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3報)

— ヒトおよびハムスターの抜去歯牙についての比較 —

An increment of acid-resistance of dental enamel with the irradiation of various types of laser beam (3rd Report)

— A comparison of hamster and human teeth in vitro —

森田恵美子・鈴木和雄・森岡俊夫

Emiko MORITA, Kazuo SUZUKI and Toshio MORIOKA

九州大学歯学部予防歯科学講座

Department of preventive dentistry, School
of dentistry, Kyushu university

A preliminary experiments were carried out on the caries prevention with Nd-YAG laser using hamster molar teeth and intact human permanent teeth in vitro. Molar teeth of conventional hamsters were obtained from 9-14 weeks age.

Human and hamster teeth were irradiated with AO Q-sw pulse and normal pulse of Nd-YAG laser at the various energy density.

The results were as follows.

1) There were the correlations between the value of energy density and the degree of the acquired acid-resistance of the dental enamel with AO Q-sw pulse and normal pulse of Nd-YAG laser. The pattern of acid-resistance with the two different kinds of pulses on the hamster teeth were similar to those of the human teeth.

2) The lased enamel of hamster teeth indicated a grazing of surface enamel with scanning electron microscopic observation, and the morphological changes were also obtained from the human teeth. However, the degree of the morphological changes of the hamster teeth were harder than those of human teeth at the same energy density.

3) The hamster teeth indicated the less variation in regard to the level of acquired acid-resistance with laser irradiation compared with the human teeth.

These results suggested that the hamster is a good model for the experiment of acid-resistance with laser irradiation.

1. 緒言

エナメル質の耐酸性を向上させる事により齲蝕を予防しようとする方法は、口腔環境を改善することによる予防法とは異なり、歯質そのものの齲蝕感受性を低下させる特徴を持っている。

現在広く行なわれているフッ素塗布による方法と異なり、レーザー照射によりエナメル質表面を加工し耐酸性を付与するという方法は、極めて短時間で処置が終了するという利点を持っているが、その作用機序がヒトの生体組織（エナメル質）に瞬時に不可逆的变化を起こさせる事から、適用を誤ると生体を障害する危険性もなしとはしない。

われわれは、第1報において、ヒトの抜去歯牙を用いた *in vitro* の実験で、適当なエネルギー密度を持つ normal pulse の Nd-YAG レーザーを歯面に照射すると、エナメル質に著明な耐酸性が付与される事を示し、また、第2報において、レーザー照射によるエナメル質の温度変化について計算式を立て、耐酸性付与の作用機序に関し仮説を提示した。

これらの結果を *in vivo* で確認し、また、実際のヒト口腔内で有効で、かつ、安全性の高いレーザー光の種類や照射条件を決定するために、動物によるモデル実験が必要な段階となつて来ているが、この種のモデル実験は未だ報告をみない。

本研究は、この目的に則したモデル実験系について検討し、基礎的資料を得るための実験を行なったものである。

2. 材料および方法

1) Nd-YAG レーザーによる齲蝕抑制モデル実験に適した動物の選択

齲蝕モデル実験系に使用される動物の第1条件として、齲蝕に対し感受性を有している事が必須であるが、現在まで、ラットおよびハムスターなどのげっ歯類と2, 3の霊長類が、齲蝕感受性の高い動物として報告されている。とくに、ラットおよびハムスターは、口腔内への齲蝕原因菌の接種が可能な事、雑食性で齲蝕誘発性餌料の導入が容易な事、齲蝕の進行が早く実験期間が比較的短かい事、種や年齢がはっきりしている事、および、統計処理に必要な数の確

保や飼育が容易な事などの点から、齲蝕のモデル実験用動物として適している。

つぎに、今回のわれわれのモデル実験について、ハムスターがラットより優れていると考えられる理由は、ハムスターは180°近くまで開口が可能であり、歯牙など局所に対する操作が容易であるが、ラットでは開口が十分ではなくレーザー光の導入に困難が予測される事である。また、第2の理由としては、ハムスター臼歯が咬頭頂を含む歯冠全体をエナメル質が被っているのに比し、ラットでは咬頭頂付近のエナメル質が欠如し、象牙質が露呈している点である。すなわち、レーザー照射によりエナメル質を加工し耐酸性を向上させ、齲蝕を抑制するという今回の実験内容から考え、ヒトと同じく歯冠全体がエナメル質で被われているハムスターの方がより適当であると考え本実験に供した。

今回は、*in vivo* 実験に入る前の基礎的研究として、ハムスターおよびヒト抜去歯牙への Nd-YAG レーザー照射の効果について実験を行なった。

2) エナメル質への Nd-YAG レーザー照射

ヒト抜去永久歯エナメル質： 齲蝕のないヒト抜去永久歯をホルマリン固定後、蒸留水中に冷蔵保存したものを用いた。照射前に歯面を pumice および研磨用ブラシで十分清掃し、超音波洗浄器で洗浄したものを用いた。

ハムスターエナメル質： 通常飼育された9～14週齢の雄性ゴールデン・ハムスターの上下顎を摘出後ホルマリン固定し、歯面を清掃研磨したものを試料とした（図1）。すなわち、上下顎を、それぞれ、正中部で左右に離断し、右側臼歯M1, M2およびM3をレーザー照射実験側とし、左側をレーザー非照射コントロール側とした。

レーザーの照射条件： Nd-YAG レーザーは第1報で示した結果より、耐酸性付与効果の高かった normal pulse (20 pps, 10 pulses) および AO Q-sw pulse (1 KHz, 1 sec) の2種の発振形式で照射した（表1）。また、照射エネルギー密度とエナメル質への耐酸性付与の度合との相関を検討するために、AO Q-sw pulse の場合には $0 \sim 146 \text{ J/cm}^2$ の範囲で、そして、normal pulse の場合には $0 \sim 112 \text{ J/cm}^2$ の範囲で段階的に変化させて照射を行な

った。

また、照射による耐酸性付与効果を高めるため、照射前に歯面黒色塗布剤を施した。この場合も、第1報に示した結果より、AO Q-sw の場合には毛筆用墨を、そして、normal pulse の場合には耐水性黒色インクを用いた。

Hamster teeth

図1 ゴールデン・ハムスターの摘出顎ならびに臼歯部の写真。

- a. 摘出された上下顎をホルマリン固定後清掃したもの。
b. 臼歯 M1, M2 および M3 で顎骨内で歯列を形成している。

	AO Q-sw pulse	Normal pulse
Peak power	100 kW	3 kW
Pulse width	10 nsec	0.3 msec
Repetition rate	1000 pps	10 pps
Energy density	0-146 J/cm ²	0-112 J/cm ²
Coating	Chinese ink	India ink (water-proof)

表1 Nd-YAGレーザーの2種の発振形式の特徴の比較。

レーザーの照射方法： ヒト抜去永久歯の場合、歯牙エナメル質ブロックのほぼ中央に照射した。照射面積はdefocus の距離により異なったが、後述の耐酸性を評価するための歯表面積を十分越える範囲とした。

ハムスター歯牙の場合には、試料が極めて小さく、一歯面内に十分量の平坦な部分を設定する事が困難であったので、臼歯 M1, M2 および M3 が顎骨に植立したままで、咬合面、頬側面および舌側面の3方向より歯面にほぼ垂直になるように照射を行なった。

3) エナメル質耐酸性付与効果の判定

試料を乳酸緩衝液中で脱灰させ、一定時間に一定面積より溶出してくる Caイオン量を原子吸光法で定量し、レーザー照射歯面と非照射コントロール歯面とで比較し、耐酸性付与の度合を判定した。

ヒト抜去永久歯の場合、歯面中央部に $\phi 2.6$ mm のwindow を設定し、残りの部分を全て nail varnish で被覆したものを脱灰実験用試料とした。一方、ハムスター歯牙では、試料が小さく、歯面に window の設定が困難であったので、臼歯 M1, M2 および M3 の歯冠部を除く全ての部分（顎骨などを含む）を同じく nail varnish で被覆した後、脱灰実験を行なった。脱灰操作は 37°C の 0.1 M 乳酸緩衝液 pH 4.0, 5 ml 中に試料を浸し、振とうしながら 30 分 脱灰させた。この操作により溶出した Caイオン量を原子吸光法で定量し評価を行なった。

4) 歯面性状の形態学的観察

Nd-YAGレーザー、AO Q-sw pulse および normal pulse 発振のそれぞれ、所定のエネルギー密度で照射した後の歯面性状の変化を実体顕微鏡により観察し、併せて、写真撮影を行なった。この際、損傷などを明確にする目的で、0.1%ローズベンガル・アルコール溶液により染色を施した。

また、表面の微細構造は走査型電子顕微鏡で観察した。

3. 結果

1) Nd-YAGレーザー照射によるエナメル質耐酸性付与効果について

a.

b.

図2 レーザー照射エネルギー密度とエナメル質耐酸性付与との関係。

a. ハムスター歯牙の場合。

b. ヒト歯牙の場合。

AO Q-sw pulse および normal pulse のそれぞれについて、数段階に照射エネルギー密度を変化させてレーザー照射を行ない、それに対応して、どの程度ハムスターならびにヒトエナメル質に耐酸性が付与されたかを図2に示した。耐酸性付与の程度(縦軸)は脱灰操作により単位時間・単位面積あたりに溶出してきたCaイオン量をレーザー照射歯面とそのコントロール歯面との比で示しており、1.0より値が小さくなるほど耐酸性付与効果は高い事となる。

AO Q-sw および normal pulse の各発振形式において、照射エネルギー密度と耐酸性付与程度の間に関係性が示された。

AO Q-sw pulse の場合、ハムスター、ヒト歯牙のいずれの場合においても、今回の実験の照射エネルギー密度の範囲では、エネルギー密度が高くなるに従い、耐酸性付与効果も高くなる事が示された。一方、normal pulse の場合は、ハムスターおよびヒトのいずれにおいても、照

射エネルギー密度が約 50 J/cm^2 前後で、耐酸性付与効果は、ほぼ、プラトーに達した。また2種の発振形式を比較した場合、エナメル質耐酸性付与効果は、照射エネルギー密度が同程度の場合、normal pulse が AO Q-sw pulse より優れている事がわかった。

また、各測定点におけるCaイオン溶出量の比の分散については、ハムスター歯牙の方がヒト歯牙に比し小なる事が示された。

2) レーザー照射後の歯面性状の形態学的観察

歯面に耐酸性付与効果を生ずる照射条件でNd:YAGレーザー照射を行なった時、歯面が形態学的にどのような変化を示すかを、ハムスターおよびヒト歯牙とで比較観察を行なった。

AO Q-sw pulse による場合、ヒト歯牙では歯面に網目状の深い亀裂が生ずる事を第1報で示したが、図3に示すように、ハムスター歯牙でも同様な網目状の亀裂が生じた。また、その程度はハムスター歯牙の方が強いようであり、エ

エネルギー密度 110 J/cm^2 では、熱により歯面が黄褐色に変化した。

一方、normal pulse による場合、ヒト歯牙ハムスター歯牙いずれも、図4に示すように、一見粗造な極めて細かいモザイク状変化を呈しているが、その程度はAO Q-sw pulseの場合と同様にハムスター歯牙の方が強い傾向を示している。

つぎに、レーザー照射後の歯面の微細な構造変化を走査型電子顕微鏡により観察した。図5は、そのうち、ハムスター歯牙での例を示して

図3 AO Q-sw pulseでレーザー照射後の歯面を実体顕微鏡で観察したもの。

a. ハムスター歯牙 b. ヒト歯牙。
c. ヒト歯牙 (断面)

Control

20 μ

AO Q-sw pulse

55.3 J/cm^2

図4 Normal pulseでレーザー照射後の歯面を実体顕微鏡で観察したもの。

a. ハムスター歯牙。 b. ヒト歯牙。
c. ヒト歯牙 (断面)

Normal pulse

49.2 J/cm^2

図5 Nd-YAG レーザー照射後のハムスター歯牙の表面微細構造をSEMにより観察したもの。

4. 考察

今回、われわれは、Nd-YAG レーザーによる齲蝕抑制モデル実験に適した動物としてハムスターを選択した。しかしながら、レーザー照射の対象として、ハムスター歯牙がヒト歯牙のモデルとなりうるかどうかの確認が必要であるが、現在までのところ、これについての実験報告はない。

本実験は、それを確かめるために、in vitro でハムスターおよびヒトの抜去歯牙を用い、Nd-YAG レーザー照射によるエナメル質への耐酸性付与効果と照射後の歯面の形態学的性状変化について行なわれたものである。

レーザー照射エネルギー密度とエナメル質耐酸性付与程度の間には、AO Q-sw pulse および normal pulse のそれぞれに、独自の相関性が示され、このパターンがヒトとハムスターで非常に類似していた。

また、レーザー照射後の歯面の性状を実体顕微鏡で観察した場合、エナメル質耐酸性付与効果と同様に、ヒトとハムスターとで、その様相の類似性が示された。即ち、AO Q-sw pulse では歯面に網目状の亀裂を生じ、normal pulse ではモザイク様変化を示した。しかしながら、変化の程度は、ハムスター歯牙の方がヒト歯牙に比べ、照射エネルギー密度に対応した感受性が高い傾向にある事が示された。これは、ハムスター歯牙がヒト歯牙に比べ、そのサイズが小さく、また、エナメル質の厚径も薄いためではないかと考えられる。

一方、耐酸性付与程度の判定に際し、ハムスター歯牙では平滑面に画一的な window を設定できなかったが、それにもかかわらず、脱灰による Ca イオン量に基づく判定値の分散はヒト歯牙より小であった。これは、ハムスターの場合、年齢や飼育条件が一定しており、試料の均一性が高かったためと推測される。

今回、in vitro の実験から、Nd-YAG レーザー照射のエナメル質に対する作用がヒトおよびハムスターで著しく類似している事が示され、また、歯面損傷などは、ハムスター歯牙がヒト歯牙より感受性が高い傾向が示され、Nd-YAG レーザー照射による齲蝕抑制実験にハムスターを用いる事の有用性が確かめられた。

5. 結論

ヒトおよびハムスターの抜去歯牙を用い、Nd-YAG レーザー照射によるエナメル質への耐酸性付与効果と歯面の形態学的変化について比較検討した。

レーザー照射は AO Q-sw pulse ならびに normal pulse の2種の発振形式により、照射エネルギー密度を数段階に変化させて行なった。

その結果、以下のような知見を得た。

1) 発振形式を異にする2種の Nd-YAG レーザーにおいて、照射エネルギー密度とエナメル質耐酸性付与程度との間には、相関性が認められた。この場合、相関性のパターンはハムスターとヒトとの間で高い類似性が示された。

2) Nd-YAG レーザー照射後の歯面の性状変化は、2種の発振形式のレーザーにおいて、それぞれ特徴があった。しかしながら、その変化の様相はハムスターとヒトとで類似していた。また、変化の程度は、照射エネルギー密度に関しハムスター歯牙がヒト歯牙に比して感受性が高かった。

3) Nd-YAG レーザー照射による耐酸性付与効果の判定の結果より、ハムスター歯牙はヒト歯牙より整一性が高いことが示された。

以上の結果より、ハムスターはNd-YAG レーザー照射による齲蝕抑制モデル実験用動物として有用である事が示された。

文献

1) 鈴木和雄、森岡俊夫：各種レーザー照射によるエナメル質の耐酸性向上に及ぼす黑色塗布剤の効果，口衛誌，31(4)：738，'81.

2) 森田恵美子、鈴木和雄、森岡俊夫：Nd-YAG レーザー照射による摘出ハムスター臼歯の耐酸性付与に関する実験，口衛誌，32(3)：248，'82.