原 著

共焦点レーザ走査顕微鏡のエナメル質齲蝕への応用

田 中 淳 司 西 川 哲 成

大阪歯科大学口腔病理学講座（指導：田中昭男教授）

〔受付：平成7年7月17日，受理：平成7年10月2日〕

Application of confocal laser scanning microscopy to enamel caries

Junji Tanaka and Tetsunari Nishikawa

Department of Oral Pathology, Osaka Dental University

(Director : Prof Akio Tanaka)

5-31, Otemae 1-chome, Chuo-ku, Osaka 540, Japan

[Received on July 17, 1995 ; Accepted on October 2, 1995]

Key words : enamel/caries/confocal laser scanning microscopy

Abstract : To assess the usefulness of confocal laser scanning microscopy (CLSM) in the examination of enamel caries, we prepared ground sections of carious teeth, stained them with fuchsin, observed them with CLSM and then compared the results with light microscopy and contact microradiography findings. The following results were obtained : 1) Sound enamel could not be visualized using CLSM. 2) In enamel caries, a surface layer, the body of the lesion and a dark zone were observed, but a translucent zone was hardly observed with CLSM. 3) Subsurface decalcification, which was observed with CLSM, appeared as destruction of the enamel rods, slightly toward the dentin side from the surface layer. 4) In the areas adjoining the lesion, disruption at the center or the margin of enamel rods was seen. 5) Lesions were also present alongside enamel lamella-like structures that had formed in the enamel close to the dentin. These lesions had extended laterally, engulfing the center or the margin of enamel rods near the enamel lamella-like structures. The lesions were also enlarged in the dentin adjacent to the structure. However, these lesions were not observed by light microscopy or contact microradiography. In summary, observation of enamel caries by CLSM revealed that it can give the same sort of findings as conventional histological visualization. In addition, it may also be possible to obtain three-dimensional findings with CLSM that are difficult to observe by conventional means.

Therefore, we conclude that CLSM is useful for observing enamel caries.

抄録：Fuchsin 染色の齲蝕研磨標本を共焦点レーザ走査顕微鏡（CLSM）によって観察するとともに，光学顕微鏡および顕微エックス線写真の各所見を比較検討した。その結果，エナメル質齲蝕の表層部，病巣体部そして不透明層は CLSM で具視化できたが，健全エナメル質，透明層はほとんど観察できなかった。表層よりやや象牙質側で病巣体部がみられ，これに連続するエナメル小柱の中心部あるいは周辺部に病変が認められる所見があった。またエナメル葉様構造物に沿ってもエナメル小柱の中心部と周辺部に病変がみられ，この構造物と接す

る象牙質に病変が拡大していた。エナメル質齲蝕の CLSM による観察では、従来の組織像とほぼ同様の所見がみられ、さらに病巣部におけるエナメル小柱の病変の進行など、光学顕微鏡や顕微エックス線写真では具視化しにくい所見が断層像として得られ、しかもこれらが三次元的に観察できることから、齲蝕の観察には CLSM が有用であることが示唆される。

緒 言

共焦点レーザ走査顕微鏡 (confocal laser scanning microscopy, CLSM と略す) は分解能が高く、36 mm のフィルムサイズで理論上 2,000 倍までの拡大が可能とされ、通常の光学顕微鏡と電子顕微鏡の中間に位置している。このことは CLSM が光学顕微鏡あるいは電子顕微鏡の代役をするのではなく、この両者の像とは異なった情報を提供するであろうと考えられているため、生物学の分野でよく用いられるようになった¹⁻³⁾。齲蝕の観察は従来、非脱灰や脱灰標本を用いて光顕的あるいは電顕的に行われてきたが、エナメル質の有機質は 1% しかないため、脱灰標本として連続薄切切片を作ることは困難であり、三次元的な観察はほとんど行われていない。タンデム型の共焦点走査型反射顕微鏡が開発され硬組織の深部を非破壊的に観察することが可能となり、骨^{4,5)}、エナメル質^{5,6)}、象牙質齲蝕やエナメル質齲蝕^{6,7)}の断層像が得られた。さらに、近年通常の光源に代わってレーザを使用した CLSM が開発され、より鮮明な組織の断層像が得られるようになり、ウサギの脛骨⁸⁾、ウマの象牙質⁹⁾あるいはブラッシングによるエナメル質表面の磨耗症¹⁰⁾の観察が報告されている。しかも、コンピュータを併用することにより、三次元像の観察が容易に、そしてより詳細に得られるようになった^{11,12)}。Watson¹³⁾ は CLSM を用いて、エナメル質と充填物との境界の断層像を観察し、その有用性を報告している。齲蝕については、まだ CLSM による観察がほとんど行われていないため、従来の観察結果と相違があるか不明である。今回、われわれは CLSM のエナメル質齲蝕への応用をはかる目的で、fuchsin で染色したエナメル質齲蝕を観察し、さらに光学顕微鏡、顕微エックス線写真から得られた所見と比較、検討したので報告する。

実験材料および方法

肉眼的にエナメル質に齲蝕病巣が認められる抜去歯 30 本を砥石で厚さ約 200 μm の研磨標本とし、10 本は無染色のまま、20 本は 0.5% fuchsin 水溶液で 2 時間染色し、封入した。また、fuchsin で染色した研磨標本を超微

粒子フィルム (KODAK spectroscopic safety film type No. 649-0) に密着させ、その上から CABINET SOFT X-Ray APPARATUS (SOFRON SRO-M50, 綜研, 東京) で軟エックス線を 2 分間照射して顕微エックス線写真を得た¹⁴⁾。これらの標本を通常の光学顕微鏡で観察するとともに、CLSM (LSM-GB200, オリンパス, 東京) を用いて、切片の表層から 0.5~2 μm の間隔でそれぞれの断層像を観察し、コンピュータ (HEWLETT PACKARD, Vectra 386/25, USA) による画像処理によって、蛍光濃度勾配の解析像や三次元像を得た。なお、アルゴンレーザによる励起波長は 488 nm で、波長 535 nm と 590 nm のバリアーフィルターを用い、それぞれ CH1 (緑色) と CH2 (赤色) から入る情報を画面上に表現した。また、これらの画像は付属のカメラ (Avio film recorder FR-3000, 日本アビオニクス, 東京) で撮影した。

結 果

1. エナメル質齲蝕病巣の各層

1) Fuchsin 染色標本の光学顕微鏡所見

齲蝕はエナメル小柱の走行に沿って進行し、平滑面では外側に基底面を有する齲蝕円錐がみられた。これらの齲蝕病巣では外側から内側に向かって表層部、病巣体部、不透明層、透明層の各層が観察されたが、典型的な例は少なかった (Fig. 1A)。表層部では褐色の着色がみられるが、エナメル小柱の構造は保たれていることが多く、病巣体部では脱灰が進んで fuchsin による染色および黒褐色の着色ならびにエナメル小柱の破壊が認められた。不透明層では暗いエナメル小柱が観察され、透明層では明るいエナメル小柱がみられた。

2) 顕微エックス線写真所見

表層部および不透明層では弱いエックス線透過像が、また病巣体部では強い透過像が観察され、表層下脱灰の所見がみられた。また、透明層および健全なエナメル質はエックス線不透過像として観察された (Fig. 1B)。

3) CLSM 所見

健全エナメル質では CH1 フィルター (緑色) および CH2 フィルター (赤色) のいずれを用いても、蛍光を認めず黒色として観察された。一方、エナメル質齲蝕病巣は健全な部位と比較すると CH1 および CH2 でいずれ

Fig. 1

A : Enamel smooth surface caries. Several zones of caries, from outer surface to dentin, are observable. B : Contact microradiograph of the same area as in 1A. Radiolucent area can be seen in bodies of lesions. C : CLSM view of same area in 1A. Carious lesions are visualized well with CH2 ; dark zones are observed with either CH1 or CH2.

Fig. 2 CH2 fluorescence from subsurface decalcification was subjected to line-map processing by computer and divided into various colors, as shown here. Strong fluorescence of CH2 is observed in area of enamel slightly toward dentin from outer surface.

も明るく観察された。光学顕微鏡でみられた各層に関してはおよそ次の所見が多くみられた。表層部は CH2 で赤色の蛍光として、また一部は CH1 および CH2 で黄色の蛍光として、病巣体部の中心部は CH2 で赤色の蛍光として観察された。不透明層の病巣体部側では CH1 および CH2 の蛍光として認められ、その象牙質側では CH2 が強く CH1 による蛍光が減弱しているため赤色を呈していた。なお、透明層は CH1 および CH2 ともに蛍光が減弱していた (Fig. 1C)。齲蝕病巣での CH1 および CH2 で観察した組織像のうち、CH2 のみの蛍光染色の強さを桃色から赤、緑、青色までの色分けを行い画像解析を行うと、外側から象牙質側に向かって緑、赤色そして桃色と、外側よりやや象牙質側寄りに CH2 でのピークがあり、再び赤、緑、青色と色別できた。さらに、任意の線上の蛍光の強さをヒストグラムで表示すると、明らかにエナメル質の最外層および外側のやや象牙質側にそのピークを認め、象牙質側に向かって徐々に蛍光の強さを減じた (Fig. 2)。

2. 病巣部とエナメル小柱の観察

エナメル質齲蝕巣部では、ほぼ全域にわたって CH2 での蛍光が認められた。また、外層よりやや象牙質側において病巣体部の中心部でエナメル小柱が消失している部位では CH1 で観察されず CH2 のみの赤色の蛍光としてみられ、その周囲のエナメル小柱が残っている部位あるいは表層部では、CH1 でも蛍光が観察されるため黄色を呈していた。病巣体部よりやや外側にあるこのエナメル小柱は形や太さもまちまちで不規則であり、所々で

Fig. 3 CLSM view of enamel smooth surface caries. Carious lesions were stained with CH2; enamel rods that have undergone pathological changes are observed with CH1 as well as with CH2.

Fig. 4 Tomogram (2 μm intervals) of smooth surface caries. Upper left shows surface, disappearing enamel rods in enamel adjacent to dentin followed by deeper sections shows on upper right, lower left and lower right.

くびれており、小柱と小柱との間には直径約 $1\mu\text{m}$ の黒く見える隙が散在していた (Fig. 3)。CLSM によって齲蝕の同じ部位における厚さ $2\mu\text{m}$ 間隔の断層像 4 枚を求めると、病巣体部におけるエナメル小柱が標本の深部から表面に向かってその構造を失い、破壊されている様子が三次元的に観察できた (Fig. 4)。

不透明層から透明層にかけてのエナメル小柱は (Fig. 5A), LSCM では CH1 および CH2 で弱い蛍光としてみられた (Fig. 5B)。この部位を拡大して観察すると、エナメル小柱の中心部は CH1 および CH2 でほとんど観察

Fig. 5

A : Enamel smooth surface caries. From outer surface, surface zone, body of the lesion, dark zone and translucent zone are seen. B : CLSM view of same area as in 5A. Weak fluorescence of CH1 and CH2 are seen in dark zone and part of translucent zone.

されないのに対し、小柱の周辺部では強い蛍光が鍵穴状にみられ、この蛍光も病巣体部から離れるに従って弱くなった (Fig. 6A, B)。この部位をさらに拡大して観察すると、病巣体部から象牙質側に向かって、まずエナメル小柱の中心部および小柱の周辺部がともに CH1, CH2 で観察され、次に小柱周辺部とそれぞれのエナメル小柱中心部の病巣体部側で蛍光がみられた。さらに、その象牙質側ではエナメル小柱中心部の蛍光は消え、小柱周辺部に蛍光が規則正しくみられた。また、同じ部位における $2\mu\text{m}$ 間隔の断層像を求めると、病巣体部においてエナメル小柱中心部が標本の深部 (Fig. 7D) から表面 (Fig. 7A) にいくに従って破壊されていく様子が三次元的に観察できた。すなわち、標本の深部では小柱周辺部に、さらに病巣体部側のエナメル小柱では中心部にも蛍光がみられ、小柱の構造が確認できる (Fig. 7D) のに対し、その断層面より $2\mu\text{m}$ 表層 (Fig. 7C) ではエナメル小

Fig. 6

A : Close-up view of Figure 5B. Interprismatic substance is seen as keyhole shape in part of dark zone. B : CH2 view alone was processed and divided into various colors based on fluorescence intensity. Strong fluorescence is seen in interprismatic substance alongside body of lesion.

柱の中心部および周辺部が CH2 で強くみられ、一部のエナメル小柱の構造は不明瞭となり、さらに深層の断層面 (Fig. 7D) から $4\mu\text{m}$ (Fig. 7B) あるいは $6\mu\text{m}$ 表層 (Fig. 7A) では一部エナメル小柱は完全に消失し、この部位は CH1 および CH2 でも蛍光を認めることができなかった。

CLSM の CH2 で得られた情報による $0.5\mu\text{m}$ 間隔の 12 枚の断層像から三次元像を構築することができ、これを左右の眼で同時に観察することにより三次元像を結ぶ parallax (Fig. 8A), 赤と青の眼鏡を用いて三次元像を観察するカラー表示の stereo 像 (Fig. 8B), そしてビデオではアニメのように画像が回転し、三次元的に観察できる movie 像 (Fig. 9) で表示した。これらから病巣体の象牙質側のエナメル質でエナメル小柱中心部の破

Fig. 7

Tomogram ($2\mu\text{m}$ intervals) of Close-up view of Figure 6A. A shows surface and B shows deeper sections. Enamel rods have disappeared in bodies of the lesions ; the margin of enamel rods surrounding them shows strong fluorescence. Destruction of enamel rods extends from deep layers of specimens to surface.

Fig. 8

A : Parallax view from tomogram ($0.5\mu\text{m}$ intervals) of Figure 7. B : Stereo view from tomogram ($0.5\mu\text{m}$ intervals) of Figure 7.

Fig. 9 Movie views from tomogram ($0.5\ \mu\text{m}$ intervals) of Figure 7. Three of seven frames are shown here.

壊，およびそれに続く小柱周辺部への罹患状態が立体的に観察できた。

3. エナメル葉様構造物の観察

エナメル質の外側から象牙質側にかけてエナメル葉様構造物がみられるが，光学顕微鏡あるいは顕微エックス線写真で観察してもこの構造物の周辺には病巣はみられなかった (Fig. 10A, B)。しかし，この部位を CLSM で観察すると象牙質に近いエナメル質ではその構造物の周

Fig. 10

A : Enamel lamella-like structure is present from outside and reaching to dentin. B : Contact microradiograph of the same area as in 10A. Radiolucent area can not be seen without the enamel lamella-like structure. C : CLSM view of same area as in 10A. Strong fluorescence is seen in enamel lamella-like structure and in enamel close to dentin.

囲に CH1 および CH2 とともに強い蛍光を認めた (Fig. 10C)。この部位を拡大して観察すると，エナメル葉様構造物はエナメル小柱中心部を避け小柱周辺部を走行し，構造物周囲にあるエナメル小柱中心部では CH1 および

Fig. 11

A: Close-up view of same area in Figure 10B. Enamel lamella-like structure tends to worsen in the margin of enamel rods. B: Tomogram (2 μm intervals) of same area. Strong fluorescence can be seen in the center and margin of enamel rods surrounding enamel lamella-like structure.

CH2 の蛍光が観察された。とくにその構造物に近いエナメル質では小柱の周辺部よりエナメル小柱中心部において CH2 で強い蛍光がみられた。また、このエナメル小柱では、横紋状の縞模様が観察され、さらに小柱周辺部でも蛍光がみられた (Fig. 11A)。同部位における 2 μm 間隔の CH2 による断層像を求めると、深層から浅層にかけてエナメル葉様構造物およびその周囲のエナメル小柱中心部が変化を受けているのが観察された (Fig. 11B)。また、エナメル葉様構造物に接する象牙質でも CH1 および CH2 で強い蛍光がみられた (Fig. 12)。

4. 無染色標本の CLSM による観察

エナメル質の健全な部位は CH1 (緑色) および CH2 (赤色) とともに蛍光を認めなかった。また、齲蝕病巣部においては表層部および不透明層を中心に CH1 の蛍光を

Fig. 12 Fluorescence is seen in dentin adjacent to enamel lamella-like structure. As dentin possesses auto-fluorescent qualities, it is observed more brightly overall. E: enamel, D: dentin.

認めたが、CH2 の蛍光はほとんど観察されなかった (Fig. 13A~D)

考 察

CLSM の特徴の一つに共焦点がある。これは、光源から発生したレーザー光が標本に当たり、この標本の焦点平面からの反射光は 1 つのスポットに像が結ばれアパーチャーのピンホールを通過し、他方焦点以外の平面からの散乱、反射光はピンホールによって除去されることである¹⁵⁾。したがって、エナメル質齲蝕の標本をスライスすることなく任意の深さの平面像を観察でき、その観察平面の厚さは 0.1 μm である。すなわち、標本の表面を観察するのではなく、その深部を断層的に観察できるという特徴がある。そのため標本の厚さもさほど問題にならないし、標本に傷を加えたくない、例えば歯の化石にも応用できる¹⁶⁾。しかし、歯の表面に不規則な凹凸がある場合には鮮明な像を得ることが困難となる。したがって、標本の表面より深部を観察する場合であっても標本を平らに研磨することや、表面の牙粉を取り除くことが望ましい。観察できるのはレーザー光の透過する範囲までであり、エナメル質の場合 150 μm が限界である。また、CLSM GB-200 のレンズの作動距離は 100 μm であるので、断層像も厚さ 100 μm の範囲で得られる。

CLSM のもう一つの利点はコンピュータとの併用で、画像の解析あるいは立体像の再構築が可能なことである¹⁷⁾。画像解析では組織での任意の 2 点間の直線距離、組織中の蛍光強度の変化、そして任意に取り囲んだある組

Fig. 13

A : CLSM view of unstained ground section of carious enamel. B : Same area as in 13A, observed with CH1 and CH2. Carious lesions are visualized as green. C : same area as in 13A, observed with CH1 alone. Strong fluorescence can be seen. D : Same area as in 13A, observed with CH2 alone. The fluorescence hardly can be seen.

組織の面積が測定できる。立体像の表現方法としては parallax 像, movie 像および stereo 像がある。しかし, parallax 像では観察者の慣れが, stereo 像では赤色と青色のメガネが, そして movie 像ではビデオ装置がそれぞれ必要となる。この立体像では, ある標本の断面では独立してみえる組織や構造物の連続性や走行, あるいは目的とする物質が細胞内あるいは細胞外に存在するののかといった位置的關係を調べるのに有効である。

この CLSM の観察には, 標本から発生する蛍光が必要となる。もし, 蛍光が極めて弱い場合でも, レーザ源からの高エネルギーによって観察することが可能となる⁹⁾。観察したエナメル質はコラーゲン線維を含まないため, 自家蛍光がなく無染色のままでは CLSM による観察は困難である。今回用いた fuchsin は蛍光色素の一つであり, CLSM による観察では CH2 で蛍光を得ることができる。この fuchsin はプラークあるいは脱灰され

たエナメル質を染めるとの報告がある¹⁸⁾。本実験で未染色の齲蝕病巣を CLSM で観察した場合, CH2 では蛍光はほとんど認められないが, CH1 では強く確認できた。これは齲蝕によるエナメル質の無機質あるいは沈着した有機質の変化などの何らかの原因によって, 488 nm の励起波長を反射光として 535 nm 付近にまで長くしたが, 590 nm にまでは延長しなかったことになる。

エナメル質齲蝕病巣の層分けは光学顕微鏡, 偏光顕微鏡そして顕微エックス線写真などの観察所見に基づいて行われ, Darling¹⁹⁾ は 1) 透明層, 2) 不透明層, 3) 病巣体部そして 4) エナメル質表層部に分けている。この層分けは肉眼的に白斑病巣でよく観察され, また乳酸ゲルを用いたエナメル質の実験的初期齲蝕でも観察される²⁰⁾。

今回, CLSM 像ではこの層分けが複雑に混在し, 典型的なパターンは少数の症例にしか認められなかった。病

巢体部ではエナメル小柱の中心部および周辺部に破壊が認められ、それに連続するエナメル質でも小柱周辺部に病変が認められた。

酸でエッチングしたエナメル質横断標本を走査型電子顕微鏡で観察すると、小柱鞘は結晶配列の異なるエナメル小柱の頭部と尾部との間に存在し、盛り上がったように観察される²²⁻²⁴⁾。その理由として小柱鞘では有機質が多いので²⁵⁾、酸に対して抵抗性をもつためと考えられている^{22,26)}。一方、酸エッチング効果は結晶の方向によって異なり、エナメル質の表面に対して直角に結晶が配列しているエナメル小柱の頭部が溶けやすく、平行に配列している尾部が溶けにくいといった考えもある^{27,28)}。今回、エナメル小柱中心部（頭部）よりもその周辺部（尾部あるいは小柱鞘）が齲蝕に対し感受性の高いと思われる像、あるいは逆にエナメル小柱の周辺部よりもむしろ中心部に沿って病変が認められる像が観察され、これは石灰化の程度を表わす back-scattered electrons によって観察されたエナメル質齲蝕の組織像とほぼ一致する²⁹⁾。このことは小柱鞘で有機質の含有量が高いことから、細菌が産生する酸あるいは酵素に対し path-way としての役割を果たしたり、逆に脱灰に対し抵抗を示すとともに再石灰化に関与したとも考えられる。一方、酸による脱灰が結晶の方向によっても異なるため、病巣が同一エナメル小柱にある場合、病巣から遊離する有機酸が、結晶配列を横断するエナメル小柱中心部を早く溶解し、他方病巣がエナメル小柱の横にある場合、結晶配列を横断するエナメル小柱の周辺部で早く破壊されるのではないかと考えられる³⁰⁾。また今回、病巣体部に接するエナメル小柱の病巣側に CH2 による蛍光が偏って観察されたことから、小柱全体が一度に破壊されるのではなく、まず小柱の病巣体部側から部分的に変化を受けることが推察された。

エナメル質初期齲蝕の表層下脱灰では外層よりやや象牙質側でエナメル小柱の破壊消失がみられ、その外層では不規則ながらエナメル小柱の構造は認められる像が多かった。これは 1) 唾液に含まれるあるいは病巣体部から二次的に遊離されたリン酸カルシウムが表層部に沈着し、小柱構造が残った³¹⁾。2) エナメル質表層部の高い石灰化とフッ素の含有量³²⁾、そしてエナメル小皮やペリクルの存在による齲蝕抵抗性があること³³⁾などが考えられる。

今回、エナメル小柱と小柱との間に直径約 1 μm の小さな隙がみられた。Orams ら³⁴⁾は初期齲蝕の透過型電子顕微鏡所見でエナメル小柱と小柱との間の electron-lucent space の拡大と不規則な形、短くなった不定形の

結晶の増加と同時に多孔性を報告しており、CLSM で観察された隙がこれらと関係があるものと思われる。

CLSM では齲蝕はエナメル質に生じたエナメル葉様の構造物に沿っても象牙質側に進行し、とくに象牙質に近いエナメル質で病変はエナメル小柱の走行に対して垂直にすなわち側方に拡大されていた。しかしながら、ここに病変がみられるものの顕微エックス線写真では透過像は認められず、必ずしも脱灰しているとは思われない³⁵⁾。エナメル・象牙境より表層まで走る石灰化の悪い構造物としてエナメル葉がある。これは萌出前に生じたものもあるが、多くは萌出後に生じて増齡的に増加するエナメル質の有機質に富んだ構造物で²²⁾、歯冠の歯頸部寄りで多くみられ、横断標本でよく観察できる²⁶⁾。今回、CLSM ではエナメル葉様の構造物を中心に拡大するエナメル質とくにエナメル小柱の病変、あるいはこの構造物と接する象牙質にも齲蝕病巣がみられたことから、この構造物は抜歯後にできた人工産物ではなく、この構造物の形成後齲蝕病巣ができたものと推察される。しかし、今回観察されたその構造物はエナメル葉に似たものと思われるが、有機質の有無、そしてその走行からさらに確認する必要がある³⁶⁾。

細菌の産生する有機酸と酵素によるエナメル質の変化と抵抗、あるいはその石灰化の程度を理解するうえで、CLSM だけでこれを知ることは困難であり、光学顕微鏡、顕微エックス線写真、偏光顕微鏡あるいは電子顕微鏡などによる従来の観察法の一手段として、今後適切な蛍光染色液を検討するとともに、従来の観察法と対比した独自の CLSM 像を確立する必要がある。

結 論

エナメル質齲蝕を fuchsin で染色し、CLSM で観察するとともに光学顕微鏡、顕微エックス線写真の観察から、次の所見が多くみられた。1) エナメル質の健全部は CH1 および CH2 を用いて具視化することはできなかった。2) 高倍率の断層像が得られ、これらの断層像をコンピュータで処理することにより、エナメル質齲蝕の崩壊状態を三次元的に観察できた。3) 病巣の表層部では CH1 および CH2 の観察で不規則なエナメル小柱構造を呈した蛍光が、そして顕微エックス線写真ではエックス線不透過像としてそれぞれ観察された。4) 病巣体部の中心部では CH2 の蛍光が、顕微エックス線写真では透過像がそれぞれみられた。また、不透明層では CH1 と CH2 あるいは CH2 のみの蛍光で、透明層は CH1 および CH2 とともに減弱して観察された。病変の認められな

いエナメル質では CH1 および CH2 とともに蛍光は認められず、顕微エックス線写真では不透過像としてみられた。5) 病巣体部に連続するエナメル質でもエナメル小柱の中心部あるいは周辺部に病変が認められる所見があった。6) 表層下脱灰では表層よりやや象牙質側でエナメル小柱の中心部が破壊された。しかし、表層部では不規則なエナメル小柱がみられた。7) エナメル葉様構造物に沿っても象牙質に近いエナメル質で病変がみられ、この病変は光学顕微鏡および顕微エックス線写真ともに観察することができず、CLSM ではこの構造物の周囲のエナメル小柱中心部および小柱周辺部で側方に拡大されていた。また、その構造物と接する象牙質においても病変が拡大していた。

以上のことから、エナメル質齲蝕の CLSM による観察では、酸あるいは機械的な操作の加わっていない intact なエナメル質においても、従来の組織像とほぼ同様の所見がみられ、さらに病巣部におけるエナメル小柱の中心部あるいは周辺部の病変の進行、そしてエナメル葉様構造物とエナメル小柱の組織像など、光学顕微鏡では具視化しにくい所見が組織レベルでの断層像として得られ、しかもこれらが立体的に観察できることから、齲蝕の観察には CLSM が有用であることが示唆される。

本論文の要旨は第 440 回大阪歯科学会例会（平成 7 年 2 月 18 日、大阪）において発表した。

稿を終えるにあたり、終始ご懇篤なるご指導とご校閲を賜りました大阪歯科大学口腔病理学講座 田中昭男教授に深謝致しますとともに、口腔病理学講座の各位に感謝を表します。

文 献

- 1) Suzuki, T. and Horikawa, Y. : Development of a real-time scanning laser microscope for biological use. *Appl. Opt.* **25** : 4115~4121, 1986.
- 2) 加藤一夫, 村上 徹 : 共焦点レーザー走査顕微鏡, 全載標本の観察. *細胞* **23** : 76~80, 1991.
- 3) 杉田道夫, 天神美夫 : 共焦点レーザー顕微鏡 (CLSM) の細胞生物学への応用. *日本臨床* **51** : 1108~1113, 1993.
- 4) Boyde, A., Petran, M. and Hadravsky, M. : Tandem scanning reflected light microscopy of internal features in whole bone and tooth samples. *J. Microsc.* **132** : 1~7, 1983.
- 5) Benn, D.K. and Watson, T.F. : Correlation between film position, bite-wing shadows, clinical pitfalls, and the histologic size of approximal lesions. *Quintessence Int.* **20** : 131~141, 1989.
- 6) Howard, V., Reid, S., Baddeley, A. and Boyde, A. : Unbiased estimation of particle density in the tandem scanning reflected light microscope. *J. Microsc.* **138** : 203~212, 1985.
- 7) Boyde, A. : Applications of tandem scanning reflected light microscopy and three-dimensional imaging. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **483** : 428~439, 1986.
- 8) 大谷敬一, 安井みちよ, 小田敏弘, 青木和広, 小椋秀亮 : 共焦点レーザー走査顕微鏡を用いた硬組織の形態学的観察. *歯基礎誌* **34** : 339~349, 1992.
- 9) Kodaka, T., Debari, K. and Yamada, M. : Physicochemical and morphological studies of horse dentin. *J. Electron Microsc.* **40** : 385~391, 1991.
- 10) Kuroiwa, M., Kodaka, T. and Kuroiwa, M. : Microstructural changes of human enamel surfaces by brushing with and without dentifrice containing abrasive. *Caries Res.* **27** : 1~8, 1993.
- 11) Nakamura, O. and Kawata, S. : Three-dimensional transfer-function analysis of the tomographic capability of a confocal fluorescence microscope. *J. Opt. Soc. Am.* **A7** : 522~526, 1990.
- 12) Carlsson, K., Danielsson, P. E., Lenz, R., Liljeborg, A., Majlöf, L. and Åslund, N. : Three-dimensional microscopy using a confocal laser scanning microscope. *Opt. Lett.* **10** : 53~55, 1985.
- 13) Watson, T.F. : Applications of confocal scanning optical microscopy to dentistry. *Br. Dent. J.* **171** : 287~290, 1991.
- 14) Nakajima, K., Kawase, M., Onoda, Y. and Ide, Y. : A study of the internal structure of the Japanese mandible. *Bull. Tokyo Dent. Coll.* **33** : 205~213, 1992.
- 15) 高松哲郎, 藤田哲也 : レーザ顕微鏡 (CLSM) による計量細胞学. *日本臨床* **50** : 2542~2546, 1992.
- 16) Boyde, A. and Martin, L. : A non-destructive survey of prism packing patterns in primate enamels. In : *Tooth Enamel IV*. pp. 417~421, (edited by Fearnhead, R.W. and Suga, S.), Elsevier Science, Amsterdam, 1984.
- 17) Takamatsu, T. and Fujita, S. : Microscopic tomography by laser scanning microscopy and its three-dimensional reconstruction. *J. Microsc.* **149** : 167~174, 1988.
- 18) Fusayama, T. : Clinical guide for removing caries using a caries-detecting solution. *Quintessence int.* **19** : 397~401, 1988.
- 19) Darling, A.I. : Studies of the early lesion of

- enamel caries. *Br. Dent. J.* **105** : 119~135, 1958.
- 20) 川崎正行, 奥田綾子 : 実験的初期齲蝕病巣の層的構成—偏光顕微鏡および軟X線による観察—. *日大口腔科学* **16** : 16~26, 1990.
- 21) Soames, J. V. and Southam, J. C. : *Oral pathology*. 2nd edn., pp. 19~33, Oxford University Press, Oxford, 1993.
- 22) 相山誉夫, 今井倭武, 織田正豊, 北村博則, 鈴木和夫, 寺木良巳, 戸田善久, 東 義景 : 人体口腔組織図譜. (北村博則, 織田正豊編), 第4版, pp. 59~72, 医歯薬出版, 東京, 1993.
- 23) 桐野忠大, 一條 尚, 後藤仁敏, 小野 毅, 小沢幸重, 山下靖雄, 脇田 稔, 鈴木駿介 : ヒトエナメル質の構造に関する走査型電子顕微鏡的研究 1. エナメル小柱の形態ならびに小柱鞘と小柱間質について. *口病誌* **39** : 247~296, 1972.
- 24) Meckel, A. H., Griebstein, W. J. and Neal, R. J. : Structure of mature human dental enamel as observed by electron microscopy. *Arch. Oral Biol.* **10** : 775~783, 1965.
- 25) Uchida, T., Tanabe, T., Fukae, M., Shimizu, M., Yamada, M., Miake, K. and Kobayashi, S. : Immunohistochemical and immunohistochemical studies, using antisera against porcine 25 kDa amelogenin, 89 kDa enamelin and the 13~17 kDa nonamelogenins, on immature enamel of the pig and rat. *Histochemistry* **96** : 129~138, 1991.
- 26) Swancar, J. R. : Inheritance and development. In : *Oral histology*, (edited by Provenza, D. V. and Seibel, W.), pp. 243~263, Lea & Febiger, Philadelphia, 1986.
- 27) Silverstone, L. M., Saxton, C. A., Dogon, I. L. and Fejerskov, O. : Variation in the pattern of acid etching of human dental enamel examined by scanning electron microscopy. *Caries Res.* **9** : 373~387, 1975.
- 28) Ten Cate, A. R. : *Oral histology, development, structure, and function*. 4th edn. pp. 239~256, Mosby, St. Louis, 1994.
- 29) Pearce, E. I. F. and Nelson, D. G. A. : Microstructural features of carious human enamel imaged with back-scattered electrons. *J. Dent. Res.* **68** : 113~118, 1989.
- 30) Scott, D. B., Simmelink, J. W. and Nygaard, V. : Structural Aspects of dental caries. *J. Dent. Res.* **53 (suppl)** : 165~178, 1974.
- 31) 須賀昭一 : エナメル質齲蝕の初発と進行—脱灰とそれに逆行する諸現象—. *歯界展望* **59 (別冊)** : 51~80, 1982.
- 32) Koulourides, T., Phantumvanit, P., Munksgaard, E. C. and Housch, T. : An intraoral model used for studies of fluoride incorporation in enamel. *J. Oral Pathol.* **3** : 185~196, 1974.
- 33) Rowe, N. : *Oral pathology*. (edited by Regezi, J. A. and Sciubba, J.), 2nd edn. pp. 521~536, W. B. Saunders company, Philadelphia, 1993.
- 34) Orams, H. J., Phakey, P. P., Rachinger, W. A. and Zybert, J. J. : Ultrastructural changes in the translucent and dark zones of early enamel caries. *J. Oral Pathol.* **9** : 54~61, 1980.
- 35) 水橋哲夫, 須賀昭一 : 横断研磨片におけるエナメル質齲蝕変化のマイクログラフイーによる観察. *歯学* **78** : 283~312, 1990.
- 36) Ando, T. : Reexamination of cariogenesis in relation to the distribution of enamel lamellae on crowns of human teeth. *J. Nihon Univ. Sch. Dent.* **23** : 79~91, 1981.