原 著

再石灰化エナメル質へのフッ素取り込み量に およぼす再石灰化液の組成成分の効果*

Effect on Fluoride Incorporation in Remineralized Enamel
of Elements in Remineralizing Solution

飯 島 洋 一** 高 木 興 氏**

Youichi IJIMA** and Okiuji TAKAGI**

Received October 14, 1992; accepted November 27, 1992

Abstract: The aim of this study was to find the optimal remineralizing solution under various remineralizing conditions. To evaluate the combined effect of elements in remineralizing solution, a factorial experiment (3 factors, 3 levels) was performed. The optimal remineralizing solution was determined as that which produced the highest fluoride incorporation in the remineralized enamel.

Demineralized lesions were produced on human enamel (N=54; Area=15mm²) by a 2-day immersion in 0.1 mol/l lactic acid solution (pH 4.0, 37°C). The remineralizing solutions (pH 7.0, 37°C) containing various concentrations of carboxymethylcellulose (CMC), Ca/P and fluoride were changed every 2 days during the 10-day remineralizing period. The concentrations of CMC, Ca/P, and fluoride consisted of the following three levels, respectively: 0.5, 1.0 and 1.5% for CMC; 1.0/0.6, 2.0/1.2 and 3.0/1.8 mmol for Ca/P and 1.0, 2.0 and 3.0ppm for fluoride.

The lowest concentration of CMC (0.5%) showed the highest fluoride incorporation in remineralized enamel. The highest concentration of fluoride (3ppm) showed the highest fluoride incorporation throughout the entire remineralized enamel. The highest concentration of Ca/P (3.0/1.8mmol) showed the highest fluoride incorporation but was limited to the first layer. The middle concentration of Ca/P (2.0/1.2mmol) showed rather higher fluoride incorporation in inner part of the remineralized enamel than the highest concentration of Ca/P (3.0/1.8mmol). Interaction between CMC and Ca/P was found from the second to the forth layers. Interaction between CMC and fluoride was found at the third layer only.

Judging from the highest fluoride incorporation at the first layer, the remineralizing solution containing 1.0% CMC, 3.0/1.8mmol Ca/P and 2.0ppm fluoride seemed to be an optimal remineralizing solution. On the other hand, considering the high fluoride incorporation in the inner layers, the remineralizing solution containing 0.5% CMC, 2.0/1.2 mmol Ca/P and 3.0 ppm fluoride also seemed to be an optimal remineralizing solution. Remineralized enamel derived from the optimal remineralizing solutions showed acid resistance against acid challenge.

* 本論文の一部は、第41回日本口腔衛生学会総会（平成4年10月4日：新潟）において発表した。

** 長崎大学歯学部予防歯科学講座（主任：高木興氏）

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

索引用語：要因実験，再石灰化エナメル質，フッ素取り込み，交互作用，耐酸性

Key words: Factorial experiment, Remineralized enamel, Fluoride incorporation, Interaction, Acid resistance

緒 言

エナメル質の初期齲蝕病変である脱灰症状は，再石灰化液中に含まれる歯質との共通イオンである $\text{Ca}^{2+}/\text{PO}_4^{3-}$ さらに F^- の存在によって in vitro においては健全エナメル質程度に再石灰化することが報告されている¹⁻³⁾。すなわち，脱灰を主とする初期齲蝕病変は再石灰化により溶出した歯質ミネラルが可逆的に回復することを意味する。同様の変化は，in vivo においては脱灰に由来する臨床的白斑が，健全エナメル質に可逆的に変化する事実として疫学的に報告されている^{4,5)}。これらの事実は脱灰病変に対して積極的に再石灰化処置を実施した場合，平滑面に発現するエナメル質白斑部は，実質欠損への進行を停止するか，あるいは健全エナメル質へと可逆的な変化をとげる可能性を示唆している。しかも，再石灰化エナメル質は健全エナメル質に比較して明らかに脱灰抵抗性であり，耐酸性の性状を有している^{6,7)}。

唾液の再石灰化能については従来より確認されており⁸⁾，唾液ムチンが明らかな脱灰抑制能を有することも指摘されている⁹⁾。このような作用を有する唾液ムチンの代用として Carboxymethylcellulose (以下 CMC) を含有した再石灰化液あるいは人工唾液が実際に使用されており，口腔乾燥症の症状改善に効果のあることが報告されている¹⁰⁾。

CMC は分子構造中に Carboxyl 基を有する高分子材料としてエナメル質最表層での反応様式が注目されており¹¹⁾，再石灰化液に粘性を付与するほか，再石灰化能に与える影響についても検討する必要がある。しかしながら，再石灰化液の組成として CMC 濃度，カルシウム・リン (以下 Ca/P) 濃度さらにフッ素 (以下 F) 濃度の違いが再石灰化程度に与える影響についてはこれまで検討されていない。本研究は，再石灰化エナメル質に取り込まれるフッ素濃度を指標に再石灰化液の組成として，CMC 濃度，Ca/P 濃度，F 濃度の3因子を選び，各因子の濃度を3水準とした要因実験¹²⁾を行って，最適な再石灰化条件を有する再石灰化液の組成について検討した。

材料と方法

H ナメル質試料片の脱灰：エナメル質試料には矯正的

理由により抜去された健全な小臼歯の唇面エナメル質54例を用いた。脱灰はエナメル質試料片 (3 × 5 mm) を 0.1M 乳酸緩衝液 (pH 4.0, 37°C) に2日間浸漬し行った。乳酸緩衝液は1試料片につき20ml であり，溶液の攪拌は行わなかった。脱灰エナメル質試料片の水洗は，脱イオン水により30秒，流水下で行った。

再石灰化液の調製：再石灰化液の CMC 成分の調製には，分子量10万～11万，重合度450～500の CMC ナトリウム塩 (試薬：化学用，和光純薬) を用い，CMC 濃度は0.5, 1.0, 1.5%の3種とした。Ca/P 成分の調製には，Ca/P のモル比が1.67である Hydroxyapatite (試薬：カラムクロマトグラフ用，和光純薬：以下 HA) を用い，Ca/P 濃度は1.0/0.6, 2.0/1.2, 3.0/1.8mM の3種とした。F成分の調製には，NaF (試薬：一級，和光純薬) を用い，F濃度は1.0, 2.0, 3.0 ppm の3種とした。3因子3水準の組合せからなる，計27種の再石灰化液を調製した。再石灰化液はそれぞれ濃度の異なる CMC, Ca/P, F の各成分以外に再石灰化液のイオン強度を調節するために150mM の NaCl を含有し，pH 7.0 に調製した。再石灰化期間は10日間，液は2日ごとに交換した。再石灰化は各再石灰化液につき2回ずつ繰返して行った。

最適な再石灰化条件の検討：10日間の再石灰化期間内にどれだけ多くのフッ素濃度を再石灰化エナメル質の表層から内層にかけて取り込むことができたかを指標として検討した。表層から内層へ各層ごとの再石灰化エナメル質中のフッ素濃度を得るため，前報¹³⁾に準じて 0.5 M HClO_4 溶液 1.0ml に再石灰化試料を一定時間，合計240秒間浸漬・脱灰し，10層におよぶフッ素濃度分布を求めた。

Ca, F の定量法：脱灰溶液中に溶出した Ca, F の測定は前報¹³⁾と同様の方法で行った。Ca 濃度の測定は溶液中のランタン濃度を最終的に0.1%とし，原子吸光度計 (180-80, HITACHI) を用い，F濃度はフッ素複合電極 (96-09, Orion Research) を用いて測定した。

再石灰化エナメル質中フッ素濃度 (ppm) の算出：脱灰一再石灰化エナメル質試料を実験に用いたことにより，健全エナメル質の比重である $2.95\text{g}/\text{cm}^3$ を仮定できない。したがって，エナメル質表層からの深さを算出することなく，各層ごとのフッ素濃度 (ppm) を再石灰化

エナメル質中の Ca 含有量を37%として次式を用いて算出した。フッ素濃度 (ppm) = [フッ素量 (μg) $\times 10^6$] / 溶出エナメル質量 (μg)

統計学的解析: 統計学的分析は各層ごとに各組成単独の主効果ならびに各組成間の交互作用の有無について ANOVA, さらに Newman-Keuls test (SAS, 長崎大学総合情報処理センター) を用いて検討した。

再石灰化エナメル質の耐酸性能の評価: 最適な条件下で再石灰化したエナメル質が獲得する耐酸性能が十分な脱灰抵抗性を有している否かを評価するため, 再石灰化エナメル質を再度0.1M 乳酸緩衝液 (pH 4.0, 37°C) に浸漬, 脱灰を2日間行った。いわゆる pH サイクリング後, 薄切切片を作製し microradiogram (以上 MR) を撮影した。既報¹⁴⁾に準じて MR 画像を画像処理し白黒画像 (256階調) ならびに擬似カラー画像 (32色) として表示し, 耐酸性能を評価した。

結 果

1. 再石灰化エナメル質のフッ素濃度分布

1) CMC の主効果: 組成成分 CMC の主効果別の再石灰化エナメル質のフッ素濃度分布 (Mean $\pm$ S. E.) を Fig. 1a に示した。いずれの CMC 濃度とも同様に表層で最も高いフッ素濃度分布を示した。CMC 濃度が低い場合, 再石灰化エナメル質へのフッ素取り込み濃度が高くなる傾向を示した。また第3層, 4層で再びフッ素濃度が高くなる傾向を示したが, 第5層以上の深層では CMC 濃度による差は認められなかった。統計的解析の結果, CMC 濃度別では1%と1.5%の両者にはいずれの層においても有意差は認められなかった。有意差が認められたのは第1層から第4層までであり, CMC 濃度0.5%と1.0%ならびに0.5%と1.5%の両者にそれぞれ有意差 ($P < 0.05$) を認めた。再びフッ素濃度が高くなる第3層, 4層では0.5%と1.5%にのみ有意差 ($P < 0.05$) を認めた。

2) Ca/P の主効果: 組成成分 Ca/P の主効果別の再石灰化エナメル質のフッ素濃度分布 (Mean $\pm$ S. E.) を Fig. 1b に示した。Ca/P 濃度により再石灰化エナメル質のフッ素濃度が変化する特徴的な分布様式を示した。すなわち, Ca/P 濃度が1.0/0.6mM と低い場合は再石灰化エナメル質へのフッ素取り込み濃度が低い傾向を示し, 表層よりも第5層において最も高いフッ素濃度分布であった。Ca/P 濃度2.0/1.2mM の場合も, 第5層において最も高いフッ素濃度分布であったが1.0/0.6mM の場合に比較して第1層から第6層まで明らかに

Fig. 1 Main effects of CMC (a), Ca/P (b), and F (c) element in remineralizing solution on fluoride incorporation in remineralized enamel

高いフッ素濃度であった ($P < 0.01$)。Ca/P 濃度3.0/1.8mM の場合, 最表層において2000 ppm 台と他に比較して明らかに高いフッ素濃度であった ($P < 0.01$) が, 第2層以上の深層では急な減少傾向を示し, 第4層から第10層までは1.0/0.6mM の場合と同程度の低いフッ素濃度であった。

Fig. 2 Fluoride incorporation deriving from the interaction between CMC & Ca/P (a,b,c) and CMC & F (d) in each layer

3) Fの主効果：組成成分Fの主効果別の再石灰化エナメル質のフッ素濃度分布 (Mean±S.E.) を Fig. 1c に示した。F濃度に比例して表層から7層までフッ素濃度が高くなる特徴を示した。表層で最も高いフッ素濃度を示したが、F濃度2.0, 3.0 ppm の場合、5層においてもフッ素濃度が高くなる傾向であった。F濃度別では、第1層から第7層まで1.0 ppm と2.0 ppm 間、1.0 ppm と3.0 ppm 間に有意差 ($P<0.05$) が認められた。F濃度3.0 ppm の場合は常に高いフッ素濃度分布であったが、2.0 ppm と3.0 ppm 間はいずれの層においても有意差は認められなかった。

4) 交互作用の有無：交互作用は CMC×Ca/P, CMC×F の両者にそれぞれ有意差 ($P<0.05$) が認められたが、Ca/P×F ならびに CMC×Ca/P×F には認められなかった。CMC×Ca/P の組成成分間の交互作用は、第2, 第3, 第4層に認められた。すなわち Fig. 2a, 2b, 2c に示すように、CMC 濃度0.5%で Ca/P 濃度3.0/1.8 mM の組合せの条件の場合、第2, 第3, 第4層の内層で再石灰化エナメル質でのフッ素取り込み

量が他の組合せ条件に比較して低くなる傾向を示した。また、CMC×F の組成成分間の交互作用は第3層にのみ認められ、CMC 濃度1%, F濃度3 ppm の組合せ条件の場合は Fig. 2d に示すようにフッ素取り込み量が同様に低くなる傾向を示した。

10日間の再石灰化期間内に再石灰化エナメル質の表層から内層にかけて取り込まれたフッ素濃度の値を各組成の主効果ならびに交互作用の発現を考慮して検討すると最適な再石灰化条件は、CMC 濃度0.5%, Ca/P 濃度2.0/1.2mM, F 濃度3.0 ppm の組合せである。一方、最表層で最も高いフッ素濃度を示したのは CMC濃度1.0%, Ca/P 濃度3.0/1.8mM, F 濃度2 ppm の組合せであった。Fig. 3に示すように前者の組合せ条件の場合、エナメル質最表層では中程度に高いフッ素濃度を有し、内層においてはむしろ高いフッ素濃度分布であった。一方、後者の場合は最表層では最も高いフッ素濃度を示したが、内層では中程度のフッ素濃度分布であった。Fig. 3に示した CMC 濃度0.5%, Ca/P 濃度3.0/1.8mM, F 濃度3 ppm ならびに CMC 濃度1.0%, Ca/P 濃度3.0/

Fig. 3 Typical factorial effect of elements in remineralizing solution on fluoride incorporation in remineralized enamel

1.8mM, F濃度3ppmの組合せの場合は、両者ともに交互作用の影響が認められた例である。その結果、フッ素濃度分布は表層ならびに内層において必ずしも最も高い値を示さなかった。

5) 耐酸性能の評価：再石灰化エナメル質に取り込まれたフッ素濃度から最適と思われた2種の再石灰化液による耐酸性能は、Fig. 4のMRが示すようにいずれの再石灰化エナメル質はともに、最表層ならびに内層に明瞭な lamination 構造を認め、耐酸性の性状を示した。いずれの再石灰化エナメル質ともに第1層の青色の耐酸性層に比較して内層に位置する第2層の耐酸性層は広い幅を有し、特に最表層で高いフッ素濃度分布を示した再石灰化エナメル質では pH サイクリング後においても脱灰底部までの深さは浅くなる傾向を示した。

考 察

再石灰化エナメル質に取り込まれるフッ素濃度を指標に、再石灰化液の組成成分として CMC 濃度、Ca/P 濃度、F濃度それぞれの主効果ならびに交互作用を要因実験に基づいて検討した。その結果、各組成成分の主効果ならびに交互作用に統計的有意差が認められた。すなわち CMC の存在は再石灰化エナメル質へのフッ素取り込み程度に影響を与えていることが示唆され、しかも再石灰化エナメル質の内層においては CMC は Ca/P 濃度ならびに F濃度と交互作用を有することが認められた。その結果、再石灰化エナメル質の表層から内層にかけて取り込まれるフッ素濃度分布には、次の2つの特徴が認められた。すなわち、再石灰化によりエナメル質最表層で最も高いフッ素濃度分布を示した例と最表層よりもむしろ内層において最も高いフッ素濃度分布を示した

例である (Fig. 3)。最表層で最も高いフッ素濃度分布を特徴とした再石灰化液の組成成分の組合せは、CMC 濃度1.0%、Ca/P 濃度3.0/1.8mM、F濃度2.0ppmであり、内層において最も高いフッ素濃度分布を示した再石灰化液の組成成分の組合せは、CMC 濃度0.5%、Ca/P 濃度2.0/1.2mM、F濃度3.0ppmであった。いずれの再石灰化エナメル質ともに耐酸性の性状を示したが、最表層において高いフッ素濃度分布を示した再石灰化エナメル質は、内層において最も高いフッ素濃度分布を示した場合に比較して pH サイクリング後の脱灰においても表層より脱灰底部までの深さは浅い状態であった。このことは最表層において明らかに高いフッ素濃度分布である場合、内層において最も高いフッ素濃度分布を示す例よりもその後の脱灰に対して耐酸性であることを示唆している。

CMC は分子構造中に carboxyl 基を有しており、エナメル質最表層の歯質リン酸基とは H_2O ブリッジ、Caブリッジあるいはリン酸基と直接的に置換する可能性が示唆されている^{11,15,16}。また hydroxyapatite 表面の Ca^{2+} との吸着作用を有することも指摘されており¹⁷、歯質側の PO_4^{3-} との反応あるいは Ca^{2+} とキレート結合している可能性が考えられる。これからのことが CMC×Ca/P に交互作用が認められた主な理由と思われる。しかし、最表層ではなくむしろ内層で交互作用が認められたことは、脱灰エナメル質内部に CMC が浸潤し、再石灰化に関与していることが示唆される。CMC×F に認められた交互作用は CMC と歯質側 Ca/P とが優先的に作用した結果、歯質とフッ素の反応性が低下しフッ素取り込み量に影響をおよぼしたものである。また再石灰化液中の CMC 濃度の増加にともなって再石灰化液中の Ca^{2+} 量の減少が今回の結果に影響を与えた可能性も考えられるが、CMC 濃度0.5%では平均98%のCaがイオン化しており、CMC 濃度1.0%では平均93%、CMC 濃度1.5%の場合であっても平均86%がイオン化しておりその影響の程度は少ないものと考えられる。

CMC の再石灰化におよぼす効果については、微小硬度計を用いた検討から唾液ムチン含有の再石灰化エナメル質に比較して硬度の回復程度が高いことが報告されており、その濃度は1.0%である¹⁸。また CMC 濃度が1.3%の場合は、粘性の増加にともなって再石灰化液中に共存する Ca/P の拡散速度に影響を与えるために硬度の回復程度が低くなると考えられている¹⁹。

Ca/P 濃度の再石灰化におよぼす効果は、Silverstone ら²⁰によればF濃度1ppm 存在下における再石灰化程

Fig. 4 Typical microradiographic pictures of remineralized enamel after acid challenge for 2 days at pH 4.0

度は、CMC を含有しない再石灰化溶液中の Ca/P 濃度 3/1.8mM の場合、表層に局限して発現したこと。また Ca/P 濃度 1/0.6mM の場合は、脱灰部の全層におよぶ再石灰化が確認できたことを偏光量を定量し報告している。今回我々は、再石灰化エナメル質に取り込まれたフッ素濃度を指標に再石灰化程度を検討した結果、Ca/P 濃度が 3.0/1.8mM の高濃度の場合、最表層で明らかに高いフッ素濃度分布を認めており、また Ca/P 濃度が 1.0/0.6mM の低濃度の場合、内層で最も高いフッ素濃度分布であったことからほぼ同様の結果であると思われる。これまでの著者ら²¹⁾の報告からも明らかなように、再石灰化エナメル質中のフッ素濃度は再石灰化によるミネラル量の増加にともなって比例的に増加する傾向にあることから、再石灰化の程度を評価することができたと思われる。

F 濃度の再石灰化におよぼす効果については、Ca/P ならびに F 濃度 1 ppm 存在下において再石灰化を促進させること^{1,2)}、また F 濃度 1 ppm と低濃度であっても長期間の作用により再石灰化エナメル質に取り込まれることが知られている²²⁾。今回は、エナメル質試料としてヒト・エナメル質を用いたため、ウシ・エナメル質試料に比較して再石灰化により取り込まれたフッ素濃度は明らかに低い傾向にあった。再石灰化溶液中の F 濃度の増加によってフッ素濃度分布は高くなる傾向を示したが、F 濃度 2 ppm と 3 ppm の両者間に統計学的有意差が認められなかったのは、全体的に取り込みフッ素濃度が低く、しかも相互に近似した値の範囲内であったためである。

再石灰化エナメル質の耐酸性の性状は、再石灰化により回復するミネラルの構成成分として fluoroapatite (以

下 FA) がどの程度、形成されるかに関係している。すなわち脱灰エナメル質中に認められる構成成分である $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ はフッ素の存在下によって FA に遷移することが知られており²³⁾、再石灰化期間中この反応により FA が形成される。FA は HA よりも溶解度が明らかに低く²⁴⁾、その結果、再石灰化エナメル質は耐酸性の性状を有するようになる。しかし形成された FA は酸の浸透によってわずかに脱灰され、再石灰化エナメル質内にフッ素ならびに Ca/P を供給することになる。歯質との共通イオンである Ca/P ならびにフッ素の存在下による脱灰抑制作用は、ten Cate ら²⁵⁾によって検討されており、pH 4.5 の脱灰溶液中においても Ca/P 濃度 2.2/2.2mM 共存下ではフッ素濃度 2 ppm で脱灰が認められなくなることを報告している。再石灰化エナメル質内部の局所では飽和度を増し、さらなる脱灰が抑制される。これら両者の作用によって再石灰化エナメル質は耐酸性の性状を有すると理解される。

脱灰—再石灰化の過程を通じて再石灰化エナメル質が獲得する耐酸性の意義は、次のような点にあると考える。すなわち、脱灰エナメル質に対しフッ化物を単独で作用させるだけでなく、Ca/P の無機成分を含有する再石灰化液を応用することにより、再石灰化を積極的に促進し、耐酸性を向上させる。その結果として、再石灰化エナメル質のさらなる脱灰・進行が停止し、齲窩の形成を抑制する。あるいは、健全エナメル質へ回復することが期待される。これらのことは、初期齲蝕に対する再石灰化処置の可能性を示唆している。

結 論

再石灰化エナメル質の表層から内層にかけて取り込まれるフッ素濃度分布を指標に要因実験を行って最適な再石灰化液の組成成分について検討した。その結果、次の 2 種類が最適な再石灰化液であった。最表層で最も高いフッ素濃度を示した点からは、CMC 濃度 1.0%、Ca/P 濃度 3.0/1.8mM、F 濃度 2 ppm であり、内層でも高いフッ素濃度を維持していた点からは、CMC 濃度 0.5%、Ca/P 濃度 2.0/1.2mM、F 濃度 3 ppm であった。いずれの再石灰化エナメル質ともに耐酸性の所見を示した。

本研究の一部は、平成 2 年度～4 年度文部省科学研究費補助金（一般研究（B）課題番号 02454473）を得て行った。

文 献

1) Koulourides, T., Cueto, H. and Pigman,

- W.: Rehardening of softened enamel surfaces of human teeth by solutions of calcium phosphates, *Nature*, **189**; 226-227, 1961.
- 2) Feagin, F., Patel, P. R., Koulourides, T. and Pigman, W.: Study of the effect of calcium, phosphate, fluoride and hydrogen ion concentrations on the remineralization of partially demineralized human and bovine enamel surfaces, *Archs. Oral Biol.*, **16**; 535-548, 1971.
- 3) ten Cate, J. M. and Arends, J.: Remineralization of artificial enamel lesions in vitro, *Caries Res.*, **11**; 277-286, 1977.
- 4) Backer Dirks, O.: Post-eruptive changes in dental enamel, *J. Dent. Res.*, **45**; 503-511, 1966.
- 5) ten Cate, J. M.: Remineralization phenomena: Dental plaque and surface interactions in the oral cavity. edited by Leach, S. A., London: IRL Press, 1980, pp 273-286.
- 6) Koulourides, T. and Cameron, B.: Enamel remineralization as a factor in the pathogenesis of dental caries. *J. Oral Pathol.* **9**; 255-269, 1980.
- 7) 飯島洋一, 川崎浩二, 高木興氏: 再石灰化エナメル質の化学的安定性, *口腔衛生会誌*, **39**; 205-210, 1989.
- 8) Head, J.: A study of saliva and its action on tooth enamel in reference to its rehardening and softening, *J. Amer. Medical Ass.*, **59**; 2118-2122, 1912.
- 9) Nieuw Amerongen, A. V., Oderkerk, C. H. and Driessen, A. A.: Role of mucins from human whole saliva in the protection of tooth enamel against demineralization in vitro, *Caries Res.*, **21**; 297-309, 1987.
- 10) Vissink, A., 's-Gravenmade, E. J., Panders, A. K., Vermey, A., Petersen, J. K., Visch, L. L. and Schaub, R. M. H.: A clinical comparison between commercially available mucin- and CMC-containing saliva substitutes, *Int. J. Oral Surg.*, **12**; 232-238, 1983.
- 11) Voegel, J. C. and Frank, R. M.: Interactions between various macromolecules, acquired pellicle and enamel surface: their possible application in preventive dentistry: Tooth surface interactions and preventive dentistry edited by Rølla, E., Sønju, T. and Embery, G., London: IRL Press, 1981, pp 147-156.
- 12) Winer, B. J.: Statistical principles in experimental design. 2nd ed. New York: McGraw Hill, 1971, pp 452-464.
- 13) 飯島洋一, 松尾千恵子, 高木興氏: 各種フッ化物応用後の健全エナメル質におけるアルカリ溶

- 解性フッ素濃度, 口腔衛生会誌, **40**; 209-215, 1990.
- 14) 稲葉大輔, 飯島洋一, 高木興氏: 再石灰化エナメル質および歯根表層における lanination の画像解析法による評価, 口腔衛生会誌, **41**; 294-300, 1991.
 - 15) Röllä, G.: Formation of dental integuments-some basic chemical considerations, *Swed. Dent. J.*, **1**; 241-251, 1977.
 - 16) Juriaanse, A. C., Arends, J. and Ten Bosch, J. J.: The role of surface ions in a model for peptide adsorption to whole bovine dental enamel, *J. Colloid Interface Sci.*, **76**; 220-226, 1980.
 - 17) Elizabeth, P. G. A. and Galembeck, F.: Adsorption of Carboxymethylcellulose onto hydroxyapatite. *J. Colloid Interface Sci.*, **147**; 370-377, 1991.
 - 18) Gelhard, T. B. F. M., Fidler, V., 's-Gravenmade, E. J. and Vissink, A.: Remineralization of softened human enamel in mucin-or CMC-containing artificial salivas, *J. Oral Pathol.*, **12**; 336-341, 1983.
 - 19) Vissink, A., 's-Gravenmade, E. J., 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**; 212-218, 1985.
 - 20) Silverstone, L. M., Wefel, J. S., Zimmerman, B. F., Clarkson, B. H. and Featherstone, M. J.: Remineralization of natural and artificial lesions in human dental enamel in vitro, *Caries Res.*, **15**; 138-157, 1981.
 - 21) Iijima, Y. and Koulourides, T.: Mineral density and fluoride content of in vitro remineralized lesions, *J. Dental Res.*, **67**; 577-581, 1988.
 - 22) Iijima, Y. and Koulourides, T.: Fluoride incorporation into and retention in remineralized enamel, *J. Dental Res.*, **68**; 1289-1292, 1989.
 - 23) Chow, L. C. and Brown, W. E.: Reaction of dicalcium phosphate dihydrate with fluoride, *J. Dental Res.*, **52**; 1220-1227, 1973.
 - 24) Christoffersen, M. R., Christoffersen, J. and Arends, J.: Kinetics of dissolution of Calciumhydroxyapatite. VII The effect of fluoride ions, *J. Crystal Growth*, **67**; 107-114, 1984.
 - 25) ten Cate, J. M. and Duijsters, P. P. E.: Influence of fluoride in solution on tooth demineralization. II. Microradiographic data, *Caries Res.*, **17**; 513-519, 1983.