

令和 3 年 6 月 18 日現在

機関番号：32703

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K17144

研究課題名（和文）コロジオン膜を利用した積極的再石灰化療法の開発と審美応用への展開

研究課題名（英文）Development using collodion film to remineralize enamel treatment and deployment for esthetic dentistry

研究代表者

飯塚 純子（IIZUKA, JUNKO）

神奈川歯科大学・大学院歯学研究科・講師

研究者番号：00706484

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,600,000 円

研究成果の概要（和文）：本年度は、コロジオン膜の半透膜作用の検証を行った。ウシ下顎中切歯よりエナメル質ブロックを作製し研磨後、被験歯面を規定して表層化脱灰病巣を作製した。これら試料の上にコロジオン膜を成膜し、再石灰化への影響を確認した。研究計画上では比較的簡便に成膜ができ評価できる予定であったが、様々な問題が生じ困難をきたした。傾向としてはコロジオン膜群は再石灰化群と同様に再石灰化傾向を示した。よってイオンの透過は可能であると考えられ、エナメル質歯面に成膜を行ったとしても再石灰化に悪い影響は及ぼさないものと考えられた。今後も継続して評価を行っていきたいと考える。

研究成果の学術的意義や社会的意義

虫歯は自然治癒はせず進行してしまう疾患であるため早期発見・早期治療が重要とされ、その際は歯を削ることが正しいと考えられてきた。しかし、近年削らずに再石灰化を行うことに重きを置かれている。そこで初期の虫歯を再石灰化しやすい状態にし有効なイオン種のみ透過させる半透膜にて歯面をコーティングすれば、従来のフッ素塗布などの再石灰化手段の効果を格段に向上させ、国民の健康に貢献できると考える。本研究でコロジオン膜を歯面に製膜することができ、且つ人工唾液中に浸漬しても脱落しないことが確認された。また再石灰化に関与するイオン種は膜を透過したと考えられた。今後は再石灰化阻害物質が膜を透過しないことを確認したい。

研究成果の概要（英文）：This year, I verified the semipermeable membrane action of the collodion film. An enamel block was cut out from the bovine mandibular central incisor and polished. Subsurface lesions were prepared by defining the test tooth surface on these blocks. A collodion film was formed on these samples, and the effect on remineralization was confirmed. In the research plan, it was planned that the film could be formed relatively easily and evaluated, but some problems arose and it became difficult. As for the tendency, the collodion film group showed a remineralization tendency as well as the remineralization group. Therefore, it is considered that ion permeation is possible, and even if a film is formed on the enamel tooth surface, it is considered that the remineralization is not adversely affected. I would like to continue the evaluation in the future.

研究分野：表層下脱灰病巣の再石灰化

キーワード：エナメル質表層下脱灰 再石灰化

1. 研究開始当初の背景

従来、う蝕という疾患は自然治癒することではなく放置すれば進行するため、早期発見・早期治療が重要であるという概念が一般的であった。また、治療には切削を伴う修復処置を前提に、審美的・機能的回復を行うことが正しいと考えられてきた。しかし、MI の概念の普及から、2002 年に ICDAS (International Caries Detection and Assessment System) という革新的なう蝕診査・評価システムが提唱され、さらに 2005 年および 2012 年に改定されて我が国においても普及と定着化が図られている。これに伴い世界的に初期段階のう蝕の評価がさらに重要視されるようになり、切削を伴わずに歯質を回復させるいわゆる再石灰化療法に重きを置くことが求められるようになった。現在臨床の場で実際に行われている再石灰化療法は、口腔内清掃におけるプラークコントロールとフッ化物ならびに CPP-ACP の適用などである。

申請者は、これまでエナメル質表層下脱灰病巣内に侵入して再石灰化を抑制する有機質を漂白材で変性・除去すれば、積極的かつ審美的な再石灰化療法を確立することができるという仮説を立て検討したところ、再石灰化を抑制する唾液タンパク質はブリーチング材等で生成されるフリーラジカルにより比較的容易に断片化されることを確認した(飯塚純子, 向井義晴, 高垣裕子ら, 日歯保存誌 55, 127-133, 2012., Taniguchi M, Iizuka J, Mukai Y, Mikuni-Takagaki Y, Biomed Res Int 2013, Article ID 168765.)。さらに、全唾液に浸漬して唾液タンパク質を取り込ませたウシエナメル質表層下脱灰病巣に漂白材を適用し、電気泳動法ならびに顕微ラマン分光光度計にて分析・評価したところ、唾液由来の有機物の侵入深度は病巣の最深部にまで取り込まれハイドロキシアパタイトに吸着すること、またブリーチング材の過酸化水素は病巣内の無機成分に有意な影響を与えることなく、病巣全体の有機物を分解・除去できることを報告した(Iizuka J, Mukai Y, Taniguchi M, Mikuni-Takagaki Y, et al. Dent Mater J, 33, 663-668, 2014., 飯塚純子, 向井義晴, 歯科審美, 27, (1) 1-7, 2014.)。

このように、表層下脱灰病巣内には有用なイオンのみならず唾液タンパク質が侵入しており、漂白材にて statherin などの強い石灰化抑制作用が報告されている唾液タンパク質 (Tamaki et al. Calcif Tissue Int 71, 59-62, 2002.) を分解し低分子化して除去できる可能性は示されたが、施術後唾液に再び浸漬されれば数分でハイドロキシアパタイトに再吸着してしまう (Moreno EC, Varughese K, Hay DI. Calcif Tissue Int 28, 7-16, 1979.)。したがって、ブリーチング後の歯面を直接唾液に暴露させないことが重要であり、そのためには簡便且つ迅速に有機質が透過できない膜で覆う必要がある。またその膜はカルシウム、リン酸さらにはフッ化物などの再石灰化に有効なイオンの透過は妨げないものとするのが必須である。

再石灰化療法の研究は従来から各種の方法で行われているが、本研究のように表層下脱灰病巣内をより効率的に再石灰化に適した状態に処理を行った後、半透性を有する膜にて歯面をコーティングする一連の積極的再石灰化システムの構想は申請者を除いては見受けられない。

2. 研究の目的

今日のう蝕治療は MI の理念を基盤に、ホワイトスポットやブラウンスポットなどのエナメル質初期脱灰病巣に対しては、プラークコントロールとフッ化物の適用を代表とする積極的な再石灰化療法が行われている。しかしながら、審美的で確実な再石灰化を誘導でき、且つ再石灰化後もその状態を維持するための効果的な治療法は未だ確立されていない。

本研究の目的は、エナメル質初期脱灰病巣の再石灰化の抑制や変色の原因となっている唾液由来の有機物をブリーチング処置により除去後、有機質の再侵入を制御するのみならず、再石灰化に必要なイオンは透過できる「半透性膜」で漂白歯面を覆うことにより、審美的再石灰化療法の確実性と持続性を立証することである。

3. 研究の方法

(1) コロジオン膜の半透膜作用の検証

既に申請者は、唾液由来の有機物の侵入深度は病巣の最深部にまで及ぶこと、また漂白材は病巣自体の無機成分に有意な影響を与えることなく、深部の有機物を分解させていることを報告した。したがって再石灰化におけるコロジオン膜の半透膜としての性能を検証するため、以下の実験を行う。

試験片および実験的表層下脱灰病巣エナメル質の作製

ウシ下顎中切歯よりエナメル質片を切り出し、耐水研磨紙を順次使用し #2,000 まで研磨を行い平坦な面を作製する。超音波洗浄を 5 分間行った後、耐酸性パーニッシュを塗布し 2×3mm の被験歯面を作製する。エナメル質試料を円筒状容器の底部にスティッキーワックスにて固定し、8% Methocel MC gel (Fluka, Switzerland) を注入後、37 °C の恒温槽中に 24 時間静置する。ゲル硬化後、pH4.6 の 0.1mol/l 乳酸溶液を注入する乳酸二層法にて 10 日間脱灰し、実験的初期う蝕モデルである表層下脱灰病巣を作製する (Ingram GS, Silverstone, Caries Res 15, 393-408, 1981.)。作製した表層下脱灰病巣エナメル質試料は本研究を通して使用し、試料数は各群 6 個ずつとする。

(2) コロジオン膜の再石灰化に与える影響 (イオンの透過性)

表層下脱灰病巣

表層下脱灰病巣 再石灰化 (37 , 2~6 週*, 30 ml / 試料)

表層下脱灰病巣 コロジオン膜 再石灰化 (37 , 2~6 週*, 30 ml / 試料)

*実験群の および 群は適切な再石灰化期間を設定するため、2、4、および6週とする。

再石灰化液: 1.5 mM CaCl_2 、0.9 mM KH_2PO_4 、130 mM KCl、20 mM Hepes、pH 7.0。なお、再石灰化液は1週間毎に交換する。

コロジオン膜: まずは、標準的な 12w% のニトロセルロース (溶媒はエタノールとジエチルエーテルの混合液) を塗布することで成膜する。なお、コロジオン膜は他の濃度、塗布回数による厚さと再石灰化速度から適切な塗布量を検討する。再石灰化状態は TMR にて比較検討する。

(3) コロジオン膜の半透膜としての有用性の検討

表層下脱灰病巣

表層下脱灰病巣 唾液浸漬 (37 , 5 日)

表層下脱灰病巣 コロジオン膜 唾液浸漬 (37 , 5 日)

唾液: 氷冷下にて採取した自己安静時唾液 15 ml に NaN_3 を 0.02% 加え 4 ml ずつに分け浸漬する。唾液の保管は 4 にて行い、唾液浸漬時は毎日 1 回交換する。唾液交換時は容器を洗浄する。

3-1. 表層下病巣に取り込まれたタンパク質の回収ならびに分析 (電気泳動法)

唾液に浸漬した試料表面に付着した唾液等を取り除くため氷冷リン酸ナトリウム緩衝液 (20 mM PB, pH 6.8) にて洗浄後コロジオン膜を除去し、0.15 M NaCl 含有 PBS および 0.4 M PB (pH 6.8) をそれぞれ試験面に滴下して病巣内のタンパク質を順次抽出する。以上の抽出操作後も残存しているタンパク質を得るため、1 M HCl を同様に滴下してエナメル質を脱灰して回収する。これらの抽出液を透析、濃縮後、SDS sample buffer に溶解し、94 °C、5 分間熱変性処理する。回収したタンパク質は電気泳動後 Gel Code Blue Stain にて染色し、安静時唾液中のタンパク質と比較する。さらには、albumin、amylase および statherin 抗体を用いた Western Blotting によりタンパク質の生化学的性状変化を検討する。

3-2. タンパク質の侵入深度分析 (顕微ラマン分光分析)

試料を脱水・樹脂包埋後、顕微ラマン分光分析 (Nicolet Almega XR、現有機器) でミネラルおよびマトリックスの性状の変化を定性および定量的に分析する (参考論文: Kuramochi E, Iizuka J, et al., Eur J Oral Sci; in press, Iizuka J, Mukai Y, et al., Dent Mater J; 33: 663-668, 2014.)。試片の作製には、優れた薄切能力を有する超精密小型ダイヤモンドワイヤーソー (Well 3242、現有機器) を用いる。

4. 研究成果

申請した研究方法通り、コロジオン膜の半透膜作用の検証を行った。ウシ下顎中切歯よりエナメル質ブロックを作製し研磨後、被験歯面を規定して表層下脱灰病巣を作製した。これら試料の上にコロジオン膜を成膜し、再石灰化液に浸漬することで再石灰化への影響を確認した。研究計画上では比較的簡便に成膜ができ評価できる予定であったが、計測機器の故障が続いたこと、またコロナ禍で修理の委託もできず、また外部の測定機器の使用も許可が下りずと問題解決に大変困難をきたした。最終年度にやっと成膜から評価までが辛うじて行うことができた。

コロジオン膜は事前実験のとおり、再石灰化液に 14 日間浸漬し続けても剥がれ落ちるなどの劣化は認められなかった。さらにコロジオン膜を製膜した群は再石灰化群と同様に病巣体部から不透過性の亢進が認められ再石灰化傾向を示した。よって、カルシウムやリンなどのイオンの透過は可能であると考えられ、エナメル質歯面に成膜を行ったとしても再石灰化を阻害するような影響は及ぼさないものと考えられた。今後も継続して評価を行っていきたいと考える。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6 . 研究組織

	氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7 . 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------