

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 16 日現在

機関番号：32665

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24792037

研究課題名(和文) 機能性高分子材料を用いた象牙質再石灰化療法の確立

研究課題名(英文) Establishment of remineralization of dentin caries lesions using PRG materials

研究代表者

安田 源沢 (YASUDA, Genta)

日本大学・歯学部・非常勤医員

研究者番号：50579977

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円、(間接経費) 630,000円

研究成果の概要(和文)：F以外にも種々のイオンを徐放するS-PRGフィラー溶出液およびS-PRGフィラー含有歯磨剤に着目し、これらをエナメル質と異なり、脱灰抑制および再石灰化が困難な象牙質に適用させた際の状態変化を、超音波パルス法を用いて検討した。その結果、歯質を透過する縦波音速は経時的に上昇する傾向を示すとともに、SEMおよびレーザー顕微鏡観察では象牙細管の閉鎖が認められたことから、S-PRGフィラーは象牙質の脱灰抑制および再石灰化促進に寄与する可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：This study evaluated the effect of pre-reacted glass-ionomer (PRG) filler extraction solution on demineralization of bovine enamel by measuring changes in the ultrasound transmission velocity. No changes in sonic velocity were found for specimens stored in the PRG filler extraction solution, indicating that the PRG extraction solution had an effect on inhibiting the demineralization of bovine enamel. Within the limitations of this in vitro study, it can be concluded that the S-PRG filler extraction solution has an ability to prevent demineralization of the enamel. Released ions such as Al, B, Si, Sr, the S-PRG fillers might improve the acid resistance of teeth.

研究分野：歯科保存修復学

科研費の分科・細目：歯学・保存治療系歯学

キーワード：機能性高分子材料 脱灰抑制 再石灰化 S-PRG

1. 研究開始当初の背景

齲蝕発生のメカニズムは、脱灰と再石灰化の動的平衡が崩れた結果生じるものと考えられている。そのため、齲蝕の処置および予防に際しては、リスク因子を把握、コントロールすることが重要であり、齲蝕病巣に対するアプローチも変化してきている。すなわち、早期発見、早期治療から脱灰抑制を期待した待機的治療あるいは再石灰化療法にシフトしている。最近では、フッ化物などの各種イオンを放出するバイオアクティブな性質を有する修復材（機能性高分子材料）の開発も進められており、二次齲蝕の抑制や歯質の強化など機能と審美の回復にとどまらず、多様化する臨床への応用が期待されている。これらの臨床的背景のもと、機能性高分子材料の歯質への効果、とくに細管構造を有するとともに、水分を多く含有する象牙質は、エナメル質と異なり脱灰抑制あるいは再石灰化効果が発現しにくいことから、象牙質への効果的な臨床応用を確立することは急務であり、今後、さらなる増加が懸念される根面齲蝕への対応の一助となるものと考えられる。

2. 研究の目的

フッ化物などの各種イオンを放出する S-PRG フィラーに着目し、S-PRG フィラー含有機能性高分子材料の歯質の脱灰抑制および再石灰化に及ぼす影響について検討するとともに、これらの効果的な臨床応用法を確立することを目的とし、以下の実験を行った。

(1) S-PRG フィラー溶出液が、口腔内環境を想定した状況での歯質の脱灰あるいは再石灰化に及ぼす影響について、超音波透過法を用いて検討した。

(2) S-PRG フィラー含有コート材を歯質に塗布した際の、歯質に生じた脱灰あるいは再石灰化という変化を、非破壊的に物質の状態変化を測定可能である光干渉断層画像診断法 (Optical Coherence Tomography、以後 OCT) を用いて検討した。

(3) S-PRG フィラー含有コート材が乳歯の脱灰あるいは再石灰化におよぼす影響について、OCT を用いて歯質の状態変化を観察するとともに、OCT から得られた二次元グラフデータを基に $1/e^2$ 幅を算出、数値化することで検討した。

(4) S-PRG フィラー含有試作歯磨剤を象牙質に適用させた際の状態変化を、レーザ顕微鏡および走査型電子顕微鏡を用いて観察するとともに、超音波パルス法を用いて非破壊的に検討した。

3. 研究の方法

以下の実験において、超音波測定にはパルサーレーザ (Model 5900、Panametrics)、内径 5mm の縦波用トランスデューサー (V112、

Panametrics) と内径 15mm の横波用トランスデューサー (V156、Panametrics) およびオシロスコープ (Wave Runner LT584、Lecroy) から構成されているシステムを用いた。

OCT 観察には SLD を光源として、マイケルソン型光干渉計の応用技術によって構築された Time-Domain 型 OCT 装置 (モリタ東京製作所) を用いた。すなわち、干渉計にプローブを組合せ、パーソナルコンピュータで制御するシステムであり、SLD から発せられる近赤外線を試片に照射し、試片内部から反射あるいは散乱してくる物体光と参照鏡から反射してくる参照光を干渉させることで 2 次元断層像をイメージ化するものである。また、OCT イメージ像の変化をより客観的に把握することを目的として、測定範囲内の任意の 20 ヶ所における歯質の表層から深層にわたる反射光分布の信号強度グラフを得ることで信号強度を解析し、ピーク値を算出した。さらに、最大ピークを有する非対称な波形のピーク強度値から 86.5% に低下した時点での強度での幅を示す $1/e^2$ 幅を求めた。

(1) S-PRG フィラー溶出液がウシ歯エナメル質および象牙質の脱灰および再石灰化におよぼす影響

ウシ抜去下顎前歯歯冠部唇側面中央付近のエナメル質および象牙質をブロックとして切り出した後、耐水用 SiC ペーパーの #2000 まで順次研し、 $4 \times 4 \times 1$ mm の大きさに調整したものを測定用試片とした。

この試片に対して、以下の pH サイクルを 1 日 2 回、28 日間適用した。

0.1M 乳酸緩衝液 (pH4.75) で 10 分間脱灰した後、37 人工唾液 (pH7.0) に 12 時間保管

0.1M 乳酸緩衝液で 10 分間脱灰した後、S-PRG フィラー溶出液に 10 分浸漬後、37 人工唾液に 12 時間保管

これら pH サイクルを施した試片に対して、超音波測定装置を用いて超音波の伝播時間を測定、縦波音速を求めることで、エナメル質および象牙質の状態変化を経時的かつ非破壊に測定した。なお、超音波の伝播時間の測定時期としては、実験開始前および実験開始 1、7、14、21 および 28 日経過とし、あわせてレーザ顕微鏡 (VK-8700、KEYENCE) を用いて歯質の表面性状を観察した。さらに、実験期間の終了した試片に対しては、FE-SEM (ERA8800-FE、Elionix) を用いて観察を行った。なお、試片の数は各条件についてそれぞれ 5 個とした。

(2) S-PRG フィラー含有コート材のエナメル質脱灰抑制・再石灰化促進効果

ウシ抜去下顎前歯歯冠部唇側面中央付近のエナメル質をブロックとして切り出した後、耐水用 SiC ペーパーの #2000 まで順次研し、 $4 \times 4 \times 1$ mm の大きさに調整したものを測定用試片とした。この試片の表面に対して、製造者指示条件に従って S-PRG フィラー含有

コート材（PRG バリアコート、松風）を塗布したもの、あるいは塗布を行わないものの2条件を設定した後、37 人工唾液あるいは精製水中に 28 日間浸漬保管した。保管中の試片について、OCT を用いて歯質に生じる状態変化を経時的に観察した。また、所定の保管期間が終了した試片については、コート材を探針にて除去し、レーザ顕微鏡を用いて表面性状の観察を行った。なお、試片の数は各条件についてそれぞれ5個とした。

(3) S-PRG フィラー含有コート材が乳歯エナメル質におよぼす影響

ヒト抜去乳歯の歯根部を切断、歯冠部歯髄を除去した後、エナメル質表面を清掃し、これを測定用試片とした。この試片の表面に対して、製造者指示条件に従って PRG バリアコートを塗布したもの、あるいは塗布を行わないものの2条件を設定した後、37 人工唾液あるいは 0.1M 乳酸緩衝液に 28 日間浸漬保管した。保管中の試片について、OCT を用いて歯質に生じる状態変化を経時的に観察した。また、所定の保管期間が終了した試片については、コート材を探針にて除去し、レーザ顕微鏡を用いて表面性状の観察を行った。なお、試片の数は各条件についてそれぞれ5個とした。

(4) S-PRG フィラー含有歯磨剤がウシ歯象牙質におよぼす影響

ウシ抜去下顎前歯歯根部象牙質をブロックとして切り出した後、耐水用 SiC ペーパーの#2000 まで順次研し、4×4×1 mmの大きさに調整したものを超音波測定試片とした。

この試片に対して、以下の pH サイクルを 1 日 2 回、28 日間適用した。

EDTA (pH4.75) で 10 分間脱灰した後、37 人工唾液に 12 時間保管

EDTA で 10 分間脱灰した後、S-PRG 含有歯磨剤希釈液に 10 分浸漬後、37 人工唾液に 12 時間保管

EDTA で 10 分間脱灰した後、フッ化物含有歯磨剤希釈液（フッ素イオン濃度 900 ppm）に 10 分間浸漬後、37 人工唾液に 12 時間保管

これら pH サイクルを施した試片に対して、超音波測定装置を用いて超音波の伝播時間を測定、縦波音速を求めることで、象牙質の状態変化を経時的かつ非破壊に測定した。なお、超音波の伝播時間の測定時期としては、実験開始前および実験開始 1、7、14、21 および 28 日経過とし、あわせてレーザ顕微鏡を用いて象牙質の表面性状を観察した。さらに、実験期間の終了した試片に対して、FE-SEM を用いて試片の断面を観察するとともに、元素分析（EDAX Genesis、Elionix）を併せて行った。なお、試片の数は各条件についてそれぞれ5個とした。

4. 研究成果

(1) S-PRG フィラー溶出液がウシ歯エナメル

質および象牙質の脱灰および再石灰化におよぼす影響

0.1M 乳酸緩衝液による脱灰群では、他の条件と比較して経時的にその音速が減少する傾向が認められた。一方、S-PRG フィラー溶出液適用群ではエナメル質および象牙質試片ともに音速が増加する傾向が認められた。この歯質を透過する音速の変化は、S-PRG フィラー溶出液が脱灰抑制あるいは再石灰化に影響を及ぼしたことを示すものと考えられた。また、SEM およびレーザ顕微鏡像からは、エナメル質では S-PRG フィラー溶出液適用群で脱灰を示す像は観察されず、S-PRG フィラー由来と考えられる付着物あるいは析出物が認められた。一方、象牙質においては 0.1M 乳酸緩衝液による脱灰群で象牙細管の漏斗状拡大が観察されたが S-PRG フィラー溶出液適用群では象牙細管の開口あるいは閉鎖している像などが混在して認められた。

以上の結果から、S-PRG フィラー溶出液は、歯質の脱灰抑制効果および再石灰化促進に寄与する可能性が示唆され、齲蝕予防には、S-PRG フィラーから放出される F、Si あるいは Sr などの各種イオンが有効であり、齲蝕予防効果を発揮する修復物の開発に必要であることが判明した。

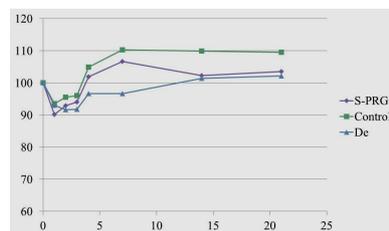


図 1-1 エナメル質での縦波音速の経時的変化

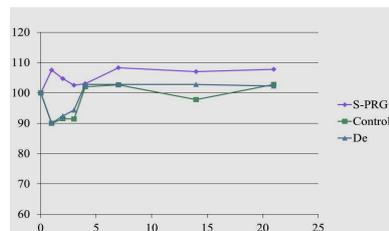


図 1-2 象牙質での縦波音速の経時的変化

(2) S-PRG フィラー含有コート材のエナメル質脱灰抑制・再石灰化促進効果

人工唾液保管群における PRG バリアコート塗布直後の OCT イメージ像からは、塗布面表層とその下方に強度分布を示す画像が得られ、その信号強度を解析したグラフからは、最大ピークのほかに信号の増強部が検出された。一方、実験期間の延長に伴い、コーティング面表層でのシグナルは減少し、その部位での信号解析からは、ピーク幅の拡大が認められた。非コーティング面の歯質は、塗布直後に比べ表層でのシグナルは増加し、そのグラフ解析より信号強度は増幅していることが判明した。また、レーザ顕微鏡による観察からは、観察期間の延長に伴って歯質表面

が粗糙になる傾向が認められた。OCT を用いた歯質断面像の解析においては、歯質が脱灰することによって生じた基質的变化が光線透過性に影響を及ぼすことによって、OCT イメージ像の変化として表れた。さらに、A スキャンモードにおける信号強度で検出されるピークの幅あるいは位置を検討することによって、より詳細な解析が可能であった。

以上の結果から、S-PRG フィラー含有コート材は歯質に生じる脱灰を抑制し、再石灰化を促進する可能性を有することが示され、乳歯あるいは高齢者の齲蝕予防に有効である可能性が示された。

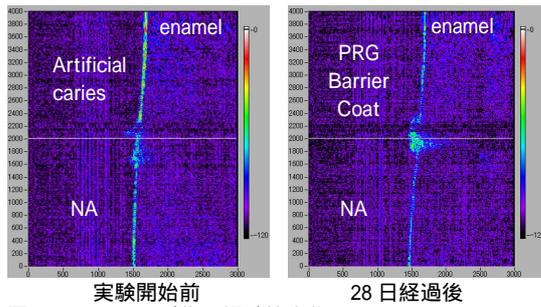


図 2 OCT イメージ像の経時的変化

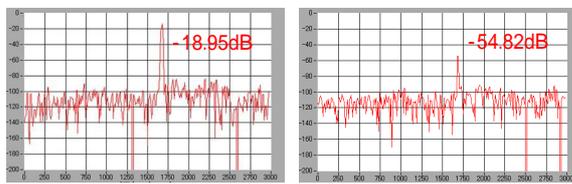


図 3-1 PRG バリアコート塗布条件の信号ピーク強度変化

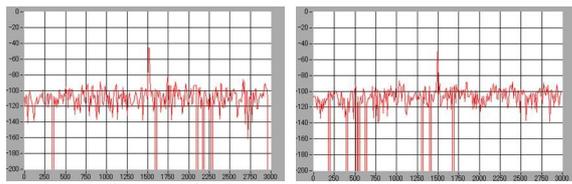


図 3-2 PRG バリアコートなし条件の信号ピーク強度変化

(3) S-PRG フィラー含有コート材が乳歯エナメル質におよぼす影響

PRG バリアコートの塗布に関わらず、人工唾液浸漬条件においては、浸漬期間の延長に伴い、表面のシグナル強度は低下する傾向がみられたのに対し、脱灰液浸漬条件では、シグナル強度は増加する傾向がみられた。一方、PRG バリアコートを塗布しなかった群での脱灰液浸漬条件においては、OCT 像の表面シグナル強度は増加し、 $1/e^2$ 幅は減少する傾向がみられた。また、レーザー顕微鏡像では、人工唾液浸漬条件において、削除痕の平坦化が認められたのに対し、脱灰液浸漬条件では、表面性状の粗糙化が進行した結果が得られた。シグナル強度の変化を浸漬期間でみた場合、人工唾液浸漬期間の延長における表面のシグナル低下および、内部シグナル増加傾向は、エナメル質表面の光学的性質の変化に起因していると考えられる。すなわち、エナメル質表面での散乱光が減少したことによって、光線の深部到達性が増し、さらには内部での

光干渉性が向上し、検出が可能になったと考えられる。 $1/e^2$ 幅を用いた解析では、PRG バリアコートを塗布した群のピーク値は、人工唾液浸漬条件において、優位に増加する傾向がみられた。これは、先に述べた表面での散乱の減少および深部到達性の向上によって、低シグナルの検出頻度が増加したことにより、OCT 像での深部可視化が向上したことを表していると考えられる。

以上の結果から、S-PRG フィラー含有コート材は乳歯に生じる脱灰を抑制し、再石灰化を促進する可能性が示され、フッ化物配合歯磨剤などのホームケア製品とともに応用することで、より効果的に齲蝕予防を行えることが示された。

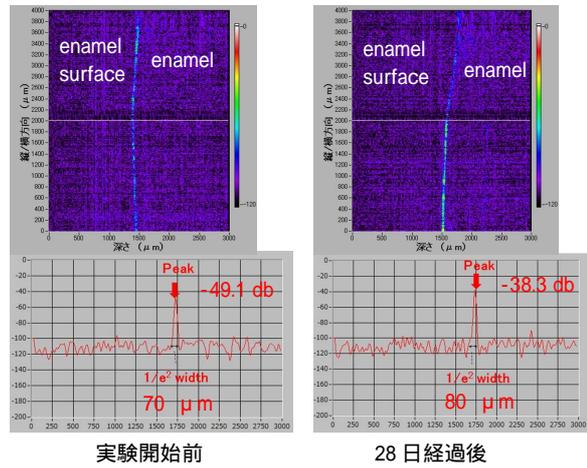


図 4-1 乳歯脱灰条件の OCT および信号ピーク強度変化

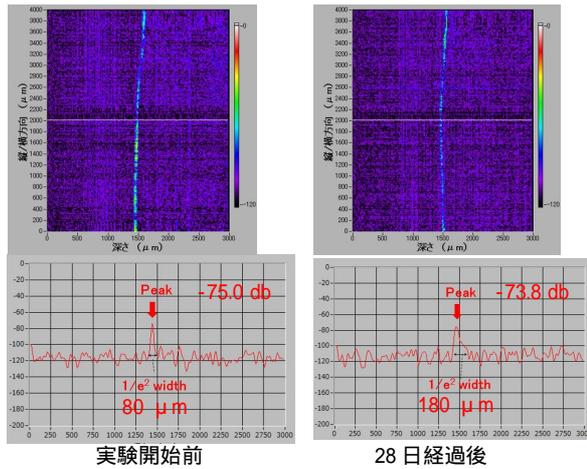


図 4-2 乳歯 PRG バリアコート塗布条件の OCT および信号ピーク強度変化

(4) S-PRG フィラー含有歯磨剤がウシ歯象牙質におよぼす影響

pH サイクルに適用した象牙質試片の音速を超音波パルス法を用いて測定した結果、EDTA による脱灰群では、縦波音速は実験開始前と比較して、実験期間を通じて低下する傾向を示した。一方、S-PRG 含有歯磨剤適用群およびフッ化物含有歯磨剤適用群では、実験期間の延長に伴い縦波音速が上昇する傾向が認められるものの、その上昇程度は異なるものであった。このように、S-PRG 含有歯磨剤適用群およびフッ化物含有歯磨剤適用群

で縦波音速が上昇した原因としては、歯磨剤中に含まれるイオンが、象牙質の脱灰あるいは再石灰化に影響を及ぼしたためと考えられた。

以上の結果から、S-PRG フィラー含有歯磨剤は象牙質の脱灰抑制および再石灰化に影響を及ぼす可能性が示された。フッ化物配合歯磨剤などのホームケア製品の効果は、患者個人の実行性やブラッシングの手技に大きく影響を受けるとともに、歯磨剤に含まれるフッ化物濃度にも制限があるのが現状である。したがって、高齢者や乳幼児など、齲蝕リスクのコントロールが困難な場合、S-PRG フィラー含有歯磨剤を応用することで、より効果的に齲蝕予防を行えることが示された。

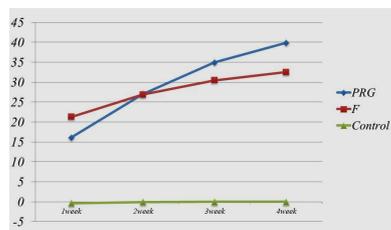
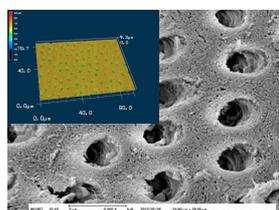
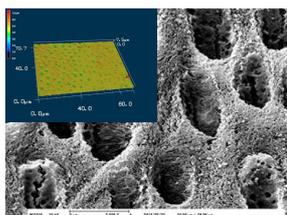


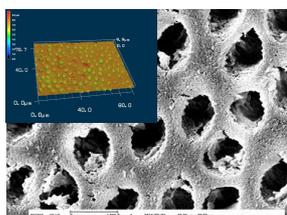
図5 象牙質での縦波音速の経時的変化



脱灰群



フッ素含有歯磨剤適用群



S-PRG フィラー含有歯磨剤適用群

図6 28日経過後の象牙質表面性状

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1件)

黒川 弘康、利根川 雅佳、白土 康司、瀧本 正行、島村 穰、池田 昌彦、安田 源沢、色川 敦士、宮崎 真至、日野浦 光、照射器光源の光強度が新規修復システムの象牙質接着性に及ぼす影

響、接着歯学、2012、30巻、72-78、査読有、

<http://www.adhesive-dent.com/publication/file/30-02.pdf>

〔学会発表〕(計3件)

竹中 宏隆、S-PRG フィラー含有試作歯磨剤がウシ象牙質におよぼす影響、第138回日本歯科保存学会、2013.6.27、福岡国際会議場、福岡

村山 良介、OCTによる乳歯の脱灰状況の観察、第137回日本歯科保存学会、2012.11.23、広島国際会議場、広島

高橋 史典、各種歯面コーティング材の歯質脱灰抑制効果の超音波透過法による検討、第137回日本歯科保存学会、2012.11.22、広島国際会議場、広島

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

安田 源沢 (YASUDA, Genta)

日本大学・歯学部・非常勤医員

研究者番号：50579977

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：

(4)研究協力者

宮崎 真至 (MIYAZAKI, Masashi)

日本大学・歯学部・教授

研究者番号：70239391

黒川 弘康 (KUROKAWA, Hiroyasu)

日本大学・歯学部・助教

研究者番号：10291709