

経済産業大臣賞

独自素材リン酸化オリゴ糖カルシウムを活用した
食品の初期う蝕回復に関する新規概念「再結晶化」の
提唱とその解析手法の開発

江崎グリコ(株) 健康科学研究所

田中 智子 小林 隆嗣 釜阪 寛

1. 緒言 ～う蝕(むし歯)は治療からセルフケアの時代へ～

人類誰もが望むであろうものの一つは健康長寿であろう。すでに先進国の中でも最長寿をひた走る日本では、その飽くなき追求により、近年では医療コストの上昇が国民経済を圧迫してきている⁽¹⁾。

しかし医療技術や薬で解決する前に忘れてはならないのが、体そのものを作りだしている“食”である。人間の根幹をなす“食”は、人間にとって欠かせない欲求であり、楽しみであり、健康な体を作る物そのものなのである。“食と健康”を満たすためには、まず何でも食べられ、消化できる健康な消化管を維持することが重要である。多くの人は胃腸の健康は強く意識して生活しているが、消化管の入り口である口腔機能は命に係る重篤な疾患とは直結しないため、軽視されがちであった。ところが、口腔機能は我々の生活に多大な影響を及ぼす重要な器官である。事実、WHOは2003年世界口腔保健報告書⁽²⁾の中で、口腔の健康は、全身の健康に統合され、口腔の健康はQOLの決定要因であると述べている。またWHOは二大口腔疾患のう蝕(むし歯)や歯周疾患は、コミュニティケア、プロフェッショナルケア、セルフケアの実践で効果的に予防することができると宣言している。実際う蝕は、近年多くの国で、歯磨剤へのフッ素添加や歯磨き回数の増加などの予防取り組みがなされており、徐々にう蝕率が低下しつつある。日本でも厚生労働省や歯科医師会が、80歳で20本以上の健全歯を残す運動(「8020運動」)を展開しており、定期健診や歯磨き回数の増加によりその達成率は4割近くまで達している⁽³⁾。しかし、健康に気をつけなければいけないという意識のもとで個人が注意深く歯磨きでセルフケアをし、健診を受けに行く“努力型”のケアが普及してきているが、むし歯は撲滅に至っていない。今後、歯を残すだけでなく、口腔機能のさらなる改善を目指すためには、より日常生活で自然かつ継続的に行うことができる新たな“自発的”オーラルケアが必要と考えられた。

そこで、我々は、自発的オーラルケアに貢献すべく、う蝕の初期状態を元に回復させる能力の高い食品素材を開発し、本来う蝕の原因であった食品を逆にう蝕を回復させる食品に変えることを目指した。さらに、その食品の機能をナノサイズの結晶レベルで解析する手法を開発し、リン酸化オリゴ糖カルシウムの歯の構造回復への有効性を検証した新たなう蝕回復概念として「再結晶化」を提唱した。

2. う蝕にさせないための戦略

歯の表面はエナメル質と呼ばれ、体の中で最も硬い組織であり、カルシウムとリン酸の化合物である hidroksiapatit の結晶からなっている。しかし飲食の度に、口腔内のう蝕原因菌が糖から酸を生成すると、その酸によって hidroksiapatit は容易に溶けだしてしまう。う蝕のステージ変化を図1に示す。う蝕の前段階である「初期う蝕(初期むし歯)」では、エナメル質表面は残ったまま、表層下の hidroksiapatit が溶け出し(脱灰)、密度が低下した状態となる。脱灰がさらに進行すると、表面もなくなって、穴の開いた状態となる。穴のあく前の初期う蝕では、失ったミネラル(カルシウムとリン酸)が唾液を通じて歯エナメル質に再補給(再石灰化)されることで健全状態に戻ることが可能である。

シュガーレスの食品は原因菌に酸を作らせないことによりう蝕の原因にならないことを目的としているが、本研究では、人体が本来持つ自己修復機能である唾液の再石灰化機能を増

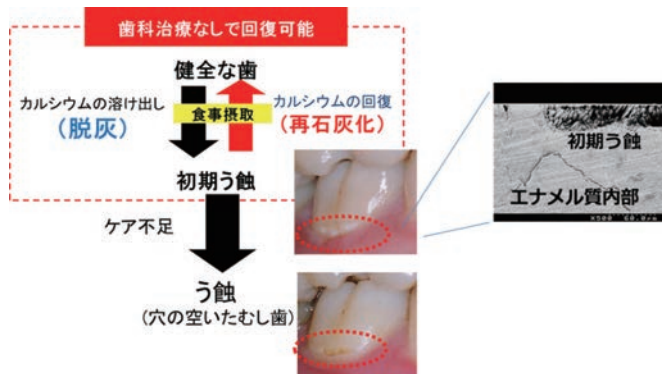


図1 初期う蝕とは

強することで、初期う蝕の段階から穴のあいたう蝕に進行させず、かつ元の健康な歯に戻るようにより再石灰化させることを目指した。

3. 独自素材 リン酸化オリゴ糖カルシウムの利用

リン酸化オリゴ糖カルシウム (POs-Ca[®]) は、馬铃薯澱粉を酵素分解してグルコースやマルトースを生産する糖化工程の中で、副産物として作られて専ら捨てられていたリン酸化糖を再生利用した、弊社で独自開発された素材である。3~6のグルコース単位にリン酸基1つないし2つ結合したオリゴ糖のカルシウム塩であり(図2)⁽⁴⁾、食品素材として認められている。また、単糖類や二糖類を含まないため、ノンシュガー・シュガーレス両方の製品に使用することができるカルシウム素材である。その主な特徴は以下の3つである。

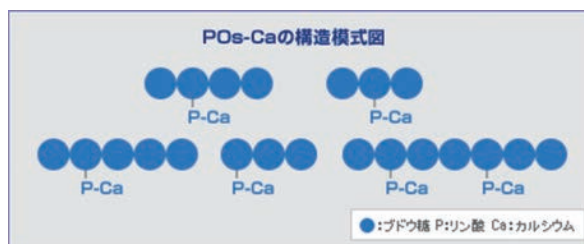


図2 リン酸化オリゴ糖カルシウムの構造

① 高い水溶性(唾液に溶けるカルシウム)

図3に示すように、食品で利用可能なカルシウム素材のほとんどは水に溶けにくい。さらに、唾液ではそれに含まれるリン酸や重炭酸イオンと反応して、生体に利用できない沈殿物になってしまう。しかしリン酸化オリゴ糖カルシウムは、唾液の中でも高い水溶性をもつカルシウム素材である。リン酸化オリゴ糖はそのリン酸基の負電荷でカルシウムイオンと相互作用して、安定化すると考えられている。そして糖部分が高い親水性を持つことにより、う蝕予防に欠かせないフッ化物イオン^(5,6)や、再石灰化に欠かせないリン酸イオンとの塩の形

成が抑制され⁽⁷⁾、これまでのカルシウムとのような相性の悪さを克服した(図4)。



図3 食品に利用されるカルシウム剤とリン酸化オリゴ糖カルシウムの溶解性評価
各溶液はカルシウム濃度として700 mg/100 mL に調整

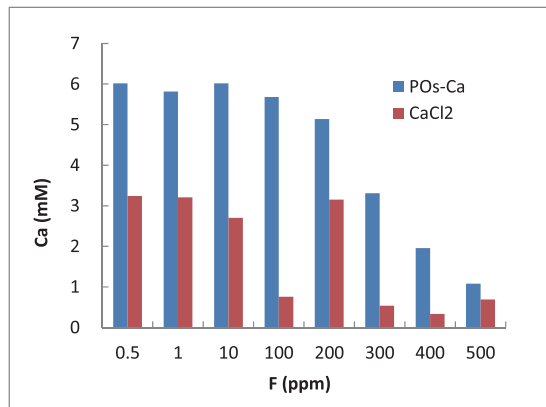


図4 カルシウムによるフッ化物イオンとの共存性の違い
リン酸化オリゴ糖カルシウムと塩化カルシウムを6 mM 加えたときの種々のフッ化物の可溶化度を示す。

② pH 緩衝作用

リン酸化オリゴ糖カルシウムのリン酸基は pH 6 付近で優れた緩衝作用を発揮するため、食後などにエナメル質の脱灰が起こる臨界 pH (pH 5.5) 以下になった口腔内を速やかに臨界 pH 以上に引き上げ、脱灰を抑制する効果が期待できる。

③ 非う蝕原性⁽⁸⁾

リン酸化オリゴ糖カルシウムはオリゴ糖の一種からなっているが、リン酸基修飾のため、う蝕原性細菌であるミュータンスレンサ球菌に資化されず、酸は発生しない。

これらの特徴から、リン酸化オリゴ糖カルシウム素材は、歯垢内 pH を中性に保ち、唾液にカルシウムイオンを増強できる高水溶性カルシウム剤と考えられた。

5. リン酸化オリゴ糖カルシウム配合ガムによる歯の再結晶化効果の検証

(1) エナメル質の結晶構造とその解析の試み

歯エナメル質(図5)は、その95%以上が、ハイドロキシアパタイトの結晶からなる。その結晶は歯の噛む方向に垂直に配列する配向性を有したエナメル小柱と呼ばれる緻密な構造を形成している。これが歯が体の中で最も硬い組織となる理由である⁽⁹⁾。

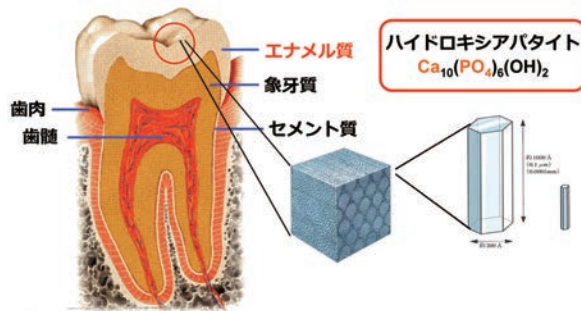


図5 歯の構造

これまでの研究において、再石灰化した初期う蝕のミネラル密度の回復は通常骨のレントゲンを撮影するように、歯の薄片にX線を照射し、透過光の強度をマイクロレベルで撮影する Transversal microradiography (TMR) が用いられてきた。しかし、この方法でミネラル密度を測ることはできても、回復した部分が結晶になっているか、それとも非結晶の物質が詰まっているかを明確に解析することは非常に難しく報告例がなかった。しかし、その結晶変化量と微小構造変化こそが、歯の質を決定づける重要な要素である。そこで、結晶を測定する方法である X 線回折法を歯のマイクロレベルの解析に応用することで、リン酸化オリゴ糖カルシウムで初期う蝕を再石灰化したときの結晶量の変化を捉える方法を開発した(図6)。

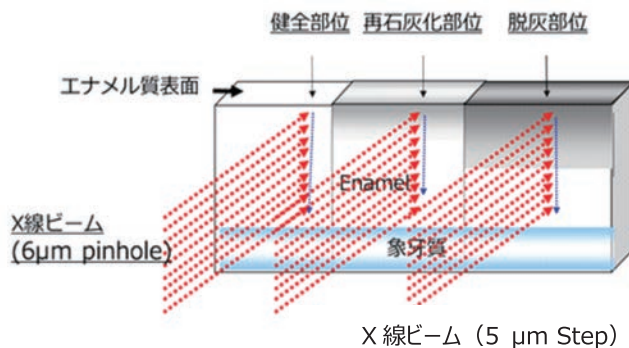


図6 X線回折法による歯のハイドロキシアパタイト結晶構造解析概要

初期う蝕部分は表面からわずか $200\mu\text{m}$ の領域で変化しており、その中の結晶量分布を知るには μm オーダーの分解能での深さ別の結晶量測定が必要であった。その一方で、分解能を上げると測定点は増加する。歯は個体差があるため、検証には多サンプルの測定が必須であり、何千・何万ものポイントを測定しなければならないこととなるが、通常のX線では1点当たり数時間レベルの時間がかかり、測定時間が莫大になってしまう。そこで、世界最大級の放射光施設 SPring-8(スプリング・エイト)のなかでも高い輝度と平行性を誇る BL40XU ビームラインを利用することとした。ビームを集光せずにピンホール通過によって直径 $6\mu\text{m}$ にまで細くすることで、表層下脱灰が起こるエナメル表面から深さ $200\mu\text{m}$ までを $5\mu\text{m}$ ステップで走査するように回折測定ができるようになった(図7)^(10, 11)。

さらに、本実験で用いたビームは、非常に直線性の高いビームのため、広角X線回折(WAXRD)と小角X線散乱(SAXS)の両方を測定することが可能であった。

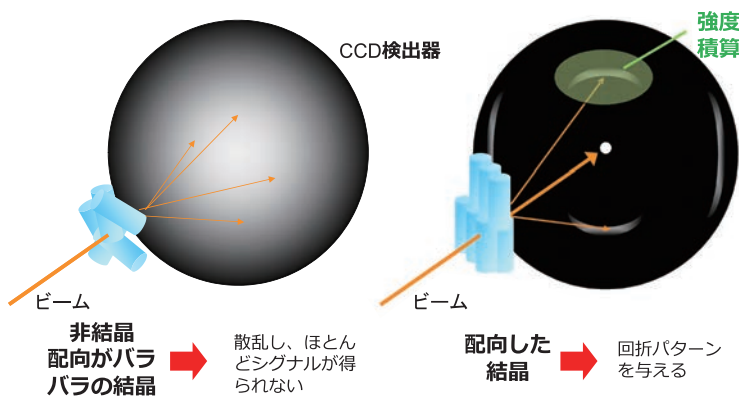


図7 歯片へのマイクロX線の照射と検出

サンプルには再石灰化検証で用いた歯片をそのまま用いることもできる。この方法により、サンプル数10歯片をセットすると1測定で1500枚前後の回折データを3時間程度で得ることができるようになった。ハイドロキシアパタイト固有の回折をCCDカメラで捉えて強度を積算し、積算強度をエナメル表層からの深さに対してプロットしていくことにより、ちょうどTMRのミネラルプロファイルに対応するような歯エナメル質の深さ別結晶量のプロファイルが得られた(図8)。

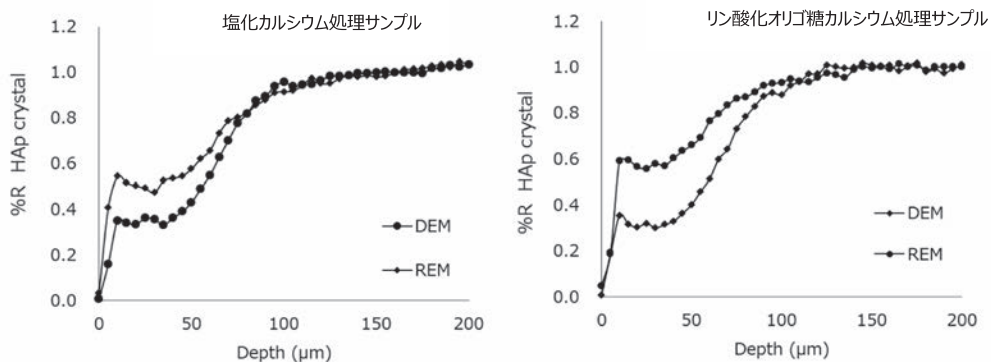


図8 SPring-8で得られた結晶量プロファイルの例
(DEM：初期う蝕部位，REM：再石灰化処理部位)

(2) 初期う蝕の再結晶化を促す機能性ガムの開発

口腔機能を維持するために、“噛む”ことを味覚で楽しみながら手軽に噛むトレーニングができるシュガーレスガムにリン酸化オリゴ糖カルシウムでカルシウム強化し、歯の再石灰化と再結晶化を増強する機能性ガムの開発を世界で初めて行った。

歯エナメル質はCa/Pモル濃度比率1.67のヒドロキシアパタイト結晶から成り、初期う蝕の再石灰化には、カルシウムとリン酸が必要である。そこで唾液を、歯エナメル質と同じ組成に調整しようとするとう効率的な再石灰化効果が得られると考えられた。ところが、唾液のような中性環境下でカルシウム濃度を高めようとするとう一般的なカルシウムは、不溶性のリン酸塩を形成し、可溶化カルシウムやリン酸が減少しがちである。しかしリン酸化オリゴ糖カルシウムのカルシウムは、カルシウム / リン酸 (Ca/P) モル濃度比率1.67になるまでカルシウム濃度を高めても可溶性性を保つことができた。実際、試験管内の比較実験として、リン酸イオン3.6 mMを含む人工唾液(Ca/P = 0.4)に、Ca/Pモル濃度比率が(0.4、1.0、1.3、1.67、3.0)になるようにリン酸化オリゴ糖カルシウムを添加した緩衝液4種について、初期う蝕を形成したエナメル質を37℃で24時間浸漬し、再石灰化させた。浸漬処理後、TMRで測定し、再石灰化の度合いを解析・比較した。その結果、唾液組成にリン酸化オリゴ糖カルシウムでカルシウムイオンを強化し、歯エナメル質と同じCa/Pモル濃度比率1.67にすることで、最も再石灰化が促進することが判明した。⁽⁶⁾(図9)。

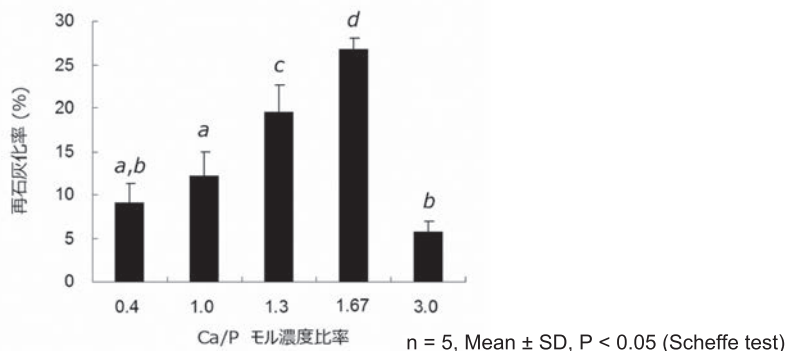


図9 リン酸化オリゴ糖カルシウムを用いて調整したときの初期う蝕に対する最適 Ca/P モル濃度比率の検証

上述の結果を踏まえ、ガムを噛んだときの唾液中のリン酸イオンとカルシウムイオンの組成を、歯エナメル質と同じ、Ca/P モル濃度比率1.67となるようにリン酸化オリゴ糖カルシウムの配合量を調整し、唾液が液体エナメル組成が実現できるガムを設計した。

(3) リン酸化オリゴ糖カルシウム配合ガムの臨床試験

この最適配合したガム食品が初期う蝕に与える効果について、ヒトにおける効果検証試験を東京医科歯科大学へ委託した。臨床試験は、リン酸化オリゴ糖カルシウム配合ガムを試験食、非配合ガムをプラセボガムとして設計し、臨床試験サンプルとした。

臨床試験は図10に示すような初期う蝕を形成したエナメル質歯片を装着した口腔内装置を用いて、試験食(リン酸化オリゴ糖カルシウム配合ガム、リン酸化オリゴ糖+フッ化物配合ガム)ならびにプラセボガムを用いた3群間比較試験を実施した。



図10 ヒトでの試験の、オーラルデバイスの画像
(東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科 田上順次教授 提供)

被験者にガム1種につき1回2粒、1日3回2週間摂取して頂き、初期う蝕に対する効果について上記の方法に基づいて再石灰化、再結晶化評価を行った。

その結果、リン酸化オリゴ糖カルシウム配合のシュガーレスガムは、プラセボに比べて有意に初期う蝕の再石灰化、再結晶化を促進していた(図11)⁽¹²⁾。

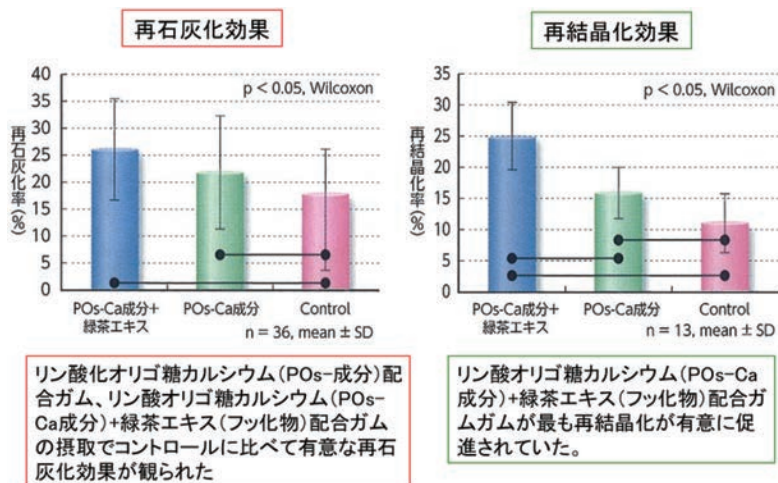


図11 リン酸化オリゴ糖カルシウム配合ガム、リン酸化オリゴ糖カルシウム+フッ化物 (緑茶エキス) 配合ガムの再石灰化 (TMR を用いたミネラル密度測定) と再結晶化 (X 線回折による結晶量測定) の結果

そして、ミネラル密度の回復と結晶量の回復がほぼ同様に起こることから、再石灰化で歯に戻ったカルシウムのほとんどは、元のしっかり配向した水酸化アパタイト結晶となっていることが示された (図12)。

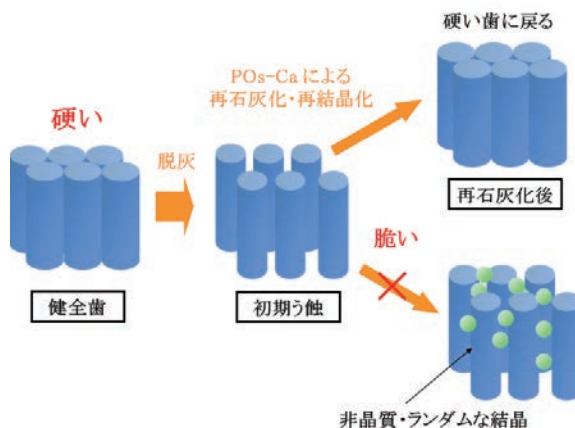


図12 リン酸化オリゴ糖カルシウムによる再結晶化のイメージ図

7. まとめと今後の展望

本研究では、独自のカルシウム素材であるリン酸化オリゴ糖カルシウムを歯の再石灰化に利用する試みから端を発して、その再石灰化の構造的解析を行うために新規な結晶量解析手法を開発することにつながった。実際、この方法を用いてリン酸化オリゴ糖カルシウム配合ガムが臨床試験でガムを噛んだときの試料歯の再結晶化を示し、その手法の有用性を確認す

ることができた。この手法は他の歯磨剤やマウスウォッシュ、歯科材料などの歯の再石灰化において、真に歯の構造を元に戻すかどうかを検証するのに役立ち、ひいてはそれら製品を通じて人々の健康に役立つものと期待される。

一方で、この再結晶化の検証により、リン酸化オリゴ糖カルシウム配合ガムはその機能性が国の審査により確認され、「初期むし歯対策ガム」として特定保健用食品の許可を受けるに至っており(「POs-Ca[®]」)、現に人々の健康維持増進に貢献している。なお、本ガムは、これらの研究成果が認められ、「日本歯科医師会」、「日本学校歯科医会」の推奨品となっている。再石灰化した部位が強固な結晶に戻るということは、健康な歯と同じ硬い歯に戻ることを示唆する。その後の研究で、歯の硬さの測定により初期う蝕で軟らかくなった組織の硬さも戻ることが明らかにされている⁽¹³⁾。また、近年、小学生の毎給食後の食生活習慣により初期う蝕が改善される傾向が報告されている⁽¹⁴⁾。

今後、高齢化社会で健康長寿を実現するために、これまでと同じ生活様式をしているだけでは十分といえないことは言うまでもない。これから高齢を迎える世代を含め、今回開発した手法が歯科の分野の基礎-応用研究の発展に貢献し、またリン酸化オリゴ糖カルシウムを利用した機能性食品が今後、健康長寿を支える口腔ケアツールの1つとして食生活習慣に取り入れて頂ければ幸いである。

引用文献

- (1) 厚生労働省 平成 18 年 歯科疾患実態調査
- (2) The World Oral Health Report 2003: continuous improvement of oral health in the 21st century, the approach of the WHO Global Oral Health Program. *Community Dentistry and Oral Epidemiology* **31** (Suppl 1) 3-24(2003)
- (3) 厚生労働省 平成 23 年 歯科疾患実態調査
- (4) 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. *Biosci. Biotech. Biochem.* **59**, 1412-1416(1995)
- (5) Buzalaf MAR., Pessan JP., Honório HM., Ten Cate JM. *Oral Sci.* **22**, 97-114(2011)
- (6) Tanaka T., Kobayashi T., Kamasaka H., Takii H., Ohta N., Matsuo T., Yagi N., Kuriki T. Optimization of calcium concentration of saliva with phosphoryl oligosaccharides of calcium (POs-Ca) for enamel remineralization in vitro. *Arch. Oral Biol.* **58**, 174-180(2013)
- (7) Kamasaka H., To-o K., Kusaka K., Kuriki T., Kometani T., Hayashi H., Okada S. The structures of phosphoryl oligosaccharides prepared from potato starch. *Biosci. Biotech. Biochem.* **61**, 238-244(1997).
- (8) Kamasaka H., Imai S., Nishimura T., Kuriki T., Nishizawa T. Effect of phosphoryl oligosaccharides from potato starch on acid fermentation by mutans streptococci. *J. Dent. Hlth.* **52**, 66-71(2002).
- (9) 青木秀希. 驚異の生体物質 アパタイト 医歯薬出版 p24
- (10) 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.* **16**, 398-404(2009).

- (11) Tanaka T., Yagi N., Ohta N., Matsuo T., Terada Y., Kamasaka H., To-o K., Kometani T., Kuriki T. Evaluation of the distribution and orientation of remineralized enamel crystallites in subsurface lesion by X-ray diffraction. *Caries Res.* **44**, 253-259 (2010).
- (12) Kitasako Y., Tanaka M., A Sadr., Hamba H., Ikeda M., Tagami J. Effects of a chewing gum containing phosphoryl oligosaccharides of calcium (POs-Ca) and fluoride on remineralization and crystallization of enamel subsurface lesions in situ. *J. Dent.* **39**, 711-779 (2011)
- (13) Kitasako Y., A Sadr., Hanba H., Tanaka M., Ikeda M., Nikaido T., Tagami J. Gum containing calcium fluoride reinforces enamel subsurface lesions in situ. *J. Dent. Res.* **91**, 370-375 (2012)
- (14) Doi T., Miyake T., Kawasaki K., Jin K., Uene M., Kambara M. Effect of chewing gum containing phosphoryl oligosaccharides of calcium and fluoride extracted from green tea on early caries lesions of occlusal surface in 1st permanent molars of 6~7 year-old children. *J. Dent. Hlth.* **63**, 428-435 (2013)

※ 本論文の図8, 9は引用文献(6), 図11は引用文献(12)を引用したものである。

謝 辞

高輝度光科学研究センター (JASRI)

八木直人先生、太田昇先生、松尾龍人先生

東京医科歯科大学

田上順次先生、北迫勇一先生、Alireza Sadr 先生

長崎大学

飯島洋一先生 (故人)

に多大なるご指導を賜りました。深く感謝いたします。(所属はいずれも当時のもの)