

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 30 日現在

機関番号：34408

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23792530

研究課題名（和文）Enamel Erosion の早期検出・定量法構築のための基礎的研究

研究課題名（英文）Basic study for early detection and quantification of enamel erosion

研究代表者

土居 貴士（DOI TAKASHI）

大阪歯科大学・歯学部・講師

研究者番号：20388375

研究成果の概要（和文）：近年，食習慣の変化から酸蝕症が注目されている。酸蝕症はう蝕とは異なり微生物の関与がない状態でエナメル質の喪失が生じる。しかし，酸蝕症による初期の変化を視診によって診断することができず，臨床の現場では実質欠損を伴った重症化した状態で酸蝕症が診査されるのが現状である。酸蝕症の早期検出が可能になれば，酸蝕症の予防が可能となるだけでなく，エナメル質の健康増進が可能となる。本研究では，光学的手法を用いることで，酸蝕症の初期変化を診査できる可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：Recently, enamel erosion attracts attention by changing the food custom. Enamel erosion is different from the dental caries. Dental caries is produced by bacteria, but erosion is produced without bacteria. The first erosive tooth ware is not diagnosed by visual examination. In the clinical situation, most patients visit a dental clinic with severe enamel erosion. If it is possible to detect an early stage of enamel erosion, it may be possible to preventive enamel erosion. Moreover, it is possible to promote the oral health. Based on this study, it may be possible to detect an early stage of dental erosion by optical method.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,200,000	660,000	2,860,000

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：口腔衛生学（含公衆衛生学・栄養学）

## 1. 研究開始当初の背景

（1）歯牙酸蝕症（Enamel Erosion）はう蝕とは異なったメカニズムでエナメル質が溶出する疾患である。う蝕の発生には口腔内細菌の存在が必須であるのに対し，Enamel Erosion は口腔内細菌の関与なくエナメル質が溶出し，象牙質が露出する疾患である。我が国では Enamel Erosion は産業保健の現場で問題とされてきた疾患であった。しかし，近年では欧米諸国と同様に柑橘系食品や炭酸飲料水の頻回摂取など，食生活習慣に依存する疾患として問題にされており，その罹患

状態も報告されている。

（2）現在，報告されている Enamel Erosion に関する研究は，人工的に作成された Enamel Erosion の表面を電子顕微鏡や原子間力顕微鏡を用いて微細構造観察を行うミクロ的な研究か，視診によって明らかに Enamel Erosion と診断できるものを対象とした臨床研究に二極化している。しかし，臨床応用を目指した Enamel Erosion の早期検出・定量方法に関する研究が少ないのが現状である。

(3) 現在、臨床の現場で用いられているエナメル質表面の観察方法には、視診によって初期う蝕の進行過程を診査・診断する方法が確立されてきているが、光学的な手法を応用することによって、初期う蝕の検出や定量を客観的に行う方法が確立されてきた。1995年、Jongらはエナメル質の自家蛍光を利用した Quantitative light-induced fluorescence (QLF) 法とスタムメイドされたコンピュータプログラムを用いて臨床的に初期う蝕のモニタリングを可能にした。1997年には Schneiderman らがエナメル質の光透過性を用いて、その状態を映像化する Digital Imaging Fiber-optic Teansillumination (DIFOTI) を発表した。1998年には Hibst 等がダイオードレーザーを用いた早期う蝕検出方法を開発し、Lussi 等はこの方法を DIAGNOdent として市場に登場させ、広く臨床家の間に普及している。つまり、光学的な手法を用いることによって、以前は肉眼では観察することができなかったエナメル質表層で生じている変化を確認するだけでなく、客観的に定量する方法が確立されてきた。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は以下の通りである。

(1) 牛歯試料による Enamel Erosion サンプルモデルの確立。

(2) Enamel Erosion サンプルの形態的変化の観察。

(3) Enamel Erosion の早期検出および定量法の確立に適した機器の検索および開発。

予防医学の進歩からも分かるように、歯科臨床の現場においても、う蝕の早期発見、早期治療よりも、う蝕の前段階である初期う蝕を検出し、再石灰化を積極的に促すことによって健全歯面に回復することが重要であると考えられ、実践されている。Enamel Erosion はエナメル質の表面が食品や飲料水に起因する酸によって酸蝕されている事から、エナメル質の耐酸性が低下するなど、う蝕リスクも高くなると考えられている。また、Enamel Erosion の予防にもフッ化物の応用が効果的であると考えられる。しかし、フッ化物の効果を判定するためには、対象部位が Enamel Erosion になったかどうかでしか判定できないのが現状である。しかし、Enamel Erosion の検出・定量法を確立することによって、フッ化物の効果判定に要する時間が短縮され、Enamel Erosion の予防だけでなく、口腔の健康増進に寄与できると考えられる。

## 3. 研究の方法

(1) 牛歯エナメル質ブロックサンプルの作製

牛切歯の唇側面を対象歯面として 5.0mm 四方 (厚さ 3mm) のエナメル質ブロックの切り出しを行う。サンプル表面は #600 の耐水ペーパーで 30 分間の研磨を行った後、研磨用ダイヤモンドペーストを用いて、鏡面研磨を行い、牛歯エナメル質ブロックサンプルを作製した。

### (2) サンプル表面の酸処理

試料表面の酸処理には 0.1M の塩酸を用いる。試料表面を 5 分割して、30 秒間隔で酸処理を行い、1 つの試料表面に 0 秒、30 秒、60 秒、90 秒、120 秒間の酸処理されたサンプルを作成した。

### (3) サンプル表面の観察

サンプル表面の状態を White-light 下で画像撮影を行った。次に既存の初期う蝕検出機器である Quantitative Light-induced Fluorescence (QLF) 法によってサンプル表面の観察を行った。QLF 法の観察には Inspektor Pro (Inspektor Research BV, Amsterdam, The Netherland) を用いて行い、撮影条件は暗室で行った。

(4) Enamel Erosion 早期検出法確立のための観察条件の検討

サンプル表面の観察に適した照射ライト、偏光フィルターの検索を行った。

### (5) サンプル表面のフッ化物処理

Enamel Erosion サンプルの表面に対してフッ化物処理を行った。フッ化物はフッ素濃度 250 ppm のフッ化ナトリウム溶液、およびフッ化物配合歯磨剤 (Check-Up, ライオン株式会社製) を蒸留水で 4 倍に希釈したフッ化物配合歯磨剤溶液を用いた。また、処理方法は 1 回の処理を各フッ化物溶液にサンプルを 5 分間の浸漬とし、24 時間間隔で 7 回行った。

### (6) サンプル表面の微細構造の観察

サンプル表面の微細構造の変化を Atomic Force microscopy (AFM) を用いて行った。なお、測定は室温下で行い、AFM 観察までサンプルは 4℃、湿度 100% で行った。

## 4. 研究成果

### (1) サンプル表面の観察結果

サンプル表面の状態を White-light 下で画像撮影を行った。120 秒間の酸処理を行った部分では他の部分よりわずかに白色化が強く認められたが、他の部位では酸処理を行わなかった部分とほぼ同じような色調を呈した。

### (2) サンプル表面の QLF 観察結果

サンプル表面をQLF法によって観察した結果、酸処理の時間に関係なく、サンプル全体が同じ程度の傾向を発する像が観察された。すなわち、0.1Mの塩酸による120秒間の酸蝕された表面をQLF法では検出できないことが分かった。

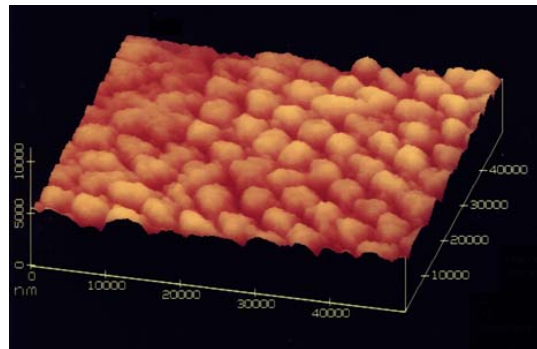
QLF法は初期う蝕の早期検出・定量を行うことを目的とした機器である。QLFのメカニズムは歯に励起光を照射し、エナメル—象牙境に多く存在するタンパク質に蛍光反応を起こさせる。蛍光によって発せられた光が健全なエナメル質を通過する際には規則正しく並んだエナメル小柱の間を通過するために光の減弱がほとんどないが、エナメル小柱の規則性が乱れた初期う蝕病巣を通過する場合には規則性の乱れの程度や初期う蝕病巣の深さに比例して光の減弱が生じる。つまり、健全エナメル質を通過してきた光の強さと、初期う蝕を通過してきた光の強さの違いを画像として捉えることによって初期う蝕を検出し、光の強さの違いを数値化することによって初期う蝕病巣内のミネラルの溶出量などを知ることができる。後述するが、Enamel Erosionでは酸の侵襲によってエナメル小柱鞘が消失するが、エナメル小柱の規則性は乱れていない。また、初期う蝕病巣では認められる表層エナメル質がEnamel Erosionでは存在しないため、初期う蝕病巣で見られるような光の減弱が観察されなかったと考えられる。

### (3) Enamel Erosion 早期検出法確立のための観察条件の検討結果

QLF法では120秒間の酸処理によって作製したEnamel Erosionの検出を行うことができなかった。そこで、QLF法とは異なった光学条件を検討した。本研究で検索を行った条件は、照射する光の波長を405nmと655nmの2種類を用いた。また、観察時に用いたCCDカメラのレンズに取り付ける偏光フィルターを410nmバンドパスフィルターと475nmのロングパスフィルターの2種類を用いた。すなわち、4通りの組み合わせによって早期検出法確立のための観察条件を検討した。その結果、照射する光の波長は405nm、偏光フィルターは410nmのバンドパスフィルターを用いることによって、酸蝕時間が30秒間の箇所から白色化して観察できることが分かった。

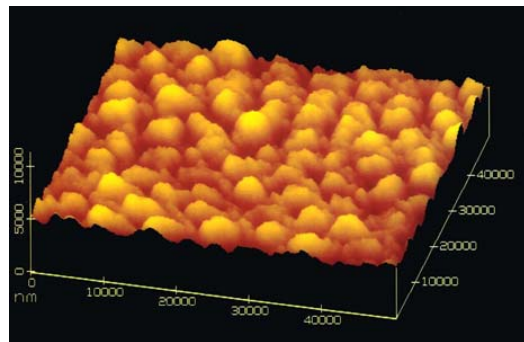
### (4) サンプル表面の微細構造の観察結果

Enamel Erosionサンプル表面の微細構造の観察をAFMによって行った。下図は30秒間の酸処理Enamel Erosionサンプル表面のAFM弱拡大の3次元画像である。



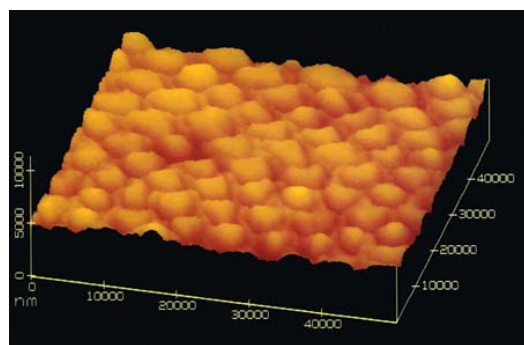
酸による表面脱灰が認められ、凹凸のある表面が観察された。また、エナメル小柱鞘部分の脱灰が顕著に認められ、小柱間隙が観察された。小柱間隙の形成に伴い、直径約5 $\mu$ mのアーケード型のエナメル小柱が観察された。また、凹凸の深さはエナメル小柱先端からエナメル小柱間隙底部までの深さは約1 $\mu$ mであった。

下図は30秒間の酸処理 Enamel Erosion をフッ化ナトリウム溶液で処理したサンプル表面のAFM弱拡大の3次元画像である。



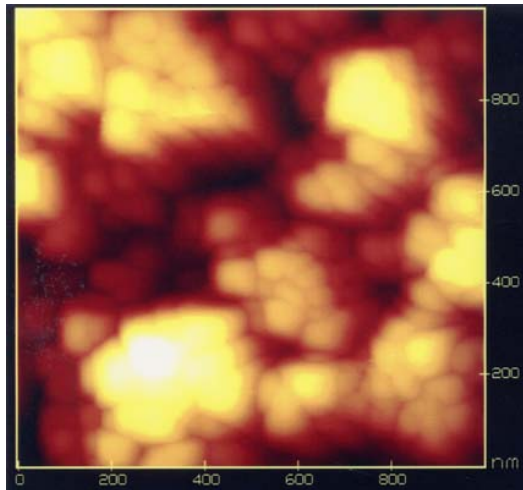
酸処理のみのサンプル表面のAFM 3次元画像同様、エナメル小柱鞘の消失に伴うエナメル小柱間隙とアーケード型のエナメル小柱が観察された。しかし、酸処理のみのサンプル表面とは異なり、エナメル小柱先端部に沈着物が認められたために、エナメル小柱先端からエナメル小柱間隙底部までの凹凸の深さが大きくなることが分かった。

下図は30秒間の酸処理 Enamel Erosion をフッ化物配合歯磨剤溶液で処理したサンプル表面のAFM弱拡大の3次元画像である。



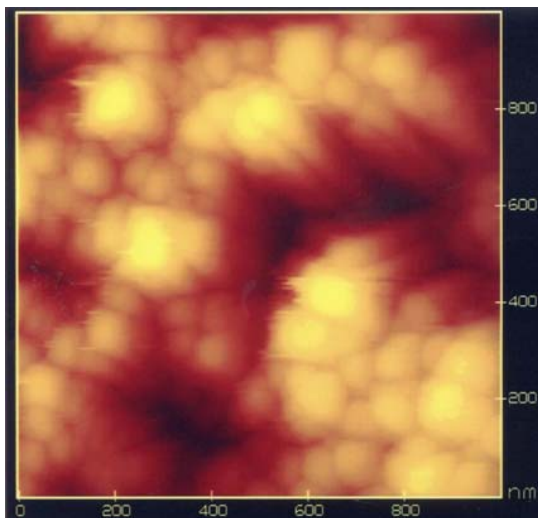
他のサンプル表面と同じようにアーケード型のエナメル小柱が観察された。しかし、エナメル小柱間隙部分全体に沈着物が認められ、エナメル小柱先端からエナメル小柱間隙底部までの凹凸の深さが小さくなる像が観察された。

下図は30秒間の酸処理 Enamel Erosion サンプル表面の AFM 強拡大像である。



酸処理のみのサンプルでは、大きさ 50~100 nm の結晶が多数認められ、形態も円形および四角形のエナメル小柱結晶が混在して観察された。

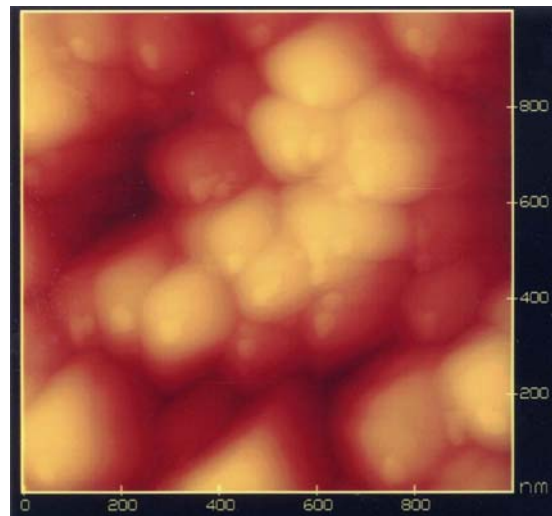
下図は30秒間の酸処理 Enamel Erosion をフッ化ナトリウム溶液で処理したサンプル表面の AFM 強拡大像である。



酸処理のみのサンプルのエナメル小柱結晶に比べ、その大きさは約 120 nm を示したが、局所的にいくつかの結晶が融合した状態が認められ、大きさが約 200 nm の結晶も散見された。また、結晶の形態は四角形と円形の物が混在していた。

下図は30秒間の酸処理 Enamel Erosion

をフッ化物配合歯磨剤溶液で処理したサンプル表面の AFM 強拡大像である。



他のサンプルのエナメル小柱結晶とは異なり、大きさが約 200 nm で楕円形を呈しており、結晶に沈着物の形成が観察された。

#### 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1件)

(1) Takashi Doi, (他7名, 1番目): Comparison between Visual and QLF examination of incipient caries in deciduous dentition. J Dent Health, 査読有, Vol. 61, 2011, 233-238.

[学会発表] (計5件)

① 土居貴土. P0s-Ca および緑茶より抽出されたフッ化物配合チューイングガムが学童期の口腔保健に及ぼす影響. 第61回日本口腔衛生学会総会, 2012年5月26日, 神奈川歯科大学.

② 土居貴土. 学童期の口腔保健状態および平滑面初期う蝕に及ぼすチューイングガム摂取の影響. 第61回日本口腔衛生学会総会, 2012年5月26日, 神奈川歯科大学.

③ Takashi Doi. ICDAS and dental caries. QLF Yokohama workshop, 2011年10月10日, 鶴見大学歯学部.

④ 土居貴土. フッ化物および P0s-Ca 配合チューイングガムが学童期の口腔保健に及ぼす影響. 第60回日本口腔衛生学会総会, 2011年10月10日, 日本大学松戸歯学部

⑤ Doi T. Effect of chewing-gum containing P0s-Ca and fluoride on oral health status in school children. 58<sup>th</sup> Annual ORCA congress, 2011年7月7日, Kaunas, Lithuania.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

土居 貴士 (DOI TAKASHI)  
大阪歯科大学・歯学部・講師  
研究者番号：20388375