

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 5 日現在

機関番号：32703

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26861610

研究課題名(和文) 漂白と効率的再石灰化を誘導する歯質改質システムの創製

研究課題名(英文) Development of an enamel treatment system to induce bleaching and efficient remineralization.

研究代表者

飯塚 純子 (IIZUKA, JUNKO)

神奈川県立歯科大学・大学院歯学研究科・助教

研究者番号：00706484

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,500,000円

研究成果の概要(和文)：エナメル質初期脱灰病巣に侵入した唾液由来のタンパク質等の有機質が、再石灰化の抑制や変色の原因となっていることを明らかにすることが本研究課題の目的であった。人工的に作製したエナメル質初期脱灰病巣をヒト唾液に浸漬し、侵入した有機質をオフィスブリーチング剤により変性、除去することが可能であるかを検証したところ、選択適に病巣に侵入する有機質を変性、除去できたという結果を得た。また、その際に、ブリーチング材は無機質に有意な影響を与えないという結果も同時に得た。さらに同様に作製した病巣をブリーチング処理の有無に分け再石灰化を行ったところ、ブリーチング後の再石灰量が有意に上昇するという結果も得られた。

研究成果の概要(英文)：The aim of this research was to clarify whether salivary organic compounds such as proteins that have invaded subsurface enamel lesions inhibit remineralization and cause discoloration. In-office bleach was verified to selectively denature and remove organic compounds invaded in artificial subsurface enamel lesions immersed in human saliva. We also found that the bleach did not have significant influences on the minerals. Furthermore, similarly prepared lesions were divided into a bleached group and an unbleached group, and those were followed by remineralization. We found that the amount of remineralization after bleaching was significantly increased.

研究分野：保存修復学

キーワード：エナメル質表層下脱灰病巣 漂白 再石灰化 唾液タンパク質 TMR RAMAN オフィスブリーチング

1. 研究開始当初の背景

近年の口腔清掃に対する関心の高まりとフッ化物含有歯磨剤の普及により齲蝕は軽症化し、齲窩を伴わないホワイトスポットやブラウンスポットを主訴として来院する患者が増加しているように思われる。このようなエナメル質初期齲蝕に対して従前の歯科治療では審美的および予防的観点から主として切削・修復治療が行われてきたが、近年のMI概念の下では初期齲蝕をいかに検出し、元の健全な歯質に戻すかという再石灰化処置に重きを置いた歯科治療が求められるようになってきている。一方、主たる現行の臨床的対応策はプラークコントロールとフッ化物の応用であるが、表層下病巣の再石灰化速度は極めて緩徐である。1日で1~2 μ mとも言われており、初期齲蝕病巣体部に侵入した唾液タンパク質等の有機物は、着色の原因となるのみならず再石灰化の進行を妨げている可能性が報告されている (Teranaka T et al., Arch Oral Biol 1986., Robinson C et al., Caries Res 1990.)

このような背景から申請者は、エナメル質表層下脱灰病巣内に侵入した有機質を変性、除去すれば、効果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 (Fig. 1) 優れた方法を検討してきた。その中でも、再石灰化を妨げる物質が唾液タンパク質であるとの報告に基づき、それを除去する物質の候補として漂白材 (オフィスブリーチング材) を検討していた。

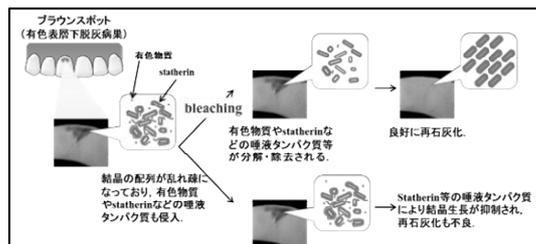


Fig. 1: 申請者が提唱する新規再石灰化システム

2. 研究の目的

齲蝕が軽症化し、可逆的な段階であるエナメル質初期病変に対する効率的な再石灰化療法が求められている。本研究は病巣内のタンパク質が速やかな再石灰化を妨げているという仮説を検証し、タンパク質除去を効率的に行うと共に再石灰化を促進する独自の方法を検討し、社会に求められている齲蝕の治癒をめざすものである。

従来の再石灰化療法は、プラークコントロールとフッ化物の応用のみに着目されてきた。本研究は、再石灰化を妨げる病巣内の有機質に着目し、それを除去しようとする点で独創的である。

なお、表層下脱灰病巣に侵入した有機質を除去するという試みは、次亜塩素酸水溶液を使用した方法で報告されている (Robinson C et al. Caries Res 24, 226-230, 1990.) が、これ

らの物質は臨床的に安全にエナメル質面に広く適用できる方法であるか否かは疑問が残っており、臨床応用には時間を要する。一方、本研究で検討する材料は漂白材 (オフィスブリーチング材) であり、直ちに臨床応用が可能である。本研究によって漂白材がエナメル質初期齲蝕病巣の再石灰化を促進し、かつ審美的にも良好な状態をもたらすことが確認できれば、口腔清掃とフッ化物の応用に依存してきた従来の再石灰化手段の概念を払拭する新たな初期齲蝕マネージメントの一手法として、臨床の場に広く貢献と考える。

よって、本研究の目的は、エナメル質初期脱灰病巣に侵入したタンパク質が再石灰化の抑制や変色の原因となっていることを明らかにし、そのタンパクを除去することで、効率的・効果的に再石灰化と審美的回復を行う「歯質改質システム」を創製することである。

3. 研究の方法

(1) 病巣に侵入した唾液タンパク質の生化学的解析

表層下病巣を有するエナメル質を採取全唾液に浸漬した試料に漂白材を作用させ、病巣内に侵入した唾液タンパク質の生化学的变化を解析した。

脱灰病巣の形成唾液浸漬および漂白処理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#2,000で平坦な面を作製。耐酸性パーニッシュにて試験面を規定し、脱灰溶液 (0.1 M acetic acid, 1.5 mM CaCl₂, 0.9 mM KH₂PO₄, pH 4.6) に 37 で 4 日間浸漬して表層下脱灰病巣を作製し、以下に示す 2 群 (各群 n=12) に分け実験を行った。

1) Control 群: エナメル質片に表層下脱灰病巣を作製した後、氷冷下にて採取した自己安静時全唾液 (0.02 % NaN₃ 添加) に 37 で 5 日間浸漬。なお、唾液は 1 日 1 回新鮮なものと交換した。

2) Saliva 群: 病巣群と同様に表層下病巣を作製後、安静時全唾液に浸漬する。その後、数種類のオフィスブリーチングを通法に従い適用した。

タンパク質の回収ならびに分析

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) にて洗浄した。洗浄後、0.15 M NaCl 含有 PBS および 0.4 M PB (pH6.8) 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した。これらの抽出液を透析、濃縮後、SDS sample buffer に溶解し、94°C、5 分間熱変性処理した。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した。さらに、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

の性状変化を検討を行った。
すべての手順を Fig. 2 に示す。

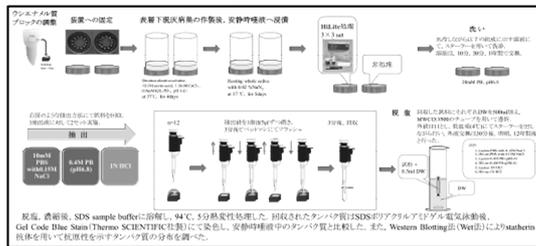


Fig. 2 : 研究 A の実験手順

(2) 漂白の有無における歯質と病巣内唾液タンパク質のラマン解析

侵入した有機質と病巣を構成する無機質との関係を解析すると共に、ブリーチングによる有機質の除去について TMR、顕微ラマン分析を用いて検討した。

ウシエナメル質 (試験面 2×3 mm) に表層下脱灰病巣を作製、以下に示す 3 群に分けた。
1) Control 群 : エナメル質表層下脱灰病巣
2) Saliva 群 : 同様に病巣作製後、自己安静時唾液 (0.02 % Na₃添加) に 37 °C で 5 日間浸漬 (1 日 1 回唾液交換)。3) Bleaching 群 : 同様に病巣作製後、安静時唾液に浸漬。その後 Hi-Lite (松風) にてブリーチング処理。評価は TMR とラマン分光光度計を用い、計測部位は表層部及び病巣体部 (エナメル質表面より 60、80 μm) とした。

(3) 漂白処理による唾液浸漬病巣の再石灰化誘導能の定量的評価

歯質改質システムの開発を目的とする再石灰化に対する影響を検討するため、以下の実験を行った。

先述と同様に、ウシエナメル質に表層下脱灰病巣を作製した。

験は以下に示す 5 群 (n=6) で行った。

- 1) 脱灰群 (D 群) : 表層下脱灰病巣
- 2) 再石灰化群 (DR 群) : 表層下脱灰病巣を作製後、再石灰化液 (30 ml / 試料) に 4 週間浸漬
- 3) 唾液群 (DS 群) : 表層下脱灰病巣を作製後、唾液浸漬
- 4) 唾液再石灰化群 (DSR 群) : 表層下脱灰病巣を作製後、唾液浸漬、その後再石灰化液に 4 週間浸漬
- 5) 漂白群 (DSBR 群) : 表層下脱灰病巣を作製後、唾液浸漬、漂白処理を行い、その後再石灰化液に 4 週間浸漬

尚、3)、4)、5)群では、氷温にて採取した安静時唾液 15 ml に Na₃ を 0.02%加え 4 ml ずつに分け浸漬する。唾液の採取・保管は 4 °C にて行い、唾液は毎日 1 回交換した。唾液交換時は容器を洗浄した。再石灰化溶液の組成は 1.5 mM CaCl₂、0.9 mM KH₂PO₄、130 mM KCl、20 mM HEPES、37 °C pH 7.0 とした。なお、再石灰化液は 1 週間毎に交換した。

再石灰化の評価

エナメル質を脱水・樹脂包埋後、150 μm に

薄切片、顕微エックス線装置 (PW 3830、現有機器) で TMR を撮影した後、ミネラル量分析ソフト (TMR 2000、現有機器) で再石灰化量を定量した (向井義晴ら、日本歯科保存学雑誌 53, 579-584, 2010., J Dent Health 59, 125-131, 2009., 日本歯科保存学雑誌 52, 1-11, 2009.)。TMR、顕微ラマン分析 (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他、X 線回析 (分析依頼) にて結晶の評価も行った。

その他の関連実験として、現在のオフィスにおける漂白システムに不可欠である青色光に対する基礎的研究や、象牙質に対する漂白材の作用についても検討すると同時に、ホームでの漂白システムにおける人工エナメル質表層下脱灰病巣の脱灰抑制能や再石灰化誘導能について評価検討を行った。さらに、有色の表層下脱灰病巣モデルの開発も同時に行った。

* 上記すべての研究は、神奈川歯科大学研究倫理委員会承認番号 第 160 番 のもとに遂行された。

4. 研究成果

(1) 病巣に侵入した唾液タンパク質の生化学的解析

安静時唾液に浸漬した表層下脱灰病巣から抽出した試料は、唾液中のタンパク質のパターンと比較すると、表層下脱灰病巣内には選択的に唾液タンパク質が侵入していることが示された。なかでも、0.4 M PB によるタンパク溶出量が最も多いことから、唾液タンパク質は脱灰病巣内でヒドロキシアパタイトと選択的に強く結合していることが示唆された (Fig. 3)。

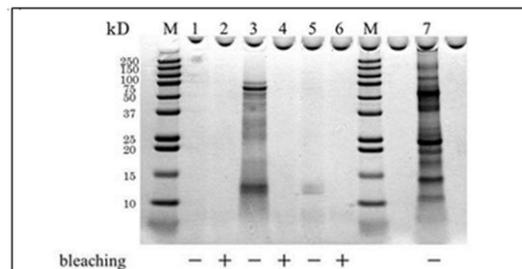
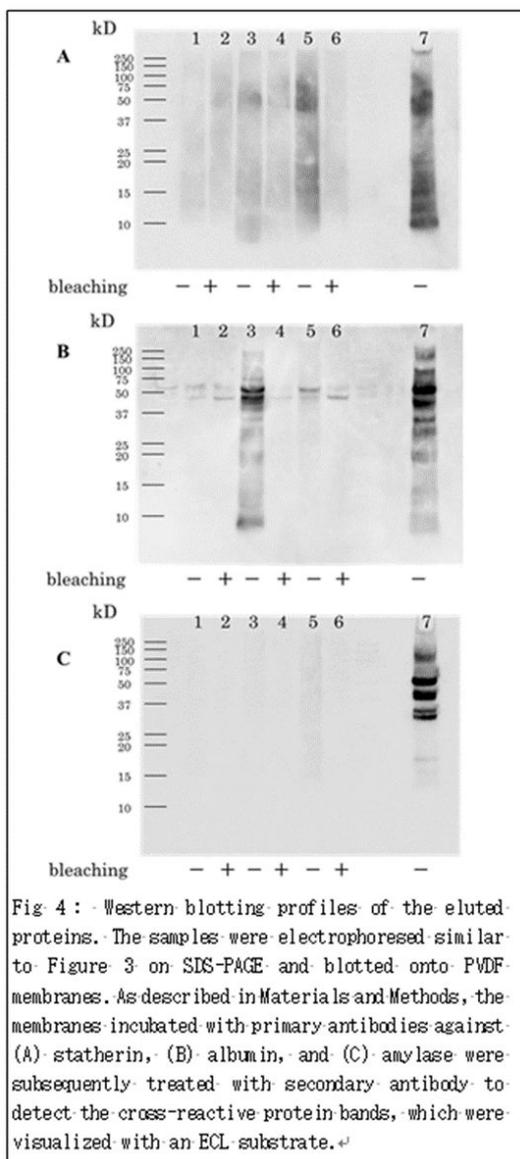


Fig. 3 : Profiles of proteins sequentially eluted from enamel subsurface lesions. One-fourth aliquots protein preparations were analyzed by SDS-PAGE. The proteins were stained with Gel Code Blue. Samples were either extracted from untreated control lesions, lanes 1, 3 and 5, or from bleached lesions, lanes 2, 4 and 6. Extracts with PBS (lanes 1 and 2), 0.4 M phosphate buffer (lanes 3 and 4) and IN-HCl (lanes 5 and 6) were compared. Lane 7 represents whole saliva. Molecular size markers were run on Lane M.

さらに、これら抽出したタンパク質に含まれる、albumin、amylase および statherin 抗体を用い Western Blot で解析すると、以下のような結果となった (Fig. 4)。albumin 抗

体では、0.4 M PB でのタンパク質の溶出量が多かった。albumin も statherin 程ではないが、ハイドロキシアパタイトに結合し、再石灰化を阻害するとの報告がありますが、ブリーチング処理は病巣内の albumin に対して効果をみる事ができた。amylase 抗体を使用した結果では前に示した albumin や後で示す statherin とは異なり、もともと病巣内に侵入していないことが示された。statherin 抗体での結果では、タンパク溶出量が最も多かったのは 1 M HCl であった。この結果は statherin のハイドロキシアパタイトへの結合はかなり強いことを示すものである。またブリーチング処理を施すことで、スタセリンの検出量は減少・消失することも示された。さらにプロファイルから分子量が約 7kDa である statherin が、様々な分子量で検出されることから、他の唾液タンパク質とも結合していると思われるが、それらに対してもブリーチング材の効果は見られた。



3つのプロファイルと比較すると、プロファイルの様相が異なっていることが示されていた。これは病巣内に侵入する唾液タンパク質が選択的であることを示すものと考察する。しかしブリーチング処理は全てにおいて効果的であることが明らかとなった。

(2) 漂泊の有無における歯質と病巣内唾液タンパク質のラマン解析

病巣の状態を Fig. 5 に示す。有機質の指標である amide、及び CH_2 wag のピークを 3 群間で比較したところ、Saliva 群で強く検出された。部位別に比較すると (Fig. 6)、病巣体部 60 μm では有機質の検出値に有意差は確認できなかったが、表層部と 80 μm 部では Saliva 群に比較し Control および Bleaching 群で有意に低く検出された。これらの結果は表層および病巣体部深部まで唾液有機質が侵入しており、ブリーチングによりそれら有機質が減少することを示唆している。また、60 μm ではミネラル密度が低いいため、唾液タンパク質の吸着量が相対的に減少したことに起因すると考えられた。

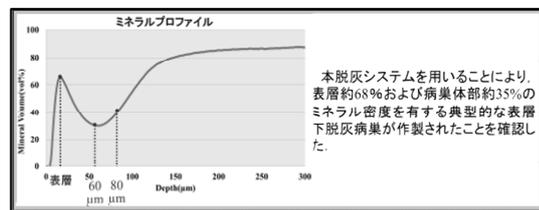
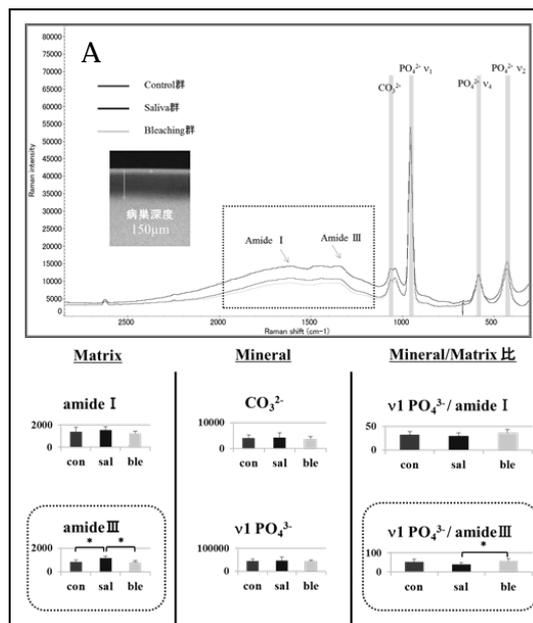


Fig. 5: 使用した基準病巣のミネラルプロファイル



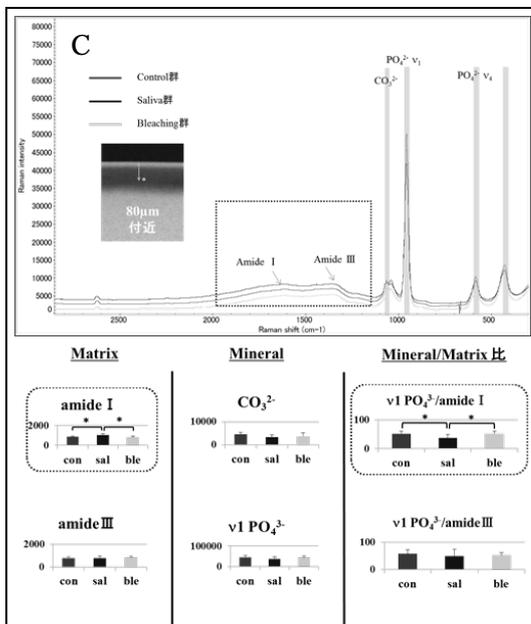
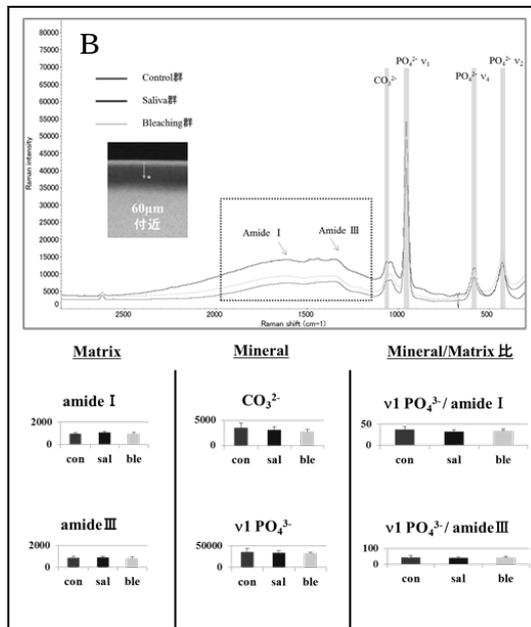


Fig. 6 : 顕微ラマン分光法による表層下脱灰病巣へ侵入した唾液成分の解析

- (A) 表層部
 (B) 病巣体部 表層から 60µm 付近
 (C) 病巣体部 表層から 80µm 付近

(3) 漂白処理による唾液浸漬病巣の再石灰化誘導能の定量的評価

D 群の結果から、表層に 58 % および病巣体部に 33 % のミネラル密度を有する表層下脱灰病巣が作製されたことが確認できた。また、DS 群ならびに DR 群では、D 群と比較し有意な IML の減少が確認されたことから、28 日間唾液または再石灰化溶液に浸漬することで再石灰化が進行することが確認された。一方、DSR 群は DS 群と比較し有意な IML の減少が確認されたが DR 群とは有意差が認められなかった。これは再石灰化がある程度進行しても

唾液成分により抑制がかかる可能性を示している。また、DSBR 群は他の 4 群と比較し有意に減少した。とくに DSBR 群が DSR 群と比較して有意な IMR の減少を示した結果は、唾液由来の有機質がブリーチングによって除去され、ハイドロキシアパタイトの結晶生長を促進した可能性を示す結果であると考えられた。

唾液成分が浸潤したエナメル質表層下脱灰病巣をブリーチング処理することにより、効果的な再石灰化を誘導できる可能性があると考えられる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 6 件)

Iizuka J, Mukai Y, Taniguchi M, Mikuni-Takagaki Y, ten Cate JM, Teranaka T: Chemical alteration by tooth bleaching of human salivary proteins that infiltrated subsurface enamel lesions. - Experimental study with bovine lesion model systems - . Dental Materials Journal, 33, 663-668, 2014. 査読あり

DOI : 10.4012/dmj.2014-046

飯塚純子, 向井義晴: エナメル質表層下脱灰病巣における唾液由来有機質のラマン分析とブリーチングによる変化 - 審美的な再石灰化療法を開発を目指して - 歯科審美, 27, 1, 1-7, 2014. 査読あり

Yoshida A, Iwata S, Iizuka J, Takahashi S-S, W-Takahashi S, Miyamoto C, Maehata Y, Ogura Y, Lee M-C, Yoshino F: Blue light from dental resin curing unit causes light-induced vasoconstriction in isolated rat aorta. Oral Health and Dental Management, 13, 1147-1151, 2014. 査読あり

實吉安正, 飯塚純子, 岡田周策, 川村和章, 長谷川晴彦, 倉持江里香, 向井義晴: フッ化物含有ホームブリーチング剤の歯質脱灰抑制能. 日本歯科保存学会誌, 57, 570-577, 2014. 査読あり

DOI : 10.11471/shikahozon.57.570

菌部悠子, 飯塚純子, 岡田周策, 武村幸彦, 倉持江里香, 國松雄一, 向井義晴: オフィスブリーチング材が歯根象牙質に与える影響 TMR および硬さ試験による検討 . 日本歯科保存学会誌, 59 (3), 273-278, 2016. 査読あり

DOI : 10.11471/shikahozon.59.273

Kuramochi E, Iizuka J, Mukai Y : Influences of bicarbonate on processes of enamel subsurface remineralization and demineralization: assessment using micro-Raman spectroscopy and transverse microradiography. European

Journal of oral science, 124 (6) ,
554-558, 2016. 査読あり
DOI : 10.1111/eos.12301

[学会発表](計15件)

飯塚純子, 國松雄一, 谷口紀江, 倉持江里香, 長谷川晴彦, 藺部悠子, 松島 大, 櫻井 孝, 高垣裕子, 寺中敏夫, 向井義晴: プリーチング法を利用したエナメル質表層下脱灰病巣の再石灰化戦略

唾液浸漬期間延長モデルによる検討
. 2014 年度秋季学会(第141回)日本

歯科保存学会, 山形, 2014. 10. 30-31

飯塚純子, 國松雄一, 谷口紀江, 倉持江里香, 長谷川晴彦, 藺部悠子, 松島 大, 櫻井 孝, 高垣裕子, 寺中敏夫, 向井義晴: プリーチング法を利用したエナメル質表層下脱灰病巣の再石灰化誘導

唾液浸漬期間延長モデルによる検討
. 2014 年学会総会, 横須賀, 2014. 11.

29.

飯塚純子, 國松雄一, 谷口紀江, 倉持江里香, 長谷川晴彦, 櫻井 孝, 高垣裕子, 寺中敏夫, 向井義晴: オフィスブリーチング剤を利用したエナメル質表層下脱灰病巣の再石灰化誘導-唾液浸漬期間延長モデルによる検討-. 神奈川歯科大学学会第146回例会, 神奈川, 2015. 1. 8.

藺部悠子, 飯塚純子, 岡田周策, 長谷川晴彦, 倉持江里香, 國松雄一, 向井義晴: オフィスブリーチング剤が歯根象牙質に及ぼす影響. 日本歯科保存学会 2015 年度春季学術大会(第142回), 北九州, 2015. 6. 24-26.

國松雄一, 飯塚純子, 長谷川晴彦, 倉持江里香, 谷口紀江, 向井義晴: 着色表層下脱灰病巣モデルの開発とTMR分析. 日本歯科保存学会 2015 年度春季学術大会(第142回), 北九州, 2015. 6. 24-26.

飯塚純子, 谷口紀江, 高垣裕子, 向井義晴: プリーチング法を利用したエナメル質表層下脱灰病巣の再石灰化戦略 - 唾液浸漬モデルによる検討 -. 第57回歯科基礎医学会学術大会, 新潟, 2015. 9. 11-13.

國松雄一, 飯塚純子, 谷口紀江, 長谷川晴彦, 倉持江里香, 向井義晴: 着色表層下脱灰病巣モデルの作製とブリーチング効果の検討. 神奈川歯科大学学会 第148回例会, 横須賀, 2015. 10. 8

飯塚純子, 國松雄一, 谷口紀江, 高垣裕子, 向井義晴: オフィスブリーチング法を利用したエナメル質表層下脱灰病巣の再石灰化戦略 - 唾液浸潤モデルによる検討 -. 日本歯科保存学会 2015 年度秋季学術大会(第143回), 東京, 2015. 11. 12-13.

飯塚純子, 國松雄一, 向井義晴: オフィスブリーチングを用いた表層下脱灰病巣における再石灰化誘導. 第26回日本歯科審美学会学術大会, 東京, 2015, 11.

22-23.

國松雄一, 飯塚純子, 向井義晴: 着色表層下脱灰病巣モデルを使用したブリーチング効果の検討. 第26回日本歯科審美学会学術大会, 東京, 2015, 11. 22-23.

飯塚純子, 國松雄一, 谷口紀江, 倉持江里香, 長谷川晴彦, 櫻井 孝, 高垣裕子, 向井義晴: プリーチング法を利用した新規再石灰化療法におけるエナメル質様相の解析. 神奈川歯科大学学会 第50回例総会, 横須賀, 2015. 12. 5.

國松雄一, 飯塚純子, 石澤将人, 谷口紀江, 向井義晴: 表層下脱灰病巣に対するオフィスブリーチング剤の再石灰化促進効果. 日本歯科保存学会 2016 年度春季学術大会(第144回), 栃木, 2016. 6. 9-10.

飯塚純子: ホワイトニングを利用した審美的再石灰化へのアプローチ. 第16回美容口腔管理学会学術講演会, 千葉, 2016. 11. 5. (招待講演)

飯塚純子, 國松雄一, 向井義晴: オフィスブリーチングを用いた表層下脱灰病巣における再石灰化誘導. 再石灰化部位のミネラル分析. 第27回日本歯科審美学会学術大会, 北海道, 2016, 8. 26-28.

飯塚純子, 國松雄一, 谷口紀江, 櫻井 孝, 高垣裕子, 向井義晴: プリーチング剤を活用したエナメル質初期齲蝕病巣の再石灰化誘導 - 再石灰化部位のミネラル分析 -. 神奈川歯科大学学会 第51回総会, 横須賀, 2016. 12. 3.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

飯塚 純子 (IIZUKA, Junko)

神奈川歯科大学・歯学研究科(研究院)・助教

研究者番号: 00706484