

新しいタイプの亜鉛・フッ素含有歯面  
コーティング材の抗菌性及び脱灰抑制に関する研究

熊谷 徹弥

## 目次

要旨 .....	3
緒言 .....	4
材料と方法 .....	7
結果 .....	13
考察 .....	21
結論 .....	25
謝辞 .....	25
参考文献 .....	26

## 要 旨

現在、小児に対する齲蝕予防法として推奨されている方法としてフッ化物の応用がある。しかし、フッ化物は脱灰抑制において効果的であるが抗菌性は限定的である。齲蝕は、多元的な原因より発生しており、更なる予防効果を高めるためには、抗菌性や脱灰抑制を含めた総合的な予防システムが必要だと考える。GC社では、フッ化物と亜鉛を配合した知覚過敏抑制材(ケアダインシールド®(CS))を販売した。私は、これに含まれるフッ化物と亜鉛はエナメル質に対しても抗菌性や脱灰抑制に効果があるのではないかと考えた。そこで、本研究では、色々な観点からCSの抗菌性と脱灰抑制を評価することにした。

まず、CSの酸産生抑制試験を行なった。また、比較試験として牛歯と *Streptococcus mutans*(以下 *S.mutans* と略す)を用いた抗菌性評価を行った。そこで、牛歯に付着した *S.mutans* より作られたバイオフィルムの細菌付着量と Live/Dead 染色法および走査型電子顕微鏡による観察を行なった。耐酸性と再石灰化試験では、脱灰溶液と人工唾液を用いて評価を行い、走査型電子顕微鏡による表面観察およびミネラルプロファイル解析よりミネラルロス量を算出した。牛歯と *S.mutans* を用いた抗菌性評価と耐酸性と再石灰化試験の比較群としては、無処理(コントロール群)とフッ化物(APF 群)を用いた。その結果、CSの抽出液からは亜鉛イオンとフッ化物イオンが確認され、抽出液に *S.mutans* を作用させたところ、酸産生抑制効果が認められた。また、*S.mutans* を使った細菌付着量では、CS群はAPF群およびコントロール群に比べて24時間後に確認された細菌付着量に有意な差が認められた( $p < 0.01$ )。更に、CS群ではLive/Dead染色法及び走査型電子顕微鏡下で、バイオフィルムの形成が認められなかった。酸蝕を想定した耐酸性と再石灰化試験では、コントロール群と比較してAPF群とCS群は、優位にミネラルロスが少なく、同等の脱灰抑制を示した。また、脱灰後の人工唾液接触によりCS群はAPF群と比較し再石灰化促進効果を有することが確認された。

以上のように、本研究の結果から、CSは *S.mutans* による酸産生とバイオフィルムの形成に対して抑制効果があり、優れた抗菌作用を示すことが分かった。また、CSをエナメル質表面にコーティングすることで、フッ化物歯面塗布法と同等の脱灰抑制効果が認められた。以上の結果から、知覚過敏抑制材であるCSは、新しいエナメル質齲蝕予防材として使用できる可能性が示唆された。

## 緒言

歯科疾患実態調査によれば、フッ化物塗布経験者の割合は昭和 44 年で 6.0%であったが平成 28 年には 62.5%に上昇しており、フッ化物の応用など様々な齲蝕予防により、齲蝕は減少傾向にある<sup>1)</sup>。平成 30 年度学校保健統計調査結果によると、幼稚園から高校に所属するどの年代をみても齲蝕を有する者の割合は昭和 45 年から 50 年前半での 95%を境に年々減少し、平成 30 年ではピーク時の半分以下に減少している<sup>2)</sup>。しかし平成 30 年度の年齢別齲蝕有病者率を確認してみると、側方歯群交換期にあたる 10 歳から 12 歳の前後の年齢では増加傾向にあり、17 歳では未だ 50%もの児童が永久歯齲蝕に罹患しているのが現状である<sup>2)</sup>。世界においても、WHO によれば 12 歳児 DMF 者率は先進国では減少傾向にあるが発展途上国では増加傾向にあると報告している<sup>3)</sup>。その事により 2018 年に国際小児歯科学会において初の Global Summit on Early Childhood Caries が開催され、小児の齲蝕問題について話合われている<sup>4)</sup>。このように、小児の代表的な疾患であるエナメル質齲蝕は、未だに問題となっている。

本来、エナメル質表面では脱灰と再石灰化が繰り返されている均衡状態にあるが<sup>5,6)</sup>、様々な要因により均衡状態が崩れると脱灰が進み齲蝕となる<sup>7)</sup>。Newburn は齲蝕の要因として、宿主(歯質)、微生物(プラーク)、口腔環境(食物)、時間を挙げ、その 4 つの要因が重なる事で齲蝕が発症すると述べている<sup>8)</sup>。要因の一つである微生物(プラーク)として *Streptococcus mutans*(以下 *S.mutans* と略す)があげられる。*S.mutans* はスクロースを基質とした不溶性グルカンの合成により、菌体を歯面に強固に付着させ、バイオフィームを形成する。バイオフィームは唾液等の侵入を遮り、細菌が育ちやすい環境を作る。そして、バイオフィーム内において酸や内毒素を産生して歯を脱灰させ、齲蝕を発生させる<sup>9-12)</sup>。更に、歯の脱灰は、要因の一つである口腔環境(食物)による日常的に飲用されている清涼飲料水によっても起こりうる現象である。市販飲料水の多くがエナメル質臨界 pH5.5 を下回っているという現状を考えると、食生活の制限によって完全に予防することは難しい<sup>13,14)</sup>。従って、エナメル質齲蝕を予防するには抗菌性と耐酸性の両方が求められる。

エナメル質にフッ化物を塗布すると、フッ化物イオンによって歯面のハイドロキシアパタイトが耐酸性の高いフルオロアパタイトに置換され脱灰抑制作用<sup>15,16)</sup>を示すことが知られている。唾液中にフッ化物イオンが存在すると唾液中のカルシウムイオンやリン酸イオンと結びつきフルオロアパタイトを形成し再石灰化に寄与します<sup>17)</sup>。更にフ

ッ化物イオンには細菌の代謝系酵素であるエノラーゼを阻害し酸産生を抑制する抗菌作用などが認められるという報告もある<sup>18)</sup>。

代表的なフッ化物応用法としては、酸性フッ素リン酸溶液(acidulated phosphate fluoride solution, 以下 APF と略す)が幅広く使用されている<sup>1)</sup>。APF はフッ化ナトリウムに、正リン酸が加えられており、pH が酸性に調整されている点を特徴とする。これはフッ化物の歯質への取り込み効果を促進するものである。さらに、近年は溶液よりも歯面に留まりやすいゲル状が主に使用されている。APF はフッ素濃度 9000ppm に調整された高濃度のフッ化物が使用されている。エナメル質歯面に高濃度フッ化物が作用すると歯面が脱灰され、カルシウムイオンがフッ化物イオンと結合し、主にフッ化カルシウムが析出する。フッ化物イオンの一部はハイドロキシアパタイトに作用してフルオロアパタイトを生成する<sup>19,20)</sup>。析出したフッ化カルシウムはフッ化物イオンが徐々に口腔内に溶出し、ハイドロキシアパタイトを置換してフルオロアパタイトを形成し耐酸性を向上させ、再石灰化も生じると説明されている<sup>21)</sup>。APF の有用性については、多くの報告<sup>19,20)</sup>が存在し、諸外国や我が国における小児齲蝕の著しい減少をみても明らかである。しかし、APF は一度脱灰した歯面の再石灰化には長い期間が必要であり<sup>21)</sup>、再石灰化効果は限定的である。また *S. mutans* に対するフッ化ナトリウムの最小殺菌濃度(MBC)は 2.500 $\mu$ g/mL<sup>22)</sup>との報告もあるため、抗菌性は限定的なものと考えられる。従って、脱灰抑制のみならず、抗菌性や再石灰化能を有する新たなエナメル質齲蝕予防材の提案が必要と考えられる。

株式会社 GC 社より販売されているケアダインシールド® (以下 CS と略す)は象牙質知覚過敏抑制材として臨床応用されているが、BioUnion™filler というマルチイオンを徐放する機能を備えており、脱灰抑制作用や抗菌作用のみならず、再石灰化への寄与も期待される材料<sup>23,24)</sup>であることから、エナメル質齲蝕の予防材としての応用を秘めており、脱灰抑制のみならず、抗菌性や再石灰化能の発現にも期待が持てる。図 1 に示すとおり、CS は液体 A(亜鉛-フッ素ガラス分散液, pH9)と液体 B(リン酸, pH1)で構成されており、2 液を混合して歯面に塗布することが容易であり、エナメル質齲蝕予防材としてそのまま応用できると考えられる。

そこで本研究では、CS のエナメル質齲蝕予防材としての性能を評価・検討するための実験を行った。エナメル質齲蝕予防材として期待される効果は酸産生抑制、抗菌性、脱灰抑制、再石灰化促進である。実験 I では酸産生抑制に対して、齲蝕の原因菌である *S. mutans*(ATCC 25175)と齲蝕活動試験と用いられるカリオスタット®(デンツプライシロナ, 東京)を利用して、CS の酸生成抑制効果を検討した。実験 II では牛歯エナメ

ル質試料と *S.mutans* を利用して、CS を塗布したエナメル質の抗菌性を検証した。続いて、実験Ⅲでは、酸蝕を想定したクエン酸溶液(pH5.0)と口腔内を想定した人工唾液(pH7.0)を利用して、CS を塗布した牛歯エナメル質試料の脱灰抑制効果と再石灰化効果を検討した。実験ⅡおよびⅢに関しては現在エナメル質齲蝕予防材として主流の APF と比較した。

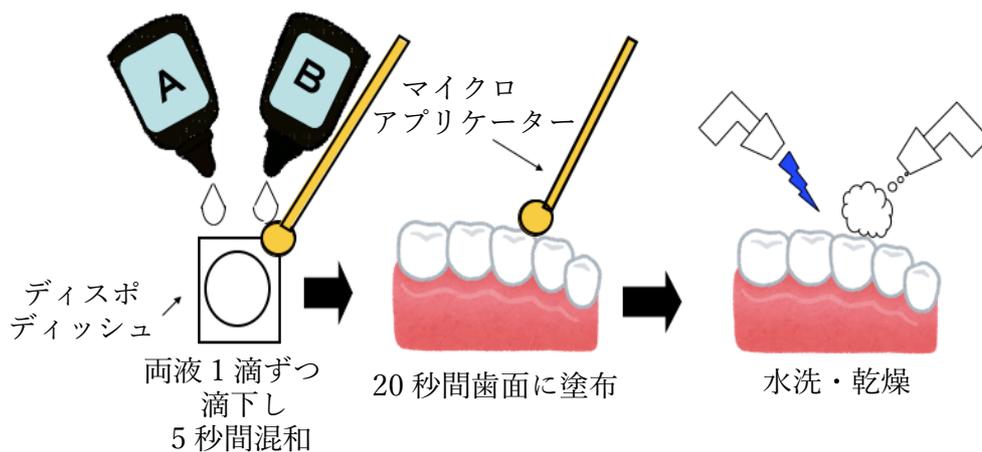


図 1 : CS のエナメル質齲蝕予防材としての応用方法

## 材料と方法

### I. ケアダインシールド®(CS)の酸産生抑制効果

#### 1. CS 抽出液の作製とイオン濃度測定

CS の液体A(亜鉛-フッ素ガラス分散液, pH9)と液体B(リン酸, pH1)を 5 秒間混和し, 25 ml の脱イオン水を加え, 遠心分離機(Model 4000, クボタ社製, 東京)にて 4000 rpm で 2 分間遠心分離を行い, 上清をプラスチックシリンジで除去した。採取した析出物を, 恒温器(DKN402, ヤマト科学社製, 東京)を用いて 120°Cで 5 時間乾燥させ, 乳鉢にて解砕し, 反応生成物として回収した。0.15 g の反応物に 5ml の脱イオン水を添加した。その後, 攪拌機(F-606N, 東京硝子器械社製, 東京)にて 100 rpm で 24 時間攪拌した。そして, 0.22  $\mu$ m シリンジフィルター(Millex-GP, Merck 社製, ダルムシュタット)にて濾過し, 抽出液を得た。抽出液の亜鉛イオン濃度は高周波誘導結合プラズマ発光分光分析装置(ICP-OES, Thermo Scientific, ペンシルベニア)によって測定した。フッ化物イオン濃度はフッ化物イオン電極(LAQUA F-72, 堀場製作所製, 京都)を使用し測定した(N=3)。

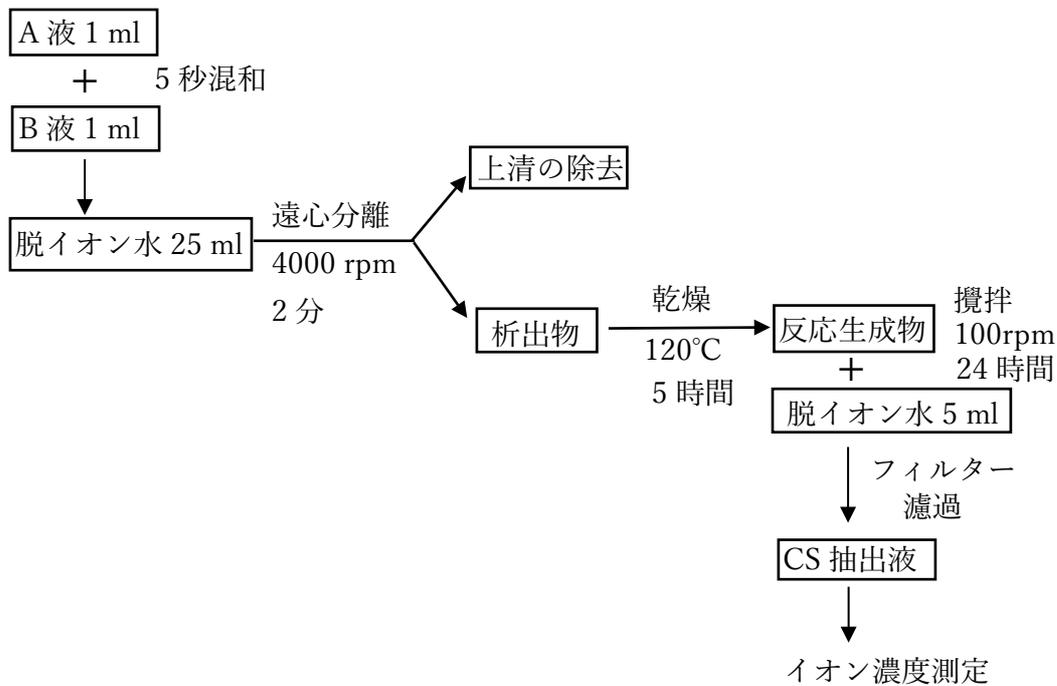


図 2 : CS 抽出液の作製とイオン濃度測定

## 2. CS による *S. mutans* の酸産生抑制試験

*S. mutans* の菌液濃度が  $1.25 \times 10^7$  cfu/ml になるように調整した 4ml のカリオスタット®に 1ml の CS 抽出液(CS 群)もしくは対照群として 1ml の蒸留水を加え、37°C で 48 時間培養した。混合直後および培養後の培養液の色の変化と pH 測定を行った。試験管の色の変化を、カリオスタット®の製品説明書から青(pH 7.0)、緑(pH 5.5)、黄緑色(pH 4.5)、明るい黄色(pH 4.0)として観察した。各時間の pH 値の統計分析は有意水準 5% で t-検定および Tukey HSD にて行った(N=3)。酸産生抑制試験の手順を図 3 に示す。

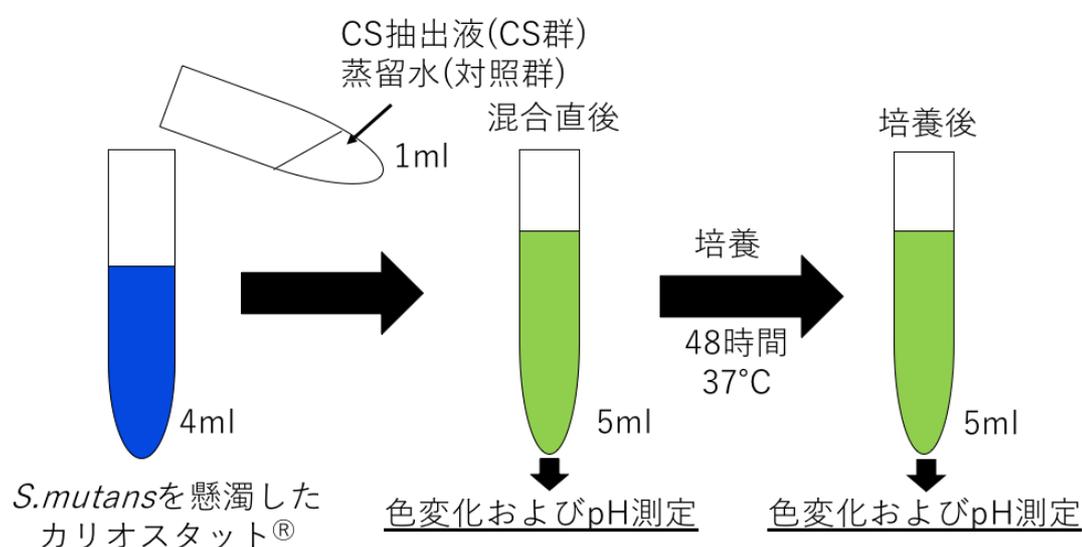


図 3 : CS による *S. mutans* の酸産生抑制試験の手順

## II. CS を塗布したエナメル質の抗菌性

### 1. エナメル質試験体の作製

アイソメット™LS(Buehler 社製, レイクブラフ)と卓上ボール盤 (TB-1131K, リョービ社製, 広島)を使用して牛歯歯冠から直径 4.5 mm, 厚さ 1.5 mm の唇側エナメル質の円盤状試片を切り出した。その後, 耐水研磨紙(# 800-2000, マルトー社製, 三重)及びラッピングフィルム(# 3・1, マルトー社製, 三重)にてエナメル質表面を鏡面研磨することにより, 新鮮エナメル質を露出させた。超音波洗浄を行なった後, オートクレー

ブにて滅菌し、試験体とした。その後、無作為に選んだ試験体を APF 群(フッ素濃度 9000ppm, B 社製, 以下 APF 群)および CS 群(A 液; 亜鉛-フッ素ガラス分散液, B 液; リン酸水溶液, 以下 CS 群)をメーカー指定の方法で試験体に塗布した。APF 群は歯面に APF を 4 分間塗布後, 30 分放置した。CS 群は A 液と B 液を等量 5 秒間混和した後, 歯面に 20 秒間塗布を行なった。無処理のエナメル質試験体をコントロール群とした。すべての群で 5 秒間の水洗と乾燥を行い以降の試験に用いた。作製手順の流れを図 4 に示す。

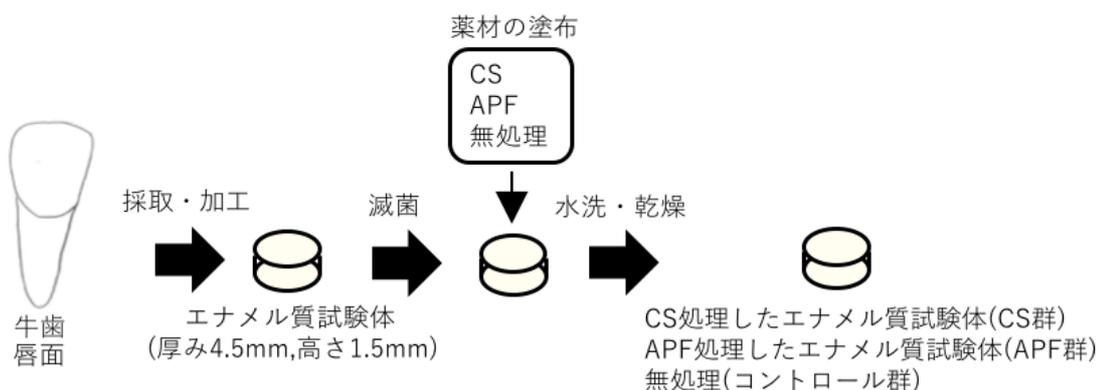


図 4：エナメル質試験体の作製手順

## 2. *in vitro* 抗菌性評価

### 1) 各試験体表面への *S.mutans* の播種と培養

24 ウェルプレートに CS 群, APF 群およびコントロール群のエナメル質試験体を静置し, 各ウェルに 0.5%スクロース含有 BHI 液体培地 1ml を加えた後, 菌液濃度を  $1.0 \times 10^6$  cfu/ml に調整した *S.mutans* 菌液を 10 $\mu$ l 播種した。その後, 37°C嫌気培養した。

### 2) 細菌付着量の測定

12, 24, 48, 72 時間培養後, 試験体を回収し, 1ml 中 PBS(-)に浸漬し, 90 秒間の超音波処理を行い, 試験体に付着した細菌を剥離・分散させた。得られた菌液を分取後希釈し, BHI 寒天培地上に均等に塗抹し, 48 時間嫌気培養した後, 出現したコロニー数を測定した。各群および各時間の細菌付着量の統計分析は, 有意水準 1%および 5% で one-way ANOVA および Tukey HSD を行った。

### 3) Live/Dead 染色法による試験体表面に付着した細菌の観察

24 および 72 時間培養後、各試験体を回収し、1ml 中 PBS(-)で洗浄した。その後、Live/Dead 染色法(Live/Dead Cell Staining Kit II, Thermo FisherScientific 社製, ウォルサム)により、試験体表面に付着した細菌を生細胞(緑色)と死細胞(赤色)に染色後、蛍光顕微鏡(BX51, OLYMPUS 社製, 東京)にて観察した。

### 4) 電子顕微鏡による試験体表面に付着した細菌の観察

24 および 72 時間培養後、各試験体を回収し、1ml 中 PBS(-)で洗浄した。その後、2.5%グルタルアルデヒドで固定し、エタノール系列で脱水後、デシケーター中で減圧乾燥しオートファインコーター(JFC-1600, 日本電子社製, 東京)にてカーボン蒸着した。走査型電子顕微鏡(SEM)(JSM-6330F, 日本電子社製, 東京)を用い、加速電圧 5kV にて付着細菌を観察した。

*S.mutans*を播種した

スクロース含有BHI液体培地

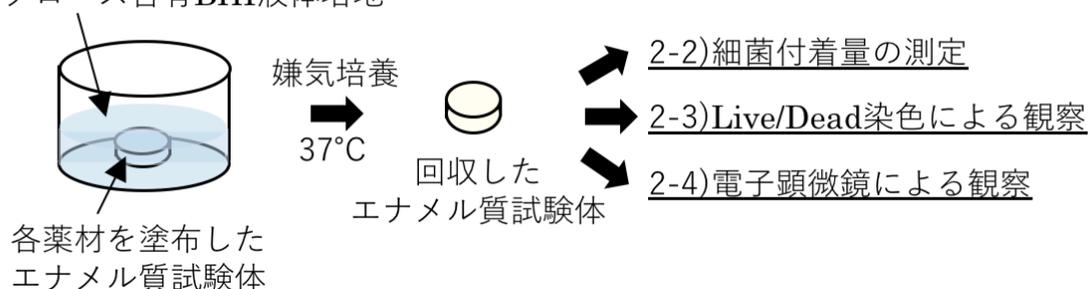


図 5 : *in vitro* 抗菌性評価手順

## Ⅲ. CS を塗布したエナメル質の脱灰抑制と再石灰化

### 1. エナメル質試験体の作製

実験Ⅱ.1と同様にエナメル質試験体を採取・加工した。頬側エナメル質が露出するように、周囲を即時重合レジン(ユニファーストⅡ®, GC 社製, 東京)で包埋した。実験Ⅱ.1と同様の方法を用い表面の鏡面研磨を行い、新鮮エナメル質を露出させ、超音波洗浄し、直径 2 mm のテフロンシールを貼付し、エナメル質露出部位が評価対象となる試験体を作製した。

## 2. 脱灰抑制および再石灰化の *in vitro* 評価

エナメル質試験体を無作為に抽出し、コントロール群(無処理)、APF 群、CS 群の 3 群に分けた。APF 群、CS 群は、実験 II.1 と同様の手法で塗布した。脱灰抑制および再石灰化の *in vitro* 評価試験の手順を図 6 に示す。まず、口腔内に近い状態を再現するため、前処理として、各試験体を人工唾液<sup>25)</sup>(20 mM HEPES, 30 mM KCl, 0.2 mM MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O, 0.7 mM CaCl<sub>2</sub>, 4 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.3mM NaN<sub>3</sub>, pH7.0)に 24 時間浸漬した。次に、50 mM クエン酸溶液<sup>26)</sup>(50mM クエン酸, pH5.0)に浸漬することで酸蝕を想定した脱灰を、37±1°Cの恒温槽に 24 時間行った。その後、再石灰化を確認するため、再び人工唾液に 10 日間浸漬した。それぞれの試料を以下の方法で比較した(N=3)。

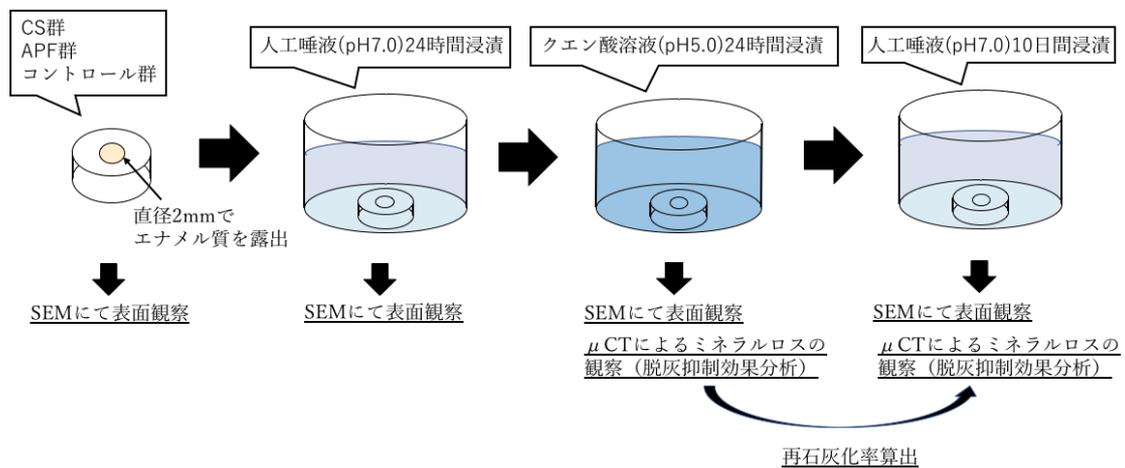


図 6：脱灰抑制および再石灰化の *in vitro* 評価試験の手順

各試験体の表面を II.1 の同様の方法で、SEM を用いて表面構造を観察した。続いて、24 時間クエン酸溶液浸漬後(脱灰)および 10 日間人工唾液浸漬後(再石灰化)の各群試験体のエナメル質の中心を、精密低速切断機(Buehler 社製, レイクブラフ)を用いて、厚さ 1 mm にスライスした。試験断面についてマイクロフォーカス X 線 CT (inspeXio SMX-225CT FPD Plus, 島津製作所社製, 京都)を用いて X 線透過像を撮影した(70kV, 30 $\mu$ A)。撮影像を Image J にて、深さ 300  $\mu$ m, 幅 300  $\mu$ m のエリアまで解析し非脱灰部の輝度を 100%とし、脱灰部の輝度からミネラル量(vol%)を算出した。ミネラル量が健全な領域まで回復するエナメル質の深さを脱灰深度( $\mu$ m)としミネラルプロファイルを作成した。また、脱灰もしくは再石灰化部のミネラルプロファイルで囲まれる部分の面

積より、ミネラルロス(vol%・ $\mu\text{m}$ )を算出した。II.1と同様、統計分析を行った(N=4)(図6,7)。

ミネラルロスの最大値である 24 時間クエン酸溶液浸漬後(脱灰)から 10 日間人工唾液浸漬後(再石灰化)のミネラルロスを比較し、ミネラル増加割合を以下の式を用い、再石灰化率(%)を算出した。II.1と同様、統計分析を行った(N=4)。

$$\text{再石灰化率(\%)} = \frac{(\text{クエン酸 24 時間浸漬後ミネラルロス}) - (\text{人工唾液 10 日間浸漬後ミネラルロス})}{\text{クエン酸 24 時間浸漬後ミネラルロス}} \times 100$$

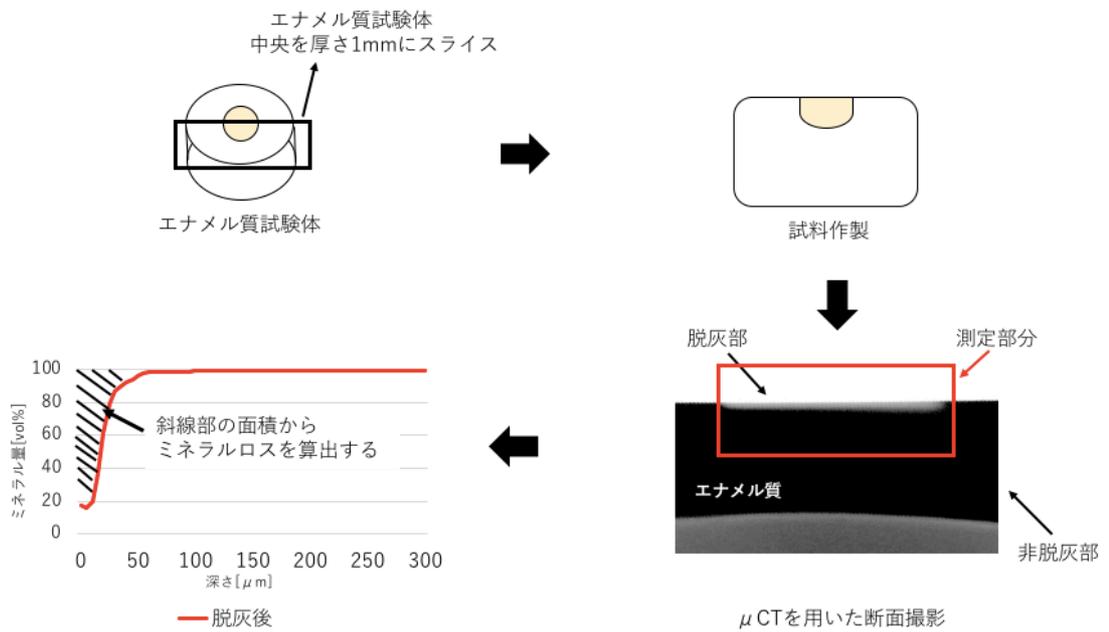


図 7：ミネラルロス算出方法の手順

## 結果

### I. ケアダインシールド® (CS)の酸産生抑制効果

#### 1. CS 溶出液の亜鉛およびフッ化物イオン濃度

亜鉛イオン濃度およびフッ化物イオン濃度の平均値(±標準偏差)は、それぞれ 25.3(±0.9)ppm および 52.0(±2.0)ppmであった。

#### 2. CS による *S.mutans* の酸産生抑制試験

*S.mutans*( $1.25 \times 10^7$ cfu/ml)を含むカリオスタット®に CS 抽出液 1ml(CS 群)もしくは蒸留水 1ml(対照群)を混合直後および 48 時間培養後の色の变化と pH 変化を図 8 に示す。混合直後はいずれも青色(pH  $7.0 \pm 0.1$ )を呈していたが、48 時間培養後、対照群は黄緑色(pH  $4.6 \pm 0.1$ )に、CS は緑色(pH  $6.1 \pm 0.1$ )に変化した。48 時間培養後の CS 群の pH と対照群の pH の間には有意差( $p < 0.05$ )を認めた。

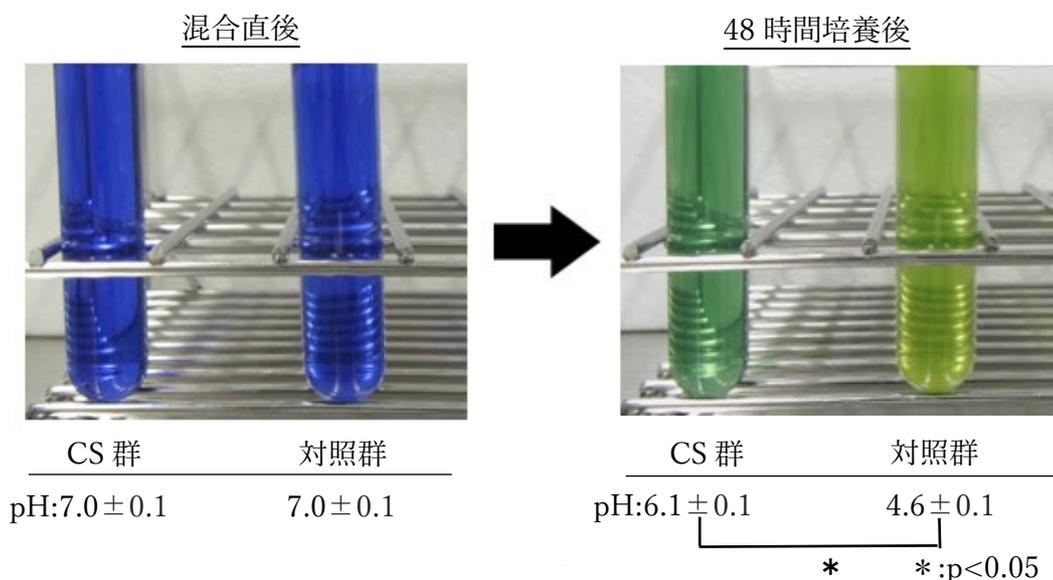


図 8 : *S.mutans*( $1.25 \times 10^7$ cfu/ml)を含むカリオスタット®に CS 抽出液 1ml(CS 群)もしくは蒸留水 1ml(対照群)を混合直後および 48 時間培養後の色の变化と pH 変化

## II. CS を塗布したエナメル質の抗菌性

### 1. エナメル質試験体表面の細菌付着量の測定

無処理(コントロール群), APF 処理したエナメル質試験体(APF 群)および CS 処理したエナメル質試験体(CS 群)に対して *S.mutans*( $1.0 \times 10^6$ cfu/ml)を播種し, 12, 24, 48 および 72 時間培養した各試験体表面における細菌付着量を図 9 に示す。いずれの群においても時間の経過とともに細菌付着量が増加したが, CS 群はコントロール群および APF 群に比べ, 増殖抑制傾向を示した。培養 12 時間では 3 群間に有意差を認めなかったが, 培養 24 時間および 48 時間では 3 群間に有意差を認めた。培養 72 時間ではコントロール群と APF 群の間に有意差は認められなかったものの, CS 群はその他の 2 群に比べて圧倒的に低い細菌付着量を示した。

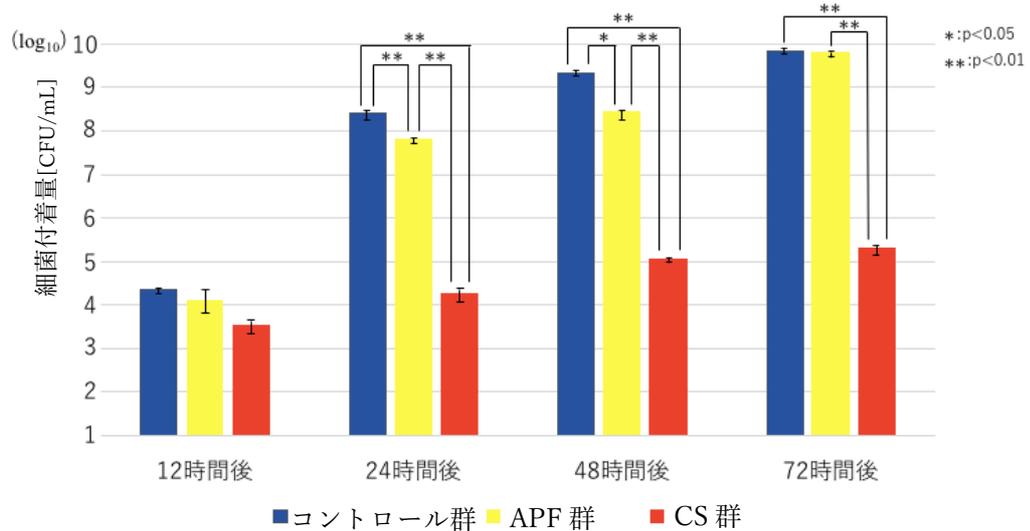


図 9: コントロール群, APF 群および CS 群のエナメル質試験体表面の細菌付着量の経時変化

## 2. Live/Dead 染色法による試験体表面に付着した細菌の観察

Live/Dead 染色法により染色したエナメル質試験体(コントロール群, APF 群および CS 群)の蛍光顕微鏡像を図 10 に示す。全群の 24 時間および 72 時間培養した試験体表面において *S.mutans* の生細胞(緑色)は観察されたが死細胞(赤色)は観察されなかった。コントロール群および APF 群においては 24 時間培養した試料表面に生細胞(緑色)が認められ(図 10 A, B), 72 時間培養した試料表面では生細胞(緑色)の集合体を認めた(図 10 D, E)。これに対し, CS 群においては生細胞(緑色)の付着が見られたものの, その付着量はコントロール群や APF 群に比べ圧倒的に少なかった(図 10 C, F)。

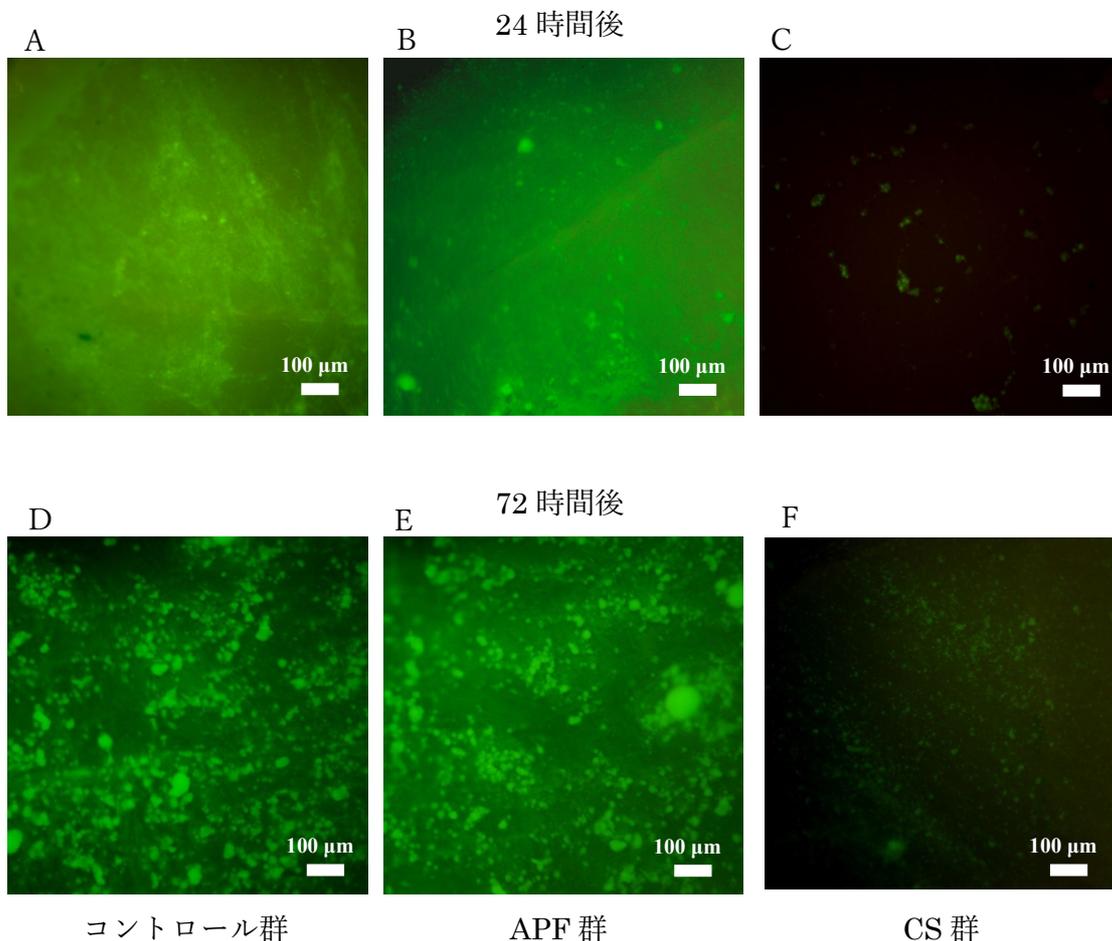


図 10: Live/Dead 染色法により染色したエナメル質試験体(コントロール群, APF 群および CS 群)の蛍光顕微鏡像(×20) 培養 24 時間: A, B, C, 培養 72 時間: D, E, F

### 3. SEM による試験体表面に付着した細菌の観察

培養 24 時間および 72 時間後のエナメル質試験体(コントロール群, APF 群, および CS 群)表面に付着した細菌の SEM 像を図 11 に示す。全群において 24 時間および 72 時間培養した試験体表面において *S.mutans* を認めた。コントロール群と APF 群では 24 時間および 72 時間培養した試験体表面では *S.mutans* が数珠状に連鎖し、集塊状に積層していた(図 11 A, B, D, E)。これに対し, CS 群はコントロール群と APF 群に比べ, 圧倒的に付着細菌数が少なかった。24 時間培養後の *S.mutans* は単体で散在しており(図 11 C), 72 時間培養には数珠状に連鎖していたが, コントロール群や APF 群のような, 集塊状の *S.mutans* は認められなかった(図 11 F)。

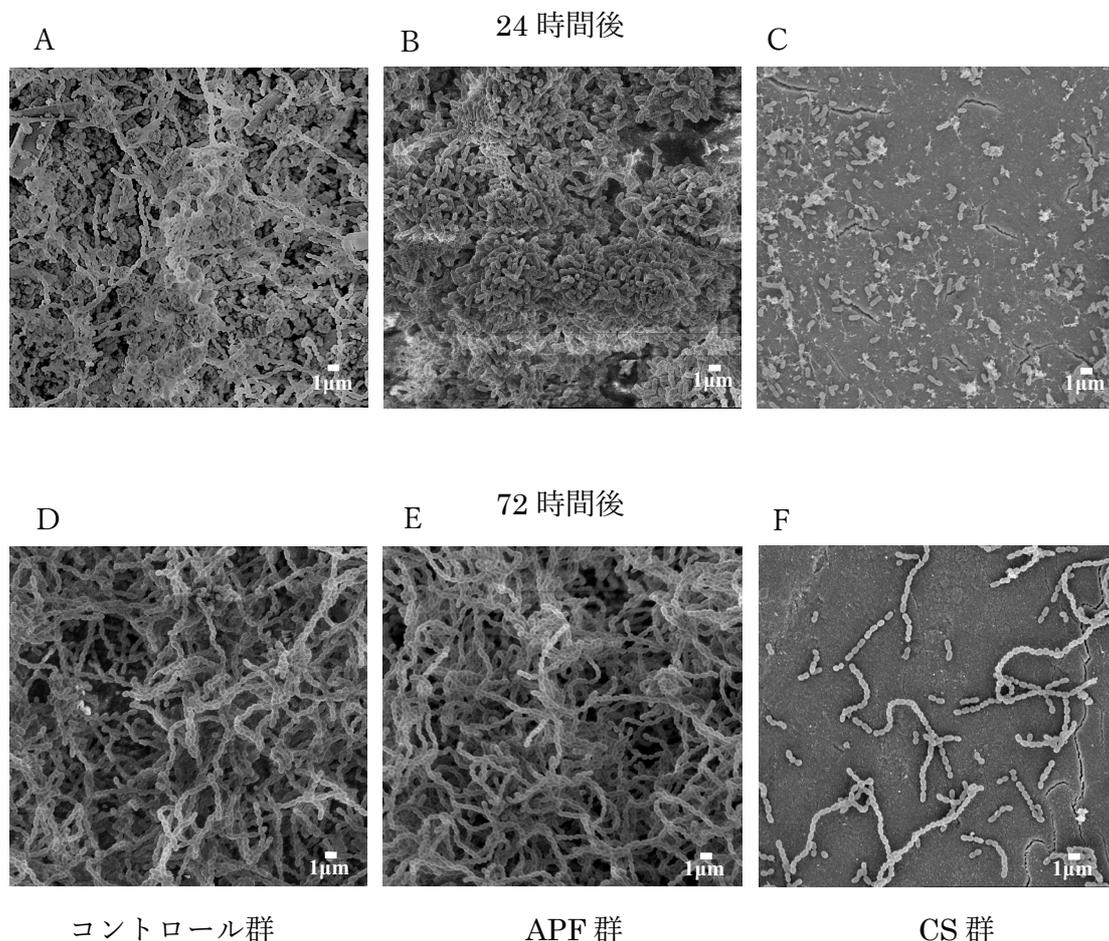


図 11 : 培養 24 時間および 72 時間後のエナメル質試験体(コントロール群, APF 群, および CS 群)表面に付着した細菌の SEM 像(×3,000) 培養 24 時間 : A, B, C, 培養 72 時間 : D, E, F

### Ⅲ. CS を塗布したエナメル質の脱灰抑制と再石灰化

#### 1. SEM による試験体表面観察

まず、表面処理によるエナメル質試験体の構造変化を観察した。エナメル質試験体の表面(図 12 A)には研磨痕と思われる方向性のある線状構造が存在していたが、APF 処理によりエナメル小柱間質が選択的に脱灰されていた(図 12 E)。また、CS 処理では 0.1 ~0.5  $\mu\text{m}$ 程度の粒子が歯面全体を覆っていた(図 12 D)。

次に、それぞれの群における人工唾液浸漬およびクエン酸溶液浸漬による表面構造変化を観察した。コントロール群では、前述の通り、表面には線状構造が確認されたが、人工唾液に 24 時間浸漬した後はその構造が確認できなくなり、部分的に粒子状物質で覆われていた(図 12 B)。引き続き、この試料をクエン酸溶液に 24 時間浸漬するとエナメル小柱間質が明瞭化されたが(図 12 C)、再び、人工唾液に 10 日間浸漬すると表面は粒子状物質で覆われ、クエン酸浸漬前と同様な構造が観察された(図 12 D)。APF 群では、APF 処理により粗造化した表面(図 12 E)が人工唾液浸漬による粒子状物質の堆積により平滑化した(図 12 F)。引き続き、この試料をクエン酸溶液に 24 時間浸漬するとコントロール群で見られたようなエナメル小柱間質の明瞭化は認められなかったが、はっきりとした粗造化が認められた(図 12 G)。再び、人工唾液に 10 日間浸漬すると、表面は粒子状物質の堆積による平滑化が認められたが、局所的に粗造構造の残存が確認された(図 12 H)。CS 群では、処理により粒子が表面を覆った様子が観察されたが(図 12 I)、人工唾液に 24 時間浸漬した後もほぼ同様の表面構造が認められた(図 12 J)。引き続き、この試料をクエン酸溶液に 24 時間浸漬すると粒子状構造物は認められなくなったが、他群で観察されたような粗造化は生じていなかった(図 12 K)。再び、人工唾液に 10 日間浸漬すると、粒子状物質の堆積による平滑化が認められた(図 12 L)。

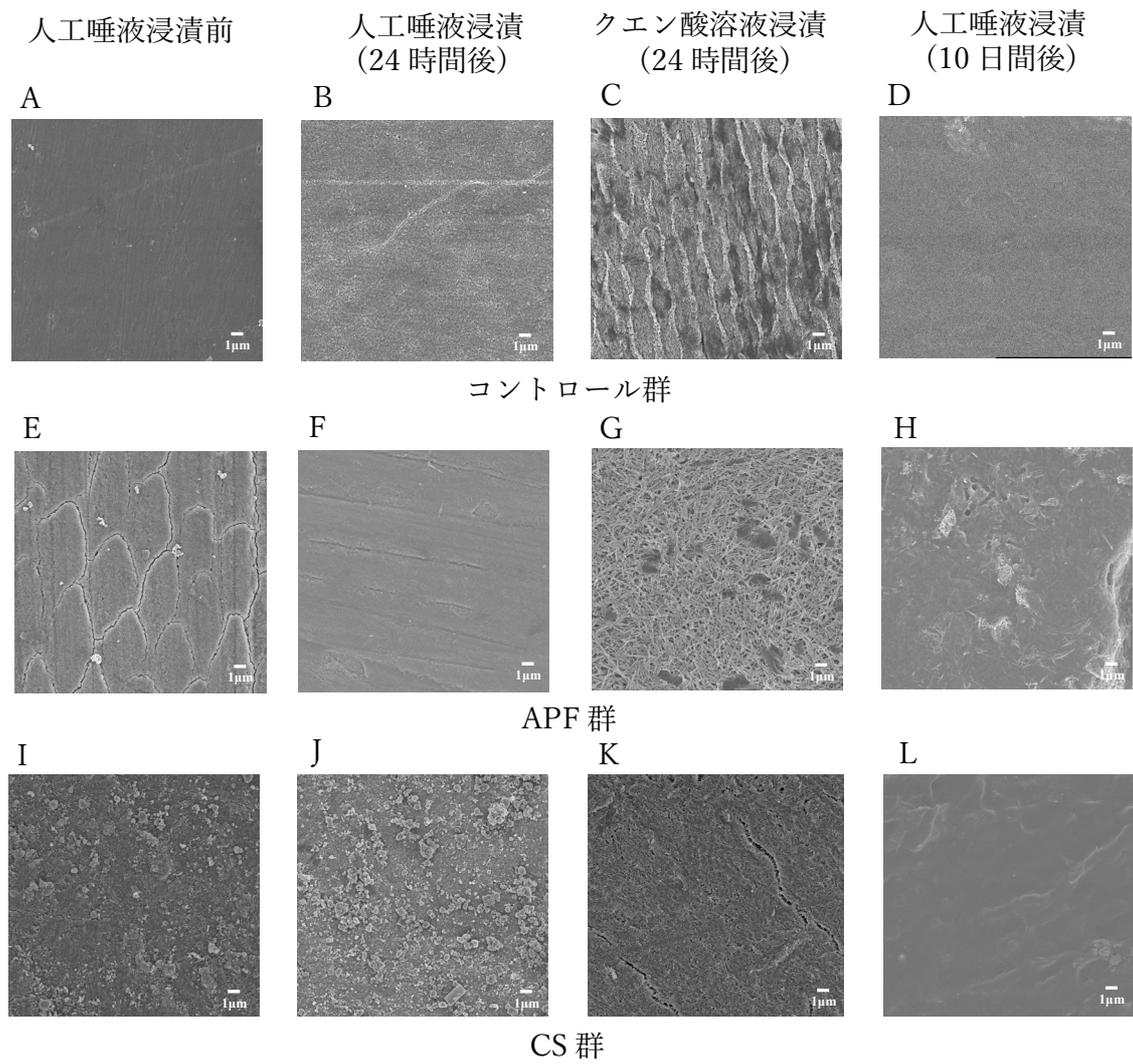


図 12: エナメル質試験体(コントロール群, APF 群, および CS 群)のエナメル質試験体の塗布直後, 人工唾液浸漬 24 時間後およびクエン酸溶液浸漬 24 時間後, 人工唾液浸漬 10 日間後の試験体表面の SEM 像

## 2. 脱灰抑制および再石灰化の評価

エナメル質試験体(コントロール群, APF 群および CS 群)のクエン酸溶液浸漬 24 時間後(脱灰), 引き続き人工唾液浸漬 10 日間後(脱灰+再石灰化)のミネラルロスを図 13 に示す。クエン酸溶液浸漬によるミネラルロスを比較すると, コントロール群は他群に比べて有意に高かった( $p<0.05$ )。引き続き人工唾液浸漬 10 日間後のミネラルロスを比較すると, すべての群間で有意差を認め, CS 群のミネラルロス是他群に比べ有意に低かった。

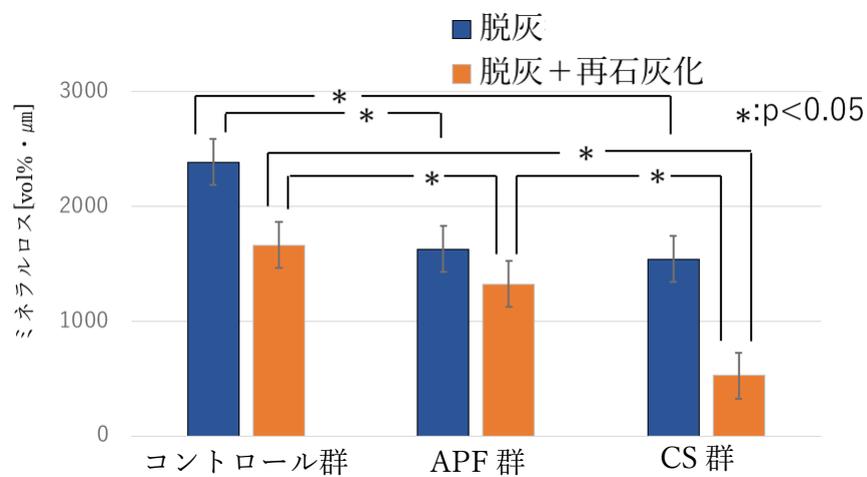


図 13: エナメル質試験体(コントロール群, APF 群および CS 群)のクエン酸溶液浸漬 24 時間後(脱灰), 引き続き人工唾液浸漬 10 日間後(脱灰+再石灰化)のミネラルロス

### 3. 再石灰化率

エナメル質試験体(コントロール群, APF 群および CS 群)のクエン酸溶液浸漬 24 時間後(脱灰), 引き続き人工唾液浸漬 10 日間後(再石灰化)のミネラルロス値より算出した再石灰化率を図 14 に示す。CS 群では APF 群(18.6%)やコントロール群(30.4%)と比較して有意に高い再石灰化率(65.9%)を認めた。コントロール群と APF 群の間には有意差を認めなかった。

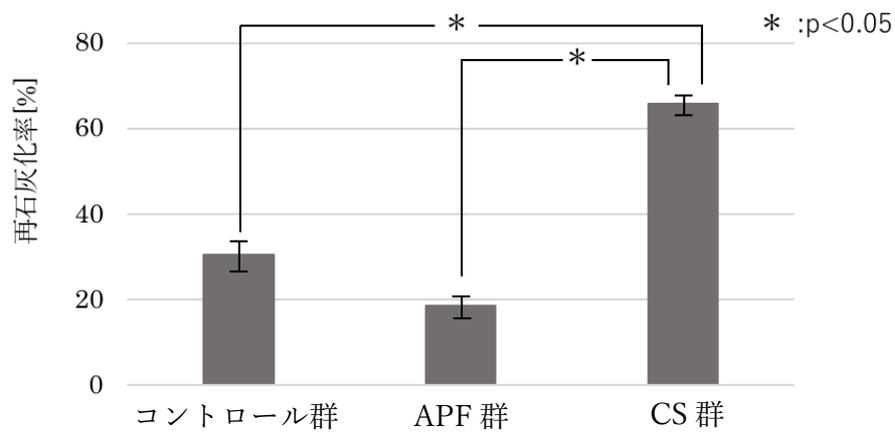


図 14：エナメル質試験体(コントロール群, APF 群および CS 群)のクエン酸溶液浸漬 24 時間後(脱灰), 引き続き人工唾液浸漬 10 日間後(再石灰化)のミネラルロス値より算出した再石灰化率(%)

## 考 察

ケアダインシールド®(CS)は象牙質の知覚過敏を抑制する目的で臨床使用されているが、その作用機序は以下のように説明されている。液体 A(亜鉛-フッ素ガラス分散液)および液体 B(リン酸水溶液)を歯面に塗布する事と、歯質表面がリン酸によりエッチングされ歯面のハイドロキシアパタイトからカルシウムやリン酸カルシウムが溶出される。これらと CS に含まれる亜鉛イオンやフッ化物イオンにより、エナメル質表面にリン酸亜鉛、フッ化カルシウム、リン酸カルシウムから成るナノ粒子が形成されるといわれており、これが開口している象牙細管を封鎖することで知覚過敏が抑制される<sup>23)</sup>。この反応生成物からはフッ化物イオンや亜鉛イオンが溶出すると考えられるため、これらの溶出イオンがエナメル質の酸産生抑制、抗菌性、脱灰抑制、再石灰化の向上に寄与すると期待される。

実験 I では最初に CS の反応による生成物からのイオン溶出について検討した。CS の液体 A と液体 B の反応により生成した物質は少量のため同定が困難であったが、生成物 0.15 g を 5ml の脱イオン水に加え 24 時間攪拌したところ、約 25 ppm の亜鉛イオンと約 52 ppm のフッ化物イオンの溶出が認められた。BioUnion™filler からのイオン溶出に関する報告によると、BioUnion™filler を pH7.0 の水に(0.04g/0.3ml)24 時間攪拌しながら浸漬すると約 6 ppm の亜鉛イオンと約 80 ppm のフッ化物イオンが溶出される<sup>23)</sup>。CS の反応生成物は BioUnion™filler がリン酸水溶液と反応して生成した物質であり、BioUnion™filler とは異なるが、BioUnion™filler と比較して多くの亜鉛イオンを徐放するが本実験結果から明らかになった。次に、CS 抽出液による *S.mutans* の酸産生抑制効果について検討した。実験に用いたカリオスタット®はスクロースやトリプロースが含まれている液体培地であり、*S.mutans* を培養すると細菌増殖や代謝の過程で産生される酸により pH に変化が生じ、プロモクレゾールグリーンとプロモクレゾールパープルによる pH 指示薬により色の変化が確認できる。カリオスタット®による齲蝕活動試験では 48 時間培養後の色の変化を評価するため<sup>27)</sup>、本実験でも 48 時間培養後の色を評価した。CS 群はコントロール群に比べ、培養前後の色および pH 変化が少なく、有意に *S.mutans* の酸産生が抑制されていることが分かった。この *S.mutans* の酸産生は亜鉛イオンやフッ化物イオンによって抑制されることが既に報告されている<sup>18,28-32)</sup>。亜鉛イオンの抗菌性の機序については解糖酵素グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼおよびピルビン酸キナーゼ、ならびにホスホエノールピルビン酸を阻害し、解糖抑制による酸産生抑制が起こると報告されている<sup>32)</sup>。また、フッ化物イオ

ンにより解糖酵素エノラーゼが阻害され、解糖抑制による酸産生抑制が起こると報告されている<sup>18)</sup>。本実験により CS 反応生成物から亜鉛イオンとフッ化物イオンが溶出することが確認されていることから、CS 反応生成物から溶出した亜鉛イオンおよびフッ化物イオンが *S.mutans* の酸産生抑制に寄与したと考えられる。但し、CS 反応生成物からのイオンの溶出挙動は pH により変化すると予想されることから、口腔内を想定した弱酸性環境(pH5.0)におけるイオン溶出挙動の調査が今後の検討課題と思われる。

実験Ⅱでは、CS を塗布したエナメル質の抗菌性を評価し、現在エナメル質齲蝕予防材として主流の APF を塗布した場合と比較した。APF 群とコントロール群の抗菌性を比較すると、24 時間および 48 時間後の細菌付着量に有意差が認められるものの、72 時間後の細胞付着量には有意差が認められず、Live/Dead 染色法や SEM による付着細胞の観察結果からみても APF 群とコントロール群の間に有意な差は認められなかった。一方、CS 群と他の 2 群間にはいずれの評価法においても細菌付着状況に著しい差が認められ、CS の塗布は APF の塗布に比べて有意に抗菌性を高めることが明らかとなった。Live/Dead 染色法で *S.mutans* のバイオフィーム形成を検討した Chen H らの報告<sup>33)</sup>および SEM で *S.mutans* のバイオフィーム形成を検討した Yu F らの報告<sup>34)</sup>を参考にすると、本実験における 24 時間培養後のコントロール群および APF 群には既にバイオフィームが形成していると考えられるが、CS 群は 72 時間培養後においても明瞭なバイオフィームは形成しておらず、CS の塗布はバイオフィームの形成抑制にも寄与することが明らかとなった。CS は亜鉛イオンとフッ化物イオンが溶出します。*S.mutans* に対する亜鉛イオンの MIC 濃度は、フッ化物イオンの値よりも低いと報告<sup>23)</sup>があり亜鉛イオンはフッ化物イオンより強い抗菌性を発揮します。作用機序は前述のように亜鉛イオンとフッ素イオンは解糖抑制により抗菌性を示します。フッ化物イオンと亜鉛イオンの組み合わせでは更なる解糖抑制によりバイオフィームの原因となるグルコシルトランスフェラーゼ抑制が報告<sup>35)</sup>されています。これらのことから CS は細菌付着量が少なくなり、バイオフィームが形成されなくなったと思われる。APF を塗布したエナメル質からは主にフッ素イオンが溶出することが報告されています<sup>20)</sup>。CS を塗布したエナメル質からはフッ化物イオンだけでなく亜鉛イオンも溶出すると実験Ⅰより推察される。フッ化物イオンの溶出量は APF 群と CS 群で異なるため有効濃度に関する詳細な議論は避けるが、本実験から亜鉛イオンを溶出しない APF の抗菌性は限定的であることが明らかになった。今回、Live/Dead 染色法による実験結果から、3 群とも死細胞が認められなかったことから、溶出した亜鉛イオンやフッ化物イオンが高濃度ではなかったことと、亜鉛イオンでは殺菌作用より静菌作用の報告がされている<sup>30,31)</sup>。

従って、CS においても静菌作用の効果が強いと考えられる。CS を塗布したエナメル質から溶出するイオン種やイオン濃度と抗菌性との関連に関する詳細な調査や CS が *S.mutans* 以外の口腔内細菌について効果を示すのかといった調査が今後の検討課題と思われる。

実験Ⅲでは、CS を塗布したエナメル質の脱灰抑制と再石灰化を評価し、現在エナメル質齲蝕予防材として主流の APF を塗布した場合と比較した。*In vitro* でエナメル質の脱灰を評価する条件としては酸蝕を想定し<sup>25)</sup>、クエン酸溶液(pH5.0)を用いた。コントロール群において、クエン酸溶液浸漬後にはエナメル小柱間質が明瞭化していたことから、クエン酸溶液浸漬によりエナメル質の *in vitro* 脱灰評価が可能であると判断した。一方、再石灰化を評価する条件としては人工唾液(pH7.0)を用いた<sup>26)</sup>。人工唾液浸漬後のエナメル質試料表面には人工唾液に含まれるカルシウムイオンとリン酸イオンから成るリン酸カルシウム粒子の析出が見られる<sup>36)</sup>。コントロール群において、人工唾液浸漬後のエナメル質表面には粒子状物質が観察され、再石灰化が認められたことから、人工唾液浸漬によりエナメル質の *in vitro* 再石灰化評価が可能であると判断した。SEM による構造観察結果から、APF 群では、APF 塗布によるわずかなエナメル質の脱灰が生じ、続いて人工唾液浸漬による再石灰化(回復)、クエン酸溶液浸漬による脱灰(粗造化)、人工唾液浸漬による再石灰化(回復)が段階的に生じたと考えられる。APF 処理により、エナメル質表面は高濃度フッ化物イオンによるフルオロアパタイトにより耐酸性が向上する<sup>19,20)</sup>と報告されている。コントロール群のクエン酸溶液浸漬後に観察されたエナメル小柱間質の明瞭化は確認されなかったが、粗造化していたことから、未処理のエナメル質とは異なる脱灰様式と思われる。その後の人工唾液浸漬により再石灰化(回復)による平滑化が認められるものの、局所的に粗造構造が残存していた。一方、CS 塗布後のエナメル質表面は多数の粒子状物質で覆われていたが、これは CS 反応生成物であると考えられる。この CS 反応生成物は人工唾液浸漬後も表面に残存していた。この CS 反応生成物はクエン酸溶液浸漬により多少溶解されるものの表面には残存しており、人工唾液に再浸漬すると平滑化が認められることから再石灰化(回復)も誘起する表面であることが確認された。過去の報告から<sup>23)</sup>、CS 反応生成物は主にヒドロキシアパタイト表面にリン酸亜鉛やフッ化カルシウム形成したものであると考えられる。リン酸亜鉛はクエン酸溶液浸漬により多少溶解するもののヒドロキシアパタイトより耐酸性が高く<sup>37,38)</sup>、エナメル質表面に残存できたと考えられる。

脱灰・再石灰化は表層下で生じること<sup>5,6)</sup>が知られており、表面観察のみで議論するのは難しい。そこで、割断面試料の  $\mu$  CT 測定により深さ方向のミネラルロスを出し、

脱灰・再石灰化の指標とした。まず、薬材塗布がエナメル質の脱灰抑制に及ぼす効果を見たところ、APF 群と CS 群はコントロール群に比べ有意に脱灰抑制効果が表れた。APF 群と CS 群では有意差を認めなかった。したがって、APF と CS においては同等の脱灰抑制効果を有することになる。前述のとおり、APF にはフルオロアパタイト<sup>19,20)</sup>、また CS においてはリン酸亜鉛<sup>23)</sup>が歯面表面に存在するため、耐酸性が高くなる。この事から APF と CS は脱灰抑制効果有すると思われる。

続いて 10 日間人工唾液浸漬後のミネラルロスを確認したところ、CS 群が最も少なく、直下のエナメル質に対して再石灰化促進効果を有することが確認された。CS はフッ化物イオンと亜鉛イオンが溶出する。フッ化物イオンは口腔内のカルシウムイオンやリン酸イオンと結びフルオロアパタイトを形成し、再石灰化に寄与します<sup>17)</sup>。亜鉛イオンにも再石灰化促進の報告<sup>39)</sup>はありますが詳細な機序は解明されておりません。フッ化物イオンと亜鉛イオンの組み合わせはさらなる再石灰化が促進する報告<sup>40)</sup>があります。CS から徐放された亜鉛イオン、フッ化物イオンが歯質や人工唾液中のリン酸イオン、カルシウムイオンと結びつき、フルオロアパタイトやリン酸亜鉛が生成され、再石灰化が促進されたと推測されます。APF にもフッ化カルシウムによる再石灰化が促進を期待したがコントロール群との有意差は認められなかった。APF は一度脱灰した歯面の再石灰化には長い期間が必要である報告<sup>21)</sup>があります。前述の抗菌性のところでも述べましたが APF を塗布したエナメル質からは主にフッ素イオンが溶出されています<sup>19)</sup>。CS を塗布したエナメル質からはフッ化物イオンだけでなく亜鉛イオンも溶出する事から、本実験から亜鉛イオンを溶出しない APF の再石灰化能は限定的であることが明らかになった。この事からコントロール群と有意差を認めなかったと思われる。これらのことから CS は APF と同等の脱灰抑制を有し、優れた再石灰化能を有します。

以上より、CS は *S.mutans* による酸産生とバイオフィルムの形成に対する抑制効果があり、抗菌作用の持続を示した。また、APF と同等の脱灰抑制効果を持ち、かつ APF より高い再石灰化能を有する新しいエナメル質齲蝕予防材として臨床応用が期待される。また、簡便に塗布できる点からも治療困難な低年齢児や障害児に対するエナメル質齲蝕予防材としての有用性が考えられる。今回は CS の健全エナメル歯面に対しての効果を検証したが、今後は実質欠損のない初期齲蝕に対しての再石灰化効果やフッ化配合歯磨剤といった低濃度フッ化物との併用との効果を視野に入れ、検討を重ねていく予定である。

## 結 論

知覚過敏抑制材であるケアダインシールド®(CS)のエナメル質齲蝕予防材としての性能を検討した結果、CSの反応生成物から溶出したフッ化物イオンと亜鉛イオンによって、*S.mutans*の酸産生が抑制されることが分かった。牛歯のエナメル質試料を用いて抗菌性、脱灰抑制能および再石灰化能を評価した結果、CSを塗布した試料は、現在のエナメル質齲蝕予防材の主流である酸性フッ素リン酸溶液(APF)を塗布した試料と同等の脱灰抑制能を示し、有意に優れた抗菌性と再石灰化能を示すことを明らかにした。以上の結果から、CSは新しいエナメル質齲蝕予防材として十分期待される。

## 謝 辞

本研究の遂行に当たり、研究計画の立案、論文執筆にご指導を賜りました尾崎正雄教授、柏村晴子講師、実験器具の提供や実験器具の手技を賜りました歯科医療工学講座の皆さまに深く感謝致します。

最後に、所属する成育小児歯科学分野の皆さまに心より感謝申し上げます。

## 参考文献

- 1) 厚生労働省 平成 28 年 歯科疾患実態調査結果の概要：  
<https://www.mhlw.go.jp/toukei/list/dl/62-28-02.pdf>.
- 2) 平成 30 年度学校保健統計(学校保健統計調査報告書)の公表について：  
[https://www.mext.go.jp/component/b\\_menu/other/\\_icsFiles/afieldfile/2019/03/25/1411703\\_01.pdf](https://www.mext.go.jp/component/b_menu/other/_icsFiles/afieldfile/2019/03/25/1411703_01.pdf).
- 3) Folayan MO, Tanatawi MIL, Aly NM, Al-Batayneh OB, Schroth RJ, Castillo JL, Gaffer BO, Amalia R, Kemoli A, Vulkovic A, Feldems CA. Association between early childhood caries and poverty in low and middle income countries. *BMC Oral Health* 2020; 20: 8.
- 4) Early Childhood Caries. IAPD Bangkok Declaration. *International Journal of Paediatric Dentistry* 2019; 29: 384-386.
- 5) Stephan RM, Miller BF. A Quantitative Method for Evaluating Physical and Chemical Agents which Modify Production of Acids in Bacterial Plaques on Human Teeth. *Journal of Dental Research* 1943; 22: 45-51.
- 6) García-Godoy F, Hicks MJ. Maintaining the integrity of the enamel surface. *The Journal of American Dental Association* 2008; 139: 25-34.
- 7) Takahashi N, Nyvad B. Caries Ecology Revisited: Microbial Dynamics and the Caries Process. *Caries Research* 2008; 42: 409-418.
- 8) Newbrun E. Sugar and dental caries: a review of human studies. *Science* 1982; 217: 418-423.
- 9) Hamada S, Slade HD. Biology, immunology, and cariogenicity of *Streptococcus mutans*. *Microbiological Reviews* 1980; 44: 331-384.
- 10) Hamada S, Koga T, Ooshima T. Virulence factors of *Streptococcus mutans* and dental caries prevention. *Journal of Dental Research* 1984; 63: 407-411.
- 11) Carlsson J. Bacterial metabolism in dental biofilms. *Advances in Dental Research* 1997; 11: 75-80.
- 12) Ccahuana-Vásquez RA, Cury JA. S. mutans biofilm model to evaluate antimicrobial substances and enamel demineralization. *Brazilian Oral Research* 2010; 24: 135-141.
- 13) Nishiguchi E, Ikazaki R, Suzuki Y, Fujino F, Watabe K. Enamel Decalcification by Beverages. *Journal of Dental Health* 1995; 45: 314-321.

- 14) Kinehara M, Horie H. Studies concerning the effect of soft drinks on tooth dissolution. Chiba Medical Journal 2001; 77: 145-149.
- 15) Tenuta LMA, Zamataro CB, Cury AADB, Tabchoury CPM, Cury JA. Mechanism of fluoride dentifrice effect on enamel demineralization. Caries Research 2009; 43: 278-285.
- 16) Ten Cate JM, Featherstone JDB. Mechanistic aspects of the interactions between fluoride and dental enamel. Critical Reviews in Oral Biology and Medicine 1991; 2: 283-296.
- 17) Silverstone LM. The effect of fluoride in the remineralization of enamel caries and caries-like lesions in vitro. Journal of Public Health Dentistry 1982; 42: 42-53.
- 18) Pandit S, Kim HJ, Song KY, Jeom JG. Relationship between fluoride concentration and activity against virulence factors and viability of a cariogenic biofilm: *in vitro* study. Caries Research 2013; 47: 539-547.
- 19) Ga Y, Motokawa W, Miyazaki K. The Relationship between a Remineralization in the Subsurface Lesion of Bovine Enamel and a pH of Acid Phosphate Fluoride Solution. The Japanese Journal of Pediatric Dentistry 2003; 41: 580-587.
- 20) Baud CA, Bang S. Electron probe and X-ray diffraction microanalyses of human enamel treated *in vitro* by fluoride solution. Caries Research 1970; 4: 1-13.
- 21) Kawasaki K, Sakai R, Park YD, Kambara M. Effect of Fluoride Application on Remineralization of Bovine Tooth Enamel Using QLF *in Vitro*. Journal of Dental Health 2008; 58: 482-489.
- 22) Tong Z, Tao R, Jiang W, Li J, Zhou L, Tian Y, Ni L. *In vitro* study of the properties of *Streptococcus mutans* in starvation conditions. Archives Oral Biology 2011; 56: 1306-1311.
- 23) Saad A, Toru N, Abdou A, Matin K, Burrow MF, Tagami J. Inhibitory effect of zinc-containing desensitizer on bacterial biofilm formation and root dentin demineralization. Dental Materials Journal 2019; 38: 940-946.
- 24) Liu Y, Kohno T, Tsuboi R, Kitagawa H, Imazato S. Acidity-induced release of zinc ion from BioUnion™filler and its inhibitory effects against *Streptococcus mutans*. Dental Materials Journal 2020; 39: 547-553.
- 25) Pashley DH, Tay FR, Yiu C, Hashimoto M, Breschi L, Carvalho RM, Ito S. Collagen degradation by host-derived enzymes during aging. Journal of Dental Research 2004; 83: 216-221.

- 26) Zalizniak I, Palamara JEA, Wong RHK, Cochrane NJ, Burrow MF, Reynolds EC. Ion release and physical properties of CPP-ACP modified GIC in acid solutions. *Journal of Dentistry* 2013; 41: 449-454.
- 27) Shimono T, Mizuno J, Nonomura E, Morisaki J, Masuda N, Matsumura S, Sobue S. Studies on a new caries activity test (Cariostat®): Comparison with the Snyder Test. *The Japanese Journal of Pediatric Dentistry* 1976; 14: 6-18.
- 28) Watson GK, Cummins D, Van der Ouderaa FJ. Inhibition of acid production by *Streptococcus mutans* NCTC 10449 by zinc and the effect of metal speciation. *Caries Research* 1991; 25: 431-437.
- 29) He G, Pearce EIF, Sissons CH. Inhibitory effect on ZnCl<sub>2</sub> on glycolysis in human oral microbes. *Archives of Oral Biology* 2002; 47: 117-129.
- 30) Phan TN, Buckner T, Sheng J, Baldeck JD, Marquis RE. Physiologic actions of zinc related to inhibition of acid and alkali production by oral streptococci in suspensions and biofilms. *Oral Microbiology and Immunology* 2004; 19: 31-38.
- 31) Cummins D, Watson GK. Zinc citrate/Triclosan: new anti-plaque system for the control of plaque and the prevention of gingivitis: short-term clinical and mode of action studies. *Journal of Clinical Periodontology* 1991; 18: 455-461.
- 32) Belli WA, Marquis RE. Catabolite modification of acid tolerance of *Streptococcus mutans* GS-5. *Oral Microbiology and Immunology* 1994; 9: 29-34.
- 33) Cheng H, Yang Y, Weir MD, Dai Q, Lei L, Homayounfar N, Oates TW, Yang K, Zhangn K, Hu T. Regulating Oral Biofilm from Cariogenic State to Non-Cariogenic State via Novel Combination of Bioactive Therapeutic Composite and Gene-Knockout. *Microorganisms* 2020; 8: 1410.
- 34) Yu F, Dong Y, Yu HH, Lin PT, Zhang L, Sun X, Liu Y, Xia Y, Huang L, Chen JH. Antibacterial Activity and Bonding Ability of an Orthodontic Adhesive Containing the Antibacterial Monomer 2-Methacryloxyethyl Hexadecyl Methyl Ammonium Bromide. *Scientific Reports* 2017; 7: 41787.
- 35) Koo H, Sheng J, Phuong T, Nguyen M, Marquis RE. Co-operative inhibition by fluoride and zinc of glucosyl transferase production and polysaccharide synthesis by *mutans streptococci* in suspension cultures and biofilms. *FEMS Microbiology Letters* 2006; 254: 134-140.

- 36) Wang X, Mihailova B, Klocke A, Heidrich S, Bismayer U. Effect of Artificial Saliva on the Apatite Structure of Eroded Enamel. *International Journal of Spectroscopy*. 2011; 9.
- 37) Mohammed NR, Mneimne M, Hill RG, Al-Jawad M, Lynch RJM, Anderson P. Physical chemical effects of zinc on *in vitro* enamel demineralization. *Journal of Dentistry* 2014; 42: 1096-1104.
- 38) Takatsuka T, Tanaka K, Iijima Y. Inhibitory effect on ZnCl<sub>2</sub> on glycolysis in human oral microbes. *Archives of Oral Biology* 2002; 47: 117-129.
- 39) Matsunaga T, Ishizaki H, Tanabe S, Hayashi Y. Synchrotron radiation microbeam X-ray fluorescence analysis of zinc concentration in remineralized enamel *in situ*. *Archives of Biology* 2009; 54: 420-423.
- 40) Lynch RJM, Churchley, Butler A, Kearns S, Thomas GV, Badrock TC, Cooper L, Higham SM. Effects of zinc and fluoride on the remineralization of artificial carious lesions under simulated plaque-fluid conditions. 2011; 45: 313-322.
- 41) Bodde H, Koops PG, Arends J. Effect of an APF pretreatment on in vitro remineralization of initial enamel lesions. *Caries Research* 1984; 18: 344-347.

## 対象論文, 学会発表および受賞

### 実験Ⅰ. ケアダインシールド®(CS)の酸産生抑制効果

熊谷徹弥, 柏村晴子, 田村翔悟, 中村雅子, 酒井亜希子, 尾崎正雄. 亜鉛-フッ素徐放性ガラスを用いた新規シール材の齲蝕予防に関する研究 - *S.mutans* 菌の酸産生抑制効果について -. 小児歯科学会誌.2018; 56: 172-172(第 58 回小児歯科九州地方会にてポスター賞受賞)

### 実験Ⅱ. CS を塗布したエナメル質の抗菌性

Tetsuya Kumagai, Haruko Kashiwamura, Mari Katsumata, Masao Ozaki.

Antibacterial activity of a new type of enamel surface-coating material containing zinc and fluoride. *Pediatric Dental Journal*.2021; 31:86-91

熊谷徹弥, 柏村晴子, 尾崎正雄. 亜鉛-フッ素徐放性ガラスを用いたシール材(ケアダインシールド®)によるバイオフィーム形成抑制効果に関する研究. 小児歯科学会誌.2019; 57: 286-286

### 実験Ⅲ. CS を塗布したエナメル質の脱灰抑制と再石灰化

柏村晴子, 熊谷徹弥, 田村翔悟, 宮原那実, 尾崎正雄. 亜鉛・フッ素徐放性ガラスを用いた新規シール材(ケアダインシールド®)の酸蝕に対する耐酸性試験小児歯科学雑誌. 2018; 56: 241-241