

〔原著〕 松本歯学 14 : 49~57, 1988

key words : 唾石 - 細菌 - 石灰化能 - 分析電顕

唾石細菌とその石灰化能に関する電子顕微鏡的研究

赤羽章司

松本歯科大学 電子顕微鏡室 (赤羽章司 主任技士)

中村 武, 志村隆二

松本歯科大学 口腔細菌学教室 (主任 中村 武 教授)

中嶋 哲, 千野武廣

松本歯科大学 口腔外科学第1講座 (主任 千野武廣 教授)

Electron Microscopic Studies on the Bacteria in Salivary Calculus and Their Calcification Activity

SHOJI AKAHANE

Laboratory of Electron Microscope, Matsumoto Dental College

(Chief : S. Akahane, B. Sc.)

TAKESHI NAKAMURA and RYUJI SHIMURA

Department of Oral Microbiology, Matsumoto Dental College

(Chief : Prof. T. Nakamura)

SATOSHI NAKAJIMA and TAKEHIRO CHINO

Department of Oral and Maxillofacial Surgery I, Matsumoto Dental College

(Chief : Prof. T. Chino)

Summary

To study the relationship of the origin, development, and enlargement of salivary calculi to bacterial calcification, electron microscopic and bacteriological examinations of a calculus extracted from a child were made. Results obtained were as follows :

1. Cocci-like and filamentous microbiota-like structures, bearing needle crystals, were observed to adhere to the surface of the calculus and/or to exist immediately in the vicinity of the surface of the calculus. They were also found inside the calculus.

2. Two bacterial species, identified as *Streptococcus sanguis* and *Corynebacterium pseudodiphtheriticum*, could be isolated from the calculus.
3. Both isolated species formed needle crystals *in vitro* within the cell from which calcium and phosphate were detected by elementary analyses, demonstrating that the two bacterial species possess calcification activity.
4. These isolated bacteria may contribute to the formation of salivary calculi.

緒 言

唾石の表面あるいは断面を走査電顕で観察した多くの報告者は、球菌様または線状菌様の構造物が存在することを認めている^{8,9,11,14,18,20}。著者ら²⁾も摘出唾石の透過電顕観察によって球状や線状構造物を認め、その形態上から唾石内には多数の球菌や線状菌が存在することを明らかにし、さらにその元素分析所見から、これら構造物は菌体内石灰化した細菌像であるとした。また、川嶋ら⁷⁾は唾石から細菌の検出を試み、球菌と線状菌を分離して、この分離線状菌の一種は *Actinomyces israelii* 類似菌であることを示し、この *A. israelii* 類似菌が唾石形成に関与することを示唆している。

唾石の成因には種々の全身的、局所的諸因子など様々な関与が考えられているが^{9,15}、その成因機序は必ずしも明確ではない。しかし、石灰化した細菌像が唾石内に多く認められる事実は、唾石の形成ないし増大に細菌が重要な役割を有することを示唆する。本研究は、唾石内細菌種を検索するとともに、これら細菌の石灰化能について調べたものである。

材料と方法

唾石と細菌の分離・同定

女児（4歳）の左側顎下腺導管内より摘出した唾石（約10×2 mm）材料を用いた。唾石から細菌の分離は、摘出後ただちに無菌的に2分割し、その一方の唾石は滅菌生理食塩液でよく洗浄し、これを乳鉢で細かく破碎した。これをBHI平板および血液平板を用いて好・嫌氣的に3日～5日培養した。各集落についてグラム染色性および形態について調べ、その代表的分離菌株について医学細菌同定の手びきに準じて生物学的性状を調べ、菌種同定を行なった^{4,12,13}。

菌体の石灰化法

代表的分離2菌種の培養菌体を供試して、Wassermanら¹⁹⁾の石灰化溶液（各50mg/100ml湿菌体）を用い最長10日間の石灰化実験を行なった。なお、石灰化溶液は48時間ごとに交換した。菌体の石灰化能は透過電顕によって経日的に観察するとともに、元素分析をも行なった。なお、石灰化実験を行なった各菌体は観察試料調製前に精製水でよく洗浄した。

電子顕微鏡による検索法

透過電顕用の試料作製は、破碎した唾石材料および石灰化実験を行なった菌体試料ともに1%グルタルアルデヒド液にて固定し、コロジオン膜を張ったメッシュ上に載せ検鏡した。また、菌体試料の一部は1%グルタルアルデヒドおよび1%OsO₄で二重固定し、2%寒天中に包埋固定後、通法に従ってエタノール脱水、エポキシ樹脂包埋し超薄切片を作製した。

試料の観察および分析は、JEOL JEM-1200EX型透過電顕にTracor Northern TN-2000エネルギー分散型分光器を装着した分析電子顕微鏡を使用した。

唾石表面の形態を検索するため、先に分割した他方の唾石材料を1%グルタルアルデヒド液にて固定、エタノール脱水後、液体炭酸によって臨界点乾燥を行なった。この試料に金イオンスパッタコーティングを施して、JEOL JCX-A-733型X線マイクロアナライザーによる走査電顕像で唾石表面を観察した。

結 果

1. 唾石の電子顕微鏡所見

唾石表面を走査電顕によって観察すると、不定形の結晶様物に混じって線状の構造物が密集している部分が認められた(図1-A)。この部位を強拡大(図1-B)で観察すると、球菌様構造物と線状菌様構造物が散在しないし附着していた。このよう

な構造物は、破碎した唾石内でも認められた。すなわち図2-Aにみられるごとく、電子密度の高い球状(a)および長桿状(b)、または低電子密度を呈する線状(c)の細菌とみられる像が観察された。高電子密度を示す構造物の内部には針状結晶様構造物がみられ(図2-B, C)、これら所見からこの構造物は明らかに細菌の石灰化像であることが強く示唆された。

2. 検出細菌とその生物学的性状

破碎唾石の細菌培養では、好気培養の供試 BHI 平板および血液平板のいずれからも2種類の細菌が検出・分離された。とくに小さなS型集落(球状)に比較し、やや大きなR型の集落(長桿状)を示すものが多く検出された。

分離した2菌群(各3~4菌株)の形態および生物学的性状は表1、2に示した。すなわち、上

記培養平板上でS型集落を示す菌株(group I)はいずれもグラム陽性のレンサ状球菌で(図3-A, B), MS培地で発育した。これら菌株はいずれも過酸化水素を産生し、アルギニンからアンモニアを産生した。エスクリンを水解し、シュクロースからグルカンを合成する。また種々の炭水化物を分解するが、マンニトールおよびソルビトールを分解しなかった。これらの性状から本菌群は *Streptococcus sanguis* と同定した⁴⁾(表1)。

一方、R型集落を示す菌株はいずれもグラム陽性の桿菌状を示し、やや短桿菌形態から長桿菌状を呈す多形性を有していた(図4-A, B)。また、菌体内には著明ではないが異染顆粒がみられた。いずれの菌株も、カタラーゼ、ウレアーゼ陽性で、

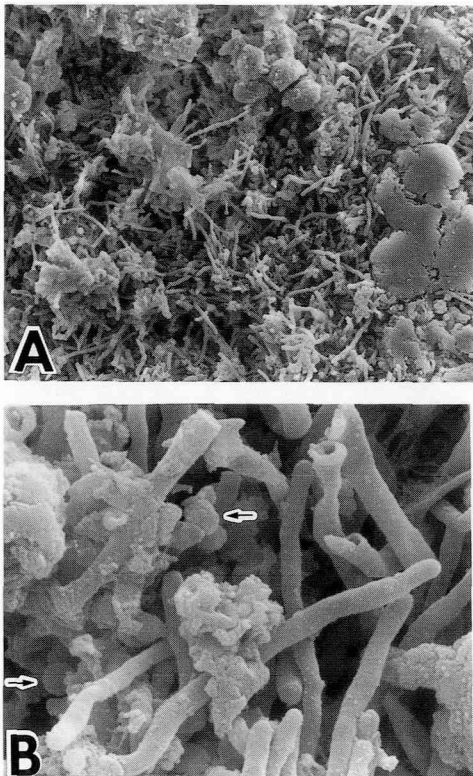


図1：唾石表面の走査電顕像
A：線状構造物の密集した部分(×1,300),
B：球菌様構造物(矢印)と線状菌様構造物(×7,600)

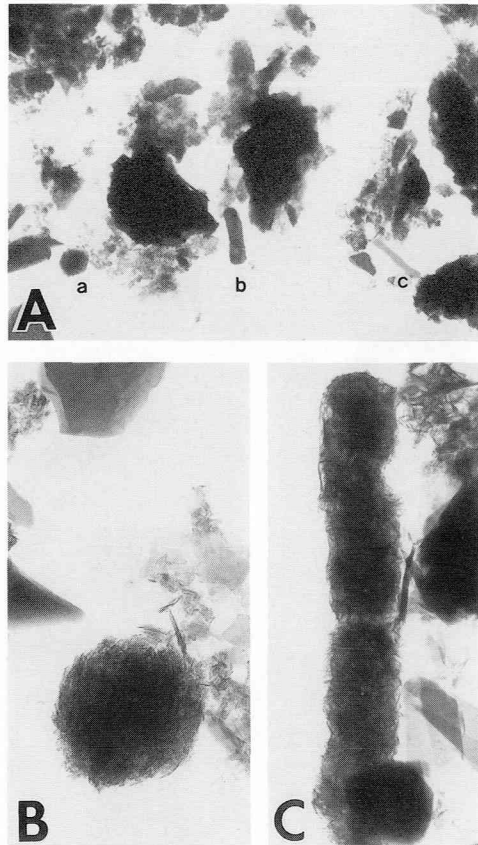


図2：唾石の破碎試料の透過電顕像
A：球状、線状および不定形の結晶様物(×5,000), B：高電子密度な球状構造物(×25,500), C：高電子密度な線状構造物(×25,500)

表1：分離菌株の形態および生物学的性状(group I)

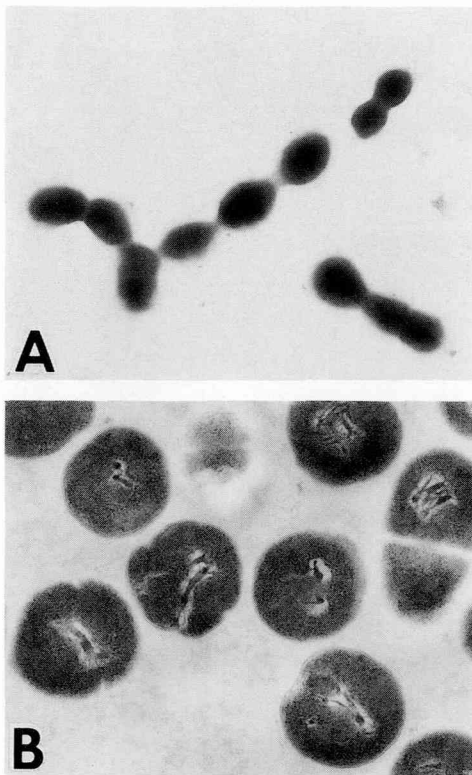
Character	Isolates 3 strains
Gram stain	+
Morphology	cocci, chain
Catalase production	-
Acetoin production	-
H ₂ O ₂ production	+
NH ₃ from arginine	+
Aesculin hydrolysis	+
Glucan from sucrose	+
Acid from	
Mannitol	-
Sorbitol	-
Raffinose	+
Inulin	+
Glucose	+
Sucrose	+
Lactose	+
Maltose	+
Trehalose	+

硝酸塩還元能およびゲラチン水解能が陰性であった。また、全菌株がグルコースをはじめとする殆ど炭水化物に対する分解能を示さなかった。これらの生物学的性状から、本菌群は *Corynebacterium pseudodiphtheriticum* と同定した^{4,13)} (表2)。

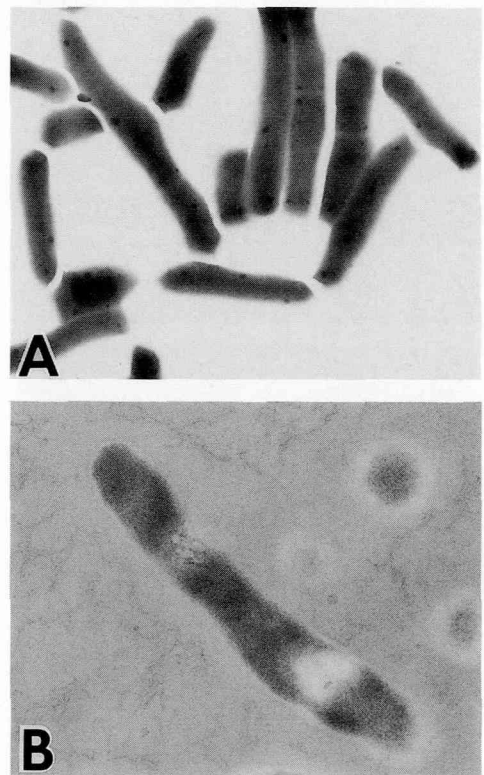
3. 分離菌の菌体石灰化

1) *S. sanguis* の石灰化能

分離された *S. sanguis* 菌体の石灰化能について経日的にみると、1日～3日経過では菌体の石灰化像がほとんどみられず、石灰化4日経過後からわずかではあるが石灰化した菌体が認められるようになった。4日間石灰化した菌体の透過電顕像は図5-Aに示した。大部分の菌体は低電子密度でいわゆる未石灰化像を呈していた。しかし、一部の菌体内にはまばらではあるが針状様結晶を認めるもの、これがほぼ全層にわたるものが認められた。これらの所見は、菌体石灰化の進行過程を

図3：唾石より分離した *S. sanguis*

A：透過電顕像 (×9,500)，B：超薄切片像 (×25,500)

図4：唾石より分離した *C. pseudodiphtheriticum*

A：透過電顕像 (×7,600)，B：超薄切片像 (×20,000)

表 2 : 分離菌株の形態および生物学的性状 (group II)

Character	Isolates 4 strains tested	Related diphtheroid*		
		<i>C.</i> <i>pseudodiphtheriticum</i> ATCC 10700	<i>C. xerosis</i> ATCC 373	<i>C.</i> <i>pseudotuberculosis</i> ATCC 19410
Gram stain	+	+	+	+
Morphology	filamentous, rod	•	•	•
Metachromatic granules	±	•	•	•
Anaerobic growth	-	-	-	-
Catalase production	+	+	+	+
Hemolysis	-	-	-	-
Nitrate reduction	-	-	+	-
Gelatin hydrolysis	-	-	-	-
Urease production	+	+	-	-
Lipase production	-	-	-	-
Acid from Glucose	-	-	+	+
Fructose	-	-	+	+
Galactose	-	-	-	+
Mannose	-	-	-	+
Sucrose	-	-	+	-
Maltose	-	-	-	-
Rhamnose	±	±	+	+
Melibiose	±	±	-	-
Sorbitol	-	±	-	+
Starch	-	-	-	-

± : weakly positive, * : Sasaki et al (1978)
strains : SCB-1, SCB-2, SCB-3, SCB-4

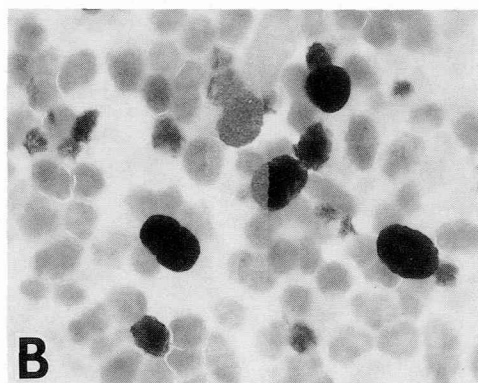
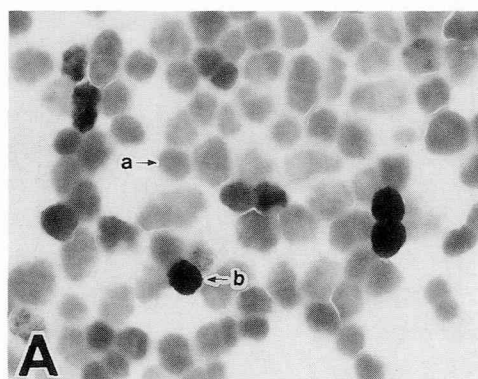


図 5 : *S. sanguis* の石灰化所見
A : 4日間経過後 (×7,200), B : 10日間経過後 (×7,200)

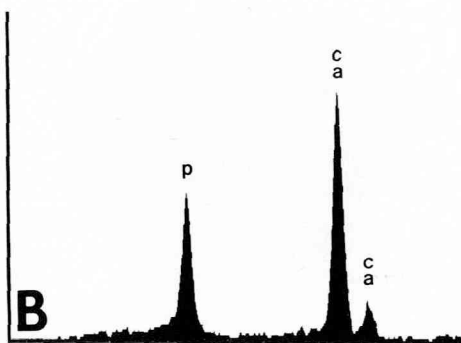
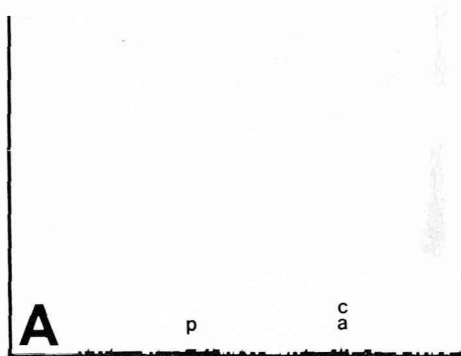


図 6 : *S. sanguis* の元素分析結果 (石灰化 4 日間経過後)
A : 図 5 A の a 菌体, B : 図 5 A の b 菌体

示すものとみられた。10日間の石灰化を続けると高電子密度を呈する菌体数がやや増加し、これら菌体は低電子密度の菌体の直径に比較して約2倍程度に増大して認められた(図5-B)。しかし、*S. sanguis* 菌体は10日間の石灰化実験によっても石灰化が全くみられない多数の菌体も存在した。

電子密度の異なる菌体について分析電顕による元素分析を行なってみると、低電子密度の菌体からはCaやPなどを含めたいずれの特定元素も検出されなかった(図6-A)。これに対して高電子密度を示した菌体から著明なCaおよびPが検出された(図6-B)。

一方、菌体内石灰化の過程を超薄切片によって観察してみると、石灰化溶液中で6日間経過した

菌体の初期では石灰化が菌体内の一部に局限して始まり、ついでこの針状結晶が成長して徐々に菌体内を満たし、やがて菌体内全層から細胞壁外に向かって進行・増大していくことがうかがえた(図7-A, B)。

2) *C. pseudodiphtheriticum* の石灰化能

本分離菌の石灰化所見は上記の *S. sanguis* の菌体石灰化のそれと類似の経過で観察された。しかし、本菌は石灰化実験2日ですでに電子密度の高い菌体が認められた(図8-A)。また経日的にみると、これら石灰化像を示す菌体が *S. sanguis* に比較して多く認められた(図8-B, 石灰化6日間)。

分析電顕によってこれら石灰化菌体(石灰化2日間)について元素分析を行なってみると、低電子密度の菌体(図8-Aのa菌体)でわずかのCaを検出したが、Pは認められなかった(図9-A)。しかし、高電子密度の菌体(図8-Aのb菌体)からは上記の *S. sanguis* 菌体と同様にCaおよびPが高濃度に検出された(図9-B)。

一方、本菌の石灰化過程を超薄切片によって観察すると(図10)、石灰化の初期ですでに同一菌体内の数ヶ所に針状結晶の散在がみられた。この石灰化所見はとくに *C. pseudodiphtheriticum* 菌体でよく観察された。このことは本菌の形態や構造上の特異性に起因するのかも知れない。本菌の石灰化が必ずしも局限した菌体内一部からの石灰化ではなく、石灰化が数ヶ所から進行・増大することを示唆する。また、本菌の経日的石灰化所見からみて *S. sanguis* よりやや石灰化能の強いことが示唆された。

考 察

唾石を形態学的に観察した多くの研究者がその表・内部に球状ないし線状の石灰化構造物を認めている^{8,14,20)}。すでに著者ら^{1,2)}も2,3の摘出唾石についての電顕的観察から類似の石灰化構造物を認め、また、これら構造物に混在して明らかに細胞壁や細胞質膜をもつ構造形態がみられることから、その構造本態は石灰化した細菌体像であるとした。事実、近年著者ら³⁾は唾石内から細菌を分離・同定し、その分離菌が強い石灰化能を有することも明らかにしている。今回、本研究に供した小児の唾石の表面および内部にもこれまで多くの

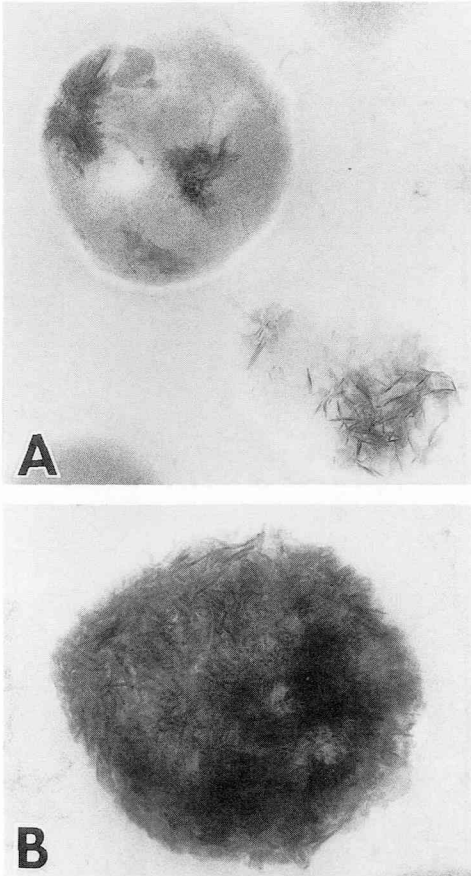


図7: *S. sanguis* の菌体内石灰化像(石灰化6日間経過後)

A: 初期石灰化像($\times 52,000$), B: 高度石灰化像($\times 80,000$)

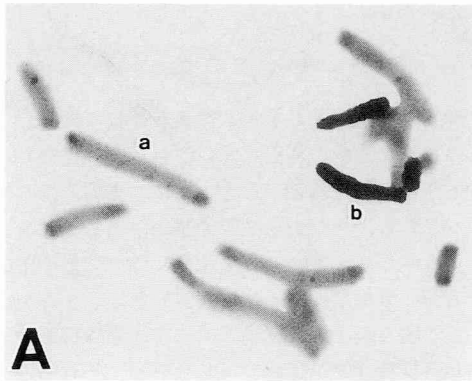


図8 : *C. pseudodiphtheriticum* の石灰化所見
 A : 2日間経過後 (×5,000), B : 6日間経過後 (×5,100)

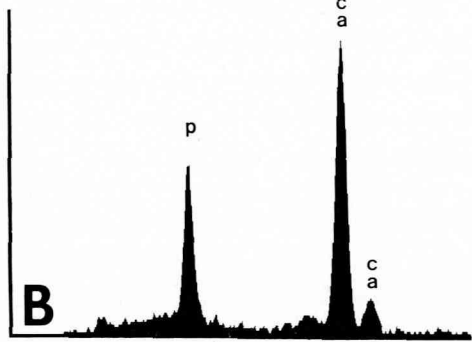
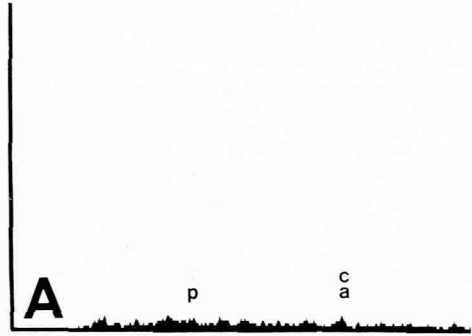


図9 : *C. pseudodiphtheriticum* の元素分析結果 (石灰化2日間経過後)
 A : 図8 Aのa菌体, B : 図8 Aのb菌体

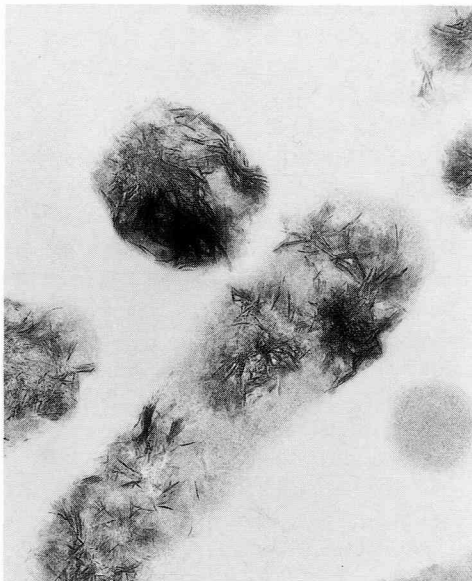


図10 : *C. pseudodiphtheriticum* の菌体内石灰化像 (石灰化10日間経過後) (×32,000)

唾石で観察された所見と近似し、球状や線状構造物が認められ、その形態には特異的の差異がみられなかった。しかし、著者ら^{2,3)}が先に観察した唾石と同様に小児唾石においても明らかに球菌状や長桿菌状とみられる細菌像が観察できた。このことは破碎した唾石の細菌培養所見によって確認することができた。すなわち唾石内から2菌群が検出・分離され、その形態はいずれも唾石の観察所見と一致することから明らかである。

一方、唾石の培養によって2菌群が検出された事実は、唾石内に生菌の存在を示すものである。唾石の成因やその進行・増大、ひいては唾石症悪化にこれら生細菌が密接に関連する可能性の強いことを示唆する。

さて、この検出・分離された2菌群の形態ならびに生物学的性状からそれぞれ *S. sanguis* および *C. pseudodiphtheriticum* と同定された。これら2菌種はいずれも口腔内常在菌種であり、局所へ

の侵入には上行性が考えられる。しかし、唾石形成局所への侵入・伝播ないし定着機序は不明である。

唾石の形態学的観察が多いが細菌の培養・検出や菌種同定まで行なった報告は極めて少ない⁷⁾。したがって本唾石から検出・同定された *S. sanguis* および *C. pseudodiphtheriticum* の 2 菌種を他の唾石から検出される細菌種と厳密に比較することができない。しかし川嶋ら⁷⁾は *Actinomyces israelii* 類似菌を検出しており、また著者ら³⁾がすでに他の唾石例から *S. salivarius* および *Bacterionema matruchotii* の 2 菌種を検出したことなどから考え合わせ、唾石によって検出菌種が可成り異なることを示唆する。事実、川嶋ら⁷⁾が19例中10例の唾石からの検出菌として *Streptococcus* sp., *Staphylococcus* sp., *Corynebacterium* sp., および *Actinomyces* sp., などを報告している。

これまで唾石内の形態観察や検出細菌所見から、唾石の成因に関する細菌の役割が示唆されていた。しかし、唾石からの分離菌について石灰化能を検討した報告はみられない。本研究で唾石から分離・同定された *S. sanguis* および *C. pseudodiphtheriticum* の 2 菌種が *in vitro* でいずれも菌体内石灰化をおこす事実は注目に値する。すなわち、2 菌種の *in vitro* における電顕的種々の菌体内石灰化所見が、唾石の形態ないし分析電顕所見と極めて近似するからである。本研究によって唾石から分離した細菌の石灰化の実証は、唾石の成因ないし進行・増大にこれら細菌が密接に関連することを示したものといえよう。

歯石形成に関連して口腔細菌の石灰化能が検討されている。とりわけ石灰化能の強い菌種として *B. matruchotii* などその近縁の線状菌種が示されている^{5,6,10,16)}。すでに著者ら³⁾も唾石から分離した *B. matruchotii* に強い石灰化能を認めているが、本研究で示した *C. pseudodiphtheriticum* も *B. matruchotii* と極めて近縁の菌種である。しかしその石灰化能について経日的石灰化所見からは、*B. matruchotii* の石灰化能と比較してやや弱いものと考えられた。しかし、*C. pseudodiphtheriticum* の菌体石灰化所見は Takazoe, et al.¹⁷⁾が *B. matruchotii* で示している菌体内石灰化所見と極めて近似していた。一方、*S. sanguis* の石灰化能はその経日的石灰化所見からみて、*C. pseudodi-*

phtheriticum より弱いものと考えられた。

結 論

唾石の成因やその進行・増大と密接に関連するとみられる細菌の石灰化能に注目し、小児の摘出唾石を電顕的に観察するとともに、唾石内から細菌を分離し、その生物学的性状から菌種同定を行ない、さらに分離菌の石灰化能について形態学的ならびに分析電顕によって検討した。

1 唾石表面および唾石内には球菌様構造物と線状菌様構造物が付着ないし存在し、それらの一部には針状結晶を認めた。

2 唾石内から 2 菌種が検出され、その生物学的性状から *Streptococcus sanguis* および *Corynebacterium pseudodiphtheriticum* と同定された。

3 分離 2 菌種はいずれも菌体内に針状結晶を形成し、その元素分析から高濃度に Ca および P を検出し、2 菌種が明らかに石灰化能を有することを実証した。

4 分離 2 菌種の石灰化能から唾石の成因ないし進行・増大に細菌が密接に関連することを考察した。

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, 長谷川博雅, 吉田潤一郎, 千野武広 (1986) 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. 松本歯学, 12 : 189-201.
- 3) 赤羽章司, 志村隆二, 中村 武, 矢ヶ崎 崇, 北村 豊, 鹿毛俊孝, 千野武広 (1986) 唾石から分離した線状菌の生物学的性状とその石灰化に関する電顕的観察. 松本歯学, 12 : 247.
- 4) Buchanan, R. E., Gibbons, N. E., Cowan, S. T., Hat, J. G., Liston, J., Murray, R. E., Niven, C. F., Rabin, A. W. and Stnier, R. Y. (1974) Bergey's Manual of Determination Bacteriology. 8th. ed. : 490-509, 599-631.
- 5) Ennever, J., Vogel, J. J. and Streckfuss, J. L. (1971) Synthetic medium for calcification of *Bacterionema matruchotii*. J. dent. Res. 50 : 1327-1330.
- 6) Ennever, J., Vogel, J. J. and Brown, JR. L. R. (1972) Survey of microorganisms for calcifica-

- tion in a synthetic medium. J. dent. Res. 51: 1483-1486.
- 7) 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.
 - 8) 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.
 - 9) 倉地洋一, 松本英彦, 南雲正男, 榎本昭二, 滝口 勳司 (1980) 走査電子顕微鏡による唾石の観察. 口外誌, 26: 945-951.
 - 10) Lie, T. and Selvig, K. A. (1974) Calcification of oral bacteria: an ultrastructural study of two strains of *Bacterionema matruchotii*. Scand. J. dent. Res. 82: 8-18.
 - 11) 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.
 - 12) 坂崎利一 訳 (1974) 医学細菌同定の手びき. 第2版: 235-261, 近代出版社, 東京.
 - 13) Sasaki, N., Takaoka, M., and Takazoe, I. (1978) Biological characteristics of corynebacterium isolated from human gingival crevice material. Bull. Tokyo dent. Coll. 19: 97-101.
 - 14) 副島嘉男, 小笠原 靖, 山田清夫, 平川栄二, 本川 渉, 吉田 稔, 隅本 真, 江 永言, 谷口邦久, 北村勝也 (1987) 小児に見られた唾石症4例と, 唾石の走査電顕的観察. 小児歯誌, 25: 184-192.
 - 15) 田縁 昭, 児玉園昭 (1972) 過去3年間における唾石症の10例について. 口外誌, 18: 341-346.
 - 16) Takazoe, I., Takeuchi, T. and Nakamura, T. (1963) A chemical investigation of the intracellular calcification of *Bacterionema matruchotii*. Bull. Tokyo dent. Coll. 4: 61-75.
 - 17) Takazoe, I., Kurahashi, Y. and Takuma, S. (1963) Electron microscopy of intracellular mineralization of oral filamentous microorganisms *in vitro*. J. dent. Res. 42: 681-685.
 - 18) 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.
 - 19) Wasserman, B. H., Mandel, I. D. and Levy, B. M. (1958) *In vitro* calcification of dental calculus. J. Periodontol. 29: 144-147.
 - 20) 八島幸子, 石川武憲, 奥井 寛, 田中浩二, 安井良一, 野村雅久, ハッタ・ハサン, 森山 透, 村上和億, 下里常弘, 細井光輝 (1986) 耳下腺唾石症3例と唾石の組成構造の観察. 口科誌, 35: 712-722.