露出セメント質のX線分析計による定性および定量分析

栗山正之 古宅康久 宮下元

長谷川 紘司 滝口 励司*

昭和大学歯学部歯周治療学教室

(主任：長谷川紘司教授)

*昭和大学歯学部第1口腔解剖学教室

(主任：滝口励司教授)

(昭和56年12月20日受付)

Electron Probe Microanalysis of Human Exposed Cementum

Masayuki KURIYAMA, Yasuhisa KOTAKU, Hajime MIYASHITA,
Kohji HASEGAWA and Reiji TAKIGUCHI*

Department of Periodontics

School of Dentistry, Showa University

*Department of Oral Anatomy

School of Dentistry, Showa University

Pocket formation is a most prominent symptom of the periodontal disease. Cementum facing to the pocket became exposed and soaked to the pocket and oral environment receiving several pathologic changes. The most striking feature of these changes is that in chemical composition. However, conflicting results have been reported on the distribution pattern of major element and also on the presence or absence of minor element in the exposed root surfaces mostly because of scanty of similar works. This study was intended to compare the distribution pattern of some chemical element between unexposed (healthy) and exposed human cementum using electron probe microanalyser.

The point by point analysis of polished cemental surface showed that wide variation of ditribution pattern of element was observed, however, the consistent emergence of Ca and P, and frequent appearance of Mg, Na, Al, Si, S, Cl, Cu and Zn could be recognized in both exposed and unexposed specimen. Among those found in unexposed cementum, Fe was a sole element which failed to find in exposed cementum. By linear scan analysis, Ca and P increased its concentration at surface area in some specimen of exposed cementum. This result was confirmed statistically ($P < 0.01$) by quantitative analysis of Ca and P using Fluor apatite as a control.

I. 緒言

歯周疾患の主要な徴候としてポケットの形成がある。この結果、結合組織によって被覆されていたセメント質はポケット内環境あるいは口腔内環境に露出して、その

表面には多数の細菌が付着するようになり種々の病的変化を受ける。この露出セメント質の性状の変化は、各種歯周手術を行う際、これをどのように取り扱うかとの関連からきわめて興味深い。

露出セメント質の性状の変化については、今日まで形態学的、構造学的にあるいは物理、化学、生物学的に多

図1 露出セメント質と非露出セメント質の区分

くの報告がなされている。なかでもマイクロラジオグラムを用いた多くの研究^{1,2,3)}から、露出セメント質の表層に10~30 μm の幅で石灰化が充進している層(過石灰化帯)の存在が指摘されている。また、セメント質の主な構成元素であるCaとPの定量分析により、非露出セメント質に比べ露出セメント質でその値が有意に高いことも報告¹⁾⁴⁾⁵⁾されており、さらに、Ca, P以外の無機元素のうちMg⁴⁾⁵⁾⁶⁾, F⁴⁾⁵⁾⁷⁾, Cu⁶⁾, Zn⁶⁾の増加傾向も他の研究者によって報告されている。

近年、走査型電子顕微鏡とX線分析計(X-ray micro-analyzer=XMA)⁸⁾を組み合わせたシステムにより生物試料の構成元素の分析が容易になった。これにより、かなり小さな試料でも特定部位を非破壊的に定性、定量分析することが可能である。

我々は、かねてより露出セメント質の性状変化を調べているが、今回このXMAを用いて露出セメント質と非露出セメント質の相異を探るため、セメント質構成元素の定性分析とセメント質表層から深層に至る各元素の分布、およびCa, Pの二元素の定量分析を行った。

II. 材料と方法

1. 材料

被検歯は、昭和大学歯科病院保存科に来院した年齢25歳~62歳の12名(男性7名、女性5名)の患者より、過去にスケーリング、ルートプレーニング、ポケット掻爬等の既往のない歯周疾患罹患歯で平均4mm以上

図2 試料作製方法

図3 歯根表面上での分析点の位置(点分析)

の歯周ポケットを有し、抜歯が適当と診断したもの20本を用いた。

2. 方法

定性および定量分析に用いた試料の作製方法は図1, 2に示す通りである。

抜歯前にポケット計測の後、分析する各部位を明確に区分するために歯肉辺縁の高さの歯面に、エンジン用 #1/2 ラウンドバーを用いてノッチを付与した。このノッチより歯冠側のセメント質を歯肉縁上露出セメント質とし、ノッチよりポケット底に至るセメント質を歯肉縁下

図4 研磨面における分析点の位置（点分析）

セメント質表面から約 $30\mu\text{m}$ までをセメント質浅層とし、それより象牙質境に至るまでをセメント質深層とした。

露出セメント質とした。抜歯器具による損傷を少なくするために鉗子のみで抜去し、外科的侵襲を受けた試料は分析から除去した。固定は10%中性ホルマリン溶液を用いて24時間行った。固定終了後、流水下で水洗した後、歯肉縁下露出および非露出セメント質を区分するために実体顕微鏡下で歯根膜線維付着部を目安としてノッチを付与した。また、根面に付着する軟組織は、ガーゼ棒を用いて物理的に可能な限り除去し、上昇アルコール系列による脱水を行った。各分析には試料を次のように分割した。歯軸方向に中央で切断した1方を根表面の定性分析（点分析 point-by-point analysis）用に、他方はリゴラックで樹脂包埋を施し、切断面を荒さ $1\mu\text{m}$ のアルミナ研磨紙を用いて研磨面を作製し点分析、線分析（line analysis）および定量分析用とした。

3. XMA による定性分析

A. セメント質表面および研磨面での点分析

分析試料には厚さ約 150Å のカーボン蒸着を施した後、日立 S-550 型走査電子顕微鏡とそれに接続した Ke-vex-7000 エネルギー分散型 X 線分析計およびデータ解析用のコンピューターと CRT ディスプレイを用いて分析を行った。分析条件は次の通りである。

- ① 加速電圧……………15 KV
- ② 試料照射電流…………… $1 \times 10^{-10}\text{A}$
- ③ 分析時間……………200 second
- ④ 入射角度…………… 90°

図5 定量分析を行った分析点の位置

露出・非露出セメント質のそれぞれの浅層と深層において各5点ずつの分析点を求めた。

- ⑤ 取り出し角度…………… 38°

標準試料にはフッ化アパタイトを使用した。

図3のように歯根表面上の中央部においてそれぞれ歯肉縁上露出、縁下露出、非露出の各セメント質で1か所

表 1 セメント質の元素分析

部 位 \ 元素名	Ca	P	Mg	Na	Al	Si	S	Cl	Fe	Cu	Zn
歯肉縁上露出セメント質	+	+	+	+	+	+	+	+		+	+
歯肉縁下露出セメント質	+	+	+	+	+	+	+	+		+	+
非露出セメント質	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

⦿：全試料で観察された元素
+：一部の試料で観察された元素

ずつの計3か所を、また研磨面では図4のように上記各セメント質内での浅層と深層の計6か所について分析を行った。

B. 研磨面での線分析

試料には研磨面を用いた。分析部位は、歯肉縁上露出、縁下露出、非露出の各セメント質について1か所ずつ、セメント質浅層から象牙質境に至る直線上でCaとPの二元素について分析を行い、その濃度分布を記録した。

4. XMAによる定量分析

試料には定性分析に用いた研磨面を用いた。分析はセメント質の主要構成元素であるCaとPについて、露出および非露出セメント質で行った。分析に際しては、セメント質の最表層から約30μmまでをセメント質浅層とし、それより象牙質境に至るまでの間をセメント質深層とした(図5)。これら露出セメント質浅層・深層、非露出セメント質浅層・深層の各層内ではそれぞれ5点ずつ、直径150~200Åの点分析による定量分析を行った。

III. 結 果

1. XMAによる定性分析

A. セメント質表面および研磨面での点分析

各セメント質で検出された点分析の結果は表1の通りである。

非露出セメント質ではCa, P, Mg, Na, Al, Si, S, Cl, Fe, Cu, Znを検出し、縁上露出セメント質および縁下露出セメント質ではFeを除く全ての元素が検出された。

それぞれの部位における歯根表面での分析と研磨面での検出元素には明確な相異はみられなかった。

B. 研磨面での線分析

図6~8は、研磨面上で歯肉縁上露出、縁下露出、非露出セメント質においてそれぞれの表面から象牙質境に

図 6 歯肉縁上露出セメント質での線分析：
分析元素Ca-Kα, P-Kα

C.D.J. はセメント象牙質境の部位である。セメント質表層付近(矢印)でCa, Pともにその濃度上昇を示すピークがみられる。このようなセメント質表層での濃度上昇は、本実験の一部の試料で特徴的に認められた。

至る直線上での分析でCaとPの濃度分布を示したものである。

歯肉縁上露出セメント質ではセメント質表面付近でCaとPの濃度上昇を示すピークがみられた(図6)。しかし、このように表面付近で濃度上昇を示した試料はごく一部であり、大多数はセメント質表面から象牙質に至るまで一様な濃度として表示された。また、歯肉縁下露出および非露出セメント質での濃度についてもセメント質表面から象牙質境に至るまで変化は少なく、平坦な推移を示した(図7, 8)。

2. XMAによる定量分析

表2は、CaとPについての定量分析の結果を露出セメント質浅層・深層、非露出セメント質浅層・深層の各

図 7 歯肉縁下露出セメント質の線分析

図 8 非露出セメント質の線分析

図 7, 8 の両部位ともセメント質表面から象牙質境までの Ca, P の濃度分布に変化はほとんど認められない。

層ごとに平均値を重量パーセントで表したものである。

表 3, 4 は, Ca および P の全測定値を各部位別にスキッタード・ダイアグラムで表わしたものである。

各部位での Ca と P 値についてその平均値を t 検定にて統計処理した結果, 両元素共に露出セメント質浅層と非露出セメント質浅層間で有意差 (Ca で危険率 1.0%, P で危険率 0.1%) が認められた。また, 露出セメント質深層と非露出セメント質深層間にも有意の差 (Ca で危険率 1.0%, P で危険率 0.1%) が認められた。

しかし, 露出セメント質浅層と深層間, および非露出

セメント質浅層と深層間には, Ca と P のいずれの元素にも有意の差は認められなかった。

IV. 考 察

露出セメント質の性状は, 炎症の程度, 露出期間, 口腔衛生状態, 唾液の性状等の口腔内環境と食物の嗜好, 飲料水が複雑にからみ, 同一口腔内であっても個々の歯による差があると思われる。また, 同一歯の露出セメント質でも病変の進行状況によって部位による違いもでて

表 2 露出・非露出セメント質の浅層と深層における Ca, P の平均値

	露出セメント質				非露出セメント質			
	浅 層		深 層		浅 層		深 層	
	Ca	P	Ca	P	Ca	P	Ca	P
平 均	27.93	13.26	28.22	13.52	27.18	12.68	27.46	12.75
標準偏差	±1.62	±0.89	±1.64	±0.79	±1.89	±0.83	±1.62	±0.81
分析点数	100	100	95	95	100	100	100	100

(標準試料：フッ化アパタイト, 単位：重量%)

表 3 セメント質各層における Ca の分散
全試料の測定値（標準試料に対する重量%）をセメント質の各層別にプロットし、その平均値と標準偏差値を示した
露出セメント質浅層と非露出セメント質浅層間、および露出セメント質深層と非露出セメント質深層間には統計的に有意差がみられた (*P<0.01)

くる可能性が十分に考えられる。今回用いた被検歯は、男女合計 12 名から 20 本であったが、試料間の特定な偏りはなかった。

セメント質表面と研磨面での点分析による元素の定性分析の結果、非露出セメント質では Ca, P のほか Na, Mg, Al, Si, S, Cl, Fe, Cu, Zn を検出した。この元素の種類と数は Selvig ら³⁾ (1977), Hals ら⁴⁾ (1977) の報

表 4 セメント質各層における P の分散
Ca と同様に、露出セメント質浅層と非露出セメント質浅層間、および露出セメント質深層と非露出セメント質深層間に有意差がみられた (*P<0.001)

告とほぼ同様であるが、装置の検出限界のため我々の実験では F (フッ素) の検出をみていない。検出元素のうち、Ca と P はセメント質の主要構成元素としてハイドロキシアパタイト $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ の形で存在するが、他元素については、セメント質中の微少構成元素として元来存在していたものか、あるいは、飲食物等の外来摂取物、試料作製上の研磨紙、包埋材等の影響も考えられるが、個々の検出元素の出所を明確にするのは現時点では難しい。

歯軸方向に縦断した研磨面上での歯肉縁上露出、縁下

露出の各セメント質での表面から象牙質に至る線分析によって Ca と P の濃度分布を調べたが、一部の試料のセメント質表面で濃度上昇を示すピークが現れた。これは、Selvig ら¹⁾ (1962), Hals ら⁹⁾ (1977) の報告のように露出セメント質表層での過石灰化帯の出現状況と一致するものであるように思われる。しかし、他の試料では部位に関係なく Ca, P 共に、表層でこのように高いピークを示す特有な現象は見られなかった。これは、患歯の病変の程度とセメント質の露出時間に影響されるもののように思われる。

セメント質構成元素の定量分析は、従来より比色定量法あるいは原子吸光分光分析法等を用いた方法が主に行われており、正確で誤差の少ない方法として行われてきた。しかし、分析する際に試料を粉碎しなければならず、そのために試料の特定部分を選択的に定量分析しにくく、さらにある程度の試料の大きさが必要となるなどの難点があったが、近年電子顕微鏡とX線分析装置の進歩にともなう、鉱物試料のみならず、生物試料の定量分析への道が開かれた。

今回の XMA による定量分析の結果(表2)は、Selvig ら¹⁾ (1962) の Ca と P の生化学的な定量分析の結果(露出セメント質 Ca : 27.5%, P : 12.6%, 非露出セメント質 Ca : 25.7%, P : 12.1%) とほぼ同じ値を示した。また、かれらは、露出セメント質表層の 20~30 μm (最大 50 μm) で、Ca, P の濃度が非露出セメント質より有意に高くなっていることを報告している。我々は今回、露出セメント質浅層(30 μm までを露出セメント質浅層と規定した)ばかりでなく、それより深部(浅層 30 μm から象牙質境までをセメント質深層と規定した)についても、Ca と P の濃度が非露出セメント質と差があるのかどうか、いいかえると、露出セメント質浅層の影響がどこまで及んでいるかを分析してみた。そこで、分析値を各部位ごとに統計処理した結果、露出セメント質浅層と非露出セメント質浅層間、および露出セメント質深層と非露出セメント質深層間で Ca と P の両元素共に有意の差があることを認めた。また、露出セメント質浅層と深層間および非露出セメント質浅層と深層間では有意差は認められなかった。このことは、露出セメント質での Ca と P の濃度上昇傾向は、露出セメント質浅層だけにとどまらず、深層にまで影響が及んでいることを示している。

分析に際して、セメント質浅層の分析点を表面から約 30 μm までの任意な点と規定したことは、セメント質の薄い試料では必ずしも妥当でなかったように思われた。

V. 結 論

歯周疾患の進行に伴い歯周ポケット内に露出したセメント質は、口腔内環境に露出し種々の病的変化を受ける。

この露出セメント質の性状変化を知る目的で、X線分析計(XMA)を用いてセメント質の構成元素の定性および定量分析を行った結果、次の様な結論を得た。

1. 歯根表面および研磨面での定性分析(点分析)により、露出セメント質では、Ca, P, Mg, Na, Al, Si, S, Cl, Cu, Zn を検出し、非露出セメント質ではこれらに加えて Fe の元素を検出した。
2. 研磨面におけるセメント質表面から象牙質境に至る Ca と P の線分析によって、一部の試料に縁上露出セメント質の表面付近で濃度上昇を示すピークがみられた。しかし、概して、各セメント質での特異な濃度変化は示さず、部位による特定な濃度変化は明らかではなかった。
3. 研磨面における Ca と P の定量分析によって、両元素が露出セメント質の浅層と深層で、非露出セメント質のそれぞれの層より有意に高い値を示した。

文 献

- 1) Selvig, K.A. and Zander, H.A. : Chemical analysis and microradiography of cementum and dentin from periodontally diseased human teeth., J. Periodontol., 33 : 303-310, 1962.
- 2) Furseth, R. and Johansen, E. : A microradiographic comparison of sound and carious human dental cementum., Arch. Oral Biol. 13 : 1197-1206. 1968.
- 3) Selvig, K.A. and Hals, E. : Periodontally diseased cementum studied by correlated microradiography, electron probe analysis and electron microscopy., J. Periodont. Res., 12 : 419-429, 1977.
- 4) Nakata, T.M., Stepnick, R.J. and Zipkin, I. : Chemistry of human dental cementum : The effect of age and fluoride exposure on the concentration of asch, fluoride, calcicum, phosphorus and magnesium., J. Periodontol. 43 : 115-124. 1972.

- 5) Wirthlin, M.R., Pederson, E.D., Hancock, E. B., Lamberts, B.L. and Leonard, E.P. : The hypermineralization of diseased root surface., J. Periodontol., 50 : 125-127, 1976.
 - 6) Sherman, D.B., Ruben, M.P., Goldman, H.M., Breck, F. and Healy, M. : Laser spectrochemical microanalysis of cementum., I.A.D.R. Abstracts, Abstr. A85. 59. 1966.
 - 7) Stepnick, R.J., Nakata, T.M. and Zipkin, I. : The effects of age and fluoride exposure on fluoride, citrate and carbonate content of human cementum., J. Periodontol., 46 : 45-50, 1975.
 - 8) 内山 郁, 渡辺 融, 紀本紀雄著 : X線マイクロアナライザ, 日刊工業新聞社, 東京, 1972.
 - 9) Hals, E. and Selvig, K.A. : Correlated electron probe microanalysis and microradiography of carious and normal dental cementum., Caries Res., 11 : 62-75, 1977.
-