

令和 3 年 5 月 18 日現在

機関番号：14401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2018～2020

課題番号：18H06291・19K21379

研究課題名（和文）UVA活性リボフラビン架橋法による根面う蝕の再石灰化治療法の開発

研究課題名（英文）Development of remineralization treatment for root caries using UVA-activated riboflavin to promote collagen crosslinking

研究代表者

上村 怜央（Uemura, Reo）

大阪大学・歯学部附属病院・医員

研究者番号：10823560

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,100,000円

研究成果の概要（和文）：活動性根面う蝕を想定した象牙質試料の作成にあたり、ヒト抜去大白歯の歯根から象牙質試料を採取し、試験面以外をワックスにて被覆したのち、脱灰溶液（酢酸、pH5.0）に3日間浸漬し、象牙質う蝕を模倣した脱灰病変モデルの作成に成功した。そのモデルを用いた試料にUVA活性リボフラビン架橋法を実施し、pH7.0の再石灰化液に浸漬させることにより、走査型電子顕微鏡像において石灰化物の析出を検出し象牙細管の開口度の差異を明らかにし、そして、析出した石灰化物の元素分析の結果、象牙細管内にはリン酸カルシウムを主成分とする組織の沈着を確認することができ、本手法による象牙質の再石灰化の促進が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

高齢者の保有歯数の増加に伴い急増している根面う蝕は、広範囲に拡大しやすいため修復操作が困難である。そのため、これからの超高齢社会において、「削って詰める」従来のう蝕治療から、「削らない」う蝕治療へのパラダイムシフトが必須であり、活動製う蝕の再石灰化に重点を置く非切削の治療は極めて重要であると考えられ、溶液にひたし、光照射をして歯質の再石灰化を促す本手法を用いることは画期的な新規手法であると考えられる。

研究成果の概要（英文）：To assume active root caries, the dentin specimens were obtained from human third molars. Specimens were coated with acid resistant varnish leaving an exposed dentin area. The specimens were immersed in demineralizing solution (acetic acid, pH 5.0) for 3 days, and a demineralized lesion model that mimics dentin root caries was successfully created. We used UVA-activated riboflavin method on the specimens, and immersed it in a remineralized solution at pH7.0. Precipitation of mineralization was detected on a scanning electron microscope image to clarify the difference in the opening degree of the dentin tubules, and for elemental analysis of the precipitated calcified material, it was confirmed that mineralized tissues were containing calcium phosphate as a main component precipitated in the dentin tubules. It suggested that this method promotes remineralization of dentin.

研究分野：象牙質う蝕の再石灰化

キーワード：象牙質 根面う蝕 再石灰化 光増感剤

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

高齢化の急速な進行と口腔衛生概念の普及により、高齢者の保有歯数が増加し、それに伴い根面う蝕の急増が報告されている。一般に、エナメル質と比較して無機質含有量が少ない根面象牙質はう蝕に罹患しやすく、病変が広範囲に拡大しやすいため、修復操作は困難を極める。よって、根面う蝕の予防や初期活動性根面う蝕に対する再石灰化に重点を置いた非切削での治療といったアプローチへのパラダイムシフトが必須である。

近年、眼科領域で円錐角膜の治療に、食品にも含まれるリボフラビン(ビタミン B2)を光増感材として用いて、安全領域とされる長波長紫外線 UVA に限定して照射し、角膜のコラーゲン架橋を促進させて強化を図る治療法が開発され、実際に臨床応用が始まっている(UVA 活性リボフラビン架橋法)。この方法を、コラーゲン架橋促進による象牙質の強化にも応用できると確信し、UVA 活性リボフラビン架橋法を応用した象牙質コラーゲンの分子間・分子内架橋形成促進による根面う蝕の予防・治療法の開発を着想し、申請者らは健全な象牙質に対して UVA 活性リボフラビン架橋法を用いることにより、象牙質の機械的強度が向上し、脱灰を抑制することでう蝕を予防しうることを発見した。本手法をさらに発展させ、根面う蝕の予防のみならず、進行した活動性の根面う蝕を抑制そして再石灰化できるかどうかということはまだわかっていないため、ここに着目した。

2. 研究の目的

本研究は、眼科にて用いられている UVA 活性リボフラビン架橋法を象牙質コラーゲンに応用することによって、既に初期根面う蝕に罹患した象牙質病変のさらなる進行を抑制し、そしてさらに、コラーゲンの架橋形成促進効果によって歯の強化を図ることによって、ダメージを受けて喪失した無機質を象牙質に取り込むことで、根面象牙質の再石灰化を促進する新たな根面う蝕抑制法を開発し、高齢者の「削らない」う蝕治療を実現することを目的としている。

リボフラビン(ビタミン B2)は水溶性のビタミンで、日常では食物から摂取されることから、組織為害性が全くない点が、グルタルアルデヒドやカルボジイミドに代表される従来のコラーゲン架橋材と比較して生体応用に際して決定的に有利である。このリボフラビンを光増感材として使用することで、本来反応性の低い hidroキシアパタイトに被覆された象牙質のタイプコラーゲンに効率的に安全に作用させて架橋形成促進を狙っている。

再石灰化を目指すにあたり、UVA 活性リボフラビン架橋法に従来のう蝕予防材であるフッ化物およびカルシウム素材を組み合わせて、より相乗効果を得て再石灰化を飛躍的に導くことができるかどうか検証することも目的とする。

3. 研究の方法

ヒト抜去大白歯の歯根より象牙質試料(0.5 mm×3 mm×8 mm)を採取し、0.5 mm×2 mm の試験面以外をワックスにて被覆した。その後、脱灰溶液(50 mM 酢酸、2.2 mM CaCl₂、2.2 mM KH₂PO₄、pH5.0)に3日間浸漬し、象牙質脱灰試料として用いた。一方を処理群(0.1% リボフラビン溶液および 1600mW/cm² 紫外線照射を使用)、もう一方を対照群とした。その後、自動 pH サイクル装置を用いて、口腔を模倣した脱灰負荷試験を行う。脱灰溶液(0.2 M 乳酸、3.0 mM CaCl₂、1.8 mM KH₂PO₄、pH4.5)と再石灰化溶液(0.02 M HEPES、pH7.0)を用いて、脱灰時間と回復時間のサイクルを設定し、脱灰負荷試験を行い、再石灰化を促進する。

脱灰負荷試験後の試料を試験面に対して垂直に切断し、試験面および切断面について走査型電子顕微鏡観察を行い、象牙質の表面性状、象牙細管の開口径および脱灰深度を比較検討した。また試験面の脱灰負荷試験前後におけるフッ素およびカルシウム元素の分布を EDX を用いて測定した。イオン濃度の違いを試験面および切断面のいずれにおいてもマッピングを行い、脱灰によって失われた無機質の再石灰化を視覚化した。

4. 研究成果

マイルドな脱灰溶液に浸漬した象牙質試料に関してマイクロ CT 撮影を行い、象牙質のミネラル密度を測定したところ、わずかに脱灰が進行しており、初期活動性根面う蝕を模倣した根面象牙質試料の作成について成功した。いずれの試料においてもばらつきはなく、再現性に優れていると考えられる。

また、脱灰負荷試験後の試料を走査型電子顕微鏡にて観察を行ったところ、脱灰面に対しては石灰化物の析出を検出したことが明らかになった。UVA 活性リボフラビン架橋法を用いなかった対照群については石灰化物の析出は明らかではなく、この対照群と比較し、象牙細管の開口径が明らかに異なっており、脱灰によって失われた無機成分が沈着されていたことを示唆している。

その析出した石灰化物の構成要素を探るべく元素分析を実施したところ、象牙細管内に満たされていた石灰化物はリン酸カルシウムを主成分とする組織であり、象牙質と同等の構成成分のものが沈着されていることがわかった。これにより、UVA 活性リボフラビン架橋法を用いることで、コラーゲンの架橋結合を生じて再石灰化の足場となる箇所を増やすことによって、何も用い

ない対照群と比較すると、歯質成分と同じ元素で構成された石灰化物の沈着がまず最初に象牙細管の中に生じ、そこから再石灰化が促進されるということが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Yagi Kyoko, Uemura Reo, Yamamoto Hiroko, Ishimoto Takuya, Naito Katsuaki, Itoh Shousaku, Matsuda Yasuhiro, Okuyama Katsushi, Nakano Takayoshi, Hayashi Mikako	4. 巻 -
2. 論文標題 In-air micro-proton-induced X-ray/gamma-ray emission analysis of the acid resistance of root dentin after applying fluoride-containing materials incorporating calcium	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Dental Materials Journal	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Uemura R., Miura J., Ishimoto T., Yagi K., Matsuda Y., Shimizu M., Nakano T., Hayashi M.	4. 巻 9
2. 論文標題 UVA-activated riboflavin promotes collagen crosslinking to prevent root caries	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 1252
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-018-38137-7	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 上村怜央、山本洋子、須崎尚子、内藤克昭、天羽萌、神田ひかる、林美加子
2. 発表標題 リン酸三カルシウム配合フッ化物パーニッシュによる根面象牙質の脱灰抑制効果
3. 学会等名 日本歯科保存学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 天羽萌、上村怜央、内藤克昭、三浦治郎、林美加子
2. 発表標題 UVA活性リポフラビン処理によるヒト象牙質のう蝕進行抑制効果
3. 学会等名 日本歯科保存学会
4. 発表年 2019年

〔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
---------	---------