

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 10 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2016

課題番号：25861784

研究課題名(和文) 抗菌性バイオマテリアルの評価・開発を目的とした根面齲蝕モデルの創出

研究課題名(英文) Creation of root caries model for evaluation and development of antibacterial biomaterials

研究代表者

真柳 弦 (Mayanagi, Gen)

東北大学・歯学研究科・助教

研究者番号：10451600

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：水素イオン感受性電界効果型トランジスタ(ISFET)微小pH電極を用いた歯質脱灰モデルを確立し、歯質-細菌インターフェイスにおけるpHのモニタリングおよび歯面から溶出したカルシウムの定量を行い、歯冠エナメル質と根面象牙質の脱灰の様相について検討した。本研究によって、細菌が産生する酸に対する溶解性は、根面象牙質が歯冠エナメル質よりも高く、溶解した無機質がインターフェイスのpHを中和していることが示唆された。本モデルにより、歯質-細菌インターフェイスにおける歯質脱灰の評価が可能となり、今後、歯面塗布剤やコーティング剤などの齲蝕予防効果を検討することができると考えられる。

研究成果の概要(英文)：The mineral solubility of coronal enamel and root dentin were evaluated using a model of tooth/bacteria interface. The pH changes at the interface were measured by a miniature ion-sensitive field-effect transistor pH electrode and the amounts of calcium dissolved from tooth surfaces were measured by a fluorescent dye. As a result, it was suggested that root dentin is more soluble to the bacteria-induced acidification than coronal enamel, and that the minerals dissolved from tooth surfaces could raise pH at the tooth/bacteria interface. The method employed in the present study could be useful for evaluating the caries-preventive effects on tooth surface treatment.

研究分野：う蝕学

キーワード：ISFET微小pH電極 pH エナメル質 象牙質 根面う蝕 う蝕関連細菌 脱灰 インターフェイス

1. 研究開始当初の背景

高齢者の口腔内では、個人差はあるが、加齢変化あるいは歯周病による歯肉の退縮が徐々に進行し、根面が大きく露出する。さらに高齢者で装着率が増加する歯冠補綴物のマージンや部分床義歯のクラスプ周囲などではプラークが付着しやすくなり、その結果、根面齲蝕の発症リスクが高くなる。従って、根面齲蝕機序の解明や予防法の開発が喫緊の課題となっている。

根面齲蝕は、エナメル質齲蝕と同様に、歯根面歯質の構成無機物であるハイドロキシアパタイトが脱灰することで発症すると考えられている。歯根面を構成するセメント質や象牙質はエナメル質よりも耐酸性が低いと考えられることから、齲蝕を生じやすく進行もはやいと理解されているが、未だ根面齲蝕の病態や発症機構については十分に解明されていない。

これまでに *in vitro* で行われたエナメル質・象牙質の脱灰実験 (Hoppenbrouwers ら、1986 ; Wiegand ら、2008) は、酸溶液にエナメル質あるいは象牙質小片を浸漬した結果であり、プラーク下の脱灰状況を反映しているとは言えない。一方、*in vivo* で行われたエナメル質・象牙質齲蝕に関する研究 (Correia ら、2012) では、口腔内に蓄積させたプラークで糖代謝・酸産生を行わせ、カルシウムの増減から脱灰の程度を推定しているが、検出したカルシウム量が脱灰により生じたものなのか、口腔内のプラーク中あるいは唾液中に存在していたものであるのかが不明であり、エナメル質と象牙質で脱灰の程度に差があるとの結論に至っていないのが現状である。

従って、根面齲蝕の病態を解明するためには、エナメル質と歯根面 (象牙質) の脱灰の程度をこれまでの酸溶液中ではなく、プラーク下で比較・検討することが重要である。すなわち、特に無機質の脱灰に着目したモデル実験系を創出し、齲蝕関連菌を用いた人工プラークと歯質 (エナメル質・象牙質) とのインターフェイスにおける細菌の糖代謝・酸産生中の pH のモニタリング (ステファンカーブ) さらにその間に人工プラーク内に溶出するカルシウム量を測定し、歯質の脱灰程度を評価することが必要と考え、本研究を行うこととした。

2. 研究の目的

8020 運動の奏功により高齢になっても自身の歯を保持できる時代となった。高齢者が自身の歯の機能を維持するためには、歯周炎と共に根面齲蝕の予防を図ることが重要である。しかし、根面齲蝕はこれまで研究されてきたエナメル質齲蝕とは異なり、その病態や発症機構について未だ十分に解明されて

いない。本研究では、イオン感受性電界効果型トランジスタ (ISFET) 微小 pH 電極を用いた歯質脱灰モデルを確立し、歯質-細菌インターフェイスにおける pH のモニタリングおよび歯面から溶出したカルシウムの定量を行い、歯冠エナメル質と根面象牙質の脱灰の様相について検討した。さらに、歯面塗布されたフッ化物による pH 低下抑制効果の評価を行った。

3. 研究の方法

(1) ISFET 微小 pH 電極による歯質-細菌インターフェイス pH 測定

ISFET 微小 pH 電極を用いて、齲蝕関連菌として代表的なミュータンスレンサ球菌と歯質 (ウシ中切歯の歯冠エナメル質および根面象牙質) とのインターフェイスにおける pH 測定法を確立し、細菌の糖代謝・酸産生下における連続的な pH モニタリングを行った。すなわち、アクリル板で作製した実験装置の直径 4 mm、深さ 2 mm の well の底に、歯質を固定し、ISFET 微小 pH 電極を歯質の直上に設置後、その上にグルコースを含む複合培地 (Trypton-Yeast extract 培地) にて高度嫌気条件下で培養した *Streptococcus mutans* NCTC 10449 を緊密に填入し、well 内を満たした。10 分間静置後、細菌上に 0.5% グルコース 500 μ L を滴下して、比較電極を設置し、37°C のインキュベーター内で pH 変化を測定した。

(2) 乳酸および溶出カルシウム量の測定

pH 測定後の *S. mutans* を回収し、細菌が糖代謝を行った結果生じる乳酸量を、ラクテート分析装置を用いて測定した。さらに、カルシウム結合蛍光試薬 (Fluo 3) を用いて、歯質表面から溶出したカルシウムと結合・発色させ、マイクロプレートリーダーでカルシウムの定量を行い、酸による歯質表面の脱灰量を評価した。

(3) 歯面塗布されたフッ化物による pH 低下抑制効果の評価

(1) で確立した ISFET 微小 pH 電極を用いた歯質-細菌インターフェイスにおける pH 測定法を応用し、*S. mutans* による人工バイオフィームと、フッ化物を塗布した歯面とのインターフェイスにおける pH 変化を測定し、歯面塗布されたフッ化物による pH 低下抑制効果を評価した。すなわち、ウシ中切歯の歯冠エナメル質および根面象牙質を 2% フッ化ナトリウム (NaF) または 38% フッ化ジアンミン銀 (SDF) にそれぞれ 10 分間浸漬した歯面と、浸漬していないもの (コントロール) を準備した。実験装置の well の底に歯面試料を固定し、微小 pH 電極を歯面上に設置後、well 内に *S. mutans* を填入した。*S. mutans* 上に 0.5% グルコースを滴下し、120 分間の pH 変化を測定した。さらに、pH 測定後の *S. mutans* を

回収し、人工バイオフィーム中のフッ素量をフッ素電極、銀量を高周波誘導結合プラズマ質量分析装置にて測定した。

4. 研究成果

(1) ISFET 微小 pH 電極による歯質-細菌インターフェイス pH 測定

グルコース添加後 120 分間の pH カーブは、歯冠エナメル質と根面象牙質で異なり、根面象牙質の pH カーブは歯冠エナメル質のそれと比べて、上方にシフトすることが明らかとなった。

(2) 乳酸および溶出カルシウム量の測定

歯冠エナメル質と根面象牙質において、細菌が産生する乳酸量は、ほぼ同量であったが、検出されたカルシウム量は、歯冠エナメル質よりも根面象牙質の方が多く、根面象牙質の酸に対する溶解性は、歯冠エナメル質よりも高いことが明らかとなった。

以上のことから、根面象牙質の酸に対する溶解性は、歯冠エナメル質よりも高く、溶解した無機質がインターフェイスの pH を中和していることが示唆された。

(3) 歯面塗布されたフッ化物による pH 低下抑制効果の評価

その結果、歯冠エナメル質、根面象牙質ともに、NaF および SDF を塗布したものはコントロールと比べて 120 分後の pH が有意に高いことが示された。以上のことから、バイオフィーム-歯面インターフェイスにおいて、フッ化物塗布歯面が細菌の糖代謝による pH 低下を有意に抑制することが明らかとなった。また、NaF 塗布歯面からはフッ素が、SDF 塗布歯面からはフッ素と銀が人工バイオフィーム中に溶出し、フッ素量は NaF よりも SDF が、歯冠エナメル質より根面象牙質が多く、銀量は歯冠エナメル質より根面象牙質が多かった。SDF 塗布根面象牙質では、人工バイオフィームから検出されたフッ素および銀の量が最大となった。これらの結果から、歯質-細菌インターフェイスにおいて、フッ化物歯面塗布が齲蝕予防に効果的であり、とくに SDF が根面齲蝕の予防や進行抑制に効果的であると考えられた。

本研究により、細菌-歯質インターフェイスにおける歯質脱灰の評価が可能となり、今後、既存あるいは新規の歯面塗布剤や歯根面コーティング材剤などの pH 低下抑制、脱灰抑制効果を検討することができると考えられる。

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 5 件)

Mayanagi G, Igarashi K, Washio J, Takahashi N, pH response and tooth surface solubility at the tooth/bacteria interface, *Caries Research*, 査読有, 51 巻, 2017 年, 160-166, DOI: 10.1159/000454781.

Tian L, Sato T, Niwa K, Kawase M, Mayanagi G, Washio J, Takahashi N, PCR-dipstick DNA chromatography for profiling of a subgroup of caries-associated bacterial species in plaque from healthy coronal surfaces and periodontal pockets, *Biomed Res*, 査読有, 37 巻, 2016 年, 29-36, DOI: 10.2220/biomedres.37.29.

Fukushima A, Mayanagi G, Nakajo K, Sasaki K, Takahashi N, Microbiologically induced corrosive properties of the titanium surface, *J Dent Res*, 査読有, 93 巻, 2014 年, 525-529, DOI: 10.1177/0022034514524782.

Mayanagi G, Igarashi K, Washio J, Domon-Tawaraya H, Takahashi N, Effect of fluoride-releasing restorative materials on bacteria-induced pH fall at the bacteria-material interface: An in vitro model study, *Journal of Dentistry*, 査読有, 42 巻, 2014 年, 15-20, DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jdent.2013.11.006>

Kawashima J, Nakajo K, Washio J, Mayanagi G, Shimauchi H, Takahashi N, Fluoride-sensitivity of growth and acid production of oral Actinomyces: comparison with oral Streptococcus, *Microbiology and Immunology*, 査読有, 57 巻, 2013 年, 797-804, DOI: 10.1111/1348-0421.12098

[学会発表](計 25 件)

真柳弦, 高橋信博、益一哉、歯質-細菌インターフェイスにおける歯質脱灰の評価、平成 28 年度生体医歯工学共同研究拠点成果報告会、2017 年 3 月 24 日、東京医科歯科大学(東京)

真柳弦, 五十嵐公英、鷺尾純平、中條和子、土門ひと美、高橋信博、スマート ISFET を用いた口腔微小環境マルチイオン測定、東北大歯学研究科-東工大未来学術連携シンポジウム、2017 年 3 月 9 日、東北大学大学院歯学研究科(仙台)

曾田彩花、佐藤拓一、石黒和子、安彦友希、真柳弦、鷺尾純平、高橋信博、ペットボトルの口の部分に付着する細菌の量および構成(A pilot study)、第 6 回口腔保健用機能性食品研究会・総会、2017 年 1 月 29 日、鶴見大学会館(神奈川県)

真柳弦、五十嵐公英、鷺尾純平、中條和子、土門ひと美、高橋信博、ISFET のう蝕研究への展開、第 5 回生体医歯工学公開セミナー、2016 年 12 月 22 日、東京工業大学すずかけ台キャンパス（神奈川県）

Mayanagi G, Igarashi K, Washio J, Nakajo K, Domon H, Takahashi N, Evaluation of pH using an ISFET at the bacteria/restorative materials interface, International Symposium on Biomedical Engineering, 2016 年 11 月 10, 11 日, 東京医科歯科大学（東京）

Fukushima A, Mayanagi G, Sasaki K, Takahashi N, Corrosive effects of fluoride on titanium under artificial biofilm of *Streptococcus mutans*, The 11th International Workshop on Biomaterials in Interface Science, Innovative Research for Biosis-Abiosis Intelligent Interface Summer Seminar 2016, 2016 年 8 月 30, 31 日 東北大学大学院歯学研究科（仙台）

Fukushima A, Mayanagi G, Sasaki K, Takahashi N, Effect of Fluoride on Titanium Discoloration and Elution under Biofilm, 45th Annual meeting & Exhibition of the American Association for Dental Research, 2016 年 3 月 16 ~ 19 日, ロサンゼルス（アメリカ）

Ishiguro T, Mayanagi G, Fukushima A, Sasaki K, Takahashi N, Fluoride-coated tooth surface inhibits bacteria-induced pH fall at the biofilm/tooth interface, Innovative Research for Biosis-Abiosis Intelligent Interface Symposium -The 6th International Symposium for Interface Oral Health Science-, 2016 年 1 月 18, 19 日, 東北大学良陵会館（仙台）

Tian L, Sato T, Niwa K, Kawase M, Mayanagi G, Abiko Y, Washio J, Takahashi N, PCR-dipstick DNA chromatography for multiplex and semi-quantitative analysis of plaque biofilm microbiota, Innovative Research for Biosis-Abiosis Intelligent Interface Symposium -The 6th International Symposium for Interface Oral Health Science-, 2016 年 1 月 18, 19 日, 東北大学良陵会館（仙台）

三木彩希、真柳弦、安彦友希、騎馬和歌子、北川晴朗、北川蘭奈、林美加子、高橋信博、今里聡、S-PRG フィラー含有コンポジットレジン の *Streptococcus mutans* の糖代謝活性に対する抑制効果、日本歯科保存学会 2015 年度秋季学術大会（第 143 回）、2015 年 11 月 12, 13 日、文京シビックホール（東京）

Fukushima A, Mayanagi G, Sasaki K, Takahashi N, Effect of Fluoride on Titanium Corrosion under *Streptococcus mutans* Biofilm, The 63rd annual meeting of Japanese Association for Dental Research (JADR), 2015 年 10 月 30, 31 日, 福岡国際会議場（福岡）

福島梓、真柳弦、中條和子、佐々木啓一、高橋信博、人工バイオフィーム下におけるチタンの微生物腐食性、粉体粉末冶金協会平成 27 年度春季大会、2015 年 5 月 26 ~ 28 日、早稲田大学国際会議場（東京）

Ishiguro T, Mayanagi G, Fukushima A, Sasaki K, Takahashi N, Fluoride-coating on Tooth Surface Inhibits Bacteria-induced pH-fall at Biofilm-tooth Interface, 93rd General Session & Exhibition of the International Association for Dental Research, 2015 年 3 月 11 ~ 14 日, ボストン（アメリカ）

Tian L, Sato T, Niwa K, Mayanagi G, Kawase M, Tanner A.C.R, Takahashi N, PCR-dipstick DNA Chromatography for Semi-quantitative Analysis of Oral Microbiota, 93rd General Session & Exhibition of the International Association for Dental Research, 2015 年 3 月 11 ~ 14 日, ボストン（アメリカ）

Fukushima A, Mayanagi G, Nakajo K, Sasaki K, Takahashi N, Effects of bacterial oxygen consumption on corrosive properties of the titanium surface, NIH-Japan-JSPS Symposium 2014, 2014 年 10 月 23, 24 日, NIH Bethesda Campus, ベセスダ（アメリカ）

石黒朋子、真柳弦、佐々木啓一、高橋信博、バイオフィーム-歯面インターフェイス pH 測定装置を用いた各種フッ化物の pH 低下抑制効果の評価、第 56 回歯科基礎医学会学術大会・総会、2014 年 9 月 26, 27 日、福岡国際会議場（福岡）

Tian L, Sato T, Niwa K, Mayanagi G, Yamaki K, Kawase M, Tanner A.C.R, Takahashi N, PCR-dipstick DNA chromatography for multiplex analysis of oral microbiota, 第 56 回歯科基礎医学会学術大会サテライトシンポジウム, 2014 年 9 月 25 日, 福岡国際会議場（福岡）

Fukushima A, Mayanagi G, Nakajo K, Sasaki K, Takahashi N, Microbiologically induced corrosive properties of the titanium surface under artificial biofilm of *Streptococcus mutans*, 9th International Workshop on Biomaterials in Interface Science (Innovative Research for Biosis-Abiosis Intelligent Interface Summer Seminar 2014), 2014 年 8 月 26, 27 日, 宮城蔵王ロイヤルホテル（遠刈）

田)

Mayanagi G, Igarashi K, Washio J, Takahashi N, Glucose-induced acidification and tooth surface solubility at tooth-bacteria interface, Innovative Research for Biosis-Abiosis Intelligent Interface Symposium -The 5th International Symposium for Interface Oral Health Science-, 2014年1月20, 21日, 東北大学片平さくらホール(仙台)

Fukushima A, Mayanagi G, Nakajo K, Sasaki K, Takahashi N Microbiologically-induced corrosive property of titanium under artificial biofilm of *Streptococcus mutans*, Innovative Research for Biosis-Abiosis Intelligent Interface Symposium -The 5th International Symposium for Interface Oral Health Science-, 2014年1月20, 21日, 東北大学片平さくらホール(仙台)

⑳ Sato T, Kawamura Y, Mayanagi G, Washio J, Takahashi N: Oral microbiota in crevices around dental implants: profiling of the oral biofilm, Innovative Research for Biosis-Abiosis Intelligent Interface Symposium -The 5th International Symposium for Interface Oral Health Science-, 2014年1月20, 21日, 東北大学片平さくらホール(仙台)

㉑ Fukushima A, Mayanagi G, Nakajo K, Sasaki K, Takahashi N, Possible involvement of oxygen concentration cell in microbiologically-induced titanium corrosion, International College of Prosthodontists, 2013年9月18~21日, トリノ(イタリア)

㉒ Mayanagi G, Igarashi K, Washio J, Takahashi N, pH response and mineral solubility of tooth root surface at tooth-bacteria interface, 8th International Workshop on Biomaterials in Interface Science -Innovative Research for Biosis-Abiosis Intelligent Interface Summer Seminar 2013-, 2013年8月29, 30日, さんさ亭(遠刈田)

㉓ Mayanagi G, Igarashi K, Washio J, Takahashi N, Involvement of Tooth Surface Solubility in Stephan Curve, 2nd Meeting of the International Association for Dental Research -Asia Pacific Region, 2013年8月21~23日, Plaza Athenee, バンコク(タイ)

㉔ Fukushima A, Mayanagi G, Nakajo K, Sasaki K, Takahashi N, Involvement of oxygen-concentration in microbiologically-induced corrosion of titanium under biofilm, 2nd Meeting of the International Association for Dental Research

-Asia Pacific Region, 2013年8月21~23日, Plaza Athenee, バンコク(タイ)

[図書](計1件)

Sato T, Kawamura K, Yamaki K, Ishida N, Tian L, Takeuchi Y, Hashimoto K, Abiko Y, Mayanagi G, Washio J, Matsuyama J, Takahashi N Oral Microbiota in Crevices Around Dental Implants: Profiling of Oral Biofilm, In: K. Sasaki, O. Suzuki, N. Takahashi (eds.) Interface Oral Health Science 2014: Innovative Research on Biosis-Abiosis Intelligent Interface, Springer, 2015年, 45-50ページ

6. 研究組織

(1) 研究代表者

真柳 弦 (MAYANAGI, GEN)

東北大学・大学院歯学研究科・助教

研究者番号: 10451600