原 著

脱灰エナメル質のフッ素取り込みと再石灰化に 及ぼすカルボキシメチルセルロースの効果*

Effect of Carboxymethylcellulose on Fluoride Uptake and
Remineralization in Demineralized Enamel*

川 崎 浩 二**

Koji KAWASAKI**

Received January 17, 1989; accepted March 2; 1989

Abstract: The effect of carboxymethylcellulose (CMC) on enamel remineralization was investigated *in vitro*. CMC is a component of artificial saliva substitutes and may be considered as a model molecule for the salivary mucins. Human dental enamel slabs (N=60) were demineralized for 12 hours by immersion in a demineralizing solution containing 0.1 M lactic acid, 3.0 mM Ca, 1.8 mM P, and 1 % CMC at pH 4.5. After demineralization, the enamel slabs were immersed in four groups of remineralizing solutions for 10 days (20 ml/slab), which contained 3.0 mM Ca, 1.8 mM P, and 150 mM NaCl at pH 7.0, with and without 1 % CMC and 3 ppm fluoride, that is, ①0 % CMC/0 ppm F (C0F0), ②1 % CMC/0 ppm F (C1F0), ③0 % CMC/3 ppm F (C0F3), and ④1 % CMC/3 ppm F (C1F3). After remineralization, the degree of remineralization were evaluated by chemical analysis for Ca amount, Ca/P ratio, and fluoride uptake, and by microradiography using calculated mineral vol%. The remineralized enamel slabs were treated with 1.0 N HClO₄ solution to evaluate the acid resistance and also the mineral vol% was reevaluated by microradiography. The following results were obtained.

1) The fluoride uptake in group C1F3 was about two times higher than that of group C0F3 for the first to fourth layers ($p < 0.05$). 2) According to the microradiography evaluation of group C1F0, the lowest mineral vol% was evident. Groups C0F0, C0F3, and C1F3 were obviously remineralized, but the mineral vol% of group C0F3 was lower than that of groups C0F0 and C1F3. 3) A radiopaque zone, indicating acid resistance, was not found in group C1F0, but the other three groups showed acid resistant zones. The microradiographic characteristics of the acid resistant zone in groups C0F3 and C1F3 were uniform. This zone was formed through the remineralized area, particularly at the surface and bottom layer of the remineralized area. In group C0F0, however, such uniformity was not found. 4) The Ca amount and Ca/P ratio were not sufficient to evaluate the degree of remineralization.

These results suggest that not only the CMC molecule, which is relatively large (50,000~12,000), inhibits remineralization without fluoride ions, but also, that the CMC molecule promotes fluoride up-

* 本論文の要旨の一部は第37回日本口腔衛生学会総会において発表した。

** 長崎大学歯学部予防歯科学講座 (指導: 高木興氏教授)

** Department of Preventive Dentistry, Nagasaki University School of Dentistry (Director: Prof. Okiuji TAKAGI)

take and the degree of remineralization with fluoride ions.

索引用語：再石灰化エナメル質，カルボキシメチルセルロース，フッ素取り込み量

Key words: Remineralized enamel, Carboxymethylcellulose, Fluoride-uptake

緒 言

表層部を部分的に脱灰されたエナメル質（以下脱灰エナメル質と呼称）がフッ素の存在下で再石灰化を起こす場合、フッ化物の種類或いはフッ素濃度の違いによって再石灰化がどの程度促進されるかどうかということについての研究は数多く行われている¹⁻¹⁰⁾。しかし、再石灰化に影響を及ぼすその他の物質についての研究は少ない。Carboxymethylcellulose(CMC)は、その粘性、安定性、保護コロイド性、皮膜形成などの特性から食品工業をはじめ、多方面に応用され、歯磨剤の粘結剤としても利用されており、また、高分子でその末端にカルボキシル基を有している点で、唾液蛋白ムチンとも類似している。これらの特性は、人工唾液への粘性付与あるいは唾液蛋白の代用として利用できるのではないかと考えた。

従って本研究は、このような性質を有する CMC が脱灰エナメル質を浸漬した再石灰化液の作用にどのような影響を及ぼすか、さらに再石灰化に深く関係していると考えられるフッ素と共存する場合にどのような役割を果たすかについて検討するために実施され、その結果、幾つかの知見を得たので報告する。

材料及び方法

1. 実験用歯牙切片の作成

歯牙の選択：フッ化物応用の既往の有無にかかわらず、歯列矯正上の理由で抜去された8歳～14歳児（平均 10.8 ± 1.3 歳）の小白歯を収集し、70%エチルアルコール中に保存したものをを用いた。各歯の頰側エナメル質を実体顕微鏡（ $\times 10$ ）で観察して、亀裂、白濁、着色が認められないもので、さらにオーラルイルミネーター（東京歯材社）を用いる透視で亀裂の無いことを確認した60本の歯牙を本実験に使用した。

実験エナメル質平面の確保：歯冠を注水下でダイヤモンドバーを用いて頰側と舌側に2分し、その頰側を本実験に用いた。各試料片をアクリル板（ $25 \times 25 \times 5$ mm）にスティッキーワックスで固定し、研磨削除装置（Fig. 1）と #800, #1500の耐水研磨紙を用いて、頰側エナメル質をアクリル板平面と平行に最大豊隆部からおおよそ $400 \mu\text{m}$ の深さまで鏡面研磨した。この研磨量は、歯面の

彎曲をとり除き、 $10 \mu\text{m}$ ごとの層別化学分析に際して、フッ素、カルシウム、リンの検出が十分可能な分析面積（ $15 \sim 20 \text{mm}^2$ ）が得られる深さであり、さらに、歯牙のフッ化物局所応用経験の有無にかかわらずエナメル質中のフッ素濃度が一定値を示すようになる深さであることを予備実験において既に確認済みである。

エナメル質の表層下脱灰：試料の実験エナメル質平面以外の部分は予め nail varnish で被覆し、Table 1 に示す脱灰溶液を一実験エナメル質平面当り 20ml の割合で用い、 37°C で12時間スターラー（Mini. Stirrer 井内）で攪拌して脱灰を行った。

2. 再石灰化の方法と条件

まず、試料を10歯ずつの6群に分け、その1群を健全エナメル質対照群（Intact）に当て、残り5群の実験エナメル質平面に前述の方法で脱灰溶液を作用させ、その1群を脱灰エナメル質対照群（Demineralized）とした。残余の4群のそれぞれに4種の再石灰化液〔①0% CMC, 0 ppm F (C0F0) ②1% CMC, 0 ppm F (C1F0) ③0% CMC, 3 ppm F (C0F3) ④1% CMC, 3 ppm F (C1F3)：いずれも 3.0mM Ca, 1.8mM P, 150mM NaCl を含み、 pH 7.0, 37°C]を作用させたが、その方法は試料片1個に対し 20ml の割合の再石灰化液に浸漬し、マグネティックスターラー（Mini. Stirrer 井内）で連続的に攪拌しながら再石灰化液の交換を2日ごとに行って、10日間継続した。再石灰化後は流水（脱イオン蒸留水）で1分間洗浄し、湿度100%の条件下で保存した。これら6群のそれぞれの各10個の試料片を化学分析用に5個、Microradiographyによる再石灰化の評価用に5個用いた。

3. 研磨削除と化学分析の方法

実験エナメル質平面の表層のカルシウム量、リン量、フッ素量を分析するためのエナメル質研磨削除法は、Ikemi ら¹¹⁾のAbrasion biopsy techniqueに準じてエナメル質表層から約 $10 \mu\text{m}$ ごとの第10層（約 $100 \mu\text{m}$ ）まで層別に行った。研磨削除には研磨削除用装置（Fig. 1）とラッピングフィルムシート（粒度 $15 \mu\text{m}$ ）を用いた。なお、表層からの深さを算出するためにエナメル質試料片の両側にハイドロキシアパタイト板を取りつけ、試料片と同時に研磨削除を行った（Fig. 2）。こうして、各

Fig. 1 Grinder/polisher apparatus with cement-mixing glass plate

Table 1 Composition of the demineralizing solution

components	
1.0 M lactic acid	400 ml
Carboxymethylcellulose	40 g
5 mM Hydroxyapatite soln.	240 ml
1% Thymol soln.	40 ml
0.5 N NaOH	add (up to pH 4.5)
deionized water	add (up to 4,000 ml)

層ごとに、エナメル質試料片からのラッピングフィルムシート1枚とハイドロキシアパタイト板からのシート2枚が得られた。この各層ごとに削除されたエナメル質およびハイドロキシアパタイトは別々に0.1N 過塩素酸溶液 (50% TISAB IIを含む) 2 ml 中に浸漬攪拌し、室温で24時間放置した後、それぞれから溶出した Ca, P, F の測定を行った。

Ca の測定：試料溶液0.5 ml に10,000 ppm ランタン溶液0.5 ml, 蒸留水4.0 ml を加えて全量を5.0 ml として原子吸光度計 (180-80, HITACHI) を用いて測定した。Ca 量は単位体積当りのグラム量 (g/cm^3) として算出した。

P の測定：リン・モリブデン法により吸光度計 (228, HITACHI) で測定した。

F の測定：フッ素イオン電極法を用いた。複合フッ素電極 (96-09型, オリオン社) をデジタルイオナライザー (901A 型, オリオン社) に接続して使用した。

エナメル質表層からの深さの算出：実験に用いたエナメル質試料片はその再石灰化の程度によって Ca の含有量, 比重も相違しているため, 通常の方法のように, エナメル質中の Ca 含有量を37%と仮定して深さを算出

Fig. 2 Enamel slab mounted between two hydroxyapatite slabs on acrylic acid resin plate

することはできない。従って表層からの深さは、得られたハイドロキシアパタイト (以下 HA と略記) の Ca 量から次式により求めた。なお, HA の比重の $3.42 \text{ g}/\text{cm}^3$ は予め求めた値である。

$$\text{深さ} (\mu\text{m}) = \frac{\text{溶出した HA 質量} (\mu\text{g})}{3.42 (\text{g}/\text{cm}^3) \times \text{HA 面積} (\text{mm}^2)}$$

分析面積の算出：エナメル質試料片の作用面は再石灰化後に輪郭を明瞭にし、その上に Tin foil を軽く圧接した。次に輪郭に沿って Tin foil をメスで切りとり、その Tin foil の重量を微量天秤で秤量した。予め Tin foil の一定面積当り重量を秤量してあるので、それぞれの試料片から得られた Tin foil の重量からその実験エナメル質平面の面積を求めた。

4. 化学的評価法

次の評価値を求めて検討を行った。

エナメル質のフッ素取り込み量：エナメル質へのフッ素取り込み量は研磨削除した層ごとに (約 $10 \mu\text{m}$)、単位体積当りの F 量 ($\mu\text{g}/\text{cm}^3$) として表した。

エナメル質の Ca 量：エナメル質の再石灰化度を評価する目的で、層ごとに単位体積当りの Ca 量 (g/cm^3) として表した。

エナメル質の Ca/P 比：再石灰化エナメル質を質的に評価する目的で Ca/P 比を求めた。

5. Microradiography による再石灰化度の評価法

Microradiography による評価に用いたエナメル質試料片は実験面を歯軸方向に3区分し、まず歯頸部よりの3分の1を nail varnish で被覆し脱灰し、続いて中央3分の1も nail varnish で被覆して再石灰化を行った。この処理によって、同一切片試料上で健全エナメル質、脱灰エナメル質、再石灰化エナメル質の比較が行え

るようにした。再石灰化後に試料片をポリエステルレジ
ン (Rigolac-2004, 日新 EM) に包埋し、硬化後、硬組
織切断機 (Isomet Low Speed Saw, Buehler 社) を用
いて、歯軸方向に切断し、厚さ約 300 μ m の切片を求
め、次いで #800, #1500 の耐水研磨紙を用いて準備
研磨し、さらに、仕上げ研磨 (粒度 9 μ m) と底取研磨
(粒度 3 μ m) を行って鏡面研磨し、厚さ 100 μ m の薄切切
片を得た。Microradiograph は、これらの薄切切片と 10
段階からなるアルミニウムステップウェッジ (25 μ m ~
250 μ m) を共に X 線フィルム (Type 649, Kodak) 上に密
着させて撮影して求めた (PW1729 X-ray Generator,
タングステン管球, Philips 社)。照射条件は 20 KV, 20
mA, 12min., 管球被写体距離 30cm, 現像は D19 (Kodak)
を用いて 20°C で 5 分間行った。得られたエナメル質薄
切切片及びアルミニウムステップウェッジの Microrad-
iograph は Densitometer (サクラ Densitometer PDS
15, 小西六社) を用いて、エナメル質表層から深さ方向
に 10 μ m, 幅 50 μ m のスリットで走査し、density をレコ
ーダーに記録した。density からミネラル量への換算は
Angmar ら¹²⁾ の方法に準じて行った。

6. 酸抵抗性試験による再石灰化エナメル質の質的評価

再石灰化エナメル質の強酸作用時における酸抵抗性につ
いて検討した。すなわち、Microradiography による
再石灰化の評価に用いたエナメル質薄切切片を 1 N 過
塩素酸溶液 1 ml に 1 分間浸漬後、水洗し、前述と同様
の条件で Microradiograph を再度撮影した。酸抵抗性
は各群 3 例ずつのミネラル量の平均値で評価した。

7. 統計分析

化学分析によって得られた各群 5 例の層別フッ素量、

カルシウム量の平均値について、まず分散分析法によっ
て層ごとの 6 群間に全体として統計学的有意差があるか
どうかを検定した。次に、有意性が認められた層につい
てはどの群間に統計学的有意差があるのかを Newman-
Keuls Test にて検定した¹³⁾。すなわち、

$$q_r = \frac{\bar{X}_i - \bar{X}_j}{\sqrt{S/n}}$$

にて有意性の判定をした。ここで $\bar{X}_i$, $\bar{X}_j$ は平均値, n
は各群の例数, S は誤差変動の不偏分散を示す。 r は平
均値を大きさの順に並べ、比較しようとする 2 つの平均
値の順位をそれぞれ k , l ($l > k$) とした場合 $r = l - k +$
1 と表される。

実験値から求めた q_r 値を r と誤差変動の自由度に対
応する q 値 (表の値) とを比較することより有意差の有無
を判定した。

結 果

1. エナメル質各層のフッ素含有量

実験 4 群、対照 2 群における層別のフッ素含有量
(μ g/cm³) の平均値、標準偏差を Table 2 に示した。ま
た、エナメル質表層からの深さに対するフッ素含有量分
布の関係を Fig. 3 に示した。対照としての Intact,
Demineralized のフッ素含有量は、340~662 μ g/cm³ の
範囲にあり、全層にわたりほぼ一定した値であった。一
方、C0F0 の第 1 層から第 4 層までは 1,000 μ g/cm³ を越
え、深層より高い傾向がみられた。同様に、C1F0 の第
1 層から第 3 層までは 1,000~2,500 μ g/cm³ と高い値を
示す傾向が認められた。しかし、これら 4 群間には全層
において統計学的有意差は認められなかった (Table 3)。
一方、C0F3, C1F3 のエナメル質表層では非常に高い

Table 2 Fluoride content in each enamel layer (Mean μ g/cm³ $\pm$ S.D.)

No of layer	Remineralization type					
	Intact	Demineralized	C0F0	C1F0	C0F3	C1F3
1	343 $\pm$ 81	520 $\pm$ 171	1118 $\pm$ 230	2544 $\pm$ 1041	6978 $\pm$ 2305	11908 $\pm$ 5999
2	380 $\pm$ 144	662 $\pm$ 147	1103 $\pm$ 166	1026 $\pm$ 516	12725 $\pm$ 2623	21443 $\pm$ 8214
3	561 $\pm$ 386	593 $\pm$ 110	1152 $\pm$ 321	1078 $\pm$ 511	10148 $\pm$ 2351	21116 $\pm$ 5554
4	466 $\pm$ 121	568 $\pm$ 173	1031 $\pm$ 200	908 $\pm$ 186	7744 $\pm$ 4034	11391 $\pm$ 2696
5	489 $\pm$ 167	533 $\pm$ 116	925 $\pm$ 153	798 $\pm$ 122	4475 $\pm$ 2417	5726 $\pm$ 3196
6	409 $\pm$ 82	572 $\pm$ 140	848 $\pm$ 182	790 $\pm$ 83	3054 $\pm$ 2096	3920 $\pm$ 3521
7	431 $\pm$ 77	552 $\pm$ 118	941 $\pm$ 246	817 $\pm$ 166	2271 $\pm$ 1319	2183 $\pm$ 1717
8	428 $\pm$ 88	570 $\pm$ 140	758 $\pm$ 200	783 $\pm$ 95	1548 $\pm$ 686	1551 $\pm$ 1213
9	475 $\pm$ 210	542 $\pm$ 107	869 $\pm$ 161	692 $\pm$ 177	1433 $\pm$ 489	1261 $\pm$ 662
10	414 $\pm$ 95	547 $\pm$ 113	857 $\pm$ 269	691 $\pm$ 231	1192 $\pm$ 327	974 $\pm$ 400

Fig. 3 Fluoride profile of Intact, Demineralized, C0F0, C1F0, C0F3, and C1F3 enamel

フッ素含有量を示した。すなわち、C0F3の第2, 第3層では $10,000 \mu\text{g}/\text{cm}^3$ を越える高いフッ素含有量であり、Newman-Keuls Testの結果、前述した4群のどの群とも第2層から第5層において統計学的有意差が認められた。また、C1F3の第2, 第3層では $20,000 \mu\text{g}/\text{cm}^3$ を越えた極めて高い値を示し、前述の4群のどの群とも第1層から第6層で統計学的有意差が認められ、また、C1F3の第1層から第4層はC0F3よりもさらに統計学的有意に高いフッ素含有量を示した。C0F3, C1F3におけるフッ素量の分布はエナメル質表層の第2層, 第3層において特に高く、深層に向かうにつれて

フッ素含有量は徐々に減少した。

2. 再石灰化エナメル質のミネラル量についての評価
Ca量による評価：各群における層別Ca量(g/cm^3)をTable 4に示した。第1層ではIntactのCa量が他のどの群よりも有意に高く、第2層ではIntactのCa量がC1F0より有意に高かった。第3層ではIntactより有意に低いものはDemineralized, C0F0, C1F0であった。第4層から第10層では6群間に有意差が認められなかった。

Microradiographyによる再石灰化の評価：10日間に及ぶ再石灰化液作用後の各群のMicroradiographをFig. 4~Fig. 7に示した(矢印の左側：脱灰部, 右側：再石灰化部)。C1F0の作用例では再石灰化液の効果が写真上では確認できないが、C0F0, C0F3, C1F3では明らかに再石灰化所見が確認できた。再石灰化像の特徴は、脱灰エナメル質の内層に再石灰化が起こっており、エナメル質表面に堆積するような形のミネラル沈着は発現していないということである。また、内層の再石灰化は脱灰エナメル質の全層に均等に発現しているのではなく、表層下には再石灰化が不十分な層が存在するように思われた。

各群5例についてMicroradiographのdensityからミネラル量に換算した平均値と標準偏差をTable 5~8に示し、各群のミネラル量と深さとの関係をFig. 8~11に示したが、C1F0以外の3群においては再石灰化によるミネラル量増加が著明に認められた。C0F0では、

Table 3 Statistically significant difference between groups with respect to fluoride content in each enamel layer

	Intact	Demineralized	C0F0	C1F0	C0F3	C1F3
Intact	—	N.S.	N.S.	N.S.	1* 2** 3** 4** 5** 7* 9** 10**	1** 2** 3** 4** 5** 6* 7* 9* 10*
Demineralized		—	N.S.	N.S.	1* 2** 3** 4** 5** 7* 9* 10**	1** 2** 3** 4** 5** 6* 7* 9*
C0F0			—	N.S.	2** 3** 4** 5** 6*	1** 2** 3** 4** 5** 6* 7*
C1F0				—	1* 2** 3** 4** 5** 9* 10*	1** 2** 3** 4** 5** 6*
C0F3					—	1* 2** 3** 4**
C1F3						—

Note: The numbers (1~10) correspond to each layer (approximately $10 \mu\text{m}$) abraded from the surface enamel

N.S.: no significance at any enamel layer

*: $p < 0.05$

**: $p < 0.01$

Table 4 Calcium quantity in each enamel layer (Mean g/cm³ ± S.D.)

No of layer	Remineralization type					
	Intact	Demineralized	C0F0	C1F0	C0F3	C1F3
1	0.58±0.12	0.20±0.12	0.24±0.10	0.18±0.12	0.16±0.05	0.30±0.20
2	0.77±0.23	0.38±0.17	0.36±0.11	0.31±0.16	0.51±0.20	0.66±0.23
3	0.96±0.16	0.48±0.18	0.52±0.07	0.51±0.12	0.65±0.26	0.89±0.27
4	1.01±0.17	0.63±0.23	0.68±0.17	0.70±0.20	0.84±0.22	0.91±0.25
5	1.25±0.46	0.77±0.16	0.81±0.09	0.85±0.22	0.99±0.17	0.99±0.25
6	1.02±0.27	0.84±0.22	0.92±0.11	0.92±0.08	1.06±0.12	1.11±0.20
7	1.05±0.17	0.97±0.13	0.97±0.19	1.13±0.23	1.19±0.10	1.17±0.11
8	1.08±0.11	1.07±0.17	0.94±0.19	1.25±0.22	1.16±0.14	1.12±0.12
9	1.11±0.19	1.05±0.13	1.06±0.08	1.24±0.07	1.30±0.14	1.18±0.05
10	1.04±0.06	1.09±0.10	0.99±0.09	1.21±0.09	1.19±0.08	1.21±0.15

Fig. 4 Microradiograph of C0F0 enamel **Fig. 7** Microradiograph of C1F3 enamel **Fig. 5** Microradiograph of C1F0 enamel **Fig. 6** Microradiograph of C0F3 enamel**Table 5** Mineral content in vol % of C0F0 enamel

Depth (μm)	Mineral vol % (Mean ± S.D.)		
	Intact enamel	Demineralized enamel	Remineralized enamel
0	9.4 ± 9.1	8.8 ± 8.6	8.5 ± 8.1
10	43.1 ± 11.0	17.8 ± 6.4	43.4 ± 20.0
20	90.0 ± 5.2	29.6 ± 9.6	79.1 ± 10.4
30	101.6 ± 19.5	35.6 ± 13.1	81.0 ± 12.9
40	101.6 ± 19.5	45.3 ± 17.9	79.5 ± 12.4
50	101.6 ± 19.5	63.9 ± 19.0	86.7 ± 8.0
60	101.6 ± 19.5	90.5 ± 9.0	94.8 ± 10.1
70	101.6 ± 19.5	102.1 ± 18.5	98.5 ± 11.7
80	101.6 ± 19.5	103.1 ± 19.7	98.7 ± 11.5
90	101.6 ± 19.5	104.0 ± 21.4	98.8 ± 11.4
100	101.6 ± 19.5	104.2 ± 21.2	98.8 ± 11.4

表層からミネラル量が急増し、10μm で健全エナメル質とほぼ同等のミネラル量に達した。20~50μm ではミネ

ラル量は一定し、健全エナメル質の約80%であり、これは脱灰エナメル質の約60~80%が回復したことに相当する。70μm 以降のミネラル量は脱灰エナメル質、再石灰化エナメル質共に健全エナメル質とほぼ同等である。C1F0 では表層10μmを越えたあたりからミネラル量の増加がわずかに認められたが、20~50μm でのミネラル

Table 6 Mineral content in vol % of C1F0 enamel

Depth (μm)	Mineral vol % (Mean $\pm$ S.D.)		
	Intact enamel	Demineralized enamel	Remineralized enamel
0	10.3 $\pm$ 11.0	9.2 $\pm$ 11.0	9.3 $\pm$ 11.1
10	63.0 $\pm$ 23.2	25.6 $\pm$ 11.1	26.9 $\pm$ 13.0
20	88.6 $\pm$ 15.3	41.6 $\pm$ 17.4	51.4 $\pm$ 16.4
30	100.4 $\pm$ 9.8	54.1 $\pm$ 13.2	70.4 $\pm$ 12.9
40	102.2 $\pm$ 12.7	76.2 $\pm$ 10.8	89.6 $\pm$ 8.4
50	102.2 $\pm$ 12.7	92.5 $\pm$ 10.7	96.0 $\pm$ 8.8
60	102.2 $\pm$ 12.7	100.1 $\pm$ 12.1	98.6 $\pm$ 11.5
70	102.2 $\pm$ 12.7	101.1 $\pm$ 12.1	98.8 $\pm$ 11.3
80	102.2 $\pm$ 12.7	101.9 $\pm$ 13.6	98.8 $\pm$ 11.3
90	102.2 $\pm$ 12.7	101.9 $\pm$ 13.6	98.8 $\pm$ 11.3
100	102.2 $\pm$ 12.7	101.9 $\pm$ 13.6	98.8 $\pm$ 11.3

Table 7 Mineral content in vol % of C0F3 enamel

Depth (μm)	Mineral vol % (Mean $\pm$ S.D.)		
	Intact enamel	Demineralized enamel	Remineralized enamel
0	8.7 $\pm$ 9.7	7.5 $\pm$ 8.3	7.8 $\pm$ 8.2
10	46.3 $\pm$ 22.0	18.2 $\pm$ 13.2	32.2 $\pm$ 21.0
20	86.4 $\pm$ 15.6	30.5 $\pm$ 21.2	65.0 $\pm$ 12.4
30	94.4 $\pm$ 11.0	39.3 $\pm$ 23.3	69.1 $\pm$ 12.7
40	95.8 $\pm$ 9.5	50.7 $\pm$ 27.1	72.0 $\pm$ 17.2
50	95.8 $\pm$ 9.5	66.5 $\pm$ 21.2	82.9 $\pm$ 8.2
60	96.1 $\pm$ 9.6	80.4 $\pm$ 8.9	95.6 $\pm$ 4.6
70	96.1 $\pm$ 9.6	88.3 $\pm$ 5.0	99.8 $\pm$ 7.5
80	96.4 $\pm$ 9.8	92.0 $\pm$ 5.2	100.0 $\pm$ 7.3
90	96.4 $\pm$ 9.8	93.4 $\pm$ 6.3	100.0 $\pm$ 7.3
100	96.4 $\pm$ 9.8	93.9 $\pm$ 6.9	100.0 $\pm$ 7.3

量の増加は脱灰エナメル質のそれより10%~15%上まわる程度であった。C0F3では10~20 μm で再石灰化によるミネラル量の急増が認められ、約65%のミネラル量となった。20~40 μm では健全エナメル質の約50~60%程度のミネラル量の回復が認められた。40 μm 以降も徐々にそのミネラル量が増加し、60 μm 付近からは健全エナメル質と同等のミネラル量であった。C1F3では表層からミネラル量が急増し、20~50 μm では健全エナメル質の80~90%のミネラル量に達し、60 μm 以降では健全エナメル質と同程度であった。

3. 再石灰化エナメル質の質的評価

Ca/P比による評価：各群の層別Ca/P比をTable 9に示した。IntactのCa/P比は2.07から2.19の範囲で全層にわたり一定していた。他の5群の第1層のそれは

Table 8 Mineral content in vol % of C1F3 enamel

Depth (μm)	Mineral vol % (Mean $\pm$ S.D.)		
	Intact enamel	Demineralized enamel	Remineralized enamel
0	7.4 $\pm$ 8.9	7.1 $\pm$ 8.7	7.4 $\pm$ 8.6
10	51.8 $\pm$ 27.0	17.6 $\pm$ 12.7	45.5 $\pm$ 29.0
20	89.4 $\pm$ 13.8	29.4 $\pm$ 22.3	70.3 $\pm$ 19.0
30	97.0 $\pm$ 12.1	36.1 $\pm$ 25.3	77.8 $\pm$ 13.0
40	97.3 $\pm$ 12.5	50.2 $\pm$ 30.5	84.3 $\pm$ 13.7
50	97.3 $\pm$ 12.5	67.0 $\pm$ 24.2	90.4 $\pm$ 13.9
60	96.7 $\pm$ 11.8	80.4 $\pm$ 14.8	94.1 $\pm$ 12.8
70	96.7 $\pm$ 11.8	91.1 $\pm$ 10.7	94.8 $\pm$ 12.0
80	97.0 $\pm$ 12.1	92.7 $\pm$ 11.1	94.8 $\pm$ 12.0
90	97.0 $\pm$ 12.1	92.7 $\pm$ 11.1	94.8 $\pm$ 12.0
100	97.6 $\pm$ 12.9	92.7 $\pm$ 11.1	94.8 $\pm$ 12.0

Fig. 8 Mineral content in vol % in C0F0 enamel **Fig. 9** Mineral content in vol % in C1F0 enamel

Fig. 10 Mineral content in vol % C0F3 enamel

Fig. 11 Mineral content in vol % in C1F3 enamel

1.41から1.88であり、低い傾向がみられた。しかし、第2層以降は1.98から2.25の範囲にあり、どの群もほぼ一定した値であった。

酸抵抗性試験による再石灰化エナメル質の質の評価：エナメル質薄切片を1N過塩素酸溶液1mlに1分間浸漬した後のMicroradiographをFig. 12~15に示した。C0F0の再石灰化エナメル質には不均一な酸抵抗性を示す部分の存在が認められたが、C1F0では、酸抵抗性を示すX線不透過像は認められなかった。一方、C0F3、C1F3では全体的に不透過像が存在し、かなり強い酸抵抗性が認められ、特に表層と底部においてそれが強いようであった。

これらのMicroradiographのdensityをミネラル量に換算した各群3例の各層別平均値と標準偏差をTable 10とFig. 16に示した。C1F0のミネラル量が最も低く、C1F3のミネラル量が最も高く、C1F3の40μm付近では最大70%近い値を示した。C0F3は20μmまではC1F3と同等の高いミネラル量を示したが、さらに深層ではミネラル量が増加せず、横ばい傾向を示した。C0F0はC1F0とC1F3の中間的なミネラル量であった。

考 察

1. 歯牙の選択について

ヒト・エナメル質表層のフッ素濃度は歯種、歯齡、歯面によって異なることが明白であり、また、フッ化物応用の経験有無によっても変る¹⁴⁻¹⁸⁾。従って、本実験で用いた歯牙は矯正治療の過程で抜歯された8歳から14歳(平均10.8±1.3歳)の上・下顎小臼歯に限定し、それらの歯の頬側エナメル質のみを実験材料とした。また、エナメル質の化学分析の方法としてIkemiら¹¹⁾のAbrasion biopsy techniqueに準じたので、エナメル質表層から約400μmの深さまで予め研磨したエナメル質平面を用い

Table 9 Ca/P ratio in each enamel (Mean ± S.D.)

No of layer	Remineralization type					
	Intact	Demineralized	C0F0	C1F0	C0F3	C1F3
1	2.13±0.04	1.83±0.29	1.88±0.15	1.47±0.56	1.41±0.30	1.69±0.93
2	2.19±0.05	2.09±0.14	2.12±0.09	1.98±0.15	2.00±0.23	2.24±0.14
3	2.14±0.07	2.13±0.22	2.14±0.09	2.10±0.03	1.98±0.25	2.15±0.02
4	2.16±0.05	2.06±0.11	2.09±0.09	2.15±0.06	2.15±0.12	2.05±0.15
5	2.08±0.10	2.07±0.08	2.15±0.18	2.13±0.06	2.09±0.01	2.15±0.04
6	2.07±0.06	2.06±0.09	2.06±0.10	2.10±0.05	2.12±0.05	2.13±0.04
7	2.11±0.07	2.03±0.08	2.02±0.10	2.25±0.37	2.05±0.05	2.15±0.07
8	2.08±0.07	2.00±0.09	2.08±0.10	2.02±0.05	2.05±0.04	2.12±0.07
9	2.10±0.09	1.99±0.07	2.03±0.12	2.02±0.07	2.03±0.07	2.09±0.07
10	2.12±0.18	2.00±0.08	2.08±0.06	2.05±0.06	2.04±0.04	2.08±0.04

Fig. 12 Microradiograph of remineralized (C0F0)enamel treated with HClO_4

Fig. 13 Microradiograph of remineralized (C1F0)enamel treated with HClO_4

Fig. 14 Microradiograph of remineralized (C0F3)enamel treated with HClO_4

Fig. 15 Microradiograph of remineralized (C1F3)enamel treated with HClO_4

た。予備実験において、フッ化物応用の未経験者の小白歯4本とフッ化物応用の経験者(フッ化物洗口2年~2年5カ月)の小白歯4本をそれぞれ同様に表層から400 μm まで研磨したのち、そのエナメル質平面を基準としてAbrasion biopsy techniqueを適用して10 μm ごとの削

Table 10 Mineral content in vol % of remineralized enamel treated with HClO_4

Depth (μm)	Mineral vol % (Mean $\pm$ S.D.)			
	C0F0	C1F0	C0F3	C1F3
0	0.2 $\pm$ 0.2	0.6 $\pm$ 1.1	3.9 $\pm$ 6.2	0.0 $\pm$ 0.0
10	25.9 $\pm$ 6.3	10.2 $\pm$ 10.0	31.2 $\pm$ 19.9	26.4 $\pm$ 25.6
20	37.2 $\pm$ 6.1	19.1 $\pm$ 19.1	48.2 $\pm$ 28.4	48.2 $\pm$ 11.2
30	47.2 $\pm$ 12.3	24.6 $\pm$ 20.7	43.0 $\pm$ 28.1	60.1 $\pm$ 10.1
40	54.4 $\pm$ 6.5	38.1 $\pm$ 19.8	42.2 $\pm$ 25.7	68.9 $\pm$ 10.5
50	55.2 $\pm$ 5.3	46.7 $\pm$ 21.5	48.9 $\pm$ 27.9	66.8 $\pm$ 18.4
60	54.3 $\pm$ 6.3	50.7 $\pm$ 21.3	50.8 $\pm$ 27.3	58.0 $\pm$ 20.4
70	52.5 $\pm$ 6.8	51.1 $\pm$ 20.6	50.4 $\pm$ 24.4	53.9 $\pm$ 17.6
80	52.1 $\pm$ 7.2	51.2 $\pm$ 20.3	50.7 $\pm$ 23.5	52.4 $\pm$ 16.2
90	52.1 $\pm$ 7.2	51.8 $\pm$ 19.2	51.3 $\pm$ 23.2	51.8 $\pm$ 15.2
100	52.1 $\pm$ 7.2	52.5 $\pm$ 18.2	51.7 $\pm$ 23.0	51.8 $\pm$ 15.2

Fig. 16 Mineral content in vol% in remineralized enamel treated with HClO_4

除エナメル質中のフッ素濃度について検討した。その結果、フッ化物応用未経験群では各層のフッ素濃度の平均値は最小312.6ppm, 最大457.3ppmの範囲であり、フッ化物応用経験群では最小332.5ppmから最大365.7ppmの範囲に分布していた。すなわち、両群のフッ素濃度は相互に近似しており、統計学的有意差は全層にわたり認められなかった。この成績から、400 μm の深さまで研磨削除することにより個々の歯牙におけるエナメル質中のフッ素濃度の差はほとんど無視してよいと考えた。

2. エナメル質の脱灰条件と脱灰エナメル質の様相について

ヒト・エナメル質を用いて齲蝕様病巣 (Caries like lesion) を形成する方法について数多くの報告がある¹⁹⁻³¹⁾。それらの脱灰条件としては、pHは4.0~5.0、

脱灰期間は24時間～120日間とさまざまであり、酸の種類は乳酸 buffer と酸性ゼラチンゲルの2つのタイプに大別される。また、口腔内の唾液中のカルシウムイオン、リン酸イオンの代用としては、ハイドロキシアパタイトまたはMHDP (Methane hydroxydiphosphonate) の添加が一般的である。しかし、これらの脱灰条件は表層を削除研磨したエナメル質に対してのものではない。従って、本実験で用いた表層を削除研磨したエナメル質表面に実質欠損を伴うことのない程度の齲蝕様病巣 (Caries like lesion) を形成するには新たな pH と脱灰時間を決定する必要がある。これらの点については既報したように³²⁾、pH4.5で12時間の脱灰時間が最適であった。本実験に用いた脱灰液は、0.1M 乳酸溶液に3mM Ca, 1.8mM P が含まれるようにハイドロキシアパタイト (Ca/P モル比: 1.67) を加え、唾液ムチンの代用として1% CMC を添加したものをを用いたが、この条件下で脱灰を行うと、脱灰最深部が100 μ m 未満の比較的浅い脱灰部が得られた。脱灰エナメル質の様相は、Arends ら³³⁾ が述べている表層から均一に脱灰が起こった状態 (softened enamel) のものが多く認められたが、一部には表層下脱灰 (subsurface lesion) も認められた。

3. エナメル質表面からの深さならびにエナメル質のフッ素取り込み量の評価法について

エナメル質表面からの深さの評価法: エナメル質の表層から連続的に化学分析する方法としては、一般的に Weatherell ら³⁴⁾ の方法に準拠した酸エッチング法が用いられることが多い。しかし、本実験では分析の対象となるエナメル質が均一な健全エナメル質ではなく、かなりの程度に脱灰されたエナメル質や種々の程度に再石灰化されたエナメル質である。従って、一律にエナメル質の Ca 含有量を37%、エナメル質の比重を2.95としてエナメル質の深さを算出することができない。また、このようなエナメル質を酸エッチング法を用いて分析するのは Patterson ら³⁵⁾ が指摘しているように実際の脱灰深度は求められない。上述の理由により、本実験では Ikemi らの Abrasion biopsy technique を用いた。この方法は、エナメル質の深さを分析対象となったエナメル質試料片の分析値から直接求めるのではなく、計画的に同時に研磨削除されるハイドロキシアパタイトの Ca 量を分析することによって、間接的に求めようとするものである。

エナメル質のフッ素取り込み量の表し方: 再石灰化エナメル質中のフッ素量については、健全エナメル質のフッ素取り込み量の定量と同様にエナメル質重量に対する

フッ素重量濃度 (ppm) として表したものがほとんどである^{1,36-40)}。しかし、上述したように、本研究で対象としたエナメル質は脱灰、再石灰化の過程を経ており、その Ca 含有率、エナメル質比重は健全エナメル質と種々の程度に異なり、また、Microradiography を用いたミネラル量の測定からも理解されるようにその構造は粗と考えられる。従って、フッ素取り込み量を重量濃度として比較するよりも単位体積当りの絶対量として表したほうがフッ素量の分布を知る上でより妥当であると考えた。

4. 再石灰化の評価法について

再石灰化を評価する方法には、これまでに Microradiograph からミネラル量を換算したもの^{7,22,26,28,41-44)}、偏光顕微鏡による評価^{20,27,45)}、Microhardness test^{3,9,29,46-49)}、SEM像^{10,20,45,50)}、さらには分析化学的な評価が報告されている¹¹⁾。本実験では、エナメル質中のフッ素取り込み量の分布を表層から約10 μ m 単位で100 μ m まで明らかにし、これと再石灰化の程度とを関連づけて評価しようとしたため、化学分析による層ごとの Ca 量 (g/cm³)、ならびに Microradiograph から算出したミネラル量 (vol %) をもって、再石灰化の指標にした。しかし、Ca 量については、Table 4 に示したように群間の差がほとんど認められなかった。その理由は、再石灰化度を脱灰エナメル質に本来存在していた Ca 量と再石灰化によって取り込まれた Ca 量とを区別することなく、両者の和として評価したところに難点があったのかもしれない。従って本実験においては、化学分析による Ca 量をもって再石灰化の評価を行うことは、不適当と判断した。一方、Microradiography を用いる評価は、ミネラル量の変化についての感度が良好な成績であったため、再石灰化度の評価として採用した。

5. CMC の再石灰化に及ぼす効果について

ten Cate ら²⁹⁾ は 1.5mM Ca (NO₃)₂, 0.9mM KH₂PO₄, 150mM KCl, 20mM cacodylate buffer を含む pH7.0の再石灰化液にヒトの脱灰エナメル質を3週間浸漬した結果、再石灰化が発現することを確認している。本実験における C0F0 でも再石灰化像が認められたことから、*in vitro* で再石灰化液中に Ca, P が適量存在すれば、脱灰エナメル質において再石灰化の可能なことは確認された。しかし、C1F0 では再石灰化がほとんど認められなかったことから、フッ素が存在しない条件下における CMC は再石灰化に対して抑制的に働くことが示唆された。その理由として考えられることは、第1に CMC は高分子 (分子量50,000～120,000) であるため、脱灰エナメル質中に浸透しにくく、一種の

barrier となって Ca イオンがエナメル質中へ拡散するのを妨げている可能性が推察される。第2の理由としては、CMC 末端のカルボキシル基が再石灰化液中の Ca イオンをキレートしている可能性もある。本実験で用いた再石灰化液の Ca イオン濃度を Ca 電極(93-20型, オリオン社)を用いて測定したところ, C0F0 は 2.4mM, C1F0 は 1.4mM であった。すなわち CMC によって約40%の Ca イオンがキレートされていることになり, 再石灰化に利用される Ca イオンが不足していることになる。その結果, 再石灰化も不十分であったのではないかと考えた。

一方, 再石灰化液中にフッ素が存在する場合には, CMC の有無にかかわらず再石灰化像が認められた。この場合, CMC の存在はフッ素取り込み量を増大させ, 再石灰化を促進している成績が得られた。Vissink ら⁴⁹⁾ は, 1% CMC, 1.9ppm F を含む再石灰化液に浸漬した脱灰エナメル質の再硬化度が, 0% CMC, 1.9ppm F を含む再石灰化液に浸漬したものより高いことを報告しており, 本実験においても C1F3 が C0F3 より再石灰化度が高く, CMC はフッ素存在下では再石灰化を促進していることが確認された。

本研究において, CMC はフッ素の存在していない条件下では再石灰化を抑制し, フッ素存在下では再石灰化を促進する方向に働いているという結果が得られたのであるが, このことは, CMC がフッ素の存在していない条件下では Ca イオンの barrier となり, フッ素共存下では Ca イオンの barrier としての機能は緩和されると考えられる。Alhaique ら⁵¹⁾ はムチンを隔壁にした Ca イオンの拡散模型を用いてムチンの Ca イオン透過性について研究し, 10^{-4} M NaF (F : 1.9ppm) を含む Ca 溶液は NaF を含まない Ca 溶液よりも Ca イオンの透過性が高いと報告した。CMC は高分子でその末端にカルボキシル基を有している点で構造上ムチンと類似しており, 本研究において C1F0 では再石灰化がほとんど認められなかったのに C1F3 では顕著に再石灰化が生じたのは, CMC の Ca イオン透過性に及ぼす作用がフッ素の存在によって変わるのではないかと考えている。

6. 脱灰エナメル質へのフッ素取り込み量について

CMC のフッ素取り込みに対する影響について: C1F3 では表層約30 μ m までは約20,000 μ g/cm³ のフッ素取り込み量を示し, C0F3 に比較して約2倍のフッ素の取り込み量が認められた (Fig. 3)。CMC の存在下では何故にフッ素がエナメル質中に有意に多く取り込まれるかは不明であり, 今後更に検討する必要がある。

Intact, Demineralized, C0F0, C1F0 のフッ素取り込み量について: Demineralized は脱灰したにもかかわらず, そのフッ素量は減少せず, 統計学的有意差はないが Intact のフッ素量より高い傾向にある。脱灰によりエナメル質のフッ素量が減少しないのは, 本実験において脱灰液中のフッ素濃度が脱灰前後で 0.05 ppm と不変であったことから裏づけられる。すなわち, 本実験における程度の脱灰ではエナメル質からフッ素は溶出せず, エナメル質内に止まると考えてよい。Clarkson ら⁸⁹⁾ は人工的に脱灰したエナメル質白斑 (white spot enamel) のフッ素濃度は, 健全エナメル質フッ素濃度と比較して, 表層10 μ m では低いが高深層では逆に約2倍高く, 脱灰中に表層中のフッ素が深層へと移行した可能性がある」と指摘している。

C0F0, C1F0 においてフッ素量が, 約1,000 μ g/cm³ と Demineralized と比べて統計学的有意差はないが高い傾向にあった理由としては, pH の違いが考えられる。すなわち, Demineralized では脱灰液中のフッ素濃度が0.05ppm であっても pH 4.5であるために溶液中のフッ素がエナメル質中に取り込まれにくい条件にあり, 一方, C0F0, C1F0 では再石灰化液の pH が 7.0と高く, 脱灰液と同程度 (0.05ppm) の微量フッ素の存在下においても, ある程度エナメル質中に取り込まれたと考えている。

7. 再石灰化エナメル質の質的検討

Ca/P 比から再石灰化ミネラルの質的評価をすることは, 前述のとおり有意差を認めることができなかったことから困難であった。酸抵抗性試験においては, 最も酸抵抗性の高かったのが C1F3 の再石灰化エナメル質であったが, その理由は C1F3 の再石灰化エナメル質中に取り込まれた豊富なフッ素量と関係が深いと考える。すなわち, C1F3 の再石灰化エナメル質は fluoroapatite や fluoridated hydroxyapatite 等の hydroxyapatite より酸抵抗性の高いミネラルによって構成されている可能性がある。一方, C0F3 は深層までは十分にフッ素イオン及び Ca イオンが取り込まれていないが, 表層20 μ m 付近まではフッ素に富んだ耐酸性ミネラルによる再石灰化が起っていると考える。C0F0 の再石灰化エナメル質のミネラル量は C1F3 と同等であるが (Fig. 8, 11), 強酸溶液への浸漬による酸抵抗性試験後には両群間に差が認められるようになることは, C0F0 と C1F3 で再石灰化エナメル質のミネラルが質的に異なることを示唆している成績であろうと考えている。

総 括

脱灰エナメル質のフッ素取り込みと再石灰化に及ぼす CMC の影響を *in vitro* で検討した結果、次の知見が得られた。

- 1) CMC は、フッ素と共存した場合に、脱灰エナメル質へのフッ素の取り込み量を有意に増大させると思われた。
- 2) 再石灰化が C0F0 で認められ、C1F0 でほとんど認められなかったことから、CMC は、フッ素が存在しない条件下では再石灰化に対して抑制的に働いていると思われた。
- 3) C0F3, C1F3 の両群に再石灰化が認められたが C1F3 の再石灰化度が高く、CMC はフッ素と共存した場合には再石灰化を促進していると思われた。
- 4) C0F0 と C1F3 の再石灰化エナメル質について、Microradiography により評価したミネラル量はほぼ同等であるが、再石灰化エナメル質の酸抵抗性試験の結果では、C1F3 の酸抵抗性が強く、C0F0 が弱かったことから、両群の再石灰化エナメル質に質的な差があると思われた。

謝 辞

稿を終えるにあたり、本研究に対し終始懇篤なる御指導と御校閲を賜りました長崎大学歯学部予防歯科学講座 高木興氏教授、並びに東北大学歯学部予防歯科学教室 島田義弘教授に深甚なる謝意を表します。

また、本研究の遂行にあたり、種々な御教示、御助言を賜りました長崎大学歯学部予防歯科学講座 飯島洋一助教授に深く感謝いたします。

さらに、フッ素定量法につきまして御教示いただきました東北大学歯学部予防歯科学教室 浅野淑子博士の御指導に厚くお礼申し上げます。

併せて、御協力下さいました長崎大学歯学部予防歯科学講座の皆様に感謝いたします。

文 献

- 1) Crall, J. J., Silverstone, L. M., Clarkson, B. H., Wefel, J. S. and Wei, S. H. Y.: Fluoride uptake and *in vitro* caries-like lesion formation in enamel after two-step topical fluoride applications, *Caries Res.*, **16**; 162, 1982.
- 2) Dijkman, A. G., Tak, J. and Arends, J.: Fluoride deposited by topical applications in enamel, *Caries Res.*, **16**; 147, 1982.
- 3) Featherstone, J. D. B., Cutress, T. W., Rodgers, B. E. and Dennison, P. J.: Remineralization of artificial caries-like lesions *in vivo* by a self-administered mouthrinse or paste, *Caries Res.*, **16**; 235, 1982.
- 4) Retief, D. H., Bradley, E. L., Holbrook, M. and Switzer, P.: Enamel fluoride uptake, distribution and retention from topical fluoride agents, *Caries Res.*, **17**; 44, 1983.
- 5) Liisa Seppä and Luoma, H.: Fluoride content and calcium release from enamel, in relation to rat caries following the application of fluoride varnishes, *Caries Res.*, **17**; 258, 1983.
- 6) Dijkman, A. G., de Boer, P. and Arends, J.: *In vivo* investigation on the fluoride content in and on human enamel after topical applications, *Caries Res.*, **17**; 392, 1983.
- 7) Mellberg, J. R. and Mallon, D. E.: Acceleration of remineralization *in vitro* by sodium monofluorophosphate and sodium fluoride, *J. Dent. Res.*, **63**; 1130, 1984.
- 8) Reintsema, H., Schuthof, J. and Arends, J.: An *in vivo* investigation of the fluoride uptake in partially demineralized human enamel from several different dentifrices, *J. Dent. Res.*, **64**; 19, 1985.
- 9) Corpron, R. E., More, F. G., Clark, J. W., Korytnicki, D. and Kowalski, C. J.: *In vivo* remineralization of artificial enamel lesions by a fluoride dentifrice or mouthrinse, *Caries Res.*, **20**; 48, 1986.
- 10) Möller, H. and Ulla Schröder: Early natural subsurface caries, *Caries Res.*, **20**; 97, 1986.
- 11) Ikemi, T. and Koulourides, T.: Abrasion biopsy in studies of mineral density of experimental enamel lesions, *J. Dent. Res.*, **67**; 508, 1988.
- 12) Angmar, B., Carlström, D. and Glas, J. E.: Studies on the ultrastructure of dental enamel VI. the mineralization of normal human enamel, *J. Ultra. Res.*, **8**; 12, 1963.
- 13) Winer, B. J.: Statistical principles in experimental design, Mc Graw-Hill Kogakusha, LTD, Tokyo, 1971, p. 149.
- 14) Weatherell, J. A., Robinson, C. and Halls-worth, A. S.: Changes in the fluoride concentration of the labial enamel surface with age, *Caries Res.*, **6**; 312, 1972.
- 15) Aasenden, R.: Post-eruptive changes in the fluoride concentrations of human tooth surface enamel, *Arch. Oral Biol.*, **20**; 359, 1975.
- 16) Jones, K. W., Annegarn, H. J. and Sellsch-

- op, J. P. F.: Charged particle analysis of fluorine distributions in the surface of human tooth enamel, *Arch. Oral Biol.*, **23**; 31, 1978.
- 17) Richards, A., Joost Larsen, M., Fejerskov, O. and Thylstrup, A.: Fluoride content of buccal surface enamel and its relation to dental caries in children, *Arch. Oral Biol.*, **22**; 425, 1977.
 - 18) Koulourides, N. and Walker, A.: Fluoride distribution in the facial surfaces of maxillary central incisors, *J. Oral Path.*, **8**; 179, 1979.
 - 19) Groeneveld, A., Purdell-lewis D. J. and Arends, J.: Influence of the mineral content of enamel on caries-like lesions produced in hydroxyethylcellulose buffer solutions, *Caries Res.*, **9**; 127, 1975.
 - 20) Silverstone, L. M., Wefel, J. S., Zimmermann, B. F., Clarkson B. H. and Featherstone, M. J.: Remineralization of natural and artificial lesions in human dental enamel *in vitro*, *Caries Res.*, **15**; 138, 1981.
 - 21) Tyler, J. E. and Poole, D. F. G.: Uptake of fluoride by human surface enamel from ammonium bifluoride and consequent reduction in the penetration *in vitro* by caries-like lesions, *Archs. Oral Biol.*, **29**; 971, 1984.
 - 22) Mellberg, J. R. and Mallon, D. E.: Soluble calcium-enhanced remineralization of artificial caries lesions with monofluorophosphate, *Caries Res.*, **18**; 416, 1984.
 - 23) Featherstone, J. D. B. and Rosenberg, H.: Lipid effect of the progress of artificial carious lesions in dental enamel, *Caries Res.*, **18**; 52, 1984.
 - 24) Hicks, M. J. and Silverstone, L. M.: Acid-etching of caries-like lesions of enamel: a polarized light microscopic study, *Caries Res.*, **18**; 315, 1984.
 - 25) Mellberg, J. R. and Chomicki, W. G.: Lack of effect of sodium lauryl sulfate of fluoride uptake by artificial caries lesions *in vivo*, *Caries Res.*, **18**; 478, 1984.
 - 26) Mellberg, J. R., Chomicki, W. G., Mallon, D. E. and L. A. Castrovence.: Remineralization *in vivo* of artificial caries lesions by a monofluorophosphate dentifrice, *Caries Res.*, **19**; 126, 1985.
 - 27) Hicks, M. J., Flaitz, C. M. and Silverstone, L. M.: Initiation and progression of caries-like lesions of enamel: effect of periodic treatment with synthetic saliva and sodium fluoride, *Caries Res.*, **19**; 481, 1985.
 - 28) Klinger, H. G. and Wiedemann, W.: A method for radiographic longitudinal study of mineral content during *in vitro* demineralization and remineralization of human tooth enamel, *Archs. Oral Biol.*, **30**; 373, 1985.
 - 29) ten Cate, J. M., Shariati, M. and Featherstone, J. D. B.: Enhancement of (salivary) remineralization by 'Dipping' solutions, *Caries Res.*, **19**; 335, 1985.
 - 30) Featherstone, J. D. B., Holmen, L. Thylstrup, A., Fredebo, L. and Shariati, M.: Chemical and histological changes during development of artificial caries, *Caries Res.*, **19**; 1, 1985.
 - 31) Sato, K. and Yamamoto, H.: Studies on the formation of laminations within artificial caries-like lesions of enamel, *Caries Res.*, **20**; 40, 1986.
 - 32) 好川 正, 川崎浩二, 飯島洋一, 高木興氏: エナメル質の脱灰におよぼす0.1M 乳酸の pH ならびに作用時間の影響, *口腔衛生会誌*, **38**; 470, 1988.
 - 33) Arends, J. and ten Cate, J. M.: Tooth enamel remineralization, *J. Crys. Growth*, **53**; 135, 1981.
 - 34) Weatherell, J. A. and Hargreaves, J. A.: The micro-sampling of enamel in thin layers by means of strong acids, *Arch. Oral Biol.*, **10**; 139, 1965.
 - 35) Patterson, C. M., Weatherell, J. A. Robinson, C.: Sampling of porous hard tissues *in vitro* by acid etching, *Caries Res.*, **18**; 231, 1984.
 - 36) Mellberg, J. R. and Chomicki, W. G.: Effect of soluble calcium on fluoride uptake by enamel from sodium monofluorophosphate, *J. Dent. Res.*, **61**; 1394, 1982.
 - 37) Mellberg, J. R. and Chomicki, W. G.: Fluoride uptake by artificial caries lesions from fluoride dentifrices *in vivo*, *J. Dent. Res.*, **62**; 540, 1983.
 - 38) Mellberg, J. R. and Chomicki, W. G.: Effect of soluble calcium on fluoride uptake by artificial caries lesions *in vivo*, *Caries Res.*, **19**; 122, 1985.
 - 39) Clarkson, B. H., Wefel, J. S. and Silverstone, L. M.: Redistribution of enamel fluoride during white spot lesion formation: an *in vitro* study on human dental enamel, *Caries Res.*, **15**; 158, 1981.
 - 40) White, D. J.: Reactivity of fluoride dentifrices with artificial caries, *Caries Res.*, **22**; 27, 1988.
 - 41) ten Cate, J. M. and Rempt, H. E.: Comparison of the *in vivo* effect of a 0 and 1,500 ppm F MFP toothpaste on fluoride uptake,

- acid resistance and lesion remineralization, *Caries Res.*, **20** ; 193, 1986.
- 42) Dijkman, A. G., Schuthof, J. and Arends, J.: *In vivo* remineralization of plaque-induced initial enamel lesions—A microradiographic investigation, *Caries Res.*, **20** ; 202, 1986.
 - 43) Creanor, S. L., Strang, R., Telfer, S., MacDonald, I., Smith, M. J. and Stephen, K. W.: In situ appliance for the investigation of enamel de-and remineralization, *Caries Res.*, **20** ; 385, 1986.
 - 44) ten Cate, J. M., Timmer, K., Shariati M. and J. D. B. Featherstone: Effect of timing of fluoride treatment on enamel de-and remineralization *in vitro*: A pH-cycling study, *Caries Res.*, **22** ; 20, 1988.
 - 45) John Hicks M.: Acid-etching of caries-like lesions of enamel treated with acidulated phosphate fluoride: an *in vitro* study, *J. Dent. Child.*, *Sept.-Octo.* ; 346, 1986.
 - 46) Vissink, A., J.'s-Gravenmade, E., Gelhard, T. B. F. M., Panders, A. K. and Franken, M. H.: Rehardening properties of mucin-or CMC-containing saliva substitutes on softened human enamel, *Caries Res.*, **19** ; 212, 1985.
 - 47) Smits, M. T. and Arends, J.: Influence of xylitol-and/or fluoride-containing toothpastes on the remineralization of surface softened enamel defects *in vivo*, *Caries Res.*, **19** ; 528, 1985.
 - 48) Clark, J. W., More, F. G., Corpron, R. E., Korytnicki, D. and Kowalski C. J.: Effects on artificial enamel lesions *in vivo* by exposure to NaF lozenges, *Caries Res.*, **20** ; 465, 1986.
 - 49) Goorhuis, J. and Purdell-Lewis, D. J.: 0.25% and 0.4% amine fluoride gel for weekly topical application, *Caries Res.*, **20** ; 458, 1986.
 - 50) ten Cate, J. M. and Arends, J.: Remineralization of artificial enamel lesions *in vitro*, *Caries Res.*, **11** ; 277, 1977.
 - 51) Alhaique, F., Ricciari, F. M., Santucci, E. and Riccioni, G.: Effect of fluoride on diffusion of calcium in mucin: A possible mechanism affecting remineralization of carious enamel, *Caries Res.*, **20** ; 437, 1986.