

Title	象牙質における加齢変化と微小亀裂との関連の検討
Author(s)	久保, 美寿穂
Citation	大阪大学, 2015, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/52353
rights	
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

学位論文

象牙質における加齢変化と 微小亀裂との関連の検討

大阪大学大学院歯学研究科

分子病態口腔科学専攻

療護歯科保健学講座 顎口腔総合医療学教室

(主任：竹重 文雄 教授)

久保 美寿穂

緒言

歯科臨床において、歯の破折は歯の喪失原因となりうる重篤な病態である。破折の病態に関しては、失活歯における歯根破折リスクの増加¹⁾や、加齢に伴う破折リスクの増加²⁾といった報告があり、抜髄処置や加齢が象牙質の破折リスクを高くすることは広く知られている。しかし、象牙質の破折に関する統計報告や臨床報告は多くみられるものの³⁾、形態学的な検討を加えた研究は少ない。

象牙質の破折の原因となる微小亀裂の伸展に関して、Koester らは、走査型電子顕微鏡(以下 SEM)内での荷重試験において、若年者では象牙細管と交通している微小亀裂が隣接する微小亀裂とつながることで亀裂の伸展方向を決めるが、高齢者では細管の閉塞により亀裂伸展様相が変化すると報告している⁴⁾。Nazari らは加齢に伴う亀裂の伸展抵抗の低下⁵⁾を、Kinney らは加齢に伴う細管の閉塞が亀裂の伸展抵抗を低下させること⁶⁾を報告し、Koester らと同様の結果を示している。また、Brauer らは、細管密度が歯髄近傍の象牙質では高くエナメル象牙境近傍の象牙質では低く、歯髄近傍からエナメル象牙境に向かい象牙質の物性が変化することを報告している⁷⁾。Ivancik らは、細管密度の高い部位では、亀裂は発生しやすくなるが、亀裂の伸展抵抗は高くなることを報告している⁸⁾⁹⁾。加齢に伴い象牙質は乾燥し、亀裂の伸展抵抗が低下するという報告もある¹⁰⁾。こ

これらの報告のように、象牙質に生じる亀裂現象の解明については加齢変化や形状に関連した様々な研究がなされているが、それらは物性試験や表面観察による評価がほとんどであり、硬組織の観察試料作製の困難さから内部構造を含めた詳細な形態学的分析が行われていないのが現状である。

生体の加齢変化には様々なものが知られており¹¹⁾⁻¹⁴⁾、その一つとして生体の基質タンパク質が血中の還元糖と反応することが報告されている¹⁵⁾⁻¹⁷⁾。特に生体内に多く存在する基質タンパク質の一種であるコラーゲンは血中の還元糖により糖化され、分子内に最終糖化生成物(Advanced Glycation End-products: 以下 AGEs)という非常に安定な物質を形成することが知られている¹⁸⁾。AGEs 中でもクロスリンやペントシジンはコラーゲン線維に架橋構造を形成するといわれ、加齢に伴い増加し¹⁹⁾、非生理的架橋を形成することが知られており²⁰⁾、血管においては動脈硬化の原因となり²¹⁾、骨においてはリモデリングの阻害と脆弱化から骨折のリスクを高めることが報告されている¹⁹⁾²⁰⁾。

象牙質においても、基質タンパク質であるコラーゲン線維に AGEs による修飾が起こり²²⁾、象牙質の構造および物性へ影響することが指摘されている²³⁾。しかし、象牙質内の AGEs の局在や動態を調べた報告は少なく、加齢に伴う象牙質における AGEs 形成の詳細は未だ明らかにされていない。

本研究では、象牙質破折のメカニズムの解明において内部構造を含めた詳細な形態学的評価を行うことが重要であるとの認識のもと、象牙質における加齢による形態学的変化、及び糖化修飾による生化学的変化と象牙質微小亀裂伸展との関連を解明することを目的とした。

材料と方法

本研究は大阪大学大学院歯学研究科倫理委員会の審査を受けて承諾を得て行った。(承認番号 H21-E27-1、H21-E25)

1、材料

口腔保健の観点から、保存不能と判断されたう蝕に罹患していない第 3 大臼歯を有する若年者(30 歳以下)および高齢者(60 歳以上)に、実験の目的と方法を説明し了承を得た。歯を抜去し、亀裂が存在しないことを確認後、4℃ハンクス緩衝溶液 (Hanks' Balanced Salt Solution: HBSS) に浸漬し、2 週間以内に実験に使用した²⁴⁾。ダイヤモンドソー (MC201、マルト一社、東京) を用いてセメントエナメル境にて切断し(図 1a)、歯冠象牙質と歯根象牙質に分けた。歯冠と歯根象牙質を歯軸に対し直交方向に 1mm の厚さにダイヤモンドソーにて切り出し(図 1b)、さらに扇形に小さく切り分けて試料とした(図 1c)。試料の大きさは厚さ 1mm、歯髄近傍の象牙質の幅 2 mm、エナメル象牙境近傍(セメント質近傍)の象牙質を幅 5 mm、歯髄近傍からエナメル象牙境(セメント象牙境)までの幅を 5 mm とした(図 1d)。

2、象牙質微小亀裂の超微形態学的評価

1) 未脱灰試料における透過型電子顕微鏡(Transmission Electron Microscope:

以下 TEM)による観察

象牙質の未脱灰試料を若年者、高齢者各々7 つずつ用意し、試料を 2%パラホルムアルデヒド(以下 PFA)と 2.5%グルタルアルデヒド(以下 GA)にて浸漬固定処理を行った。アルコール上昇系にて脱水処理後、エポキシ樹脂(Quetol812、日清 EM、東京)にて包埋を行った(図 2a)。

圧子としてオートセンターポンチ(H-330、三井コーポレーション、静岡)を使用し、象牙質に亀裂を作製できかつ破壊しない負荷として最大 $2.5\text{N}^{(5)(9)(25)}$ の力を瞬間的にかけることで人工的に亀裂を作製した(図 2b)。実体顕微鏡(SZ61、OLYMPUS、東京)にて亀裂の有無を確認した後、亀裂保存のために再度包埋を行った(図 2c)。さらに超薄切切片作製のため、亀裂を中心にして0.5mm角にトリミングした後、再々包埋を行い(図 2d)、ウルトラマイクローム(UltrameV、LKB 社、スウェーデン)及びダイヤモンドナイフ(ナノーム、酒井電子顕微鏡応用研究所、埼玉)にて70~90nm厚の超薄切切片を作製した(図 2e)。作製した微小亀裂を有す無染色試料の歯髄近傍象牙質とエナメル象牙境近傍(セメント質近傍)象牙質を、細管との直交断面に対して、TEM(H800、日立、東京)にて観察を行った。

2) 未脱灰試料における超高圧電子顕微鏡 (Ultra-High Voltage Electron Microscopy: 以下 UHVEMT) による 3 次元構築

TEM 観察に用いた歯冠象牙質の試料から、新たにウルトラミクローム及びダイヤモンドナイフにて 2 μ m の薄切切片を作製し、トモグラフィー撮影²⁶⁾²⁷⁾に供した。単軸トモグラフィー用ホルダー (HAR3000T、日立、東京) に切片を装着し、UHVEMT (H3000、日立、東京) にて観察を行った。観察時の試料への損傷を考慮して加速電圧は 2081keV に設定した²⁶⁾。画像取得には高解像度 CCD (4096 × 4096 ピクセル) を使用し、観察倍率は 5000 倍で、傾斜角範囲 -60 度 ~ +60 度において 2 度間隔で撮影した。再構築用アライメントの基準として金粒子法 (金粒子コロイド: 直径 60nm) を用い、傾斜連続像からの三次元構築は逆投影法にて行った。画像解析は 3 次元構築ソフトウェア (TEMography、株式会社システムインフロンティア、東京) を使用した。

3) 脱灰試料における TEM による観察

未脱灰試料の観察において、亀裂を作製し包埋した試料からウルトラミクロトーム及びダイヤモンドナイフにて 4 μ m 厚の切片の作製を行った(図 3a)。切片をプレパラート上にて 4°C、10%EDTA に 1 週間浸漬することで脱灰(図 3b)、その後倒立包埋法にて包埋し(図 3c)、ウルトラミクロトーム及びダイヤモンドナイフにて 90nm の超薄切切片を作製した(図 3d)。2%酢酸ウランと2%クエン酸鉛による染色を行った後、細管との直交断面に対して TEM にて観察を行った。

4) 亀裂伸展パターンの分析

TEM において得た画像から、象牙細管と交通する亀裂の伸展をパターン A とし、管周象牙質を回り込む亀裂の伸展をパターン B とした(図 5i)。歯冠象牙質と歯根象牙質のそれぞれにおいて、歯髄近傍とエナメル象牙境近傍およびセメント質近傍の象牙質における若年者と高齢者におけるパターン A と B の比率の比較を行った。比較には Student-t 検定を用い、有意水準は 5%とした。

3、石灰化度の評価

1) エネルギー分散型 X 線分析 (Energy Dispersive X-ray spectrmetry: 以下 EDX)

装置による管間象牙質の元素組成分析

象牙質未脱灰試料を 2% の PFA と 2.5% GA にて浸漬固定処理を行い、アルコール上昇系による脱水処理後、エポキシ樹脂にて包埋を行った。ウルトラマイクロームおよびダイヤモンドナイフにて試料の表面を露出させ、白金蒸着によって導電処理を施した。試料表面に電子線を照射し、発生した特性 X 線を EDX 装置 (VE9800、KEYENCE、大阪) にて測定した。若年者と高齢者それぞれ試料を 4 つずつ用意し、各 5 か所に測定を行った。各試料で 5 回の測定結果の平均を算出し、さらに 4 つの試料の平均値を測定結果とした。測定結果に、目的元素の定量に用いる補正法である ZAF (原子番号補正 atomic number: Z、吸収補正 absorption: A、蛍光補正 fluorescence: F、以下 ZAF) 補正を行い、指標とする炭素に対してのカルシウム構成比を得た。結果を Student- t 検定にて有意水準を 5% として比較した。

2)マイクロ X 線 CT 撮影 (micro-Computed Tomography: 以下 μ CT)による歯冠象牙質全体のミネラル密度の測定

エポキシ樹脂に包埋した未脱灰の歯冠象牙質試料を、 μ CT 装置 (R_mCT2、Rigaku、東京)を用いて撮影した。試料数は若年者と高齢者で 4 つずつとした。撮影条件は X 線管電圧を 90kV、X 線管電流を 160 μ A、照射時間を 3 分に設定し、試料全体の撮影を行った。CT 画像における試料全体の輝度を測定し、象牙質のみの輝度の平均値を校正し、ミネラル密度の評価を行った。若年者と高齢者のミネラル密度の有意差検定には Student-t 検定を用い、有意水準は 5%とした。

4、AGEs が象牙質に及ぼす影響の評価

1) 免疫組織化学的染色による AGEs の局在の検討

歯軸に対し直交断面で1mm厚に切断した歯を、4°C、10%EDTAにて3週間浸漬し脱灰を行った。脱灰後、2%PFA で固定処理を行い、アルコール上昇系にて脱水及びパラフィン包埋を行った後、回転式マイクローム(RM2125RT、LEICA、ドイツ)及びマイクロームブレード(フェザーマイクロームブレード、フェザー安全剃刀株式会社、岐阜)を用いて4µmの切片を作製した。各切片をキシレンにて脱パラフィンを行った後、トリス緩衝溶液(TBS: Tris-Buffered Saline)にて洗浄した。ブロッキングにはウサギ血清(和光純薬工業株式会社、大阪)、一次抗体として抗AGEマウスモノクローナル抗体(6D12、Transgenic社、熊本)、二次抗体としてビオチン標識ラビット抗マウスIgG(DAKO Cytomation社、東京)を使用し、ジアミノベンジジンにて発色させ光学顕微鏡(CX41、OLYMPUS、東京)を用いて観察を行った。試料数は若年者と高齢者共に4つずつとした。

2) AGEs が象牙質コラーゲンの物性に及ぼす影響の検討

歯軸に対し平行断面で 1mm に切断した歯を若年者と高齢者ともに 3 つずつ用意し、4%の PFA で固定処理を行い、室温で 10%EDTA にて 4 週間浸漬し脱灰を行った。固さの評価には、押し込み試験機 (EZ-S、島津製作所、京都) を用いた。試料をマイクロステージに乗せ、圧縮ヘッドの先端直径が 1mm のものを用いて、各ポイントの固さを計測しては移動させるという過程を繰り返し行った。計測は各試料に対し 25 か所に行った。横軸にヘッドの変位、縦軸に発生した力を表した力-変位曲線を取得し線形近似で傾きを算出したものを固さ (stiffness) とした。若年者と高齢者の固さの比較には ANOVA と Tukey-Kramer 検定を併用し、有意水準を 5% とした。

結果

1、未脱灰象牙質における亀裂伸展の超微形態学的評価

象牙細管の密度は、歯冠象牙質と歯根象牙質共それぞれにおいて、若年者と高齢者共に歯髓近傍の象牙質の方がエナメル象牙境近傍(セメント質近傍)の象牙質と比べて高かった(図 4、5)。

管周象牙質の厚さを各試料において測定し平均値を算定すると、歯冠象牙質では、若年者の歯髓近傍の象牙質では $0.62\mu\text{m}$ 、エナメル象牙境近傍の象牙質では $0.55\mu\text{m}$ 、高齢者の歯髓近傍の象牙質では $0.91\mu\text{m}$ 、エナメル象牙境近傍の象牙質では $1.42\mu\text{m}$ であった(図 4、5)。歯根象牙質では、若年者の歯髓近傍の象牙質では $0.60\mu\text{m}$ 、セメント質近傍の象牙質では $0.61\mu\text{m}$ 、高齢者の歯髓近傍の象牙質では $0.65\mu\text{m}$ 、セメント質近傍の象牙質では $0.92\mu\text{m}$ であった(図 4、5)。高齢者の管周象牙質の肥厚は若年者と比較し顕著であり、特に高齢者の歯冠象牙質のエナメル象牙境近傍象牙質が歯髓近傍の象牙質と比較して、管周象牙質の肥厚が顕著であった(図 4、5、6)。

亀裂の伸展に関しては、歯冠象牙質と歯根象牙質共に、若年者では亀裂の多くが象牙細管と交通し、象牙質内を断続的にかつ曲線的に進む様相を認めた(図 5a、c、e、g)。一方、高齢者では亀裂の多くが管間象牙質内を直線的に進み、

肥厚した管周象牙質を回りこみながら、象牙質内を連続的に進む様相を認めた(図 5b、d、f、h)。

2、トモグラフィー像による観察結果

亀裂は、若年者においては象牙細管と交通し、高齢者においては管周象牙質を回り込み象牙細管を避けるように伸展している様相を立体的に観察することができた(図 6)。

3、微小亀裂伸展様相とコラーゲン線維の断裂像との関連

亀裂破断面に沿ってコラーゲン線維が断裂している像が観察された。コラーゲン線維はその走行方向と直交方向に断裂している様相が多く認められた。歯冠象牙質と歯根象牙質の若年者と高齢者を比較したところコラーゲン線維の断裂像において著明な差は認められなかった(図 7)。

4、亀裂伸展パターンの比較

歯冠象牙質において、若年者では、象牙細管に亀裂が交通し伸展するパターン A の比率が、高齢者では管周象牙質を回り込むように亀裂が伸展するパターン B の比率がそれぞれ高く、若年者と高齢者の亀裂伸展パターンの比率に有意差が認められた。特に、高齢者においてはエナメル象牙境近傍の象牙質の方が歯髄近傍の象牙質に比べパターン B の割合が大きいことが分かった(図 8a、b)。

歯根象牙質において、若年者ではパターン A の比率が、高齢者ではパターン B の比率がそれぞれ高いが、若年者と高齢者の亀裂伸展パターンの比率には有意差が認められなかった(図 8c、d)。

5、元素組成分析の比較

管間象牙質における元素スペクトルにおいては、象牙質の主要元素である炭素、酸素、カルシウム、リンのシグナル量に大きな変化はなく、若年者と高齢者で類似していた(図 9a、b)。歯冠象牙質と歯根象牙質、若年者と高齢者のそれぞれにおいても ZAF 補正による構成元素の比率にも大きな違いは認められなかった(図 9c、d、e、f)。また指標とする炭素に対してのカルシウム構成比を若年者と高齢者で比較したが、歯冠象牙質と歯根象牙質共に、t 検定における有意差は認められなかった(図 9g、h)。

6、 μ CT 画像の分析によるミネラル密度の評価

歯冠象牙質全体のミネラル密度の評価として、 μ CT 画像における輝度の分析によるミネラル密度の評価を行った。若年者と高齢者において輝度の有意差は認められなかった(図 10a、b)。

7、AGEs 沈着の評価

歯冠象牙質において、若年者では、歯髄近傍の象牙質に AGEs 陽性反応を強く認めた(図 11a)。高齢者でも歯髄近傍の象牙質に強い陽性反応を認め、若年者よりも歯髄近傍からエナメル象牙境方向に向かって広範囲に陽性反応を認めた(図 11d)。強拡大画像においては、若年者と高齢者ともに象牙細管周囲に陽性反応を認めた。歯髄近傍の象牙質とエナメル象牙境近傍の象牙質の各部位においては、若年者と比較して高齢者がより強い陽性反応を示した(図 11b、c、e、f)。

歯根象牙質において、若年者では、歯髄近傍の象牙質に弱い陽性反応を認めた(図 11g)。高齢者では、歯髄近傍の象牙質に強い陽性反応を認め、歯髄近傍からセメント質方向に向かって広範囲に陽性反応を認めた(図 11j)。歯冠象牙質と同様、強拡大像から若年者と高齢者ともに象牙細管周囲に陽性反応を認め、また、歯髄近傍からセメント質近傍の象牙質の各部位を比較すると、若年者より高齢者の方が強い陽性反応を示した(11h、i、k、l)。

8、象牙質コラーゲンの物性の比較

歯冠象牙質と歯根象牙質共に加齢に伴いコラーゲン線維は固くなっており、若年者と高齢者を比較し有意差が認められた(図 12)。

考察

本研究の基盤となる技術として石灰化組織内亀裂構造の切片化がある。これは、象牙質内の微小亀裂を保存して切片化することで、これまで不可能であった象牙質微小亀裂の透過観察を可能にするものである。象牙質は脆性を呈するため亀裂を作製して薄切切片を作製する際に破壊され易く、これまで亀裂を有する象牙質の切片化はほとんどなされてこなかった。本研究では、エポキシ樹脂による未脱灰象牙質の包埋と亀裂作製法を組み合わせることにより、亀裂を保存したまま超薄切切片を作製し、透過型電子顕微鏡観察を行うことに成功した。これにより SEM による表面観察のみの評価が大半を占めていた亀裂観察手法において、表面のみでなくコラーゲン線維や石灰化顆粒といった内部構造の評価を加えることが可能となった。

しかし、本手法においても、超薄切時に 2 次的に出来た亀裂によるアーティファクトに注意を払う必要がある。実際、数十 nm まで薄切するため切片自体が破れ実際の亀裂と混同する恐れもあった。そのため本研究では、同一切片を複数回撮影し、同結果が得られることの確認を行いアーティファクトである部分を除くことでより正確な結果を得るように工夫し、この問題を解決した。

管周象牙質は、有機基質をほとんど含んでおらず、大部分がリン酸カルシウム

ムであるため管間象牙質と比較して弾性係数が高い値を示す²⁸⁾⁻³⁰⁾。このような弾性係数のミスマッチは内部応力の不均一な分布の誘因となり、象牙質の靱性に影響を及ぼし亀裂伸展様相を変化させると報告されている³¹⁾。本研究でも管周象牙質と管間象牙質における弾性係数の差が、象牙質の亀裂の伸展様相に大きな影響を及ぼしたと考えられる。

TEM 観察では、管周象牙質の電子密度は管間象牙質と比較して高いため容易にその幅を確認することができ、加齢により肥厚する傾向が認められる(図 4、5、6)。若年者では管周象牙質が薄いため、亀裂が細管を通過することで亀裂の伸展が途切れる傾向を示し(図 4、5)、亀裂が再び細管から伸展する際に大きなエネルギーを必要とすることから、亀裂伸展におけるエネルギー消費が大きくなり、亀裂の伸展抵抗が高くなったと考えられる。一方、高齢者では管周象牙質が厚く、亀裂が管周象牙質を回り込み連続的に伸展する傾向を示すことから(図 4、5)、亀裂伸展時のエネルギー消費が若年者と比べて小さくなり、亀裂の伸展抵抗を低下させたと考えられる。以上のことから、加齢に伴う象牙質の脆弱化に関しては、管周象牙質の肥厚によって亀裂の伸展様相が変化することが、その一因となっていると推察される。

また、管間象牙質においては、若年者で亀裂が曲線的に伸展し、高齢者では

直線的に伸展するという様相が認められた。若年者では、高靱化のメカニズムの一つであるボウイング³¹⁾により亀裂伸展時にエネルギーを費やし、亀裂の伸展抵抗が高くなった可能性が考えられる。

歯冠象牙質では、加齢に伴い、管周象牙質への石灰化が起こるものの(図 4)、管間象牙質においては、カルシウム組成に変化は認められなかった(図 9g)。また、 μ CT による象牙質試料全体のミネラル密度の分析において、加齢に伴う石灰化度に有意差を認めなかったことから(図 10a)、加齢に伴う象牙質の石灰化度の変化は、管周象牙質への添加がその多くを占めていることが示唆された。

象牙質の加齢に伴う石灰化度の増加は、総ミネラル量と比較するとごく微量であった。歯根象牙質において、管周象牙質への加齢に伴う石灰化物の添加は一定量認められるものの(図 4)、歯冠象牙質ほど顕著ではなかった。また、管間象牙質のカルシウム組成にも有意差は認められず(図 9h)、歯全体の象牙質の加齢に伴う石灰化は、歯冠象牙質の管周象牙質への石灰化が大きな割合を占めているものと考えられる。一方、象牙質の石灰化の総量はわずかであり、加齢に伴う亀裂伸展抵抗の変化には石灰化以外の他の要素が関与していると推察される。

加齢に伴い象牙質の弾性係数が大きくなること³²⁾に関しては、コラーゲン線維

に対する糖化修飾により線維の伸展性が低下し、結果として弾性係数が大きくなるという報告もあることから²³⁾、加齢に伴う象牙質の弾性係数の変化には、管周象牙質の石灰化の亢進だけでなくコラーゲン線維に対する糖化修飾も関与していると考えられる。特に管間象牙質においては、加齢に伴うカルシウム量の変化がほとんど認められないことから(図 9g、h)、構成する基質タンパク質であるコラーゲン線維における変化が主体と考えられる。本研究の抗 AGE 抗体を用いた免疫組織化学染色より、加齢に伴い象牙質のコラーゲン線維に対して糖化修飾が認められ(図 11a、d、g、j)、特に歯髄近傍の象牙質に顕著な糖化修飾が加わっていることが分かった(図 11b、e、h、k)。

これは、歯髄近傍の象牙質においては、コラーゲン線維が血流の影響をより受けやすく、還元糖からの修飾が起こりやすいことが理由として考えられる。すなわち、高齢者においては、加齢に伴い歯髄から象牙細管に沿ってエナメル象牙境近傍あるいはセメント質近傍へ糖化修飾を受けたこと、および象牙前質付近における二次象牙質の添加に伴い歯髄近傍で修飾を受けたコラーゲン線維が長い期間を経て内部に取り込まれたことが、若年者よりも広範囲に AGEs 陽性反応を認めた原因と推察できる。

歯根象牙質は歯冠象牙質と比較して曲げ強さが大きいという報告がある³³⁾。こ

これは、歯冠象牙質と比較して歯根象牙質では管周象牙質への石灰化が少なく（図 4、5）、さらに歯冠象牙質と比較し歯根象牙質において、コラーゲン線維の糖化が弱いため（図 9a、g）、曲げ強さが大きくなっていると考えられる。コラーゲン線維に起こる糖化修飾による非生理的架橋は、骨においても骨強度を低下させ脆弱化の原因となると報告されている²⁰⁾³⁴⁾。骨と類似した構造を持つ象牙質においても、コラーゲン線維の非生理的架橋は象牙質を脆弱化させていると推察され、象牙質のコラーゲン線維の分子間の非生理的架橋が加齢に伴い増加することで、コラーゲン線維の剛性が上がり（図 12）、管間象牙質の物性に影響を与えている¹⁸⁾と考えられる。

脱灰試料の TEM 観察におけるコラーゲン線維の断裂像においては、加齢に伴うコラーゲン線維自体の破断様相に顕著な変化は認められなかった（図 7）。コラーゲン線維の破断は、糖化修飾の有無と関係なく生じていると考えられ、加齢に伴う糖化修飾はコラーゲン線維単体の物性に大きな影響を及ぼすものではないことが示唆された。今後、コラーゲン線維内での分子レベルの破断様相を解明するには、高分解能電子顕微鏡観察といったより詳細な検討が必要であると考えている。

若年者と高齢者の亀裂パターンの割合で、歯冠象牙質のエナメル象牙境近傍

の象牙質では両者の差が大きく、歯髄近傍の象牙質では差が小さかった(図 8a、b)。加齢に伴う管周象牙質の肥厚⁶⁾³⁵⁾が、エナメル象牙境近傍の象牙質で歯髄側象牙質より顕著であったことが(図 4、5)影響しているのではないかと考えられた。また、エナメル象牙境近傍の象牙質ではコラーゲン線維への糖化修飾はわずかであったことから(図 11a、d)、加齢に伴う亀裂伸展様相は管周象牙質の肥厚に強く影響を受けていることが示唆された。

歯根象牙質では、セメント質近傍および歯髄近傍の象牙質のいずれも若年者と高齢者の亀裂パターン割合の差が小さかった(図 8c、d)。これは、歯根象牙質は、歯冠象牙質ほど加齢に伴う管周象牙質の肥厚が顕著でなかったためであると考えられる。

本研究から、加齢に伴う管周象牙質の肥厚が亀裂の伸展様相を変化させ、亀裂伸展が連続的となってエネルギー消費を小さくさせることで、象牙質の亀裂伸展抵抗を低下させると推察される。この結果は、Koester らの加齢に伴う細管の閉塞により亀裂の伸展様相が変化するという報告⁴⁾や、Nazari らの加齢に伴う亀裂の伸展抵抗の低下⁵⁾といった報告と同傾向の結果を示しており、管周象牙質の肥厚が、象牙質の亀裂の伸展様相の変化及び伸展抵抗の低下に強く影響を与えていることは明らかであろう。

亀裂伸展様相や抵抗性の変化は、加齢以外にも象牙細管の走行²⁵⁾³⁶⁾⁻³⁸⁾や石灰化コラーゲンの配向といった要素からも影響を受けることが指摘されている³⁹⁾。

象牙質の加齢変化を明らかにし、他の要素による影響を併せて解析することで、歯の破折の予防法や歯の加齢による劣化の抑制方法の提案が可能であると考えられる。

結論

- 1、本研究の手法を用いることで、未脱灰象牙質の微小亀裂を保存した状態で、観察及び評価を行うことが可能となった。
- 2、加齢に伴うコラーゲン線維への AGEs 関連物質の沈着の様相が明らかとなった。
- 3、若年者では亀裂が象牙細管と交通し、断続的で曲線的に伸展し、高齢者では亀裂が肥厚した管周象牙質を回りこみ連続的で直線的に進む様相を認められた。
- 4、加齢に伴う管周象牙質の肥厚とコラーゲン線維への AGEs 関連物質の沈着が、微小亀裂伸展様相の変化に関与していることが示唆された。

謝 辞

稿を終えるにあたり、本研究の機会を与えていただきご鞭撻を賜りました大阪大学大学院歯学研究科 療護歯科保健学講座 竹重文雄教授ならびに三浦治郎博士に深甚なる謝意を表します。

そして本研究の遂行にあたり、懇厚なるご助言を賜りました大阪大学 超高压電子顕微鏡センター 西竜治准教授に心より感謝申し上げます。さらに、本研究を行うにあたり多大なるご協力とご教示を戴いた大阪大学基礎工学研究科 荒木勉教授および工学研究科 津田哲哉博士に深謝申し上げます。

最後に、本研究に種々のご配慮、ご援助を頂いた療護歯科保健学講座顎口腔総合医療学教室の諸先生方に厚く御礼申し上げます。

文献

- 1) Testori T, Badino M, Castagnola M, (1993) : Vertical root fractures in endodontically treated teeth: a clinical survey of 36 Cases. *J Endod*, 19, 87–90
- 2) Cohen S, Berman LH, Blanco L, Bakland L, Kim JS, (2006) : A demographic analysis of vertical root fractures. *J Endod*, 32, 1160–1163
- 3) Ilena-Puy MC, Former-Navarro L, Barbero-Navarro I, (2001) : Vertical root fracture in endodontically treated teeth: a review of 25 cases. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, 92, 553–555
- 4) Koester K J, Ager J W 3rd, Ritchie R O, (2008) : The effect of aging on crack-growth resistance and toughening mechanisms in human dentin. *Biomaterials*, 29, 1318–1328
- 5) Nazari A, Bajaj D, Zhang D, Romberg E, Arola D, (2009) : Aging and the reduction in fracture toughness of human dentin. *J Mech Behav Biomed Mater*, 2, 550–559
- 6) Kinney J H, Nalla R K, Pople J A, Breunig T M, Ritchie R O, (2005) : Age-related transparent root dentin: mineral concentration, crystallite size, and mechanical properties. *Biomaterials*, 26, 3363–3376

- 7) Brauer D S, Hilton J F, Marshall G W, Marshall S J, (2011) : Nano- and micromechanical properties of dentine: Investigation of differences with tooth side. *J Biomech*, 44, 1626–1629
- 8) Ivancik J, Neerchal N K, Romberg E, Arola D, (2011) : The reduction in fatigue crack growth resistance of dentin with depth. *J Dent Res*, 90, 1031–1036
- 9) Ivancik J, Arola D, (2013) : The importance of microstructural variations on the fracture toughness of human dentin. *Biomaterials*, 34, 864–874
- 10) Bajaj D, Sundaram N, Nazari A, Arola D, (2006) : Age, dehydration and fatigue crack growth in dentin. *Biomaterials*, 27, 2507–2517
- 11) Block E, (1952) : Quantitative morphological investigations of the follicular system in women; variations at different ages. *Acta Anat(Basel)*, 14, 108–123
- 12) Fenske N A, Lober C W, (1986) : Structural and functional changes of normal aging skin. *J Am Acad Dermatol*, 15, 571–585
- 13) Syed F A, Ng A C, (2010) : The pathophysiology of the aging skeleton. *Curr Osteoporos Rep*, 8, 235–240

- 14)Collins J A, Munoz J V, Patel T R, Loukas M, Tubbs R S, (2014) : The anatomy of the aging aorta. *Clin Anat*, 27, 463–466
- 15)Vitek M P, Bhattacharya K, Glendening J M, Stopa E, Vlassara H, Bucala R, Manogue K, Cerami A, (1994) : Advanced glycation end products contribute to amyloidosis in Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91, 4766–70
- 16)Singh R, Barden A, Mori T, Beilin L, (2001) : Advanced glycation endproducts : a review. *Diabetologia*, 44, 129–46.
- 17)McIntyre N J, Chesterton L J, John S G, Jefferies H J, Burton J O, Taal M W, Fluck R J, McIntyre C W, (2010) : Tissue–advanced glycation end product concentration in dialysis patients. *Clin J Am Soc Nephrol*, 5, 51–5
- 18)福島 修一郎、荒木 勉、三浦 治郎、(2012) : 歯の形成と老化の可視化、*O plus E*, 34, 1051–1055、平成 24
- 19)Saito M, Marumo K, Fuji K, Ishioka N, (1997) : Single–column high–performance liquid chromatographic–fluorescence detection of immature, mature, and senescent cross–links of collagen. *Anal Biochem*, 253, 26–32

- 20)Wang X, Shen X, Li X, Agrawal CM, (2002) : Age-related Changes in the Collagen Network and Toughness of bone. *Bone*, 31, 1-7
- 21)Yamagishi S, Imaizumi T, (2005) : Diabetic vascular complications: pathophysiology, biochemical basis and potential therapeutic strategy. *Curr Pharm Des*, 11, 2279-2299
- 22)Saito M, Fujii K, Mori Y, Marumo K, (2006) : Role of collagen enzymatic and glycation induced cross-links as a determinant of bone quality in spontaneously diabetic WBN/Kob rats. *Osteoporos Int*, 17, 1514-1523
- 23)Miura J, Nishikawa K, Kubo M, Fukushima S, Hashimoto N, Takeshige F, Araki T, (2014) : Accumulation of advanced glycation end-products in human dentine. *Arch Oral Biol*, 59, 119-124
- 24)Habelitz S, Marshall GW Jr, Balooch M, Marshall S J, (2002) : Nanoindentation and storage of teeth. *J Biomech*, 35, 995-998
- 25)Imbeni V, Nalla R K, Bosi C, Kinney J H, Ritchie R O, (2003) : In vitro fracture toughness of human dentin. *J Biomed Mater Res A*, 66, 1-9

- 26) Miura J, Kubo M, Nagashima T, Takeshige F, (2012) : Ultra-structural observation of human enamel and dentin by ultra-high-voltage electron tomography and the focus ion beam technique. *J Electron Microsc*, 61, 335–341
- 27) Kubo M, Miura J, Sakata T, Nishi R, Takeshige F, (2013) : Structural modifications of dentinal microcracks with human aging. *Microscopy*, 62, 555–561
- 28) Ryou H, Romberg E, Pashley D H, Tay F R, Arola D, (2012) : Nanoscopic dynamic mechanical properties of intertubular and peritubular dentin. *J Mech Behav Biomed Mater*, 7, 3–16
- 29) Kinney J H, Balooch M, Marshall S J, Marshall G W Jr, Weihs T P, (1995) : Hardness and young's modulus of human peritubular and intertubular dentine. *Arch Oral Biol*, 41, 9–13
- 30) Ziskind D, Hasday M, Cohen S R, Wagner H D, (2011) : Young's modulus of peritubular and intertubular human dentin by nano-indentation tests. *J Struct Biol*, 174, 23–30

- 31)香川 豊、八田 博志、(1990):セラミックス基複合材料、1 版、アグネ承風社、
東京、145-158、平成 2
- 32)Senawonqse P, Otsuki M, Tagami J, Mjor I, (2006) : Age-related changes in
hardness and modulus of elasticity of dentine. *Arch Oral Biol*, 51, 457-463
- 33)Eltit F, Ebacher V, Wang R, (2013) : Inelastic deformation and microcracking
process in human dentin. *J Struct Biol*, 183, 141-148
- 34)Shiraki M, Urano T, Kuroda T, Saito M, Tanaka S, Miyao-Koshizuka M, Inoue S,
(2008) : The synergistic effect of bone mineral density and
methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) polymorphism (C677T) on
fractures. *J Bone Miner Metab*, 26, 595-602
- 35)Amariti M L, Restori M, Ferrari F D, Paganelli C, Faglia R, Legnani G, (1999) :
Age determination by teeth examination: a comparison between different
morphologic and quantitative analyses. *J Clin Forensic Med*, 6, 85-89
- 36)Iwamoto N, Ruse N D, (2003) : Fracture toughness of human dentin. *J Biomed
Mater Res A*, 66, 507-512

- 37)Arola D, Reid J, Cox M E, Bajaj D, Sundaram N, Romberg E, (2007) : Transition behavior in fatigue of human dentin : structure and anisotropy. *Biomaterials*, 28, 3867–3875
- 38)Ivancik J, Majd H, Bajaj D, Romberg E, Arola D, (2012) : Contributions of aging to the fatigue crack growth resistance of human dentin. *Acta Biomater*, 8, 2737–2746
- 39)Nalla R K, Kinney J H, Ritchie R O, (2003) : Effect of orientation on the in vitro fracture toughness of dentin: the role of toughening mechanisms. *Biomaterials*, 24, 3955–3968

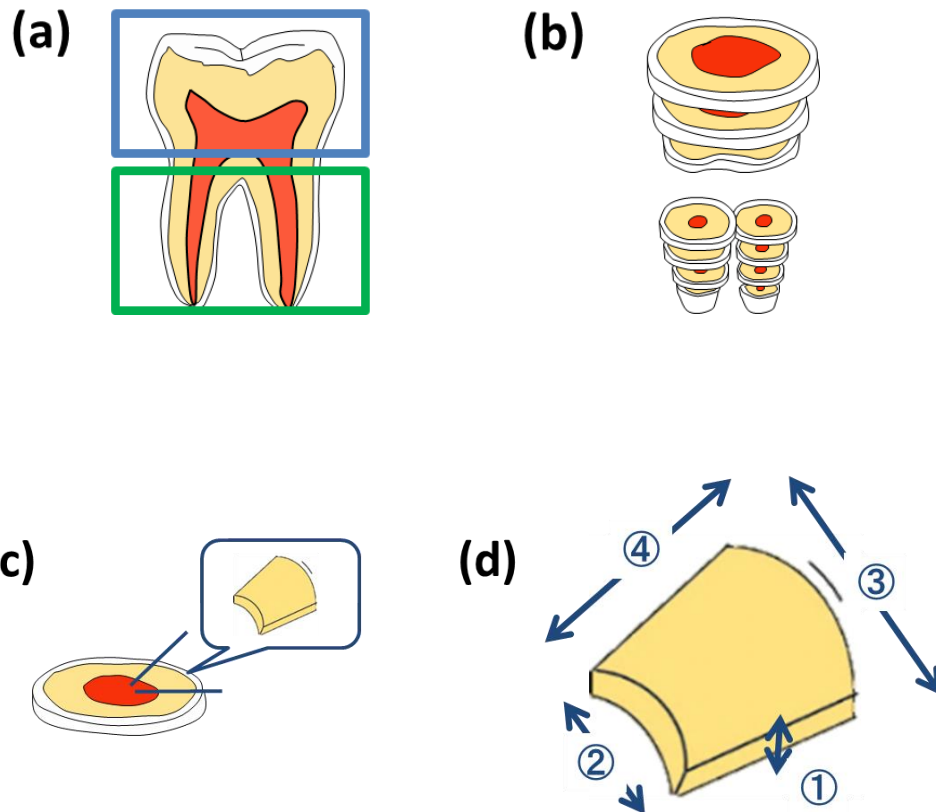


図 1 未脱灰象牙質の試料作製の模式図

(a) セメントエナメル境にて歯冠象牙質と歯根象牙質を分割

青枠：歯冠象牙質、緑枠：歯根象牙質

(b) 歯冠象牙質と歯根象牙質を歯軸と直交方向に 1mm 厚に切断

(c) 試料をさらに小さく切り分け扇形に整形

(d) 試料サイズ

①厚さ：1mm

②歯髄近傍の象牙質の幅：2 mm

③エナメル象牙境およびセメント質近傍の象牙質幅：5 mm

④歯髄近傍からエナメル象牙境(セメント象牙境)までの幅：5 mm

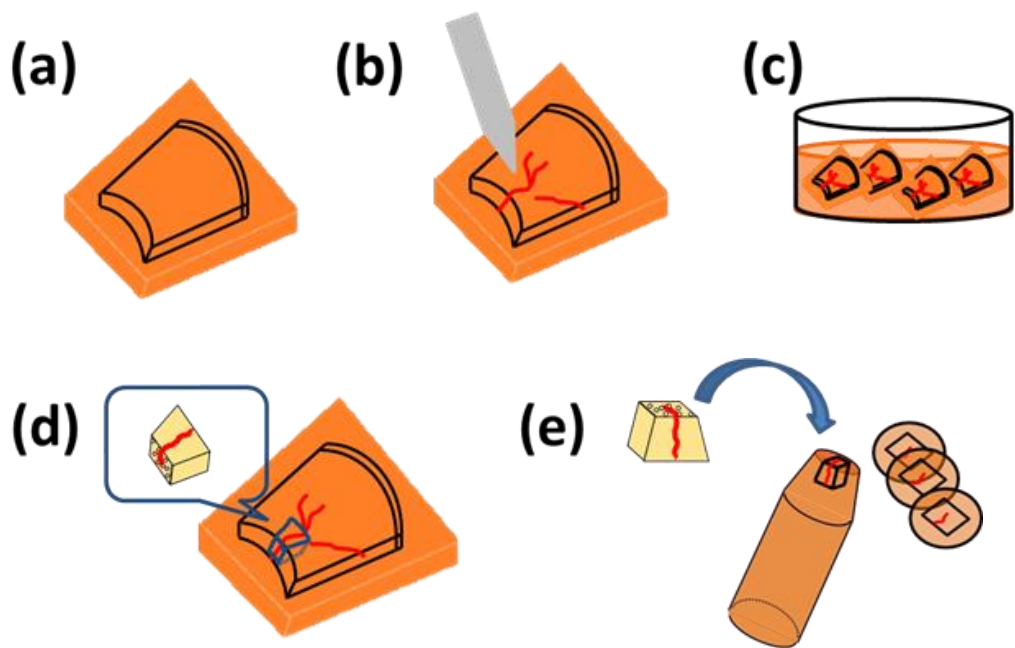


図 2 未脱灰試料における TEM および UHVEMT の試料作製の模式図

(a) 未脱灰試料をレジン包埋

(b) 圧子にて人工的に亀裂を作製

(c) レジン包埋

(d) 亀裂を中心に試料をトリミング

(e) レジン包埋し、亀裂を含む部位で 70~90nm の超薄切切片を作製

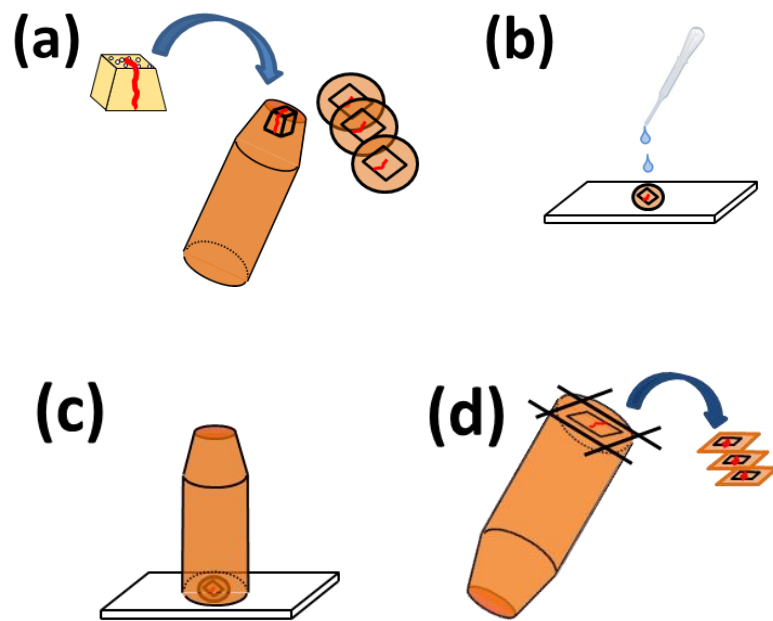


図3 脱灰試料における TEM の試料作製の模式図

- (a) 未脱灰試料から $4\mu\text{m}$ の薄切切片を作製
- (b) プレパラート上で、10%EDTA にて試料を脱灰
- (c) 倒立包埋法にて包埋
- (d) 亀裂を含む部位で 90nm の超薄切切片を作製

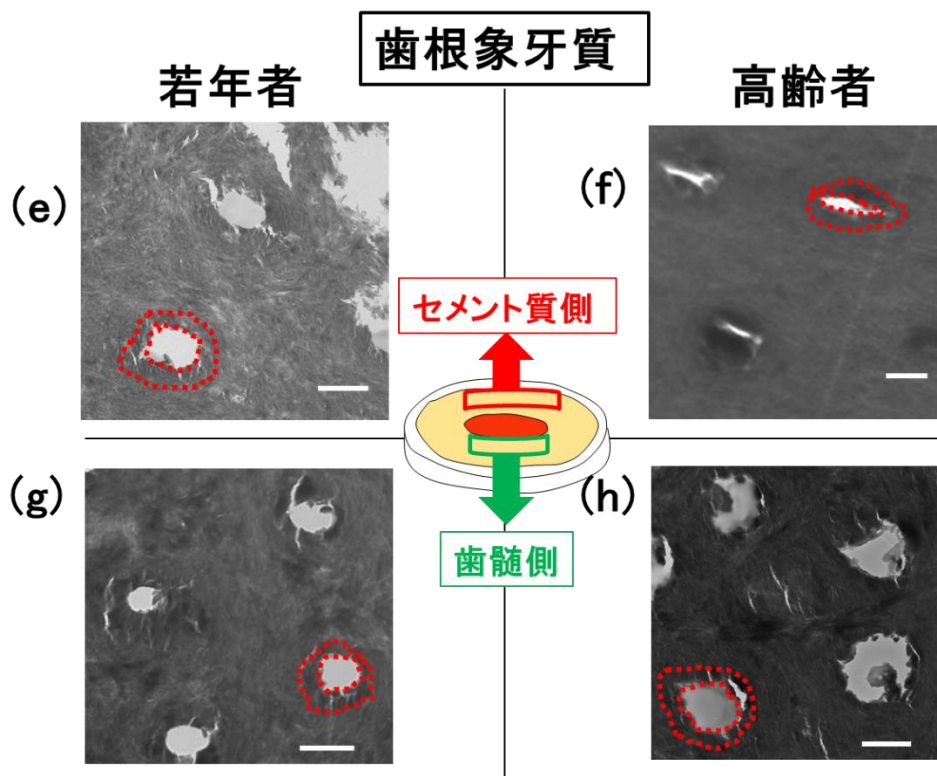
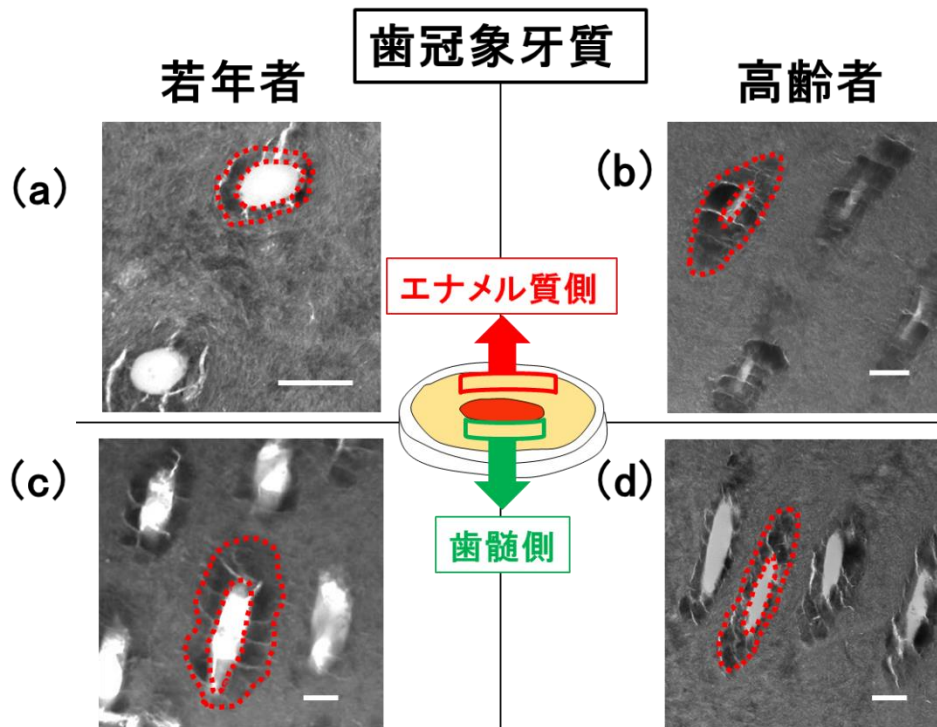


図 4

図 4 TEM 観察による未脱灰象牙質

スケールバー: 2 μ m

赤点線により囲まれた部位: 管周象牙質

(a)(b)(c)(d) 歯冠象牙質

(e)(f)(g)(h) 歯根象牙質

(a) 若年者のエナメル象牙境近傍の健全象牙質像

(b) 高齢者のエナメル象牙境近傍の健全象牙質像

(c) 若年者の歯髄近傍の健全象牙質像

(d) 高齢者の歯髄近傍の健全象牙質像

(e) 若年者のセメント質近傍の健全象牙質像

(f) 高齢者のセメント質近傍の健全象牙質像

(g) 若年者の歯髄近傍の健全象牙質像

(h) 高齢者の歯髄近傍の健全象牙質像

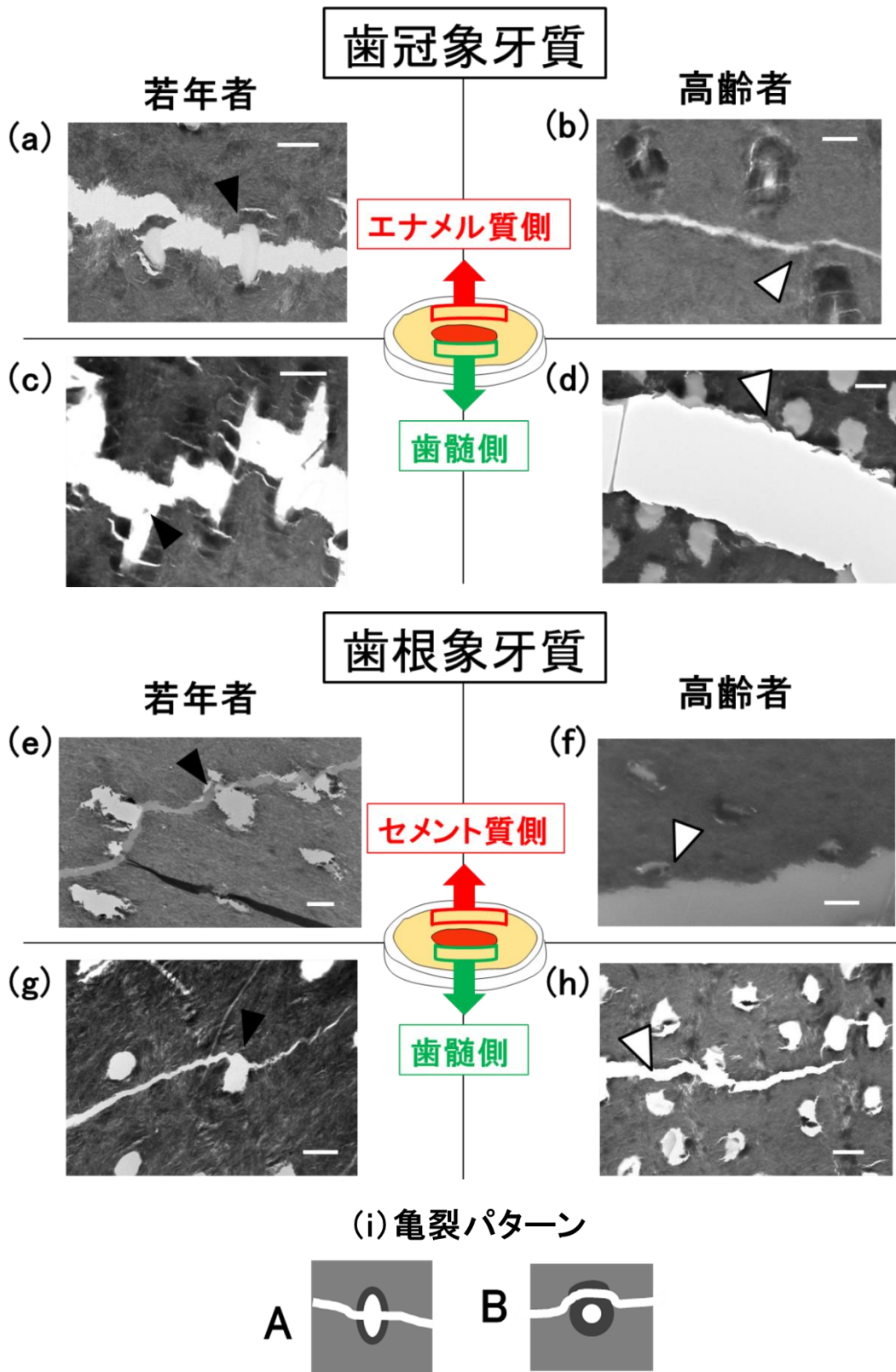


図 5

図 5 TEM 観察による未脱灰象牙質の微小亀裂伸展様相の比較

スケールバー: 2 μ m

黒矢印: 細管と交通し伸展する亀裂

白矢印: 細管と交通せず管周象牙質を回り込み伸展する亀裂

(a)(b)(c)(d) 歯冠象牙質

(e)(f)(g)(h) 歯根象牙質

(a) 若年者のエナメル象牙境近傍の象牙質亀裂像

(b) 高齢者のエナメル象牙境近傍の象牙質亀裂像

(c) 若年者の歯髄近傍の象牙質亀裂像

(d) 高齢者の歯髄近傍の象牙質亀裂像

(e) 若年者のセメント質近傍の象牙質亀裂像

(f) 高齢者のセメント質近傍の象牙質亀裂像

(g) 若年者の歯髄近傍の象牙質亀裂像

(h) 高齢者の歯髄近傍の象牙質亀裂像

(i) 亀裂伸展パターンの模式図

A: 細管と交通し伸展する亀裂

B: 管周象牙質で伸展経路を変え細管と交通せず伸展する亀裂

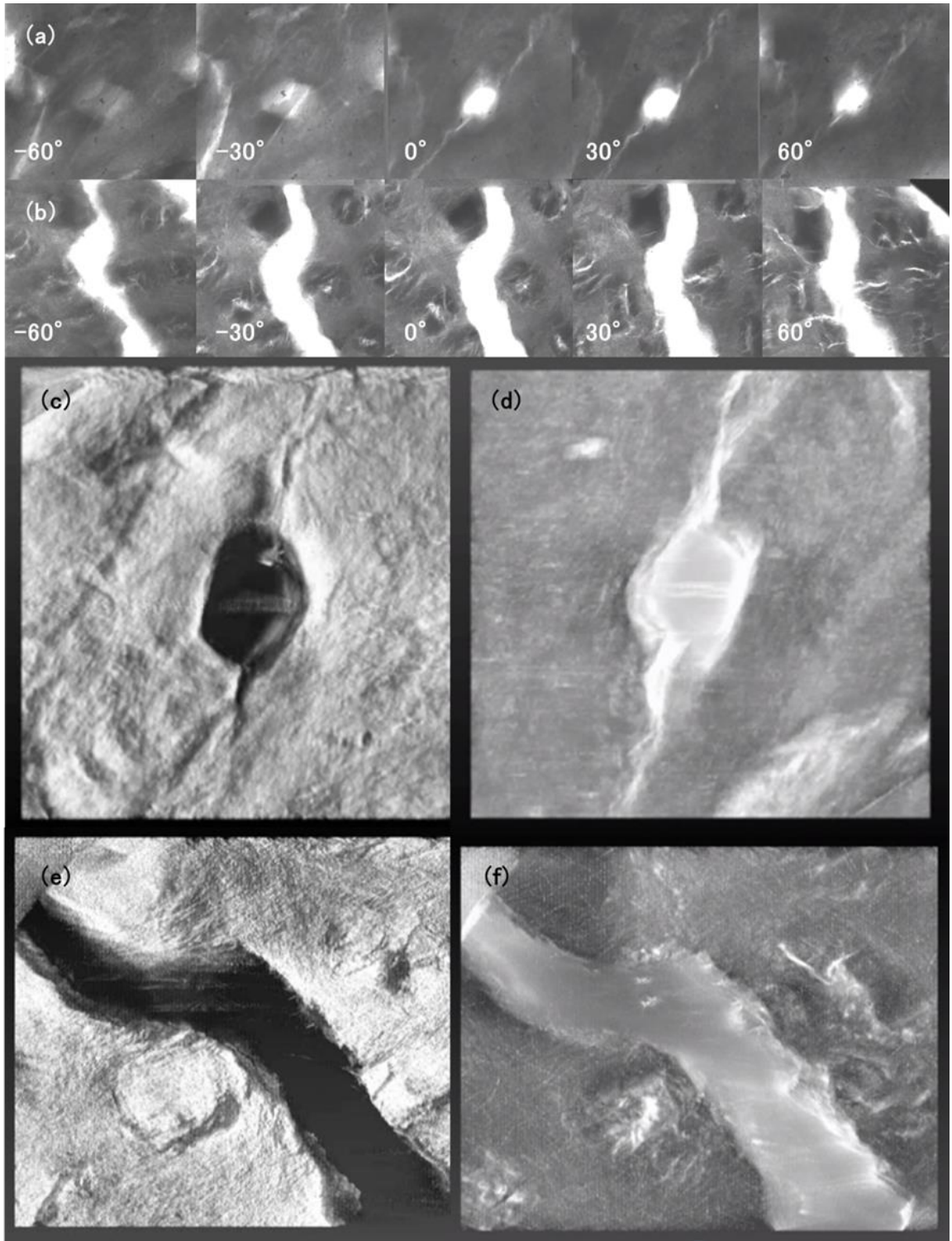


图 6

図 6 トモグラフィー撮影像

(a)(b) UHVEMT により傾斜角範囲-60 度～+60 度において 2 度ずつ撮影した画像から 30 度毎の傾斜撮影画像を抜粋

(a) 若年者の歯冠象牙質の亀裂の傾斜撮影像

(b) 高齢者の歯冠象牙質の亀裂の傾斜撮影像

(c)(d) トモグラフィー像(a)から 3 次元構築を行った若年者の亀裂像

(c) 表面性状を再現した亀裂像

(d) 内部構造を含む亀裂像

(e)(f) トモグラフィー像(b)から 3 次元構築を行った高齢者の亀裂像

(e) 表面性状を再現した亀裂像

(f) 内部構造を含む亀裂像

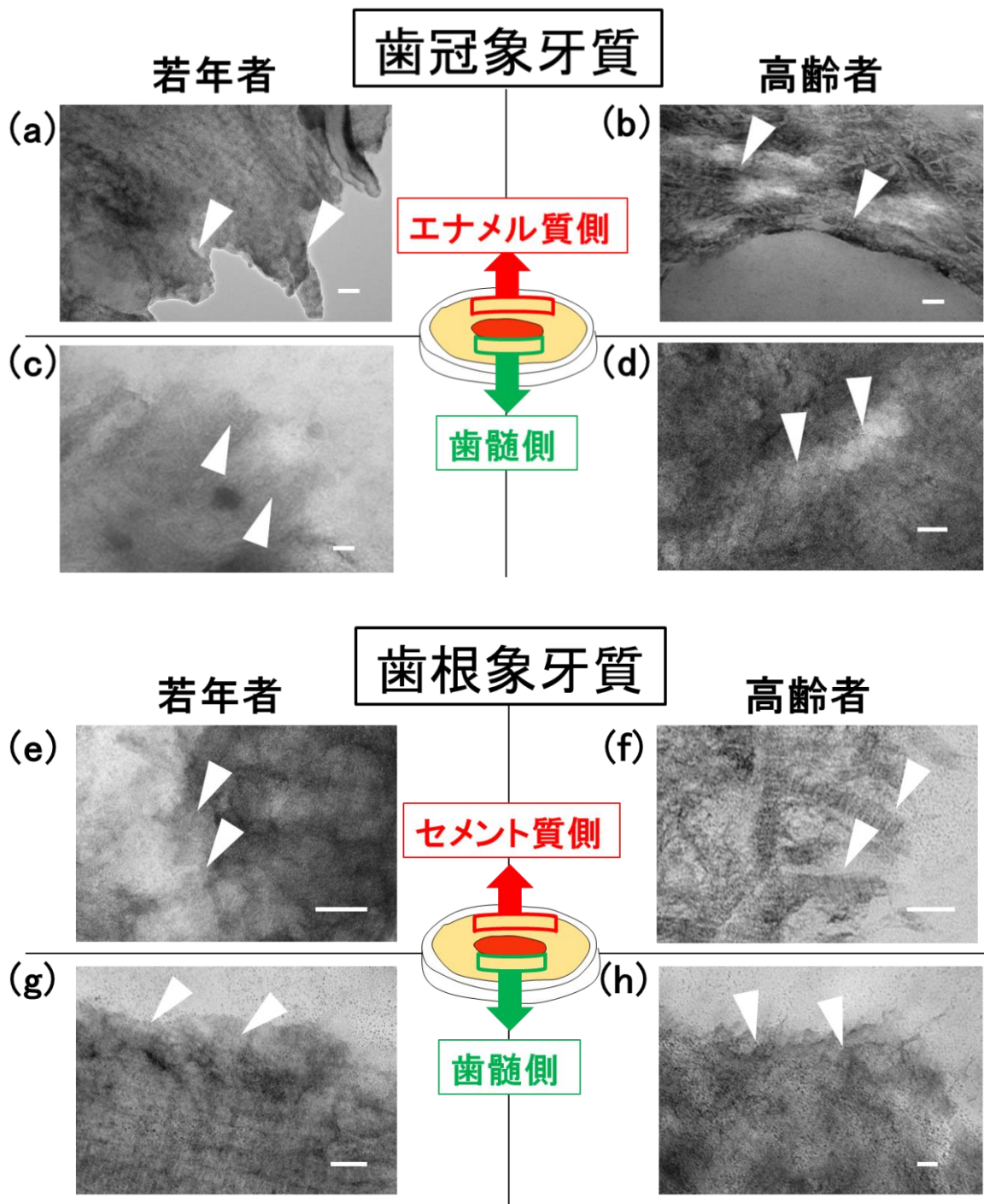


図 7

図7 脱灰象牙質試料における微小亀裂伸展様相の評価

スケールバー: 2 μ m

白矢印: コラーゲン線維の断裂像

(a)(b)(c)(d) 歯冠象牙質

(e)(f)(g)(h) 歯根象牙質

(a) 若年者のエナメル象牙境近傍の象牙質亀裂像

(b) 高齢者のエナメル象牙境近傍の象牙質亀裂像

(c) 若年者の歯髄近傍の象牙質亀裂像

(d) 高齢者の歯髄近傍の象牙質亀裂像

(e) 若年者のセメント質近傍の象牙質亀裂像

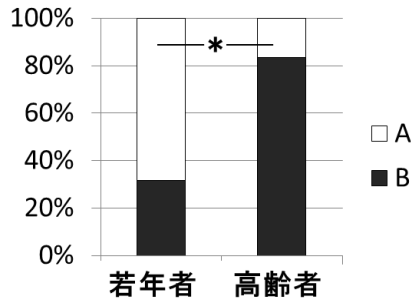
(f) 高齢者のセメント質近傍の象牙質亀裂像

(g) 若年者の歯髄近傍の象牙質亀裂像

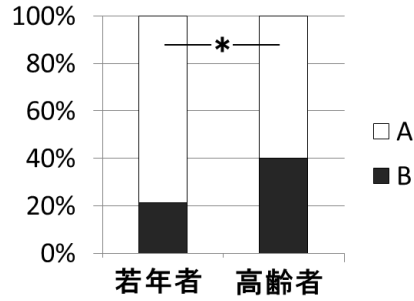
(h) 高齢者の歯髄近傍の象牙質亀裂像

歯冠象牙質

(a)エナメル象牙境近傍の象牙質



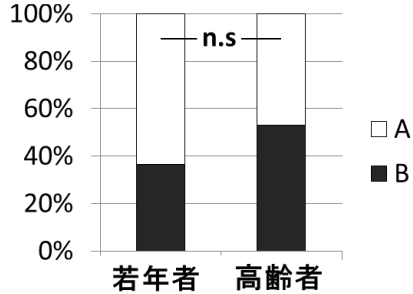
(b)歯髄近傍の象牙質



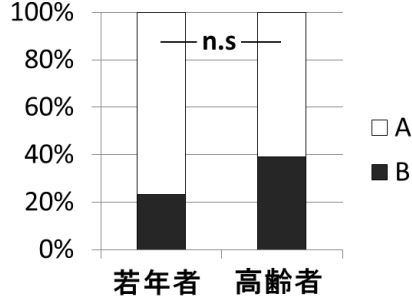
若年者:n=7
 高齢者:n=7
 細管総数:n=282

歯根象牙質

(c)セメント質近傍の象牙質



(d)歯髄近傍の象牙質



* : 若年者と高齢者における亀裂パターンの有意差 ($P < 0.05$)

図 8 亀裂伸展パターンの統計結果

(a)(b) 縦軸: 比率

(a) 歯冠部エナメル象牙境近傍の象牙質亀裂パターンの比較

(b) 歯冠部歯髄近傍の象牙質亀裂パターンの比較

(c) 歯根部セメント質近傍の象牙質亀裂パターンの比較

(d) 歯根部歯髄近傍の象牙質亀裂パターンの比較

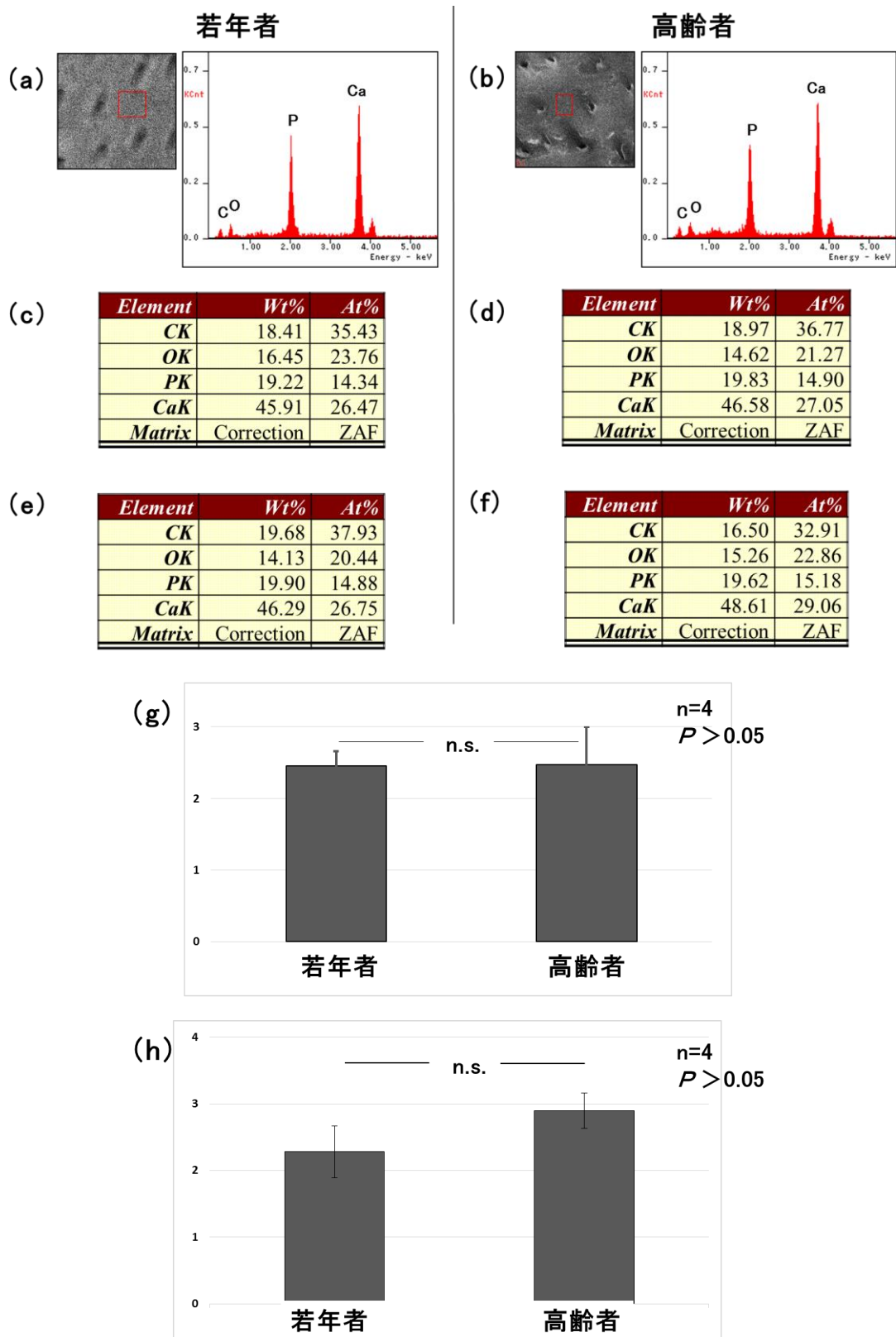


图 9

図 9 元素組成分析

(a) (b): 横軸: 特性 X 線のエネルギー

縦軸: 元素の特性 X 線エネルギーのシグナルカウント数

(g)(h): 縦軸: Ca/C 比

(a) 若年者の元素組成スペクトル

(b) 高齢者の元素組成スペクトル

(c) 若年者の歯冠象牙質における ZAF 補正後の構成元素比

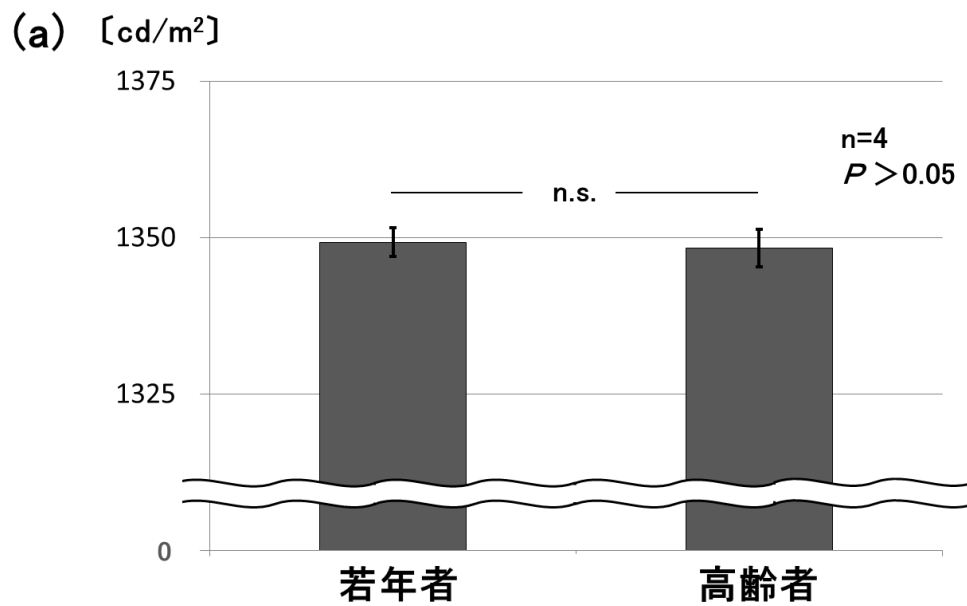
(d) 高齢者の歯冠象牙質における ZAF 補正後の構成元素比

(e) 若年者の歯根象牙質における ZAF 補正後の構成元素比

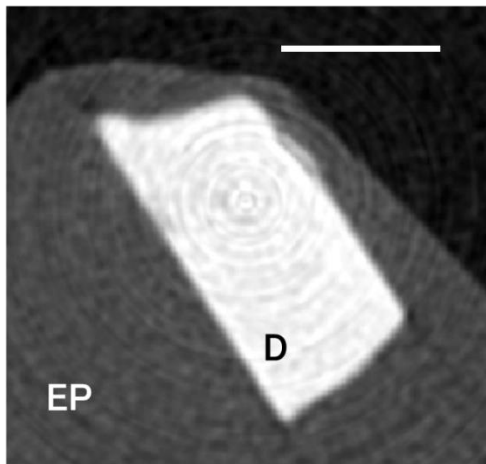
(f) 高齢者の歯根象牙質における ZAF 補正後の構成元素比

(g) 若年者と高齢者の歯冠象牙質のカルシウム構成比の比較

(h) 若年者と高齢者の歯根象牙質のカルシウム構成比の比較



(b) 若年者



(c) 高齢者

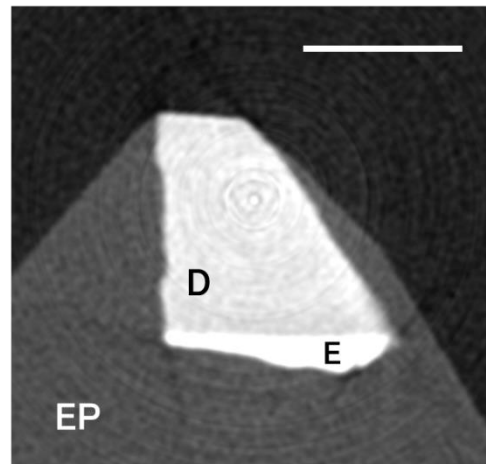


図 10 μ CT 画像によるミネラル密度の評価

D:象牙質、E:エナメル質、EP:エポキシ樹脂、スケールバー:1mm

(a) 若年者と高齢者のミネラル密度の比較

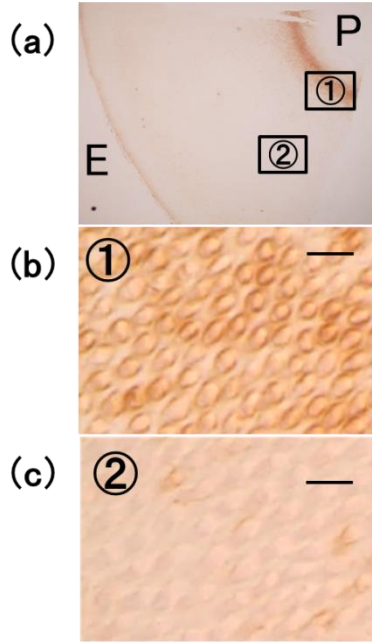
縦軸: μ CT 画像から得られた試料の輝度

(b) 若年者の μ CT 画像

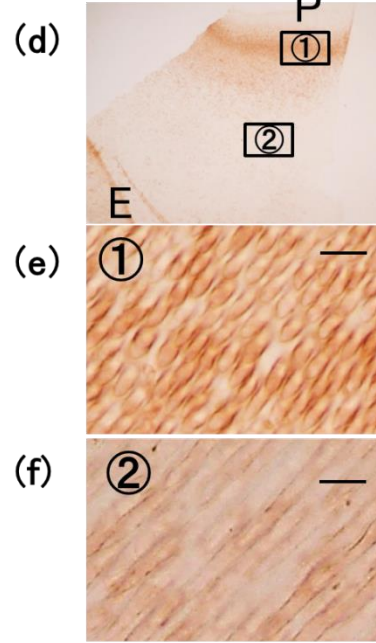
(c) 高齢者の μ CT 画像

齒冠象牙質

若年者

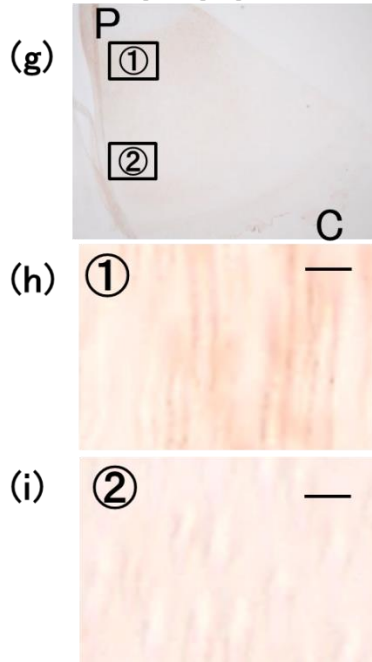


高齡者



齒根象牙質

若年者



高齡者

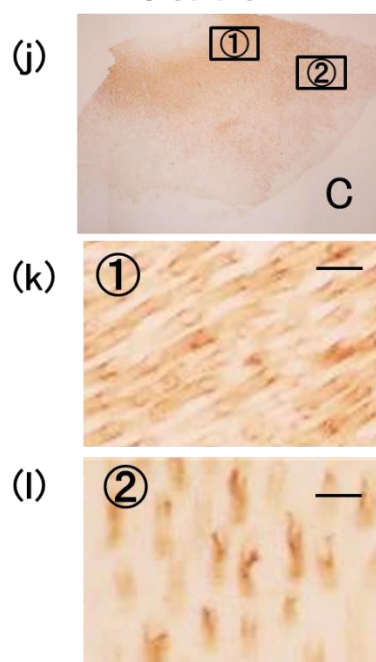


图 11

図 11 免疫組織化学染色による AGEs 沈着の評価

P: 歯髄、E: エナメル質、C: セメント質、スケールバー: 5 μ m

(a)(b)(c)(d)(e)(f) 歯冠象牙質

(g)(h)(i)(j)(k)(l) 歯根象牙質

(a) 若年者の免疫化学染色像

(b) (a)の①の強拡大像

(c) (a)の②の強拡大像

(d) 高齢者の免疫化学染色像

(e) (d)の①の強拡大像

(f) (d)の②の強拡大像

(g) 若年者の免疫化学染色像

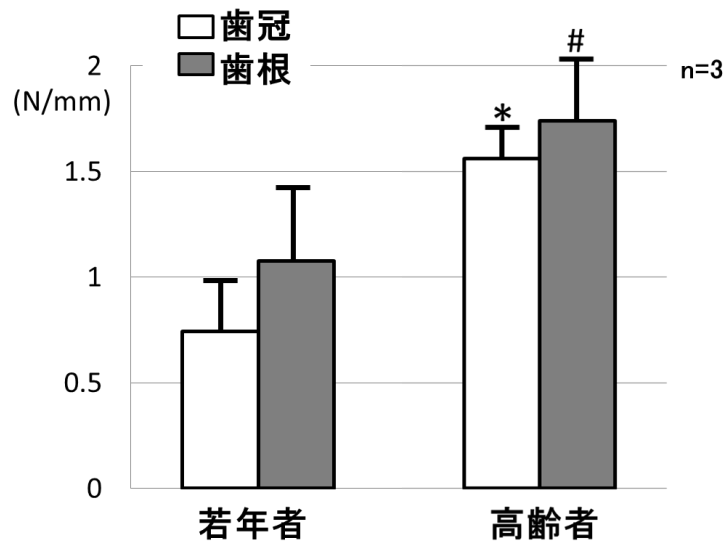
(h) (g)の①の強拡大像

(i) (g)の②の強拡大像

(j) 高齢者の免疫化学染色像

(k) (j)の①の強拡大像

(l) (j)の②の強拡大像



* :若年者と高齢者の歯冠象牙質コラーゲン線維の剛性の有意差 ($P < 0.05$)
 # :若年者と高齢者の歯根象牙質コラーゲン線維の剛性の有意差 ($P < 0.05$)

図 12 象牙質コラーゲンの剛性の比較

縦軸:stiffness 値