

歯の脱灰・再石灰化における結晶の経時変化の解明
A wide-angle X-ray diffraction and a small-angle X-ray scattering time course study of de and re-mineralization mechanisms of tooth enamel

田中智子^a, 釜阪寛^a, 滝井寛^a, 石塚紗和子^a, 八木直人^b

Tomoko Tanaka^a, Hiroshi Kamasaka^a, Hiroshi Takii^a, Sawako Ishiduka^a, Naoto Yagi^b

^a江崎グリコ株式会社, ^b高輝度光科学研究センター

^a Ezaki Glico Co.,Ltd., ^b JASRI/SPring-8

「初期う蝕」とはエナメル質表面に実質欠損（う窩）は認められないが、プラーク内の細菌によって生じる酸による脱灰が原因で表層下のミネラルが失われ、微小な空隙が生じる現象である。むし歯の始まりであるにも係わらず、実質欠損が認められないことから「隠れむし歯」とも呼ばれている。この初期う蝕は、失われたミネラル成分であるカルシウムイオンやリン酸イオンが再び供給されることで回復する（再石灰化）ことが知られている。一方、江崎グリコ（株）で開発された高水溶性カルシウム素材であるリン酸化オリゴ糖カルシウム（POs-Ca）は再石灰化を促進する素材であることが知られている。さらに、POs-Caによって再石灰化された部位は、元の健全な歯と同じ配向性を有する hidroキシアパタイトとして再結晶化することが判明した。しかしカルシウムイオンとリン酸イオンが中性下で最適比を保って供給されるだけで、再石灰化期間中に、「どのようなメカニズムで再結晶化していくか」という詳細な過程の解明までは至っていなかった。今回、再石灰化および再結晶化の過程をリアルタイムで観察を試みた。結果、再石灰化処理開始後少なくとも12時間以内に再結晶化が起こっていることが判明した。

An early caries lesion in tooth enamel is caused by acids produced by bacteria in dental plaque and dentally observed as a white opaque spot. In a cross section along the direction perpendicular to the enamel surface, a caries lesion appears as enamel decay with a relatively intact surface layer and a mineral loss in the subsurface region. When not cared, the decay spreads to the dentin and forms a cavity. Early caries lesion can be remineralized that takes place in the top 0.1mm layer of tooth enamel. Phosphoryl oligosaccharides of Calcium (POs-Ca) which prepared from potato starch (The product corresponded to Ezaki Glico Co., Ltd) effectively enhanced the remineralization as recovery of mineral contents in lesions. The distribution and orientation of longitudinal hydroxyapatite (HAp) crystallite were directly detected at remineralized zone in enamel subsurface lesion by using X-ray microbeam diffraction method. Although the HAp crystallites had the same orientation as the original sound enamel, it is not clear how to regrowth of hydroxyapatite crystallites during the remineralization. Thus in this study, we tried to investigate the mechanism of regrowth of hydroxyapatite at a time of remineralization in vitro. Hence we found that regrowth of hydroxyapatite crystallites under the subsurface lesion has been occurred at least during 12 hours at the period of remineralization.

背景と研究目的：

江崎グリコ（株）では、馬鈴薯澱粉からリン酸基を有する新しいオリゴ糖（POs）の研究開発に成功した¹⁾。POsのカルシウム塩であるリン酸化オリゴ糖カルシウム（POs-Ca）は高い水溶性を有しており、唾液へも速やかに溶解して水溶性カルシウムを増加させるこ

とができた。さらに、POs-Ca および POs-Ca 配合ガムの初期う蝕への再石灰化促進効果を実証し、POs-Ca 配合ガムを特定保健用食品として上市した。

現在まで SPring-8 で実施した実験において、初期う蝕を発症させたウシ歯を再石灰化処理後、歯横断面の薄片試料サンプルのマイクロ

ラジオグラムからミネラルプロファイルを得た。本プロファイルからミネラル量を計測した。再石灰化処理後にミネラル量の回復した部位は、健全歯と同じ歯配向性をもったハイドロキシアパタイトとして復元していることが解った。再石灰化処理は、POs-Ca 含有人工唾液にウシ歯エナメル質歯片を浸漬することで実施した。一方、ミネラル量が失われた脱灰部にはナノサイズの間隙が生じていることも解った。つまり、従来法によるミネラルプロファイルと同等な結晶量プロファイルを得たことで、両者を直接比較検討することに成功した。今回のメディカルバイオ課題においては、再石灰化および再結晶化の生じるメカニズムを明らかにし、今後の商品開発に応用したい。そのために、再石灰化溶液をエナメル質表面に接触循環させながら再石灰化および再結晶化がエナメル質表層下で生じる過程をリアルタイムで観察可能な装置を新たに考案した。今回は本装置中で、人工唾液を循環させて再石灰化処理し、続いて再結晶化が生じる過程を SPring-8 のビームラインを用いて詳細に観察することを目的とした。

実験：

【試料】ウシ歯のエナメル質スライス標本を用いた。本試料は、牛海綿状脳症対策特別措置法に基づき大阪市より使用許可された試料である。試料は、ウシ歯冠部よりブロック状に切り出し（約 10mm x 10mm）、レジン樹脂にエナメル質面以外を包埋し、研磨処理を行って新しいエナメル質面を露出させた。エナメル質面 1/3 をネイルバーニッシュで被覆し、健全部として保存した後、脱灰処理を行った。脱灰処理後、脱灰面の半分(全体の 1/3)もネイルバーニッシュで被覆

して、脱灰部の一部を保存した。続いて、この表層化脱灰病変を生じさせたウシ歯エナメル質の横断面(150 μ m 厚 10mm \times 10mm)を切り出した。

【方法】マイクロ流路チップに、切り出した脱灰エナメル質薄片を装着して、再石灰化溶液がエナメル質表面のみに接触するよう循環させて再石灰化処理をした。マイクロビームを用いて、この過程で再結晶化する挙動をリアルタイムで観察評価することを試みた。再石灰化溶液は、カルシウム源に POs-Ca を用いて調製した。

【X線照射実験】直径約 6 μ m のピンホールを用いたマイクロビーム光学系を使用し、カメラ長は 3 m 程度とした。小角散乱は、X線イメージンテンシファイアと CCD カメラを真空パイプの後ろに置いて測定した。広角散乱は、フラットパネル検出器を真空パイプの前に置いて測定した(図 1)。X線が垂直に入射するようにスライス状の試料をセットし、X線ビームがエナメル質の上端から歯の内部に入る方向に、5 μ m ステップで試料を移動させた。

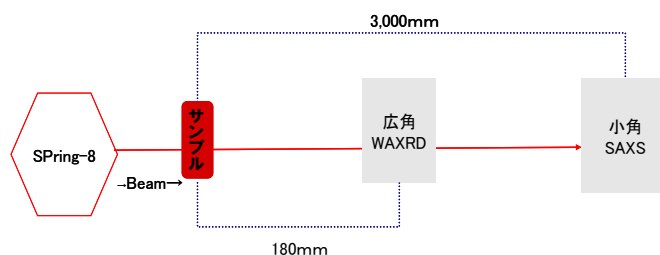


図 1 ビームラインの設定

【結果】0 時間と 12 時間後の解析の結果、結晶量の増加傾向が観察された。しかし、測定治具と試料の境界が明確に検出できなかったため、結晶変化量を正確に測定することができなかった。

結果、および、考察：

0 時間後と 12 時間後を比較すると、12 時間後明らかに結晶量の変化が観られた。しかしながら、ビームの反射により治具とサンプルの界面が不明瞭であったため、サンプルと反応液の境界を明確に捉える事ができなかった。その結果、エナメル質表面の最表層位置が特定できないことから、結晶量の変化を正確に測定することができなかった。リアルタイム解析を実施するには、測定治具を改良しなければならないことがわかった。また再石灰化反応 0 時間後(図 2)と 12 時間後(図 3)のプロファイルと比較すると、プロファイルのバラツキが大きいものの、増加傾向が観察された。このことから、*in vitro* の試験系において、POs-Ca による再結晶化反応は 12 時間で十分に観察されることが解った。

う治具の改良を実施する予定である。

参考文献：

- 1) H. Kamasaka, D. Inaba, K. Minami, T. Nishimura, T. Kuriki, and M. Yonemitsu : Production and Application of Phosphoryl Oligosaccharides Prepared from Potato Starch. Trends Glycosci. Glycosci . 15 , 75-89 (2003) .
- 2) N. Yagi, N. Ohta, T. Matsuo, T. Tanaka, Y. Terada, H. Kamasaka, K. To-o, T. Kometani, T. Kuriki : Evaluation of Enamel Crystallites in Subsurface Lesion by Microbeam X-ray Diffraction. J Synchrotron Rad.(2009)16,398-404

図 2 反応前

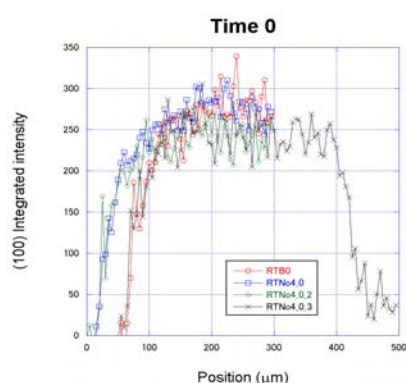
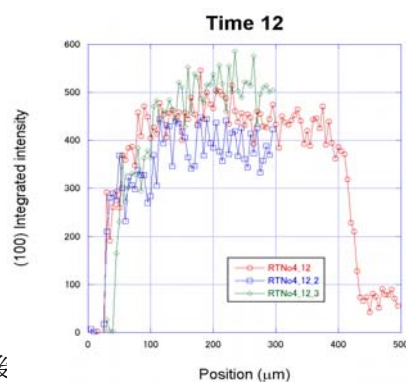


図 3 . 12 時間後



今後の課題：

測定方法を再度検討し、詳細に解析できるよ