

平成 30 年 5 月 25 日現在

機関番号：33902

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K11437

研究課題名(和文) 定量的層別マッピングによる機能性資材の抗口腔バイオフィーム作用の評価に関する研究

研究課題名(英文) Study on the evaluation of anti-oral biofilm effects of functional materials using quantitative layer-specific analysis

研究代表者

加藤 一夫 (KATO, KAZUO)

愛知学院大学・歯学部・准教授

研究者番号：60183266

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：表面改質型酸反応性無機ガラス(S-PRG)フィラーは、ガラスコアの表層にグラスアイオノマー相を形成させたもので、種々の無機イオンを徐放する特性を有している。S-PRGフィラー配合歯磨剤の濾過液を口腔バイオフィームに作用させると、齲蝕予防に有利なフッ化物停滞性の向上が認められたため、フィラーから徐放される二価の陽イオンであるストロンチウムに注目し、フッ化物停滞性の要因を検討したが、ストロンチウム単独の作用ではなく他のイオンとの相互作用の結果であることが示唆された。バイオフィームに対する機能性という観点では、オーラルケア製品を利用した間欠的であっても高濃度での応用は望ましい方法かもしれない。

研究成果の概要(英文)：The surface of pre-reacted glass-ionomer (S-PRG) fillers, which are formed by an acid-base reaction between fluoroboroaluminosilicate glass and polyacrylic acid, have the ability to release ions, such as aluminum, boron, fluoride, silicate and strontium. We have found that toothpaste containing S-PRG fillers promotes fluoride retention into biofilms. It is known that some divalent cations promote fluoride retention in oral biofilms, by enhancing fluoride binding to bacterial cells in the presence of fluoride. However, depth-specific analyses of in situ oral biofilm couldn't confirm a hypothesis that strontium, which is a divalent cation containing S-PRG filler extract, has similar effects on biofilm, indicating that promotion of fluoride retention in oral biofilms was caused by the interaction with other ions. The results suggest that fluoride behavior within oral biofilm might be effected when fluoride is applied at the same time as other mineral ions released from the same resources.

研究分野：口腔衛生学

キーワード：口腔バイオフィーム フッ化物停滞性 定量的層別マッピング S-PRGフィラー配合歯磨剤 ミネラル徐放コンポジットレジン 機能性

## 1. 研究開始当初の背景

- (1) 歯面や修復物表面に付着する歯垢は、多糖類を主成分とする基質と多様な細菌類から形成される口腔バイオフィームである。定量的層別マッピングは、代表研究者加藤が開発したバイオフィームの深度特異性を解析する方法 (depth-specific analysis) で、バイオフィームの層別採取法に bacterial DNA や微量元素などの定量分析を組合せ、目標とする成分のプロファイルを作成することができる。
- (2) 一方、研究代表者加藤は、脆弱で特定が困難な口腔バイオフィームや残遺した有機質に被覆された酸蝕象牙質の最表層を、電子プローブマイクロアナライザ (EPMA) を応用して可視化する手法で、通常のジェット水流の洗浄圧 (350 ~ 700kPa) でも 2 日間堆積させた in vivo 歯肉縁上バイオフィームの約 85% が除去できることや、酸蝕歯面では音波ブラシによる磨耗の影響が限定的なことを明らかにし、機械的ブラークコントロールに新しい知見を加えた。
- (3) 本来、プラークコントロールは、口腔バイオフィームの成長や成熟を抑制することにより、歯科疾患の誘発リスクの高い状態を低い状態に維持することと定義できる。広義的には、口腔ケア製品や保健用食品の機能性も化学的プラークコントロールの範疇に属すると思われるが、その臨床的意義は不明な点が多く、この領域への定量的層別マッピングの応用は、新しい知見を見いだす可能性が高く、有意義なことと考えるに至った。

## 2. 研究の目的

- (1) 表面改質型酸反応性無機ガラス (S-PRG) フィラーは、フッ化物やストロンチウムに加え、ホウ酸、アルミニウム、ケイ酸およびナトリウムの各イオンを徐放する性質を持ち、この S-PRG フィラーを配合した歯科用セメントや複合レジンなどの歯科材料がすでに市販されている。
- (2) 口腔環境中のフッ化物のバイオフィーム内へ浸透速度には、バイオフィームの成熟度や pH など様々な要因が影響することが知られている。一方、S-PRG フィラーから徐放される多種イオンが同時に口腔バイオフィームに曝露した際のフッ化物の動態に与える影響は大変興味を持たれるところであるが、これまでほぼ未検討の状態に置かれてきた。
- (3) 口腔バイオフィームをコントロールするという機能性の解明という観点から、歯磨剤に代表されるオーラルケア製品へ S-PRG フィラーを応用した場合の有用性を明らかにすることを目的として、次の実

験を行った。

S-PRG フィラー配合歯磨剤から放出される Al、B、F および Sr のイオンが同時に口腔バイオフィームに作用した場合のフッ化物停滞性への影響

バイオフィームのフッ化物停滞性が 2 価の陽イオンである Ca や Mg により高まることから、S-PRG フィラーから徐放される同じく 2 価の陽イオンである Sr がバイオフィームの F 停滞性を促進させるという仮説の検証

S-PRG フィラー配合レジン上に堆積し、絶えずそこから徐放されるイオンに曝された口腔バイオフィーム内のフッ化物分布の解析

## 3. 研究の方法

- (1) 被験者 20 名の上顎臼歯部に装着した一対の in situ バイオフィーム堆積装置のエナメル質 (4 mm<sup>2</sup>) 上に、バイオフィームを堆積させた。3 日後、装置を取り外し、一方は 5wt% S-PRG フィラー配合歯磨剤スラリーの濾過液 (Al ; 344.9 ppm, B ; 460.5 ppm, F ; 202.0 ppm, Sr ; 931.1 ppm を含む) に 1 分間浸漬した。もう一方は対照群として、フィラー未配合の歯磨剤濾過液に F (195.0ppm) を添加した溶液に浸漬した。30 分間口腔内に装置を保持した後、回収し、直ちに凍結乾燥させ、バイオフィームの包埋試料を作製した。試料の表面から一定の 2 μm または 4 μm の切片を交互に採取し、外層、中層および内層の層別試料分画 (厚さ 300 μm) に分離した。4 μm の切片から、酢酸緩衝液 (pH5.2) を用いて無機イオンを抽出し、F はイオン電極法、Al、B および Sr は ICP 発光分光分析法により定量を行った。統計的検討 (ANOVA および t 検定) には、2 μm の切片を染色し、その面積と切片の厚さから推定したバイオマス量で補正した値を用いた。
- (2) 被験者 18 名の上顎両側臼歯部に in situ バイオフィーム堆積装置を取り付け、そのエナメル質スラブにバイオフィームを 3 日間堆積させた。その間、装置を、朝夕 2 回、5wt% S-PRG フィラー配合歯磨剤スラリーの濾過液 (Al ; 340.5, B ; 447.7, F ; 181.0, Sr ; 985.2 ppm) に 1 分間浸漬した。最終浸漬から 30 分後に装置を回収し、凍結乾燥後、包埋試料を作製した (S-PRG 群)。フィラー未配合歯磨剤濾過液に F と Sr および F のみを添加した溶液で浸漬処理したものを陽性 (PC 群) および陰性対照 (NC 群) とし、3 群による交叉試験とした。バイオフィーム表面から切片 (2 μm または 4 μm) を交互に反復採取し、外層、中層および内層の層別試料分画 (厚さ 300 μm) に分離した。酢酸緩衝液 (pH5.2) を用いて 4 μm 切片から無機イオンを抽出後、F はイオン電極法、他のイオンは ICP 発光分光分析法

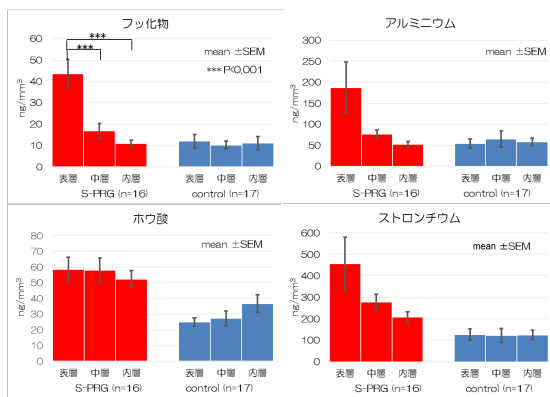
で定量した。結果は、染色した2 $\mu$ m切片の面積と切片の厚さから推定したバイオマス量で補正後、ANOVAと多重比較で統計的検討を行った。

(3) S-PRG フィラーを配合したコンポジットレジンから放出された無機イオンが、そのCR上に形成された口腔バイオフィーム内でどのように分布するかを、3群による交叉試験により検討を行った。S-PRG フィラーを70wt%含むS-PRGディスク、NaFを3.2%含有しS-PRGディスクと同濃度のフッ化物を徐放する陽性対照(PC)ディスクおよび有効成分を含まない陰性対照(NC)ディスクという3種類のCRディスクを用意した。健康な被験者16名の上顎臼歯部に装着したin situバイオフィーム堆積装置内の1対のディスク(直径4mm)上にバイオフィームを4日間形成させた。ディスクを回収し、ディスクに接したバイオフィーム深部から順に2 $\mu$ mと4 $\mu$ mの切片に分けながら、内層、中層、外層の層別試料分画(厚さ300 $\mu$ m)に分離した。Fはイオン電極法、他のイオン(Al、B、F、Si、Sr)はICP発光分光分析法で定量した。結果は、バイオマス量で補正後、ANOVAと多重比較で統計的検討を行った。

#### 4. 研究成果

(1) S-PRG 処理群と対照群におけるバイオフィームの層別ミネラル濃度分布を図1に示す。

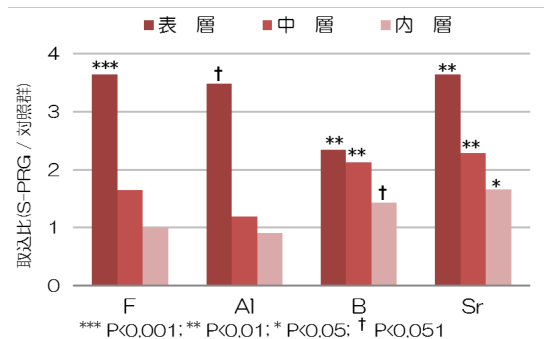
図1 バイオフィーム内のミネラル分布



S-PRG 処理群では、外層でフッ化物濃度が、中層および内層より有意に上昇していた。また、S-PRG 処理群のアルミニウムとストロンチウムにおいても、外層で濃度が高く、内部に向かって減少するnegative gradientな分布傾向を示した。一方、ホウ酸については、S-PRG 処理群ではほぼ均一な分布であったのに対して、対照群で内部に向かって濃度が増加傾向を示すなど、アルミニウムやストロンチウムとはバイオフィーム内での分布に差異あることが示唆された。

S-PRG フィラー歯磨剤濾過液で処理したバイオフィーム内のフッ化物、アルミニウム、ホウ酸およびストロンチウムの平均濃度比(S-PRG群/対照群)を図2に示す。

図3 各ミネラルの取込比

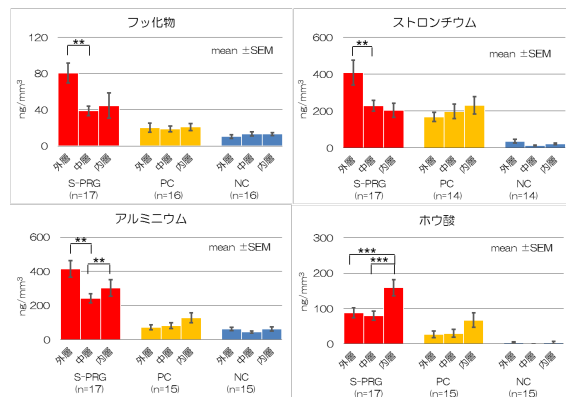


フッ化物とアルミニウムの濃度は、バイオフィーム表層で対照群より有意に高く、また、ホウ酸とストロンチウムは、バイオフィームの全層で対照群より有意に高い濃度を示した。

S-PRG フィラー配合歯磨剤による口腔バイオフィームにおけるフッ化物停滞性への影響を検討する目的から、対照群のフィラー未配合の歯磨剤濾過液においても、フッ化物濃度レベルがS-PRG群と同程度になるように調整を行った。それにもかかわらず、S-PRG群では、対照群よりバイオフィーム表層で有意(t-test,  $p < 0.001$ )に高いフッ化物濃度を示したことから、多種類の陽イオンや陰イオンが同時に口腔バイオフィームに作用するS-PRG フィラー濾過液への曝露は、バイオフィームのフッ化物停滞能を促進することが明らかとなった。

(2) バイオフィーム内のミネラル分布を図3に、3群の間の多重比較の結果を図4に示した。

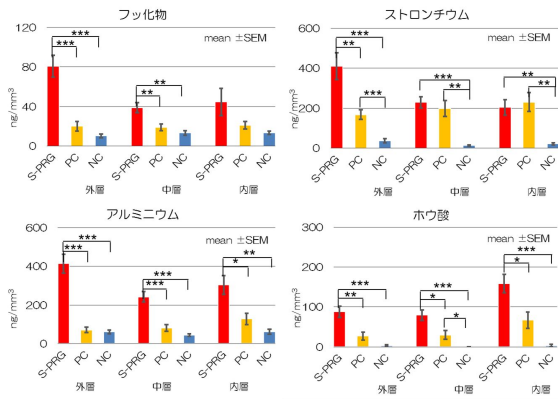
図3 バイオフィーム内のミネラル分布



バイオフィーム内のミネラル濃度を層別に比較したところ、S-PRG群では、バイオフィーム内の層間で、フッ化物、ストロンチウム、アルミニウムおよびホウ酸のイオン濃度

に有意な差が見られた。こうした、各無機イオンのバイオフィーム内の深度による濃度差は、バイオフィーム内での各元素の浸透や排出といった移動速度の違いを反映した可能性があり、今後検討が必要と考えられる。

図4 多重比較の結果



S-PRG 群、PC 群および NC 群の間におけるミネラル濃度を比較では、S-PRG 群のフッ化物濃度は、バイオフィームの外層と中層で、同じ濃度のフッ化物溶液が作用した PC 群および NC 群より有意に増加したことから、この歯磨剤濾過液にはバイオフィーム内のフッ化物停滞性を促進する作用のあることが明らかとなった。しかし、バイオフィームの総ての層で、ストロンチウムを添加した PC 群と無添加の NC 群の間のフッ化物濃度には、有意な差は認められなかったことから、このフッ化物停滞性の促進作用が濾過液に含まれるストロンチウムの働きによるという仮説を検証することはできなかった。

(3) (1)および(2)の結果から、S-PRG フィラー配合歯磨剤濾過液中の各無機イオンは容易に口腔バイオフィーム内に浸透し、その過程でフッ化物停滞性が促進することが確認された。しかし、その作用はストロンチウムに依存するものではなく、他のイオンとの相互作用が関与している可能性が示唆された。

一方、S-PRG フィラーを配合したレジン上に形成させた口腔バイオフィームは、歯磨剤への S-PRG フィラーの応用という観点から、間欠的に曝露のあったバイオフィームとは異なり、S-PRG フィラーから徐放するミネラルに絶えず曝されることから、フッ化物と他のイオンとの相互作用がより明瞭に現れることが期待された。そこで、S-PRG フィラーに由来する多種イオンが作用したバイオフィームとフッ化物のみが作用したバイオフィームを分析試料として、機能性資材としての S-PRG フィラーの口腔バイオフィームへの作用を検討した。

ミネラル徐放レジン上に堆積したバイオフィームの内層から外層にかけてのミネラル分布を図5に、3群の間の多重比較の結果

を図6に示した。

図5 バイオフィーム内のミネラル分布

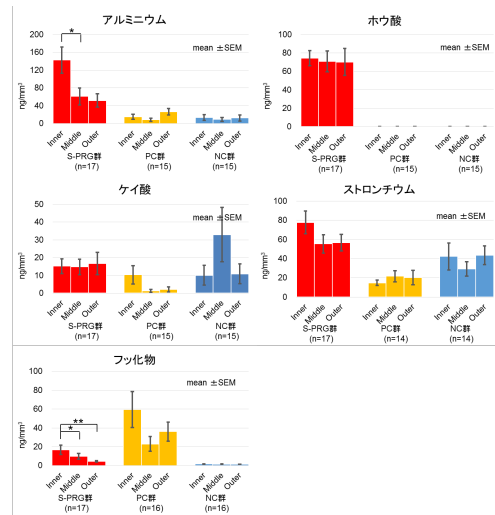
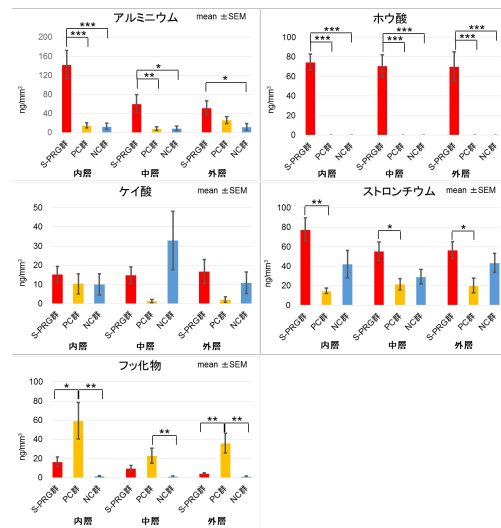


図6 多重比較の結果



アルミニウムとホウ酸に関しては、S-PRG 群でバイオフィームの深度の関わらず有意な濃度の上昇が認められた。ストロンチウムに関しては、PC 群との間に有意な差はみられたものの、明瞭な濃度上昇は見られず、ケイ酸に関しては有意な濃度変化は認められなかった。

一方、フッ化物に関しては、4日間のフッ化物徐放量が同じレベルのディスクに形成された S-PRG 群と PC 群では、PC 群のみに有意な上昇が見られ、フッ化物停滞性の促進も期待された S-PRG 群では、予想に反して有意な濃度上昇が認められなかった。この理由については不明であるが、S-PRG ディスクと陽性対照ディスクでフッ化物の徐放速度や徐放パターンに差が存在した可能性やイオンによるバイオフィームからの排出速度の違いが関与した可能性、フッ化物と他の無機イオンで定量法が違い、同じ試料で比較することができないという分析上の制約も否定で

きなかった。しかし、S-PRG フィラーのバイオフィルムに対する機能性という観点では、低濃度で継続的な曝露より、歯磨剤などオーラルケア製品への応用による間欠的であっても高濃度な曝露のほうが望ましいかもしれない。

口腔バイオフィルムは水分が多く不均質で物理的に脆弱なため、構造と関連したバイオフィルムの情報は極めて限られている。S-PRG フィラーから徐放される無機イオンが同時に作用したバイオフィルムで、フッ化物停滞性が促進したことは、このようなバイオフィルム内の深度特異的な影響を考慮した分析の結果から、明らかにできたものである。アルミニウムやホウ酸がバイオフィルムに及ぼす影響については不明な点が多く、ホウ酸は殺菌・洗浄剤として医療用に用いられることから、細菌叢やバイオフィルム構造の変化を指標とした S-PRG フィラーの機能性を検討することも有用と考えられる。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 6 件)

Kato K, Tamura K, Shimazaki Y: Mineral distribution within oral biofilm which was grown on mineral-releasing composite resin containing S-PRG filler. The 65th Congress of the European Organisation for Caries Research. 2018.

加藤一夫、村上多恵子、嶋崎義浩 : S-PRG フィラー配合歯磨剤による口腔バイオフィルムのフッ化物停滞性の要因の検討 .第 76 回日本公衆衛生学会総会, 2017.

Kato K, Tamura K, Shimazaki Y: Mineral Ions Released from Experimental Toothpaste Containing S-PRG Filler Enhance Fluoride Retention in Oral Biofilm. The 64th Congress of the European Organisation for Caries Research. 2017.

加藤一夫、村上多恵子、嶋崎義浩 : S-PRG フィラー配合歯磨剤の作用した口腔バイオフィルムのフッ化物停滞性 . 第 75 回日本公衆衛生学会総会, 2016.

Kato K, Tamura K, Shimazaki Y: Enhancement of fluoride retention in oral biofilm using extract from experimental toothpaste containing S-PRG fillers. 63rd Congress of the European Organisation for Caries Research. 2016.

加藤一夫、村上多恵子、嶋崎義浩 : 口腔バイオフィルムによる S-PRG フィラー配合歯磨剤からの無機イオンの取り込

み 第 74 回日本公衆衛生学会総会, 2015 .

〔その他〕  
ホームページ等  
<http://kazkato.agu.ac.jp/>

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者  
加藤 一夫 (KATO, Kazuo)  
愛知学院大学・歯学部・准教授  
研究者番号 : 6 0 1 8 3 2 6 6

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者 なし

(4) 研究協力者 なし