原 著

萌出時期におけるラット臼歯裂溝内細菌叢の
電子顕微鏡的観察

尾 崎 文 子 佐 藤 誠*

寺 岡 加 代 岡 田 昭五郎

東京医科歯科大学歯学部予防歯科学教室（主任：岡田昭五郎教授）

*徳島大学歯学部予防歯科学教室（主任：中村 亮教授）

（1984年12月11日 受付）

Electron Microscopic Study of Bacterial Colonization in Fissures of Rat
Molars During Eruption Period

Fumiko Ozaki, Makoto Sato*, Kayo Teraoka and Shōgoro Okada

Department of Preventive Dentistry and Public Health, Faculty of Dentistry

Tokyo Medical and Dental University (Chief : Prof. Shōgoro Okada)

* Department of Preventive Dentistry, School of Dentistry, The University of
Tokushima (Chief : Prof. Ryo Nakamura)

The fissures of the rat molars were examined by the SEM technique with the purpose of demonstrating the change in the bacterial colonization according to the period of tooth eruption. The bacteria began to adhere to the entrance of the fissures as soon as the molars appear in the oral cavity and the colonization extended up to the deeper places of the fissures with eruption.

At the completion of eruption, the bacteria were observed at the lower part of the fissure. Only a slight difference was found in the formation of the bacterial plaque in the fissures when the rats were given different diets.

Extracellular polysaccharide was observed in the fissures of rats provided with diet containing sucrose.

I. 緒 言

ラットの臼歯は裂溝底部の幅がヒトの裂溝とはほぼ等しく¹⁾、ヒトのウ蝕に類似したウ窩が形成されるために裂溝ウ蝕のモデルとして広く利用されている。ラットの裂溝ウ蝕は口腔内常在菌の1つである *S. mutans* の感染によって発生する疾病と考えられ²⁾、また歯質への感染時期は離乳後5～10日（日齢26～31日）と報告されている³⁾。一方

wistar 系ラットの臼歯萌出時期は、 M_1 で19日齢、 M_2 で21日齢であるから前述の感染時期を考え合わせると *S. mutans* は萌出直後のかなり早い時期に歯質内に侵入するものと考えざるを得ない。したがってそれに先立つ *S. mutans* の裂溝内への定着も、臼歯の歯冠部が完全に露出する以前にすでに始まっているものと思われる。

口腔内微生物のラット臼歯裂溝内部での増殖に関しては、Kalberer, P. U. ら (1971)⁴⁾ が、離乳後

sucrose を含むウ蝕誘発性食餌を与えられたラットの裂溝内細菌集落について、透過型電顕を用いて観察を行い、裂溝内部の組織の消失に伴って細菌の量が増加していくことを示しているが、裂溝内への細菌の侵入や集落形成の時期についての報告はない。そこでわれわれは、裂溝内部への細菌の侵入と定着、集落形成がどのような時期から始まり、ウ蝕とどのようななかかわりを持つかを検討するために、萌出前から離乳後7日までのラット臼歯裂溝内の細菌叢の変化を走査型電子顕微鏡を用いて観察したので報告する。

II. 材料と方法

1. 動物

当教室で継代飼育中の wistar 系ラットを用い、16日齢より27日齢まで経時的に観察を行った。21日齢で離乳し、同腹のラットを2群に分け、一方の群にはウ蝕誘発性食餌 Diet-2000⁵⁾ (船橋農場製)を、他方の群には飼育用粉末飼料 CE-2 (日本クレア製)を与えた。飲料水は蒸留水とし、飼料、水は自由に摂取させた。

2. 標本の作製

ラットは16日齢より離乳後7日まで毎日5匹ずつクロロフォルム麻酔下で殺し、下顎臼歯を摘出し、ただちにカルノア液で固定した。固定後臼歯裂溝部を観察するために、裂溝部を中心にダイヤモンドディスクで近遠心的に2分割し、分割面をエメリペーパーで軽く研磨し標本作製した。標本は etylalcohol で脱水、CO₂ の臨界点乾燥、Pt のイオン蒸着を行い電顕用試料とした。

3. 標本の観察

走査型電子顕微鏡 (日立450) で裂溝内部の状態を観察した。

III. 結 果

1. wistar系ラットの臼歯 M₁ は17日齢で咬頭頂の一部が萌出し、20日齢で萌出が完了する。M₂ は20日齢で咬頭頂の一部が萌出し22~23日齢で萌出が完了する (図1, 2, 3, 4)。

2. 萌出前に歯冠部全体を覆っていた ameloblast

は、萌出に伴って咬頭頂より消失していくが、萌出完了時にはまだ裂溝底部に残っている (図5, 6, 7)。

3. 細菌の付着は19日齢 (M₁) で裂溝入口附近や裂溝上部内壁に球菌、桿菌がみられる (図8, 9)。20日齢の M₁ では裂溝深部まで細菌が侵入し、一部に filamentous な菌も観察された (図10, 11)。21日齢の M₁ では裂溝底部まで細菌の集落が形成されている (図12, 13, 14, 15, 16)。離乳後 (21~27日齢) は、裂溝内の菌数は経時的に急速に増加し、27日齢では裂溝内は細菌集落で満たされていた。2種類の飼料 (Diet-2000 と CE-2) の差異による細菌数の増加、細菌の形態等に差はみられなかったけれども、sucrose 56% を含む Diet-2000 飼育群の裂溝内には菌体外多糖類と思われる物質が形成されている像が観察された (図17, 18, 19, 20, 21, 22, 23)。

IV. 考 察

ラットは裂溝ウ蝕のモデルとして使用されているが、この実験結果から裂溝内への細菌の侵入と定着は、歯冠の出齦とともに開始し M₁ では離乳前、M₂ では離乳時に裂溝底部にまですすむことが認められた。ラットの臼歯はほぼ4日で萌出を完了するが、完全に萌出した時点では裂溝底部にはまだ ameloblast が残っているものの、崩壊した ameloblast の部位にまですでに細菌が侵入していることが認められた。また細菌の侵入状態や菌量に関しては、ラットの飼育飼料によるちがいは少なく、いずれも萌出直後には球菌、桿菌が多く、その後 filamentous な菌が認められるようになった。けれども砂糖の多い餌 (Diet-2000) を与えた群では菌体間に多糖類様物質の形成がみられた。これらの知見は Kalberer, P. U. ら (1971)⁴⁾ の報告と一致している。

一方、ヒトの裂溝ウ蝕の初発に関しては Löe, H. ら (1973)⁶⁾, Theilarde, E. ら (1973)⁷⁾, Karring, T. ら (1974)⁸⁾ は、人工裂溝を用い、また Theilarde, E. ら (1978)⁹⁾, Thott, E. K. ら (1974)¹⁰⁾ は末萌出の第3大臼歯裂溝部分を利用し

て、菌濃の変化を調べたものが報告されている。これらはいずれも試料片を口腔内に装着してその直後から裂溝内に菌がみられ、とくに球菌、桿菌の占める割合が多く、filamentous な菌が少ないと報告されており、このことは平滑面の歯垢とのちがいと述べられている。ラットの場合はわれわれの観察では、球菌、桿菌とともに filamentous な菌も裂溝深部に観察された点がヒトの場合と異なっていた。これはラットの裂溝形態が頬舌的に広がっていることも影響しているのかもしれない。

Liisa, S. (1984)¹¹⁾ は臨床的に健全な萌出途上の第3大臼歯の裂溝を走査型電子顕微鏡で観察し、表層下のエナメル質内、D-E junction, Dentin への細菌の侵入状態を調べ、細菌の歯質内への侵入が非常に早く起こることを示している。今回のわれわれの観察では裂溝内への細菌の侵入や増殖には、ウ蝕誘発性食餌と通常の飼育食餌による差はほとんど認められなかった。しかしラットのウ蝕誘発実験では、明らかにウ蝕誘発性食餌を与えた群でウ蝕が多発することから、裂溝内に定着する菌の種類のみならず与える食餌、さらに歯質、ラットの健康状態等が歯質内への細菌の侵入に影響することが考えられ、これらの関連性についてはさらに検討する必要があると考えている。

V. ま と め

萌出時のラット臼歯裂溝内への細菌の侵入定着状態を臼歯 (M₁) 萌出前の16日齢より27日齢（離乳後7日）まで走査型電子顕微鏡を用いて観察した。細菌は歯冠部が口腔内に露出するとすぐにエナメル質表面に付着しはじめ、萌出に伴って裂溝内に侵入し、萌出が完了した時点では裂溝底部にまで細菌の集落が認められた。離乳後のラットの飼料として、砂糖56%を含むウ蝕誘発性食餌 Diet-2000, および普通飼育用粉末飼料 CE-2 の2種を用いたが2群の間に細菌の種類、菌量の差はみられなかった。Diet-2000 を与えた群では菌体のまわりに多糖類様物質が形成されているのが観察された。

謝 辞

稿を終わるにあたり走査型電子顕微鏡の操作、観察を懇切にご指導下さいました本学中央電子顕微鏡室宮本泰博先生に厚くお礼申し上げます。また本実験にご助言いただきました北里研究所 鶴水隆先生に感謝いたします。

本研究の要旨は第31回口腔衛生学会総会で発表した。

本研究の一部は文部省科学研究費補助金によった。

文 献

- 1) Rasebury, T. : The problem of dental caries. Dental Science and Dental Art. Lea and Feb-ign, 269, 1938.
- 2) 大西正男：鼠う蝕による *St. mutans* の感染機構とう蝕の予防体系。口腔衛生会誌 25 : 105-114, 1975.
- 3) 大西正男, 尾崎文子, 村上淑子：ラット歯牙年齢と *S. 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) Kalberer, P. U., Schroeder, H. E., Guggenheim, B. and Muhlemann, H. R. : The microbial colonization in fissures. A morphological and morphometric study in rat molars. Helv. Odont. Acta. 15 : 1-14, 1971.
- 5) Keyes, P. H. and Jordan, H. V. : Periodontal lesion in the Syrian hamster III. Findings related to an infections and transmissible component. Arch. Oral Biol. 9 : 377-414, 1964.
- 6) Löe, H., Karring, T. H. and Theilade, E. : An in vitro method for the study of the microbiology of occlusal fissures. Caries Res. 7 : 120-129, 1973.
- 7) Theilade, E., Larson, R. H. and Karring, T. H. : Microbiological studies of plaque in artificial fissures implanted in human teeth. Caries Res. 7 : 130-138, 1973.
- 8) Karring, T., Ostergaard, E., Theilade, J. and Löe, H. : Histochemical study of the formation of dental plaque in artificial fissures. Scand. J. Dent. Res. 82 : 471-483, 1974.
- 9) Theilade, E., Fejerskov, O., Karring, T. and Theilade, J. : A microbiological study of old plaque in occlusal fissures of human teeth. Caries Res. 12 : 313-319, 1978.
- 10) Thott, E. K., Folde, L. E. A. and Sveen, O. B. : A microbiologic study of human fissure plaque. Scand. J. Dent. Res. 82 : 428-436, 1974.

- 11) Liisa, S. : Scanning electron microscopic study of early subsurface bacterial penetration of human molar fissure enamel. Arch. Oral. Biol. 29 : 503-506, 1984.

図1 17日齢 M_1 咬頭部
咬頭頂が1箇所わずかに萌出しはじめている
(矢印)

図3 19日齢 M_1 咬頭部
歯冠部がほぼ全体に萌出している

図2 18日齢 M_1 咬頭部
咬頭頂が3箇所萌出している (矢印)

図4 20日齢 M_1
萌出が完了し歯冠部が完全に露出している

図5 16日齢 M₁ 咬頭部
萌出前の状態で全体に ameloblast に覆われている。
×200

図7 21日齢 M₁ 裂溝内部
歯冠部が完全に萌出した時点でも裂溝底部に
は ameloblast が残っている。×200

図6 17日齢 M₁ 咬頭部
咬頭頂の一部が萌出し ameloblast が崩壊し始め
ている。×200

図8 19日齢 M₁ 裂溝入口
球菌の集落がみられる。×2,000

図9 19日齢 M₁ 裂溝上部内壁
球菌，桿菌が付着している。×4,000

図11 20日齢 M₁ 裂溝深部
一部に filamentous な菌も観察された。×8,000

図10 20日齢 M₁ 裂溝深部
裂溝深部に形成された細菌の集落。×8,000

図12 21日齢 M₁ 裂溝底部
崩壊した組織の間に細菌が観察される。×300

図13 図12の一部拡大図。×2,000

図15 図12の一部拡大図。×2,000

図14 図13の一部拡大図。×8,000

図16 図15の一部拡大図。×8,000

図17 24日齢 (CE-2 飼育) M₁ 裂溝底部
裂溝内の細菌集落。×800

図19 24日齢 (Diet-2000 飼育) M₁ 裂溝底部
裂溝底部の細菌集落。×5,000

図18 図17の一部拡大図。×8,000

図20 図19の一部拡大図
菌体の周りに多糖類様物質の形成がみられる。
×20,000

図21 27日齢 (Diet-2000 飼育) M₁ 裂溝内部
裂溝内は細菌塊で満たされている。×300

図23 図22の一部拡大図。×8,000

図22 図21の一部拡大図。×2,000