



Title	In-air micro-beam PIXE/PIGE法を用いた根面象牙質の脱灰評価
Author(s)	八木, 香子
Citation	大阪大学, 2017, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/61646
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

学 位 論 文

In-air micro-beam PIXE/PIGE 法を用いた
根面象牙質の脱灰評価

大阪大学大学院歯学研究科
口腔科学専攻（歯科保存学教室）

指導教員：林 美加子教授

八木 香子

目次

I.	緒言	3
II.	実験方法および結果	
1.	In-air micro-PIXE/PIGE を用いた，根面象牙質における脱灰前後の Ca および F の連続的定量評価法の確立	7
1.1	方法	
1.1.1	試料の作製	
1.1.2	In-air micro-PIXE/PIGE を用いた脱灰前の Ca および F の定量	
1.1.3	試料の脱灰	
1.1.4	In-air micro-PIXE/PIGE を用いた脱灰後の Ca および F の定量	
1.1.5	脱灰前後における Ca および F の分布および濃度の解析	
1.1.6	マイクロ CT における脱灰前後のミネラル密度測定	
1.1.7	統計的解析	
1.2	結果	
2.	フッ化物徐放性材料 (FRM) の塗布期間および脱灰時の pH を変えた条件での FRM が根面象牙質の耐酸性に及ぼす影響の検討	15
2.1	方法	
2.1.1	試料の作製	
2.1.2	In-air micro-PIXE/PIGE を用いた脱灰前の Ca および F の定量	
2.1.3	試料の脱灰	
2.1.4	In-air micro-PIXE/PIGE を用いた脱灰後の Ca および F の定量	
2.1.5	脱灰前後における Ca および F の分布および濃度の解析	
2.1.6	統計的解析	
2.2	結果	

3. Ca を添加した FRM が根面象牙質の耐酸性に及ぼす影響の検討	21
3.1 方法	
3.1.1 実験に使用した FRM	
3.1.2 試料の作製	
3.1.3 In-air micro-PIXE/PIGE を用いた脱灰前の Ca および F の定量	
3.1.4 試料の脱灰	
3.1.5 In-air micro-PIXE/PIGE を用いた脱灰後の Ca および F の定量	
3.1.6 脱灰前後における Ca および F の分布および濃度の解析	
3.1.7 統計的解析	
3.2 結果	
4. FRM からのイオン溶出濃度の測定	25
4.1.方法	
4.1.1 試料の作製	
4.1.2 溶出濃度の測定	
4.1.3. 統計的解析	
4.2 結果	
III. 考察	27
IV. 結論	39
V. 謝辞	40
VI. 参考文献	41
VII. 図表	51

I. 緒言

近年，諸国においては，高齢者における根面う蝕の増加が問題となっている（Morse et al. 2002; Imazato et al. 2006; Mamai-Homata et al. 2012; Sugihara et al. 2014; Mariño et al. 2015; Hayes et al. 2016）．根面象牙質の臨界 pH はエナメル質に比べて高く，う蝕に罹患しやすい（Hoppenbrouwers et al. 1987; Featherstone 1994; Donovan 2008）．また，一度う窩を形成するとエナメル - セメント境に沿って隣界面や歯肉縁下に拡大しやすいため，修復治療による対応には苦慮する場面も多い（Bignozzi et al. 2014）．よって，根面う蝕の予防・進行抑制は生涯にわたる口腔の健康を支えるために重要な課題である．フッ化物は，歯質の耐酸性を向上させ，再石灰化を促進することから，根面う蝕の予防・進行抑制に効果的であるといわれている（Mukai and ten Cate 2002; Wierichs et al. 2015; Ekstrand 2016）．しかし，従来のう蝕研究がう蝕病変内でのフッ素（F）の元素レベルでの挙動とう蝕抑制効果について明らかにできていないため，どのような濃度や形態でフッ化物を作用させる方法が根面う蝕の予防により効果的であるかについてはさらなる検討の余地がある．

エナメル質や象牙質におけるう蝕病変の脱灰および再石灰化の評価には，Transverse Microradiography（TMR）が一般的な方法として広く用いられている

(Arends and ten Bosch 1992; Tomiyama et al. 2008; Lippert and Lynch 2014; Cochrane et al. 2014) . しかし, TMR は歯質内のミネラルの量的変化を評価するものであり, う蝕病変における元素レベルの変化を捉えていない. また, 測定には細密な薄切切片の作製が必要であり, 測定中は乾燥による収縮や変形が起こりやすいため, 経時的な測定を行うには高度な技法と時間を要する (Van et al. 1995; Damen et al. 1997; Thomas et al. 2006; Hamba et al. 2012) . 一方, Electron Probe Micro Analysis (EPMA) は歯質表面の元素分析を行うことが可能であるが (Yamamoto et al. 2000; Yamamoto et al. 2001; Knight et al. 2007; Bezerra et al. 2012; Kawasaki and Kambara 2014) , 試料の乾燥や蒸着, 鏡面研磨などの前処理が必要となり, 同一試料を用いた経時的評価を行うことはできない. このように従来の方法では, う蝕病態の質的な連続的な変化を元素レベルで明らかにすることは実現していなかった.

そこで本研究では, In-air micro-beam Particle Induced X-ray/Gamma-ray Emission (PIXE/PIGE) に着目した. PIXE および PIGE は, 高精度な多元素分析法で, 陽子が元素に衝突することで発生する特性エックス線およびガンマ線を検出することにより, それらの元素を測定する. PIXE は, 1ppm より高い感度で, ナトリウムからウランまでの元素を同時に分析することが可能である. このことより, 大気浮遊粒子の組成分析や水質汚染のモニタリングなどに用いられ

(Aldape and Flores 2004; Yamazaki et al. 2005) , 医学の分野においても, 脳内の元素分析 (Morawski et al. 2005) や骨内のミネラルの測定 (Eisa et al. 2016) など, 様々な研究に利用されている. PIGE は軽元素を測定できる特性から, $F(\rho, \alpha\gamma)^{16}\text{O}$ の原子核反応で生ずるガンマ線を測定することにより, F も測定することが可能で, 歯科の分野では歯質の中の F を測定するために 1980 年代前後より用いられてきた方法である (Crawford and De Bruin 1983) .

本研究に用いる PIXE/PIGE は, 数 μm レベルの小さな径でビームを安定することが可能となり, 軽元素を含めた元素分布を高解像度でみることができるところから (Sakai et al. 2002; Yasuda et al. 2007; Yasuda et al. 2011) , エナメル質や象牙質内におけるカルシウム (Ca) , F, ストロンチウム (Sr) などの定量に用いられてきた (Yamamoto et al. 2003; Yamamoto et al. 2005; Yasuda et al. 2007; Komatsu et al. 2007; Yamamoto et al. 2009; Komatsu et al. 2009; Okuyama et al. 2011; Matsuda et al. 2015) . さらに, 本測定法は従来の PIXE や PIGE での測定とは異なり, 大気中での測定が可能であるため, 試料の乾燥や蒸着を必要とせず, 同一試料を用いた脱灰前後での測定が可能であると考えられる. このように, PIXE/PIGE は歯質の元素分析に有用な分析法であることは示されてきたが, 現在までの PIXE/PIGE を用いた研究においては, 歯質中の単一の元素のみに着目しており, これを用いてう蝕の進行を評価した研究はいまだ報告されていない.

本研究では、歯質内の Ca と F を同時に連続的定量が可能な In-air micro-PIXE/PIGE を用いることで、近年の急増が懸念される根面う蝕を想定し、根面象牙質の脱灰挙動の評価が可能かどうかを検討した。さらに、この方法を用いて、フッ化物徐放性材料（fluoride releasing material : FRM）を根面に塗布した場合の脱灰抑制効果について評価した。

II. 実験方法および結果

本実験で用いた歯は、大阪大学歯学部附属病院にて同意を得られた患者の、矯正もしくは歯周病治療により抜歯適応となつたう蝕や修復処置のない第三大臼歯で、抜去後湿度 100% 下で 4°C にて保管し、半年以内のものを用いた。

なお、使用する抜去歯に関しては、大阪大学大学院歯学研究科倫理審査委員会の承認を得た（承認番号第 H25-E28）。

1. In-air micro-PIXE/PIGE を用いた、根面象牙質における脱灰前後の Ca および F の連続的定量評価法の確立

1.1 方法

1.1.1 試料の作製

23 歳から 27 歳までのヒト抜去第三大臼歯 9 本を用いた。作製方法を図 1 に示す。流水下で低速精密切断機（ISOMET2000, BUEHLER, IL, USA）を用いて、セメント-エナメル境より歯冠側 0.5 mm、歯根側 7.0 mm の部位にて歯軸に垂直に切断後（図 1a）、近遠心方向に半切した頬側片を使用した。頬側片の頬側根

面象牙質を露出させた後，その露出面中央に垂直かつ歯軸に平行に半切した（図 1b）．近心側ブロックの露出面に FRM であるアドシールド®GI（クラレノリタケデンタル，東京）を塗布し（以下 FRM 群），遠心側は FRM を塗布しないコントロールとし（以下コントロール群），露出面以外の面をスティッキーワックス（ジーシー，東京）にて保護し，37°C生理食塩水中に浸漬保管した．生理食塩水は1週間ごとに交換し，保管期間は1ヵ月とした．1ヵ月後，各試料を取り出し，FRM とスティッキーワックスを除去した．FRM の除去は手用器具を用い，30 倍の倍率で実体顕微鏡観察下にて行った．FRM 除去後の試料を，露出面に垂直かつ歯軸に平行に 500 μm 幅に切り出して測定試料とした（図 1d）．その後，各測定試料の切断面に，露出根面から歯髄方向に 800 μm の部位に厚さ 4 μm の銅箔を貼付した（図 1e）．作製した試料は湿度 100 %下にて保管した．

1.1.2 In-air micro-PIXE/PIGE を用いた Ca および F の定量

各試料における根面象牙質表層からの Ca および F の分布および濃度の定量を，若狭湾エネルギー研究センターの In-air micro-PIXE/PIGE を用い既報に準じて行った（Yasuda et al. 2011）．2.5 MeV のプロトンビームを，ビームサイズ 10 μm 以下でビーム電流は 50 pA とし，大気中に設置された試料に照射した．F の測定には， ${}^9\text{F}(\text{p},\alpha\gamma){}^{16}\text{O}$ の原子核反応を用い，核反応で生ずるガンマ線を試料台の

背面に設置した 3''BGO 検出器にて検出した。Ca 濃度は、プロトンビーム照射によって生じた特性エックス線を真空内に置かれた純ゲルマニウム検出器で測定した。測定中のビーム量は、窒化ケイ素窓を通過する際に生じるシリコン K 特性エックス線を Si-PIN エックス線検出器を用いて測定した。測定試料は、大気中に設置された試料台に設置し、銅箔を貼付した面上で、銅箔を含む 1000 x 1000 μm^2 の範囲で部位を確定後、Ca および F の線分析を行った。線分析は 1 試料につき、分析面の上切端部より 400 μm 、600 μm の部位で行った(図 1f)。

定量するために、標準試料として水酸基とフッ素イオンの置換率 100, 75, 50, 25, 0 %の粉末合成フッ素化ヒドロキシアパタイト ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_{2-2x}\text{F}_{2x}$, $x=0, 0.25, 0.5, 0.75, 1$; HOYA Technosurgical 株式会社, 東京) を円板状に圧接作製したものをを用い、測定日毎に測定した。

1.1.3 試料の脱灰

PIXE/PIGE 測定後、各試料の根面象牙質露出面に開窓部を設定し、開窓部以外を再びスティッキーワックスにて被覆した。10 ml の脱灰溶液 (0.2 mol/l lactate buffer, 3.0 mmol/l CaCl_2 , 1.8 mmol/l KH_2PO_4 , pH 4.5; Matsuda et al. 2006) に 37°C 条件下で 3 日間浸漬した (図 1g) 。3 日後、脱灰液より試料を取り出し、根面

象牙質露出面を脱イオン水にて 30 秒間水洗後, スティッキーワックスを除去し, 湿度 100 %下にて保管した.

1.1.4 In-air micro-PIXE/PIGE を用いた脱灰後の Ca および F の定量

脱灰後の各試料において, 脱灰前の In-air micro-PIXE/PIGE 解析と同一部位における Ca および F の分布および濃度の定量を, 1.1.2 と同様に実施した(図 1h).

1.1.5 脱灰前後における Ca および F の分布および濃度の解析

定量分析ソフトウェア (Tooth linescan analyzer, 若狭湾エネルギー研究センター) を用い, 標準試料の測定結果より, 検量線 (直線回帰, 脱灰前: $y=1.549x-0.081$, $R^2>0.998$; 脱灰後: $y=1.151x-0.084$, $R^2>0.998$) を作成し, 得られた検量線を用いて, 各測定値から Ca および F の濃度を算出した. 脱灰前 (図 2A) および脱灰後 (図 2B) の Ca 濃度分布グラフにおいて, 健全部を示す平坦部位の Ca 濃度の平均値の 5 %となる値を脱灰前後の歯質の表層とし, また平均値の 95 %となる値までの部分を病巣と定義した.

同一試料の同一部位における脱灰前後の Ca および F の分布グラフを, 銅箔を基準に重ね合わせ, 脱灰前後の Ca および F の濃度分布を同一平面上にあらわした (図 2) .

Ca および F 濃度の算出にあたり，脱灰前の表層から 10 μm ごとの平均 Ca 濃度，平均 F 濃度を算出した．算出した部位と同部位の脱灰後の平均 Ca 濃度，平均 F 濃度を脱灰後で各々算出し，脱灰前後の同部位で各平均 Ca 濃度量の差を積算したものを Ca 喪失量とした．また，表層からの 10 μm ごとの各平均 F 濃度を累積したものを歯質内 F 量とし，表層から F が 0 となるところまでの距離を F 浸透深さとした．

1.1.6 マイクロ CT における脱灰前後のミネラル密度測定

脱灰前後の試料をマイクロ CT (SMX-100CT-SV3, 島津製作所, 京都) を用いて解析した．撮影は，管電圧 40 kV，管電流 100 μA ，空間分解能 8.1 μm の条件で行い，金属フィルタは 0.1 mm アルミ箔を使用した．データは 512 x 512 ピクセル解像度および 8.1 μm 等方性ボクセルサイズで得た．異なる濃度のハイドロキシアパタイト (100, 200, 300, 400 mg/cm^3) とアルミ製の円柱 (1550 mg/cm^3) をもつ標準試料を各試料と同時に撮影し，各々のグレースケール値に基づいて，ミネラル密度較正曲線を作成した (直線回帰，脱灰前: $y=0.964x-33942$, $R^2>0.996$; 脱灰後: $y=0.721x-25454$, $R^2>0.998$) ．

撮影した画像は，CT 解析ソフトウェア (CT-solver, 島津製作所) にて 2 次元画像を再構成し，それぞれの脱灰前，脱灰後の画像を，画像編集ソフトウェア

(Adobe Photoshop CS6, Adobe Systems, San Jose, CA, USA) を用いてレイヤー (差の絶対値) モードにて, セメント-エナメル境を基準に重ね合わせた.

それぞれの試料のグレースケールを汎用画像解析ソフトウェア (Image J, NIH, Bethesda, MD, USA) を用いて解析した. 得られたグレースケールを, 先述のミネラル密度校正曲線を基準として補正し, ミネラルプロファイルを作成した. 解析部位は, In-air micro-PIXE/PIGE 解析で分析を行った同部位とした. 同一試料における脱灰前後のミネラルプロファイルから, ミネラル喪失量 ($\text{mg}/\text{cm}^3 \times \mu\text{m}$) を測定した.

1.1.7 統計的解析

本研究の全ての統計的解析は, 統計解析ソフトウェア (IBM SPSS Statistics Version22, IBM, Armonk, NY, USA) を用いて行った.

Ca 喪失量, 歯質内 F 量, F 浸透深さ, およびミネラル喪失量における 2 群間の比較については, Mann-Whitney's *U*-test を用いて危険率を 5%として評価した. Ca 喪失量とミネラル喪失量, 歯質内 F 量, および F 浸透深さとの相関関係については, Spearman's rank correlation coefficient を用いて危険率を 1%として検定した.

1.2 結果

図 3 に FRM 群およびコントロール群の根面象牙質の、脱灰前後の代表的な実体顕微鏡像，PIXE/PIGE からの分布グラフ，およびマイクロ CT 像からのミネラル密度変換画像を示す。

PIXE/PIGE からの分布グラフより，コントロール群の脱灰後根面象牙質では FRM 群より Ca 量の減少が認められ，マイクロ CT においても同様に，ミネラル密度の減少傾向が認められた（図 3-B4, B6）．さらに，PIXE/PIGE からの分布グラフにおいて，FRM 群に F の取り込みが認められたが，コントロール群には概ね検出値以下を示した（図 3-A3, 4, B3, 4）．

図 4A に示す FRM 群における Ca 喪失量は $5.4 \times 10 \sim 7.7 \times 10^2 \text{ vol}\% \cdot \mu\text{m}$ （中央値: $3.5 \times 10^2 \text{ vol}\% \cdot \mu\text{m}$ ）であり，一方コントロール群においては $3.9 \times 10^2 \sim 1.6 \times 10^3 \text{ vol}\% \cdot \mu\text{m}$ （中央値: $1.2 \times 10^3 \text{ vol}\% \cdot \mu\text{m}$ ）であった．FRM 群はコントロール群より Ca 喪失量が有意に少なかった（Mann-Whitney *U*-test, $P < 0.05$ ）．図 4B に示す FRM 群におけるミネラル喪失量は $2.0 \times 10^4 \sim 1.6 \times 10^5 \text{ mg/cm}^3 \cdot \mu\text{m}$ （中央値: $1.1 \times 10^5 \text{ mg/cm}^3 \cdot \mu\text{m}$ ）であり，コントロール群においては $1.3 \times 10^5 \sim 2.1 \times 10^5 \text{ mg/cm}^3 \cdot \mu\text{m}$ （中央値: $1.8 \times 10^5 \text{ mg/cm}^3 \cdot \mu\text{m}$ ）であった．マイクロ CT におけるミネラル喪失量においても Ca 喪失量と同様の傾向が認められた（Mann-Whitney *U*-test, $P < 0.05$ ）．

図 4C に示す FRM 群における脱灰前後の歯質内 F 量は、各々 $7.2 \times 10^3 \sim 8.9 \times 10^3$ ppmF $\cdot\mu\text{m}$ (中央値: 4.0×10^3 ppmF $\cdot\mu\text{m}$) および $1.0 \times 10^3 \sim 1.1 \times 10^4$ ppmF $\cdot\mu\text{m}$ (中央値: 6.0×10^3 ppmF $\cdot\mu\text{m}$) であり、コントロール群においては、 $0.0 \sim 6.8 \times 10^3$ ppmF $\cdot\mu\text{m}$ (中央値: 1.0×10^3 ppmF $\cdot\mu\text{m}$) および $8.1 \sim 1.2 \times 10^3$ ppmF $\cdot\mu\text{m}$ (中央値: 2.0×10^2 ppmF $\cdot\mu\text{m}$) であった。FRM 群における脱灰前後の歯質内 F 量は、コントロール群に比べ有意に多かった (Mann-Whitney *U*-tests, $P < 0.05$) .

さらに、図 4D に示す FRM 群における脱灰前後の F 浸透深さは、各々 $1.0 \times 10^2 \sim 4.0 \times 10^2 \mu\text{m}$ (中央値: $1.6 \times 10^2 \mu\text{m}$) および $1.1 \times 10^2 \sim 5.7 \times 10^2 \mu\text{m}$ (中央値: $2.9 \times 10^2 \mu\text{m}$) であり、コントロール群においては $0.0 \sim 2.0 \times 10^2 \mu\text{m}$ (中央値: $0.0 \mu\text{m}$) および $0.0 \sim 7.0 \times 10^2 \mu\text{m}$ (中央値: $0.0 \mu\text{m}$) であった。脱灰前後ともに、FRM 群における F 浸透深さはコントロール群と比較して有意に深かった (Mann-Whitney *U*-test, $P < 0.05$) .

PIXE/PIGE の結果より算出された Ca 喪失量とマイクロ CT の結果より算出されたミネラル喪失量は、有意な強い正の相関を示し (図 5A; Spearman's rank correlation coefficient, $r = 0.88$, $P < 0.01$) , Ca 喪失量と脱灰前の歯質内 F 量には有意な負の相関が認められた (図 5B; Spearman's rank correlation coefficient, $r = -0.72$, $P < 0.01$) . また、Ca 喪失量と F 浸透深さとの間にも有意な負の相関が認められた (図 5 C; Spearman's rank correlation coefficient, $r = -0.74$, $P < 0.01$) .

2. FRM の塗布期間および脱灰時の pH を変えた条件での FRM が根面象牙質の耐酸性に及ぼす影響の検討

2.1 方法

2.1.1 試料の作製

23 歳から 35 歳までのヒト抜去第三大臼歯 21 本を用いた。試料の作製方法は 1.1.1 に準じ、流水下で低速精密切断機を用いて、セメント-エナメル境より歯冠側 0.5 mm、歯根側 7.0 mm の部位にて歯軸に垂直に切断後、頬舌側の表層に、根面象牙質を露出させたうえで、歯軸に平行に近遠心頬舌方向に 4 分割し、根面象牙質露出試料を各歯より 4 ブロック作製した。4 ブロックのうち、3 ブロックの象牙質露出部に、FRM として、表 1. に示す Fuji VII (ジーシー; 以下 F7 群), MI Varnish (ジーシー; 以下 MI 群), アドシールド®GI (以下 Ad 群) を各々塗布した。FRM を塗布しない残りの 1 ブロックをコントロール (以下 CO 群) とした。FRM 塗布部と根面象牙質露出部以外をスティッキーワックスにて被覆し、そのうち 15 本から得た試料を 1 ヶ月、6 本から得たものを 3 ヶ月、37°C で生理食塩水中に浸漬した。1 ヶ月もしくは 3 ヶ月後、各試料を生理食塩水中より取り

出し、水洗後、FRM およびスティッキーワックスを除去し、実験 1. と同様に銅箔を貼付して測定用試料を作製した。作製した試料は湿度 100 % 下にて保管した。

2.1.2 In-air micro-PIXE/PIGE を用いた脱灰前の Ca および F の定量

各試料における根面象牙質表層の Ca および F の分布と濃度の定量を実験 1. と同様に実施した。

2.1.3 試料の脱灰

PIXE/PIGE 測定後の試料の、象牙質露出部以外をスティッキーワックスにて再び被覆した。1 ヶ月塗布試料のうち 10 本分を pH 4.5 の脱灰液 (0.2 mol/l lactate buffer, 3.0 mmol/l CaCl₂, 1.8 mmol/l KH₂PO₄) に、5 本分を pH 5.0 の脱灰液 (0.05 mol/l acetate buffer, 2.2 mmol/l CaCl₂, 2.2 mmol/l KH₂PO₄) に 3 日間浸漬した。また、3 ヶ月塗布試料 6 本分を pH 5.0 の脱灰液に 3 日間浸漬した。

2.1.4 In-air micro-PIXE/PIGE を用いた脱灰後の Ca および F の定量

脱灰後の各試料において、脱灰前の In-air micro-PIXE/PIGE 解析と同一部位における Ca および F の分布と濃度の定量を、実験 1. と同様に実施した。

2.1.5 脱灰前後における Ca および F の分布および濃度の解析

実験 1.と同様に，脱灰前後の PIXE/PIGE からの分布グラフを重ね合わせ，Ca 喪失量と歯質内 F 量を得た．さらに，脱灰前後の表層部の Ca の濃度分布の変化から，脱灰後の表層の形態について，a. 脱灰が認められないもの，b. 表層下脱灰は認められるものの表層が後退せずに維持されたもの，および c. 脱灰されて表層が後退したもの，の 3 段階で評価した．

2.1.6 統計的解析

Ca 喪失量および歯質内 F 量における群間比較については，Steel-Dwass test を用いて危険率を 5%として評価した．塗布期間による比較には，Mann-Whitney's *U*-test を用いて危険率を 5%として評価した．Ca 喪失量と歯質内 F 量との相関関係については，Spearman's rank correlation coefficient を用いて危険率を 1%として検定した．さらに，表層の形態については Kruskal-Wallis test を用いて危険率を 5%として検討した．

2.2 結果

FRM 塗布期間 1 ヶ月，脱灰 pH5.0 の条件の場合，図 6A に示すとおり，F7 群，MI 群，Ad 群における Ca 喪失量は，各々 $0.0 \sim 2.5 \times 10^2$ vol% $\cdot\mu\text{m}$ (中央値: 6.3×10

vol%・ μm) , $0.0 \sim 1.2 \times 10^2$ vol%・ μm (中央値: 4.2×10 vol%・ μm) , $8.0 \times 10^{-1} \sim 1.5 \times 10^2$ vol%・ μm (中央値: 2.2×10 vol%・ μm) であり, CO 群においては $1.8 \times 10^2 \sim 4.6 \times 10^2$ vol%・ μm (中央値: 4.1×10^2 vol%・ μm) であった. FRM 群は CO 群より Ca 喪失量が有意に少なかった (Steel-Dwass test, $P < 0.05$) . 歯質内 F 量は, 図 7A に示すとおり F7 群, MI 群, Ad 群において, 各々 $6.0 \times 10^2 \sim 1.0 \times 10^4$ ppmF・ μm (中央値: 5.8×10^3 ppmF・ μm) , $7.2 \times 10^3 \sim 2.3 \times 10^4$ ppmF・ μm (中央値: 1.3×10^4 ppmF・ μm) , $2.6 \times 10^3 \sim 1.1 \times 10^4$ ppmF・ μm (中央値: 5.3×10^3 ppmF・ μm) であり, CO 群は, $0.0 \sim 3.0$ ppmF・ μm (中央値: 0.0 ppmF・ μm) であった. FRM 群における歯質内 F 量は, CO 群に比べ有意に多かった (Steel-Dwass test, $P < 0.05$) .

また, FRM 塗布期間 3 ヶ月, 脱灰 pH5.0 の条件の場合, 図 6B に示すとおり, F7 群, MI 群, Ad 群における Ca 喪失量は, 各々 $0.0 \sim 2.7 \times 10^2$ vol%・ μm (中央値: 1.3×10^2 vol%・ μm) , $0.0 \sim 1.1 \times 10^2$ vol%・ μm (中央値: 5.9×10 vol%・ μm) , $0.0 \sim 2.9 \times 10$ vol%・ μm (中央値: 4.0 vol%・ μm) であった. CO 群においては $6.7 \times 10 \sim 7.7 \times 10^2$ vol%・ μm (中央値: 4.2×10^2 vol%・ μm) であり, MI 群と Ad 群は CO 群より Ca 喪失量が有意に少なかった (Steel-Dwass test, $P < 0.05$) . 歯質内 F 量は, 図 7B に示すとおり, F7 群, MI 群, Ad 群において, 各々 $5.5 \times 10^3 \sim 1.5 \times 10^4$ ppmF・ μm (中央値: 1.0×10^4 ppmF・ μm) , $1.5 \times 10^4 \sim 5.0 \times 10^4$ ppmF・ μm (中央値: 1.9×10^4 ppmF・ μm) , $9.9 \times 10^3 \sim 1.9 \times 10^4$ ppmF・ μm (中央値: 1.4×10^4 ppmF・

μm) であり, CO 群は, $0.0 \sim 9.0 \times 10^2$ ppmF $\cdot\mu\text{m}$ (中央値: 3.0×10^2 ppmF $\cdot\mu\text{m}$) であった. FRM 群における歯質内 F 量は, CO 群に比べ有意に多かった (Steel-Dwass test, $P < 0.05$) .

図 6C において, FRM1 ヲ月塗布群と 3 ヲ月間塗布群を比較すると, Ca 喪失量においては, 塗布期間を増すことにより, Ad 群においてのみ有意な減少が認められた (Mann-Whitney's U -test, $P < 0.05$) . 一方, 図 7C に示すとおり, 歯質内 F 量は 3 ヲ月の群において有意に増加した (Mann-Whitney's U -test, $P < 0.05$) .

図 8 に示すとおり, Ca 喪失量と歯質内 F 量との間には, 塗布期間 1 ヲ月および 3 ヲ月ともに有意な負の相関が認められた (Spearman's rank correlation coefficients, 1 ヲ月: $r = -0.56$, $P < 0.01$, 3 ヲ月: $r = -0.63$, $P < 0.01$) . しかし, CO 群を除外して FRM 群のみで解析した場合, 塗布期間 1 ヲ月および 3 ヲ月ともに相関関係は認められなかった (Spearman's rank correlation coefficients, 1 ヲ月: $r = -0.09$, $P > 0.01$, 3 ヲ月: $r = -0.23$, $P > 0.01$) .

図 9A に示す FRM 塗布期間 1 ヲ月, 脱灰時 pH4.5 の条件の場合, F7 群, MI 群, Ad 群における Ca 喪失量は, 各々 $4.3 \times 10^2 \sim 1.3 \times 10^3$ vol% $\cdot\mu\text{m}$ (中央値: 7.2×10^2 vol% $\cdot\mu\text{m}$) , $3.4 \times 10^2 \sim 1.0 \times 10^3$ vol% $\cdot\mu\text{m}$ (中央値: 4.9×10^2 vol% $\cdot\mu\text{m}$) , $5.4 \times 10^2 \sim 7.7 \times 10^2$ vol% $\cdot\mu\text{m}$ (中央値: 3.5×10^2 vol% $\cdot\mu\text{m}$) であり, CO 群においては $3.9 \times 10^2 \sim 1.6 \times 10^3$ vol% $\cdot\mu\text{m}$ (中央値: 1.2×10^3 vol% $\cdot\mu\text{m}$) であった. ここでは,

MI群とAd群においてのみ,CO群との間に有意差が認められた(Steel-Dwass test, $P<0.05$)。歯質内F量は,図9Bに示すとおり,F7群,MI群,Ad群において,各々 $6.2 \times 10^2 \sim 6.5 \times 10^3$ ppmF $\cdot\mu\text{m}$ (中央値: 2.4×10^3 ppmF $\cdot\mu\text{m}$), $2.9 \times 10^3 \sim 1.9 \times 10^4$ ppmF $\cdot\mu\text{m}$ (中央値: 7.5×10^3 ppmF $\cdot\mu\text{m}$), $1.0 \times 10^3 \sim 1.1 \times 10^4$ ppmF $\cdot\mu\text{m}$ (中央値: 6.3×10^3 ppmF $\cdot\mu\text{m}$)であり,CO群においては, $8.0 \sim 1.1 \times 10^3$ ppmF $\cdot\mu\text{m}$ (中央値: 2.4×10^2 ppmF $\cdot\mu\text{m}$)で,MI群,Ad群,F7群,CO群の順で多く,MI,Ad,F7群とCO群との間に有意差が認められた(Steel-Dwass test, $P<0.05$)。

図10に示すとおり,Ca喪失量と歯質内F量との間には,有意な負の相関が認められた(Spearman's rank correlation coefficient, $r=-0.71$, $P<0.01$)。ここでは,CO群を除外したFRM群のみにおいても相関関係が認められた($r=-0.72$, $P<0.01$)。

図11に脱灰後の表層形態を示す。塗布期間1ヵ月で脱灰時pH5.0,塗布期間3ヵ月で脱灰時pH5.0,塗布期間1ヵ月で脱灰時pH4.5のすべての条件において,異なる群間に有意差が認められた(Kruskal-Wallis test, $P<0.05$)。表層が後退せず維持されていたaとbは,塗布期間1ヵ月脱灰pH5.0では,CO群で0%,F7群で67%,MI群で44%,Ad群で89%(図11A)であり,塗布期間3ヵ月脱灰pH5.0では,CO群で0%,F7群で50%,MI群で50%,Ad群で100%であった(図11B)。一方,塗布期間1ヵ月で脱灰pH4.5の条件では,CO群で0%,F7群で0%,MI群で5%,Ad群で25%に表層が維持されていた(図11C)。

3. Ca を添加した FRM が根面象牙質の耐酸性に及ぼす影響の検討

3.1 方法

3.1.1 実験に使用した FRM

表 2. に示すとおり，Fuji VII の成分から，ガラスの組成を変更し，Sr/Ca の mol%比をそれぞれ 50/50，0/100 と変化させた試作セメント①（以下 P1）および試作セメント②（以下 P2）を実験に供した。

3.1.2 試料の作製

16 歳から 37 歳までのヒト抜去第三大臼歯 9 本を用いた。実験 2. と同様に，根面象牙質露出試料を各歯より 4 ブロック作製した。4 ブロックのうち，3 ブロックの象牙質露出部に Fuji VII（以下 F7 群），P1（以下 P1 群），P2（以下 P2 群）を各々塗布した。FRM を塗布しない残り 1 ブロックをコントロール（以下 CO 群）とした。FRM 塗布部と象牙質露出部以外をスティッキーワックスにて被覆し，1 ヶ月間 37°C の生理食塩水中に浸漬保管した。1 ヶ月後，各試料を生理食塩水中より取り出し，FRM およびスティッキーワックスを除去し，実験 2. と同様に測定用試料を作製した。

3.1.3 In-air micro-PIXE/PIGE を用いた脱灰前の Ca および F の定量

各試料における根面象牙質の Ca および F の分布状態の評価と濃度の定量を
実験 1. と同様に実施した.

3.1.4 試料の脱灰

PIXE/PIGE 測定後の試料の, 象牙質露出部以外をスティッキーワックスにて
再び被覆し, pH 5.0 の脱灰液 (0.05 mol/l acetate buffer, 2.2 mmol/l CaCl₂, 2.2 mmol/l
KH₂PO₄) に 3 日間浸漬した. 3 日後, 水洗し, スティッキーワックスを除去し
て湿度 100 % 下にて保管した.

3.1.5 In-air micro-PIXE/PIGE を用いた脱灰後の Ca および F の定量

脱灰後の各試料において, 脱灰前の In-air micro-PIXE/PIGE 解析と同一部位に
おける Ca および F の分布状態の評価と濃度の定量を, 実験 1. と同様に実施
した.

3.1.6 脱灰前後における Ca および F の分布および濃度の解析

実験 1.と同様に，脱灰前後の PIXE/PIGE からの分布グラフを重ね合わせ，Ca 喪失量と歯質内 F 量を得た．さらに，脱灰後の表層の形態について，実験 2. と同様に 3 段階で評価した．

3.1.7 統計的解析

Ca 喪失量および歯質内 F 量における群間比較には，Steel-Dwass test を用いて危険率を 5%として評価し，相関関係については，Spearman's rank correlation coefficient を用いて危険率を 1%として検定した．さらに，表層の形態については Kruskal-Wallis test を用いて危険率を 5%として検討した．

3.2 結果

図 12A に示すとおり，F7 群，P1 群，P2 群における Ca 喪失量は，各々 $8.4 \times 10^2 \sim 5.2 \times 10^2 \text{ vol}\% \cdot \mu\text{m}$ （中央値: $2.8 \times 10^2 \text{ vol}\% \cdot \mu\text{m}$ ）， $0.0 \sim 4.0 \times 10^2 \text{ vol}\% \cdot \mu\text{m}$ （中央値: $1.2 \times 10^2 \text{ vol}\% \cdot \mu\text{m}$ ）， $0.0 \sim 2.3 \times 10^2 \text{ vol}\% \cdot \mu\text{m}$ （中央値: $7.0 \times 10^1 \text{ vol}\% \cdot \mu\text{m}$ ）であり，CO 群においては $2.2 \times 10^2 \sim 8.1 \times 10^2 \text{ vol}\% \cdot \mu\text{m}$ （中央値: $4.1 \times 10^2 \text{ vol}\% \cdot \mu\text{m}$ ）であった．P1 群と P2 群では，CO 群および F7 群より Ca 喪失量が有意に少なかった（Steel-Dwass test, $P < 0.05$ ）．図 12B に示すとおり，歯質内 F 量は，

F7 群, P1 群, P2 群において, 各々 $2.5 \times 10^2 \sim 7.7 \times 10^3$ ppmF $\cdot\mu\text{m}$ (中央値: 2.1×10^3 ppmF $\cdot\mu\text{m}$), $8.1 \times 10^2 \sim 7.4 \times 10^3$ ppmF $\cdot\mu\text{m}$ (中央値: 2.9×10^3 ppmF $\cdot\mu\text{m}$), $1.7 \times 10^3 \sim 1.0 \times 10^4$ ppmF $\cdot\mu\text{m}$ (中央値: 5.5×10^3 ppmF $\cdot\mu\text{m}$) であった. CO 群は $0.0 \sim 0.0$ ppmF $\cdot\mu\text{m}$ (中央値: 0.0 ppmF $\cdot\mu\text{m}$) であり, F7 群, P1 群, P2 群が CO 群より有意に多くなった (Steel-Dwass test, $P < 0.05$). また, 各 FRM 群間に有意差は認められなかった. F7 群における歯質内 F 量は約 2.1×10^3 ppmF $\cdot\mu\text{m}$ であったが, Ca 喪失量に関しては CO 群と有意差は認められなかった. P1 群および P2 群においては, F7 群と比べ歯質内 F 量に有意差はなかったが, Ca 喪失量に関しては CO 群と有意差が認められた.

Ca 喪失量と歯質内 F 量との間には, 図 13 に示すとおり, 有意な負の相関が認められた (Spearman's rank correlation coefficient, $r = -0.63$, $P < 0.01$).

脱灰後の表層形態を図 14 に示す. 異なる群間に有意差が認められ (Kruskal-Wallis test, $P < 0.05$), CO 群で 0 %, F7 群で 50 %, P1 群で 94 %, P2 群で 100%において表層が後退せず維持されていた.

4. FRM からのイオン溶出濃度の測定

4.1 方法

4.1.1 試料の作製

実験 2. および 3. に使用した Fuji VII, MI Varnish, アドシールド®GI, P1, P2 を, セメントはメーカー指示通りに混和後, 直径 9 mm, 深さ 2 mm のシリコンモールドに填入し, セロファンストリップス (松風, 京都) を介在させてスライドガラスで 1 時間圧接し, ディスク状硬化試料を作製した. また, MI Varnish も同様にシリコンモールドに填入し, 1 時間静置した. 作製した硬化試料を各々 50 ml の蒸留水中に浸漬し, 12 時間, 24 時間, 5 日, 7 日, 14 日, 28 日後に溶液を回収し, 交換した.

4.1.2 溶出濃度の測定

サンプル中に含まれる Ca イオンおよび Al イオンについては, ICP 発光分光分析装置 (ICPS-8000, 島津製作所) で濃度を測定し, F イオンについては, フッ素イオン電極 (Model 9609BN, Orion Research Inc., MA, USA) を用いて測定を行った. 試料数は各 FRM につき 4 とした.

4.1.3. 統計的解析

群間の差を Two-way ANOVA および Turkey's test を用いて、危険率を 5%にて評価した.

4.2 結果

図 15 に示すとおり、各セメント硬化体、およびバーニッシュからの 28 日間の Ca イオン溶出濃度は、Fuji VII で 2.1×10^{-1} ppm, MI Varnish で 1.4×10 ppm, アドシールド®GI で 1.2×10 ppm, P1 で 3.1 ppm, P2 で 7.2 ppm であり、すべての群間に有意差が認められた ($P < 0.05$) . 28 日間の F イオン溶出濃度は、Fuji VII で 4.0×10 ppm, MI Varnish で 1.7×10^2 ppm, アドシールド®GI で 6.8×10 ppm, P1 で 2.7×10 ppm, P2 で 3.3×10 ppm であり、MI Varnish とアドシールド®GI と Fuji VII, P1 および P2 との間に有意差が認められ ($P < 0.05$) , Fuji VII, P1, P2 の間には有意差は認められなかった. また、28 日間の Al イオン溶出濃度は、Fuji VII で 1.4×10 ppm, MI Varnish で 3.0×10^{-2} ppm, アドシールド®GI で 2.8×10 ppm, P1 で 1.0×10 ppm, P2 で 7.2 ppm であり、アドシールド®GI と Fuji VII, P1 および P2 と MI Varnish との間に有意差が認められ ($P < 0.05$) , Fuji VII と P1 および P1 と P2 の間には有意差は認められなかった.

III. 考察

従来から、脱灰および再石灰化挙動などのう蝕病態を評価する方法には、TMR やマイクロ CT、EPMA などが用いられてきた。しかし、TMR やマイクロ CT は歯質内のミネラルの量的変化といった現象を評価するものであり、EPMA では歯質表面の元素分析が可能であるが経時的評価はできないため、これらの方法では、う蝕病態の質的な経時変化を元素レベルで明らかにすることは実現していなかった。本研究では、試料の繰り返し測定が可能である In-air micro-PIXE/PIGE を用いて、う蝕の進行に伴う歯質の主要なミネラルである Ca およびう蝕の抑制に効果的であるとされる F の歯質内での濃度分布の変化をとらえることを目的として研究を行った。

実験 1.を遂行するにあたり、脱灰前後のデータを比較するための基準の設定が必須であった。その基準としては、Ca や F と明確に分別できるよう、特性エックス線エネルギーが大きく異なる銅を用いることにした。さらに、測定誤差を最小限にとどめるため、銅箔の厚さを $4\ \mu\text{m}$ とし、銅箔の位置は $1000\ \times\ 1000\ \mu\text{m}^2$ の測定範囲域で感知するため、表層より歯髄側に $800\ \mu\text{m}$ に設置した。このように銅箔を基準点に設定したことにより、脱灰前後の線分析結果を精確に重ね

合わせることが可能となり，Ca および F の濃度分布の変化をとらえることができた。

本測定法では，10 μm 以下のビームサイズを用いることで象牙質における各ミネラルの分布を高解像度で分析することが可能であった。同程度の解像度をもつマイクロ CT との比較を行い，本方法の妥当性を検証したところ，同一の試料における PIXE/PIGE より算出された Ca 喪失量と，マイクロ CT の結果より算出されたミネラル喪失量との間には，非常に強い正の相関を認めた (図 5A; $r=0.88$)。両者は完全に一致したわけではなく，これは，PIXE/PIGE 測定では Ca の濃度のみに着目しており，脱灰後に残存した他のミネラル組織がマイクロ CT では感知されていた可能性が考えられる。しかし，このように非常に強い相関を持つことより，脱灰の現象をとらえるには，Ca の濃度分布の変化を評価することが妥当であると考えられた。

In-air micro-PIXE/PIGE 法は，試料を薄切切片に作製する必要がない。そのため，連続的測定時の試料のひび割れや収縮および変形，微細構造の重複などの問題が生じにくい (Van et al. 1995; Damen et al. 1997, Thomas et al., 2006, Hamba et al. 2012)。また，大気中での測定が可能であるため，EPMA などで必要な乾燥，蒸着，および鏡面研磨などの前処理も必要としない。さらに TMR 法と比べた本測定法の大きな利点は，PIXE と PIGE を併用することで Ca と F の濃度分布を

同時に定量できることである。このように精密な元素レベルでの多元素分析が、同一の試料を用いて、異なる時点において何度でも可能であることは、今後、脱灰や再石灰化のメカニズム究明において大きな役割を果たす可能性がある。

Ca 喪失量と歯質内 F 量との間には、有意な負の相関が認められ (図 5B) , 歯質内 F 量が増加することで、耐酸性が向上したと推察される。本結果は、過去の文献により提唱されている F によるエナメル質および象牙質の耐酸性向上の効果をサポートするものとなった (Wefel 1990; ten Cate and Featherstone 1991; Pessan et al. 2011; ten Cate 2013; Twetman and Keller 2016) .

また、Ca 喪失量と F 浸透深さとも有意な負の相関が認められた (図 5C) . これより、F がより深く浸透することにより、耐酸性が向上する可能性が示された。また、脱灰前と脱灰後の歯質内 F 量を比較すると有意差は認められなかった (図 4C) . FRM からの F 溶出は中性環境下よりも酸性環境下において顕著であり、これは、F がアニオンであるため、水素カチオンが多く存在する酸性環境下において、より溶解するためであると考えられる (Gandolfi et al. 2006; Wiegand et al. 2007) . また、FRM より放出された F は、速やかにエナメル質もしくは象牙質に吸着すると Komatsu ら (2007) は報告している。本結果では、脱灰前後の歯質内 F 量に有意差がないことから、脱灰によってミネラルが喪失するに付随して F が溶液中に放出されても、再び歯質内へ取り込まれることが示唆され

た。脱灰前後の歯質内 F 量に有意差は認められなかったものの、脱灰後の歯質内 F 量が多くなる傾向がみられたことについては、試料表面にわずかに残存した材料より酸性環境において放出された F が歯質内に取り込まれたのではないかと推測される。一方、F 浸透深さにおいては脱灰前より脱灰後の方が有意に深くなった (図 4D)。これより、脱灰後の象牙質においては、脱灰前には表層側に存在した F が脱灰により多孔質となった構造を通過し、深部まで浸透したのではないかと推察された。

本研究は、近年の急増が懸念される根面う蝕を想定し、根面象牙質を用いて実験を行った。根面う蝕は、セメントの崩壊後、象牙質う蝕と同様の病態を示す。象牙質う蝕では、酸による脱灰と併行して、コラーゲンの分解が生じることで進行する (Chaussain-Miller et al. 2006; Thanatvarakorn et al. 2016; Takahashi and Nyvad 2016)。このコラーゲンの代表的な分解因子として、酸性環境下において活性化する組織あるいは細菌由来のマトリクスメタロプロテアーゼ (MMP) とシステインプロテアーゼであるカテプシンが挙げられる (Hannas et al. 2007; Breschi et al. 2010; Buzalaf et al. 2012; Vidal et al. 2014)。この MMP やカテプシンの活性を阻害する物質として、クロルヘキシジンやプロアントシアニジン - ブドウ種子抽出物などが知られている (Magalhães et al. 2009; Osorio et al. 2011; Epasinghe et al. 2013; Montagner et al. 2014)。近年では、F によっても MMP およ

びカタペシンの活性が阻害されることが報告されているため (Kato et al. 2014; Altinci et al. 2016), 根面象牙質へのフッ化物の応用は脱灰抑制効果のみならず, コラーゲンの分解を抑制する効果も併せて, う蝕抑制効果が期待される. このような FRM から歯質内へ浸透する F によるコラーゲン分解抑制効果については, 今後更なる検討が必要である.

実験 2. においては, 異なる 3 種類の FRM を用い, FRM の塗布期間および脱灰時の pH を変えた条件で, FRM が根面象牙質の耐酸性に及ぼす影響を検討した. 塗布期間 1 ヶ月および 3 ヶ月ともに, Ca 喪失量は FRM 群においてコントロール群と比べて有意に減少した (図 6A, B). 歯質内 F 量は, いずれも FRM 群ではコントロール群に比べて有意に増加した (図 7A, B). さらに, Ca 喪失量と歯質内 F 量との間には, 塗布期間 1 ヶ月および 3 ヶ月ともに有意な負の相関が認められた (図 8). これにより, 歯質内に F が取り込まれることによって根面象牙質の耐酸性が向上していると考えられ, 実験 1. の結果と合致した.

FRM 群における歯質内 F 量は, 塗布期間 1 ヶ月および 3 ヶ月とも MI 群と F7 群に有意差が認められ, Ad 群は MI 群と F7 群に対してともに有意差は認められなかった (図 7A, B). 溶出濃度では MI は F7 の約 40 倍, Ad は F7 の約 1.7 倍の F を溶出していたが (図 15), 溶出量と歯質への浸透は異なる傾向を示した.

これは、ガラスアイオノマーセメントの F は硬化時に多く放出されるが、本実験のイオン溶出濃度の測定においては、硬化体からの F イオン溶出を観察しており、ガラスアイオノマーセメントから歯質への F 取り込みを直接表していないためではないかと考えられる。

次に、FRM の塗布期間を変化させることで、同じ FRM 間における歯質内 F 濃度と Ca 喪失量との関係を検討した。FRM を 1 ヶ月間塗布した群と 3 ヶ月間塗布した群を比較すると、Ca 喪失量においては、塗布期間を増すことにより、Ad 群以外では有意な変化が認められなかったが、歯質内 F 量は 3 ヶ月の群において有意に増加した (図 6C, 7C)。これより、歯質内へ F が取り込まれることにより耐酸性は向上するが、その影響は必ずしも量依存的ではない可能性が考えられた。Ca 喪失量と歯質内 F 量との関係において、コントロール群を除外した FRM 群のみでは、塗布期間 1 ヶ月および 3 ヶ月ともに相関関係は認められなかった (図 8)。これらより、根面象牙質の耐酸性の向上は歯質内の F の量依存的ではない可能性が考えられる。

ここで、FRM より放出される F の作用としては、2 種類が考えられている。第 1 は結晶構造に組み込まれ、フルオロアパタイトを形成することによる歯質の耐酸性向上である。ヒドロキシアパタイトの水酸基が F イオンと置換することにより形成されるフルオロアパタイトは化学的に安定であるため (Aoba 1997;

Featherstone 1999) , 歯質の耐酸性の向上に寄与するといわれている。第2は、溶液中に溶解している F もしくは歯質結晶表面に緩く結合している F も歯質の脱灰を抑制すると考えられている。Ogaard ら (1988) はヒトエナメル質とフルオロアパタイトを構成成分とするサメのエナメロイドを用いた *in vitro* の実験において、NaF を共存させたエナメル質はエナメロイドに劣らない耐酸性を示すとした。また、低濃度の F イオンが口腔内に存在することがミネラル内に組み込まれることよりも重要であるという報告もされている (Featherstone et al. 1990; ten Cate and Featherstone 1991) 。このように歯質の結晶全周が緩く結合している F で囲まれている場合、フルオロアパタイトのような働きをすることで耐酸性が向上する。しかし、この F による被覆が部分的である場合には被覆されていない部分から結晶が溶解する (Arends and Christoffersen 1990; Featherstone 2008) 。一方、根面象牙質においては、高濃度の F を作用させることが重要であるとの報告も多数ある (Baysan et al. 2001; Ekstrand et al. 2013; Garcia-Godoy et al. 2014; Ekstrand 2016) 。このように、歯質内に取り込まれた F の耐酸性への影響について、特に歯質ミネラルと F との相互作用の有無や化学的状態、あるいは最適な濃度や F の局在などについては、未だに議論が尽きない。

本実験の結果においては、F を歯質内に浸透させた象牙質はコントロール群と比較して有意に脱灰が抑制された。これより、歯質内に F が取り込まれること

で耐酸性が向上することは明らかであった。しかし、歯質内の F 量を増加させることによって量依存的に象牙質の耐酸性が向上したわけではなく、根面象牙質の耐酸性の獲得には一定以上の F 量が歯質内に存在することが重要であるといえる。今回の結果では、この耐酸性の向上に必要な歯質内の F 量について、脱灰時の pH が 5.0 の場合において、歯質内 F 量が $5.3 \times 10^3 \text{ ppmF} \times \mu\text{m}$ 程度で効果的に脱灰が抑制されることが示唆されたが、一定量以上の F が浸透することによる効果については、今後のさらなる検討が必要である。

次に、脱灰時の pH4.5 は、唾液緩衝能が低いなどのう蝕高リスク群を想定したものである。Ca 喪失量は Ad 群、MI 群、F7 群、CO 群の順で少なく、Ad 群および MI 群と CO 群の間に有意差が認められた。歯質内 F 量は、MI 群、Ad 群、F7 群、CO 群の順で多く、FRM 群ではコントロール群に比べて有意に増加した。また、MI 群と F7 群との間にも有意差が認められた (図 9)。これより、F7 群から取り込まれた歯質内 F 量 ($2.4 \times 10^3 \text{ ppmF} \times \mu\text{m}$) のみでは、pH が低い条件においては歯質の脱灰を抑制しにくいことが示唆された。Komatsu ら (2011) は、FRM の脱灰抑制効果はカリエスリスクに依存し、カリエスリスクが高い場合には十分量の F が供給されることが必要であるとしている。本実験の結果もこの報告を支持するものと考ええる。MI 群および Ad 群では、Ca イオンも放出しており、その影響があった可能性も考えられるため、脱灰を抑制するために必要な

歯質内 F 量については今後の検討が必要である。また、Ca 喪失量と歯質内 F 量との間には、有意な負の相関が認められた。さらに、コントロール群を除外して FRM 群のみでも有意な相関関係が認められた (図 10)。これは、歯質内に F が取り込まれることによって根面象牙質の耐酸性が向上するが、pH が低い場合には脱灰抑制に必要な F 量の閾値があがるため、その閾値以下の F 量だけでは脱灰が抑制できなかつたためと推察された。

脱灰後の表層形態は、コントロール群においては表層が後退したが、FRM 群においては、表層の後退が抑制される傾向が認められた。また、pH が低い場合においては、脱灰が顕著で表層が後退しており、酸蝕の様相を呈していた。特に、Ad 群では他群と比較して有意に表層が保持される傾向にあった (図 11)。ここで、すべての条件において、Ca 喪失量においては Ad 群と MI 群の間には有意差は認められなかつたが、表層形態においては異なる傾向が示された。アドシールド®GI は Ca を徐放するガラスアイオノマーセメントであり、MI Varnish は casein phosphopeptide-amorphous calcium phosphate (CPP-ACP) を含有するバーニッシュである。CPP-ACP は可溶性のリン酸カルシウムを歯の表面に運び安定化させ、歯質内部へ Ca イオン、PO₄ イオンを浸透させることにより、歯質の再石灰化能や脱灰抑制能を向上させると言われている (Reynolds 1997; Oshiro et al. 2007; Reynolds et al. 2008)。一方、一般的に歯質と材料との界面に高濃度

の F イオンや Ca イオンなどが存在すると、界面にフッ化カルシウム (CaF₂) 様の物質が沈着し、この CaF₂ は F イオンや Ca イオンの供給源として働き、フルオロアパタイトの形成の促進や更なる脱灰の抑制などの役割を果たしていると考えられている (ten Cate 1997; Ogaard 2001; Tenuta et al. 2008) . 歯質周辺での F と Ca の挙動は、いまだ精確には解明されていないが、アドシールド®GI から溶出される F イオン、Ca イオンは、界面において CaF₂ のような形態をとっているのではないかと推測される。このように、アドシールド®GI と MI Varnish から放出される F イオン、Ca イオンの化学的状態が異なることより、歯質の表層もしくは病巣内部における働きが異なっているのではないかと推測される。このようにアドシールド®GI は高い脱灰抑制効果を示した。一方、イオンの溶出濃度実験において、アドシールド®GI では高い Al イオン溶出が認められた (図 15C) .

これより、徐々にガラス骨格が溶出しているのではないかと推察され、長期的に塗布する場面には適していない可能性が考えられる。

実験 2. で用いた 3 種類の FRM の中で、特に Ca が添加されたセメントの Ad 群において、すべての条件で高い脱灰抑制効果が認められた。そこで実験 3. では、Ca の添加による効果を検索するため、Ca を徐放するセメントタイプの FRM の脱灰抑制効果について検討することとした。

各群の Ca 喪失量は、CO 群、F7 群、P1 群、P2 群の順に多く、P1 群および P2 群は F7 群および CO 群と比較して有意に Ca 喪失量が少なかった (図 12) .

また、P1 群と P2 群との間には有意差は認められなかった。各群における歯質内 F 量は、P1 群、P2 群、および F7 群と CO 群との間に有意差が認められ、P1 群、P2 群、F7 群の間には有意な差はなかった (図 12) . エナメル質において、Ca の存在下では歯質表面の F 濃度が高まり、う蝕抑制効果が高まるとの報告がある (Sköld-Larsson et al. 2013; Souza et al. 2016) . 本実験では、F7 から取り込まれた歯質内 F 量は 2.1×10^3 ppmF \cdot μ m 程度であったが、Ca 喪失量に関して CO 群と有意差が認められなかった。また、3 種類の FRM 群では根面象牙質内に取り込まれた歯質内 F 量は同等であったが、Ca を添加した群においては、より効果的に脱灰が抑制された。これより、根面象牙質においても、F と Ca が共存することにより、耐酸性はさらに向上することが示された。本実験の結果のみでは歯質内への Ca の取り込み量は不明であり、Ca 取り込み量と脱灰抑制効果との関係についてはさらなる検討が必要である。表層の形態について、異なる群間に有意差が認められた (図 14) . CO 群では全て表層が後退していたが、P1 群および P2 群においてはほぼ全ての試料で表層が保持されており、Ca の添加は表層の保持にも影響を与えることが分かった。これらより、高フッ化物徐放性

ガラスイオノマーセメントの Sr を Ca に置換した材料を塗布することによって、根面象牙質の耐酸性がさらに向上する可能性が示唆された。

IV. 結論

In-air micro-PIXE/PIGE を用いて、根面象牙質における脱灰前後の Ca および F の変化を捉える定量評価法を確立できた。また、高フッ化物徐放性ガラスイオノマーセメントの Sr を Ca に置換した材料を塗布することにより、根面象牙質の耐酸性がより向上することが分かった。

V. 謝辞

稿を終えるにあたり，本研究の機会を与えていただき，御指導と御高閲を賜りました大阪大学大学院歯学研究科口腔分子感染制御学講座（歯科保存学教室）林 美加子教授に，深甚なる感謝の意を表します。

また，本研究の遂行にあたり多大な御指導，御鞭撻を賜りました大阪大学大学院歯学研究科口腔分子感染制御学講座（歯科保存学教室） 山本 洋子博士，大阪大学大学院工学研究科マテリアル生産科学専攻材料機能化プロセス工学講座 中野 貴由教授ならびに石本 卓也博士，朝日大学歯学部歯科理工学教室 奥山 克史博士，北海道医療大学大学院口腔機能修復・再建学系う蝕制御治療学講座 松田 康裕博士，京都府立大学生命環境科学研究科応用生命科学専攻 安田 啓介博士に心より感謝申し上げます。

最後に，本研究を行うに際し，多大なる御協力と御助言を頂いた大阪大学大学院歯学研究科口腔分子感染制御学講座（歯科保存学教室）ならびに若狭湾エネルギー研究センターの皆様に，心よりお礼申しあげます。

VI. 参考文献

- Aldape F, Flores MJ. 2004. Source apportionment of fine airborne particulate matter collected in the Mexico City metropolitan area. *Int J PIXE*. 14(3-4):147-160.
- Altinci P, Mutluay M, Seseogullari-Dirihan R, Pashley D, Tjäderhane L, Tezvergil-Mutluay A. 2016. NaF inhibits matrix-bound cathepsin-mediated dentin matrix degradation. *Caries Res*. 50(2):124-132.
- Aoba T. 1997. The effect of fluoride on apatite structure and growth. *Crit Rev Oral Biol Med*. 8(2):136-153.
- Arends J, Christoffersen J. 1990. Nature and role of loosely bound fluoride in dental caries. *J Dent Res*. 69(Spec Iss):601-605.
- Arends J, ten Bosch JJ. 1992. Demineralization and remineralization evaluation techniques. *J Dent Res*. 71(Spec Iss):924-928.
- Baysan A, Lynch E, Ellwood R, Davies R, Petersson L, Borsboom P. 2001. Reversal of primary root caries using dentifrices containing 5,000 and 1,100 ppm fluoride. *Caries Res*. 35(1):41-46.
- Bezerra AC, Novaes RC, Faber J, Frencken JE, Leal SC. 2012. Ion concentration adjacent to glass-ionomer restorations in primary molars. *Dent Mater*. 28(11):259-263.
- Bignozzi I, Crea A, Capri D, Littarru C, Lajolo C, Tatakis DN. 2014. Root caries: a periodontal perspective. *J Periodont Res*. 49(2):143-163.
- Breschi L, Martin P, Mazzoni A, Nato F, Carrilho M, Tjäderhane L, et al. 2010. Use of a specific MMP-inhibitor (galardin) for preservation of hybrid layer. *Dent Mater*. 26(6):571-578.

- Buzalaf MA, Kato MT, Hannas AR. 2012. The role of matrix metalloproteinases in dental erosion. *Adv Dent Res.* 24(2):72-76.
- Chaussain-Miller C, Fioretti F, Goldberg M, Menashi S. 2006. The role of matrix metalloproteinases (MMPs) in human caries. *J Dent Res.* 85(1):22-32.
- Cochrane NJ, Iijima Y, Shen P, Yuan Y, Walker GD, Reynolds C, MacRae CM, Wilson NC, Adams GG, Reynolds EC. 2014. Comparative study of the measurement of enamel demineralization and remineralization using transverse microradiography and electron probe microanalysis. *Microsc Microanal.* 20(3):937-945.
- Crawford AW, De Bruin HJ. 1983. Concentration changes in surface Ca, P, F, Zn, Fe, and Sr during white spot formation. *J Dent Res.* 62(9):964-968.
- Damen JJ, Exterkate RA, ten Cate JM. 1997. Reproducibility of TMR for the determination of longitudinal mineral changes in dental hard tissues. *Adv Dent Res.* 11(4):415-419.
- Donovan T. 2008. Critical appraisal: protocol for the prevention and management of root caries. *J Esthet Restor Dent.* 20(6):405-411.
- Eisa MH, Shen H, Jin W, Alaamer AS, Al-Rajhi MA, Idriss H. 2016. PIXE study on the effects of parathyroid hormone on elemental content in rat bones. *Phys Med.* 32(12):1615-1620.
- Ekstrand KR, Poulsen JE, Hede B, Twetman S, Qvist V, Ellwood RP. 2013. A randomized clinical trial of the anti-caries efficacy of 5,000 compared to 1,450 ppm fluoridated toothpaste on root caries lesions in elderly disabled nursing home residents. *Caries Res.* 47(5):391-398.

- Ekstrand KR. 2016. High fluoride dentifrices for elderly and vulnerable adults: does it work and if so, then why? *Caries Res.* 50(Suppl 1):15-21.
- Epasinghe DJ, Yiu CK, Burrow MF, Hiraishi N, Tay FR. 2013. The inhibitory effect of proanthocyanidin on soluble and collagen-bound proteases. *J Dent.* 41(9):832-839.
- Featherstone JD, Glena R, Shariati M, Shields CP. 1990. Dependence of *in vitro* demineralization of apatite and remineralization of dental enamel on fluoride concentration. *J Dent Res.* 69(Spec Iss):620-625.
- Featherstone JD. 1994. Fluoride, remineralization and root caries. *Am J Dent.* 7(5):271-274.
- Featherstone JD. 1999. Prevention and reversal of dental caries: role of low level fluoride. *Community Dent Oral Epidemiol.* 27(1):31-40.
- Featherstone JD. 2008. Dental caries: a dynamic disease process. *Aust Dent J.* 53(3):286-291.
- Gandolfi MG, Chersoni S, Acquaviva GL, Piana G, Prati C, Mongiorgi R. 2006. Fluoride release and absorption at different pH from glass-ionomer cements. *Dent Mater.* 22(5):441-449.
- Garcia-Godoy F, Flaitz C, Hicks J. 2014. Role of fluoridated dentifrices in root caries formation *in vitro*. *Am J Dent.* 27(1):23-28.
- Hamba H, Nikaido T, Sadr A, Nakashima S, Tagami J. 2012. Enamel lesion parameter correlations between polychromatic micro-CT and TMR. *J Dent Res.* 91(6):586-591.
- Hannas AR, Pereira JC, Granjeiro JM, Tjäderhane L. 2007. The role of matrix metalloproteinases in the oral environment. *Acta Odontol Scand.* 65(1):1-13.

- Hayes M, Da Mata C, Cole M, McKenna G, Burke F, Allen PF. 2016. Risk indicators associated with root caries in independently living older adults. *J Dent.* 51:8-14.
- Hoppenbrouwers PM, Driessens FC, Borggreven JM. 1987. The demineralization of human dental roots in the presence of fluoride. *J Dent Res.* 66(8):1370-1374.
- Imazato S, Ikebe K, Nokubi T, Ebisu S, Walls AW. 2006. Prevalence of root caries in a selected population of older adults in Japan. *J Oral Rehabil.* 33(2):137-143.
- Kato MT, Bolanho A, Zarella BL, Salo T, Tjäderhane L, Buzalaf MA. 2014. Sodium fluoride inhibits MMP-2 and MMP-9. *J Dent Res.* 93(1):74-77.
- Kawasaki K, Kambara M. 2014. Effects of ion-releasing tooth-coating material on demineralization of bovine tooth enamel. *Int J Dent.* 2014:463149.
- Knight GM, McIntyre JM, Craig GG, Mulyani. 2007. Electron probe microanalysis of ion exchange of selected elements between dentine and adhesive restorative materials. *Aust Dent J.* 52(2):128–132.
- Komatsu H, Yamamoto H, Nomachi M, Yasuda K, Matsuda Y, Murata Y, Kijimura T, Sano H, Sakai T, Kamiya T. 2007. Fluorine uptake into human enamel around a fluoride-containing dental material during cariogenic pH cycling. *Nucl Instrum Meth B.* 260(1):201-206.
- Komatsu H, Yamamoto H, Nomachi M, Yasuda K, Matsuda Y, Kinugawa M, Kijimura T, Sano H, Satou T, Oikawa S, Kamiya T. 2009. Fluorine uptake into human enamel around fluoride-containing dental materials during cariogenic pH cycling. *Nucl Instrum Meth B.* 267(12-13):2136-2139.

- Komatsu H, Yamamoto H, Matsuda Y, Kijimura T, Kinugawa M, Okumura K, Nomachi M, Yasuda K, Satoh T, Oikawa S. 2011. Fluorine analysis of human enamel around fluoride-containing materials under different pH-cycling by μ -PIGE/PIXE system. *Nucl Instrum Meth B.* 269(20):2274-2277.
- Lippert F, Lynch RJ. 2014. Comparison of Knoop and Vickers surface microhardness and transverse microradiography for the study of early caries lesion formation in human and bovine enamel. *Arch Oral Biol.* 59(7):704-710.
- Magalhães AC, Wiegand A, Rios D, Hannas A, Attin T, Buzalaf MA. 2009. Chlorhexidine and green tea extract reduce dentin erosion and abrasion *in situ*. *J Dent.* 37(12):994-998.
- Mamai-Homata E, Topitsoglou V, Oulis C, Margaritis V, Polychronopoulou A. 2012. Risk indicators of coronal and root caries in Greek middle aged adults and senior citizens. *BMC Public Health.* 12:484.
- Mariño RJ, Fu CS, Giacaman RA. 2015. Prevalence of root caries among ambulant older adults living in central Chile. *Gerodontology.* 32(2):107-114.
- Matsuda Y, Komatsu H, Murata Y, Tanaka T, Sano H. 2006. A newly designed automatic pH-cycling system to simulate daily pH fluctuations. *Dent Mater J.* 25(2):280-285.
- Matsuda Y, Okuyama K, Yamamoto H, Komatsu H, Koka M, Sato T, Hashimoto N, Oki S, Kawamoto C, Sano H. 2015. Fluorine uptake into the human enamel surface from fluoride-containing sealing materials during pH cycling. *Nucl Instrum Meth B.* 348:156-159.
- Montagner AF, Sarkis-Onofre R, Pereira-Cenci T, Cenci MS. 2014. MMP Inhibitors on dentin stability: a systematic review and meta-analysis. *J Dent Res.* 93(8):733-743.

- Morawski M, Meinecke Ch, Reinert T, Dorffel AC, Riederer P, Arendt T, Butz T. 2005. Determination of trace elements in the human substantia nigra. *Nucl Instrum Meth B*. 231(1-4):224-228.
- Morse DE, Holm-Pedersen P, Holm-Pedersen J, Katz RV, Viitanen M, von Strauss E, Winblad B. 2002. Dental caries in persons over the age of 80 living in Kungsholmen, Sweden: findings from the KEOHS project. *Community Dent Health*. 19(4):262-267.
- Mukai Y, ten Cate JM. 2002. Remineralization of advanced root dentin lesions *in vitro*. *Caries Res*. 36(4):275-280.
- Ogaard B, Rölla G, Ruben J, Dijkman T, Arends J. 1988. Microradiographic study of demineralization of shark enamel in a human caries model. *Scand J Dent Res*. 96(3):209-211.
- Ogaard B. 2001. CaF₂ formation: cariostatic properties and factors of enhancing the effect. *Caries Res*. 35(Suppl 1):40-44.
- Okuyama K, Komatsu H, Yamamoto H, Patricia NR Pereirab, Ana K, Bedran-Russo, Nomachi M, Sato T, Sano H. 2011. Fluorine analysis of human dentin surrounding resin composite after fluoride application by μ -PIGE/PIXE analysis. *Nucl Instrum Meth B*. 269(20):2269-2273.
- Oshiro M, Yamaguchi K, Takamiza T, Inage H, Watanable T, Irokawa A. 2007. Effect of CPP-ACP paste on tooth mineralization: an FE-SEM study. *J Oral Sci*. 49(2):115–120.
- Osorio R, Yamauti M, Osorio E, Ruiz-Requena ME, Pashley D, Tay F, Toledano M. 2011. Effect of dentin etching and chlorhexidine application on metalloproteinase-mediated collagen degradation. *Eur J Oral Sci*. 119(1):79-85.

- Pessan JP, Toumba KJ, Buzalaf MA. 2011. Topical use of fluorides for caries control. *Monogr Oral Sci.* 22:115-132.
- Reynolds EC. 1997. Remineralization of enamel subsurface lesions by casein phosphopeptide-stabilized calcium phosphate solutions. *J Dent Res.* 76(9):1587–1595.
- Reynolds EC, Cai F, Cochrane NJ, Shen P, Walker GD, Morgan MV, Reynolds C. 2008. Fluoride and casein phosphopeptide-amorphous calcium phosphate. *J Dent Res.* 87(4):344-348.
- Sakai T, Komiya T, Oikawa M, Sato Y, Tanaka A, Ishii K. 2002. JAERI Takasaki in-air micro-PIXE system for various applications. *Nucl Instrum Meth B.* 190(1-4):271-275.
- Sköld-Larsson K, Sollenius O, Karlsson L, Petersson LG, Twetman S. 2013. Effect of fluoridated milk on enamel demineralization adjacent to fixed orthodontic appliances. *Acta Odontol Scand.* 71(3-4):464-468.
- Souza JG, Tenuta LM, Del Bel Cury AA, Nóbrega DF, Budin RR, de Queiroz MX, Vogel GL, Cury JA. 2016. Calcium prerinse before fluoride rinse reduces enamel demineralization: an *in situ* caries study. *Caries Res.* 50(4):372-377.
- Sugihara N, Maki Y, Kurokawa A, Matsukubo T. 2014. Cohort study on incidence of coronal and root caries in Japanese adults. *Bull Tokyo Dent Coll.* 55(3):125-130.
- Takahashi N, Nyvad B. 2016. Ecological hypothesis of dentin and root caries. *Caries Res.* 50(4):422-431.
- ten Cate JM, Featherstone JD. 1991. Mechanistic aspects of the interactions between fluoride and dental enamel. *Crit Rev Oral Biol Med.* 2(3):283-296.

- ten Cate JM. 1997. Review on fluoride, with special emphasis on calcium fluoride mechanisms in caries prevention. *Eur J Oral Sci.* 105(5):461-465.
- ten Cate JM. 2013. Contemporary perspective on the use of fluoride products in caries prevention. *Br Dent J.* 214(4):161-167.
- Tenuta LMA, Cerezetti RV, Del Bel Cury AA, Tabchoury CPM, Cury JA. 2008. Fluoride release from CaF₂ and enamel demineralization. *J Dent Res.* 87(11):1032-1036.
- Thanatvarakorn O, Islam MS, Nakashima S, Sadr A, Nikaido T, Tagami J. 2016. Effects of zinc fluoride on inhibiting dentin demineralization and collagen degradation *in vitro*: a comparison of various topical fluoride agents. *Dent Mater J.* 35(5):769-775.
- Thomas RZ, Ruben JL, de Vries J, ten Bosch JJ, Huysmans MC. 2006. Transversal wavelength-independent microradiography, a method for monitoring caries lesions over time, validated with transversal microradiography. *Caries Res.* 40(4):281-291.
- Tomiyaama K, Mukai Y, Teranaka T. 2008. Acid resistance induced by a new orthodontic bonding system *in vitro*. *Dent Mater J.* 27(4):590-597.
- Twetman S, Keller MK. 2016. Fluoride rinses, gels and foams: an update of controlled clinical trials. *Caries Res.* 50(Suppl 1):38-44.
- Van Strijp AJ, Buijs MJ, ten Cate JM. 1995. Contact microradiography of dentine under wet conditions to prevent lesion shrinkage. *Caries Res.* 29(2):107-110.
- Vidal CM, Tjäderhane L, Scaffa PM, Tersariol IL, Pashley D, Nader HB, Nascimento FD, Carrilho MR. 2014. Abundance of MMPs and cysteine cathepsins in caries-affected dentin. *J Dent Res.* 93(3):269-274.

- Wefel JS. 1990. Effects of fluoride on caries development and progression using intra-oral models. *J Dent Res.* 69(Spec Iss): 626-633.
- Wiegand A, Buchalla W, Attin T. 2007. Review on fluoride-releasing restorative materials--fluoride release and uptake characteristics, antibacterial activity and influence on caries formation. *Dent Mater.* 23(3):343-362.
- Wierichs RJ, Meyer-Lueckel H. 2015. Systematic review on noninvasive treatment of root caries lesions. *J Dent Res.* 94(2):261-271.
- Yamamoto H, Iwami Y, Unezaki T, Tommi Y, Tuchitani Y. 2000. Fluoride uptake around cavity walls; two-dimensional mapping by electron probe microanalysis. *Oper Dent.* 25(2):104-112.
- Yamamoto H, Iwami Y, Unezaki T, Tomii Y, Ebisu S. 2001. Fluoride uptake in human teeth from fluoride-releasing restorative material *in vivo* and *in vitro*: two-dimensional mapping by EPMA-WDX. *Caries Res.* 35(2):111-115.
- Yamamoto H, Normachi M, Yasuda K, Iwami Y, Ebisu S, Yamamoto N, Sakai T, Kamiya T. 2003. Fluorine mapping of teeth treated with fluorine-releasing compound using PIGE. *Nucl Instrum Meth B.* 210:388-394.
- Yamamoto H, Nomachi M, Yasuda K, Iwami Y, Ebisu S, Sakai T, Fukuda M. 2005. Fluorine mapping in sound and carious fissures of human teeth using PIGE. *Nucl Instrum Meth B.* 231(1-4):300-307.
- Yamamoto H, Iwami Y, Ebisu S, Nomachi M, Yasuda K, Sakai T, Kamiya T. 2009. Development of a system for measuring fluoride distribution in teeth using a nuclear reaction. *Int J PIXE.* 19(1-2):91-102.

Yamazaki H, Ishii K, Takahashi Y, Matsutama S, Kikuchi Y, Amartaivan Ts, Yamaguchi T, Momose G, Abe S, Inomata K, Watanabe Y, Ishizaki A. 2005. Identification of oxidation states of trace-level arsenic in environmental water samples using PIXE. *Int J PIXE*. 15(3-4):241-247.

Yasuda K, Hai VH, Nomachi M, Sugaya Y, Yamamoto H. 2007. In-air micro-PIGE measurement system for fluorine analysis of the tooth. *Nucl Instrum Meth B*. 260(1):207-212.

Yasuda K, Nomachi M, Sugaya Y, Yamamoto H, Komatsu H. 2011. Progress of in-air microbeam system at the Wakasa wan energy research center. *Nucl Instrum Meth B*. 269(20):2180-2183.

VII. 図表

表1. フッ化物含有材料の組成

メーカー	組成	Lot No.
Fuji VII	(粉) フルオロアルミノケイ酸ガラス	(粉) 1410231
	(液) ポリアクリル酸 蒸留水 ポリカルボン酸	(液) 1410211
MI Varnish	ポリケイ酸ビニル エタノール	1307081
	水素化ロジン フッ化ナトリウム5% (22,600 ppmF) CPP-ACP 二酸化ケイ素	
アドシールド®GI	(粉) フルオロアルミノケイ酸ガラス 酸化ジルコニウム ポリカルボン酸 酒石酸、無機顔料	(粉) 151069
	(液) ポリカルボン酸水溶液 酒石酸	(液) 203010

表2. 試作ガラスアイオノマーセメントの組成

	組成	Sr/Ca (mol%)	Lot No.
Fuji VII		100/0	(粉) 1507161 (液) 1506021
P1	(粉) フルオロアルミノケイ酸ガラス (液) ポリアクリル酸 蒸留水 ポリカルボン酸	50/50	(粉) 150805 (液) 1506021
P2		0/100	(粉) 150805 (液) 1506021

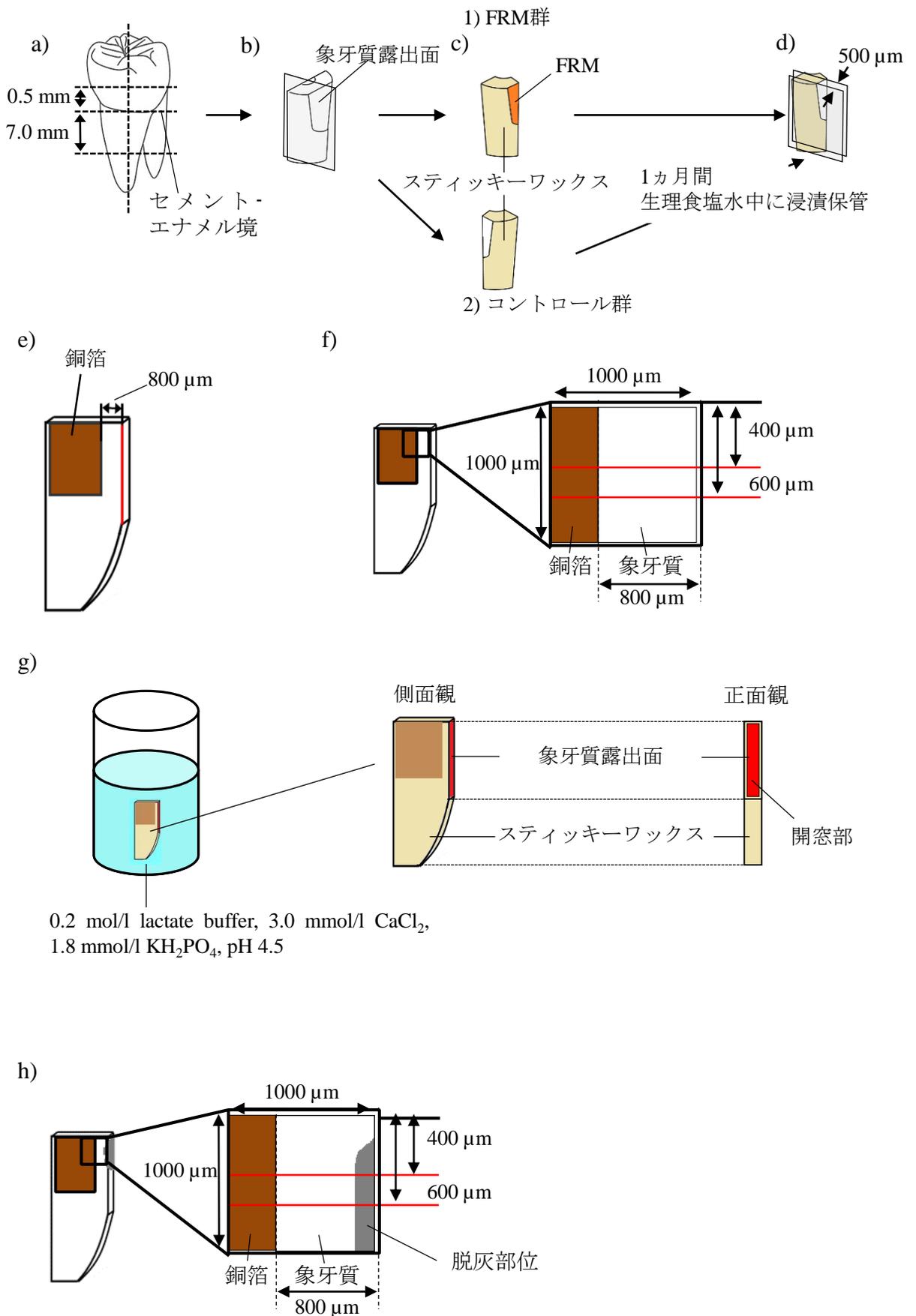


図1. 試料の作製方法

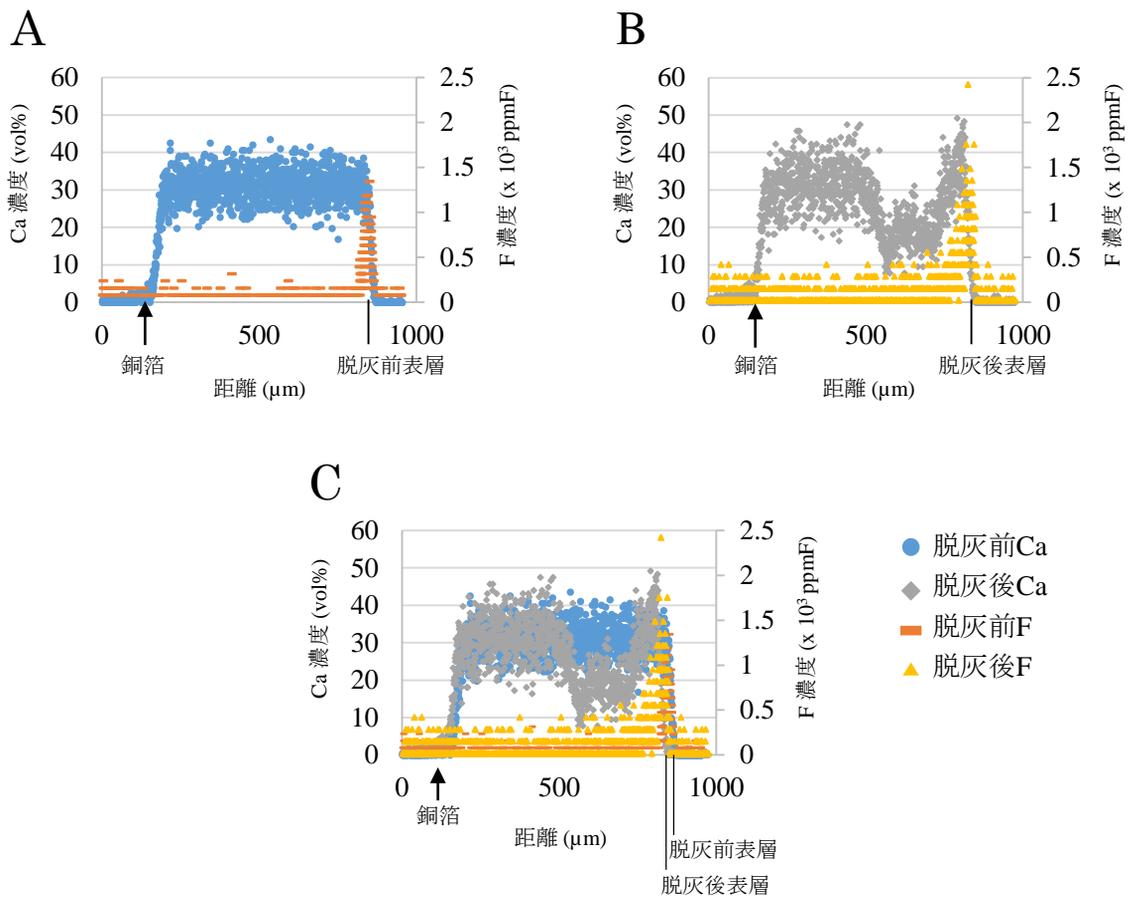


図2. 脱灰前後のCaおよびFの濃度分布

同一試料の同一部位における脱灰前 (A) および脱灰後 (B) のCaおよびFの分布グラフを、銅箔を基準に重ね合わせ、脱灰前後のCaおよびFの濃度分布を同一平面上にあらわした (C)。

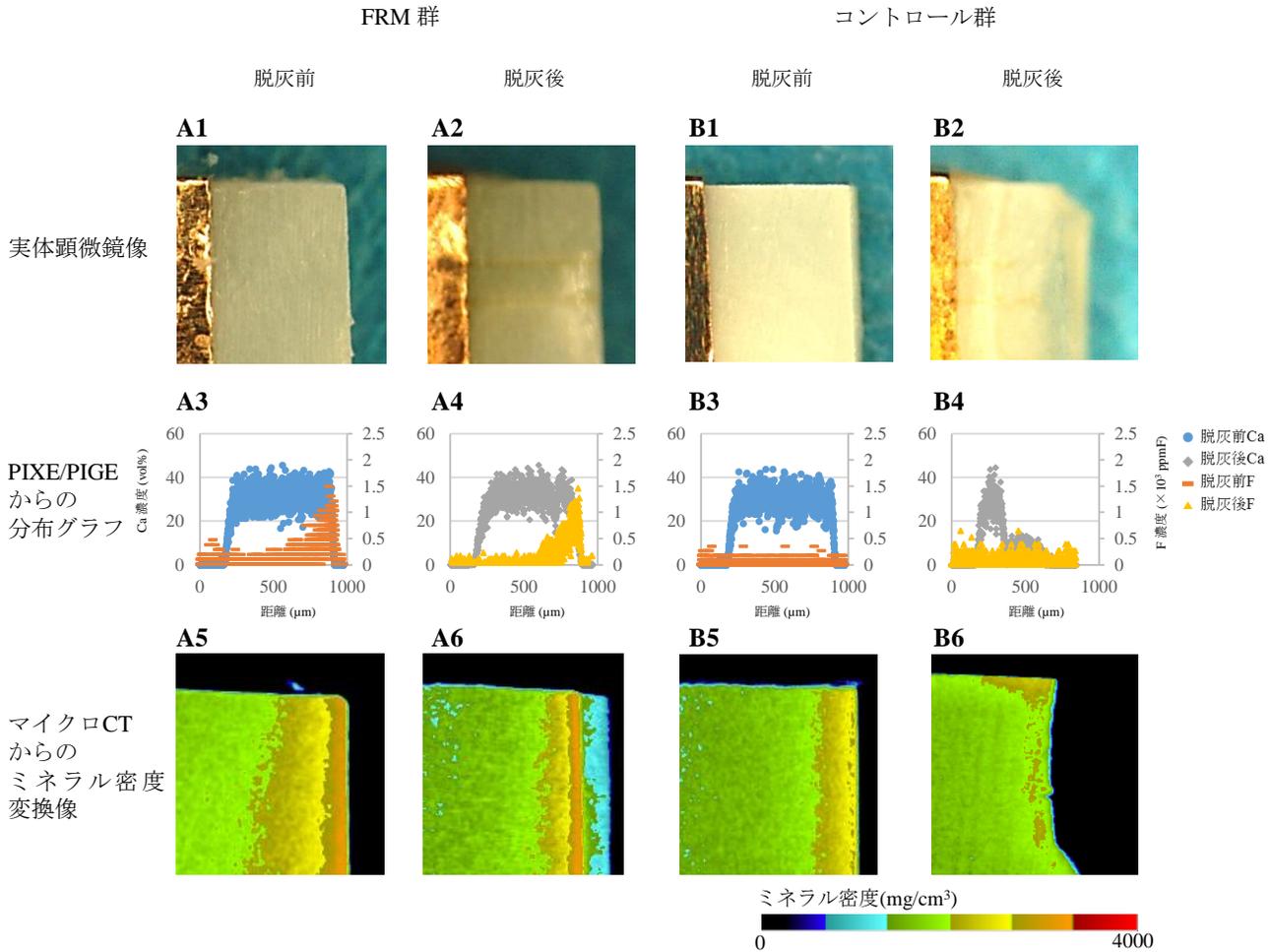
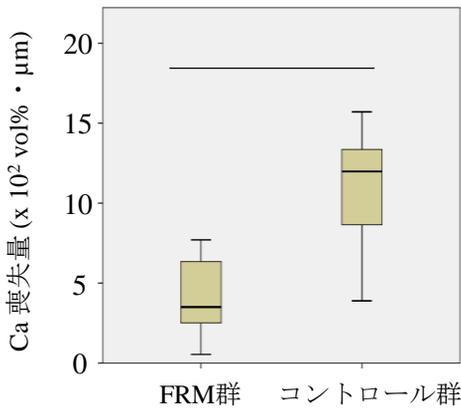


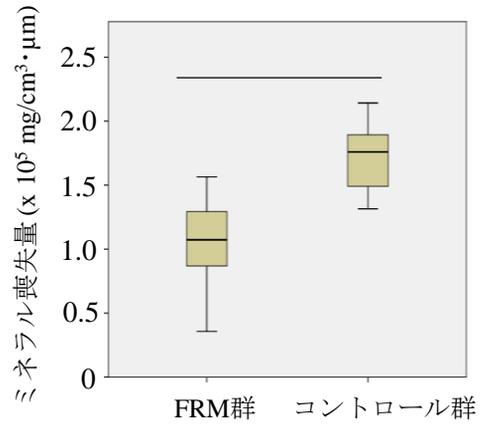
図3. 脱灰前後のFRM群およびコントロール群の代表像

同一試料における脱灰前後のFRM群 (A) , コントロール群 (B) の実体顕微鏡像, PIXE/PIGEからの分布グラフ, およびマイクロCTからのミネラル密度変換像を示す.
 同一試料についてPIXE/PIGEからの分布グラフとマイクロCT像からのミネラル密度変換像は同様の傾向を示した.

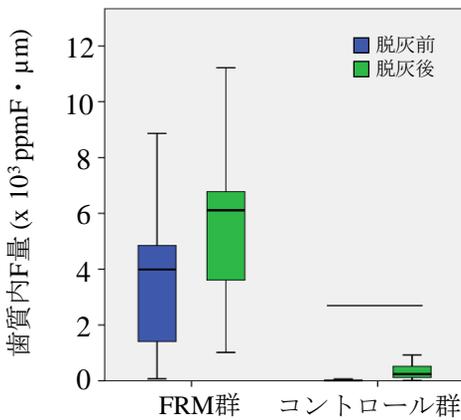
A



B



C



D

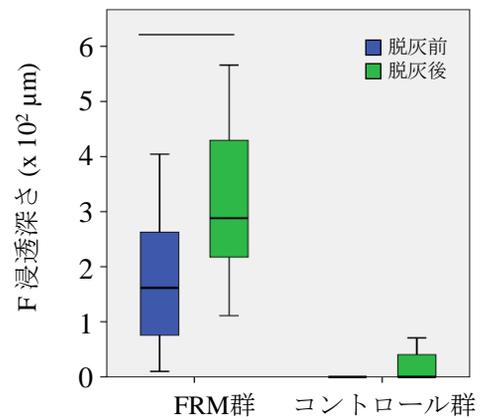


図4. Ca喪失量，ミネラル喪失量，脱灰前後の歯質内の歯質内F量，およびF浸透深さ

(A) PIXE/PIGEから算出した脱灰後のCa喪失量，(B) マイクロCT結果から算出した脱灰後のミネラル喪失量，(C) 脱灰前後の歯質内F量，

(D) 脱灰前後のF浸透深さ

n=9, Mann-Whitney U-test

—: 有意差を示す

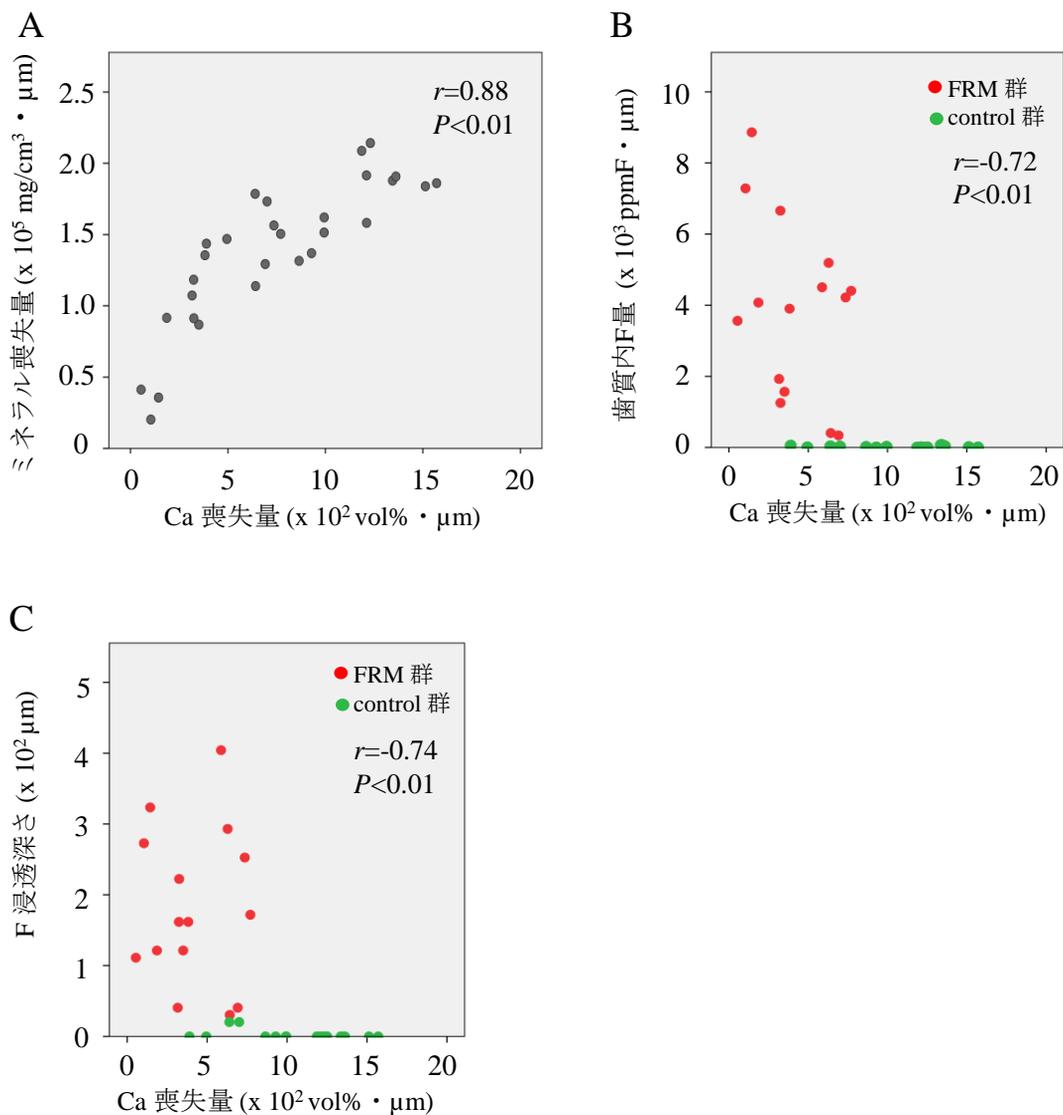


図5. Ca喪失量とミネラル喪失量、歯質内F量、F浸透深さとの関係

- (A) PIXE/PIGE測定から算出されたCa喪失量とマイクロCTから算出されたミネラル喪失量との相関関係
- (B) 歯質内F量とCa喪失量との間の相関関係
- (C) F浸透深さとCa喪失量との間の相関関係
- (Spearman's rank correlation coefficient, $P<0.01$)

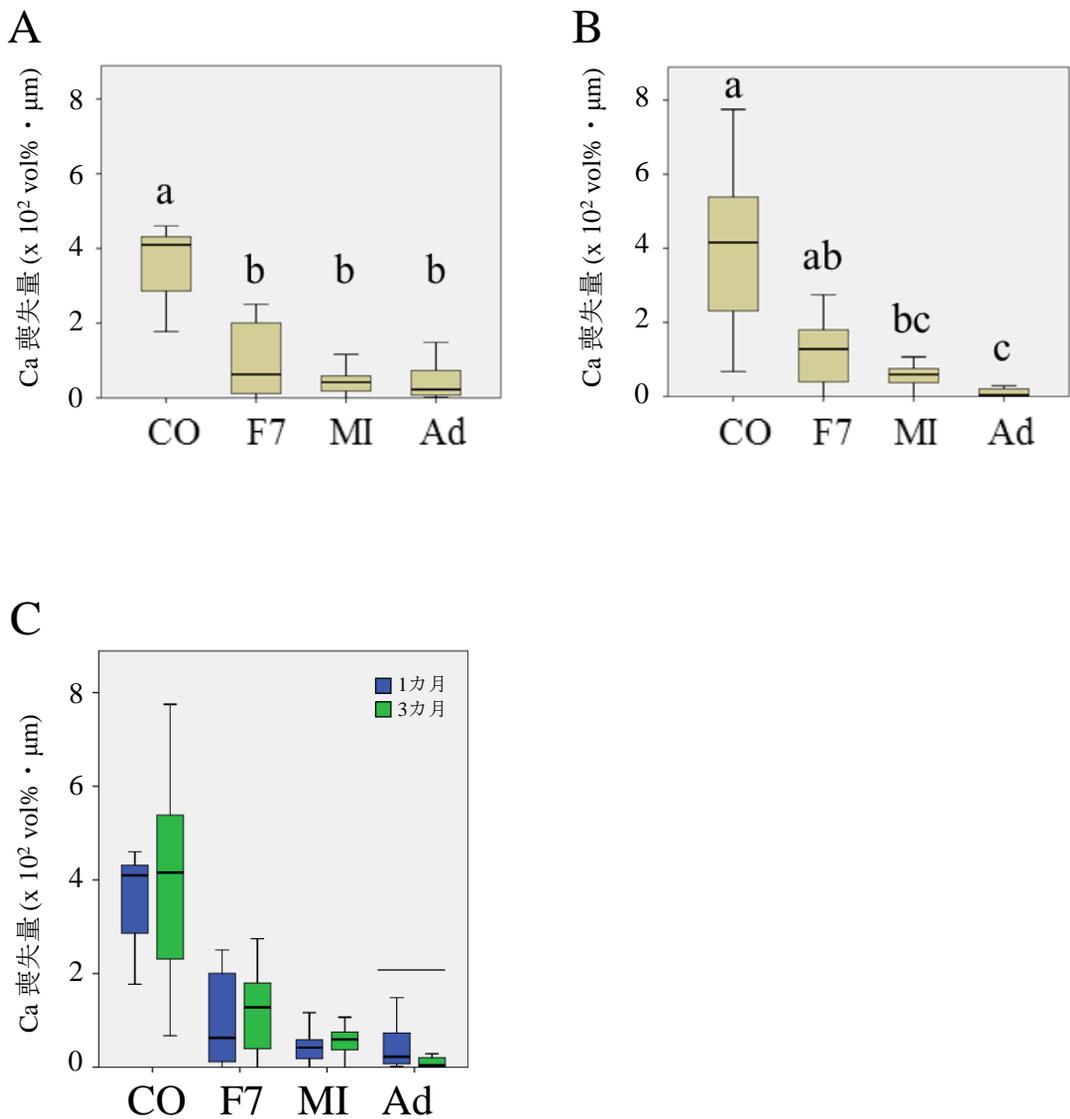


図6. FRM塗布期間1ヵ月および3ヵ月における各群のpH5.0脱灰後のCa喪失量
 CO : コントロール, F7 : Fuji VII, MI : MI Varnish, Ad : アドシールド®GIを示す.
 塗布期間1ヵ月 (A) および3ヵ月 (B) とともに, Ca喪失量は, FRM塗布群においては
 コントロール群より有意に減少した (異文字は有意差をあらわす, Steel-Dwass test,
 $P < 0.05$) .
 同群間におけるFRM塗布期間による比較では, 塗布期間を増すことにより, Ad群に
 においてのみ有意な変化が認められた (-:有意差をあらわす, Mann-Whitney's U -test,
 $P < 0.05$) .

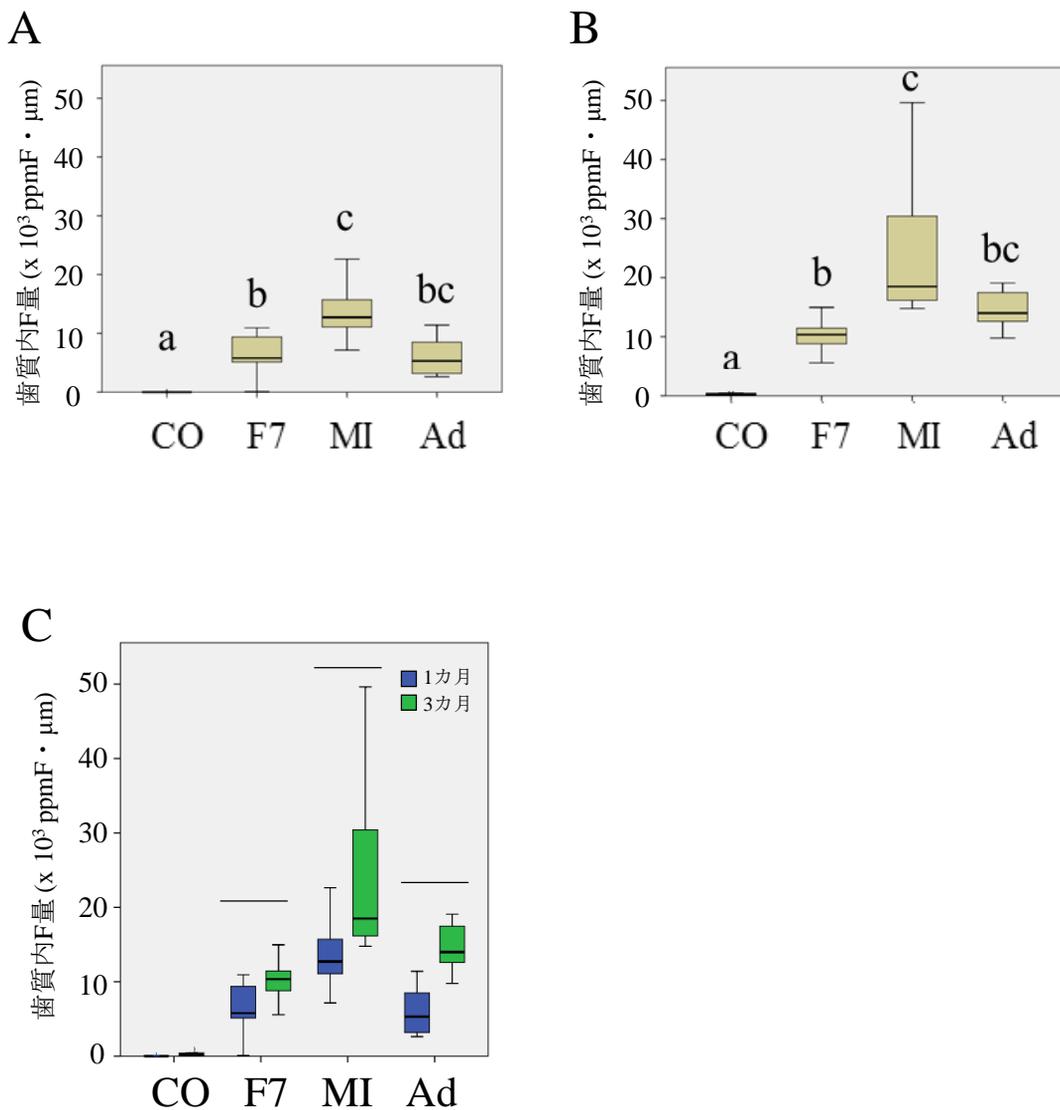


図7. FRM塗布期間1ヵ月および3ヵ月における歯質内F量

CO : コントロール, F7 : Fuji VII, MI : MI Varnish, Ad : アドシールド®GIを示す. 塗布期間1ヵ月 (A) および3ヵ月 (B) とともに, 総歯質内量はコントロール群に比べて有意に増加した (異文字は有意差をあらわす, Steel-Dwass test, $P < 0.05$). 根面象牙質内の歯質内F量 (C) は, 同群間におけるFRM塗布期間による比較では, 3ヵ月の群において有意に増加した (—: 有意差をあらわす, Mann-Whitney's U -test, $P < 0.05$).

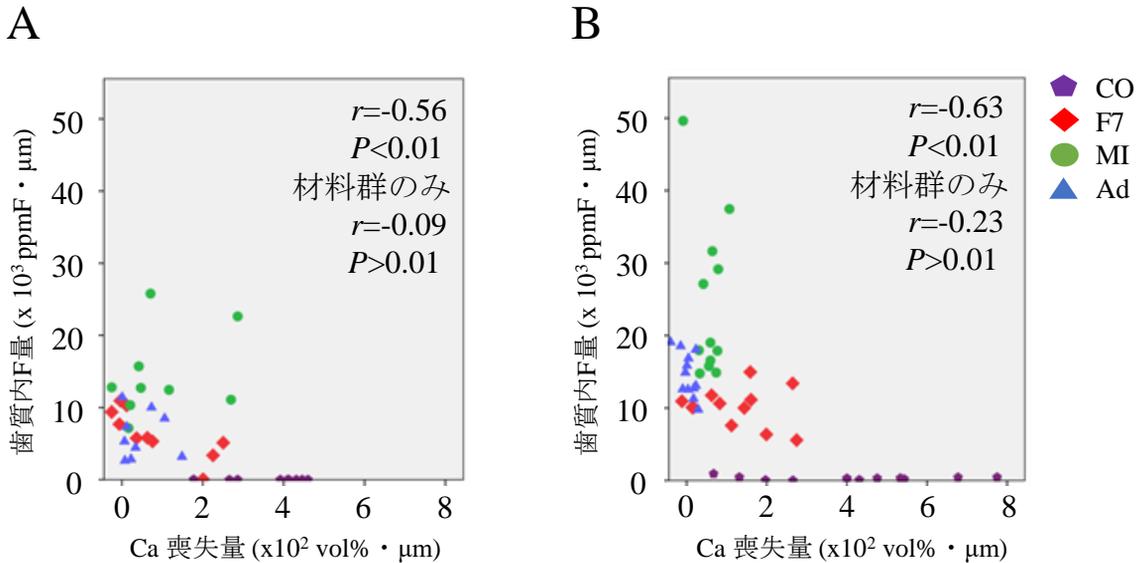
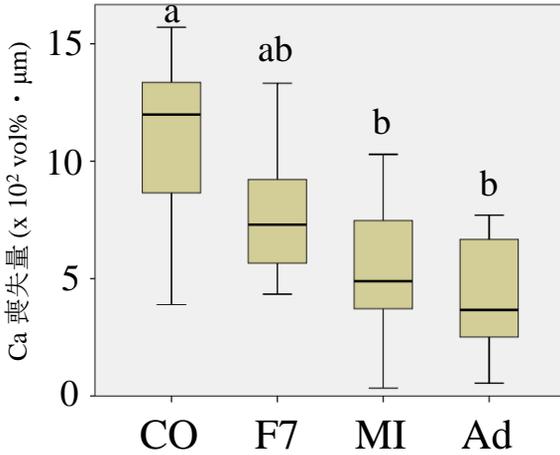


図8. フッ化物塗布期間1ヵ月および3ヵ月におけるCa喪失量と歯質内F量との関係 (脱灰pH5.0)

CO : コントロール, F7 : Fuji VII, MI : MI Varnish, Ad : アドシールド®GIを示す.
Ca喪失量と歯質内F量との間には, 塗布期間1ヵ月 (A) および3ヵ月 (B) ともに有意な負の相関が認められた (Spearman's rank correlation coefficient, $P<0.01$).
コントロール群を除外して, FRM塗布群間のみで比較した場合, 塗布期間1ヵ月および3ヵ月ともに相関関係は認められなかった.

A



B

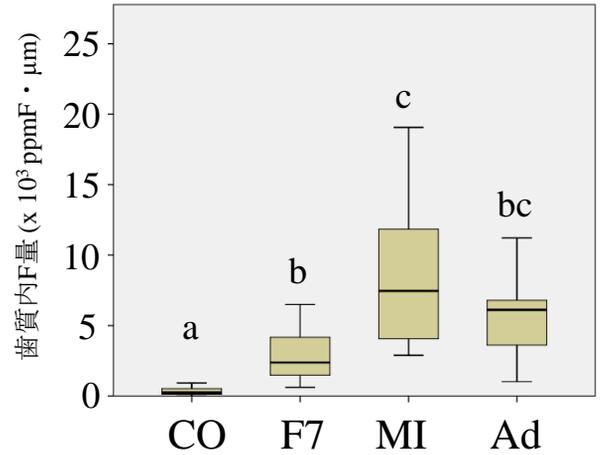


図9. 脱灰時 pH 4.5 におけるCa喪失量と歯質内F量

CO : コントロール, F7 : Fuji VII, MI : MI Varnish, Ad : アドシールド®GIを示す.

(A) Ca喪失量はAd群およびMI群とコントロール群の間に有意差が認められた.

(B) 歯質内の歯質内F量は, FRM塗布群においてコントロール群に比べて有意に増加した. また, MI群およびAd群とF7群との間にも有意差が認められた.

(異文字は有意差をあらわす, Steel-Dwass test, $P < 0.05$)

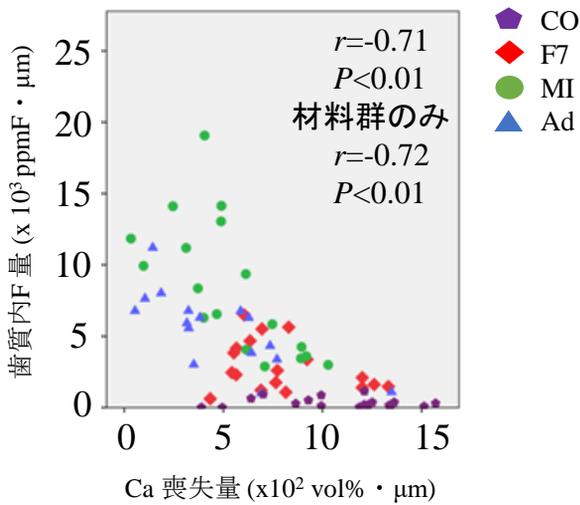
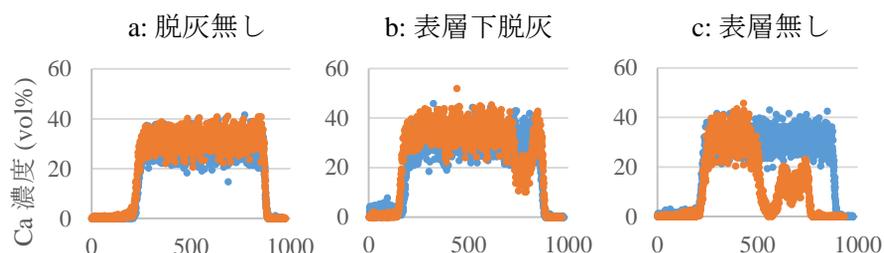


図10. 脱灰時pH 4.5 の場合のCa喪失量と歯質内の歯質内F量との関係

CO : コントロール, F7 : Fuji VII, MI : MI Varnish, Ad : アドシールド®GIを示す。

Ca喪失量と歯質内の歯質内F量との間には、有意な負の相関が認められた (Spearman's rank correlation coefficient, $P < 0.01$)。また、コントロール群を除外したFRM塗布群のみでも、相関関係が認められた ($P < 0.01$)。



A) 塗布期間 1 ヶ月 脱灰時 pH 5.0 (各群 n=9)

	表層形態		
	a	b	c
CO	0 (0.0%)	0 (0.0%)	9 (100.0%)
F7	3 (33.3%)	3 (33.3%)	3 (33.3%)
MI	4 (44.4%)	0 (0.0%)	5 (55.6%)
Ad	6 (66.7%)	2 (22.2%)	1 (11.1%)

B) 塗布期間 3 ヶ月 脱灰時 pH 5.0 (各群 n=12)

	表層形態		
	a	b	c
CO	0 (0.0%)	2 (16.7%)	10 (83.3%)
F7	3 (25.0%)	3 (25.0%)	6 (50.0%)
MI	3 (25.0%)	3 (25.0%)	6 (50.0%)
Ad	12 (100.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)

C) 塗布期間 1 ヶ月 脱灰時 pH 4.5 (各群 n=20)

	表層形態		
	a	b	c
CO	0 (0.0%)	0 (0.0%)	20 (100.0%)
F7	0 (0.0%)	0 (0.0%)	20 (100.0%)
MI	1 (5.0%)	0 (0.0%)	19 (95.0%)
Ad	1 (5.0%)	4 (20.0%)	15 (75.0%)

図11. 脱灰後の表層形態

a : 脱灰が認められないもの

b : 表層下脱灰は認められるものの表層が後退せずに維持されたもの

c : 脱灰されて表層が後退したもの

CO : コントロール, F7 : Fuji VII, MI : MI Varnish, Ad : アドシールド®GI

脱灰後の表層形態について、コントロール群においては表層が後退したが、FRM塗布群においては、表層の後退が抑制される傾向が認められた

(Kruskal-Wallis test, $P < 0.05$) .

また、pHが低い場合においては、脱灰が顕著で表層が後退したが、Ad群の25%には表層が保持された。

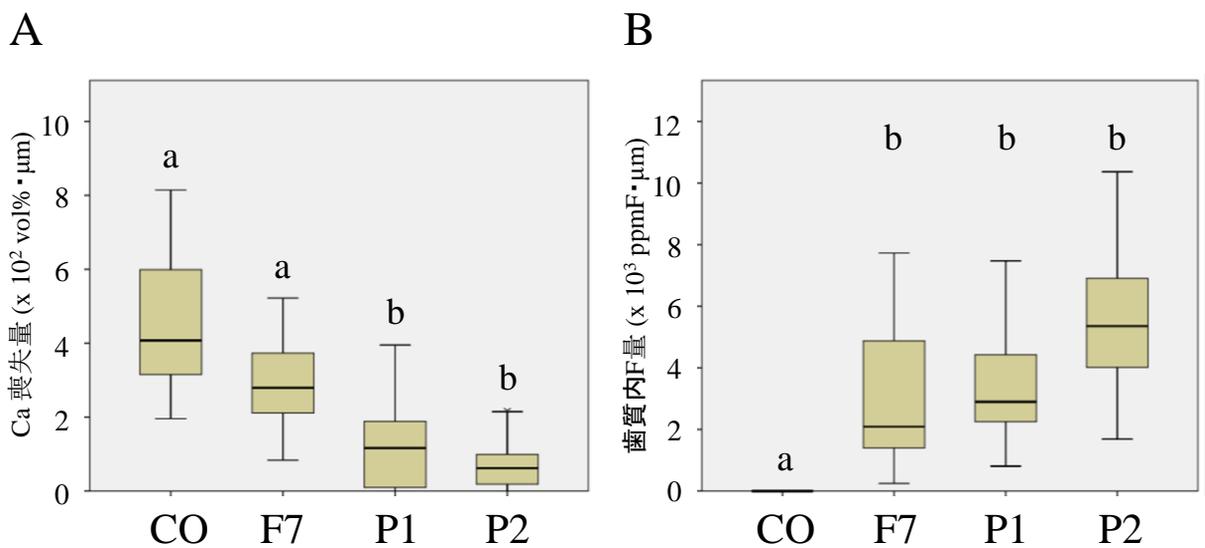


図12.各群のCa喪失量と歯質内F量

CO : コントロール, F7 : Fuji VII (Sr/Ca=100/0) , P1 : Sr/Ca=50/50, P2 : Sr/Ca=0/100を示す.

Ca喪失量はP1およびP2群とコントロール群との間に有意差が認められた. 一方, 歯質内F量はF7, P1, P2群が, コントロール群より有意に多くなり, 各FRM群間に有意差は認めらなかった.

(異文字は有意差をあらわす, Steel-Dwass test, $P < 0.05$)

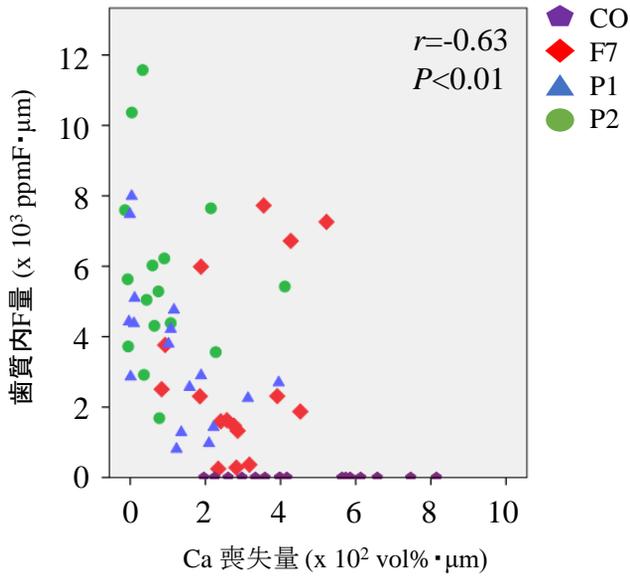
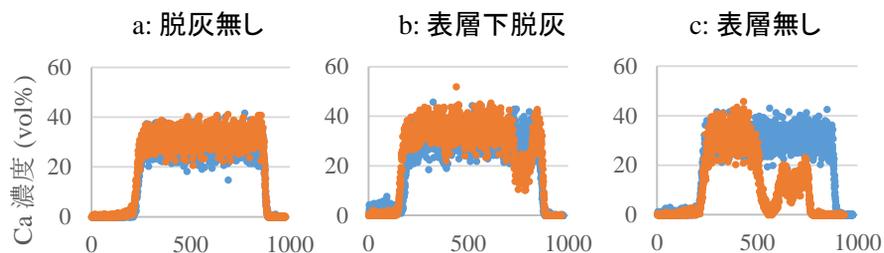


図13. Ca喪失量と歯質内F量との関係

CO : コントロール, F7 : Fuji VII (Sr/Ca=100/0) , P1 : Sr/Ca=50/50, P2 : Sr/Ca=0/100を示す.

Ca喪失量と歯質内F量との間には, 有意な負の相関が認められた (Spearman's rank correlation coefficient , $P < 0.01$) .



	表層形態		
	a	b	c
CO	0 (0.0%)	0 (0.0%)	16 (100.0%)
F7	0 (0.0%)	8 (50.0%)	8 (50.0%)
P1	5 (31.3%)	10 (62.5%)	1 (6.2%)
P2	7 (43.8%)	9 (56.2%)	0 (0.0%)

図14. 脱灰後の表層形態

a : 脱灰が認められないもの

b : 表層下脱灰は認められるものの表層が後退せずに維持されたもの

c : 脱灰されて表層が後退したもの

CO : コントロール, F7 : Fuji VII (Sr/Ca=100/0) , P1 : Sr/Ca=50/50,
P2 : Sr/Ca=0/100, (各群 n=16)

脱灰後の表層形態について、コントロール群においては表層が後退したが、試作セメント群においては、ほぼ全ての試料で表層が維持されていた。異なる群間で有意差が認められた (Kruskal-Wallis test, $P < 0.05$) .

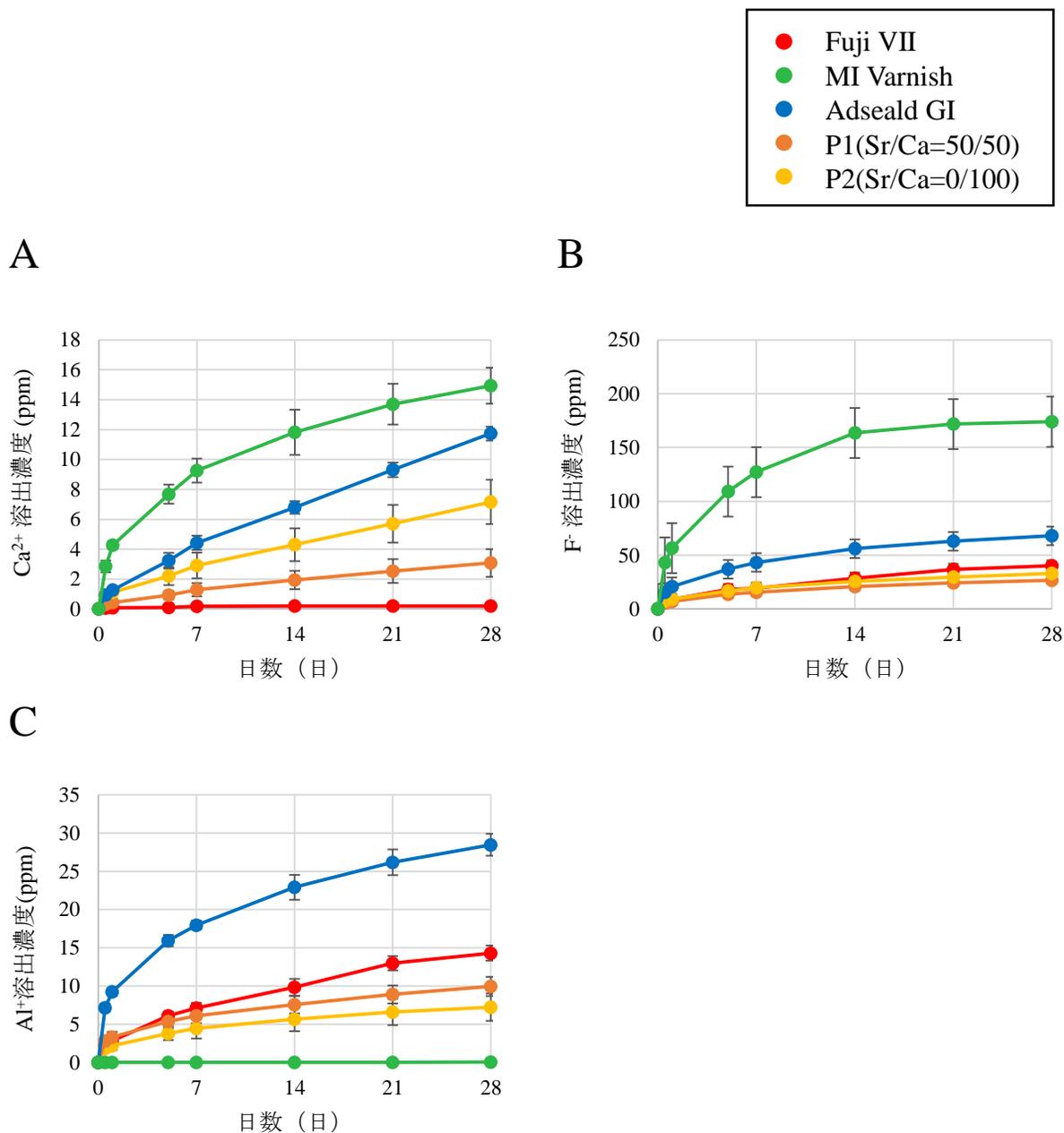


図15. FRMからの28日間のイオン溶出濃度

(A) Ca イオンの溶出濃度, (B) F イオンの溶出濃度, (C) Al イオンの溶出濃度
 縦線は標準偏差を示す (n=4) .