

令和 2 年 6 月 8 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K11540

研究課題名(和文) 齲蝕予防・治療を目的としたpH・カルシウム蛍光イメージングによる齲蝕モデルの構築

研究課題名(英文) Developing the model using pH/calcium fluorescent imaging for prevention and treatment of dental caries

研究代表者

真柳 弦 (MAYANAGI, Gen)

東北大学・歯学研究科・助教

研究者番号：10451600

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：口腔を模した微小環境下で、材料および歯面と細菌のインターフェイスにおけるpH変化を連続的に測定する方法を構築した。その結果、フッ素徐放性歯科修復材料やフッ化ジアンミン銀を塗布した歯面は、インターフェイスのpH低下を有意に抑制することが明らかとなった。さらに、pH測定後の細菌中から検出されたフッ素や銀の量が多いほど、材料によるpH低下抑制が大きくなったことから、pH低下の抑制効果は材料から放出されたフッ素や銀によるものと考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の成果は、歯面や歯根面の詳細な脱灰メカニズムの解明に寄与するものであり、齲蝕の予防・治療に効果のある歯科材料・食品・薬剤等の評価や開発に応用が可能なことに加えて、より精度の高い齲蝕の基礎研究・臨床研究への展開が期待できる。

研究成果の概要(英文)：This study aimed to develop the methods to assess pH change at the interface between material or tooth and bacteria continuously under the same kind of conditions as an oral microenvironment in vitro. The fluoride releasing materials and the silver diamine fluoride coated tooth inhibited pH fall at the interface between material/tooth and bacteria. The degree of inhibition of pH fall seemed to correspond to the amounts of fluoride and silver detected, suggesting that the fluoride and silver released from these materials inhibited pH fall.

研究分野：口腔生化学、保存修復学、歯周病学

キーワード：細菌 pH カルシウム エナメル質齲蝕 根面齲蝕 フッ化物徐放性歯科材料 インターフェイス

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。

## 1. 研究開始当初の背景

齲蝕発症の直接の原因は、歯面に付着するバイオフィーム中の細菌が、糖を代謝した結果生じる酸により、歯の表面が脱灰されることである。脱灰が生じる場である歯面 - バイオフィームインターフェイスでは、その評価系の確立が困難なことから、これまでの齲蝕モデル研究の多くは、酸溶液のみあるいは脱灰溶液と再石灰化液との組み合わせによる pH サイクリングを代用として行われてきた。しかしながら、これらのモデルは、糖のバイオフィーム内への浸透、細菌が産生した酸のバイオフィーム内への拡散、酸の歯面への到達などの様相や速度が考慮されていないため、バイオフィームが存在する実際の脱灰状況を十分に再現しているとは言い難い。従って、酸溶液による歯質脱灰の様相はバイオフィーム存在下のそれと異なる可能性があると考えられ、バイオフィームを用いた口腔内環境を模した齲蝕モデル系の構築が不可欠である。

バイオフィーム中の齲蝕の原因となる酸、すなわちその指標としての pH を測定する方法は、歯面上の歯垢中に微小 pH 電極を挿入して測定した電極挿入法 (Stephan ら、1940)、微小 pH 電極を義歯に埋め込み、電極上に歯垢を形成させて、pH を測定する電極内蔵法 (Graf ら、1966; Igarashi ら、1981; Chida ら、1986) が知られている。これらの方法は、歯面 - バイオフィームインターフェイスの pH 変化をリアルタイムに測定できるという点で優れているが、厚みのあるバイオフィーム全体の水平的および垂直的な pH 分布をモニターすることは不可能であった。

一方、歯質の脱灰の指標となるカルシウムの検出については、カルシウム結合発色試薬を用いた比色法によるものが主であったが、検出感度や精度がやや低く、短時間の脱灰による微量カルシウムの定量には適していないと考えられる。従って、カルシウム結合蛍光試薬 (Fluo 3) 等を用いて、歯質表面から人工バイオフィーム内に溶出したカルシウムを結合・発色させ、高感度に定量する方法を用いて、歯質表面からバイオフィーム内に溶出したカルシウムを蛍光試薬により経時的に観察する必要がある。

そこで、研究代表者らはバイオフィーム内とくに歯面および材料とバイオフィームのインターフェイスにおいて、脱灰の直接の原因となる pH 変化、さらに脱灰の結果として生じるカルシウムの変化を蛍光試薬により同時に検出し、モニタリングすることを着想した。そして、歯冠エナメル質、根面象牙質の詳細な齲蝕メカニズムの解明、既存あるいは新規の齲蝕予防材料および修復材料の評価・検討を行うための齲蝕モデルの構築を目指して、本研究を行うこととした。

## 2. 研究の目的

歯面に付着するバイオフィーム中の細菌が糖代謝し産生した酸により、歯の表面が脱灰されることで齲蝕が生じる。従って、歯面 - バイオフィームインターフェイスにおいて、脱灰の原因となる酸と脱灰の結果生じるカルシウムを同時にモニタリングすることは、歯の脱灰の様相を解明するために必要である。本研究では、歯面上のバイオフィーム内部の pH およびカルシウムの変化を経時的にイメージングする齲蝕モデル系を構築する。さらに、そのモデル系を用いて、歯冠エナメル質、根面象牙質の詳細な齲蝕メカニズムの解明、既存あるいは新規の齲蝕予防材料および修復材料の評価・検討を行う。

## 3. 研究の方法

### (1) 齲蝕モデル系の構築

齲蝕関連細菌として代表的なミュータンス連鎖球菌 (*Streptococcus mutans* NCTC 10449) をグルコース含有の複合培地 (Trypton-Yeast extract 培地) にて高度嫌気条件下で培養し、2 mM リン酸緩衝液 (PPB、pH 7.0) を用いて集菌・洗菌後に使用した。歯質や材料の表面に人工的に形成したバイオフィーム内の細菌の糖代謝・酸産生中の pH およびカルシウムについて蛍光試薬によるイメージングを蛍光実体顕微鏡あるいは共焦点レーザー顕微鏡を用いて行い、齲蝕モデル系の構築を試みた。バイオフィーム内の細菌の糖代謝・酸産生中の pH モニタリングは、pH 感受性蛍光試薬 (C-SNARF-4) を用いて、また、歯質表面から人工バイオフィーム内に溶出したカルシウムのモニタリングは、カルシウム結合蛍光試薬 (Fluo 3) を用いた。

### (2) フッ素徐放性歯科材料の齲蝕予防効果の検討

*S. mutans* を Trypton-Yeast extract 培地にて高度嫌気条件下で培養し、集菌・洗菌後に人工バイオフィームとし、材料と細菌 (*S. mutans*) のインターフェイスにおける pH 変化を連続的に測定するモデル系を用いて、フッ素徐放性セメントやレジンなどの歯科材料の pH 低下抑制能を評価した。すなわち、実験装置のアクリル製の well (直径 4 mm、深さ 2 mm) の底に材料を固定し、イオン感受性電界効果型トランジスタ微小 pH 電極を材料の直上に設置後、well 内に *S. mutans* を緊密に填入した。その後、*S. mutans* 上に 0.5% グルコース 500  $\mu$ L を滴下し、比較電極を設置し、37 °C のインキュベーター内で 90 分間の pH 変化を連続的に測定した。さらに、pH 測定後に残存したグルコースを除去し、人工バイオフィームを回収し、2 mM PPB (pH 7.0) に懸

濁した。回収した細菌を酢酸ナトリウムと過塩素酸を用いて処理した後、人工バイオフィーム内のフッ素量を、フッ素電極を用いて測定し、フッ素徐放性歯科材料が細菌の糖代謝・酸産生に及ぼす影響について検討した。

### (3) フッ化物塗布歯面の齲蝕予防効果およびその持続性の検討

ウシの中切歯を解剖学的歯頸線付近で切削器具（精密切断機アイソメット LS：新規購入）を用いて歯冠と歯根に切断し、耐水研磨紙を用いてそれぞれに平坦面を作成した。さらに、これらを歯冠エナメル質および根面象牙質の試料とし、2%フッ化ナトリウムまたは38%フッ化ジアンミン銀にそれぞれ10分間浸漬したフッ化物塗布歯面と、浸漬していないもの（コントロール）を準備した。その後、歯面と細菌（*S. mutans*）のインターフェイスにおけるpH変化を連続的に測定するモデル系を用いてフッ化物塗布歯面のpH低下抑制能を評価した。すなわち、実験装置のwellの底に歯面試料を固定し、イオン感受性電界効果型トランジスタ微小pH電極を歯面の直上に設置後、人工バイオフィームとしてwell内に*S. mutans*を緊密に填入した。*S. mutans*上に0.5%グルコース500 $\mu$ Lを滴下し、37 $^{\circ}$ Cのインキュベーター内で120分間のpH変化を測定した。pH測定後に人工バイオフィームを回収し、2mM PPB (pH 7.0) に懸濁した。歯質表面から人工バイオフィーム内に溶出したカルシウムをカルシウム結合蛍光試薬 (Fluo 3) を用いて、結合・発色させ、マイクロプレートリーダーを用いて定量した。さらに、回収した人工バイオフィーム内に含まれるフッ素の量をフッ素電極、銀の量を高周波誘導結合プラズマ質量分析装置 (ICP-MS; 8800) 乳酸の量をラクテート分析装置 (Lactate Pro 2) にてそれぞれ測定した。また、フッ化物塗布後、1週間経過した後の歯面についても、同様の方法により評価を行った。これらの方法により、フッ化物塗布歯面と細菌のインターフェイスにおけるpHのモニタリング、細菌により産生された酸の量、材料から溶出したフッ素および銀の量、歯質表面の脱灰量を評価し、フッ化物塗布歯面のpH低下抑制および脱灰抑制効果とその作用機序について検討した。

## 4. 研究成果

### (1) 齲蝕モデル系の構築

齲蝕関連細菌として代表的な *S. mutans* による人工バイオフィームを用いて、糖代謝中のバイオフィーム内のpH分布をpH感受性蛍光試薬 (C-SNARF-4) により可視化することを目指したが、本研究期間内でバイオフィーム内のpH分布を精度良くモニターする最適な条件設定が困難であることが分かった。そのため、本研究において、pH変化の測定は、歯質あるいは歯科材料と *S. mutans* による人工バイオフィームとのインターフェイスに微小pH電極を設置して、pH変化の測定を行うモデル系を使用することとした。従って、当初計画していた、蛍光試薬を用いたpH変化の可視化は今後の課題となる。

### (2) フッ素徐放性歯科材料の齲蝕予防効果の検討

ガラスアイオノマーセメント、フロアブルコンポジットレジンなどフッ素徐放性の歯科材料では、アクリル板（コントロール）と比べて、細菌の糖代謝・酸産生後のpHは高い値を示した。このことから、フッ素徐放性歯科材料はインターフェイスのpH低下を有意に抑制することが明らかとなった。また、pH測定後に回収した細菌中から検出されたフッ素量が多いほど、材料によるpH低下抑制が大きくなったことから、pH低下の抑制効果は材料から放出されたフッ素によるものと考えられた。

### (3) フッ化物塗布歯面の齲蝕予防効果およびその持続性の検討

フッ化物塗布後の歯面（歯冠エナメル質、根面象牙質）のpH低下抑制、乳酸およびカルシウム溶出量を検討したところ、特にフッ化ジアンミン銀塗布歯面において、細菌の糖代謝により産生される乳酸量の減少、pH低下抑制および溶出カルシウム量の減少が認められた。また、フッ化ナトリウムおよびフッ化ジアンミン銀塗布歯面上の細菌中の銀の量やフッ素の量を測定した結果、フッ化物塗布後の歯面とバイオフィームのインターフェイスにおけるpH低下抑制効果およびカルシウム溶出量の減少が、銀やフッ素の効果であると推察された。さらに、これらフッ化物の効果の持続性についても検討したところ、塗布後1週間で、細菌への代謝抑制効果は減少するものの、歯の表面からのカルシウム溶出量の減少が認められたことから、フッ化物により、歯の耐酸性が増加していることが示唆された。

本研究で確立したモデルにより、口腔を模した微小環境下で、材料とバイオフィームのインターフェイスにおけるpH変化、すなわち細菌が糖代謝により産生する酸および材料から溶出するフッ素や銀によってもたらされる酸産生抑制作用に伴うpH変化をリアルタイムかつ連続的に測定することが可能となった。今後は、本モデルを改良し、pHおよびカルシウムの動態について、蛍光色素を用いたイメージングの再検討を行うとともに、これらのイオンに加えて、材料から溶出するフッ素イオンなども同時にモニタリング可能なマルチイオン測定デバイスの開発を目指

す。本研究で構築されたモデルを基盤として、新たなモデル系が確立されれば、歯冠エナメル質と根面象牙質の詳細な脱灰メカニズムの解明や、齲蝕の予防・治療に効果のある材料・食品・薬剤等の評価・開発へ更なる進展が期待できる。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Ishiguro T, Mayanagi G, Azumi M, Otani H, Fukushima A, Sasaki K, Takahashi N	4. 巻 印刷中
2. 論文標題 Sodium fluoride and silver diamine fluoride-coated tooth surfaces inhibit bacterial acid production at the bacteria/tooth interface.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Dent.	6. 最初と最後の頁 印刷中
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jdent.2018.12.017.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Fukushima Azusa, Mayanagi Gen, Sasaki Keiichi, Takahashi Nobuhiro	4. 巻 62
2. 論文標題 Corrosive effects of fluoride on titanium under artificial biofilm	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J Prosthodont Res.	6. 最初と最後の頁 104～109
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jpor.2017.08.004	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kitagawa Haruaki, Miki-Oka Saeki, Mayanagi Gen, Abiko Yuki, Takahashi Nobuhiro, Imazato Satoshi	4. 巻 70
2. 論文標題 Inhibitory effect of resin composite containing S-PRG filler on Streptococcus mutans glucose metabolism	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J Dent.	6. 最初と最後の頁 92～96
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jdent.2017.12.017	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Mayanagi G, Igarashi K, Washio J, Takahashi N	4. 巻 51
2. 論文標題 pH response and tooth surface solubility at the tooth/bacteria interface	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Caries Research	6. 最初と最後の頁 160-166
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1159/000454781.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計17件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 6件）

1. 発表者名 相原 瞳、涌井杏奈、佐野拓人、河内美帆、鷺尾純平、安彦友希、真柳 弦、 八巻恵子、高橋信博、佐藤拓一
2. 発表標題 ニプルを通して飲んだ際の、ベビー飲料内への口腔細菌の流入
3. 学会等名 第60回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Wakui A, Sano H, Aihara H, Kawachi M, Takahashi A, Washio J, Abiko Y, Mayanagi G, Ishiguro K, Yamaki K, Takahashi N, Sato T
2. 発表標題 Profiling of Microbiota of Baby-Drinks after Drinking with Artificial Nipples.
3. 学会等名 JADR2018/ 66th Japanese Division Meeting (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 鷺尾純平、真柳弦、高橋信博、柳田保子
2. 発表標題 非破壊的超高感度細胞内ATP及びNADH計測マイクロデバイスの開発
3. 学会等名 東京工業大学 科学技術創成研究院 未来産業技術研究所 - 東北大学大学院歯学研究科 包括的研究協力協定にかかる連携シンポジウム
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Sato S, Fukushima A, Mayanagi G, Sasaki K, Takahashi N
2. 発表標題 Electrochemical evaluation of the hydrogen peroxide-and fluoride-induced corrosive property and its recovery on the titanium surface.
3. 学会等名 International Symposium for Multimodal research and Education in IOHS-Liaison 2019. (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名	涌井杏奈, 佐野拓人, 河内美帆, 高橋彩朱伽, 加藤理都, 鷺尾純平, 安彦友希, 石黒和子, 真柳 弦, 高橋信博, 佐藤拓一
2. 発表標題	哺乳瓶用乳首(ニプル)を通して乳児用飲料を飲んだ際の, 口腔からの逆流について
3. 学会等名	第8回口腔保健用機能性食品研究会
4. 発表年	2019年

1. 発表者名	真柳 弦, 高橋信博, 齋藤滉佑, 石原昇, 柳田保子
2. 発表標題	口腔内微小環境マルチイオン測定マイクロデバイスのためのイオン選択膜の作成
3. 学会等名	平成30年度 生体医歯工学研究拠点成果報告会
4. 発表年	2019年

1. 発表者名	真柳弦, 五十嵐公英, 鷺尾純平, 土門ひと美, 高橋信博, 柳田保子, 伊藤浩之, 石原昇, 益一哉
2. 発表標題	スマートデバイスを用いた口腔微小環境マルチイオン測定
3. 学会等名	東工大未来研 - 東北大学歯学研究科 包括的研究協力協定 第5回研究会
4. 発表年	2017年

1. 発表者名	Mayanagi G, Igarashi K, Washio J, Takahashi N
2. 発表標題	pH response and tooth surface solubility at the tooth/bacteria interface
3. 学会等名	The 2nd International Symposium on Biomedical Engineering (国際学会)
4. 発表年	2017年

1. 発表者名	Sano H, Aida A, Vidanapathirana GU, Wakui A, Hirabuki Y, Takenaka Y, Kawachi M, Aihara H, Washio J, Abiko Y, Mayanagi G, Ishiguro K, Yamaki K, Takahashi N, Sato T
2. 発表標題	Microbiota Profiling at the Mouth of Plastic Bottles after Drinking Straight from Bottles
3. 学会等名	International Symposium for Multimodal Research and Education in IOHS-Liaison 2018 -International Symposium for Interface Oral Health Science 2018- (国際学会)
4. 発表年	2018年

1. 発表者名	河内美帆、佐野拓人、涌井杏奈、平吹有香、曾田彩花、竹中佑太、米田茜音、中畑那奈、相原瞳、Vidanapathirana GU、佐藤拓一、鷺尾純平、安彦友希、石黒和子、真柳弦、高橋信博
2. 発表標題	ペットボトルの口の部分に付着する細菌および飲料物中の細菌の量および構成の解析 (第2報)
3. 学会等名	第7回口腔保健用機能性食品研究会・総会
4. 発表年	2018年

1. 発表者名	真柳弦、鷺尾純平、高橋信博、柳田保子、伊藤浩之、石原昇、益一哉
2. 発表標題	細菌-材料インターフェイスにおけるフッ素徐放性材料のpH低下抑制効果の評価および将来への展望
3. 学会等名	平成29年度生体医歯工学共同研究拠点成果報告会
4. 発表年	2018年

1. 発表者名	Fukushima A, Mayanagi G, Sasaki K, Takahashi N
2. 発表標題	Corrosive effects of fluoride on titanium under artificial biofilm of Streptococcus mutans
3. 学会等名	The 11th International Workshop on Biomaterials in Interface Science Innovative Research for Biosis-Abiosis Intelligent Interface Summer Seminar 2016 (国際学会)
4. 発表年	2016年



1. 発表者名 Mayanagi G, Igarashi K, Washio J, Nakajo K, Domon H, Takahashi N
2. 発表標題 Evaluation of pH using an ISFET at the bacteria/restorative materials interface
3. 学会等名 International Symposium on Biomedical Engineering (国際学会)
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 真柳弦、五十嵐公英、鷺尾純平、中條和子、土門ひと美、高橋信博
2. 発表標題 ISFETのう蝕研究への展開
3. 学会等名 第5回生体医歯工学公開セミナー
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 曾田彩花、佐藤拓一、石黒和子、安彦友希、真柳 弦、鷺尾純平、高橋信博
2. 発表標題 ペットボトルの口の部分に付着する細菌の量および構成 (A pilot study)
3. 学会等名 第6回口腔保健用機能性食品研究会・総会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 真柳弦、五十嵐公英、鷺尾純平、中條和子、土門ひと美、高橋信博
2. 発表標題 スマートISFETを用いた口腔微小環境マルチイオン測定
3. 学会等名 東北大歯学研究科 - 東工大未来研学術連携シンポジウム
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 真柳弦、高橋信博、益一哉
2. 発表標題 歯質 - 細菌インターフェイスにおける歯質脱灰の評価
3. 学会等名 平成28年度生体医歯工学共同研究拠点成果報告会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	鷺尾 純平  (WASHIO Jumpei)  (20400260)	東北大学・歯学研究科・講師    (11301)	
研究分担者	高橋 信博  (TAKAHASHI Nobuhiro)  (60183852)	東北大学・歯学研究科・教授    (11301)	
研究分担者	佐藤 拓一  (SATO Takuichi)  (10303132)	新潟大学・医歯学系・教授    (13101)	