

—原 著—

歯牙象牙質のX線マイクロアナライザー分析と 酢酸鉛注射による硬組織内時刻描記法

姥 山 良 雄 小 柳 久 子

新潟大学歯学部歯科薬理学教室

(昭和48年5月7日受付)

Electron Probe Microanalysis of Dentine and the Time Marking
Method in Hard Tissues by Lead Acetate Injection

Yoshio UBAYAMA & Hisako OYANAGI

Department of Dental Pharmacology, Niigata University School of Dentistry

緒 言

X線マイクロアナライザー (EPMA) を用いて、歯牙硬組織の表面や切断面を元素分析した研究が、最近数多く見受けられる^{1)~6)}。この装置によって、ある種の薬物の特徴的な元素の硬組織における分布状態を知ることができるので、石灰化障害の機構を研究するのにも役立っている⁷⁾⁸⁾。ところで1938年に、岡田・三村によって報告された酢酸鉛注射による硬組織内時刻描記法 (酢酸鉛法)⁹⁾は、硬組織の生長速度を精査したり、薬物による形成障害を経時的に解析したりするのに広く使われている¹⁰⁾¹¹⁾。しかし、脱灰を必要とする方法であるため、投与した鉛以外の無機質成分は殆んど除かれてしまい、薬物の局在や無機質の変動などについては、推測せざるを得ない。そこで、硬組織の元素分析ができるEPMA法に鉛という元素を用いる酢酸鉛法を適用してみたところ、象牙質中の鉛沈着線は明瞭に検出されることが分かり、そのため、これ迄酢酸鉛法で観

察のできなかった部分も、注射時刻描記の対象となし得ることが判明したので報告する。

実 験 方 法

実験動物及び投与薬物

この実験では、体重100~150gの雄ラット120匹を使用した。

動物を3群に分けて、それぞれ違った手順で薬物を投与した。

I群: 2.5mg/kg, 5mg/kg, 10mg/kgの酢酸鉛を、3日間隔で静脈注射した。

II群: 薬物を1回注射した。

静注した薬物

酢酸鉛	50mg/kg
塩化第1錫*	20mg/kg
硝酸ビスマス**	20mg/kg
塩化カドミウム	5mg/kg
酒石酸アンチモンカリウム	30mg/kg
酢酸銅	10mg/kg

皮下注した薬物

* ** 第1錫塩、ビスマス塩は難溶のため、錫は1%塩酸に、ビスマスは1%硝酸に溶かした各1%溶液を使用した。

塩化マグネシウム	0.5 g/kg
塩化カルシウム	1 g/kg
塩化バリウム	75mg/kg
塩化マンガン	100mg/kg
塩化コバルト	50mg/kg
ヨウ化ナトリウム	0.5 g/kg

III群: 5 mg/kgの酢酸鉛の静注と1 g/kgの塩化ストロンチウムの皮下注を同時に行なった。

標本作成と分析方法

薬物の投与をして3～7日後に、動物をエーテル麻酔下に屠殺して、下顎切歯を取り出し、10%ホルマリンで固定した。一部歯牙には酢酸鉛法¹⁰⁾を適用した。その他の大部分の切歯は、アルコールで脱水後、メタクリレート樹脂で包埋し、厚さ約1 mmの横断切片とした後、砥石、研磨紙、研磨布で断面を研磨した。この切片のあるものは、そのままEPMA分析に用いた。他の切片は、部分的にビニールテープで覆い、露出した部分を、酢酸鉛法の不脱灰変法¹²⁾に従ってエッチングした(図1及び図5)。硫化水素を飽和した薬液(0.2 N蟻酸もしくは塩酸)への浸漬時間は2分間とし、その後、覆いを取り除いた。

表 1

特性X線	分光結晶	加速電圧(kV)	試料電流(μA)
Pb Mα ₁	ADP	15	0.1
		25	0.05
Sr Lα ₁	ADP	25	0.02
			0.05
Ca Kα	LiF	15	0.1
		25	0.05
Ba Lα ₁	LiF	20	0.03
Bi Mα ₁	ADP	15	0.1
Cd Lα ₁	ADP	15	0.1
Co Kα	LiF	25	0.05
Cu Kα	ADP	30	0.04
I Lα ₁	LiF	15	0.1
Mn Kα	LiF	25	0.05
Mg Kα	RAP	15	0.1
Sb Lα ₁	LiF	25	0.05
Sn Lα ₁	LiF	20	0.1

このようにして、象牙質面に鉛その他の元素を残した切片と無処理の研磨切片とをデシケーター中で乾燥した後、カーボンペーストで試料台に張り付け、更にカーボン蒸着をして分析用に供した。

使用したEPMAは、島津SM型で、ビーム径を1 μに絞り、主に線分析を試みた。部分的エッチングをした標本では、エッチング部分と非エッチング部分(研磨面)との境界線の近辺を分析部分に当てた(図1及び図5)。

各種元素に対する、装置の使用条件は、表1に示した通りである。

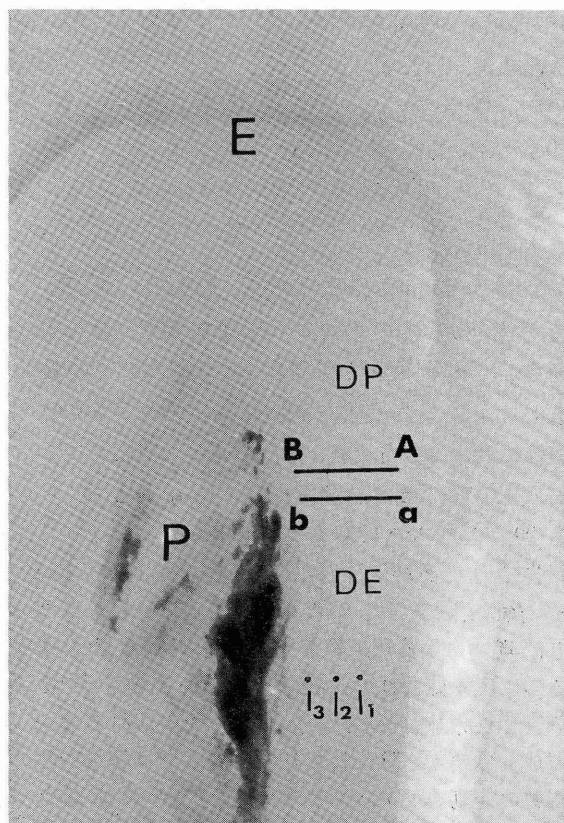


図1 部分的エッチングをした象牙質研磨標本
実体顕微鏡(×40)

E : エナメル質 A-B : 線分析距離
DP : 象牙質研磨面 a-b : 線分析距離
DE : エッチング面 l₁ : 2.5mg/kgの鉛線
P : 歯 髄 l₂ : 5mg/kgの鉛線
 l₃ : 10mg/kgの鉛線

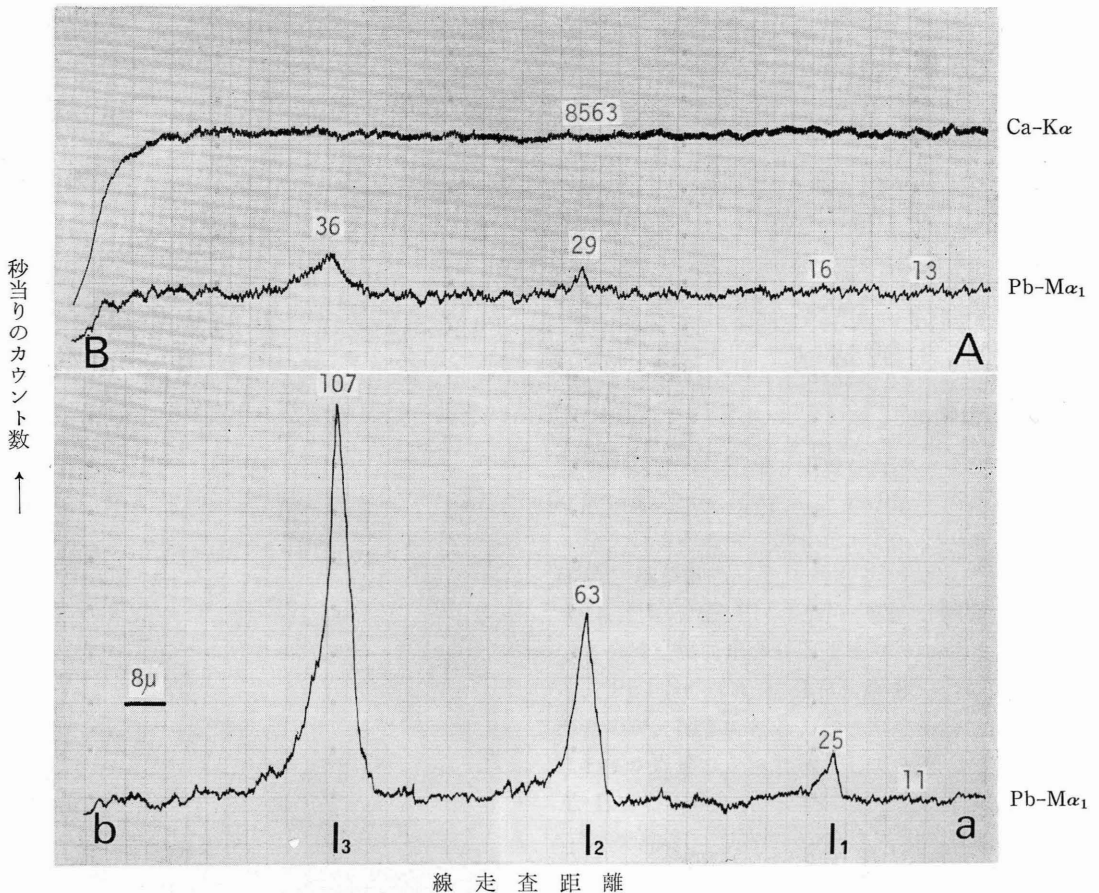


図2 ラット象牙質の研磨面, エッチング面の鉛, カルシウム
(記入数値はその近辺の平均値)

l_1 : 2.5mg/kgの鉛線

l_2 : 5mg/kgの鉛線

l_3 : 10mg/kgの鉛線

結 果

2.5mg/kg, 5mg/kg, 10mg/kgの酢酸鉛を3日間隔で, 次々に投与したラットの下顎切歯象牙質の横断面を部分的にエッチングすれば, 黒褐色の鉛線が3本, 投与量に比例した濃さで現われる(以下単に2.5mg/kgの鉛線などと略す)(図1)。それらは象牙質の生長線であり 鉛線の消える所は研磨面との境界線となる(図5)。図1の研磨面のA-B間と, すぐ近くのエッチング面のa-b間(以下単にA-B, a-bと略す)とを平行に, PbとCaについてEPMAで線分析した結果の1例は,

図2に示した通りであった。a-bで投与量に比例したPbのピークが観察された。Pbに関して両者を対応させてみると, a-bでは2.5mg/kgの鉛線にも明らかにピークが出現していたが, A-Bでは検出できなかった。5mg/kgの鉛線は, A-B, a-bの両方に検出され, この投与量が双方のピークを確実に対応させ得る最小量であった。10mg/kgの鉛線は, a-bでピークが著しく高くなっていたが, A-Bではその割に高くならなかった。

次に, a-bでPbのピークが等間隔に出現し, またA-BでPb沈着に伴うCa量の変動が現われないことから, 10mg/kg以下の酢酸鉛ならば, 象

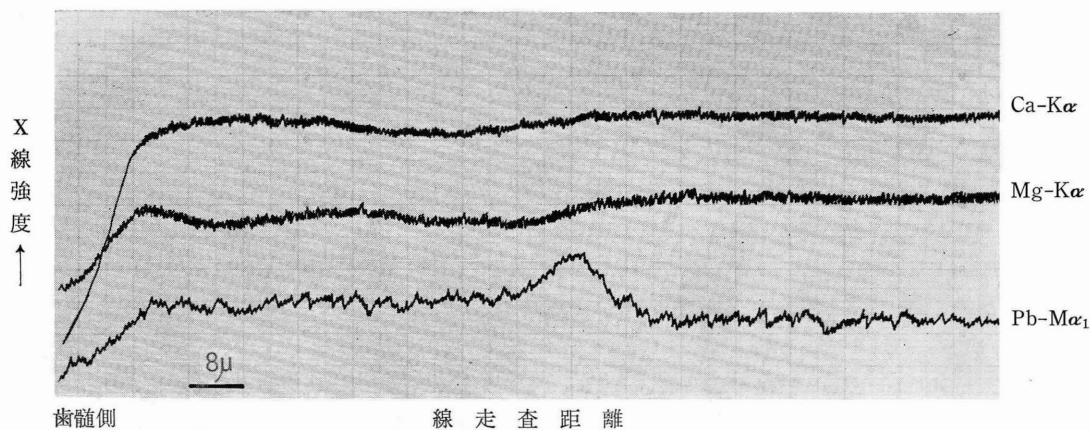


図3 ラット象牙質研磨標本の鉛, カルシウム, マグネシウム

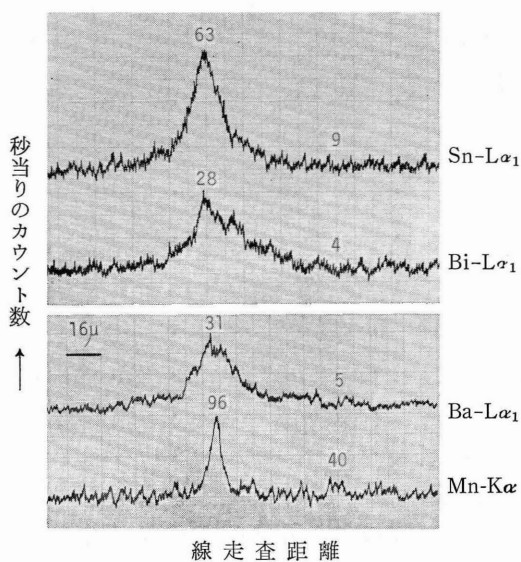


図4 象牙質エッチング面の錫, ビスマス及び研磨面のバリウム, マンガン

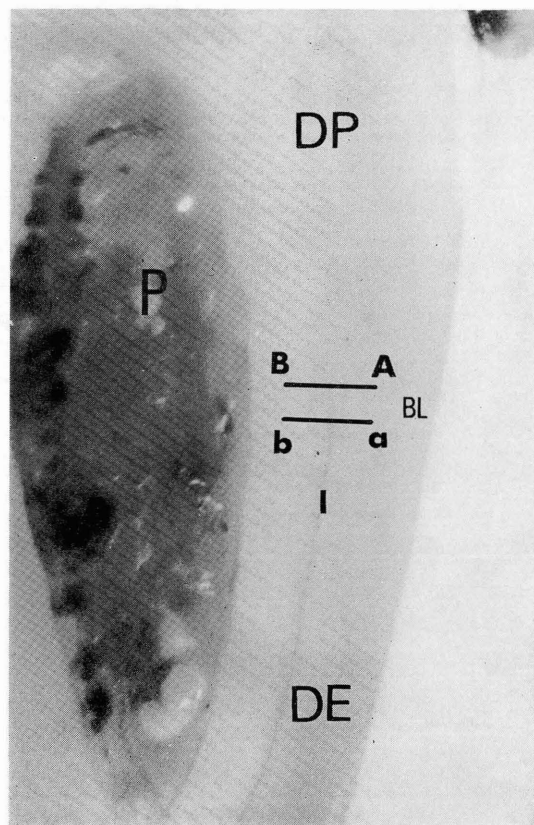


図5 象牙質の研磨面とエッチング面
実体顕微鏡 (×40)
DP : 研磨面
DE : エッチング面
BL : 境界線
P : 歯髄
A-B : 線分析距離
a-b : 線分析距離
l : 鉛線

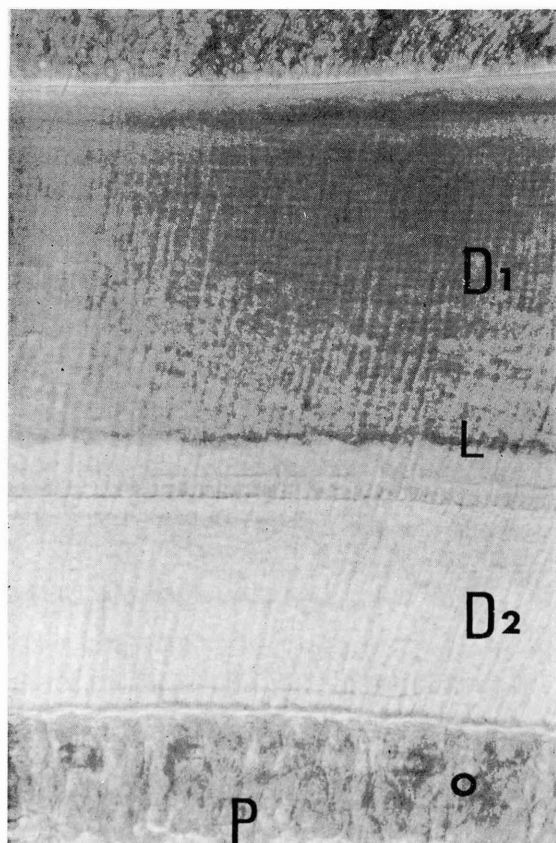


図6 象牙質脱灰切片のメタクロマジー (×200)

- D₁: Sr 投与前に形成された象牙質
- D₂: Sr 投与後に形成された象牙質
- L: 鉛線
- O: 象牙芽細胞層
- P: 歯髄

牙質の発育と無機質沈着は、あまり鉛の影響を受けないものと考えることができた。

50mg/kg の酢酸鉛を静注した場合には、象牙質の研磨面において、図3の如くに明らかな Ca 及び Mg の減少が見られた。そして、Pb のピークはそれ程高くならず、以後沈着分布は長期間続いていた。

鉛沈着線は、エッチングをすると、EPMA によって明瞭に検出されるようになったので、この方法を応用して、他の注射投与した重金属の象牙質における分布を調べてみたところ、図4上の如くに、Sn と Bi が著明に検出できたが、他の金属については、はっきり検出できなかった (Cd,

Sb, Ag, Cu, Hg)。

エッチングすると、表面から流れてしまう元素については、比較的多量を皮下注して、象牙質の研磨面でのみ分析を行なった。その中で、図4下の如く、Ba, Mn, Sr に著明なピークが出現した。しかし、Fe, Co, Ni, Br, I 等は検出できず、Mg, Ca は常在のものと区別ができなかった。

次に、注射時刻描記のための 5 mg/kg の酢酸鉛の静注と、1 g/kg の塩化ストロンチウムの皮下注を同時に行なって、7日間経過したラットの象牙質の研磨面の一部をエッチングすると、図5の如く中断された鉛線が出現した。その標本の鉛線に近い A-B において、先ず Pb と Sr を線分析し、次いでその極く近くを、Pb と Ca について同様に線分析し、更に最も近いエッチング面の a-b について、Pb を同一条件で線分析し、後で各分析結果に示された Pb のピークを基準として、Pb, Sr, Ca の分布状態を一つの図にまとめたのが、図7である。a-b の鉛線は、分析中にわずかに盛り上った線として観察できるので、A-B での Pb のピークが容易に決められた。

Sr は鉛線の外側にも分布するが、ピークは内側にあり、しかも歯髄寄りに長期間沈着を続けていた。Ca の低下も、Pb のピークの内側にみられ、Sr のピークとほぼ一致していた。

この分布状態は、鉛線を基準としているので、酢酸鉛法による脱灰薄切片と対応させ得る点が大変に便利である。Pb と Sr とを同様に投与したラットの象牙質の脱灰切片を、0.05% トルイジンブルー液 (pH 3.5) で染色してみると、鉛線を境として、内側全体に明らかにメタクロマジーの低下がみられた (図6)。このことから、鉛線の外側に沈着して、石灰化異常やムコ多糖類の変化に関与しない Sr と、鉛線の内側に著しく沈着して、両方の現象に関与すると考えられる Sr とがあることがわかった。

考 察

微量の Pb が象牙質中に沈着している場合に、EPMA で検出することは容易でないが、適当な

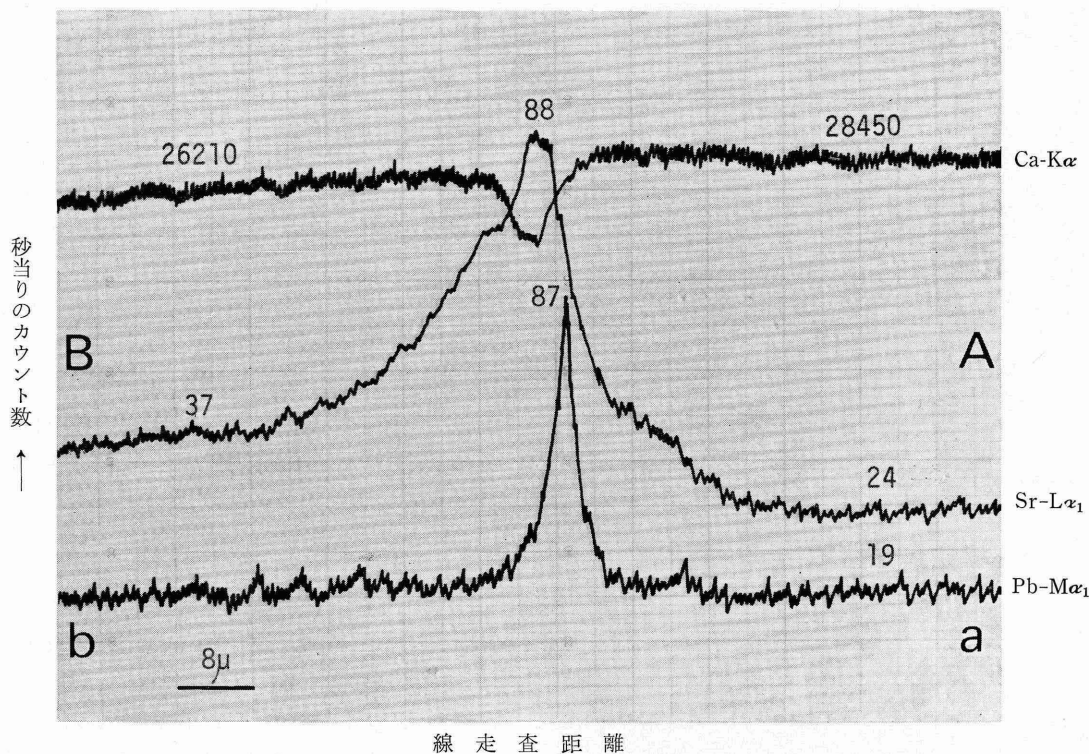


図 7 象牙質研磨面のカルシウム，ストロンチウム及びエッチング面の鉛

エッチングをすれば、鋭敏に検出できるようになる¹³⁾。これは、エッチング液に溶けない PbS の濃度が、局所的に高まるためと考えられる。この鉛線は酸に抵抗性を示すので、わずかな凸部が光顕で観察される。EPMA により 2.5 mg/kg 以上の鉛線は、鮮明なピークを出すので、その凹凸による影響はあまり無いと考えられるが、たとえ影響があったとしても、その部分が鉛線の走る箇所であることは、目で見えるので、分析上の支障とならないことは明らかである。

エッチングが有効と目される元素は、分析化学の見地から、Ag, Cu, Hg, Bi, Sn, Cd, Sb, As などであり、この他に酸が特に薄い場合に、Zn も有望である¹⁴⁾。これらの中で、Sn と Bi は、その局在が確かめられたが、その他の元素は確認できなかった。Sn と Bi は、既に組織化学的にも、その局在を知り得たものである¹⁵⁾。研磨切片でみた場合も、Mn と Ba と Sr に沈着が認められた他は、すべて失敗に終わった。もちろん、

EPMA で検出されないからと言って、直ちに沈着していないと決めることはできないが、多数の元素について調べた結果から、沈着しやすい元素と、そうでない元素とがあることは十分考えられる。それが生体のどこで、どのように選択されるのか、大変興味深い。

確かに、Pb は有毒であるが、酢酸鉛の致死量は意外に大量である¹⁶⁾。そして、 5 mg/kg で家兎の象牙質にヘマトキシリン異常染色層が出現する¹²⁾。ラットで象牙質の発育と石灰化状態に変化をもたらすには、更に多量を投与する必要があった。従って、EPMA で分析する限りでは、 5 mg/kg の酢酸鉛は分析結果に混乱を与える量ではないと判断された。この量の酢酸鉛によって、研磨面にも、エッチング面にもピークが現われ、必要に応じて両者を的確に対応させることができた。

$2.5 \sim 5 \text{ mg/kg}$ の鉛線が、EPMA によって象牙質に観察されることは、Pb と同時に投与された他の薬物及びその薬物によって生ずる無機成分の

変動を、鉛線を基準として、的確に知り得るので便利である。しかし、3元素を同時に分析することは一般的には難しい。そこで今回は、図5のA-Bを、PbとSr、PbとCaについて2度走査して、そのPbのピークから各元素の分布図を合成する方法を採った。その際、何故一部をエッチングするかと言え、a-bには目に見える鉛線が存在し、そのためA-BでもPbのピークが正しく読み取れるからである。

しかも、このPbのピークは、脱灰切片中の鉛線とも確実に対応させ得るので、各元素の分布状態と有機質成分における変動との関連をはっきりさせることができる。既に、須賀は¹⁷⁾、Srを投与したラットの切歯象牙質において、EPMAの線分析像と軟X線像とを、石灰化不全層を基準として対比している。ここでは、EPMA分析像と脱灰切片とが正確に対比されることにより、別のいろいろの事柄が理解されてくる。図7から、SrのピークとCaの低下層とは共に鉛線の内側、即ち、注射後形成された象牙質にあって、ほぼ一致しており、そこでは、図6から有機質成分にも著明な変化が起こっているのが明らかである。その詳しい位置関係は、酢酸鉛の注射時間をずらすことによって、解明できると思われるので、今後、実験を追加したい。

以上のように、酢酸鉛法は歯牙のEPMA分析にも応用できる方法であることが分った。

結 語

歯牙象牙質のX線マイクロアナライザー分析に、酢酸鉛法を応用して、次の結論を得た。

1. 線分析法によって、研磨面では5 mg/kgの鉛線が検出でき、特殊なエッチングをすれば、2.5 mg/kgの鉛線が検出できた。
2. そのエッチング法により、SnとBiの沈着が確かめられた。
3. 研磨標本では、Sr、Ba、Mnの局在が認められた。
4. 5 mg/kgの酢酸鉛は、象牙質のEPMA分析における時刻描記に利用できることが判明した。それによって、同時投与した薬物の局在や石

灰化に及ぼす影響を経時的に知ることができる。

稿を終るにあたり、分析を手助けして下さったX線マイクロアナライザー室の小林正義さんと、教室の佐々木悦子さんに心から感謝申し上げます。

文 献

- 1) Wei, S. H. Y.: Electron microprobe analyses of the remineralization of enamel. J. Dent. Res., **49**: 621-625, 1970.
- 2) Johnson, A. R.: Strontium, calcium, magnesium, and phosphorus content of rat incisors as determined by electron microprobe analysis. J. Dent. Res., **51**: 115-121, 1972.
- 3) Neiders, M. E., Eick, J. D., Miller, W. A. and Leitner, J. W.: Electron probe microanalysis of cementum and underlying dentin in young permanent teeth. J. Dent. Res., **51**: 122-130, 1972.
- 4) Kantola, S.: Laser-induced effects on tooth structure. IV A study of changes in the calcium and phosphorus contents in dentine by electron probe microanalysis. Acta odont. scand., **30**: 463-474, 1972.
- 5) 須賀昭一, 近藤 稔, 小野寺 章, 久保田安則, 大塚倫治: 各種動物エナメル質内でのCl, Mg, Naの分布のX線マイクロアナライザによる観察. 歯基礎誌, **13**: 85-94, 1971.
- 6) 張 春輝: 球間象牙質の石灰化に関する研究. 歯科学報, **72**: 1372-1402, 1972.
- 7) 石田 武: 急性フッ素中毒症におけるエナメル質形成に関する実験的研究. 歯基礎誌, **12**: 88-107, 1970.
- 8) 松本 章: ストロンチウム投与ラットにおける脛骨骨端部のストロンチウム分布と脂質染色. 日薬理誌, **68**: 48p, 1972.
- 9) 岡田正弘, 三村 二: 鉛塩を以てする硬組織の生体染色法と其の応用による歯牙硬組織縞模様形成の週期性に関する研究. 日薬物誌, **25**: 122, 1938.
- 10) 布施貞夫, 松田 登: 酢酸鉛による硬組織の生体染色法. そのI. 歯界展望, **15**: 297-302, 1958.

- 11) Yen, P. K.-J. and Shaw, J. H. : Preliminary study of inhibitory effects of tetracyclines on membranous bone growth in rhesus monkeys. *J. Dent. Res.*, **51**: 1651-1657, 1972.
- 12) 姥山良雄: 酢酸鉛注射による硬組織内時刻描記法の不脱灰切片への応用. *新潟歯学会誌*, **1**: 1-7, 1971.
- 13) 内山 郁, 渡辺 融, 紀本静雄: X線マイクロアナライザ. 93頁, 日刊工業新聞社, 東京, 1972.
- 14) 石館守三: 微量定性分析. 154-169頁, 南山堂, 東京, 1969.
- 15) 姥山良雄: ビスマス及び錫の象牙質内沈着とその鑑別法について. *新潟歯学会誌*, **2**: 1-8, 1972.
- 16) 池田良雄: 薬物致死量集. 131-132頁, 南山堂, 東京, 1968.
- 17) 須賀昭一: 全身条件と歯質形成障害の病理. 「カルシウム」藤田拓男, 尾形悦郎, 大野丞二, 佐々木哲(編), 107-108頁, 医歯薬出版, 東京, 1970.