

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 16 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462870

研究課題名(和文) 知覚過敏抑制材の開発 光化学透過モデルを用いた後もどりの解析

研究課題名(英文) Development of materials for dentin hypersensitivity : Analysis of retrogression with transmission model

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) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：知覚過敏症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計測する事が可能となり、異なる材料の透過性抑制効果の発現機序の違いを明らかにした。また、材料の粒度分布および結晶生成の意義、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。

研究成果の概要(英文)：The cause of regression of hypersensitivity has not been elucidated yet. We established a quantitative measurement system of dentin permeability to analyze the time-based effect for hypersensitivity. The process was analyzed through the morphological analysis and the measurement of dentin permeability after the improvement of equipment. As a result, new device made it possible to measure the hydraulic conductance and was clarified the differences in the permeability suppression mechanism of different materials. 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 safe and effective therapeutic agents of dentinal hyperesthesia.

研究分野：保存修復学

キーワード：象牙質透過性 知覚過敏 マイクロフロー 光化学

1. 研究開始当初の背景

知覚過敏を有する患者は多い。疫学調査によれば、日本国民の8～35%が知覚過敏を経験し、別な調査では30代40代の45～57%が知覚過敏を経験していると報告されており、罹患率としては比較的高い割合である。一般に知覚過敏は、重篤な状態に至ることは少ない疾患であるが、処置後も早期に後戻りする 경우가多く、症状は弱くても訴えは高頻度であり、対策を講じる必要がある。

象牙質知覚過敏の発生機序に関しては、生理学の立場から種々の学説があるが、そのなかでも、「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、この理論は提唱した 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細管内あるいは歯髄にある神経を興奮させることを見出した。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、上記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化学発光を用い、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組み込んだ象牙質透過性計測装置を開発した。この方法では、象牙質ディスクに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、その量に応じた化学発光を高感度フォトダイオードにて検知してコンピューターで処理するものである。この方法は Pashley らの方法に比べ、微量移動量の検知能力、再現性等の性能において格段の向上が見られ、この装置を応用する事の有用性が高いものと考えられる。

2. 研究の目的

知覚過敏処置後の後戻りに関しては多くの歯科医が経験しており、時に対応に苦慮する局面がある。後戻りの原因ならびそのプロセスはいまだ解明されておらず、その理由として、症状に着目した *in vivo* 解析、および象牙質透過性を対象とした *in vitro* シミュレーションの困難さがあげられる。我々は、ル

ミノール化学反応を応用した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。本研究では知覚過敏処置後における象牙質透過性計測の実施と、並行して象牙質に対する微細形態学的解析を行い、知覚過敏抑制効果が時間と共に変化するプロセスを解明し、より実効性ある知覚過敏抑制法を確立する事を目的とした。

3. 研究の方法

(1) 象牙質透過性試験には、ヒト第三大臼歯から調整した厚さ 1.3mm の象牙質ディスク片を作製し、両面を EDTA にて処理して試料とした。なお、本研究は東北大学大学院歯学研究科倫理委員会の承認を得て行われた。

本研究に使用する象牙質透過性リアルタイム検知装置の概要を図 1 に示した。片側の chamber に化学発光試薬ルミノールを充填し、一方の chamber には発光トリガー液を充填する。トリガー側を加圧するとトリガーは象牙質試験片内に浸透し、発光試薬側 chamber に達して化学発光を生じる。その強度を時系列的に計測することで試料の透過性を計測するものである。本研究においてはプロトタイプの CCD をさらに性能の高い製品に交換しており、検出感度はさらに向上している。本装置を用いて象牙質試片の透過性を計測し、透過性抑制材の効果について計測を行った。

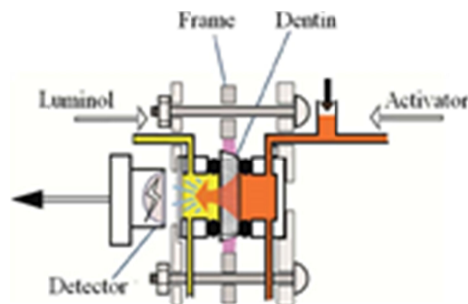


図 1. 化学発光による象牙質透過性計測法の概念図

(2) ナノフローセンサーの応用

上記装置で得られるデータは、光強度の積分値であり透過量を直接表しているわけではない。そのため、他の研究者が行う実験で得られる象牙質の透過量や流体コンダクタンスと直接比較することはできない。そこで、直接象牙細管内液の移動量を計測するために本装置の改造を計画した。図 2 にはその概念図を示す。

計測部にはナノリットル単位で流量を計測できる高精度のフローセンサーを取り付け、図 1 の装置と同等の性能を発揮できるように配管等装置周りを一新し試作機を作製した。試作機の一連の性能試験後、象牙細管内液に対する加圧量を変化させた場合の象牙質スライス片での透過量を計測し、基本性能について図 1 の装置との比較・検討をおこなった。

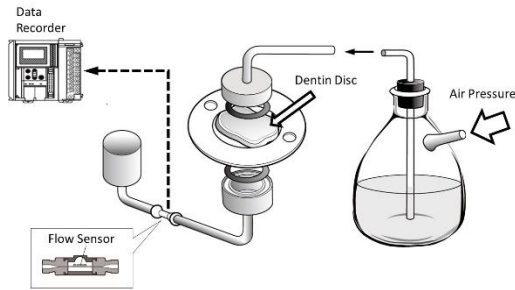


図 2. ナノフローセンサーを応用した象牙質透過性計測法の概念図

(3) リン酸カルシウム系知覚過敏抑制材と HEMA/Glutaraldehyde 製剤との比較

生体親和性に優れているとされるリン酸カルシウム系の知覚過敏抑制材の象牙質透過性抑制効果と欧米で一般的に使用されている HEMA/Glutaraldehyde 製剤を用い、塗布後の時間経過と象牙質透過性の変動について、蒸留水保管 1 ヶ月にわたる経時的な変化をナノフローセンサーを用いて計測した。HEMA/Glutaraldehyde 製剤は、象牙細管内のタンパク成分を凝固させる事により象牙質の透過性を抑制すると考えられている。そのため、本製剤を使用する場合には、牛アルブミン溶液を象牙細管内液として用いた。また、試験終了後の試料については、その表面と割断面について電界放出形走査電子顕微鏡にて形態学的に観察を行った。

(4) リン酸カルシウム系知覚過敏抑制材

TTCP と DCPA を配合したリン酸カルシウム系知覚過敏抑制材では、粉末と水を混和する事により、歯の成分であるハイドロキシアパタイトが生成される事が知られている。しかしながらこの化学反応は比較的ゆっくり進むとされており、治療効果の観点からハイドロキシアパタイトが生成される時期を見極める事は重要である。そこで、粉と液の混和前、混和直後、30分、1時間、1日、3日および7日後の試料をエネルギー分散型X線分光器(EDS)、X線回折装置(XRD)、電子線マイクロアナライザ(EPMA)で成分分析を行った。また、生成初期のハイドロキシアパタイト結晶はX線のエネルギーで簡単に破壊されることを考慮し、飛行時間型二次イオン質量分析法(TOF-SIMS)による非破壊的な分析で検証を行った。

(5) 粒度分布と象牙細管内到達度

TTCP と DCPA を成分とするリン酸カルシウム系知覚過敏抑制材のハイドロキシアパタイト結晶生成は、上記の結果からもゆっくり進む事が予想された。そのため、初期の抑制効果には混和泥の粒度分布が影響すると考え、混和直後の知覚過敏抑制材の象牙質表面および象牙細管内への粒度分布について共焦点レーザー顕微鏡にて形態学的に観察を行った。また、観察を終えた試料を割断し、その到達度について検討を行った。

4. 研究成果

(1) 我々の開発した装置では、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している。象牙質透過量はごく微量である事から、この機械の精度は結果に大きな影響を与える。本研究では CCD の交換等により、大幅な改造を行い、従前の装置より高精度で解析できるようになった。本研究で使用したルミノール化学反応を応用した象牙質透過性試験器は、我々が開発した独自のものであり、国内外に類似の装置はない。Pashley の開発した従来法に比較しても、特にその検出感度に優れており優位性は明らかであった。

(2) 象牙質透過量や象牙質の流体コンダクタンスを他者のデータと比較するためには、実際の透過流量を計測する必要がある。そこで、上記装置を改造し検出部にナノフローセンサーを取り付け調整して、象牙質透過性計測の検証を行った。その結果、ナノフローセンサーの応用した方法では、光化学を用いた方法と同程度の性能を堅持でき、併用する事で信頼性の高い計測法になる事がわかった。本装置を用い、83個の象牙質スライス試料の象牙質透過量をナノリットルの単位で計測し、それぞれの流体コンダクタンスを算出した。その結果、象牙質の流体コンダクタンスのデータは、正規分布しない事が判明した。

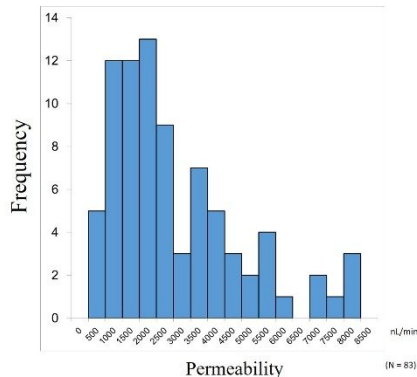


図 3. 象牙質透過量の分布

(3) ハイドロキシアパタイトの生成が期待できるリン酸カルシウム系の知覚過敏抑制材と HEMA/Glutaraldehyde 製剤のそれぞれを象牙質スライス片試料に塗布し、蒸留水中に 1 ヶ月まで保管した象牙質の流体コンダクタンスの経時的変化を図 4 に示す。何も塗布しなかったコントロール群においては、1 ヶ月経過後も流体コンダクタンスに統計学的な変化は見られなかったが、塗布した 2 つの材料群では塗布直後より流体コンダクタンスは減少して継続し、その値は 1 ヶ月後においても統計学的な有意差はなかった。象牙細管に加える内圧を 1 kPa または 3kPa と変えても同じ傾向を示した。

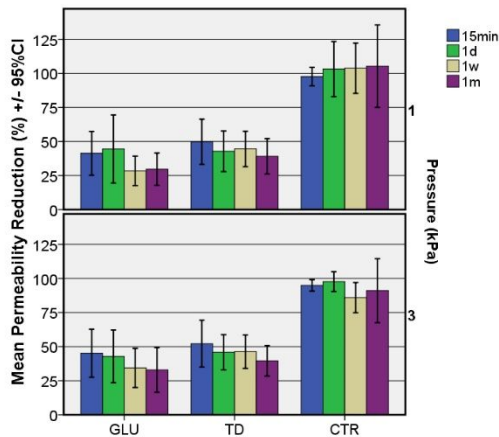


図4. 水力学的コンダクタンスの経時的変化

1ヶ月経過後の代表的な電子顕微鏡写真を図5に示す。

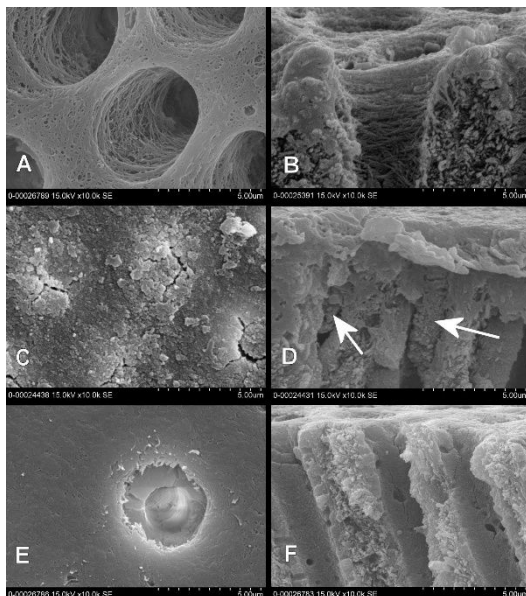


図5. 代表的SEM写真例

HEMA/Glutaraldehyde 製剤では、露出したコラーゲン繊維のメッシュ構造が温存されている像が観察された。一方、リン酸カルシウム系知覚過敏抑制材ではすべての根管内に結晶様構造物が観察された。コントロール群の象牙細管内は空洞で結晶様構造物は観察されなかった。これらの事より、両材料の応用は象牙質透過性減少させるがその組織学的な機序は異なる事が明らかとなった。

(4) ハイドロキシアパタイトの生成が象牙質の透過性に及ぼす機序を解明するために、TTCP と DCPA の混和から始まるハイドロキシアパタイトへの変化過程について、混和物の表面分析を行った。X線のエネルギーの大きい分析法では、混和初期の結晶を破壊するため結果は不安定であったが、混和30分頃から Ca/P 比がハイドロキシアパタイトと同等のエネルギー分布を示した。また、X線エネルギーが低い非破壊的分析性である

TOF-SIMS による解析では、様々な形態のイオンが計測されたが、その経時的な傾向は他の分析法と類似していた。図5にはEDSによる分析の一例を示す。

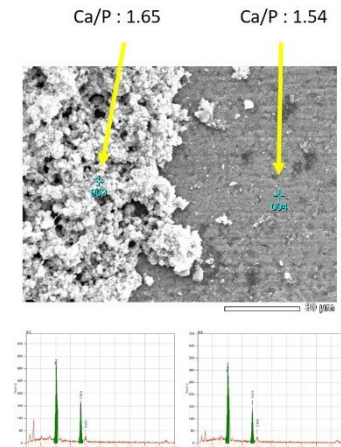


図6. 表的EDS表面分析の例

(5) TTCP と DCPA を成分とするリン酸カルシウム系知覚過敏抑制材の混和直後の象牙質表面の共焦点レーザー顕微鏡像では、混和物の分布は多くの象牙細管で見られたが、細管すべてを閉塞しておらず、部分的に細管内が封鎖されている像が多く見られた。また象牙質表面からの侵入度分布は表層から約10μm以内のものが多かった。ベルヌーイの定理によると、流速は象牙細管の断面積の2乗に反比例するため、象牙質透過量のわずかな減少が疼痛発現に大きく影響すると考えられる。そのため、初期の透過抑制効果は象牙細管内に分布した混和物によるものである事が推測された。また、この材料では塗布条件の違いや保管期間なども象牙質透過性に影響を及ぼす事がわかった。

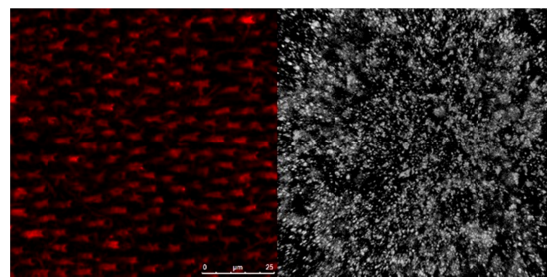


図7. リン酸カルシウム系知覚過敏抑制材塗布後の共焦点レーザー像(左:蛍光 右:反射)

これらの結果より、リン酸カルシウム系の象牙質抑制材料の応用は、象牙質表面にハイドロキシアパタイトの生成が期待でき、象牙質透過性抑制効果が高く生体適合性の高い材料となる可能性が示唆された。本研究は安全でより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、有益な成果となった。

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4件)

Hiroshi ISHIIHATA, Masafumi KANEHIRA, Werner J. FINGER, Hidekazu TAKAHASHI, Makoto TOMITA, Keiichi SASAKI, Effect of two desensitizing agents on dentin permeability in vitro, Journal of Applied Oral Science, 査読有, 25(1), 34-41, 2017, <http://dx.doi.org/10.1590/1678-77572016-0228>
M. Kanehira, H. Ishihata, M. Saito, Dentin Hypersensitivity: Etiology, prevalence and treatment modalities, Interface Oral Health Science 2014, 査読有, 28, 325-334, 2015, DOI: 10.1007/978-4-431-55192-8
Krid KAMONKHANTIKUL, Mansuang ARKSORNNUKIT, Hidekazu TAKAHASHI, Masafumi KANEHIRA and Werner J. FINGER, Polishing and toothbrushing alters the surface roughness and gloss of composite resins, Dental Materials Journal, 査読有, 33(5), 599-606, 2014, DOI:10.4012/dmj.2015-228

〔学会発表〕(計6件)

Masafumi KANEHIRA, Hiroshi ISHIIHATA, Keiichi SASAKI, Masahiro SAITO, Effect of two dentin desensitizing agents on dentin disc permeability, 94th General Session & Exhibition of the IADR, 3rd Meeting of the IADR Asia Pacific Region, 35th Annual Meeting of the IADR Korean Division, 2016年6月22日-25日、ソウル(大韓民国)
IWAMATSU-KOBAYASHI Yoko, ORIMOTO Ai, VENKATAIAH Venkata Suresh, KANEHIRA Masafumi, HANDA Keisuke and SAITO Masahiro, The effect of S-PRG filler eluate on periodontitis models, Innovative Research for Biosis-Abiosis Intelligent Interface Symposium(The 6th International Symposium for Interface Oral Health Science),2016年1月18日-19日, 艮陵会館(宮城・仙台)
Kanehira M, Ishihata H, Mehta D, Finger WJ, Can in vivo efficacy of dentin desensitizers be predicted by in vitro dentin permeability

measurements?, Innovative Research for Biosis-Abiosis Intelligent Interface Symposium(The 6th International Symposium for Interface Oral Health Science), 2016年1月18日~19日, 艮陵会館(宮城・仙台)
Sasipin LAUVAHUTANON, Hidekazu Takahashi, Meiko Oki, Mansuang Arksornnukit, Masafumi Kanehira, Werner J. FINGER, WEAR RESISTANCE OF CAD/CAM COMPOSITE RESIN BLOCKS, Academy of Dental Materials Annual Meeting, 2015年10月7日~10日, ホノルル(USA)
KANEHIRA Masafumi, MEHTA Deepak, MOOGI Prashant, SURESH Venkata, RUPESH Maratham C., SAITO Masahiro, SASAKI Keiichi, Randomized, controlled clinical trial on dentin desensitization with a calcium phosphate containing paste, 日本歯科保存学会2015年度春季学術大会, 2015年6月25日~26日, 西日本総合展示場(福岡・北九州)

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 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 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

兼平 正史(KANEHIRA, Masafumi)

東北大学・大学院歯学研究科・助教

研究者番号: 30177539

(2) 研究分担者

石幡 浩志 (ISHIHATA, Hiroshi)
東北大学・大学院歯学研究科・助教
研究者番号：40261523

高橋 英和 (TAKAHASHI, Hidekazu)
東京医科歯科大学・歯学部・
教授
研究者番号：90175430

(3) 連携研究者

荒木 保幸 (ARAKI, Yasuyuki)
東北大学・多元物質科学研究所・准教授
研究者番号：80361179

(4) 研究協力者

FINGER, Werner, J. (FINGER, Werner, J.)