

## ナノ粒子化アパタイトとリン酸化オリゴ糖カルシウムによる再結晶化 Recrystallization Effect by POs-Ca and Nanoparticle Hydroxyapatite

田中 智子<sup>a</sup>, 石塚 紗和子<sup>a</sup>, 滝井 寛<sup>a</sup>, 釜阪 寛<sup>a</sup>,  
太田 昇<sup>b</sup>, 松尾 龍人<sup>b</sup>, 八木 直人<sup>b</sup>, 米谷 俊<sup>a</sup>

Tomoko Tanaka<sup>a</sup>, Sawako Ishiduka<sup>a</sup>, Hiroshi Takii<sup>a</sup>, Hiroshi Kamasaka<sup>a</sup>,  
Noboru Ohta<sup>b</sup>, Tatsuhito Matsuo<sup>b</sup>, Naoto Yagi<sup>b</sup>, Takashi Kometani<sup>a</sup>

<sup>a</sup>江崎グリコ(株)健康科学研究所, <sup>b</sup>(財)高輝度光科学研究センター

<sup>a</sup>Health Science Laboratory, Ezaki Glico Co.,Ltd, <sup>b</sup>The Japan Synchrotron Radiation Research Institute

従来、リン酸化オリゴ糖カルシウム(POs-Ca)には初期う蝕の再石灰化効果が知られている。また最近の研究から、その再石灰化部位は hidroキシアパタイトとして結晶化していることを、X線マイクロビームを用いて高角 X 線回折解析で確認された。本研究では POs-Ca にナノ粒子化 hidroキシアパタイトを加えることで初期う蝕を処理した場合、従来の効果より高い再結晶化が望めるかどうかの検討を行った。結果、POs-Ca 単独よりも優れた再結晶化効果が観られた。

**キーワード:** 広角 X 線回折、リン酸化オリゴ糖カルシウム、ナノ粒子化 hidroキシアパタイト、初期う蝕

### 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; リン酸化オリゴ糖カルシウム(POs-Ca)の調製に成功した[1]。糖化産業において、リン酸化オリゴ糖は未利用画分として廃棄されてきたことから、POs-Ca はバイオマスの有効利用という側面を有している。この POs-Ca の効果は、カルシウムイオンをオリゴ糖が持つリン酸基で安定化することで、他のカルシウム素材に比べて高いカルシウムの水溶性を実現している。それゆえ、POs-Ca は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る。これまで、POs-Ca については初期う蝕(エナメル質表面に実質的欠損がなく、表層下からミネラルが溶出してミネラル濃度が疎になっている状態)の再石灰化効果が高いことを国際的な標準解析法の一つである Transverse microradiography (TMR)法を用いて実証してきた[2][3]。しかし TMR 法では初期う蝕の起こるエナメル質部分のミネラルの含有変化率としてしか捉えることができないため、回復したミネラルが hidroキシアパタイトの結晶としてどのように回復しているか定量的かつ定性的に捉えることができなかった。本効果を明かにすることは国民の歯の健康維持増進に貢献できる基盤技術開発に繋がるものである。

そこで、我々は X 線回折法を用いて、TMR 測定で用いた人工的に脱灰状態を作り出した歯片(150 μm 厚)のエナメル質中の微小領域の hidroキシアパタイト結晶変化を定量化することを試みた。表層下約 200 μm の範囲での結晶変化を細かく捉えられるような X 線を用いた解析方法は、歯科においてはこれまで例がなかった。高分解能で結晶化量のプロファイルを算出するためには、短時間で 1 区画ごとの測定を行う必要があるため、SPring-8 の高輝度で極小に絞り込んだマイクロビームが必要であった。そこで 2007 年度の SPring-8 の課題において、6 μm に絞ったマイクロビームを用いた広角 X 線回折法および小角 X 線散乱法を同時測定できる BL40XU を用いて解析する方法を確立し[4]、その結果歯片の再石灰化部分が、健康な歯と同様の hidroキシアパタイト結晶として復元していることを初めて明らかにした[5]。また、小角散乱法により、脱灰患部は hidroキシアパタイト結晶単位でナノサイズの空隙が生じていることも解った[5]。

本研究課題では、新たに従来よりも優れた再石灰化を示した POs-Ca とナノ粒子化 hidroキシアパタイトを含む組成の溶液の処理により、再結晶化がどれだけ促進されているかを X 線回折法により明らかとすることを目指した。

## 実験：

### 【試料】

ウシ歯エナメル質スライス標本を試験試料とした。本試料は牛海綿状脳症対策特別措置法に基づき大阪市食肉衛生検査所内で検査され、許可され分譲を受けたウシ歯から調製した。試料はウシ歯冠部よりブロック状に切り出し(約 10mm×10mm×2mm)、レジン樹脂にエナメル質面以外を包埋し、新しいエナメル質面を研磨処理で露出させた。エナメル質表面約 1/3 を健全面としてネイルバージッシュで被覆した健全部位(SOUND)後、脱灰処理を行った。脱灰処理後、脱灰表面約 1/2 を被覆して脱灰部位(DEM)とし、残り 1/2 面で再石灰化部(REM)を行った。再石灰化処理後、横断面を切り出したスライス標本(150μm×10mm×5mm)を試験試料とした。

再石灰化処理の方法を次に示す。表層下脱灰病巣を形成させたエナメル質ブロックサンプルを再石灰化溶液に 5 歯片ずつ 72 時間、37°C で浸漬処理を施した。再石灰化溶液は、20 mM HEPES 緩衝液、6 mM カルシウム、3.6 mM リン酸、100 mM KCl にナノ粒子化アパタイトを添加し、1N KOH 溶液で pH 6.5 に調整した。カルシウム源として、POs-Ca、リン酸源として KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> を用いた(表 1)。

### 【方法】

#### 【Transverse microradiography(TMR)ミネラル回復量の解析】

再石灰化処理後のエナメル質ブロック試験面中央より SOUND/DEM/REM の 3 領域面全てが含まれるように厚さ約 150 μm の切片を各試料ブロックから切り出し、TMR 法より得られたマイクロラジオグラフより、エナメル表層から象牙質にかけてのミネラル分布(ミネラルプロファイル)からミネラル喪失量(ΔZ)を測定した。再石灰化率(ΔZ DEM - ΔZ REM) / ΔZ DEM (なお ΔZ DEM は DEM 面におけるミネラル喪失量、ΔZ REM は REM 面におけるミネラル喪失量を示す)を算出し、再石灰化効果の指標とした。

#### 【広角 X 線回折】

BL40XU の X 線を、ピンホールを通して直径約 6 μm のマイクロビームとした。カメラ長は 3000 mm 程度とした。広角散乱は、フラットパネル検出器(C9728DK, 浜松ホトニクス)を真空パイプの前(試料から 20 cm 程度の位置)に置いて記録した。スライス状の試料を X 線が垂直に入射するようにセットし、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、試料を 5μm ステップで移動し、逐次回折データを収集した[4]。ハイドロキシアパタイトの(100)面由来の反射に相当する X 線回折斑の強度積算から、ハイドロキシアパタイト結晶量を定量した。さらに、プロファイルにわたって表層から 200 μm までのハイドロキシアパタイト量を積分により求め、結晶割合測定値(健全部 ; s、脱灰部 ; d、再石灰化部 ; r)とした。再結晶化率は(s-d)/(r-d)×100 の計算値より算出した。

## 結果および考察：

POs-Ca とナノ粒子化アパタイトで再石灰化処理を施すと、POs-Ca 単独のよりも優れた再石灰化と再結晶化効果の両方の効果があることが確認された(図 1)。しかし、その度合いは再石灰化効果を示す TMR 法と再結晶化効果を示す広角 X 線回折法では異なる傾向を示した(図 2)。つまり、広角 X 線散乱法ではナノ粒子化アパタイトの粒子サイズが小さいほど効果的であるが、TMR 法では同じ結果にはならなかった。このことは TMR 法ではハイドロキシアパタイトの結晶物以外のミネラル堆積物が検出されているものと考えられる。

## 今後の課題：

ナノ粒子化アパタイトと POs-Ca の併用によって、優れた再結晶化効果も見出せた。今後、TMR 法と広角 X 線回折法での粒子径での効果の違いについて再現性を含めて詳細に検討し、脱灰度と粒子径の相関を含めて検討を進めたい。また、電子顕微鏡でナノ粒子化アパタイトがどのように取り込まれているかなどを観察により検討を進めたい。

また表層下脱灰は、エナメル表層から 20 μm で急激にミネラル量が低下する現象である。脱灰が下層で起こっているか、あるいは上層で起こっているかは学術的にも商品開発の上でも重要な課題である。その現象を厳密に解析するには、6 μm というビーム直径で決められる分解能では、まだ十分とは

いえない。今後はさらなるマイクロビームの性能を向上させられる可能性があるかどうかを検討するとともに、単純な走査ではなく、測定法や解析法を工夫することによる分解能の向上ができるかどうかを検討していきたいと考えている。また、本研究においては、生物の歯から歯片を調製し、それを試料として用いている。それぞれの歯について、エナメル質の違いがある上に、試料調製において、さらに試料ごとのばらつきが生じやすい。従って、多くの試料を測定し、得られたデータを統計処理しなければ、有意な結果を得ることができない。そこで、今後はより多サンプルを迅速に測定できるような試料マウントの方法や走査の方法、また検出や解析の自動化などが課題となると考えられる。

表 1. 再石灰化溶液組成

組成	濃度	添加量(ml)
Distilled Water		50
KCl	2M	5
HCl	1M	0.05
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	100mM	3.6 (1.5) ***
nHAp or HAp*		0.1
10%POs-Ca**		4.8
CaCl <sub>2</sub> **	100mM	(0.9) ***
HEPES	200mM	10
KOH	1M	pH 6.5 に調整
Total		100m L

\*各種サイズに加工されたナノ粒子化アパタイト；nHAp, ナノ粒子化前のアパタイト粉末；HAp

\*\*POs-Ca 含有再石灰化溶液以外の人工唾液はカルシウム源として CaCl<sub>2</sub> を添加した。

\*\*\*人工唾液のカルシウムとリン酸の濃度は( )内に示す添加量で調整をおこなった。

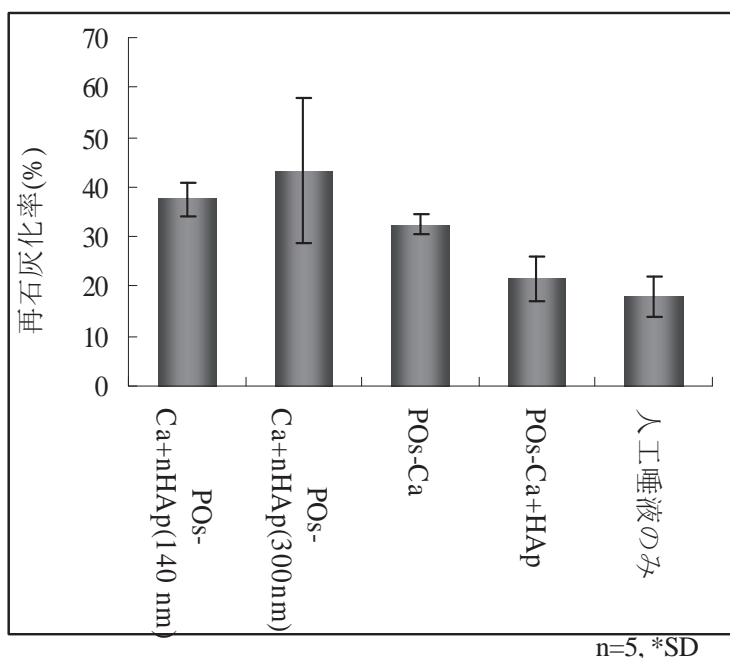
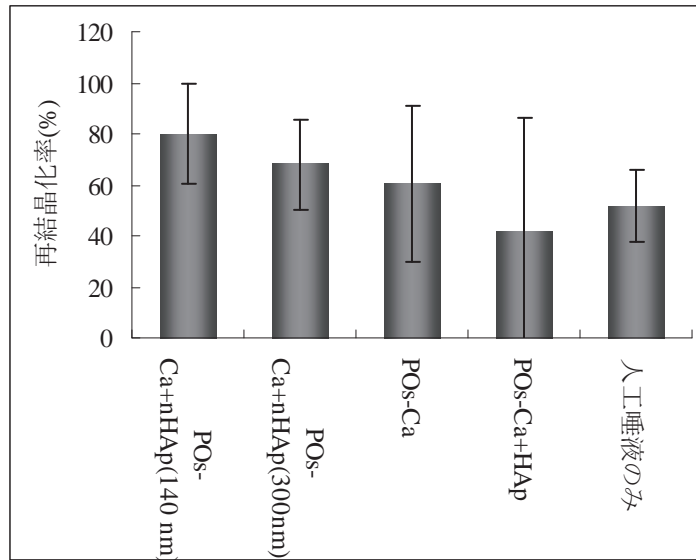


図 1. 各再石灰化溶液による再石灰化率グラフ



n=5, \*SD

図2. 各再石灰化溶液による再結晶化率グラフ

参考文献：

- [1]Kamasaka, H., Uchida, M., Kusaka, K., Yamamoto, K., Yoshikawa, K., Okada, S., Ichikawa, T. Inhibitory effect of phosphorylated oligosaccharides prepared from potato starch on the formation of calcium phosphate, *Bosci. Biotech Biochem*, 59 : 1412-1416, 1995
- [2]H. Kamasaka, D. Inaba, K. Minami, T. Nishimura, T. Kuriki, S. Imai, and M. Yonemitsu : Remineralization of Enamel by Phosphoryl-Oligosaccharides(POs) Supplied by Chewing Gum. Part I. Salivary Assessment in vitro. *J. Dent. Hlth*. 52, 105-111 (2002)..
- [3]H. Kamasaka, D. Inaba, K. Minami, T. Nishimura, K. To-o, T. Kuriki, S. Imai, N. Hanada, and M. Yonemitsu : Application of Phosphoryl Oligosaccharides of Calcium (POs-Ca) for Oral Health. *J. Appl. Glycosci*. 51, 129-134(2004).
- [4]Yagi N, Ohta N, Matsuo T, Tanaka T, Terada Y, Kamasaka H, et al. Evaluation of enamel crystallites in subsurface lesion by microbeam X-ray diffraction. *J Synchrotron Rad* 2009; 16:398-404
- [5]Tomoko Tanaka, Yshinobu Terada, Hisorishi Kamasaka, Takashi Kometani, Takashi Kuriki, and Naoto Yagi. Correlation analysis between remineralization and recrystallization of subsurface lesion by phosphoryl oligosaccharides of calcium (POs-Ca®) ORCA congress 2008.