

令和 3 年 6 月 24 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K11699

研究課題名(和文)光化学およびナノフロー解析から見た知覚過敏抑制材の開発と効果

研究課題名(英文) Development and effects of hypersensitivity reduction material by photochemistry and nanoflow analysis

研究代表者

兼平 正史 (Kanehira, Masafumi)

東北大学・歯学研究科・助教

研究者番号：30177539

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：知覚過敏症の発症やその後戻りの原因はいまだに解明されていない。我々は象牙質透過性の定量的計測法を開発し、知覚過敏抑制材の効果を経時的に解析する手法を確立した。本研究では象牙質透過性計測法の改良、表面分析および微細形態学的解析を行い、抑制効果が時間と共に変化するプロセスを解析した。その結果、装置の改良により流体コンダクタンスを精密に計測する事が可能となり、リン酸カルシウム系材料の透過性抑制効果の発現機序と成分添加の効果を明らかにした。また、粒度分布、結晶生成の意義、内部結晶の生成量や構造の変化について明らかにし、安全で効果の高い象牙質知覚過敏抑制材の開発に必要なエビデンスを得た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

知覚過敏は多くの国民が経験しており疫学的に発生率が高い。一般に知覚過敏は重篤な症状を呈する事は少ないが、処置後早期に後戻りするケースが多く症状は弱くとも訴えは高頻度である。本研究ではルミノール化学やナノフロー解析を併用する独自の手法を用い、加えて生体に近い環境を再現しながらの効果の発現、後戻りに検討を加えた点に特色があり独創的である。欠損を伴わない知覚過敏症では、歯の形態を変えることなく周囲の組織に影響しない生体適合性に優れた治療法が必要であり、知覚過敏抑制材の効果を経時的に長期間の解析を行う事は、確かで安定した治療用材料や処置方法の開発に欠く事のできない事柄であり、国民のQOL向上に寄与する。

研究成果の概要(英文)：The cause of dentin hypersensitivity and its regression have not been elucidated yet. We established a quantitative measurement system of dentin permeability to analyze the time-based effect for hypersensitivity. In this study, we improved the dentin permeability measurement system and analyzed the process in which the inhibitory effect changes with time after performing the surface analysis and micromorphological analysis. As a result, new devices made it possible to measure the hydraulic conductance accurately, and was clarified the mechanism of the suppressing effect of the permeability by calcium phosphate-based material and the effect of the ingredient addition from the outside. The particle size distribution, the significance of crystal formation, the amount of internal crystals and the changes of structure were also clarified. These findings were expected to become base evidence for developing a safe and highly effective dentin hypersensitivity inhibitor.

研究分野：歯科保存学分野

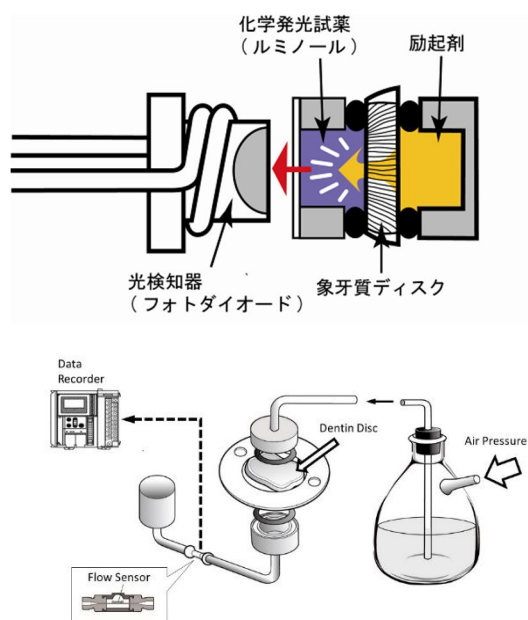
キーワード：知覚過敏 象牙質透過性 フロー

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

象牙質知覚過敏を有する患者は多い。疫学調査によれば国民の8～35%に知覚過敏の経験があり、また別な調査では30～40代の45～57%が知覚過敏を経験していると報告され(Kanehira, et al. Interface Oral Health Science 2014)、象牙質知覚過敏の発生率が高い。一般に象牙質知覚過敏症は重篤な状態に至ることは少ない疾患であるものの、処置後早期に後戻りする場合が多く、また症状は弱くとも訴えは高頻度であり多くの歯科医が対応に苦慮した経験をもっている。

象牙質知覚過敏のメカニズムおよび処置後の症状の後戻りについて、原因ならびにそのプロセスはいまだ解明されていない。その理由として、知覚過敏が本人の訴え以外に症状として捉える事ができない事、プラセボ効果によるマスキングが発生する事があげられ、これらが in vivo の解析および in vitro シミュレーションを困難にしている。象牙質知覚過敏のメカニズムに関しては種々の学説があるが、そのなかで「動水力学説(Hydrodynamic Theory)」は広く支持されている。この「動水力学説」では、象牙質知覚過敏は象牙質の透過性上昇を前提としており、この理論を提唱した Brännstrom は、疼痛誘発刺激が象牙細管内液を移動させること、象牙細管内液の移動方向を問わず細管液の移動が象牙質あるいは歯髄にある神経を興奮させることを見出した。この時の象牙質透過性は、象牙細管数とその開口径に比例すると考えられ、Pashley はこの時の象牙細管内における流体コンダクタンスに着目し、象牙質における流体の透過性を Split Chamber を用いて計測する方法を考案した。この方法は象牙細管内液移動の様相を定量的に観察する方法として、象牙質知覚過敏抑制材の開発や象牙質接着に関わる研究に大きな進歩をもたらした。しかし本来、ヒト象牙質における透過量はごく微量であり、Pashley の方法によって透過量を可視化する計測装置には配管のコンプライアンスや温度環境などを厳密に均一化することが要求され、さらにこの方法ではガラス管を移動する空気の気泡を指標として用いているため、ごく短



時間に変動する透過量を検知するには限界がある事が明らかとなってきた。そこで我々は、ヒト象牙質の透過性を簡便に、しかも透過量の瞬間的な変動を捉えて高速サンプリングを可能とする方法として微量でも強いルミノール発光を惹起する励起剤をトレーサーとして用い、これを電子的に計測するため Split Chamber の一部にウィンドウを設けた光化学反応検知セルを開発した。この方法の有用性については、日本歯科保存学会等にて発表し、種々の知覚過敏抑制材の効果を検討するとともに象牙質接着の研究にも応用し、数多くの報告を国内外の学会や海外のジャーナルに発表してきた。また得られたデータの臨床的な意義については、海外の研究者と共同の臨床研究を行い、本装置から得られたデータと臨床試験の結果には高い相関がある事を示した。動水

力学説では、疼痛誘発刺激が急激な象牙細管内液の移動を発生させるとされている。そのため象牙細管内液の流速の変化と後戻りの関係は重要であるが、これまでほとんど解明されていない。そこで我々は象牙細管内液の移動をフローセンサーを用いてリアルタイムに解析する方法を考案した。

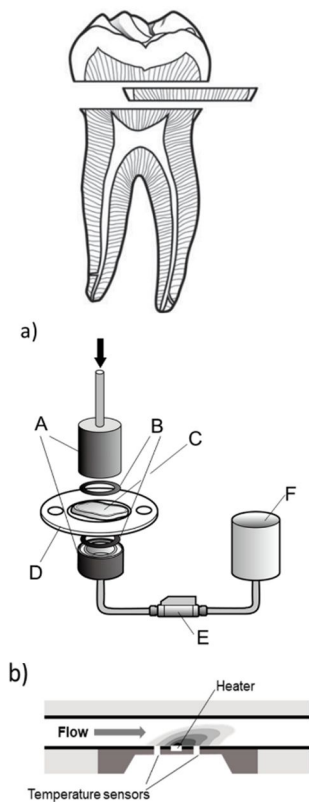
2. 研究の目的

光化学反応を応用した解析方法とフローセンサーを使用した方法の2種類の方法を組み合わせ補完しながら知覚過敏抑制材の抑制効果を解析する事は、象牙質知覚過敏の in vitro シミュレーション法としての有用性が高いと考えられ、知覚過敏抑制材の効果と後戻りの動態解明に非常に有益となる。本

研究では、これまでの研究成果を進展させ解明されていない知覚過敏の後戻りと象牙細管内液の移動速度との関係および象牙細管内の微細形態学的関連性を明らかにする事により、新たに開発中の知覚過敏抑制材を含めより有効な知覚過敏抑制法の確立につなげる事を目的とした。象牙質の透過性を抑制する方法としては現在3種類の異なるメカニズムが考えられているが、これまでの多くの方法では象牙細管開口面を封鎖する事でその効果を得ようとするものであった。しかしながらこの方法の耐久性は低く、また象牙細管内圧の影響を受けやすいという欠点があった。無水リン酸二カルシウム(DCPA)とリン酸四カルシウム(TTCP)を含むリン酸カルシウム系材料は、一定の条件下で生体親和性の高いハイドロキシアパタイト(HA)を生成する。HAが象牙細管内に析出し、結晶が成長すれば象牙細管を封鎖する事が期待できる。さらに、HAの象牙細管内部での結晶化は処置後の後戻りを防止する上で効果が高い事が期待される。しかしながら、これらの効果を発揮するであろう粒径サイズの生成には4~6時間必要である事がわかってきたため、結晶化反応を促進させる事が必要である。この反応促進のための生成速度、成分比、付加成分および環境要因等については外部からの成分添加が効果的であったという予備的実験の結果をふまえ、唾液成分としたCa/P比の影響について検討を加えた。

3. 研究の方法

(1)象牙質試料の作製方法: 抜歯後最大1ヶ月間脱イオン水に室温保管されたう蝕のないヒト第三大臼歯を試験に供した。なお本研究は東北大学大学院歯学研究科倫理委員会の許可を得て実施された。試料はダイヤモンドマイクローム(Model SP 1600)を使用し、水冷下にて歯牙の歯冠部より歯の長軸に垂直方向に切断し、厚さ1.3mmの象牙質スライス片を取り出し87個の試験片を作製した。試験片を0.5 M EDTA 溶液(pH 7.4)にて2分間超音波洗浄してスマア層を除去してから再度蒸留水で洗浄した。



(2)象牙質透過性計測装置: 象牙質透過性計測装置の概略図を左図に示した。本装置は本研究期間中にセンサー部分をナノレベルで計測出来るように改良した。取り付けられた象牙質ディスクは、各試験片は金属リングに開けられた孔により各測定段階で正確に同じ位置に戻す事が可能となっている。歯髄側から象牙質ディスクへ歯髄内圧を想定したごく低圧の2kPaで加圧されており、フローは熱電式流量計(LG16-0150; Sensirion AG)を用い0.1秒間隔で流体流量を測定した。

(3)各試料のベースライン値: 最初に試料の象牙質透過量を測定し、その値をその試料の透過量として記録した。象牙細管内に含まれる極少量の気泡等の影響を極力排除するため、7日間脱イオン水に保管してから再度象牙質の透過量の測定を行い、その値をベースライン値(BL値)とした。これらの試料の中から象牙質透過量0.5~5 $\mu\text{L}/\text{min}$ の範囲にある試料40個を実験に採用した。

(4)hydraulic conductanceと実験期間: 象牙質透過量は1分あたりの流体流量($\mu\text{L min}^{-1}$)を計測してから水力学的コンダクタンス(L_p)を計算し、ベースラインの透過性を100%とした。水力学的コンダクタンス(L_p)は、 $\mu\text{L min}^{-1}$ (流量) cm^{-2} (表面積) $\text{cmH}_2\text{O}^{-1}$ (静水圧)で表した。各期間グループの測定値は、BL値の L_p 値からのパーセンテージ値(RP%)として記録した。計測は処理後、1日後(22~26時間)、1週間後(6~8日)および1か月(28~32日)後に行なった。

(5)使用材料: 知覚過敏抑制材としてTeethmate™Desensitizer (Kuraray Noritake Dental Inc.: TD)を使用した。この材料に含有される無水リン酸二カルシウム(DCPA)とリン酸四カルシウム(TTCP)の粉末を水溶液と混合してペースト状にして使用する事によりHAの形成が期待できる。

(6)実験手順: 40個の試料を下記の4つの試験群にランダムに割り振った(n=10)。第1群(TD / AS): 混合したTDをマイクロブラシにて塗布して軽い力ですり込み、さらに追加して2度塗りを行い合計

60 秒間処理後、蒸留水にて3秒間軽くすすいだ。次に、試験片を金属製リテーナのパイロット孔にステンレス鋼のフックで試験片をピーカーに吊るし、人工唾液 (1.5 mmol/L CaCl₂, 0.9 mmol/L KH₂PO₄, 20 mmol/L Hepes, 150 mmol/L NaCl, pH 7.0) に浸漬して、実験期間中に沈殿物ができないようマグネチックスターラーにて攪拌を行った。第2群(TD / DW) : 試料を第1群と同様に処理し、浸漬はマグネチックスターラーを使用して蒸留水に浸漬した。第3群(DW / AS) : 試料を蒸留水で第1群と同様に軽くこすりながら 60 秒間マイクロブラシで処理してから人工唾液に浸漬した。第4群(DW / DW) : 試料を第3群と同様に蒸留水で処理し、第2群と同じように蒸留水に浸漬した。なお、人工唾液および蒸留水は2日ごとに交換した。試料は1人の研究者が作製し、象牙質透過性の計測は処理の方法がわからない状態で別の研究者が行った。実験は、実験室温度(23±1)で実施された。

(7)統計: 4群の BL 値データは正規分布をしていなかったため、ノンパラメトリック統計により分析を行った。処理条件の違いと保管期間について、Wilcoxon の符号順位検定を行った後に Bonferroni により補正を行い計算した。なお計算には PC 版 IBM SPSS, version 22 (IBM SPSS Statistics)を使用し、統計学的有意レベルは ≤0.05 とした。

(8)走査型電子顕微鏡 (SEM) による観察: 象牙質透過量測定後、各グループの透過量の平均に近い RP%を持つ2個の試料を各グループより選択し、昇順アルコールを通過させてから乾燥後、Pt にてスパッタコーティングを行った。観察には、走査型電子顕微鏡 (VE-8800; Keyence Inc) を使用し、加速電圧 15 kV、倍率 1000 倍にて写真撮影を行った。また、電界放出型走査電子顕微鏡 (SU-4800; 日立ハイテクノロジー) を用い、試料の1万倍の高解像度 SEM 写真を撮影した。

4. 研究成果

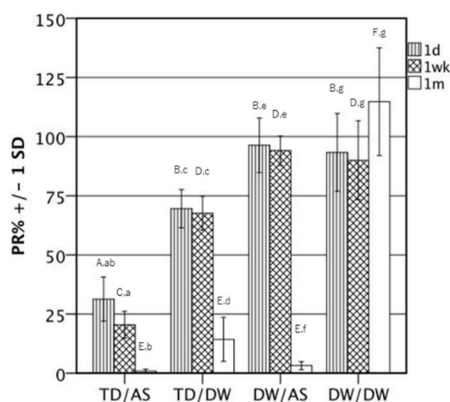
表には、各処理群および各期間の水力学的コンダクタンス値の平均と標準偏差 (n=10) を示した。TD

Table 1 Hydraulic Conductance (Lp) $\mu\text{L min}^{-1} \text{cm}^{-2} \text{cmH}_2\text{O}^{-1}$ (n=10) by treatment groups and time points

Time point	TD/AS	TD/DW	DW/AS	DW/DW
BL	0.23 (0.12) A,a	0.21 (0.09) A,d	0.22 (0.06) A,g	0.30 (0.17) A,i
1 day	0.07 (0.07) B,b	0.15 (0.05) C,e	0.21 (0.08) C,g	0.28 (0.16) C,i
1 week	0.05 (0.04) D,b	0.14 (0.05) E,e	0.21 (0.04) F,g	0.27 (0.16) F,i
1 month	0.00 (0.01) G,c	0.03 (0.06) G,f	0.01 (0.01) G,h	0.36 (0.21) H,i

Means (S.D.). Means with the same upper-case letters were not significantly different among the 4 conditions at the same time points. Means with the same lower-case letters denote no difference within each of the experimental groups (p>0.05).

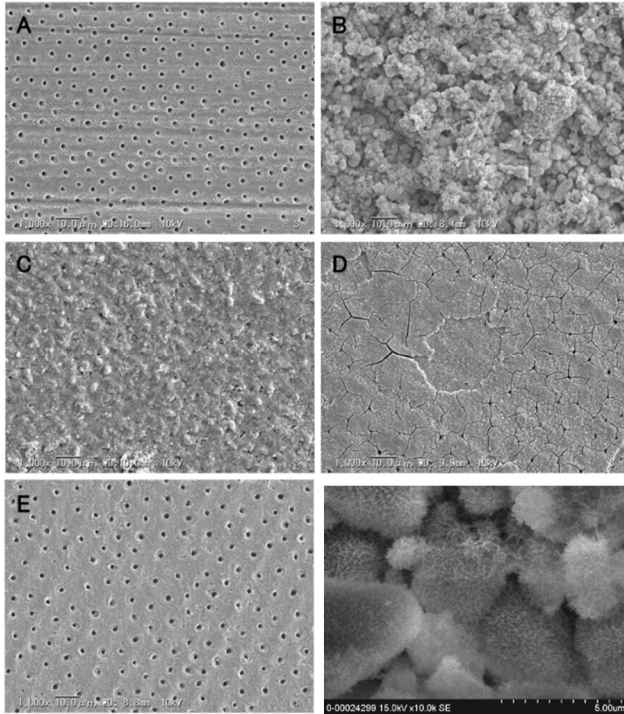
にて処理された試料は、BL から 1 月後まで Lp 値が徐々に減少したが、TD/DW 群よりも TD/AS 群の方が減少量が多かった。蒸留水で処理し人工唾液に浸漬した試験片では、BL から 1 週間までの Lp の値に有意差を示さなかったのに対し、水力学的コンダクタンスは 1 月後に 0.01 に低下した。しかしながら 1 月後の 2 つの TD 処理群に統計学的な有意差はなかった。DW/DW 群の 4 つの時点での Lp 値に有意差は見られなかった (p>0.05)。4 群の BL 値に有意差はなかった (p>0.05)。



左図は各群の減少率 (PR%) を示してる。TD/AS 群では、1 日後、1 週間後、1 月浸漬後の PR% がそれぞれ 31.31、20.43、0.87 となり最大の減少を示した。1 日および 1 週間浸漬後の TD/DW 群の平均 PR% 値はほぼ 70% であり統計学的有意差はなかったが、1 月後では 14.29% となり有意な減少が見られた。DW/AS 群の 1 日後と 1 週間後は BL からの減少はほとんど見られなかったが、1 月浸漬後では PR% 3.18 であった。3 つの時点での DW/DW 群の PR% は 93.33、90.00、114.74% であり、BL(100%) と統計学的有意差はなかった。

次ページには人工唾液および蒸留水中で 1 月浸漬後の TD および蒸留水処理象牙質表面それぞれ

の SEM 写真を示した。また、コントロールとして処理前の象牙質表面像を A に示した。A では石灰化した



管周象牙質とすべての象牙細管が開口している像が観察され、管間象牙質は EDTA 処理後に残ったコラーゲン線維で覆われてスミア層の除去と象牙質細管の開口が確認された。TD/AS の象牙質表面は、石灰化沈着物で密に覆われ多くの沈着物の形態は球状だった。数ミクロン間隔の小さな球状の石灰化物の間にはそれよりさらに小さい石灰化物の沈着が見られ、象牙細管の入り口を確認する事はできなかった(B)。TD/AS の表面には、多くの球状石灰化沈着物と極微細な結晶性沈着物が観察され、すべての象牙細管開口部は完全に塞がれていた(C)。この沈着物の高倍率の SEM 写真では、Ca イオンとリン酸イオンの過飽和環境下で反応を開始し生成され始めたリン

酸カルシウム結晶の微細な沈殿物が見られた(右最下図)。DW/AS では、表面を被う沈着物の層と試料作製あるいは SEM 観察中の真空処理により発生したクラックが観察された。一部層が喪失している下部にはさらに別の微細な構造の沈着物が見られ、象牙細管を確認する事はできなかった(D)。DW/DW の表面は、コントロールと同様の像を示していたが、表面に有機質コラーゲン繊維は見られなかった(E)。

本研究においては、当初予定していた装置に熱量移動プロファイルを利用した象牙質透過性計測のための極低速のフローのリアルタイム検出方法を新たに追加した。その結果、今回使用したナノフロー計測装置は最小計測流量検出能に優れ、装置の維持に繊細さが必要であるもののその有効性は高いと考えられた。また、光化学を応用した方法との併用により優れた検知能力を発揮することが確認された。

象牙質知覚過敏に対する治療方法としてハイドロキシアパタイトを象牙細管および象牙質表面に生成させる事は、生体親和性、安定性に優れた最も望ましい方法である。しかしながらこの反応には数時間を要するため、臨床的には改善する事が必要である。本研究の結果より、外部から石灰化に必要なイオンを供給する事は、ハイドロキシアパタイトの生成促進に効果的であり、象牙質知覚過敏の改善に有効となる事が予想された。

本研究では、ルミノール化学発光とナノフロー解析を利用した象牙質ディスクの透過性測定法の 2 方法を併用する事で、象牙質透過性を抑制する異なる原理の 3 種類の方法の 1 つである象牙細管内液の移動を抑制する方法として、新たに象牙細管内に生体親和性の高い結晶を生成させその効果を加速させる方法について、経時的な象牙質透過性の解析および象牙質表面および内部の形態学的な観察を行うことにより、その抑制方法の特徴と効果持続性に影響する要因を解析した。本方法は我々独自に開発した手法でありこの方法での研究は他に見当たらない。生体組織である歯を再石灰化させる方法は国内外で様々な方法を検討しているが、臨床に適用できるまでには到っていない。本研究の結果に基づき外部環境を改善する事で石灰化を促進させる事は 1 つの手法として有望であると考えられる。これらの事より、本研究により得られた知見は安全で効果の高い象牙質知覚過敏抑制材の開発に必要な基本的エビデンスとする事ができ、有益な成果とする事ができた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Masafumi KANEHIRA, Hiroshi ISHIHATA, Yasuyuki ARAKI, Hidekazu TAKAHASHI, Keiichi SASAKI, Werner J. FINGER	4. 巻 38
2. 論文標題 Effect of artificial saliva on permeability of dentin treated with phosphate containing desensitizer measured by digital flow meter	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Dental Materials Journal	6. 最初と最後の頁 963-969
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.4012/dmj.2018-134	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 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Masafumi KANEHIRA, Hiroshi ISHIHATA, Yasuyuki ARAKI, Hidekazu TAKAHASHI, Keiichi SASAKI, Werner J. FINGER
2. 発表標題 Effect of artificial saliva on reduction in dentin permeability using Calcium-Phosphate Desensitiser
3. 学会等名 The 96th General Session & Exhibition of the International Association for Dental Research（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Toshinori Tanaka, Keisuke Handa, Suresh V. Venkataiah, Masafumi Kanehira, Tatsuya Hasegawa, Yuichiro Noiri, Masahiro Saito
2. 発表標題 Establishment of in vivo intraradicular biofilm model using cattle pig
3. 学会等名 11th International Federation of Endodontic Associations World Endodontic Congress（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 KANEHIRA Masafumi, ENDO Tatsuo, SAITO Masahiro
2. 発表標題 Comparative Evaluation of TCD-DI-HEA , Bis-GMA or UDMA resin -based Composites- Basic Mechanical Characteristics -
3. 学会等名 日本歯科保存学会2017年度春季学術大会
4. 発表年 2017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
研究分担者	石幡 浩志 (Ishihata Hiroshi) (40261523)	東北大学・歯学研究科・助教 (11301)	
研究分担者	高橋 英和 (Takahashi Hidekazu) (90175430)	東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・教授 (12602)	

	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
研究協力者	荒木 保幸 (Araki Yasuyuki)		
研究協力者	フィンガー ヴァーナー (Finger Werner J.)		

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
---------	---------