象牙質及び骨の水溶性物質について*

関 野 格 郎 名 倉 啓 一 増 井 康 男

東京医科歯科大学歯学部生化学教室 (指導 荒谷教授)

大 森 郁 朗 鬼 久 保 博 昭 岡 田 泰 紀

東京医科歯科大学歯学部保存学教室 (主任 檜垣教授)

" " 生化学教室 (指導 荒谷教授)

Water-soluble Substances of Dentin and Bone

Kakuro Sekino, Keiichi Nagura and Yasuo Masui

Department of Biochemistry (Prof. S. Araya)

Ikuo Ohmori, Hiroaki Onikubo and Yasunori Okada

Department of Operative Dentistry (Prof. R. Higaki) and

Department of Biochemistry (Prof. S. Araya)

School of Dentistry, Tokyo Medical and Dental University

1) Water-soluble substances of the triturated equine and bovine dentins and bovine bone, when suspended in distilled water and N/100 Veronal buffer, are studied by the determinations of calcium, magnesium, phosphorus and nitrogen.

2) The dissolution of magnesium ions of dentin considerably differs from that of bone, i.e. the ratio of magnesium and calcium dissolved from dentin (Mg/Ca) is much greater than that of bone, and in the case of bone it keeps nearly constant throughout the experiment period, but in the case of dentin the ratio shows an increasing inclination.

From these phenomenons it is suggested that dentin and bone hold magnesium ions in different manners respectively.

3) The ratio of water-soluble magnesium and calcium is much greater than that of the composition of magnesium and calcium in the both tissues.

4) The ratio of calcium and phosphorus dissolved from dentin (Ca/P) is fairly small (below 1.0). It seems that other phosphate salts are more soluble than calcium phosphate, since the ratio of calcium and phosphorus in $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ gives 1.94 and in hydroxylapatite gives 2.15. But (Mg+Ca)/P gives nearly 2.0 when magnesium ions are also multiplied by the ratio of both molecular weights (40/24.3).

So it can be considered that the soluble magnesium ions are driven from some phosphate compounds such as tricalcium phosphate or hydroxylapatite in which calcium ions are replaced by magnesium ions.

On the contrary, the ratio of calcium and phosphorus dissolved from bone is greater than 2.3, especially in N/100 Veronal buffer, and it seems that other calcium salts are dissolved more than calcium phosphate is.

5) According to the nitrogen determination, little difference is observed with the amount of dissolved organic compounds between dentin and bone.

本学歯学部 of 生化学教室では硬組織の構造を研究する一つの手段として、硬組織に種々な溶媒、キレート剤、酵素等を作用させてそれ等に対する硬組織の化学的な反応性をしらべている。それ等の試みの一つとして、まず硬組織を蒸留水及び N/100 Veronal 緩衝液 (pH: 7.5) に懸濁させた時に溶出して来る物質をしらべてみた。J. J. Martin 等¹⁾ は歯牙粉末に有機の塩類を 37°C で 7 日間作用させた時に溶出して来る Ca[#] 量をしらべ、盲験として蒸留水中に溶解出す Ca[#] 量もみているが、その場合にも Ca[#] の溶出は認められている。

我々は此等の溶媒の作用によつて溶出して来る物質のうち、Ca[#], Mg[#], P 及び N を時間を追つて測定した。尙、N 量は溶出して来た有機物を分解して測定したものであるから、可溶性の有機物の一つの消長を示すものであろうと思われる。

実 験

I. 実験材料

a) 試料

試料には象牙質と骨を用いたが、象牙質は馬及び牛、骨は牛を使つた。

馬及び牛の象牙質は、それ等の歯牙粉末から浮游法によつて分離して得たものであり²⁾、粉末の大きさは標準篩によつて 100~200 mesh に限定した。牛骨は管状骨の骨幹部を用い骨膜及び骨髓を除去して Acetone で洗滌、粉碎して 100~200 mesh の大きさの粉末とした。

b) 溶媒

i) 蒸留水

通常のカス式蒸溜装置によつて得たものを用いた。(pH: 5.8)

ii) N/100 Veronal 緩衝液

Sodium Diethylbarbiturate 2.06g を蒸留水に溶解、全容を 1 l としたものと N/100 HCl とを

7:3 の割合に混じたもので、pH 7.5 に調整しておく。

II. 実験操作

実験試料を溶媒量に対して 1 % の割合に秤りとり、これを magnetic stirrer 上の恒温槽に入れてある 200 ml の三角コルベンにとつた溶媒に加え、stirring を開始する。温度を 38°C に保ちながら一定時間ごとに suspension の状態にある、この溶液の一部を 10ml の駒込ピペットでとり出し、直ちに glass filter 3 G 4 で吸引濾過して試料と溶媒とを分離し、その濾液を被検液とする。

III. 各成分の測定方法

1) Ca[#], Mg[#] の定量

M/100 EDTA 溶液を滴定液とし、指示薬に Murexide (MX) と Phthalein Complexone (PC) を用いて、キレート滴定法³⁾によつて Ca[#], Mg[#] の分離定量を行つた。即ち、被検液 5 ml を 100 ml の三角コルベンにとり、共存重金属イオンの隠蔽剤として N/25 NaCN 溶液 0.5ml (被検液の pH の上昇を防ぐため、この溶液の添加量を少くした) 及び NH₄OH-NH₄Cl 緩衝液約 1 ml を加えて pH=10 となし、これに指示薬 PC を 1 滴滴下 (これを多量に入れすぎると Naphthol Green B で適当に調整しておいたものでも、終点において PC の微紅色が残るから注意を要する) した後 M/100 EDTA 溶液で滴定した。紫色から無色に変る点が終点である。この際、滴定にかゝつて来るのは Ca[#] 及び Mg[#] である。

勿論、PC と反応し、CN⁻ で隠蔽されない他の金属イオンも滴定にかゝつて来るわけであるが、歯牙及び骨ではそれ等の金属量は殆んど negligible である。次いで同一の被検液 5 ml をとり、N/25 NaCN 溶液を加え更に 1N-NaOH 溶液約 1 ml を加えて pH=12 となし、M/100 EDTA 溶液で MX を指示薬として滴定した。赤色から紫色に変る点が終点である。この場合は、Ca[#] のみが測定にかゝつて来る。

* 本研究は昭和31年度文部省科学研究費の援助により行われたものである。

そこで、指示薬にPCを用いて得た滴定値を V_{PC} とし、指示薬にMXを用いて得た滴定値を V_{MX} とすれば、次の計算によつて $Ca^{#}$ 、 $Mg^{#}$ を算出することが出来る。

$$(V_{PC}-V_{MX}) \cdot F \times 0.243 = Mg^{#} \text{ (mg)}$$

$$(V_{MX}-BL) \cdot F \times 0.4 = Ca^{#} \text{ (mg)}$$

F： 滴定液の力価

BL： 被検液の代りに蒸留水をとリ、指示薬にMXを用いて滴定した盲験値、(この場合、PC、MXの指示薬による滴定値の差は殆んどない)。

尙、MXによる滴定の際に赤の余色である緑色の眼鏡をフィルターとして用いると、変色点がわかり易い。

二種の金属指示薬による $Ca^{#}$ 、 $Mg^{#}$ の分離定量については、既に報告されているところであるが、念のため次のような model test を行つた。即ち、200 γ /ml $Ca^{#}$ 溶液及び 20 γ /ml $Mg^{#}$ 溶液(いずれも第一化学製、カルシウム標準液及びマグネシウム標準液を稀釈調製したもの)を各 10ml ずつ 100ml のメスコルペンにとリ、蒸留水を加えて全容を 100ml としたものを試料とした。試料を 10ml ずつとり、指示薬にPC及びMXを用いて M/100 EDTA 溶液で直接滴定した。測定値は表1の通りである。理論値は $Ca^{#}=0.200mg$ 、 $Mg^{#}=0.020mg$ であるから測定法の誤差は約5%である。

2) Pの定量 (Ortho-Pのみ)

Pの定量は Isobutanol 抽出法⁴⁾によつた。即ち、10%モリブデン酸ソーダ 1ml に 5 N・H₂SO₄ 1ml を加え、それに Isobutanol 4 ml を加えた

ものを氷で充分冷却し、これに被検液 1 ml を速かに加えて 15 秒間強く振盪した後、22~23°C の水浴中に入れ液相の分離を待つ (これに要する時間は 40~60 秒である)。液相が分離したならば直ちに駒込ピペットで Butanol 層を cuvette に入つしとり、spectrophotometer によつて波長 380~430m μ で比色した。

P量はP標準液 (100 γ /ml) の吸光度との比から求められる。即ち

$$\frac{E'}{E} \times 100 = P \gamma / ml$$

E'： 被検液の吸光度

E： 100 γ /ml 標準液の吸光度

3) Nの定量

被検液 5 ml を酸化管にとリ、酸化して micro-Kjeldahl 法の Parnas の変法によつて測定した。

実験成績並びに考按

I. 象牙質からの溶出状況

図1, 2, 3はそれぞれ馬及び牛の象牙質粉末を1%の割合に蒸留水及び N/100 Veronal 緩衝液に懸濁させて、溶媒に溶出して来る $Ca^{#}$ 、 $Mg^{#}$ 及び P, N を 5分, 15分, 30分, 1時間, 3時間と時間を追つて測定した結果であるが、図の如く微量ながら無機物及び有機物の溶出がみられ、その溶出量は時間と共に増加している。尙、蒸留水の pH は 5分：6.85, 1時間：7.20, 3時間：7.40 と僅かであるが上昇した。

1) $Ca^{#}$ と $Mg^{#}$ の溶出について

まず馬の象牙質粉末に蒸留水を作用させた場合 (図1-A) であるが、作用時間 30 分を過ぎると

表 1

P C				M X			
	V_{PC} (ml)	$V_{PC}-V_{MX}$	$Mg^{#}$ (mg)		V_{MX} (ml)	$V_{MX}-BL$	$Ca^{#}$ (mg)
1	0.581	—	—	1	0.502	—	—
2	0.585	—	—	2	0.503	—	—
平均 値	0.583	0.080 ₅	0.019	平均 値	0.502 ₅	0.492 ₅	0.197

BL： 0.010

BL： 0.010

図1-A 馬象牙質を水で抽出した場合

図1-B

Ca^{2+} の溶出量よりも Mg^{2+} の溶出量の方が多く、 Ca^{2+} と Mg^{2+} の溶出量比 Mg/Ca をとてみると図1-Bのようにその値は時間と共に稍々大きくなる傾向が認められ、 Mg^{2+} の溶出量が Ca^{2+} の溶出量にくらべて時間と共に増加していることを示している。

これを牛の象牙質についてみると(図2), Mg/Ca は馬よりもいくらか小さいが、それでも略々同じ様な傾向が見られる。この傾向は馬の象牙質に溶媒の pH を一定に保つために N/100 Veronal 緩衝液を作用させた場合(図3)にも認められる。 Mg^{2+} の溶出の比較的少ない牛についてみてこの Mg/Ca は別に測定した同一試料の牛象牙質 Mg^{2+} と Ca^{2+} の含有量比が 3.6×10^{-2} である⁵⁾ ことと比較すると桁違いに大きな値であることに気附く。即ち、このような溶媒によつて象牙質粉末を抽出すると、 Ca^{2+} に比して Mg^{2+} が異常に速く抽出されてくることが示されている。

図2-A 牛象牙質を水で抽出した場合

図2-B

2) P及び有機物の溶出について

図1, 2, 3においてPの溶出量と Ca^{2+} の溶出量の比 Ca/P をしらべてみると大体1.0以下であつて、 $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ の場合の1.94, Hydroxylapatite の場合の2.15のような理論値からみると可成り低い値を示している。従つてこの場合 Ca^{2+} に比して大量に溶け出している磷酸は、磷酸カルシウム以外の塩として出ている筈であるが、 Mg^{2+} の溶出量が比較的多いことから試みに溶出 Mg^{2+} 量を Ca^{2+} 量に換算して、その値を溶出 Ca^{2+} 量に加えたものとPとの比 $(\text{Mg}+\text{Ca})/\text{P}$ をとてみると、図1の場合は 1.99 ± 0.28 , 図2の場合は 2.27 ± 0.16 , 図3では 1.85 ± 0.06 と云う値を示し、ほぼ $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 或いは Hydroxylapatite の Ca/P の値に近い値を示すようになる。

このことから溶出する Mg^{2+} のかなりの部分は磷酸カルシウム中の Ca^{2+} に Mg^{2+} が置換したような磷酸化合物に由来しているのではないかと想

図3-A 馬象牙質を N/100 Veronal 緩衝液で抽出した場合

図3-B

像される。

又、有機物の溶出をそのN量からみると、これも時間と共に増加している。

II. 骨からの溶出状況

図4及び図5は象牙質の場合と同様、牛骨粉末を蒸留水及び N/100 Veronal 緩衝液に1%の割合に懸濁させた時に、溶媒に溶出して来るCa²⁺、Mg²⁺及びP、Nを時間を追って測定した結果である。

1) Ca²⁺ 及び Mg²⁺ の溶出について

蒸留水を作用させた場合(図4)も N/100 Veronal 緩衝液を作用させた場合(図5)もMg²⁺の溶出量は少い。そしてこれは象牙質の場合と著しく異なる点である。

Ca²⁺ と Mg²⁺ の溶出量比 Mg/Ca をとつてみると、象牙質よりも小さく又、象牙質の Mg/Ca が時間と共にやや増加しているのに対して、いずれの時間においても0.3~0.4の値を示し、Ca²⁺ と

図4-A 牛骨を水で抽出した場合

図4-B

Mg²⁺ がほぼ一定の割合で溶出していると考えられる。しかし象牙質同様、Mg²⁺ の溶出は Ca²⁺ の溶出に対して可成り多く、別に同一試料の牛骨のCa²⁺、Mg²⁺の含有量比を測定した結果は 1.9×10^{-2} である⁵⁾から、それよりは著しく大きい値を示しているわけで、骨でもMg²⁺はCa²⁺に比し比較的溶け易い状態にあることが示されているようである。

2) P及び有機物の溶出について

Ca/Pをしらべてみると象牙質より大きな値を示している。そして、蒸留水を作用させた場合は始め1.3位のものが次第に増大して3時間では1.8位になるが、N/100 Veronal 緩衝液を作用させた場合は、始め2.0位のものが3時間では2.5にもなるから、そのように大きな値を示す場合には磷酸塩以外のカルシウム塩が溶出しているように思われる。

図5-A 牛骨を N/100 Veronal 緩衝液で抽出した場合

図5-B

又、象牙質の場合と同様に $(Mg+Ca)/P$ をとつてみると、水抽出の場合始めは2前後の値であるが後にはやはり2.5以上にもなり、Veronal抽出の場合は勿論3.0を越す非常に大きな値になつてしまう。従つてこの場合は溶け出て来た Mg^{2+} が磷酸の化合物であるということは想像し難い。しかし、勿論、溶け出た Mg^{2+} は大部分磷酸化合物であるが、 Ca^{2+} の極めて多くが磷酸化合物ではないと考えても差支へはない。

尚、N測定からみた有機物の溶出については、象牙質の場合と見るべき差違はないようである。

以上の如く象牙質と骨との溶出状況を比較してみても特徴的な差のみられるのは Mg^{2+} の溶出状況である。即ち、象牙質からの Mg^{2+} の溶出量は骨のそれとくらべて著しく多く、 Ca^{2+} の溶出量との比 Mg/Ca をみても象牙質の方が大きく 且つ又

その値は作用時間と共にいくらか大きくなる傾向を示しているのに対して、骨では作用時間と無関係にはゞ一定の値を示している。しかし、両組織とも抽出液中の Mg/Ca は本来その組織の含有する Mg/Ca よりは桁違いに大きい。

以上のような現象は両組織での Mg^{2+} の在り方の相違を示唆しているものであり、又、両組織共 Mg^{2+} は Ca^{2+} に比して比較的このような条件で溶け易い状態にあるものと考えられる。

総 括

1) 馬及び牛の象牙質粉末と牛骨粉末を蒸留水、N/100 Veronal 緩衝液に懸濁させた時に溶出する Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 、P 及びN量を測定したところ、いずれの試料からも微量の溶出が認められた。

2) Mg^{2+} の溶出については、象牙質と骨とでは著しい相違がみられる。即ち、象牙質の Mg/Ca は骨にくらべて著しく大きく、又、骨の場合ははゞ一定の値を示すのに対して、象牙質の Mg/Ca は時間と共に大きくなる傾向がある。

このことから、両組織での Mg^{2+} の在り方の相違が示唆される。

3) 水溶性の Mg/Ca の溶出量比は、牛象牙質、牛骨の Mg/Ca の含有量比よりも著しく大きい。

4) Ca/P をみると、象牙質は可成り小さく水溶性の磷酸塩はカルシウム塩以外のものが多いと考えられるが、 $(Mg+Ca)/P$ をとつてみると、いずれも2.0近辺の値を示す。このことから溶出する Mg^{2+} は $Ca_3(PO_4)_2$ 或いは Hydroxylapatite 中の一部の Ca^{2+} に Mg^{2+} が置換つたような磷酸化合物に由来するものかもしれない。骨では殊に N/100 Veronal 緩衝液に懸濁させた場合に2.3以上の値を示し、磷酸塩以外のカルシウム塩が溶出しているようである。

5) N測定から見た有機物の溶出は、象牙質と骨で見るべき差違はないようである。

稿を終るに当り、御指導御校閲をたまわりました荒谷真平教授並びに御校閲をたまわりました檜垣麟三教授

に深甚なる感謝の意を表します。

文 献

- 1) Martin, J. J. et al. : Chelation, or metal-binding, as a new approach to the problem of dental caries, Revista Euclides 14 : 311, 1954.
- 2) 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, 口病誌. 24 : 135, 1957.

- 3) 上野景平 : キレート滴定法, 東京, 1956, 南江堂, p. 132.
- 4) 中西茂子, 他 : 無機磷酸の一定量法, 生化学 28 : 574, 1956.
- 5) 大森郁朗, 他 : EDTA による硬組織脱灰時のMg⁺⁺の溶出について. 口病誌. 24 : 267, 1957.