

Coupled with Transistor via Molecular Wire”, *Biochim. Biosci. Acta*, in press.

4. Tetsu Yonezawa, Keigo Kamoshita, Masayoshi Tanaka, and Takatoshi Kinoshita, “Preparation of Stable Iron Oxide Nanoparticles using Gelatin as Stabilizing Molecules”, to be submitted.

5. 米澤 徹、金属ナノ粒子の配列固定化と機能、*未来材料*、7(3)、44-49 (2007).

6. 米澤 徹、「金属クラスター集積薄膜」、関 隆広監修「機能物質の集積膜と応用展開」、シーエムシー出版、東京、pp. 119-125 (2006).

7. 米澤 徹、「金属ナノ粒子の種類、合成法分類と基本的な物性」、菅沼克昭監修「金属ナノ粒子ペーストのインクジェット微細配線」、第1編・第2章、シーエムシー出版、東京、pp. 7-19 (2006).

8. 米澤 徹、「小さな配位子に保護された金属ナノ粒子」、菅沼克昭 (阪大産研) 監修「金属ナノ粒子ペーストのインクジェット微細配線」、第1編・第3章8、シーエムシー出版、東京、pp. 70-74 (2006).

9. Tetsu Yonezawa, “Wet preparation of metal nanoparticles and their immobilization on silicon substrates” in “Metal nanoclusters in catalysis and materials science: the issue of size-control: Part II Methodologies”, ed. by Benedetto Corain, Günter Schmid, Naoki Toshima, Elsevier, in press.

2. 学会発表

1. 鴨志田、米澤 徹、田中正剛、木下隆利、「安定な第一周期遷移金属ナノ粒子の湿式合成」、高分子年次大会、3Pd066、2006.5.26、名古屋国際会議場。

2. 米澤 徹、西原 寛、「金属ナノ粒子の湿式調製と精製」、第3回「ナノトコシコロジーアセスと微粒子・ナノチューブのバイオ応用」研究会 13、2006.12.11、仙台ワシントンホテル。

3. 米澤 徹、日本化学会第87春季年会 特別講演「貴金属・遷移金属ナノ粒子の湿式製造と応用展開」、2007.3.28、関西大学。

4. Keigo Kamoshita, Tetsu Yonezawa, Masayoshi Tanaka, and Takatoshi Kinoshita, “Preparation and Property of Magnetite Nanoparticles Stabilized by Gelatin”, Fourth International Conference on Molecular Electronics and Bioelectronics (M&BE4), 1P_66, Tokyo (2007.3).

5. 米澤 徹、「高分散金属ナノ粒子の調製と応用展開—シングルナノからサブミクロンまでの材料づくり」、表面技術協会ナノテク部会第13回研究会(招待)、2006.7.11、東京大学。

6. Tetsu Yonezawa, “Supramolecular approach for arrangement and

immobilization of metal nanoparticles”, Asia Academic Seminar “Molecular and Supramolecular Materials with Designed Functions”, 2007.2.26, Pune, India (National Chemical Laboratory). (Committee Member)

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

特許出願中：金属ナノ粒子を利用した分析に関する技術について、東大 TLO から特許を出願中。公開可能になった時点で詳細はご報告します。

2. 実用新案取得

なし

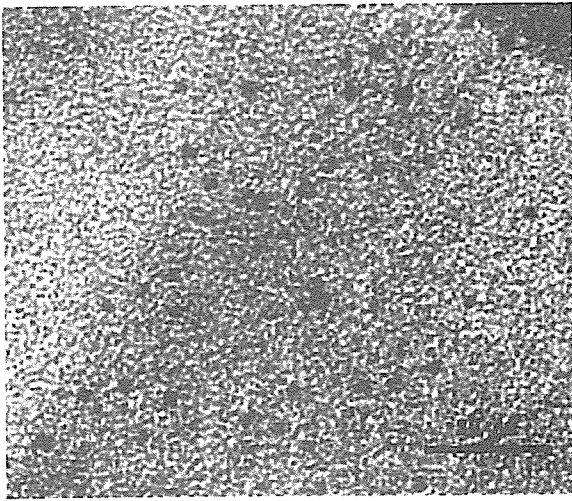


図1 磁性酸化鉄粒子のTEM像

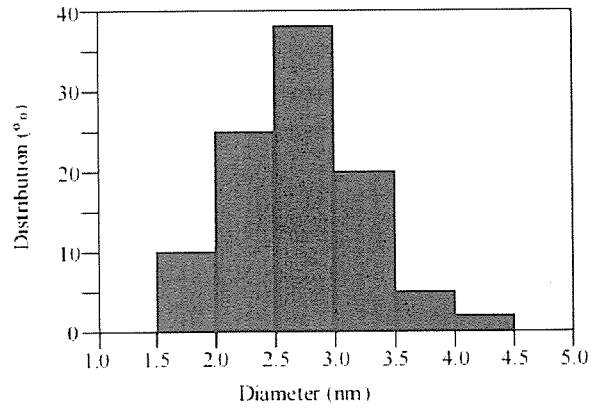


図2 図1の粒子の粒子径分布

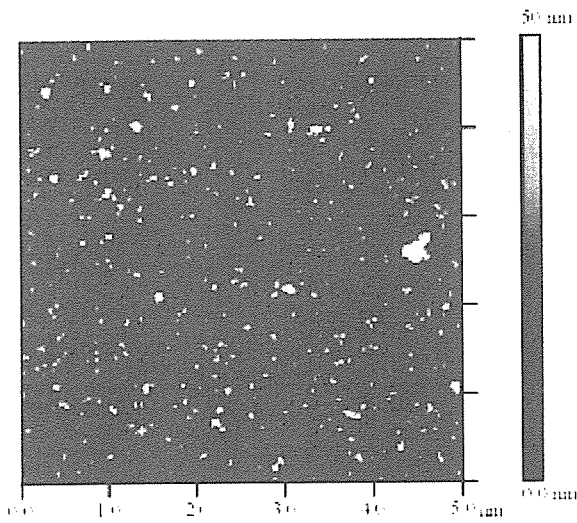


図3 図1粒子のAFM像

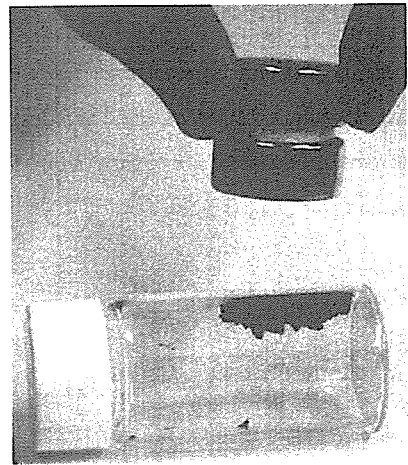


図4 希土類磁石をあてた

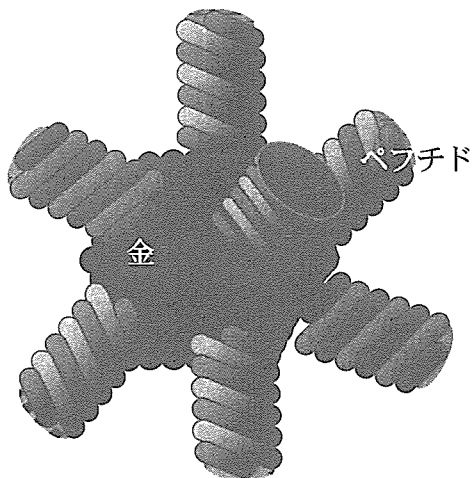


図5 ペプチドに保護された金ナノ粒子の模式図。

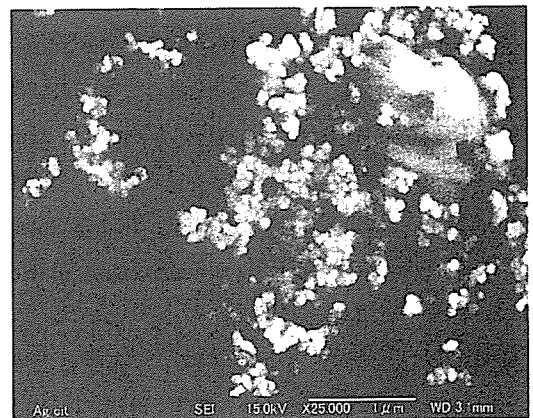


図6 クエン酸還元による円形大型銀ナノ粒子

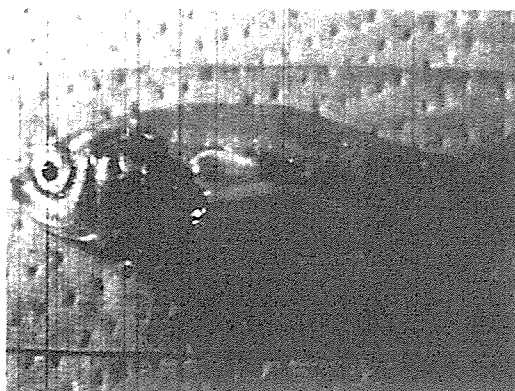


図6 銀ナノ粒子に暴露した金魚



図7 左図の金魚の腸管。

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
分担研究報告書

歯根象牙質表面への BMP-2 塗布による硬組織形成と象牙質吸収に及ぼす
象牙質表面構造の影響

主任研究者 巨理文夫 北海道大学歯学研究科教授
研究協力者 川浪雅光 北海道大学大学院歯学研究科教授
研究協力者 菅谷 勉 北海道大学大学院歯学研究科助教授

研究要旨 これまでの研究で、象牙質表面を脱灰して BMP を塗布することが、新たな歯周組織再生療法に発展する可能性が示された。しかし、硬組織形成だけでなく同時に象牙質面の吸収が観察されたことから、BMP を根面に塗布する前の脱灰液と BMP 濃度が、象牙質表面構造や硬組織形成と象牙質吸収に及ぼす影響を検討し、さらにビスフォスフォネートによる破骨細胞抑制の影響を検討した。

ラット歯根から象牙質片を作製し、EDTA (24%、pH7)、塩酸テトラサイクリン (200mg/ml、pH2)、クエン酸 (飽和、pH1)、PBS の各溶液で脱灰、さらに 0、100、400 μ g/ml の rhBMP-2 に 10 分間浸漬した。口蓋結合組織内に象牙質片を移植し、2、4 週後、硬組織の形成率と象牙質の吸収率を計測した。次にラットにインカドロネートを投与して、破骨細胞の機能を抑制しながら同様の実験を行った。

その結果、いずれの脱灰液を用いた場合も SEM ではコラーゲン線維の露出がみられ、2、4 週後には硬組織形成と象牙質吸収の両方が観察された。硬組織形成率は、EDTA が有意に多かったが、象牙質吸収率は塩酸テトラサイクリンが多かった。また BMP 濃度が高くなると硬組織形成率が低下して象牙質吸収率が高くなる傾向がみられた。ビスフォスフォネートを投与すると、象牙質吸収率だけでなく硬組織形成率も低下した。

以上の結果から、象牙質面を脱灰して BMP を塗布すると、破骨細胞およびカップリング現象が活性化して硬組織が形成するのが主な反応であることが明らかとなった。この反応には、脱灰液の種類や BMP 濃度などが影響していたが、同一標本のきわめて近傍で破骨細胞と骨芽細胞の両方が活性化したことから、さらに象牙質表面の微細な性状が関与している可能性が考えられた。

A. 研究目的

歯周病は歯を支持している歯周組織が炎症によって破壊され、やがて歯が脱落する疾患で、日本人が歯を失う原因の約半分が歯周病とされている。歯周病で失われた骨、歯根膜、セメント質を再生する治療法は、現在でもいくつかの方法が臨床応用されているが、抜歯せざるを得ない進行した歯周病では、

機能を回復するほど十分な量の組織が再生できないのが現状である。

そこで我々はより多くのセメント質を象牙質表面に再生する目的で、bone morphogenetic protein (BMP) を用いて研究を行ってきた。これまでの研究で、象牙質表面を脱灰して BMP-2 を塗布し、その上で線維芽細胞を培養すると付着した細胞の石灰化能

が上昇し、象牙質表面に BMP-2 が付着して機能することが明らかとなった。さらに、BMP-2 を塗布した象牙質片をラット口蓋結合組織内に移植すると、象牙質表面にセメント質様硬組織が形成され、現在臨床応用されている歯周組織再生療法では再性が期待できない、著しく歯周組織が失われているような症例に対しても、有効性が期待された。また、ビーグル犬の前臼歯を用いて裂開状骨欠損を作製し BMP-2 を歯根象牙質に塗布して歯周組織再生への有効性を検討した結果、歯槽骨、セメント質、歯根膜の再生に有効性が認められ、新たな歯周組織再生療法への可能性に、大きく道を開いた。しかし、ラット口蓋結合組織内で実験した場合も、ビーグル犬の歯周組織で実験した場合も、象牙質表面にセメント質様硬組織が形成されただけでなく、象牙質が吸収されたことから、BMP-2 には硬組織誘導作用だけでなく硬組織吸収も活性化することが明らかとなった。象牙質吸収が進行すると歯の脱落に至ることから、象牙質吸収のメカニズムを解明し進行を阻止する方法を明らかにすることはきわめて重要な課題である。そこで本研究では、BMP-2 を根面に塗布する際に前処置として行う象牙質の脱灰液の種類が、象牙質表面構造に及ぼす影響を検討し、さらに塗布する BMP-2 の濃度、さらにビスフォスフォネートによる破骨細胞の抑制が、象牙質表面の硬組織形成や象牙質吸収にどのような影響を及ぼすかを検討した。

B. 研究方法

1) 脱灰液の種類と表面構造の比較

ヒト抜去歯から歯根膜セメント質を除去し、ダイヤモンドディスクで象牙質面を露出させた。さらに露出した象牙質表面を砥石で平滑化した。

作製した象牙質片を 24% EDTA (pH7), 200mg/ml, 塩酸テトラサイクリン (pH2), 飽和クエン酸群 (pH1), で 3 分間脱灰した。コントロールとしてリン酸緩衝液 (pH7) に同様に 3 分間浸漬した。各試験片を水洗、乾燥、蒸着後、走査型電子顕微鏡で表面形態の観察を行った。

2) 脱灰液と BMP-2 濃度の違いによる硬組織形成と象牙質吸収

ラットより採取した歯牙より象牙質片 (1×1×0.

3mm) を作製し、EDTA 群 (24%, pH7), 塩酸テトラサイクリン群 (200mg/ml, pH2), クエン酸群 (飽和, pH1), 非脱灰群の 4 群に分け、各溶液で 3 分間脱灰した。その後、象牙質片を 0, 100, 400 μg/ml のリコンビナントヒト BMP-2 (アステラス製薬) に 10 分間浸漬した。

ウィスター系雄性ラット (10 週齢) を全身麻酔下にて硬口蓋粘膜を部分層弁で剥離し、結合組織内に脱灰、BMP-2 処理した象牙質片を移植して弁を復位縫合した。2, 4 週の観察期間後、10%ホルマリン固定、10%EDTA (pH7. 0) にて脱灰、パラフィン包埋を行い、ヘマトキシレン・エオジン重染色を行って、光学顕微鏡にて病理組織学的に観察した。また、象牙質片上に形成された硬組織の形成率と象牙質の吸収率を計測した。

3) 破骨細胞抑制による硬組織形成と象牙質吸収

同様に、ラット象牙質から象牙質片を作製し、EDTA (24%, pH7) で 3 分間脱灰して 0, 100, 400 μg/ml の BMP-2 溶液に 10 分間浸漬した。実験群はウィスター系雄性ラット (10 週齢) の腹腔内にインカドロン (アステラス製薬) を 1 μg/kg/日, 3 回/週、観察期間終了まで投与し、対照群は生理食塩水を投与した。

投与開始 2 週後に、ラットの口蓋結合組織内に脱灰、BMP-2 処理した象牙質片を移植し、2, 4, 8 週後に組織標本を作製して、象牙質上に形成された硬組織形成率、象牙質表面の吸収率、TRAP 陽性細胞率を計測した。さらに、硬組織形成率は象牙質面が一旦吸収されてから形成された硬組織と、象牙質面が吸収されずに形成された硬組織を分けて計測を行った。

C. 研究結果

1) 脱灰液の種類と表面構造の比較

24% EDTA (pH7), 200mg/ml, 塩酸テトラサイクリン (pH2), 飽和クエン酸群 (pH1) のいずれかで処理を行った場合も、スマヤー層が除去され象牙細管が露出していた。管間象牙質ではコラーゲン線維が露出し、その露出程度は脱灰液の違いによる差は認められなかった (図 1, 2)。リン酸緩衝液で表面処理したコントロールは、象牙質表面にスマヤー層が観察され、象牙細管は閉塞しコラーゲン線維の露出は見られなかった (図 3)。

2) 脱灰液と BMP-2 濃度の違いによる硬組織形成と象牙質吸収

象牙質面を脱灰しなかった場合や BMP-2 を塗布しなかった場合には、硬組織の形成は見られなかったが、脱灰して BMP-2 を塗布した場合には、いずれの群でも硬組織形成と象牙質吸収の両方が観察された。EDTA 群では象牙質表面に薄い硬組織の形成が多く観察されたが(図4)、塩酸テトラサイクリン群では活発な象牙質吸収と不定形な硬組織の形成が多く認められた(図5)。クエン酸群では象牙質表面の脱灰層はもっとも深く、薄い硬組織の形成と多核の巨細胞が脱灰層内に多く観察された(図6)。

4 週後の硬組織形成率は、EDTA 群が他の 3 群と比較して有意に多かった(図7)。一方、象牙質吸収率は、塩酸テトラサイクリン群が他の 3 群と比較して有意に多かった(図8)。また BMP-2 濃度が高くなると硬組織形成率が低下して象牙質吸収率が高くなる傾向がみられた。

3) 破骨細胞抑制による硬組織形成と象牙質吸収

ビスフォスフォネートで破骨細胞の機能を抑制した実験群は、対照群に比較して象牙質の吸収は減少したが、破骨細胞は両群とも同程度に観察された。硬組織形成は、実験群では薄く形成量も減少していた(図9)。

象牙質吸収率は、ビスフォスフォネートで破骨細胞の機能を抑制した実験群が、対照群に比較して有意に低かった($p < 0.01$) (図10)。しかし、TRAP 陽性細胞数は両群間に有意差はなかった。すなわち、破骨細胞の機能が抑制されていることが明らかとなった。

硬組織形成率は、実験群が対照群に比べて有意に低い値となった($p < 0.01$)。また、硬組織形成率を象牙質吸収面に形成されたものと非吸収面に形成されたものを分けて計測した結果、両群とも吸収面に形成された硬組織の方が多かった(図11)。さらに、ビスフォスフォネートで破骨細胞の機能を抑制した実験群は、対照群と比較して象牙質吸収面に形成された硬組織の量は著しく低下したが、非吸収面に形成される硬組織形成率はあまり変わらなかった(図11)。

D. 考察

根面を脱灰してコラーゲン線維が露出した象牙質

表面に BMP-2 を塗布すると、硬組織が形成されたことから、象牙質表面は BMP-2 の担体として機能していたと考えられた。BMP-2 はコラーゲンへの親和性が高く付着しやすいとされており、BMP-2 の担体としても多く使用されていることから、脱灰によって露出したコラーゲン線維が BMP-2 の保持に大きな役割を果たしていたと考えられた。

さらに、根面に BMP-2 を塗布する前の脱灰液が異なると、硬組織形成と象牙質吸収に影響を及ぼした。この原因として、クエン酸や塩酸テトラサイクリンは pH が低く、脱灰と同時に露出したコラーゲン線維を変性させるが、EDTA は中性のキレート剤でコラーゲン線維を変性することなくアパタイトを除去することから、露出したコラーゲン線維の変性程度が BMP-2 の担体としての機能の違いになったと考えられた。すなわち、コラーゲン線維の変性程度は BMP-2 の付着量、細胞の付着や増殖、分化などに影響するのと考えられた。また、塩酸テトラサイクリンは象牙質のカルシウムと結合して根面に残ることが報告されており、塩酸テトラサイクリンは BMP-2 の活性に影響を及ぼす可能性も考えられた。

一方、BMP-2 の濃度が高くなると硬組織形成の活性が低下し、象牙質の吸収率が増加する傾向がみられた。これは、一般に成長因子の活性には至適濃度があるとされているが、BMP-2 は硬組織形成の至適濃度より象牙質吸収の至適濃度が高いためと思われる。

また、ビスフォスフォネートを投与し破骨細胞機能を抑制すると、象牙質の吸収が減少するとともに、硬組織形成も抑制されることが明らかになり、BMP-2 による象牙質表面への硬組織形成には破骨細胞と骨芽細胞のカップリングが深く関与していると考えられた。さらに、ビスフォスフォネートを投与しない対照群では、形成された硬組織の約 30% が非吸収面に、約 70% が吸収面に形成されたことから、BMP-2 の硬組織誘導作用は直接骨芽細胞を活性化するより、破骨細胞を活性化してカップリングを向上させる作用の方が大きいと考えられた。

歯周組織再生には象牙質の吸収を最小限に抑制して硬組織を表面に誘導することが重要であり、そのためには硬組織形成と象牙質吸収におよぼす因子の解明がきわめて重要と考えられる。これまでの結果から、象牙質表面に BMP-2 を塗布して硬組織形成を

誘導する場合には、脱灰液の種類や BMP-2 の濃度など多くの因子が関与していることが明らかとなった。しかし、硬組織の形成と象牙質の吸収が同一の組織標本のきわめて近傍で観察されたこと、また BMP-2 の活性は担体の微小構造に影響されるとされていることから、担体として機能している歯根象牙質表面のきわめて微小な性状の違いなどが、硬組織形成と象牙質吸収に関与している可能性が高いと思われる。

E. 結論

象牙質表面を脱灰して BMP-2 を塗布し、象牙質表面にセメント質様硬組織が形成する新たな歯周組織再生療法を検討する目的で、脱灰液と BMP-2 濃度が象牙質表面構造や硬組織形成と象牙質吸収に及ぼす影響を検討し、さらに破骨細胞の抑制による影響を検討した。

その結果、骨芽細胞が直接活性化するのではなく、破骨細胞およびカップリング現象が活性化して硬組織が形成されることが主な反応であることが明らかとなった。この反応には、脱灰液の種類や濃度、BMP-2 の濃度などが影響していることが明らかとなったが、同一標本のきわめて近傍で破骨細胞と骨芽細胞の両方が活性化したことから、さらに象牙質表面の微細な性状が関与している可能性が考えられた。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Miyaji H, Sugaya T, Kato K, Kawamura N, Tsuji H, Kawanami M. Dentin resorption and cementum-like tissue formation by bone morphogenetic protein application. *J Periodont Res*; 41: 311-315. 2006.
2. 本郷哲也, 宮治裕史, 菅谷 勉, 川浪雅光: BMP-2 処理した象牙質表面におけるセメント質様硬組織形成のビスフォスフォネートによる抑制. *日歯周誌*, 48 (4) : 285-296, 2006.

2. 学会発表

1. 得永圭介, 宮治裕史, 伊部敬介, 石塚良介, 菅谷 勉, 川浪雅光: 歯根象牙質への BMP-2 塗布による歯周組織再生の経時的評価. 第 49 回春季日本歯周病学会, 市川, *日歯周誌*, 48 (春季特別号) : 107, 2006

2. 石塚良介, 宮治裕史, 伊部敬介, 加藤昭人, 得永圭介, 井上加菜, 田中 陽, 菅谷 勉, 川浪雅光: 歯根象牙質表面への BMP-2 とコラーゲンハイドロゲルの塗布が歯周組織再生を高める. 第 49 回秋季日本歯周病学会, 大阪, *日歯周誌*, 48 (秋季特別号) : 148, 2006.

3. 本郷哲也, 宮治裕史, 川村直人, 天雲太一, 大谷香織, 得永圭介, 菅谷 勉, 川浪雅光: Bisphosphonate 投与は BMP-2 処理した象牙質表面へのセメント質様硬組織形成と象牙質吸収を抑制する. 第 49 回秋季日本歯周病学会, 大阪, *日歯周誌*, 48 (秋季特別号) : 149, 2006.

4. H. MIYAJI, T. SUGAYA, K. IBE, R. ISHIZUKA, K. TOKUNAGA, M. KAWANAMI : Periodontal tissue reaction on BMP application to root dentin surface. 84th General Session of the IADR, Brisbane, CD-ROM of abstracts, *J Dent Res*, 85, Spec Iss B, 2006.

G. 知的所有権の取得状況

なし



図1. 24%EDTAで3分間脱灰後の象牙質面



図2. 200 μg/ml 塩酸テトラサイクリンで3分間脱灰後の象牙質面

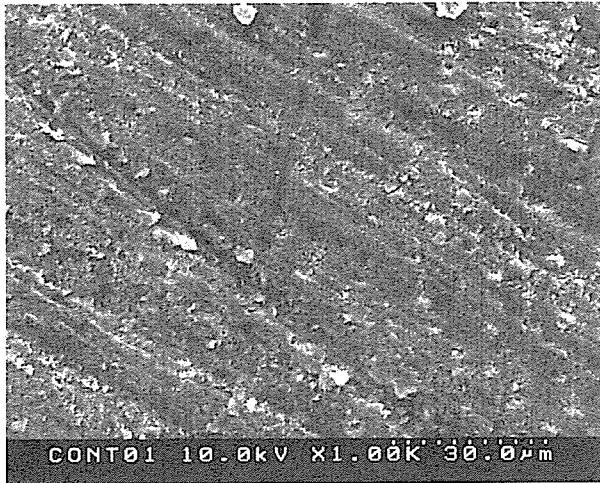


図3. 非脱灰象牙質面

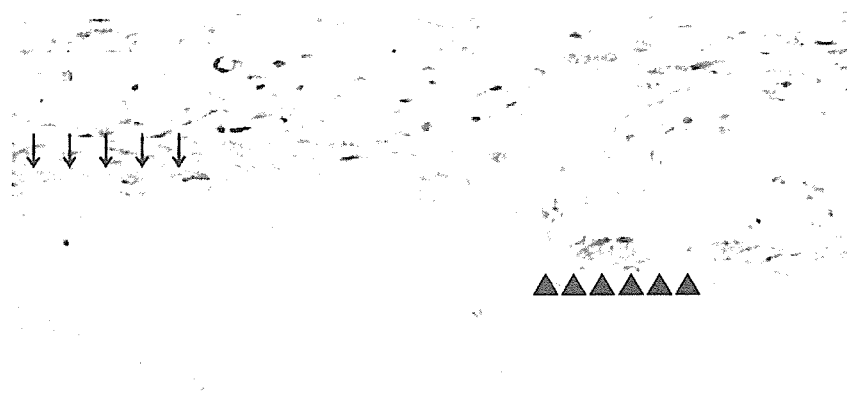


図4. EDTA脱灰 BMP400 μg/ml 処理 (2週後)
硬組織形成 (↓) と象牙質吸収 (▲) が見られる

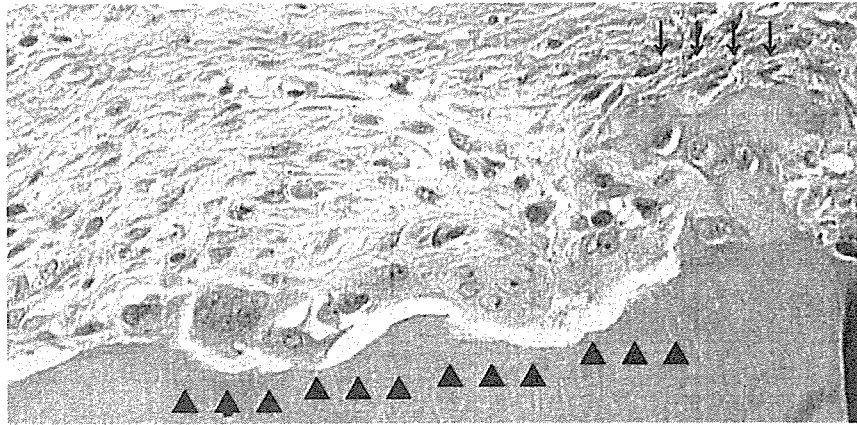


図5. 塩酸テトラサイクリン脱灰 BMP100 μ g/ml 処理 (2 週後)
硬組織形成 (↓) と象牙質吸収 (▲) が見られる

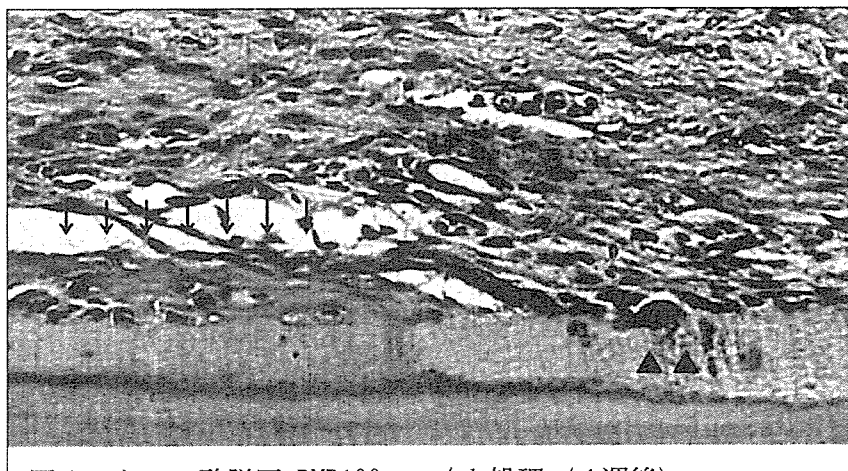


図6. クエン酸脱灰 BMP100 μ g/ml 処理 (4 週後)
硬組織形成 (↓) と象牙質吸収 (▲) が見られる

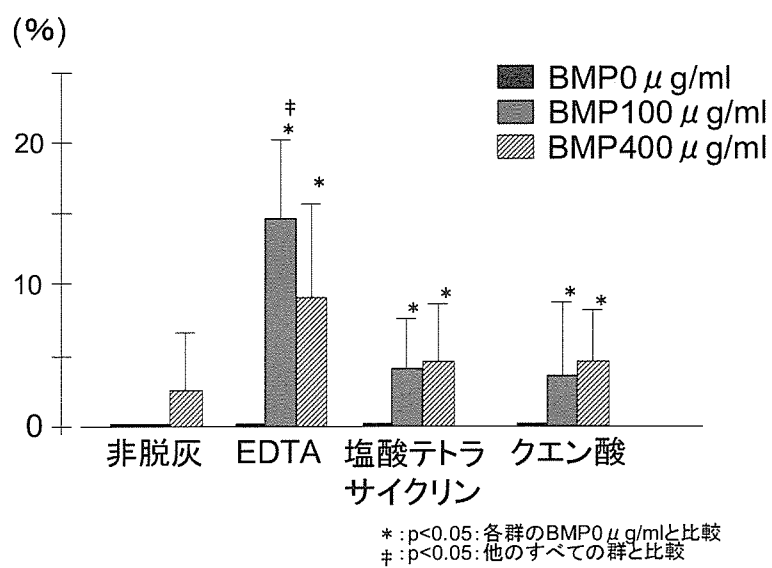


図7. 各溶液で脱灰した場合の硬組織形成率 (4 週後)

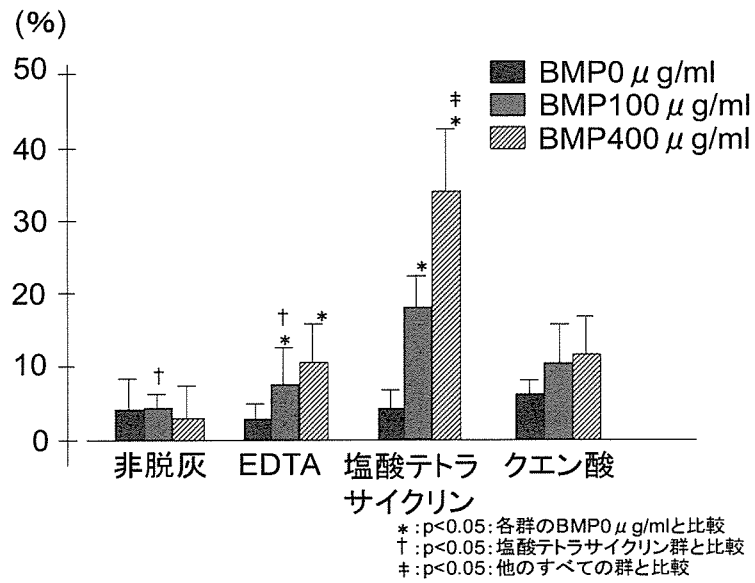


図8. 各溶液で脱灰した場合の象牙質吸収率 (4週後)

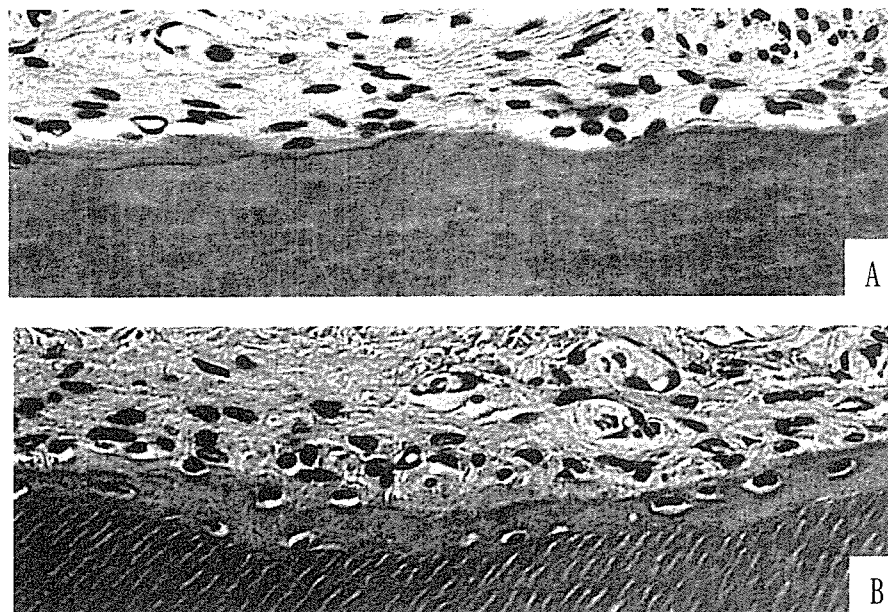


図9. BMP100 $\mu\text{g/ml}$ 処理 (8週後)

A: ビスフォスフォネート投与。B: PBS 投与

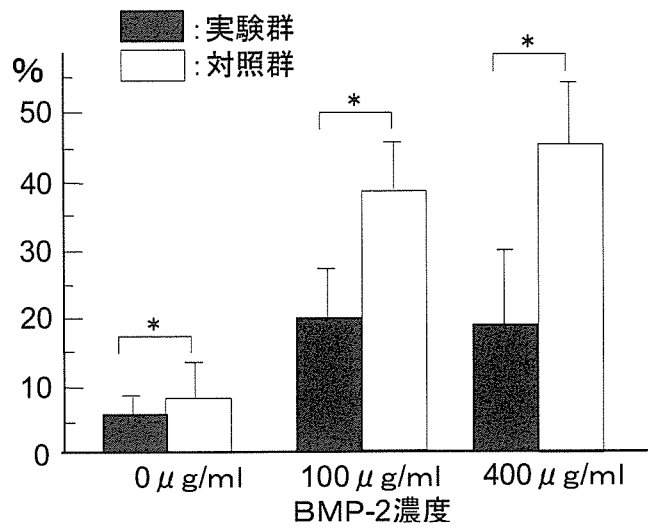


図 10. ビスフォスフォネートで破骨細胞を抑制した場合の象牙質吸収率（8週）

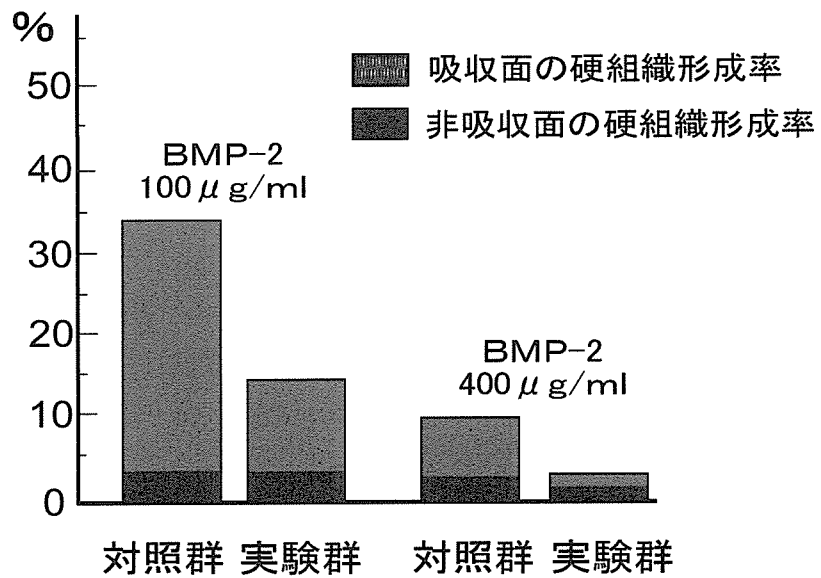


図 11. ビスフォスフォネートで破骨細胞を抑制した場合の象牙質吸収面と非吸収面の硬組織形成率（8週後）

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
分担研究報告書

乳歯歯根吸収部位における修復機構の存在とナノ物質の影響について

主任研究者 亘理文夫
研究協力者 八若保孝

北海道大学歯学研究科教授
北海道大学大学院歯学研究科教授

研究要旨 本研究は、まず、いろいろな環境下での乳歯歯根吸収の状態を組織学的に明らかにすると同時に、同部位に対する生体の局所修復機構の存在の証明することを第一の目的として、ヒト乳歯歯根を光学顕微鏡ならびに透過型電子顕微鏡を用いて、組織学的観察を行った。乳歯歯根の観察により、健全と考えられていた乳歯であっても、歯根吸収が部分的に生じていること、炎症などの病的歯根吸収では、歯根象牙質の深部にまで吸収が及んでいることを明らかにした。続いて観察された修復機構の、すなわち修復性セメント質添加の微細構造を詳細に検索し、吸収部位への修復性セメント質添加により、歯根表面の形態がある程度修復されていることが示された。しかし、添加したセメント質は、もとの健全セメント質とは構造上異なり、その構造は、比較的疎で、空隙を有し、コラーゲン線維はあまり観察されず、多数の細く短い細線維と微小顆粒が観察された。これらの結果から、局所の修復機構は働くが、周囲の環境因子の影響などにより、十分な修復が得られていないことが示唆された。

ナノ物質を担体としてこのような修復機構の働く部位に応用することにより、修復機構の確実で速やかな発現が可能になれば、より健全に近い修復性セメント質の添加が生じる可能性が高く、ナノ物質の応用による歯根再生の可能性が考えられた。

A. 研究目的

歯根は、表層のセメント質と内層の象牙質から構成されており、歯槽骨とは歯根膜を介して連絡している。歯根膜のシャープ線維が、セメント質ならびに歯槽骨に入り込み、歯は歯槽骨に安定した植立状態を保っている。

歯根吸収は古くから観察されており、乳歯と永久歯の交換に際した生理的歯根吸収と炎症や外傷による病的歯根吸収がある。しかし、この歯根吸収に伴う修復機構に関する報告は少なく、特に乳歯に関する修復機構の詳細な報告はない。

本報告は、乳歯における生理的歯根吸収部ならびに病的歯根吸収部でのセメント質添加による修復機構の発現と、添加されたセメント質の微細構造の検

索についてを中心としており、この研究を基礎とした歯根吸収部への修復機構発現の誘導に関するナノ物質応用の可能性について、すなわち、病的歯根吸収部分への修復機構の発現の制御を目的として、まず病的歯根吸収領域の組織学的検索を行い、主に担体としてのナノ物質の応用の可能性ならびに応用部へのナノ物質の固定法についての展望を紹介する。

B. 研究方法

1. 試料

北海道大学病院咬合系歯科小児専門外来において、外傷および咬合誘導上の理由で抜去された歯根安定期の乳歯ならびに重度のう蝕により保存不可能と診

断され抜去された乳歯を試料とした。抜去前に、患児およびその保護者へ本研究の目的と内容について説明し、同意を得られた症例を試料として、研究に供した。

2. 固定および脱灰

抜去された乳歯は、2.5%グルタルアルデヒドと3.0%パラホルムアルデヒドの混合固定液(0.05M カコジル酸緩衝、pH7.3)により、室温で1週間浸漬固定を行った。固定後、試料は、5.0%EDTA 溶液(7.0%ショ糖含有)により、4°Cで2~3か月脱灰した。

3. 光学顕微鏡観察

歯根安定期の乳歯は、上昇エタノール系列で脱水し、通法に従いパラフィンに包埋した。薄切切片を作製し、一般的なヘマトキシ・エオジン染色ならびに象牙細管や細胞突起を明瞭にするシュモール染色を施し、光学顕微鏡(光顕: NIKON OPTIPHOT、ニコン株、東京)を用いて観察した。

4. 透過型電子顕微鏡観察

重度う蝕を有する乳歯は、1.0%四酸化オスミウムにより、室温で3時間、後固定を行い、次に4.0%酢酸ウランによる塊染色を1時間行った。その後、上昇エタノール系列で脱水し、通法に従いエポキシ樹脂(Epok 812、応研商事株、東京)に包埋した。準超薄切片および超薄切片を作製し、準超薄切片はメチレンブルーとアズールⅡの二重染色を行い、光顕で観察した。超薄切片は、酢酸ウランとクエン酸鉛の二重染色を行い、透過型電子顕微鏡(TEM: HITACHI H-7000、日立製作所株、東京)を用いて、加速電圧75 kVで観察した。

C. 研究結果

1. 歯根安定期の乳歯歯根(図1、2)

光顕による観察から、歯根の中央部や根尖領域において、セメント質ならびに象牙質に至る歯根吸収の痕跡が観察された。これらの吸収部位は、セメント質の添加により修復されていた。多くの吸収部位で、歯根の外形を修復するまでの添加が観察されたものの、歯根の外形の修復まで至っていない吸収部分も存在した。観察された領域の多くの部分にシャ

ーピー線維が侵入していた。

観察された修復性のセメント質の多くは、無細胞セメント質であったが、有細胞セメント質の部分も存在した。

2. 重度う蝕を有する乳歯歯根(図3、4)

光顕による観察から、残存している根尖領域に著しい象牙質ならびにセメント質の吸収が広い範囲で観察された。セメント質は吸収により観察されない領域も多く認められた。病的に吸収された象牙質の表面は著しい不規則な凹凸を示し、いわゆる虫喰い状の表面を呈していた。これらの凹凸の著しい病的吸収面に、セメント質が添加し、歯根の外形をある程度修復している部分が多く観察された。

添加したセメント質の構造はさまざまで、層状を示すものが多く、その他に、染色されない部分や空隙を有する部分も観察された。層状を示すセメント質は、吸収表面に対し何層にもわたり添加されており、その結果、歯根表面を比較的平坦な状態にまで修復していた。また、染色されない部分は、吸収された象牙質表面およびセメント質との境界部に、幅の狭い帯状に多く認められた。添加した修復性セメント質が有する空隙には、細菌の存在が観察された。

TEMによる観察から、光顕で観察された修復性セメント質の微細構造は、もとのセメント質の構造とは違っていた。層状を示す領域では、均質無構造の層や、コラーゲン線維ではないきわめて細く比較的短い細線維と微小顆粒により構成されている層、コラーゲン線維は観察されるものの、修復性セメント質に占める割合が小さい層など、さまざまな構造が観察され、これらの層が重積して、歯根表面を平坦にしていた。しかし、一般的に観察される歯根膜とセメント質の関係、すなわち歯根膜のシャーパーピー線維がセメント質内に入り込んでいる構造は、最表層の修復性セメント質において、観察されなかった。光顕で染色されない帯状領域のセメント質は、電子染色でも染色されず、この部分の構造は明らかにできなかった。

D. 考察

本研究の結果から、乳歯は生理的ばかりでなく、炎症や外傷などの病的な種々の環境下で、歯根吸収が生じることが示された。また、この歯根吸収は、

表層に限局するわけではなく、特に病的歯根吸収の場合、歯根象牙質の深部にまで吸収が及んでいた。

これらの吸収部位には、セメント質の添加による修復機構が働いており、吸収によって不規則で著しい凹凸を示す歯根象牙質表面が、比較的平坦になるまでの修復が認められたことは、局所の修復機構がもとの状態を認識して、それに近似するだけの活性を有していることが示唆される。しかし、透過型電子顕微鏡による修復性セメント質の微細構造は、もとの一般的なセメント質の構造とは、全く異なるものであり、構造自体が空隙を有しており、比較的疎な状態で、コラーゲン線維もあまり観察されなかったことから、修復機構の発動に対し、周囲の環境が多きく影響を及ぼしたことが考えられる。また、修復性のセメント質の最表面において、歯根安定期の病的要因を有していない歯根においては、シャープ一線維の侵入が観察されたものの、炎症による病的歯根吸収部位においては、シャープ一線維の侵入は観察されなかった。このようなことから、局所の修復機構は、最も良好な状態へと修復する可能性を有してはいるが、周囲組織の環境により、大きく影響を受けることが示唆された。

以上のことから、歯根吸収部の環境を制御することにより、生体は元の状態に近い構造にまで修復することの可能性が考えられる。すなわち、いかにしてすばやく歯根吸収を停止させ、修復機構が生じる環境に局所を誘導することができるかである。

この点において、ナノ物質を担体として、修復機構を有効に誘導することの可能性が考えられる。ナノ物質が存在することにより、セメント質添加の足がかりが必要以上の労力を必要とせず確保できるため、セメント質の形成添加が順調に速やかに生じ、その構造も健全なセメント質に近くなることが予想できる。修復性セメント質の構造が、健全な構造に近くなることにより、周囲組織との関係が再構築され、シャープ一線維のセメント質への侵入も獲得できると考えられる。

今後、歯根吸収部への修復機構の発現に関する、ナノ物質の影響について、細胞培養系ならびに動物

を使用した実験系により、明らかにする予定である。

E. 結論

乳歯歯根においては、生理的状态でも環境に応じて吸収が生じ、その部分に対する修復機構としてセメント質の添加が示された。また、著しい根尖領域の炎症を伴う場合でも、ある環境を整えば、同様なセメント質添加が観察された。しかし、病的状態で見られるセメント質の微細構造は、一般的なセメント質の構造とは異なったものであった。

この修復機構の発現にナノ物質が担体として関与することができれば、修復性セメント質の誘導ならびに修復性セメント質の構造がより健全に近いものにできる可能性があると考えられる。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Yawaka, Y., Osanai, M., Akiyama, A., Ninomiya, R., Oguchi, H. : Histological study of deposited cementum in human deciduous teeth with pathological root resorption. *Ann. Anat.*, 185: 335-341, 2003.

2. 学会発表

1. 八若保孝, 福井亜実, 谷口由実, 加我正行, 小口春久, “乳歯セメント質の構造と厚さについて”, 第 回日本小児歯科学会北日本地方会, 山形県, 山形市, 2003. *小児歯誌*, 42:128, 2004 (抄).
2. 八若保孝, 福井亜実, 谷口由実, 加我正行, 小口春久, “乳歯セメント質の組織学的研究: 吸収と添加について”, 第 回日本小児歯科学会, 福岡県, 福岡市, 2004. *小児歯誌*, 42:251, 2004 (抄).

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

無し。

2. 実用新案取得

無し。

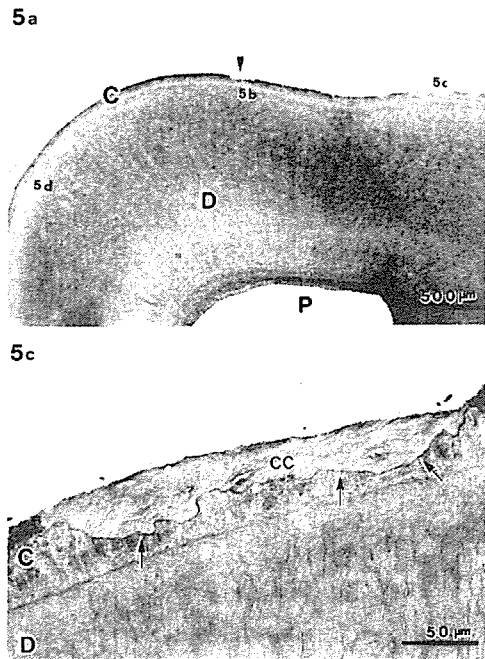


図 1

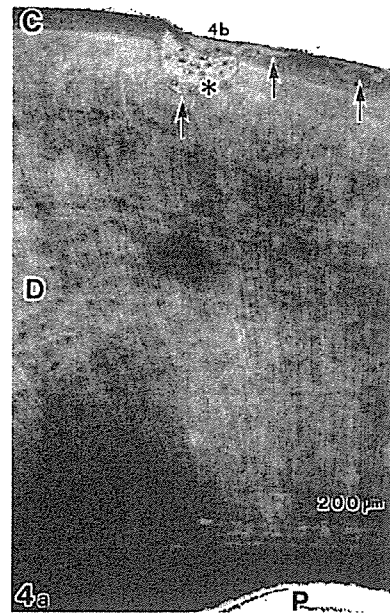


図 2-a

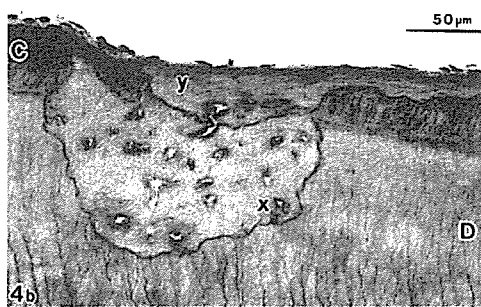


図 2-b

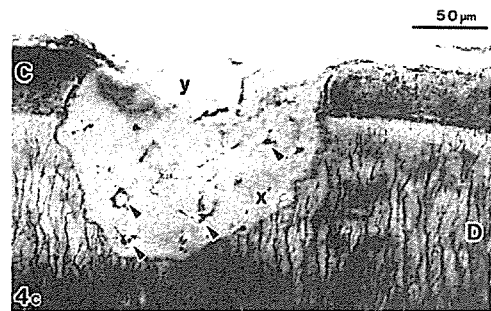


図 2-c

図 1. 外傷により抜去された乳歯歯根中央部の光学顕微鏡像 ヘマトキシリン・エオジン染色

図 1 下部は、図 1 上部の 5c 部分の拡大で、歯根表層にシャープー線維の侵入が観察される。

C: 健全セメント質 D: 象牙質 P: 歯髄 cc: 修復性セメント質

↑: 健全セメント質と修復性セメント質の境界

図 2. 咬合誘導上抜去された乳歯歯根中央部の光学顕微鏡像

図 2-a,b ヘマトキシリン・エオジン染色 図 2-c シュモール染色

図 2-c は、図 2-b の隣接した切片であり、シュモール染色により、セメント細胞とその細胞突起が観察される。

C: 健全セメント質 D: 象牙質 P: 歯髄 *: 修復性セメント質

↑: 健全セメント質および歯根象牙質と修復性セメント質の境界

x: 有細胞セメント質による修復 y: 無細胞セメント質による修復

▲: セメント細胞

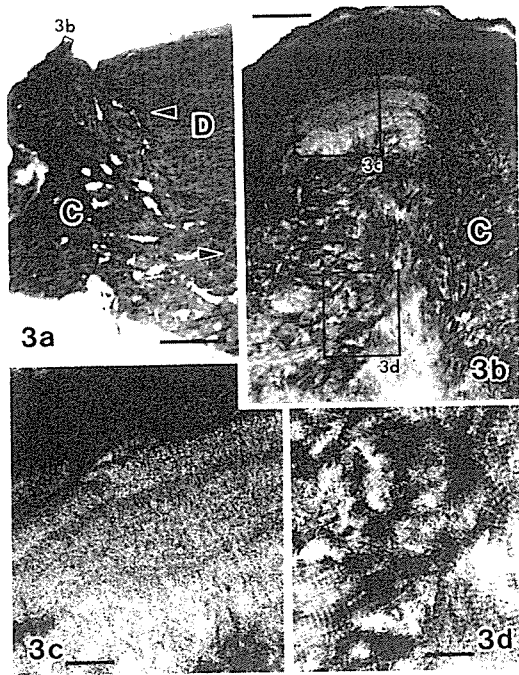


図3

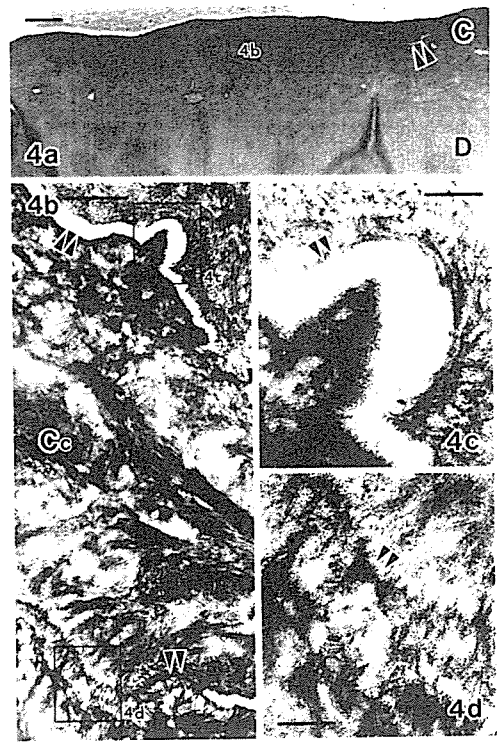


図4

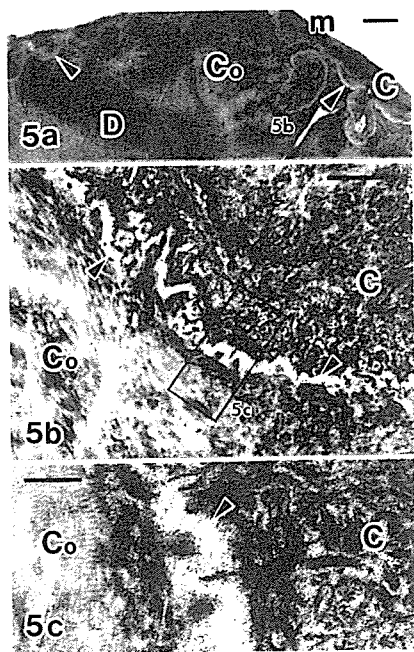


図5

図3. 根尖領域の病的歯根吸収部 図3-a: 光学顕微鏡像 メチレンブルー・アズールⅡ染色

図3-b,c,d: 透過型電子顕微鏡像

修復性セメント質に多数の空隙が観察され、拡大像において層状構造が観察される。

C: 修復性セメント質 D: 象牙質 ▲: 象牙質と修復性セメント質の境界

図4. 根尖領域の病的歯根吸収部 図4-a: 光学顕微鏡像 メチレンブルー・アズールⅡ染色

図4-b,c,d: 透過型電子顕微鏡像

修復性セメント質と修復性セメント質ならびに修復性セメント質と健全セメント質の境界は明瞭で

あり、拡大において帯状のこの領域は均質無構造である。

C：修復性セメント質 D：象牙質 Co：健全セメント質

▲▲：修復性セメント質と修復性セメント質（4 c）ならびに健全セメント質（4 d）との境界

図5. 根尖領域の病的歯根吸収部 図5-a：光学顕微鏡像 メチレンブルー・アズールⅡ染色

図5-b,c：透過型電子顕微鏡像

修復性セメント質と健全セメント質の境界は明瞭であり、拡大において帯状のこの領域は均質無構造である。修復性セメント質に、多量の細く短い細線維と微小顆粒が観察される。

C：修復性セメント質 D：象牙質 Co：健全セメント質 m：細菌

▲：健全セメント質と修復性セメント質の境界

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
分担研究報告書

電界型 X 線の細胞照射効果

主任研究者 巨理文夫
研究協力者 奥山文雄

北海道大学歯学研究科教授
名古屋工業大学工学研究科
名誉教授

研究要旨 電界型 X 線源においては、カーボンナノチューブ (CNT) から電界放出された電子をターゲットに衝突させて X 線をつくる。電界型 X 線源のメリットは、線源を小型化できることである。ミリメートル次元の口径をもつ、所謂“ミニチュア X 線源” (MXS) は、内視鏡との一体化により、体腔内腫瘍の直接 X 線照射の可能性を秘める。この、“ナノ放射線治療”とも言うべき次世代ガン治療を実現するには、まず、電界型 X 線が、実際にガン細胞を死滅させるか否かを確認しなければならない。本研究により、電界型 X 線が、培養ガン細胞にアポプトシスを誘起し、ガン細胞を死に至らしめることが確認された。

A. 研究目的

X線治療が、ガン治療の中核をなすことは、論を待たない。従来のX線治療は、体外より多量のX線を照射するものであり、時として、過剰照射、および正常細胞の損傷を伴う。

X線治療にかかる医療過誤は、とりわけ、口腔ガン、咽頭ガン、食道ガン等、体腔表面に発生するガンの治療において懸念される。もし、微小なX線源を体腔内に挿入し、ガン組織をピンポイントで攻撃できれば、正常組織の損傷は防ぐことができる。この、非侵襲X線治療への道を拓くと期待されるのが、“ミニチュアX線源” (MXS) である。^{1, 2)}

MXSの実用化をはかるためには、電界型X線が、実際にガン細胞を死滅させることを確認しなければならない。本研究の目的である。

関連文献

- 1) H. Sugie, M. Tanemura, V. Filip, K. Iwata, T. Takahashi, and F. Okuyama, Appl. Phys. Lett. 78 (2001) 2578.
- 2) S. Senda, T. Sakai, Y. Mizuta, S. Kita, and

F. Okuyama, Appl. Phys. Lett. 85 (2004) 5679.

B. 研究方法

本研究に用いた試料は、マウスの3SB培養 (in vitro) 細胞である。試料を培養皿に保持し、表1に示す条件の下でX線照射を行った。電界型 (FE) に加え、類似条件下で熱電子型 (TE) X線の照射実験も行い、それぞれの結果を比較・検討した。FEX線照射に使用した電界エミッターは、平行配列多重CNT (図1)³⁾である。また、照射システムの概要は、文献3)を参照されたい。

関連文献

- 3) S. Senda, M. Tanemura, Y. Sakai, Y. Ichikawa, S. Kita, T. Otsuka, A. Haga, and F. Okuyama, Rev. Sci. Instrum. 75(2004)1366.

C. 研究結果

以下に示すのは、代表例である。

H2AX は、放射線あるいは発ガン物質の誘起する DSBs (DNA 二重ラセンの損傷) の生体マーカーとして知られている。X 線照射が、H2AX の派生体である γ -H2AX の生成を誘起することが確認されれば、ガン細胞の死滅が確認されたことになる。図 2 は、3SB 細胞の、FEX 線、TEX 線による 1 時間照射後のデータであり、いずれの場合も、 γ -H2AX の生成は明らかである。細胞中 γ -H2AX も、双方で略同数であり、FEX 線が、TEX 線と同程度と DNA 損傷効果をもつことが結論される。

TUNEL 分析は、細胞死の同定ならびに細胞数変化過程の定量化に有効な手法である。図 3 に示すように、3SB 細胞中の TUNEL-positive 細胞は培養時間ならびに X 線ドーズ量と共に増加する。これらは、FEX 線が、3SB 細胞のアポトシスを誘起し、かつ、その効率は TEX 線と同程度であることの確かな証拠である。

D. 考察

図 2, 3 に示すデータは単純明解であり特に考察要はない。

E. 結論

本研究により、FEX 線が DNA にダメージを与えること、及びガン細胞のアポトシスを誘起することが明らかとなった。このことは、FEX 線が、原理上、ガンの放射線治療に適用でき、かつ、革新的なガン治療技術を生み出すことの可能性を示唆する。すなわち、ミニチュア X 線源と内視鏡を一体化することにより、体腔内表面に発生した初期ガンの、標的 X 線照射と言う、ガン治療のフロンティアが拓かれることになろう (図 4 参照)。

F. 研究発表

1. 論文発表

T. Nakasato, M. Nakanishi, S. Kita, F. Okuyama, Y. Shibamoto, and T. Otsuka “Biological Effects of Field Emission-Type X-Rays Generated by Nanotechnology”

学会発表

[無し]

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

[無し]

2. 実用新案取得

[無し]

管電圧 (kV)	50	X スペクトル	特性
電流 (mA)	1	線源-試料間距離 (mm)	125
ターゲット材	W	ドーズ率 (Gy/min)	3.3
窓材	Be	ドーズ変動量	<10%

表 1. X 線照射条件

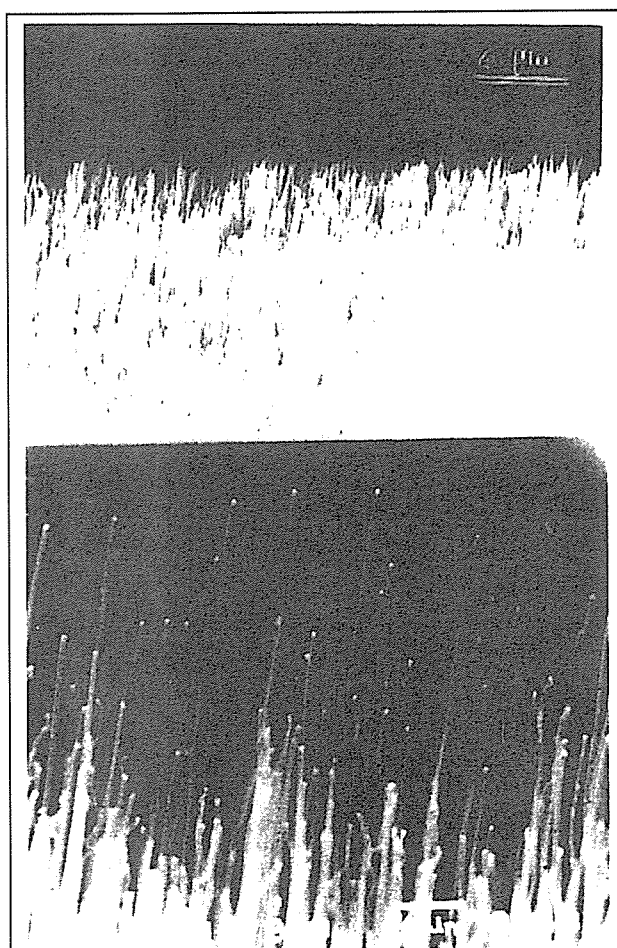


図 1. FEX 線の発生に使用した CNT エミッター。
上図：小倍率, 下図：大倍率