

200501254B

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15年度～17年度 総合研究報告書

主任研究者 神原 正樹

平成18(2006)年 4月

目 次

I. 総合研究報告書 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 神原正樹 3
II. 研究成果の刊行に関する一覧表 69
III. 研究成果の刊行物・別刷 80

厚生労働科学研究費補助金（医療技術評価総合研究事業）
（総合）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

日本人のう蝕罹患状況はとくに学童期において減少傾向にあり、健康日本21の歯科保健目標である3歳でう蝕のないものの割合を80%以上にするという目標と、12歳児の一人平均う蝕指数を1本以下にするという目標は、2010年には達成されると予測されている。他方、近年のう蝕学ではエナメル質表層は脱灰と再石灰化を繰り返しており、表層下脱灰の初期う蝕は再石灰化現象により健全に回復することが明らかにされているなどの新しい知見が出現してきている。将来の歯科医療を考えると、う蝕が減少しほとんどが健全歯である状況の中で、Minimum Intervention（最小の侵襲）で行なう治療に至るまでのステップである初期う蝕の状態でいかに管理するかが重要であり、歯科医療における包括的なシステムを構築することが急務であるといえる。本研究では初期う蝕の脱灰状態をデジタル画像として保存し、定量化できる新たな技術、可視光誘導蛍光定量法（QLF；Quantitative Light-induced Fluorescence）の妥当性、応用の可能性を基礎的研究、臨床研究および臨床応用法の検索により明らかにしようと企画したものである。基礎的研究ではQLF法の光学的検討により歯が持つ蛍光特性を明らかにし、*in vitro*環境下で人工的に初期う蝕を作製し脱灰の大きさと同種フッ化物応用による再石灰化過程の違いを明らかにした。また、再石灰化に及ぼす唾液タンパク質の影響についてもあわせて検討を加え、初期う蝕表層の特性をプローブ粒子の吸着現象の解析により検を行なった。臨床研究では、光照射によって得られる赤色の蛍光を発する歯垢を、歯周病患者、矯正患者および義歯装着患者について、歯垢付着特性および蛍光強度の面から検討を加えた。歯列不正患者によるう蝕発生状況の検索結果から、歯列不正患者に対する矯正治療の必要性を裏付ける結果を得た。以上の研究結果からQLF法が初期う蝕検出の妥当性の高い方法であることが明らかになるとともに、う蝕検出だけでなく高度のポテンシャル（歯垢検出等）を保有していることが明らかになった。QLF法による光学的診査は、疾患を検出し評価するためだけの機器ではない。光学的診査は従来の技術ではなしえなかった、健全な部位を健全であると数値で表現することが可能であり、さらにその部位を継続的にモニタリングすることも可能なのである。これは、キュアからケアへ移行する21世紀の口腔保健を考える上で重要なポイントであり、光学的診査は健康増進を念頭に置いた口腔保健プログラムを構築する上において、必須のテクノロジーとなるものと考えている。

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

1. はじめに

現在のう蝕予防の現状は、リスク管理の考え方に従い、口腔内環境（唾液・口腔内細菌）要因を中心に、う蝕罹患性を把握して判定する方法が中心であるが、今後は、ホスト要因をも組み入れた積極的な予防管理が重要であり、そのためには診断においてただ単にう蝕であるかないかを診断するだけでなく、その病変の進行、特にう蝕活動性に着目した評価が必要である。診断、処置決定、その後の管理・予後についてのシステムの一段階としてのう蝕診断方法が確立できれば、かかりつけ歯科医システムの中で個別に健康管理するシステムを構築することが可能となる（図1）。

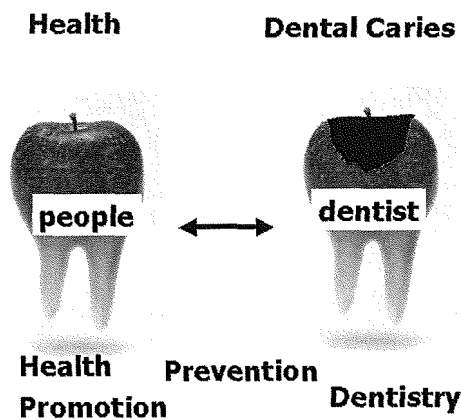


図1 健康増進とう蝕予防の関係

歯科疾患の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、そのなかでもとくに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ったのに対し、う蝕予防や健康増進を目的とした初期う蝕の早期検出は、健全エナメル質から初期う蝕（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。すなわち、初期う蝕の早期検出の意味は、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）へのパラダイムの変化を促すという意味を持っている。

これらのうち、可視光励起蛍光定量法（QLF；Quantitative Light-induced Fluorescence）は、光照射することにより歯の保有する蛍光物質を励起し、生ずる蛍光が表層下脱灰部において乱反射することを利用し、健全部との蛍光強度の差を、フィルタを装着したCCDカメラを介してコンピュータに取り込み、そのデジタル画像を解析することにより、表層下脱灰の定量化を図るものである（脱灰面積、最大深さ、平均深さ、脱灰量として数値化）。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年に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至っていない。

QLF法が他の早期う蝕検出法とは異なる

る特徴を有しているのは、初期う蝕の定量化（う蝕面積、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法を用いて行った、初期う蝕の進行／回復に関する1年間の臨床研究の結果では、1年間の経過観察を行った初期う蝕のうち、進行したものは49.5%、回復（再石灰化）したものが41.5%であった。一方、ある種のフッ化物配合歯磨剤の使用を指示した場合、経過観察を行った初期う蝕のうち、71.5%のものが1年後に回復傾向を示した。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%程度であった事実と比較すると、我々の研究で得られた結果は、非常に高いう蝕抑制率を示した。これは、視診によるう蝕検出とQLF法の定量化によるう蝕検出との精度の違いを示しているものと考えられる。

早期う蝕検出技術およびう蝕予防実践のための技術が完成すると、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メイドの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および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。

初期う蝕の目に見えない変化が明らかになると、個人の齲蝕罹患性傾向が明らかになり、歯の実質欠損が生じ現在の保険診療を適用する前に再石灰化を促進する予防処

置により、修復することが可能になり、歯科医療の予防歯科医療を目指した改革の手始めになる。

また、個人さらには歯面ごとの脱灰・再石灰化バランスを歯質自体のデータとして把握することが可能となり、診断のみならず予防管理の一環としての診断の位置づけが明確となる。さらには、為害性のある歯垢とそうでない歯垢とが判別できるようになると、予防のためのブラッシングに対し、どこまで磨いたらいいのかの規準を与える。すなわち、歯科保健指導に対し、明確な基準を与えることになる。QLF法は、歯の中の変化が目に見えるため（図2~6）、患者に対しインフォームドコンセントが容易にとれ、歯科医療に対する患者の理解が得られやすいなどの成果が期待できる。

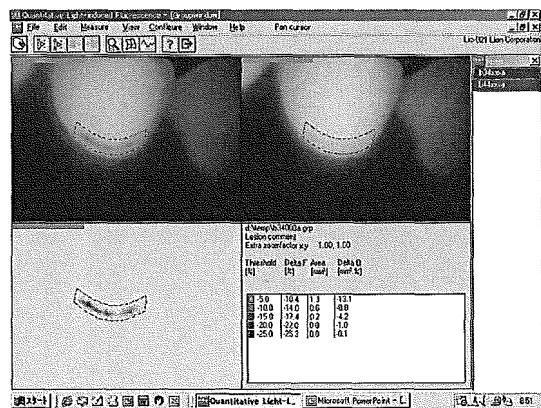


図2 初期う蝕の画像解析 ①

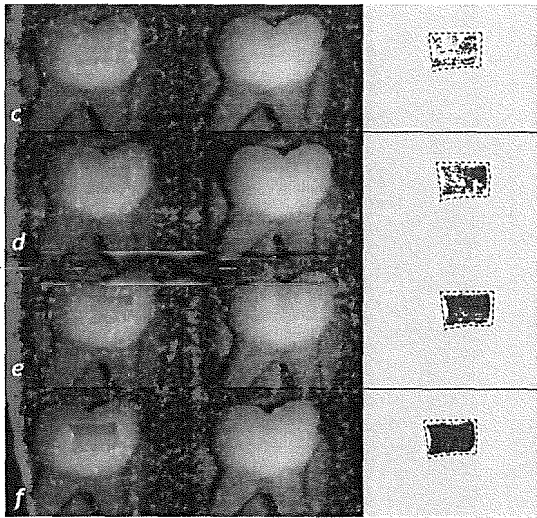


図3 初期う蝕の画像解析 ②

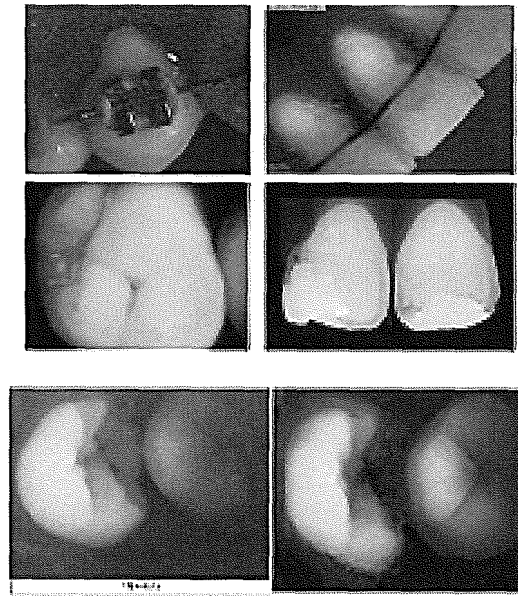


図5 微生物の活動が活発な歯垢および歯石のQLF法による明示

Tooth No	Clinical Photograph	Radiographic Image	Histological Section	QLF Image	Lesion Analysis	Analysis Values	REK Scores
41						AQ 333.3	C 1
						AF-5% 32.2	F 4
						AF-10% 34.4	H 4
						AF-15% 37.1	
						3(24.9)	
42						AQ 90.2	C 2
						AF-5% 33.3	F 2
						AF-10% 26.9	H 3
						AF-15% 29.8	
						37.7(2.9)	
43						AQ 133.3	C 4
						AF-5% 37.1	F 3
						AF-10% 41.3	H 4
						AF-15% 44.6	
						5(5.117)	
44						AQ 363.3	C 2
						AF-5% 19.1	F 2
						AF-10% 24.5	H 2
						AF-15% 29.6	
						9(3.8)	
45						AQ 223.3	C 3
						AF-5% 23.8	F 2
						AF-10% 28.6	H 3
						AF-15% 33.8	
						32.6(1.2)	

Tooth No	Clinical Photograph	Radiographic Image	Histological Section	QLF Image	Lesion Analysis	Analysis Values	REK Scores
11						AQ 110.1	C 4
						AF-5% 36.9	F 4
						AF-10% 45.1	H 4
						AF-15% 49.2	
						9(23.6)	
12						AQ 103.3	C 2
						AF-5% 32.8	F 2
						AF-10% 35.9	H 3
						AF-15% 37.8	
						3(3.04)	
13						AQ 111.1	C 2
						AF-5% 32.3	F 2
						AF-10% 31.4	H 2
						AF-15% 31.4	
						6(6.65)	
14						AQ 116.7	C 2
						AF-5% 23.7	F 2
						AF-10% 33.9	H 3
						AF-15% 35.9	
						3(3.23)	
15						AQ 113.1	C 2
						AF-5% 31.5	F 2
						AF-10% 34.4	H 3
						AF-15% 37.5	
						7(2.17)	

図4 初期う蝕の画像解析 ③

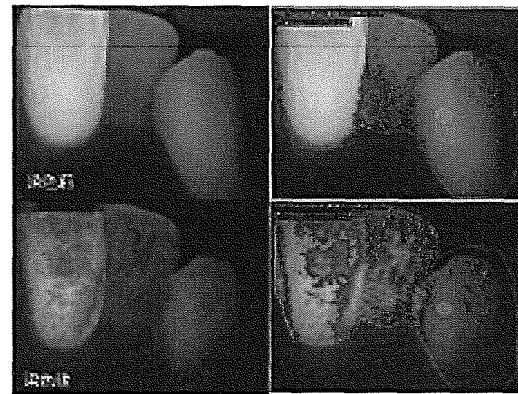


図6 歯垢の画像解析

2. 早期う蝕診断の意義

日本全体が好むと好まざるとにかかわらず変革を迫られている今、21世紀の歯科界も20世紀の歯科界からの変容が求められている。歯科医療改革が何故必要なのかの問いに対する答えは、歯科疾患の構造の変化、健康日本21の歯科保健目標の策定、健康増進法の制定、8020運動の推進、住民の健康志向の向上、歯学教育制度の変化、卒後研修制度の施行、超少子高齢化社会の到来など、歯科界の周囲で起こっているハイスピードな変化に求めることができる。

ほんの数十年前までは、萌出した歯にう蝕ができ、充填し、再充填の度に窩洞は大きくなり、ついでクラウンをかぶせ、最後には抜歯にいたるのが歯の自然史であり、歯の当然の帰結であると考えられてきた(図7)。しかし、ここ数十年の間に、とくに学童期の歯は健全歯がう蝕歯に比べ数十倍多く、ほとんどの歯が健全歯である状況になってきたのである。近代歯科医療がう蝕洪水への対応に終始してきたのに対し、その対象となるう蝕が影を潜め、現況はこれまで歯科医療が体験したことのない状況を迎えており、この状況はますます進展していくものと推察できる。

とくに、2010年における歯科保健目標を定めた「健康日本21」では、う蝕のない3歳児の割合を80%以上にする、12歳児の一人平均う蝕歯数を1本以下にするとのゴールに向け、産官学歯科医師会での取り組みがなされてきている。その中間年である2005年のデータでは、う蝕のない3歳

児の割合は68.7%、12歳児の一人平均う蝕歯数は1.9本にまで改善されてきている。これらの現状に対する評価が行われ、3歳児、12歳児のう蝕データのように、数値が得られている項目では、2010年に目標達成が可能であると推察されている。

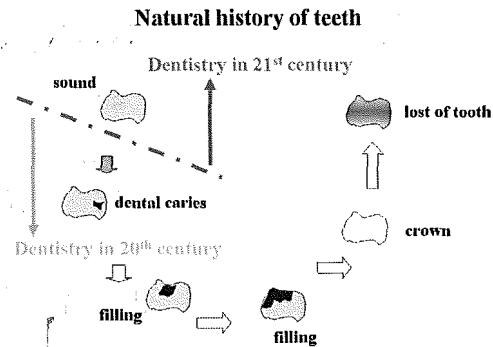


図7：歯の自然史

これらのこれまで人類が体験したことのない歯科疾患構造の変化に対して、疾患対応型の歯科医療では対応できないのは明らかである。もともと歯科医療の本来の目的が、歯科疾患の予防・健康増進であることを考えると、歯科医療が本来の目的を遂行できる状況を迎えたことになる。このことは我々歯科従事者が、十分認識する必要がある。言い換えると、この認識なくして21世紀の歯科医療は成り立たない。

世界的にも、先進工業諸国の歯科関係者、とくにう蝕学者は、一人平均う蝕歯数(DMFT)のD(未処置歯)が1本以下の状況に対し、歯(T)単位から歯面(S)単位の評価基準への移行を行ってきた。一方、歯科保存学の歯科治療の面からは、Blackの窩洞基準を見直し、新たな窩洞分類基準が提示されるようになってきている。しか

し、この基準では、単にう蝕の形態的存在部位を提示するに過ぎず、本質的には Black の基準と変わっていないといえる。

ここ数年、N. Pitts や A. Ismail を中心としたう蝕学者は、健全歯と初期う蝕（予防処置により健全歯に回復するう蝕）に焦点を当てた、う蝕評価基準の作成に取り組んできている（図 8）。I C D A S（International Caries Diagnosis and Assessment System）Ⅱが、現時点でまともまっている評価基準である。まだ科学的なエビデンスが確立されていないために、空欄が多いのが現状であるが、その項目、う蝕の活動性（進行性、停滞性、回復性）の判定やその対応は新しい考え方であり、健全歯が多いという歯科疾患構造の現状を考えると、これらの項目は健全歯の保持を目的とした予測性のあるう蝕評価をする上で必要な項目であり、研究の急速な進展が望まれる。

健全歯の増加への対応、健全歯に焦点を当てた歯科医療の構築が望まれる中、初期う蝕を科学的に評価しようとした測定機器がいくつか開発されてきている。その中で、光学的手法により、今まで視診では見えなかったものを見えるようにするというコンセプトで開発されたのが、QLF法である。QLF法は、ある波長の光を象牙質に存在する蛍光物質（図 9、10）に照射し、励起された蛍光を発する歯の画像をコンピュータに取り込み、得られたデジタル画像の解析から、初期う蝕の面積、平均蛍光強度、最大蛍光強度を求め、初期う蝕窩洞の大きさ（脱灰量；面積×平均蛍光強度の減少量）を求めようとするものであり、光学的診査

機器の中では最も定量性の高い機器である。図 1 1 に示す自然光での口腔内写真ではすべての歯が健全歯に見えるが、図 1 2 に示す Q L F 画像では無数の初期う蝕脱灰像が観察される。



図 9 象牙質の発する自家蛍光

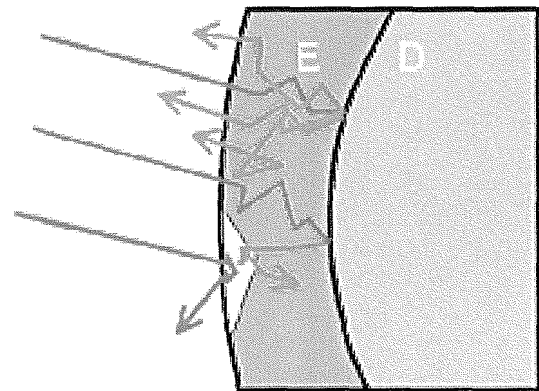


図 1 0 初期う蝕の検出原理

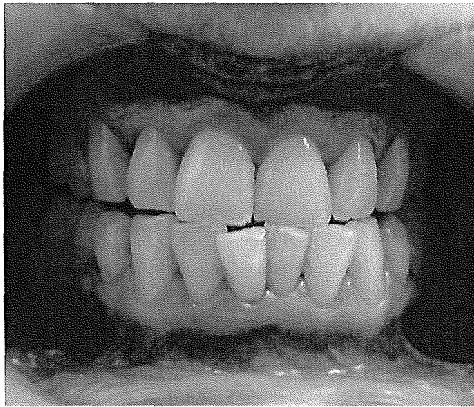
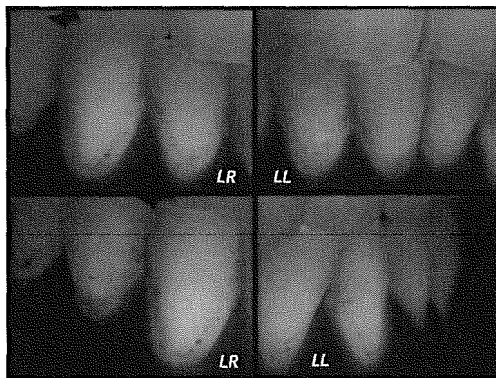


図 1 1 : 自然光での口腔内写真



Detection of incipient caries by QLF

図 1 2 : Q L F 法により撮影したデジタル画像

3. 今後の課題

サイエンスの進展により、健全歯の増加に対応した予防の技術や健康増進のための技術が確立され始めている。現在の日本の保険制度が、疾病に対する保険であるとの認識で推移する限り、予防に対応した技術の保険への導入は困難を極める。しかし、この度、厚生労働科学研究として「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」が採択されたことにより、本研究が 21 世紀の歯科医療におけるブレイクスルーとなる可能性が出てきたといえる。そのためには、産官学歯科医師会が協力して、この壁を打破すべく結束する必要がある。

QLF 法による初期う蝕や再石灰現象の観察および分析により、これまでのサイエンスで証明できなかったことがらの解明や、新たな現象の発見等が可能になってきている。それは、これまでの歯科医学が疾患であるう蝕窩洞やその治療に焦点を当てて考えてきたのに対し、歯科医学が健全歯に焦点を当てて考え出したために可能になってきたことである。これは、新しい歯科医療の構築における重要な一里塚であるが、新たな歯科医療の構築のためには、まだまだ解決すべき課題は無数に存在する。しかし、この課題の解決が、将来の歯科医療の創造につながり、真の意味での社会貢献できる歯科医療につながるものと確信している。

4. 本研究の目的、必要性及び期待される成果

本研究の目的は、実質欠損に至るまでのエナメル質内のう蝕進行状態をエナメル質内の蛍光を利用して光学的に検出できる QLF 法を用いて、病巣の微細な変化をモニタリングする定量的診断方法および適切な処置プログラムを確立し、かかりつけ歯科医システムの中で個別に健康管理するシステムを構築することである。

本研究を実施する必要性は以下の通りである。

1. 現在のう蝕予防の現状は、微生物要因を中心にう蝕罹患性を判定する方法が中心であるが、今後はホスト要因をも組み入れた積極的な予防管理が重要であること。

2. そのためには、診断においてただ単にう蝕であるかないかを診断するだけでなく、その病変の進行特にう蝕活動性に着目した評価が必要であること。

3. 診断、処置決定、管理・予後についてシステムの一段階としてのう蝕診断方法の確立が重要であり、かかりつけ歯科医システムの中で個別に健康管理するシステムの構築が重要であること。

4. 近年のフッ化物応用の普及および再石灰化の機構が明らかになるにつれ初期う蝕の捉え方がこれまでとは変化してきており、有用性の高い初期う蝕診断法の開発が急務となっていること。

5. 現行のう蝕診断においては、健全歯から実質欠損までの脱灰進行状況の把握が不十分であり、長期にわたり病巣の微細な変化をモニタリングする定量的診断方法が必要であること。

6. 歯列不正により矯正治療を行った患者のう蝕罹患の実態については十分に把握されておらず、矯正治療中の患者におけるう蝕のスクリーニング方法の開発が必要であること。

本研究の実施により期待される成果は、

明確にしようとする初期う蝕の目に見えない変化が明らかになると、個人のう蝕罹患性傾向が明らかになり、歯の実質欠損が生じた結果として現在行われているような保険診療を適用する前に、再石灰化を促進する予防処置により修復することが可能になり、歯科医療の予防歯科医療を目指した改革の手始めになる。また、個人さらには歯面ごとの脱灰・再石灰化バランスを歯質自体のデータとして把握することが可能となり、診断のみならず予防管理の一環としての診断の位置づけが明確となる。診断、処置決定、その後の管理・予後についてのシステムの一段階としてのう蝕診断方法が確立でき、かかりつけ歯科医システムの中で個別に健康管理するシステムを構築することが可能となる。

5. 各研究課題における目的

①QLF法によるエナメル質人工初期う蝕試料の脱灰および再石灰化に関する研究

in vitro でエナメル質人工表層下脱灰試料を作製する場合、試料として用いるエナメル質の性状や脱灰溶液の組成などの違いにより、得られるエナメル質表層下脱灰の程度に差が見られ、一定のエナメル質表層下脱灰試料が得られていない。また、得られたエナメル質人工表層下脱灰試料の脱灰程度の違いや再石灰化溶液の違いにより、再石灰化の過程に差が見られる。すなわち、個人の齲蝕罹患傾向に基準を設け、それぞれの基準に最適な予防処置システム構築のための基盤を確立するための基礎的情報が十分に得られていないのが現状である。

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^{1~3)}。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分析する方法である(図13)。

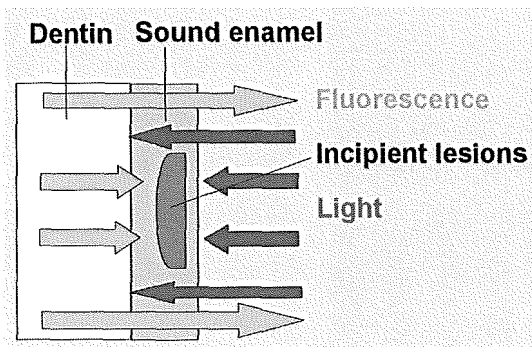


図13 QLF法の原理

初期う蝕の形態学的な観察におけるゴールド・スタンダードとしてマイクロ・ラジオグラフィ(MR)法がある⁴⁾。MR法における初期う蝕部のミネラル喪失量とQLF法における健全部と初期う蝕部の蛍光強度差には、強い相関($R=0.97$)があることが報告されている¹⁾。

本研究ではQLF法を用い、得られた鏡面研磨/非鏡面研磨エナメル質試料と、二種類の脱灰溶液を用い、得られるエナメル質人工表層下脱灰の違いについて検討を行った。さらに、QLF法を用い、エナメル質人工表層下脱灰試料の脱灰程度と再石灰化溶液におけるフッ素濃度がエナメル質人工表層下脱灰試料の再石灰化に及ぼす影響

を調べた。

②In vitroにおける各種フッ化物応用が再石灰化に及ぼす影響

現在、初期う蝕あるいはう窩形成前のう蝕は、う窩に至ったう蝕より多く発生していることが知られている^{5~7)}。脱灰によって引き起こされたエナメル質の障害が、再石灰化現象によって修復することができるという概念は、う蝕予防のマネジメントにおいてとくに重要である。

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^{8~12)}。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¹³⁾、初期う蝕表層のエナメル質性状¹⁴⁾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。

本研究では、臨床応用を目指したQLF法の応用のため、異なる脱灰の程度のエナメル質に対し、それぞれ異なる局所的フッ化物応用を試みたうえで、経時的な再石灰化過程のモニタリングを行うことにより、脱灰程度に対するフッ化物応用の至適条件を検索した。

③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¹⁵⁾。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^{16~18)}。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注目されるに至り¹²⁾、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^{1~3)}。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分析する方法である(図14、15)。



図14 QLF法による初期う蝕像



図15 QLF法の初期う蝕検出原理

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。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ンサスや、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¹⁹⁾、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か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。

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。

④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

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¹⁹⁾、とくにスタセリン²⁰⁾や高プロリンタンパク質²¹⁾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。

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。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。

⑤QLF法による歯垢検出技術の評価に関する研究

QLF法によってエナメル質表層下脱灰を非破壊的に定量的な観察が行えることは知られているが^{1~3)}、QLF法を応用した光学的診査によって、歯垢が発する蛍光をも検出できることが明らかとなってきた²²⁾。

従来行われてきた色素を用いる歯垢染色法は、染色により歯垢を顕示することは可能であるが、その定性的・定量的評価は難しいため、各種インデックスによる評価^{23、24)}や写真撮影による歯垢付着面積の評価^{25、26)}は可能であるが、撮影した画像の標準化が困難であり、さらに、一度染色を行ってしまった歯垢に対して経時的な追跡を行うことも非常に困難である^{27、28)}。

QLF法を応用した光学的診査による歯垢の検出は、歯垢が発する蛍光をデジタル画像として取り込み、画像処理を施すことによって、最大蛍光強度、平均蛍光強度、蛍光を発する面積を測定できる²²⁾。すなわち、定量的・定性的に歯垢のプロファイルを評価できる可能性がある。本研究では、人を対象に口腔内に歯垢を蓄積させ、QLF法により歯垢の経時的変化の評価を行い、その実用化の可能性を評価した。

⑥QLF法およびPCR法の応用による歯垢特性の評価

QLF法の応用により歯垢が発する蛍光を検出できることが明らかとなりつつある

22)。色素で歯垢を染色し、各種インデックスによって評価を行う場合^{29~31)}、その評価は診査者の主観によるため標準化が困難であり、さらに、得られる情報は歯垢付着面積の解析に留まっていたのが現状であった。

QLF法による歯垢の評価は、蛍光を発する歯垢を検出し、デジタル画像としてコンピュータに取り込み、画像解析ソフトウェアによる分析を施すことによって、蛍光を発する面積、平均蛍光強度、最大蛍光強度を測定できる。すなわち、定量的な歯垢の性状を詳細に評価できる可能性がある。

研究課題⑤「QLF法による歯垢検出技術の評価に関する研究」において、人を対象に口腔内に歯垢を蓄積させ、QLF法による歯垢の経時的な評価を行った。その結果、歯垢付着面積および歯垢の発する蛍光の強度がQLF法により定量的に評価できることが明らかとなり、さらに、蛍光を発する歯垢と蛍光を発しない歯垢が存在することが明らかとなった(図16、17)。

そこで、蛍光性の歯垢と非蛍光性の歯垢を採取し、polymerase chain reaction法(PCR法)による解析を施すことによって、蛍光性の違いにより歯垢の持つ病原性にどのような違いがあるのかを明らかにする目的で本研究を行った。

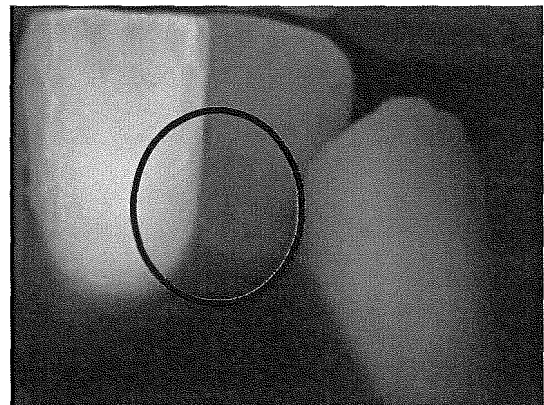


図16 蛍光を発する歯垢

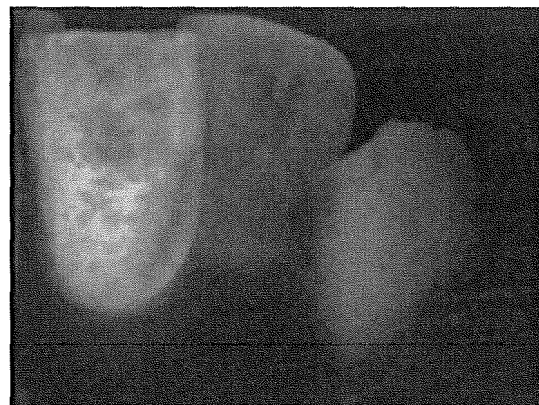


図17 色素により染色した歯垢
(全体的に歯垢が存在することがわかる)

⑦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

近年、歯面に一定の波長の可視光線を照射すると、蛍光が励起される性質を利用して、初期齲蝕や感染象牙質等の観察を行う光診査器具が開発されてきているが²⁾、この光診査器具を歯垢の観察に応用すると、歯垢の中には赤色蛍光を発するものと発さないものが存在することが明らかとなってきた³²⁾。従来、歯垢の評価は、染色剤を用いてその付着面積を診査者の視診に基づく基準で点数化する等の方法が用いら

れてきており、診査者の主観に左右されやすく、情報としても付着面積のみである場合がほとんどであった。それに対し、光診査法では、コンピュータによる画像解析を行うことで、蛍光を発する歯垢の、蛍光を発する面積、平均蛍光強度、最大蛍光強度測定できることから、定量的な評価を行うことが可能であり³³⁾、さらにはその蛍光の有無や蛍光の強度が歯垢の質的な相違を反映する可能性も指摘されている^{32, 34)}。研究課題⑥「QLF法およびPCR法の応用による歯垢特性の評価」では、蛍光を発する歯垢のなかには発さない歯垢よりも歯周病関連菌が多いことが明らかとなった。そこで、本研究では歯周疾患患者を対象に、光診査法による歯垢の観察を行い、蛍光を発する歯垢の付着部位やその蛍光強度が歯周組織状態や歯垢の菌叢とどのように関連しているかを検討することで、蛍光性歯垢の病原性を明らかにすることを目的とした。

⑧感染象牙質の除去におけるQLF法の応用

21世紀の健康科学時代において、歯科のフィールドにおける疾患の予防、さらに健康増進を目指した医療の構築のためには、予防歯科診療に必要なArts(技術)の開発が不可欠である。近年の多くの疫学的調査において、う蝕の総修復数に占める再修復数の割合が高いことが報告されている^{35~38)}。う蝕の修復治療において感染象牙質の除去が不十分であった場合、う蝕の再発を招く原因のひとつとなるため、感染象牙質の有無の診断は再発予防を考慮した修復治療における重要なポイントとなる。

いまだ口腔内における二大疾患のひとつ

であり続けているう蝕において、ミニマル・インターベンション^{39, 40)}の考え方が膾炙してきているとはいうものの、除去が必要な感染象牙質から健全な歯質にいたる段階、すなわち象牙質における微生物感染の診断は、視診による色調の変化や触診による象牙質の硬さ⁴¹⁾、う蝕検知液による染色^{42, 43)}などが指標となるが、これらの主観的診断は標準化が困難である⁴⁴⁾。

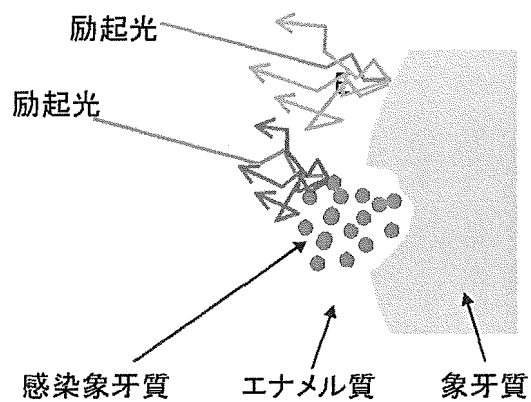


図18 QLF法により感染象牙質を検出する原理

エナメル質の表層下脱灰を、歯の持つ自家蛍光を応用した可視光励起蛍光定量法(QLF法)^{1~4, 22, 45, 46)}によって非破壊的な定量的観察が可能であることは知られているが、QLF法により感染象牙質が発する蛍光も検出できることが明らかとなってきている(図18)^{47, 48)}。QLF法による診査は対象物が発する蛍光をデジタル画像としてコンピュータに取り込み画像解析を施すもので、定量的に感染象牙質の性状を詳細に評価できる可能性がある。本研究ではヒトを対象に感染象牙質の除去を行う際に段階的なQLF法による評価を行い、感染象牙質の除去に対するQLF法

の応用の可能性について検討した。

⑨義歯装着患者に対するQLF法の応用

高齢化社会を迎えている我が国においては、高齢者の増加とともに有床義歯補綴の需要が高まりつつあるのが現状である。義歯の不調和が引き起こす影響は、口腔内だけにとどまらず、心身に深く関わっていることが指摘されているが、義歯や支台歯に付着する歯石や歯垢の定量的指標はあまりみられないのが現状である。

エナメル質の表層化脱灰を、歯の持つ自家蛍光を応用した可視光励起蛍光定量法（QLF法）^{1~4)}によって非破壊的な定量的観察が可能であることは知られているが、近年、歯垢の検出や感染象牙質の除去や修復物の評価についてもQLF法の応用が試みられつつあり、多様な分野へのQLF法の応用が期待されている。そこで我々は、QLF法による歯垢や歯石の量的評価の可能性を検索することを目的に研究を行った。

⑩画像解析を応用した初期歯肉炎診査

本事業において、う蝕の初期脱灰病変を客観的に診査するため、QLF法、すなわち、ある特定条件下で歯の初期脱灰病変部位をデジタル画像で取得し、その画像を解析して得られた定量値による客観的評価方法の検討を行ってきた。

この診査方法や考え方の歯肉への応用、すなわち、歯肉をデジタル画像で取得し、その画像を解析して得られた定量値により初期歯肉の状態を把握する診査方法の確立を試み、二種類の測定機器で撮影した歯肉のデジタル画像を各々の解析方法で分析し、得られた定量値により、初期の炎症性歯肉

の経日的変化を客観的に観察し、初期歯肉炎のinvisibleな変化を解析することを目的に本研究を行った。

⑪口腔内蛍光測定用のプローブ開発

口腔内疾患のう蝕などの早期発見に利用が試みられているQLF法の新規な発展を探る目的で、極めて初期のう蝕等の発見の可能性に結びつくプローブの開発を研究目的とする。QLF法で歯を観察すると健康な歯のエナメル質からはほぼ均一な黄緑色蛍光（青色励起）を発光する。う蝕などでエナメル質に欠損を生ずると蛍光強度が低下する。この方法を拡張してさらに極く初期疾患状態の歯の部分に吸着し歯からの蛍光発光を阻害するプローブ粒子の開発を試みる。

⑫歯列不正と齶蝕との関連評価、臨床試験

一般に歯列不正部位や不正咬合部位は、自浄作用や口腔清掃の効率が低下しやすいことから、歯垢や歯石が堆積し、う蝕や歯周疾患に罹患しやすいと考えられている^{49~69)}。しかしながら、歯列不正や不正咬合と歯垢・歯石の付着およびう蝕との相関について、初期う蝕や歯周病関連菌まで含めた科学的根拠は、いまだ十分とはいえない。

近年、エナメル質表層下脱灰を生体に対して非侵襲的に定量観察できる可視光励起蛍光定量法が開発^{1~4, 70)}・検証され^{33, 46, 71~82)}、初期う蝕の検出や再石灰化の経時的観察などに応用されている^{83~92)}。さらにこのQLF法を応用した光学診査により、歯垢や歯石が発する自家蛍光も検出できることが明らかになっている^{22, 32)}。

本研究で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齲蝕状態との関連性を明らかにすることを目的に、主にQLF法を用いて検討を行った。

B. 研究方法

①QLF法によるエナメル質人工初期う蝕試料の脱灰および再石灰化に関する研究

a) エナメル質試料

鏡面研磨エナメル質試料（以下鏡面試料と略）については、着色や白斑のないヒト抜去上顎中切歯から、ダイヤモンドドリルを用い、流水下で直径4 mmのエナメル質ディスクを取り出した。ディスクの表面は、耐水ペーパー（# 600 および# 1,000）およびゲル状研磨剤（gamma alumina, 0.05 μ m）で90分間鏡面研磨した後、15分間超音波洗浄し、鏡面試料を作製し、脱灰させる部位以外を透明マニキュアで被覆した。非鏡面研磨エナメル質試料（以下非鏡面試料と略）については、着色や白斑のないヒト抜去上下顎第一小臼歯を、JETポリッシャーおよびロビンソンブラシにより歯面清掃して作製し、脱灰させる部位以外を透明マニキュアで被覆した。

b) 脱灰溶液および脱灰試料の作製

鏡面／非鏡面試料をA液（CaCl₂; 3 mM、KH₂PO₄; 10 mM、NaCl; 100 mM、乳酸; 100 mM、pH 4.5）、B液（50 %飽和ハイドロキシアパタイト、0.2 %水溶性レジン、乳酸; 50 mM、pH 5.0）それぞれの脱灰溶液に対し、3、6、12、24、48、72 時間浸漬したのち、蒸留水で洗浄し、脱灰試料

を作製した（図19）。

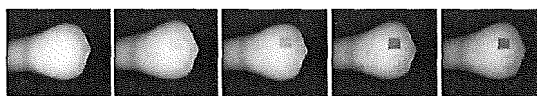


図19 エナメル質試料の表層下脱灰に伴うQLFで得られる画像の経時的変化

c) 表層下脱灰エナメル質の測定

表層下脱灰程度の測定は、QLF法により行った。システムとしてのQLFはInspekter Research Systems社製（オランダ）を使用した。健全エナメル質に対し95%以下の蛍光を発する部分を表層下脱灰とする条件で、平均蛍光強度（ ΔF ）の減少程度の解析を行った。

d) 表層下脱灰エナメル質の再石灰化測定

鏡面試料を脱灰溶液A液に任意の時間浸漬した。得られた初期う蝕試料をQLF法にて観察し、低脱灰初期う蝕試料群（低脱灰群）と高脱灰初期う蝕試料群（高脱灰群）に分けた。

初期う蝕試料はフッ素の入っていない（以下0 ppm Fとする）再石灰化溶液と2種類の異なるフッ素濃度（0.1 ppm F, 1 ppm F）の再石灰化溶液（100 mM：塩化ナトリウム, 5 mM：リン酸一カリウム, 1.5 mM：塩化カルシウム, 20 ppm：カゼイン, 0.2%：アジ化ナトリウム, フッ化ナトリウム, pH: 6.5）に浸漬し、3日ごとに15日間QLF法による観察を行った。

e) QLF法

QLF法は光をエナメル質に照射し、励起される蛍光をCCDカメラを介しコンピュータに取り込み画像解析を行うシステム

である。健全なエナメル質では、歯の内部から発せられる蛍光がエナメル小柱を通り外部に達するため歯の表面に蛍光が観察できる。表層下脱灰のあるエナメル質においては、蛍光が表層下脱灰部で乱反射を起こし、外部に達する蛍光が減少する。その結果、表層下脱灰部は暗く見える（図20）。

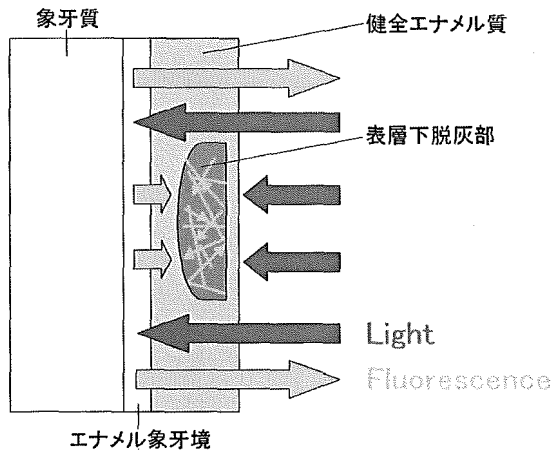


図20 表層下脱灰部を検知する仕組み
観察される蛍光量の減少程度と、エナメル質表層下脱灰部のミネラル減少度の間には相関関係が示されており¹⁾、蛍光量の減少度によりエナメル質表層下脱灰部の状態を定量化することができる。

QLF法による初期う蝕脱灰程度の評価には、 ΔF (%) (健全部に対する初期う蝕病変部の平均蛍光強度減少率)²⁾、Area (mm²) (検出した初期う蝕病変部の面積)²⁾、 ΔQ (ΔF をAreaに乗じたもので初期う蝕病変部全体の蛍光減少量を示す)⁹⁾³⁾という3つの指標が用いられている。表層下脱灰部の蛍光量を平均した値である ΔF は、脱灰部位を評価する際の指標として用いられる。

②In vitroにおける各種フッ化物応用が再石灰化に及ぼす影響

a) 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 μ m) にて90分間、鏡面研磨を行いエナメル質試料とした。

b) 初期う蝕試料の作製

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, ハイドロキシアパタイト: 3 g/l, carboxymethyl cellulose: 0.2 g, pH: 5.0) に37°Cで12から96時間の浸漬を行い、脱灰程度の異なる試料を作製した。作製した初期う蝕試料はアセトンによりネイルバーニッシュを除去した (図21)。



図21 初期う蝕試料 (左から処理前、 ΔF -8%、-16%、-24%、-32%)

c) 初期う蝕試料の再石灰化

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, pH: 7.0) に37°Cにて合計28日間浸漬した。再石灰化溶液は5日ごとに新たに調製し交換した。

d) フッ化物の応用

以下の四種類のフッ化物を初期う蝕試料に応用した。

- I) コントロール群：初期う蝕試料を継続的に再石灰化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 / 14 ml, 950 ppm F）に初期う蝕試料を5分間浸漬した。
- III) APF群：実験開始前、および実験開始後14日目にAPFゲル（9000 ppm F）を初期う蝕試料に5分間作用させた。
- IV) フッ化物配合歯磨剤+APF群：IIおよびIII両方の処理を行った。

e) QLF法による脱灰および再石灰化程度の評価

Inspektor Pro 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および再石灰化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⁹⁴⁾。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ΔF値を用い解析を行った。再石灰化程度の評価は、3、6、9、12、15、21、28日目に行った。

③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

a) 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。

b) 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, ハイドロキシアパタイト：3 g/l, carboxymethyl cellulose：0.2 g, pH：5.0）に37℃で96時間の浸漬を行った。

c) 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^{95~97)}。

d) 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。