研 究 者：小西　博和（所属：鶴見大学歯学部小児歯科学講座）

研究題目：近交系マウスのフッ化物感受性に関する研究

目　的：

フッ化物が齲蝕予防に有効かつ安全であることは広く知られている。Bibby（1942）らの報告によって，初めてフッ化物が齲蝕抑制効果を有することが証明されて以来，フッ化物応用における齲蝕予防効果に関する研究は疫学的調査が主に行われてきた。一方で，基礎研究は少なく，抜去歯を用いたエナメル質表層脱灰面へのフッ化物の取り込みやフッ化物含有の充填剤のエナメル質への取り込みに関する研究が散見されるだけである。

現在，様々なフッ化物配合の歯磨剤や洗口液が市販されて，広く一般社会で齲蝕予防のためのフッ化物応用が浸透している。しかしながら，フッ化物洗口ガイドラインでは，フッ化物応用による齲蝕予防の有効性と安全性は示されているものの，個人レベルでの齲蝕予防効果としての宿主の感受性には言及していない。

そこで，本研究では，すでに齲蝕誘発実験系の中で齲蝕感受性マウスとして確立しているC57BL/6JJc1, BALB/cAJc1, DBA/2JJc1 マウスの 3 系統を用い，齲蝕予防効果としてのフッ化物応用に対する宿主の感受性の違いが存在するのか否かを検討した。

対象および方法：

1. 供試マウス

既に齲蝕感受性モデルマウスとして確立している近交系マウス C57BL/6JJc1, BALB/cAJc1, DBA/2JJc1 の 3 系統を実験に用いた。

2. 供試菌株と培養条件

Streptomycin 耐性 *Streptococcus mutans* PS-14（血清型 C 型）菌株を用いた。培養条件は，前培養として 3ml の brain heart infusion（BHI）broth に 1 ml の凍結保存菌液を加え一晩 37℃で嫌気培養し，前培養菌液 100 μl を 10ml の BHI broth に加え 6 時間好気 37℃で振とう培養後，さらに 10 μl を新たな BHI broth へ接種し，一晩振とう培養した後，菌液濃度を 10^7〜10^8CFU/ml に調整した。

3. 齲蝕実験

供試マウスを生後 21 日齢で離乳，供試マウス口腔内に *S. mutans* が存在しないことを swab 検体を培養して確認し，飼料としてスクロース 30% 含有 DIET#2000 を与えた。22 日齢から 28 日齢までの 1 週間毎日 50 μl ずつマイクロピペットを用い口腔内に調整後の供試菌を接種し，感染終了翌日の 29 日齢に供試菌株の定着および菌数を 10 秒間の swab を段階希釈し，0.2 mg/ml Streptomycin 含有 Mitis Salivarius Agar にて培養し確認した。この間の飲料水は水道水のみを自由摂取とした。30 日齢より 6 匹ずつ 4 群に分け，実験群には NaF を 5 ppm，10 ppm，20 ppm に調整した水道水を，対照群は水道水のみを自由摂取させた。35 日齢，42 日齢で供試菌株

の定着を swab で確認し，42 日齢にてクロロホルム麻酔下で安楽死させた後に下顎骨の摘出を行った。右側下顎臼歯は齲蝕スコアの算定を，左側下顎臼歯はエナメル質表層フッ化物測定に用いた。

4. EPMA 解析

摘出した左側下顎骨の軟組織を除去した後，水洗，乾燥，包埋し，第一臼歯遠心裂溝部で頬舌的に切断，切断面は耐水研磨紙で鏡面研磨し，観察面に金蒸着を施して，電子線マイクロアナライザ〔Electron Probe Microanalysis（EPMA）〕観察試料とし，反射電子像〔Backscattered electron image（BEI）〕観察にてエナメル質表層脱灰を認めた部位と認めない部位を Map Analysis にて F 元素の解析を行った。また，フッ素定量は EPMA による解析の後，EPMA 解析に基づいて 15 × 4 μm 四方に含まれるフッ素量〔Counts per second（CPS）〕を比較した。

5. 統計解析

齲蝕スコアの各系統の実験群と対照群間の差の検定は，Mann-Whitney の U 検定で解析し危険率 5%とした（SPSS Version 14.0J）。

結果および考察：

すべての系統において，対照群および実験群ともに，供試菌の経時的な口腔内定着菌数の違いは認められず，対照群におけるカリエススコアもすでに報告されているレベルに一致した。フッ化物応用による齲蝕抑制効果について検討したところ，C57BL/6 マウスでは 5 ppm，10 ppm，20 ppm の NaF において対照群との間に有意差が認められ，低濃度フッ化物応用による齲蝕抑制効果が認められることから，フッ化物感受性が高い系統であることが示された。BALB/cA マウスでは，10 ppm と 20 ppm の NaF において有意に齲蝕が抑制されたが，DBA/2J マウスでは対照群との間に有意差が認められたのは 20 ppmNaF のみであったことから，BALB/cA マウスは中程度の感受性，DBA/2J マウスは低感受性であることが示された。（Fig. 1, 2, 3）

この 3 系統間でみられたフッ化物感受性の違いが，エナメル質表層へのフッ素の取り込み量の差異に起因している可能性を検証するため，EPMA 解析を行った。健全エナメル質表層にはフッ素は取り込まれず，初期脱灰部表層では系統差および NaF 濃度に関係なく一定量のフッ素が微量元素として検出された。（Fig. 4）この結果から，本研究で得られた近交系マウスにおけるフッ化物感受性の違いは，菌の定着状態，エナメル質表層へのフッ素の取り込みという局所的要因によるものではないことが示唆され，全身的影響としての宿主の感受性の違いと捉えるべきであると考えられた。

成果発表：（予定を含めて口頭発表，学術雑誌など）

・ポスター発表，発表者

① The mouse strains with different susceptibility to fluoride
88th General Session & Exhibition of IADR　at the Barcelona Spain July 14-17 2010

②フッ化物応用が齲蝕予防に及ぼす影響　特に近交系マウスを用いた基礎的研究
第 47 回日本小児歯科学会大会，大阪大学，2009. 5. 15-16

③ Effect on Inducing Dental Caries in Inbred mouse Using Fluoride

87th general session of The IADR at the Miami beach convention center, Miami, Florida, April 1～4 2009

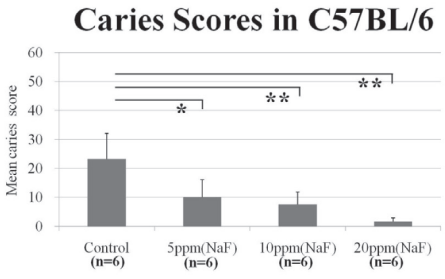


Fig. 1 The mean caries score and standard deviation for C57BL/6 (n=6). Control vs 5ppm= 0.015, Control vs 10ppm= 0.005, Control vs 20ppm= 0.0017 (*p<0.05, **p<0.005)

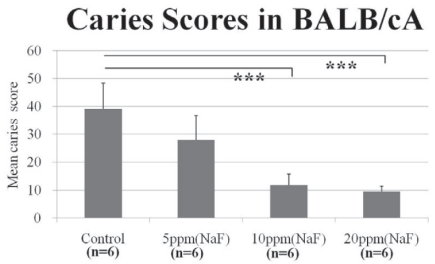


Fig. 2 The mean caries score and standard deviation for BALB/cA (n=6). Control vs 5ppm= 0.056, Control vs 10ppm= 0.0003, Control vs 20ppm= 0.0004 (***p<0.0005)

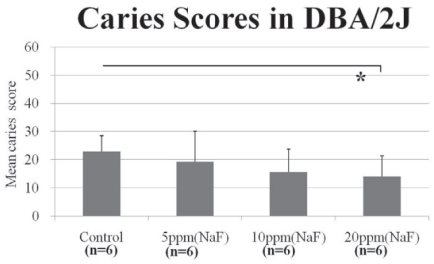


Fig. 3 The mean caries score and standard deviation for BALB/cA (n=6). Control vs 5ppm= 0.482, Control vs 10ppm= 0.524, Control vs 20ppm= 0.039 (*p<0.05)

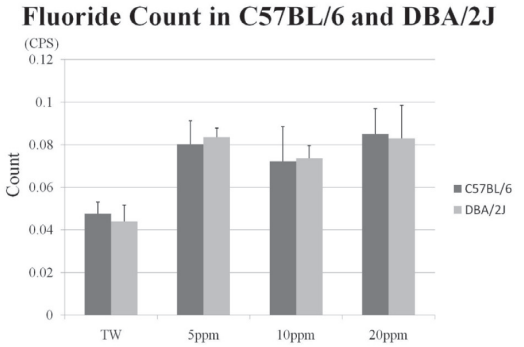


Fig.4 The mean Fluoride count and standard deviation for C57BL/6 (n=4)and DBA/2J (n=4)