

令和 4 年 5 月 24 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K18533

研究課題名（和文）UVA活性リボフラビンを用いたコラーゲン架橋による根面う蝕再石灰化療法の新規開発

研究課題名（英文）New development of root caries remineralization method by collagen crosslinking using UVA-activated riboflavin.

研究代表者

上村 怜央（UEMURA, Reo）

大阪大学・医学部附属病院・特任助教

研究者番号：10823560

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：臨床現場で遭遇する根面う蝕を想定し、ヒト大臼歯の歯根象牙質を切り出し、脱灰溶液に浸漬し、初期根面う蝕モデルを作成した。試料にUVA活性リボフラビン架橋法を行う際に、リボフラビン溶液に各種フッ化物溶液を混ぜて処理を行った後、再石灰化液に浸漬させ、う蝕の再石灰化を促した。その結果、走査型電子顕微鏡像では、脱灰面に石灰化物の析出が観察され、元素分析を行った結果、リン酸カルシウムを主成分とする物質の沈着を確認することができた。また、ミネラル密度分析において、非処理群と比べて再石灰化は促されたものの、材料間において明らかな違いはなく、最適な材料および濃度はさらなる検討が必要である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年の超高齢社会において、高齢者が保有する歯数の増加に伴い、歯の根元の虫歯（根面う蝕）が急増している。この根面う蝕は広範囲に広がりやすく、歯茎に埋もれる位置に拡大しやすいため、う蝕を除去したのちに形態を修復する操作が困難になりやすい。そのため、これまでに行われてきた「削って詰める」という従来のう蝕治療方法から、「削らない」う蝕治療方法へ移行していくことが、さらなる保有歯数の増加への新たなきっかけとなり、既に進行した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。処理溶液に浸した後に光を当てることで歯の再石灰化を促す本手法を用いることは、画期的であると考えられる。

研究成果の概要（英文）：Assuming root caries encountered in the clinic, root dentin of human molars was cut out and immersed in demineralized solution to create a model of early root surface caries. In UVA-activated riboflavin cross-linking treatment, the riboflavin solution is mixed with various fluoride solutions before treatment, and then the specimens are immersed in remineralizing solution to promote remineralization of caries. As a result, calcified deposits were observed on the demineralized surfaces in scanning electron microscope images, and elemental analysis confirmed the deposition of substances consisting mainly of calcium phosphate. In the mineral density analysis, remineralization was promoted compared to the non-treated group, but there was no clear difference between the materials, and further study is needed to determine the optimal material and concentration.

研究分野：象牙質の再石灰化

キーワード：象牙質 根面う蝕 再石灰化

1. 研究開始当初の背景

近年、我が国での超高齢社会において、8020 運動に代表される口腔衛生への関心の高まりから、高齢者が保有する歯の数が年々増加している。しかしその増加に伴い、加齢による歯肉の退縮や服用薬剤の影響による唾液分泌の低下といった原因から、根面う蝕が急増していることが多数報告されている。歯冠部のエナメル質と比較して、根面の象牙質は無機成分の含有量が少ないために、臨界 pH が高く、う蝕に罹患しやすいと言われている。ひとたび病変ができると、慢性的に広範囲に拡大しやすく、歯肉縁下にも進行するため、修復操作は困難となることが多い。よって、根面う蝕に対しては、ごく初期のうちに、活動性である根面う蝕を石灰化し、進行を停止させることにフォーカスした非切削での治療といったアプローチが必須で、極めて有用であると考えられる。

近年の眼科領域において、円錐角膜という疾患の治療に、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、さらに安全領域とされる長波長紫外線 UVA に限定して照射することにより、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、実際に臨床応用されている(UVA 活性リボフラビン架橋法)。この方法を、I 型コラーゲンを構成成分として含む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た。研究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。その成果をさらに発展させ、根面う蝕の予防だけでなく、初期活動性根面う蝕に対して本手法を利用することで、根面う蝕を抑制し、さらにミネラル成分を同時に配合することによってう蝕の再石灰化ができるかどうかということはまだわかっていない。歯面への材料塗布および表面処理によって再石灰化が誘導されれば、非切削でのアプローチに大いに貢献することになるであろうと考え、ここに着目した。

2. 研究の目的

本研究は、UVA 活性リボフラビン架橋法を象牙質コラーゲンに応用し、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、加えてコラーゲンの架橋形成促進効果によって歯の強化を図りつつ、従来から用いられているう蝕予防材であるフッ化物含有材料を複合的に作用させることによって、すでに喪失した無機質を新たに架橋形成されたコラーゲンに沈着させて象牙質内に取り込むことによって、根面象牙質の再石灰化を促進させ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、本来反応性の低いヒドロキシアパタイトに被覆された象牙質の型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。

3. 研究の方法

ヒト抜去大白歯の歯根より象牙質試料を採取し、頬舌面から新鮮面を出し、その中央に位置する 1.0 mm x 2.0 mm の試験面以外をスティッキー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、初期根面う蝕を想定した象牙質脱灰試料として用いた。試料をコントロール群および処理群に分け、処理群は、0.1% リボフラビン溶液に、各種フッ化物含有溶液を混和させた溶液を用いて、試験面に塗布し、その後 1600mW/cm² 紫外線を照射した。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い、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、脱灰時間と石灰化時間のサイクルを設定し、脱灰負荷試験を行い、再石灰化を促進した。

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、象牙細管の開口度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。

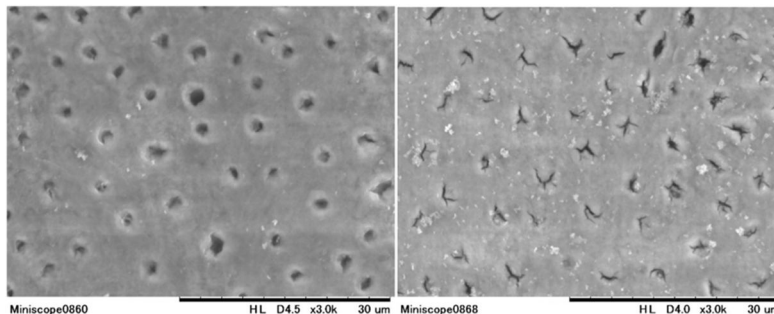
また、脱灰負荷試験の前後においては、マイクロ CT 撮影によって、試料の 3 次元画像を取得し、ミネラル密度の変化を算出した。

4. 研究成果

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、UVA 活性リボフラビン処理を行った群については、管周象牙質の形態が異なっており、また象牙細管の開口度も異なることから、象牙細管を含む、試験面に石灰化物の沈着を認めたことが明らかになった。一方コントロール群については石灰化物の析出は明らかではなく、象牙細管の形態も変化は見られなかった。

代表的な画像を下記に示す（左：コントロール群、右：UVA 活性リボフラビン処理 + フッ化物配合群）。

脱灰液の作用によって象牙細管周囲のミネラルが失われ露出したコラーゲンに対して、UVA 活性リボフラビン処理によってコラーゲンが強化され、そこにフッ化物含有材料および再石灰化溶液に起因する無機質が沈着し、象牙細管そのものを閉塞することができたということを示している。



また、この象牙細管を閉鎖している無機物の沈着に対し、元素分析を行った結果、主にリン酸カルシウムを含む物質で満たされていることが判明した。

マイクロ CT 撮影による、ミネラル密度の変化については、コントロール群と処理群には差を認めなかったものの、各種フッ化物含有材料の違いによっては明らかな有意差を認めなかった。

今後の展望として、最適な材料および濃度、リボフラビン溶液との混和の方法、処理の仕方などについて検討を重ねる必要があるが、本手法を利用することによって、コントロール群よりも再石灰化を促進させる可能性があることから、非切削でのう蝕治療のアプローチとして有用であることが示唆され、臨床応用できる可能性を秘めていると考えられる。

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 1件/うちオープンアクセス 1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 40
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 1142 ~ 1150
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.4012/dmj.2020-273	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1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バ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

〔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
---------	---------