

機関番号：11301

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2008～2010

課題番号：20390532

研究課題名（和文） 非破壊的硬組織評価法による口腔内環境と唾液性状に基づいた  
歯根面再石灰促進法の開発研究課題名（英文） Development of accelerated remineralization method based upon  
the non-invasive assessment of mineral density of tooth

研究代表者

小関 健由 (Koseki Takeyoshi)

東北大学・大学院歯学研究科・教授

研究者番号：80291128

研究成果の概要（和文）：我々は、歯面の石灰化度を鋭敏に非破壊的に短時間で観測できる超音波石灰化度測定装置を開発し、歯根面の石灰化に及ぼす口腔内環境と唾液性状に関する実験を実施した。その結果、歯面の耐酸性が超音波石灰化度測定値と相関が見られ、新たなう蝕リスク評価法の可能性が示された。これを応用すれば、唾液緩衝能等の検査値と合わせて生活習慣を含めた効果的なう蝕予防プログラムを構築することが可能であると考えられた。

研究成果の概要（英文）：Ultrasonic measurement system for mineral density of tooth surfaces had been developed. This system actualized significantly sensitive, non-destructive, and quick measurement. Using this system, we analyzed the relationship between mineral density of tooth and oral environment, especially function of saliva. The result revealed that acid resistivity was correlated with ultrasonic density of tooth mineral. This indicated the possibility of developing new preventive program against tooth decay according to the ultrasonic density of tooth mineral, buffering capacity of saliva, and living practice of daily life.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	8,000,000	2,400,000	10,400,000
2009年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
総計	11,200,000	3,360,000	14,560,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・社会系歯学

キーワード：予防歯科学・再石灰化

## 1. 研究開始当初の背景

「カリオロジー」にもとづく現代の歯科臨床では、う蝕の進行阻止や治療方法の開発以上に、う蝕発生を如何に予防するかのリスク判定が重要課題であると強調されている。これは二大歯科疾患のう蝕や歯周病に共通して、実質欠損や組織破壊が一度生じてしまうと、その生体修復が望めないために、生涯を通して高い生活の質を維持するための口の健康基盤が崩れてしまうからである。う蝕予

防を考える上で、う窩の発生前の脱灰の進行状態を評価する手法が重要な鍵となる。2005年には「International Caries Detection & Assessment System (ICDAS) Workshop」が開催され、新しいう蝕評価基準を用いて、疫学調査や臨床研究を行おうとする提案がなされている。この評価法の特徴は、より初期のう蝕様病変についても詳細に評価する点であり、初期う蝕の詳細な客観的評価法の緊急の開発と普及が緊急の課題である。これまでに、視診・X線撮影による画像診断の他に

多くの初期う蝕診断法が報告されてきた。実質欠損がない早期の状態では非破壊的にエナメル質脱灰を評価する方法には、QLF (Quantitative Light-induced Fluorescence) 法、電気抵抗値診断法の研究が進められている。しかしながら、この方法は、エナメル質平滑面に対しては有効であるが、隣接面う蝕の診断や象牙質表面の初期う蝕の評価には応用できない。

これらの問題を解決するために、我々は超音波を利用したエナメル質と象牙質の石灰化度を測定するシステムを構築した。この超音波石灰化度測定装置は、一定圧負荷をかけられる特殊な歯周プローブ (TUCL プローブ) の先端に小さなシリンダーをとりつけ、先端が丸い金属製の測定子に超音波発振子と受信子を貼り付けたセンサーを封入している。この機器は、健康な個々の歯面の石灰化度の固有値、さらにはその歯を脱灰処理したり再石灰化処理を実施すると、その変化量が鋭敏に非破壊的に観測でき、特に象牙質表面の計測に関しては世界初の機器である。試作機による測定には、傷や痛み等の侵襲を全く与えず、2秒以内に測定が終了する。よって、形状も測定方法も確立し、実際の歯冠部・歯根部両面のピンポイントの石灰化度の測定が出来る機器が完成した。つまり、これまで不可能であった歯の表面局所の石灰化度が測定できることとなった。

## 2. 研究の目的

本申請研究では、これまでの研究から完成した世界でも類を見ない高性能の歯面石灰化度計測器を使用し、次を目標として実施した。

### (1) 歯面の超音波石灰化度測定値とう蝕発症との関連の検索法の開発

臨床的に歯質の硬さに個人差があることは感じとることができるが、それを実際に測定してう蝕発症との関連を調査した研究はない。歯面の石灰化度測定値とう蝕発症の頻度との関連を明らかにするために、リスク検査としての有効性を検証する。

### (2) 歯面バイオフィルムのモデル制作法の開発

歯面の脱灰・再石灰化のバランスがう蝕の発症の鍵となるが、この両者を統合してう蝕発症の詳細な検討を行うには、歯面上の細菌性バイオフィルムを模した実験バイオフィルムのモデルの制作が必要となる。この歯面バイオフィルムのモデルを制作する。

### (3) 口腔内環境因子としての唾液とう蝕発

## 生の関連の検索

口腔内環境因子である安静時唾液と刺激唾液は常に口腔内を潤し、どちらもう蝕発生の抑制因子として重要な機能を持つ。よって、この両者とう蝕経験歯数を比較し、唾液の性状とう蝕発生との関連を検索する。

### (4) 耐酸性と超音波石灰化度測定値の関連

エナメル質・象牙質表面の再石灰化に必要な条件を検索し、効果的な再石灰化の状態を明らかにして、種々の条件下での歯面の再石灰化法を提言する。歯冠の白濁部や根面の軟化象牙質は、唾液とフッ化物の作用をうまく応用すると再石灰化を促進できることは臨床的・実験的に知られる事実である。この促進に必要な唾液側の要件や塗布する試薬の賦形や種類を検証して、実際の歯面の効果的な再石灰化法を探った。

## 3. 研究の方法

### (1) 歯面の超音波石灰化度測定値とう蝕発症との関連の検索法の開発

超音波石灰化度測定装置を臨床応用する為に、超音波石灰化度測定装置の測定子に薄膜カバーを被せて超音波石灰化度測定値に与える影響を検証した。エナメル質を対象とした実験では、ネイルマニキュア、レジック充填の前処理用のエッチング・ボンディング剤の塗布を行い、超音波石灰化度計測値を計測した。さらに、ポリ塩化ビニリデン製ラップ (11  $\mu$ m厚) 等の臨床応用が可能な薄膜を集め、超音波測定子と歯面の間に介在させ、同様に超音波石灰化度測定値を計測した。

### (2) 歯面バイオフィルムのモデル制作法の開発

口腔内バイオフィルムの製作には、う蝕病原性の極めて高いと考えられる *Streptococcus sobrinus* 6715株を用いて、ハイドロオキシアパタイト片上に疑似歯垢 (バイオフィルム) のモデルを作成した。使用培地は、*S.sobrinus* を継代している Brain-Heart Infusion 培地を元に、様々に成分濃度を変えて実際に培養し、バイオフィルムの生成と性状を確認した。

### (3) 口腔内環境因子としての唾液とう蝕発生の関連の検索

宮城県の農業地帯に位置する小規模な市で、住民一般健康診査の会場に併設して、40、

50, 60, 70歳の節目者179名を対象とした歯周疾患健診を実施した。この歯周疾患健診の受診者で、実験の説明を行い同意書を頂いた方を対象に、キシリトール100%ガムを用いた改良刺激唾液採取法を用いて刺激唾液流出量を計量した。即ち、キシリトール100%ガム (XYLITOL シュガーレス・アップルミント、オーラルケア社製) を用い、唾液採取容器として、吐唾が容易であること、採取した唾液性状観察が容易である半透明の容器であること、内容量を読み取る詳細な目盛の印刷から、50mLのディスプレイの遠心管 (91050、TPP社製) を使用し、口腔内の唾液を嚥下した後に口腔にガムを入れて3分間咀嚼して、口腔内に貯留する唾液を飲み込まずに遠心管に吐き出して刺激唾液を採取した。同時に歯周疾患健診の結果と合わせて、現在の刺激唾液流出量と口腔内現症との関連を検索した。本研究は、東北大学大学院歯学研究科倫理専門委員会の承認を得て実施した (承認番号19-25, 19-26)。

#### (4) 耐酸性と超音波石灰化度測定値の関連

耐酸性は、酸エッチング生検法を用いて計測した。即ち、乳酸緩衝液 (pH=3.0) を直径3mmの濾紙に染み込ませ、その濾紙を歯面に載せて1分後に濾紙を除去し、濾紙から遊出したカルシウムをイオン電極法で確認した。

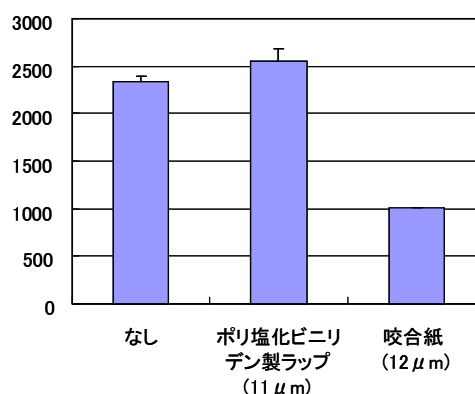
#### 4. 研究成果

超音波技術を応用した歯面石灰化度計測を中心に、歯根面の石灰化に及ぼす口腔内環境と唾液性状に関する実験、及び実験準備を実施した。

##### (1) 歯面の石灰化度測定値とう蝕発症との関連の検索法の開発

超音波石灰化度計測装置を臨床応用するには、感染症伝播予防のためにスタンダード・プリコーション(標準対策)に従う必要がある。その為に、超音波石灰化度計測装置の測定子に何らかのカバーを被せるかなどの措置を講じる必要がある。エナメル質を対象とした実験では、ネイルマニキュア等の極めて薄い皮膜は測定値に有意差は無かった。しかしながら、レジン充填の前処理用のエッチング・ボンディング剤の塗布は、3倍以上超音波石灰化度計測値を上昇さ

せた。これは、ボンディング剤の表面が酸素の存在で完全に硬化せず、エッチングの表面の微細な凹凸を埋めて超音波測定子の歯面への接触面積を増大させた可能性が考えられる。一方で、ポリ塩化ビニリデン製ラップ (11 $\mu$ m厚) は、音波石灰化度計測値が高くなる傾向があるが、有意差がなかった。他の材質の薄膜テープは、超音波石灰化度計測値の値がどれも有意に低下した。よって、ポリ塩化ビニリデン製ラップを用いた臨床での応用を行うことが可能となった。これを用いて、臨床での萌出歯と口腔内のう蝕罹患歯数を比較することにより、う蝕発生の後ろ向き調査が可能となった。



##### (2) 歯面バイオフィルムのモデル制作法の開発

口腔内バイオフィルムによるステファン曲線の動態とう蝕の発生に及ぼす口腔内の環境因子を検索する上で、歯面バイオフィルムのモデルの構築は重要である。よって、う蝕病原性の極めて高いと考えられる *Streptococcus sobrinus* 6715株を用いて、ハイドロオキシアパタイト片上に疑似歯垢(バイオフィルム)のモデルを作成した。*S.sobrinus* を用いた歯面バイオフィルムモデルであるならば、pHスタットの使用が有効である。しかしながら設備が大規模になり、口腔内の生活に伴う口腔環境の刻々の変化を追従することは不可能である。よって、バッチ法による *S.sobrinus* を用いた歯面バイオフィルムモデルを試みた。

Brain-Heart Infusion 培地を元に種々の培地成分と培養条件を検討した結果、以下の変法が安定した *S.sobrinus* を用いた歯面バイオフィルムモデル構築に適していた。リン酸緩衝液 (Dulbecco's Phosphate-Buffered Salines) に50%濃度のBrain-Heart Infusion 培地と 1%Yeast

extract を加え、ショ糖を加える場合は最終濃度0.8%になるように調整した。バッチ法の培地の交換は、初回は12時間後、次回から *S.sobrinus* バイオフィルムの積層の状態を観察しながら8時間から4時間毎に交換する製作法を確立した。本法で製作した *S.sobrinus* バイオフィルムモデルは、ハイドロオキシアパタイトの表面に固着しながら生育したが、ショ糖から酸を産生するために培養時間が長くなると歯面表面の溶解が発生し、バイオフィルムの脱離が起きるので注意が必要であった。本法を用いて、実験室での脱灰条件を変えながら、口腔内の環境因子の変動を *S.sobrinus* バイオフィルムモデルに与えて、歯面石灰化度計測を実施している。

### (3) 口腔内環境因子としての唾液とう蝕発生の関連の検索

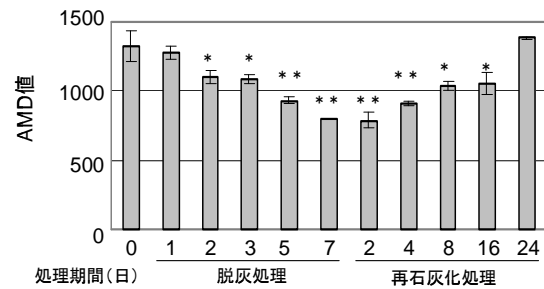
口腔内環境因子の中心的な存在である唾液は、安静時唾液と刺激唾液に分けられる。前者は常に口腔内を潤しているのう蝕の進行と再石灰化に大きな影響を与えていると考えられる。一方後者は、食事時に食物による口腔内 pH の変動を強い緩衝能にて安定化させ、食物を口腔内から嚥下させて洗い流す役割を担い、どちらもう蝕発生の抑制因子として重要な機能を持つ。よって、この両者とう蝕経験歯数を比較した。

96名の成人において安静時唾液分泌量と刺激唾液分泌量の測定、および78名の成人において安静時唾液分泌量と刺激唾液分泌量の緩衝能の測定を実施した。どの年齢階級においても、健全歯数との有意な関連は見つけられなかった。年齢階級が上がるほど歯周疾患による歯の脱落の影響を受けるので、その点を考慮した調査対象を選択する必要性が示された。

### (4) 新たなう蝕予防法の提言を目指して

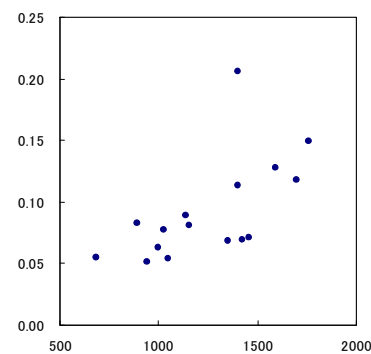
硬組織石灰化度測定器は、歯面の石灰化度を鋭敏に測定することを報告した。これは、脱灰・再石灰化の変化を経時的に非破壊測定を実施することに適していることを示している。

さらに、歯の石灰化度が歯の表面の耐酸性の状態に関連するのであるならば、歯の表面の極めて初期のう蝕進行度の評価を行うと共に、新しいう蝕リスク評価法となることが出来る。実際にエナメル質で石灰化



健全部位との比較 \*P<0.05 \*\* :p<0.01

度測定値を測定し、さらに酸エッチング生検法で耐酸性を測定した場合、両者は有意な相関を示した。よって、石灰化度測定値から、耐酸性を見積もることが可能になることが示唆され、新たなう蝕リスク評価法の可能性を示した。さらに、石灰化度測定値を応用すれば、効果的なう蝕ハイリスク者を効果的に選択することが出来、生活習慣とあわせた評価法を応用すると、新たなう蝕予防プログラムを構築することが可能となった。



## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計0件)

[学会発表] (計9件)

1. E. Yoshida, J. Suzuki, E. Ito, R. Hosokawa, N. Tada, T. Tamahara, J. Harako, K. Taura, T. Koseki  
Flow rate of stimulated saliva of the healthy Japanese subjects  
The 4th International Symposium for Interface Oral Health Science  
2011年3月8日、ホテル仙台プラザ
2. E. Ito, I. Yuki, R. Funahashi, T. Ohba, M. Takahashi, R. Hosokawa, T. Koseki  
Constant-Forced Periodontal Probe for

- Practical Training of Probing Instrumentation  
The International Association for Dental Research General Session  
2010年7月16日、Barcelona, Spain
3. J. Suzuki, R. Hosokawa, N. Tanda, E. Ito, T. Koseki  
Secular changes of overjet and overbite among middle school students  
The 58th Annual Meeting of Japanese Association for Dental Research  
2010年11月20日、九州歯科大学
4. E. Ito, Y. Takahashi, T. Ohba, M. Takahashi, R. Funahashi, I. Yuki, R. Hosokawa, T. Koseki  
Probing force for accurate detection of calculus on root surfaces  
The 58th Annual Meeting of Japanese Association for Dental Research  
2010年11月20日、九州歯科大学
5. N. Tanda, Y. Hinokio, J. Washio, N. Takahashi, T. Koseki  
Acetone in Mouth Air in Type 2 Diabetes Mellitus  
The International Association for Dental Research General Session  
2010年7月16日、Barcelona, Spain
6. E. Ito, I. Yuki, R. Funahashi, T. Ohba, M. Takahashi, R. Hosokawa, T. Koseki  
Probing force for accurate detection of calculus on root surfaces  
The 4th International Symposium for Interface Oral Health Science  
2011年3月8日、ホテル仙台プラザ
7. M. Sugiyama, J. Aida, T. Koseki  
Oral health care program to achieve self-actualization in health services facility for the aged  
The 4th International Symposium for Interface Oral Health Science  
2011年3月8日、ホテル仙台プラザ
8. T. Tamahara, J. Harako, R. Hosokawa, K. Kimura, M. Komagata, K. Hanaoka, S. Aonuma, F. Okuya, K. Itagaki, Y. Akai, K. Tamura, H. Sonobe, T. Koseki  
Enforcement of dentists to promote oral care of hospitalized and home-care patients  
The 4th International Symposium for Interface Oral Health Science  
2011年3月8日、ホテル仙台プラザ
9. J. Harako, T. Tamahara, R. Hosokawa, K. Kimura, M. Komagata, K. Hanaoka, S. Aonuma, F. Okuya, K. Itagaki, Y. Akai, K. Tamura, H. Sonobe, T. Koseki  
Collaboration of medical and dental facilities to promote oral care in hospitals  
The 4th International Symposium for Interface Oral Health Science  
2011年3月8日、ホテル仙台プラザ

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計0件)

○取得状況(計0件)

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

小関 健由 (Koseki Takeyoshi)  
東北大学・大学院歯学研究科・教授  
研究者番号：80291128

##### (2) 研究分担者

高橋 信博 (Takahashi Nobuhiro)  
東北大学・大学院歯学研究科・教授  
研究者番号：60183852  
鈴木 治 (Suzuki Osamu)  
東北大学・大学院歯学研究科・教授  
研究者番号：60374948  
田浦 勝彦 (Taura Katsuhiko)  
東北大学・病院・講師  
研究者番号：90005083  
井川 恭子 (Ikawa Kyoko)  
東北大学・大学院歯学研究科・助教  
研究者番号：40241640  
丹田 奈緒子 (Tanda Naoko)  
東北大学・病院・助教  
研究者番号：00422121