

チェアサイドにおける SEM 観察法

高木 誠 司¹⁾ 堀田 康 明²⁾ 小竹 宏 朋¹⁾ 山本 宏 治¹⁾

Chair-side Diagnostic SEM System for Dentistry

TAKAGI SEIJI¹⁾, HOTTA YASUAKI²⁾, KOTAKE HIROTOMO¹⁾ and YAMAMOTO KOHJI¹⁾

Tiny-SEM (Technex Co. Ltd., Japan) is a compact and low-price scanning electron microscope (SEM) developed recently in Japan, which can be set up in a hospital examination room. The chair-side Diagnostic SEM System is quite useful in dental hospitals as a dentist can immediately give accurate information to a patient. Furthermore, it may become possible to give rapid diagnosis at the time of examination, and precise treatment can be administered. In the future, we will develop a new and improved method for sample preparation and establish this system.

Key words: Tiny-SEM, Dental Materials, Chair-side.

緒 言

歯科治療においては治療内容の説明を行う際に口腔内写真、レントゲン写真および顎模型などの資料を用いているが¹⁾難治症例および二次的な疾患の症例を患者に対して口腔内の情報材料のみで分かりやすく今後の治療内容を説明することが困難なケースに遭遇することがあり、より高度な情報を患者に提供する必要がある。一方、歯科治療は材料依存的な治療でもあり、中でも歯科材料の特性を知る目的で走査型電子顕微鏡 (SEM) がよく利用され、口腔環境下での材料の長期的な評価を知る上で SEM 観察は重要な手法の一つである。一般的に SEM 観察のための試料を作製するにあたっては、処理用に大型の周辺装置が必要であり、従来法では処理過程に長時間を必要とすることから²⁾、患者に対して口腔内から得られた重要な情報をチェアサイドでリアルタイムに伝えることは困難である。このことから、短時間で SEM 観察がチェアサイドにて行うことができるシステムを構築することは有用であると考えられる。

そこで、本研究ではチェアサイドで SEM 観察ができるシステムを確立する目的で、最近開発された超小型走査型電子顕微鏡を用いて歯科治療に用いる各種材料、軟化象牙質および根管内容物を観察し、従来型走査型電子顕微鏡との比較検討を行った。また、生物

試料の作製の処理過程に関しては今回、開発を行った迅速 SEM 試料作製キットと従来法との比較を併せて検討した。

材料および方法

1. 超小型走査型電子顕微鏡

本実験に使用した超小型走査電子顕微鏡 (テクネックス工房製、東京、以下 Tiny-SEM と略す。) は最近開発された装置であり、従来の走査型電子顕微鏡とはコンセプトの点で全く異なり、使用目的や機能を限定することで使いやすく、さらに小型の SEM を目指したものである。すなわち、図 1 に示したように従来機種に比べて小型 (顕微鏡本体380mm(W)×350mm(D)×

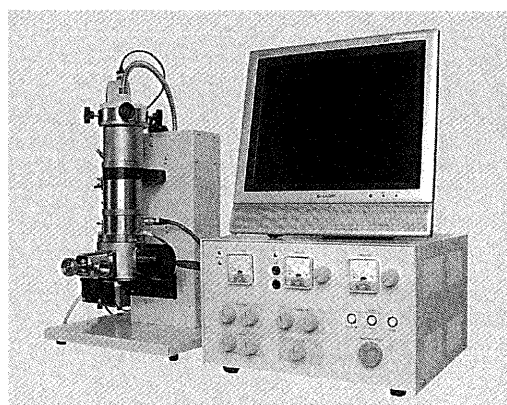


図 1 Tiny-SEM

¹⁾朝日大学歯学部口腔機能修復学講座歯科補綴学分野

²⁾朝日大学歯学部口腔科学共同研究所
501-0296 岐阜県瑞穂市穂積1851

¹⁾Department of Oral Functional Science and Rehabilitation, Division Prosthodontics, Asahi University School of Dentistry

²⁾Central Research Laboratories of Oral Science, Asahi University School of

Dentistry

Department of Oral Functional Science and Rehabilitation, Division Prosthodontics,

Asahi University School of Dentistry

Hozumi 1851, Mizuho, Gifu, 501-0296, Japan

(平成17年12月20日受理)

600mm(H), ディスプレイユニット350mm(W)×350mm(D)×210mm(H)), 軽量(37kg), 低消費電力で永久磁石電子レンズ, オイルレス排気系 (ターボ分子ポン

プ)を採用している. 主な仕様は表1に示したとおりであり, 従来型走査型電子顕微 (S-4500型, 日立製, 東京, 以下S-4500と略す) との相違点を示した.

表1 Tiny-SEMとS-4500の主な仕様

	Tiny-SEM	S-4500
分解能	20 nm (15 kv)	1.5 nm (15kv) 4.0 nm (1kv)
倍率	25~40000 倍	50~500000倍
試料サイズ	Max 14 mm×14 mm	Max 50 mm×50 mm
電子銃	熱電子源	電界放射型電子源
電子レンズ	永久磁石レンズ	電磁レンズ
真空排気系	ダイアフラムポンプ ターボ分子ポンプ	ロータリーポンプ 油拡散ポンプ

2. 各種歯科材料

1) 合着用セメント: グラスアイオノマーセメント, レジンセメント, カルボキシレートセメントの3種類を供試材料としグラスアイオノマーセメントとしてビトレマールーティングセメント® (スリーエム株式会社) 他1種, レジンセメントとしてパナビアフルオロセメント® (株式会社クラレ) 他1種, カルボキシレートセメントではハイボンドカルボセメント® (株式会社松風) を用いた.

2) 光重合型レジン: 成形修復材料としてクリアフィル®AP-X (株式会社クラレ), パルフィーク®エステライト (徳山曹達株式会社), ビューティフィル® (株式会社松風) を用いた.

3) 根管充填材: シーラーとしてキャナルス® (昭和薬品工業株式会社) 他2種を用いた.

4) 暫間充填材料: 仮封材, 歯髄鎮痛材を供試材料とし, 仮封材としてはルミコン (ヘレウスデンタルマテリアル株式会社) 他2種を用い, 歯髄鎮痛材とし

表2 各種歯科材料

1)	合着用セメント	グラスアイオノマーセメント	ビトレマールーティングセメント® (スリーエム株式会社, 東京) ハイボンドグラスアイオノマーCX® (株式会社松風)
		レジンセメント	パナビアフルオロセメント® (株式会社クラレ, 東京) フジルーティングセメント® (株式会社ジーシー, 東京)
		カルボキシレートセメント	ハイボンドカルボセメント® (株式会社松風, 京都)
2)		光重合型レジン	クリアフィル®AP-X (株式会社クラレ, 東京) ビューティフィル® (株式会社松風, 京都) パルフィーク®エステライト (徳山曹達株式会社, 東京)
3)		根管充填材	キャナルス® (昭和薬品工業株式会社, 山形) N ₂ ® (アグザジャパン株式会社, 東京) ツブリシール® (白水貿易株式会社, 大阪)
4)	暫間充填材料	仮封材	ルミコン® (ヘレウスデンタルマテリアル株式会社, 大阪) テンポラリーセメントソフト® (株式会社松風, 京都) テンポラリーセメントハード® (株式会社松風, 京都)
		歯髄鎮痛材	ネオダインα® (ネオ製薬工業株式会社, 東京) ユージダイン® (昭和薬品工業株式会社, 東京)
5)		粘膜調整材	ティッシュコンディショナー® (株式会社松風, 京都) ソフトライナー® (株式会社ジーシー, 東京)
6)		義歯裏層材	トクソーリベースファースト® (トクヤマ株式会社, 東京) トクソーライトリベース® (トクヤマ株式会社, 東京)
7)		石膏材	DCプラスタ® (株式会社ヨシダ, 東京) ニュープラスト® (株式会社ジーシー, 東京) ニューフジロック® (株式会社ジーシー, 東京)

てはネオダイン[®]_α (ネオ製薬工業株式会社) 他 1 種を用いた。

- 5) 粘膜調整材：ここではティッシュコンディショナー[®] (株式会社松風) 他 1 種を使用した。
- 6) 義歯裏層材：一般的によく使用されているトクソーリベースファースト[®] (トクヤマ株式会社) 他 1 種を用いた。
- 7) 石膏材：使用頻度の高い DC プラスタ[®] (株式会社ヨシダ) と他 2 種を供試材料とした。

またこれら全て 7 項目 23 種を表 2 に示した。

3. 歯科治療材料の SEM 観察法および EDS 分析

歯科材料である 7 分野の材料を対象として、オスミウムコーティング装置 (真空デバイス製, HPC-1 S, 茨城) にて導電処理を施し, SEM 観察用試料を作製した。試料作製後, Tiny-SEM (加速電圧 15kv) と S-4500 (加速電圧 5 kv) を用い材料の表面観察をするるとともに, その材料表面の元素分析を S-4500 に装着したエネルギー分散型 X 線分析装置 EMAX-7000 (HORIBA 製, Super Xerophy, 京都, 以下 EDS と略す。) を用いて検討を行った (加速電圧 20kv, 分析時間 100~150 秒間)。

4. 迅速 SEM 試料作製キット

本実験では迅速 SEM 試料作製キット (イーエム・

テクノサイエンス製, 愛知, 以下キットと略す。) を使用した。生物試料を観察する際, 従来は試料作製に多くの時間と労力を必要としたが, このキットは主として生物材料などを観察する場合の試薬調整の手間を省き, 迅速な生物試料処理を実現するために開発されたものである。このキットを用いると試料処理は 15 分から 30 分間で完了し, 乾燥の終わった試料を試料台に載せオスミウムコーティングするだけで簡単に SEM 観察ができる。

試料処理は, A 液 (アルデヒド系固定液), B 液 (リン酸緩衝液), C, D 液 (エタノール脱水剤), E 液 (シラン系乾燥用試薬) を順次滴下することにより完了する。表 3 は処理時間を従来法と比較したものである。

また, キットを用いて作製した試料については導電処理をオスミウムコーティング装置で行い, SEM 観察を行った。

今回, 比較のために行った従来法の SEM 観察用試料の作製は以下のとおりである²⁾。すなわち, 2.5% グルタルアルデヒド (0.1M カコジル酸緩衝液, pH7.4) にて 2 時間前固定 (4℃) した後, カコジル酸緩衝液にて洗浄し, 1% 四酸化オスミウム (同一緩衝液) にて 1 時間後固定を行い, エタノール上昇系列にて脱水を行った。次いで酢酸イソアミルを置換剤として用い, 臨界点乾燥装置 (日立製, 東京, HCP-2) により乾燥を行った。

表 3 キットと従来法の処理時間の比較

	キット	従来法
化学固定	3~10分	60分
洗浄	2分×2回	10分×2回
脱水	2分×4回	10分×12回
乾燥	1分×2回	90分~
合計時間	30分以内	5時間以上

5. 歯科治療器具の SEM 観察

使用済みの切削用バー, 研磨バー, 根管形成用ファイル等の劣化の状態を Tiny-SEM を用いて観察を行った。これらの試料は導電性を有するため導電処理は行わなかった。

6. 軟化象牙質の SEM 観察

進行性う蝕を有する歯 (20 症例) を対象にう蝕検知液 (Caries Detector[®]) を用いて 1 層目および 2 層目に区分し, ラウンドバーで得られた感染象牙質をすみやかにキット用いて SEM 試料の作製を行い, Tiny-SEM にて観察を行った。

7. 根管内細菌の SEM 観察

根管治療中の根管 (20 症例) から綿栓を用いてその内容物を採取し, 嫌気培養 (チェアサイド嫌気培養システム³⁾) を行うとともに, 根管内容物をキット用いて処理を行い, 細菌の有無を Tiny-SEM を用いて観察し, 培養結果と比較検討を行った。

結 果

1. 各種歯科材料の SEM 所見

1) 合着用セメント

ガラスイオノマーセメントのビトレマールレーティングセメントは加速電圧の違いによるコントラストの差異が Tiny-SEM と S-4500 での観察結果には見られたが, コアとマトリックスの存在は確認できた。特

に像に違いのあるマトリックス部分を EDS 分析するとアルミノシリケートガラスの主成分である Al, Si が主体に構成されていることが認められた (図 2). またハイボンドガラスアイオノマー CX についても同様の SEM 所見を得た.

レジンセメントであるパナビアフルオロセメントの Tiny-SEM と S-4500 による観察結果は, ほぼ同一であった. EDS 分析により Al, Si が検出され, その表

面は密でありフィラーが確認できた (図 3). その他のレジン系セメントにおいても同様の所見が得られた.

カルボキシレートセメントであるハイボンドカルボセメントに関しては Tiny-SEM と S-4500 による観察結果も同一であった EDS 分析により, 粉末成分の ZnO_2 が検出され, その表面は多孔性であった (図 4).

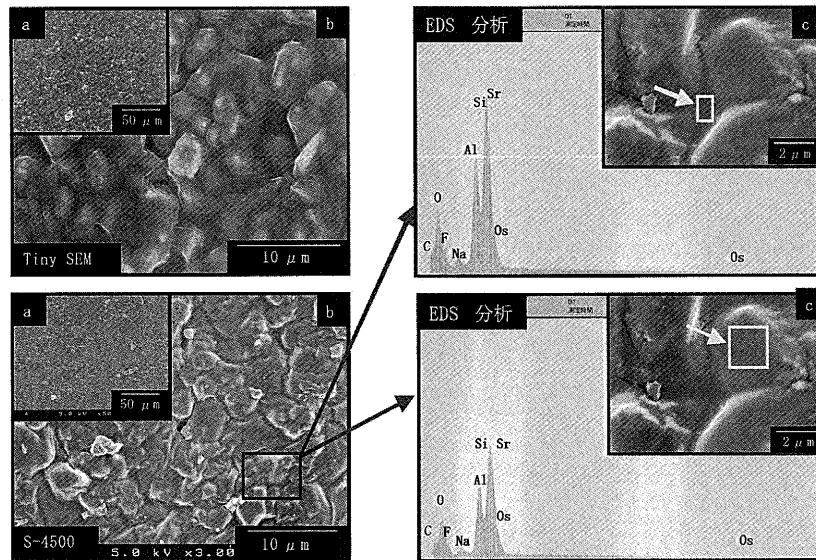


図 2 ビトレマールーティングセメントの SEM 像
b は a の拡大像を c は強拡大像を示す. スペクトル像は c の SEM で示した矢印 (四角) の部分を EDS 分析で得たものである.

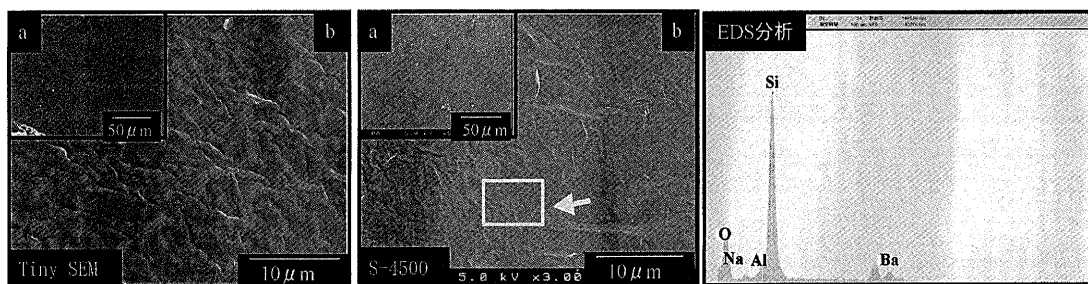


図 3 パナビアフルオロセメントの SEM 像
b は a の拡大像を示す. スペクトル像は SEM で示した矢印 (四角) の部分を EDS 分析で得たものである.

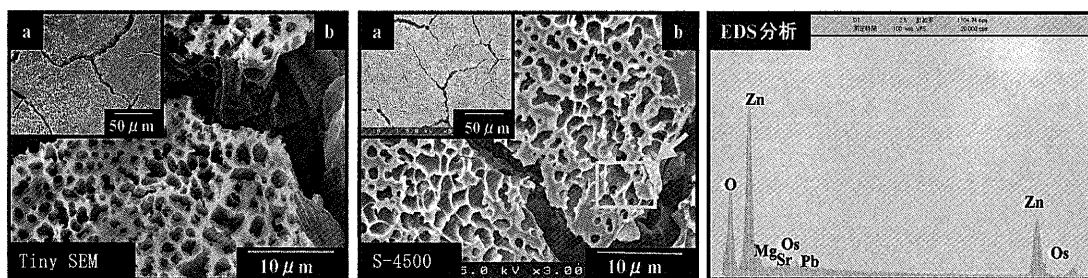


図 4 ハイボンドカルボセメントの SEM 像
b は a の拡大像を示す. スペクトル像は SEM で示した矢印 (四角) の部分を EDS 分析で得たものである.

2) 光重合型レジン

成形修復材料であるクリアフィル AP-X (図5), ビューティフィル (図6), パルフィークエステライト (図7) の Tiny-SEM と S-4500 による観察結果の比較はクリアフィル AP-X, ビューティフィルに関しては Tiny-SEM の方で種々の大きさのフィラーの存在が顕著に観察された。パルフィークエステライトでは

S-4500でフィラーを高倍率で確認できたが Tiny-SEM においては確認できなかった。また, EDS 分析においてはクリアフィル AP-X でフィラーの成分である Si が多く認められた。ビューティフィルに関しては, Al, Si, Sr が多く認められた。パルフィークエステライトでは, Si, Zr が認められた。

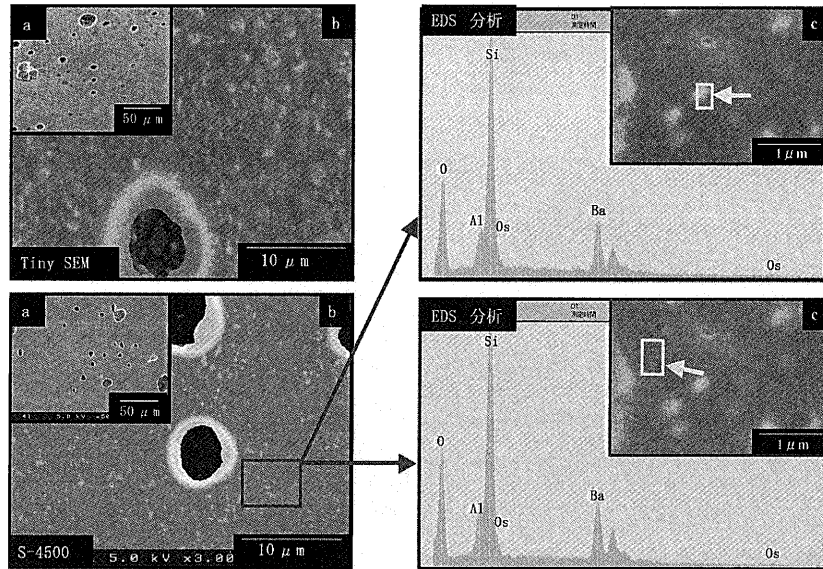


図5 クリアフィル AP-X の SEM 像

b は a の拡大像を c は強拡大像を示す。スペクトル像は c の SEM で示した矢印 (四角) の部分を EDS 分析で得たものである。

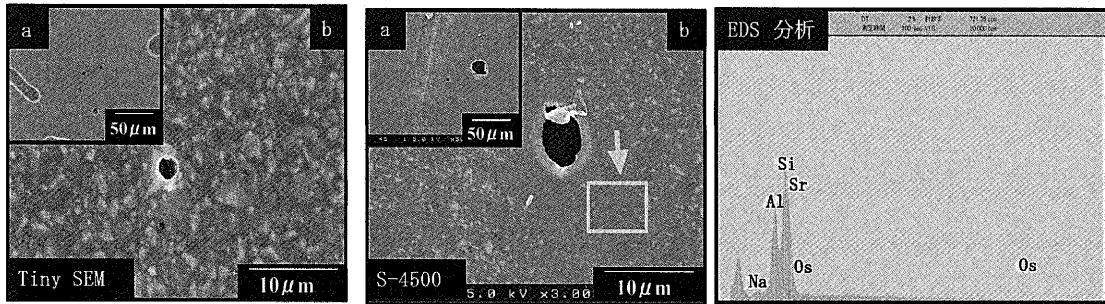


図6 ビューティフィルの SEM 像

b は a の拡大像を示す。スペクトル像は SEM で示した矢印 (四角) の部分を EDS 分析で得たものである。

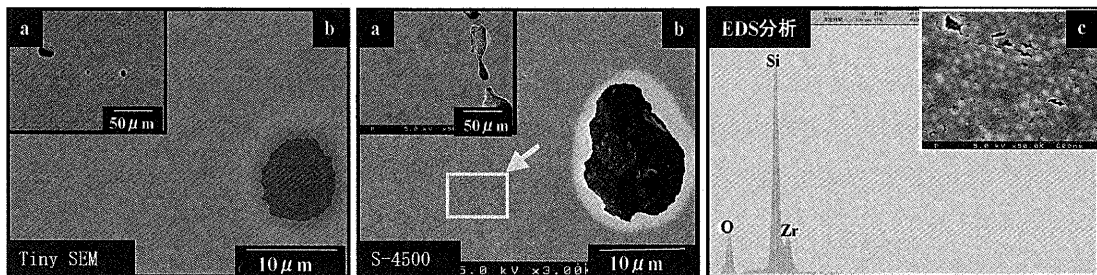


図7 パルフィークエステライトの SEM 像

b は a の拡大像を c は強拡大像を示す。スペクトル像は c の SEM で示した矢印 (四角) の部分を EDS 分析で得たものである。

3) 根管充填材

チャンネル (図8) のSEM観察した結果は特に両者間のSEM像に差異は認められず、コントラスト等の違いのみでTiny-SEMで基本的構造解析は可能であった。またEDS分析において両方ともZn, Baが認められた。N₂, ツブリシールにおいても同様の結果が得られた。

4) 暫間充填材

ルミコンのSEM所見に関しては両観察結果には特に差異は認められず、石膏様の構造物が観察された。

EDS分析によりO, Zn, S, Caと多くの元素が検出された (図9)。またテンポラリーセメントソフトに関しては接着材料で述べたカルボキシレートセメントと同様の結果が得られた。

歯髄鎮痛作用のあるネオダイン α においては若干Tiny-SEMの方が像の鮮明度で劣ると思われる。特に像の違いがあるフィラーの部分でEDS分析すると明るく観察されるフィラーの存在部分とその他の部分ではZnなどの元素の検出量の違いを認めた (図10)。また、ユージダインにおいても同様の所見を得た。

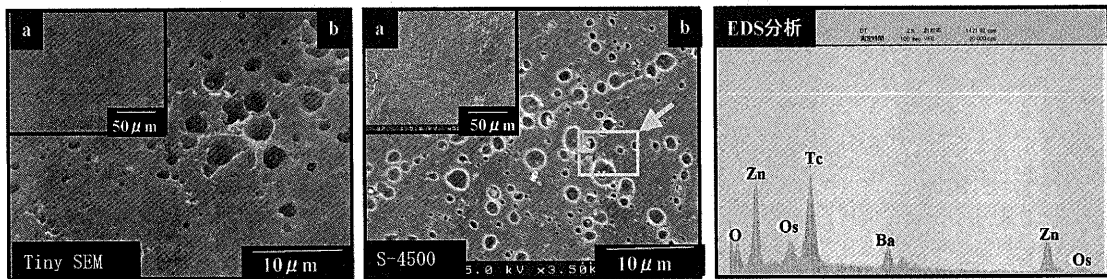


図8 チャンネルのSEM像

bはaの拡大像を示す。スペクトル像はSEMで示した矢印 (四角) の部分をEDS分析で得たものである。

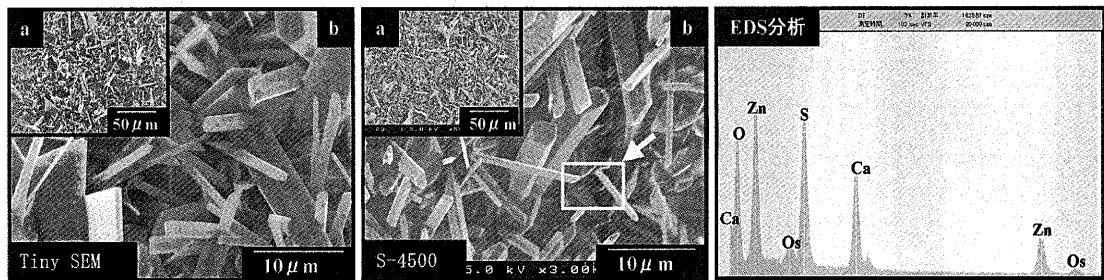


図9 ルミコンのSEM像

bはaの拡大像を示す。スペクトル像はSEMで示した矢印 (四角) の部分をEDS分析で得たものである。

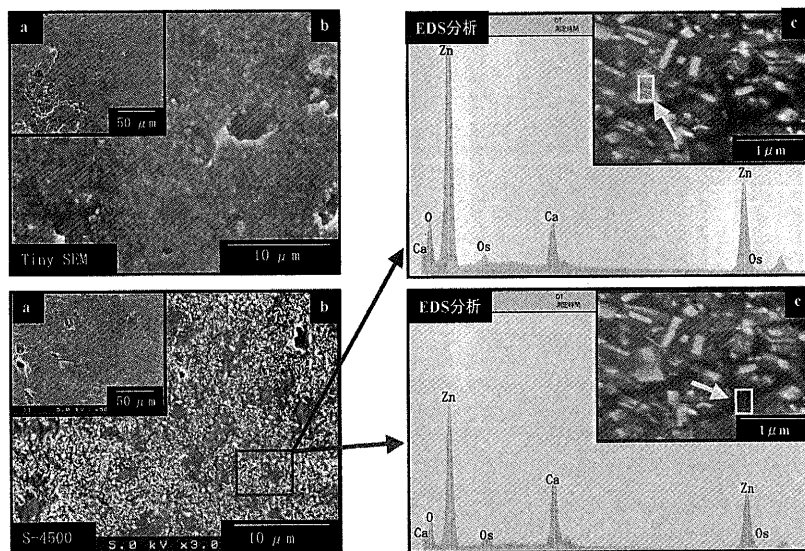


図10 ネオダイン α のSEM像

bはaの拡大像をcは強拡大像を示す。スペクトル像はcのSEMで示した矢印 (四角) の部分をEDS分析で得たものである。

5) 粘膜調整 粘膜調整材であるティッシュコンディショナーの SEM 所見は S-4500 ではビームダメージによるひび割れを生じ観察が困難であった。一方 Tiny-

SEM による観察では解像度はやや低いもののひび割れは生じなかった (図11)。ソフトライナーに関して同様の結果を得た。

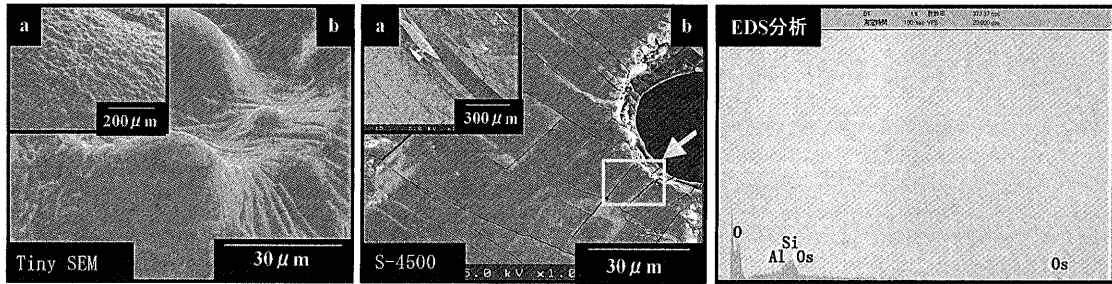


図11 ティッシュコンディショナーの SEM 像

b は a の拡大像を示す。スペクトル像は SEM で示した矢印 (四角) の部分を EDS 分析で得たものである。

6) 義歯裏層材

義歯裏層材のトクソーリベースファーストの Tiny-SEM と S-4500 による観察結果は特に差異は認められず、表面に気泡を認める程度であった。EDS 分析に

おいてもフィラーが配合されていないことから特に特徴的な元素は検出されなかった。その他の化学重合型レジンにおいても同様の結果が得られた (図12)。

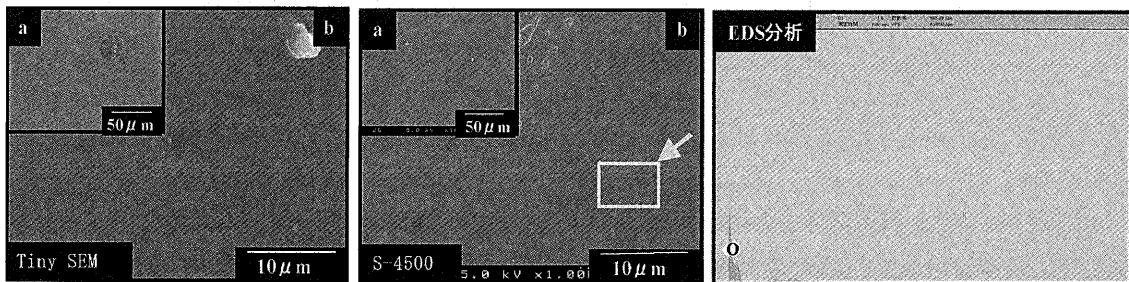


図12 トクソーリベースファーストの SEM 像

b は a の拡大像を示す。スペクトル像は SEM で示した矢印 (四角) の部分を EDS 分析で得たものである。

7) 石膏材

石膏材である DC プラスタ (図13) の SEM 所見は特に差異は認められず石膏の特徴的な像が観察され

た。EDS 分析においては DC プラスタは石膏の特徴である Ca, S が認められた。その他の石膏材においても同様の結果が得られた。

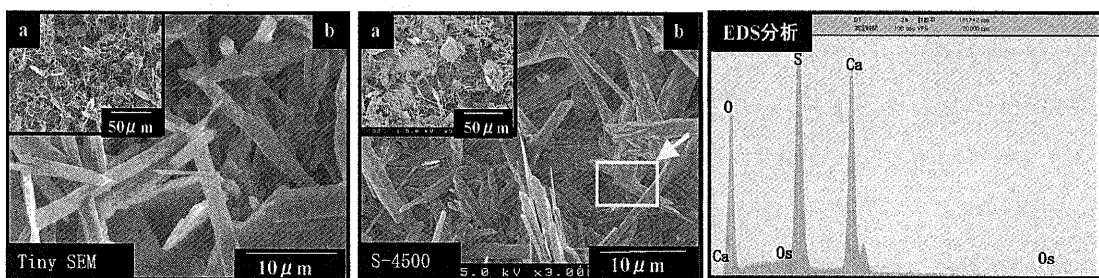


図13 DC プラスタの SEM 像

b は a の拡大像を示す。スペクトル像は SEM で示した矢印 (四角) の部分を EDS 分析で得たものである。

また今回使用した各種歯科材料の EDS 分析の結果を表 4 に示した。

2. 迅速 SEM 試料作製キットと従来法との比較

1) 隣接面プラーク

歯間ブラシを使用して口腔内からプラークを採取し、得られた試料を従来法とキットを用いた迅速法と

で処理した球菌様および桿菌様の SEM 像に関しては、キットを用いた迅速法においても従来法と同じようにプラーク中の試料の細菌とその内容物などが微細構造レベルで保存され明瞭に観察できた (図14)。

微細構造の保存状態をより詳細に観察する為に S-4500 による観察を行った。細菌などの微細構造は迅速法においても死後変化、乾燥時のダメージもなく良好

表4 各種歯科材料のEDS分析結果

			Al	Sr	Si	Zn	S	Ca	Ba	Zr
1)	合着用 セメント	ビトレマールーディングセメント	○	○	○					
		ハイボンドグラスアイオノマーCX		○		○				
		フジルーディングセメント	○		○		○			
		パナビアフルオロセメント			○				○	
		ハイボンドカルボセメント				○				
2)	光重合型 レジン	クリアフィルAP-X	○		○					
		ライトフィルII	○		○					
		パルフィークエステライト			○					○
3)	根管用材料	キャナルス				○			○	
		N ₂				○			○	
		ツブリシール				○	○		○	
4)	暫間充填 材料	ルミコン				○	○			
		テンポラリーセメントソフト		○		○				
		テンポラリーセメントハード							○	
		ネオダインα				○				
		ユージダイン		○		○				
5)	粘膜調整材	ティッシュコンディショナー ソフトライナー								
6)	義歯裏層材	トクソーリペースファースト トクソーライトリペース								
7)	石膏材	DCプラスタ					○	○		
		ニュープラスト					○	○		
		ニューフジロック					○	○		

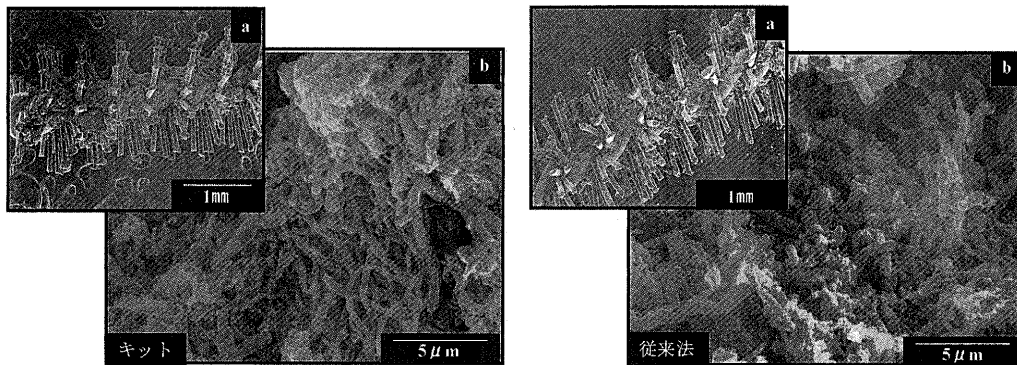


図14 歯間ブラシから採取したプラークのSEM像
Tiny SEMにて観察(左:キット 右:従来法) bはaの拡大像を示す。

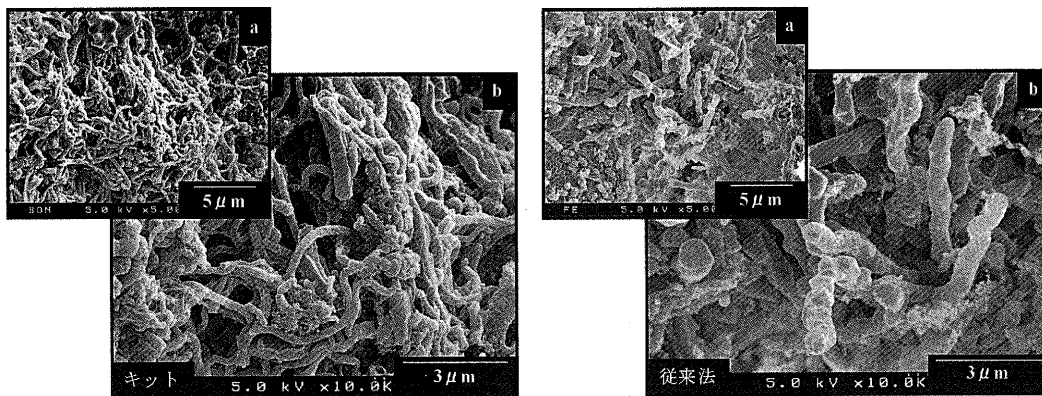


図15 歯間ブラシから採取したプラークのSEM像
S-4500にて観察(左:キット 右:従来法) bはaの拡大像を示す。

に保存されていた (図15).

2) 歯石

口腔内から短針を用いて歯石を採取し、キットを使用したものと従来法との比較は、両法とも歯石の結晶化、細菌の微細形態が良好に観察された (図16).

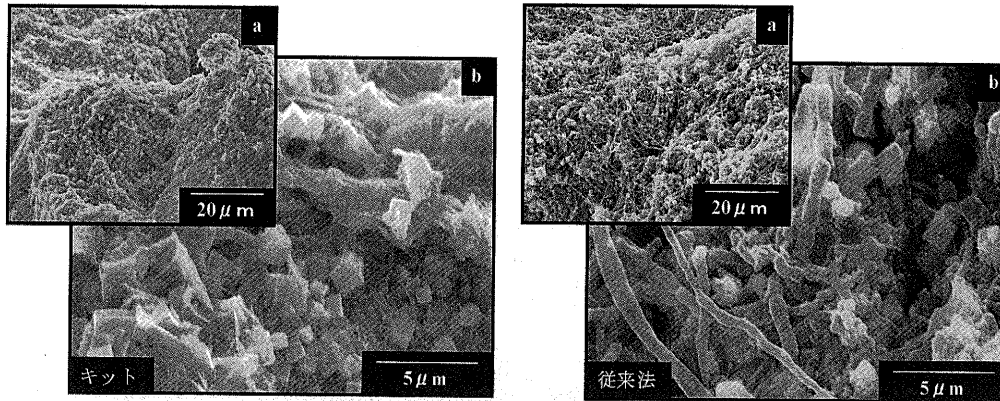


図16 口腔内から採取した歯石の SEM 像
Tiny-SEM にて観察 (左:キット 右:従来法) bはaの拡大像を示す.

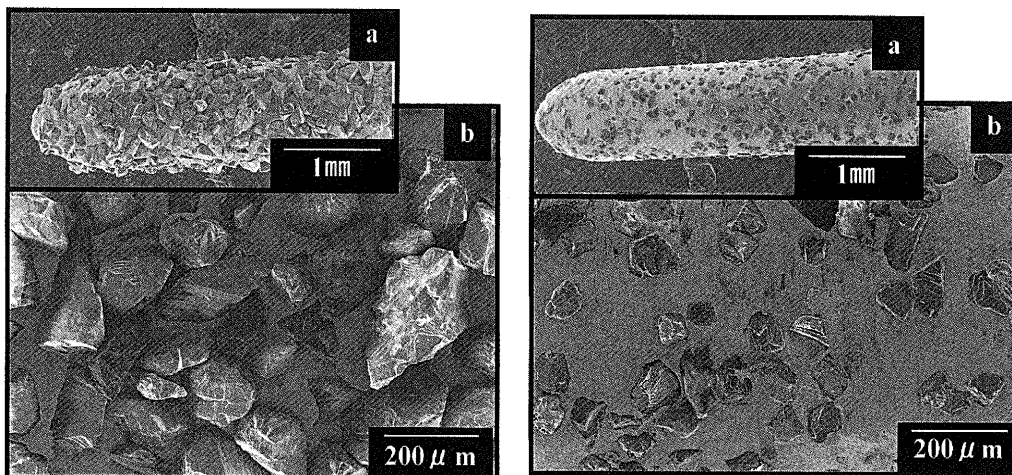


図17 ダイヤモンドポイント (K-1) の SEM 像
bはaの拡大像を示す. 左図は未使用, 右図は使用済みバーを示す.

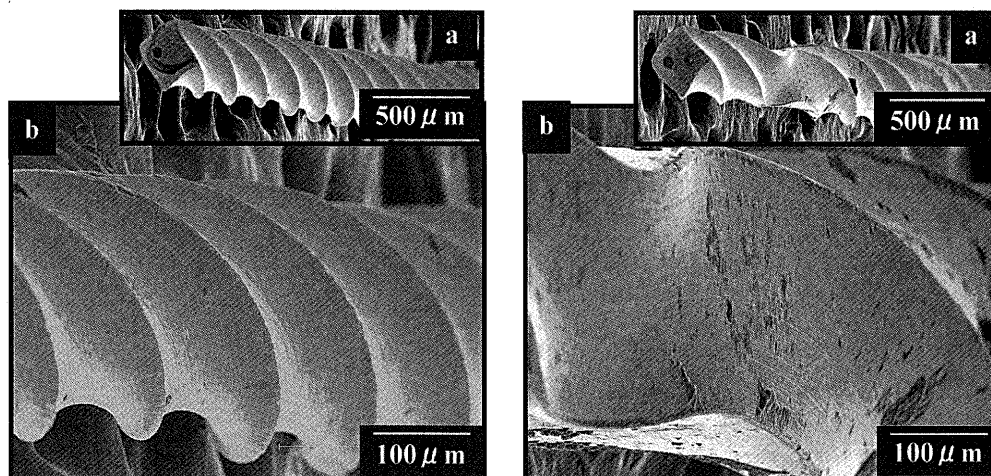


図18 Kファイルの SEM 像
bはaの拡大像を示す. 左図は未使用, 右図は使用済みファイルを示す.

3. 歯科治療材料の Tiny-SEM 所見

各種切削用ダイヤモンドポイント (K-1) の劣化状態を Tiny-SEM で観察した結果は、使用済みのダイヤモンドポイントでは表面のダイヤモンド砥粒部分が脱落しているのが確認された (図17). Kファイルに

関しては、使用によって生じた金属部分の伸長が確認された(図18)。研磨バーも同様の結果が得られた。

4. 軟化象牙質の Tiny-SEM 所見

1層目のみ細菌が認められたのは20症例中17例であり(図19), 1層目, 2層目ともに細菌が認められたのは3症例であった(図20)。

5. 根管内容物の Tiny-SEM 所見

根管内容物を綿栓を用いて採取し, 得られた材料をSEM観察したところ20症例中11症例に細菌が確認された(図21)。

また Tiny-SEM で細菌が認められた11症例中2例に培養陰性であった。一方, Tiny-SEM で細菌が確認されなかった症例(9症例)の中で1症例が培養陽性であった(表5)。

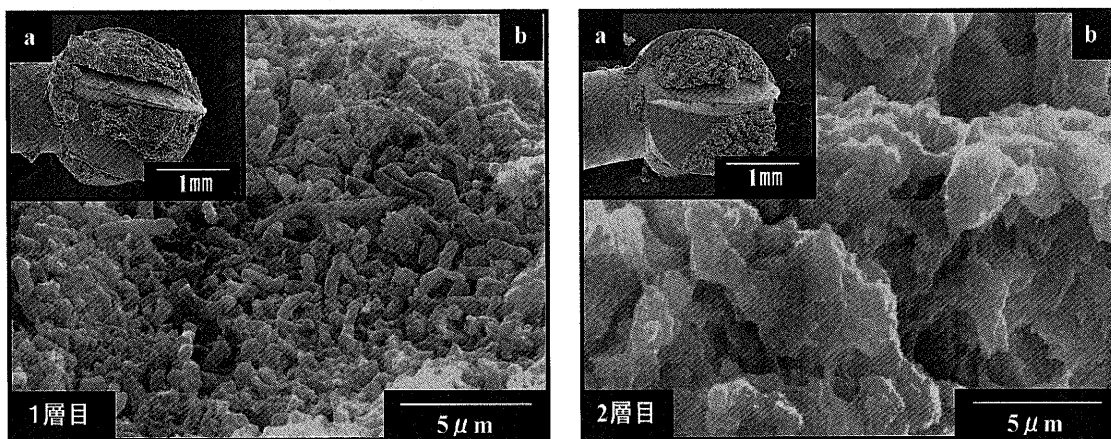


図19 1層目のみ細菌が認められた軟化象牙質
bはaの拡大像を示す。左図は1層目, 右図は2層目を示す。

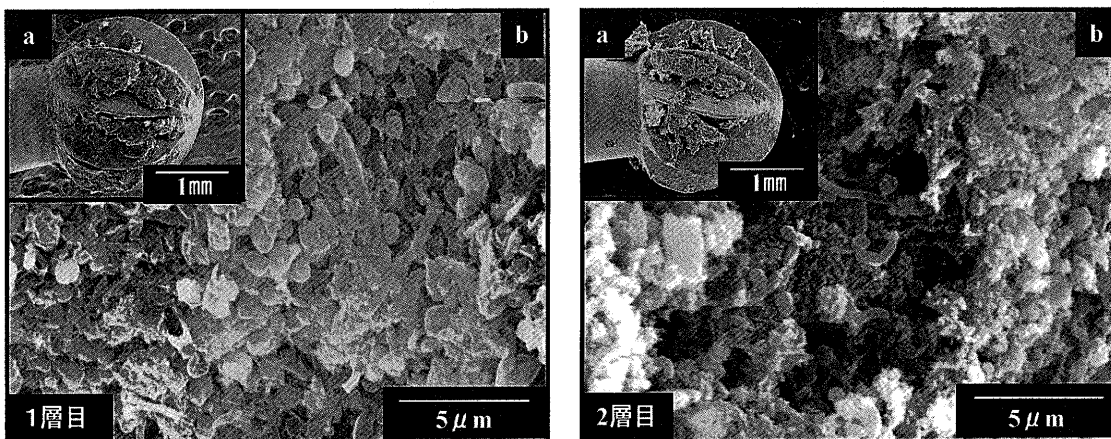
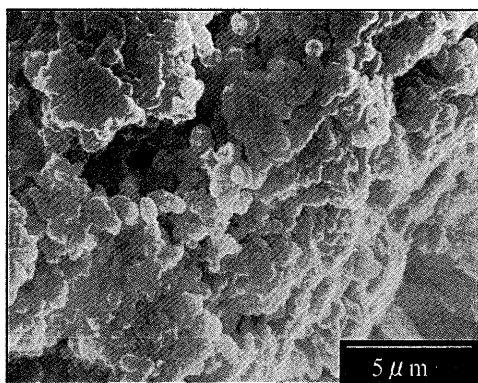


図20 1層目, 2層目ともに細菌が認められた軟化象牙質
bはaの拡大像を示す。左図は1層目, 右図は2層目を示す。

No4
per
打診-
排膿-
病巣+
培養+



No11
per
打診+
排膿+
病巣+
培養+

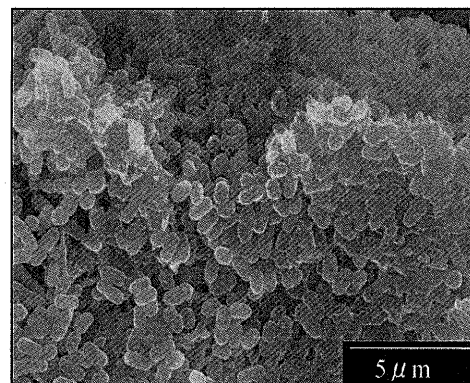


図21 細菌が認められた綿栓のSEM像

表5 Tiny-SEMにて細菌の有無

Tiny-SEMにて細菌が確認された症例

	病名	打診	排膿	病巣	培養
1	pul	+	+	-	+
2	pul	+	-	-	+
3	pul	-	±	-	+
4	per	-	-	+	+
5	pul	-	-	-	+
6	pul	-	-	-	+
7	pul	+	-	-	-
8	per	±	±	-	+
9	per	±	-	+	-
10	per	+	-	-	+
11	per	+	+	+	+

Tiny-SEMにて細菌が非確認であった症例

	病名	打診	排膿	病巣	培養
12	per	-	-	+	-
13	pul	-	-	-	+
14	pul	-	-	-	-
15	per	-	+	+	-
16	pul	±	-	-	-
17	pul	+	-	-	-
18	per	-	-	+	-
19	pul	+	-	-	-
20	per	-	-	-	-

考 察

各種歯科材料の基本的構造をSEMを用いて観察し、特徴を理解することは、より高度な歯科治療を行う上で極めて重要である。本研究においてはチェアサイドにおいてTiny-SEMを臨床の場で活用すべくその基礎的なデータを確認するために利用頻度の高い歯科材料を対象にTiny-SEMを用いて観察した。成績で述べたように、ほとんどの歯科材料において多くの知見が得られ、それらの結果は従来の報告と同様の基本構造が確認できた材料⁴⁻¹⁴⁾と従来の報告と異なった基本構造が確認できた材料¹⁵⁾およびTiny-SEMでは基本構造の確認が困難であった材料に^{10,16)}大別された。

まず、これまでに報告のある基本構造がTiny-SEMによって確認できた材料としては、合着用セメント、覆髄・裏層材、超微粒子フィラーを除いた光重合型レジン、根管充填材料、暫間充填材料および石膏系であった。すなわち、観察に用いたTiny-SEMの加速電圧と分解能において、基本構造が確認された材料である。SEM観察では加速電圧が高くなるとエッジ効果などの影響によって観察対象物の表面の微細構造の観察が困難となる傾向がある。本研究で比較のために用いたS-4500は電界放射型SEMであり、低加速電圧（たとえば5kv）においても十分な分解能を得ることが出来るので材料表面の構造がTiny-SEMよりも明瞭に観察されるが、15kvの加速電圧を用いたTiny-SEMによっても多くの試料の基本構造の観察に充分であると考えられる。また、加速電圧を高くすると、試料からの反射電子の放出量が増加し、それらの情報が2次電子に加わって像が形成されることから、供試材料の組成の違いがあると、それらがコントラストの違いとして像

に反映される。超微粒子フィラーを除いた光重合型レジンにおいては材料に含まれるフィラーが他の部位よりも高コントラストに観察されたのはこの理由によるものと考えられる。したがって、Tiny-SEMによってこれらの情報を得ることが可能であることが判明した。

これまでの報告と異なる基本構造が確認された材料としては粘膜調整材が挙げられる。S-4500と比較してTiny-SEMの方が観察中のビーム損傷が少ないものと思われ、Tiny-SEMにおいてはティッシュコンディショナーなどの材料本来の構造が損なわれることなく観察することができる。

Tiny-SEMにおいて基本構造の確認が困難であった材料としては超微粒子フィラー配合である光重合型レジンのパルフィークエステライトをはじめとし、義歯裏層材、化学重合型レジンなどが挙げられる。パルフィークエステライトに関してはTiny-SEMの分解能ではその構造の詳細は確認できなかった。この種の材料についてはS-4500を用いればその構造の観察が可能であり、ごく限られたこれらの材料についてはS-4500のような高分解能SEMが必要であると思われる。また、義歯裏層材、化学重合型レジンの様な材料については、表面の構造は極めて平坦で、特徴的な構造を持たないためSEMで得られる情報は極めて少ない。しかしながら、これらの材料に関しては、実際に臨床的に使用した際の劣化についてTiny-SEM下で把握できるものと考えている。

Tiny-SEMでの観察も含めて、歯科材料をSEM観察するにあたっては、観察しようとする試料が真空中に置かれるという制約が生じるとともに観察中に高いエネルギーを持った電子ビームの照射を受ける。これ

ら2つの過酷な条件下で材料の真の形態を観察するには多くの困難があるが、今回得られた所見から Tiny-SEM を用いて各種歯科材料から得られる情報は、それぞれの材料の特徴を把握するのに充分であると考えている。また、必要に応じて上位機種あるいはEDS分析などの手法の併用も考えなくてはならない。いずれにせよ、今回得られた各種歯科材料のSEM所見がデータベースとなり今後、レプリカ法¹⁷⁻¹⁹⁾などを用いて口腔内における材料の評価あるいはチェアサイドでのTiny-SEMの応用がダイヤモンドポイント、Kファイル等⁴⁾などの使用器具の劣化の確認ができることから治療器具の品質管理にも有用であると考えられる。

Tiny-SEMを用いたチェアサイドでSEM観察を構築するにあたって、臨床から得られた生体材料あるいは細菌などの生物試料を迅速に処理してSEM観察することが望ましい。本研究では、生物試料を短時間で観察するために迅速SEM試料作製キットを考案した。すなわち、この方法は化学固定から脱水までの操作を従来の方法に比べて時間的に簡便化したものである。乾燥法には従来から用いられている臨界点乾燥法²⁰⁻²⁴⁾や凍結乾燥法^{25,26)}を使用せず、シラン系特殊試薬²⁷⁾を代用した。この乾燥法は脱水後に生体組織内に残存するタンパク質などを安定化させると同時に残留エタノールをアンモニアガスとして放出させる効果を有することから、乾燥時の試料損傷が極めて少ない。このキットを使用した歯石およびプラーク^{28,29)}に関しては全て微細構造も破壊されることもなく、乾燥による収縮も認められなかった。チェアサイドで患者から採取される生体試料は通常非常に小さなものであり、キットを使用して迅速処理が常に可能であることはより高度な治療方針、診断を可能にするものと考えられる。また、軟化象牙質に関しては感染象牙質の取り残しの確認あるいは根管細菌のSEM観察においてはTiny-SEM下で細菌の存在が確認でき、根管細菌検査³⁾で得られた成績と類似していたことから、直接SEM観察する方法と培養との併用を行うことにより、根管内のより確実な無菌化の判定行われるものと示唆する。よってチェアサイドにおいてTiny-SEMの観察が臨床生物材料についても有効活用できるものと考えられる。今後は導電処理^{30,31)}の簡便化についても検討が必要と思われる。

結 論

本検索では、超小型走査型電子顕微鏡を用いて各種歯科材料を観察し、従来型走査型電子顕微鏡との比較検討を行った。また、生物試料の作製の処理過程に関

しては迅速SEM試料作製キットと従来法との比較を併せて検討した。その後、各種歯科治療器具、軟化象牙質および根管内容物を観察した。

得られた成績は以下のとおりであった。

1. 各種歯科材料においてはTiny-SEMはS-4500より解像度において劣るが、それぞれの材料の特徴を把握するのに充分であった。
2. 迅速SEM試料作製キットを用いた試料は、プラーク、歯石においては微細構造まで破壊されず観察することができた。
3. 各種歯科治療器具であるダイヤモンドポイントや、Kファイル等は、すみやかに観察できた。
4. 軟化象牙質のSEM観察は20症例中3例に感染象牙質の取り残しが確認された。
5. 根管細菌のSEM観察に関してTiny-SEM下で細菌が確認できた症例と嫌気培養の結果は類似していた。

以上のことからTiny-SEMでほとんどの歯科材料が観察でき、迅速処理用のキットを使用することによって臨床材料も迅速に観察できることからチェアサイドで患者に対して、従来にない高度な情報が提供できるものと考えられる。よって臨床上にチェアサイドにおいてSEM観察の構築が歯科治療領域において非常に有用であると示唆する。

引用文献

- 1) 岡崎卓司. 見せるインフォームド・コンセント 目は口ほどにモノを言い インフォームド・コンセントに欠かせぬ機器のシステム化. デンタルダイヤモンド. 2000; 25: 38-44.
- 2) 島田達生, 北 重夫. よくわかる電子顕微鏡技術, 朝倉書店. 1992: 99-136.
- 3) 小川 敏, 坪井新一. チェアサイド嫌気培養システムを用いた根管細菌検査. クイntenテッセンス. 1995; 14: 2167-2173.
- 4) 大橋正敬, 中井宏之, 橋本弘一, 堀江港三, 堀部 豊, 森脇 豊, 山木昌雄. 最新歯科理工学. 学建書院; 1987: 69-367.
- 5) 西尾政文, 山本宏治, 堀田正人, 松本 敦, 中橋輝夫, 高木久正, 近藤 緑, 木村健一. グラスアイオノマーセメント表面のSEM像. 日歯保存誌. 1989; 32: 241-244.
- 6) 西尾政文, 山本宏治. 各種グラスアイオノマーセメントのESEM像. 日歯保存誌. 2002; 45: 489-496.
- 7) 柴 満生, 荒井雄一郎, 西崎 寛, 覚本嘉美. 凍結直接乾燥法を利用した歯科用セメントの走査型電子顕微鏡による表面状態の撮影について. 医器材研報. 1987; 21: 9-15.
- 8) 柴 満生, 山本喜子, 西崎 寛, 覚本嘉美, 石崎雄一

- 郎. 臨界点乾燥法を利用した歯科用セメントの走査型電子顕微鏡による表面状態の撮影について. 医器材研報. 1983 ; 17 : 11-19.
- 9) 畦森雅子. 歯科用硬石こう硬化体の表面あれについて. 歯科材料・器械. 1985 ; 4 : 267-273.
 - 10) 藤島昭宏, 池田順子, 宮崎 隆, 佐々木竜二. フィラータイプによるコンポジットレジンの分類と機械的性質. 昭歯誌. 1999 ; 19 : 16-24.
 - 11) 平 雅之, 荒木吉馬. コンポジットレジン配合の製品分析. 調製と機能評価. 岩医大歯誌. 2001 ; 26 : 125-131.
 - 12) 細田裕康, 山田敏元, 中嶋正俊. 歯科用セメントに関する研究 第1報 クライオ SEM と画像解析による合着用セメントの構造について. 歯科材料・器械. 1990 ; 9 : 197-204.
 - 13) Goldberg F, Massone EJ, Pruskin and E Zmerner O. SEM study of surface architecture of gutta-percha cones. *Endod Dent Traumatol.* 1991 ; 7 : 8-15.
 - 14) 村島祐子, 吉岡隆知, 須田英明. 各種ガッタパーチャに関する検討. 日歯保存誌. 2002 ; 45 : 1057-1059.
 - 15) Malmstrom HS, Mehta N, Sanchez R and Moss ME. The effect of two different coatings on the surface integrity and softness of a tissue conditioner. *J Prosthet Dent.* 2002 ; 87 : 153-157.
 - 16) Wyatt CC and Harrop MacEntee MI. A comparison of physical characteristics of six hard denture reline materials. *J Prosthet Dent.* 1986 ; 55 : 343-346.
 - 17) Wilner FJ and Oliver RG. Evaluation of a reproduction technique for the study of the enamel composite/bracket base area. *J Orthod.* 2000 ; 27 : 261-266.
 - 18) 砂田 賢, 韓 臨麟, 岡本 明. 加齢に伴う歯の亀裂発生とその対処法に関する臨床的研究. 新潟歯学会雑誌. 2002 ; 32 : 275-283.
 - 19) Leonard RH Jr., Van Haywood B, Caplan DJ and Tart ND. Nightguard vital bleaching of tetracycline-stained teeth 90 months post treatment. *J Esthet Restorant.* 2003 ; 15 : 142-152.
 - 20) Anderson TF. Techniques for the preservation of three-dimensional structure in preparing specimens for electron the microscope. *Trans N.Y. Acad Sci Ser.* 1951 ; 13 : 130.
 - 21) Cohen AL, Marlow DP and Garner GE. A rapid critical point method using fluorocarbons (freons) as intermediate and transitional fluids. *J Microscopy.* 1968 ; 7 : 331.
 - 22) Horrige GA and Tamm SL. Critical point Drying for scanning electron microscopic study of ciliary motion. *Science.* 1969 ; 163 : 817-818.
 - 23) Boyde A and Wood C. Preparation of animal tissues for surface-scanning electron microscopy. *J Microscopy.* 1969 ; 90 : 221-249.
 - 24) 田中敬一. 臨界点乾燥法とその走査電子顕微鏡への応用. 電子顕微鏡. 1975 ; 10 : 44-50.
 - 25) Wheeler EE, Gavin JB and Seelye RN. Freeze-drying from tertiary butanol in the preparation of endocardium for scanning electron microscopy. *Stain Technol.* 1975 ; 50 : 331-337.
 - 26) Inoue T and Osatake H. A new drying method of Biological specimens for scanning electron microscopy. *Arch Histol Cytol.* 1987 ; 51 : 53-59.
 - 27) Nation JL. A new method using hexamethyl-disilazane for preparation of soft insect tissues for scanning electron microscopy. *Stain Technol.* 1983 ; 58 : 347-351.
 - 28) 山田敏彦, 永山元彦, 竹内 宏. 長期ブランクの電顕的観察. 岐歯学誌. 2002 ; 29 : 12-29.
 - 29) 尾上孝利. 口腔細菌の走査型電子顕微鏡(SEM)観察. 電子顕微鏡. 2003 ; 38 : 138-141.
 - 30) 大隅正子. 高分解能走査電子顕微鏡による酵母の観察—分裂酵母プロトプラストの細胞壁再生過程—. 電子顕微鏡. 1989 ; 24 : 83-89.
 - 31) 堀田康明, 新妻絵里子. ライフサイエンスにおける走査型電子顕微鏡の現状と未来. 細胞. 2000 ; 32 : 382-385.