活動性試験の1つとして開発した Resazurin Disc 法についての細菌ならびにヒト混合唾液を検体とした成績から次の結論を得た。

1. 試作 Resazurin Disc のうち、0.0275% resazurin sodium salt, 0.2% PVA, 10% sucrose 処方の disc が細菌ならびにヒト混合唾液において最も鋭敏な色調変化を呈した。

2. RD の反応は 32~37°C 15 分間で青紫色→紅紫色→紅色と変化し、最終的には白色(脱色)を呈するようになる。

3. RD の変色には特定の生菌の存在および一定量以上の菌数が必要であり、特に *S. mutans*, *S. mitis*, *S. faecalis*, *S. aureus*, *L. casei* および *B. subtilis* のグラム陽性菌において顕著な色調変化が認められた。

4. RD の変色段階は、ヒト唾液中の *S. mutans* および *Lactobacilli* 等の齲蝕原性菌数と関連性のあることが明らかになった。

5. Resazurin は pH 指示薬としても使用され、pH 5.5 以下で変色をきたすが、菌液ならびに唾液試料はともにこの pH 領域以上で、pH の影響によらず変色することが認められた。

6. 細菌ならびに混合唾液によって変色をきたした resazurin 溶液の可視部および蛍光スペクトルは、化学的に還元した resazurin 溶液のスペクトルと一致し、酸による resazurin 溶液変色のスペクトルとは異なっていた。このことは、細菌や混合唾液による resazurin の変色が、酸産生による pH の低下に基づくものではなく、還元作用によるものであることを示唆している。

文 献

- 岡本清纒：齲蝕活動性試験，口腔病会誌，21；61-68，1954.
- 榊原悠紀田郎：齲蝕活動性試験法の有用性について，口腔衛生会誌，9；194-201，1959.
- Snyder, M. L.: A simple colorimetric method for the diagnosis of caries activity, J. A. D. A., 28；44-49, 1941.
- 下野 勉，祖父江鎮雄：新しい齲蝕活性試験，歯界展望，43；829-835，1974.
- 下野 勉，水野 純，野々村栄二，森崎市治郎，増田典男，松村誠士，祖父江鎮雄：新しい齲蝕活性試験（カリオスタット）に関する研究，スナイダーテストとの比較，小児歯誌，14；6-18，1976.
- 弓削朝子，石塚詔子，金子信雄，佐川寛典，谷明，小中島論一，福原裕子，浅見邦明，斉藤 斉：う蝕活動性試験にアンブル化スナイダー培地の応用，日本歯科評論，458；213-220，1980.
- Matsukubo, T., Ohta, K., Maki, Y. Takeuchi, M. and Takazoe, I.: A semi-quantitative determination of *Streptococcus mutans* using its adherent ability in a selective medium, Caries Res., 15；40-45, 1981.
- Green, G. H.: Salivary oxidation-reduction rates and their relation to dental caries activity, J. Dent. Res., 39；699-700, 1960.
- Rapp, G. W.: Fifteen minute caries test, Ill. Dent. J., 31；290-295, 1962.
- 中村正一，山本洋一，岩本義史：新しいう蝕活動性試験法に関する研究，I. 試験液 S-3105 の開発と予備試験について，口腔衛生会誌，30；376-381，1980.
- 白坂昭治，久池井忠男：牛乳の品質改善に関する研究，III. 牛乳のレサズリン還元試験，獣医畜産新報，331；791-795，1962.
- Mashige, F., Imai, K. and Osuga, T.: A simple and sensitive assay of total serum bile acids, Clin. Chim. Acta, 70；79-86, 1976.
- 日本薬学会編：衛生試験法・注解，金原出版，東京，1973年版，1980，p. 244-245.
- 戸田恭司，新本正名，中村正一，渡辺達夫，岩本義史：新しい齲蝕活動性試験法に関する研究，II. 試験液 S-3105 の臨床応用について，口腔衛生会誌，30；382-387，1980.
- Kanazawa, Y. and Kuramata, T.: Resazurin disc method for rapid determination of drug sensitivities of microorganisms, J. Antibiotics, 19；229-233, 1966.
- 真木吉信，山本秀樹，松久保隆，高江洲義矩，渋谷 睦，斉藤 斉，浅見邦明：Resazurin Disc による齲蝕活動性迅速判定法，口腔衛生会誌，32；403-404，1982.
- Gold, O. G., Jordan, H. V. and van Houte, J.: A selective medium for *Sterptococcus mutans*, Archs oral Biol., 18；1357-1364, 1973.
- Ikeda, T. and Sandham, H. J.: A medium for the recognition and enumeration of *Streptococcus mutans*, Archs oral Biol., 17；601-604, 1972.

- 19) 竹内光春：疫学的齲蝕発病理論について，齒科学報，61；61-70，1961.
- 20) 松久保隆，真木吉信，佐塚仁一郎，波多江道子，高江洲義矩，竹内光春：個人の齲蝕発病性評価に基づく齲蝕予防プログラム，口腔衛生会誌，32；79-91，1983.
- 21) Köhler, B., Petterson, B. and Bratthall, D.: *Streptococcus mutans* in plaque and saliva and the development of caries, Scand. J. dent. Res., 89；19-25, 1981.
- 22) van Houte, J. and Green, D. B.: Relationship between the concentration of bacteria in saliva and colonization of teeth in humans, Infect. Immun., 9；624-630, 1974.
- 23) Svanberg, M. and Löesche, W. J.: The salivary concentration of *S. mutans* and *S. sanguis* and their colonization of artificial tooth fissure in man, Archs oral Biol., 17；441-447, 1977.
- 24) 武井 盈：齲蝕と口腔微生物叢，虫歯のシンポジウム，病因論，口腔保健協会，東京，1973，p. 17-26.
- 25) Burnett, G. W., Scherp, H. W. and Schuster, G. S.: Oral microbiology and infectious disease, The Williams and Wilkins Co., Baltimore, 1976, p. 287-295.
- 26) 下野 勉，松村誠士，今西秀明，岡崎好秀，泉谷 明，黒田和博，祖父江鎮雄，夕田貞之，三好伸宜，甲村 保：短時間判定用齲蝕活性試験について，小児歯誌，18；606-611，1980.

Abstract: Specific Color Reaction of Resazurin Disc with Saliva as A Rapid Caries Activity Test, Yoshinobu MAKI, Hideki YAMAMOTO, Takashi MATSUKUBO, Yoshinori TAKAESU, Mutsumi SHIBUYA*, Yuichi KINOSHITA*, Hitoshi SAITO*, Humio TANAKA*, Kuniaki ASAMI*

A simple and rapid test of saliva for caries activity by Resazurin Discs was investigated. The Resazurin Disc method has a characteristic color reaction developing within 15 min at 32-37°C. The composition of Resazurin Discs was 0.0275 % resazurin sodium salt, 0.2 % PVA and 10 % sucrose, and these were impregnated in a filter paper with 8 mm diameter. The color of these discs changed from blue to bluish violet, reddish violet, and then to red or colorless with saliva.

Experiments were demonstrated to examine the effect on color reaction of resazurin with saliva and representative strains. Resazurin Discs were highly sensitive to gram-positive microorganisms such as *S. mutans*, *S. mitis*, *S. faecalis*, *S. aureus*, *L. casei* and *B. subtilis*. The sensitivity was correlated with the number of *S. mutans* and Lactobacilli in saliva.

Furthermore, from the data of the spectrum analysis of color changes caused by bacterial and salivary substrate, it was apparently shown that the visible and fluorescence spectrum of resazurin coincided with the spectrum of the solution based on chemical reduction and not coincided with acid origin. These results suggested that the color reaction of saliva and bacteria was due to a chemical reaction (oxidation-reduction rate) and not to a pH effect.

The use of Resazurin Discs might be a useful caries activity test and they might also be used advantageously for a screening in dental health instruction.

Key words: Resazurin Disc, color reaction, Saliva, Caries activity test.