

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 22 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592866

研究課題名(和文)新規根面う蝕治療法の基盤となるう蝕原性細菌の動態解析

研究課題名(英文)Kinetic analysis of cariogenic bacteria on root dentin caries

## 研究代表者

大原 直子(OHARA, NAOKO)

岡山大学・医歯(薬)学総合研究科・助教

研究者番号：80301365

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、口腔連鎖球菌やActinomyces属を用い、根面う蝕誘発モデルを作製した。そして、菌種や培養条件の変化に対する象牙細管内への侵入度や象牙細管径の増大率の違いについて解析した。その結果、菌種により集落形成や象牙質侵入、結果として生じる歯根表面の崩壊に相違があることが明らかとなった。さらに、う蝕感染菌がう蝕病態に大きく関わっていることが示された。

研究成果の概要(英文)：In this study, root caries-induced model was constructed in vitro using the oral streptococci or Actinomyces species. With respect to the change of bacterial species and culture conditions, the penetration depth and dentinal tubules diameter into the dentinal tubules in the lesion of root surface caries were analyzed. As the results, it was indicated that the number of colonization and dentin invasion depended on bacterial species. These findings suggest that bacterial infection of root dentin caries are heavily involved in dental caries pathology.

研究分野：歯科保存学

キーワード：根面う蝕 う蝕誘発モデル う蝕細菌

## 1. 研究開始当初の背景

高齢化社会の実現にともない、残存・機能する歯の根面う蝕の増大が危惧されている。根面はその表面が粗造であるなどの理由から多種の細菌が定着しやすいため、多くの菌によりバイオフィーム形成が可能であり、エナメル質表面とは異なる特徴的な細菌叢を示す。患者の唾液分泌量の減少や身体機能の衰えによるプラークコントロールの悪化など予防管理に苦慮する例も多く、根面う蝕の病態解明および治療法の確立は急務である。

これまでに歯冠部(エナメル質)う蝕については、細菌学的アプローチを含め多くの研究がなされ、すぐれた研究結果が多く蓄積されてきたが、根面う蝕に関する研究は、特に細菌学的見地を含め、まだ十分には研究がなされていない。

本研究では、根面う蝕誘発モデルを作製し、根面う蝕原性細菌の動態解析を行うことを目的として計画した。

## 2. 研究の目的

本研究では、まず *in vitro* の系における根面う蝕誘発モデルを作製し、そのう蝕モデルを用いて根面う蝕原性細菌の動態および根面う蝕の進行機構の解析を目的とする。その結果得られた成果を応用し、根面う蝕の治療法開発をめざす。

## 3. 研究の方法

### (1) 根面う蝕誘発モデルの作製

ヒト抜去歯の解剖学的歯頸部に近い歯根象牙質部の平坦面を露出後、中央部(3mm×3mm)を除いた全ての歯面をネイルバーニッシュでコーティング後、24時間ガス滅菌を行い被験歯とした。調整した菌液に被験歯を浸漬し、37℃嫌気条件で反応させて根面う蝕を誘発した。

### (2) 培養条件の検討

歯根象牙質う蝕は、細菌により産生される酸による脱灰とともに、マトリックスメタロプロテアーゼによる有機質の崩壊が病変の進行に関与しているとされている。培地中にスクロースおよびコラゲナーゼを添加することとし、それぞれの添加条件とう蝕誘発の効果の関連性について検討した。

供試菌として口腔連鎖球菌の *Streptococcus mutans* GS-5、*S. mutans* MT8148、*Streptococcus sobrinus*、*Streptococcus salivarius*、*Streptococcus*

*sanguis* を用いた。

う蝕の程度を判定するため、露出根面を垂直に切断し、切断面をう蝕検知液(カリエスチェック、日本歯科薬品)にて染色した後、デジタル顕微鏡(VH-5500、キーエンス)において露出面から歯髄方向へ赤染した距離を計測した。また、スープ硬さおよび反応菌液の pH を測定した。

### (3) *Actinomyces* 属における根面う蝕の誘発および進行

*Actinomyces* 属として、*A. naeslundii* ATCC 12104、*A. viscosus* ATCC 15987、*A. israelii* ATCC 12102 を使用し、歯根象牙質う蝕誘発能を比較した。

(2) で得られた条件にてタイプ IV コラゲナーゼおよびスクロースを添加し、被験歯を 37℃嫌気条件で反応させ、根面う蝕を誘発した。

ホルマリン固定・脱灰後、パラフィン包埋を行い、露出根面に対して垂直に組織切片を作製した。その後、Brown-Brenn 染色を施し、象牙質への細菌侵入を観察、評価した。

## 4. 研究成果

### (1) 培養条件の検討

口腔連鎖球菌培養液への浸漬による歯根象牙質人工う蝕の誘発について検討した結果、う蝕の誘発能は、酸産生能および耐酸性の高い菌種で高く、スクロースおよびコラゲナーゼの添加は人工う蝕の進行に効果的であることが示された。

色素染色によるう蝕の評価を図 1 に示す。*S. mutans* GS-5 群は色素浸透が最も深く、7日目で約 120μm を示した。色素浸透は *S. mutans* MT8148 群、*S. sobrinus* 群、*S. salivarius* 群、*S. sanguis* 群の順に減少傾向を認めた。また、コラゲナーゼの添加にも統計学的な有意差はなかったが、添加の場合に色素浸透が増加する傾向を認めた。

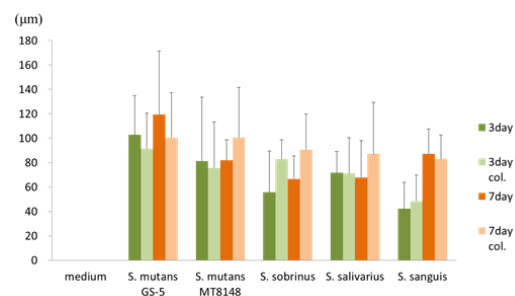


図 1

スクロース濃度の結果を図2に示す。添加が0%の場合にはわずかに色素浸透を認めたのみであったが、1%添加群は、5%あるいは20%添加群と同程度の色素浸透を認めた。統計学的には、添加の有無で有意差が認められ、1%~20%の群間には有意差は認められなかった。

これらのことから、スクロースの添加が細菌の糖代謝を促進したことが推測され、スクロースの添加濃度は1%以上で同様の効果を得ることができる可能性が示された。

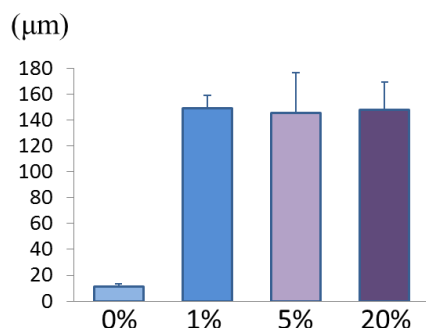


図2

## (2) *Actinomyces* 属による歯根象牙質う蝕形成能

*Actinomyces naeslundii*, *A. israelii*, *A. viscosus* を中心に、歯根象牙質う蝕形成能について検討を行った

*A. naeslundii* と *A. viscosus* は根面う蝕との関連性が示唆されており類似性が強い菌であるが、*A. naeslundii* の方が歯面での集落形成能は低いものの象牙細管への侵入は顕著であり、動向に違いをみせた。(図3、図4)

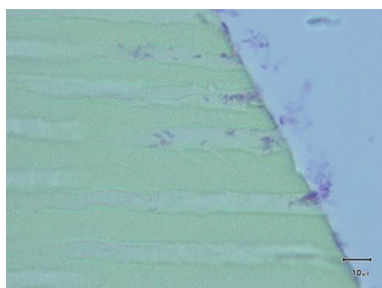


図3. *A. naeslundii* (Brown-Brenn 染色)

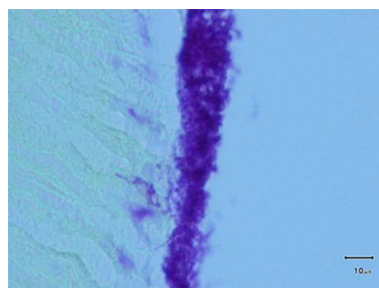


図4. *A. viscosus* (Brown-Brenn 染色)

*A. israelii* は歯面に厚いバイオフィルムを形成していたが、組織切片作製段階で脱離してしまったことより、3菌の中で *A. israelii* の歯面付着能が低いと考えられた。しかし、歯面に最も顕著な凹みを形成し、菌が産生する酸による脱灰あるいは有機成分の分解力は他の菌と比較して強力であることが明らかとなった(図5)。



図5. *A. israelii* (Brown-Brenn 染色)

以上、菌種により象牙質侵入と結果として生じる歯根表面の崩壊に相違があり、根面う蝕感染菌はう蝕病態に大きく関わっている可能性が示唆された。

## 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 3 件)

1. 大原直子、大原直也、田中久美子、山路公造、西谷佳浩、吉山昌宏  
*Actinomyces* 属 3 菌種による歯根象牙質う蝕の誘発  
 日本歯科保存学会 2014 年度春季学術大会  
 2014 年 6 月 19 日~20 日  
 滋賀県立芸術劇場

(滋賀県大津市)

2. 大原 直子、大原 直也、田中 久美子、澁谷 和彦、横山 章人、山路 公造、西谷 佳浩、吉山 昌宏

細菌バイオミネラルリゼーション誘導の試み  
日本歯科保存学会 2013 年度秋季学術大会  
2013 年 10 月 17 日～18 日  
秋田県総合生活文化会館  
(秋田市)

3. 大原直子、田中久美子、澁谷和彦、西谷佳浩、大原直也、吉山昌宏

口腔連鎖球菌による歯根象牙質う蝕の誘発  
日本歯科保存学会 2012 年度秋季学術大会  
2012 年 11 月 12 日～13 日  
広島国際会議場  
(広島市)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
取得年月日：  
国内外の別：

[その他]

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

大原 直子 ( OHARA NAOKO )  
岡山大学 医歯薬学総合研究科・助教  
研究者番号：80301365

### (2) 研究分担者

吉山 昌宏 ( YOSHIYAMA MASAHIRO )  
岡山大学 医歯薬学総合研究科・教授  
研究者番号：10201071

大原 直也 ( OHARA NAOYA )  
岡山大学 医歯薬学総合研究科・教授  
研究者番号：70223930

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：