原	著
---	---

いしばしラットの齲蝕について

—Ⅲ. いしばしラットの齲蝕誘発実験—

尾崎 文子 佐藤 誠* 岡田 昭五郎
石橋 正彦**

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）

**麻布大学獣医学部

（1992年6月29日 受付）

Studies on Caries of Ishibashi Rat

—Ⅲ. Experimental Caries in Ishibashi Rat—

Fumiko Ozaki, Makoto Sato*, Shogoro Okada
and Masahiko Ishibashi**Department of Preventive Dentistry and Public Health, Faculty of Dentistry,
Tokyo Medical and Dental University (Chief : Prof. Shogoro Okada)

*Department of Preventive Dentistry, School of Dentistry,

The University of Tokushima (Chief : Prof. Ryo Nakamura)

**School of Veterinary Medicine, Azabu University

Dental caries was experimentally induced in the Ishibashi rats (ISR) by feeding them with conventional diets or with caries-producing diets, and the pattern and severity of their induced carious lesions were compared with those of the Sprague-Dowly rats (SD). Simultaneously, serum antibody titers against *Streptococcus mutans* and calcium and phosphorus concentration in the sera and in the femurs were compared between the ISR and SD.

The results were as follows :

1. When judged by cavities, ISR showed a higher carious incidence and average number of cavities per one rat than the SD, whichever diet the rats were fed.
2. When judged by fissure caries observed on the thin sections of the teeth, both the carious incidence and average number of fissure lesions in the ISR were not always high compared with those in the SD, and there seemed to be a great variation of caries-susceptibility in the ISR.
3. Caries in the ISR seemed to be more progressive than that in the SD.
4. There were no differences in the serum antibody titers against the *S. mutans* between the ISR and SD.
5. No differences in the concentration of calcium and phosphorus in the sera and femurs were observed between the ISR and SD, whichever diet they were fed.

I. 緒 言

前報¹⁾で市販普通飼育用飼料 (MR-ラボブリーダー® 日本農産工) で飼育された「いしばしラット」(以下 ISR) の齲蝕について報告した。すなわち, ISR は蔗糖を高濃度に含むいわゆる齲蝕誘発性食餌を用いず, 普通飼料で飼育されているにもかかわらず 101 日齢以上の動物の 70~80% に齲蝕が観察され, 特に下顎第 2 臼歯に重症の病変がみられた。そこで今回は ISR の齲蝕の発生状態を経時的に調べるために齲蝕誘発実験を行い, 通常, 齲蝕誘発実験に用いられるアルビノラットの齲蝕発生状態と比較検討した。

II. 材料と方法

1. 動 物

ISR および Sprague Dawley Rat (以下 SD ラット) の雄各 80 匹を使用した。いずれも麻布大学獣医学部で継代飼育中の動物である。

2. 実験の概要

動物は ISR, SD ラットとも 21 日齢で離乳し, おのおの 40 匹ずつ 2 群に分け, 飼料として各ラットとも 1 群には普通飼育用飼料 MR-ラボブリーダー粉末 (以下 MR-ラボブリーダー群) を, 他の 1 群には齲蝕誘発性食餌 Diet-2000²⁾ (以下 D-2000 群) を与えた。飲料水は水道水を与え, 餌, 水は自由に摂取させた。実験期間は 120 日間とし, その間 15, 30, 60, 90, 120 日ごとに, 各群から 8 匹ずつを選び, エーテル麻酔下で頸動脈より採血後, 上下顎を摘出し中性ホルマリンで固定した。また同時に大腿骨を取り出し実験に供するまで -80°C で冷凍保存した。

3. 齲蝕の評価

各歯牙とも, 齲蝕の評価のために齲窩の検索と裂溝齲蝕の検索を行った。すなわち上下顎標本は水洗後, 実体顕微鏡下で JIS 規格 10 号のメリケン針を用いて齲窩を検索し, 前報¹⁾ で述べたように Cavity Score を算出した。その後上下片顎を 0.5% 塩基性フクシン溶液で 4 時間染色, 硬組織標本薄切装置 No. 60 (Brown will Scientific Co.)

を用いて約 100 μm の薄切片とし, エナメル象牙境界部に染色部のみられる裂溝を裂溝齲蝕として評価した。

4. 血清中の抗体価について

各ラットより採血した血清に対して, マイクロタイタープレートを用い, 通法³⁾ に従ってラットの口腔内より分離した *Streptococcus mutans* RC-20 および人口腔由来の *S. mutans* NCTC 10449 株についての凝集反応を行った。凝集のみられた血清の最大希釈倍数をその血清の抗体価とした。

5. 血清中の Ca, P 量の測定

血清中の Ca 量は採取した血清試料 0.1 ml に蒸留水 3.9 ml, ランタン溶液 1 ml を加え総量 5 ml としたものを測定用試料とし, 原子吸光光度計 (Perkin Elmer AA-603 型) および自動サンプリング装置 (Perkin Elmer AS-1) を用いて小椋らの方法⁴⁻⁶⁾ に従って測定した。血清中の P 量は血清 1 ml に 5% トリクロール酢酸 9 ml を加え 1,500G, 10 分間遠心分離を行いタンパク質を除去, 上清 3 ml を試料として Fiske Sabarrow 法⁷⁾ により測定した。

6. 大腿骨の Ca, P 量の測定

冷凍保存した大腿骨は軟組織を除去, 水洗した後 100°C で恒量になるまで乾燥し, その後電気炉中で 500°C, 4 時間加熱灰化した。灰化した試料 10 mg を 0.6 mM 塩酸溶液 1 ml に溶解, 蒸留水で 50 倍に希釈したものを Ca 測定用試料とした。これをさらに蒸留水で 100 倍に希釈したものを P 測定用試料としておのおの前記の血清中 Ca, P の測定法に準じて測定した。

III. 結 果

1. ラットの体重増加量

実験期間中 (15, 30, 60, 90, 120 日) の各ラットの摂取飼料別体重増加量を表 1 に示す。MR-ラボブリーダー群, D-2000 群ともに ISR より SD ラットのほうが体重増加量が大きかった。また ISR では MR-ラボブリーダー群と D-2000 群の体重増加量に大きな差は認められなかったが, SD ラットでは MR-ラボブリーダー群の体重増

表 1 ISR および SD ラットの飼育飼料別体重増加量

群		実験日数	15	30	60	90	120
ISR	MR-ラボブリーダー		67.1 g	131.7 g	208.1 g	253.1 g	285.3 g
	D-2000		58.7	121.3	202.9	255.4	276.5
SD	MR-ラボブリーダー		102.1	182.9	290.4	352.7	405.9
	D-2000		88.0	162.9	251.0	317.8	382.6

表 2 ISR および SD ラットの飼育飼料別、齧蝕罹患率と 1 匹平均齧窩数

群 日数	MR-ラボブリーダー				D-2000			
	ISR		SD		ISR		SD	
	P	E	P	E	P	E	P	E
15	0	0	0	0	0	0	0	0
30	0	0	0	0	28.6	0.57	0	0
60	0	0	0	0	28.6	1.14	0	0
90	0	0	0	0	66.7	4.44	37.5	1.25
120	12.5	1.0	8.3	0.08	83.3	7.17	50.0	1.42

P : Prevalence : 齧窩のある動物の百分率

E : Extent : 齧窩の総数
動物数

加量が D-2000 群に比べて大きい傾向がみられた。

2. 齧蝕の評価

1) 齧窩について

各実験群の齧蝕罹患率、1 匹平均齧窩数を表 2 に示す。MR-ラボブリーダーを与えて飼育した群では ISR, SD ラットとも、120 日飼育グループのみに齧窩がみられたが、齧蝕罹患率 (Prevalence)、1 匹平均齧窩数 (Extent) とともに ISR のほうが高かった。D-2000 を与えて飼育した群では ISR は 30 日飼育グループから齧窩が観察されたが、SD ラットでは 90 日、120 日飼育グループにのみ齧窩が認められ、齧蝕罹患率、1 匹平均齧窩数とも SD ラットより ISR のほうが大きな値を示した。さらに齧蝕進行度を前報¹⁾の方法で計算すると表 3 に示すように MR-ラボブリーダー群、D-2000 群ともに ISR の齧蝕のほうが進行度の高いことが明らかになった。

2) 裂溝齧蝕について

臼歯の薄切片について実体顕微鏡によって齧蝕の発生状態を観察した結果を表 4 に示す。裂溝齧蝕は ISR, SD ラットともに各飼料群の動物に認められ、MR-ラボブリーダー飼育群では飼育日数にかかわらず裂溝齧蝕罹患率 (Prevalence)、1 匹平均齧蝕裂溝数 (Extent) とともに SD ラットが ISR よりも多い傾向がみられたが統計的に有意な差はみられなかった。Diet-2000 飼育群では 15, 30, 60 日飼育群で SD ラットの裂溝齧蝕罹患率が高かったが 1 匹平均齧蝕裂溝数は SD ラット、ISR の間に大きな差はみられなかった。そこで裂溝齧蝕の認められる有病ラットのみについて 1 匹当たり齧蝕裂溝数を算出し、表 5 にその結果を示した。MR-ラボブリーダー飼育群では SD ラットに齧蝕裂溝が多い傾向があるが Diet-2000 飼育群では ISR のほうが多く、特に 30 日、60 日飼育群ではその傾向が顕著であった。しかし、いずれも 5% の危険率で ISR と SD ラットの間に有意な差はみられなかった。

表3 ISR および SD ラットの飼育飼料別
齧蝕進行度 (Intensity)

日数	MR-ラボブリーダー		D-2000	
	ISR	SD	ISR	SD
15	0	0	0	0
30	0	0	0.71	0
60	0	0	1.71	0
90	0	0	8.11	2.5
120	1.5	0.17	11.17	2.75

Intensity : 各動物の 1 歯ごとの Cavity Score の合計
動物数

表5 齧蝕有病ラットの 1 匹当り齧蝕裂溝数

日数	MR-ラボブリーダー		D-2000	
	ISR	SD	ISR	SD
15	2.0	1.7	4.2	3.2
30	1.5	2.3	8.0	3.8
60	2.3	2.7	7.6	4.0
90	2.1	2.5	6.7	6.0
120	3.5	3.7	5.1	6.6

表4 ISR および SD ラットの飼育飼料別, 齧蝕裂溝の評価

日数	MR-ラボブリーダー				D-2000			
	ISR		SD		ISR		SD	
	P	E	P	E	P	E	P	E
15	14.28	0.28	50.0	1.67	57.14	2.57	85.71	2.42
30	28.57	0.43	85.71	2.00	57.14	4.57	100.0	3.71
60	42.85	1.28	87.5	2.50	42.86	3.28	87.5	3.43
90	66.67	1.44	75.0	1.88	100.0	6.77	100.0	5.75
120	50.0	1.75	100.0	3.83	100.0	5.16	100.0	6.55

P : 齧蝕のある動物の百分率

E : 齧蝕裂溝の総数
動物数

裂溝齧蝕の発生状態を上下顎別にみると ISR, SD とともに飼料, 飼育日数を問わず下顎に多く発生し, ISR の MR-ラボブリーダー群では上顎にはほとんど齧蝕を認めなかった (図 1)。

3. 血清中の抗体価

S. mutans RC-20に対する抗体価の平均値を表 6 に示す。各群とも90日以上飼育の各群に抗体価が高くなる傾向がみられたが, 動物の種類, 飼料の違いによる抗体価の差はみられなかった。また各動物の齧蝕裂溝数, 齧窩数との間にも一定の関係はみられなかった。*S. mutans* NTCC 10449に対する抗体価は各群とも実験期間中ほとんど変化はみられなかった。

4. 血清中の Ca, P 量について

血清中の Ca 量, P 量ともアルビノラットの正

常範囲の値⁶⁾で, 動物の種類, 飼料等による差はみられなかった。表 7 に各群の Ca 量, P 量, および Ca/P の平均値を示した。

5. 大腿骨の Ca, P 量について

表 8 に各群の動物の大腿骨中の Ca 量, P 量および Ca/P 比を示した。大腿骨の Ca/P 比は MR-ラボブリーダー群では動物の種類, 餌, 日齢による差はみられなかった。Diet-2000 群では日齢の若い SD ラットがやや高い傾向がみられるものの ISR のそれに比べて有意な差ではなかった。

IV. 考 察

ISR の齧蝕発生の要因を明らかにする目的で齧蝕誘発実験を行い, SD ラットの齧蝕発生状態と

図1 ISR および SD ラットの飼育飼料別1匹当り齶蝕裂溝数

表6 ISR および SD ラットの飼育飼料別、血清中の抗体価（凝集価）

群 抗原 日数	MR-ラボブリーダー				D-2000			
	ISR		SD		ISR		SD	
	RC-20	10449	RC-20	10449	RC-20	10449	RC-20	10449
15	2.67	2.00	2.25	2.25	2.00	2.00	1.75	2.00
30	2.50	2.00	3.00	2.00	2.00	2.00	1.75	1.75
60	2.30	2.00	2.00	2.00	2.67	3.00	2.25	1.50
90	—	1.67	3.75	1.30	3.67	2.33	4.00	2.00
120	4.00	2.75	3.50	2.25	4.00	2.50	3.50	2.50

比較検討を行った。21日齢で離乳後、市販飼育用飼料 MR-ラボブリーダーで飼育した群では齶窩は120日飼育群のみに観察されたが ISR のほうが罹患率、平均齶窩数ともに高く、齶蝕進行度も大きい値を示した。しかし染色薄切標本で観察される裂溝の初期齶蝕像は罹患率、1匹当り齶蝕裂溝数とも ISR に比べ SD ラットのほうが多い傾向がみられた。このことから ISR の齶蝕は SD ラッ

トの齶蝕に比べて進行が早く、120日飼育群では大きな齶窩が観察されたものと思われた。これは ISR の保存顎骨標本の齶蝕が100日齢以上の動物で増加していたという前報¹⁾の結果と一致する。また、保存顎骨標本の齶蝕は下顎のみに発症することが特徴的であったが、今回の実験齶蝕でも ISR の場合はほとんどが下顎に発症した。また齶蝕有病ラットの1匹当り齶蝕裂溝数を比較したと

表7 ISR および SD ラットの飼育飼料別
血清中の Ca, P 量

日数	群	MR-ラボ ブリーダー		D-2000	
		ISR	SD	ISR	SD
15	Ca	7.98	10.37	8.18	10.46
	P	10.31	10.46	10.78	11.77
	Ca/P	0.77	0.99	0.75	0.88
30	Ca	9.11	9.22	9.99	11.16
	P	9.14	9.43	10.31	9.99
	Ca/P	0.99	0.98	0.97	1.11
60	Ca	8.58	7.55	9.80	9.55
	P	8.20	8.88	9.01	9.49
	Ca/P	1.05	0.85	1.09	1.01
90	Ca	6.74	7.46	8.04	8.30
	P	9.53	10.05	9.38	8.87
	Ca/P	0.71	0.74	0.86	0.94
120	Ca	8.37	7.62	7.90	7.38
	P	7.59	7.20	7.96	8.60
	Ca/P	1.10	1.06	0.99	0.86

mg/dl

表8 ISR および SD ラットの飼育飼料別
大腿骨中の Ca, P 量

日数	群	MR-ラボ ブリーダー		D-2000	
		ISR	SD	ISR	SD
15	Ca	75.75	—	64.75	75.00
	P	35.05	—	30.25	22.75
	Ca/P	2.16	—	2.14	3.29
30	Ca	80.50	59.71	67.33	63.08
	P	33.88	24.29	28.03	19.83
	Ca/P	2.38	2.46	2.40	3.18
60	Ca	75.50	97.33	96.67	92.50
	P	29.68	39.77	30.50	34.60
	Ca/P	2.54	2.54	3.17	2.67
90	Ca	90.21	102.50	86.96	109.25
	P	33.33	39.30	35.19	40.74
	Ca/P	2.64	2.61	2.47	2.68
120	Ca	98.00	105.57	110.17	112.50
	P	42.00	41.47	43.55	41.70
	Ca/P	2.33	2.55	2.53	2.69

mg/g (Wt)

ころ両者に差はみられなかったが、これは ISR の齶蝕感受性に個体差が大きいことを示しているように思われた。

一方、砂糖を56%含有する齶蝕誘発性食餌 Diet-2000 で飼育した場合は、ISR では30日飼育群から齶窩が観察されたが SD ラットでは90日以上飼育した群で齶窩がみられた。1匹平均齶窩数は ISR が多く、齶蝕進行度も ISR のほうが高かった。裂溝にみられる初期齶蝕の発生は実験期間15～60日では SD ラットの罹患率が ISR より高いことから ISR の齶蝕が SD ラットより重症化しやすいことが考えられた。しかし1匹当りの齶蝕裂溝数には差がみられず、したがって齶蝕有病ラットの齶蝕裂溝数は、ISR のほうが SD ラットより多く、MR-ラボブリーダー飼育の場合と同様に ISR の齶蝕感受性は個体差が大きいことが示唆された。以上の結果から ISR はいったん感染した齶蝕の進行が SD ラットより早く、重症化することを示している。この要因を考えるため

に血中の *S. mutans* に対する抗体価、また ISR の特徴である Ca 代謝異常との関連を考え、血清中および大腿骨の Ca, P 量を測定したが、いずれも齶蝕の発生との関連は見い出せなかった。前報¹²⁾で ISR の口腔内 *S. mutans* 菌数には個体差が大きいこと、日齢60日以上で *S. mutans* 菌数が増加することを示したが、このことが ISR の齶蝕感受性、進行性と関連のあることも考えられる。

ラットの齶蝕感受性については歯牙の形態と関係があるとする報告が多く、Grainger ら⁹⁾はラットの上顎第一臼歯について裂溝上部の幅、傾斜角度、裂溝の深さなどを各方向から検討し、裂溝の深さが齶蝕感受性と最も関係があるといっている。また、Kifer ら¹⁰⁾は遺伝的に齶蝕感受性のラットと齶蝕抵抗性のラットの下顎臼歯の裂溝の広さを比較し感受性ラットのほうが有意に大きいと報告している。今回の実験でも染色薄切標本を用い、顕微鏡下でマイクロメーターにより ISR と SD

の裂溝の形態を測定, 比較したが差はみられなかった。長期間飼育された ISR の保存顎骨標本では高度の齲蝕が観察されたのに反して, 今回の齲蝕誘発実験では, SD ラットの場合と比較して齲蝕罹患率が低く, 初期齲蝕の裂溝数もむしろ少ない傾向があった。しかし, 飼育期間が長くなるにつれて ISR の齲蝕罹患率は高くなり齲蝕進行度も増加した。著者らは Wistar 系のラットを用いた実験齲蝕では感染期間を離乳後一週間と考えている¹¹⁾が, ISR では齲蝕の感染期間が Wistar 系ラットと異なり長期間に渡る可能性もあり, ISR の口腔内の *S. mutans* 数が日齢の大きい個体で増加する¹²⁾こととも合わせて ISR の齲蝕感染時期や齲蝕の拡大因子の検索が必要と考えられる。

V. ま と め

齲蝕誘発性食餌 Diet-2000, 普通飼育用飼料 MR-ラボブリーダーを用いて ISR および SD 系ラットの齲蝕発生と進行性を比較した。

ISR の齲蝕感受性は個体差が大きく, いったん感染した齲蝕の進行は早く, 重症化するものが多いことが明らかになった。

謝 辞

稿を終わるにあたり, 本研究の実施にご協力いただきました麻布大学獣医学部家畜環境学科の学生諸氏に深く感謝いたします。

文 献

- 1) 尾崎文子, 佐藤 誠, 岡田昭五郎, 石橋正彦: いしばしラットの齲蝕について I. 齲蝕罹患

状態. 口病誌 58: 687-691, 1991.

- 2) Keyes, P. H. and Jordan, H. V.: Periodontal lesions in the syrian hamster-III finding related to an infectious and transmissible component. Arch. Oral Biol. 9: 377-400, 1964.
- 3) 医科学研究所学会編: 細菌学実習提要 改訂 5 版. 東京, 1977, 丸善, 231-232.
- 4) 小椋秀亮, 加藤有三, 山田庄司: 多用途微量金属分析装置による生物試料中の金属定量 I. 口病誌 44: 257-266, 1977.
- 5) 小椋秀亮, 山田庄司, 加藤有三: 多用途微量金属分析装置による生物試料中の金属定量 II. 口病誌 44: 483-491, 1977.
- 6) 山田庄司, 加藤有三, 小椋秀亮: 多用途微量金属分析装置による生物試料中の金属定量 III. 口病誌 47: 391-396, 1980.
- 7) 斉藤正行: 光電比色計による臨床化学検査. 東京, 1955, 南山堂, 185-187.
- 8) 石井しん, 吐山豊秋, 坂口 考監訳: 実験動物とヒトの血液, 臨床生化学検査値集. 東京, 1983, 清至書院, 160.
- 9) Grainger, R. M., Paynter, K. J. and Show, J. H.: Differences in the morphology and size of a caries susceptible and caries resistant strain of rats. J. Dent. Res. 38: 105-120, 1959.
- 10) Kifer, P. E., Hunt, H. R., Hopper, C. A. and Witkop, C. J.: A comparison between the widths of the fissures of the lower molars of caries-resistant and caries-susceptible albino rats (*Rattus Norvegicus*) J. Dent. Res. 35: 620-629, 1956.
- 11) 大西正男, 尾崎文子, 村上淑子: ラット歯牙年齢と *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.
- 12) 尾崎文子, 佐藤 誠, 岡田昭五郎, 石橋正彦: いしばしラットの齲蝕について II. 口腔内 *Streptococcus mutans* について. 口病誌 58: 692-695, 1991.