単一感染動物による歯垢形成に関する実験的研究

一歯垢量の評価法ならびに比較について一

石 田 悦 保 色 川 俊 則 福 岡 康 裕
梁 川 誠 郎 加 藤 伊 八

東北大学歯学部歯科保存学第一講座

(主任：加藤伊八助教授)

(昭和52年12月20日受付)

Experimental Study of Plaque Formation in Conventional and Gnotobiotic Mice: Evaluation of Stained Areas on the Tooth Surfaces by Disclosing Agent

by

Etsuo ISHIDA, Yasuhiro FUKUOKA, Seiro YANAGAWA,
Toshinori IROKAWA, Ihachi KATO

Department of Endodontics and Periodontics
Tohoku University, School of Dentistry

The present study was carried out to establish the method for evaluating the plaque on the tooth surfaces of experimental animals, and to compare the degree of stained areas with disclosing agents between conventional and mono-infected gnotobiotic mice.

ICR: JCL germfree mice as control and gnotobiotic mice by a plaque forming *Str. mutans* strain PK1 were used. The mono-infected mice were divided into two experimental groups, one was bred with the 10% sucrose added water, another with nonsucrose water, and both were evaluated 1 week after inoculation.

The results obtained were follows;

- 1) The plaque could be stained by tincture of iodine more remarkably than other disclosing agents, and this suited our purpose.
- 2) The staining index was statistically the smallest in germfree mice among the four groups.
- 3) The nature of staining in germfree mice was different from the other groups, and the stained materials seemed to be food debris or substances derived from saliva.
- 4) In the mono-infected mice, sucrose-added group had a tendency to show the larger staining index than non-sucrose group.

緒 言

歯垢は、歯周疾患の発症ならびに進行に関与する重要

な局所因子である。Lilienthal¹⁾らは、Periodontal indexと歯垢沈着量との間には強い正の相関があり、歯垢は歯周疾患の最も有力な原因的因子であることを報告している。また Ash²⁾ らと O'Leary³⁾ らは、歯垢と歯肉炎の

程度との間には著しい関連性があることを報告している。

先に加藤^{4,5)}らは、動物実験によって歯垢形成機序を詳しく検索することを目的として、無菌マウスに歯垢形成性 *streptococcus mutans* を接種し、菌の定着性について検索した。すなわち、ICR:JCL 系無菌マウスに *Str. mutans* PK1 を経口投与し、歯面沈着物中の菌量 (CFU) を測定した結果、接種後 4 週から 13 週までは、ほぼ同程度の定着性を示し、単一感染ノートバイオーツの歯面に、 $5.8 \times 10^4 \sim 1.1 \times 10^6$ CFU/g の菌量が維持されていることを報告した。

今回は、こうした単一感染マウスの歯面を観察し、歯垢形成量について実験を行った。すなわち、先づ歯垢形成量を評価するための、染色剤、染色方法ならびにその被染色部位の評価方法などを検討し、また無菌飼育マウス、普通飼育マウスおよび単一感染マウスについて、その染色の程度を比較し、2, 3 の知見を得たので報告する。

実験材料および方法

1. 歯垢染色剤ならびに評価方法の検討

先ず、この実験に適した歯垢染色剤を選択するために、表 1 に示す 5 種類の染色剤について検討を行った。即ち、エリスロシン、局方ヨードチンキ、塩基性フクシン、トルイジンブルーおよびマーキュロクロムなどであった。エリスロシンは、臨床的ならびに実験的に広く用いられている 0.2% エリスロシン溶液であり⁶⁻⁸⁾、局方ヨードチンキはヨウ素 60 g、ヨウ化カリ 40 g に 70% エタノールを加えて 1000 ml としたものであり、同じヨウ素を主剤とする染色液にはスキナー氏液⁹⁾ があるが、今回は単にヨードチンキを用いた。また 0.5% 塩基性フクシン溶液は、塩基性フクシン粉末 0.5 g に対し、蒸留水 100 ml を加えたものである。トルイジンブルーおよびマーキュロクロム液については、それぞれ Turesky¹⁰⁾ の処方と Peterson¹¹⁾ らの方法に従った。

各染色剤による染色方法は、7 週令から 30 週令の普通飼育マウスを用い、下顎を血液および組織などが歯面に付着しないように注意しながら切断、摘出し、左側臼歯を蒸留水で軽く水洗した後、先に述べた各染色液中に 30 秒間浸漬し、さらに余分の色素を除去するために水洗後に、歯面が比較的乾燥してからオリンパス実体顕微鏡 MTX 型にて観察した。また右側臼歯については、技工用エンジンにより低速回転のもとでブラシコーンで

表 1 染色剤の種類

0.2% エリスロシン溶液
局方ヨードチンキ
0.5% 塩基性フクシン溶液
トルイジンブルー飽和溶液
マーキュロクロム液

舌側歯面清掃洗滌後、同じく染色・水洗後に観察した。その結果、0.2% エリスロシンでは、乾燥状態において顕微鏡照明下で観察中に徐々に退色し、数分で不鮮明となる。また、塩基性フクシンおよびトルイジンブルーも同様に不鮮明であり、被検体を拡大して観察するためには、なお不鮮明であった。マーキュロクロムは、Peterson¹¹⁾ の述べているように、染色濃度は強いが、色素のかぶりが大きく歯垢沈着部以外も染色され、歯垢沈着部と非沈着部と判別が困難であった。以上 4 種の染色剤と比較して、ヨードチンキは、歯垢沈着部と非沈着部との間のコントラストも強く、その境界も明瞭であり、この実験目的に適しているように思われた。また、ブラシコーンによって研磨した右側臼歯の舌側面は、マーキュロクロムで淡く染色されたが、他の染色剤ではほとんど染色されないこと、およびその染色部位などから、被染色物は主に歯垢であると思われた。また鮮明度および染色部、非染色部の判別の明瞭さにおいて、ヨードチンキが最も優れており、この実験に最も適しいと思われたので、以下の実験の歯垢染色剤として採用した。

一方、染色の程度の評価は、野口¹²⁾ とほぼ同様な方法で染色部分の面積によって行った。すなわち、マウス臼歯の舌側面の拡大率約 20 倍の拡大模式図上に、被染色部を実体顕微鏡で観察しながら記入し、その面積を 1 mm 四方のます目の数で表わし、拡大図全体の評価部位のます目の数、第 1 臼歯 952、第 2 臼歯 381、合計 1333 に対する割合 (%) を染色指数とした。この場合、第 3 臼歯は歯冠が低位で、しかも歯冠形態が小さく、第 1、第 2 臼歯よりも不揃いであるため評価部位から除外した。また臼歯の咬頭は増令的に破折または咬耗が見られ、またそのために象牙質が露出するものが多く、染色性が変化するため観察しにくく、計測が困難な場合があるので、今回の実験における被染色部の評価部位から除外した。つまり評価部位は、図 1 に示すマウス下顎臼歯の舌側面の模式図上で、第 3 臼歯遠心歯肉縁と、第 1 臼歯近心歯肉縁から切端側へ一定の距離の点を結んだ直線より歯頂側、すなわち図 1 において、第 1、第 2 臼歯の斜線部位を除いた歯面に限定した。

図 1 染色面積測定部位
マウス M₁, M₂ 舌側面の拡大模型図 (約 20 倍) で斜線部分は評価部位から除外した。

表 2 実験動物の種類
(ICR : JCL 系マウス)

第 1 群	普通飼育マウス
第 2 群	無菌飼育マウス
第 3 群	Str. mutans 単一感染マウス
第 4 群	Str. mutans 単一感染マウス (10% sucrose 添加飲料水)

2. 普通飼育および単一感染マウスの歯面の染色程度の比較

この実験に用いた動物は、ICR : JCL 系マウス (12 週令~15 週令) で、表 2 に示されているように、ヨードチンキによる歯面の染色面積によって、染色指数を求め 4 群について比較した。

第 1 群は、普通飼育マウス (♀ 5) で、第 2 群は無菌飼育マウス (♂ 2, ♀ 3) である。また第 3 群は Str. mutans PK1 による単一感染マウス (♂ 1, ♀ 4) で、感染処置後 1 週間経過したものである。第 4 群は第 3 群と同様の単一感染マウス (♀ 5) で、飲料水中に 10% (W/V) 蔗糖を添加して飼育したものである。各動物をアイソレーター内で頸椎脱臼法で屠殺し、飼育装置外に搬出して、前述の方法で歯面を染色して被染色指数を求めた。また、無菌動物の飼育器材およびその滅菌方法、無菌であることを確認するための無菌試験の方法ならびに菌の接種方法などは、我々がすでに報告した方法に従った^{4,5,13)}。

結 果

各群のマウスの歯面をヨードチンキで染色し実体顕微鏡で観察しながら左右第 1, 第 2 臼歯の舌側の被染色部を拡大模式図上に記録した。図 2 において A) の①は普通飼育群の症例 2 の右側で、被染色面積は合計 330 であり染色指数は 24.7 であった。A) の②は同様に普通

図 2 各群の染色部位

飼育群の症例 4 の左側で、面積の値は 282 で指数は 21.1 であった。B) の①, B) の②は無菌群の症例 7 と 9 の左側で染色面積の合計は各々 76 と 86 であり染色指数は 5.7 と 6.4 であった。C) の①は単一感染群の症例 11 の右側であり, C) の②は症例 14 の左側の被染色部を示

表 3 染色面積

	症例	性別	左側臼歯	右側臼歯	合計	平均
第 1 群 (普通飼育)	1	♀	340	366	706	663.6
	2	♀	320	330	650	
	3	♀	237	335	672	
	4	♀	282	299	581	
	5	♀	343	366	709	
第 2 群 (無菌飼育)	6	♀	170	143	313	231.6
	7	♀	76	126	202	
	8	♀	141	117	258	
	9	♂	86	112	198	
	10	♂	98	89	187	
第 3 群 (単一感染)	11	♀	234	230	464	592.2
	12	♀	315	304	619	
	13	♂	361	324	685	
	14	♀	310	224	534	
	15	♀	387	265	659	
第 4 群 (蔗糖添加 単一感染)	16	♀	374	444	818	760.8
	17	♀	183	419	602	
	18	♀	449	369	818	
	19	♀	435	516	951	
	20	♀	269	346	615	

表 4 染色指数

	症例	性別	左側臼歯	右側臼歯	平均
第 1 群 (普通飼育)	1	♀	25.5	27.4	24.9
	2	♀	24.0	24.7	
	3	♀	17.7	25.1	
	4	♀	21.1	22.4	
	5	♀	25.7	27.4	
第 2 群 (無菌飼育)	6	♀	12.7	10.7	8.6
	7	♀	5.7	9.4	
	8	♀	10.5	8.7	
	9	♂	6.4	8.4	
	10	♂	7.3	6.6	
第 3 群 (単一感染)	11	♀	17.5	17.2	22.2
	12	♀	23.6	22.8	
	13	♂	27.0	24.3	
	14	♀	23.2	16.8	
	15	♀	29.0	19.8	
第 4 群 (蔗糖添加 単一感染)	16	♀	28.0	33.3	29.5
	17	♀	13.7	31.4	
	18	♀	33.6	27.6	
	19	♀	32.6	38.7	
	20	♀	20.1	25.9

図 3 各群の染色指数

第 1 群は普通飼育，第 2 群は無菌飼育，第 3 群は Str. mutans 単一感染，第 4 群は Str. mutans 単一感染および 10% 蔗糖添加飲料水摂取マウスを示す。

し，染色指数は各々 17.2，16.8 であった。D) の①は単一感染および蔗糖添加の症例 17 の右側を，また同様に D) の②は，症例 19 の左側を示し，染色指数はそれぞれ 31.4 および 38.7 であった。

表 3 は，普通飼育，無菌飼育，単一感染および 10%

sucrose を添加した飲料水で飼育した単一感染マウスの染色面積をまとめたもので，各染色面積と各群の平均値である。表 4 は，各群の染色指数を示している。また図 3 は，群別に各症例の染色指数をヒストグラムによって比較したものである。染色面積ならびに染色指数の平均値は，第 4 群の Str. mutans PK1 単一感染マウスを 10% sucrose 添加飲料水で飼育したものが最も高く，それぞれ 760.8 と 29.5 であった。また無菌飼育群では，染色指数の平均は 8.6 と著しく小さな値を示し，他の 3 群との間に統計的に有意差が認められた ($p<0.001$)。また第一群の普通飼育群および第 3 群の単一感染群では，それぞれ 24.9，22.2 であり，これら両群はほぼ同程度の染色性を示している。また 3 群と 4 群の染色指数を比較すると，その平均値はそれぞれ 22.2 と 29.5 であり，統計的に明らかな有意差は認められなかったが，4 群の方が高い値を示す傾向が認められた。

考 察

歯垢沈着の程度を評価するために、種々の歯垢染色剤が挙げられている。Peterson¹¹⁾は、この歯垢を染め出すため、臨床で用いる3つの染色液、マーキュロクロム、ビスマルクブラウン、ヨード溶液を挙げており、なかでもマーキュロクロムとヨード溶液が最も鮮明に歯垢を染色しうるとしている。近年臨床においては、エリスロシン(F.D.C. Red No.3)を含む染色剤が一般に用いられているようである。また Arnim⁶⁾は、歯垢染色剤として塩基性フクシンを用いていたが、人体に対する為害性があるとされてから、臨床ではエリスロシンの使用を推奨している⁷⁾。また Lang¹⁴⁾、Cohen⁸⁾らは、蛍光色素を含む染色剤を用いて患者の口腔内で染色面積を測定している。また Katayama¹⁵⁾は酸化還元電位指示薬を応用し、プラークの成熟度を見ている。これらの染色剤は、いずれも臨床において人の口腔内で使用するもので、不快な味覚または嗅い、衣服の汚染、生体に対する為害性などが考慮されている。しかし、動物実験に用いる歯垢染色剤の条件は、歯面の歯垢沈着部位が確実に、しかも鮮明に染め出されることである。この実験では、臨床で用いられない局方ヨードチンキおよびトルイジンブルーも含めて、実験目的にかなった歯垢染色剤を選択するために各種の色素について検討した。その結果、ヨードチンキが他の4種類の薬剤に比較して優れた染色性を示し、我々の動物実験による歯垢形成に関する研究に、最も適しているように思われた。

今回の実験では、各群の歯垢沈着の程度を表わす方法として、被染色部位の面積を1辺1mmのグラフ用紙を用いて行ったが、更に正確な値を得るためには、planimeterを用いる必要があろう。また各群の染色指数を比較すると、第2群の無菌飼育群では8.6と著しく低い値を示し、歯頸部および隣接面に極く軽度の染色性を示したが、他群の染色性とは多少異っているように思われた。その歯面沈着物中には、細菌は存在し得ないのであるから、勿論歯垢ではなく、食物残渣またはその他の有機物質が滞留して、染色されたものと思われる。

単一感染群と、更に10%蔗糖添加飲料水で飼育した群を比較してみると、染色指数の平均は、それぞれ22.2および29.5と、後者の方が高い値を示したが、明瞭な統計的有意差は認められなかった。しかし、この *Str. mutans* はデキストランを産生し歯垢を形成すると言われている¹⁶⁻¹⁹⁾。また、この菌の齧蝕原性および歯周疾患

に関連する実験では、飼料中に蔗糖を添加し、歯垢形成ならびに細菌の定着性に対する蔗糖の影響が検索されている。このことから、飲料水中に蔗糖を添加した場合と飼料中に添加した場合、総摂取量の相違や、蔗糖と飼料を同時に与えることにより、歯垢形成または菌の定着性が変わってくることも考えられる。また今回の実験は、感染後1週目で実験期間も短期間であったが更に長期間にわたる観察が必要である。

無菌マウスの歯面の染色性を他の3群、すなわち普通飼育群、単一感染群、および蔗糖添加飲料水で飼育した単一感染群のそれと比較すると明らかな統計的有意差が認められた。これは、普通飼育群では自然の口腔内菌相を形成しており、また単一感染群では *Str. mutans* が存在していることから、これらの細菌が歯垢形成に関与しているためと思われる。

また普通飼育マウスおよび単一感染マウスの染色指数は、それぞれ24.9および22.2であり普通飼育群の方が高い値を示したことから歯垢形成は多数種の細菌の相互作用によって促進され、*Str. mutans* の単一感染では十分な歯垢形成能を発揮し得ないことも考えられる。

総括および結論

動物実験によって、歯垢形成機序を詳しく観察するための第1段階として、マウス口腔内における歯垢形成量の評価法を確立し、またその方法を用いて、普通飼育群、無菌飼育群ならびに単一感染群の歯面を染色し、各群の被染色面積を測定し、全評価部に対するパーセントすなわち染色指数を求め、比較検討を行った。

単一感染群は、*Str. mutans* PK1 の 10^8 CFU を経口接種したものと、菌接種と同時に10%蔗糖添加飲料水で飼育した2種類で、いずれも感染後1週間を経過したものである。またこの実験に用いたマウスは、いずれもICR:JCL系のマウスで、飼料は普通の繁殖用固型飼料を用いた。以上の実験から次の結論を得た。

1) 5種類の歯垢染色剤について比較検討した結果、染色部と非染色部の判別が明瞭で、操作性からもヨードチンキが最も優れており、この種の実験に適しているように思われた。

2) 無菌飼育マウスの被染色面積は、他の3群より小さく、染色指数について比較すると統計的有意差が認められた。

3) 無菌マウスにおける染色性は、他群とは異なっており、食物残渣、唾液由来の物質などであると思われる。

た。

4) 普通飼育群および単一感染群は、無菌飼育群と比較して高い染色指数を示したが、このことは、細菌の存在によって歯垢の形成が起こることを示すものと思われる。

5) 単一感染マウスにおいて、飲料水中に蔗糖を添加したものと添加しないものの染色指数は、それぞれ 29.5, 22.2 であり、今回の実験期間では、蔗糖添加群に高い値を示す傾向が認められた。

6) 以上の結果から、この実験に用いた歯垢量の評価法ならびに歯垢形成に関する実験モデルは、歯垢形成に及ぼす諸因子について検索する有効な手段となりうると思われる。

稿を終えるにあたり、終始御懇篤なる御指導と御校閲を賜った東京医科歯科大学第 3 保存学教室砂田今男教授に、心から謝意を表します。

(本論文の要旨は、第 39 回日本歯科保存学会例会、および第 20 回秋期日本歯周病学会において発表した。)

文 献

- 1) Lilienthal, B., Amerena, V., and Gregory, G. : An Epidemiological Study of Chronic Periodontal Disease. *Archs. Oral Biol.*, 10 : 553-566, 1965.
- 2) Ash, M.M., Gitlin, B.N., and Smith, W.A. : Correlation between Plaque and Gingivitis. *J. Periodontol.*, 35 : 424-429, 1964.
- 3) O'Leary, T.J., Shannon, I.L., and Prigmore, J.R. : Clinical Correlation and Systemic Status in Periodontal Disease. *J. Periodontol.*, 33 : 243-251, 1962.
- 4) 加藤伊八, 梁川誠郎, 砂田今男 : 歯垢形成性 *Streptococcus mutans* の無菌マウス口腔内への定着に関する研究. *日歯周誌*, 19 : 143-146, 1977.
- 5) 加藤伊八 : 無菌マウスへの歯垢形成性 *Streptococcus mutans* の定着性に関する研究—歯周病の実験モデルへのアプローチ—. *日歯周誌*, 18 : 215-224, 1976.
- 6) Arnim, S.S. : The Use of Disclosing Agents for Measuring Tooth Cleanliness. *J. Periodontol.*, 34 : 227-245, 1963.
- 7) Arnim, S.S. : Thoughts Concerning Cause, Pathogenesis, Treatment and Prevention of Periodontal Disease. *J. Periodontol.*, 29 : 217-223, 1958.
- 8) Cohen, D.W., Stoller, N.H., Chace, R., Laster, L. : A Comparison of Bacterial Plaque Disclosants in Periodontal Disease. *J. Periodontol.*, 43 : 333-338, 1972.
- 9) Skinner, F.H. : The Prevention of Pyorrhea and Dental caries by oral prophylaxis. *Dent. Cosmos*, 56 : 299-309, 1914.
- 10) Turesky, S., Renstrup, G., and Glickman, I. : Histologic and Histochemical Observations Regarding Early Calculus Formation in Children and Adults. *J. Periodontol.*, 32 : 7-14, 1961.
- 11) Peterson, S. : *Clinical Dental Hygiene*. 4th ed. 88-89, The C.V. Mosby Co., Saint Louis 1972.
- 12) 野口俊英 : デキストラナーゼの歯垢沈着に及ぼす影響について—アカゲザルにおける観察—*口病誌*, 39 : 787-799, 1972.
- 13) 日本実験動物研究会 (無菌試験の基準に関する委員会) : 無菌動物の無菌試験法について, *実験動物*, 21 : 35-38, 1972.
- 14) Lang, N.P., Østergaard, E. and Løe, H. : A Fluorescent plaque disclosing agent. *J. Periodont. Res.*, 7 : 59-67, 1972.
- 15) Katayama, T., Suzuki, T., Okada, S. : Clinical Observation of Dental Plaque Maturation. *J. Periodontol.*, 46 : 610-613, 1975.
- 16) Gibbons, R.J., and Nygaard, M. : Synthesis of insoluble dextran and its significance in the formation of gelatinous deposits by plaque-forming streptococci. *Archs. Oral Biol.*, 13 : 1249, 1968.
- 17) Guggenheim, B. and Schroeder, H.F. : Biochemical and morphological aspects of extracellular poly saccharides produced by cariogenic streptococci. *Helv. Odontol. Acta.*, 11 : 131, 1967.
- 18) Gibbons, R.J. and Nygaard, M. : Interbacterial aggregation of plaque bacteria. *Archs. Oral Biol.*, 15 : 1397, 1970.

- 19) Gibbons, R.J. and Fitzgerald, R.J. : Dextran induced agglutination of *Streptococcus mutans*, and its potential role in the formation of microbial dental plaques. *J. Bacteriol.*, 98 : 341, 1969.
- 20) Carlsson, J., Egelberg, J. : Effect of diet on early plaque formation in man. *Odontologisk Revy*, 16 : 112-125, 1965.
- 21) Krasse, B. : The effect of the diet on the implantation of caries-inducing streptococci in hamsters. *Archs. Oral Biol.*, 10 : 215-221, 1965.
- 22) Krasse, B. : The effect of caries-inducing streptococci in hamsters fed diets with sucrose or glucose. *Archs. Oral Biol.*, 10 : 223-226, 1965.
- 23) Gibbons, R.J., Berman, K.S., Knoettner, P. and Kapsimalis, B. : Dental caries and alveolar bone loss in gnotobiotic rats infected with capsule forming streptococci of human origin. *Archs. Oral Biol.*, 11 : 549-560, 1966.