

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 10 日現在

機関番号：43905

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2012

課題番号：20592478

研究課題名（和文）エナメル質の脱灰・再石灰化メカニズムの結晶学的解析

研究課題名（英文）Crystal analysis of demineralization and remineralization mechanism of dental enamel

研究代表者

犬飼 順子（INUKAI JUNKO）

愛知学院大学短期大学部・歯科衛生学科・准教授

研究者番号：40319190

研究成果の概要（和文）：本研究はエナメル質の脱灰・再石灰化のミネラル濃度による評価と結晶学的構造分析を対比することを目的とした。エナメル質の粉末試料をメンブレンで封入し CMR によるミネラル濃度解析と FTIR ならびに TEM による結晶相の分析を行った。その結果、再石灰化後のエナメル質の結晶は CMR による分析では有意差が認められない場合でも、健全エナメル質の結晶構造は異なっていた。また、ミネラル濃度解析と結晶構造解析を比較するための本研究方法は 4 週間以上再石灰化時間を確保した場合の評価が妥当であると言えた。したがって、脱灰・再石灰化の評価はミネラル濃度解析だけでなく結晶構造分析も行うことが重要であると言える。

研究成果の概要（英文）：The aim of this study is to compare mineral level evaluation with crystal structure analysis of demineralized and remineralized enamel. The specimens were prepared with powdered enamel enclosed by membrane filter. The specimens evaluated mineral loss by CMR and analyzed crystal structure by FTIR and TEM. The results of this study, when there was no significant difference by CMR evaluation, the crystal structure of remineralized enamel and sound enamel was different. The method of this study which was compared mineral level evaluation with crystal structure analysis was appropriate for keeping 4 weeks remineralization time. It was concluded that it is important for evaluate of demineralization and remieralization of enamel, not only use mineral level evaluation but also crystal structure analysis.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
20 年度	1,400,000	420,000	1820,000
21 年度	400,000	120,000	520,000
22 年度	500,000	150,000	650,000
23 年度	600,000	180,000	780,000
24 年度	700,000	210,000	910,000
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・社会系歯学

キーワード：エナメル質・再石灰化・コンタクトマイクログラフィー・結晶学的解析

1. 研究開始当初の背景
う蝕は、口腔内で常に繰り返されている歯の脱灰・再石灰化のバランスがくずれることで

進行する。脱灰・再石灰化を繰り返すとき、歯のエナメル質のリン酸カルシウム塩はそのほとんどがヒドロキシアパタイトであ

ったものが、脱灰によってその構造をくずし、再石灰化によりくずれた構造を再構築していくものと考えられる。

このエナメル質の再石灰化はその挙動が明らかになった後、その量的評価は B Angmar¹⁾によってコンタクトマイクログラフィー、微小 X 線回折、偏光顕微鏡を用いて行われた。その中で B Angmar は再石灰化組織は微細で部位特異性があり石灰化が低いと報告し、表層下脱灰部分や再石灰化部分のグレイ値をミネラル濃度として相対的に評価するコンタクトマイクログラフィーを使用した方法が再石灰化の評価として可能であると報告した。この方法は 1986 年 J Arends²⁾によってさらに確立され、現在でもエナメル質の再石灰化の量的評価法として国内外の研究者によってさかんに用いられている^{3,4,5)}。さらにこのミネラル濃度として測定される相対的グレイ値は再石灰化のサロゲートエンドポイントとして用いられ、特定保健用食品の許可申請のための資料とされている。実際、わが国のいくつかの特定保健用食品はすでにこの方法により特定保健用食品の許可を得ているが、脱灰・再石灰化されたエナメル質が、脱灰もしくは再石灰化する前の結晶と同一であるかは明らかにされていない。口腔内で脱灰・再石灰化のバランスが取れている場合は、脱灰したエナメル質はそのほとんどが唾液の作用を受け再石灰化にシフトしていくものと考えられるが、短期間でエナメル質を効率的に再石灰化させるために、*in vitro* の研究でも *in vivo* の研究でもなんらかのカルシウム塩の供給を行い脱灰、再石灰化させているのが現状である。こうした、カルシウム塩を添加した脱灰、再石灰化と唾液の作用を中心とした脱灰、再石灰化はどちらも相対的グレイ値を用いたミネラル濃度は同一であっても、その結晶学的構造は果たして同一であるのかは現在明らかにされていないのが当該研究の学術的背景である。

2. 研究の目的

本研究では脱灰、再石灰化の過程でのカルシウム塩の供給の有無や供給するカルシウム塩の種類による、エナメル質の結晶構造の変化を明らかにすることを目的とする。当該分野での再石灰化の評価は、現在エナメル質の表層という微細な部位の評価であるため、質的な解析は後回しされ量的評価が先行してきたが、わが国の特定保健用食品の認可のための評価として取り扱われるようになり、さらに評価をツールポイントに近づけるためには質的評価の必要性が重要視されている。本研究は再石灰化を質的・量的方法を同時に評価しその関連性を比較検討するもので、従来の量的評価の精度をさらに高めることになる点が特色・独創的であり、この研究

結果が得られると質的にヒトエナメル質に望ましい再石灰化の状態を把握・誘導させることが可能となり、特定保健用食品の許可認定に貢献でき、さらには国民の健康の保持・増進に大きく貢献することが目的となる。

3. 研究の方法

(1) 研究 1

ヒトエナメル質に類似した β タイプのハイドロキシアパタイト(以下 HA)を A. B. Sønju Clasen らの方法⁶⁾により作成し、600°C で焼成後 50~100 μ の大きさになるよう分粒し HA 顆粒とした。さらに、内径 4mm 厚さ 300 μ m のナイロンリングにこの HA 顆粒 1.0mg を孔径 5 μ m のセルロースエステルメンブレンで封入し試料を作成した。

試料は 0.1M 乳酸、3mM CaCl₂、1.8mM KH₂PO₄、KOH で pH4.5 に調整した脱灰液で 2 日間脱灰した。また、20ml HEPES、1.5ml CaCl₂、0.9mM KH₂PO₄、pH7.0 に調整した再石灰化液および、この再石灰液に 2ppmF を添加したフッ化物が配合再石灰化液を作成した。試料は脱灰

(n=10) および 1 週間再石灰化液に浸漬 (グループ 1 : n=11)、1 週間フッ化物配合再石灰化液に浸漬 (グループ 2 : n=11)、2 週間再石灰化液に浸漬 (グループ 3 : n=11)、2 週間フッ化物配合再石灰化液に浸漬 (グループ 4 : n=11) の 4 グループに分けた。それぞれの実験条件下で実験後、乾燥試料を A1 ステップウェッジと共に CMR (softex CMR-2) を撮影後、光学顕微鏡 (Eclipse E1000M, Nikon, Japan) 下で CCD カメラ (DXM1200, Nikon, Japan) を用いて画像を取り込み、画像解析ソフト (Win ROOF ver. 5.0, Mitani, Japan) をもちいて平均ミネラル濃度を計測した。結果は spss17.0 を用い再石灰化液への浸漬時間とフッ化物添加の有無を要因とした二元配置分散分析を行った。その後、試料から HA 顆粒を取り出し、その結晶相を FTIR (JEOL Diamond20) で測定した。カルシウム : リン比は EPMA (フィールドエミッションプローベマイクロアナライザー) を使用し、結晶相は FTIR を用いて分析した。測定値は 2 元配置分散分析および sheffé の多重比較を行った。

(2) 研究 2

ヒト抜去歯からエナメル質を削りだし、50~100 μ m に粉碎し分粒した。厚さ 300 μ m のナイロンリングにエナメル質顆粒 1.0mg をセルロースエステルメンブレンで封入し試料を作成した。試料は脱灰液 (0.1M 乳酸、3mM CaCl₂、1.8mM KH₂PO₄、KOH により pH4.5 に調整) で 7 日間脱灰した。その後、50ml の再石灰化液

(1.5mM CaCl₂、0.9mM KH₂PO₄、KOH で pH 7 に調整) にそれぞれ 1 (n=10)、2 (n=10)、3 (n=10)、4 (n=10) 週間浸漬した。試料を CMR で撮影後、画像解析ソフトをもちいて平

均ミネラル濃度を計測した。さらに FTIR により結晶相を定性分析し、相対的グレイ値と比較検討した。

(3) 研究 3

厚さ $300\ \mu\text{m}$ の Diffusion Chamber を作成し、 $50\sim 100\ \mu\text{m}$ に分粒したヒトエナメル質 2mg を封入した。1 週間通法により脱灰 (0.1M 乳酸、 3mM CaCl_2 、 1.8mM KH_2PO_4 、 KOH により $\text{pH}4.5$ に調整) したのち、再石灰化液 A (1.5mM CaCl_2 、 0.9mM KH_2PO_4 、 2ppmF 、 KOH で $\text{pH}7$ に調整) (グループ 1)、再石灰化液 B (3.0mM CaCl_2 、 0.9mM KH_2PO_4 、 2ppmF 、 KOH で $\text{pH}7$ に調整) (グループ 2)、再石灰化液 C (1.5mM CaCl_2 、 0.9mM KH_2PO_4 、 0ppmF 、 KOH で $\text{pH}7$ に調整) (グループ 3)、再石灰化液 D (3.0mM CaCl_2 、 0.9mM KH_2PO_4 、 0ppmF 、 KOH で $\text{pH}7$ に調整) (グループ 4)、の 4 種の再石灰化溶液に 1 試料あたり 100ml で 4 週間再石灰化させた。それぞれの条件について CMR、FTIR および X 線回折により相対的グレイ値、結晶相について比較検討した。再石灰化は再石灰化率で検討した。

(4) 研究 4

ヒト抜去歯のエナメル質を *in vitro* で脱灰液 (0.1M 乳酸、 3mM CaCl_2 、 1.8mM KH_2PO_4 、 KOH により $\text{pH}4.5$ に調整) により 1 週間脱灰した後、採唾したヒト唾液で 1 週間再石灰化させ、脱灰前、脱灰後、再石灰化後の結晶構造を透過型電子顕微鏡 (TEM) で観察した。電子顕微鏡像から、 a 軸の結晶格子の大きさを測定し、一元配置分散分析および Tukey の多重比較により分析した。

4. 研究成果

(1) 研究 1

再石灰化率はグループ 1: 40.6% 、グループ 2: 53.8% 、グループ 3: 47.8% 、グループ 4: 46.6% であった。

グループ 1 の脱灰後から増加したミネラル量は再石灰化液への浸漬時間が 1 週間と比較して 2 週間のほうが高い傾向 ($p < 0.1$) が認められた。またフッ化物の添加の有無についてミネラル量の有意差は認められなかった。フッ化物の添加の有無による再石灰化率に有意差は認められなかった。カルシウム：リン比はグループ 1 $1.76 \pm 0.04\text{SE}$ 、グループ 2 $1.69 \pm 0.02\text{SE}$ 、グループ 3 $1.70 \pm 0.02\text{SE}$ 、グループ 4 $1.70 \pm 0.02\text{SE}$ であった。カルシウム：リン比についても有意差は認められなかった。しかし、FTIR スペクトルでは再石灰化の時間が長いほど、またフッ化物を添加するとアパタイトから OCP が増加していた。したがって、アパタイトにまず OCP が沈着するものと示唆された。また結晶相は再石灰化時間が増加するにつれ、 PO_4^{2-} 基のスペクトルがブロードになりピークが分割されており、結

晶相が変化していることが認められた。

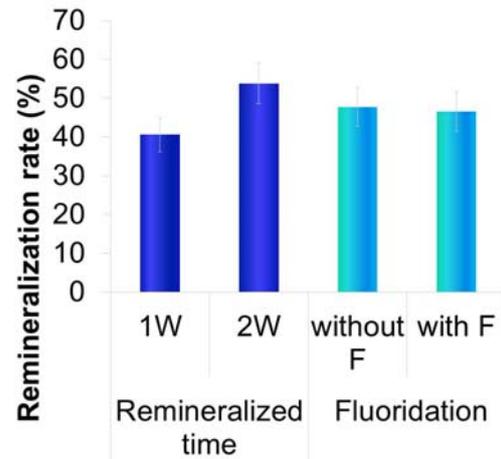


Fig. 1 再石灰化時間とフッ化物添加を要因としたときの再石灰化率

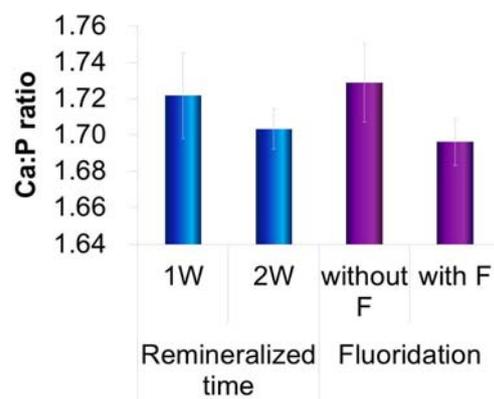


Fig. 2 再石灰化時間とフッ化物添加を要因としたときのカルシウムリン比

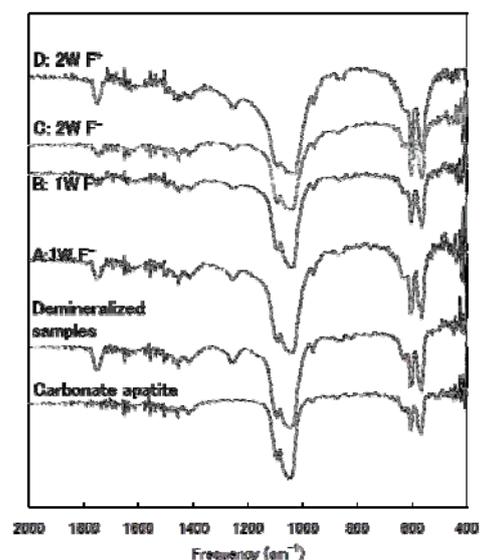


Fig. 3 FTIR スペクトル

(2)研究 2

再石灰化率は一元配置分散分析の結果、浸漬時間は $p<0.01$ で有意に再石灰化率に関連していた。再石灰化率は試料の浸漬時間と共に増加したが、浸漬後 3 週間までは有意差は認められなかったが、浸漬時間が 4 週間と 1 週間との間に $p<0.05$ で有意差が認められ、4 週間浸漬すると約 50%再石灰化した。また、FTIR の結果、浸漬後時間の経過とともに、カーボネートアパタイトの結晶構造に、徐々に OCP が検出されていた。したがって、ミネラル濃度解析には 4 週間以上再石灰化時間を確保する必要があると思われた。また、試料は画像解析後取り出し結晶学的解析が可能であると思われた。

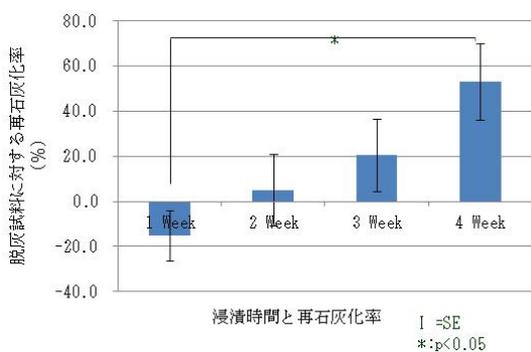


Fig. 4 浸漬時間と再石灰化率

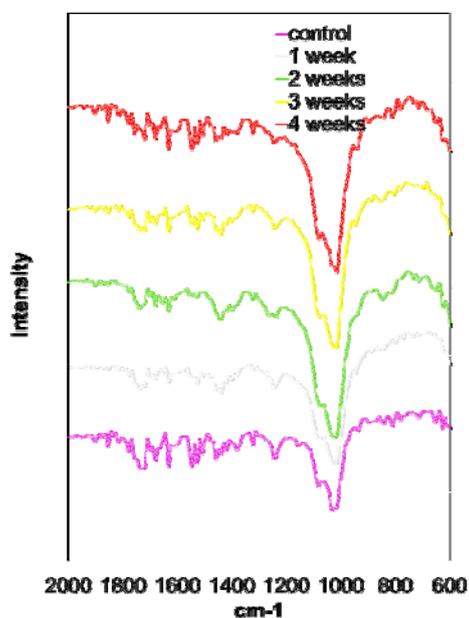


Fig. 5 浸漬時間と FTIR スペクトル

(3)研究 3

再石灰化はミネラル濃度とフッ化物濃度の両者とも関与しているが、結晶構造は再石灰

化率が高いほど結晶性が高まっているがフッ化物の存在による有意差認められないと解析された。

(4)研究 4

脱灰後と比較して再石灰化後の a 軸の結晶格子は有意に大きかった ($p<0.05$)。また、結晶性は脱灰により高まるが、再石灰化により低下した。以上の結果より、再石灰化後のエナメル質の結晶は CMR による分析では再石灰化として回復していても健全エナメル質の結晶構造とは異なっていた。



Fig. 6 健全エナメル質の TEM 像



Fig. 7 脱灰エナメル質の TEM 像



Fig. 8 再石灰化エナメル質の TEM 像

以上の研究結果より、脱灰・再石灰化の評価としてミネラル濃度による評価は有効であるが、結晶構造はミネラル濃度で検出されるより初期に結晶相に変化が認められる。また、再石灰化した結晶構造は脱灰前の健全エナメル質と全く同一の構造にはならない。したがって、脱灰・再石灰化を評価するときはすでに確立しているミネラル濃度による評価に結晶構造解析を加えることが望ましいと結論できた。

(文献)

- 1) B Angmar, D Carlstrom, J E Glas: Studies on the ultrastructure of dental enamel IV. The mineralization of normal human enamel, J Ultrastructure Research 8: 12-13, 1963.
- 2) J Arends, J Christoffersen: The nature of early caries lesions in enamel, J Dent Res: 65(1) 2-11, 1986.
- 3) E C Reynolds: Remineralization of enamel subsurface lesions by casein phosphopeptide-stabilized calcium phosphate solutions, J Dent Res 76(9): 1587-1595, 1997.
- 4) D Inaba, K Minami, H Kamasaka, T Kuriaki, S Imai, M Yonemitsu, Intraoral Effects of phospholyl-origosaccharide calcium on remineralization of enamel lesions, J Dent Hlth 53: 8-12, 2003.
- 5) 佐伯洋二、高橋満、上川新吾、徳本匠、見明康雄、山田了、奥田克爾、柳澤孝彰、フノリ抽出物と第2リン酸カルシウムを配合したキシリトールチューインガムの実験的初期齲蝕エナメル質に及ぼす再石灰化促進効果、J Oral Biol 42: 590-600, 2000.
- 6) A.B. Sønju Clasen, I.E. Ruyter, Quantitative determination of type A and type B carbonate in human deciduous and permanent enamel by means of Fourier transform infrared spectrometry, Adv Dent Res 11(4):523-527, 1997.

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)

[学会発表] (計4件)

- ① 犬飼順子, 中垣晴男, 向井正視: リン酸カルシウムの再石灰化に画像定量によるミネラル濃度解析と結晶学的解析の試み 第58回日本口腔衛生学会・総会(2008年10月9日、岐阜) 口腔衛生学会雑誌 59(4): 361, 2009.
- ② J Inukai, H Nakagaki, K Kato, M Mukai: リ Comparative study of Radiographical evaluation and Morphological evaluation of Remineralization of Carbonate apatite. 57th ORCA (European Organization for Caries Research), Sup Agro Montpellier, France, 2010.7.8.
- ③ 犬飼順子, 中垣晴男, 向井正視: ヒトエナメル質の再石灰化の結晶学的解析の可能な画像定量によるミネラル濃度解析法. 第60回日本口腔衛生学会総会(2011年10月10日、松戸) 口腔衛生会誌, 61(4): 508, 2011.

④ 犬飼順子, 中垣晴男, 向井正視: 清涼飲料水がエナメル質と象牙質の硬度に与える影響. 第61回日本口腔衛生学会総会(2012年5月26日, 横須賀) 口腔衛生会誌, 62(2): 225, 2012.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

犬飼 順子 (INUKAI JUNKO)

愛知学院大学短期大学部・歯科衛生学科・准教授

研究者番号: 40319190