

むし歯研究におけるイメージング分析の活用方法

Research on Dental Caries using Imaging Analysis

北迫勇一*，田上順次*，平石典子*，奥田真実子*，二階堂 徹*

*東京医科歯科大学大学院

従来，むし歯の臨床診断は，主に視診，触診，透過X線診断など，術者の主観的な判断のもと行われてきたが，定量性や客観性の点で十分ではない。近年，イメージング機能を有するpH測定技術やX線分析技術が開発されており，より定量的かつ客観的なむし歯診断法や治療法の確立に寄与できるものと期待される。そこで，筆者らは，堀場製作所が開発した光走査型化学顕微鏡とX線分析顕微鏡を使って，(1)むし歯の進行度の定量的評価，(2)歯科用接着性修復材料の評価，(3)フッ素徐放性むし歯修復材料の評価など，歯科分野での可能性を検討し，良好な結果を得た。本稿では，これらの研究結果を報告し，今後の期待と課題を述べる。

Clinical diagnosis of dental caries has relied on the techniques such as visual examination, tactile examination, and transmissive X-ray diagnosis. These methods are neither quantitative nor objective because they are mainly based on the clinical experience of dentists. On the other hand, new kinds of pH or X-ray measurement technique having an imaging function is expected to develop more quantitative and objective clinical treatment of dental caries. The authors have investigated the potential for using a pH-imaging microscope and an X-ray analytical microscope developed by HORIBA for (1) quantitative evaluation of the degree of dental caries, (2) evaluation of adhesive properties of dental restorative materials, and (3) evaluation of fluoride-releasing materials on inhibitory effect for dental caries. In this article, we describe the results obtained in these evaluations and discuss the scope of the imaging technologies in dental research.

1

はじめに

近年，むし歯に対する歯科医のアプローチが大きく変わりつつある。その変化の1つとしてむし歯予防に対する意識の向上が挙げられる。この変化は，歯の健康が日常生活の質を維持し，高める上で重要な意味をもつことが認識され始めた結果であり，むし歯の診断と治療に重点がおかれてきた歯科医の役割も大きく変えるものである。

一方，むし歯の診断と治療についても，その手法に変化が生まれつつある。従来，むし歯の診断は，視診，触診，X線診断といった歯科医の主観に頼るところが大きかったが，近年，診断基準として定量的な指標を用いる試みが行われるようになってきた。加えて，むし歯の治療も，疑わ

しき部分をすべて削り取るという手法に対して，歯科用修復材料の進歩とともに，できる限り歯を残す治療法が提案され普及しつつある^[1]。

しかし，一方では，このような新しいアプローチの妥当性については，基礎的な歯科研究のレベルで十分に検証されていないのが現状である。この妥当性の検証を行うために，歯科研究に携わる著者らは，“科学的根拠をわかりやすく説明すること”そして，“より定量的な指標を示すこと”が重要であると考えている。そこで，著者らはこれら2つの要求を満たす研究ツールとして，堀場製作所で近年開発されたpHイメージング顕微鏡（光走査型化学顕微鏡）とX線分析顕微鏡を用いて，将来を先取りしたむし歯の予防，診断，治療に寄与する研究を行っている^[2-5]。

2

光走査型化学顕微鏡およびX線分析顕微鏡によるむし歯の進行度の定量的評価

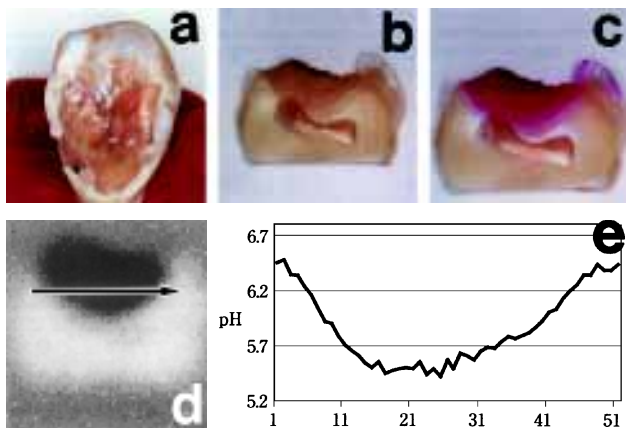
光走査型化学顕微鏡およびX線分析顕微鏡は、試料を真空や乾燥状態に晒すことなく、前者はサンプル表面のpH分布を、後者はサンプルを透過するX線量とサンプル内の元素分布を、それぞれ可視化できる装置である^[6-8]。本研究では、むし歯を有するヒト新鮮抜去大白歯について、2つの分析装置を活用しむし歯の進行度の定量的評価を試みた。

2.1 pH イメージング分析

まず、光走査型化学顕微鏡を用いた分析では、歯冠部に中等度から高度のむし歯を有するヒト新鮮抜去大白歯 20本を試料とし、患者年齢、むし歯発生部位、進行形態および臨床症状を参考に、急性むし歯と慢性むし歯に分類した。次に、これらのむし歯を嚙む方向にスライスし、光走査型化学顕微鏡のセンサ上に形成した薄い寒天ゲルフィルムの上に測定面を接触させ、ゲルフィルムに形成されるpHを二次元測定して、サンプル表面のpH分布を可視化した。さらに、pHイメージング分析を行ったむし歯罹患領域を、むし歯検知液を用いて染め出し、pH画像と肉眼による観察結果とを比較検討した。

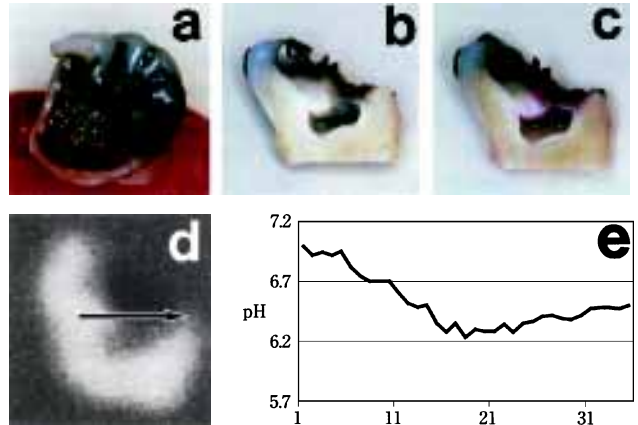
得られたpH分布画像と、むし歯検知液で染めた試料の写真を図1, 2に示す。pH分布画像上、ゲルフィルムに試料の健全領域が接している領域のpH値は、6.8-7.3とほぼ中性を示した。これに対して、むし歯罹患領域が触れた領域では、急性ならびに慢性むし歯ともにpH値の低下が認められた。急性むし歯では最小pH値 5.4 - 5.8(図1)を、慢性むし歯では最小pH値 6.3 - 6.6(図2)を示した。

一方、急性むし歯ではpH値が低下した部位とむし歯検知液染色部分とが肉眼的にほぼ一致したが、慢性むし歯では表面に黒褐色の強い着色が認められ、pH分布画像上でむし歯相当部分と認識された領域をむし歯検知液での染色性を判定することが困難な場合があった。



a: 被験歯
b: 被験歯半切測定面
c: むし歯検知液染め出し面
d: pH分布画像(水平はpH測定ライン)
e: pHのラインスキャンプロファイル

図1 急性むし歯染色写真とpH分布像*



a: 被験歯
b: 被験歯半切測定面
c: むし歯検知液染め出し面
d: pH分布画像(水平はpH測定ライン)
e: pHのラインスキャンプロファイル

図2 慢性むし歯染色写真とpH分布像*

2.2 脱灰量の測定

次に、同じ試料を光走査型化学顕微鏡とX線分析顕微鏡とで測定し、むし歯罹患部のpH値変化と歯質脱灰量の相関関係を検討した。ここでは、歯冠部に中等度のむし歯を有するヒト新鮮抜去大白歯110本について、患者の年齢、むし歯進行形態および臨床症状を参考に、急性むし歯(n=22)または慢性むし歯(n=88)に分類した。

まず、前述同様、スライスしたサンプルを、光走査型化学顕微鏡でむし歯領域を走査して最小pH値が得られる部位を特定し、X線分析顕微鏡を用いてその領域のX線透過量分布を可視化した。得られたX線透過画像から、健全歯質領域のX線透過量に相当する信号値(Gi)と最小pHを示した部位のX線透過量に相当する信号値(Gc)を求め、両者の比($G_{xam} = G_c / G_i$)を算出した。X線透過量は試料中のミネラル量が多い程小さくなり、逆に、少ない程大きくなる。したがって、 G_{xam} の値はむし歯によって脱灰されたミネラル量の指標になると考えられる。

X線分析顕微鏡による脱灰量の測定結果は、急性むし歯で $G_{xam} = 4.94$ 、慢性むし歯では $G_{xam} = 2.32$ となり、急性むし歯の方が脱灰量が多いことを確認できた。また、pHイメージング分析で得られたう蝕部分の最小pH値と G_{xam} との相関関係をピアソン分析により検討した。この結果、急性むし歯では強い相関関係($r = 0.8079$)が認められたが、慢性むし歯では弱い相関関係($r = 0.0775$)であった(図3)。

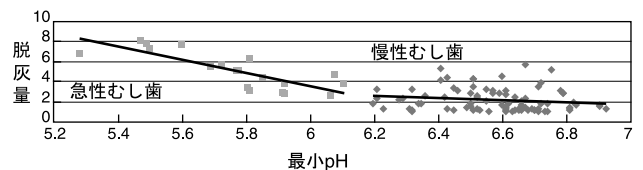


図3 むし歯の最小pHと脱灰量との相関関係

急性むし歯では、むし歯原因細菌によって産生された酸による脱灰が活発であると予想され、これがpH値の変化と脱灰量の変化の双方に影響し、強い相関関係を示したと考えられる。一方、慢性むし歯では、むし歯原因細菌の活動性が低下し、さらに唾液からのミネラルの再沈着も生じるため(再石灰化)、相関関係が弱かったものと考えられる。

以上のように、光走査型化学顕微鏡では、歯の健全部分とむし歯部分とを定量的に識別可能であることに加え、むし歯領域の最小pH値をpH分布画像から得ることで、むし歯の進行程度(急性または慢性むし歯)が把握できることが明らかになった。このことは、pH値による定量的むし歯診断法の確立の可能性を示すものであり、新たなむし歯診断法を構築していく上で、臨床的価値が非常に高いものと考えられる。

一方で、X線分析顕微鏡による脱灰量の評価は、pHイメージングによって得られた知見を裏付けするものであり、今後、pHを指標としたむし歯診断法の信頼性をより高めることに貢献できると考えられる。

現在、むし歯の検出や進行度の確認には、むし歯検知液が用いられている。しかし、慢性むし歯では自然着色が強いため、むし歯検知液の染色部分が適切に認識できないことがある。一般にこのようなケースでは、染色部を含めて強い自然着色部分をすべて削除するよう推奨されているが、これでは健全歯質部まで切削されてしまう恐れもある。pH値を応用したむし歯活動性診断法が確立されれば、歯質削除量の大幅な減少を積極的に促す治療へと導き、8020運動(コラム参照)にも大いに貢献するものと思われる。

また、このような新規概念の歯科むし歯活動性診断法を確立し、臨床の場で定着させるためにも、本実験で行ったような2つのイメージング技術で同一のサンプルを評価でき、その相関を確認できたことは、大変意義深いことである。

さらに、光走査型化学顕微鏡とX線分析顕微鏡は、サンプルに特殊な表面処理が不要で、大気下で繰り返し測定できる。この点は、臨床サンプルの入手が困難な歯科分野の研究では、非常に有効な分析法である。

3

光走査型化学顕微鏡による歯科用接着性修復材料の評価

歯科分野におけるpH値は、むし歯の発生研究以外にも、むし歯治療に用いる接着性修復材料の酸処理効果のめやすとして馴染みが深い。そこで著者らは、唾液汚染前後ならびに汚染部に対する再処理による一連のpH変化を、光走査型化学顕微鏡にて観察した^[9]。

実験にはヒト新鮮抜去健全大臼歯を用い、噛む方向と直交する方向にスライスしたサンプルを作成した。センサへの取り付けは前述した方法と同じである。まず、処理をされていないサンプル表面のpH分布を測定し、その後同じサンプルの全面に酸処理剤を塗布し、処理面の半分を唾液で汚染させた後、表面のpH分布を測定した。引き続き唾液汚染部には汚染除去を目的とした再酸処理を施し、残り半分の領域には水洗後に再酸処理を試みた。

その結果、酸処理にともない低下したサンプル表面のpH値は、唾液汚染により中性側に戻るが、再度酸処理を行うとpH値がもとの酸処理後のpH値まで回復していく。この過程が、視覚的にも明瞭に観察された(図4)。

高性能で簡便な歯科用接着性修復材料の開発により、むし歯の部分だけを取り除く治療が主流となりつつある。接着材を用いるむし歯治療では、pH値2.0前後に調整された低pH酸処理材で修復領域歯表面の酸処理が行われる。よりよい治療予後を確保するためには、この表面処理を確実に行うことが最も重要となる。しかしながら、ヒト口腔内には唾液等のさまざまな分泌液が存在し、表面処理後の被着面が汚染される可能性がある。これまで、唾液汚染による歯科用接着材の接着強さ低下や汚染後の表面形態に関する研究は数多く報告されているが、唾液汚染後の表面性状ならびにその後の対策方法に関する細かな検証はなされていない。今後、本研究におけるpHイメージングによる分析法が、より高性能な歯科用接着剤の開発と評価に貢献できるものと考えられる。

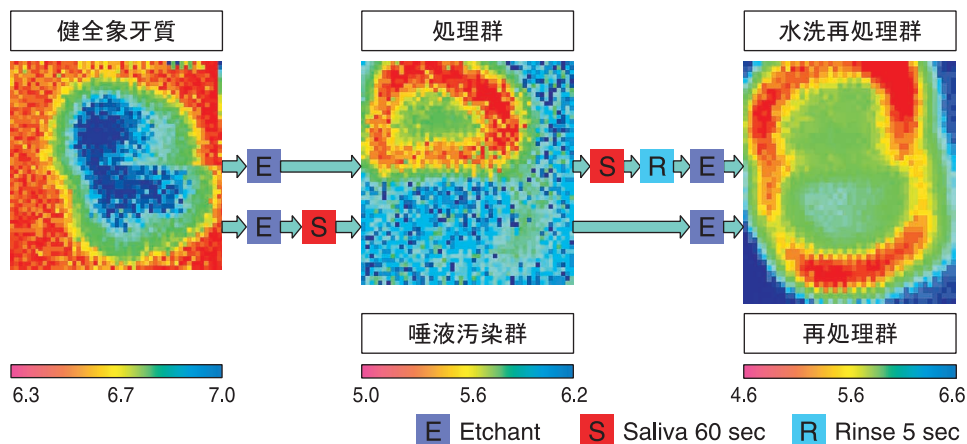


図4 りん酸エッチャントによる象牙質表面のpH変化

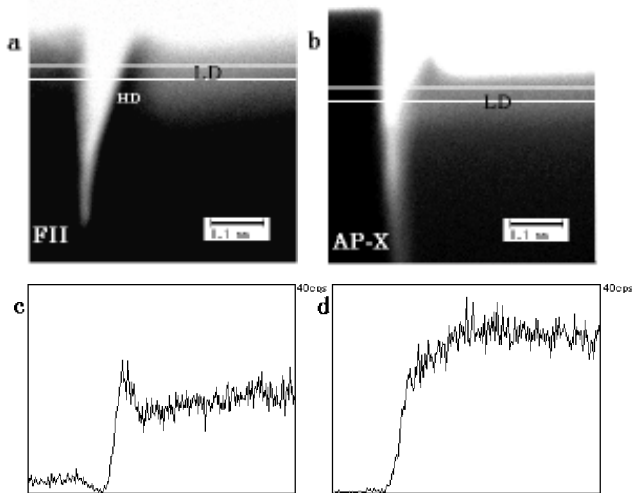
4

X線分析顕微鏡によるフッ素徐放性むし歯修復材料の評価

近年、むし歯予防にフッ素の応用が着目され、フッ素徐放性むし歯修復材料のむし歯発生抑制効果に関する研究が多く報告されている。著者らは、新しいアプローチとして、X線分析顕微鏡を用いて、フッ素徐放性修復歯の修復物周囲における透過X線撮影と、Ca濃度分析を試みた^[10]。代表的なフッ素徐放性材料(FII: グラスアイオノマーセメント)ならびにフッ素徐放性のない材料(AP-X: コンポジットレジン)を用いてむし歯修復周辺部を形成し、レーザ顕微鏡で観察されたむし歯発生抑制部について、X線分析顕微鏡による観察した。この結果、図5に示すように、レーザ顕微鏡で観察されたむし歯発生抑制部にX線不透過性を有する層が確認され、さらにその部分のCa濃度は、健全歯に比べて高くなっていることが判明した。

現在、フッ素徐放性材料の評価には、フッ素徐放性材料修復後のむし歯を*in vitro*の酸性環境下にさらし、修復周辺部に人工的にむし歯を発生させる方法が各種考案されている。そして、むし歯の発生状況の評価には、偏光顕微鏡、マイクロラジオグラフィー、硬さの測定等が用いられているが、これらは試料作製に手間を要し、さらにはアルコール脱水など試料ダメージも懸念される。

本研究で用いたレーザ顕微鏡とX線分析顕微鏡とを組み合わせた分析手法は、これら既存の手法の欠点を解消し、簡単かつ明瞭なフッ素徐放性材料の評価法として今後活用されていくことが期待できる。



a: FII : グラスアイオノマーセメント(フッ素徐放性材料)の透過X線像
 b: AP-X: コンポジットレジン(非フッ素徐放性材料)の透過X線像
 c: FII : グラスアイオノマーセメント(フッ素徐放性材料)のCa濃度分布
 d: AP-X: コンポジットレジン(非フッ素徐放性材料)のCa濃度分布
 HD : High density area (= むし歯発生抑制部)
 LD : Low density area

図5 フッ素徐放性修復歯の修復物周囲における透過X線像とCa濃度分布

5

おわりに

歯科研究分野における光走査型化学顕微鏡とX線分析顕微鏡の応用例について、著者らの研究成果の一部を紹介した。光走査型化学顕微鏡にX線分析顕微鏡による評価を加えることにより、pH値を用いたむし歯活動性診断の妥当性を示すことができた。pH値のイメージ測定によって、削るべきむし歯や部位を明らかにする、つまり、むし歯の診断から、処置、処置後の予後審査まで、むし歯処置をトータルにサポートできるものと思われる。さらに、光走査型化学顕微鏡による歯科用接着性修復材料の評価や、X線分析顕微鏡によるフッ素徐放性むし歯修復材料の評価は、今後の歯科材料開発およびそれらを用いたむし歯治療法の革新に大いに貢献するものと期待できる。

さらに、本報で紹介したイメージング技術が、今後の歯科医療ならびに歯科学生教育の発展に貢献するとともに、最終的には、国民のむし歯予防意識の向上や、むし歯患者の治療負担軽減へ寄与することを期待する。

なお、これらの成果は、再現性が高くかつ簡便なむし歯診断方法として、国際歯科学会においても大いに注目を集めている(2001年 IADR / Lion Award Cariology 部門 2001年6月27日受賞, International Association for Dental Research において国際レベルの優れた研究および若手研究者を奨励する学術賞を受賞)。

参考文献

[1] 田上順次, 島田康史, 北迫勇一, 中島正俊, 二階堂徹, 大槻昌幸: う蝕治療における接着. 接着歯学 18, 154-159, 2000.
 [2] Kitasako Y, Hiraishi N, Nakajima M, Nikaido T, Tagami J and Nomura S: In vitro surface analysis of active and arrested dentinal caries in sliced extracted human teeth using a pH-imaging microscope. Operative Dentistry (in press).
 [3] 北迫勇一, 平石典子, 中島正俊, 二階堂徹, 田上順次, 野村聡: 半導体シリコンセンサーを用いた光走査型化学顕微鏡によるヒト抜去う蝕象牙質の表面観察. 日本歯科保存学雑誌 44, 56-63, 2001.
 [4] 北迫勇一, 二階堂徹, 田上順次, 池田健一, 光成京子, 野村聡: 半導体シリコンセンサーを用いる pH イメージング顕微鏡によるヒトの歯の表面観察. 分析化学 49, 325-327, 2000.
 [5] 平石典子, 北迫勇一, 二階堂徹, 田上順次, 野村聡: pH イメージング顕微鏡及び X 線分析顕微鏡によるう蝕象牙質の表面観察. 日本歯科保存学雑誌 44(秋季特別号), 110, 2001.

- [6] Nomura S, Mitsunari K, Nakao M, Kohno Y and Matsuki R: Estimation of plant leaf response to acid solutions using a pH-imaging microscope. G.I.T. Imaging & Microscopy 2, 59-61, 2000.
- [7] Nomura S: Review of pH Measurement (5) ; pH Measurement a la Carte. PNE 143, 903-907, 1998.
- [8] Nomura S: Review of pH Measurement (6) ; Recent Development in pH Measurement. PNE 143,1295-1302, 1998.
- [9] Hiraishi N, Kitasako Y, Nikaido T, Nomura S and Tagami J: Effect of saliva contamination on pH-value and Bond-strength on dentin. Journal of Dental Research 80:658,2001.
- [10] Okuda M, Pereira PNR, Nikaido T and Tagami J: Evaluation of in vitro secondary caries using confocal laser scanning microscope and X-ray analytical microscope. American Journal of Dentistry (in press).

* 北迫勇一ほか

「半導体シリコンセンサを用いた pH イメージング顕微鏡によるヒト抜去う触象牙質の表面観察」
日本歯科保存学雑誌 Vol.44 No.1(2001)より転載



北迫 勇一

Yuichi KITASAKO, DDS, M.D.

東京医科歯科大学大学院
医歯学総合研究科
歯学博士



田上 順次

Junji TAGAMI, DDS, M.D.

東京医科歯科大学大学院
医歯学総合研究科
教授
歯学博士

平石 典子

Noriko HIRAISHI, DDS, M.D.

東京医科歯科大学大学院
医歯学総合研究科
歯学博士

奥田 真実子

Mamiko OKUDA, DDS, M.D.

東京医科歯科大学大学院
医歯学総合研究科
歯学博士

二階堂 徹

Toru NIKAIDO, DDS, M.D.

東京医科歯科大学大学院
医歯学総合研究科
講師
歯学博士

コラム 1 8020 運動とむし歯の予防

歯の健康は、日常生活の質を維持し、高める上で重要な意味をもっています。近年、むし歯は生活習慣病の1つと認定され、適切なむし歯予防法の確立が急務となっています。厚生労働省と日本歯科医師会は、来たるべき高齢化社会に向けて、80歳になっても20本以上の自分の歯を保とうという「8020運動：ハチ・マル・ニー・マル」が10年以上前から展開されています。各方面で8020運動を推進したおかげで、近年、小児のむし歯が減りつつありますが、いまだにその目標は達せられていません。

むし歯発生のリスクは、個々の患者ごとに異なり、ブラッシング不良、食事習慣、歯の強度、唾液の量と質、歯並びなど多岐にわたります。むし歯が予防可能な疾患であるからこそ、患者ごとのむし歯リスクを適切に分析し、各々のリスクに応じた予防処置を行っていくことが重要となっています。

コラム 2 むし歯とpH

歯科分野では、臨界pH、唾液や歯垢のpHなど、pH値はむし歯発生の指標として馴染み深いものです。むし歯は、ミュータンス連鎖球菌を代表とするむし歯原因菌によって産生された酸によって歯の表面が溶解(脱灰)することにより発生します。歯の主成分のハイドロキシアパタイトは、pHがある値(臨界pH)より低くなると溶け始め、その値は5.5とされています。

食事中は、むし歯原因菌が糖を代謝して酸を産生すると、歯垢内のpHが低下し、歯の溶解を促進します。一方、食間時は、酸産生量が低下し、歯垢内のpHは中性付近まで回復します。ここが、むし歯予防には食後の歯磨き励行が第1条件だといわれている理由です。

むし歯のない人の口腔内歯垢ではpH値が5.2～6.7であるのに対し、重度のむし歯患者さんの場合には4.0～5.2まで低下すると報告されています。また、フッ素のむし歯原因菌阻害作用はpHが低い方が強く、むし歯原因菌の活動性に影響を与える各種酵素には至適pHが存在します。

このように、むし歯の発生や進行過程(活動性)では、pH値が大きく影響しています。