

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）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：基盤研究(B)

研究期間：2010 ～ 2012

課題番号：22390358

研究課題名(和文) 失活歯強化法の臨床応用をめざした紫外線による象牙質強化メカニズムの解明

研究課題名(英文) Analyses of strengthening mechanisms of human dentin by UV

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、紫外線による象牙質の強化効果を検索した。その結果、象牙質に長波長 365nm の紫外線を照射すると、異方性を示しながら機械的強度が有意に増加し、紫外線照射は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 コラーゲンの構成アミノ酸の一種であるプロリンの化学変化による新たな架橋形成によ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 UV irradiation were investigated with an aim of preventing tooth fracture. We found that a UV irradiation treatment with a wave length of 365 nm was significantly effective to improve the mechanical strengths of dentin with showing anisotropy. The strengthening mechanism of dentin by UV was found to be the chemical changes in its type I collagen such as formation of new cross-links in relation with its typical amino acid such as proline.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	5,700,000	1,710,000	7,410,000
2011年度	4,700,000	1,410,000	6,110,000
2012年度	4,400,000	1,320,000	5,720,000
年度			
年度			
総計	14,800,000	4,440,000	19,240,000

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, 紫外線, コラーゲン

1. 研究開始当初の背景

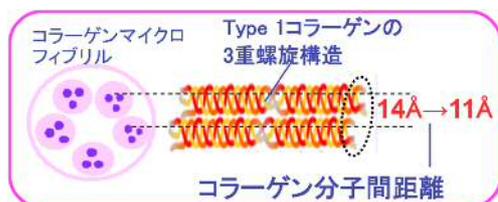
失活歯の安定した予後を達成するために、ポストコアによる修復法に関しては、これまでに様々な方向から研究されてきたにもかかわらず、日常臨床では依然として失活歯の垂直歯根破折に遭遇する。Axelsson らがスウェーデンにおいて 30 年の長期にわたる定期的なメンテナンスの効果を検証したところ、歯を喪失する第一の原因は歯根破折であり、

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

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ない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。

先の研究にて、我々は歯の有機質の主成分であり、象牙質の体積の25%を占めるタイプIコラーゲンを110°Cで加熱すると引張り強さが増加する事実に着目し、加熱が象牙質の機械的強度に及ぼす影響を多面的に分析した。その結果、110~140°Cで象牙質を加熱することによって、曲げ強さは加熱前と比較して最大3倍高くなることを発見した(Hayashi *et al*, *J Dent Res*, 2008)。さらに、その強化メカニズムを明らかにするために、象牙質コラーゲンの線維内部の分子配列をX線回折装置にて解析したところ、加熱によってコラーゲンのトリプルヘリックスの分子間距離が14Åから11Åへ約30%収縮することを明らかにした(下図)。



この失活歯強化装置開発の過程で明らかとなったことは、象牙質の有機成分であるコラーゲンを強化することによって、象牙質そのものの強化につながるという事象である。この概念は、本研究の連携研究者である東京慈恵会医科大学・整形外科の斎藤 充らが発見した、骨粗鬆症患者の骨質はヒドロキシアパタイトの含有成分のみならず骨のタイプIコラーゲンの架橋構造の違いが大きく影響しているとの事実にも通ずるものである。

そこで我々は、歯のコラーゲンの強化に焦点を絞り、より安全かつ持続的な強化効果を期待できる方法としてコラーゲン架橋促進の代表的な因子である紫外線による象牙質の強化を着想した。

紫外線の有機質に対する効果に関しては、蜘蛛の巣が長波長の紫外線(UV-A)によって高い剪断応力が得られることが知られている。我々はこの事象に着目し、紫外線照射に

よる象牙質の強化の可能性とそのメカニズムを検索した。

2. 研究の目的

まず、歯の象牙質の機械的強度に紫外線が及ぼす影響を詳細に明らかにする。さらに、その理由は、象牙質のコラーゲン繊維に化学変化が起ることと推察されるが、詳細は明らかではないため、強化メカニズムを明らかにすることが本研究の目的である。そして、歯根破折が懸念される失活歯を紫外線照射によって強化する治療法を開発することを目標とした。

3. 研究の方法

[紫外線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、紫外線を照射した象牙質棒状試料を、①片持ち梁曲げ試験、②走査電子顕微鏡による破面観察に供した。さらに、③弾性係数、および④破壊靱性値を算出して、紫外線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、以下に示すいずれかの条件で紫外線を照射した後、試験に供した。

紫外線照射群：LED紫外線照射器(ZUV-C30H, Omron)を用いて、波長350~400nm、照射強度800~3200mW/cm²、照射時間5~30分に条件を変えて紫外線照射。

コントロール群：23°C HBSS溶液に浸漬保存。

(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)にて、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、紫外線照射が象牙質の微細構造への影響を検索した。

③弾性係数の算出：円盤状試料に紫外線を1600mW/cm²、15分の条件で照射後、ナノインデ

ンテーションに供した。先端部の半径 100nm のベルコピッチチップを装着した微小押し込み強度試験器 (Nano Indenter SA2, エムティエスジャパン, 東京) を用いて, 紫外線照射前後での微小押し込み硬さおよび弾性係数を, 室温大気中で押し込み荷重 $10 \mu\text{N}$ の条件で測定した。さらに, 原子間力顕微鏡 (Nanoscope Dimension 3100, Digital Instruments, NY, USA) を用いた 20,000 倍の画像より, 象牙細管の中心から測定点までの距離と押し込み硬さおよび弾性係数の関係を分析した。

④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。

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

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

実験①～④の結果より, 象牙質の強化に最適な紫外線照射条件を確定した。

[紫外線照射による象牙質の微細構造変化]

上述の実験で確定した強化に最適な紫外線照射条件で処理した象牙質を用いて, 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 $\text{CuK}\alpha$ 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。

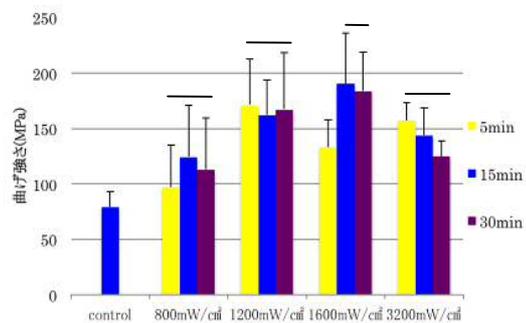
(2) 赤外分光分析による象牙質TypeIコラーゲンの分子構造変化の分析
 $50 \mu\text{m}$ の薄切切片に加工した象牙質試料を, フーリエ変換赤外分光高度計 (FTIR-8400S, 島津製作所) にて $1400 \sim 1100\text{cm}^{-1}$ 波長のピークの変化を中心に観察し, 加熱前後でのコラーゲン分子内の構造変化を分析した。

(3) 顕微ラマン分光分析による象牙質タイプIコラーゲンの分子構造変化の分析

厚さ約 $20 \mu\text{m}$ の薄切切片に加工した象牙質試料を脱灰し, 紫外線照射を行った。試料は, 顕微レーザーラマン分光分析装置 (RAMAN-11, ナノフォトン) にて, レーザー波長 785nm で測定に供し, 右図に示すようなスペクトルを得て, 紫外線照射前後でのコラーゲンの分子構造変化を分析した。

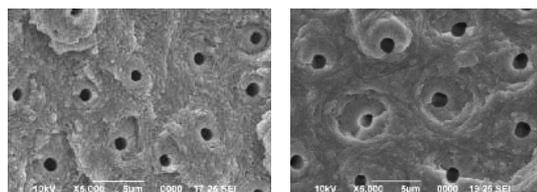
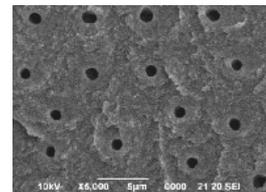
4. 研究成果

象牙質の曲げ強さは, $800 \text{mW}/\text{cm}^2$, 5分照射群以外はコントロールと比較して有意に高い値を示した(下図)。特に, $1600 \text{mW}/\text{cm}^2$, 15分の条件で照射すると, 象牙質曲げ強さは 190.3MPa に上昇し, コントロールの非照射群と比較して約 2.4 倍に上昇した。



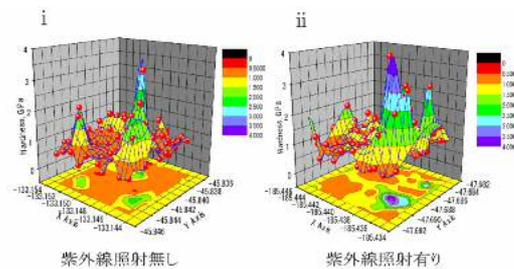
また, 7日間水中浸漬後の曲げ強さは, 水中浸漬前と比べ全ての実験群で低下したが, 非照射群と比較すると有意に高い値を保っており, 特に $1600 \text{mW}/\text{cm}^2$, 15分照射群では, 強化効果の約 42%が保持されていた。

SEM による破面観察において, 紫外線照射群では非照射群 (下図上段) と比較して, 管周象牙質に段差がより頻繁に認められる凹凸に富んだ破面が観察され, 破壊により多くのエネルギーを要したことを示していた (下図下段)。



紫外線照射前後では, 特に $1200 \sim 1600 \text{mW}/\text{cm}^2$, 15分照射によって破壊靱性値はコントロール群と比較して有意に上昇した。

紫外線照射前後の押し込み硬さを 3 次元イメージにて比較したところ、紫外線照射によって管間象牙質に相当する部位の押し込み硬さが選択的に上昇していた。また、象牙細管と測定点の関係性を調べるために、象牙細管中央から圧痕までの距離が $0.5\mu\text{m}$ 以上 $1.0\mu\text{m}$ 未満を管周象牙質、 $1.0\mu\text{m}$ 以上 $1.5\mu\text{m}$ 未満を中間層、 $1.5\mu\text{m}$ 以上を管間象牙質として分類し、硬さの変化を比較した。その結果、管周象牙質および中間層の押し込み硬さは、紫外線照射前後で有意差を認めなかったが、管間象牙質に相当する部分のみ押し込み硬さが紫外線照射前後で 0.81GPa から 1.12GPa に有意に上昇することが分かった(下図表)。



	管周象牙質 ($0.5\mu\text{m} < A < 1.0$)	中間層 ($1.0\mu\text{m} < A < 1.5$)	管間象牙質 ($1.5\mu\text{m}$)
照射前(GPa)	1.47 ± 0.72 ^{ab} (N=12)	1.33 ± 0.50 ^b (N=12)	0.81 ± 0.25 ^c (N=76)
照射後(GPa)	1.96 ± 0.84 ^a (N=11)	1.32 ± 0.57 ^b (N=13)	1.12 ± 0.43 ^b (N=76)

	管周象牙質 ($0.5\mu\text{m} < A < 1.0$)	中間層 ($1.0\mu\text{m} < A < 1.5$)	管間象牙質 ($1.5\mu\text{m}$)
照射前(GPa)	33.44 ± 10.45 ^{ac} (N=12)	30.95 ± 9.46 ^{abc} (N=12)	21.89 ± 5.98 ^b (N=76)
照射後(GPa)	42.97 ± 17.28 ^a (N=11)	31.23 ± 11.75 ^{ac} (N=13)	26.83 ± 8.28 ^c (N=76)

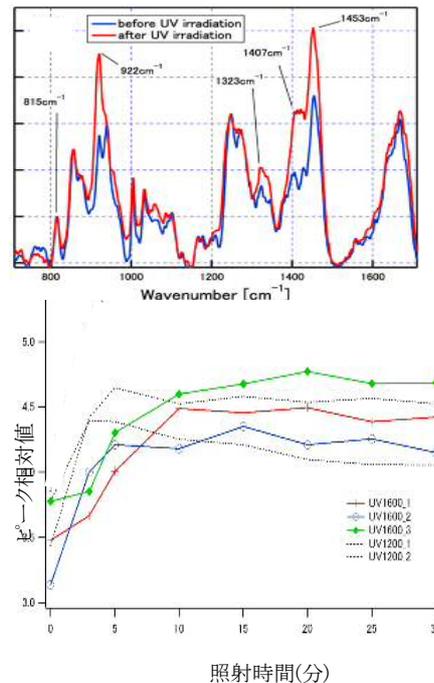
Two way ANOVA, Scheffe's F test, $p < 0.05$
a, b, c: 同一記号間で有意差を認めない。

また、弾性係数も押し込み硬さと同様に、紫外線照射前後では管間象牙質の部分のみが 21.9GPa から 26.8GPa へと有意に上昇したのに対し、管周象牙質および中間層の弾性係数は紫外線照射前後で変化を認めなかった(上表)。

X 線回折にてコラーゲン分子間距離を分析した結果、紫外線処理前のコラーゲン分子間距離が 13.9\AA であったものが、紫外線照射直後では約 12.5\AA に収縮していた。一方、7 日間水中浸漬後では分子間距離が 13.9\AA となり、紫外線照射前に戻っていた。

赤外分光分析による象牙質 Type I コラーゲンの分子構造変化を分析した結果、基軸構造を示すアミド I および II は紫外線によって明らかな影響はないことが分かった。

顕微レーザーラマン分光分析の結果、紫外線照射後プロリンイミド環の炭素に相当する 922cm^{-1} のピークの上昇が認められた(下図)。他にも、 CH_2 や CH_3 の炭素に相当する $1323, 1407$ および 1453cm^{-1} のピークに変化を認めた。また、 815cm^{-1} のピークを基準として 922cm^{-1} のピークの経時的変化を検索したところ、その反応は 5~10 分で完了することが分かった(下図)。



以上より、波長 365nm の紫外線照射により象牙質の機械的強度は上昇し、7 日間水中浸漬後もその強化効果は保持された。その強化メカニズムは象牙質の構造の緻密化のみならず、新たな分子結合をともなったタイプ I コラーゲンの分子内および分子間における化学変化に起因することが示唆された。この反応は約 5 分といった比較的速やかに完了することより、象牙質の強化による歯根破折防止法へと臨床応用できる可能性が示された。

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 8 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)

7. Hayashi M, Okamura K, Koytchev EV, Furuya Y, Sugeta A, Ota T, Ebisu S. Effects of rehydration on dentin strengthened by heating or UV irradiation. *Journal of Dental Research*. 2010, 89: 154-158.
DOI: 10.1177/0022034509354564. (査読あり)

8. Imazato S, Hayashi M, 他(9人中7番目). Proliferation and differentiation potential of pluripotent mesenchymal precursor C2C12 cells on resin-based restorative materials. *Dental Materials Journal*, 2010, 29: 341-346.
PMID: 20467157 (査読あり)

[学会発表] (計 24 件)

1. Matsushita K, Itoh S, Ikeda S, Yamamoto Y, Yamauchi Y, Hayashi M: Functional analysis of Leukemia Inhibitory Factor in osteoblast differentiation of bone marrow stromal cells, Internathional Conference on Progress in Bone and Mineral Reserch 2012, November 29, 2012, Vienna, Austria.

2. 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.

3. 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用性. 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.

4. 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.

5. 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.

6. 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.

7. 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.

8. 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.

9. 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.

10. 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6月29日, 宜野湾市

11. 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.

12. 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, Iguasu, Brazil.

13. 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.

14. 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.

15. 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.

16. 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.

17. Hayashi M, Ito A, Ebisu S: Risk assessment of dental caries in adult patients. 88th European Organisation for Caries Research July 9, 2011, Kaunas, Lithuania .

18. 武田侑子, 林 美加子, 古谷優, 恵比須繁之: 波長 405nm 紫外線照射による象牙質強化効果の検討. 第 134 回日本歯科保存学会, 2011 年 6 月 10 日, 浦安市.

19. Furuya Y, Hayashi M, Takeda Y, Ebisu S: Analysis of strengthening mechanisms of human dentin by UV irradiation. International Dental Materials Congress 2011, May 29, 2011, Seoul, South Korea.

20. Takeda Y, Furuya Y, Hayashi M, Ebisu S: Analyses of stress distributions and fracture strength of pulpless teeth restored with fiber posts. International Dental Materials Congress 2011, May 29, 2011, Seoul, South Korea.

21. Furuya Y, Hayashi M, Ebisu S: Analysis of mechanical properties of human dentin with UV

irradiation. Osaka- Chulalongkorn-Mahidol Joint Symposium, November 26, 2010, Suita.

22. Hayashi M, Ito A, Ebisu S: Caries risk assessment using data mining approach. 88th General Session & Exhibition of the IADR, July 15, 2010, Barcelona, Spain.

23. Furuya Y, Hayashi M, Ebisu S: UV strengthens human dentin under rehydration condition. 88th General Session & Exhibition of the IADR, July 15, 2010, Barcelona, Spain.

24. 古谷 優, 林 美加子, 恵比須 繁之: 紫外線照射による象牙質の機械的強度変化の多面的解析第 132 回日本歯科保存学会, 2010 年 6 月 4 日, 熊本市.

〔図書〕(計 1 件)

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

〔産業財産権〕

○取得状況 (計 1 件)

名称: 歯科装置

発明者: 林 美加子, 恵比須 繁之

権利者: 大阪大学

種類: 特許

番号: 4975039

取得年月日: 2012 年 9 月 9 日

国内外の別: 国内

〔その他〕

該当なし

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) 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

箕島 弘二 (ミノシマ コウジ)

大阪大学・工学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号: 50174107

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