

平成22年 4月30日現在

研究種目：若手研究 (B)  
 研究期間：2008～2009  
 課題番号：20791384  
 研究課題名 (和文) 電子線トモグラフィーを用いた非脱灰硬組織における超微細構造解析手法の開発  
 研究課題名 (英文) Observation of ultra-structures in human enamel and dentin by Ultra-high Voltage Electron Tomography  
 研究代表者  
 三浦 治郎 (Jiro Miura)  
 大阪大学・歯学部附属病院・助教  
 研究者番号：70437383

## 研究成果の概要 (和文)：

歯牙硬組織の代表的な構造であるエナメル質、象牙質をターゲットとし、ガリウムイオンを用いた集束イオンビームによる試料加工と、超高压電子線トモグラフィーを用いての三次元微細構造観察を行うことにより、硬組織の構造観察研究や臨床における構造評価の基本となる技術開発を目標とした。今回の実験・開発においては、エナメル質・象牙質の非脱灰硬組織内部のサブミクロンオーダーにおける超微細構造を、顕微鏡学・形態学的側面から観察可能にする手法を確立した。

## 研究成果の概要 (英文)：

Human enamel and dentin are hard and brittle mineralized tissues. It is difficult to prepare thin specimens (under 200 nm) of these tissues for transmission electron microscope observation without demineralizing them. We present a novel method for creating three-dimensional ultra structural images of human enamel and dentin using Focus Ion Beam method and ultra-high voltage electron microscope tomography.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2009年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,300,000	690,000	2,990,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学 保存治療系歯学

キーワード：石灰化硬組織、電子線トモグラフィー、ナノテクノロジー

## 1. 研究開始当初の背景

現在、歯の硬組織の構造観察では、光学顕微鏡やレーザー顕微鏡といった可視光線を用いた手法や、走査型電子顕微鏡のような表面構造を観察する手法が多く用いられている。しかし、前者は、厚みのある試料の観察が可能であるが、可視光線の波長の限界から分解能が低いためサブミクロンオーダーの微細構造観察が難しく、後者は、切断、研磨、脱灰などの処理を加えた試料に対して表面観察を行うために内部構造の観察が行えず情報量が不足すると行った欠点があった。さらに、透過型電子顕微鏡に関しては、試料作成の段階で、ナイフによる超薄切が難しく、試料を観察可能な数十nmまで薄くすることが難しかった。特に歯を構成するエナメル質は、水晶に匹敵する硬度を持ち通常のマイクローム法では薄切は困難であるといわれている。

近年になって、ナノテクノロジーの進歩によりイオンビームを用いた微細加工手法が開発され、ナイフによる薄切では不可避であった切削時の振動や傷などの影響を極力少なくした状態での試料作成を行うことが可能となった。これにより、サブミクロンスケールの構造をリアルタイムで観察しながら切削できるようになった。

さらに、観察技術の進歩から、加速電圧を飛躍的に大きくした超高压電子顕微鏡も実用化され非脱灰硬組織のような超薄切加工が困難な試料においても $2\mu\text{m}$ 程度まで薄くすれば観察が可能になった。さらに、連続的に傾斜させて撮像を行い、コンピュータ処理により断層像を得るトモグラフィー撮影も行えるようになってきている。

## 2. 研究の目的

今回用いる構造観察において用いた電子線トモグラフィー法(ET法)は透過型電子顕微鏡を用いて数ナノメートルの分解能で試料の立体情報を解析する方法である。通常



汎用透過型電子顕微鏡では厚さ $100\text{nm}$ 以下の超薄膜切片に内包される構造が観察対象となるが、本研究では大阪大学超高压電子顕微鏡センターの加速電圧 $3000\text{kV}$ の超高压電子顕微鏡を用いた。超高压電子顕微鏡トモグラフィー法(UHVEMT)では、細胞レベル( $2\sim 4\mu\text{m}$ 厚)での

**Fig. 1: 超高压電子顕微鏡** 立体構造解析が可能となりその有用性は高い。我々は、歯牙硬組織の代表的な構造であるエナメル質、象牙質をターゲットとしET法を用いた。

## 3. 研究の方法

口腔保健上保存不可能な歯に関して行われる処置において患者に同意を得た上で提供していただきハックス緩衝溶液の中で保存[1]した歯を、ダイヤモンドカッターにて厚さ $100\sim 200\mu\text{m}$ に切断した。切断後の試料を、 $2.5\%$ のパラフォルムアルデヒド、 $2\%$ グルタルアルデヒドおよび $2\%$ 四酸化オスミウムを用いて二重固定を行った。[2]その後、試料を修復界面が中央に位置するように $1\text{mm}$ 角程度にトリミ

ングした。トリミングした試料を TRIPOD POLISHER (South Bay, CA) に貼付してさらに、ダイヤモンドペーパーを回転研磨機にて  $50\ \mu\text{m}$  くらいまで薄くなるように加工した。



Fig. 2 : TRIPOD による研磨・試料加工

手作業にて薄くした試料を FIB 用切り欠きメッシュに瞬間接着剤を用いて貼付した (Fig. 3)。最終加工は、集束イオンビーム (FIB : FB2000A, HITACHI) を用いて、エナメル質、象牙質をトモグラフィー撮影における傾斜撮像で  $-60^\circ \sim 60^\circ$  の傾斜範囲がとれるように、厚さ  $2\ \mu\text{m}$ 、幅  $100\ \mu\text{m}$  の設定でモグラフィー用試料加工を行った [3]。

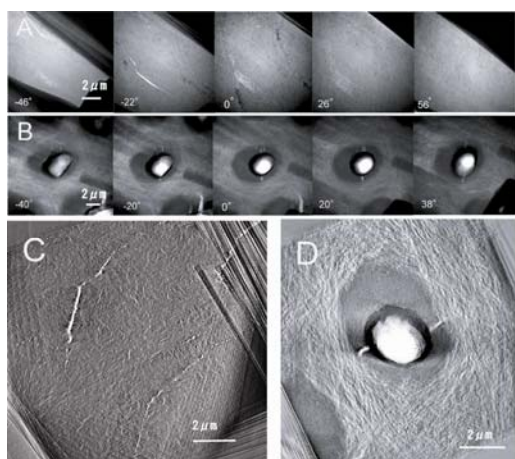


Fig. 3 : 傾斜撮像と断層像

A, C: エナメル質 ( $\times 6000$ )

B, D : 象牙質 ( $\times 10000$ )

加工後の切片に、酢酸ウラニルとクエン酸鉛を用いて電子染色を行った。乾燥後、金粒子法を用いて断層像を得るために、試料を金

コロイド溶液 ( $40\text{nm}$ ) に浸し再度乾燥を行った。サンプルホルダーは、三次元解析用片持ちホルダー (H-3066, HITACHI) を用いた。データサンプリングには、超高压電子顕微鏡 (H-3000, HITACHI) を用いて、加速電圧  $2081\text{kV}$  にて、試料は 1 軸傾斜観察において  $-60^\circ \sim +60^\circ$  まで  $2^\circ$  間隔にて試料を傾斜させ撮影を行った。エナメル質は 6000 倍、象牙質は 10000 倍にて一連の像を観察し、IMOD (Colorado Univ.) を用い [4] Back-projection 法のアルゴリズムにて再構築処理し断層像を得た [5]。

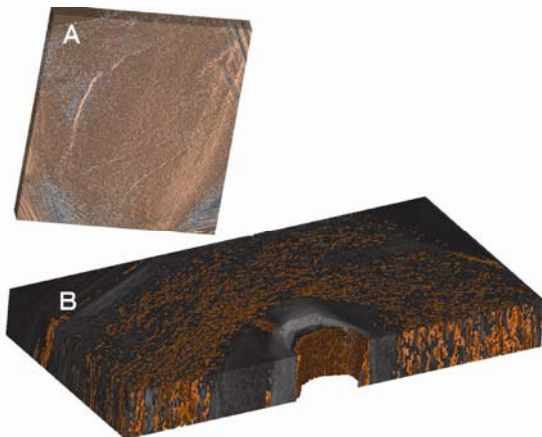


Fig. 4 : 3次元構築画像

A: エナメル質、 B: 象牙質

#### 4. 研究成果

再構築像より、脱灰試料における観察では得られないエナメル小柱内部の結晶構造や小柱間エナメル質の構造、また象牙細管周囲の管周象牙質、管間象牙質およびその内部に含まれる  $100\text{nm}$  程度のコラーゲン繊維が詳細に観察することが可能となった。

以上の結果は、本手法が歯のような非脱灰硬組織を構成する微細構造および内部に存在するコラーゲン繊維のナノオーダーでの三次元観察を行うことが可能であり、観察用試料として加工しにくくさらに電子線の透過度の低い石灰化硬組織における観察においては、非常に有効な手法であるということが示されたといえる。これからは、歯科の治療時に用いる接着性レジセメントと象牙質やエナメル質との接着界面の構造観察なども行っていく予定である。

- 1). Habelitz, S., Grayson, W., Marshall, J., Balooch, M., Shally, J., (2002). 35, 995-998.
- 2). Karnovsky, M.J., (1965). J. Cell Biol. 27, 137A.
- 3). Nalla, R.K., Porter, A.E., Daraio, C., Minor, A.M., Radmilovic, V., Stach, E.A., Tomsia, A.P., Ritchie, R.O., (2005).. Micron. 36, 672-680
- 4). Kremer, J.R., Mastronarde, D.N., McIntosh, J.R., (1996). J. Struct. Biol. 116, 71-76.
- 5). He, W., Cowin, P., Stokes, D.L., (2003). Science 302, 109-113.

#### 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4件)

- (1) Miura, J., Nakai H, Maeda Y, Zako M. Multi-scale analysis of stress distribution in teeth under applied forces. Dent Mater. 2009 25:67-73  
査読あり
- (2) 阪大複合機能ナノファウンダリ研究成果報告書 第3巻(2009)109-110  
人歯象牙質とボンディング層界面のトモグラフィー観察 査読なし
- (3) Miura, J., Maeda, Y. Biomechanical model of incisor avulsion: a preliminary report. Dent Traumatol., 2008 24:454-457  
査読あり
- (4) 阪大複合機能ナノファウンダリ研究成果報告書 第2巻(2008)66-67 超高压電子顕微鏡を用いた歯科修復材料と象牙質の接着界面微細構造観察  
査読なし

[学会発表] (計5件)

- (1) 日本保存歯科学会 (仙台)  
三浦治郎、長島 正、竹重文雄  
マルチスケール解析を用いた歯の破折

#### メカニズムの解明

2009.10.29 仙台

- (2) 日本保存歯科学会 (仙台)

三浦治郎、長島 正、竹重文雄、森博太郎  
超高压電子顕微鏡を用いた修復材料と象牙質の接着界面微細構造観察

2009.10.29 仙台

- (3) 三浦治郎、長谷川紀昭、竹重文雄、鷹岡昭夫

超高压電子線トモグラフィーを用いた人歯長微細構造観察手法の開発

2009.5.25 仙台 日本顕微鏡学会

- (4) 三浦治郎、長谷川紀昭、竹重文雄、森博太郎

超高压電子線トモグラフィーを用いた人歯長微細構造観察手法の開発

2008.11.7 富山 日本保存歯科学会

- (5) Jiro Miura, Noriaki Hasegawa, Hirotarō

Mori

Observations of ultrastructures in human-tooth by Ultra-High Voltage Electron Tomography

International Association for Dental research 2008 7.4 Toronto Canada

#### 6. 研究組織

- (1) 研究代表者

三浦 治郎 ( Jiro Miura )

大阪大学・歯学部附属病院・助教

研究者番号：70437383