

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 27 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24600002

研究課題名(和文)PIXE法を用いた乳歯硬組織および唾液中微量元素分析と子どもの環境リスク評価

研究課題名(英文)Analysis of trace elements in deciduous teeth and saliva using PIXE and evaluation of environmental risk in infant

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) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：様々な基礎疾患を有する小児から得られた乳歯を試料として、エナメル質内の微量元素の種類と濃度、分布様式についてPIXE法を用いて分析した。主たる構成元素のカルシウムとリンの他に亜鉛、銅、ストロンチウムなどが一定の濃度で検出された。新産線を境界として出生前後の各元素濃度を比較したところ、亜鉛では出生前後で変化のないものがある一方で、出生後では出生前より高濃度を示すものが多くみられ、元素の種類、試料ごとに異なる変動を示した。乳歯の元素分布状態が小児の出生前後の健康状態を反映している可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：In this study, naturally shed deciduous teeth obtained from children with some developmental disorders were analyzed for the kind, concentration and distribution of trace elements in enamel using PIXE. Ca and P, essential elements in tooth materials, and Zn, Cu, Sr were constantly detected. The concentration of each element was compared between in pre- and post-natal enamel around the neonatal line. Almost of the teeth showed higher Zn concentration in postnatal enamel rather than in prenatal enamel. The change of the element concentration in pre- and post-natal enamel varied according to an elemental kind and sample. It was suggested that the health condition of the infant could be reflected in the distribution of each element in pre- and post-natal enamel.

研究分野：社会系歯学(障害者歯科学)

キーワード：子どもの健康 微量元素 乳歯

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 近年、子どもを取り巻く環境の悪化は深刻であり、環境中の有害物質が様々な面で子どもの発達や健康に影響を与えている懸念がある。実際この20年間で出生体重の平均は3,250gから200gも減少し、さらに低出生体重児の割合も増加していて、母体の低栄養や喫煙習慣との関係が指摘されている。また、大震災により発生した大量のがれきが環境汚染の原因となる可能性がある。しかしながら、暴露物質と健康影響との関係は未解明で、その解明のために環境リスクを評価する適切な方法が求められている。

(2) その中で、乳歯および唾液は子どもの環境暴露物質を評価する生体試料として適している。乳歯は胎児期および乳児期の暴露物質を代謝せずに蓄積しており、新産線を境界として形成時期を判別することができるため暴露時期を特定して暴露物質を評価することができる。交換期に脱落した乳歯を用いれば非侵襲的に得られる生体試料である。唾液もまた非侵襲的に採取可能で繰り返し採取も可能である。

(3) 乳歯に含まれる微量元素を測定する方法として、組織を破壊せずに分析し、元素分布の様子を観察できることが求められる。研究者らは、先行研究において Particle induced X-ray emission (PIXE) 法を用いて乳歯エナメル質の胎児期形成エナメル質と乳児期形成エナメル質それぞれにおける元素分析を同時に行い、検出した各元素のマッピングを示す方法を確立した。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、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とリアルタイムの暴露物質が溶出していると考えられる唾液に注目して、発達障害児や有病児から採取した乳歯および唾液中の微量元素を PIXE 法を用いて分析し、暴露時期を特定した検出元素の種類や量の特徴を明らかにすることにより、環境暴露物質が子どもの発達や健康におよぼす影響を評価するための指標としての乳歯および唾液の有用性を示すことである。

## 3. 研究の方法

### (1) 乳歯硬組織の元素分析

研究者らが所属する歯科診療部門に通院する小児患者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。乳歯は、蒸留水で表面を洗浄後に、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のバルク試料を作成し、光学顕微鏡下でエナメル質内新産線の位置を確認した。専用ホルダーに試料を装着し、カーボン蒸着後に PIXE 分析に供した。分析条件は、ビー

ム径  $2 \times 2 \mu\text{m}^2$ 、ビームカレント約 100pA、測定時間1時間で、新産線(赤で示す)がほぼ中央に位置する  $1 \times 1\text{mm}^2$  をスキャン範囲(青枠で示す)とした(図1)。



図1

ソフトウエア GeoPIXE を用いて、検出されたおもな元素ごとに元素濃度マップ像を取得した。光学顕微鏡像の照射痕における新産線の位置をそれぞれの元素マップ上に重ね合わせ、新産線を挟んだ出生前後の平均濃度を比較した。

### (2) 唾液の元素分析

乳歯の提供を受けた小児を対象として、飲食後2時間以上経過した口腔から安静時混合唾液をスポイトにて約1cc採取しチューブにとり、試料調整時まで保管する。クリーンボックス内でマイラー膜上に1滴滴下し自然乾燥させ、山崎らの方法(1997)により PIXE 分析に供する。

### (3) 質問紙調査

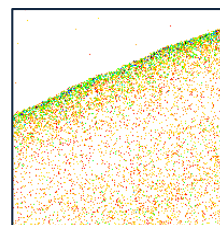
試料採取時に保護者に対して質問紙調査を実施し、当該小児妊娠時の母親の体重変化、喫煙習慣、児の在胎週数、出生体重、栄養摂取方法、基礎疾患に関する情報を収集した。

## 4. 研究成果

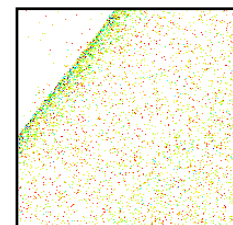
### (1) 乳歯硬組織の主な検出元素

大脳皮質形成障害、新生児仮死、難治性てんかん、脳症後遺症、染色体異常などを有する小児7名から得られた齶蝕のない乳前歯11歯の元素分析を行った。

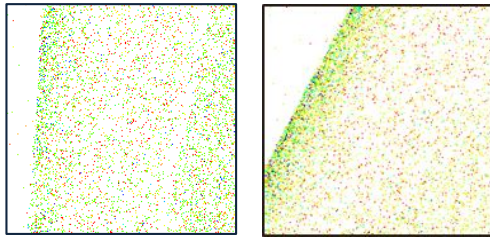
エナメル質・象牙質の主たる構成元素であるカルシウム、リンの他に、亜鉛、ストロンチウム、銅などが検出された。亜鉛は、エナメル質では象牙質よりやや濃度が低く、エナメル質の表層部で高濃度の分布を示すマップ像が全試料に共通して観察された(図2)。



試料1



試料2



試料 4 試料 5  
図 2 亜鉛マップ像

エナメル質表層部での亜鉛の高濃度集積は、エナメル質形成層に沿うものではないため、形成途上で取り込まれたものではなく、口腔内に萌出後に歯磨剤に含まれる亜鉛など外部から取り込まれたものと考えられる。これまで、歯の元素分析で用いられてきた手法の多くはエナメル質を粉砕して測定するものであり、こうした手法で求められた亜鉛濃度は濃度の異なる部位を混合して測定している可能性がある。

マップ上での新産線の位置はカルシウム、リンの一部で確認できたが、その他の微量元素のマップでは捉えることはできなかった。図 3 に示すカルシウムマップ像のエナメル質内には、光学顕微鏡像の新産線位置に一致するラインが観察された。この試料は新生児仮死のみられた児から得られた。石灰化度が低いとされる新産線が、出生時の全身状態を反映してより顕著となりマップ上で可視化されたものと考えられた。

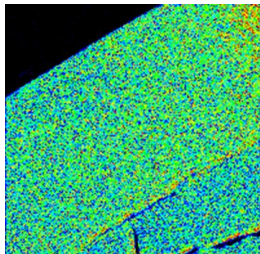


図 3 カルシウムマップ像

## (2) 出生前後の元素濃度比較

新産線を境界として、出生前に形成されたエナメル質と出生後に形成されたエナメル質においてカルシウム、亜鉛、ストロンチウム、銅の平均濃度を算出した。これにより相対濃度としてではあるが、出生前後の元素濃度を評価し比較することができた。

図 4,5 に試料ごとのカルシウムと亜鉛の出生前後の平均濃度(ppm)の比較を示す。

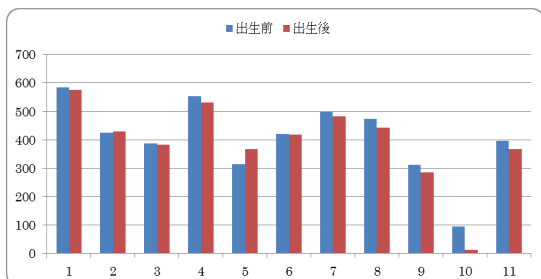


図 4 出生前後のカルシウム濃度比較

カルシウム濃度比較では、試料 5 が出生前と比較して出生後で有意に高濃度であった ( $p < 0.05$ )。その他の試料では出生後の方が低い値を示し、試料 1, 9, 10, 11 では有意であった ( $p < 0.01$ )。

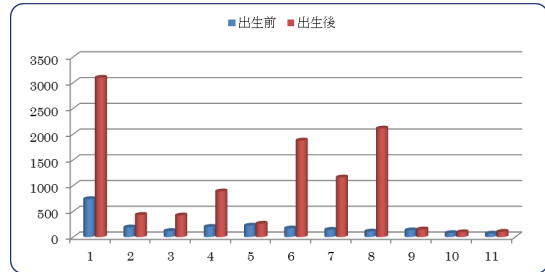


図 5 出生前後の亜鉛濃度比較

亜鉛濃度比較では、いずれの試料も出生前より出生後で高い濃度を示した。試料 1, 3, 4, 6, 8 では有意差を認められた ( $p < 0.01$ )。表層に高濃度領域があるため、その部分を含まない領域を分析した。出生前の亜鉛濃度は試料 1 を除き、100 ~ 200ppm の範囲で比較的安定していたが、出生後の平均濃度には大きなばらつきを認めた。

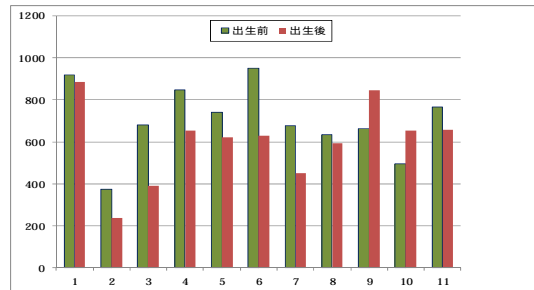


図 6 出生前後のストロンチウム濃度比較

ストロンチウムでは 7 例が出生前後で有意差を示し、うち 5 例は出生前のほうが高濃度であった。

## (3) 分析領域での Zn/Ca 比の変動様相

カルシウム濃度を内部標準として新産線を中央とした内側から表層に向けた計測点毎の Zn/Ca 比平均値をプロットし、出生前から出生後にかけての変動様相を試料ごとに評価した。

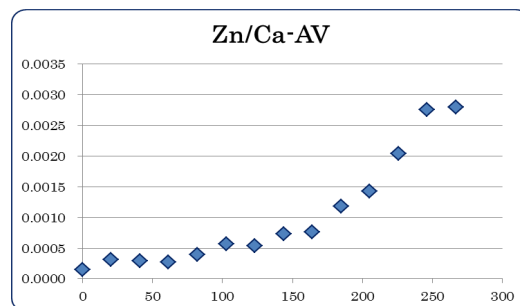


図 7 試料 4

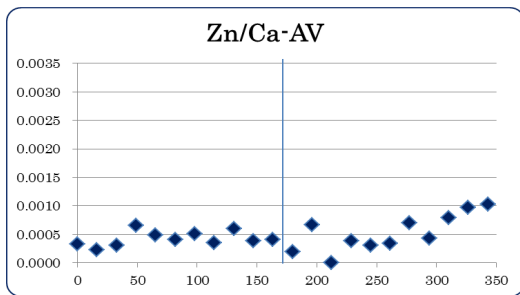


図8 試料9

試料9(図8)のように出生前後でほとんど変化のみられないものがある一方、多くは試料4(図7)のように出生後の領域で上昇がみられ、試料により異なる変化を示した。試料9は染色体異常の児から、試料4は難治性てんかんの児から得られた。出生前後の詳細な健康状態や栄養摂取に関する情報は収集できず、変動との関連を考察するには至らなかった。

#### (4) 唾液の元素分析

当初、唾液中に含まれる微量元素を乳歯と同様にPIXE法により解析し比較することを計画したが、今回分析に使用した加速器の構成では困難なことが判明し計画を断念した。

#### (5) 本研究の成果のまとめと今後の課題

PIXE法を用いた基礎疾患を有する小児から得られた乳歯に含有する微量元素の分析では、海外の土壌汚染のある地域に住む児の乳歯で検出されている鉛などの有害金属は検出されなかった。しかし必須微量元素である亜鉛、ストロンチウム、銅など脳機能の発達等に関連する元素の出生前後の変動を捉えることができた。特に、亜鉛は興味深い変化を示した。今回対象とした基礎疾患を有する児では経管栄養となることも多く、経管栄養においては亜鉛評価の重要性が指摘されている。出生前後の健康状態と微量元素の関連解明において乳歯の元素分析が有用であることを示唆する成果が得られた。

本分析法で得られた元素濃度測定値が実測値として妥当であるかについては課題が残った。本研究では同一試料内での比較をおこなったが、他の報告による濃度測定値との比較による評価を行うためには、他の測定法による検討や標準化調整などによる測定値の調整が必要となってくる。

#### <引用文献>

K. IGARI, A. TAKAHASHI, et al. Application of micro-PIXE analysis to investigate trace elements in deciduous teeth enamel. Int J PIXE, 2010, 20:52-56.

K. IGARI, A. TAKAHASHI, et al. Analysis of trace elements in pre- and post-natal tooth enamel using micro-PIXE, Int J PIXE, 2012, 22:101-106.

K. JEEJEEBHOY, Zinc: An essential trace element for parenteral nutrition, Gastroenterology, 2009, 137:S7-S12.

#### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 3 件)

高橋 温、猪狩和子、橋本 恵、伊藤あゆみ、石田直子、長沼由泰、佐々木啓一、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、2015 年 11 月 6~8 日、名古屋国際会議場(名古屋市)

猪狩和子、高橋 温、長沼由泰、松山成男、石井慶造、佐多大地、関 大輝、鈴木脩平、畠山泰輔、今泉光太、乳歯エナメル質における新産線前後の亜鉛濃度の分布、第31回PIXEシンポジウム、2015 年 10 月 28~30 日、高崎量子応用研究所(高崎市)

猪狩和子、高橋 温、松山成男、乳歯エナメル質における亜鉛の分布様相 - マイクロPIXE法による分析 -、第 53 回日本小児歯科学会、2015 年 5 月 21~22 日、広島国際会議場(広島市)

〔図書〕(計 0 件)

#### 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・大学院工学研究科・准教授  
研究者番号: 7 0 2 1 9 5 2 5