Streptomyces globisporus 由来の溶菌酵素による洗 口が人の乳歯齲蝕抑制に及ぼす効果

九州大学歯学部予防歯科学教室 (指導: 森岡俊夫教授)

壽 武 一 郎

昭和53年3月15日受付

The Effect of Mouthwash Containing a Bacteriolytic Enzyme from *Streptomyces globisporus* on the Caries Prevention of Human Deciduous Teeth.

By

Takeichiro Kotobuki

Department of Preventive Dentistry (Director: Prof.
Toshio Morioka) Faculty of Dentistry, Kyushu
University, Fukuoka, Japan.

It has been reported from our laboratory that a bacteriolytic enzyme derived from *Streptomyces globisporus* strain 1829 possessed the lytic action against strains of *Streptococcus mutans*, cariogenic *Lactobacillus casei* ATCC 4646 and *Actinomyces viscosus* strain T6. In the scanning electron microscopic studies, the cariogenic bacteria in the artificial dental plaque formed on the enamel surface *in vitro* were lyzed by the enzyme *in situ*. Similarly, the microorganisms in the naturally forming plaque on the tooth surface *in vivo* was also apparently affected by this enzyme. Furthermore, it was observed that the caries development in a group of hamsters, which were kept in the cariogenic diet #2000 containing the bacteriolytic enzyme, was significantly inhibited as compared with a group of hamsters which received the same diet without the enzyme.

The effectiveness, however, of the enzyme on caries prevention in humans is not obscure.

The purpose of the present experiment was to study the effect of the bacteriolytic enzyme on the inhibition of dental caries of children in a nursery school.

One hundred sixteen children between 2 and 4 year age were divided into two groups, an experimental and control group. They received seven ml of mouthwash containing 3mg (3,000 units) of the enzyme twice a day for washing in one minute their mouth after between meals. The procedure was continued for 18 months except holidays. In the control group, the conditions was the same as the experimental group except that the enzyme was replaced by 3mg of lactose. Every 3 months, the carious lesions were recorded by oral inspection.

The increment of dmft during 12 months was 1.6 in experimental group (Gr. 1) and 3.3 in control group (Gr. 2). These figures led the percentage of inhibition at 51.5. The increment of dmft during 18 months was 2.2 in Gr.1 and 3.8 in Gr.2, and the

percentage of dental caries inhibition at this stage was 42.1. Concerning the dmfs index, an increment of the value during 12 months was 4.8 in Gr.1 and 9.5 in Gr.2 with the percentage of inhibition was 49.5. The index at 18 months was 6.9 in Gr.1 and 11.1 in Gr.2, which indicates 37.9% of inhibition. The increment of pit and fissure caries surfaces during 12 months was 0.9 in Gr.1 and 1.7 in Gr.2, indicating 47.1% of inhibition. Similarly, an increment of the surfaces during 18 months was 1.1 in Gr.1 and 2.0 in Gr.2 with the percentage of inhibition was 45.0. In the case of smooth surface caries, the increment was 3.9 in Gr.1 and 7.8 in Gr.2 during 12 months with the percentage of inhibition was 50.0. The values at 18 months were 5.7 and 9.1 in respective groups with the percentage of inhibition was 37.4. The increment of expansion of carious lesions was 10.2 in Gr.1 and 18.4 in Gr.2 during 12 months, which indicates 44.6% of inhibition. The values at 18 months were 13.2 in Gr.1 and 24.1 in Gr.2 indicating 45.2% of inhibition.

These results strongly suggested that a mouthwash containing the bacteriolytic enzyme from *S. globisporus* is a useful procedure for the dental caries prevention of deciduous teeth, and also applicable on the numerous groups of children.

結 言

乳歯齲蝕は歯牙萌出後短期間に発症し、時間の経過に伴って急速に進行することはよく知られた事実¹⁾である。これを齲蝕罹患率でみると、乳歯萌出直後の1才で11.4%, 2才で51.7%, そして3才で84.2%と著しく高率になり、4才では91.3%で既にプラトーに達している²⁾。かくして幼小児の主な疾病異常の中で群を抜いて高い罹患率を示すのが齲蝕である。

また同一人において乳歯期に齲蝕の多い幼児は、永久歯になっても齲蝕が多いという統計的相関が示されている³⁾ことは、乳歯は交換するという理由で乳歯齲蝕をなおざりにできないことを意味している。

日本の次代を背負う若年令層のほとんどの蔓延し、かつ自然治癒のない齲蝕を何等かの有効な方法で未然に予防し幼児の心身の健康の保持・増進を確保することは焦眉の急を要する問題である。このように極めて高い罹患率と速やかな進行を示す乳歯齲蝕を有効に予防するには個人を対象とした予防処置よりも集団を対象とした具体的で、実践可能な予防策が案出されなければならない。

近年齲蝕細菌の研究が急速に進展し、齲蝕原性細菌の特性が次第に明らかにされつつある。これら齲蝕原性細菌の中で *Streptococcus mutans* は蔗糖の存在下でグルカンおよびフルクタンを菌体外に産生し、なかでも不溶性グルカンはその粘着性を介して歯面に付着するととも

に菌体を凝集することによって歯苔の形成を促進する⁴⁾。したがって歯苔細菌の主要メンバーである *Str. sanguis*, *Str. mutans*, *Str. salivarius*⁵⁾ などの発育・増殖を特異的に阻止する物質があれば、理論的にも実際的にも齲蝕の発症は防止されることになる。

このような理論的背景のもとに、齲蝕の病因の1つである齲蝕細菌の面から本症予防への新たな試みとして登場したのが、土壌より分離された *Streptomyces globisporus* 1829株由来の溶菌酵素である⁶⁻⁸⁾。本酵素の研究は応用微生物専攻の横川らと著者らの緊密な連繋のもとに進展してきたものである。この酵素の齲蝕予防を目的とした実験的研究として著者らが行なった一連の研究⁹⁻¹⁸⁾には、5群の血清学的な型別に属する25株の *Str. mutans*, 齲蝕原性 *Lactobacillus casei* ATCC 4646 および *Actinomyces viscosus* T 6 株が、いずれもこの酵素によって程度の差こそあれ *in vitro* で溶菌されること⁹⁾ 走査型電子顕微鏡で観察すると溶菌酵素で処理された人工歯苔内の *Str. mutans* は *in situ* で溶解されること^{11,12)} 同様の現象は人の口腔内で自然形成された歯苔においても認められること¹³⁾, *Str. mutans* を口腔内に接種したハムスターを溶菌酵素を添加した齲蝕誘発性飼料で飼育すると齲蝕を有意に抑制すること^{15,16)}, 健康な男子11名の口腔内に本酵素含有トローチまたは洗口液を1日3回毎食後適用すると歯苔形成が有意に抑制されるが歯苔中の連鎖球菌数ならびに総ヘキソサミン

量, 総還元基量, 蛋白質量およびカルシウム量には対照群との間に差異が認められないこと¹⁷⁾, 健康な男女18名に溶菌酵素を20日間連続投与し歯苔および舌苔の細菌叢に菌交替現象のような生態学的変化は認められないこと¹⁸⁾などがある。

一方本酵素の毒性の有無については, マウス, ラット, 猿, 犬および人について詳細に検討され, その結果特に認むべき異常所見のないことが観察されている¹⁹⁾。

このように *in vitro* ならびに *in vivo* において齲蝕原性細菌を溶解する本酵素は, ハムスター実験齲蝕において齲蝕を有意に抑制すること, および人において認むべき副作用がないことから, 本研究では野外で本酵素による洗口を実施し人の乳歯齲蝕抑制効果の有無を検索したものである。

実験材料並びに方法

1 洗口液

実験群に用いた酵素含有洗口液の組成と1回当りの使用量は, 溶菌酵素 3 mg, 酒石酸 30mg, NaHCO₃ 47mg, MgSO₄ 3.0mg, Lactose 163mg, Tween 80 19.0 mg, Saccharin Na 1.2mg, l-menthol 1.2mg, Cinnamon cassia 15mg, 水道水 7 ml である。洗口液量は年令の別なく全園児とも1回 7 ml で, これをアルミカップに分注し, この洗口液中には部分精製された溶菌酵素⁸⁾ 3,000単位が含まれている。

酵素活性の測定は次の方法によった。

Str. mutans BHT 株を Brain Heart Infusion broth (Difco Laboratories, Detroit, Mich., U. S. A.) 中で 37°C 48時間 静置培養して得られた菌体を蒸留水を用いて2回洗滌後, 通法により凍結乾燥した。この菌体 1.0mg に蒸留水 1.0ml, 0.1 M Tris acid-maleate-NaOH 緩衝液 (pH7.0) 1.5ml および被検液 1.0ml を加えよく攪拌混和したのち 37°C で1時間反応させた。Shimadzu-Baush & Lomb 20型光電比色形 (島津製作所, 京都) を用いて光路12.7mmの比色試験管で O. D._{550nm} の濁度の減少を測定した。酵素活性の単位は上記反応混合液中において1分間に濁度を 0.001 減少させる酵素量を1単位とした。対照群として用いた洗口液は上記の酵素含有洗口液から溶菌酵素だけを lactose に置きかえた組成のものである。

2 被検児

福岡市内の某保育園々児 2~4 才の男女併せて 116 名を対象に任意に実験群 58 名, 対照群 58 名の 2 群にわけた。各年令別の被検者数は対照群・実験群共 2 才, 3 才, 4

才児でそれぞれ 16 名, 19 名, 23 名であったが, 実験期間 (18 カ月) 中に転居などのため被検児数が減少し, 実験を完了した者は, 対照群で年令順に 12 名, 14 名, 11 名, 実験群で 10 名, 13 名, 10 名の総数 70 名であった。

3 洗口準備ならびに洗口

洗口液の調整は 1 日に 2 回, 使用の直前に対照群および実験群別に一括調整し, それらを 7 ml 宛アルミカップに分配した。使用後のアルミカップは保育園の給食室で煮沸消毒された。洗口現場の世話並びに監視は終始クラス担任保母並びに歯科衛生士がおこない著者らが監督した。洗口については平日は午前 10 時に間食が与えられた後と, 午後 3 時の間食後の 2 回, 土曜日は午前 10 時の間食後のみ, 洗口液を口中に含み強くブクブクうがいするように指示し, 1 分間洗口させた。この洗口は日曜及び休園日を除く 18 カ月間継続した。但し実験開始前約 3 カ月間は所定の洗口に慣れさせるための練習期間とし, 被検児全員がこの洗口法を修得後に実験を開始した。

4 口腔診査と結果の分析

実験開始前及び開始後 3 カ月間隔で齲蝕を歯面別に 4 度分類検出基準²⁰⁾に基づき 2 重盲検法によって検診した。診査の正確を期すために園児 1 名について 2 名の歯科医師がそれぞれ独自に検診しその記録をとった。検診結果で不一致が生じた場合は再検診を実施した。検診時の口腔照明にはキャノンイルミネーターを, そして探針 (No. 5 モリタ), 歯鏡は一定規格のものを用いた。検診資料は実験開始時, 12 カ月および 18 カ月のものについて dmft および dmfs 指数を算定し, これらの値から洗口による齲蝕の抑制率および有意差を検定した。

また齲窩が経時的に拡大する状態を両群について比較するために, 各歯面別に C₁ に対して 1 点を, C₂ 及び充填面に対して 2 点を, C₃ 及び C₄ 面に対して 3 点を与え, 群別に総得点を算出した上, 1 人当りの平均値を計算した。

実験成績

1 被検児の齲蝕罹患状況

健全歯の推移については, 実験対象となった保育園児の実験開始時, 12 カ月, 18 カ月 (以下 0 M, 12 M, 18 M と略す) 後の齲蝕の罹患状況を表 1 に示した。実験群および対照群の齲蝕は各年令共 C₂ が大多数を占め, 次に多いのは C₁ であり, 充填歯と喪失歯は稀であった。健全歯は対照群で 0 M, 12 M, 18 M において各々 460 本, 340 本, 321 本と順次減少し, 又実験群においても 393 本,

Table 1. Status of deciduous teeth in children of nursery school indicated indices of decayed, missing and filled teeth

Teeth status	0 month		12 months		18 months	
	Control (n=37)	Exptl. (n=33)	Control	Exptl.	Control	Exptl.
no caries	460	393	340	342	321	323
caries decay	C ₁	35	63	27	65	35
	C ₂	213	267	239	284	249
	C ₃	7	30	21	29	22
	C ₄	13	14	23	23	23
filled	11	11	20	7	12	7
missing	0	1	6	1	6	1

342本, 323本と減少した. この場合両群の健全歯数を比較すると実験群において健全歯の減少度が低かった.

ちなみに図1に示す如く厚生省の調査²⁾によると2才, 3才, 4才児の dmft 指数はそれぞれ 2.0, 6.3, 8.3で, 本実験の対照児は3.9, 8.4, 10.4であり各年齢群で1.9ないし2.1程度保育園児に齲歯数が多かった.

Fig. 1. Number of carious teeth per child by the age groups

歯面別の齲蝕の増加の割合は下顎第2乳臼歯についてみれば図2の如く咬合面の齲蝕の増加は著しく, 次いで近心面, 遠心面の順となっている. 即ち咬合面齲蝕は3才児で87%, そして4才児で95%にも達している.

Fig. 2. Rate of carious teeth surfaces per present teeth surfaces of lower second deciduous molar (e|e)

2 新生齲歯数および新生齲歯面数の抑制

対照群および実験群における dmft 並びに dmfs 指数の 0M, 12M, 18Mの増加と実験群の齲蝕抑制率は表2, 3, 4および5に示した.

2才児群(表2)の1人平均 dmft は、対照群において検診0M, 12M, 18Mの値はそれぞれ3.9, 9.0, 9.6であり、実験群においては4.0, 6.5, 7.2であった。即ち1人平均新生齲歯数は検診12Mにおいて対照群で5.1本、実験群で2.5本であり、新生齲歯抑制率は51% ($0.01 < P < 0.02$)であった。また同18Mの1人平均新生齲歯数は対照群で5.8本、実験群で3.2本で同抑制率は44.8% ($0.02 < P < 0.05$)であった。また dmfs 指数でみると、対照群で検診0M, 12M, 18Mにおいて5.3, 15.5, 16.6、実験群では5.0, 8.9, 10.7となった。即ち1人平均新生齲歯面数は両群において、検診12Mでそれぞれ10.3面, 3.9面で新生齲歯面抑制率は62.1% ($0.001 < P < 0.005$)、同18Mで対照群11.3面、実験群5.7面で同抑制率は49.6% ($0.01 < P < 0.02$)であった。

3才児群(表3)の dmft 指数は対照群においては検

診0M, 12M, 18Mの値はそれぞれ8.4, 11.3, 11.8で、実験群においてはそれぞれ8.9, 9.9, 10.4であった。新生齲歯数は両群において、検診12Mでそれぞれ2.9本, 1.1本で、新生齲歯抑制率は62.1% ($0.02 < P < 0.05$)であった。同18Mで対照群3.4本、実験群1.5本で、同抑制率は55.9% ($0.02 < P < 0.05$)が認められた。また dmfs 指数では対照群において検診0M, 12M, 18Mはそれぞれ14.3, 24.8, 26.9であり、実験群においてはそれぞれ16.2, 20.9, 22.8であった。即ち新生齲歯面数は検診12Mで、対照群において10.5面、実験群において4.7面で、新生齲歯面抑制率は55.2%であった。また同18Mにおいては対照群で12.6面、実験群で6.6面で、同抑制率は47.6%で両群間にいづれも有意差 ($0.01 < P < 0.02$)がみられた。

4才児(表4)の dmft 指数は対照群において検診

Table 2. Reduction of dental caries of the children in a nursery school with mouthwash containing the bacteriolytic enzyme during 12 months or 18 months (2-year age)

Group	dmft			new caries teeth/person		dmfs			new caries tooth surface/person	
	0 M	12M	18M	12M-0 M	18M-0 M	0 M	12M	18M	12M-0 M	18M-0 M
Control (n=12)	3.9 ±	9.0 ±	9.6 ±	5.1 ±	5.8 ±	5.3 ±	15.5 ±	16.6 ±	10.3 ±	11.3 ±
	4.0	3.6	3.9	2.7	3.1	6.4	9.4	9.7	4.7	6.0
Exptl. (n=10)	4.0 ±	6.5 ±	7.2 ±	2.5 ±	3.2 ±	5.0 ±	8.9 ±	10.7 ±	3.9 ±	5.7 ±
	3.7	3.7	4.3	1.5	1.2	5.4	6.9	7.9	2.5	3.1
% inhibition				51.0%**	44.8%***				62.1%*	49.6%**

* $0.001 < P < 0.005$

** $0.01 < P < 0.02$

*** $0.02 < P < 0.05$

Table 3. Reduction of dental caries of the children in a nursery school with mouthwash containing the bacteriolytic enzyme during 12 months or 18 months (3-year age)

Group	dmft			new caries teeth/person		dmfs			new caries tooth surface/person	
	0 M	12M	18M	12M-0 M	18M-0 M	0 M	12M	18M	12M-0 M	18M-0 M
Control (n=14)	8.4 ±	11.3 ±	11.8 ±	2.9 ±	3.4 ±	14.3 ±	24.8 ±	26.9 ±	10.5 ±	12.6 ±
	3.3	3.6	3.7	2.6	3.0	7.3	12.5	12.7	7.7	7.3
Exptl. (n=13)	8.9 ±	9.9 ±	10.4 ±	1.1 ±	1.5 ±	16.2 ±	20.9 ±	22.8 ±	4.7 ±	6.6 ±
	3.9	3.5	3.3	1.1	1.1	10.7	11.8	11.7	2.4	3.3
% inhibition				62.1%**	55.9%**				55.2%*	47.6%*

* $0.01 < P < 0.02$

** $0.02 < P < 0.05$

Table 4. Reduction of dental caries of the children in a nursery school with mouthwash containing the bacteriolytic enzyme during 12 months or 18 months (4-year age)

Group	dmft			new caries teeth/person		dmfs			new caries tooth surface/person	
	0 M	12M	18M	12M-0 M	18M-0 M	0 M	12M	18M	12M-0 M	18M-0 M
Control (n=11)	10.4 ± 3.5	12.2 ± 3.3	12.4 ± 3.1	1.8 ± 1.4	2.0 ± 1.7	19.0 ± 10.9	26.5 ± 12.8	28.0 ± 13.5	7.5 ± 3.7	9.0 ± 5.8
Exptl. (n=10)	11.0 ± 4.9	12.4 ± 4.5	12.9 ± 4.5	1.4 ± 1.5	1.8 ± 1.6	20.5 ± 10.9	26.2 ± 12.2	28.6 ± 13.0	5.7 ± 3.7	8.1 ± 4.9
% inhibition				22.2%	10.0%				24.0%	9.9%

Table 5. Reduction of dental caries of the children in a nursery school with mouthwash containing the bacteriolytic enzyme during 12 months or 18 months (total children)

Group	dmft			new caries teeth/person		dmfs			new caries tooth surface/person	
	0 M	12M	18M	12M-0 M	18M-0 M	0 M	12M	18M	12M-0 M	18M-0 M
Control (n=37)	7.5 ± 4.5	10.8 ± 3.6	11.3 ± 3.8	3.3 ± 2.5	3.8 ± 3.1	12.8 ± 9.8	22.3 ± 12.6	24.0 ± 13.0	9.5 ± 6.1	11.1 ± 6.3
Exptl. (n=33)	8.0 ± 5.0	9.6 ± 4.5	10.2 ± 4.5	1.6 ± 1.5	2.2 ± 1.7	14.1 ± 11.4	18.9 ± 12.8	20.9 ± 13.2	4.8 ± 2.4	6.9 ± 3.9
% inhibition				51.5%**	42.1%***				49.5%*	37.9%**

* $P < 0.001$ ** $0.001 < P < 0.01$ *** $0.01 < P < 0.02$

0 M, 12M, 18Mの値はそれぞれ10.4, 12.2, 12.4で、実験群においてそれぞれ11.0, 12.4, 12.9であった。従って新生齲蝕抑制率は検診12M, 18Mでそれぞれ22.2%, 10.0%であり、対照群と実験群間に有意差はないが実験群において新生齲蝕の抑制傾向がみられた。一方dmfs指数では検診0 M, 12M, 18Mの値は、対照群においてそれぞれ19.0, 26.5, 28.0で、実験群においてそれぞれ20.5, 26.2, 28.6であった。即ち新生齲蝕面抑制率は、それぞれ24.0%, 9.9%となり上述の新生齲蝕抑制率と同様、両群間に有意差はないが、実験群において抑制傾向がみられた。

次に全園児(表5)について両群を比較すると検診0 M, 12M, 18Mにおいて対照群のdmft指数は、7.5,

10.8, 11.3で実験群で8.0, 9.6, 10.2となった。新生齲蝕抑制率は検診12Mで51.5% ($0.001 < P < 0.01$), 同18Mで42.1% ($0.01 < P < 0.02$) が認められた。dmfs指数は検診0 M, 12M, 18Mの対照群において12.8, 22.3, 24.0, 実験群において14.1, 18.9, 20.9であった。即ち新生齲蝕面抑制率は、検診12Mで49.5% ($P < 0.001$) が、また同18Mで37.9% ($0.001 < P < 0.01$) がみられた。

図3は2才, 3才および4才児の1人平均dmftの両群の齲蝕数の増加曲線を示したもので、明らかに2才児の齲蝕増加が実験群において抑制されている。次いで3才児が抑制効果が高く、4才児の抑制効果は軽微であった。

Fig. 3. Effect of mouthwash containing the bacteriolytic enzyme on dmft per child by the age groups during 18 months

3 小窩裂溝および平滑面齲蝕の抑制

各年令別に小窩裂溝齲蝕と平滑面齲蝕を両群で比較すると表6, 7, 8および9の如くである。

2才児(表6)において1人平均小窩裂溝齲蝕面は検診0M, 12M, 18Mにおいてそれぞれ対照群で2.0, 4.7, 5.3となり, 実験群で2.6, 3.7, 4.2となり, 新生齲蝕面数は検診12Mにおいて対照群で2.7, 実験群で1.1となり, 新生齲蝕面抑制率は59.3% ($0.02 < P < 0.05$)であった。また同18Mにおいて新生齲蝕面数はそれぞれ3.3面, 1.6面であり, 新生齲蝕抑制率は51.5% ($0.02 < P < 0.05$)であった。一方平滑面齲蝕は検診0M, 12M, 18Mにおいて対照群で3.3, 10.8, 11.3となり実験群で2.4, 5.2, 6.5となり, 新生齲蝕面数はそれぞれ検診12Mの対照群で7.6, 実験群で2.8であり, 新生齲蝕抑制率は63.2% ($0.02 < P < 0.05$)が認められた。また同18Mの新生齲蝕面数はそれぞれ8.1, 4.1で新生齲蝕面抑制率は

49.4%で両群間に有意差はないが齲蝕の減少する傾向がみられた。

3才児(表7)においては1人平均小窩裂溝齲蝕面の検診0M, 12M, 18Mの値は対照群で4.5, 6.1, 6.3, 実験群で4.8, 5.7, 6.0となり, 新生齲蝕面数はそれぞれ検診12Mで1.6, 0.8, 同18Mで1.8, 1.2であった。新生齲蝕面抑制率は検診12Mで50.0%, 同18Mで33.3%で有意差はないが対照群に比して実験群は齲蝕の減少する傾向が認められた。一方平滑面齲蝕において検診0M, 12M, 18Mの値は対照群で9.8, 18.6, 20.5, 実験群で11.3, 15.2, 16.7で新生齲蝕面数はそれぞれ検診12Mで8.9, 3.8, 同18Mで10.8, 5.4であった。新生齲蝕面抑制率は, 検診12Mで57.3% ($0.02 < P < 0.05$)であり, また同18Mの新生齲蝕面抑制率は50.0% ($0.01 < P < 0.02$)で両群間にいずれも有意差が認められた。

4才児(表8)においては, 検診0M, 12M, 18Mの小窩裂溝齲蝕は対照群で5.6, 6.5, 6.6, 実験群で5.7, 6.4, 6.5となり新生齲蝕面数はそれぞれ検診12Mで0.8, 0.7, 同18Mで1.0, 0.8であった。新生齲蝕面抑制率は検診12Mで12.5%, 同18Mで20.0%で両群間に有意差はないが, 新生齲蝕面の抑制傾向が実験群にみられた。平滑面齲蝕も抑制率は12カ月後で24.2%, 18カ月後で9.9%であったが有意差はみられなかった。

全園児(表9)でみると, 検診0M, 12M, 18Mの小窩裂溝齲蝕は対照群で4.0, 5.8, 6.0, 実験群において4.4, 5.3, 5.5となり, 新生齲蝕面数はそれぞれ検診12Mで1.7, 0.9, 18Mで2.0, 1.1であった。新生齲蝕面抑制率は検診12Mで47.1%, 同18Mで45.0%となり両群間に有意差($0.01 < P < 0.02$)が認められた。一方検診0M, 12M, 18Mの平滑面齲蝕は対照群で8.7, 16.5, 17.9, 実験群で9.7, 13.5, 15.4となり, 新生齲蝕面数はそれぞれ検診12Mで7.8, 3.9, 同18Mで9.1, 5.7であった。新生齲蝕面抑制率は検診12Mで50.0%, 同18Mで37.4%で両群間に高度の有意差($0.001 < P < 0.01$)が認められた。

2才児, 3才児, 4才児の実験群, 対照群の齲蝕の増加を示したのが図4である。図から明らかなように一般に対照群に比して実験群において齲蝕の増加が少ない。また年令別でみると低年令児程, 実験群において齲蝕の増加が著しく抑制されている。

また典型的な齲蝕の増加のみられた下顎第1乳臼歯で, 対照群と実験群との歯面別の齲蝕増加を示したのが図5である。2才児においては咬合面, 近心面, 遠心面

Table 6. Reduction of pit and fissure caries of the children in a nursery school with mouthwash containing the bacteriolytic enzyme during 12 months or 18 months (2-year age)

Group	pit and fissure dmfs			new caries surface/person		smooth surface dmfs			new caries surface/person	
	0 M	12M	18M	12M-0 M	18M-0 M	0 M	12M	18M	12M-0 M	18M-0 M
Control (n=12)	2.0 ± 3.5	4.7 ± 2.3	5.3 ± 2.2	2.7 ± 1.6	3.3 ± 1.7	3.3 ± 4.1	10.8 ± 6.6	11.3 ± 8.0	7.6 ± 5.5	8.1 ± 5.9
Exptl. (n=10)	2.6 ± 2.3	3.7 ± 2.9	4.2 ± 3.1	1.1 ± 1.3	1.6 ± 1.5	2.4 ± 3.8	5.2 ± 5.8	6.5 ± 5.9	2.8 ± 2.5	4.1 ± 2.8
% inhibition				59.3%*	51.5%*				63.2%*	49.4%

* $0.02 < P < 0.05$

Table 7. Reduction of pit and fissure caries of the children in a nursery school with mouthwash containing the bacteriolytic enzyme during 12 months or 18 months (3-year age)

Group	pit and fissure dmfs			new caries surface/person		smooth surface dmfs			new caries surface/person	
	0 M	12M	18M	12M-0 M	18M-0 M	0 M	12M	18M	12M-0 M	18M-0 M
Control (n=14)	4.5 ± 2.2	6.1 ± 1.8	6.3 ± 1.9	1.6 ± 1.1	1.8 ± 1.0	9.8 ± 6.2	18.6 ± 11.5	20.5 ± 11.7	8.9 ± 7.0	10.8 ± 6.7
Exptl. (n=13)	4.8 ± 1.5	5.7 ± 1.5	6.0 ± 1.5	0.8 ± 1.1	1.2 ± 1.1	11.3 ± 9.7	15.2 ± 11.0	16.7 ± 10.7	3.8 ± 2.5	5.4 ± 3.5
% inhibition				50.0%	33.3%				57.3%**	50.0%*

* $0.01 < P < 0.02$ ** $0.02 < P < 0.05$

Table 8. Reduction of pit and fissure caries of the children in a nursery school with mouthwash containing the bacteriolytic enzyme during 12 months or 18 months (4-year age)

Group	pit and fissure dmfs			new caries surface/person		smooth surface dmfs			new caries surface/person	
	0 M	12M	18M	12M-0 M	18M-0 M	0 M	12M	18M	12M-0 M	18M-0 M
Control (n=11)	5.6 ± 1.5	6.5 ± 1.1	6.6 ± 1.2	0.8 ± 0.7	1.0 ± 0.7	13.4 ± 10.6	20.0 ± 11.6	21.4 ± 12.4	6.6 ± 3.5	8.1 ± 5.3
Exptl. (n=10)	5.7 ± 1.6	6.4 ± 1.6	6.5 ± 1.5	0.7 ± 1.2	0.8 ± 1.2	14.8 ± 9.9	19.8 ± 11.1	22.1 ± 11.2	5.0 ± 4.1	7.3 ± 4.6
% inhibition				12.5%	20.0%				24.2%	9.9%

Table 9. Reduction of pit and fissure caries of the children in a nursery school with mouthwash containing the bacteriolytic enzyme during 12 months or 18 months (total children)

Group	pit and fissure dmfs			new caries surface/person		smooth surface dmfs			new caries surface/person	
	0 M	12M	18M	12M-0 M	18M-0 M	0 M	12M	18M	12M-0 M	18M-0 M
Control (n=37)	4.0 ± 2.7	5.8 ± 2.0	6.0 ± 1.9	1.7 ± 1.5	2.0 ± 1.6	8.7 ± 8.1	16.5 ± 11.3	17.9 ± 11.8	7.8 ± 5.7	9.1 ± 5.9
Exptl. (n=33)	4.4 ± 2.6	5.3 ± 2.3	5.5 ± 2.3	0.9 ± 1.2	1.1 ± 1.2	9.7 ± 9.8	13.5 ± 11.4	15.4 ± 10.9	3.9 ± 3.2	5.7 ± 3.9
% inhibition				47.1%*	45.0%*				50.0%**	37.4%**

* $0.01 < p < 0.02$

** $0.001 < p < 0.01$

Fig. 4. Effect of mouthwash containing the bacteriolytic enzyme on pit and fissure caries per child by the age groups during 18 months

Fig. 5. Effect of mouthwash containing the bacteriolytic enzyme on the rate of carious teeth surfaces per present teeth surfaces of lower first deciduous molar (d|d) during 18 months

共に対照群に比して実験群が齲蝕の増加は少ない。3才児になると咬合面、近心面は実験群の方が2才児程ではないが齲蝕の増加は少ない傾向がみられた。しかし4才児では齲蝕の増加の差は両群間に認められなかった。

4 齲窩の拡大の抑制

実験期間中における齲窩の拡大を対照群と実験群において比較すると表10, 11, 12, 13の如くである。

2才児(表10)においては検診0M, 12M, 18Mの値は対照群で14.8点, 26.8点, 32.3点, 実験群で11.6点, 17.0点, 19.3点となり両群の得点差は検診12Mでそれぞれ

れ12.0点, 5.4点, 同18Mにおいてそれぞれ17.5点, 7.7点であった. 即ち対照群に比して実験群は検診12Mにおいて齲窩拡大抑制率は55.0% ($0.01 < p < 0.02$), 同18Mにおいて 56.0% ($0.001 < p < 0.01$) が認められた.

3才児 (表11) においては検診0M, 12M, 18Mの値は対照群で31.0点, 57.8点, 63.1点, 実験群では43.2点, 54.2点, 57.8点で, 得点差は検診12Mの対照群で26.8点, 実験群で11.0点, 同18Mにおいて得点差は対照群で32.1点, 実験群で14.6点であった. 即ち実験群は対照群に比して検診12Mにおいて齲窩拡大抑制率は59.0% ($0.01 < p < 0.02$) であり, 同18Mにおいては 54.5% ($0.001 < p < 0.01$) であった.

4才児 (表12) においては対照群の得点差は検診12M

において15.0点, 同18Mにおいて21.2点, 実験群で検診12Mにおいて13.8点, 同18Mにおいて16.9点で齲蝕の抑制率は検診12Mにおいて8.0%, 同18Mにおいて20.3%で有意の差はみられなかったが実験群の方が齲窩の拡大の少ない傾向がみられた.

全園児 (表13) でみると検診0M, 12M, 18Mの値は対照群で29.7点, 48.2点, 53.8点, 実験群で38.8点, 49.0点, 52.0点であり, 得点差は検診12Mにおいてそれぞれ18.4点, 10.2点であり, 齲窩拡大抑制率は44.6% ($0.001 < p < 0.01$) であった. 同18Mにおいては得点差は対照群で24.1点, 実験群で13.2点で齲窩拡大抑制率は45.2% ($p < 0.001$) であった.

Table 10. Reduction of expansion of caries lesion in children of nursery school with mouthwash containing the bacteriolytic enzyme during 12 months or 18 months (2-year age)

Group	caries expansion (points)				
	0 M	12M	18M	12M-0 M	18M-0 M
Control (n=12)	14.8±16.5	26.8±21.5	32.3±21.0	12.0±7.3	17.5±9.7
Exptl. (n=10)	11.6±14.8	17.0±16.1	19.3±17.6	5.4±3.2	7.7±3.8
% inhibition				55.0%*	56.0%**

* $0.01 < p < 0.02$ ** $0.001 < p < 0.01$

Given points for dmfs:

C₁; 1, C₂ and f; 2, C₃ and C₄; 3

Table 11. Reduction of expansion of caries lesion in children of nursery school with mouthwash containing the bacteriolytic enzyme during 12 months or 18 months (3-year age)

Group	caries expansion (points)				
	0 M	12M	18M	12M-0 M	18M-0 M
Control (n=13)	31.0±19.5	57.8±33.6	63.1±32.9	26.8±19.4	32.1±18.3
Exptl. (n=14)	43.2±28.3	54.2±29.0	57.8±29.2	11.0±7.4	14.6±7.5
% inhibition				59.0%*	54.5%**

* $0.01 < p < 0.02$ ** $0.001 < p < 0.01$

Table 12. Reduction of expansion of caries lesion in children of nursery school with mouthwash containing the bacteriolytic enzyme during 12 months or 18 months (4-year age)

Group	caries expansion (points)				
	0 M	12M	18M	12M-0 M	18M-0 M
Control (n=11)	44.4±32.4	59.4±37.0	65.5±36.3	15.0±7.2	21.2±12.7
Exptl. (n=10)	60.3±35.0	74.1±39.0	77.2±35.6	13.8±10.3	16.9±12.7
% inhibition				8.0%	20.3%

Table 13. Reduction of expansion of caries lesion in children of nursery school with mouthwash containing the bacteriolytic enzyme during 12 months or 18 months (total children)

Group	caries expansion (points)				
	0 M	12M	18M	12M-0 M	18M-0 M
Control (n=37)	29.7±26.1	48.2±34.6	53.8±33.9	18.4±14.8	24.1±15.2
Exptl. (n=33)	38.8±34.1	49.0±37.2	52.0±36.5	10.2±8.2	13.2±9.3
% inhibition				44.6%*	45.2%**

* 0.001<P<0.01 ** P<0.001

考 察

齲蝕予防の目的に酵素を応用したものに、dextranase²⁴⁾ や mutanase²⁵⁾ がある。これらの酵素は齲蝕原性細菌が菌体外に産生するグルカンを分解することによって歯苔形成を阻止し、その結果、齲蝕を抑制するもので菌体そのものの viability に影響を与えるものではない。これらの酵素は特定条件下での動物実験において齲蝕抑制効果が認められたとするもの^{26,27)} と認められなかったとするもの²⁸⁾ があり一定でない。しかしながら本実験に用いた溶菌酵素は齲蝕原性細菌に対する直接作用を有しているので上記の2酵素とは作用機構を異にするものである。

年令別の乳歯齲蝕増加曲線を見ると2才、3才、4才で齲蝕は急上昇することが知られている。従って1才から2才未満児も本実験の対象に含めることが望まれたが、残念ながらこの時期の子供に一定条件の洗口をさせることは至難であり今回の実験対象とはなしえなかつ

た。

実験開始にあたり、園長はじめ園教職員に対しスライドや位相差顕微鏡、VTRを用い口腔衛生教育を行い、口腔衛生知識の啓蒙につとめた。ついで本実験の目的を父兄に説明し了解と協力を得た。当初2才児に対して一定の洗口を実施させることが著しく困難で、最初は洗口液を口の中に入れると、これを吐き出すか飲みこむかのどちらかの反応を示す子供が多数いた。しかしこの洗口を個人別に繰返し指導すると2～3カ月後には全員が所定の洗口を遂行しうようになった。幸いなことに、この時期の幼児に一旦洗口の習慣が成立すると休園日における家庭での洗口を親に催促するという例が報告されるに至った。このことは幼児の習慣形成がいかに大切であるかを示す事例となるものであろう。

口腔診査に関しては、最初幼児の協力を得ることが非常に困難であったが、回数を重ねるに従い次第に良好な検診をおこなえるようになった。

フッ化物含有洗口液による学童の3年間に亘る永久歯

齲蝕抑制実験におい可児ら (1973)²¹⁾ は DMFT 指数で 20%, DMFS 指数で 22% の抑制率を認め、有意差があったと報告している。他方 Torell ら (1969)²²⁾ は 0.2% フッ化ソーダ溶液で洗口を 1 年間実施し DMFS 指数で 21% の抑制効果があったことを報告している。

本実験において乳歯ではあるが、1 年後において dmft 指数で 52%, dmfs 指数で 50% の抑制率を示し、2 年間に亘る フッ化ソーダ 500ppm 洗口液による洗口法よりも高い齲蝕抑制効果を認めた。

実験開始後 12 カ月後の抑制率よりも 18 カ月後の抑制率が総じて低くなった理由は、対照群において、本実験ならびに厚生省の調査から明らかなように、4 才になると齲蝕は既にプラトーに達し対照群・実験群共にそれ以上の増加を示し得ない状態になっているためと考えられる。

酵素活性の口腔内における持続性については既に著者らの実験で報告¹⁷⁾ されているが、洗口中は極めて高い酵素活性が維持されるが洗口液をはき出したあとでは、口腔内に停留している活性は急激に減少し、唾液中に残存する活性はほとんど認められない。しかしながら洗口後に回収した洗口液は、唾液の混入により希釈されているにもかかわらず投与前の洗口原液の示す本酵素活性よりも高い活性を示した。このような増強効果は唾液リゾチームによるものと推測されている。尚この酵素は、0.05M 磷酸緩衝液 pH6.8 中で人・牛エナメル質粉末中及びハイドロオキシアパタイトのいずれにも吸着され、また 0.1M 磷酸緩衝液 pH6.8 によって吸着量の約 1/2 の酵素活性が失活することなく溶出されることが認められている。これらの現象を併せ考えると本実験で 1 分間の洗口後短時間において唾液中の酵素活性は著明に減少する反面エナメル表面や歯苔に吸着された本酵素が *in situ* で持続作用を発揮することが当然考えられる。

また著者らは他の実験¹⁷⁾ において酵素非含有洗口液を使用した対照群に比して酵素を使用した実験群の歯苔形成量が減少する傾向にあることを認めており、本酵素による洗口によってかなりの歯苔着生が抑制されることを報告している。本実験において実験群に乳歯齲蝕が有意に抑制された理由も上述の機作に帰因することが考えられる。

なお本溶菌酵素の毒性試験に関しては、まずラットについて対照群獣と実験群獣の間に体重増加曲線、飼料摂取量、生存獣の病理肉眼所見、死亡獣の病理肉眼所見、病理組織所見および血液所見をしらべ特記すべき異常が

ないことが認められている¹⁹⁾。更にアカゲザルおよびビーグル犬を用いたそれぞれ慢性毒性、体重曲線、飼料摂取量、血液学的検査、血液生化学的検査、血清学的検査 (ゲル内沈降反応) においても特に異常のないことが確認されている¹⁹⁾。また 3～12 才児 60 名について本酵素含有ペーストを 12 カ月間歯面および歯肉に塗布マッサージを行なったが、局所 (口腔内) にも全身にも特筆すべき異常は認められなかった²⁰⁾。

本実験においても園児 70 名について実験期間 18 カ月間を通じ注意深く観察した結果、洗口による副作用とみられるような所見は局所的にも全身的にも認められなかった。

本実験に用いた洗口法は、保育園・幼稚園などにおいて十分に実施可能な方法であり、またこの方法によって齲蝕を集団で効果的に抑制しうることがわかった。今後この方法を乳歯萌出後の幼児に広く適用すれば乳歯齲蝕は有意に抑制しうることが期待される。

結 論

福岡市内の某保育園の 2～4 才園児 116 名を対象に溶菌酵素含有洗口液で 1 日 2 回 1 分間の洗口を 18 カ月間継続させ、乳歯齲蝕の抑制効果を検討した結果、実験期間を通じ対象となった 70 名について次の如き成績をえた。

1. dmft 指数の増加は 12 カ月後に、対照群で 3.3、実験群で 1.6 で、新生齲蝕抑制率は 51.5%、18 カ月後に対照群で 3.8、実験群で 2.2 で新生齲蝕抑制率は 42.1% であった。また dmfs 指数の増加は、12 カ月後に対照群で 9.5、実験群で 4.8 で、新生齲蝕面抑制率は 49.5%、18 カ月後では対照群で 11.1、実験群で 6.9 で、同抑制率は 37.9% であった。これらの抑制率はいずれも統計学的に有意差が認められた。

2. 小窩裂溝齲蝕の増加は 12 カ月後に対照群で 1.7、実験群で 0.9 で小窩裂溝齲蝕抑制率は 47.1%、18 カ月後に対照群で 2.0、実験群で 1.1 で同抑制率は 45.0% であった。また平滑面齲蝕の増加は対照群で 7.8、実験群で 3.9 で、平滑面齲蝕抑制率は 50.0%、18 カ月後に対照群で 9.1、実験群で 5.7 で、同抑制率は 37.4% を示した。これらの抑制率には有意差がみられた。

3. 齲窩の拡大は 12 カ月後に対照群で 18.4 点、実験群で 10.2 点で、齲窩拡大抑制率は、44.6% を示し、18 カ月後に対照群で 24.1 点、実験群で 13.2 点で、同抑制率は 45.2% であり、両群間に高度に有意の差がみられた。

4. 全被検児について洗口による齲蝕抑制率は概して低年齢群程高い傾向にあった。

これらのことは本酵素含有洗口液による洗口が幼児の齲蝕予防に有効な新しい方法の一つであることを示唆するものである。

稿を終わるに当たり、本研究に終始、ご懇篤なるご指導とご鞭撻を賜った九州大学歯学部予防歯科学教室森岡俊夫教授ならびに御校閲の労を賜った九州歯科大学口腔衛生学教室佐伯栄一教授に謹んで深謝します。また本研究を進めるにあたりご協力をいただいた予防歯科学教室員の各位に感謝します。本実験に用いた洗口剤の製造を担当された大日本製薬株式会社総合研究所の高松秀二所長および横川哉恵博士に深謝します。本研究の実施にあたりご理解とご協力をいただいた保育園の奥田園長はじめ教職員、父兄各位ならびに洗口の指導および実施に協力された歯科衛生士の桃島和世、寺本晴美両嬢に謝意を表します。

文 献

1. 島田義弘・高見 猛・他：乳歯齲蝕の頻度に関する研究，口腔衛生学会誌 9：395—400，1959.
2. 厚生省歯科衛生課：昭和50年歯科疾患実態調査，歯科衛生関係資料，日本口腔保健協会，1976.
3. 宮入秀夫・宮武光吉・他：同一個体における乳歯と永久歯の齲蝕罹患性の関連について，口腔衛生学会誌 18：1—7，1968.
4. Gibbons, R. J. and Fitzgerald, R. J.: Dextran-induced agglutination of *Streptococcus mutans* and its potential role in formation of microbial dental plaque, J. Bacteriol. 98:341—346, 1969.
5. Krasse, B.: A review of the bacteriology of dental plaque. in dental plaque. Livingstone, London, 1970, 199—205.
6. Yokogawa, K., Kawata, S., et al.: Bacteriolytic activity of enzymes derived from *Streptomyces* species, Agr. Biol. Chem. 36:2055—2065, 1972.
7. Yokogawa, K., Kawata, S., et al.: Lytic enzyme from *Streptomyces globisporus* 1829 strain, Agr. Biol. Chem. 37:799—808, 1973.
8. Yokogawa, K., Kawata, S., et al.: Mutanolysin, bacteriolytic agent for cariogenic streptococci: Partial purification and properties, antimicrobial agents and chemotherapy, 6:156—165, 1974.
9. 森岡俊夫・阿部睿子・他：*Streptomyces globisporus* 由来の溶菌酵素のう蝕原性細菌に対する溶菌活性について，口腔衛生学会誌 24：93—104，1974.
10. 壽武一郎・井上昌一・他：*Streptomyces globisporus* 1829株由来の溶菌酵素の人，牛エナメル質及びハイドロオキシアパタイトへの吸着，口腔衛生学会誌 25：31—36，1975.
11. Morioka, T., Kotobuki, T., et al.: Scanning electron microscopic studies of dental plaque treated with the bacteriolytic enzyme. Abstracts of papers, 21th Annual Meeting of the Japanese Division of IADR, Takarazuka, 1973.
12. 古賀敏比古・井上昌一・他：*Streptomyces globisporus* 1829株由来の溶菌酵素の齲蝕原性細菌の形成する人工歯苔に及ぼす影響に関する走査電子顕微鏡による観察，口腔衛生学会誌 24：322—331，1974.
13. 古賀敏比古・井上昌一・他：人の自然歯苔に対する溶菌酵素の作用に関する走査型電子顕微鏡学的研究，口腔衛生学会誌 25：252—257，1975.
14. 古賀敏比古・井上昌一・他：*Streptomyces globisporus* 由来の溶菌酵素の人工歯苔除去作用に関する走査型電子顕微鏡的研究—デキストラナーゼおよびリゾチームの協同効果，口腔衛生学会誌 24：49—55，1974.
15. 大杉利幸・柴田治雄・他：ハムスター実験系における歯苔形成，齲蝕ならびに歯槽骨吸収の *Streptomyces globisporus* 由来の溶菌酵素による抑制，口腔衛生学会誌 24：365—372，1974.
16. 柴田治雄・大杉利幸・他：*Streptomyces globisporus* 由来の溶菌酵素の投与開始時期がハムスター齲蝕の抑制効果に及ぼす影響，口腔衛生学会誌 26：234—238，1976.
17. 井上昌一・大杉利幸・他：*Streptomyces globisporus* 1829株由来の溶菌酵素による人の歯苔形成の抑制に関する実験的研究，口腔衛生学会誌 24：251—261，1974.
18. 竹原直道・柴田治雄・他：人の歯苔および舌苔の微生物叢に及ぼす *Streptomyces globisporus* 溶

- 菌酵素の影響, 口腔衛生学会誌 26: 48—55, 1977.
19. 高松秀二・横川哉恵: *Streptomyces globisporus* 由来の溶菌酵素の急性, 亜急性, 慢性毒性に関する研究 未投稿資料
20. 森岡俊夫・井上昌一・他: *Streptomyces globisporus* 由来の溶菌酵素含有パスタの口腔内応用に関する研究 未投稿資料
21. 可児瑞夫・藤岡三之輔・他: フッ素含有洗口液による洗口法のう蝕抑制効果について, 口腔衛生学会誌 23: 68—74, 1973.
22. Torell, P. and Ericsson, Y.: Two-year clinical tests with different methods of local caries preventive fluorine in Swedish school children, Acta Odont. Scandinav. 23: 287, 1969.
23. 口腔衛生上水道弗素調査委員会: 上水道弗素化のう蝕予防効果に関する調査, 口腔衛生学会誌 12: 27—41, 1962.
24. Bowen, W. H.: Effect of dextranase on cariogenic and non-cariogenic dextran, Brit. Dent. J. 124: 347—349, 1968.
25. Guggenheim, B. and Haller, R.: Purification and properties of α -(1—3) glucanohydrolase from *Trichoderma harzianum*, J. Dent. Res. 51: 394—402, 1972.
26. 大西正男: デキストラナーゼによる実験齲蝕予防効果, 口腔衛生学会誌 20: 286, 1971.
27. Guggenheim, B., Regolati, B., et al.: Caries and plaque inhibition by mutanase in rats, Caries Res. 6: 289—297, 1972.
28. Keyes, P. H.: Dispersion of dextraneous bacterial plaque on human teeth with dextranase, J. A. D. A. 82: 136—141, 1971.