原 著

エナメル質における歯質崩壊過程の連続的観察

——顕微鏡下における酢酸緩衝液による初期崩壊——

吉 田 茂*

概要：顕微鏡下において、エナメル質の崩壊過程を連続的に追跡したものである。

実験技法はすでに報告したが、その概要は次の通りである。約 20μ の平行薄切々片を接着剤 (poly-vinylmethylether) にてサンドウィッチ法により歯の切裁面を接着し、エナメル質表面のみを露出させる。このエナメル質表面に作用液 (pH 5.0 N/10 酢酸緩衝液) を約 1mm/5min の速度で作用させ、それにより生ずる変化を 16mm 自動微速度撮影により記録したものである。その結果エナメル質表層部の変化を従来の研究結果では得られない動的な過程として観察出来た、とくにエナメル質最表層部から 30~40 μ の深さに至る変化過程について次の結果が得られた。1) エナメル質最表層における耐酸性が認められた。2) エナメル質表層の一部に脱灰がはじまると、その下層に小規模な表層下脱灰を形成する。3) 表層下脱灰は多くの場合、1本ないし数本の酸浸入路とみられる幅 1 μ 内外の細い通路がある。これは脱灰が進むと脱灰巣に融合してしまう。4) 表層下脱灰は必ずしも表層に生ずるとは限らず、ある程度深部においても形成される。5) Retzius 線および無柱エナメル質にみられる線状の横紋も一種の酸浸入路となりうる。6) 表層の小欠損はごく初期には酸の浸入門戸となりうる。7) エナメル質深層部における脱灰は一般にエナメル小柱よりも、エナメル質小柱間に先行する。

Abstract: A Microscopical Study on Destructive Process in Human Enamel, by Shigeru YOSHIDA*. The changes in the enamel lesion produced by acetic acid were microscopically demonstrated by use of a continuous observation device.

A new method for continuous observation of changes in enamel destruction was previously devised, leading the way to important development in the pathological study of enamel caries.

In this experiment patterns of changes in enamel destruction owing to the attack of acetic acid were demonstrated using the device detailed in the previous paper.

Using approximately 20 μ thick sections of undecalcified teeth, artificial lesions were produced by exposing the surface of the enamel to N/10 acetic acid buffer solution at pH 5.0 under the microscope.

Fifty six specimens from freshly extracted unerupted third molar were used in the experiment.

The main observation results are as follows:

1. It was shown in all cases that remarkable change did not appear until several hours after the start of the acid attack. This may be due to an acid resistant property of the enamel surface.

2. A suggestion regarding the important role in the initiation of acid attack of small defects and the ends of striae of Retzius at superficial layer of enamel was derived from the

* Department of Dental Research (Chief: Shimpei ARAYA) National Institute of Health, Tokyo, Japan
国立予防衛生研究所歯科衛生部 (部長: 荒谷真平)

昭和47年1月18日受付

changes appeared in Figs. 1, 2 and 3.

3. Following the initiation of acid attack, decalcification appears to take place in the underlying portion of the enamel through micro-channels. This seems to be the ordinary and typical pattern of enamel destruction in the inner portions as well as in the superficial layer of enamel. Figs. 2, 3 and 4.

4. Occurrence of preferential damage in the interprismatic area was demonstrated at a later stage of enamel destruction.

結 言

歯質の崩壊を顕微鏡下において発現させ、その変化の過程を連続的に追跡する実験技法についてはすでに著者らの報告がある¹⁾。

酸などによる歯質の崩壊が、エナメル質の最表層部からはじまり、次第に深層に進む変化の過程を形態的に捉えることは、齲蝕の進行する形式を知るうえからも、齲蝕の予防的見地からも必要であろう。特にエナメル質の表層部における崩壊の過程を追求することは、ここが直接、細菌、歯石、歯垢など齲蝕の誘発因子と接触している特異な場であることから重要なことである。

エナメル質の表層部に関する研究は、形態学的、物理化学的など各方面より多く研究されている。エナメル質表面を被う Enamel cuticle (エナメル表皮) については形態またはその年齢的、および歯種の消長に関する形態学的研究²⁾⁻¹⁰⁾があり、さらにそれが酸抵抗性をもつことも知られている¹¹⁾⁻¹²⁾。

また、エナメル質を物理化学的見地から検討し、エナメル質表層部はその下層部に比べ明らかに硬度、緻密性は高く¹³⁾⁻¹⁸⁾。また、表層部の化学成分が、齲蝕罹患性、耐酸性などに影響することを示している報告も数多い。ことに表層部と深層部のエナメル質における $\text{Co}_2^{19)}$ 、 $\text{N}^{20)-23)}$ 、また $\text{F}^{24)}$ 等の含有量に差があり、年齢によっても差があり、この差が齲蝕罹患性に影響を及ぼすと言う成績もある。その他エナメル質の表層の界面活性²⁵⁾なども齲蝕罹患性を減弱させることが示されている。

エナメル質表層には散在する多くの小さな欠損がある²⁶⁾⁻³¹⁾。Hodson²⁶⁾⁻²⁷⁾はこの小欠損は歯の形成途上につくられ、齲蝕発生の誘因部位として必

ずしも位置づけることは出来ないと言っている。

一方、Malleson³¹⁾は逆に齲蝕の attack entry としての役割を示すであろうと言っている。このようにエナメル質の表層に関する研究業績は枚挙にいとまがない。

また、初期齲蝕の研究は近年著しく進展したが、そのほとんどは変化後の成績が多く、エナメル質の最表層数 μ における変化と、それより深層部のエナメル質との間に実験的なつながりが見出せない。

Pigman ら³²⁾⁻³⁵⁾、および Wachtel ら³⁶⁾は歯質の崩壊像を in-vitro で経時的に観察しているが、エナメル質の表面からの変化、とくに attack entry などには言及していない。しかし、従来の断面的な研究から脱却し、歯質の崩壊を動的なものとして追求する可能性を示唆するものである。

このようなエナメル質の表層部における歯質の崩壊過程を知るためには、その変化を動的に捉えることが重要である。

本実験の目的は、このような意味でエナメル質の表層部が酸に対してどのような変化過程を示しながらエナメル質の深層部へ進むかを連続的に観察し、齲蝕解明の端緒と齲蝕予防の手懸りとしての attack entry を知る目的で行なわれた。

材料および方法

使用歯は、20歳代より30歳代の未萌出または、半萌出のヒト第3大臼歯23個である。

歯は、抜去後、可及的短時間のうちに使用した。流水下でブラッシングによる歯面清掃後、実体顕微鏡下で、外観を詳細に観察し、破損、形成不全など異常のみとめられない歯を実験に供した。

観察標本の作成および観察方法の詳細は、著者がすでに報告した¹⁾がその概略は次の通りである。

1個の歯より、連続的に数枚の厚径約 20μ の平行薄切々片を作成した³⁷⁾。従つて、1個の歯より数例の観察標本が得られる。薄切々片をスライドおよびカバーガラス間に接着させて、エナメル質外表面のみを露出させる。この露出させたエナメル質外表面に対して作用液を流し入れ、それにより生ずるエナメル質の変化を生物顕微鏡下で連続的に追跡した。

観察は、長時間にわたり継続しておこなうため、おもに16mm微速度撮影装置⁽⁺⁾を用いた。観察間隔は1, 2, 4, 8, 15および30秒の6回路を用いた。ただし、作用開始直後は、観察間隔は出来る限り短時間とし、作用液の流し入れと同時に自動撮影で観察を開始した。

観察部位は、エナメル咬面、pit, fissure部を除いたエナメル質の外表面である。作用液には、pH 5.0, 0.1N 酢酸緩衝液を用いた。

作用液のエナメル質の外表面における流れの方向は、歯冠部より歯根部へ流れるように統一し、すべての操作は 20°C に調整した恒温室中⁽⁺⁺⁾において実施した。流水の速度は約 $1\text{mm}/5\text{min}$ である。

観察総数は56例であるが、本論文に提示した写真は、すべて16mm自動微速度撮影によりえたFilmを実体顕微鏡下で拡大し35mm filmに経時的にduplicateし、さらにこれをprintしたものである。変化の観察は16mm filmの映写と、上記の方法でprintした写真とを併用しておこなった。

(+) Nikon/Nac 製シネオートタイマー BS
型: Bolex-cine camera Hib Rx-Matic

(++) 日軽プレハブ冷凍室 R-2型, DFM 型,
改良型

成 績

56例を観察した結果、エナメル質表層の変化過程は、以下に示す4例において説明し得るものである。従つて、まず成績の所見を経時的に述べ、

次いで変化過程の概要を述べる。

(なお、成績の説明のうち脱灰により生じたと考えられる写真上の「暗影像」などの変化個所を、1部「脱灰」または「脱灰像」と言う表現をした。また、本実験においては、エナメル質の表面から、深さ約 $30\sim 40\mu$ までの変化をおもに観察した。そこで、エナメル質の表面から $2\sim 3\mu$ の範囲をエナメル質最表層とし、それより深い部位をエナメル質表層と表現した。)

1) Retzius 線およびエナメル質表層末端部と三角状の無柱エナメル質 (Fig. 1)

a) 経時的所見

エナメル質表層の Retzius 線末端部 (Fig. 1-B) に、しばしば三角状の無柱エナメル質が観察された。

本観察例は、この三角状の無柱エナメル質を含めて、Retzius 線(以下R-線と略す)の変化を観察したものである。

観察した歯は、29歳男性、下顎左側の半萌出第3大臼歯である。観察部位は舌面である。観察倍率は600倍である。

実験開始前 (Fig. 1-1)

矢印Sは作用液の流れる方向を示し、R-線をそれぞれR, R'で示す。A部は、R-線の表層移行部、B部はR-線の最表層でおわる部位で、ここに三角状の無柱エナメル質が観察される。C部は2本のR, R'最表層でおわる部位の中間部である。

5時間20分後 (Fig. 1-2)

最表層の全域に、脱灰による変化が暗影として認められる。とくにB部の斜めに走る約 2μ 幅の線状の脱灰像は、他の部位より深い(矢印)。この時期より脱灰の直下に幅約 5μ の白色の層が帯状に見られる。脱灰層が深層に進むにつれてこの層もまた深層へ進むが、つねに脱灰の直下に見られる。

7時間後 (Fig. 1-3)

表層部には、約 $1\sim 2\mu$ 幅の継続した透明帯(白色の線)が見られる。B部の脱灰は著明となる(矢印)。B部はR-線のエナメル質最表層の末端部に相当することが、この時期から

明らかとなる。

8時間20分後 (Fig. 1-4)

B部の脱灰は、R-線に沿って深部に進む(矢印)。

11時間後 (Fig. 1-5)

前記 (Fig. 1-3)に見られた透明帯(白色の線)は、ほぼ全表層に認められる。B部における脱灰はR-線に沿って進む。

14時間20分後 (Fig. 1-6)

脱灰は、表層の全体にわたり、ほぼ均等に深部へ進む。

23時間後 (Fig. 1-7)

表層からの脱灰は、さらに深さをまし、R-線にほぼ平行した線状の横紋(寺崎ら³⁸⁾)が多数認められる。

27時間後 (Fig. 1-8)

線状の横紋は、さらに明らかとなり、脱灰は、この横紋に沿って深部に進む。

30時間40分後 (Fig. 1-9)

R-線に達したA部の脱灰は、C部の変化と比較すると明らかに深部への進む速度は遅くなる。しかもA部では、エナメル質小柱の間に脱灰が著明となる。

37時間後 (Fig. 1-10)

脱灰は、全域にわたり約 20μ の深さに及び、ここでもA部はB、C部に比べ、深部へ進む速度は遅い。

39時間後 (Fig. 1-11)

無柱エナメル質部(B、C部)における線状の横紋は、著明となる。C部の脱灰は、R-線(R')に達すると、一時その進行が弱まる。

43時間後 (Fig. 1-12)

C部の脱灰は、R-線を越えて深部に進む。

45時間後 (Fig. 1-13)

R-線(矢印部)に達した脱灰は、一時弱まり、R-線に沿って進む。

48時間40分後 (Fig. 1-14)

R-線の矢印部の脱灰は、R-線に沿って進むことが明らかとなる。

51時間後 (Fig. 1-15)

全層にわたる脱灰は、表面より約 30μ の深

さに達した。この程度の深さに達すると脱灰はエナメル質小柱の間に先行するのが認められる。

b) 変化過程の概要

実験開始後、約3時間よりB部にごく表在的に脱灰がはじまり、約5時間後ではエナメル質最表層に均一な脱灰像が暗影として認められる。しかも、この頃よりR-線の最表層末端部は特に脱灰が著明である(B部)。

しかし、この時期では、まだこの脱灰部位がR-線の末端部位であるか否かは明らかでないが、7~8時間経過すると、R-線のエナメル質表層面に達する部位であることが明らかとなる (Fig. 1-4~6以降)。すなわち、これらの所見はR-線が、脱灰のごく初期においては、attack entry ともなり得ることを示唆するものであろう。

この時期に、エナメル質最表層部に厚径 $1\sim 2\mu$ の断続した白色の透明帯が観察される (Fig. 1-3)。これは Gustafson³⁹⁾の報告した齲蝕進行の形態分類の第三帯、つまり過石灰化帯(再石灰化帯)および Nishimura⁴⁰⁾の第二透明層 (Zweite Zone der Transparenz)に相当するものと考えられる。この透明層は、経時的に少しずつ鮮明さ、とその厚さを増す。

また、この断続した透明層が見られる以前、すなわち作用後約3時間より、脱灰の最も深い部位に、全層にわたり約 5μ 幅の白色の透明帯が生じるが、これは Gustafson³⁹⁾の第一帯、および Nishimura⁴⁰⁾の第一透明層に相当するものと考えられる。

作用後、20時間前後より、無柱エナメル質部にR-線にほぼ平行に走る数多くの線状の横紋が現われる (Fig. 1-7 B部)。これはエナメル質表面を通過した酸が、まづこの線状の横紋に沿って深部に進む (Fig. 1-8 B 矢印)結果と考えられる。さらにR-線に達すると、ここで深部への脱灰が一時的に弱まる。ある時間を経過すると、再びエナメル質小柱の間に沿って深部に進む (Fig. 1-9, 10 A)。勿論、この間R-線に沿つても、僅かではあるが酸は浸入しつづける。この時期の変化を低倍率で観察すると、R-線に沿って鋸歯状の脱灰像を

呈する。これは Crabb⁴²⁾ が偏光顕微鏡で観察した arrested caries の鋸歯状所見と類似する。

このように R-線は酸浸入に対して、重要な役割をもつものと考えられる。すなわち、エナメル質最表層部では、attack entry となり得ることを示唆し、表層下部では酸の浸入を一時的に遅延させる (Fig. 1-9 矢印)。これは、R-線が酸の浸入を阻止すると言うよりもむしろ R-線に沿って進むため下層への浸入が止まったように見えるのである。

2) 実験開始前には観察されない小欠損部 (不顕性小欠損) (Fig. 2)

a) 経時的所見

本観察例は、実験開始前にはエナメル質最表層部に観察されなかった小欠損の例である。

観察した歯は、21歳男性、上顎左側の埋伏第3大臼歯である。観察部位は、近心面である。観察倍率は600倍である。

実験開始前 (Fig. 2-1)

矢印 S は、作用液の流れる方向を示す。E は、エナメル質。R は R-線である。

2時間12分後 (Fig. 2-2)

作用後、約2時間より急速に A 部 (矢印) に脱灰による蕾状の暗影が現われ、エナメル質の表面との間に1本の線状の暗影をとまう脱灰像が見られる。あたかも蕾状の脱灰像と表面とを連絡しているように観察された。

3時間32分後 (Fig. 2-3)

蕾状の脱灰像は、球状に拡大する (A 部)。

7時間8分後 (Fig. 2-4)

球状となつた脱灰像 (A 部) は、次第に大きさを増し、R-線に達する。エナメル質表面と交通する線状の脱灰像も拡大する。

12時間28分後 (Fig. 2-5)

球状の脱灰像は、作用後7~8時間以後は、ほとんど変化が見られない。なお脱灰の深さは約 20μ である。

19時間8分後 (Fig. 2-6)

球状の脱灰像 (A 部) は、深さ、幅ともにほとんど変化を示さない。

27時間8分後 (Fig. 2-7)

球状の脱灰像は、表面と連なり凹陷状を呈するようになる。

40時間28分後 (Fig. 2-8)

その後、A 部は、ほとんど変化を示さず、極めてわずかに側方に拡大する。

b) 変化過程の概要

実験開始後、1時間30分頃より A 部のエナメル質最表層部にやや不明瞭な線状の脱灰が生じた。この脱灰像は急速に拡大し、表面下数 μ において球状を呈するようになる。おそらく、これは酸可溶性物質の溶出にともない暗影として観察されるようになったものであろう。

その後、経時的に球状の脱灰像は大きさを増すが、その間、エナメル質表面とは1本の線状の脱灰像によつて連絡されている (Fig. 2-2, 3 A 部)。

さらに、球状の脱灰像は全体に拡大しながら R-線に接する。

作用後、約10時間を経過すると、表面と連絡する線状の脱灰像は徐々に拡大し、幅も増し、太い管状を呈するようになる (Fig. 2-4, 5 A)。しかし、それ以後は、この小欠損における脱灰像はそれほど著明な変化を示めさない。

3) 実験開始前にすでに存在する半球状の小欠損 (顕性小欠損部) (Fig. 3)

a) 経時的所見

本観察例は、深さ、幅とも約 5μ の半球状の小欠損における変化の例である。

観察した歯は、21歳男性、上顎左側の埋伏第3大臼歯である。観察部位は、遠心面の歯冠中央よりもやや咬頭に偏した部位である。観察倍率は600倍である。

実験開始前 (Fig. 3-1)

表層中央部に、半球状の欠損 (C) がある。

E はエナメル質、R は R-線である。

40分後 (Fig. 3-2)

C 部の欠損の底部に、わずかに脱灰による変化が認められるが、周囲の組織には、まだ著明な変化はない。

1時間20分後 (Fig. 3-3)

欠損 (C) の底部、及び側壁に線状の脱灰像が認められる (矢印)。この時期から、A・

B・D部における変化が、次第に観察されてくる。

2時間後 (Fig. 3-4)

A, B, C 及びD部に、それぞれ異なつた脱灰像が観察されてくる。すなわち、A部ではエナメル質表面下に均等な深さに脱灰が見られるが、B部は最表層約 2μ の厚さを残し、その下層に脱灰による変化が見られる。D部は、数本の線状の脱灰像と、その下層の変化は明らかである。C部の欠損の形態はくさび状を呈するようになり、側壁に見られる線状の脱灰像も明らかとなる。

2時間40分後 (Fig. 3-5)

BおよびD部の表層下の脱灰像は著明となり、A部においても側方に表層下脱灰が進む。

4時間後 (Fig. 3-6)

A, BおよびD部の表層下脱灰は、いずれも著明となる。C部の欠損底部の脱灰は、さらに深層に進む。

6時間後 (Fig. 3-7)

D部における線状の脱灰像は拡大し、下層の脱灰像はエナメル質表面と連なる。A部においては最表層部に帯状の白色透明帯が現われる (Fig. 1-3 と類似している)。全域にわたつて脱灰の深さは約 15μ に及ぶ。

10時間後 (Fig. 3-8)

脱灰は進み、約 20μ の深さに達する。

16時間後 (Fig. 3-9)

さらに脱灰は約 35μ の深さに達する。C部の欠損部の側壁に一層の白色の透明帯が見られる。

22時間40分後 (Fig. 3-10)

脱灰は、次第に深層に及び全域にわたり粗造感を呈するようになる。

b) 変化過程の概要

本観察例の変化過程は、かなり複雑な様相を呈する。そこで、欠損部(C)の脱灰変化を中心として、他のA, BおよびD部を比較しながら特徴ある変化について述べる。

作用後、約1時間後より脱灰による変化が観察

されはじめる。まず欠損部(C)の下方と、欠損部の側壁に3本の線状の脱灰像が認められる。とくに底部の下方にのびる脱灰像の変化は明らかである。この脱灰像は、作用前 (Fig. 3-1 C 矢印) には、きわめて細い線として認められるものであるが、部位的にエナメル質小柱の間と一致しない。おそらく、細い亀裂の中に酸が浸入し脱灰が進んだものと思われる。

一方、この時期における他の部位の特徴ある変化は、A部の表層における比較的強度な脱灰像と、B, D部に見られる表層下脱灰像とである。とくにB, D部では、表面と表層下の脱灰像の間に、あたかも両者を交通させるような線状の脱灰像が見られる。

約3時間を経過すると欠損部(C)では、著明な変化は殆んど見られなくなるが、B, D部の表層下脱灰像は非常に著明となる。この時期が過ぎると、脱灰によつて生じた暗影部に白色の透明帯が観察されるようになる (Fig. 3-6 矢印)。これは Gustafson³⁹⁾, Nishimura⁴⁰⁾の指摘する崩壊過程で生ずる無機質の再沈着に相当するものであろう。

約6時間を経過すると、欠損部(C)は、それ自体は著明な変化を示さず、僅かに深さ、幅を拡大するのみで、欠損部の側壁の周囲に一層の透明帯が現われる。

4) 無柱エナメル質層と横断されたエナメル質小柱部 (Fig. 4)

a) 経時的所見

本観察例は、エナメル質表層の全域に無柱エナメル質層が存在している例である。また、エナメル質小柱はやや横断されている。

観察した歯は、29歳男性、下顎左側の半萌出第3大臼歯である。観察部位は、舌面のやや歯頸寄りである。観察倍率は600倍である。

実験開始前 (Fig. 4-1)

矢印Sは、作用液の流れる方向を示す。Eは、エナメル質である。

3時間後 (Fig. 4-2)

エナメル質表面よりの脱灰による変化は、表層の全域に認められるが、その深さは部位的に不規則である。

3 時間40分後 (Fig. 4-3)

表層全域にわたる不規則な脱灰はさらに進み、とくにA部(矢印)では、表層下脱灰像が見られる。この場合もエナメル質表面と表層下の脱灰部との間に数本の線状の交通路が観察される。

4 時間後 (Fig. 4-4)

A部の表層下脱灰像は、一層著明となる(矢印)。

4 時間20分後 (Fig. 4-5)

A部の表層下の脱灰は、さらに拡大し、エナメル質表面との交通路である線状の脱灰像も明らかとなる。

4 時間40分後 (Fig. 4-6)

A部(矢印)の線状の脱灰は、さらに拡大して表層下の脱灰部との区別は次第になくなる。B部の脱灰は、不均一に深部に進む。

5 時間後 (Fig. 4-7)

A部の表層下の脱灰は、エナメル質表面と連らなるようになる。

5 時間20分後 (Fig. 4-8)

エナメル質表層の全域にわたる脱灰は、さらに不均一に進行する。A部の表層下脱灰像はエナメル質表面との交通路も明らかでなくなる。

5 時間40分後 (Fig. 4-9)

B部(矢印)において、線状の脱灰が見られる。

6 時間後 (Fig. 4-10)

B部(矢印)における線状の脱灰はさらに明らかとなる。

6 時間20分後 (Fig. 4-11)

C部(矢印)には、3本の線状の脱灰像とその下層に脱灰像が現われる。B部(矢印)における線状の脱灰像は消失する。

6 時間40分後 (Fig. 4-12)

C部(矢印)の脱灰像の左側に線状の脱灰像が現われる。また、B部(矢印)においては、深部に進む線状の脱灰像が見られる。

7 時間後 (Fig. 4-13)

B、C部における各々の脱灰像は、その特

徴が著明となる。

7 時間20分後 (Fig. 4-14)

C部の線状の脱灰像は下層の脱灰像と融合し、また左側に見られた脱灰部とも完全に連なる。

この部における線状の脱灰像の出現から、僅か1時間経過しているにすぎない。

7 時間40分後 (Fig. 4-15)

A部(矢印)の突起状の脱灰像は、40分前(Fig. 4-13)に比べると、かなり深部に進んでいる。

8 時間後 (Fig. 4-16)

B部において再び特徴ある脱灰像が観察される。すなわち、エナメル質小柱間の部位に一致して線状の脱灰が現われ、小柱の輪郭の存在が認められるようになる(矢印)。これは酸浸入がエナメル質小柱よりも小柱間に先行するためであろう。

8 時間20分後 (Fig. 4-17)

B部のエナメル質小柱間への脱灰は、かなり著明となる。

8 時間40分後 (Fig. 4-18)

エナメル質小柱間の脱灰像は、その幅をまし、完全に小柱の周囲をとりかこむ(B部矢印)。

A部の突起状の脱灰はさらに深部に進む。

9 時間後 (Fig. 4-19)

A部およびB部における脱灰像は次第に拡大する。

9 時間20分後 (Fig. 4-20)

B部の小柱間における脱灰像は、さらに拡大し、エナメル質小柱に波及していく。表層全域にわたる脱灰の深さは、約 25μ である。

b) 変化過程の概要

本観察例は、エナメル質表層に約 10μ の無柱エナメル質層が存在し、またエナメル質小柱がやや横断されている例である。

作用後、2時間前後よりエナメル質最表層の全域にわたり、脱灰による暗影が見られる。しかしA部は、Fig. 4-1の所見であきらかなように、作用前に皿状の凹陷が認められており、かかる部位

では、初期変化の進行は他の部位に比べて遅いようである (Fig. 4-1, 2A)。

しかし、3時間前後よりA部においては、脱灰による線状の暗影が認められるようになり、その後、次第にこの表層下脱灰像は著明となる。3時間40分後では、表層下の脱灰が数本の線状の脱灰像によつてエナメル質表面と連絡されているのが明らかとなる。この線状の脱灰像はそれ以後、約1時間(作用後、4時間30分前後)までは観察できるが、その後消滅し、表層下の脱灰部は表面と連絡され、いわゆる“Cavitation”と言われる崩壊像となる。

これらの所見と関連して興味をひくのは、エナメル質表層下約 10μ の深層において観察された表層下脱灰像の変化である (Fig. 4-11~14C)。この変化過程は、線状の脱灰像の消長をも含めて、C部より表層に近い所で見られたA部の脱灰変化と類似している。すなわち、これらの所見は、表層下脱灰像の形式に一つの pattern があり、しかもその形式の場がエナメル質最表層部のみに限るとは言えないことを示唆するものであろう。さらに、ここで注目すべきは、この変化過程に、必ず線状の脱灰像が関与することである。おそらく線状の酸可溶性の部分が溶出し、酸の深部への浸入を容易にするのであろう。いずれにせよ、線状の脱灰像の存在は、表層下脱灰像の形成に一つの重要な知見を加えたと言える。

また、B部における変化過程から明らかなように、表層の無柱エナメル質層を越えた深層では、酸は小柱間部位をまづ脱灰する。

考 察

歯質崩壊の変化過程において、無機質の溶解(いわゆる脱灰)が先行するか、あるいは、有機性基質⁽⁴²⁾⁻⁽⁴⁹⁾の溶解が先行するものか、に関して現在その結論は出されていない。しかし、これらの見解は、いずれもエナメル質深層における崩壊所見をもとにしたものが多く、最表層部に始まる attack-entry の解釈は少い。

著者の得た成績からも明らかなように、エナメル質表層の変化は、その組織の形態と関連して多

様性を示すものである。すなわち、エナメル質表層における崩壊過程には、1) Enamel cuticle を含むと思われる歯の最表層、2) R-線、3) 無柱エナメル質、4) エナメル質小柱、および 5) 小欠損、などの存在が大きな意味を持つものであった。

この実験における特徴の一つは、このさまざまな変化過程を直接顕微鏡下で経時的に観察し得ることにあつた。そこで、時間的推移のもとに考察を進める。

本実験において、エナメル質最表層に脱灰の変化が観察し得るようになるのは、実験開始より約2時間から3時間を経過してからであつた。このように、作用後、一定の時間にわたり変化が認められないのは、エナメル質最表層に耐酸性、もしくは酸などの浸透を妨げる因子が存在することを示唆するものであろう。それは、エナメル質表層の trace element などの影響も考えられるが⁽¹⁹⁾⁻⁽²⁵⁾、Enamel cuticle の存在も無視出来ないものである。

Enamel cuticle には、Nasmyth 膜をはじめ数多くの名称があるばかりか、組成的にも、角質性有機質⁽⁴⁾、ケラチン様物質、酸不溶性の蛋白質⁽⁵⁰⁾⁻⁽⁵³⁾などと言われているが、いずれにせよ有機成分を主体としたものと考えられている。またその厚さは、Gottlieb 4μ : Weski $4\sim 6\mu$: Glickman et al. $2\sim 3\mu$: Lehner $2\sim 10\mu$: Kronfeld 7μ : Orban $<10\mu$ ⁽⁵⁴⁾、Meckel $2\sim 3\mu$ ⁽⁵⁵⁾ とさまざまである。しかし、この有機性薄膜が酸抵抗性を有することは、Bibby⁽¹¹⁾、Dobbs⁽¹²⁾らによつて古くから指摘されている。

実験開始後、数時間エナメル質最表層部に変化の見られない著者の成績からこれを Enamel cuticle の耐酸効果と考えても間違いなさそうである。

この変化の認められない時期を過ぎると、エナメル質表層に、それぞれ注目すべき脱灰所見が観察されてくる。とくに無柱エナメル質およびR-線は興味あるものであつた。

無柱エナメル質は次に述べる2つの形態を示すことが観察された。

Fig. 1 Photographs show the changes on the progress of enamel destruction marked by the striae of Retzius and "Triangular type" layer of prismless enamel.

Notice occurrence of the change in portions designated by A, B, and C., "R" shows the end of stria of Retzius, and R' another one. "S" shows a direction of flow.

29 years old, male, lower third molar unerupted tooth, lingual surface.

1) Original appearance, orig. mag. $\times 600$

4) After 8hr. 20min.

2) After 5hr. 20min.

5) After 11hr.

3) After 7hr.

6) After 14hr. 20min.

7) After 23hr.

10) After 37hr.

8) After 27hr.

11) After 39hr.

9) After 30hr. 40min.

12) After 43hr.

13) After 45hr.

14) After 48hr. 40min.

15) After 51hr.

Fig. 2 Photographs show the changes on the progress of the destruction involving a small defect (A) located in superficial layer of enamel which was not detectable on the original appearance. "R" means the stria of Retzius. "S" shows a direction of flow.

21 years old, male, upper third molar unerupted tooth, medial surface.

1) Original appearance, orig. mag. $\times 600$

4) After 7hr. 08min.

2) After 2hr. 12min.

5) After 12hr. 28min.

3) After 3hr. 32min.

6) After 19hr. 08min.

7) After 27hr. 08min.

8) After 40hr. 28min.

Fig. 3 Photographs show the changes on the progress of the destruction involving a V-type defect (C) in superficial layer of enamel.
Notice the change in A, B, and D, "S" shows a direction of flow.
21 years old, male, upper third molar unerupted tooth, distal surface.

1) Original appearance, orig. mag. $\times 600$

4) After 2hr.

2) After 40min.

5) After 2hr. 40min.

3) After 1hr. 20min.

6) After 4hr.

7) After 6hr.

10) After 22hr. 40min.

8) After 10hr.

9) After 16hr.

Fig. 4 Photographs show the changes on the progress of enamel marked by the transversely sectioned prisms and "band type" layer of prismless enamel lied on superficial surface of enamel.

Notice the change in A, B, and C, "S" shows a direction of flow.

29 years old, male, lower third molar unerupted tooth, lingual surface.

1) Original appearance, orig. mag. $\times 600$

4) After 4hr.

2) After 3hr.

5) After 4hr. 20min.

3) After 3hr. 40min.

6) After 4hr. 40min.

7) After 5hr.

10) After 6hr.

8) After 5hr. 20min.

11) After 6hr. 20min.

9) After 5hr. 40min.

12) After 6hr. 40min.

13) After 7hr.

16) After 8hr.

14) After 7hr. 20min.

17) After 8hr. 20min.

15) After 7hr. 40min.

18) After 8hr. 40min.

19) After 9hr.

20) After 9hr. 20min.

- 1) エナメル質表層部において、相隣接する2本のR-線のほぼ中間に存在し、三角状を呈する(三角状無柱エナメル質)(Fig. 1)。
- 2) エナメル質表層に帯状に観察されるもので(帯状無柱エナメル質)これと Enamel cuticle との区別は明らかでない (Fig. 4)。

前者の三角状無柱エナメル質の崩壊は、まづR-線がエナメル質表面に達する末端部に始まり、次第にこのR-線に沿って深部に進む (Fig. 1-2B)。この初期の段階においては、R-線を貫通して深部へ進む脱灰は殆んど見られない。やがて、三角状無柱エナメル質部のほぼ全域に、R-線にやや平行した線状の脱灰が見られる。この線状の脱灰は、寺崎ら³⁸⁾および Ripa, Gwinnett ら⁵⁶⁾⁻⁵⁸⁾の指摘する横紋に一致して生ずる。寺崎らはこの無柱エナメル質にある横紋は、比較的低い石灰化度を示す

と言っており、エナメル質の小柱横紋やR-線をも含めて、こうした石灰化度の低い部位は、酸による脱灰または酸の浸入を容易にするのであろう。

つぎに、帯状無柱エナメル質であるが、この無柱エナメル質と Enamel cuticle の識別は生物顕微鏡下では困難である。従つて、この部位を簡単に論ずることはむずかしいが、一般に齲蝕の変化は、白斑現象 (white spot) から始まると言われている。これは、inner-spot⁵⁹⁾、subsurface lesion⁶⁰⁾とも呼ばれている表層下の脱灰現象である。Bartheld⁶¹⁾によると、この表層下の脱灰現象は、エナメル質をとりかこむ外界とエナメル質表層下との間に低分子イオンの移動があり、表層下にHイオンが増加する結果 pH が低下しその為に生ずるものであると説明されている。

一方、表層下脱灰像は in-vitro でもつくり出すことができるが、これを形成させるには幾つかの条件が指摘される。

Hals ら⁵⁹⁾、Soni ら⁶⁰⁾は酸の pH, Mol 濃度、並びに作用時間などを条件として挙げ、Buonocore および Sperber ら^{62), 63), 64)}は、作用液の攪拌条件などを挙げている。これらは、いずれも浸漬脱灰方法(静止した酸液中に歯を漬す)によつて証明したものである。

著者の実験条件は、厚径約 20 μ の切片であり、作用液の流水速度は、約 1 mm/5min であつたが、ほとんどの観察例において局所的に表層下脱灰像を見だしている (Fig. 1, Fig. 3 および Fig. 4)。しかしこれらの表層下における脱灰像は、Hals ら⁵⁹⁾の所見と比べると、広がり、深さにおいて、はるかに小さいものである。この差は、おそらく両者の実験条件に起因するものであろう。

さらに、前記したR-線も、表層下に脱灰を起こさせる一つの成因として無視できない。

表層下脱灰像で、とくに注目されることは、Fig. 3-5, 6 A, B, D の各部に見られたように、表層下の脱灰部とエナメル質表面との間に、1本ないし数本の線状の酸浸入路が形成されることである。とくにD部は著明である。この線状の酸浸入路は、本実験に観察された表層下脱灰像に共通した所見であり、これらは時間の経過とともに脱

灰像に融合し、遂には観察されなくなる。また Fig. 4-11~14C 部に示した表層下脱灰像は、エナメル質最表層下約 10μ の部位に観察されたものであるが、この場合も、まず細い線状の脱灰が生じ、その下層に脱灰が広がる例である。この線状の脱灰像は時間の経過にともない、下層の脱灰像に融合し、認められなくなるがこの過程は前述のエナメル質表層部における表層下脱灰像の消長と非常に類似している。

Sperber⁶²⁾ もエナメル質表層を研磨除去したのち、浸漬脱灰方法によつて明らかな white spot の形成を証明しており、こうした表層下脱灰像は必ずしもエナメル質表層直下にのみ生ずるとは限らない。

これらの知見から考えると、エナメル質表層下の脱灰現象は必ずしも画一的な形式をとらないが、エナメル質における代表的な崩壊の pattern であるように思える。

一方、エナメル質表層には、しばしば小さな欠損が観察される。Ishii, Yoshida³⁵⁾ は、これを notch-like type と pointed-type に分け、その深さは、前者で平均 10μ 程度、後者では平均 4.3μ 程度のものであると指摘した。

Hodson ら^{26, 27)}、Malleson³¹⁾ によれば、この小さな欠損は、歯の形成途上に出来る、いわゆる先天的なものが多く、その中に組織片、唾液細菌などが入りこみ、なかには Nasmyth's membrane すら認められると報告している。

本実験において、これらの小欠損部の崩壊過程には二つの型が認められた。一つは、実験開始前にその存在が明らかな顕性小欠損 (Fig. 3, C) であり、他は酸的作用により、はじめてその存在が観察されるようになった不顕性小欠損 (Fig. 2, A) である。

後者は、内部の可溶性物質が溶出し、顕性化するのであろう。しかも脱灰による変化は比較的早い時期に現われる。

また、詳細に観察すると、まず線状の酸浸入路が認められ、ついで表層下脱灰様変化が生じ、その結果、小欠損の存在が明らかとなつた (Fig. 2-2, 3)。

顕性小欠損部では、欠損の底部に線状の脱灰が観察された (Fig. 3-3)。いずれにせよ、両者ともに、attack-entry として性格を有するものである。

しかし、これらの小欠損部は、周囲の歯質に脱灰がある程度進むと、それ以上の変化は示さない。

かかる小欠損と、齲蝕発生の attack-entry との関連について、Hodson ら²⁷⁾ は否定的であるが、Malleson³¹⁾、Darling⁴⁴⁾ は、ある程度、原発部位としての役割を推察している。著者の成績からも、脱灰の初期においては、この部位を attack-entry から除くことは出来ない。

なお、深層部のエナメル質の脱灰は、エナメル質小柱間に先行する例が多く、Fig. 1-7A, Fig. 4-11~15B においても脱灰は、まずエナメル質小柱間に認められ、徐々にエナメル質小柱を浸し、次第に深層へと波及するものであつた。

齲蝕像に関して Gustafson³⁹⁾ および Nishimura⁴⁰⁾ の代表的な層の分類がある。このうち、崩壊の最も深い部位に、無機質の再沈着をしめす Zone 1 (Gustafson) および Zone B (Nishimura) を指摘しているが、著者の成績の Fig. 1 および Fig. 4 に見られた白色の透明帯がこれと類似した所見であつた。

また、齲蝕像の中間部に過石化帯として見られる透明層 Zone 3 (Gustafson) および Zone D (Nishimura) に類似した所見が Fig. 1-3, 4, 5 および Fig. 3-10C に認められた。

このように酢酸緩衝液によつても、齲蝕像に類似した崩壊像が観察出来たのである。

結 論

生物顕微鏡下において、酢酸緩衝液によるエナメル質の崩壊過程を連続的に観察した。実験に用いた歯は、未萌出および半萌出の、ヒト第3大臼歯である、この歯を厚径約 20μ の平行薄切々片として、sandwich method によりエナメル質表面のみを露出させ、その歯面に液を作用させた。作用液は pH 5.0, 0.1N 酢酸緩衝液を用いた。観察は、16mm 自動微速度撮影装置を用いて撮影し、その一部を print し 16mm film と併用して観察した。観察例数は56例である。その成績を

要約すると、次の通りである。

1. エナメル質の最表層は、一時的に耐酸性を示す。
2. エナメル質表層に脱灰が始まると、そのエナメル質下層部に小範囲な表層下脱灰 (Subsurface lesion) が形成される。
3. 表層下脱灰像は、多くの場合、1本ないし数本の酸浸入路 (solution channel) によつて、エナメル質表面と連絡されている。酸浸入路の幅は 1μ 内外であり、これは脱灰が進むにつれて脱灰像に融合する。
4. 表層下脱灰像は、必ずしもエナメル質最表層下に生ずるとは限らない。
5. R-線、および無柱エナメル質部に見られる線状の横紋も、一種の酸浸入路となり得る。
6. 表層の小欠損部は、attack-entry となり得る。
7. 脱灰は、エナメル質小柱よりもエナメル質小柱間に先行する。

謝 辞

稿を終るに臨み、終始御懇篤なる御指導並びに御校閲を賜つた国立予防衛生研究所 初代歯科衛生部長、故大西栄蔵博士に深い感謝の意を表する。さらに御校閲を賜つた国立予防衛生研究所 歯科衛生部長 荒谷真平博士並びに日本大学歯学部 衛生学教授 木所正直博士同じく衛生学助教授森本基博士に謝意を表し、また多大なる御助言および御支援をいただいた国立予防衛生研究所 歯科衛生部第二室長 石井俊文博士に謝意を表する次第である。

なお、本論文の要旨は、昭和42年3月第17回日本医学総会の分科会第21回日本口腔科学会総会(名古屋)において発表した。

文 献

- 1) 石井俊文, 吉田 茂: エナメル質崩壊過程の連続的観察, 薄切片による歯質崩壊の連続的観察方法; 口腔衛生会誌, 21巻3号 (1971).
- 2) Beretta, A.: The Enamel Cuticle. Histological and Histogenetic Researches; Dent. Cosm., Vol. 57, 584 (1915).
- 3) Talbot, E. S.: Histo-pathology of the jaws and apical dental tissues. No. VII, The So-called Nasmyth's Membrane; Dent. Cosm., Vol. 62, 162-176 (1920).
- 4) Kronfeld, R.: The Epithelial Attachment and So-called Nasmyth's Membrane; J. Amer. dent. Ass., Vol. 17, 1889-1907 (1930).
- 5) Bibby, B. G.: The Organic Structure of Dental as a Passive Defence Against Caries; J. dent. Res., Vol. 12, 99-116 (1932).
- 6) Villa, V. G.: Dentino-enamel cuticle present in adult human teeth; J. dent. Res., Vol. 28, 565-568, (1949).
- 7) 檜垣麟三: 第二珐瑯質表面薄膜の脱灰標本上における消失および変化について; 口腔病会誌, 4巻, 260-275, (1937).
- 8) Miller, W. D.: A Study of Certain Questions Relating to the Pathology of the Teeth; Dent. Cosm., Vol. 46, 981-1001, (1904).
- 9) Miller, W. D.: A study of Certain Questions Relating to the Pathology of the teeth; Dent. Cosm., Vol. 47, 18-39. (1905).
- 10) Waerhaug, J.: Enamel Cuticle; J. dent. Res., Vol. 35, 313-322, (1956).
- 11) Bibby, C. G., Huyssen, G. V.: Changes on the Enamel Surface, A. Possible Defense Against Dental Caries; J. Amer. dent. Ass., Vol. 20, 828-839, (1933).
- 12) Dobbs, E. C.: Surface resistance of human enamel to acid decalcification; J. dent. Res., Vol. 12, 581-584, (1932).
- 13) Caldwell, R. C., Muntz, M. L., Gilmore, R. W. & Pigman, W.: Microhardness Studies of Intact Surface Enamel; J. dent. Res., Vol. 36, 732-738, (1957).
- 14) Bhussry B. R.: Chemical and Physical Studies of Enamel from Human Teeth. II. Specific gravity, nitrogen content, and hardness rating of discolored enamel; J. dent. Res., Vol. 37, 1045-1053, (1958).
- 15) Craig, R. G., Peyton, F. A.: The Microhardness of Enamel and Dentin; J. dent. Res., Vol. 37, 661-668, (1958).
- 16) Newbrun, E., Timberlake, P. & Pigman, W.: Changes in micro hardness of enamel following treatment with lactate buffer; J. dent. Res., Vol. 38, 293-300, (1959).
- 17) Avery, J. K., Visser, R. L. & Knapp, D. E.: The pattern of the mineralization of enamel; J. dent. Res., Vol. 40, 1004-1019, (1961).
- 18) Avery, J. K.: Microradiographic and microhardness studies of developing enamel; Advances in fluorine research and dental caries prevention, Edited for O R C A, Vol. 1, 245-256, (1962).
- 19) Little, M. F., Brudevold, F.: A Study of the Inorganic Carbon Dioxide in Intact Human Enamel; J. dent. Res., Vol. 37, 991-1000, (1958).
- 20) Savory, A., Brudevold, F.: The distribution

- of nitrogen in human enamel ; J. dent. Res., Vol. 38, 436-442, (1959).
- 21) Bhussry, B. R. : Chemical and Physical Studies of Enamel from Human Teeth. I. Specific gravity and nitrogen content of enamel from different surfaces ; J. dent. Res., Vol. 37, 832-836, (1958).
 - 22) Bhussry, B. R. : Chemical studies of enamel from human teeth. III. Specific gravity, nitrogen content, and histologic characteristics of opaque white enamel ; J. dent. Res. Vol. 37, 1054-1059, (1958).
 - 23) Bhussry, B. R. : Chemical and physical studies of enamel from human teeth. IV. Density and nitrogen content of mottled enamel ; J. dent. Res., Vol. 38, 369-373, (1959).
 - 24) Brudevold, F., Gardner, D. E. & Smith, F. : The Distribution of Fluoride in Human Enamel ; J. dent. Res., Vol. 35, 420-429, (1956).
 - 25) Walsh, J. P., Green, R. W. : The Influence of Some Surface-Active Substances on Decalcification of the Enamel Surface ; J. dent. Res., Vol. 29, 270-277, (1950).
 - 26) Hodson, J. J., Sheff, B. D. S. & Edin, L. D. S. : Micro-Dissection and other Techniques for the Investigation of Human Enamel ; Brit. dent. J., Vol. 92, 195-203, (1952).
 - 27) Hodson, J. J., Sheff, B. D. S. & Edin, L. D. S. : The Structure and Histogenesis of Certain Wedge and other Shaped Defects in the Surface of Human Enamel, with a Note on Their Relation to the Carious Process ; Brit. dent. J., Vol. 94, 141-152, (1953).
 - 28) Williams, J. L. : A Contribution to the Study of Pathology of Enamel ; Dent. Cosm., Vol. 39, 269-295, (1897).
 - 29) Williams, J. L. : On Structural Changes in Human Enamel. With Special Reference to Clinical Observation on Hard and Soft Enamel ; Dent. Cosm., Vol. 40, 505-537, (1898).
 - 30) Ishii, T., Yoshida, S. : Histochemical Demonstration of the Behavior of Tin in or on Human Dental Enamel after Topical Application of Stannous Fluoride ; The Bulletin of Tokyo Dental College, Vol. 9, 83-91, (1968).
 - 31) Malleson, H. C. : The Histology of Enamel Caries ; Brit. dent. J., Vol. 46, 907-916, (1925).
 - 32) Pigman, W., Elliot, H. C. & Raffer, R. O. : An Artificial Mouth for Caries Research ; J. dent. Res., Vol. 31, 627-633, (1952).
 - 33) Pigman, W., Hawkins, W., West, H. & Gabton, C. : Carious-Like Lesions of Enamel Produced in the Artificial Mouth ; Oral Surg. oral Med. & oral Pathol., Vol. 7, 427-438, (1954).
 - 34) Pigman, W., Hawkins, W. & Thomas, A. E. : Attack of Smooth Enamel Surfaces in the Artificial Mouth ; N. Y. Statedent. J., Vol. 20, 355-359, (1954).
 - 35) Pigman, W., Gilman, E., Powell, R. & Muntz, L. : The Action of Individual Bacterial Strains on Human Teeth under In Vitro Conditions ; J. dent. Res., Vol. 36, 314-324, (1957).
 - 36) Wachtel, L. W. & Brown, L. R. : Factors Influencing the Shape of the Developing Lesion ; Arch. oral Biol., Vol. 8, 99-107, (1963).
 - 37) 石井俊文, 吉田 茂, 大塩英雄, 白石立夫 : 未脱灰硬組織の薄切平行切片の作成 ; 口腔衛生会誌, 20巻, 191-200(1970).
 - 38) 寺崎太朗, 塩田研次 : 成熟した人類歯牙エナメル質表層に見られる“無柱エナメル”について ; 日口会誌, 7巻, 55-59, (1958).
 - 39) Gustafson, G. : The histopathology of caries of human dental enamel. With special reference to the division of the carious lesion into zones ; Acta. odontol. scand., Vol. 15, 13-55, (1957).
 - 40) Nishimura, T. : Histologische Untersuchungen uber die Anfänge der Zahnkaries, speziell der Karies des Schmelzes ; Schweiz. Mschr. Zahnhlk., BD. 36, 491-543, (1926).
 - 41) Crabb, H. S. M. : Enamel Caries ; Brit. dent. J., Vol. 121, 167-174, (1966).
 - 42) Darling, A. I. : Studies of the Early Lesion of Enamel Caries with Transmitted Light Polarised Light and Radiography I ; Brit. dent. J., Vol. 101, 289-297, (1956).
 - 43) Darling, A. I. : Studies of the Early Lesion of Enamel Caries with Transmitted Light, Polarised Light and Radiography II ; Brit. dent. J., Vol. 101, 329-341, (1956).
 - 44) Darling, A. I. : Studies of the Early Lesion of Enamel Caries. It's nature, mode of spread, and points of entry ; Brit. dent. J., Vol. 105, 119-135, (1958).
 - 45) Miller, J. : Note on the Early Carious in Enamel ; Brit. dent. J., Vol. 105, 135-136, (1958).
 - 46) Sullivan, H. R. : The Formation of Early Carious Lesions in Dental Enamel I ; J. dent. Res., Vol. 33, 218-230, (1954).
 - 47) Sullivan, H. R. : The Formation of Early Carious Lesions in Dental Enamel II ; J. dent. Res., Vol. 33, 231-244, (1954).
 - 48) Coolidge, T. B., Wallace, B. J. : The Pathways of the Early Carious Process. I Histologic Study ; J. dent. Res., Vol. 40, 312-327, (1961).

- 49) Coollidge, T. B., Wallace, B. J.: The Pathways of the Early Carious Process. II Radiologic Study; *J. dent. Res.*, Vol. 40, 321-327, (1961).
- 50) Rosebury, T.: A Biochemical study of the Protein in dental enamel; *J. dent. Res.*, Vol. 10, 187-213, (1930).
- 51) Williams, J. L., Gies, W. J. & Bodecker, C. F.: Discussion concerning the organic content in dental enamel; *Dent. Cosm.*, Vol. 69, 123-136, (1927).
- 52) Schüle, H.: Chemische Zusammensetzung und physikalische Eigenschaften des Schmelzoberhautchens; *Arch. oral Biol.*, Vol. 4, 40-49, (1951).
- 53) Schüle, H.: The Enamel Cuticle in Incipient Caries Morphological and Biochemical Investigation; *Internat. dent. J.*, Vol. 13, 465-470, (1963).
- 54) Hodson, J. J., Path, F. C.: A Critical review of the Dental cuticle with special reference to recent investigations; *Internat. dent. J.*, Vol. 16, 350-384, (1966). より引用.
- 55) Meckel, A. H.: Formation and properties of organic films on teeth (abstr.); *J. dent. Res.*, 40, 754, (1961).
- 56) Ripa, L. W., Gwinnett, A. J. & Buonocore, M. G.: The "Prismless" outer layer of deciduous and permanent enamel; *Arch. oral Biol.*, Vol. 11, 41-48, (1966).
- 57) Gwinnett, A. J.: The Ultrastructure of the "Prismless" enamel of deciduous teeth; *Arch. oral Biol.*, Vol. 11, 1109-1115, (1966).
- 58) Gwinnett, A. J.: The Ultrastructure of the "Prismless" enamel of permanent human teeth; *Arch. oral Biol.*, Vol. 12, 381-387, (1967).
- 59) Hals, E., Mörch, T. & Sand, H. F.: Effect of Lactate Buffers on Dental Enamel in vitro; *Acta. odontol. scand.*, Vol. 13, 85-122, (1955).
- 60) Soni, N. N., Brudevold, F.: Microradiographic and polarized-light studies of artificially produced lesions; *J. dent. Res.*, Vol. 39, 233-240, (1960).
- 61) Bartheld, F.: Membrane Phenomena in Carious Dissolution of the Teeth; *Arch. oral Biol.*, Vol. 6, 284-303, (1961).
- 62) Sperber, G.H., Buonocore, M. G.: Enamel Surface in "White-Spot" Formation; *J. dent. Res.*, Vol. 42, 724-731, (1963).
- 63) Buonocore, M. G.: Solubility rates of effect of acid structures on enamel and dentin in acid buffers; *J. dent. Res.*, Vol. 42, 700-706, (1963).
- 64) Sperber, G. H., Buonocore, M. G.: Effect of Different on Character of Demineralization of Enamel Surfaces; *J. dent. Res.*, Vol. 42, 707-723, (1963).