

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 20 日現在

機関番号：32665

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26861608

研究課題名(和文)ペプチド(P11-4)を応用した根面齲蝕に対する再石灰化療法の確立

研究課題名(英文)Establishment of the remineralization therapy that targeted root caries-application of Peptide P11-4

研究代表者

瀧本 正行(TAKIMOTO, Masayuki)

日本大学・歯学部・専修医

研究者番号：90723239

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、ペプチドの象牙質再石灰化効果および脱灰抑制効果について、超音波測定法およびOCT装置を用いることで評価したものである。

その結果、超音波の音速は脱灰とともに減少していくことが示された。一方、P11-4の塗布は、音速が上昇することが判明した。以上のことから、ペプチドP11-4の塗布によって音速が上昇したところから、象牙質再石灰化効果が認められた。

研究成果の概要(英文)：This study evaluates the effect of self-assembling peptide P11-4 on bovine dentin remineralization by measuring changes in ultrasonic propagation velocity and using optical coherence tomography. Sonic velocity was found to decrease with time for specimens stored in the demineralizing solution. On the other hand, increases in sonic velocity were found for specimens treated with P11-4. By measuring the ultrasonic propagation velocity, it can be concluded that P11-4 application has an ability to promote bovine dentin remineralization.

研究分野：保存修復学

キーワード：根面齲蝕 脱灰抑制 再石灰化 ペプチド 光干渉断層画像法 超音波測定装置

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おいては、リスク因子を把握して歯質の脱灰および再石灰化をコントロールすることが重要であるという認識から、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。とくに、高齢者においては歯肉退縮に伴う根面齲蝕の増加が懸念されており、実質欠損を伴う根面齲蝕は環状に進行し隣接面に及ぶ場合も多い。したがって、実質欠損を生じる以前の初期段階で、積極的に再石灰化療法を行うことによって根面齲蝕の進行を抑制することが重要となる。一方、近年の再石灰化療法に代表されるものとしてフッ化物の応用が挙げられる。フッ化物含歯磨剤や洗口剤の使用が推奨されているが含有できる濃度に限界がある。しかし、フッ化物以外にも CPP-ACP に代表される一部のペプチドは、カルシウムイオンを吸着することが知られている。CPP-ACP は、乳製品に含有されているカゼインリンタンパクおよびリン酸カルシウムで構成されている。そのため、乳製品に対するアレルギー反応を示す患者には使用することが難しい。新たなバイオアクティブな性質を持つ再石灰化促進剤として今回着目したペプチド (P11-4) は、グルタミン、グルタミン酸、フェニルアラニン、トリプトファンおよびアルギニンから構成され、pH が 7.5 以下の水中で半量体性不規則コイル構造を形成するという特徴を有している。また、ペプチド P11-4 の側鎖がマイナ

スに荷電していることから、 Ca^{2+} を取り込むことが容易であるとともに、構造的にもハイドロキシアパタイト形成に適したものとなっている。そこで、ペプチド P11-4 を歯質に塗布することによって再石灰化の足場を形成し、唾液中の Ca^{2+} を取り込むことによって、歯質の脱灰抑制さらに再石灰化を促進することを目的とした手法が開発された。

そこで代表者は、これらの臨床的、学術的背景から、初期象牙質齲蝕への非侵襲的なアプローチとして、バイオアクティブな性質を有するペプチド (P11-4) に着目し、これが口腔内環境を想定した状況で歯質の脱灰抑制あるいは再石灰化に効果があると推測した。すなわち、ペプチド (P11-4) を応用することで、将来的には口腔内における再石灰化療法の新たな製品の開発が可能となるものと考えられる。

2. 研究の目的

Minimal Intervention という治療概念の普及に伴い、臨床においても齲蝕リスクを低減化させる予防処置に焦点が置かれている。とくに、高齢者においては歯肉退縮に伴う根面齲蝕の増加が懸念されており、実質欠損を生じる以前の初期段階で積極的に再石灰化療法を行うことによって根面齲蝕の進行を抑制することが重要となる。そこで、初期象牙質齲蝕への非侵襲的なアプローチとして、バイオアクティブな性質をするペプチド (P11-4) に着目し、ペプチドを応用した際の人工脱灰象牙質の状態変化を定量ならびに客観的評価として、超音波パルス法および光干渉断層画像診断法 (Optical Coherence Tomography, 以後、OCT) を用い、経時的かつ非破壊的に観察することで、その効果的な臨床応用法を確立することを目的とした。

3. 研究の方法

実験には、ペプチド P11-4 を含有する Curodont (Credentis) を用いた。

(1)測定用試片の制作

ウシ抜去下顎前歯の歯冠部唇側面中央付近の歯質を、直径4~6mm、厚さ2~3mmの象牙質平坦面が得られるように切り出した後、耐水性SiCペーパーの#2000を用いて露出面が平坦となるように調整し、超音波洗浄を5分間行った。この象牙質ブロックの底面(象牙質側)および側面をワックスで被覆し、これを測定用試片とした。

測定用試片は、以下に示す条件に保管した。

未塗布(nCD)群:ペプチド未塗布の測定用試片を、実験期間を通じて37人工唾液中に保管

未塗布-脱灰(nCD-De)群:ペプチド未塗布の測定用試片を1日2回、0.1M乳酸緩衝液(pH4.75, 0.75mM CaCl₂·2H₂Oおよび0.45mM KH₂PO₄)に10分間浸漬した後、37の人工唾液中に保管

塗布(CD)群:P11-4を5分間塗布した測定用試片を、実験期間を通じて37人工唾液中に保管

塗布-脱灰(CD-De)群:P11-4を5分間塗布した測定用試片を1日2回、0.1M乳酸緩衝液に10分間浸漬した後、37の人工唾液中に保管

(2)超音波測定

超音波測定装置は、パルサーレーザ、縦波用トランスデューサおよびオシロスコープから構成されている(図1)。

超音波測定を行うにあたり、パルサーレーザを周波数500Hz、出力16μJに設定し、高周波電圧をトランスデューサ内部の水晶振動子に送ることによって10MHzの超音波を発生させた。探触子を測定用試片に接触させ、試片内を伝播する超音波の変化をオシロスコープを用いて電氣的に増幅することによって波形を検出した。この波形から、1ns単位で試片を透過する超音波の伝播時間を求め、試片の厚さとの関係から縦波音速を求めた。なお、超音波の測定時期としては、実

験開始前および開始7,14,21および28日後とし、試片の数は各条件についてそれぞれ6個とした。



図1 超音波測定装置

(3) OCTによる信号強度分布測定

信号強度分布測定は、超音波測定と同一の測定用試片を用いて、超音波測定と同時期に行った。測定には、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(OCT,モリタ東京製作所)を用いた。このOCTは、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ことで断層画像を得るシステムである(図2)。

Super luminescent diode光源からの照射光線が、測定用試片の中央付近へ垂直に照射されるように測定用試片をサンプルステージに静置し、プローブと試片表面との距離を2mmに固定した。人工唾液から取り出した測定用試片はエアブローを10秒間行った後、歯質表面の残留水分をキムワイプを用いて除去した。測定はA-scan modeで行い、測定範囲内の任意の20箇所における信号強度情報を得た。



図2 OCT測定装置

(4)最大ピーク強度値および1/e²幅

A-scan modeの信号強度分布を解析することによって最大ピーク強度値(dB)を検出し、その座標を割り出した。次いで、この座標を中心として86.5%の信号強度が含まれる範囲を算出し、その波形幅をもって1/e²幅(μm)

とした。

(5) レーザー顕微鏡観察

レーザー顕微鏡 (VK-9710, キーエンス) を用い、その鳥瞰像を得ることによって、3次元的な形態変化について検討を加えた。(図3)



図3 レーザー顕微鏡

4. 研究成果

歯質の脱灰を抑制し再石灰化を亢進させるものとして、自己集合性ペプチド P11-4 がある。このペプチドは、歯質に塗布することによって連結成長し、網状構造を形成することによって歯質の石灰化を誘導するとされている。本研究では、ペプチド P11-4 を応用した際の象牙質の脱灰抑制ならびに再石灰化促進効果について、超音波透過法とともに OCT を用いて検討した。

超音波透過法を用いた検討の結果、試片を透過する音速の変化は、実験開始7日目以降、nCD-De 群では低下し、CD 群および CD-De 群では上昇した。また、CD-De 群の音速の上昇程度は顕著であり、実験開始7日以降の音速は CD 群と比較して有意に高い値を示した(表1)。硬組織中を伝播する超音波の音速の変化は、歯質の石灰化の程度と相関があり、無機成分の増加に伴って上昇する。したがって、CD を応用した試片を乳酸緩衝液に浸漬させた CD-De 群においては、他の条件と比較して再石灰化が亢進していることが示された。

	Baseline	7-day	14-day	21-day	28-day
nCD群	4950 (41) ^{a,A}	4907 (18) ^{a,A}	4901 (34) ^{a,A}	4894 (37) ^{a,A}	4864 (60) ^{a,A}
nCD-De群	4852 (91) ^{a,A,B}	4607 (107) ^{b,B}	4566 (83) ^{b,B}	4555 (82) ^{b,B}	4506 (74) ^{b,B}
	Baseline	7-day	14-day	21-day	28-day
De群	4988 (83) ^{a,A,C}	5201 (81) ^{b,C}	5219 (28) ^{b,C}	5185 (63) ^{b,C}	5142 (87) ^{b,C}
CD-De群	4927 (67) ^{a,A}	5460 (69) ^{b,D}	5438 (90) ^{b,D}	5435 (83) ^{b,D}	5452 (114) ^{b,D}

単位: m/sec, n=6, ()=SD
同一条件内において、同じ文字間で有意差なし ($p > 0.05$)

表1 超音波測定法による音速の変化

超音波透過法とは異なるモダリティとして OCT を用い、得られた A-scan mode から最大ピーク強度値および $1/e^2$ 幅を求めた。その結果、nCD-De 群の最大ピーク強度値は、7

日目以降で有意に増加し、 $1/e^2$ 幅は有意に減少した(表2, 3)。一方、CD 群においては、最大ピーク強度値は実験期間を通して変化は認められず、 $1/e^2$ 幅は7日目以降に有意に大きくなった。

	0-day	7-day	14-day	21-day	28-day
nCD群	-58.8(9.2) ^a	-59.7(7.6) ^a	-57.4(9.5) ^a	-62.4(9.1) ^a	-65.2(8.1) ^a
nCD-De群	-51.7(7.8) ^a	-44.4(5.7) ^{b,C}	-40.1(7.8) ^c	-32.2(4.1) ^c	-30.0(6.0) ^c
	0-day	7-day	14-day	21-day	28-day
CD群	-53.7(7.2) ¹	-42.1(9.3) ^{1,2}	-41.1(7.2) ²	-44.5(9.0) ²	-40.3(5.7) ²
CD-De群	-61.3(8.7) ³	-61.1(7.2) ^{3,2}	-57.3(6.2) ²	-57.6(7.0) ²	-58.1(9.2) ²

単位: dB, n=6, ()=SD
同一条件内において、同じ文字間で有意差なし ($p > 0.05$)

表2 最大ピーク強度値の経時的変化

	0-day	7-day	14-day	21-day	28-day
nCD群	100(10.0) ^a	100(11.0) ^a	90(11.0) ^a	90(11.0) ^a	90(12.0) ^a
nCD-De群	160(10.0) ^a	140(10.0) ^b	140(12.0) ^b	120(12.0) ^c	100(14.0) ^d
	0-day	7-day	14-day	21-day	28-day
CD群	140(15.0) ¹	170(13.0) ²	170(10.0) ²	210(16.0) ³	240(12.0) ⁴
CD-De群	140(10.0) ³	270(20.0) ²	420(21.0) ³	520(30.0) ⁴	550(25.0) ⁵

単位: μm , n=6, ()=SD
同一条件内において、同じ文字間で有意差なし ($p > 0.05$)

表3 $1/e^2$ 幅の経時的変化

また、28日後の LSM 像からは、試片表面を覆うように析出物が認められ、平坦な表面性状を呈した(図4)。このように、CD 塗布面における析出物の存在によって、粗造面が平坦になったために、象牙質表面での照射光線の散乱が少なくなり、歯質内部への光線透過量が増加して $1/e^2$ 幅が大きくなったものと考えられた。

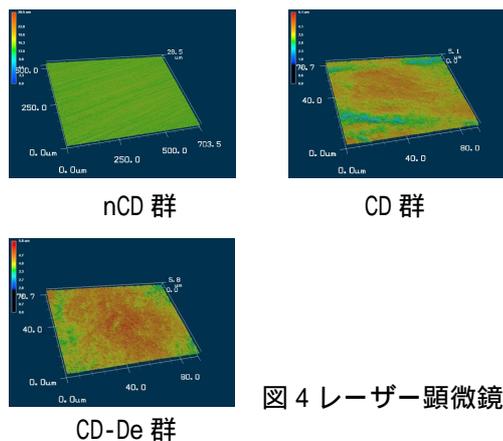


図4 レーザー顕微鏡像

CD群とCD-De群との $1/e^2$ 幅を比較すると、7日目以降で CD-De 群が有意に大きい値を示した。これは、CD を塗布して人工唾液に浸漬するのみではなく、1日2回乳酸緩衝液に浸漬する条件のほうが、表層に多くの析出物が形成されるとともに、その部が緻密化したことを示すものと考えられた。

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)

Fuminori Takahashi, Hiroyasu Kurokawa, Takimoto Masayuki (外6名, 5番目), Ultrasonic assessment of the effects of self-assembling peptide scaffolds on) Acta Odontologica Scandinavica, 査読あり, 74巻, 2016, 142-147
村山良介、松吉佐季、柴崎翔、土屋賢司、瀧本正行、川本諒、黒川弘康、宮崎真至、
The effect of Coating Material Containing S-PRG Filler on the prevention of Enamel Demineralization Detected by Optical Coherence Tomography、日本歯科保存学会誌、査読あり、57巻、2014、578-125
DOI:10.11471/shikahozon.57.578

〔学会発表〕(計2件)

瀧本正行、高橋史典、黒川弘康、古市哲也、佐藤愛子、寺井里沙、宮崎真至、ペプチド P11-4 のエナメル質への応用における OCT 像の観察、日本歯科保存学会平成 27 年度春季大会、2015.6.25、北九州国際会議場、福岡県(北九州市小倉北区)
高橋史典、黒川弘康、村山良介、瀧本正行、小泉美香、瀧川智義、佐藤幹武、根面齲蝕をターゲットとした再石灰化療法の確立へのペプチド P11-4 の応用、日本歯科保存学会平成 26 年度秋季大会、2014.10.30、山形テレサ、山形県(山形市双葉町)

〔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

瀧本正行 (TAKIMOTO Masayuki)
日本大学・歯学部・専修医
研究者番号：90723239

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：