原 著

齲蝕自然発症ラットにおける歯垢中の
齲蝕原性細菌数の経月的推移*

Cariogenic Bacterial Counts in Plaque of Rats
with Naturally Occurring Dental Caries

三 浦 宏 子** 原 口 克 博*** 松 田 浩 一***
磯 貝 恵 美 子** 広 瀬 公 治** 脇 坂 仁 美**
井 藤 信 義** 上 田 五 男**

Hiroko MIURA**, Katsuhiko HARAGUCHI***, Koichi MATSUDA***,
Emiko ISOGAI**, Kimiharu HIROSE**, Hitomi WAKIZAKA**,
Nobuyoshi ITO** and Itsuo UEDA**

Received April 15, 1991; accepted May 13, 1991

Abstract: The monthly changes in the counts of anaerobic bacteria, streptococci, and mutans streptococci in plaque of caries-susceptible rats (SDC) and control rats (CSC) were examined at 1, 2, 3, and 4 months. Carious lesions were also evaluated at each change by Keyes' method.

No changes in the bacterial counts were observed but there was a transient increase at 3 months, especially in mutans streptococci counts. Also, no significant difference in bacterial counts was found between SDC and CSC rats. However, SDC rats had significantly higher caries scores than CSC rats after 3 months ($p < 0.01$). The monthly age of SDC rats when their caries scores were increased was consistent with the age when their bacterial counts were significantly increased.

These results suggested that the number of mutans streptococci contributed to dental caries in SDC rats, but that it was only a necessary conditions, but not a sufficient condition, for the occurrence of caries.

索引用語: 実験齲蝕, 齲蝕原性細菌, 齲蝕感受性

Key words: Experimental dental caries, Cariogenic bacteria, Dental caries susceptibility

* 本論文の要旨は第36回口腔衛生学会総会（横須賀，昭和62年10月18日）で発表した。

** 東日本学園大学歯学部口腔衛生学講座（主任：上田五男教授）

*** Department of Preventive Dentistry, School of Dentistry, Higashi-Nippon-Gakuen University (Chief: Prof. Itsuo UEDA)

*** 東日本学園大学歯学部歯科保存学第二講座（主任：松田浩一教授）

*** Department of Operative Dentistry and Endodontology, School of Dentistry, Higashi-Nippon-Gakuen University (Chief: Prof. Koichi MATSUDA)

緒 言

齲蝕の発症要因には細菌、食物、宿主、時間等が挙げられる¹⁾。このうち、細菌要因については齲蝕原性菌としてミュータンスレンサ球菌が注目されており²⁾、食物要因についてはミュータンスレンサ球菌の最適基質であるショ糖が齲蝕の発症と密接に関わっていることが報告されている³⁾。宿主要因については、エナメル質表層の組成や唾液の組成と分泌量が齲蝕と密接な関わりを有しているとの報告がある⁴⁾。しかし、齲蝕の自然発症要因と環境要因との関わりについては、未だ明確ではない。

Miura et al. は、齲蝕誘発能を有しない通常の市販固型飼料のみで齲蝕が自然発症するラット (SDC ラット) とその対照系ラット (CSC ラット) を開発し、齲蝕発症と宿主要因との関連性について報告した⁵⁾。原口らは、この両系統ラットを用いて、齲蝕発現の差異には臼歯裂溝部の形態的因子が関与していることを報告している⁶⁾。また、原口らは両系統ラットのエナメル質のX線回折像より、SDC ラットの方がエナメル質の結晶性が低いことを報告している⁷⁾。これらの研究より、両系統間の齲蝕発現の差異には、宿主要因が大きく関係しているものと考えられる。しかしながら、Orland の実験⁸⁾が示すように、齲蝕の発症には齲蝕原性菌の伝播が必須の条件であることから、両系統のラットの齲蝕発現と齲蝕原性細菌との関連性を調べることは必要である。

本研究は、齲蝕原性細菌として最有力視されているミュータンスレンサ球菌を中心とした、数種の歯中の細菌数と齲蝕発症状況から、両者の関連性を調べ、両系統間の齲蝕発症の差異を検討する一助とするものである。

材料および方法

実験動物は、東日本学園大学実験動物センターにて、inbred で継代繁殖中の齲蝕感受性ラット (SDC ラット) とその対照系ラット (CSC ラット) を使用した。ラットに齲蝕を誘発させるには、通常、ミュータンスレンサ球菌の接種やショ糖の摂取等が不可欠とされるが、SDC ラットは市販固型飼料のみで齲蝕が発症する自然発症ラットである。

飼料は、市販の固型飼料として汎用されているオリエンタル酵母社製の MF 飼料を用いた。なお、飼料および飲料水は自由に摂取させ、飼育は conventional な環境で行った。

SDC ラットと CSC ラットは、生後1か月、2か月、3か月、4か月の各時点で、それぞれ10匹 (♂5匹, ♀

5匹) ずつ屠殺し、齲蝕発症状況の評価と細菌学的実験に供した。歯牙標本の調製法および齲蝕発現頻度の評価は、Keyes の方法⁹⁾に従って行った。

各月齢のラットの歯牙表面に付着したプラークを採取し、以下の要領で細菌培養を行った。プラークの採取は、ラットをクロロホルムにて屠殺後、分離した上下顎臼歯部より滅菌綿棒で Swab する方法で行った。採取したプラークの重量を電子天秤で、綿棒ごと測定した後、直ちに嫌気ボックス内に移し、検体を嫌気条件 (80% N_2 , 10% H_2 , 10% CO_2) 下に保った。歯垢が付着した滅菌綿棒を GAM broth (日本製薬社製) 10ml 中でよく分散させ、連続階段希釈を行った。非選択培地として、馬脱線維血液を5%添加した BL 培地 (日本製薬社製)、レンサ球菌の選択培地として、Mitis Salivarius 培地 (Difco Laboratories, MS 培地)、およびミュータンスレンサ球菌の選択培地として Gold の MSB 培地¹⁰⁾を用いた。BL 培地は嫌気条件下で2日間培養し、MS 培地と MSB 培地は嫌気条件下で1日培養し、さらに好気条件下で1日培養した。培養後、総嫌気性菌数、総レンサ球菌数、およびミュータンスレンサ球菌数を計測し、それぞれプラーク 1mg あたりの細菌数を求めた。

なお、両系統間の有意差の検定には t 検定を用いた。

結 果

1. 齲蝕発現状況について

両系統ラットの齲蝕指数の経月的推移を Fig. 1 に示した。生後1か月の時点では両系統とも齲蝕の発現は殆ど認められなかったが、生後2か月の時点で、齲蝕の発現が認められた。2か月での齲蝕発現数は、両系統間で有意な差はなかったが、SDC ラットの方が高かった。生後3か月になると、SDC ラットの発現頻度が著しく増加し、CSC ラットに較べて有意に高い値を示した ($p < 0.01$)。生後4か月では、SDC ラットの齲蝕がさらに進行して、両系統間での差異は一層顕著となった。

SDC ラットの齲蝕は、下顎にその殆どが発症しており、特に下顎第1大臼歯と第2大臼歯の裂溝部に好発していた。

なお、齲蝕発症状況に関する性差は、両系統ラットとも認められなかった。

2. プラーク中の細菌数について

両系統のプラーク 1mg 当たりの総嫌気性菌数、総レンサ球菌数、およびミュータンスレンサ球菌数の経月的推移について、その平均値と標準偏差を Fig. 2 に示し

Fig. 1 Comparison of change in caries scores between SDC and CSC rats (mean $\pm$ S.E.) (○: SDC rat, ●: CSC rat)

Fig. 2 Change in the number of total anaerobic bacteria, streptococci, and mutans streptococci in plaque between SDC and CSC rats (mean $\pm$ S.D.) (—: total anaerobic bacteria, ---: streptococci, - · - : mutans streptococci; ○: SDC rat, ●: CSC rat)

た。菌数は、いずれもほぼ同様な経月的変化を示している。すなわち、生後2か月までは菌数の変動が少なく、3か月において増加し、4か月では再び減少している。特に、ミュータンスレンサ球菌で、この傾向は顕著であり、生後2か月から3か月にかけて有意に細菌数が増加した ($p < 0.05$)。ただし、総レンサ球菌数では個体間のバラツキが大きく、2か月から3か月にかけての増加は、統計的には有意ではなかった。また、両系統間における差異についても、今回調べた範囲では有意な差は認められなかった。なお、両系統ともブラーク中の細菌数に関して性差は認められなかった。

考 察

前報同様、市販固型飼料のみで飼育した二系統のラットのうち、SDC ラットでは、齲蝕が極めて高頻度に発症した。一方、その対照系である CSC ラットでは、齲蝕は全観察期間を通して低頻度しか発症しなかった。両系統の齲蝕発症状況の差異は、生後2か月から3か月にかけて現われ始め、生後4か月になると一層顕著になった。つまり、SDC ラットは生後2か月を経過した段階で、何らかの因子により齲蝕感受性が增大するものと考えられる。また、その後も齲蝕の進行を助長する因子が作用していることが考えられる。一般に、ラットの成長は10~15週で成年期に達するといわれており¹¹⁾、また歯質の成熟も歯牙萌出後2~3週間ではほぼ達成されるといわれている¹²⁾。したがって、固型飼料を用いた SDC ラットのこの時期における齲蝕の発症は、ヒトの場合の一般的な要因に加えて、生得的な要因も考慮しなければならないものと考えられる。

そこで、ラットブラーク中の総レンサ球菌数およびミュータンスレンサ球菌数の月齢変化をみると、いずれも生後3か月において、それらの増加が認められる。総嫌気性細菌数においても、同様な増加傾向が認められるが、他の菌数に較べて顕著ではない。このように菌種により若干の相違は認められるが、ラットでは齲蝕原性の有無によらず、生後2か月~3か月で歯垢中の細菌の増殖が起こり易いことを示している。その要因については、現在のところ不明であるが、全身的な代謝機能の一部との関連性を追究する必要があると考えられる。

ラットの菌数が増加する月齢と SDC ラットの齲蝕発症月齢とが極めてよく一致しており、このことは、齲蝕誘発要因として細菌因子、特にミュータンスレンサ球菌の役割を強く支持するものである。しかし、ミュータンスレンサ球菌が歯垢中で増殖を開始してもなお、CSC

ラットにおいて、齲蝕の発症が少ないことは、ミュータンスレンサ球菌が齲蝕発症の必要条件であっても、必ずしも十分条件ではないことを意味している。この点については、両系統のミュータンスレンサ球菌の酸産生能についても検討する必要がある。

ラットの齲蝕好発部位は、裂溝底部である。この部分は低石灰火の箇所であり、酸によって侵されやすい¹³⁾。したがって、ひとたび裂溝部で酸が産生されると、この部位のエナメル質の薄さと相まって、脱灰はかなり急速に進み、比較的早期に象牙質まで到達するものと考えられる。SDC ラットは CSC ラットに比較して、裂溝部が深く鋭角な形態を有するので、特にブラークの沈着が生じやすく、その結果、齲蝕が発症しやすい環境になることが考えられる。

結 論

齲蝕が自然発症する齲蝕感受性の SDC ラットと、齲蝕抵抗性である CSC ラットのブラーク中の総嫌気性菌数、総レンサ球菌数、およびミュータンスレンサ球菌数の経月的推移を調べた結果、菌数の月齢変化では両系統間に有意差が認められなかった。しかし、ラットの菌数が増加する月齢と SDC ラットの齲蝕発症月齢とが、極めてよく一致していた。

文 献

- 1) Nikiforuk, G.: Understanding dental caries 1 Etiology and mechanisms Basic and clinical aspects, Karger, Basel, 1985, p. 79.
- 2) 須賀昭一: 図説齲蝕学, 医歯薬出版, 東京, 1990, p. 107.
- 3) 須賀昭一: 図説齲蝕学, 医歯薬出版, 東京, 1990, p. 120.
- 4) Thylstrup, A. and Fejerskov, O.: Text-book of cariology, Munksgaard, Copenhagen, 1986, p. 181.
- 5) Miura, H., Ueda, I., Wakizaka, H., Isogai, H. and Ito, N.: Studies on caries occurrence in rats with naturally occurring dental caries, Jpn. J. Oral Biol., 30; 539-544, 1988.
- 6) 原口克博, 三浦宏子, 渡辺敏彦, 荻木裕司, 井藤信義, 松田浩一: 齲蝕自然発症ラットの研究 第1報 歯の形態と寸法, 日歯保誌, 31; 1026-1032, 1988.
- 7) 原口克博, 三浦宏子, 荻木裕司, 松田浩一, 上田五男, 井藤信義, 森脇 豊: 齲蝕自然発症ラットの研究 第2報 X線回折法によるエナメル質の結晶の評価, 日歯保誌, 33(秋期特別号); 132, 1990.
- 8) Orland, F. J., Blayney, J. R., Harrison, R. W., Reyniers, J. A., Trexler, P. C., Wagner, M., Gordon, H. A. and Luckey, T. D.: Use of the germfree animal technic in the study of experimental dental caries, J. Dent. Res., 33; 147-174, 1954.
- 9) Keyes, P. H.: Dental caries in the molar teeth of rats. II A method for diagnosing and scoring several types of lesions simultaneously, J. Dent. Res., 37; 1077-1087, 1958.
- 10) Gold, O. G., Jordan, H. V., van Houte, J.: A selective medium for *Streptococcus mutans*, Archs. oral Biol., 18; 1357-1364, 1973.
- 11) 石橋正彦, 高橋寿太郎, 菅原七郎, 安田泰久: 実験動物学ラット, 講談社, 東京, 1984, p. 111.
- 12) Navia, J. M.: Animal models in dental research, The University of Alabama Press, Alabama, 1977, p. 249.
- 13) 田中 倫: ラット 臼歯実験齲蝕の形態学的研究, 鶴見歯学, 15; 183-199, 1989.