

平成22年 5月21日現在

研究種目：若手研究（B）  
 研究期間：2008～2009  
 課題番号：20791649  
 研究課題名（和文） フッ化物齲蝕予防機序に対するバイオフィルムの影響の検討：人工口腔の応用  
 研究課題名（英文） Examination of influence of biofilm on anticariogenic capability by fluoride：application of artificial mouth system  
 研究代表者 鴨田 剛司（KAMODA TAKESHI）  
 日本歯科大学・生命歯学部・助教  
 研究者番号：00366767

研究成果の概要（和文）：齲蝕予防を目的としたフッ化物の応用は、最も効果的で広く普及している予防法である。そのフッ化物の齲蝕抑制機構と、歯に付着するバイオフィルムとしてのプラークや、それを生成する細菌、それを取り巻く環境を考慮するために、ヒト口腔内環境を再現した人工口腔システムを用いて、フッ化物による再石灰化に与えるバイオフィルムの影響を検討した。結果から、本実験系のフッ化物による齲蝕抑制効果の評価法としての有用性を考察した。

研究成果の概要（英文）：Caries prevention with fluoride is the most effective and common method. The purposes of this study were to examine the influence of biofilm on anticariogenic capability by fluoride using culture and artificial mouth systems. This study suggested that experiment may be efficient for *in vitro* screening of the influence of biofilm on anticariogenic capability by fluoride.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・予防歯科学

キーワード：①人工口腔 ②フッ化物 ③再石灰化

## 1. 研究開始当初の背景

齲蝕予防を目的としたフッ化物の応用は、最も効果的かつ広く普及している予防法である。そのフッ化物の齲蝕抑制機構は、フッ化物中のフッ素イオンが歯質に取り込まれ、フルオロアパタイトが形成されて耐酸性を強化し、齲蝕の予防となつた考え方

従来の解釈である。近年、脱灰と再石灰化を繰り返している歯質表面において、プラーク中のフッ化物イオンが、細菌の酸産生を抑制し、再石灰化を促進することにより齲蝕進行を阻止あるいは予防する、とも考えられてきている。

このような齲蝕予防機構の考え方の変化

に伴い、フッ化物の齲蝕予防研究も多数の要因を考慮した研究方法が必要とされている。さらに従来から、齲蝕は、宿主、食餌、細菌、時間などの多要因性の疾患であるといわれる。すなわち、齲蝕の発生が多要因性ならば、フッ化物の齲蝕予防機序の検討においても、口腔内で発生し得る多数の要因を考慮した研究が必要となる。すなわち、歯とその表面に付着するバイオフィームとしてのプラークや、それを生成する細菌、そして、それを取り巻く環境、中でも唾液との関連を考慮し、総合的かつ同時進行で検証する研究が必要である。

これまで、齲蝕予防としてのフッ化物応用に関する研究は *in vitro*, *in vivo* ともに数多くなされてきた。フッ化物の再石灰化効果の検討やフッ化物が口腔内バイオフィームに及ぼす影響などが代表的である。しかしながら、この2つを同時に検討しなければ、お互いの結果を推論で繋ぐだけで、フッ化物の再石灰化・齲蝕予防機序の本当の解明にはなりえない。すなわち、バイオフィームの性状、日齢、唾液の緩衝作用の差などにより、フッ素の取り込みは異なる可能性が高い。また、その物理的性状はフッ化物による再石灰化に大きな影響を与えるであろう。ところが、口腔内バイオフィーム、そしてフッ化物による歯質の再石灰化を *in vitro* で同時にシミュレーションした研究は未だに報告されていない(図1)。

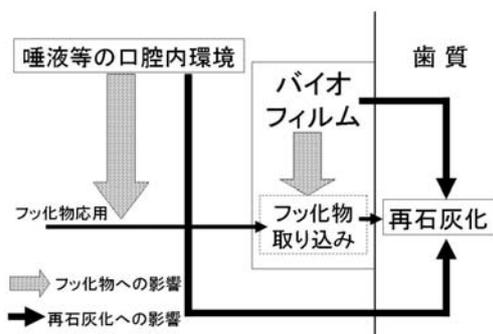


図1 フッ化物による歯質再石灰化の概念図

申請者は、これまでにヒト口腔内環境を再現した人工口腔システムを開発しバイオフィーム形成と齲蝕発生研究を行ってきた。また、新しい代甘味料の齲蝕抑制効果の検討も行い成果を得た(日本口腔衛生学会論文奨励賞受賞)。さらに以上の装置を応用して口臭産生の口腔内環境やバイオフィーム再現し、口臭予防剤の新しい評価方法の確立を目的とした研究も、ほぼ終了した(科学研究費補助金・若手研究(B)(H18~19))。そこで本研究は、人工口腔システムを用い、フッ化物による再石灰化に与えるバイオフィームの影響を検討する。その結果から、フッ化物齲

蝕予防効果に対する新しい評価法を確立すると共に、セルフケア用フッ化物ゲル・歯磨剤・洗口剤などのフッ化物応用方法を科学的に再検証し、最良のフッ化物応用プロトコルを確立する。

## 2. 研究の目的

(1) 研究期間内に何をどこまで明らかにしようとするのか

フッ化物応用における齲蝕予防機序は、口腔内バイオフィームにフッ化物が取り込まれ、脱灰と再石灰化を繰り返している歯質表面に作用し、バイオフィーム中のフッ化物濃度が上昇することで再石灰化が促進する。つまり、バイオフィーム中のフッ化物濃度が歯質再石灰化を左右する。研究の第一段階では、人工口腔システムで人工的にバイオフィームを形成し、フッ化物を適用した後、バイオフィーム中のフッ素濃度を定量することで、フッ化物濃度とバイオフィーム中に取り込まれるフッ素濃度の相関性を検討する。バイオフィーム形成条件を経時的に変化させ、異なる性状のバイオフィームで、逐次フッ化物濃度の検討を行う。第二段階では、バイオフィームをエナメル質上に形成させ脱灰を行い、その後各種フッ化物を作用させ再石灰化を行い、形成されたバイオフィーム直下のエナメル質再石灰化の状況を位相差顕微鏡やEPMAで解析する。このことからバイオフィーム中フッ素濃度とエナメル質の再石灰化度を同時に定量し、適用するフッ化物濃度との相関性を検証する。またバイオフィームを上述のように経時的に変化させ、異なる性状のバイオフィームで逐次、再石灰化の程度・性状の検討を行う。

(2) 当該分野における本研究の学術的な特色・独創的な点及び予想される結果と意義  
本研究で用いる人工口腔システムはこれまでの *in vitro* 試験系とは異なり、人工的に口腔内環境を作り出すという極めて斬新な発想に基づくものである。従来の古典的 *in vitro* 実験では、最初に実験系に加えた buffer の能力を超え恒常性を維持するのは不可能であった。しかし、この人工口腔システムでは、継続的に培地や細菌懸濁液をバイオフィーム上に持続滴下することで、仮想口腔環境を一定に維持するという大きな特徴がある。また今までの再石灰化実験では、再石灰化を行う前処理として歯質を先に脱灰させるが、これまでのよく行われた手法は乳酸などを用いて化学的に脱灰を行ってきた。本研究の人工口腔システムでは齲蝕原性細菌を用い、齲蝕発生の食餌要因ともいえるスクロース溶液を供給し、エナメル質上に人工的にバイオフィームを形成させ、実際にバイオフィームから酸を産生させて生物学的に脱灰を行

う。つまり脱灰・再石灰化の作用機構の上で最も重要である細菌要因が検討できるという大きな利点を持つ。また、緩衝液は人工唾液に相当し、まさにバイオフィーム・歯質が口腔内環境に置かれた状況を同時に on time で再現することが出来る。

このように口腔内環境を作り出し、バイオフィームを形成させ、脱灰を行う。そしてフッ化物を応用させ再石灰化を行う人工環境を本システムは作ることができ、他の研究方法ではまず見られないシステムで、明らかに大きく進歩している。このように本研究は *in vitro* でありながら、極めてヒト口腔内環境に近い状況における検討が行えるため、得られた結果は生体における齲蝕予防メカニズムをよく反映する。

### 3. 研究の方法

人工口腔システムを構築し、人工的にバイオフィームを産生する環境を再現し、フッ化物応用の評価のための *in vitro* システムの構築を行う。

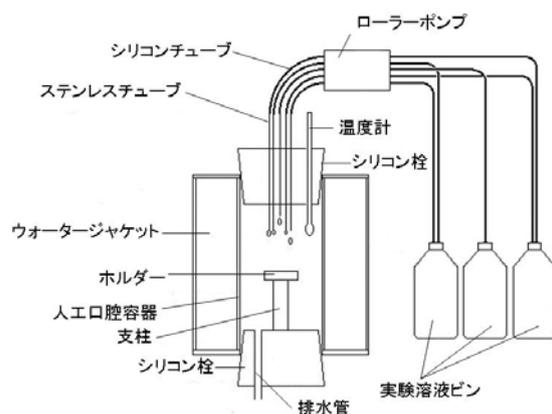


図2 人工口腔システムの模式図

#### (1) 人工口腔システムの作成

人工口腔システムの模式図を図2に示す。人工口腔容器は透明色の塩化ビニールで作製する。周囲をウォータージャケットで取り囲み、恒温槽で温水を循環させ人工口腔内部を37℃に維持する。人工口腔の上部に装着したシリコン栓にはステンレスチューブ、温度計を取り付ける。ステンレスチューブから実験溶液、細菌懸濁液、培地をローラーポンプによって滴下する。細菌懸濁液は冷却攪拌器で低温を維持する(冷却攪拌器を購入)。人工口腔下部のシリコン栓に排水管とテフロン製の支柱を取り付ける。支柱の上にはホルダーを装着する。ホルダーにはヒトエナメル質を固定する。システム全体を嫌気性チャンバーで覆い、内部を嫌気状態にした上で、細菌懸濁液滴下によりバイオフィームを作製し、その後実験溶液(フッ化物溶液)を滴下

する。

#### (2) 使用菌株

菌体には *Streptococcus mutans* MT8148 株を用いる。ブレインハートインフュージョン液体培地にて37℃、16時間培養後、菌数を分光光度計(500nm)で測定し、等張リン酸緩衝液にて濃度を調整(OD=2.0)、細菌懸濁液とする。

#### (3) 評価法

①人工バイオフィーム中のフッ素濃度の測定：滴下終了後、ホルダーからエナメル質上に形成された人工バイオフィームを採取し凍結切片を得て、深度毎のフッ素イオン濃度を、フッ素検出感度がフッ素電極の100倍以上あるフローインジェクション装置(FAU-2100, 大和電子工業, 京都)を用いて、バイオフィーム中の深さ別のフッ素濃度(ppm)を決定する。

②エナメル質の再石灰化の評価：滴下終了後、エナメル質から約100mmの平行切片を作成し、位相差顕微鏡観察やマイクロラジオグラフ撮影後、画像定量法により脱灰深度、ミネラル喪失量を計測する。

#### (4) フッ化物齲蝕抑制効果の検討

各種フッ化物の齲蝕抑制効果の検討を行う。フッ化物としてフッ化物歯面塗布剤(2%フッ化ナトリウム(9000ppmF)、リン酸酸性フッ化ナトリウム(APF)(9000ppmF)、8%フッ化第一スズ(1.9%F))、フッ化物洗口(フッ化ナトリウム溶液0.05%(225ppmF)、0.2%(900ppmF))、フッ化物配合歯磨剤(モノフルオロリン酸ナトリウム(1000ppmF)、フッ化ナトリウム(1000ppmF)、フッ化第一スズ(1000ppmF))をそれぞれ使用する。

評価法：

①人工口腔システムにおける評価。使用菌株、評価法は前年度と同様に行う。

②以上の結果から、本実験系のフッ化物による齲蝕抑制効果の評価法としての有用性を考察する。

### 4. 研究成果

#### (1) 人工口腔システムの作成

人工口腔システムの外観図を図3に示す。人工口腔容器を透明色の塩化ビニールで作製した。人工口腔容器は嫌気チャンバー内に設置した。嫌気チャンバー自体が恒温維持が可能であるため恒温槽なしで人工口腔内部を37℃に維持出来た。人工口腔の上部にはステンレスチューブを装着した。ステンレスチューブから実験溶液、細菌懸濁液、培地をローラーポンプによって滴下した。細菌懸濁液は冷却装置によって低温を維持した。人工口腔下部には排水管とテフロン製の支柱を取り付けた。支柱の上にはホルダーを装着した。ホルダーにはヒトエナメル質を固定した。システム全体を嫌気性チャンバーで覆い、内部

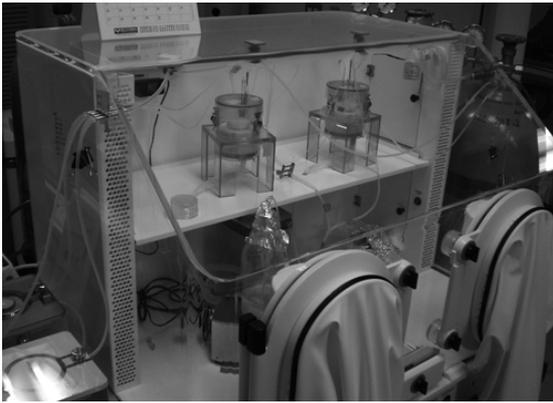


図3 人工口腔システムの外観図

を嫌気状態にした上で、細菌懸濁液滴下によりバイオフィルムを形成させ、その後実験溶液（フッ化物溶液）を滴下した。

(2) 人工バイオフィルムの形成

菌体を保存培地から予備培養後、等張リン酸緩衝液にて濃度を調整（OD=2.0）、細菌懸濁液とした。人工バイオフィルムの形成を引き起こすために、スクロース含有ハートインフュージョン液体培地を細菌懸濁液と共に、人工口腔容器内ホルダー上に連続滴下した。細菌懸濁液滴下後、およそ数時間で人工バイオフィルムの形成が認められ、12時間以降では形成量は約2（ $\mu\text{g}/\text{mm}^2$ ）以上となった。本研究の人工口腔システム上における人工バイオフィルムの形成能が確認された。

(3) フッ化物齲蝕抑制効果の検討

人工口腔システムにおいて人工バイオフィルムを形成後、各種フッ化物を連続的に滴下を行った。形成された人工バイオフィルム中におけるフッ化物濃度は、滴下終了後、ホルダー上に形成された人工バイオフィルムを収集して懸濁し、フッ素イオン電極を用いて計測した。人工バイオフィルム中フッ化物濃度は、人工バイオフィルム形成量によって変化がみられた。人工バイオフィルム中のフッ化物濃度の計測により、本研究のフッ化物応用の評価のための *in vitro* システムの有効性が示唆された。

5. 主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕（計0件）

〔学会発表〕（計0件）

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鴨田 剛司 (KAMODA TAKESHI)

日本歯科大学・生命歯学部・助教