The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	マルチモーダルイメージングを用いたin vivo う蝕修復モデルの構築
Author(s)	神田, ひかる
Citation	大阪大学, 2024, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/95996
rights	
Note	やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

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　（　　神田　ひかる　　）	
論文題名	マルチモーダルイメージングを用いた *in vivo* う蝕修復モデルの構築

論文内容の要旨

【研究目的】

「削らないう蝕治療」の実現のために、イオン動態に着目したバイオミネラリゼーションを促進させる材料開発が進められている。フッ素（F）をはじめとした多様なイオンは、う蝕においてダイナミックな動態を示し、その過程はう蝕の進行と抑制に大きく関わっている。先行研究の *in vitro* 実験においては、健全象牙質における亜鉛（Zn）イオンによる象牙質の耐酸性獲得メカニズムを量子・エックス線ビーム技術を駆使して明らかにした。ここから、う蝕に罹患した歯質におけるイオン動態に関する理解をさらに深めるためには、 実際の口腔内環境で評価をすることが必須である。しかしながら、う蝕修復に関与する *in vivo* モデルは確立されておらず、う蝕病変内におけるイオン動態は知られていない。本研究では、すでに確立されている *in vivo* う蝕モデルを応用し、ラットの臼歯部咬合面にう蝕修復を施して、う蝕の残存状態によるイオン分布の違いや、脱灰されたう蝕象牙質にイオンがどのような変化をもたらすかについて検討した。具体的には、ラマン分光分析、ナノ CT を用いて象牙質の構造およびう蝕の状態を結晶学的に評価し、大気陽子線励起エックス線/ γ 線分析法（PIXE/PIGE 法）および 飛行時間型 2 次イオン質量分析法（TOF-SIMS）によってう蝕象牙質に共局在するイオンと有機質との関係性を調べ、複数の画像を統括したマルチモーダルイメージングの構築を目的とした。 さらに、 PIXE/PIGE 法による定量評価を組み合わせることで、生体内の象牙質う蝕の病態およびイオン動態を評価するモデルを作製することを試みた。

【材料と方法】

本研究における動物実験は、大阪大学大学院歯学研究科動物実験委員会の承認のもと、大阪大学動物実験規定に則って実施した（承認番号：動歯 R-02-007-0）。

<u>実験1： *in vivo* ラットう蝕修復試料の作製</u>

Sprague-Dawley 系ラット（15 日齢）の口腔内に *Streptococcus mutans* MT8148R 株を感染させ、スクロース高配合う蝕誘発飼料を与えて飼育した。上顎第一臼歯咬合面小窩裂溝部にラウンドバーおよびマイクロエキスカベータを用いて窩洞を形成し、窩洞内に F および Zn イオン徐放性グラスアイオノマーセメントであるケアダイン™ レストア（GC、東京）を充填した。その際、近心小窩はう蝕を除去し、遠心小窩はう蝕を残存させた。なお、コントロール試料として、う蝕のない 7 週齢 Sprague-Dawley 系ラットの上顎第一臼歯咬合面小窩裂溝部に窩洞を形成した後、充填を行った。1 週間および 3 ヵ月経過後、上顎臼歯部を摘出し、近遠心方向に厚さ 500 μm に切断した試料を測定に用いた。（う蝕群 n=6 コントロール群 n=3）

<u>実験2：窩洞象牙質における脱灰状態の評価およびイオンと有機質の共局在解析</u>

実験 1 の 3 ヵ月セメント充填試料において、セメントに接する窩洞内の象牙質の脱灰および象牙質内に取り込まれたイオンの挙動をイメージングし、その相関を探索した。また得られたイメージングを image J を用いて線分析を行なった。

1. ナノ CT による３次元微細構造およびミネラル密度の評価
   試料をナノ CT（SKYSCAN2214、BRUKER）を用いて、ピクセルサイズ 1 ×1 μmで撮影し、非破壊的に 3 次元構造の観察を行った。
2. ラマン分光分析による結晶化度の評価

脱灰によるハイドロキシアパタイト（HAp）の結晶化度の変化を、ラマン分光分析（RAMAN-touch VIS-NIR-OUN、 ナノフォトン）にてイメージングした。

3. PIXE/PEGE 法による元素分布の評価
   カルシウム（Ca）の元素分布を PIXE/PIGE 法（量子科学技術研究開発機構高崎量子応用研究所、 群馬県）で取得した
4. TOF-SIMS による元素および分子イオン分布の共局在評価
   Ca、F 、Zn およびコラーゲンを構成するアミノ酸であるグリシンのイオン分布を TOF-SIMS（M6、IONTOF）を用いてイメージングを行った。

実験3：窩洞象牙質内の多元素定量評価

1 週間、3 ヵ月セメント充填試料、およびコントロール試料において、PIXE/PIGE 法を用いて得られた歯質内の Ca、F および Zn の元素濃度を検量線法を用いて定量的に解析した。各サンプルの Ca イオンのプロファイルから得られた指標をもとに、Ca の喪失量と F 、Zn の取り込み量の関係、および時間経過に伴うその変化を検討した。

【結果および考察】

実験１　*S. mutans* 感染 1 ヶ月後に、マイクロ CT にて上顎第一臼歯に象牙質の深さ 1/3～1/2のう蝕様透過像が観察された。ラット臼歯部において、象牙質の厚さ 2/3 に満たないう蝕の場合は歯髄に不可逆的な炎症を認めないことが過去に報告されているため、この段階で修復処置を行うこととした。セメント充填後マイクロ CT を撮影し、セメントが過不足なく充填されていることを確認して、以降の実験試料に供した。

実験２　ラットから採取した同一試料の同部位をマルチモーダルイメージングすることで、う蝕の状態とイオンの動態を比較し、その相関の検討を行うことが可能となった。う蝕除去試料は、ラマン分光分析で HAp の結晶化度の減少を認めず、ナノ CT においてミネラルの喪失を認めなかった。また、PIXE/PIGE および TOF-SIMS において Ca の減少は認めない健全象牙質には、F の浸透は認めるものの、Zn はほとんど浸透していなかった。また、う蝕残存試料においてラマン分光分析にて HAp の結晶化度の減少を認めるものの、ナノ CT においてミネラルの喪失を認めない試料があり、これはラマン分光分析の感度が高いことを示している。う蝕残存試料の象牙質表層に Ca 濃度の低下した領域には、コラーゲン構成要素であるグリシンの存在が確認された。その領域には F の浸透は認めるものの、Zn は存在せず、そこを通過し Ca が存在する領域に浸透していることがわかった。これにより、HAp が崩壊している領域には Zn は停滞できないことが示唆された。

実験３

PIXE/PIGE 法の結果から、各サンプルにおける Ca 喪失量、Ca 喪失領域における F および Zn の積算濃度、試料表層からの浸透深さ、浸透した総積算濃度を算出した。F は Ca 喪失量が多くなるほど象牙質に取り込まれる量も増加するものの、長期にセメントを充填しても、その浸透深さおよび総取り込み量に有意差はなかった（one-way ANCOVA 、 $*P > 0.05$）。一方、Zn は Ca 喪失量が多くなるほど象牙質に取り込まれる量も増加し、長期にセメントを充填することでその浸透深さおよび総取り込み量は有意に増加した（one-way ANCOVA 、 $*P < 0.05$）。Zn は、 Ca とのイオン半径や配位数の違いから HAp の骨格に取り込まれるとアパタイト構造の歪みを生み出すが知られている。そのため、Zn の浸透には F に比べ時間を要したと考えられる。

【結論】

生体内のう蝕をマルチモーダルイメージングを行うことで、原子スケールでのイオン動態とう蝕の関係を評価するモデルを作製することができた。今後、このモデルを使用することで生体内のう蝕の耐酸性獲得に関する理解が深まり、生物学的なプローチによる非侵襲的なう蝕治療法の開発につながると考えられる。

様式７

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏　名　（　神田　ひかる　）			
論文審査担当者		（職）	氏　名
	主 査	教授	林　美加子
	副 査	教授	天野　敦雄
	副 査	准教授	山口　哲
	副 査	講師	峯　篤史

論文審査の結果の要旨

本研究は、歯の耐酸性獲得メカニズムを元素レベルで解明することを目的とし、生体内の象牙質う蝕の病態およびイオン動態を評価する *in vivo* モデルの構築を試みた。

その結果、*in vivo* ラットう蝕モデルを応用し作製したう蝕修復試料において、う蝕象牙質に共局在するイオンと有機質との関係性を明示するマルチモーダルイメージングの構築を達成した。さらに、イメージングと定量評価を組み合わせることで、歯質内のイオン濃度と抗う蝕性の関連を評価することが可能となった。

以上の研究成果は、う蝕の新規予防・治療法を開発する新たな基盤になるものであり、本研究は博士（歯学）の学位授与に値するものと認める。