原 著

弗化第一錫溶液処理エナメル質における 錫の組織化学的検出法

第1報 歯牙エナメル質に応用した“岡本・Gallein法”の評価

石 井 俊 文 * 吉 田 茂 *
小 谷 大 発 * 鈴 木 鍾 美 **

I. 緒 言

齲蝕予防剤としての弗化第一錫の優秀性は、Muhler等を始めとする数多くの研究^{1)~4)}によって指摘されている。しかし、その予防機序または作用機序についてはまだ残された問題も少なくない。

過去における著者らの弗化第一錫に関する一連の実験⁵⁾もこうした機構の解明に努力の大半が向けられていた。

その一環として、著者らは錫に注目し、弗化第一錫処理エナメル質中における錫を組織化学的に染色し、その付着浸透状態を顕微組織的に観察することを計画した。これは、エナメル質中の錫に関する知見が、Brudevold等^{6)~7)}による化学的分析結果のみで、組織構造との関連の基に観察された成績がないためでもある。

従って、著者らの計画には、まず弗化第一錫処理エナメル質中における錫を組織化学的に染色することが必要であった。しかし、現在のところ、エナメル質の如き硬組織中の錫に関する組織化学的方法是報告されていない。

一般的に物質中における錫の検出法としては、大きく二つに分けることができる。一つはSpot-test⁸⁾としてのCacotheline, Ammonium Phos-

phomolybdate, Dithiol等による方法であり、他の一つが岡本⁹⁾によって報告されている軟組織を対象とした硫化水素及びGalleinによる組織化学的検出法である。

そこで、著者等の実験は、この岡本による組織検出法がエナメル質にも応用し得るか否かを検討することに始まり、その上で必要かつ可能であれば改良を加え、新たにエナメル質に応用し得る錫検出法を確立することにあつた。

実験もこうした経過に従って進められたが、観察成績が多岐にわたるので以下1報、2報として報告する。

II. 実験材料及び方法

1. 使用歯牙

本実験に使用した歯牙は、都内の病院及び歯科医院に依頼し集収したものである。歯牙は、抜去後一歯毎に、70%アルコール浸潤綿花とガラスフアイバーを重層した小試験管内に入れて、集収した。

表1 使用歯牙数及び切片数

	歯 牙 数	切 片 数
10~19	7	7
20~29	21	23
30~39	25	27
40~49	9	9
計	62	66

* 国立予防衛生研究所歯科衛生部
(部長：大西栄蔵博士)

** 東京歯科大学病理学教室 (教授：松宮誠一博士)

使用本数は表1に示すごとく62本であり、年令層は20歳代及び30歳代の歯牙が多い。観察した切片枚数は66枚である。

2. 歯牙の前準備

集収後の歯牙はただちに清掃し、再び一歯毎に集収時と同様の新しい小試験管内に密栓した後、使用時迄氷室保存とした。

歯牙の清掃は、人工的損傷をさけ、かつ清掃の完全を期するため、ルーペにて観察しつつスクレーパー及びエンジン・ブラシを用いて実施した。この際、歯石歯垢の附着状態・亀裂・齲蝕度及び色調・滑沢度等を記録した。

なお、歯牙は出来得る限り新鮮な状態で実験に供した。

3. SnF_2 溶液の処理

歯牙は、根端部から作用溶液が浸潤するのを防ぐため、根端部をwaxで被覆した後、対照側とした半側の根部に切痕を入れて切片観察時の目印とした。対照には、実験歯の半側すなわち臼歯では近心側または遠心側、前歯では唇側または舌側をあてることとした。

次いで、シャーレ状のポリエチレン容器中对照側を上にして歯牙をはほぼ水平に懸垂し、下部半側が浸漬するまで、 SnF_2 溶液をホールピペットにて徐々に静かに注入し作用させた。

使用したポリエチレン容器の大きさは底面の直径約4.5cm、深さ約3cmであるが、これは SnF_2 溶液約25ml乃至30mlで歯牙の半側を処理することができ、かつ操作も容易なためである。

一定時間作用させた後、再びホールピペットで注意深く SnF_2 溶液を除去し、純水で軽く対照面より水洗し、染色に移った。

この間、歯牙には直接手指で触れないようにし、またガーゼ上の操作も常に新鮮な箇所でおこなうように注意した。

使用試薬は弗化第一錫（森田化学）である。

4. 染色操作

SnF_2 処理後の歯牙は、根端部をwaxで被覆し

たまま、50ccの染色液中に歯冠部がほぼ浸漬されるまで懸垂し、所要条件下で染色した。なお一部の実験歯は、研磨切片作製後染色したが、この場合も前記同様懸垂して染色した。染色液の交換は隔日毎におこなった。

使用した Gallein (phenyl trioxyfluoran-o-carbon acid, $\text{C}_{20}\text{H}_{12}\text{O}_7$) は東京化成、特級である。

III. 観察成績及び考察

1. 硫化水素法（以下 H_2S 法）

H_2S 法は、金属との有色硫化物の形成を原理としており、錫の場合、第一錫塩と第二錫塩とで呈する色調に差異が生ずる。前者は黒褐色沈澱物を、後者は黄色沈澱物を形成する。

岡本⁹⁾は、第二塩の場合に生ずる黄色の色調が顕微鏡下で容易に認め難い点を述べ、組織切片中の錫化合物の証明に際しては、還元剤を用いて、第一塩の形とし、黒色反応を生ぜしめることを推奨している。

実際に、この H_2S 法を SnF_2 処理歯牙中の錫証明に応用すると、Sn付着部位は一部黒褐色に、一部黄色に呈色するのが認められた。

しかし、歯質、特にエナメル質の顕微鏡観察には、その微細構造を観察するために、高倍率とし、強い絞りを用いて、斜光照明として行われる場合が多く、かつ位相差顕微鏡の使用頻度も高い。かかる条件下では、黄色は勿論、黒褐色の色調をもそれぞれ識別することは甚だ困難となり、かつ齲蝕または着色部位等の種々なる Pigmentation の存在下では、より一層識別が困難であった。

こうした観察上の理由から、この H_2S 法はエナメル質中の錫検出のためには不適当であると考えられた。

しかし、本法は、前述の通り、第一錫塩と第二錫塩とで呈色色調が異なるという特徴を有しており、特殊な実験目的のためには利用価値が大きいとおもわれる。特に、 H_2S がgas状でも使用し得るということは、実験技法の上で興味あることであらう。

2. Gallein 法

本法の原法に示された染色条件の要約は、次の如きものである。

すなわち染色液は、Galleinの0.1%無水アルコール溶液約1ccに、pH2～4の稀塩酸水溶液50ccを加えた溶液として、室温で2乃至3日間染色す

る。(ただし24時間では反応不充分であるという。)この際、Gallein・錫の陽性反応の色調は赤色である。

このように Gallein 錫の反応色調が赤色であるため、H₂S法染色に際して観察された鏡検上の欠点は認められなかった。

表 2 染色時の温度影響に関する検討

濃度	期間	室 温										37℃											
		例数	作 用 側				非 作 用 側				脱 灰 所 見		例数	作 用 側				非 作 用 側				脱 灰 所 見	
			1度	2度	3度	4度	1度	2度	3度	4度	強度	着色		1度	2度	3度	4度	1度	2度	3度	4度	強度	着色
0.1 %	3 日	1	+	+	+						±	±	1		+	+						±	±
		2			±	±						±	—	2	±			±				+	±
		3			+	+						±	±										
	7 日	1				+					+	+	1	±	±	+						±	+
2					±	+					±	+	2			+					±	+	
1 %	5 日	1			±	±					+	+	1			+						+	+
		2	±			+						±	+	2			+	±				±	±
	7 日	1				+					±	±	1		±	+	±					±	±
		2				+					+	+	2			+						±	±

反応色調（—）は記入しない。

表 3 染色期間と濃度に関する検討

濃度 期間	0.1 %											1 %												
	例 数	作 用 側				非 作 用 側				脱 灰 所 見			例 数	作 用 側				非 作 用 側				脱 灰 所 見		
		1度	2度	3度	4度	1度	2度	3度	4度	強度	着色	1度		2度	3度	4度	1度	2度	3度	4度	強度	着色		
1 日												1	+	±	±						±	—		
												2		+	+						±	±		
												3	+		±						±	—		
3 日	1	±		+						+	±	1		±	+					+	+			
	2	±	±	±						±	—	2	+	+	±					+	+			
												3			+					±	±			
5 日	1	+	+	±	±					+	+	1		±	+	±				+	+			
	2	±		+						+	±	2			+					+	±			
	3			+						+	±	3			+					+	+			
												4			±					+	+			
												5			+	±				±	±			
7 日	1			+						±	+	1			+	+				±	±			
	2			+	±					±	±	2		±	+	±				±	±			
	3	±		+						+	+	3			+					+	±			
10 日	1			+						±	+	1		±	+	±				±	±			
	2		+	+	+					±	±	2			+					±	±			

反応色調（—）は記入していない。

そこで本法について、さらに検討を加えることとした。すなわち、これら軟組織を対象とした染色条件を、エナメル質に応用する染色方法として確立するために、染色条件から改めて検討した。

染色条件を検討するに際して改変し得る条件は、温度・濃度及び期間の3点である。理論的にはこれら三者の様々な条件の数多くの組合せが存在するわけであり、実際にもかなり広範囲の検討を試みたわけであるが、それらの一つ一つの検討は徒らに冗長煩雑を招くだけであろう。さらに SnF_2 作用条件が加味されると一層複雑となる。従って条件決定の整理のためにも成績は次の諸点にとどめることとした。

すなわち、

(1) Gallein 濃度 0.1% と 1% の場合を比較し、
(2) 室温及び 37°C 中との両者について温度処理の効果を検討し、さらに (3) 染色期間を 3 日、5 日、7 日、10 日 (1% の場合 1 日染色を含む) として、濃度・温度および期間の関係を総括的に検討した。

また、 SnF_2 処理条件は、4% SnF_2 溶液を 20 分間作用させた標本に統一した。

観察に当っては、まず染色された色調によって各条件による効果を検討したわけであるが、エナメル質表層における Gallein の反応呈色部位が散在的に存在するため、これら部分的な反応色調の個々について、次のような観察基準をもうけることとした。

- 1 度：薄桃色または薄橙色を呈し、染色不足と考えられる。
- 2 度：茶褐色を呈する。なおまた僅かに紫味を呈する場合もあり、本来の Gallein 錫の反応陽性色調と異なる。
- 3 度：赤色。Gallein 錫の陽性反応を示す。
- 4 度：黒赤色。Gallein 錫の色調に、Gallein または他の Pigment が強度に重層されるためと考えられる。

さらにこれら呈色部位を検出頻度の多少に従って、(+), (±) 及び (-) として判定した。例え小部分といえども 1 箇所でも該当色調を呈する部位があれば、切片として (-) の判定はおこな

わなかった。

これらの基準を基として、成績を要約したのが表 2、表 3 である。なお表中の脱灰所見については後述する。

表 2 のうち、Gallein 濃度 0.1% で室温にて 3 日間染色した標本例が、前述した“岡本 Gallein 法”の原法に準じたものである。観察結果は、表中の成績でも示した如く、錫 Gallein の赤色反応以外に、薄ピンク、薄紫または橙色味を帯びる部位が散見され、染色状態としてかなり不安定な所見を示した。これは原法に示された染色条件が軟組織を対象としているため、エナメル質中の Sn 染色に対しては不十分なためであろうと考えられた。

すなわち、エナメル質において安定した染色所見を得るためには、染色条件を増強させる必要が示唆されたといえよう。その意味で温度効果の影響を検討し、それらの成績を要約したのが表 2 であり、また染色期間を主として検討した成績が表 3 である。

表 2 から温度効果を検討すると、0.1%、1% 共に染色期間の比較的長い場合には、温度差による染色の影響は殆んど認められなかった。しかし短期間の場合、特に 0.1% 3 日染色においては、37°C の方が染色色調は比較的安定した所見を示した。すなわち呈色色調の安定性を期するためには、37°C 中における染色の方がより効果的であろうと思われた。

対照側においては、いずれも呈色 (-) であった。

表 3 について主に染色期間の影響を検討すると、0.1%、1% 共に 3 日染色以前においては不安定な染色所見が観察された。5 日染色においては、0.1% 濃度の場合はやや安定性を欠く染色所見を示したが、1% においては殆んど観察上の支障はなく、7 日染色以上においては、両者共安定した染色色調を示した。

これらの観察結果から考察すると、安定した染色状態を得るためには、染色条件の増強が望ましく、従って、①濃度は 1%、② 37°C 中において、③ 5 日間以上の染色期間という条件が一応選定さ

〔写真 1〕

〔写真 2〕

〔写真 3〕

- 〔写真 1〕 19. 8. 8. $\times 150$
 1% Gallein · etOH · 1 + dil HCl 50, 37°C,
 5日染色
 A. 錫・Galleinの陽性反応部(赤色)
 B. 脱灰部におけるGalleinの着色(黄褐色)
- 〔写真 2〕 19. 8. 8. $\times 150$
 写真1の対照側
 B. 脱灰部におけるGalleinの着色(茶褐色)
- 〔写真 3〕 24. 8. 8. $\times 150$
 1% Gallein · etOH 1 + dil HCl 50, 37°C,
 7日染色
 A. 脱灰部におけるGalleinの着色(黄褐色)
 に、錫・Galleinの陽性反応部(赤色)が
 重層している。
 B. 脱灰部におけるGalleinの着色(黄褐色)

れた。

写真1は、安定した染色色調の認められた1%濃度、37°C中における5日間染色の標本例であり、写真2はその対照側である。また、写真3は、1%濃度37°C中における7日間染色例である。明らかに錫・Galleinの陽性反応と認められる赤色反応部位が観察される。

しかし、上記の如き染色色調の観察以外に特記すべき所見は、これらの標本においても観察されるように、部分的に生じた脱灰像所見であった。

この脱灰像は、比較的軽度と考えられるものから、実質欠損を伴うに至るものまで、脱灰強度にかなり差異が認められたので、その強度差に準じて次の如き基準をもうけて観察した。

一. 脱灰所見を認めず。

二. 稜柱構造及びベリチウス構造が鮮明となり、又透明層等が出現するが、実質欠損

の認められないもの。

十. Ⅱ. エナメル質に実質欠損の認められるもので、このうち特に実質欠損が比較的深層または広範囲に及んでいる場合をⅡとした。

これら基準に基く脱灰所見の成績も、各標本例毎に表中に記載してある。

この脱灰像は、写真例においても明らかな如く、対照側に比較的強く認められた。しかし、もし歯質の脱灰が一般的にpHの影響だけで生ずるとしたら、pH値の低い SnF_2 溶液でも脱灰がおこることが考えられる。しかも、もし SnF_2 で脱灰がおこるとしたら、 SnF_2 作用側においてもむしろ比較的強い脱灰が観察されなければならない。しかるに事実はこちらと反対であった。また、表3の成績が示す通り、染色期間の増強につれて脱灰が強く認められることから考えても、この脱灰は染

色時の pH によって生ずるものと解釈された。

5 日染色である写真例と、7 日染色例とを比較すれば、この脱灰差は明らかであろう。

さらに、多くの基礎的実験¹⁾⁵⁾によって立証されているように、 SnF_2 が優れた耐酸性効果を有しているとしたら、染色時の pH による脱灰が対照側に強く認められるのは当然であろう。

これらの観察所見を検討すると、本実験は SnF_2 の耐酸性効果をも推測し得る成績を提供しているともいえよう。しかしこれに関する検討は、本論文の目的から逸脱し、しかも徒らに観察内容を煩雑にする因ともなりかねないので、あえて割愛した。

また、これら脱灰像は、部位によって、黄褐色、茶褐色または黒褐色を呈しているので、その着色の強弱に応じて、一、±、+、# の段階に分けてその着色度を観察し記載した。

この着色は、写真にみられる如く、蝕蝕・脱灰等によって出現する着色とは明らかに異り、Gallein 色素が塩酸溶液中で呈色する黄褐色と一致したものであった。また、表 3 に示された如く、Gallein 濃度および染色期間の強弱に殆んど比例して着色の強弱が認められることから、Gallein 色素の沈着によって生ずる着色と考えられた。

この着色は、脱灰像所見の場合と同様、対照側において比較的強く認められたが、 SnF_2 処理側においても部分的に認められた。したがって、前述した染色色調の検討の際、これら着色部位における Gallein 錫の陽性反応の判定は、かなり複雑であった。Gallein 錫の赤色を、Gallein 色素による褐色様着色との関連の下に検討する必要があったからである。これが、前記観察基準において、1 度、2 度または 4 度という複雑な基準を設けた理由となっている。

すなわち、写真 3 にみられる如く、脱灰部位における Gallein の着色層に Gallein- 錫の陽性反応(赤色)が重層されると、外見上本来の Gallein 錫の色調を失うごとき部位が生じた。しかし、このような変色色調は、対照側または NaF 作用歯牙においては全く観察されなかった。このことから考えると、こうした部位は、染色色調としては

多少異っていても、そこには Gallein と錫が共存しているものと解釈してさしつかえないと思われる。

しかし一方、このような変色色調を示す部位の中には、染色不足による場合もあろうし、また——phthalein 系 pH 指示薬でもある Gallein が局在的な pH の変動によって影響され得るとすれば——染色時の塩酸脱灰による局所的な pH の変化や、また遊離化学的成分等が Sn と Gallein の発色に影響することも考えられ、現在のところこれら変色の理由を明確に指摘することはできない。従って、これら変色部位は、前記観察基準において、3 度(Gallein 錫の陽性反応; 赤色)以外の項目に各々包含させた。

これら観察上生じた疑問点は、殆んどの場合このような染色時の pH によって生じた脱灰部位と、またその部に沈着した Gallein 色素の着色によって、惹起されたものであった。

しかも、この観察上不利となる脱灰像は、前記写真でも明らかな如く、染色色調が一応良好と認められる 5 日間染色以上になると、エナメル質表層に部分的な実質欠損を伴うに至っている。

このような場合においては、 SnF_2 作用側における Sn 反応陽性部位が散在的であるという形態的根拠は極めて弱くなり、単に呈色色調の困難さを招く以上に、Sn のエナメル質表層における付着浸透状態を微細に観察し得ない結果を招いているわけである。

しかも、もし本実験で観察したごとく、Sn の付着浸透がエナメル質において散在的であるなら、Sn の作用機序は、歯牙表層の組織性状と密接な関連をもつことが推察され、染色時における歯質の脱灰は、その形態的表現を複雑化させるとともに、作用機序の正しい理解をさまたげるものと云えよう。

本実験の目的は、自然エナメル質表層における Sn の付着浸透状態を詳細に観察するための基礎的実験として計画されたものであった。従って、染色時における歯質の損傷は出来る限りさけなければならない、Gallein 染色に関する今後の研究は、染色時の pH の影響を検討する点に集約されると思われた。

IV. ま と め

SnF₂ 処理エナメル質中における Sn の検出に，“岡本・Gallein 法”が応用し得るか否かを検討した。

すなわち，試料には新鮮抜去歯牙62本を用い，種々なる染色条件下における Gallein 錫の呈色色調を顕微鏡下で観察し，適応染色条件の選定を試みたわけである。

その結果，Gallein 錫の陽性反応色調は赤色であるため鏡下の観察に適したものであったが，安定した染色状態を得るためには原法に示された条件をかなり増強させる必要が認められた。しかし，それにつれて染色時の pH の影響により脱灰が生じ，Sn の歯質における正確な付着浸透状態の観察をさまたげた。すなわち，Gallein 法を，このままエナメル質に应用することは不適当と認められる結果であった。

擲筆に際して，御指導，御校閲を忝うした歯科衛生部長・大西栄蔵博士，また御校閲を賜った上田喜一博士に深甚なる謝意を表します。

引 用 文 献

1. Muhler, J. C., Boyd, T. M., & Van Huysen. G.: Effect of Fluorides and Other Compounds on the Solubility of Enamel, Dentine and Tricalcium-phosphate in Dilute Acids. *J. Dent. Res.*, 29 : 182, 1950.
2. Muhler, J. C., Day, H. G.: Effects of Stannous Fluoride, Stannous Chloride and Sodium Fluoride on the Incidence of Dental Lesions in Rats Fed a Caries-Producing Diet. *J. Am. Dent. Assoc.*, 41 : 528, 1950.
3. Howell, C. L., Gish, C. W., Smiley, R. D., & Muhler, J. C.: Effect of Topically Applied Stannous Fluoride on Dental Caries Experience in Children. *J. Am. Dent. Assoc.*, 50 : 14, 1955.
4. McLaren, H. R., Brown, H. K.: A Study of the Use of a Topically Applied Stannous Fluoride Solution in the Prevention of Dental Caries. *Canad. J. Pub. Health*. 46 : 387, 1955.
5. 石井俊文，吉田茂，小谷大発：弗化第一錫の齲蝕予防効果に関する研究。I. 弗化第一錫および弗化ナトリウムのエナメル質粉末に対する影響。 *口衛誌*. 10 : 300, 昭35.
6. Brudevold, F., Steadman, L. T.: A Study of Tin in Enamel. *J. Dent. Res.*, 35 : 749, 1956.
7. Brudevold, F., Steadman, L. T., Gardner, D. E., Rowley, J., & Little, M. F.: Uptake of Tin and Fluoride by Intact Enamel. *J. Am. Dent. Assoc.* 53 : 159, 1956.
8. Feigl, F.: Spot tests in Inorganic Analysis., transt by Oesper, R. E. 107~112. Elsevier. AMSTERDAM. 1953.
9. 岡本耕造：錫の顕微化学的証明法，*体質学雑誌* 13 : 69. 昭19.
10. 内藤多喜夫：有機アンチモン錯塩の研究（第一報）Gallein とアンチモンとの錯塩並びに Gallein によるアンチモンの検出，*薬学誌*，58 : 690, 昭13.

STUDIES ON THE HISTOCHEMICAL STAINING FOR TIN IN DENTAL ENAMEL TREATED WITH STANNOUS FLUORIDE

REPORT 1, EVALUATION OF OKAMOTO'S HISTOCHEMICAL METHOD FOR DETECTION OF TIN IN APPLICATION TO DENTAL ENAMEL

BY

Toshibumi ISHII, Shigeru YOSHIDA, and Daihatsu KOTANI

Department of Dental Research (Chief. E. Ohnishi)

The National Institute of Health, Tokyo, Japan

Atsumi SUZUKI

Department of Pathology (Chief. S. Matsumiya)

Tokyo Dental College, Tokyo, Japan

For researching the anti-carious action of stannous fluoride, it seems to be one of the important problems to detect histochemically tin in dental enamel. However, the present knowledge on the location of tin in tissue is very poor, particularly in dental enamel; it has never been observed.

For the purpose to establish a stable and applicable histochemical method for tin in dental enamel, an attempt was made to apply the Okamoto's histochemical method with phenyl trioxo-fluoro-o-carbonic acid (gallein), which had been originally devised for soft tissues.

Freshly extracted teeth were employed in this experiment. A half dental crown was treated with stannous fluoride, while the other half was remained untreated as the control, and the whole crown was stained with gallein solution. After being stained, the ground sections were made and observe to estimate the staining states of tin in enamel under the microscope.

Gallein-tin reaction found on sections appeared red as expected, but the enamel surface was partially decalcified with the strong acidity of the staining solution. The grade of decalcification seemed to be parallel with the staining capacity which was increased by the elevation of temperature or the elongation of staining time. Moreover, in these attacked sites, the color changed to yellowish-brown like a caries lesion owing to the impregnation by gallein.

Owing to this drawback, it was difficult to differentiate clearly the color between gallein and gallein-tin; hence the distinct localization of tin in or on the intact enamel surface was not detected.

From these experiences, the authors were forced to devise a new staining method for tin applicable to dental enamel and other hard tissues.

The details of the new method will be reported in the next paper.