

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 7 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462956

研究課題名(和文)超微構造解析を用いた歯根破折発生メカニズムの解明

研究課題名(英文)Morphological evaluation of dentinal microcracks with human aging

研究代表者

竹重 文雄 (Takeshige, Fumio)

大阪大学・歯学部附属病院・教授

研究者番号：60206969

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：象牙質の微細構造が、破折が伸展する過程においてどのような影響を与えているかを明らかにするため、亀裂の先端部分の状態を未脱灰において透過型電子顕微鏡および電子線トモグラフィーにより3次元構造を観察し亀裂がどのように進展していくかを明らかにすることを目的とした。

歯の亀裂の先端部の微細構造は、超高压電子顕微鏡を用いたトモグラフィー撮影法を行えることにより厚い未脱灰試料の観察を可能にしようというものであり、さらに透過型電子顕微鏡の特徴である電子回折法を用いたアパタイト結晶の配向性と亀裂との相関およびマルチスケールな力学的視野と超微細な構造学的視野を併せた多面的解析を行った。

研究成果の概要(英文)：Several studies have investigated the effect of aging on the mechanism of crack propagation. They examined the cracked surface using scanning electron microscopy (SEM) to evaluate the structural modifications of dentinal microcracks with aging. Very few studies have utilized transmission electron microscopy (TEM) for sectional observation of microcracks. The purpose of this study were to morphologically evaluate the relation between dentinal microcrack propagation and human aging.

In young dentin, dentinal microcracks are propagated without interference in PTD. In contrast, in aged dentin, PTD is mature with hydroxyapatite, which prevents microcracks from propagating and they deflect around PTD. With this specimen fabrication method and TEM observation, it is possible to visualize ultra-structural propagation of microcracks within dentin, and evaluate dentinal microcrack propagation related to dentin microstructural modifications with aging.

研究分野：保存修復

キーワード：象牙質 破折 コラーゲン 加齢

1. 研究開始当初の背景

歯の破折は、臨床における予後の悪い病態であるが、その発生・進展機序に関しては、発生原因の複雑さや破折モデルの作製が困難であることなどから活発に行われているとはいえない。申請者らは、これまでに歯根の微小破折を、生体への侵襲の少ない赤外線サーモグラフィを用いて検出する手法開発を行っており、今後の歯根破折の研究に有用となる歯根破折モデルの開発や赤外線サーモグラフィによる微小破折検出に成功するなど、臨床における破折検出技術の一つとして大きな成果を出すことができた。今回、歯根破折の検出に関する一連の研究を進める中で、歯の破折の発生機序について考察を行い、その微細構造の形態学的な検討、破折の起点となる微小亀裂の発生、進展から破折へと至る一連の様相の分析が、歯の破折メカニズムの解明と予防法の確立において重要であると考えた。

2. 研究の目的

象牙質は、象牙細管の周囲に石灰化度の低い管周象牙質にさやのように囲まれ、細管の間にコラーゲン繊維を多く含む管間象牙質が存在するという複雑な構造をとっている。微細構造が、破折が伸展する過程においてどのような影響を与えているかを明らかにするため、亀裂の先端部分の状態を未脱灰において透過型電子兼美容および電子線トモグラフィにより3次元構造を観察し、さらに得られた象牙質の形状データを用いて外部応力下での亀裂がどのように進展していくかを明らかにすることを目的とした。

歯の破折には、顎骨や歯といった比較的大きなスケールから、エナメル小柱、象牙細管といったミクロのスケールまでの様々な構造が関与する。スケール格差を

考慮した解析は非常に複雑であり、歯科領域ではこれまでほとんど行われていない。また、歯の亀裂の先端部の微細構造は、光学顕微鏡では分解能の問題で捕らえることが難しいが、本研究は、超高压電子顕微鏡を用いたトモグラフィ撮影法を行えることにより厚い未脱灰試料の観察を可能にしようというものであり、さらに透過型電子顕微鏡の特徴である電子回折法を用いたアパタイト結晶の配向性と亀裂との相関およびマルチスケールな力学的視野と超微細な構造学的視野を併せた多面的解析を行った。

3. 研究の方法

1) 象牙質における AGEs 沈着に関連した免疫染色及び免疫電子顕微鏡観察の被験歯としてヒトの抜去歯(若年、高齢)を使用した。歯軸に対し垂直方向に1mmの厚さにダイヤモンドソーにて切り出し、セメントエナメル境により歯冠部と歯根部の象牙質に分けた。試料に固定処理後、アルコール脱水および樹脂包埋を行った。亀裂進展観察は未脱灰にてウルトラミクローム(UltratomeV: LKB社製)及びダイヤモンドナイフにて100nm厚の超薄切片を作製し、透過型電子顕微鏡(H800: Hitachi)にて観察を行った。

免疫組織化学的分析及び免疫電子顕微鏡法に関して、パラフォルムにおける浸漬固定後、脱灰操作を10%EDTAにて1週間処理した後、抗AGE抗体を用いた免疫染色法、および金コロイド標識2次抗体を用いた免疫電子顕微鏡法にて評価を行った。

2) 破折象牙質の電子顕微鏡による観察としてヒトの抜去歯を歯軸に対し垂直方向に1mmの厚さにダイヤモンドソーにて切り出した。エナメル象牙境により歯冠部の象牙質と歯根部の象牙質とに分け、さらに歯冠部の歯髓側とエナメル質側、歯根部の歯髓側とセメント質側の4つのグループに分けた。

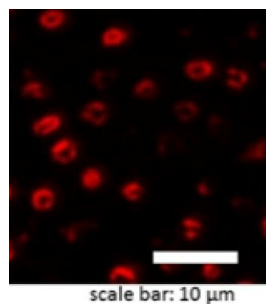
試料を2%パラホルムアルデヒド、2.5%グルタルアルデヒドにて固定処理を行い、アルコール脱水後エポキシ樹脂(Quetol812、日新EM)にて覆い、楔状の圧子で負荷をかけることで亀裂を人工的に作製した。実体顕微鏡で亀裂の有無を確認した後、再度エポキシ樹脂にて試料全体の包埋を行った。1回目のエポキシ樹脂包埋は亀裂発生時に試料の形態を保持するために、2回目は亀裂保存のために行われた。試料を、亀裂を中心に約0.5mm角にトリミングを行い、超薄切片のために再度エポキシ樹脂にて包埋した。ウルトラミクローム及びナノーム(酒井電子顕微鏡応用研究所)にて100nm厚の超薄切片を作製し、透過型電子顕微鏡(H800、Hitachi)および超高压電子顕微鏡(H3000: Hitachi)にて観察を行った。

4. 研究成果

亀裂進展パターンが加齢により変化した原因として、加齢により象牙細管周囲のコラーゲン線維間にAGEsが沈着および石灰化による亀裂進展経路の変化したことがみとめられた。

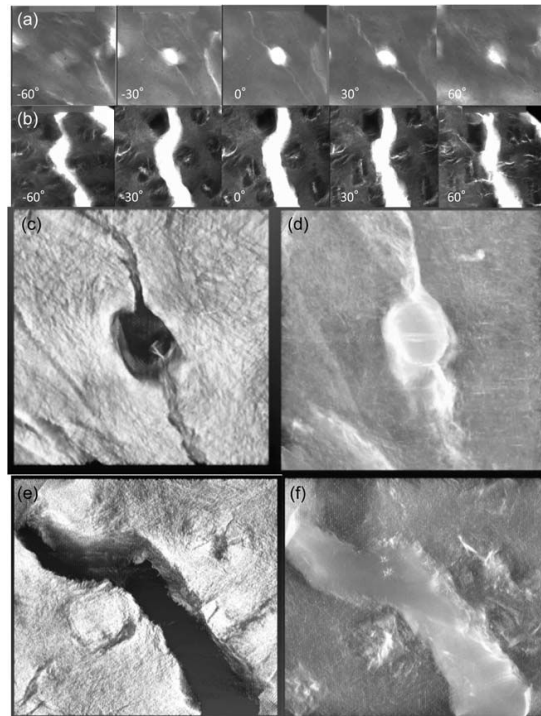
脱灰象牙質における抗AGE抗体による免疫組織化学的染色で(下図)は、

歯髓腔の周囲の象牙前質の外側にコラーゲン線維の糖化を示す染色像が特に高



齢の象牙質において顕著に見られた。その分布位置はマクロ的視点で歯冠側において歯髓周囲に特に多く存在するのに対して、歯根部においては歯髓側からセメント質側に向かって緩やかな減少することが分かった。さらに免疫電子顕微鏡像において微細領域での局在を調べたところ、高齢者にお

いて象牙細管周囲のコラーゲン線維により多くのAGEsが沈着している様相が確認された。特に管間象牙質における亀裂進展にはコラーゲンの弾性変化が大きく関与し、亀裂進展抵抗もコラーゲン線維の変化により大きな影響を受けると考えられる。コラーゲン線維に糖化反応が起こることで弾性の低下だけでなく色調の変化(browning)といった加齢に伴い起こる様々な変化がとの関連



が示唆された。

象牙質亀裂の電子顕微鏡観察(上図)においては、若年者では亀裂は象牙細管に達すると細管に亀裂が交通し、進入方向の反対側から亀裂が再度広がっていくのに対し、高齢者の象牙質においては加齢により厚くなった管周象牙質をまわりこむように進む像が多く観察された。また細管と細管を繋ぐ管間象牙質部位においても破折様相に違いが見られ、コラーゲン線維の物性の違いと思われる亀裂進展の差が認められた。

これらの結果より、加齢に伴う基質蛋白の修飾と石灰化の進行による亀裂進展経路の変化が原因と成り加齢に伴う亀裂進展に変化が現れることが分かった。

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8件)

1. S Fukushima, M Shimizu, J Miura^{*}, Y Matsuda, M Kubo, M Hashimoto, T Aoki, F Takeshige, and T Araki, Decrease in fluorescence lifetime by glycation of collagen and its application in determining advanced glycation end-products in human dentin, *Biomedical Optics Express*, 23;6(5):1844-56, 2015.
2. Higashi M, Matsumoto M, Kawaguchi A, Miura J, Minamino T, Kabetani T, Takeshige F, Mine A^{*}, Yatani H: Bonding effectiveness of self-adhesive and conventional-type adhesive resin cements to CAD/CAM resin blocks. Part 1: Effects of sandblasting and silanization, *Dent Mater J*: in press.
3. Kawaguchi A, Matsumoto M, Higashi M, Miura J, Minamino T, Kabetani T, Takeshige F, Mine A^{*}, Yatani H: Bonding effectiveness of self-adhesive and conventional-type adhesive resin cements to CAD/CAM resin blocks. Part 2: Effect of ultrasonic and acid cleaning, *Dent Mater J*: in press. (IF: 0.968)
4. Jiro Miura^{*}, Kantaro Nishikawa, Mizuho Kubo, Shuichiro Fukushima, Mamoru Hashimoto, Fumio Takeshige, Tsutomu Araki, Accumulation of advanced glycation end-products in human

dentin. *Archives of Oral Biology* 59(2):119-24, 2014

5. Jiro Miura^{*}, Kantaro Nishikawa, Mizuho Kubo, Shuichiro Fukushima, Mamoru Hashimoto, Fumio Takeshige, Tsutomu Araki, Accumulation of advanced glycation end-products in human dentin. *Archives of Oral Biology*. 2013 in press (IF:1.549)
6. Mizuho Kubo, Jiro Miura^{*}, Takao Sakata, Ryuji Nishi, Fumio Takeshige, Structural Modifications of Dentinal Microcracks with human aging. *Microscopy*, 62:555-561, 2013
7. Mariko Matsumoto, Jiro Miura^{*}, Fumio Takeshige, Hirofumi Yatani, Mechanical and morphological evaluation of the bond-dentin interface in direct resin core build-up method, *Dental Materials*, (29) 287-293, 2013
8. Matsushita-Tokugawa M, Miura J^{*}, Iwami Y, et al, Detection of dentinal microcracks using Infrared Thermography, *Journal of Endodontics*, (39)88-91, 2013

[学会発表](計16件)

1. 西川貫太郎、福島修一郎、荒木勉 三浦治郎 加齢に伴う象牙細管近傍における AGEs 蓄積の観測 応用物理学会関西支部 2013年10月9日 奈良先端科学技術大学院大学
2. . 久保美寿穂、三浦治郎、清水真人、松田祐輔、長島正、竹重文雄 ヒト象牙質におけ

る微小亀裂進展とコラーゲン線維の加齢変化 第 139 回日本歯科保存学会 2013 年 10 月 17, 18 日 秋田市

3. 三浦治郎 (招待講演) 第 35 回医学生物学電子顕微鏡学会近畿支部会「硬いサンプルを切ってみる - 未脱灰硬組織への挑戦」
場 所: 奈良先端科学技術大学院大学 2013 年 11 月 16 日

4. . 中谷早希、峯篤志、松本真理子、岩下太一、南野卓也、三浦治郎、矢谷博文
1 step システムを用いた象牙質接着における NaOCl およびスルホン酸塩を用いた前処理の効果 日本補綴歯科学会関西支部 大阪 2013 年 11 月 23 日

5 .Nishikawa Kantaro, Fukushima Shuichiro, Araki Tsutomu, Kubo Mizuho, Miura Jiro, Takehige Fumio, Distribution of Advanced glycation end-products in human dentin measured by fluorescence lifetime imaging ICBME Singapore 2013 12/4-7

6 .M. Shimizu, J. Miura, M. Kubo, Y. Matsuda, S. Fukushima, F. Takehige, and T. Araki, Determination of Advanced Glycation End-products in human dentin. IADR/PER congress September 11, 2014, Dubrovnik, Croatia

7. 久保美寿穂、三浦治郎、清水真人、松田祐輔、長島正、竹重文雄、西川貴太郎、荒木勉 ヒト象牙質微小亀裂進展と加齢による糖化最終生成物 (AGES) 沈着の変化 大阪大学歯学会 第 60 回総会 第 117 回例会、2014 年 1 月 9 日、大阪

8. 久保美寿穂、三浦治郎、清水真人、松田祐輔、竹重文雄、坂田孝夫、西竜治、保田英

洋 象牙質微小亀裂進展様相の形態学的評価 医学生物学電子顕微鏡技術学会 第 30 回学術講演会および総会、2014 年 5 月 24 日、大阪

9. 松田祐輔、三浦治郎、清水真人、久保美寿穂、竹重文雄、坂田孝夫 西竜治: 齲蝕罹患象牙質における基質蛋白の多面的評価 第 30 回 医学生物学電子顕微鏡技術学会学術講演会および総会、2014 年 5 月 24 日、大阪

10. 清水真人、三浦治郎: 象牙質基質タンパク質の糖化による加齢変化 第 54 回 歯科基礎医学会学術大会、2014 年 9 月 27 日、福岡

11. 松下真美、久保美寿穂、大谷直矢、三浦治郎、竹重文雄、坂上隆英、林美加子、赤外線サーモグラフィを用いた歯根破折診断法の検出限界、日本歯科保存学会、2014 年 10 月 31 日 山形

12. Yusuke Matsuda; Jiro Miura; Mizuho Kubo; Masato Shimizu; Fumio Takehige; Tsutomu Araki , Localization And Quantification Of Advanced Glycation End-Products In Dentinal Caries International Association for Dental Research, Boston 2015, 3/12

13. Jiro Miura; Yusuke Matsuda; Masato Shimizu; Mizuho Kubo; Fumio Takehige; Sakiko Enomoto; Shigeo Arai, Ultrastructural Morphological Evaluation of Non-demineralized Human Dentin Using FIB/SEM Tomography, International Association for Dental Research, Boston 2015, 3/13

14. Asuka Kawaguchi; Mami Higashi; Mariko Matsumoto; Jiro Miura; Atsushi Mine; Hirofumi Yatani Effects of Ultrasonic Cleaning and Etching on CAD/CAM Resin Bonding, International Association for Dental Research, Boston 2015, 3/14

15. Effects of Sandblasting and Silanization on CAD/CAM Resin Bonding
Mami Higashi; Asuka Kawaguchi; Mariko Matsumoto; Jiro Miura; Atsushi Mine; Hirofumi Yatani, International Association for Dental Research, Boston 2015, 3/14

16. 清水 真人, 三浦 治郎, “象牙質コーゲンの糖化と加齢変化” 歯科基礎医学会、2015年9月11日 朱鷺メッセ 新潟市

6. 研究組織

(1) 研究代表者

竹重 文雄 (Fumio Takeshige)
大阪大学歯学部附属病院 教授
研究者番号: 60206969

(2) 研究分担者

三浦 治郎 (Miura Jiro)
大阪大学歯学部附属病院 助教
研究者番号: 70437383

西 竜治 (Nishi Ryuji)
大阪大学超高压電子顕微鏡センター准教授
研究者番号: 40243183