

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 12 日現在

機関番号：33902

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24593178

研究課題名(和文) ジェット水流による口腔バイオフィルムの構造と菌叢への影響の定量的評価に関する研究

研究課題名(英文) Study on quantitative evaluation of the influence of a dental water jet on the oral biofilm structure and the oral micro flora

研究代表者

加藤 一夫 (Kato, Kazuo)

愛知学院大学・歯学部・准教授

研究者番号：60183266

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：口腔洗浄器(洗浄圧350kPa)の併用による0.2%クロルヘキシジン溶液の口腔バイオフィルム抑制効果とその堆積厚さから検討したが、増強作用は検出できなかった。
酸蝕象牙質の磨耗に対するブラッシング力を伝達する因子(毛先の形態、ブラッシング圧、歯磨剤の粘度)の影響を、電子線マイクロアナライザによる歯質消耗の厚さから評価したところ、フラット毛よりテーパ毛の方がブラッシングによる磨耗が大きかった。
S-PRGフィラー配合歯磨剤から抽出されるAl、B、F、Srのバイオフィルム浸透性を、depth-specific analysisの手法で検討したところ、FとSrはバイオフィルムの内部まで浸透していた。

研究成果の概要(英文)：An inhibitory effect of 0.2% chlorhexidine treatment against the oral biofilm which was irrigated with a pulsating jet stream of water (350 kPa) was evaluated by measuring thickness of biofilm using an Electron Probe Micro-Analyzer (EPMA). However, the combined effect of the chlorhexidine treatment and the water irrigation could not be detected.
The influence of factors (such as tip form, brush tension and slurry viscosity) transmitting brushing force onto eroded dentine surface was evaluated by measuring thickness of substance loss using an EPMA. Eroded dentine wear by a sonic toothbrush was deeper with tapered tip than with flat trim.
Oral biofilm uptake of mineral ions (Al, B, F, Sr) released from experimental toothpaste containing surface pre-reacted glass-ionomer (S-PRG) filler was estimated by depth-specific analysis. The biofilm showed significant uptake of only F and Sr.

研究分野：口腔衛生学

キーワード：口腔バイオフィルム ジェット水流 定量的評価 電子線マイクロアナライザ S-PRGフィラー配合歯磨剤 酸蝕象牙質の磨耗 depth-specific analysis

1. 研究開始当初の背景

- (1) ジェット水流を利用して歯面を清掃する口腔洗浄器は、近年、高い洗浄圧で断続的な水流を噴射する製品が開発されている。しかし、これまでジェット水流のバイオフィーム除去効果を適切に評価する方法がなく、その効果は低いとされてきた。
- (2) 研究代表者加藤は、脆弱で特定が困難な口腔バイオフィームの最表層を、電子プローブマイクロアナライザ (EPMA) を応用して可視化する手法を考案し、標準的なジェット水流の洗浄圧 (350 ~ 700kPa) でも 2 日間堆積させた *in vivo* 歯肉縁上バイオフィームの約 85% が除去できることを明らかにした。
- (3) ジェット水流で洗浄された歯面に残存するバイオフィームは、水の圧力や低張性の影響により、菌体の破壊や基質成分の選択的な消失が生じ、本来のバイオフィームの機能が損なわれた状態と予想される。そこで、ジェット水流で処理したバイオフィームの再生速度や薬剤浸透性などの特性を研究することに関心を抱くに至った。
- (4) また、象牙質が酸蝕されると、その表面にはコラーゲンなどの有機質が残遺する。この有機質の存在は酸蝕歯面における最表層の同定を困難にしている。EPMA を応用したバイオフィームの最表層を可視化する手法は、摩耗などによる酸蝕象牙質のダメージを評価するのに有効なものではないかと考えた。

2. 研究の目的

- (1) ジェット水流による洗浄処理の後、新たに再生される口腔バイオフィームを対象に、試験薬剤への曝露がバイオフィームに与える影響を、その成長速度、バイオマス容積やグルカンのプロファイルあるいは細菌の密度分布などから分析することで、ジェット水流による処理が、化学的プラークコントロールの効果を促進させるかどうかを検討する。
- (2) EPMA を利用した解析方法の新たな展開として、酸蝕象牙質の摩耗量の定量的評価に対する有用性を検討するため、酸性溶液中に長時間浸漬させた脆弱な酸蝕象牙質を対象に、酸蝕による象牙質の消失とブラッシングによる摩耗の程度を評価する。
- (3) 表面改質型酸反応性無機ガラス (S-PRG) フィラーは、ガラスコアの表層に安定化したガラスアイオノマー相を形成させたもので、6 種類 (Al、B、F、Na、Si、Sr) の無機イオンを徐放することが知られている。本研究で試料採取されるバイオフィームを利用して、S-PRG フィラー配合歯磨剤

から抽出される 4 種類のイオン (Al、B、F、Sr) について、バイオフィーム浸透性を depth-specific analysis の手法で検討した。

3. 研究の方法

- (1) 化学的プラークコントロールの効果促進に対するジェット水流の有効性の検討は次の手順で実施した。インフォームドコンセントの得られた学生ボランティア (17 名) を対象に印象採得を行い、歯科用金属製のバイオフィーム堆積装置を歯科技工所に外注し作製した。この装置に一对の健全なエナメル質小片 (スラブ) を組み込み、咬合を妨げないようにクラスプを介して上顎大臼歯の頬側面に 2 日間装着し、その部位のブラッシングを避けることで、スラブ表面にバイオフィームを堆積させた。装置を口腔から外し、スラブを口腔洗浄器 (デントレックス、リコーエレメックス) で 350kPa の洗浄圧で 5 秒間処理した。一方のスラブは 0.2% クロロヘキシジン溶液 (CHX) に、他方のスラブは対照として生理的食塩水に、30 秒間浸漬した後、装置を再び口腔内に戻し、その 2 日後に回収した。CHX への曝露がバイオフィームに与える影響を、その成長速度からみるために、スラブは直ちに凍結乾燥し、表面を白金でコート後、樹脂包埋し、スラブ中央部で切断した。EPMA (JXA8530FA, 日本電子) を用いてその断面の反射電子像 (COMPO 像) を撮影し、画像解析によりスラブ上のバイオフィームの厚さを測定した。
- (2) 酸蝕による象牙質の歯質消失とブラッシングによる摩耗の程度を次の 2 つのステップから評価した。
音波歯ブラシによる酸蝕象牙質の摩耗に及ぼす影響
ネイルバニッシュで中央部にウインドウ (4 mm²) を作成したヒト象牙質の包埋ブロックを、A : 100% グレープフルーツジュース (pH3.3)、B : 白ワインビネガー (pH2.7) または C : 0.83M 酢酸溶液 (pH2.3) に 60 分、120 分または 180 分間浸漬した。ブロックを固定し、酸蝕させたウインドウ面に音波歯ブラシの毛先を 1 g/mm² の加圧下で垂直に当てた。フッ化物非含有歯磨剤 (RDA108) のスラリー (水 : 歯磨剤 = 4 : 1) または水を滴下しながら、ブロックを音波歯ブラシ (Dent EX システムビブラトケア、ライオン歯科材) (480Hz) で 1 分間ブラッシングした。酸性溶液に浸漬した後、刷掃処理を行わなかったものを対照群とした。処理面は超音波洗浄後、アセトンでネイルバニッシュを除去し、自然乾燥させた。白金コーティング後、EPMA で二次電子像を撮影した。ブロックをメチルメタクリレートで包埋後、機械研磨でウインドウ中央部の断面を露出させ、鏡面研磨後、カ

ーボン蒸着し、COMPO 像を撮影した。ウインドウ断面部の画像解析により摩耗深さを計測した。酸蝕の要因として酸性溶液の種類と作用時間、磨耗の要因としてブラッシング処理を取り上げ、三元配置分散分析と多重比較を行った。

酸蝕象牙質に摩耗に及ぼすブラッシング力を伝達する因子の影響

ネイルバニッシュでウインドウ (4 mm²) を作成した象牙質ブロックを 0.83M 酢酸溶液 (pH2.3) に 30 分間浸漬し酸蝕した。このウインドウ面の約 1/2 をネイルバニッシュで被覆し、これをコントロール面とした。ブロックを固定し、歯ブラシの毛先 (フラット毛 or テーパー毛) を酸蝕ウインドウ面に当て、一定の荷重 (100g or 200g) を掛けた。無水ケイ酸とカルボキシメチルセルロース溶液 (CMC 濃度 0.5% or 1%) を混和した研磨剤 (Sorbosil AC77, RDA125; PQ Corporation, UK) のスラリー (10 g /50mL) を使用して、音波歯ブラシ (Dent EX システムビブラートケア, ライオン歯科材) (480Hz) で 1 分間ブラッシングを行った。その後、試料表面からネイルバニッシュを除去し白金でコーティングした後、象牙質片を再包埋し、ウインドウの中央部でブロックを切断した。その断面を研磨し、ウインドウ内の刷掃処理面とコントロール面の COMPO 画像を撮影し、画像解析により両者の表層からの歯質の消失厚さを測定し、両者の差を刷掃処理による歯質の摩耗量とした。ブラッシング力を伝達する因子として、毛先の形態、ブラッシング圧および歯磨剤の粘度を設定し、統計学的検討は、三元配置分散分析と t 検定で行った。

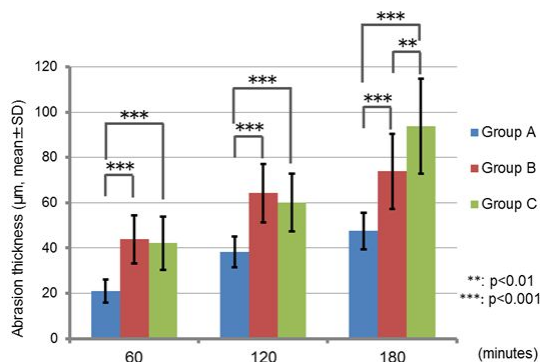
- (3) 口腔バイオフィームによる S-PRG フィラー配合歯磨剤からの無機イオンの取り込みに関しては、以下の方法で行った。被験者 18 名 (19-39 歳) の左右上顎臼歯部にバイオフィーム堆積装置を装着し、その部位のブラッシングを避け装置内のエナメル質 2 片上にバイオフィームを堆積させた。3 日後、装置を取り外し、一方は S-PRG フィラー配合歯磨剤のスラリーを濾過した抽出液 (A ; 369.4 ppm, B ; 506.4 ppm, F ; 193.0 ppm, Sr ; 216.0 ppm を含む) に 1 分間浸漬した。もう一方はフィラー未配合の歯磨剤抽出液で処理し、対照群とした。各成分のバイオフィーム浸透性をみる目的で、装置を口腔内に 30 分間保持した。回収した装置は直ちに凍結乾燥後、エナメル質を取り出し、2 組の包埋バイオフィーム試料を作製した。バイオフィームは表面から順に薄片化し、3 層の層別試料分画 (厚さ 300 μm) に分離した。酢酸緩衝液 (pH5.2) を用いて、各試料分画から無機イオンを抽出し、1 組の試料分画からは F をイオン電極法で、もう一方は ICP 発光分

光分析法を用いて他の無機イオンを定量した。試料分画中の各成分は、一部の薄片をトルイジンブルー染色し、染色面積と切片の厚さから推定したバイオマス量により濃度を補正し、一元配置分散分析と多重比較で統計的検討を行った。

4. 研究成果

- (1) 洗浄圧 350kPa で 5 秒間処理した口腔バイオフィームに 0.2% クロロヘキシジン溶液 (CHX) または生理的食塩水を 30 秒間作用させ、2 日後のバイオフィーム厚さを比較したが、両者の厚さに有意な差は認められず、ジェット水流で処理したバイオフィームに対する殺菌剤の抑制効果の増強を検出することができなかった。この原因として、ジェット水流で洗浄された歯面に残存するバイオフィームと CHX 処理後に形成されたバイオフィームを画像から区別することができなかったためと考えられた。
- (2) 酸蝕による象牙質の消失とブラッシングによる摩耗に関して以下の結果が得られた。
音波歯ブラシによる酸蝕象牙質の摩耗に及ぼす影響
分散分析の結果から、浸漬液と作用時間は、摩耗深さに有意に影響し、両者には交互作用が認められた。一方、スラリーは有意な因子とは認められなかった。60 分、120 分および 180 分浸漬したときの摩耗深さ (μm ± SD) は、A 群 21.1 ± 5.1、38.2 ± 6.8、47.5 ± 8.1、B 群 43.8 ± 10.7、64.2 ± 12.8、73.9 ± 16.6、C 群 42.1 ± 11.7、60.0 ± 12.7、93.9 ± 21.0 であった (図 1)。結果は、酸蝕象牙質のブラッシングによる摩耗における歯磨剤使用の影響が限定的な可能性を示唆した。

図 1 浸漬時間別にみた酸性溶液間の酸蝕象牙質摩耗量の比較

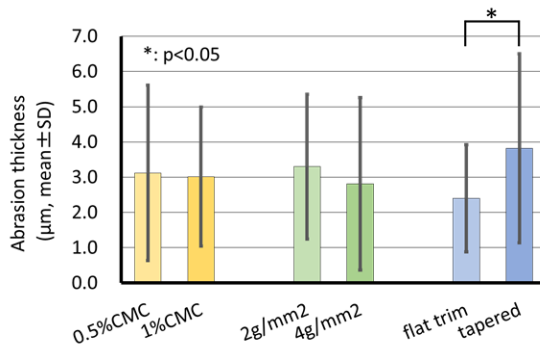


酸蝕象牙質に摩耗に及ぼすブラッシング力を伝達する因子の影響

三元配置分散分析から、ウインドウ内の刷掃処理面とコントロール面の歯質消耗の厚さの差である摩耗量に対して、毛先の形

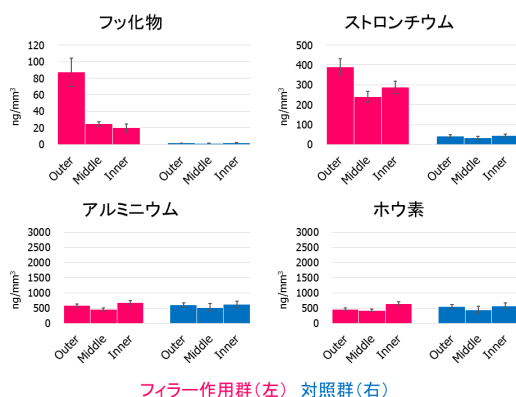
態は有意な因子であったが、歯磨剤の粘度とブラッシング圧は有意な因子とは認められなかった。酸蝕象牙質のブラッシングによる摩耗は、フラット毛 ($2.40 \pm 1.54 \mu\text{m}$) より、テーパ毛 ($3.82 \pm 2.73 \mu\text{m}$) の方が有意に大きかった (図2)。以上の結果より、酸蝕象牙質の消耗に対するブラッシング力を伝達する因子の影響は限定的である可能性が示唆された。

図2 要因別の酸蝕象牙質摩耗量の比較



(3) バイオフィルムの外層、中層および内層における各成分の平均濃度比(フィラー作用群 / 対照群)は、Al が 0.97, 0.89, 1.08、B が 0.84, 0.96, 1.12、F が 47.7, 16.8, 10.2、Sr が 9.13, 7.03, 6.45 となり、F と Sr は、全層でフィラー作用群に有意な濃度上昇がみられたが、Al と B では、フィラー抽出液の作用による有意な濃度上昇は認められなかった (図3)。B と Al のバイオフィルムへの取り込みは確認できなかったが、F と Sr はバイオフィルムの内部まで浸透することが明らかとなった。Ca や Mg など 2 価の陽イオンは、バイオフィルム内のレンサ球菌とフッ化物の結合を促進し、フッ化物の停滞性を高め、フッ化物による細菌の乳酸産生能を抑制することが知られている。2 価の陽イオンである Sr にも、同様に作用する可能性がある。

図2 各無機イオンのバイオフィルム深度別の濃度の比較



フィラー作用群(左) 対照群(右)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 3件)

田村清美, 加藤一夫, 曾我雄也, 嶋崎義浩. 電子線マイクロアナライザを用いた象牙質の酸蝕深度評価の試み. 口腔衛生学会誌, 2014; 64: 270-277. 査読有

徳永有一郎, 中野 崇, 加藤一夫, 福田理 . S-PRG フィラー含有歯科矯正用レジンのフッ化物徐放・リチャージ能. 小児歯科学雑誌, 2013; 51: 1-7. 査読有

Naganawa T, Nakano T, Higashi K, Tokura T, Kato K, Nakagaki H, Fukuta O. Distribution of fluoride, calcium, and phosphorus in plaque of maxillary anterior and posterior teeth after fluoride mouthrinse. Aichi Gakuin Dent Sci, 2012; 25: 31-36. 査読有

〔学会発表〕(計 7件)

Kato K, Tamura K, Shimazaki Y. Oral biofilm uptake of mineral ions released from experimental toothpaste containing S-PRG filler. 62nd ORCA Congress 2015.7.1-4 Brussels, Belgium.

Kato K. Caries detection and management - on the basis of current concept of cariology -. The 37th Annual Scientific Conference on Dental Research, University of Medicine and Pharmacy at Ho Chi Minh City 2015.4.14 Ho Chi Minh, Vietnam. (招待講演)

Kato K, Soga Y, Tamura K, Shimazaki Y. Relative Influence of Brushing Force Transmission Factors on Substance Loss of Eroded Dentine. 61th ORCA Congress 2014.7.4 Greifswald, Germany.

Hirose M, Fukuda A, Murata Y, Yahata S, Hirose Y, Kato K. Fluoride Retention in Saliva following Tooth Brushing Using Fluoridated Dentifrices in Three Different Forms. 60th ORCA Congress 2013.7.6 Liverpool, UK.

Kato K, Tamura K, Soga Y. Quantitative Evaluation of Abrasion Thickness of Eroded Dentine by Sonic Toothbrush with or without Toothpaste. 60th ORCA Congress 2013.7.5 Liverpool, UK.

Tokunaga Y, Nakano T, Kato K, Fukuta O. Fluoride release and recharge

capabilities from orthodontic resin containing S-PRG filler .24th Congress of the International Association of Paediatric Dentistry. 2013.6.13 Seoul, Korea .

田村清美,加藤一夫,曾我雄也,嶋崎義浩.ブラッシングによる酸蝕象牙質の摩耗に及ぼす要因の検討と摩耗量の定量的評価.第62回日本口腔衛生学会2013.5.16 松本市.

〔その他〕

ホームページ等

<http://kazkato.agu.ac.jp/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

加藤 一夫 (KATO, Kazuo)

愛知学院大学・歯学部・准教授

研究者番号：60183266

(2)研究分担者 なし

(3)連携研究者 なし