

[22055]

量子技術を応用した感染象牙質の非古典的結晶化分析

In-Air microbeam analysis of Nonclassical crystallization of caries effected dentin.

松田康裕^{#,1)}, 奥山克史²⁾, 山本洋子³⁾, 櫻井雅彦¹⁾, 内藤克昭³⁾, 神田さやか³⁾, 林美加子³⁾, 齋藤隆史¹⁾
Yasuhiro Matsuda^{#,1)}, Katsushi Okuyama²⁾, Hiroko Yamamoto³⁾, Masahiko Sakurai¹⁾,
Katsuaki Naito³⁾, Sayaka Kanda³⁾, Mikako Hayashi³⁾, Takashi Saito¹⁾

¹⁾Division of Clinical Cariology and Endodontology, School of Dentistry, Health Sciences University of Hokkaido

²⁾Department of Dental Materials Science, Asahi University School of Dentistry

³⁾Department of Restorative Dentistry and Endodontology, Osaka University Graduate School of Dentistry

Abstract

Zinc and copper having antibacterial properties, it has been reported to suppress the activity of (MMP) matrix metalloproteinase and possibly protect the nucleus from remineralization. Zinc and copper are commonly compounded and used in the dental field. Therefore, we investigated the demineralization inhibitory effect of Zinc and copper. The root surfaces of bovine teeth were exposed by polishing, demineralized, and immersed in 2% zinc sulfate and 2% copper sulfate. After 24 hours, it was sliced and polished to prepare a dentin sample. These were performed before and after two weeks of loading with an automatic pH cycle system. The obtained samples were subjected to In-air micro PIXE/PIGE measurements to determine the distribution of calcium, Zinc, and copper. It revealed Zinc, copper, and magnesium uptake in the surface layer before pH cycling. In addition, both the amount of calcium loss and the depth of demineralization was significantly lower in the dentin group to which zinc sulfate and copper sulfate were applied than in the control group. From these results, it was thought that zinc sulfate and copper sulfate acted as divalent cations when absorbed into the tooth and worked to suppress demineralization and calcium loss.

Keyword: Nonclassical crystallization, collagen, Zinc, Copper

1. 緒言

歯のエナメル質、象牙質は発生時に規則性のある硬組織を形成する。特に象牙質はコラーゲンとハイドロキシアパタイト (HAP) の有機無機複合体である。生体内で硬組織が作られる場合は結晶を核として石灰化だけでなく、コラーゲンなどの高分子を核とした Nonclassical crystallization (NCC、非古典的結晶化) により規則性を持った硬組織の成長を示す。無基質である HAP と有機質のコラーゲンであるからなる象牙質を主病巣とした根面う蝕では口腔内細菌から生じる酸やたんぱく分解酵素により、象牙質の HAP の脱灰とそれによって露出したコラーゲンの分解により進行する。しかしながら、pH 緩衝作用をもつ唾液によって歯質表面の pH は中性となる。したがって Ca、P や歯磨剤などに含まれる F とともに様々な微量元素が中性時に象牙質に取り込まれ再石灰化が生じる。象牙質の再石灰化では結晶を核とした古典的経路だけでなく、コラーゲン線維を核とした非古典的経路による石灰化も生じる [1]。したがって、象牙質う蝕の予防のためにはハイドロキシアパタイトの脱灰抑制だけでなく、コラーゲン線維の保護も重要である。歯科材料に様々な微量元素が応用されており、Zn には再石灰化の核を保護する可能性や [2]、抗菌性と Matrix metalloproteinase (MMP) の活性抑制効果報告されており [3]、in situ で脱灰抑制効果が報告されている。Cu や Ag もその抗菌性からグラスアイオノマーセメントやリン酸亜鉛セメントに含まれている材料もある。

そこで、本研究では脱灰させた象牙質にコラーゲンの保護作用が報告されている亜鉛、銅を作用させた

後の再石灰化能の検討をおこなった。

2. 材料と方法

ウシ抜去下顎乳前歯 (n=3) を低速回転切断機 (IsoMet、Buehler;ダイヤモンドブレード使用) を用いて歯軸に平行に 4 分割し、歯冠部側面を手動研磨機 (EcoMet3、Buehler) と耐水研磨紙 (#400~1200) で研磨して新鮮象牙質を露出させた。得られた試料は歯軸方向に (IsoMet、Buehler;ダイヤモンドブレード使用) を用いて 300 μm の厚さに切り出し、露出させた象牙質面以外のすべての面をスティッキーワックスで被覆して、Single-section 試料を作製した。その後、脱灰液に 48 時間浸漬して脱灰し、初期根面う蝕モデル試料とした。材料群として 2% 硫酸亜鉛溶液 (ZnSO₄ 群)、2% 硫酸銅溶液 (CuSO₄) を調整した。材料群は脱イオン水で洗浄後、脱灰象牙質試料を材料群 (ZnSO₄、CuSO₄ 群) に浸漬し 37°C で 24 時間保存し脱イオン蒸留水で洗浄した。その後、露出象牙質の歯根側半分の領域をスティッキーワックスで被覆し、コントロール (Control 群) とした。

2-3. 自動 pH サイクル装置

自動 pH サイクル装置は 10ml 容量のストロール棒瓶 (アズワン) に接続された内径 3.0 mm のファームドチューブ (AY242817、タイゴン) をそれぞれ脱灰溶液、再石灰化溶液につないだ。タイマー (ラボクロック、アズワン) を用いてファームドチューブを接続したマイクロチューブポンプ (MP-3N、東理化学器械) の On/Off の制御を行い、ストロール棒瓶内にそれぞれの溶液を環流させ、容器内の pH サイク

[22055]

ルを自動的に作製した。以下に pH サイクル負荷試験の概要を示す。まず流量を 1000ml/hour に設定したポンプで脱灰溶液を 2 分間還流させた。3 分間放置した後、再石灰化溶液を 100ml/hour の流量に設定したポンプで 60 分間還流させた。各サイクルにおける pH が 5.5 以下である時間(脱灰時間)を平均 18 分、初期の pH に戻るまでの時間(回復時間)を平均 52 分とした。サイクル数は 1 日 6 回 (6, 9, 12, 15, 18, 21 時)、各サイクルの間隔は 120 分とし、この期間及び装置を稼働させていない間は、再石灰化溶液に浸漬した。サイクル期間は 2 週間とした。Single-section 試料はサンプルパック(栄研化学)内に挿入した状態で、スチロール棒瓶(アズワン)に留置し、pH サイクル負荷試験を行った。

2-4. In-air Micro PIXE/PIGE 法による象牙質内の元素分析

pH サイクル負荷試験後、取り出した試料表面のワックスはキシレンを用いて除去した(n=3)。また再石灰化検討のために得られた試料を国立研究開発法人 量子科学技術研究開発機構 量子ビーム科学研究部門 高崎量子応用研究所 (TIARA QST)にて、In-air micro PIXE/PIGE 解析法により計測を行った。本研究では PIXE 法による測定範囲を 250×500 μm と設定した。このマッピングと、標準試料を測定して得られた検量線をもとに各元素の濃度を算出した。表層の測定では、PIXE マップ上で垂直方向に plot を行った。Plot data と検量線より算出した Ca 量のデータをもとに、最表層部を健全象牙質の 5% の Ca 含有量を示す部位と定義した。試料の露出象牙質表層における亜鉛の取り込み量を断面方向から入射したビームカウントによって計算し、pH サイクル前後の表層から健全象牙質までのカルシウム量の変化(ミネラル喪失量)、健全象牙質までの深さ(ミネラル喪失深度)を比較して脱灰抑制効果の検討を行った。

3. 結果

In-air micro PIXE/PIGE 法による 2 価イオンとカルシウムの分析で、コントロール群では Zn、Cu、F などの微量元素は検出されなかった(図 1)。各材料群における元素の取り込みでは pH サイクル前に ZnSO₄ 群では表層から深さ 30 μm 付近に Zn のピーク(図 2)を、CuSO₄ 群では表層から 50 μm に Cu のピークを認めた(図 3)。すべての材料群で pH サイクル後では元素のピークは認められなかった。

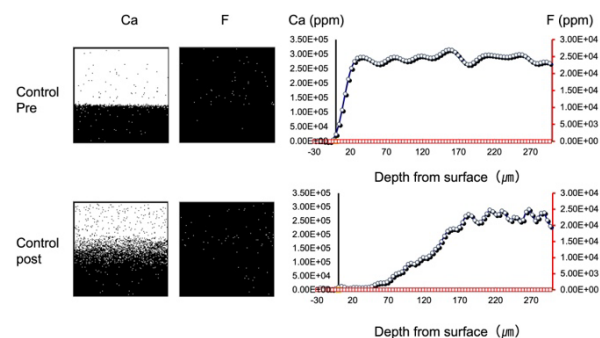


Figure 1. F and Ca distributions and concentrations from the surface of dentin samples in the control group before (upper panel) and after (lower panel) pH cycle loading. In the distribution plots, white dots indicate the presence of the corresponding elements. In the concentration graphs, Ca is indicated by blue dots on the left axis, and the corresponding elements are indicated by red dots on the right axis.

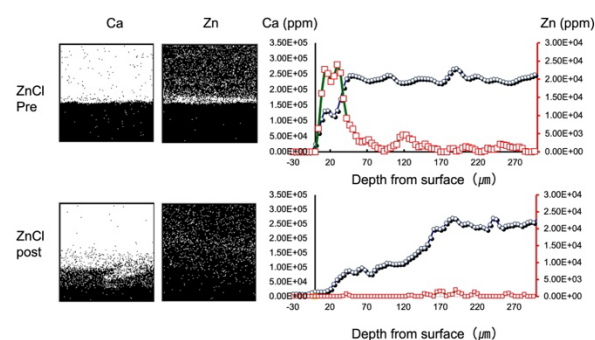


Figure 2. Zn and Ca distributions and concentrations from the surface of dentin samples in the control group before (upper panel) and after (lower panel) pH cycle loading. In the concentration graphs, Ca is indicated by blue dots on the left axis, and the corresponding elements are indicated by red dots on the right axis.

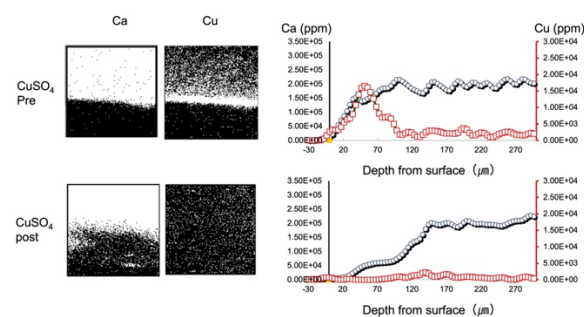


Figure 3. Cu and Ca distributions and concentrations from the surface of dentin samples in the control group before (upper panel) and after (lower panel) pH cycle loading. In the concentration graphs, Ca is indicated by blue dots on the left axis, and the corresponding elements are indicated by red dots on the right axis.

[22055]

pH サイクル負荷試験後のミネラル喪失量はコントロール群と比較して ZnSO₄群、CuSO₄群は有意に低い値を示した (図 4)。

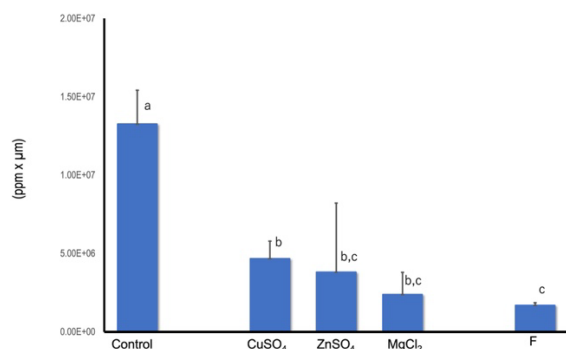


Figure 4. Calcium loss due to pH cycle loading

3. 考察と結論

今回の結果から、亜鉛、銅は象牙質に取り込まれ、象牙質の脱灰抑制効果を持つことが明らかとなった。

非古典的経路によるバイオミネラリゼーションは、コラーゲンのギャップを核とした石灰化を生じ、規則性があり密度の高い結晶を生成する。Zn は象牙質へのカルシウムの沈着を増加させ、タンパク質のリン酸化を促進するため、結果として象牙質組織の再石灰化が促進されることが報告されている [4]。Co²⁺、Ni²⁺、Zn²⁺、Fe³⁺、Mn²⁺、Cu²⁺ などを浸漬したコラーゲンスポンジは弱酸性状態でもコラーゲン/ハイドロキシアパタイト複合体を形成し、微量元素イオンは骨様のバイオミネラリゼーションを誘導する [5]。象牙質のコラーゲン線維は石灰化のコアとなる可能性が報告されており [6]、コラーゲン線維を分解する MMP を抑制することによって象牙質の再石灰化が促進される可能性が考えられる。バイオミネティックミネラリゼーションでは生体高分子との複合体で、象牙質で表面でもコラーゲンを起点としたバイオミネラリゼーションを生じる事が [1] が報告されておりコラーゲン線維の保護は再石灰化において重要である。今回の結果から F のみならず Zn²⁺、Cu²⁺ 群で再石灰化促進効果が得られたのは 2 価のイオンにより非古典的石灰化が生じたことも一因と考えられる。

本研究の結果から Zn²⁺、Cu²⁺ の添加により脱灰象牙質表層のカルシウム喪失量の抑制とカルシウムの沈着量の増加が認められ、Zn²⁺、Cu²⁺ による脱灰抑制効果と再石灰化促進作用の可能性が示唆された。

参考文献

- [1] Y. Li-Na Niu, Wei Zhang, David H Pashley, Lorenzo Breschi, Jing Mao, Ji-Hua Chen, Franklin R Tay. Biomimetic remineralization of dentin: Dent Mater. 30(1):77-96, 2014.
- [2] Takatsuka T, Tanaka K, Iijima Y. Inhibition of dentine

- demineralization by zinc oxide: In vitro and in studies. Dent Mater 21(12): 1170-1177, 2005.
- [3] Huang ST, Yang RC, Wu HT, Wang CN, Pang J-HS. Zinc-Chelation Contributes to the Anti-Angiogenic Effect of Ellagic Acid on Inhibiting MMP-2 Activity, Cell Migration and Tube Formation. PLoS ONE 6(5): e18986, 2011.
- [4] Osorio R, et al., Zinc induces apatite and scholizite formation during dentin remineralization, Caries Res. 48 (4): 276-290, 2014.
- [5] Mingfen J, Yuanping H, Shuyuan D, Yongjun L, Bo Y, Fengzhi J, The influence of transition metal ions on collagen mineralization. Materials Science and Engineering: C, Volume 33-4,(1)2399-2406, 2013.
- [6] Liu Y, Mai S, Li N, Yiu CK, Mao J, Pashley DH, Tay FR. Differences between top-down and bottom-up approaches in mineralizing thick, partially demineralized collagen scaffolds. Acta Biomaterialia 7: 1742-51, 2011.