

学位論文内容の要旨

愛知学院大学

論文提出者

田村清美

論文題目

電子線マイクロアナライザ（EPMA）を用いたジェット水流による口腔バイオフィルムの除去効果および象牙質の酸蝕深度の評価に関する研究

I. 緒言

化学的または機械的な方法によるバイオフィルムの除去効果を調べるために様々な評価方法が試みられているが、その結果は文献ごとに異なるものであった。これは、バイオフィルム付着量を正確に評価する方法がなく、化学的または機械的なバイオフィルム除去後に残留するバイオフィルムの厚みを敏感に測定できないためである。

一方、飲食物による歯の酸蝕リスクの評価には、硬組織試料中のミネラル量の評価に使用されるマイクロラジオグラフや微小硬度の計測、光学式・接触式の表面形状測定機を使用する方法など様々な手法が試みられてきたが、評価結果は報告により異なっている。

本研究では、これまで定量的な評価が困難であったバイオフィルムの厚みや酸蝕象牙質の歯質消失深度といった 2 つの現象について、白金コーティングした試料を電子線マイクロアナライザ (EPMA) により観察し、評価を試みた。

II. 試料および方法

研究 1 : EPMA を用いたジェット水流による口腔バイオフィルム除去効果の評価

1. 口腔バイオフィルムの形成

インフォームドコンセントを得た被験者 30 名の上顎大臼歯頬側面に一対

の健全なエナメル質スラブを組み込んだバイオフィーム堆積装置を取り付け、2日間ブラッシングを中止させた。本研究は愛知学院大学倫理委員会の承認を得た（承認No. 202）。

2. ジェット水流での洗浄

ブラッシング中止によりバイオフィームを堆積させたスラブを口腔から取り出し、一方を口腔洗浄器で洗浄し、もう一方を未洗浄のコントロール群とした。

3. EPMA によるバイオフィームの観察

各スラブを凍結乾燥後白金コーティングし、EPMA によりスラブ面の二次電子像を撮影した。その後メタクリレートで包埋し、中央で垂直に切断し断面を露出させた。スラブ表面を鏡面研磨後、カーボン蒸着を行い、反射電子像を撮影した。

バイオフィームの外面を示す白金の薄層とエナメル質に挟まれたバイオフィームの厚みを、画像解析ソフトにより測定することでバイオフィームの平均厚さを求め、洗浄群とコントロール群の測定結果の差によりバイオフィーム除去効果を評価した。

4. 統計分析

洗浄群とコントロール群のバイオフィームの厚さの差は、対応のある t 検定を用いて検討した。洗浄群の水圧の違いによるバイオフィームの厚みの減少率およびコントロール群のバイオフィームの厚さの差について、多

重比較を行った。

研究 2 : EPMA を用いた象牙質の酸蝕深度の評価

1. 象牙質片の採取

ヒト抜去智歯の歯頸部から採取した象牙質片をメチルメタクリレートで包埋し、象牙質表面を鏡面研磨後、象牙質表面の中央部にネイルバニッシュにより 2 mm×2 mm のウィンドウを作製した。

本研究に用いた抜去歯は、提供を受けた段階で個人を識別できないものであった。

2. 音波ブラシでの洗浄

1) 酸性溶液による浸漬処理

酸性溶液は、グレープフルーツジュース、ワインビネガー、5%酢酸溶液の 3 種類とした。処理時間は、各溶液とも 60 分、120 分、180 分とした。

2) 音波ブラシによる酸蝕面の処理

象牙質ブロックを水洗後、音波ブラシによる処理を行った。ブラッシングは、蒸留水とフッ化物非配合歯磨剤の割合を 4 対 1 に混和したスラリー (以下スラリー群)、または蒸留水のみ (以下水群) を滴下しながら 480 Hz で 60 秒間行った。酸性溶液に浸漬した後、ブラッシングを行わなかったものをコントロール群とした。

3. EPMA による酸蝕面の観察

象牙質ブロック表面のネイルバニッシュを除去し、ウィンドウ面を白金

コーティングした。EPMAにより二次電子像を撮影し、ウィンドウ面の摩耗状態を確認した。次に、ウィンドウ面の中央部分でブロックを縦断し、切断面が観察できるようにメチルメタクリレートで再包埋した。鏡面研磨後、カーボン蒸着を行い、反射電子像を撮影した。

4. ウィンドウ面の摩耗深さの測定

撮影したウィンドウ面は水平にして僅かな角度のずれが認められたため、低倍率のCOMPO像を利用して角度を補正した。高倍率のCOMPO像のウィンドウのエッジを通過する水平線を引き、左右のCOMPO像それぞれ3ヶ所、計6ヶ所についてウィンドウ底面からの距離を計測し、その平均値を象牙質消失深度(μm)とした。

5. 統計分析

酸蝕の要因として酸性溶液の種類と作用時間、摩耗の要因としてブラッシング処理とし、各要因3水準の三元配置分散分析を行い、その後の検定として多重比較を行った。

III. 結果

研究1：EPMAを用いたジェット水流による口腔バイオフィルムの除去効果の評価

バイオフィルムの厚さの減少率は、洗浄水圧707 kPaで85.5%、350 kPaで85.1%、102 kPaで63.4%であり、いずれの洗浄圧でも洗浄群のバイオ

フィルムの厚さはコントロール群に比べて有意に減少していた。洗浄圧の違いによる減少率の多重比較から、707 kPa 群と 350 kPa 群は、102 kPa 群より有意にバイオフィルムの厚さは減少したが、707 kPa 群と 350 kPa 群の間には有意な差は認められなかった。コントロール群のバイオフィルムの厚さには、9.37 から 26.0 μm の範囲でばらつきが見られたが、多重比較の結果、有意な差は認められなかった。

研究 2 : EPMA を用いた象牙質の酸蝕深度の評価

酸性溶液の種類および作用時間は、ともに酸蝕象牙質の消失深度に対して有意な主効果を示し、両者には交互作用が認められた。ブラッシング条件は、主効果および一次交互作用に有意性は認められなかった。一方、3つの要因間には有意な交互作用が認められた。

処理時間の影響をみると、ワインビネガー群および酢酸溶液群では、ブラッシング条件に関わらず酸性溶液への浸漬時間が長いほど酸蝕象牙質の消失深度が有意に増加しており、グレープフルーツ群ではコントロール群を除き処理時間が長い程酸蝕象牙質の消失深度に有意な増加が認められた。

ブラッシング条件の違いによる酸蝕象牙質の消失深度の比較では、酢酸溶液群の 180 分およびグレープフルーツ群の 120 分間を除き、ブラッシング条件による影響はみられなかった。

研究1：EPMA を用いたジェット水流による口腔バイオフィルムの除去効果の評価

ジェット水流での洗浄によるバイオフィルム厚さの減少は、齲蝕を誘発する特性、例えば細菌の多様性、pH 値の勾配、また栄養成分や発酵生成物などに大きな影響を及ぼすと考えられる。口腔洗浄によって歯肉炎の改善がみられるように、口腔洗浄器による処理は、バイオフィルムから齲蝕誘発性に関連する様々な基質の排除を促進するかもしれない。

反射電子像によるバイオフィルム断面の測定から、ジェット水流を使用した洗浄によってバイオフィルムの厚さが大幅に減少することが明らかになった。口腔洗浄器で処理したバイオフィルムの特性、例えば再生速度または組織への薬剤浸透速度などについてさらに研究することは、口腔洗浄器を齲蝕防止の補助手段として適用するために、有意義であると考えられる。

研究2：EPMA を用いた象牙質の酸蝕深度の評価

脱灰した脆弱な象牙質表面を EPMA により視覚的に確認しながら、酸蝕に伴う象牙質の消失深度の評価をしたところ、酸蝕による象牙質の消失程度は、溶液の酸性度に依存しながら、少なくとも 3 時間にわたりほぼ直線的に進行している状態を観察することができた。

従来の方法では有機質主体の酸蝕象牙質表層の形態を正確に把握することは困難であったが、本研究による方法は、脱灰した脆弱な象牙質の消失

深さを評価する方法として有用であると考えられる。

V. 結 論

研究1：口腔内に留置したエナメル質スラブを用いて、口腔洗浄器で洗浄したスラブ上のバイオフィルムの厚みを EPMA で観察したところ、口腔洗浄器によってバイオフィルムの厚さが 8 割以上減少することが明らかとなった。

研究2：ヒト抜去智歯の象牙質スラブを用いて、酸性飲料の種類、作用時間およびブラッシング条件の違いによる歯質の消失を EPMA を使用して観察したところ、pH が低く作用時間が長い程象牙質の消失が大きいが、ブラッシング条件による影響は小さいことが明らかとなった。

2つの研究により、バイオフィルムの厚さや酸蝕による歯質の消失深度など、これまで評価しにくかったものに対して EPMA を用いて視覚的に観察し評価する方法が有用であることが示唆された。