弗素の歯牙に対する作用に就いての実験的研究 続報 象牙質変化に就いての電子顕微鏡的検索

窪 田 賢 三

北海道大学医学部薬理学教室（主任 真崎教授）

Studies of the Effect of Fluorine on Rabbit Dentin by Electron Microscopy

Kenzo Kubota

From the Department of Pharmacology, Faculty of Medicine,
Hokkaido University (Prof. T. Masaki)

As already reported, the intravenous injection of fluoride solution causes the formation of a characteristic dentin layer in rabbits. But it has been not found the definite mechanism on this and then the author investigated this question by electron microscopy.

Visible changes were recognized when the dentin was etched with weak acid, therefore the detailed structures of the normal and decalcified dentin has been able to proved in electron micrographs.

The fluorine dentin layer has been observated as the decreasing region of acid solubility under the light microscope but revealed nothing by electron microscope. It is believed this reason that the decalcified surface structure of dentin is not different from the normal structure. Namely it is not indicated the fluoride deposits in the dentin fluorine layer.

In future it is advisable to differentiate the crystalline composition of the fluorine layer and the normal layer by electron or X-ray diffraction.

緒 言

弗素化された歯牙硬組織が酸に対する溶解性を減少することは既に多くの実験報告¹⁻⁹⁾の指摘する処であり、その出現機序に関しては弗化カルシウム及び弗化磷酸カルシウム置換説が学者の一致した見解である。周知の如く弗素作用の研究は齲蝕予防と密接な関係にあるのでその原発部位となる琺瑯質のみに従来の実験は局限されて来た。従つて電子顕微鏡(以下電顕と略す)的観察に於ても殆んどの報告¹⁰⁾は琺瑯質表面構造の変化に関するもので象牙質に就いての弗素作用の研究は殆んど見当らない。

さきに岡田・三村¹¹⁾は家兎に弗素注射を行い歯牙硬組織に変質層板の出現することを報告して居るが、この方法に依れば確実に弗素化された部分と然らざる部分との比較検討が極めて容易であるからその形態学的差異を追究するには誠に好都合である。象牙質横断面を何等の処理も施さずにその儘光学顕微鏡(以下光顕と略す)的観察を行つても一様な微粒像を呈するだけで基質、象牙細管、成長線及び灰化条などの微細構造は見られないのであるが、反之、弱酸で処理した後に鏡検すれば脱灰度の差に依つて前記微細構造がかなり明瞭に現われて来る。この際あらかじめ弗素注射を行つ

た家兎に於ては、注射時刻に相当する象牙層板が歯髄腔を囲む同心状に極めて良好なコントラストを呈するので容易に他の層板と識別することが出来る(図1, 2参照)。之は弗素イオンの介入によつて象牙質組成に変化を来し耐酸性の強い石灰化層が形成される為であろうと考えるが、果して歯牙表面に弗素塗布を行つた場合と同様に弗化カルシウム或は弗化磷酸カルシウムの置換が行われて居るか否かに就いての確認はない。そこで斯る弗素変質層板の形態学的変化を電顕に依つて超倍率下に検討し象牙質に於ける弗素作用の一端を解明しようと試みた。

実験方法

実験動物には成熟家兎を使用し、観察のもつとも容易な下顎切歯象牙質の横断面を主として用いた。電顕試料の作成は全て methylmethacrylate-aluminium 2段レプリカ法¹²⁾に依ることとし、shadowing 投射角度はこの場合小なる方が好ましいので chrome を用いて5:1とした。なお電顕写真は微細像の検索を容易にする為反転していないので、従つて shadow 部は白く現われる。家兎を屠殺後、歯牙を抜去し、歯髄腔に対して直角に切断した断面を砥石で可及的に滑沢にする。研磨面は流水で洗滌した後充分に乾燥し、以下通法に従つて電顕試料を作成する。

1. 酸処理前の正常象牙質電顕像 対照となる可き正常象牙質に就いての電顕像は未だ明瞭にされて居ないので、正常家兎歯牙を用いて前記方法で観察を行つた。

2. 酸処理後の正常象牙質電顕像 正常象牙質の酸に依る脱灰像も爾後の実験には欠くことの出来ない対照であるから、正常家兎歯牙を横断、研磨した後、pH 4 の醋酸緩衝液中に 5 分間浸漬して表面を軽く脱灰したものに就いて前記方法に従つて試料を作成し電顕観察した。また実験 3 に於ける正常層板は之と同一条件のものとみて差支えないのでそれに就いても観察を進めた。

3. 弗素に依る象牙質変質層板の電顕像 弗素 0.5 mg/kg (弗化曹達を使用した) を 1 乃至 5 日

間隔に耳静脈内に注射し最終注射より 7 日以後に屠殺した家兎の歯牙を横断、研磨後、pH 4 の醋酸緩衝液中に 5 分間浸漬し、光顕下で明らかに弗素変質層板の出現したものに就いて前記方法で電顕試料を作成する。

電顕は北海道大学電顕研究室の JEM-4 型、HU 7 型、JEM-T 1 型及び北海道大学結核研究所電顕研究室の JEM-4 型を使用させて戴いた。

実験成績

1. 酸処理前の正常象牙質電顕像

象牙質断面は図 3 に見られる如く種々なる凹陥と微細な顆粒像から成つて居るが、全体的には均等質であつて緻密な粒子様構造を呈する。その他には光顕的に既知の組織像は殆んど認めないが、更に仔細な検討を重ねて居れば図 4 の如く V 字型乃至半円型凹陥部の存在を確認することが出来る。然も之等は互に組合わされて網状の連続像を形成して居り、その大きさは $0.2 \sim 0.5 \mu$ で粗密の度合及び形態は部位的にかなりの変異も見られるが、推察するに基質部に出現する集団化した灰化像であろうと考える。一方、研磨による scratch その他の二次的人工産物の出現することも屢々ある。

以上の像に就いては弗素注射家兎象牙質に於ても全く同様で、特徴にすき構造は認めることが出来なかつた。

2. 酸処理後の正常象牙質電顕像

石灰化の良い部分と不十分なる部分とでは酸による溶解度に差異がある訳であるが、弱酸処理の場合には表面構造を損傷せずに種々なる微細像を詳細に鑑別することが出来る。そこで正常に發育した象牙質断面を pH 4 の醋酸緩衝液で 5 分間処理した後の電顕像を酸処理前のそれに比較してみるに両者は全く相違した像として確認された。

図 5 に見る如く粗糙感が強くなり $0.01 \sim 0.03 \mu$ の大きさをもつ顆粒像が鮮明に出現する。之は恐らく象牙質の基本となる灰化粒子の脱灰像であろうと考える。他方、酸処理前に僅かに見られた凹陥部は灰化度の特に強い部分として容易に確認され、

然もその大きさは $0.2\sim 1.0\mu$ となつて酸処理前のそれに較べて拡大して来る。従つて網様構造は益々顕著となる。図6, 7は chrome shadowing を行つたものでかなり微細な脱灰像まで詳細に現われて居る。

以上の脱灰像は更に大きな集団を形成するが、図8, 9の如く特に強調された像として見られる場合と、殆んど確認出来ない場合とがあるのは、部位的特徴なのか或は横断方向の差異によるのか明確でない。図に見られる如く直径 5μ 前後の網様構造であり且つその内部に前記脱灰像を包含し周辺部には灰化点と思われる像があること等から推察するに、光顕写真(図2参照)に見られる Inter-globularnetz(球間網)であらうと考える。

然し乍ら象牙質脱灰面は必ずしも前記構造のみを呈するものではなく、部位に依つて或は試料の異なることに依つて様々な像が見られる。図10, 11の如く層状構造の累積と之に直角な象牙細管を思わせる構造から出来たものは、光顕的知識からすれば寧ろ理解し易い像の様である。

他方、有機質に富む象牙細管は基質中に多数見られる筈であるが本実験ではかなり発見が困難であつた。歯牙の断面部位に依つては必ずしも一定の形で出現するものではないが、図12, 13は略々横断されたと思われる象牙細管で $1\sim 2\mu$ の大きさのものである。之等の像は何れも Pease¹³⁾, Bernick et al.¹⁴⁾ 及び Kennedy et al.¹⁵⁾ の報告に類似して居る。図14は之を更に拡大したもので、40,000以上の倍率像に於ては前記化灰粒子の確認が極めて容易である。

更にまた象牙質石灰化に重要な因子となる膠原線維の観察にはもつとも関心を抱いて居たが、本実験方法では検索することが極めて困難であつた。Scott et al.¹⁶⁾ の行つた様に 0.1 N HCl 位の酸を使用して無機質を完全に溶解しなければその像は得られないだろう。Bernick et al.¹⁴⁾ も同様に10%硝酸を使つて観察して居る。図15は本実験中に得られた膠原線維と思われる像で、略々 1.5μ の等間隔に並列して居る。各線維の幅径は 0.05μ 前後を示し Scott et al. 及び Bernick

et al. の報告に一致する。

3. 弗素による象牙質変質層板の電顕像

歯牙象牙質断面を醋酸緩衝液で処理すれば光顕下では弗素注射日に相当する日週期層を容易に区別することが出来るのであるが、その構造を微細に検討することは困難である。そこで之を電顕下に観察して以下の如き成績を得た。

図16は3日間連日弗素注射を行つた場合で日週期状に変質層板が配列して居る。層板境界部に見られる線維像はこの部位が凹凸移行部に当るので、aluminium 膜が押し潰されて出来た皺であらうと推測される。

図17は chrome shadowing を行つたもので2日間隔に変質層板が見られる。図18は変質層板の部分を拡大したものである。正常層板は極めて複雑な様相を呈して居るのに反して変質層板は平滑であるから光顕下に見られる如く両者の脱灰度の差を識別出来る様にも思われるが、之を詳細に観察すれば正常層板の像は不規則な線維様像であつて aluminium 膜を平坦にする時に二次的産物として出来た皺であらうと考えることが出来る。他方、図19の如く寧ろ変質層板中に複雑な像の出現することもあることから推察すれば Scott et al.¹⁶⁾ の報告して居る種別不明の線維と考えるのが妥当の様に思われる。然しながら必ずしも常にこの様な像を呈するのではなく図20の如く正常層板の構造に殆んど差の無いのが寧ろ普通である。従つて光顕下で明瞭に鑑別出来る試料でも電顕像では鑑別困難な場合が屢々ある。前者は脱灰された組織量の差に依つて生じた凹凸を落下光線を利用して影を捕えたものであるが、後者は脱灰面の最表層に垂直方向の電子線を投影したものであるから層板全体の凹凸感は失われる訳である。要するに電顕像では脱灰した表面構造のみを観察して居ることになるので、その構造に差異がないとすれば両層板の鑑別は極めて困難となる。

他方また、図21に見られる如く変質層板中には之を直角に横切る管状構造を屢々認めるが、恐らく象牙細管の縦断像と考えて差支えないだろ

う。

更に図 22 の如く変質層板附近には直径 $2\sim4\mu$ の多角形様構成物の出現することが時々見られるが、之は試料作成中に出来た人工産物なのか或は弗素注射に因る石灰沈着の攪乱を意味するものかは断言の域でない。

弗素変質層板の電顕像は上述の如くであるが全体的にみて正常層板のそれと比較して差したる相違の無いことを知ることが出来た。

総括並びに考按

歯牙の電顕観察は Gerould¹⁷⁾ 及び Richard et al.¹⁷⁾ に依つて 10 数年前に開始され現在までには既にかんがりの業績が挙げられて居る¹³⁻²⁰⁾。従来行われた研究の大半は齲蝕病変に関するもの²¹⁻³⁴⁾と歯牙の弗素化に関するものに大別出来る。前者に就いては此処では論外とするが後者に就いての実験成果には極めて貴重な報告が多い。即ち Gerould²⁵⁾ は 4% 弗化曹達液中に 30 日間歯牙を浸漬すれば珪瑯質中に弗化カルシウムの沈着が出現することを電顕及び電子廻折法から確認し、Scott & Wyckoff²⁶⁾ は電顕的には 2% 弗化曹達液中 7 日間で弗化カルシウムの沈着を認めるが電子廻折では僅か 3 分の浸漬で確認可能であり、然も斯る沈着物は水洗を行えば容易に消失するものであると報告して居る。また Fischer et al.^{27,28)} は各種弗化物溶液の珪瑯質に対する作用を比較検討し、一般に酸性液の方が磷酸カルシウムから弗化カルシウムに変化し易いことを X 線及び電子廻折法から解明した。更に松宮等²⁹⁻³²⁾ は珪瑯質表面構造の詳細に就いて電顕的に検討を加え、Scott et al. の実験と同じく弗化物塗布に依つて弗化カルシウムの沈着物を再確認して居る。弗素を歯牙に作用させた場合歯質の耐酸性が強化されることは既に周知の事実であり、之に加えて上記諸実験を考察すればその成因となるのは歯牙組成の弗化カルシウム或は弗化磷酸カルシウム置換であることは確実と考えられる。

而して此の種実験は全て珪瑯質に関するもののみで象牙質に就いての報告は殆んどその例を見な

い。勿論珪瑯質と象牙質では成分に大きな差が無いので同一理論が成立する筈であるが、弗素の介入経路には明らかに差異があつて正常の場合には血行路を介してのみ象牙質に到達されるものである。家兎静脈内に弗素を注射すればその一部は速かに歯牙に移行し、その量が極めて微量であつても注射時に形成される象牙質に形成障害を与えること等に就いては窪田³³⁾ がさきに詳細な実験報告を行つて居る。然も弗素介入象牙質は耐酸性のかかなり強い層板であつて、恰も珪瑯質に於ける前記諸実験と類似の結果を得ることが出来た。そこで更に考察を進めて電顕的に之等の変化過程を追究するに、先ず光顕的には全く見られない正常象牙質断面の微細像が電顕的には明瞭に出現することを知り、更に弱酸処理を行うことに依つてその構造は一層明確に把握することが出来た。正常象牙質には $0.2\sim1.0\mu$ の灰化集団を見るが之は Pease¹³⁾ 及び Bernick et al.¹⁴⁾ が脱灰空胞として報告したものに相当すると思われる。然もその基体となる化灰粒子は $0.01\sim0.03\mu$ の顆粒像として確認された。象牙細管、膠原線維、球間網などの組織像は部位に依つて著明に出現するが、勿論既往の光顕像と較べて同一の様相は呈しない。

以上の正常象牙質電顕像を対照として弗素介入層板を検索するに、光顕下では極めて容易に鑑別出来たにも拘らず電顕下ではその発見すら困難であつた。時にはかなり鮮明な像として判別出来ることもあつてその場合には酸に依る脱灰度の軽微と思われる像を呈して居たが、全般的には本実験に使用した 4,000 倍乃至 40,000 倍電顕像に於ける脱灰面構造は正常層板のそれと比較して差異を認めなかつた。即ち前記諸報告にある様な弗化物沈着は変質層板中に出現して居ない。之は電顕倍率の過少に依るのか或は酸に依る脱灰面に於てはその判別が不可能のことなのか不明である。斯る疑問に就いては Scott & Wyckoff²⁶⁾ も同じ見解を指摘して居る。彼等は珪瑯質に於ける実験で酸処理後に弗素を作用させたものは弗化カルシウムの沈着を認めるが、この順序を逆にした場合には耐酸性の増大は見られるが前記沈着物は確認出来

ないと報告して居る。然し乍ら弗素変質層板の耐酸性が増大して居ることは光顕下に見られる脱灰量が正常層板に比較して極めて微量なことから確実なのであるから、その成因となる可きものは両層板の組成成分の変動にあることも又否定出来ない。本実験中に化灰粒子は $0.01\sim0.03\mu$ の像として確認されて居るが之は使用した電顕の解像限度内ではあつたが比較検討して成分の鑑別を行うには不充分であることから考えて、今後の研究に於ては寧ろX線乃至電子廻折法に依つて前記成分の判定を行うのが望ましいことであろうと思う。

結 論

1. 弗素静注によつて家兎象牙質に出現する変質層板の形態学的観察を電顕を用いて行つた。

2. 象牙質断面に就いての電顕像を検討するに弱酸処理後の脱灰面に於ては微細構造の観察も可能なることを知つたので、之に依つて正常象牙質電顕像の詳細を明らかにすることが出来た。

3. 弗素変質層板は耐酸性の特に強い部分として光顕的に確認されるが、之は脱灰量の差に依るもので表面構造の差異に関係はない。他方、電顕像では斯る層板の検出すら困難であつたが之は脱灰後の表面構造が正常層板のそれと殆んど差が無い所以であろう。要するに酸処理後の弗素介入象牙層板には従来報告された弗化物の沈着は認めることが出来ない。

4. 従つて斯る象牙層板の組成変化を追究するには電顕法に依るよりは廻折法を行うのが望ましいことである。

稿を終るに臨み終始御懇篤なる御指導と御校閲を賜つた恩師真崎教授に満腔の謝意を捧げ、電子顕微鏡使用に当り御便宜並びに御助言を賜つた電子顕微鏡研究室の方々に感謝する。

文 献

- 1) Volker, J. F. : Effect of fluorine on solubility of enamel and dentin, Proc. Soc. Exper. Biol. & Med. 42 : 725, 1939.
- 2) Volker, J. F. : Solubility of fluorosed enamel and dentin, Proc. Soc. Exper. Biol. &

Med. 43 : 643, 1940.

- 3) Muhler, J. C. et al. : Solubility of enamel protected by sodium fluoride and other compounds, J. D. Res. 26 : 119, 1947.
- 4) Zipkin, I. : Inhibitory effect of fluoride on teeth decalcification by citrate and lactate in vivo, J. D. Res. 28 : 151, 1949.
- 5) Manly, R. S. : Substances capable of decreasing the acid solubility of tooth enamel, J. D. Res. 28 : 160, 1949.
- 6) Rathje, W. : The formation of hydroxy-fluor apatite in tooth enamel under influence of drinking water containing fluoride, J. D. Res. 31 : 761, 1952.
- 7) Fischer, R. B. & Muhler, J. C. : Relationship between pH, age, and concentration of solutions of stannous fluoride and sodium fluoride in decreasing enamel solubility and affecting the uptake of fluorine, J. D. Res. 31 : 756, 1952.
- 8) Massler, M. : Effect of various fluoride salts in inhibiting acid action on intact enamel, J. D. Res. 32 : 628, Meeting No. 171, 1953.
- 9) Muhler, J. C. et al. : Studies on stannous fluoride and other fluoride in relation to the solubility of enamel in acid and the prevention of experimental dental caries, J. D. Res. 33 : 33, 1954.
- 10) Wyckoff, R. W. G. : Electron microscopy, London, 1949, p. 105.
- 11) 岡田正弘, 三村二 : 硬組織の生理及び薬理 (第28報), 日薬理誌. 48 : 199, 1952.
- 12) 笹川久吾 : 電子顕微鏡, 東京, 昭26, 182頁.
- 13) Pease, D. C. : Electron microscopy of sectioned teeth, Anat. Rec. 110 : 539, 1951.
- 14) Bernick, S. et al. : Electron microscopy of enamel and dentin, J. A. D. A. 45 : 689, 1952.
- 15) Kennedy, J. J. et al. : The ultramicroscopic structure of enamel and dentin, J. A. D. A. 46 : 423, 1953.
- 16) Scott, D. B. & Wyckoff, R. W. G. : Electron microscopy of human dentin, J. D. Res. 29 : 556, 1950.
- 17) Gerould, C. H. : Ultramicrostructures of the human tooth as revealed by the electron microscope, J. D. Res. 23 : 239, 1944.
- 18) Richard, A. C. & Thomassen, L. : Microstructure of tooth surfaces as revealed by the electron microscope, J. A. D. A. 31 : 772, 1944.

图1 (光顯)

图 4

图2 (光顯)

图 5

图 3

图 6

图 7

图 10

图 8

图 11

图 9

图 12

图 13

图 16

图 14

图 17

图 15

图 18

图 19

图 21

图 20

图 22

- 19) Scott, D. B. et al. : Studies of tooth surface structure by optical and electron microscopy, J. A. D. A. 39 : 275, 1949.
- 20) Albright, J. T. et al. : Demineralization and dehydration of dental tissues for electron microscopy, J. D. Res. 31 : 455, Meeting No. 64, 1952.
- 21) Scott, D. B. & Albright, J. T. : Electron microscopy of carious enamel and dentin, J. D. Res. 32 : 628, Meeting No. 120, 1953.
- 22) Bernick, S. et al. : Electron microscopy of carious dentin, J. D. Res. 33 : 20, 1954.
- 23) Lenz, H. : Elektronenmikroskopischer Nachweis der Dentinveränderungen durch Karies, Dtsch. Zahn-Mund-Kieferhkl. 22 : 24, 1955.
- 24) Helmcke, J. G. : Elektronenmikroskopische Strukturuntersuchungen an gesunden und kranken Zähnen, DDZ. 15 : 1461, 1955.
- 25) Gerould, C. H. : Electron microscope study of the mechanism of fluorine deposition in tooth, J. D. Res. 24 : 223, 1945.
- 26) Scott, D. B. & Wyckoff, R. W. G. : Studies of the action of sodium fluoride on human enamel by electron microscopy and electron diffraction, Pub. Health Rep. 65 : 43, 1950.
- 27) Fischer, R. B. & Muhler, J. C. : The effect of sodium fluoride upon the surface structure of powdered dental enamel, J. D. Res. 31 : 751, 1952.
- 28) Fischer, R. B. & Muhler, J. C. : Effects of several fluoride reagents on the surface structure of powdered dental enamel, J. D. Res. 33 : 50, 1954.
- 29) 松宮誠一, 田熊庄三郎, 土倉秀次: 歯牙齲蝕と其予防に関する電子顕微鏡的研究(1), 歯科学報 50 : 61, 91, 1950.
- 30) 松宮誠一, 他: 歯牙齲蝕と其予防に関する電子顕微鏡的研究(2), 歯科学報 52 : 121, 173, 1952.
- 31) 松宮誠一, 田熊庄三郎: 超薄切片による歯牙硬組織の電子顕微鏡像, 最新医学 9 : 1167, 1954.
- 32) Takuma, S. : The electron microscopy of the enamel surface of teeth under various abnormal conditions, J. D. Res. 34 : 152, 1955.
- 33) 窪田賢三, 弗素の歯牙に対する作用に就ての実験的研究, 口腔病学会雑誌 23 : 13, 1956.