

試作フッ素系ナノシール剤の耐酸性の向上に関する研究

柏村 晴子

要旨：我々は、カルシウムフルオロアルミノシリケート粉末混濁液とリン酸水溶液の2液からなるフッ素系ナノシール剤（以下ナノシール剤）を試作し本剤の粒子沈着効果を利用した耐酸性効果を明らかにすることを目的として、人歯を用い APF 製剤との比較研究を行った。耐酸性の評価には、QLF と FE-SEM を用い、人工齲蝕エナメル質と健全エナメル質の耐酸性性能の検討を行った。

1. QLF を用いた耐酸性評価において、人工的初期齲蝕および健全エナメル質の双方でナノシール剤はコントロール群よりも高い耐酸性性能を示した。
 2. 人工的初期齲蝕における FE-SEM 観察において、APF ゲルおよび APF 液群では、薬剤塗布直後と脱灰 72 時間後を比較すると、一部の表面に脱灰の進行が認められた。これに対して、ナノシール剤群では、脱灰処理前後もエナメル質表層に大きな差はみられなかった。
 3. 健全エナメル質表面に沈着したナノ粒子析出物は、FE-SEM 観察においてエナメル質表層へ緊密な被覆が確認された。
 4. 健全エナメル質において行われた、塗布・脱灰を繰り返した実験でも、ナノシール剤は安定した耐酸性性能を示した。
- 以上より、本剤は、新たな齲蝕予防剤としての使用が期待できると考えられた。

Key words：ナノシール剤、耐酸性、齲蝕予防、QLF、FE-SEM

緒 言

近年、清涼飲料水の蔓延は著しく、口腔内 pH の低下による酸蝕歯が問題となってきている¹⁾。酸蝕歯は、顕著な歯の実質欠損や自覚症状を伴わずに進行する場合が多いため、発見が遅れる傾向にある²⁾。また、生活習慣に左右されるためその予防は困難である³⁾。現在、市販飲料水の約 70% がエナメル質臨界 pH 5.5 を下回っているという現状を考えると、酸蝕歯を食生活の制限によって完全に予防することは難しい。

小児期からの積極的な齲蝕予防としては、古くからリン酸酸性フッ化ナトリウム溶液 (Acidulated Phosphate Fluoride: APF) の歯面塗布が幅広く応用されている。APF 塗布の有用性については、多くの報告が存在し、その効果は、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⁴⁻⁷⁾。

APF 塗布による耐酸性については、様々な報告がある⁸⁻¹⁰⁾が、一方で一度脱灰がおきた歯面での APF 塗布

による再石灰化には、長い期間が必要であることも指摘されている⁸⁾。また、初期齲蝕に対する局所的な塗布剤としては、銀による蛋白の固定及びフッ化物による不溶性塩の生成することで高い齲蝕進行抑制を示すフッ化ジアンミン銀がある¹¹⁻¹³⁾。しかし、フッ化ジアンミン銀は、歯質が黒変するため、審美性の問題から応用できる歯種が限られており、最近では前歯部の初期齲蝕には用いられないのが現状である。

我々が開発を行ってきた、フッ素系ナノシール剤 (日本歯科薬品株式会社製、以下 NS 剤と略す) は、カルシウムフルオロアルミノシリケート粉末分散液とリン酸水溶液の2液からなり、2つを混和するとカルシウムフルオロアルミノシリケート粒子がリン酸水溶液と酸塩基反応により、歯質の一部を脱灰しながら凝集を開始し、歯面上に無着色の強固な粒子沈着層を形成する。このような性質から、根面が露出した知覚過敏症では、すでに臨床応用されている¹⁴⁾。

そこで、本研究では、本剤の粒子沈着効果を利用した、エナメル質平滑歯面齲蝕や健全エナメル質への耐酸性効果を明らかにすることを目的として、初期齲蝕と健全エナメル質への耐酸性性能について検討を行った。

福岡歯科大学成長発達歯学講座教育小児歯科学分野
福岡県福岡市早良区田村 2-15-1
(主任：尾崎正雄教授)
(2013 年 8 月 26 日受付)
(2013 年 10 月 22 日受理)

材料および方法

1. 試料の作製

実験に用いた試料は、臨床上抜歯が適切と診断され、患者または保護者が歯の提供を承諾した小白歯を使用した。患者からの歯の提供は、福岡歯科大学倫理審査委員会の審査、承認を得て行われた（福岡歯科大学倫理審査委員会承認番号第 143 号）。

採取された小白歯は、生理的食塩水中（4℃）にて保存し、頬側面を4つに分割後、即時型重合レジン（ユニファーストⅡ[®]、株式会社ジーシー製）で周囲を包埋した。その後、頬側面部のエナメル質表面を耐水研磨紙（#800-2000、マルトー）及びラッピングフィルム（#3・1、マルトー）にて鏡面研磨し、新鮮エナメル質を露出させ、超音波洗浄を行い試験体とした。

被験材料は、NS 剤、ゲル状および液体のフッ化物（フッ素濃度 9,000 ppm、B 社製、以下 APF ゲルおよび APF 液と略す）を実験に用いて、耐酸性能の比較を行った。

2. NS 剤の性状観察および pH 変化の測定

1) NS 剤塗布前後の表面観察

NS 剤は A 液：カルシウムフルオロアルミノシリケートガラス分散液と B 液：リン酸水溶液の 2 液からなる。使用方法としては、A 液、B 液を等量混合し、混合 5 秒後から 20 秒間歯面に塗布し、水洗乾燥を行う。

そこで、NS 剤塗布前後の健全エナメル質試料に対し、白金コーティング（約 30 nm、オートファインコーター、JFC-1600、日本電子データム株式会社製）後、フィールドエミッション走査型電子顕微鏡（JSM-7000 F、日本電子株式会社製、以下 FE-SEM と略す）を用い、歯面の状態を観察した（n=3）。

2) カルシウムフルオロアルミノシリケートガラス分散液の粒度分布

NS 剤の A 液（カルシウムフルオロアルミノシリケートガラス分散液）1 g を精製水 25 g で希釈し、レーザー回折・散乱方式粒度分布測定装置 LA-920（株式会社堀場製作所製）を用いて、体積基準による平均粒子径（D 50）および最大粒子径（D 100）について、粒度分布を測定した（n=3）。

3) NS 剤の pH 変化測定

A 液、B 液の 2 液を混合し、歯面に塗布すると NS 剤は、pH 変化を起こす。

そこで、A 液、B 液混合液および混合液を歯面に塗布した後の歯面上の pH 変化を pH 測定器（本体：Orion 2115010 DUAL STAR pH/イオンメーター・pH 電極：

Orion 8102 BN、サーモフィッシャーサイエンステイフィック株式会社製）を用いて、混合 5 秒後以降、10 秒毎に 60 秒時点まで観察した。

なお、計測は混合液、歯面上の pH とも異なる試料を用いて 5 回測定し、その平均値を算出した。

3. 耐酸性能評価試験

1) 実験群の設定

1 歯の頬側面を分割し、作製した 4 つの試験体を、以下の 4 群に設定した（n=16）。

コントロール群：薬剤の塗布なし

NS 剤群：A 液、B 液の等量を混合し、混合 5 秒後から 20 秒間歯面に塗布し水洗乾燥

APF ゲル群：APF ゲルを 5 分間歯面に塗布し水洗乾燥

APF 液群：脱脂綿に APF 液を浸透させ、歯面上に 5 分間静置後、水洗乾燥

2) 脱灰処理と実験サイクル

実験サイクルの詳細を図 1 に示す。作製した試験体表面に、ネイルバーニッシュを用いて、2 mm×2 mm の窓を調整した後、脱灰処理による初期齲蝕を形成し、各薬剤を塗布したものと、健全エナメル質に各薬剤を塗布したものとに分けた。その後、耐酸性試験を行うため、脱灰液に浸漬した。

脱灰液は、0.1 M 乳酸緩衝溶液（pH: 4.5, Ca: 3.0 mM, P: 1.8 mM, CMC-Na: 1%, チモール: 0.01%）¹⁵⁻¹⁷⁾を用い、37±1℃ で 72 時間の浸漬を 1 ツールとした。なお、

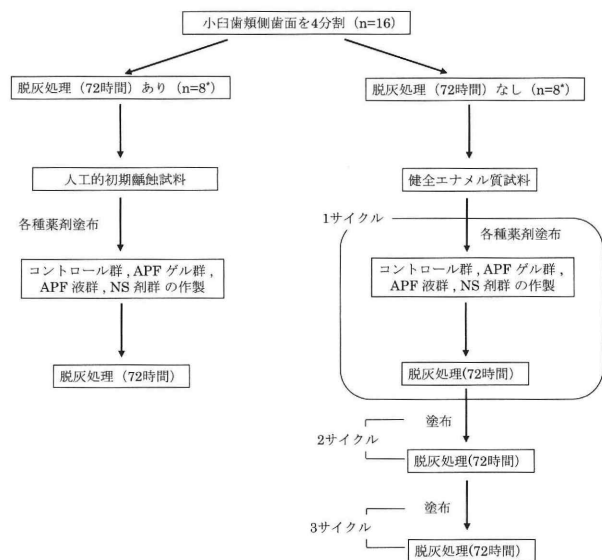


図 1 実験方法

(*n=8 のうち n=5 は QLF 測定, n=3 は FE-SEM 撮影を行った。)

初期齲蝕試料は、この脱灰処理を、前処理として1クール行ったものとした。

また、健全エナメル質試料については、より臨床に近い薬剤塗布状態を想定し、塗布・脱灰を3サイクル繰り返し行った。この際、脱灰液は72時間ごとに交換した。

3) 定量的光誘導蛍光法による耐酸性能評価

脱灰処理による脱灰量の定量分析は、定量的光誘導蛍光法 (INSPEKTOR[®], Inspektor Dental Care 社製, 以下 QLF と略す) を用いて行った。それぞれの試料の余剰水分をマイルドエアブローにて除去し、遮光環境下で各実験後の同一試料を、フレームキャプチャーレベル (画像一致度) 0.98 以上で取り込み解析した。脱灰の程度の測定は、脱灰面積 (WS), 脱灰深さ (ΔF), 総脱灰容量 ($\Delta Q = WS \times \Delta F$) を行った (初期齲蝕試料・健全エナメル質試料各 n=5)。

統計分析は、Dunnett の検定を用いて、コントロール群を基準とした各経過時間の群間比較を行った。

4) 試験体の FE-SEM 観察

人工的初期齲蝕試料と健全エナメル質試料における各薬剤を塗布した前後の歯面を白金コーティング後、FE-SEM にて観察した。また、脱灰試験後の歯面も比較観察した (初期齲蝕試料・健全エナメル質試料各 n=3)。

結 果

1. NS 剤の性状と pH 変化

1) NS 剤塗布前後の表面観察

NS 剤塗布前の健全エナメル質および塗布後の歯面の状態を図 2-A, B に示す。NS 剤塗布後は、エナメル質表層が、0.1~0.5 μm 程度の粒子様の析出物で覆われている様子が確認できた。

2) カルシウムフルオロアルミノシリケートガラスの粒度分布

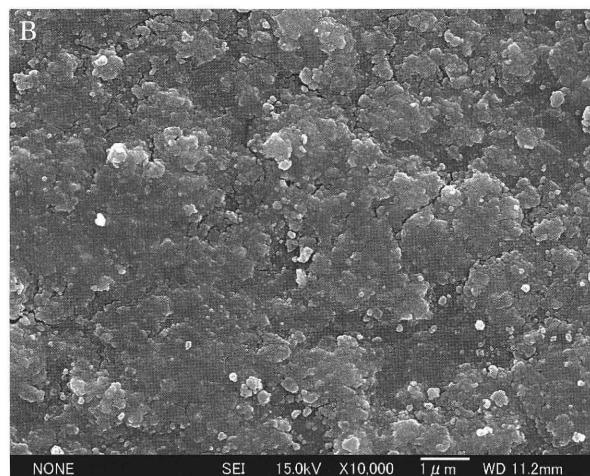
NS 剤の A 液におけるカルシウムフルオロアルミノシリケートガラスの粒度分布測定結果を図 3-A に示す。平均粒子径はおよそ 0.378 μm であり、最大粒子径は 1.004 μm であった。同様の測定を 3 回行ったが、いずれも類似した粒度分布状態を示していた。

3) NS 剤の混合時および歯面塗布後の pH 変化

NS 剤の混合時および歯面塗布後の pH 変化を図 3-B に示す。A 液, B 液を混合すると、すみやかに pH は上昇した。その後、60 秒経過時点でその変化は緩やかになり、その pH の値は約 $\text{pH } 3.5 \pm 0.05$ を示していた。一方、NS 剤を混合し、5 秒後に歯面上に塗布すると、直ちに pH 4 付近まで上昇し、その後は非常に緩やかに上昇し、60 秒後には $\text{pH } 4.2 \pm 0.06$ であった。



塗布前



塗布後

図 2 NS 剤塗布前後の健全エナメル質表層の FE-SEM 像 ($\times 10,000$)

A: 研磨跡と思われる方向性のある線状構造がみられた。
B: 塗布後は、表層が 0.1~0.5 μm の粒子様析出物で覆われていた。

2. 人工的初期齲蝕での耐酸性能の比較結果

1) QLF による比較結果

人工的初期齲蝕試料に各薬剤を塗布し、その後脱灰液に 72 時間浸漬した際の WS, ΔF および ΔQ を 12 時間毎に測定した値を表 1 に示す。

NS 剤群のみが塗布後から 72 時間脱灰後までのすべての測定点において、コントロール群に対して有意差を認めた。しかし、人工的初期齲蝕試料作製時の WS は $2.65 \pm 0.64 \sim 3.20 \pm 0.46$, ΔF は $-12.18 \pm 1.76 \sim -14.14$

±3.46, ΔQ は -32.42±9.55~-46.00±17.79 の間に分散していたため, 人工的初期齲蝕作製時の計測値を基準とし, 各浸漬時間ごとのQLF 値の変化率を図4~6に示した。

コントロール群は, 脱灰液浸漬24時間以降, 除々に

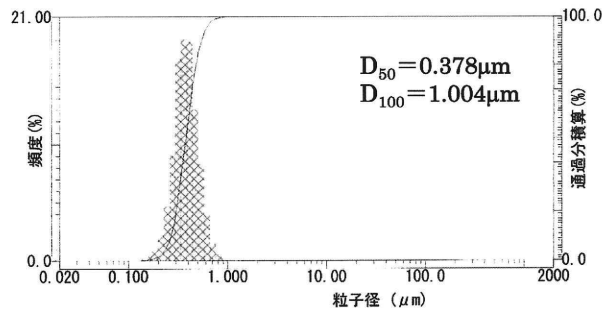


図3-A NS剤(A液)の粒度分布測定結果

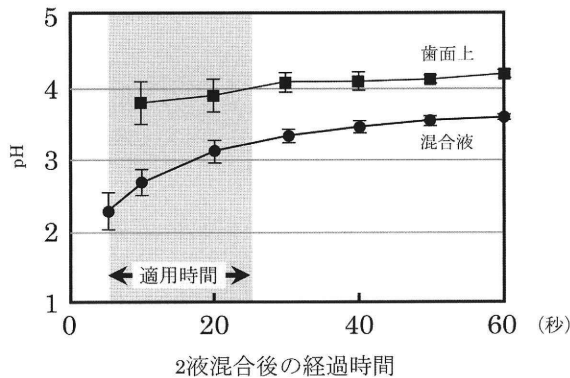


図3-B NS剤の混合時および塗布後のpH変化

値の上昇を認め, 72時間後には, 総脱灰容積であるΔQは約2倍の値を示していた。APFゲル, APF液群は, 脱灰抑制の傾向がみられたが, いずれも60時間を超える脱灰処置で, 塗布前の値を上回っていた。NS剤群では, 塗布直後より, 明らかなWS, ΔF, ΔQ値の減少がみられ, 72時間脱灰後も人工的初期齲蝕作製時より, 低い値を維持していることが確認された。

2) FE-SEMによる表面観察

人工的初期齲蝕試料への各薬剤塗布後および72時間脱灰後のFE-SEM像を図7に示す。コントロール群では, 人工的初期齲蝕作製時の脱灰処理により, 全面に明らかなエナメル小柱構造の露出が観察された(図7A)。これに対し, APFゲル, APF液, NS剤を塗布すると, 露出したエナメル小柱構造が消失している像が観察された(図7C, E, G)。

これらを72時間脱灰液に浸漬すると, コントロール群では, 全体的に表面の粗雑化が起っていた(図7B)。また, APFゲルおよびAPF液群でも, 一部の表面が長時間の脱灰により, 粗雑化している像がみられた(図7D, F)。これに対して, NS剤群では, 脱灰処理後もエナメル質表面が滑らかに維持されていた(図7H)。

3. 健全エナメル質での耐酸性能の比較結果

1) QLFによる解析

健全エナメル質に対するWS, ΔF, ΔQの測定値を表2に示す。APFゲル, APF液, NS剤群では, 塗布後, どれもΔF値が減少していた。その後, 72時間脱灰液に浸漬したところ, コントロール群と比べて, ΔF, ΔQともに小さい値を示すが, 有意差は認められなかった。

表1 人工的初期齲蝕試料の脱灰液浸漬後の経時的なQLF測定値

(n=5)

QLFデータ	実験群	塗布前	経過時間							
			塗布後	12時間脱灰後	24時間脱灰後	36時間脱灰後	48時間脱灰後	60時間脱灰後	72時間脱灰後	
WS	コントロール群	2.99±1.02	2.99±1.02	2.97±1.12	3.35±0.87	3.67±0.90	3.80±1.02	3.84±1.03	3.88±1.15	
	NS剤群	2.65±0.64	0.13±0.18	*0.23±0.22	*0.56±0.43	*0.70±0.51	*1.13±0.61	*1.52±0.84	*1.63±0.86	
	APFゲル群	3.20±0.46	3.18±0.59	2.83±0.83	3.03±0.60	3.07±0.60	3.24±0.60	3.33±0.62	3.33±0.63	
	APF液群	2.77±0.86	2.69±0.88	2.42±0.95	2.43±0.91	2.61±0.85	2.74±0.83	2.84±0.86	2.95±0.85	
ΔF	コントロール群	-13.68±5.15	-13.68±5.15	-13.89±4.94	-15.61±6.34	-16.64±6.28	-17.34±6.21	-17.80±5.71	-17.96±4.87	
	NS剤群	-12.18±1.76	-5.22±3.00	*-6.64±0.58	*-7.10±0.89	*-7.34±0.81	*-8.18±1.05	*-9.35±1.22	*-9.66±1.27	
	APFゲル群	-14.14±3.46	-14.52±5.12	-11.04±2.89	-12.12±3.67	-12.47±3.55	-13.11±3.86	-13.81±3.67	-13.92±3.04	
	APF液群	-13.74±1.47	-13.38±1.64	-11.36±1.99	-11.85±2.26	-12.21±2.19	-13.26±1.66	-13.84±2.00	-15.18±1.94	
ΔQ	コントロール群	-44.72±29.62	-44.72±29.62	-45.34±30.06	-56.46±35.48	-64.12±35.28	-69.34±36.40	-71.68±35.48	-73.04±34.86	
	NS剤群	-32.42±9.55	-0.92±1.37	*-1.66±1.65	*-4.20±3.30	*-5.34±3.90	*-9.41±5.18	*-14.45±8.13	*-16.08±9.16	
	APFゲル群	-46.00±17.79	-48.3±26.30	-32.84±17.63	-38.30±18.99	-39.68±18.79	-44.08±20.97	-47.68±21.19	-47.66±18.36	
	APF液群	-38.06±12.67	-36.00±13.25	-28.28±14.33	-29.22±14.27	-31.94±13.42	-36.20±12.46	-39.06±13.27	-43.90±12.06	

*P<0.05

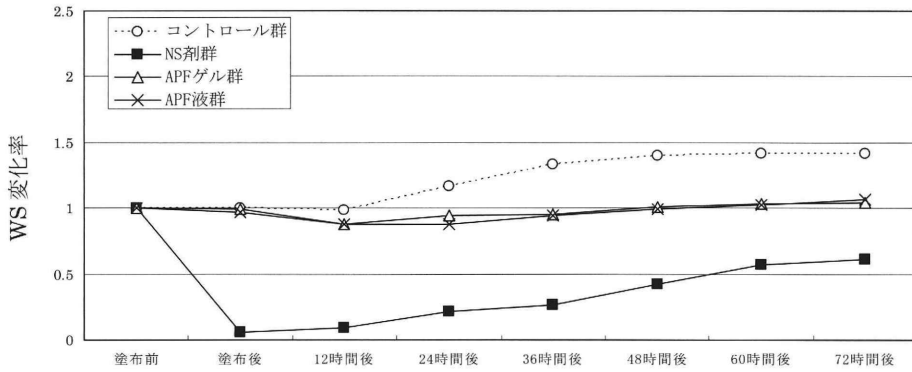


図 4 人工的初期齲蝕試料における WS 値の変化率

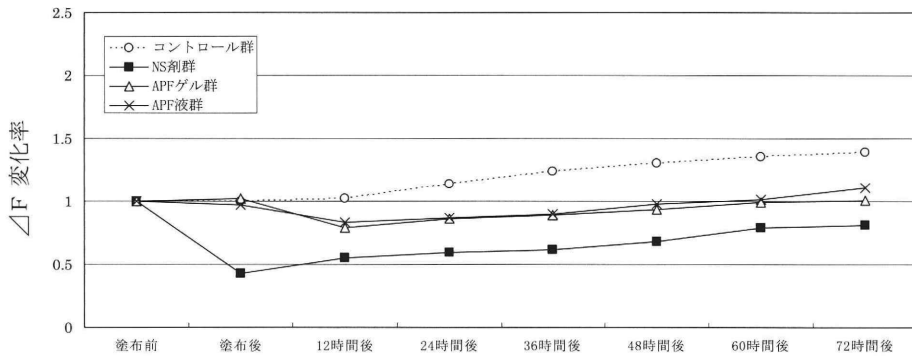


図 5 人工的初期齲蝕試料における ΔF 値の変化率

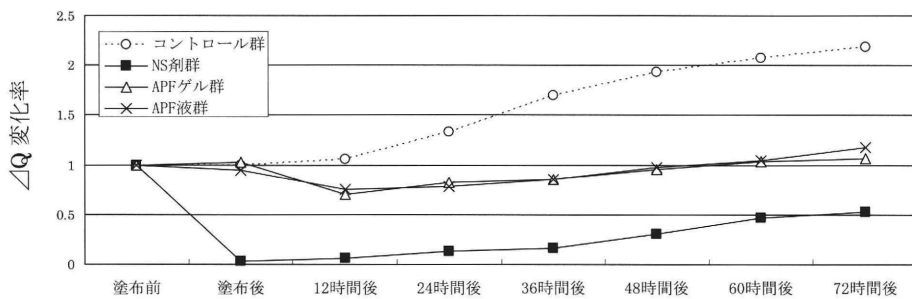


図 6 人工的初期齲蝕試料における ΔQ 値の変化率

しかしながら、塗布・脱灰の2サイクル目以降から、NS 剤群に限りコントロール群と比較して、WS、ΔF、ΔQ に有意差が認められた。

そこで、各薬剤塗布群の耐酸性を比較検討するために、特に変動がみられたΔF に対して、薬剤塗布前の値を基準とした変化率を求め、脱灰液浸漬後の経時の変化を観察した (図 9)。

1 サイクルの塗布・脱灰後、各薬剤塗布群は ΔF 値が上昇はするものの、コントロール群と比べるとその値は

小さく、3 群とも類似した値を示していた。2 サイクル以降、コントロール群、APF ゲル群および APF 液群は、脱灰環境において、ΔF 値はわずかな上昇しかみられなかった。一方、2 サイクル以降、NS 剤群は、塗布後に、ΔF 値の減少が著しく認められ、その後の脱灰液浸漬でわずかに上昇するものの、3 サイクル目に再度 NS 剤を塗布することで、再び ΔF 値は減少していた。

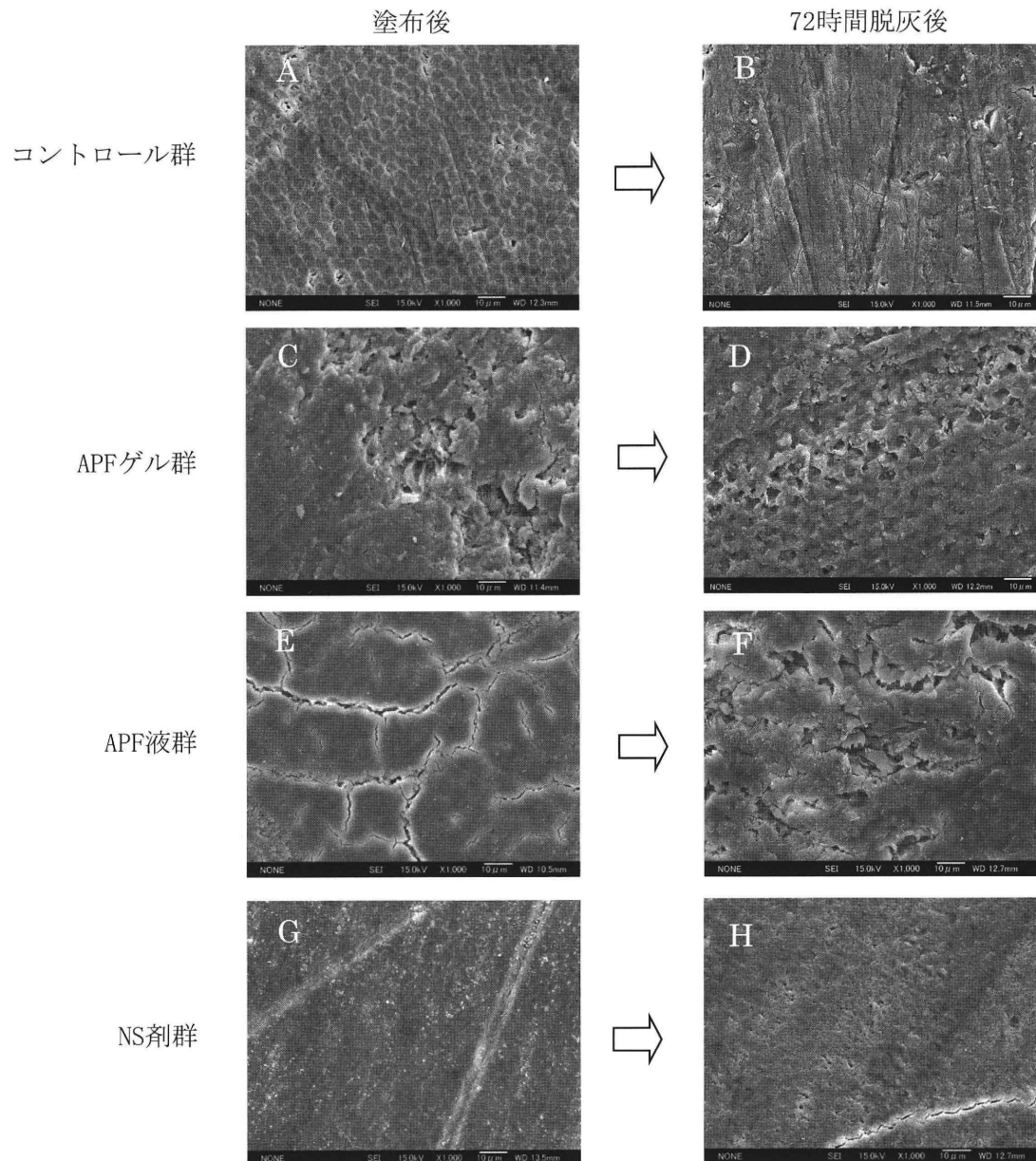


図7 人工的初期齲蝕試料を用いた各実験群のFE-SEM像(×1000)
人工的初期齲蝕試料群でのエナメル質表面をFE-SEMで観察した。

- A: 全体的にエナメル質小柱構造の露出が確認できた。
- B: 脱灰により、全体的に粗雑化が進んでいた。
- C: APFゲル塗布により、エナメル小柱構造が消失していた。
- D: 脱灰を受けて一部粗雑化していた。
- E: APF液塗布により、エナメル小柱構造が消失していた。
- F: 脱灰を受けて一部粗雑化していた。
- G: エナメル質小柱構造がナノ粒子析出物で覆われていた。
- H: B, D, Fと比較し、表面は滑らかに維持されていた。

表 2 エナメル質試料の脱灰液浸漬後の経時的な QLF 測定値

(n=5)

QLFデータ	実験群	経過時間							
		塗布前	1 サイクル		2 サイクル		3 サイクル		
			塗布後	72時間脱灰後	塗布後	72時間脱灰後	塗布後	72時間脱灰後	
WS	コントロール群	0.00±0.00	0.00±0.00	3.77±1.35	3.77±1.35	3.86±1.38	3.86±1.38	4.00±1.43	
	NS剤群	0.01±0.01	0.00±0.01	2.64±0.84	1.13±0.35	2.36±0.66	1.85±0.58	2.51±0.89	
	APFゲル群	0.01±0.03	0.01±0.02	4.12±0.80	4.03±0.73	4.10±0.74	4.19±0.85	4.37±0.90	
	APF液群	0.00±0.01	0.00±0.00	3.21±0.69	3.21±0.71	3.26±0.71	3.28±0.73	3.33±0.72	
ΔF	コントロール群	-5.97±0.40	-5.97±0.40	-21.86±3.45	-21.86±3.45	-22.28±2.83	-22.28±2.83	-23.40±2.69	
	NS剤群	-6.85±1.00	-3.50±3.19	-17.62±4.99	-10.68±0.53	-10.69±0.63	-9.33±0.96	-10.44±1.16	
	APFゲル群	-6.52±0.23	-6.17±0.28	-18.66±5.26	-19.24±5.22	-20.92±4.87	-20.70±3.72	-21.80±3.12	
	APF液群	-7.00±1.55	-5.09±2.90	-18.06±1.17	-19.74±1.58	-19.74±1.74	-20.58±1.04	-20.86±1.53	
ΔQ	コントロール群	-0.01±0.01	-0.01±0.01	-84.22±38.24	-84.22±38.24	-87.28±37.77	-87.28±37.77	-94.18±37.81	
	NS剤群	-0.06±0.07	-0.02±0.02	-47.24±18.57	-12.13±3.93	-25.16±6.83	-16.98±4.86	-26.06±9.07	
	APFゲル群	-0.09±0.16	-0.05±0.10	-74.74±14.77	-75.50±14.12	-84.18±15.94	-85.80±21.40	-94.44±20.77	
	APF液群	-0.04±0.05	-0.02±0.02	-57.94±12.35	-58.18±11.69	-64.24±14.91	-67.56±15.77	-69.52±16.38	

*P<0.05

2) FE-SEM による表面観察 (図 8, 9)

①健全エナメル質へ応用した場合の耐酸性能の比較

薬剤塗布後および72時間脱灰後の試料表面のFE-SEM観察を行った(図8)。脱灰処理前のコントロール群(図8A)と比較し、APFゲル、APF液、NS剤塗布群では、いずれも塗布による研磨痕が消失し、エナメル質表層が覆われている像が確認できた(図8C, E, G)。

72時間の脱灰処理後は、コントロール群においては、表層が粗雑化しエナメル小柱構造の露出が全体的に観察された。また、APFゲル群およびAPF液群でも、一部ではあるが、エナメル小柱構造の露出を認めた(図8D, F)。これに対して、NS剤群では、脱灰処理後も他群とは異なり、スムーズな表面が維持されていた(図8H)。

②塗布・脱灰を繰り返した場合の耐酸性能の比較

各薬剤を塗布、72時間の脱灰処理を3サイクル繰り返した後の表面のFE-SEM観察結果を図9に示す。コントロール群は、72時間の脱灰処理を合計3回行ったことにより、表面は非常に粗雑な状態を示していた(図9A)。APFゲル群、APF液群では、局所的に、エナメル小柱構造の露出を認めた(図9B, C)。一方、NS剤群は非常に滑らかな表面(図9D)を示していた。

考 察

1. NS 剤について

NS剤は2液からなる製剤で、A液はカルシウムフルオロアルミノシリケートガラスの分散液、B液はリン酸溶液で構成される。NS剤は歯面塗布直前に両液を混合して使用するが、両液の混合液のpHは混合から60秒

の間に2付近から4付近まで徐々に上昇していく。すなわちNS剤は、分散液の形態をしてはいるものの、基本的にはシリケートガラスとリン酸の混合により得られるシリケートセメントの一種であり、両液を混合することでガラスとリン酸の酸塩基反応が起こる。つまり、NS剤はガラスがリン酸の酸を消費する形で反応が進み、その結果混合液のpHが上昇する。

一方、NS剤を歯面に塗布すると、本実験で示したように、塗布とほぼ同時に歯面上のpHが4付近まで上昇していた。このことは、NS剤を混合塗布すると、未反応のリン酸により、塗布された歯面が一時的に脱灰を起こすことを示している。この作用により、歯面上に生成された析出物は、FE-SEMによる観察により、0.1~0.5μm程度の粒子であることが確認された。この粒子の大きさはNS剤のA液の粒度分布の測定結果と近似していることから、歯質の成分を取り込んだ形でNS剤の反応生成物が歯面上に生成され、歯面を一体化するように覆っていると考えられる。

また、NS剤は歯面塗布後、時間が経過してもpH4を示していた。しかし、実際の口腔内では、塗布後の水洗および唾液による緩衝作用により混合液による歯面脱灰は、長時間行われないと考えられる。

次に、色調であるが、NS剤は白色の懸濁液である。歯面に塗布しても色調に変化を及ぼさないため、審美性に優れている。また流動性の高い液状であるため、形態的な変化を伴わないことからすべての歯種・歯面への塗布が期待できると考えている。

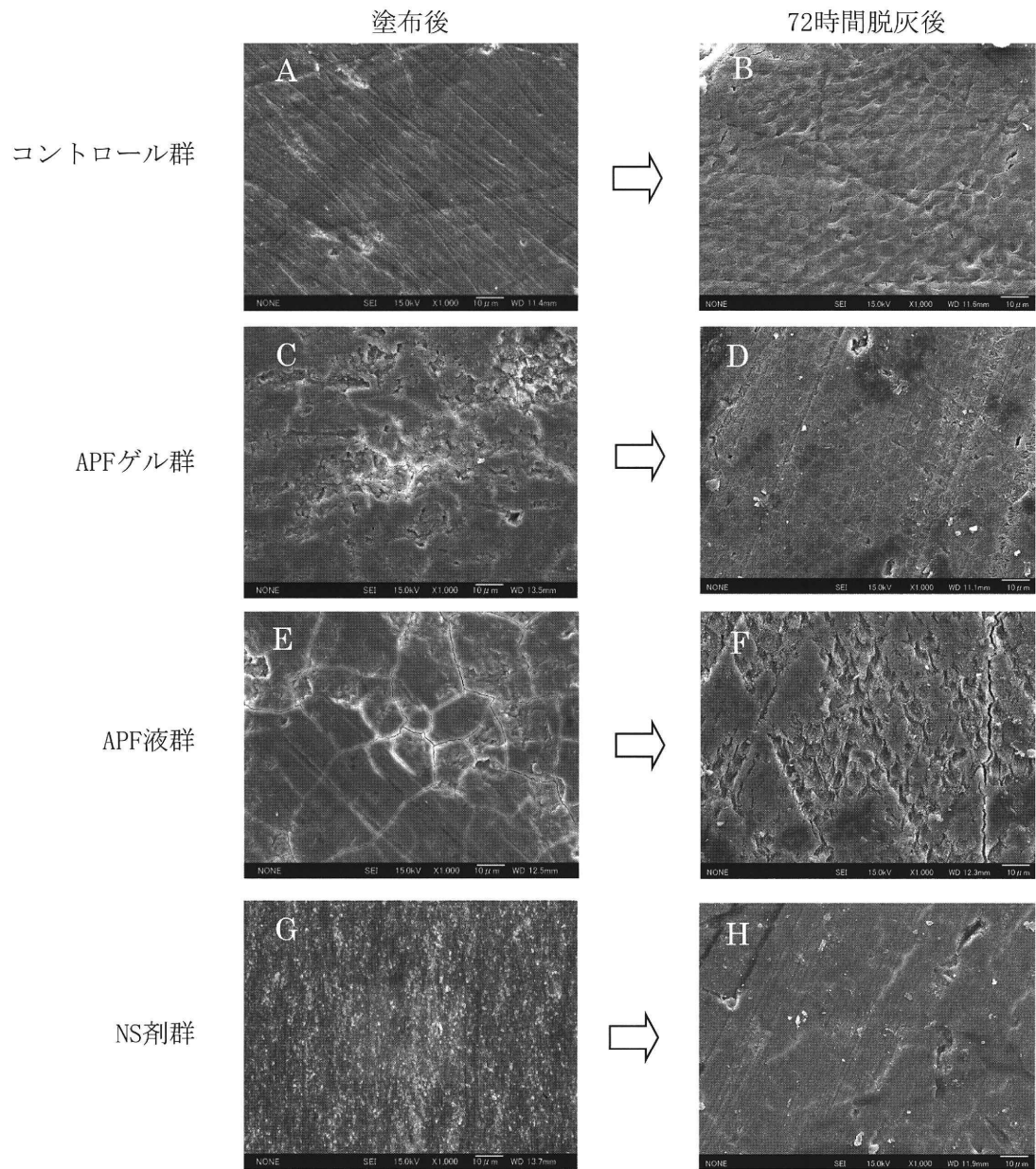


図 8 エナメル質試料を用いた各実験群の FE-SEM 像 (×1000)
 各歯面処理後のエナメル質表面を FE-SEM で観察した。
 A: 研磨跡と思われる方向性のある線状構造がみられた。
 B: 全体的にエナメル質小柱の間質に一部脱灰がみられた。
 C: APF ゲル塗布により、研磨痕が消失していた。
 D: エナメル質小柱構造の間質に一部脱灰がみられた。
 E: APF 液塗布により、研磨痕が消失していた。
 F: エナメル質小柱構造の間質に一部脱灰がみられた。
 G: 研磨痕が消失し、ナノ粒子析出物で覆われていた。
 H: B, D, F と比較し、表面は滑らかに維持されていた。

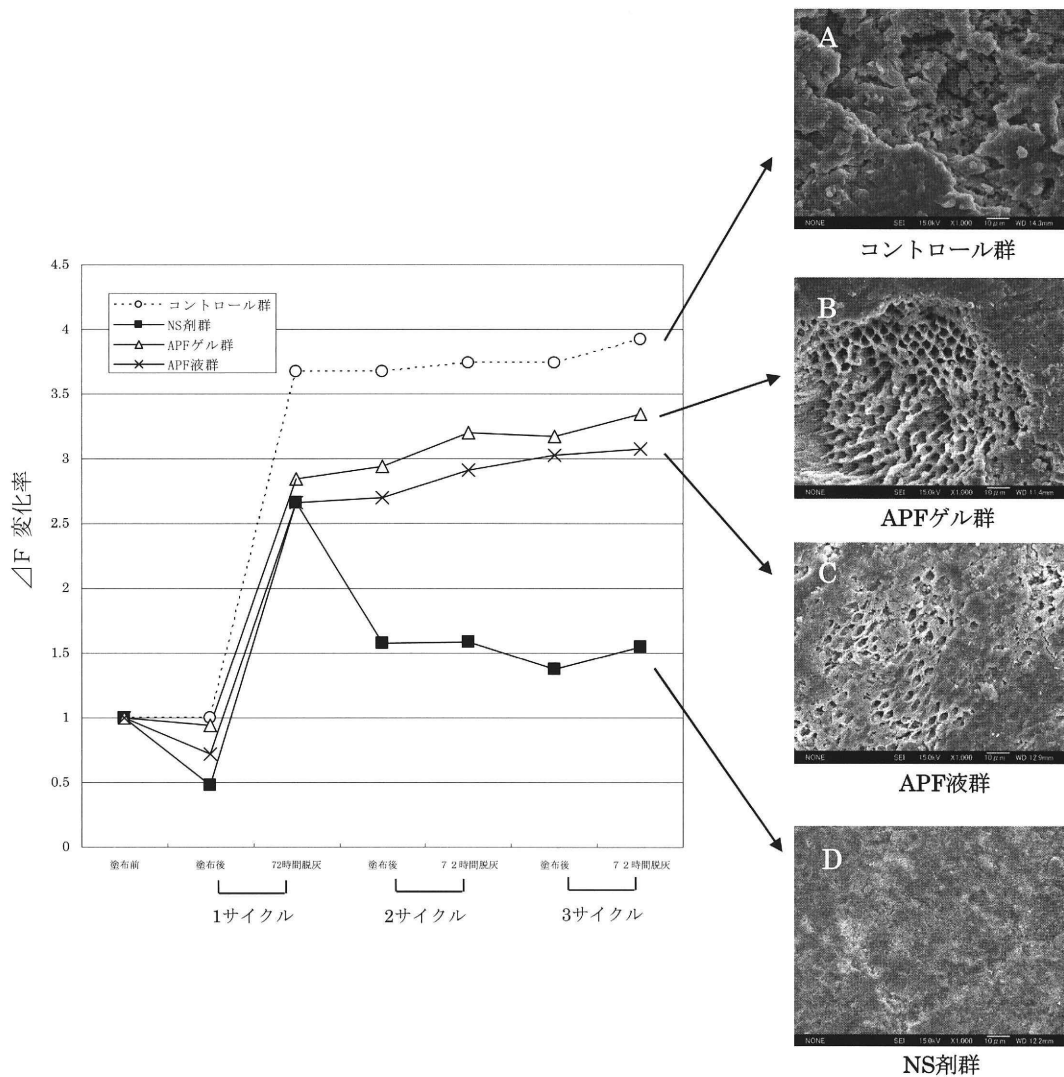


図9 エナメル質試料を用いたΔF値の変化率および塗布・脱灰3サイクル目におけるFE-SEM像(×1000)塗布・脱灰3サイクル後のエナメル質表面をFE-SEMで観察した。
 A: 表面は非常に粗雑な状態を示していた。
 B: 局所的にエナメル質小柱構造の露出がみられた。
 C: 比較的広範囲にエナメル質小柱構造の露出がみられた。
 D: A, B, Cと比較し、表面は滑らかに維持されていた。

2. 耐酸性試験について

本研究では、より臨床的な環境下でNS剤の耐酸性性能を観察するために、ヒト歯を用いて実験を行った¹⁸⁾。ヒト歯の使用については、それぞれの歯の抜去前の口腔内環境が異なるため、個体差が大きく影響するという報告もある^{19, 20)}。従って、本研究では、それぞれの歯の表層を研磨除去、さらに同一歯の同一面を分割し個体内に各実験群を設定し、個体差ができるだけ影響しない条件下で比較することとした^{15, 17, 18)}。

耐酸性試験においては、定量的な解析として、QLF測定法を、また脱灰処理を行った際のエナメル質表層をFE-SEMを用いて観察した。QLFはエナメル象牙境付近に多く存在するといわれる蛍光物質を利用し、歯に励起光を照射して得られる自家蛍光のうち、健全部と脱灰部の蛍光強度差をもとに脱灰部を検出し、脱灰程度を定量的に分析する方法である^{21~24)}。QLFでは歯に損傷を与えることなく、脱灰、再石灰化の観察を行うことができる^{25~30)}。従って、本研究のように脱灰処理後に試験体を

計測し、経時的な変化を比較する上で最適な研究方法と考えられた。

1) 人工的初期齲蝕に対する耐酸性効果について

初期齲蝕は、プラークコントロールが困難な部位に特徴的に好発する脱灰現象であり、口腔内の状況に応じて、再石灰化(回復)・停滞・脱灰(悪化)を複雑に繰り返す^{31~33)}。つまり、初期齲蝕部では、唾液由来のリン酸イオンやカルシウムイオンなどの無機成分が沈着することで表層に過石灰化層が形成され、病態部の再石灰化に必要なミネラルが沈着しない。そのため、さらに表層下脱灰が起こる場合があると考えられている^{34,35)}。しかしフッ化物を応用すると、歯質は耐酸性を獲得し、脱灰や再石灰化といった変化を伴わない停止性の齲蝕となることが報告されている³⁶⁾。一方で、初期齲蝕部位は、機械的刺激に極めて弱く、停止性の齲蝕を維持することは困難であるとの報告もある^{37,38)}。

今回の実験において、人工的初期齲蝕作製時の WS・ Δ F・ Δ Q の値と比較して、NS 剤、APF 剤いずれも脱灰処理後、耐酸性を示していた。しかし、APF ゲル、APF 液群は、60 時間を超える脱灰処置で開始時の値を上回り、再び脱灰が起こり始めることがわかった。本研究で比較対照となった APF 剤については、十分な耐酸性を得るには頻回に应用することが必要とされている。今回の解析では、1 度の塗布のみであったため、APF 剤塗布の効果を得るのに不十分であったと考えられる。これに対し、NS 群はコントロール群と比較して塗布直後から有意に脱灰を抑制しており、72 時間脱灰液に浸漬しても耐酸性能が維持されていた。これは、FE-SEM で観察されたように、NS 剤を塗布することにより歯面上に析出されたカルシウムフルオロアルミノシリケート粒子が、脱灰後も維持されていたためと考えられる。

以上のことより、NS 剤は人工的初期齲蝕において、1 回の塗布で長時間、耐酸性効果を持続することが可能であることが示唆された。

2) 健全エナメル質に対する検討

健全エナメル質に対して APF ゲル、APF 液および NS 剤を塗布したところ、QLF 値、FE-SEM 像ともにその効果を認めた。その後、72 時間脱灰液に浸漬したところ、コントロール群と比較して、薬剤塗布群はいずれも同程度の脱灰抑制効果を認めた。

次に、より臨床に近い薬剤塗布状態を再現するために、塗布と脱灰を繰り返し行い、その変化を観察した。

コントロール群は 72 時間の脱灰を 3 サイクル行ったところ、表層の粗雑化が進行している像が FE-SEM により観察された。これに対し、QLF の実測値の変化は 1

サイクル以降、大きく認められなくなった。これは QLF の特性上、歯面に残存した齲蝕病変の光散乱により減衰した蛍光を検出して定量するものであるため、すでに溶解してしまった歯質が測定されず、QLF の実測値がリミットに達したものと考えられる。APF ゲル群、APF 液群の両群とも 3 サイクル後の FE-SEM での観察を行ったところ、部分的なエナメル小柱の露出や表層の粗雑化がみられた。これは、塗布後に水洗を行ったことで、APF 塗布によって生成されたフッ化カルシウムが水に溶出してしまった影響を受けたと考えられる。しかし、QLF の実測値が 1 サイクル以降、大きな変化を示さず、コントロール群と比較して明らかに脱灰抑制が行われていたことから、引き続き脱灰環境において、APF 製剤を定期的に塗布したことで歯面が耐酸性を獲得したと考えられる。

これに対し、NS 剤群は、特に、2 サイクル目の塗布以降、WS、 Δ F、 Δ Q 値の顕著な減少がみられ、この状態は、一度脱灰処理を行った人工的初期齲蝕表面に NS 剤を作用させた場合と類似していた。この値の減少は、再度脱灰液に浸漬しても、脱灰を抑制しており、3 サイクル後もこの状態を維持していた。これは、FE-SEM で観察されたナノ粒子析出物が、NS 剤塗布を繰り返すことで、過酷な脱灰状態でも維持されるためと考えられる。よって NS 剤は、脱灰表面を強固に被覆し、また繰り返し塗布することで、さらに耐酸性の向上が得られることが示唆された。

なお、塗布前の脱灰処理の有無の違いにより、人工的初期齲蝕と健全エナメル質の NS 剤の効果と比較することは難しいが、健全エナメル質における 1 サイクル後の脱灰抑制傾向は、人工的初期齲蝕に対する効果ほど顕著ではなかった。しかし、NS 剤は、健全エナメル質においても、1 回の塗布で APF 製剤と同等の効果が得られ、また数回塗布を続けることで、さらなる脱灰抑制が確認できたことから、齲蝕リスクの高い部位に対して、耐酸性を付与するのに有用であると考えられた。

今回の解析によって、NS 剤は齲蝕予防、初期齲蝕進行抑制剤として有用性の高い塗布材であることが示された。今後は、臨床で口腔内に応用し、脱灰抑制と齲蝕予防効果についてさらなる検討が望まれる。

まとめ

今回、我々が開発を行った NS 剤について、エナメル質塗布における耐酸性効果を明らかにするため、QLF と FE-SEM を用いた解析を行った。その結果、健全エナメル質および人工的初期齲蝕表面において、NS 剤の

ナノ粒子析出物は、緊密にエナメル質を被覆し、過酷な条件下での脱灰処置においても優れた耐酸性の向上を示したことから、NS 剤は、簡便な操作で全歯面に応用できる新たな齲蝕予防剤となる可能性が示唆された。

本研究をまとめるにあたり、ご指導頂いた福岡歯科大学成長発達歯学講座成育小児歯科学分野 尾崎正雄教授、本川 渉名譽教授ならびに教室員の皆様に心から感謝致します。さらに、資料提供と本研究にご協力頂いた日本歯科薬品株式会社 常川勝由博士、横田兼欣氏に深謝致します。

文 献

- 1) 北迫勇一：各種飲食物の酸性度と酸蝕歯の関係，日本歯科医師会雑誌，63：925-935，2010。
- 2) 北迫勇一：臨床に活かす！ 酸蝕歯の病態・ケア・食生活，デンタルハイジーン，32：1157-1159，2012。
- 3) 前田隆秀ほか：小児の口腔科学第3版，株式会社 学健書院，東京，2013，pp.157-194。
- 4) Newburn E, Brudevold Finn：Discovery of Acidulated Phosphate Fluoride in Caries Prevention, J Dent Res, 90：977-980，2011。
- 5) Featherstone JDB, Cutress TW, Rodgers BE and Dennison PJ：Remineralization of artificial caries-like lesions in vitro by a self-administered mouthrinse or paste, Caries Res, 16：235-242，1982。
- 6) Caslacska V, Moreno EC and Brudevold F：Determination of the calcium fluoride solutions, Archs Oral Biol, 20：333-339，1975。
- 7) Leach SA：Reactions of fluoride with powdered enamel and dentin, Brit Dent J, 106：133-142，1959。
- 8) 飯島洋一，熊谷 崇：カリエスコントロール 脱灰と再石灰化のメカニズム，医歯薬出版，東京，1999，pp.60-63。
- 9) 日本口腔衛生学会・フッ化物応用研究委員会：フッ化物応用と健康－う蝕予防効果と安全性－，第1版，口腔保健協会，東京，1998，pp.97-105。
- 10) 星野倫範，藤原 卓，新谷誠康：齲蝕基礎・齲蝕予防，高木雄三ほか編，小児歯科学 第4版，医歯薬出版，東京，2011，pp.153-178。
- 11) 北原 稔：フッ化ジアンミン銀溶液塗布による乳白歯隣接面う蝕予防効果に関する研究，口腔衛生会誌，46：80-94，1996。
- 12) 鈴木俊行：フッ化ジアンミン銀の局所塗布による白歯のう蝕予防効果について，小児歯誌，11：33-54，1973。
- 13) 堤 修朗：フッ化ジアンミン銀塗布による健全および白斑エナメル質への影響，小児歯，19：507-522，1981。
- 14) 韓臨麟，石崎裕子，福島正義，興地隆史：試作フッ化物含有歯面コート材に関する研究－エナメル質，象牙質の表面性状に与える影響について－；日歯保存誌，55，53-59，2012。
- 15) 何 陽介，岡本佳三，馬場篤子，本川 渉，宮崎光治：酸性フッ素リン酸溶液の性状とエナメル質の耐酸性の向上に関する検討，小児歯誌，45：65-73，2007。
- 16) Wang XY, Miyazaki K and Motokawa W：Relationship between the fluoride concentration of the fluoridizing elasmomers and the acquired acid resistance of human enamel in vitro, Dent Mater J, 22：180-190，2003。
- 17) 何 陽介，本川 渉，宮崎光治：エナメル質初期齲蝕の再石灰化と酸性フッ素リン酸溶液の pH との関係について，小児歯誌，44：385-395，2006。
- 18) 高島隆太郎，川崎弘二，上村産生，酒井怜子，川上富清，小室 崇，西島典幸，田治米元信，多名部実，小室美樹，神原正樹：エナメル質人工初期齲蝕試料の再石灰化における QLF 観察，口腔衛生会誌，55：41-49，2005。
- 19) 掛川達彦，大橋英夫，林 恒彦，黒下礼奈，高橋昌司，鈴木 昭，稲葉大輔，渡部 茂：光誘導蛍光定量法を用いたフッ化物によるエナメル質再石灰化の評価，小児歯誌，46：609-616，2008。
- 20) 川上富清，川崎弘二，神原正樹：光誘導傾向定量法より観察した in vitro におけるエナメル質再石灰化に及ぼす各種フッ化物応用の影響，歯科医，62：87-92，2006。
- 21) 神原正樹：予防歯科へのテクノロジー－齲蝕予防における早期齲蝕診断－，日歯医師会誌，56：611-618，2003。
- 22) 南 真紀，渡部 茂：小児歯科臨床における QLF（光誘導蛍光定量）法の有用性の検討について，小児歯臨，11：55-66，2006。
- 23) Sofia Tranæus, Xie-Qi Shi, Lars-Erik Lindgren, Karin Troll-så, Biright Angmar-Månsson：In vivo Repeatability and Reproducibility of the Quantitative Lighe-Induced Florescence Method, Caries Res, 36：3-9，2001。
- 24) 河村泰治，土居貴志，神原正樹：乳歯初期う蝕活動性評価への QLF の応用，歯科医，72：85-93，2009。
- 25) KAWASAKI Koji, SAKAKI Reiko, Yong-Duk PARK and KAMBARA Masaki：Effect of Fluoride Application on Remineralization of Bovine Tooth Enamel Using QLF in Vitro, J Dent Health, 58：482-489，2008。
- 26) Gmüer R, Giertsen E, van der Veev MH, de Josselin de Jong E, ten Cate JM, Guggenheim B：In vitro quantitative light-induced fluorescence to measure changes in enamel mineralization, Clin Oral Investig, 10：187-195，2006。
- 27) KAWASAKI A, SUGE T, ISHIKAWA K, OZAKI K, MATUO T, EBISU S：Ammonium hexafluorosilicate increased acid resistance of bovine enamel and dentin, JOURNAL OF MATERIALS SCIENCE, 16：461-466，2005。
- 28) 大塚秀人，三宅達郎，神原正樹：In vivo における QLF による早期う蝕診断に関する研究－初期う蝕病巣の1年間の追跡結果について－，歯科医，67：266-273，2004。
- 29) NAKATA Keiko, NIKAIIDO Toru, IKEDA Masaomi, Richard M, FOXTON and TAGAMI Junji：Relationship between fluorescence loss of QLF and depth of demineralization in an enamel erosion model, Dental Materials Journal, 28：523-529，2009。
- 30) J. M. ten Cate, P. P. E. Duijsters.：Alternating Demineralization and Remineralization Artificial Enamel Lesions, Caries Res, 16：201-210，1982。
- 31) 日本口腔衛生学会・フッ素研究部会：口腔保健のためのフッ化物応用ガイドブック，第1版，口腔保健協会，東京，1996，pp.96-100。
- 32) 田治米元信，川崎弘二，神原正樹：In vitro におけるエナメル質の脱灰に及ぼす糖タンパクおよびフッ化物応用の影響，口腔衛生会誌，57：126-135，2007。
- 33) Van Rijkom HM, Truin GJ, van't Hof MA：A meta-analysis of clinical studies on the caries-inhibiting effect of fluoride gel treatment, Caries Res, 32：83-92，1998。

- 34) 熊谷 崇：カリオロジーにおけるフッ化物の役割, DENTAL DIAMOND, 25 : 28-37, 2000.
- 35) Arends J, Christoffersen J: The nature of early caries lesions in enamel, J Dent Res, 65 : 2-11, 1986.
- 36) 飯島洋一：フッ化物についてよく知ろうーう蝕予防の知識と実践ー, 株式会社デンタルダイヤモンド社, 東京, 2010, pp.56-104.
- 37) 鈴木 一, 上村参生, 神原正樹：高濃度フッ化物の初期う蝕表層に及ぼす影響について, 歯科医, 63 : 275-286, 2000.
- 38) 日本口腔衛生学会フッ素研究部会編：フッ化物局所応用に関するガイドブック, 初版, 口腔保健協会, 東京, 1985, pp.23-38.

Acid Protective Effects of Nano Seal on Human Enamel

Haruko Kashiwamura

*Division of Pediatric Dentistry, Department of Oral Growth
and Development, Fukuoka Dental University
(Director : Prof. Masao Ozaki)*

We manufactured a product termed Nano Seal, which consists of nano-sized particles of fluoroaluminosilicate glass dispersed in an aqueous solution as well as a phosphoric acid aqueous solution. The purpose of this study was to examine the acid protective effects of Nano Seal in comparison with APF using human teeth. Quantitative optical induction fluorescence (QLF) and field emission scanning electron microscopy (FE-SEM) were used to examine artificially decalcified and sound human enamel. The following results were obtained.

1. FE-SEM observations of artificially decalcified enamel with incipient dental caries revealed decalcification in progress on the partial enamel surface as compared with immediately after application of the acid solution, as well as after 72 hours of decalcification in both the APF gel and APF liquid groups. On the other hand, the enamel surface was largely unchanged between before and after decalcification treatment when treated with Nano Seal.
2. FE-SEM observation of decalcification showed that nano particles deposited on sound enamel surfaces by application of Nano Seal tightly covered the enamel within 72 hours.
3. QLF evaluations of the acid protective effects of Nano Seal showed significantly greater acid resistance with both artificially decalcified enamel and sound enamel as compared to the control group.
4. The acid protective effects of Nano Seal remained stable with repeated applications and decalcification procedures.

Our results indicate that Nano Seal is a novel material for effective prevention of dental caries.

Key words : Nano Seal, Acid protective, Dental caries prevention, QLF, FE-SEM