九州歯会誌33(4):376~381, 1979.

ハムスターにおける齲蝕実験系の検討, 特に萌出期歯牙に対する影響について

九州歯科大学口腔衛生学教室(主任:佐伯榮一教授)

竹原直道・佐伯榮一

九州大学歯学部予防歯科学教室(主任:森岡俊夫教授)

古賀敏比古

昭和54年9月26日受付

Experimental Dental Caries in Golden Hamsters Effects on the Teeth During Eruption

Tadamichi Takehara, Eiichi Saeki

Department of Preventive Dentistry (Chief: Prof. Eiichi Saeki)

Kyushu Dental College, Kitakyushu, Japan

Toshihiko Koga

Department of Preventive Dentistry (Chief: Prof. Toshio Morioka)

Kyushu University, School of Dentistry, Fukuoka, Japan

Cariogenic challenge was effects in the experimental animals of the difference in timing of effecting cariogenic challenge.

The groups with earlier cariogenic challenge showed higher caries scores. With aging, the caries score decreased sharply. On the second molar, what is called "post eruptive maturation" appeared to be continuing even at 37-day-old. With an increase in the intake of sucrose, the caries score increased. Sucrose intake during tooth eruption in particular affects the caries score. Sucrose intake during tooth eruption, even though minute in quantity, has a great influence.

緒 言

動物の萌出期歯牙に及ぼす齲蝕侵襲の影響を調べた研究ではラットにおいて増齢により実験齲蝕の発生が抑制されることが知られており¹⁻⁵⁾, 同様のことはハムスターにおいても言われている^{6,7)}. 更には, *Streptococcus mutans* の歯面への定着もラットにおいて増齢により低下するという⁸⁾. ところで動物を用いた齲蝕実験系の成立には, 基本的に Keyes, P.H. (1969)⁹⁾ の提起した3条件がそのままではまると考えてよい. すなわち, 齲蝕原性菌の接種, 齲蝕誘発性飼料の投与そして歯牙そのものの持つ条件である. 今日ではこれに実験期間の因子

が付け加えられる. しかしながら, 実験齲蝕の惹起は, これらの諸条件の微妙なバランスの頂点に成立しており, たとえば投与飼料の種類, 投与時期, 投与量等によって, また接種菌(主に *S. mutans*) の菌株, 接種時期, 接種量, 接種期間等によって実験結果は大きく異ってくる. したがって, 飼料中のある物質(たとえばスクロース)を1%減少させただけで実験齲蝕が著しく減少したり¹⁰⁾, 接種日を一日遅らせることによって実験齲蝕が減少する⁵⁾ などということが起ってくる. すなわち, 実験齲蝕の誘発には Keyes の条件がすべてそろることが不可欠であるが, 一方この実験齲蝕の抑制または

減少にはこれらの条件の一つを欠落させることはもちろん、これらの条件の一部の改変によっても実験齲蝕は成立しないことになる。本研究では、ハムスターの萌出期歯牙が一定期間の齲蝕実験系の成立＝齲蝕侵襲、によりまたは、齲蝕実験系の不成立＝齲蝕抑制、によりいかなる影響を受けるかを調べるため齲蝕誘発性飼料の因子の有無により実験条件に手を加えることによって以下の実験を行った。

材 料 と 方 法

1) 菌株と培養

実験には *Streptococcus mutans* AHT-SMR 1株¹¹⁾を用いた。同株は硫酸ストレプトマイシン (明治製薬, 東京), 0.2mg/ml培地に耐性であった。この株をBrain Heart Infusion (BBL, Cockeysville, Md., U.S.A.) ブロースで 37°C 一夜, 嫌氣的に (90%N₂ + 5% CO₂ + 5%H₂) 培養した。

2) 齲蝕実験

離乳後, 実験開始まで日農ブリーダMR固型飼料 (日本農産, 横浜) で飼育したゴールデンハムスター¹²⁾ の雌48匹 (日齢22±1日, 平均体重28.8±0.2g) を体重をそろえながら任意に8匹ずつ6群に分け, 各群を同一のステンレス製金網ケージに入れた。I群を *S. mutans* 接種, ラット飼育用のM粉末普通飼料 (オリエンタル酵母, 東京) 投与群, II群を *S. mutans* 接種, 齲蝕誘発性飼料 diet #2000¹³⁾ (56%のスクロースを含む) 投与群とした。III群は, 日齢26日まで *S. mutans* 接種, diet #2000 投与とし, 27日よりM粉末飼料に切り換えた。IV群は, 日齢26日までM粉末投与, 27日より *S. mutans* 接種, diet #2000 飼料に切り換えた。V群は, 日齢36日まで *S. mutans* 接種, diet #2000 投与し, 37日よりM粉末飼料に切り換えた。VI群は, 日齢36日までM粉末飼料投与, 37日より *S. mutans* 接種, diet #2000 飼料に切り換えた。飼料ならびに飲料水 (脱イオン水) は自由に摂取させ, また飼料の摂取量 (給餌器からの脱流量を含む) を記録した。また, *S. mutans* の接種は上記培養液 0.2mlをピペットでハムスターの口腔内に滴下した。接種は, 1日1回, 2日間行った。歯牙萌出期における一定条件下の齲蝕侵襲が成長した同日齢のハムスターに及ぼす影響を調べるという目的のため, ハムスターを日齢65日で同時に屠殺した。以上の実験のプロトコルを Fig. 1 に示した。尚, ハムスターの飼育はバイオトロン (温度20°C, 湿度60%, 昼光12時間/日) で行った。

Fig. 1 Design of the experiment in golden hamsters.

3) 齲蝕と歯苔の評価および細菌検査

ハムスターをエーテル屠殺し, 顎骨を摘出した後, 臼歯部を歯苔染色液 (Butler Co. Chicago, U.S.A.) で染色し, 各臼歯の頬・舌 (口蓋) 面に付着した歯苔を0～3の4段階で評価した。その後, 顎骨をオートクレーブして軟組織を剝離, 乾燥させ, 臼歯に生じた齲蝕を Keyes¹⁴⁾ の方法に準じて評価した。尚, 本実験の結果はすべて Mann-Whitney の順位和法¹⁵⁾ を用いて検討した。

口腔よりの *S. mutans* の検出には, ハムスターの上顎臼歯を滅菌綿棒でスワブし, 2mlの滅菌生食水に懸濁後, その0.1mlを0.2mg/ml培地のストレプトマイシンを含む Mitis salivarius 培地 (Difuco, Detroit, U.S.A. MS-SM培地) に接種し, 嫌氣的に37°C 2日間培養した。*S. mutans* は, 色素のとりこみの良い, 岩様状の培地にくいこんだ集落を計数したが, 疑わしいものについては, 更に試験管壁付着能の有無¹¹⁾ を検討し, 同定した。得られた集落数をもとにスワブ生食水0.1ml当りの集落形成単位数を-～4+の6段階で表示した。¹⁶⁾

結 果

1) ハムスター歯牙の萌出状態

普通飼育のゴールデンハムスター (雌) の日齢22日, 27日, 65日における歯牙の萌出状態を示す歯牙標本を Fig. 2 に示した。日齢22日でM₂はすでに萌出して歯列に並んでいるが, M₃は口腔内に露出していない。日齢27日においても基本的に同様である。日齢65日ではすべてのハムスター臼歯が萌出し終えていた。

2) 齲蝕と歯苔の形成

結果を Table 1 にまとめて示した。実験開始前および *S. mutans* 接種前においては, 調べた限りにおいて

Table 1 Caries development and plaque formation in golden hamsters.

Exp.	No. of group	No. of animals	Body weight gain (g/ animal)	Intake of diet (g/animal)			Tooth decay (/animal)				Plaque score (/animal)	Recovery* of <i>S. mutans</i> (64day, MS-SM agar)
				Lab. chow	Diet #2000	(sucrose)	No. of caries teeth	Caries surface score	Caries score	(range)		
I		8	60	456	0	0	0.4	0.13	0.13	(0-0.5)	24	—
II		8	58	0	358	200	9.4	16.0	24.3	(13.3-36)	34.4	+++
III		8	59	454	25	14	0.4	0.13	0.13	(0-0.5)	24.9	±
IV		8	52	41	322	180	8.0	12.3	16.4	(4.3-35.3)	29.6	+++
V		8	56	331	82	46	3.4	1.60	1.63	(0.5-3.3)	24.5	±
VI		8	65	156	254	142	3.0	1.80	1.81	(0-5.3)	24	+++

* Colony forming units per 0.1ml of swab's saline :

—, no colony ; ±, <50 ; +, 50~250 ; ++, 250~500 ; +++, 500~1,000 ; +++, >1,000

ハムスター口腔内には *S. mutans* は全く検出できなかった。接種した *S. mutans* はI群において日齢26日のリカバーでわずかに見られたが、36日ではすでに姿を消していた(成績省略)。日齢64日においてリカバーした

S. mutans の集落数は、実験終了時に 普通飼料摂取群 (I, III, V群) で少く, diet #2000 摂取群 (II, IV, VI群) で多かった。

各群の齲蝕スコアは、ハムスターの各歯牙に齲蝕感受性に差がある^{12,17-19)} ことを考慮に入れて、Table 2 に各歯別の齲蝕スコアを示し、さらに、統計処理の結果を Table 3 に示した。Table 1, 2 の結果をわかりやすくするため、横軸に diet #2000中に含まれるスクロースの摂取量を、縦軸に齲蝕スコアをとって図に表わした (Fig. 3)。齲蝕スコアは *S. mutans* 接種、全実験期間中 diet #2000 摂取群 (II群) が最も高く、diet #2000 摂取量が0 かまたはは少く、かつ摂取期間が短い群 (I, III群) において最も低かった。I群とIII群では、*S. mutans* の接種あるいは短期間の diet #2000 の摂取はその齲蝕スコアに影響を与えず統計学的に有意な差は認められなかった。V群と比較してVI群は齲蝕スコアはほぼ同程度であったが、スクロースの摂取量は3倍多く、またVI群ではM₃のスコアが高いのに較べてV群ではM₂のスコアが高かった。また、VI群はV群に較べて齲蝕スコアにバラツキが大きくI, III群との間に有意な差は見られなかった。II群とIV群では、スクロース摂取量では差はあまりないが(日数でも5日間)スコアは、1.5倍であった(もっとも有意な差はない)。結局I・III群とV群, I・III・V・VI群とII・IV群の間に有意な差が存在することがわかった。II, IV, VI群の間で見ると、早期の齲蝕侵襲を受けた群ほど齲蝕スコアが高かった。一方歯牙別の齲蝕スコアについて見てみると、M₁についてはすべての群に有意差がなく、M₂, M₃は総齲蝕スコアとほぼ同様の結果を示した。もっとも、I-V群, III-V群についてはM₃に有意差はなく、IV-V群についてはM₂に有意差がなかった (Table 3)。

Fig. 2 Photographs of teeth of golden hamsters at different ages. The numbers indicate post natal age of the hamster in days. U:Upper jaw, L:Lower jaw

Table 2 Caries score of individual molars of golden hamsters.

Exp. group	$\overline{M}_1$	$\overline{M}_2$	$\overline{M}_3$	$\overline{M}_1$	$\overline{M}_2$	$\overline{M}_3$
I	0	0.03	0	0	0	0.09
II	0.28	4.97	8.09	1.16	2.81	6.94
III	0	0.06	0	0	0	0.06
IV	0.25	1.84	5.97	0.72	2.38	5.25
V	0	0.63	0.09	0.03	0.72	0.16
VI	0	0.22	0.66	0	0.19	0.75

齲蝕歯面スコア (齲蝕の拡がりを示す) は II, IV 群を除いてほぼ齲蝕スコアと一致し, 齲蝕の深まりは見られなかった. II, IV 群では齲蝕面積の拡がりとともに齲蝕の深度も増加した.

齲蝕歯数も齲蝕スコアとほぼ同様の傾向を示した. 歯苔スコアも齲蝕スコアとほぼ同様の傾向を示したが, ごく僅かの歯苔形成をもすべて +1 として評価するという方法上の問題点もあって, 各群間の差ははっきりしなくなる傾向があった.

これらのことからみて, diet #2000 ひいてはスクロースの摂取量が多ければ齲蝕スコアが増大するという関係を示したが, その摂取時期により大きな差が存在し,

Fig. 3 Comparative analyses of caries score and intake of sucrose.

Table 3 The comparison of statistically significance of caries score and plaque score between experimental groups.

	Caries score						Caries surface score	No. of caries teeth	Plaque score
	$\overline{M}_1$	$\overline{M}_2$	$\overline{M}_3$	$\overline{M}_1$	$\overline{M}_2$	$\overline{M}_3$			
I - II		***	***		***	***	***	***	***
I - III									
I - IV		**	***		*	***	***	***	***
I - V					*		***	***	
I - VI									
II - III		***	***		***	***	***	***	***
II - IV									*
II - V		***	***		**	***	***	***	***
II - VI		***	***		***	***	***	***	***
III - IV		**	***		***	***	***	***	*
III - V					*		***	***	
III - VI									
IV - V			***			***	***	***	**
IV - VI		*	***		**	***	***	**	***
V - VI									

Statistically significance * ($p < 0.05$), ** ($p < 0.02$), *** ($p < 0.002$)

スクロース摂取量と齲蝕スコアの間には直線関係は得られなかった。

考 察

本研究では Keyes の 3 条件の充足をもって齲蝕侵襲が始めて成立するという前提をもうけ、その前提のもとに以上の実験を行ってきた。以下これらの実験の結果について若干の検討を加えることにしたい。最初に *S. mutans* の接種は Fig. 1 に示すように、I 群を除き diet #2000 投与の 2 日目と 3 日目に行った。したがって Keyes の 3 条件がそろえるのは、たとえば II 群の場合では日齢 23 日ということになる。一方、I 群においては、*S. mutans* の接種のみでは Keyes による齲蝕侵襲の条件を満たしておらず Table 1 の結果から見ても菌の接種だけでは齲蝕侵襲は成立しないと思われる。しかしながらスクロースをグルコースまたはでんぷんに変えた飼料での *S. mutans* の接種の有無により齲蝕スコアを調べた Fitzgerald, *et al.* (1972)²⁰⁾ の実験では、非接種群のスコアは接種群より少ない結果が示されており、極めて微量の変化ながら *S. mutans* 非接種、普通飼料飼育群を想定した場合、この想定群と I 群あるいは III 群との間の齲蝕スコアに有意の差が生ずる可能性は否定できない。

次に本実験では非齲蝕誘発性飼料として計量の便をはかるためもあり普通粉末飼料を用いたが、進行中の齲蝕を停止させるという目的からはむしろ固型飼料の方がよいと思われる。しかしながら V 群と II, IV 群の間に有意差があることから見て普通粉末飼料においても十分進行中の齲蝕を停止させていると思われた。

次に歯牙の萌出状態は Fig. 2 に示した如く日齢 27 日までは M₃ は萌出しておらず、たとえば M₃ に限ってみれば II-IV 群間の齲蝕スコアには差はない。一方、IV-VI 群間には有意差が存在し、この間 10 日間の差が M₃ の齲蝕スコアにして約 8 倍の差として表われている。この間に M₃ の萌出が予測される²¹⁾ことから歯牙萌出直後の齲蝕侵襲は極めて大きな影響をその歯牙に与えることが示唆される。さらにいわゆる“post eruptive maturation”を想定した場合、M₂ について V 群の齲蝕スコアが VI 群のそれより高いことから見て日齢 12~14 日の間に萌出した M₂ の“post eruptive maturation”は少なくとも日齢 37 日の段階まで続いていることが推定される。したがって M₃ における“post eruptive maturation”は日齢 37 日以後に引き続き存在するのであろう。また齲蝕侵襲の期間を一定にするという、Schuster, *et al.* (1978)⁵⁾,

Larson, *et al.* (1964)²⁾, Navia, *et al.* (1977)⁴⁾ の方法をとらず同日齢での屠殺を行うことにより Fig. 3 に示したように歯牙萌出期に摂取した齲蝕誘発性飼料、ひいてはスクロースの量と齲蝕スコアの関係を示し得ると思われる。すなわち、一定日齢（この場合 65 日齢）における齲蝕スコアはその歯牙萌出期における齲蝕侵襲、なかんずくスクロースの摂取によって影響され、歯牙の萌出時期においては、微量のスクロース量によっても、その齲蝕スコアに強い影響を与えると思われるのである。

結 論

ハムスターの歯牙萌出期に時期を変えて、*S. mutans* の接種と齲蝕誘発性飼料投与による齲蝕侵襲を行うことにより以下の結果を得た。

1. 早期に齲蝕侵襲を受けた群ほど齲蝕スコアは高く、加齢とともに、齲蝕スコアは急激に減少した。
2. 日齢 37 日の段階で M₂ のいわゆる“post eruptive maturation”が続いていると思われた。
3. スクロースの摂取量が増加すると齲蝕スコアも増加した。
4. しかしながら歯牙萌出期におけるスクロースの摂取が齲蝕スコアに影響を与えており、萌出期のスクロース摂取は微量でも大きな影響力を持つことがわかった。
5. 同様の齲蝕実験系における実験上の諸条件について考察した。

文 献

- 1) Madsen, K. O. and Edmonds, E. J.: Use of twelve day-old cotton rats for dental caries studies, *J. Dent. Res.* 42: 867—873, 1963.
- 2) Larson, R. H. and Fitzgerald, R. J.: Caries development in rats of different ages with controlled flora, *Archs. oral Biol.* 9: 705—712, 1964.
- 3) 大西正男, 尾崎文子・他: ラットの歯牙年齢と *St. mutans* 感染に対するラットの抵抗増加, 口腔衛生会誌. 23: 116—117, 1973.
- 4) Navia, J. M. and Lopez, H.: Sources of variability in rat caries studies: weaning age and diet fed during tooth eruption, *J. Dent. Res.* 56: 222—227, 1977.

- 5) Schuster, G.S., Morse, P.K., *et al.* : Interaction of microbial challenge and age at inoculation in the production of dental caries in rats, *Caries Res.* 12 : 28—34, 1978.
- 6) Sognnaes, R.F. : Caries-conducive effect of a purified diet when fed to rodents during tooth development, *J. Am. Dent. Ass.* 37 : 676—686, 1948.
- 7) Volker, J. F. and Klapper, C. E. : Some observations on dental caries in syrian hamsters, *O. Surg. O. Med. O. Path.* 7 : 207—212, 1954.
- 8) van Houte, J., Upeslakis, V. N. *et al.* : Decreased oral colonization of *Streptococcus mutans* during aging of sprague-dawley rats, *Infect. Immun.* 16 : 203—212, 1977.
- 9) Keyes, P. H. : Present and future measures for dental caries control, *J. Am. Dent. Ass.* 79 : 1395—1404, 1969.
- 10) Michalek, S. M., Mcghee, J. R., *et al.* : Low sucrose levels promote extensive *Streptococcus mutans*-induced dental caries, *Infect. Immun.* 16 : 712—714, 1977.
- 11) 古賀 敏比古, 井上 昌一 : *Streptococcus mutans* AHT 株の管壁付着能変異株の分離と性状, 歯科基礎誌. 19 : 117—127, 1977.
- 12) 柴田治雄, 竹原直道・他 : 乳酸菌飲料による実験齲蝕の重症化, 口腔衛生会誌. 27 : 46—57, 1977.
- 13) Keyes, P. H. and Jordan, H. V. : Periodontal lesions in the syrian hamster, III. Findings related to an infectious and transmissible component, *Archs. oral Biol.* 9 : 377—400, 1964.
- 14) Keyes, P. H. : A method of recording and scoring gross carious lesions in the molar teeth of syrian hamsters, *J. Dent. Res.* 23 : 439—444, 1944.
- 15) Mann, H. B. and Whitney, D. R. : On a test of whether one of two random variables in stochastically larger than the other, *Ann. Math. Statist.* 18 : 50—60, 1947.
- 16) Keyes, P. H. and Fitzgerald, R. J. : Dental caries in the syrian hamster-IX, *Archs. oral Biol.* 7 : 267—278, 1962.
- 17) Keyes, P. H. : Dental caries in the syrian hamster-VIII. The induction of rampant caries activity in albino and golden animals, *J. Dent. Res.* 38 : 525—533, 1959.
- 18) Fitzgerald, R. J., Keyes, P. H. *et al.* : The effects of a dextranase preparation on plaque and caries in hamsters, a preliminary report, *J. Am. Dent. Ass.* 76 : 301—304, 1968.
- 19) 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, 口腔衛生会誌, 24 : 365—372, 1974.
- 20) Fitzgerald, D. B. and Fitzgerald, R. J. : Intermittent sucrose feeding and caries in hamsters, *Archs. oral Biol.* 17 : 215—217, 1972.
- 21) Orland, F. J., : A study of the syrian hamster, its molars, and their lesions, *J. Dent. Res.* 25 : 445—453, 1946.