

平成 22 年 4 月 25 日現在

研究種目：基盤研究 (B)
研究期間：2007-2009
課題番号：19390482
研究課題名 (和文) 加熱による象牙質の緻密化原理に基づく失活歯強化法の開発
研究課題名 (英文) How heat treatment reinforces human dentin in pulpless teeth

研究代表者
林 美加子 (HAYASHI MIKAKO)
大阪大学・歯学部附属病院・講師
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、加熱による象牙質の強化効果を検索した。その結果、象牙質を 110-140°C で 10 分加熱すると、異方性を示しながら機械的強度が有意に増加し、加熱は象牙質の強化に有効であることが分かった。そして、加熱による象牙質の強化メカニズムは、コラーゲンの分子間距離が収縮してネットワークが緻密になることで象牙質が構造体として強化されるためであることが明らかとなった。

研究成果の概要 (英文)：The strengthening effects of human dentin by heating were investigated with an aim of preventing tooth fracture. We found that a heat treatment with temperature at 110 to 140°C was significantly effective to improve the mechanical strengths of dentin with showing anisotology. The strengthening mechanism of dentin by heating was found to be the compaction of dentin structure promoted by shrinking its collagen network.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	3,800,000	1,140,000	4,940,000
2008 年度	6,500,000	1,950,000	8,450,000
2009 年度	4,000,000	1,200,000	5,200,000
年度			
年度			
総計	14,300,000	4,290,000	18,590,000

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, 破折, コラーゲン

1. 研究開始当初の背景

失活歯の安定した予後を達成するために、ポストコアによる修復法に関しては、これまでに様々な方向から研究されてきたにもかかわらず、日常臨床では依然として失活歯の垂直歯根破折に遭遇する。Axelssonらがスウェ

ーデンにおいて 30 年の長期にわたる定期的なメンテナンスの効果を検証したところ、歯を喪失する第一の原因は歯根破折であり、喪失全体の 62%に及んでいたと報告している (J Clin Periodont, 2004)。よって、失活歯の垂直歯根破折は依然として早急に解決すべ

き問題でありつづけている。

我々は、失活歯を効果的に補強する修復法を確立することを目的として、近年開発されたファイバーポストや、鋳造および既製金属ポストによる支台築造歯の破壊抵抗を検証した。その結果、ファイバーポストとレジンコアによる支台築造は残存歯質の保護に有効であることを明らかにした (Hayashi *et al*, Dent Mater 2006)。しかし、臨床では、すでに歯冠全体が崩壊したような歯質欠損の大きな歯を修復しなければならぬ場合もしばしばあり、そのような歯を効果的に補強して確実に歯根破折を回避できるような修復法は確定しておらず、長期予後に関しては不安をかかえたまま治療せざるを得ない現状にある。

ところで、象牙質の 25v%をしめる TypeI コラーゲンは、110°Cで加熱すると引張り強度が増加する事が確認されている (Wang *et al*, Biomaterials 1994)。我々は、この事実に着目し、構造的に弱くなった失活歯の支台築造に先だて、象牙質を加熱によって強化することができれば、失活歯の安定した長期予後の達成に極めて効果的であると考えた。本研究は、「加熱による象牙質の強化」を歯の強化の治療法に展開させるための基礎的研究である。

2. 研究の目的

乾燥および加熱によって象牙質の機械的強度がどのように変化するかを、静的破壊抵抗と疲労破壊抵抗を多面的に評価し、歯質強化に最も効率的で臨床応用が可能な加熱温度と時間の条件を確定することを目的とした。

続いて、確定した最適条件における象牙質の加熱による強化メカニズムについて、加熱前後のコラーゲンの分子配列構造のエクス線回折、赤外分光分析による分子構造変化の解析、さらには原子間力顕微鏡を用いたナノインデンテーションより、分子レベルでの強化メカニズムの詳細を明らかにすることも目的とした。

3. 研究の方法

[乾燥および加熱が象牙質の機械的強度に及ぼす影響の多面的解析]

象牙細管走行方向を規定し、乾燥および加熱条件で保管した象牙質棒状試料を、①片持ち梁曲げ試験、②微小引張試験の後、③走査電子顕微鏡による破面観察に供した。さらに、④弾性係数、および⑤破壊靱性値を算出して、乾燥および加熱が象牙質の静的破壊抵抗に及ぼす影響を多面的に評価した。

(1) ヒト象牙質棒状試料の採取：新鮮抜去ヒト第3大臼歯の歯冠咬合面中央より象牙質棒状試料を採取した。その際、象牙細管の走行方向を試料の長軸に対して平行あるいは垂直に規定した。

(2) 試料の保管条件：試料は、以下のいずれかの条件で保管した後、強度試験に供した。
湿潤：23°C HBSS 溶液に保存
乾燥：23°C デシケーター中に1週間保管
加熱：50, 70, 110, 140, 200°C のいずれかの温度のオープン中で1時間加熱

(3) 機械的強度の多面的解析：

①片持ち梁曲げ試験：象牙質棒状試料を金属ホルダーに片持ち梁状に固定し、万能強度試験機 (オートグラフ AG-IS、島津製作所) で、試料が破壊に至るまで圧縮負荷を加え、破壊荷重と変位量を記録した。破壊応力 (σ) は次式にて求めた。

$$\sigma = 6ML/bd^2$$
 M: 破壊荷重 (N), L: 有効距離 (m), b: 試料の幅 (m), d: 試料の厚さ (m)

②微小引張試験：象牙質棒状試料の中央を断面積が 1mm^2 になるように切削加工し、微小引張試験用金属ホルダーに両端を固定して、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負荷を加え破壊荷重と変位量を記録した。

③破面観察：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試験の試料の破断面を観察した。特に、象牙細管の走行と管間象牙質および管周象牙質の破面形状に着目し、加熱の象牙質の微細構造への影響を検索した。

④弾性係数の算出：片持ち梁曲げ試験の結果より、次式にて弾性係数 (E) を算出した。

$$E = [(PL^3)/3\delta I]10^{(-9)}$$

E: 弾性係数 (GPa), P: 降伏点での破壊荷重 (N), L: 有効距離 (m), δ : 降伏点での変位量 (m), I: 弾性二次モーメント (m^4) [I = $(bd^3)/12$, b: 試料の幅 (m), d: 試料の厚さ (m)]

⑤破壊靱性値の算出：象牙質棒状試料の上面に、試料の厚さの約40%の深さの予亀裂をダイヤモンドブレードで形成した後、片持ち梁曲げ試験で用いた金属ホルダーに試料を固定し、電磁式微小試験機 (マイクロサーボ MMT-101N, 島津製作所) にて正弦波, 2Hz, R=0.1 の件で5000回の繰返し負荷をかけて疲労

亀裂を進展させた。続いて、試料を万能強度試験機による片持ち梁曲げ試験に供して破壊荷重を測定し、破断面における亀裂進展深さと試料厚さより次式にて破壊靱性値（K値）を算出した。

$$K = \sigma \sqrt{(\pi a) \cdot F(a/b)}, \quad \sigma: \text{破壊応力}, \quad a: \text{亀裂進展深さ (m)}, \quad b: \text{試料の厚さ (m)}$$

$$F(a/b) = 1.112 - 0.231(a/b) + 7.33(a/b)^2 - 13.08(a/b)^3 + 14.0(a/b)^4$$

実験①～⑤の結果より、象牙質の強化に最適な加熱条件を確定した。

[加熱による象牙質の微細構造の変化]
上述の実験で確定した強化に最適な加熱条件で処理した象牙質を用いて、加熱による微細構造の変化を分子レベルで分析した。

(1) エックス線回折による象牙質TypeIコラーゲンの分子配列構造の分析
加熱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、出力50kV, 250mA, エックス線源CuK α 線, ビームサイズ 0.3mm, カメラ長70mmにてエックス線回折にて分析した。

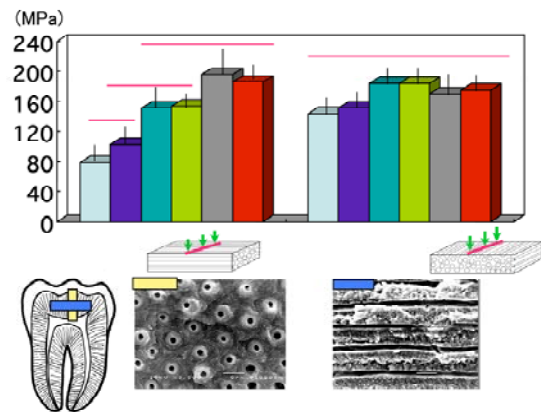
(2) 赤外分光分析による象牙質TypeIコラーゲンの分子構造変化の分析
50 μ mの薄切切片に加工した象牙質試料を、フーリエ変換赤外分光高度計(FTIR-8400S, 島津製作所)にて1400～1100cm⁻¹波長のピークの変化を中心に観察し、加熱前後でのコラーゲン分子内の構造変化を分析した。

(3) 原子間力顕微鏡を用いたナノインデントレーション
象牙質ディスク状試料に原子間力顕微鏡(Nano Scope Dimension3100, Digital Instruments)に接続したナノインデント(Nano Indenter SA2, MTS)にて荷重0.4mNで1試料につき100個のインデントーションを行って、象牙細管からの距離と硬度および弾性係数の関係に着目し、加熱前後で微細構造のどの部位に物理学的性質の変化が生じるかを分析した。

4. 研究成果

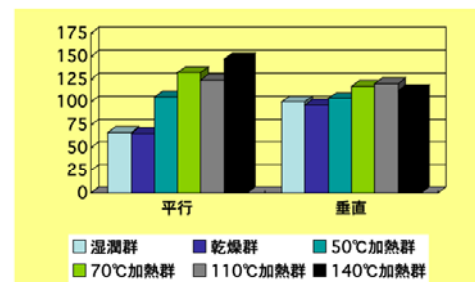
(1) 加熱による機械的強度の多面的解析
① 片持ち梁曲げ試験
下図に示すとおり、象牙細管が負荷表面に平行に走行する試料を 110-140℃に加熱した場

合において、曲げ強さが約 2.5 倍に増加することが明らかとなった。



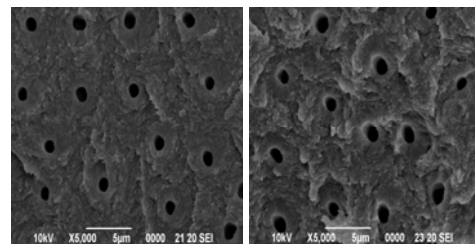
② 微小引張試験

曲げ試験と同様に、象牙細管が負荷表面に平行に走行する試料を 110-140℃に加熱した場合において、曲げ強さが約3倍に増加することが明らかとなった（下図）。



③ 破面観察

走査電子顕微鏡による破面観察より、加熱前（左下図）と比較して、加熱試料（右下図）の表面が粗造となっていたことから、破壊に多くのエネルギーを必要としたことを示していた。

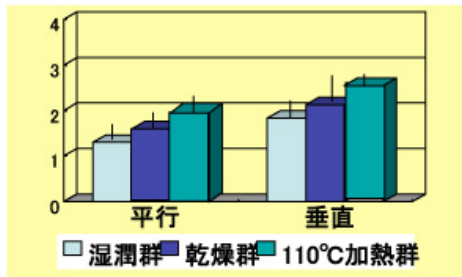


④ 弾性係数の算出

加熱の前後で弾性係数に変化はみとめられなかった。

⑤ 破壊靱性値の算出

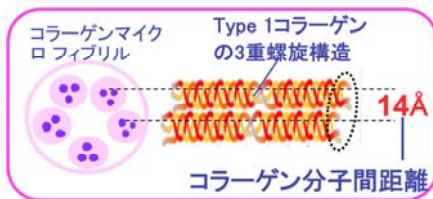
下図に示すとおり、象牙細管が負荷表面に平行と垂直の試料いずれにおいても、加熱によって破壊靱性値が上昇することが分かった。



(2)加熱による象牙質の微細構造の変化

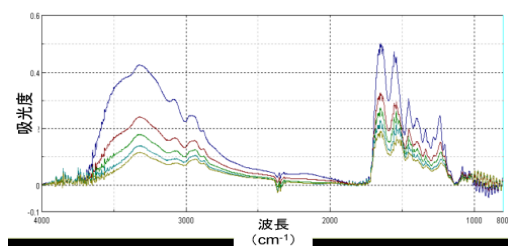
①エックス線回折による象牙質TypeIコラーゲンの分子配列構造の分析

コラーゲン分子間距離は下図に示すとおり 14 Å であることが知られているが、加熱によって 11 Å へと約 30% 収縮することが分かった。



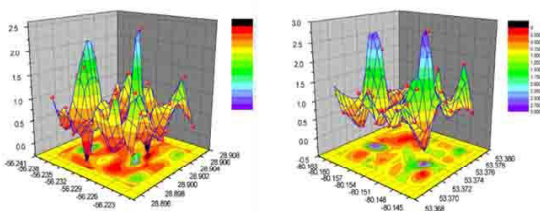
②赤外分光分析による象牙質TypeIコラーゲンの分子構造変化の分析

加熱によるコラーゲンの分子構造における変化を顕微赤外分光分析した結果、脱水によるピークの減衰を認めるものの、ポリペプチドの平面構造を規定しているアミド I および II といった基本骨格構造には顕著な変化が起らないことが分かった (下図)。



③原子間力顕微鏡を用いたナノインデンテーション

ナノインデンテーションの結果より、 hidroキシアパタイトが組成のほとんどを占める管周象牙質には変化が認められず、コラーゲンに富む管間象牙質が加熱によって選択的に強化されたことが明らかとなった。



以上の結果より、象牙質を 110-140°C に加熱すると、異方性を示しながら機械的強度が有意に増加し、加熱は象牙質の強化に有効であることが分かった。そして、加熱による象牙質の強化メカニズムは、コラーゲンネットワークの緻密化によって象牙質が構造体として強化されるためであることが明らかとなった。これらの知見に基づき、加熱によって歯を強化する「歯科装置」を考案し、国際および国内特許を申請した。現在、将来の実用化に向かって、加熱による歯の強化の検証実験を重ねて前進している。

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 12 件)

1. Hayashi M, Okamura K, Koytchev EV, Furuya Y, Sugeta A, Ota T, Ebisu S. (2010) Effects of rehydration on dentin strengthened by heating or UV irradiation. *Journal of Dental Research*, 89, 154-158. (査読有り)
2. Wu H, Hayashi M, Okamura K, Koytchev EV, Imazato S, Tanaka S, Tanaka Y, Sano H, Ebisu S. (2009) Effects of light penetration and smear layer removal on adhesion of post-cores to root canal dentin by self-etching adhesives. *Dental Materials*, 25, 1484-1492. (査読有り)
3. Hayashi M, Seow LL, Lynch CD, Wilson NHF. (2009) Teaching of posterior composites in dental schools in Japan. *Journal of Oral Rehabilitation*, 36, 292-298. (査読有り)
4. 林 美加子 加熱による象牙質の強化 (2009) *The Journal of Dental Engineering*, 169, 17-20. (査読有り)
5. 岩見 行晃, 山本 洋子, 永山 智崇, 成田 寛子, 恵比須 繁之. 新規う蝕検知液 Caries Check®によるう蝕除去の客観性 (2009) 日本歯科保存学雑誌 52, 384-392. (査読有り)
6. Hayashi M, Koytchev EV, Okamura K, Sugeta A, Hongo C, Okuyama K, Ebisu S. (2008) Heat treatment strengthens human

- dentin. *Journal of Dental Research*, 87, 762-766. (査読有り)
7. Hayashi M, Okamura K, Wu H, Takahashi Y, Koytchev EV, Imazato S, Ebisu S. (2008) The root canal bonding of chemical-cured total-etch resin cement. *Journal of Endodontics*, 34 583-586. (査読有り)
8. Hayashi M, Sugeta A, Takahashi Y, Ebisu S. (2008) Static and fatigue fracture resistances of pulpless teeth restored with post-cores. *Dental Materials*, 24, 1178-1186. (査読有り)
9. Iwami Y, Hayashi N, Ebisu S. (2008) Relationship between the color of carious dentin with varying lesion activity, and bacterial detection. *Journal of Dentistry*, 36, 143-151.
10. Iwami Y, Hayashi N, Yamamoto H, Hayashi M, Takeshige F, Ebisu S. (2007) Evaluating the objectivity of caries removal with a caries detector dye using color evaluation and PCR. *Journal of Dentistry*, 35, 749-754. (査読有り)
- [学会発表] (計 21 件)
1. 古谷 優, 林 美加子, 恵比須 繁之. 紫外線照射による象牙質強化メカニズムの解析 第 131 回日本歯科保存学会 2009 年 10 月 30 日 仙台国際センター(仙台市).
2. 林 美加子: 骨質・骨構造と骨粗鬆症 - 歯・象牙質の強度とカラーゲン 第 27 回日本骨代謝学会シンポジウム 2009 年 7 月 24 日 大阪国際会議場 (大阪市)
3. Hayashi, M., Koytchev, E. V., Okamura, K. and Ebisu, S.: Effects of heating on the flexural strength of human dentin. The 86th General Session of the IADR, July, 4, 2008, Metro Toronto Convention Centre (Toronto, Canada)
4. 呉 紅霞, 林 美加子, 岡村 健司, Koytchev EV, 今里 聡, 恵比須 繁之: A comparison of bond strength of fiber posts luted with different resin cements. International Symposium for Adhesive Dentistry, 2008 年 2 月 16 日, 金沢アートホール (金沢市).

5. 岡村 健司, 林 美加子, Koytchev, E. V., 恵比須 繁之: 加熱による象牙質強化メカニズムの解析. 第 127 回日本歯科保存学会秋季大会, 2007 年 11 月 8 日, 岡山コンベンションセンター (岡山市).

[図書] (計 1 件)

林 美加子, エンド難症例 メカニズムと臨床対応(恵比須 繁之編)一支台築造と歯根破折一 (2009) 医歯薬出版, 153-161.

[産業財産権]

○出願状況 (計 2 件) [産業財産権]

名称: 歯科装置

発明者: 林 美加子, 恵比須 繁之,
菅田 淳

権利者: 大阪大学, 広島大学

種類: 特許

国際出願番号: PCT/JP2007/058574

出願年月日: 2007 年 4 月 13 日

国内外の別: 国際

名称: 歯科装置

発明者: 林 美加子, 恵比須 繁之,
菅田 淳

権利者: 大阪大学

種類: 特許

国内出願番号: 特願 2009-207783

出願年月日: 2009 年 9 月 9 日

国内外の別: 国内

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・歯学部附属病院・講師

研究者番号: 40271027

(2) 研究分担者

岩見 行晃 (イワミ ユキテル)

大阪大学・大学院歯学研究科・助教

研究者番号: 90303982

(3) 連携研究者

菅田 淳 (スゲタ アツシ)

広島大学・大学院工学研究科・教授

研究者番号: 60162913