

鹿児島大学歯学部紀要

Annals of Kagoshima University Dental School

Volume 6

1986

— 目 次 —

細菌の細胞壁自己融解現象	物 種 利 彦	1
GUSTATION I N FISH	丸 井 隆 之	10
深部象牙質う蝕と細菌	長 岡 成 孝・劉 宏 志	28

鹿 齒 紀

Ann. Kagoshima Dent.

鹿児島大学歯学部紀要投稿規定

1. 本誌は歯科医学の研究や教育に関して特定のテーマに基づき、総説あるいは啓蒙的・解説的な論文を主体に掲載する。本学部の教官は下記の規定に従い、誰でも投稿することが出来る。投稿論文の採否は、編集委員会で決定する。
 2. 本誌は年1回発行する。
 3. 論文の掲載は受理の順とする。ただし編集委員会より特に依頼した原稿については、別に委員会が定める。
 4. 掲載料は無料とし、別刷20部を贈呈する。
 5. 和文原稿はA4版(21*29cm)の400字詰め原稿用紙を用いて書き、英文原稿は10ピッチ、ダブルスペースでタイプする。別にコピーを一部つける。
 6. 表紙(原稿第一枚目)には、1)表題、2)著者名、3)所属、4)欄外見出し(和文25字以内)、5)図表の数、6)原稿の枚数、7)別刷請求部数(朱書)、8)編集者への希望などを書く。
 7. 英文抄録(Abstract)の表紙には、1)タイトル、2)著者名、3)所属、4) Key words (5 words以内)、5)抄録本文はA4版タイプ用紙で250字以内とする。
 8. 和文中の外国文字はタイプとし、和綴りにするとき片かなとする。イタリック指定をしたいところは、アンダーラインを引きその下にイタリックと書く。動物名などは原則として片かなを用いる。単位及び単位記号は、国際単位系による。
 9. 図表及び写真の説明は英文で書く。本文の欄外に赤字で図表を挿入すべき位置を指定する。
 10. 項目分けは、I, II……さらにA, B……さらに1, 2……さらにa, b……というように分ける。
 11. 文献表の作り方
 - 1) 本文中に文献を引用するときは文中の該当する箇所または著者名の右肩に引用の順に従って、番号を付ける。3人以上連名の場合は、“ら”または“et al.”を用いる。
例1 : 前田ら³⁾によれば……
例2 : Hodgkin & Huxley¹⁾によれば……
 - 2) 末尾文献表は引用の順に整理し、本文中の番号と照合する。著者名は、et al. と略さず全員を掲げる。
 - 3) 雑誌は著者名：表題、雑誌名、巻、頁(始一終)、西暦年号の順に記す。
例1 : 3) 前田敏宏, 渡辺 武, 水野 介, 大友信也 : B型肝炎ウイルスに対するモノクローナル抗体, 細胞工学1, 39-42, 1982
例2 : 1) Hodgkin, A. L. & Huxley, A. F.: The components of membrane conductance in the giant axon of *Loligo*. J. Physiol. (Lond.) 116, 473-496, 1952
 - 4) 単行本は著者名、書名、版数、編者名、章名、引用頁、発行所、その所在地の順に記す。論文集などの場合は雑誌に準じるが、著者名：章名、書名、版数、編者名、引用頁、発行所、所在地、西暦年号の順に記す。
例1 : 金子章道 : 視覚 ; 感覚と神経系 (岩波講座現代生物化学8), 初版, 伊藤正男編, 38-57, 岩波書店, 東京, 1974
例2 : McElligott, J. G.: Chap 13, Long-term spontaneous activity of individual cerebellar neurons in the awake and unrestrained cat. , In ; Brain Unit Activity during Behavior, 1st Ed. , M. I. Phillips, Ed. 197-223, Charles C. Thomas, Springfield, 1973
 - 5) 孫引きの場合は原典とそれを引用した文献及びその引用頁を明らかにし、“より引用”と明記する。
 - 6) 雑誌名の省略名は雑誌により決めてあるものについてはそれに従い、決めてないものについては日本自然科学雑誌総覧(1969, 日本医学図書館協会編, 学術出版会)またはIndex Medicusによる。これらにないものについては、国際標準化機構の取り決めISO R4(ドクメンテーションハンドブック, 1967, 文部省, 大学学術局編, 東京電気大学出版局, 39-42頁参照)に従う。
12. その他
集会などの内容紹介、海外だより、ニュース、討論、意見、書評、随筆など歯科医学または歯科医学者に関係あるあらゆる投稿を歓迎する。全て図表、写真などを含めて400字詰め原稿用紙5枚以内にまとめる。但し、採否は編集委員会が決定する。

編集委員

川越昌宜 清水信一郎
徳永美知子 長岡英一
(50音順)

細菌の細胞壁自己融解現象 —その生理的意義について—

物 種 利 彦

鹿児島大学歯学部 口腔細菌学講座

Cell Wall Autolysis in Gram-Positive Bacteria —with special reference to the physiological role—

Toshihiko Monodane

Department of Microbiology, Kagoshima University
Dental School, Kagoshima 890, Japan

Abstract

It is well-known that cellular autolysis is caused by enzymatic degradation of cell walls, and the enzyme(s) responsible for the autolysis is indispensable for the growth of bacterial cells. In fact, however, there are many autolytic-defective bacteria for which we can hardly observe cellular autolysis.

How can bacteria lacking the indispensable autolytic mechanisms survive and maintain their existence? Another question is why susceptibilities to autolysis can change during the growth phase, i.e., from the autolysable log phase cells to the non-autolysable stationary phase cells. It is strongly suggested that there must be inactivation mechanism(s) of the autolytic enzymes which have lost their physiological roles and become rather harmful to the bacteria themselves.

In accordance with this reasoning, the existence of two kinds or phases of autolytic enzymes, "a physiological autolytic enzyme" and "a useless autolytic enzyme," was assumed. The former is the indispensable enzyme for bacterial growth, and the latter is the harmful one which has completed its physiological role and should be inactivated. Autolytic bacteria are those which can not inactivate the "useless autolytic enzyme" effectively, and autolytic-defective bacteria are those which have an effective inactivating mechanism for the "useless autolytic enzyme."

Key words

autolysis, physiological role, cell wall, gram-positive bacteria, *M. luteus*

I. はじめに

グラム陽性菌とグラム陰性菌は細胞壁の構造が異なりペプチドグリカン含量も大きく異なるので、同じに論じ難い点がある。ここではグラム陽性菌の自己融解現象に限った。

さて細菌を一定容量の液体培地に接種、培養し、経時的に濁度を測定してその変化を片対数のグラフ用紙に記入すると、Fig. 1 のようないわゆる増殖曲線が

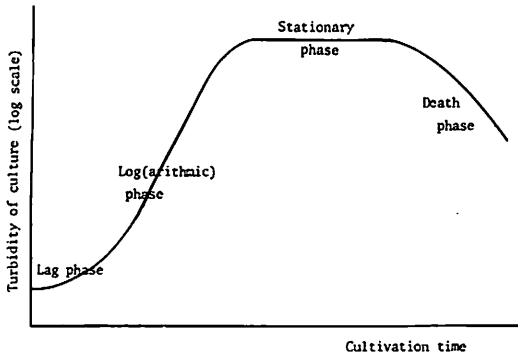


Fig. 1. Growth curve of bacteria.

得られる。ここで取り扱った自己融解現象は死滅期における濁度の減少を対象としたものではなく、対数期菌体と静止期菌体の自己融解能、特に対数期の菌体が示す自己融解現象を取り上げたものである。

II. 細菌の自己融解現象¹⁾⁻⁹⁾

溶菌現象 (bacteriolysis) は細菌が認識されて以来今日に至るまで細菌を扱う者が常に目にする現象であり、また注意を払わねばならない現象である。溶菌という現象—通常は菌懸濁液 (培養や集落を含む) の濁度の減少、透明化といった細菌細胞の集団について観察される—は関与する因子の起源からみて2つに分けられる。1つは細菌の自己融解現象と呼ばれるもので、これは外的因子の助けを借りずに菌自身の内的因子によって起こる溶菌現象と定義されてきた¹⁰⁾。それに対して物理的・化学的・生物的な外的因子によって引き起こされる heterolysis がある。しかしながら自己融解 (autolysis) と heterolysis を明確に区別するのが困難な場合があるために、その後自己融解の定義として菌自身が保有するムレイナーゼ (ペプチドグリカン加水分解酵素) の作用によって起こる溶菌という定義が出さ

れた¹¹⁾。すなわち内的因子・外的因子によらず、細胞内ペプチドグリカン加水分解酵素の働きが溶菌の直接原因となっている場合には自己融解とする考えであり、この定義が現在でも最も一般的なようである。しかし厳密な意味での内的因子によるものだけを区別して自己融解としている場合もある。いずれにせよ菌自身が保有するペプチドグリカン加水分解酵素による細胞壁の解体をもって自己融解とする考えの背景には、
 Ⅰ) 単離した細胞壁にも自己融解現象が観察されること、
 Ⅱ) ムレイン (ペプチドグリカン) がすべての細菌細胞壁の構築成分であること、
 Ⅲ) 蔗糖溶液中で自己融解を起こさせるとプロトプラスト或いはスフェロプラストが生成すること、
 Ⅳ) それまでに作用点が明らかになっている自己融解酵素がすべてペプチドグリカン加水分解酵素であることなどの実験事実があった。

静止期の後の死滅期の自己融解現象に対して、何故死滅期が存在するのか、静止期の状態を続けることはできないのか、静止期から死滅期への移行の鍵をにぎる要因は何か、といった細菌に限らず全生物に共通のやや哲学的な疑問が投げかけられるが、この現象の意義は因果関係に目をつづれば合目的に理解できないものでもない。ところがここに取り上げた対数期菌体の示す自己融解現象に対しては次のような別の大きな疑問が生じてくる。【対数期の菌体を適当な緩衝液中に懸濁し適温に保つと経時的に濁度が減少する】というのがいくつかの菌種に認められる典型的な対数期自己融解現象であり、細胞壁自己融解酵素 (ペプチドグリカン加水分解酵素) による細胞壁の解体に起因することが知られている。この自己融解現象が何故増殖の最も盛んな対数期の菌体に観察されるのか、静止期菌体に観察され難いのはどうしてなのか、自分自身の死につながりかねない危険な酵素を何故細菌が保有しているのか、この酵素は一体どのように制御されているのか、といった様々な疑問に答えるべく多年にわたって多くの研究が積み重ねられてきた。これら従来の研究は全て、今でもそうであるが、最も増殖の盛んな対数期に細胞壁自己融解酵素の活性が最も高いからには細胞壁自己融解酵素が細胞の増殖、形質転換における受容能力 (competence) の獲得、細胞外毒素の分泌、細胞外酵素の分泌などのいずれも細胞壁が関与する細胞の生理機能に重要な役割を果たしているに違いないという想定のもとに進められてきた。

細胞壁自己融解酵素という用語は厳密には生きた細胞の構築成分としての細胞壁、或いは単離した細胞壁

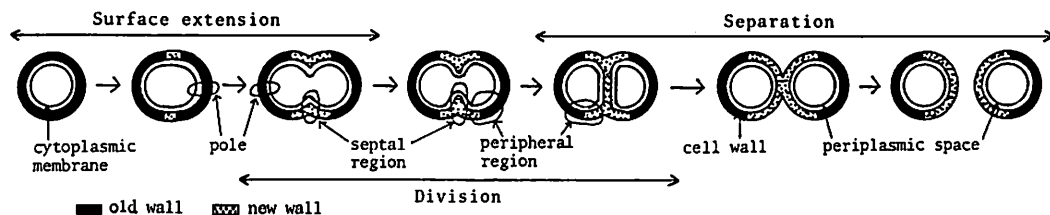


Fig. 2. Growth cycle of gram-positive monococci.

標品自身が自己融解を起こした時、この現象を引き起こしている酵素に対して使われるべき用語である。しかし細胞壁自己融解酵素は、自己融解を引き起こすのが本来の役割ではなくむしろ菌の生理機能に重要な役割を果たしている（あるいは果たしていた、または果たすはずであった）と考えられる。ここでは細胞壁自己融解が観察され難い菌（され難い場合）にも細胞壁自己融解酵素という用語を用いたが、本来の生理機能が不明のうえに別の用語を用いると混乱や誤解が生じるので、細胞壁自己融解酵素という用語で統一した。

細菌細胞の増殖（Fig. 2）に果たす細胞壁自己融解酵素の役割としては次の5つの可能性が考えられる。i）ペプチドグリカン前駆体を細胞壁中に組み入れるための細胞壁ペプチドグリカンの切断：ペプチドグリカンの生合成に関する研究からペプチドグリカンの単位モノマーを細胞壁ペプチドグリカン中に組み込むための受容体として非還元末端にN-アセチルグルコサミンが必要であると考えられ、N-アセチルムラミダーゼがこの役割を担っていることが示唆されている。ii）細胞の形態変換のためのペプチドグリカンの切断：*Arthrobacter crystallopoietes*の球状菌と桿状菌の間でN-アセチルムラミダーゼ活性に変化が認められることからN-アセチルムラミダーゼが、また桿状菌の細胞壁ペプチドグリカンの平均グリカン鎖長が球状菌のそれに比べて長いという所見に基づいてN-アセチルムラミダーゼとN-アセチルグルコサミンダーゼの一方または両方が形態変換で役割を演じていることが推定されている。一方*Myxococcus xanthus*における形態変換ではエンドペプチダーゼが関与することを示唆する実験結果が報告されている。iii）分裂の際のペプチドグリカンの切断：*Bacillus subtilis* 168の変異株であるlms-12が隔壁を持たない多核長桿状を呈することが報告されているが、細胞壁自己融解酵素との関係については述べられていない。ついでながら分裂を前項の形態変換や次項の分離と区別することが容

易でない場合があり、また従来分裂と分離という言葉が混交して使用されていることもあり、分裂を分離と言い換えた方が適切だと思われる場合がかなりある。iv）分離のためのペプチドグリカンの切断：例えば自己融解能を欠いた*Bacillus licheniformis*の変異株が長鎖状に生育することが知られ、親株がN-アセチルムラミル-L-アラニンアミダーゼを持っていることから、この酵素が分離の役割を担っていることが示唆されている。v）加水分解酵素が合成反応を行う可能性：*Streptomyces*属の数種類の菌株より単離されたD-アラニル-Dカルボキシペプチダーゼがトランスペプチレーションを行うことが報告されている。又鶏卵白リゾチーム（N-アセチルムラミダーゼ）がトランスグリコシダーゼ作用を持っていることもよく知られている。したがって細胞壁自己融解酵素であるペプチドグリカン加水分解酵素がペプチドグリカンの生合成に何らかの役割を果たしている可能性が考えられている。以上5つの可能性が細胞壁自己融解酵素の増殖に果たす生理的役割として考えられる。ただし一つの酵素がいくつもの役割を兼ねているのか、一つの役割に何種類の酵素が関与しているのか、などの疑問については今までになされた研究からは適確な解答を得難い。

さてここに今まで触れられていない重要な問題が残されている。それはこれら細胞壁自己融解酵素がその生理的役割を果たし終えた後の不活性化の問題である。対数期の菌体が細胞壁自己融解現象を示す菌種ないし菌株も静止期になると一般に自己融解を起こしにくくなることが知られている。とすれば対数期菌体に存在する細胞壁自己融解酵素は静止期への過程でどのような運命をたどるのか、また対数期の菌体についても自己融解現象の認め難い菌種や菌株も数多く存在するが、これらの菌は細胞壁自己融解酵素を持っていないのか。細胞壁自己融解酵素が上述のように細胞の増殖に必須のものであるならばこの酵素を全く持たない

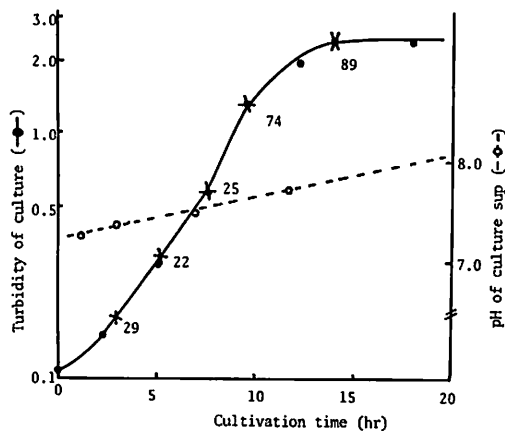


Fig. 3. Dependence of cellular autolysis on growth phase. The cells harvested at the growth phase marked with X were incubated in the autolyzing buffer at 37°C. Figures near the mark "X" show % residual turbidity after a 16 hr incubation.

細菌の存在は考えられない。ならば何故自己融解が観察され難いのか。私がこの実験を開始した十数年前までこれらの疑問に言及した報告は見られなかった。私が行った実験からこれらの疑問に一つの答えが見出された。その実験について簡単に述べる。

Ⅲ. *Micrococcus luteus* の自己融解

当時 *Micrococcus luteus* の自己融解現象に関しては NCTC 2665 株の菌体および単離した細胞壁が自己融解を起こすという簡単な報告¹²⁾があったに過ぎない。その後同じく NCTC 2665 株のメソゾーム画分に細胞壁自己融解酵素が局在しているとの報告¹³⁾が出たが、対数期菌体の自己融解について全く触れていなかった。micrococci は非病原性とされているが日和見感染の可能性も無視できないとされている。type species である *M. luteus* は鶏卵白リゾチームに最も感受性の高い菌として Fleming によって土壤中より発見された好気性のグラム陽性の球菌であり、よく知られよく利用されている菌の一つである。その細胞壁はペプチドグリカンとそれに共有結合したタイクロン酸の二種類の高分子物質より成り立っており、それらの構造・生成もよく研究されている。複雑な形態や組成の細胞壁をもつ他の菌の基礎的実験モデルとして適している。

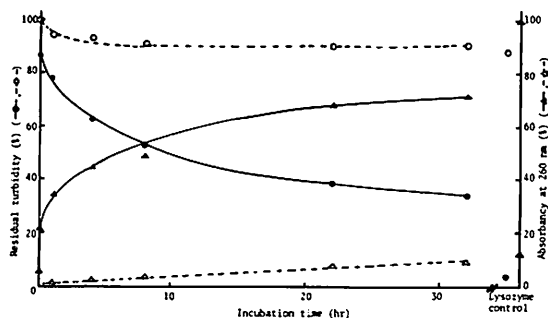


Fig. 4. Time course of the development of osmotic fragility of log phase cells. Log phase cells were incubated in 1.2 M buffered sucrose at 37°C. Two aliquots of the suspensions were taken out at various time intervals. One of them was diluted with 1.2 M sodium chloride solution (---) and the other was with deionized water (—). Turbidity of both diluted samples was measured, and the samples were centrifuged. The absorbancy of supernatant fluids was measured at 260 nm.

以下 A ~ G の実験は type strain である *M. lysodeikticus* (luteus) IFO 3333 についてのものである^{14), 15)}。

A. 増殖相と自己融解能

Fig. 3 に見られるように、対数期の菌はよく自己融解を起こしたが静止期に入ると殆ど自己融解を起こさなくなった。これは細菌の増殖と自己融解との間に何らかの関係があることを示している。Fig. 3 以下 autolyzing buffer とは 0.01 M pH 7.5 のリン酸ナトリウム緩衝液である。

B. 蔗糖加緩衝液中での自己融解

Fig. 4 は対数期菌体の示す自己融解が細胞壁の溶解によることを示している。すなわち 1.2 M 食塩水による希釈の場合と異なり脱イオン水で希釈した際に著明な濁度の減少が見られるのは細胞壁の自己融解の結果、露出した細胞質膜が細胞内部の高浸透圧に抗しきれず破裂したと考えられる。

なお保温 0 時間で濁度ならびに上清の紫外吸収が一致しないのは保温 0 時間よりも前の操作中に既に細胞壁自己融解酵素が働いたことを示している。この点は先にも述べたが特に細胞壁を研究材料とする者は注意

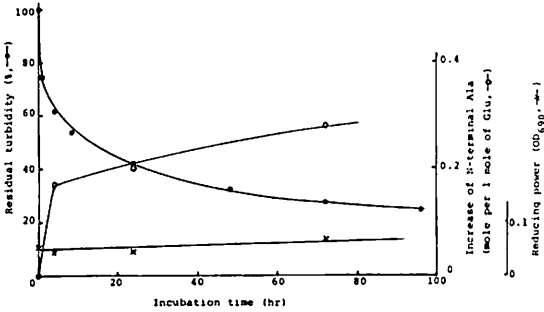


Fig. 5. Analyses of the terminal groups liberated by autolysis of the cell walls isolated from the log phase cells. The cell walls were incubated in the autolyzing buffer at 37°C. At time intervals aliquots were withdrawn to measure OD₅₅₀, to determine the reducing power and to determine N- or C-terminal amino acids. There was no significant increase in either N-terminal Glu, Gly and Lys or C-terminal Ala, Glu, Gly and Lys during the incubation.

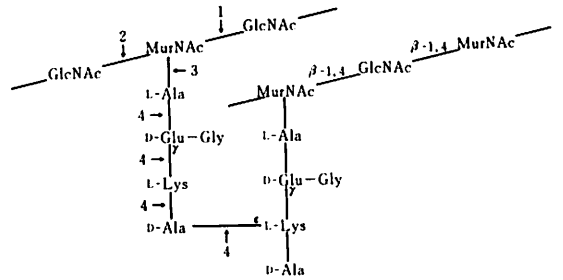


Fig. 6. Primary structure of peptidoglycan in *M. luteus* and possible bond(s) hydrolyzed by the autolytic enzyme(s). Arrows 1, 2, 3 and 4 indicate the sites of action of endo-N-acetylmuramidase, endo-N-acetylglucosaminidase, N-acetylmuramyl-L-alanine amidase and of endopeptidases, respectively.

を払わねばならない。得た菌や細胞壁が既に自己融解酵素の作用を受けていて元の細胞壁の構造を保持していないかもしれない。

C. 単離した細胞壁の自己融解

対数期菌体より調製した細胞壁の自己融解の程度は対数期の全菌のそれに比し弱い。Fig. 5はこの自己融解に関与しているのはN-アセチルムラミル-L-アラニンアミダーゼであることを示している (Fig. 6参照)。

D. 全菌の自己融解に及ぼすトリプシンの影響

Fig. 7は細胞表層に存在する細胞壁自己融解酵素活性がトリプシンにより抑制され、その結果細胞壁の剛性が保持され細胞質の漏出が抑えられたことを示している。

E. トリプシン加培地での培養と自己融解

Fig. 8は培地に加えたトリプシンが増殖曲線には影響を与えず対数期菌体の自己融解能を抑えたことを示している。グラム染色性や形態 (Fig. 9, 当学部中研の走査型電子顕微鏡で一昨年撮り直したものである) にも変化は見られなかった。

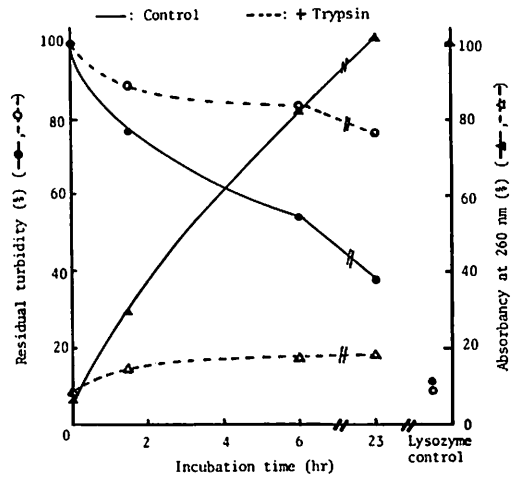


Fig. 7. Effect of trypsin on the cellular autolysis and leakage of cytoplasmic materials of log phase cells. Log phase cells were incubated in the autolyzing buffer with trypsin at 37°C. At time intervals, the turbidity and ultraviolet absorbancy of the supernatant fluid were measured.

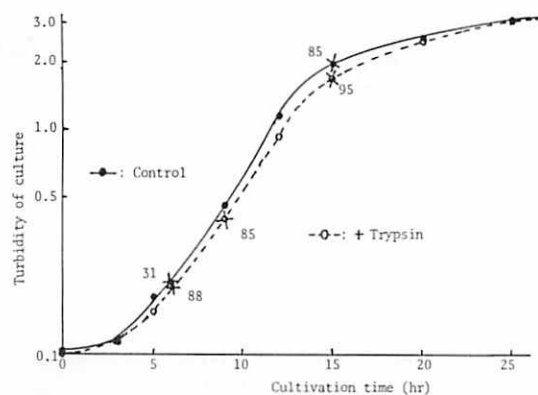


Fig. 8. Effect of addition of trypsin to the culture medium on growth curve and autolytic ability. The experimental procedures were the same as those in Fig. 3.

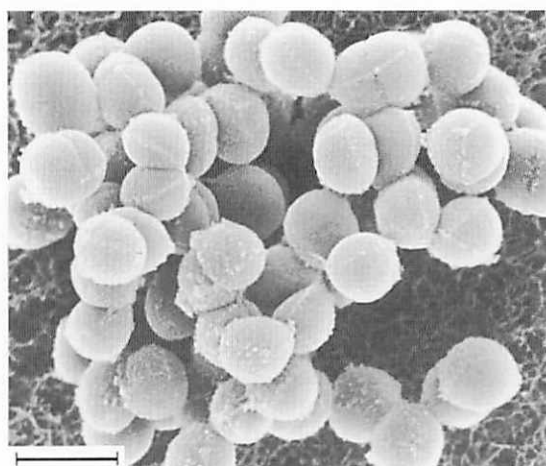


Fig. 9. *M. luteus* IFO 3333 seen under a scanning electron microscope. The cells occur singly, in pairs and in irregular clusters. The newly exposed surfaces of the cells were smoother than the old surfaces. No discernible morphological changes were observed on the cells in the culture medium either in the presence or absence of externally added trypsin. The bar represents 1 μ m.

Table 1. Chemical compositions and terminal group analyses of cell walls^{a)}

Components ^{b)}	Hydrolysis		Hydrolysis after FDNB-treatment		Hydrazinolysis	
	LCW ^{c)}	SCW ^{d)}	LCW	SCW	LCW	SCW
Mur	0.88	0.82	0.68	0.62	—	—
GlcN	0.99	1.02	0.84	0.85	—	—
Glu	1.00	1.00	1.00	1.00	[1.00]	[1.00]
Gly	1.05	1.05	0.94	0.92	0.95	0.98
Ala	2.00	1.91	1.56	1.64	0.18	0.14
Lys	0.96	1.13	0.28	0.29	0.41	0.51
Hexose [Glucose]	1.36	1.21				
Phosphorus [Organic]	0.42	0.38				
Glu contents ^{e)}	0.49	0.52				
Yield ^{f)}	40	36				

^{a)} Values are expressed in molar ratios to the total glutamic acid residue.

^{b)} Other ninhydrin positive materials detected were negligibly small.

^{c)} Cell walls prepared from the log phase cells.

^{d)} Cell walls prepared from the stationary phase cells.

^{e)} μ mole of glutamic acid per mg of lyophilized cell walls.

^{f)} Yield (mg) of lyophilized cell walls prepared from 1 g of wet cell.

F. トリプシン加培養により抑制された自己融解能の回復

トリプシン加培養により自己融解能の抑制された対数期菌体をトリプシンを含まない新しい培地で洗浄し、一部をトリプシンを含まない培地に植え再び培養した。こうして対数期に達した菌体は自己融解能を回復しており、autolyzing bufferに保温13時間後の残存濁度は50%だった。

G. 細胞壁の化学分析

Table. 1は対数期菌体及び静止期菌体より調製した細胞壁の間でペプチドグリカン構成成分、タイクロン酸のグルコースを反映していると思われるヘキソース、ペプチドグリカンとタイクロン酸の結合部に存在するとされる有機リン含量に有意差のないことを示している。さらに両者のグリカン鎖の長さ、 700 cm^{-1} から $4,000\text{ cm}^{-1}$ の赤外吸収スペクトルにも差はみられなかった。加うるに両者の鶏卵白リゾチームに対する感受性にも差はなかった。これらは対数期菌体と静止期菌体でペプチドグリカンの構造に差のないことを示していると考えられ、静止期菌体が自己融解を起こし難いのはペプチドグリカンの構造が変化したことによるものではなく、自己融解酵素活性が変化したことによるものと考えられる。

H. 考察

Eに述べたようにトリプシンを加えて培養することにより増殖曲線・形態・グラム染色性には全く変化を与えず、対数期菌体の自己融解が抑えられた。このことは一見自己融解と増殖とが無縁なことを示すようだが、次の解釈も可能である。すなわち対数期菌体を適当な条件においた時に観察される自己融解現象は、既にその生理的役割を果たし終えた菌自身にとって不要な用済みの細胞壁自己融解酵素により引き起こされ、この酵素がトリプシンにより不活性化されても菌の増殖や形態やグラム染色性に全く影響が見られないのであると解釈できないだろうか。すべての細菌細胞は細胞壁自己融解酵素を持っており、その生理的役割を終えた放置すれば非常に危険な存在である自己融解酵素を何らかの機序により不活性化する機構が存在するのではないだろうか。細胞壁自己融解現象はこの不活性化機構の不完全な菌においてのみたまたま観察される現象であり、生理的役割を果たし終えた不要な細胞壁自己融解酵素によって引き起こされるものと考えられる。この解釈と関連あると思われる報告がいく

つかある。micrococci^{16), 17)}や*Streptococcus*¹⁸⁾において細胞表面に蛋白質分解酵素が存在することが報告されているが、原著者らはこれらの酵素は培地から栄養を取り入れるための消化酵素だと考えている。さらに*Bacillus subtilis* 168の芽胞形成変異株SR22(細胞外蛋白質分解酵素を欠いている)の持つ三種類の細胞壁自己融解酵素のうちの一つが、親株(一種類の細胞壁自己融解酵素をもつ)の細胞外蛋白質分解酵素により不活性化されたという報告がある¹⁹⁾。原著者はこの実験事実の意義を詳しく議論していないが細胞外蛋白質分解酵素を欠く変異株に3種類の自己融解酵素活性が認められるのに、細胞外蛋白質分解酵素を持つ親株には1種類の自己融解酵素しか検出されないという事実は、前述の説によれば無理なく説明できよう。また*Bacillus subtilis* 168WTの変異株*Cbl-1*はゆっくりと自己融解を起こすが、その対数期菌体より調製した細胞壁は蛋白質分解酵素活性を持っているという²⁰⁾。現在かなり多くの菌種で細胞壁自己融解現象が報告されているが、菌種・菌株により検出される自己融解酵素の種類が1つのものから3つのものまでであり、加うるにその特異性(ペプチドグリカンの切断点)がまちまちであることも不完全な不活性化を受ける細胞壁自己融解酵素を保有する菌にたまたま自己融解が観察されるのだと考えれば納得できるように思われる。

さてこの実験に用いたIFO 3333株とは別のNCTC 2665株については対数期菌体・静止期菌体ともに自己融解は認め難かった。このNCTC 2665株が自己融解を起こしたという報告があること、IFO 3333株も継代を重ねると次第に自己融解を起こしにくくなる傾向にあることを考えると、自己融解能という性質は変化しうるものであり人為的に或いは自然に何らかの選択にかけられるのでなければ、生理機能を果たし終えた細胞壁自己融解酵素の不活性化が滑らかに進行せず、いわば不必要な自己融解酵素が残るために自己融解を起こしやすい菌は選択によって除かれ用済みの自己融解酵素の制御がうまく行われて不必要な自己融解を起こさない菌が淘汰を免れて生き残る可能性が大きいと考えられる。

V. おわりに

*M. luteus*の自己融解に関する報告はその後見られないが、対数期菌体より調製した細胞質膜と細胞壁がペプチドグリカン合成に関与しているN-アセチルムラミル-L-アラニンアミダーゼ活性を含んでいる

という報告がある²¹⁾。

自己融解酵素の制御（活性化）に関する注目すべき報告としては、永年にわたって *Streptococcus faecalis* と *Streptococcus pneumoniae* を供試菌として実験している2つのグループによる報告がある²²⁾⁻²⁴⁾。全菌や細胞壁の自己融解がその菌から抽出したリポタイコ酸や他の脂質により阻害され、脱アシル化されたリポタイコ酸によっては阻害されない。静止期では脱アシル化されたリポタイコ酸が培養上清に多量に検出されるという。これらはリポタイコ酸の脂質部分が自己融解酵素活性に関与していることを示している。リポタイコ酸が自己融解酵素の活性を阻止しており、自己融解酵素がその生理機能を発揮すべき時にはリポタイコ酸が脱アシル化され、その結果自己融解酵素が活性化され、そして脱アシル化されたリポタイコ酸は細胞外へ放出されると考えられている。しかしながらリポタイコ酸の脂質部分は細胞質膜内にあり、タイコ酸部分が細胞壁内にあるとされている。自己融解酵素の働く場所は細胞壁内である。細胞質膜内にあるリポタイコ酸の脂質部分が、どのように細胞壁内の自己融解酵素を制御するのかまた機能を発揮した後の自己融解酵素はどうなるのか今後説明を要する点である。

S. faecalis を実験材料としているグループは自己融解酵素が前駆体として存在し、機能を発揮すべき時には細胞質内に存在するトリプシン様の蛋白質分解酵素により活性化されるという考えも捨てていない²⁵⁾。

すべての細菌がいろいろな機能を担った数種類の特異性の異なった細胞壁自己融解酵素を持っていると考えられる。それらが異なった機構で制御されていることは充分考えられる。細胞壁自己融解酵素の制御機構に関する研究はかなり進展したがまだ説明されるべく残されている部分が多い^{9), 26), 27)}。

ついでながらペニシリン等の β -ラクタム系抗生物質（細胞壁合成阻害剤）やフェージによる溶菌にも自己融解酵素が関与しているようである^{9), 27)-32)}。ペニシリンによる溶菌はペニシリンが細胞壁ペプチドグリカンの生合成を阻害することによるのみでなく、ペニシリンがリポタイコ酸と自己融解酵素の結合を解き自己融解酵素を活性化することにもよるのだという。対数期菌体に自己融解の観察される菌の対数期培養にペニシリンを添加すると濁度が減少するが、自己融解の観察され難い菌では濁度が減少しない。すなわちペニシリンによる細胞壁生合成阻害は静菌的であり、自己融解酵素が殺菌的に働くのだと考えられている。

自己融解の観察され難い菌であろうと静止期菌体

（静止期培養にペニシリンを添加しても濁度は減少しない）であろうと、すべての細菌は何らかの細胞壁自己融解酵素をもっていると考えられる。これらの潜在する自己融解酵素を働かせうる薬剤の開発は基礎的研究（例えばプロトプラストの調製）にも応用的研究（例えば病気の治療）にも新たな道を開くことが期待される。

引用文献は特に関係あるもの、近年の重要なものと総説に限った。

引用文献

- 1) Weidel, W. & Pelzer, H.: Bagshaped macromolecules-A new outlook on bacterial cell walls. *Advan. Enzymol.* 26, 193-232, 1964
- 2) Ghuyssen, J. M.: Use of bacteriolytic enzymes in determination of wall structure and their role in cell metabolism. *Bacteriol. Rev.* 32, 425-464, 1968
- 3) Rogers, H. J.: Bacterial growth and the cell envelope. *Bacteriol. Rev.* 34, 194-214, 1970
- 4) Ghuyssen, J. M. & Shockman, G. D.: Chap. 2, Biosynthesis of peptidoglycan., In: *Bacterial Membranes and Walls*, L. Leive, Ed. 37-130, Marcel Dekker, Inc., New York, 1973
- 5) Glaser, L.: Bacterial cell surface polysaccharides. *Ann. Rev. Biochem.* 42, 91-112, 1973
- 6) Tipper, D. J.: Chap. 3, Bacterial cell walls., In: *Subunits in Biological Systems, Part B (Biological Macromolecules Vol. 8)*, G. D. Fasman & S. N. Timasheff, Ed. 121-346, Marcel Dekker, Inc., New York, 1973
- 7) Shockman, G. D., Daneo-Moore, L. & Higgins, M. L.: Problems of cell wall and membrane growth, enlargement, and division. *Ann. New York Acad. Sci.* 235, 161-197, 1974
- 8) Slater, M. & Schaechter, M.: Control of cell division in bacteria. *Bacteriol. Rev.* 38, 199-221, 1974
- 9) Rogers, H. J., Perkins, H. R. & Ward, J. B.: The bacterial autolysins., In: *Microbial Cell Walls and Membranes*, 437-460, Chapman and Hall Ltd., London, 1980
- 10) Welsch, M.: Lysis by agents of microbial origin. *J. Gen. Microbiol.* 18, 491-497, 1958
- 11) Stolp, H. & Starr, M. P.: Bacteriolysis. *Ann. Rev. Microbiol.* 19, 79-104, 1965
- 12) Mitchell, P. & Moyle, J.: Autolytic release and osmotic properties of 'protoplasts' from *Staphylococcus aureus*.

- J. Gen. Microbiol. 16, 184-194, 1957
- 13) Owen, P. & Freer, J. H.: Isolation and properties of mesosomal membrane fractions from *Micrococcus lysodeikticus*. Biochem. J. 129, 907-917, 1972
 - 14) Monodane, T., Matsushima, Y., Hirachi, Y. & Kotani, S.: Cell wall autolysis in log phase cells of *Micrococcus lysodeikticus* (*luteus*). Microbiol. Immunol. 22, 57-66, 1978
 - 15) Monodane, T., Matsushima, Y. & Kotani, S.: Demonstration of the physiological role of autolysis by a comparative study with a wild-type and its non-autolytic mutant of *Micrococcus lysodeikticus* (*luteus*) cultivated with externally added proteolytic enzymes. Microbiol. Immunol. 22, 67-80, 1978
 - 16) McDonald, I. J.: Location of proteinase in cells of a species of *Micrococcus*. Can. J. Microbiol. 8, 785-794, 1962
 - 17) Sarner, N. Z., Bissell, M. J., DiGirolamo, M. & Gorini, L.: Mechanism of excretion of a bacterial proteinase: Demonstration of two proteolytic enzymes produced by a *Sarcina* strain (coccus P). J. Bacteriol. 105, 1090-1098, 1971
 - 18) Thomas, T. D., Jarvis, B. D. W. & Skipper, N. A.: Localization of proteinase(s) near the cell surface of *Streptococcus lactis*. J. Bacteriol. 118, 329-333, 1974
 - 19) Brown, W. C. & Young, F. E.: Dynamic interactions between cell wall polymers, extracellular proteases and autolytic enzymes. Biochem. Biophys. Res. Commun. 38, 564-568, 1970
 - 20) Heijenoort, J. van, Menjon, D., Flouret, B., Szulmajster, J., Laporte, J. & Baltelier, G.: Cell wall of a teichoic acid deficient mutant of *Bacillus subtilis*. Eur. J. Biochem. 20, 442-450, 1971
 - 21) Jensen, S. E. & Campbell, J. N.: Amidase activity involved in peptidoglycan biosynthesis in membranes of *Micrococcus luteus* (*sodonensis*). J. Bacteriol. 127, 319-326, 1976
 - 22) Höltje, J.-V. & Tomasz, A.: Lipoteichoic acid: A specific inhibitor of autolysin activity in pneumococcus. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 72, 1690-1694, 1975
 - 23) Cleveland, R. F., Höltje, J.-V., Wicken, A. J., Tomasz, A., Daneo-Moore, L. & Shockman, G. D.: Inhibition of bacterial wall lysins by lipoteichoic acids and related compounds. Biochem. Biophys. Res. Commun. 67, 1128-1135, 1975
 - 24) Cleveland, R. F., Daneo-Moore, L., Wicken, A. J. & Shockman, G. D.: Effect of lipoteichoic acid and lipids on lysis of intact cells of *Streptococcus faecalis*. J. Bacteriol. 127, 1582-1584, 1976
 - 25) Pooley, H. M. & Shockman, G. D.: Relationship between the latent form and the active form of the autolytic enzyme of *Streptococcus faecalis*. J. Bacteriol. 100, 617-624, 1969
 - 26) Shockman, G. D. & Barrett, J. F.: Structure, function, and assembly of cell walls of gram-positive bacteria. Ann. Rev. Microbiol. 37, 501-527, 1983
 - 27) Microbial Cell Wall Synthesis and Autolysis (Proceedings of a Symposium by FEMS, 1984), C. Nombela, Ed. Elsevier Science Publishers B. V., Amsterdam, 1984
 - 28) Rogers, H. J. & Forsberg, C. W.: Role of autolysins in the killing of bacteria by some bactericidal antibiotics. J. Bacteriol. 108, 1235-1243, 1971
 - 29) Tomasz, A.: The mechanism of the irreversible antimicrobial effects of penicillins: How the beta-lactam antibiotics kill and lyse bacteria. Ann. Rev. Microbiol. 33, 113-137, 1979
 - 30) Shockman, G. D., Daneo-Moore, L., Cornett, J. B. & Mychajlonka, M.: Does penicillin kill bacteria? Rev. Infec. Dis. 1, 787-796, 1979
 - 31) Rogers, H. J., Perkins, H. R. & Ward, J. B.: β -Lactam antibiotics: the penicillins and cephalosporins. In: Microbial Cell Walls and Membranes, 326-369, Chapman and Hall Ltd., London, 1980
 - 32) Garcia, E., Rojo, J. M., Garcia, P., Ronda, C., Lopez, R. & Tomasz, A.: Preparation of antiserum against the pneumococcal autolysin; inhibition of autolytic activity and some autolytic process by the antibody. FEMS Microbiol. Lett. 14, 133-136, 1982

GUSTATION IN FISH

Takayuki Marui

Department of Oral Physiology, Kagoshima University
Dental School, Kagoshima 890, Japan

Abstract

This report reviews the taste systems of teleosts as ideal animal models to investigate the neural processing of gustatory and tactile information from peripheral through to higher gustatory centers. An overview of recent physiological studies is mainly focused on to allow a better understanding of the sense of taste in fishes. Then, what should be done in this science field is discussed.

Key words

fish, taste, tactile, amino acids, facial taste system, vagal taste system, somatotopic arrangement, neuroanatomy, electrophysiology

I. INTRODUCTION

Living action of all animals including man requires a supply of energy, for which they have to obtain foods from various sources of surroundings by using chemical perceptivity. Vertebrates possess two principle systems, olfaction and taste, adapted to respond to chemical substances in environments. Although olfaction is generally termed the "distant" sense and gustation the "contact" sense, with fishes chemical stimuli are present in the aquaous medium and it is difficult to distinguish between olfactory and gustatory stimuli or to explain the development of two chemical senses in aqueous vertebrates¹¹⁻³¹, because taste in fish would appear to be an important distant sense having behavioral implications⁴¹⁻⁶¹. Fish, olfaction aside, evolve elaborately their gustatory systems of all vertebrates and are the best endowed for the detection of foods. Generally the taste sense of animals plays an important role in selection of foods and protection against noxious substances. As well-known, the mode of fish life diversifies in the aquatic environment, which affects on the structure of the hind brain in relation to fish habits of feeding⁷¹⁻¹¹¹. In order to adapt to a specific way of life, some teleosts, especially Cyprinidae and Siluridae (and Ictaluridae), have an enormous number of taste buds in the mouth, the palatal organ (only in Cyprinidae), the gill region, and over the whole body surface¹²¹⁻¹⁸¹. Especially their barbels and lips are densely studded with taste buds^{121, 161, 181} (Fig. 1). The external cutaneous chemoreception on fish has close connection with searching, hitting and picking up behavior

丸井隆之

鹿児島大学歯学部口腔生理学講座

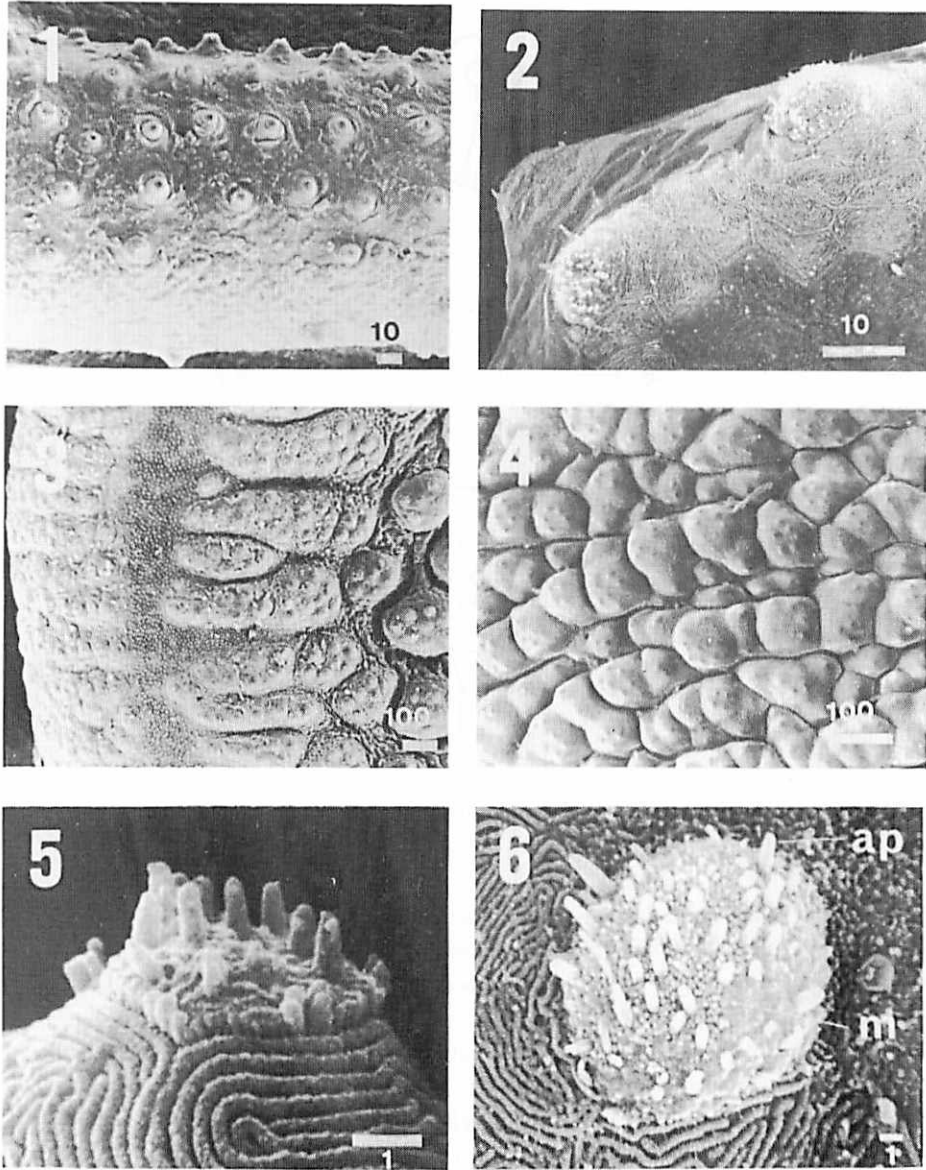


Fig. 1 Scanning electron microscopic micrographs of taste buds on carp.

1. Taste bud distribution on the maxillary barbel.
2. Taste buds on the outer skin surface.
3. Anterior part of the oral roof.
4. Palatal organ.
5. Lateral view of a taste bud swollen.

6. Detail of the surface of the bud. The surrounding epithelium exhibits microridges, as well as in 5. The numbers attached the bars in each micrograph show the scale in μm . Abbreviations : ap, apical process on the surface of the bud ; m, microvilli.

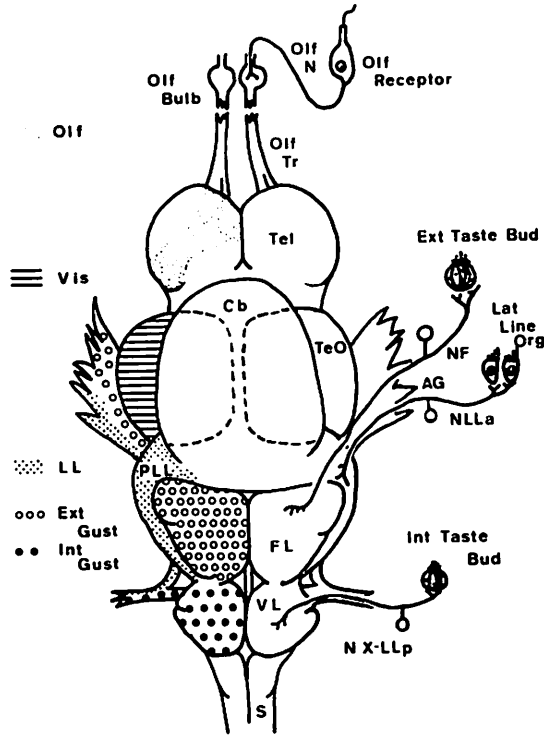


Fig. 2 Schematic dorsal view of the Japanese sea catfish ("Gonzui") brain is shown, where primary central terminal fields for various cranial nerves are represented. (Reformed from T. E. Finger, 1982, reference no. 92.)

in its feeding¹²). Cyprinidae and Siluridae inhabit poorly illuminated ponds and lake bottoms, and rely less on sight than do other fishes¹⁹, indicating that the families are prime exponents of such gustatory systems. Therefore, most gustatory experiments in fish have been performed using these families. Taste buds in fish are innervated by fibers from the cranial VIIth, IXth, and Xth nerves^{20)–23)}. According to those peripheral developments, the primary gustatory centers, the facial, glossopharyngeal and vagal lobes, are enlarged into prominent features, and better developed than in other fishes. Each lobe serves as the region of primary termination for one of the three gustatory fibers; facial, glossopharyngeal and vagal nerves. Their central gustatory projections show the cerebral enlargements which have a series of a few dorsal conformations^{81, 24)–30)}, the vagal and facial lobes arising from the visceral sensory column^{201, 23)}. These lobes are called "the primary gustatory centers", the nuclei gustus primus, by C. J. Herrick²³⁾. In Fig. 2, schematic dorsal view of the Japanese sea catfish brain is shown, in which only primary central terminal fields for various cranial nerves, olfactory, visual, lateral line and taste centers, are represented. Further, there are two major secondary gustatory nuclei in these species. One, the superior secondary gustatory nucleus (nGS), is situated at the isthmic region between the optic tectum and cerebellum²³⁾. This secondary nucleus should correspond to the pontine taste area in mammals^{31)–33)}. The other secondary gustatory nucleus, the inferior secondary gustatory nucleus, is situated at the medial funicular region of the caudal medulla (the nucleus funicularis medialis, nFM). The former nucleus receives input from the facial and vagal lobes. The latter does only from the facial lobe^{271, 281, 30)}. Thus, these species serve as ideal animals to study the central relation and connections

of the gustatory systems³⁴¹⁻³⁶¹. However, there were a few report of electrophysiological experiments on their central mechanisms³⁴¹⁻³⁹¹.

On the other hand, over the past decade, electrophysiological^{21, 31, 61, 401-441}, biochemical^{451, 461} and behavioral^{411, 471-501} experiments clearly demonstrate that L- α -amino acids are an important class of chemical stimuli to the chemosensory systems of fishes, as well as those of numerous aquatic invertebrates⁵¹¹⁻⁵⁵¹. Specific amino acids are suitable, high-affinity ligands for the fish taste receptor, because electrophysiological^{31, 401, 421-441} and behavioral^{471, 491} stimulus thresholds for them in the facial taste systems of a number of different teleosts fortunately approach and occasionally extend below nanomolar stimulus concentrations. Thus, using such kinds of fishes as experimental models allows us to best use our knowledge in taste physiology.

This report provides an overview of recent physiological and anatomical studies to allow a better understanding of the sense of taste in fishes closely associated with that in mammals.

II. TASTE STIMULI AND CHEMICAL ACUITY

In the 1930's, Hoagland⁵⁶¹ recorded mechanoreceptive activity along with the gustatory activity from the barbel nerve of North American catfish, in which acetic acid, sodium chloride and meat juice evoked barely appreciable potentials in the facial nerve. The relative response magnitudes might be associated with the di-

TABLE I. GUSTATORY EFFECTIVENESS AND CONCENTRATION SERIES.

Species	Stimulus	Threshold (10 \times M)	References
1. Catfish <i>Ictalurus</i> <i>Punctatus</i>	L-Ala>L-Arg> L-Ser>L-Abu> L-Gln>Gly	- 8 to -11	Caprio 1975, 1978, (40, 6)
2. Puffer <i>Fugu</i> <i>pardalis</i>	L-Pro>L-Ala> Gly	- 5 to - 6	Hidaka et al., 1976. (61)
3. Eel <i>Anguilla</i> <i>japonica</i>	L-Arg>Gly> L-Ala>L-Pro> L-Lys	- 7 to - 9	Yoshii et al., 1979 (44)
4. Minnow <i>Pseudorasbora</i> <i>parva</i>	L-Por>L-Lys> L-Ala>L-Arg> L-CysH	- 9 to -11	Kiyohara et al., 1980 (42)
5. Red sea bream <i>Chrysophrys</i> <i>major</i>	L-Ala>Gly> L-Arg>L-Ser> L-Lys	- 6 to - 7	Goh and Tamura, 1980.(2)
6. Mullt <i>Mugil</i> <i>cephalus</i>	L-Arg>L-Lys> L-Ala>L-Ser> L-Leu	- 6 to - 7	Goh and Tamura, 1980.(2)
7. Rainbow trout <i>Salmo</i> <i>gairdneri</i>	L-Pro>Bet> L-Hyp>L-Leu> L-Ala	- 5 to - 8	Marui et al., 1983.(43)
8. Carp <i>Cyprinus</i> <i>carpio</i>	L-Pro>L-Ala> L-CysH>L-Glu-Na Bet	- 8 to -10	Marui et al., 1983.(3)
9. Tilapia <i>Tilapia</i> <i>nilotica</i>	L-His>L-Arg> L-Try>L-Ser> L-Gln	- 8 to - 9	Marui et al., unpublished

ameter of nerve fibers : the large Gasserian ganglion cells supply the tactile receptors and small size of the geniculate ganglion cells send axons to taste buds. Since then, there are a number of reports concerning fish taste physiology. However, most investigations had been performed by using the classical taste stimuli until Caprio⁴⁰⁾ found with electrophysiological techniques that the taste system of the channel catfish is sensitive to extremely dilute concentrations of amino acids ($< 10^{-9}M$). After the report on the catfish taste, taste systems of many fishes^{21,31,42) - 44)} were shown to parallel that of the catfish taste sensitivity to amino acids. Being highly responsive to amino acids allows the determination of the molecular characteristics required for stimulatory effectiveness, which is an advantage of gustatory receptors of fish. Electrophysiological recordings from the taste system of fishes support the contention that the amino acid spectrum is highly species-specific across species tested so far (Table I). Gustatory effectiveness of basic or acidic amino acids is strongly dependent on species, suggesting species differences of receptor sites^{21,31}. Generally, taste responses to amino acids for fish were highly stereospecific ; the L-isomer of an amino acid was stimulatory, but the enantiomer was not (Fig. 3). The gustatory receptors were responsive to amino acids containing 3 to 4 carbon atoms having unbranched and uncharged side chains (Fig. 4). Further, it seems that α -amino group and α -hydrogen were essential for maximal effectiveness, and that ionically charged primary carboxyl group was generally unnecessary for a maximal receptor response (Fig. 5). Representative examples as mentioned above for the carp taste system are shown in Figs.3, 4 and 5 . Consequently, the effectiveness of an amino acid molecule depends on its size, the arrangement of its atoms and the chemical properties of substituents in the side chain^{31,61,57)}.

As to the possible reasons why amino acids are potent chemosensory stimuli to fish, it is conceivable that those chemicals serve as a source for orientation to potential food organisms. However, the integrated facial

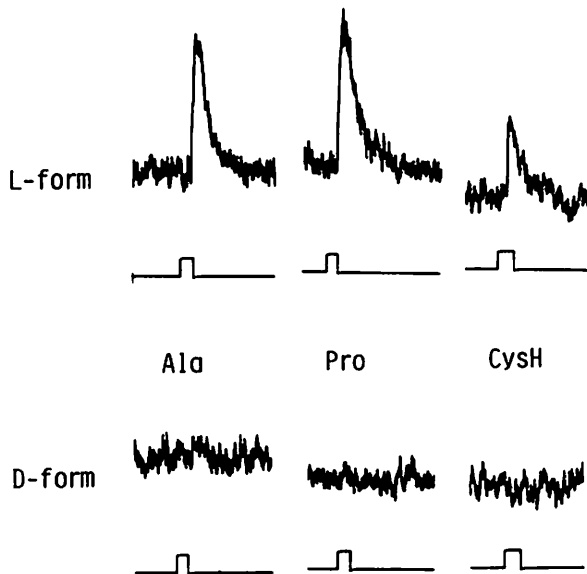


Fig. 3 Typical integrated responses upon stimulation of gustatory receptors with amino acids, showing that L-isomer of an amino acid is stimulatory, but its antiomer is ineffective. The results indicate that the receptors involved possess a corresponding chirality.

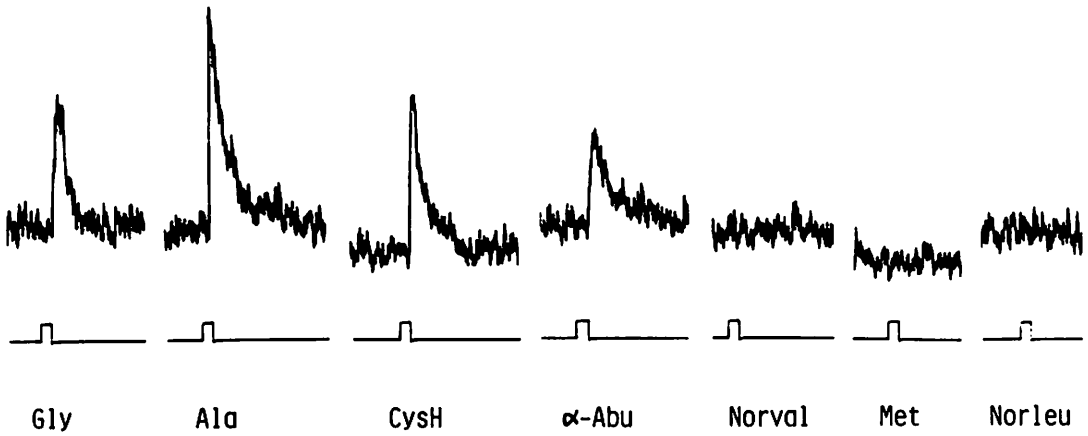


Fig. 4 The carp gustatory receptors are stimulated best by amino acids containing 3 to 4 carbon atoms and having unbranched and uncharged side chains.

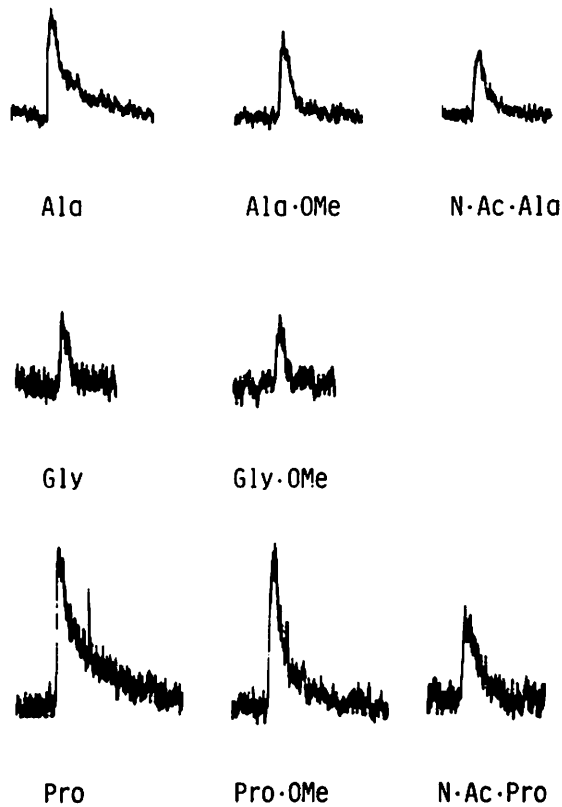


Fig. 5 Effects on gustatory neural responses due to structural changes in amino acids. Esterification of the primary carboxyl group resulted in little change in response magnitudes. However, replacements of the α -amino group significantly reduced the taste responses.

taste activity of some fishes^{44),57)} is greater to carboxylic acids than to amino acids, and the concentration-response curves for some carboxylic acids were steeper than for the corresponding amino acid with increases in concentration (unpublished data in carp). Therefore, further attempts are desirable to know what chemical is the most adequate stimulus. On the other hand, it has been shown that certain mixtures of L-amino acids or extracts of prey animals were stimulatory in experimentally eliciting feeding behavior, while individual components of mixtures or extracts were inactive or weak stimulants^{50),58)}. Also, for some fish, there is evidence that amino acids and betaine interacted synergistically to elicit feeding behavior^{50),59),60)}. Synergistic effects were obtained with a mixture of betaine plus amino acids for the gustatory system with electrophysiological techniques^{21),44),57),61)}. Since betaine and some amino acids are contained in the extracts of prey animals, it is likely that betaine acts strongly as a feeding stimulant in conjunction with L-amino acids. Although most effective chemicals for the taste system in fishes are of lower molecular weight as amino acids, the mixtures like food extracts show highly stimulatory effectiveness for the system⁵⁷⁾.

III. TASTE PATHWAYS

C. J. Herrick^{23),62)} confirmed essentially the primary afferent projections of the Vth, IXth nerves in fish. During the past decade, the primary and secondary gustatory connections of the facial and vegal taste systems in fish have precisely been reported by new anatomical neural tracing methods^{24)–30)}. According to Finger²⁵⁾, the sensory and recurrence roots of the facial nerve of the catfish (*Ictalurus nebulosus* and *I. natalis*) project together to the facial lobe via the anterior ganglion. Terminal degeneration of the sensory roots of the carp²⁴⁾ and the crucian carp²⁷⁾ was exclusively in the ipsilateral half of the facial lobe forming the so-called tuberculum impar^{20),23)}, but differing from the catfish, the two roots of the carp and crucian carp enter the brainstem separately. In Siluridae (Ictaluridae), the facial lobes are paired structures with fiber fascicles dividing each lobe into several lobules^{25),26),30)}, which means more developed manner of the primary gustatory nucleus. The topographic organization of the facial lobe to each of the body regions have been reported in the catfish^{25),35),37)} and goldfish⁶³⁾ as presented in the carp^{34),36)}. Taste and touch neurons in the medio-anterior part of the lobe in the carp are arranged, from dorsal to ventral, in order of head, upper jaw and upper lip, and those in the latero-posterior part are in the order of fin, gill-cover, lower jaw, barbels, and lower lip (Fig. 6). It has been revealed with electrophysiological techniques that taste and tactile neurons in the facial lobes of channel catfish were organized in a somatotopic manner³⁵⁾ as well. These results confirm the anatomical reports of their lobes^{24)–26)}. The secondary taste neurons in these fishes tend to be arranged generally in the more dorsal regions of the tactile sensitive areas of the facial lobe. In Fig. 7, typical gustatory unitary discharges in the facial lobe of the channel catfish are shown. The secondary gustatory neurons in the facial lobe responded with highest frequency to L-alanine or L-arginine applied to taste buds along the external body surface (Fig. 7), which is similar to that obtained from the peripheral neurons in the same species^{6),40)}. However, there are some discrepancies among their somatotopic arrangements of these species. Although these discrepancies may be due to a real species difference or may merely reflect a difference in techniques, the differences of somatotopic manner within the facial lobe might be dependent on a developmental (specialized) degree of their gustatory centers. On the other hand, there is only one report concerning somatotopy and characteristics of visceral neurons in the vegal lobe of the channel catfish^{38),64)}. The majority of the units observed in the vegal lobe were excited by mechanical stimulation and taste activity was generally restricted to the superficial region (< 600 μ m deep) of the lobe. Vagal unit responses to mechanical stimulation of the oral epithelium revealed that the anteroposterior axis of each lateral half of the oral cavity is represented ipsilaterally in an anterior to posterior direction in the vegal lobes. Specific structures, such as the palatal organ, gill arches and tongue region, are represented in somewhat diffuse and

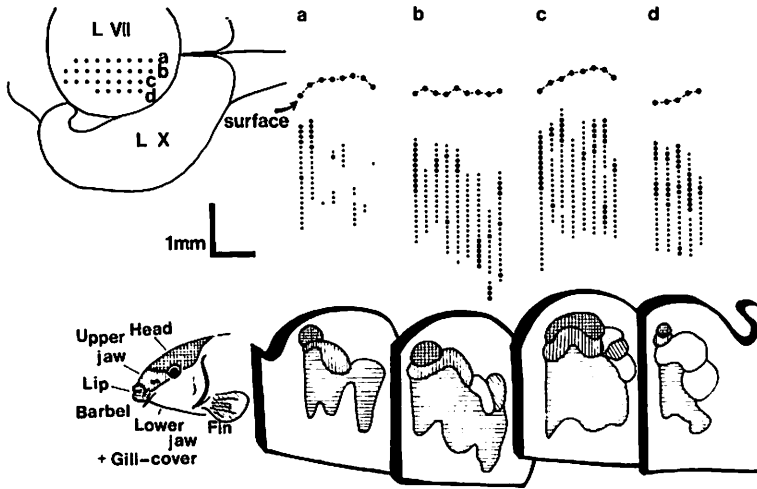


Fig. 6 Localization of taste and tactile neurons in the facial lobe and their topographical relation. A: dorsal view of the facial lobe with 30 inserted electrode points, B: sagittal sections of one-half facial lobe at a, b, c, and d levels being at intervals of 0.25mm. Small closed circles indicate touch responding points in the lobe and large circles indicate taste points. C: division of the face with different marks. D: distribution of the 5 areas in the facial lobe. The marked regions correspond to those in the face.

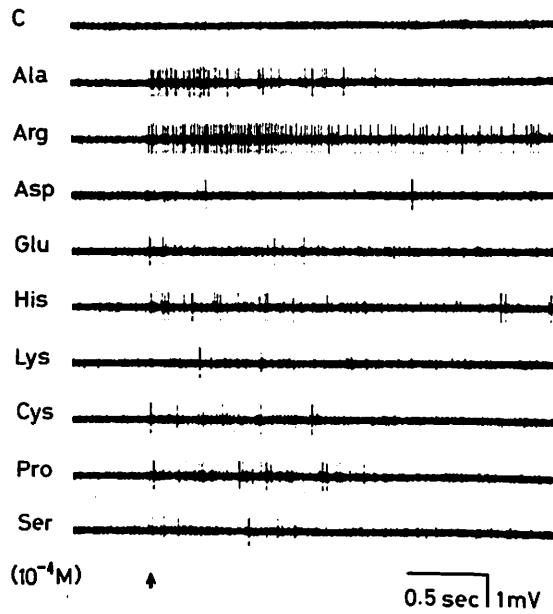


Fig. 7 Taste responses in a neuron of the facial lobe of the channel catfish to 10^{-4} M amino acids. This unit responded with highest frequency to L-Ala and L-Arg-HCl among several amino acids tested.

overlapping domains. Thus, the vagal lobe preserves, in general, the spatial organization and electrophysiological nature of the visceral sensory input, as observed in the facial lobe of the same species³⁵⁾.

From the facial lobe and the vagal lobe in siluroids and cyprinoids, a path made up of the axons of the secondary gustatory cells, runs ventralward and ascends ventral and medial to the descending root of the trigeminus^{25)–30)}. As the secondary gustatory tract approaches the rostral end of the medulla, the tract breaks up into a number of fascicles, turns medially and enters the superior secondary gustatory nucleus (nGS)^{23), 28), 30)}. It has been revealed with anatomical^{26), 27), 30)} and electrophysiological⁶⁵⁾ techniques that the ascending secondary gustatory tract from the facial lobe projects bilaterally to the nGS^{26)–28), 30), 65)} in agreement with the description by Ariens-Kappers²⁰⁾. Judging from the extent of responses obtained electrophysiologically, projections of the ascending secondary gustatory or tactile axons to the nGS were ipsilateral, contralateral or bilateral. Most neurons in the nGS responded only to mechanical stimulation such as stroking the skin surface with a small brush or a galss probe, or with flowing water. The taste neurons were located in the tactile sensitive areas and approximately 95% of them gave tactile responses as in the facial lobe³⁴⁾ of the same species. A segregation of the facial taste system from the vagal one in the nGS was reported in these fishes^{26), 29), 30)}. It is also noted in the catfish by the anatomical observations that some degree of somatotopy exist in the second order projection to the nGS, because the vagal lobe projects most heavily to the lateral portion of the nGS and the facial lobe to more medial regions³⁰⁾ (Marui, Kanwal and Caprio, unpublished on the Japanese sea catfish). In the carp, some degree of somatotopy was confirmed in the nGS⁶⁵⁾, but a separation of terminal areas between the facial and the glossopharyngeal-vagal taste systems, which was also found in the crucian carp²⁷⁾, was not clarified in the electrophysiological experiments of the carp⁶⁵⁾. The topographical relation to each of the body regions in the nGS was ambiguous because of their wide receptive fields. The receptive fields were organized such that the most anterior fields are found in the most ventral portion of the nGS in the same manner as in the facial lobe. The size of the area of tactile sensitive neurons in ithmic region is about 6 mm wide, 1 mm long in front and rear, and 3 mm deep, while that of taste responsive neurons is about 2 mm deep centered within the tactile area⁶⁵⁾. However, the precise construction of the nGS in the carp is not appeared yet but Herrick's description²³⁾.

The tertiary gustatory tract projects ipsilaterally to the nucleus glomerulosus and the nucleus diffusus lobi inferioris of the diencephalon^{23), 26), 27), 66)} which might correspond to the tertiary gustatory nucleus. However, there is no agreement with the terminology of the thalamic regions in fish among investigators. Nobody either reported about the tertiary gustatory nucleus with electrophysiological techniques so far.

The descending secondary gustatory tract from the facial lobe is closely related to the trigeminal complex. This tract projects mostly to the nucleus of the spinal trigeminal tract and sparsely to the nFM^{23), 27), 62)}. However, there is no projections to these regions from the vagal lobe in the catfish³⁰⁾. The descending projections from the vagal lobe were recognized to occur to the nucleus commissure of Cajal and so on. It is indicated by Herrick⁶²⁾ that terminations of the secondary descending visceral tract were recognized within both lateral and medial funicular nuclei in the carp and *Ameiurus* (= *Ictalurus*), and these nuclei are regarded as gustatory-tactile correlation centers. Actually, tactile responses can easily be recorded there, where the latencies obtained by electrical stimulation to the peripheral receptive fields show rather short; i. e. the tactile information may terminate to the funicular regions directly through the trigeminal root (Marui, unpublished data). The two components concerning the gustatory sense, facial and vagal gustatory system, are dissociable and parallel within the vertebrate central nervous system²⁹⁾. The former system is to be used for food selection and the latter is to be involved in swallowing²⁹⁾, which confirms the earlier findings by Atema¹²⁾. It was also demonstrated by neural tracing methods^{29), 30)} that the primary gustatory nucleus for the facial system projects to the reticular formation and to trigeminal nuclei other than the main gustatory tract, and the nucleus for the vagal taste system does to the motor neurons (nucleus ambiguus) mediating swallowing. The

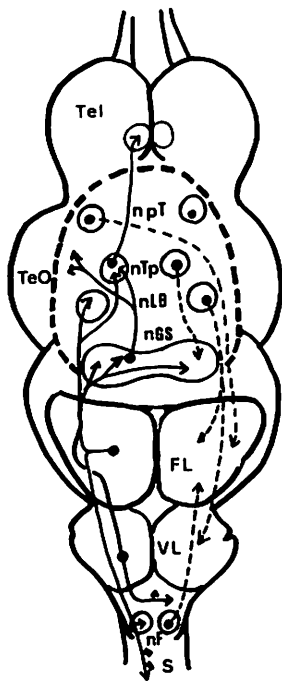


Fig. 8 Schematic diagram of a dorsal view of the catfish brain, showing the central fiber connections of the different gustatory centers. Solid lines represent ascending gustatory pathways from the facial and vagal lobes, and broken lines show descending gustatory pathways to the two lobes. Abbreviations: FL, facial lobe; nF, funicular nuclei; nGS, secondary gustatory nucleus; nLB, nucleus lobobulbaris; npT, pretectal nucleus; nTp, posterior thalamic nucleus; Tel, lencephalon; TeO, optic tectum; VL, vagal lobe.

whole projections of the gustatory systems of the Japanese sea catfish are simply summarized in Fig. 8, schematically showing different brainstem connections. Further neurophysiological experimental works will be necessary in parallel with anatomically neural tracing to test and confirm these taste pathways in detail.

IV. TACTILE INPUT TO THE GUSTATORY NUCLEI

It is believed that certain fishes developing their external gustatory system find their foods ordinarily by the simultaneous use of taste and touch^{51, 221, 621}. In fish, the trigeminal and facial nerve components are intimately complexed peripherally as mentioned before so that it is difficult to discriminate one from the other, anatomically and functionally. However, the two senses belong to entirely different system of neurons, visceral and somatosensory, respectively. Thus, it becomes of great interest to solve a question of their connections. The lips, barbels and other facial skin of fish are highly sensitive to chemical and tactile stimulation^{43), 56), 67) - 72)}. Functional properties of mechanoreception in the carp and the channel catfish coincided with those of barbel mechanoreceptors in catfish, *Ictalurus nebulosus*⁷³⁾ and *Plotosus anguillaris*⁷⁴⁾. Position type neurons responded to a slight bend a more distal point on the barbel, so it is considered to be involved in stretch-sensitive receptors as in the catfish. This might indicate the connection for reflex movements of barbels. It is well-known that these regions are controlled by the cranial Vth and VIIth nerves. Taste buds on the facial skin surface have been thought to be innervated by the latter^{22), 23)} and the former is regarded as a tactile nerve carrying impulses from the same regions as innervated by the facial nerve⁶⁸⁾. Clarification is needed as to where and in what way the taste and tactile messages from the outer skin come into physiological relation to facilitate the ordinarily reflex feeding movements of fish. Several attempts were also made to shed light on the properties of the tactile input and tactile pathways³⁶⁾.

Fujiya and Bardach⁷²⁾ considered that taste cells in the yellow bullhead, *Ictalurus natalis*, are sensitive to very light touch. Electrical responses of the facial nerve induced by tactile stimulation of the facial skin have been reported in catfish^{561, 73)}, carp^{361, 69)} and salmon⁷⁰⁾. It is unlikely that the taste fibers themselves of the facial nerve carry impulses of tactile sensation, since Johnstone⁷⁵⁾ reported in an anatomical study in fish that the facialis contains general tactile fibers, apart from the taste fibers. There was also an electrophysiological study in the puffer, *Fugu paradalis*⁷⁶⁾ which showed that taste messages from the facial regions are transmitted by the communis only and tactile ones by the trigeminus mainly. The communis root does admittedly contain a small amount of tactile fibers. The sensory part of the trigeminus is regarded exclusively as a tactile nerve by Herrick²³⁾. Primary nerve cell bodies are densely distributed among axon bundles in catfish⁷⁷⁾ and carp²⁴⁾. Therefore, it was easily possible to obtain electrical activities of primary neurons in fish by tactile and taste stimulation with the microelectrode techniques. The electrical amplitude of the trigeminus is 10 times higher than that of the other primary nerves³⁶⁾. This may be attributed to a mixture of large and small cells originating from the Gasserian ganglion, while the geniculate is composed of small ones^{561, 78), 79)}. Therefore, the spikes evoked by mechanical stimulation are easily obtained as rather large responses from the trigeminofacial complex nerve under the metal hook electrode techniques. Tactile responses have been reported in the facial lobes of catfish^{35), 37)}, carp^{34), 36)} and goldfish⁶³⁾. Unit discharges in the facial lobe of catfish are generally situated at a depth of 0.5–3.2mm. This range agrees with the results in the carp^{34), 36)} and in the channel catfish³⁵⁾ in which taste and tactile areas in the lobe were found at an average depth of 0.4–3.2mm below the surface. The sensory trigeminus root, upon entering the oblongata, turns caudal to constitute the spinal V tract^{23), 26), 27), 30), 62), 80)}. There is no chief sensory nucleus at the level of entrance of the nerve^{24), 81)} and the funicular nucleus has been regarded as a tactile center in fish^{62), 68)}. The latency measurements of the tactile units obtained from nFM with electrical stimulation suggest mono-synaptic pass to this area (Marui, unpublished). Although purely taste loci were found in the facial lobe of the carp, almost all taste sensitive areas gave tactile responses^{34), 35)}. It has been considered that crossmodal responses were attributed to convergences of neural input in the central nervous system. Luiten²⁴⁾ verified by means of the technique of anterograde axon degeneration in the carp that the trigeminal fibers terminate in several areas of the brain, not in distinct areas. Bimodal responses in the facial lobe are consistent with the anatomical findings that the solitary nucleus in rat⁸²⁾ and cat⁸³⁾ receives trigeminal fibers, and the facial lobe of catfish, *Ameiurus nebulosus*, receives trigeminal collaterals from fibers passing to the spinal V nucleus⁶²⁾. Recently, it is revealed with neural tracing methods of HRP (horseradish peroxidase) that in the Japanese sea catfish, some part of the trigeminal root passing to the spinal V nucleus turn medially towards the facial lobe and then terminate directly in the lobe, which may be collaterals⁸⁰⁾. These anatomical findings support the observation that the facial lobes of the carp and the channel catfish fit in with the somatotopic arrangement of the tactile nuclei of trigeminal medullary components^{34)–36)}. Therefore, there must be a fibrous connection between the spinal V tract and facial lobe to correlate the diverse modalities. The facial lobe of fishes, then, is conceivable to be a primary center not only for the gustatory root of the VIIth nerve but also for the tactile root of the Vth nerve, and must be an important correlation station for simple short reflexes. Although latency measured by electrical stimulation of the end organs is not equivalent to stimulation of the nerves, the results of the two methods agree³⁶⁾. The latencies obtained in the carp³⁶⁾ of up to 59 msec (Fig. 9) are larger than Biedenbach's³⁷⁾ observation in the catfish, in which latencies of the facial lobe neurons were of 4–34 msec. The long latencies of electrically driven neurons suggest that some tactile input from the trigeminal root might project to the facial lobe via multisynaptic path. This supports partly the anatomical finding that direct fibers from the descending root of the trigeminus also pass into the deeper portion of the facial lobe²⁰⁾ and thus are correlated with tactile and gustatory impulses from homologous body regions.

The superior secondary gustatory nucleus of the carp is situated in the dorsal isthmus region^{20), 23), 65)} which

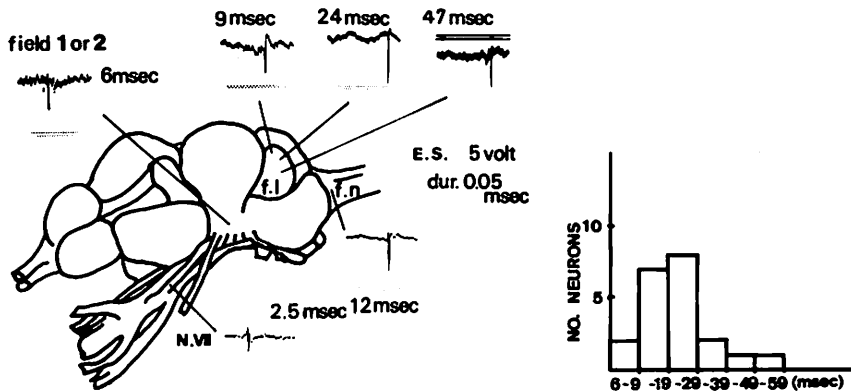


Fig. 9 The latency measurements in several regions of the brainstem of the carp by electrical stimulation to the trigemino-facial complex nerves at the base of a mandible barbel. The right graph shows distribution of latencies of evoked potentials measured in the facial lobe tactile neurons; 20 neurons evoked by electrical stimulation to the trigemino-facial complex nerves.

Abbreviations: f.l. facial lobe; f.n. funicular nuclei; N. VI, facial nerve.

is in front of motor nucleus of the trigeminal nerve and is in synaptic relation with this nucleus through the dendrites of motor neurons of the trigeminal nerve. This might be related to the extent of the tactile input in the isthmus region⁶⁵. The bimodal chemosensitive neurons converged by other inputs in the facial lobe may reflect on the tertiary gustatory neurons.

V. BEHAVIORAL IMPLICATIONS

A number of studies have shown dexterously that amino acids acting singly and in combination elicit feeding behavior in fishes⁸⁴⁻⁸⁷. Behavioral and electrophysiological results available for comparison indicate considerable overlap between effective gustatory stimuli determined for the channel catfish^{61,47}, the sea bream⁴¹, eel^{44,84} and puffer⁵⁰ (Table II). However, in the rainbow trout, the results obtained by both methods make us confusing. L-proline, which was in highest concentration in the synthetic squid extract, was inactive as feeding stimulant⁵⁸, but was a highly stimulatory taste chemicals with electrophysiological test⁴³; lysine, tyrosine and histidine were inactive physiological stimuli (Table II). Therefore, it is risky to apply the electrophysiological data to behavioral bioassay in a hurry; i.e. there is a possibility that olfaction may relate to the eliciting feeding behavior, because both gustatory and olfactory systems are capable of detecting amino acids^{1,88,91}. Behavioral experiment is very important to the fish chemosensory field in confirming earlier information obtained electrophysiologically on amino acid sensitivity of the other fishes. Accomplishment of behavioral evaluation for stimulatory chemicals obtained from electrophysiological investigations could provide valuable insights and speculations into the difference and similarity of the effectiveness between results from both experimental procedures. Then, definitive statements concerning the correlations of both behavioral and physiological results should be made after accumulation of such data in numerous other species. If not so, our objectives will be misled to out of the truth. Thus, further experiments are required to determine if the gustatory sense is involved primarily in eliciting feeding behavior. Details concerning the role of gustation in feeding behavior should be referred to other reviews^{85,87}.

TABLE II. POTENT AMINO ACIDS DETERMINED BY ELECTROPHYSIOLOGY AND BEHAVIOR.

Species	Electrophysiology	Feeding Behavior
1. Channel catfish (<i>Ictalurus punctatus</i>)	Ala, Arg, Pro ^a	Arg, CysH, Met ^b
2. Eel (<i>Anguilla japonica</i>)	Arg, Gly, Ala, ^c Pro	Arg, Ala, Gly ^d
3. Puffer (<i>Fugu pardalis</i>)	Gly, Pro, Bet, ^e Ala	Pro, Bet, Ala, ^f Gly
4. Rainbow trout (<i>Salmo gairdneri</i>)	Pro, Hyp, Leu, ^g Ala	(Tyr, Phe & His) ^h or (Tyr, Phe & Lys)
5. Sea bream (<i>Chrysophrys major</i>)	Ala, Gly, Arg, ⁱ Ser	Ala, Gly, Ser ^j

a. Caprio, 1975(40) e. Hidaka et al., 1976(61) i. Goh & Tamura, 1980(2)
b. Holland & Teeter, 1981(47) f. Hidaka et al., 1978(50) j. Goh & Tamura, 1980(41)
c. Yoshii et al., 1979(44) g. Marui et al., 1983(43)
d. Hashimoto et al., 1968(84) h. Adron & Mackie, 1978(58)

VI. GENERAL DISCUSSION

The objectives of our research are to obtain the critical information needed for describing how taste quality and quantity are represented in the peripheral nerves and to know how these neural inputs are processed in the taste centers of the brain. However, due to the complexity and time-consuming nature of these objectives, it has the advantage of improving the efficiency of the taste research that specific aims should be focused on some organisms specializing gustatory systems. Then the general meaning of the results obtained is to be drawn for our better understandings of the research. On the other hand, there is another difficulty in making rapid progress of the taste physiology. Differing from the other senses like vision or audition, no continuum of the stimulant for the chemical senses is found, which throws us into confusion. The significant parameters of the stimulus in the chemical senses are not understood yet, although a certain parameter is confirmed in the other senses like wavelength in the visual sense. Nevertheless, it is quite possible to come to considerable understanding of the neural message without knowledge about the significant aspects of the taste stimulus.

Indeed it appears to be many difficulties in the field of chemical senses, but specific advantages for using fishes as the appropriate model for the taste research include :

- (1) In certain fishes such as catfishes, the quantity and distribution of taste buds have increased and facially innervated extraoral taste buds are found on lips, head, barbels, fins, and flank^{(2), (67)}.
- (2) Peripheral taste neurons are easily separated into small bundles in which highly responsive and durable individual taste fibers can be easily isolated and studied electrophysiologically.
- (3) In the taste system of fish, amino acids are known to be highly stimulatory and behaviorally relevant compounds.
- (4) Since the gustatory brainstem nuclei and other higher taste centers are specialized and consequently enlarged, electrophysiological investigations are readily accessible.
- (5) Somatotopic and overlapping taste-tactile neural maps of the external body surface (facial taste system) and oro-pharyngeal regions (glossopharyngeal-vagal taste system) onto medullary taste nuclei are known

are an aid in quickly defining chemosensory receptive fields.

Teleosts are probably the best developed of all vertebrates for detecting chemicals in their surroundings, using at least three different chemosensory systems (olfaction, gustation and the common chemical sense). They can identify chemical compounds in their environment with such chemosensory systems. At present, gustation is thought to have a close relationship to fish feeding behavior, the relative importance of olfaction may primarily be related to conspecific chemical communication concerning social behavior, and the common chemical sense detects the presence and location of various chemicals like noxious substances.

Problems concerning processing of the taste information in the central nervous system are as follows:

- (1) What is a pathway for reflex movements of the lips, barbels, tongue, jaws, gills and pharynx in response to gustatory stimulation ?
- (2) How does the taste pathway come into relation with the most complex reflexes of which the fish is capable ?
- (3) What are the roles of different cell types⁹²⁾ of gustatory nuclei ?
- (4) How are connections among gustatory nuclei constructed anatomically and functionally ?
- (5) How does the tactile information via the trigeminus play a role with the gustatory one via the facialis in feeding behavior ?

Thus, experiments should be planned at first to answer following questions concerning the processing of amino acid taste information across peripheral, medullary, pontine, thalamic and telencephalic levels of neural organization.

- (1) Do taste sensitive neurons that respond with highest frequency to certain amino acids belong to distinct classes at each synaptic level ?
- (2) Is taste input to taste nuclei of the brain modified by synaptic processing ? If so, how ?
- (3) How prevalent are bimodal (taste and tactile) units at all synaptic levels ? Is there evidence for taste-tactile interaction ?
- (4) Is there evidence for taste vs the other senses interaction in these taste pathway?

These experimental protocols are to be performed with both neuroanatomical and neurophysiological techniques, which might provide the basic concepts of the neural structures on taste pathways and processing of taste information in vertebrates including man.

REFERENCES

- 1) Caprio, J. : Electrophysiological distinctions between the taste and smell of amino acids in catfish. *Nature* 266, 850-851, 1977.
- 2) Goh, Y. and Tamura, T. : Olfactory and gustatory responses to amino acids in two marine teleosts-red sea bream and mullet. *Comp. Biochem. Physiol. [c]* 66, 217-224, 1980.
- 3) Marui, T., Harada, S. and Kasahara, Y. : Gustatory specificity for amino acids in the facial taste system of the carp, *Cyprinus carpio* L., *J. Comp. Physiol.* 153 [A], 299-308, 1983.
- 4) Bardach, J. E. and Case, J. : Sensory capabilities of the modified fins of Squirrel hake (*Urophycis chus*) and Searobin (*Prionotus carolinus* and *P. evolvance*). *Copeia* 2, 194-206, 1965.
- 5) Bardach, J. E., Todd, J. H. and Crickmer, R. : Orientation by taste in fish of genus *Ictalurus*. *Science* 155, 1276-1278, 1967.
- 6) Caprio, J. : Olfaction and taste in the channel catfish : an electrophysiological study of the responses to amino acids and derivatives. *J. Comp. Physiol.* 123 [A], 357-371, 1978.
- 7) Evance, H. M. : A comparative study of the brains in British cyprinoids in relation to their habits of feeding, with special reference to the anatomy of the medulla oblongata. *Proc. Roy. Soc. B.* 108, 233-257, 1931.

- 8) Bhimachar, B. S.: A study of correlation between the feeding habits and the structure of the hind brain in the South Indian Cyprinoid fishes. Proc. Roy. Soc. B. 117, 258-272, 1935.
- 9) Sato, M.: A comparative observation of the hind-brains of fishes, in relation to their feeding habits. (1). Bull. Jap. J. Fish. 15, 557-560, 1950.
- 10) Uchihashi, K.: Ecological study of the Japanese teleosts in relation to the brain morphology. Bull. Jap. Sea Reg. Fish. Res. Lab. 2, 1-166, 1953.
- 11) Shimamura, H.: A study on the comparative anatomy of the valvula cerebelli in Japanese teleosts. Bull. Jap. Sea Reg. Fish. Res. Lab. 12, 1-218, 1963.
- 12) Atema, J.: Structures and functions of the sense of taste in the catfish. Brain Behav. Evol. 4, 273-294.
- 13) Bardach, J. E., Arbor, A. and Atema, J.: Chap. 14, The sense of taste in fishes. In ; Handbook of Sensory Physiology, Vol. 4; Chemical Senses, Taste, L. M. Beidler, Ed. 295-336, Springer, New York, 1971.
- 14) Edwards, L. F.: Origin of taste buds in the oro-pharyngeal cavity of the carp. Ohio J. Sci. 30, 385-397, 1930.
- 15) Iwai, T.: A comparative study of the taste buds in gill rakers and gill arches of teleostean fishes. Bull. Misaki Mar. Biol., Kyoto University 7, 19-34, 1964.
- 16) Kawakita, K., Marui, T. and Funakoshi, M.: Scanning electron microscopic observations on the taste buds of the carp (*Cyprinus carpio* L.). Jap. J. Oral Biol. 20, 103-113, 1978.
- 17) Landacre, F. L.: On the place of origin and method of distribution of taste buds in *Ameiurus melas*. J. Comp. Psychol. 17, 1-66, 1907.
- 18) Kiyohara, S, Yamashita, S, and Kitoh, J.: Distribution of taste buds on the lips and inside the mouth in the minnow, *Pseudorasbora parva*. Physiol. Behav. 24, 1143-1147, 1980.
- 19) Scharrer, E., Smith, S. W. and Palay, S. L.: Chemical sense and taste in fishes, *Prionotus* and *Trichonogaster*. J. Comp. Neurol. 68, 183-198, 1947.
- 20) Ariens-Kappers, C. U., Huber, G. C. and Crosby, E. C.: The comparative Anatomy of the Central Nervous System of Vertebrates, including Man. Hanfer, 353-362, New York, 1960.
- 21) Herrick, C. J.: An attempt to define the primitive functional divisions of the central nervous system. J. Comp. Neurol. 12, 87-106, 1902.
- 22) Herrick, C. J.: The doctrine of nerve components and some of its applications. J. Comp. Neurol. 14, 301-312, 1904.
- 23) Herrick, C. J.: The central gustatory paths in the brains of bony fishes. J. Comp. Neurol. 15, 375-456, 1905.
- 24) Luiten, P. G. M.: The central projections of the trigeminal, facial and anterior lateral line nerves in the carp (*Cyprinus carpio* L.). J. Comp. Neurol. 160, 399-418, 1975.
- 25) Finger, T. E.: Gustatory pathways in the bullhead catfish. I. Connections of the anterior ganglion. J. Comp. Neurol. 165, 513-526, 1976.
- 26) Finger, T. E.: Gustatory pathways in the bullhead catfish. II. Facial lobe connections. J. Comp. Neurol. 180, 691-706, 1978.
- 27) Morita, Y., Ito, H. and Masai, H.: Central gustatory paths in the crucian carp, *Carassius carassius*. J. Comp. Neurol. 191, 119-132, 1980.
- 28) Morita, Y., Murakami, T. and Ito, H.: Cytoarchitecture and topographic projections of the gustatory centers in a teleost, *Carassius carassius*. J. Comp. Neurol. 218, 378-394, 1983.
- 29) Finger, T. E. and Morita, Y.: Two gustatory systems: Facial and vagal gustatory nuclei have different brainstem connections. Science 227, 776-778, 1985.
- 30) Morita, Y. and Finger, T. E.: Reflex connections of the facial and vagal gustatory systems in the brainstem of the bullhead catfish, *Ictalurus nebulosus*. J. Comp. Neurol. 231, 547-558, 1985.
- 31) Norgren, R. and Leonard, C. M.: Taste pathways in rat brainstem. Science 173, 1136-1139, 1971.
- 32) Norgren, R. and Pfaffman, C.: The pontine taste area in the rat. Brain Res. 91, 99-117, 1975.

- 33) Yamamoto, T., Matsuo, R. and Kawamura, Y.: The pontine taste area in the rabbit. *Neurosci. Letter* 16, 5-9, 1980.
- 34) Marui, T.: Taste responses in the facial lobe of the carp, *Cyprinus carpio* L.. *Brain Res.* 130, 287-298, 1977.
- 35) Marui, T. and Caprio, J.: Electrophysiological evidence for the topographic arrangement of taste and tactile neurons in the facial lobe of the channel catfish. *Brain Res.* 231, 185-190, 1982.
- 36) Marui, T. and Funakoshi, M.: Tactile input to the facial lobe of the carp, *Cyprinus carpio* L.. *Brain Res.* 177, 479-488, 1979.
- 37) Biedenbach, M. A.: Functional properties and projection areas of cutaneous receptors in catfish. *J. Comp. Physiol.* 84, 227-250, 1973.
- 38) Kanwal, J. S. and Caprio, J.: Topographic arrangement and response properties of gustatory neurons in the vagal lobe of the catfish. *Assoc. Chemorecept. Sci.*, V. Abstr. #69, 1984.
- 39) Vasilevskaya, N. E. and Polykova, N. N.: On central mechanisms of taste in fishes. *Chem. Senses Flav.* 2, 503-514, 1977.
- 40) Caprio, J.: High sensitivity of catfish taste receptors to amino acids. *Comp. Biochem. Physiol.* 52[A], 247-251, 1975.
- 41) Goh, Y. and Tamura, T.: Effect of amino acids on the feeding behavior in red sea bream. *Comp. Biochem. Physiol.* 66 [C], 225-229, 1980.
- 42) Kiyohara, S., Yamashita, S. and Harada, S.: High sensitivity of minnow gustatory receptors to amino acids. *Physiol. Behav.* 26, 1103-1108, 1981.
- 43) Marui, T., Evans, R. E., Zielinsky, B. and Hara, T. J.: Gustatory responses of the rainbow trout (*Salmo gairdneri*) palate to amino acids and derivatives. *J. Comp. Physiol.* 153 [A], 423-433, 1983.
- 44) Yoshii, K., Kamo, N., Kurihara, K. and Kobatake, Y.: Gustatory responses of eel palatine receptors to amino acids and carboxylic acids. *J. Gen. Physiol.* 74, 301-317, 1979.
- 45) Cagan, R. H.: Biochemical studies of taste sensation. VII. Enhancement of taste stimulus binding to catfish taste receptor preparation by prior exposure to the stimulus. *J. Neurobiol.* 10, 207-220, 1979.
- 46) Cagan, R. H.: Chap. 10, Recognition of taste stimuli at the initial binding interaction, In: *Biochemistry of Taste and Olfaction*, R. H. Cagan and M. R. Kare, Eds., 175-203, New York, Academic Press, 1981.
- 47) Holland, K. N. and Teeter, J. H.: Behavioral and cardiac reflex assays of the chemosensory acuity of channel catfish to amino acids. *Physiol. Behav.* 27, 699-707, 1981.
- 48) Johnsen, P. B. and Teeter, J. H.: Spatial gradient detection of chemical cues by catfish. *J. Comp. Physiol.* 140, 95-99, 1980.
- 49) Stewart, A. B., Bryant, B. and Atema, J.: Behavioral evidence for two populations of amino acid receptors in catfish taste. *Biol. Bull.* 157, 396, 1979.
- 50) Hidaka, I., Ohsugi, T. and Kubomatsu, T.: Taste receptor stimulation and feeding behavior in the puffer, *Fugu pardalis*. I. Effects of single chemicals. *Chem. Senses Flav.* 3, 341-354, 1978.
- 51) Fulton, C.: Proline control of the feeding reaction of *Cordylophora*. *J. Gen. Physiol.* 46, 823-837, 1963.
- 52) Goldrich, N. R.: Behavioral responses of *Phormia regina* (Meigen) to labellar stimulation with amino acids. *J. Gen. Physiol.* 61, 74-88, 1973.
- 53) Thomas, J. D., Assefa, B., Cowley, C. and Ofosu-Barko, J.: Behavioral responses to amino acids and related compounds, including propionic acid, by adult *Biomphalaria glabrata* (Say), a snail host of *Schistosoma mansoni*. *Comp. Biochem. Physiol.* 66 [C], 17-27, 1980.
- 54) Derby, C. D. and Atema, J.: Narrow-spectrum chemoreceptor cells in the walking legs of the lobster, *Homarus americanus*: Taste specialists. *J. Comp. Physiol.* 146 [A], 181-189, 1982.
- 55) Hatt, H.: Structural requirements of amino acids and related compounds for stimulation of receptors in crayfish walking leg. *J. Comp. Physiol.* 155 [A], 219-231, 1984.

- 56) Hoagland, H.: Specific nerve impulses from gustatory and tactile receptors in catfish. *J. Gen. Physiol.* 16, 685-693, 1933.
- 57) Marui, T., Harada, S. and Kasahara, Y.: Chap. C, Multiplicity of taste receptor mechanisms for amino acids in the carp, *Cyprinus carpio* L., In; Umami Taste Physiology of its Taste-, Y. Kawamura and M. R. Kare, Eds., in press, Marcel Dekker Inc., New York.
- 58) Adron, J. W. and Mackie, A. M.: Studies on the chemical nature of feeding stimulants for rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson. *J. Fish. Biol.* 12, 303-310, 1978.
- 59) Carr, W. E. S.: Chemoreception and feeding behavior in the pigfish, *Orthopristis chrysopterus*: characterization and identification of stimulatory substances in a shrimp extract. *Comp. Biochem. Physiol.* 55 [A], 153-157, 1976.
- 60) Carr, W. E. S. and Chaney, T. B.: Chemical stimulation of feeding behavior in the pinfish, *Lagodon rhomboides*: Characterization and identification of stimulatory substances extracted from shrimp. *Comp. Biochem. Physiol.* 54 [A], 437-441, 1976.
- 61) Hidaka, I., Nyu, and Kiyohara, S.: Gustatory response in the puffer. IV. Effects of mixtures of amino acids and betaine. *Bull. Fac. Fish. Mie Univ.* 3, 17-28, 1976.
- 62) Herrick, C. J.: On the centers for taste and touch in the medulla oblongata of fishes. *J. Comp. Neurol.* 16, 403-439, 1906.
- 63) Peterson, R. H.: Tactile responses of the goldfish (*Carassius auratus* L.) facial lobe. *Copeia* 4, 816-819, 1972.
- 64) Kanwal, J. S. and Caprio, J.: Sensory maps of the oropharyngeal region in the vagal lobe of the catfish are diffuse and overlapping. (in preparation.)
- 65) Marui, T.: Taste responses in the superior secondary gustatory nucleus of the carp, *Cyprinus carpio* L., *Brain Res.* 217, 59-68, 1981.
- 66) Barnard, J. W.: A phylogenetic study of visceral afferent areas associated with the facial, glossopharyngeal, and vagus nerves, and their fiber connections: the afferent facial nucleus. *J. Comp. Neurol.* 65, 503-602, 1936.
- 67) Herrick, C. J.: The cranial nerves and cutaneous sense organs of the North American siluroid fishes. *J. Comp. Neurol.* 11, 177-245, 1901.
- 68) Herrick, C. J.: The fasciculus solitarius and its connections in the amphibians and fishes. *J. Comp. Neurol.* 81, 307-331, 1944.
- 69) Konishi, J. and Zotterman, Y.: Taste functions in the carp. *Acta Physiol. Scand.* 52, 150-161, 1961.
- 70) Sutterlin, A. M. and Sutterlin, N.: Taste responses in Atlantic salmon (*Salmo salar*) parr. *J. Fish. Res. Board Can.* 27, 1927-1942, 1970.
- 71) Funakoshi, M., Kawakita, K. and Marui, T.: Taste responses in the facial nerve of the carp, *Cyprinus carpio* L. *Jpn. J. Physiol.* 31, 381-390, 1981.
- 72) Fujiya, M. and Bardach, J. E.: A comparison between the external taste sense of marine and freshwater fishes. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.* 32, 45-56, 1966.
- 73) Biedenbach, M. A.: Functional properties of barbel mechanoreceptors in catfish. *Brain Res.* 27, 360-364, 1971.
- 74) Konishi, J., Uchida, M. and Mori, Y.: Gustatory fibers in the sea catfish. *Jpn. J. Physiol.* 16, 194-204, 1966.
- 75) Johnstone, J. B.: An attempt to define the primitive functional divisions of the central nervous system. *J. Comp. Neurol.* 12, 87-106, 1902.
- 76) Kiyohara, S., Hidaka, I. and Tamura, T.: The anterior cranial gustatory pathway in fish. *Experientia (Basel)* 31, 1051-1053, 1975.
- 77) Kamrin, R. P. and Singer, M.: Influence of sensory neurons isolated from on maintenance of taste buds regeneration of barbels in the catfish, *Ameiurus nebulosus*. *Amer. J. Physiol.* 174, 146-148, 1953.
- 78) Herrick, C. J.: Cranial and first spinal nerves on menidia: A contribution upon the nerve components of the bony fishes. *J. Comp. Neurol.* 9, 153-455, 1899.
- 79) Herrick, C. J.: The doctrine of nerve components and some of its applications. *J. Comp. Neurol.* 14, 301-312, 1904.

- 80) Kiyohara, S., Houman, H., Yamashita, S., Caprio, J. and Marui, T.: Morphological evidence for a direct projection of the trigeminal nerve fibers to the primary gustatory center in the sea catfish, *Plotosus anguillaris*. (in preparation.)
- 81) Woodburne, A.: A phylogenetic consideration of the primary and secondary centers and connections of the trigeminal complex in a series of vertebrates. *J. Comp. Neurol.* 65, 403-503, 1936.
- 82) Torvic, A.: Afferent connections to the sensory trigeminal nuclei, the nucleus of the solitary tract and adjacent structure. *J. Comp. Neurol.* 106, 51-141, 1956.
- 83) Kerr, F. W. E.: Structural relation of the trigeminal spinal tract to upper cervical roots and the solitary nucleus in the cat. *Exp. Neurol.* 4, 134-148, 1962.
- 84) Hashimoto, Y., Konosu, S., Fusetani, N. and Nose, T.: Attractants for eels in the extracts of short-necked clam - I. Survey of constituents eliciting feeding behavior by the omission test, *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.* 34, 78-83, 1968.
- 85) Hidaka, I.: Chap. 13, Taste receptor stimulation and feeding behavior in the puffer. In ; *Chemoreception in Fishes*, T. J. Hara, Ed. 243-258. Elsevier, 1982.
- 86) Carr, W. E. S.: Chap. 14, Chemical stimulation of feeding behavior. In ; *Chemoreception in Fishes*, T. J. Hara, Ed. 259-274, Elsevier, 1982.
- 87) Mackie, A. M.: Chap. 15, Identification of the gustatory feeding stimulants. In ; *Chemoreception in Fishes*, T. J. Hara, Ed. 275-292, Elsevier, 1982.
- 88) Suzuki, N and Tucker, D.: Amino acids as olfactory stimuli in freshwater catfish, *Ictalurus catus* (L). *Comp. Biochem. Physiol.* 40 [A], 399-404, 1971.
- 89) Hara, T. J.: Olfaction in fish. In ; *Progress in Neurobiology*, Vol. 5, G. A. Kerkut and J. W. Phillis, Eds. 271-335, Pergamon Press, Oxford, 1975.
- 90) Caprio, J. and Byrd, R. P.: Electrophysiological evidence for acidic, basic and neutral amino acid olfactory receptor sites in the catfish. *J. Gen. Physiol.* 84, 403-422, 1984.
- 91) Goh, Y. and Tamura, T.: The electrical responses of the olfactory tract to amino acids in carp. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.* 44, 341-344, 1978.
- 92) Finger, T. E.: Gustatory system in teleost fish. In ; *Fish Neurobiology*, Vol. I. Brainstem and Sense Organs., R. G. Northcutt and R. E Davis, Eds. 285-309, Univ. Michigan Press, Ann Arbor, 1983.

深部象牙質う蝕と細菌

長岡成孝・劉宏志

鹿児島大学歯学部歯科保存学第一講座

Deep dentinal caries and microorganisms

Shigetaka Nagaoka, Hong-Jih Liu

Department of Operative Dentistry and Endodontology,
Kagoshima University Dental School, Kagoshima 890, Japan

Abstract

Compared to our understanding of coronal plaque, less is known about the microbiology and the biochemistry of deep dentinal caries. It seems to be very important to clarify the bacteria at the advancing front of the caries process and the pulpal effect of the bacterial components. This study was designed to assess the ability of the oral microorganisms to induce dentinal caries by using *in vitro* system. In essence, the results of this study suggest that *Lactobacillus casei* strain PSR 3002, *Streptococcus mutans* strain 6715, and clinically isolated strain *L. casei* have capacity to invade into the exposed dentinal tubules. This ingrowth capacity, however, seemed to be mild in this experimental system. Therefore, future research will be taken to assess the bacterial ingrowth capacity for long incubation time.

Key words

deep dentinal caries, bacteria, dentinal tubules, dental pulp

I. はじめに

近年、う蝕の病因論に関する基礎的研究が急速に進展したために、う蝕の初発に関与する細菌の実態については、かなり多くのことが明らかになってきた。しかし、う蝕病変の最前線に位置し、その進行や増悪に大きな役割を果たしていると思われる細菌の種類や性

状については、まだ不明な点が数多く残されている。

これまでの報告によると、*Lactobacillus*, *Streptococcus* および *Actinomyces* に属する各菌種や、多くの未同定のグラム陽性桿菌などが、深部う蝕象牙質から検出されている。なかでも、もっとも高い比率で検出されて

いるのは *Lactobacillus* である。たとえば Edwardsson¹¹ の報告では、被検歯の約1/3から *Lactobacillus* が分離同定されているが、これに比べて *Streptococcus* や *Actinomyces* の検出率は著しく低く1割にも満たない。一方、歯冠部のプラーク中からは、これとは逆に *Streptococcus* が高率に検出され、*Lactobacillus* や *Actinomyces* は非常に低い比率でしか検出されない^{2,3)} ことがわかっている。したがって細菌叢のこのような構成からみても、深部う蝕象牙質内は、歯冠部のプラーク中とは生理的にかなり異なった環境下にあり、ここでは *Streptococcus* 以外の菌種が、う蝕の進行に重要なかわりを有している可能性が大きい。

象牙質う蝕も、それに継発しておこる歯髄炎も、ともに細菌のもつ病原因子によって引き起こされることは、すでに周知の事実である。しかし、その発症のメカニズムについては未解決な点も多い。われわれはこれまで約3年間、象牙質う蝕発症から歯髄炎発症にいたる一連の過程を解析するために、いくつかの基礎的研究を行ってきた⁴⁻⁸⁾。そこで本稿では、そのあらましについて述べ、あわせて内外で行われているこの方面の研究の現況について紹介する。

II. 深部う蝕象牙質内の細菌叢

象牙質う蝕の進行・増悪のメカニズムを知るためには、まずう蝕の最前線、すなわち象牙質う蝕の最深部における細菌叢の実態を調べる必要がある。前述した Edwardsson¹¹ は、象牙質う蝕を有する被検歯 (46本) を抜去後、その病変部を嫌気条件下で歯髄腔の方向から表層に向けて順に採取し培養した。この方法によれば、最初に培養成績が陽性になった部位が、う蝕病変の最深部ということになる。この部位における細菌叢の分離・同定の結果を Table 1 に示した。*Lactobacillus* が被検歯の約1/3に見出されてもっとも優勢である。ついでグラム陽性の嫌気性桿菌および糸状菌として *Arachnia*, *Bifidobacterium*, *Eubacterium*, *Propionibacterium*, および *Actinomyces* が検出されている。*Rothia* や *Bacillus* 属も検出されているが、これらはいずれも1%にも満たない。グラム陽性の球菌である *Streptococcus* 属の出現率はここでは低く、本菌が歯冠部のプラーク中に占める比率とは著しく異なっている。この結果は、う蝕象牙質の最深部が、耐酸性を有するある種の嫌気性菌が優位に生育しうる特殊な環境下にあることをよく示唆するものだといえよう。事実、その後行われたいくつかの研究でも、これとほぼ同様の

Table 1 Organisms isolated from deep dental caries

Organisms	Mean	Range
Gram positive anaerobic rods	44	0-100
<i>Arachnia</i> sp.	12	
<i>Bifidobacterium</i> sp.	9	
<i>Eubacterium</i> sp.	9	
<i>Propionibacterium</i> sp.	11	
Gram positive facultative anaerobic rods	38	0-100
<i>Actinomyces</i> sp.	5	
<i>Lactobacillus</i> sp.	33	
Gram positive anaerobic cocci	7	0-100
<i>Streptococcus</i> sp.	7	
Gram positive facultative anaerobic cocci	6	0-100
<i>Streptococcus</i> sp.	6	

(Modified from Edwardsson, S.: Bacteriological studies on deep areas of carious dentine. Odontol. Revy 25 : Suppl. 32, 1-143, 1974)

結果が示されている^{9,10)}。そのほか採取方法は異なるが、*Lactobacillus* をう蝕象牙質内におけるもっとも優勢な菌種としてあげている報告^{11,12)} がいくつかみられる。われわれも、数例のヒトの深部う蝕象牙質内から *Lactobacillus casei* や *Streptococcus mutans* などいくつかの菌種を分離・同定した。

いずれにせよ、このように深部う蝕象牙質内の細菌叢が、歯表面のそれとかなり異なって嫌気性菌が優位を占めていることがしだいに明らかになってきた。したがって今後は、現在よりもはるかに多くのヒト集団を対象とした研究が、一定の試料採取方法と培養方法をもとに行われる必要があろう。これまでの報告ではこれらの条件はほとんど統一されていない。そのデータが豊富になるにしたがって、深部う蝕象牙質内における細菌叢の実態も、さらにはう蝕の進行過程におけるいわゆる pioneer bacteria の同定も、今よりもずっと明確になってくるものと思われる。歯周疾患の病因論をめぐる研究動向は、すでにそういった方向へ大きく転回し、多くのすぐれた成果を生み出しているからである。

III. *in vitro* における象牙質う蝕の誘発

周知のように現在では、う蝕病因論のなかで *Streptococcus mutans* がう蝕原性細菌として占める位置は決定的である。一方、これに比べて、*Lactobacillus* がう

蝕の初発に關与する役割は非常に小さいとする意見が多い¹³⁾。しかし、これまでの深部う蝕象牙質内における検出結果でみる限り、象牙質う蝕の進行に際して *Lactobacillus* が果たす役割は、必ずしも小さくはないと思われる。

そこでわれわれは、多数の口腔常在菌のなかから、この *Lactobacillus* を含むいくつかの菌種を選び、それらの象牙質う蝕誘発能の有無を、人工的に露出させた象牙細管内への各細菌の侵入能という面にしぼり、形態学的、生化学的に調べることにした。まず最初に行ったのは被検菌株がどのような条件下でもっともよく細管内へ侵入しうるか、また脱灰能を強めうるかを調べるための実験である。

A. 試料 (dentin block) の作成法

試料には矯正学的理由で抜歯されたヒトの健全な幼若小白歯を用いた。これらの歯を、Fig. 1 に示したような形態に歯根を切断し歯髄を除去したのち、パラフィンワックスでこの部分を封鎖した。ついで歯冠の全周にわたって象牙質に達するノッチを入れ、このノッチに沿って歯を切断して象牙細管の横断面を露出させた。なお、これらの操作はすべて無菌的に行った。

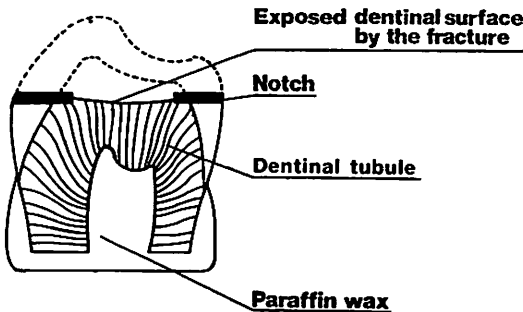


Fig. 1 Schematic representation of dentin block

B. 培養条件

A. に述べた方法で作成した dentin block を滅菌したのち、チオグリコート培地中で前培養して、blockの無菌状態が保たれていることを確認した。ついで、これらの無菌 dentin block をB. H. I. ブロースに入れ、そのなかに被検菌株を代表して前述の *L. casei* の臨床分離株を接種した。培養は21日間、37℃

Table 2 Culture conditions of dentin block associated with clinically isolated strain of *L. casei*

Experimental Group	0.5% Sucrose	Exchange of culture medium	Aerobic(☆) or Anaerobic(★)
A	+	+	☆
B	+	-	☆
C	+	+	★
D	+	-	★
E	-	+	☆
F	-	-	☆
G	-	+	★
H	-	-	★

で行ったが、このときTable 2 に示したような組み合わせで計8通りの実験群を設けた。実験期間中、各群について培地中の pH の経時的な変動を測定し、培養条件の違いによってその値に違いが生ずるかどうかを調べた。また培養終了(21日)後には、走査型電顕(SEM)と顕微鏡で細管内への菌の侵入の有無や脱灰の程度などを観察した。

その結果、培地にスクロースを加えた実験(A~D)群の平均最終 pH は約4.3、加えなかった(E~H)群の平均値は約5.2で、培地交換(3日ごとに半量ずつ交換)の有無や好気培養であるかどうかの条件は、培地中の pH の低下にまったく影響を及ぼさないことがわかった(Table 3)。これは培地にスクロースを加えることによって、細菌の代謝過程におけるエネルギー源としての糖の量が増えたためと考えられる。形態学

Table 3 Degree of decalcification and bacterial invasion of dentin block

Experimental Group	Decalcification	Bacterial invasion	Final pH of Culture broth
A	+	+	4.27
B	+	-	4.24
C	++	+	4.30
D	++	-	4.25
E	+	+	5.19
F	+	-	5.15
G	+	+	5.21
H	+	-	5.26

的所見では、脱灰はすべての実験群で種々の程度で認められた。また細管内への菌の侵入は、一定の間隔で栄養成分が補給される培地交換（A, C, E, G）群ではすべてに認められたが、非交換（B, D, F, H）群では非常におこりにくいようであった（Fig. 2, Table 3）。

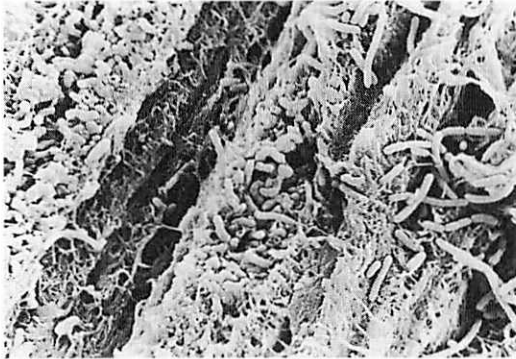


Fig. 2 SEM of the longitudinally fractured tubules. Clinically isolated strain of *L. casei* are present in the dentinal tubules: experimental group; C. ×5,440.

したがって以上の結果から、この実験系におけるおおまかな至適培養条件はつかめたと考えられたので、ついで下記に述べるような実験にうつった。すなわち、*Lactobacillus casei* の標準株である PSR3002 株（以下 *L. casei* PSR 3002 と略）と、代表的な口腔細菌の標準株である *Streptococcus mutans* 6715 株（以下 *S. mutans* 6715 と略）および *Staphylococcus aureus* 209P 株（以下 *S. aureus* 209P と略）、さらにさきの *L. casei* の臨床分離株を用いて、これらの菌株の象牙質う蝕誘発能の有無を形態学的、生化学的に調べた。培養はさきの実験で示唆されたことから21日間、37℃、嫌気条件（10% CO₂, 10% H₂, 80% N₂）下で行い、培養終了時まで3日ごとに培地の一部をグラム染色して純培養であることを確認した。またこのとき同時に培地の pH を測定し、そのあと、その半量ずつを新鮮な培地と交換した。培養終了（21日）後、培地から dentin block を取り出し、通法により SEM および光顕用の標本を作製した。以下に本実験でえられた結果を示す。

C. 各種細菌の酸産生能

Fig. 3 は、使用した各菌株間における酸産生能の

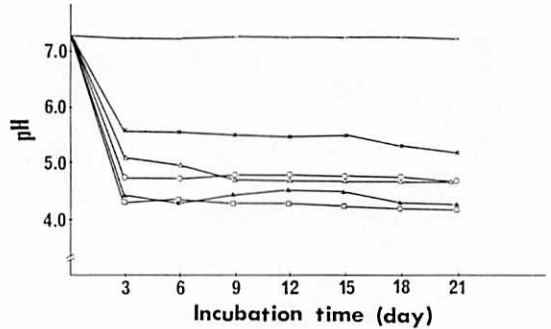


Fig. 3 pH changes of culture broth associated with the growth of organisms in dentin block : △-△, *L. casei* PSR 3002; ▲-▲, *L. casei* (clinically isolated strain); □-□, *S. mutans* 6715; ○-○, *A. viscosus* ATCC 19246; ×-×, *S. aureus* 209 P; ·-·, control.

違いを、培地中の pH の変化を経時的に測定することによって調べたものである。用いた5種の菌株のうちでは *S. mutans* 6715 と *L. casei* 臨床分離株の pH がもっとも低く、その最終値は約4.3であった。ついで *L. casei* PSR 3002 と *A. viscosus* ATCC 19246 が約4.7を示し、*S. aureus* 209P は約5.3であった。この値は菌に脱灰がおこる際の臨界 pH 5.5 に非常に近接した値といえる。

なおこのような現象は、各菌株間における酸産生能の違いを、各培地中に溶出したCa量の差として調べた場合にも認められた。すなわち各 dentin block の単位面積 (cm²) 当たりのCa溶出量は、*L. casei* PSR 3002 や *S. mutans* 6715 などを接種した群が *S. aureus* 209P 接種群よりも多く、約2倍量に達していた。

したがって以上のことから、われわれの用いたこの実験系のなかで、培地中に投入されたおのおのの dentin block は、同時に接種された種々の細菌（この場合とくに *L. casei* PSR 3002 や *S. mutans* 6715 など）の産生する酸によって徐々に脱灰されていったことがあらためて確認できたわけである。以下その所見を SEM 写真によって述べる。

D. 象牙細管内への細菌侵入

ここでは代表例として、最初に *L. casei* PSR 3002 接種例の所見をあげる。まず Fig. 4 で示したように、接種された *L. casei* PSR 3002 は、脱灰されて管周象牙質の大部分が消失した露出象牙質面の細管開口部が

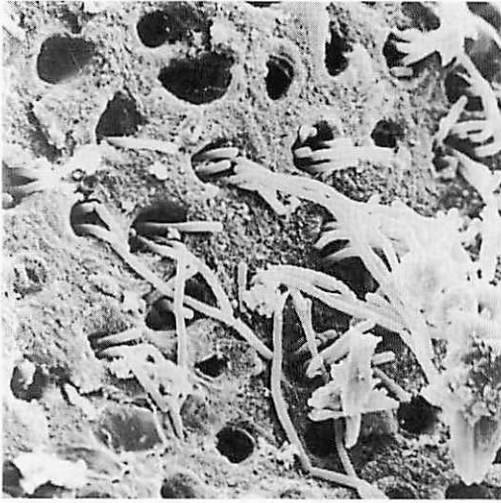


Fig. 4 SEM of the exposed dentinal surface. *L. casei* strain PSR 3002 are invading into the dentinal tubules. Peritubular dentins are partially dissolved. $\times 5,700$

ら、細管内部へ大量に侵入しているのが観察された。さらにこれを縦断標本でみてみると、これらの細菌群は、周囲の細管壁を溶解しながらしだいに深部へ増殖、侵入をつづけていた (Fig. 5)。このときの細菌の侵入度はもっとも深い部位で約200 μ であった。なお、これとほぼ同様の所見は、*L. casei* 臨床分離株と *S. mutans* 6715 接種群でも認められたが、いずれの侵入度ともまだ低く、各菌株間にくに優劣はないようであった (Fig. 6, 7)。

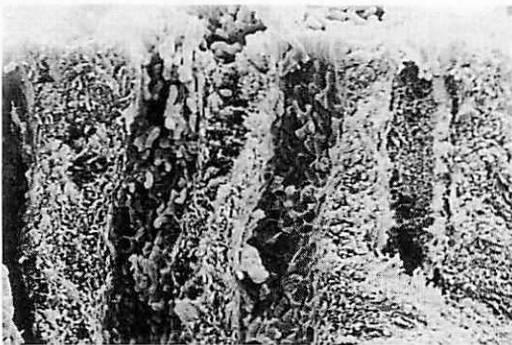


Fig. 5 SEM of the longitudinally fractured dentinal tubules with ingrowing *L. casei* strain PSR 3002. Destruction caused by bacterial products is present in the peritubular and intertubular dentin. $\times 5,440$



Fig. 6 SEM of longitudinally fractured dentinal tubules with ingrowing *S. mutans* strain 6715. The fibrillar structure of the intertubular dentin is visible. $\times 5,440$

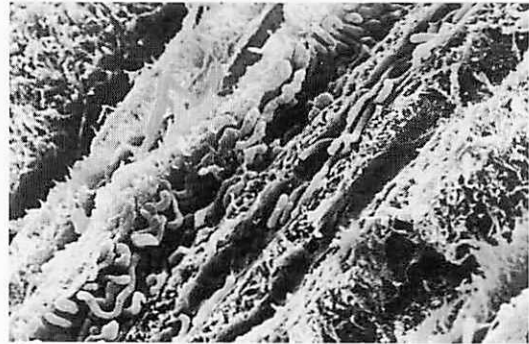


Fig. 7 SEM of the longitudinally fractured dentinal tubules. Clinically isolated strain of *L. casei* are also invading the tubules. $\times 5,440$

以上のように、われわれはこれまでに *in vitro* の実験系を用いて、象牙質う蝕誘発に関するいくつかの基礎的知見をうることができた。しかしこれまでにえられたデータでは、いずれの菌株の象牙細管内への侵入率、侵入距離とも非常に低値だったため、各菌株間におけるう蝕誘発能の強弱を判定するまでにはいたらなかった。この原因としては、生体内で咀嚼時などに通常生じている hydrostatic pressure¹⁴⁻¹⁶⁾ が、本実験のような *in vitro* の条件下ではまったく生じていないことなどもあげられよう。そこでこの問題を解決する方法として、最近、簡単な長期 (90日) 培養実験を行ってみたところ、用いた *S. mutans* 6715 と *L. casei* PSR 3002 の両菌株とも、短期 (21日) 培養例に比べ著しい細管侵入能を示すことがわかった (Fig. 8)。したがって現在は、この長期培養システ

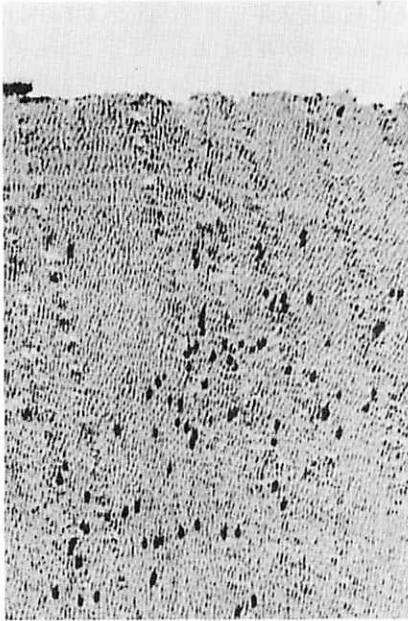


Fig. 8 Invasion into dentinal tubules of *L. casei* strain PSR 3002 after ninety days inoculation. $\times 300$

ムを用いて象牙質う蝕進行過程の解析をすすめている。

IV. 歯髄の生・死と細菌侵入

Ⅲ. で述べた実験方法は、*in vitro* の条件下で各細菌間の象牙細管内への侵入能を比較検討することを主な目的として設定したため、細菌に侵入される側の象牙細管内部の解剖学的問題についてはとくに考慮をばらわなかった。しかし実際の生体内における象牙細管内部には、象牙芽細胞突起やコラーゲン細繊維、dental fluid などが存在して、それぞれが多彩な機能を営んでいる。また加齢や各種刺激に対する生理的諸変化も、そこでは当然おこっていると考えられる。したがって歯髄に生じた種々の変化は、象牙細管を通じてこれらの構成々分にも、さまざまな影響を及ぼしていることが十分予想される。

これまで一般に、歯髄が生活機能を営んでいる生活歯(有髄歯)では、象牙細管内部に象牙芽細胞の突起などが存在し、さらに歯髄側からは一定の圧でdental fluid が流入しているために、これらを欠いた失活歯(無髄歯)よりも、露出象牙質表面から細管内部への細菌の侵入程度は劣るとされてきた^{14), 15), 17), 18)}。しかし一方では、歯髄側からつねに栄養成分が供給されるた

め、生活歯のほうが失活歯よりも細菌は細管のより深部まで侵入するという報告¹⁹⁾²⁰⁾もある。

そこでわれわれは、さきの *in vitro* の実験と併行して、補綴学的に不要と診断されたヒトの健全な永久歯(8 | 8)を用いて、歯髄の生死が以後の象牙質う蝕の進行の程度(露出象牙質表面から細管内部への細菌の侵入の程度)にどのような影響を及ぼすかを組織学的に調べてみた。実験にあたっては、まず被験歯(8 | 8)のいずれか一方を抜髄、根管充填して失活歯とし、未処理の反対側同名歯とともに口蓋側歯面に、象牙質に達する5級窩洞を形成した(Fig. 9)。ついて仮封をしないまま一定期間(短期例として30日間、長期例として150日間)放置後、これらの被験歯を抜歯し、窩洞形成後の露出象牙質表面から細管内部への細菌侵入の程度、象牙質基質の変化の状態などを、光顕およびSEMで観察した。なお細管内部への細菌侵入率は、細菌染色(Brown-Brenn染色)を行った連続切片のうち、細菌がもっとも深部まで侵入した標本と、その前

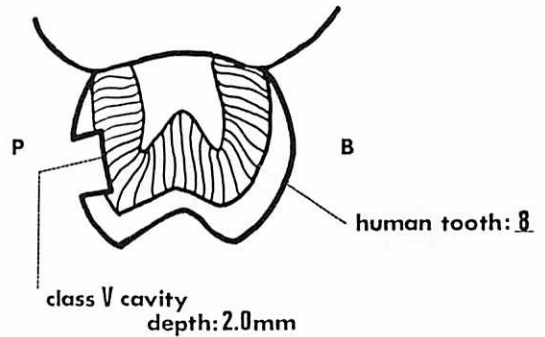


Fig. 9 Schematic illustration of the method of dentin exposure: P, palatal side; B, buccal side.

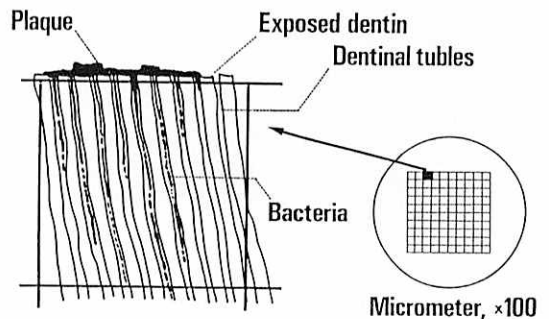


Fig.10 Schematic illustration of the method used to measure the degree of bacterial invasion.

後各10枚目の標本, 計3枚を接眼マイクロメーターを装着した顕微鏡($\times 100$)下で観察し, えられた数値をもとに算定した(Fig. 10)。その結果をまとめたものが Fig. 11である。短期例では生活歯群(Fig. 12), 失活

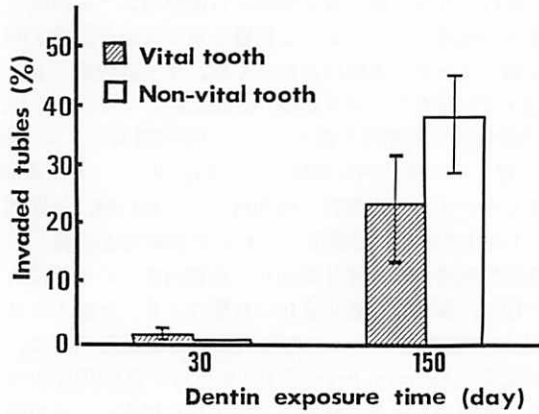


Fig. 11 Degree of bacterial invasion into the exposed dentinal tubules.

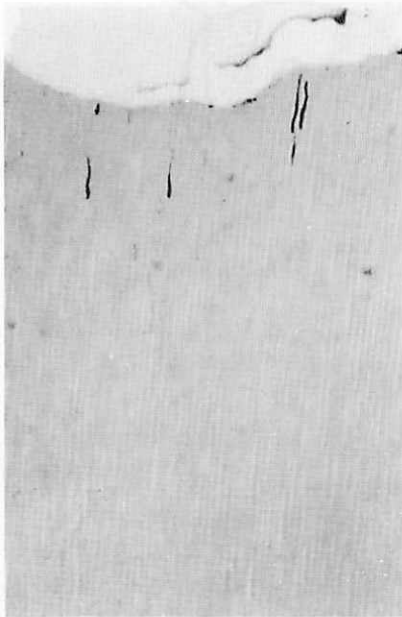


Fig. 12 Vital tooth cavity, exposed for 30 days. Bacteria are present only in a few tubules. Percentage of invaded tubules; 1.1%, Brown & Brenn stain. $\times 300$.

歯群ともに細菌侵入率は非常に低く(約1.0%), 両群間にはほとんど差がみられなかった。しかし長期例になると, 失活歯群(Fig. 13, 14)の方が生活歯群に比べ有意(危険率 0.1%以下)に高い細菌侵入率(38.5%対 23.5%)を示し, なかには侵入距離が約1.4mmの深さに及んでいる例もあった(Fig. 13)。

このように, われわれは今回行った実験結果から, 歯髄の生死は象牙質う蝕の進行に大きな影響を及ぼしうること, そして失活歯のう蝕進行速度は生活歯に比べ著しく促進される傾向にあるという知見を与えることができた。この原因としては, 歯髄が失活すると, それにともなって細管内部の象牙芽細胞突起が変性, 収縮し, さらに免疫成分や抗菌性物質を含んだ dentinal fluid が消失することなどがあげられよう。

象牙細管内への細菌侵入度を左右する重要な因子のひとつである象牙芽細胞突起が, 象牙細管のどの部位にまで分布しているかという問題は, 象牙質の痛覚の面からも多くの研究者の関心をよんでいる問題であるが, 現在もなお明らかな決着はついていない²¹⁻²³。塩酸・コラゲナーゼ法の利用はこの問題を解明するう

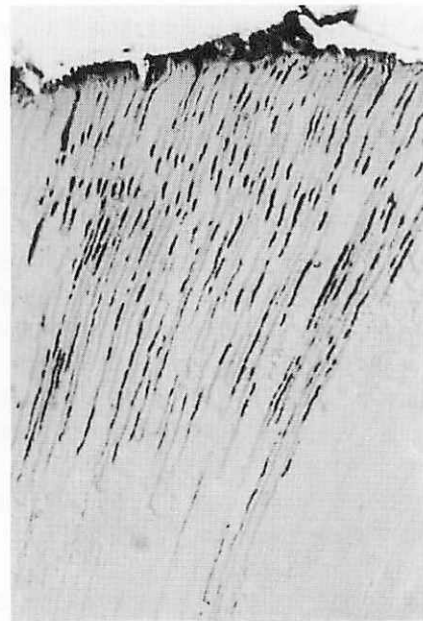


Fig. 13 Non-vital tooth cavity, exposed for 150 days. Bacteria are unevenly distributed over the surface, and chains of bacteria are present in many of the tubules at various levels. Percentage of invaded tubules; 39.0%, Brown & Brenn stain. $\times 300$.



Fig.14 SEM of the non-vital tooth cavity, exposed for 150 days. Bacteria of coccal type and many rods invading the tubules. $\times 5,440$.

えでも、またわれわれの目的とする生活歯における象牙芽細胞突起と細菌侵入との関係を明らかにするうえでも有用な手法となる可能性がある。

V. おわりに

象牙質う蝕の発症・進行から歯髄炎発症にいたる一連の動的過程を解析するために、これまでわれわれが行ってきた研究の概要について述べてきた。われわれ自身が行った実験結果を軸に話をすすめすぎたために、他の多くの論文の内容についてはほとんど紹介することができなかった。

実験にさいし、われわれが現在までに用いてきた菌種は *L. casei*, *S. mutans* などわずか数種にすぎず、しかも *in vitro* という限られた条件下で、個々の菌を別個に切り離してその生物学的諸性状のごく一部を調べたにすぎない。しかし、もとより生体内の口腔細菌叢はきわめて複雑であり、しかもそこではたえず細菌相互の拮抗作用や遷移現象が生じている。単感染ではつよい蝕原性を発揮する菌も、他の菌種とのかかわり合いのなかでそのままのう蝕原性を示すかどうかは必ずしも明らかでない²⁴⁾。現にわれわれが行ったラットにおけるう蝕誘発実験でも、*S. mutans* 6715は *L. casei*

PSR 3002とともに混合感染させると、*S. mutans* 単独で感染させた場合よりも、う蝕原性を弱めることを示唆する所見をえている。したがって今後は、このような細菌間の相互作用の解析も *in vitro* および *in vivo* の両面からすすめていく必要がある。このとき、酵素抗体法をはじめとする免疫組織化学的手法はきわめて有用な手法になりうると思われる。(本稿に記した研究の経費の一部は文部省科学研究費補助金 No. 58570801, 58771348, 59771413, 60771591によるものである 記して謝意を表する。)

引用文献

- 1) Edwardsson, S.: Bacteriological studies on deep areas of carious dentin. *Odontol. Revy*, 25 (Suppl. 32) 1-143, 1974
- 2) Gibbons, R. J.: Bacteriology of dental caries. *J. Dent. Res.* 43, 1021-1028, 1964
- 3) Ducin, S. & J. Van Houte.: Relationship of *Streptococcus mutans* and *lactobacilli* to incipient smooth surface dental caries in man. *Arch. Oral Biol.* 23, 779-786, 1978
- 4) 劉宏志, 鬼ヶ原左知子, 長岡成孝, 川越昌宜: *In vitro* における象牙質う蝕の誘発 (1), 日歯保誌, 26, 643, 1983 (抄)
- 5) 鬼ヶ原左知子, 劉宏志, 西岡慎一, 長岡成孝, 川越昌宜: *In vitro* における象牙質う蝕の誘発 (2), 日歯保誌, 27, 256-257, 1984 (抄)
- 6) 渡辺敦子, 劉宏志, 鬼ヶ原左知子, 塚田洋子, 長岡成孝, 川越昌宜: *In vitro* における象牙質う蝕の誘発 (3), 日歯保誌, 27, 700, 1984 (抄)
- 7) 劉宏志, 塚田洋子, 渡辺敦子, 古村左知子, 西岡慎一, 宮崎洋一, 北見真一, 諏訪素子, 長岡成孝, 川越昌宜: 実験う蝕における *Streptococcus mutans* と *Lactobacillus casei* の相互作用, 日歯保誌, 28, 287-288, 1985 (抄)
- 8) 宮崎洋一, 諏訪素子, 北見真一, 竹下敦子, 塚田洋子, 劉宏志, 長岡成孝, 川越昌宜: 歯髄の生・死が象牙質う蝕の進行に及ぼす影響, 日歯保誌, 28, 1136-1137, 1985 (抄)
- 9) McKay, G. S.: The histology and microbiology of acute occlusal dentine lesions in human permanent molar teeth, *Arch. Oral Biol.* 21, 51-58, 1976
- 10) Hoshino, E.: Predominant obligate anaerobes in human carious dentin, *J. Dent. Res.* 64, 1195-1198, 1985

- 11) Shovlin, F. E., & Gillis, R. E.: Biochemical and antigenic studies of *Lactobacilli* isolated from deep dental caries: I. Biochemical aspects, J. Dent. Res. 356-360, 1969
- 12) Loeshe, W. J. & Syed, S. A.: The predominant cultivable flora of carious plaque and dentine, Caries Res. 7, 201-216, 1973
- 13) 大嶋隆: 実験動物のおけるう蝕の誘発; う蝕と歯周病—研究の進歩— 2, 初版, 浜田茂幸編, 1-29, 日本歯科評論社, 東京, 1982
- 14) Olgart, L., Brannstrom, M. & Johnson, G.: Invasion of bacteria into dentinal tubules; Experiments *in vivo* and *in vitro*, Acta Odontol. Scand. 32, 61-70, 1973
- 15) Michelich, V. J., Schluster, G. S. & Pashley, D. H.: Bacterial penetration of human dentin *in vitro*, J. Dent. Res. 59, 1398-1403, 1980
- 16) Trowbridge, H. O.: Chap.10, Pulp histology and physiology., In: Pathways of the pulp, 3rd Ed., Cohen, S. & Burns, R. C. Ed. 323-378, C. V. Mosby, St. Louis, 1984
- 17) Michelich, V., Pashley, D. H. & Whiford, G. M.: Dentine permeability; A comparison of functional versus anatomical tubular radii, J. Dent. Res. 57, 1019-1024, 1978
- 18) Chirside, I. M.: Bacterial invasion of non-vital dentin, J. Dent. Res. 40, 134-140, 1961
- 19) Brown, L. R., Wachtel, L. W. & Whiford, G. M.: Diffusion of niacin through extracted human teeth and its effect on bacterial penetration into dentin. J. Dent. Res. 41, 684-694, 1962
- 20) Wachtel, L. W. & Brown, L. R.: *In vitro* caries; Factors influencing the shape of the developing lesion, Arch. Oral Biol. 8, 99-107, 1963
- 21) Gunji, T. & Kobayashi, S.: Distribution and organization of odontoblast processes in human dentin, Arch. Histol. Jap. 46, 213-219, 1983
- 22) Thomas, H. F. & Carella, P.: Correlation of scanning and transmission electron microscopy of human dentinal tubules, Arch. Oral Biol. 29, 641-646, 1984
- 23) Sigal, M. J., Pitaru, S., Aubin, J. E. & Ten Cate, A. R.: A combined scanning electron microscopy and immunofluorescence study demonstrating that the odontoblast process extends to the dentinoenamel junction in human teeth, Anat. Rec. 210, 453-462, 1984
- 24) Michalek, S. M., Hirasawa, M., Kiyono, H., Ochiai, K. & McGhee, J. R.: Oral ecology and virulence of *Lactobacillus casei* and *Streptococcus mutans* in gnotobiotic rats, Infect. Immun, 33, 690-696, 1981

編 集 後 記

紀要第6巻をお届けします。

本号からは投稿規定を設け、本文欄外に著者名と見出しを印刷するなど少し変更を加えてみました。毎号雑記の体裁が変わるのは好ましいことではありませんが、紀要は創刊以来日も浅く、学術誌として成長の過程にあるわけですから何卒ご容赦願いたいと思います。

内容もこれにふさわしく三人の若手の助教授の方々に執筆を依頼しました。生理の丸井助教授は本記として始めて英文の総説を寄稿されました。これからも学部の皆様のご協力を得て言語、内容ともに国内は勿論、国際的にも批判に堪える紀要に成長させたいというのが、編集委員の心からの願いであります。

(清水)

昭和 61 年 3 月 10 日 印刷

昭和 61 年 3 月 17 日 発行

発行所

鹿児島大学歯学部 代表 浦郷篤史

鹿児島市宇宿町1208-1

印刷所 (有)朝日印刷

鹿児島市上荒田町854-1

