

ヒト・ビリルビン着色歯のビリルビン分析

—歯牙硬組織中のビリルビンの証明—

Bilirubin Analysis of Human Tooth Pigmentation
due to Hyperbilirubinemia

—Demonstration of Bilirubin in Dental Hard Tissue—

渡辺一史 柴田敏之 大森一幸
牧富弥代 森崎市治郎* 甲原玄秋**
五十嵐清治*** 有末真Kazufumi WATANABE, Toshiyuki SHIBATA, Kazuyuki OHMORI,
Fumiyo MAKI, Ichijiro MORISAKI*, Michitoki KINEHARA**,
Seiji IGARASHI*** and Makoto ARISUE

Abstract: This study was conducted to demonstrate the presence of bilirubin in deciduous teeth obtained from three patients with severe liver dysfunction. The diagnosis was bilirubin pigmentation of the teeth. A part of each tooth was used for histological analysis and the remaining part of the tooth was used for qualitative analysis after bilirubin extraction with a mixed solution of chloroform, methanol, and acetic acid, 30 : 10 : 0.5, v/v. Histological analysis of the pigmented teeth showed the presence of a green stripe in the dentine running parallel to the incremental line in two cases that had hyperbilirubinemia for a short time. On the other hand, in a case of hyperbilirubinemia for a long time, this characteristic stripe was not observed. The bilirubin extracted solution was evaporated, and the residue was redissolved in chloroform. Then its absorption spectrum was measured before and after diazo reaction. This resulted in a shift of the absorption maximum from 450 to 540 nm and indicated the enhancement of the spectrum as compared with that of normal deciduous teeth. These results indicated the presence of bilirubin in the teeth that were clinically diagnosed as bilirubin pigmented teeth.

Key words: Bilirubin (ビリルビン), Pigmented teeth (着色歯), Jaundice (黄疸)

[Received Aug. 25, 1997, Accepted Dec. 23, 1997]

北海道医療大学歯学部口腔外科学第2講座 (主任: 有末真教授)

* 大阪大学歯学部附属病院障害者歯科治療部 (主任: 森崎市治郎部長)

** 千葉県こども病院歯科 (主任: 甲原玄秋主任医長)

*** 北海道医療大学歯学部小児歯科学講座 (主任: 五十嵐清治教授)

Second Department of Oral and Maxillofacial Surgery, School of Dentistry, Health Sciences University of Hokkaido (Chief: Prof. Makoto ARISUE)

* *Faculty of Dentistry, Division of Dentistry for the Disabled, Osaka University* (Chief: Ichijiro MORISAKI)

** *Division of Dentistry, Chiba Children's Hospital* (Chief: Michitoki KINEHARA)

*** *Department of Pediatric Dentistry, School of Dentistry, Health Sciences University of Hokkaido* (Chief: Prof. Seiji IGARASHI)

[平成9年8月25日受付, 平成9年12月23日受理]

緒 言

新生児の高度黄疸に伴ってビリルビンが菌に沈着し、着色菌が萌出することは従来より良く知られている現象である¹⁻¹¹⁾。しかし、このビリルビン着色菌の診断は、臨床的所見、すなわち黄疸の既往、および着色菌の色調のみによって行われ、着色菌中にビリルビンが存在する証明すらなされていないのが現状である。

われわれは、これまで、実験的黄疸によって生じさせたラットのビリルビン着色菌を用い、この着色菌中のビリルビンを検出することを試み、その分析法を確立し、報告してきた^{12,13)}。今回、ヒト・ビリルビン着色菌中のビリルビンの証明と診断法の確立を目的に先天性胆道閉鎖症児などの重度肝機能障害を持つ患児で、臨床的にビリルビン着色菌と診断される、3症例のヒト乳菌のビリルビン分析を行ったので報告する。

材料および方法

1. 検索材料

以下の重度肝機能障害に罹患した3症例の小児より得られた乳菌を検索材料とした。

検体1：先天性胆道閉鎖症にて総ビリルビン値1.2~1.8 mg/dlの状態が持続している11歳男児より得られた上顎乳犬歯1本。

検体2：出生時の高度出血に引続き生じた高ビリルビン血症にて総ビリルビン値20 mg/dl以上（最高で59 mg/dl）の状態を生後1か月半まで持続していた7歳男児より得られた上顎乳中切歯2本と、上顎乳側切歯1本。

検体3：先天性胆道閉鎖症にて生後より総ビリルビン値7~16 mg/dlの状態が持続し、8歳時に生体肝移植を受け、その後、総ビリルビン値が1 mg/dl前後となった10歳女児より得られた下顎第二乳臼歯1本。

なお、対照として自然脱落正常乳菌（上顎乳犬歯、上顎乳中切歯、下顎第二乳臼歯）各々1本を用いた。

2. 検索方法

各々の症例より得られた検体および正常乳菌の一部を形態観察用の標本とし、残りをビリルビン分析用とした。すなわち、検体1、検体3では菌根の一部が横断面となるように、また、検体2では上顎乳中切歯が唇舌的縦断面となるように歯を分割し、形態観察用に用いた。なお、残った検体は可及的に歯根膜線維などの軟組織を削除し、ビリルビン分析用に用いた。

3. 着色菌の病理組織学的観察

未包埋の着色菌からマイクロカッティングマシーンBS-3000（EXAKT社製）を用い、先に述べた断面に

て薄切切片を1枚採取し、マイクログラインディングマシーンMG-4000（EXAKT社製）を用いて厚さ約100 μm の研磨標本を作製し、未脱灰、未染色のまま光学顕微鏡にて観察した。また、同一標本を落射型蛍光顕微鏡（CARL ZEISS社製）にて検鏡した。

4. 着色菌のビリルビン分析

1) 分析試料の作製

検体を乾燥後、乳鉢にて粉碎した。この結果、検体1では0.2743 g、検体2では0.2163 g、検体3では0.3683 gの分析試料を得た。これら試料を抽出溶媒（クロロホルム：メタノール：酢酸=30：10：0.5, v/v）20 mlに入れ、10分間超音波下に混和し、ビリルビンを抽出した。次に、これを遠心分離（2,800 rpm, 1800G, 5分間）し、上澄を採取したのち、沈殿物に再び抽出溶媒を加え、同様の操作を行い上澄みを採取した。これを計3回行い、得られた抽出液計60 mlをビリルビン抽出液とし、エバポレーターで濃縮乾固したものをビリルビン分析試料とした。なお、対照として、各々の検体と同じ菌種の健常児の自然脱落乳菌より得られた検体1の対照として0.2923 g、検体2の対照として0.2163 g、検体3の対照として0.3921 gの試料を用いた。

2) ジアゾ試薬

スルファニル酸（100 mg/0.18 N HCl 100 ml）溶液と亜硝酸ナトリウム（500 mg/H₂O 100 ml）溶液を使用直前に100：3（v/v）で混和し用いた。

3) ビリルビン標準液

ビリルビン試薬（MERCK社製）を100%クロロホルムで10 $\mu\text{g/ml}$ の濃度に溶解したものを用いた。

4) 吸光度の測定

各検体および正常乳菌より得られたビリルビン分析用試料に、ビリルビン標準液1 mlを加え、これを濃縮乾固後、100%クロロホルム2.5 mlに溶解し、400~600 nmの範囲で吸光度を測定した。測定後、ジアゾ化によるビリルビンの確認を行うため、検体を回収し、再度濃縮したのち、メタノール2.2 mlに溶解し、ジアゾ試薬0.3 mlを加えて30分間室温放置後、吸光度を測定した。また、各検体中のビリルビン含有量を測定するために、ビリルビン試薬を1~50 μg の範囲で各検体を溶解したのと同じ100%クロロホルム2.5 mlに溶解し、その吸光度を測定し、検量線を作成した（図4）。この検量線をもとに、各検体中のビリルビン量を算出した。なお、本予備実験の結果、本実験系における検出限界は約1 μg であった。

結 果

1. 着色菌の肉眼的所見



写真 1 検体 1 の肉眼像

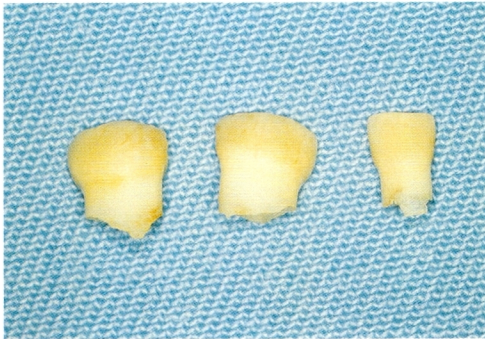
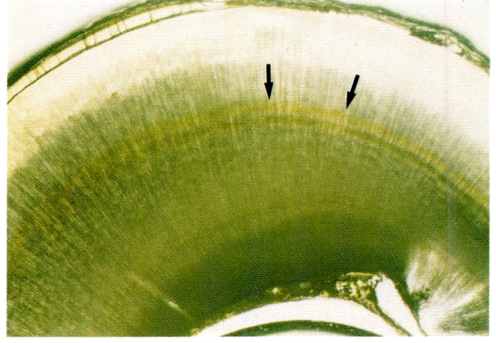
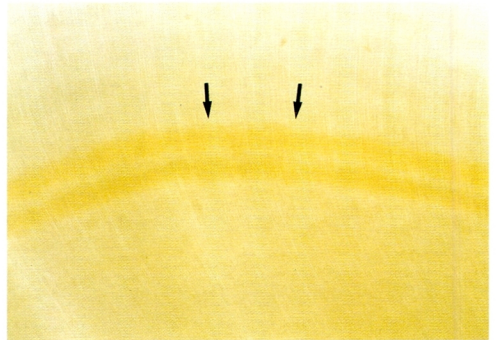


写真 2 検体 2 の肉眼像



写真 3 検体 3 の肉眼像

写真 4 検体 1 の歯根部横断面の光顕像 (×50)
矢印: 着色帯写真 5 検体 1 の歯根部横断面の強拡大像 (×300)
矢印: 着色帯

検体 1 では、歯冠の歯頸側約 1/2 から歯根の歯頸側約 2/3 にかけて淡褐色の着色が認められた (写真 1)。検体 2 では、萌出時は歯冠部切端側約 1/2 の範囲に淡緑色の着色が認められたが、交換期には淡黄色となった (写真 2)。検体 3 では、歯冠 (一部) と 2 本の歯根に分れており、歯冠、歯根とも全体的に緑色を呈していた (写真 3)。

2. 着色歯の光顕所見

検体 1 では、象牙質内の成長線に沿って太さの異なる数本の帯状の着色を認めた (写真 4, 5)。検体 2 では、エナメル質内の新産線と思われる太い成長線とエナメル象牙境で交わる象牙質内の成長線よりやや内側の成長線に沿った帯状の着色を認めた (写真 6, 7)。一方、検体 3 では、象牙質全層がほぼ均一な黄緑色を呈し、検体 1, 2 で認められたような帯状の着色は認められなかった (写真 8)。なお、全ての検体とも観察した限りではエナメル質内の着色や象牙細管の走行異常は認められなかった。

3. 着色歯の蛍光顕微鏡所見

光顕観察に使用した標本を蛍光顕微鏡にて観察した結果、検体 1 では、光顕像で認められた帯状の着色部に一



写真 6 検体 2 の歯冠部縦断面の光顕像 (×50)
矢頭：着色帯



写真 7 検体 2 の歯冠部縦断面の強拡大像 (×200)
D：象牙質 E：エナメル質
矢印：着色帯 矢頭：成長線

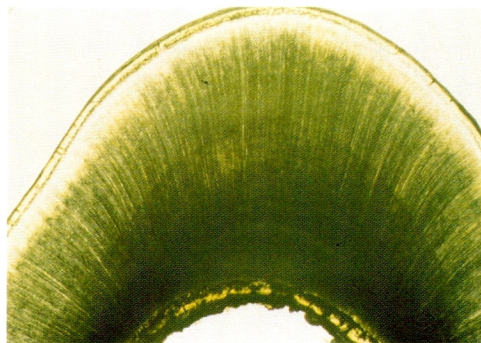


写真 8 検体 3 の歯根部横断面の光顕像 (×50)

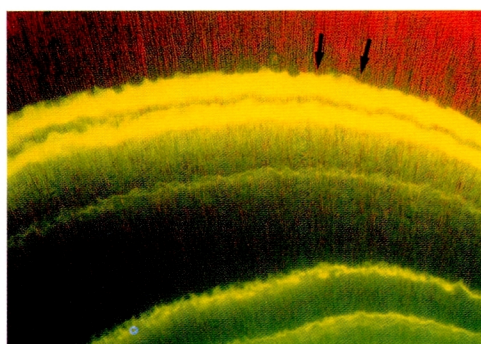


写真 9 検体 1 の歯根部横断面の蛍光顕微鏡像 (×300)
矢印：蛍光帯

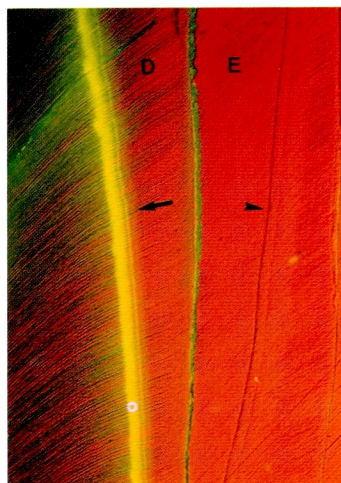


写真 10 検体 2 の歯冠部縦断面の蛍光顕微鏡像 (×200)
D：象牙質 E：エナメル質
矢印：蛍光帯 矢頭：成長線

致して強い蛍光帯が認められた。また、光顕像で着色帯と判断できなかった部位でも数本の蛍光帯が認められた (写真 9)。同様に、検体 2 では、象牙質内の光顕像で帯状の着色の認める部位に一致して強い蛍光帯を認めた (写真 10)。一方、検体 3 では、特徴的な所見は認められなかった。この結果より、少なくとも光顕的に認められる帯状の着色は、蛍光を発する着色であることが示された。

4. 着色菌のビリルビン分析

ビリルビン分析の結果、検体 1, 2, 3 とも極大吸収波

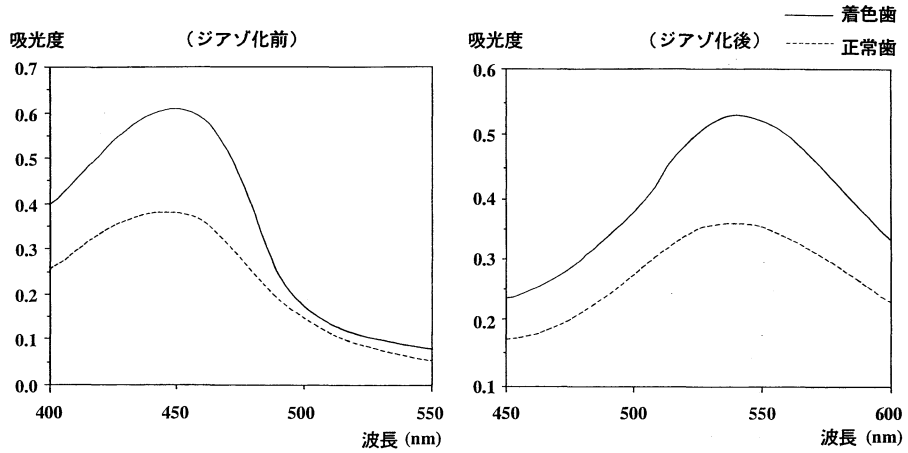


図 1 検体 1 のビリルビン分析

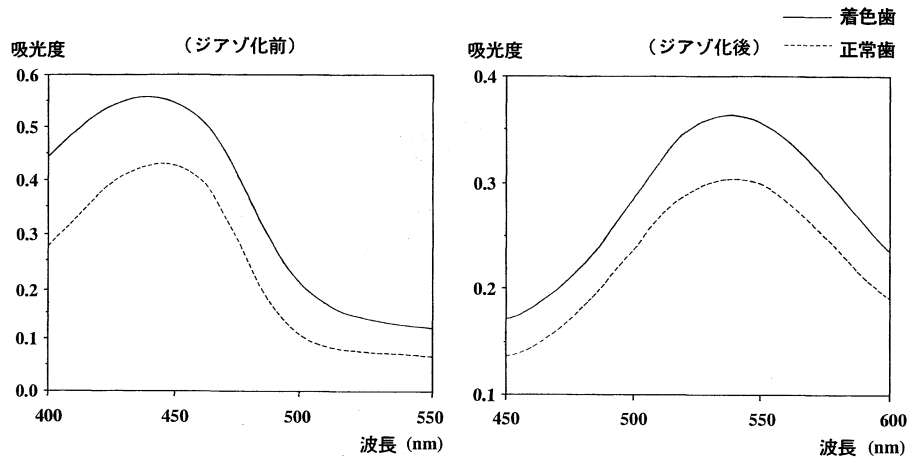


図 2 検体 2 のビリルビン分析

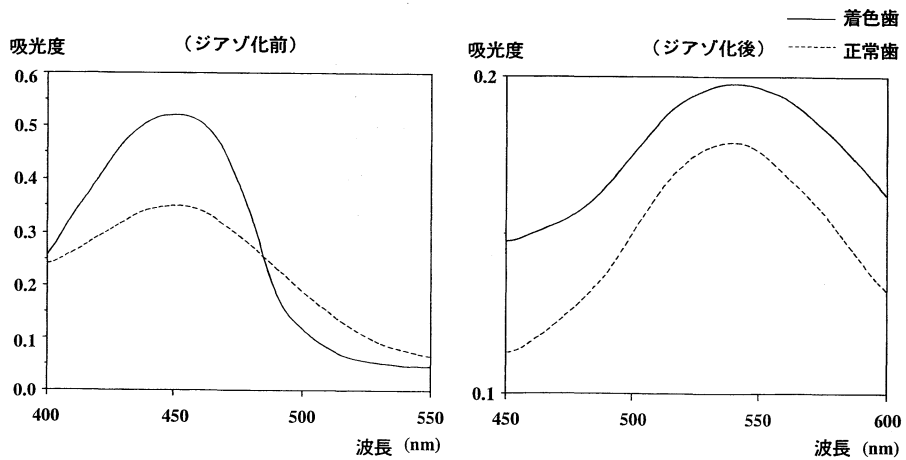


図 3 検体 3 のビリルビン分析

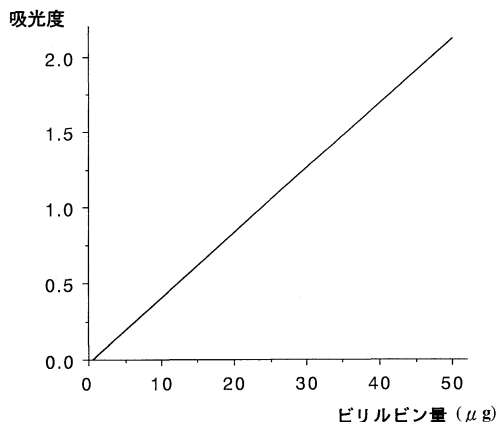


図 4 検量線

表 1 ビリルビン定量分析結果

	吸光度	ビリルビン量 (μg) [*]	歯の重量 (g)	含有量 (ppm)
検体 1	0.52	3.0	0.2743	10.9
検体 2	0.61	5.0	0.2163	23.1
検体 3	0.54	3.4	0.3683	9.2

* : 実測値 - 10

長は 450 nm 付近に認められ、その吸光度は、各々、正常乳歯より得られたものに比べ増大しているのが観察された。また、ジアゾ化により、その極大吸収波長は 540 nm 付近に移動するのが観察された (図 1, 2, 3)。この結果より、着色歯中には正常乳歯に含まれる以上の量のビリルビンが存在していることが示された。検量線 (図 4) から得られた歯の重量あたりのビリルビン含有量 (ppm) は、検体 1 では 10.9、検体 2 では 23.1、検体 3 では 9.2 であった (表 1)。なお、正常乳歯ではビリルビン標準液単独と同じ吸光度を示し、測定限界以下であった。

考 察

今回、従来の基準、すなわち臨床的にビリルビン着色歯と診断されるヒト乳歯のビリルビン分析を行った。その結果、着色歯抽出液は 450 nm 付近に極大吸収波長を認め、対照とした正常乳歯抽出液よりも高い値を示していた。また、これをジアゾ化すると極大吸収波長は 540 nm 付近に遷移し、着色歯抽出液中にビリルビンが存在していることが示された。

重度新生児黄疸に伴って歯の着色が生じる現象は、以前より良く知られている¹⁻¹¹⁾。現在、この歯の着色は、

臨床的に得られた着色歯の病理組織学的検討⁷⁻¹¹⁾や、ラットに胆管結紮やビリルビン投与を行い、着色歯を発生させた基礎的研究など¹⁴⁻¹⁶⁾により、黄疸時の高濃度の血中ビリルビンが形成中の歯質に沈着することによって生じるものと考えられている。しかし、このビリルビン着色歯の診断は、既往歴および着色歯の色調のみによって行われており、実際に着色物質がビリルビンであるという証明、さらにはビリルビン着色歯中に本当にビリルビンが高濃度に存在する証明はなされておらず、その機序はいまだ不明な部分が多い。先にわれわれは、いわゆるビリルビン着色歯中のビリルビンを証明するために、LE (Long Evans) ラットのクローズドコロニーより得られた肝炎を全く発症しない LEA (Long Evans Agouti) ラットを用い、Miller ら¹⁴⁾の方法に従って胆管結紮、およびビリルビン投与を行い、実験的に黄疸を発生させ、緑色のビリルビン着色歯を形成し、これを検索した¹⁷⁾。その結果、高度の黄疸を示した時期に形成された象牙質内に帯状の着色が認められる着色切歯を得た。次いで、この着色切歯中のビリルビンを検出するために、着色歯を乾燥・粉碎し、クロロホルム溶液にて抽出し、これにビリルビン標準液を加え吸光度計にて測定した^{12,13)}。LEA ラットの正常歯より得られた検体にビリルビン標準液を加えたスペクトルは、ビリルビン標準液単独と全く同一のスペクトルを呈し、ピークは 450 nm 付近に認められ、ジアゾ化により両者のスペクトルは、同一のままピークが 540 nm 付近に遷移し、正常歯中にはビリルビンは検出限界以下しか含まれていないことが示された。一方、先に得られた着色歯の検体では、ビリルビン標準液単独を上回るピークが 450 nm 付近に認められ、ジアゾ化によりこのピークがそのまま 540 nm 付近に遷移するのが観察された。以上の結果より、ビリルビンの化学的性質、すなわち、極大吸収波長が 450 nm を示すことと、ジアゾ化により特異的に極大吸収波長が 540 nm に遷移することを利用して、歯牙硬組織中のビリルビンを証明することが可能であることが明らかとなった。また、正常歯ではビリルビンは検出限界以下しか含まれていないことも示された。

今回得られたヒト着色歯を病理組織学的に検索した結果、検体 1 や 2 のように歯の形成中に一過性の黄疸を呈した症例では、着色はラットの場合にみられたのとはほぼ同様に象牙質内に成長線に沿って帯状に認められ、その臨床経過を考え合せると、着色はビリルビンにより生じたものと推察された。また、検体 3 では、帯状の着色は認められなかったが、象牙質全体が着色しているのが観察された。このことは、臨床経過において、歯の形成期を通して持続的に高いビリルビン血症を呈していたこと

より, 歯全体が着色していることを示唆したと推察された。これらの結果より, 今回検討した検体は, 臨床的, 組織学的にビリルビン着色歯であると診断して良いものと考えられた。さらに, これら着色歯を, われわれがラットを用いた基礎研究で確立したビリルビン分析法を用いて検討した結果, 着色歯中に正常歯より多くのビリルビンが含まれていることが示された。以上の結果は, 今回得られたヒト乳歯の着色がビリルビンの沈着による可能性が高いことを示すとともに, 先にわれわれが報告したビリルビン分析法がヒト・ビリルビン着色歯中のビリルビンの証明および診断に応用可能であることを示唆したと考えられた。

ビリルビン着色歯の成因を明らかにする上で, ビリルビンが歯質のハイドロキシアパタイトなどの無機成分中に存在するのか, または, コラーゲン繊維などの有機成分中に存在するのか, さらには, どのような形で存在するのかを検討することは, きわめて重要なことと考えられる。この点に関し, これまでわれわれがラットを用いて行ってきた基礎的検討の結果では, 象牙質の着色部に一致して石灰化不全が生じていること, ビリルビン着色歯を脱灰標本にすると, その着色が認められなくなること, さらには, ビリルビン着色歯を放置した場合, 自然に退色していくことなどより, テトラサイクリンによる着色などのようにコラーゲン繊維に強固に結合するのではなく, ハイドロキシアパタイトなどの無機成分中に沈着している可能性が高いと推察している。しかしながら, これまで, われわれが行ってきた方法は, 歯の硬組織全体を粉末とし, これを検討の対象としているため, 歯の硬組織中に存在するビリルビンの証明は可能であるものの, 着色部におけるビリルビンの局在, さらには, 歯質構成成分とビリルビンの結合様式について解明することは不可能であった。したがって, 今後の課題として, ビリルビンのより簡便な検出法, および局在を示すことが可能な方法を考案し, 着色がビリルビンであることを直接的に証明するとともに, その結合様式についてもさらに検討を加える必要があると考えられた。

結 語

1. 着色歯の光顕所見では, 一過性の高度黄疸を呈した症例での着色は象牙質内に成長線に沿って帯状に認められ, 持続性の高度黄疸を呈した症例では象牙質全体が着色していた。
2. 蛍光顕微鏡所見では, 光顕像でみられた着色部に一致して蛍光が観察された。
3. ビリルビン分析では, 着色歯抽出液は約 450 nm にピークを認め, 対照とした正常乳歯抽出液よりも高い

値を示した。さらに, これをジアゾ化するとピークは約 540 nm に移動した。以上の結果より, ヒト・ビリルビン着色歯中にビリルビンが存在することが証明された。

稿を終えるにあたり, 本研究の御指導をいただいた, 北海道医療大学薬学部薬品分析化学教室黒澤隆夫助教授に厚く御礼申し上げます。

本論文の要旨の一部は, 第 34 回日本小児歯科学会総会(平成 8 年 6 月, 札幌), 第 15 回東日本歯学会学術大会(平成 9 年 2 月, 札幌)において発表した。

文 献

- 1) Thursfield H.: Green teeth, subsequent to a prolonged jaundice in the first weeks of life. *Proc R Soc Med* 5: 147-148, 1912.
- 2) Langmead F.: Anomalous jaundice with enlargement of liver and spleen, and bilestained teeth. *Proc R Soc Med* 5: 148, 1912.
- 3) Belanger G. K., Sanger R. et al: Oral and systemic findings in biliary atresia: report of 11 cases. *Pediatr Dent* 4: 322-326, 1982.
- 4) Eisenberg E. and Bernick S. M.: Anomalies of the teeth with stains and discolorations. *J Prev Dent* 2: 7-20, 1985.
- 5) Herbert F. L. and Delcambre T. J.: Unusual case of green teeth resulting from neonatal hyperbilirubinemia. *J Dent Child* 54: 54-56, 1987.
- 6) Losch P. K., Brown J. C. et al: Staining of the dental structure in jaundice of the new born. *J Dent Res* 19: 293, 1940.
- 7) Boyle P. E. and Dinnerman M.: Natural vital staining of the teeth of infants and children. *Amer J Orthodont Oral Surg* 27: 377, 1941.
- 8) Marsland E. A. and Gerrard J. W.: Intrinsic staining of teeth following icterus gravis. *Brit Dent J* 12: 305-310, 1953.
- 9) 松田繁一郎, 内田 仙: 新産児重症黄疸における歯牙の着色について. *口病誌* 24: 256-259, 1957.
- 10) Morisaki I., Abe K. et al: Dental findings of children with biliary atresia: report of seven cases. *J Dent Child* 57: 220-223, 1990.
- 11) 宋 連玉, 加藤一生, 他: 胆道閉鎖症児 15 症例の歯科所見. *障歯誌* 14: 149-153, 1993.
- 12) 柴田敏之, 渡辺一史, 他: 歯牙硬組織中のビリルビン分析法の検討. *歯科ジャーナル* 40: 769-771, 1994.
- 13) Shibata T., Watanabe K. et al: Experimental bilirubin pigmentation of rat dentine and its detection by a qualitative analytical method. *Archs oral Biol* 41: 509-511, 1996.
- 14) Miller J.: The effect of bilirubin on tooth development in the rat. *Arch oral Biol* 2:

- 143-150, 1960.
- 15) Hals E. and Nielsen K.: Dental changes in experimental bile duct obstruction in rodents. *Archs oral Biol* 14: 151-160, 1969.
- 16) 加藤一生: 高ビリルビン血症による歯牙着色に関する実験病理組織学的研究. *阪大歯誌* 36: 415-432, 1991.
- 17) 柴田敏之, 渡辺一史, 他: ビリルビン着色菌萌出モデル LEC ラットの着色機序の検索—実験的黄疸との比較. *J Jpn Stomatol Soc* 44: 392-398, 1995.