

厚生労働科学研究研究費補助金
医療技術評価総合研究事業
初期齲蝕および歯列等の新たな診断技術の開発に関する総合的研究
平成17年度 総括・分担研究報告書
主任研究者 神原 正樹
平成18(2006)年 4月

目 次

I. 総括研究報告	
初期齲蝕および歯列等の新たな診断技術の開発に関する総合的研究 神原正樹	3
II. 分担研究報告	
1. 唾液タンパク質および各種フッ化物応用がエナメル質の再石灰化に及ぼす影響 川崎弘二	16
2. 義歯装着患者に対するQLF法の応用 川崎弘二	21
3. 口腔内蛍光測定用のプローブ開発 松村英夫	25
4. 歯列不正と齲蝕との関連評価、臨床試験 相馬邦道	29
5. 歯周疾患患者における光診査法の応用による歯垢特性の評価 日吉紀子	40
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	45
IV. 研究成果の刊行物・別刷	50

厚生労働科学研究費補助金（医療技術評価総合研究事業）

総括研究報告書

初期齲蝕および歯列等の新たな診断技術の開発に関する総合的研究

主任研究者 神原正樹 大阪歯科大学口腔衛生学講座 教授

研究要旨

本年度の本研究事業はQLF（quantitative light-induced fluorescence）法による研究を行った。その結果、①唾液タンパク質およびフッ化物応用がエナメル質の脱灰に及ぼす影響については、唾液タンパク質の存在は脱灰抑制に作用すること、高濃度フッ化物応用は高い脱灰抑制効果のあることが分かった。さらに、低濃度フッ化物応用も、唾液タンパク質の存在下では、高い脱灰抑制効果を示すことが明らかとなった。②唾液タンパク質および各種フッ化物応用がエナメル質の再石灰化に及ぼす影響については、本研究では唾液総タンパク質の存在が初期う蝕の再石灰化に及ぼす影響については明らかではなかったが、低脱灰群においてはフッ化物応用の種類にかかわらず高い再石灰化を示し、高脱灰群においては低濃度フッ化物であるフッ化物配合歯磨剤応用に比べ、高濃度フッ化物であるAPF応用は再石灰化を低下させることがわかった。③義歯装着患者に対するQLF法の応用については、人工的な歯科材料でも材質によっては蛍光が見られることから、義歯装着患者の評価にQLF法の応用が可能であることが分かり、歯垢あるいは歯石の付着を示すといわれている赤色蛍光が鈎歯および人工歯表面に観察されることが分かった。以上の結果から、義歯装着患者においてもQLF法による歯石や歯垢の定量的評価が応用可能であることが示唆された。④口腔内蛍光測定用のプローブ開発については、通常のQLF法では判別が難しい極めて初期のう蝕発見の可能性が本研究により開発したプローブ併用法で行える可能性が高いことが確認された。⑤歯列不正とう蝕との関連評価、臨床試験については、上下顎前歯部の歯列不正、不正咬合である叢生、空隙および低位咬合の状況と、歯垢・歯石付着および初期う蝕状態との関連性について、QLF法を用いて検討を行ったところ、叢生、低位咬合部位はう蝕リスクが高いこと、叢生、空隙、低位咬合部位は歯周病関連菌付着のリスクが高いこと、叢生、空隙、低位咬合を改善する矯正歯科治療は、う蝕および歯周疾患のリスクファクターを減らし、これら二大歯科疾患の予防法の一つとして重要であることが分かった。⑥歯周疾患患者における光診査法の応用による歯垢特性の評価では、光診査法により測定される歯垢の蛍光強度が蛍光性物質の蓄積度を示し、古い歯垢ほど蛍光強度が増すと考えられることから、光診査法により歯垢の成熟度や病原性を診断できる可能性が示された。

分担研究者

川崎弘二

大阪歯科大学口腔衛生学講座
講師

松村英夫

独立行政法人産業技術総合研究所光技術
研究部門
主任研究員

相馬邦道

東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究
科咬合機能矯正学分野
教授

酒井怜子

大阪歯科大学口腔衛生学講座
大学院生

George K. Stookey

Indiana University, School of Dentistry
Associate Dean for Research

安藤昌俊

Indiana University, Oral Health
Research Institute
Assistant Scientist

Elbert de Josselin de Jong

Inspektor Research Systems b. v.
Chief Research & Development

研究協力者

上村参生

大阪歯科大学口腔衛生学講座
講師

三宅達郎

大阪歯科大学口腔衛生学講座
講師

土居貴士

大阪歯科大学口腔衛生学講座
助手

上根昌子

大阪歯科大学口腔衛生学講座
研究技術員

日吉紀子

大阪歯科大学口腔衛生学講座
非常勤講師

松本芳郎

東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究
科咬合機能矯正学分野
講師

A. 研究目的

歯科疾患構造や歯科医療への需要構造が変化し、さらに、近年の 8020 推進事業への支援強化、健康日本 21・健康増進法の設立・制定などの変化の中で、う蝕に対する予防や健康増進のための光学領域の技術を応用した Evidence-based な技術が出現し始めており、初期う蝕の早期検出が注目を集めている。

これまでのう蝕診査は、う蝕治療が必要な歯や部位を検出することが目的であるのに対し、う蝕予防や健康増進を目的とした診査は、健全エナメル質から初期う蝕（early caries, 表層下脱灰像を示し、再石灰化によって回復するエナメル質う蝕、予防処置ですむ段階）の歯の診査を行おうとするものである。このことにより、Caries prevention is invisible（う蝕予防は見えない）から Caries prevention is visible（う蝕予防が見える）を行おうというのが早期う蝕検出の意味である。

これらのうち、定量蛍光法（QLF；Quantitative Light-induced Fluorescence）は、光照射することによる歯の保有する蛍光を励起し、反射する蛍光が表層下脱灰部において乱反射することにより健全部との差を、フィルターを通して CCD カメラでコンピュータに取り込んだ画像を解析（健全エナメル質との比較で判断し、脱灰面積、最大深さ、平均深さ、脱灰量として数値化）することにより脱灰部の定量化を図るものである。歯が蛍光を有していることは、歴史的に古くから知られており、1926 年 Benedict がエナメル質、象牙質の蛍光を可視、紫外線（UV）範囲で励起できることを初めて示したとされて

いる。それ以来、多数の研究者により研究されてきているが蛍光物質の特定にはいまだいたっていない。

QLF 法が他の早期う蝕検出法とは異なる特徴を有しているのは、初期う蝕の定量化（う蝕の面積、脱灰深さならびに脱灰量）および初期う蝕脱灰の画像化である。

QLF 法を用いた臨床研究（1年間）の結果では、う蝕が進行した初期齲蝕は 49.5%、う蝕が回復（再石灰化）した初期う蝕が 41.5%であった。一方、ある種のフッ化物配合歯磨剤を指示した初期う蝕は、1年後 71.5%の回復を示した。これまで報告されてきたフッ化物配合歯磨剤のう蝕抑制効果は、30-40%程度であった結果と比較すると非常に高いう蝕抑制率である。う蝕検出を視診で行ってきた方法と QLF 法の定量化によるう蝕検出との精度の違いを示したものと考えられる。

う蝕予防実践のための技術、早期う蝕検出法が完成すると、初期う蝕の評価（進行・停止・回復）ができ、各歯に応じたテーラードう蝕予防治療が可能になる。また、現在行われている微生物要因や環境要因を中心としたう蝕リスク評価に宿主要因を加えることができ、より精度の高いう蝕リスク評価を行うことができるようになる。さらに、う蝕治療（充填処置、補綴処置）の二次う蝕発現の有効性評価や新たな予防処置剤の開発にもつながる可能性がある。

B. 研究方法

1. 唾液タンパク質およびフッ化物応用がエナメル質の脱灰に及ぼす影響

21 世紀においても、依然としてう蝕は口腔内の二大疾患のひとつであり続けている。

このう蝕を予防する手段として、安全性、有効性ともに、最も高いレベルでエビデンスが確立されている手段がフッ化物応用であることは論を俟たない¹⁾。フッ化物応用に関するエビデンスは百年近い多数の研究の成果により齎されたものであり、時代とともにフッ化物の応用に関するコンセプトと手段は推移してきている。

以前は歯の萌出前後におけるエナメル質への応用、すなわち、水道水フッ化物濃度調整や高濃度フッ化物塗布の結果として生じる、フルオロアパタイトの生成による耐酸性の向上がその核となるコンセプトであった^{2~4)}。しかし、近年、多くの疫学調査の結果より、う窩に至るう蝕よりも、う窩を形成する以前のう蝕が多く観察されていることから^{5~7)}、再石灰化の促進、すなわち、口腔内に存在する低濃度フッ化物イオンの存在が再石灰化促進に有効であるという機序が着目されるに至り⁸⁾、持続的なフッ化物配合歯磨剤、健康食品としてのリン酸カルシウム、重炭酸イオンなどの応用が進められているのが現状である。

初期う蝕の脱灰程度を非破壊的に観察する手段としてQLF (quantitative light-induced fluorescence) 法がある^{9~11)}。QLF法は象牙境に存在する蛍光物質を利用し、歯に励起光を照射して得られる自家蛍光のうち健全部と初期う蝕部の蛍光強度差をもとに初期う蝕を検出し、コンピュータに取り込んだうえで画像処理を行い、初期う蝕を定量的に分析する方法である。

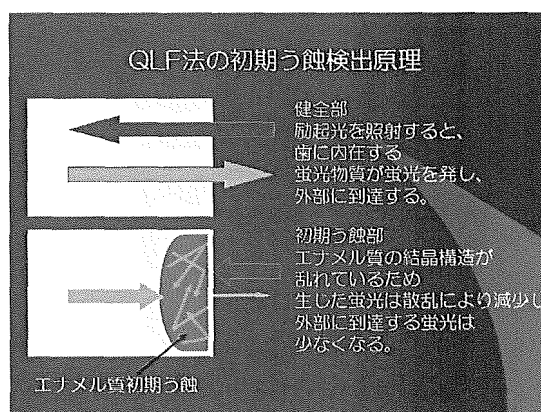


図1 QLF法の原理

初期う蝕の再石灰化にフッ素イオンが与える影響は数多くの研究で検討され、低濃度フッ素イオンの存在下で再石灰化は促進されると報告されている^{7~11)}。しかし、脱灰を防ぐための個々人に対するプログラムの策定にどのような診査・診断・予防方法を用いるべきかというコンセサスや、初期う蝕の微細な変化を光学的診断によって定量化できるQLF法などの方法を援用して脱灰抑制プログラムを策定するには、いまだ十分な情報が得られているとは言えないのが現状である。

すなわち、脱灰抑制にかかわる因子としては唾液中のタンパク質の存在が着目されているが¹²⁾、唾液中のタンパク濃度が脱灰抑制に与える影響が明らかになれば、う蝕活動性試験の一環としていままで評価が困難であった宿主因子に対するスクリーニングが実現できる可能性がある。また、脱灰抑制にかかる効果的なフッ化物応用を、QLF法による詳細な定量的評価と組み合わせれば、効果的なう蝕予防プログラムをわかりつけ歯科医システムのなかで構築できる可能性がある。



図2 QLF法による初期う蝕像

本研究では、臨床応用を目指したQLF法の応用のため、異なる種類のフッ化物応用に対し、それぞれ異なる濃度の唾液タンパク質のモデルであるムチンを加えたうえで、経時的な脱灰過程のモニタリングを行うことにより、脱灰抑制に対するフッ化物応用の至適条件および唾液タンパク質が脱灰に与える影響を検索した。

①エナメル質試料の作製

ダイヤモンドドリルを用いウシ下顎中切歯の唇側面から流水下で直径4 mmのエナメル質ディスクを取り出した。エナメル質ディスクは中空のアクリリックロッドにデンチャーレジンをを用いて包埋し、耐水ペーパー (Silicon Carbide, #1000) にて15分間、ゲル状研磨剤 (Gamma Alumina, 0.05 μm) にて90分間、鏡面研磨を行いエナメル質試料とした。

②エナメル質試料の脱灰およびムチンの応用

エナメル質試料の表面中央に初期う蝕を作製するため、 2×2 mmの脱灰予定窓以外をネイルバーニッシュで被覆したのち、

脱灰溶液 (乳酸: 100 mM、ヒドロキシapatite: 3 g/l、carboxymethyl cellulose: 0.2 g、pH: 5.0) に37°Cで96時間の浸漬を行った。

③唾液タンパク質の添加

エナメル質試料は40試料ずつ、四種類の異なる濃度のムチン (Sigma Chemical Co.) を添加した脱灰溶液に浸漬した。すなわち、ムチン非添加、0.29 mg/ml、0.87 mg/ml、2.70 mg/mlの四種類の濃度である。ムチンの濃度は文献的に得られた最低値から最高値を採用した^{13~15)}。

④フッ化物の応用

四種類の異なる濃度のムチン添加脱灰溶液に浸漬した40試料のエナメル質試料は、10試料ずつ以下の四種類のフッ化物応用を行った。

- I) コントロール群: エナメル質試料を継続的に脱灰溶液のみに浸漬した。
- II) フッ化物配合歯磨剤群: 一日3回、フッ化物配合歯磨剤溶液 (1 g/3 ml、950 ppm F) にエナメル質試料を5分間浸漬した。
- III) APF群: 実験開始前にAPFゲル (9000 ppm F) をエナメル質試料に5分間作用させた。



図3 コントロール群におけるエナメル質試料の経時的変化 (左から処理前、24、48、72、96時間脱灰溶液に浸漬)

⑤QLF法による脱灰程度の評価

Inspektor Pro QLF システム (QLF™、Inspektor Research Systems 社製、オランダ) により初期う蝕試料の脱灰程度の評価を行った。デジタル画像の取得は試料表面についた水滴を吸い取り、25℃にて15分間乾燥させたのちに撮影した¹⁶⁾。得られたデジタル画像は付属の画像解析ソフト (QLF200h) により解析した。今回は脱灰程度の指標としてマイクロラジオグラムによる脱灰量と相関する指標である ΔQ 値を用いて解析を行った。脱灰程度の評価は、24、48、72、96時間目に行った。

2. 唾液タンパク質および各種フッ化物応用がエナメル質の再石灰化に及ぼす影響

分担研究報告 (1) に詳述。

3. 義歯装着患者に対するQLF法の応用

分担研究報告 (2) に詳述。

4. 口腔内蛍光測定用のプローブ開発

分担研究報告 (3) に詳述。

5. 歯列不正と齲蝕との関連評価、臨床試験

分担研究報告 (4) に詳述。

6. 歯周疾患患者における光診査法の応用による歯垢特性の評価

分担研究報告 (5) に詳述。

C. 研究結果

1. 唾液タンパク質およびフッ化物応用がエナメル質の脱灰に及ぼす影響

①コントロール群 (フッ化物非応用) の経時的な脱灰の評価

ムチン非添加の場合、四日目の ΔQ 値は約-160 ($\text{mm}^2 \cdot \%$) を示した。0.29 mg/ml の濃度でムチンを添加すると、脱灰はやや抑制され、四日目の ΔQ 値は約-130 ($\text{mm}^2 \cdot \%$) であった。0.87 および 2.70 mg/ml の濃度でムチンを添加した場合、脱灰の傾向はほぼ同じ様相を示し、四日目の ΔQ 値は約-85 ($\text{mm}^2 \cdot \%$) であった。

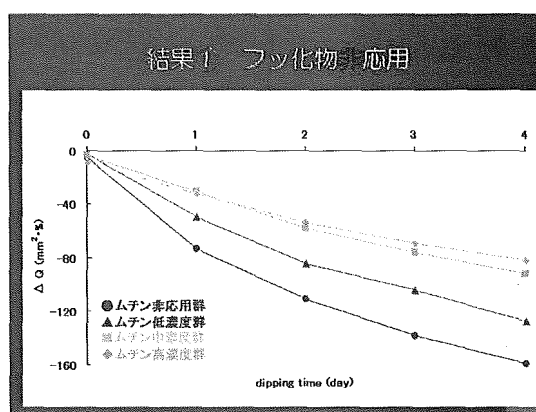


図4 コントロール群の経時的な脱灰過程

②フッ化物配合歯磨剤群の経時的な脱灰の評価

ムチン非添加の場合、四日目の ΔQ 値は約-30 ($\text{mm}^2 \cdot \%$) を示した。0.29、0.87 および 2.70 mg/ml の濃度でムチンを添加した場合、脱灰の傾向はほぼ同じ様相を示し、四日目の ΔQ 値は約-13 ($\text{mm}^2 \cdot \%$) であった。

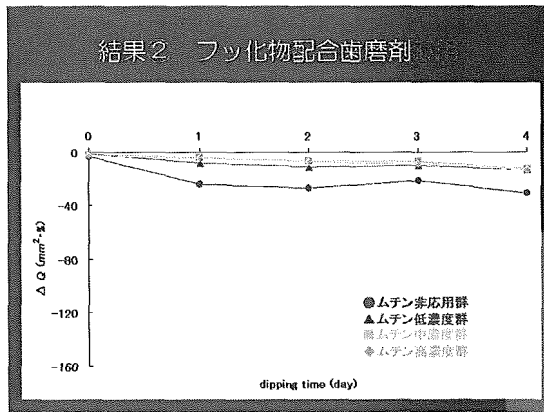


図5 フッ化物配合歯磨剤群の経時的な脱灰過程

③ A P F 群の経時的な脱灰の評価

ムチンの濃度に関わらず、脱灰の傾向はすべての試料でほぼ同じ様相を示し、四日目の ΔQ 値は約 -7 ($\text{mm}^2 \cdot \%$)以下であった。

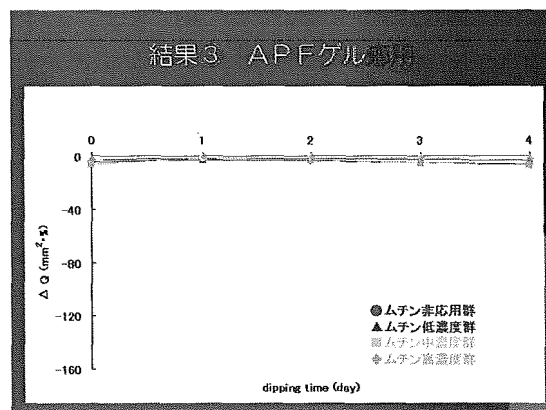


図6 A P F 群の経時的な脱灰過程

2. 唾液タンパク質および各種フッ化物応用がエナメル質の再石灰化に及ぼす影響

分担研究報告(1)に詳述。

3. 義歯装着患者に対するQLF法の応用

分担研究報告(2)に詳述。

4. 口腔内蛍光測定用のプローブ開発

分担研究報告(3)に詳述。

5. 歯列不正と齲蝕との関連評価、臨床試験

分担研究報告(4)に詳述。

6. 歯周疾患患者における光診査法の応用による歯垢特性の評価

分担研究報告(5)に詳述。

D. 考察

1. 唾液タンパク質およびフッ化物応用がエナメル質の脱灰に及ぼす影響

本研究の結果、コントロール群ではムチンの濃度によって脱灰が抑制される傾向にあることが分かった。唾液中に含まれているムチンは組織を被覆し、バイオフィルムが生成する酸の浸透と拡散を抑制し、pHの低下を防ぐことが知られているが、今回の結果から、少なくとも 0.29 以上 0.87 mg/ml の範囲でムチンが唾液中に存在すれば、脱灰を抑制する機能が発揮されていることが明らかとなったが、ムチンのみでは完全に脱灰を抑制することはできないことも同時に明らかとなった。とはいえ、唾液タンパク質の成分分析を行えば、宿主要因におけるう蝕活動性の判定を行なえる可能性のあることが明らかとなった。

また、A P Fの応用は高い脱灰抑制効果を導くことが明らかとなった。さらに、口腔内に十分な濃度でムチンが存在すれば、低濃度のフッ化物の持続的な応用であったとしても、脱灰は高度に抑制されることも明らかとなった。本研究課題の2004年度の報告において、筆者は初期う蝕の再石灰化には持続的な低濃度のフッ化物応用を行

なうべきで、高濃度のフッ化物応用は表面の過石灰化のため、再石灰化を阻害してしまう可能性のあることを指摘したが、本年度の研究成果と併せ、フッ化物の応用には、QLF法を応用した局所応用プログラムの策定が口腔内の健康の実現のために効果的であることが明らかとなった。すなわち、QLF法は初期う蝕のみを検出する機器ではなく、健全な部分をも検出できるポテンシャルを持った機器であるということが重要なポイントである。QLF法により健全と診断された部位には高濃度のフッ化物応用を行なうことによって、未来に発生しうるう蝕の発生=脱灰の予防を行い、あるいは、十分な濃度のムチンが口腔内に存在し、微生物要因や環境要因が良好であれば、低濃度のフッ化物応用によって、脱灰を抑制し、さらに、QLF法によって初期う蝕であると診断された部位には、高濃度のフッ化物応用を行わず、持続的な低濃度のフッ化物応用を行ない、再石灰化を促進させるプログラムの確立、および歯面のごく一部に効果的に高濃度のフッ化物を応用する手段の確立が急務である。これらの知見は、臨床の現場でQLF法を応用して、脱灰抑制療法ならびに再石灰化療法プログラムを構築するには不可欠な基本的データであり、こうした知見はQLF法の応用によってはじめて明らかになる事柄であり、今後の臨床研究が不可欠であると考えている。

2. 唾液タンパク質および各種フッ化物応用がエナメル質の再石灰化に及ぼす影響

分担研究報告（1）に詳述。

3. 義歯装着患者に対するQLF法の応用

分担研究報告（2）に詳述。

4. 口腔内蛍光測定用のプローブ開発

分担研究報告（3）に詳述。

5. 歯列不正と齶蝕との関連評価、臨床試験

分担研究報告（4）に詳述。

6. 歯周疾患患者における光診査法の応用による歯垢特性の評価

分担研究報告（5）に詳述。

E. 結論

1. 唾液タンパク質およびフッ化物応用がエナメル質の脱灰に及ぼす影響

唾液タンパク質の存在は脱灰抑制に作用することが分かり、高濃度フッ化物応用は高い脱灰抑制効果のあることが分かった。さらに、低濃度フッ化物応用も、唾液タンパク質の存在下では、高い脱灰抑制効果を示すことが明らかとなった。

2. 唾液タンパク質および各種フッ化物応用がエナメル質の再石灰化に及ぼす影響

本研究では唾液総タンパク質の存在が初期う蝕の再石灰化に及ぼす影響については明らかではなかった。

低脱灰群においてはフッ化物応用の種類にかかわらず高い再石灰化を示し、高脱灰群においては低濃度フッ化物であるフッ化物配合歯磨剤応用に比べ、高濃度フッ化物である APF 応用は再石灰化を低下させることがわかった。

3. 義歯装着患者に対するQLF法の応用

人工的な歯科材料でも材質によっては蛍光が見られることから、義歯装着患者の評価に QLF 法の応用が可能であることが分かり、歯垢あるいは歯石の付着を示すといわれている赤色蛍光が鈎歯および人工歯表面に観察されることが分かった。以上の結果から、義歯装着患者においても QLF 法による歯石や歯垢の定量的評価が応用可能であることが示唆された。

4. 口腔内蛍光測定用のプローブ開発

通常の QLF 法では判別が難しい極めて初期のう蝕発見の可能性が本研究により開発したプローブ併用法で行える可能性が高いことが確認されたが、まだサンプル試料数が少ないため今後の詳細な研究が期待される。

5. 歯列不正と齲蝕との関連評価、臨床試験

上下顎前歯部の歯列不正、不正咬合である叢生、空隙および低位咬合の状況と、歯垢・歯石付着および初期齲蝕状態との関連性について、QLF 法を用いて検討を行ったところ、以下の結論が得られた。

1. 叢生、低位咬合部位は齲蝕リスクが高い。
2. 叢生、空隙、低位咬合部位は歯周病関連菌付着のリスクが高い。
3. 叢生、空隙、低位咬合を改善する矯正歯科治療は、齲蝕および歯周疾患のリスクファクターを減らし、これら二大歯科疾患の予防法の一つとして重要である。

6. 歯周疾患患者における光診査法の応用

による歯垢特性の評価

光診査法により測定される歯垢の蛍光強度が蛍光性物質の蓄積度を示し、古い歯垢ほど蛍光強度が増すと考えられることから、光診査法により歯垢の成熟度や病原性を診断できる可能性が示された。

引用文献

- 1) Marinho VCC, Higgins JPT, Logan S, Sheiham A. Topical fluoride (toothpastes, mouthrinses, gels or varnishes) for preventing dental caries in children and adolescents. The Cochrane Database of Systematic Reviews 2003 (4): CD002782.
- 2) Brudevold F et al. A study of acidulated fluoride solutions 1: In vitro effects on enamel. Arch Oral Biol 1963; 8: 167-177.
- 3) Baud CA, Bang S. Electron probe and X-ray diffraction microanalyses of human dental enamel treated in vitro by fluoride solution. Caries Res 1970; 4: 1-13.
- 4) Ripa LW. Professionally (operator) applied topical fluoride therapy: a critique. Int Dent J 1981; 31: 105-120.
- 5) Ismail AI, Brodeur JM, Gagnon P, Payette M, Picard D, Hamalian T, Olivier M, Eastwood BJ. Prevalence of non-cavitated and cavitated carious lesions in a random sample of 7-9-year-old schoolchildren in Montreal, Quebec. Community Dent Oral Epidemiol 1992; 20: 250-255.

- 6) Clark DC, Hann HJ, Williamson MF, Berkowitz J. Effects of lifelong consumption of fluoridated water or use of fluoride supplements on dental caries prevalence. *Community Dent Oral Epidemiol* 1995; 23: 20-24.
- 7) Marthaler TM. Changes in dental Caries 1953-2003. *Caries Res* 2004; 38: 173-181.
- 8) Featherstone JDB. Prevention and reversal of dental caries: role of low level fluoride. *Community Dent Oral Epidemiol* 1999; 27: 31-40.
- 9) Hafstrom-Bjorkman U, Sundstrom F, de Josselin de Jong E, Oliveby A, Angmar-Mansson B. Comparison of laser fluorescence and longitudinal microradiography for quantitative assessment of in vitro enamel caries. *Caries Res* 1992; 26: 241-247.
- 10) de Josselin de Jong E, Sundstrom F, Westerling H, Tranaeus S, ten Bosch JJ, Angmar-Mansson B. A new method for in vivo quantification of changes in initial enamel caries with laser fluorescence. *Caries Res*. 1995; 29: 2-7.
- 11) al-Khateeb S, ten Cate JM, Angmar-Mansson B, de Josselin de Jong E, Sundstrom G, Exterkate RA, Oliveby A. Quantification of formation and remineralization of artificial enamel lesions with a new portable fluorescence device. *Adv Dent Res*. 1997; 11: 502-506.
- 12) van Nieuw Amerongen A, Bolscher JGM, Veerman ECI. Salivary proteins: Protective and diagnostic value in cariology? *Caries Res* 2004; 38: 247-253.
- 13) Kapsimalis P, Rosenthal SL, Updegrave W, Evans R, Hurley B, Cobe HM. The relationship between caries activity, flow rate, total nitrogen and the mucin content of saliva. *J Oral Med* 1966; 21: 107-110.
- 14) Fox PC, Bondner L, Tabak LA, Levine MJ. Quantitation of total human salivary mucins. *J Dent Res* 1985; 64: 327.
- 15) Meyer-Lueckel H, Umland N, Hopfenmuller W, Kielbassa AM. Effect of mucin alone and in combination with various dentifrices on in vitro remineralization. *Caries Res* 2004; 38: 478-483.
- 16) Al-Khateeb S, Exterkate RA, de Josselin de Jong E, Angmar-Mansson B, ten Cate JM. Light-induced fluorescence studies on dehydration of incipient enamel lesions. *Caries Res* 2002; 36: 25-30.

F. 健康危険情報

研究の結果、得られた成果の中で健康危険情報として厚生労働省に報告すべき点はみられなかった。

G. 研究発表

1. 論文発表

Kambara M, Uemura M, Miyake T, Doi T, Nakashima S, Eckert GJ, Stookey GK. Results of clinical trial of

fluoride dentifrice using QLF.
ed: Stookey GK. Early Detection of
Dental Caries III. Indiana University
Indianapolis; 2005: 229-235.

神原正樹. う蝕から歯を守る唾液. 下野
正基, 奥田克爾編. 唾液による健康づく
り—明日からの臨床に取り組む. ヒョー
ロン・パブリッシャーズ; 東京, 2005:
149-160.

松村英夫. リポソームの固体微粒子との
複合化とエレクトロ・パーミエーション.
秋吉一成, 辻井薫編. リポソーム応用の
新展開 人工細胞の開発に向けて. 株式
会社エヌ・ティー・エス; 東京, 2005:
388-395.

Kawasaki K, Kawakami T, Kambara
M. Effect of various fluoride
applications on remineralization of
bovine tooth enamel using
quantitative light-induced
fluorescence in vitro. Caries Research
2006; 40: in press.

川上富清, 川崎弘二, 神原正樹. 光誘導
蛍光定量法により観察した in vitro にお
けるエナメル質再石灰化に及ぼす各種フ
ッ化物応用の影響. 歯科医学 69 (2);
110-115: 2006.

柘植紳平, 上村参生. 齲蝕の診断と検出.
歯界展望 107 (1); 177-182: 2006.

Matsumura H, Saburi M. Protein

adsorption and wetting of the protein
adsorbed surfaces studied by a new
type of laser reflectometer. Colloids
and Surfaces B: Biointerfaces 47 (2);
138-144: 2006.

上村参生, 三宅達郎, 上根昌子, 川崎弘
二, 日吉紀子, 土居貴士, 伊津元博, 田
中秀直, 神原正樹. Quantitative
light-induced fluorescence(QLF)の早期
齲蝕診断への応用. 歯界展望 2005(
特別号); 265: 2005.

神原正樹. <う蝕治療の最前線>エナメ
ル質診断. 歯界展望 2005(特別号); 87
: 2005.

神原正樹. 齲蝕検査システムの必要性と
その確立へ向けて—初期齲蝕早期検出法.
日本歯科医学会誌 24; 106-110: 2005.

Petersson LG, Kambara M.
Remineralisation study of artificial
root caries lesions after fluoride
treatment. An in vitro study using
electric caries monitor and transversal
micro-radiography. Gerodontology
21 (2); 85-92: 2004.

2. 学会発表

神原正樹. 初期齲蝕および歯列等の新た
な診断技術の開発に関する総合的研究.
「Osaka Conference」講演会プログラム.
9: 2005.

田中秀直, 伊津元博, 高島隆太郎, 西島

典幸, 川上富清, 田治米元信, 川崎弘二, 上村参生, 神原正樹. QLF法による根面う蝕の観察. 日本口腔衛生学会雑誌 55 (5) ; 633 : 2005.

川上富清, 川崎弘二, 神原正樹. 光誘導蛍光定量法により観察した *in vitro* におけるエナメル質再石灰化に及ぼす各種フッ化物応用の影響. 日本口腔衛生学会雑誌 55 (4) ; 513 : 2005.

高島隆太郎, 川崎弘二, 酒井怜子, 小室美樹, 安達郁, 河村泰治, 朴容徳, 尾崎均, 阪本充, 神原正樹. 感染象牙質の除去における QLF (Quantitative Light-induced Fluorescence) 法の応用. 日本口腔衛生学会雑誌 55 (4) ; 390 : 2005.

田中秀直, 上村参生, 三宅達郎, 土居貴士, 伊津元博, 田治米元信, 田中浩二, 白石雅照, 奥忠之, 神原正樹. QLF法を用いた根面齲蝕および口腔清掃効果の観察. 日本口腔衛生学会雑誌 55 (4) ; 389 : 2005.

酒井怜子, 川崎弘二, 高島隆太郎, 多名部実, 吉田邦晃, 西村有祐, 朴容徳, 櫻井宏守, 生内信男, 神原正樹. 唾液タンパク質およびフッ化物応用が初期う蝕の再石灰化に及ぼす影響. 日本口腔衛生学会雑誌 55 (4) ; 386 : 2005.

西島典幸, 上村参生, 神原正樹. 年齢別にみた初期う蝕病巣の進行・回復に及ぼすフッ化物配合歯磨剤の効果について.

日本口腔衛生学会雑誌 55 (4) ; 359 : 2005.

加藤尚, 川崎弘二, 神原正樹, 兼平治和, 前田照太, 井上宏. 義歯装着患者の歯垢・歯石に対する光誘導蛍光定量法の応用. 日本補綴歯科学会雑誌 49 (113 回特別号) ; 98 : 2005.

Uemura M, Doi T, Miyake T, Sakamoto Y, Kambara M. Clinical trials on early caries detection using QLF technique. *Journal of Dental Research* 84 Special Issue A; Seq #229 2061: 2005.

Kawasaki K, Sakai R, Takashima R, Kambara M. Evaluation of red-fluorescent dental plaque using QLF method. *Journal of Dental Research* 84 Special Issue A; Seq #229 2059: 2005.

Sakai R, Takashima R, Kawasaki K, Kambara M. In vitro QLF observation of remineralizing effect in fluoride applications. *Journal of Dental Research* 84 Special Issue A; Seq #229 2051: 2005.

Izu M, Miyake T, Uene M, Tanaka H, Takasjima R, Nishijima N, Kambara M. New analysis method of gingiva with quantitative light-Induced fluorescence. *Journal of Dental Research* 84 Special Issue A; Seq #127 1069: 2005.

川崎弘二. タンパク質吸着層表面の濡れ性. 「タンパク質の非特異的吸着現象」講演会プログラム. 3: 2005.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

現在出願中。

2. 実用新案登録

特になし

3. その他

特になし

唾液タンパク質および各種フッ化物応用がエナメル質の再石灰化に及ぼす影響

分担研究者 川崎弘二 大阪歯科大学口腔衛生学講座 講師

研究要旨

各種フッ化物の応用と唾液総タンパク質の存在が初期う蝕の再石灰化に及ぼす影響を *in vitro* にて観察した。低脱灰群においては、すべての群が近似した再石灰化の過程を示し 6 日目ではほぼ 100%回復した。高脱灰群においては、APF 応用群以外の 3 群は 15 日目にはほぼ 100%回復したのに比べ、APF 応用群は 9 日目に再石灰化のスピードが低下し 28 日目には約 75%しか回復しなかった。低脱灰群、高脱灰群ともに再石灰化過程における唾液総タンパク質の影響は明確でなく、対照群とタンパク質添加群の間に実験期間中、統計的有意差はみられなかった。以上の結果から低脱灰群においてはフッ化物応用の種類にかかわらず高い再石灰化を示し、高脱灰群においては低濃度フッ化物であるフッ化物配合歯磨剤応用に比べ、高濃度フッ化物である APF 応用は再石灰化を低下させることがわかった。

A. 研究目的

近年実施された多くの疫学的研究の結果から、初期う蝕あるいはう窩形成前のう蝕は、う窩に至ったものより多く検出されていることが明らかとなっている^{1~3}。脱灰によって引き起こされたエナメル質の傷害が再石灰化現象によって修復できるという概念は、う蝕予防を念頭に置いた歯科保健のマネジメントにおいてとくに重要である。

90 年代以降、さまざまな初期う蝕検出機器が発表され、肉眼で評価することが困難な初期う蝕の診断が可能となりつつある。初期う蝕の脱灰程度を非破壊的に観察する手段として光誘導蛍光定量法（QLF）がある^{4~6}。QLF 法は象牙質に存在する蛍光物

質を利用し、歯に励起光を照射して得られる自家蛍光のうち、健全部と初期う蝕部の蛍光強度差をもとに初期う蝕を検出し、コンピュータに取り込んだうえで画像処理を行い、初期う蝕を定量的に評価する方法である。

現在、エナメル質の脱灰・再石灰化に促進あるいは抑制として働く唾液タンパク質の作用の研究、そして各種唾液タンパク質と共同して働くフッ化物の作用についての研究が多く行われるようになってきており⁷、とくにスタセリン⁸や高プロリンタンパク質⁹などの再石灰化抑制に働くタンパク質の影響が考慮されている。

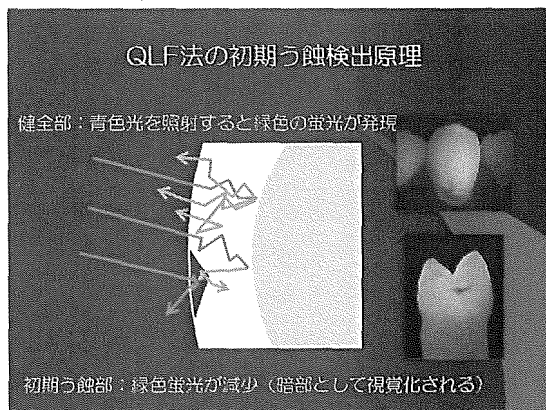


図1 QLF法の初期う蝕検出原理

しかし、唾液中に含まれている総タンパク質、さらにそれと共同して作用するフッ化物がエナメル質の脱灰・再石灰化に及ぼす影響については統一した見解が得られていないのが現状である。

初期う蝕の再石灰化にフッ素イオンが与える影響は数多く研究され、低濃度フッ素イオンの存在下で再石灰化は促進されると報告されている。⁷⁻¹¹しかし、初期う蝕における脱灰病変の大きさやミネラル喪失量、¹²初期う蝕表層のエナメル質性状¹³が再石灰化量に影響を与えるという報告もあり、初期う蝕における再石灰化の至適条件について、いまだコンセンサスが得られていないのが現状である

そのため、本研究では唾液総タンパク質と各種フッ化物応用が初期う蝕の再石灰化に及ぼす影響を *in vitro* 環境下にて検討した。

B. 研究方法

①唾液総タンパク質の精製

パラフィルム咀嚼により採取したヒト刺激全唾液 (n=2) の遠心分離 (10,000 g、10分) 上清に最終濃度 1mM になるように

0.2M フェニルメチルスルフォニルフルオリドを添加し、透析膜 (MW cutoff: 8,000) を用い蒸留水で一昼夜 4°Cにて透析を行い、再び遠心分離し (10,000 g、10分) 上清を凍結乾燥させ唾液総タンパク質を得た。

②エナメル質初期う蝕試料の作製

ウシエナメル質試料 (直径 5 mm) の表面を耐水ペーパー (#600、#1000、#1500) ゲル状研磨剤 (gamma alumina: 0.05 μm) にて鏡面研磨した後、脱灰溶液 (乳酸: 100 mM、ヒドロキシアパタイト: 3 g/L、カルボキシメチルセルロース: 0.2 g、PH: 5.0) に 37°Cで 48 および 96 時間浸漬し、低脱灰群および高脱灰群の初期う蝕試料を各 40 試料作製した。

③初期う蝕試料の再石灰化およびフッ化物応用

初期う蝕試料は再石灰化溶液 (KCl: 130 mM、KH₂PO₄: 0.9 mM、CaCl₂: 1.5 mM、HEPES: 20 mM、0.2%アジ化ナトリウム、PH: 7.0) に浸漬した。フッ化物応用は以下の4種を行った。

- I) 対照群：再石灰化溶液のみに浸漬。
- II) タンパク質添加群：唾液総タンパク質を添加した再石灰化溶液 (タンパク質濃度: 0.1 mg/ml) に浸漬。
- III) フッ化物配合歯磨剤群：(II) に加え 1日3回、フッ化物配合歯磨剤 (950 ppmF) 溶液 (1 g/14 ml) に浸漬。
- IV) フッ化物配合歯磨剤+APF 群：(III) に加え APF ゲル (9,000 ppmF) を実験開始前および実験開始後 14 日目に 5 分間作用。

④QLF 法による観察

再石灰化の観察は QLF 法(Quantitative Light-induced Fluorescence; Inspektor Research Systems, The Netherlands)により行った。QLF 法は歯に励起光を照射して得られる自家蛍光のうち、健全部と初期う蝕部の蛍光強度差をもとに初期う蝕を検出し、コンピュータに取り込んだうえで画像処理し、初期う蝕を定量的に評価する方法である。QLF 法の測定は再石灰化の過程を実験開始前および実験開始後 3、6、9、12、15、21、28 日目に行い、脱灰量を示す ΔQ ($\% \cdot \text{mm}^2$) 値を算出した。

C. 研究結果

再石灰化の指標は ΔQ 値をもとに回復率で評価した。低脱灰群はすべての群が近似した回復率の変化を示し 6 日目以内で 90%以上再石灰化後、平衡に達した。高脱灰群においてはフッ化物配合歯磨剤 + APF 応用群以外が近似した回復率の変化を示し 15 日目以内で 80%以上再石灰化後、平衡に達した。またフッ化物配合歯磨剤 + APF 応用群は 15 日目以降、対照群に比べ有意に再石灰化率の低下がみられた ($p < 0.05$)。

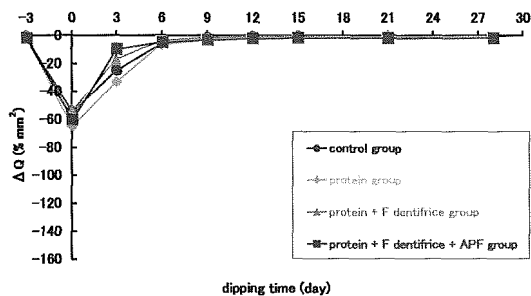


図 1 低脱灰群の再石灰化時間に伴う ΔQ 値の変化

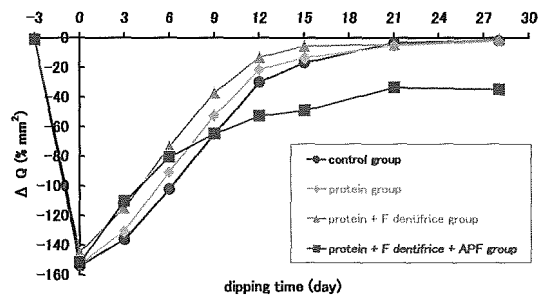


図 2 高脱灰群の再石灰化時間に伴う ΔQ 値の変化

表 1 各フッ化物処理群における ΔQ 値の統計的有意差 ($p < 0.05$)

	control group		protein group		protein + F dentifrice group	
	低脱灰群	高脱灰群	低脱灰群	高脱灰群	低脱灰群	高脱灰群
protein group	3日目					
	6日目					
	9日目					
	12日目					
	15日目					
	21日目					
protein + F dentifrice group	3日目		*			
	6日目					
	9日目					
	12日目					
	15日目					
	21日目					
protein + F dentifrice + APF group	3日目	*	*			
	6日目					
	9日目					
	12日目			*	*	*
	15日目		*	*	*	*
	21日目		*	*	*	*
28日目		*	*	*	*	

D. 考察

以上の結果より低脱灰群においてはフッ化物応用の種類にかかわらず高い回復率を示すが、高脱灰群においては高濃度フッ化物応用である APF 応用に比べ、低濃度フッ化物応用であるフッ化物配合歯磨剤の応用が有効であることがわかった。

唾液総タンパク質と再石灰化については、低脱灰群、高脱灰群ともに再石灰化過程における唾液総タンパク質の影響は明確でなく、対照群とタンパク質添加群の間に実験

期間中、統計的有意差はみられなかった。

また、唾液総タンパク質とフッ化物配合歯磨剤とが再石灰化に及ぼす影響は明らかではなかった。理由として、唾液総タンパク質およびフッ化物配合歯磨剤溶液の濃度が低いことが考えられる。

今後の課題として APF 応用による有効性の検討、さらに本研究よりも高濃度フッ化物配合歯磨剤溶液への浸漬および高濃度唾液総タンパク質また特定の唾液タンパク質添加による初期う蝕の再石灰化に及ぼすフッ化物と唾液タンパク質の影響を検討する必要があると考えている。

E. 結論

本研究では唾液総タンパク質の存在が初期う蝕の再石灰化に及ぼす影響については明らかではなかった。

低脱灰群においてはフッ化物応用の種類にかかわらず高い再石灰化を示し、高脱灰群においては低濃度フッ化物であるフッ化物配合歯磨剤応用に比べ、高濃度フッ化物である APF 応用は再石灰化を低下させることがわかった。

引用文献

1. Ismail AI, Brodeur JM, Gagnon P, Payette M, Picard D, Hamalian T, Olivier M, Eastwood BJ. Prevalence of non-cavitated and cavitated carious lesions in a random sample of 7-9-year-old schoolchildren in Montreal, Quebec. *Community Dent Oral Epidemiol* 1992; 20: 250-255.
2. Clark DC, Hann HJ, Williamson MF, Berkowitz J. Effects of lifelong consumption of fluoridated water or use of fluoride supplements on dental caries prevalence. *Community Dent Oral Epidemiol* 1995; 23: 20-24.
3. Marthaler TM. Changes in dental Caries 1953-2003. *Caries Res* 2004; 38: 173-181.
4. Hafstrom-Bjorkman U, Sundstrom F, de Josselin de Jong E, Oliveby A, Angmar-Mansson B. Comparison of laser fluorescence and longitudinal microradiography for quantitative assessment of in vitro enamel caries. *Caries Res* 1992; 26: 241-247.
5. de Josselin de Jong E, Sundstrom F, Westerling H, Tranaeus S, ten Bosch JJ, Angmar-Mansson B. A new method for in vivo quantification of changes in initial enamel caries with laser fluorescence. *Caries Res* 1995; 29: 2-7.
6. al-Khateeb S, ten Cate JM, Angmar-Mansson B, de Josselin de Jong E, Sundstrom G, Exterkate RA, Oliveby A. Quantification of formation and remineralization of artificial enamel lesions with a new portable fluorescence device. *Adv Dent Res* 1997; 11: 502-506.
7. van Nieuw Amerongen A, Bolscher, JGM, Veerman ECI. Salivary proteins: Protective and diagnostic value in cariology? *Caries Res* 2004; 38: 247-253.
8. Schlesinger DH, Hay DI. Complete covalent structure of statherin, a tyrosine-rich acidic peptide which

inhibits calcium phosphate precipitation from human parotid saliva. *J Biol Chem* 1977; 252: 1689-1695.

9. Hay DI, Carlson ER, Schluckebier SK, Moreno EC, Schlesinger DH. Inhibition of calcium phosphate precipitation by human salivary acidic proline-rich proteins: structure-activity relationships. *Calcif Tissue Int* 1987; 40: 126-132.

F. 健康危険情報

研究の結果、得られた成果の中で健康危険情報として厚生労働省に報告すべき点はみられなかった。

G. 研究発表

1. 論文発表

川上富清, 川崎弘二, 神原正樹. 光誘導蛍光定量法により観察した *in vitro* におけるエナメル質再石灰化に及ぼす各種フッ化物応用の影響. *歯科医学* 69 (2); 110-115 : 2006.

高島隆太郎, 川崎弘二, 上村参生, 酒井怜子, 川上富清, 小室崇, 西島典幸, 田治米元信, 多名部実, 小室美樹, 神原正樹. エナメル質人工初期う蝕試料の再石灰化における QLF 観察. *口腔衛生学会雑誌* 55 (1); 41-49 : 2005.

2. 学会発表

川上富清, 川崎弘二, 神原正樹. 光誘導蛍光定量法により観察した *in vitro* におけるエナメル質再石灰化に及ぼす各種フッ化物応用の影響. *日本口腔衛生学会雑誌* 55 (4); 513 : 2005.

酒井怜子, 川崎弘二, 高島隆太郎, 多名部実, 吉田邦晃, 西村有祐, 朴容徳, 櫻井宏守, 生内信男, 神原正樹. 唾液タンパク質およびフッ化物応用が初期う蝕の再石灰化に及ぼす影響. *日本口腔衛生学会雑誌* 55 (4); 386 : 2005.

Sakai R, Takashima R, Kawasaki K, Kambara M. *In vitro* QLF observation of remineralizing effect in fluoride applications. *Journal of Dental Research* 84 Special Issue A; Seq #229 2051 : 2005.

川崎弘二. タンパク質吸着層表面の濡れ性. 「タンパク質の非特異的吸着現象」講演会プログラム, 3 : 2005.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

特になし

2. 実用新案登録

特になし

3. その他

特になし