紫外線吸収並びに蛍光測定から見た EDTA による硬組織脱灰過程の研究

鬼 久 保 博 昭

東京医科歯科大学歯学部保存学教室 (指導 檜垣教授)

東京医科歯科大学歯学部生化学教室 (指導 荒谷教授)

EDTA-Decalcifying Process of Hard Tissues Observed With Ultraviolet Absorption and Fluoro-metry

Hiroaki Onikubo

Department of Operative Dentistry (Prof. Rinzo Higaki),

Department of Biochemistry (Prof. Shimpei Araya),

Tokyo Medical and Dental University

The decalcifying process of the dental and osseo hard tissues was investigated in EDTA solution by the methods of ultraviolet absorption spectrum and fluoro-metry together with the determination of dissolved saccharide, and the following conclusions were obtained:

I. Ultraviolet absorption of EDTA solution

1. The ultraviolet absorption spectrum of EDTA-Na salt solution considerably varies with the degree of dissociation of the solution.

2. It has been already reported that the ultraviolet absorption of EDTA-Ca salt solution shifts to the shorter wave-lengths than that of EDTA-Na salt solution, but little attention has been paid to the findings that -Ca salt solution gives a higher absorption than -Na salt solution at longer wave lengths than 255 m μ .

3. The absorption curves of the mixed solution containing EDTA-Na salt and -Ca salt at various proportions at pH 4.5 show an isosbestic point, which means that these solutions are the two-component system.

4. Considerable variations are observed with the absorption of EDTA-Ca salt solution as pH varies, though it likely keeps an almost stable structure at pH 5-10.

II. Decalcifying process in EDTA solution observed with ultraviolet absorption

1. Decalcification of marble

The change in absorption illustrates that EDTA-Na salt solution mainly changes into -Ca salt solution as the decalcification proceeds. In this case, a curve showing the change in absorption at 250 m μ under the decalcifying process well agrees with the result obtained from the determination of Ca by the titration method.

2. Decalcification of dentin and bone

Differing from the above mentioned marble, dentin and bone give a steep increase of absorption at 270 m μ -300 m μ at the beginning, this absorption then markedly decreases for

a while and again gradually increases with a duration of the decalcification. It seems that such increase of absorption at the whole range of longer wave lengths than 270 m μ shows a simultaneous extraction of organic substances which gives absorption and also scattering at this range of wavelength.

3. Decalcification of enamel

The steep increase of absorption observed with dentin and bone at the very beginning of the decalcification is not so obvious in this case, and the absorption shows an only gradual increase at the whole range.

III. Fluoro-metry examined under the decalcification in EDTA solution

Fluoro-substance is considerably extracted at the beginning of decalcification of dentin, but this fluorescence becomes not observable for a while and then gradual dissolution of this substance seems to be proceeded again. This phenomenon is similar with the case of ultraviolet absorption.

IV. Determination of saccharide in EDTA decalcifying solution of dentin

This solution gives some reactions of saccharide. The determination of saccharide by the "Anthrone reaction" has shown that saccharide dissolves out considerably at the very beginning of decalcification, which followed by a decrease and again increase as observed with the afore-mentioned ultraviolet absorption and fluoro-metry.

緒 言

従来は酸でしか行えなかつた硬組織の脱灰が、EDTA (Ethylene diamine tetraacetic acid) によつて中性からアルカリ性でさえも行えるようになったことは、歯牙の研究などには大変都合なことである。

我々の生化学教室では、別到大森¹⁰⁾が報告しているように、歯牙粉末を EDTA 溶液で処理する時の様子から歯牙の構造に対する新しい知見を得ようと種々実験を重ねている。

私も、この脱灰過程を紫外線吸収の方面からしらべることが分担したが、その研究の為にはまず EDTA 自身の紫外線吸収像が明かにされていないなければならない。

従来、EDTA の紫外線吸収^{11,12)} については多少の報告もあるが、いずれも断片的で、例えば EDTA 溶液の pH 変化によつてその吸収がどのように変るか、又 Ca²⁺ や Mg²⁺ などとキレート

化合物をつくつた時にそれが Na 塩のようなものと較べてどう異なるか、というような問題は充分組織的にはしらべられていないようである。

殊にこれから我々が脱灰に用いる EDTA の試料については、その純度にも多少の疑問があるので、まずこの EDTA 試料自身の紫外線吸収をしらべてみようと考えた。

そしてその結果を基にして、EDTA による歯牙の脱灰過程をこの紫外線吸収から追求することを意図した。

即ち、歯牙の中では有機質と無機質が唯雑然と混在しているのではなく分子構造的に相互の間に何か特定の関係があることが想像されるが³⁾、そのような問題を研究する一つの方法として、EDTA による脱灰のような mild な条件下で脱灰と同時に溶け出てくる色々な有機物をつかまえてみようと考えた。そしてその手がかりとして、まず紫外線吸収をしらべてみようというわけである。

I EDTA の紫外線吸収

実験方法

本実験に用いた EDTA は第一化学の製品で、

本論文の要旨は昭和 31 年 5 月、口腔病学会例会にて報告した。

これらの解離の pk は

$$\text{pk}_1 = 1.996$$

$$\text{pk}_2 = 2.672$$

$$\text{pk}_3 = 6.161$$

$$\text{pk}_4 = 10.262$$

である。

ところで、このように分子の解離状態が変わつてくると、それに伴つて当然その紫外線吸収像も変化するとと思われる。

図2のA曲線に於て、 $\text{pk}_3 = 6.161$ 、 $\text{pk}_4 = 10.262$ に相当する pH のところを見ると大体そのカーブの変曲点に相当しているから、解離の状態に対応して吸収像が変化していることは確かであろうと思われる。

2) EDTA・Na 塩溶液と EDTA・Ca 塩溶液との吸収像の比較

EDTA の Na 塩は殆んど完全に解離しているのに対し、 Ca^{2+} は EDTA とキレート化合物を作るので、その紫外線吸収像も当然変つてくるだろうと思われる。

それを示したのが図3であり、いずれも0.05M 溶液について実験したものである。

この図から明かなように Ca^{2+} のキレート化合物は、酸性では約 $255\text{m}\mu$ 以上、アルカリ性では約 $270\text{m}\mu$ 以上の長波長では EDTA・Na 塩より吸収が大きいが、短波長では逆に EDTA・Na 塩の吸収より小さくなっている。

この吸収が小さくなっていることは、吸収が短波長にずれたことをも意味するわけであり、図1に見る EDTA の解離が抑制された場合の効果と

図3 EDTA・Na 塩と EDTA・Ca 塩の紫外線吸収像の比較

似た傾向のようにも思われる。

Martell⁸⁾らは、キレート化合物の形成によりその中の電子の運動は制限されるので、一般にキレート剤の吸収は短波長にずれ、しかも多くの金属イオンとのキレートをしらべてみると、その化合物の安定度が高い程、吸収はより強く短波長にずれるという。

このように EDTA のキレート化合物の紫外線吸収が EDTA 自身のそれより短波長にずれることは既に知られていることであるが、しかし図3に示されているように $255\text{m}\mu \sim 270\text{m}\mu$ 付近で Ca

塩と Na 塩の曲線が交叉して、それ以上の波長では Ca キレート化合物の吸収の方が大きくなるという点は今迄殆んど注目されていない事実である。

又 Ca 塩自身も pH によりその吸収は多少変化し、その変化の性質は Na 塩の場合とやゝ似ているように思われるが、この点については後に更に詳しく論ずる。

3) EDTA・Na 塩溶液と EDTA・Ca 塩溶液とを混合した場合の吸収

pH=4.5 の 0.05M EDTA・Na 塩溶液と 0.05M EDTA・Ca 塩溶液とを種々の割合に混合した場合の吸収像を図 4 に示す。

pH はすべて 4.5 である。

図 4 EDTA・Na 塩と Ca 塩の混合液の吸収像

ここにも、はつきりと曲線の交叉点所謂 Isobestic-point が示されており、これらの液が明かに 2 成分系から成ることを認めることが出来る。

4) EDTA・Ca 塩溶液の pH 変化

既に、図 3 で示されているように Ca 塩の吸収

も pH により変化するが、これを更に詳細にしらべたのが図 5 である。

即ち、同一濃度の 0.05M EDTA・Ca 塩溶液を pH=3.85 の酸性側より、アルカリ性側の pH=11.80 まで pH のみ変化させたものである。

図 5 EDTA・Ca 塩の pH による吸収の変化

この図を見ると、pH=3.85, pH=4.55, pH=7.31 の吸収曲線はそれぞれ異つてゐるが、それらは相互に交叉することなく pH の増加と共に吸収は全波長領域で小さくなり、その差異は連続的な変化のように見える。ところが pH 7.3 以上になると 250mμ 位以下では吸収が増大するが、255mμ 位以上では更に減少し、そのため吸収曲線は交叉するので pH 7 以下の変化とは非常に質の異つた変化がこゝに起つてゐるように見える。そして更に pH 10.5 以上になると今度は又吸収は全波長領域で減少してくる。この間の関係は図 2 の B 及び C 曲線に 245mμ と 265mμ の吸収の pH 変化として示してある。前に図 3 で Ca 塩の吸収の pH による変化は Na 塩のそれに似ているようだ

と記したのは、偶然 pH 4.5 と pH 10.5 の吸収のみを比較した為で、図 2 の A 及び B 曲線を比較してみても両者の変化にかなりの違いのあることは明かである。

元来 EDTA の Ca キレート化合物は大体 pH 5~10 位では安定な Ca Y'' 型の正規錯塩をつくるといわれており、その間の pH では滴定曲線にも特殊な所見は見られないのであるが、それにも拘らずその間の pH でこのように吸収曲線に大きな変化が起るということは、やはりそこで分子内構造の変化が生じていることを推察させる。

猶 pH 11.8 の吸収曲線が 10.5 以下のそれとは又異つた変化を示しているのは、この pH では Ca キレートが CaOH Y''' 型の塩基性錯塩を生じているためかもしれない。

小 括

我々は、EDTA による脱灰時に、同時に溶出する有機性物質を紫外線吸収からしらべたいと思い、その基礎的な研究として、EDTA 自身の紫外線吸収像をしらべた所、次のような結果を得た。

1) EDTA・Na 塩の紫外線吸収は 280m μ 附近から短波長にかけて急激に吸収が大きくなるが、pH が小さいと、即ち解離の程度が小さくなると吸収は短波長にずれる傾向がある。

又 265m μ に於ける吸光度を各 pH に対して plot した場合、 pk_3 , pk_4 の部を見ると大体このカーブの変曲点に相当しているので、解離の状態に対応して吸収像が変化することは確かであろうと思われる。

2) EDTA・Ca 塩の吸収は、255m μ 以上の長波長では EDTA 自身より吸収が大きく、短波長では逆に EDTA 自身の吸収より小さい。Ca 塩が EDTA 自身の吸収より短波長にずれることは従来も知られていたことであるが、255m μ 以上の波長では Ca 塩の吸収が Na 塩のそれより大きくなる点は、今迄注目されていない事実と思われる。

3) EDTA の Na 塩と Ca 塩を pH=4.5 で

種々の割合に混合した吸収曲線では Isosbestic-point が示され、これらの液が 2 成分系である事を明かに認める。

4) EDTA・Ca 塩は pH 5~10 位では、大体安定な構造をもつといわれるが、それにも拘らず吸収には pH によりかなりの変化が認められる。これはやはり分子内構造に変化が生じてそれが紫外線吸収に反映されて来るのだらうと想像される。

II 紫外線吸収より見た EDTA による脱灰過程 実験方法

硬組織の試料としては、人の Enamel 及び Dentin, 更に牛骨を用い、又対照としては大理石を用いた。人の歯牙は齲蝕のない抜去歯牙を用いた。

Enamel, Dentin, Cement の分離は、Manly 等の Flotation method^{5,6)} に我々の考案した方法を補促して行い、Enamel は純度 99% 以上、Dentin は純度 97% 以上のものを使用した。その詳細は当教室の大森の論文¹⁰⁾を参照されたい。

実験は、大理石、人の Enamel, Dentin 及び牛骨を 100~200 mesh の粉末として用い、その 50mg を EDTA の 4 Na 塩, M/200, 100ml の中に入れて (pH=10.2~10.3) magnetic-stirrer で攪拌しながら、2~3 分、5 分、10 分、20 分、30 分、60 分、90 分、120 分と一定時間毎に、その懸濁液をとり出し、直ちに glass filter で吸引濾過しその濾液について、時間的経過と共に EDTA と結合する Ca²⁺、或いは EDTA 溶液中に溶出する物質の状態を紫外線吸収により比較検討した。

紫外線吸収には、日立製作所の EPU-2 型光電分光光度計を使用した。

実験成績並びに考按

1) 大理石脱灰

第一に、Control として単純な組成をしている大理石の 100~200mesh の粉末 50mg を、EDTA・4 Na 塩, M/200 100ml (pH=10.2) 中で脱灰し、時間的経過と共に推移する紫外線吸収像の

変化を見た。これを図6に示す。

図6 大理石脱灰時の紫外線吸収像の変化

脱灰の進行と共に $270\text{m}\mu$ 以下の短波長の吸光度は低くなり、短波長にずれる傾向にある。 $275\text{m}\mu$ 以上の長波長では Control のカーブと交叉するが、Control に比しわずかに高くなるのみである。

これは、前述の EDTA 及び EDTA·Ca の紫外線吸収像からわかるように、脱灰の進行と共に EDTA·Na が主として EDTA·Ca 塩になることを反映している。この場合の pH の推移を見ると脱灰前 $\text{pH}=10.2$ より 120 分脱灰後 $\text{pH}=9.30$ までいくらか低下する傾向にあるが、一応 pH 変化による吸収像の変化を無視することにして、図5で見られるように pH 変化の少ない $250\text{m}\mu$ の吸収の変化から脱灰の時間的経過をグラフにしたのが

図7である。

図7の減少率の Control としては、 $\text{pH}=9.80$ の EDTA·Na 塩溶液の吸収曲線を用いた。

図7 $250\text{m}\mu$ に於ける吸光度の減少率及び Ca の直接測定値

しかもこの結果が同様の条件での脱灰過程を Ca^{2+} の直接測定でしらべた大森の実験結果¹⁰⁾とも図のようによく一致していることは、この場合の紫外線吸収像の変化が EDTA の Ca 塩形成によるだろうという上述の推定を裏書きしているものと思われる。

2) Dentin 脱灰

人の Dentin 100~200 mesh の粉末 50mg を EDTA·4 Na 塩, M/200, 100ml 中で大理石の場合と同様に脱灰し、時間的経過と共に推移する紫外線吸収像の変化を観察したところ、大理石の場合とは全く異つた吸収像の変化を見た。それを図8に示す。

これから明かなように、Dentin 粉末を EDTA で処理すると、5分位で $270\sim 300\text{m}\mu$ 位の吸収が一時急激に増大し、その後 20分位で急にこの吸収は減少し、更に時間がたつと再びいくらか吸収が増大するのである。

この変化を $280\text{m}\mu$ の吸収で示したのが図9で5分一度急に吸光度が増加し、10~20分位で再び減少し、以後は徐々に増大して行き、120分ではわずかに減少するという結果である。

図8 Dentin 脱灰時の紫外線吸収像の変化

図9 Dentin 脱灰
280mμ に於ける吸収 EDTA の値補正

この結果は非常に奇妙な現象で、もし脱灰により EDTA・Na 塩が EDTA・Ca 塩になるために吸収が変化するものとすれば、当然図6に見られるように 280mμ 以上では極めてわずかに吸収が増大するが、280mμ以下では寧ろ吸収は急激に減少すべき筈である。

しかるに、脱灰によりこのように 270mμ 位以上の全波長で吸収が増大してくることは、この際脱灰と同時に何か吸収を起すような有機物質が溶け出したと考えなければならない。

しかし、ここに見られる吸光度の増大は、真の吸収の増大によるものではなく、EDTA の脱灰に伴つてコロイド様の物質が溶け出し、それが一種の濁りとして光を散乱させる所謂 Tyndall 現象によるものではないかと想像もされる。

勿論、このコロイド様の濁りはこの場合、3000回転位の遠沈では除けないし、又1日乃至数日液を放置してもその紫外線吸収の値は殆んど変化しない。

又この場合、320~380mμ に於ける吸光度は、本来の吸収によるものでなく Tyndall の散乱によるものとして、Rayleigh の理論式

$$E_{\text{Tyndall}} = \kappa \lambda^{-n}$$

に実測値を代入して κ と n を求め、これによつて 320mμ 以下の波長に於ける値に対して散乱光を補正して真の吸光度を求めると図10の如くなる。

図10 Tyndall 光を補正した Dentin
脱灰時の吸収像

即ち、やはり脱灰の5~10分の吸光度は高い値を示しているから、脱灰初期に見られる吸光度の増大は一概にすべて Tyndall 現象によるとばかりはいいい難い。

然しいずれにしても、脱灰過程で一度溶け出した又は極く小さい粒子として懸濁してきたそのような有機物質が脱灰を続けると再び溶液中から消失してゆくということは大変奇妙な現象である。おそらく、不溶性の物質に吸着されるか、相互に会合して不溶性になるのであろうと想像される。

3) Enamel 及び牛骨脱灰

以上のように EDTA 脱灰の極く初期に液の紫外線吸収が急に増大し、それ以後、一時吸収が急

図 11 牛骨脱灰時の紫外線吸収像の変化

図 12 牛骨脱灰 280mμ に於ける吸収 EDTA の値補正

に減少し、後再び徐々に増加するという事実は、牛骨の粉末を用いた実験でも認められる。その例を図 11 及び図 12 に示す。

ところが、Enamel では少し様子が異つて、図 13 及び図 14 に見られるように脱灰の極く初期に見られる急激な吸収の増大は明かでなく、寧ろ徐々に吸収の増大が起つて行く。

図 13 Enamel 脱灰時の紫外線吸収像の変化

図 14 Enamel 脱灰
280mμ に於ける吸収 EDTA の値補正

骨や Dentin で見られた脱灰の極く初期に吸光度を増大させる物質と、それ以後に次第に出てくる物質とが、もし異なつた物質であれば、Enamel には Dentin や骨などに存在して極く初期に溶け

出す特殊な物質が存在していないのだろうと想像される。

III EDTA 脱灰時の蛍光測定

歯牙の中に種々な蛍光性の物質の存在することは既によく知られている事実^{3,4)}であるが、筆者は Dentin の EDTA 脱灰過程で蛍光を呈するものが溶け出ることを知つたので、これを観察した。

実験方法

純度 95.1 % の牛の Dentin 500 mg を M/100 EDTA・4 Na 溶液 (pH=10.2~10.3) 500ml 中に入れ、温度 $20^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ の水槽中にて magnetic stirrer で攪拌しながら、5分、10分、20分、30分、60分、90分、120分、完全脱灰と各時間を追つて随時 10ml のピペットにてその懸濁液を各時間毎に約 60 ml ずつ取り出し、直ちに 3 G・4 の glass filter にて濾過し蛍光測定にそなえた。完全脱灰液は 120 分脱灰濾液を抽出後氷室中に一昼夜放置し、翌日その脱灰濾液を氷室中に保存した。

上記の実験を計 9 回、即ち牛の Dentin 4.5g を M/100 EDTA・4 Na 溶液 4.5l にて脱灰を行い各時間毎の脱灰濾液 500ml ずつを集めた。これを減圧濃縮し、濃縮後 50ml のメスコルベンにて全量 50ml とした。

減圧濃縮の条件

常時 30°C を保ち乍ら行つた。最高温度 = 35°C 最低温度 = 28°C 。濃縮に要した時間 = 5 ~ 6 時間 (500ml に付き)、細心の注意の下に突沸を防いだ。

Control の EDTA についても、各脱灰液と全く同様の条件にて濃縮を行つた。

上述の如き各脱灰濃縮液及び EDTA 液を 3000 回転、20 分間遠沈し、3 G・4 の glass filter にて吸引濾過して多少存在している不溶性の物質を除去した後、蛍光測定を行つた。即ち波長幅 $5\text{m}\mu$ にて、波長 $380\text{m}\mu$ より $500\text{m}\mu$ までを追求した。

蛍光測定には、日立製作所の蛍光光度計を使用した。本装置は日立分光光電光度計に装着し、可視線を遮断して光源よりの主として $365\text{m}\mu$ の紫

外線照射により発した蛍光を、分光器を通して波長を追つて蛍光の分光輻射特性を測定し、又蛍光物質の定量分析を行うものである。

実験結果及び考按

実験結果は図 15 及び 16 に示されている。即ち

図 15 Dentin 脱灰液の蛍光測定

図 16 $440\text{m}\mu$ に於ける各脱灰液の蛍光 EDTA の値補正

縦軸には分光器を通して得た蛍光の強さを指示器の振れて読み、横軸に波長を plot すれば試料の分光輻射特性が求められる。(但しこの場合光電管の分光感度は補正されていない)。

図15でも見られるように、EDTA も或程度の蛍光を示しているが、EDTA の脱灰によつてそれに新たな蛍光が加わつてくるように見える。EDTA・Na 塩が Ca 塩に変化してもその蛍光は殆んど変らないことを別に確めているから、図15に見られる蛍光の増大は、やはり脱灰過程中何らかの蛍光性物質が溶け出していることを推知させる。しかも面白いことは図16にはつきり示されているように、脱灰5分で一度蛍光性の物質がかなり溶け出後、10分になるとその存在が一度認められなくなり、更にその後は又徐々に蛍光性の物質が溶けて出てくるように見えることで、このことは紫外線吸収の場合と似ている。

但し、実験条件が異つているので定量的に比較することは出来ないし、おそらくは定量的に比較しても必ずしも一致しないかもしれないが、しかし同様の傾向である。

即ち、紫外線吸収を増大させるものが単一の物質で、それが直ちに蛍光を呈するものだという事ではないかもしれないが、両者の間には何か関係のあることは確かであろう。

IV EDTA による Dentin 脱灰液中の糖質の定量

以上の如く、Dentin、骨などでは EDTA 脱灰の極く初期に紫外線を吸収し、且つ蛍光を放つ物質が溶出し、その後それが一度減少してから再び新しくこの液中の紫外線吸収性及び蛍光性が徐々に増大する。

この場合、一体どのような物質が溶け出てくるのかという問題の解決は今後にゆずるとして、その手がかりにもなろうと思われる一つの実験を附記する。

即ち、この脱灰液は糖質の反応を比較的はつきり呈し、Elson-Morgan のアミノ糖の反応も陽性であり、Bial 試薬による Orcin-HCl 反応では緑色乃至黄褐色を呈する。

又 Anthron とも反応して緑色を呈するので、こゝではこれを定量的に測定²⁾してみた。

実験方法

試料としては前記 (III) に記した定量的に濃縮した牛の Dentin の脱灰液を各 40ml ずつとり出し、これに終濃度が 1 N になるように HCl を加えて全量を 50ml とした。

これによつて試料中の EDTA が析出してくるが、その析出時の様子を観察すると、脱灰 5 分のものでは一番早くすぐ EDTA が析出しはじめるが、脱灰 30 分以後のものは氷室に入れて初めて析出し、20分脱灰のものは氷室中 2 日後、10分脱灰のものは 4 日後に析出するのを認めた。析出の遅いものは析出量も少い。このような差異が何故起るのかわからないが、溶液の状態がそれぞれにかなり異つていることを示唆しているものと思われる。

以上の如くして出来るだけ EDTA を析出させた脱灰液を 3 G・4 の glass filter で濾過して、その濾液 2.0ml に新しく調製した Anthron 試薬を 4.0ml 徐々に加え(氷水中で反応させる)ガラス棒で充分攪拌し室温に 15 分静置してから Cu-vett に移し、620m μ の吸光度を測定した。猶、糖の基準液としては Galactose 及び Mannose が各 100mg/l に混合されている液をつくり、水 2.0 ml 中に 0.1mg 溶存するものを用い脱灰液と全く同様の操作を行つて吸光度を測定し、これから試料中の糖の含有量を算出した。

Anthron の試薬は、Anthron (第一化学) を 0.2g/dl の割合に濃硫酸に溶かしたものである。猶、EDTA 自身は勿論 Anthron の反応を呈さない。

実験結果並びに考按

実験結果は図 17 に示されている。

こゝに見られるように、Anthron の反応から見られる糖質も、EDTA の脱灰の極く初期に一度かなり溶け出し、その後それが減少してから再び又増量してゆくという紫外線吸収や蛍光測定で見

図 17 Dentin 脱灰液中の総糖質量

られたと同様の傾向を示している。

EDTA による脱灰過程で溶け出てくるものは勿論単一な物質ではないであろうから、紫外線吸収や蛍光測定及び Anthron の反応によつて見ているものは、それぞれその中のある種のものだけを見ているのであろう。従つて、それら相互の間に簡単な定量的関係を期待することは無理かもしれないが、ともかく以上の実験結果から見ると、Dentin や骨の粉末を EDTA で脱灰処理すると、極く初期にかなり多くの有機物質が溶出し、それが一度減少してから再び又徐々にかなりのものが溶け出てゆくように見える。

総括並びに結論

EDTA の紫外線吸収の結果を基にして、EDTA による硬組織脱灰過程を紫外線吸収並びに蛍光測定から追求し、又その脱灰液中の糖質量を測定した結果、次のような結論を得た。

I EDTA の紫外線吸収

1) EDTA・Na 塩の紫外線吸収は、その解離状態に対応してかなり変化する。

2) EDTA・Ca 塩の紫外線吸収が EDTA・Na 塩の吸収より短波長にずれることは既に知られていたことであるが、255m μ 以上の波長で Ca 塩の吸収が Na 塩のそれより大きくなる点は、今迄注目されていない事実と思われる。

3) EDTA の Na 塩と Ca 塩を pH=4.5 で種々の割合に混合した吸収曲線では Isosbestic point が示され、これらの液が 2 成分系であることを認めしめる。

4) EDTA・Ca 塩は pH 5~10 位では大体安定な構造をもつといわれるが、それにも拘らず吸収には pH によりかなりの変化が認められる。

II 紫外線吸収より見た EDTA による脱灰過程

1) 大理石脱灰

脱灰の進行と共に、275m μ 以下の短波長の吸光度は低くなり短波長にずれる傾向にあり、275m μ 以上の長波長では Control のカーブと交叉するが Control に比しわずかに高くなるのみである。これは脱灰の進行と共に EDTA・Na 塩が主として EDTA・Ca 塩になることを反映している。この場合、250m μ の吸収の変化から脱灰の時間的経過をグラフにすると、Ca[#]の直接測定の結果とよく一致する。

2) Dentin 脱灰

大理石脱灰の場合と異なり、脱灰初期の 5 分で 270~300m μ 位の吸収が一時急激に増大し、その後 20 分位で急にこの吸収は減少し、更に時間が経つと再びいくらか増大する傾向にある。このように 270m μ 位以上の全波長で吸収が増大することは、この際脱灰と同時に吸収を起すような有機物質が溶け出したと考えなければならない。しかしこゝに見られる吸光度の増大のかかなりの部分は真の吸収の増大によるものではなく、EDTA の脱灰に伴つてコロイド様の物質が溶け出し、それが一種の濁りとして光を散乱させる所謂 Tyndall 現象によるものではないかという想像もなされる。牛骨の脱灰でも同様の事実を認めた。

3) Enamel 脱灰

Enamel では Dentin の場合と少し様子が異なり、脱灰の極く初期に見られる急激な吸収の増大は明かでなく、寧ろ徐々に吸収の増大が起つて行くことが認められた。

III EDTA 脱灰時の蛍光測定

Dentin 脱灰の極く初期に一度蛍光性物質が、かなり溶け出すが、その後一時その存在が認められなくなる。しかし更にその後は徐々に蛍光性物質が溶け出てくるように見える。

これは紫外線吸収の場合と似た現象である。

IV EDTA による Dentin 脱灰液中の糖質の定量

1) この脱灰液は糖質の反応を比較的はつきり呈し, Elson-Morgan のアミノ糖の反応も陽性であり, Bial 試薬による Orcin-HCl 反応も緑色乃至黄褐色を呈した。

2) Anthron の反応により脱灰液中の糖質量を定量的に測定したところ, 脱灰の極く初期に一度かなり溶け出し, その後それが減少してから再び又増量して行くという紫外線吸収や蛍光測定で見られたと同様の結果を得た。

稿を終るにあたり, 御校閲を賜った檜垣教授に深謝し終始本研究の御指導と御鞭撻を賜った 荒谷教授に心からの謝意を捧げると共に, 種々御援助を頂いた生化学教室の方々に厚く御礼申し上げます。

文 献

- 1) 荒谷真平: 歯と蛋白質, 歯界展望 12 : 432, 1955
- 2) 藤井暢三: 生化学実験法, 定量篇, 東京南山堂, 400, 1956.
- 3) Hartles, R. L., and Leaver, A. G.: The fluorescence of teeth under ultraviolet irradiation, Biochem. J. 54 : 632, 1953.
- 4) Hartles, R. L., and Leaver, A. G.: The identification of pyrimidines in the fluores-

cing factors of the teeth of the sperm whale, J. Dent. Res. 34 : 820, 1955.

- 5) Manly, R. S., and Hodge, H. C.: Density and refractive index studies of dental hard tissues, J. Dent. Res., 18 : 133, 1939.
- 6) Manly, R. S., Hodge, H. C., and Ange, L. E.: Density and refractive index studies of dental hard tissues, J. Dent. Res. 18 : 203, 1939.
- 7) Martell, A. E., Calbin, M.: Chemistry of the metal chelate compounds, Prentice-Hall, Inc., New York, 89, 1952.
- 8) Martell, A. E.: Chemistry of the metal chelate compounds, Prentice-Hall, Inc., New York, 223, 1952.
- 9) 音在清輝: EDTA の分析への応用のための基礎的知識, 化学 10 : 874, 1955.
- 10) 大森郁朗: EDTA による歯牙の脱灰過程の研究—殊にカルシウムと磷酸について, 口腔病学会雑誌 24 : 135, 1957.
- 11) Plumb, R. C., Martell, A. E., and Berworth, F. C.: Spectrophotometric determination of displacement series of metal complexes of the sodium salts of ethylene diamine tetraacetic acid, J. Phys. and Colloid Chem. 54 : 1208, 1950.
- 12) Sweetser, P. B., Bricker, C. E.: Spectrophotometric titrations with ethylenediamine tetraacetic acid (II), Analyt. Chem. 26 : 195, 1954.