

—原 著—

# ビスマス及び錫の象牙質内沈着と その鑑別法について

姥 山 良 雄

新潟大学歯学部歯科薬理学教室 (主任 三村 二教授)

(昭和47年5月6日受付)

Histochemical Demonstration of Bismuth and Tin  
in Rodential Dentine

Yoshio UBAYAMA

*Department of Dental Pharmacology, Niigata University School of Dentistry  
(Director: Prof. Tasuku Mimura)*

## 緒 言

すでに幾つかの重金属は、硬組織中に沈着することが知られているが<sup>1,2)</sup>、鉛以外に実際にその分布が組織片中に示された例<sup>3,4)</sup>は少い。しかし、重金属の硬組織における沈着状態を組織化学的に表出することは、重金属摂取に伴う形成障害の発現機構を探究して行く上に、また石灰化機構を解明して行く上にも必要なことと思われる。

先に、著者は歯牙や骨に沈着した鉛を、未脱灰切片上に表出する方法<sup>5)</sup>について報じた。今回は、その方法を鉛以外の各種重金属に当てはめて、象牙質中に沈着するかどうかを検討した。硫化水素飽和の塩酸酸性溶液中で、黒褐色の硫化物沈殿を生成するため、もし硬組織中に沈着していれば、この方法により検出できると考えられる重金属は、理論上6種に限られる<sup>6,7)</sup>。その中で、ビスマスと錫が鉛と同じように組織片中に線状に沈着することが観察され、更にビスマスと錫の沈着線は、簡単な方法で鉛線と区別できることも判明したので、その順序に従って報告する。

## 実 験 方 法

## In Vitro 実験

普通金属23種<sup>6)</sup>の中で、硬組織生体染色の酢酸鉛法<sup>8)</sup>と同一条件即ち H<sub>2</sub>S 飽和 0.2N 塩酸中で、黒色ないし褐色の沈殿(硫化物)を生成するものは、すべて重金属であって、分析化学の知見<sup>6,7)</sup>によれば、鉛、ビスマス、錫、銅、銀、水銀の6種に限られる。その他の重金属は黄色など象牙質中では判別の困難な沈殿を生ずるか、或いはこの条件では沈殿を生じないものである。

まず、水溶液となりやすい酢酸鉛、硝酸ビスマス、塩化第一錫、酢酸銅、酢酸銀、酢酸第二水銀を別々の試験管に0.1g ずつとり、ビスマス塩には0.2N になるように硝酸を、他の重金属塩には0.2N 塩酸を加えて、夫々約10ml の溶液とした。塩化第二錫は黄色沈殿を生ずるため、また酢酸第一水銀は、結局第二水銀と同じ HgS を生成するので用いなかった。

この溶液中に、キップの装置から発生する H<sub>2</sub>S ガスを通ずると、直ちに黒色、黒褐色の沈殿が生

じた。

次に、上清を取り除き、3%  $H_2O_2$  を10ml 加えると、硫化物の中で、鉛はすぐに白色沈殿（硫酸鉛）<sup>7,9)</sup>となり、ビスマスと錫は数時間後に白色沈殿となった。

この3種の白色沈殿の上清を取り除き0.2N 塩酸を10ml加えて、更び $H_2S$ を通ずると、鉛とビスマスは黒色の沈殿となった。

### 動物実験

酢酸鉛、硝酸ビスマス（少量の硝酸に溶かした後水で薄める）、塩化第一錫、酢酸銅、酢酸銀、酢酸第二水銀の0.1%及び1%溶液を直前に調製し、体重120~150gの雄ラットの足静脈と、体重2~4kgの家兎の耳静脈から静かに注入した。各重金属ごとに体重1kg当り、3 $\mu$ モル、30 $\mu$ モル、60 $\mu$ モル、100 $\mu$ モルの各量を3例以上に投与した。ラットは3日後に、家兎は4日後にエーテル麻酔下で屠殺するか、もしくは次回の薬物注入を行なった。

動物を屠殺後、直ちに上下切歯を顎骨ごと取り出し、中性ホルマリンで固定して、以後の操作は前報<sup>5)</sup>の通り行なった。今回は、象牙質を実験材料として用いた。この実験の目的に沿って、重金属の発色試薬として $H_2S$ 飽和0.2N塩酸を用いたが、この溶液は酢酸鉛法<sup>8)</sup>で使用される脱灰液であり、象牙質切片をこの中に10分間浸漬すれば、重金属が沈着している場合には、黒褐色の硫化物が出現する。

次に、象牙質中に出現した重金属の沈着線を、3%  $H_2O_2$  に10分間浸漬することにより消失せしめる（白色化合物に変える）操作<sup>10)</sup>を行なった。時には30%  $H_2O_2$  に10秒間浸漬して、その消失を試みた。

この方法で、沈着線を消失せしめても、そこにはまだ重金属が形を変えて残っているので、再び $H_2S$ 飽和0.2N塩酸中に入れて、黒色の沈着線を再現させる操作も施した。

また、この他にも本来の酢酸鉛法に従い、脱灰薄切切片中の重金属沈着線を、鍍金法<sup>8)</sup>によって表出せしめる述式も試みた。

### 結 果

#### ラット、家兎の切歯象牙質における ビスマスと錫の沈着

ラットに体重1kg当り、6 $\mu$ モルの酢酸鉛（約2mg/kg）と、30 $\mu$ モルの硝酸ビスマスと、60 $\mu$ モルの塩化第一錫とを、3日間隔で投与した場合の未脱灰切歯象牙質中における各重金属の沈着状態を示したのが図1である（図1）。

鉛沈着線は、歯髄からもっとも離れた所にみられ、内側にビスマス沈着線がやや淡く走っている。更にその内側の錫沈着線は非常に淡く、100 $\mu$ モル/kgの投与例でも、実体顕微鏡で写真に表出することは大変に困難であった。線の色も夫々少しずつ異り、鉛の黒褐色に対してビスマス、錫は褐色を呈していた。

ビスマス沈着線は明瞭で、30 $\mu$ モル/kg投与したラットの切歯を、常法に従って脱灰し、鍍金法を施すと、象牙質中に黒色の線が出現した（図2）。

また、その他の重金属（銅、銀、水銀）は、未脱灰切片上に検出できなかった。

各重金属の投与量と象牙質内沈着線の有無の関係は、未脱灰切片では表1の通りである（表1）。

ビスマスと錫だけが、鉛と同じように象牙質中に線状に沈着することが判明したが、両金属とも鉛と比べて多量投与する必要があった。

#### In Vitro 実験による $Pb^{++}$ , $Bi^{+++}$ , $Sn^{++}$ の鑑別

それぞれ重金属を溶かした酸性溶液に $H_2S$ を通ずると、図3の如く黒色の硫化物が生じた（図3）。この他の重金属は、この条件では沈着しないか、全く色の異なる沈殿を生成するかのどちらかであった。

次に、上清を除いて沈殿に3%  $H_2O_2$  を加えると、 $PbS$  は直ちに白色沈殿となり、酢酸アンモニウムに溶けた。数時間後に $Bi_2S_3$  はやや黄色がかった白色沈殿に、 $SnS$  は真白な沈殿になった（図4）。

また $CuS$  は青色の硫酸銅液中に褐色の沈殿を沈め、 $Ag_2S$  と $HgS$  はその色を変えなかった。

次いで、白色沈殿と化したものの上清を取り去

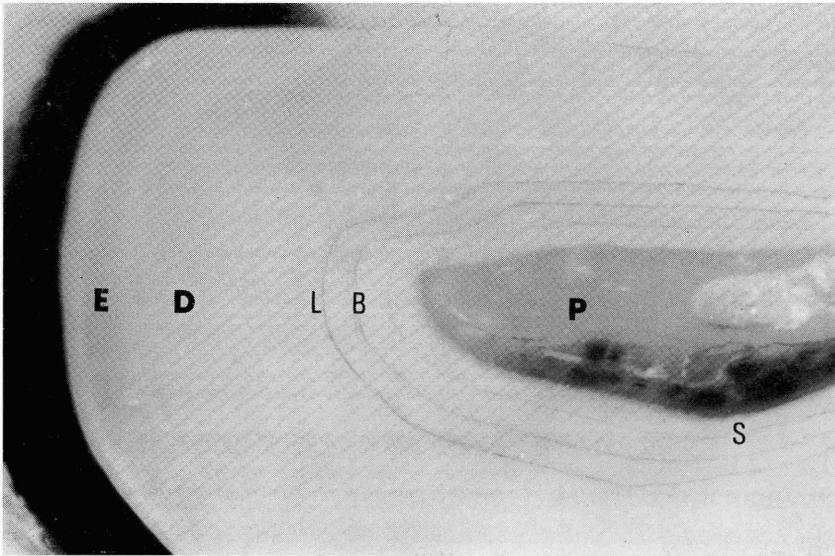


図1 ラット切歯象牙質中の重金属沈着線

L: 鉛線	B: ビスマス線
S: 錫線	E: エナメル質
D: 象牙質(未脱灰)	P: 歯髄

実体顕微鏡(×40)

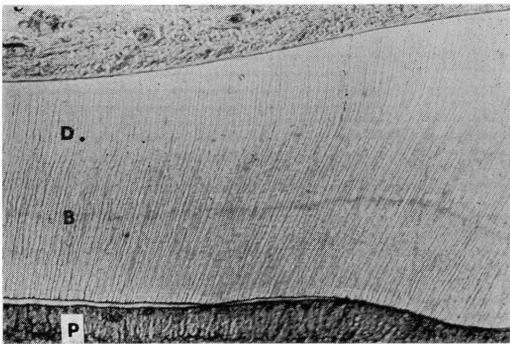


図2 ラット切歯象牙質脱灰切片中の Bi 沈着線に鍍金法を施したもの

B: ビスマス線  
D: 象牙質  
P: 歯髄  
(×100)

### 象牙質切片を用いた各種重金属の鑑別

ラット及び家兎の切歯象牙質内に沈着することが確認できた3種の重金属 (Pb, Bi, Sn) は、すべて黒色の硫化物が3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> によって白色沈殿に変わるものであった。そこで前述の in vitro の鑑別法を象牙質中の重金属沈着線に応用した。

先ず、図6に示すように、酢酸鉛(2mg/kg)の注射によって家兎の下顎切歯未脱灰切片中に出現した鉛沈着線(1の部分)は、その切片の一部を3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> に10分間浸漬すると消失した(2の部分)。これは白色化合物となって検出できなくなったため、線の消えた部分に再び H<sub>2</sub>S を作用させると、鉛線は再現された(3の部分)(図6)。

次に、6μmol/kgの酢酸鉛と、30μmol/kgの硝酸ビスマスとを投与して、図7のようにラット切歯象牙質に出現させた鉛線とビスマス線を30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> に10秒間浸漬したところ、図8のように、鉛線は消えてビスマス線のみが残った(図7、図8)。

り、0.2N塩酸を加えた上で H<sub>2</sub>S を通ずると、Pb と Bi とは直ちに黒色沈殿となったが、Sn は白色のままであった(図5)。

このようにして6種の金属を in vitro で区別することができたが、以上の化学反応をまとめると表2の通りになる(表2)。

表1 歯牙象牙質における重金属沈着の検出

実験動物	ラット, 家兎	ラット, 家兎	ラット	ラット
重金属 投与量	3 $\mu$ M/kg	30 $\mu$ M/kg	60 $\mu$ M/kg	100 $\mu$ M/kg
Pb <sup>++</sup>	+			
Bi <sup>+++</sup>	-	+		
Sn <sup>++</sup>	-	-	-	+
Cu <sup>++</sup>	-	-	-	死
Ag <sup>+</sup>	-	-	-	死
Hg <sup>++</sup>	-	死		

+: 検出できたもの, -: 検出できなかったもの, 死: 動物の死亡

表2 硫化水素及び過酸化水素による重金属の鑑別法

I	塩酸性溶液中で H <sub>2</sub> S により黒(褐)色の沈殿(硫化物)を生ずるもの	Pb, Bi, Sn, Cu, Ag, Hg
II	硫化物に H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> を加えると白色沈殿となるもの 1. 直ちに白色沈殿となるもの 2. 徐々に白色沈殿となるもの	Pb, Bi, Sn Pb Bi, Sn
III	白色沈殿に再び H <sub>2</sub> S を作用させると直ちに黒色沈殿となるもの	Pb, Bi

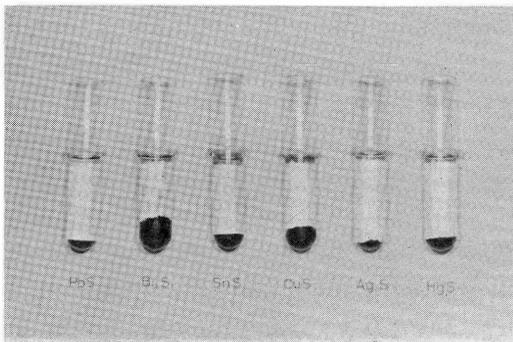
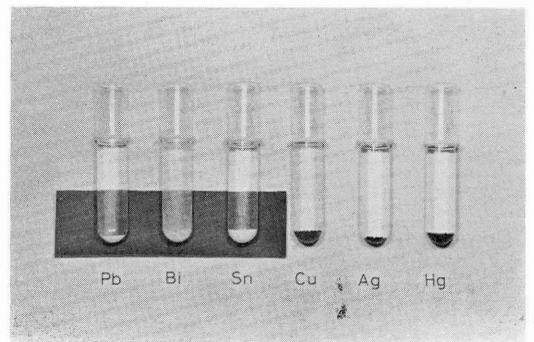


図3 重金属の硫化物沈殿

左から PbS, Bi<sub>2</sub>S<sub>3</sub>, SnS, CuS, Ag<sub>2</sub>S, HgS

図4 硫化物に 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> を作用させた場合の沈殿変化

Pb: 白色沈殿  
Bi: //  
Sn: //  
Cu: 褐色沈殿  
Ag: 黒色沈殿  
Hg: //

これは、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> によって酸化されて白色沈殿となる反応の速度が大変に違うため、このことを利用して、鉛線とビスマス線とが象牙質上で区別できた。

なお、ビスマス線は H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> によって消された後に H<sub>2</sub>S によって再現されたが、錫線は再現できなかった。

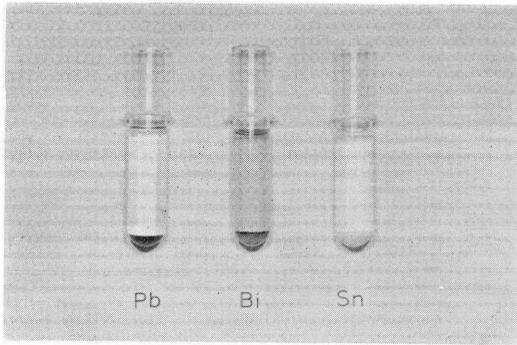


図5 白色沈殿に  $H_2S$  を作用させた場合の沈殿変化

- Pb: 黒色沈殿
- Bi: 褐色沈殿
- Sn: 白色沈殿

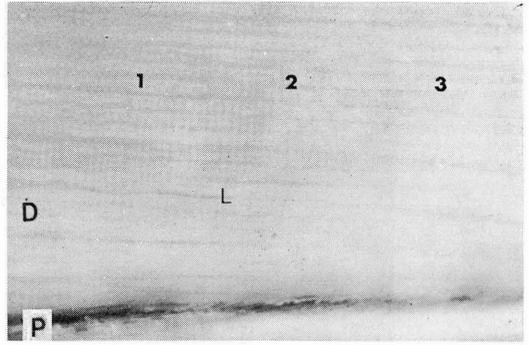


図6 家兎切歯象牙質中の鉛沈着線

- 1: 鉛線の出現 ( $H_2S$  による)
  - 2: 鉛線の消失 ( $H_2O_2$  による)
  - 3: 鉛線の再現 ( $H_2S$  による)
  - L: 鉛沈着線
  - D: 象牙質
  - P: 歯 髄
- 実体顕微鏡 ( $\times 40$ )

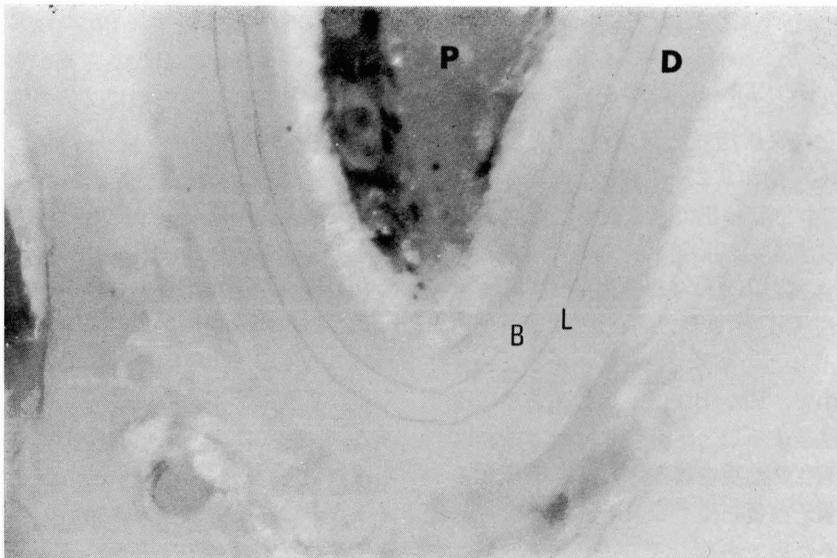


図7 ラット切歯象牙質中に出現した鉛線とビスマス線

- L: 鉛 線
  - B: ビスマス線
  - D: 象 牙 質
  - P: 歯 髄
- 実体顕微鏡 ( $\times 40$ )

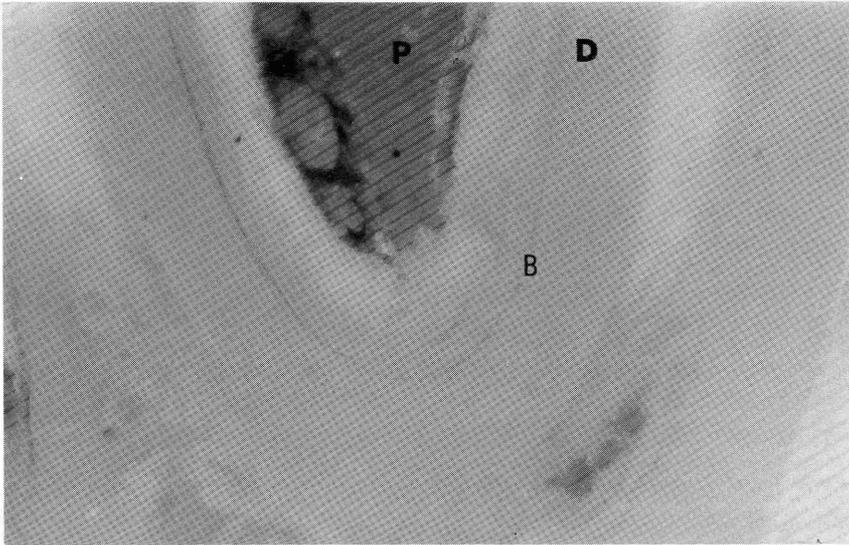


図8 ラット切歯象牙質中の消えないビスマス線

B: ビスマス線  
 D: 象牙質  
 P: 歯髄  
 実体顕微鏡 (×40)

## 考 察

この実験で、Pb, Bi, Sn, Cu, Ag, Hg の6種の重金属のみを取り扱った理由は、1) 酢酸鉛法の脱灰液 ( $H_2S$  飽和 0.2N 塩酸) に溶けないもの、2) 象牙質中でも検出できるように黒色系統の硫化物を生成するもの、という2条件を満たす金属は、普通金属の中ではこの他にないからである<sup>6,7)</sup>。例えば、Cd や As は硫化物が黄色であり、Zn や Mn はこの条件では沈殿を生じない。

この6種の中で、Pb, Bi, Sn は象牙質中に薄い層をなして沈着することが観察された。これは血中に多量注入された重金属イオンが、石灰化の現行面、即ち象牙前質と接する象牙質面に、一時に多量沈着するためである。そして、本来ならばCaが沈着すべき所に、Pb, Bi, Snが沈着したものと考えられるが、これは複雑な構造をもつ、テトラサイクン<sup>11)</sup>やトリパンプルー<sup>12)</sup>等が象牙質中に沈着する現象とは、Caとの関連において異った意味をもつものであろう。石灰化が行なわれる際に、アパタイトに特に親和性をもつ陽イオン

として、 $Sr^{++}$ ,  $Mg^{++}$ ,  $Pb^{++}$ などが知られている<sup>13)</sup>が、その系列に  $Bi^{+++}$  と  $Sn^{++}$  とが加わったものと解せられる。一般に2価の陽イオンが多い中で、Biは3価であり、しかももっとも金属らしくない元素の一つなので、石灰化の場で如何にアパタイトと関連をもつのか興味深い。

ところで、Pbと同じように沈着線を表出させるためには、BiとSnは多量投与する必要がある。その理由については未検討であるが、Pbが特に強く石灰化組織に対して親和性をもっているのは事実であろう。

この実験では、Cu, Ag, Hgの象牙質内沈着を確認できなかった。これらの重金属イオンとSイオンとの結合力は強いので<sup>6,7)</sup>、操作の過程で重金属が象牙質から溶け出すことは考えにくいし、また重金属が硫化物を形成しないということは、なお更考えられないことなので、検出の時点では象牙質中に層状沈着をするほど存在してなかったと見られる。このことは、X線マイクロアナライザーによっても確かめつつある。もっと多量投与すれば沈着するのかどうかは、動物が死んでしま

うので追求できなかつた。いずれにしても、これらの重金属は、硬組織形成にあまり関係のないものと言えよう。

次に、重金属の鑑別で問題となるのは、何故、黒色の硫化物が  $H_2O_2$  によって白色化合物となるかである。鉛の場合は、白色の硫酸鉛を生ずることがわかっている<sup>9)</sup>、この反応は既に岩橋によって組織片中の鉛確認法として利用されている<sup>10)</sup>。しかし著者の実験によれば、Bi も Sn も  $H_2O_2$  によって in vitro で白色沈殿を生じ、象牙質中の黒褐色の沈着線は消えた。従って  $H_2O_2$  によって、変色するのは Pb だけと限らないことがわかった。

しかし、Pb と Bi, Sn とでは白色沈殿の生成過程に違いがあり、 $Bi_2S_3$  と  $SnS$  は、 $H_2O_2$  によってゆっくり分解されて、白色の塩基性塩<sup>14,15)</sup>を形成する。更に、この両塩にも違いがあつて、Bi は  $H_2S$  と反応して褐色沈殿と変つたが、Sn は  $H_2S$  とは反応しにくいものとなつていた。

次に、象牙質中の鉛線とビスマス線を弁別するには、 $H_2O_2$  に対する反応時間の著しい差を利用すればよい訳で、結果は、30%  $H_2O_2$  に象牙質を10秒間浸漬したときに最も良くあらわれた。この処理で、鉛線は消え、ビスマス線は残った。しかし、この実験のように、二本の線が並んでいる時にはこの弁別法で十分といえるが、それぞれが単独にある場合には、この方法だけでは不十分であるかもしれない。

以上の通りに、Bi と Sn とが Pb と同じように象牙質に沈着することが判明した訳であるが、これを鉛の場合と同じように硬組織の生長を測定するために用いる<sup>9)</sup>ことは、重金属を多量投与する必要があるので得策でない。むしろ今後硬組織の重金属による形成障害作用を研究して行く上に、この結果は重要な意味をもつようになると思われる。

## 結 語

1. 酢酸鉛法の応用不脱灰法により、ビスマスと錫とが鉛と同じように歯牙象牙質に沈着することが観察された。

2. ビスマス及び錫は、鉛に比べて多量投与しないと沈着線は検出できなかった。

3. 銅、銀、水銀の象牙質内沈着は観察できなかった。

4. 鉛とビスマスの象牙質及び in vitro における弁別を試みた。

稿を終るにあたり、この研究に数々の御教示を下された三村 二教授に深謝申し上げます。

## 文 献

- 1) Goodman, L. S. and Gilman, A. (eds.): The pharmacological basis of therapeutics. 4 th ed., p. 958-982, 1970, The Macmillan Company, New York.
- 2) Sollmann, T.: A manual of pharmacology. 8 th ed., p. 1237-1352, 1964, W. B. Saunders Company, Philadelphia.
- 3) 三村 二: 鉛中毒動物の骨及び歯牙組織に於ける鉛の分布状態に就て. 口病誌, 8: 381, 1934.
- 4) Okada, M. and Asoda, A.: Studies on deposition mechanism of heavy metal salts in hard tissues. I. Proc. Jap. Acad., 34: 730-735, 1958.
- 5) 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.
- 6) 阿藤 質: 分析化学 (改訂版) p. 71-102, 1971, 培風館, 東京.
- 7) 石館守三: 微量定性分析 (第17版). p. 154-197, 1969, 南山堂, 東京.
- 8) 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.  
(その II) 歯界展望, 15: 541-546, 1958.
- 9) 岩永源作: 横観無機化学 (第4版). p. 125, 1955, 培風館, 東京.
- 10) 岡本耕造, 上田政雄, 前田隆英, 水谷昭: 顕微鏡的組織化学 (第3版) p. 127, 1965, 医学書院, 東京.
- 11) Johnson, R. H. and Mitchell, D. F.: The effects of tetracyclines on teeth and bones. J. Dent. Res., 45: 86-93, 1966.
- 12) Auskaps, A. M. and Shaw, J. H.: Vital staining of calcifying bone and dentin

- with trypan blue. J. Dent. Res., **34**: 452-458, 1955.
- 13) Neuman, W. F. and Neuman, M. W. 著, 荒谷真平 (訳): 骨の生化学. p. 85-90, 1960, 医歯薬出版, 東京.
- 14) 千谷利三: 無機化学. p. 818, 1970, 産業図書, 東京.
- 15) Stecher, P. G. (ed.): The Merck Index. 8 th ed., p. 979, 1968, Merck & Co., Inc., Rahway, N. J..