

博士學位論文

鶴見大学大学院歯学研究科博士学位論文

内容の要旨および審査の結果の要旨

氏 名 佐々木里那
博士の専攻分野 博士（歯学）
学位記番号 甲第532号
学位授与年月日 令和6年3月14日
学位授与の要件 学位規則第4条第1項該当
研究科専攻 鶴見大学大学院歯学研究科
(博士課程) 歯学専攻
学位論文 Effect of an Amorphous Calcium Phosphate Agent on Artificial Dentin Caries lesions
(非晶質リン酸カルシウム材が人工象牙質齲蝕病巣に及ぼす影響)
Journal of Hard Tissue Biology 第33巻, 第1号, 39頁～46頁掲載, 2024年1月31日発行
論文審査委員 主査 教授 朝田 芳 信
副査 教授 細 矢 哲 康 副査 教授 山 本 雄 嗣

内 容 の 要 旨

歯科接着技術の目覚ましい発展により、歯質削除が中心の齲蝕治療から、Minimal Intervention (MI) のコンセプトに基づいた健全歯質を最大限に保存する齲蝕治療へとシフトした。

このMIコンセプトをさらに追求し、健全歯質だけではなく脱灰象牙質の切削量をも可能な限り減らす治療方法の確立を目標とし、充填材の結晶性と残存象牙質の再石灰化について検討した。そこで本研究では、ハイドロキシアパタイト (HAP) の前駆体である Amorphous calcium phosphate (ACP) に着目し、臨床応用の可能性について実験を行った。ACPは持続的なCaおよびPイオンの徐放が期待されるため、CPP-ACPやレジンとのハイブリット複合材料としての歯科領域への応用研究が数多く報告されている。しかし、これまでのところACP単体を歯質に応用する試みはなされていない。

先行研究では、ACPと2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl] ethanesulfonic acid (HEPES) Bufferを混和すると、15分後にHAPが析出することを見出した。このことから、生体と同等材料を用いた修復の短時間での実現の可能性が示された。そこで、本研究ではACPとHEPES Bufferの混和で析出するHAPを化学量論的に検証した上で、象牙質齲蝕病巣モデルに適用し、ACPからHAPへの結晶化と脱灰象牙質の再石灰化状態を評価した。

まず初めに、ACP粉末と0.1 mol/l HEPES Buffer (pH = 7.4) の粉液比を決定するために、3種類の混合溶液を準備した。それぞれのACP:HEPESは、1:100, 1:200, 1:1000とした。混和開始から30分後まで5分間隔で各群の遠沈上清液を採取し、吸光度によるCaの定量を行った。その結果、1:200群のみCaが15分後にピークに達し、それ以降は減少傾向を示した。上清中のCaの減少はHAPの析出を意味している。このことから、1:200はACPがHAPに結晶化するのに適していることが分かった。

さらにHEPES Bufferを酸性 (pH = 5.3) とアルカリ性 (pH = 8.1) に調整し、粉液比1:200で上記と同様にCaを定量した。その結果、pH = 5.3群のCa量は5分後pH = 8.1群の約4倍に達し、それ以降60分を経過しても両群のCa量に大きな変動はなかった。次に、上記2種類のACP/HEPES混和液の上清を混合し、HAP粉末と粉液比1:200で混和した。このHAPは齲蝕深層の結晶を想定している。その上清中のCa量を10分間隔で60分間定量した。その結果、混和後20分までCa量は急激に減少し、以後50分までは大きな変化は認められなかった。このことから、上清中のCaイオンにより、HAPに付加的な結晶成長（エピタキシャル結晶成長）が生じたことが示唆された。

次に、牛歯に人工的に象牙質齲蝕病巣を作製し、齲窩にACPを2.5 mg充填した後、pH = 5.3のHEPES Buffer 250 μ lを滴下した。5分間室温で放置後、次いでpH = 8.1のHEPES Buffer 250 μ lを滴下した。これで粉液比は1:200となる。

齲窩の ACP を透過型電子顕微鏡で観察したところ、充填前の ACP は 10 ～ 20 nm の微細な粒状であったが、HEPES Buffer を滴下した群では、20 分経過後で、粒状の ACP は残存するものの大部分は幅の広い板状ないし棒状結晶に変化し、40 分および 60 分経過後には幅のやや狭い針状結晶へと変化していた。

さらに充填した ACP が脱灰歯質に与える影響を観察するために、齲窩に 10% 次亜塩素酸ナトリウム 0.2 ml を滴下して 1 分間放置し、齲窩表層の有機質を一部除去した後、1) 非滴下群、2) 齲窩に pH = 5.3 の HEPES Buffer を滴下後、pH = 8.1 の HEPES Buffer を滴下した群 (HEPES 群)、3) ACP を齲窩に充填後 2) と同様に滴下した群 (ACP + HEPES 群) を準備した。滴下 20 分後、各試料をエポキシ包埋、鏡面研磨し、齲窩断面の反射電子像を撮影した。そして反射電子像の輝度値からミネラル濃度曲線を作成し、脱灰深度とミネラル喪失量を計算した。非滴下群の反射電子像では、暗い脱灰部の下方に部分的な脱灰像が混在する移行部が観察された。HEPES 群では、脱灰部の暗調程度が少なく、その下層には明調領域である健全象牙質が認められた。ACP + HEPES 群では、齲窩に ACP と HEPES の混和物が残存しており、それに接する象牙質表面から約 200 μm の幅で HEPES 群よりも明るい暗調領域が認められ、その下が健全象牙質となっていた。3 群間で脱灰深度に大きな差は認められなかったが、ACP + HEPES 群のみで齲窩の石灰化度の上昇を認め、その上昇率は 13% であった。Kruskal-Wallis 検定と Dunn-Bonferroni 検定で分析した結果、非滴下群と ACP + HEPES 群の間に有意差が認められ ($p < 0.05$)、他群間には有意差は認められなかった。これらの結果から、HEPES 群で脱灰層に無機質の沈着がみられたのは、pH 5.3 の HEPES により齲窩の残存無機質から溶解した Ca と PO_4 が脱灰層に拡散し、その後 pH 8.1 の HEPES により中和されて HAP に結晶化したためと考えられる。したがって、非滴下群と ACP + HEPES 群の比較では、充填した ACP が短時間のうちに HAP に変化したこと、ACP と HEPES Buffer の混和物からは持続的な Ca、P イオンの供給がなされ脱灰象牙質中で再石灰化が起り、無機質量が有意に増加したものと考察された。

さらに、上記のエポキシ包埋試料から象牙質脱灰部の超薄切片を作製し、エタノール-ウラン染色を施し透過型電子顕微鏡観察を行ったところ、非滴下群では結晶沈着はほとんどみられず、象牙質コラーゲン線維の走行が観察された。HEPES 群では非滴下群よりも結晶沈着がやや多く、コラーゲン線維の走行は不明瞭となっていた。ACP + HEPES 群では象牙質管間基質に多量の結晶沈着が観察され、一部の象牙細管内にも結晶が観察された。

以上より、ACP に pH の異なる 2 種類の HEPES Buffer を時間をおいて滴下することにより、持続的な Ca、P イオンの供給がなされると同時に、充填した ACP が短時間のうちに HAP に結晶化することが明らかになった。本研究は、歯質と同等の成分による充填材の創生を目的とし、牛歯内でも短時間での ACP の HAP への結晶化が確認されたことから、本材の充填材としての有用性がより期待される。ACP + HEPES 充填材の物性や歯質接着性、他の歯質由来成分との併用など、今後さらなる検討が必要であると考えている。

審査の結果の要旨

ハイドロキシアパタイト (HAP) の前駆体である Amorphous calcium phosphate (ACP) は、骨や歯などの生体硬組織に存在するとともに、骨伝導性や生物活性を持つため、組織再生を誘導する生体活性材料として広く用いられている。さらに持続的な Ca および P イオンの徐放が期待され、CPP-ACP やレジンとの複合材料としての歯科領域への応用研究が数多く報告されている。しかし、これまでのところ ACP 単体を歯質に応用する試みはなされていない。過去の報告では、ACP と 2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl] ethanesulfonic acid (HEPES) Buffer を混和すると、15 分後に HAP が析出することを見出し、これによって歯質成分由来の ACP を用いた短時間での修復治療の可能性が示唆されている。

そこで、本研究では ACP と HEPES Buffer の混和で析出する HAP を化学量論的に検証した上で、象牙質齲蝕病巣モデルに適用し、ACP から HAP への結晶化と脱灰象牙質の再石灰化状態の評価を行った。

牛歯に人工的に象牙質齲蝕病巣を作製し、齲窩に ACP を 2.5 mg 充填した後、pH = 5.3 の HEPES Buffer 250 μl を滴下し、5 分間室温放置後、pH = 8.1 の HEPES Buffer 250 μl を滴下したところ、齲窩内には粒状の ACP は残存するものの幅の広い板状ないし棒状結晶が多く認められ、ACP が相転換し HAP が析出したことが示唆された。

次に、充填した ACP が脱灰歯質に及ぼす影響を検証した。齲窩に 10% 次亜塩素酸ナトリウムを滴下し、齲窩表層の有機質を一部除去後に、上記同様の条件の ACP と HEPES Buffer を適用し、エポキシ包埋後に試料を半切し、齲窩断面の反射電子像を撮影した。その輝度値からミネラル濃度曲線を作成し、脱灰深度とミネラル喪失量を計算した。その結果、象牙質表面から約 200 μm の幅で比較的明るい暗調領域が認められ、その下が健全象牙質となっていた。脱灰深度とミネラル喪失量の算出結果から、齲窩内の石灰化度は 13% 上昇した。ACP と HEPES Buffer の混和物から持続的に Ca、P イオンの供

博 士 学 位 論 文

給がなされ、それと同時に充填した ACP は短時間のうちに HAP に結晶化したことが示唆された。

以上の結果から、ACP に pH の異なる 2 種類の HEPES Buffer を時間差で滴下することにより、周囲歯質には持続的に Ca, P イオンの供給がなされ、また充填した ACP が短時間のうちに HAP に結晶化することが明らかになった。本研究は、ACP の生体活性材料としての新たな臨床応用法につながる成果と考えられる。

よって、本論文は博士（歯学）の学位請求論文として十分な価値を有するものと判定した。