The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	UVA活性リボフラビン処理による象牙質う蝕抑制効果の評価
Author(s)	上村, 怜央
Citation	大阪大学, 2018, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/69502
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

様式３

論　文　内　容　の　要　旨

氏　名　（　　上村　怜央　　）	
論文題名	UVA活性リボフラビン処理による象牙質う蝕抑制効果の評価

論文内容の要旨

【緒言】

近年の超高齢社会において、高齢者における根面う蝕の増加が問題となっている。象牙質の臨界pHはエナメル質と比べて高いため、根面でのう蝕は発生しやすく、一度う窩を形成すると歯肉縁下に広がり、修復治療が困難になることが多い。したがって、根面う蝕を予防・進行抑制することは、生涯にわたる口腔の健康を支えるために重要な臨床課題である。根面を含む象牙質う蝕の進行には2つのステージがある。まず、バイオフィルム中の細菌から産生される酸により、ミネラルが喪失しコラーゲンが露出する。次に、露出したコラーゲンが細菌性や内在性の酵素により分解され、さらなるミネラルの喪失を引き起こすという循環を繰り返している。

本研究では、象牙質コラーゲンを強化することがう蝕の予防および進行抑制に重要な役割を担うと考え、眼科領域にて既に臨床応用されているリボフラビン溶液と紫外線照射の併用によるコラーゲン架橋形成法（UVA活性リボフラビン処理）を、象牙質コラーゲンに応用することに着目した。すなわち、UVA活性リボフラビン処理の象牙質への応用により、象牙質そのものの機械的性質に変化が生じるかを検証した。続いて、象牙質の酸および酵素反応への抵抗性が向上するかを検討し、UVA活性リボフラビン処理が、根面う蝕予防および進行抑制につながる新たな治療法として有用であるかを調べることを目的とした。

【材料および方法】

本研究は、大阪大学大学院歯学研究科倫理委員会の承認下で実施した（承認番号：H25-E28）。

Ⅰ. UVA活性リボフラビン処理の最適条件の同定および象牙質コラーゲンにおける架橋形成の評価

ヒト健全第三大臼歯の歯冠中央部の象牙質を切断し、0.2×1.7×8.0 mmの棒状試料および厚さ1.0 mmの円盤状試料を作製した。棒状試料は、象牙細管の走行方向を試料の長軸に対して平行に規定した。リボフラビン溶液は、リボフラビン-5'-モノフォスフェートナトリウムを蒸留水に溶解させて、0.1%および1%溶液を作製し、試料を1分間浸漬した。試料を乾燥させた後、それに続くUVA照射は、LED紫外線照射装置を用いて、波長365 nm、照射強度800、1200、1600 mW/cm^2、照射時間5、10、15分の条件で行った。

1. 機械的性質の評価：棒状試料を万能試験機に固定し、クロスヘッドスピード0.1 mm/minにて3点曲げ試験に供した。まず紫外線の照射時間を10分に設定したうえで、曲げ強さ、靭性および弾性係数を測定し、得られた結果を二元配置分散分析法およびScheffe's *F*法にて有意水準95%で検定した。その後、最適条件において、照射時間の影響を一元配置分散分析法およびTukey法にて有意水準95%で検定した。
2. 分子構造変化の評価：円盤状試料を10% EDTAにて脱灰し、コラーゲンを露出させたものに前項１で確定した最適条件にてUVA活性リボフラビン処理を施した。処理前後のラマン分光分析から、分子構造の変化を確認した。
3. 架橋形成の評価：円盤状試料から1 mm角に切り出した象牙質試料に、前項１で確定した最適条件にてUVA活性リボフラビン処理を施した。1M 塩酸に24時間浸漬し、コラーゲンを溶解させ、タンパク質の抽出を行ったのち、SDS-PAGEを実施し、総タンパク質量の検出のため銀染色、コラーゲンの検出を行うため抗コラーゲン抗体を用いたウェスタンブロッティングを行い、コラーゲンの架橋形成を確認した。

Ⅱ. UVA活性リボフラビン処理による象牙質の脱灰抑制および酵素分解抑制効果の評価

実験Ⅰ-1で確定した最適なUVA活性リボフラビン処理条件を用いて、以下の実験を行った。

1. 耐酸性の評価：ヒト健全第三大臼歯のセメントエナメル境に近接する頬側面を歯軸に平行に切断し、根面象牙質を露出させた2ブロックを切り出した。さらにブロックを厚さ500 μmに切り出し、露出した象牙質面にUVA活性リボフラビン処理を施した後、pH5.0の脱灰溶液に3日間浸漬した。脱灰前後にμCT撮影を行い、ミネラル喪失量および脱灰深さを算出した（Student-*t*検定、α=0.05）。

2. 酵素分解抵抗性の評価：根面象牙質より1 mm角に切り出した象牙質試料を10% EDTAにて完全に脱灰させ、UVA活性リボフラビン処理を施したものを、ペプシン（0.05 mg/ml）にて1日間およびコラゲナーゼ（*Clostridium histolyticum*、0.2 unit/ml）にて1日および5日間酵素分解させた。溶解したコラーゲンを抽出してSDS-PAGEを行い、銀染色にて総タンパク質量の評価および抗コラーゲン抗体によるウェスタンブロッティングにてコラーゲンの分子量の差異を評価した。
3. 象牙質微細構造の形態学的評価：UVA活性リボフラビン処理を施した象牙質棒状試料を、pH5.0の脱灰溶液に浸漬させ、脱灰深さおよび象牙細管の微細構造を走査型電子顕微鏡（SEM）にて観察した。また、コラゲナーゼにて酵素分解を行った試料を用いて超薄切片（70 nm）を作製し、コラーゲンの分解による構造変化を透過型電子顕微鏡（TEM）にて観察した。

Ⅲ. 口腔を想定した環境下におけるUVA活性リボフラビン処理による象牙質の耐酸性に関する評価

根面象牙質を露出させた2ブロックを切り出し、UVA活性リボフラビン処理を施した後、口腔環境を模倣した自動pHサイクル装置を使用し、う蝕リスクの違いによる耐酸性を評価するため、2種類のプログラムに従って脱灰および再石灰化を2週間繰り返した。脱灰前後のミネラル喪失量および脱灰深さをμCT撮影にて算出し比較した（Student-*t*検定, α =0.05）。

【結果および考察】

Ⅰ. 0.1%リボフラビン溶液1分間浸漬後、1600 mW/cm^{2}の紫外線を10分間照射することにより、曲げ強さは295 ± 46 MPaを示し、コントロール群（136 ± 29 MPa）の約2.2倍に有意に増加した。靭性においても曲げ強さと同様の結果が得られ、UVA活性リボフラビン処理により、象牙質の機械的強度が有意に増加することが示された（P < 0.05）。

ラマン分光分析より、815 cm^{-1}を基準とし、プロリン環を示す921、1037 cm^{-1}およびC-N結合を示す1248 cm^{-1}、N-H結合を示す1271 cm^{-1}、C-C結合を示す1343、1451 cm^{-1}に変化が生じた。

銀染色では、タンパク質の総量に明らかな変化は見られなかった。しかし、抗コラーゲン抗体を用いたウェスタンブロッティングの場合、明らかにバンドが強く発現している場所が異なり、架橋形成によるコラーゲンの分子量の変化を確認した。

これらより、象牙質コラーゲンに架橋形成が生じることにより、機械的強度が著しく増加することがわかった。

Ⅱ. pH5.0の脱灰によるミネラル喪失量は、コントロール群が7.9 ± 2.9 mg/cm^{2}であるのに対し、UVA活性リボフラビン群では、3.0 ± 1.0 mg/cm^{2}であり、有意に少ないことがわかった。また、脱灰深さは、コントロール群が75.9 ± 29.3 μmを示し、UVA活性リボフラビン群（25.4 ± 14.6 μm）よりも有意に少ないことが示された（P < 0.05）。

ペプシン分解およびコラゲナーゼ分解においても、UVA活性リボフラビン群は明らかに溶出するタンパク質の総量が少なく、分解されにくいことが示された。また、経時的な変化についても、分解量は明らかにUVA活性リボフラビン群の方が少なく、コラーゲンの架橋形成による分解抵抗性の向上が示された。

SEM像より、UVA活性リボフラビン群は顕著に脱灰深さが少なく、象牙細管周囲のミネラルの喪失を抑制していることがわかった。また、TEM像より、コントロール群では象牙細管周囲のコラーゲンが顕著に分解されているのに対し、UVA活性リボフラビン群では本来の構造を保っていることがわかった。

これらより、UVA活性リボフラビン処理により、耐酸性および酵素分解抵抗性が向上し、コラーゲンの分解を抑制することによって新たなミネラルの喪失を防ぎ得ることが分かった。

Ⅲ. 口腔を想定した環境下においても、う蝕リスクが高い患者を想定した場合、ミネラル喪失量はコントロール群が36.7 ± 5.3 mg/cm^{2}であったのに対し、処理群は25.1 ± 6.2 mg/cm^{2}であり、有意差を認めた。また脱灰深さについては、コントロール群が225.1 ± 18.0 μmであったのに対し、処理群では163.8 ± 26.9 μmであり、同様に有意差を認めた（P < 0.05）。う蝕リスクが低い患者を想定した場合、ミネラル喪失量は、UVA活性リボフラビン群が5.7 ± 2.6 mg/cm^{2}となり、コントロール群（13.3 ± 2.8 mg/cm^2）よりも有意に少ないことがわかった。脱灰深さについても、UVA活性リボフラビン群は31.3 ± 12.0 μmとなり、コントロール群（67.4 ± 10.8 μm）よりも有意に少なくなった。

【結論】

UVA活性リボフラビン処理を象牙質面に施すと、コラーゲンの新たな架橋形成が生じることによって、象牙質の機械的性質が強化された。また、酸および酵素に対する抵抗性を高めることから、象牙細管周囲のコラーゲンの分解およびミネラルの喪失を防ぎ、根面象牙質の脱灰を抑制するのに有効であることが示された。以上より、UVA活性リボフラビン処理は、根面う蝕の予防および進行抑制に有効な方法であると考えられる。

様式７

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏　名　（　上村　怜央　）			
論文審査担当者		（職）	氏　名
	主 査	教授	林　美加子
	副 査	教授	仲野　和彦
	副 査	准教授	久保庭　雅恵
	副 査	講師	住友　倫子

論文審査の結果の要旨

本研究は、リボフラビンと紫外線の併用によるコラーゲン架橋形成法（UVA 活性リボフラビン処理）を象牙質に応用することによって、象牙質の強化およびう蝕の抑制効果を検証し、そのメカニズムを明らかにしようとしたものである。

その結果、UVA 活性リボフラビン処理を象牙質に適用することによって、コラーゲンの架橋形成が生じ、象牙質が強化されることが示された。また、その新たな架橋形成によって、コラーゲンの分解およびミネラルの喪失を防ぐことで、酸および酵素反応への抵抗性を高め、根面象牙質の脱灰抑制に有効であることがわかった。

以上の研究成果は、高齢者のう蝕予防を行ううえで、重要な知見を提供するものであり、本研究は博士（歯学）の学位授与に値するものと認める。