

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23390435

研究課題名(和文) ミニマムインターベンションの概念と齲蝕病態に基づく新規の包括的齲蝕治療法の開発

研究課題名(英文) Development of a new comprehensive treatment for dental caries based on minimum intervention dentistry

研究代表者

松尾 敬志 (MATSUO, Takashi)

徳島大学・ヘルスバイオサイエンス研究部・教授

研究者番号：30173800

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,700,000円、(間接経費) 4,410,000円

研究成果の概要(和文)：高齢化が急激に進み、根面齲蝕など現行の治療法では対処の困難な症例が多くなっている。今回、ミニマムインターベンションの概念をさらに進めた新しい齲蝕の包括的齲蝕治療法の開発を試みた。すなわち、抗菌活性保持象牙質再石灰化法の開発 電磁波/高周波による細菌不活性化法の開発 カテキン等ポリフェノールのヒト線維芽細胞への効果を検討した。

その結果、アンモニウムヘキサフルオロシリケートによるハイドロキシアパタイトの結晶性向上、電磁波/高周波の口腔内細菌に対する殺菌効果と不活性化、カテキンによる歯髄線維芽細胞の炎症サイトカインやケモカインの産生抑制を見出し、最小限の侵襲による齲蝕治療の開発の基盤を得た。

研究成果の概要(英文)： In Japan, challenging cases of dental disease such as root surface caries become a problem in step with a rapid aging society. We tried to develop a new comprehensive treatment of caries based on minimum intervention. First, we developed the remineralization and reinforcement of decalcified tooth using ammonium hexafluorosilicate (SiF) with antimicrobial agents. Second, we developed the disinfection of caries related bacteria with electro-magnetic wave irradiation (EMWI). And finally, we examined the anti-inflammatory effects of tea catechin to fibroblasts to develop a new treatment for deep carious lesion.

We found the increase of crystallinity of hydroxyapatite with SiF treatment and antibacterial agents such as catechin are effective with SiF. Also, we found the bacteriocidal or inactive effects of EMWI on *S. mutans*. Catechin had inhibited the production of cytokines and chemokines from pulpal fibroblasts.

These results indicate the possibility of new caries treatment.

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：齲蝕 歯髄炎 ミニマムインターベンション 高周波/電磁波 アンモニウムヘキサフルオロシリケート

1. 研究開始当初の背景

(1) 2010年9月に100歳以上が4万人を突破するなど、我が国では高齢化が急激に進み、2025年には後期高齢者は総人口の18%となると予想されている。高齢者の残存歯数は、齲蝕の予防処置や歯周治療、口腔ケア認識の高まりにより大幅に増加している。その一方、ADLの低下による既存の修復物の二次齲蝕や根面齲蝕、それに続発する歯髄炎などが、在宅医療のニーズに伴って、新たな問題となって浮上してきた。

(2) 二次齲蝕や根面齲蝕は現行の治療法では対処の難しい場合が多く、治療による歯質削除によって歯が脆弱化し、破折などで抜歯に至るケースも多い。そこで、歯の保存に繋がる歯質および歯髄の可及的保存を目指した、新しい概念による包括的齲蝕治療法の開発が望まれた。

2. 研究の目的

(1) FDIはMinimum Intervention (MI)という概念を提唱しているが、現在のところこの概念はレジン接着システムを用いた保存修復に際しての最少の歯質切削と捉えられている。

(2) 我々はMIの概念を齲蝕治療における最小限の侵襲にまで発展させた新しいコンセプトによる包括的齲蝕治療の開発を試みた。すなわち、齲蝕は細菌感染症という認識に基づき、歯質に侵入している細菌を殺菌し、罹患歯質を除去することなく積極的に石灰化あるいは強度を改善し、可及的に歯髄を保存する治療法を検討した。

3. 研究の方法

(1) 抗菌活性保持歯質石灰化法による齲蝕歯質再石灰化および二次齲蝕の防止

・象牙質板を用いて表層を脱灰処理することにより疑似齲蝕を作成し、アンモニウムヘキサフルオロシリケート溶液(SiF)を用いて脱灰歯質の石灰化を走査型電子顕微鏡(SEM)で観察した。さらに、抗菌物質のクロルヘキシジン、塩化セチルピリジニウム、イソプロピルメチルフェノール、そして茶カテキンであるエピガロカテキンガレートとSiFに混和し、石灰化に及ぼす影響や齲蝕原性細菌のミュータンス菌への殺菌および発育抑制効果をSEMで検討した。

(2) 高周波/電磁波の齲蝕治療への応用および初期歯髄炎への効果

・齲蝕原性細菌であるミュータンス菌などに対する高周波/電磁波の効果を検討した。すなわち、培養した各種の細菌に高周波/電磁波を周波数500-1000 KHz、1秒間で5~10回照射し、残存細菌のコロニー数でその効果を検討した。また、SEMを用いて細菌の形態的变化を観察した。

・深部齲蝕に起因する歯髄の初期炎症を想定し、ミュータンス菌によるヒト単球への炎症性サイトカイン産生誘導に対する効果を検討した。すなわち、ヒト単球系の細胞株であるTHP-1細胞を用い、これに高周波/電磁波を周波数500KHz、1秒間で5回照射し、ミュータンス菌刺激によるIL-1 β 、IL-8、TNF- α の産生をELISAで測定した。

(3) 茶カテキン等ポリフェノールの深部齲蝕・歯髄炎への応用

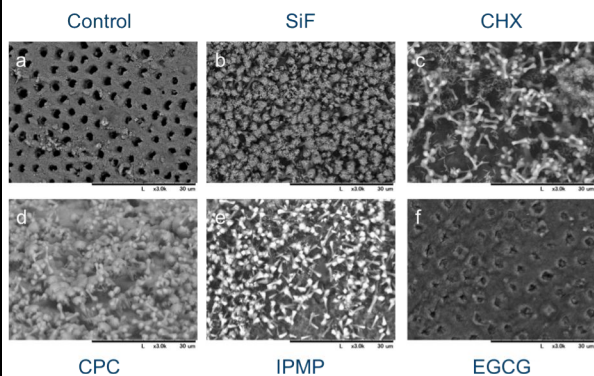
・ヒト線維芽細胞を用いて、IL-1 β 、IL-4、TNF- α で刺激し、CCケモカインリガンド11(CCL11)産生に対するエピガロカテキンガレートの効果をELISAそしてウェスタンブロット法で検討した。

4. 研究成果

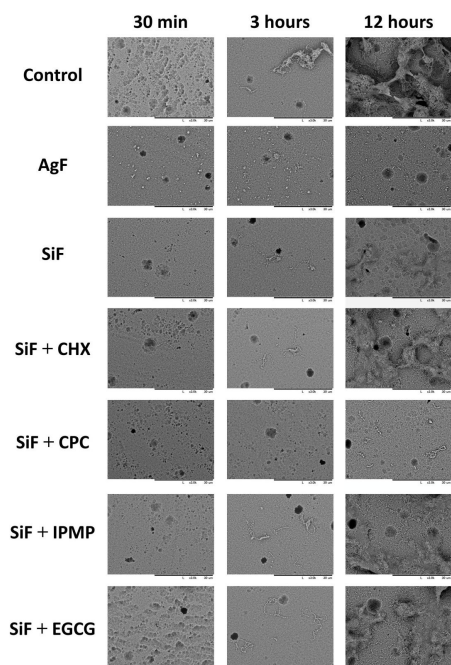
(1) 抗菌活性保持歯質石灰化法による齲蝕歯質再石灰化および二次齲蝕の防止

・SiF処理により歯質脱灰面はハイドロキシアパタイトが沈着し、再石灰化することが確認された。また、この石灰化は抗菌物質の混和によって阻害されないことが明らかとなった(下図)。

・さらに、象牙質齲蝕を想定した脱灰象牙細管内にも再石灰化はみとめられた。また、この石灰化は象牙細管内にも起こっており、表面より10~20ミクロンの長さで石灰化物の沈着が認められた。なお、この再石灰化物は、人口唾液中でも溶解されないことが確認されている。

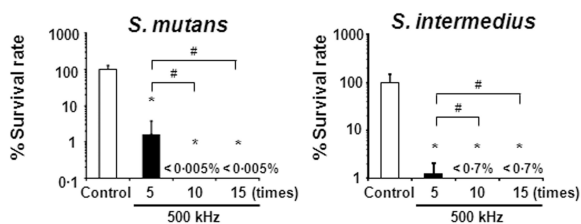


・抗菌薬(クロルヘキシジン、塩化セチルピリジニウム、イソプロピルメチルフェノール、エピガロカテキンガレート)をSiFに混和することにより再石灰化歯質表面へのミュータンス菌の付着ならびに増殖が抑制された。この作用は塩化セチルピリジニウムが最も強く、陽性コントロールであるフッ化ジアンミン銀(サホライド)と比較しても遜色はなかった。また、歯髄への抗炎症作用のあるカテキンにもこの細菌増殖抑制効果が認められた。なお、この抑制効果は、12時間後でも認められた(下図)。

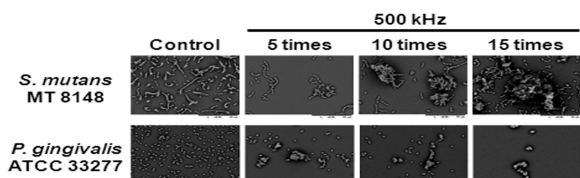


(2) 高周波/電磁波の齲蝕治療への応用および初期歯髄炎への効果

・ *S. mutans* や *S. intermedius* に高周波/電磁波照射(EMWI)を行ったところ、5回の照射で生存細菌率は1%以下となり、10回照射でほぼ死滅した(下図)。なお、この殺菌効果はEMWIによる温度変化によるものでないことも明らかになっている。また、EMWIの周波数(500~1000kHz)では特に効果に相違はなかった。グラム陰性菌の *P. gingivalis* でも同様にEMWIの効果が認められたが、効果は *S. mutans* の方が顕著であった。



・ EMWI後の細菌の形態学的変化をSEMで観察したところ、*S. mutans*は5回の照射で連鎖が短くなり、10回の照射では細菌自体の形態が不明瞭となった。グラム陰性菌の *P. gingivalis*でもEMWIの5回照射で細菌形態が不明瞭となった(下図)。これらの結果は、高周波/電磁波が齲蝕治療へ応用可能であることを意味しており、齲蝕歯質の削除を必要としない新しい概念の齲蝕治療法に繋がる物と期待される。



・細菌刺激によるTHP-1細胞の炎症性サイトカイン産生誘導能を検討した結果、EMWIを行った *S. mutans*はTHP-1細胞のIL-1 β 、IL-8、TNF- α 産生を有意に抑制した。この抑制は熱処理で不活性化した *S. mutans*と同等であり、EMWIの歯髄炎への応用が考えられた。

(3) 茶カテキン等ポリフェノールの深部齲蝕・歯髄炎への応用

・Th2細胞の遊走に關与するケモカインCCL11はヒト線維芽細胞をIL-1 β 、IL-4、TNF- α で刺激した場合に産生されるが、茶カテキンのエピガロカテキンガレートはこの産生を抑制した。IL-1 β /IL-4およびTNF- α /IL-4刺激によるCCL11産生は細胞内シグナル伝達経路のMAPK、ERK、JUNKを介して行われるが、エピガロカテキンガレートはERKおよびJUNK経路を阻害しCCL11産生を抑制することが明らかとなった。

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16件)

Hosokawa Y, Shindo S, Hosokawa I, Ozaki K, Matsuo T. IL-6 trans-signaling enhances CCL20 production from IL-1 β -stimulated human periodontal ligament cells. Inflammation (査読あり), 37 (2), 381-386, 2014. DOI: 10.1007/s10753-013-9750-8

Shindo S, Hosokawa Y, Hosokawa I, Ozaki K, Matsuo T. Genipin inhibits IL-1 β -induced CCL20 and IL-6 production from human periodontal ligament cells. Cell Physiol Biochem (査読あり), 33, 357-364, 2014. DOI: 10.1159/000356675

菅 俊行. 象牙質知覚過敏症の病態と治療法. 四国歯誌(査読あり), 26(2), 55-60, 2014

松尾敬志, 尾崎和美, 中西 正, 湯本浩通, 高橋加奈子, 平尾功治, 武川大輔, 歯髄疾患の病態と診断. 日歯内療誌(査読あり), 34, 67-76, 2013

Hosokawa Y, Hosokawa I, Shindo S, Ozaki K, Matsuo T. TLR3 agonist enhances CC chemokine ligand 20 production in IL-1 β -stimulated human gingival fibroblasts. Cell Immunol (査読あり), 283, 8-11, 2013. DOI: 201310.1016/j-cellimm.2013.05.005

Hosokawa Y, Hosokawa I, Shindo S, Ozaki K, Matsuo T. (-)-Epigallocatechin-3-gallate inhibits

CC chemokine ligand 11 production in human gingival fibroblasts. Cell Physiol Biochem (査読あり), 31, 960-967, 2013. DOI: 2013.10.1159/000350114

Nur A, Hirota K, Yumoto H, Hirao K, Takahashi K, Murakami K, Matsuo T, Shu R, Miyake Y. Effect of extracellular DNA and DNA-binding protein on the development of a *Streptococcus intermedius* biofilm. J Appl Microbiol (査読あり), 115, 260-270, 2013. DOI: 10.1111/jam.12202

松尾敬志, 中西 正. 歯髄炎の病態形成における細菌侵襲と歯髄の反応性. 日本歯科評論 (査読なし). 73, 9-11. 2013

Suge T, Ishikawa K, Matsuo T. Changes in the crystallinity of hydroxyapatite powder structure of enamel treated with several concentration of ammonium hexafluorosilicate. Am J Dent 25 (査読あり), 299-302, 2013

Yumoto H, Tominaga T, Hirao K, Kimura T, Takahashi K, Sumitomo T, Bando N, Matsuo T: Bactericidal activity and oral pathogen inactivation by electromagnetic wave irradiation. J Appl Microbiol (査読あり), 113(1): 181-191, 2012. 10.1111/j.1365-2672.2012.05307.x

Shibata S, Suge T, Kimura T, Ishikawa K, Matsuo T: Antibacterial activity of ammonium hexafluorosilicate solution with antimicrobial agents for the prevention of dentin caries. Am J Dent 25 (査読あり), 31-34, 2012.

坂東直樹, 富永敏彦, 湯本浩通, 住友孝史, 平尾早希, 平尾功治, 松尾敬志. 電磁波照射の歯内療法への応用 -EMAT (Electro-Magnetic Apical Treatment). 日歯内療誌 32 (査読あり), 184-200, 2011.

Nakanishi T, Takegawa D, Hirao K, Takahashi K, Yumoto H, Matsuo T. Roles of dental pulp fibroblasts in the recognition of bacterium-related factors and subsequent development of pulpitis. Jap Dent Sci Rev 47 (査読あり), 161-166, 2011. 10.1016/j.jdsr.2011.02.001

Shibata S, Suge T, Ishikawa K, Matsuo T. Occlusion of dentin tubules with ammonium hexafluorosilicate solution for the prevention of dentin caries. Am J Dent 24 (査読あり), 148-152, 2011.

Hirota K, Yumoto H, Miyamoto K,

Yamamoto N, Murakami K, Hoshino Y, Matsuo T, Miyake Y. MPC-polymer reduces adherence and biofilm formation by oral bacteria. J Dent Res 90 (査読あり), 900-905, 2011. 10.1177/0022034511402996

Hosokawa Y, Hosokawa I, Shindo S, Ozaki K, Nakanishi T, Nakae H, Matsuo T. Black tea polyphenol inhibits CXCL10 production in oncostatin M-stimulated human gingival fibroblasts. Int Immunopharmacol 11 (査読あり), 670-674, 2011. 10.1016/j.intimp.2011.01.009

〔学会発表〕(計 30 件)

平尾功治, 湯本浩通. 細菌関連病原因子によるラット象牙芽細胞の自然免疫機構の解析. 第 87 回日本細菌学会総会. 2014, 3/26-28, タワーホール船堀 (東京都)

Nur A, Yumoto H, Murakami K, Hirota K, Amoh T, Miyake Y. Extracellular DNA affects *Streptococcus mutans* biofilm through quorum sensing system and histone-like DNA binding protein expression. The 12th Japan-Korea International Symposium on Microbiology 2014. 2014, 3/24-25, Tower Hall Funabori, (Tokyo)

Shindo S, Hosokawa Y, Hosokawa I, Matsuo T. The effect of genipin on MMP-1 and MMP-3 expression in IL-1 β -stimulated human periodontal ligament cells. The 15th Joint Scientific meeting of JSCD-KACD. 2013,11/23, The K hotel & resort, The K Hotel & Resort, (Gyeongju, Korea)

Yumoto H, Hirota K, Hirao K, Murakami K, Miyake Y, Matsuo T. Pathologic roles of Streptococcal histon-like protein in microbial infection. The 15th Joint Scientific meeting of JSCD-KACD. 2013,11/23, The K hotel & resort, The K Hotel & Resort, (Gyeongju, Korea)

木村智子, 尾崎和美, 湯本浩通, 村上圭史, 菅原千恵子, 篠原千尋, 武川恵美, 三宅洋一郎, 松尾敬志, 河野文昭. *Streptococcus mutans* の病原性における scrA 遺伝子の役割. 第 6 回総合歯科学会総会, 2013, 11/16-17, 昭和大学 (東京都)

湯本浩通, 平尾功治, 松尾敬志. イグサ抽出液のう蝕および歯周病予防効果の評価. 第 139 回日本歯科保存学会 2013 年度秋期学術大会. 2013, 10/17-18, 秋田県総合生活文化会館 (秋田県)

進藤 智, 細川義隆, 細川育子, 尾崎和美, 松尾敬志. Genipin は IL-1 β が誘導するヒト歯根膜細胞の CCL20 および IL-6 産生を抑制する. 第 139 回日本歯科保存学会 2013 年度秋期学術大会. 2013, 10/17-18, 秋田県総合生活文化会館 (秋田県)

湯本浩通, 富永敏彦, 坂東直樹, 平尾功治, 松尾敬志. 高周波・電磁波照射の歯内療法への応用 -基礎実験～臨床症例-. 第13回日本歯内療法学会西日本支部会研修会, 2013, 7/7, 大阪歯科大学附属病院 (大阪府)

富永敏彦, 湯本浩通, 坂東直樹, 平尾功治, 平尾早希, 加古晋也, 前田やよい, 山口由美子, 高比良一輝, 松尾敬志. Electro-Magnetic Apical Treatment -嚢胞性疾患に対する対応-. 第138回日本歯科保存学会2013年度春期学術大会. 2013, 6/27-28, 福岡国際会議場 (福岡県)

Tominaga T, Bando N, Yumoto H, Matsuo I. Trial of electro-magnetic wave irradiation therapy for vertical root fracture as tooth conservative therapy: a case report. The 9th World Congress. 2013, 5/23-26, Tokyo international forum, (Tokyo)

Bando N, Tominaga T, Yumoto H, Matsuo I. Clinical application of electro-magnetic wave irradiation to the treatment for periapical peirodontitis: a case report. The 9th World Congress. 2013, 5/23-26, Tokyo international forum, (Tokyo)

Nakanishi T, Takegawa D, Hirao K, Yumoto H, Takahashi K, Matsuo T. Prostaglandin F2a regulates cytokine expression in dental pulp cells. 91st General Session & Exhibition of the IADR, 2013, 3/20-23, (Seattle USA)

Takegawa D, Nakanishi T, Hirao K, Yumoto H, Takahashi K, Matsuo T. Interferon-g modulates the innate immune response of dental pulp cells. 91st General Session & Exhibition of the IADR, 2013, 3/20-23, (Seattle USA)

Hosokawa I, Hosokawa Y, Ozaki K, Matsuo I. The effect of Adrenomedullin on human Th 17 cells differentiation. 第60回国際歯科研究学会日本部会学術大会. 2012, 12/14-15, 新潟コンベンションセンター, (新潟県)

細川育子, 細川義隆, 尾崎和美, 松尾敬志. Adrenomedullin が樹状細胞の Th 17 関連サイトカイン産生に及ぼす影響. 第137回日本歯科保存学会2012年度秋期学術大会. 2012, 11/22-23, 広島国際会議場 (広島県)

細川義隆, 細川育子, 尾崎和美, 中江英明, 松尾敬志. IL-17A は TNF-a が誘導するヒト歯肉線維芽細胞の CCL20 産生を増強する. 第137回日本歯科保存学会2012年度秋期学術大会. 2012, 11/22-23, 広島国際会議場 (広島県)

湯本浩通, 富永敏彦, 平尾功治, 松尾敬志. 電磁波照射による骨芽細胞の活性化と Growth Factor の発現誘導. 第10回日本再生歯科医学会学術大会. 2012, 9/1-2, 二チイ

学館神戸ポートアイランドセンター (兵庫県)

中西 正, 武川大輔, 平尾功治, 湯本浩通, 高橋加奈子, 松尾敬志. Prostaglandin F2a は歯髄細胞における炎症メディエーター発現を調節する. 第136回日本歯科保存学会2012年度春期学術大会. 2012, 6/28-29, 沖縄コンベンションセンター (沖縄県)

細川義隆, 細川育子, 尾崎和美, 中西正, 中江英明, 松尾敬志. TNF- α と IL-4 刺激が誘導するヒト歯肉線維芽細胞の CCL11 産生に及ぼす緑茶カテキンの影響. 第136回日本歯科保存学会2012年度春期学術大会. 2012, 6/28-29, 沖縄コンベンションセンター (沖縄県)

Yumoto H, Tominaga T, Hirao K, Bando T, Sumitomo T, Takahashi K, Matsuo T. Signaling pathways and gene activate by electro-magnetic-wave in osteoblastic cells. 90th General Session & Exhibition of the IADR, 2012, 6/20-23, Iguazu Falls, (Brazil)

② Yumoto H, Tominaga T, Matsuo T. Electromagnetic wave irradiation stimulated osteoblasts to enhance cell growth and gene expression of growth factors. 2012 Annual Session of the American Association of Endodontists, 2012, 4/18-21, Hynes Convention Center, (Boston, USA)

② Tominaga T, Yumoto H, Matsuo T. Clinical application of electromagnetic wave irradiation for infected root canal Treatment-EMAT (electromagnetic Apical Treatment). 2012 Annual Session of the American Association of Endodontists, 2012, 4/18-21, Hynes Convention Center, (Boston, USA)

③ Yumoto H. Basic research aimed at application of electro-magnetic wave irradiation for endodontic treatment. The 13th Joint Scientific meeting of JSCD-KACD. 2011, 11/11-12, Kim Koo Museum & Library, (Seoul, Korea)

④ Suge T, Shibata S, Matsuo T. Antibacterial activity of ammonium hexafluorosilicate solution with antimicrobial agents for the prevention of dental caries. The 13th Joint Scientific meeting of JSCD-KACD. 2011, 11/11-12, Kim Koo Museum & Library, (Seoul, Korea)

⑤ 湯本浩通, 富永敏彦, 平尾功治, 高橋加奈子, 松尾敬志. 高周波・電磁波照射による骨芽細胞の Growth Factor の発現・産生誘導. 第135回日本歯科保存学会2011年度秋期学術大会. 2011, 10/21-22, 大阪国際交流センター (大阪府)

⑥ 住友孝史, 富永敏彦, 坂東直樹, 平尾早希, 加古晋也, 湯本浩通, 松尾敬志. 電磁波根尖治療法 EMAT (Electro-Magnetic Apical

Treatment)を行った1例。第32回日本歯内療法学会学術大会。2011, 7/30-31, 全日空長崎ホテル(長崎県)

⑳ 柴田眞吾, 菅 俊行, 木村智子, 松尾敬志. 抗菌成分フッ化ジアンミンシリケートが *S. mutans* の初期付着、バイオフィルム形成に与える影響。第134回日本歯科保存学会2011年度春期学術大会。2011, 6/9-10, 東京ベイ舞浜ホテルクラブリゾート(千葉県)

㉑ 武川大輔, 中西 正, 平尾功治, 湯本浩通, 高橋加奈子, 松尾敬志. ヒト歯髄線維芽細胞の自然免疫応答に対するインターフェロン γ の影響。第134回日本歯科保存学会2011年度春期学術大会。2011, 6/9-10, 東京ベイ舞浜ホテルクラブリゾート(千葉県)

㉒ 湯本浩通, 富永敏彦, 柴田眞吾, 武川大輔, 高橋加奈子, 木村智子, 平尾功治, 松尾敬志. 高周波・電磁波照射を歯内療法に応用した症例。第134回日本歯科保存学会2011年度春期学術大会。2011, 6/9-10, 東京ベイ舞浜ホテルクラブリゾート(千葉県)

㉓ Suge T, Shibata S, Matsuo T. Changes of crystallinity of hydroxyapatite powder and structure of enamel treated with several concentrations of ammonium hexafluorosilicate. International Dental Materials Congress 2011, 5/28, Yonsei University, (Seoul, Korea)

〔図書〕(計1件)

Yumoto H, Hirao K, Matsuo T, Miyake Y, The roles of cytokines in periodontal disease, In Cytokines: Mechanisms, functions and abnormalities. ed. Manjili M H, 254 (236-254), Nova Science Publishers, Inc. New York, 2012

〔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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松尾 敬志 (MATSUO, Takashi)
徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・教授
研究者番号: 30173800

(2) 研究分担者

中西 正 (NAKANISHI, Tadashi)
徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・准教授
研究者番号: 00217770

菅 俊行 (SUGE, Toshiyuki)
徳島大学・病院・講師
研究者番号: 60243713

湯本 浩通 (YUMOTO, Hiromichi)
徳島大学・病院・講師
研究者番号: 60284303

平尾 功治 (HIRAO, Kouji)
徳島大学・病院・助教
研究者番号: 00581399

(3) 連携研究者

()

研究者番号: