

原著

エナメル質の基質代謝と石灰化形成

Metabolism and Calcification of Bovine Tooth Enamel

高木亨¹⁾, 田上順次²⁾, 中村聡³⁾

東京医科歯科大学歯学部 1) 生化学講座, 2) 歯科保存学第1講座, 3) 医用器材研究所: 〒113 東京都文京区湯島 1-5-45.

Tohru TAKAGI¹⁾, Junji TAGAMI²⁾ and Satoshi NAKAMURA³⁾1) Department of Biochemistry, 2) Department of Operative Dentistry I, 3) Institute of Medical and Dental Engineering, Faculty of Dentistry
Tokyo Medical and Dental University, 1-5-45, Yushima, Bunkyo-ku, Tokyo 113, Japan.

(Accepted for publication : October 10, 1997)

Abstract: The purpose of this study was to investigate the mineralization mechanism in developing enamel using pH staining. Unerupted bovine teeth were used for the experiment. The activity of a proteolytic enzyme was evaluated against enamel protein obtained from bovine enamel. Crystals in developing enamel, which were classified into neutral zone 1 and 2, acid zone 1 and 2, were investigated using infrared spectroscopy, thermal analysis, and power X-ray diffractometry. Proteolytic enzyme showed the highest activity at approximately pH6.0, which was in accordance with the pH at the acidic zone. Most of the organic components of the enamel decomposed at 580°C, except for the carbonate and hydrogen phosphate groups included in the apatite crystals. In the developing enamel, (Ca+Mg)/P molar ratio was lower than that of the stoichiometric hydroxyapatite. Furthermore, carbonate amount, which were considered to replace the OH and PO₄ sites in the apatite crystal, was higher than those in the matured enamel. The a-axis dimension of the apatite crystals in the secretory stage enamel (Neutral zone 1) was confirmed to be greater than that in acidic zone 2 and matured enamel. These results indicated that enamel mineralization was followed by decarbonation in carbonate apatite.

Key words: ruffle-ended ameloblast, enzyme, carbonate apatite, mineralization

【緒言】

歯の石灰化は発生学的に外胚葉系上皮細胞と中胚葉系の間葉細胞との共同作業によって成りたっている。骨や象牙質および軟骨の石灰化形成には Matrix vesicles の存在と、未分化な間葉細胞から硬組織が形成されるまでに分泌された種々の蛋白が石灰化形成に役立っていることで知られている¹⁻²⁾。骨、象牙質および軟骨といった石灰化形成部位での基質成分は形成される硬組織の種類によって異なっている。例えば、軟骨の蛋白ではIIコラーゲンを主体に、IX、X、XI型コラーゲンによって構成されているのに対し、骨ではI型コラーゲンを主体とした蛋白質成分で構成されている。このほか、石灰化形成に関連した蛋白質ではオステオカルシン、オステオネクチン、骨シアロプロテインといった、各々の役割と機能をもった蛋白質が存在している。

一方、エナメル質の石灰化は外胚葉性の上皮由来の細胞 (Ameloblast) によって形成され、骨や象牙質の形成に重要な matrix vesicle や骨や軟骨で認められるような石灰化形成蛋白質の存在は認められず、エナメル質蛋白をもったエナメル質特有の石灰化形成機序をもつことが考えられている。これまでに、エナメル質の形成初期の組織学的観察では、Ameloblast の基底板の消失に伴いエナメル様物質が外套象牙質中に出現するようになり、象牙質の石灰化が始まった後、既成の象牙質に Ameloblast からエナメル質蛋白が分泌される。その後、エナメル質の石灰化が始まるとされている³⁾。したがって、形成期のエナメル質は石灰化の程度も骨や象牙質に比べ低く、多くのエナメル質蛋白 (Amelogenin⁴⁻⁷⁾, Enamelin^{8,9)}) が存在している。エナメル質が形成期から成熟期に移行すると主要な有機質 (Amelogenin) は脱却し低分子化され石灰化が増していく。また、Enamelin の脱却も Amelogenin の脱却に遅延して起こるが、石灰化が進行した後に残ることが多い¹⁰⁾。

これまで、石灰化の進行に伴う有機質は脱却しアパタイトの形成が進むという現象は骨や象牙質の石灰化形成時にも認められている。石灰化における有機質やアパタイトの量的、質的相違は有機質の脱却の程度や構成していた有機質の性質によって大きく影響される。しかし、エナメル質を含むほとんどの生体内石灰化の結晶構造は、透過型電子顕微鏡観察によりリボン状のc軸方向に伸びたヒドロキシアパタイト構造を呈していることが報告されている¹¹⁾。エナメル質の結晶はエナメル質の成熟に伴い、骨や象牙質アパタイト結晶(200×30~70 Å)の約10倍になりエナメル質特有の規則性のあるアパタイト結晶(2,100×30~70 Å)が形成されている。このようなエナメル質の成長過程における石灰化基質の変化は、生物学的ならびに物理化学的立場から検討がなされてきているが、現在まで、その詳細な結論を得るに至っていない¹²⁻¹⁵⁾。

本研究はウシ未萌出エナメル質を用いて、形成期エナメル質から成熟期エナメル質にいたる Ameloblast の分布を pH 変化をもとにして、成熟期エナメル芽細胞の変化に対応した、細胞直下のエナメル質基質の酵素活性と蛋白質消失の関係を分析した。また、同時期に形成されるエナメル質基質の石灰化形成での無機成分の質的变化を熱重量-示差熱、赤外吸光分析、誘導結合プラズマ発光分析および X 線回析によって、その石灰化形成時の基質内化学変化の特徴からエナメル質特有のアパタイト結晶形成のメカニズムを考察した。

【材料ならびに方法】

1. 材料

ウシ未萌出永久歯は、屠殺後直ちに氷冷して保存した前歯部下顎骨中の歯胚より摘出採取した。採取した切歯のエナメル質表面の軟組織成分はガーゼで注意深く除去した。

2. 細胞分布別エナメル質の採取

下顎骨中より得られた切歯の成熟期エナメル質は pH 染色法¹⁶⁻¹⁸⁾により呈色液(Universal Indicator Solution, BDH- limited Poole England)で1~2分間染色した。また、GBHA 染色は Glyoxal bis (2 hidroxyanil) 20mg を 0.105 N NaOH 2ml に溶解した後 30 から 60 秒間染色した後、直ちにエタノール原液によって洗浄した^{19,20)}。pH 染色された中性領域と酸性領域は、歯根側

から順に歯冠先端部にかけて形成期(N1), 成熟期(A1), (N2), (A2)および高度に石灰化したエナメル質(Enamel)に分類し、注意深く鋭利な刃物によりエナメル質を採取した。

3. エナメル質蛋白の抽出と精製

採取されたエナメル質からは以下に述べる2通りの抽出方法によりエナメル質蛋白の抽出を行った。1) 4M Guanidine-HCl (Gua- HCl)緩衝液(pH7.4、0.1M 6-Aminohexanoic acid, 5 mM Benzamid ine Hydrochloride, 1 mM ethylmalei mide, 1 mM Phenyl Methyl Sulfonylfluoride の Proteinase Inhibiter を含む)により4℃にて72時間抽出後、10,000g×20 min. 遠心し、沈殿物は 0.5 M EDTA を含む Gua- HCl 緩衝液にて脱灰抽出を行った。2) 0.2M Na₂HPO₄・NaH₂HPO₄ 緩衝液(pH 7.4)による脱灰抽出を行った。

Amelogenin の精製は抽出画分を DEAE- Sepacel クロマトグラフィーによって精製した。カラムは 50 mM Tris- HCl 緩衝液(pH 7.5)にて平衡化した後、0~0.5 M NaCl を含む緩衝液で溶出した。Amelogenin 画分は 0.1M 蟻酸に溶解(100 mg/ 5ml)した後、ゲルろ過クロマトグラフィー(Bio-Rad, Bio -Gel P-30、2.5×190 cm)によって、0.1M 蟻酸で展開した。吸光度 280 nm で分画された Amelogenin 画分は凍結乾燥後、調整用等速電気泳動(7900 Unipho, LKB 社)により Amelogenin の精製を行った。

4. SDS-PAGE

SDS-PAGE は 15- 30 % の Gradient Gel による Laemmli らの方法²¹⁾に準じ、不連続緩衝液系で行った。すなわち、50 mM Tris- HCl (pH 8.8) による Gradient Gel (Acrylamid:Bis=56:1) 作成後、50 mM Tris- HCl / Glysine (pH 8.3)緩衝液を用いて泳動した。既知分子量マーカーは Electrophoreshis Calibulation Kit (Pharmacia)を用いた。染色は Coomassie Brilliant Blue (CBB) 法および銀染色法によって行った。

5. 蛋白分解酵素の精製

幼弱エナメル質から得られたエナメル質画分は 20 mM リン酸緩衝液にて抽出後、45 % 硫酸アンモニウム塩析した上清を、さらに 65 % 濃度で塩析沈殿した画分を粗酵素活性画分とした²²⁾。粗酵素画分は 50 mM 酢酸緩衝液(pH 6.0)を用い平衡化した DEAE- Sepacel カラム

(1.6 × 20 cm)を用いた。溶出は 0.05M NaCl を含む緩衝液で溶出した後、0.05- 0.1M NaCl (計 200ml)で展開精製した。

6. 活性測定法

酵素は SDS-PAGE で分子量 28 K を示すウシ Amelogenin 蛋白を基質として用いた。基質 0.01 % 濃度 0.5 ml に酵素溶液 0.1 ml 加え、37 °C、10 時間反応した。基質溶液は pH 4.5- 6.5 の場合には 20 mM 酢酸 Na 緩衝液を、pH 7.0- 9.0 の場合には 50mM Tris- HCl 緩衝液を用いた。反応停止は 20 % 硫酸アンモニウムを等量加え、基質を沈殿(11,000 g × 10 min.)させ反応を停止した。分解された Amelogenin 低分子画分は上清に含まれているため、これを 230 nm (DU- 64、Beckman) で吸光度を測定した。

7. 熱分析

熱分析は示差熱-熱重量分析 (DTA- TG) 法により、エナメル質 (酸性領域、中性領域) 10 mg (wet weight) を用い、理学社製 ATS-100 システムを用いてアルミナ粉末を対照に昇温速度 10 °C/min.、1,000 °C にて、水および有機物の定量ならびに脱有機温度を測定した。試料容器は白金パンを、熱伝対には白金ロジウムを用いた。

生体中の無機成分は炭酸基 (CO_3^{2-}) やリン酸水素基 (HPO_4^{2-}) を含み、 Ca^{2+} の欠損した非化学量論的な炭酸水素アパタイトと考えられるため、熱分析の結果から炭酸基およびリン酸水素基の分解離脱の起こらないと考えられる温度を設定し、当該温度による脱有機加熱を行った。また、脱有機温度は試料が恒量になるまで加熱し、有機物がすべて分解したものとした。

8. Ca, Mg, P と炭酸基の定量

Ca, Mg, P の定量は誘導結合プラズマ (Inductively Coupled Plasma, ICP) 発光分析法により行った。脱有機処理した試料 5 mg は 0.1 N HCl で溶解後、ICP 発光分析 (Nippon Jarrel-Ash 社製 ICAP-575 mark 2) に供した。炭酸基の定量はガス分析法 (CHN コーダー) によって行った。脱有機処理した試料から 1000 °C までの加熱で放出される炭素 (C) の定量を行い、C の分析値から炭酸基の量を求めた。炭酸基の存在様式は KBr 錠剤法に準じて赤外吸光分析 (日立、260 - 50) により測定した。1,000 °C 加熱処理および未処理の試料は乾燥後、KBr 粉末と混練後、錠剤を形成し、赤外分光分析にて測定した。

9. 格子定数、結晶相の同定

格子定数測定および結晶相の同定は未処理試料に対して粉末 X 線法 (粉末 X 線回析システム、PW- 1710、日本フィリップス社製) により行った。粉碎した試料に内部標準として 5 wt% の Si 粉末 (NBS # 640) を良く混合し、Si 無反射試料板に塗布し、グラフアイトモノメーターで単色化した $\text{CuK} \alpha$ 線 (40 kV、40 mA) を用い 100, 200, 002, 210, 211, 112, 300, 202, 310, 222, 213 の 11 個の回析角を 2θ , $0.1^\circ/\text{min}$ の速度で精密に測定した。得られた回析角の測定誤差を用い補正し、プログラム RLC-3²³⁾を用いた最小二乗法により格子定数を精密化した。

A : 酸性 N : 中性 RA : Ruffle-ended Ameloblast
S : 形成期 SA : Smooth-ended Ameloblast

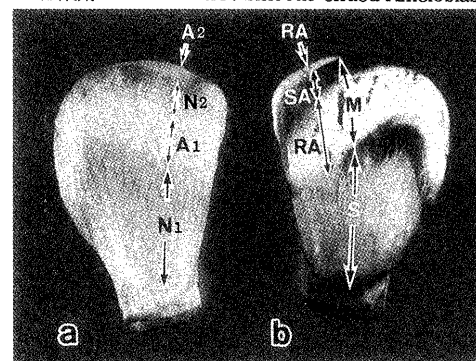


図1. 染色によるエナメル質の pH 分布、中性 1 (エナメル質形成期を含む)、酸性 1、酸性 2 (成熟期、酸性領域)、中性 2 (成熟期、中性領域) を示す。

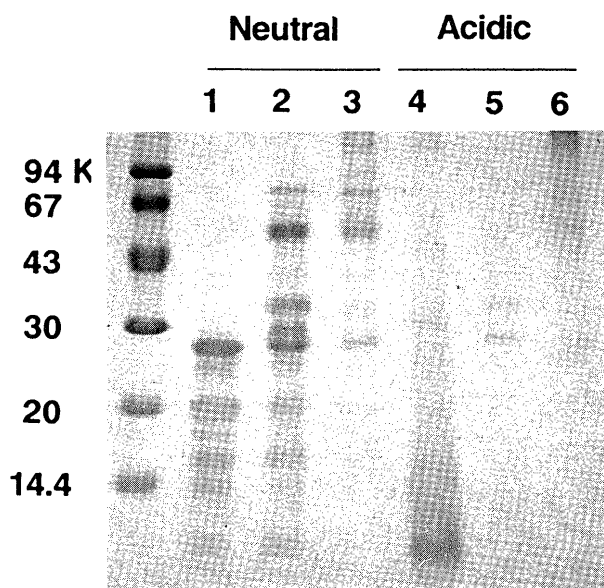


図2. SDS-PAGEによる酸性領域と中性領域のエナメル質蛋白の泳動図、Lane 1, 4 は Gua-HCl (pH 7.4)、Lane 2, 5 はリン酸緩衝液 (pH 7.4)、Lane 3, 6 は EDTA を含む Gua-HCl (pH 7.4) によって抽出した。

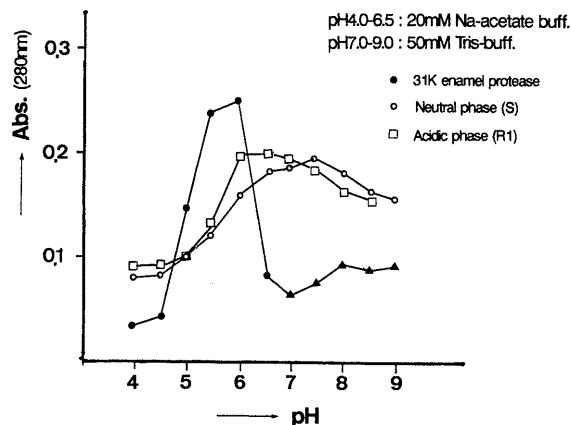


図3、形成期エナメル質から抽出したエナメル質分解酵素の至適pH活性。●は酢酸ナトリウム、▲はTris-HCL緩衝液中で測定する。

【結果】

1. エナメル質の細胞別分布と基質採取

ウシ成熟期エナメル質は Universal indicator solution で酸性領域 (pH 5.5- 6.0) と中性領域 (pH 7.0) に分けられた (図1)。成熟期エナメル質の各 pH 領域はエナメル質の深層から表層へ変化が認められた。深層部の高度に進んだアパタイトの形成部位は pH の染色性はなくアパタイト本来の白色を呈し、表層に向って pH 染色性が認められた。エナメル質は複数の歯牙をを用い採取した後、4M Gua-HCl 緩衝液およびリン酸緩衝液で各々抽出した。各々の SDS-PAGE は図2に示すように中性領域は Amelogenin, Enamelin もその存在が認められたが、酸性領域ではエナメル質蛋白画分である Amelogenin や Enamelin のほとんどが消失していた。

2. エナメル芽細胞の分布に伴う酵素活性

幼弱エナメル質から得られた酵素活性画分は精製された分子量 28 K の Amelogenin 基質を対象に酵素反応を進めた。分解された低分子は反応終了後の上清に存在し、未反応画分は 12 % 硫酸アンモニウムで沈殿しすることが確かめられたことから、上清画分の蛋白分解産物は 230 nm で測定した。酵素活性は図3に示すように pH 5.5- 6.0 の範囲で最も強い活性が認められた。

3. 熱分析による有機質含量

エナメル質の各 pH 領域の熱分析による TG パターンは図4に示す。各 pH 領域に於ける DTA -TG 分析のうちエナメル質形成期で、中性の蛋白質を多く含む N1 領域は吸熱および発熱によるピークが認められた (図4)。100 °C 付近の脱水によると認められる吸熱ピークと、200 ~ 600 °C に認められる発熱ピークを伴った

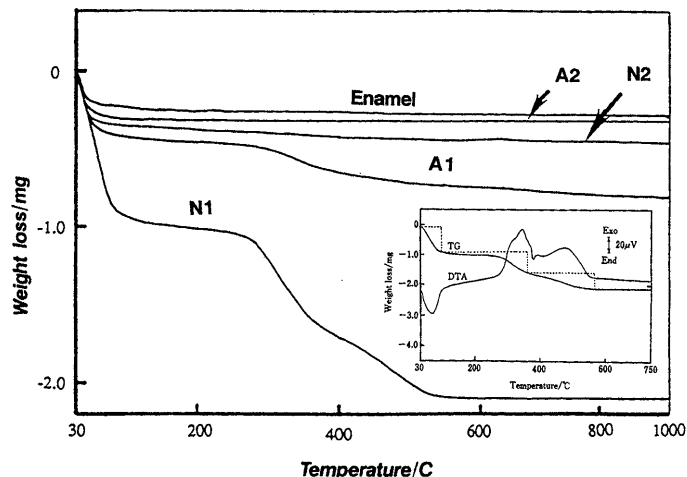


図4、成熟過程におけるエナメル質の熱分析 (TG) 曲線。図4内図：エナメル質形成期 (中性 1) の示差熱 (DTA) - 熱重量 (TG) 曲線。点線は TG 曲線における吸着水、有機物、炭酸の離脱の各段階を示した。

2 段階の減量である。1 段目は蛋白燃焼、2 段目は脂質の燃焼による減量と類似したパターンを示すものであった。有機質の消失温度設定は昇温速度を 2 °C/min、6 °C/min、10 °C/min に変えて行った。この結果より、エナメル質ヒドロキシアパタイト中の炭酸基に変化を与えず、有機質のみを消失する至適加熱温度は 580 °C とし、消失した量から有機質の存在する割合を算出した。

4. 結晶構造

非加熱処理および 1,000 °C 加熱処理エナメル質の X 線回折は非加熱エナメル質でアパタイト固有のパターンを示した。1,000 °C 加熱処理エナメル質では、ヒドロキシアパタイトと β -リン酸三カルシウムの 2 相が検出され

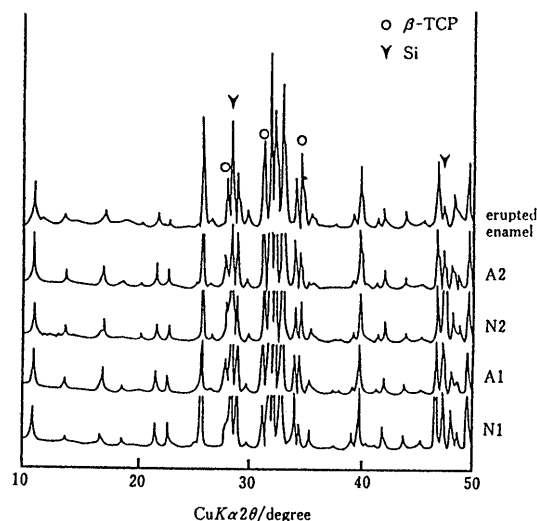


図5、エナメル質 X 線パターン：加熱処理 (1,000 °C) による回折像を示す。図中の Si は内部標準。

	中 1	酸 1	中 2	酸 2	Enamel
CaO / %	30.2	44.7	49.4	51.6	54.0
MgO / %	0.2	0.3	0.3	0.6	0.4
P ₂ O ₅ / %	26.2	38.1	42.0	42.0	40.8
CO ₂ / %	3.5	3.2	2.3	2.1	2.1
Weight-loss / %	41.6	14.3	5.9	4.2	3.4
Total / %	101.0	100.0	99.6	99.8	99.9
(Ca+Mg)/P	1.47	1.50	1.50	1.58	1.69

表1、成熟過程に(pH変化) 合わせた(Ca+ Mg)/P比、炭素(C)の重量%を示す。

た(図5)。格子定数の加熱による変化は図6に示した。1,000℃加熱処理した格子定数は成熟の程度に関係なく、一定の値が示された。この値は化学量論的なヒドロキシアパタイト $[\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2]$ の格子定数 $a=9.418 \text{ \AA}$, $c=6.884 \text{ \AA}$ と近似の値を示している。また、600℃加熱処理では炭酸アパタイト単相を示し、格子定数のa軸の長さは1,000℃加熱処理の場合より長い値を示した。また、加熱未処理ではさらに長い格子定数を示した。c軸の格子定数は加熱、非加熱のいずれの場合でもほとんど近似の値を示した。これらの格子定数の加熱変化から、エナメルアパタイトは炭酸アパタイトであることが示唆された。

赤外吸収スペクトルは非加熱処理で 2600 cm^{-1} から 3600 cm^{-1} に水の吸収帯が、 1600 cm^{-1} 、 1700 cm^{-1} に有機成分の吸収帯が認められた。炭酸基の吸収帯は 880 cm^{-1} 、 1440 cm^{-1} 、 1460 cm^{-1} に認められた。1,000℃加熱処理したエナメル質では有機質、炭酸基の吸収帯すべてが消失していた。また、Ca, Mg, P および炭酸の測定値は表2に示した。(Ca + Mg)/P 比は中性1, 酸性1, 中性2 および酸性2のすべての段階で完成したエナメル質のモル比よりも低い値を示した。炭酸の含有量は形成期(N1)で最も多く、その含有量は完成したエナメル質に近づくにつれて減少した。

【考 察】

1. 成熟期エナメル芽細胞の分布とエナメル質蛋白の変化

成熟期エナメル質はこれまでのpH染色やGBHA染色による色調変化から、構成しているエナメル芽細胞の形態的变化を知ることができる。エナメル質の成熟に伴う Ruffle-ended Ameloblast (RA)、Smooth-ended Ameloblast (SA) の繰り返し構造は、染色性から組織学的なそれぞれの分布を特徴的に知ることができる。

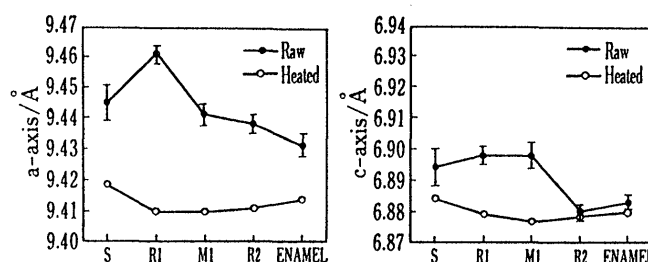


図6. X線回析から求めた格子定数、左：非加熱、右：1000℃加熱、

RAは細胞の遠心端に発達した閉鎖堤(結合対)を有し、強固に細胞間を結合している。近心端の結合はほとんど斑状結合で閉鎖堤を持たない特徴を有している。SAは近心端に閉鎖堤が存在し、遠心端には結合構造を持たない。RAは機能的に Ca^{2+} の能動輸送の働きが有り、石灰化形成に重要な働きを担っていることが知られている²⁴⁾。従って、成熟期エナメル質における Ca^{2+} やリン酸の供給は石灰化増大に伴うエナメル質中の蛋白の分解が平行して行われていることを示唆していた。この点、本研究はGBHA, pH染色によって分別されたRA, SA細胞期のエナメル質蛋白の分布から検索した。SA期(中性領域)では通常認められるエナメル蛋白基本構造である分子形態を示したが、RA期(酸性領域)ではエナメル質蛋白の存在が認められず、Caやリン酸の供給によるアパタイト形成と同時に蛋白の消失はこのRA期細胞が担っているものと考えられた。図3で示すpHに伴うエナメル質蛋白の酵素活性の変化は、これらRA期では細胞での蛋白の分解が各々活発に行われるに十分な至適pH(6.0)となっていることを示している¹⁶⁻¹⁸⁾。これらの結果はRA期細胞が生ずる Ca^{2+} やリン酸の分泌と同時にミトコンドリアが分泌する CO_2 、 H_2O または CO_3^{2-} や H^+ がエナメル基質に分泌される。 H^+ によるpHの低下およびCa, リン酸の分泌でアパタイトの形成 $[\text{10Ca}^{2+} + 6\text{HPO}_4^{2-} + 2\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2 + 8\text{H}^+]$ が起こる。エナメル質で起こるpHの低下は、リン酸やプロトン(H^+)の生成によるとの説明がある²⁵⁾、この点に関して、本研究でのエナメル質のpHの低下は酵素の活性化ならびに石灰化形成に重要な役割を担っていることを直接示唆する事が出来た。さらに、至適pH測定により酵素活性がRA期細胞に強く依存していることが明らかとなった。したがって、エナメル質の石灰化は、このような酵素作用による生理的環境が整って初めてエナメル質の高度な石灰化が形成され则认为された。

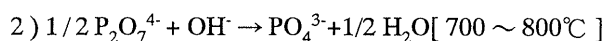
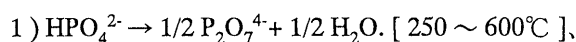
2. エナメル質結晶形成とpH変化

RA 期細胞に認められる酸性化(5.5 < pH < 7)領域では、 $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ の様なヒドロキシアパタイトは合成されにくく、DCPD [Dicalcium phosphate dihydrate, Brushite, $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$], OCP [Octa calcium phosphate, $\text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_6 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$] の合成が生じやすい。エナメル質のような酸性下で合成されたアパタイトの前駆相である DCPD あるいは OCP は、水の存在下で加水分解し、ヒドロキシアパタイトを産生する。そこで生じた水やリン酸の反応副産物に、また Ca やリン酸が加わり新たなアパタイト結晶の生成が生じ石灰化が進行する。すなわち DCPD では、 $10[\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}] \rightarrow \text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2 + 4\text{HPO}_4^{2-} + 18\text{H}_2\text{O} + 8\text{H}^+$ の反応が、OCP であれば $5[\text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_6 \cdot 5\text{H}_2\text{O}] \rightarrow 4[\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2] + 6\text{HPO}_4^{2-} + 17\text{H}_2\text{O} + 12\text{H}^+$ といった反応によってヒドロキシアパタイトが生じると考えられる。したがって、RA、SA の繰り返しによるエナメル質の成長は、エナメル質完成までの長期に渡って効率的かつ高度に石灰化していくのに必要な機序であると考えられた。

3. 成熟期エナメル質の構造と変化

成熟期エナメル質の Ca, Mg, P の含有量は、ヒドロキシアパタイトの Ca/P モル比 1.67 に比べて、N1 から A2 に至る成熟過程では $(\text{Ca} + \text{Mg})/\text{P} < 1.67$ で、 Ca^{2+} の欠損した非化学量論的ヒドロキシアパタイトであることが示された。また、成熟期のそれぞれの細胞周期に炭酸の存在が示され、酸性、中性領域を示している成熟過程で成熟が増すに従い炭酸基の含有量が減少し、非化学量論的な炭酸アパタイト様の構造の存在が示された。一方、萌出後の完成したエナメル質の Ca/P = 1.69 は、ヒドロキシアパタイトの化学量論値に近い値を示している。

一般に、ヒドロキシアパタイトは多くの種類のイオン、基を固溶し、非化学量論的な組成をとりうる。この組成が変わることによって、その加熱特性が変わるとされている²⁶⁾。また、化学量論的なヒドロキシアパタイトは 1,000℃ まで加熱しても、吸着水の脱水脱離が 300℃ 付近まで見られるだけで、 β -リン酸三カルシウム [β - $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 、以下 β -TCP] などには分解せず、格子が膨張するのみであるとされている²⁷⁾。生体内硬組織の炭酸アパタイトに存在する CO_3^{2-} 、 HPO_4^{2-} 基は加熱処理で複雑な変化をきたすとされている。また、Ca が欠損し Ca/P 比が化学量論値である 1.67 を下回ることが多く認められるアパタイトは約 800℃ の加熱によって β -TCP に分解する²⁸⁾。この反応は



の2段階に進み、1) の反応が起きても、ヒドロキシアパタイト構造は保持されたままであるが、2) の反応は HAp から β -TCP への分解を伴うとされている。また、炭酸アパタイトの炭酸基の加熱変化は通常 700 ~ 900℃ で離脱するという報告がなされている²⁹⁾。

本研究では、エナメル質における炭酸アパタイトの有無については、赤外分光、X線回析によって解析を進めた。エナメル質中に存在する結晶の赤外線吸収スペクトルによる同定では、881、1440、1460 cm^{-1} に炭酸基によるスペクトルが認められた(図9)。スペクトルは有機質消失温度でもある 580℃ 加熱処理後においても吸収スペクトルは認められ、エナメル質固有の炭酸基であることを示していた。この炭酸の含有量は N1 から A2 の炭素量で示されたように、石灰化の程度が増すにつれ炭酸量は減少を示し、エナメル質の成熟に合わせ脱炭酸化したアパタイトの形成を示唆していた。さらに、赤外吸収スペクトルでは 2600 ~ 3600 cm^{-1} に水、1600 ~ 1700 cm^{-1} に有機基質の吸収帯が示された。炭酸基の固溶部位は、化学的に合成した炭酸アパタイトの PO_4 あるいは OH 基サイトの炭酸基置換による値³⁰⁾と比較し検索したところ、炭酸はリン酸基、水酸基のいずれにも置換してアパタイトに存在することが示唆された。これらは 1,000℃ 加熱処理したあとではアパタイトに固溶している炭酸がすべて離脱していた。したがって、成熟期エナメル質中のアパタイトは加熱によって $\text{Ca}_{10-x}\text{H}_2\text{x}(\text{PO}_4, \text{CO}_3)_6(\text{OH})_2(\text{CO}_3) \rightarrow \text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2 + \beta\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2 + \text{CO}_2 \uparrow + \text{H}_2\text{O} \uparrow$ のごとく、炭酸を含む Ca 欠損アパタイトがヒドロキシアパタイトと β -TCP に分解している可能性を示していた³¹⁾。また、1,000℃ 加熱処理後の X線回析において、 β -TCP の存在が萌出後のエナメル質で観察されたことから、エナメル質においても骨などの石灰化形成時に認められるアパタイト形成反応と同じ過程を経て、ヒドロキシアパタイトが形成されていると考えられた³²⁾。

1,000℃ 加熱処理後でエナメル質の成熟の度合に関係なく、アパタイト格子定数が a, c 軸ともに JCPDS #9-432 のヒドロキシアパタイトの標準値に近似したものであることが示された。一方、600℃ 加熱処理による a 軸の長さは 1,000℃ 加熱処理よりも長く、 HPO_4 基の存在によるものと考えられる。エナメル質中のアパタイトは HPO_4 を含み、 HPO_4 基が存在するとアパタイトの a 軸の長さが増加することが知られている³³⁾。

4. 結晶形成に伴う細胞の役割

成熟期エナメル質で認められる酸性領域の RA 期細

胞は、 Ca^{2+} や PO_4^{2-} が盛んに分泌されている時期であると同時に、細胞のミトコンドリアが分泌する H^+ ($\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{CO}_3^{2-} + 2\text{H}^+$)やアパタイト形成で生じる H^+ の存在によって、エナメル質基質に酸性化が認められることが示唆されている。このような酸性下ではヒドロキシアパタイトの合成よりもDCPD、OCPの形成が生じ易く、細胞から分泌されたと考えられる炭酸と共に炭酸アパタイトができるものと考えられた。さらに、分泌された酵素は活性化し、蛋白質の分解と共に炭酸水酸アパタイトの形成が進められていることが推測される。また、SA期の中性領域では水の存在により炭酸アパタイトの加水分解が進行し、ヒドロキシアパタイトの形成によって安定した結晶へと成熟していく事が考えられた。一方で、成熟初期に多く認められた炭酸基は、エナメル質アパタイトの結晶成長にも関与していると考えることができる。エナメル質アパタイトの結晶の大きさに関しては、Ameloblastが分泌した蛋白(Enamelin)のアパタイト結晶への吸着によって、方向性をもった大きな結晶を形成しているとされている。この点で、本研究では結晶成長阻害因子でもある炭酸基のアパタイト固溶によって、Ameloblastはアパタイト形成初期の大量生成を抑制し、阻害され核となる脱炭酸に伴って形成されたアパタイトにEnamelin蛋白が吸着し、エナメル質特有の硬く大きなアパタイト結晶が形成されていくものと考えられた。

【参考文献】

- Price P.: Osteocalcin: Bone and mineral research, Annual, Excerpta Medica, ed. by Peck W. A., Amsterdam, Oxford, Princeton, 1983, pp 157.
- Termine D. J., Kleinman H. K., Whitson S. W., Conn K. M., MacGarvery M. L., and Martin G. L.: Osteonectin, a bone specific protein linking mineral to collagen. Cell, 26: 99, 1981.
- Reith E. J. and Cotty V. F.: The absorptive activity of ameloblasts during the maturation of enamel. Anat Rec, 157: 577-587, 1967.
- Fukae M., Tanabe T., Ijiri H. and Shimizu M.: Studies on porcine enamel proteins-A possible original enamel protein. Tsurumi Univ Dent J, 6(2): 87-94, 1980.
- Fincham A. G., Belcourt A. B., Termine D. J.: Amelogenin sequence homologues in enamel matrix proteins from three mammalian species. Biochem J, 3: 149-154, 1983.
- Sasaki S., Shimokawa H. and Tanaka K.: Mechanisms of tooth enamel formation. ed. by Suga S., Quintessence. Tokyo, 1983, pp11-24
- Takagi T., Suzuki M., Baba T., Minegishi K. and Sasaki S.: Complete amino acid sequence of amelogenin in developing bovine enamel. Biochem. Biophys Res Comm, 121(2): 592-597, 1984.
- Termine D. J., Belcourt A. B., Christner P. J., Conn K. M. and Nylen M. U.: Properties of dissociatively extracted fetal tooth matrix proteins. J Biol Chem, 255: 9760-9768, 1980.
- Limeback H.: Isolation and characterization of pig enamelin. Biochem J, 243: 385-390, 1987.
- Termine D. J., Torchia D. A. and Conn K. M.: Enamel matrix, structural protein. J Dent Res, 58(B): 773-778, 1979.
- 秦まゆみ, 森脇豊, 土井豊, 後藤隆泰, 若松宣一 亀水秀男: 陽イオン選択的透過膜上でのオクタカルシウムリン酸塩の配向成長. 日本結晶成長学会誌, 12(1): 91-99, 1985.
- Eanes E. D. and Meyer J. L.: The maturation of crystalline calcium phosphates in aqueous suspensions at physiologic pH. Calcif Tiss Res, 23: 259-269, 1977.
- Meyer J. L., and Eanes E. D.: Aous to crystalline calcium phosphate transformation. Calcif Tiss Res, 25: 59-68, 1978.
- Nancollas G. H. and Mohan M. S.: The growth of hydroxyapatite crystals. Arch Oral Biol, 15: 731-745, 1970.
- Eanes E. D., and Pattner S. L.: The effect of magnesium on apatite formation in seeded supersaturated solutions at pH7.4. J Dent Res, 60(9): 1719-1723, 1981.
- Takagi T.: The cyclical change and its physiological role in developing tooth enamel. The quintessence, 10(6): 6-11, 1991.
- Sasaki S., Takagi T., and Suzuki M.: Cyclical change in pH bovine developing enamel as sequential bands. Arch Oral Biol, 36(3): 227-231, 1991.
- Takagi T., Suzuki M., Sasaki S.: Alternating pH modulation on maturing enamel. Apatite ed. by Aoki H., Vol.1, Jpn Associ of Apatite Sci, Tokyo, 1992, pp7-15.
- Crenshaw M. A. and Takano Y.: Mechanisms by which the enamel organ controls calcium entry into developing enamel. J Dent Res, 61: 1571-1579, 1982.
- Takano Y., Crenshaw M. A., Hammarstrom L., Sawden J. W., and Lindskog S.: The visualization of the patterns of ameloblast modulation by the glyoxalbis (2-hydroxyanil) staining method. J Dent Res, 61(b): 1580-1586, 1982.
- Laemmli U.K.: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head and bacteriophage T4. Nature, 227, 680-685, 1970.
- Shimizu M., Tanabe T. and Fukae M.: Proteolytic enzyme in porcine immature enamel. J. Dent. Res. Special issue B, 58(B): 782-788, 1978
- 桜井敏夫: UNICS: Universal crystallographic computation program system, 日本結晶学会, 1967
38. Takano Y.: Enamel mineralization and the role of ameloblasts in calcium transport. Connective Tissue Res, 33: 127-137, 1995
24. Takano Y.: Enamel mineralization and the role of ameloblasts in calcium transport. Connect Tissue Res, 33: 127-137, 1995.
25. 高木亨, 青木秀希: 脊椎動物における歯および骨の形成と成長機構, セラミックス, 28(1): 22-25, 1993.
26. Elliott J.C.: Structure and chemistry of the apatites and other calcium orthophosphates. Amsterdam, 1994, pp111-189.
27. Balmain N., Legros R. and Bonel G.: X-ray diffraction of calcified bone tissue: A reliable method for the determination of bone Ca/P molar ratio. Calcified Tissue International, 34: 93-98, 1982.
28. Guillaume M.: Application du dosage par voie diffractométrique. Bull Soc Roy Sci Liege, 30: 340-366, 1961
29. Mayer I., Featherstone J. D. B., Nagler R., Noeovich M., Deutsch D., Gedalia I.: Thermal decomposition of Mg-containing carbonate apatites. J Solid State Chem, 56: 230-235, 1980.
30. Montel G.: Conceptions nouvelles sur la physicochimie des phosphates de structure apatitique. Bull Soc Chem Fr: 1693-1700, 1968.
31. Aoki H.: Science and Medical applications of hydroxy-apatite. Jpn Assoc of Apatite Sci, 1991, Tokyo.
32. Eanes E. D., Gillespie I. H. and Posner A. S.: Intermediate states of the precipitation of hydroxyapatite. Nature, 208: 365-367, 1965.
33. LeGeros R. Z., LeGeros D. J.: Phosphate minerals in human tissues. In: Phosphate Minerals, ed. by Nriagu J. and Moore P. B. Springer, 1984, pp355-385.