

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 3 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25560196

研究課題名(和文) 歯は老化するのか - 光学・力学・組織学による検証と考察 -

研究課題名(英文) Optical, mechanical, and histological analyses of teeth aging

研究代表者

荒木 勉 (Araki, Tsutomu)

大阪大学・基礎工学研究科・教授

研究者番号：50136214

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：老化の原因のひとつである「糖化」が、象牙質中のコラーゲン線維に及ぼしている影響を終末糖化産物(AGEs)の蓄積に着目して検討した。脱灰した象牙質中のAGEsは加齢とともに蓄積量が増加し、象牙細管近傍への蓄積が顕著であることを免疫染色により確認した。また、加齢に伴い脱灰象牙質が硬化することを押し込み試験で確認した。これらの結果は、変化に乏しい組織と考えられていた歯でも糖化は起こっており、老化が進行することを示している。AGEsには蛍光性をもつものがあり、蛍光寿命計測による老化の評価が有効であることも確認できた。

研究成果の概要(英文)：This project revealed the effect of glycation, which causes aging of biological tissue, to teeth. The results of immunostaining of advanced glycation endproducts (AGEs) showed that accumulation of AGEs in dentine increased with aging, especially around dental tubule. Moreover, hardness of demineralized dentin increased with aging. These results indicate that teeth aging is related to glycation progress, and AGEs cross-linkage to collagen in dentine affects mechanical property of teeth. To evaluate the teeth aging, fluorometry is effective because fluorescent AGEs accumulation in dentine was confirmed, and fluorescent lifetime of dentine decreased with the glycation progress.

研究分野：計測工学

キーワード：象牙質 老化 糖化 メイラード反応 コラーゲン 蛍光 押し込み試験

1. 研究開始当初の背景

「歯の老化」とはいったい何のことか依然疑問のままである。歯科医師の間では「年齢を重ねると歯は脆くなる」ということはある程度共通の認識になっているが、科学的なバックグラウンドが確立されていない。

歯は生体組織であり、象牙質の30%がコラーゲンである以上、全身の老化と同期すると考えるのが当然であろう。コラーゲン線維が組織中の糖の働きで非酵素的なメイラード反応を起こした結果、AGEs (advanced glycation endproducts) と呼ばれる分子間架橋が形成される。近年になり、AGEs により修飾された蛋白質が糖尿病性血管合併症や、動脈硬化などの多くの疾患病変部位に沈着していることがわかり、糖化反応は老化現象に関連した全身疾患 (認知症、癌、高血圧、動脈硬化症など) に関与していることが明らかになってきている。

2. 研究の目的

本研究の目的は、老化の原因のひとつである「糖化」が、象牙質中のコラーゲン線維に及ぼしている影響とその糖化過程を多面的に解明し、歯の老化について議論を進めることである。具体的には、象牙質にはAGEsが蓄積されるのか、AGEsの蓄積により架橋が形成されるとすれば材料特性は変化するのか、蛍光特性によりAGEsの蓄積が評価できるのかを検証した。

3. 研究の方法

(1) 象牙質中のAGEsの検出

試料として、大阪大学歯学部倫理委員会の承認のもので、同病院から齲歯がない第三大臼歯を入手した。年齢を若年群 (18 - 26 歳) と老年群 (68 - 76 歳) に分類し、それぞれ頬舌方向の切片を作製後、EDTA で脱灰した。

(2) 材料特性の評価

小型卓上試験機 (EZ-S, 島津製作所) を用いて、脱灰切片の押し込み試験を行った。

(3) 蛍光特性の評価

AGEs の中には蛍光性をもつ物質が存在するため、AGEs の蓄積を蛍光特性の変化として検出できる可能性がある。そこで、蛍光分光光度計 (RF-5300, 島津製作所) で蛍光スペクトルを、共焦点レーザー顕微鏡 (DIGITAL ECLIPSE C1, Nikon) で蛍光強度画像を、ナノ秒蛍光寿命測定顕微鏡 (本研究で開発) で蛍光寿命画像をそれぞれ取得して、AGEs 蓄積と蛍光特性の関係について検討した。

蛍光寿命を算出するために、各測定点で取得した減衰波形 $F(t)$ を式 (1) に示すように AGEs (蛍光寿命 τ_a) とその他の成分 (蛍光寿命 τ_r) の 2 成分系で近似し、平均蛍光寿命 τ_D (式 (2)) を画像化の指標とした。

$$F(t) = A_a \exp\left(-\frac{t}{\tau_a}\right) + A_r \exp\left(-\frac{t}{\tau_r}\right) \quad (1)$$

$$\tau_D = \frac{A_a \tau_a + A_r \tau_r}{A_a + A_r} \quad (2)$$

4. 研究成果

(1) AGEs 免疫染色

免疫染色画像 (図 1) では、高齢者の象牙質には若年者に比べて AGEs が多く蓄積されていた。また、高齢者では歯冠部よりも歯根部の蓄積の方が多かった。さらに細部を調査すると、AGEs の蓄積は象牙細管壁で顕著に起こっていた。これらの結果は、加齢に伴う AGEs の蓄積は歯でも起こっており、象牙細管内の組織液中の糖が関与していることを示唆している。

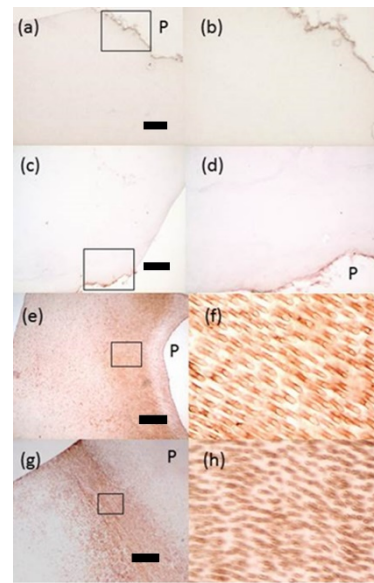


図 1 象牙質における AGEs の蓄積

若年者の歯冠部 (a, b) と歯根部 (c, d) および老年者の歯冠部 (e, f) と歯根部 (g, h) の切片を AGE 抗体で染色。スケールバー: 100 μm , 右列は拡大図

(2) 脱灰象牙質の材料特性の変化

図 2 に 19 歳歯と 72 歳歯の押し込み試験の結果を示す。他の年齢の歯も同様に、老年群のほうが若年群よりも硬くなり、硬化は歯冠部よりも歯根部で顕著にあらわれた。従来の歯の研究ではハイドロオキシアパタイトの存在のため、加齢による機械的特性変化はないと理解されていた。同じ硬組織でも骨においては、骨密度が低下しないのに骨折しやすいなどの症状が現われる。これには骨のコラーゲン線維がメイラード反応を起こし、ヤング率が増加したことが原因であり、当然歯でも起こりうる。しかし歯は水晶と同等の硬さのエナメル質で覆われているため、日常生活において歯自体の老化はなかなか理解できない。本研究の結果は、全身の老化と同期した老化として歯の機械特性も変化することを示している。前節のとおり AGEs は加齢とともに蓄積するので、この架橋により機械特性が変化すると推察される。

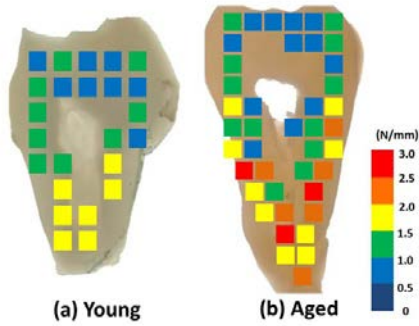


図2 脱灰象牙質の硬さ

(3) 蛍光特性の変化

象牙質切片に対して各部位の平均蛍光寿命を求め、マッピングした結果を図3に示す。高齢者の歯(A)は若年者(B)に比べてわずかながら蛍光寿命が短くなっていること、またいずれも歯根部の蛍光寿命が歯冠部に比べて短くなっていることが確認できた。これらの蛍光特性の変化が糖化によるものかを確認するために、同一歯の別切片を0.1M リボース溶液に37°Cで6週間振盪させて人工的にAGEsを産生させると、両者とも蛍光寿命が激減した(C, D)。AGEsが短い蛍光寿命をもつと仮定すると、得られたマッピング画像はAGEsの蓄積情報をあらわすものと考えられる。

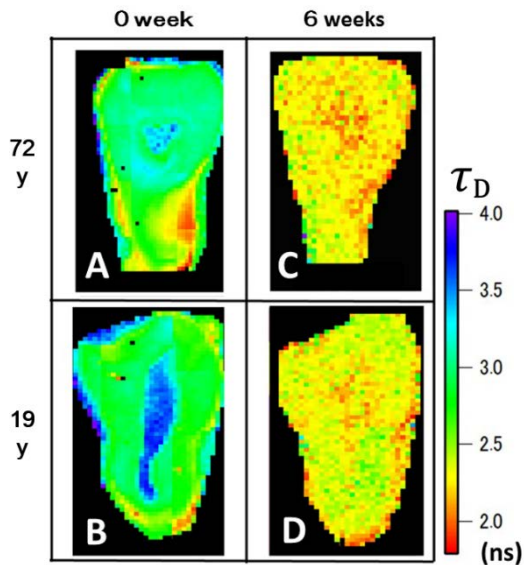


図3 脱灰象牙質の硬さ

さらに蛍光寿命の減少の要因を明らかにするために、単純な組成のコラーゲンをを用いた実験を行った。細胞培養用のコラーゲンを、象牙質切片と同様に37°Cで6週間振盪させて蛍光寿命の経時変化を測定した。

図4は水銀ランプで励起して撮影した培養ディッシュ内のコラーゲンの蛍光画像である。ディッシュ基材からの蛍光が認められるが、ゲルを作製した中央のガラス底部にリン酸緩衝液(A)またはリボース溶液(B)を注入した領域では蛍光の発光はみられなかった。

リボース無添加群(C下段)では、ゲル領域の蛍光強度は変化がないのに対し、リボース添加群(C上段)では明確に蛍光強度が増加した。蛍光スペクトル(図5)の経時変化はなかったが、強度の増加は確認できた。蛍光減衰波形の測定結果(図6)からは、リボース振盪時間と共に減衰が早くなることが確認できた。この時の平均蛍光寿命は、3.2 ns(リボース無添加対照)から2.9 ns(6週間)に減少した。また、リボースとの反応後のコラーゲン中にはAGEs(250 kDa)が存在することをウエスタンブロッティング法で確認した。以上の結果からコラーゲンの糖化によって生成されるAGEsのなかには平均蛍光寿命を減少させる短寿命のものが、その蓄積は蛍光寿命計測で検出できることが確認できた。象牙質切片で得られた結果も同様にAGEsの蓄積を示していると解釈できるため、糖化の検出に蛍光寿命測定が有効であるといえる。

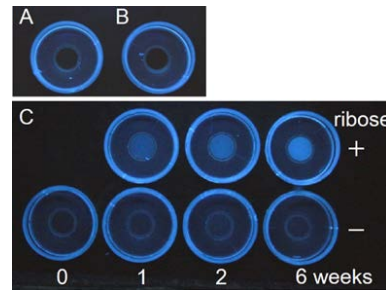


図4 コラーゲンの蛍光画像

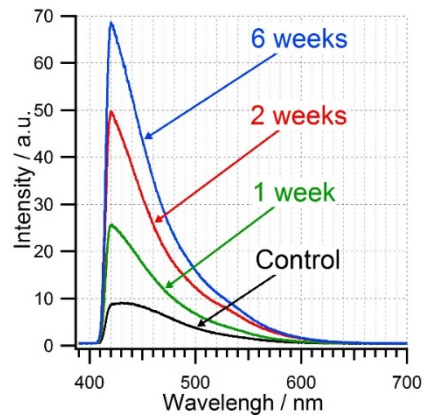


図5 コラーゲンの蛍光スペクトル

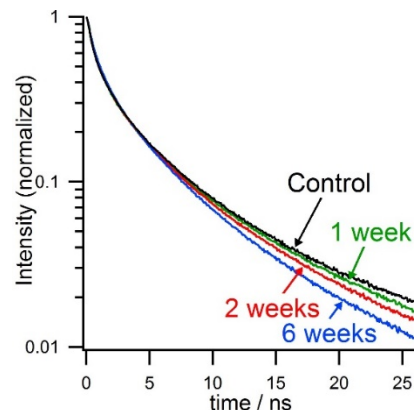


図6 コラーゲンの蛍光減衰波形

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計2件)

- ① Shuichiro Fukushima, Masato Shimizu, Jiro Miura, Yusuke Matsuda, Mizuho Kubo, Mamoru Hashimoto, Takuya Aoki, Fumio Takeshige, and Tsutomu Araki, Decrease in fluorescence lifetime by glycation of collagen and its application in determining advanced glycation end-products in human dentin, *Biomedical Optics Express*, 査読有, Vol. 6, 2015, 1844-1856
DOI:10.1364/BOE.6.001844
- ② Jiro Miura, Kantaro Nishikawa, Mizuho Kubo, Shuichiro Fukushima, Mamoru Hashimoto, Fumio Takeshige, Tsutomu Araki, Accumulation of advanced glycation end-products in human dentine, *Archives of Oral Biology*, 査読有, Vol. 59, 2014, 119-124
DOI:10.1016/j.archoralbio.2013.10.012

〔学会発表〕(計7件)

- ① 荒木勉, 歯は老化するのか?, 日本機械学会 第27回バイオエンジニアリング講演会, 2015年1月9日, 朱鷺メッセ新潟コンベンションセンター(新潟・新潟市)
- ② Tsutomu Araki, Non-invasive visualization of collagen by laser induced second harmonic generation light and its application to tissue diagnosis, Fourth Japan-Switzerland Workshop on Biomechanics, 2014年9月1日, 志摩観光ホテル クラシック(三重・志摩市)
- ③ Shuichiro Fukushima, Observation of extracellular collagen remodeling by second-harmonic-generation microscopy, 7th World Congress of Biomechanics, 2014年7月6日, Hynes Convention Center (Boston, USA)
- ④ Kantaro Nishikawa, Distribution of Advanced glycation end-products in human dentin measured by fluorescence lifetime imaging, The 15th International Conference on Biomedical Engineering, 2013年12月6日 (Singapore)
- ⑤ 久保美寿穂, 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, 日本歯科保存学会 2013年度秋季学術大会, 2013年10月17日, (秋田・秋田市)

〔その他〕

ホームページ等

<http://sml.me.es.osaka-u.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

荒木 勉 (ARAKI, Tsutomu)
大阪大学・基礎工学研究科・教授
研究者番号: 50136214

(2) 研究分担者

福島 修一郎 (FUKUSHIMA, Shuichiro)
大阪大学・基礎工学研究科・助教
研究者番号: 40362644

三浦 治郎 (MIURA, Jiro)
大阪大学・歯学部附属病院・助教
研究者番号: 70437387