



先端研究施設共用促進事業 フォトンファクトリーにおける産業利用促進 利用報告書

課題番号： 2010I001

研究責任者： 小林 隆嗣 (江崎グリコ株式会社)

利用施設： 高エネルギー加速器研究機構 放射光科学研究施設 BL-9A, 11A

利用期間： 2010年4月～2011年3月

XAFS解析を用いた水溶性カルシウム素材 POs-Ca の初期う蝕の再石灰化・再結晶化メカニズムの解明とう蝕予防効果の改善

Elucidation of the mechanisms of remineralization and recrystallization of early caries lesion with a water-soluble calcium, POs-Ca by XAFS analysis for improving caries prevention effect

小林 隆嗣¹、田中 智子¹、滝井 寛¹、釜阪 寛¹

Takatsugu Kobayashi¹, Tomoko Tanaka¹, Hiroshi Takii¹, Hiroshi Kamasaka¹

¹江崎グリコ株式会社

¹Ezaki Glico Co., Ltd.

アブストラクト： POs-Ca は水溶性の高いカルシウム素材である。POs-Ca とフッ化物は初期う蝕の再石灰化を促進することでう蝕予防に寄与する。まずわれわれは POs-Ca 水溶液の Ca-K XAFS を測定し、POs のリン酸基とカルシウムイオンが会合していることを見出した。POs とカルシウムの間の大まかな会合の比率を水和したカルシウムイオンとリン酸と会合したカルシウムイオンの XANES の線形フィッティングより見積もった。次に POs-Ca+フッ化物により再石灰化したエナメル質の表面領域の F-K XANES を測定し、フッ化物がエナメル質表面に CaF₂ として堆積すること、さらに 10-20 μm の深さで歯エナメル質に取り込まれ、ハイドロキシアパタイトがフッ化アパタイトとなっていることが示された。

POs-Ca is a highly soluble calcium material. POs-Ca and fluorides contribute to caries prevention by enhancing the remineralization of early caries lesions. First, we measured Ca-K XAFS of POs-Ca solutions, and found the association of the phosphate group in POs and a calcium ion. A rough association ratio between POs and Ca was estimated by the linear combination fitting between the XANES from hydrated calcium ions and phosphate-bound calcium ion. Next, F-K XANES of the surface area of enamel remineralized with POs-Ca+fluoride was measured, and showed that fluorides were deposited as CaF₂ on the surface of enamel, and then incorporated into tooth enamel and converted hydroxyapatite to fluorapatite at the depth of 10-20 μm.

キーワード： エナメル質 再石灰化 フッ素 カルシウム XAFS

1. はじめに： う蝕 (いわゆるむし歯) は歯周病と並んで大きな歯の喪失要因であるにもかかわらず、未だに多くの人々が患っている疾病である。う蝕予防のためには、穴の開く前の初期むし歯 (初期う蝕) という可逆的に回復しうる段階で進行を抑え、対処することが望ましい。初期う蝕は歯エナメル質の表面は残ったまま、表層下からエナメル質を構成するハイドロキシアパタイト (HAp, Ca₁₀(PO₄)₆(OH)₂) がう蝕原性細菌の産生する酸により溶出 (脱灰) して生じる。表層が残っていれば初期むし歯の脱灰部分

は唾液からのカルシウムとリン酸の供給により回復 (再石灰化) する。

江崎グリコでは、水溶性のカルシウムを唾液に補う素材としてリン酸化オリゴ糖カルシウム (phosphoryl oligosaccharides of calcium, POs-Ca) を開発し^[1]、POs-Ca の再石灰化促進効果と HAp の結晶構造回復 (再結晶化) 促進効果を X 線透過法および X 線回折法により示した^[2-4]。そして、現在 POs-Ca を配合したガムを特定保健用食品として販売している。

さらに POs-Ca 配合ガムの有効性を高めるた

めに、歯科で広く再石灰化促進があると認められているフッ化物を加えたときの効果を調べている。フッ化物からのフッ素はエナメル質中の hidroキシアパタイトの水酸基と置換してフルオロアパタイト (FAP, $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{F}_2$) に変え、化学的安定性を高める。しかし、一般にフッ化物とカルシウムの共存は、速やかに水に不要なフッ化カルシウム (CaF_2) の形成を引き起こすため、互いの再石灰化促進効果を打ち消しあってしまう。POs-Ca のカルシウムと低濃度のフッ化物イオンは共存することができ、効率よく歯の再石灰化を促進することがわかっている。

しかし、実際にフッ素がエナメル質の HAp に取り込まれているかどうかは分かっていなかった。特に、低濃度のフッ化物により歯のエナメル質がどのような化合物を経てフッ素置換されるかは、国内外を含めて知見が得られていなかった。

本研究では、POs-Ca とその再石灰化作用に関連し、以下の 2 つを目的として研究を行った。

- ① POs-Ca の溶液中におけるカルシウム安定化の基盤を溶液の Ca-K XAFS の解析により解明し、POs-Ca のカルシウム素材の利用性を明らかにすることで、新しい産業価値の創出につなげる。
- ② POs-Ca+フッ化物処理でフッ素がどのような化学形態で、どの程度浸透しているかを Ca-K XAFS および F-K XANES 解析により明らかにする。そしてカルシウム素材とフッ化物を併用することで、フッ化物のもつ耐酸性などの特性を歯に付加できるか検証する。

2. 実験:

【POs-Ca 溶液の測定】

実際の使用を想定した 1% POs-Ca 溶液 (Ca 換算で 13 mM) を pH 3.0-8.0 に調整した。対照として、単純に水和したカルシウムイオン、リン酸

が会合したカルシウムイオンを含む溶液を得るため、0.1 M 塩化カルシウム溶液、カルシウム:リン酸 = 1:5 から 1:20 までの塩化カルシウム (1.5 mM)-リン酸二水素カリウム溶液を調製した。後者の溶液は水酸化カリウムで pH 7.0 に調整した。Ca-K XAFS は以上の溶液を厚さ 5 mm のカプトン窓を持つセルに満たしたものをサンプルとして BL-9A で 19 素子 SSD による蛍光法で EXAFS 領域まで (3133-5138 eV) 測定した。

【再石灰化エナメルの測定】

人工的に酸により脱灰状態を作り出した歯を人工唾液 (1.5 mM カルシウムと 3.6 mM リン酸を含む中性溶液) に POs-Ca もしくは POs-Ca + 低濃度フッ化物を添加した溶液に浸して再石灰化処理した。処理後のエナメル質から表層 100 μm を切り出して BL-9A において透過法により Ca-K XAFS を測定した。また、表層から 10 μm ずつ研磨紙を替えながら粉末化し、それぞれの研磨紙上の粉をカーボンテープに固定してサンプルとし、真空下 ($< 10^{-6}$ Torr) で SDD を用いた蛍光法により F-K XANES を測定した。

3. 結果および考察:

【POs-Ca 溶液の測定】

pH を pH 3.0 から 8.0 まで 1 刻みで変化させて POs-Ca 溶液を調製し、Ca-K XAFS を測定した結果、図 1A に示すように pH によらず同一の XANES が得られた。塩化カルシウム溶液およびリン酸水素カリウムを加えた溶液 (Ca+P 溶液) の Ca-K XANES では塩化カルシウム溶液と比較して 4053.7 eV の位置に新しいピークが現れる。POs-Ca でも同一のエネルギーでピークが得られている (図 1A)。また、EXAFS より得られる同系分布関数では、カルシウムとリン酸のリンとの結合距離に近い位置にピークが現れる (図

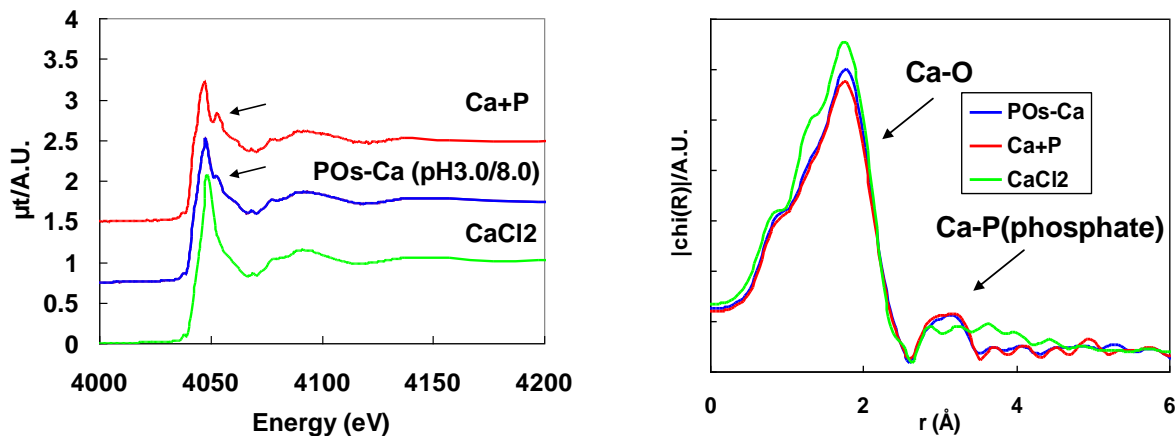


図 1 溶液の Ca-K XAFS 比較。(A) XANES 領域の比較。リン酸と相互作用した矢印で示すピークがリン酸と会合したカルシウム由来のピークと考えられる。(B) XAFS から導き出される動径分布関数のプロット。
Ca+P: リン酸二水素カリウムを添加した塩化カルシウム水溶液 (Ca/PO₄ = 0.4)

1B)。以上から、POs-Ca のリン酸基とカルシウムイオンが相互作用している様子が観察されたと考えられる。

POs-Ca の XANES は塩化カルシウム水溶液と Ca+P 溶液の XANES の中間にあたる形状であった。リン酸をカルシウムに対して 5 倍、10 倍、20 倍と過剰に供給したとき、 $\text{Ca}/\text{PO}_4 = 0.1$ 以下では XANES の変化がなくなることから、 $\text{Ca}/\text{PO}_4 = 20$ では水溶性を保った状態でカルシウムに対してリン酸が十分に会合した状態とみなすこととした。そこで、塩化カルシウム水溶液および $\text{Ca}/\text{PO}_4 = 20$ の Ca+P 溶液の XANES について、POs-Ca 溶液の XANES に対して線形フィッティングを行い比較すると、図 2 のようにカルシウムに対するリン酸の会合割合を計算することができた。POs-Ca のリン酸化オリゴ糖部分はカルシウムと緩やかに会合していることが示された。

【再石灰化エナメル測定】

POs-Ca もしくは POs-Ca とフッ素の併用により再石灰化した歯のエナメル質表層 100 μm の Ca-K XAFS を測定したが、HAp 由来のピークしか見出されなかった。再石灰化により析出すると考えられるカルシウム-リン酸化合物の標準物の XANES 比較でも HAp の XANES との間に微小な差異しか観察されないことから、HAp 以外の生成物の検出は困難と判断した。

次に、POs-Ca+低濃度フッ化物で再石灰化したエナメル質の F-K XANES を測定した結果、図 3 のような結果が得られた。未処理のエナメル質からはフッ素由来のピークは検出されなかった。一方、POs-Ca+フッ化物処理した歯では、表層から深さ 0–10 μm のサンプルからは CaF_2 が主成分で FAp が混合していると思われる XANES が得られた。一方、表層から深さ 10–20 μm の部分では、FAp と思われる XANES が得られた。それより深い層では、フッ素は XANES 検出限界以

下であった。これらより、POs-Ca とフッ化物の併用による再石灰化では、表層にフッ化カルシウムが堆積しつつ、歯の表面付近のエナメル質にフッ化アパタイトとしてフッ素が取り込まれることが明らかとなった。

4. まとめ： 本研究では、当初予定していた歯の再石灰化に伴って蓄積するカルシウムの種類を区別することはできなかった。今後 F-K XAFS の測定で利用したサンプル調製法を利用することで、健全なヒドロキシアパタイトの混入を防ぐことができれば、歯の微小領域の組成を解析できる可能性はある。その他に、歯の微小 X-PEEM と組み合わせた XAFS 測定の例も報告されている^[5]。

一方、POs-Ca の溶液中での状態の知見と、歯へのフッ素の浸透についての知見は得ることができた。POs-Ca のリン酸化オリゴ糖が溶液中で緩やかにカルシウムと会合し安定化することが実証されたことで、キレート剤よりも徐放性に優れたカルシウム安定化剤であることが実証できた。リン原子の側からの XAFS 解析により、さらなる詳細な解析ができると期待される。また、低濃度のフッ化物の利用により、フッ素のコーティング効果やフッ化アパタイトが形成されるかどうかはこれまで歯科領域でも未知であったが、本研究によりそれらの効果が実証された。今後、POs-Ca とフッ化物の併用により、歯の質を高める製品の開発・販売への利用が期待される。

参考文献

- [1] Kamasaka H. et al. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **59**, 1412–1416 (1995).
- [2] Yagi N. et al. *J. Synchrotron Rad.* **16**, 398–404 (2009).
- [3] Tanaka T. et al. *Caries Res.* **44**, 253–259 (2010).
- [4] 田中美由紀ら. 日本歯科保存学雑誌 **52**,

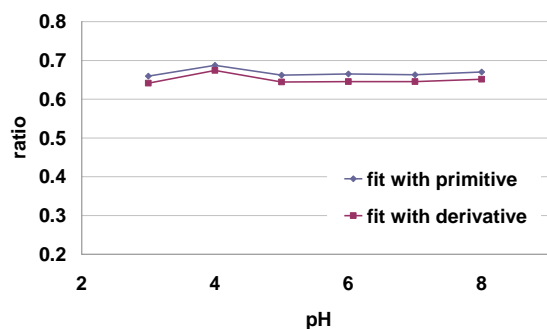


図 2 各 pH における POs-Ca の溶液中で会合しているカルシウムの割合 (XANES 領域の原始関数及びその微分についてフィッティングした結果を示す)

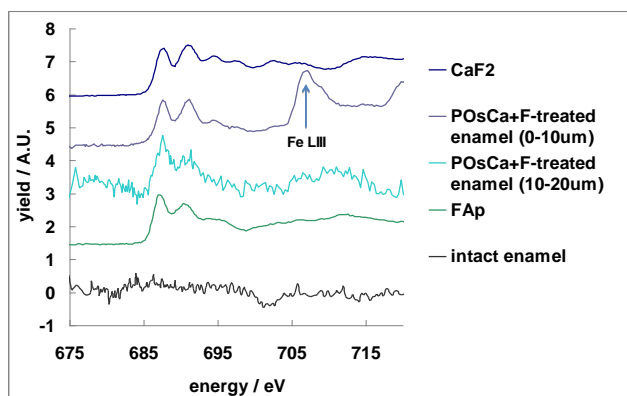


図 3 POs-Ca とフッ化物で処理をした歯の F-K XANES 一部のサンプルに、再石灰化成分として加えている物質の夾雑物由来と思われる鉄のピークが見えている。

534–542 (2009).

[5] Beriash E. et al. *J. Struct. Biol.* **166**, 133–143 (2009).

成果発表状況： 再石灰化エナメル解析の成果について投稿準備中。