

鶴見大学大学院歯学研究科博士学位論文

内容の要旨および審査の結果の要旨

氏名(本籍) 浅田由佳(神奈川県)
 博士の専攻分野 博士(歯学)
 学位記番号 甲第494号
 学位授与年月日 平成31年3月14日
 学位授与の要件 学位規則第4条第1項該当
 研究科専攻 鶴見大学大学院歯学研究科
 (博士課程) 歯学専攻
 学位論文題目 Acidic Calcium Phosphate Crystals Observed on the Outermost Layer of Human Enamel
 (ヒトエナメル質最表面に観察される酸性リン酸カルシウム結晶)
 Journal of Hard Tissue Biology 第28巻 第2号 139頁~146頁掲載 平成31年4月発行
 論文審査委員 主査 教授 細矢 哲 康
 副査 教授 朝田 芳 信 副査 教授 山本 雄 嗣

内容の要旨

【緒言】

ブラッシング時期の評価, エナメル質の酸蝕症, 初期う蝕に関して数多くの研究が行われている。しかし, その評価はエナメル質表面の硬さの変化や X 線透過性の変化などマクロな視点から行われている。また, エナメル質表面の基礎的構造に関する研究では, 健全なアパタイトの表面に顆粒状の結晶を含む歯小皮第二膜の存在を確認しているが, その結晶の組成には触れていない。つまり, エナメル質表面のリン酸カルシウムの結晶の特性とその組成については解明されていない。本研究は口腔内に存在した歯のエナメル質最表面の結晶構造が, 唾液などの口腔内環境液に接している状況と, 接していない状況, また実質欠損の認められない初期う蝕の状況においてどのように異なるのか, 元素分析と透過型電子顕微鏡での観察により形態学的側面から検討し, 結晶の成因について考察を行うことを目的とした。

【材料および方法】

本研究には ICDAS コード 2 相当の実質欠損を伴わないう蝕を有するヒト永久歯 5 本と半埋伏歯 5 本を用いた。う蝕を認めるエナメル質を Post-eruptive enamel with caries (Po-C), う蝕を認めないエナメル質を Post-eruptive enamel with no caries (Po-N), 半埋伏歯の付着上皮下のエナメル質を Pre-eruptive original enamel (Pr-E) と, 3 条件に分類した。各試料は幅 500 ~ 700 μm 間隔で歯軸方向に切断し縦断面を作成した。

まず, 落射光下でエナメル質最表面の構造を実体顕微鏡を用いて観察した。そして, 100 μm 厚に縦断面を鏡面研磨し, 光学顕微鏡と偏光顕微鏡にて観察を行った。その後, 電子線プローブマイクロアナライザー (EPMA) を用いて反射電子像の観察と, エナメル質表面の Ca, P, Mg の元素分析を行った。歯質界面から 0-1 μm , 10 μm , 20 μm の各深度で Ca, P のそれぞれの濃度値 (CPS) を計測し, 得られた CPS 値から Ca/P 比, Mg/P 比, Mg/Ca 比, (Ca+Mg) / P 比を算出した。統計処理にはノンパラメトリックの Steel-Dwass 法を使用した。また, ダイヤモンドナイフで各試料の超薄切片を作成し, 透過型電子顕微鏡 (TEM) によるエナメル質の結晶断面形態の観察を行った。加えて, 一部の試料から集束イオンビームによる超薄切片を作製し, 電子線回折を行った。

【結果】

光学顕微鏡では, Po-C のエナメル質の表層下脱灰層の表層に高石灰化を呈する透明性の高い層が, さらにその外層には深層と比較して明らかに輝度の高い層が認められた。Po-N においてもエナメル質最表面に深層と比較して明らかに輝度の高い層が観察された。Pr-E では Po-C, Po-N で観察された輝度の高い層は明瞭には観察されなかった。偏光顕微鏡では

Po-C, Po-N, Pr-E すべてにおいてエナメル質表面に複屈折特性の異なる層を認めた。Po-C, Po-N, Pr-E について反射電子像の濃度を比較すると, Po-C のエナメル質表面には約 $6 \mu\text{m}$, Po-N には約 $3 \mu\text{m}$, Pr-E には約 $4 \mu\text{m}$ まで, 深層と比較して反射電子密度の高い明調な領域が観察された。

Ca/P 比では各深度で統計的有意差は認められなかったが, Po-N, Pr-E ではエナメル質表面から $0-1 \mu\text{m}$ の Ca/P 比が深層 ($10 \mu\text{m}$ および $20 \mu\text{m}$) と比較して低値を示す傾向が認められた。Mg/P 比, Mg/Ca 比では Pr-E のエナメル質表面から $0-1 \mu\text{m}$ は深層と比較して高値を示し, $0-1 \mu\text{m}$ と $10 \mu\text{m}$ の間では有意差 ($p < 0.01$) が認められた。(Ca+Mg)/P 比では各深度で有意差は認められなかった。

Po-C のエナメル質表面を TEM で観察すると, 最表面には酸性リン酸カルシウムであるリン酸三カルシウム (TCP), リン酸水素カルシウム 2 水和物 (DCPD), リン酸オクタカルシウム (OCP) に典型的な四角形や多角形の結晶の断面が観察され, その下層には中心穿孔を伴う HAp 結晶が観察された。そして, 更にその下には六角形を呈する結晶の密度の高い層が観察された。また, 電子線回折により表面には HAp 結晶とは異なる結晶が存在することが確認された。Po-N のエナメル質最表面には Po-C のような層構造は認められなかったが, 四角形や多角形の結晶の断面が観察された。Pr-E のエナメル質最表面には四角形や多角形の結晶の断面は観察されなかったが, 他 2 条件と比較して結晶の大きさが小さかった。また, Po-C では最表面まで小柱構造が観察されたが, Pr-E では小柱構造は観察されなかった。

【考 察】

Po-N の最表面で Ca/P 比は低値を示し, TEM により最表面に OCP, TCP, DCPD などの酸性リン酸カルシウムに典型的な四角形や多角形の結晶の断面が観察された。つまり Po-N ではエナメル質最表面に酸性リン酸カルシウム結晶が存在することが強く示唆された。Po-C の Ca/P 比, Mg/P 比, Mg/Ca 比において深度による差が認められなかったのは, 同じ ICDAS コード 2 のう蝕でも進行度が異なるためと考えられる。しかし Po-C でも, エナメル質最表面に酸性リン酸カルシウムに典型的な結晶の断面が観察され, 更に電子線回折により最表面に HAp とは異なる結晶が存在することが確認されている。よって, Po-N と同様に, Po-C の最表面にも酸性リン酸カルシウム結晶が存在することが強く示唆された。一方, Pr-E の表面では Ca/P 比が低値を示したにも関わらず, TEM で酸性リン酸カルシウムに典型的な結晶の断面は観察されなかった。これは結晶の大きさが Po-N や Po-C と比較して非常に小さかったことに起因する。しかし, HAp の前駆物質である非晶質リン酸カルシウム (ACP) に対して安定剤として作用する Mg がエナメル質表面に多く検出されたことから, Pr-E の表面に ACP の存在する可能性が示唆された。

【結 論】

付着上皮に被われている部位の最表面には ACP の安定剤として作用する Mg が含まれていたため, ACP が存在する可能性がある。やがて, エナメル質最表面が唾液に触れると ACP から OCP を介した HAp への転移が生じると考えられる。また, 通常の口腔内では, 唾液の pH の変動により, 歯の最表面に酸性リン酸カルシウムを含む薄層が形成されると考えられる。この薄層は, 林ら¹⁾が実験的にヒト抜去歯と酸溶液を用いた *in-vitro* 実験でエナメル質の脱灰底面において確認した薄層と同様のものと考えられ, 本研究においてリン酸カルシウムを含有する層が実際にヒト口腔内に存在した歯のエナメル質表面においても存在していることが明らかとなった。本研究結果は, 今後のエナメル質初期う蝕に対する再石灰化療法 of 臨床研究に基礎的知見として寄与すると考えられる。

審査の結果の要旨

これまでのエナメル質に関する研究では, エナメル質表面のリン酸カルシウム結晶の特性や組成に関する詳細については解明されていない。

本研究では, エナメル質最表面の結晶構造において, 唾液への曝露などの口腔内環境や初期う蝕がおよぼす影響について, 元素分析と電子顕微鏡的観察により, リン酸カルシウム結晶の成因について形態学的に検討した。

被験歯には, 実質欠損を伴わない (ICDAS コード 2) ヒトう蝕永久歯 5 本と半埋伏歯 5 本を用いた。試料は, う蝕を有するエナメル質 (Po-C), う蝕のないエナメル質 (Po-N), 半埋伏歯の付着上皮下のエナメル質 (Pr-E) の 3 条件に分類した。

エナメル質最表面を実体顕微鏡, 光学顕微鏡 (偏光顕微鏡を含む) にて観察した。さらに, EPMA にて反射電子像の観察ならびに Ca, P, Mg の元素分析を行った。歯質表面から $0-1 \mu\text{m}$, $10 \mu\text{m}$ および $20 \mu\text{m}$ における Ca/P, Mg/P, Mg/Ca, (Ca+Mg)/P を算出し統計学的検索を行った。さらに, エナメル質の結晶断面形態の観察を TEM にて行い, 一部の試料に対して電子線回折を行った。

その結果、本研究では以下のことが明らかとなった。

Po-Cのエナメル質表層下脱灰層には高石灰化層が存在し、外層には内層と比較して明らかに輝度の高い層が認められた。これはPo-Nにおいても同様であったが、Pr-Eでは観察されなかった。

すべての試料のエナメル質表面には、異なる複屈折性の層が認められた。また、最表面からPo-Cで約6 μm 、Po-Nで約3 μm 、Pr-Eで約4 μm まで、内層に比べ反射電子密度の高い領域が観察された。

Ca/Pは深度による有意差は認められなかったが、Mg/P、Mg/Caに関してはPr-Eの0-1 μm で内層に比べ有意に高い値を示した。

Po-Cのエナメル質最表面で、リン酸三カルシウム、リン酸水素カルシウム二水和物、リン酸オクタカルシウムに典型的な四角形や多角形の結晶断面が観察され、下層には中心穿孔を伴うHAp結晶が観察された。また、電子線回折でも表面にHApとは異なる結晶が確認された。さらに、超薄切片において小柱構造が観察された。Po-NではPo-Cのような層構造は認めなかったが、同様の結晶断面が観察された。Pr-Eには結晶断面は認められず、他の2条件に比べ結晶が小さかった。

本研究では、種々の方法を用いてエナメル質最表面の超微細構造ならびに口腔内環境の影響による変化を明らかにした。本研究で得られた結果は、初期う蝕や酸蝕症などの硬組織疾患に関する基礎研究やブラッシング時期やう蝕管理、う蝕処置に関する臨床研究、ならびに日常臨床における歯面の薬物塗布療法などに大きく貢献するものである。

よって、本論文は博士（歯学）の学位請求論文として十分な価値を有するものと判定した。