

論文の内容の要旨

氏名：須 田 駿 一

博士の専攻分野の名称：博士（歯学）

論文題名：酸蝕歯予防への自己集合性ペプチド P₁₁-4 の応用

—超音波透過法および光干渉断層画像法による検討—

近年、細胞培養において播種細胞の足場として用いられているペプチド P₁₁-4 (P₁₁-4) が有する歯質石灰化能が注目されている。P₁₁-4 は、低 pH 環境下で線維化を開始し、最終的に 3 次元網目状構造を形成することによってここに無機成分が集結し、隣接する歯質の石灰化を誘導するとされている。酸性環境下における歯質の石灰化促進効果は、酸蝕歯における再石灰化という観点からは有利に作用するものと考えられ、その臨床応用には期待が持たれている。

そこで著者は、ウシ歯エナメル質を用いて製作した酸蝕歯モデルに P₁₁-4 を適用し、これを異なる条件に保管した際のエナメル質の脱灰抑制ならびに再石灰化に及ぼす影響について、超音波透過法とともに光干渉断層画像法 (Optical Coherence Tomography, OCT) を用いることによって検討した。さらに、エナメル質表層における形態的变化をレーザー顕微鏡 (LSM) および走査電子顕微鏡 (SEM) によって観察した。

ウシ抜去歯のエナメル質をブロック状に調整した試片を、オレンジジュース (pH 3.6) に 5 分間浸漬し、精製水で水洗した後に人工唾液に保管した。この操作を 1 時間毎に 1 日 6 回、28 日間行うことで酸蝕歯モデルを製作した。P₁₁-4 としては、Curodont Repair (CR, Credentis) を製造者指示条件で精製水と混和して用いた。

実験開始時に CR を塗布した酸蝕歯モデルを、37°C 人工唾液中に 28 日間保管した群を CR 群、CR 未塗布の酸蝕歯モデルを、オレンジジュースに 5 分間浸漬した後に人工唾液に保管する操作を 1 時間毎に 1 日 6 回、28 日間継続した群を nCR-De 群および実験開始時に CR を塗布した酸蝕歯モデルを、オレンジジュースに 5 分間浸漬した後に人工唾液に保管する操作を 1 時間毎に 1 日 6 回、28 日間継続した群を CR-De 群とした。

超音波測定には、パルサーレーザ (Model 5900, パナメトリクス)、縦波用トランスデューサ (V112, パナメトリクス) およびオシロスコープ (Wave Runner LT584, レクロイ) から構成されるシステムを用いた。このシステムによって試片内を伝播する超音波の変化を電氣的に増幅することによって波形を検出し、1 ns 単位で試片を透過する超音波の伝播時間と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、酸蝕歯モデル製作時および実験開始 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。

OCT による測定には、time-domain 型 OCT 装置 (モリタ東京製作所) を用い、A-scan mode で得られた信号強度分布を解析、最大ピーク強度値 (dB) を検出することでその座標を決定した。次いで、この座標を中心として最大ピーク強度値が 13.5% に減少した際の信号強度が含まれる範囲を算出し、その波形幅 ($1/e^2$ 幅, μm) を求めた。なお、信号強度分布の測定には超音波測定に供した試片を用い、超音波測定と同時期に行った。また、超音波測定および OCT による信号強度分布測定に用いた試片について、形状解析 LSM (VK-9710, キーエンス) を用いて観察するとともに、同様の実験環境に保管した試片について SEM 観察を行なった。同一保管条件内および各保管条件間での縦波音速、最大ピーク強度値および $1/e^2$ 幅の比較は重複測定分散分析を行うとともに Tukey-Kramer post-hoc test によって、有意水準 5% の条件で統計学的検定を行った。

その結果、超音波透過法による検討では、酸蝕歯モデル製作時における縦波音速は、いずれの試片においても、オレンジジュース浸漬前と比較して浸漬 28 日後で有意に低下した。また、オレンジジュース浸漬前の試片の LSM 像では、表層がスミヤ層で覆われている像が観察されたのに対し、浸漬 28 日後ではエナメル小柱の露出が観察された。硬組織中を伝播する超音波の縦波音速の変化は歯質の石灰化の程度と相関があり、無機成分の増減に伴って変化する。したがって、試片の縦波音速が低下したことは、オレンジジュースへの浸漬によって、エナメル質の無機成分が減少したことを示す

ものであり、この結果はエナメル質の表面性状の変化と一致するものであった。

次いで、超音波測定に供した同一試片について、OCTのA-scan modeから最大ピーク強度値および $1/e^2$ 幅を求めた。本研究で用いたOCTは、近赤外線を歯質に照射して反射あるいは散乱した光の様相を光学干渉計によって捉えるものであり、最大ピーク強度値は歯質表層における形態的变化の、 $1/e^2$ 幅は歯質内部における光線透過性変化の指標となる。nCR-De群の最大ピーク強度値は実験期間の経過に伴って有意に上昇したのに対し、 $1/e^2$ 幅に変化は認められなかった。また、実験開始28日後のSEM像では、実験開始前と比較してさらにエナメル小柱が明瞭化した像が観察された。この結果は、エナメル質の脱灰が進行することで表面が粗糙化し、照射光線の散乱が大きくなったために、試片内部への透過光線量が減少したことを示すものと考えられた。一方、CR-De群では、実験期間の経過に伴う最大ピーク強度値の低下と $1/e^2$ 幅の増加が認められ、実験開始28日後で酸蝕歯モデル製作前と比較して有意差が認められた。また、実験開始28日後のSEM像では、脱灰したエナメル小柱の間隙を埋めるように析出物が観察された。したがって、CR-De群では、P₁₁-4の塗布による析出物の存在によって照射光線の散乱が少なくなることで、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。CR群とCR-De群の最大ピーク強度値および $1/e^2$ 幅を比較すると、最大ピーク強度値は、実験開始前7日以降でCR-De群が有意に低い値を、 $1/e^2$ 幅は、実験開始14日以降でCR-De群が有意に大きな値を示した。また、CR群およびCR-De群の実験開始28日後のLSM像および三次元画像では、いずれの試片においても析出物による粗糙面が観察されたが、その程度はP₁₁-4を塗布して人工唾液に浸漬するのみではなく、1日6回オレンジジュースに浸漬したCR-De群で著明であった。P₁₁-4は、pHの変化によってβシート構造の自己集合を可逆的に制御できるようにグルタミン酸の側鎖を配置しており、pHが7.5以下の水中でコイル構造を形成する性質を有している。したがって、pHが低い条件に曝されるCR-De群でより多くの析出物が形成され、この析出物の光拡散性が最大ピーク強度値および $1/e^2$ 幅に影響したものと考えられた。

本実験の結果から、P₁₁-4は酸蝕歯モデルとしたエナメル質の表層および内部構造に変化を及ぼすことで、脱灰抑制ならびに再石灰化促進効果を有することが明らかとなった。また、P₁₁-4はpHが低い環境でその効果が著明であったことから、酸蝕歯の予防に有効であることが示唆された。