

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 13 日現在

機関番号：32667

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2013

課題番号：22791847

研究課題名(和文)レーザー照射した齲蝕病変 μ CT法による再石灰化現象の4次元観察

研究課題名(英文)Four-dimensional observation of remineralization phenomenon with carious lesion using micro CT method and laser irradiation.

研究代表者

東理 頼亮(KANRI, Yoriaki)

日本歯科大学・新潟生命歯学部・講師

研究者番号：40366761

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円、(間接経費) 900,000円

研究成果の概要(和文)：レーザー照射による歯面へのう蝕病変回復過程を理解する目的で表層下脱灰を伴うヒト臼歯を用いて、CO₂レーザー照射による歯質変化を非破壊的・経日的に観察し病巣域と石灰化度の変化を追跡した。実験は当病院で抜歯し本学倫理規定で使用が許可された大臼歯の平滑面白斑う蝕にフッ化ナトリウム塗布とレーザー照射の併用を経日的に行い、 μ CT画像と無機塩濃度変化を解析した。結果は照射試料と未照射試料の脱灰深度に有意な差があり、レーザー照射したエナメル質表面の色調は健常部分と類似し、 μ CT画像から深部の齲蝕病巣の再石灰化度に増量を認めた。本研究は表層下脱灰へレーザー照射と歯面塗布剤の併用が有効である可能性を示唆する。

研究成果の概要(英文)：We clarified the caries lesion recovery by the laser irradiation on the tooth surface, using human molars with subsurface demineralization. Purpose of our study is the quality of enamel after a CO₂ laser radiation. These observations are done non-destructively by means of micro CT. Sequential quantitative changes was evaluated with the time axis variation of the calcification and the degree widening range of lesion. We used the molars having a white spot caries in smooth surface for experiments. In order to observe the recovery of caries, we performed the combination of CO₂ laser irradiation and sodium fluoride application to the white spot. We have observed samples in the 3D image after shooting micro CT. As results, it was a significant difference in demineralization depth in a sample of laser irradiated sample. We suggested the possibility of the tooth surface coating agent and irradiation of the CO₂ laser is effective area of subsurface demineralization from this study.

研究分野：保存治療系歯学

科研費の分科・細目：保存修復学

キーワード：再石灰化 レーザー照射 病理学 立体構築 初期齲蝕

1. 研究開始当初の背景

日本での齲蝕罹患率は過去 20 年間で減少してきてはいるが、5 歳児においては 70% 近く、成人の罹患率では 90% に達している。このような齲蝕の状況を抑えるには初期齲蝕病変の進行を抑えることが求められている。近年、齲蝕予防に向けてフッ化物応用が普及するとともに表層エナメル質は外来性のフッ素イオンによる再石灰化促進効果によって硬く維持されているが、一方では、脱灰病巣が歯質内部に広まった不顕性齲蝕 (hidden caries) の問題を生じさせている。従来の齲蝕病巣の確定診断と再石灰化処理の効果判定に向けて、非脱灰標本の偏光顕微鏡観察あるいは標準物質を参照した顕微 X 線法 (デンシトメトリーによる無機塩濃度の測定) が基本的な方法となっている。これらの組織観察は 2 次元情報に基づいているが、齲蝕病巣の全体像を把握する目的では、硬組織薄切操作により連続非脱灰標本 (これまでの報告では 100 μm 前後の厚さが選ばれている) を作製し、標本別に撮影した顕微鏡画像あるいは無機塩濃度プロファイルを積層する 3 次元観察も試みられてきた。これらの非脱灰標本作製に基づく観察方法では、薄切操作に伴う試料損失を避けることができない固有の問題を抱えている。現在市販されている硬組織薄切装置での切断刃の厚さは最小でも 100 μm 幅であり、この切断刃の厚さによる損失を防ぐことはできず、硬組織の連続薄切片による立体観察での空間分解能は数 100 μm の範囲に止まっているのが実情である。これらの組織観察法が抱える問題点を補う上で、歯の表面から内部構造を判定する非破壊的観察法も考案されており、可視非光の散乱強度やレーザー励起による蛍光強度を指標とする臨床診断法が注目されている。ただし、これらの非破壊的な観察法で得られる情報は歯質の組成・構造の変化と一義的に関連するとは限らず、測定内容から病態診断に至る上で不確実さを残している。文献的にも歯の表面からの診断情報については病理組織観察による確証を必要とすることが強調されており、裂溝齲蝕形態の多様性や裂溝壁の性状変化の診断能については未解決の課題を多く残している。研究代表者は歯質内部の変化を連続的に非破壊的に捉えて、歯質組成の違い (石灰化度) を定量評価するうえではマイクロフォーカス X 線トモグラフィ (μCT) の導入が不可避と考えている。歯科臨床においては、マクロ CT と共にデンタル CT の開発・導入も進んできた。トモグラフィに基づく歯の 3 次元観察の報告も増えてきている。現状での歯を対象とした CT 診断法の問題点は、歯の形状の立体観察にとどまる場合が多く、エックス線濃淡レベルに基づき無機塩濃度を反映した歯の内部構造の観察には至っていないことが挙げられる。研究代表者はこれまでに、歯や骨の硬組織研究に μCT 法を導入し、濃淡画像の最適二値化処理に基づき石灰化度の

異なる組織要素 (例えば、健全なエナメル質・象牙質・歯髄腔、あるいは齲蝕罹患歯では脱灰歯質や再石灰化部位) を抽出したうえで、それぞれの組織要素の空間局在を明示した立体構築法と 3 次元形態計測法を確立している。これまでの国内外の学会では、ヒト抜去歯の裂溝齲蝕の μCT 立体観察に基づき、細かな分枝を持つ裂溝形態を分画するとともに裂溝壁面の直下に広がる脱灰病巣の広がり (表層下脱灰) を 3 次元表示できることを報告してきた。2006 年 IADR では裂溝齲蝕病変、2008 年 IADR 及び歯科基礎医学会学術大会では根面齲蝕を対象に 15 日間にわたるキシリトール溶液を用いて再石灰化処理を施し、局所的な石灰化度の変化を充分な空間分解能で表示できることと時間経過に伴う組成変化を追跡 (4 次元観察) できることを報告した。4 次元観察は、日時を変えて撮影した原図データから構築した 3 次元画像の空間座標を重ね合わせる必要があるが、 μCT 断層像の撮影方法や画像処理法の工夫により、座標位置の重ね合わせの精度も高く、空間位相を揃えた後の裂溝形状や組織容積の計測値 (誤差 1% 以内) も再現性が高いことも確かめている。これは新たな観察技法として国内外で高い評価を得ている。また、新たな診療技術として 2000 年代からレーザーの歯科領域への研究・応用が急速に発展し、標準的な治療法の一つとして 2008 年から保険適用となった。治療術式も一定の傾向にある。その中で大野らや久田は齲蝕予防から初期齲蝕の進行抑制にレーザーの応用を報告しており、フッ化ナトリウムとレーザーを併用し初期齲蝕病変である白斑 (表層下脱灰病変) を消失させている (レーザー・サンドウィッチ法)。また、何らは人工的に脱灰・再石灰化したヒト永久歯に酸性リン酸フッ素溶液を作用させ、レーザー照射を施すことで再石灰化の進行の促進を報告している。しかし、以上の報告は口腔内写真によるエナメル質の色調の変化を検討したものや EPMA を用いた解析にのみ観察がとどまっていた。

2. 研究の目的

本研究は、レーザー治療の正確な効果を理解する一環として、また処置前後の病態の回復モデルの確立として、表層下脱灰の広がる範囲と再石灰化の経日的変化を立体構築像を用いて視覚的にとらえることが可能であり、従来報告された実験内容と総括して将来の臨床分野の向上のために計画した研究であった。

3. 研究の方法

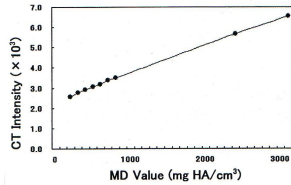
歯冠部に崩壊や損傷がなく、平滑面初期齲蝕を有した抜去歯を用いて、 μCT 立体構築と無機塩濃度表示によりレーザー照射による病状の形状変化と再石灰化の進行度を評価した。 μCT 像の解像度の向上のため、歯質をブロック状にトリミングし、初期齲蝕領域にレーザー・サンドウィッチ法を行う中で、時系列での μCT 立体構築像と無機塩濃度変化を

定量解析した。病巣領域の無機塩濃度表示に向けては、既知の無機質密度を持つ標準物質(合成ハイドロキシアパタイトと樹脂の混合物、アルミ箔、健全ヒトエナメル質)を歯質試料

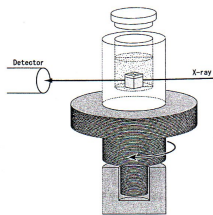
と同条件下で撮影し、密度 vs CT 値の検量線を設定した(上図参照)。試料の撮影には μ CT 断層画像撮影法を用いて、トリミング前に歯冠部の撮影を行い、表層下脱灰の形成を確認した。歯質ブロックの経時的な変化を観察する連続撮影は、X

線透過性の発泡スチロールで自作した試料容器に設置し、水溶液中に浸漬した状態で撮影台に固定した(右図参照)。 μ CT 撮影時には容器ごと μ CT 装置に設置し、異なる時間間隔で同一方位より3次元画像を撮影した。

同じ歯質ブロックを日時を変えて繰り返し μ CT 画像を撮影するうえではX線源 - 試料 - 検出器の幾何学的位置を、一定に保ちながら試料へのX線入射部位と入射方向も規定する必要があったため、歯質ブロックの設置位置と方位を規定するため精確な容器設置個所を試料台にマークするとともに、容器自体にも個々の歯質試料に適合する収納部位を設け、立体構築像の重ね合わせの指標としてX線不透過な銀ペーストをマーキングに用いた。試料設置は経時的に同一試料を再撮影し立体構築像を比較するうえで、3次元画像間での空間座標位置合わせの演算処理の所要時間を短縮できることと、座標変換に伴う立体構築像の容積誤差を抑えるうえで重要であった。 μ CT 撮影条件は管電圧/管電流 96Kv/75 μ A、断層画像枚数 300 枚、スライス厚み 11.3 μ m に設定した。撮影時エナメル質はX線散乱により試料周辺部のX線不透過度が高まるハードニング効果と断層画像にリングアーチファクトが現れる。リングアーチファクトを軽減するために、試料ステージ周囲を厚さ 0.1mm の真鍮板で遮蔽した。予備撮影と画像処理に基づく検討結果から、真鍮板の被覆により、断層画像のリングアーチファクトは検出限度以下に抑えられることと、健全歯質と脱灰病巣との濃淡レベルを検出するうえで十分なコントラストが保たれて

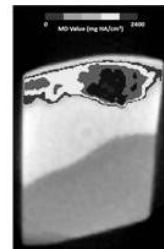


濃淡スケール vs CT 値から無機塩濃度域に換算。標準物質として、 μ CT 原因を石灰化度に対応した画素値でラベルすることにより無機塩量の空間分布を視覚的に捉えることができる。



撮影時の試料設定法。 μ CT 撮影装置は X 線照射器、試料ステージ、検出器で構成されている。撮影時は、試料を蒸留水に浸漬させた状態でステージに設置する。撮影法として試料の拡大率と撮影範囲を設定し試料の中心部に X 線が照射されるようにステージの位置を整える。試料の撮影開始から終了時までは試料ステージは 180° 回転する。

いる画像を得ることができた。 μ CT 画像では平滑面齲蝕の形態観察に十分な空間分解能(10 μ m 前後)を備えている。CT 立体構築では、256 階調の濃度設定(CT 値)を TIFF 変換したスライス画像(濃淡画像)に変換し、各スライス画像の最適二値化の数値(L 値)に基づき石灰化領域とバックグラウンドとを識別する。この際に濃淡表示される設定値の範囲を決めるが、異なる石灰化度を示す組織抽出処理に大きく影響する。そのため、画像コントラスト幅を最適化するための管電圧/管電流、試料台と光軸とのズレを補正するためのファントム校正、観察試料と回転軸とのズレを補正するシフト値、画質を規定するウィンドウ幅、スライス画像ごとの石灰化領域を抽出する二値化処理の設定条件について、それぞれの最適条件を決定した。撮影した画像を元に立体構築用のデータを抽出する手段には歯質とバックグラウンドを分ける自動二値化法と歯質と齲蝕領域を文画する局所二値化法(2 \times 2 ピクセルの微小領域で濃淡レベルを分画する)があり、これらの技法を併用している。加えて、4D 観察において単独の画像データの立体構築に引き続き、それぞれの立体構築像の x、y、z 軸での角度変換により、相互の立体画像が空間的に重なり合う座標を決定する。この座標軸の重ね合わせ処理は試料表面に塗布した銀ペーストが空間位相の基準マーカーとして有効である。座標位置合わせと濃淡標準化を完了した断層画像データについて、断層画面ごとに局所二値化処理を施し、健全歯質と齲蝕脱灰病巣との境界を分画する。この分画処理により、脱灰病巣の輪郭を直視できるとともに、脱灰病巣の容積と内部構成要素の無機塩濃度変動について形態計測が可能になる。形態計測項目として、ラベリングされた組織要素(脱灰病巣内部とともに周囲のエナメル質や象牙質)の粒子数、容積、連続性などの形態パラメータを対象とする。また、2 種類の空間位相情報の差分により、脱灰病巣内部での時間軸(レーザー照射処理回数)による濃淡レベルの変化を検出する。下図は、石灰化度の異なる表層下脱灰領域に濃淡スケール vs CT 値から無機塩濃度域に換算した値を解析用ソフトを用いて色調別に表した図である。内部から表層へ向かい石灰化度が高まっていることを示している。



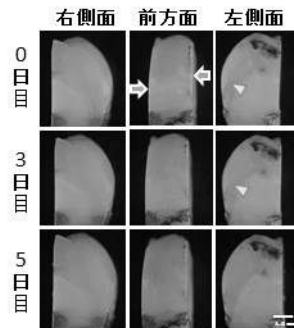
無機塩濃度の濃淡スケールを基準に表層下脱灰領域を石灰化度別に色分けした歯質ブロックの μ CT水平断面像。石灰化度に対応した画素値でラベルすることで無機塩量の分布を表わしている。

レーザー照射処置は、再石灰化処理で形成した白斑領域に歯面塗布剤を併用してレーザー照射を連日行った。レーザー照射機器は、照射野表面から作用する炭酸ガスレーザー(ヨシダ社製炭酸ガスレーザー手術装置オペレーター03S SP)を使用した(下図参照)。なお、機器の照射条件は照射直後の歯面の肉眼的観察を容易にするためと過剰な蒸散を防ぐために、0.5W、50×0.001Sの条件下で連続発振/連続照射×5分間とした。この条件は、歯面を炭化させるには至らない照射条件であり、実際に初期齲蝕に対する照射条件と同等である。また、レーザー照射を行う直前に、臨床時の照射時に齲蝕予防の増強効果を期待して頻用されるフッ化ナトリウム(商品名:フルオールゼリー、東洋製薬化成株式会社)を病巣領域に一層塗布した。

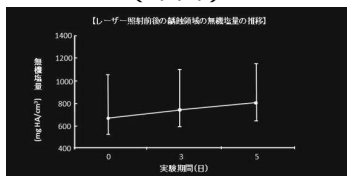


4. 研究成果

肉眼所見によるレーザー照射後の変化を下に示す。レーザーサンドイッチ法施行前である0日目では、前方面観にて白斑領域(矢印)が確認される。照射3日目以降は白斑の色調が薄まり、本来のエナメル質の色調に近づいている。中央部にみられる淡黄色の領域には変化がみられない。左右側面のエナメル質にみられる白斑領域は左側面では軽度の消失が確認できるが(矢頭)、右側面では色調に変化がみられない。しかし、立体構築像でレーザー照射の前後による齲蝕領域の無機塩量の推移を観察すると、実験期間を通して低石灰化の領域の減少が確認できる(下図)。

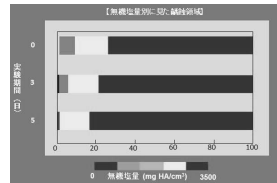


レーザー照射前後の齲蝕領域の無機塩量の推移をグラフにすると経日的に増殖していることがわかる(下図)。



また、無機塩量別に齲蝕領域を観察したグラフでは、経日的に高石灰化域の増加と低石灰

化域の減少が窺えた(下図)。



結論として、歯科診療にて予防処置として頻繁に行われているレーザーサンドイッチ法は、肉眼的所見においては白斑を伴うエナメル質表面の色調を周囲の正常なエナメル質の状態に近づけ、審美的に初期齲蝕から早期に回復したような状態となった。レーザーとフッ化物塗布の併用処置を施すと、表層下脱灰部のエナメル質へのフッ素の取り込みが促進され、再石灰化に有利となり脱灰の進行が抑制されるといわれていることが証明できた。また、レーザーをエナメル質に照射するとその表面はクラッカー状を呈するといわれている。今回の実験では、CT画像所見にみられる齲蝕領域や立体構築像、無機塩量解析データにより石灰化量に変化が見られたことから、経日的な照射を施すことで表層下脱灰領域に到達するまでのフッ化ナトリウムの浸透を有効に促進させるクラッキングの形成が生じることを示唆した。今回使用した炭酸ガスレーザーのデータを踏まえて、今後はEr:YAGレーザーによる照射野内面からの効果を利用した硬組織修復学の研究に移行を考えている。

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3件)

第56回歯科基礎医学会学術大会・総会 2014. 9/25~27.

第68回NPO法人日本口腔科学会学術集会 2014. 5/7~9.

第55回歯科基礎医学会学術大会・総会 2013. 9/20~22.

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕
出願状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況（計0件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

東理 頼亮 (KANRI, Yoriaki)
日本歯科大学新潟生命歯学部・病理学講座・講師
研究者番号： 40366761

(2) 研究分担者

()
研究者番号：

(3) 連携研究者

()
研究者番号：