

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 2 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462949

研究課題名(和文) 金属化合物とフッ化物が象牙質コラーゲンの分解と脱灰に及ぼす影響

研究課題名(英文) Combination effect of metal and fluoride on inhibiting demineralization and collagen degradation in dentin

研究代表者

中嶋 省志 (Nakashima, Syozi)

東京医科歯科大学・歯学部・非常勤講師

研究者番号：90571282

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：商品名サホライドには優れた根面う蝕予防効果が認められている。しかし根面や歯肉が黒くなるという審美的問題があり。本研究では黒くならない根面う蝕の予防剤(象牙質ミネラルの脱灰抑制とコラーゲン分解の抑制)の開発に繋がる探索研究を行った。

その結果、フッ化亜鉛に最少量の塩酸を加えた溶液に、サホライドの濃度の約1/5という低濃度フッ素にもかかわらず、これと同等レベルの脱灰抑制効果を認めた。また処置面で着色は認められなかった。一方、コラーゲンの分解抑制効果に関しては、サホライドに匹敵するような十分な効果は得られなかったが、今後、より高い濃度での評価や塗布方法を改良することでこの目標を達成したい。

研究成果の概要(英文)：This study aimed to develop a new topical fluoride agent for root caries prevention which has anti-demineralization and anti-collagen degradation without discoloration of root surface. Silver diamine fluoride (SDF) or Saforide has an excellent root caries preventive efficacy, but it causes severe browning of root surface and gingiva as a drawback. This study tried to employ ZnF₂ as an alternative of SDF. ZnF₂ is less soluble in water, and thus was solubilized by adding a minimum amount of HCl (ZnF₂/HCl).

Present results revealed that ZnF₂/HCl demonstrated similar anti-demineralization efficacy to SDF in spite of less fluoride concentration (1/5 compared to SDF), but insufficient anti-collagen degradation efficacy was noted comparing to that of SDF. No observable discoloration was noted on the treated surface by ZnF₂/HCl. Further study is needed to improve the anti-collagen degradation efficacy by increasing the concentration and treatment time.

研究分野：歯科保存学分野 う蝕制御学

キーワード：根面う蝕 サホライド フッ化亜鉛 脱灰抑制 コラーゲン分解抑制

1. 研究開始当初の背景

高齢者人口の増加、加えて残存歯の増加傾向が続いている。高齢者の中には心身的な問題を抱え、十分な口腔のセルフケアができない人も増加傾向にある。このような背景で、根面う蝕の罹患の増加が懸念される。

う蝕予防には、従来からフッ化物が有効であることは知られおり、国内外で広く使われている。これらは、エナメル質う蝕の予防(アパタイトの脱灰抑制)のアナロジーとして使用されているが、根面う蝕の予防効果は必ずしも十分でない。これは、根面う蝕の発症メカニズムとエナメル質う蝕のそれと大きく異なるかと推察される。すなわち根面う蝕ではコラーゲンの分解を伴いながらう蝕が進行する点である。象牙質が脱灰されるとコラーゲンが露出して酵素的に分解される。そうすると脱灰がより進みやすくなることが実験的に示されている。また象牙質ミネラルはエナメル質よりはるかに脱灰されやすい性質を持つ。

最近の臨床研究で、フッ化ジアミン銀(今後 SDF と略す：商品名サホライド®)に高い根面う蝕の予防効果が示された。しかしながら、SDF は歯面や歯肉に黒や褐色の着色を引き起こし審美的に問題があり、使用には大きな制約がある。そこで着色を起こさない新規の根面う蝕予防剤の開発が望まれる。

コラーゲンの酵素的分解に対して、種々の金属イオンが抑制的に作用することが報告されている。本研究では、将来の臨床的応用性(安全性、歯を着色させない)も視野に入れてフッ素と亜鉛を含む化合物(フッ化亜鉛：ZnF₂)に注目した。

2. 研究の目的

ZnF₂ には、これに含まれるフッ素(F)による象牙質脱灰抑制効果と亜鉛(Zn)によるコラーゲン分解抑制効果が期待される。本研究ではインビトロでそれらの効果を評価し、

SDF と比較することで、その応用可能性を検討することである。

3. 研究の方法

(1) 実験試料の作製：牛の歯根部象牙質をブロック状(2.5×2.5 mm)に切断し、これをレジンに包埋して象牙質表面を研磨し、レジンと象牙質のあいだを耐水性のマニキュアで覆い、試料面とした。

(2) 試験液(塗布液)の調製：本研究では下表 1 に示した試験液を評価した。なお ZnF₂/HCl は、4.18% ZnF₂·4H₂O を溶解するのに最小量の 1N の塩酸を加えて調製した。

群	試験液	組成
SDF	フッ化ジアミン銀(サホライド、ビーブランドメデイコ)	F=44,880ppm, Ag=25.5%
KF	フッ化カリウム	F=44,880 ppm (pH 中性)
APF	NaF を 0.1 M リン酸に溶解	F=9,048 ppm (pH 3.8)
ZnF ₂ /HCl	4.18% ZnF ₂ ·4H ₂ O を塩酸に溶解	F=9,048 ppm, Zn=1.56% (pH 2.7)
ZnF ₂	4.18% ZnF ₂ ·4H ₂ O (水に難溶性)	F=9,048 ppm, Zn=1.56%
コントロール	無処置	-

(3) 脱灰抑制効果の評価：表 1 に示した試験液を上記の試料面に 3 分間塗布し、軽く水洗した後、脱灰液(2.2mM CaCl₂, 2.2mM KH₂PO₄, 50mM 酢酸, 0.02% NaN₃, pH5.0) に 5 日間浸漬し、37°C にて脱灰した(各試験液に対し 10 試料)。脱灰後、脱灰試料から約 220 μm の切片を切出し、TMR 法(Transverse Micro Radiography)にて脱灰程度(脱灰深さ：μm、ミネラル溶出量：vol%×μm)を計測した。

(4) コラーゲン分解抑制効果の評価：上記象牙質試料を EDTA (0.5 M, pH7.4) に浸漬し、4°C にて 6 日間脱灰し、コラーゲン層を露出させた。次いでこの試料に試験液(ZnF₂/HCl, SDF, APF, NaF)を 3 分間処置した(各試験液に対し 20 試料)。その後、各試験液の試料を

2群に分け、30秒間軽く水洗した群(試料数10)と人工唾液(1.0mM CaCl₂, 3.0mM KH₂PO₄, 100mM NaCl, 0.02% NaN₃, pH 6.5)に24時間浸漬した群(試料数10)とした。後者の群は、薬剤の滞留性の検討するための群である。各試験液で塗布された2群の試料をコラゲナーゼ溶液(12.5 unit/mL *Clostridium histolyticum*: Type 1A; 50 mM HEPES 緩衝液に 0.36 mM CaCl₂を含む)に6時間37°Cにて浸漬し、コラーゲン分解を行った。

その後、コラゲナーゼ溶液を十分洗浄し、これらの試料から約200 μmの切片を切出し、この切片を透過型光学顕微鏡にて観察し、分解されたコラーゲン層の深さを計測した。

(5) 統計解析

脱灰抑制のデータに関しては one-way ANOVA と Tukey's HSD test で、またコラーゲン分解抑制データに関しては、two-way ANOVA with Bonferroni post-hoc で解析した(5%有意水準)。

4. 研究成果

(1) TMR 画像

図1に脱灰後の各群における TMR 画像を示した。コントロール群では、表層のないう窩状の脱灰を呈し、強い脱灰を受けた様子がわかる。それに対し、フッ化物塗布群では表層が維持されており、一定の脱灰抑制効果が認められた。フッ化物塗布群の中では ZnF₂ 群の効果は顕著ではなかったが、ほかの群ではかなり強い抑制効果が見られた。特に SDF と KF 群では微かな脱灰しか見られなかった。

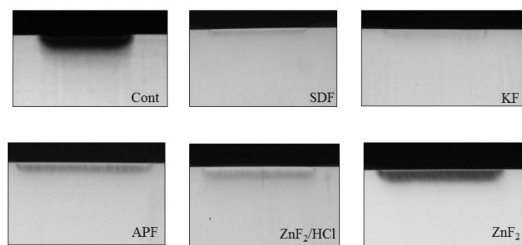


図1. 脱灰後の TMR 画像

(2) 脱灰抑制効果の比較(脱灰深さ: LD)

図2に示したように、コントロール群と比較して、有意に脱灰深さを抑制したフッ化物群

は SDF のみであった。KF 群では平均値では明らかにコントロール群より浅い脱灰深さであったが、有意ではなかった。これは試料間のバラツキが大きかったこと、あるいは試料数が十分ではなかったことよると推察される。

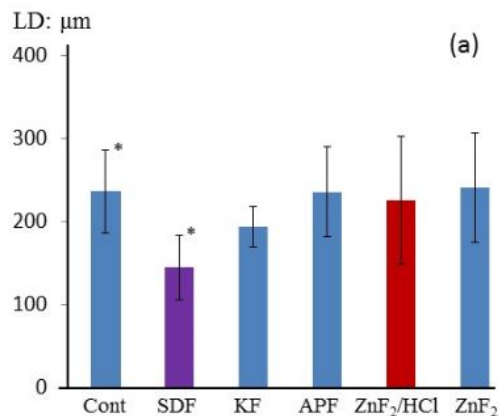


図2. 脱灰深さの比較

(3) 脱灰抑制効果の比較(ミネラル溶出量)

図3に各群におけるミネラル溶出量(ΔZ)を示した。ZnF₂群を除いて、他のフッ化物群は、コントロール群と比較してミネラル溶出量は小さく、有意な脱灰抑制効果を示した。アルファベットの異なる組み合わせ間では有意差が認められたことを示している。平均値では最も強い抑制効果を示した SDF 群に対して、KF 群と ZnF₂/HCl 群は、やや大きい ΔZ を示したが、有意な差はなかった。これも脱灰深さの場合と同様、試料のバラツキと試料

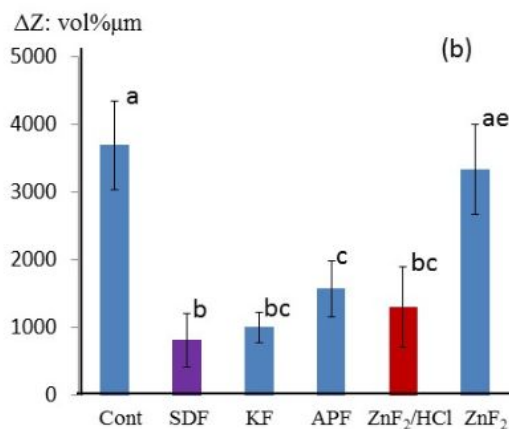


図3. ミネラル溶出量の比較

数に起因すると思われる。

興味あることは、SDF や KF と比べて ZnF₂/HCl ではフッ化物イオン濃度が約 1/5 と少ないにもかかわらず同レベルの脱灰抑制効果が認められたことである。これは HCl で酸性にしてあることから、多量の CaF₂ が歯面に形成されたことによると推察される。

(4) コラーゲン分解抑制効果

図 4 に各群におけるコラーゲン分解深さを示した。APF と NaF 群には、コラーゲンの分解抑制効果がないことが明らかになった。それに対して SDF には強力な抑制効果が認められた。ZnF₂/HCl 群では有意な抑制効果が認められた。このことから、ZnF₂/HCl に含まれる Zn がコラーゲンの分解抑制に関与している

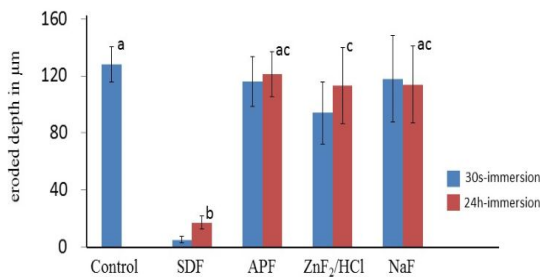


図 4. コラーゲン分解量の比較

ことが示唆された。一方、平均値では、SDF 群と ZnF₂/HCl 群において、フッ化物塗布後の 30 秒間軽く水洗した群と 24 時間人工唾液液に浸漬した群とのあいだで幾らか減少傾向が見られたが、統計学的には有意な差ではなかった。これは、分解抑制を担う薬効成分が、簡単にはコラーゲンから離脱しないことを示唆している。この図ではアルファベットの異なる組み合わせ間で有意差が認められたことを示している。

本研究では、ZnF₂/HCl に含まれるフッ化物イオン濃度は、歯科医院でよく使用される APF や NaF 塗布剤の濃度に合わせて評価したが、今後は SDF の効果に近づけるべく、より高い濃度での評価、あるいはより長い塗布時間または繰り返し塗布での評価が必要である。

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 6 件)

(1) Thanatvakorn O, Islam MS, Nakashima S, Sadr A, Nikaido T, Tagami J. Effects of zinc fluoride on inhibiting dentin demineralization and collagen degradation *in vitro*: a comparison of various topical fluoride agents. (Dental Material Journal からアクセプトの受理, 2016 年内に発行予定: 査読あり)

(2) Romero MJ, Nakashima S, Nikaido T, Ichinose S, Sadr A, Tagami J. Inhibition of hydroxyapatite growth by casein, a potential salivary phosphoprotein homologue. Eur J Oral Sci. 査読あり, 2015; 123: 288-96. doi: 10.1111/eos.12196. Epub 2015 Jun 17.

(3) Romero MJ, Nakashima S, Nikaido T, Sadr A, Tagami J. In vitro dentine remineralization with a potential salivary phosphoprotein homologue. Arch Oral Biol. 査読あり, 2016; 68: 35-42. doi: 10.1016/j.archoralbio.2016.03.014

(4) Bista B, Nakashima S, Nikaido T, Sadr A, Takagaki T, Romero MJ, Sato T, Tagami J. Adsorption behavior of methacryloyloxydecyl dihydrogen phosphate on an apatite surface at neutral pH. Eur J Oral Sci. 査読あり, 2016; 124: 195-203. doi:10.1111/eos.12254. Epub 2016 Mar 2.

(5) Islam MS, Khunkar SJ, Nakashima S, Sadr A, Nikaido T, Tagami J. Comparative study of demineralized collagen degradation determined by hydroxyproline assay and microscopic depth measurement. J Dent. 査読あり, 2016; 47: 94-7. doi: 10.1016/j.jdent.2016.01.001.

(6) Khunkar SJ, Utaka S, Hariri I, Sadr A, Ikeda M, Nakashima S, Nikaido T, Tagami J. Formation and characterization of hypermineralized zone beneath dentine lesion

body induced by topical fluoride in-vitro. Arch Oral Biol. 査読あり, 2015; 60: 574-81. doi: 10.1016/j.archoralbio.2015.01.001.

〔学会発表〕(計4件)

(1) Islam M, Khunkar S, Nakashima S, Sadr A, Nikaido T, Tagami J. Comparative study of demineralized collagen degradation determined by hydroxyproline assay and microscopic depth measurement. 第143回日本歯科保存学会総会 (2015/11/12, 東京都文京区)

(2) M.J.R.H. Romero, S. Nakashima, A. Sadr, T. Nikaido, J. Tagami. Effect of Casein as a Model Pellicle Precursor Protein on In Vitro Dentin Remineralization. 61th ORCA Congress. (2014/7/2, Greifswald, Germany).

(3) フッ化亜鉛による象牙質脱灰抑制およびコラーゲン分解抑制. 中嶋省志, Ornnicha Thanatvarakorn, 田上順次. 第141回日本歯科保存学会総会 (2014/10/30, 山形市)

(4) Formation of hypermineralization zone below dentin lesion body induce by topical fluoride in vitro. Khunkar SJ, Utaka S, Hariri I, Sadr A, Ikeda M, Nakashima S, Nikaido T, Tagami J. 第138回日本歯科保存学会総会 (2013/6/27, 福岡市)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕
出願状況 (計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況 (計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中嶋 省志 (NAKASHIMA Syozi)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・非常勤講師

研究者番号：90571282

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：