

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 31 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462879

研究課題名(和文) 根面象牙質の耐酸性獲得および再石灰化メカニズムの多面的解析と臨床的評価法の確立

研究課題名(英文) Multi-faceted analysis in acid resistance and remineralization of root dentin and establishment of clinical evaluation method

研究代表者

岩見 行晃 (IWAMI, Yukiteru)

大阪大学・歯学研究科・招へい教員

研究者番号：90303982

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：我々が開発してきたIn-air micro-PIXE/PIGE測定法を用いてのカルシウムの変化によるう蝕の評価法は、マイクロCTによる脱灰評価との整合性が認められ、確立された。歯質内に含有されているフッ素によるう蝕抑制の効果は明らかにあるものの、フッ素はカルシウムと共存することにより、一層う蝕抑制されることが判明した。

レーザー診断器、客観的色彩診断法、定量的光励起蛍光法などによる臨床的評価は個体差や環境の影響が大きく、関連性をまとめるにはさらなるデータ集積が必要であったが、根面う蝕予防への新規材料への開発の第一歩は踏み出すことができた。

研究成果の概要(英文)：The evaluation method of caries due to the change of calcium using In-air micro-PIXE / PIGE measurement method developed by us correlated with the decalcification evaluation by micro CT. Although the effect of dental caries control by fluorine contained in the tooth is obvious, it was found that fluorine can be further suppressed for caries by coexisting with calcium. Clinical evaluation by laser diagnostic equipment, objective color diagnostic method, quantitative photoexcited fluorescence method, etc. has been great influenced of individual difference and environment, and further data accumulation was necessary to summarize relevance. We were able to take the first step in the development of new materials for root caries prevention.

研究分野：医歯薬学

キーワード：フッ素 定量測定法 う蝕 加速器 PIXE/PIGE

1. 研究開始当初の背景

発症率の増加している根面う蝕は、歯冠部う蝕病巣と比較してう蝕病巣の修復操作は容易ではない。今日の Minimal Intervention に立脚したう蝕治療においては、脱灰病変形成抑制や、非侵襲的な再石灰化療法の確立は非常に重要である。そのためには、根面象牙質の耐酸性獲得や再石灰化のメカニズムを詳細に解明し、それをもとにした効果の高い根面塗布材を開発することは意義あるアプローチであるが、各元素レベルでの詳細なメカニズムを解明した研究は皆無である。また、口腔内で使用する根面塗布材の種類やそれらの適正な使用頻度を決定するためには、口腔内での歯質の耐酸性や再石灰化の状態を客観的に評価する必要がある。

申請者が開発してきた歯質内のフッ素定量測定法 In-air micro PIXE/PIGE measurement system や CIE 1976 L*a*b* 表色系を用いた歯質の客観的色彩診断法に加え、レーザー診断器 DIAGNOdent®、定量的光励起蛍光法 (以下 QLF)、う蝕硬さ測定システムカリオテスター、光誘導蛍光システムピスタカム P などが市販され、根面象牙質の状態を臨床上の客観的数値で多面的かつ総合的に評価できるようになってきている。以上の背景からこれまで主観的であった耐酸性獲得や初期脱灰病巣の再石灰化効果に対する臨床レベルの評価を、元素レベルで解明すると共に、数値に基づいた客観的な評価法として確立することは独創的で意義のあることである。

2. 研究の目的

本研究は、根面象牙質の耐酸性獲得や再石灰化メカニズムを分子レベルや元素レベルで解明することを目的とし、臨床的評価と関連づけ、効果的なプロフェッショナルケアの確立とう蝕予防効果の高い根面塗布材の将来的な開発へとつなげる。

3. 研究の方法

(1) 根面象牙質の耐酸性獲得および再石灰化メカニズムの解析

ヒト健全第三大臼歯のセメントエナメル境付近の頬側面を歯軸に平行に切断し、根面象牙質を露出させた後、頬舌方向に半切した象牙質露出部を除きスティッキーワックスにて被覆し、一方の象牙質面にアドシールド®GI (クラレノリタケデンタル) を塗布 (以下 GI 群)、他方には何も塗布せず (以下 C0 群)、37 °C で生理食塩水中に浸漬した。生理食塩水は 1 週間ごとに交換し、1 か月後、材料及びスティッキーワックスを除去して頬舌方向に 0.5 mm 幅に切断し、測定試料とした。

μCT で測定後、切断面の象牙質表層より約 800 μm の部位に厚さ 4 μm の銅箔を貼付し、根面象牙質表層から銅箔まで歯質内方向に歯質内のカルシウム (Ca) およびフッ素 (F) 濃度

を PIXE/PIGE を用いて線分析を既報 (Yasuda et al. NIM B 2011, 269, 2180-2183) に従い行った。

その後、再び象牙質表層を除いてスティッキーワックスにて被覆し、脱灰溶液 (0.2 mol/l Lactic acid, 3.0 mmol/l CaCl₂, 1.8 mmol/l KH₂PO₄, pH 4.5) 10 μm に 3 日間浸漬後、スティッキーワックスを除去、再度 PIXE/PIGE にて同部位の線分析を行った。銅箔除去後に μCT で測定を再度行った。

脱灰後の試料の健全象牙質の平均 Ca 量の 5% を示す部位を脱灰表層とし、95% までを脱灰病巣とした。銅箔を基準として脱灰処理前後の線分析を重ね合わせ、脱灰前後の Ca および F の濃度分布を同一平面上にあらわした。表層から 10 μm ごとの平均 Ca 濃度、平均 F 濃度を算出し、脱灰前と脱灰後の同部位の 10 μm ごとの各平均 Ca 濃度量の差を積算したものを Ca 喪失量 とした。また、表層からの 10 μm ごとの各平均 F 濃度を累積したものを F 取り込み量 とし、表層から F が検出値以下となるところまでの距離を F 浸透深さ とした。

μCT においても、同一試料における脱灰前後のミネラルプロファイルから、ミネラル喪失量 を測定した。

23 歳から 35 歳までのヒト健全第三大臼歯 21 本のセメントエナメル境付近の頬側面を歯軸に平行に切断し、根面象牙質を露出させた 4 ブロックを各歯より切り出し、3 ブロックの象牙質露出部に、Fuji (GC)、(以下 F7 群)、MI Varnish (GC) (以下 MI 群)、アドシールド GI (以下 Ad 群) を各々塗布した。一方、材料を塗布しない 1 ブロックをコントロール (以下 C0 群) とした。37 °C で 1 か月もしくは 3 か月間生理食塩水中に浸漬後、と同様に脱灰前の測定を行った。

PIXE/PIGE 測定後、1 か月塗布試料 (n=15) を脱灰溶液 A (50 mmol/l acetate buffer, 2.2 mmol/l CaCl₂, 2.2 mmol/l KH₂PO₄, pH 5.0) (n=5) あるいは脱灰溶液 B (0.2 mmol/l Lactic acid, 3.0 mmol/l CaCl₂, 1.8 mmol/l KH₂PO₄, pH 4.5) (n=10)、また 3 か月塗布試料 (n=6) は脱灰溶液 A 10 μm に 3 日間浸漬した後、再度 PIXE/PIGE にて脱灰前と同部位の線分析を行った。

脱灰前後の積算 Ca および F 濃度量はと同様に分析し、Ca 喪失量と歯質内に取り込まれた F 取り込み量との相関を検定した。

と同様に試料を切断し、塗布材料は Fuji (F7)、FR-01 (Fuji 中のストロンチウム (Sr) を半分 Ca に置き換えた材料、P1 群)、FR-02 (Fuji 中の Sr 全て Ca に置き換えた材料、P2 群) とし、後の試料作成測定はと同様に行い、Ca 喪失量と歯質内に取り込まれた F 取り込み量との相関も、と同様に検定した。

(2) 根面象牙質面の耐酸性に対する臨床的評価

(1) で作成した試料の無処理群では脱灰溶液浸漬前後、処理群では根面塗布材塗布前後と

脱灰溶液浸漬後の測定面に対し、客観的色彩評価法による色彩評価,DIAGNOdent による蛍光強度の評価,カリオテスターによる硬さ測定,QLF によるミネラル喪失量の計測,ピスタカム P による脱灰程度の評価を実施した。

4. 研究成果

(1) 基準としての銅箔を設置したことで、得られた脱灰前後の線分析を重ね合わせることが可能となり、Ca 喪失量、F 取り込み量および F 浸透深さが得られた (図 1)。

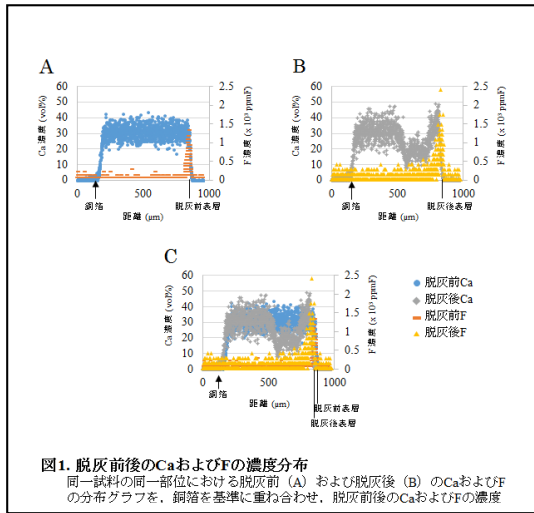


図1. 脱灰前後のCaおよびFの濃度分布
同一試料の同一部位における脱灰前 (A) および脱灰後 (B) のCaおよびFの分布グラフを、銅箔を基準に重ね合わせ、脱灰前後のCaおよびFの濃度

G1 群の Ca 喪失量およびミネラル喪失量は C0 群と比較して有意に小さかった (図 2.A, B) . G1 群では脱灰後の表層は減少したものの、F 取り込み量は大きくは変化せず、F 浸透深さは脱灰前後に有意差が認められた。C0 群の F 浸透深さとは有意差が認められた (図 2.C, D) .

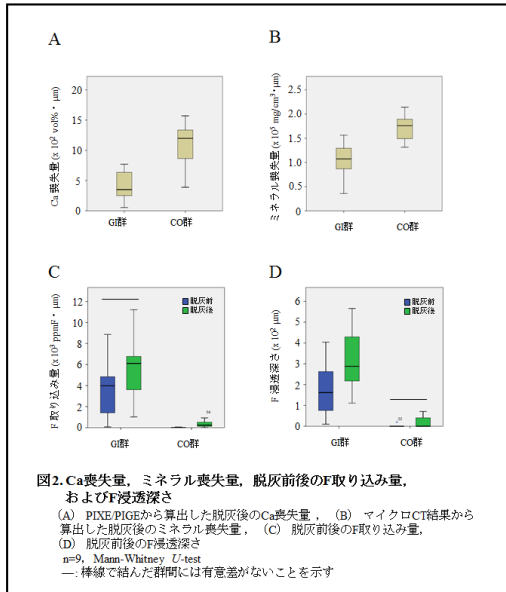


図2. Ca喪失量、ミネラル喪失量、脱灰前後のF取り込み量、およびF浸透深さ
(A) PIXE/PIGEから算出した脱灰後のCa喪失量、(B) マイクロCT結果から算出した脱灰後のミネラル喪失量、(C) 脱灰前後のF取り込み量、(D) 脱灰前後のF浸透深さ
n=9, Mann-Whitney U-test
—: 棒線で結んだ群間には有意差がないことを示す

Ca 喪失量は、 μ CT から得られたミネラル喪失量、F 取り込み量および F 浸透深さとそれぞれ負の相関を示した (図 3)。

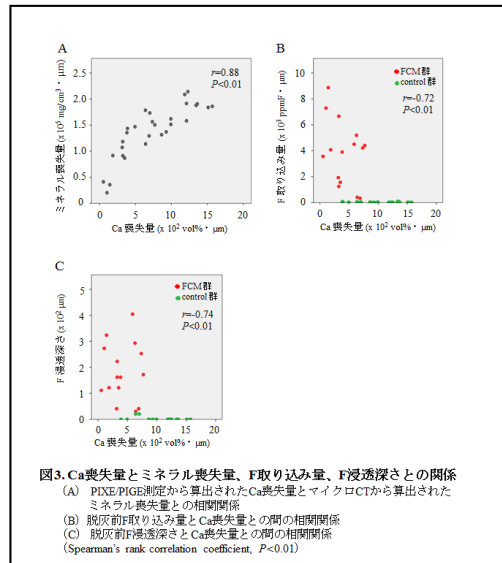


図3. Ca喪失量とミネラル喪失量、F取り込み量、F浸透深さとの関係
(A) PIXE/PIGE測定から算出されたCa喪失量とマイクロCTから算出されたミネラル喪失量との相関関係
(B) 脱灰前F取り込み量とCa喪失量との間の相関関係
(C) 脱灰前F浸透深さとCa喪失量との間の相関関係 (Spearman's rank correlation coefficient, $P < 0.01$)

以上の結果より PIXE/PIGE で脱灰前後の歯質内の Ca と F の動態を検討することが可能であり、う蝕予防の評価には有用な測定法であることが示唆された。

(1) の脱灰液 A (pH 5.0) に浸漬した 1 か月および 3 か月材料塗布群は、いずれの材料塗布群も C0 群と比較して、カルシウム喪失量が有意に少なく、F の歯質への有意に高い浸透が認められた (図 4A, B, C, D) . Ca 喪失量と F 取り込みにおいては負の相関が認められた (図 5) . 1 か月と 3 か月では F 取り込み量では有意差が認められたが、Ca 喪失量では有意差は認められなかった (図 4E, F) .

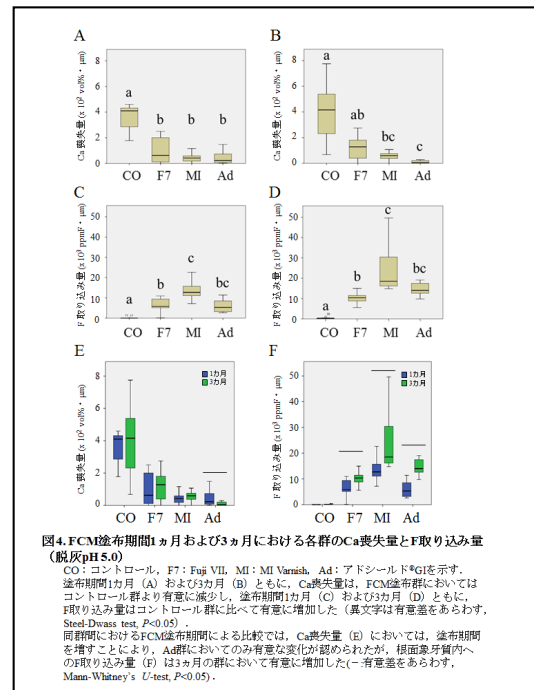
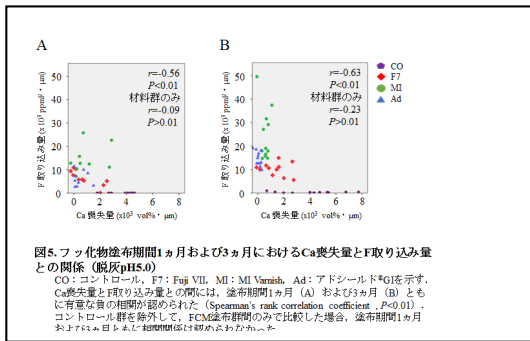
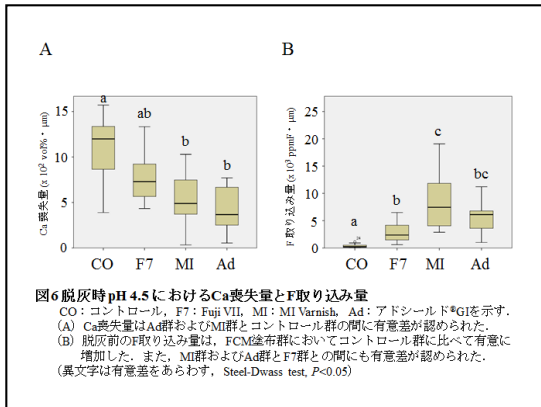


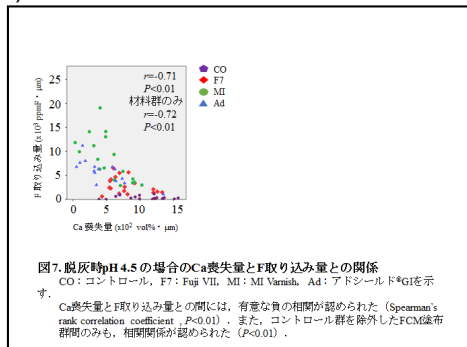
図4. FCM塗布期間1か月および3か月における各群のCa喪失量とF取り込み量 (脱灰pH5.0)
CO: コントロール, F7: Fuji VII, MI: MI Varnish, Ad: アドシールド*G1を示す.
塗布期間1か月 (A) および3か月 (B) とともに、Ca喪失量は、FCM塗布群においてはコントロール群より有意に減少し、塗布期間1か月 (C) および3か月 (D) とともに、F取り込み量はコントロール群に比べて有意に増加した (真文字は有意差をあらわす, Student-*t* test, $P < 0.05$) .
同群間におけるFCM塗布期間による比較では、Ca喪失量 (E) においては、塗布期間を増すことにより、Ad群においてのみ有意な変化が認められたが、根面象牙質内へのF取り込み量 (F) は3か月の群において有意に増加した (有意差をあらわす, Mann-Whitney's U-test, $P < 0.05$) .



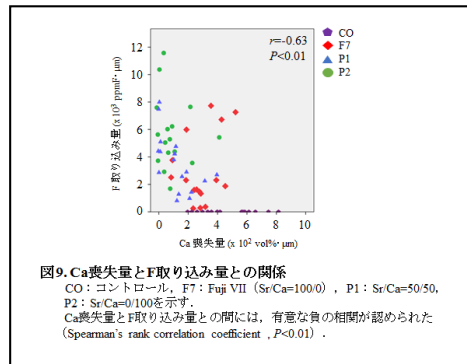
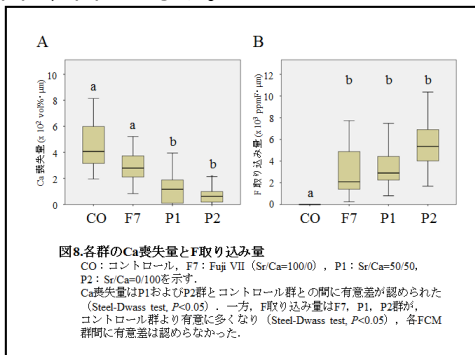
1ヶ月試料脱灰液B(pH 4.5)浸漬においても、材料塗布群がCO群と比較して、Fの歯質への有意に高い浸透が認められた。Ca喪失量は、MI群とAd群がCO群と比較して有意に少なかった(図6)。いずれの試験条件においても、歯質に取り込まれたF量は、Ca喪失量に対してともに負の相関を示した(図5,7)。



酸性度が高い条件においては、より高濃度のフッ化物材料の根面象牙質への塗布がう蝕進行抑制に効果的であることが示された(図7)。



(1) .Ca喪失量およびF取り込み量の結果を図8、図9に示す。



(2) レーザー診断器、客観的色彩診断法、定量的光励起蛍光法などによる臨床的評価は個体差や環境の影響が大きく、関連性をまとめるにはさらなるデータ集積が必要であった。

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12件)

Matsuda Y, Okuyama K, Komatsu H, Yamamoto H, Hashimoto N, Hayashi M, Nomachi M, Yasuda K, Satoh T, Koka M (2017). Fluoride varnish remaining after physical stress. QST Takasaki Annual Report 2015: 152-152. 2017年3月発行 査読有

奥山克史、山本洋子、松田康裕、八木香子、安田啓介、鈴木耕拓、林美加子、玉置幸道、斎藤隆史、能町正治、菅谷頼仁 (2016) 大気マイクロPIXE/PIGEを用いた歯根面象牙質における脱灰のpHによる影響。若狭湾エネルギー研究センター研究年報(平成27年度) 18:76-77 2016年10月発行 査読有

Okuyama K, Kadowaki Y, Matsuda Y, Hashimoto N, Oki S, Yamamoto H, Tamaki Y, Sano H. (2016) Efficacy of a new filler-containing root coating material for dentin remineralization. American Journal of Dentistry 29(4): 213-218 2016年8月発行 査読有

Matsuda Y, Ushimura S, Okuyama K, Komatsu H, Yamamoto H, Hashimoto N, Hayashi M, Nomachi M, Yasuda K, Satoh T, Koka M. (2016) The demineralization inhibit effect of fluoride-containing sealants for primary teeth. JAEA Takasaki Annual Report 2014 JAEA-Review 2015-022: 83-83. 2016年2月発行 査読有

Matsuda Y, Ushimura S, Okuyama K, Komatsu H, Yamamoto H, Hashimoto N, Hayashi M, Nomachi M, Yasuda K, Satoh T, Koka M. (2016) The demineralization inhibit effect of fluoride-containing

sealants for primary teeth. JAEA Takasaki Annual Report 2014 JAEA-Review 2015-022: 83-83. 2016年2月発行 査読有

奥山克史、山本洋子、松田康裕、小松久憲、佐野英彦、安田啓介、鈴木耕拓、林美加子、能町正治、菅谷頼仁 (2015) 歯根面象牙質における脱灰評価へのマイクロ PIXE/PIGE の応用。若狭湾エネルギー研究センター研究年報(平成26年度) 17: 31-32, 2015年10月発行 査読有

松田康裕、奥山克史、山本洋子、小松久憲、江夏昌志、佐藤隆博、佐野英彦、安田啓介、鈴木耕拓、林美加子、能町正治、菅谷頼仁 (2015) フッ化物含有う蝕予防材による脱灰抑制効果のマイクロ PIXE/PIGE による評価。若狭湾エネルギー研究センター研究年報(平成26年度) 17: 33-34, 2015年10月発行 査読有

Komatsu H, Okuyama K, Yamamoto H, Yasuda K, Nomachi M, Sugaya Y. (2015) Tooth-bound fluoride uptake from fluoride-containing dental materials. International Journal of PIXE 23, 127-134. 2015年5月発行 査読有

Matsuda Y, Okuyama K, Yamamoto H, Komatsu H, Koka M, Sato T, Hashimoto N, Oki S, Kawamoto C, Sano H. (2015) Fluoride uptake into the human enamel surface from fluoride-containing sealing materials during cariogenic pH cycling. Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms 348: 156-159 2015年4月1日発行 査読有

Funato Y, Matsuda Y, Okuyama K, Yamamoto H, Komatsu H, Sano H. (2015) A new technique for analyzing trace element uptake by human enamel. Dental Materials Journal 34(2), 240-245. 2015年4月1日発行 査読有

H. Yamamoto, Y. Iwami, K. Yagi, M. Hayashi, H. Komatsu, K. Okuyama, Y. Matsuda, K. Yasuda; Evaluation of caries progression in dentin treated by fluoride-containing materials using an in-air micro-PIGE and micro-PIXE measurement system. Nuclear Instruments & Methods in Physics Research, B348, 152-155, 2015, DOI: 10.1016/j.nimb.2015.01.068 査読有

Matsuda Y, Okuyama K, Yamamoto H, Komatsu H, Oki S, Hashimoto N, Iwami Y, Hayashi M, Sano H, Nomachi M, Yasuda K, Satoh T, Koka M. Distribution of fluoride penetrating from fluoride-containing filling materials in pre-demineralized enamel. JAEA

Takasaki Annual Report 2013 JAEA-Review 2014-050: 92-92.2015, 査読有

[学会発表](計13件)

松田康裕、齋藤隆史、奥山克史、山本洋子、岩見行晃、林美加子、能町正治、安田啓介、山田尚人、佐藤隆博 (2017). 脱核反応による歯質中のフッ素分布測定 13 第1回 QST 高崎研シンポジウム 高崎高崎量子応用研究所 1/26/2017、要旨集 129、演題番号 2-44.

Okuyama K, Komada Y, Abe M, Matsuda Y, Yamamoto H, Tamaki Y (2016). XRD and FT-IR analysis on fluoride-treated hydroxyapatite. International dental materials congress 2016, The Stones hotel-Legian Bali, Bali, Indonesia, 11/5/2016 講演抄録集 163、P-94.

Yagi K, Yamamoto H, Uemura R, Okuyama K, Matsuda Y, Suzuki K, Hayashi M (2016). Evaluation of the acid resistance of root dentin when applying fluoride containing materials incorporating Ca using in-air micro-PIXE/PIGE. International dental materials congress 2016, The Stones hotel-Legian Bali, Bali, Indonesia, 11/5/2016 講演抄録集 142、P-72.

Matsuda Y, Okuyama K, Yamamoto H, Oki S, Izumikawa M, Yui T, Ito S, Sano H, Saito T (2016). Demineralize Prevention of Dentin With S-PRG Varnish via Automatic pH-cycling. 18th Joint scientific meeting of 146th scientific meeting of the Korean Academy of Conservative Dentistry (KACD) and JSCD, The K-Hotel, Seoul, Korea, 10/22/2016 poster No. P-48.

Yagi K, Uemura R, Yamamoto H, Matsuda Y, Okuyama K, Yasuda K, Hayashi M (2016). Evaluation of demineralization in root dentin using in-air micro PIXE/PIGE. 94th General session of IADR (International association for dental research), COEX Convention Center, Seoul, Korea, 6/24/2016, Journal of dental research 95 spec iss B: Abstract #1059, 2016 (www.iadr.org).

八木香子、山本洋子、上村玲央、奥山克史、松田康裕、鈴木耕拓、林美加子 (2016). In-air micro beam PIXE/PIGE による根面象牙質の耐酸性評価 -pH およびフッ化物の影響に関する検討? 日本歯科保存学会2016年度春季学術大会(第144回) 宇都宮 栃木県総合文化センター 6/10/2016、講演抄録集 41、演題番号 A-21

松田康裕、奥山克史、山本洋子、大木彩子、泉川昌宣、油井知雄、伊藤修一、佐野英彦、齋藤隆史: フッ化物含有知覚過敏抑制材による象牙質表面の脱灰抑制効果
日本歯科保存学会 2016年度 秋季学術大会, 平成28年10月27日~28日, 松本市 キッセイ文化ホール

八木香子、山本洋子、岩見行晃、林美加子; In-air micro-beam PIXE/PIGE を用いた根面象牙質の脱灰評価: 第142回日本歯科保存学会春季学術大会 2015.6.25 北九州市、北九州国際会議場
奥山克史、松田康裕、山本洋子、橋本直樹、林美加子、佐野英彦、玉置幸道 (2015) フッ化物含有歯科材料によるフッ素のエナメル質への取り込みと結合状態の評価
日本歯科保存学会 2015年度秋季学術大会(第143回)東京 文京シビックホール 11/13/2015, 講演抄録集 162, 演題番号 P-16

松田康裕、齋藤隆史、奥山克史、大木彩子、橋本直樹、佐野英彦、山本洋子、岩見行晃、林美加子、能町正治、安田啓介、山田尚人、喜多村茜、佐藤隆博 (2015). 核反応による歯質中のフッ素分布測定 12 第10回高崎量子応用研究シンポジウム 高崎 高崎量子応用研究所 10/9/2015、要旨集 132、演題番号 2P-Y. Y. Matsuda, K. Okuyama, H. Yamamoto, M. Koka, T. Satoh, H. Komatsu and H. Sano; Fluorine uptake into human enamel surface from fluoride-containing sealing materials during cariogenic pH cycling: 14th ICNMTA, Padova, Italy 2014.7.8, Poster

H. Yamamoto, Y. Iwami, K. Yagi, M. Hayashi, H. Komatsu, K. Okuyama, Y. Matsuda, and K. Yasuda; Evaluation of caries progression in dentin treated by fluoride-containing materials using PIGE/PIXE system: 14th ICNMTA, Padova, Italy 2014.7.8, Poster

松田康裕、奥山克史、小松久憲、大木彩子、橋本直樹、佐野英彦、山本洋子、岩見行晃、林美加子、能町正治、安田啓介、山田尚人、喜多村茜、佐藤隆博、江夏昌志 (2014). 脱灰処理されたエナメル質におけるフッ化物含有材料からのフッ素の拡散 第9回高崎量子応用研究シンポジウム 高崎 高崎シティギャラリー、2014.10.10, ポスター

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岩見 行晃 (IWAMI Yukiteru)

大阪大学・大学院歯学研究科・招へい教員
研究者番号: 90303982

(2) 研究分担者

林 美加子 (HAYASHI Mikako)

大阪大学・大学院歯学研究科・教授
研究者番号: 40271027

(3) 研究分担者

山本 洋子 (YAMAMOTO Hiroko)

大阪大学・大学院歯学研究科・招へい教員
研究者番号: 60448107