

学 位 論 文 題 名

自動 pH サイクル装置を用いた乳歯および
永久歯エナメル質脱灰の比較

学位論文内容の要旨

【目 的】

エナメル質は臨界 pH 以下で脱灰を生じ、それ以上では再石灰化を示す。この脱灰と再石灰化が繰り返し起こるなか、両者のバランスが崩れることで、脱灰が多く生じ齲蝕が発生、進行する。脱灰と再石灰化には歯面の pH が強く関与しており、口腔内では Stephan のカーブでよく知られているような連続的な変化を示す。これまでの齲蝕研究には、Single-section 法で作製した試料を、脱灰溶液と再石灰化溶液に交互に浸漬する pH サイクル処置を施すことによって初期齲蝕を形成し、Transverse Microradiography (TMR) などで観察するという手法が数多く行われてきた。しかしこの方法では、pH サイクル処置中における試料表面の pH は、脱灰溶液の pH か再石灰化溶液の pH しか示さない急激な変化となってしまう、Stephan のカーブのような連続的な pH 変化を再現することは不可能であり、実際の口腔内とは異なる環境での研究にならざるを得なかった。Matsuda らは口腔内の pH 変化を再現できる自動 pH サイクル装置を開発し、連続的な pH 変化における歯質の脱灰の経時的変化を検討する実験系を構築した。これにより、連続した pH の変化による脱灰と再石灰化の繰り返しによって起こる歯質の変化を *in vitro* で観察することが可能となり、永久歯を用いた研究において良好な結果を示した。しかし、これまでの自動 pH サイクル装置を用いた研究はすべてヒト永久歯を対象としており、ヒト乳歯での検討は行われていない。そこで本研究は、ヒト乳歯を用い自動 pH サイクル装置による乳歯エナメル質の脱灰を観察し、エナメル質脱灰部分の定量分析を行うとともに、永久歯エナメル質の脱灰との比較検討を行うことを目的とした。

【材料と方法】

1) 試料の調整

本研究には歯の交換期に自然脱落または抜去した健全ヒト乳臼歯および抜去した健全ヒト第三大臼歯を用いた。なお、歯の提供に関しては、本実験の趣旨を患者とその保護者に十分説明し、その提供に承諾を得たもののみを用いた。得られた歯は低速切

断機を用いて歯冠を歯軸に平行に頬舌方向へ切断し、厚さ約 300 μm の切片を作製した。得られた切片は切断面を砥石を用いて注水下で研磨し、約 150 μm の厚さに調整した。切断面はスティッキーワックスで被覆し、Single-section 試料を作製した。試料は乳歯、永久歯それぞれ 10 切片とした。

2) 自動 pH サイクル装置の設定

pH サイクルは Matsuda らの方法を用いて 1 日 9 回 pH が変化する環境に設定した。脱灰溶液 (0.2mol/l 乳酸、3.0mmol/l CaCl_2 、1.8mmol/l KH_2PO_4 、pH4.5) と再石灰化溶液 (0.02mol/l HEPES、3.0mmol/l CaCl_2 、1.8mmol/l KH_2PO_4 、pH7.0) を用いて、各サイクルにおける pH が 5.5 以下である時間 (脱灰時間) を平均 37.2 ± 0.7 分、初期の pH に戻るまでの時間 (回復時間) を平均 61.1 ± 0.7 分となるように設定した。サイクル数は 1 日 9 回 (6、8、10、12、14、16、18、20、22 時) とし、この期間および装置を稼働させない期間は再石灰化溶液に浸漬した。

3) エナメル質脱灰の観察

エナメル質の脱灰評価は、Transverse Microradiography (TMR) の観察によって行った。実験開始前と pH サイクル開始後 1、2、3、4 週目に、両群の試料をアルミステップウェッジとともにコンタクトマイクロラジオグラフィ撮影装置を用いて撮影した。撮影条件は、管電圧 15kV、電流 3mA、試料-焦点間距離 100mm、照射時間 20 分間で行った。撮影には、ガラス乾板を用い、現像定着は専用現像液、専用定着液を用いて行った。

4) エナメル質脱灰の評価

現像した TMR 画像は Matsuda らの方法に準じて、光学顕微鏡に接続した CCD カメラと汎用画像処理ソフトウェアを用いてデジタル化処理を行った。デジタル化した画像は Adobe Photoshop7.0 を用い、エナメル-象牙境を基準として重ねあわせた。エナメル質辺縁から距離 150、250、350 μm の位置で、それぞれ 50 μm の幅で表層から 150 μm までの領域における脱灰像の黒化度を、画像解析ソフトにより測定した。得られた黒化度は、アルミニウムステップウェッジの黒化度を基準として補正を行った後、Angmar らの式を基に解析してミネラルプロファイルを算出した。各試料における実験開始前のミネラルプロファイルと pH サイクル後のミネラルプロファイルを重ね合わせ、健全歯質の 95% の位置を比較し、その差として現れる面積であるミネラル喪失量を Integrated Mineral Loss (IML)、脱灰深度を Lesion depth (Ld) として算出し、この 2 つの要素により脱灰を評価した。

5) 統計処理

すべての統計処理は $p < 0.05$ の有意差で行った。乳歯と永久歯の IML ($\text{Vol}\% \cdot \mu\text{m}$)

と Ld (μm) について、各週の検定および両群間における検定は一元配置の分散分析 (one-way ANOVA) を用いて行った後に、Scheffé の方法を用いて比較検討を行った。

【結 果】

乳歯、永久歯両群における測定部位ごとの IML、Ld の変化について、測定部位間での統計学的有意差は認められなかった ($p > 0.05$)。乳歯における測定部位 3 ヲ所の平均を用いた平均 IML、平均 Ld は週を経るごとに増加し、各測定期間において有意差が認められた。永久歯においても同様な結果が得られた。また、乳歯は永久歯と比較して、1 週、2 週、3 週、4 週における IML、Ld の値が高く、それぞれにおいて有意差が認められた。特に 4 週における乳歯の IML、Ld は、他の週と比較して大きな値を示した。

【考 察】

本研究では、口腔内に類似した pH の連続的な変化を再現する自動 pH エナメル質に人工齲蝕を発生させ、ミネラル喪失量を示す IML と脱灰深さを示す Ld により両者を比較した。その結果、乳歯、永久歯ともに週を経るごとに、IML と Ld がそれぞれ増大した。この傾向は松田らや木地村らの報告と同様であり、本研究結果は乳歯および永久歯において妥当なものであると考えられた。一方、乳歯は永久歯と比較して齲蝕に罹患しやすいことは周知の事実であり、今回の研究でも乳歯の IML、Ld が永久歯のそれと比べて有意に大きかったことで、乳歯は永久歯と比べて脱灰されやすいことが示された。以上のことから、自動 pH サイクル装置による脱灰・再石灰化処理は乳歯においても有用であることが示唆された。乳歯と永久歯は、厚さ、結晶の性状、有機質の含有率など、異なる部分が多い。そのため、同様のフッ素徐放性修復物を使用したとしても、その抗齲蝕効果などに違いが生じることが予想される。自動 pH サイクル装置は、このような修復材料やフッ化物の効果の判定や、齲蝕学における乳歯と永久歯の違いに関する研究などに応用できることが示唆された。

【結 論】

自動 pH サイクルを用いて乳歯、永久歯における脱灰変化を IML、Ld について比較検討し、以下の結論を得た。

1. 今回の実験条件において、乳歯、永久歯の IML ($\text{Vol}\% \cdot \mu\text{m}$) および Ld (μm) の経時的増加から、両群に有意な脱灰変化が認められた。
2. 乳歯は永久歯と比較して IML および Ld が有意に増加したことから、乳歯は永久歯よりも脱灰しやすいことが本実験からも示すことができた。
3. 自動 pH サイクル装置は乳歯においても、永久歯同様に脱灰、再石灰化を起こすことが示されたとともに、乳歯を用いた齲蝕研究に有用であることが示唆された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 八 若 保 孝

副 査 教 授 佐 野 英 彦

副 査 教 授 土 門 卓 文

学 位 論 文 題 名

自動 pH サイクル装置を用いた乳歯および 永久歯エナメル質脱灰の比較

口腔内における歯質の脱灰・再石灰化を予測することは、齲蝕の発生・進行の予防・治療において重要である。これまでの齲蝕研究では、Single - section 法で作製した試料を脱灰溶液と再石灰化溶液に交互に浸漬する pH サイクル処置を施すことによって、初期脱灰を形成し観察するという手法が数多く行われてきた。しかしこの方法では、pH サイクル処置中における試料表面の pH 変化は急激で、Stephan のカーブで知られる連続的な pH 変化を再現することは不可能であり、実際の口腔内とは異なる環境での研究にならざるを得なかった。

松田らは口腔内の連続的な pH 変化を再現することが可能な自動 pH サイクル装置を開発し、その有効性を報告している。しかし、これまでの研究はすべてヒト永久歯を対象としており、ヒト乳歯での検討は行われていない。そこで本研究は、自動 pH サイクル装置を用いて乳歯エナメル質の脱灰を観察し、エナメル質脱灰部分の定量分析を行うとともに、永久歯エナメル質の脱灰との比較検討を行うことを目的とした。

試料は健全ヒト乳臼歯および健全ヒト第三大臼歯を厚さ約 $150\mu\text{m}$ の薄片に調整したものを用いた。装置の設定は松田らの方法に準じ、1 日 9 回 pH が変化する環境に設定した。脱灰溶液 (0.2mol/l 乳酸、 3.0mmol/l CaCl_2 、 1.8mmol/l KH_2PO_4 、 $\text{pH}4.5$) と再石灰化溶液 (0.02mol/l HEPES、 3.0mmol/l CaCl_2 、 1.8mmol/l KH_2PO_4 、 $\text{pH}7.0$) を用いて、各サイクルにおける pH が 5.5 以下である時間 (脱灰時間) を平均 37.2 ± 0.7 分、初期の pH に戻るまでの時間 (回復時間) を平均 61.1 ± 0.7 分となるように設定した。各サイクルの間隔は 60 分とし、この期間および装置を稼働させない期間は再石灰化溶液に浸漬した。

脱灰の評価は、試料に対して実験開始前と開始後 1 週毎に 4 週まで Transverse Microradiography (TMR) 撮影を行った。得られた画像はデジタル化した後、実験前後の画像をエナメル - 象牙境を基準として重ねあわせ、エナメル質辺縁から距離 150、250、 $350\mu\text{m}$ の位置で、それぞれ $50\mu\text{m}$ の幅で表層から $150\mu\text{m}$ までの領域における脱灰像の黒化度を求めた。得られた黒化度はアルミニウムステップウェッジの黒化度を基準として補正を行った後、Angmar らの式を基に解析してミネラルプロファイルを算出した。実験前後のミネラルプロファイルを重ね合わせて

健全歯質の 95%の位置を比較し、その差として現れる面積であるミネラル喪失量を Integrated Mineral Loss (IML)、脱灰深度を Lesion depth (Ld)として算出し、この 2つの要素により脱灰を評価し、乳歯と永久歯で比較した。

その結果、乳歯、永久歯ともに週を経るごとに IML および Ld が増加し、各測定時間において有意差が認められた。また、乳歯は永久歯と比較して各測定時間において IML、Ld が高く、有意差が認められた。特に乳歯では第 4 週において IML、Ld が大きく増加し、永久歯の脱灰傾向と差異が認められた。さらに、乳歯では表層脱灰および表層下脱灰が認められたのに対し、永久歯では表層脱灰のみ認められた。

以上の結果から、乳歯は永久歯よりも脱灰しやすいことが本研究からも示すことができた。また、自動 pH サイクル装置は、乳歯においても、永久歯同様に脱灰・再石灰化を起こすことが示されたとともに、乳歯を用いた齲蝕研究に有用であることが示唆された。

口頭試問では、本論文の内容とそれに関連した学問分野について質疑応答がなされた。主な質問事項は、

- ① 黒化度測定部位の設定根拠について
- ② エナメル質脱灰部の形態観察について
- ③ 乳歯および永久歯における表層下脱灰の個体差について
- ④ 予備実験と本実験におけるエナメル質脱灰の違いについて
- ⑤ 口腔内温度における自動 pH サイクル装置の実験について
- ⑥ TMR 画像上での黒化度測定部位の位置について
- ⑦ 同一被検歯面上におけるエナメル質脱灰の差について
- ⑧ 被検歯エナメル質の成熟度と脱灰の関係について
- ⑨ 乳歯における第 4 週の脱灰とエナメル小柱構造との関連について
- ⑩ 乳歯および永久歯におけるエナメル質の厚さについて
- ⑪ 今後の展望について

などであり、これらの質問に対し申請者から適切かつ明快な回答が得られた。さらに実験手技を含めた詳細な内容についても熟知していることが示され、申請者が関連する分野について幅広い知識を有しており、研究の立案と進行、結果の解析について十分な能力を有していることが明らかになった。さらに、本研究の発展を見据えた今後の展望と、発展に必要となる研究についての具体的な提示が申請者から示された。

本研究は、乳歯と永久歯の脱灰・再石灰化において差異があること、ならびに乳歯の脱灰・再石灰化に関する実験において自動 pH サイクル装置が有用であることを示した点が評価された。

以上のことから、審査担当者全員が、本研究が学位論文に十分に値し、申請者は博士（歯学）の学位を授与するのに十分な学識・資質を有しているものと認めた。