

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 30 年 5 月 9 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K01746

研究課題名(和文) 乳歯および永久歯における必須微量元素の分布と子どもの健康背景

研究課題名(英文) Distribution of essential trace elements in deciduous and permanent teeth, its relationship with general health condition of children

研究代表者

猪狩 和子 (IGARI, Kazuko)

東北大学・大学病院・講師

研究者番号：90125493

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：脳機能の発達に重要な役割を持つ必須微量元素である亜鉛と銅に注目し、歯に含まれる亜鉛と銅の分布を分析して児の出生時の状況や健康状態との関連を検索した。新生児仮死や低出生体重を伴った児から得られた乳歯においては、出生前後のエナメル質における亜鉛と銅の濃度比(Zn/Cn比)が低く、相対的亜鉛濃度の不足がみられた。また、超低出生体重児の乳歯では象牙質における亜鉛の低濃度も観察された。銅は、エナメル質、象牙質共に一様の分布を示した。低出生体重と亜鉛の取込み不足の関連が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Zinc (Zn) and copper (Cu) are essential trace elements and important for the development of the brain function. This study aimed to investigate the distribution of these trace elements in the teeth and evaluate its relationship with general conditions of the perinatal period. The low Zn/Cn ratio and relatively low concentrations of Zn were showed in the pre- and postnatal enamel of the deciduous teeth from children with neonatal asphyxia and/or low birth weight. Also, the low concentration of Zn in the dentin was observed in the deciduous tooth from the extremely-low-birth-weight infant. The distributions of Cu were almost same in both enamel and dentin of all teeth. It was suggested that there was a relationship between low birth weight and the deficiency of Zn intake.

研究分野：社会系歯学(障害者歯科学)

キーワード：必須微量元素分析 乳歯 永久歯 PIXE法 子どもの健康

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 必須微量元素の代表である亜鉛の貯蔵は主に胎児期の後期に行われ30週以降に急速に増加する。従って、早期産児では体内の亜鉛貯蔵が少ない状態で出生する。母乳中の亜鉛は初乳には多く含まれるが成乳になるにつれて減少するため、早期産児・低出生体重児では生後早い時期に亜鉛欠乏症が発症しやすい(児玉2012)。さらに、哺乳障害を伴えば長期の経腸栄養剤が用いられるが、経腸栄養剤には微量元素が不足しているものもある。また、自閉症児でしばしばみられる極端な偏食も微量元素の不足をきたす可能性がある。早期産児・低出生体重児、発達障害が増加している現在、必須微量元素不足の環境下にある子どもは稀ではない。

(2) 必須微量元素である亜鉛と銅は、脳機能の発達に重要な役割を持つ。実際にてんかんのある児において血清中の亜鉛と銅のレベルが通常と異なることや、自閉症児において定型発達児と比較して血清中の亜鉛レベルが低く、銅のレベルが高いことなどが報告されている。これらの研究では on time での血清を用いて微量元素を評価しその時点の症状との関連をみているが、微量元素の不足と発症との間にはタイムラグが存在するうえ、DOHaD の概念(将来の疾病や健康の素因が胎児期にある)に基づけば、胎児期の微量元素の評価が不可欠である。

(3) 乳歯のエナメル質には胎児期に取り込まれた微量元素が代謝されずに蓄積されている。我々は先行研究にて乳歯エナメル質内の新産線の位置を利用して出生前後のエナメル質を区別してそれぞれに含まれる微量元素の分布を明らかにする手法を確立した。この手法により、乳歯を用いて胎児期、乳児期に取り込まれた微量元素量を知ることができ、さらに永久歯(智歯)を用いることで学童期から思春期にかけて取り込まれた微量元素量を知ることができる。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、脳機能の発達に重要な役割を持つ必須微量元素の亜鉛と銅に注目し、乳歯および永久歯のエナメル質における亜鉛と銅の分布を  $\mu$  Particle Induced X-ray Emission ( $\mu$ PIXE) 法により分析して、含有量の年代的推移を知るとともに、児の出生時の状況や出生後の栄養摂取法、発達障害やてんかんの有無などの健康背景との関連を検索することである。

## 3. 研究の方法

### (1) 元素分析用の歯の収集

研究者らの所属する歯科診療部門に定期的に通院する小児患者およびその同胞から永久歯との交換期に自然脱落あるいは抜去した乳前歯および乳犬歯の提供を受けた。齲

蝕のある歯、充填処置が行われている歯、明らかな形成不全を有する歯は分析対象から除外した。

永久歯については、抜去の対象となった智歯の提供を受けた。完全埋伏歯と萌出歯を区別して収集した。抜去智歯の提供者の年齢は20~30歳であった。

### (2) 分析試料の調整

各歯は蒸留水で表面を洗浄後に、歯冠を歯科用レジンに包埋した。ダイヤモンドディスクを装着したスラサーを用いて矢状断で厚さ約1.5mmの試料を作成した。断面を研磨洗浄後に光学顕微鏡にて観察し写真撮影した。乳歯試料ではエナメル質内の新産線の位置を確認し、 $1 \times 1 \text{ mm}^2$ の照射部位を決定した。

### (3) $\mu$ PIXE 法によるエナメル質元素分析

分析試料を専用ホルダーに装着し、カーボン蒸着後に  $\mu$ PIXE 分析に供した。東北大学マイクロビームシステムの試料台に被検試料を設置し、試料表面にマイクロイオンビームを照射して発生する X 線スペクトラムを低・高エネルギー用2つの検出器で測定した。X 線スペクトラムの分析から元素を特定し、次にソフトウエア GeoPIXE を用いて照射領域の各検出元素のマッピング像を得て、分布状態を視覚的に評価した。マップ上で実験要件に応じた濃度分析領域を特定し、領域における  $5 \mu\text{m}$  間隔での線分析により元素濃度を計測した。測定条件はビームスポットサイズ  $2 \times 2 \mu\text{m}^2$ 、ビームカレント 150pA、測定時間1時間に設定した。

### (4) 質問紙調査

乳歯の提供を受ける際に、保護者に対して質問紙調査を実施した。当該小児の妊娠時の母体の栄養状態、児の在胎週数、出生体重、周産期のイベントの有無、経管栄養の有無と期間、発達の状況等を調査した。

### (5) 倫理的配慮

対象歯の提供を受けるに当たり、研究の趣旨を文書および口頭にて保護者(理解可能な範囲で本人にも)に説明し、同意を得た。本研究は、東北大学大学院歯学研究科研究倫理委員会の承認を得て実施した(受付番号26-12)。

## 4. 研究成果

### (1) 乳歯エナメル質の出生前後での元素濃度比較

種々の発達期障害のある7名の児から得られた10本の乳歯を分析した結果を示す。先行研究にて、マップ像にて亜鉛はエナメル質の表層に並行して高濃度の集積を認めたことから、新産線前後の濃度分析範囲を、可能な限り高濃度集積部位が含まれない領域に設定した。新産線を境界とする前後の領域を新産線に並行に線分析を行い、カルシウム、

亜鉛、銅の濃度の平均値を求め、カルシウム濃度に対する比を求めて、出生前後で比較した。Zn/Ca の変化、Cu/Ca の変化を図 1, 2 に、さらに Zn/Cu の変化を図 3 に示す。

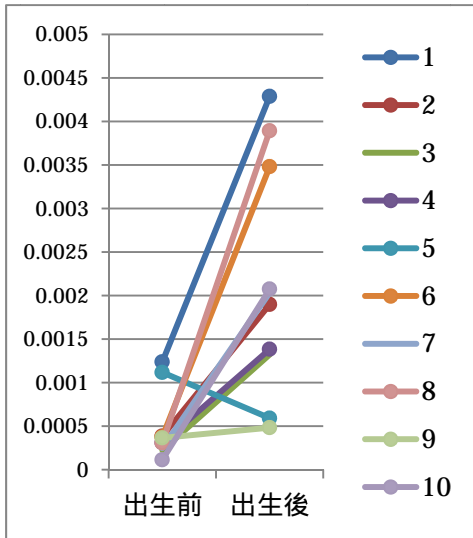


図 1 出生前後の Zn/Ca の変化

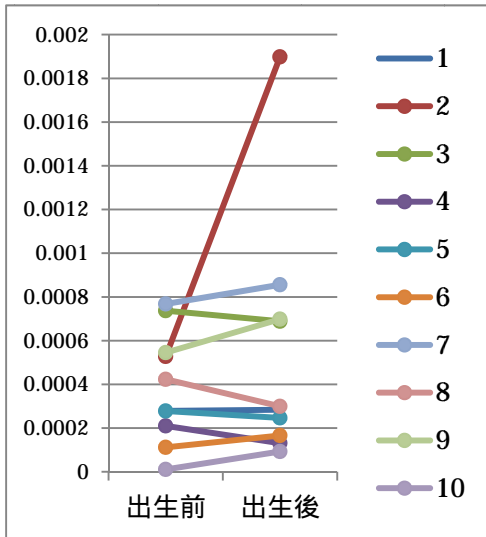


図 2 出生前後の Cu/Ca の変化

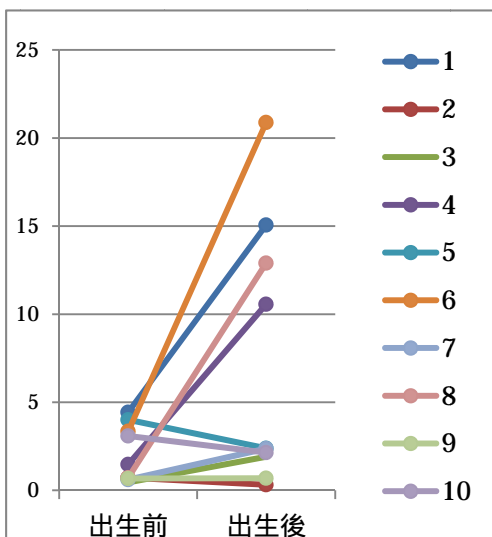


図 3 出生前後の Zn/Cu の変化

Zn/Ca は、試料 5 を除きすべて出生後に大きく上昇がみられた。試料 5 は唯一出生後の Zn 濃度が出生前より低い値であった。Cu/Ca は、試料 2 を除き出生前後で大きな変動はみられなかった。試料 2 では、出生前領域の Cu 濃度 229ppm が出生後領域では 828ppm と大きく上昇していた。

Zn/Cu は、上昇が 6 例でそのうち 4 例は大きく上昇し、出生後の Zn 濃度の増加による。出生前の Zn/Cu 比が 1 未満のものが 5 例あり、内 4 例では新生児仮死と低出生体重があった。

### (2) 定型発達児の乳歯との比較

乳児期における特段の健康上のエピソードを有さない定型発達児から得た 4 歯を加えた合計 14 歯において象牙質を含みエナメル質全域での亜鉛、銅の濃度分布を比較した。

亜鉛は共通してエナメル質より象牙質で濃度が高く、エナメル質表層下 100~200 μm の位置から表層に向けて徐々に濃度上昇がみられた。エナメル質、象牙質における濃度には試料により差がみられた。銅はエナメル質、象牙質で明らかな濃度差はみられず 50~100ppm 程度で安定していたが、1 例のみ象牙質で 1000ppm を越えたものがみられた。

定型発達児から得られた上顎乳側切歯の試料と在胎 25 週、1000g 未満で出生した児の下顎乳中切歯の試料の分析結果をグラフで示す(図 4, 5)。

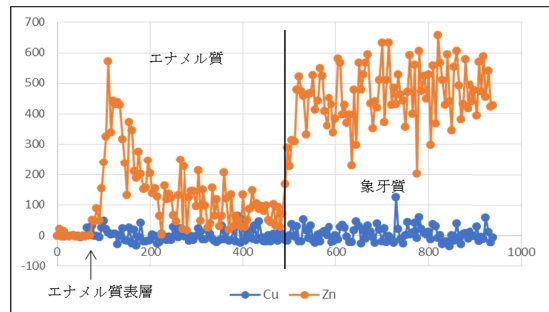


図 4 定型発達児の乳歯の亜鉛・銅濃度分析

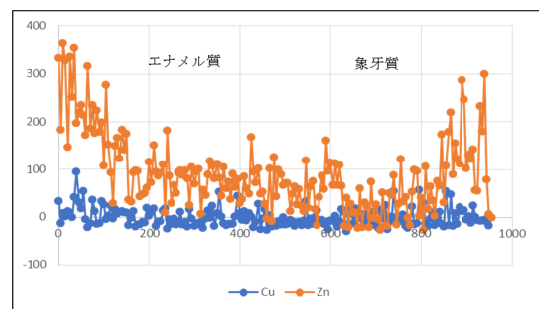


図 5 低出生体重児の乳歯の亜鉛・銅濃度分析

低出生体重児の乳歯ではエナメル表層部の亜鉛の高濃度はみられたが、濃度は 400ppm 以下であり、エナメル象牙境付近の象牙質はさらに低い値を示した。象牙質での亜鉛濃度は内層に向けて高くなる傾向がみられた。一方、銅の濃度変化は他の試料と大きく変わら

ず、安定した値を示した。

### (3) 永久歯エナメル質の元素分析

乳歯との比較および、乳歯で認められたエナメル質表層の高濃度亜鉛が萌出後に唾液や歯磨剤等から取り込まれたものかどうかを確認するため、完全埋伏智歯(萌出前の歯)と萌出後の歯での比較も行った。

完全埋伏智歯(抜歯前のエックス線および抜歯時に口腔内で確認)5歯と少なくとも歯冠の一部の萌出を口腔内で確認できた智歯9歯、合計14歯の歯冠エナメル質を試料とした。1×1mm<sup>2</sup>の範囲にビーム照射し各元素マップを求めたのちに、表層から深さ約600~900μmまでの範囲で濃度分析を行った。

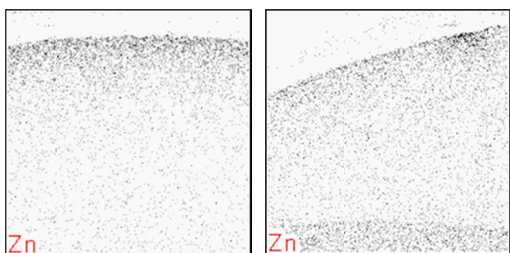


図6 埋伏智歯 図7 萌出智歯

完全埋伏智歯(図6)と萌出智歯(図7)のいずれにおいてもエナメル質表層に亜鉛の高濃度領域が存在し、照射範囲に象牙質が含まれるものでは、エナメル質内層より象牙質で高濃度を呈し、乳歯でみられた分布状態と基本的に同様であった。

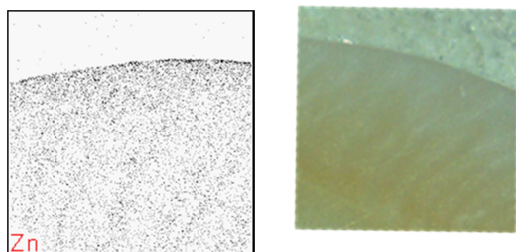


図8 ハンター・シュレーゲル条

試料中には、図8右に示すマクロ写真におけるハンター・シュレーゲル条に一致した亜鉛の濃度分布を示す(図8左)ものも見られた。

分析試料中6歯のエナメル質表層から内層に向けての亜鉛濃度の推移を図9に示す。

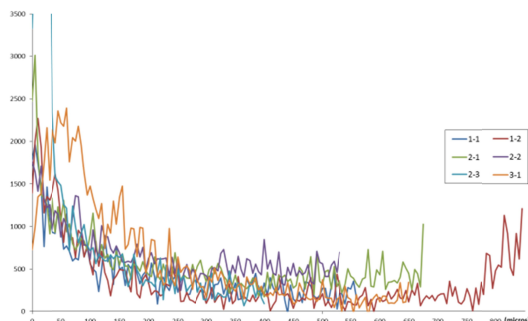


図9 エナメル質表層からの亜鉛濃度推移

永久歯エナメル質の亜鉛濃度は表層の高濃度領域で800~1000ppm、内層では50~200ppm程度であり乳歯と同程度であった。

### (4) 研究成果のまとめと今後の課題

脳機能の発達や健康の維持に重要な役割を果たす必須微量元素である亜鉛と銅に注目して、胎生期から乳児期における暴露物質を蓄積している乳歯エナメル質における分布状態を様々な発達期障害を有する児から得られた乳歯を用いて解析した。カルシウムに対する濃度比を求めて比較すると、Cu/Caは出生前後で大きな変動がみられないものの、Zn/Caは出生後形成領域では出生前より大きく上昇する例が多いことが示された。しかしながら、亜鉛の分布では表層約200μm付近から表層に向けて濃度上昇が共通してみられ、新産線の位置によっては濃度分析領域にこの高濃度部位が含まれた可能性がある。それゆえ出生後領域の亜鉛濃度の評価には外部からの取込みと考えられる表層の高濃度領域の存在を考慮する必要がある。そこで、動態の相互作用がある亜鉛と銅の濃度比(Zn/Cu)をみたところ1未満、すなわち亜鉛が銅より低濃度の状態を示す例が、新生児仮死や低出生体重を伴った児から得られた乳歯でみられた。出生前後での相対的亜鉛濃度の不足が示唆された。また、超低出生体重児の乳歯の分析では、エナメル質、象牙質共に銅の濃度には定型発達児と大きな差はないが、亜鉛濃度は全体的に低く、特に象牙質における低値が顕著であった。自閉症スペクトラム児の外殻象牙質において出生前形成領域で亜鉛の不足を報告したAroraらの報告(2017)に通じる所見と考えられた。

定型発達児の乳歯との比較においては、周産期の異常のない精神遅滞児の例を含めて、亜鉛分布はエナメル質より象牙質で濃度が高く、エナメル質表層に向けての濃度上昇があるという共通の分布を示した。また、永久歯(智歯)における亜鉛分布も乳歯と同様であり、本研究で共通して見られた分布状態は基本的なものと考えられた。なお、エナメル質表層の亜鉛の高濃度領域は完全埋伏歯においても観察され、この部位の亜鉛が萌出後に唾液や歯磨剤等から取込まれただけでなく、萌出前の周囲組織からの取込みがあることを明らかにした。また、20代前半の若年者から得られた智歯では、ハンター・シュレーゲル条に一致した亜鉛分布がみられ、歯の形成における亜鉛の役割を解明する一助となる可能性も示された。

本研究により、周産期の異常をもつ児における相対的亜鉛の不足が示唆されたが、乳歯をバイオマーカーとして用いて発達期障害との関連における微量元素の過不足を追究するには、より環境要件を揃えた研究デザインとともに、乳歯の元素分析の部位と手法についてもさらなる検討が必要となる。

## 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 0 件)

〔学会発表〕(計 4 件)

NAGANUMA Yukihiro, TAKAHASHI Atsushi,  
MATSUYAMA Shigeo, IGARI Kazuko.  
Distribution of trace elements in pre- and  
post-natal enamel of teeth in children  
with disabilities, 24<sup>th</sup> International  
Association for Disability and Oral Health,  
2018.9.1-2. ドバイ(アラブ首長国連邦)

長沼由泰、猪狩和子、高橋 温、松山成男  
ほか、マイクロ PIXE による永久歯エナメル  
質の微量元素分析、第 33 回 PIXE シンポジウ  
ム、平成 29 年 10 月 20 日、京都大学宇治キ  
ャンパス(宇治市)

猪狩和子、高橋 温、松山成男ほか、乳歯  
エナメル質の微量元素分析 - 新産線前後で  
の比較 -、第 32 回 PIXE シンポジウム、平成  
28 年 11 月 10 日、サン・リフレ函館(函館市)

高橋 温、猪狩和子ほか、乳歯エナメル質  
における微量元素の分布様相 - 新産線前後  
の比較 -、第 32 回日本障害者歯科学会、平  
成 27 年 11 月 7 日、名古屋国際会議場(名古屋  
市)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕なし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

猪狩 和子(IGARI, Kazuko)

東北大学・大学病院・講師

研究者番号：9 0 1 2 5 4 9 3

### (2) 研究分担者

高橋 温(TAKAHASHI, Atsushi)

東北大学・大学病院・助教

研究者番号：5 0 3 3 3 8 2 8

松山 成男(MATSUYAMA, Shigeo)

東北大学・工学研究科・教授

研究者番号：7 0 2 1 9 5 2 5

(3) 連携研究者 なし

(4) 研究協力者 なし