

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 25 日現在

機関番号：14401  
 研究種目：挑戦的萌芽  
 研究期間：2011 ～ 2012  
 課題番号：23659888  
 研究課題名（和文） 水溶性カルボジイミドを応用した象牙質コラーゲンの架橋促進による歯の強化法の開発  
 研究課題名（英文）  
 Effects of soluble carbodiimide on the strengthening mechanism of human dentin by collagen cross-linking  
 研究代表者  
 林 美加子 (HAYASHI MIKAKO)  
 大阪大学・歯学研究科（研究院）・教授  
 研究者番号：40271027

研究成果の概要（和文）：歯の破折に対する防止策を探求することを目的として、水溶性カルボジイミドによる象牙質の強化効果を検索した。その結果、象牙質に水溶性カルボジイミドに作用させると、濃度勾配を示しながら象牙質の強化に有効であることが分かった。その強化メカニズムは、象牙質の主要な有機成分である type I コラーゲンに水分子が関わる変化による新たな架橋形成によるためであることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：The strengthening effects of human dentin by soluble carbodiimide were investigated with an aim of preventing tooth fracture. We found that soluble carbodiimide was significantly effective to improve the mechanical strengths of dentin. The strengthening mechanism of dentin by heating was found to promote new collagen cross-linking with relation to water molecules.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,700,000	810,000	3,510,000

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：保存修復学，象牙質，機械的強度，水溶性カルボジイミド，コラーゲン

## 1. 研究開始当初の背景

我々は、加熱によって象牙質の引張り強さと曲げ強さが3倍に増加することを発見した。この現象は、コラーゲンのトリプルヘリックス間の距離が 14Å から 11Å に収縮することに起因しており、加熱による架橋形成の可能性を報告した (Journal of Dental Research, Hayashi *et al.*, 2008, 87 762-766)。

また、連携研究者の斎藤らは、骨粗鬆症患者を健常者と比較した場合、アパタイト量のみならずコラーゲン分子間架橋の量と質が全く異なることを突き止めた

(Calcified Tissue International, Saito *et al.*, 2006, 79(3) 160-168)。従って、骨と似通った組成の象牙質において、コラーゲンの架橋促進が歯の機械的強度を増加さ

せる可能性が大いに考えられる。

一方、研究協力者の本郷らは、組織工学の手法にて人工角膜の創成に取り組んでおり、生体親和性が高い水溶性カルボジイミドがスキャフォールドとしてのコラーゲンの分子間架橋の形成促進に効果的であることを証明している (Chemistry Letters, Hongo *et al.*, 2008, 37(12) 1254-1255, 特許申請番号 2007-339635)。

水溶性カルボジイミド：1-ethyl-3-(3-dimethyl-aminopropyl)-carbodiimide, hydrochloride は、再生医療・組織工学分野で用いられる細胞のスキャフォールドとしてのコラーゲンに対する架橋材である。そこではアミノ基とカルボキシル基が脱水縮合してコラーゲン分子間にアミド結合を形成さ

せる。この反応の副反応物の尿素は容易に洗浄が可能であり、水溶性カルボジイミド自体は架橋構造中に残らないため架橋材が遊離して毒性を示すことが無い。これが従来の架橋材であるグルタルアルデヒドやポリエポキシ化合物と比較して、水溶性カルボジイミドの生体親和性が高い理由である。

このような背景に基づき、水溶性カルボジイミドを応用した象牙質コラーゲンの分子間架橋形成促進による歯の強化法の開発を着想するに至った。

## 2. 研究の目的

象牙質中のタイプ I コラーゲンに水溶性カルボジイミドを濃度、pH、温度および作用時間などの条件を変えた作用させた場合、どのように架橋が形成されて象牙質の機械的強度が変化するかを分析した。続いて、コラーゲンの分子レベルでの変化メカニズムを、ナノインデンテーション、エックス線回折、顕微赤外分光分析、および顕微ラマン分光分析によって多面的に解析することを目的とした。

## 3. 研究方法

### [水溶性カルボジイミド処理による象牙質の機械的強度変化の分析]

1) ヒト象牙質棒状試料の採取と水溶性カルボジイミド処理：ヒト新鮮抜去第3大臼歯の歯冠咬合面中央より、象牙細管の走行方向を試料の長軸に対して垂直または平行に規定した棒状試料を採取した。象牙質棒状試料は、濃度 0~1M, pH3~8, 温度 25~80°C, および作用時間 0~120分の異なる条件のカルボジイミド水溶液に浸漬した後、機械的強度試験に供した。

2) 機械的強度の解析—曲げ試験および引張り試験：カルボジイミド処理した象牙質棒状試料を金属ホルダーに固定し、万能強度試験機（オートグラフAG-IS、島津製作所）あるいは卓上型万能強度試験機（イージーテスト、島津製作所）にて、試料が破壊に至るまで圧縮負荷を加え、破壊荷重および変位量を記録し、曲げ強さ、引張り強さおよび破壊エネルギーを算出した。さらに、走査電子顕微鏡（JSM9-840A, JOEL）を用いて観察倍率 200~5000倍にて曲げ試験と微小引張り試験の試料の破断面を観察した。

3) 象牙質の機械的強度の相関の解析：上述のカルボジイミド処理した象牙質曲げ強さおよび引張り強さとの相関を統計学的に検索し、象牙質強化に最も有効なカルボジイミド処理条件を確定した。

### [水溶性カルボジイミド処理による象牙質の

### 微細構造変化の分析]

1) ナノインデンテーション：象牙質円盤状試料を用いて、ナノインデーター（Nano Indenter SA2、MTS）にて荷重 0.4mN にて 1 試料につき 100 個のインデンテーションを行った。得られた微小硬度および弾性係数と圧痕から象牙細管までの距離の係数に着目し、カルボジイミド処理によって象牙質の微細構造のどの部位に機械的性質の変化が生じるかを分析した。

2) エックス線回折による象牙質コラーゲンの分子配列の分析：カルボジイミド処理前後の象牙質のコラーゲンの分子配列を、回転対陰極型 X 線発生装置（UltraXI8、リガク）を搭載したイメージングプレート X 線検出器（R-AIS IV、リガク）を用いてエックス線回折を行い、カルボジイミド処理によるコラーゲン線維内部の構造変化を解析した。

3) 顕微赤外分光分析による象牙質コラーゲン分子の基軸構造の分析：約 30μm の薄切切片に加工した後、カルボジイミド処理した象牙質試料を、顕微赤外分光分析装置（FTIR620+IR T30、Jasco）にて 4000~1000cm<sup>-1</sup> 波長のうち、特にコラーゲン・トリペプチドの基軸構造であるアミド I、II および III の変化に注目して比較した。

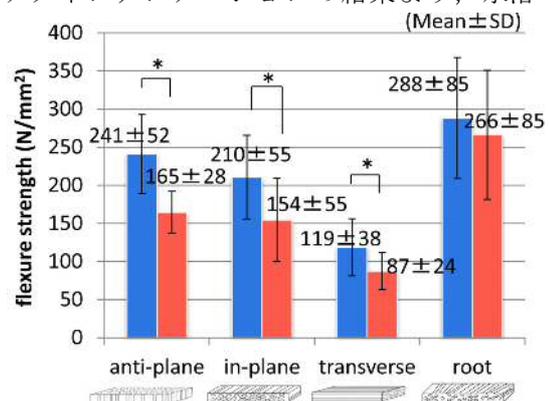
4) 顕微ラマン分光分析による象牙質コラーゲンの分子構造の分析：カルボジイミド処理前後の象牙質のコラーゲンの分子配列の変化を、顕微レーザーラマン分光分析装置（Raman-11、ナノフoton）にてラマンスペクトルを採取し分析した。

## 4. 研究成果

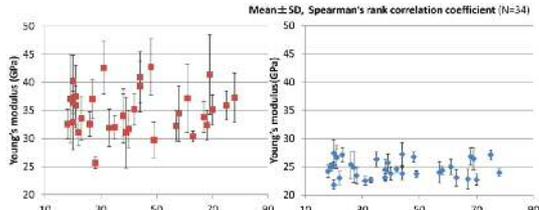
ヒト象牙質棒状試料を 0.1M 水溶性カルボジイミドにて 40~50°C で 10 分処理することにより、3 点曲げ応力が異方性を示しながら変化することが明らかとなった（下図）。歯根は、細管方向の規定が困難なため、有意差が現れなかったものと考えられる。

また、破壊エネルギーも同様の挙動を示すことが明らかとなった。

ナノインデンテーションの結果より、水溶

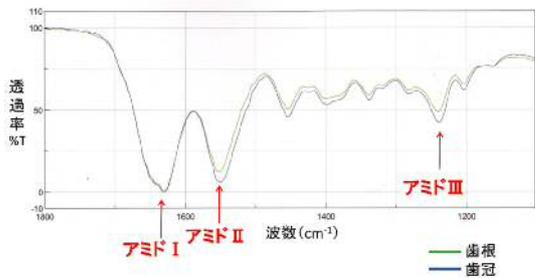


性カルボジイミド処理を施すことにより、有意に弾性係数が増加した（下図）。



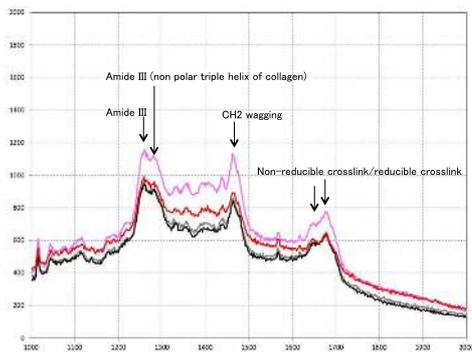
エックス線回折の結果より、水溶性カルボジイミド処理後にはコラーゲンの配向性が向上することが分かった。

また、顕微赤外分光分析による象牙質コラーゲン分子の基軸構造を分析したところ、水溶性カルボジイミド処理前後でアミド I, II, III に変化は認められず、基軸構造以外の変化である可能性が示された（下図）。



さらに、顕微ラマン分光分析による水溶性カルボジイミド処理前後の象牙質コラーゲンの分子構造の分析を行ったところ、アミド III とクロスリンク比に有意な変化は認められなかった。

以上より、象牙質に水溶性カルボジイミド



を作用させると、その機械的強度が上昇することがわかった。その強化メカニズムは、象牙質の主要な有機成分である type I コラーゲンの基軸構造以外の部分で水分子が関わる変化による新たな架橋形成によるためであることが示唆された。

##### 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 6 件）

1. Hayashi M, Furuya Y, Minoshima K, Saito M, Marumo K, Nakashima S, Hongo C, Kim J, Ota T, Ebisu S. Effects of heating on the mechanical and chemical properties of human dentin. *Dental Materials*, 2012, 28: 385-391.

DOI: 10.1016/j.dental.2011.11.015（査読あり）

2. Momoi Y, Hayashi M, 他(10人中2番目). Clinical guidelines for treating caries in adults following a minimal intervention policy-Evidence and consensus based report. *Journal of Dentistry*, 2012, 40: 95-105.

DOI: 10.1016/j.jdent.2011.10.011（査読あり）

3. Ito A, Hayashi M, Hamasaki T, Ebisu S. How regular visits and preventive programs affect onset of adult caries. *Journal of Dental Research*, 2012, 91: 52S-58S.

DOI: 10.1177/0022034511435701（査読あり）

4. Ito A, Hayashi M, Hamasaki T, Ebisu S. Risk assessment of dental caries by using Classification and Regression Trees. *Journal of Dentistry*, 2011, 39: 457-463.

DOI: 10.1016/j.jdent.2011.04.002.（査読あり）

5. Hayashi M, Fujitani M, Yamaki C, Momoi Y. Ways of enhancing pulp preservation by stepwise excavation - A systematic review. *Journal of Dentistry*, 2011, 39: 95-107.

DOI: 10.1016/j.jdent.2010.10.012.（査読あり）

6. Iwami Y, Yamamoto H, Hayashi M, Ebisu S. Relationship between laser fluorescence and bacterial invasion in arrested dentinal carious lesions. *Lasers in Medicine and Science*, 2011, 26: 439-444.

DOI: 10.1007/s10103-010-0798-5.（査読あり）

〔学会発表〕（計 15 件）

1. 林 美加子 (招待講演): バイオメカニクスの視点でとらえる高齢者の歯根破折. 第 137 回日本歯科保存学会秋季学術大会, 2012 年 11 月 22 日, 広島市.

2. 岩見行晃, 山本洋子, 林 美加子: 慢性う蝕の進行状態の評価におけるう蝕歯質の硬さ測定の有効性. 第137回日本歯科保存学会秋季学術大会, 2012年11月22日, 広島市.

3. Takahashi Y, Okamoto M, Yoshioka S, Hayashi M: Effect of degraded dentin matrix proteins induced by matrix metalloproteinase

molecules on pulp cells function. 第137回日本歯科保存学会秋季学術大会, 2012年11月22日, 広島市.

4. Kitagawa H, Imazato S, Hayashi M: Development of rechargeable CPC-loaded hydrogel particles for long-term delivery of antimicrobials. The First Japan-Thailand-Korea Joint Symposium on Translational Research in Oral Sciences, November 16, 2012, Bangkok, Thailand.

5. 林 美加子(招待講演): 口腔外傷治療最前線「歯根破折への保存的対応 vs 外科的対応」. 日本歯科医学会総会分科会プログラム (日本外傷歯学会) 2012年11月12日, 大阪市.

6. 林 美加子(招待講演): 臨学一体の日本歯内療法学会がお知らせする最新の歯内療法「先進医療: X線CT画像診断に基づく手術用顕微鏡を用いた歯根端切除手術」. 日本歯科医学会総会分科会プログラム (日本歯内療法学会), 2012年11月11日, 大阪市.

7. Yamaguchi M, Noiri Y, Asahi Y, Maezono H, Yamamoto R, Kuremoto K, Hayashi M, Ebisu S: Dispersal of Porphyromonas gingivalis biofilm induced by environmental factors and proteases. 6th ASM Conference on Biofilms, October 3, 2012, Miami, USA.

8. 古谷優, 武田侑子, 和田陽子, 辻本恭久, 林 美加子, 恵比須繁之: 紫外線照射による象牙質強化効果メカニズムの化学的解析. 第136回日本歯科保存学会, 2012年06月29日, 宜野湾市.

9. 熊 宇, 古谷優, 武田侑子, 林 美加子, 今里聡: 光透過型ファイバーポスト修復の根部における接着状態の評価. 第136回日本歯科保存学会, 2012年06月29日, 宜野湾市.

10. 武田侑子, 古谷優, 石本卓也, 中野貴由, 林 美加子: 象牙質の構成成分および微細構造における個体差が機械的性質に及ぼす影響. 第136回日本歯科保存学会, 2012年06月28日, 宜野湾市.

11. Furuya Y, Takeda Y, Hayashi M: Chemical changes through UV strengthening of human dentin. 90th International Association for Dental Research General Session, June 20, 2012, Iguazu, Brazil.

12. Hayashi M (招待講演): Best ways to treat pulpless teeth Practical strategies to prevent root fracture. International Symposium for Adhesive

Dentistry, May 19, 2012, Tokyo.

13. Hayashi M (招待講演): How to achieve the best oral cosmetic appearance while preserving maximum natural tissues. 28th American Academy of Cosmetic Dentistry. May 4, 2012, Washington DC, USA.

14. 岩見 行晃, 山本 洋子, 林 美加子, 恵比須繁之: う蝕病巣におけるう蝕歯質の硬さと DIAGNOdent による評価との関係. 第135回日本歯科保存学会, 2011年10月21日, 大阪市.

15. 松下真美, 三浦治郎, 竹重文雄, 岩見行晃, 阪上隆英, 和泉遊以, 林 美加子, 今里聡, 恵比須繁之: 赤外線サーモグラフィを用いた歯根破折診断法の開発. 第135回日本歯科保存学会, 2011年10月20日, 大阪市.

〔図書〕(計1件)

1. 今里 聡, 林 美加子, 伊藤 中 (編著): 削るう蝕・削らないう蝕 クインテッセンス出版, 東京, 2012, pp1-215

6. 研究組織

(1) 研究代表者

林 美加子 (ハヤシ ミカコ)  
大阪大学・大学院歯学研究科・教授  
研究者番号: 40271027

(2) 連携研究者

斎藤 充 (サイトウ ミツル)  
東京慈恵会医科大学・医学部・准教授  
研究者番号: 50301528