

科学研究費補助金研究成果報告書

平成 25 年 5 月 28 日現在

研究種目：若手研究 (B) 機関番号：14401
 研究期間：2010～2012
 課題番号：22791831
 研究課題名 (和文) 電子線トモグラフィーによるレジン接着修復界面の 3 次元超微細構造解析
 研究課題名 (英文) Observation of ultra-structures in resin-bonding interface by Ultra-high Voltage Electron Tomography
 研究代表者
 三浦 治郎 (Jiro Miura)
 大阪大学・歯学部附属病院 助教
 研究者番号：70437383

研究成果の概要 (和文)：

歯の代表的な構造である象牙質と修復材料との界面をターゲットとし、ガリウムイオンを用いた集束イオンビームによる試料加工やダイヤモンドナイフによる加工と、超高圧電子線トモグラフィーを用いての三次元微細構造観察を行うことにより、硬組織の構造観察研究や臨床における構造評価の基本となる技術開発を目標とした。今回の実験・開発においては、エナメル質・象牙質の非脱灰硬組織内部のサブミクロンオーダーにおける超微細構造を、顕微鏡学・形態学的側面から観察可能にする手法を確立した。

研究成果の概要 (英文)：

Human dentin are hard and brittle mineralized tissues. It is difficult to prepare thin specimens (under 200 nm) of these tissues for transmission electron microscope observation without demineralizing them. We present a novel method for creating three-dimensional ultra-structural images of interface of resin and dentin bonding.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2011 年度	900,000	270,000	1,170,000
2012 年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

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：石灰化硬組織、電子線トモグラフィー、ナノテクノロジー

1. 研究開始当初の背景

近年になって、ナノテクノロジーの進歩によりイオンビームを用いた微細加工手法が開発され、ナイフによる薄切では不可避であった切削時の振動や傷などの影響を極力少

なくした状態での試料作成を行うことが可能となった。これにより、サブミクロンスケールの構造をリアルタイムで観察しながら切削できるようになった。

さらに、観察技術の進歩から、加速電圧を飛躍的に大きくした超高圧電子顕微鏡も実用化され非脱灰硬組織のような超薄切加工が困難な試料においても $2\mu\text{m}$ 程度まで薄くすれば観察が可能になった。さらに、連続的に傾斜させて撮像を行い、コンピュータ処理により断層像を得るトモグラフィー撮影も行えるようになってきている。

近年、コンポジットレジン修復は、歯質との接着強さ、およびコンポジットレジンの機械的強度の向上により、臼歯部にも適用可能な修復法となっている。歯質との接着強さにもっとも寄与したのはハイブリッドレインの形成であり、機械的強度の向上にはフィラーがその主な役割を果たしている。しかし、両者の長期的耐久性についての科学的な検討は十分とはいえない。この方面の研究が進展しない原因のひとつとして、両者の修復物内におけるマイクロレベルでの3次元的情報を得るためのET法を用いた。

今後、コンポジットレジン修復の予後を議論するにあたって、構造的な面ではレジンの接着界面の3次元微細構造の可視化が、機能的な面では咬合力の接着界面の耐久性に与える影響が、それぞれ重要なテーマとなると考えられる。

我々は、比較的厚い試料に対しても、電子線による透過観察が可能な 3000 kV の超高圧電子顕微鏡と、ガリウムイオンを照射により硬組織の超薄加工が可能な集束イオンビーム加工装置を使用することにより、3次元的情報を得るためのET法を用いた。

2. 研究の目的

今回用いる構造観察において用いた電子線トモグラフィー法 (ET 法) は透過型電子顕微鏡を用いて数ナノメートルの分解能で試料の立体情報を解析する方法である。通常の汎用透過型電子顕微鏡では厚さ 100nm 以下の超

薄膜切片に内包される構造が観察対象となるが、本研究では大阪大学超高圧電子顕微鏡センターの加速電圧 3000 kV の超高電圧電子顕微鏡を用いた。超高圧電子顕微鏡トモグラフィー法 (UHVEMT) では、細胞レベル ($2\sim 4\mu\text{m}$ 厚) での **Fig. 1: 超高圧電子顕微鏡** 立体構造解析が可能となりその有用性は高い。本研究では、象牙質とコンポジット・レジンの接着界面をターゲットとし3次元的情報を得るためにET法を用いた。



3. 研究の方法

口腔保健上保存不可能な歯に関して行われる処置において患者に同意を得た上で提供していただきハンクス緩衝溶液の中で保存[1]した歯に対して、メーカーの指示に従ってレジン充填を行い、ダイヤモンドカッターにて厚さ $100\sim 200\mu\text{m}$ に切断した。切断後の試料を、2.5%のパラホルムアルデヒド、2%グルタルアルデヒドおよび2%四酸化オスミウムを用いて二重固定を行った。[2]その後、試料を修復界面が中央に位置するように 1mm 角程度にトリミングした。トリミングした試料を TRIPOD

POLISHER (South Bay, CA) に貼付してさらに、ダイヤモンドペーパーを回転研磨機にて $50\ \mu\text{m}$ くらいまで薄くなるように加工した。



Fig. 2 : TRIPOD による研磨・試料加工

手作業にて薄くした試料を FIB 用切り欠きメッシュに瞬間接着剤を用いて貼付した (Fig. 3)。最終加工は、集束イオンビーム (FIB : FB2000A, HITACHI) を用いて、エナメル質、象牙質をトモグラフィー撮影における傾斜撮像で $-60^{\circ} \sim 60^{\circ}$ の傾斜範囲がとれるように、厚さ $2\ \mu\text{m}$ 、幅 $100\ \mu\text{m}$ の設定でトモグラフィー用試料加工を行った [3]。

同時に、ダイヤモンドナイフによる超薄切片加工を試み、nanotome (阪井電子顕微鏡技術応用研究所 埼玉) を用いて準超薄切片 ($2\ \mu\text{m}$) および超薄切片の取得も行った。

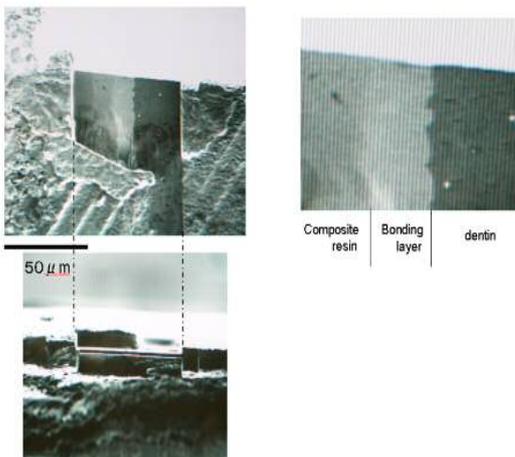


Fig. 3 : 集束イオンビームによる接着界面の薄切加工

加工後の切片に、酢酸ウラニルとクエン酸鉛を用いて電子染色を行った。乾燥後、金粒子法を用いて断層像を得るために、試料を金コロイド溶液 (40nm) に浸し再度乾燥を行った。サンプルホルダーは、三次元解析用片持ちホルダー Fig3 FIB にて加工した象牙質とレジンの接着界面を含んだトモグラフィー用切片 (H-3066、HITACHI) を用いた。データサンプリングには、超高压電子顕微鏡 (H-3000、HITACHI) を用いて、加速電圧 2081kV にて、試料は 1 軸傾斜観察において $-60^{\circ} \sim +60^{\circ}$ まで 2° 間隔にて試料を傾斜させ撮影を行った。5000~10000 倍にて一連の像を観察し、IMOD (Colorado Univ.) を用い [4] Back-projection 法のアルゴリズムにて再構築処理し断層像を得た [5]。



Fig. 4 : 断層像および 3 次元構築画像
A: 断層像 B: 3 次元構築像

4. 研究成果

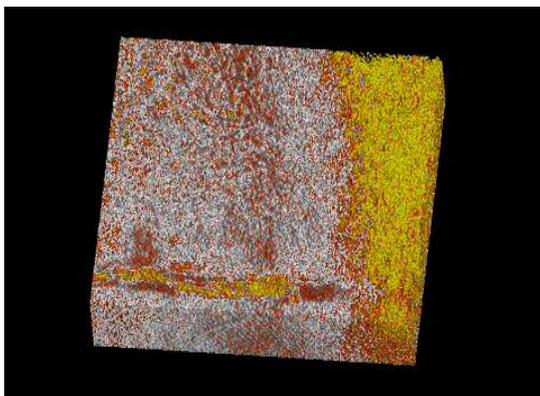
図 4 から集束イオンビーム加工装置を用いることにより、修復材料と象牙質の界面が選択的に切り出されている状態が確認できた。また、 $2\ \mu\text{m}$ といった厚い切片であっても断層像観察を有効に用いることにより、コラーゲンとボンディング層が混在した状態を観察できるということが分かった。同時にダイヤモンドナイフを用いて作成した薄切切片においても、切削の方向によっては界面の切り出しが可能であるということが分かった。

以上の結果は、本手法が非脱灰状態での硬組織および内部に存在するコラーゲン繊維のナノオーダーでの三次元観察を行うことが可能であり、電子線の透過度の低く、また薄切が困難な硬組織における界面観察においては、特に有効な手

法であるということが示されたといえる。

今回用いた集束イオンビームを用いた硬組織の薄切による加工精度を上げて、最終的には超高圧電子顕微鏡を用いたトモグラフィ撮影を行うことにより界面の3次元的な観察を行おうと考えている。

そのためには、FIB法における試料の加工デザインや加工精度、電子線による損傷といった問題を解決する必要があると考えてい



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5件)

(1) Kubo M, Miura J, Sakata T, Nishi R, Takehige F. Structural Modifications of Dentinal Microcracks with human aging, *Microscopy*, 2013年, 学術論文、in press、(査読有)

(2) Matsumoto M, Miura J, Takehige F, Yatani H, Mechanical and morphological evaluation of the bond-dentin interface in direct resin core build-up method, *Dental Materials*, (29) 287-293, 2013年(査読有)

(3) Detection of dentinal microcracks using Infrared Thermography, Matsushita-Tokugawa M, Miura J, Iwami Y, et al, *Journal of Endodontics*, (39)88-91, 2013年(査読有)

(4) Miura J, Kubo M, Nagashima T, Takehige F, Ultrastructural observation of human enamel and dentin by ultra-high voltage electron tomography and focus ion beam technique, *Journal of Electron Microscopy*, 61(5) :335-41, 2012年, 学術論文(査読有)

(5) 歯の形成と老化の可視化, 福島修一郎, 荒木勉, 三浦治郎, *O plus E*, 34, 1051-1055, 2012年, 解説・総説(査読無)

[学会発表] (計13件)

(1) Jiro Miura, Mizuho Kubo, Kantaro Nishikawa, Shuichiro Fukushima, Fumio Takehige, and Tsutomu Araki
Fluorescence Characteristics and Morphological evaluation of Advanced Glycation End Products in Human Dentin
IADR 2013 3.20-23 Seattle, United States

(2) Mizuho Kubo, Jiro Miura, Masato Shimizu, Tadashi Nagashima, Fumio Takehige
Structural Modifications of dentinal microcracks with human aging
IADR 2013 3.20-23 Seattle, United States

(3) 三浦治郎
歯科医療における界面構造観察の有用性
微細構造解析プラットフォーム第2回ワークショップ(招待講演)NIMS 筑波 2013年3月1日、つくば市

(4) 三浦治郎、久保美寿穂、清水真人、長島正、竹重文雄：象牙質接着界面評価における電子線トモグラフィ用切片加工法の検討、第137回日本歯科保存学会 2012年11月21日、広島市

(5)久保美寿穂、三浦治郎、木下可子、西藤三紀子、長島正、竹重文雄：加齢による象牙質の形態変化と微小亀裂伸展様相の検討、第137回日本歯科保存学会 2012年11月21日、広島市

(6)西川貫太郎 近藤恵太 田中佑治 三浦治郎 荒木勉
糖化によるヒト象牙質の蛍光と力学特性の変化 日本バイオフィロンティア学会 2012年10月5日、青森

(7)Miura J: Influence of Glycosylation on Fluorescence Characteristics and Mechanical Properties of Human Dentin, 1st Internatinal Conference on Fluorescence-based diagnostic of Oral Diseases, 20 September, 2012, Montpellier France

(8)Matsumoto M, Miura J, Mine A, Yatani H: Evaluation of Adhesion of Resin to Radicular Dentin in a Direct Resin Core Build-up Method, 12th Asian Academy of Aesthetic Dentistry, 20 July, 2012, Sapporo Japan

(9)三浦治郎、長谷川利昭、久保美寿穂、長島正、竹重文雄：未脱灰石灰化硬組織における電子線トモグラフィ用切片加工法、第68回日本顕微鏡学会学術講演会 2012年5月14日 筑波市

(10)松本真理子、三浦治郎、矢谷博文：新規デュアルキュア型レジンコア材料を用いた支台築造システムにおける根面接着様相の評価 日本歯科保存学会 2011年10月20, 21日、大阪

(11)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 日本歯科保存学会 2011年10月20, 21日、大阪

(12)Mariko Matsumoto, Jiro Miura, Hirofumi Yatani :Evaluation of Adhesion of Resin to Radicular Dentin in a Direct Resin Core Build-up Method, International Congress on Adhesive Dentistry April15-17, 2011 Seoul

(13)Jiro Miura , Noriaki Hasegawa, Tadashi Nagashima, Fumio Takeshige
Three-dimensional ultrastructure of the interfaces between dentin and composite resin. International Association for Dental Research July 14-17 2010 Barcelona Spain

6. 研究組織

(1)研究代表者

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

