

平成 22 年 5 月 21 日現在

研究種目：若手研究（B）  
 研究期間：2008～2009  
 課題番号：20791594  
 研究課題名（和文） CPP-ACP を応用した再石灰化象牙質による新たな齲蝕予防システムの構築  
 研究課題名（英文） Newly Caries Prevention System by CPP-ACP-induced Remineralized dentin  
 研究代表者  
 割田 幸恵 (WARITA SACHIE)  
 日本歯科大学・生命歯学部・講師  
 研究者番号：50386257

研究成果の概要（和文）：ウシ象牙質においてカゼインホスホペプチド-非結晶性リン酸カルシウム複合体（CPP-ACP）を応用した環境下での構造変化を同一試料上で観察した。マイクロ CT による画像解析の結果、エナメル質と比べ脱灰象牙質では再石灰化初期の微少な再石灰化層の検出が困難だった。臨床研究に向け、マイクロ CT に併せ非破壊的な歯質評価が可能な QLF（光励起蛍光定量法）でヒト乳歯への再石灰化効果をより簡便に測定する可能性を見出したが、現在の抜去ヒト乳歯試料は定期的なフッ化物塗布の影響で再石灰化研究に最適ではないことが示唆された。

研究成果の概要（英文）：This study suggested that the validity of the using  $\mu$ CT to evaluate the effect of Casein phosphopeptide-amorphous calcium phosphate(CPP-ACP) on demineralized bovine dentin. However it was difficult to measure the initial remineralization on the dentin in this experimental condition. And for preparing clinical study, the non-invasive evaluation on human extracted deciduous teeth using quantitative light-induced fluorescence (QLF) was done. It was found the possibility to measure the effects of remineralization on deciduous teeth easily. It was suggested that the human deciduous teeth which recently extracted were not so suitable for de/remineralization studies.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2009 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：小児歯科学

科研費の分科・細目：歯学・矯正・小児系歯学

キーワード：CPP-ACP、象牙質、再石灰化、脱灰抑制、齲蝕

## 1. 研究開始当初の背景

歯質表面における脱灰・再石灰化プロセスとその機序について共有する知見が増加するにつれ、フッ化物応用等の予防法により、齲蝕の進行を食い止めることができ、ある程度は歯質破壊部分の再生が可能であるという見解が広まってきている (T Aoba: *Oral Dis.* 10(5): 249-257, 2004.)。特にフッ化物に関しては、先進国をはじめ世界のさまざまな国において種々の方法で応用が進められ、すでにその効果による齲蝕有病率の減少が報告されている。このようにフッ素の齲蝕予防効果は周知の事実であるが、フッ化物以外にも、キシリトールによる再石灰化促進効果 (柳澤孝彰ほか: *日歯保存誌*, 45: 984-991, 2002.)、リン酸化オリゴ糖カルシウム塩(POs-Ca®)の再石灰化効果 (稲葉大輔ほか: *口腔衛生会誌*, 53: 8-12, 2003.)、カゼインホスホペプチド-非結晶性リン酸カルシウム複合体 (CPP-ACP: リカルデント®)の脱灰抑制および再石灰化促進効果 (E.C. Reynolds et al.: *J Dent Res.* 82(3): 206-211, 2003.)などが報告されている。わが国では、これらを「保健機能成分」として含んだ食品が「厚生労働省許可特定保健用食品」として市場に登場し、「歯を丈夫で健康に保つ」アイテムとして国民からの認知度が高まりつつある。そのなかで CPP-ACP は食品添加物であり、その応用についての制限が極めて少ないという利点から、齲蝕予防に際し薬物であるフッ化物がもつ使用限界を補うものとして大いに

期待されている。

申請者は CPP-ACP を配合したペースト (MI Paste®, GC 社製) を用いた歯に対する脱灰・再石灰化の研究を活発に行っており、既に CPP-ACP がフッ化物のエナメル質再石灰化を促進させることを確認した (小方清和ら、エナメル質の再石灰化促進に及ぼす CPP-ACP 配合ペーストの効果、2005.)。また齲蝕処置時に露出する象牙質に着目し、CPP-ACP を応用したエナメル質のみならず象牙質へもアプローチする齲蝕予防法を新たに確立することを目指した研究に対し「平成 18、19 年度科学研究費補助金」を交付され(「CPP-ACP を応用した脱灰象牙質再建療法の新開発」、現在、積極的に研究を続けている。これまでに CPP-ACP が象牙質においてもエナメル質と同様、低濃度 (100~500ppm) フッ化物との併用で脱灰抑制効果を有することを確認し、エナメル質において CPP-ACP の効果が大きい発揮されるリンとカルシウムが少ない環境での象牙質ではエナメル質で見られる層状構造ではなく無構造な領域として再石灰化が観察されることを報告してきた (割田幸恵ら: CPP-ACP 配合ペーストの齲蝕抑制効果に関する研究—象牙質への脱灰抑制効果について—, 2007.)。今後、摂取時の安全性を利点とした CPP-ACP を用いた新たな齲蝕予防法の確立をさらに推進するにあたっては、CPP-ACP を応用した象牙質再石灰化層構造の多角的評価を行い、その齲蝕予防効果を理解し、エナメル

質だけでなく象牙質においてもフッ化物との併用で CPP-ACP がもたらす最大の相乗効果を引き出すのに最適な環境と歯の形成時期をふまえた適切な条件を明らかにすることが、臨床応用を図る上で重要な鍵となると考えている。

本研究は、現在の日本における小児期の齲蝕罹患状況に合致した、齲蝕処置歯が現存する環境下での齲蝕予防（進行抑制）法をもう一步前進させるため、従来はエナメル質が中心であった CPP-ACP の再石灰化促進効果を期待する対象を、象牙質にも広げたもので、このことで新たな効果を見出せる可能性が高いと考えている。小児期の口腔内に存在する生理的咬耗による乳歯露出象牙質をはじめ、高齢者の根面齲蝕への応用等その適応範囲は広がっていくと考えられ、さらに最も効果的な応用時期を明らかにすることで、CPP-ACP の象牙質応用が国民の口腔保健に対する貢献度は計り知れないものと期待している。また、小児歯科臨床において乳歯あるいは幼若永久歯はその解剖学的特徴から、齲蝕罹患象牙質を完全に除去した場合、歯髄に影響が及ぶ可能性が高く、感染歯質を一層残して窩洞を封鎖する場合も少なくない。こうした状況を考慮し、エナメル質だけでなく象牙質においても脱灰抑制や再石灰化促進の効果が有効に働く条件を明らかにし、光重合型ガラスアイオノマーセメントに CPP-ACP を配合した新しい歯科材料を開発することは、今後の齲蝕予防法あるいは齲蝕治療法に極めて大きな変化をもたらし、国民の健康に寄与すると考えている。

## 2. 研究の目的

これまでに CPP-ACP（カゼインホスホペプチド-非結晶性リン酸カルシウム複合体）が象牙質に対するフッ化物による脱灰抑制

および再石灰化促進効果を増強することを確認してきたが、エナメル質に比べ、有機成分含有量の違いからか、エナメル質で行った実験と同条件では再石灰化効果が明確に現れず、実験条件をさらに詳細に解明していく必要があると考えている。本研究の目的は口腔内環境の齲蝕抵抗性向上に大きな役割を担う CPP-ACP を応用した再石灰化象牙質形成の最適な条件を明らかにし、臨床応用を目指すことである。

## 3. 研究の方法

(1) ウシ象牙質における CPP-ACP による再石灰化層の検討

### 【被験歯】

これまでの実験（割田幸恵ら：CPP-ACP 配合ペーストの齲蝕抑制効果に関する研究—象牙質への脱灰抑制効果について—、2007.）と同様に、本研究課題においてもウシ歯象牙質を対象とした。

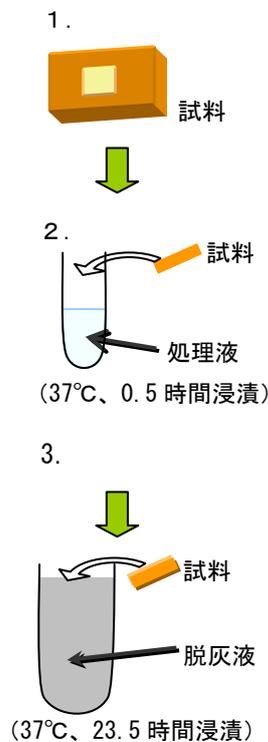


図 試料作製と実験の流れ

1. 被験歯（象牙質）に3×4mmのウインドウを形成し、同部以外を対照側とするためにネイルバーニッシュで被覆する。

2. 再石灰化層形成は、試料を処理の有無および使用するペーストの種類で以下の4群に分けて行う。(各ペーストは脱イオン水で30%W/W slurry に調整) 処理ペースト(4種)：

- ①表面未処理群 (脱イオン水)
- ②フッ化物配合ペースト群  
(フッ化ナトリウムのみ)
- ③MI ペースト<sup>※</sup>群 (CPP-ACP のみ)
- ④Tooth Mousse Plus<sup>※</sup>群  
(CPP-ACP+フッ化ナトリウム)

※CPP-ACP 含有ペーストである

「GC 社製 MI ペースト<sup>※</sup>」

MI ペースト<sup>※</sup>にフッ化物が添加された

「GC 社製 Tooth Mousse Plus<sup>※</sup>」

各試料を各処理ペーストまたは液に 37℃で30分間浸漬する。

3. その試料を、脱灰液(0.1M 乳酸、0.1M 乳酸ナトリウム、3mM CaCl<sub>2</sub>、1.8mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>;pH5.3) に 37℃で 23.5 時間浸漬する操作を1サイクルとして4日間繰り返す、各試料上に再石灰化層を得た。

#### 【マイクロ CT による検索】

各試料再石灰化層に対し、マイクロ CT (EIE-SCAN model, Nittetsu ELEX Co., Japan) による撮影を経時的(浸漬前、1サイクル後毎の計5回)に行う。得られた画像を解析し(TRI-BON, RATOC, Japan)、処理による歯質構造の変化を各群間またはエナメル質再石灰化層と比較検討する。

(2) ヒト乳歯における CPP-ACP による再石灰化効果の非破壊的評価

マイクロ CT を用いた再石灰化効果の非

破壊的評価が可能であることから臨床研究を念頭に、ヒト抜去乳歯における CPP-ACP の効果測定のため QLF(光励起蛍光定量法)を用いた。

#### 【被験歯】

ヒト抜去乳犬歯に対し(1)のウシ象牙質試料と同様ウインドウ形成を施し、脱灰・4群の処理液による再石灰化層形成を行う。

#### 【QLF・マイクロ CT による検索】

各試料再石灰化層に対し、QLF(Inspector Dental Care, The Netherlands)、マイクロ CT による評価を経時的に行う。処理による歯質構造の変化を各群間で比較検討する。

#### 4. 研究成果

(1) ウシ象牙質における CPP-ACP による再石灰化層の検討

ウシ象牙質における CPP-ACP を応用した環境下で脱灰から再石灰化に至る過程の構造変化をマイクロ CT による画像解析を用いて同一試料上で観察した。これまでの薄切切片上での観察と比べ、マイクロ CT を使用することで脱灰～再石灰化の経過を全く同じ場所で観察することが可能であり、切片作成上の試料の破壊もほとんどなかった。ただし、エナメル質における脱灰・再石灰化の観察と比較して、有機質の含有量が多い脱灰象牙質における再石灰化初期(1～2サイクル後)のわずかな再石灰化層の検出は困難であったため、撮影条件や基準の設定には今後更なる検討を要する。エナメル質に対するマイクロ CT による脱灰/再石灰化実験評価は非破壊的であり経時的変化の観察が可能であるため、近年、国内外で多く用いられつつある。象牙質に対する同様の評価法が確立すれば、脱灰化象牙質再石灰化研究にも大きな一助となると考え

られる。

## (2) ヒト乳歯における CPP-ACP による再石灰化効果の非破壊的評価

ウシ象牙質試料のマイクロ CT による検索による破壊はほとんどなかったことから、より臨床に即した研究を推進するためにヒト乳歯抜去/脱落歯での CPP-ACP 効果をマイクロ CT で測定する準備を進めた。現在、ヒト乳歯は提供される数が激減しているため、協力者から一定期間貸出を受け、CPP-ACP ならびにフッ化物の効果を実験的に測定した後に提供者へ返却するというシステムを立ち上げることは、今後の臨床研究を円滑に遂行する上で必要だと思われるからである。そのためマイクロ CT に併せ、非破壊的な脱灰/再石灰化歯質評価が可能である QLF (光励起蛍光定量法) を用いた。これによりヒト乳歯エナメル質および露出象牙質に対する再石灰化効果をより簡便に測定する可能性が見出されたが、大学附属病院で収集されたような抜去ヒト乳歯では定期的なフッ化物塗布あるいはフッ化物配合歯磨剤の日常的な使用による長期間の再石灰化の影響が著明であり、特にエナメル質においては耐酸性が高く、本研究でこれまで用いてきた方法による試料作製は困難であり、pH5.3 の脱灰液を用いていたところを pH2.0 にまで酸性度を変化させて、ようやく乳歯エナメル質表面に脱灰層が確認された。これにより、フッ化物使用が日常化してきた現在のヒト抜去乳歯は *in vitro* での再石灰化効果測定用試料として最適ではないことが示唆された。従来、臨床に即した脱灰/再石灰化研究の試料としては口腔内環境に曝露されていないヒト永久埋伏歯の使用が通例であるが、その組織学的構造・特徴が乳歯とは異なる。また前述した

ように、近年の少子化の影響も相まって、子どもの成長の証として手元に残すことを希望する保護者が多く、ヒト抜去乳歯は収集が困難であり、その上、今回確認されたように再石灰化研究には不向きな性状を示すようになってきた。本研究を立ち上げた大きな目的である乳歯をターゲットにした齲蝕予防手法を確立する上で、臨床応用に先んじて、より臨床に即した研究試料を確保することも今後の課題の一つとなった。

## 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 1 件)

① Kiyokazu Ogata, Sachie Warita, Kisaki Shimazu, Tomomi Kawakami, Kyoko Aoyagi, Hiroyuki Karibe: Combined Effect of Paste Containing CPP-ACP and Fluoride on Enamel Lesions: An *in vitro* pH-cycling Study, *Pediatric Dentistry*, 査読有、32 巻、2010 年 (投稿中)

[学会発表] (計 2 件)

① 割田幸恵、Micro-computed tomographic evaluation of effects of CPP-ACP on demineralized dentin、第 22 回国際小児歯科学会、2009 年 6 月 17-20 日、ドイツ・ミュンヘン

② 割田幸恵、The effects of CPP-ACP with fluoride on demineralised dentine、第 19 回国際障害者歯科学会、2008 年 10 月 29-31 日、ブラジル・サントス

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

割田 幸恵 (WARITA SACHIE)  
日本歯科大学・生命歯学部・講師  
研究者番号：50386257

(2) 研究分担者  
( )

研究者番号：

(3) 連携研究者  
( )

研究者番号：