

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 4 日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2013

課題番号：23659960

研究課題名(和文) マグネシウムをターゲットとした元素置換型齲蝕予防法の開発

研究課題名(英文) Development of caries prevention of elemental-substitution type targeted magnesium

研究代表者

福本 恵美子 (Fukumoto, Emiko)

東北大学・大学病院・助教

研究者番号：10264251

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円、(間接経費) 780,000円

研究成果の概要(和文)：う蝕予防には、これまでフッ化物が用いられてきたが、エナメル質内にはマグネシウムを含有するアパタイトも存在し、この構造が酸に対しての弱点となっている。そこで、このマグネシウムを他の元素に置換することによる、耐酸性向上技術の開発を行った。フッ素やストロンチウムを徐放する薄膜を用いて、初期う蝕部に応用した結果、再石灰化の促進により歯の色調改善が認められた。さらに、乳歯48歯に対し本薄膜を応用した結果、1年経過症例においてう蝕の発生は認められなかった。以上の結果から、フッ素やストロンチウムを用いたエナメル質のイオン置換技術は、齲蝕予防に極めて重要な手法と考えられる。

研究成果の概要(英文)：Fluoride has been applied for caries prevention. Apatites included Magnesium also exist in Enamel and are easy to dissolve by acid. We developed the technique for improvement of acid resistance by replace magnesium with other chemical element. As a result of applying thin film releasing fluoride and strontium for early caries, we observed that remineralization of early caries was promoted and the color was improved. Moreover, all forty-eight deciduous teeth applied the film did not occur the caries. From these results, the ion replace technique of enamel using fluoride and strontium is considered the pivotal method for caries prevention.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学 矯正・小児系歯学

キーワード：う蝕予防 エナメル質

1. 研究開始当初の背景

齲蝕は歯周病とともに、歯科の2大疾患の1つである。フッ化物の応用により、齲蝕の発生はかなり抑制されてきた。その一方で、一旦齲蝕を生じた歯においては、フッ化物の応用では齲蝕の進行を抑制することは困難であり、人工物による修復に頼らざるを得ない。

我々は、エナメル質形成に関わる分子機能の解析から、エナメル質に特異的に存在する細胞外基質が、歯の形成に重要であることを見いだしてきた。現在のエナメル質の研究は、遺伝子や蛋白レベルの解析が主であり、エナメル質に含まれる金属元素は、その成分分析や構造解析が行われてきただけで、その役割に関する報告は、ほとんど無い。その一方で、齲蝕細菌の酸産生に関わる多くの酵素分子は、マグネシウム要求性であり、これらマグネシウムがどのように供給されているかは不明であった。その多くは、食品中や唾液成分由来と考えられている。

エナメル質は、90%程度がリン酸カルシウムの結晶であり、それ以外では、炭酸カルシウム、リン酸マグネシウムで構成され、それ以外の分子種は極めて少ない。したがって、齲蝕病巣においては、唾液による影響も少ないことから、酸により脱灰されたエナメル質から、十分量のマグネシウムが供給されることは容易に想像がつくが、このマグネシウムの溶出を抑制し、齲蝕予防あるいは進行抑制に応用した報告は無い。したがって、本研究では、このエナメル質内マグネシウムを置換することで、酸によるマグネシウム溶出を抑制し、齲蝕細菌の活性化抑制を試みる。

2. 研究の目的

エナメル質は生体内で最も硬い組織であるが、齲蝕により破壊され、人工物による修復に頼らざるを得ない。フッ素を応用した齲蝕予防が行われているが、付加的な齲蝕予防

を期待し、マグネシウムをターゲットとした予防法の開発を目指す。

マグネシウムは、カルシウム、リン酸に次ぐ、エナメル質の主要構成元素である。マグネシウムは、エナメル質内リン酸マグネシウムとして存在するが、齲蝕の原因菌の多くは、その機能維持のためにマグネシウムを必要とする。したがって、酸により破壊されたエナメル質は、マグネシウムの供給源となることが予想される。そこで、リン酸マグネシウム置換により、齲蝕細菌の代謝活性促進を生じないエナメル質強化法の開発を目指す。置換する元素としては、カルシウムやストロンチウム等の、リン酸マグネシウムより耐酸性の高い(溶解度積恒数の小さい)イオンを含有した分子への置換を目指す。

3. 研究の方法

人工齲蝕を用いたヒトエナメル質の元素置換

ヒトの矯正治療等により抜去された永久歯(フッ素塗布されていないもの)を利用し、酸と再石灰化液によるサイクル処理により、表層下脱灰モデルを作成する。

作成された表層下脱灰モデルでは、再石灰化溶液に浸漬することで、その溶液中に存在する様々な元素が取り込まれる。そこで、この再石灰化溶液中にマグネシウムの含有-非含有の組み合わせとともに、塩化カルシウム、塩化ストロンチウム、塩化バリウムを5段階の濃度で添加することで、エナメル質表面に取り込まれた金属元素の定量を、SEM-EDXにて解析を行う。

ストロンチウムのアルカリ土類金属リリースマトリックス作成の検討

上記の実験から、エナメル質中のマグネシウムの置換が可能で、かつ耐酸性の向上が期待できる場合には、これら置換するイオンをフッ素含有溶液に添加、あるいは除放(スローリリース)する表面コートマトリックスが

有効であると考えられる。特に、唾液中には多くのマグネシウムイオンを含むため、口腔内環境から遮断できる後者のマトリックス応用が有効と考えられる。

特にストロンチウム供給の為には、特殊なコートが必要であろう。そこで、アルカリ土類金属塩を含有するコート材の作成を試みる。塩化ストロンチウムは高温超伝導体であり、また炭酸ストロンチウムはブラウン管などの陰極線管のガラスに利用されている。したがって、類似の工業製品に分類されるシリケートガラス（ガラスアイオノマーセメントに含まれる）を応用し、ストロンチウム除放性を向上させるガラスアイオノマーセメントの作成と、その皮膜化技術の開発に取り組む。

4. 研究成果

我々は、エナメル質表面の酸に対して溶出しやすいイオンの置換を試みるために、細胞表面にストロンチウム、フッ素イオンを放出可能な S-PRG フィラーを被膜化することを考えた。S-PRG フィラガ、松風社が考案したアルミノシリケートガラスの表面にガラスアイオノマー相と酸化シリカの膜を有する 3 層構造のフィラーであるが、これまでコンボジットレジンの物理的強度を増すためのフィラーとして応用されてきた。この S-PRG フィラーを水に溶解し、ホスホン酸系モノマーと、カルボン酸系モノマーを添加し、エナメル質表面に被膜構造を作る材料の開発を行った。本コート材は、約 5-10mm の被膜としてコートすることが可能であった。

S-PRG フィラーを含有するコート材を、表層下脱灰させた人工齲蝕モデルに塗布し、再石灰化溶液中に浸漬させた。コントロールとしては、爪に塗布するネイルパーニッシュ、レジン系シーラントを用いて、再石灰化の程度に関してソフトエックス線を用いた検討

を行った。ネイルパーニッシュ群や、レジン系シーラント群においては、再石灰化溶液中に人工齲蝕歯を浸漬させても、全く再石灰化は起こらなかった。一方、S-PRG を含有したコート材を塗布した群では、エックス線透過性が減少し、再石灰化が確認できた。また、エナメル質表層におけるミネラルの含有量を SEM-EDX を用いて検討した結果、S-PRG を含有したコート材を塗布した群においては、マグネシウムイオンの減少を認めたことから、マグネシウムがカルシウム等に置換したことが予想された。一方、ストロンチウムイオンに関しては、微量であるために当教室が有する SEM-EDX での確認は困難であった。

次に、S-PRG フィラー含有コート材表面における齲蝕細菌の定着や増殖能、酸産生能について検討した。オリンパス社製のハイドロキシアパタイトディスクに、S-PRG フィラー含有コート材およびフィラー非含有コート材を塗布し硬化させた後、*S.mutans* および *S.sibirinus* とともに培養を行なった。培養後にアパタイトディスク上に付着している細菌数、培養液中の pH、および培養液中の総細菌数の検討を行った。S-PRG フィラー含有コート材を用いた群では、コントロールと比較して、*S.mutans* および *S.sibirinus* とともに付着および総細菌数の減少を認めたが、特にその効果は、重症齲蝕患児において検出される *S.sibirinus* において著明であった。培養液中の pH について検討した結果、S-PRG フィラー含有コート材を用いた群では、コントロールと比較して、pH が 0.5-1.0 程度上昇する傾向が認められた。このことは、S-PRG フィラー含有コート材が細菌の定着抑制、増殖抑制、酸産生抑制に関与している可能性が示唆された。ただし、pH の上昇に関しては、フィラーそのものの酸緩衝、また細菌数の低下に伴う二次的な影響も考えられることから、より詳細な実験計画の立案が必要と考えた。

これまでの研究結果から、新しく開発した S-PRG フィラーを含有した歯面コート材は、初期齲蝕病変の再石灰化を促進し、再石灰化領域におけるマグネシウム含有量を低下させ、さらに齲蝕細菌である *S.mutans* および *S.sobrinus* の定着、増殖の抑制に関与することを見いだした。この結果から、口腔内初期齲蝕病変に対しても、有効な効果が得られるかもしれないと考えた。そこで、ヒト乳歯 48 本（半数はエナメル質形成不全等の齲蝕ハイリスク群）に対し、本歯面コート材を応用し、齲蝕の発生頻度、初期齲蝕病変の再石灰化について、エナメル質の白濁状態の変化を指標に評価した。1 年経過症例において、いずれの歯に関しても齲蝕の発生は認められなかった。歯頸部の観察された初期齲蝕病変に関しては、病変が観察されたいずれの症例においても、その白濁程度と色調の改善が認められた。この結果から、本歯面コート材は、齲蝕予防において極めて効果的な材料になることが考えられた。

これまでの研究成果から、齲蝕細菌がエナメル質を脱灰することで生じる遊離マグネシウムを利用した酸産生が、本コート剤の使用により直接阻害されたデータは得られなかったが、積極的に齲蝕細菌の定着や増殖を抑制し、齲蝕の発生を抑制することも、*in vitro* および *in vivo* においても確認できたこのことから S-PRG フィラーを含有する材料は、齲蝕予防、特にエナメル質形成不全等のハイリスク患者において有効な手段であろう。現在、S-PRG フィラーを含有した歯磨材を用いた臨床研究においては、その使用により新たなプラークの付着が抑制されることを確認している。また、今回用いた歯面コート材は、混和後光照射により硬化させる材料であるが、光照射無しで歯面に定着させるような被膜化技術開発も行っており、本知見

で得られた知見は、より簡便で、極めて効果の高い新たな齲蝕予防法の開発に繋がる技術として期待される。

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 4 件)

Hino R, Furagi M, Yamada A, Arakaki M, Saito K, Sugawara Y, Ono M, Fukumoto E, Nakamura T, Fukumoto S. Establishment of ex vivo mucocele model using salivary gland organ culture, 査読有、Pediatric Dental Journal, 2014, in press

Fukumoto S, Nakamura T, Yamada A, Arakaki M, Saito K, Xu J, Fukumoto E, Yamada Y., New insight into the functions of enamel matrices in calcified tissues, 査読有、Japanese Dental Science Review, 2014, in press

Arakaki M, Ishikawa M, Nakamura T, Iwamoto T, Yamada A, Fukumoto E, Saito M, Otsu K, Harada H, Yamada Y, Fukumoto S. Role of epithelial-stem cell interactions during dental cell differentiation. 査読有、J Biol Chem. 2012 Mar 23;287(13):10590-601. DOI: 10.1074/jbc.M111.285874.

Kitaura H, Fujimura Y, Yoshimatsu M, Kohara H, Morita Y, Aonuma T, Fukumoto E, Masuyama R, Yoshida N, Takano-Yamamoto T. IL-12 and IL-18-mediated, nitric oxide-induced apoptosis in TNF- α -mediated osteoclastogenesis of bone marrow cells. 査読有、Calcif Tissue Int. 2011. Jul 98(1):65-73. DOI:10.1007/s00223-011-9494-0.

[学会発表] (計 2 件)

菅原優、山田亜矢、福本恵美子、相澤志津子、岩本勉、福本敏：新規エナメル質コート材 (PRG バリアコート) のイオン徐放性による再石灰化促進について . 第 49 回日本小児歯科学会 2011.11.29 いわて県民情報交流センターアイーナ 盛岡市

福本敏、岩本勉、福島秀文、山田亜矢、

新垣真紀子、福本恵美子、中村卓史、自見
英治郎：NF- κ B 経路を介した歯の形態形成
分子制御機構．第 84 回日本生化学会
2011.9.23. 国立京都国際会館 京都市

6 . 研究組織

(1)研究代表者

福本 恵美子 (Fukumoto, Emiko)

東北大学・大学病院・助教

研究者番号：10264251