

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 13 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462961

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の齲蝕および酸蝕歯への臨床応用

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・大学病院・講師

研究者番号：60243713

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

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ミン銀(商品名：サホライド)は、塗布後に歯質着色を起こすことから、その使用は乳歯に制限されている。そこで、歯質着色を起こ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、永久歯の齲蝕予防や酸蝕歯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および酸蝕症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.

研究分野：保存治療系歯学

キーワード：フッ化ジアミンシリケート フッ化ジアミン銀 齲蝕 酸蝕症 抗菌成分 フッ素 象牙質知覚過敏症 塩化セチルピリジニウム

1. 研究開始当初の背景

現在、齲蝕進行抑制剤及び象牙質知覚過敏症治療剤として臨床で用いられているフッ化ジアンミン銀(商品名:サホライド)は歯質に塗布後に銀の沈着による歯質の黒変が起こることから、永久歯に多発する根面齲蝕や象牙質知覚過敏症治療剤として使用することは審美的な観点から困難であった。乳歯における齲蝕は歯科疾患実態調査によると減少傾向であるのに対して、根面齲蝕は8020運動などの推進による高齢者の残存歯数の増加という理由もあるが、増加傾向にある。根面のうち特に近遠心面などの隣接面はブラッシングが行いづらく、プラークコントロールが適切に行えないという理由もあるが、歯磨剤に通常添加されているフッ化ナトリウムなどの既存のフッ化物では根面齲蝕予防にエナメル質齲蝕予防ほどの効果を有していないのではないかと考えられる。象牙質は無機物だけでなくコラーゲン繊維などの有機物を含んでいることから、リン酸カルシウムなどの無機物の溶解を防ぐとともにコラーゲン繊維の崩壊を抑制する作用が求められる。シリカは革のなめし剤として使用されていることから、コラーゲン繊維の崩壊を抑制する働きが期待できる。またシリカは擬似体液中からリン酸カルシウム析出を誘導する触媒作用が報告されており、歯表面の石灰化を誘導できる可能性がある。そのため、シリカとフッ素の両方を含むフッ化ジアンミンシリケート溶液を調製した。これまでにフッ化ジアンミンシリケート溶液の歯質耐酸性に及ぼす影響を検討した結果、フッ化ジアンミン銀と同等の脱灰抑制効果を有することが明らかとなった。しかしながら、フッ化ジアンミンシリケート溶液の抗菌作用は銀を含むフッ化ジアンミン銀に劣ることが予想される。

2. 研究の目的

フッ化ジアンミンシリケート溶液の抗菌作用を高める目的で、口腔内で使用可能な4種類の抗菌成分(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ン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ン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ンミンシリケート溶液の調製と歯質ブロックの作製

フッ化ジアンミンシリケート溶液 $\{(NH_4)_2SiF_6\}$ 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、カテキン等)を添加して、抗菌成分添

加フッ化ジアン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歯質ブロック(エナメル質ブロック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ンミンシリケート処理がエナメル質表面構造へ与える影響および象牙質中への浸透深度の評価

各種抗菌成分添加フッ化ジアンミンシリケート溶液を歯質ブロックに塗布した後、エナメル質および象牙質中にどの程度浸透して抗菌性結晶を析出させるのかを、走査電子顕微鏡(SEM)で観察を行う。試料の一部を切断して、エネルギー分散型X線マイクロアナライザー(EDXA)を用いて歯質表面から深部へとラインスキャンを行い、フッ素、シリカ等の元素分布を定量して、歯質中への浸透深度を測定する。また、歯質ブロックの一部は擬似唾液に浸漬して、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。唾液中へと溶出したフッ素はフッ素イオン電極により測定し、抗菌成分の濃度測定はIPC発光分光分析法により測定を行う。

(3) 抗菌成分添加フッ化ジアン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ン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ン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処理により附着菌体を回収し、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、附着菌数を求める。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附着した細菌をSEMにて観察を行う。

(4) フッ化ジアン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ン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ン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ンミンシリケート溶液の調整

フッ化ジアン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 μm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変化を粉末 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種類の抗菌成分の中で、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 2件)

菅俊行、象牙質知覚過敏症の病態と治療法、四国歯学会雑誌、査読無 26, 2014, 55-60

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

[学会発表](計 3件)

Suge T, Fluorine activity of antibacterial ammonium hexafluorosilicate solution for the prevention of dental caries, Asia Pacific Dental Congress 2015, 2015.4.4、Santec city convention center, シンガポール(シンガポール)

Suge T, Fluorine activity of antibacterial ammonium hexafluorosilicate solution for the prevention of dental caries, International Conference on Antimicrobial Research 2014, 2014.10.2、Faculty of Medicine, Complutense University of Madrid, マドリード(スペイン)

菅俊行、象牙質知覚過敏症の病態と治療法、四国歯学会第42回例会、2013.3.28,

徳島大学（徳島県徳島市）

6．研究組織

(1)研究代表者

菅 俊行（SUGE, Toshiyuki）

徳島大学・病院・講師

研究者番号：60243713

(2)研究分担者

細川 育子（HOSOKAWA, Ikuko）

徳島大学・大学院医歯薬学研究部・助教

研究者番号：50707908

研究分担者

高橋 加奈子（TAKAHASHI, Kanako）

徳島大学・病院・特任講師

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