原 著

フッ化アンモニウム溶液のヒトエナメル質および ラット実験う蝕におよぼす影響について*

Effect of Ammonium Fluoride on Human Enamel and Rat Experimental Caries

梶 田 秀 行**

Hideyuki KAJITA **

Received July 16, 1990; accepted July 31, 1990

Abstract: The purpose of this study was to evaluate the possibility of clinical use for fluoride topical application of dilute ammonium fluoride solution, in which fluoride concentration was 1/3 times lower than that of APF solution.

Experiments were performed *in vitro* and *in vivo* using a solution of phosphoric acid-acidified NH_4F (3000 ppm of F^- , pH 4.4) and APF (9000 ppm of F^- , pH 3.4). In the experiments on intact enamel, fluoride uptake, acid solubility, and morphological changes in enamel blocks following topical treatment (for 60 min. at 37°C) with fluoride solutions were studied by chemical analysis, scanning electron microscopy, and electron probe X-ray microanalysis. In experiments on rats, the cariostatic effect of ammonium fluoride solution was investigated. Eighteen-day-old male Sprague-Dawley rats were infected with *Streptococcus mutans* GS-5 for three days and fed a cariogenic diet (Diet 2000 No. 3) during the experimental period. Experimental groups were given topical application of each fluoride solution twice a week. Caries prevalence was examined using a standardized photograph ($\times 50$) of the rat jaw, and then caries scores (caries incidence and caries extent) were calculated from these data.

The fluoride uptake of NH_4F -treated enamel surface was a few times higher than that of APF-treated enamel. In the electron probe X-ray microanalysis, the same results were obtained. The acid solubility test proved the acquisition of acid resistance by the enamel. SEM images showed heavy deposits of crystalline material on NH_4F -treated enamel surface, whereas the deposit was homogeneous in APF-treated enamel.

Both caries incidence and caries extent were clearly reduced, and significantly lower values were found in the fluoride groups than in the control group. The fluoride groups had very few serious grade lesions, whereas the control group had many collapsible lesions.

It is concluded that the topical application of dilute NH_4F solution leads to uptake of fluoride into

* 本論文の要旨は平成2年2月17日第72回岐阜歯科学会例会において発表した。

** 朝日大学歯学部口腔衛生学教室 (主任: 可児瑞夫教授)

** *Department of Preventive Dentistry, Asahi University School of Dentistry (Director: Prof. Mizuo KANI)*

the enamel surface and proves the acquisition of acid resistance by enamel *in vitro*, and is effective in reducing caries incidence and inhibiting caries progression in rat experimental caries *in vivo*. A dilute NH_4F solution can be expected to have the same effect as APF in topical application for caries prevention.

索引用語：フッ化アンモニウム，フッ化物歯面塗布，ラットう蝕，フッ素取り込み，酸溶解性

Key words: Ammonium fluoride, Fluoride topical application, Rat caries, Fluoride uptake, Acid solubility

緒 言

現在，う蝕予防の目的で一般的に用いられているフッ化物局所応用法としては，フッ化物歯面塗布法，フッ化物洗口法およびフッ化物配合歯磨剤の使用などがあげられる¹⁻⁹⁾。

フッ化物洗口法およびフッ化物配合歯磨剤は低濃度のフッ素を使用するため安全性が高く，実施方法が簡便であり，また専門家の手をわずらわせるという繁雑さがないという利点があるが，一方では，長期間にわたり毎日実施しなければならないという負担がある。その点，フッ化物歯面塗布法は専門家の手をわずらわせるという繁雑さはあるが，年1回の塗布で効果が期待されるので，小児にとっては負担の軽い方法であり，フッ化物歯面塗布法の普及は公衆歯科保健上重要であると思われる。

フッ化物歯面塗布法は，通常，一般法ではフッ化物溶液の塗布時間は4分間で，年1回ないし2回実施するようになっている。この方法は塗布時間が長いので，幼児や児童にとっては負担が大きく，また，集団に対する塗布法の普及を困難にする要因ともなっている。この塗布時間を短縮できれば，効率よく多人数に応用できることとなり，さらに，フッ素濃度を低下させることができれば，安全性も向上することから，フッ化物歯面塗布法の普及の拡大にも役立つものと考えられる。

現在，フッ化物歯面塗布法に用いられているリン酸酸性フッ化ナトリウム溶液（APF 溶液）は，フッ素濃度が9,000ppmと高く，また溶液の pH は3.4であり，安全性の面ではまだ改善の余地が残されている。

低濃度のフッ化物溶液をエナメル質に作用させると，フッ素はエナメル質中に取り込まれフルオロアパタイトあるいはハイドロキシフルオロアパタイトとして安定な形で存在する¹⁰⁻¹⁴⁾。フルオロアパタイトの生成は，エナメル質アパタイトが難溶性で耐酸性の安定した結晶に移行することを意味しており，歯エナメル質にう蝕抵抗性をもたらすためのフッ素のう蝕予防機序として，重要な

ものである。

一方，フッ化物歯面塗布法は高濃度のフッ化物溶液を使用する。フッ素濃度が高い場合はエナメル質との反応で，表層に多量のフッ化カルシウム（ CaF_2 ）を生成し，塗布直後のエナメル質へのフッ素取り込みは非常に大きい。また生成した CaF_2 は比較的早期に流出し，低濃度のフッ素供給源となり歯質と反応してフルオロアパタイトを生成することにより歯質を安定化させる¹⁵⁻¹⁹⁾。

フッ化アンモニウム溶液をエナメル質に作用させると，エナメル質へのフッ素取り込み量がフッ化ナトリウム溶液作用時より高く²⁰⁻²⁴⁾，エナメル質表面に結晶性の高い顆粒状の CaF_2 の沈着が認められている^{17,20)}。また，この CaF_2 はフッ化ナトリウム溶液作用により生成される CaF_2 より水に溶出しにくいことも認められている^{20,24)}。さらにフッ化アンモニウム溶液（pH 4.4）は人工う蝕形成に対しても APF 溶液（pH 3.2）と同様に抑制効果のあることが報告されている²⁵⁾。

本教室の山村²⁶⁾はリン酸酸性フッ化アンモニウム溶液（9,000ppm F^- ，pH 3.4）のエナメル質に及ぼす影響について APF 溶液と比較検討したところ，同フッ素濃度，同 pH の溶液ではエナメル質へのフッ素取り込み量が APF 溶液作用に比べ非常に高く，また CaF_2 生成量でみるかぎり APF 溶液の1/2以下の時間で APF 溶液と同様の効果が得られることを示唆している。また加藤²⁷⁾は APF 溶液の1/3のフッ素濃度のリン酸酸性フッ化アンモニウム溶液をエナメル質粉末に作用させ，エナメル質中に多量の CaF_2 の生成を認めている。さらに新谷²⁸⁾は APF 溶液と同 pH でフッ素濃度を1/5にしたフッ化アンモニウム溶液をエナメル質粉末に作用させ，フッ素取り込み量， CaF_2 生成およびエナメル質アパタイトの結晶性，さらに耐酸性効果について比較検討し，両者の間に同程度の成績を得ている。

本研究では，フッ化アンモニウム溶液のフッ化物歯面塗布液としての有用性と臨床応用への可能性を追求する目的で，溶液のフッ素濃度を APF 溶液の1/3の3,000

ppm とし、pH を4.4に調整したリン酸酸性フッ化アンモニウム溶液について、実験1として intact enamel を用いてフッ素取り込み量の測定、酸溶解性試験、エナメル質表面の観察を行い、実験2としてラットを用いた動物実験う蝕の抑制効果について検討を行った。

材料および方法

実験1：intact enamel を用いて

実験材料には抜去永久歯（上顎第一小臼歯）18歯を用いた。これらの歯をロビンソンブラシを用いて清掃し、エナメル質の頬面および舌面が実験歯面となるように長軸方向に2分割した。次いで超音波洗浄を行った後、エナメル質表面を露出させ他の面は wax で被覆し実験試料とした。

作用溶液は半井化学薬品社製フッ化アンモニウムを用いて157.9 mM NH_4F 溶液（フッ素濃度理論値3,000 ppm, pH 4.4）および MERCK 社製フッ化ナトリウムを用いて APF 溶液（フッ素濃度理論値9,000ppm, pH 3.4）を調製し使用した。溶液の pH は正リン酸を用いて調整した。また、対照群には精製水を用いた。

エナメル片に各溶液を37°C で60分間作用させ、作用後精製水にて十分水洗を行った後、直径2.5mm の window を作製した。

(1) フッ素取り込み量の測定

試料を0.5M 過塩素酸溶液2 ml 中に懸垂し、15、40、40および60秒間連続的に振盪脱灰を行い²⁹⁾、window から溶出するフッ素量とカルシウム量を測定した。

フッ素の測定は McCann の方法³⁰⁾に準じて上記脱灰液0.5ml に0.2ppm F^- となるように NaF 溶液を添加した0.5M クエン酸ナトリウム溶液2 ml を加え、イオン電極法により行った。測定には ORION 社製イオナライザ901型ならびにフッ素複合電極96-09型を用いた。カルシウムの定量は原子吸光光度法により行った。測定には日立偏光ゼーマン原子吸光光度計（HITACHI Polarized Zeeman 180-80形）を用い、リンの妨害除去のため硝酸ランタン（ランタン終濃度2000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ）を添加した。脱灰エナメル質の表層からの深さは、エナメル質のカルシウム含有量を36.0%、比重を2.95³¹⁾としてこれらの測定値から算出した。

(2) 酸溶解性試験

0.4M 酢酸-酢酸ナトリウム緩衝液（pH 4.0）20ml 中に試料を懸垂し、37°C 恒温槽中で180分間振盪脱灰して酸溶解性試験を行った。その間、正確に30分ごとに緩衝液2 ml を採取し、溶出するリン量を測定した。

リンの定量は、*p*-aminodiphenylamine monohydrochloride を用いる Dryer らの方法³²⁾に従って、分光光度計（HITACHI 124型）を用いて波長350nm にて比色定量を行った。各脱灰液2 ml 中の溶出リン量からそれぞれの脱灰時間までに溶出した総リン量を算出し、エナメル質の酸抵抗性の指標とした。

(3) 走査電子顕微鏡観察

フッ化物溶液作用エナメル質表面および、作用面の酸抵抗像を観察する目的で、薬液作用直後および酸溶解性試験後の切片を試料とした。各試料は水洗乾燥、上昇アルコール脱水ののち、イオンスパッタ装置により直流1.2kV, 5mA にて6分間のゴールド蒸着を行い、走査電子顕微鏡（JEOL, JSM-35C）を用いて加速電圧15 kV, 倍率3,000倍でエナメル質表面の観察を行った。

(4) X線マイクロアナライザ分析

フッ化物溶液作用後および酸溶解性試験後のエナメル質中の各元素の分布状態を検索するためにX線マイクロアナライザによる線分析を行った。試料は通法に従い上昇アルコール脱水を行い、スチレンモノマー、ポリエステル樹脂（BPS レジン、京都科学標本）に浸漬の後、ポリエステル樹脂包埋を行った。硬化後エナメル質表面に垂直に切断し、断面を鏡面研磨した。研磨切片は導電性接着剤（JEOL, ドータイト）を用いて試料台に固定し、真空蒸着装置（SHIMADZU, EA-250GP）にて100~150Å の厚さにカーボン蒸着をほどこした。次いで Table 1 に示す測定条件にて、X線マイクロアナライザ（SHIMADZU, EMX-SM）によりカルシウム、リン、フッ素の線分析を行った。

Table 1 Experimental conditions of electron probe X-ray microanalysis

Accelerating voltage	20kV	
Specimen current	0.05 μA	
Take off angle	52.5°	
Beam diameter	2.5 μm	
Scanning speed	20 $\mu\text{m}/\text{min}$	
Chart speed	20mm/min	
Characteristic X-rays	Analysing crystal	Count full scale
CaK α	LiF	1 $\times 10^4$
PK α	ADP	1 $\times 10^4$
FK α	RAP	100, 500

実験2：ラットを用いた動物実験

1) 実験材料

(1) 実験動物

実験には同ファミリー、15日齢のSD系雄ラット180匹を使用した。これらのラットは室温 $22 \pm 2^\circ\text{C}$ 、湿度 $50 \pm 5\%$ の一定環境下で飼育した。

(2) 飼料

普通粉末飼料 CE-2 (日本クレア社製) およびう蝕誘発性飼料 Diet 2000 No. 3³⁹⁾ (日本クレア社製) を用いた。すなわち、実験開始時よりラットの離乳時 (20日齢) までは CE-2 を、以後実験終了時まで Diet 2000 No. 3 を与え飼育した。なお飼料および飲料水は自由摂取とした。

(3) 接種菌および接種菌液

接種菌は本学口腔細菌学教室より分与を受けた *Streptococcus mutans* GS-5 株³⁴⁾ である。接種菌液の調製は可見児の方法³⁵⁾ に従った。すなわち、0.5% Yeast Extract (Difco 社) を加えた 1,000 ml の Trypticase Soy Broth (BBL 社) で接種菌を16時間培養し、その培養菌液を $10,000 \times g$ にて10分間遠心分離することにより集菌し、生理食塩水で3回洗浄後、20ml の滅菌生理食塩水に懸濁したものを用いた。この懸濁液中には比濁法によると 3×10^7 個の菌が存在する。

(4) 塗布液

フッ化物歯面塗布液は実験1と同様に 157.9 mM N-HF 溶液 (フッ素濃度理論値 3,000 ppm, pH 4.4) および APF 溶液 (フッ素濃度理論値 9,000 ppm, pH 3.4) を使用した。対照群には精製水を用いた。

2) 実験方法

実験スケジュールは Fig. 1 に示すとおりである。なお、う蝕の評価は30, 37, 44および51日齢に行うこととした。

(1) 菌の接種および定着状態

18日齢より3日間毎日ラット口腔内に接種菌液 0.1 ml を滴下接種するとともに、その間の飲料水中にも菌液 1 ml/200 ml を混入し菌の接種を行った。

Rat age (day)	15	23	30	37	44	51
Diet	CE-2		Diet 2000 No.3			
Inoculation of <i>S.mutans</i>	└ (18,19,20)					
Recovery test	16	once a week				51
Topical application		21	twice a week			50
Body weight check	15	twice a week				51
Sacrifice			30	37	44	51

Fig. 1 Schedule of rat experimental caries

ラット口腔内の接種菌の定着状態は菌接種後週1回の割合で観察した。すなわちラットの臼歯を綿棒で清拭したものを試料とし、それを Mitis Salivarius Agar (Difco 社) に Sucrose が最終濃度20%となるように、さらにバシトラシンを0.25単位/ml 添加³⁶⁾した MSB20S 培地に接種し、 37°C にて2日間嫌氣的に培養を行い、コロニーの有無を観察した。なお、菌接種前の口腔内細菌叢の状態を観察するため16日齢にも同操作を行った。

(2) 歯面塗布

ラットは60匹ずつ3群に分けてそれぞれ NH₄F 溶液塗布群 (以下 NH₄F 群)、APF 溶液塗布群 (以下 APF 群) ならびに精製水塗布群 (以下対照群) とした。

薬液塗布は菌接種後週2回の割合で行った。したがって30, 37, 44および51日齢では塗布回数はそれぞれ4, 6, 8, および10回となる。塗布方法はラットを非麻酔下で強制開口させ、薬液をしみ込ませた綿球を用いて直接ラットの上下臼歯部に塗布を行った。また、塗布後30分間は飼料および飲料水の供給を絶った。

(3) う蝕の評価法

実験期間終了後のラットは直ちにエーテル麻酔下で屠殺後断頭し、10%ホルマリン溶液で固定後、軟組織を除去して上下顎骨をとり出しう蝕の観察を行った。

う蝕の評価は従来より当教室で実施している方法³⁷⁾ に従った。すなわち Fig. 2 に示すように、ラット

Fig. 2 Caries score chart of rat molars

Table 2 Scoring of rat caries lesions

Grade

- 0 : Non caries
- 1 : Subsurface lesion
- 2 : Enamel lesion
- 3 : Lesion with dentinal involvement
- 4 : Lesion penetrated to pulp
- 5 : Destruction of cusp

臼歯咬合面裂溝部のう蝕好発部位を上顎10unit, 下顎 12 unit と定め, 各部位に発生するう蝕の進行状態を Table 2 に示す 5 段階に分け, 顕微鏡写真撮影装置 (MICROFLEX, UFX-II, Nikon) を用いカラー写真撮影を行った。

なお, ラットの第3臼歯の萌出は33日齢前後であるため, 30日齢群では第1, 第2臼歯のみのう蝕診査を行った。したがって30日齢群では上顎 8 unit, 下顎10unit が判定対象である。

う蝕の診査は写真上で NH_4F 群, APF 群および対照群が明らかでない状態にして, 各 unit のう蝕の有無ならびにう蝕 grade の判定を行った。この成績から各日齢におけるう蝕の発生状況 (caries incidence), 進行状態 (caries extent) およびう蝕罹患程度 (caries grade) の割合を算出して比較検討を行った。群間の有意差検定は t-test を用いた。

成 績

実験1: intact enamel を用いて

(1) フッ素取り込み量の測定

フッ化物溶液作用群, および対照群の第1層から第4層までのフッ素量の測定値を Fig. 3 および Table 3 に示した。

NH_4F 群は APF 群と比べフッ素取り込み量が非常に高い値であった。すなわち, APF 群第1層の4.94 μm の深さで8,684ppm であったのに対し, NH_4F 群では, 表層から0.27 μm の第1層で63,499ppm, 8.58 μm の第2層でも26,936ppm のフッ素取り込み量を示した。また, NH_4F 群は0.5M 過塩素酸に対して耐酸性が高く, 脱灰深さは第4層までの155秒間で APF 群および対照群のそれぞれ1/3, 1/4であった。

(2) 酸溶解性試験

Window method を用い, 直径2.5mm の window から0.4M 酢酸-酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 4.0) 20

Fig. 3 Fluoride concentration in human enamel treated with fluoride solutions

ml 中に溶出したリン量を経時的に測定し, 酸抵抗性の指標とした (Fig. 4, Table 4)。

フッ化物溶液作用群は対照群に比較していずれもリンの溶出が少なく, 特に NH_4F 群では高い酸溶解性の抑制が認められた。また, 対照群とフッ化物溶液作用群の溶出リン量の比から NH_4F 群と APF 群の耐酸性を比較すると, APF 群では経時変化が少なく, 一貫して2~3倍の耐酸性を示したが, NH_4F 群では脱灰初期の30分後, 60分後において耐酸性が高く, 対照群の約12倍, APF 群の約4倍の値を示した。また経時的に耐酸性の低下は認められるが180分後でも対照群の約4.5倍,

Table 3 Mean fluoride concentration in human enamel treated with fluoride solutions

layer	NH_4F		APF		control	
	depth(μm)	F^- (ppm)	depth(μm)	F^- (ppm)	depth(μm)	F^- (ppm)
1	0.27	63499	4.94	8684	15.79	1675
2	8.58	26936	47.80	3417	86.27	581
3	26.21	8387	122.44	1298	176.63	256
4	75.90	3838	245.84	303	317.54	74

Fig. 4 Phosphorus released into 0.4 M acetate buffer (pH 4.0)

Table 4 Amount of phosphorus released into 0.4M acetate buffer (pH 4.0)

time(min)	NH ₄ F	APF	control
30	1.58	7.18	19.91
60	1.91	9.20	24.22
90	3.25	13.22	29.52
120	5.28	15.40	33.65
150	8.03	16.81	37.87
180	9.49	18.77	42.19

(μg/20ml)

APF 群の約 2 倍の値であった (Fig. 5)。

(3) 走査電子顕微鏡観察

フッ化物溶液作用直後および酸溶解性試験後のエナメル質表面の SEM 観察を行った (Fig. 6)。対照群の作用直後の SEM 像ではゆるやかな凹凸を示す周波条の像が観察されたが、APF 溶液作用直後のエナメル表面は CaF₂ と思われる顆粒状の生成物が沈着していた。一方、NH₄F 溶液作用直後の SEM 像では表面は生成物の厚い層で覆われており、APF 溶液作用で観察された像とは異なり、細かい粒子が緻密に重なりあった像が認めら

Fig. 5 Acquisition of acid resistance by human enamel with fluoride solutions

れた。

酸溶解性試験後のエナメル質表面の SEM 像では対照群は明らかな脱灰像を示した。APF 群では耐酸性を示す像が観察されたが、NH₄F 群では顆粒状沈着物の残留が認められ、APF 群より高い酸抵抗像が確認された。

(4) X線マイクロアナライザ分析

フッ化物溶液作用直後および酸溶解性試験後のエナメル質中のカルシウム、リン、フッ素の分布状態については EPMA による線分析を行った (Fig. 7)。

作用直後では対照群はカルシウム、リンが表層から内層にわたって均一な分布状態を示し、フッ素のピークは認められなかった。APF 群ではカルシウム、リンは対照群と比べ差異は認められなかったが、フッ素では FKα 線が表層から 10μm の深さで高いピークを示し、約 30μm の深さまでフッ素が取り込まれていることが示された。NH₄F 群ではエナメル質表層約 10μm に FKα 線と CaKα 線の高いピークが出現し、同部位で PKα 線のピークの低下が認められた。また、NH₄F 群の FKα 線の count full scale は APF 群の 5 倍であることからみて、エナメル質へのフッ素取り込みは NH₄F 群の方が APF 群より数倍大きいことが示された。

酸溶解性試験後の試料では対照群、APF 群ともに CaKα 線、PKα 線の低下が認められ脱灰像が観察されたが、NH₄F 群は最表層にフッ素のピークが認められ、また表層から数 10μm の深さまでフッ素が浸透している像が示された。さらに表層下 30μm の深さの所では CaKα 線、PKα 線が低下し、脱灰像が観察された。

実験 2 : ラットを用いた動物実験

(1) う蝕発生状況 (caries incidence)

Caries incidence はう蝕発生 unit 数で示した (Fig. 8, Table 5)。

Fig. 6 SEM images of enamel surface, * AST: acid solubility test

対照群は30日齢で上下18unit 中 5.7 ± 2.6 unit, 37, 44, 51日齢で 22 unit 中それぞれ 11.0 ± 3.2 unit, 19.4 ± 2.0 unit, 20.7 ± 1.1 unit と, 44, 51日齢ではほとんどのunit でう蝕発生が認められた。

NH_4F 群では30, 37, 44, 51日齢でそれぞれ, 4.3 ± 2.9 unit, 9.3 ± 2.6 unit, 18.5 ± 1.6 unit, 18.5 ± 1.8 unit とう蝕の発生は抑制され, 51日齢では対照群に比べ危険

率0.1%以下で統計的に有意の差でう蝕発生が抑制された。

一方 APF 群では44日齢まではう蝕発生が著しく抑制されており, 30日齢では 18 unit 中わずかに 2.1 ± 1.6 unit の発生を認めたにすぎなかった。また44日齢では 15.4 ± 4.1 unit と NH_4F 群と比較しても危険率5%以下で発生抑制がみられた。

Fig. 7 Distribution patterns of Ca, P, and F in enamel revealed by EPMA

またう蝕罹患率（う蝕罹患 unit 率）は対照群では37日齢ですでに50.0%であり、51日齢では94.2%を示した。 NH_4F 群では、44日齢から51日齢でう蝕発生が抑制

されており、ともに84.2%を示した。APF 群ではほぼ直線的に罹患率は増加しており51日齢では NH_4F 群以上の罹患率を示した（Table 6）。

Table 5 Caries incidence scores in each group

		maxilla	mandible	total
30-day-age	NH ₄ F	1.5±1.5	2.8±2.0	4.3±2.9
	APF	0.3±0.7	1.8±1.6	2.1±1.6
	control	1.8±1.6	3.9±1.6	5.7±2.6
37-day-age	NH ₄ F	3.5±1.8	5.7±1.5	9.3±2.6
	APF	2.8±1.3	5.4±1.5	8.3±2.5
	control	4.9±2.1	6.1±1.6	11.0±3.2
44-day-age	NH ₄ F	7.9±1.4	10.7±1.4	18.5±1.6
	APF	6.2±2.2	9.2±2.3	15.4±4.1
	control	8.3±0.7	11.1±2.4	19.4±2.0
51-day-age	NH ₄ F	7.8±0.7	10.7±1.3	18.5±1.8
	APF	7.9±1.7	10.9±2.1	18.8±3.4
	control	8.9±0.8	11.0±0.5	20.7±1.1

*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001

*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001

Fig. 8 Comparison of caries incidence scores

(2) う蝕進行状態 (caries extent)

Caries extent は各 unit の caries grade の合計で表した (Fig. 9, Table 7)。

NH₄F 群では30日齢で5.3±4.1, 37, 44, 51日齢ではそれぞれ11.9±4.1, 30.7±4.1, 32.9±5.4を示し, 37, 44日齢で対照群の19.0±7.3, 39.7±10.3と比較すると危険率1%以下で, 51日齢の46.8±7.7と比較すると危険率0.1%以下でそれぞれ統計的に有意の進行抑制効果が認められた。

APF 群では30日齢で2.4±2.0を示し, 対照群に比べ危険率0.1%以下で, NH₄F 群と比較しても5%以下で有意に進行抑制効果が認められた。また, 44日齢でも23.3±8.9を示し, NH₄F 群と比較しても危険率1%以下で進行抑制効果が認められた。

(3) う蝕罹患程度 (caries grade) の割合

う蝕の各 grade の分布状態はフッ化物溶液塗布群では対照群に比べ, すべての日齢で caries grade は低く, う蝕は軽症であることが示された (Fig. 10, Table 8)。

初期う蝕を示す grade 1 についてみると, NH₄F 群では30日齢で80.0%, 37, 44, 51日齢でそれぞれ74.1, 34.9, 28.1%を示し, 対照群の67.0, 42.4, 25.4, 15.4%と比較すると明らかに高く, う蝕進行抑制効果の高

Table 6 Caries prevalence rate at each rat age

	30-day-age	37-day-age	44-day-age	51-day-age
NH ₄ F	24.1	42.1	84.2	84.2
APF	11.9	37.3	70.0	85.5
control	31.5	50.0	88.2	94.2

(%)

Table 7 Caries extent scores in each group

		maxilla	mandible	total
30-day-age	NH ₄ F	1.7±1.7 ^{**}	3.6±3.3	5.3±4.1 [*]
	APF	0.3±0.7 ^{**}	2.1±2.0 ^{***}	2.4±2.0 ^{***}
	control	2.1±1.8	6.0±3.4	8.1±4.1
37-day-age	NH ₄ F	3.9±2.2 ^{**}	8.1±2.9 ^{**}	11.9±4.1 ^{**}
	APF	2.9±1.5 ^{**}	7.2±2.5 ^{**}	10.1±3.3 ^{***}
	control	7.5±4.2	11.5±3.7	19.0±7.3
44-day-age	NH ₄ F	12.6±3.2 ^{**}	18.1±3.2 [*]	30.7±4.1 ^{**}
	APF	8.8±4.4 ^{***}	14.5±5.7 ^{**}	23.3±8.9 ^{***}
	control	17.3±4.9	22.5±6.7	39.7±10.3
51-day-age	NH ₄ F	13.7±2.6 ^{***}	19.2±3.4 ^{***}	32.9±5.4 ^{***}
	APF	12.6±3.7 ^{***}	17.5±4.9 ^{***}	30.1±8.0 ^{***}
	control	18.7±3.9	28.1±4.7	46.8±7.7

*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001

Fig. 9 Comparison of caries extent

いことが認められた。また、対照群は重症う蝕を示す grade 4 以上のう蝕がすでに30日齢より存在し、以後日齢がすすむにつれ割合は増加し、最終屠殺日の51日齢では7.4%を示した。NH₄F 群は重症う蝕が37日齢でわずか0.7%存在したにすぎず、日齢がすすんでも以後重症

う蝕は認められなかった。一方 APF 群では実験期間を通して重症う蝕は認められなかった。

(4) 菌の定着状態および発育状態について

菌の定着についてはコロニーの有無を観察した。各群ともに菌接種前の16日齢では菌の存在を認めなかったが、菌接種後は各日齢で菌の定着が確認された (Table 9)。

実験期間中ラットの健康状態を把握する目的で定期的に体重測定を行った。ラットの体重は実験開始時より順調に増加し、フッ化物溶液塗布群と対照群の間に体重増加の差は認められなかった (Fig. 11)。また、各群とも飼料、飲料水の摂取状態に差はなく、疾病の兆候をもつラットは認められなかった。

考 察

フッ化アンモニウム化合物のエナメル質耐酸性付与効果についての研究は、1949年 Manly ら³⁸⁾ によつてはじまり、pH 3.5の NH₄HF₂ 溶液は中性 NaF 溶液よりエナメル質への耐酸性付与効果が高いことが報告されている。しかしこれはpH の差によるものとも考えられていた。Muhlemann ら³⁴⁾ は同 pH (2.9) の NH₄HF₂ 溶液と NaF 溶液を比較し、NH₄HF₂ 溶液の方が耐酸性付与効果が大きいことを認め、さらに NH₄F 溶液と NaF 溶液を比較した場合でも、耐酸性付与効果は NH₄F 群で有意に大きいことを示している。また、このことにより NH₄⁺ が何らかの役割を演じているのであらうと考察している。

フッ化アンモニウムに関しての研究は1970年代より

Table 8 Percentage of the caries grades at each rat age

		1	2	3	4	5
30-day-age	NH ₄ F	80.0	18.5	1.5	0.0	0.0
	APF	87.5	12.5	0.0	0.0	0.0
	control	67.0	24.7	7.1	1.2	0.0
37-day-age	NH ₄ F	74.1	23.7	1.5	0.7	0.0
	APF	78.9	19.5	1.6	0.0	0.0
	control	42.4	43.0	14.0	0.6	0.0
44-day-age	NH ₄ F	34.9	64.7	0.4	0.0	0.0
	APF	50.6	47.2	2.2	0.0	0.0
	control	25.4	45.7	27.5	1.4	0.0
51-day-age	NH ₄ F	28.1	66.2	5.7	0.0	0.0
	APF	41.1	57.8	1.1	0.0	0.0
	control	15.4	50.8	26.4	7.4	0.0

(%)

Fig. 10 Distribution of each caries grade**Table 9** The status of implantation of *S. mutans*

group	age	before inoculation	after inoculation				
		16	21	26	33	40	47
NH ₄ F		-	+	+	+	+	+
APF		-	+	+	+	+	+
control		-	+	+	+	+	+

Fig. 11 The mean body weight gain

盛んに行なわれるようになっていく。Caslavská ら²⁰⁾は 0.05M H₃PO₄ による 1 分間の前処理後、0.62MNH₄F 溶液 (pH 4.4) を 3 分間作用させたエナメル質は、同条件下の NaF 溶液作用のものよりも取り込まれるフッ素量がかなり多く、エナメル質表面に CaF₂ の生成がみら

れることを認めている。そして、この生成物は長時間の人工唾液浸漬後も除去されないことから、 NH_4F 溶液作用により生成する CaF_2 はエナメル質とかなり強固に結合しているのであろうと考察している。

また Wei ら²⁹⁾は現在フッ化物歯面塗布液として用いられている APF 溶液と比較して、 NH_4F 溶液 (pH 5.8, 1.23% F^-) は APF 溶液 (pH 3.0, 1.23% F^-) の 1/2.3 のフッ素取り込みを確認しており、酸による前処理なしで pH 5.8 の NH_4F 溶液作用によるエナメル質への多量のフッ素取り込みを認めている。

フッ化物歯面塗布は年 1 回、あるいは半年に 1 回の割合で行い、塗布時間は 4 分間が通法となっている。現在用いられている APF 歯面塗布液はフッ素濃度が 9,000 ppm と高く、また溶液の pH が 3.4 であり、低学年の児童にとっては負担が大きいに思われる。当教室の山村²⁰⁾は APF 溶液と同フッ素濃度、同 pH の NH_4F 溶液をエナメル質粉末に作用させ、生成した CaF_2 量からみて NH_4F 溶液を用いれば APF 溶液の 1/2 の塗布時間で同様の効果が期待できることを示唆している。この事は言い換えれば同一塗布時間の場合、フッ素濃度を低下させても同様の効果が期待できることを示している。このような理由から本研究では、APF 溶液の 1/3 のフッ素濃度 3,000 ppm で、さらに安全性を加味し、溶液の pH を 4.4 に調節したリン酸酸性フッ化アンモニウム溶液を調製し、ヒト intact enamel を用いた基礎的研究と、ラットを用いた動物実験を行い、APF 溶液との比較検討を行った。

実験 1 intact enamel を用いて

Intact enamel を材料とし、フッ化物溶液のエナメル質に及ぼす影響について検討を行った。

Intact enamel へのフッ素取り込みについての研究では、Arends ら⁴⁰⁾は pH 4.0 の APF 溶液と NH_4F 溶液を作用させ、 NH_4F 溶液作用の方が permanent fluoride の吸収が幾分多いことを報告している。さらに Gron ら²⁰⁾は NaF , KF , NH_4F 溶液についてエナメル質へのフッ素取り込みの比較を行っており、pH 4.6 の NH_4F 溶液にリン酸アンモニウムを加えた溶液がエナメル質へのフッ素浸透が最も大きく、フルオロアパタイトの生成量も多いことを報告している。本研究においても、 NH_4F 溶液の方がフッ素濃度が低いにもかかわらず、APF 溶液より多量のフッ素取り込みが認められた。

フッ化物溶液作用エナメル質の酸溶解性試験では、連続脱灰により表層から内層へのリン溶出量を測定したものであるが、耐酸性獲得効果は NH_4F 群で大きく、内

層にまで及ぶことが示された (Fig. 4)。このことはエナメル質表面の SEM 像からも明らかであり、溶液作用後の NH_4F 群と APF 群はいずれもかなりの量の沈着物がみられたが形態が異なり、 NH_4F 群エナメル質の沈着物は細粒で厚みがあった (Fig. 6)。また、表面の沈着物の性状について、酸溶解性試験後のエナメル表面の SEM 観察を行ったところ、APF 群でもわずかにエナメル質の脱灰像が観察されたが、 NH_4F 群では表面に顆粒状の沈着物が明らかに残存しており、酸抵抗像を示した (Fig. 6)。同様の所見は EPMA の酸脱灰像の成績からも明らかである。すなわち、APF 群では表層から数 μm まで $\text{CaK}\alpha$ 線、 $\text{PK}\alpha$ 線の低下が認められ脱灰像が観察されたが、 NH_4F 群では酸溶解性試験後でも最表層に CaF_2 由来と考えられる $\text{FK}\alpha$ 線の鋭いピークが観察され、さらに表層下 30 μm の深さの所では $\text{CaK}\alpha$ 線、 $\text{PK}\alpha$ 線の著しい低下が示され、表層下脱灰像が認められた (Fig. 7)。Caslavská ら⁴¹⁾は 1.5M NH_4F 溶液 (pH 7.0) を 5 分間作用させたエナメル片に CaF_2 生成を認めており、作用後エナメル質表層を 1M KOH 溶液で洗浄すると CaF_2 は除去されると報告している。また Wefel ら²⁹⁾は APF 溶液作用エナメル質で生成された CaF_2 は 48 時間の人工唾液洗浄、あるいは 1M KOH 溶液洗浄で安易に除去されるが、 NH_4F 溶液 (1.23% F^- , pH 4.2) 作用で生成した CaF_2 は 1M KOH 溶液洗浄では除去されるが、人工唾液洗浄では残留することを示している。一方、可児ら⁴²⁾の報告では APF 溶液作用エナメル質とリン酸酸性フッ化アンモニウム溶液作用エナメル質の 1M KOH 溶液洗浄後のエナメル質表面の SEM 観察では、 NH_4F 溶液作用の方が明らかに沈着物に厚みがあり、1M KOH 溶液 48 時間洗浄後にも沈着物はまだ残留することを示している。この様に APF 溶液作用と NH_4F 溶液作用で生成された CaF_2 は形態が異なり、 NH_4F 溶液で生成された CaF_2 はかなり溶出しにくいものと思われる。Wei ら²⁹⁾も NH_4F 溶液はエナメル質中に多量の CaF_2 を生成するが、量が多いため洗浄されにくいことを示している。

以上の報告とあわせて、本研究の NH_4F 溶液作用エナメル質へのフッ素取り込み量の増大は多量の CaF_2 生成によるものであり、酸抵抗性の獲得も CaF_2 の生成によるものであると考えられる。

実験 2 ラットを用いた動物実験

リン酸酸性フッ化アンモニウム溶液 (3,000 ppm F^- , pH 4.4) の歯面塗布によるう蝕予防効果について、ラットを用いた動物実験系でその発生子防効果と進行抑制効

果の両面から検討を行った。

ラットは従来より当教室で行っているように好う蝕発生条件下で飼育したものをを用いた⁸⁷⁾。すなわち離乳直後よりう蝕誘発性試料を与え⁴³⁾、*S. mutans* GS-5 株を接種した⁴⁴⁾。可児ら⁸⁷⁾は早期離乳を行ったラットでは、54日齢ですでに被検歯のほとんどの unit とう蝕発生が認められ、フッ化物溶液塗布による予防効果が確認できなかったと述べている。本実験では30日齢より51日齢までの実験期間でう蝕発生予防効果を比較するために、ラットは早期強制離乳ではなく自然離乳とした。

う蝕発生状況 (caries incidence) をみると、フッ化物溶液塗布群は対照群に比べてう蝕発生が少なかった (Fig. 8)。しかしフッ化物溶液塗布群間でもう蝕発生状況は異っており、APF 群は日齢が少ないほど罹患率は低い、日齢が進むに従ってほぼ直線的に増加していく傾向がみられた (Table 6)。このことは Wellock ら⁴⁵⁾の APF 溶液は特にう蝕の初発に対し予防効果があるという報告と一致する。一方 NH_4F 群では APF 群と同程度にはう蝕予防効果は認められなかったが、対照群に比べると51日齢では危険率 0.1 % 以下で統計的に有意のう蝕発生予防効果が観察された (Table 5)。

ラット臼歯の裂溝部は軽度石灰化しており⁴⁶⁾、ラットの歯牙萌出時に存在する裂溝底部のエナメル質未石灰化部分の石灰化は日数の経過とともに二次的にすすむといわれている⁴⁷⁾。また Silverstone⁴⁸⁾ はフッ素による石灰化促進作用に注目している。そこで今回の動物実験では離乳後直ちにフッ素塗布を行い、う蝕進行抑制効果を観察した。対照群では30日齢よりすでに重症う蝕を示す grade 4 のものが存在し、日齢がすすむにつれてう蝕の程度は重症になった (Fig. 10)。一方、フッ化物溶液塗布群では対照群と比較してう蝕の程度は低く、統計的に有意の差をもってう蝕進行抑制効果が認められた (Fig. 9)。

ラットを用いた NH_4F 溶液塗布実験では、Gron ら⁴⁹⁾ が 1,000ppm のフッ素を含む NaF 溶液と NH_4F 溶液を pH 5 と pH 7 で比較しており、リン酸で pH 5 にした NH_4F 溶液で最も高いう蝕抑制効果がみられ、NaF と NH_4F のう蝕抑制効果の違いは cation の大きさによるものであると述べている。Caslavská ら⁵⁰⁾ はフッ素濃度 30ppm, pH 7.0 の NH_4F 溶液と NaF 溶液を飲料水に混入して、ラットのう蝕抑制効果について検討を行い、 NH_4F 群の方が効果が大きいことを認めている。また、DePaola ら⁵¹⁾ は児童に NH_4F 溶液 (1,000ppm F^- , pH 4.4) と NaF 溶液 (1,000ppm F^- , pH 4.4) で 2 年

間洗口させたところ、新萌出歯に対するう蝕発生の予防効果は NH_4F 群で有意に大きいことを認めている。この様に同フッ素濃度、同 pH の溶液では臨床上でも NH_4F 溶液の方が高い効果が認められている。

本研究ではフッ素濃度 3,000ppm, pH 4.4 のリン酸性フッ化アンモニウム溶液のう蝕抑制効果をフッ素濃度 9,000ppm, pH 3.4 の APF 溶液と比較検討した。 NH_4F 群ではフッ素濃度が APF 溶液の 1/3 にもかかわらず、う蝕発生予防効果、う蝕進行抑制効果が認められ、特に進行抑制効果においては塗布回数が増加するにつれ、APF 溶液と同程度の効果を持つことが認められた。

以上、実験 1、実験 2 の成績からフッ素濃度 3,000ppm, pH 4.4 のリン酸性フッ化アンモニウム溶液は intact enamel に対し多量の CaF_2 生成により耐酸性を増強させること、またラットに対してはう蝕抑制効果を獲得させることが認められたことから、フッ化物歯面塗布液としての臨床応用の可能性が示された。

結 論

リン酸性フッ化アンモニウム溶液 (フッ素濃度 3,000ppm, pH 4.4) のフッ化物歯面塗布液としての有効性と臨床応用の可能性を追求することを目的とし、*in vitro* の実験としてヒト intact enamel を材料とし、フッ素取り込み、酸溶解性試験およびエナメル質表面の観察を行い、*in vivo* ではラット実験う蝕系を用いてう蝕抑制効果を観察し、それぞれ APF 溶液と比較検討を行った結果、次の成績を得た。

1. フッ化アンモニウム溶液作用により intact enamel 中のフッ素量は増加した。
2. フッ化アンモニウム溶液作用では APF 溶液作用と比較してもリンの溶出が抑えられており、高い酸抵抗性獲得が認められた。また、その効果はエナメル質内層におよぶことが示された。
3. フッ化アンモニウム溶液作用では、エナメル質表面に細かい粒子が緻密に重なりあった SEM 像が観察され、また 180 分間の酸溶解性試験後でも表面に顆粒状沈着物の存在を認めた。
4. X線マイクロアナライザの結果からも、フッ化アンモニウム溶液作用エナメル質は APF 溶液作用群より数倍高いフッ素取り込みを認め、酸溶解性試験後でも表層より 10 μm の深さまでフッ素が取り込まれていることが示された。
5. ラット実験う蝕において、フッ化アンモニウム溶液の歯面塗布は統計的にも有意の差で、う蝕の発生予

防, 進行抑制効果が認められ, APF 溶液と同程度の効果を認めた。

6. フッ化アンモニウム溶液の歯面塗布ではラットの健康状態への影響は認められなかった。

以上のことより, フッ素濃度3,000ppm, pH 4.4のリン酸酸性フッ化アンモニウム溶液は, 現在臨床応用されているリン酸酸性フッ化ナトリウム溶液の1/3のフッ素濃度でもう蝕予防効果が期待され, 臨床応用の可能性があることが示唆された。

稿を終えるにあたり, 本研究課題を与えられ, 終始御懇篤なる御指導, 御校閲を賜りました口腔衛生学講座の可見瑞夫主任教授, ならびに研究の計画と遂行にひとかたならぬ御指導, 御助言を賜りました社会歯科学講座の可見徳子教授に深甚の謝意をささげます。同時に, 種々御協力をいただいた口腔衛生学教室の諸氏に心より感謝申し上げます。

また, *S. mutans*を提供いただきました朝日大学歯学部口腔細菌学教室の並河 勇教授に御礼申し上げます。

文 献

- 飯塚喜一, 岡田昭五郎: フッ化物とその応用, 医歯薬出版, 東京, 1973, 143-194頁。
- Stearns, R. I.: Incorporation of nonfluoride and fluoride prophylactic pastes and APF gels, *J. Dent. Res.*, **52**; 30-35, 1973.
- 可見瑞夫: 学校歯科における齲蝕予防対策, 国際歯科ジャーナル, **3**; 171-177, 1977.
- 可見瑞夫: フッ化物洗口法の位置づけ, 歯界展望, **50**; 1033-1045, 1977.
- 可見瑞夫: 齲蝕予防のためのフッ化物洗口法, 口腔衛生会誌, **27**; 131-147, 1977.
- Leske, G. S.: Guidelines for establishing a fluoride mouthrinsing caries prevention program for school children, *Public Health Rep.*, **92**; 240-244, 1977.
- 河野 節: 酸性フッ素リン酸溶液歯面塗布法のう蝕予防効果に関する研究—二重盲検法による検討—, 岐歯学誌, **10**; 346-365, 1980.
- Triol, C. W., Kranz, S. M., Volpe, A. R. and Frankl, S. N.: Anticaries effect of a sodium fluoride rinse and a MFP dentifrice in a nonfluoridated water area: A thirteenth-month study, *Clinical Preventive Dentistry*, **2**; 13-15, 1980.
- 磯崎篤則: 学校歯科保健活動へのフッ化物局所応用法導入によるう蝕予防に関する研究, 口腔衛生会誌, **34**; 598-631, 1984.
- Caslavska, V., Moreno, F. C. and Brudevold, F.: Determination of the calcium fluoride formed from *in vitro* exposure of human enamel to fluoride solutions, *Arch. Oral Biol.*, **20**; 333-339, 1975.
- 可見徳子, 可見瑞夫, 富松早苗, 新海研志, 河野 節, 久保憲昭: エナメル質におよぼすフッ化物洗口液の影響について 第1報 X線回折法による検討, 口腔衛生会誌, **27**; 38-45, 1977.
- 可見徳子, 可見瑞夫, 富松早苗, 新海研志, 河野 節, 久保憲昭: エナメル質におよぼすフッ化物洗口液の影響について 第2報 フッ素取込量と流出量について, 口腔衛生会誌, **27**; 93-99, 1977.
- 久保憲昭: 低濃度フッ化物洗口液のエナメル質粉末におよぼす影響に関する研究, 口腔衛生会誌, **32**; 390-402, 1982.
- 中西国夫: フッ化物溶液作用エナメル質における生成フルオロアパタイトのX線回折法による研究, 口腔衛生会誌, **34**; 109-123, 1984.
- 米林光三: 象牙質 Apatite に生成された CaF_2 の反応に関するX線結晶学的研究, 阪大歯学誌, **12**; 79-93, 1967.
- 可見徳子, 河合庄治郎, 森脇 豊, 山賀礼一: アパタイト結晶の格子不整におよぼす CaF_2 の影響について, 歯理工誌, **11**; 92-96, 1970.
- 可見徳子: フッ化物によるアパタイト結晶の格子不整修復に関するX線結晶学的研究, 阪大歯学誌, **15**; 42-56, 1970.
- 須賀昭一: 歯・科学とその周辺, 共立出版, 東京, 1981, 225-239頁。
- 可見瑞夫, 可見徳子: う蝕予防のためのフッ化物応用法 I. フッ化物の齲蝕予防機序, 岐歯学誌, **12**; 1-12, 1985.
- Caslavska, V., Brudevold, F., Vrbic, V. and Moreno, E. C.: Response of human enamel to topical application of ammonium fluoride, *Arch. Oral Biol.*, **16**; 1173-1180, 1971.
- Wei, S. H. Y.: Enamel microsampling technique for assessing fluoride uptake from topical fluoride treatments, *In vitro*, *J. Dent. Res.*, **52**; 1268-1272, 1973.
- Wei, S. H. Y., Soboroff, M. D., Wefel, J. S. and Wolfson, S.: Relative effects of ammonium fluoride and acidulated phosphate fluoride solutions on human enamel, *J. Dent. Res.*, **54**; 1234, 1975.
- Wei, S. H. Y., and Schulz, E. M. Jr.: *In vivo* microsampling of enamel fluoride concentrations after topical treatments, *Caries Res.*, **9**; 50-58, 1975.
- Gron, P. and Caslavska, V.: Fluoride deposition in enamel from application of sodium, potassium or ammonium fluoride, *Caries Res.*, **15**; 459-467, 1981.

- 25) Wefel, J. S. and Harless, J. D.: The effect of topical fluoride agents on fluoride uptake and surface morphology, *J. Dent. Res.*, **60**; 1842-1848, 1981.
- 26) 山村利貞: リン酸酸性フッ化アンモニウムのエナメル質におよぼす影響について, *口腔衛生会誌*, **35**; 330-344, 1985.
- 27) 加藤裕久, 飯野新太郎, 広瀬晃子, 徳本龍弘, 磯崎篤則, 可児徳子, 可児瑞夫: フッ化アンモニウム溶液によるエナメル質粉末の CaF_2 生成と酸溶解性について, *口腔衛生会誌*, **37**; 478-479, 1987.
- 28) 新谷裕久: 低濃度フッ化アンモニウム歯面塗布溶液のエナメル質粉末に及ぼす影響について, *口腔衛生会誌*, **40**; 270-286, 1990.
- 29) Wefel, J. S.: Artificial lesion formation and fluoride uptake after TiF_4 applications, *Caries Res.*, **16**; 26-33, 1982.
- 30) McCann, H. G.: Determination of fluoride in mineralized tissue using the fluoride ion electrode, *Arch. Oral Biol.*, **13**; 475-477, 1968.
- 31) Chow, L. C., Guo, M. K., Hsieh, C. C. and Hong, Y. C.: Apatitic fluoride increase in enamel from a topical treatment involving intermediate $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ formation, an *in vivo* study, *Caries Res.*, **15**; 369-376, 1981.
- 32) Dryer, R. L., Tammes, A. R. and Routh, J. I.: The determination of phosphorous and phosphatase with N-phenyl-p-phenylenediamine, *J. Biol. Chem.*, **225**; 177-183, 1957.
- 33) Navia, J. M.: (河村洋二郎監訳): 歯科学研究のための動物実験法, 学建書院, 東京, 1979 (第1版) 225-258, 232-234頁.
- 34) Hamada, S. and Slade, H. D.: Biology, immunology and cariogenicity of *Streptococcus mutans*, *Microbiol. Rev.*, **44**; 331-384, 1980.
- 35) 可児徳子, 広瀬晃子, 磯崎篤則, 伊川英二, 新谷裕久, 可児瑞夫: フッ化チタンアンモニウム溶液によるラット実験う蝕の予防効果について, *口腔衛生会誌*, **39**; 16-26, 1989.
- 36) Gold, O. G., Jordan, H. V. and Houde, J. V.: A selective medium for *streptococcus mutans*, *Arch. Oral Biol.*, **18**; 1357-1364, 1973.
- 37) 可児瑞夫, 可児徳子, 飯野新太郎, 広瀬晃子, 磯崎篤則, 伊川英二, 奥野雅典, 加藤裕久: フッ化チタンアンモニウムによるラット実験う蝕抑制効果, *口腔衛生会誌*, **37**; 63-71, 1987.
- 38) Manly, R. S. and Bibby, B. G.: Substance capable of decreasing the acid solubility of tooth enamel, *J. Dent. Res.*, **28**; 160-171, 1949.
- 39) Mühlemann, H. R., Schmid, H. and König, K. G.: Enamel solubility reduction on studies with inorganic and organic fluorides, *Helv. Odont. Acta*, **1**; 23-33, 1957.
- 40) Arends, J. and Schuthof, J.: Fluoride content in human enamel after fluoride application and washing—an *in vitro* study, *Caries Res.*, **9**; 363-372, 1975.
- 41) Caslavská, V., Gron, P., Stern, D. and Skobe, Z.: Chemical and morphological aspects of fluoride acquisition by enamel from topical application of ammonium fluoride with ammonium monofluorophosphate, *Caries Res.*, **16**; 170-178, 1982.
- 42) Kani, T., Shimizu, M., Fukuoka, Y., Iino, S. and Kani, M.: The effect of ammonium titanium fluoride on human enamel-III, *JADR 32nd annual meeting, abst.*, No. 41, 1984.
- 43) Menaker, L. and Navia, J. M.: Effect of under nutrition during the perinatal period on caries development in the rat.: IV Effects of differential tooth eruption and exposure to a cariogenic diet on subsequent dental caries incidence, *J. Dent. Res.*, **52**; 692-697, 1973.
- 44) Gibbons, R. J., Berman, K. S., Knoettner, P. and Kapsimalis, B.: Dental caries and alveolar bone loss in gnotobiotic rats infected with capsule forming *Streptococci* of human origin, *Arch. Oral Biol.*, **11**; 549-560, 1966.
- 45) Wellock, W. D., Maitland, A. and Brudevold, F.: Caries increments tooth discoloration and state of oral hygiene of children given single annual applications of acidulated phosphate fluoride and stannous fluoride, *Arch. Oral Biol.*, **10**; 453-460, 1965.
- 46) Brinner, W. W., Francis, M. D. and Widder, J. S.: Factors affecting the rate of post-eruptive maturation of dental enamel, *Calc. Tiss. Res.*, **7**; 249-256, 1971.
- 47) Francis, M. D. and Brinner, W. W.: The development and regression of hypomineralized areas of rat molars, *Arch. Oral Biol.*, **11**; 349-354, 1966.
- 48) Silverstone, L. M.: Chapter 11 Fluoride and remineralization, Edied by Wei, S. H. Y.: *Clinical Uses of Fluorides*, Lea & Febiger, 1985. 可児瑞夫監訳: フッ化物の臨床応用. 医歯薬出版, 東京, 1988, 167-190頁.
- 49) Gron, P., Caslavská, V., Tamura, T. and Kent, R.: The caries inhibitory effect of repeated topical applications of NaF or NH_4F in rodents, *Caries Res.*, **21**; 346-352, 1987.
- 50) Caslavská, V., Gron, P., Picard, M. and Kent, R.: Comparison of the relative ca-

- ries-inhibitory effect of sodium and ammonium fluoride administered in the drinking water to rats, *Caries Res.*, 21 ; 62-67, 1987.
- 51) DePaola, P. F., Soparkar, P., Foley, S., Bookstein, F. and Bakhos, Y.: Effect of high-concentration ammonium and sodium fluoride rinses on dental caries in school children, *Community Dent. Oral Epidemiol.*, 5 ; 7-14, 1977.