原 著

歯質抵抗性判定のためのほうろう質リン定量法： 原法による生体歯牙での応用*

(歯質耐酸性測定法シリーズⅡ)

川 崎 徹** 長 島 暉*** 馬 場 久 衛***

概要：生体歯牙について歯質耐酸性を判定するため、竹内・川崎によつて開発された、いわゆる Agar plate 法の臨床的応用の術式を検討するため、この研究を行なった。

実験に用いた Agar plate は、pH 4.5の0.1M 乳酸・乳酸ナトリウム緩衝液による直径6.5mm、厚さ2mmの円形寒天平板で、これを上顎中切歯唇面に一定時間包摂したのち、Agar plate 中に溶出したリン量をモリブデン酸・サフラニン法で定量した。

小学校第4学年男女児童1036名中から無作為に抽出した49名および317名に対し、前者では5分間、後者では3分間、前記 Agar plate の包摂を行なったところ、そのリン溶出量は、前者では平均 $1.87\mu\text{g}$ 、標準偏差 $0.39\mu\text{g}$ 、後者では平均 $1.60\mu\text{g}$ 、標準偏差 $0.38\mu\text{g}$ の何れもほぼ正規型の分布を示した。この結果から、いわゆる Agar plate 法はヒトの歯質の耐酸性の強弱の判定に利用し得る可能性を示すものと考えられよう。

別に、20歳前後の女子6名の上顎左右側中切歯唇面について、Agar plate を同一歯ごとに1, 2, 3, 4, 5分間包摂して測定したところ、リン溶出量は、各歯牙の耐酸性の大小にかかわらず包摂時間が長くなるにつれて増加した。したがつて、本法で用いているリン定量法の精度、検出限界および包摂時間の計時誤差ならびに被測定者の負担をあわせ検討し、包摂時間は3分間でよいと判定した。

Abstract: Evaluation of Acid Resistance of Enamel Using Microdetermination of Phosphorus: II. Application of the Agar Plate Method in Vivo. by Tohru KAWASAKI**, Akira NAGASHIMA*** and Kyue BABA***. This investigation was undertaken to evaluate acid resistance of the surface enamel in vivo by the agar plate method reported by TAKEUCHI and KAWASAKI in 1963.

The agar plate used in this study were made of agar (0.5% weight/volume) and 0.1 M lactic acid-sodium lactate buffer solution, pH 4.5, mixed together by heating in a water bath for 20 minutes and left standing for 24 hours to solidity in a glass vessel of 2 mm in depth. Circular plates of 6.5 mm in diameter were cut out for experimental use. The surface of the upper central incisor was polished with a slurry of pumice and glycerin and then washed with re-distilled

* 本論文の要旨は、昭和40年11月6日、第167回東京歯科大学学会で発表した。

** 東京歯科大学口腔衛生学教室（主任：竹内光春教授）

現在：東北歯科大学口腔衛生学教室（主任：清水秋雄教授）、薬理学教室兼任

*** 財団法人ライオン歯科衛生研究所研究部（部長：佐藤新一）

** *Department of Preventive Dentistry, Tokyo Dental College, (Director: Prof. Mitsuharu Takeuchi)*
Present address: Department of Preventive Dentistry, Tohoku Dental College, Fukushima

*** *Department of Research, The Lion's Foundation of Dental Health Institute (Director: Dr. Shinichi Sato)*

昭和47年9月21日受付

water and dried with compressed air. The plate was placed on the tooth surface for various periods of time to determine the effective time for application in vivo. After application, the phosphorus dissolved from the enamel was estimated by spectrophotometric determination with molybdate-safranin.

The subjects were 366 children chosen at random from 1,036 pupils of the 4th grade (9-10 years old) of elementary school. Fortyseven children were subjected to the application of an agar plate for 5 minutes and 317 of children for 3 minutes.

In the case of 5-minute application, the mean value of phosphorus dissolved from the enamel was $1.87 \mu\text{g}$ and the standard deviation was $0.39 \mu\text{g}$. For the 3-minute application, the values of mean and standard deviation were $1.60 \mu\text{g}$ and $0.38 \mu\text{g}$, respectively.

The data revealed that the distribution of phosphorus dissolved from the enamel showed a fairly normal pattern. With these experiments, the possibility of evaluation of acid resistance of enamel in vivo system by means of the agar plate method devised in this laboratory was demonstrated.

Moreover, six female subjects aged 18-20 were studied to determine an appropriate time for in vivo application. The experimental times were set from one to five minutes for each analysis. The results showed that phosphorus dissolved from the enamel in these samples increased with increasing the time of application, notwithstanding the magnitude of acid resistance of individual enamel.

From the data in this study, the 3-minute application of the agar plate in vivo seemed to be the best, since it obtains enough phosphorus for analysis with a minimum of trouble to the patient and takes into account possible error in measuring the time.

I. 緒 言

竹内の疫学的齲蝕発病理論式¹⁾は、齲蝕発病に関する因子を環境因子と Host 因子とに大別し、これらの関係を数量的に把握しようとするものである。Host 因子のうち、歯牙それ自身の齲蝕発病抵抗性は、歯牙の酸に対する溶解が齲蝕の発病ないし進行に関係があるとする一般の見解にしたがうならば、歯牙の酸に対する溶解性いいかえれば耐酸性を何等かの方法で測定することにより、これを数値化することができる。

齲蝕予防剤開発のためのスクリーニング方法として、実験室でしばしば実施されている Powdered enamel 法、Window 法および Whole teeth 法は、歯牙の耐酸性を測定するための方法ではあるが、何れも直接または間接に抜去歯牙を試料とするものである。また、ヒトの口腔内にある歯牙の耐酸性を測定しようとする試みも従来から行なわれており、そのうち最も一般的なのは、うすい酸液を浸した小円形濾紙を歯面に接触させる方

法である。この方法によつて、Walter²⁾や Mühlemann ら³⁾は酸がほうろう質と反応して生ずる pH の変化を共存させた指示薬の色の変化によつて観察し、Marthaler ら⁴⁾、Wallis⁵⁾、大森ら⁶⁾は溶出した歯質成分中のリンなどを定量している。一方、Holmes ら⁷⁾や Herd ら⁸⁾はクランプつきの特殊なセルを歯面に装着して、この中に入れた酸液の pH の変化を測定し、また、Volpe ら^{9,10)}は酸液を満したポリエチレンの容器を、両隣在歯間に空隙を有する上顎歯の歯間に挿入して歯牙を浸漬し、溶出したリン量を定量している。しかし、これらの方法は、何れも特殊な装置を必要としたり精度が不良であつたりなどして、各個人の生活歯牙の齲蝕抵抗性を知るための野外測定用としては不適當なものが多い。

著者の一人、川崎は、竹内とともに、乳酸緩衝液を寒天によつて取扱い易い一定の形状とし、歯面に付着させたのち、歯面から溶出したリンの量を定量する、いわゆる Agar plate 法を考案し、さらに、これを抜去埋伏智歯に適用して、Window

法と相関があることを歯質耐酸性測定法シリーズ I¹¹⁾ (以下、前報と略記する)で報告した。

われわれは、本法をヒトの口腔内にある歯牙に適用するに当り、なるべく被測定者に負担のかからないことを念頭において術式を定めるとともに、小学校第4学年児童の上顎中切歯について、この方法による歯質耐酸性の分布を知るため、以下の研究を行なった¹²⁾。

II. 研究方法および研究材料

1. Agar plate (寒天平板) の作成

前法と同一の方法、すなわち、pH 4.5 の 0.1M 乳酸・乳酸ナトリウム緩衝液を用い、厚さ 2 mm、直径 6.5 mm の寒天平板を作成した。

2. 生体歯牙での測定の術式

生体歯牙に対し、つぎの術式で上顎中切歯を測定した。

1) 前処理 (歯面清掃)

(1) まず、被測定者に、フッ化物を添加していない市販歯磨剤と歯刷子とを用い、歯口清掃を行なわせる。

(2) ポリッシングブラシに浮石末グリセリンをつけ、約 3000 r.p.m. で約 10 秒間、測定する歯面を研磨清掃する。

(3) 洗口後、測定歯面に 0.2 % サフラニン液を塗布してふたたび洗口させ、歯垢の残存を認めたときは、それが除かれるまで研磨清掃を反復する。

(4) 簡易防湿する。

(5) 排唾管を装着する。

(6) 測定歯面を、ポリエチレン製噴射瓶に入れた再蒸留水を用いてじゅうぶん洗浄する。

(7) エアーコンプレッサーにより、測定歯面を乾燥する。

2) Agar plate の歯面への包摂

(1) 直径約 6 mm の円形の定量用濾紙 (東洋濾紙 No. 7 C) の一端をピンセットでつまみ、これを、あらかじめ用意した Agar plate に附着させて Agar plate を保持し、測定歯面のほぼ中央に置き、同時にストップウォッチにより計時を開始する。

(2) 所定時間 (後記する) 放置する。この間、Agar plate に唾液等が附着しないよう注意する。

(3) 所定時間の経過と同時に、Agar plate の上面の濾紙の一端をピンセットでつまみ、Agar plate を附着させたまま歯面からとり除き、これをあらかじめ蒸留水 2 ml を入れてある 10 ml 遠心沈殿管の中に投入する。

(4) 引続いて、なるべく速やかに測定ずみの歯面に残った液を別の小円形定量用濾紙で拭きとり、この濾紙を、Agar plate を投入したと同じ遠心沈殿管の中に入れる。

3) 歯面から溶出したリンの定量

遠心沈殿管に移された、包摂歯面から溶出した歯質成分について、以下、前報¹¹⁾と同様に操作し、リン溶出量の定量を行なう。

3. 研究対象と包摂時間

1) 実験 I および実験 III (術式および歯質耐酸性の分布の検討)

埼玉県浦和市、蕨市、川口市、大里郡および山梨県甲府市の小学校 7 校の第 4 学年男女児童 1,036 名から、実験 I では 49 名、実験 III では 317 名をそれぞれ無作為に抽出して研究対象とし、齲蝕のない左側上顎中切歯唇面を測定歯面とする前記術式による測定を行なった。包摂時間は、実験 I では、前報の抜去埋伏智歯の場合と同じく 5 分間としてリン溶出量の比較を試みたが、実験 I および II の結果に基づき、実験 III では包摂時間を 3 分間に改め実施した。

2) 実験 II (包摂時間とリン溶出量)

同一歯牙についての包摂時間とリン溶出量との関係を検討するため、20 歳前後の女子 6 名の左右側上顎中切歯唇面を測定歯面として、つぎの測定を行なった。

(1) 包摂時間の種類と順序：包摂時間は、各歯牙について 1, 2, 3, 4, 5 分間の 5 段階をすべて実施した。ただし、包摂時間を 1 分間から始めて 2, 3, 4, 5 分間の順序で実施すると、前の測定の影響がつぎの測定値に影響し、測定値全体に偏りを生ずるおそれがあるので、各被測定者ごとに、実施する包摂時間の順序を無作為化して測定を行なった。

(2) 術式：前述の一般的術式にしたがつて研磨清掃を行なったのち、乾燥させた被測定歯牙の一歯の歯面に Agar plate を包摂し、10～20秒後、反対側の歯牙にも Agar plate を包摂する。両歯面とも同一時間の包摂を行ない、Agar plate 除去後の歯面の残存液滴の拭きまで完了したのち、両歯面を再蒸留水でよく洗浄し、乾燥後、定められた別の包摂時間による測定を上記と同様にくりかえす。

III. 研究成績および考察

1. 実験 I (5分の場合)

小学校第4学年児童男女49名の 上顎左側中切歯唇面について前記方法で測定を行なった結果、図1の通り、リン溶出量の平均値 $1.87\mu\text{g}$ 、標準偏差 $0.39\mu\text{g}$ の成績を得た。測定値の分布は、抜去埋伏智歯について行なった前報の場合と同様、ほぼ正規分布を示したが、その平均値 $1.87\mu\text{g}$ は前報の $0.95\mu\text{g}$ に対して著しく大きな値である。

図1 包摂時間5分の場合のリン溶出量

ところで、Agar plate の包摂を5分間として前記術式を生体歯牙に適用したとき、簡易防湿後測定完了までの所要時間は平均6～7分間で、熟練した測定者の場合でもこれを6分以下とすることはできなかった。被測定者にとり、この間開口したままになっていることは、かなりの負担であることが認められた。本実験において、リン溶出量が埋伏抜去智歯の場合に比して過量であったことから、リンの定量上支障のない範囲で Agar plate の包摂時間を短縮できる可能性が考えられたので、包摂時間とリン溶出量との関係を検討するため、つ

ぎの実験IIが行なわれた。

2. 実験 II (包摂時間とリン溶出量)

図2は、1～5分間の各包摂時間ごとに、6名の各被測定者についてそれぞれの左右側中切歯の測定値を平均して図示したもので、歯質耐酸性の大小にかかわらず、Agar plate の包摂時間が長くなるにつれてリン溶出量は増加することがわかる。

各歯牙ごとに、包摂時間2～5分間での測定値を、包摂1分間のときのリン溶出量を1とする比率に換算し、図示したのが図3である。これについて回帰分析を行なったところ、リン溶出率は包

図2 同一人の同一歯牙の包摂時間ごとのリン溶出量

図3 包摂時間に対するリン溶出率の回帰直線

摂時間に対して高度に有意で、その回帰式は、 $y = 0.35x + 0.86$ ($x = 2 \sim 5$) となった。

本研究で用いているリン定量法¹¹⁾では、検量線はリン量の $0 \sim 0.8 \mu\text{g/ml}$ の範囲で直線性を有し、 $0.1 \mu\text{g/ml}$ のリンを検出し定量することが可能である。この検出限界および測定精度から上記実験結果をみると、包摂時間は $1 \sim 2$ 分間でもじゅうぶんといえるが、一方、包摂時間が短くなった場合、歯面から Agar plate を除去しあるいはその後歯面を清拭するのに伴う計時誤差（最小 $5 \sim 10$ 秒）が、包摂時間に対して無視し得ない大きさとなってくる。

これらの見地から、今回の生体歯牙に対していわゆる Agar plate 法による術式および測定条件において、被検者の負担を軽くするため、包摂時間は 3 分間を適当と認めた。

3. 実験 III (3 分の場合)

小学校第 4 学年男女児童 317 名の 上顎左側中切歯唇面について、pH 4.5 の Agar plate を用いて包摂時間を 3 分間としたときの測定結果は、図 4 の通りで、平均値 $1.60 \mu\text{g}$ 、標準偏差 $0.38 \mu\text{g}$ のほぼ正規型の分布を得た。これは、この条件におけるいわゆる Agar plate 法によつて、ヒトの表層

図 4 包摂時間 3 分の場合のリン溶出量

表 1 被検歯数 (1)

歯牙年齢 性別	0	1	2	3	計
男	6	58	62	20	146
女	9	59	72	31	171
計	15	117	134	51	317

歯質の耐酸性の強弱を評価し得る可能性を示すものと考えられよう。なお、被測定歯の男女別および歯牙年齢別の内訳は、表 1 に示す通りである。

この実験における平均値 $1.60 \mu\text{g}$ は、包摂 5 分間の場合の既述の平均値 $1.87 \mu\text{g}$ とともに、前報の抜去埋伏智歯における包摂 5 分間のときの値に比し著しく大きい値であるが、この違いが、歯牙の種類による歯質耐酸性の差を示すものか、単に生体歯牙と抜去後 10%ホルマリン液により固定保存された歯牙との差に基づくものか、あるいはまた、これら測定歯面に対する事前の研磨清掃条件の影響の違いによるものかなどについては、今後の検討にまちたい。

IV. 結 論

生体歯牙について歯質耐酸性を判定するために開発された、いわゆる Agar plate 法の臨床応用の術式を定めるため、pH 4.5、厚さ 2 mm、直径 6.5 mm の Agar plate を用い、上顎中切歯唇面について研究を行ない、つぎの結論を得た。

1. 小学校第 4 学年の男女児童 49 名についての 5 分間包摂のリン溶出量は、平均値 $1.87 \mu\text{g}$ 、標準偏差 $0.39 \mu\text{g}$ のほぼ正規型の分布を示した。
2. 20 歳前後の女子 6 名についての、包摂時間が 1, 2, 3, 4, 5 分間の場合の同一歯牙のリン溶出量は、包摂時間が長くなるにつれて増加し、包摂時間とリン溶出率に関する回帰分析の結果、両者は高度に有意であり、回帰式 $y = 0.35x + 0.86$ ($x = 2 \sim 5$) を得た。
3. 小学校第 4 学年の男女児童 317 名についての 3 分間包摂のリン溶出量は、平均値 $1.60 \mu\text{g}$ 、標準偏差 $0.38 \mu\text{g}$ のほぼ正規型の分布を示した。
4. これらの結果から、包摂時間は 3 分間を適当と認め、また、いわゆる Agar plate 法は、生体歯牙の歯質の耐酸性の判定に利用し得る可能性を示すものと考えられた。

終りに、ご指導ならびにご校閲を賜った竹内光春教授に深謝し、また、本研究にご協力いただいた東京歯科大学口腔衛生学教室ならびにライオン歯磨株式会社研究所の関係各位に感謝の意を表します。

文 献

- 1) 竹内光春：疫学的齲蝕発病理論について，歯科学報，**61**：61-70，1961.
- 2) Walter, H. G.：A simple laboratory method for preliminary screening of organic fluorides as to their enamel reducing effect, *Helv. odont. Acta.*, **2**：40-43, 1958.
- 3) Mühlemann, H. R. and Wolgensinger, F.：In vivo reduction of enamel solubility in children using an organic fluoride dentifrice, *Herv. odont. Acta.*, **3**：35-39, 1959.
- 4) Marthaler, T. M. and Zillio, R.：Enamel solubility studies in vivo: method, error and effect of topically applied fluorides, *Herv. odont. Acta.*, **4**：27, 1960.
- 5) Wallis, C. P.：Solubility of enamel in situ, *J. dent. Res.*, **40**：1276, 1961, (I. A. D. R. Abs.).
- 6) 大森郁朗，神山紀久男，太田章雄，荻野昭夫：Enamel Biopsy について，口腔衛生会誌，**15**：185, 1965.
- 7) Holmes, A. W. and Middleton, J. D.：An in vivo method for the estimation of enamel solubility, *Brit. dent. J.*, **4**：380-386, 1962.
- 8) Herd, J. K. and Overell, B. G.：Effect of toothpaste containing sodium monofluorophosphate on enamel solubility in vivo, *Brit. dent. J.*, **117**：286-291, 1964.
- 9) Eigen, E., Volpe, A. R., Lapeyrolerie, F. M., Weiss, S. and King, W. J.：An in vivo technique for determining the effect of agents on enamel solubility in human subjects, *Arch. oral Biol.*, **7**：459-460, 1962.
- 10) King, W. J., Weiss, S., Volpe, A. R. and Eigen, E.：In vivo tooth surface solubility studies, mechanisms of dental caries. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **131**：713, 1965.
- 11) 竹内光春，川崎徹：歯質抵抗性判定のためのほうろう質リン定量法：いわゆる Agar plate 法ならびに本法と Window 法との相関（歯質耐酸性測定法シリーズ I），口腔衛生会誌，**22**：346-352, 1972.
- 12) 竹内光春，川崎徹，嶋村昭平，長島暲，馬場久衛：歯質抵抗性判定のための琺瑯質表面の P 定量法（Ⅲ）生体歯牙への予備的応用，歯科学報，**65**：727-728, 1965.