原 著

蔗糖の歯質脱灰性に関する研究

小 菅 充 子*

概要：蔗糖の歯質に対する作用を知るため、蔗糖の歯質脱灰性に関する研究を行つた。pH 7.5 Tris-buffer 溶液(B)，モル蔗糖B溶液(S)，Sをオートクレーブしてカラメル化した溶液(CS)に、新鮮牛切歯のエナメル質および象牙質粉末を浮遊して、37°Cで16日間 incubate し、溶液中に溶出するCaとPの量より歯質の溶解性に対する効果を観察した。B液に比べS液は、象牙質ではその溶出性を増加させたが、エナメル質では逆に減少させた。これに対しCS液は、エナメル質、象牙質とも特にCaの溶出性を有意に増強させた。この作用は歯質中のどの部分に関して行われるのかをみるため、B液およびCS液で16日間溶出を行つたエナメル質および象牙質中のN-末端アミノ酸を調べた。エナメル質、象牙質とも二溶液間で差は見られなかった。更に脱有機した歯質、天然アパタイト、脱脂した歯質についても同様の溶出実験を行なつたところ、この様な系で脱灰されるCaとPは、歯質中の脂肪成分と関係あることが推測された。

次に、蔗糖がカラメル化された時、どのような物質に変化し、又どのような作用を持つようになるかを観察した。カラメル溶液中には、乳酸、蟻酸、酢酸、ピルビン酸などの有機酸が生成され、これらの酸はアルカリ性で塩化カルシウム溶液のカルシウムイオン濃度を低下させた。

Abstract: A Study on the Effect of Sucrose Upon the Solubility of the Teeth, Mitsuko KOSUGE*. The purpose of this study was to examine the effect of sucrose upon the solubility of the dental hard tissues.

Enamel and dentine powder prepared from freshly extracted bovine teeth was suspended in the following 3 solutions, namely pH 7.5 tris-buffer solution (B), mol sucrose in solution B (S) and solution S autoclaved at 125°C for 1 hr (CS). After 16 days incubation at 37°C, the amounts of Ca and P dissolved in each solution were determined. Solution S increased the solubility of Ca and P in dentine, but decreased it in enamel in comparison with solution B. Solution CS significantly increased the solubility of Ca and P in both enamel and dentine.

The free N-terminal groups in enamel and dentine incubated in solution B and solution CS for 16 days were determined by the use of Sanger's fluorodinitrobenzene method. No difference was found between the two solutions.

In tooth powder deprived of its organic components by extraction with ethylendiamine, in natural apatite powder and in lipid-extracted teeth powder, the solubility tests were carried out under similar experimental conditions.

The results indicated that the amounts of dissolved Ca and P were strongly influenced by the extraction of the lipid component.

* 東京医科歯科大学歯学部予防歯科学教室（指導：大西正男教授）

* *Department of Preventive Dentistry, School of Dentistry, Tokyo Medical and Dental University. (Director: Prof. Masao ONISI)*

昭和47年8月12日受付

In the caramelized sucrose solution, lactate, formate, acetate and pyruvate were found. Any one of these acids was able to decrease calcium ion concentration in slightly alkalized CaCl_2 solution.

緒 言

文明社会と交易を行なうようになったエスキモ一人にう蝕が急増したという疫学的観察¹¹⁻²⁾をはじめとして、炭水化物とう蝕発生との関連については多くの報告がある。

特に蔗糖は病変を生じさせる重要な因子の一つであり、う蝕の開始と進展に特異的に働くことは、多くの動物実験及び臨床的研究における報告³⁾⁻¹⁴⁾から疑いのないところである。はたして蔗糖の如何なる作用がう蝕に対して影響を与えるのであろうか。

日本をはじめ世界各国でみられた第一次及び第二次大戦、戦中戦後のう蝕罹患者の激減に対し、Sognaes¹⁵⁾、Tøverud¹⁶⁾等は国民の蔗糖消費量の経年推移とう蝕罹患状態の推移を比べ、その関連の間接的な証拠としたが、その中でSognaesは蔗糖消費量の減少とう蝕の減少に時間的なずれのあることから、歯牙形成期の蔗糖摂取の低下が歯牙の抵抗性を増したと仮説した。これに対し竹内¹⁷⁾は、歯牙一個ずつを単位とし、一定期間内の発病にCohorts Analysisの技法を用いた結果、砂糖摂取はう蝕発生に対し、歯牙形成期にはほとんど影響は認められないが、萌出後は時間的に極めて密接な関係をもつて悪影響を与えると述べており、Marthaler¹⁸⁾も萌出後歯牙表面に対する環境因子として働くことが、主なる要因であろうとしている。

胃チューブにより高濃度の蔗糖を含むう蝕誘発食餌を直接ラットの胃に投与した時、う蝕の発生を全く見なかったというKite¹⁹⁾等の報告は、蔗糖が歯牙表面に作用するという考え方を支持させる。更に蔗糖が摂取される時、それが粉末状で食餌に混合されず、溶液として与えられる時は、う蝕形成は非常に少なかった。即ち、う蝕形成は与えられる蔗糖の形態に非常に影響されたとの報告²⁰⁾もある。

人う蝕の観察では、非常に良くcontrolされたGustafsson²¹⁾等のVipeholmにおける報告があるが、その中で彼等は、多量の蔗糖を与えても、それが食事時に際して与えられるなら、う蝕に対してたいした影響を与えなかったが、間食として摂取した時、特に長時間歯牙表面に留まると考えられる粘稠な形で摂取した場合には、著明なう蝕の増加が認められたと述べている。King²²⁾等の実験に於ても、食事と共に蔗糖を多量に摂取しただけでは、う蝕は増加しなかったことが認められている。これらのことは全て、蔗糖は歯牙表面に停滞し、何らかの作用でう蝕発生を助長することを示唆している。

う蝕は口腔内の酸生産菌が、ブドウ糖をはじめ発酵性炭水化物を利用して酸を産生し、これによりエナメル質が脱灰されることに始まるという一つの仮説が、Millerの化学細菌説に基づき進められてきた。いわゆる酸脱灰説である。

Shaw²³⁾はう蝕病原菌が代謝を行ない病巣を形成するためには、適当な基質が必要であると述べている。人間が摂取する炭水化物は殆んど澱粉と蔗糖に限られている²⁴⁾ことを考え合わせる時、ここのう蝕に対する蔗糖の重大さの理由の一つが見出される。

蔗糖が細菌による酸発酵の基質として働く以外に、う蝕の進展に何らかの影響を与える可能性も考えられる。

近年、う蝕病原性のStreptococcus mutansが蔗糖よりデキストランを形成し、歯垢の一部となることが注目されて来た^{25), 26)}。Jordan and Keyes²⁷⁾等の人工歯苔実験に見られるごとく、その接着性に重要な意味が見出されているのである。Stoppelar²⁸⁾等は母株と異なり、粘稠物質を作らないSt. mutansの変異株が顕著にその病変原性を失なっていたことを報告している。

一方、Fosdick^{29), 30)}等は一連の研究の中で、蔗糖は H^+ 、 Ca^{++} 、 PO_4^{---} の拡散速度を変化させる

と述べている。又彼³¹⁾等は、蔗糖は、酸溶液中ではエナメル質の溶解性を減少させたが、それに比して中性溶液中では逆に増加させたことを報告している。更に pH11 の蔗糖溶液はエナメル質表面を間違いなく腐蝕するという電顕写真を示した³²⁾。大西³³⁾等も同様の実験で、酸性側では蔗糖の存在がエナメル質及び象牙質からの Ca と P の溶出を少なくしたが、pH6.5 よりアルカリ側では特に Ca の溶出を助長する傾向があったと報告している。更に、大西³⁴⁾等は、う蝕病変部に於て脱灰と共に普遍的に見られる褐色着色現象に対する試験管内実験に於て、歯質が褐色に着色するためには、褐色色素と脱灰因子が共に作用することが必要であることを認めたが、その際予想に反してアルカリ環境にあつてもカラメル化（焦糖化）されたブドー糖溶液が歯質を強く着色したことを重要視し、この現象に対してブドー糖が歯質を脱灰したのだと推定している。

う蝕に対する蔗糖の作用の一端を明らかにするために、次の様な実験を計画した。

実験Ⅰは、アルカリ溶液中での歯質の溶解性に対する蔗糖及びカラメル化された蔗糖の効果を、溶液中に溶出する Ca と P の量より観察し、更に歯質中のどの部分に於てその作用がなされたのかを推測するために計画された。

実験Ⅱは、蔗糖がカラメル化された時、どのような物質に変化し、又どのような作用を持つようになるかを観察するために計画された。

実験Ⅰ 歯質溶解実験

材料と方法

材料として新しく抜去し、使用直前までフリーザー中に保存した牛切歯を用いた。先ず表面をクリスタル紫溶液で染色し、表層の細菌苔を削り去る。次に義歯用ゴムヤスリで白亜質を削り去り、歯冠部を灌水冷却しながら薄片におろす。各薄片につきエナメル質と象牙質を分離し、各々を破砕して100~200メッシュのものを実験材料とした。

溶解に用いた溶液は、pH 7.5 の 0.1 M Tris buffer 溶液(B液)、これに1Mの割合で蔗糖を溶解したもの(S液)、更にこれを1時間オートクレ

ーブにかけ(125°C)蔗糖の一部をカラメル化したもの(CS液)の三種類とする。なお、各溶液は炭酸ガスを含まぬものとした。

溶出期間は大西等の実験で、エナメル質及び象牙質が共に褐色化が判然と見られる様になった日数の16日間とした。

Ca の測定は 蔞酸アンモニアにて 蔞酸カルシウムの沈澱を作り、これを一度灰化した後、0.01 N HCl に溶解し、Model 303 Parkins-Elmer 原子吸光光度計で測定した。なお、蔗糖の有無及び灰化により生ずる測定上の誤差は、CaCO₃を用いての予備実験で、ほぼ認められないことを確認した。

P の測定は Fiske-Subbarow の方法³⁵⁾による。

(1) 無処理のエナメル質及び象牙質からのCaとPの溶出実験

1) 経過日数毎の溶出量の測定

各溶液 100ml にエナメル質及び象牙質粉末200mg を加え、クロロホルム一滴を加えて、空気中の炭酸ガスの入らぬ様窒素ガスを満して密栓したフラスコ中で、一日数分間振盪しながら溶出を行つた。37°C で16日間 incubate し、glass filter 3G-4 に通した濾液につき、Ca と P の量を各経過日数毎に測定した。

2) 16日後の溶出量の測定

1)と同様の方法で、7~10個の試料につき、三溶液による16日後の Ca 及びPの溶出量を測定した。

(2) 16日間の 溶出実験後の歯質中の N-末端 アミノ酸の定性実験 (Dinitrofluorobenzen^{36), 37)}法による)

B液及びCS液で16日間溶出を行なつたエナメル質及び象牙質粉末を、充分水洗した後乾燥してDNP化の試料とした。DNP化はエナメル質及び象牙質とも100mgにNaHCO₃ 100mgと水5mlを加え、これにDinitrofluorobenzenの5%エタノール溶液1mlと更にエタノール9mlを加え、室温で24時間振盪反応させる。反応後遠沈し、水、エタノール、エーテルにて洗滌して乾燥後、再溜塩酸(約6N)10mlを加えて封管し、105°Cで8時間加水分解を行う。分解後エーテルにて抽

出し、エーテル層、水層に分ける。エーテル層は減圧乾燥後 Mills の装置で Dinitrophenol を出来るだけ除去して、薄層クロマトグラフィーの試料とした。一方水層は、タルク処理した後乾固して、薄層クロマトグラフィーの試料とした。薄層クロマトグラフィーには EASTMAN CHROMAG-RAM SHEET 6061 (20×20) を用いて、二次元クロマトグラフィーを行った。展開剤として第一次元に 2 N-NH₄OH 飽和 n-ブタノール、第二次元に 1.5M リン酸 buffer (pH 6.0) を用い、室温で上昇法によった。エーテル層の試料は、エナメル質及び象牙質とも 1/10 量を原点に添加し、一方水層の試料は、エナメル質は 1/10 量を、象牙質は 1/100 量を原点に添加した。

(3) 脱有機したエナメル質及び象牙質からの Ca と P の溶出実験

脱有機したエナメル質及び象牙質について、

(1)–(2)と同様の方法で、16日後の各溶液中への Ca と P の溶出量を測定した。

脱有機の方法は、Williams 等の方法³⁸⁾の変法³⁹⁾を用いた。80%エチレンジアミン水溶液 100ml を三角フラスコにとり、これに歯牙粉末 5g を加えて 15時間攪拌しながら、95°C の湯浴上におく。充分水洗してエチレンジアミンを除いた後、乾燥して溶出実験試料とした。

(4) 天然アパタイトからの Ca と P の溶出実験

天然アパタイト(モロッコ産)を 100~200 mesh の粉末とし、500°C にて 14~15 時間燃焼後、(1)–(1)と同様の方法で経過日数毎の溶出 Ca と P 量を測定した。

(5) 脱脂したエナメル質及び象牙質からの Ca と P の溶出実験

脱脂したエナメル質及び象牙質について、(1)–(1)と同様の方法で経過日数毎の溶出 Ca と P 量を測定した。

脱脂の方法は、Dirksen の方法⁴⁰⁾により、ソックスレー抽出器を用いて、エーテルにて 60°C の湯浴上で 12 時間抽出した後、約 20 倍のクロロホルム：メタノール (2 : 1) を加え、1 時間攪拌抽出後遠沈する。これを更に一度繰返し、次にク

ロロホルムにて 20 時間攪拌抽出した後、乾燥して溶出実験の試料とした。

結 果

(1) 無処理のエナメル質及び象牙質からの Ca と P の溶出量

1) 経過日数毎の溶出量 (表 1 及び図 1)

表 1 無処理のエナメル質及び象牙質から経過日数後に溶出された Ca と P の量

	溶出液	溶出日数	Ca mg%	P mg%	Ca/P
エ ナ メ ル 質	B	1	0.74	0.38	1.95
		4	0.72	0.42	1.71
		8	0.74	0.47	1.58
		16	0.81	0.58	1.40
	S	1	0.72	0.33	2.18
		4	0.70	0.34	2.06
		8	0.69	0.42	1.64
		16	0.69	0.45	1.52
	C S	1	0.83	0.35	2.38
		4	0.84	0.42	2.00
		8	0.81	0.48	1.69
		16	0.96	0.59	1.63
象 牙 質	B	1	1.23	1.24	0.99
		4	1.20	1.19	1.01
		8	1.19	1.17	1.02
		16	1.20	1.19	1.01
	S	1	1.23	1.07	1.18
		4	1.20	1.10	1.15
		8	1.19	1.28	0.98
		16	1.39	1.34	1.04
	C S	1	1.13	1.00	1.13
		4	1.47	1.26	1.17
		8	1.55	1.41	1.10
		16	1.64	1.48	1.11

エナメル質及び象牙質から溶出される Ca と P の量は、ともに 16 日間の溶出期間の内、1 日目ですべて溶出量の大半を溶出した。Ca/P は、エナメル質に於ては、処理法の差によつて、それぞれ 1 日目の 1.95, 2.18, 2.00 から 16 日目の 1.40, 1.52, 1.63 までいずれも低下している。一方象牙質に於ては、1 日目より 16 日目までほぼ変化がなく、その値は 0.98~1.18 の間であつた。なお、象牙質の方

図 1-1 無処理のエナメル質から溶出した Ca 量

図 1-2 無処理のエナメル質から溶出した P 量

図 1-3 無処理の象牙質から溶出した Ca 量

図 1-4 無処理の象牙質から溶出した P 量

表 2 無処理のエナメル質及び象牙質からの16
日後の Ca と P の溶出量

溶出液	エナメル質		象牙質	
	Ca mg%	P mg%	Ca mg%	P mg%
B	0.80	0.63	1.24	1.24
	0.84	0.51	1.28	1.24
	0.86	0.63	1.25	1.26
	0.86	0.62	1.28	1.20
	0.81	0.65	1.25	1.06
	0.73	0.48	1.28	1.11
	0.86	0.50	1.24	1.32
	0.86	0.66	1.25	1.20
	0.93	0.70	1.25	1.20
	0.74	0.60		
	0.83±0.0192	0.62±0.0266	1.27±0.0116	1.21±0.0261
Ca/P=1.38		Ca/P=1.05		
S	0.59	0.50	1.38	1.46
	0.61	0.41	1.54	1.38
	0.68	0.43	1.49	1.42
	0.63	0.45	1.64	1.46
	0.69	0.47	1.64	1.48
	0.61	0.50	1.26	1.40
	0.59	0.55	1.34	1.41
	0.69	0.46		
	0.63±0.0156	0.47±0.0156	1.47±0.0486	1.43±0.0173
	Ca/P=1.34		Ca/P=1.05	
	CS	0.95	0.53	1.55
0.93		0.65	1.57	1.37
1.08		0.55	1.69	1.59
0.89		0.59	1.71	1.50
0.89		0.54	1.63	1.56
0.92		0.59	1.68	1.59
0.91		0.60	1.63	1.51
1.00		0.56	1.56	1.57
0.85		0.60	1.56	1.48
0.91		0.56	1.57	1.46
0.93±0.0206		0.58±0.0114	1.62±0.0120	1.52±0.0220
Ca/P=1.57		Ca/P=1.08		

がエナメル質よりCaとPの溶出量がともに大きかった。

2) 16日後の溶出量 (表 2)

エナメル質に於ては、CaとPの溶出量は共に、B液に比べてS液では有意に低下していた。又、B液に比べてCS液ではCaの溶出量が有意に増加したが、Pの溶出量では差が見られなかった。一方象牙質に於ては、CaとPの溶出量は共に、B液に比べてS液及びCS液で有意に増加しており、更にCS液はS液よりも溶出量が大きかった。

(2) 溶出実験後の歯質中のN-末端アミノ酸 (図

B液による溶出実験後のDNP-アミノ酸(エーテル層)

CS液による溶出実験後のDNP-アミノ酸(エーテル層)

B液による溶出実験後のDNP-アミノ酸(水層)

CS液による溶出実験後のDNP-アミノ酸(水層)

図2 溶出実験後の象牙質中のN-末端アミノ酸

2)

B液及びCS液で16日間溶出実験を行なったエナメル質と象牙質中のN-末端アミノ酸は、エーテル層に於ては、エナメル質及び象牙質ともに、一次元で $R_f=0.3-0.8$ 附近に長く流れ、二次元で展開されない部分(図中A)を得た。この部分は、Sudan IIIにて染色された。一方水層に於ては、エナメル質及び象牙質ともに、 ϵ -DNP-Lysineと ϵ -DNP-Hydroxylysine及び未同定のspot(図中B)一つを得た。これらのspotの大きさは、B液及びCS液で溶出したものについて全てほぼ等しい。

(3) 脱有機したエナメル質及び象牙質からのCaとPの16日後の溶出量(表3)

エナメル質に於ては、CaとPの溶出量はともに、B液に比べてS液で有意に減少しているが、B液とCS液とでは差が見られない。一方象牙質に於ても、B液に比べてS液が有意に減少しているが、B液とCS液ではCaの溶出量で差が見られず、Pについては有意に増加している。尚、溶出量については、無処理のものよりCaとPが共に減少しており、象牙質に於てそれが著しい。

(4) 天然アパタイトからのCa及びPの経過日数毎の溶出量(表4, 図3)

Caの溶出量はB液とCS液ではほぼ等しく、S液はこれらに比べて低い値を示したが、全体的に溶出量が非常に少なく、Pに於てその傾向が著

表 3 脱有機したエナメル質及び象牙質からの
16日後の Ca と P の溶出量

溶出液	エナメル質		象牙質	
	Ca mg%	P mg%	Ca mg%	P mg%
B	0.68	0.63	0.88	0.41
	0.79	0.51	0.86	0.53
	0.69	0.52	0.89	0.53
	0.63	0.51	0.89	0.54
	0.63	0.45	0.89	0.57
	0.79	0.53	0.90	0.42
	0.65	0.51	0.86	0.51
			0.93	0.53
			0.89	0.54
			0.83	0.57
	0.71±	0.52±	0.88±	0.52±
	0.0269	0.0203	0.0086	0.0177
	Ca/P=1.36		Ca/P=1.70	
S	0.51	0.36	0.63	0.45
	0.63	0.45	0.63	0.48
	0.56	0.35	0.68	0.43
	0.54	0.40	0.66	0.42
	0.65	0.39	0.63	0.42
	0.58	0.44	0.56	0.44
	0.51	0.36	0.61	0.46
	0.61	0.38	0.60	0.45
			0.61	0.44
			0.69	0.44
	0.55±	0.39±	0.62±	0.44±
	0.0200	0.0114	0.0109	0.0059
	Ca/P=1.42		Ca/P=1.41	
CS	0.64	0.54	0.88	0.67
	0.73	0.61	0.84	0.64
	0.64	0.38	0.89	0.60
	0.84	0.47	0.86	0.60
	0.66	0.54	0.83	0.60
	0.74	0.49	0.90	0.64
	0.78	0.46	0.84	0.63
			0.91	0.61
	0.72±	0.50±	0.87±	0.63±
	0.0288	0.0255	0.0100	0.0092
	Ca/P=1.44		Ca/P=1.38	

しい。Ca/P は 2.4~5.5 と幅広く、しかも脱有機した歯質の値に比べて、かなり高い値を示した。

(5) 脱脂したエナメル質及び象牙質からのCaとPの経過日数毎の溶出量 (表 5, 図 4)

エナメル質及び象牙質ともに、B液に比べて、S液は Ca と P の溶出量を減少させたが、B液とCS液では差がみられない。16 日間の溶出実験後の Ca/P は、無処理のものと比べて、エナメル質は高い値を示し、象牙質ではほぼ等しい。

表 4 天然アパタイトから経過日数後に溶出した Ca と P の量

溶出液	溶出日数	Ca mg%	P mg%	Ca/P
B	2	0.12	0.03	4.0
	4	0.14	0.04	3.5
	10	0.22	0.07	3.1
	16	0.23	0.05	4.6
S	2	0.11	0.02	5.5
	4	0.41	0.05	2.8
	10	0.15	0.04	3.8
	16	0.17	0.07	2.4
CS	2	0.09	0.02	4.5
	4	0.18	0.06	3.0
	10	0.19	0.04	4.7
	16	0.24	0.07	3.4

図 3-1 天然アパタイトから溶出した Ca 量

図 3-2 天然アパタイトから溶出した P 量

実験 II カラメル(焦糖)に関する実験

方 法

(1) カラメル生成時の pH 及び糖量の変化についての実験

表 5 脱脂したエナメル質及び象牙質から経過
日数後に溶出した Ca と P の量

	溶出液	溶出日数	Ca mg%	P mg%	Ca/P
エ ナ メ ル 質	B	1	0.51	0.25	2.04
		2	0.72	0.36	2.00
		4	0.88	0.43	2.05
		8	0.90	0.50	1.80
		16	0.88	0.51	1.73
	S	1	0.50	0.23	2.17
		2	0.54	0.25	2.16
		4	0.61	0.31	1.97
		8	0.68	0.37	1.84
		16	0.65	0.36	1.81
	C S	1	0.63	0.27	2.33
		2	0.66	0.32	2.06
		4	0.76	0.41	1.85
		8	0.92	0.48	1.91
		18	0.90	0.50	1.84
象 牙 質	B	1	1.00	0.78	1.28
		2	1.70	1.27	1.34
		4	1.75	1.38	1.27
		8	1.70	1.46	1.16
		16	1.72	1.48	1.16
	S	1	0.82	0.60	1.43
		2	1.13	0.74	1.20
		4	1.46	1.16	1.26
		8	1.45	1.21	1.20
		16	1.38	1.35	1.02
	C S	1	0.86	0.59	1.57
		2	1.37	1.02	1.34
		4	1.74	1.24	1.37
		8	1.70	1.43	1.19
		16	1.73	1.50	1.15

図 4-1 脱脂したエナメル質から溶出した Ca 量

図 4-2 脱脂したエナメル質から溶出した P 量

図 4-3 脱脂した象牙質から溶出した Ca 量

図 4-4 脱脂した象牙質から溶出した P 量

1 M 蔗糖水溶液 (A 液), 実験 I に用いた 1 M 蔗糖 Tris-buffer 溶液 (B 液), 更に A 液に 100mg の NaHCO_3 を加えた溶液 (C 液) の三溶液を, 一定火力で加熱して, カラメルを生成する。各上昇温度で反応をとめ, その時の pH 及び非還元糖, 還元糖の量を測定した。

糖の測定はベルトラン法⁴⁾により, 還元糖はブドウ糖として計算した。

(2) カラメル溶液中の有機酸の定性及び定量実験

(1)で生成された各々のカラメル溶液につき、有機酸の定性及び定量実験を行った。

定性はペーパークロマトグラフィによった⁽⁴²⁾。各カラメル溶液は、まず糖及びその他の妨害物を除くため、陰イオン (Amberlite IRA 402) 及び陽イオン (Amberlite 200) 交換樹脂を通して有機酸を分離させた後、全てをヒドロキザム塩としてクロマトグラフィーの試料とした。展開剤は、n-ブタノール：酢酸：水 (4 : 1 : 5) 及び水飽和イソブチルアルコールを用い、室温で一次元上昇法によった。

更にカラメル化の進行に伴う有機酸量の変化をみるため、B液について、乳酸及びピルビン酸を各々 Hydroxybiphenyl 法及び Dinitrophenyl hydrazine 法⁽⁴³⁾で定量した。

(3) 塩化カルシウム溶液中のカルシウムイオン濃度 ($[Ca^{++}]$) の変化に関する実験

1) 添加した蔗糖の量による影響についての実験

0.05M 塩化カルシウム溶液 5 ml に蔗糖 2, 4, 6, 8, 10, 15 g を加え、更に水を加えつつ充分に溶解させた後、25 ml にメスアップする。これを KOH にて pH 7.5 とし、1時間放置後、溶液中の $[Ca^{++}]$ をカルシウムイオンメーター (ORION IONALYZER MODEL 401) を用いて測定した。

2) カラメル化の程度の異なる溶液を添加した際の影響についての実験

0.02M 塩化カルシウム溶液に、カラメル化の程度の異なる 1 M カラメル溶液を等量添加し、pH 7.5 で1時間放置後、溶液中の $[Ca^{++}]$ を測定した。

3) 蔗糖及びカラメル溶液を添加し、pH を変化させた時の影響についての実験

0.02M 塩化カルシウム溶液に等量の 1 M 蔗糖及びカラメル溶液を加え、pH 5.5~9.0 で1時間放置後、溶液中の $[Ca^{++}]$ を測定した。

4) 添加した有機酸の影響についての実験

0.04M 塩化カルシウム溶液に、蟻酸、酢酸、乳酸、ピルビン酸の 0.01~0.10M 溶液を等量加え、pH 7.5 で1時間放置後、溶液中の $[Ca^{++}]$ を測定した。更に 1 M 溶液となる様に蔗糖を加えた溶液中の $[Ca^{++}]$ についても測定した。

結 果

(1) カラメル生成時の pH 及び糖量の変化について

蔗糖溶液からカラメルを生成させた時、溶液は温度の上昇と共に、黄色、茶色、褐色と着色が進んだが、pH の高い溶液程低い温度で着色が始まり (A液—140°C, B液—120°C, C液—110°C) 色調の変化も激しかった。pH の変化については、A液及びB液では着色化の進行と共に、pH は下降を続け、完全に褐色と見られる溶液は pH 2~3 にまで低下していた。C液に於ては、pH は着色と共にむしろ上昇し、150°C 位より下降をはじめた (図5)。

図5 カラメル化に伴う pH の変化

一方糖量の変化は、カラメル化が進むにつれ、非還元糖が減少し還元糖が増加したが、全糖量は減少した (図6)。

図6 カラメル化に伴う糖量の変化

(2) カラメル溶液中の有機酸について

カラメル生成に伴い pH が低下した(1)の結果より、カラメル溶液中有機酸の生成が推測され、

図 7 カaramel溶液中の有機酸のペーパークロマトグラフ

図 8 カaramel化に伴う乳酸及びピルビン酸量の変化

図 9 蔗糖の増加に伴う [Ca²⁺] の変化

定性実験を行なったところ、A液からは蟻酸、酢酸、アクリル酸が、B液からは酢酸、蟻酸、乳酸、ピルビン酸が、C液からは酢酸、蟻酸、乳酸が同定されたが、これらの spot の出現やその大きさは、カaramel化の程度により種々異った。

その一例を図7に示した。

一方カラメル化に伴うB液中の乳酸及びピルビン酸の増加は、図8に示した通りである。

(3) 塩化カルシウム溶液中の $[Ca^{++}]$ の変化について

1) 添加した蔗糖の量による影響について

図9に示した様に、蔗糖の増加と共に溶液中の $[Ca^{++}]$ は増加し、1 M蔗糖溶液中では2倍近くに達した。

2) カラメル化の程度の異なる溶液を添加した際の影響について

カラメル化が進むにつれ、溶液中の $[Ca^{++}]$ は減少し、ついには加えられたカルシウム濃度よりも低い値を示すようになった(図10)。

図10 カラメル化に伴う $[Ca^{++}]$ の変化

3) 蔗糖及びカラメル溶液を添加し、pHを変化させた時の影響について

カラメル溶液を添加した時は、溶液のpHがある点を越すと、アルカリ性とともに $[Ca^{++}]$ の急激な減少が見られたが、蔗糖溶液を添加した時は、このような変化は見られなかった(図11)。

図11 $[Ca^{++}]$ に対するpHの影響

4) 添加した有機酸の $[Ca^{++}]$ に対する影響について

添加した有機酸の濃度が高まるにつれ、 $[Ca^{++}]$ は減少した(図12)。蔗糖の存在の下でも同様の作

図12 $[Ca^{++}]$ に対する有機酸の影響

用が見られ、ついには加えられたカルシウム濃度以下にまで減少した(図13)。

図13 $[Ca^{++}]$ に対する乳酸の影響

考 察

う蝕病変に見られる褐色変化現象に対しては、種々の説明がなされている^{44)~49)}。その褐色化と脱灰との関係について、Manly and Deakins⁴⁷⁾は、象牙質う蝕に於ては褐色化が脱灰に先行すると述べ、これに反して奥瀬⁴⁸⁾は、軟化(脱灰)は常に着色に先行するとの報告をしている。

Dreizen⁴⁹⁾等は、Lactobacillusによるブドー糖の分解産物が歯質を着色したと述べ、大西³⁴⁾等も、歯片を加えたブドー糖ブイオン中で各種細菌を培養する時、培地のpHの低下に応じて、歯牙を強く褐色化したことを観察して、着色に必要な条件の一つに、pHの低下による反応基の開放をあげている。しかし彼等は又、アルカリ性でも、Na-EDTAによるキレート作用でも脱灰による反応基の開放があれば、歯質に着色の起ること、即ち歯質中の反応基による結合点の発生と、続いて

有色物質（又はその前物質）の歯質内形成、あるいは歯質内へのとりこみにより、褐色着色が起ると考察し、脱灰を起す物質の一つとし、ブドウ糖をあげている。

Schatz and Martin⁵⁰⁾ は、エナメル質の有機物の分解産物や、歯垢中の種々の物質のキレート作用により、中性乃至アルカリ性でエナメル質が溶解される可能性を推定した。Zipkin⁵¹⁾ 等は動物実験において、強いキレート剤である EDTA を飼料中に加えた時、著しい caries の増加を引き起こすことを観察している。Brosowsky⁵²⁾ も歯牙有機成分の分解産物、細菌の代謝産物、食品からの物質が、Ca と結合物質を作り、それが、歯牙に対する破壊作用を開始し、持続させることができるとし、しばしば口腔内にみられるピルビン酸、乳酸、クエン酸の溶液中に歯牙片を加えて、溶出する Ca の量を測定している。この時反応 pH を 6.9 とした。三溶液とも Ca の溶出作用がみられ、その濃度の増加に対して、溶出 Ca 量は指数関数的に増加すると報告している。更に酸性側での脱灰が起るにしても、口腔内に於ては、酸は非常に広い範囲に広がり、短時間で唾液によつて希釈されるので、中性、アルカリ性での Ca 結合物質によるエナメル質の溶解の可能性について、より一層の注意を払うべきだと述べている。同様 Lura⁵³⁾ も、pH 7.8—8.0 において、エナメル質粉末からの Ca の溶出作用を種々の物質について調べ、クエン酸塩、10～20% 蔗糖溶液、シアル酸、ピクリン酸、ATP、DNP などは、Ca に対する強結合物質であることを見つけ、特に蔗糖に対しては、0.5～2% 又は 40.0% 以上の濃度では効果が弱まることを観察している。そして彼も、歯垢中では乳酸の反応時間は非常に僅かであるのに対し、この様な Ca と結合作用を持つ物質は、う蝕病巣に常に存在していることを重要視している。エナメル質粉末からの Ca の溶出実験で、Blackwell and Fosdick³¹⁾ も、中性溶液中では蔗糖が Ca の溶出を高めたと報告している。

カラメル溶液による褐色着色現象を同時に観察した今回の Ca 溶出実験（実験 1）は、Lura の 4 時間、Blackwell 等の 24 時間という溶出時間に

対し、16 日間という長い溶出期間で行なつた。16 日後の溶出量は表 2 に示すごとく、象牙質に於ては蔗糖の Ca 溶出に対する効果が見られたが、エナメル質に於ては有意の減少を示した。Blackwell 等は、酸性側に於ては蔗糖が Ca の溶出量を減少させたことを観察し、これは蔗糖を添加したことにより、溶液の粘性が増大してイオンの拡散に減少を起こしたこと、蔗糖分子に水の分子が水和され、遊離の水分子が減少したこと等によると報告している。図 9 にみられる様に、アルカリ側に於ても、蔗糖添加の溶液中では $[Ca^{++}]$ が増加した事実は、蔗糖溶液中の自由水の減少を推測させる。

一方、カラメル溶液による Ca の溶出量は、buffer 溶液に較べて、エナメル質、象牙質とも、有意に増加している（表 2）。カラメル化の進行とともに、 $[Ca^{++}]$ が減少し、ついには加えられた Ca 濃度以下となつたことは（図 10）、カラメル化に伴い、溶液中の蔗糖濃度が減少した（図 6）ことによる現象だけではなく、カラメル化の間に、Ca 結合物質が生成されたことを意味する。このことは、カラメル共存の下ではアルカリ性と共に $[Ca^{++}]$ が減少し、蔗糖ではこの作用が全くみられなかつた（図 11）ことから推測される。実験 II で定性された有機酸などが、アルカリ側で Ca と結合できる物質として作用したと考えられる。

16 日間の溶出実験で、buffer 溶液中にもかなりの Ca や P の溶出がみられ、カラメルは溶出に対する特異的なものではなく、その増強であつたが、ではこれら溶出した Ca や P は、歯質のどの部分に由来するものであろうか。

16 日間の溶出期間の後、カラメル溶液で溶出を行つた歯質には、褐色着色が起こつており、その程度は、エナメル質に較べて象牙質の方がはるかに強かつた。このことは、着色化とそれに伴う脱灰が、有機物質に関与して行なわれたことを推測させる。

Solomon and Irving⁵⁴⁾ は、EDTA による歯質の脱灰と、Lysine 及び Hydroxylysine の遊離の ϵ -アミノ基の増加が平行すると述べている。

本実験では、16 日間の溶出実験後の、エナメル質及び象牙質の N-末端アミノ酸の定性実験で、

buffer 溶液及びカラメル溶液による溶出後の ϵ -D-NP-Lysine 及び ϵ -DNP-Hydroxylysine の量に差がみられなかったことは（定量的ではないが）（図 2），カラメル溶液が Ca の溶出を増強させた部分は，EDTA 溶液による脱灰の部分とは他に求めるべきであろう。

一方の α -DNP アミノ酸については，脂肪性の物質の存在により（図 4 中 A）充分展開がなされず，カラメル溶液による N-末端のアミノ基の増加は観察されなかった。

溶出実験に於ては，脱有機した歯質では，無処理のものと異り，カラメル溶液の溶出増加の特徴が見られなくなった（表 3）。天然アパタイトに於ても，同様の結果がみられる（表 4）。更に溶出量は，無処理のものに比べて減少しており，特に象牙質に於てこの現象が著しい。これらの結果は，有機質と結びついていた Ca が，脱有機処理の間に溶出してしまい，それらは又，カラメル溶液により溶出されうる Ca であつたために，脱有機した歯質に於ては，カラメル溶液と buffer 溶液の Ca 溶出量の差がみられなくなったと推測される。

一方 Scheinman 等⁵⁵⁾は，歯質中の脂質には石灰化に関与しているものがあると述べており，更に Irving⁵⁶⁾は，Sudan black 好染物質が石灰化可能な点であると述べている。

溶出実験に於て，脱脂した歯質は，buffer 溶液とカラメル溶液に於て，Ca と P の溶出量に差がみられなくなった（表 4）。無処理のものとその溶出量を比較してみると，buffer 溶液の溶出性が増加している。このことから，脂質に Ca と P が結合しており，脂肪を除くと Ca と P が露出され，溶解性が増したと解釈される。即ち，カラメル溶液によつて溶出が増強されていた Ca は，脂質とは結合しており，脱脂処理によつて露出されることにより，buffer 溶液にても溶出されるようになったと考えられる。尚，脂肪を抽出した際，脂質と共に溶出した Ca の量は微量にすぎなかった（Ca 0.005mg/象牙質 1g）ことから，カラメル溶液で溶出が増強される Ca が，脱脂処理と同時に溶出され，buffer 溶液との差がみられなくなったとは考えられない。

Neuman and Neuman⁵⁷⁾の石灰化のエピタキシー説に従つて考えれば，これらの場所が核形成の場であり，逆に溶出 Ca の根はこれらの物質にあることが推定される。

以上のことから，弱アルカリ溶液にも，歯質中の Ca 及び P は溶出するものであるが，特にカラメル溶液によつてその特徴が強められることが分つた。これは，アルカリ性で Ca と可溶性の結合物質を作るカラメル溶液中の有機酸の様な物質の働きによるものである。更にこの様な系で脱灰される Ca と P は，歯質中の脂肪成分と関係あるものと推定された。尚，蔗糖そのものによる歯質脱灰力はむしろ弱く，カラメル化等により有機酸の様な物質が生成された時に，その脱灰力を顕著に増加させると考えられた。食品中の蔗糖が，製品化の段階や調理の段階でカラメル化されているような時には，う蝕に対する蔗糖の影響がより一層推測される。

一般に歯質を酸性で脱灰すると Ca と P が溶出し，その比率はアパタイトのそれに近い。蔗糖が酸性側で Ca と P の溶出を抑制したという Blackwell 等³¹⁾の実験に於ても，その Ca/P は変らなかったことを示している。しかしアルカリ側では Ca/P はこの値から非常に離れることを大西等³²⁾は報告している。前に報告した蔗糖及びカラメル溶液による Ca の連続くり返し抽出実験からも，アルカリ性での抽出は，歯質の無機化合物を溶解したというより，むしろ歯質からの Ca 及び P は別々に抽出されたものをかなり含んでいると考えられた。

結 論

う蝕に対する蔗糖の作用の一端を明らかにするために，蔗糖の歯質脱灰性について研究を行なつた。

弱アルカリ性で，蔗糖及びカラメル化された蔗糖溶液中に歯質を incubate し，溶出する Ca 及び P を測定したところ，蔗糖の歯質脱灰力は弱く，むしろ溶出をおさえる作用もみられた。これに対し，カラメル化された溶液中では，歯質は褐色に着色化され，Ca 及び P の溶出性も有意に高

まつた。これはアルカリ性で、Ca と可溶性の結合物質を作る有機酸の様な物質が、カラメル溶液中に生成されたためと考えられた。更に、カラメル溶液により Ca や P の溶出が増強される部分は、歯質中の有機物質の内、遊離の ϵ -Lysine 及び ϵ -Hydroxylsine に関した部分ではなく、歯質中の脂肪と関係したものと推測された。

稿を終わるにあたり、終始御懇篤なる御指導と御校閲を賜りました大西正男教授に深く感謝致します。併せて御協力いただきました教室員の皆様に心から御礼申し上げます。

本論文の要旨は、第17回および第19回口腔衛生学会総会において発表した。

文 献

- 1) A. Baarreagaard: Dental conditions and nutrition among natives in Greenland. *Oral. Sang. Med. Path.* 2: 995, 1949.
- 2) P. O. Pedersen: Investigations into dental conditions of about 3,000 ancient and modern Greenlanders. *Dent. Rec.* 58: 191, 1938.
- 3) W.G. Shafer: The caries-producing capacity of starch, glucose, and sucrose diets in the Syrian hamster. *Science* 110: 143, 1944.
- 4) T. H. Grenby: The effects of carbohydrates on experimental dental caries in the rat. *Arch. oral. Biol.* 8: 27, 1963.
- 5) B. Krasse: The effect of the diet on the implantation of caries-inducing streptococci in hamsters. *Arch. oral. Biol.* 10: 215, 1965.
- 6) B. Krasse: The effect of caries-inducing streptococci in hamsters fed diets with sucrose or glucose. *Arch. oral. Biol.* 10: 223, 1965.
- 7) J. H. Shaw, I. Krumins and R. J. Gibbons: Comparison of sucrose, lactose, maltose and glucose in the causation of experimental oral diseases. *Arch. oral. Biol.* 12: 755, 1967.
- 8) G. Frostell, P. H. Keyes and R. Larson: The effect of various sugars and sugar substitutes on dental caries in hamsters and rats. *J. Nutr.* 93: 65, 1967.
- 9) R. M. Green and R. L. Harties: The effect of diets containing different mono- and disaccharides on the incidence of dental caries in the albino rat. *Arch. oral. Biol.* 14: 235, 1969.
- 10) P. Jay and A. Arbor: The role of sugar in the biology of dental caries. *J. Am. dent. Ass.* 27: 393, 1940.
- 11) F. B. Hopkins: Has it been proved that sugar is a significant factor in dental caries? *J. Am. Dent. Ass.* 27: 1801, 1940.
- 12) 岡本清纒: 砂糖と歯, 歯時報, No. 305: 10, 1958
- 13) B. E. Gustafsson: the Vipeholm dental caries study. Survey of literature on carbohydrates dental caries. *Acta. odontol. Scand.* 11: 207, 1954.
- 14) R. M. Stephan: Relative importance of polysaccharide, disaccharides and monosaccharides in the production of caries. *J. Am. dent. Ass.* 37: 530, 1948.
- 15) R. F. Sognnaes: Analysis of wartime reduction of dental caries in European children: *Ame. J. dis. child.* 37: 6, 1948.
- 16) G. Toverud: Decrease in caries frequency in Norwegian children during world war II. *J. Am. dent. Ass.* 39: 127, 1949.
- 17) 竹内光春: 齲蝕発生と砂糖消費量とに関する疫学的研究, 歯科学報, 59: 67, 219, 324, 1659.
- 18) T.M. Marthaler: Epidemiological and clinical dental findings in relation to intake of carbohydrates. *Caries. Res.* 1: 222, 1967.
- 19) O. W. Kite, J. Shaw and R. F. Sognnaes: The prevention of experimental tooth decay by tube-feeding. *J. Nutr.* 42: 89, 1950.
- 20) R. F. Sognnaes (ed.): Dietary factors in experimental rat caries. *Advances in Experimental Caries Reserch.*
- 21) B. E. Gustafsson, et al.: The Vipeholm dental caries study. The effect of different levels of carbohydrate intake on caries activity in 436 individuals observed for five years. *Acta. odontol. Scand.* 11: 232, 1954.
- 22) J. D. King, et al.: The effect of sugar supplements on dental caries in children. *Med. Res. Council. Spec. Rep. Series.* No. 288, London, 1955.
- 23) J. H. Shaw: Effect of carbohydrate-free and carbohydrate-low diets on incidence of dental caries in white rats. *J. Nutr.* 53: 151, 1954.
- 24) R. M. Green and R. L. Hartles: The effect of diets containing different mono and disaccharides on the incidence of dental caries in the albino rat. *Arch. oral. Biol.* 14: 235, 1969.
- 25) R. J. Gibbons, et al.: Dental caries and alveolar bone loss in gnotobiotic rats infected with capsule forming streptococci of human origin. *Arch. oral. Biol.* 11: 549, 1966.
- 26) R. J. Fitzgerald, P. H. Keyes, T. H. Stoudt and D. M. Spinell: *J. Am. dent. Ass.* 76: 301, 1968.
- 27) H. V. Jordan and P. H. Keyes: In vitro methods for the study of plaque formation and caries lesions. *Arch. oral. Biol.* 11: 793,

- 1966.
- 28) J. D. Stoppelar and K. G. König : Decreased cariogenicity of a mutant of *Streptococcus mutans*. Arch. oral. Biol. 16 : 971, 1971.
 - 29) B. K. Foscher and L. S. Fosdick : Studies of physiochemical phenomena related to dental caries. I. The effect of sugar on the rate of diffusion of hydrogen ion. J. dent. Res. 33 : 206, 1954.
 - 30) L. S. Fosdick and B. K. Forscher : Studies of physiochemical phenomena related to dental caries. II. The effect of sugar on the rates of diffusion of calcium and phosphate ions. J. dent. Res. 33 : 212, 1954.
 - 31) R. Q. Blackwell and L. S. Fosdick : Studies on the physicochemical phenomena related to dental caries. III. The effect of sucrose upon the solubility of human dental enamel. J. dent. Res. 35 : 210, 1956.
 - 32) R. Q. Blackwell, L. Mcmillan and L. S. Fosdick : Sucrose retardation of acid etching in dental enamel; An electron-microscopic study. J. dent. Res. 40 : 16, 1961.
 - 33) 大西正男, 玉置幸子 : 砂糖溶液の歯質脱灰作用 口腔衛生会誌, 12 : 160, 1963.
 - 34) 大西正男, 弓削朝子, 鷹森健志郎 : 歯質の試験管内褐色着色に関する予備的研究, 口腔衛生会誌, 17 : 75, 1967.
 - 35) 斉藤正行 : 光電比色計による臨床化学検査, 南山堂, 東京, 第6版, 1955, 185頁.
 - 36) 日本化学会編 : 実験化学講座23, 丸善, 東京, 第2版, 1964, 169頁.
 - 37) F. Sanger : The free amino groups of insulin. Bioch. J. 39 : 507, 1945.
 - 38) J. B. Williams and J. W. Irvine : Preparation of the inorganic matrix of bone. Science 119 : 771, 1954.
 - 39) 神山紀久男 : 乳歯歯質に関する生化学的研究 [1] 脱灰反応について, 口腔病会誌, 32 : 74, 1965.
 - 40) T. R. Dirksen : Lipid components of sound and caries dentine. J. dent. Res. 42 : 128, 1963.
 - 41) 永原太郎, 岩尾裕之 : 食品分析法, 柴田書店, 東京, 1960, 104頁.
 - 42) 佐竹一夫 : クロマトグラフィー, 共立全書, 東京, 1955, 54頁, 120頁.
 - 43) 斉藤正行 : 光電比色計による臨床化学検査, 南山堂, 東京, 第6版, 1955, 166頁, 168頁.
 - 44) B. Gottlieb : A new concept of the caries problem and its clinical application. J. Am. dent. Ass. 31 : 1489, 1944.
 - 45) M. Deakins : The isolation of a melanin-like substance from caries organic matrix of human dentin. J. Dent. Res. 20 : 39, 1941.
 - 46) S. Dreizen, et al. : In vitro studies on effect of furfural, hydroxy methylfulfural and tobacco smoke on demineralized and noncarious human teeth. J. Am. dent. Ass. 56 : 340, 1958.
 - 47) R. S. Manly and M. L. Deakins : Change in the volume percent of moisture, organic and inorganic material in dental caries. J. dent. Res. 19 : 165, 1940.
 - 48) 奥瀬孝一 : う蝕象牙質の硬さと着色および細菌侵入度との関係, 口腔病会誌, 31 : 187, 1964.
 - 49) S. Dreizen and T. D. Spies : A note on the production of a yellow-brown pigment in the organic matrices of noncarious human teeth by oral lactobacilli. O.S.O.M.O.P. 3 : 686, 1950.
 - 50) A. Schatz, et al. : The proteolysis-chelation theory : Application to caries and erosion. Ann. Dent. 16 : 37, 1957.
 - 51) I. Zipkin and R. H. Lerson : Caries potentiating effect of Na EDTA, Ca EDTA, and Mg EDTA in the rat. J. dent. Res. 38 : 1240, 1959.
 - 52) A. Brosowsky : Das Verhalten einiger organischer Verbindungen gegenüber menschlichen Zahnschmelz : ein Beitrag zur Karies genese durch Komplexbilder. D.Z.Z. 20 : 665, 1965.
 - 53) H. E. Lura : Investigation into complex formation with the calcium of the tooth. Adv. in Fluorine Res. and Dent Caries Pre. 2 : 77, 1964.
 - 54) C. C. Solomons and J. T. Irving : Studies in Calcification. Bioch. J. 68 : 499, 1958.
 - 55) E. Scheinman, M. M. Weinreb and M. Wolman : Histochemical study of the ameloblasts and enamel matrix in rat molars. J. dent. Res. 41 : 1293, 1962.
 - 56) J. T. Irving : The sudanophil material at sites of calcification. Arch. oral. Biol. 8 : 735, 1963.
 - 57) W. F. Neuman and M. W. Neuman : The chemical dynamics of bone mineral. Univ. of Chicago Press, Chicago, 1958. 骨の生化学 (荒谷真平訳), 医歯薬出版, 東京, 1960.
 - 58) 大西正男, 小菅充子 : 蔗糖およびカラメル化蔗糖溶液による牛歯質からの Ca の溶出増加について, 口腔衛生会誌, 20 : 180, 1970.