

# Clinico-Bacteriological Study on Dental Calculus

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	<a href="http://hdl.handle.net/2297/8086">http://hdl.handle.net/2297/8086</a>

## 歯石の臨床細菌学的研究

金沢大学医学部歯科口腔外科学講座 (主任: 山本悦秀教授)

仲 井 雄 一

(平成1年1月18日受付)

歯石の細菌叢を明らかにし、口腔内感染症および菌血症との関連性を検索するため、歯石中の細菌の分離を行い、かつ分離菌株の抗生物質感受性について検討した。また、高頻度分離菌株に関しては、家兎の腹部で皮内反応を行い、その病原性について検討した。菌分離法に関する実験結果に基づき、玉井・福田 (Tamai-Fukuda, TF) 培地を用い、増菌培養時間を48時間とすることにより歯石より菌の分離を行った。歯石203症例を検索した結果、好気性菌単独分離例21例、残りの182症例は好気性菌と嫌気性菌の混合分離例であり、嫌気性菌の単独分離例はなかった。総分離株741株中、好気性菌393株、嫌気性菌348株で、嫌気性菌の分離率は47.0%であった。分離率の高かった菌属は好気性菌では *Lactobacillus* (123株)、*Streptococcus* (77株)、*Corynebacterium* (57株)、嫌気性菌では *Veillonella* (72株)、*Eubacterium* (59株)、*Bacteroides* (57株)、*Peptococcus* (50株) で、これら7菌属で全分離菌株の約70%を占めており、これらが歯石における主常在菌であるとする結果が得られた。分離同定した731株 (好気性菌386株、嫌気性菌345株) についてペニシリン G (penicillin G, PCG)、アンピシリン (ampicillin, ABPC)、セファロリジン (cephaloridine, CER)、テトラサイクリン (tetracycline, TC)、エリスロマイシン (erythromycin, EM)、クリンダマイシン (clindamycin, CLDM)、ゲンタミシン (gentamicin, GM)、ポリミキシン (polymyxin, PL) の8剤の抗生物質に対する感受性試験を3濃度ディスク法を用いて行った。好気性菌群では90%以上の菌株が、嫌気性菌群では95%以上の菌株が CER, TC, CLDM に対し感受性を示した。高頻度検出好気性菌4株、嫌気性菌4株、計8株を用いて16通りの組合せで家兎の腹部で皮内反応を行った。各々 $10^8$ コロニー形成単位 (colony forming unit, CFU) /ml に調整した培養菌液を好気性菌および嫌気性菌単独注射の場合は0.2ml、好気性菌と嫌気性菌の混合注射の場合は0.1mlずつ計0.2mlを家兎の腹部に注射したところ、菌の種類や組合せにより、局所の変化もある程度異なるが、いずれの場合においても、単独注射した場合よりも混合注射した方が、発赤、腫脹、硬結が大きかった。また、単独注射、混合注射いずれの場合も、発赤は24時間、腫脹、硬結は48時間を最大として、その後は消退傾向を示した。さらに、家兎腹部の好気性菌と嫌気性菌の混合感染部を摘出し、病理組織標本を作成したところ、組織学的に膿瘍の形成を認め、病原性が示唆された。

**Key words** 歯石, 口腔内感染症, 抗生物質感受性, 病原性, TF 培地

歯石とは、口腔内に露出した歯の表面に沈着している硬い沈着物で細菌苔の石灰化の進んだものであり、一般的には歯頸部に沈着していることが多い。歯肉縁より上方、すなわち歯冠部側へ沈着しているものは歯

肉上歯石と呼ばれており、これに対して歯肉縁の根尖側に沈着しているものは、歯肉下歯石と区別されている<sup>1)</sup>。歯石の歯牙沈着については、成人男子で70%以上、女子では60%以上に認められ、特に50代において

Abbreviations: ABPC, ampicillin; BHI, brain heart infusion; CER, cephaloridin; CFU, colony forming unit; CLDM, clindamycin; EM, erythromycin; GM, gentamicin; PCG, penicillin G; PL, polymyxin; TC, tetracycline; TF, Tamai-Fukuda; TGC, thioglycollate medium without indicator

は90%以上に認められる<sup>2)</sup>。また、学童でも6~8歳で15%、9~10歳で33%、12~14歳で40%以上に歯石の沈着が認められる<sup>3)</sup>。歯石の病因的意義については、清掃状態の悪い口腔内では、歯頸部に多量の歯苔や歯石が沈着して歯肉に慢性炎症を起こしたり、しばしば進展した辺縁性歯周炎を生ずることは古くから臨床的に多数の人々によって注目されていた<sup>4)</sup>。歯肉の炎症からの続発症として歯肉膿瘍、歯性上顎洞炎、骨髄炎、蜂窩織炎等の口腔内感染症、あるいは菌血症、更に亜急性心内膜炎などが発症することを考えれば、これらの感染症における歯石の第一次的病因的意義を明らかにすることは極めて重要である。さらに、歯石は歯科口腔外科領域で日常臨床にて頻繁に行う抜歯術の際の菌血症の一因であるとも考えられている<sup>5)~7)</sup>。しかしながら、歯石中の細菌に関しては形態学的にはいくつかの報告<sup>8)~11)</sup>はみられるが、歯石からの菌分離に関する研究はほとんど行われていない。

口腔内感染症は、従来は主として口腔内に常在する好気性菌群による内因感染症と解されていた。近年、嫌気培養法の発達にともなって感染症から容易に嫌気性菌が分離同定されるようになったため<sup>12)</sup>、嫌気性菌感染症が注目され、口腔領域でも嫌気性菌の単独感染症例、あるいは好気性菌と嫌気性菌の混合感染症例が数多く報告されるようになった<sup>13)~15)</sup>。さらに、時としてこれらの感染症が重篤な症状を呈する場合もあり、その際の起因菌は従来、弱毒菌または非病原菌とみなされてきた口腔内常在嫌気性菌であることが判明してきた<sup>16)~19)</sup>。それ故に口腔内感染症、菌血症等と歯石の細菌叢との関連性を口腔内感染症の立場から解明するため、歯石の細菌叢を嫌気性菌をも含めて明らかにすることが必要である。歯石は古くからその成因上、層板構造をなすために<sup>10)</sup>、嫌気性菌が多く潜んでいると考えられ、そのため、培養時間、培養法、使用培地を注意深く検討すれば、嫌気性菌の分離頻度は大幅に増加すると思われる。

以上の見地より著者は歯石の細菌叢を嫌気性菌を中心に検索した。また、口腔内感染症および菌血症における有効な抗生物質を明らかにするため、分離菌株の抗生物質感受性試験を行った。さらに、歯石からの高頻度検出菌について家兎を用いてその病原性について検討した。

## 対象および方法

### 1. 歯石よりの菌分離法

#### 1. 対象

主として金沢大学医学部歯科口腔外科外来を訪れた

患者203名(男性, 113名; 女性, 90名)を対象とした。対象患者の平均年齢は, 44.4歳(17~83歳)であった。

#### 2. 使用培地

カルチャーボトル用培地として変法チオグリコレート培地(thioglycollate medium without indicator, TGC培地)(ニッスイ, 東京), プレインハートインフュージョン培地(brain heart infusion medium, BHI培地)(ニッスイ), 玉井-福田培地(Tamai-Fukuda medium, TF培地)(ニッスイ), GAM半流動培地(GAM培地)(ニッスイ)を比較検討した。カルチャーボトルは以下のごとくに作製した。容量約50mlのスクリーキャップ付投薬瓶に上述の各々の培地約30mlを入れ, さらに瓶内部を吸引ポンプMINI-VaC(ヤマト精機, 東京)で陰圧にした後, 115°C15分間高圧蒸気滅菌した。上述の培地に寒天を1.5%(w/v)濃度になるように加えたものを菌分離のための寒天平板培地として使用した。なお, TF寒天平板培地およびGAM寒天平板培地作成には, さらに綿羊血液(日本バイオテスト研究所, 東京)を10%(w/v)濃度に添加した。

#### 3. 歯石の採取法

口腔内のスプレー洗浄を行ない, 対象歯牙および, 周囲歯肉粘膜をイソジン液<sup>®</sup>(ポピドンヨード, 100mg/ml)(明治製菓, 東京)および0.4%ヒピテングルコネート液<sup>®</sup>(住友製薬, 東京)で消毒し, 滅菌ロールワッテで防湿を行なった後, 滅菌スクーラにて歯石約100mgを採取し, 使用培地ごとに3ml注入してある滅菌小試管に入れ, 直ちに手動式5mlホモゲナイザー(池本理化, 東京)で細粉懸濁した後, その1mlを各カルチャーボトルに注入した。

#### 4. 菌の分離・培養法

細粉懸濁液を直接, あるいは細粉懸濁液のカルチャーボトルでの増菌培養液を使用寒天平板培地に塗抹することにより菌分離を行った。増菌培養期間に関しては2, 5, 7日間について比較検討した。増菌培養液からの菌分離は, それぞれの増菌培養培地の寒天平板を用いておこなった。培養液のそれぞれ1白金耳を2枚の寒天平板(直径12cm)に塗抹し, 1枚は37°Cで24時間好気培養, 1枚は48時間嫌気培養後, 性状が異なるコロニーをそれぞれTF培地(15ml)に釣菌植菌した。37°C48時間培養後, TF寒天平板を用いて純粋分離株を得た。嫌気培養は, GAS PACK(BBL, Cockeysville, USA)を用いて行った(GAS PACK法)。直接塗抹においても同様の方法で行った。

#### 5. 分離菌株の同定法

純粋分離菌株について、好気性菌は Cowan & Steel's manual<sup>20)</sup>、嫌気性菌は Bergey's manual<sup>21)</sup> に従い、同定した。

## II. 抗生物質感受性試験

分離菌株の薬剤感受性試験は、トリディスク<sup>®</sup> “栄研” (栄研化学, 東京) の3濃度ディスクを用いて行った。被験抗生物質はペニシリン G (penicillin G, PCG), アンピシリン (ampicillin, ABPC), セファロリジン (cepharolidine, CER), テトラサイクリン (tetracycline, TC), エリスロマイシン (erythromycin, EM), クリンドマイシン (clindamycin, CLDM), ゲンタミシン (gentamicin, GM), およびポリミキシン (polymyxin, PL) の8剤を実験に供した。

分離菌株の TF 培地 (15ml) 培養菌液 (好気性菌, 24時間培養液; 嫌気性菌, 48時間培養液) (菌数約  $10^8$ /ml) を実験に供した。培養菌液 0.2ml を TF 寒天平板に滴下し、コンラージ棒で均等に塗抹した後、各ディスクを平板上に置き、好気性菌は  $37^{\circ}\text{C} \cdot 24$  時間、嫌気性菌は  $37^{\circ}\text{C} \cdot 48$  時間培養した。培養後、発育阻止円の有無を観察し、高・中・低濃度ディスクあるいは、高・中濃度ディスクにおいて、発育阻止円がみられる場合を薬剤感受性とした。

## III. 動物実験

### 1. 使用動物

日本白色家兔 (北陸実験動物, 金沢) を購入後、体調不整による実験誤差をできるだけ避けるため、1週間教室で飼育した後実験に供した。この際、生後11~12週齢 (約2 kg) の雄の家兔を実験に使用した。

### 2. 菌液の調整

被験分離菌株については、分離同定後、凍結保存されたものを、TF 平板培地で純培養菌であることを確認した後使用した。被験菌株の TF 培地 (中試験管中 15ml) 培養菌液 (好気性菌, 24時間培養液; 嫌気性菌, 48時間培養液) を実験に供した。この際、あらかじめ平板希釈法<sup>22)</sup> により菌数を測定しておき、実験に際

し生理的食塩水を用い  $10^8$  コロニー形成単位 (colony forming unit, CFU) /ml に調整した。

### 3. 家兔の腹部における皮内反応

家兔の腹部を電動バリカン Thrive aminal clipper, Model 900 (大東電気工業, 東京) を用いて剃毛, エタノールで消毒後、好気性菌あるいは嫌気性菌単独では 0.2ml, 好気性菌と嫌気性菌の混合の場合は、各々 0.1ml ずつ計 0.2ml を家兔の皮内に注射した。注射後 24, 48, 72, 96 および 120 時間経過後の発赤, 腫脹, 硬結の反応の有無を観察し、その直径を計測した。なお、実験は2回繰り返した。

### 4. 病理標本の作成及び観察

患部を摘出後、10%ホルマリンにて固定し、標本を作成し、常法<sup>23)</sup> に従い、ヘマトキシリン-エオジン染色を行った後、光学顕微鏡下に観察した。

## 成 績

### I. 歯石からの菌分離法 (増菌・菌分離用培地, 増菌培養期間) の検討

まず、基礎実験として、患者20名の歯石を用い、増菌・菌分離用培地, 増菌培養期間について検討した。この際、増菌・菌分離用培地としては TF, GAM, BHI, TGC 培地を比較検討し、増菌培養期間に関しては 2, 5, 7 日間培養について検討した。また、菌分離用培地への被験歯石試料の直接塗抹による菌分離も試みた。

被験20症例全例において、各症例あたり 3~6 菌属の菌分離が認められ、総計92菌株が分離された。TF 培地における分離率が最も高く、84株 (91.3%) が分離された。GAM, BHI, TGC 培地における分離株数 (分離率) は各々76株 (82.6%), 65株 (70.7%), 45株 (48.9%) であった。

各培地における菌分離率を増菌培養期間について分析した。3菌属が分離された1症例については TG, GAM, BHI, TGC 培地いずれの培地でも2日間増菌

Table 1. Comparison of different media for the isolation of bacteria in relation to incubation period of enrichment culture in 9 cases of dental calculus with 4 genera

Medium used	Number of cases with 4 genera in incubation period (day) of			
	0 <sup>a)</sup>	2	5	7
TF	0	7	4	0
GAM	0	3	1	0
BHI	0	1	0	0
TGC	0	0	0	0

a) Dental calculus sample was directly inoculated on each agar medium.

Table 2. Relationship between total number of bacterial genera and number of aerobic bacterial genera found in dental calculus

Total number of bacterial genera isolated	Number of dental calculus cases	Number of dental calculus cases										
		Number of aerobic bacterial genera isolated										
		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
1	8	0	8									
2	26	0	17	9								
3	63	0	23	36	4							
4	62	0	9	49	4	0						
5	27	0	0	16	11	0	0					
6	12	0	0	2	7	3	0	0				
7	4	0	0	0	1	2	1	0	0			
9	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0

培養で3菌属がすべて同時に分離された。

4菌属が検出された9症例ではTF培地2日間増菌培養における分離率が最も高く、7症例で4菌属が同時に検出され、残り2症例においても各々3菌属が分離された(表1)。GAM培地、BHI培地においても2日間増菌培養が最も有効であったが分離率は低く、各々3症例、1症例で4菌属が同時に分離されたにすぎなかった。また、いずれの症例においても、直接塗抹、7日間増菌培養では分離率はきわめて低く、いずれの培地を用いても4菌属が同時には分離されなかった。TGC培地では、4菌属が同時に分離された培養時間はなかった。5菌属が分離された7症例ではTF培地、GAM培地、BHI培地いずれにおいても2日間培養のみで、各々3、3、1症例で5菌属が同時に検出された。また、TF培地2日間増菌培養については残り4症例中2症例では各4菌属が、2症例では各3菌属が同時に分離された。TGC培地ではいずれの培養時間でも5菌属が同時に分離されたことはなかった。6菌属が検出された3症例についてはTF培地では2日間および5日間増菌培養後、それぞれ2症例、1症例で6菌属が同時に分離され、2日間が最も有効であった。TF培地2日間増菌培養における残り1症例においては5菌属が分離された。また、GAM培地では2日間増菌培養のみで1症例に6菌属が同時に検出された。BHI、TGC培地を用いたとき、いずれの培養時間でも6菌属が同時に分離されたことはなかった。

以上の結果をまとめるとTF培地・2日間増菌培養における菌分離率が最も高く総分離株92株中83株(90.2%)が分離された。

Table 3. Kind of isolates from dental calculus

Organism	Number (%) of isolates
<b>Aerobe</b>	
<i>Lactobacillus</i>	123 (16.6)
<i>Streptococcus</i>	77 (10.4)
<i>Corynebacterium</i>	57 (7.7)
<i>Staphylococcus</i>	34 (4.6)
<i>Micrococcus</i>	23 (3.1)
<i>Acinetobacter</i>	19 (2.6)
<i>Bacillus</i>	16 (2.2)
<i>Branhamella</i>	15 (2.0)
<i>Candida</i>	12 (1.6)
<i>Arachnia</i>	6 (0.8)
Unidentified G(+) rod <sup>a)</sup>	4 (0.5)
Unidentified G(-) rod <sup>b)</sup>	3 (0.4)
<i>Nocardia</i>	2 (0.3)
<i>Proteus</i>	1 (0.1)
<i>Escherichia</i>	1 (0.1)
	393 (53.0)
<b>Anaerobe</b>	
<i>Veillonella</i>	72 (9.7)
<i>Eubacterium</i>	59 (8.0)
<i>Bacteroides</i>	57 (7.7)
<i>peptococcus</i>	50 (6.7)
<i>Actinomyces</i>	35 (4.7)
<i>Peptostreptococcus</i>	32 (4.3)
<i>Bifidobacterium</i>	21 (2.8)
<i>Propionibacterium</i>	12 (1.6)
Unidentified G(+) rod	6 (0.8)
<i>Leptotrichia</i>	3 (0.4)
<i>Fusobacterium</i>	1 (0.1)
	348 (47.0)

a) Unidentified gram-positive rod.  
b) Unidentified gram-negative rod.

## II. 歯石からの菌分離

先の実験成績から、歯石からの菌分離は、増菌・菌分離用培地として TF 培地を用い、2日間増菌培養について行うこととし、203症例の歯石を対象に検索した。

203症例全例から菌の検出が認められた。1菌属のみが分離された8症例全例、2菌属が分離された26症例中9例、3菌属が分離された63症例中4例、計21例(10.3%)では好気性菌のみが分離された(表2)。残り全て(182例)は好気性菌と嫌気性菌の混合症例であり、嫌気性菌のみが分離された症例はなかった。歯石あたりの分離菌属数については3菌属分離例が63症例(31.0%)、4菌属分離例が62症例(30.5%)であり、両者で全症例の61.5%を占めた。これら最も頻度の高かった3菌属および4菌属分離例について更に詳細に分析した。3菌属分離例では好気性菌2菌属・嫌気性菌1菌属の症例が、好気性菌1菌属・嫌気性菌2菌属の症例(23例)より多く、36症例であり、3菌属分離症例の(63症例)の57.1%を占めた。また、4菌属分離症例については好気性菌、嫌気性菌各々2菌属分離例が最も多く49症例であり、4菌属分離例(62症例)の79.0%を占めた。

## III. 歯石からの分離菌属

203症例の歯石から分離した総菌株数は741株であり、好気性菌393株(53.0%)、嫌気性菌348株(47.0%)であった(表3)。好気性菌群ではグラム陽性桿菌の分離頻度が最も高く、好気性菌群(393株)の52.9%(208株)を占めた。次いでグラム陽性球菌が34.1%(134株)であり、両者で好気性菌の87.0%をしめた。グラム陰性桿菌及び同球菌の分離頻度は低く、

Table 4. Relationship between total number of bacterial genera and isolation frequency of *Lactobacillus* in dental calculus

Total number of bacterial genera isolated	Number of dental calculus cases	Number (%) of <i>Lactobacillus</i> -positive dental calculus cases
1	8	1 (12.5)
2	26	11 (42.3)
3	63	43 (68.3)
4	62	40 (64.5)
5	27	21 (77.8)
6	12	5 (50.0)
7	4	3 (75.0)
9	1	0 (0.0)

各々6.1%(24株)、3.8%(15株)にすぎなかった。分離菌株の菌属については好気性菌群の10%以上を占めた菌属は *Lactobacillus* (グラム陽性桿菌)、*Streptococcus* (グラム陽性球菌)、*Corynebacterium* (グラム陽性桿菌)であったが、*Lactobacillus* の分離率が特に高く、123株分離された。後2者については各々77株、57株が分離され、3菌属で好気性菌群の65.4%を占めた。

嫌気性菌群においても好気性菌群と同様、グラム陽性桿菌、グラム陽性球菌の順で高頻度に分離されたが、嫌気性菌群(348株)での占める割合は低く、各々39.1%(136株)、23.6%(82株)を占めたにすぎなかった。また、嫌気性菌群では好気性菌群に比べグラム陰性菌の占める割合は高く、グラム陰性球菌、グラム陰性桿菌の割合は各々20.7%(72株)、16.7%(58株)であった。分離菌株の菌属については、特に高い分離率を示した菌属はなかったが、嫌気性菌群の10%以上を占めた菌属は *Veillonella* (グラム陰性球菌)(72株)、*Eubacterium* (グラム陽性桿菌)(59株)、*Bacteroides* (グラム陰性桿菌)(57株)、*Peptococcus* (グラム陽性球菌)(50株)、*Actinomyces* (グラム陽性桿菌)(35株)であり、これら5菌属で嫌気性菌群の78.4%を占めた。

各歯石からの菌分離パターンについて分析したが、特徴ある菌属の組合せによる分離パターンは認められなかった。しかしながら、全体を通じて最も分離頻度の高かった *Lactobacillus* については1菌属分離例ではその分離頻度が低く、8症例中1症例(12.5%)で *Lactobacillus* が分離されたにすぎなかった。これに反して複数菌属分離例では *Lactobacillus* の分離頻度は高く、特に3菌属以上の分離症例では169症例中112症例(66.3%)から *Lactobacillus* が分離された(表4)。

分離菌を総合的に分析すると *Lactobacillus*、*Streptococcus*、*Corynebacterium*、*Veillonella*、*Eubacterium*、*Bacteroides*、*Peptococcus* の7菌属で66.8%を占め、これらが歯石の主常在菌であるとする結果が得られた。

## IV. 抗生物質感受性試験

歯石から分離・同定した741菌株のうち、好気性菌386株、嫌気性菌345株、計731株について抗生物質8剤に対し、感受性試験を行った(表5)。

好気性菌群では CER、TC、CLDM に対して被験菌株の90%以上が感受性であった。PL に対しては感受性が極めて低く、感受性株は被験菌株の4.9%にすぎなかった。検出率の高かった *Lactobacillus*、*Streptococcus*、*Corynebacterium* について感受性分析を行った。*Lactobacillus* は CLDM に対し最も感受性が高く、被験株123株中121株(98.4%)が感受性であった。

次いで CER, TC に対し感受性が高く、各々118株 (95.9%), 115株 (93.5%) が感受性であった。Streptococcus は CER に対し被験77株全株が感受性を示し、次いで TC に対し75株 (97.4%) が、ABPC に対し74株 (96.1%) が感受性であった。Corynebacterium は TC に対し最も高い感受性を示し、被験株56株中55株 (98.2%) が感受性であった。また、CER, CLDM に対しても感受性が高く、各々53株 (94.6%), 52株 (92.9%) が感受性であった。

嫌気性菌については、好気性菌群と同様に CER, TC, CLDM に対し高い感受性を示し、被験株の95%以上が感受性であった。また、PCG, ABPC にも90%以上の菌株が感受性であった。しかしながら、GM については、感受性が低く、37.3%の菌株が感受性で

あったにすぎなかった。また、PL については1株を除き全株が耐性であった。検出率の高かった Veillonella, Eubacterium, Bacteroides, Peptococcus について感受性分析を行った。Veillonella においては、72株中70株 (97.2%) が TC に感受性であった。CER, CLDM には共に69株 (95.8%) に感受性を認めた。Eubacterium では58株中、CER, CLDM に対し、各々56株 (96.6%)、また TC にも55株 (94.8%) が感受性であった。Bacteroides では CLDM に対し特に感受性が高く被験56株全株が感受性であった。次いで CER に対し感受性が高く53株 (94.6%) が感受性であった。Peptococcus においても CLDM, CER に対し、特に感受性が高く、各々49株 (98.0%)、48株 (96.0%) が感受性であった。

Table 5. Susceptibility of 731 strains from dental calculus against 8 antibiotics

Organism	Number of strains tested	Number of strains susceptible against							
		PCG	ABPC	CER	TC	EM	CLDM	GM	PL
<b>Aerobe</b>									
<i>Lactobacillus</i>	123	113	113	118	115	111	121	92	0
<i>Streptococcus</i>	77	73	74	77	75	71	73	57	0
<i>Corynebacterium</i>	56	51	51	53	55	45	52	36	0
<i>Staphylococcus</i>	33	20	21	30	31	24	27	20	0
<i>Micrococcus</i>	23	23	23	23	22	21	23	21	0
<i>Acinetobacter</i>	19	19	19	19	19	19	19	19	0
<i>Branhamella</i>	15	8	8	14	14	7	11	8	8
<i>Bacillus</i>	14	13	13	14	11	8	14	9	1
<i>Candida</i>	12	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Arachnia</i>	6	6	6	6	6	4	6	3	0
Unidentified G(+) rod <sup>a</sup>	3	3	3	3	3	3	3	2	0
<i>Nocardia</i>	2	0	1	2	2	2	2	2	0
Unidentified G(-) rod <sup>b</sup>	1	0	0	1	1	0	1	0	0
<i>Proteus</i>	1	1	1	0	0	0	1	0	0
<i>Escherichia</i>	1	1	1	1	1	1	0	0	0
Total	386	331	334	361	355	316	353	269	19
(%)		(85.8)	(86.5)	(93.5)	(92.0)	(81.9)	(91.5)	(69.7)	(4.9)
<b>Anaerobe</b>									
<i>Veillonella</i>	72	64	63	69	70	63	69	32	0
<i>Eubacterium</i>	58	49	49	56	55	45	56	18	1
<i>Bacteroides</i>	56	50	51	53	51	50	56	15	0
<i>Peptococcus</i>	50	44	43	48	45	36	49	20	0
<i>Actinomyces</i>	35	35	35	34	35	17	34	2	0
<i>Peptostreptococcus</i>	32	28	28	30	30	26	29	19	0
<i>Bifidobacterium</i>	20	20	20	20	20	19	20	12	0
<i>Propionibacterium</i>	12	12	12	12	12	12	12	5	0
Unidentified G(+) rod	6	6	6	6	6	6	6	5	0
<i>Leptotrichia</i>	3	3	3	3	3	3	3	2	0
<i>Fusobacterium</i>	1	1	1	1	1	1	1	0	0
Total	345	312	311	332	328	278	335	130	1
(%)		(90.4)	(90.1)	(96.2)	(95.1)	(80.6)	(97.1)	(37.7)	(0.3)

a) Unidentified gram-positive rod.  
b) Unidentified gram-negative rod.

## V. 家兔腹部における皮内反応

分離頻度が高かった好気性菌4菌属, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Corynebacterium*, *Staphylococcus*, および嫌気性菌4菌属, *Veillonella*, *Eubacterium*, *Bacteroides*, *Peptococcus*の病原性について, その培養菌液を家兔の皮内に注射することにより検討した(表6). 各菌株の培養菌液(生菌数,  $10^8$ CFU/ml) 0.2ml

を各々単独で注射した場合, いずれの菌株においても注射24時間後には注射部位に発赤, 腫脹が認められた. *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Veillonella*, *Eubacterium*, *Bacteroides*においては強い発赤, 腫脹がみられ, その拡がりは直径5~11mm(24時間後)におよんだ. また発赤, 腫脹は120時間目まで観察できた. しかし, *Corynebacterium*, *Staphylococcus*,

Table 6. Skin reaction in intracutaneous injection of various bacterial cultures into the skin of abdominal region of rabbit

Aerobe injected	Diameter (mm) of redness (swelling) 24 hr after the injection				
	Anaerobe injected together with each aerobe				
	None	<i>Veillonella</i>	<i>Eubacterium</i>	<i>Bacteroides</i>	<i>Peptococcus</i>
None		10.5( 9.5)	10.5(10.0)	6.5( 6.0)	3.5( 3.0)
<i>Lactobacillus</i>	6.0( 5.5) <sup>a)</sup>	16.0(15.5)	16.0(15.5)	15.0(12.0)	10.0( 9.5)
<i>Streptococcus</i>	11.5(10.0)	20.0(16.5)	16.5(15.5)	16.0(15.5)	17.0(16.0)
<i>Corynebacterium</i>	2.5( 2.5)	15.0(10.5)	16.0( 9.5)	11.0(10.0)	5.5( 5.0)
<i>Staphylococcus</i>	3.0( 2.5)	15.0(10.5)	15.0(12.5)	9.5( 9.0)	4.5( 4.0)

Two tenth ml ( $2 \times 10^7$  CFU) of each culture of aerobe or anaerobe, or a mixture ( $2 \times 10^7$  CFU) of 0.1 ml each of cultures of aerobe and anaerobe was injected intracutaneously into the abdominal region of rabbits.

a) Mean value of two experiments.

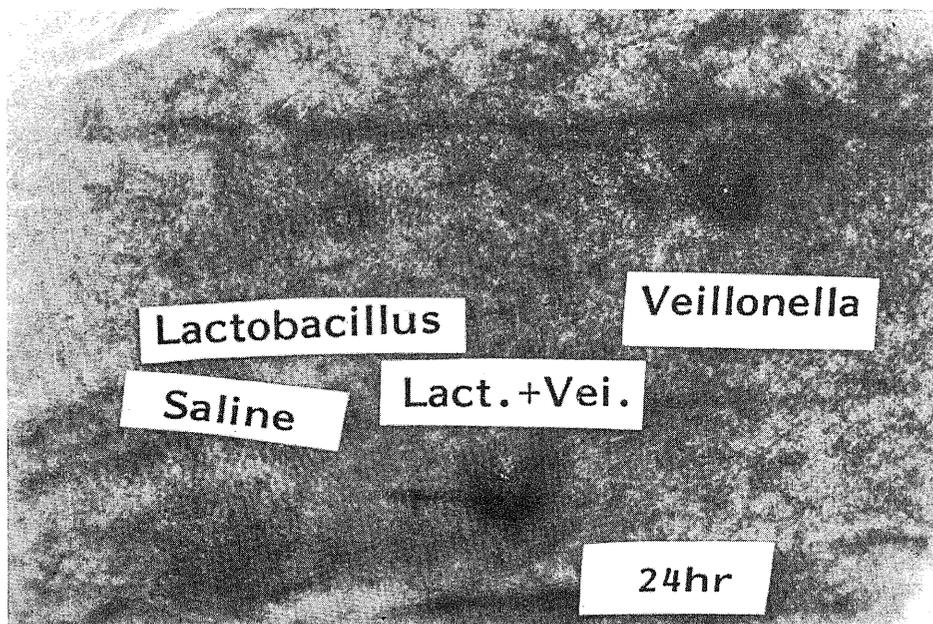


Fig.1. Macroscopic findings of skin reactions 24 hr after intracutaneous injection of various bacterial cultures. Two tenth ml of physiological saline (saline), each culture of *Lactobacillus* or *Veillonella*, or a mixture of 0.1 ml each of cultures of *Lactobacillus* and *Veillonella* (Lact.+Vei.) was injected intracutaneously into rabbit's abdominal skin.

*Peptococcus*では発赤、腫脹は軽度であり、その拡がりは直径2～4mm(24時間後)にすぎなかった。また発赤、腫脹は *Peptococcus*, *Corynebacterium*では72時間後には完全に消退したが、*Staphylococcus*では120時間

後においてもわずかにみられた。これら単独注射の場合、好気性菌、嫌気性菌ともに発赤は注射後24時間、腫脹は48時間を最大として経時的に消退傾向を認めた。

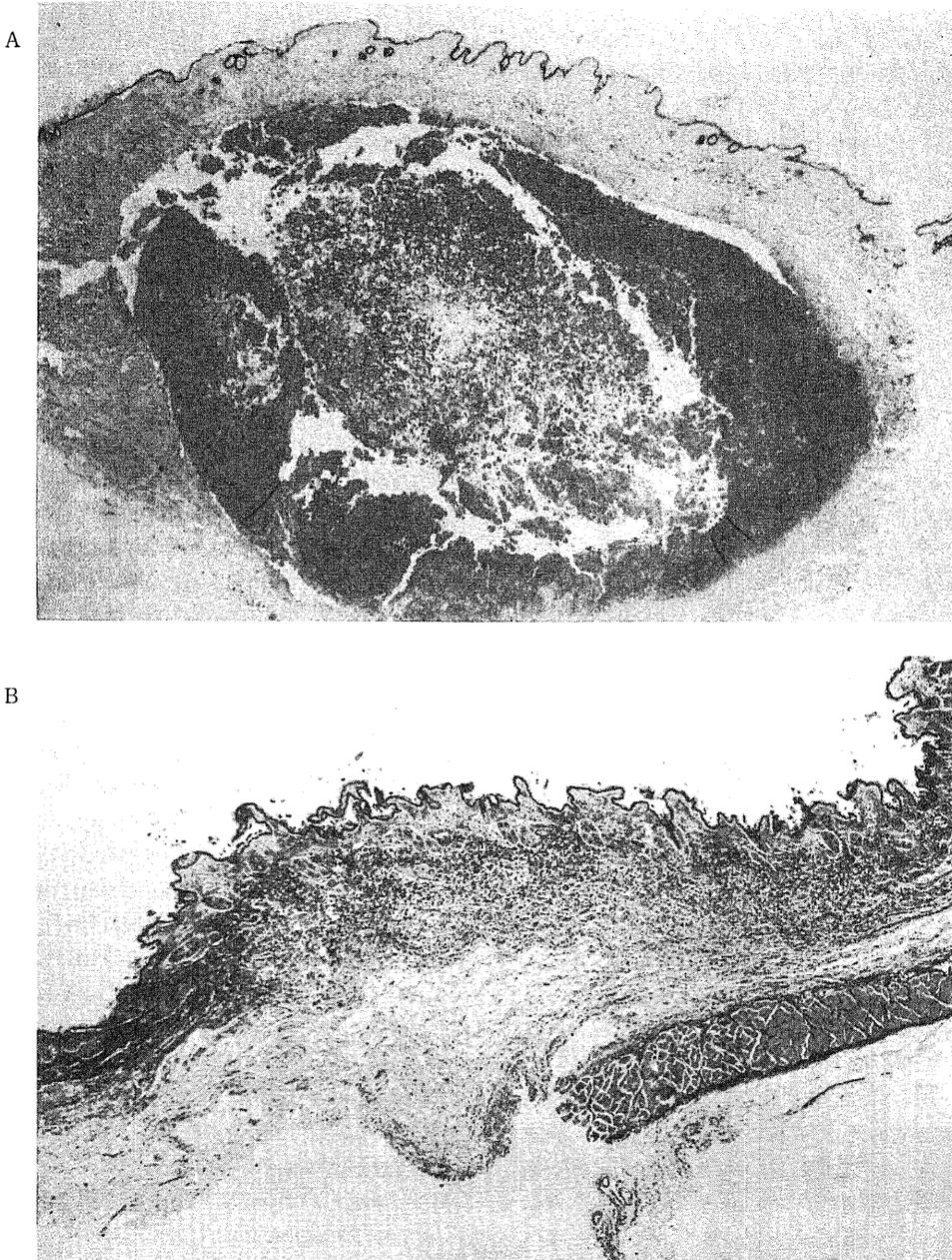


Fig. 2. Histological findings of skin lesion produced 5 days after the injection of a mixture of *Lactobacillus* and *Veillonella* (Hematoxyline & Eosin stain, ×5). A, skin injected with a mixture of *Lactobacillus* and *Veillonella*; B, normal skin.

好気性菌、嫌気性菌それぞれの培養菌液（生菌数、 $10^6$ CFU/ml）0.1ml ずつの混合菌液（合計 0.2ml）を注射した時、いずれの組合せにおいても単独注射した時と比べより強い発赤、腫脹反応がみられた。特に *Lactobacillus* と *Veillonella*, *Lactobacillus* と *Eubacterium*, *Streptococcus* と *Veillonella*, *Streptococcus* と *Eubacterium*, *Streptococcus* と *Bacteroides*, *Streptococcus* と *Peptococcus* の混合注射では著しく強い皮内反応がみられ、発赤、腫脹は 15mm 以上（24時間後）にも及んだ。混合注射においても発赤は注射後24時間、腫脹は48時間を最大として、暫時消退傾向を示した。硬結については、すべての注射部位において触知することができた。その大きさは *Corynebacterium*, *Staphylococcus* 単独注射の場合のみ、他に比較し 1~2 mm とやや小さかった。混合注射では全例において単独注射より強い硬結反応がみられた。また、*Veillonella* では *Lactobacillus* との混合注射にて一部に潰瘍形成が認められた（図 1）。

好気性菌と嫌気性菌との混合菌液注射部位を摘出し、病理組織学的に検討した結果、膿瘍形成が認められた（図 2）。

## 考 察

Hippocrates は歯石の沈着によって歯肉に炎症が起こると紀元前に指摘しており、そのことは今日においても不変的な事実である<sup>20</sup>。Allen ら<sup>29</sup>は1965年に患者の口腔内より採取した歯石の一つはオートクレーブ滅菌し、もう一つはそのままそれぞれモルモットの腹腔内に接種し、組織学的に検索した。滅菌した歯石を接種した場合は、肉芽形成の異物反応を示す程度であったが、歯石をそのまま接種した場合は化膿性炎症を起こして、しばしば膿瘍を形成したと報告している。Ash<sup>20</sup>も歯石の沈着の程度と歯肉炎との関係については明確な関連性があると報告している。また、Schroeder<sup>20</sup>は歯石を電子顕微鏡で観察し、歯石は円形、球状、桿状あるいは糸状の無数の細菌によって構成されているとしている。

本邦においては秋吉<sup>20</sup>が23例の青年の剖検例から183歯の歯周組織について組織学的検索を行い、歯肉における炎症の程度はその部位に沈着している歯石の表面の性状と密接な関係を有していることを明らかにした。さらに、歯石の表面に多数の細菌が増殖している場合には、歯肉に強い炎症が発生していることが多く、また、歯石の表面が平坦で、細菌の増殖がみられない場合には、歯肉の炎症は一般に軽度であることを見出し、歯肉炎の場合における歯石の病因的役割は

その表面に増殖する細菌の感染によると考えた方が妥当であると主張した。

臨床的には歯石沈着の抑制や歯石除去が歯周疾患治療にきわめて効果的であるが、このことはまた歯周疾患において、近年その病因的意義が注目されている歯垢（dental plaque）とともに歯石が重要な役割を演じていることを意味している。歯石の病因的意義については、歯牙に歯石が沈着することにより、歯牙周囲および歯肉溝の嫌気度が高まり、口腔内嫌気性菌が増殖し、歯肉に炎症を起こしたり、歯肉にすでにある炎症をさらに増悪させたりすると考えられる。また、歯周疾患の二次感染とも考えられる口腔内炎症性疾患も多数存在し、さらに歯科日常臨床で頻繁に行われる抜歯の際に起こる菌血症も歯石および歯肉の炎症がその原因の一つと考えられている<sup>20-31</sup>。それ故、歯石の細菌学的検索は国民病と呼ばれる歯周疾患の解明の一端ばかりでなく、口腔内感染症における原因菌の追究、および治療に際し、極めて重要である。近年、種々の感染症について嫌気性菌の検索がなされているが、口腔内感染症においても口腔に常在する嫌気性菌が大きな役割をはたすことが判明してきた<sup>18)19)32</sup>。今回、著者は口腔内常在菌叢解明の一端として歯石の臨床細菌学的分析を行い、各種口腔内感染症および菌血症の起菌となる可能性について検索した。本研究ではまず、歯石からの菌分離法について使用培地、増菌培養時間について検討した。各症例より採取した検体20症例の直接塗抹、2、5、7日間増菌培養液について種々の培地（TF、GAM、TGC、BHI 培地）で検討した結果、全増菌培養液についての成績では、菌分離率は異なるが、全培地において全症例から菌の検出を認めた。特に、TF 培地においては91.3%、GAM 培地では82.6%の高い菌分離率を認めた。これらを増菌培養時間の点からみると、TF 培地、GAM 培地ともに2日目の分離率が高く、それぞれ90.2%、81.7%であったが、5日目、7日目になるに従って分離率は低下した。直接塗抹においては、全培地ともに著しく菌検出率が低かった。また、予備実験において、10、14日間増菌培養を行ったが、全く菌の分離がみられない場合があり、本実験では行わなかった。

以上の基礎実験結果に基づき、203名を対象として歯石を採取し、TF 培地を増菌・菌分離用培地に用い、増菌培養期間を2日間として菌の分離を試みた。203症例全例より、菌分離を認めた。好気性菌のみの単独分離例が21例にすぎず、他の182症例は好気性菌と嫌気性菌との混合分離例であり、ほとんどの歯石に嫌気性菌が常在菌として存在することがわかった。全

分離菌株 (741株) の中で嫌気性菌の占める割合は 47.0% (348株) であった。他に歯石より嫌気性菌の分離を行った報告がないため比較は出来ないが、口腔内の他の部位での常在菌を分離した報告における嫌気性菌の分離状態を比較すると、唾液、舌、歯垢、歯肉溝では分離菌の30~50%前後<sup>39)~40)</sup>の割合で嫌気性菌の検出がなされており、歯石には口腔内の各部位の中でも嫌気性菌が高い頻度で存在すると考えられた。歯石の細菌叢を、グラム陽性・陰性、桿菌・球菌、好気性菌 (偏性好気性菌、通性嫌気性菌を含む)・嫌気性菌の観点から、口腔内の他の部位と比較すると、歯石では好気性グラム陽性桿菌 (28.1%)、好気性グラム陽性球菌 (18.1%)、嫌気性グラム陽性桿菌 (17.9%) が多く、歯垢の細菌叢に比較的類似していたが<sup>36)37)</sup>、歯垢に比べ好気性グラム陽性球菌の占める割合は低かった。歯石中の好気性菌に関してはグラム陽性桿菌が最優勢と報告<sup>38)</sup>されているが、著者の成績でも同様な傾向がみられた。今回、歯石からの分離菌属については好気性菌群では *Lactobacillus* (16.6%)、*Streptococcus* (10.4%)、*Corynebacterium* (7.7%)、嫌気性菌群では *Veillonella* (9.7%)、*Eubacterium* (8.0%)、*Bacteroides* (7.7%)、*Peptococcus* (6.1%) が多く分離された。これらの菌属は歯肉膿瘍、歯周病、歯性上顎洞炎、頬部蜂窩織炎、骨髓炎、拔牙後および口腔外科手術後の菌血症においても高頻度に検出されている菌であり<sup>39)~42)</sup>、口腔内常在菌としての歯石の細菌がこれらの感染症に関与している可能性が示唆された。即ち、拔牙操作による歯肉の損傷および拔牙後感染、外傷、骨折、口腔癌、白血病、悪性リンパ腫、放射線照射、免疫抑制剤、ステロイド剤の長期連続投与などにより抵抗力が低下した宿主 (易感染性宿主, compromised host) では、歯石、歯垢等に含まれる口腔内常在菌が感染を誘発し (日和見感染)、急性炎症が成立していくと考えられる。

今回行った歯石の臨床細菌学的分析において特定した菌属存在パターンがみられなかったのは口腔内細菌叢が一定不変のものでなく、歯牙の萌出や喪失、義歯の装着、年齢、食物、口腔清掃状態などの因子により変化するため変動し、さらにう蝕、および歯周疾患の有無によって口腔内細菌叢が変化することによるものと考えられた。

感染症の治療においては、抗生剤の投与は最も有力な手段であり、治療に際しては起因菌に感受性を示す抗生剤を投与することは早期に病状を緩快させるのに役立つ。また、有病者および高齢者に拔牙および歯石除去などを行う際には菌血症が必発と考え対処しなけ

ればならない。その予防には抗生物質を投与することは重要なことである。それ故、著者は歯石より分離した好気性菌386株、嫌気性菌345株について8剤 (PCG, ABPC, CER, TC, EM, CLDM, GM, PL) に対し感受性試験を施行した。

好気性菌では CER, TC, CLDM に対し90%以上の菌株が感受性を示し、嫌気性菌では、特に CER, TC, CLDM に対し高い感受性を示し、95%以上の菌株が感受性を示した。これらの成績は他の口腔内炎症疾患および拔牙後菌血症、口腔外科手術後菌血症における分離菌株での成績<sup>39)~42)</sup>と類似していた。歯科的処置に続発する菌血症や心内膜炎の予防として、米国<sup>43)</sup>では、PCG ないし、これとストレプトマイシン (streptomycin) の併用を推め、英国<sup>44)</sup>では、アモキシリン (amoxicillin) とゲンタミシンの併用を推奨しているが、これらは主として緑色連鎖球菌を対象としたものである。臨床的には拔牙術の際の菌血症<sup>45)</sup>、あるいは亜急性心内膜炎<sup>46)</sup>からは *Bacteroides* をはじめとして多種の嫌気性菌種が分離されている。それ故、歯科的処置に続発する菌血症や心内膜炎の予防には緑色連鎖球菌を対象として考えるのは不十分であり、口腔内常在菌をも考えるべきと思われる。上述の如く本研究において、CER, TC, CLDM は口腔内に常在する好気性菌及び嫌気性菌に対し極めて有効であることが示されたが、これらの薬剤は歯科的処置に続発する菌血症、亜急性心内膜炎予防のため、あるいは口腔内感染症治療の第1次選択剤として有効であると考えられる。

日常臨床上、歯石を除去することによって歯肉の炎症が消失することはしばしば経験する。この事実に関し明解な解釈は現在なされていない。歯石の刺激により炎症反応が起きることは当然考えられるが、歯石中の細菌による感染もまた重要な意味を持つものと考えられている。そこで本研究では高頻度に検出された菌株の病原性を皮内反応によって検討した。嫌気性菌感染症実験モデルにおいては、元来嫌気性菌が病原性が少ないため、ムチン、塩化カルシウム等を添加している場合が多い。本実験では原則としてなるべく自然の人体に近い状態での感染モデルを考え、ムチン、塩化カルシウム等の添加は行わずに家兔の腹部に 10<sup>7</sup> CFU の菌数を含む培養菌液のみを皮内注射することによって、高検出菌である好気性菌4株、嫌気性菌4株の病原性を検討した。その結果、単独注射、混合注射いずれの場合においても、発赤・腫脹が認められたが、発赤は24時間、腫脹は48時間を最大として、その後は消退傾向を示した。好気性菌、嫌気性菌単独注射

の場合と、混合注射した場合とを比較すると、混合注射した場合が発赤・腫脹が大であり、現在嫌気性菌感染症に関する発症論で注目されている二相性感染論<sup>50)</sup>を支持するものであった。特に、歯石よりの分離菌の中でも優勢に分離された嫌気性菌、*Veillonella*, *Eubacterium* と好気性菌、*Lactobacillus*, *Streptococcus* それぞれによる混合注射では炎症反応が強くみられたことは注目される。また、最も高頻度に検出された *Veillonella* と *Lactobacillus* の混合注射では潰瘍の形成が認められたが、ヒトにおいてもこの2菌種が同時に感染した場合、強い炎症反応が現れる可能性がある。*Veillonella* は口腔内感染症において好気性菌との混合感染でしばしば検出される菌種であり、歯肉膿瘍、上顎洞炎の主因菌<sup>18)19)</sup>とも考えられている。本研究では局所の炎症性変化について病理組織学的にも検討したが、膿瘍の形成がみられたにすぎなかった。今回の実験においては、検出菌の病原性に関与する諸因子(毒素、酵素等)<sup>51)~54)</sup>についての検討は行われていないが、上述の如く *in vivo* の実験から炎症と判断し得る発赤、腫脹は認められたことにより、これらの菌は弱いながらも病原性を有していると考えられた。

今後日本においては、いままでに考えられない高齢者社会をむかえようとしている中で、抗癌剤、ステロイド、免疫抑制剤の長期連用者等の易感染性宿主は増加する一方であり、現在においても口腔内常在菌によって起こる敗血症、肺化膿症、肺膿瘍、脳膿瘍、急性唾液腺炎等<sup>55)</sup>はよく知られているが、今後ますます増加してくると考えられる。また、血液疾患の治療等においては無菌病室、無菌食、消化管の無菌化することによって感染を防御しているが、敗血症が生じることがある。この際の菌の侵入門戸としては、口腔が考えられており、口腔内感染症が重要視されはじめて<sup>56)</sup>。さらに今後行われるであろう心臓移植、肝臓移植等についても、口腔内感染症を無視するならば、歯肉のわずかな炎症が原因となり、菌血症から敗血症に至り、不幸な結果を生むであろう<sup>56)</sup>。本研究では歯石には各種の好気性菌、嫌気性菌が存在しており、またそれらは炎症の惹起能を有することを明らかにしたが、このような口腔内細菌叢の温床である歯石を除去することは、上述の日和見感染としての、口腔内感染症予防の見地から鑑み重要なことと思われる。

## 結 論

歯石の細菌叢について口腔内感染症の解明の観点から、嫌気性菌を中心に検討した。また、高頻度分離菌株を用いて、家兎の腹部で皮内反応を行い、以下の結

果を得た。

1. 歯石20症例を用いて各種増菌・菌分離用培地、および増菌培養時間を検討した結果、TF 培地を用い、増菌培養期間を2日間としたとき、最も多数の菌株(83株)が分離された。

2. 歯石203症例について TF 培地を用い、増菌培養時間を2日間として歯石中の細菌を検索した結果、好気性菌単独分離症例21例、残りの182症例が好気性菌と嫌気性菌の混合分離症例であり、嫌気性菌の単独分離症例はなかった。

3. 歯石203症例より分離同定した菌株は好気性菌393株、嫌気性菌348株で、嫌気性菌比率は47.0%であった。分離率の高かった菌属は好気性菌では、*Lactobacillus* (123株, 16.6%), *Streptococcus* (77株, 10.4%), *Corynebacterium* (57株, 7.7%), *Staphylococcus* (34株, 4.4%), 嫌気性菌では、*Veillonella* (72株, 9.7%), *Eubacterium* (59株, 8.0%), *Bacteroides* (57株, 7.7%), *Peptococcus* (50株, 6.7%) で、これらが歯石における主常在菌であるとする結果が得られた。

4. 分離同定した731株(好気性菌386株、嫌気性菌345株)の抗生物質感受性試験(8剤)の結果、好気性菌株の90%以上および嫌気性菌株の95%以上が CER, TC, CLDM に対し感受性を示した。

5. 高頻度分離菌株(好気性菌、嫌気性菌各々4菌株)について家兎の腹部を用いて、皮内反応を行ったところ、発赤は注射後24時間、腫脹は48時間を最大として発現し、その後、消退傾向を示すことが分かった。また、好気性菌と嫌気性菌の混合注射の場合の方が、好気性菌、嫌気性菌単独注射の場合より炎症反応が著しく強かった。

6. 家兎の腹部における好気性菌と嫌気性菌の混合感染部を摘出し、病理組織学的に検討したところ、膿瘍の形成がみられた。

## 謝 辞

稿を終るにあたり、本研究の御指導と御校閲を賜りました恩師故玉井健三教授並びに、恩師山本悦秀教授に衷心より深謝の意を表します。また、御助言、御校閲を賜りました本学微生物学講座、中村信一教授、本研究の遂行にあたり、直接御指導と御教示を頂きました当教室中川清昌助教授、病理標本について貴重な御助言を頂きました石川県立中央病院病理科、林守源医長、および教室員の皆様へ深謝致します。

本論文の要旨は第42回日本口腔科学会総会(1988, 札幌)において発表した。

## 文 献

- 1) 石川梧郎, 秋吉正豊: 口腔病理学 1, 第4版,

157-169 頁, 永末書店, 京都, 1986.

2) **Marshall-Day, C. D.**: The epidemiology of periodontal disease. *J. Periodont.*, **34**, 13-60 (1951).

3) **Everett, F. G., Tuchler, H. & Lu, K. H.**: Occurrence of calculus in grade school children in Portland, Oregon. *J. Periodont.*, **34**, 54-59 (1963).

4) **Burnett, W. G., Scherp, W. H. & Schuster, S. G.**: *Oral Microbiology & Infectious Disease*, 4th ed., p332-382, The Williams & Wilkins Co., Baltimore, 1976.

5) **Palmer, H. D. & Kampf, M.**: *Streptococcus viridans* bacteremia following extraction of teeth. *J. A. D. A.*, **113**, 1788-1792 (1939).

6) **Macentegart, M. G. & Porterfield, J. S.**: Bacteremia following dental extraction. *Lancet*, **2**, 596-598 (1949).

7) **Coffin, F. & Thompson, R. E. M.**: Factors in fluencing bacteremia following dental extractions. *Lancet*, **2**, 654-656 (1956).

8) **梶田正樹**: Microradiography によるセメント質および歯石の研究. *口病誌*, **32**, 82-101 (1965).

9) **Gonzales, F. & Sognnaes, R. F.**: Electron microscopy of dental calculus. *Science*, **131**, 156-158 (1960).

10) **McMillan, L., Hutchinson, A. C. & Fosdick, L. S.**: Electronmicroscopic study of dental calculus. *Dent. Progress.*, **1**, 188-191 (1961).

11) **Gonzales, F. & Sognnaes, R. F.**: Electron microscopy of dental calculus. *Science*, **131**, 156-158 (1959).

12) **William, J. & Martin, W. J.**: Isolation and identification of anaerobic bacteria. *Mayo Clinic Proc.*, **49**, 300-308 (1974).

13) **沖野善則, 渡辺好造, 玉井健三**: 嫌気性菌単独感染症と思われる下顎骨髄炎の1例. *口科誌*, **33**, 507-512 (1984).

14) **坂下英明, 宮本博一, 玉井健三**: 嫌気性菌敗血症を合併した下顎歯肉癌の1症例. *日口外誌*, **28**, 36-41 (1982).

15) **東野純也, 坂下英明, 真館修一郎, 玉井健三**: 口腔外科手術後の嫌気性菌感染症の1例. 嫌気性菌研究, **14**, 34-38 (1984).

16) **Kirsch, W. K. & Stears, J. G.**: Actinomycotic osteomyelitis of the skull and epidural space. *J. Neurosurg.*, **33**, 347-351 (1970).

17) **Eliezer, E. F., Dershowitz, T., Shalit, M.**

**& Toledo, E.**: Brain abscess following dental infection. *Oral Surg.*, **45**, 955-958 (1978).

18) **玉井健三**: 口腔内嫌気性菌感染症. 嫌気性菌感染症研究, **15**, 247-254 (1985).

19) **玉井健三**: 口腔内嫌気性菌感染症. 歯薬療法, **5**, 169-180 (1986).

20) **Cowan, S. T. & Steel, K. J.**: *Manual for the Identification of Medical Bacteria*, 2nd ed., p45-122, Cambridge Univ. Press., London, 1975.

21) **Buchaman, R. E. & Gibbons, N. E.**: *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 8th ed., p290-861, Williams & Wilkins, Co., Baltimore, 1974.

22) 伝染病研究会学友会: 細菌学実習提要, 第5版, 164-166 頁, 丸善, 東京, 1983.

23) 慶應義塾大学医学部病理学教室: 病理組織学標本の作り方, 第5版, 1-79 頁, 医学書院, 東京, 1978.

24) 口腔細菌学談話会: 歯学微生物学, 第4版, 227-228 頁, 医歯薬出版, 東京, 1987.

25) **Allen, D. L. & Kerr, D. A.**: Tissue response in the guinea pig to sterile and non sterile calculus. *J. Periodont.* **36**, 121-126 (1965).

26) **Ash, M. M.**: Correlation between plaque and gingivitis. *J. Periodont.*, **35**, 424-429 (1964).

27) **Schroeder, H. E., Lenz, H. & Muhlman, H. R.**: Mikrostrukturen und Verkalkungsvorgänge im jungen Zahnstein. *D. ZZ.*, **19**, 124-133 (1964).

28) **秋吉正豊**: 歯周組織の構造と病理, 136-141 頁, 医歯薬出版, 東京, 1962.

29) **Laskin, D. M.**: *Oral and Maxillofacial Surgery*, 1st ed., p217-289, C. V. Mosby Co., St Louis, 1984.

30) **Kruger, G. O.**: *Text book of Oral and Maxillofacial Surgery*, 6th ed., p196-228, The C. V. Mosby Co., St Louis, 1984.

31) **Archer, W. H.**: *Oral and Maxillofacial Surgery*, 5th ed., p438-446, W. B. Saunders Co., Philadelphia, 1975.

32) **Tamai, K., Fukuda, J., Nakao, J., Nakagawa, K., Watanabe, K., Sakashita, H., Yoshimoto, Y. & Nakashin, T.**: Anaerobic bacteria in suppurative infection of oral cavity. *Pro. China-Japan Int. Cong. Microbiol.*, 86-87 (1984).

33) **Morris, E. O.**: The bacteriology of the oral cavity. *Brit. Dent. J.*, **95**, 259-270 (1953).

- 34) Sanyal, B. & Russell, C.: Nonsporing, anaerobic, gram-positive rods in saliva and the gingival crevice humans. *Appl. Environ. Microbiol.*, **35**, 670-678 (1978).
- 35) Socransky, S. S.: Relationship of bacteria to the etiology of periodontal disease. *J. Dent. Res.*, **49**, 202-222 (1970).
- 36) Hamada, S. & Slade, D. H.: Biology, immunology and cariogenicity of *Streptococcus mutans*. *Microbiol. Rev.*, **44**, 331-384 (1980).
- 37) Socransky, S. S. & Manganiello, D. S.: The oral microbiology of man from birth to senility. *J. Periodont.*, **41**, 485-496 (1971).
- 38) Yardeni, J.: Dental calculus. *J. D. Res.*, **27**, 532-540 (1948).
- 39) 福田順子: 口腔内嫌気性菌の研究. 十全医会誌, **83**, 544-563 (1974).
- 40) 玉井健三: 口腔内嫌気性菌の研究. 日口外, **27**, 393-415 (1978).
- 41) 山田 壽: 歯周病における嫌気性菌の役割. 岐阜大医紀, **33**, 1-34 (1985).
- 42) Sklavounos, A., Legakis, N. J., Ioannidou, H., & Patrikis, A.: Anaerobic bacteria in dentoalveolar abscess. *Int. J. Oral Maxillofac. Surg.*, **15**, 288-291 (1986).
- 43) 室木俊美: 歯性上顎洞炎における細菌学および抗生物質の洞粘膜への動態に関する薬理学的研究. 十全医会誌, **97**, 134-148 (1988).
- 44) 岡部孝一, 玉井健三: 抜歯後菌血症の臨床細菌学的検討. 口科誌, **37**, 18-25 (1987).
- 45) Kannangara, D. W., Thadepalli, H. & McQuirter, J. L.: Bacteriology and treatment of dental infections. *Oral Surg.*, **50**, 103-109 (1980).
- 46) 真館修一郎: 口腔外科手術後の Bacteremia に関する研究. 十全医会誌, **91**, 777-793 (1982).
- 47) Keplan, E. L., Anthony, B. F., Bisno, A., Durak, D., Millard, H. D., Sanford, J., Shulman, S. T., Stillerman, M., Taranta, A. & Wengen, N.: Prevention of bacterial endocarditis. *Circulation*, **56**, 139A-143A (1977).
- 48) Report of a working party of the British Society for antimicrobial chemotherapy: The antibiotic prophylaxis of infective endocarditis. *Lancet*, **2**, 1323-1326 (1982).
- 49) 勝 正孝: 感染性心内膜炎の現状. 日医会誌, **84**, 869-886 (1980).
- 50) Gorbach, S. L.: Interactions between aerobic bacteria and anaerobic bacteria. *Scand. J. Infect. Dis.*, **31**, 61-67 (1982).
- 51) 宮田 勝, 玉井健三: 嫌気性菌 (*Eubacterium lentum*) の家兎皮膚に対する実験感染症. 口科誌, **36**, 423-434 (1986).
- 52) 宮本博一: *Bacteroides* の病原性に関する研究. 十全医会誌, **92**, 674-688 (1983).
- 53) 中村 武: 口腔内嫌気性 heparinase 産生菌に関する研究. 十全医会誌, **78**, 509-530 (1969).
- 54) Mergenhagen, S. E., Hamp, E. G. & Scherp, H. W.: Preparation and biological activities of endotoxins from oral bacteria. *J. Infect. Dis.*, **108**, 304-310 (1961).
- 55) 舟田 久: 敗血症とその周辺疾患, 第1版, 1-164 頁, 新興医学出版社, 東京, 1986.
- 56) 山田 繁: 腎移植後に発生した急性顎下放射菌症の1例. 日大歯学, **61**, 141-143 (1987).

**Clinico-Bacteriological Study on Dental Calculus** Yuichi Nakai, Department of Oral Surgery, School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920—J. Juzen Med. Soc., 98, 48—61 (1989)

**Key words** dental calculus, oral infection, antibiotic susceptibility, pathogenicity, TF medium

### Abstract

With a view to analyzing bacterial flora of dental calculus and examining its relationship with oral infections and bacteremia, bacterial isolation from dental calculus was performed and susceptibility of these isolates to antibiotics was examined. In addition, the pathogenicity of the isolates found at high frequency was investigated by skin reaction in intracutaneous injection of their cultures into rabbit's abdominal skin. On the basis of the experimental results with the bacterial isolation method, bacterial isolation from dental calculus was performed by 48 hr-enrichment culture of sample in Tamai-Fukuda (TF) medium. The results of bacterial examination of 203 cases of dental calculus revealed that only aerobes were isolated in 21 cases and both aerobes and anaerobes in the remaining 182 cases. A total of 741 isolates were obtained; the number of aerobes and anaerobes was 393 (53.0%) and 348 (47.0%), respectively. Bacterial genera isolated with high frequency were *Lactobacillus* (123 strains), *Streptococcus* (77 strains) and *Corynebacterium* (57 strains) in aerobes, and *Veillonella* (72 strains), *Eubacterium* (59 strains), *Bacteroides* (57 strains) and *Peptostreptococcus* (50 strains) in anaerobes; these bacterial genera represented about 70% of all isolates, suggesting that they are the main bacteria in dental calculus. A total of 731 strains, 386 aerobes and 345 anaerobes, were tested, by the three concentration-disc method, for susceptibility to 8 antibiotics, penicillin G (PCG), ampicillin (ABPC), cephaloridine (CER), tetracycline (TC), erythromycin (EM), clindamycin (CLDM), gentamicin (GM), and polymyxin (PL). More than 90% of strains of the aerobes and more than 95% of those of the anaerobes were susceptible to CER, TC and CLDM. The pathogenicity of 8 strains isolated with high frequency, 4 aerobes and 4 anaerobes, was examined by intracutaneous injection of their cultures into rabbit's abdominal skin. The bacterial culture adjusted to  $10^8$  CFU/ml was injected at doses of 0.2ml for aerobe or anaerobe alone and 0.1ml each for the mixture of them. The results showed that in all cases, redness, swelling and induration were greater in the mixed injection of aerobe and anaerobe than in the injection of either aerobe or anaerobe alone, and that in all cases redness at 24hr and both swelling and induration at 48hr were the greatest, and thereafter showed fading tendencies. Histological examination of rabbit's abdominal skin lesion by the injection of the mixture of aerobe and anaerobe revealed the formation of abscess.