

平成23年6月10日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20592168

研究課題名（和文） 象牙質における成長線の周期性と生物時計との関連：メラトニンによる調節

研究課題名（英文） The relationship between the periodicity of incremental lines in the tooth dentin and a biological clock: Regulation by melatonin

研究代表者

三島 弘幸（MISHIMA HIROYUKI）

高知学園短期大学・教授

研究者番号：30112957

研究成果の概要（和文）：

ラットの切歯と臼歯の歯胚組織において、メラトニンのレセプターMT1とMT2は発現していることが判明した。夜間が昼間より発現量が高かった。夜間時の石灰化前線にヘマトキシレンに濃染する層が観察された。夜間に石灰化が進行し、ヘマトキシレンに濃染する層が形成され、昼間にヘマトキシレンに淡染する層が形成され、濃染層と淡染層が対になった成長線になると考察される。成長線の周期性にメラトニンが関与する可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：

It became clear that the melatonin receptors MT1 and MT2 were present in the tooth embryo. The level of melatonin concentration during the night time was higher than that of the daytime. The dark-staining layer of hematoxylin was observed at the calcification front of dentin formed during the night time. It is considered that calcification advances during night periods, when the dark-staining layer of hematoxylin is formed, while the light-staining layer is formed during the daytime. It is suggested that melatonin may participate in the periodicity of the incremental lines of dentin.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
20年度	2,300,000	690,000	2,990,000
21年度	800,000	240,000	1,040,000
22年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・形態系基礎歯科学

キーワード：遺伝子、細胞・組織、歯学、成長線、メラトニン

1. 研究開始当初の背景

(1) ヒトや類人猿の歯のエナメル質では、エナメル小柱に見られる横紋がもっとも周期の短い成長線にあたり、標識実験などが

らサーカディアンリズムの一日周期にあたる^{2,3)}。間隔は約20 μ mであり、歯頸部では約4 μ mである。また、周期の長い成長線としては、やはりエナメル小柱に見られるレ

チウス条（歯の表面では周波条）であり、平均 9 日間隔（6 日-11 日）で形成される。それに対して、象牙質では横紋に対応する一日周期の成長線はエブネル（von Ebner）線である。レチウス条に対応する象牙質の成長線はアンドレーゼン線である。他の哺乳類の歯の象牙質の成長線において、年周期、月齢周期、日周期の 3 周期が同定されている。しかし、本邦の教科書では、異なる見解もある。象牙質の成長線の周期性、定義、あるいは名称では混乱がある。

（2）生物時計の階層には、サーカディアン（概日周期：約 25 時間）、やサーカトリジン（約 30 日）、サーカアニュアル（一年）などが知られており、これらは外界環境の周期的変化と同調することが多い。また、あらゆる生物にはサーカディアン・リズムがあるが、その作用因子は遺伝的に組み込まれていて、多くの生理現象がその制御下にある。そして、脳の視交叉上核における時計遺伝子の研究が盛んに行われており、分子メカニズムが解明されつつある。一方、サーカディアンリズムの同調因子は主としてメラトニンであり、松果体が主要な産生器官である。しかし、近年、このメラトニンが松果体以外の多くの器官でも産生され、局所ホルモンとして作用していることが明らかになってきた。そして、象牙質において、サーカディアンにあたる成長線が観察されることから、メラトニンが関与していることが十分に考えられる状況である。しかし、歯や歯胚におけるメラトニンの産生の有無や成長線との関連もほとんどわかっていない。

2. 研究の目的

我々は、歯の成長線の年周期、季節周期、月齢周期、日周期などに注目し、これまで形態学的な研究を行い、4 種の周期性を見

出した。そして、象牙質の成長線形成機構には①有機質の分泌のリズムによるものと②石灰化の沈着リズムによるもの、の 2 つがあることを明らかにした。歯や歯胚におけるメラトニンの産生の有無や成長線との関連はほとんど解明されていない。本研究ではメラトニンと象牙質における成長線の周期性との関係を解明し、その作用機序を探ることを目的とする。

3. 研究の方法

（1）成長線の周期性形成メカニズムを明らかにすることを目的として、メラトニンに注目し、歯胚組織におけるメラトニンレセプターの mRNA 発現を調べた。

・材料：SD ラットの歯胚組織

①出産後 3 日令（歯冠形成期） 夜間と昼間に摘出した。上・下顎の歯胚組織（切歯。臼歯部）を実体顕微鏡下で摘出し、メラトニンレセプターの mRNA 発現を解析した。

②妊娠ラットにメラトニン経口投与しての成長線の周期の変化

（2）ラット象牙質の組織学的研究

①出生後 3 日・4 日令の SD ラット（歯冠形成期）を用いて昼間と夜間に切歯を摘出し、脱灰標本と研磨標本作製した。脱灰標本は厚さ $4\mu\text{m}$ の切片を作製し、HE 染色を施し、光学顕微鏡にて成長線を観察した。

②体重 110g-220g のラットの切歯は昼間に摘出し、脱灰標本と研磨標本作製した。研磨標本（片面研磨と両面研磨：厚さ 80-100 μm ）は鏡面研磨し、偏光顕微鏡、走査電子顕微鏡（S-2380N, Hitachi）の反射電子像（石灰化の状態や元素組成の状態把握のため）により、成長線を観察した。また EPMA

（JXA-8200, JEOL）を用いて組成分析を行った。分析は SEM-EDS (Scanning Electron Microscopy-Energy Dispersive Spectrometer) : 走査電子顕微鏡によるエネ

ルギー分散型検出器の分析)で点分析にて行い、加速電圧 15kV で分析し、分析時間は 60 秒であった。また、顕微レーザーラマン分光装置 (Raman rxn system ならびに Kaiser HoloLab 5000, Kasier optical systems 社製) による分析を行った。レーザーの波長は 514nm, 532nm 及び 785nm を用い、レーザーの出力は 0.32-0.5mW、分析範囲は 1 μ m であった

4. 研究成果

(1) メラトニンレセプター

切歯と臼歯の歯胚組織において、メラトニンのレセプター MT 1 と MT 2 は発現していることが判明した。夜間 (暗期) が昼間 (明期) より発現量が高いという結果になった。

(2) 組織学的ならびに分析学的結果

①出生 4 日 夜間時の切歯組織標本の観察において、象牙前質にヘマトキシレンに濃染する石灰化前線が観察された。昼間に屠殺した試料では、石灰化前線は濃染されない。夜間に石灰化が進行し、ヘマトキシレンに濃染する層が形成され、昼間にヘマトキシレンに淡染する層が形成され、濃染層と淡染層が対になった成長線になると考察される。また濃染層と淡染層の間隔を形成すると、平均 15.50 \pm 1.15 μ m であった。これは Schour¹⁵⁾ のサーカディアンリズムの成長線の間隔の結果とほぼ一致する。

②SEM の反射電子像の観察では、切歯象牙質に暗帯と明帯の対になった成長線が観察された。脱灰標本とは異なり、EPMA 分析結果では、Ca, P, Mg の元素が検出され、暗帯と明帯では、それらの元素の密度に若干の差が認められ、明帯がより元素が密集していた。Mg の含有量にわずかな差があり、暗帯に多い傾向があった。Ca/P 比では、暗帯で 1.53 \pm 0.08 で、明帯では 1.56 \pm 0.03 であった。また研磨標本での SEM 観察では、

成長線の周期は 10 μ m 周期 (平均) と 70 μ m 周期 (平均) の成長線が観察された。偏光顕微鏡では、干渉色の違いから成長線が認められる。特にセメント質に覆われている舌側の中層から深層にかけて明瞭に認められた。その成長線の間隔から 11.5 μ m (平均)、29.1 μ m (平均)、63.3 μ m (平均) の 3 種が区別された。10-12 μ m 前後の周期の成長線は脱灰標本でのサーカディアンリズムの成長線の間隔平均 (15.50 \pm 1.15 μ m) に対応すると考察される。研磨標本で、サーカディアンリズムより長周期の成長線が観察された。これら長周期の成長線が認められるが、成長線の周期性にメラトニンが関与する可能性があるとして推定し、今後研究を進めていきたい。さらに脱灰標本では長周期の成長線が明瞭に認められない原因について詳細に検索していきたい。

③顕微レーザーラマン分光装置において、生体のハイドロキアパタイト (biological apatite:Bi-Ap) では 960-961 cm^{-1} に PO_4^{3-} のピークが検出され、フロールアパタイトでは 964-967 cm^{-1} に PO_4^{3-} のピークが検出され、差異が見出されている¹⁰⁾。本研究では 961 cm^{-1} に PO_4^{3-} のピークが検出され、明帯で高いピークであり、暗帯で低いピークであった。これは元素の密度の差を現しており、EPMA の結果と調和的であった。明帯はヘマトキシレンに濃染する層であり、暗帯はヘマトキシレンに淡染する層と判断される。

④妊娠ラットにメラトニン経口投与 (低濃度 20 μ g と高濃度の 1000 μ g) を行い、出産後 5 日令 (歯根形成期) にて、夜間と昼間に歯胚を摘出した。

妊娠ラットにメラトニン経口投与した場合、コントロールに比較し、常に石灰化が亢進した状態が続き、低濃度と高濃度ともヘマトキシレンに濃染した層が観察された。濃染

層と淡染層の成長線が認められなかった。高濃度の場合、コントロールに比較し、石灰化前線付近に石灰化球が密に分布していた。

(3) 成長線の周期性とメラトニン

①サーカディアンリズムの同調因子は主としてメラトニンであり、松果体が主要な産生器官である。しかし、近年、このメラトニンが松果体以外の多くの器官でも産生され、局所ホルモンとして作用していることが明らかになってきた。研究結果により、夜間に分泌されるメラトニンが、歯胚に作用し、成長線の周期性形成を制御している可能性が示唆された。そして、象牙質において、サーカディアンにあたる成長線や長周期の成長線が観察されたことから、成長線の周期性にメラトニンが関与する可能性が示唆された。また、妊娠ラットにメラトニン経口投与した場合、コントロールに比較し、常に石灰化が亢進した状態が続くことが判明した。メラトニンが硬組織の石灰化促進にも影響があると

②Ohtsuka *et al* は象牙芽細胞のコラーゲンの合成や分泌に関してサーカディアンリズムがあることを示した。また、Dean *et al* はサーカディアンリズムに呼応して、エナメル芽細胞が有機質を分泌することを報告している。しかし、象牙芽細胞などの歯の形成細胞、かという着想は公認されておらず、これらの点をさらに追求していきたい。象牙芽細胞など歯の形成細胞が末梢の生物時計であることが判明すれば、歯の痛みのリズムをうまく制御できる可能性があり、歯科臨床治療に有効となる。末梢組織での生物時計が体内に存在するかということは、薬理学を含め、医学や歯科学での興味深い重要な問題であり、研究成果ができれば、医学・歯学において有意義であると思われる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 9 件)

- ①三島弘幸、宮元沙織、田中和夫、大久保厚司、見明康雄、西野彰恭、歯肉縁上歯石における加齢変化による組成の変化、日本再生歯科医学会誌、査読有、8 巻、2010、10-18
- ②三島弘幸、寛光夫、安井敏夫、シルル紀から石炭紀のコノドント化石の硬組織の構造、化石研究会会誌、査読有、42 巻、2010、193-200
- ③寛光夫、三島弘幸、脊椎動物の歯と石灰化一生物アパタイト結晶の構造と形成機構の進化、化石研究会会誌、査読有、42 巻、2010、175-181
- ④ M. Kakei, T. Sakae, H. Mshima, M. Yoshikawa, Ultrastructure of apatite crystals formed during vascular calcification in human, Journal of hard tissue biology, 査読有, vol. 18, 2010, 135-140
- ⑤歯の象牙質における成長線の周期と生物リズムとの関連、三島弘幸、北原正大、服部淳彦、鈴木信雄、田畑純、寛光夫、見明康雄、メラトニンによる調節の可能性、比較内分泌学、査読有、36 巻、2010、106-112.
- ⑥大久保厚司、三島弘幸、松永常典、川久保敦、辻本真規、井上正朗、川島正、辻本恭久、中田浩史、MTA と組成配合したポルトランドセメントの SEM-EDS 分析による成分検討、日本歯内療法学会雑誌、査読有、30 巻、2009、140-146
- ⑦川久保敦、松永常典、大久保厚司、辻本真規、井上正朗、三島弘幸、中田浩史、下御領良二、M 熱可塑性オブチュレーションガッタによる根管充填後、6 年経過した臨床症例の根尖部塞性と経時変化に関する SEM および SEM-EDS 分析による検討、日本歯内療法学会

雑誌、査読有、30 巻、2009、147-157

⑧三島弘幸、北原正大、宮元沙織、田中和夫、大久保厚司、西野彰恭、大野由香、中石裕子、野村加代、和食沙紀、見明康雄、性差と年齢による歯肉縁下歯石の形態と組成の変化、日本再生歯科医学会誌、査読有、7 巻、2009、34-46

⑨Suzuki, N., Hayakawa, K., Kameda, K., Triba, A., Tang., Tabata, M. J., Takada, K., Wada, S., Omori, K., Srivastav, A. K., Mishima, H., Hatttori, A, Monohydroxylated polycyclic aromatic hydrocarbons inhibit both osteoclastic and osteoblastic activities in teleost scale, Life Sciences, 査読有, 84, 2009, 482-488.

[学会発表] (計 8 件)

①三島弘幸、見明康雄、コノドント化石の硬組織の組織構造と化学組成の解析、歯科基礎医学会、平成 22 年 9 月 22 日、東京

② M. Kakei, T. Sakae, H. Mishima, M. Yoshikawa, Transmission electron microscopy of vascular calcification, 37th European Symposium on Calcified Tissues, 平成 22 年 6 月 27 日, Glasgow, Scotoland

③H Mishima, M Kitahara, A Hattori, N Suzuki, M J. Tabata, M Kakei, Y Miake, Possible involvement of melatonin in the relationship between biological rhythm and periodicity of incremental line formation in the dentin of teeth, 37th European Clcified Tissue Society, 2010 年 6 月 29 日, Glasgow, Scotoland

④三島弘幸、北原正大、服部淳彦、鈴木信雄、田畑純、笥光夫、見明康雄、象牙質の成長線の性状とその形成メカニズム、化石研究会、2010 年 5 月 29 日、新潟

⑤三島弘幸、大久保厚司、北原正大、田中和夫、和食沙紀、大野由香、中石裕子、野村加代、見明康雄、柳澤孝彰、日本解剖学会、平成 22 年 3 月 30 日、盛岡

⑥笥光夫、寒河江登志朗、三島弘幸、吉川正芳、動脈および歯石における石灰化過程について、日本解剖学会、平成 22 年 3 月 28 日、盛岡

⑦三島弘幸、歯の象牙質に「おける成長線の周期と生物リズムとの関連：メラトニンによる調節の可能性、比較内分泌学会、2009 年 10 月 24 日、大阪

⑧三島弘幸、北原正大、服部淳彦、鈴木信雄、田畑純、笥光夫、見明康雄、象牙質の成長線の形成リズムとメラトニンの分泌リズムとの関連、バイオミネラルイゼーション研究会、2009 年 12 月 12 日、東京

[その他]

高知学園短期大学のホームページ <http://www.kochi-gc.ac.jp> に掲載予定

6. 研究組織

(1) 研究代表者

三島 弘幸 (Mishima Hiroyuki)
高知学園短期大学・幼児保育学科・教授
研究者番号：30112957

(2) 研究分担者

田畑純 (Tabata J Makoto)
東京医科歯科大学・院医歯学総合研究科・准教授
研究者番号：20243248

(3) 連携研究者

鈴木信雄 (Suzuki Nobuo)
金沢大学・環日本海域環境研究センター・准教授
研究者番号：60242476

服部淳彦 (Hattori Atsuhiko)
東京医科歯科大学・教養部・教授
研究者番号：70183910