

令和 3 年 5 月 26 日現在

機関番号：32622

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K17055

研究課題名（和文）ラマン分光法を用いた新規歯質検出法の開発

研究課題名（英文）Development of new tooth substance detection method using Raman Spectroscopy

研究代表者

中村 紫野（Nakamura, Shino）

昭和大学・歯学部・兼任講師

研究者番号：80782573

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,800,000円

研究成果の概要（和文）：まず励起波長と規格化に用いるラマンバンドについては、これまで通り785nmのレーザー光、規格化に用いるHAラマンバンドは960cm⁻¹が最適であることが分かった。次に、歯石除去毎に同一部位で蛍光/ラマン強度比の変化を観察したところ最終的にほぼ一定値を示すことが確認できた。これにより、歯石除去終了タイミングを知ることができる可能性を示唆した。

そして、実際の歯周ポケット内には歯肉溝浸出液や血液が貯留していることを考慮し、生理食塩水と血液に浸した状態の歯牙で同程度の結果が得られるか確認したところ、乾燥状態の歯牙と変わりなく測定できたため、実際の口腔内でも使用可能である可能性が高まった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、根面歯石検出・歯石除去終了を知らせるセメント質の露出・オーバーインスツルメンテーションを示す象牙質の識別を可能にする為の励起波長の検討および、規格化に使用するハイドロキシアパタイトラマンバンドの検討をすることである。

本研究により歯周治療において最も重要である歯根面に沈着した歯石の除去を適性に評価でき、さらにオーバーインスツルメンテーションによる偶発症を防ぐことができると考える。これによって多くの歯科医、歯科衛生士が手指の感覚に頼って治療してきた手技を客観的数値で捉えることが可能となり、歯科界に貢献できると考える。

研究成果の概要（英文）：At first it was revealed that 785nm laser irradiation was most suitable for fluorescence/Raman excitation, and we used the Raman band intensity of HA 960cm⁻¹ band for the normalization of fluorescence intensity. Then we determined that scaling was accomplished when the change in that ratio after debridement, which was defined as the delta value, was close to zero. Our findings are expected to be incorporated as part of an objective method for evaluation of root debridement.

Furthermore we considered that gingival crevicular fluid and blood were pooling in the actual periodontal pocket. To simulate the conditions in a periodontal pocket during the measurement procedure, the teeth were covered by a layer of physiological saline solution or blood in order to determine the influence of different inflammatory fluids. Raman measurement was not influenced by the body fluids used. This results can be used to develop a new system for debridement of subgingival calculus in periodontal pockets.

研究分野：歯周病学

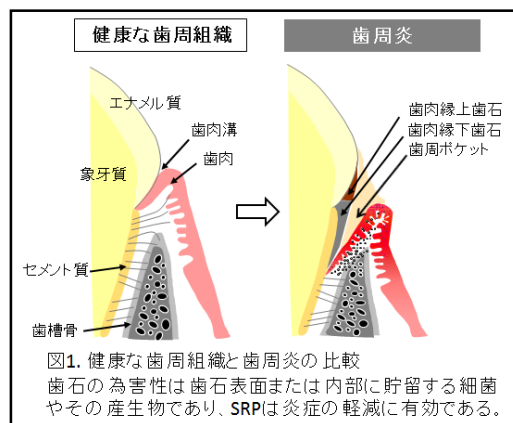
キーワード：ラマン分光法 ラマンバンド 蛍光強度 セメント質 象牙質 歯石

1. 研究開始当初の背景

(1) スケーリング・ルートプレーニングは歯周炎の改善に寄与する有効な処置である

歯周炎は口腔内の歯周病原性細菌による感染症であり、歯肉や歯槽骨などの歯周組織の破壊を主とする慢性炎症性疾患である。発炎性因子の代表はプラークであるが、そのプラークを増加させたり、除去しにくくして歯肉の炎症を増悪させるプラーク保持因子として歯石が挙げられる。

特に、歯肉縁下歯石は歯肉溝浸出液や血液由来成分を含むため、黒褐色を帯びており、歯肉縁上歯石より硬く、歯面に強固に沈着している(図1)。歯周組織の炎症が強くなり、歯肉溝浸出液が増えるほど、歯肉縁下歯石は沈着しやすい状態となり、嫌気性菌のすみかとなる歯肉縁下歯石の存在は歯周組織に対する為害性が大きいと考えられる。スケーリング・ルートプレーニング(SRP)という歯周治療は口腔内または歯周ポケット内に露出した歯の表面に付着したプラーク、歯石、その他の沈着物を機械的に除去する操作である。歯根面に沈着した細菌成分の完全な除去を行うことで、セメント質への



上皮の再付着が起こり、歯周治療の成功へと繋がる (Aleo et al., *J Periodontol*, 45:672-675, 1974. Aleo et al. *J Periodontol*, 46; 639-645, 1975)。

(2) 歯石の探査は訓練が必要とされる

SRPを行う前には、歯石の沈着量、分布状況、歯根面の粗造性を把握する必要がある。歯肉縁上歯石は肉眼的診査で容易に見つけることが可能だが、歯肉縁下歯石は歯周ポケット内に存在するため、肉眼では発見しにくい。歯石の探査は歯周ポケット探針、探針、スケーラーなどによる触診が最も一般的に行われる。この方法では歯根面の状況把握を目視、手指の感触に頼らざるを得ず、この点は改善が期待されている(Low SB et al. *Periodontology* 2000, 9;23-26, 1995. Clerehugh V et al., *J Dent* 24:329-333, 1996)。申請者は、この点を考慮して、視覚的にコントロールできない歯周ポケット内の根面状況把握のための分析的システムおよび歯石検出の原理、方法の開発を目指した。(3) 歯質の過度な削合は避けなければならない

歯石の除去は必要不可欠であるが、健全セメント質を除去しすぎてしまうオーバーインストルメンテーションは避けなければいけないことが理解されている (Oberholzer.R et al., *J Clin Periodontol*, 23; 326-330, 1996)。しかし、実際の臨床現場では、セメント質の過度な削除により知覚過敏を起こす例が少なくない。術中の歯根面がセメント質であるか、象牙質まで露出しているかの確認方法は未だに報告されていない。

2. 研究の目的

以上の背景をふまえ、歯根表面のラマンスペクトルの解析により歯質の識別が可能であるか以下の研究を実施した。

- (1) セメント質と象牙質の識別を可能にする為のレーザー光の励起波長を検討
- (2) 規格化に利用するハイドロキシアパタイト(以下、HA)のラマンバンドを検討
- (3) SRP終了のタイミングを知る方法を検討
- (4) 測定時の体液、血液の影響を検討

3. 研究の方法

(1) 抜去歯の選定

昭和大学歯科病院歯周病科に通院中の患者のうち、研究協力に同意の得られた患者の治療の過程で抜歯が決定している歯を対象とする。選定条件は、歯周病が理由で抜歯する歯、歯根面に歯石が塊状に沈着している歯、抜髄処置がされていない歯、歯冠補綴物が装着されていない歯、とする(例; 図2)。



図2 抜去歯の選択

(2) スライス作成

抜去歯の歯根面に 歯石沈着部位、SRP を行いセメント質を露出させた部位、歯根面を削合し象牙質を露出させた部位を作成し、自動精密切断機アイソメット (JEOL 社製) を用いて1mm厚のスライスを作成する(例; 図3)。

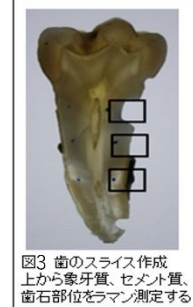


図3 歯のスライス作成
上から象牙質、セメント質、
歯石部位をラマン測定する

(3) ラマンスペクトルの取得

ラマン測定に使用する励起波長の種類は数種存在する。歯石沈着部位、セメント質、象牙質のラマンスペクトルを各々取得する。測定条件は出力100mW、露光時間10秒とし、1部位につき10回の平均を解析に用いた。分光器はポータブルラマン分光光度計 (Enwave Optronics, Inc. ProRaman-L) を使用した。

(4) 取得したラマンスペクトルから HA のラマンバンドのうちセメント質と象牙質の識別に用いることのできるラマンバンドを検討する。

(5) HA のラマンバンドを用いて蛍光/ラマン強度比の算出を行う。算出方法は以下に記す。

取得したラマンスペクトルの各ラマンバンドにガウス関数によるスペクトルフィッティングを行う。

その結果から蛍光強度とラマンバンド強度を求める(図4)。

蛍光/ラマン強度比を算出する。

各バンドで得られた蛍光/ラマン強度比の比較について統計解析を行う。

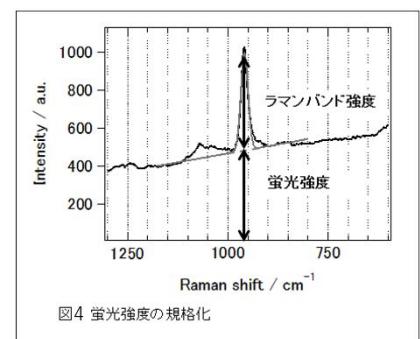


図4 蛍光強度の規格化

(6) SRP を順次行い、同一部位で蛍光/ラマン強度比の変化を観察する。

(7) 乾燥状態での測定、生理食塩水と血液に各々24時間浸漬させた歯で比較検討する。

4. 研究成果

(1) 励起レーザーの種類は紫外から近赤外まで幅広く選択できるが、一般的に532nmのグリーンレーザーから1064nmのYAGレーザーまでの励起波長レーザーが選択される。今回は532nmのグリーンレーザーと785nmの半導体レーザーを検討した。785nmの励起波長では図5のように綺麗なスペクトルを取得できた。一方で532nmの励起波長では蛍光の影響を多く受けること分かった。

また、象牙質、セメント質の各部位からラマンスペクトルの比較を行った。100本の抜去歯の歯根面よりラマンスペクトルを取得したところ、どの抜去歯でも確認できたHAラマンバンドは主に3つ、有機質のラマンバンドは1つであった(図5)。

3つのHAラマンバンドのうち 448cm^{-1} [2]、 582cm^{-1} [4]は歯石沈着が多量の場合には強い蛍光強度によりラマンバンドは認められなかったが、 960cm^{-1} [1]はある程度歯石除去すると必ず最初に確認できるラマンバンドであった。そのため、励起波長は785nm、規格化に用いるHAラマンバンドは 960cm^{-1} とした。

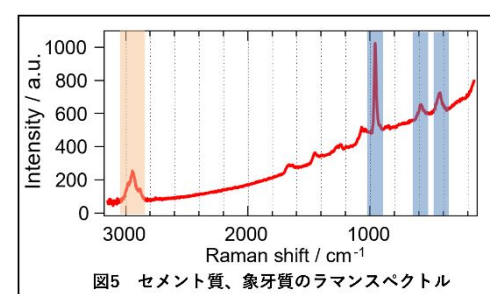


図5 セメント質、象牙質のラマンスペクトル

(2) SRP を順次行い、同一部位で蛍光/ラマン強度比の変化を観察した。SRP ごとに数値は低下

していき、最終的に、ほぼ一定値を示すことが確認できた(図 6A)。しかし、最終的な測定値は必ずしも一定ではなかったため、各歯ごとに異なる固有の値を持つと考え、各測定ごとの差(値)を算出したところ、漸近的に0となった(図 6B)。これより、SRP 終了のタイミングを蛍光/ラマン強度比の値をもって知る可能性があることを示唆した。

(3) 最後に、体液の影響を検証するために乾燥状態での測定と、生理食塩水、血液に 24 時間浸漬させたものを比較した。両者とも、蛍光/ラマン強度比に大きな変化はなく、生体内でも正確な測定が可能であることが示された(図 7)。

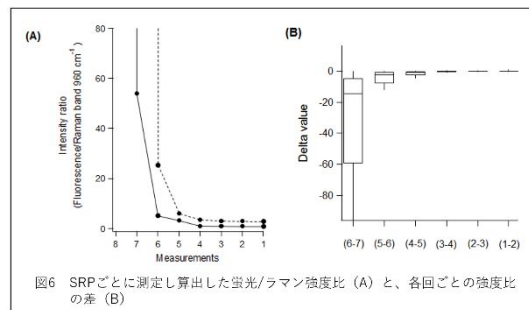


図6 SRPごとに測定し算出した蛍光/ラマン強度比 (A) と、各回ごとの強度比の差 (B)

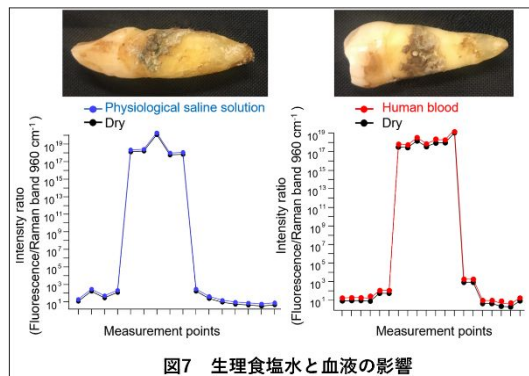


図7 生理食塩水と血液の影響

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------