

[原 著]

Sodium tellurite 投与による実験的う歯の発生と
口腔内レンサ球菌叢の変動に関する研究

馬場 久衛, 松本 仁人*, 田中かえで
鎌口 有秀, 金森 啓子, 長谷田順子*

東日本学園大学歯学部口腔細菌学講座
*東日本学園大学歯学部歯科薬理学講座

(主任: 馬場 久衛助教授)
*(主任: 松本 仁人 教授)

Studies on the Relation between the Experimental Dental
Caries and the Change of Oral Streptococcal Flora by
Administration of Sodium Tellurite in Rat

Hisae BABA, Yoshito MATSUMOTO*, Kaede TANAKA,
Arihide KAMAGUCHI, Keiko KANAMORI, and Noriko HASEDA*

Department of Oral Microbiology, School of Dentistry,
HIGASHI-NIPPON-GAKUEN UNIVERSITY

*Department of Pharmacology, School of Dentistry,
HIGASHI-NIPPON-GAKUEN UNIVERSITY

(Chief: Ass. Prof. Hisae BABA)
*(Chief: Prof. Yoshito MATSUMOTO)

Abstract

In rats fed on a diet containing sodium tellurite, an increase in dental caries and a change in oral streptococcal flora was observed. Dental caries developed in both the control and tellurite group, but a clear increase was seen in the latter over the former. Simultaneously, a change in proliferation of oral streptococcal flora was seen: namely, *Streptococcus*(*S.*) *mutans* was isolated in all plaque samples from pits and fissures of the control and tellurite groups, but the ratio of *S. mutans* to total streptococci was lower in the tellurite group. On the other hand, *S. salivarius* was detected from all tellurite rats, but not from the control. It was also shown that *S. salivarius* was more resistant to sodium tellurite than *S. mutans in vitro*. Further-

more, *S. milleri* was isolated at a higher rate in the tellurite group than in the control group.

From the above, it was clear that, after administration of sodium tellurite, both a qualitative and a quantitative change of oral streptococcal flora occurred. This change of flora is probably related to the increase of dental caries in the tellurite group.

Key words : Dental caries, sodium tellurite, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus milleri*

緒 言

田村ら¹⁻⁵⁾は、栄養とう歯の発生との関連について、種々の研究を行っている。Tellurium は第6属の元素であるが、これは極めて少量で動物の栄養障害を起こし、その成長を抑制することが知られている。⁶⁾そこで本剤をラットに投与して、栄養障害と実験的う歯の発生について検討を加えたところ、ラットにおいても極めて顕著な成長の抑制とう歯の多発と病巣の拡大とが見られたことを既に報告した⁸⁾。また、本剤は微生物の増殖にも影響を及ぼすことが知られており⁹⁾、本剤の投与は当然、ラットの口腔においても、その微生物叢に変動を与えていることが予想される。

本報告は、Tellurium の投与によるう歯の増加と、う蝕の発生と最も関連性の深い口腔レンサ球菌種の変動との関係について検討を加え、興味ある知見を得たので報告する。

実験方法

1. 実験動物

実験に供したラット、実験飼料、体重測定およびう歯の観察方法は松本⁸⁾らの報告と同様に行った。なお、実験に供したラットは21日令で体重が47~60gのものを使用した。対照群はう蝕誘発性飼料(sucrose ; 68.5%, casein ; 20%, soybean oil ; 5%, salts ; 5%, vita-

mins ; 1%と choline chloride ; 0.5%) で、実験群はこれに sodium tellurite を 0.1% に添加した飼料でそれぞれ12週間飼育した (Table 1)。う蝕の観察は中井の方法¹⁰⁾ に準じて行った。

2. レンサ球菌の分離方法

エーテルを吸入させて、ラットを非動化したのち、まず、滅菌綿棒を用いて、歯牙表面をまんべんなく swab して試料を採取した。ついで、臼歯部の咬合面小窩裂溝部 (う歯も含む) より先端の鋭い臼歯用探針を用いて歯垢を採取した。採取した試料は直ちに 2ml の希釈液 (KH_2PO_4 ; 3.6g, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$; 13.4g, Tween 80 ; 1g, L-cysteine · HCl ; 1g, 寒天 ; 1g, および純水 1,000ml) 入りポッター型ホモジナイザーに移し、肉眼的に均一な懸濁液となるまでホモジネートした。これを同希釈液を用いて10倍の階段希釈をし、各歯垢希釈液の 0.1ml を Mitis-Salivarius agar (Difco, 以下 MSA) に塗抹した。これを嫌氣的に 37°C で 48 時間培養したのち、室温に 24 時間放置した。平板上に發育した集落の形態的特徴によって類別しその数を数えたのち、Table 2 に示す性状検査を行い、Hamada & Slade (1980)¹¹⁾ Carlsson (1968)¹²⁾ の文献を参考にしてレンサ球菌種の同定を行った。

3. 分離菌株の性状試験

集落の形態・性状を MSA 培地を用いて調べ

た。羊血液を加えた培地による溶血性試験と、Table 2 に示す糖についての酸産生性試験は、Carlsson (1968)¹²⁾の方法で行った。

また、final pH は glucose を 1% に添加した Brain Heart infusion (Difco) で 24 時間培養後、pH メータ (TOA electric Ltd) を用いて測定した。L-arginine と esculin の加水分解は Niven ら (1942)¹³⁾ と Cowan (1974)¹⁴⁾の方法でそれぞれ行った。H₂O₂ の産生性は Kraus ら (1957)¹⁵⁾の方法で行った。sucrose からの多糖類の産生性は、Niven ら (1941)¹⁶⁾の方法で抽出し、その主なる構成糖については、加水分解後、シリカゲル薄層クロマトグラフィにより判定した。

4. 菌の増殖に対する Na₂TeO₃の影響

供試菌株は、*Streptococcus* (以下 *S.*) *mutans* E49株¹⁷⁾ *S. salivarius* ATCC9222株および実験に供したラットの口腔より分離した *S. mutans* BT11株と *S. salivarius* BT18株の 4 菌株を用いた。

overnight culture を phosphate buffered saline pH7.0 (以下 PBS) で洗浄した後、per ml 当り、おおよそ $\times 10^5$ になるように、PBS に懸濁した。その 1 ml を、種々の濃度に Na₂TeO₃ (和光純薬) を含む 10 ml の GAM 培地 (日水) に接種して、37°C で 24 時間培養し、その菌数を測

定した。菌数の測定には MSA 培地を用い、colony forming units (CFU) で計算した。

実験成績

対照群と 0.1% Na₂TeO₃ 投与群のラットの体重とう歯の罹患状況を Table 1 に示した。Table 2 に、*S. mutans*, *S. salivarius* および *S. milleri* とした分離菌株の生物学的性状を示した。Table 3 に、対照群と tellurite 投与群別にラットの口腔より分離された *S. mutans*, *S. salivarius*, *S. milleri* およびその他のレンサ球菌の分離状況を総レンサ球菌に対する比率で示した。*S. mutans* は対照群ならびに tellurite 投与群ともに、小窩裂溝部のすべての歯垢より高率で分離されたが、綿球を用いた swab 法で採取した試料からは 6 例中 2 例のみに検出され、しかもそれは低い比率であった。*S. salivarius* は tellurite 投与群からの全試料より分離されたが、対照群ではまったく分離されなかった。*S. milleri* は tellurite 投与群では全試料から高い比率で分離されたが、対照群では、6 例中 4 例に検出され、しかも低い比率であった。

sodium tellurite を添加した GAM ブイヨンに、*S. mutans* 株と *S. salivarius* 株をそれぞれ単独に接種したときの生育状況を Table 4 に示した。保存株の 2 株は、0.001% の Na₂TeO₃ を含む GAM 培地で生育可能であった。これに

Table 1 Body weight and experimental dental caries in control and tellurite groups

group	rat	sex	body weight (g)			dental caries	
			initial	final	increase	incidence	extent
control	C ₁	male	49	415	366	10	10
	C ₂	"	47	345	298	9	9
	C ₃	"	51	397	346	8	8
	average		49	386	337	9	9
0.1% sodium tellurite	T ₁	male	58	244	186	12	15
	T ₂	"	60	252	192	14	16
	T ₃	"	61	298	237	13	15
	average		60	265	205	13	15

Table 2 Characteristics of *S. mutans*, *S. salivarius* and *S. milleri* isolated from oral samples of rats

character	<i>S. mutans</i>	<i>S. salivarius</i>	<i>S. milleri</i>
Fermentation of			
mannitol	+	-	-
sorbitol	+	-	-
melibiose	+	+	-
raffinose	+	+	-
esculin	+	+(-)	+
inulin	+(-)*	+(-)	-
Hydrolysis of			
L-arginine	-	-	+(-)
esculin	+(-)	+(-)	+
Polysaccharide produced from sucrose	+ (G)**	+ (F)**	-
Hydrogen peroxide formed	-	-	-
Hemolysis in sheep blood plate	γ	γ	γ
Final pH in broth containing 1% glucose	4.19-4.51 (4.38)***	3.87-4.07 (3.95)***	4.40-4.65 (4.51)***

* : some strains ; -

** : main constituent sugar ; G=glucose, F=fructose,

*** : average of pH

Table 3 Ratio of *S. mutans*, *S. salivarius*, *S. milleri* and other streptococci to total streptococci in control and tellurite groups

group and rat	Control						0.1% sodium tellurite					
	C ₁		C ₂		C ₃		T ₁		T ₂		T ₃	
strain	swab*plaque**		swab plaque		swab plaque		swab plaque		swab plaque		swab plaque	
	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%
<i>S. mutans</i>	-	92.9	2.5	90.1	-	90.8	-	52.3	-	66.9	1.1	50.0
<i>S. salivarius</i>	-	-	-	-	-	-	4.9	6.2	2.4	7.9	5.6	6.7
<i>S. milleri</i>	4.9	-	2.5	2.6	7.2	-	57.4	6.2	72.6	5.0	49.4	2.9
other streptococci	95.1	7.1	95.0	7.2	92.8	9.2	37.7	35.4	25.0	20.1	43.8	40.3
No. of test strain	193	271	240	152	152	142	61	65	84	139	178	238

* : a specimen obtained by swab method

** : a plaque sample from pits and fissures

Table 4 Effect of sodium tellurite on the growth of *S. mutans* or *S. salivarius* strain (single inoculation)

strain	inoculum size	concentration of sodium tellurite		
		0.1%	0.01%	0.001%
	CFU	CFU	CFU	CFU
<i>S. mutans</i> E-49	8.0×10^5	0	0	2.0×10^6
<i>S. mutans</i> BT11	2.5×10^5	0	2.9×10^6	9.7×10^7
<i>S. salivarius</i> ATCC9222	1.8×10^5	0	0	2.8×10^6
<i>S. salivarius</i> BT18	2.5×10^5	0	1.5×10^8	2.1×10^9

CFU : colony forming units

(CFU / ml)

Table 5 Effect of sodium tellurite on the growth of *S. mutans* and *S. salivarius* strains (mixed inoculation)

strain	inoculum size	concentration of sodium tellurite		
		0.1%	0.01%	0.001%
<i>S. mutans</i> E-49	1.2 × 10 ⁵ CFU	0 CFU	1.0 × 10 ⁴ CFU	7.3 × 10 ⁵ CFU
<i>S. salivarius</i> ATCC9222	0.9 × 10 ⁵	0	2.1 × 10 ⁶	1.1 × 10 ⁸
<i>S. mutans</i> BT11	2.3 × 10 ⁵	0	3.0 × 10 ⁵	5.5 × 10 ⁶
<i>S. salivarius</i> BT18	2.0 × 10 ⁵	0	1.2 × 10 ⁸	1.6 × 10 ⁹

(CFU/ml)

対して新鮮分離株の2株は、0.01%添加培地で生育可能であった。

また、*S. mutans*と*S. salivarius*とを混合培養したときの結果をTable 5に示した。混合系では、すべての菌株が0.01% Na₂TeO₃添加培地で増殖可能であり、また、両混合系ともに*S. salivarius*の方が*S. mutans*より生育数が多かった。

考 察

本研究においては、対照群ならびにtellurite投与群の全例において、う蝕が発生し、その罹患の程度は後者において明らかに高いという結果が得られ、これは松本ら⁸⁾の報告とも一致する。一方、*S. mutans*は種々のう蝕原性菌の中でも、実験動物に対して最も高いう蝕誘発能を有する菌であるが^{11,18)}本菌が対照群ならびにtellurite投与群の全例においてその咬合面小窩裂溝部の歯垢より高い比率で分離された。しかし、swab法による試料からは検出されないかあるいは分離されても極めて低い比率であった。この差異は本菌が主として小窩裂溝部の歯垢から分離される(Ikedaら1971)¹⁹⁾ことに起因するものと思われる。以上の結果から、本研究においても*S. mutans*が主なるう蝕誘発菌であるものと思われる。しかしながら、この*S. mutans*は対照群とtellurite投与群において、その総レンサ球菌数に対する比率で大きな差異がある。すなわち、対照群では極めて高い

比率で存在したが、tellurite投与群では約50%の比率であった。これに対して、*S. salivarius*は、tellurite投与群では全例より分離されたが、対照群ではどの試料からもまったく分離されなかった。*S. salivarius*は一般に歯垢中には少なく、口腔粘膜とくに舌に多いとされているので^{12,18)}この両群の間の明確な差は、本研究において明らかにされたように(Table 4, 5)、本菌が*S. mutans*よりsodium telluriteに対して比較的耐性であることに起因するものと考えられる。*S. salivarius*は*S. mutans*よりそのう蝕誘発能においては劣るとされている^{18,20)}しかしながらsucroseより、多量の酸とレバンを産生して、自らの周囲のpHを低下させる能力は、本実験でも示したように、*S. mutans*より強いものをもっている^{12,21,22)}したがって、本菌の強いpH低下能がtellurite投与群のう蝕の増加拡大に關与している可能性があるものと考ええる。

*S. milleri*もまた、歯垢中に少なく、口腔の他の部位に多く見られる菌株である^{11,23)}本研究においても本菌は小窩裂溝部の歯垢に少なく、swab法で得られた試料において、高い比率で分離された。さらにまた本菌は、tellurite投与群では全例の歯垢中より分離され、その比率は対照群のそれより高かった。しかし、対照群では3例中1例の歯垢より分離されるのみで、その比率はtellurite投与群より低かった。また、本菌のfinal pHは比較的低い値を示している

(Table 2)。Druckerら²⁴⁻²⁷⁾は, *S. milleri*は, 比較的強い蝕誘発能を有すると述べている。これらの事実から, 本菌の増加もまた, tellurite 投与群のう蝕の増加と拡大に一役を担っている可能性がある。

以上の事実から, sodium tellurite の投与によって, 口腔レンサ球菌種に変動を生じていることは明白である。口腔のレンサ球菌はう蝕の発病と密接な関係を持っているので, このような歯垢中のレンサ球菌叢の変動が tellurite 投与群のう蝕の増加と拡大に関与していることが十分に考えられる。

文 献

1. Tamura, S: Nutrition and experimental caries in young albino rats. (1) Studies on cariogenic basal diets. Bull. Tokyo dent. Coll., 2 ; 113~124, 1961.
2. Tamura, S. and Ito, H: Nutrition and experimental dental caries in young albino rats. (2) Studies on breeding period. Bull. Tokyo dent. Coll., 4 ; 99~102, 1963.
3. Tamura, S., Tsutsumi, S., Kizu, K., Ito, H., Nakai, K., and Masuda, M: Nutrition and experimental dental caries in young albino rats. Bull. Tokyo dent. Coll., 7 ; 144~162, 1922.
4. Tamura, S., Ishizuka, S., and Matsumoto, Y: Study of the control of development of experimental dental caries by changing amino acid pattern of protein in diet (Report 1), Bull. Tokyo dent. Coll., 15 ; 181~191, 1974.
5. Tamura, S., Ishizuka, S., Ito, H., and Matsumoto, Y.: Study of the control of development of experimental dental caries by changing amino acid pattern of protein diet (Report 2). Bull. Tokyo dent. Coll., 15 ; 193~198, 1974.
6. Frank, K. W. and Moxon, A. L: Toxicity of orally ingested As, Se, Te, V and Mo, J. Pharmacol., 61 ; 89~101, 1937.
7. Carlton, W. W. and Kelly, W. A: Tellurium Toxicosis, Toxicology and Applied Pharmacology. 11 ; 203~204, 1967.
8. 松本仁人, 猿田 峻, 比喜 保, 藤本典子, 田村俊吉: 実験的う歯の発生に対する Tellurium の影響に関する研究, Sodium Tellurite の栄養並びに実験的う歯の発生に及ぼす影響及びそれに対する Glutathione の影響について. 歯科学報, 81 ; 797~804, 1981.
9. Eisenberg, P: Untersuchungen über spezifische Desinfektions Vorgänge. II Mitteilung: Ueber die Wirkung von Salzen und Ionen auf Bakterien., Zentralbl. Bakteriolog. Parasitenkd. Infektionskr. Hyg. Abt. 1 : Orig. 82 ; 69~208, 1919.
10. 中井一仁: 乳児栄養に関する実験的研究, Casein を蛋白源とした高蛋白並びに低蛋白飼料を与えたシロネズミの実験的齲歯の発生及び歯牙の灰分, Ca 及び P 含有量について. 歯科学報, 66 ; 273~280, 1966.
11. Hamada, S. and Slade, H: Biology, Immunology and Cariogenicity of *Streptococcus mutans*. Microbiological Reviews. 44 ; 331~384, 1980.
12. Carlsson, J: A numerical taxonomic study of human oral streptococci. Odont. Revy, 19 ; 137~160, 1968.
13. Niven, C. F., Smiley, K. L., and Sherman, J. L.: The hydrolysis of arginine by streptococci, J. Bacteriol., 43 ; 651~660, 1942.
14. Cowan, S. T: Manual for the identification of medical bacteria. 2nd. Edition, Cambridge Univ. Press, England p.241, 1974.
15. Kraus, F. W., Nickerson, J. F., Perry, W. I., and Walker, A. P: Peroxide and peroxidogenic bacteria in human saliva. J. Bacteriol. 73 ; 727~735, 1957.
16. Niven, C. F., Smiley, K. L., and Sherman, J. L.: The hydrolysis of arginine by streptococci. J. Bacteriol., 43 ; 651~660, 1942.
17. Fitzgerald, R. J. and Keyes, P. H: Demonstration of the etiologic role of streptococci in experimental caries in hamster. J. Amer. Dent. Ass. 51 ; 9~13, 1942.
18. Gibbons, R. J: Ecology and Cariogenic Potential of Oral Streptococci, In: Streptococcal and streptococcal diseases. Edited by Wannamaker, L. W. and Matsen, J. M., pp.371~385, Academic Press, New York and London, 1972.
19. Ikeda, and Sandham, H. J: Prevalence of *Streptococcus mutans* on various tooth surfaces in negro children. Arch. oral Biol., 16 ; 1237~1240, 1971.

20. Guggenheim, B : Streptococci of dental plaques, Caries Res. 2 ; 157~163, 1968.
21. Krasse, B. and Carlsson J : Various types of streptococci and experimental caries in hamster, Arch. oral Biol., 15 ; 25~32, 1970.
22. 小林やす子, 日比栄子, 吉崎信弥, 武井盈 : 口腔レンサ球菌の性状について, 愛院大歯誌, 10 ; 1~6, 1972.
23. Mejare, B. and Edwardsson, S : *Streptococcus milleri* (Guthof), an indigenous organism of the human oral cavity. Arch. oral Biol., 20 ; 757~762, 1975.
24. Drucker, D. B. and Green, R. M : Dental Caries Induced by *Streptococcus milleri*. J. dent. Res., 56 ; 1062, 1977.
25. Drucker, D. B. and Green, R. M : The relative cariogenicities of *Streptococcus milleri* and other viridans group streptococci in gnotobiotic hooded rats. Arch. oral Biol., 23 ; 183~187, 1978.
26. Drucker, D. B. and Green, R. M : The relative cariogenicity of different streptococci in the gnotobiotic WAG/RIJ rat. Arch. oral Biol., 26 ; 599~606, 1981.
27. Drucker, D. B., Shakespeare, A. P., and Green, R. M : The production of dental plaque and caries by the bacterium *Streptococcus salivarius* in gnotobiotic WAG/RIJ rats. Arch. oral Biol., 29 ; 437~443, 1984.