

令和元年6月14日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K11564

研究課題名(和文)自己集合性ペプチドを用いた酸蝕歯の予防法の確立

研究課題名(英文)Application of peptide (P11-4) to remineralization of acid tooth

研究代表者

黒川 弘康 (KUROKAWA, Hiroyasu)

日本大学・歯学部・准教授

研究者番号：10291709

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：酸蝕歯に有効な非侵襲的予防法を確立することを目的として、細胞培養において播種細胞の足場として用いられているペプチドP11-4に着目し、これを酸蝕歯モデルに適用した際の状態変化を、超音波透過法および光干渉断層画像法を用いて検討した。その結果、ペプチドP11-4は歯質の表層および内部構造に変化を及ぼすことで、脱灰抑制ならびに再石灰化促進効果を有することが明らかとなり、酸蝕歯の予防に応用可能であることが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

酸蝕歯は食生活習慣の変化などによって顕著化した第3の硬組織疾患とされているが、その予防法については確立されていないのが現状である。ペプチドP11-4は、低いpH環境下でカルシウムイオンを吸着するための足場となることが判明しており、酸蝕が進行する口腔内環境でこそ、歯質の脱灰抑制、再石灰化効果を発揮する可能性がある。本研究の結果はこれを裏付けるものであり、ペプチドP11-4が酸蝕歯の予防に有効であることが示された。

研究成果の概要(英文)：A new product containing the peptide P11-4 was recently introduced to enhance remineralization and inhibit demineralization of the tooth substrate. Peptide P11-4 self-assembles into a three-dimensional (3D) scaffold on the surface of the tooth, where it promotes hydroxyapatite precipitation while inhibiting diffusive mineral loss. Therefore, due to its mineralization effect, this material is potentially useful not only for early carious lesions but also for enamel defects caused by erosion and tooth wear. Considering the potential of the self-assembly peptide P11-4 to enhance enamel remineralization, the purpose of this study was to use ultrasonic measurements to evaluate the preventive effects of peptide P11-4 on acidic erosion of enamel substrates.

Within the limitations of this in vitro study, application of the self-assembling peptide P11-4 may be able to prevent the progress of erosion from acid challenge and even to promote remineralization.

研究分野：保存治療系歯学

キーワード：酸蝕歯 自己集合性ペプチドP11-4 脱灰抑制 再石灰化

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

酸蝕歯とは、細菌が関与することなく、酸性飲食物あるいは胃酸などによって硬組織の脱灰を生じる疾患であり、社会環境あるいは食生活習慣の変化によって発症の増加が問題となっている。これまで、酸蝕歯の予防にはフッ化物が積極的に応用されており、これを簡便に行う方法として、フッ化物含有歯磨剤の使用が推奨されてきた。一方、酸性飲食物摂取直後においては、歯質表面が酸に曝されることで、その硬度が低下することが判明しており、酸蝕歯へのブラッシングに関しては、開始するタイミングによっては、歯ブラシによって歯質の損耗をさらに大きくする危険性がある。

### 2. 研究の目的

酸蝕歯に効果的な非侵襲的予防法を確立することを目的として、細胞培養において播種細胞の足場として用いられているペプチド P<sub>11-4</sub> (以後、P<sub>11-4</sub>) に着目し、これを酸蝕歯モデルに適用した際のエナメル質の状態変化について、以下の実験を行うことで客観的に評価した。

(1) P<sub>11-4</sub> は、これを歯質に塗布することで網状構造を形成し、石灰化を誘導するとされている。一方、P<sub>11-4</sub> に関するこれまでの研究では、P<sub>11-4</sub> が齶蝕の進行に及ぼす影響について判定したものがほとんどであり、酸性飲食物あるいは胃液などの酸によって脱灰したエナメル質への影響に関しては不明な点が多い。本研究では、酸蝕歯モデルに P<sub>11-4</sub> を応用した際の脱灰抑制ならびに再石灰化促進効果を捉えるモダリティとして、超音波透過法を用いて検討した。

(2) 超音波透過法を用いて検討した結果から、P<sub>11-4</sub> は酸蝕歯モデルの脱灰抑制ならびに再石灰化促進に有効であることが明らかとなった。本研究では、酸蝕歯モデルに P<sub>11-4</sub> を応用した際の歯質内部の微細な状態変化を捉えるモダリティとして、光干渉断層画像診断法 (Optical Coherence Tomography、以後、OCT) を用いて検討した。

### 3. 研究の方法

#### (1) 測定装置

超音波測定装置は、パルサーレシーバ、縦波用トランスデューサおよびオシロスコープから構成されるシステムを用いた。パルサーレシーバを周波数 500 Hz、出力 16  $\mu$ J に設定し、高周波電圧をトランスデューサ内部の水晶振動子に送ることで 10 MHz の超音波を発生させた。探触子を測定用試片に接触させ、試片内を伝播する超音波の変化を、オシロスコープを用いて電氣的に増幅することで波形を検出した。この波形から、1 ns 単位で試片を透過する超音波の伝播時間を求め、試片の厚さとの関係から縦波音速を求め、これを歯質に生じた状態変化の指標とした。

OCT は測定対象の構造を光強度と干渉周波数との情報に置き換えるものであり、高解像な断層画像法である。A-scan mode による測定では、測定範囲内の任意の 20 箇所における信号強度分布を得ることが可能であり、この信号強度分布を解析、最大ピーク強度値 (dB) を検出するとともに、最大ピーク強度値が 13.5% に減少した際の信号強度が含まれる範囲を算出し、その波形幅 (1/e<sup>2</sup> 幅、 $\mu$ m) を求め、これらを歯質表層および内部での状態変化の指標とした。

#### (2) 酸蝕歯モデルの作製

ウシ抜去下顎前歯の唇側面中央付近のエナメル質をブロックとして切り出した後、耐水性 SiC ペーパーを用いて露出面が平坦となるように調整し、超音波洗浄を 10 分間行った。このエナメル質ブロックの象牙質面および側面をワックスで被覆した試片を、オレンジジュース (pH3.4) に 5 分間浸漬した後、精製水を用いて水洗、乾燥し、pH7.0 に調整した人工唾液に保管した。この操作を 1 時間ごとに 1 日 6 回、28 日間行うことで酸蝕歯モデルを製作した。

#### (3) 酸蝕歯モデルの保管条件

酸蝕歯モデルを以下に示す条件で保管した際の状態変化を、超音波透過法および OCT を用いて検討した。

コントロール群 : P<sub>11-4</sub> を 5 分間塗布した酸蝕歯モデルを、37  $^{\circ}$ C 人工唾液中に 28 日間保管

未処理群 : P<sub>11-4</sub> 未塗布の酸蝕歯モデルをオレンジジュースに 5 分間浸漬した後、水洗、乾燥し、人工唾液に保管。この操作を 1 時間ごとに 1 日 6 回、28 日間継続

処理群 : P<sub>11-4</sub> を 5 分間塗布した酸蝕歯モデルをオレンジジュースに 5 分間浸漬した後、水洗、乾燥し、人工唾液に保管。この操作を 1 時間ごとに 1 日 6 回、28 日間継続

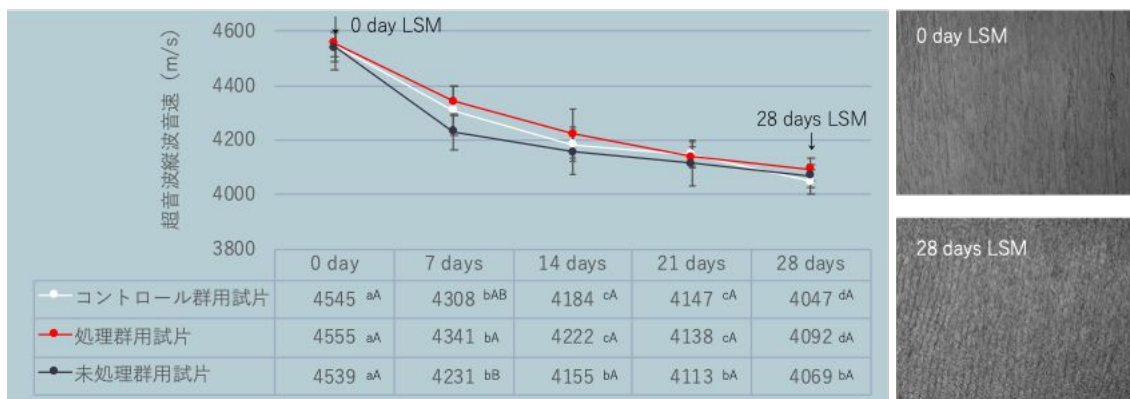
なお、超音波測定および OCT による信号強度分布測定時期としては、実験開始前および開始 7、14、21 および 28 日後とした。また、形状解析レーザー顕微鏡 (以後、LSM) および走査電子顕微鏡 (SEM) を用いて酸蝕歯モデルの表面性状を観察することで考察資料とした。

#### 4. 研究成果

##### (1) P<sub>11</sub>-4 が酸蝕歯モデルの脱灰抑制および再石灰化に及ぼす影響-超音波透過法による検討

###### 酸蝕歯モデル作製時の縦波音速の経時的変化と LSM 像

酸蝕歯モデル作製過程における超音波縦波音速の経時的変化および試片の LSM 像の代表例を示す(図1)。すなわち、オレンジジュース浸漬前のエナメル質試片の音速値は 4539~4555m/s を示したのに対し、浸漬 28 日後の音速値は 4047~4092m/s であり、いずれの試片においても、音速値は有意に低下した。また、オレンジジュース浸漬前のエナメル質試片の LSM 像では、試片研削時の削状痕が認められ、その表層がスミヤー層で覆われている像が観察されたのに対し、浸漬 28 日後の試片では、スミヤー層が除去されるとともにエナメル小柱が明瞭に観察された。



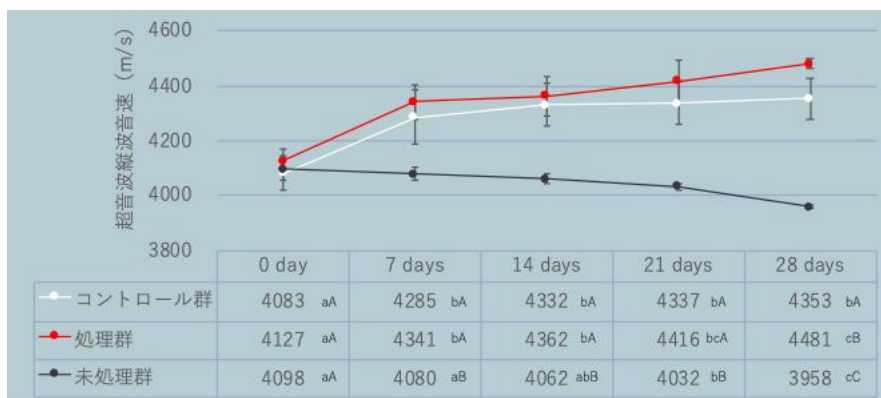
各試片で同じ小文字のアルファベットは有意差なし、各経過期間で同じ大文字のアルファベットは有意差なし

図1 縦波音速の経時的変化と LSM 像(酸蝕歯モデル作製時)

硬組織中を伝播する超音波の音速の変化は歯質の石灰化の程度と相関があり、無機成分の増減に伴って変化する。したがって、試片の音速が低下したことは、オレンジジュースへの浸漬によって、エナメル質の無機成分が減少したことを示すものであり、この結果はエナメル質の表面性状の変化と一致するものであった。

###### 実験環境下での縦波音速の経時的変化

酸蝕歯モデルを各実験環境下に保管した際の超音波縦波音速の経時的変化を示す(図2)。すなわち、コントロール群の音速は、実験開始7日後まで上昇したが、それ以降で変化は認められなかったのに対し、処理群では実験期間を通じて音速が上昇し、28日後でコントロール群と比較して有意に高い値を示した。また、28日後の処理群の音速値は、酸蝕歯モデル作製前の試片の音速値と有意差は認められなかった。一方、未処理群では、実験期間を通じて音速が低下し、実験開始7日以降でコントロール群および処理群と比較して有意に低い値を示した。したがって、コントロール群および処理群においては、未処理群と比較して再石灰化が亢進しており、とくに処理群ではオレンジジュースに浸漬する前の状態まで回復していた。



各試片で同じ小文字のアルファベットは有意差なし、各経過期間で同じ大文字のアルファベットは有意差なし

図2 超音波縦波音速の経時的変化(実験環境下)

### 実験環境下での酸蝕菌モデルの表面性状の経時変化 (LSM 像)

実験開始前および実験開始 28 日後の各条件における LSM 像の代表例を示す (図 3)。実験開始前の LSM 像では、オレンジジュースへの浸漬によってエナメル表層が脱灰している像が観察された。未処理群の 28 日後の LSM 像では、エナメル質の脱灰が進行し、さらに粗雑な面を呈した。一方、コントロール群および処理群の 28 日後の LSM 像では、いずれの保管条件においても、エナメル表面を覆うように析出物が観察されたが、その程度は P<sub>11-4</sub> を塗布して人工唾液に浸漬するのみではなく、1 日 6 回オレンジジュースに浸漬した処理群で、より多くの析出物が観察された。

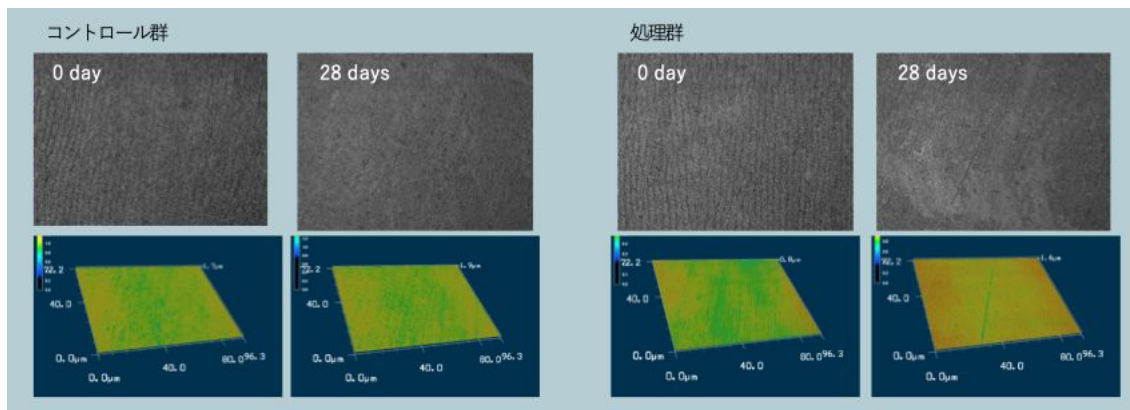


図 3 酸蝕菌モデルの LSM 像

P<sub>11-4</sub> は、低い pH 環境下で線維化を開始し、次第に 3 次元網目状構造が形成される。したがって、pH の低い条件で石灰化の足場としての機能がより発揮されたために、とくに処理群で析出物が多く観察されたものと考えられた。

以上のように、本実験の結果からペプチド P<sub>11-4</sub> は、エナメル質の脱灰抑制および再石灰化促進効果を有することが明らかとなり、酸蝕菌の予防に応用可能であることが示唆された。

### (2) P<sub>11-4</sub> が酸蝕菌モデルの表層および内部構造に及ぼす影響—超音波透過法による検討

#### 酸蝕菌モデル作製時の最大ピーク強度値の経時変化と LSM 像

酸蝕菌モデル作製過程における最大ピーク強度値の経時変化および LSM 像の代表例を示す (図 4)。すなわち、最大ピーク強度値は、オレンジジュース浸漬前で、-72.3~-68.2dB であったのに対し、浸漬 28 日後で -49.4~-46.2dB となり、いずれの試片においても有意に高い値を示した。また、オレンジジュース浸漬前のエナメル質試片の LSM 像では、試片研削時の削状痕が認められ、その表層がスマヤー層で覆われている像が観察されたのに対し、浸漬 28 日後の試片では、スマヤー層が除去されるとともにエナメル小柱が明瞭に観察された。

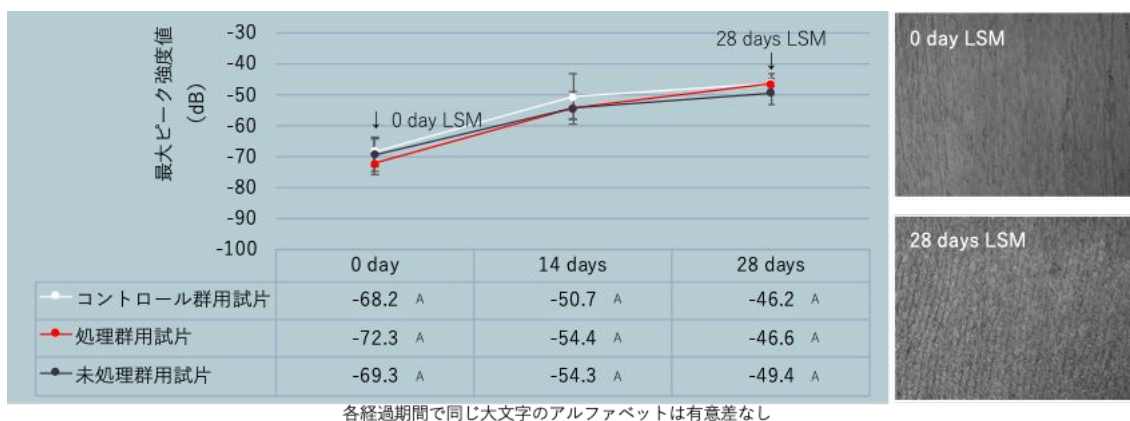
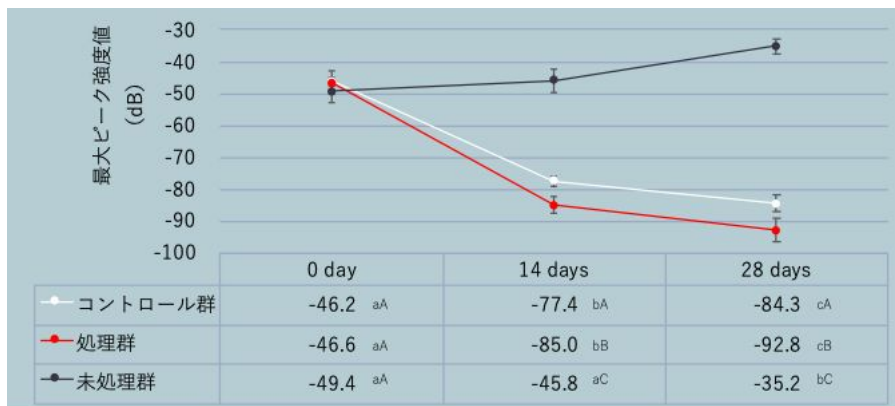


図 4 最大ピーク強度値の経時変化と LSM 像 (酸蝕菌モデル作製時)

本研究で用いた酸蝕菌モデルの作製過程では、エナメル質表層脱灰が進行することで粗雑化し、照射光線の歯質表層での散乱が大きくなることで最大ピーク強度値が上昇したものと考えられた。

### 実験環境下での最大ピーク強度値の経時的変化

酸蝕歯モデルを各実験環境下に保管した際の最大ピーク強度値の経時的変化を示す(図5)。すなわち、未処理群では実験期間の経過に伴って増加したのに対し、コントロール群および処理群では低下した。また、その程度は処理群で大きく、14日以降の最大ピーク強度値は、コントロール群と比較して処理群で有意に低い値を示した。



各試片で同じ小文字のアルファベットは有意差なし、各経過期間で同じ大文字のアルファベットは有意差なし

図5 最大ピーク強度値の経時的変化(実験環境下)

### 実験環境下での酸蝕歯モデルの表面性状の経時的変化(SEM像)

実験開始前のSEM像の代表例および実験開始28日後の未処理群と処理群のSEM像を示す(図6)。すなわち、実験開始前のSEM像では、オレンジジュースへの浸漬によってエナメル小柱が露出している像が観察されたのに対し、未処理群の28日後のSEM像では、露出したエナメル小柱の脱灰が進行し、さらに粗糙な面を呈した。一方、処理群の28日後のSEM像では、脱灰したエナメル質の間隙を埋めるように析出物が観察された。

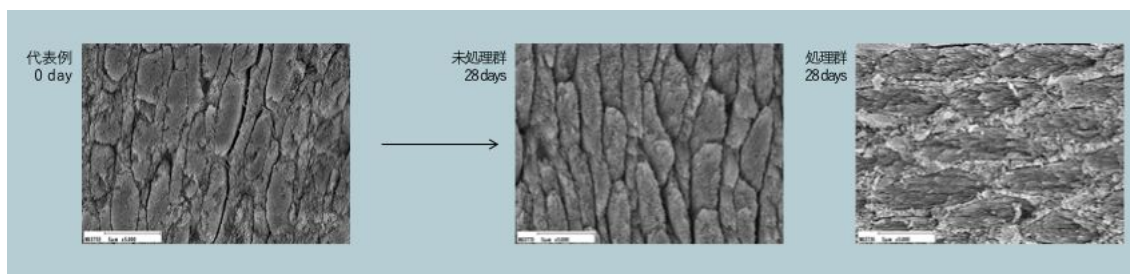
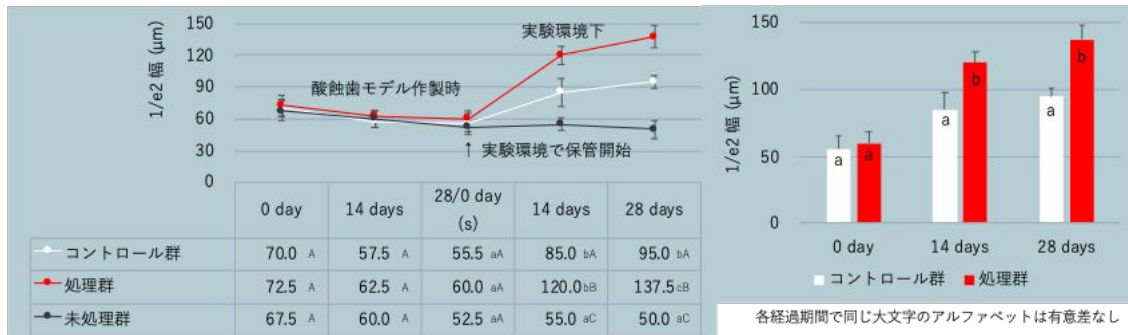


図6 酸蝕歯モデルのSEM像

$P_{11-4}$ は、異なる種類のアミノ酸で構成された11残基のペプチドであり、水素結合などを介してナノサイズのシート構造を形成する。形成されたシート構造物は、水分の存在下で疎水性相互作用によって自己集合し、さらに連結成長することで3次元網目状構造を形成する。この網目状構造の表面はマイナスに荷電しており、さらに網目状構造にカルボキシ基が存在することから、 $Ca^{2+}$ を吸着する足場となることでハイドロキシアパタイト形成のための核形成部位となる。処理群の28日後のSEM像では、エナメル質表面に析出物が認められたことから、 $P_{11-4}$ の応用によって、歯質表面に再石灰化による緻密な層が形成され、これがOCTの照射光線の光拡散性に影響するとともに、酸に対する抵抗層として機能することで、最大ピーク強度値が減少したものと考えられた。

### $1/e^2$ 幅の経時的変化

$1/e^2$ 幅の経時的変化を示す(図7左)。すなわち、酸蝕歯モデル作製過程における $1/e^2$ 幅は、オレンジジュース浸漬前で、 $67.5\sim 72.5\mu m$ であったのに対し、浸漬28日後で $52.5\sim 60\mu m$ となり、いずれの試片においても有意に低い値を示した。一方、酸蝕歯モデルを各実験環境下に保管した際の $1/e^2$ 幅は、未処理群で実験期間を通じて変化が認められなかったのに対して、コントロール群および処理群では、実験開始前と比較して14日以降で有意に高い値を示した。エナメル質の光学的特性は、表面性状だけでなく内部構造の変化によっても影響を受ける。すなわち、最大ピーク強度値はエナメル質表面における形態的变化の影響を受けるのに対して、 $1/e^2$ 幅は歯質内部における光線透過性の変化として捉えられる。したがって、コントロール群および処理群では、 $P_{11-4}$ を応用することでエナメル質の緻密化が生じ、OCT照射光線の歯質内部での反射および散乱状態が変化したために、 $1/e^2$ 幅が有意に大きくなった可能性が考えられた。



各試片で同じ小文字のアルファベットは有意差なし、各経過期間で同じ大文字のアルファベットは有意差なし

図7 1/e<sup>2</sup>幅の経時的変化

さらに、コントロール群と処理群の 1/e<sup>2</sup> 幅を比較すると(図7右) 14日以降の 1/e<sup>2</sup> 幅は、処理群で有意に高い値を示した。P<sub>11-4</sub> は、低い pH 環境下で線維化を開始して 3 次元網目状構造を形成することから、pH の低い条件でより形成が促進されたものと考えられた。

以上のように、本実験の結果からペプチド P<sub>11-4</sub> はエナメル質の表層および内部構造に変化を及ぼすことで、脱灰抑制ならびに再石灰化促進効果を有することが明らかとなり、酸蝕歯の予防に応用可能であることが示唆された。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計2件)

Suda S, Takamizawa T, Takahashi F, Tsujimoto A, Akiba S, Nagura Y, Kurokawa H, Miyazaki M, Application of the self-assembling peptide P11-4 for prevention of acidic erosion, Oper Dent, 査読有、43、2018、E166-E172  
DOI:10.2341/17-175-L

Takahashi F, Kurokawa H, Shibasaki S, Kawamoto R, Murayama R, Miyazaki M, Ultrasonic assessment of the effects of self-assembling peptide scaffolds on preventing enamel demineralization, Acta Odontol Scand, 査読有、74、2016、142-147  
DOI:10.3109/00016357.2015.1066850

[学会発表](計4件)

須田駿一、黒川弘康、ペプチド P11-4 の応用による酸蝕歯の再石灰化効果、日本歯科保存学会 2018 年度春季学術大会(第 148 回)、2018

須田駿一、黒川弘康、ペプチド P11-4 を応用した酸蝕歯の戦略的予防法の確立、第 70 回 日本大学歯学会学術大会、2018

Takahashi F, Kurokawa H, Application of the self-assembling peptide P<sub>11-4</sub> on acid erosion prevention, 95<sup>TH</sup> General Session & Exhibition of the IADR, 2017

須田駿一、黒川弘康、酸蝕歯予防への自己集合性ペプチド P<sub>11-4</sub> の応用、日本歯科保存学会 2016 年度秋季学術大会(第 145 回)、2016

## 6. 研究組織

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。