

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 30 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K15700

研究課題名(和文) リボフラビン励起UVA架橋法による根面う蝕予防・治療法の開発

研究課題名(英文) UVA-activated riboflavin inhibits demineralization of human dentin

研究代表者

林 美加子 (Hayashi, Mikako)

大阪大学・歯学研究科・教授

研究者番号：40271027

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、UVA活性リボフラビンを応用することにより、象牙質コラーゲンにおける架橋形成の確認、および耐酸性の向上が認められるかを検索した。ウェスタンブロットングにおいて、処理後粉碎群および粉碎後処理群はコントロール群と比較し、ブロードなバンドが示す位置が高分子量側に変位していることがわかった。これにより、UVA活性リボフラビン処理が象牙質コラーゲンへの架橋を形成することが確認された。また、 μ CT画像においては、UVA活性リボフラビン処理により、通常と比較して脱灰が抑制されることが示された。これらより、象牙質う蝕を想定した場合、耐酸性が向上することでう蝕の進行抑制につながることを示唆された。

研究成果の概要(英文)：Flexural strength is the highest in the group of 0.1% riboflavin exposure and UVA irradiated with 1600 mW/cm² for 10min, which was significantly higher than control group. Raman spectra showed that a C-C bond in a proline ring was amplified, and the ratio between C-N bond and N-H bond was changed by the riboflavin/UVA treatment. SDS-PAGE analysis suggested that the molecular weight of collagen was increased after the riboflavin/UVA treatment due to new collagen crosslinking. In μ CT analysis, the amount of mineral loss after demineralization in the RF/UVA group was significantly lesser than the control group. In SDS-PAGE analysis, the collagen after the collagenase degradation was less soluble in the riboflavin/UVA group than in the control group because of new collagen crosslinking promoted by a radical reaction. Riboflavin/UVA treatment was effective in enhancing the acid and enzymatic resistance of human dentin by producing new collagen crosslinking.

研究分野：医歯薬学

キーワード：歯科保存学 根面う蝕 コラーゲン 紫外線 リボフラビン 象牙質

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、それに伴って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易く、病変が広範囲に拡大しやすいため修復操作は容易ではない。よって、根面う蝕予防や初期活動性根面う蝕に対する非切削での侵襲の少ないアプローチは高齢者の口腔保健を維持する上で非常に重要である。

これまでに申請者は、失活歯の歯根破折を防止すべく、熱や紫外線といった物理刺激による象牙質の強化に取組んできた (Hayashi *et al*, J Dent Res 2008, 2010, Hayashi *et al*, Dent Mater 2012)。そこでは、象牙質の構造体としての強化には成功したものの、実際の臨床応用に際しては安全性ならびに強化効率が解決すべき障壁として常に立ちはだかっていた。

ところが近年、眼科領域で円錐角膜の治療に、食品にも含まれるビタミン B2 であるリポフラビンを光増感励起材として用いて、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 (Spoerl *et al.*, Cornea 2007, McCall, *et al*, Invest Ophthalmol Vis Sci 2010)。まさにこの方法を、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ことを確信し、リポフラビン励起 UVA 架橋法を応用した象牙質コラーゲンの分子間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するに至った。

2. 研究の目的

本研究では、眼科領域で円錐角膜治療に用いられはじめたコラーゲン強化法であるリポフラビン励起 UVA 架橋法を、口腔に露出した象牙質、あるいは初期う蝕に罹患した根面象牙質に应用することによって、象牙質のコラーゲン分子間架橋の形成を効果的に促進し、ダメージを受けた象牙質、あるいはダメージを受けやすい環境にある象牙質の強化を図るといふ、根面う蝕を念頭に全く新しいう蝕予防および治療法の開発を目的とした。

3. 研究の方法

概要：リポフラビン励起 UVA 架橋法によって象牙質中のタイプ I コラーゲンに、どのように架橋が形成されるかを顕微ラマン分光分析にて解析し、象牙質の機械的強度が最大になる架橋処理条件を確定した。さらに確定した最適条件でリポフラビン励起 UVA 架橋処理を施した象牙質の耐酸性および再石灰化能をマイクロ CT 画像解析、ナノインデンテーション、走査電子顕微鏡観察によって評価した。

UVA 活性リポフラビンによるヒト象牙質の強化効果

う蝕および破折のないヒト抜去大白歯の歯冠中央部より、 $0.2 \times 1.7 \times 8.0$ mm の棒状試料および厚さ 1.0 mm の円盤試料を、低速精密切断機 (ISOMET2000, BUEHLER) を用いて採取し、耐水研磨紙 (カービメットペーパー #600, #1000, #1500, BUEHLER) を用いて試料の寸法を調整した。棒状試料は、象牙細管の走行方向を試料の長軸に対して平行に規定し、HBSS に浸漬した状態で保管した。リポフラビン溶液は、リポフラビン-5'-モノホスファートナトリウム (東京化成工業株式会社) を蒸留水に溶解させて 0.1% および 1% 溶液を作製し、棒状試料を 1 分間浸漬した。UVA 照射は、LED 紫外線照射装置 (ZUV-C30H, オムロン) を用いて、波長 365 nm、出力 800、1200、1600 mW/cm²、照射時間 5、10、15 分の条件で行った。曲げ強さは、棒状試料を万能試験機 (AUTOGRAPH AG-IS, 島津製作所) に固定し、クロスヘッドスピード 1.0 mm/min にて 3 点曲げ試験を行い測定した。得られた結果は、二元配置分散分析法および Scheffe's *F* 法にて有意水準 95% で検定した。その後最適な条件において、照射時間の変化を一元配置分散分析法および Tukey 法にて有意水準 95% で検定した。

次に、ウシ皮膚コラーゲン溶液 (Sigma-Aldrich) を用いて、コントロール群、UVA 照射群、リポフラビン浸漬 + UVA 照射群に分類し、SDS-PAGE にて UVA 活性リポフラビンによる架橋形成について評価した。さらに、10% EDTA にて脱灰した円盤試料を、顕微レーザーラマン分光分析装置 (RAMAN-11, ナノフォトン) を用いて、レーザー波長 785 nm、レーザーパワー 130 mW、測定時間 120 秒、測定領域 $1.0 \times 1.0 \mu\text{m}^2$ の条件で、リポフラビン浸漬後、UVA 照射を行いながら経時的にラマン分光分析にて、分子レベルでの変化を検索した。

UVA 活性リポフラビンによるヒト象牙質の脱灰抑制効果の評価

う蝕および破折のないヒト抜去大白歯の歯冠中央部より、厚さ 1.0 mm の円盤試料を、低速精密切断機 (ISOMET2000, BUEHLER) を用いて採取した。リポフラビン溶液は、リポフラビン-5'-モノホスファートナトリウム (東京化成工業株式会社) を蒸留水に溶解させて 0.1% 溶液を作製した。UVA 照射は、LED 紫外線照射装置 (ZUV-C30H, オムロン) を用いて、波長 365 nm、出力 1600 mW/cm²、照射時間 10 分の条件で行った。

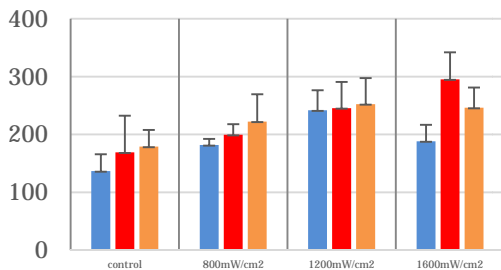
SDS-PAGE 分析においては、同一歯から得られた円盤試料を、それぞれコントロール群、処理後粉碎群、粉碎後処理群に分類し、UVA 活性リポフラビンによる処理および破砕機 ($\mu\text{T-01}$, TAITEC) による試料の粉碎を行った。粉末化した象牙質試料を 1M HCl にて分解し、SDS-PAGE 分析、および抗コラーゲン

抗体を使用してのウェスタンブロッティングを行った。

次に μ CTによる耐酸性の評価においては、円盤試料を半切後500 μ mの厚さに切断し、象牙細管の走行と垂直になる面を脱灰面と設定した。試料をコントロール群、実験群に分類し、試験前に μ CTを撮影した。その後UVA活性リポフラビン処理を脱灰面に施したのち、脱灰面以外をスティッキーワックスにて被覆した。脱灰溶液(0.2 mol/l Lactic acid, 3.0mmol/l CaCl₂, 1.8mmol/l KH₂PO₄, pH5.0)中に3日間浸漬後、スティッキーワックスを除去したうえで μ CT撮影に供し、それぞれの群において脱灰前後でのミネラル密度の変化を比較検討した。

4. 研究成果

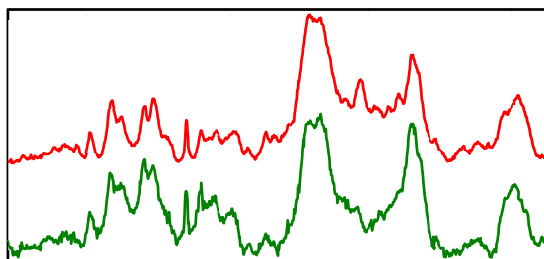
リポフラビン濃度およびUVAの照射条件を変えて曲げ強さを測定したところ、リポフラビン0.1%溶液1分浸漬、紫外線出力1600 mW/cm²、10分照射群において曲げ強さは295 MPaを示し、コントロール群の約2.2倍に増加した。



リポフラビン UVA による象牙質曲げ強さの変化

SDS-PAGE では、リポフラビン浸漬 + UVA 照射群が、コントロール群では明確に認められなかった 500 kDa よりも高い分子量を示す位置にバンドが認められた。

また、顕微レーザーラマン分光分析では、リポフラビン浸漬後の UVA 照射により、1243 cm⁻¹、1267 cm⁻¹、1660 cm⁻¹ 付近でのピークに変化が認められた。以上の結果より、UVA 活性リポフラビンは象牙質を強化し、それにはコラーゲン分子の架橋結合の増加および構造の変化が関与している可能性が示唆された。



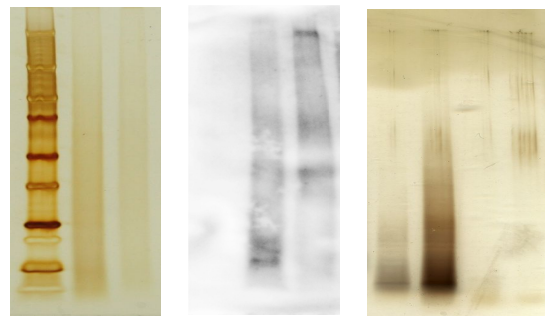
リポフラビン UVA による顕微ラマンスペクトルの変化 (緑: UVA 処理前、赤: UVA 処理後) コラーゲン架橋に関わるピークに変化が認められた。

次に、ウェスタンブロッティングにおいて、処理後粉碎群および粉碎後処理群はコントロール群と比較し、ブロードなバンドが示す位置が高分子量側に変位していることがわかった。特に、コラ

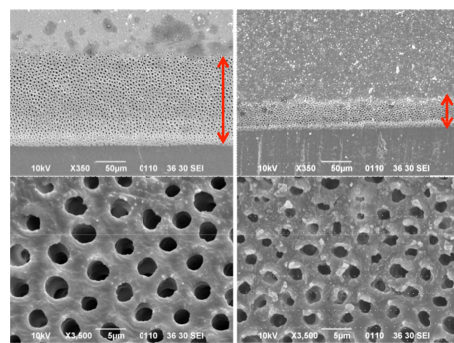
ーゲン抗体による標識にて、UVA 活性リポフラビン処理群の高分子側への分布が顕著であった。これにより、UVA 活性リポフラビン処理が象牙質コラーゲンへの架橋を形成することが確認された。

さらに、コラーゲナーゼ分解に対する抵抗性を検討した結果、コントロール(C)では5日処理(C5)で明らかに、コラーゲンが分解されて低分子側にバンドを認めたが、UVA 活性リポフラビン処理群では明らかな分解は認められず、架橋形成による強化効果が示唆された。

銀染色	コラーゲン抗体		コラーゲナーゼ分解抵抗性		
	C	R	C1	C5	R1 R5



また、 μ CT 撮影および SEM 観察においては、UVA 活性リポフラビン処理により、コントロール群と比較して脱灰が抑制されることが示された。 μ CT 画像より、UVA 活性リポフラビン処理により、ミネラル喪失量および表層の後退はコントロール群と比較して明らかに抑制された。また、SEM 観察により、UVA 活性リポフラビン処理により、脱灰領域は明らかに狭く、とりわけ象牙細管周囲の脱灰が抑制されていた。



SEM による脱灰後のミネラル喪失量の比較

(左: コントロール群、右: UVA 処理群)

上段より、UVA 処理群の脱灰領域は明らかに狭く (矢印) 下段の強拡大像より、象牙細管周囲の脱灰が抑制されている。

以上より、UVA 活性リポフラビン処理により、新たなコラーゲン架橋が形成され、象牙質の強度が向上すると同時に、耐酸性および酵素分解抵抗性が上がることがわかった。根面う蝕を想定した場合、UVA 活性リポフラビン処理により、う蝕進行抑制につながることを示唆された。

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 9 件)

Shinno Y, Ishimoto T, Saito M, Uemura R, Arino M, Marumo K, Nakano T, Hayashi M: Comprehensive analyses of how tubule occlusion and advanced glycation end-products diminish strength of aged dentin, *Sci Rep* 22: 19849, 2016.

Momoi Y, Shimizu A, Hayashi M, Imazato S, Unemori M, Kitasato Y, Kubo S, Takahashi R, Nakashima S, Nikaido T, Fukushima M, Fujitani M, Yamaki C, Sugai K: Root Caries management: evidence and consensus based report, *Curr Oral Health Rep* 3: 117-123, 2016.

Arino M, Ito A, Fujiki S, Sugiyama S, Hayashi M: Multicenter study on caries risk assessment in adults using survival Classification and Regression Trees, *Sci Rep* 6: 29190, 2016.

Yamada T, Kuwano S, Ebisu S, Hayashi M: Statistical analysis for subjective and objective evaluations of dental drill sounds, *PLoS One* 11: e0159926, 2016.

Miki S, Kitagawa H, Kitagawa R, Kiba W, Hayashi M, Imazato S: Antibacterial activity of resin composites containing surface pre-reacted glass-ionomer (S-PRG) filler, *Dent Mater* 32: 1095-1102, 2016.

Yamamoto H, Iwami Y, Yagi K, Hayashi M, Komatsu H, Okuyama K, Matsuda Y, Yasuda K: Evaluation of caries progression in dentin treated by fluoride-containing materials using an in-air micro-PIGE and micro-PIXE measurement system, *Nucl Instrum Meth B* 348: 152-155, 2015.

Arino M, Ito A, Fujiki S, Sugiyama S, Hayashi M: Multicenter study on caries risk assessment in Japanese adult patients, *J Dent* 43: 1223-1228, 2015.

Takeda K, Kitagawa H, Tsuboi R, Kiba W, Sasaki J, Hayashi M, Imazato S: Effectiveness of non-biodegradable poly (2-hydroxyethyl methacrylate)-based hydrogel particles as a fibroblast growth factor-2 releasing carrier, *Dent Mater* 31: 1406-1414, 2015.

Xiong Y, Huang SH, Shinno Y, Furuya Y, Imazato S, Fok A, Hayashi M : The use of a

fiber sleeve to improve fracture strength of pulpless teeth with flared root canals, *Dent Mater* 31: 1427-1434, 2015.

〔学会発表〕(計 17 件)

Hayashi M: Oral health as the key to good global health: challenges of creating a caries free society, International Caries Symposium, March 21, 2016, Osaka.

上村怜央、八木香子、新野侑子、松田祐輔、三浦治郎、林 美加子 : UVA 活性リポフラビンによるヒト象牙質の脱灰抑制効果 第 144 回日本歯科保存学会春季学術大会、2016 年 6 月 9 日、宇都宮。

八木香子、山本洋子、上村怜央、奥山克史、松田康裕、鈴木耕拓、林 美加子 : In-air micro-beam PIXE/PIGE による根面象牙質の耐酸性評価-pH およびフッ化物の影響に関する検討 第 144 回日本歯科保存学会春季学術大会、2016 年 6 月 10 日、宇都宮。

Yagi K, Yamamoto H, Uemura R, Okuyama K, Matsuda Y, Hayashi M: Evaluation of demineralization in root dentin using in-air micro-PIXE/PIGE, 94th International Association for Dental Research General Session, June 24, 2016, Seoul, Korea.

Uemura R, Yagi K, Shinno Y, Miura J, Hayashi M: How UVA-activated riboflavin strengthen human dentin, 94th International Association for Dental Research General Session, June 24, 2016, Seoul, Korea.

Hayashi M: How best to shift from invasive treatment to preventive care, Asia KOL Meeting, July 19th 2016, St Paul, USA

Okamoto M, Takahashi Y, Komichi S, Yoneda N, Hayashi M: Effect of tissue inhibitor metalloprotease-1 on tertiary dentinogenesis, PBRG symposium 2016, June 27, 2016, Nagoya.

Yamada T, Kato T, Kuwano S, Hayashi M: Evaluation of teeth grinding sounds during sleep, The 45th International Congress of Noise Control Engineering, August 23, 2016, Humburg, Germany.

Yagi K, Yamamoto H, Uemura R, Okuyama K, Matsuda Y, Suzuki K, Hayashi M: Evaluation of the acid resistance of root dentin when applying fluoride containing materials incorporating Ca using in-air

micro- PIXE/PIGE, International Dental Materials Congress 2016, November 5, 2016, Bali, Indonesia.

Hayashi M: Japan pioneering clinical Guideline treating dental caries : lessons for the world, Gadjah Mada Dentistry Scientific Conference, February 26, 2015, Yogyakarta, Indonesia.

Hirose N, Kitagawa R, Kitagawa H, Hayashi M, Imazato S: Development of a novel cavity disinfectant containing antibacterial monomer MDPB, 93th International Association for Dental Research General Session, March 13, 2015, Boston, USA.

Okamoto M, Takahashi Y, Komichi S, Hayashi M: Effect of degraded dentin matrix components on dentinogenesis, 93th International Association for Dental Research General Session, March 14, 2015, Boston, USA.

Hayashi M: Japan pioneering clinical Guideline treating dental caries, 10th International Dental Collaboration of the Mekong River Region, June 8, 2015, Bangkok, Thailand.

上村怜央、新野侑子、岡本基岐、高橋雄介、林 美加子 : UVA 活性リポフラビンによるヒト象牙質の強化効果、第 142 回日本歯科保存学会春季学術大会、2015 年 6 月 25 日、北九州市。

八木香子、山本洋子、岩見行晃、林 美加子 : In-air micro-beam PIXE/PIGE を用いた根面象牙質の脱灰評価、第 142 回日本歯科保存学会春季学術大会、2015 年 6 月 25 日、北九州市。

Arino M, Ito A, Fujiki S, Sugiyama S, Hayashi M: Caries risk assessment in adults using Survival Analysis Classification and Regression Trees, 62nd ORCA 2015, July 2, 2015, Brussels, Belgium.

Kitagawa R, Kitagawa H, Hirose N, Yamaguchi S, Mehdawi IM, Hayashi M, Imazato S: Antibacterial effects of self-adhesive resin cements containing chlorhexidine, Academy of Dental Materials Annual Meeting 2015, October 8, 2015, Maui USA.

{図書}(計 0 件)

{産業財産権}
該当なし

{その他}
該当なし

6 . 研究組織

(1)研究代表者

林 美加子 (HAYASHI Mikako)
大阪大学・大学院歯学研究科・教授
研究者番号 : 40271027

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

箕島 弘二 (MINOSHIMA Koji)
大阪大学・大学院工学研究科・教授
研究者番号 : 50174107

(4)研究協力者

なし