原 著

レーザー照射—再石灰化エナメル質に おける耐酸性能の変化

Changes in the Acid Resistance in Laser
Irradiated-Remineralized Enamel

好 川 正* 飯 島 洋 一* 稲 葉 大 輔*
川 崎 浩 二* 田 中 円 裕* 高 木 興 氏*

Tadashi YOSHIKAWA*, Youichi IJIMA*, Daisuke INABA*,
Koji KAWASAKI*, Nobuhiro TAGUCHI* and Okiuji TAKAGI*

Received July 16, 1992; accepted August 24, 1992

Abstract: The aim of this study was to examine the change in acid resistance of laser-irradiated enamel. Sixty-six enamel slabs were prepared from thirty-three human premolars. These enamel slabs were demineralized artificially. They were irradiated with a Q-switch Nd-YAG laser and remineralized with two remineralizing solutions, one with and the other without fluoride. To evaluate acid resistance, the enamel slabs were subsequently immersed in 0.1 M lactic acid solution (pH 4.5) while stirring (139 r.p.m. $\pm$ 12; Mean $\pm$ S. D.), and dissolved Ca^{2+} was measured as a function of time from 15 min to 180 min.

The results were as follows:

- 1) Laser irradiation increased acid resistance of demineralized enamel during short periods (up to 60 min).
- 2) Remineralization without fluoride increased acid resistance of demineralized enamel during short periods (up to 60 min) regardless of laser irradiation.
- 3) Remineralization with fluoride increased acid resistance of demineralized enamel during long periods (up to 180 min) regardless of laser irradiation.

索引用語: 再石灰化, レーザー照射, 耐酸性, 溶出 Ca^{2+} 量

Key words: Remineralization, Laser irradiation, Acid resistance, Dissolved calcium

緒 言

脱灰エナメル質の再石灰化におよぼすレーザー照射ならびにフッ素の影響について検討した結果, レーザー照射は脱灰エナメル質の耐酸性を向上させたこと, レーザ

ー照射の耐酸性付与効果はフッ素存在下での再石灰化とほぼ同等の効果が認められたこと, またレーザー照射後, 再石灰化液中にフッ素が存在する場合, 耐酸性は付加的に獲得されることを報告してきた¹⁾。しかしながら, 乳酸溶液への溶出 Ca^{2+} 量の測定に際し, 前報¹⁾では溶

* 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)

Table 1 Accumulated volume of dissolved Ca^{2+} ($\mu\text{g}/10\text{mm}^2 \cdot 5\text{ml}$) during acid resistance test.

Groups	N	Immersion time (minutes)				
		15	30	60	120	180
D	10	20.46 $\pm$ 6.66*	35.48 $\pm$ 8.66	66.26 $\pm$ 15.65	121.60 $\pm$ 27.02	174.90 $\pm$ 31.77
D+L(+)	10	8.97 $\pm$ 4.52	14.54 $\pm$ 6.81	44.79 $\pm$ 15.61	120.08 $\pm$ 26.44	190.75 $\pm$ 31.63
D+L(+) F(+)	10	3.17 $\pm$ 1.74	6.27 $\pm$ 3.47	19.94 $\pm$ 9.77	50.69 $\pm$ 17.15	78.93 $\pm$ 24.27
D+L(-) F(+)	10	3.45 $\pm$ 4.15	11.21 $\pm$ 7.85	24.55 $\pm$ 15.62	59.71 $\pm$ 25.71	86.93 $\pm$ 33.26
D+L(+) F(-)	10	3.70 $\pm$ 4.03	13.15 $\pm$ 9.70	38.58 $\pm$ 19.01	111.74 $\pm$ 30.46	179.50 $\pm$ 59.52
D+L(-) F(-)	10	7.73 $\pm$ 6.33	15.80 $\pm$ 11.90	47.54 $\pm$ 17.56	124.39 $\pm$ 35.25	201.62 $\pm$ 53.53

*Mean $\pm$ S.D.

液の撈拌を行わずに評価した。そのためレーザー照射に起因する亀裂深部からの Ca^{2+} 溶出が発現しにくいことが推察され、耐酸性の評価に影響を与えていると思われた。

本研究では、前報と同様の各群の試料を pH 4.5 の 0.1 M 乳酸溶液 5 ml (37°C) に撈拌しながら浸漬し溶出 Ca^{2+} 量を測定し、耐酸性について評価を行った。

材料と方法

材料は矯正目的で抜歯されたヒト小臼歯33歯で、頬側および舌側からエナメル質ブロック計66例を切り出した。抜去歯牙は、フッ化物応用の有無を問わずに収集されたため、表層におけるフッ素濃度の差より生じる個体差をなくす目的で、耐水研磨紙にてエナメル質表層を約 400 μm 削除し実験に用いた。

前報¹⁾と同様にエナメル質試料を 1 群11例ずつ、以下の 6 群に分けた。

- 1) D群: 脱灰のみ (Demineralization)
- 2) D+L (+) 群: 脱灰後レーザー照射 (Demineralization plus Laser)
- 3) D+L (+) F (+) 群: 脱灰後レーザー照射し、3 ppm F 添加再石灰化液浸漬 (Demineralization plus Laser and F containing remineralization)
- 4) D+L (-) F (+) 群: 脱灰後 3 ppm F 添加再石灰化液浸漬 (Demineralization plus no Laser, and F containing remineralization)
- 5) D+L (+) F (-) 群: 脱灰後レーザー照射し、フッ素無添加再石灰化液浸漬 (Demineralization plus Laser and non F containing remineralization)
- 6) D+L (-) F (-) 群: 脱灰後フッ素無添加再石灰化液浸漬 (Demineralization plus no Laser and non F containing remineralization)

脱灰、レーザー照射および再石灰化の各処理は、前報

と同様に行った。

溶出 Ca^{2+} 量を指標とした耐酸性試験は、各群10例の試料 (平均面積10.49 mm^2 , S. D.: 2.21) を 0.1M 乳酸溶液 (pH 4.5, 37°C) に浸漬するところまでは前報と同様であるが、以下は前報¹⁾と異なりスターラー撈拌下 (平均139r.p.m., S. D.: 12) で15, 15, 30, 60, 60分の各時間ごとに溶液を交換しながら計180分浸漬し、乳酸溶液に溶出した Ca^{2+} 量を原子吸光度計 (180-80型, HITACHI 社製) を用いて測定した。溶出 Ca^{2+} 量は、前報と同じく乳酸溶液 5 ml に溶出した Ca^{2+} 量 (μg) を単位面積 (10 mm^2) 当たりで算出し、各時間における溶出 Ca^{2+} 量を累積値で表した。各時間ごとの 6 群間の溶出 Ca^{2+} 量の比較は、ANOVA および Newman-Keuls test²⁾ を用いて検討した。

また、各群1例の試料は、乳酸溶液浸漬に際し 30, 30, 60分の計120分の各浸漬時間ごとに実験歯面の一部を nail varnish で順次被覆した。浸漬終了後、既報³⁾に準じ厚さ100 μm の切片とし、microradiograph (以下, MR と略) を撮影した。MR は、グレイスケール 256階調でデジタル画像化し、32階調擬似カラー処理を併用してミネラル分布を観察した。

結 果

溶出 Ca^{2+} 量の経時的推移 (Table 1, Fig. 1) は、大きく 3 種の傾向を示した。すなわち、レーザーおよび再石灰化処理を加えていない D 群の溶出 Ca^{2+} 量は、経時的に180分後まで、ほぼ直線的に増加する傾向を示した。一方、3ppm F 添加再石灰化液で処理した D+L (+) F (+) および D+L (-) F (+) の 2 群は、同じく直線的増加傾向を示したが、D 群のおよそ 1/2~1/8 の低い値で推移した。

その他の D+L (+), D+L (+) F (-) および D+L (-) F (-) の 3 群は、浸漬時間30分までは D+L (+)

Fig. 1 Accumulated volume of dissolved Ca²⁺ corresponding to Table 1.

F(+) 群および D+L(-) F(+) 群とはほぼ類似する低い溶出傾向を示したが、60分以降溶出量が増加し、120分以降はD群に近似する溶出 Ca²⁺ 量を示した。

Newman-Keuls test の結果、これら3群はD群に比較し、浸漬時間60分までは有意に低い値を示した ($p < 0.01$) が、120分以降では有意差は認められなかった (Table 2)。

一方、D+L(+) F(+) 群および D+L(-) F(+) 群の溶出 Ca²⁺ 量は、浸漬時間15分および30分では D+L(+), D+L(+) F(-) および D+L(-) F(-) 各

群との間で有意差を認めなかったが、60分以降では有意に低い値を示した ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。しかも、D+L(+) F(+) 群と D+L(-) F(+) 群の間に統計学的有意差は認められなかった。レーザー照射後再石灰化エナメル質とレーザー非照射再石灰化エナメル質の耐酸性に差が認められなかったことは、興味ある事実であった。同様に、D+L(+) F(-) 群と D+L(-) F(-) 群間においても有意差は認められなかった。

Fig. 2 に各群の30分および60分浸漬域 MR のモノクロおよび擬似カラー画像を示した。D群 (Fig. 2, a・a') および D+L(+) 群 (Fig. 2, b・b') は、浸漬30分から60分浸漬にかけて脱灰部のほぼ全域が溶解し、脱灰底部より深層に位置する健全エナメル質 (擬似カラー像のオレンジ色あるいは赤色部に相当) にも一部脱灰がおよんでいた。

D+L(+) F(-) 群 (Fig. 2, c・c') および D+L(-) F(-) 群 (Fig. 2, d・d') は、60分浸漬域で最表層部の溶解を認めたが、脱灰底部に接する健全エナメル質におよび脱灰は認められなかった。

D+L(-) F(+) 群 (Fig. 2, e・e') および D+L(+) F(+) 群 (Fig. 2, f・f') は、60分浸漬域で再石灰化部の耐酸性を示す部分と脱灰を示す部分が混在する、不均一に脱灰される所見を呈した。ただし、再石灰化底部に

Table 2 Results of Newman-Keuls tests corresponding to Table 1.

	D	D+L(+)	D+L(+) F(+)	D+L(-) F(+)	D+L(+) F(-)	D+L(-) F(-)
D	—	15 min** 30 min** 60 min**	15 min** 30 min** 60 min** 120 min** 180 min**	15 min** 30 min** 60 min** 120 min** 180 min**	15 min** 30 min** 60 min**	15 min** 30 min** 60 min**
D+L(+)		—	60 min** 120 min** 180 min**	60 min* 120 min** 180 min**	15 min*	N S
D+L(+) F(+)			—	N S	60 min* 120 min** 180 min**	60 min** 120 min** 180 min**
D+L(-) F(+)				—	120 min** 180 min**	60 min** 120 min** 180 min**
D+L(+) F(-)					—	N S
D+L(-) F(-)						—

NS: Not significant * $p < 0.05$ ** $p < 0.01$

Fig. 2 Microradiographic images after further demineralization with 0.1M lactic acid; a: D, b: D+L (+), c: D+L (+) F (-), d: D+L (-)F(-), e: D+L (-)F(+) and f: D+L(+) F(+). Photographs a'-f' represent pseudo-color images of a-f, respectively. The arrows indicate the borders between 30-and 60-minutes immersion in acid.

隣接する健全エナメル質に脱灰はおよんでいなかった。

Fig. 3 にレーザー照射単独処理の D+L(+) 群, ならびに溶出 Ca^{2+} 量の最も少なかった D+L(-) F(+) および D+L(+) F(+) 群の浸漬時間 0, 30, 60, 120 分における MR のモノクロ像および擬似カラー画像を示した。D+L(+) 群 (Fig. 3, a1~a3・a1'~a3') は未浸漬域と30分浸漬域の間には著明な変化は認められなかった。60分浸漬域では、表層部における溶解および深部の健全エナメル質 (擬似カラー像のオレンジ色あるいは赤色部に相当) におよぶ脱灰が認められた (Fig. 3, a2・a2')。120分浸漬域においては、さらに深層健全エナメル質におよぶ溶解を認めた (Fig. 3, a3・a3')。

D+L(-) F(+) 群 (Fig. 3, b1~b3・b1'~b3') では、30分浸漬域から120分浸漬域にかけて、再石灰化部の耐酸性部と脱灰部が混在する、不均一な脱灰の所見を呈した。その溶解部分は、経時的に拡大する傾向を示したが、再石灰化底部より深層に位置する健全エナメル質

(擬似カラー像のオレンジ色あるいは赤色部に相当) の明らかな溶解は認められなかった。また、レーザー照射を加えた D+L(+) F(+) 群は、浸漬30分後 (Fig. 3, c1・c1') で、最表層の溶解を疑わせる所見を呈し、浸漬30分から120分にかけて不均一な溶解が発現した (Fig. 3, c2~c3・c2~c3')。120分後では溶解部が拡大し、レーザー非照射の D+L(-) F(+) 群 (Fig. 3, b3・b3') に比較して、表層の溶解が深部方向へ進行している所見を示した。

考 察

攪拌条件下において各群の耐酸性を評価した結果、溶出 Ca^{2+} 量は前報¹⁾に比較して1/4の浸漬時間にもかかわらず約70%~125%の範囲であった。約140r.p.m. の攪拌速度ならびに180分の攪拌時間によってほぼ前報に近い溶出 Ca^{2+} 量を測定することができた。しかしながら前報と異なる点は次の3点であった。すなわち、攪拌しな

Fig. 3 Microradiographic images after further demineralization with 0.1 M lactic acid; a1-3: D+L(+), b1-3: D+L(-)F(+), and c1-3: D+L(+)F(+). Photographs a1'-3', b1'-3' and c1'-3' represent pseudocolor images of a1-3, b1-3 and c1-3, respectively. The arrows indicate the borders between each immersion time.

い場合、D+L(+) 群の耐酸性能はD群に比較して明らかに耐酸性の所見を呈した。本研究において D+L(+) 群はD群に比較して乳酸溶液浸漬時間が短時間（15～60分）のうちは、これまでと同様に耐酸性効果を示した

が、長時間では耐酸性効果は認められなかった。このことは、D+L(+) 群の耐酸性能が経時的に変化したためと考えられる。しかも浸漬時間の初期に耐酸性であったことは、レーザー照射により健全エナメル質表層（5

um) ならびに表面が耐酸性を有するとの報告⁴⁻⁶⁾と同様の結果であった。すなわち浸漬初期は、レーザー照射によるエナメル質表層の耐酸性によって溶出 Ca^{2+} 量は明らかに低い値を示したものと考えられる。D+L(+) 群の短縮時間浸漬における表層の残存と長時間浸漬における表層の消失は、MR の所見からも確認される (Fig.3)。

これらの事実、プラーク直下での酸産生能が旺盛で、しかも酸の拡散速度が早く長期間におよび場合、レーザー照射単独による表層の耐酸性は脱灰抑制には不十分であることを意味している。

次に、攪拌しない場合、D+L(+) F(-) 群の溶出 Ca^{2+} 量は、D+L(-) F(-) 群に比較して明らかに耐酸性の所見を示していた。しかしながら今回、この両群の耐酸性には経時的変化を認めなかった。このことは前報の考察でも述べたように、D+L(+) F(-) 群ではレーザー照射により表層は耐酸性となるが、攪拌により内層からの Ca^{2+} 溶出ならびに亀裂深部からの溶出 Ca^{2+} 量が増加したと思われる。一方、D+L(-) F(-) 群はフッ素無添加再石灰化のため表層に局限した Ca/P の沈着による不十分な耐酸性効果であり、再石灰化部内層からの溶出 Ca^{2+} 量が攪拌により増加した結果、両群に差が認められなくなったと思われる。

さらに、攪拌しない場合、D+L(+) F(+) 群と D+L(+) F(-) 群の溶出 Ca^{2+} 量には差が認められなかった。今回は、両群の耐酸性には経時的変化が認められるようになった。すなわち、浸漬時間が短時間 (15分, 30分) では、いずれの群ともにレーザー照射の影響による表層の耐酸性により溶出 Ca^{2+} 量に差が認められない。しかし、長時間 (60~180分) では、フッ素存在下の再石灰化による耐酸性の効果によって D+L(+) F(+) 群は明らかに低い溶出 Ca^{2+} 量を示した。このことは、レーザー照射に起因する微細な亀裂の内壁が、フッ素存在下の再石灰化により、表層と同様に十分な耐酸性を獲得した結果、亀裂深部からの Ca^{2+} 溶出も少なかったためと考えられる。これに対し、D+L(+) F(-) 群はフッ素添加再石灰化のため、亀裂深部からの溶出 Ca^{2+} 量が攪拌により増加したと思われる。

脱灰エナメル質にレーザー照射後、3ppm フッ素存在下で再石灰化を行った場合の耐酸性は、レーザー照射の有無に関係なくフッ素非存在下で再石灰化した場合に比較して長時間にわたる効果が認められた。ただし、この効果は 3 ppm フッ素存在下の再石灰化エナメル質の耐酸性と差は認められないが、攪拌の有無に関わらず、溶出 Ca^{2+} 量が常に最も低い値を示していることは、注

目すべき点である。著者らの既報⁹⁾からも明らかなように、レーザー照射は再石灰化機構を阻害しないことから、レーザー照射により微細亀裂の発生が認められるとしても、その後フッ素存在下で再石灰化が発現するならば最大の耐酸性効果を発揮するものと思われる。再石灰化エナメル質が耐酸性を発揮する理由は、レーザー非照射の場合、再石灰化により回復されるミネラルの構成成分が fluoroapatite だからである⁷⁾。一方、レーザー照射の場合も、フッ素存在下においては再石灰化により回復されるミネラルの構成成分が fluoroapatite であるためと思われる。

今回、我々はレーザー照射エナメル質の耐酸性の評価に一定速度での攪拌を加えて経時的に溶出 Ca^{2+} 量を検討した。同様の評価は、振盪による方法^{8,9)}や高速攪拌¹⁰⁾による方法等が用いられている。溶出 Ca^{2+} 量による耐酸性の評価には、脱灰溶液の pH、溶液中の Ca/P の存在ならびに溶液量によって異なることが指摘されている¹¹⁾、さらに今回の検討により耐酸性は攪拌の有無や攪拌速度ならびに脱灰時間によっても明らかな影響を受けることが示された。攪拌条件下で耐酸性を経時的に評価することにより、レーザー照射再石灰化エナメル質の耐酸性の性状をより詳細に検討することが可能であった。耐酸性の評価には、これらの点を考慮に入れて検討する必要がある。

結 論

レーザー照射に起因する亀裂深部からの Ca^{2+} 溶出を可能とする攪拌条件下において耐酸性を評価した結果、以下の結論を得た。

- 1) レーザー照射は脱灰エナメル質 [D+L(+)] の耐酸性向上に関与するが、耐酸性は短時間 (60分以内) の効果であった。
- 2) フッ素添加再石灰化エナメル質 [D+L(+) F(-), D+L(-) F(-)] の耐酸性はレーザー照射の有無に関係なく、脱灰エナメル質に比較して短時間 (60分以内) の効果であった。
- 3) フッ素添加再石灰化エナメル質 [D+L(+) F(+), D+L(-) F(+)] の耐酸性はレーザー照射の有無に関係なく、脱灰エナメル質に比較して長時間 (180分) の効果であった。また、フッ素無添加再石灰化エナメル質の耐酸性に比較して、長時間 (120分, 180分) におよぶ耐酸性効果であった。

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ならびにフッ素の影響，口腔衛生会誌，**42**；211-218，1992.
- 2) Winer, B. J. : Statistical principles in experimental design, Mc Grau-Hill Kogakusya LTD., Tokyo, second edition, 1971, p. 193.
- 3) 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.
- 4) 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.
- 5) Yamamoto, H. and Sato, K. : Prevention of dental caries by Nd : YAG laser irradiation, J Dent Res, **59** ; 2171-2177, 1980.
- 6) Oho, T. and Morioka, T. : A possible mechanism of acquired acid resistance of human dental enamel by laser irradiation, Caries Res., **24** ; 86-92, 1990.
- 7) Chow, L. C. and Brown, W. E. : Reaction of dicalcium phosphate dihydrate with fluoride, J. Dent. Res., **52** ; 1220-1227, 1973.
- 8) 鈴木和雄，森田恵美子，森岡俊夫：各種レーザー照射によるエナメル質耐酸性向上に関する研究（第2報）—計算によるエナメル質温度上昇と耐酸性との相関—，日本レーザー医学会誌，**3**；613-618，1982.
- 9) 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.
- 10) Meurman, J. H., Voegel, J. C., Rauhamma-Mäkinen, R., Gasser, P., Thomann, J. M., Hemmerle, J., Luomanen, M., Paunio, I. and Frank, R. M. : Effects of carbon dioxide, Nd : YAG and carbon dioxide-Nd : YAG combination lasers at high energy densities on synthetic hydroxyapatite, Caries Res., **26** ; 77-83, 1992.
- 11) ten Cate, J. M. and Duijsters, P. P. E. : Influence of fluoride in solution on tooth demineralization, Caries Res., **17** ; 513-519, 1983.