

〔原著〕 松本歯学 12 : 189~201, 1986

key words : 唾石 — 超微形態 — 微生物 — 石灰化

唾石に関する超微形態学的研究  
第1報 線状微生物の石灰化について

赤羽章司

松本歯科大学 電子顕微鏡室 (赤羽章司 主任技士)

枝 重夫, 川上敏行, 中村千仁, 長谷川博雅  
松本歯科大学 口腔病理学教室 (主任 枝 重夫 教授)

吉田潤一郎, 千野武広

松本歯科大学 口腔外科学第1講座 (主任 千野武広 教授)

Ultrastructural Studies on the Salivary Calculus  
First Report : Calcification in filamentous microorganisms

SHOJI AKAHANE

*Laboratory of Electron Microscope, Matsumoto Dental College*  
(Chief : S. Akahane, B. Sc.)

SHIGEO EDA, TOSHIYUKI KAWAKAMI, CHIHITO NAKAMURA  
and HIROMASA HASEGAWA

*Department of Oral Pathology, Matsumoto Dental College*  
(Chief : Prof. S. Eda)

JUNICHIRO YOSHIDA and TAKEHIRO CHINO

*Department of Oral and Maxillofacial Surgery I,*  
*Matsumoto Dental College*  
(Chief : Prof. T. Chino)

Summary

For the purpose of searching the mechanism of salivary calculus formation, a salivary calculus obtained from the duct of the submandibular gland of a 65-year-old woman was

---

本論文の要旨は第18回松本歯科大学学会(例会)(昭和59年6月16日), および第26回歯科基礎医学会総会(昭和59年9月29日)において発表された。(1986年7月15日受理)

examined by scanning and transmission electron microscopes and electron probe microanalysers from the point of view of the relationship between the calculus and microorganisms. The results were as follows:

- 1) Cocci and filamentous microorganisms were observed both on the surface and inside the salivary calculus.
- 2) Filamentous microorganisms on the surface had double membrane structures and a nucleus.
- 3) Needle-like deposits in the cytoplasm of the filamentous microorganisms showed an intracellular calcification.
- 4) The distribution of intracellular calcium salts differed each microorganisms. Some contained the elements of P and Ca among higher at the periphery, while in others they were higher in the center.

## 緒 言

唾石形成に微生物が関与していることは多くの研究者が認めており、走査電子顕微鏡によっても確認されている(内田ら, 1979<sup>16)</sup>; 森永, 1980<sup>13)</sup>; 倉地ら, 1980<sup>11)</sup>; 赤羽ら, 1982<sup>1)</sup>, 1984 a<sup>2)</sup>, b<sup>3)</sup>; 北村ら, 1983<sup>9)</sup>; 川嶋ら, 1985<sup>12)</sup>). 一方、歯石形成に関連して口腔細菌の石灰化能を検討した Ennever (1960)<sup>6)</sup>および高添 (1961<sup>14)</sup>, 1977<sup>15)</sup>)は、とくに線状菌である *Bacterionema matruchotii* が菌体内石灰化能の強いことを報告している。

石灰化物の組成を調べる方法として、走査電子顕微鏡を用いた反射電子による組成像の観察があるが、東 (1973)<sup>5)</sup>, 亀山ら (1979)<sup>8)</sup>および森永 (1980)<sup>13)</sup>は、これを使って唾石の断面に組成的な違いによる層状構造を認めている。著者ら (赤羽ら, 1982<sup>1)</sup>)も同様の層状構造を認め、P・S・CaのContour mapによって微小な組成変化を明確に示した。しかし、これらはいずれも微生物の石灰化を検索するまでには至っていない。そこで著者らは、まず組成像によって唾石全体の石灰化状態を調べ、次に微生物との関わりを検索した。

唾石内微生物の超微細構造を透過電子顕微鏡によって観察した例は非常に少なく (Anneroth, et al., 1978<sup>4)</sup>; 川嶋ら, 1985<sup>12)</sup>)、さらにその石灰化物の組成を調べるため、分析電子顕微鏡を使用して元素分析した報告は、著者ら (赤羽ら, 1984 a<sup>2)</sup>, b<sup>3)</sup>)以外に見当たらない。今回は唾石の非脱灰超薄切片を用いて、その超微細構造を観察し、さらにエネルギー分散型分光器 (Energy dispersive x-ray spectroscope, EDS と略) による分析電子顕

微鏡で石灰化状態の検索を行なったところ、若干の知見を得たので報告する。

## 材料と方法

検索材料は、女性 (65歳) の顎下腺導管内より摘出された唾石である (長径約 3 mm × 短径約 2 mm)。摘出後、ただちに 1% グルタルアルデヒド・1% パラホルムアルデヒド混合液にて固定した。緩衝液としては、カコシル酸緩衝液を使用した。通法によるエタノール脱水を行なった後、2分割して、それぞれ走査電子顕微鏡用および透過電子顕微鏡用の試料を作製した。その詳細は次の通りである。

走査電子顕微鏡用としては、液体炭酸による臨界点乾燥後、唾石の表面および断面に Au イオンスパッタコーティングを施し、JEOL・JCSA-733 型 X 線マイクロアナライザーを使用して 2 次電子像を観察した。なお、透過電子顕微鏡用の超薄切片を作製した残りのブロック切面にカーボン蒸着を施し、組成像の観察も行なった。

透過電子顕微鏡用の試料は、エポキシ樹脂 (エボン 812) に包埋し、非脱灰超薄切片を作製した。切片は無染色のもの、および U-Pb 2 重染色したものを、後記機器を用い 120KV の加速電圧によって観察した。一部の試料については、その組成を調べるために元素分析も行なった。分析電子顕微鏡として、JEOL・JEM-1200EX 型透過電子顕微鏡、および Tracor Northern TN-2000 エネルギー分散型分光器 (EDS) を用いた。

## 結 果

### 走査電子顕微鏡所見

唾石の断面を観察すると、表面近くに層状構造があり(図1, 矢印), その一部(図1, 星印)を拡大すると、層状構造の間隙に球菌および線状菌(または桿菌)が認められた(図2)。また唾石表面には断面と同様な菌体が付着し、線状菌より球菌の方が多く認められた(図3)。唾石の超薄切片を作製した残りのブロック切断面を組成像によって観察すると、球菌および線状菌が混在する部分と、明瞭な層状構造をもつ部分とに大別できた(図4)。さらに前者においては、円形および線状の構造が暗く見えるものと、明るく見えるものとに区別され、表面に近いほど暗く見えるものの数が増加していた(図4左側)。表層部を拡大すると、唾石表面から離れた位置に線状菌および球菌と思われる構造が明るく観察された。そして一部の線状菌は、その一端を唾石表面に遊離させているかのように認められた(図5)。

唾石内部において、球菌や線状菌が比較的疎に分布している所では、菌体内部が石灰化物で充満したものや、管状(被膜構造)として中央部が暗く石灰化度の低い状態を示す像が観察された(図7)。また、一つの境界を画する部位(図6, 星印)を詳細に検索したところ、そこには線状菌(または桿菌)が整然と配列し、その多くは管状(被膜構造)を呈することが判明した(図8)。また層状構造は様々な厚みをもって(最小では $0.2\mu\text{m}$ 以下)、微妙なコントラストを呈しながら、何層にも重なっていた(図6)。

### 透過電子顕微鏡所見

非脱灰、無染色による超薄切片によると、唾石表面には線状菌が高電子密度の構造物として存在し(図9)、その内部に微細な針状結晶が密に沈着していることがわかった(図10)。別な菌体においては、その一端から外方に向かって比較的長い針状結晶が成長していた(図11)。他方、線状菌と思われる低電子密度の構造も見られたが(図12, 矢印)、唾石内部には高電子密度の被膜構造をもった菌体や、球菌あるいは線状菌と思われる明るい構造物が観察された。菌体の被膜構造については、電子密度の高いものと低いものがあり、それは針状結晶の沈着度合によるものであった(図13)。唾

石表面に見られた線状物をU-Pb 2重染色すると、膜構造や核構造が現われ(図14)、拡大すると、膜構造は2重膜となっていた(図15, 16)。一部の線状菌では、変性像あるいは石灰沈着の初期像と思われる高電子密度な粒状(図15)や針状(図16)の構造物が認められた。

走査電子顕微鏡による図7と同様な部位を透過電子顕微鏡で観察したものが図17で、高電子密度な被膜構造をもった菌体が多数認められた。また、石灰化物が充満した線状菌では(図18)、細菌に特有な隔壁と思われる構造が明瞭であった(図19, 矢印)。図20は図8と同様な部分で、右 $\frac{1}{3}$ が高度に石灰化した基質部、左 $\frac{2}{3}$ が石灰化した細菌層を示す。この部位をEDSによって元素分析してみると、基質部(図20, A点)と線状菌の中央部(図20, B点)とは、PおよびCaの濃度がほぼ同様となっていた(図21, 22)。また、線状菌の周囲(図20, C点)と線状菌内部の低電子密度の部分(図20, D点)を比較すると、PおよびCaの濃度が類似の傾向を示した(図23, 24)。

## 考 察

唾石内に存在する微生物として、東ら(1972)<sup>7)</sup>は脱灰切片標本による検索で、グラム陽性の球菌や桿菌を証明している。走査電子顕微鏡による観察では、内田ら(1979)<sup>16)</sup>、森永(1980)<sup>13)</sup>、倉地ら(1980)<sup>11)</sup>、赤羽ら(1982)<sup>1)</sup>が線状菌を認め、北村ら(1983)<sup>9)</sup>、赤羽ら(1984a, b)<sup>2,3)</sup>、川嶋ら(1985)<sup>12)</sup>は、球菌と線状菌を報告している。本研究において著者らも球菌と線状菌を観察し、線状菌よりもむしろ球菌の方が多いいことを認めた(図2, 3)。このことは唾液細菌叢における球菌の占める割合が、グラム陽性球菌およびグラム陰性球菌を合わせて約75%<sup>10)</sup>であることから肯首できる。

走査電子顕微鏡の使用に際し、形態観察を行なう上では2次電子像が有利であり、組成(石灰化状態)を検索する場合は組成像が効果的であることは周知の事実である。しかしながら、組成像は2次電子像に比較して分解能がやや劣るところから、高倍率での応用は適切とはいえない。そこで以下に、組成像によって得た所見について考察する。

唾石の超薄切片を作製した残りのブロック切削

面において、表面近傍にみられた暗い円形や線状の構造(図4)は、石灰化がまったく起きていないか、あるいは石灰沈着の初期状態の球菌および線状菌の存在を示すものと考えられる。あるいは菌体が何らかの原因によって脱落し、そこに存在しないものもあるかもしれない。一方、表層部において唾石表面より離れたところに線状菌、および球菌と思われる構造が明るく見えたのは、それが石灰化していることを明確に示しており(図5)、これは2次電子像による表面的観察では把握できない所見である。また唾石内に見られた菌体に、石灰化程度の高い被膜構造を認めたことは、微小な組成変化をとらえたものと考えられる(図7, 8)。層状構造の厚さに関して、2次電子像の観察から、森永(1980)<sup>13)</sup>が数十 $\mu\text{m}$ ~数百 $\mu\text{m}$ あったとし、北村ら(1983)<sup>9)</sup>は数 $\mu\text{m}$ ~数十 $\mu\text{m}$ と報告している。著者らが組成像によって調べたところでは、最小0.2 $\mu\text{m}$ 以下の層まで観察することができた(図6)。

唾石表層に認められた線状構造物は、2重膜によって囲まれた線状形態を示し、中に核を有していたので(図14)、線状菌(または桿菌)であることを示している。唾石表面に付着した線状菌の一部に針状結晶が沈着していたことは(図9)、唾石内へ取り込まれる以前に、菌体自身が石灰化すること、つまり菌体内石灰化を証明するものである。高添(1977)<sup>15)</sup>は菌体内石灰化能の強い線状菌として *Bacterionema matruchotii* を報告し、その石灰化のメカニズムを以下のように説明している。すなわち、“細胞内の石灰化は、膜構造をしたメソゾームのところからはじまり、その後は物理・化学的過程で進み、細胞全体に広がる。さらに、細胞を破って成長は進む”ものであるという。このことから類推して、図17および20に見られる高電子密度の被膜構造は、菌体の膜構造の部分に石灰沈着が強く起こった結果であると考えられる。そして図11の菌体は、石灰化が細胞外へ及んだ状態を示しているものと考えられる。Anneroth, et al. (1978)<sup>4)</sup>は、透過電子顕微鏡によって唾石表層に変性しているが、結晶沈着のない球菌または大腸菌様の細菌を認めて、電子密度の高い基質部分に被膜構造を見出だしている。著者らが観察した被膜構造は、これに類似するものである。

唾石の形成過程において、線状菌が深く関係し

ていることが次第に明らかにされ、菌種の同定に関する報告も若干みられる。すなわち内田ら(1979)<sup>16)</sup>および北村ら(1983)<sup>9)</sup>は、唾石内に見られた線状微生物は形態的に放線菌であることを示唆している。また川嶋ら(1985)<sup>12)</sup>は唾石から球菌と線状菌を分離し、とくに線状菌は生物学的性状から、*Actinomyces israelii* に類似の細菌であると述べている。今回、著者らが明らかにした線状菌は、菌体内石灰化能を有するところから *Bacterionema matruchotii* の可能性があり、今後、菌種の同定を行なう必要がある。

## 結 論

唾石の形成に細菌が深い関わりをもつことがこれまで明らかにされ、とくに線状菌の存在が注目されている。そこで走査電子顕微鏡によって唾石内の微生物について検索し、さらに透過電子顕微鏡による超微細構造の観察、および元素分析を行なったところ次の結論を得た。

1. 唾石の表面には球菌および線状菌が付着し、その切断面においても内部に同様な細菌が存在した。
2. 唾石表面に見られた線状菌には、2重膜構造と核が認められた。
3. 線状菌の菌体内には微細な針状結晶が沈着し、菌体内石灰化を示した。
4. 線状菌の石灰化状態は一樣でなく、その周囲、あるいは中央部にPおよびCaの濃度が高くなっているものがあつた。

## 文 献

- 1) 赤羽章司, 枝 重夫, 川上敏行, 中村千仁, 河住信(1982) 硬化象牙質に関する電子顕微鏡的研究, 第2報, 歯冠硬化象牙質の細管内沈着物と歯石および唾石との比較. 松本歯学, 8: 23-50.
- 2) 赤羽章司, 枝 重夫, 川上敏行, 中村千仁, 河住信, 長谷川博雅, 吉田潤一郎, 千野武広(1984) 唾石に関する超微形態学的研究(第1報). 松本歯学, 10: 75-76.
- 3) 赤羽章司, 枝 重夫, 川上敏行, 中村千仁, 長谷川博雅, 吉田潤一郎, 千野武広(1984) 唾石の電子顕微鏡的観察と化学組成分析. 歯基礎誌, 26(補冊): 220.
- 4) Anneroth, G., Eneroth, C. M., Isacson, G. and Lundquist, P. G. (1978) Ultrastructure of salivary calculi. Scand. J. Dent. Res. 86: 182-192.
- 5) 東 俊雄(1973) X線マイクロアナライザによる

- 唾石の分析. 歯学, 61: 124—164.
- 6) Ennever, J. (1960) Intracellular calcification by oral filamentous microorganisms. J. Periodontol. 31: 304—307.
  - 7) 東 昇平, 福田弘一, 多胡 彬, 尾上 暲, 高橋博水, 今泉 功, 市川泰右, 三田春美 (1972) 特殊脱灰法による唾石の連続切片標本の作製法とその観察. 歯科学報, 72: 1864—1876.
  - 8) 亀山忠光, 森永 太, 川原秀樹, 本川和寿, 北川博一, 朱雀直道, 渡辺 隆 (1979) 自然排出した大きな唾石症の1例. 口科誌, 28: 269—275.
  - 9) 北村勝也, 谷口邦久, 沢熊正明, 今村 實, 豊嶋昭治 (1983) 唾石の走査電顕による観察. 口科誌, 32: 279—290.
  - 10) 口腔細菌学談話会編(1986)歯学微生物学. 4版: 232. 医歯薬出版株式会社, 東京.
  - 11) 倉地洋一, 松本英彦, 南雲正男, 榎本昭二, 滝口 劬司 (1980) 走査電子顕微鏡による唾石の観察. 口外誌, 26: 945—951.
  - 12) 川嶋龍一, 亀山忠光, 喜多清基, 矢毛石 豊, 朱雀直道, 近藤正治 (1985) 唾石表面の線状構造物と微生物との関連性について. 口外誌, 31: 1841—1845.
  - 13) 森永 太 (1980) 走査型電子顕微鏡による唾石の微細構造の観察. 口科誌, 29: 254—267.
  - 14) 高添一郎 (1961) 口腔内好気性 Leptotrichia の菌体内石灰化に関する研究. 歯科学報, 61: 394—401.
  - 15) 高添一郎 (1977) バクテリアの石灰化と歯石. サイエンス, 8: 104—113.
  - 16) 内田 實, 石井雅良, 小川邦男, 佐久間成晴, 富田 寛 (1979) 細菌が成因と思われる巨大な顎下腺内唾石の走査電顕的観察. 耳喉, 51: 235—245.

【付図は次頁より】

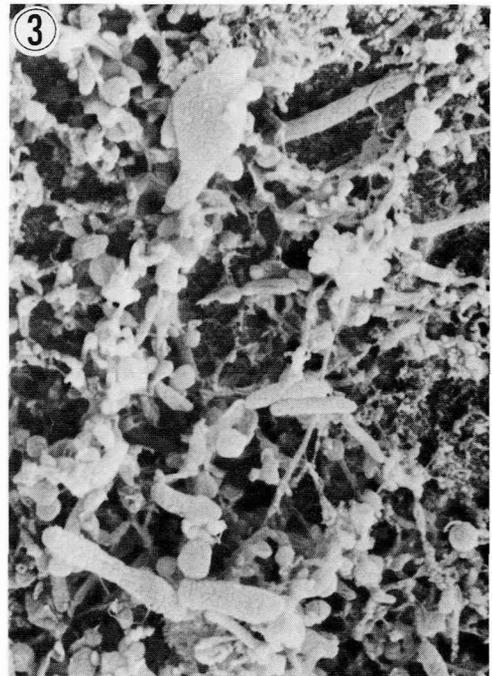
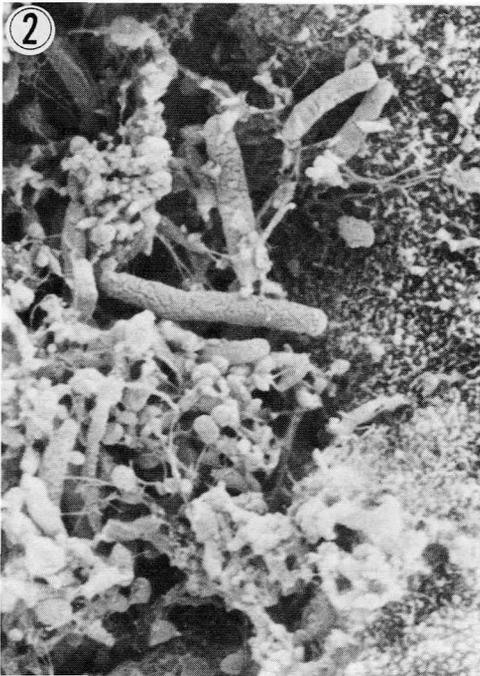
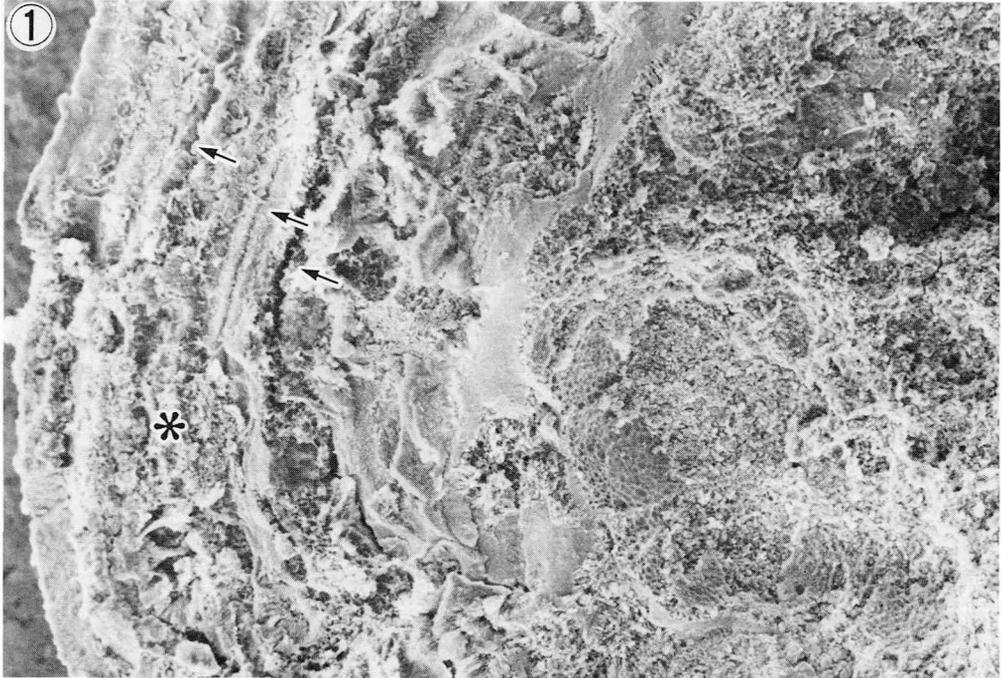


図1：唾石断面の2次電子像：表面近くに層状構造がある（矢印），（ $\times 270$ ）

図2：図1の一部（星印）拡大像：球菌および線状菌が見られる，（ $\times 4,800$ ）

図3：唾石表面の2次電子像：断面と同様に球菌と線状菌が見られ，とくに球菌が多い，（ $\times 4,100$ ）

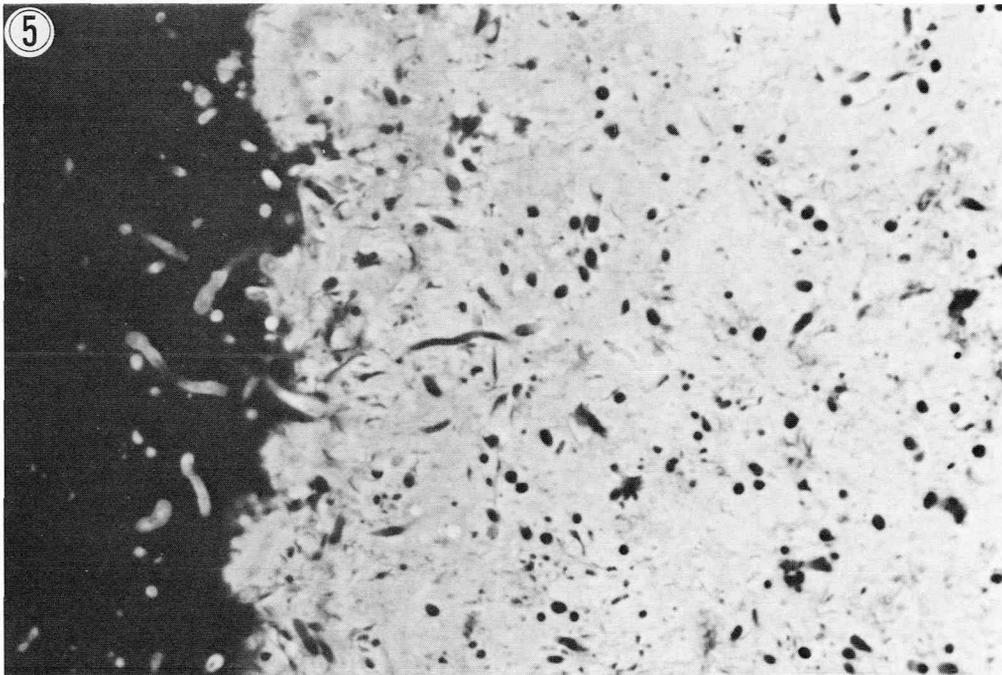
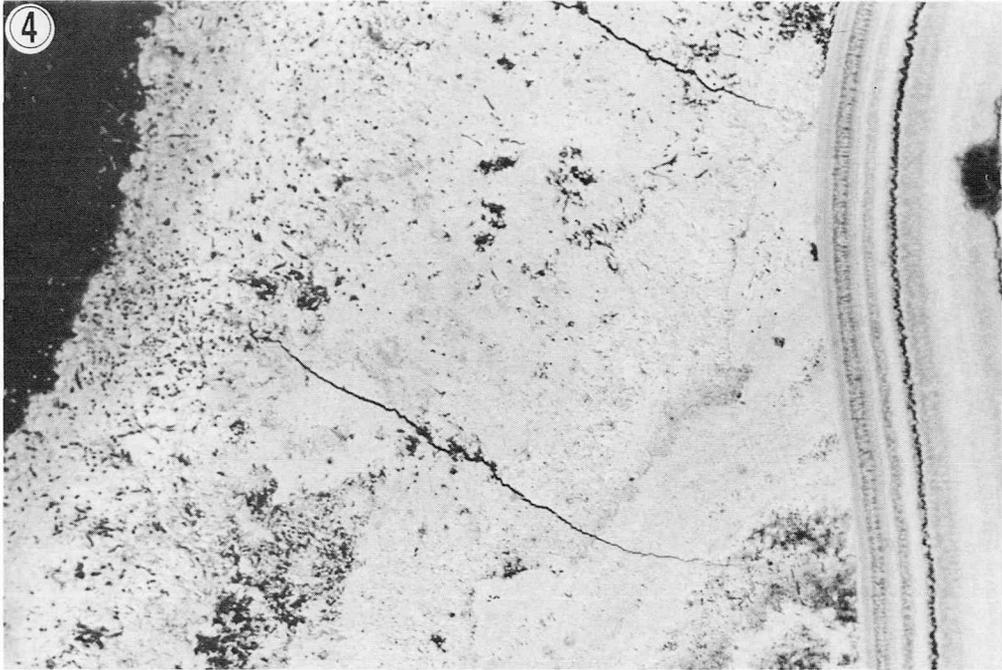


図4：超薄切片を作製した残りのブロック切断面の組成像：球菌と線状菌が混在する部分と、層状構造が認められる。(×360)

図5：図4の一部拡大像：唾石表面に石灰化した球菌および線状菌がある。(×1,500)

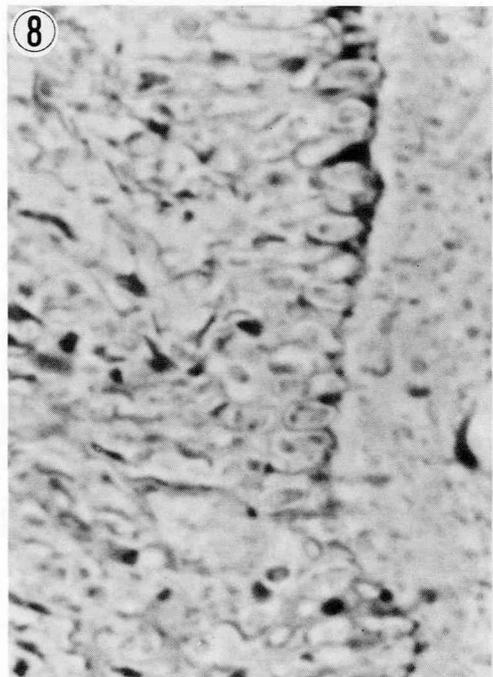
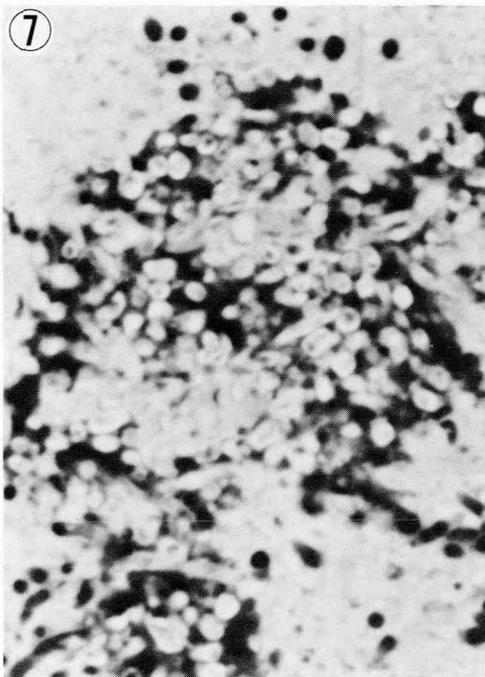
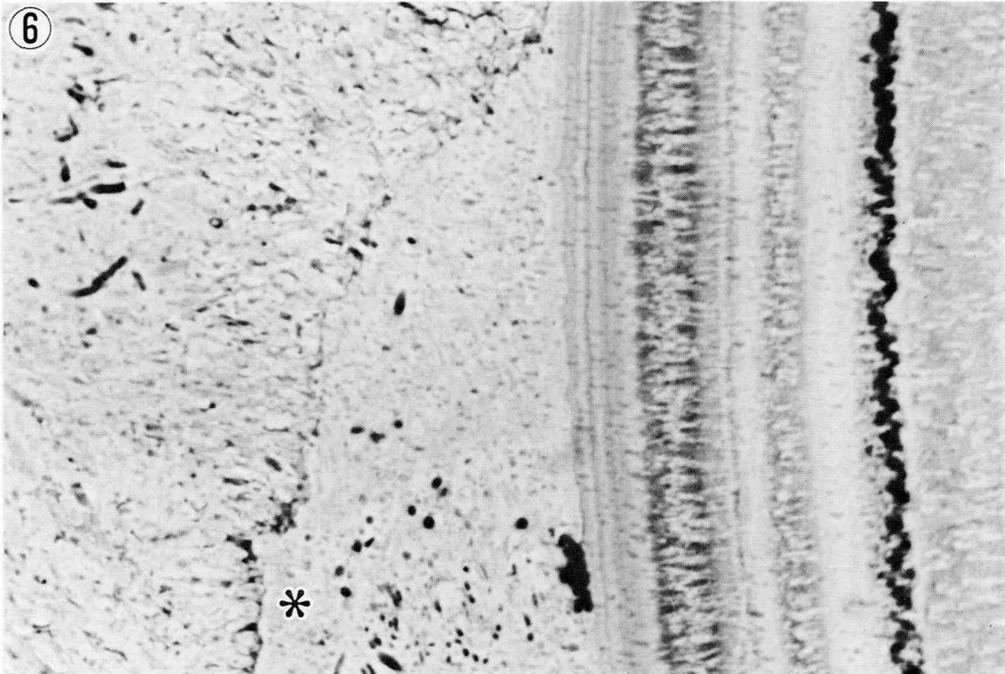


図6：図4の一部拡大像：微細な層が多重構造を成している。(×1,500)

図7：図4の一部拡大像：被膜構造(管状)を呈した球菌,あるいは線状菌が見られる。(×2,700)

図8：図6の一部(星印)拡大像：一線を画して線状菌(または桿菌)が配列している。(×3,200)

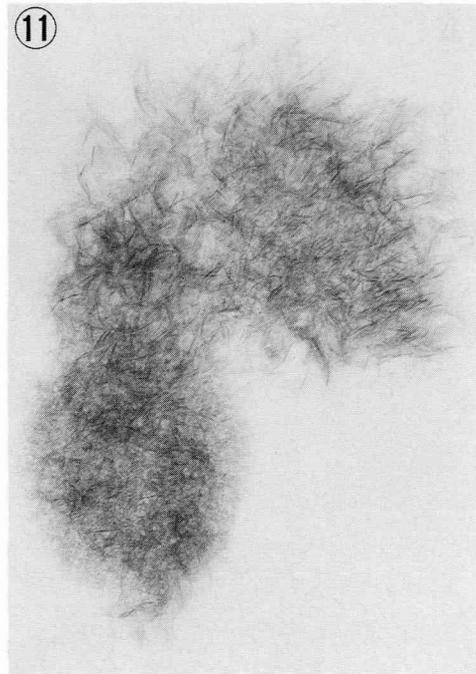
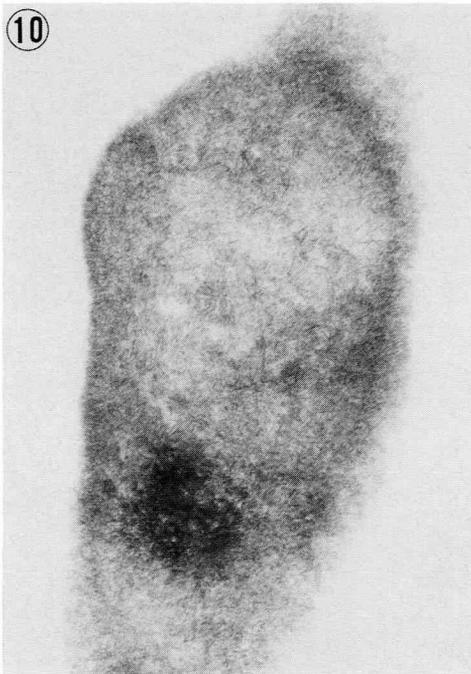
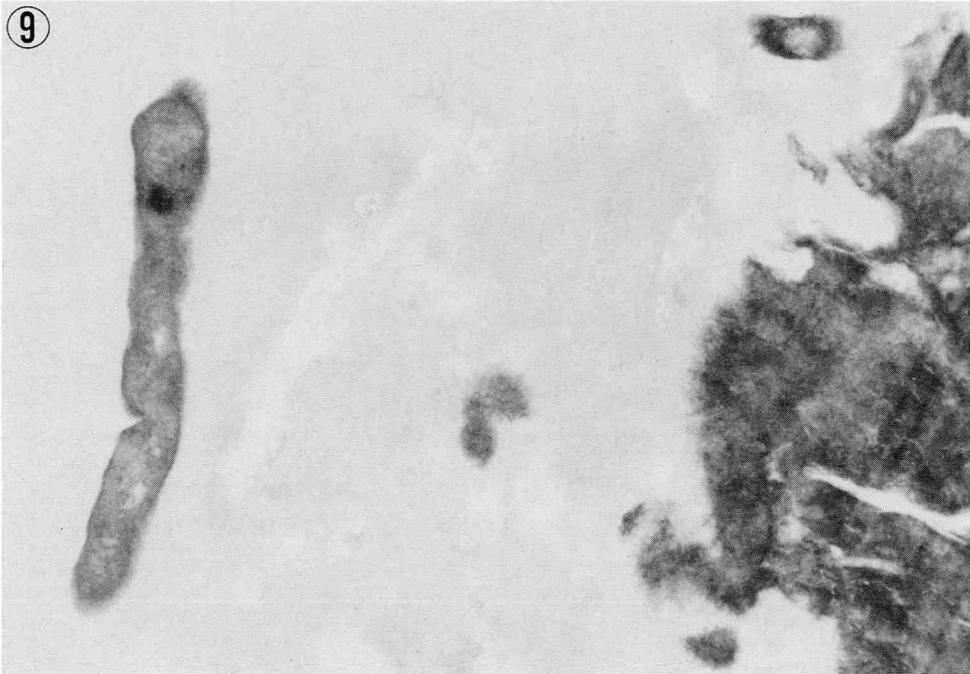


図9：唾石表層の超薄切片像：電子密度の高い線状菌が観察される。(無染色)( $\times 12,000$ )  
以下、すべて超薄切片像である。  
図10：図9の一部拡大像：菌体内には微細な針状結晶が沈着している。( $\times 52,000$ )  
図11：図9の一部拡大像：菌体外に比較的長い針状結晶が成長している。( $\times 69,000$ )

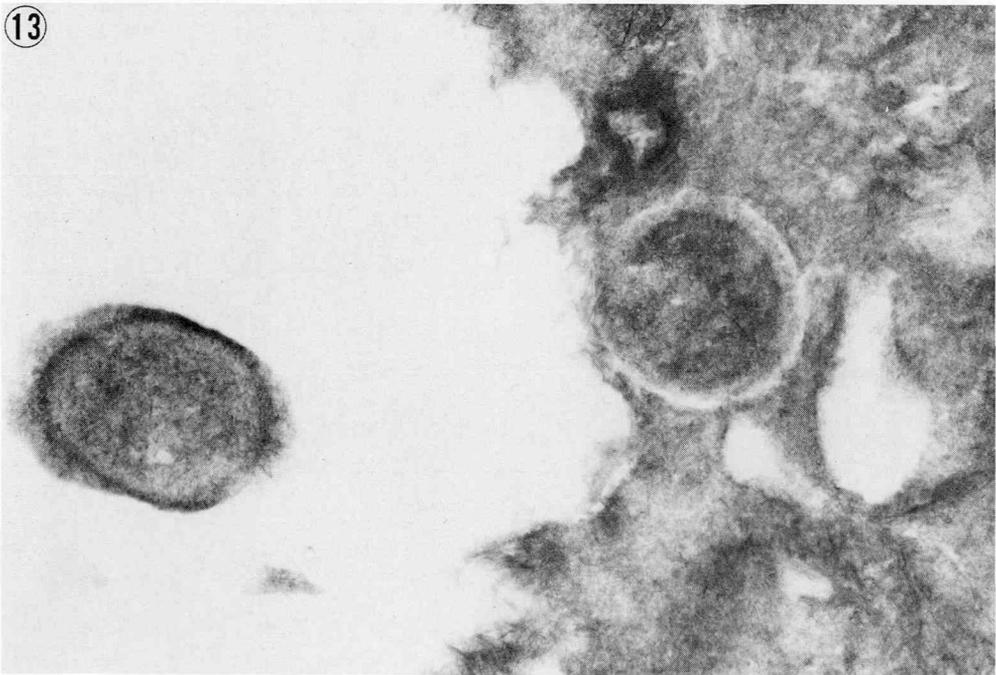
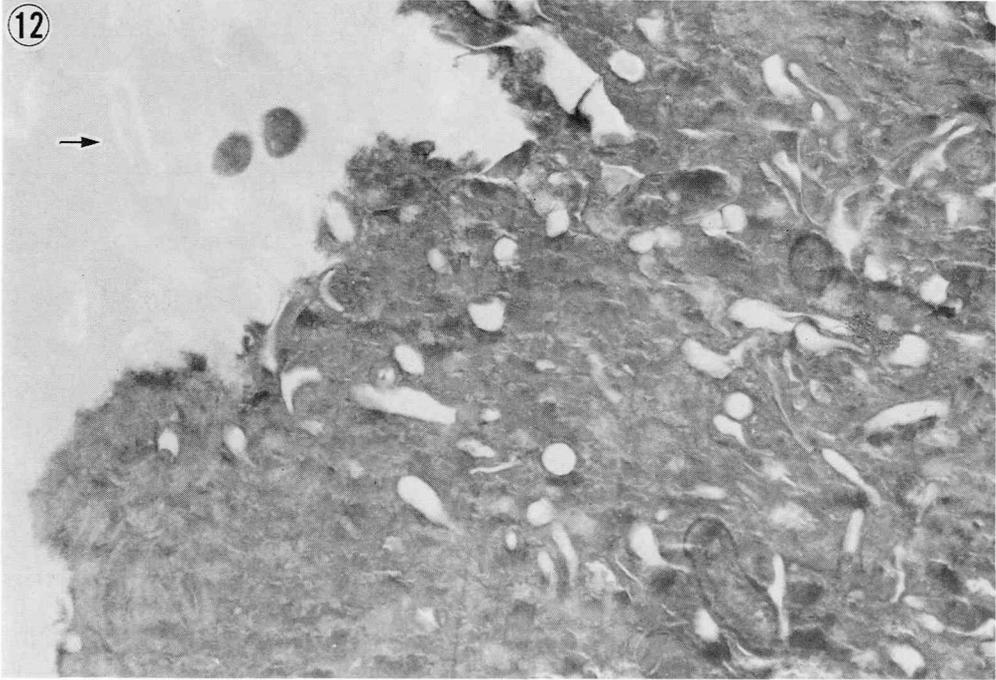


図12：唾石の表層部：表面には線状菌と思われる低電子密度の構造物が見られる(矢印)。内部には高電子密度の被膜構造をもった菌体がある。(無染色) (×7,200)

図13：唾石の表層部：被膜構造は針状結晶の沈着度合によって、その濃淡が変化している。(無染色) (×35,000)

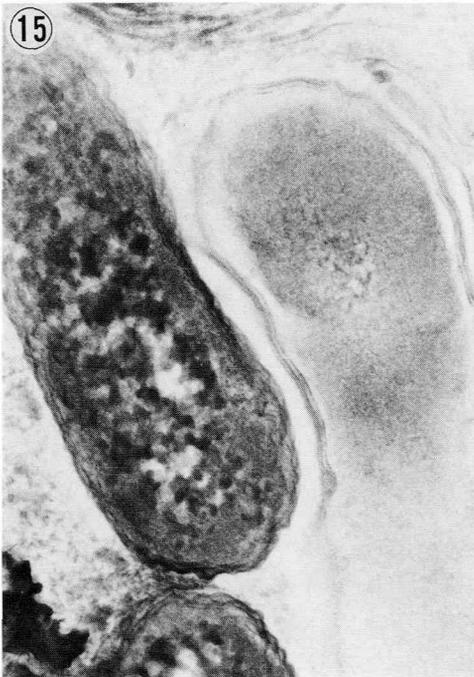


図14：唾石表面の線状構造物：膜構造と核を有しているのので、細菌であることが確認できる。(U-Pb 染色) (×40,000)

図15：線状菌の拡大像：線状菌は2重膜構造をもち、内部に高電子密度の粒状物を入れたものがある。(U-Pb 染色) (×49,000)

図16：線状菌の拡大像：内部に針状の構造物をもっている。(U-Pb 染色) (×63,000)

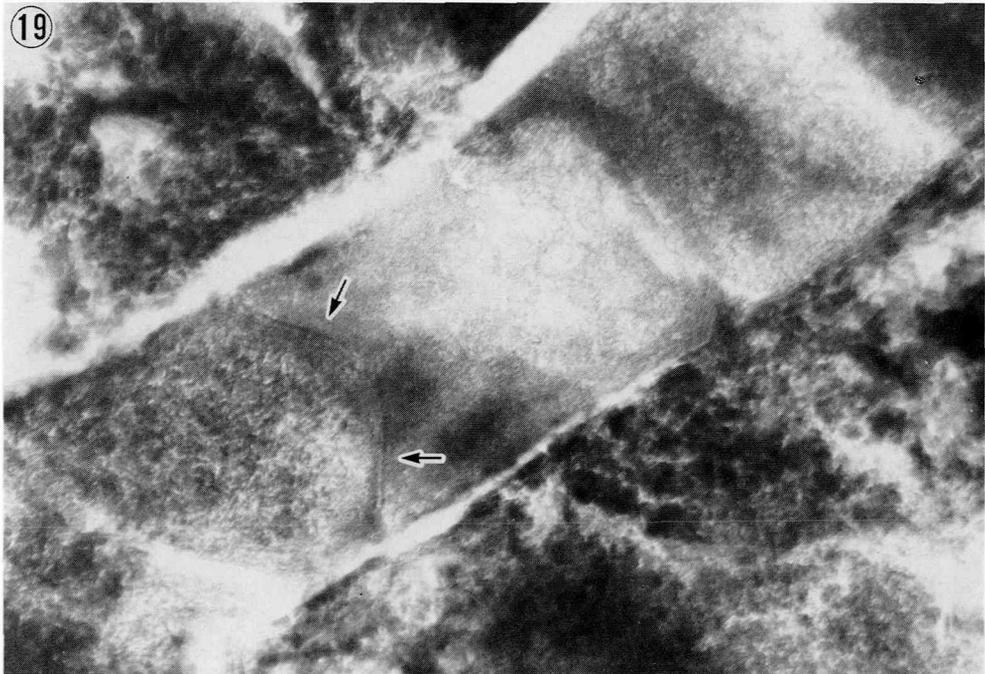
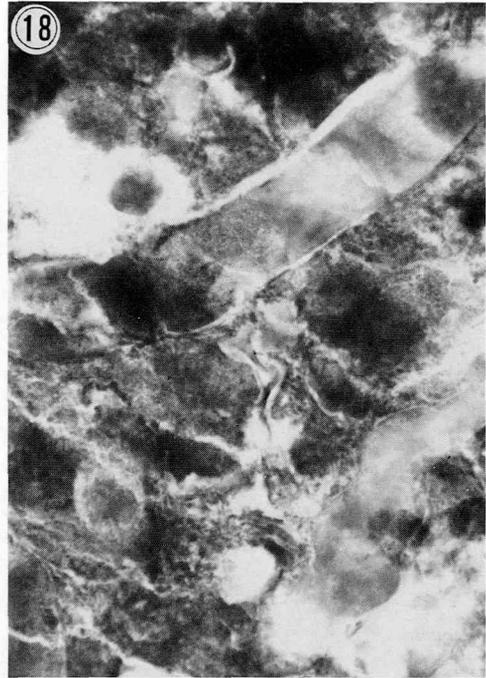
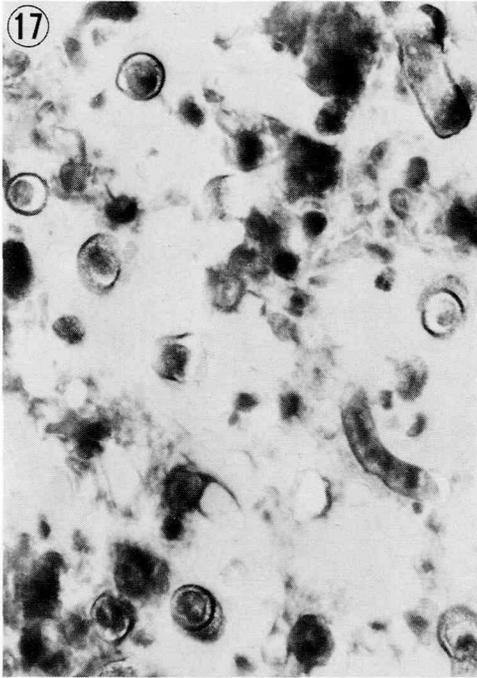


図17：唾石内部の菌体：電子密度の高い被膜構造をもっている。(無染色)( $\times 9,300$ )

図18：唾石内部の菌体：線状菌内部およびその周囲に石灰沈着が起こっている。(無染色)( $\times 17,000$ )

図19：図18の一部拡大像：菌体内に隔壁と思われる構造(矢印)が認められる。( $\times 60,000$ )

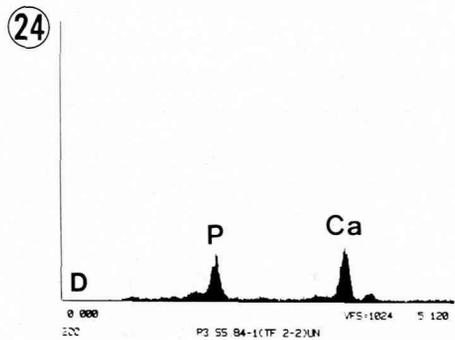
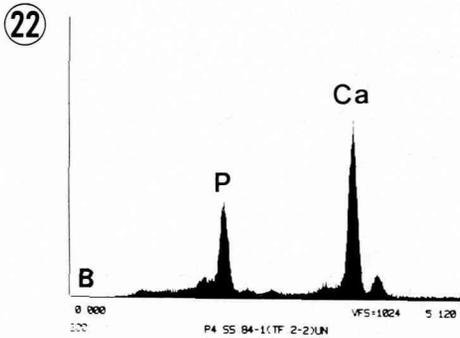
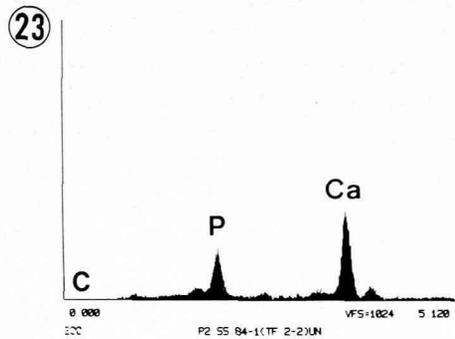
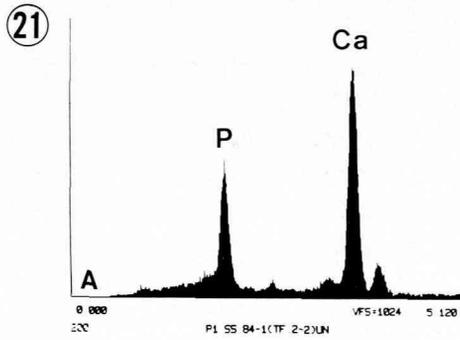


図20：唾石内部の拡大像：高度に石灰化した基質部（右半）に接して、石灰化した菌体が配列している（左半）。（無染色）（ $\times 13,000$ ）

図21：高石灰化部（図20、A点）の元素分析結果：PとCaが高いピークを示している。

図22：菌体中央部（図20、B点）の元素分析結果：PとCaの濃度は高石灰化部に近い値となっている。

図23：菌体周囲部（図20、C点）の元素分析結果：PとCaの濃度は低下している。

図24：菌体内（図20、D点）の元素分析結果：菌体周囲部と類似の組成を示す。