

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-

日本大学大学院歯学研究科歯学専攻

須田 駿一

(指導：宮崎 真至 教授, 黒川 弘康 准教授, 高見澤 俊樹 准教授)

概 要

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、パルサーレシーバ (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、表層がスミヤー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。

なお、本論文は原著論文 Suda S, Takamizawa T, Takahashi F, Tsujimoto A, Akiba S, Nagura Y, Kurokawa H, Miyazaki M. Application of the self-assembling peptide P11-4 for prevention of acidic erosion. *Oper Dent* 2018; 43: E166-E172. を基幹論文とし、これに OCT および LSM の実験データを新たに加えることによって総括したものである。

緒 言

Tooth wear は、齧蝕原因菌が関与することなく生じる歯の損耗であり、このうち酸蝕歯とは、歯質が飲食物由来の酸によって損耗する病態である¹⁾。この疾患は、社会環境あるいは食生活習慣が変化してきたことに関連して注目されるようになった^{2,3)}。すなわち、日常生活において消費される酸性飲食物が増加することによって、広範囲な年齢層に酸蝕歯のリスクが認められるようになった⁴⁾。酸蝕歯の予防法としてはフッ化物の応用が考えられており、とくにブラッシング時にフッ化物配合歯磨剤を使用することが推奨されている⁵⁻⁷⁾。しかし、フッ化物配合歯磨剤を使用してブラッシングすることはあくまでもエナメル質損耗の可能性を低くするものであり、積極的に石灰化物形成を促進するものではないとされている⁸⁾。すなわち、フッ化物配合歯磨剤の使用が DMFT を減少させている理由が歯質の脱灰抑制効果にある⁹⁾ のと同じく、酸蝕歯においても脱灰の可能性を低下させるものと考えられている¹⁰⁾。

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) について、このペプチドが有する歯質石灰化能が注目されている^{11,12)}。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^{13,14)}。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¹²⁾。しかし、P₁₁₋₄ が歯質の脱灰抑制ならびに再石灰化に及ぼす影響に関しては、その臨床応用が開始されて間もないこともあり、不明な点が多いのが現状である。

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¹⁵⁾とともに光干渉断層画像法 (Optical Coherence Tomography, OCT)¹⁶⁾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。

材料および方法

1. 酸蝕歯モデルの製作

実験には、ウシ (2~3 歳齢) 下顎前歯の歯根を切断して歯冠部のみを用いた。次いで、唇側面中央付近の歯質を直径 4~6 mm, 厚さ 2~3 mm のエナメル質ブロックが得られるようにモデルトリマー (TC251, アロー電子) を用いて調整した。このエナメル質ブロック全面を、耐水性シリコンカーバイドペーパー#2,000 まで順次研磨して 4×4×1 mm に調整した後、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た。このエナメル質ブロックを、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キムワイプ (日本クレシア) を用いて余剰水分を除き、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¹⁷⁾。なお、人工唾液としては、14.4 mM NaCl, 16.1 mM KCl, 0.3 mM MgCl₂·6H₂O, 2.0 mM K₂HPO₄, 1.0 mM CaCl₂·2H₂O および sodium carboxymethyl cellulose 0.10 g/100 mL を加えて pH 7.0 に調整したものをを用いた¹⁸⁾。

2. P₁₁₋₄ の塗布

P₁₁₋₄ としては、Curodont Repair (CR, Credentis) を用いた。CR を適用する条件では、製

造者指示条件で精製水と混和した CR を塗布，5 分間放置した後，歯質表面の余剰水分をキムワイプを用いて除いた。

3. 保管条件

酸蝕歯モデルは，以下に示す各条件に保管した。

- 1) CR 群：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。
- 2) nCR-De 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，精製水で水洗，乾燥し，人工唾液に保管した。この操作を 1 時間毎に 1 日 6 回行うことを 28 日間継続した。
- 3) CR-De 群：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，精製水で水洗，乾燥し，人工唾液に保管した。この操作を 1 時間毎に 1 日 6 回行うことを 28 日間継続した。

4. 超音波測定

本実験に用いた超音波測定装置は，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である。

超音波測定では，パルサーレーザを出力 16 μJ 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超音波を発生させた。探触子を試片に接触させ，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，この波形から，1 ns 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、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。

5. OCT による最大ピーク強度値および $1/e^2$ 幅の算出

本実験では、マイケルソン型光干渉計¹⁹⁾を応用した time-domain 型 OCT 装置 (モリタ東京製作所) を用いた。この装置は、干渉計にプローブを組合せ、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。Super luminescent diode 光源からの照射光線が、試片中央付近へ垂直に照射されるように調整し、プローブと試片表面との距離を 2 mm に固定した。人工唾液から取り出した試片は、5 秒間水洗を行った後、試片表面の残留水分をキムワイプを用いて除いた。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²⁰⁾。この信号強度分布を解析し、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^{21,22)}。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。

6. LSM 観察

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) を用いて観察した。

7. SEM 観察

SEM 観察に際して、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と同

様の実験環境に保管した試片について、通法に従って *tert*-ブタノール濃度上昇系列に順次浸漬した後、凍結乾燥 (Model ID-3, エリオニクス) を行った。次いで、イオンコーター (Quick Coater Type SC-201, サンヨー電子) で金蒸着を施した後、フィールドエミッション SEM (ERA-8800 FE, エリオニクス) を用いて加速電圧 10 kV の条件で観察した。

8. 統計処理

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 $1/e^2$ 幅については, 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。

成 績

縦波音速の経時的変化を Table 1 に示した。酸蝕歯モデル製作時における縦波音速は, オレンジジュース浸漬前で 4,539~4,555 m/s であったのに対して, 浸漬 28 日後で 4,047~4,092 m/s となり, いずれの試片においても有意に低下した。CR 群および CR-De 群の縦波音速は, いずれにおいても実験期間を通して上昇し, とくに CR-De 群で著明であった。一方, nCR-De 群の縦波音速は実験期間を通して低下し, 実験開始 7 日以降で CR 群および CR-De 群と比較して有意に低い値を示した。

OCT による最大ピーク強度値の経時的変化を Table 2 に示した。酸蝕歯モデル製作時における最大ピーク強度値は, オレンジジュース浸漬前で -72.3~-68.2 dB であったのに対して, 浸漬 28 日後で -49.4~-46.2 dB であり, いずれの試片においても有意に上昇した。nCR-De 群の最大ピーク強度値は, 実験期間の経過に伴って上昇する傾向を示したのに対して,

CR 群および CR-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低下した。

また、実験開始 7 日以降の最大ピーク強度値は、nCR-De 群および CR 群と比較して CR-De 群で有意に低い値を示した。

OCT による $1/e^2$ 幅の経時的変化を Table 3 に示した。酸蝕歯モデル製作時における $1/e^2$ 幅は、オレンジジュース浸漬前で $67.5\sim 72.5\ \mu\text{m}$ であったのに対し、浸漬 28 日後で $52.5\sim 60.0\ \mu\text{m}$ となり、いずれの試片においても減少する傾向を示した。nCR-De 群の $1/e^2$ 幅は、実験期間を通して変化は認められなかったのに対して、CR 群および CR-De 群の $1/e^2$ 幅は、実験期間の経過に伴って有意に増加した。また、実験開始 14 日以降の $1/e^2$ 幅は、nCR-De 群および CR 群と比較して CR-De 群で有意に大きな値を示した。

超音波測定および OCT による信号強度分布測定に供した試片について、それらの代表的な LSM 像および三次元画像を Fig. 1 に示した。酸蝕歯モデル製作時における LSM 像では、オレンジジュース浸漬前では試片研削時の削状痕が認められ、その表層がスミヤー層で覆われている像が観察された。これに対して、浸漬 28 日後ではスミヤー層が除去され、エナメル小柱が観察された。nCR-De 群の実験開始 28 日後の LSM 像では、脱灰が進行してエナメル小柱がさらに明瞭化したのに対し、CR 群および CR-De 群の実験開始 28 日後の LSM 像では、試片表面が析出物で覆われた様相が観察された。また、析出物の形成された程度は CR 群と比較して CR-De 群で著明であった。

nCR-De 群および CR-De 群と同一の条件で保管した試片について、それらの代表的な SEM 像を Fig. 2 に示した。実験開始前の SEM 像では、オレンジジュースへの浸漬によってエナメル小柱が露出している像が観察された。nCR-De 群の実験開始 28 日後の SEM 像

では、露出したエナメル小柱の脱灰が進行し、さらに粗慥な面を呈した。これに対して CR-De 群の実験開始 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。

考 察

CRの主成分である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た11残基のペプチドであり、側鎖がマイナスに荷電していることから、Ca²⁺を取り込むことが容易とされている²³⁾。また、構造的にもハイドロキシアパタイト形成に適しており、これを歯質に塗布することで石灰化を誘導可能とするものである²³⁾。これまでのP₁₁₋₄に関する研究の多くは、齲蝕歯質に及ぼす効果について検討したものがほとんどであり^{24,25)}、酸性飲食物などの酸によって脱灰した酸蝕エナメル質への効果に関しては明らかにされていない。そこで著者は、エナメル質をオレンジジュースに浸漬することで酸蝕歯モデルを製作し、このモデルにP₁₁₋₄を応用した際の脱灰抑制ならびに再石灰化促進効果を、超音波測定装置およびOCTを用いて検討した。

超音波透過法による検討では、酸蝕歯モデル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、試片表層がスマヤー層で覆われていたのに対して、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²⁶⁻²⁸⁾。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。

CR群およびCR-De群の縦波音速は、実験期間を通じて上昇傾向を示したのに対して、nCR-De群の縦波音速は逆に有意に低下した。P₁₁₋₄は、水素結合などを介してナノサイズのβシート構造を形成する²⁹⁾。形成されたβシート構造は、親水性基と疎水性基とを有しており、水分の存在下で疎水性相互作用によって自己集合（self-assembling）し、さらに連結成長することで3次元網目状構造を形成する³⁰⁾。この網目状構造の表面はマイナスに荷電しており、さらに網目状構造にカルボキシ基が存在することからCa²⁺を取り込み、ハイドロキシアパタイト形成のための核形成点となる³¹⁾。したがって、超音波測定の結果は、P₁₁₋₄の適用によって酸蝕されたエナメル質の脱灰を抑制するとともに、再石灰化を促進したことを示すものと考えられた。

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/e²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³²⁾、最大ピーク強度値は歯質表層における形態的变化の、1/e²幅は歯質内部における光線透過性変化の指標となる^{21,22)}。nCR-De群の最大ピーク強度値は実験期間の経過に伴って上昇する傾向を示したのに対し、1/e²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、エナメル小柱が露出した粗慥面が観察された。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慥化し、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。

ここで、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 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群が有意に大きい値を示した。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³³⁾。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は酸蝕を模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、pHが低い環境でその効果の発現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された。

結 論

P11-4が、ウシ歯エナメル質を用いて製作した酸蝕歯モデルに及ぼす影響について、超音波透過法およびOCTを用いて検討するとともに、LSMおよびSEMによる観察を行った結果、以下の結論を得た。

1. 縦波音速は、CR群およびCR-De群で、実験期間の経過に伴って上昇したのに対して、nCR-De群で実験期間の経過に伴って低下した。また、実験開始 7日以降の縦波音速は、nCR-De群と比較してCR群およびCR-De群で有意に高い値を示した。
2. OCTによる最大ピーク強度値は、CR群およびCR-De群で、実験期間の経過に伴って低下したのに対して、nCR-De群では実験期間の経過に伴って上昇した。また、実験開始 7日以降の最大ピーク強度値は、nCR-De群およびCR群と比較してCR-De群で有意に低い値を示した。
3. OCTによる $1/e^2$ 幅は、CR群およびCR-De群で、実験期間の経過に伴って増加したのに対して、nCR-De群では実験期間を通して変化は認められなかった。また、実験開始 14日以降の $1/e^2$ 幅は、nCR-De群およびCR群と比較してCR-De群で有意に大きい値を示した。
4. LSM観察からは、実験開始前で、いずれの試片においてもオレンジジュースへの浸漬によってエナメル小柱の露出が観察されたのに対して、実験開始 28日後ではnCR-De群でエナメル小柱がさらに明瞭化した像が、CR群およびCR-De群では試片表面に析出物が観察された。
5. SEM観察からは、実験開始前でいずれの試片においてもオレンジジュースへの浸漬によってエナメル小柱が露出している像が観察されたのに対して、実験開始 28日後では、

nCR-De群でエナメル小柱がさらに明瞭化した像が，CR-De群では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。

文 献

- 1) El Aidi H, Bronkhorst EM, Huysmans MC, Truin GJ. Multifactorial analysis of factors associated with the incidence and progression of erosive tooth wear. *Caries Res* 2011; 45: 303-312.
- 2) Dugmore CR, Rock WP. A multifactorial analysis of factors associated with dental erosion. *Br Dent J* 2004; 196: 283-286.
- 3) Lussi A, Schaffner M, Jaeggi T. Dental erosion-diagnosis and prevention in children and adults. *Int Dent J* 2007; 57: 385-398.
- 4) Kitasako Y, Sasaki Y, Takagaki T, Sadr A, Tagami J. Erosive tooth wear among different tooth types and surfaces in Japanese adults 15 to 89 years old. *Oral Health Prev Dent* 2017; 15: 357-364.
- 5) Huysmans MC, Young A, Ganss C. The role of fluoride in erosion therapy. *Monogr Oral Sci* 2014; 25: 230-243.
- 6) Carvalho JC, Scaramucci T, Aimée NR, Mestrinho HD, Hara AT. Early diagnosis and daily practice management of erosive tooth wear lesions. *Br Dent J* 2018; 224: 311-318.
- 7) Assunção CM, Lussi A, Rodrigues JA, Carvalho TS. Efficacy of toothpastes in the prevention of erosive tooth wear in permanent and deciduous teeth. *Clin Oral Investig* 2019; 23: 273-284.
- 8) Ganss C, Lussi A, Grunau O, Klimek J, Schlueter N. Conventional and anti-erosion fluoride toothpastes: effect on enamel erosion and erosion-abrasion. *Caries Res* 2011; 45: 581-589.
- 9) Topping G, Assaf A. Strong evidence that daily use of fluoride toothpaste prevents caries. *Evid Based Dent* 2005; 6: 32.

- 10) Wierichs RJ, Kogel J, Lausch J, Esteves-Oliveira M, Meyer-Lueckel H. Effects of self-assembling peptide P11-4, fluorides, and caries infiltration on artificial enamel caries lesions in vitro. *Caries Res* 2017; 51: 451-459.
- 11) Huang Z, Newcomb CJ, Bringas P Jr, Stupp SI, Snead ML. Biological synthesis of tooth enamel instructed by an artificial matrix. *Biomaterials* 2010; 31: 9202-9211.
- 12) Jablonski-Momeni A, Korbmacher-Steiner H, Heinzl-Gutenbrunner M, Jablonski B, Jaquet W, Bottenberg P. Randomised in situ clinical trial investigating self-assembling peptide matrix P11-4 in the prevention of artificial caries lesions. *Sci Rep* 2019; 9: 269.
- 13) Takahashi F, Kurokawa H, Shibasaki S, Kawamoto R, Murayama R, Miyazaki M. Ultrasonic assessment of the effects of self-assembling peptide scaffolds on preventing enamel demineralization. *Acta Odontol Scand* 2016; 74: 142-147.
- 14) Hannig M, Hannig C. Nanotechnology and its role in caries therapy. *Adv Dent Res* 2012; 24: 53-57.
- 15) Miyazaki M, Inage H, Onose H. Use of an ultrasonic device for the determination of elastic modulus of dentine. *J Oral Sci* 2002; 44: 19-26.
- 16) Colston B, Sathyam U, Dasilva L, Everett M, Stroeve P, Otis L. Dental OCT. *Opt Express* 1998; 3: 230-238.
- 17) West NX, Maxwell A, Hughes JA, Parker DM, Newcombe RG, Addy M. A method to measure clinical erosion: the effect of orange juice consumption on erosion of enamel. *J Dent* 1998; 26: 329-335.

- 18) Adair SM, Whitford GM, McKnight-Hanes C. Effect of artificial saliva and calcium on fluoride output of controlled-release devices. *Caries Res* 1994; 28: 28-34.
- 19) Chinn SR, Swanson EA, Fujimoto JG. Optical coherence tomography using a frequency-tunable optical source. *Opt Lett* 1997; 22: 340-342.
- 20) Shimamura Y, Murayama R, Kurokawa H, Miyazaki M, Mihata Y, Kmaguchi S. Influence of tooth-surface hydration conditions on optical coherence–tomography imaging. *J Dent* 2011; 39: 572-577.
- 21) 三富純一. エナメル質表層脱灰の光干渉断層画像解析への $1/e^2$ 幅の応用. *日歯保存誌* 2013; 56: 488-497.
- 22) Matsuyoshi S, Murayama R, Akiba S, Yabuki C, Takamizawa T, Kurokawa H, Miyazaki M. Enamel remineralization effect of a dentifrice containing calcium sodium phosphosilicate: an optical coherence tomography observation. *Acta Odontol Scand* 2017; 75: 191-197.
- 23) Kirkham J, Firth A, Vernals D, Boden N, Robinson C, Shore RC, Brookes SJ, Aggeli A. Self-assembling peptide scaffolds promote enamel remineralization. *J Dent Res* 2007; 86: 426-430.
- 24) Brunton PA, Davies RP, Burke JL, Smith A, Aggeli A, Brookes SJ, Kirkham J. Treatment of early caries lesions using biomimetic self-assembling peptides—a clinical safety trial. *Br Dent J* 2013; 215: E6.
- 25) Kamal D, Hassanein H, Elkassas D, Hamza H. Comparative evaluation of remineralizing efficacy of biomimetic self-assembling peptide on artificially induced enamel lesions: An *in vitro* study. *J Conserv Dent* 2018; 21: 536-541.

- 26) Peck SD, Rowe JM, Briggs GA. Studies on sound and carious enamel with the quantitative acoustic microscope. *J Dent Res* 1989; 68: 107-112.
- 27) Yamaguchi K, Miyazaki M, Takamizawa T, Inage H, Kurokawa H. Ultrasonic determination of the effects of casein phosphopeptide-amorphous calcium phosphate paste on the demineralization of bovine dentine. *Caries Res* 2007; 41: 204-207.
- 28) Murayama R, Furuichi T, Yokokawa M, Takahashi F, Kawamoto R, Takamizawa T, Kurokawa H, Miyazaki M. Ultrasonic investigation of the effect of S-PRG filler-containing coating material on bovine tooth demineralization. *Dent Mater J* 2012; 31:954-959.
- 29) Aggeli A, Nyrkova IA, Bell M, Harding R, Carrick L, McLeish TC, Semenov AN, Boden N. Hierarchical self-assembly of chiral rod-like molecules as a model for peptide beta-sheet tapes, ribbons, fibrils, and fibers. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98: 11857-11862.
- 30) Jablonski-Momeni A, Heinzl-Gutenbrunner M. Efficacy of the self-assembling peptide P11-4 in constructing a remineralization scaffold on artificially-induced enamel lesions on smooth surfaces. *J Orofac Orthop* 2014; 75: 175-190.
- 31) Takeuchi A, Ohtsuki C, Kamitakahara M, Ogata S, Miyazaki T, Tanihara M. Biomimetic deposition of hydroxyapatite on a synthetic polypeptide with beta sheet structure in a solution mimicking body fluid. *J Mater Sci Mater Med* 2008; 19: 387-393.
- 32) Darling CL, Huynh GD, Fried D. Light scattering properties of natural and artificially demineralized dental enamel at 1310 nm. *J Biomed Opt* 2006; 11: 34023.
- 33) Aggeli A, Bell M, Carrick LM, Fishwick CW, Harding R, Mawer PJ, Radford SE, Strong AE,

Boden N. pH as a trigger of peptide beta-sheet self-assembly and reversible switching between nematic and isotropic phases. *J Am Chem Soc* 2003; 125: 9619-9628.

表および図

Table 1 Ultrasonic velocity of bovine enamel specimens according to treatment groups

Group	Erosion period (days)		Treatment period (days)			
	0	28	7	14	21	28
CR	4545 (90) ^{aA}	4047 (44) ^{bA}	4285 (98) ^{cA}	4338 (89) ^{cA}	4320 (96) ^{cA}	4336 (87) ^{cA}
nCR-De	4539 (54) ^{aA}	4069 (41) ^{bA}	4080 (26) ^{bB}	4062 (20) ^{bB}	4032 (10) ^{bB}	3968 (11) ^{cB}
CR-De	4555 (53) ^{aA}	4092 (42) ^{bA}	4341 (64) ^{cA}	4362 (71) ^{cA}	4416 (77) ^{cA}	4415 (62) ^{cA}

Unit: m/s, n = 6, values in parenthesis indicate standard deviations.

Within groups, means with the same lower-case letter are not significantly different.

Between groups at the same storage times, means with the same upper-case letter are not significantly different ($p > 0.05$).

Table 2 Maximum peak intensity of bovine enamel specimens according to treatment groups

Group	Erosion period (days)		Treatment period (days)			
	0	28	7	14	21	28
CR	-68.2 (4.7) ^{aA}	-46.2 (1.3) ^{bA}	-69.8 (4.1) ^{aA}	-77.4 (1.6) ^{cA}	-82.3 (3.3) ^{cdA}	-84.3 (2.6) ^{dA}
nCR-De	-69.3 (5.2) ^{aA}	-49.4 (3.6) ^{bA}	-46.5 (3.3) ^{bB}	-45.8 (3.7) ^{bcB}	-39.4 (4.1) ^{cB}	-35.2 (2.2) ^{cB}
CR-De	-72.3 (3.5) ^{aA}	-46.6 (3.5) ^{bA}	-79.5 (4.7) ^{cC}	-85.0 (2.6) ^{cC}	-92.3 (2.1) ^{dC}	-92.8 (3.7) ^{dC}

Unit: dB, n = 6, values in parenthesis indicate standard deviations.

Within groups, means with the same lower-case letter are not significantly different.

Between groups at the same storage times, means with the same upper-case letter are not significantly different ($p > 0.05$).

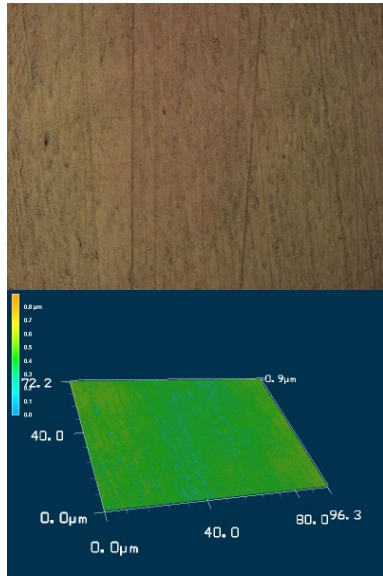
Table 3 $1/e^2$ width of bovine enamel specimens according to treatment groups

Group	Erosion period (days)		Treatment period (days)			
	0	28	7	14	21	28
CR	70.0 (8.2) ^{aA}	57.9 (9.6) ^{abA}	72.5 (5.0) ^{abcA}	85.0 (12.9) ^{acA}	90.0 (8.2) ^{dA}	95.0 (5.8) ^{dA}
nCR-De	67.5 (9.6) ^{aA}	52.5 (5.0) ^{bA}	55.0 (5.8) ^{bB}	55.0 (5.8) ^{bB}	55.5 (5.0) ^{bB}	50.0 (8.2) ^{bB}
CR-De	72.5 (9.6) ^{aA}	60.0 (8.2) ^{aA}	77.5 (9.6) ^{aA}	120.0 (18.3) ^{cC}	135.0 (12.9) ^{cC}	137.5 (20.6) ^{cC}

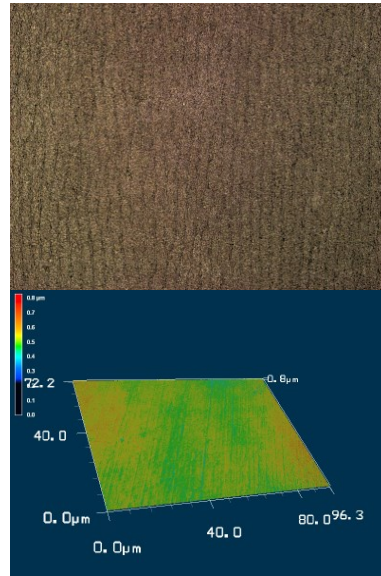
Unit: μm , n = 6, values in parenthesis indicate standard deviations.

Within groups, means with the same lower-case letter are not significantly different.

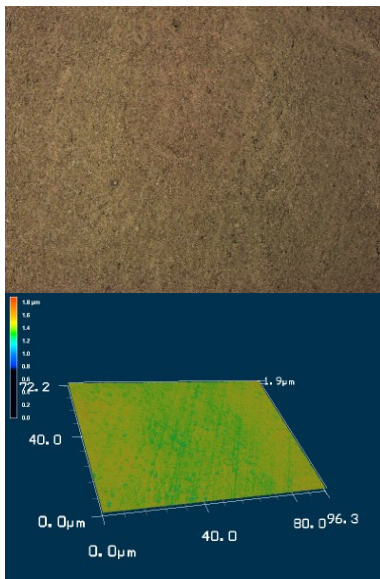
Between groups at the same storage times, means with the same upper-case letter are not significantly different ($p > 0.05$).



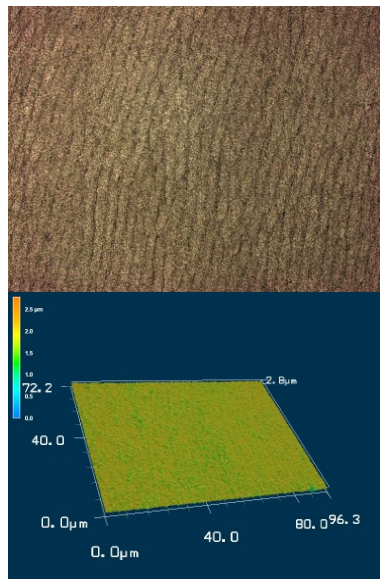
Untreated enamel ground with SiC paper



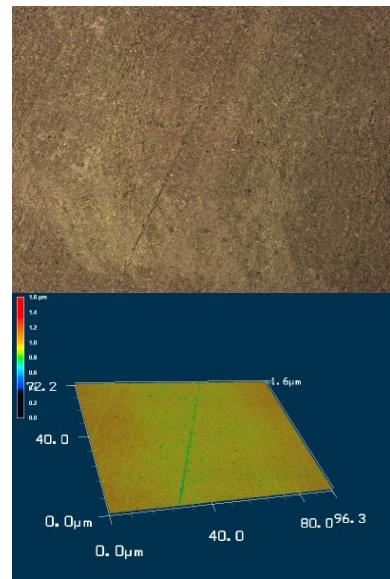
After initial treatment with orange juice



CR group / 28 days

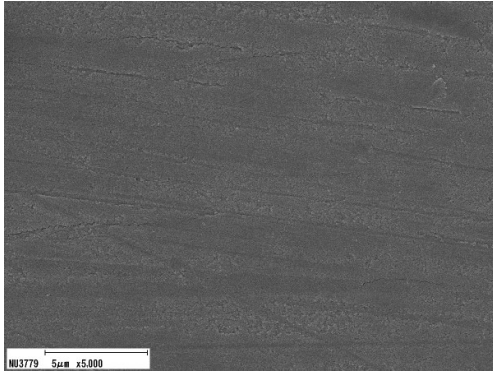


nCR-De group / 28 days

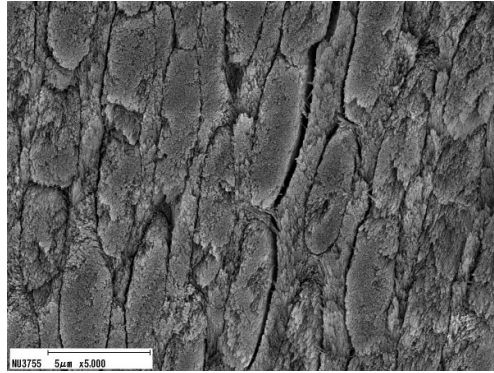


CR-De group / 28 days

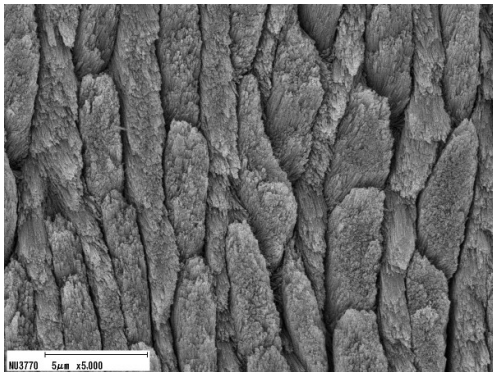
Fig. 1 LSM images of bovine enamel surface under the experimental conditions.



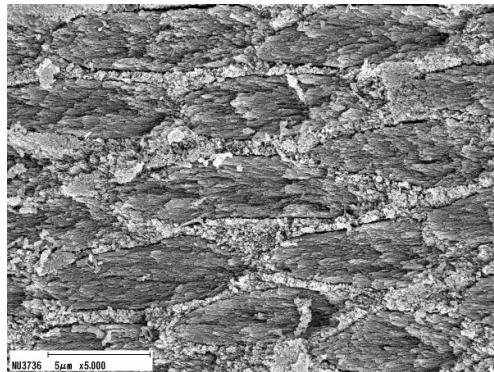
Untreated enamel ground with SiC paper



After initial treatment with orange juice



nCR-De group / 28 days



CR-De group / 28 days

Fig. 2 SEM images of bovine enamel surface under the experimental conditions.