原 著

レーザー被照射再石灰化エナメル質における 耐酸性の評価*

Evaluation of Acid Resistance on Lased Remineralized Enamel

好 川 正**

Tadashi YOSHIKAWA**

Received October 7, 1991 ; accepted October 24, 1991

Abstract: The purpose of this study was to examine the acid resistance of remineralized enamel after laser irradiation that could not be defined by microradiograph (MR). Forty-five human premolar enamel slabs were prepared for this study. The enamel slabs were ground down to about $400\mu\text{m}$. Forty enamel slabs were divided into four groups, i. e., sound, demineralized (Dem), remineralized after laser irradiation (Lased) and remineralized (Rem) groups. The Other five slabs were used for MR. The Dem, Lased, and Rem groups were exposed to 0.1 M lactic acid buffer (3.0 mM Ca, 1.8 mM P, 1.0 % carboxymethylcellulose, pH 4.5, 37°C) for 12 hours. The Lased group was irradiated with a Q switch Nd-YAG laser with 50 J/cm^2 of total energy density. The Lased and Rem. groups were exposed to remineralizing solution (3.0 mM Ca, 1.8 m MP, 1.0 % carboxymethylcellulose, 150 mM NaCl, 3.0 ppm F, pH 7.0, 37°C) for 10 days. The surface of the slabs for MR was divided into four, for all treatment. All slabs were exposed to 0.1 M lactic acid solution (pH 4.5, 37°C , 5 ml) for 12 hours. The dissolved calcium in the lactic acid solution was measured, and the dissolved calcium per 10 mm^2 was evaluated. The slabs for MR were sectioned their MRs were evaluated using the calculated mineral content. The Dissolved calcium of the Lased and Rem groups was significantly lower than in the Sound and Dem groups. Acid resistance for remineralization could be defined. However, there was no statistically significant difference between the lased and Rem group. The results were the same as the results of the MR evaluation. The Lesions of the lased remineralized area were deeper than in unlased the remineralized area, but there was not statistic difference between these areas. It was thought that permeability of the enamel was increased by laser irradiation. However, the lesion depth was not related to the amount of dissolved calcium. It was thought that disssolved calcium from the deep layer of the remineralized enamel after laser irradiation was not diffused easily because of reaction to each layer.

* 本論文の要旨は平成3年9月22日第40回日本口腔衛生学会総会（東京都）において発表した。

** 長崎大学歯学部予防歯科学講座（主任：高木 興氏教授）

** *Department of Preventive Dentistry, Nagasaki University School of Dentistry (Director: Prof. Okiuji TAKAGI)*

索引用語：脱灰エナメル質，再石灰化，レーザー照射，溶出カルシウム量

Key words: Demineralized enamel, Remineralization, Laser irradiation, Dissolved calcium

緒 言

脱灰エナメル質へのレーザー照射は，再石灰化を阻害しないことを既に報告した¹⁾。また同報において，microradiograph から読みとられた density より算出したミネラル量を指標に再石灰化を評価した場合は，レーザー照射による耐酸性の効果を明確にすることはできなかった。一方，再石灰化の程度を定量的に評価する方法として再石灰化エナメル質を酸に浸漬し，そこから溶出する Ca^{2+} 量を測定する方法が用いられてきた²⁾。また，健全エナメル質や脱灰エナメル質にレーザー照射後，同様に酸に浸漬し，溶出する Ca^{2+} 量を測定し，その耐酸性を評価する報告³⁻⁷⁾ も認められる。

本研究は，microradiograph より換算したミネラル量からは明確にすることができなかったレーザー照射後再石灰化されたエナメル質の耐酸性を，その溶出 Ca^{2+} 量から検討する目的で実施した。またレーザー非照射-再石灰化エナメル質の溶出 Ca^{2+} 量との比較，検討も行った。

材料および方法

試料には，矯正目的のため抜去されたヒト小臼歯を用いた。各歯牙の頬側面を，肉眼および実体顕微鏡下で観察し，亀裂，白斑の存在しない45例を実験に供した。抜去歯牙は過去のフッ化物応用経験の有無を問わず収集されたため，エナメル質表層を耐水研磨紙を用い約400 μm 削除し表層のフッ素濃度の差より生じる個体差を抑えるよう配慮した。40例の試料は，溶出 Ca^{2+} 量測定のため，健全群，脱灰群，レーザー照射後再石灰化群（以下レーザー群と略），再石灰化群の4群に分けた。これらは，実験面（平均面積10.79 mm^2 ）を除いてダイヤモンドポイントで歯質を削除しブロック状とし，実験面以外をスティッキーワックスで被覆した。他の5例は実験面以外を nail varnish で被覆し，microradiograph（以下MRと略）撮影用とした。

脱灰，レーザー，再石灰化各群および健全域保持のため実験面1/4に nail varnish を塗布したMR用試料を0.1M 乳酸緩衝液（3.0mM Ca, 1.8mM P, 1.0% carboxymethylcellulose, pH 4.5, 37°C）に12時間浸漬し，スターラー（Ministiror, 井内）攪拌下で脱灰を行った。

緩衝液容量は，1試料当たり20ml とした。脱灰終了後，MR用試料の脱灰面の一部に nail varnish を塗布し被覆した。レーザー群およびMR用試料の一部に墨汁を塗布後，280mJ/pulse，発振頻度10Hz でQスイッチ Nd-YAG レーザー（DCR3型，日本赤外線工業製）をプリズム導光にて照射した。総エネルギー密度を50J/cm² で統一するため照射時間を調節した（約1.5秒）。レーザー，再石灰化両群およびMR用試料を再石灰化液（3.0mM Ca, 1.8mM P, 1.0% carboxymethylcellulose, 150mM NaCl, 3.0ppm F, pH 7.0, 37°C）に10日間浸漬し，再石灰化を行った。再石灰化液量は，1試料当たり20ml とし，2日ごとに液の交換を行った。再石灰化終了後，MR用試料はアセトンにて実験面の nail varnish を除去した。

さらに全試料をそれぞれ0.1M 乳酸溶液（pH 4.5）5 ml に37°C で12時間，攪拌を行わず浸漬した。試料を浸漬した乳酸溶液0.5ml を取り，1%硝酸ランタン溶液0.5ml を加え，さらに超純水4.0ml を加えて10倍希釈し， Ca^{2+} を原子吸光光度計（180-80型，HITACHI）を用いて測定した。溶出 Ca^{2+} 量は，乳酸溶液5 ml に溶出した Ca^{2+} 量を単位面積（10 mm^2 ）当たりで算出した。溶出 Ca^{2+} 量の各群の比較は，Newman-Keuls 法⁸⁾を用いて評価した。

MR用試料は乳酸溶液浸漬後，既報¹⁾と同様に薄切切片とし，そのMRを撮影した。撮影したMRの density を，densitometer（Densitometer PDM-5, 小西六社）を用い，エナメル質表層から深層方向に高さ5 μm ，幅10 μm のスリットで走査し読みとった。読みとられた density は，Angmar ら⁹⁾の方法に準じミネラル量に換算して評価した。

結 果

各群の溶出 Ca^{2+} 量を Table 1 に示した。溶出 Ca 量は，レーザー群が120.23 $\mu\text{g}/10\text{mm}^2$ と最小であり，次いで再石灰化（131.39 $\mu\text{g}/10\text{mm}^2$ ），脱灰（241.40 $\mu\text{g}/10\text{mm}^2$ ），健全群（284.93 $\mu\text{g}/10\text{mm}^2$ ）の順であった。溶出 Ca^{2+} 量の4群の比較を Newman-Keuls 法で検定した結果を Table 2 に示した。レーザー群および再石灰化群の溶出 Ca^{2+} 量は，健全群，脱灰群と比較し有意に小さい傾向を示した（ $p < 0.01$ ）。レーザー群と再石灰化群

Table 1 Dissolved Ca^{2+} of each group

Groups	N	Dissolved Ca^{2+} Mean $\pm$ S.D. ($\mu\text{g}/10\text{mm}^2$)
Sound	10	284.93 ± 78.79
Dem	10	241.40 ± 40.58
Lased	10	120.23 ± 21.90
Rem	10	131.39 ± 29.16

Table 2 Result of Newman-Keuls test corresponding to Table 1

	Lased	Rem	Dem	Sound
Lased	—	NS	**	**
Rem		—	**	**
Dem			—	NS

** : $p < 0.01$

NS : Not significant

Fig. 1 Typical microradiographic pictures of each section of enamel after acid challenge

- Sound and demineralized enamel (arrow indicates border between sound and demineralized area)
- Lased remineralized enamel
- Unlased remineralized enamel

間では、レーザー群の溶出 Ca^{2+} 量が小さい傾向を示したが、統計学的有意差は認められなかった。また脱灰群と健全群間においては、脱灰群で小さい傾向を示したが、有意差は認められなかった。

また、MR の所見を Fig. 1 に示した。MR 試料上の健全域は乳酸溶液浸漬による脱灰像を呈し、脱灰域は、さらなる脱灰を受けたことにより実質欠損を示す所見を

Fig. 2 Mineral content in vol% of each section of enamel**Table 3** Lesion depth (μm) of lased and unlased areas

Lesion depth (Mean $\pm$ S.D.)	
Lased area	Unlased area
53.0 ± 6.7	48.0 ± 5.7

呈した。しかしながらレーザー照射一再石灰化域（以下照射一再石灰化域と略）は、レーザー非照射一再石灰化域（以下非照射一再石灰化域と略）と比較し明確な差は認められずとも不透過像を呈する所見を示した。MR の density より換算したミネラル量の分布（5例の平均）を Fig. 2 に示した。照射一再石灰化域におけるミネラル量は、非照射一再石灰化域に比較し表層より再石灰化底部に至るまでわずかに低い傾向を示した。また照射一再石灰化域における脱灰深度は、非照射一再石灰化域における深度より深い傾向を示した。さらに Table 3 に両域の脱灰深度（5例の平均）を示した。両域における深度は照射一再石灰化域で $53.0\mu\text{m}$ 、非照射一再石灰化域で $48.0\mu\text{m}$ と照射一再石灰化域で深い傾向を示したが、両域間で統計学的な有意差は認められなかった。

考 察

レーザー、再石灰化群の溶出 Ca^{2+} 量は、健全、脱灰群のそれと比較し有意に小さな値を示した (Table 1, 2)。再石灰化エナメル質が耐酸性を有することは既に知られており^{2,10,11)}、再石灰化による耐酸性効果を確認することができた。

レーザー群の溶出 Ca^{2+} 量は、再石灰化群に比較して有意差は認められなかったが小さい傾向が認められた (Table 1, 2)。著者は、既報¹⁾において脱灰エナメル質にレーザー照射後再石灰化を行い、その切片の両面脱灰

後、MR から耐酸性を検討したが、レーザー照射後再石灰化エナメル質の耐酸性は、非照射一再石灰化エナメル質と比較し有意に高い傾向は認められなかった。このことは、本実験条件下においてもレーザー照射による耐酸性向上は非照射再石灰化エナメル質のそれと比較して明確にされなかったことを示している。一方、森岡ら⁷⁾は表層の存在するヒト・エナメル質を用い、乳酸ゲルで1時間脱灰後、Nd-YAG レーザー照射を行い、酸性フッ素リン酸溶液を塗布しフッ素を含まない再石灰化液に浸漬し再石灰化を行っている。その後、0.5M 過塩素酸溶液に最長45秒浸漬し溶出 Ca^{2+} 量を測定し、レーザー照射により再石灰化が促進され、耐酸性が向上することを報告している。森岡ら⁷⁾の研究は、0.1M 乳酸溶液に12時間浸漬した本研究と比較し、用いられた酸の種類は異なるが、短時間で溶出した Ca^{2+} 量を検討しており、その後の経時的変化は不明である。一方本研究においては、12時間での溶出 Ca^{2+} 量のみを評価しており短時間での溶出量は不明である。今後、耐酸性の程度を検討する上で溶出 Ca^{2+} 量の経時的変化を調べる必要があると思われる。

また、健全群の溶出 Ca^{2+} 量は、脱灰群のそれと比較し有意差は存在しないが大きい傾向を示した (Table 1, 2)。脱灰エナメル質は、12時間乳酸緩衝液に浸漬した部分であり、比較的溶出しにくいミネラルが残存している可能性がある。これに対し健全エナメル質においては、溶出しやすいミネラルも比較的溶出しにくいミネラルもともに含有しているため、乳酸溶液に浸漬した際、まず溶出しやすいミネラルが溶出し、結果として高い溶出 Ca^{2+} 量を得たものと思われる。さらに、脱灰エナメル質は健全エナメル質に比較し多孔性であることが知られており¹²⁻¹⁴⁾、乳酸溶液に浸漬した場合、反応に関与する面積が大きくなることが考えられる。このため脱灰エナメル質においては短時間で Ca^{2+} が溶出するものと思われる。本実験において、乳酸溶液浸漬にあたり攪拌は行っていないため、脱灰群の溶液中の反応域では局所で飽和に達し易く、以後の溶出速度は遅くなることが考えられる。一方健全群においては、脱灰群と比較し Ca^{2+} の溶出に時間を要するが、急速な溶出は起こらず、局所で飽和に達することなく Ca^{2+} の溶出が起こるものと思われる。以上のことから本実験条件下では健全群において溶出 Ca^{2+} 量が大きくなることが考えられる。

乳酸溶液に浸漬したエナメル質の MR において、照射一再石灰化域におけるミネラル量の分布は、非照射一再石灰化域に比較し低い傾向を示し (Fig. 2)、その脱

灰深度は有意差は認められなかったが照射一再石灰化域で深い傾向を示した (Table 3)。田籾ら⁹⁾は、in vitro で脱灰したヒト・エナメル質にノーマルパルス・Nd-YAG レーザーを照射し、その表面構造を走査型電子顕微鏡にて観察し、レーザー照射を受けた脱灰エナメル質は、微細なモザイク状の亀裂が存在していることを報告している。また、Oho ら¹⁵⁾は、健全エナメル質へのレーザー照射により微細なクラックが生じ、物質透過性が向上することを報告している。健全エナメル質に比較して低いミネラル量を有する脱灰エナメル質にレーザー照射を行った本実験においては、その物質透過性の向上もより大きいことが考えられる。このため乳酸溶液に浸漬した際、より深部に酸が到達し、その脱灰深度が深くなると思われる。

しかし、この脱灰深度が深いことは、前述した溶出 Ca^{2+} 量の結果と矛盾する。Oho ら¹⁵⁾は、健全エナメル質へレーザーを照射し、これを酸に浸漬した場合、レーザー照射により発生した微細なクラックに溶出した Ca^{2+} がとらえられ拡散しないと推定している。再石灰化エナメル質を用いた本実験で、レーザー群の深層より溶出した Ca^{2+} は、各層での再反応により拡散しにくくなることが考えられた。

結 論

1. レーザー照射後再石灰化を受けたエナメル質の溶出 Ca^{2+} 量は、レーザー非照射一再石灰化エナメル質に比較し低い傾向を示したが、統計学的な有意差は認められなかった。

2. レーザー照射一再石灰化域の脱灰深度は、非照射一再石灰化エナメル質と比較し有意差は認められなかったが深い傾向を示し、その深層で溶出した Ca^{2+} は各層の再反応により拡散しにくくなることが考えられた。

謝 辞

稿を終えるにあたり、本研究に対し終始懇篤なる御指導と御校閲を賜りました長崎大学歯学部予防歯科学講座 高木興氏教授に深甚なる謝意を表します。

また、本研究の遂行にあたり、種々なる御教示、御助言を賜りました長崎大学歯学部予防歯科学講座 飯島洋一助教授に深く感謝いたします。

併せて、御協力下さいました長崎大学歯学部予防歯科学講座の皆様へ感謝いたします。

本研究の一部は文部省科学研究費奨励研究 A (課題番号 02857318) の補助を受けた。

文 献

- 1) 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の影響，口腔衛生会誌，**41**；314-318，1991.
- 2) Feagin, F., Pate, P. R., Koulourides. T. and Pigman, W.: Study of the effect of calcium, phosphate, fluoride hydrogen ion concentrations on the remineralization of partially demineralized human and bovine enamel surfaces, *Arc. Oral Biol.*, **16**；535-548, 1971.
- 3) 田箆祥子，森岡俊夫，堤 裕之：エナメル質のフッ素とりこみに及ぼすレーザー照射の影響—EPM 線分析による—，日本レーザー医学会誌，**6**；239-242，1986.
- 4) 於保孝彦，森岡俊夫：Ar レーザー照射によるヒトエナメル質への耐酸性付与効果，口腔衛生会誌，**37**；283-289，1987.
- 5) 田箆祥子，宮谷範子，森岡俊夫：レーザー照射によるエナメル質表層下脱灰の進行抑制に関する研究，口腔衛生会誌，**38**；514-515，1988.
- 6) Tagomori, S. and Morioka, T.: Combined effects of laser and fluoride on acid resistance of human dental enamel, *Caries Res.*, **23**；225-231，1989.
- 7) 森岡俊夫，田箆祥子，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促進への効果について，日本レーザー歯学研究会誌，**2**；1-9，1991.
- 8) Winer, B. J.: Statistical principles in experimental design, Mc Grau-Hill Kogakusya LTD., Tokyo, second edition, 1971, p. 193.
- 9) Angmar, B., Carlstöm, D. and Glas, J. E.: Studies on the ultrastructure of dental enamel, IV. The mineralization of normal human enamel, *J. ultra. Res.*, **8**；12-23, 1963.
- 10) 川崎浩二：脱灰エナメル質のフッ素取り込みと再石灰化に及ぼすカルボキシメチルセルロースの効果，口腔衛生会誌，**39**；242-245，1989.
- 11) 飯島洋一，川崎浩二，高木興氏：再石灰化エナメル質の化学的安定性，口腔衛生会誌，**39**；205-210，1989.
- 12) Palamara, J., Phakey, P. P., Rachinger, W. A. and Orams, H. J.: Utrastucture of the intact surface zone of white spot and brown spot carious lesions in human enamel, *J. Oral Pathol.*, **15**；28-35, 1986.
- 13) Simmelink, J. W. and Nygaard, V. K.: Ultrastucture of striations in carious human enamel, *Caries Res.*, **16**；179-188, 1982.
- 14) Hicks, M. J. and Silverstone, L. M.: Acid-etching of caries-like lesions of enamel: A scanning electron microscopic study, *Caries Res.*, **18**；327-335, 1984.
- 15) Oho, T. and Morioka, T.: A possible mechanism of acquired acid resistance of human dental enamel by laser irradiation, *Caries Res.*, **23**；225-231, 1990.