

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 6 月 1 日現在

機関番号：33703

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K17145

研究課題名(和文)テオブロミンは齲蝕を予防する；齲蝕抑制の解明と新規歯面コーティング材の開発

研究課題名(英文)Enhanced Protective Effect of Tooth Coating Materials Containing Theobromine

研究代表者

日下部 修介(Shusuke, Kusakabe)

朝日大学・歯学部・講師

研究者番号：30614557

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)： カカオに含まれ、フッ化物より安全で、歯質を強化する効果が強いとされているテオブロミン、および多種類のイオンを徐放し、抗ブラーク性などを有するS-PRGフィラーに注目し、歯面コーティング材を開発・試作した。本研究ではその齲蝕予防・抑制効果と特性について検討した。
その結果、テオブロミンは細菌付着抑制効果は認められなかったものの、S-PRGフィラーよりコーティング下で強い再石灰化を認めた。S-PRGフィラーを含有するコーティング材は、酸中和能、脱灰抑制能、細菌付着抑制効果を示す可能性が示唆された。テオブロミン、S-PRGフィラーの両者が合わさると相乗効果が期待できることが考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

社会の高齢化に伴う齲蝕予防の問題から歯の脱灰・破壊を阻止するために歯面コーティング材がその一助になると考え、齲蝕予防・抑制効果を発揮し、十分な機能を有するコーティング材について試作・開発した。
カカオに含まれるフッ化物より安全で歯質強化の効果が高いとされるテオブロミンは、多種類のイオンを徐放し、抗ブラーク性等を有するS-PRGフィラーよりコーティング下で強い再石灰化を認め、S-PRGフィラー含有コーティング材は、酸中和能、脱灰抑制、細菌付着抑制を有する可能性が示唆された。またテオブロミンとS-PRGフィラーによる相乗効果も期待でき、従来以上の機能を有するコーティング材が実現可能と考えられた。

研究成果の概要(英文)： This study investigated protective effects of tooth-coating materials containing theobromine and/or Surface Pre-Reacted Glass (S-PRG) filler, by measuring acid buffering, hardness changes and inhibited demineralization of enamel.

The coating materials containing S-PRG filler neutralize lactic acid, while the buffer pH shifted to lower values with the materials without S-PRG filler. Both theobromine and S-PRG filler increase enamel and dentin hardness, with the greater increase observed when S-PRG and theobromine are combined. The ability of theobromine may provide an added protective benefit for ion-releasing/reminalizing, topical treatments. In addition, S-PRG filler inhibited demineralization for enamel around the coating and bacterial adhesion of coating.

It was suggested that the coating materials containing S-PRG filler + theobromine have excellent functionality.

研究分野：歯科保存修復学分野

キーワード：テオブロミン S-PRGフィラー 再石灰化 齲蝕予防 脱灰抑制 細菌付着効果 酸中和能

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

国民の齲蝕予防に対する意識が高まり、齲蝕罹患率は減少傾向にある。しかし、社会の高齢化に伴い根面齲蝕は増加している。現在、日本は高齢化率が25%を越えており、2030年には約5人に1人が75歳以上の超高齢社会の到来が確実となっている。高齢者の全身状態の悪化に伴い、口腔衛生状態の悪化が容易に予測され、急速に齲蝕病変の進行が生じる。したがって、高齢者の齲蝕、特に根面齲蝕に対する予防、処置、管理が重要な問題となる。

現在、齲蝕予防にはフッ化物が多く用いられている。しかしながら、フッ素の過剰摂取は歯だけでなく全身にも影響を及ぼすとされており、フッ素の摂取に対して否定的な意見があることも事実である。フッ素に代わる齲蝕予防が望まれる。

欧米では、歯のエナメル質の再石灰化を促し、歯質を強化する効果がフッ化物より強力であると報告されているテオブロミン (Amaechi BT, Nakamoto T et al. Caries Res. 2013) が注目されている。テオブロミンはチョコレートやカカオに含まれる物質 (Fig.1) で、フッ化物より生体にも安全といわれている。すでに米国では歯とテオブロミンに関連する研究が進められており、齲蝕や象牙質知覚過敏の予防に有効であると報告 (Amaechi BT et al. Clin Oral Investig. 2014) されており、テオブロミン配合の歯磨剤も市販されている。しかしながら日本の歯科分野においてはまだ研究されていない。

本研究ではまずテオブロミンを応用した歯科材料・歯面コーティング材の試作・開発し、その齲蝕予防・抑制効果とその特性について検討することとした。

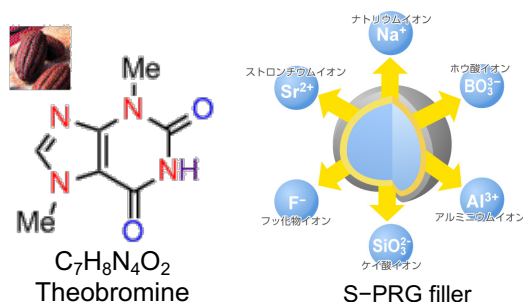


Fig.1 Molecular and Structural formula of Theobromine, and schematic diagram of S-PRG filler

2. 研究の目的

超高齢化社会の到来が確実となっている日本において、介護保険との連携を含めて、高齢者の齲蝕、特に根面齲蝕に対する予防、処置、管理はこれまでになく重要な課題になると思われる。その課題をクリアするためには齲蝕予防、齲蝕抑制効果を有する歯面コーティング材を開発し、高齢者に臨床応用することである。齲蝕は歯質表面の脱灰から始まるため、初期の脱灰を阻止できれば、後に続く歯質の破壊も阻止できる。齲蝕を予防するには「歯面コーティング材」がその一助になると考えられる。歯面コーティング材は歯質を削除することなく、歯面に塗布することのみであることから、Minimal Intervention の概念にも一致する。さらには、有病者など口腔清掃が困難で口腔清掃状態の悪い環境、歯の形態異常・歯列不正などより齲蝕リスクの高い場合にも応用可能なために、歯面コーティング材自体に齲蝕を抑制する機能を発揮させることが有効と考える。

歯面コーティング材には、歯質を強化するフッ素イオンを徐放するフッ化ナトリウムやフッ化物を含有するもの、多種類のイオンを徐放し、抗プラーク性を有する S-PRG フィラー (Fig.1) を含むものなど、多くの種類が市販されているが、齲蝕予防、齲蝕抑制効果を十分に発揮し、耐久性のある歯面コーティング材は存在しない。そこで本研究では、テオブロミンおよび S-PRG フィラーを含有させた歯面コーティング材を開発・試作し、その齲蝕予防・抑制効果が増強されるかどうか、さらに従来以上の齲蝕予防が可能かどうか検討した。

3. 研究の方法

(1) 供試歯面コーティング材料

本研究を行うにあたり、まず以下の7種類の歯面コーティング材を試作した。

- i) S-PRG フィラー含有コート材
- ii) S-PRG フィラー含有コート材+2.5% テオブロミン
- iii) S-PRG フィラー含有コート材+5.0% テオブロミン
- iv) シリカフィラー含有コート材+2.5% テオブロミン
- v) シリカフィラー含有コート材+5.0% テオブロミン
- vi) シリカフィラー含有コート材
- vii) フィラー非含有コート材

なお、5%以上のテオブロミンを配合すると、硬化性が低下し、テオブロミンの徐放能力 (液クロ 210nm) での検出も向上しなかったことから、テオブロミンの配合率を2.5%および5%について検討することとした。

(2) 実験方法

以下の実験においては、次の①～④の歯面コーティング材を供試した。

- ①S-PRG フィラー含有コーティング材
 - ②S-PRG フィラー含有コーティング材+5.0%テオブロミン
 - ③シリカフィラー含有コーティング材+5.0%テオブロミン
 - ④シリカフィラー含有コーティング材
- (以下、①～④とする.)

1) 乳酸中における各試作コーティング材の緩衝能試験

直径 10mm, 厚さ 1mm のテフロンモールドにそれぞれのコーティング材を硬化させたディスクを試料とした。これらの試料を pH4.0 の乳酸溶液中に浸漬し, pH の経時的变化を 24 時間, さらに 2 日後～6 日後まで測定した(n=5).

また, これらの試料を 1 日ごとに新たな pH4.0 の乳酸溶液に置き換えた時の 2 日後～4 日後までの pH も測定した(n=5).

2) エナメル質と象牙質の硬さ測定

ヒト新鮮抜去歯のエナメル質および歯根象牙質に対して, 耐水研磨紙(#600～#1500)を用いて, 平坦な平面を作製した。各コーティング材を塗布し, 光照射器にて硬化させて, ロックウェルスーパーフィシャル硬さ試験機 (Wilson 社) にてそれぞれコーティングしたエナメル質および歯根象牙質に対して 3 回ずつ硬さを測定した。測定後, 人工唾液 (Bijl and Waal らの方法) 中に 4 週間保管し, 再度硬さを測定し, その変化率 ($\Delta\% = [\text{人工唾液浸漬後の平均硬さ} - \text{浸漬前の平均硬さ}] / [\text{浸漬前の平均硬さ}] \times 100$) を算出した (n=5)。得られた値は, 一元配置分散分析と多重比較検定 Scheffé を用いて有意差検定 ($p < 0.05$) を行った。なお, 本実験で使用した抜去歯は, 朝日大学歯学部倫理委員会の承諾 (受付番号 23112) を得たものである。

3) コーティング材の硬さの測定

直径 3/8 インチ, 厚さ 1/16 インチのテフロンモールドにそれぞれのコーティング材を硬化させたディスクを試料とし, デュロメータ硬さ試験機 (Type D, PTC Instruments) にてコーティング材の硬さを測定した。硬さは, 試料を pH4.0 の乳酸溶液中に浸漬し, 浸漬前および 1～4 日後の測定を行った。

4) コーティング材によるエナメル質の脱灰抑制試験

ヒト新鮮抜去歯の歯冠部エナメル質の 2×2mm の部分以外はコーティング材を塗布し, 硬化させた後, pH4.0 の乳酸溶液にて脱灰を行った。脱灰前および脱灰後 24, 48, 72, 96 時間に, 脱灰部分の経時的变化を QLF 法 (Inspektor Pro システム, Inspektor Research Systems) の $\Delta F(\%)$ (平均蛍光強度減少度) を用いて測定を行った。脱灰後それぞれの ΔF の変化率 ($\Delta\% = [\text{脱灰後の } \Delta F - \text{脱灰前の } \Delta F] / [\text{脱灰前の } \Delta F] \times 100$) を算出した (n=5)。なお, 本実験で使用した抜去歯は, 朝日大学歯学部倫理委員会の承諾 (受付番号 23112) を得たものである。

5) 細菌付着性試験

各供試コーティング材料を, 金属製型枠 (4 mm×4 mm×1 mm) に填入し, ガラス板を圧接後, 20 秒間光照射して硬化させたものを試料とした。さらに試料の裏面にネイルバーニッシュを施した後, #2000 の耐水研磨紙で研磨し, 生理食塩水を用いて 1 分間超音波洗浄した。一方, TSBY 寒天培地を用いて細菌 *Streptococcus mutans* ATCC25175 を培養後, [methyl-3H]thymidine (ARC) にてラベルした。その後, 遠心 12,000 g で 15 分間, 4℃で集菌し, PBS での洗浄を 3 回繰り返し行った後に, ラベルされた調整菌液中に各試料を浸漬し, 37℃で 2 時間振盪した。その後, 試料を取り出して PBS で 3 回洗浄後, 全自動試料燃焼装置 (ASWC-113, Aloka) を用いて試料片に付着した菌体を完全燃焼させ, 3H₂O として回収し, 放射線量を液体シンチレーションカウンター (LSC-903, Aloka) で測定した。得られた値は一元配置分散分析 (ANOVA) および Tukey の HSD ($\alpha = 0.05$) を用いて行った。

4. 研究成果

1) コーティング材の緩衝能 (Fig.2)

6日後のそれぞれのコーティング材のpHは、① 6.80 ± 0.07 , ② 6.86 ± 0.05 , ③ 3.74 ± 0.06 , ④ 3.64 ± 0.04 で、S-PRG フィラー含有のコーティング材のpHは経時的に上昇した。また1日ごとに乳酸溶液に置き換えた時の4日後のコーティング材のpHは、① 5.98 ± 0.09 , ② 6.06 ± 0.08 , ③ 4.40 ± 0.04 , ④ 4.36 ± 0.05 であった。S-PRG含有のコーティング材は乳酸溶液を1日ごとに置き換えることでpHは若干減少したものの、S-PRG非含有のコーティング材のpHは僅かに上昇する傾向を認めた。

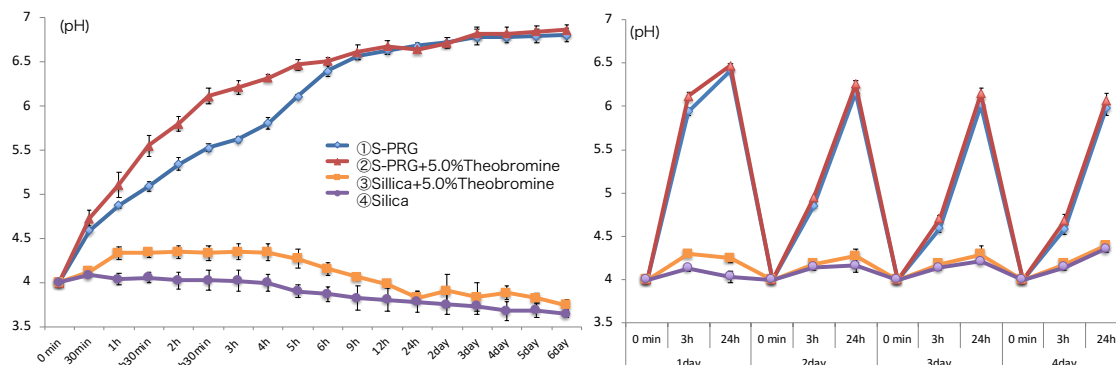


Fig.2 pH changes of acid after immersion of tooth coating materials

2) エナメル質・象牙質の硬さ (Fig.3)

それぞれコーティングした歯の変化率(エナメル質/歯根象牙質)は、① $2.64 \pm 0.36 / 3.56 \pm 1.12$, ② $5.56 \pm 2.30 / 7.39 \pm 1.57$, ③ $3.34 \pm 1.00 / 5.34 \pm 0.94$, ④ $-1.32 \pm 2.14 / 0.72 \pm 1.68$, Control(コーティング材なし) $-1.51 \pm 1.93 / 0.36 \pm 1.28$ であった。エナメル質および象牙質の硬さは、④およびControl以外は有意に増加した ($p < 0.05$)。

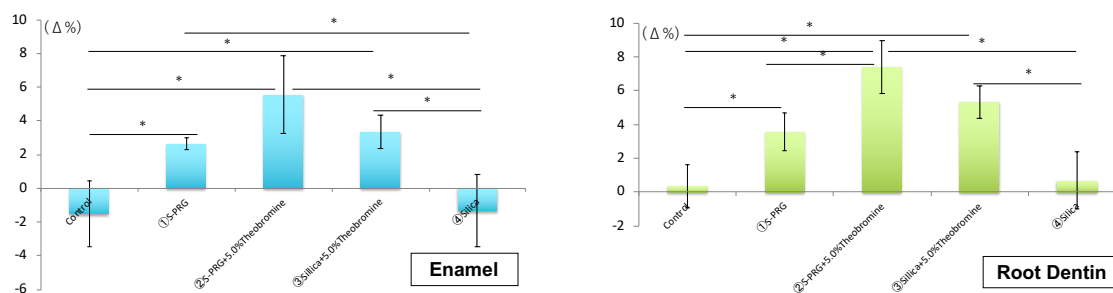


Fig.3 Mean percent change ($\Delta\%$) in hardness (enamel/root dentin) ($*p < 0.05$)

3) コーティング材の硬さ (Fig.4)

それぞれのコーティング材の硬さ(浸漬前/浸漬後)は、① $69.5 \pm 4.85 / 68.0 \pm 2.73$, ② $68.6 \pm 4.53 / 66.7 \pm 2.05$, ③ $68.3 \pm 3.99 / 59.9 \pm 2.77$, ④ $69.5 \pm 3.66 / 58.2 \pm 2.07$ であった。S-PRG フィラー含有のコーティング材は乳酸溶液中においても大きな変化を認めなかった。

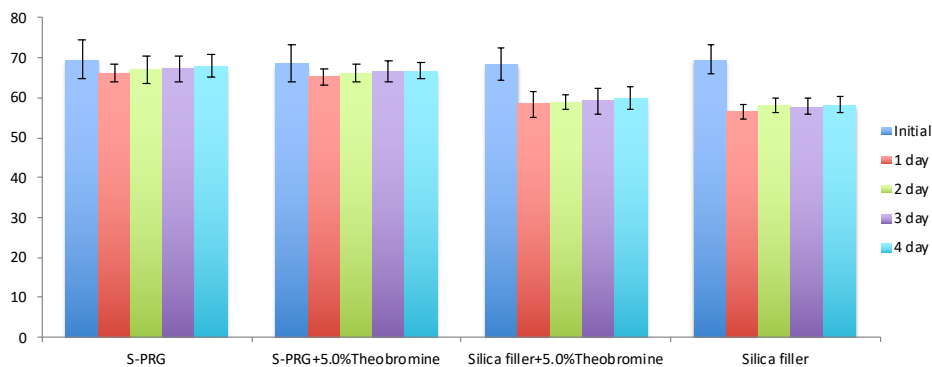


Fig.4 The mean values of hardness for tooth coating materials

4) コーティング材に対するエナメル質の脱灰抑制 (Fig.5)

コーティングを行ったエナメル質の脱灰後 24, 96 時間それぞれの ΔF の変化率 ($\Delta\%$, 24/96 時間) は, ① 0.87 ± 0.66 , ② 0.65 ± 0.46 , ③ 2.68 ± 2.22 , ④ 4.43 ± 2.35 , Control (コーティング材なし) 6.78 ± 3.63 であった。

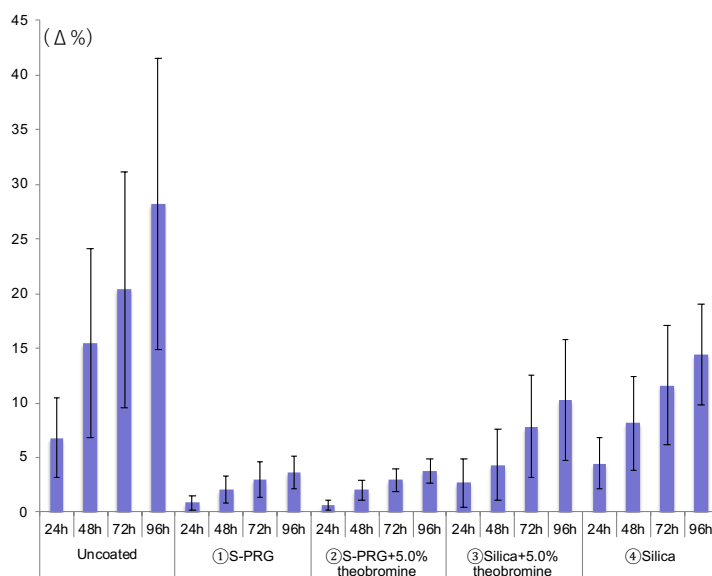


Fig.5 Mean percent change ($\Delta\%$) in demineralization (enamel) for 96h

5) 細菌付着性

各供試材料に対する細菌付着量は, ① 166.0 ± 13.7 dpm, ② 166.9 ± 12.6 dpm, ③ 207.5 ± 7.1 dpm, ④ 204.9 ± 7.9 dpm であった。S-PRG を含む①および②は, ③, ④と比較して有意に細菌付着量が少なかった ($p < 0.05$)。一方, ①と②, ③と④間で細菌付着量に有意な差は認められなかった。

6) まとめ

以上より, S-PRG フィラーを含有する歯面コーティング材は, 酸中和能を有し, 周囲エナメル質に脱灰抑制を示す, 酸性下においてもコーティング材に大きく影響を及ぼさない可能性が示唆された。またテオブロミンは S-PRG フィラーよりコーティング下で歯質を強く再石灰化させる可能性があり, 両者が合わさると相乗効果が期待できることが示唆された。一方, 細菌付着抑制については, テオブロミンには効果が認められず, S-PRG フィラーとの相乗効果も認めなかったが, S-PRG フィラーによる細菌付着性を阻害しない可能性は示唆された。

このことから S-PRG フィラー+テオブロミン含有コーティング材は, S-PRG フィラー含有コーティング材に比べて再石灰化能が高く, さらに細菌付着抑制能を有する効果が期待でき, 従来以上の機能を有する歯面コーティング材が実現可能と考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 尾池 和樹、藤井 和夫、日下部 修介、堀田 正人	4. 巻 37
2. 論文標題 フッ素ポリマーとナノシリカフィラー含有床用硬質レジン人工歯材料の着色性と微生物付着性	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 日本歯科理工学会誌	6. 最初と最後の頁 255 ~ 264
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) https://doi.org/10.18939/jsdmd.37.4_255	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 MURASE Yuki, KOTAKE Hiroto, KUSAKABE Shusuke, OKUYAMA Katsushi, TAMAKI Yukimichi, HOTTA Masato	4. 巻 -
2. 論文標題 Use of new scratch test and tensile test for evaluation of bond strength of selfadhesive flowable resin composite for repair of artificial tooth erosion	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Dental Materials Journal	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) https://doi.org/10.4012/dmj.2019-009	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 清水翔二郎, 日下部修介, 二階堂 徹
2. 発表標題 テオブロミンおよびS-PRGフィラー含有歯面コーティング材の細菌付着性
3. 学会等名 第152回日本歯科保存学会学術大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Kusakabe.S, Ichimura Y, Hotta M, Nakamoto T, Rawls HR
2. 発表標題 Enhanced Protective Effect of Ion-Releasing S-PRG Coatings Containing Theobromine
3. 学会等名 IADR (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Ichimura Y, Kusakabe S, Wu Y, Yokose S, Chu L, Rawls HR
2. 発表標題 Catechin in the development of an antibiofilm tooth coating barrier
3. 学会等名 IADR (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 日下部修介, 堀田正人, 中本哲夫, H. Ralph Rawls
2. 発表標題 テオプロミンおよびS-PRGフィラー含有歯面コーティング材の齲蝕予防効果
3. 学会等名 第146回日本歯科保存学会学術大会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	Rawls H. Ralph (Rawls H. Ralph)	テキサス大学ヘルスサイエンスセンターサンアントニオ校・教授	
研究協力者	中本 哲夫 (Nakamoto Tetsuo)	ルイジアナ州立大学ヘルスサイエンスセンター・名誉教授	
研究協力者	清水 翔二郎 (Shimizu Shojiro)	朝日大学歯学部 (33703)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	市村 葉 (Ichimura Yoh) (60286010)	明海大学歯学部・准教授 (32404)	
研究協力者	堀田 正人 (Hotta Masato) (10157042)	朝日大学・教授 (33703)	
研究協力者	二階堂 徹 (Nikaido Toru) (00251538)	朝日大学歯学部・教授 (33703)	