

《原 著》

微小部 X 線回析法を用いたヒトエナメル質脱灰表面の 結晶学的分析

わた 渡 辺 新¹ 河 野 哲 朗¹ と 田 みゆき²
おか 岡 田 優一郎² 栗 田 隆 史² さ 笹 本 祐 馬²
たま 玉 村 りょう¹ さ 寒 河 江 登 志 朗³ おか 岡 田 裕 之¹

¹ 日本大学松戸歯学部 組織学講座

² 日本大学大学院松戸歯学研究科 解剖・組織・発生学専攻

³ 日本大学

キーワード：炭酸飲料，酸蝕菌，ヒトエナメル質，生体アパタイト，微小部 X 線回折法

要旨：本研究は，ヒトエナメル質が形態学および物理化学的性質の多様性を示すことに基づき，脱灰による個々のエナメル質の結晶学的変化を明らかにするために，微小部 X 線回折装置（micro-XRD）を用いて分析を行った。10 本の大白歯を 0.5 mm の厚さに薄切し，実験群は炭酸飲料水に，対照群は生理食塩水に，7 日間浸漬した。得られたサンプルのうち，エナメル質の脱灰が弱いものと強いものから 1 本ずつ選択し，弱脱灰標本 A と強脱灰標本 B として，エナメル質の表層および深層に対し X 線回析を行った。その結果，新しい知見を得ることができた。

今回の実験でも従来の報告と同様に，エナメル質を構成する生体アパタイト結晶格子の a-axis, c-axis の値は，エナメル質の表層および深層，ならびに歯ごとに変化が認められた。このことから，これらの値の差はエナメル質の化学組成が，エナメル質の層ごと，または，歯ごとに異なり，脱灰の進行に影響を与えていることが示唆された。次に，結晶子の大きさ（crystallite size）において，エナメル質の結晶子は実験群と対照群とに著しい差があることが判明した。以上の結果から，エナメル質の結晶学的性質と脱灰の進行との間に，何らかの関係が存在することを見出すことができた。最後に，炭酸飲料水に浸漬したサンプル B 表層の XRD パターンから，標準的なハイドロキシアパタイト結晶の XRD パターン以外のピークが認められた。そのピークは，従来報告のない未知の特殊反応生成物のものであると考えられた。

本研究が，エナメル質の生体アパタイト構造は歯ごとに差があること，脱灰によってこれらのエナメル質の結晶学的性質が変化し，それらが同一傾向の反応を呈しないことなどを明らかにしたことから，今後は個々のエナメル質のより詳細な研究の必要性が指摘された。これらの結果から，現在すべてのヒトエナメル質に共通して適用されている齲蝕予防方法の再検討の必要性が示唆された。

Crystallographic Analysis of Demineralized Surface of Human Enamel Using Micro-XRD

Arata Watanabe¹, Tetsuro Kono¹, Miyuki Toda²,
Yuichiro Okada², Takashi Kurita², Yuma Sasamoto²,
Ryo Tamamura¹, Toshiro Sakae³, Hiroyuki Okada¹

¹Department of Histology, Nihon University School of Dentistry at Matsudo

²Nihon University Graduate School of Dentistry at Matsudo,
Histology, Cytology and Developmental Anatomy

³Nihon University
Matsudo, Chiba 271-8587, Japan

Key Words : carbonated drink, tooth erosion, human tooth enamel, biological apatite, micro-XRD

Abstract : The present study is based on the fact that enamel exhibits a variety of morphological and physicochemical properties. To clarify the crystallographic changes of enamel due to decalcification, analyses were performed micro X-ray diffraction (micro-XRD). Ten human teeth were sliced to a thickness of 0.5 mm. The experimental group was soaked in carbonated drinking, and the control group was done in physiological saline for 7 days. Authors classified them into two groups; lightly demineralized sample A and heavily demineralized sample B. For enamel crystal analysis, micro-XRD was used for molecule elemental analysis.

At first, the values of a-axis and c-axis in enamel biological apatites crystals were changed in the surface layer and deep layer in each tooth. These results show that the value of the difference suggests the chemical composition of enamel was different in each layer and each tooth, affecting the degree of decalcification. Furthermore, crystallites of enamel from crystallite size were found that there is a significant change when compared with the control group and experimental groups. As a result, some relationship was found between the crystallographic properties of enamel and the extent of decalcification. In addition, the peak except the pattern of the hydroxyapatite crystal was shown from an outer layer pattern of sample B. The peak was formed by a special reaction product.

From these incidents, decalcification changes the crystallographic properties of enamel and not all react identically. It is considered that the biological apatite structure of enamel varies from tooth to tooth. These results suggest that re-examination of caries prevention methods commonly applied to all human enamel is needed.

Nihon Univ. J. Oral Sci. 46 : 15~21, 2020

緒 言

ヒトエナメル質の酸蝕症研究において、脱灰作用の発現とその強弱は元々の歯の構造的および化学的特性に影響を受けることが明らかにされた^{1,2)}。エナメル質結晶は電子線回折 (Electron diffraction: ED) および X 線回折 (X-ray diffraction: XRD) 研究により、ハイドロキシアパタイト結晶との類似性を示したが、それらの実験では、ハイドロキシアパタイト結晶と生体アパタイト結晶との間に有意差を示す結果となった³⁻⁵⁾。また、エナメル質結晶の化学組成は、歯種の違いだけでなくエナメル質内の部位の違いによっても均一ではないことが明らかにされている^{5,6)}。

近年、食生活の変化に伴い、炭酸飲料水による齲蝕の発生はここ数十年でより頻繁に報告されている。in vivo および in vitro での齲蝕研究に関する報告が多数行われているが、これらの研究結果は結論付いておらず、齲蝕進行のメカニズムにおいて統一された見解はまだ明らかにされていない^{7,8)}。これらの原因として、エナメル質の特性が個人およびエナメル質の部位によって、マクロ的およびミクロ的な構造が共通しているわけではないという事実によるものだと考えられる⁵⁾。これまでの XRD を用いた研究はマクロ的な解析手段が多く、したがって、齲蝕の形成メカニズムはマクロ的な観点のみならず、ミクロ的な観点からもさらに研究を行っていく必要がある。

本研究の目的は、エナメル質が形態学的および物理化学的性質の多様性を示していることに基づいて、脱灰によるエナメル質の結晶学的変化を明らかにすることである。

材料と方法

1. 試料の作製

本講座に保存されている抜去歯の中から、肉眼的所見に、齲蝕や充填物などがなく健全歯であると判断したヒト第三大臼歯を 10 歯選び、実験に供した。歯は low-speed diamond saw (IsoMet[®], Buehler Co. Ltd., Lake Bluff, IL, USA) により約 0.5 mm 間隔で縦断的に薄切し、6 枚の全割切片標本を作製した。この中から中央の 2 枚を試料とした。

試料の一枚は実験群とし 1.5 L の炭酸飲料水 (Sprite[®]; Coca-Cola (Japan) Company Limited) 中に、もう一

枚は対照群とし生理食塩水で湿潤化した容器の中に、7 日間静置した。浸漬後、炭酸飲料に浸漬した 10 歯のサンプルのうち、エナメル質の脱灰が弱いもの (弱脱灰: A) と、強いもの (強脱灰: B) とを 1 歯ずつ選択し、X 線回折を行った。本研究は日本大学松戸歯学部倫理委員会の承認を得て行った (承認番号 EC 17-015 号)。

2. 切片浸漬後のエナメル質観察

選択した二つのサンプルを実体顕微鏡 (Leica M60[®] 及び Leica DFC295[®]; Wetzlar, Germany) を用いて観察・撮影した。

3. 微小部 X 線回折法 (Micro-X-ray diffraction: micro-XRD) による分析

エナメル質表層および深層の結晶学的性質を、微小部 X 線回折装置 (RINT-2500, RIGAKU, Co. Ltd., Tokyo, Japan) を使用して分析した。測定・回折条件は以下の通り行った。回転式ターゲット: Cu, 加速電圧: 50 kV, 電流: 300 mA, モノクロメーター: グラファイト (黒鉛), X 線ビーム直径: 100 μm , 検体回転軸: χ, ω, θ 。また、得られた X 線回折データは JADE (MDI, Materials Data Inc., Livermore, CA, USA) を用いて分析した。比較のために、ハイドロキシアパタイトの粉末回折ファイル (International centre for diffraction data: ICDD) (PDF#09-0432) を使用した。組成に関係する a-axis, c-axis の値と、ピークの広がりから結晶度をみる半値幅 (The full width half maximum: FWHM) (300) 値、さらにそこから誘導される crystallite size はすべて JADE にて検討した。

結 果

選択した二つのサンプル A, B の実体顕微鏡像を示す (Fig. 1)。※印の箇所では、エナメル質がすべて溶解していた。また、実験群では対照群と比較して、Hunter-Schrege 条が明確に観察された。サンプル A, B の表層および深層の micro-XRD パターンを示す (Fig. 2)。サンプル A 及び B の実験群表層を 1, 実験群深層を 2, 対照群表層を 3, 対照群深層を 4 として、A-1, A-2, A-3, A-4, B-1, B-2, B-3, B-4 と表記した。すべてのパターンにおける強い回折ピークは、ハイドロキシアパタイトのそれとほぼ一致したが、全体的に高角度側にシフトしていた。A-1, A-2, B-2 では、3.48 \AA (25.6°,

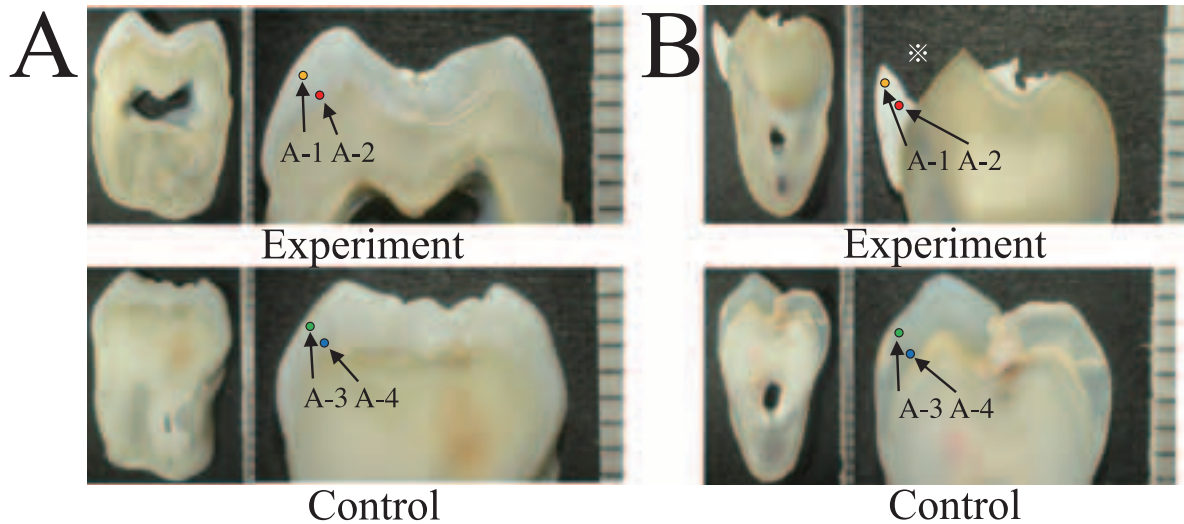


Fig. 1 0.5 mm の厚さに薄切したヒトの歯の切片。
 実験群表層を 1, 実験群深層を 2, 対照群表層を 3, 対照群深層を 4 とし、A-1, A-2, A-3, A-4, B-1, B-2, B-3, B-4 と表記。
 A : 弱脱灰, B : 強脱灰

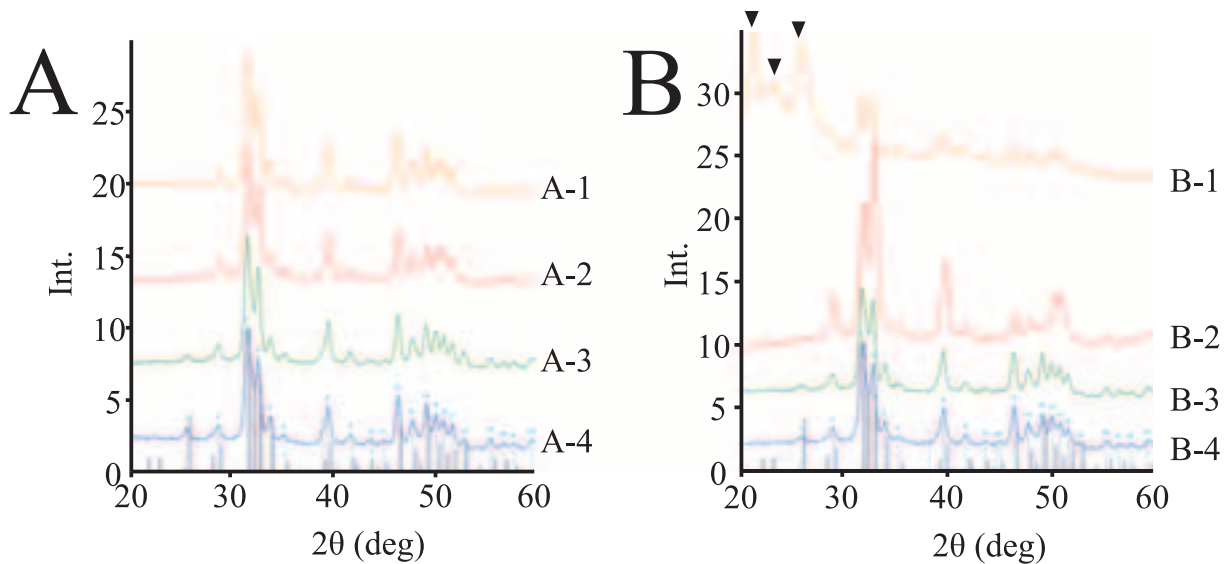


Fig. 2 A-1 から A-4, B-1 から B-4 の micro-XRD パターン。
 ▼ : ハイドロキシアパタイトのパターン以外のピーク。

20) のピークが消失していた。さらに、B-1, B-2 では、 1.85 \AA ($49.2^\circ, 2\theta$) と 1.62 \AA ($56.8^\circ, 2\theta$) のピークが消失しており、 1.96 \AA ($46.4^\circ, 2\theta$), 1.82 \AA ($50.1^\circ, 2\theta$), 1.79 \AA ($50.9^\circ, 2\theta$) のピークが B-3, B-4 に比べやや低角度側にシフトしていた。B-1 では 4.26 \AA ($20.8^\circ, 2\theta$) と 3.84 \AA ($23.2^\circ, 2\theta$) に強度の強い、ハイドロキシアパタイトのパターン以外のピークが認められた。B-2 の 2.83 \AA ($31.5^\circ, 2\theta$) のピークは 2.74 \AA ($32.6^\circ, 2\theta$) のピークに比

べ強度が低いのにに対して、その他のパターンでは 2.74 \AA ($32.6^\circ, 2\theta$) のピークは 2.83 \AA ($31.5^\circ, 2\theta$) のピークよりも強度が強かった。また、 1.90 \AA ($47.8^\circ, 2\theta$) のピークがやや低角度側にシフトしていた。

JADE によって計算された a-axis, c-axis, FWHM (300), crystallite size の値を示す (Table 1)。サンプル A, B において、それぞれ a-axis の値は 9.467 \AA から 9.485 \AA , 9.392 \AA から 9.469 \AA の範囲で、c-axis の値

Table 1 サンプル A, B の結晶学的性質

	a-axis	c-axis	FWHM(300)	crystallite size
A-1	9.485	6.913	0.372	231
A-2	9.467	6.906	0.386	222
A-3	9.482	6.918	0.488	173
A-4	9.480	6.917	0.483	175
B-1	9.424	6.871	0.422	202
B-2	9.469	6.834	0.605	139
B-3	9.392	6.869	0.492	172
B-4	9.398	6.884	0.358	241

a-axis, c-axis, crystallite size の単位は Å. FWHM(300) の単位は 2θ.

a-axis および c-axis について計算された推定標準偏差 (e.s.d) 値は 0.005 以内であった。

FWHM の値は 300 に対するもので、サイズは c-axis に沿ったものである。

が 6.906 Å から 6.912 Å, 9.834 Å から 9.884 Å の範囲であった。表層から深層にかけての値の変化を比較したものを示す (Fig. 3)。a-axis, c-axis の値において、サンプル A ではすべて減少し、サンプル B では、B-2 以外の値がすべて増加した。FWHM (300) の値では、サンプル A, B ともに実験群で増加し、対照群で減少した。一方、crystallite size の値では、サンプル A, B ともに実験群で減少し、対照群で増加した。

対照群から実験群にかけての値の変化を比較したものを示す (Fig. 4)。a-axis において、サンプル A の深層以外の値が増加し、c-axis においてサンプル B の表層以外の値が減少していた。FWHM (300) ではサンプル B の深層以外の半値が減少し、一方、crystallite size においてはサンプル B の深層以外の値が増加していた。さらに、サンプル A とサンプル B の a-axis, c-axis, FWHM (300), crystallite size の値の違いを比較したものを示す (Fig. 5)。a-axis, c-axis, crystallite size において、サンプル B よりサンプル A の方が大きい値となった。FWHM (300) では、対照群の深層を除き、サンプル A よりサンプル B が大きい値となった。

考 察

本研究は、ヒトエナメル質が形態学および物理化学的性質の多様性を示していることに基づき、脱灰によるエナメル質の表層および深層について結晶学的特性を分析した。その結果、いくつかの発見と再確認事項を示すことができた。

まず、Fig. 1 で示したサンプル A, B の実体顕微鏡像

から、炭酸飲料水がエナメル質に個々で異なる形態変化をもたらしたことが判明した。エナメル質齲蝕は病理学的な観点から、Retzius 条や小柱鞘のようなエナメル質の組織学的構造が、齲蝕病変を開始または伝播させるための重要な構造因子であると言われている⁹⁾。この事実はこれらの構造が変動する因子である炭酸塩含有量に関係している可能性があり、炭酸塩に富む層は希酸によって選択的に溶解されることを示している⁴⁾。Robinson ら¹⁰⁾ および Anatoly ら¹¹⁾ は、エナメル質齲蝕の成分が部分および層によって変化することに注目した。本研究でみられる形態変化はこれらの報告と一致しており、このような変化はエナメル質の研究において注意深く観察すべき点である。

次に、Fig. 3 および 5 に示す a-axis, c-axis のグラフから、歯ごとやエナメル質の層によって値が変動することが判明した。これは、Fig. 2 のピークシフトやピークの消失などからも確認することができた。本研究における対照群の a-axis, c-axis はサンプル A の表層、深層で a = 9.482 Å, 9.480 Å, c = 6.918 Å, 6.917 Å, サンプル B の表層、深層で a = 9.392 Å, 9.398 Å, c = 6.869 Å, 6.884 Å であった。B-1, B-2 の間では大きな差を示したが、その他の表層、深層間での値の差はあまり認められなかった。また、サンプルごとの値の差は a-axis の A-2, B-2 を除き大きい差を示した。この結果から、実際にエナメル質結晶は多種多様な結晶構造を示していると考えられる。また、アパタイト結晶の a-axis, c-axis は結晶内の化学組成を反映している¹²⁾ ため、これらの値の差は、エナメル質の化学組成が個体ごとに異なることを示していると考えられる。しかし、エナメル質の明確な化学組成は、この研究で使用した X 線回折条件が限られているため、分析することができなかった。

次に、Fig. 4 の crystallite size から、エナメル質結晶の結晶子は実験群と対照群とを比較すると、著しい変化が認められた。また、a-axis, c-axis も実験群と対照群との値に変化があることが判明した。crystallite size は結晶子の大きさを表しており、この値が低い程結晶性が悪いということが言えるため、FWHM の値は大きくなる。よって、crystallite size の値が対照群よりも実験群の方が小さくなったサンプル B 深層は、FWHM の値から見ても対照群よりも実験群の結晶性の方が悪いということが理解できる。しかし、それ以外のデータでは、実験群よりも対照群の結晶性の方が良いという結果となっ

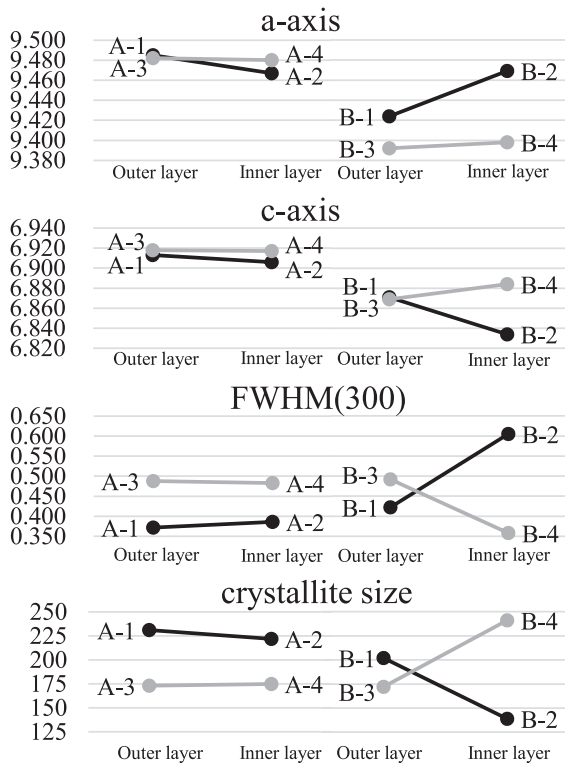


Fig. 3 JADE によって計算された a-axis, c-axis, FWHM (300), crystallite size の値を表層と深層と比較したグラフ。
(左 : A-1 と A-2, A-3 と A-4 右 : B-1 と B-2, B-3 と B-4)

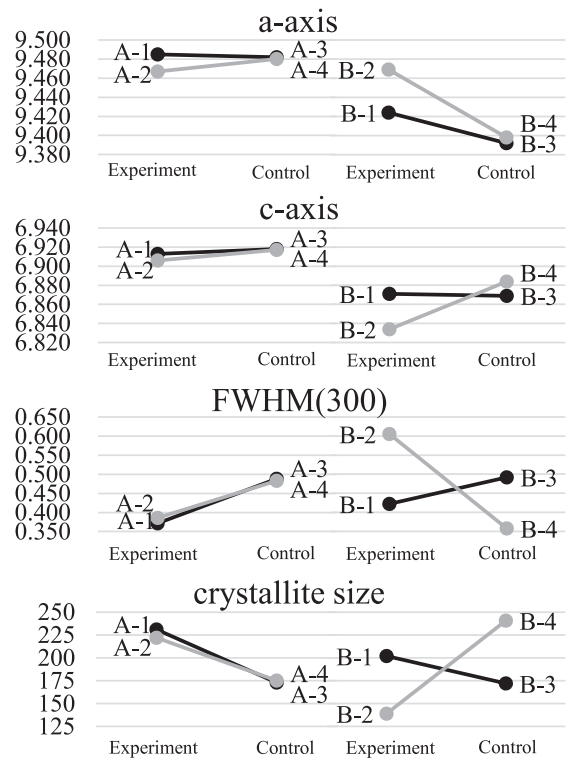


Fig. 4 JADE によって計算された a-axis, c-axis, FWHM (300), crystallite size の値を実験群と対照群と比較したグラフ。
(左 : A-1 と A-3, A-2 と A-4 右 : B-1 と B-3, B-2 と B-4)

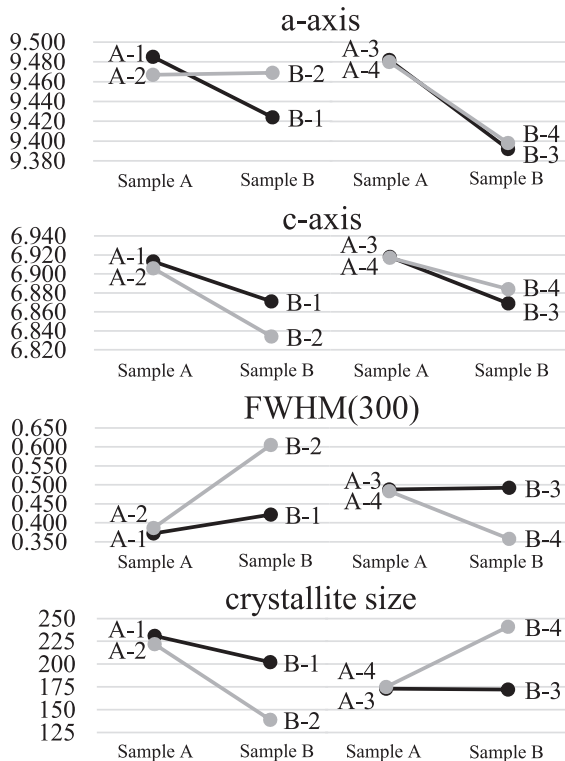


Fig. 5 JADE によって計算された a-axis, c-axis, FWHM (300), crystallite size の値をサンプル A と B で比較したグラフ。
(左 : A-1 と B-1, A-2 と B-2 右 : A-3 と B-3, A-4 と B-4)

た。これらの事実から、結晶学的性質と脱灰との間に何らかの関連性があることが判明した。

最後に、Fig. 2 の B-1 のパターンからハイドロキシアパタイト結晶のパターン以外のピークが認められた。これはハイドロキシアパタイト結晶のパターンに存在しないピークであることから、特殊反応生成物であると考えられる。また、これらのピークの幅は広がっており、結晶性が低いことを示している。この特殊反応生成物は、リン酸カルシウムのどれにも同定されなかった¹³⁾。また、人体の硬組織形成における前駆体として疑われる calcite, aragonite, および vaterite のような炭酸カルシウムのいずれにも同定されなかった^{14, 15)}。特殊反応生成物の発生有無や発生量は脱灰溶液とエナメル質結晶間の複雑な化学反応に起因し、個々のエナメル質毎に反応の違いが生じることに関係していると考えられる。また、特殊反応生成物の存在は今後、脱灰の進行や予防を検討する上で考慮しなければならない物質であることが示唆された。

本研究結果は、エナメル質結晶の変化を明らかにする

ために、個々の歯に関する基礎データのさらなる蓄積が必要であることを示した。今後の研究では、より正確な分析を行うために、アパタイト結晶構造を Rietveld 法のようないくつかの結晶構造分析ソフトを使用して解析しなければならない。それにより、エナメル質結晶のより詳細な結晶構造が明らかにされるであろう。

結 論

炭酸飲料水 (Sprite®) で浸漬させたエナメル質のアパタイト結晶は、結晶学的性質を著しく変化させ、エナメル質内に不均一性を示した。サンプル A と B は脱灰される以前の段階でアパタイト結晶の化学組成に違いがあったと考えられ、エナメル質の結晶学的性質と脱灰との間に何らかの関連性があることが示唆された。また、特殊反応生成物の発生の有無、および量の変化は、脱灰溶液とエナメル質結晶の複雑な化学的反応に起因し、個々のエナメル質ごとに反応の違いが生じることに関係していると考えられ、特殊反応生成物の同定が待たれる。今回の実験では、数値の意味する解釈を得ることはできなかったが、今後の研究ではデータのさらなる蓄積と Rietveld 法などの解析ソフトの使用を検討する必要がある。

謝辞及び利益相反

今回使用した micro-XRD は、日本大学量子科学研究所電子線利用研究施設 (Laboratory for electron beam research and application: LEBRA) 所有の装置である。使用を快諾してくれた LEBRA メンバーに、感謝申し上げます。本論文に関連して、開示すべき利益相反はない。本研究は 2018 年度日本大学松戸歯学部口腔科学研究所共同研究費 (競争申請分) 研究実施責任者：岡田裕之を用いて行った。

文 献

- 1) Gotouda H, Nasu I, Kono T, et al.: Erosion by an acidic soft drink of human molar teeth assessed by X-ray diffraction analysis. *J Hard Tissue Biol*, 26: 81-86, 2017.
- 2) Kono T, Watanabe A, Kanno T, et al.: Second order differentiation analysis of micro FTIR method revealed the variable erosion characteristics of carbonated soft drink for the individual human teeth enamel. *J Hard Tissue Biol*, 29: 7-12, 2019.
- 3) Brudevold F, Soremark R: Chemistry of the mineral phase of enamel; *in* Teeth (Miles AEW ed), 247-277, Academic Press, New York, 1967.
- 4) Frank RM, Nalbandian J: Development of dentine and pulp; *in* Teeth (Berkovitz BKB, et al. ed) , 73-171, Springer-Verlag, Berlin and Heidelberg, 2012.
- 5) Sakae T, Nakada H, LeGeros JP: Historical review of biological apatite crystallography, *J Hard Tissue Biol*, 24: 111-122, 2015.
- 6) Sakae T: Variations in dental enamel crystallites and micro-structure, *J Oral Biosci*, 48: 85-93, 2006.
- 7) Carvalho TS, Baumann T, Lussi A: Does erosion progress differently on teeth already presenting clinical signs of erosive tooth wear than on sound teeth? An in vitro pilot trial, *BMC Oral Health*, 17: 14, 2016.
- 8) LeGeros RZ: Chemical and crystallographic events in the caries process, *J Dent Res Spec*, 69: 567-574, 1990.
- 9) Shellis RP, Hallsworth AS: The use of scanning electron microscopy in studying enamel caries, 1th ed, 1109-1123, Scanning Microsc, 1987.
- 10) Robinson C, Shore RC, Brookes SJ, et al.: The chemistry of enamel caries, *Crit Rev Oral Biol Med*, 11: 481-495, 2000.
- 11) Anatoly AK, Anna YE, Natalia SM: Age-related differences of tooth enamel morphochemistry in health and dental caries, *The EPMA Journal*, doi: 10.1186/s.13167-014-0025-8, 2015.
- 12) Gruner JW, McConnell D, Armstrong WD: The relationship between crystal structure and chemical composition of enamel and dentin, *J Biol Chem* 12: 771-781, 1937.
- 13) Elliott JC: Calcium phosphate biominerals; *in* Phosphates (Kohn MJ, et al. ed), Vol. 48, 427-453, Mineralogical Society, America, 2002.
- 14) Lowenstam HA, Weiner S; *On Biomineralization*, 1-324, Oxford University Press, New York, 1989.
- 15) Addadi L, Raz S, Weiner S: Taking advantage of disorder: amorphous calcium carbonate and its roles in biomineralization, 12th ed, 959-970, *Adv Materials*, 2003.