

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 6月15日現在

機関番号：32667

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22792129

研究課題名（和文） 人工口腔システムを用いた高齢者の齲蝕予防研究：歯根面齲蝕発生機序の解明

研究課題名（英文） Examination of anticarious for senior in artificial mouth system : study for mechanism of root carious.

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）：我が国は高齢者の現在歯数が増加傾向による歯根面齲蝕が重要な問題となっている。しかし象牙質齲蝕に始まる特異性のため、その発生・予防に関する詳細な機構は解明されていない。そこで本研究は歯根面に付着するバイオフィームや、それを取り巻く環境を考慮するために、口腔内環境を再現した人工口腔システムを応用し、歯根面齲蝕の発生の機序を考察した。結果から、本実験系による歯根面齲蝕予防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）：Gain population of senior poses a matter of importance of increase of root carious. The purposes of this study were to examine the influence of biofilm on anticarious for senior of root carious using culture and artificial mouth systems. This study suggested that experiment may be efficient for *in vitro* screening to mechanism of root carious.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,500,000	750,000	3,250,000

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歯根面齲蝕

## 1. 研究開始当初の背景

我が国は、高齢者有歯顎者数あるいは高齢者の現在歯数が増加傾向にあるなか、欧米と同様に歯根面齲蝕が重要な問題となっている。しかし歯根面齲蝕は、象牙質齲蝕に始まる特異性のためか、その発生・予防に関する詳細な機構は解明されていない。たとえば歯根面齲蝕窩から分離される細菌種は、通常のエナメル質バイオフィームの菌種とは異なり、歯根面齲蝕の細菌学的発生機序は必ずし

もエナメル質齲蝕と一致しない。しかし現在まで、歯根面齲蝕の細菌学的発生機序でさえ十分には解明されていない。さらに齲蝕予防は宿主、食餌、細菌、時間などの多要因性を考慮しなければならないが、齲蝕の多要因性を考慮した歯根面齲蝕についての科学的研究となると、全く無いに等しい。

一方、訪問診療を含め高齢者保健医療の比重が大きい歯科では、近年、予防が重視されている。そこで、現在の歯科保健医療では、

「今後、高齢者で口腔ケアを含めた予防医療の発展」を大いに考えている。しかし、それを実現するには、根面齲蝕予防における科学的根拠を国あるいは国民に提供する必要がある事実には余り耳目が集まっていない。そこで本研究では、高齢者口腔保健を推進するには、齲蝕の多要因性を考慮した歯根面齲蝕の発生機序の解明が必須と考えた。すなわち、歯根面に発生するバイオフィーム形成機序やその実態、それを構成する細菌、そしてバイオフィームを取り巻く環境、中でも基質や唾液とバイオフィーム、とくに内部チャンネルなどとの関連を考慮しながら、根面齲蝕の多因子を同時進行で検討する必要があると考えた。

研究者は大学院以来一貫して、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、新しい代用甘味料の齲蝕抑制効果の検討も行い成果を得た（平成19年日本口腔衛生学会論文奨励賞）。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を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行った（科学研究費補助金・若手研究（B）（平成18年～19年））。さらにはフッ化物齲蝕予防機序に対するバイオフィームの影響について検討（科学研究費補助金・若手研究（B）（平成20年～21年））も行ってきた。そこで本研究は、歯根面齲蝕の発生機序を齲蝕の多要因性の面から明らかにし予防法開発に寄与することを目的とするとともに、歯根面齲蝕の発生機序に対しての評価法を確立する。

## 2. 研究の目的

象牙質が露出した状態の歯根面は、エナメル質に比べ齲蝕誘発性バイオフィームの堆積により酸による脱灰、すなわち齲蝕が進行すると思われる。そこで研究の第一段階では人工口腔システムにおいて歯根面上に人工的にバイオフィームを形成させ、歯根面上における各種原因菌の齲蝕誘発能を測定、比較を行う。また、細菌種や基質などの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、齲蝕誘発能の検討を行う。第二段階では、歯根面齲蝕予防法の検討のため、種々のバイオフィームに人工唾液を種々の条件下で応用し抗齲蝕作用を再現させ、生理的な齲蝕予防条件を検討する。

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

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。このような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。他の研究方法ではまず見られない画期的なシステムで、明らかに大きく進歩している。そして本研究は *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。

本研究では齲蝕誘発性細菌であるミュータンスレンサ球菌を使用し、口腔内の歯根面上での齲蝕発生のプロセスをより忠実に再現することが可能である。形成されたそれぞれのバイオフィームを比較検討することで、各細菌の歯根面上における齲蝕誘発能をさらに詳しく明らかにすることができる。

歯根面齲蝕については臨床的知見、疫学研究がそのほとんどである現状において、このような人工口腔システムを用いて、口腔内環境を再現した *in vitro* 研究の意義は大きい。本研究の結果により、歯根面齲蝕の発症、そしてその予防に関する有用な知見が得られると考える。

## 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、歯根面齲蝕予防の評価のための *in vitro* システムの構築を行う。さらに人工口腔システム上でバイオフィームを形成させ、種々の条件下で、歯根面齲蝕誘発能、すなわちバイオフィーム形成量、象牙質脱灰度を測定するなどの比較を行う。

### (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1に示す。人工口腔容器は透明色のポリカーボネート樹脂で作製する。周囲を恒温チャンバーで取

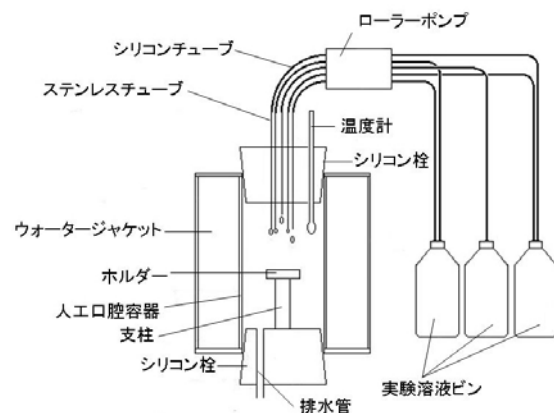


図1 人工口腔システムの模式図

り囲み、人工口腔内部を37℃に維持する。人工口腔の上部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。人工口腔内部にテフロン製ホルダーを装着する。ホルダーにはヒト象牙質を固定する。細菌懸濁液を連続的に滴下してバイオフィームを作製する。

#### (2) 象牙質切片の作製

ヒト抜去歯牙をエポキシ樹脂にて包埋し、ダイヤモンド回転切削器具を用いて歯根面を切り出し、方形な切片とし、耐水ペーパー、ラッピングフィルムを用いて段階的に研磨を行い、平滑な象牙質表面とする。

#### (3) 細菌培養条件

菌体には *Streptococcus mutans* MT8148 株を用いる。Brain heart infusion 細菌液体培地にて37℃、24時間培養後、菌数を分光光度計で測定し、等張リン酸緩衝液にて濃度を調整、細菌懸濁液とする。Heart infusio 液体培地にスクロースを含有させ実験溶液とする。

#### (4) 評価法

滴下終了後、形成された人工バイオフィームを取り外し、濁度を測定して菌体量とする。またビッカース微小硬度計を用いて実験前後の象牙質表面の微小硬度変化を測定する。さらに共焦点レーザー顕微鏡を用いて実験前後の象牙質表面の形状変化を解析する。

以上の結果から、本実験系による歯根面齲蝕発生機序の評価法としての有用性を考察した。

### 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2に示す。人工口腔容器を透明色のポリカーボネート

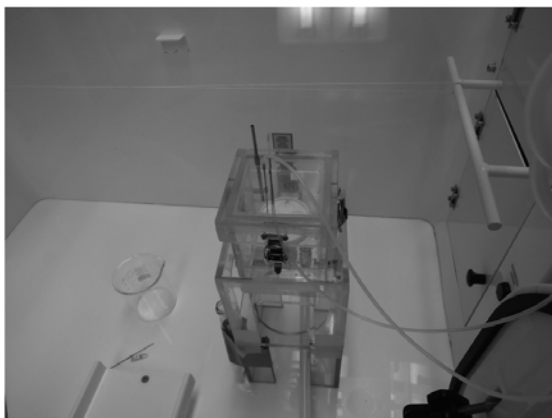


図2 人工口腔システムの外観図

樹脂で作製した。人工口腔容器は周囲を恒温チャンバー内に設置した。恒温チャンバーによって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、液体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。ホルダーにはヒト象牙質を固定した。細菌懸濁液滴下によりバイオフィームを形成させた。

#### (2) 人工バイオフィームの形成

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、細菌懸濁液とした。人工バイオフィー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ームの形成が認められ、24時間以降では形成量は有意に増加した。本研究の人工口腔システムにおける人工バイオフィームの形成能が確認された。

#### (3) 歯根面齲蝕発生機序の検討

人工口腔システムにおいて人工バイオフィームを形成後、ビッカース微小硬度計を用いて実験前後の象牙質表面の微小硬度変化を測定した。実験前後のビッカース微小硬度 (VHN) の変化を図3に示す。実験群の方が対照群と比べ実験前後の微小硬度の変化量

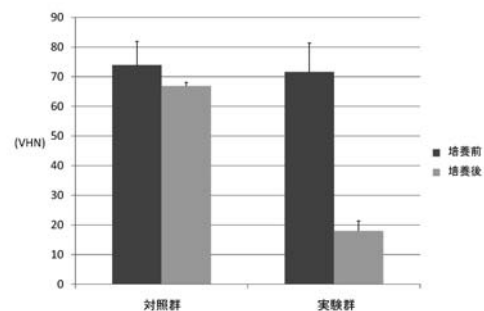


図3 実験前後のビッカース微小硬度 (VHN) の変化

は有意に増加した。人工口腔システムにおいて形成された人工バイオフィームにおいて象牙質の脱灰が認められた。さらに共焦点レーザー顕微鏡を用いて、実験前後の象牙質表面の形状変化を解析した。共焦点レーザー顕微鏡の解析図を図4に示す。形成された人工プラークに曝露された象牙質表面の高度は

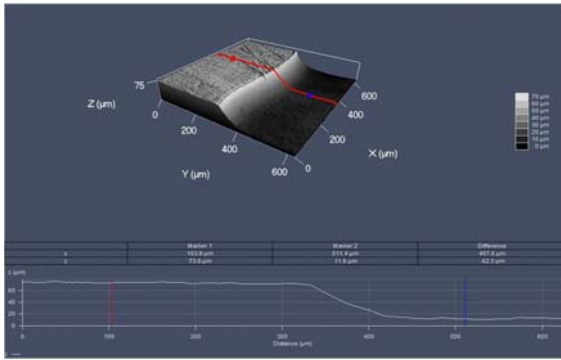


図4 共焦点レーザー顕微鏡の解析図

対照面と比べて有意に減少した。また表面粗さも増加傾向にあった。人工口腔システムにおける象牙質の脱灰状態が確認された。

共焦点レーザー顕微鏡を用いて実験前後の象牙質表面の形状解析を行い、培養作用時間の変化における象牙質表面の高度変化量を測定した。人工口腔システムにおける培養時間と象牙質表面の高度の変化量を図5に示す。48時間培養時の表面の高度変化量は

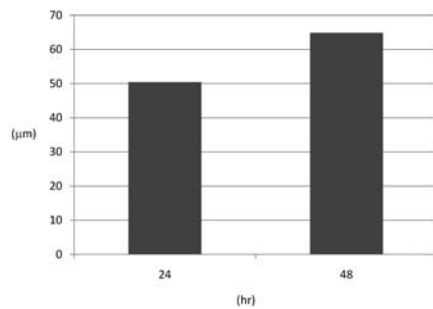


図5 培養時間と表面高度の変化量

24時間培養時の表面の高度変化量と比べて増加傾向であった。人工口腔システムにおいて象牙質の脱灰量は培養時間に伴って変化することが認められた。

以上の結果により、人工口腔システムを用いた本研究の歯根面齲蝕発生機序の評価法としての有用性が示唆された。

#### 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)