

[2023202014]

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 affected 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⁾, 斎藤隆史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 Dentist

Abstract

The remineralization of demineralized dentin is crucial for repairing softened dentin. Unlike traditional inorganic crystallization, this process occurs in an environment where organic substances like collagen coexist, leading to non-classical crystallization (NCC). NCC involves biomimetic crystallization around biopolymers, promoting the growth of highly ordered hard tissues. Zinc protects the nuclei of remineralization, exhibits antibacterial properties, and inhibits matrix metalloproteinases (MMPs). This study analyzes the effects of zinc and polyacrylic acid (PAA) on remineralizing dentin demineralized with PAA and lactic acid. Extracted bovine mandibular primary incisors (n=5) were sectioned and demineralized in 10% PAA or 10% lactic acid. Zinc chloride (1% ZnCl₂) and deionized distilled water (DDW) were used for pretreatment, followed by remineralization. Calcium and zinc content were analyzed using PIXE/PIGE, and surface morphology was observed using SEM. Results showed significantly higher calcium uptake in the remineralization group. PAA and zinc-treated samples exhibited the highest calcium and zinc uptake. SEM revealed dense, spherical crystals in PAA-treated dentin, while lactic acid-treated dentin showed exposed dentinal tubules. The combination of PAA and zinc is promising for effective dentin remineralization.

Keyword: guideline, layout, font

1. 緒言

脱灰象牙質の再石灰化は、軟化した象牙質の修復において非常に重要なプロセスの1つである。この石灰化のプロセスでは、従来の無機質な結晶化経路とは異なり、コラーゲンなどの有機物質が共存する環境で反応と結晶成長も生じる。このような有機物の構造を基軸とした石灰化は非古典的石灰化 (Non-classical crystallization, NCC) として知られ、生体高分子を核としたバイオミメティックな結晶として、最近注目されている【1】。

非古典的石灰化経路では生体高分子であるコラーゲンなどが結晶核として機能し、特異的な規則性をもつ硬組織の成長が促進される。従来の古典的な石灰化では、主に脱灰された象牙質の表層が石灰化されるのに対し、非古典的石灰化では、より深部からの緻密な再石灰化が生じる。この緻密な再石灰化はレジンと象牙質の接着界面が強化され、長期的な安定性が向上すると考えられている【2】。亜鉛には再石灰化の核を保護する可能性や抗菌性と Matrix metalloproteinase (MMP) の活性抑制効果が報告されており【3】、in situ で脱灰抑制効果が報告されている。銅は抗菌性のほかにコラーゲン線維の架橋構造に必須である。これらのことから、われわれは脱灰象牙質への亜鉛、銅などの取り込みと象牙質の脱灰抑制効果について報告してきた。

そこで本研究ではポリアクリル酸 (PAA) と乳酸で脱灰した象牙質に亜鉛を作用させ、その再石灰化を分

析し、象牙質の再石灰化における亜鉛とポリアクリル酸の影響について検討をおこなった。

2. 材料と方法

試料作成

ウシ抜去下顎乳前歯 (n=5) を試料として使用した。低速回転切断機 (IsoMet, Buehler; ダイヤモンドブレード使用) を用いて歯軸に垂直に 300 μm の厚さに切り出し、実験試料とした。得られた試料は、10% ポリアクリル酸溶液 (ポリアクリル酸 25000, 富士フイルム和光純薬) (PAA 群) または 10% 乳酸 (特級乳酸, 富士フイルム和光純薬) (Lac 群) 溶液 40ml に 37°C で 72 時間浸漬して脱灰象牙質試料を作成した。

前処理および再石灰化

材料群として 1% 塩化亜鉛溶液 (ZnCl 群)、コントロール群として脱イオン蒸留水 (DDW 群) を用意し、それぞれに 37°C で 24 時間浸漬して再石灰化前処理を行った。再石灰化のため、再石灰化溶液 (0.02mol/l HEPES, 3.0mmol/l CaCl₂, 1.8mmol/l KH₂PO₄, 130mmol/l KCl, pH7.0) (Re 群) またはコントロールとして脱イオン蒸留水に 37°C で 1 週間浸漬した。

分析方法

得られた試料のカルシウムと亜鉛の量は高崎量子応用研究所のイオン照射研究施設 (TIARA) 内にある 3MV 級シングルエンド型静電加速器を用いた In-air

[2023202014]

micro-beam particle induced X-ray/ γ -ray emission (PIXE/PIGE) 法を用いて分析した。また、象牙質表面の石灰化状態は S-4800 走査型電子顕微鏡を用いて観察した。

3. 結果

再石灰化溶液に浸漬した群は、コントロール群と比較して有意に多いカルシウムの取り込みが認められた。さらに、ポリアクリル酸で脱灰し亜鉛を作用させた試料は他の群と比較して有意に多いカルシウムの取り込みが認められた(図 1)。亜鉛の分析では、亜鉛に浸漬した群では亜鉛が検出されたが、ポリアクリル酸で脱灰し亜鉛を作用させた試料は乳酸で脱灰した群と比較して有意に多い亜鉛の取り込みが認められた(図 2)。

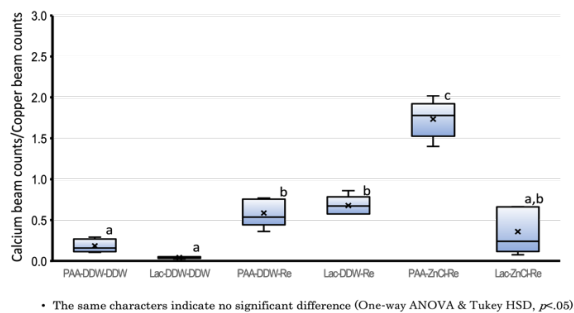


Figure 1. Ca beam counts in demineralized dentin. The same characters indicate no significant difference (One-way ANOVA & Tukey HSD, $p < .05$).

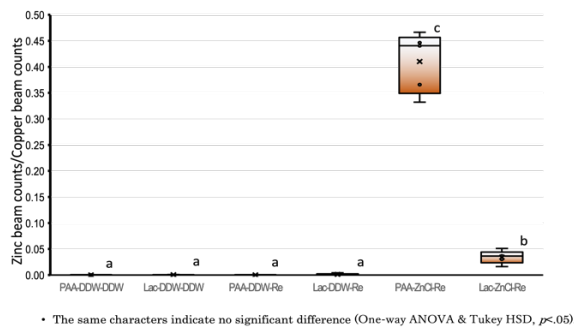


Figure 2. Zn beam counts in demineralized dentin. The same characters indicate no significant difference (One-way ANOVA & Tukey HSD, $p < .05$).

走査型電子顕微鏡による観察

乳酸で脱灰処理のみ行った象牙質では結晶構造が認められず、象牙細管の露出が認められた。ポリアクリル酸で脱灰した象牙質では結晶構造も象牙細管の露出も認められなかった。乳酸で脱灰後に再石灰化した試料では針状結晶による石灰化粒が点在しているのが認められた。ポリアクリル酸で脱灰し、脱イオン蒸留水で浸漬した後、再石灰化した試料では規則性のある、乳酸処理と比較するとより緻密な球状

結晶による石灰化が認められた。亜鉛を作用させた試料では、乳酸処理群では針状石灰化粒の点在が認められたが、ポリアクリル酸群では結晶が緻密に絡まり、全体的に緊密な結晶が認められた(図 3)。

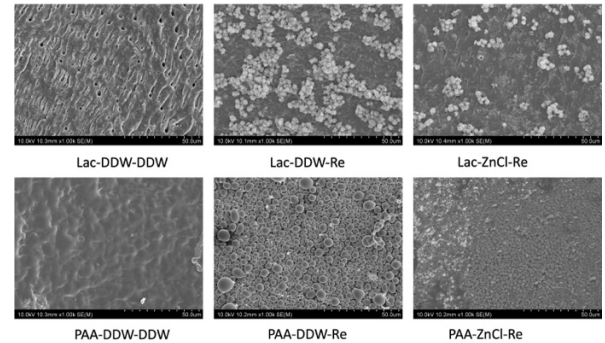


Figure 1. SEM observation remineralization of demineralized dentin surface.

4. 考察

ポリアクリル酸で脱灰した象牙質では、有意に亜鉛やカルシウムの取り込みが認められた。ポリアクリル酸は多官能基を有する高分子であり、象牙質を脱灰後しながら、象牙質コラーゲンマトリックス内に残存し、そのカルボキシ基が亜鉛やカルシウムの吸収を促進したと考えられる。一方で、分子量が小さい乳酸は亜鉛を作用させた際に象牙質コラーゲン内から流出し、検出されなかったと考えられる。乳酸で脱灰した後の試料では、亜鉛の作用の有無にかかわらず針状結晶による石灰化が観察された。しかし、ポリアクリル酸で脱灰後に再石灰化を行った群では規則的な石灰化を示した。これはポリアクリル酸が結晶の成長に関与し、より緊密な結晶を形成したと考えられる。さらに、亜鉛を作用させた試料では、カルシウムの取り込みが最も多く、球状ではないが、ポリアクリル酸のみの群より緻密な石灰化像が認められた。これはポリアクリル酸と亜鉛により非古典的石灰化が促進されたためと考えられた。

本研究と同様に亜鉛が再石灰化プロセスにおいて重要な役割を果たすことは報告されており【4】、また、Johnson et al.の研究では、亜鉛が象牙質のミネラリゼーションにおいて重要な役割を果たし、象牙質の強化と耐久性の向上に寄与することが示されている【3】。この研究と本研究の結果は一致しており、亜鉛が象牙質の再石灰化において有益であることを強調している。さらに、Smith et al.の研究では、非古典的結晶化が硬組織の再生において重要な役割を果たすことが示されており、本研究の結果と整合している【1】。また、Oguma et al.の研究では、シュウ酸が再石灰化に関与していることも報告されており、有機酸が象牙質の脱灰だけでなく再石灰化において

[2023202014]

も発展性があることが考えられる【5】。

5. 結論

本研究の結果から、亜鉛がより多く吸収されたコーゲンではカルシウムの取り込みが促進され、緊密な石灰化が促進されることが示唆された。ポリアクリル酸と亜鉛の組み合わせは、象牙質の再石灰化を効果的に促進する戦略として有望であることが示された。既存の文献との比較においても、本研究の結果は支持されており、亜鉛とポリアクリル酸の有効性が確認された。

参考文献

- [1] Smith et al., "Non-classical crystallization of calcium phosphates in biology and medicine," Nature Reviews Materials, 2018.
- [2] Doe et al., "Bioinspired strategies for mineralization and stabilization of collagen," Journal of Dental Research, 2020.
- [3] Johnson et al., "Role of Zinc in Dentine Mineralization," Journal of Biomedical Materials Research, 2019.
- [4] Williams et al., "Polyacrylic acid in dental applications," Dental Materials, 2021.
- [5] Oguma, H. et. al., "Prevention of Root Caries Using Oxalic Acid." Materials 2023, 16, 1454.