



Title	高水溶性カルシウム素材による歯質強化に関する研究
Author(s)	田中, 智子
Citation	大阪大学, 2022, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/89478
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

高水溶性カルシウム素材による歯質強化に関する研究

大阪大学大学院歯学研究科
口腔分子免疫制御学講座
予防歯科学
松本 智子

目次

1. 序文

1-1. 歯と健康

2 初期う蝕の結晶評価法の開発

2-1. 材料と方法

2-1-1. 材料

2-1-2. 初期う蝕歯 (表層下脱灰病巣) の調製法

2-1-3. 再石灰化処理法

2-1-4. 再石灰化評価法 : Transversal micro radiography 法

2-1-5. 再結晶化評価 : 広角 X 線回折法-小角 X 線散乱法

2-1-6. 統計解析

2-2. 結果

2-2-1. TMR 解析

2-2-2. 広角 X 線回折-小角 X 線散乱 (WAXRD-SAXS) 解析

2-3. 考察

3. 高水溶性カルシウムによる初期う蝕の再石灰化・再結晶化促進検討

3-1. 材料と方法

3-1-1. 材料

3-1-2. 表層下脱灰病巣 (初期う蝕歯) の調製法

3-1-3. 再石灰化評価法

3-1-4. カルシウム可溶化性評価法

3-1-5. 水溶性カルシウム添加による再石灰化効果の検証法

(1) 人工唾液に最適なリン酸化オリゴ糖カルシウム添加量を Ca/P 比率評価

(2) リン酸化オリゴ糖カルシウムと水溶性カルシウム CaCl_2 の再石灰化能の比較

3-1-6. カルシウム添加による結晶再生効果評価法

3-1-7. カルシウム フッ化物とイオンの共存性評価法

3-1-8. カルシウムとフッ化物添加による再石灰化効果検証法

(1) リン酸化オリゴ糖カルシウムの再石灰化促進に最適なフッ化物の添加濃度評価

(2) リン酸化オリゴ糖カルシウムとフッ化物併用時の再石灰化促進に最適なカルシウム添加量を Ca/P 比率で評価。

(3) リン酸化オリゴ糖カルシウムなし水溶性カルシウム CaCl_2 とフッ化物の再石灰化能比較

3-1-9. 蛍光 X 線分析 (XRF) と X 線吸収端近傍構造分析法(XANES) 分析による フッ化物評価

3-1-10. 統計解析

3-2. 結果

3-2-1. カルシウム可溶化性評価

3-2-2. 水溶性カルシウム添加による再石灰化効果比較結果

(1) リン酸化オリゴ糖カルシウムの再石灰化促進に最適なリン酸カルシウムモル濃度比、リン酸オリゴ糖カルシウムの最適添加量を人工唾液中のリン酸に対するリン酸カルシウムモル濃度比率として評価

(2) リン酸化オリゴ糖カルシウムと水溶性カルシウム CaCl_2 の再石灰化比較

3-2-3. 水溶性カルシウムの再結晶化効果比較較結果

3-2-4. カルシウム フッ化物とイオンの共存性評価

3-2-5. 水溶性カルシウムとフッ化物併用の再石灰化効果

(1) リン酸化オリゴ糖カルシウムとフッ化物の再石灰化比較

(2) 水溶性カルシウム (CaCl_2 /リン酸化オリゴ糖カルシウム) とフッ化物の再石灰化比較

3-2-6. リン酸化オリゴ糖カルシウムとフッ化物で再石灰化処理特のフッ化物効果

(1) XRF 法によるフッ化物の分布

(2) XANES 分析による結晶性測定結果

3-3. 考察

4. 結論

謝辞

引用文献

1. 序文

1-1. 歯と健康

世界の中で最長寿国である日本は、一方で少子化も進む典型的な少子高齢化社会となり、医療コストの上昇、労働力不足など国民経済を圧迫する深刻な状況になっている。この現状を打破すべく、国家レベルの取り組みとして“健康寿命”を延ばす試みが推進されている。健康寿命の延伸において欠かせない因子は“食”である。命の根幹をなす“食”は、人間にとって欠かせない欲求であり、健康な体を作る物そのものである。そこで“食と健康”を満たすためには、まず何でも食べられることができ、消化できる健康な消化器官を維持することが必要不可欠である。中でもその入り口である口腔は、全身の健康維持において大きな役割を果たしており、WHOは口腔の健康はQOLの決定要因であると2003年世界口腔保健報告書(1)で述べている。事実、歯の喪失数と介護日数は相関性が高く(2)、健康長寿において口腔機能は多大な影響を与える要因であるといえる。しかし現状は、口腔機能の重要な役割を担う歯の高齢者における喪失率は依然として高い(3)。歯の喪失要因の2大疾患はう蝕と歯周病であるが、その背景要因として、残存歯の増加による根面う蝕の発生、硬組織の疲労、長寿化に伴う服薬量の増加、唾液分泌能の低下、あるいは社会環境の変化によるストレスなどの要因があると考えられている(4)。

このような環境下、近年のう蝕への対処法は形態的修復処置から発症予防の流れに動きつつある(5)。う蝕予防において、フッ化物の応用は効果的な方法であり(6)、様々な市販製品に用いられている。一方、歯のエナメル質はカルシウムを主成分とする結晶であること、飲食毎に口腔細菌が生成する酸により僅かに溶解してカルシウムが喪失(脱灰)していることから、エナメル質へのカルシウム補充によって効果的にう蝕予防効果が得られる可能性も考えられる。実際、唾液にカルシウムを添加することにより初期う蝕の再石灰化を促進し、う蝕予防効果が得られることが報告されている(7-9)。しかし、エナメル質へのフッ化物とカルシウムの補充を検討する際には課題がある。フッ化物は化学反応性が高いため唾液の中性環境下では容易にフッ化カルシウムを形成し不溶化する。同様にカルシウムも唾液中のリン酸濃度がカルシウムに対して高いため、容易にリン酸カルシウム形成し不溶化し易い。この不溶化状態を再度可溶化させる工程が必要であることから、臨床応用は進んではいなかった。さらに歯エナメル質の結晶構造は、カルシウムを主成分とするハイドロキシアパタイト結晶であり、その結晶構造が人体で最も硬い組織を生み出している(10)ことから、初期う蝕の回復における重要な因子は結晶構造の回復であると考えられる。そこで初期う蝕へカルシ

ウムの強化による有力な歯質強化方法を検討するにあたり、結晶構造の回復を目標としなければならない。

従来、初期う蝕を評価する方法はミネラル含有量や硬さ変化による定量評価 (11, 12, 13) が標準的であった。一方で歯エナメル質の結晶構造は、分解能透過電子顕微鏡 (Transmission electron microscopy : TEM), 走査型電子顕微鏡 (Scanning Electron Microscopy:SEM) による構造観察, X線回折 (X-ray diffraction:XRD) による定性と解析手法が限られており、初期う蝕の表層下数百 μm までの領域における数 μm 単位の結晶変化を定性・定量的に捉えることは難しいとされていた (14)。そこで、本研究では、まず初期う蝕の結晶の定性・定量変化を測定できる手法を構築し、次に有力な高水溶性カルシウム素材も用いた初期う蝕の効率的な再石灰化・再結晶化を得られる方策を検討することを目的とした。

本研究では、初期う蝕における数 μm ~ 数十 μm 単位結晶の定性・定量のために、X線を μm オーダーに絞り、広角X線回折 (Wide angle X-ray diffraction:WAXRD), 小角X線散乱 (Small angle X-ray diffraction:SAXS) を用いて結晶性、結晶量を評価した。さらに、X-ray fluorescence (XRF) と X-ray absorption fine structure (XANES) を用いてフッ化物がエナメル質結晶に与える効果の評価方法を検討した。数 μm 毎に厳密に結晶性を測定するためには、X線ビームの直径が μm オーダー単位で調整できること、かつ、ビームの直線性の揺らぎも μm 范囲に留めることができることから、高いエネルギーで安定した $\mu\text{-X}$ 線ビームを調整する必要があった。そこで高輝度放射光施設 SPring-8 (兵庫県播磨) のビームライン (BL40) を採用し、測定手法の構築を行った。次に構築した手法を用いて、高水溶性カルシウムによる初期う蝕の結晶再生について検討を加えた。有力なカルシウム素材として、高水溶性の有機カルシウム素材であるリン酸化オリゴ糖カルシウムに注目した。リン酸化オリゴ糖カルシウムは、生理学的 pH 条件 (pH 6.0 ~ 7.0) で、他のミネラルと結合し不溶物を形成することなく溶解性を保つことで、生物学的に利用可能なカルシウムイオン濃度を高めることを可能とすることが報告されている (15, 16) ことから、リン酸と共にカルシウムの可溶化度を高め効率的な再石灰化・結晶再生を促す可能性があると考えた。そこで、歯を構成するリン酸とカルシウムの構成比率に着目した。歯エナメル質を形成するハイドロキシアパタイト結晶のリン酸カルシウムモル濃度比率は (17) 1.67 である一方、唾液中での比率は 0.3 ~ 0.7 であり (18), 歯エナメル質のカルシウム濃度が低かった。そこで唾液中のミネラル比率を基軸とし、歯エナメル質への最適なカルシウム添加条件について検討を加えた。

2. 初期う蝕の結晶評価法の開発

2-1. 材料と方法

2-1-1. 材料

特に記載のない場合、化学薬品については、富士フィルム和光純薬工業株式会社の特級試薬を使用した。4-(2-ヒドロキシエチル)-1-パイパーアジンエタンスルホン酸 (HEPES)は同仁化学から、ウシ歯は大阪市食肉衛生検査所より入手した。

2-1-2. 初期う蝕歯 (表層下脱灰病巣) の調製法

ウシ歯のエナメル質部分を $7 \times 5 \times 3$ mm (縦×横×奥行) に切り出し、エナメル面を露出させてレジン樹脂 (GC ユニファーストラボ, Tokyo Japan) にて包埋し、露出したエナメル面の研磨処理を行った (300 番手, 800 番手, 1000 番手, 2000 番手 3M wrapping paper)。露出したエナメル面は 3 分割し、1/3 に被覆処理を行い健全部として保存し、残り 2/3 について脱灰処置を行った。8 %メチルセルロールゲル (Fluka Milwaukee WI USA Metcel MC, Fluka, USA) にサンプルを包埋し、37 °Cで 24 時間安定化させた後に、0.1 ml 乳酸 (pH 4.6) を添加した (19)。脱灰処理終了後、脱灰面の 1/2 の被覆処理を行い脱灰部 (初期う蝕部) として保存し、脱灰部残り 1/2 を再石灰化処理部とした。

2-1-3. 再石灰化処理法

人工唾液を、Ca 6 mM, P 3.6 mM, K 100 mM になるように CaCl_2 , KH_2PO_4 , KCl を用いて調整し、4-(2-ヒドロキシエチル)-1-パイパーアジンエタンスルホン酸 (HEPES) の最終濃度 20 mM pH 6.5 になるよう KOH を用いて調整した。調整後、初期う蝕歯 1 サンプルあたり 20 ml 人工唾液を添加し、37 °C, 24 時間再石灰化処理した。

2-1-4. 再石灰化評価法 : Transversal micro radiography 法

初期う蝕部の再石灰化処理後、被覆処理をすべて除去した。エナメル質ブロックを、脱灰部 (demineralized: DEM), 再石灰化部 (re-mineralized: REM), 健全部 (sound: SOU) を含む歯面に垂直な断面をワイヤーソー (Well Diamond Wire Saws Co. Ltd, Germany)

を用いて $150 \pm 5 \mu\text{m}$ に切り出し, 鏡面研磨 (3M wrapping paper 2000番, 14000番) により断面の水平性を担保した。次に薄片化サンプルと共にアルミニウムステップエッジを設置し, 反対側に感光フィルム High-resolution plate (Konica Minolta opt, Inc., Japan) を置き, X線 (PW-3830, Philips Netherlands) を平行に照射 (Cu-Ka X-ray, 20 kv, 20 mA, 13分) することで, 深さ方向のミネラル量をフィルムの濃淡として検出した (図1)。現像されたフィルムは画像処理システム (TMR v1.25, Inspektor Research Systems, the Netherlands) で解析した。得られたミネラルプロファイルに基づき, 深さに対する積分値から脱灰部, 再石灰化部, 健全部の各エリアのミネラル喪失量 (ΔZ)を算出した。脱灰部のミネラル喪失量 (ΔZ_d), 再石灰化部におけるミネラル喪失量 (ΔZ_r), 再石灰化率を $(\Delta Z_d - \Delta Z_r) / \Delta Z_d \times 100$ として, 再石灰化の効率を評価した (20, 21)。

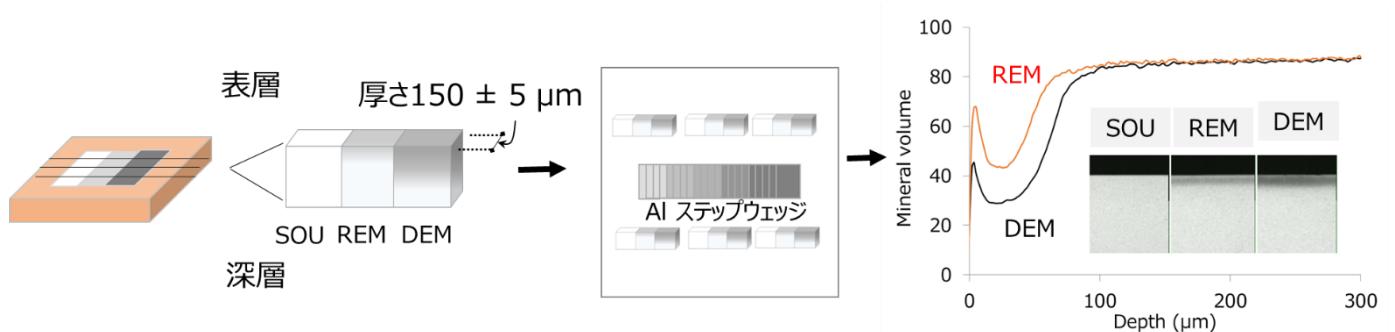


図1. 初期う蝕歯サンプルの Transversal micro radiography (TMR) 法による分析方法

初期う蝕歯サンプル(DEM, REM, SOU 含む)を断面方向に $150 \pm 5 \mu\text{m}$ 厚に切り出し, 感光フィルムに設置してX線照射した。得られた画像から, 画像処理システム (TMR v1.25, Inspektor Research Systems, the Netherlands) で解析した。

2-1-5. 再結晶化評価：広角 X 線回折法-小角 X 線散乱法

高輝度放射光施設の SPring-8 のビームライン BL40XU (22) を用いて, X 線エネルギー 1 5.0 keV (帯域幅: 2 %) に調整し, X 線をピンホールに通して 6 μm 大きさのビームになるよう調整した (23)。X 線フラックスは 3×10^{11} photons/s に設定した。サンプルと広角 X 線回折 (Wide-angle X-ray diffraction: WAXRD) のカメラ長を 180 mm, 小角 X 線散乱 (Small-angle X-ray scattering: SAXS) のカメラ長を 3000 mm に設置して(図 2), X 線イメージインテンシファイア (V5455P, Hamamatsu Photonic, Hamamatsu, Japan) を搭載した X 線検出器に, 測定位置調整のために冷却システム搭載の CCD カメラ (ORAC- II ER-, (Hamamatsu Photonics) を組み合わせたものを用いた (24)。TMR 法で再石灰化量を評価したウシ歯エナメル質薄片サンプルの断面に X 線 μ ビームが垂直に当たるよう設置し, エナメル表面から深部に向かって 5 μm の間隔で直径 6 μm の X 線ビームを移動させ, 広角 X 線回折および小角散乱のパターンの画像を同時に記録した (25)。広角散乱におけるハイドロキシアパタイト (Hydroxyapatite: HA) に由来する回折スポットの強度から, 各測定部位におけるハイドロキシアパタイトの結晶量を求めた。また, 小角散乱における赤道反射の強度から, 各測定部位の結晶中の空隙(ボイド) 量の指標を得た。バックグラウンド減算後, 100 面 (0.815 nm のブレグ間隔で微結晶の長軸に垂直に現れる HA に特異的なピーク) の赤道反射の 2 次元積分強度を, HA 微結晶の量の指標として測定した。次に, 表面から 150 μm を超える強度プロファイルを統合して, このゾーンの健全領域の結晶量とした。次に, 結晶の回収率を計算するため, 結晶回復率 (% Crystal)を次のように定義した。% Crystal = $\{\sum (1 - d) - \sum (1 - r)\} / \sum (1 - d) \times 100$ 。d, r は, それぞれ脱灰ゾーンと再石灰化ゾーンの各深さの正規化された強度を示した。

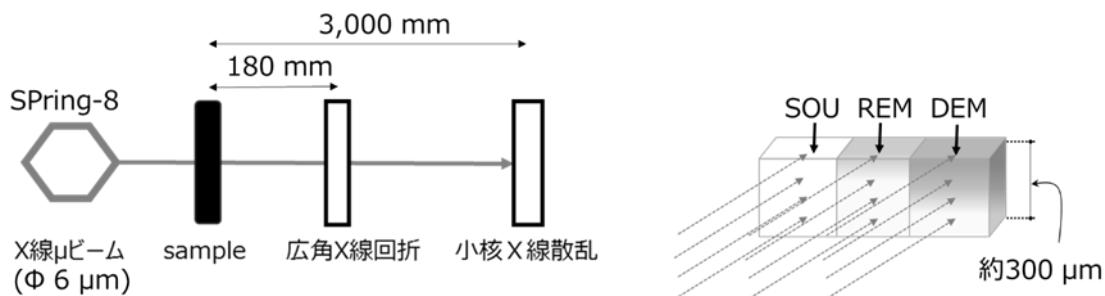


図 2. WAXRD-SAXS を用いた歯エナメル質の結晶測定方法

6 μm 径のサイズに絞り込んだ直線性の高い X 線マイクロビームを用いて, 水平ステージにセットした。初期う蝕歯サンプル (SOU, DEM, REM を含む) の横断面に対して, 初期う蝕歯サンプル表面から脱灰深部へ向けて 5 μm ステップでサンプルを移動させ, ステップ毎ビームを照射し WAXRD と SAXS で検出した。サンプルから各検出器までの距離は WAXRD 180mm, SAXS 3000mm に調整した。照射時間は WAXRD 1.0 秒, SAXS 0.1 秒とした。

2-1-6. 統計解析

TMR および X 線回折分析からのデータは, SPSS version 14 データ分析ソフトウェアを使用して解析を行った。処理群の評価は ANOVA を使用し, $p < 0.05$ を有意差とした。

2-2. 結果

2-2-1. TMR 解析

初期う蝕試料を再石灰化処理した後, 150 μm 厚に切り出した薄片化サンプルを用いて TMR 法で解析を行い, 得られたミネラルプロファイル (図 3) を元に再石灰化度を算出した。初期う蝕の ΔZd ($3867 \pm 868 \text{ vol\%} \cdot \mu\text{m}$, $n = 5$), 再石灰化部 ΔZr ($2702 \pm 764 \text{ vol\%} \cdot \mu\text{m}$, $n = 5$)。再石灰化率は $30.4 \pm 1.4\%$ ($n = 5$)。脱灰部に対して有意な再石灰化が確認された ($p < 0.05$, Student's paired t test)。

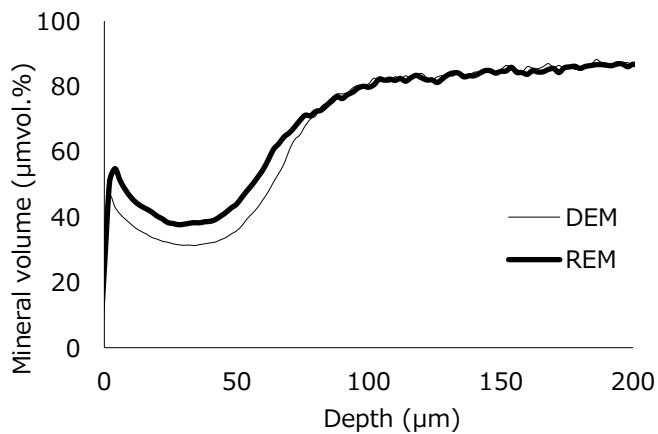


図 3. TMR 法により初期う蝕歯を解析したミネラルプロファイル
縦軸ミネラル量, 横軸 歯の表層から深層への深さを示した。

2-2-2. 広角 X 線回折-小角 X 線散乱 (WAXRD-SAXS) 解析

TMR 法で解析した初期う蝕歯サンプルを用いて WAXRD-SAXS の評価をした。TMR 法を同一サンプルで評価することで, TMR 法で得られたミネラルプロファイル (図 3) と WAXRD で得られた HAp プロファイル(図 4)を直接比較した。ミネラル変化が HAp 結晶ないし他の結晶もしくは非結晶物の変化なのかの判別が可能となった。WAXRD から得られる HAp 特異的な 100 面の反射強度変化 (図 4a) を積分した結果をプロファイル化した (図 4b)。これらの結果から, HAp 結晶プロファイルの変化が TMR 法により得られたミネラルプロファイルと同様であったことから, 再石灰化したミネラルの一部は HAp 結晶として再生することが示唆された。WAXRD-SAXS の同時撮影から WAXRD で測定した部位の SAXS の強度が検出され (図 5a), この強度変化を積分した結果をプロファイル化した (図 5b)。その結果, SAXS のプロファイルは WAXRD プロファイルに反比例していた。これは HAp 結晶量変化に反比例する初期う蝕部位におけるボイドの変化を示唆していた。つまり, 初期う蝕形成における HAp の喪失や回復が, ボイドの増減の原因であると考えられた。また SAXS の強度は一定方向で増減していたことから, 初期う蝕において増減した HAp は元の健全歯と同様の HAp 結晶配向性を維持していることが示唆された。

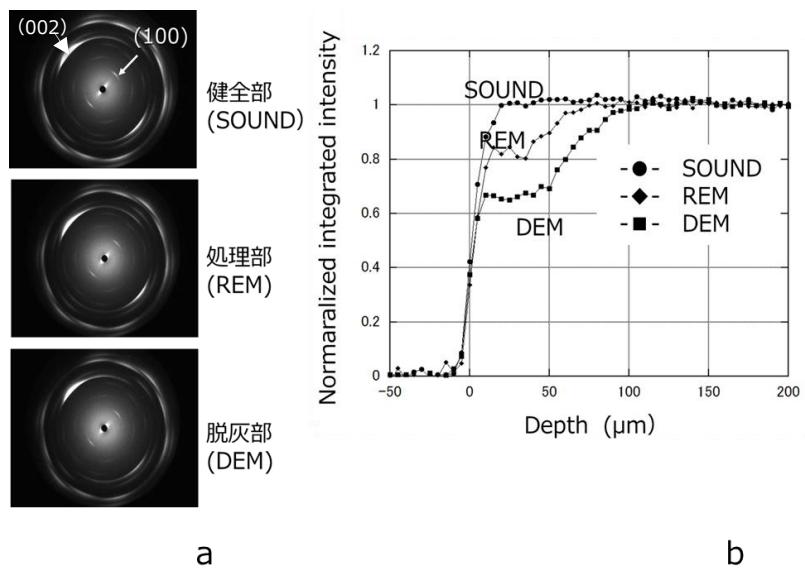


図 4. WAXRD から得られた初期う蝕歯 (DEM, REM, SOU) のパターン

- 初期う蝕歯サンプル (SOU, DEM, REM) の深さ方向の 100 面の強度のパターンを示した。短い矢印は, HA₁P_{0.6} 微結晶から 100 面の赤道反射を示し, 短い矢印は (002) 子午線反射を示した。 HA₁P_{0.6} 結晶の c 軸の方向は子午方向の異なる 2 ペアの回折図が重ね合わされることが多く, c 軸は互いに約 90° 傾いていた。
- 初期う蝕歯サンプル (SOU, DEM, REM) の深さ方向の強度変化プロットを示した。エリア毎 6 領域を測定した。6 領域の平均値を採用し、さらにサンプルの厚の差異を補正するために, 100~150 μm の領域の平均強度で正規化して, 5 つのサンプルの値を平均値化しプロットした。

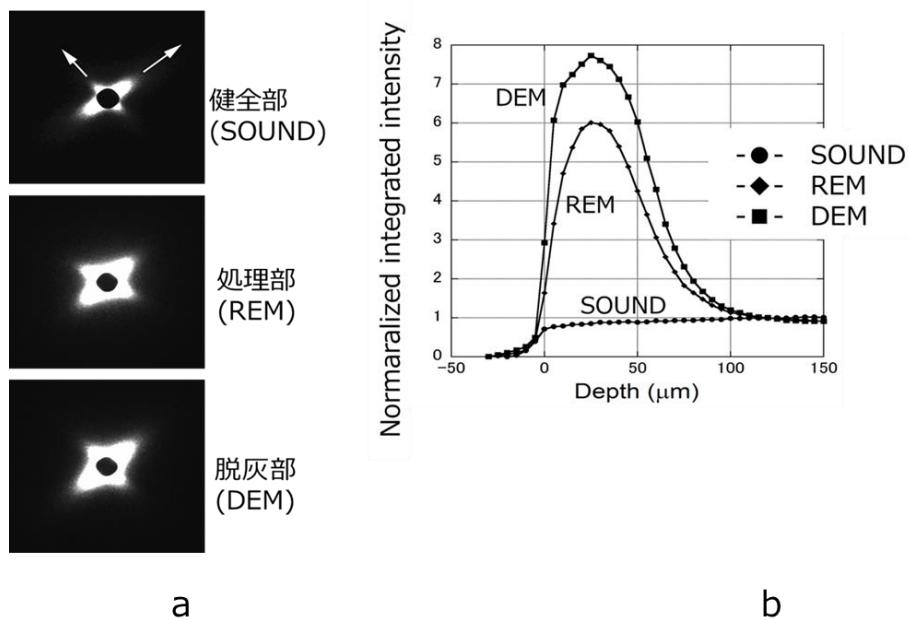


図 5. SAXS から得られた初期う蝕歯 (DEM, REM, SOU) のパターン

- a. 初期う蝕歯サンプル (SOU, DEM, REM) の深さ方向の 100 面の強度のパターンを示した。得られたパターンは、2 つの異なる方向の回折像が重なっていた。
- b. 初期う蝕歯サンプル (SOU, DEM, REM) の深さ方向の総赤道散乱強度の変化プロットした。サンプルの厚の差異を補正するために深さ 100~150 μm の平均強度で正規化した。プロットは、5 つのサンプルのデータを平均化しプロットした。

2-3. 考察

1960 年代より初期う蝕の再石灰化研究が行われてきた (26, 27, 28, 29)。初期う蝕における再石灰化の標準的な評価方法として、X 線透過法で微量なミネラル密度の変化を直接測定する TMR 法が用いられているが、本法による測定は薄片化ワナメル質の断面全体の X 線吸収から分析されるため、HAp 結晶の配向性や増減量の評価まではできなかった (14, 30)。しかし歯の質を決定付ける因子は、結晶の配向性とその増減量に反映されることから、本研究では、八木ら (25) によって構築されたマイクロビーム (直径 6 μm) X 線回折法を使用して、初期う蝕の再石灰化部位における数 μm 単位の極微小の結晶変化の定性・定量および配向性について直接検出

する方法を確立した (31)。検討を進めるために同一サンプルを用いて、以下の 3 つの手法で初期う蝕を評価した。① TMR 法を用いてミネラル密度変化定量化を行った。② WAXRD で HAp 結晶子に由来した 100 面の回折強度から結晶量の定量化と、その配向性を同定した。③ SAXS で得られる反射強度が HAp 結晶子の喪失の結果形成されたボイドを反映していることから、反射強度を面積のボイドの増減量として定量化した (32)。TMR 法は、初期う蝕部位の再石灰化部におけるカルシウムをリン酸カルシウムの非結晶物の堆積やリン酸カルシウムから構成されるアモルファスリン酸カルシウム、カルシウムのリン酸三カルシウムといった HAp と異なる結晶物を区別することができないため、ミネラル密度の増加として評価しているが、WAXRD では HAp 結晶物のみが抽出できる。したがって、3 つの評価法を合わせて考察することで、初期う蝕部位におけるエナメル質の結晶構造変化の解析を可能とした。これまで Tsuda and Arends ら (33) は、マイクロラマン分光法によるヒトエナメル質の HAp 微結晶の配向性の評価を報告している。彼らの報告によると、ヒトエナメル質の HAp 結晶子は高度に配向しており、HAp 結晶子の c 軸の平均配向は外面に垂直であった。ただし、マイクロラマン法では、初期う蝕における再石灰化後の HAp 微結晶の変化量と配向性を検出することはできなかった。これに対して本研究では、配向性だけではなく、その領域の結晶性と変化量を評価することが可能となった。

3. 高水溶性カルシウムによる初期う蝕の再石灰化・再結晶化促進検討

3-1. 材料と方法

3-1-1. 材料

リン酸化オリゴ糖カルシウム: Phosphate oligosaccharides of calcium はグリコ栄養食品株式会社より POs-Ca®50 として入手した。POs-Ca®50 は馬鈴薯澱粉を酵素分解してグルコースやマルトースを生産する糖化工程の中で、副産物として作られて専ら捨てられていたリン酸化糖を再生利用した独自開発した食品素材で、3-6 のグルコース単位にリン酸基が 1 つないし 2 つ結合したオリゴ糖のカルシウム塩である (31) (図 6)。このカルシウムの含有量は 5.0 % (w/w) で、単糖類や二糖類を含まないため、ノンシュガー・シュガーレスの表示可能なカルシウム素材である。

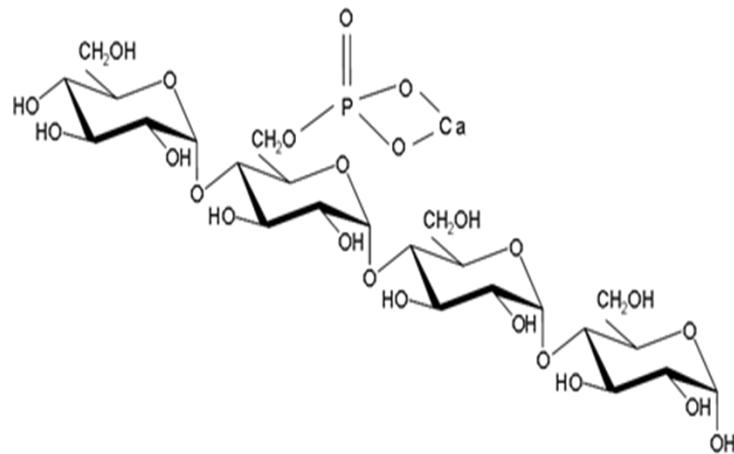


図 6. リン酸化オリゴ糖カルシウム構造図

3-1-2. 表層下脱灰病巣（初期う蝕歯）の調製法

2-1-2. 表層下脱灰病巣調製と同様の方法で行った。

3-1-3. 再石灰化評価法

2-1-4. 再石灰化評価と同様の方法で行った。

3-1-4. カルシウム可溶化性評価法

人工唾液を、Ca 6 mM, P 3.6 mM, K 100 mM になるように CaCl_2 またはリン酸化オリゴ糖カルシウム, KH_2PO_4 , KCl を用いて調整し, 4- (2-ヒドロキシエチル) -1-パイパーアジンエタンスルホン酸 (HEPES) の最終濃度 20 mM pH 6.5 になるよう KOH を用いて調整した。各液を 37 °C に調温後カルシウムイオン濃度をイオンメーター (F-52 堀場製作所) を用いて、5 分間隔のインターバルで 40 分間測定した。

3-1-5. 水溶性カルシウム添加による再石灰化効果の検証法

(1) 人工唾液に最適なリン酸化オリゴ糖カルシウム添加量の Ca/P 比率評価

人工唾液を（表 1）の配合で調整した。まず Ca (CaCl_2) 1.5mM, P (KH_2PO_4) 3.6 mM, K (KCl) 100 mM になるように調整し、次に Ca/P 比率を (0.4, 1.0, 1, 67, 3.0) にするため、リン酸化オリゴ糖カルシウムを最終濃度が 0, 0.17, 0.26, 0.36, 0.74 %となるように添加した。最後に KOH を用いて HEPES の終濃度 20 mM pH 6.5 に調整した。各処理液を用いて、初期う蝕歯サンプルあたり 20 ml 添加し、37 °C, 24 時間再石灰化処理をした。反応後、TMR 法で再石灰化度を評価した。

(2) リン酸化オリゴ糖カルシウムと水溶性カルシウム CaCl_2 の再石灰化能の比較

一般的な水溶性カルシウムとリン酸化オリゴ糖カルシウムとの再石灰化能を比較するため、以下の 2 種類の人工唾液を調整して再石灰化処理をした。Ca (CaCl_2 /リン酸化オリゴ糖カルシウム) 6.0 mM, P (KH_2PO_4) 3.6mM, K (KCl) 100 mM, HEPES 緩衝液 20 mM, pH 6.5 に KOH で調整した各溶を初期う蝕歯サンプルあたり 20 ml 添加、37°Cで 24 時間再石灰化処理後に、TMR 法で再石灰化を評価した。

表 1: 人工唾液組成にリン酸化オリゴ糖カルシウムで Ca/P 比率を調製した溶液組成

Ca/P 比率	0.40	1.0	1.30	1.67	3.0
KCl	100 mM				
KH_2PO_4	3.6 mM				
CaCl_2	1.5 mM				
POs-Ca	0	0.17%	0.26%	0.36%	0.74%
HEPES	20 mM				
pH	6.5	6.5	6.5	6.5	6.5

3-1-6. カルシウム添加による結晶再生効果評価法

2-1-5. 再結晶化評価：広角 X 線回折法-小角 X 線散乱法と同様の方法を用いた。

3-1-7. カルシウム フッ化物とイオンの共存性評価法

種々の濃度のカルシウムを用いて次のように人工唾液を調整した。Ca (CaCl₂/リン酸化オリゴ糖カルシウム) 6.0 mM, P (KH₂PO₄) 3.6 mM, KCl 100 mM, HEPES 緩衝液 20 mM, NaF で、フッ化物濃度を各々の濃度(0.5, 1.0, 10, 100, 200, 300, 400, および 500 ppm) になるよう NaF で調整した後, KOH を用いて pH 6.5 に調整した。調整後, 各サンプル溶液を 37 °C に調温し 24 時間反応させた後, 各溶液中のカルシウムイオン濃度を E-テスト Wako kit (和光純薬工業株式会社, 日本) を用いて o-CPC 法で測定した。

3-1-8. カルシウムとフッ化物添加による再石灰化効果検証法

(1) リン酸化オリゴ糖カルシウムの再石灰化促進に最適なフッ化物添加濃度の評価

添加フッ化物の濃度による再石灰化能を比較するために, Ca (リン酸化オリゴ糖カルシウム 0.48 %) 6.0 mM, P (KH₂PO₄) 3.6 mM, KCl 100 mM, HEPES 緩衝液 20 mM に, フッ化物濃度が それぞれ 0, 0.5, 1.0, 10, および 100 ppm となるよう NaF を添加し, KOH で pH 6.5 に調整した。各溶液に歯片サンプル/20 ml, 37 °C, 24 時間反応させた後, TMR 法で再石灰化を評価した。

(2) リン酸化オリゴ糖カルシウムとフッ化物併用時の再石灰化促進に最適なカルシウム添加量を Ca/P 比率で評価

フッ化物含有の人工唾液を次のように調整した。Ca (CaCl₂) 1.5 mM, P (KH₂PO₄) 3.6 mM, KCl 100 mM, NaF 1.0 ppm, HEPES 緩衝液 20 mM の人工唾液をベースに, 人工唾液の Ca/P 比率 が それぞれ 0.4, 1.0, 1, 67, 3.0 となるように, リン酸化オリゴ糖カルシウムを 0.11, 0.29, 0.37, 0.48, 0.86 % 添加し, KOH で pH 6.5 に調整した。各処理液を用いて, 初期う蝕歯サンプル/20 ml, 37 °C, 24 時間反応させた。反応後, TMR 法で再石灰化を評価した。

(3) リン酸化オリゴ糖カルシウムないし水溶性カルシウム CaCl₂とフッ化物の再石灰化能比較

人工唾液を pH 6.5 に調整した後, 各溶液に歯片サンプル/20 ml, 37 °C, 24 時間反応させた後, TMR 法で再石灰化を評価した。

3-1-9. XRF と XANES 分析による フッ化物評価

再石灰化処理したウシ歯エナメル質ブロックから, ワイヤーソー (Well Diamond Wire Saws Co. Ltd, Germany)でサンプル片を断面方向に 200 μm 厚に切り出し薄片化した。切り出した断面は研磨処理 (3 M wrapping paper 2000 番, 14000 番)を行い, 分析用のサンプルとした。次に薄片化サンプルを銅板のサンプルプレートにダブルステイックカーボンテープ (日新 EM, 日本) で固定した。同時に比較標準品としてフルオロアパタイト (fluorapatite: FAp) (和光純薬工業株式会社), CaF_2 (和光純薬工業株式会社), ハイドロキシアパタイト (HAp) (和光純薬工業株式会社) の粉末も, ダブルステイックカーボンテープに塗布した。 μ -XRF および μ -XANES 分析は, SPring-8 (兵庫県) の軟 X 線光化学ビームライン (BL27SU) を用いて測定した。アンジュレータからの得られた光源を 87.5 meV に設定し, 光子エネルギー分解能を備えた軟 X 線モノクロメータを使用して単色化した。光子束は, 0.7 keV (フッ素 K 吸収端) 1×10^{11} Ph/s に調整して、X 線ビームの高さと幅はそれぞれ 10.0 と 200 μm に調整した。サンプルホルダーを電動 XYZ ステージに取り付け, サンプルに垂直入射角で一次単色 X 線ビームを照射して, シリコンドリフト検出器を一次光子ビームの軸 45° に取り付け, 蛍光信号を検出した。分析中, 入射光子ビームの強度は, ポストフォーカシングミラーの表面のドレン電流を測定することによってモニターした。

3-1-10. 統計解析

人工唾液の各 Ca/P 比率を リン酸化オリゴ糖カルシウムの添加により調整した。Ca/P 率を調整した人工唾液における再石灰化率の比較は one-way ANOVA with post hoc Scheffe's test で解析を行い, $p < 0.01$ を有意差とした。人工唾液 Ca/P 1.67 におけるリン酸化オリゴ糖カルシウムと塩化カルシウムの再石灰化率の比較, リン酸化オリゴ糖カルシウムと塩化カルシウムのフッ化物による各 Ca/P 比率や, 各フッ化物濃度における再石灰化効果の対比較は Mann-Whitney U-test で解析した。 $p < 0.05$ で有意差とした。すべての統計解析は, StatView software, version 5.0 を用い, データは平均 \pm 標準偏差として表記した。

3-2. 結果

3-2-1. カルシウム可溶化性評価

カルシウム源として、水溶性カルシウムである CaCl_2 ないしリン酸化オリゴ糖カルシウムを用いて人工唾液を次のように調整した。Ca (CaCl_2 /リン酸化オリゴ糖カルシウム) 6.0 mM, P (KH_2PO_4) 3.6 mM, KCl 100 mM, HEPES 緩衝液 20 mM を KOH を用いて pH 6.5 に調整し、37 °C に加温してから、40 分間 5 分毎、カルシウムイオン濃度データを取得し、人工唾液中のカルシウム可溶化の安定性を評価した。リン酸化オリゴ糖カルシウムで調整されたい人工唾液が、リン酸イオンの存在下でカルシウムの可溶性を維持したが、 CaCl_2 で調整された人工唾液のカルシウムイオンは、リン酸-カルシウムの沈殿物の形成により、可溶化性が反応開始後 20 分で初期濃度の約 80 %まで減少した（図 7）。

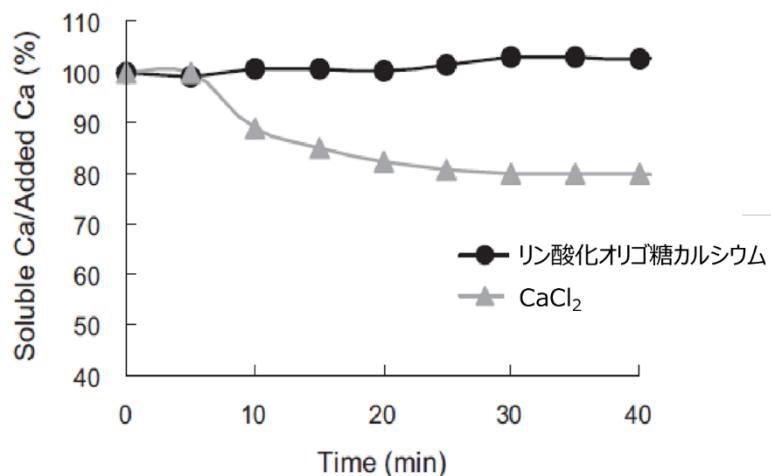


図 7. カルシウム源をリン酸化オリゴ糖カルシウムないし CaCl_2 で調整した人工唾液におけるカルシウム可溶化率の経時変化を示した。

3-2-2. 水溶性カルシウム添加による再石灰化効果比較結果

- (1) リン酸化オリゴ糖カルシウムの再石灰化促進に最適なリン酸カルシウムモル濃度比, リン酸オリゴ糖カルシウムの最適添加量を人工唾液中のリン酸に対するリン酸カルシウムモル濃度比率として評価

人工唾液にリン酸化オリゴ糖カルシウムを添加してカルシウム濃度を調整することで, 人工唾液の Ca/P 比率を各 0.4, 1.0, 1.3, 1.67, 3.0 に調整した。次に, 初期う蝕を形成したウシ歯エナメル質サンプル各濃度の人工唾液に 37 °C で 24 時間浸漬して, 再石灰化処理を行った。各々処理に用いた初期う蝕歯サンプルについて処理前の脱灰度に有意差は認められなかつた ($n = 5$, $p > 0.05$)。再石灰化処理後, TMR 法にて各サンプルの再石灰化の解析を行い (表 2), 再石灰化率 (%R) の結果を図 8 に示した。結果は, 人工唾液の Ca/P 比率 1.67 で最も有意に再石灰化を促進した ($n = 5$, $p < 0.01$)。人工唾液の Ca/P 比率 1.67 まではカルシウム添加量依存的に再石灰化率が向上したが, Ca/P 比率 3.0 は再石灰化が阻害されていたことから, カルシウム添加量が過剰であったことが示唆された。

表 2. 各 Ca/P 比率の再石灰化処理における TMR 解析結果

Ca/P	Lesion depth ^a (μm)	ΔZ (%vol.μm)	$\Delta Z_{(d-r)}$ (%vol.μm)	%R
0.4	111.2 ± 9.9	2826.2 ± 209.0	255.7 ± 59.4	9.07 ± 2.15 ^{b,c}
1.0	104.7 ± 15.5	2668.6 ± 212.7	327.2 ± 94.9	12.14 ± 2.85 ^b
1.3	99.4 ± 9.5	2733.3 ± 168.9	533.0 ± 92.4	19.51 ± 3.10 ^d
1.67	112.5 ± 19.2	3143.7 ± 434.1	844.0 ± 137.3	26.79 ± 1.24 ^e
3.0	104.3 ± 18.3	2463.8 ± 298.9	140.5 ± 29.8	5.72 ± 1.15 ^c

Mean ± standard deviation ($n = 5$).

^aInitial depth of the subsurface lesion.

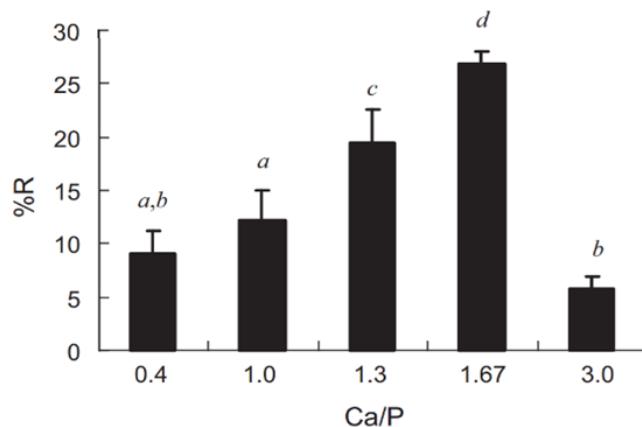


図 8. リン酸化オリゴ糖カルシウムで Ca/P 比率 (Ca/P) を調整したときにおける、最適再石灰化率の検証結果。リン酸化オリゴ糖カルシウムで、人工唾液 Ca/P 比率を 0.4, 1.0, 1.3, 1.67, 3.0 に調整した各処理液における再石灰化率 (%R) を示した。

(2) リン酸化オリゴ糖カルシウムと水溶性カルシウム CaCl_2 の再石灰化比較

上述したように、人工唾液にリン酸化オリゴ糖カルシウムでカルシウム強化した場合における初期う蝕の再石灰化促進効果は、Ca/P 比率 1.67 で最も促進した。次に Ca/P 比率 1.67 における、一般的な水溶性カルシウム CaCl_2 とリン酸化オリゴ糖カルシウムによる再石灰化促進効果の差を検討した。各カルシウム源を用いて Ca/P 比率 1.67 に調整するため、カルシウムイオン濃度を 6 mM に設定した。カルシウム源としてリン酸化オリゴ糖カルシウムないし CaCl_2 を用いて液を調整し、次に、初期う蝕を形成したウシ歯エナメル質サンプルを 37 °C, 24 時間、再石灰化処理を行った。その後 TMR 法にて解析を行い、得られたミネラルプロファイルを（図 9）に示した。初期う蝕の脱灰深度は、リン酸化オリゴ糖カルシウムおよび CaCl_2 群で有意差は認められなかった ($n = 11$, $p > 0.05$) が、再石灰化処理後の再石灰化率 (%R) は、リン酸化オリゴ糖カルシウムが $24.2 \pm 7.4\%$, CaCl_2 が $12.5 \pm 11.3\%$ ($n = 11$, $p < 0.05$ Mann-Whitney U) で、リン酸化オリゴ糖カルシウムが再石灰化を有意に促進した。

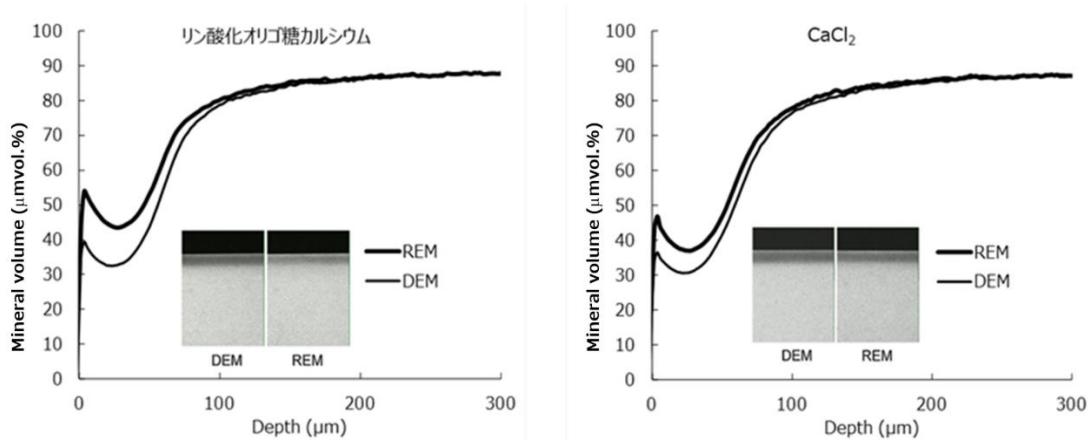


図. 9 TMR 解析結果

リン酸化オリゴ糖カルシウム（左図）および CaCl_2 （右図）で処理された初期う蝕の DEM および REM の Micro radiography の画像とミネラルプロファイルを示した。再石灰化で処理された初期う蝕歯の平均ミネラルプロファイル DEM (細線) と REM (太線) で示した。ミネラル量は、健全なエナメル質を 87% (v/v) で正規化した。

3-2-3. 水溶性カルシウムの再結晶化効果の比較結果

リン酸化オリゴ糖カルシウムと CaCl_2 による初期う蝕の結晶再生の効果を比較した。TMR 法ではミネラル量の増減しか判断できないことから、上述 3-1-2. (2) で初期う蝕の再石灰化効果が確認されたリン酸化オリゴ糖カルシウム、および CaCl_2 処理サンプルを用いて HAp 結晶変化を WAXRD で測定した（図 10）。WAXRD のスポットは、HAp 結晶からのブレグ反射として同定され、反射は六方晶の 3 次元格子で指標付けすることができた。それらの積分強度は、X 線照射領域における HAp の量と相関する（13）。100 面のピーク積分強度をエナメル質表面から断面方向にプロットすると、脱灰部（DEM）では、表面より約 100 μm 以内で減少しており（図 10 B）、TMR 法で得られるミネラルプロファイルのパターンと一致した。リン酸化オリゴ糖カルシウムないし CaCl_2 で処理した各群の再結晶化率（%R）は、リン酸化オリゴ糖カルシウム群: $35.7 \pm 10.9\%$ 、 CaCl_2 群: $23.1 \pm 13.5\%$ ($n = 11$, $P < 0.05$ Mann-Whitney U) となり、リン酸化オリゴ糖カルシウム処理群が結晶再生を有意に促進していた。再石灰化処置後、WAXRD のパターンに、新たな回折スポットは見られなかった（図 10A）。

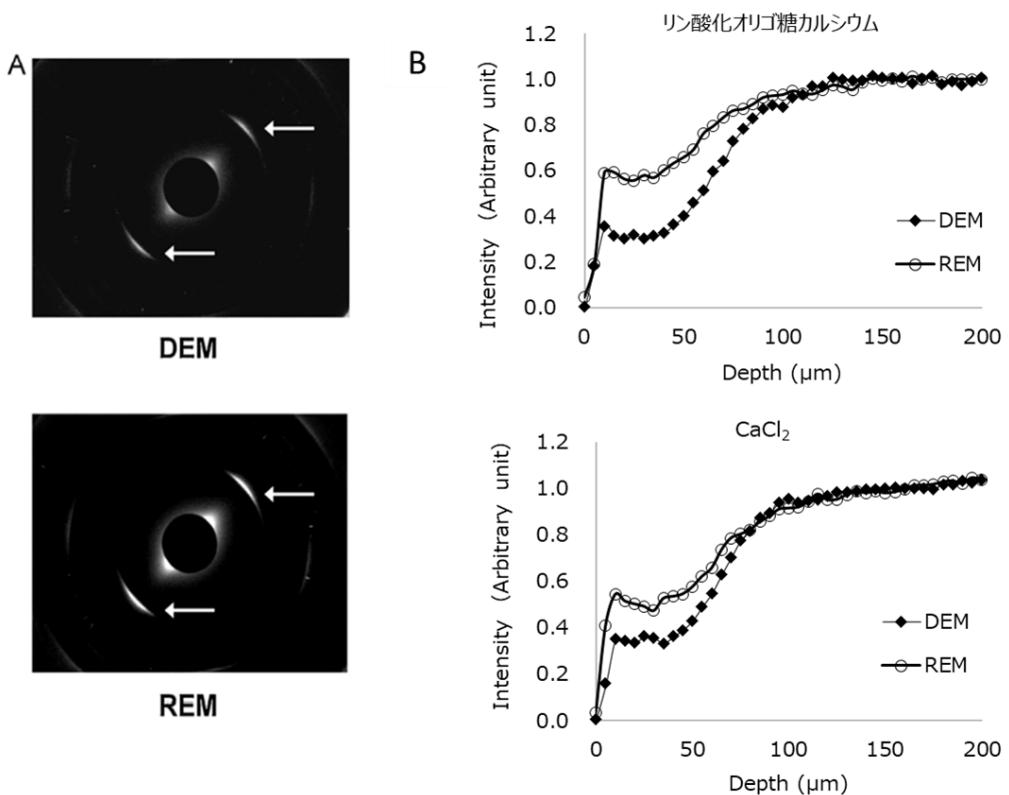


図 10. リン酸化オリゴ糖ないし CaCl_2 で処理した初期う蝕歯の, 広角 X 線回折の結果

A. リン酸化オリゴ糖カルシウムで処理をしたサンプルの DEM と REM から得られる回折パターンを示した。X線の露光時間は 300 ミリ秒に設定した。矢印は、HAp 特異的な 100 面の赤道反射を示す。 **B.** 表層から深さ方向に対する, X線照射毎の 100 面の強度をプロットした。5 サンプルの平均値をプロファイルした。

3-2-4. カルシウム フッ化物とイオンの共存性の評価

人工唾液におけるフッ化物添加濃度を以下のように調整した。カルシウム源にリン酸化オリゴ糖カルシウムまたは CaCl_2 を用いた。カルシウム 6 mM, リン酸 3.6 mM, HEPES 20 mM, NaF を各濃度 (0.5, 1.0, 10, 100, 200, 300, 400, 500 ppm) になるよう添加し, KOH を用い pH 6.5 に調整した後, 37 °C に調温した。24 時間反応させた後, 各溶液中のカルシウムイオン濃度を測定した。フッ化物濃度 100 ppm の CaCl_2 はカルシウムの可溶化度 30 % 以下を示し

た。このことにより、リン酸-カルシウムや CaF_2 の沈殿形成が形成されることで、カルシウムはイオン化を維持できていないと考えられた。これに対して、リン酸化オリゴ糖カルシウムで調整した人工唾液中のカルシウム可溶化度は 80 % 以上であった（図 11）。リン酸化オリゴ糖カルシウムは、 CaCl_2 と比較して、カルシウム、リン酸、フッ化物イオンを共存させる能力が高いことが示唆された。

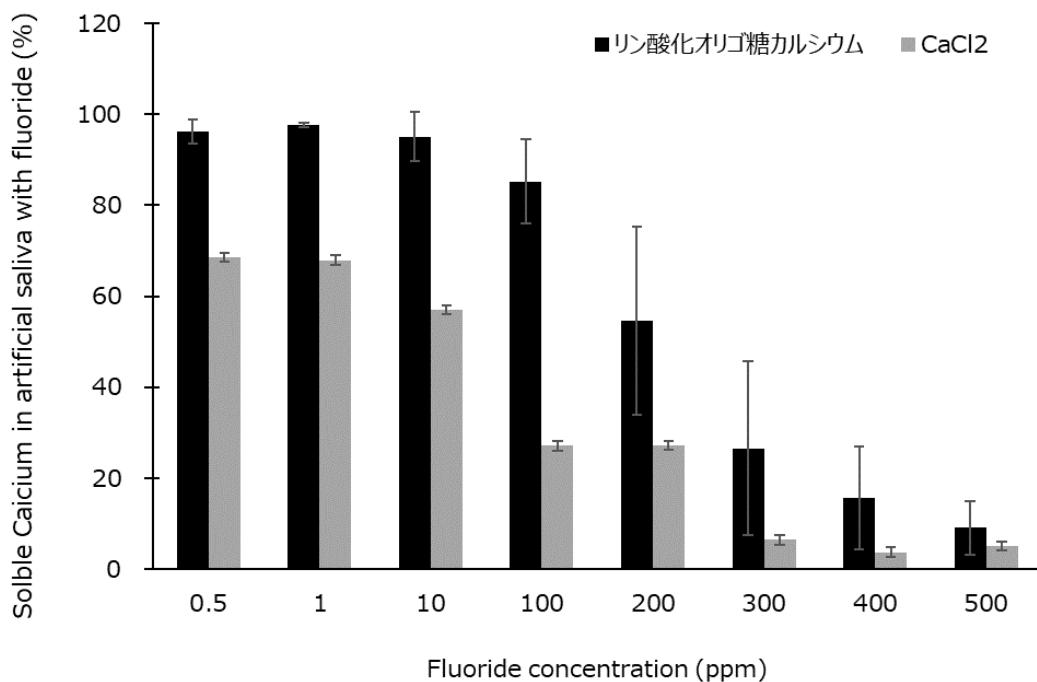


図 11. カルシウム溶解度の結果

Mean \pm standard deviation (n = 3)

リン酸化オリゴ糖カルシウムないし CaCl_2 で調整した人工唾液に、フッ化物濃度が 0.5、1.0、10、100、200、300、400、500 ppm となるように NaF を添加し、カルシウムの可溶化性を評価した。

3-2-5. 水溶性カルシウムとフッ化物併用の再石灰化の効果

(1) リン酸化オリゴ糖カルシウムとフッ化物の再石灰化の比較

リン酸化オリゴ糖カルシウムで調整した人工唾液に、フッ化物濃度が 0.5, 1.0, 10, 100 ppm となるように NaF を添加した。各処理液で、初期う蝕を形成したウシ歯エナメル質サンプルを 37 °C, 24 時間処理を行い、再石灰化効果を比較した。TMR の解析結果を表 3 に示す。フッ化物添加濃度 0.5 ないし 1.0 ppm を含む処理液溶液において有意な再石灰化促進効果が得られた ($n = 6$, $p < 0.05$)。次にフッ化物 1.0 ppm 添加した人工唾液に、リン酸化オリゴ糖カルシウムで Ca/P 比率を 0.3, 1.0, 1.67, 3.0 に調整した。各処理液で初期う蝕を形成したウシ歯エナメル質サンプルを 37 °C, 24 時間、処理を行い、最も再石灰化を促進する Ca/P 比率を検討した。TMR 法による解析結果を表 4 に示す。カルシウム単体の強化時と同様に、カルシウムとフッ化物併用時も Ca/P 比率 1.67 で最も再石灰化が促進した ($n = 5$, $p < 0.05$, Mann-Whitney U-test)。

表3. 各フッ化物濃度で再石灰化処理をした TMR 解析結果

Fluoride (ppm)	ΔZd (%vol.μm)	ΔZr (%vol.μm)	%R
0.0	3741 ± 395	3025 ± 500	19.0 ± 11.5 ^{*a}
0.5	3661 ± 647	2557 ± 220	28.4 ± 13.5 ^{*b}
1.0	3620 ± 167	2961 ± 1560	23.0 ± 6.7 ^{*b}
10.0	2446 ± 467	2024 ± 382	17.0 ± 6.4 ^{*c}
100.0	2431 ± 457	2206 ± 491	9.6 ± 3.3 ^{*d}

Means ± standard deviation ($n = 6$).

Different alphabets in each row indicate significant difference ($P < 0.05$).

表4. フッ化物と各 C/P 比率で処理した TMR 解析結果

Ca/P ratio	ΔZd (%vol. μm)	ΔZr (%vol. μm)	%R
0.4	2920 \pm 163	2624 \pm 163	10.1 \pm 2.8* a
1.0	2879 \pm 358	2514 \pm 189	12.5 \pm 3.3* a
1.3	2643 \pm 737	2095 \pm 539	20.4 \pm 1.7* b
1.67	2939 \pm 1006	2158 \pm 925	26.7 \pm 2.3* c
3.00	2827 \pm 199	2629 \pm 235	7.1 \pm 2.8* a

Means \pm standard deviations (n = 5).

Different alphabets in each row indicate significant difference (P < 0.05).

(2) 水溶性カルシウム (CaCl_2 /リン酸化オリゴ糖カルシウム) とフッ化物の再石灰化の比較

水溶性カルシウムである、リン酸化オリゴ糖カルシウム、および一般的なカルシウム CaCl_2 でカルシウム強化し Ca/P 比率 1.67 に調整した人工唾液に、 NaF 1.0 ppm を添加した各溶液で初期う蝕を形成したウシ歯エナメル質サンプルを 37 °C, 24 時間、処理を行い、再石灰化促進効果を比較した。その結果、リン酸化オリゴ糖カルシウム処理液による再石灰化率 (%R) は、リン酸化オリゴ糖カルシウム処理群: 37.9 \pm 7.3 %, CaCl_2 処理群 15.0 \pm 9.6 % (n = 5, p < 0.05, Mann-Whitney U-test), リン酸化オリゴ糖カルシウム処理群で再石灰化が有意に促進した。

3-2-6. リン酸化オリゴ糖カルシウムとフッ化物で再石灰化処理特のフッ化物効果

(1) XRF 法によるフッ化物の分布解析結果

上記 3-2-5, (2) において、リン酸化オリゴ糖カルシウムで Ca/P 比率 1.67、極微量のフッ化物 (NaF 1.0 ppm) で処理をした初期う蝕歯を TMR 法で再石灰化促進効果を確認したサンプルについて、初期う蝕歯へのフッ化物の浸透度を測定するため、 μ -XRF 法で元素分布の分析を行った。再石灰部のエナメル質断面におけるフッ素 (F) と酸素 (O) の分布を図 12 に示した。フッ素

分布はエナメル質表層で鋭いピークを示し、約 50 μm の深さで僅かに増加がみられた。表面の鋭いピークの位置は酸素分布の立ち上がりエッジが一致していると考えられた。ピーク幅の分析に基づいて、フッ素が初期う蝕の再石灰化処理部に浸透し、その浸透度は約 20 μm であった。

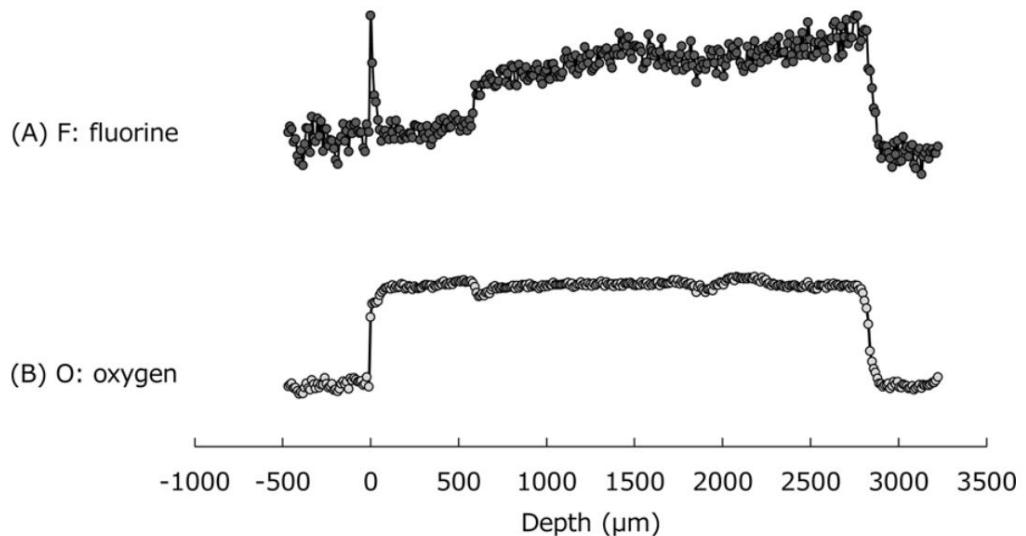


図 12. μ -XRF の元素マッピング

リン酸化オリゴ糖カルシウムとフッ化物で初期う蝕を処理後、表層下 10 μm の 690.2 eV 励起エネルギーから得られるフッ化物 (A)、酸素 (B) の元素をマッピングした。

(2) XANES 法による結晶性の解析結果

μ -XANES 分析を使用することで、元素特異性を備えた局所的な幾何学的および電子的構造を決定することができる。上記 3-2-5, (2) で、リン酸化オリゴ糖カルシウムで Ca/P 比率 1.67, 極微量のフッ化物 (1.0 ppm) で調整された人工唾液で初期う蝕を再石灰化処理を行ったサンプルについて、再石灰化部に浸透したフッ化物化合物の結晶性構造を解析するため、再石灰化部の表層下 (深さ 10 μm) の μ -XANES 法による結晶性の分析を実施した。比較対象品として、FAp, CaF₂, HAp を同時に測定した (図 13)。FAp の特徴は、最大ピーク 688.9 eV, 2 番目

に大きいピークが 690.2 eV, 1 番目と 2 番目のピークの強度比 (I1/I2) は 0.61 であった。一方, CaF_2 の最初のピークは 688.6 eV であり, FAp のピークから僅かにシフトしていく, I1/I2 比は 0.97 であった。さらに, CaF_2 には 3 つの固有のピーク (689.4, 692.7, および 696.0 eV) があった (34)。HAp のピークは検出されなかったが, 歯のエナメル質の基本物質として測定をした。リン酸化オリゴ糖カルシウムとフッ化物による再石灰化処理後の反応部位における全体的なスペクトルは, X 線エネルギーのピークが 688.9 eV, I1/I2 比が 0.67 であったことから, FAp サンプルのスペクトルに類似しており, FAp として存在することが示唆された。

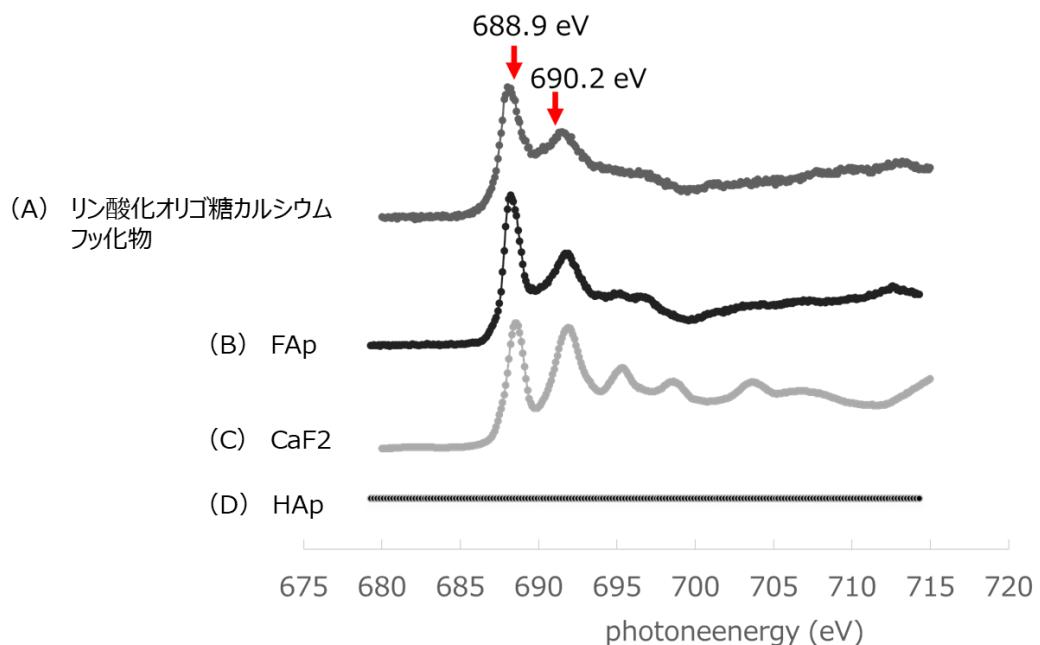


図 13. リン酸化オリゴ糖カルシウムとフッ化物を含む人工唾液で処理された初期う蝕歯の表層下 10 μm における μ -XANES スペクトルの強度プロファイル。試料 (FAp, CaF_2 , HAp) をサンプルと比較した結果を示した。

3-3. 考察

初期う蝕は、脱灰と再石灰化のバランスが崩れて脱灰に傾いたときに形成されるが、可逆的な状態にあるため、カルシウムイオンが脱灰速度を上回る速度で唾液から持続的に供給されることにより、初期う蝕の修復が期待できる(35)。本研究では、高水溶性カルシウム素材であるリン酸化オリゴ糖カルシウム(15, 16)が唾液中でリン酸やフッ化物と共に生体利用性を向上させて、さらにそれらを適切な濃度に整えることで、初期う蝕部位のミネラル密度の回復だけではなく、歯の結晶構造そのものが効果的に回復することを示した(36, 37)。

唾液は、リン酸とカルシウムを含んだ中性の性状をしている。唾液に一般的なカルシウムを強化するとリン酸-カルシウムの不溶性の塩を形成し、カルシウムの生物学的機能性が低下してしまう。本研究でも、人工唾液に CaCl_2 でカルシウムを強化すると、その可溶化性は経時的に減少した。一方で、リン酸化オリゴ糖カルシウムでカルシウム濃度を高めると、非酸性条件下でも不溶化物を形成することなく生物学的に利用可能なカルシウムを維持できたことから(図 7), CaCl_2 のようにカルシウム塩を形成した後にプラークの pH が低下して酸性条件下でカルシウムが溶解するという過程を経ずに、直接再石灰化に寄与することができると考えられた。これまでに初期う蝕の再石灰化促進効果が報告されている、 α -リン酸三カルシウムや Casein phosphor peptide – amorphous calcium phosphate (CPP-ACP) は(38, 39), いずれもカルシウム塩を一旦形成した後に酸性条件下でカルシウムが溶解する過程を経て初期う蝕に供給されるため、その効果を得るには一定の期間を要していた。そこで、リン酸化オリゴ糖カルシウムを用いることで従来よりも有意な再石灰化促進効果が得られる可能性が示唆された。

次に、カルシウム強化における初期う蝕の再石灰化に最適な添加量を検討した。歯エナメル質は 90% 以上を強い配向性を有した HAp で構成しており、それが硬組織としての機能性に反映されていることから(10), 本研究では初期う蝕のミネラル密度の回復だけではなく、HAp の回復を目指した。そこでカルシウム添加量の目安として HAp の Ca/P 比率に着目した。HAp の Ca/P 比率が 1.67 であるのに対して唾液の Ca/P 比率は低いことから、カルシウムの添加量を Ca/P 比率 1.67 になるよう調整することで、効率的に初期う蝕で喪失した結晶の回復が望めるのではないかと考えた。従来は、唾液中のカルシウム濃度を高めるとリン酸-カルシウムの不溶物を形成するため、カルシウムが生体利用性の高い状態を維持することができないという技術課題がある。そこでリン酸化オリゴ糖カルシウムを用いることでその課題を克服して、人工唾液中の Ca/P 比率を HAp と同じ

1.67まで高めたことで、再石灰化が有意に促進した。一方で人工唾液中の Ca/P 比率を 3.0 まで高めると再石灰化率は大幅に低下した(図 8)。この結果は、Ca/P 比率により初期う蝕の再石灰化率は著しく異なるという以前の報告と一致していた(19)。そこで、水溶性カルシウムであるリン酸化オリゴ糖カルシウムと CaCl_2 を用いて、人工唾液の Ca/P 比率 1.67 における再石灰化促進能と、HAp 回復について比較評価を行った。

まず TMR 法で評価した再石灰化率は、リン酸化オリゴ糖カルシウムが有意に高かった(リン酸化オリゴ糖カルシウム群: $24.2 \pm 7.4\%$, CaCl_2 群 $12.5 \pm 11.3\%$)。また TMR 法で得られたミネラルプロファイルからは、リン酸化オリゴ糖カルシウムの再石灰化は、初期う蝕の表層下 100 μm から回復しており、 CaCl_2 と比較して明らかに深層であった(図 9)。これは、初期う蝕のエナメル表面の細孔の直径が 1 mm 未満であることから(40)、各カルシウムのサイズに依存する可能性が考えられた。リン酸化オリゴ糖カルシウムの場合は、リン酸化オリゴ糖から遊離したカルシウムが浸透したのか、あるいはリン酸化オリゴ糖カルシウム自体が初期う蝕へ浸透したかは判別できなかったが、リン酸化オリゴ糖カルシウムの平均分子量が 800 Da であり、その推定分子長は 4 nm 以下である(41) のに対し、 CaCl_2 とリン酸で形成されるリン酸カルシウム塩の直径は数 μm であることから、リン酸化オリゴ糖カルシウムが初期う蝕に有意に浸透し、再石灰化を促し易いと考えられた。

次に WAXRD を用いて、HAp の回復について評価した。WAXRD で得られた HAp 特異的な 100 面の反射強度を表層から 5 μm 每プロットした。そのプロファイルは、TMR 法によるミネラルプロファイルと同様な結果であった(図 10B)。また WXRD の回折パターンは、再石灰化の前後で新たなもののが出現しておらず、回復した HAp の配向性は健全部と一致していた(図 10A)。回折パターンはリン酸化オリゴ糖カルシウム、 CaCl_2 いずれも同じであったことから、回復した HAp の配向性に両カルシウムで差はみられなかったが、その強度には差が認められ、結晶回復率(%R) が異なった。結晶回復率はリン酸化オリゴ糖カルシウムが $35.7 \pm 10.9\%$ 、 CaCl_2 が $23.1 \pm 13.5\%$ (37) でリン酸化オリゴ糖カルシウムが有意に結晶を回復していた。歯エナメル質の HAp は c 軸配向面の構造特性を有しており、エナメル質表面の耐酸性や物理的強度に反映されている(42) ことから、初期う蝕の健全歯と同様の配向性を有した有意な HAp の回復は、歯のエナメル構造において物理的および化学的安定性が向上することが示唆された。

本研究ではさらに、う蝕予防効果が最も高いとされるフッ化物 (43, 44, 45) とカルシウムの併用について検討を加えた。従来フッ化物はその反応性の高さからフッ化物とカルシウム併用時はフッ化カルシウムを形成し (46), 一旦プラークが產生する酸に晒されることで初めて溶解して初期う蝕部位に浸透する。これまでカルシウムとフッ化物の強化方法として, CPP-ACP とフッ化物 (47) の併用による再石灰化促進が報告されているが, プラーク内 pH が低下し始めてカルシウムやフッ化物の効果が発揮されるとされており, カルシウムおよびリン酸とフッ化物が非酸性条件下で直接機能を発揮する状態を維持するには技術的な課題があった。そこでミネラルの共存性能が報告されている (15, 16, 48) リン酸化オリゴ糖カルシウムとフッ化物の共存性について検討した。人工唾液にカルシウム源としてリン酸化オリゴ糖カルシウムを Ca/P 比率 1.67 になるように添加し, 種々の濃度のフッ化物を添加して, カルシウムの可溶化性を評価した。フッ化物の濃度は, ウォーターフロリデーション (0.5 - 1.0 ppm) および, 各フッ化物含有歯磨剤 (市販品ならび歯科専用品) の使用時における唾液中のフッ化物濃度 (希釈率約 3 倍) を想定して設定した。その結果, リン酸化オリゴ糖カルシウムはフッ化物濃度 100 ppm までは, カルシウムの可溶化性を 80% 以上を維持していた。一方で一般的な水溶性カルシウムである CaCl_2 は, フッ化物濃度 100 ppm においてフッ化カルシウム様の不溶化物を形成し, カルシウムの可溶化性が 30 % 以下と著しく低下した (図 11)。リン酸化オリゴ糖カルシウムは, 非酸性条件下でもフッ化物, カルシウムおよびリン酸が機能する状態に維持することが示唆された。

フッ化物は, 初期う蝕の脱灰抑制能と再石灰化促進能, 両方の機能を有しており (36), 歯エナメル質の構成要素のカルシウムと共存できることは, 従来よりもカルシウムやフッ化物の高い効果が得られる可能性があると考えられた。そこで, 初期う蝕の再石灰化に最適なリン酸化オリゴ糖カルシウムとフッ化物の添加濃度を検討した。リン酸化オリゴ糖カルシウムに最適なカルシウム添加濃度である Ca/P 比率 1.67 を起点に, フッ化物添加濃度をウォーターフロリデーションで有効性を示された 0.5 – 1.0 ppm (43) から共存性を 80 % 以上維持できた 100 ppm の範囲で再石灰化促進に有効な濃度の検討を行った。結果, フッ化物濃度 0.5 または 1.0 ppm で最も再石灰化促進効果が得られた (表 3)。さらに, フッ化物(1.0 ppm) とカルシウムの併用において, 最適なカルシウム添加濃度が Ca/P 比率がカルシウム単独による場合と同様かについても検討を加えた。その結果, カルシウム単独による再石灰化の場合と同様に, Ca/P 比率が 1.67 で最も再石灰化が促進された。

これらの結果から、リン酸化オリゴ糖カルシウムを用いることで、カルシウム、リン酸およびフッ化物の3種類のイオンの共存が可能となり、そのバランスにより効率的な再石灰化促進が得られた。リン酸-カルシウムの形成阻害効果はそのリン酸基の数に依存していること(16)から、リン酸化オリゴ糖カルシウムが唾液環境において3種類のイオンの共存を可能としたのは、そのホスホリル残基へのカルシウムイオンの弱い結合性が、フッ化物およびリン酸イオンがフッ化カルシウムやリン酸カルシウムの形成を抑制し、一方で再石灰化に必要な時に各イオンを供給できる可逆的な性質を備えているためと考えられた。

そこで次に、微量なフッ化物(1.0 ppm)が初期う蝕歯に与える効果について、フッ化物の浸透性と結晶性について検討した。 μ -XRFの結果から、リン酸化オリゴ糖カルシウムとフッ化物で初期う蝕歯を再石灰化処理すると、初期う蝕表層下10 μ m付近にフッ化物が取り込まれることが確認できた(図12)。さらに、浸透したフッ化物の結晶性について μ -XANES法で解析を行った。本手法は、元素固有の方法で元素がサンプルに浸透部位の局所構造を決定できることが示されている(49)。フッ化物の浸透が確認された表層下10 μ m付近の μ -XANES分析の結果は、フッ化カルシウム(CaF_2)またはHApと比較してFApの各ピークトップが一致していたことから、その結晶構造はFApであることが確認できた(図13)。リン酸化オリゴ糖カルシウムは、エナメル質表面での CaF_2 形成を防ぎ、生体利用可能なカルシウム、リン酸塩、フッ化物イオンを維持した状態で、初期う蝕部の空隙ボイド(脱灰によりHApを喪失することで形成)に直接浸透することができた結果、速やかにFApとして結晶回復することが示唆された。FApは耐酸性と硬度の観点からHApよりも有効であると考えられており(50)、臨床的に興味深い知見と考えられた。

4. 結論

本研究ではまず、WAXRD-SAXSを用いることで、初期う蝕における歯エナメル質構造の μ m単位の結晶変化を定性・定量的に捉えることが可能となった。さらに本手法を用いて初期う蝕部位へのカルシウム強化の効果を解析すると、歯エナメル質の健全部と同様の配向性を有したHApが再生することが示唆された。これまで、歯のカルシウム強化に関する有効性を示す根拠はミネラル密度の変化や、結晶の定性的評価で限定的であったが、本研究では初期う蝕の数百 μ m領域における結晶変化について定性・定量化できる方法が確立された。

次に本手法を用いて、高水溶性カルシウムのリン酸化オリゴ糖カルシウムで初期う蝕を処理することで、HAp 再生や FAp 形成が生理学的 pH 範囲でも起こることを示した。従来、再石灰化は酸による溶解過程が欠かせないこと、また人工的に HAp や FAp を調製するためには工業的には高温処理の工程が必須であるが、本研究ではリン酸化オリゴ糖カルシウムにおける初期う蝕の再石灰化、結晶再生においては、いずれの工程も必要せずにその効果を得られたことから、初期う蝕におけるリン酸化オリゴ糖カルシウムによるカルシウム強化は臨床的な有用性が高いと考えられた。さらに、初期う蝕の表層下に直接カルシウム、フッ化物両イオンを効率的に浸透できる可能性を示唆しており、歯磨剤、洗口剤あるいは嗜好性を含んだガムなどに応用したデイリーケアに適していると考えられた。実際、リン酸化オリゴ糖カルシウムとフッ化物を含むガムの使用による初期の齲蝕病変の再石灰化を示した *in situ* 研究試験 (41) と本研究内容は一致しており、配合されるミネラルを徐放的に溶出する物性を有するガムの有用性を示唆している (51)。これらの本研究の結果は、リン酸化オリゴ糖カルシウムあるいはリン酸化オリゴ糖カルシウムとフッ化物の組み合わせが齲蝕管理を推進するための新たな有用な素材であることを示している。

謝辞

本研究を行うにあたり、終始ご懇意なる御指導および御校閲を賜りました大阪大学大学院歯学研究科口腔分子免疫制御学講座予防歯科学 教授 天野 敦雄 先生に心から謝意を表します。公益財団法人 高輝度光科学研究センター八木直人先生, 為則雄祐先生に感謝いたします。また、共に研究を推進くださった江崎グリコ株式会社健康科学研究所栗木隆所長ならびに所員の皆様に感謝申し上げます。

引用文献

- 1) Petersen PE. The World Oral Health Report 2003: continuous improvement of oral health in the 21st century--the approach of the WHO Global Oral Health Programme. *Community Dent Oral Epidemiol* (2003) 31 (1) 3-23.
- 2) Matsuyama Y, Aida J, Watt R, Tsuboya T, Koyama S, Sato Y, Kondo K, Osaka K. Dental status and compression of life expectancy with disability in Japan. *J Dent Res* (2017) 96(9) 1006-1013.
- 3) 厚生労働省 平成 28 年 歯科疾患実態調査
- 4) Jaeggi T, Grüniger A, Lussi A. Dent Erosion. *Monogr Oral Sci* (2006) 20 200-214.
- 5) Ismail AI, Tellez M, Pitts NB, Ekstrand KR, Ricketts D, Longbottom C, Eggertsson H, Deery C, Fisher J, Young DA, Featherstone JD, Evans W, Zeller GG, Zero D, Martignon S, Fontana M, Zandona A. Caries management pathways preserve dental tissues and promote oral health. *Community Dent Oral Epidemiol* (2013) 41(1) 12-40.
- 6) Bratthall D, Hansel-Petersson G, Sundberg H. Reasons for the caries decline: What do the experts believe? *Eur Oral Sci* (1996) 104 416-422.
- 7) Keyes P H. Research in dental caries. *J Am Dent Assoc* (1968) 76 1357-1373.
- 8) Reynolds EC. Remineralization of enamel subsurface lesions by casein phosphopeptide-stabilized calcium phosphate solutions. *J Dent Res* (1997) 76 (9) 1587-1595.
- 9) Morgan MV, Adams GG, Bailey DL, Tsao CE, Fischman SL, Reynolds EC. The anticariogenic effect of sugar-free gum containing CPP-ACP nanocomplexes on approximal caries determined using digital bitewing radiography. *Caries Res* (2008) 42 (3) 171-184.

- 10) Nalla RK., Kružić JJ, Ritchie RO. On the origin of the toughness of mineralized tissue: microcracking or crack bridging? *Bone* (2004) 34(5) 790-798.
- 11) Damen JJ, Exterkate RA, ten Cate JM. Reproducibility of TMR for the demineralization of longitudinal mineral change in dental hard tissues. *Adv Dent Res* (1997) 11 415-419.
- 12) Feathersone JD, ten Cate JM, Shariati M, Arends J. Comparison of artificial caries like lesions by quantitative microradiography and micro hardness profiles. *Caries Res* (1983) 17 385-391.
- 13) Buchalla D, Imfeld T, Attin T, Swain MV, Schmidlin PR. Relationship between nano-hardness and mineral content of artificial carious mineral lesions. *Caries Res* (2008) 42 157-163.
- 14) Angmar D, Carlstrom D, Glas J-E. Studies on the ultrastructure of dental enamel IV. The mineralization of normal human enamel. *J Ultrastr Res* (1963) 8 12-23.
- 15) Kamasaka H, To-o K, Kusaka K, Kuriki T, Kometani K, Okada S. Effect of phosphoryl oligosaccharides on iron solubility under neutral conditions. *Biosci Biotec Biochem* (1997) 61(7) 1209-1210.
- 16) Kamasaka H, Uchida M, Kusaka K, Yoshikawa K, Yamamoto K, Okada S, o Ichikawa T. Inhibitory Effect of Phosphorylated Oligosaccharides Prepared from Potato Starch on the Formation of Calcium Phosphate. *Biosci Biotech Biochem* (1995) 59 (8) 1412-1416.
- 17) Palmer LC, Newcomb CJ, Kaltz SR, Spoerke ED, Stupp SI. Biomimetic systems for hydroxyapatite mineralization inspired by bone and enamel. *Chem rev* (2008) 108(11) 4754-4783.
- 18) Hara AT, Karlinsey RL, Zero DT. Dentine remineralization by simulated saliva formulations with different Ca and Pi contents. *Caries Res* (2008) 42(1) 51-56.

- 19) Exterkate RA, Damen JJ, ten Cate JM. A single-section model for enamel de- and remineralization studies. 1. The effects of different Ca/P ratios in remineralization solutions. *J Dent Res* (1993) 72, 1599-1603.
- 20) Dammen JJ, Extrkate RA, ten Cate JM. Reproducibility of TMR for the determination of longitudinal mineral changes in dental hard tissues. *Adv Dent Res* (1997) 11 415-419.
- 21) Arends J, ten Bosch JJ. Demineralization and remineralization evaluation techniques. *J Den Res* (1992) 71 924-928.
- 22) Inoue K, Oka T, Suzuki T, Yagi N, Takeshita K, Goto S, Ishikawa T. Present status of high flux beamline (BL40XU) at SPring-8. *Nuc Inst Meth Phys Res* (2001) A467-468 674-677.
- 23) Ohta N, Oka T, Inoue K, Yagi N, Kato S, Hatta I. Structural analysis of cell membrane complex of a hair fiber by micro-beam X-ray diffraction. *J Appl Crystall* (2005) 38 274-279.
- 24) Amemiya Y, Ito K, Yagi N, Asano Y, Wakabayashi K, Ueki T, Endo T. Large-aperture TV detector with a beryllium-windowed image intensifier for X-ray diffraction. *Rev Sci Instrum* (1995) 66 2290-2294.
- 25) Yagi N, Ohta N, Tanaka T, Terada Y, Kamasaka H, To-o K, et al. Evaluation of enamel crystallites in subsurface lesion by microbeam X-ray diffraction. *J Synchrotron Radiat* (2009) 16(3) 398-404.
- 26) Backer Dirks O. Posteruptive changes in dental enamel. *J Dent Res* (1966) 45 503-511.
- 27) Silverstone LM, Poole D F G. The effect of saliva and calcifying solution upon the histological appearance of enamel caries. *Caries Res* (1968) 2 87-96.
- 28) Feagin FF, Gonzalez M. & Jeansson BG. Kinetic reactions of calcium phosphate and fluoride ions at the enamel surface-solution interface. *Calcif Tissue Res* (1972) 10 113-127.

- 29) ten Cate JM, Arends J. Remineralization of artificial enamel lesions in vitro. *Caries Res* (1977) 11 277-286.
- 30) Damen JJ, Exterkate RA, ten Cate JM. Reproducibility of TMR for the determination of longitudinal mineral changes in dental hard tissues. *Adv Dent Res* (1997) 11 415-419.
- 31) Tanaka T, Yagi N, Ohta T, Matsuo Y, Terada H, Kamasaka K, To-o K, Kometani T, Kuriki T. Evaluation of the distribution and orientation of remineralized enamel crystallites in subsurface lesions by X-ray diffraction. *Caries Res* (2010) 44(3) 253-259.
- 32) Ciccarello S, Goodisman J, Brumberger H. On the Porod Law. *J Appl Cryst* (1988) 21 117-128.
- 33) Tsuda H, Arends J. Orientaional micro-raman spectroscopy on hydroxyapatite single crystals and human enamel crystallites. *J Dent Res* (1994) 73 (11) 1703-1710.
- 34) Oizumi H, Fujika T, Ohashi M, Maezawa H, Nakai S. F-K XANES studies of alkaline-earth fluorides. *J Phys Soc Jpn* (1985) 54 4025-4033.
- 35) Wefel JS, Dodds WJD. Oral biologic defenses and the demineralization and remineralization. *Prim preve dent. 4th ed. Stanford* (1995) 259-88.
- 36) Tanaka T, Kobayashi T, Yusuke T, Sakanaka A, Kuriki T, Amano A. Phosphoryl oligosaccharides of calcium enhance mineral availability and fluorapatite formation. *Arch Oral Biol* (2019) 101, 135-141.
- 37) Tanaka T, Kobayashi T, Takii H, Kamasaka H, Ohta N, Matsuo T, Yagi N, Kuriki T. Optimization of calcium concentration of saliva with phosphoryl oligosaccharides of calcium (POs-Ca) for enamel remineralization in vitro. *Arch Oral Biol* (2013) 58 174-180.

- 38) Vogel GL, Zhang Z, Carey CM, Ly A, Chow LC, Proskin HM. Composition of plaque and saliva following use of an a tricalcium-phosphate-containing chewing gum and a subsequent sucrose challenge. *J Dent Res* (2000) 79(1) 58–62.
- 39) Reynolds EC, Cain CJ, Webber FL, Black CL, Riley PF, Johnson IH, Perich JW. Anticariogenicity of calcium phosphate complexes of tryptic casein phosphopeptides in the rat. *J Dent Res* (1995) 74 (6) 1272–1279.
- 40) Daculsi, G. & Kerebel, B. High-resolution electron microscope study of human enamel crystallites: size, shape, and growth. *J Ultra Res* (1978) 163–172.
- 41) Kitasako Y, Tanaka M, Sadr A, Hamba H, Ikeda M, Tagami J. Effects of a chewing gum containing phosphoryl oligosaccharides of calcium (POs-Ca) and fluoride on remineralization and crystallization of enamel subsurface lesions in situ. *J Dent* (2011) 39 (11) 771–779.
- 42) Eimar H, Ghadimi E, Marelli B, Vali H, Nazhat SN, Amin WM, Torres J, Ciobanu O, Albuquerque Junior RF, Tamimi F. Regulation of enamel hardness by its crystallographic dimensions. *Acta Biomater* (2012) 8(9) 3400-3410.
- 43) McDonagh MS, Whiting PF, Wilson PM, Sutton AJ, Chestnutt I, Cooper J, Misso K, Bradley M, Treasure E, Kleijnen J. Systematic review of water fluoridation. *BMJ* (2000) 321(7265) 855-859.
- 44) Whelton HP, Ketley CE, McSweeney F, O'Mullane DM. A review of fluorosis in the European Union: prevalence, risk factors and aesthetic issues. *Community Dent Oral Epidemiol* (2004) 32 9-18.

- 45) Khan A, Moola, MH, Cleaton-Jones P. Global trends in dental fluorosis from 1980 to 2000: a systematic review. *SADJ* (2005) 60 418-421.
- 46) JØRgen Christoffersen, Margaret R. Christoffersen, Wiktor Kibalczyc & W. G. Perdok. Kinetics of dissolution and growth of calcium fluoride and effects of phosphate. *Acta Odontol Scand* (1988) 46 326-336.
- 47) Cochrane NJ, Saranathan S, Cai F, Cross KJ, Reynolds EC. Enamel subsurface lesion remineralization with casein phosphopeptide stabilised solutions of calcium, phosphate, and fluoride. *Caries Res* (2008) 42(2) 88-97.
- 48) To-o K, Kamasaka H, Nishimura T, Kuriki T, Saeki S, Nakabou Y. Bioavailability of calcium-bound phosphoryl oligosaccharides in rats. *J Appl Glyco* (2002) 49 159-165.
- 49) Gordon LM., Cohen MJ., MacRenaris KW, Pasteris JD, Seda T, Joester D. Dental material. Amorphous intergranular phases control the properties of rodent tooth enamel. *Science* (2015) 347 746-750.
- 49) Featherstone JDB, Glena R, Shariati M, Shields CR, Glena M, Shariati CP. Dependence of in vitro demineralization of apatite and remineralization of dental enamel on fluoride concentration. *J Dent Res* (1990) 69 (2), 620-625.
- 50) Featherstone JD. Fluoride, remineralization, and root caries. *American J Dent* (1994) 7(5) 271-274.
- 51) Dawes C, Kubieniec K. The effects of prolonged gum chewing on salivary flow rate and composition. *Arch Oral Biol* (2004) 49(8) 665-669.