

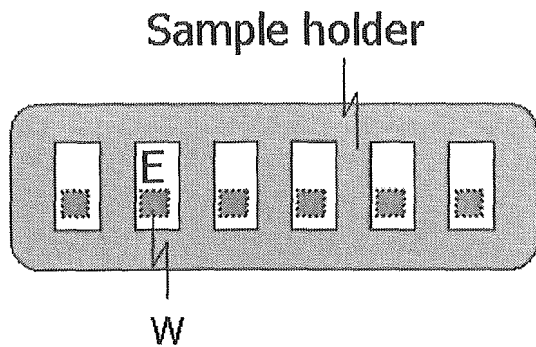
To standardize QLF™ measurements, we employed the following setup.

1. The enamel surface was coated with a clear nail varnish (top coat) except for reaction window of about 4 x 4 mm (Fig. 2a).
2. The samples were dried in the air for 15 min before measurement.
3. QLF™ image capturing was conducted in a dark

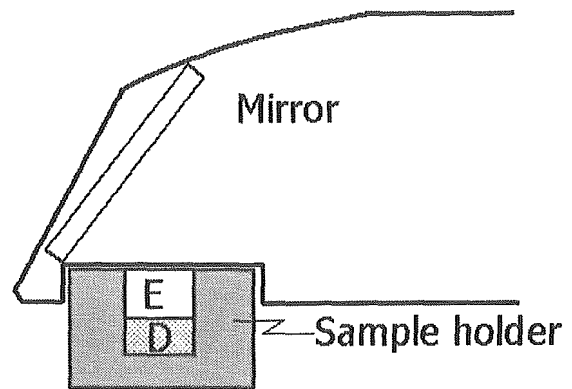
room.

4. The samples were embedded in a self-cured resin of which outline fits to the window of the QLF™ hand piece so that focus (distance between enamel surface and inner mirror plane) can always be constant (Fig. 2b).

Fig. 3 shows a typical QLF™ image taken just after initial demineralization.



a.



b.

Fig. 2. Enamel samples (E) with reaction window (W) embedded in a PMMA sample holder (a) and standardized sample position in the QLF™ hand piece for image capturing (b; E = enamel, D = dentin).

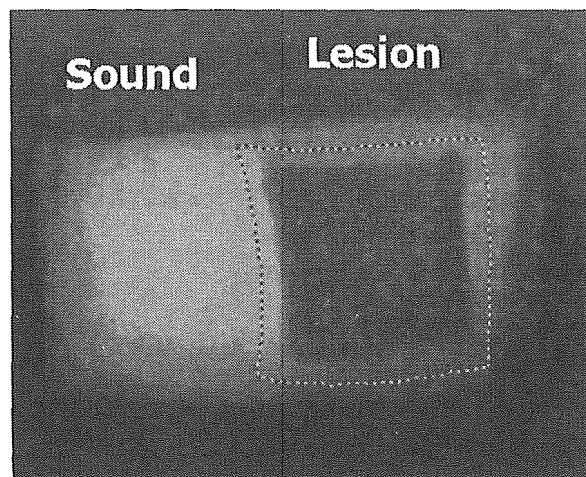


Fig.3. Typical QLF image after demineralization.

Results

The ΔF value in the group D ($-15.5 \pm 7.2\%$) was greater by 29% than that of the group C ($-21.8 \pm 8.6\%$; $p=0.099$ by unpaired t-test) and significantly greater ($p<0.01$ by Tukey-Kramer multiple comparisons test)

by about 50% compared to the groups A ($-31.4 \pm 8.0\%$) and B ($-31.1 \pm 4.0\%$). The ΔF values in this study significantly correlated ($r=0.980$; $p<0.01$) with the mineral loss values (ΔZ , $\text{vol}\% \cdot \mu\text{m}$) in enamel received the same treatments (Fig. 4).

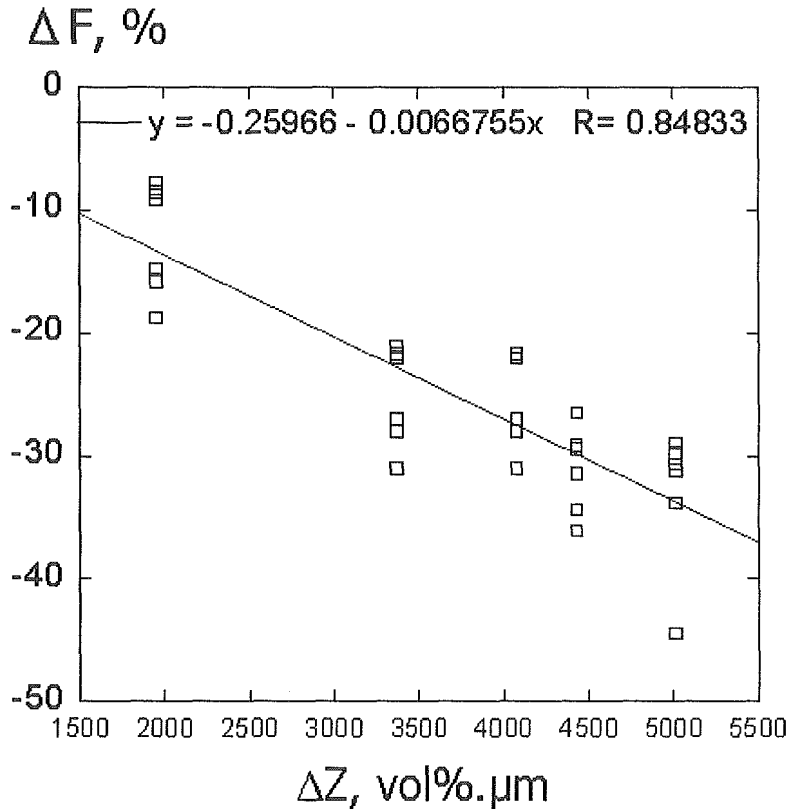


Fig. 4. Correlation between the ΔF and ΔZ values ($r=0.85$; $p<0.01$).

Discussion

It is known that starches from various sources contain ester phosphorus, and that phosphoryl groups bind covalently to a potato starch molecules in which one in 200-500 glucosyl residues are phosphorylated on the average. Preparation of phosphoryl-oligosaccharides (POs) from potato starch hydrolysates has been established previously⁽²⁾. In brief, POs can be extracted as indigestible components after amylolytic treatment because the activity of the amylolytic enzymes is covered by phosphoryl groups linking to the glucosyl residues. It

was found recently that POs remarkably solubilize calcium^(3,4).

In addition to these advantageous features, our previous studies demonstrated a unique function of the substance that the presence of relatively low contents of POs (0.07-0.2%) in the mineral solutions enhanced remineralization of enamel significantly without fluoride and, furthermore, the effects of POs on remineralization exceeded that of low fluoride ions (2 ppm as NaF) in the solution^(6, 7, 10, 11). It was also interestingly found that the beneficial effects of

POs on enamel remineralization were inversely correlated with logarithmic values of POs concentrations⁽¹⁰⁾. The optimum concentration of POs seemed to be in the order of 0.05-0.1% for remineralization of early caries lesions in enamel.

Although available information about the role of POs in caries process is limited at present, the enhanced remineralization of enamel lesions by POs could be explained as following so far. The pH of the mineral solution was adjusted to 7 in this study. This pH is suitable for remineralization, but is not preferable for Ca and phosphate to be ionized⁽²⁾. In fact, the mineral solution itself had no substantial effects on remineralization in this study despite the solution contained enough amounts of Ca and phosphate. Therefore, it was implied from our previous studies^(10, 11) that small amounts of POs as low as 0.1% in the mineral solution could maintain solubility of mineral ions even at pH 7 and, therefore, contributed for soluble Ca to recrystallize onto the residual hydroxyapatite crystals in enamel lesions. Hence, POs-Ca may play an important role in caries prevention as an ingredient to regulate mineral solubility in the oral environment (saliva and/or dental plaque).

In this study, the ΔF value in the group D (mineral solution containing 0.1% POs-Ca and 2-ppm) was greater by 29% than that of the group C (mineral solution containing 0.1% POs-Ca) and significantly higher by about 50% compared to the group B (mineral solution containing 2-ppm F⁻ as NaF). Thus, combination of POs-Ca and fluoride showed advanced effects on enamel remineralization and, therefore, POs-Ca may applicable to dental fluoride products as well as to functional foods such as a dental chewing gum.

Conclusions

In conclusion, it was suggested that the QLFTM and TMR parameter values corresponded obviously and that POs-Ca may influence the potential of fluoride enhancing remineralization.

Acknowledgement

The author is grateful to Dr. K. Minami and Dr. K. Tamura at the Department of Preventive Dentistry, Iwate Medical University for their assistance in sample preparation.

References

1. <http://www.ffrg.org/>
<http://www.mhlw.go.jp/wp/kenkyu/gaiyo04/02-29.html>
2. Kamasaka H, Uchida M, Kusaka K, Yamamoto K, Yoshikawa K, Okada S, Ichikawa, T.: Inhibitory effect of phosphorylated oligosaccharides prepared from potato starch on the formation of calcium phosphate, *Biosci Biotech Biochem* 1995; 59: 1412-1416.
3. Kamasaka H, To-o K, Kusaka K, Kuriki T, Kometani T, Okada S: Effect of phosphoryl oligosaccharides on iron solubility under neutral conditions, *Biosci Biotech Biochem* 1997b; 61: 1209-1210.
4. Kamasaka, H., Imai, S., Nishimura, T., Kuriki, T., Nishizawa, T.: Effects of phosphoryl oligosaccharides from potato starch on acid production by mutans streptococci, *J. Dent. Hlth.*, 52: 66-71, 2002. [in Japanese]
5. Kamasaka H, To-o K, Kusaka K, Kuriki T, Kometani T, Hayashi H, Okada S: The structures of phosphoryl oligosaccharides prepared from potato starch, *Biosci Biotech Biochem* 1997a; 61: 238-244.
6. Kamasaka H, Inaba D, Minami K, Nishimura T, Kuriki R, Imai S, Yonemitsu M: Remineralization

- of enamel by phosphoryl-oligosaccharides (POs) supplied by a chewing gum; Part I. Salivary assessment in vitro, *J. Dent. Hlth.*, 52: 105-111, 2002.
7. Inaba D, Kamasaka H, Minami K, Nishimura T, Kuriki R, Imai S, Yonemitsu M: Remineralization of enamel by phosphoryl-oligosaccharides (POs) supplied by a chewing gum; Part II. Intraoral evaluation, *J. Dent. Hlth.*, 52: 112-118, 2002.
8. Inaba D, Takagi O, Arends J: A computer-assisted videodensitometric method to visualize mineral distributions in in vitro and in vivo formed root caries lesions. *Eur J Oral Sci* 1997; 105: 74-84.
9. Inaba D, Tanaka R, Takagi O, Yonemitsu M, Arends J: Computerized measurements of microradiographic mineral parameters of de- and remineralized dental hard tissues. *J Dent Hlth* 1997; 47: 67-74.
10. Inaba D, Minami K, Kamasaka H, Yonemitsu M: Remineralization of enamel and dentin by a chewing gum containing phosphoryl-Oligosaccharide calcium(POs-Ca) in situ. *Dent. Soc. Iwate Med. Univ.* 27, 203-209, 2002.
11. Inaba D, Minami K, Kamasaka H, Yonemitsu M: Effect of Phosphoryl-Oligosaccharides(POs) on Remineralization of Enamel Lesions in vitro. *Dent. Soc. Iwate Med. Univ.* 27, 197-202, 2002.

Induction of White Spot Enamel Lesion by *S. mutans* Biofilm in an Artificial Mouth System and Quantification by QLF

Khairul Matin^{1,2}, Shamim Sultana¹, Masahiro Ono¹, Ayako Okada¹, Mariko Gyo¹,
Leila Daneshmehr¹, Atia Anjum¹, Junji Tagami^{1,2}

1 Cariology and Operative Dentistry, Department of Restorative Sciences

2 COE program for Frontier Research on Molecular Destruction and Reconstruction of Tooth and Bone, Tokyo Medical and Dental University, Tokyo

corresponding author: Khairul Matin, Research Associate Professor (Junior), Cariology and Operative Dentistry, Tokyo Medical and Dental University, 1-5-45 Yushima, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8549, Japan.

Tel: 81-(0)3-5803-5483, Fax: 81-(0)3-5803-0195. E-mail: matin.ope@tmd.ac.jp

Key words: White Spot Enamel Lesion (WSEL), biofilm, *S. mutans*, QLF, nano-indentation.

Abstract

Objective: Aspects of an Artificial Mouth System (AMS) to model the caries process in bovine enamel biofilm induced white spot enamel lesions (WSEL) were analyzed. **Methods:** Square shaped and polished bovine enamel slabs were covered with modeling wax and 2.5 mm diameter window was prepared to expose enamel surface at the center of each slab. Artificial biofilms were grown inside an AMS on the slabs using freshly cultured *S. mutans* (MT8148) suspended in phosphate buffered saline (PBS), heart infusion (HI) with 1% sucrose and PBS for 20, 30 and 40 hrs at 37°C. The severity of demineralization was quantified by Quantitative Light-induced Fluorescence (QLF, Inspektor, Netherlands), nano-mechanical property changes were studied by a Nanoindenter (ENT-1100, Elionix, Japan), fine-structural changes were observed by SEM after argon ion-etching. All experiments were repeated three times (n=5 for each group). **Results:** A circular WSEL could clearly be detected at the center of each slab by naked eyes, which was prominent after dehydration by mild air drying. QLF data showed

that severity of demineralization occurred with the increase of time interval, after 40 hours both ΔF (23+/-2.9) and ΔQ (148.75+/-26.78) were significantly more compared to ΔF (10.14+/-2.3) and ΔQ (47.63+/-30.67) of 20 hours. Hardness measured by nanoindenter at the center of all lesions was significantly reduced from unaffected enamel, 40-hr sample showed about 95% reductions. Perpendicularly trimmed surface topography after argon ion-etching by SEM clearly visualized depth of demineralized WSEL, widened inter-enamel prism channels, dislodgement of prism crystals and perforated prism structure at outer most layers. **Conclusion:** An advanced in vitro model of biofilm induced WSEL was developed that showed promises to be useful in studying enamel demineralization.

Introduction

When the pH of the oral cavity drops below 5.5, the hydroxyapatite crystalline lattice is damaged and the tooth surface becomes rough¹. Enamel demineralization and white lesions occur during and

sometimes remain after orthodontic treatment². Therefore, either due to some altered environmental factors in the oral cavity or as an adverse effect of some dental treatment primarily occurred damages to the enamel structure are described to be as white spot enamel lesions (WSEL); appear as white spots on tooth surface clinically. However, there is contradiction in defining WSEL and a standard classification for non-invasive treatment or restoration and prevention is yet to be established.

In the late 19th century Magitot³, Miller⁴, proposed the concept of artificial mouth systems. The complexity of oral environment, and the ethical problems associated with *in vivo* studies of oral diseases such as caries and periodontal diseases in humans have inevitably led to the development of laboratory models, which simulate the oral environment *in vitro*. These model systems are given the epithet 'artificial mouth' (AM). During such experimental procedures, real-time growth and development of dental plaque/biofilm can be observed with various microscopic tools or analyzed using microbiological, biochemical and molecular methods. A prospective WSEL model similar to that of clinically diagnosed one for multi purpose use including studying demineralization and remineralization in tooth surface needs to be introduced.

Therefore, in an aim to investigate aspects of an Artificial Mouth System (AMS) to model the caries process in bovine enamel biofilm induced WSEL were analyzed.

Material and Methods

Approximately 4×4×2 mm³ sized forty eight bovine enamel blocks were used in this study. Enamel surfaces were flattened and polished with 800, 1200, 1500 silicon carbide papers. Each enamel block surface was covered with 1.4 mm thick paraffin

wax before making a 2.5 mm diameter whole at the center of the wax.

The enamel blocks were placed on a Teflon holder around a flat bulb pH electrode of the AMS by using red utility wax and keeping the surface of the slabs horizontal to the bulb surface. The Teflon holder bearing the slabs was set through the bottom opening of the chamber by a silicon plug. Pooled sterile saliva was then poured on the slabs and the electrode from above and incubated for 30 min in order to obtain a coat of salivary pellicle.

The chamber encircled by water jacket was sealed with another silicon plug fitted with five stainless steel tubes (21 gauge). As a result, the chamber itself served as an incubator with a 37 °C inner temperature. The other end of the five stainless steel tubes were connected with five silicon tubes passing through a PC operated pump and one of them was used to collect *S. mutans* suspensions, two to collect HI and the remaining two to collect PBS from the prepared stock. All liquids were pumped into the chambers for 40 hours at 6 ml per hour per tube so that they can continually drop onto the center of the specimen holder. All liquids form water domes and are mixed by the force of gravity exerted from the falling liquid drops on the holder and which become diffusely distributed over all of the specimens. When the liquid domes reach their maximum height the mixture of excess liquid falls off from the edges of the holders. Both of the chambers were simultaneously operated and the pH on the flat bulb electrode was recorded continuously. After 20, 30 and 40 hours each block with artificial biofilms were washed with PBS. After removal of biofilms the wax was removed with knife and finally washed three times with PBS and wiped to dry the surface. Then the specimens were visually examined and digital pictures were taken.

The severity of demineralization was quantified by QLF using the InspektorTM Pro software version 2.0.0.30 (Inspektor Dental Care BV, Amsterdam, The

Netherlands)⁵. QLF images and white-light digital photographs of each enamel block were taken at a fixed position in relation to the mounted camera. The part of the enamel surrounding the WSEL that remained intact considered as control region. Thereafter, during measuring the WSEL, part of the control region was included with demineralized region and data were recorded from ΔF and ΔQ values. ΔQ value was recorded at the 5% threshold⁶.

Nano-hardness was measured by nanoindenter (ENT-1100, Elionix Co. Japan) both on WSEL region and unaffected control region.

In order to examine the fine structural changes of WSEL, the specimens were embedded in a self-curing epoxy resin (Epon 815, Nissin EM, Tokyo, Japan). They were subsequently trimmed to expose the mid-longitudinal cut surfaces, which then polished with silicon carbide papers under running water and further polished to high gloss with abrasive discs and diamond pastes of decreasing abrasiveness, down to 0.25 μm . The specimens were cleaned ultrasonically at each step. Polished specimens were subjected to argon ion beam etching (EIS-1E, ELIONIX, Tokyo, Japan) for 5 min 0.20 mA 1kv to disclose the decomposed enamel structures,

gold-sputter coated and inspected by SEM.

Results

The pH beneath the biofilms remained less than 5.5 from about 10 hours until the end of the experiment at 40 hours (Fig. 1). A circular WSEL could clearly be detected at the center of each slab by naked eyes, which was prominent after dehydration by mild air drying (Fig. 2a & 2b). QLF data showed that severity of demineralization occurred with the increase of time interval, after 40 hours both ΔF (23 \pm 2.9) and ΔQ (148.75 \pm 26.78) were significantly more compared to ΔF (10.14 \pm 2.3) and ΔQ (47.63 \pm 30.67) of 20 hours (Fig. 3). Hardness measured by nanoindenter at the center of all lesions was significantly reduced compared to unaffected enamel, 40-hr sample showed about 98% reductions (Fig. 4). Perpendicularly trimmed surface topography after argon ion-etching by SEM clearly visualized depth of demineralized WSEL, widened inter-enamel prism channels, dislodgement of prism crystals and perforated prism structure at outer most layers (Fig. 5).

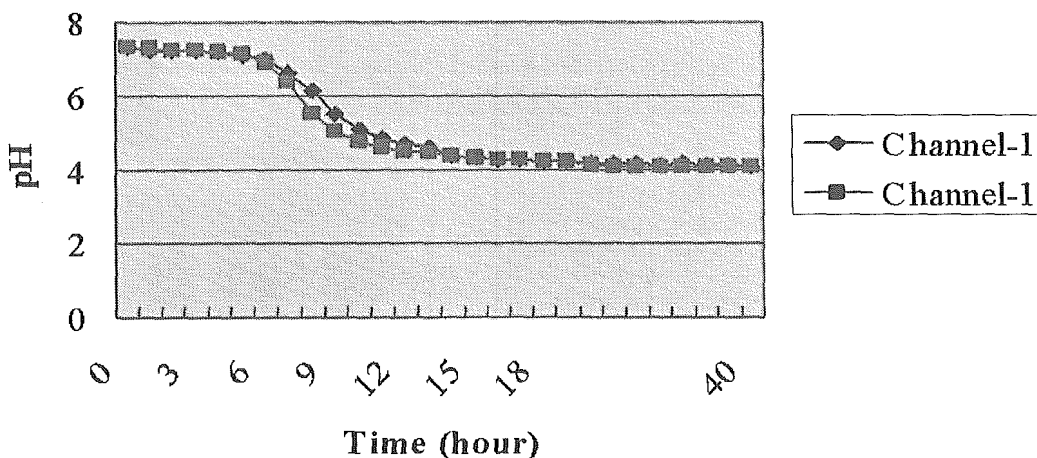


Figure 1: Fall of pH beneath the biofilms that induced WSEL on bovine enamel blocks.

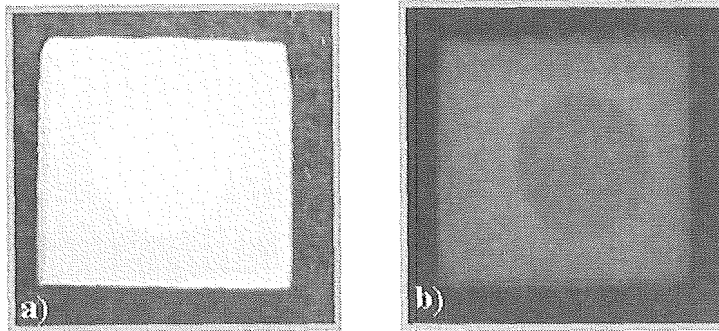


Figure 2: a) Digital photograph and b) QLF video frame of a biofilm induced WSEL.

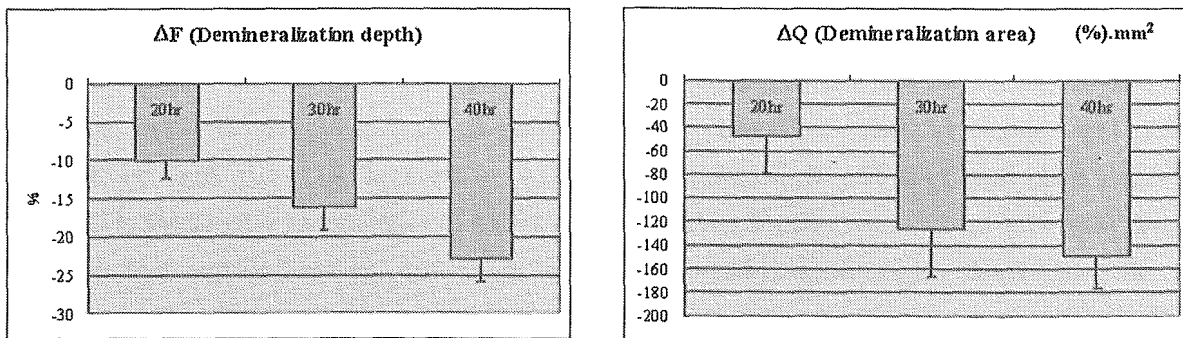


Figure 3: Graphs shows Quantitative light-induced fluorescence (QLF) data. Both ΔF and ΔQ with increment of time.

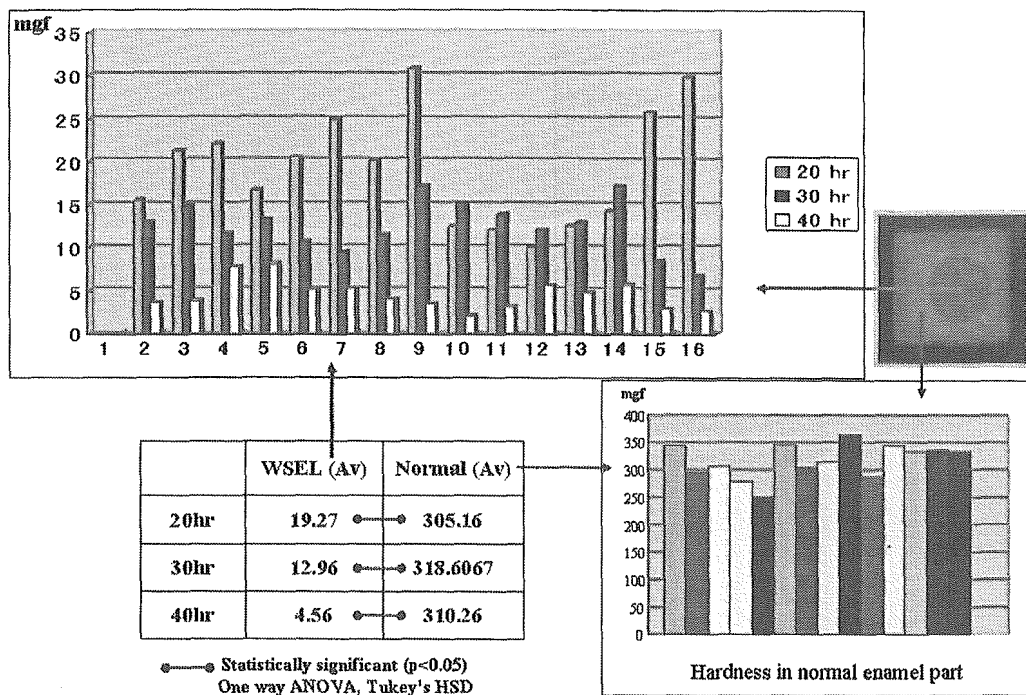


Figure 4: Hardness at the Center of the Lesion (by Nanoindentor) and surrounding unaffected enamel. Nano-hardness was significantly reduced with the increment of time.

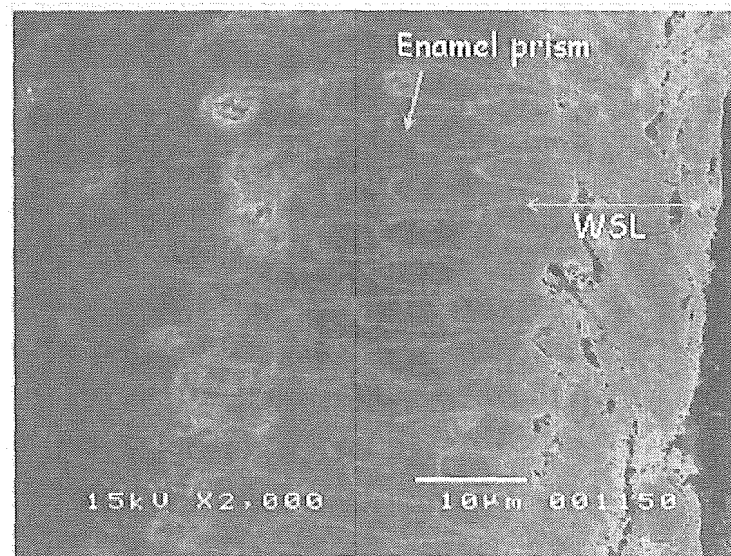


Figure 5: SEM view of a WSEL longitudinal section on bovine enamel induced by *S. mutans* in AMS. White spot enamel lesion and well defined enamel prisms are visible.

Discussion

The present study, perhaps the first ever of this type, demonstrated induction of WSEL by biofilms grown in an AMS. The AMS used in this study to grow *S. mutans* biofilms is similar in principle to other biofilm reactors used previously for *in vitro* experiments. It is equipped with two chambers with a warm water jacket to maintain constant interior temperatures and also with a N₂ (80%), H₂ (10%) and CO₂ (10%) gas delivery unit to grow biofilms under anaerobic conditions. In addition, inside the chambers the liquid dome keeps the biofilm from direct contact with available O₂. The reactor facilitates the continual monitoring of pH changes beneath the biofilm and in this study the reduction in pH was similar in all experiments; the pH began to fall from 7.35 within two hours and was reduced to below 4.0 by 20 hours.

The teeth illuminator from an arc lamp using liquid light guide with a peak intensity of 370 nm was used. A yellow high pass filter (520 nm) is placed in front of a CCD microcamera which captures the tooth image. A live image of each enamel block under

examination is displayed on a PC screen and when a quality image was visualized the operator captured that to save as video frame. The proprietary analysis software detects the darker areas of the image (video frame) and simulates the fluorescence radiance of sound enamel at the lesion site via a reconstruction algorithm. This is performed by a two dimensional linear interpolation of sound enamel values adjacent to the lesion. The absolute decrease in fluorescence and is expressed in the value ΔF (depth of the lesion). The program also calculates the area of lesion, in mm² and from this can calculate ΔQ^7 .

The rate of demineralization occurred with the increase of time intervals. Hardness measured by nanoindenter at the center of all lesions was significantly reduced from unaffected enamel, 40-hr sample showed about 98% reductions. Thereby, a correlation between QLF data and nano-hardness data was clear in this study.

The SEM topography of perpendicularly trimmed surface clearly visualized the depth of demineralized WSEL, widened inter-enamel prism channels,

dislodgement of prism crystallites. From these findings an idea on the process of gradual enamel structural damage was clearly understood.

Biofilm induced WSEL surrounded by unaffected enamel showed uniformity which is important for quantification by QLF. The thickness of the paraffin wax allowed biofilms to retain inside the window without disturbance, so uniform demineralization can continue.

Conclusion

An advanced in vitro model of biofilm induced WSEL was developed that showed promises to be useful in studying enamel demineralization employing QLF, nano-indenter and SEM.

References

1. Serra R, Otis LJ. Quantifying enamel luster, *J Clin Dent*. 2004;15 (3):83-7.
2. Willmot DR. White lesions after orthodontic treatment: does low fluoride make a difference? *J Orthod*. 2004 Sep;31 (3):235-42; discussion 202.
3. Magitot E. Treatise on dental caries (Trans by Chandler TH). Boston:Osgood;1878.
4. Miller WD. The microorganisms of the human mouth. Philadelphia: white Dental MFG; 1890.
5. Pretty IA, Hall AF, Smith PW, Edgar WM, Higham SM. The intra-and inter-examiner reliability of quantitative light-induced fluorescence (QLF) analyses.
6. Pretty IA, Pender N, Edgar WM, Higham SM. The in vitro detection of early enamel de- and re-mineralization adjacent to bonded orthodontic cleats using quantitative light-induced fluorescence. *Eur J Orthod* 2003 Jun;25(3):217-23.
7. Hintze H, Wenzel A, Danielsen B, Nyvad B. Reliability of visual examination, fibre-optic transillumination, bite-wing radiography, and reproducibility of direct visual examination following tooth separation for the identification of cavitated carious lesions in contracting approximal surfaces. *Caries Res* 1998;32 (3):204-9.

エナメル質初期齲蝕の再石灰化に及ぼす Nd:YAG レーザー及び酸性フッ素リン酸溶液の影響

何 陽介、本川 渉、宮崎光治*

福岡歯科大学成長発達歯学講座成育小児歯科学分野

* 福岡歯科大学歯科医療工学講座生体工学分野

緒言

近年の小児歯科の日常臨床において、重篤な齲蝕は減少傾向にあるものの¹⁾、エナメル質初期齲蝕病変である white spot を目にする機会はいまだ多い (Fig. 1)。また、white spot は初期う蝕からさまざまに病態を変化させるため、その対応に苦慮することが多い。そこで、我々は white spot の再石灰化に対するフッ素塗布およびレーザー照射の影響を検討するため、ヒト抜去歯牙に人工的に white spot を作製し、フッ素塗布および Nd:YAG レーザー照射を行ったのち、石灰化溶液に浸漬し、QLF 装置^{2,5)} (定量的光誘導蛍光装置) を用いて ΔF 、 ΔA および ΔQ の変化を経時的に測定し、若干の知見を得たので報告する。

材料及び方法

1. 表層下脱灰試験体の調製

臨床的理由により抜去され、生理食塩水中に保存されていたヒトの大白歯と小白歯の中から舌側および頬側面に白濁、亀裂、齲蝕のないものを選び、ロビンソンブラシで歯石、色素、沈着物を除去し、さらに #600~1500 の耐水研磨紙を用いて研磨したのち、マニキュアを用いて 3~4 mm 角の窓を形成した。そして、この歯牙を 0.1 M 乳酸緩衝溶液 (pH: 4.5, Ca: 3.0 mM, P: 1.8 mM, CMC: 1%, Thymol: 0.01%) 20 ml 中に浸漬し、37°C の恒温槽内で 72 時間脱灰を行った⁶⁾。脱灰後、アセトンを用いてマニキュアを溶解、除去し表層下脱灰試験体とした (Fig. 2, 3)。なお、実験中は、相対湿度 100% の密封容器に試験体を

保存した。

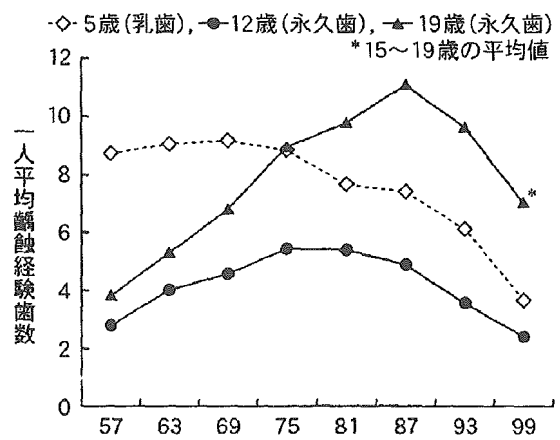


Fig. 1. 5、12、19歳の乳歯または永久歯う蝕経験歯数の推移 (厚生労働省医政局歯科保健課: 2000)

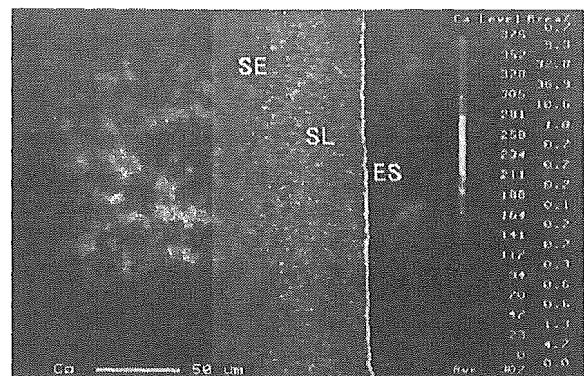


Fig. 2. 表層下脱灰試料の断面の Ca 分析の EPMA 像 SE: Sound Enamel, SL: Surface Lesion, ES: Enamel surface

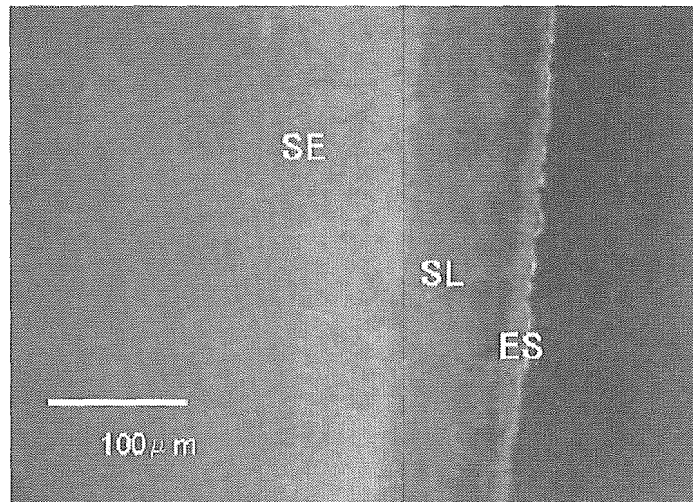


Fig.3. 表層下脱灰試料の断面のデジタル顕微鏡像

2. 実験群の分類

1. で調製した試験体は完全にランダムイズし、実験は下記の4群に分けた。

- レーザー照射のみ (DLR 群)
- フッ化物 (APF) 塗布のみ (DFR 群)
- レーザー照射後、フッ化物塗布 (DLFR 群)
- フッ化物塗布後、レーザー照射 (DFLR 群)

3. レーザー照射条件

レーザー照射条件：Nd:YAG レーザー (エヌディーコンパクト, デニックス) を用い、40 mJ、15 Hz、20 秒間照射、ビーム径：320 μm、試料とレーザーファイバーは接触状態とし、総エネルギー量：50 J/cm² 以下で照射を行った。なお、レーザー光は、直進光のみを試験体に照射し、反応剤として墨汁を使用した。

4. APF 処理

使用した APF (NaF:20.0 mg、H₃PO₄:17.3 mg/ml、pH:3.5, サンスター) は市販されている酸性フッ素リン酸塩、フローデンAをそのまま使用した。APF 塗布は1試験体あたり 10 ml APF に5分間浸漬し、濾紙で余剰な APF を吸いとったの

ち、軽く脱イオン水にて水洗した

5. 再石灰化条件および評価

各群の試料を再石灰化溶液 (pH:7.4, Ca:3.0 mM, P:1.8 mM, CMC:1%) に浸漬⁷⁾ し、石灰化状態の変化を48時間おきに240時間まで、QLF (Inspeceor Pro Ver. 2.0.0.16) を用いて測定した。なお、再石灰化溶液は48時間毎に新しいものと交換した。

6. 統計処理

ΔQ についての一元配置分散分析を行った。

結果および考察

4群 (DLF 群、DFLR 群、DLFR 群、DFR 群) の各浸漬日数後の ΔQ_n を0日における ΔQ (APF 塗布やレーザー照射を行う前の測定値) で除した値 (ΔQ₁) を示した。ΔQ₁ > 1 の場合は脱灰、ΔQ₁ < 1 の場合は再石灰化の方向に変化が起きていることになる。ヒトエナメル質に作製した white spot の ΔQ は、DLR 群以外において日数の増加に伴う顕著な減少傾向が見られた (Fig. 4)。

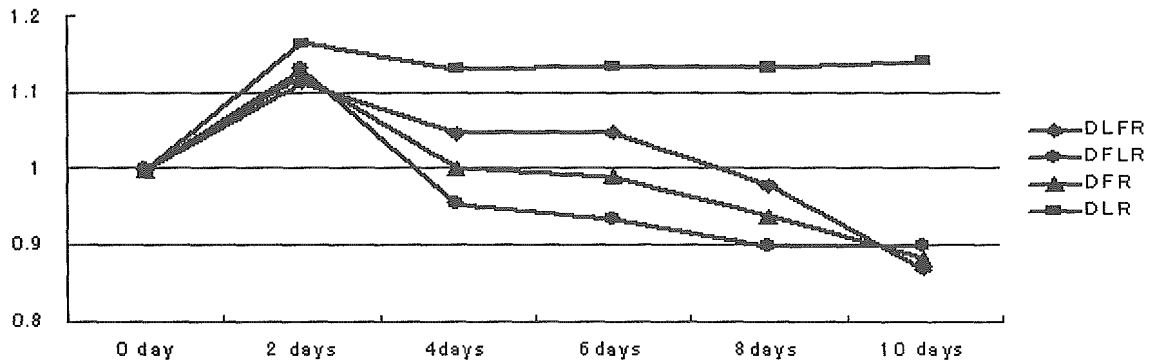


Fig. 4. 各群における10日間の ΔQ_1 ($\Delta Q_n/\Delta Q_0$) の変化

本実験で使用したNd:YAGレーザーの出力は、これまでの研究報告や健全なエナメル質を用いてレーザーの出力と表面形態との関係 (SEM 観察) を調べた結果から決定したが、本実験の様に表層下脱灰後のエナメル質は健全なエナメル質表面とは形態的にも、物理化学的にも異なることが予想されるため、熱的な影響が多少あるものと思われる。また、エナメル質にAPF塗布を行うと、リン酸によって溶解されて生ずるカルシウムイオンとフッ素イオンが反応して、フッ化カルシウムを析出する。市販品には種々のpHのものがあるが、今回の実験に使用したAPF溶液はエナメル質の臨界pHよりはるかに下回る値 (pH=3.5) であったことから、一時的には酸による大きな化学的影響を受けることは明らかであり、2日目に ΔQ が一旦増加したのも、その為であると推察される。しかし、2日以降DLR群を除く3群はいずれも ΔQ_1 の減少傾向が見られた。すなわち、再石灰化の傾向に ΔQ_1 が推移していた。しかし、一元配置の分散分析においては、いずれも統計的な有意差のないことが判明した。

そこで、試料一個ずつの10日間の再石灰化について回復率について検討を行った。すなわち、各群間の初日と10日後の ΔQ において10%以上の回復率を認めた試験体の本数の比較を行った。DLR群は3/14個、DFR群では5/

10個、DLFR群では7/10個、DFLR群では6/12個の試験体が10%以上回復していた。表層下脱灰試料に対して、フッ素単独で作用させた試験体より、レーザーとフッ素を併用した実験群が単独で作用させた実験群より高い回復率が認められた試験体数が多かった。これは、レーザーの瞬間的な熱的影響でエナメル質が一度溶解し、凝固することにより収縮孔やマイクロクラックが発生すると森岡らの報告しており、レーザーを照射したエナメル質においては、表面が一度融解し凝固している為、非晶質に変化している事が示唆され、そのものが耐酸性の向上に寄与している⁸⁾。また、生じたクラックや収縮孔により表層下脱灰病巣内部とエナメル質表面との間において物質の透過性が充進し、結果的にフッ素イオンの取り込み量も増大することが推察している。なお、取り込まれたフッ素は、再石灰化を促進するため、10%以上の再石灰化が認められた試験体が、それ以外の群より多かったと考えられる。

また、いずれの同一群でも高い回復率が認められた試験体と認められなかった試験体に分かれた。それは、実験に用いたヒトエナメル質の発生的な内的要因、口腔内の環境等の外的要因履歴等の影響による結晶学的な差異によるものと考えられる。本実験に使用した歯牙の履歴が不明であり、その個体差が大きかったためでは

ないかと思われる。したがって、この種の影響を最小限に留めるためには、使用する歯牙の年齢やフッ素に関する履歴に十分に配慮した試料の準備が必要であろう。

今回の実験条件では、好川らの報告⁷⁾とほぼ同様の結果が認められた。また、新たに経時的な再石灰化傾向についての測定を行った。その結果、レーザー照射直後では一時的な脱灰傾向が認められる事、DLR 群では他の群と比較して、ほとんど経時的な再石灰化はしない事が明らかになった。このことより、他のフッ素を使用した実験群と比較してフッ素が再石灰化に必要な不可欠なものであることが再確認された。

表層下脱灰病巣は臨床において、様々なケースにおいて遭遇する。とくに矯正治療中におけるブラケット周囲に生じた脱灰病変、小児歯科において半萌出の永久歯咬合面が不潔域となり、脱灰が発生した場合などの定期健診下においても生じた表層下脱灰病変の進行などを客観的にかつ正確に診断できる器材は、現在まで Diagnodent や超音波法、FOTI 法などがこれまで開発され、幾多の臨床の場で使用されてきた⁹⁾。しかし、それらの多くはその測定原理から、主に脱灰深さのみの測定しかできず、病巣の2次元的な推移は把握できたとしても3次元的な評価を行う事は難しい。QLF では、脱灰の深さのみならず解析画像のように脱灰面積も把握する事が可能である。脱灰深さおよび面積の同時に測定が可能であり3次元的な評価が可能であり、さらにその画像データをモニタリングしながら患者への説明も可能である。すなわち、単位面積あたりの脱灰深さのみならず、脱灰部位の面積（患部の広がり）、経時的動向等が把握できる。今後、疾病の治療から予防へとシフトしていく歯科医療のなかで、患者に対し口腔衛生に対するモチベーションの向上および初期齲蝕の客観的な評価に極めて有効である機器と思われる。

結論

- ・表層下脱灰病巣にフッ素とレーザーを併用した実験群（DLFR 群、DFLR 群）では他の群と比較して平均値で評価した場合には、再石灰化に有意な促進は認められなかった。
- ・しかし、個々の試験体で評価を行った場合、10%以上の再石灰化を認めた試験体は、過半数以上認められた。
- ・フッ素非処理の実験群（DLR 群）では、他の実験群より再石灰化の傾向が乏しく、再石灰化にはフッ素の影響が大きいことが再確認された。

文献

- 1) 厚生労働省医政局歯科保健課編. 平成 11 年歯科疾患実態調査報告 2001；第 1 版：11-40.
- 2) 神原正樹. 予防歯科へのテクノロジー —齲蝕予防における早期齲蝕診断—. 日歯医師会誌 2003；56：611-618.
- 3) Ando M, Monique H van der V, Bruce R S, George K S. Comparative study to quantify demineralized enamel in deciduous and permanent teeth using laser- and light induced fluorescence techniques. Caries Res 2001；35: 464-470.
- 4) 中嶋省志. 初期齲蝕の定量・モニタリングシステム (QLF 法). デンタルハイジーン 2004；24: 255-259.
- 5) 何 陽介, 本川 渉, 宮崎光治. 定量的光誘導蛍光法を用いたヒトエナメル質表層下脱灰層の検討. 歯材器 2005；24:189-194.
- 6) Wang X Y, Miyazaki K, Motokawa W. Relationship between the fluoride concentration of the fluoride-releasing elastomers and the acquired acid resistance of human enamel in vitro. Dent Mater J 2003；22: 180-190.
- 7) 好川 正. 脱灰エナメル質の再石灰化に及ぼすレーザー照射ならびにフッ素の影響. 口腔衛生会誌 1992；42：211-218.

8) 森岡俊夫、田籠祥子、稲井裕子. レーザー照射によるエナメル質初期齲蝕の進行阻止および再石灰化への効果について. 日レ歯誌 1991 ; 2 : 1-9.

9) 神原正樹. 予防歯科へのテクノロジー - 齲蝕予防における早期齲蝕診断-. 日歯医師会誌 2003 ; 56 : 611-618.

唾液タンパクが初期う蝕の再石灰化に及ぼす影響について

藤川晴彦^{1,2)}、内山章¹⁾、中嶋省志^{1,2)}、氏家高志¹⁾、利倉隆浩³⁾、杉森康二³⁾、渡部英夫⁴⁾

1) ライオン株式会社オーラルケア研究所、2) 九州大学大学院歯学研究院口腔保健開発学講座、
3) 株式会社島津製作所、4) 島津サイエンス東日本株式会社

背景

我々は、非破壊でう蝕評価の可能性が提案されているQLFシステムの感度や再現性、特徴等を明確にするために研究を行ってきた。例えば、初期う蝕評価のゴールドスタンダードとされているTMR技術との相関^{1,2)}、撮影や解析に関わる様々な測定条件が蛍光値へ与える影響³⁾、乳歯や永久歯・歯種による蛍光強度の違い⁴⁾、非脱灰性の白斑の蛍光値への影響⁵⁾、フッ化物配合歯磨き剤の*in vitro*⁶⁾および*in vivo*⁷⁾での再石灰化効果などが挙げられる。これらの検討の結果、QLFは非常に優れた初期う蝕定量技術であることを確認した。QLFはこれからの予防歯科の発展に大きく貢献すると期待されることから、我々は、引き続き様々な角度から研究を行いたいと考えている。今回は、このQLFを用いて、唾液タンパクおよびフッ化物が初期う蝕の再石灰化に及ぼす影響について評価した結果、非常に興味深い知見が得られたので報告する。

唾液タンパクは初期う蝕の脱灰・再石灰化に影響を与えると考えられている。例えば、スタセリンやPRP、アルブミンはリン酸カルシウムの結晶化や結晶成長を抑制することが報告されている^{8,9)}。そのメカニズムとして、タンパク成分が唾液中のカルシウムやリン酸等の無機イオンと結合する、またはリン酸カルシウムの結晶成長部位に吸着すること等が提案されている。しかしながら、実際の口腔内のように複数の唾液タンパクが存在する場合、またさらにフッ化物が存在する場合に、初期う蝕の再石灰化がどのような影響を受けるかほとんど報告されていないのが現状である。

目的

本研究ではヒト唾液中のタンパクがエナメル初期う蝕の再石灰化に及ぼす影響を明確にすることを目的とし*in vitro*評価を行った。非破壊で経時的な評価を行うために、QLFおよびマイクロCTを評価手段として活用した。

実験方法

①脱灰サンプルの調製

ヒトエナメル表面を研磨後、数個のエナメルブロックに切断した。2×2 mmのウィンドウ部を除いて周囲をマニキュアで被覆後、37°Cの脱灰液(CaCl₂: 12m M, KH₂PO₄: 10 mM, NaCl: 100 mM, 乳酸: 50mM, 酢酸: 100mM; pH 4.5)に1-2週間浸漬して、サンプルウィンドウ部に初期う蝕(QLFのΔF値として約-36%)を形成し、脱灰サンプルとした。

②唾液タンパクを含有する再石灰化液の調製

パラフィン刺激によって吐出した6人分の全唾液を混合後、その遠心上清液を分画分子量1000 Daの透析チューブに注入した。4°Cのリン酸緩衝液(NaH₂PO₄: 5 mM; pH 6.9)および再石灰化液(CaCl₂: 1 mM, KH₂PO₄: 3 mM, NaCl: 100 mM, 酢酸: 100 mM; pH 6.3)に対して数日間透析を行った後、チューブ内部液に蒸留水を添加した再石灰化液をP (+) 0 ppm F群、フッ化ナトリウム溶液を添加した再石灰化液をP (+) 1 ppm F群とした。一方、唾液タンパクを含有しない再石灰化液については、再石灰化液(CaCl₂: 1 mM, KH₂PO₄: 3 mM, NaCl: 100 mM, 酢酸: 100 mM; pH 6.3)に蒸留水を添加し

た液をP (-) 0 ppmF群、フッ化ナトリウム溶液を添加した液をP (-) 1 ppmF群とした。

Vシステム (株式会社島津製作所) を用いて、4週間再石灰化させたサンプルのCT画像を取得した。

③再石灰化処置

脱灰サンプルの初期のQLF値 (平均ΔF値) を測定後、QLF値の平均が同等となるようにサンプルを4つの群に (n=10/群) 等分した。再石灰化試験は、脱灰サンプルを37°Cの4つの群の再石灰化液に浸漬し、3日後、7日後のQLF値を測定した。1週間毎に再石灰化液を交換し、計4週間、試験を行った。

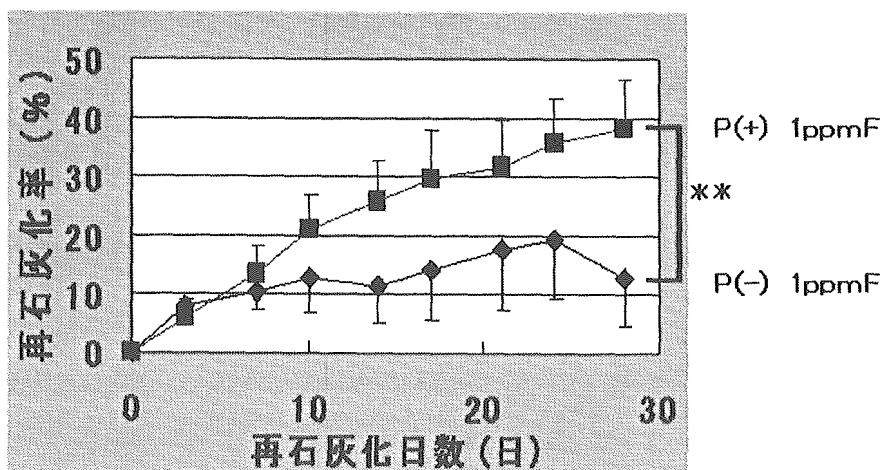
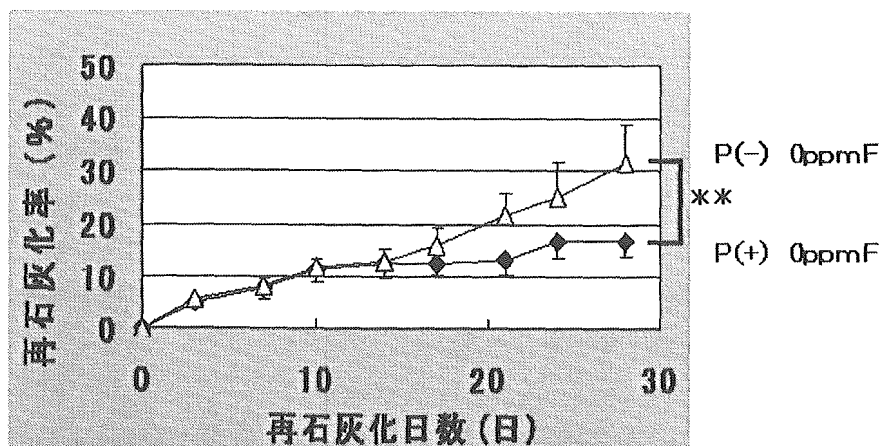
④再石灰化評価

QLFによる再石灰化評価は、 $100 \times (\text{初期の} \Delta F - \text{再石灰化後の} \Delta F) / (\text{初期の} \Delta F)$ の式より再石灰化率を算出した。マイクロCTによる再石灰化評価は、SMX-100CT-S

結果

①QLF値による再石灰化

再石灰化液中にフッ化物イオンを含まない系において、唾液タンパクの添加により再石灰化が抑制された (P<0.01)。これは、これまで報告されている各種タンパク成分を用いた Seeded crystal growth 法等による結晶成長抑制結果と一致している。フッ化物イオンを1 ppm含む系においては、唾液タンパクの添加により再石灰化が継続的に進行した (P<0.01)。一方、唾液タンパクを含まない場合は、再石灰化の進行が継続的でなく、再石灰化の進行が大きく抑制された。

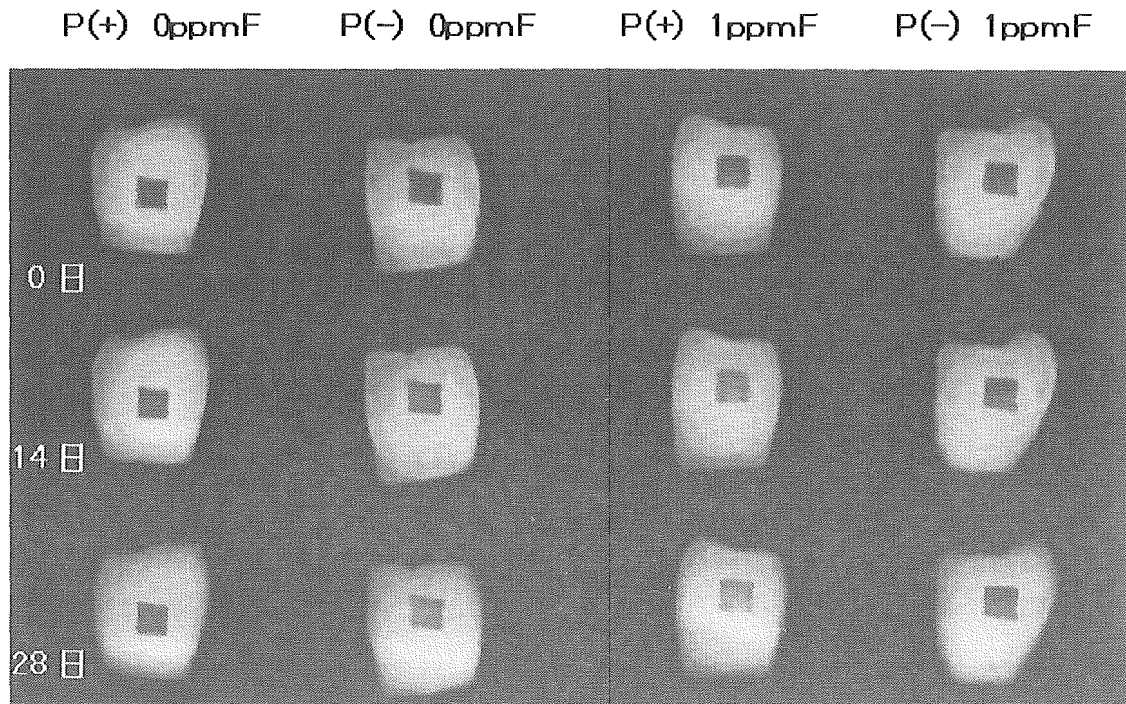


** : p < 0.01 ; 2-way ANOVA

②QLF画像観察

再石灰化液中にフッ化物イオンを含まない系において、唾液タンパクにより再石灰化が抑制さ

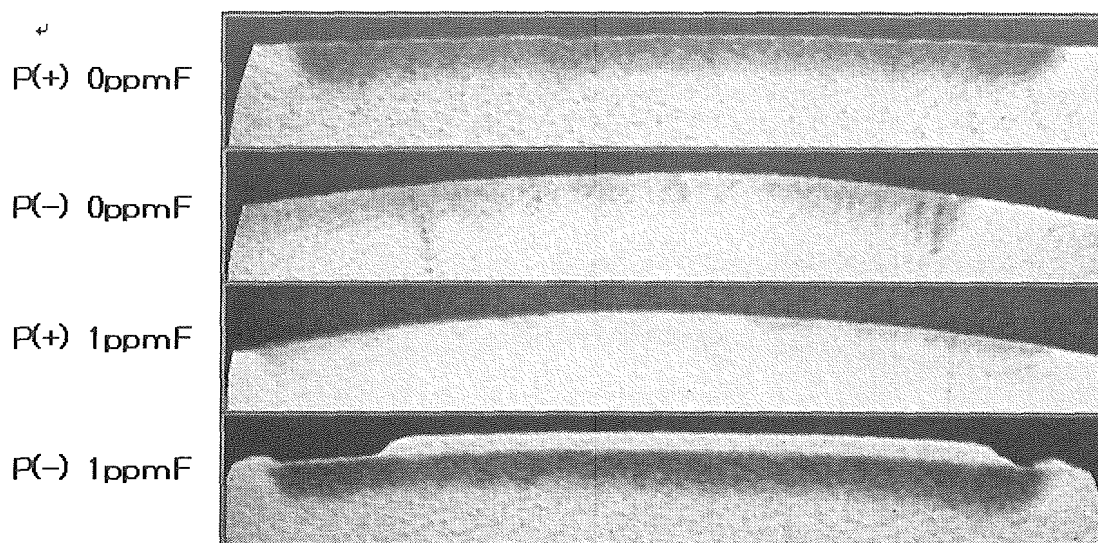
れた画像を確認した。またフッ化物イオンを1 ppm含む系において、唾液タンパクによる再石灰化が継続的に進行している画像を確認した。



③マイクロCT画像観察

CT画像により、ミネラル密度を観察した結果、再石灰化液中にフッ化物イオンを含まない系においては、唾液タンパクが脱灰内部の再石灰化進行を抑制していたことが明確になった。一方、再石灰化液中にフッ化物イオンを含む系におい

ては、唾液タンパクが存在すると脱灰内部の再石灰化が顕著に進行しているが、唾液タンパクが存在しないと、初期う蝕表面に無機質様の沈着物が生成するとともに、脱灰内部の再石灰化の進行が抑制されていた。



考察

①透析について

タンパクの回収方法として、硫酸分画法や有機溶媒沈殿法が知られているが、唾液タンパクの回収では、沈殿させたタンパクの再溶解が困難であった。そこで、本研究では透析法による無機イオン濃度の調整により、再石灰化液を調製した。透析においては、再石灰化に影響すると報告されている分子量数千のヒスタチンやスタセリンなどを回収するため、分子量 1000 Da の透析チューブを選択した。唾液の遠心上清液および透析後の再石灰化液について、SDS-PAGE法により、タンパクバンドパターンと強度を確認したところ、変化は認められず、唾液タンパクをほぼ回収することができた。また、透析後の再石灰化液中の無機イオン濃度およびpHは、設定した濃度およびpHであることを確認した。

②唾液タンパクの経時変化について

再石灰化液中の唾液タンパク組成の変化を抑制するため、0.02%アジ化ナトリウムを再石灰化液に添加した。また、SDS-PAGE法により、再石灰化液から経時的にサンプリングし、タンパクバンドパターンと強度を確認したところ、経時によって1~2のバンドに小さな強度減少が認められたが、再石灰化期間中のタンパク組成に大きな変化は認められなかった。1~2のバンドの小さな強度減少は、37°Cへの温度上昇による酵素的な分解や他のタンパクと結合などに起因すると推察されたが、再石灰化の進行、抑制に大きく影響を及ぼすものではないと考えられた。

③唾液タンパクの機能について

唾液タンパクが再石灰化の進行へ影響を及ぼした作用メカニズムとして、2点が考えられた。まず、再石灰化液中の無機イオンとの相互作用により実際の飽和度を低下させる作用、次に、

歯面への吸着により結晶成長を抑制する機能である。再石灰化液中にフッ化物を含まない系では、これらの機能により再石灰化が抑制されたと考えられる。一方、再石灰化液中にフッ化物を含む系では、これらの作用によって、初期う蝕表層での急速なミネラル密度の増加を緩和し、再石灰化液中の無機イオンが脱灰内部に継続的に供給され、再石灰化が継続的に進行したと推察された。さらに、フッ化物による再石灰化の推進力が唾液タンパクによる再石灰化抑制力を上回っていることも今回の結果をもたらした要因の1つと考えられた。

結論

- ①再石灰化液中にフッ化物が存在しない系では、唾液タンパクは再石灰化の進行を抑制することが示唆された。
- ②再石灰化液中にフッ化物イオンが存在する系では、唾液タンパクは、エナメル表面でのミネラル沈着物の生成を抑制するという重要な役割をもっており、フッ化物による継続的な再石灰化進行を助長することが示唆された。

引用文献

- 1) 長沼健ほか: 口腔衛生会誌 52: 642-643, 1998.
- 2) 西永英司ほか: 日歯保存誌 46: 27, 2003.
- 3) 長沼健ほか: 口腔衛生会誌 50: 728-729, 2000.
- 4) 松山和正ほか: 口腔衛生会誌 52: 642-643, 2002.
- 5) 中嶋省志ほか: 口腔衛生会誌 52: 644-645, 2002.
- 6) Nishinaga E et al.; J Dent Res. 80: 718, 2001.
- 7) 中嶋省志ほか: 口腔衛生会誌 53: 383, 2003.
- 8) Moreno EC et al.; Calcif Tissue Int 28: 7-16, 1979.
- 9) Gliman H et al.; J Inorg Biochem 55: 21-30, 1994.

QLF法とデジタル写真の相関関係の検討

山岸 敦

花王株式会社 ヘルスケア研究所

目的

QLF法は非侵襲的に初期う蝕の検出が可能であり、我々もフッ化物の応用等が初期う蝕の再石灰化に及ぼす影響を調べるために活用している。通常、QLF法での測定にデジタルカメラによる写真撮影を組み合わせて調査を行っているが、QLF法で検出される初期う蝕は写真でも判別できることが多い。そこで、QLF法によって得られる各種パラメーターとデジタル写真から得られるパラメーターの相関関係を調べることにより、それぞれの特性を把握し、より有効に活用すべく検討を行った。

方法

初期う蝕は表層下の脱灰であり、情報をデジ

タル写真で得るには表面反射光が阻害因子になるため取り除く必要がある。そこで、光源（ストロボ）レンズにそれぞれ直線偏光フィルタを装着し、偏光の向きを垂直にすることにより表面反射を除去できるようにしたデジタルカメラ（以下CPP）を用いた。このCPPとQLF装置を用いて矯正のために抜歯された小白歯（N=12）の隣接面に生じた初期う蝕を撮影した。QLF法は通常通りの解析を行い、CPPは色分解を行い最もコントラストの得られたBチャンネルの画像を使用した。健全部位の輝度を基準に10%以上明るい部位を初期う蝕と定義し、2値化により抽出を行い、面積、輝度を求めた。図1に画像解析のフローを示す。

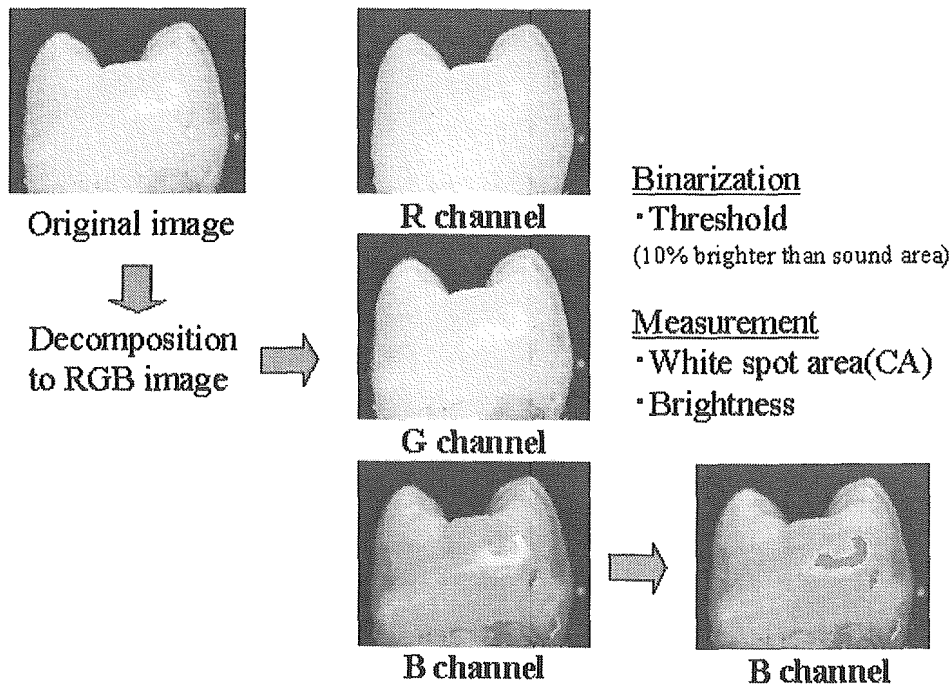


図1 CPPの画像解析フロー