



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

学 位 論 文

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

大阪大学大学院歯学研究科
口腔科学専攻（歯科保存学教室）

指導教員：林 美加子教授

上村 怜央

I．緒言

近年、先進諸国において高齢者の根面う蝕の増加が問題となっている（平成 28 年度厚生労働省歯科疾患実態調査、Griffin et al. 2004、Saunders and Meyerowitz 2005、Wierichs and Meyer-Lueckel 2015）。高齢者は、老化や歯周治療などによって歯肉が退縮し、根面が口腔環境にさらされやすい（Michaelis and Schiffner 2006）。また、全身疾患に伴う薬剤の影響で、若年者と比べて唾液流量が減少傾向にあると言われている（Bignozzi et al. 2014）。その結果として、バイオフィルムが露出した根面に停滞しやすく、根面う蝕病巣を発生させることとなる。

根面を含む象牙質は、ほとんどが無機成分であるエナメル質と異なり、有機質を全体の約 30%含んでおり（Linde 1989）、その 9 割が I 型コラーゲンで、残りの 1 割がリンタンパク質およびプロテオグリカンといった非コラーゲン性タンパク質で構成されている（Embery et al. 2001、Septier et al. 2001、Bedran-Russo et al. 2008）。そのため、象牙質の臨界 pH は約 6.0 で、エナメル質（臨界 pH5.5）と比べて高いため、う蝕が発生しやすく（Hoppenbrouwers et al. 1987、Featherstone et al. 1994、Donovan 2008、Peters 2010）、一度根面にう窩を形成すると、セメントエナメル境に沿って隣接面や歯肉縁下に拡大していくため、

修復治療を中心とした対応は非常に困難になることが多い（Fejerskov 2008、Bignozzi et al. 2014）。したがって、高齢者における根面う蝕を予防・進行抑制することが現在の高齢社会において重要な課題であると考えられる。

象牙質う蝕は、進行に2つのステージがあると考えられている。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、その象牙質コラーゲンが細菌性および内因性の酵素により分解され、コラーゲン網が崩壊することによってさらなるミネラルの喪失を引き起こすという悪循環を繰り返すと言われている（ten Cate et al. 1998、2013、Vanuspong et al. 2002、Chaussain-Milder et al. 2006、Islam et al. 2012）。そこで、ミネラル沈着の足場として働くI型コラーゲンを強化することが、根面う蝕の予防に重要な役割を担うのではないかと注目した（Ganss et al. 2004、Nakornchai et al. 2004、Hara et al. 2005、Pavan et al. 2011）。

これまでに、紫外線を象牙質に照射することによって、象牙質の機械的強度を約2倍に増加でき、そのメカニズムとしてコラーゲンの新たな分子結合による架橋形成であることが報告されてきた（Hayashi et al. 2010）。また眼科分野において、リボフラビン溶液の点眼後、紫外線を照射する方法によって、コラーゲンの崩壊により角膜が拡張する疾患である円錐角膜が改善可能であるとされ、効果的であることが数多く報告されてきている（Wollensak et al. 2003、Spoerl

et al. 2007、Ashwin and McDonnell 2009、McCall et al. 2010))。このリボフラビンとはヒトの体内においてビタミン B2 として存在している物質であり、長波長紫外線 (UVA) の照射によって特異的に励起されて蛍光を発生し、活性酸素を生じさせることにより、コラーゲンの架橋結合を促進する光増感剤として知られている (Foote 1968、Snibson et al. 2010))。このリボフラビンと紫外線照射の併用法 (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よって、紫外線照射単独よりもコラーゲンを強化することができるのではないかと着想した。

歯科においては、UVA 活性リボフラビン処理をリン酸エッチングにて脱灰した象牙質に適用することによって接着強さが上がるとの報告がなされており (Cova et al. 2011、Fawzy et al. 2012、Chiang et al. 2013))、接着分野において効果的であると言われている。しかし、コラーゲンが露出していない未脱灰の象牙質そのものに UVA 活性リボフラビン処理を適用することによって、最大でどの程度まで象牙質が強化できるか、そして結果的に、耐酸性および酵素反応抵抗性が得られ、脱灰を抑制できるかどうかについては未だ明らかになっていない。

そこで、本研究の目的は、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、象牙質そのものの機械的性質に変化が生じるか、また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

根面う蝕予防につながる新しい治療法として有用であることを目的とした。

II. 実験方法

本実験では、大阪大学歯学部附属病院の患者で、矯正もしくは歯周病治療により抜歯適応となり、同意を得られた患者の第三大臼歯を対象にし、う蝕や修復処置のされていない健全なものを 4°C にて保管し、抜去後半年以内のものを用いた。なお、本研究は、大阪大学大学院歯学研究科倫理審査委員会の承認のもと行った（承認番号第 H25-E28）。

1. UVA 活性リボフラビン処理の最適な条件の確定および象牙質コラーゲンの架橋形成の評価

1.1 試料の作製および試料の処理条件

23 歳から 39 歳までのヒト抜去第三大臼歯の歯冠中央部より、流水下で低速精密切断機（ISOMET2000、BUEHLER、IL、US）および回転研磨機（ECOMET III、BUEHLER）を用いて、厚さ×幅×長さがそれぞれ $0.2 \times 1.7 \times 8.0$ mm となる棒状試料および厚さ 1.0 mm の円盤状試料を作製した（図 1）。象牙細管の走行は、棒状試料では試料の長軸に対して平行に規定し、円盤状試料では測定平面に対して垂直になるように規定した。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（東京化成工業株式会社、東京）を蒸留水に溶解させて、0.1%および1%溶液を作製し、その中に試料を1分間浸漬した。1分後試料を取り出し、エアー乾燥させた後、それに続く UVA 照射は、LED 紫外線照射装置（ZUV-C30H、オムロン、京都）を用いて、波長 365 nm、照射強度 800、1200、1600 mW/cm²、照射時間 5、10、15 分の条件で行った。照射距離は 1 cm とした。

1.2 機械的性質の評価

棒状試料を試料台に装着し、精密万能試験機（AUTOGRAPH AG-IS、島津製作所、京都）を用いて、クロスヘッドスピード 0.1 mm/min にて 3 点曲げ試験を行った（図 1）。まず紫外線の照射時間を 10 分に設定したうえで、リボフラビン溶液の濃度および紫外線の照射強度を変化させて曲げ試験を実施し、曲げ強さ（MPa）、靱性（MPa）および弾性係数（GPa）を算出した（Hayashi et al. 2008、Shinno et al. 2016）。それぞれの計算式を以下に示す。

曲げ強さ（ σ ）は、

$$\sigma = 3PL/2wt^2$$

より算出し、 P (N) は最大破壊荷重、 L (mm) は支点間距離($L = 2$ mm、一定)、 w (mm) および t (mm) はそれぞれ試料幅、試料厚さを示す。

靱性 (u) は応力歪み曲線を解析し、次に示す計算式により算出した。

$$u = U(3/L) (y_{\max}^2/I_x)$$

U (N/mm) は破断に至るまでの吸収エネルギー、 $y_{\max}$ (mm) は中立面からの表面の距離 (ここでは $y_{\max} = t/2$ となる)、そして I_x (mm⁴) は破断面の慣性モーメント ($I_x = wt^3/12$) を示す。

弾性係数は応力歪み曲線の傾きから算出した。

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。試料数は各群 7 とした。

曲げ強さ測定後の試料破断面にプラズママルチコーター (PMC-5000、メイワフォーシス、大阪) を用いて白金蒸着を施し、走査型電子顕微鏡 (JSM-310、JEOL、東京、以下 SEM) にて破面を観察した。

1.3 分子構造変化の評価

円盤状試料を 10% EDTA (pH7.4) にて 7 日間脱灰しコラーゲンを露出させたものに、前項 1.2 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。処理前後におけるタイプ I コラーゲンの分子構造変化を顕微レーザーラマ

ン分光分析装置 (RAMAN touch、ナノフォトン、大阪) にて分析した。分析条件は、レーザー波長 785 nm、分析時間 120 秒とし、試料数は 5 とした。

1.4 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を 2 群に分け、一方をコントロール群、もう一方を UVA 活性リボフラビン群とし、前項 1.2 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。その後、1 M 塩酸を 30 μ l 加え、37°C にて 24 時間浸漬しコラーゲンを溶解させた。反応後、それぞれの試料に含まれる可溶化したタンパク質成分に、冷却したアセトンを 70 μ l 加えて沈殿させ、10000 rpm で 20 分間遠心分離を行い、沈殿物を回収した (Matsuda et al. 2016)。

タンパク質の分離を行うため、SDS-ポリアクリルアミド電気泳動 (SDS-PAGE) を Laemmli の方法 (Laemmli 1970) にて実施した。コラーゲン抽出物をリン酸緩衝液 (以下、PBS) および SDS-PAGE 用サンプルバッファー (Laemmli サンプルバッファー、Bio-rad、CA、US) に再溶解し、SDS ポリアクリルアミドゲル (ミニプロテアン TGX ゲル 4-15% グラディエントゲル、Bio-rad) に 1 レーンあたり 10 μ l ずつロードした。電源装置 (パワーパック HC、Bio-rad) にて 200 mV 定電圧、約 30 分間電気泳動した。電気泳動後、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。

銀染色では、電気泳動したゲルを 10%酢酸－50%メタノール－40%蒸留水で固定したのち、銀染色試薬（2D-銀染色試薬・II、コスモバイオ、東京）を用いて染色を行った。

ウェスタンブロッティングでは、セミドライブロット法にてゲルよりタンパク質を PVDF 膜へ転写した。陽極液に 15%メタノールを含む Tris 60mM/CAPS 40mM 緩衝液(pH9.0)を、陰極液に 0.1% SDS を含む Tris 60mM/CAPS 40mM 緩衝液 (pH9.0) を使用した。両緩衝液それぞれに、転写を行うゲルと同じ大きさの厚手の濾紙（ブロットアブソーベントフィルターペーパー極厚 2.45 mm、Bio-rad）を浸し、陽極液にはあらかじめ 100%メタノールで親水化処理を行った PVDF 膜（イミューンブロット PVDF メンブレン、Bio-rad）を、陰極液にはゲルを浸漬した。1.5 mA/cm² の定電流にて 1 時間転写を行った。

タンパク質を転写した PVDF 膜は、ブロッキング試薬(EzBlock Chemi、ATTO、東京)を用いてブロッキングを行った。コラーゲンの抗原抗体反応には、一次抗体に 1/5000 希釈したウサギ抗コラーゲン抗体 (Polyclonal Antibody to Collagen type I purified、Acris Antibodies Inc.、CA、US) を、二次抗体に 1/5000 希釈したヤギ抗ウサギ抗体 (HRP-goat anti-rabbit IgG、Jackson Inc.、PA、US) を反

応させ、検出には化学発光（Ez West Lumi plus、ATTO）を用いて、化学発光検出装置（GeneGnome 5、Syngene、UK）を使用した。

2. 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

2.1 試料の作製

前項 1.2 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、実験を行った。試料の作製には、22 歳から 36 歳のヒト抜去第三大臼歯を用いた。流水下で低速精密切断機（ISOMET2000）を使用し、セメントーエナメル境より歯冠側 0.5 mm、歯根側 7 mm の部位にて歯軸に対して垂直に切断後、近遠心方向に半切した頬側片を使用した。頬側片の頬側表面を一層除去し、根面象牙質表面を露出したブロックを用意した（図 2）。

2.2 耐酸性の評価

根面象牙質ブロックの中央部分から歯軸と平行になるよう 500 μ m 幅に切り出した試料を 2 種類作成し、一方をコントロール群、もう一方を UVA 活性リボフラビン群とし、各群の試料数は 7 とした。露出させた象牙質表面の縦 2.0 mm、

横 500 μm の範囲を処理面および脱灰面と規定し、最適な条件において UVA 活性リボフラビン処理を施した。処理面以外の面をワックスにて保護し、10 ml の脱灰溶液（50 mM 酢酸、2.2 mM CaCl_2 、2.2 mM KH_2PO_4 、pH5.0）に 37°C 条件下で 3 日間浸漬した。3 日後、脱灰液より試料を取り出し、根面象牙質露出面を脱イオン水にて 30 秒水洗したのち、ワックスを除去した（Yagi et al. 2017）。

脱灰前後における試料のミネラル密度を、マイクロ CT（SMX-1000CT、島津製作所）を用いて解析した。撮影は管電圧 35 kV、管電流 200 μA 、空間分解能 9.0 μm の条件で行い、金属フィルタは 0.1 mm アルミニウム箔を使用した。データは 512 $\times$ 512 ピクセル解像度および 9.0 μm 等方性ボクセルサイズで得られた。ミネラル密度の較正のため、異なる濃度のハイドロキシアパタイトディスク（100、200、300、400 mg/cm^3 ）およびアルミニウム製の円柱（1550 mg/cm^3 ）をもつ標準試料を試料毎に測定した。

解析は、CT 解析ソフトウェア（CT-solver、島津製作所）にて 2 次元画像を再構成した。それぞれの試料の CT 値を汎用画像解析ソフトウェア（Image J、NIH、MD、US）を用いて測定した。得られた CT 値は、標準試料の測定結果より作成した検量線を基準として補正し、ミネラル密度に変換の上、ミネラルプロファイルを作成した。解析部位は、露出面の中央に当たる、試料の上端から 1 mm に位置する部位とし、脱灰面から垂直となる深さ方向へのミネラルプロファイ

ルを作成した。同一試料における脱灰前後のミネラル密度の差の総和をミネラル喪失量 (mg/cm²) と定め、またミネラル密度がプラトーに達した値の 95% に位置する深度を試料の表層とした上で、脱灰前後における表層位置の変化を脱灰深さ (μm) と定めた。得られた値はそれぞれ有意水準 5% にて Student-*t* 検定を行い、統計解析を行った。

2.3 酵素分解抵抗性の評価

根面象牙質ブロックより、低速精密切断機 (ISOMET2000) を使用し 1 mm 角に切り出した象牙質試料を、10% EDTA (pH7.4) にて 7 日間脱灰し、コラーゲンを露出させた。コントロール群および UVA 活性リボフラビン群に分類し、UVA 活性リボフラビン群に最適な条件において処理を施した。その後、異なる酵素における分解抵抗性を確認するため、ブタ胃粘膜由来のペプシン (0.05 mg/ml、Sigma-Aldrich、USA) にて 1 日間、そして *Clostridium histolyticum* 由来のコラゲナーゼ (0.2 unit/ml、Sigma-Aldrich) にて 1 日および 5 日間、いずれも 37°C で浸漬攪拌し、コラーゲンを分解させた。反応後、それぞれの試料に含まれる可溶化したタンパク質成分をアセトン沈殿法にて回収した。

タンパク質の分離、そして総タンパク質量およびコラーゲンの検出を行うために、実験 1.4 と同様の方法を用いて、SDS-PAGE 後、銀染色およびウェスタ

ンブロッキングを行い、分解されたタンパク質量およびコラーゲンの分子量の差異を評価した。

2.4 象牙質微細構造の形態学的評価

2.4.1 脱灰処理後における象牙細管構造の解析

根面象牙質ブロックより、象牙細管の走行方向が長軸と平行となるように切り出した棒状試料を中央で半分に分割し、同一歯から採取したものをそれぞれコントロール群および UVA 活性リボフラビン群とした。UVA 活性リボフラビン群に対して、最適な条件において UVA 活性リボフラビン処理を実施した。その後試料を 10 ml の脱灰溶液（50 mM 酢酸、2.2 mM CaCl_2 、2.2 mM KH_2PO_4 、pH5.0）あるいは 10% EDTA（pH7.4）に 37 °C 条件下で 3 日間浸漬した。3 日後試料を取り出し、脱イオン水にて 30 秒水洗したのち、それぞれの試料についてエタノール上昇系にて脱水後、エポキシレジン（Quetol 812、日新 EM、東京）に浸漬し、樹脂包埋を行った。樹脂硬化後、試料中央部において象牙細管の走行と垂直方向に切断し、プラズママルチコーター（PMC-5000、メイワフォーシス）を用いて断面に白金蒸着を施し、SEM（JSM-310）を用いて、350 倍にて試料の脱灰領域を、3500 倍にて象牙細管の構造変化を観察した。pH5.0 の脱灰溶液を

用いた脱灰においては、汎用画像解析ソフトウェア（Image J）を用いて表層からの脱灰深さ（ μm ）を測定した。試料数は各群について4とした。

2.4.2 コラゲナーゼ処理後における象牙質コラーゲン構造の解析

実験 2.3 において使用した、コラゲナーゼにて1日間および5日間分解を行った象牙質試料をコラゲナーゼ溶液から取り出し、脱イオン水にて30秒水洗したのち、2.5% グルタルアルデヒド（以下 GA）で固定した。それぞれの試料について、エタノール上昇系列にて脱水後、エポキシレジン（Quetol 812）に浸漬し、樹脂包埋を行った。樹脂硬化後、ウルトラミクロトーム（Ultratome V、LKB、Sweden）、ダイヤモンドナイフ（ナノトーム、酒井電子顕微鏡応用研究所、埼玉）を用いて70 nm 厚の超薄切片を作製した。切片はニッケルグリッド（VECO グリッド#100、VECO、Nederland）にマウントし、TBSにて洗浄した。EM ステイナー（日新 EM）にて染色後、透過型電子顕微鏡（H800、日立ハイテクノロジーズ、東京、以下 TEM）で加速電圧 200 kV にて、各試料におけるコラーゲンの微細構造変化を観察した。

3. 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

実験 2.1 および 2.2 と同様の方法を用いて試料を作製し、処理面以外の面をワックスにて保護した。脱灰処理には自動 pH サイクル装置 (Matsuda et al. 2006) を使用し、後述するプログラムに従って室温にて 2 週間脱灰を行った。自動 pH サイクル装置の模式図および pH サイクルパターンを図 3 に示す。

口腔環境における日々の pH 変動を模倣するため、自動 pH サイクル装置には 2 つの pH サイクルパターンを適用し、う蝕リスクの高い患者および低い患者を想定した脱灰処理を実施した (図 3B)。

まず、脱灰サイクル群 (う蝕ハイリスク群) として、試料に脱灰溶液 (0.2 M 乳酸バッファー、3.0 mM CaCl_2 、1.8 mM KH_2PO_4 、pH4.5) を 2 分間注入し、3 分間静置したのち、再石灰化溶液 (0.02 M HEPES、3.0 mM CaCl_2 、1.8 mM KH_2PO_4 、pH6.8) を 60 分間流入するサイクルを 1 日 6 サイクル (6:00、9:00、12:00、15:00、18:00、21:00)、2 週間実施した。pH の変化については、pH5.5 以下の値を示す時間が 30 分間、そして元の pH に戻る時間が脱灰溶液を注入してから 50 分後となるように設定した。

次に、再石灰化サイクル群（う蝕ローリスク群）として、脱灰溶液を2分間注入し、直後に再石灰化溶液を30分間流入するサイクルを1日3サイクル(6:00、12:00、18:00)、2週間実施した。pHの変化については、pH5.5以下の値を示す時間が8分間、元のpHに戻る時間が脱灰溶液を注入してから23分後となるように設定した。

2週間後、脱灰液より試料を取り出し、根面象牙質露出面を脱イオン水にて30秒水洗したのち、ワックスを除去した。脱灰前後の試料を、マイクロCT(SMX-1000CT)を用いて、実験2.2と同様に解析を行った。各サイクル群におけるミネラル喪失量(mg/cm^2)および脱灰深さ(μm)を算出し、得られた値にそれぞれ有意水準5%にてStudent- t 検定を行い、統計解析を行った。試料数は各群7とした。

III. 結果

1. UVA 活性リボフラビン処理の最適な条件の確定および象牙質コラーゲンの架橋形成の評価

図 4 に 3 点曲げ試験の結果を示す。濃度および紫外線照射強度を変化させたものについて、二元配置分散分析および Scheffe's *F* 法による解析の結果、0.1% リボフラビン溶液に 1 分間浸漬後、1600 mW/cm² の紫外線を 10 分間照射することにより、曲げ強さは 295.3 ± 46.6 MPa を示し、コントロール群 (136.6 ± 29.0 MPa) と比べ有意に増加することが示された (図 4A)。靱性においても曲げ強さと同様の結果が得られ (図 4B)、UVA 活性リボフラビン処理によって、歯が脆くならないことが示された。特に 0.1% リボフラビン溶液 1 分間浸漬後、1600 mW/cm² の紫外線を 10 分間照射すると靱性は 2.5 ± 0.6 MPa、また 1% リボフラビン溶液 1 分間浸漬後、1200 mW/cm² の紫外線を 10 分間照射すると 2.6 ± 0.2 MPa を示し、コントロール群 (0.9 ± 0.2 MPa) と比較し有意に増加した。

曲げ強さおよび靱性の双方においてコントロール群と有意差を認めた、0.1% リボフラビン溶液 1 分間浸漬後、1600 mW/cm² の紫外線照射群が象牙質を強化するのに最も優れた条件であることがわかった。続いて、紫外線の照射時間を変

化させると、紫外線照射 10 分間において、コントロール群と比較し有意に曲げ強さが増加した（図 4C、 295.3 ± 46.6 MPa）。弾性係数に関しては、いずれも有意差を認めなかった（図 4D）。以上より、象牙質の機械的強度を増加するのに最も適しているのは、0.1%リボフラビン溶液に 1 分間浸漬後、 1600 mW/cm^2 の紫外線を 10 分間照射することであると確定し、本条件を今後の実験において用いた。

SEM による破断面観察においては、図 5 にコントロール群、紫外線照射群、UVA 活性リボフラビン処理群の代表的な画像を示す。

コントロール群では象牙細管に沿って平坦に歯が破断されているのに対し、紫外線照射群では管周象牙質に凹凸が認められた。UVA 活性リボフラビン群においては、管周象牙質だけでなく、象牙質全体にわたって起伏に富んだ凹凸が認められた。

次に、顕微レーザーラマン分光分析の結果を図 6 に示す。タンパク質の主鎖である炭素結合を示す 815 cm^{-1} を基準として UVA 活性リボフラビン処理前後を比較したところ、プロリンイミド環内での炭素結合を示す 921 、 1037 cm^{-1} 、アミド結合内の C-N、N-H 結合の振動を示し、アミドⅢと呼ばれるタンパク質に特徴的な波形を示す 1248 、 1271 cm^{-1} 、C-C 結合を示す 1343 、 1451 cm^{-1} においてピーク強度の変化を認めた。

また、SDS-PAGE による銀染色およびウェスタンブロッティング（図 7）においては、UVA 活性リボフラビン処理によって、可溶化したタンパク質の総量に大きな変化は認めなかったが、抗コラーゲン抗体を用いたウェスタンブロッティングにより、明らかにバンドが強く発現している部位が異なり、UVA 活性リボフラビン処理によって、より高分子量側に位置していることが分かった。

2. 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

図 8 に、各群における脱灰前後の代表的なマイクロ CT 像、ミネラルプロフィール、そしてミネラルプロフィールより解析したミネラル喪失量および脱灰深さを示す。

pH5.0 の脱灰によるミネラル喪失量は、コントロール群が $7.9 \pm 2.9 \text{ mg/cm}^2$ であるのに対し、UVA 活性リボフラビン群では、 $3.0 \pm 1.0 \text{ mg/cm}^2$ であり、有意に減少することがわかった。また、脱灰深さは、コントロール群が $75.9 \pm 29.3 \text{ }\mu\text{m}$ であるのに対し、UVA 活性リボフラビン群では、 $25.4 \pm 14.6 \text{ }\mu\text{m}$ であり、こちらも有意に減少することが示された ($P < 0.05$)。この結果より、UVA 活性

リボフラビン処理によって、象牙質の脱灰が抑制され、耐酸性が得られることが示された。

次に、図9にペプシンおよびコラゲナーゼによるコラーゲンの分解を、銀染色およびウェスタンブロッティングにて評価したものを示す。図9Aにおけるコントロール群では、ペプシンにより分解されたコラーゲンを含むバンドが認められるのに対し、UVA 活性リボフラビン群では明らかなバンドは発現しなかった。

図9Bに示されるコラゲナーゼ分解においては、UVA 活性リボフラビン群はコントロール群と比べ、1日分解および5日分解のいずれにおいても明らかに溶出するタンパク質の総量が少なく、コラーゲンが分解されにくいことが示された。特に5日間の分解では、コントロール群はスメアーなバンドが低分子量域まで広がっているのに対し、UVA 活性リボフラビン群では100~150 kDaの範囲でバンドが留まっている状態が認められる。また、UVA 活性リボフラビン群では、1日および5日の双方において、矢印で示す部位にコントロール群では認められないバンドが残存していることがわかる。抗コラーゲン抗体を用いたウェスタンブロッティングでは、それぞれの分解日数において、コントロール群はより低分子量の位置まで分解されているのに対し、UVA 活性リボフラビン群はバンドがコントロール群よりも残存していることから、UVA 活性リボフラビン処理は、象牙質コラーゲンの酵素分解抵抗性をも向上することが示された。

このコラゲナーゼ分解を行った試料を、TEM にて観察したものを図 10 に示す。1 日間では、コントロール群および UVA 活性リボフラビン群の間に明らかなコラーゲンの形態の違いは認められないが（図 10A-D）、5 日間まで酵素処理を行うと、コントロール群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においては、象牙細管周囲のコラーゲンは 1 日間と変わらず、ほぼ本来の構造を保っていた（図 10E-H）。

次に、pH5.0 の脱灰溶液および EDTA を用いた SEM による象牙質微細構造の評価について、結果を図 11 に示す。A、B、E、F が弱拡大（350 倍）、C、D、G、H が強拡大（3500 倍）である。弱拡大における脱灰溶液および EDTA のいずれの結果においても、UVA 活性リボフラビン群はコントロール群と比較し、脱灰深さが少ないことがわかった（黒矢印）。脱灰溶液にて脱灰を行った試料に関して、脱灰深さを算出したところ、コントロール群は $74.8 \pm 7.5 \mu\text{m}$ であったのに対し、UVA 活性リボフラビン群は $27.8 \pm 2.8 \mu\text{m}$ となり、有意に脱灰深さが少なかった。

脱灰領域を強拡大において観察すると、コントロール群は象牙細管が大きく露出しているのに対し、UVA 活性リボフラビン群では象牙細管の開口が小さく、EDTA での脱灰においても同様の傾向が認められることから、UVA 活性リボフ

ラビン処理によって、象牙細管周囲のカルシウムの喪失を防ぎ、脱灰を抑制することができることが形態学的にも示された。

以上より、UVA 活性リボフラビン処理を象牙質に施すことにより、象牙細管周囲のコラーゲンの分解を抑制することによって、その周囲の新たなミネラルの喪失をも防ぎ、耐酸性および酵素分解抵抗性が向上することがわかった。

3. 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

自動 pH サイクル装置を用いた耐酸性試験の結果を図 12 に示す。

まず、う蝕リスクの高い患者を想定した脱灰サイクルについて、ミネラル喪失量はコントロール群が $36.7 \pm 5.3 \text{ mg/cm}^2$ であったのに対し、UVA 活性リボフラビン群は $25.1 \pm 6.2 \text{ mg/cm}^2$ となり、有意に減少することがわかった(図 12A)。脱灰深さについてもまた、コントロール群が $225.1 \pm 18.0 \mu\text{m}$ であったのに対し、UVA 活性リボフラビン群は $163.8 \pm 26.9 \mu\text{m}$ となり、同様に有意に少なくなることがわかった(図 12B)。

一方、う蝕リスクの低い患者を想定した再石灰化サイクルでは、脱灰サイクルと比較し、いずれも低い値を示した。ミネラル喪失量はコントロール群が 13.3

$\pm 2.8 \text{ mg/cm}^2$ であったのに対し、UVA 活性リボフラビン群は $5.7 \pm 2.6 \text{ mg/cm}^2$ となり、有意に減少することがわかった（図 12C）。脱灰深さについても、コントロール群が $67.4 \pm 10.8 \text{ }\mu\text{m}$ であったのに対し、UVA 活性リボフラビン群は $31.3 \pm 12.0 \text{ }\mu\text{m}$ となり、同様に有意に少なくなった（図 12D）。

この結果から、口腔内での酸による脱灰を模倣するために、連続的に pH の変動を行った場合においても、UVA 活性リボフラビン処理によって象牙質の耐酸性が向上することが示された。

IV. 考察

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、臨床における次の2つの有用性が示された。まず、象牙質の機械的特性を改善し、歯質そのものを強化することができたということ、次にコラーゲンの新たな架橋形成によって、酸や酵素による分解抵抗性を向上させることができたということである。

コラーゲンマトリックスの構造および安定性が、象牙質の適切な石灰化や機械的強度の安定にとって重要であることはよく知られている (Ganss et al 2004、Hara et al. 2005、Pavan et al. 2011)。そのため、象牙質う蝕の進行過程において、コラーゲンが分解を受けて失われてしまった場合、酸が多孔質である象牙質により浸透しやすくなるためにさらなるミネラルの喪失を引き起こすこととなる。しかし、UVA 活性リボフラビン処理を未脱灰の象牙質に施すことによって、新たな架橋が形成され、コラーゲンが強化されることで、歯質の強化および耐酸性、酵素分解抵抗性が得られたと言える。これは、日常臨床において UVA 活性リボフラビン処理を歯質に施すことにより、象牙質う蝕を予防しうるだけでなく、歯質の強化によって歯の破折に対する抵抗性をも向上させることができる。このような2つの有用性を併せ持つということが、う蝕予防だけに留まらない新たな手法であると考えられる。

近年、プロアントシアニジン、グルタルアルデヒドやカルボジイミドといった様々なコラーゲン架橋材が研究されている (Munksgaard and Asmussen 1984、Mazzoni et al. 2014、Seseogullari-Dirihan et al. 2015、Hass et al. 2016)。グルタルアルデヒドは、人工的な架橋材であり、コラーゲンの分解を抑制し、コラーゲン線維内のリジンおよびヒドロキシリジン残基から架橋形成が生じることが報告されている (Cheung et al. 1985、1990、Bedran-Russo et al. 2008)。また、カルボジイミドは、塩酸塩で使用する化学物質であり、その架橋メカニズムとして、グルタミン酸やアスパラギン酸のカルボン酸基の活性化によって中間体を形成し、リジンやヒドロキシリジンのアミノ基と反応して架橋を形成すると言われている (Staros et al. 1986、Huang et al. 1990、Petite et al. 1995、Olde et al. 1996、Bedran-Russo et al. 2010)。しかし、いずれも人工的に生成されたものであるため、生体親和性に問題があり、加えて強い毒性を有していることから、口腔内での使用は困難であると考えられる (Han et al. 2003、Bedran-Russo et al. 2010、2014)。一方、リボフラビンやプロアントシアニジンは天然に存在する物質で、特にリボフラビンはビタミン B2 として体内で存在し、様々な食品にも用いられていることから、生体親和性に極めて優れており、為害性は少ないと考えられる。また、プロアントシアニジンとは、ブドウ種子から抽出されたポリフェノールからなる物質であり、象牙質に適用することによって、本

実験と同様にコラーゲンの架橋を形成し (Fine 2000) 、コラーゲンの分解を抑制し (Khaddam et al. 2014) 、象牙質の脱灰を抑制すると報告されている (Pavan et al. 2011、Hass et al. 2016) 。しかし、象牙質に褐色の着色を引き起こすことが報告されており、それを改善するための適切な処理時間や架橋材の適用方法は未だ疑問視されており、臨床を想定した場合の応用は現状困難であると考えられる (Green et al. 2010、Tjäderhane et al. 2013、Bedran-Russo et al. 2014、Liu et al. 2014、Fawzy et al. 2017) 。それに比べ、UVA 活性リボフラビン処理においては、リボフラビン溶液は黄色を呈しており、比較的象牙質の色に近いこと、そして 0.1%リボフラビン溶液を適用した場合は、その後の紫外線照射によってリボフラビン溶液の黄色はほとんど失われることから、臨床の現場においても受け入れられやすく、象牙質への UVA 活性リボフラビン処理の応用は有用であると考えられる。

UVA 活性リボフラビン処理を象牙質に適用するのに最適な条件は、3 点曲げ試験の結果から、0.1%リボフラビン溶液に 1 分間浸漬後、1600 mW/cm² の紫外線を 10 分間照射することと確定した。本実験において、リボフラビン溶液を 0.1%および 1%の 2 種類のみを用いたのは、これまでの報告において使用されている溶液の濃度が 1%で接着強さが有意に増加する効果が認められることに加え (Cova et al. 2011、Fawzy et al. 2012) 、1%を超える濃度を用いた場合、リ

リボフラビン溶液が沈殿し、その後の紫外線照射の過程において、沈殿したリボフラビン粉末が歯質表層への紫外線の到達を阻害すると考えられるため (Kim and Chu 2009) 、0.1%および1%の溶液を用いるのが望ましいと考えた。

800 および 1200 mW/cm² の紫外線照射を行った群では、リボフラビン溶液の濃度が上昇すると曲げ強さも増加したのに対し、1%リボフラビン溶液浸漬後、1600 mW/cm² の紫外線照射を行った群において、0.1%リボフラビン溶液に浸漬した群よりも曲げ強さが減少していたことに関して (図 4A) 、光増感剤の性質として、一般的に濃度が上昇すると光増感剤自身の分子相互作用により、蛍光作用が減弱する濃度消光と呼ばれる作用によるものであると考えられる。また、紫外線照射時間を延長した場合においても曲げ強さが減少した点について、紫外線の過剰な照射によって、試料表面の劣化が生じているのではないかと考えられる。以上より、溶液の各濃度や紫外線の強度や照射時間といった様々な変数から最適な条件を決定することが重要であると思われる。

曲げ試験にて破断された試料の破断面について、それぞれ代表的な SEM 画像を図 5 に示している。UVA 活性リボフラビン群では、コントロール群と比較し、象牙質全体において起伏に富んだ凹凸像を示していることから、歯を破断するのにより多くのエネルギーを必要とすることが示唆される。

顕微レーザーラマン分光分析においては、UVA 活性リボフラビン処理前後における試料の同一箇所での測定を行うことにより、ピーク強度の変化を分子構造の変化として捉えることができた。それによって、プロリンイミド環内の炭素結合、アミドIIIにおける C-N, N-H 結合、タンパク質主鎖である炭素結合の振動の変化を確認した。本結果およびこれまでの報告に基づいて、図 13 に示すメカニズムにより新たな架橋結合が生じているのではないかと推察される (McCall et al. 2010、Fawzy et al. 2012)。リボフラビンに UVA を照射することにより、活性酸素の一種である一重項酸素が放出され、それに伴うラジカル反応によりプロリンやヒスチジンなどのアミノ酸残基が励起状態になる。この不安定で高エネルギーな構造を経て、再度安定した分子構造に戻る際に結合が変化し、アミノ酸側鎖どうしが共有結合することによって、新たな分子内および分子間での架橋が生じ、コラーゲンのネットワークが強化されていくものであると考えられる (Tanzer 1973、Fraser et al. 1979、McCall et al. 2010、Fawzy et al. 2012)。

この新たな架橋結合は、抗コラーゲン抗体におけるウェスタンブロッティングの結果から、UVA 活性リボフラビン群がコントロール群と比べて、より高分子量側にバンドが位置していることより、分子内および分子間の結合が強化されたと考えられることから、同様に示唆される。

以上より、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、図 13 に示すメカニズムのもと誘導された新たな架橋結合が生じ、象牙質の機械的強度が有意に増加する、最適な条件を決定することができた。

次に、実験 2 におけるマイクロ CT での耐酸性の評価法について、従来から脱灰および再石灰化の挙動といった歯病態を評価する方法として、Transverse Microradiography (TMR)が多く用いられてきた (Arends and ten Bosch 1992、Tomiyama et al. 2008、Lippert and Lynch 2014、Cochrane et al. 2014)。しかし、TMR は測定に細密な薄切切片の作製が必要であり、測定中は乾燥による収縮や変形が起こりやすいため、経時的な測定を行うには高度な技法と時間を要する (Van et al. 1995、Damen et al. 1997、Thomas et al. 2006、Hamba et al. 2012)。

そこで、本実験においては、脱灰前後に試料の同一箇所を計測する必要があるため、試料を薄切する必要がなく、10 μm 以下の高解像度で分析することが可能なマイクロ CT による手法を採用することとした (Miyajima et al. 2016、Yagi et al. 2017)。このマイクロ CT による解析および脱灰された象牙質の微細構造の SEM 観察では、同一の脱灰条件において、各群におけるマイクロ CT 解析での脱灰深さと SEM 観察による脱灰深さの結果は極めて類似しており、いずれの定量分析方法も妥当であると考えられる。ミネラル喪失量については、本実験での

解析部位は、500 $\mu\text{m} \times 2 \text{ mm}$ に設定した脱灰面の中央部分における最も脱灰が進んでいると考えられる $9 \times 9 \mu\text{m}$ と定めており、同部位の試料断面を面分析することにより算出を行った。

SEM による象牙質の微細構造の解析より、UVA 活性リボフラビン処理を適用することで、脱灰深さとともに、象牙細管の開口している大きさが異なっていたことから、ミネラルの喪失を抑制することができたことが形態学的にも示された。同様に、コラゲナーゼによるコラーゲンの分解を行った TEM 像において、5 日間コラゲナーゼ処理を行った群ではコントロール群は象牙細管周囲のコラーゲン網が顕著に破壊されているのに対し、UVA 活性リボフラビン群では元の細管構造を保ったままであった。

また酵素分解抵抗性を評価するにあたり、2 種類の異なる酵素を使用し、SDS-PAGE を実施後、銀染色およびウェスタンブロッティングを行った。本実験において使用したペプシンは、芳香族アミノ酸を有するペプチド結合を切断し、コラゲナーゼにおいては、コラーゲンにおけるグリシン-プロリンの特定のアミノ酸配列を認識する酵素である。いずれの結果においても、UVA 活性リボフラビン群では明らかに溶解したタンパク質の総量が少なく、抗コラーゲン抗体におけるウェスタンブロッティングでは、コントロール群の方がよりコラーゲンが分解されていることがわかった。これは、先述の架橋形成のメカニズム(図 13)

において、コラーゲン鎖内のアミノ酸残基同士が新たな結合を作ると考えられていることも踏まえ、コントロール群ではコラゲナーゼが認識した酵素反応部位が、UVA 活性リボフラビン処理による架橋形成に伴い結合の変化を起し、反応しなくなったことを示唆している。

これらの結果から、UVA 活性リボフラビン処理を適用すると、象牙細管周囲のコラーゲンが新たな架橋結合を起こすことによって構造が変化し、酵素反応部位が認識されなくなる。さらに、コラーゲン網がより緻密になって強化されることにより、象牙細管内に浸透してきた酸による歯質の脱灰が抑制され、う蝕病変の進行における最初のステップである無機質の流出を防ぐことができたと考えられる。

日常生活において、糖分の摂取により、口腔内の pH が急速に下降し、その後徐々に元の pH まで戻ってくるという変動を繰り返すことはよく知られている (Stephan 1940)。実験 2 における、耐酸性の評価をマイクロ CT にて解析を行ったものについて、脱灰溶液に持続的に試料を浸漬させる方法では、そのような口腔内の pH が変化する状況とは異なる環境での脱灰試験であった。そのため、臨床応用を想定した場合、より口腔内の環境に近づけた試験が必要であると考え、Matsuda らが開発した口腔内での pH 変動を模倣した自動 pH サイクル装置に着目した (Matsuda et al. 2006)。実験 3 では、この自動 pH サイクル装置

を用いて、pH サイクルのパターンを 2 種類準備し、う蝕リスクの違いを想定した耐酸性試験を実施した（図 3）。まず、う蝕リスクが高い患者を想定したサイクルを脱灰サイクルと定義した。これは、1 日 6 回の pH 変化、つまり 1 日 3 回の食事に加え、間食を頻繁に行う場合を考慮している。次に、う蝕リスクが低い患者を想定したサイクルを再石灰化サイクルと定義した。これは、1 日 3 回の pH 変化、つまり間食を行わない場合を考慮しており、また pH の回復が脱灰サイクルよりも早くなるよう、唾液の緩衝能が高いものを想定し、調整を行っている。このようなプログラムの違いによって、う蝕リスクの違いを評価することとした。結果は、脱灰サイクル、再石灰化サイクルのいずれにおいても、ミネラル喪失量および脱灰深さともにコントロール群と比べて UVA 活性リボフラビン群は有意に少なくなることがわかった。そして、脱灰サイクルよりも再石灰化サイクルの方が脱灰量は少ない傾向にあり、特に脱灰サイクルの場合、試料の表層はう窩の形成を認める像を呈した一方、再石灰化サイクルの場合、表層下脱灰を起こしていると思わせる脱灰像を認めたことから、臨床において口腔内でしばしば観察されるう蝕リスクの違いが、う窩の形態の違いとして表すことができ、自動 pH サイクル装置のプログラムの変動によって、個々の患者に応じた口腔を効果的に模倣することができると考えられる。

臨床応用という点においては、露出した根面からまずプラークを除去し、近接する歯肉を保護したのちに、リボフラビンを含むジェルあるいはペーストを根面に塗布し、その後照射範囲を根面に限局するように設定した紫外線照射器を用いて UVA 照射を行うことによって、口腔内において適切に UVA 活性リボフラビン処理を施すことができるのではないかと現在のところ想定している。

V. 結論

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、象牙質の機械的性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、根面象牙質の脱灰を抑制するのに有効であった。以上より、UVA 活性リボフラビン処理は、象牙質う蝕の予防・進行抑制に有効な、新たな方法であると考えられる。

VI. 謝辞

稿を終えるにあたり、本研究を行う機会を与えていただき、御指導と御校閲を賜りました大阪大学大学院歯学研究科口腔分子感染制御学講座（歯科保存学教室）林 美加子教授に、謹んで感謝の意を表します。

また、本研究の遂行にあたり多大な御指導、御鞭撻を賜りました大阪大学大学院歯学研究科口腔総合診療部 三浦治郎博士、大阪大学大学院工学研究科マテリアル生産科学専攻材料機能化プロセス工学講座 中野貴由教授ならびに石本卓也博士、北海道医療大学大学院口腔機能修復・再建学系う蝕制御治療学講座 松田康弘博士に心より感謝申し上げます。

最後に、本研究を行うに際し、多大なる御協力と御助言を頂いた大阪大学大学院歯学研究科口腔分子感染制御学講座（歯科保存学教室）ならびに口腔総合診療部の皆様に、心よりお礼申し上げます。

VII. 参考文献

Arends J, ten Bosch JJ. 1992. Demineralization and remineralization evaluation techniques. *J Dent Res.* 71(Spec Iss):924-928.

Ashwin PT, McDonnell PJ. 2010. Collagen cross-linkage: a comprehensive review and directions for future research. *Br J Ophthalmol.* 94(8):965-970.

Bedran-Russo AK, Pashley DH, Agee K, Drummond JL, Miescke KJ. 2008. Changes in stiffness of demineralized dentine following application of collagen crosslinkers. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 86(2):330-334.

Bedran-Russo AK, Vidal CM, Dos Santos PH, Castellan CS. 2010. Long-term effect of carbodiimide on dentin matrix and resin–dentin bonds. *J Biomed Mater Res Part B Appl Biomater.* 94(1):250-255.

Bedran-Russo AK, Pauli GF, Chen SN, McAlpine J, Castellan CS, Phansalkar RS, Aguiar TR, Vidal CM, Napolitano JG, Nam JW, et al. 2014. Dentin biomodification: strategies, renewable resources and clinical applications. *Dent Mater.* 30(1):62-76.

Bignozzi I, Crea A, Capri D, Littarru C, Lajolo C, Tatakis DN. 2014. Root caries: a periodontal perspective. *J Periodont Res.* 49(2):143-163.

Chaussain-Miller C, Fioretti F, Goldberg M, Menashi S. 2006. The role of matrix metalloproteinases (MMPs) in human caries. *J Dent Res.* 85(1):22-32.

Cheung DT, Perelman N, Ko EC, Nimni ME. 1985. Mechanism of crosslinking of proteins by glutaraldehyde III. Reaction with collagen in tissues. *Connect Tissue Res.* 13(2):109-115.

Cheung DT, Tong D, Perelman N, Ertl D, Nimni ME. 1990. Mechanism of crosslinking of proteins by glutaraldehyde. IV. In vitro and in vivo stability of a crosslinked collagen matrix. *Connect Tissue Res.* 25(1):27-34.

Chiang YS, Chen YL, Chuang SF, Wu CM, Wei PJ, Han CF, Lin JC, Chang HT. 2013. Riboflavin-ultraviolet-A-induced collagen cross-linking treatments in improving dentin bonding. *Dent Mater.* 29(6):682-692.

Cochrane NJ, Iijima Y, Shen P, Yuan Y, Walker GD, Reynolds C, MacRae CM, Wilson NC, Adams GG, Reynolds EC. 2014. Comparative study of the measurement of enamel demineralization and remineralization using transverse microradiography and electron probe microanalysis. *Microsc Microanal.* 20(3):937-945.

Cova A, Breschi L, Nato F, Ruggeri A Jr, Carrilho M, Tjäderhane L, Prati C, Di Lenarda R, Tay FR, Pashley DH, Mazzoni A. 2011. Effect of UVA-activated riboflavin on dentin bonding. *J Dent Res.* 90(12):1439-1445.

Damen JJ, Exterkate RA, ten Cate JM. 1997. Reproducibility of TMR for the determination of longitudinal mineral changes in dental hard tissues. *Adv Dent Res.* 11(4):415-419.

Donovan T. 2008. Critical appraisal: Protocol for the prevention and management of root caries. *J Esthet Restor Dent.* 20(6):405-411.

Embery G, Hall R, Waddington R, Septier D, Goldberg M. 2001. Proteoglycans in dentinogenesis. *Crit Rev Oral Biol Med.* 12(4):331-349.

Fawzy A, Nitisusanta L, Iqbal K, Daood U, Beng LT, Neo J. 2012. Characterization of riboflavin-modified dentin collagen matrix. *J Dent Res.* 91(11):1049-1054.

Fawzy A, Priyadarshini BM, Selvan ST, Lu TB, Neo J. 2017. Proanthocyanidins-loaded nanoparticles enhance dentin degradation resistance. *J Dent Res.* 96(7):780-789.

Featherstone JD. 1999. Prevention and reversal of dental caries: role of low level fluoride. *Community Dent Oral Epidemiol.* 27(1):31-40.

Fejerskov O, Kidd EAM. 2008. *Dental Caries*. 2nd edition. Oxford: Blackwell publishing. Chapter 3, Pathology of dental caries, Root-surface caries; p. 44-47.

Fine AM. 2000. Oligomeric proanthocyanidin complexes: history, structure, and phytopharmaceutical applications. *Altern Med Rev.* 5(2):144-151.

Foote CS. 1968. Mechanisms of photosensitized oxidation. There are several different types of photosensitized oxidation which may be important in biological systems. *Science.* 162(3857):963-970.

Fraser RD, MacRae TP, Suzuki E. 1979. Chain conformation in the collagen molecule. *J Mol Biol.* 129(3):463-481.

Ganss C, Klimek J, Starck C. 2004. Quantitative analysis of the impact of the organic matrix on the fluoride effect in erosion progression in human dentine using longitudinal microradiography. *Arch Oral Biol.* 49(11):931-935.

Green B, Yao X, Ganguly A, Xu C, Dusevich V, Walker MP, Wang Y. 2010. Grape seed proanthocyanidins increase collagen biodegradation resistance in the dentin/adhesive interface when included in an adhesive. *J Dent.* 38(11):908-915.

Griffin SO, Griffin PM, Swann JL, Zlobin N. 2004. Estimating rates of new root caries in older adults. *J Dent Res.* 83(8):634-638.

Hamba H, Nikaido T, Sadr A, Nakashima S, Tagami J. 2012. Enamel lesion parameter correlations between polychromatic micro-CT and TMR. *J Dent Res*. 91(6):586-591.

Han B, Jaurequi J, Tang BW, Nimni ME. 2003. Proanthocyanidin: a natural crosslinking reagent for stabilizing collagen matrices. *J Biomed Mater Res Part A*. 65(1):118-124.

Hara AT, Ando M, Cury JA, Serra MC, Gonzalez-Cabezas C, Zero DT. 2005. Influence of the organic matrix on root dentine erosion by citric acid. *Caries Res*. 39(2):134-138.

Hass V, Luque-Martinez IV, Gutierrez MF, Moreira CG, Gotti VB, Feitosa VP, Koller G, Otuki MF, Loguercio AD, Reis A. 2016. Collagen cross-linkers on dentin bonding: Stability of the adhesive, cytotoxicity and in situ MMP inhibition. *Dent Mater*. 32(6):732-741.

Hayashi M, Okamura K, Koychev EV, Furuya Y, Sugeta A, Ota T, Ebisu S. 2010. Effects of rehydration on dentin strengthened by heating or UV irradiation. *J Dent Res*. 89(2):154-158.

Huang YP, Kimura M, Tawada K. 1990. Covalent crosslinking of myosin subfragment-1 and heavy meromyosin to actin at various molar ratios: different correlations between ATPase activity and crosslinking extent. *J Muscle Res Cell Motil*. 11(4):313-322.

Islam MS, Hiraishi N, Nassar M, Sono R, Otsuki M, Takatsura T, Yiu C, Tagami J. 2012. In vitro effect of hesperidin on root dentin collagen and de/re-mineralization. *Dent Mater J*. 31(3):362–367.

Khaddam M, Salmon B, Le Denmat D, Tjaderhane L, Menashi S, Chaussain C, Rochefort GY, Boukpepsi T. 2014. Grape seed extracts inhibit dentin matrix degradation by MMP-3. *Front Physiol*. 5:425.

Kim SH, Chu CC. 2009. Fabrication of a biodegradable polysaccharide hydrogel with riboflavin, vitamin B2, as a photo-initiator and L-arginine as coinitiator upon UV irradiation. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 91(1):390-400.

Laemmli UK. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 227(5259):680-685.

Linde A. 1989. Dentine matrix proteins: composition and possible functions in calcification. *Anat Rec.* 224(2):154-166.

Lippert F, Lynch RJ. 2014. Comparison of Knoop and Vickers surface microhardness and transverse microradiography for the study of early caries lesion formation in human and bovine enamel. *Arch Oral Biol.* 59(7):704-710.

Liu Y, Dusevich V, Wang Y. 2014. Addition of grape seed extract renders phosphoric acid a collagen-stabilizing etchant. *J Dent Res.* 93(8):821-827.

Liu X, Zhou J, Chen L, Yang Y, Tan J. 2015. UVA-activated riboflavin improves the strength of human dentin. *J Oral Sci.* 57(3):229-234.

Matsuda Y, Komatsu H, Murata Y, Tanaka T, Sano H. 2006. A newly designed automatic pH-cycling system to simulate daily pH fluctuations. *Dent Mater J.* 25(2):280-285.

Matsuda Y, Miura J, Shimizu M, Aoki T, Kubo M, Fukushima S, Hashimoto M, Takeshige F, Araki T. 2016. Influence of nonenzymatic glycation in dentinal collagen on dental caries. *J Dent Res.* 95(13):1528-1534.

Mazzoni A, Apolonio FM, Saboia VP, Santi S, Angeloni V, Checchi V, Curci R, Di Lenarda R, Tay FR, Pashley DH, Breschi L. 2014. Carbodiimide inactivation of MMPs and effect on dentin bonding. *J Dent Res.* 93(3):263-268.

McCall AS, Kraft S, Edelhauser HF, Kidder GW, Lundquist RR, Bradshaw HE, Dedeic Z, Dionne MJ, Clement EM, Conrad GW. 2010. Mechanisms of corneal tissue cross-linking in response to treatment with topical riboflavin and long-wavelength ultraviolet radiation (UVA). *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 51(1):129-138.

Michaelis W, Schiffner U. 2006. The Fourth German Oral Health Study (DMS IV). Köln: Institute of German Dentists, Deutscher Zahnärzte Verlag.

Miyajima H, Ishimoto T, Ma S, Chen J, Nakano T, Imazato S. 2016. In vitro assessment of a calcium-fluoroaluminosilicate glass-based desensitizer for the prevention of root surface demineralization. *Dent Mater J.* 35(3):399-407.

Munksgaard EC, Asmussen E. 1984. Bond strength between dentin and restorative resins mediated by mixtures of HEMA and glutaraldehyde. *J Dent Res.* 63(8):1087-1089.

Nakornchai S, Atsawasuwan P, Kitamura E, Surarit R, Yamauchi M. 2004. Partial biochemical characterisation of collagen in carious dentine of human primary teeth. *Arch Oral Biol.* 49(4):267-273.

Olde Damink LH, Dijkstra PJ, van Luyn MJ, van Wachem PB, Nieuwenhuis P, Feijen J. 1996. Cross-linking of dermal sheep collagen using a water-soluble carbodiimide. *Biomaterials.* 17(8):765-773.

Pavan S, Xie Q, Hara A, Bedran-Russo A. 2011. Biomimetic approach for root caries prevention using a proanthocyanidins-rich agent. *Caries Res.* 45(5):443-447.

Peters MC. 2010. Strategies for noninvasive demineralized tissue repair. *Dent Clin North Am.* 54(3):507-525.

Petite H, Duval JL, Frei V, Abdul-Malak N, Sigot-Luizard MF, Herbage D. 1995. Cytocompatibility of calf pericardium treated by glutaraldehyde and by the acyl azide methods in an organotypic culture model. *Biomaterials*. 16(13):1003-1008.

Saunders RH Jr, Meyerowitz C. 2005. Dental caries in older adults. *Dent Clin North Am*. 49(2): 293-308.

Septier D, Hall RC, Embery G, Goldberg M. 2001. Immunoelectron microscopic visualization of pro- and secreted forms of decorin and biglycan in the predentine and during dentine formation in the rat incisor. *Calcif Tissue Int*. 69(1):38-45.

Seseogullari-Dirihan R, Tjaderhane L, Pashley DH, Tezvergil-Mutluay A. 2015. Effect of ultraviolet-A-induced crosslinking on dentin collagen matrix. *Dent Mater*. 31(10):1225-1231.

Shinno Y, Ishimoto T, Saito M, Uemura R, Arino M, Marumo K, Nakano T, Hayashi M. 2016. Comprehensive analyses of how tubule occlusion and advanced glycation end-products diminish strength of aged dentin. *Sci Rep*. 6:19849.

Snibson GR. 2010. Collagen cross-linking: a new treatment paradigm in corneal disease – a review. *Clin Experiment Ophthalmol* 38(2):141-153.

Spoerl E, Mrochen M, Sliney D, Trokel S, Seiler T. 2007. Safety of UVA-riboflavin cross-linking of the cornea. *Cornea*. 26(4):385-389.

Staros JV, Wright RW, Swingle DM. 1986. Enhancement by N-hydroxysulfosuccinimide of water-soluble carbodiimide-mediated coupling reactions. *Anal Biochem*. 156(1):220-222.

Stephan RM. 1940. Changes in hydrogen-ion concentration on tooth surfaces and in carious lesions. *J Am Dent Assoc*. 27(5):718-723.

Tanzer ML. 1973. Cross-Linking of collagen. *Science*. 180(4086):561-566.

ten Cate JM. 2013. Contemporary perspective on the use of fluoride products in caries prevention. *Br Dent J*. 214(4):161-167.

ten Cate JM, Damen JJM, Buijs MJ. 1998. Inhibition of dentin demineralization by fluoride in vitro. *Caries Res*. 32(2):141-147.

Thomas RZ, Ruben JL, de Vries J, ten Bosch JJ, Huysmans MC. 2006. Transversal wavelength-independent microradiography, a method for monitoring caries lesions over time, validated with transversal microradiography. *Caries Res*. 40(4):281-291.

Tjäderhane L, Nascimento FD, Breschi L, Mazzoni A, Tersariol IL, Geraldeli S, Tezvergil-Mutluay A, Carrilho M, Carvalho RM, Tay FR, et al. 2013. Strategies to prevent hydrolytic degradation of the hybrid layer—a review. *Dent Mater*. 29(10):999-1011.

Tomiyama K, Mukai Y, Teranaka T. 2008. Acid resistance induced by a new orthodontic bonding system *in vitro*. *Dent Mater J*. 27(4):590-597.

Van Strijp AJ, Buijs MJ, ten Cate JM. 1995. Contact microradiography of dentine under wet conditions to prevent lesion shrinkage. *Caries Res*. 29(2):107-110.

Vanuspong W, Eisenburger M, Addy M. 2002. Cervical tooth wear and sensitivity: erosion, softening and rehardening of dentine; effects of pH, time and ultrasonication. *J Clin Periodontol*. 29(4):351-357.

Wierichs RJ, Meyer-Lueckel H. 2015. Systematic review on noninvasive treatment of root caries lesions. *J Dent Res*. 94(2):261-271.

Wollensak G, Spoerl E, Seiler T. 2003. Riboflavin/Ultraviolet-A-induced collagen crosslinking for the treatment of keratoconus. *Am J Ophthalmol.* 135(5):620-627.

Yagi K, Yamamoto H, Uemura R, Matsuda Y, Okuyama K, Ishimoto T, Nakano T, Hayashi M. 2017. Use of PIXE/PIGE for sequential Ca and F measurements in root carious model. *Sci Rep.* 7(1):13450.

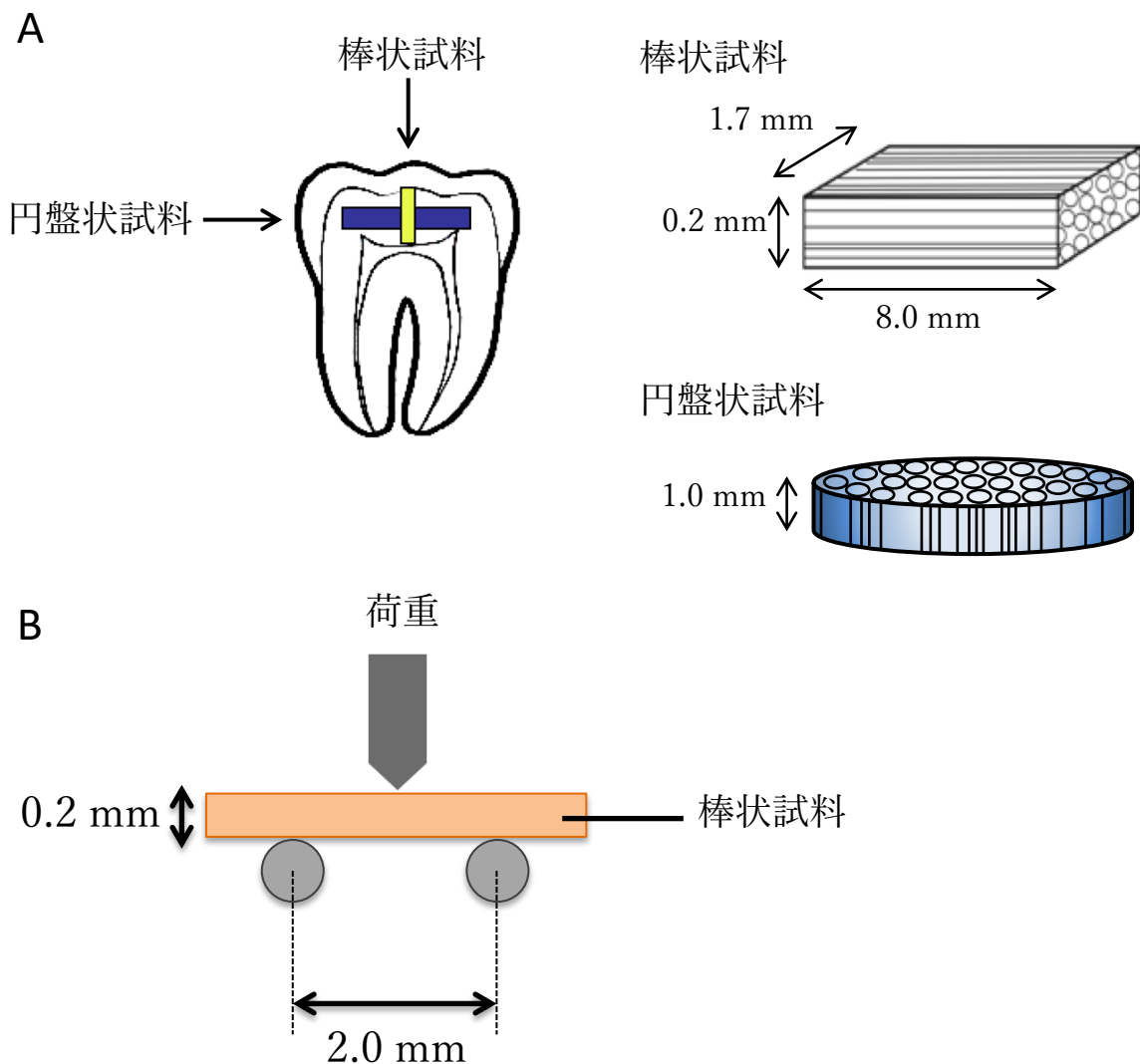


図1. 棒状および円盤状試料の調整と3点曲げ試験の仕様

- A: 棒状試料では、象牙細管の走行が試料の長軸と平行になるように規定した。
また円盤状試料は測定面に対して垂直に走行するよう規定した。
- B: 3点曲げ試験では、支点間距離を2.0 mmとし、上から荷重をかけて曲げ強さを測定した。

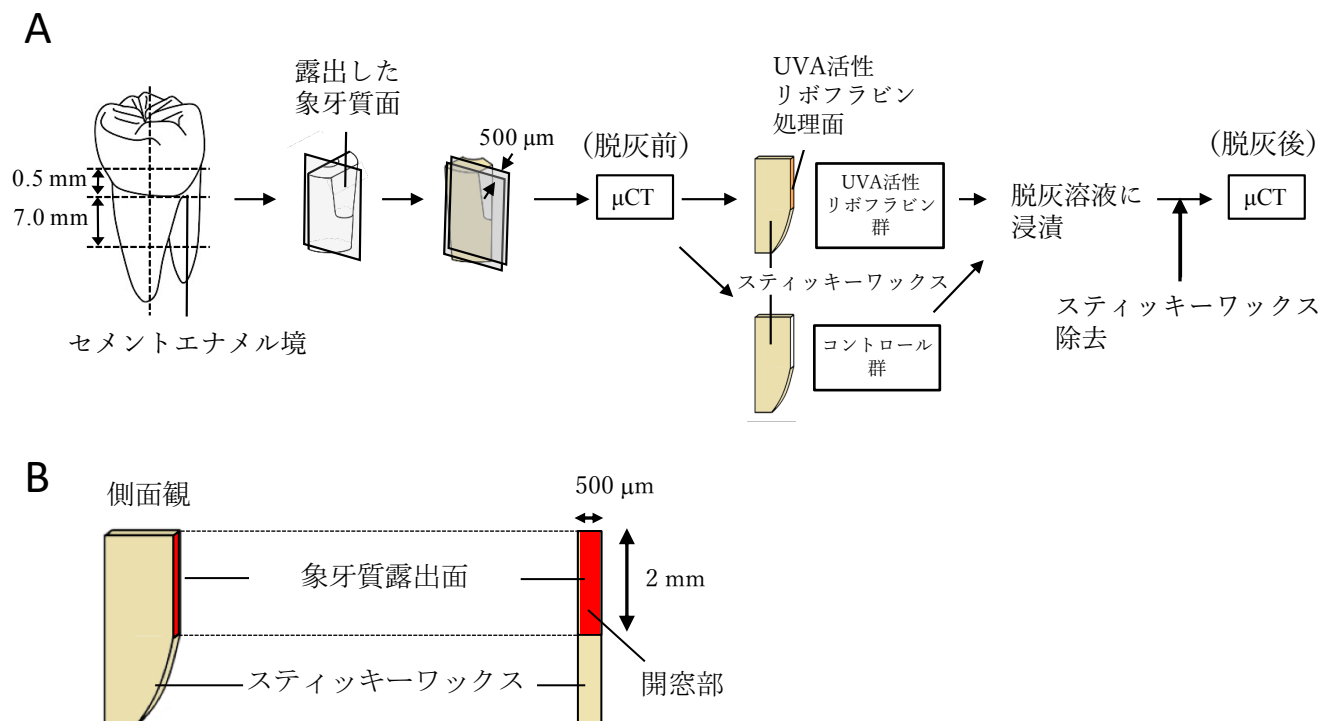


図2. 耐酸性試験における根面象牙質試料の作製方法

A: 根面象牙質試料の作製方法および実験手順の模式図。

脱灰溶液の組成：50 mM 酢酸バッファー、2.2 mM CaCl_2 、2.2 mM KH_2PO_4 、pH5.0

B: 試料拡大図。象牙質露出面（赤色部）にUVA活性リボフラビン処理を施した。その他の面はスティッキーワックスにて被覆し、脱灰溶液に触れないようにした。

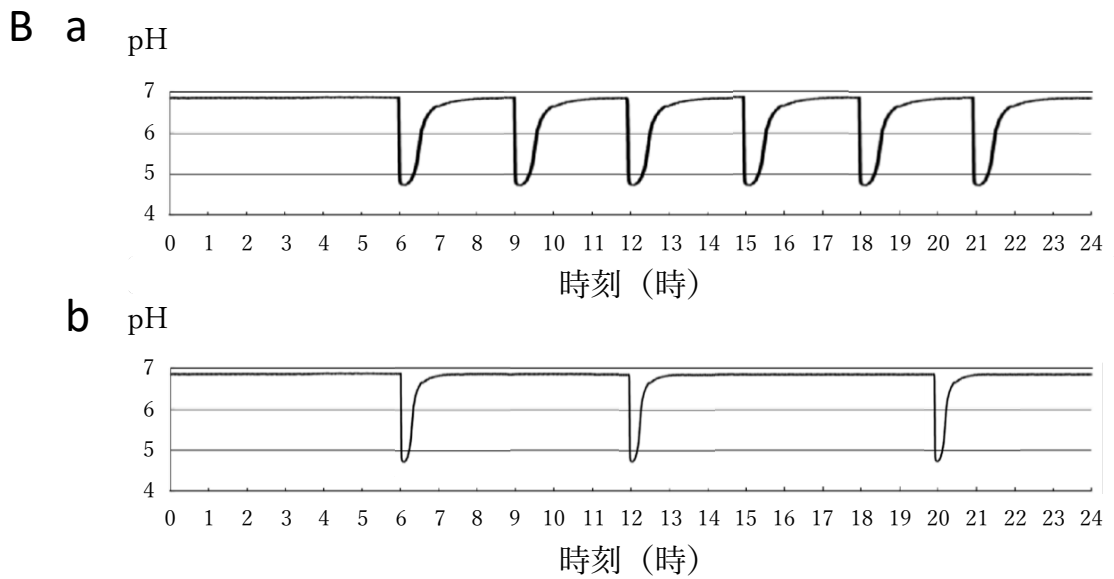
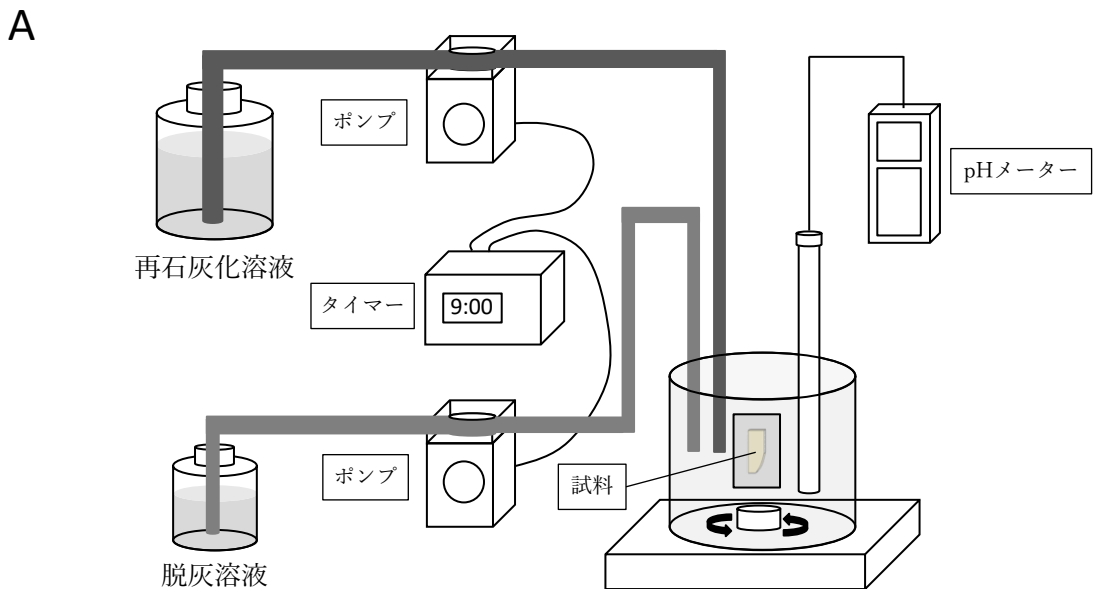


図3. 自動pHサイクル装置の模式図および脱灰プログラム

A: 自動pHサイクル装置の模式図

B-a: 脱灰サイクルの1日におけるpH変化

B-b: 再石灰化サイクルの1日におけるpH変化

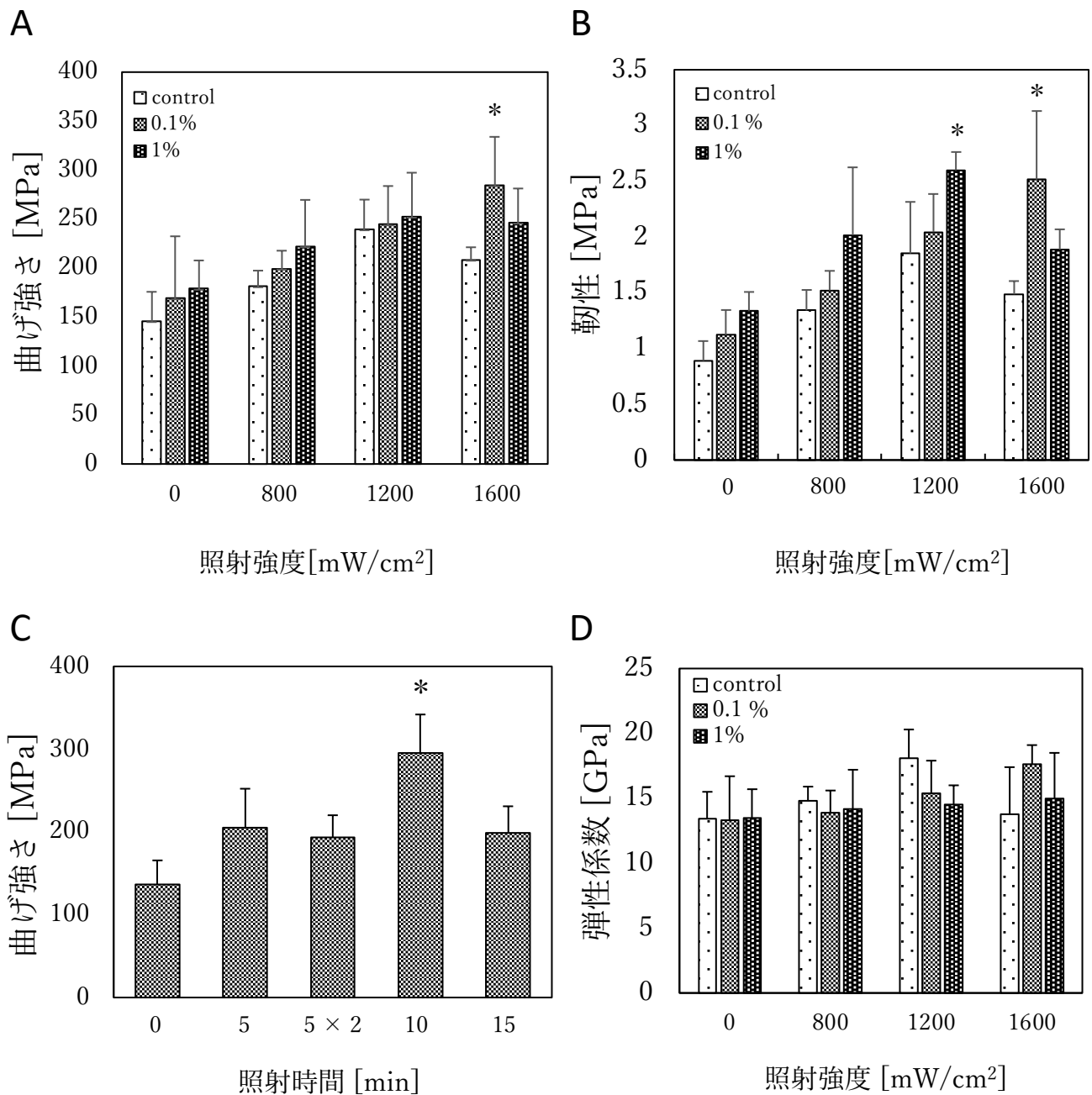


図4. UVA活性リボフラビン処理による象牙質の機械的強度の変化

A: 曲げ強さの結果。紫外線照射時間を10分とした。

B: 靱性の結果。紫外線照射時間を10分とした。

C: 曲げ強さの結果。0.1%リボフラビン溶液に1分間浸漬したのち、1600 mW/cm²の紫外線の照射時間を変化させた。

D: 弾性係数の結果。紫外線照射時間を10分とした。

A、B、D: Two-way ANOVAおよびScheffe's F法にて統計解析を行った (P<0.05)。

C: One-way ANOVAおよびTukey法にて統計解析を行った (P<0.05)。

*: コントロール群 (リボフラビン浸漬なし、紫外線照射なし群) との間に有意差を認めることを示す。

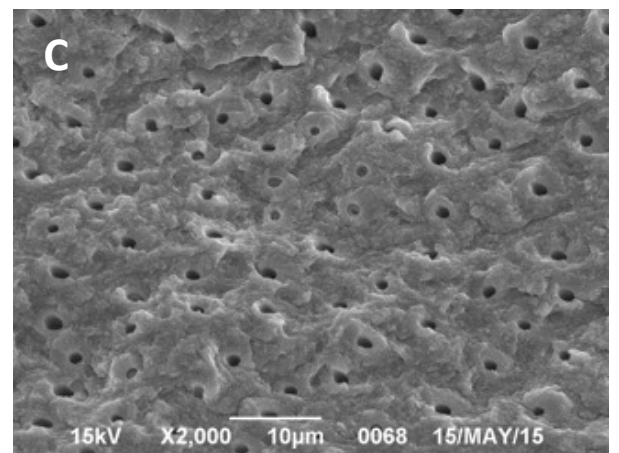
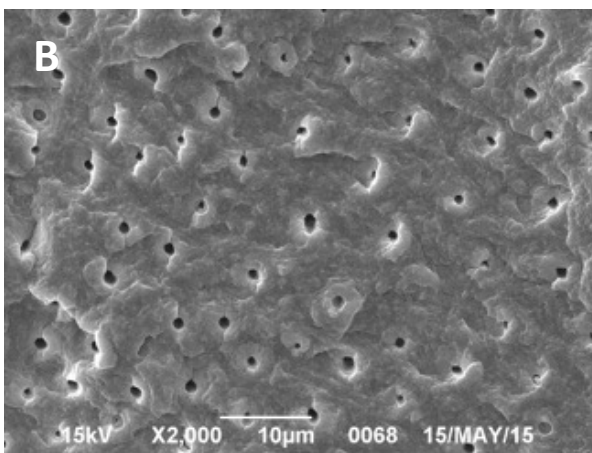
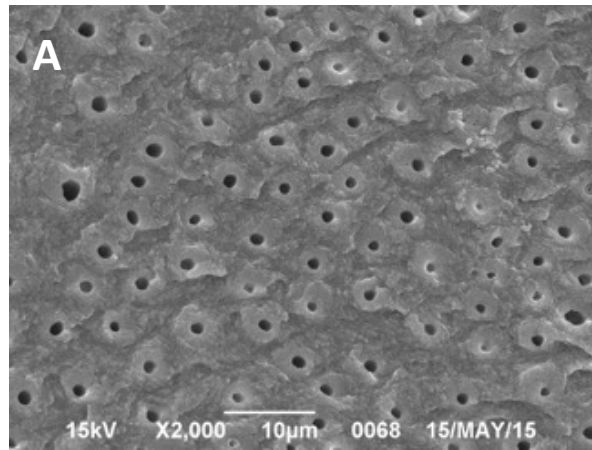


図5. 曲げ試験後の破面観察

- A: コントロール群。象牙細管に沿って平坦に歯が破断された。
- B: 1600 mW/cm² 紫外線10分照射群。象牙細管周囲の管周象牙質に多数の凹凸を認めた。
- C: 0.1%リボフラビン溶液 1 分間浸漬後、1600 mW/cm² 紫外線10分照射群。管周象牙質だけでなく、象牙質全体に起伏に富む凹凸が生じた。

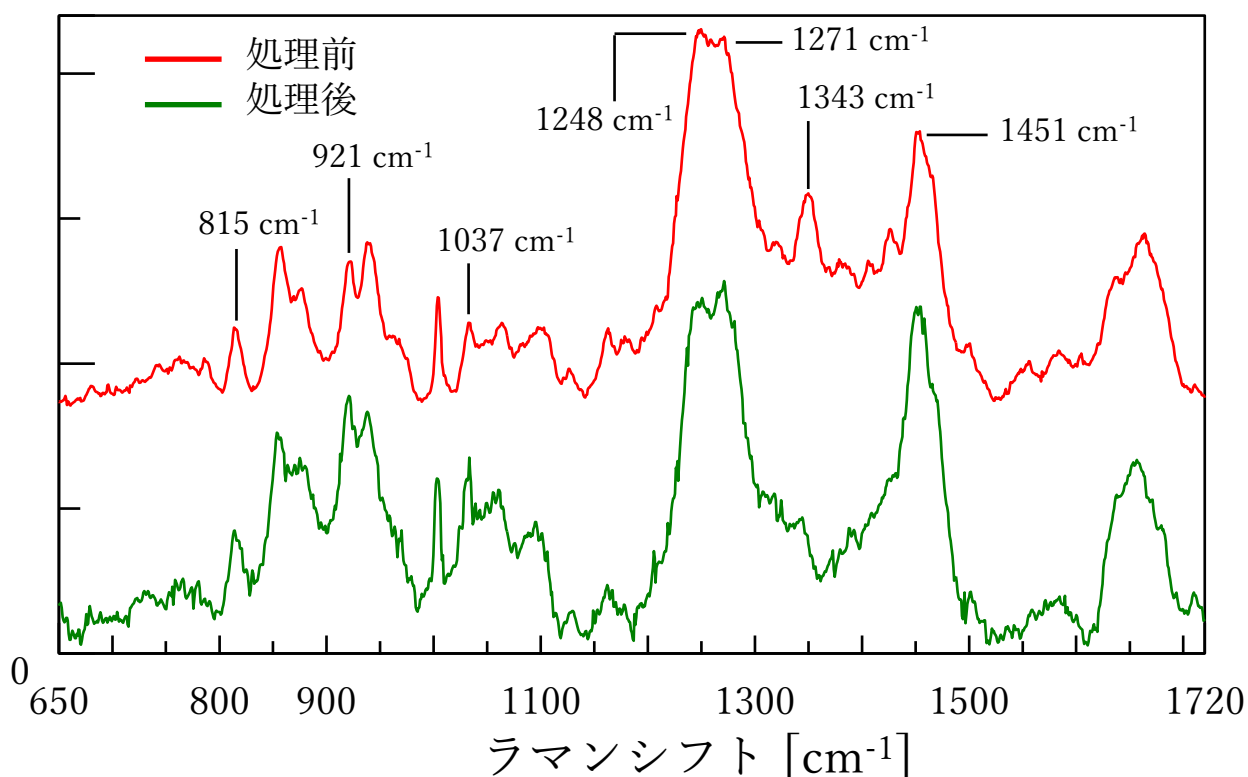


図6. 顕微レーザーラマン分光分析による象牙質の分子構造変化の観察

UVA活性リボフラビン処理後、プロリンのイミド環炭素に相当する921 cm^{-1} および1037 cm^{-1} のピークの上昇のほか、アミド結合内のC-NおよびN-H結合を表す1248 cm^{-1} および1271 cm^{-1} の変化を認めた。

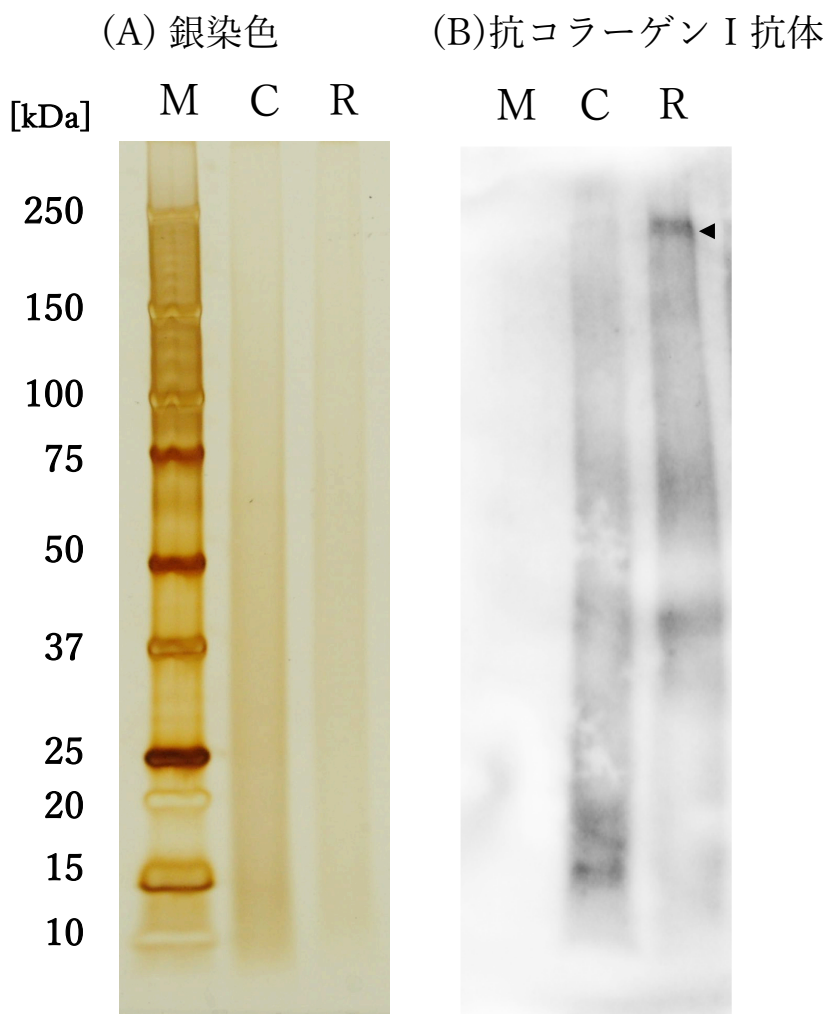


図7. 銀染色およびウェスタンブロッティングによる象牙質コラーゲンの架橋形成効果の観察

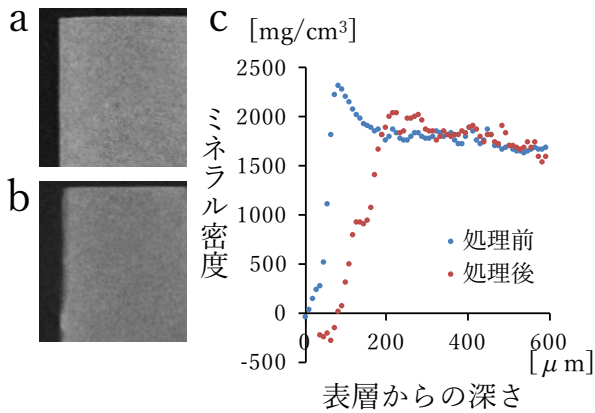
A: 銀染色によるタンパク質の総量の評価。

コントロール群 (C) およびUVA活性リボフラビン群 (R) において、溶出したタンパク質の総量に大きな変化は認められない。M: マーカー

B: 抗コラーゲン I 抗体を用いたウェスタンブロッティング。

コントロール群 (C) では、より低分子量においてバンドが強く発現しているのに対し、UVA活性リボフラビン群 (R) では、コントロール群よりも高分子量において強くバンドが発現している。

A コントロール群



B UVA活性リボフラビン群

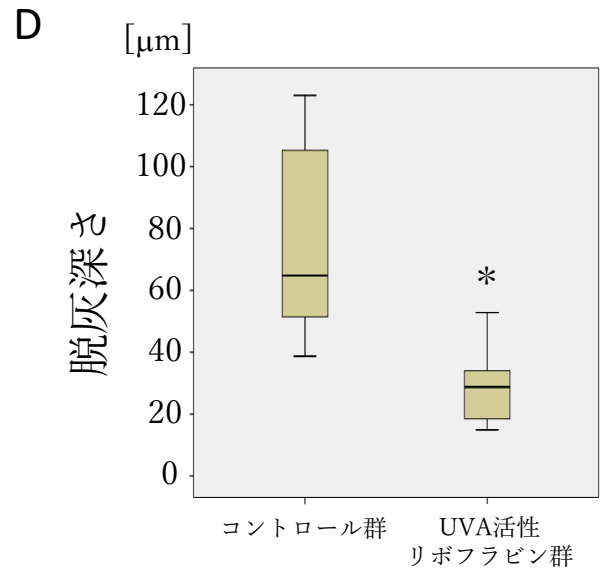
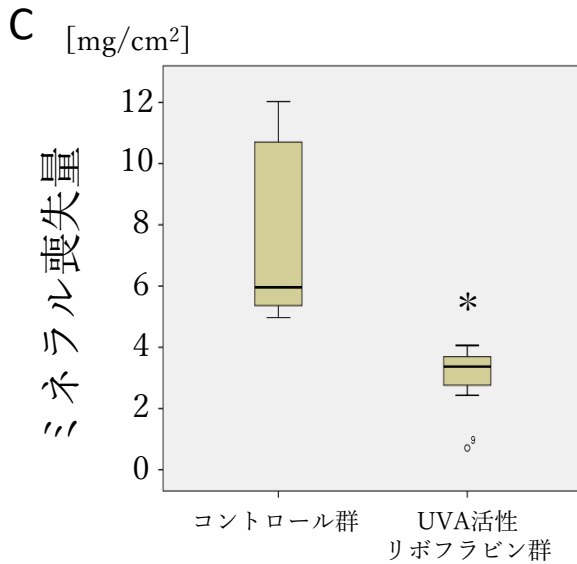
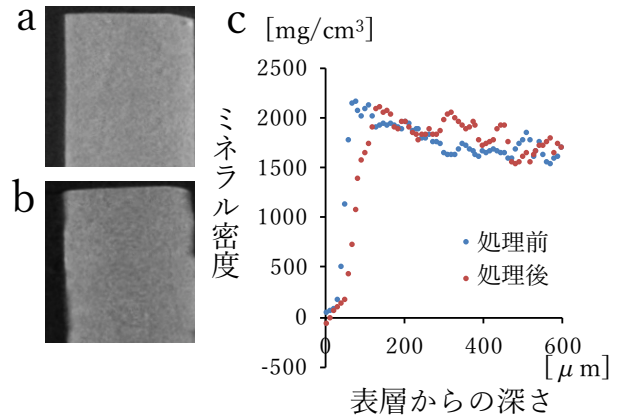


図8. マイクロCT解析による耐酸性の評価

A、B: コントロール群およびUVA活性リボフラビン群における代表的なマイクロCT像。

a: 脱灰前、b: 脱灰後、c: ミネラルプロファイル

C: ミネラル喪失量、D: 脱灰深さ。いずれもUVA活性リボフラビン処理により、有意に減少した。統計解析はStudent-*t*検定にて行った。

*: コントロール群との有意差を認める。(P<0.05)

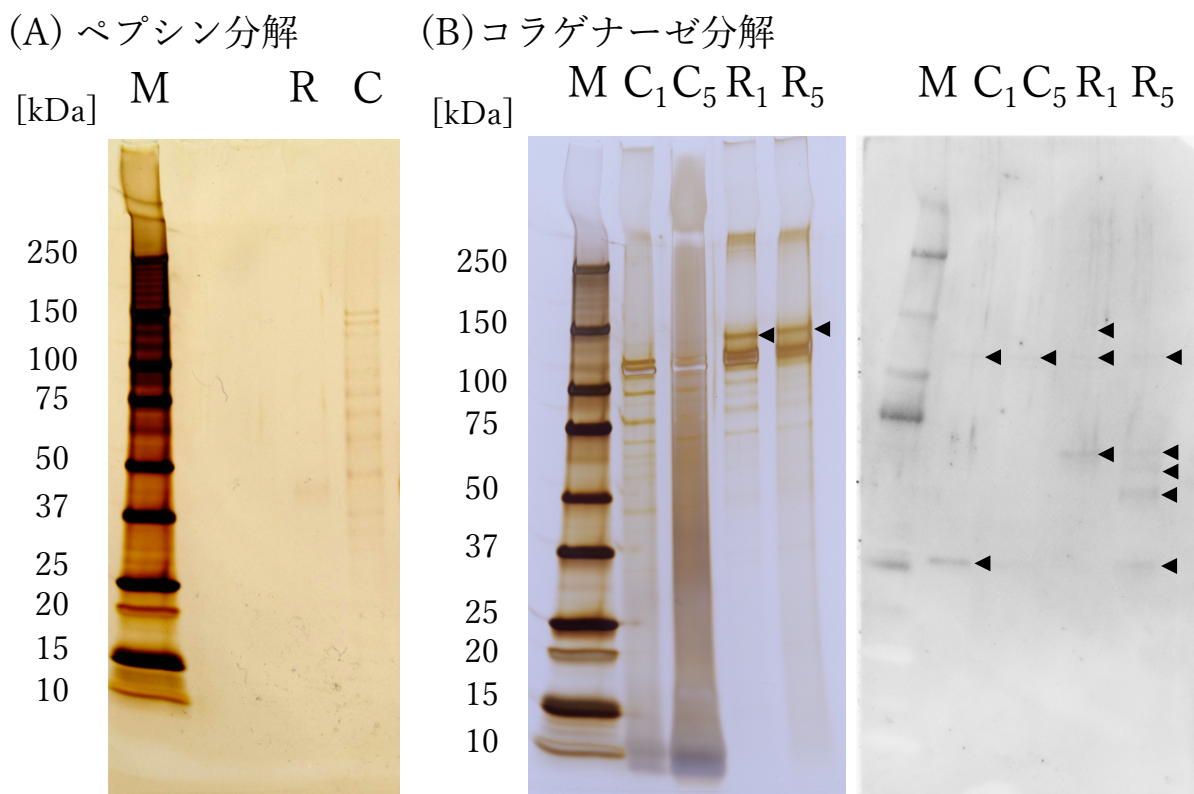


図9. 銀染色およびウェスタンブロッティングにおける酵素分解抵抗性の評価

A: ペプシンにてコラーゲンを分解。

M: マーカー、R: UVA活性リボフラビン群、C: コントロール群を示す。

コントロール群ではバンドが認められるように、可溶化したタンパク質が検出されているのに対し、UVA活性リボフラビン群では、同一分解時間においても明らかなバンドが検出されなかった。

B: コラゲナーゼにてコラーゲンを分解。

左：銀染色像、右：抗コラーゲン I 抗体によるウェスタンブロッティングを示す。

M: マーカー、C: コントロール群、R: UVA活性リボフラビン群、下付きの数字は分解日数を示す。

銀染色において、コントロール群は各日数において、UVA活性リボフラビン群よりも可溶化したタンパク質が多く認められ、低分子量まで分解されているのに対し、UVA活性リボフラビン群では、より可溶化したタンパク質量が少なく、コントロール群では認められないバンドが発現していた（矢頭）。

ウェスタンブロッティングにおいて、矢頭にて示す箇所にバンドを認めた。コントロール群では、各分解日数において、UVA活性リボフラビン群よりも分解が進んでいた。

コントロール群

UVA活性リボフラビン群

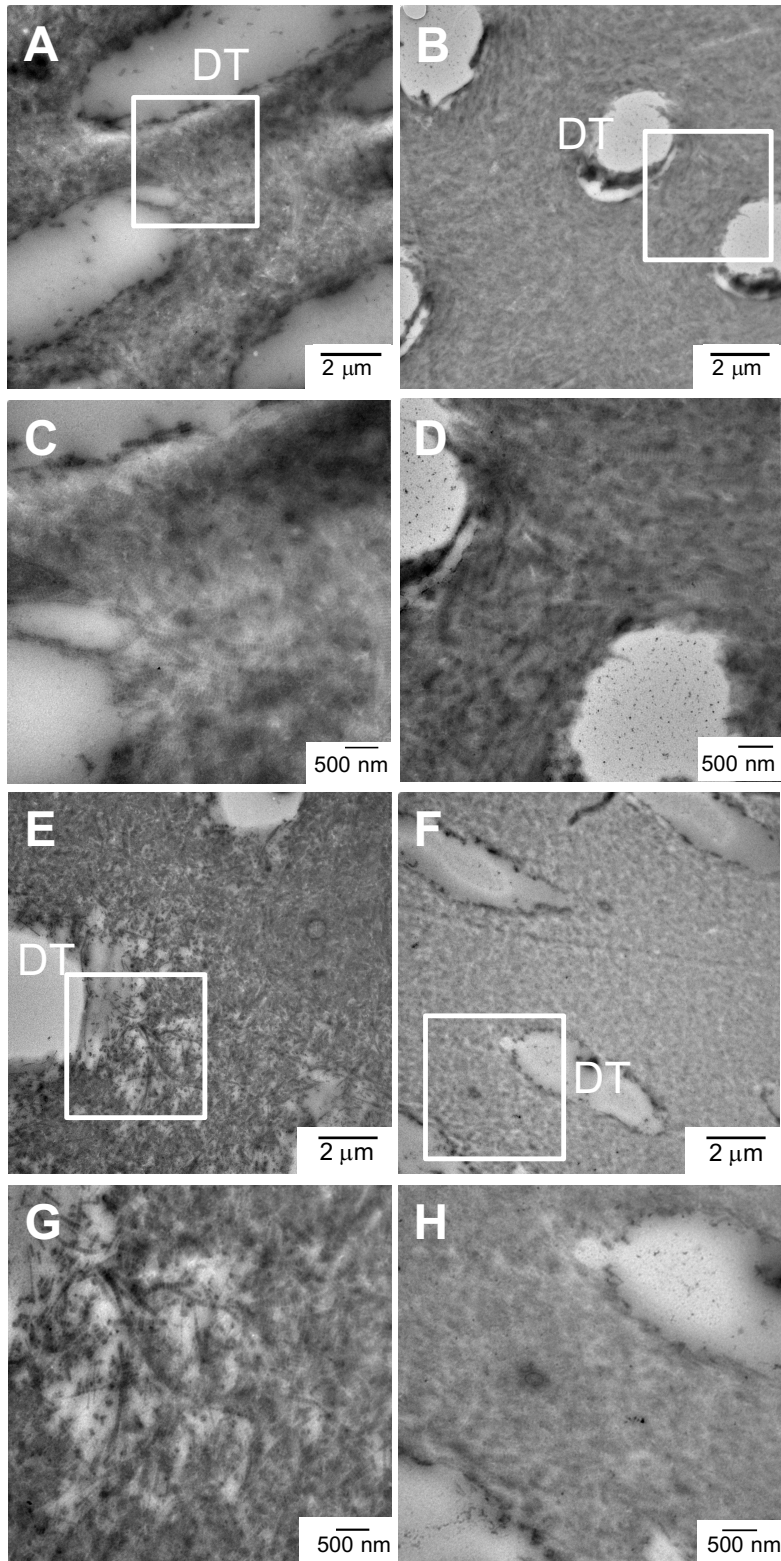


図10. TEMによるコラゲナーゼ分解後の象牙質コラーゲン微細構造の観察

A～D: コラゲナーゼ処理1日間

E～H: コラゲナーゼ処理5日間

A、C、E、G: コントロール群、B、D、F、H: UVA活性リボフラビン群

C、D、G、HはそれぞれA、B、E、Fにおける四角部分の拡大像を示す。

1日間の分解では各群において著明な相違は認められなかったのに対し、5日間の分解では、コントロール群は細管周囲のコラーゲンが分解されている一方、UVA活性リボフラビン群では、本来のコラーゲンの構造を保っていた。

DT: 象牙細管

コントロール群

UVA活性リボフラビン群

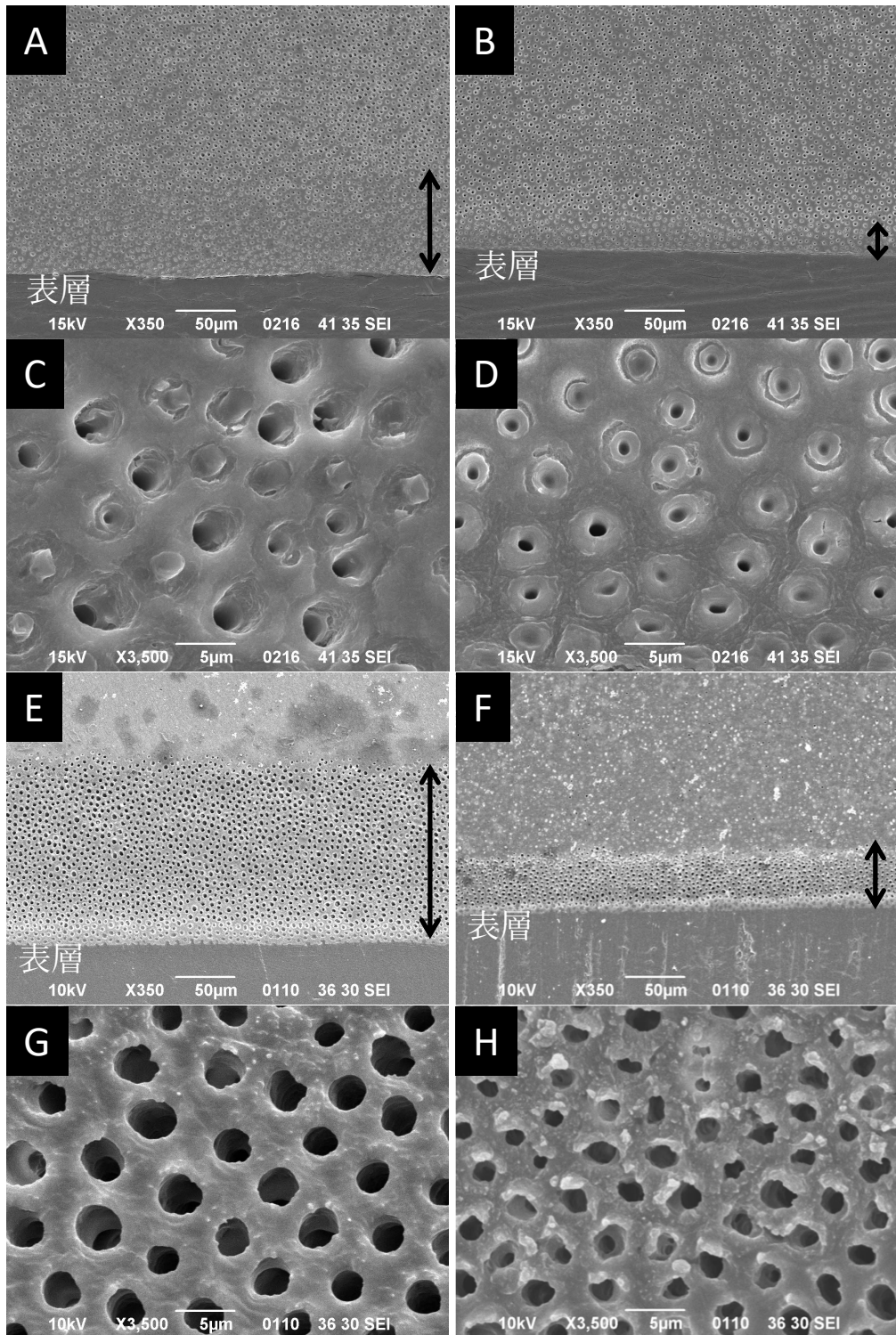


図11. 脱灰試験後のSEMによる象牙質微細構造の観察

A～D: pH5.0の脱灰溶液による脱灰試験後の試料

E～H: 10% EDTAによる脱灰試験後の試料

A、C、E、G: コントロール群、B、D、F、H: UVA活性リボフラビン群

A、C、E、Fにおける矢印は脱灰領域を示す。

脱灰溶液、EDTAのいずれにおいても、UVA活性リボフラビン群は脱灰深さが顕著に少なく、また象牙細管の開口も少なかった。

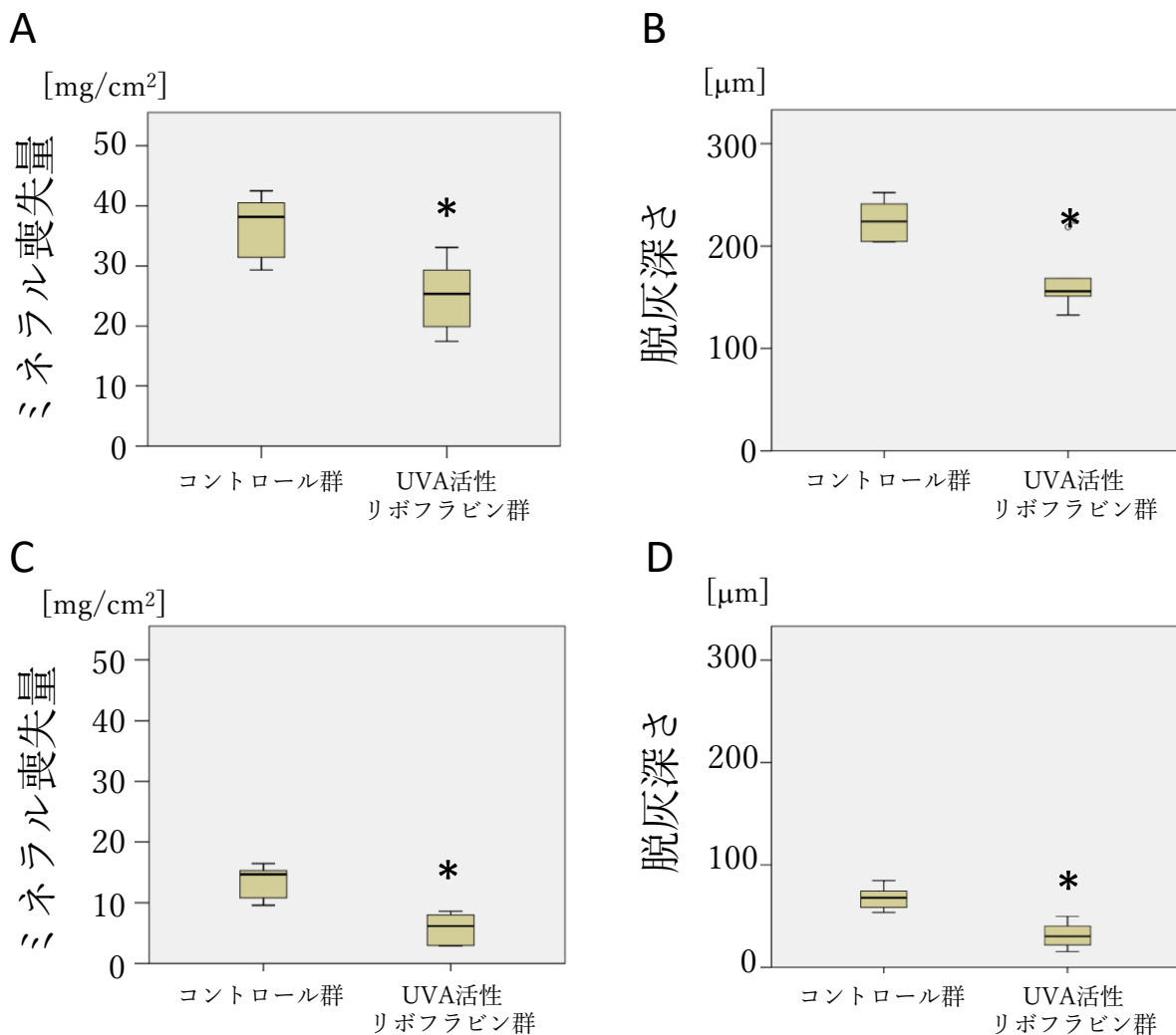


図12: 異なるpHサイクルにおけるミネラル喪失量および脱灰深さ

A、B: 脱灰サイクル C、D: 再石灰化サイクル

いずれのサイクルにおいても、ミネラル喪失量および脱灰深さともに、UVA活性リボフラビン群はコントロール群と比べて有意に減少することがわかった。

再石灰化サイクルは、脱灰サイクルに比べ、全体的な数値は減少傾向を示した。

統計解析はStudent-*t*検定にて行った。

*: コントロール群との有意差を認める。(P<0.05)

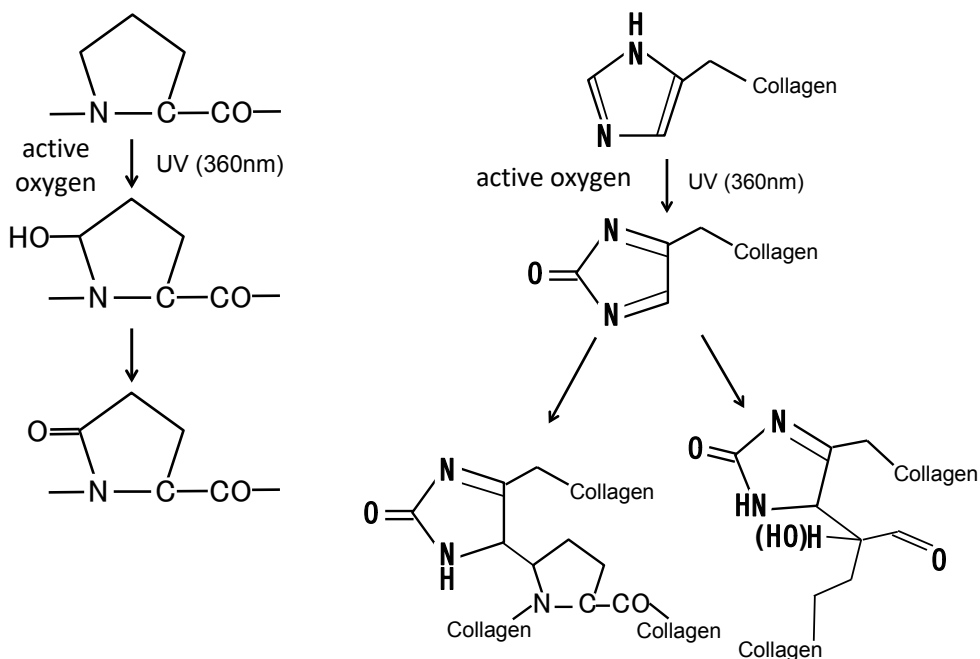


図13. UVA活性リボフラビン処理による架橋形成のメカニズムの考察

リボフラビンを適用後、紫外線を照射することにより、活性酸素が生じ、分子が励起される。励起された不安定な化学構造を経て、コラーゲン分子内に含まれるプロリン、ヒドロキシプロリンおよびヒスチジンから分子内および分子間架橋が生じると考えられる。