

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 5月11日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21592413

研究課題名（和文） 各種う蝕形態における罹患象牙質除去前後のpH変化とう蝕細菌叢遺伝子解析

研究課題名（英文） Intraoral pH measurement of different carious lesions with qPCR of cariogenic bacteria to differentiate caries activity

研究代表者

北迫 勇一（KITASAKO YUICHI）

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・助教

研究者番号：30361702

研究成果の概要（和文）：

被験者 103 名協力のもと、異なる歯面におけるむし歯除去前後の表層 pH 変化を、微小 pH センサーを用いて直接評価した。また、象牙質むし歯サンプルを採取し、サンプル中のむし歯細菌叢について定量的遺伝子分析を行った。その結果、隣接面ならびに歯頸部急性むし歯では、他の部位間と比較して、有意に低い表層 pH 値を示した。また、急性むし歯における細菌叢（Lactobacilli）においても、隣接面ならびに歯頸部では他の部位間との有意差な差を認めた。

研究成果の概要（英文）：

This study was aimed to measure pH of 103 dentin carious lesions intraorally using a micro-pH sensor, and assess predominant acid-producing cariogenic bacteria in each lesion by real-time PCR to differentiate caries activities. 50 samples were diagnosed as active and 53 as arrested lesions. Statistically significant difference was observed on average surface pH value of approximal and cervical lesions between active and arrested lesions. Prevalence of Lactobacillus spp. was higher in active approximal and cervical lesions than in occlusal and root lesions.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1400000	420000	1820000
2010 年度	1500000	450000	1950000
2011 年度	500000	150000	650000
年度			
年度			
総計	3400000	1020000	4420000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・保存治療系歯学

キーワード：象牙質う蝕・う蝕活動性・う蝕部位・う蝕診断・pH・う蝕原因細菌・遺伝子分析

1. 研究開始当初の背景

う蝕診断は、術者の経験的かつ主観的要素が大きく影響されることが指摘されている。また、う蝕の存在が発見できなくても、う蝕活動性（急性・慢性）までは把握できず、新たな客観的う蝕診断法の開発が待たれている。

申請者らは、う蝕抜去歯を用いた *in vitro* 研究において、酸性度を示す pH 値を指標とし

た新たなう蝕評価が、従来までの主観的で再現性に欠けるう蝕診断法と比較し、客観的かつう蝕活動性（急性・慢性）をも定量的に診断可能な方法であることを示唆した。そこで、申請者らは、試作臨床用微小 pH センサーを用い、口腔内う蝕活動性評価を行ってきた。しかしながら、同 pH センサーの操作性は測定対象となるう蝕形態に大きく影響し、

またう蝕原因細菌叢の分布もう蝕形態により多種多様化することが判明した。

そこで、本研究では、各種う蝕（咬合面・隣接面・根面）におけるう蝕除去前後の表層 pH 変化を測定することで、形態の異なるう蝕症例間のう蝕活動性評価結果を比較検討すると共に、除去されたう蝕サンプル中のう蝕原因細菌叢を、Realtime-PCR を用いて定量的に分析する。

2. 研究の目的

本研究では、異なるう蝕形態（咬合面・隣接面・歯頸部・根面）における、罹患象牙質除去前後の表層 pH 変化を、臨床用微小 pH センサーを用いて口腔内にて直接測定することで、各種う蝕症例間のう蝕活動性評価結果を比較検討する。さらに、除去されたう蝕サンプル中のう蝕原因細菌叢を、Realtime-PCR を用いて定量的に分析することで、pH 分析ならびに細菌分析の観点から、各種う蝕の進行メカニズムについて解析を試みる。

3. 研究の方法

本研究に同意の得られた被験者 103 名の口腔内において、異なるう蝕形態（咬合面・隣接面・歯頸部・根面）および活動性（急性および慢性う蝕）におけるう蝕除去前後の表層 pH 変化を、臨床用試作微小 pH センサー（ISFET センサー、堀場製作所製）を用いて直接評価し、その臨床データを集積した。pH 測定は、各々 3 回測定し、その平均値を各症例におけるう蝕除去前後の pH 値とした。また、pH 測定開始前に、pH 4 および pH 7 の 2 点校正を毎回行った。

さらに、口腔内 pH 測定時に、同一被験者から象牙質う蝕サンプルを採取し、サンプル中のう蝕細菌叢（mutans Streptococci および Lactobacilli）について、Real-time PCR システム（Applied Biosystems 7500 リアルタイム PCR システム）を用いた定量的遺伝子分析を行った。すなわち、う蝕サンプル採取には、滅菌したエキスカバーターおよびラウンドエンジンバーを用い、採取サンプルしたサンプルは 1mIPBS 溶液（pH7.2）が入った滅菌チューブに回収した。その後、チューブごと重さを計測して、各う蝕サンプルの重さを記録した。DNeasy extraction kit (QIAGEN) を用いて DNA 抽出後、ABI PRISM7500 を用いて Target bacteria (Oral bacteria, mutans Streptococci: *S. mutans* および *S. sobrinus*, Lactobacilli) の定量 PCR を行い、う蝕サンプル 10 µg あたりの DNA コピー比率を算出した。

4. 研究成果

得られた 103 サンプルのうち、50 サンプルが急性象牙質う蝕、残り 53 サンプルが慢性

象牙質う蝕と診断され、う蝕除去前における両者の平均表層 pH 値間に有意差を認めた（急性う蝕：pH 5.5 ± 0.3；慢性う蝕：pH 6.1 ± 0.2）。また、Lactobacilli 菌分布結果を、1000 cells/10 mg 以上以下のパーセンテージ比率で比較検討した場合、急性う蝕（76%）の方が慢性う蝕（58%）よりも高い値を示した。

急性象牙質う蝕では、隣接面ならびに歯頸部う蝕において、他の部位間と比較して有意に低い表層 pH 値を示した。さらに、急性象牙質う蝕におけるう蝕原因細菌叢（Lactobacilli）においても、隣接面ならびに歯頸部では他の部位間との有意差な差を認めた。

全てのう蝕部位におけるう蝕除去前の表層 pH レベルを考慮した場合、その平均 pH 値と Lactobacilli 菌分布との関連性が認められた ($r = -0.209, p < 0.05$)。しかしながら、mutans Streptococci ではその関連性を認めなかった。さらに、本研究で使用した臨床用微小 pH センサーは、口腔内の様々なう蝕部位において pH 値測定が可能であったことから、う蝕活動性を評価する上での一つの手法として有用であることが示唆された。

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 11 件）

1. Kitasako Y, Sadr A, Hamba H, Ikeda M, Tagami J. Gum Containing Calcium Fluoride Reinforces Enamel Subsurface Lesions *in situ*. Journal of Dental Research, 査読有, 91, 2012, 370-375.
2. Kuribayashi M, Kitasako Y, Matin K, Sadr A, Shida K, Tagami J. Intraoral pH measurement of carious lesions with qPCR of cariogenic bacteria to differentiate caries activity. Journal of Dentistry, 査読有, 40, 2012, 222-228.
3. Kitasako Y, Tanaka M, Sadr A, Hamba H, Ikeda M, Tagami J. Effect of a chewing gum containing phosphoryl oligosaccharides of calcium (POs-Ca) and fluoride on remineralization and crystallization of enamel subsurface lesions *in situ*. Journal of Dentistry, 査読有, 39, 2011, 771-779.
4. Kitasako Y, Sadr A, Nikaido T, Tagami J. Relationship between perception of difficulty and clinical experience of approximal composite restorations in final-year undergraduate students at Tokyo Medical and Dental University. Journal of Medical and Dental Sciences, 査読有, 58, 2011, 1-5.

5. Aoki K, Kitasako Y, Ichinose S, Burrow MF, Ariyoshi M, Nikaido T, Tagami J. Ten-year observation of dentin bonding durability of 4-META/MMA-TBB resin cement-a SEM and TEM study. Dental Material Journal 30,2011,438-447.
6. Fujii M, Kitasako Y, Sadr A, Tagami J. Roughness and pH changes of enamel surface induced by soft drinks in vitro-applications of stylus profilometry, focus variation 3D scanning microscopy and micro pH sensor. Dental Material Journal 30,2011,404-410.
7. Hayati F, Okada A, Kitasako Y Tagami J, Matin K. An artificial biofilm induced secondary caries model for in vitro studies. Australian Dental Journal, 査読有, 58, 2011, 40-47.
8. Kitasako Y, Cochrane NJ, Matin K, Shida K, Adams GG, Burrow MF, Reynolds EC, Tagami J. The clinical application of surface pH measurements to longitudinally assess white spot enamel lesions. Journal of Dentistry, 査読有, 38, 2010, 584-590.
9. Kunawarote S, Nakajima M, Shida K, Kitasako Y, Foxton RM, Tagami J. Effect of dentin pretreatment with mild acidic HOCl solution on microtensile bond strength and surface pH. Journal of Dentistry 38, 2010, 261-268.
10. Kitasako Y, Burrow MF, Huq LN, Stacey MA, Reynolds EC, Tagami J. A simplified quantitative test-adapted Checkbuf test-for resting saliva buffering capacity compared with a standard test. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod, 査読有, 108, 2009, 551-556.
11. 北迫勇一、各種飲食物の酸性度と酸蝕歯の関係、日本歯科医師会雑誌、査読無, 63, 2010, 19-27.

[学会発表] (計 7 件)

1. 北迫勇一、池田正臣、小林隆嗣、田中智子、釜阪寛、Alireza Sadr、田上順次、エナメル質初期う蝕最表層部における POs-Ca およびフッ素配合ガム咀嚼後の微小硬さ変化ならびにフッ素分布、日本歯科保存学会秋季学術大会、2011 年 10 月 21 日、大阪。
2. 北迫勇一、池田正臣、田上順次、保存修復学実習で使用する歯科用バーの選択に関する学生の理解度、日本歯科医学教育学会学術大会、2011 年 7 月 16 日、東京。

3. 田中美由紀、北迫勇一、池田正臣、田上順次、唾液分泌量および唾液緩衝能と最大咬合圧の関連性、日本歯科保存学会春季学術大会、2011 年 6 月 10 日、千葉。
4. Aoki K, Kitasako Y, Burrow MF, Ariyoshi M, Nikaido T, Tagami J. Dentin bond durability of 4-META/MMA-TBB resin cement after ten years. 88th IADR General Session, 2010 年 6 月 14 日, Barcelona (Spain).
5. Mita H, Kitasako Y, Takagaki T, Tagami J. Evaluation of low erosive drink with phosphoryl oligosaccharides of calcium. 89th IADR General Session, 2011年3月18日, San Diego (USA).
6. 栗林恵美、北迫勇一、マティン カイレル、田上順次、各種う蝕部位におけるう蝕除去前後の pH 変化とう蝕最近叢 qPCR 解析、日本歯科保存学会秋季学術大会、2010 年 10 月 28 日、岐阜。
7. 北迫勇一、半場秀典、Alireza Sadr、二階堂徹、池田正臣、田中智子、滝井寛、釜阪寛、田上順次、POs-Ca およびフッ素配合ガム咀嚼後のエナメル質初期う蝕の再石灰化効果および微小硬さ変化、日本歯科保存学会秋季学術大会、2010 年 10 月 28 日、岐阜。

[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：
 取得年月日：
 国内外の別：

[その他]

ホームページ等
<http://www.tmd.ac.jp/grad/ope/ope-J.htm>

6. 研究組織

(1)研究代表者

北迫 勇一 (KITASAKO YUICHI)
東京医科歯科大学・医歯学総合研究科・助教
研究者番号：30361702

(2)研究分担者

田上 順次 (TAGAMI JYUNJI)
東京医科歯科大学・医歯学総合研究科・教授
研究者番号：50171567

(3)連携研究者

マティン カイルール (MATIN KHAIRUL)
東京医科歯科大学・医歯学総合研究科・特任
講師
研究者番号：00372433