The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	齲蝕罹患象牙質における糖化最終産物（AGEs）蓄積の多面的解析
Author(s)	松田, 祐輔
Citation	大阪大学, 2017, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/61671
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

様式３

論　文　内　容　の　要　旨

氏　名　（　松田祐輔　）	
論文題名	齲蝕罹患象牙質における糖化最終産物（AGEs）蓄積の多面的解析

【研究目的】

人における加齢変化の指標には、ビタミンD、免疫能、酸化ストレスなどが挙げられるが、糖化反応によって形成される糖化最終産物（Advanced Glycation End-products：以下AGEs）もその一つである。AGEsは、メイラード反応と呼ばれる還元糖のカルボニル基がタンパク質のアミノ基と非酵素的に反応することで形成される構造群の総称であり、多くの種類が報告されている。コラーゲンをはじめとするタンパク質におけるメイラード反応による架橋構造形成はその構造を脆弱なものへと変化させ、組織の硬化を引き起こすことから動脈硬化や骨粗鬆症の重要な反応と考えられている。また架橋構造の形成はタンパク質の重合を引き起こすことから溶解性、疎水性の変化、プロテアーゼ耐性化などの変化をタンパク質にもたらし糖尿病合併症や神経変性疾患などの発症に関与することが知られている。口腔領域疾患におけるAGEsとの関連は、血糖のコントロール不良による歯周病の憎悪や髄腔内の病的な石灰化などが報告されているのみである。

齲蝕は歯科における代表的な疾患の一つであり、その発生、進行、治療方法、予防などについて様々な研究が行われてきた。齲蝕とAGEsの関連については象牙質が齲蝕に罹患することによりAGEsが増加すると報告されているが、その分布状況や影響について十分な検討が行われてはいない。

これまで当教室では加齢に伴う象牙質の物性の変化やAGEs蓄積の評価を免疫組織化学的手法、ウエスタンブロットなどの生化学的手法、高速液体クロマトグラフィーによる分析化学的手法、蛍光寿命測定法を用いて行ってきた。本研究ではこれらの技術を応用し、齲蝕罹患象牙質におけるAGEs蓄積について多面的解析を行った。

【材料と方法】

1）免疫組織化学染色法、グラム染色法による形態学的評価

脱灰処理を行った齲蝕罹患象牙質を、パラフィン包埋を行った後、切片を作成し抗AGEs抗体を用いて抗原抗体反応を行い、DAB染色後観察した。

2）免疫電子顕微鏡解析による形態学的評価

脱灰処理を行った齲蝕罹患象牙質をトリミング後低温紫外線重合にて包埋し超薄切片を作成した。抗AGEs抗体を用いて抗原抗体反応を行い、金コロイド付き2次抗体の局在を透過型電子顕微鏡で観察を行い、健全部と齲蝕罹患部でのAGEsの分布を精査した。

3）ウエスタンブロット法によるAGEsの検出

脱灰処理を行った歯片から齲蝕罹患象牙質および健全象牙質を同量切り出し、1M-HCl またはpepsin処理によって可溶化した後、ポリアクリルアミド電気泳動(SDS-PAGE)により分離、セミドライブロッティング法でPDVF膜へ転写した。抗AGEs抗体を一次抗体として用い、検出は化学発光にて行った。

4）ELISA法によるAGEsの検出・定量

脱灰処理を行った歯片から齲蝕罹患象牙質、健全象牙質をそれぞれ切り出し、封管中に6M-HClにて完全分解（110℃、20時間）を行い、競合法により検出および定量を行った。

5）高速液体クロマトグラフィー(HPLC)によるAGEsの同定

脱灰処理を行った歯片から齲蝕罹患象牙質を切り出し、完全分解後C18逆相カラム、蛍光検出器(Excitation:335nm, Emission:385nm)を用いて高速液体クロマトグラフィーを行い、AGEsの同定を行った。

6）齲蝕罹患象牙質コラーゲンの蛍光強度および蛍光寿命測定

齲蝕罹患部を含む1mm厚の歯片を切り出し脱灰後、紫外線ダイオードレーザーを用い励起させ、時間相関　単一光子相関法(TCSPC法)にて蛍光を測定した。

【結果】

1) グラム染色及び免疫組織化学染色法により齲蝕罹患部では細菌の侵入部と一致するように抗コラーゲン抗体では弱染し、周囲の抗AGEs抗体が強染した。

2)免疫電子顕微鏡による観察から、齲蝕罹患象牙質部では健全部と比較してAGEsの沈着が増加していた。また、沈着様相も健全部では象牙細管周囲に多いのに対して、齲蝕罹患象牙質部では管間象牙質にまでAGEs沈着範囲が広がっていることが分かった。

3)ウエスタンブロットでは、齲蝕罹患象牙質部でのコラーゲンの減少とAGEsの蓄積を認めた。

4)ELISA法では齲蝕罹患象牙質でのAGEs蓄積量は健全象牙質と比較し増加している傾向を示した。

5)高速液体クロマトグラフィー解析において、標品の合成ペントシジンと同じ保持時間を示すクロマトグラムピークが得られた。また、クロマトグラムから齲蝕罹患象牙質におけるペントシジンは健全象牙質よりも多く存在している傾向を示した。

6) 齲蝕罹患象牙質コラーゲンの蛍光強度は、齲蝕罹患部が健全部よりも弱く検出された。蛍光寿命は齲蝕罹患部での顕著な短縮を認めた。

【まとめ】

本研究の結果より、齲蝕罹患象牙質において象牙細管に沿う形でAGEsが蓄積し、その量は健全部と比較して増加していることが示された。これは、齲蝕の罹患により口腔内に暴露された象牙質コラーゲンが、食物などに由来する還元糖によるAGEs修飾を受けたからと考えられる。齲蝕罹患象牙質では蛍光寿命の顕著な短縮が認められたことから、コラーゲンに比べて蛍光寿命の短いAGEsの蓄積が起こっていると考えられる。さらに、齲蝕罹患象牙質にはAGEsが多く存在することから、蛍光寿命測定が齲蝕領域を判断する指標として利用できることが示唆された。

—

様式７

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏　名　（　松田　祐輔　）			
論文審査担当者		（職）	氏　名
	主 査	教授	竹重　文雄
	副 査	教授	豊澤　悟
	副 査	准教授	北村　正博
	副 査	講師	伊藤　祥作

論文審査の結果の要旨

本研究は、齲蝕罹患による象牙質への糖化最終産物(AGEs)の蓄積について解明することを目的としたものである。

形態学的手法、生化学的手法、物理化学的手法、および分析化学的手法といった多面的な解析によって、齲蝕罹患象牙質では健全象牙質よりも多くの AGEs が蓄積していることが明らかとなった。齲蝕罹患象牙質の AGEs は、歯髄からの糖供給が困難なエナメル象牙質境側に多く蓄積することから、外部環境から供給された糖による糖化修飾であることが示唆された。さらに、齲蝕罹患象牙質において AGEs の蓄積によると考えられる蛍光寿命の短縮が認められたことから、蛍光寿命測定法が齲蝕除去の指標を示す検査法として利用できる可能性が示された。

以上の研究成果は、齲蝕罹患による象牙質への糖化最終産物の蓄積について新しい知見を与えるものであり、博士（歯学）の学位論文として価値のあるものと認める。