

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月8日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21610002

研究課題名（和文）胎内環境のバイオマーカーとしての乳歯エナメル質含有元素の分析

研究課題名（英文）Analysis of elements in enamel of deciduous teeth as a biomarker for fetal environment

研究代表者

猪狩 和子（IGARI KAZUKO）

東北大学・病院・講師

研究者番号：90125493

研究成果の概要（和文）：母体の子宮内での胎児の環境を知る手掛かりとして、生え代わりのために抜去された乳歯を用いて、そのエナメル質に含まれる微量元素を測定した。乳歯エナメル質には、胎児期に作られた部分と乳児期に作られた部分があり出生時を示す新産線によって区別される。この構造を破壊せずに、それぞれに含まれる微量元素を測定する方法としてマイクロ PIXE 法を用いた分析法を確立した。胎児期形成のエナメル質にはカルシウムやリンの他にナトリウム、マグネシウム、亜鉛、ストロンチウム、鉄などの微量元素が様々な濃度で含まれていることが分かった。

研究成果の概要（英文）：Trace elements in enamel of deciduous teeth were investigated in order to assess the fetal environment. Deciduous teeth include both pre-natal formed enamel and post-natal formed enamel. They are distinguished by neonatal line. We established the analytical method using micro-PIXE, by which trace elements including pre- and post-natal enamel are measured without destruction of their structure. Some trace elements, Na, Mg, Zn, Sr, and Fe were in prenatal enamel with various concentrations.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：社会系歯学（障害者歯科学）

科研費の分科・細目：時限・子ども学（子ども環境学）

キーワード：胎内環境、乳歯、元素分析、新産線

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 胎内環境は将来の子どもの疾病・健康素因を決定する（DOHaD の概念）：近年様々な成人期慢性疾患の発症基盤が胎児期の環境と関連することが大規模疫学調査や動物実験から明らかにされ、疾病・健康の素因が胎児期という人生の極めて初期に決定されるという概念が注目を集めてい

る。

(2) 近年、胎内環境の悪化を予測させるいくつかの事象がある：

①出生体重は1980年代の平均3,250gから2000年代には約200gも減少した。

②2,500g未満の低出生時が1980年代の5.0%台から2002年には9.1%に増加している。

③若年女性の痩せによる低栄養が増えている(20代女性の25%がBMI18.5以下)。

④添加物を含む食品が流通している。これらは母体の栄養状態や環境の悪化を示すもので、胎内環境の悪化となり胎児が低栄養や環境汚染物質に暴露される結果となっていると予測される。

(3) 乳歯は胎児期および乳児期の暴露物質を蓄積している：乳歯エナメル質の石灰化時に暴露した物質は代謝されずに残り、後に永久歯との交換期に脱落した乳歯において暴露当時の物質の存在を評価することができる。乳歯エナメル質は胎児期および乳児期に形成された部分を含み、その両者を新産線によって区別することができる。胎児期形成部分のエナメル質の元素分析は、回顧的に胎内環境における暴露物質を評価する有用な方法である。

(4) マイクロ PIXE 法は乳歯エナメル質の元素分析に適した方法である：マイクロ PIXE 法では、組織を破壊せずに限局した範囲の表面の多元素を同時に分析でき、それをマッピングとして得ることができる。マイクロ PIXE 法を応用することで胎児期形成エナメル質に含まれる微量元素を検出することができる。と期待される。

## 2. 研究の目的

胎児期に形成されたエナメル質の含有元素濃度をマーカーとして、胎内環境が母体側および児側の健康・環境因子とどう関係しているのかを明らかにする。そのために、

(1) 乳歯エナメル質に含有される微量元素の種類および濃度を知る

(2) 同一歯内での出生前後で元素分布の差を明らかにする：新産線を境界とする出生前後に形成されたそれぞれのエナメル質における微量元素の濃度分布を比較し、その差が出生前後の環境の差を反映しているか検討する。

(3) 胎児期形成エナメル質含有元素量と母体側環境因子との関係、および児側の健康状態に関する因子との関係を明らかにする。その結果から、胎内環境と児の健康における影響を明らかにして DOHaD の概念を検証する。

## 3. 研究の方法

### (1) 試料の収集：

研究者らが所属する歯科診療部門に定期的に通院する小児患者から永久歯との交換期に自然脱落または抜去した乳前歯および乳犬歯の提供を受けた。乳白歯はその発育時期から胎生期に形成されるエナメル質は少量と考えられるため対象から除外した。また、齲蝕のある歯、充填処置が行われている歯も対象から除外した。得られた乳歯は、表面を

蒸留水にて洗浄後乾燥状態で保存した。

### (2) 分析方法の確立：

①試料の調整：乳歯歯冠をメチルメタアクリレート系歯科用樹脂に包埋し、矢状断で厚さ500 $\mu$ mの非脱灰切片を作成した。光学顕微鏡でエナメル質内の新産線の位置を確認し、新産線をほぼ中央に含む約1.5mm角の切片を切り出し、厚さ100 $\mu$ mに調整した後に表層をカーボン蒸着して分析用試料とした。

②マイクロ PIXE 分析条件の決定：東北大学ダイナミトロン実験室のマイクロビーム分析システムを用いた。エックス線は高エネルギー用の検出器と低エネルギー用の2台の検出器で検出した。高エネルギー用の検出器はCaからのエックス線のパイルアップを避けるために600 $\mu$ mのマイラーフィルターを取り付けた。スキャン範囲は、試料に応じて0.4 $\times$ 0.4 $\sim$ 1 $\times$ 1mm<sup>2</sup>とし、ビーム径は約2 $\times$ 2 $\mu$ m<sup>2</sup>とした。この条件下で、各試料の元素分析を試みた。さらにGeoPIXEソフトウェアを用いて各元素の分布図を作製し、濃度算出をした。

(3) 質問紙調査：試料収集時に、保護者に対して質問紙調査を実施。当該小児の妊娠時の母親の体重変化、喫煙習慣、児の在胎週数、出生体重、乳児期の栄養摂取方法、現在の健康状態などを調査した。

(4) 統計学的分析：収集試料数が蓄積されたのち、母体および児の健康背景による、検出元素の種類、濃度の違いについて比較検討した。

以上を、東北大学大学院歯学研究科倫理委員会の承認を受けた研究計画書に則って実施した。

## 4. 研究成果

(1) マイクロ PIXE 分析による元素検出と元素マッピング：

高エネルギー検出器および低エネルギー検出器より検出されたックス線スペクトラムからピークに一致する元素を抽出した。エナメル質の主成分であるCa、Pのほか、微量元素としてNa、Mg、Cl、Zn、Fe、Sr、Kが検出された。スキャン領域における各元素のマッピングが得られた。図1に代表例を示す。

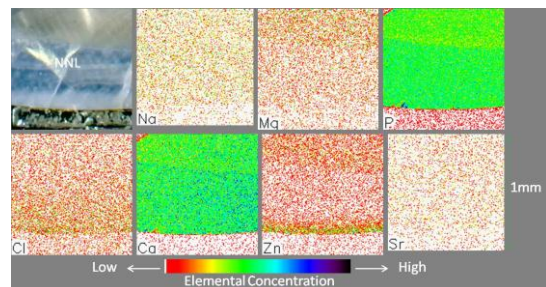


図1：元素分布図

(2) エナメル質内各元素の濃度：  
元素分布図より各元素の濃度を算出した。5  
サンプルから検出された各元素の濃度を図 2  
に示す。

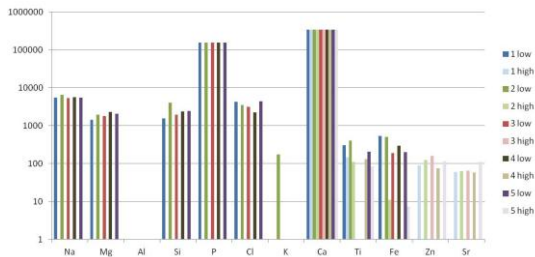


図 2：各元素濃度

(3) 分布図上への新産線の表出：  
健常児など出産時に大きなトラブルのなか  
った児から得られた乳歯では、元素分布図上  
で新産線を確認することはできなかった。そ  
のため、光学顕微鏡写真図を参考に新産線の  
位置を特定し、胎児期形成のエナメル質部  
分を特定した。しかし、在胎 35 週、出生時体  
重 1,740 g 仮死で出生した脳性麻痺児から得  
られたエナメル質では、Ca および P 分布図上  
で新産線が表出された (図 3)。

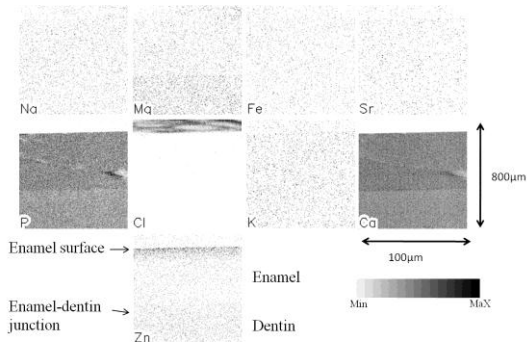


Fig 2 Elemental maps of the elements (Case of cerebral palsy)

図 3：元素分布図 (脳性麻痺児例)

これにより、新産線前後でのエナメル質内元  
素分布の比較が可能となった (図 4, 5, )。

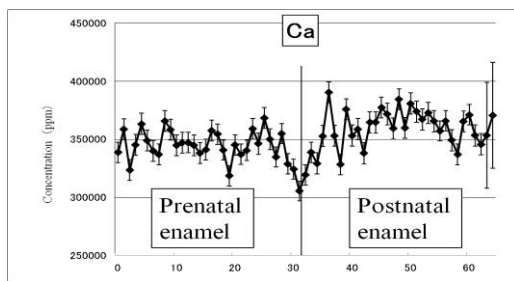


Fig4. Elemental concentration of Ca (Case of cerebral palsy)

図 4：新産線前後での Ca 濃度の比較

この例においては、新産線前後すなわち出生  
前および出生後での Ca 濃度に差があること  
が示された。

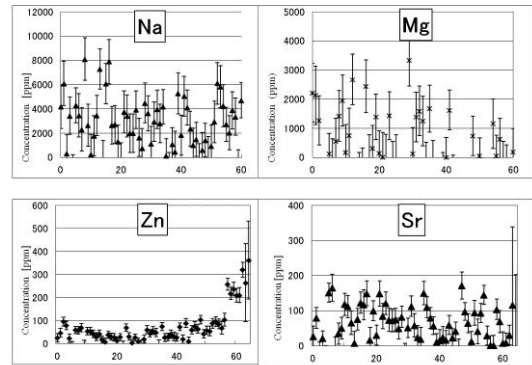


Fig5. Elemental concentration of Na, Mg, Zn, and Sr (Case of cerebral palsy)

図 5：新産線付近での各微量元素濃度

他の微量元素の分布図上では新産線を確認  
できなかったが、Ca 分布図上の新産線の位置  
をトレースすることによって新産線前後で  
の各微量元素の濃度を比較することができ  
た。

(4) 本研究の成果のまとめと今後の展望：  
これまでも乳歯の元素分析の報告は多数あ  
るが、胎児期形成のエナメル質と出生後形  
成のエナメル質における元素分布を視覚的  
に表出して、各領域の濃度を求めたものは  
他にない。本研究は胎児期形成のエナメル  
質に含まれる微量元素濃度を明らかにする  
有用な方法を提示した。

脱落乳歯が得られるのは、生後 6 年近くた  
ってからであるが、幼児期以降に明らかとな  
ってくる健康上の問題もあるため、回顧的  
に胎児期の環境を評価できる本方法は貴重  
である。先の大震災後のがれき等による土  
壌汚染などの懸念があるが、こうした環境  
汚染がこどもの健康に与える影響を評価  
する指標としても用いることができ、今  
後は広く子どもの環境リスク評価への  
応用が期待できる。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者に  
は下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

① K.IGARI, A.TAKAHASHI, H.LANDO,  
K.ISHII, S.MATSUYAMA, Y.KAWAMURA,  
S.OHKURA, Y.HASHIMOTO, M.FUJIKAWA,  
Y.ITOU, K.FUJIKI, Y.HATORI, N.HAMA  
DA, and Y.YAMAZAKI. Application of micro-  
PIXE analysis to investigate trace  
elements in deciduous teeth enamel. Int J  
PIXE, 査読有、20, 2010, 52-56,

〔学会発表〕（計 3 件）

① K. IGARI, A. TAKAHASHI, et. al., Analysis of trace elements in pre- and post-natal tooth enamel using micro-PIXE, The 7th International Symposium for PIXE, Sendai, Nov. 1, 2011.

② 猪狩和子、高橋 温、安藤 瞳 他、乳歯エナメル質の新産線前後における元素分布の比較—マイクロ PIXE 法による検討—、第 27 回 PIXE シンポジウム、平成 22 年 11 月 19 日、京都

③ 高橋 温、猪狩和子、安藤 瞳 他、マイクロ PIXE 法による乳歯エナメル質の元素分析、第 26 回 PIXE シンポジウム、平成 21 年 11 月 18 日、千葉

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

猪狩 和子 (IGARI KAZUKO)

東北大学・病院・講師

研究者番号：90125493

### (2) 研究分担者

高橋 温 (TAKAHASHI ATSUSHI)

東北大学・病院・助教

研究者番号：50333828

安藤 瞳 (ANDO HITOMI)

東北大学・歯学研究科・非常勤講師

研究者番号：60547272