

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 7 日現在

機関番号：32703

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009 ~ 2011

課題番号：21592436

研究課題名（和文） 漂白剤の有機質分解能を利用した審美的エナメル質再石灰化療法の開発

研究課題名（英文） Remineralization strategy for enamel subsurface lesions using bleaching therapy

研究代表者

向井 義晴 (MUKAI YOSHIHARU)

神奈川歯科大学・歯学部・准教授

研究者番号：40247317

研究成果の概要（和文）：唾液タンパク質に対し 30%過酸化水素水を作用させると特定のタンパク質が断片化されることが示された。また，唾液タンパク質を侵入させたエナメル質表層下脱灰病巣をオフィスブリーチング処理することにより病巣侵入唾液タンパク質成分が減少することが確認された。さらに，Statherin 抗体を用いた Western Blotting の結果から表層下脱灰病巣内に存在する Statherin はブリーチングにより抗原性を失うことが確認された。これらの結果からブリーチング材の使用は再石灰化治療に有効であると考えられた。

研究成果の概要（英文）：Salivary proteins reacted with 30 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, resulting in fragmentation of certain proteins. Also, we detected in-office bleaching agent in their capacity to remove human salivary protein components penetrated into the enamel subsurface lesions. Furthermore, western blotting with antibody against serum statherin indicated that antibody response of statherin in the lesions was undetectable after the in-office bleaching. These results indicate that bleaching will be useful for advancing of enamel remineralization.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2010 年度	900,000	270,000	1,170,000
2011 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：保存修復学

科研費の分科・細目：歯学・保存治療系歯学

キーワード：エナメル質表層下脱灰病巣，ブリーチング，唾液タンパク質，再石灰化

## 1. 研究開始当初の背景

エナメル質初期齲蝕病巣中には唾液蛋白が侵入していることが報告されており，病巣表面を次亜塩素酸水溶液で処理することによりカルシウムの取り込みが増加することが報告されている。一方，生活歯漂白用のオフィスブリーチング材には30-35%のH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>が含

まれており，H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>由来のフリーラジカルがエナメル質色素分子中の不飽和二重結合を切断することによって漂白が進行すると考えられている。また，オフィスブリーチング材より発生するフリーラジカルは色素分子中の二重結合を切断するのみならず血液成分等の蛋白質も分解するといわれている。これ

らのことから、エナメル質表層下病巣に侵入したタンパク成分を除去、変性させることにより効果的かつ審美的な再石灰化を誘導できる手段としてブリーチング材の適用を提案した。

## 2. 研究の目的

エナメル質表層下病巣を形成する表層はイオンの通過のみ可能な層であると考えられているが、微視的にはサブミクロンレベルの孔や裂溝が存在し、病巣体部には蛋白質等の有機物が侵入している。オフィスブリーチング材の成分である $H_2O_2$ にはタンパク質変性作用があること、ならびにブリーチング材はエナメル質面に広く塗布することが可能であることなどから本研究では効果的かつ審美的な再石灰化誘導の手段としてオフィスブリーチング材を利用することが有効であるか否かを検討する。

## 3. 研究の方法

### (1) エナメル質表層下脱灰病巣侵入有機質に対するオフィスブリーチング材の影響

表層下脱灰病巣群(Lesion群)：エナメル質片を脱灰ゲルに37で10日間浸漬し表層下脱灰病巣を作製した。表層下脱灰病巣再石灰化群(Rem群)：同様にエナメル質片に表層下脱灰病巣を作製した後、再石灰化溶液に14日間浸漬した。表層下脱灰病巣casein浸漬再石灰化群(Casein群)：エナメル質片に表層下脱灰病巣を作製した後、蛋白質の侵入した脱灰病巣を模倣する目的でカゼイン溶液(200 ppm)に2週間浸漬し、その後再石灰化溶液に14日間浸漬した。表層下脱灰病巣カゼイン溶液浸漬漂白再石灰化群(HiLite群)：エナメル質片に表層下脱灰病巣を作製し、カゼイン溶液に2週間浸漬した後、オフィスブリーチング材である松風HiLiteを適用し、その後再石灰化溶液に14日間浸漬した。各処理後、エナメル質片から薄切片を切り出し、TMR撮影を行った。

### (2) 30% $H_2O_2$ による唾液成分タンパク質の化学的变化

氷上にて採取した唾液上清を2群に分け、氷冷イソプロパノールを加え静置後、10分間遠心分離した。回収した沈殿に対しそれぞれ以下の処理を行った。1)  $H_2O_2$ 群：沈殿に対し30%  $H_2O_2$ を加え、30分間室温処理した。2) 蒸留水(DW)群： $H_2O_2$ に代わりDWを使用した。遠心分離にて上清及び沈殿に分けた後、SDS sample bufferに溶解し、SDS-PAGEにて分析を行った。ゲルはCBBおよびStains-All染色を行ったほか、Western Blottingにてタンパク質の化学的性状変化を検討した。

### (3) 表層下脱灰病巣に結合した唾液タンパ

## ク質の化学的变化

ウシエナメル質片に表層下脱灰病巣を作製し、以下に示す2群に分けた。1) Lesion群：氷冷下にて採取した自己安静時唾液にエナメル質脱灰病巣を37で5日間浸漬した。2) HiLite群：Lesion群と同様に病巣を作製後、安静時唾液に浸漬した。その後、HiLiteを9回適用した。これらの処理後、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5  $\mu$ lずつ2回滴下し、病巣内のタンパク質を順次抽出した。以上の抽出操作後も残存したタンパク質を得るため、1N HClを同様に滴下し回収した。これらの抽出液を透析、濃縮後、SDS sample bufferに溶解し、熱変性処理した。回収されたタンパク質はSDS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。また、Western Blotting法によりStatherin抗体を用いて抗原性を示すタンパク質の分布を調べた。

## 4. 研究成果

### (1) エナメル質表層下脱灰病巣侵入有機質に対するオフィスブリーチング材の影響

Lesion群では典型的な表層下脱灰病巣が作製された。Rem群は病巣体部のミネラル濃度が顕著に上昇し明瞭な再石灰化が誘導されていた。一方、カゼイン溶液に浸漬した表層下脱灰病巣(Casein群)では病巣体部ミネラル上昇が抑制されたプロファイルを示した。カゼイン溶液浸漬後、HiLite処理を行った群(HiLite群)は、Rem群には及ばないもののCasein群に比較してミネラル濃度の上昇したプロファイルが確認された。病巣体部のミネラル濃度の比較ではHiLite群はCasein群に比較し有意に高い値となった。Casein群に比較しHiLite群で病巣体部のミネラル濃度が有意に高い値となったこと、およびHiLite処理により再石灰化が助長される傾向が確認された結果は、カゼインが病巣体部にまで浸透し再石灰化抑制に働いたと同時にHiLiteがその分解に関与していると考えられ、その結果速やかな再石灰化が誘導される可能性があることを示している。

### (2) 30% $H_2O_2$ による唾液成分タンパク質の化学的变化

コントロール群で見られたいくつかのバンドが、30%過酸化水素水処理をした群では消失することが確認された。また、Stains-All染色によりコントロール群と過酸化水素水群の酸性タンパク質を比較したところ、分子量が250kDa以上の唾液ムチンタンパク質において、過酸化水素水と反応させた唾液タンパク質のほうがより大きい分子量を持つことが検出された。また、Western blottingの結果から、30%  $H_2O_2$ 処理により

Albumin の抗体が幅広い分子量で検出されたと同時に Statherin 抗体の反応が消失した。これらの結果から、特定のタンパク質が過酸化水素水によって断片化されることが考えられ、特に statherin の変性は石灰化抑制力の喪失を意味するものと考えられた。

anti-statherin Ab

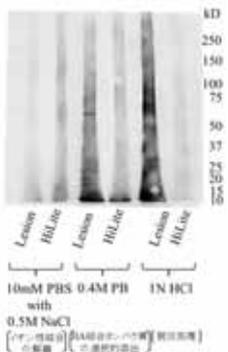


statherin のバンドは DW 群では存在するが、 $H_2O_2$  処理したものでは完全に消失した。  
\*ヒトの statherin 分子量は約 5.3kDa である。

### (3) 表層下脱灰病巣に結合した唾液タンパク質の化学的变化

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、安静時唾液中のタンパク質のパターンと比較すると、低分子量のタンパク質に限られていた。また非処理群と HiLite 群を比較すると、HiLite 群ではタンパク質成分が大幅に消失・減少していることが確認された。また、Statherin 抗体を用いた Western blotting の結果から、HiLite 処理を行うことにより、表層下脱灰病巣内に存在する Statherin は抗原性を失うことが確認された。以上のことからフッ化物の効果的な利用法にブリーチング材を併用することにより、効果的な再石灰化を導く可能性が示唆された。

Western blotting anti-statherin Ab



Western Blotting によりポリクローナル抗体を用いて statherin の分布を調べたところ、Lesion 群にて statherin の抗原性を示すタンパク質が確認できた。

一方、HiLite 群において、該当するバンドの多くは確認できなかった。

### 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 2 件)

1. 飯塚純子, 向井義晴, 高垣裕子, 寺中敏夫: 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 第 1 報 30% 過酸化水素水による唾液成分タンパク質の化学的变化. 日本歯科保存学雑誌, 査読あり, 55, 2012, 127-133.

<http://www.hozon.or.jp/member/kaisi.htm>

2. 向井義晴, 椎谷 亨, 坂本英里, 室野井麻紘, 飯塚純子, 藤野富久江, 寺中敏夫: エナメル質表層下脱灰病巣に対するブリーチング処理の影響. 日本歯科保存学雑誌, 査読あり, 53, 2010, 579-584.

<http://www.hozon.or.jp/member/kaisi.htm>

〔学会発表〕(計 10 件)

1. Iizuka J, Mukai Y, Mikuni-Takagaki Y, Teranaka T: Chemical alteration of human salivary proteins with 30%  $H_2O_2$  solution. 45<sup>th</sup> Meeting of the Continental European division of the International Association for Dental Research (CED-IADR) with the Scandinavian Division, Budapest, Hungary, 2011. 9. 3.

2. 飯塚純子, 向井義晴, 高垣裕子, 寺中敏夫: オフィスブリーチング剤を使用したエナメル質表層下脱灰病巣の再石灰化手法 表層下脱灰病巣に結合した唾液タンパク質の化学的变化. 神奈川歯科大学学会第 46 回総会, 横須賀市, 2011. 12. 3.

3. 飯塚純子, 向井義晴, 高垣裕子, 寺中敏夫: 30%  $H_2O_2$  による唾液成分タンパク質の化学的变化. 神奈川歯科大学学会第 46 回総会, 横須賀市, 2011. 12. 3.

4. 飯塚純子, 向井義晴, 高垣裕子, 寺中敏夫: 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 表層下脱灰病巣に結合した唾液タンパク質の化学的变化. 日本歯科保存学会 2011 年度秋季学術大会 (第 135 回), 大阪市, 2011. 10. 20.

5. 飯塚純子, 向井義晴, 高垣裕子, 寺中敏夫: 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 30% 過酸化水素水による唾液成分タンパク質の化学的变化. 日本歯科保存学会 2011 年度春季学術大会 (第 134 回), 浦安市, 2011. 6. 10.

6. 向井義晴, 椎谷 亨, 室野井麻紘, 坂本英里, 藤野富久江, 寺中敏夫: エナメル質ホワイトスポットに対する漂白処理の影響. 神奈川歯科大学学会第 45 回総会, 横須賀市, 2010. 12. 4.

7. 飯塚純子, 向井義晴, 寺中敏夫: オフィスブリーチング剤を使用したエナメル質表層下脱灰病巣の再石灰化手法. 神奈川歯科大学学会第 45 回総会, 横須賀市, 2010. 12. 4.

8. 飯塚純子, 向井義晴, 寺中敏夫: オフィスブリーチング剤を使用したエナメル質表層下脱灰病巣の再石灰化戦略. 日本歯科保存学会 2010 年度秋季学術大会 (第 133 回), 岐阜市, 2010. 10. 29.

9. Mukai Y, Shiiya T, Sakamoto E, Muronoi M, Fujino F, Teranaka T: Influence of bleaching agents on enamel subsurface lesions in vitro. 88<sup>th</sup> General session & exhibition of the IADR, Barcelona, Spain, 2010. 7. 17.

10. 向井義晴, 椎谷 亨, 坂本英里, 室野井麻紘, 藤野富久江, 寺中敏夫: 表層下脱灰病変に対する漂白処理の影響. 日本歯科保存学会 2010 年度春季学術大会 (第 132 回), 熊本市, 2010. 6. 4.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕  
出願状況 (計 0 件)

名称 :  
発明者 :  
権利者 :  
種類 :  
番号 :  
出願年月日 :  
国内外の別 :

取得状況 (計 0 件)

名称 :  
発明者 :  
権利者 :  
種類 :  
番号 :  
取得年月日 :  
国内外の別 :

〔その他〕  
ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

向井 義晴 (MUKAI YOSHIHARU)  
神奈川歯科大学・歯学部・准教授  
研究者番号 : 40247317

### (2) 研究分担者

寺中 敏夫 (TERANAKA TOSHIO)

神奈川歯科大学・歯学部・教授  
研究者番号 : 60104460

(3) 連携研究者  
( )

研究者番号 :