

歯牙の脱灰

ハイドロキシアパタイトの酸脱灰と脱灰に対する F⁻ の効果

歯 tooth

歯はその組織構成から、エナメル質 (enamel), 象牙質 (dentine), セメント質 (cementum) および歯髄 (dental pulp) にわけられる。歯髄を除く三者は多量のリン酸カルシウムを含む石灰化組織として特徴的である。骨や歯を構成するリン酸カルシウムは、アパタイト apatite と呼ばれる複雑な結晶構造をしたものである。代表的なアパタイトとしてハイドロキシアパタイト hydroxyapatite, $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ がある。骨組織には結晶アパタイトとともに、無定型リン酸カルシウム amorphous calcium phosphate が存在する。若い動物ではこの無定型リン酸カルシウムが約 65% 存在するが、成長するにつれてこの量は減少し、35% 程度になる。象牙質は骨に似て、リン酸カルシウムの 65-70% が結晶性アパタイト、残りの 30-35% は無定型リン酸カルシウムとして存在する。エナメル質は象牙質とは著しく異なり、結晶性アパタイトのみから成る。

う蝕 dental caries の発生機序を説明する代表的な説

- ・ 酸脱灰説, 化学寄生性説, 化学細菌説 chemicoparasitic theory
- ・ タンパク質分解説 proteolysis theory
- ・ タンパク質分解キレート説 proteolysis-chelation theory

プラーク中に検出される酸		pKa at 25°C
クエン酸	citric acid	2.87 (第一カルボキシ基)
ギ酸	formic acid	3.55
乳酸	lactic acid	3.66
コハク酸	succinic acid	4.00 (第一カルボキシ基)
酢酸	acetic acid	4.56
酪酸	butyric acid	4.63
プロピオン酸	propionic acid	4.67

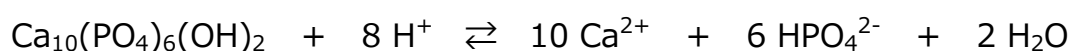
リン酸カルシウム		溶解度 (g/100 mL of H ₂ O), 20°C
リン酸三カルシウム	$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	0.002
リン酸水素カルシウム	CaHPO_4	0.0040303
リン酸二水素カルシウム	$\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$	1.8

実習概要

歯牙無機質の主成分はカルシウムとリンであり、これらは主としてハイドロキシアパタイトの形で存在する。リン酸カルシウムは酸あるいは EDTA などのキレート剤により脱灰されて Ca^{2+} とリン酸になる。実験ではハイドロキシアパタイトを用い、酸として 0.2 M の酢酸緩衝液を用いて脱灰を検討する。また予め NaF 処理したハイドロキシアパタイトの酸脱灰量を測定し、NaF 処理の効果を検討する。脱灰量は生じるリン量から求める。リンの定量は発色法を用いる。

脱灰反応

ハイドロキシアパタイトは酸によって最終的には次のような反応によって完全に脱灰される。



酸濃度がさらに高いときにはリン酸二水素イオン（第一リン酸イオン）を生成する。

リンの定量 Fiske-Subbarow 法

リン酸は酸性で、モリブデン酸アンモニウム $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$ と反応してリンモリブデン酸（黄色）となる。アミノナフトールスルホン酸（還元剤）を加えるとリンモリブデン酸は還元されて青色物質となる。この呈色度を測定する。

検量線 calibration curve

定量分析を行うために、その成分の濃度とその性質に基づいた測定値（たとえば吸光度）との濃度の関係を求めたもので、この関係を示す曲線（あるいは直線）を検量線という。

試薬

- ① 0.022% (w/V) NaF (F として 100 ppm)
- ② 0.2 M 酢酸緩衝液 (pH 4.0)
- ③ 0.2 M 酢酸緩衝液 (pH 4.5)
- ④ 0.2 M 酢酸緩衝液 (pH 5.0)
- ⑤ 0.2 M 酢酸緩衝液 (pH 5.5)
- ⑥ 0.2 M 酢酸緩衝液 (pH 6.0)
- ⑦ 1.5 M 硫酸
- ⑧ 25 g/L モリブデン酸アンモニウム水溶液
- ⑨ 2.5 mg/mL アミノナフトールスルホン酸試薬： 100 mL の水に亜硫酸水素ナトリウム NaHSO_3 15 g, 亜硫酸ナトリウム Na_2SO_3 0.5 g を加温溶解し, さらに 1,2,4-アミノナフトールスルホン酸 0.25 g を加えて溶解する.
- ⑩ 200 μg (P)/mL リン規準液： リン酸カリウム KH_2PO_4 0.4394 g を水に溶解して 100 mL にする [1 mg (P)/mL]. この液をさらに水で 5 倍に希釈する.

Q: 0.022% NaF 溶液が 100 ppm F 溶液に相当することを計算して確かめる.

4°C で 1 mL が 1 g であるとする.

Na = 22.99

F = 19.00

ppm = parts per million 百万分の一

Q: リン酸カリウム KH_2PO_4 0.4394 g 中のリン量 (g または mg) を計算する.

$\text{KH}_2\text{PO}_4 = 136.09$

P = 30.97

操作

フッ素処理

1. ハイドロキシアパタイトを秤量し、10本のキャップ付遠沈管に100 mg ずつ入れる。
2. 5本に脱イオン水 5 mL, 別の5本に100 ppm F (NaF 溶液) 5 mL を加え、キャップをして20分間振とうする。
3. 2,000 rpm で5分間遠心分離し、上清をデカンテーションにより捨てる。

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
ハイドロキシアパタイト	100 mg	100 mg	100 mg	100 mg	100 mg	100 mg	100 mg	100 mg	100 mg	100 mg
脱イオン水	5 mL	5 mL	5 mL	5 mL	5 mL	—	—	—	—	—
100 ppm F	—	—	—	—	—	5 mL	5 mL	5 mL	5 mL	5 mL

洗浄

1. すべての遠沈管に脱イオン水 5 mL を加え、転倒混和する。2,000 rpm で5分間遠心分離して上清を捨てる。

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
	脱イオン水処理					100 ppm F 処理				
酢酸緩衝液 (pH 4.0)	5 mL	—	—	—	—	5 mL	—	—	—	—
酢酸緩衝液 (pH 4.5)	—	5 mL	—	—	—	—	5 mL	—	—	—
酢酸緩衝液 (pH 5.0)	—	—	5 mL	—	—	—	—	5 mL	—	—
酢酸緩衝液 (pH 5.5)	—	—	—	5 mL	—	—	—	—	5 mL	—
酢酸緩衝液 (pH 6.0)	—	—	—	—	5 mL	—	—	—	—	5 mL

脱灰

1. 0.2 M 酢酸緩衝液を 5 mL 加え、キャップをして20分間振とうする。
2. 2,000 rpm で5分間遠心分離し、上清(脱灰液)を別の小試験管にデカンテーションにより移す。粉が混入しないように注意する。

リンの定量 = 発色反応

1. 試験管 (1-10) に脱灰液を 50 μL (0.05 mL) マイクロピペットでとり, 脱イオン水を 450 μL (0.45 mL) 加える (合計 0.5 mL).
2. 試験管 (規準) にリン規準液を 50 μL (0.05 mL) マイクロピペットでとり, 脱イオン水を 450 μL (0.45 mL) 加える (合計 0.5 mL).
3. 試験管 (ブランク) に脱イオン水を 500 μL (0.5 mL) 加える (合計 0.5 mL).
4. 試験管 12 本に硫酸 0.5 mL, モリブデン酸アンモニウム液 0.5 mL, 脱イオン水 3.3 mL, アミノナフトールスルホン酸試薬 0.2 mL の順に加える (全量各 5.0 mL). それぞれの段階でよく混和する. 時間による発色の差をなくすため, 脱灰液と規準液はまとめて発色させる.
5. 室温に 10 分間放置後, ブランクの液を対照 (吸光度 0) として 750 nm の吸光度を測定する. 規準液の吸光度 ($A_{\text{規準}}$) をもとに試料中のリン量を計算する.

	ブランク	規準	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
処理			脱イオン水					NaF				
脱灰液 pH			4.0	4.5	5.0	5.5	6.0	4.0	4.5	5.0	5.5	6.0
吸光度	0											
リン量 $\mu\text{g/mL}$	0	200										

$$200 \mu\text{g/ml} : A_{\text{規準}} = \text{試料中のリン}(\mu\text{g/ml}) : A_{\text{試料}}$$

$$\text{試料中のリン}(\mu\text{g/ml}) = 200 (\mu\text{g/ml}) \times A_{\text{試料}} / A_{\text{規準}}$$

規準液の吸光度をもとに試料 (脱灰液) のリン量を計算し, グラフ (図) を描き, pH の影響, NaF 処理の効果を検討せよ.

Q: 100 mg のハイドロキシアパタイトがすべて溶解したなら, リン量は?

ハイドロキシアパタイト $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2 = 1004.63$

P = 30.97