

[H30-1]

大気マイクロ PIXE の臨床応用による新たな診断・治療・予防戦略の開発

Development of new diagnostic, therapeutic and preventive strategies by clinical application of in-air micro PIXE

土橋邦生 ^{#A)}, 佐藤隆博 ^{B)}, 古賀康彦 ^{C)}, 解良恭一 ^{D)}, 江夏昌志 ^{B)}, 久田剛志 ^{E)}, 笠松哲光 ^{E)}, 金井敬海 ^{E)}, 村上博和 ^{E)}, 奥山克史 ^{F)}, 松田康裕 ^{G)}, 山本洋子 ^{H)}, 内藤克昭 ^{H)}, 斉藤隆史 ^{G)}, 林美加子 ^{H)}, 吉田靖弘 ^{I)}, 玉置幸道 ^{F)}, 山田尚人 ^{B)}

Kunio Dobashi^{#,A)}, Takahiro Satoh^{B)}, Yasuhiko Koga^{C)}, Kyoichi Kaira^{D)}, Masashi Koka^{B)}, Takeshi Hisada^{E)}, Tetsuhiro Kasamatsu^{E)}, Yukihiro Kanai^{E)}, Hirokazu Murakami^{E)}, Katsushi Okuyama^{F)}, Yasuhiro Matsuda^{G)}, Hiroko Yamamoto^{H)}, Katsuaki Naito^{H)}, Takashi Saito^{G)}, Mikako Hayashi^{H)}, Yasuhiro Yoshida^{I)}, Yukimichi Tamaki^{F)}, Naoto Yamada^{B)}

^{A)} Jobu Hospital for Respiratory Diseases.

^{B)} Takasaki Advanced Radiation Research Institute, Japan Atomic Energy Agency

^{C)} Department of Allergy and Respiratory Medicine, Gunma University Graduate School of Medicine

^{D)} Department of Oncology Clinical Development, Gunma University Graduate School of Medicine

^{E)} Gunma University Graduate School of Health Sciences

^{F)} Asahi University School of Dentistry,

^{G)} School of Dentistry, Health Sciences University of Hokkaido,

^{H)} Graduate School of Dentistry, Osaka University,

^{I)} Faculty of Dental Medicine, Hokkaido University,

Abstract

In H30-1 project, micro-particle induced X/gamma-ray emission (μ -PIXE) analysis using MeV-class proton microbeams found wider application in various field of medicine by the development of the sample preparation and the analytical method in the 2018 fiscal year. The details of the five research projects conducted in fiscal 2018 are described below.

It has been well known that inhalation of asbestos can be a risk factor of interstitial pneumonia. The relationship between inhalation of elements and interstitial pneumonias still remains unknown. In this study, we focused on idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) revealed by the histology obtained from video-assisted thoracic lung surgery and examined the inhaled elements in the lungs by in-air μ particle-induced X-ray emission analysis (in-air μ PIXE). The relationship between contents of elements in the lungs and the progression of IPF were analyzed. In-air μ PIXE detected elements such as Mg, Fe, Si, Al, S, P, and Zn in the lungs. Accumulation of inhaled silica/silicates were correlated with annual declined forced vital capacity, while other elements detected by in-air μ PIXE did not show any correlation with the progression of IPF. Furthermore, high levels of inhaled silica/silicates in the lungs decreased mortality of IPF, indicating that accumulated silica/silicates in the lungs are possible predictive marker of IPF prognosis. This study showed that small amounts of inhaled elements in the lungs detected by in-air μ PIXE is useful for the analysis of progression in IPF patients.

Doxorubicin is an anthracycline antibiotic with antineoplastic activity and intercalates between base pairs in the DNA helix. To evaluate influence of the doxorubicin, we analyzed the elemental change in acute myelogenous leukemia (AML) cell HL-60 and KG-1. We added doxorubicin of 0 nM, 850 nM in HL-60 and 100 μ M in KG-1 and cultured 24 hours. Compared to multiple myeloma cell, AML cell lines showed higher level of K. The level of K in HL-60 treated with 850 nM was lower than 0 nM. However, the decrease in K level was not observed in KG-1 and THP-1.

Titanium fluoride (TiF₄) is expected for one of the solutions for topical fluoride treatment. The purpose of this study is to evaluate distribution of fluorine and titanium by various concentration or pH value of TiF₄ solutions. Extracted human teeth were sliced (500 μ m thickness) longitudinal, coated with wax except for buccal dentin surface. Specimens were carried out on pH cycling (pH:4.5 and 7.0; simulate oral condition) for 4 or 8w for preparing artificial carious dentin. During this cycle, specimens were soaked into TiF₄ solution for 5 min once every two weeks. After cycling, calcium, fluorine and titanium distribution were analyzed by an in-air μ PIXE/PIGE system. Two different conditions of solution and cycling periods were used in this study (Exp. 1: 0.1 or 1% TiF₄ and 4-week cycle, Exp.2: pH 1, 4, 5, or 6 of 1% TiF₄ and 8-week cycle). For Exp.1, fluorine and titanium distribution from dentin surface to 100 μ m depth were increased by increasing TiF₄ concentration. For Exp.2, higher fluorine distribution on pH 1 and 6 of TiF₄ solution were indicated than that on pH 4 and 5. pH 1 of solution showed the highest Ti distribution among all used pH values.

Minerals, such as F and Ca, can remineralize teeth enamel and dentin. Zn and Cu also have the possibility of

土橋邦生 dobashik@gunma-u.ac.jp

[H30-1]

preventing demineralization of dentin. This study aimed to analyze the mineral uptake to the dentin from our novel fluoride-containing ZnO–CuO nanocomposites (ZCF). The nanocomposites comprising Zn, Cu, and Fluorine (ZCF) was prepared according to the previous and applied on the demineralized dentin surface. Cross-cut dentin specimen were analysis by PIXE/PIGE system. The F, Zn, and Cu were observed in the dentin surface; however, the mineral distribution tends to differ by elements. Thus, Fluoride-containing ZnO–CuO nanocomposites could provide F, Zn, and Cu to the dentin and have the potential for remineralizations.

The penetration of various ions (Ca, F, Zn, Sr) from bioactive materials into human dentin are investigated using in-air μ PIXE/PIGE system at TIARA. The human dentin surfaces were covered with following dental materials: 1) coating agent containing ZnF (ZnF), 2) glass ionomer cement (Fuji 7, which is made of glass polyalkenoate cement) (F7), and 3) F7Ca (The half rate of Sr containing in Fuji7 was replaced by Ca) (F7Ca). Root dentin without materials served as a control (Co). After 3 months, multi-elemental sequential analysis were performed by measuring concentrations of Ca, F, Zn and Sr. For evaluation of acid resistance of dentin, the mineral concentrations of all specimens before and after the demineralization was measured with μ CT. ZnF group showed significantly higher Zn concentration in dentin than other groups. ZnF and the F7Ca groups had significantly less mineral loss than the control group. However, there was no significant difference in mineral loss among the materials. The PIXE/PIGE system enabled multi-ion sequential measurements of human dentin. It was conducted that multi-ion such as F, Zn and Ca promoted caries inhibition.

As described above, in two-dimensional analysis of element distribution in tissue, in-air μ PIXE has been shown to be a very effective measuring device for diagnosis, treatment, prognosis prediction of diseases, and new drug development.

Keyword: asbestos, Idiopathic Pulmonary Fibrosis, Silica (Si), acute myelogenous leukemia, anthracycline, titanium fluoride, fluorine (F), titanium (Ti), zinc (Zn), nanocomposites, mineral uptake, dental materials, Dentin, Caries inhibition,

[H30-1]

1. はじめに

我々は、大気 μ PIXE/PIGE 分析技術を使い、医学・生物学的現象の解明で多くの成果を出してきた。今回、その中でも臨床に直結する課題を取り上げ、肺、血液、歯牙の分野で新たな診断・治療・予防戦略を確立し、国民の健康や環境改善に寄与することを目的としている。本プロジェクトでは、各種疾患における微量元素の関与の調査や薬剤や医療材料の効果の検証を行った。肺では、吸入粉塵による肺線維症や石綿肺の発症や予後に与える影響、吸入粉塵による肺線維症の病態解明、原因不明の肺線維症に潜む吸入粉塵が原因の肺線維症の同定による労災認定の手助け、血液では、骨髄異形成症候群(MDS)における無効造血および白血化の機序解明と新規治療薬の開発、歯牙では、各元素を含有した歯科材料によるう蝕進行への影響を評価し、う蝕進行抑制における各元素との相互関係を解析し、新たなう蝕の進行を抑制する方法を開発する。H30 年度報告書においては、「特発性肺線維症患者の肺組織中元素解析の検討」、「大気マイクロ PIXE 法による急性骨髄性白血病細胞内微量元素の動態解明」、「フッ化チタン処理による各種元素の歯質への浸透—溶液濃度と pH による影響—」、「フッ素含有 ZnO/CuO ナノ粒子から象牙質内へのミネラル供給作用の検討」、「多種イオンによる根面象牙質のう蝕抑制の検討」について詳述する。いずれも局所領域に分布する複数微量元素を高感度で高い空間分解能で同時に画像化できる μ PIXE の特徴を生かした研究である。

2. 特発性肺線維症患者の肺組織中元素解析の検討

2.1 背景

微量な肺組織を用いた元素分布の測定が可能な大気マイクロ PIXE (Particle Induced X-ray Emission: in-air μ PIXE)により我々は肺と縦隔リンパ節における元素濃度の検討を行ってきた[1]。同様の手法を用いて特発性肺線維症を対象とした肺組織中の元素解析を行い、肺組織中の元素濃度と特発性肺線維症の進行度及び予後との関連性を検討した。

2.2 方法

胸腔鏡下肺生検で得られた肺組織検体のパラフィン切片にイオンマイクロビームを照射し、パラフィン切片内の元素分布を測定した。対象検体は病理学的に usual interstitial pneumonia pattern と診断された特発性肺線維症症例のみとした。

2.3 結果

大気マイクロ PIXE 分析により検出された、肺組織中の元素、Al, Mg, Si, S, P, Ca, Fe, Zn の中で、唯一シリカと特発性肺線維症の肺機能の変化との間に有意な相関関係を認めた (Fig.1A)。さらにシリカ濃度 (Si/S)が 0.11 以上の症例ではそれ以下の症例より有意に予後の悪化が認められた(Fig. 1B)。

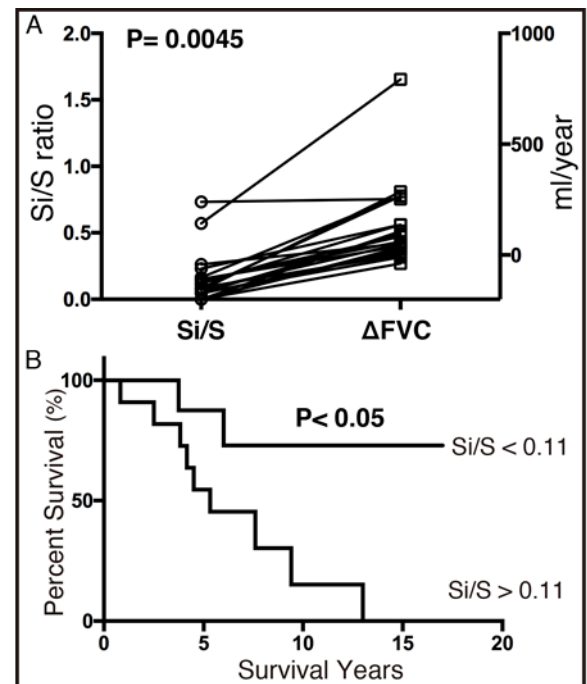


Figure 1. Accumulated silica/silicates in the lungs decreased annual forced vital capacity (A) and increased mortality (B) in IPF cases. Accumulation of silica/silicates (Si/S) in the lungs significantly correlated with annual declined forced vital capacity (A). Accumulated silica/silicates (Si/S) more than 0.11 significantly decreased mortality

2.4 考察

大気マイクロ PIXE によって検出された肺組織中シリカ濃度が、特発性肺線維症の進行度や予後を予測出来る可能性が示唆された。

3. 大気マイクロ PIXE 法による急性骨髄性白血病細胞内微量元素の動態解明

3.1 背景

急性骨髄性白血病 (AML) は 分化・成熟能が障害された幼若骨髄系細胞のクローナルな自律性増殖を特徴とする多様性に富む血液腫瘍である。骨髄における白血病細胞の異常な増殖の結果、正常な造血機能は著しく障害され、白血球減少、貧血、血小板減少に伴うさまざまな症状を呈する。適切な治療がなされない場合は、感染症や出血により短期間で致死的となる重篤な疾患である。今研究では、AML の病態解明および新たな疾患の病型分類・治療法の開発へと結びつけることを目的とし、大気 μ -PIXE 法を用いた異なる病型の AML 細胞内の微量元素の検討を行った。

3.2 対象と方法

対象としたのは病型が異なる以下の AML 細胞株 2 株。(1) 急性前骨髄球性白血病 (AML-M3) 由来 AML 細胞株 (HL-60) (2) 急性骨髄性白血病 (AML-M2)

[H30-1]

由来 AML 細胞株 (KG-1)

方法は、アントラサイクリン系抗腫瘍薬ドキソルビシン (DXR) を 0 から 200 μ M の濃度で 10 濃度に分け、HL-60・KG-1 に添加して 24 時間培養する。22 時間の段階で WST-8 を添加し、450nm の吸光度を測定する。DXR 添加量 0nM を 100% として、各濃度の生存率を算定し、そこから 50% 阻害濃度 (IC50) を算出した。

DXR を 0 nM (全細胞) と各 IC50 濃度 850 nM (HL-60)、100 μ M (KG-1) で添加し、24 時間培養を行った。細胞を TRIS-HNO₃ (pH 7.4) にて洗浄後、 5×10^5 個/mL に再懸濁後、集細胞遠心装置にて、500 rpm、15 分遠心し、0.5 μ m 厚のポリカーボネート膜に細胞を接着させ、真空蒸着させる。分析試料を in-air μ PIXE 分析チャンバーに装着、順次測定し、AML 細胞内微量元素を解析する。

3.3 結果

AML-M3 細胞株 HL-60 と AML-M2 細胞株 KG-1 および他の血液疾患である多発性骨髄腫のヒストグラムを Figure 2 に示す。1 細胞あたりを示す濃グレーのヒストグラムを比較すると、AML 細胞株である HL-60・KG-1 とともに、多発性骨髄腫細胞株に比べ K のピークが高かった。他の元素では細胞起源による明らかな差は認められなかった。DXR24 時間処理の HL-60 では未処理に比べ、K のピークが低くなっていた。しかし、AML の他の病型由来の KG-1 では DXR 処理による K ピークの減少は認められなかった。また、Si のピークは一部高くなっていたが、分布を確認したところ細胞の位置に関係なく全体的に高くなっていた。

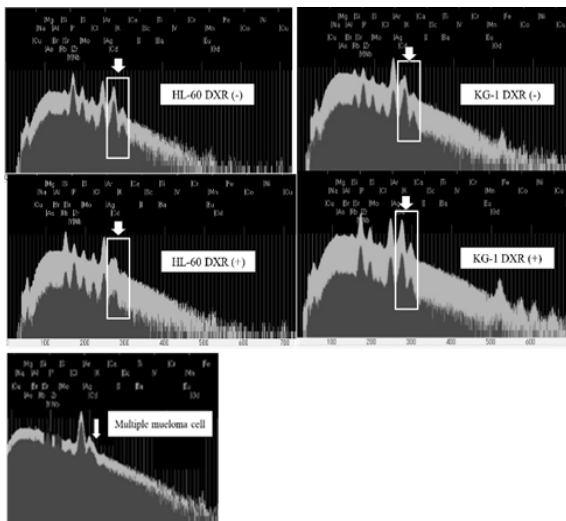


Figure 2. The histogram of AML cells and multiple myeloma cells.

3.4 考察

一般的に K は約 90% が細胞内液に存在し、神経や筋肉の興奮や伝達に重要な働きをしている。細胞

膜に存在するカリウムチャンネルによって細胞内外の K の恒常性が保たれている。神経や筋以外の非興奮系細胞ではカリウムチャンネルによる K の細胞外への流出は細胞容積を減少させ、細胞種により異なるが、マイトジェンの活性化による細胞増殖に働く場合と、カスパーゼやエンドヌクレアーゼ活性を上昇させアポトーシスが誘発される経路が存在している[2]。HL-60、KG-1 とともに非興奮系細胞であるが、K の流出により細胞増殖と細胞死のどちらが活性化されるかは明らかではない。

DXR は腫瘍細胞の DNA と複合体を形成すること

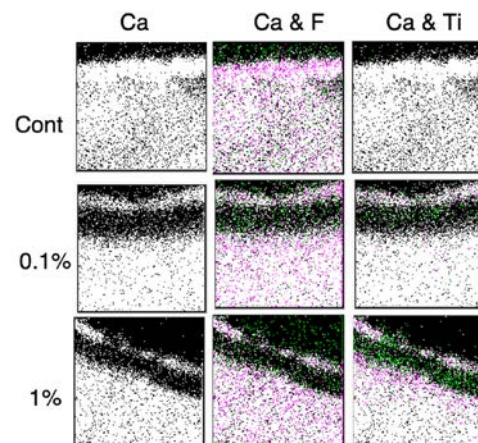


Fig. 3 Representative elemental PIXE/PIGE mapping images of each concentration of TiF₄. Left images show calcium by PIXE. Middle images show fluorine by PIGE and calcium. Right images show titanium and calcium. by PIXE. White dots in the map represent calcium signals. Green or pink dots in the map represent fluorine or titanium signals. Superficial surface is at upper side on each image.

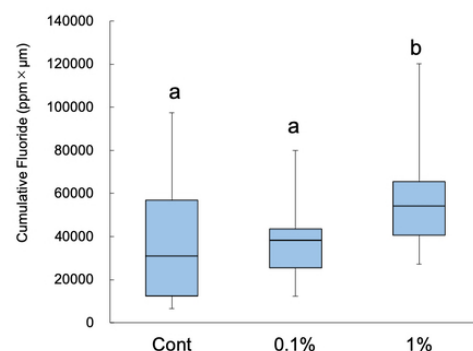


Fig. 4 Concentration of penetrated fluorine into dentin at 100 μ m depth area from superficial surface (ppm $\times\mu$ m). Same letters no indicate significant differences ($p > 0.05$).

[H30-1]

によって、DNA polymerase や RNA polymerase 反応を阻害し、DNA 複製、RNA の合成、ひいては蛋白合成を阻害し、腫瘍細胞の増殖を抑制する。本研究で DXR の添加により AML-M3 由来の HL-60 では K 濃度が低下しており、DXR が直接的または間接的に K 濃度に影響し細胞死に関与していることが示唆される。一方で、AML-M2 由来の KG-1 では K 濃度の変化が認められなかったため、AML の病型または AML 細胞の分化段階によりその機序が異なることが示唆される。今後 DXR によりカスパーゼやエンドヌクレアーゼの発現が上昇することを確認していきたい。さらに他の病型の AML 細胞株や異なる抗腫瘍薬を用いた検討を行っていく予定である。

4. フッ化チタン処理による各種元素の歯質への浸透 —溶液濃度と pH による影響—

4.1 背景

F によるう蝕抑制効果は、広く知られるところである。また近年、金属イオン（元素）によるう蝕抑制効果の促進が認められ、Sr や Zn が存在することで、F 単独よりも脱灰抑制が期待できることが報告されている[3]。金属イオンの F 化合物としてフッ化チタンの応用が報告されており、フッ化ナトリウムよりも優れた抗う蝕作用を示すことも示され[4]、海外では一部歯面塗布剤として臨床応用されているが、酸性度が強く、国内での使用は見られない。そこで本研究では、フッ化チタンの歯科における幅広い応用を目指し、局所的応用において安全かつ効果的な酸性度、およびフッ化チタン濃度を確定することを目的とし、まず、任意の濃度、および pH に調製したフッ化チタン溶液による歯質への F および Ti の浸透への影響について評価、検討を行った。

4.2 材料と方法

ヒト抜去歯を歯軸に平行に頬舌的に厚さ約 500 μ m に薄切し、試料の頬側面のエナメル質とセメント質の境目を中心に幅 3 mm の範囲を除き、ワックスで被覆した。試料を pH4.5 と 7.0 を一定のサイクルで繰り返す自動 pH サイクル装置[5]に供し、う蝕負荷のシミュレーションを行った。サイクルの間に以下に示すフッ化チタン (TiF₄) 水溶液を 2 週間に 1 度 5 分間浸漬し、その後水洗する処理を行った。pH サイクル後の試料について、表層からの F、Ca および Ti の分布を μ PIXE/PIGE 装置にて測定、分析を行った。F と Ca は標準試料を測定することで濃度 (ppm) を算出しているが、Ti についてはビーム照射時のビーム量比較のため、同時に測定される Cu のカウント数との比 (counts/Cu counts) を用いて比較した。得られたデータは Kruskal-Wallis test および Mann-Whitney's U test にて危険率 5% で統計解析を行った。

2.1 実験 1 : TiF₄ 濃度による評価

0.1, 1% TiF₄ 水溶液をフッ化物処理に用い、対象としてフッ化物処理を行わない群 (Cont) を設定し、pH サイクルに 4 週間供した後、PIXE/PIGE 分析を行った。

2.2 実験 2 : 溶液の pH による評価

1% TiF₄ 水溶液について、5M KOH にて pH を 4, 5 および 6 に調製したものと、調製を行わない溶液 (pH:1) をフッ化物処理に用い、pH サイクルに 8 週間供した後、実験 1 同様 PIXE/PIGE 分析を行った。

4.3 結果および考察

Fig. 3 に実験 1 における TiF₄ 水溶液の濃度別に代表的なマッピング像を示す。フッ化物処理をしない Cont では F が検出されておらず、溶液濃度が高くなるにつれ、F および Ti の分布が多くなっているのが確認できる。また、F の分布は Ca 濃度がある程度認められる白いドットの箇所に認められるのに対し、Ti は試料表層から Ca が脱灰している箇所に限局して認められる。Fig. 4 に表層から 100 μ m までの累積 F 量、Fig. 5 に Ti 量を示す。F、Ti いずれも、1% 水溶液処理群が他の濃度よりも大きな値を示していた。

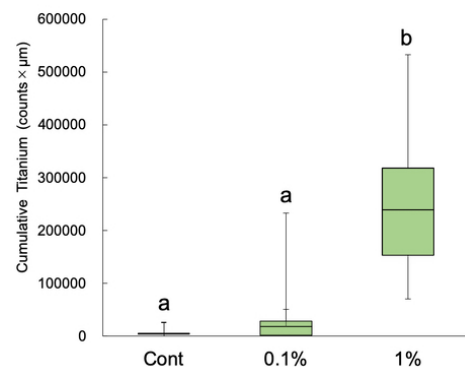


Fig. 5 Concentration of penetrated titanium into dentin around each material at 100 μ m depth area from superficial surface (counts/Cu counts $\times\mu$ m). Same letters no indicate significant differences ($p>0.05$).

Fig. 6 に実験 2 において、TiF₄ 水溶液の pH が 1 および 6 における代表的なマッピング像を示す。F については両者とも試料深部まで浸透しているが、Ti は pH 1 では試料表層から脱灰部直下までの箇所に認められるのに対し、pH6 では表層付近にわずかに認められる程度である。表層から 100 μ m までの累積量では、F で pH1、6 が pH4、5 よりも有意に高い値を認めているのに対し (Fig. 7)、Ti は pH1 が pH4、5、6 より大きい値を示していた (Fig. 8)。

[H30-1]

溶液濃度が高いほど F や Ti の浸透が多くなることを示されたが、浸透の深さ、場所に違いが認められた。これは両者の原子量の差と、F の分布は、

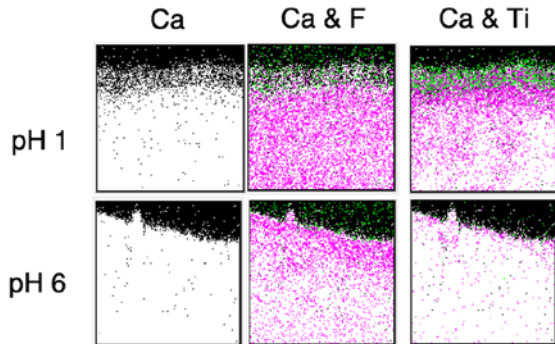


Fig. 6 Representative elemental PIXE/PIGE mapping images of pH 1 and 6 of TiF4. Left images show calcium by PIXE. Middle images show fluorine by PIGE and calcium. Right images show titanium and calcium. by PIXE. White dots in the map represent calcium signals. Green or pink dots in the map represent fluorine or titanium signals. Superficial surface is at upper side on each image.

F と歯質を構成するハイドロキシアパタイトとの結合や、アパタイトから溶出した Ca と F とが結合することで形成されるフッ化カルシウムの形で沈着のために、ある程度 Ca 濃度の高いところに認められたものと思われる。また pH による違いでも pH1 では試料表層を強く脱灰するため、F や Ti の浸透する場所が広く形成され、他の pH と比較して多い分布を認めたものと考えられる。pH4~6 の間で F や Ti の分布量に差を認めなかったことより、pH4 と 6 では同様のう蝕抑制効果が期待できるものと思われる。

今後は、フッ化ナトリウムなど他の F 化合物との比較や、TMR による脱灰量の評価検討を行い、さらなるフッ化チタンの可能性を探究していく。

5. フッ素含有 ZnO/CuO ナノ粒子から象牙質内へのミネラル供給作用の検討

5.1 背景

我々はこれまで In-air μ PIXE/PIGE 法を用いて、歯質内の F の分布および、定量を行って来た。F は歯質に取り込まれ歯質内のハイドロキシアパタイトの水酸基と置換することによってフルオロアパタイト (HAP) を生成することが知られている。フルオロアパタイト (FAP) は HAP より耐酸性を持つため、F 使用はう蝕抑制効果を示し、WHO から推奨されている。近年増加が報告されている根面う蝕は象牙質を主体としたう蝕病変であり、HAP、FAP の溶解だけでなく、コラーゲン線維の溶解、および分解も併せて生じている。コラーゲン線維は MMP によって分解される。F も MMP 阻害効果をもつが、Zn にも MMP の阻害効果が報告されている。また Cu はコ

ラーゲンの架橋構造に必須な元素の一つである。このような Zn、Cu の化合物として、ZnO、CuO のナノコンポジット (ZnO/CuO-NC) がある。

2012 年には ZnO、CuO ナノ粒子がプラズマコーティングされた歯面で細菌の付着が抑制されることが報告された。Zn と Cu の両元素のナノ複合粒子である ZnO/CuO-NC にも抗菌作用、抗真菌作用が認められており、さらに細胞毒性が ZnO、CuO よりも少なく、低濃度であれば細胞活性に影響がないことが無いことが報告されている。

Zn は象牙質コラーゲンを分解する MMP を阻害し、コラーゲン繊維を保護し、再石灰化の核となるコラーゲン内に存在するのアパタイト結晶核を保護することが報告されており、象牙質の劣化の抑制と再石灰化の促進が期待される。

一方、Cu はコラーゲンの架橋構造に必要なリシンオキシダーゼやモノアミンオキシダーゼの必須元素であり、クロスリンク抑制剤のいくつかは銅キレート剤であることから Cu はコラーゲン構造の保存に重要であると考えられる。実際に Cu のナノ粒子が象牙質コラーゲンの劣化を抑制することが報告されている。

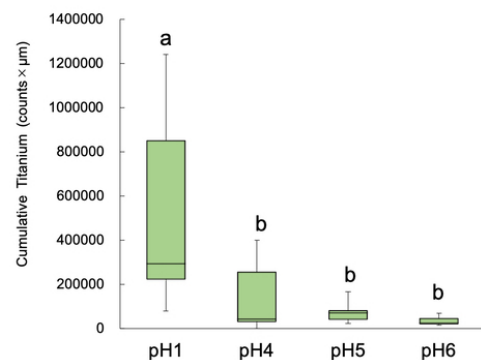


Fig. 8 Concentration of penetrated titanium into dentin around each material at 100μm depth area from superficial surface (counts/Cu counts×μm). Same letters no indicate significant differences ($p>0.05$).

我々はこれまでに F 含有の新規 ZnO/CuO-NC(ZCF)の合成を行い 16th International Conference On Nuclear Microprobe Technology and Applications (2018, Surrey, UK) で発表してきた。本研究の目的は象牙質に塗布した ZCFからのミネラルの象牙質への移行を In-air μ PIXE/PIGE 法を用いて分析する事である。

5.2 材料と方法

① 材料

本研究では、抜去後水中保存したヒト大臼歯（上下顎混在）で、う蝕や修復処置のされていない健全なものを使用した。なお使用する抜去歯に関しては、本研究は北海道医療大学歯学部・歯学研究科倫理委員会の承認を得て行われた(承認番号第 47 号)。材料として硫酸銅と塩化亜鉛溶液をもちいて混和させる

[H30-1]

手法を改変し NaF を添加し作製した ZCF を用いた。

②方法

試料の作製：用意したヒト大臼歯を使用し、ヒト大臼歯を頬舌的および近遠心的に 4 分割した。切断面をスティッキーワックス (スティッキーワックス、Kerr、USA) で被覆した(厚さ約 1mm)。ワックスで被覆されていない根面は #1000 耐水ペーパーを用いて研磨して歯軸に平行な平滑根面象牙質を露出させた。次に 37°C の脱灰溶液 (0.2M 乳酸、3.0mM CaCl₂、1.8mM KH₂PO₄、pH4.5、2%カルボキシメチルセルロースナトリウム) 5) に 72 時間浸漬して平滑根面象牙質の脱灰処理を行った。脱灰処理を行った後、脱イオン蒸留水で洗浄後の平滑根面象牙質表面に作製した ZCF 懸濁液を塗布した。塗布後、試料は湿度 100% の環境で 30 分放置した後、脱イオン蒸留水にて塗布面の洗浄を行った。洗浄後、塗布部位が含まれるように歯軸に平行に硬組織精密低速切断機 (Isomet、Buehler、USA) を用いて切断し、厚さ約 300 μ m の試料を作製した。

元素の分布状態の評価：これまで発表と同様に、陽子ビーム照射を行うシングルエンド加速器を用いた In-air μ PIXE/PIGE 解析法を用いて、試料内部の Zn、

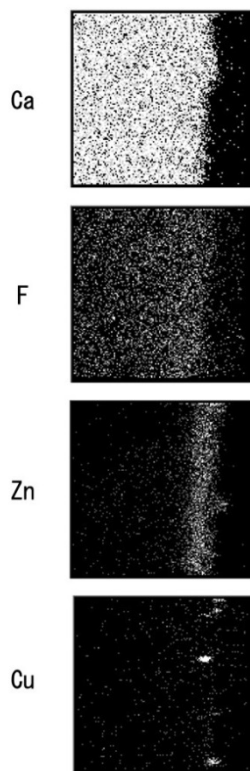


Fig 9 Cross-sectional image of dentin by in-air μ PIXE/PIGE system

Cu、F そして Ca の濃度分布を測定した。測定、解析の条件は従来の報告に準じた。加速器から得られた陽子ビームを約 1 μ m に収束して試料に照射し、発生した γ 線を NaI 検出器によって F を測定し (PIGE) , また、同時に、真空中に置かれた Si(Li)検出器で X 線

を計測 (PIXE) することで、Ca、Zn および Cu を測定した。本実験では、歯面上の 270 $\times$ 270 μ m の範囲における Ca と Zn の分布の測定を行った。

5.3 結果

材料塗布材料と断面の In-air μ PIXE/PIGE 分析像を Fig. 9 に示す。Ca、Zn、F、Cu がそれぞれ含まれている部分は白く示され、含まれていない部分は黒く示される。Ca の分布している像が歯質の領域を示しており、像右側が塗布面となる。元素の分布観察ではコントロールでは Ca 以外の元素の存在は認められなかった。材料塗布歯面では Zn、Cu、F の存在を認め、Ca の分布像と比較すると歯質内にこれらの元素が取り込まれていることが観察された。

5.4 考察

今回の結果より ZCF から Zn、Cu、F の元素が象牙質へ供給される事が示唆された。しかしながら、F は Zn や Cu と比較すると深部まで浸透している傾向が認められ、Zn や Cu は表層に局限している傾向であった。とくに Cu は部分的に点在する様にシグナルが認められたため残留した ZCF の可能性も考えられたが、ZCF の Zn/Cu は 47.2:40.0 であるためその可能性は低いと考えられる。したがって元素の種類また象牙質の状態によって元素の歯質への取り込みが異なると考えられた。

既に ZCF には抗菌作用に加えて、象牙質に塗布することによって F のみならず Zn、Cu などの重金属元素の取り込みが認められた事から、これらの元素によって脱灰抑制も期待される。 今後は、効果的にこれらの元素を浸透させやすい新たなナノ粒子の生成と分析を行い、脱灰抑制効果と抗菌性を併せ持つ新規多機能性材料の開発の基礎的を更に進める予定である。

6. 多種イオンによる根面象牙質のう蝕抑制の検討

6.1 背景

根面う蝕は、ミネラルの喪失およびコラーゲンネットワークの崩壊により重症化すると考えられており、とくに高齢者における罹患率は年々増加している。う蝕の進行・抑制には多様なイオンが関係していると言われ、近年では Zn のコラーゲン分解抑制、歯質脱灰抑制、抗菌作用が報告されているが、歯質内での動向は未だ不明である。本研究は、Zn および F など含有する塗布剤を作用させた根面象牙質での Zn、Ca、F、Sr の歯質内分布の測定を、In-air μ -beam PIXE/PIGE (高崎量子応用研究所) を用いて試み、併せて各種イオンの耐酸性への影響を検討した。

6.2 材料と方法

1.1 試料作成

ヒト健全第三大臼歯 8 本をセメントエナメル境から歯冠側に 0.5mm、歯根側に 7mm の位置で歯軸と垂直に切断した。次に頬側面と舌側面を歯軸に平行に切断し、根面象牙質を露出させた後、頬舌および近

[H30-1]

遠心方向に半切し、4 ブロックに切り分けた[6]。露出根面象牙質を除きスティッキーワックスで被覆し、3 ブロックに①Fuji VII® (F7)、②FujiVII®の成分から Sr/Ca の mol%比を 50/50 と変化させた試作セメント (F7Ca)、③ZnF₂ を含有した試作塗布剤 (ZnF) を各々露出根面象牙質に塗布した。残りの 1 ブロックは、何も塗布せずにコントロール群 (Co) とした。37°C 下で生理食塩水 10ml 中に浸漬し、生理食塩水は 1 週間毎に交換した。3 ヶ月後、材料を除去せず、各ブロックを露出根面象牙質に垂直、歯軸と平行になるように頬舌方向 0.5mm 幅に切断し、測定試料とした。

2.2 測定

標準試料として F に対しては従来のもの[7]を使用し、Zn と Sr には、酸化亜鉛、硫酸ストロンチウムおよびハイドロキシアパタイトを用いて新たに作成した。Ca、F、Zn の検出器以外に、Sr の測定のために、低エネルギーの X 線を除外するための 500 μm の厚さのアブソーバーを用いた検出器を新たに設置した。これらの検出器を備えた In-air $\mu\text{PIXE/PIGE}$ を用いて、歯質内の Zn、Ca、F、Sr の面分析を既報[8]に従い行った。

その後、材料を除去した露出根面象牙質表層を除いてスティッキーワックスで被覆し、脱灰溶液 (50 mmol/l acetate buffer, 2.2mmol/lCaCl₂, 2.2mmol/l KH₂PO₄, pH5.0) に 3 日間浸漬した。脱灰前後の歯質を μCT で撮影し[6]、各群における脱灰前後でのミネラル密度の変化を比較検討した。

6.3 結果

今回、低エネルギーの X 線を除外できる検出器を新たに設置して、Ca、F だけでなく Zn、Sr の分布も併せて簡便に計測することが可能となり、歯質内の多種のイオン分布を同時に測定できた。

Fig10 に各グループの各種イオンの分布図を示す。

Fig10 の Ca 分布図で示される Ca 領域上端から約 300 μm の位置から下方測定領域の約 150 μm 幅の各グループにおける各元素の平均濃度を Fig11 に示す。

Fig12 に各元素の歯質内の積算濃度を示す。F と Sr の積算濃度は、F7 群が最も高く、Zn は ZnF 群がすべての群と比較して有意に高かった。

Fig13 にう蝕抵抗性の指標であるミネラル喪失量を示す。ZnF 群と F7Ca 群は、Co 群と比較してミネラル喪失量が有意に少なかった。

Fig14 に歯質表層からの脱灰深さを示す。脱灰深さは、材料群とコントロール群との間で有意差を認めた。材料間では、ミネラル喪失量および脱灰深さに有意差は認められなかった。

6.4 考察

歯質内の各種イオン分布を各々個別に測定する

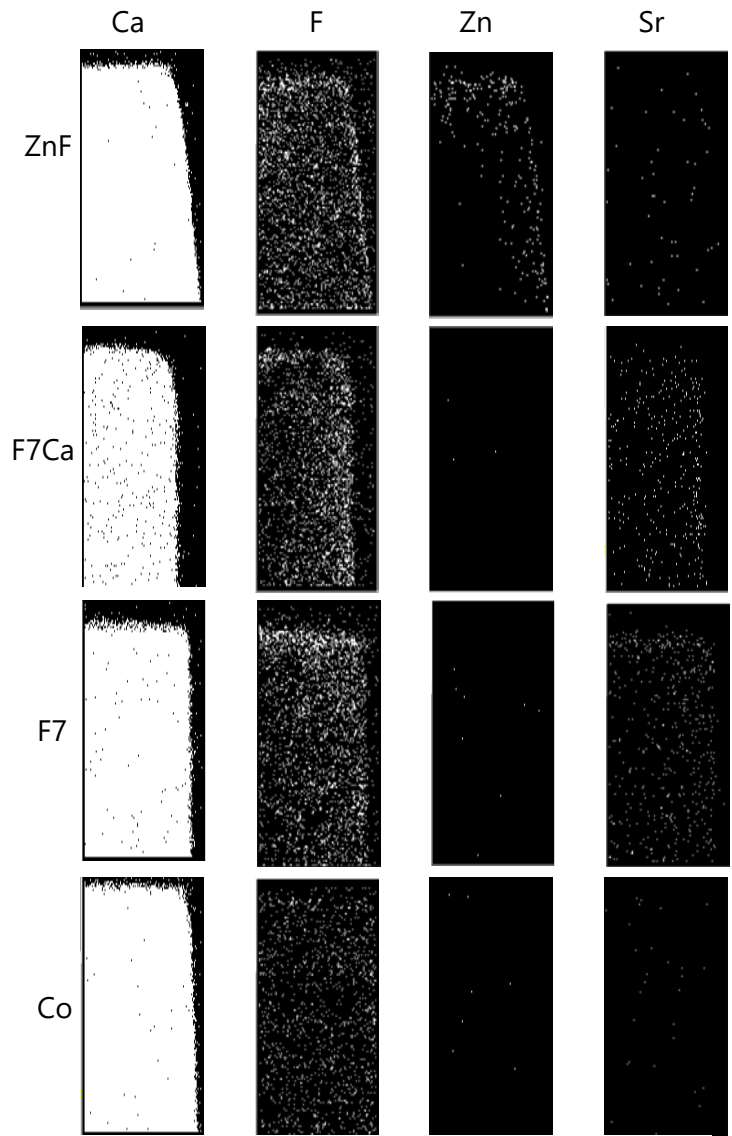


Fig.10 Two-dimensional mapping diagram of each element

ことは可能であるが、本測定法で軽元素である F と共に多種イオンが同時空間内に測定できたということは新たな知見である。F にはう蝕抑制効果があることは疫学的に知られているが、Ca や Zn と共に存在する方がより効果があることが示された。Zn にはコラーゲンを分解する酵素 MMP-9 を阻害すると言われており、歯質内のコラーゲンの分解を抑制することにより本実験でのう蝕抑制効果がみられたのではないかと考えられる。

[H30-1]

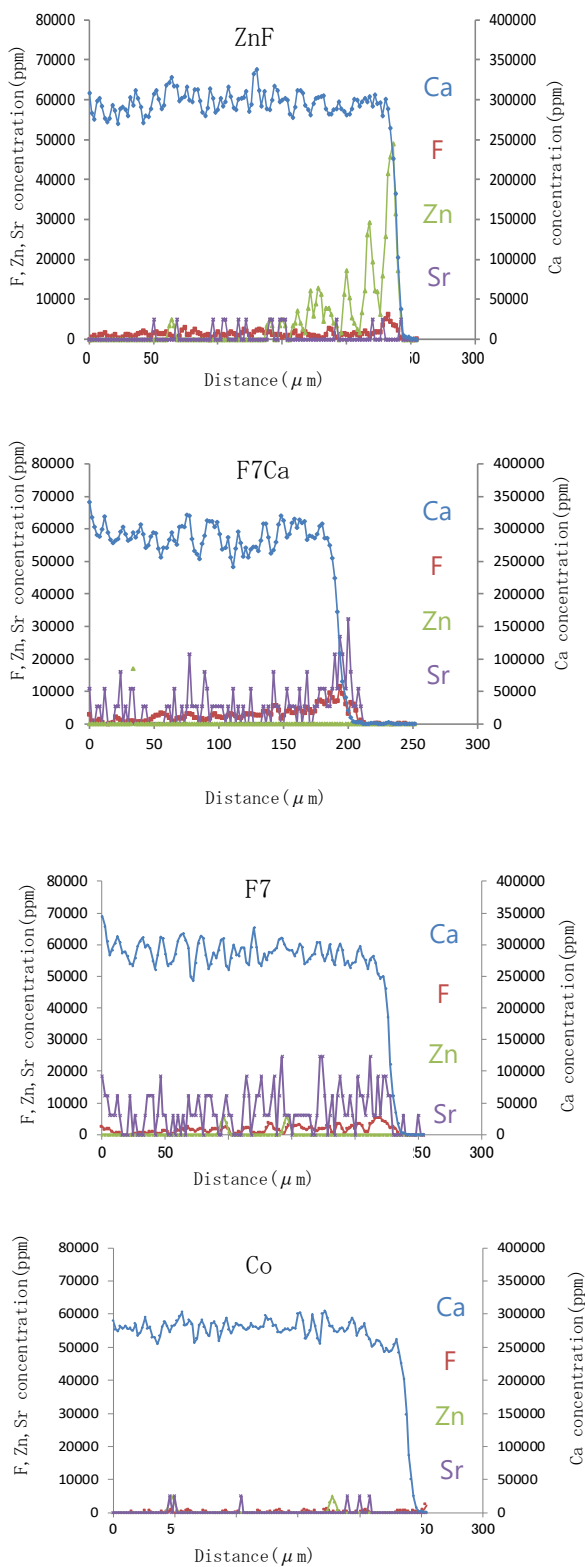


Fig.11. The graph of concentration.

今回は健全歯質でのう蝕抑制効果を検討したが、近年増加する根面う蝕や治療困難な高齢者の口腔内を考慮すれば、う蝕歯質におけるこれらのイオンの抑制効果の検討も必要である。

各種イオンのう蝕抑制効果のメカニズムの今後のさらなる解明は、バイオミネラリゼーションに基づ

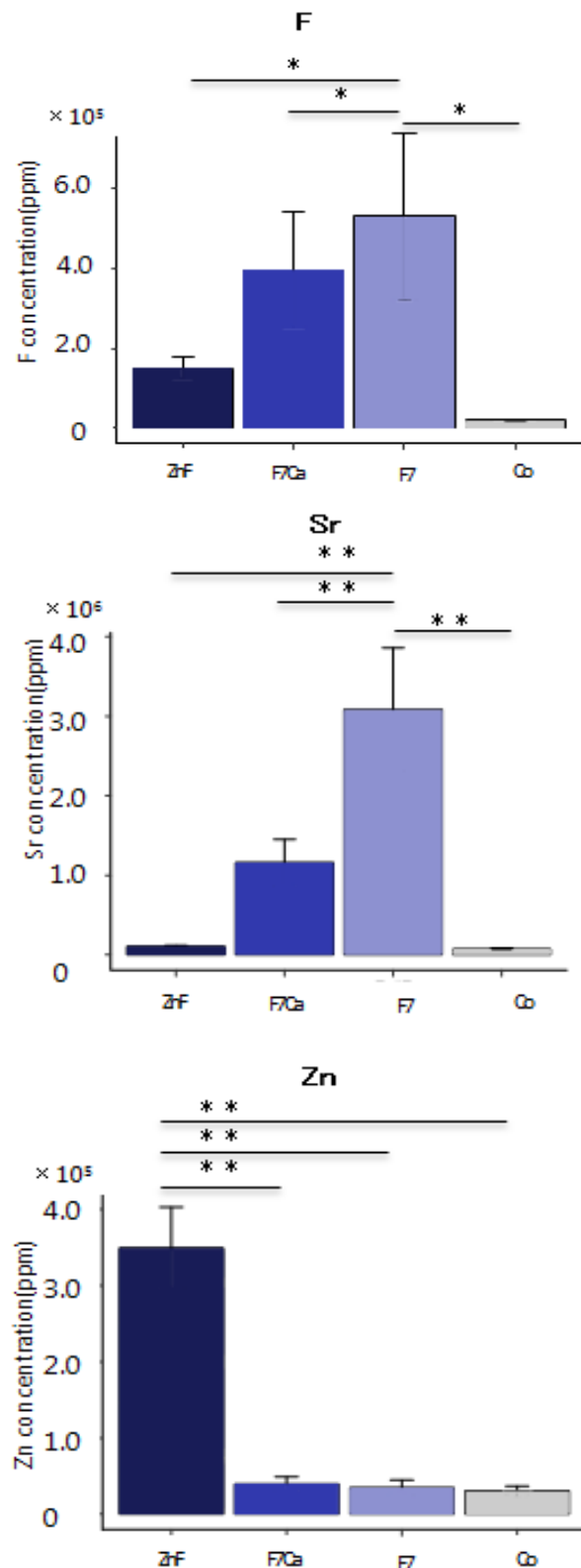


Fig.12. Accumulative concentration of F, Zn and Sr. * shows significant difference $P < 0.05$. ** shows significant difference $P < 0.01$

[H30-1]

いた新規材料の開発に寄与すると考えられる。
本研究の一部は科学研究費補助
(JP17H04382,JP17K11705) および 2017IADR
innovation Oral Care Award の補助のもとに行われた。

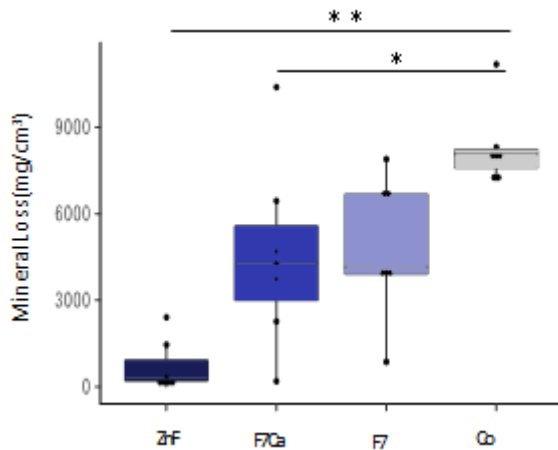


Fig.13. Mineral loss in each group. * shows significant difference $P < 0.05$. ** shows significant difference

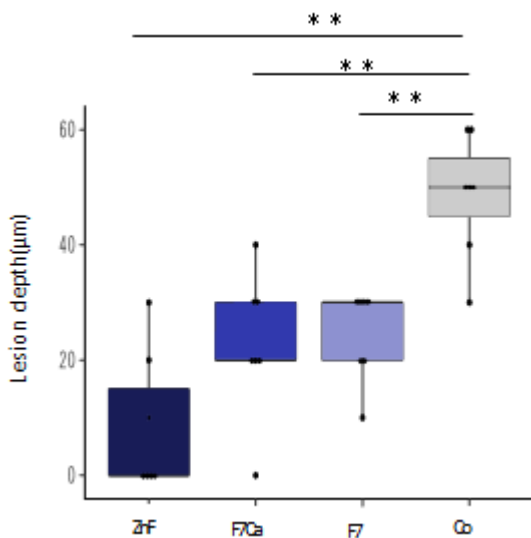


Fig.14. lesion depth in each group. ** shows significant difference $P < 0.01$

7. まとめ

いずれも、in-air μ PIXE の特徴を生かしたユニークな研究である。肺グループでは、特発性肺線維症の予後に吸入 Si の関与を示唆する画期的な成果と思われる。血液グループは、急性白血病細胞の多様性により、抗がん剤の効果に差が出ることを明らかにして、急性白血病の型に応じた抗がん剤による個別医療の可能性を示した。歯牙グループでは、う蝕抑制のための各種新規塗布剤の有効性を in-air μ PIXE を

使用して、歯牙中のミネラル分布の変化から明らかとした。まず、フッ化チタンの F にまざるう蝕抑制効果を、塗布した歯牙内の元素分布から明らかにし証明した。さらに新規物質 ZnO/CuO-NC(ZCF)の有効性を各種ミネラルの象牙質への移行を測定することにより明らかとした。最後に試作した ZnF などいくつかの塗布剤の有効性を歯牙からのミネラル喪失量を測定し、その有効性を明らかとした。

以上のように、in-air μ PIXE は、組織中の元素分布の 2 次元解析から、各種臓器の疾患の診断・治療・予後予測、新規薬剤開発などに極めて有効な測定装置であることが示された。

参考文献

- [1] Y.Koga, T.Satoh, M.Koka, K.Dobashi et al. Elemental and immunohistochemical analysis of the lungs and hilar lymph node in a patient with asbestos exposure, a pilot study. Environ Health Prev Med. 21(6):492-500. 2016
- [2] Wang Z, Roles of K⁺ channels in regulating tumour cell proliferation and apoptosis. Pflugers Arch. 448, 274-86, 2004.
- [3] Funato et al., “A new technique for analyzing trace element uptake by human enamel” Dent. Mater. J. 34, 240-245 (2015).
- [4] Hove et al., “The protective effect of TiF₄, SnF₂ and NaF on erosion of enamel by hydrochloric acid in vitro measured by white light interferometry” Caries Res 40, 440-443 (2006).
- [5] Matsuda et al., “A newly designed automatic pH-cycling system to simulate daily pH fluctuations” Dent. Mater. J. 24, 280-285 (2006).
- [6] K.Yagi et al., “Use of PIXE/PIGE for sequential Ca and F measurements in root carious model.”, Scientific Reports Volume 7, 2017. DOI: 10.1038/s41598-017-14041-4.
- [7] H.Yamamoto et al., “Development of a System for Measuring Fluoride Distribution in Teeth Using a Nuclear Reaction”;IJPIXE(19) 91-102, 2009.
- [8] H.Komatsu et al., “Fluorine analysis of human enamel around fluoride-containing materials under different pH-cycling by μ -PIGE/PIXE system”, Nucl Instr and Meth. B269, 2274-2277, 2011.