

In vitro におけるう蝕実験系の構築とその応用

学位論文内容の要旨

【 目的 】

口腔内における齲蝕はプラーク中 pH の変化に伴う歯質の脱灰と再石灰化のバランスが崩れることによって生じる。歯の表面におけるプラークの pH はステファンのカーブで代表されるような連続的な変化を示す。したがって、in vitro においてう蝕実験を行うには、このような口腔内の pH の変化を再現し、pH と脱灰・再石灰化の関係を観察できる in vitro の実験系が必要であると考えられた。そのため、に連続した pH 変化を自動的に再現出来るシステム(自動 pH サイクル装置)の作製を試みた。作製にあたって、既存の装置を応用し、簡便で広く利用されるものを目指した。脱灰・再石灰化の評価方法には最も一般的な方法の一つである Transverse Microradiography (TMR) による評価法を選択した。しかし、TMR 画像の解析法はこれまで特殊な機器そしてプログラムを用いられていた。近年の電子機器の機能の向上により一般的なハードウェアおよびソフトウェアを用いた解析法の開発が可能であると考えられた。したがって、一般的なハードウェアそしてソフトウェアを用いた多くの研究者が利用しやすい解析法の開発を試みた。

本研究の目的はこれらの実験環境(自動 pH サイクル装置)そして解析法からなる in vitro のう蝕実験系を構築することである。また、この実験系を応用した実験を行い、この実験系の検証を行うことである。

第一部：自動 pH サイクル装置の構築と確認

【材料と方法】

自動 pH サイクル装置の設定: 再石灰化溶液を満した 10cc の試料容器に脱灰溶液(0.2M 乳酸, 3.0mM CaCl_2 , 1.8mM KH_2PO_4 , pH4.5)は流量を 1000ml/hour に設定したマイクロチューブポンプ(MP-3N, 東理化器械社製)をタイマー(ラボクロック, アズワン社製)により 2 分間還流させた。3 分間放置した後、再石灰化溶液(0.02M HEPES, 3.0mM CaCl_2 , 1.8mM KH_2PO_4 , pH6.8)は同様の方法で流量 100ml/hour で 60 分間還流させた。この設定をもとに、1 日のサイクル回数や間隔をタイマーの on/off によって制御した。

エナメル質脱灰評価: ヒト抜去前歯(n=5)から厚さが約 100 μm の研磨試料を 2 枚作製した。試料の研磨面はステイキーワックスで被覆し Single-section 試料とした。対応した 2 枚の試料はそれぞれ pH サイクルが一日に 3 回の環境と、9 回の環境で 7 週間試験を行った。TMR は実験開始前、及び 1 週間毎に撮影を行った。得られた画像はフィルムスキャナ(Dimage Scan Elite, MINOLTA 社製)を用いた我々の開発した解析法により解析、比較検討を行った。

【結果と考察】

今回の設定では pH5.5 以下である時間(脱灰時間)は 37.2 ± 0.8 分で、初期の pH に戻る

までの時間（回復時間）は 60.0 ± 0.9 分であった。本装置では、タイマーの設定を変えることによって脱灰時間、回復時間を任意に変えられ、また、ポンプの流量の設定を変えると pH-時間カーブの傾きを変えることも可能である。さらに、溶液の補充以外の管理を必要とせずに簡便で安定した pH サイクルが得られた。

本装置での脱灰変化のパターンを一日 3 回の環境と一日 9 回の環境で比較すると ΔZ と L_d の経時的な増加に有意差が認められ、脱灰変のパターンが有意に異なることが認められた。

第 2 部：画像解析方法の開発と検証

【材料と方法】

研究にはヒト抜去臼歯を使用した。ヒト抜去歯に脱灰処理を行った後、半分の領域の再石灰化処理を行い、脱灰処理と脱灰再石灰化処理の両方を行った試料を作製した。作製した資料は厚さ約 $100 \mu\text{m}$ の研磨切片とし、トランスヴァースマイクロラジオグラフィ

(TMR) を撮影した。撮影した画像は①フィルムスキャナ、②光学顕微鏡に接続したデジタルカメラを用いてデジタル化を行った。得られたデジタル画像は NIH image を用いて解析した。デジタル化されたフィルムの画像解析では、1) アルミステップのグレイ値とアルミニウム厚さからグレイ値からアルミニウム厚さ当量計算する検量線を作製した。2) 得られた検量線を用いて試料におけるグレイ値から測定点におけるアルミニウム厚さ当量の計算を行った。3) アルミニウム厚さ当量から Angmer の式に基づいて Vol% および、ミネラルプロファイルを作製した。4) 得られたプロファイルから Mineral Loss (ΔZ)、Lesion Depth (L_d)、R 値 ($\Delta Z/L_d$) のパラメーターを計算した。これらのパラメーターの計算を行うプログラムはマイクロソフトエクセルの VBA (Visual Basic for Application) を用いて開発を行った。同じ試料は SSX-550 (島津製作所) を用いて SEM 観察および EDS 分析を行った。TMR から得られたミネラルプロファイルと SEM、EDS から得られたマップライン分析を比較し、検討した。

【結果と考察】

TMR から得られる脱灰再石灰化の評価パラメーターである Vol%, ミネラルプロファイル、 ΔZ , L_d をこれまでの報告に基づいた方法でマイクロソフトエクセルの VBA (Visual Basic for Application) を用いたプログラムで解析する方法を開発することが出来た。また、このプログラムから得られた脱灰再石灰化のパラメーターはこれまでの報告とほぼ一致する物であった。TMR、SEM そして EDS から得られた結果を比較すると、3 者ともいずれも同様な像を示した。マップライン分析から再石化した部分は健全歯質と同様の比率のリン、カルシウムによるものであることが示唆された。これらの結果から我々が開発した解析法が有用であることが確認された。

第 3 部：う蝕実験系の応用

【材料と方法】

ヒト抜去臼歯から厚さ $100 \mu\text{m}$ の Single-section 試料を作製した。試料の切断面はステイキーワックスで被覆した。歯冠部に幅 $200 \mu\text{m}$ (N 群) と $400 \mu\text{m}$ (W 群) の深さが約 1mm の象牙質まで達する人工裂溝を形成し試料を作製した ($n=6$)。各資料のワックス面はパラフィルムで覆い溶液の進入を防いだ。pH サイクルは、脱灰溶液と再石灰化溶液を用いて 1 サイクルで pH5.5 以下である時間（脱灰時間）が 37 分、初期の pH に戻るまでの時間（回復時間）が 60 分となるように設定した。サイクル数は 1 日 9 回とし、各サイクルの間隔は 60 分で、この期間および pH サイクルを稼働させない期間は再石灰化溶液に浸漬した。両群におけるう蝕観察は実験開始前と 2 週目と 4 週目において TMR 撮影を行い、 ΔZ と L_d の

増加の比較検討を行った。

【結果と考察】

エナメル質においては2週目、4週目のいずれにおいても ΔZ とLdに有意な増加が認められず、有意な脱灰変化認められなかった。象牙質の ΔZ についてはN群とW群の間で2週目、4週目で有意差が認められた。LdについてはN群とW群の間で2週目においてのみ有意差が認められ、4週目では有意差は認められなかった。これらの結果から、裂溝において、開放面の幅が広いほど脱灰の進行が速いことが示唆され、裂溝の幅がう蝕の進行に影響を与えることが示唆された。

【まとめ】今回我々が構築した実験環境（自動pHサイクル装置）そして解析法からなるin vitroにおけるう蝕実験系によって、pHの変化と脱灰再石灰化の関係を経時的に比較検討することが可能となった。また、これを応用した研究では、連続的なpH変化の環境において脱灰変化のパターンがpH変化の回数によって異なる事が示唆され、また歯質の形態によってpHの変化が異なる事も示唆され、この実験系の有用性が確認された。今後はう蝕リスクまたはフッ素などの予防材の評価、予測に利用し検討を行っていく予定である。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 佐 野 英 彦
副 査 教 授 森 田 学
副 査 教 授 八 若 保 孝

学 位 論 文 題 名

In vitro におけるう蝕実験系の構築とその応用

審査は、審査員が一同に会し、申請者に対して提出論文とそれに関連した学科目について口頭試問により行われた。以下に提出論文の要旨と審査の内容を述べる。

【 目 的 】

In vitro においてう蝕実験を行うには口腔内の pH の変化を再現し、pH と脱灰・再石灰化の関係を観察できる in vitro の実験系が必要であると考えられた。そのために連続した pH 変化を自動的に再現できるシステム（自動 pH サイクル装置）の作製を試みた。また脱灰・再石灰化の評価のため Transverse Microradiography (TMR) の簡便な解析法の開発を試みた。本研究の目的は作製した自動 pH サイクル装置そして開発した解析法からなる in vitro のう蝕実験系を構築し検証を行うことである。

第 1 部：自動 pH サイクル装置の構築と確認

【材料と方法】

自動 pH サイクル装置の設定：再石灰化溶液を満した 10ml の試料容器にポンプを用いて pH4.5 の脱灰溶液を 1000ml/hour の流量で 2 分間還流させた。その後、同様に pH6.8 の再石灰化溶液を 100ml/hour の流量で 60 分間還流させた。この設定をもとに、1 日のサイクル回数や間隔をタイマーの on/off によって制御した。

エナメル質脱灰評価：ヒト抜去前歯から single-section 試料を作製し、pH サイクルが 1 日に 3 回の環境と、9 回の環境で 7 週間試験を行った。TMR は実験開始前および 1 週間毎に撮影を行った。得られた画像は本研究で開発した解析法（第 2 部に後述）によって解析、比較検討を行った。

【結果と考察】

本装置では、タイマーの設定によって脱灰時間、回復時間を任意に変えられ、また、ポンプの流量の設定を変えると pH-時間カーブの傾きを変えることも可能なものとなった。本装置での脱灰変化のパターンを 1 日 3 回の環境と 1 日 9 回の環境で比較すると Mineral Loss (ΔZ) および Lesion Depth (Ld) の経時的な増加に有意差が認められ、脱灰変化のパターンが有意に異なることが認められた。

第 2 部：画像解析方法の開発と検証

【材料と方法】

研究にはヒト抜去臼歯を使用した。脱灰処理と脱灰再石灰化処理の両方を行った試料を作製し TMR 撮影を行った。得られた TMR 画像は二つの異なる方法を用いてデジタル化を行った後、NIH image を用いて解析した。画像解析では Angmer の式に基づいてミネラルプロファイルを作製した。得られたプロファイルから ΔZ と Ld のパラメーターを計算するプログラムをマイクロソフトエクセルの VBA (Visual Basic for Application) を用いて作製した。同じ試料を用いて SEM 観察および EDS 分析を行った。TMR から得られたミネラルプロファイルと SEM, EDS から得られたマップライン分析を比較し検討した。

【結果と考察】

TMR 画像からミネラルプロファイル、 ΔZ および Ld を解析するプログラムは VBA を用いて開発できた。これによって簡便な画像解析法が確立できた。

TMR, SEM および EDS によって得られた結果から、再石灰化した部分は健全歯質と同様のものであることが示唆され、本研究で開発した解析法が再石灰化の評価においても有用であると思われた。

第3部：う蝕実験系の応用

【材料と方法】

ヒト抜去臼歯から作製した single-section 試料に幅 $200\mu\text{m}$ (N群) と $400\mu\text{m}$ (W群)、深さが約 1mm の象牙質まで達する人工裂溝を形成し試料を作製した。サイクル数を 1 日 9 回の pH サイクル環境下において 4 週間試験を行った。両群におけるう蝕観察において、TMR を実験開始前、2 週目および 4 週目に撮影し、比較検討を行った。

【結果と考察】

エナメル質では有意な脱灰変化は認められなかった。象牙質の ΔZ については N 群と W 群の間で 2 週目、4 週目において有意差が認められた。Ld については N 群と W 群の間で 2 週目においてのみ有意差が認められ、4 週目では有意差は認められなかった。これらの結果から、裂溝において、開放面の幅が広いほど脱灰の進行が速いことが示唆され、裂溝の幅がう蝕の進行に影響を与えることが示唆された。

【まとめ】

本研究で構築した実験環境（自動 pH サイクル装置）および解析法からなる in vitro におけるう蝕実験系の有用性が確認された。

各審査員が行った主な質問は、以下の通りである。

- (1) 再石灰化溶液の安定性。
- (2) pH の変化の特徴および再現性について。
- (3) 脱灰において 7 週目から急に变化した理由および、歯質による差異について。
- (4) 計算ソフトのプログラム内容、マップライン分析について。
- (5) 人工裂溝における実際の裂溝、小柱の走行、スミアレイヤーとの関係。
- (6) 実験装置、期間の設定理由について。
- (7) 生活歯、エナメルのみ、の裂溝、乳歯に用いた場合はどのように予想されるか。

これらの質問に対して、論文申請者から明快な回答ならびに説明が得られ、in vitro におけるう蝕実験系の構築にあたっての豊富な経験と関連領域の幅広い知識を有していることが確認された。審査員は全員、本研究が学位論文として十分値し、申請者が博士（歯学）の学位を授与される資格を有するものと認めた。