

## 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 5月 27日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22592121

研究課題名（和文） 抗菌成分添加フッ化ジアミンシリケートを利用した齲蝕予防剤の開発

研究課題名（英文） Development of the method for prevention of dental caries with antibacterial ammonium hexafluorosilicate

研究代表者

菅 俊行 (SUGE TOSHIYUKI)

徳島大学・病院・講師

研究者番号：60243713

研究成果の概要（和文）：現在、臨床で齲蝕進行抑制剤および象牙質知覚過敏症治療剤として使用されているフッ化ジアンミン銀（サホライド）は、塗布後に歯質着色を起すことから、その使用は乳歯に制限されている。そこで、歯質着色を起さないフッ化ジアミンシリケート溶液に各種抗菌成分を添加して、永久歯の齲蝕予防へ臨床応用できるかどうか評価を行った。その結果、抗菌成分添加フッ化ジアミンシリケート溶液は齲蝕予防剤として臨床応用できる可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：Diamine silver fluoride (Saforide) is clinical use for prevent of progress of dental caries and desensitizing for hypersensitive tooth. Unfortunately, diamine silver fluoride stained tooth black due to silver deposition. To overcome this drawback, ammonium hexafluorosilicate was prepared. Comparing the antibacterial activity, ammonium hexafluorosilicate seems to be inferior to diamine silver fluoride. To increase the antibacterial activity of ammonium hexafluorosilicate, several antibacterial agents have been added to ammonium hexafluorosilicate solution. The antibacterial activity of ammonium hexafluorosilicate with the addition of antibacterial agents was increased, therefore, ammonium hexafluorosilicate is useful for prevention of dental caries.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
2012年度	900,000	270,000	1,170,000
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・保存治療系歯学

キーワード：スメア層・フッ化ジアミンシリケート・フッ化ジアンミン銀・フッ素・抗菌成分・象牙細管

## 1. 研究開始当初の背景

現在、齲蝕進行抑制剤および象牙質知覚過敏症治療剤として臨床で使用されているフッ化ジアンミン銀（商品名：サホライド）は塗布後に歯質が黒変することから、永久歯に多用することは困難で、主に乳歯に対して用いられている。学童期の齲蝕は減少傾向にある

が、歯牙保存年齢の上昇と相まって、高齢者における歯根面齲蝕は増加傾向にある。歯磨剤販売においてフッ素含有歯磨剤が90%を優に超えているにもかかわらず、根面齲蝕が増加傾向を示しているという事実は従来のフッ化物では予防効果に限界があることを物語っている。永久歯の齲蝕予防、特に歯

根面齲蝕に用いることができる、予防剤の開発が望まれる。我々は、フッ化ジアンミン銀の銀をシリカに置換することにより、歯質着色を起ささないフッ化ジアミンシリケート溶液を調製した。そして、その象牙質への浸透性を評価した結果、象牙細管深部にまで浸透し、シリカーリン酸カルシウム結晶で封鎖することが明らかとなった。また、処理後の歯質耐酸性を評価した結果、フッ化ジアミンシリケートはフッ化ナトリウムや酸性リン酸フッ素溶液よりも有意に歯質耐酸性を増加させ、フッ化ジアンミン銀と同等であった。フッ化ジアンミン銀に含まれている銀は抗菌性に優れることから、フッ化ジアミンシリケートの抗菌性は劣ることが推察される。そこで本研究では、フッ化ジアミンシリケートに各種抗菌成分を添加することにより、抗菌性を増強させて、歯面への齲蝕関連細菌の付着を抑制し、根面齲蝕を予防できる抗菌性負フッ素溶液の開発を目的として研究を行った。

## 2. 研究の目的

そこで本研究ではフッ化ジアミンシリケート溶液の抗菌作用を高める目的で、各種の抗菌成分（クロルヘキシジン、塩化セチルピリジニウム、イソプロピルメチルフェノール、カテキン）を添加したフッ化ジアミンシリケート溶液を調製して、抗菌成分添加フッ化ジアミンシリケート溶液がどの程度、象牙質中へと浸透して、齲蝕関連細菌に抗菌効果を発揮するのか評価を行い、齲蝕予防および齲蝕進行抑制剤として臨床応用可能かどうか判断することを目的として研究を行う。

## 3. 研究の方法

### (1) 抗菌成分添加フッ化ジアミンシリケート溶液の調整と歯質ブロックの作成

フッ化ジアミンシリケート溶液はフルオロケイ酸と塩化アンモニウムを反応させて調製し、エタノール-水系溶媒で再結晶して合成する。その後、各種の抗菌成分（クロルヘキシジン、塩化セチルピリジニウム、イソプロピルメチルフェノール、カテキン）を添加して、抗菌成分添加フッ化ジアミンシリケート溶液を調製する。また、保存不可能と診断され、患者の同意を得た上で採取したヒト抜去歯よりエナメル質および象牙質ブロックを作製する。

### (2) 抗菌成分添加フッ化ジアミンシリケート溶液の象牙質中への浸透度の評価

各種抗菌成分添加フッ化ジアミンシリケート溶液を象牙質ブロックに塗布した後、象牙質中へどの程度浸透して抗菌性結晶を析出させるのかを、走査型電子顕微鏡を用いて観察を行う。また、象牙質ブロックの一部は人工唾液に浸漬して、経時的に結晶の溶解性を評価することにより、口腔内でも結晶が溶解することなく長期間安定かどうかを評価す

る。

### (3) 抗菌成分添加フッ化ジアミンシリケートの齲蝕関連細菌への抗菌性の評価

齲蝕関連細菌である *S. mutans* UA159 を用いてフッ化ジアミンシリケートの抗菌効果を評価する。ペリクルでコートした面積規格化アパタイトディスクを各種抗菌成分添加フッ化ジアミンシリケート溶液で処理し、菌体懸濁液中に一定期間、浸漬する。その後、トリプシンEDTA処理により付着菌体を回収し、10段階希釈法によりSM加血液寒天培地に接種、培養後、CFUを算定し、付着菌数を求める。対照はフッ化ジアンミン銀とする。一部の試料についてはアパタイトディスク表面に付着した細菌をSEMにて観察を行う。

### (4) フッ化ジアミンシリケート溶液への各種抗菌成分の添加がフッ素活性に及ぼす影響の評価

ハイドロキシアパタイト粉末を各種抗菌成分添加フッ化ジアミンシリケート溶液で5分間処理後、水洗、乾燥し、粉末X線回折により処理前後の結晶性の変化を分析する。また、ハイドロキシアパタイトディスクを各種抗菌成分添加および無添加フッ化ジアミンシリケート溶液で3分間処理後にディスクを人工唾液に24時間浸漬した後、脱灰液に24時間浸漬攪拌後に脱灰深度を表面粗さ測定器にて計測を行った。

## 4. 研究成果

### (1) 抗菌成分フッ化ジアミンシリケート溶液の調整

フッ化ジアミンシリケート溶液に各種抗菌成分（クロルヘキシジン、塩化セチルピリジニウム、イソプロピルメチルフェノール、カテキン）を添加した場合にはクロルヘキシジン以外の抗菌成分は化学反応を起こすことなく添加できることが明らかとなった。一方、クロルヘキシジンは添加すると結晶析出が起こることから、添加できないことが明らかとなった。しかしながら、クロルヘキシジンは口腔内に使用可能である代表的な抗菌剤であることから、以下の研究では2段階処理、すなわち、フッ化ジアミンシリケート処理後にクロルヘキシジン処理を行う方法により評価した。

### (2) 抗菌成分添加フッ化ジアミンシリケート溶液の象牙質中への浸透度の評価

各種抗菌成分添加フッ化ジアミンシリケート溶液を象牙質ブロックに塗布した後、処理面および割断面を走査電子顕微鏡で観察を行った。その結果、4種類のいずれの抗菌成分を添加した場合においても、無添加フッ化ジアミンシリケート溶液と同様に象牙細管を約20  $\mu\text{m}$ の深度まで結晶性物質により緊密に封鎖した。このことから、口腔内でも析出した結晶が象牙細管内に残存していれ

ば、口腔内細菌の象牙細管への侵入が予防でき、その結果、齲蝕予防効果を期待できることが示された。次に象牙細管内に析出した結晶の安定性を象牙質プレートを人工唾液中に7日間、浸漬、攪拌を行い、評価した。いずれの抗菌成分を添加した場合も無添加のフッ化ジアミンシリケート溶液と同様に象牙細管内に析出した結晶は唾液中へと溶解することなく残存しており、持続的な象牙細管封鎖能を有することが明らかとなった。

#### (3) 抗菌成分添加フッ化ジアミンシリケートの齲蝕関連細菌への抗菌性の評価

齲蝕関連細菌である *S. mutans* UA159 を用いてフッ化ジアミンシリケートの抗菌効果を評価した。ハイドロキシアパタイトディスク表面に付着した細菌を走査電子顕微鏡にて観察した結果、抗菌成分添加フッ化ジアミンシリケート溶液で処理した場合にはコントロールと比較して付着細菌量の減少が認められた。各種抗菌成分の中でも、塩化セチルピリジニウムを添加した場合にはフッ化ジアンミン銀と同等の細菌付着抑制を示したことから、塩化セチルピリジニウム添加フッ化ジアミンシリケート溶液は齲蝕予防効果が最も高いことが示された。アパタイトディスク表面に付着した細菌をトリプシン EDTA 処理により付着菌体を回収し、10段階希釈法により SM 加血液寒天培地に接種、培養後、CFU を算定した結果からも塩化セチルピリジニウム添加フッ化ジアミンシリケート溶液の抗菌性がフッ化ジアンミン銀と同等の抗菌性を示した。

#### (4) フッ化ジアミンシリケート溶液への各種抗菌成分の添加がフッ素活性に及ぼす影響の評価

各種の抗菌成分を添加することによりフッ化ジアミンシリケート溶液のフッ素活性が阻害されると齲蝕予防の観点からは望ましくない。そこで、各種抗菌成分がフッ素活性に及ぼす影響を評価した。歯質の結晶性に及ぼす影響を定量的に評価する目的で、ハイドロキシアパタイト粉末を用いた。各種抗菌成分添加及び無添加フッ化ジアミンシリケート溶液で処理したアパタイト粉末の処理前後の結晶性の变化を粉末 X 線回折で分析を行った。その結果、各種抗菌成分を添加した場合にはアパタイト表面へのフッ化カルシウム生成量が減少することが明らかとなった。次に、アパタイトディスクを用いて脱灰試験を行った。塩化セチルピリジニウム添加フッ化ジアミンシリケート溶液処理の場合には脱灰深度は無添加フッ化ジアミンシリケート溶液およびフッ化ジアンミン銀と同程度であり、フッ素活性が阻害されないことが示された。しかしながら、その他の抗菌成分を添加した場合には脱灰深度が増加しており、フッ素活性が減少していることが判明

した。

以上の研究結果より、4種類の抗菌成分の内、塩化セチルピリジニウムを添加した場合にはフッ化ジアミンシリケート溶液のフッ素活性を減少させることなく、抗菌性をフッ化ジアンミン銀と同等まで向上させることが明らかとなった。

#### 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7件)

- ① Suge T, Matsuo T, Effects of ammonium hexafluorosilicate concentration on crystallinity of hydroxyapatite powder and enamel, Key Engineering Materials, Bioceramics 24, 査読有、Vols. 529-530, 2013 pp.526-530  
DOI:10.4028/www.scientific.net/KEM.529-530.526
- ② Suge T, Ishikawa K, Matsuo T, Changes in the crystallinity of hydroxyapatite powder and structure of enamel treated with several concentrations of ammonium hexafluorosilicate, American Journal of Dentistry, 査読有、25, 2012, 299-302
- ③ Shibata S, Suge T, Kimura T, Ishikawa K, Matsuo T, Antibacterial activity of ammonium hexafluorosilicate solution with antimicrobial agents for the prevention of dentin caries, American Journal of Dentistry, 査読有、25, 2012, 31-34
- ④ Horiuchi S, Kuroda S, Hiasa M, Suge T, Saku S, Hamada K, Matsuo T, Asaoka K, Tanaka E, Reinforcement of bond strength of self-etching orthodontic adhesive, The Angle Orthodontist, 査読有、82, 2012, 30-35  
DOI:10.2319/012011-39.1.
- ⑤ Shibata S, Suge T, Ishikawa K, Matsuo T, Occlusion of dentin tubules with antibacterial ammonium hexafluorosilicate solution for the prevention of dentin caries, American Journal of Dentistry, 査読有、24, 2011, 148-152
- ⑥ Suge T, Kawasaki A, Ishikawa K, Matsuo T, Ebisu S, Effects of ammonium hexafluorosilicate concentration on dentin tubule occlusion and composition of the precipitate, Dental Materials, 査読有、26, 2010, 29-34  
DOI:10.1016/j.dental.2009.08.011.
- ⑦ 菅俊行、フッ化ジアミンシリケートを利用した象牙質知覚過敏症治療法の開発、四国歯学会雑誌、査読無 22, 2010, 149-155

[学会発表] (計8件)

- ① Suge T, Effects of ammonium hexafluorosilicate concentration on crystallinity of hydroxyapatite powder and enamel, *Bioceramics* 24, 2012.10.23、九州大学医学部百年講堂 (福岡県)
- ② Matsuo T, Ammonium hexafluorosilicate with antimicrobial agents for the prevention of caries, 90<sup>th</sup> General Session & Exhibition of the IADR, 2012.6.21, Iguazu convention center (ブラジルイグアス)
- ③ Suge T, Antibacterial activity of ammonium hexafluorosilicate solution with antimicrobial agents for the prevention of dental caries, The 13<sup>th</sup> Joint-Scientific meeting between JSCD and KACD, 2011. 11. 11, 白凡記念館 (韓国ソウル)
- ④ 柴田眞吾、抗菌成分添加フッ化ジアミンシリケートが *S. mutans* の初期付着、バイオフィルム形成に与える影響、第134回日本歯科保存学会、2011. 6. 9, 東京ベイ舞浜ホテルクラブリゾート (千葉県)
- ⑤ Suge T, Changes of crystallinity of hydroxyapatite powder and structure of enamel treated with several concentrations of ammonium hexafluorosilicate, International Dental Materials Congress 2011 (IDMC2011) 第57回日本歯科理工学会大会・2011 Annual Meeting of KRSDM), 2011.5.28, Yonsei University (韓国ソウル)
- ⑥ S. Shibata, Addition of antimicrobial agent increased antibacterial activity of ammonium hexafluorosilicate, 88<sup>th</sup> General Session & Exhibition of the IADR, 2010.7.15, Center Conventions International Barcelona (スペインバルセロナ)
- ⑦ Suge T, Effects of ammonium hexafluorosilicate concentration on crystallinity of hydroxyapatite powder, 88<sup>th</sup> General Session & Exhibition of the IADR, 2010.7.15, Center Conventions International Barcelona (スペインバルセロナ)
- ⑧ 柴田眞吾、抗菌成分を添加したフッ化ジアミンシリケートの抗菌性評価、第132回日本歯科保存学会、2010.6.4, 崇城大学市民ホール (市民会館) (熊本県)

徳島大学・病院・講師  
研究者番号：60243713

- (2) 研究分担者  
高橋 加奈子 (TAKAHASHI KANAKO)  
徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・助教  
研究者番号：80403715

- (3) 連携研究者  
石川 邦夫 (ISHIKAWA KUNIO)  
九州大学・大学院歯学研究院・教授  
研究者番号：90202952

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

菅 俊行 (SUGE TOSHIYUKI)