原 著

凍結乾燥ハイドロキシエチルセルロースゲル法による 歯質強化に関する研究

天 野 憲 人

日本歯科大学新潟歯学部歯科矯正学教室（指導：亀田 晃教授）

〔受付日：平成4年5月25日〕

A study on the improvement of enamel crystallinity by application
of the Freeze-dried hydroxyethylcellulose gel method

Norihito Amano

Department of Orthodontics, School of Dentistry at Niigata, the Nippon Dental University
(Director: Prof. Akira Kameda)

1-8 Hamaura-cho, Niigata-city Niigata 951, Japan

Key words: Freeze-dried hydroxyethylcellulose gel method/fluorapatite/improvement enamel crystallinity/tray

Abstract: Using trays as a convenient means of applying the gel method clinically, a newly developed freeze-dried hydroxyethylcellulose gel (abbreviated freeze-dried HEC gel method) (group III) as well as a conventional HEC gel (group II) were applied to the enamel surface of extracted teeth.

As a result, the teeth were reinforced by fluorapatite crystal formation as well as by fluoride uptake. Using the enamel and sectioned surfaces of these two groups as well as untreated teeth (group I) as targets, morphologic observations were performed by scanning electron microscopy, qualitative analysis by thin-film X-ray diffraction measuring methods, composition analysis based on infrared spectral analysis, observations based on contact microradiography as well as polarized light microscopy, elemental analysis with an electron probe microanalyzer, and qualitative analysis based on microarea X-ray diffraction.

The results suggested that, as with the conventional HEC gel, the freeze-dried HEC gel was effective when using trays in vivo as a method of generating fluorapatite and of reinforcing tooth structure.

緒 言

歯科矯正治療中・後に生じることのあるエナメル質の白濁、脱灰や二次齲蝕の予防という観点から、フッ化物を応用したゲル法によるエナメル質歯質強化およびエナメル質表面のフルオルアパタイト生成による修復、すなわち歯面回復を目的として、種々なゲル基質による基礎的研究が、シリカハイドロゲル¹⁻⁹⁾、ゼラチンゲル¹⁰⁻¹³⁾、セルロース系ゲル^{14,15)}、ポリアクリル酸系ゲル¹⁶⁾、凍結乾燥シリカハイドロゲル¹⁷⁾、凍結乾燥ゼラチンゲル^{18,19)}において行われてきた。また、ゲル法を具体的により簡単に臨床応用する場合、凍結乾燥ゲル法が最も効率が良く、凍結乾燥ゼラチンゲル法²⁰⁾を適用した実験的研究が行われ成果を上げている。そこで、フルオルアパタイト結晶生成に良好な高分子合成粘質物質であるハイドロキシエチルセルロース (Hydroxyethylcellulose: HEC と略記) をゲル基質とし、臨床応用をより具体的かつ簡便に行えるように考案されたトレー法により、ハイドロキシエチルセルロースゲル法および凍結乾燥ハイドロキシエチルセルロースゲル法を適用し、エナメル質表面へのフルオルアパタイト付着生成と歯質強化を行い、比較観察分析し、凍結乾燥ハイドロキシエチルセルロースゲル法の歯質強化の有効性について検討することを目的として、本研究を行った。

実験材料および実験方法

1. ハイドロキシエチルセルロースゲル法および凍結乾燥ハイドロキシエチルセルロースゲル法に用いるゲル基質の調製

千葉¹⁴⁾の報告に基づき5重量%のハイドロキシエチルセルロースゲルを調製した。すなわち、0.3 M リン酸溶液および0.1 M フッ化ナトリウム溶液の等量混合液を溶媒として5% HEC ゲル調製した後、8 N 水酸化ナトリウム溶液を添加してpHメーター(堀場社製イオンメーター, N-8 F)にてpH 6.5 に調製し、このゲル基質を、アクリル樹脂製トレー(内径:縦 26 mm, 横 66

mm, 高さ 35 mm) に、30 ml 注入し、37°C 恒温槽(ヤマト科学社製, IC-62)中に24時間静置し膨潤させゲル化完了後、ハイドロキシエチルセルロースゲル法に用いるゲル基質とした。また、ゲル化完了後のハイドロキシエチルセルロースゲル基質を凍結乾燥した凍結乾燥ハイドロキシエチルセルロースゲルに蒸留水を加え、凍結乾燥前の重量に戻し、37°C 恒温槽中で24時間静置したものを凍結乾燥ハイドロキシエチルセルロースゲル法に用いるゲル基質とした。

2. 実験歯の調製ならびにハイドロキシエチルセルロースゲル法、凍結乾燥ハイドロキシエチルセルロースゲル法によるエナメル質表面へのフルオルアパタイト生成および歯質強化法

矯正治療のために必要抜去された小白歯の軟組織および歯石などの付着物を除去した後、フッ素が含有されていない歯面研磨材を用いてエナメル質表面の研磨を行い、歯科用エアータービン注水にて歯根部を切断して歯冠部のみとした表面観察分析用実験歯と、さらに試料板にモデリングコンパウンドで圧接固定し、硬組織薄片切載機(Bronwill 社製)にて頬舌的に切断後、切断面を硬組織研磨機(ビューラー社製, ECOMET-3)を用いてアルミナ粉末で琢磨仕上げを行い、切断面に反応が及ばないようにネイルエナメルにて被覆した切断面観察分析用実験歯との2種類の実験歯を調製した。

次いで、すでに調製したハイドロキシエチルセルロースゲル基質中に表面および切断面観察分析用実験歯を埋入し、0.5 M 硝酸カルシウム溶液10 ml を添加し、パラフィルムにて被覆後、37°C 恒温槽中に10日間保存して、エナメル質へのフルオルアパタイト生成および歯質強化を行った(Fig. 1)。

反応開始より10日後、実験歯をトレーより取り出し、超音波洗浄後、観察および分析に供した。なお、切断面観察分析用実験歯のネイルエナメルは、アセトンを用いて除去した。

すなわち、本研究は下記のごとく3群の観察および分析をし、比較検討を行ったものである。

I 群: 未処置歯(表面観察分析用30本, 切断面観察分析用50本)

Group II : HEC gel method

Group III : Freeze-drying HEC gel method

Fig. 1 Schematic diagram of the formation of fluorapatite and the improvement of enamel crystallinity with hydroxyethylcellulosic gel method (HEC).

Gel substance:

What was being gelled as the result of swelling the same volume of mixed solution of 0.1M sodium fluoride and 0.3M phosphoric acid after being adjusted by the addition of 5% by volume of hydroxyethylcellulosic powder and 8N sodium hydroxide to pH 6.5 for 24 hours, was taken for gel substance to be used in HEC gel method. In group II, this gel substance was used to form fluorapatite and improve enamel crystallinity. In group III, what had been gelled by returning to the weight before the freeze-dried gel by adding water to the gel after being freeze-dried, was used to form fluorapatite and improve enamel crystallinity.

Fluorapatite formation:

Fluorapatite was formed with the addition of 0.5M calcium after embedding enamel specimens in gel substance. Group II was with HEC gel method and Group III was with freeze-drying HEC gel method.

Ⅱ群：ハイドロキシエチルセルロースゲル法適用歯（表面観察分析用30本，切断面観察分析用50本）

Ⅲ群：凍結乾燥ハイドロキシエチルセルロースゲル法適用歯（表面観察分析用30本，切断面観察分析用50本）

3. エナメル質表面の観察および分析

1) 走査型電子顕微鏡による形態観察

I群からⅢ群の表面観察分析用実験歯各10本を乾燥後，試料台に接着し真空蒸着器（日立社製，

Table 1 Analytic conditions of X-ray diffraction of thin layer specimens

Target	Cu
Voltage	40 kV
Current	30 mA
Incident angle	0.5 degree
Scanning range	10-80 degree
Step scanning method	
Degree	0.02 degree
Fixed time	5 second
Divergence slit	1/4 degree
Monochromater	Graphite

E-101)にて白金蒸着後，走査型電子顕微鏡（日立社製，S-800 Scanning electron microscope；以下 SEM と略す）にてエナメル質表面の形態観察を行った。

2) 薄膜X線回折法による定性分析

I群からⅢ群の表面観察分析用実験歯各10本を乾燥後，封入管球型X線回折装置（日本電子社製，JDX-8030）に薄膜アタッチメント（日本電子社製，DX-GOTI）を付与し，薄膜X線回折測定を行った。標準試料としてシリコンをメノウ乳鉢にて微粉碎し，300 mesh に調製し，同様に薄膜X線回折測定を行った。測定条件は，各試料とも同一とし，Table 1 に示した。

(1) データ検索（同定）

I群からⅢ群の測定したデータをスムージング，バックグラウンド除去およびピークサーチ処理をした後，Hanawalt 法によるJCPDS カードを用いたコンピュータシステムにより，一次検索および二次検索のデータ検索を行った。

(2) Peak shift の変化

I群からⅢ群の測定したデータについて，回折角 2θ が 43° から 63° の間に出現し，互いに重なり of 少ない回折線 (113), (203), (222), (123), (004), (104), (214), (304) について，peak shift の比較検討を行った。

(3) 結晶性の評価

光学系による回折線の拡がりを，シリコンを標準物質として補正し，Rachinger の方法²¹⁾により $K\alpha_1$, $K\alpha_2$ の分離を行い $K\alpha_1$ のピークのみの回折線の回折角度および積分幅を求め，Scherrer の

式²²⁾から複数の回折線についてDを計算し、Hallの解析法²³⁾の関係図を求め、その切片(1/ε)から結晶子の大きさを、勾配(η)から格子不整を分離して計算した。

$$D = K\lambda / \beta \cos \theta$$

(Scherrer の式, K=1)

$$\beta \cos \theta / \lambda = 1/\varepsilon + \eta (\sin \theta / \lambda)$$

(Hall の解析法)

ただし、D、ε は結晶子の大きさ、λはX線の波長、η は格子不整、θ はブラッグ角、β は回折線の拡がりを表す。

(4) 格子定数の精密測定

I 群から III 群について、測定したデータの回折X線波形を Rachinger の方法²¹⁾により Kα₁、Kα₂ に分離し、ピークトップ法を用いて Kα₁ の正確な回折角度を決定した。このように求めた複数の回折線の回折角度から、最小自乗法で精密な格子定数を求めた。

Table 2 Conditions of surface analyses

	Elements		
	Ca	P	F
Accelerating voltage	8 kV		
Specimen current	1 μA		
Characteristic X-rays	Cak _β	Pk _α	Fk _α
Curved single crystals	PET	PET	TAP
Number of pixels	X=350 Y=350		
Pixel size	X, Y=1 μm		

Table 3 Concentration levels of elements

Level	Concentration		
	Ca	P	F
white	≥43.0	≥19.0	≥5.60
magenta	<43.0	<19.0	<5.60
red	<42.0	<18.5	<1.00
yellow	<39.0	<18.0	<0.70
green	<35.0	<17.5	<0.40
cian	<34.0	<17.0	<0.20
blue	<32.0	<16.5	<0.10
black	<30.0	<16.0	<0.01

unit: weight %

3) フーリエ変換赤外分光分析法による組成解析

I 群から III 群の表面観察分析用実験歯各10本のエナメル質表面について、フーリエ変換赤外分光分析(日本電子社製, JIR-RFX 4002 Fourier transform infrared spectroscopy; 以下 FT-IR と略す)を行った。測定方法として、FT-IR 装置に光音響分光法アタッチメントを付与して、光音響分光法(Photoacoustic spectroscopy; 以下 PAS と略す)を行った。

4. エナメル質切断面の観察および分析

1) コンタクトマイクロラジオグラフィーによる観察

Table 4 Conditions of line analyses

	Elements		
	Ca	P	F
Accelerating voltage	8 kV		
Specimen current	1 μA		
Characteristic X-rays	Cak _β	Pk _α	Fk _α
Curved single crystals	PET	PET	TAP

Table 5 Conditions of quantitative analyses

	Elements		
	Ca	P	F
Accelerating voltage	15 kV		
Specimen current	0.1 μA		
Characteristic X-rays	Cak _β	Pk _α	Fk _α
Curved single crystals	PET	PET	TAP

Table 6 Analytic conditions of microarea X-ray diffraction

Target	Cr
Filter	Ni
Voltage	50 kV
Current	120 mA
Count full scale	2000 counts
Collimator	50 μm
Counter	P.S.P.C.
Measuring time	3600 second

Fig. 2 SEM micrographs of enamel surface in groups I (left), II (middle) and III (right)
Well-developed apatite type of hexagonal prismatic crystal in the direction of *c*-axis was observed in groups II and III.

Fig. 3 Diffracted X-ray images from thin layer specimens.
Similar diffracted X-ray images were obtained in every group but intensity- and acutness-wise, the diffracted X-ray images obtained in group II were superior.

I 群から III 群の切断面観察分析用実験歯各20本を超音波洗浄後、上昇エタノール法により脱水し、スチレンモノマー置換法を行い、B.P.S. 樹脂（京都科学標本社製）にて包埋後、硬組織薄片切載機（Bronwill 社製）にて約 $500\mu\text{m}$ に切り出し、それらを自動研磨機（マルトー社製, ML-150DC）および手すり用ラッピングフィルム（マルトー社製、砥粒 9, 3, 1, $0.3\mu\text{m}$ ）を用い、厚さ約 $60\mu\text{m}$ の両面平行の研磨片に調製した。次いで、顕微X線装置（ソフテックス社製, Softex type CS M）によりコンタクトマイクロラジオグラム（contact microradiogram; 以下 CMR と略す）を撮影した。撮影条件は、管球の Cu ターゲットからフィルム面までの距離 25 cm, 管電圧 30 kV,

管電流 10 mA, 照射時間10分であった。使用したフィルムは, spectroscopic film, 649-0 (Eastman Kodak 社製) で、現像は, Kodak 社の処方 D-19で行い、現像時間は5分、停止、定着、水洗、乾燥の後、スライドガラスとカバーガラスの間に封入剤 MX（松浪硝子社製, $n_D=1.546$ ）で封入した後、光学顕微鏡で観察した。

2) 偏光顕微鏡による観察

各群の CMR 撮影に用いた研磨片をスライドガラスとカバーガラスの間に封入剤 MX にて封入し、偏光顕微鏡による観察を行った。

3) 電子プローブマイクロアナライザによる形態観察および元素分析

I 群から III 群の切断面観察分析用実験歯各20本

Fig. 4 Result of the 2nd search match (Group I).

を乾燥後、カーボン蒸着を行い、電子プローブマイクロアナライザ（日本電子社製、JXA-8600 M：以下 EPMA と略す）にて、形態観察および元素分析を行った。

（１）形態観察

I 群から III 群の切断面分析用実験歯を、加速電圧 15 kV にて、二次電子像および反射電子組成像により形態観察を行った。

（２）元素分析

①定性分析

I 群から III 群の切断面分析用実験歯について加速電圧 15 kV にて、分光結晶 TAP LiF, PET を用いて、 K_{α} , K_{β} 線などの各種 X 線スペクトルの存在を考慮して定性分析（元素同定）を行った。

②面分析

各試料の切断面において、Ca, P, F について面分析を行い、元素濃度マップを求めた。分析条件は、Table 2 に示した。また、元素濃度レベルを 8 段階とし、カラー表示との関係を Table 3 に示した。また、標準試料としてアパタイト質ガラス（日本電子社製）を用いた。

③線分析

各試料の切断面において、それぞれ Ca, P, F について線分析を行った。線分析は、エナメル質表面よりエナメル象牙境に向かい、エナメル小柱の走行に一致するように行った。分析条件は Table 4 に示した。

④定量分析

Fig. 5 Result of the 2nd search match (Group II).

各試料の切断面について、エナメル質表面よりエナメル象牙境に向かい $20\ \mu\text{m}$ 間隔で20ポイント、Ca, P, F について ZAF 補正法 (Z: 原子番号効果の補正, A: 吸収効果の補正, F: 蛍光励起の補正) による定量分析 (重量%濃度) を行った。分析条件は Table 5 に示した。そして、各群の Ca, P, F の定量結果について、平均値および標準偏差を算出し、さらに各群間の平均値の差の検定 (Welch 検定) を行った。

4) 微小領域X線回折法による測定

I 群から III 群の切断面分析用実験歯各10本について、エナメル質表面からエナメル象牙境に向かい $50\ \mu\text{m}$ 間隔で6ポイントについて微小領域X線回折装置 (日本電子社製, DX-MAP2) を用い、

直径 $50\ \mu\text{m}$ の微小領域X線回折測定を行った。測定条件は、各群および各微小部とも同一とし、Table 6 に示した。

(1) データ検索

I 群から III 群の測定したデータをスムージング、バックグラウンド除去およびピークサーチ処理をした後、Hanawalt 法により JCPDS カードを用いたコンピュータシステムによりデータ検索を行った。

(2) Line profile と peak shift

各群の測定したデータにおいて、回折角 2θ が 70° から 82° の間に出現し互いに重なるの少ない回折線 (222), (312), (213), (321), (402) について、line profile と peak shift の比較検討を行

Fig. 6 Result of the 2nd search match (Group III).

Table 7 Result of 1st search match

	JCPDS No.	Chemical formula		Peaks of matching	Percent of matching	Reliability factor	Error
Group I	1: D340011	$\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{F}$	Fluorapatite, syn	7/8	77%	229	.6
	2: *150876	$\text{Ca}_5\text{F}(\text{PO}_4)_3$	Fluorapatite, syn	5/6	71%	212	.5
	3: 180303	$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot \text{XH}_2\text{O}$		4/5	66%	187	.6
	4: D110232	$\text{Ca}_4\text{P}_2\text{O}_9$		4/7	50%	107	.4
Group II	1: D340011	$\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{F}$	Fluorapatite, syn	8/8	88%	265	.7
	2: 180303	$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot \text{XH}_2\text{O}$		5/5	83%	249	.6
	3: *150876	$\text{Ca}_5\text{F}(\text{PO}_4)_3$	Fluorapatite, syn	6/6	85%	236	.6
	4: D110232	$\text{Ca}_4\text{P}_2\text{O}_9$		5/7	62%	179	.5
Group III	1: D340011	$\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{F}$	Fluorapatite, syn	7/8	77%	331	.7
	2: *150876	$\text{Ca}_5\text{F}(\text{PO}_4)_3$	Fluorapatite, syn	5/6	71%	269	.7
	3: 180303	$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot \text{XH}_2\text{O}$		4/5	66%	221	.7
	4: D110232	$\text{Ca}_4\text{P}_2\text{O}_9$		4/7	50%	111	.4

Fig. 7 A change of peak shifts.

Although a little, a peak shift toward high angle sides was recognized in group II and III.

った。

実験結果

1. エナメル質表面の観察および分析

1) SEM による形態観察

I 群から III 群のエナメル質表面の典型的な SEM 所見を Fig. 2 に示した。I 群においては、一般的にエナメル質表面で認められるエナメル小柱の構造が認められたが、II 群および III 群においては、c 軸方向に発達したアパタイト型の六角柱状結晶が観察された。

2) 薄膜X線回折測定法による定性分析

(1) X線回折像およびデータ検索 (同定)

I 群から III 群のX線回折像を Fig. 3 に、一次検索結果を Table 7 に、二次検索結果を Fig. 4 ~6 に示した。

(2) Peak shift の変化

I 群から III 群の回折角 43° から 65° の間に出現した回折線の peak shift の変化を Fig. 7 に示した。I 群および III 群より II 群のX線強度は強い値を示し、peak shift の変化は、I 群と比較して、II 群

および III 群は僅かに high angle 側への shift を示した。

(3) 結晶性の評価

I 群から III 群の結晶性を結晶子の大きさと、格子不整とに分離して測定する Hall の解析法による関係図 ($\beta \cos \theta / \lambda \sim \sin \theta / \lambda$) を Fig. 8 に、また結晶子の大きさおよび格子不整を Table 8 に示した。

(4) 格子定数

I 群から III 群の軸 a および c 軸格子定数を Table 8 に示した。

3) FT-IR による組成解析

I 群から III 群の光音響スペクトル像を Fig. 9 ~11 に示した。各群に共通して認められた吸収バンドは、 $3,300 \sim 2,900 \text{ cm}^{-1}$, $2,140 \text{ cm}^{-1}$, $2,080 \text{ cm}^{-1}$, $2,000 \text{ cm}^{-1}$, $1,650 \text{ cm}^{-1}$, $1,550 \text{ cm}^{-1}$, $1,450 \text{ cm}^{-1}$, $1,410 \text{ cm}^{-1}$, $1,080 \text{ cm}^{-1}$, $1,010 \text{ cm}^{-1}$, 960 cm^{-1} , 880 cm^{-1} , 610 cm^{-1} , 580 cm^{-1} であった。また、I 群および II 群に認められた吸収バンドは $3,560 \text{ cm}^{-1}$, $1,740 \text{ cm}^{-1}$ であり、I 群および III 群に認められた吸収バンドは 470 cm^{-1} であった。

Fig. 8 Correlation chart of $\sin \theta / \lambda \sim \beta \cos \theta / \lambda$ by Hall's analyses.

The slopes of respective line are responsible for lattice imperfection, and the intercept of y is related to crystallite size.

Table 8 Crystallite size, lattice imperfection and lattice constant.

As a result of Hall's analysis, crystallite size indicated group I < group II < group III, and lattice imperfection demonstrated group I = group II > group III. As regards lattice constant, the lattice constant of a-axis showed group I > group II > group III, and the lattice constant of c-axis revealed a similar value in each group.

		Group I	Group II	Group III
Crystallite size	(Å)	750	800	1,000
Lattice imperfection		0.0009	0.0009	0.0002
Lattice constant	a-axis	9.42	9.41	9.38
	c-axis	6.88	6.88	6.88

Fig. 9 Photoacoustic spectral image (group I) by Fourier-transform infrared spectroscopy is shown.

2. エナメル質切断面の観察および分析

1) CMR による観察

I 群から III 群の CMR による所見を Fig. 12 に示した。I 群においては、ほぼ均一な X 線吸収度を呈していたが、II 群および III 群においては最表層エナメル質に X 線吸収度の高い層を認め、最表層下部に X 線吸収度の低い像が観察された。

2) 偏光顕微鏡による観察

I 群から III 群の偏光顕微鏡所見を Fig. 12 に示した。I 群においては、エナメル小柱の走行およびレッチウスの線条が確認され、表層付近において僅かに負の複屈折性を示す領域が認められ、全

体的にはほぼ均一なリターデーションを呈していた。II 群においては、表層エナメル質でエナメル小柱の走行方向に対して強い負の複屈折を呈し、その直下では複屈折性を示さず、さらに深層においては I 群と同様なリターデーションが認められた。III 群においては、II 群と同様な所見であったが表層部の複屈折性を示す領域が狭く、複屈折性も弱くなっていた。

3) EPMA による形態観察および元素分析

(1) 形態観察

元素分析に先立ち、I 群から III 群の二次電子像および反射電子組成像を撮影し、分析部位の決定

Fig. 10 Photoacoustic spectral image (group II) by Fourier-transform infrared spectroscopy is shown.

Fig. 11 Photoacoustic spectral image (group III) by Fourier-transform infrared spectroscopy is shown.

を行った。

(2) 元素分析

① 定性分析

I 群から III 群の定性分析の結果, 含有元素として, Ca, P, F, Cl, Na, Mg, O が同定された

(Fig. 13)。

② 面分析

I 群から III 群の元素濃度マップを Fig. 14 に示した。

I 群においては, Ca, P, F, Ca/P 共にほぼ均

Fig. 12 Contact microradiogram and polarised light micrograph.

A high degree of X-ray absorption on the utmost enamel surface layer was observed in groups II and III, and strong negative birefringence was recognized.

一な濃度分布を示していた。

Ⅱ群では、Ca 濃度が表層直下において 40～45 %の高い濃度を示すカラー表示が混在し、それに対応する部位において P の濃度が低かった。F は、表層下 50 μm 程度の深度において 1.00～1.50%および 1.50～2.50%の濃度を示す領域が存在し、深部に進むにつれて濃度が減少し、表層下 100 μm 付近までは、0.60～1.00%の濃度を示す領域が大部分を占め、その中に 1.00～1.50%の濃度を示す領域が混在しており、表層下 100 μm 以下において、主として 0.05～0.30%, 0.30～0.40

%および 0.40～0.60%の濃度を示す領域が混在し、0.60～1.00%の濃度を示す領域も僅かながら存在し、深部に移行するにつれ濃度が減少していくことが確認された。Ca/P においては、表層直下の Ca 濃度が高く、P 濃度が若干低かったので、対応するように 1.80～2.00 のレベルを示していたが、深部に移行するにつれ、1.80～2.00 の濃度レベルを示す領域が徐々に減少し、1.60～1.80 を示す領域が増加しているのが確認された。

Ⅲ群では、Ca において、表層直下の一部で 40.00～45.00%の高濃度を示す領域が存在した

Fig. 13 Qualitative analyses.

The presence of the following elements: Ca, P, Na, Mg, Cl, and O, was shown in every group.

が、ほぼⅠ群のカラーマップと同様な状態であった。Pについても、Ⅱ群と同様、Caの濃度が高い領域において、14.00～16.00%の濃度と低い値であった。Fについては、表層直下において、1.00～1.50%の濃度を示す領域が点在し、Ⅱ群のように表層直下全域に存在している状態とは異なっていた。しかしながら濃度%が0.60～1.00%を示すカラー表示の領域は、Ⅱ群より深部に及んでいた。Ca/Pにおいては、Ca濃度の高い領域に対応している部位でⅡ群と同様であったが、分析領域全体としては、1.80～2.00%のレベルを示す割合が少なく、1.60～1.80%のレベルが広領域を占めていた。

③線分析

Ⅰ群からⅢ群の線分析の結果を Fig. 15～17 に示した。

Ⅰ群において、Caは最低濃度が約36.0%、最高濃度が約39.0%、Pは最低濃度が約16.0%、最高濃度が約18.0%、Fは最低濃度が約0.01%、最高濃度が約0.17%であった。CaおよびPは表層下550 μm まではほぼ一定の濃度であったが、Fに

ついては、表層直下において最高濃度で0.06%を示し、表層下50 μm においてはほぼ最低濃度となり表層下550 μm まではほぼ一定の濃度を示した。

Ⅱ群において、Caは最低濃度が約35.5%、最高濃度が約39.0%、Pは最低濃度が約16.5%、最高濃度が約17.5%、Fは最低濃度が約0.26%、最高濃度が約1.00%であった。CaおよびPは表層下550 μm まではほぼ一定の濃度であったが、Fについては、表層部において最高濃度を示し、深部に進むに従い徐々に濃度が減少していた。表層下約250 μm までは比較的高濃度であり最低濃度が約0.63%を示し、表層下約250 μm から550 μm においては最高濃度が約0.62%程度、最低濃度が約0.25%程度であった。

Ⅲ群において、Caは最低濃度が約36.5%、最高濃度が約39.0%、Pは最低濃度が約16.5%、最高濃度が約17.5%、Fは最低濃度が約0.18%、最高濃度が約1.25%であった。CaおよびPは表層下550 μm まではほぼ一定の濃度であったが、Fについては、表層下約25 μm までが特に高濃度を示し、表層下約25 μm 以下においては最高濃度

Fig. 14 Cross-sectioned enamel surfaces by surface analyses.

The density of F was shown to be high in groups II and III, and a sphere showing the high density of F more widely in the vicinity of the enamel surface was confirmed in group II. The density distribution of Ca and P in groups II and III was almost the same as those in group I.

Fig. 15 Line analyses (Group I).

Fig. 16 Line analyses (Group II)

が約0.75%となり深部に移行するにつれ、徐々にその濃度が減少し表層下 550 μm 付近においては約0.18%であった。

④定量分析

I 群から III 群の Ca, P, F の定量分析結果を Table 9 に、各群間の平均値の差の検定結果を Table 10 に示した。

4) 微小領域X線回折法による定性分析

Fig. 17 Line analyses (Group III).

Fig. 15~17 As a result of carrying out line analyses of the cross-sectioned enamel surfaces of groups I, II and III from the enamel surface layers to deep strata, the density of F in groups II and III proved high at the surface layers and came to gradually decrease in proportion to deepness.

Table 9 Quantitative analyses

		Mean $\pm$ S.D.
Group I	Ca	36.131 $\pm$ 0.163
	P	17.690 $\pm$ 0.094
	F	0.431 $\pm$ 0.051
Group II	Ca	40.032 $\pm$ 2.434
	P	17.049 $\pm$ 0.595
	F	0.801 $\pm$ 0.232
Group III	Ca	40.373 $\pm$ 2.004
	P	17.090 $\pm$ 0.729
	F	0.740 $\pm$ 0.058

Unit: weight %

Table 10 Test results

		Test results	
Ca	I — II	*	*
	II — III		
	I — III	*	*
P	I — II	*	*
	II — III		
	I — III	*	*
F	I — II	*	*
	II — III		
	I — III	*	*

* *: $p < 0.01$

(1) X線回折像およびデータ検索

I 群から III 群の微小領域 X 線回折像を Fig. 18 ~ 20 に、データ検索の結果を Table 11 ~ 13 に示した。

(2) Line profile と peak shift の変化

I 群から III 群の回折角 2θ が 70° から 82° の間に

出現した回折線の line profile および peak shift の変化を Fig. 21 に示した。II 群および III 群は、I 群と比べて、回折線像の high angle 側への peak shift が認められた。

Fig. 18 Microarea X-ray diffraction image (Group I).

考 察

矯正治療中・後に生じる可能性のあるエナメル質の白濁、脱灰、二次齲蝕の予防、あるいは歯質強化、歯面回復を目的として、ゲル法によるエナメル質表面へのフルオルアパタイト生成およびエナメル質強化に関する研究は、シリカハイドロゲルを用いて行われて以来、一連の研究が進められてきた^{1-11, 14, 16-20, 24)}。

そこで、本研究は、組織為害性がなく、より良好な物性を有する高分子合成粘質物のうちハイドロキシエチルセルロースに着目し、トレー法を用いたハイドロキシエチルセルロースゲル法および凍結乾燥ハイドロキシエチルセルロースゲル法にてエナメル質歯質強化を行い、比較観察分析し、

凍結乾燥ハイドロキシエチルセルロースゲルの有効性について検討を行った。

1. エナメル質表面の観察および分析

1) SEM による形態観察

一般にゲル法とは、溶液に対し透過性の低いゲルを媒体として、それらの中の適切な成分を適切な速度で拡散会合させることによって結晶を成長させるものであり、通常の溶液反応では速やかに反応し、沈澱を生じてしまうような反応系に対して結晶性の良好な結晶として成長させることができる。ゲル基質が成長する結晶に溶質物質を供給する機構は、ゲル粘度、ゲル網目様構造の密度、ゲル表面の荒さ、細孔の大きさ、開孔率、拡散会合させるイオン粒子の半径、歯と周囲ゲル基質との制限された環境⁷⁾などが影響していると考えられている。5% HEC ゲル基質は小孔が適度に小さ

Fig. 19 Microarea X-ray diffraction image (Group II).

く Ca^{2+} の拡散を制限し良好な結晶成長を可能にするといわれている^{14,24)}。

Ⅱ群およびⅢ群において、c 軸方向に良く発達したアパタイト型の六角柱状結晶が認められた。Ⅱ群においては、結晶間隙が極めて狭く密集した状態で結晶成長しており、大部分が六角柱状を示し、その直径は一部の大きなものが約 $0.7 \mu\text{m}$ 、ほとんどのものが約 $0.4 \mu\text{m}$ 程度であった。また、一部に板状あるいは不定形な形態を示す結晶が観察されたが、その割合は僅かであり、形態的には良好な結晶生成がなされていると考えられる。Ⅲ群では結晶間に間隙が認められ、六角柱状結晶の直径は約 $0.6 \sim 0.8 \mu\text{m}$ 程度と大きな結晶が観察された。トレー法を応用したゼラチンゲル法および凍結乾燥ゼラチンゲル法を適用した歯質強化の研究²⁰⁾、およびハイドロキシエチルセル

ローズゲル法にて行われた歯質強化の研究¹⁵⁾の SEM 所見と比較した場合、Ⅲ群において観察された結晶間隙は、その差がほとんど認められず良好な結晶生成が成されたと考えられる。

Ⅱ群とⅢ群の SEM 所見で観察された結晶の大きさと結晶間隙に相違を生じる因子としては、ハイドロキシエチルセルローズゲル法と凍結乾燥ハイドロキシエチルセルローズゲル法に用いるフッ化物ゲルの物理的性状の違いが考えられる。すなわち Endo ら²⁵⁾が、ハイドロキシエチルセルローズゲル法に用いるフッ化物ゲルに比べ、凍結乾燥ハイドロキシエチルセルローズゲルに用いたフッ化物ゲルのゼリー強度が有意に大きく、かつ肉眼的所見において、ゲル基質内に気泡が存在し、応力による歪みや組成成分濃度の局所的な不均一などを生じた可能性が考えられると報告しているこ

Fig. 20 Microarea X-ray diffraction image (Group III).

Fig. 18~20 With X-ray beam collimated in 50 μm diameter, micro-area X-ray diffraction of the cross-sectioned enamel surfaces of groups I, II and III from the enamel surface layer to every depth was carried out.

とから、Ⅲ群の結晶間隙が大きく、結晶も大きくなったと考察する。一方、千葉ら¹⁴⁾は、ゼリー強度が、Endo ら²⁵⁾の報告より、大きな値であったにもかかわらず、ハイドロキシエチルセルロースゲル法により良好な結晶性を有するフルオルアパタイトの生成が可能であったと述べている。以上より、ゲル基質のトレー注入時、および凍結乾燥ゲル基質に蒸留水を注入する際に気泡が生じないように取り扱いに注意して操作する必要があることが考察された。

2) 薄膜X線回折法による定性分析

従来のディフラクトメーターでは試料の厚みが十分でなければ回折線の検出が困難であったが、

薄膜X線回折法は、薄膜試料からの回折強度を増加させるために平行ビーム法の光学系を用い、低角度入射方式とすることで100 Å程度の薄膜のX線回折が下地からの強力な回折X線を軽減させて行えることを可能とした。

歯科領域においては、この薄膜X線回折法を用いて、1987年に亀田ら⁸⁾、1988年に秦ら¹³⁾が報告を行っており、エナメル質表面にゲル法によるフルオルアパタイト層を生成した後の物質同定、結晶性の評価、格子定数の精密測定を行い、その有効性について述べている。

(1) X線回折像およびデータ検索

I群からⅢ群のX線波形を比較してみると特徴

Fig. 21 A change of peak shifts.

The microarea X-ray diffraction line images of every site of each group were depicted and as a result of analyzing a change of line profiles and peak shifts, a less clear peak shift toward high angle sides in groups II and III was confirmed.

的な大きな差は認められなかった。各群ともに 25.8° 付近に一番強いピークを認めたが、エナメル質粉末X線回折のデータにおいては 31.8° 付近で最強のピークが認められるのである。本研究において、 25.8° 付近の (002) および 53.1° 付近の (004) に強いピークが認められたのは、Ⅱ群およびⅢ群のゲル法により生成されたフルオルアパタイトが、エナメル小柱の方向に一致してc軸方向に結晶が配列し配向性を有していることによると考えられ、JCPDS のデータは粉末試料からの回折データであり、本実験試料で得られた結果との相異は妥当であると考察する。 25.8° 付近の最強ピークは各群とも同様の強度であったが、他のピ

ークにおいては、Ⅱ群の回折像が強度、鮮鋭度とも良好であった。

一般に良好な結晶性を有する物質のX線回折像は、鮮鋭度に優れ回折線の拡がりも少ないといわれている。

データ検索結果から、各群ともフルオルアパタイト $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{F}$ (JCPDS No. D340011) および $\text{Ca}_5\text{F}(\text{PO}_4)_3$ (JCPDS No. *150876), $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot \text{XH}_2\text{O}$ (JCPDS No. 180303), $\text{Ca}_4\text{P}_2\text{O}_9$ (JCPDS No. D110232) が検索されたが、それぞれの信頼値(存在確率)をⅠ群と比較するとⅡ群ではフルオルアパタイト (JCPDS No. D340011), (JCPDS No. *150876) で高信頼値を示していた。ま

Table 11 Result of 1st search match (Group I)

in depth	JCPDS No.	Chemical formula		Peaks of matching	Percent of matching	Reliability factor	Error
25 μm	1 : D 340010	$\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})$	Hydroxylfluoroxypatite, syn	8/10	72%	382	.7
	2 : I 90432	$\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})$	Hydroxylapatite, syn	5/ 6	71%	364	.8
	3 : * 150876	$\text{Ca}_5\text{F}(\text{PO}_4)_3$	Fluorapatite, syn	4/ 6	57%	230	.6
	4 : D 340011	$\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{F}$	Fluorapatite, syn	5/ 8	55%	230	.5
	5 : 189303	$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot \text{XH}_2\text{O}$		4/ 5	66%	207	.7
	6 : D 110232	$\text{Ca}_4\text{P}_2\text{O}_9$		4/ 7	50%	82	.3
75 μm	1 : D 340010	$\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})$	Hydroxylfluoroxypatite, syn	8/10	72%	405	.7
	2 : I 90432	$\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})$	Hydroxylapatite, syn	5/ 6	71%	377	.8
	3 : * 150876	$\text{Ca}_5\text{F}(\text{PO}_4)_3$	Fluorapatite, syn	4/ 6	57%	223	.6
	4 : D 340011	$\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{F}$	Fluorapatite, syn	5/ 8	55%	222	.5
	5 : 180303	$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot \text{XH}_2\text{O}$		4/ 5	66%	209	.7
	6 : D 110232	$\text{Ca}_4\text{P}_2\text{O}_9$		4/ 7	50%	82	.3
125 μm	1 : D 340010	$\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})$	Hydroxylfluoroxypatite, syn	8/10	72%	405	.6
	2 : I 90432	$\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})$	Hydroxylapatite, syn	5/ 6	71%	393	.8
	3 : D 340011	$\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{F}$	Fluorapatite, syn	5/ 8	55%	232	.5
	4 : 180303	$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot \text{XH}_2\text{O}$		4/ 5	66%	226	.7
	5 : * 150876	$\text{Ca}_5\text{F}(\text{PO}_4)_3$	Fluorapatite, syn	4/ 6	57%	224	.6
	6 : D 110232	$\text{Ca}_4\text{P}_2\text{O}_9$		4/ 7	50%	87	.3
175 μm	1 : I 90432	$\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})$	Hydroxylapatite, syn	5/ 6	71%	406	.8
	2 : D 340010	$\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})$	Hydroxylfluoroxypatite, syn	8/10	72%	391	.7
	3 : 180303	$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot \text{XH}_2\text{O}$		4/ 5	66%	234	.7
	4 : * 150876	$\text{Ca}_5\text{F}(\text{PO}_4)_3$	Fluorapatite, syn	4/ 6	57%	234	.6
	5 : D 340011	$\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{F}$	Fluorapatite, syn	5/ 8	55%	216	.5
	6 : D 110232	$\text{Ca}_4\text{P}_2\text{O}_9$		4/ 7	50%	86	.3
225 μm	1 : D 340010	$\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})$	Hydroxylfluoroxypatite, syn	8/10	72%	345	.6
	2 : I 90432	$\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})$	Hydroxylapatite, syn	5/ 6	71%	312	.7
	3 : * 150876	$\text{Ca}_5\text{F}(\text{PO}_4)_3$	Fluorapatite, syn	4/ 6	57%	222	.6
	4 : D 340011	$\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{F}$	Fluorapatite, syn	5/ 8	55%	190	.5
	5 : 180303	$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot \text{XO}_2\text{H}$		4/ 5	66%	176	.6
	6 : D 110232	$\text{Ca}_4\text{P}_2\text{O}_9$		4/ 7	50%	52	.2

たゲル法によるアパタイト生成において前駆物質と考えられている $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot \text{XH}_2\text{O}$, $\text{Ca}_4\text{P}_2\text{O}_9$ も高信頼値を示した。Ⅲ群においては、Ⅱ群と比較して、フルオルアパタイト (JCPDS No. D340011), (JCPDS No. *150876) で高信頼値を示し、 $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot \text{XH}_2\text{O}$, $\text{Ca}_4\text{P}_2\text{O}_9$ においては低い信頼値であったことから、反応生成物中の F 含有率が、Ⅱ群より高い状態の置換固溶体であり、前駆物質の存在確率も低く、より良好な反応生成物であることが考えられる。Rathje²⁶⁾ は水溶液中にお

いては純粋なフルオルアパタイトは合成されずハイドロキシフルオルアパタイトとして存在し、ハイドロキシアパタイトとフルオルアパタイトとは水溶液中で置換固溶体をなすと述べている。また、Moreno²⁷⁾ は F^- 置換量を系統的に変化させて合成した Fluoridate Hydroxypatite の溶解度は OH^- が F^- と 60% 置換されたときに最小になると報告している。

(2) peak shift の変化

X線回折測定データの検索において、各群とも

Table 12 Result of 1st search match (Group II)

in depth	JCPDS No.	Chemical formula		Peaks of matching	Percent of matching	Reliability factor	Error
25 μm	1: I 90432	$\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})$	Hydroxylapatite, syn	5/ 6	71%	399	.9
	2: D340010	$\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})$	Hydroxylfluoroxyapatite, syn	8/10	72%	353	.8
	3: * 150876	$\text{Ca}_5\text{F}(\text{PO}_4)_3$	Fluorapatite, syn	5/ 6	71%	301	.7
	4: 180303	$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot \text{XH}_2\text{O}$		4/ 5	66%	295	.7
	5: D340011	$\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{F}$	Fluorapatite, syn	5/ 8	55%	227	.7
	6: D110232	$\text{Ca}_4\text{P}_2\text{O}_9$		4/ 7	50%	114	.4
75 μm	1: I 90432	$\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})$	Hydroxylapatite, syn	5/ 6	71%	434	.9
	2: D340010	$\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})$	Hydroxylfluoroxyapatite, syn	9/10	82%	368	.7
	3: * 150876	$\text{Ca}_5\text{F}(\text{PO}_4)_3$	Fluorapatite, syn	5/ 6	71%	323	.7
	4: 180303	$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot \text{X}_2\text{HO}$		4/ 5	66%	291	.7
	5: D340011	$\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{F}$	Fluorapatite, syn	6/ 8	66%	273	.7
	6: D110232	$\text{Ca}_4\text{P}_2\text{O}_9$		4/ 7	50%	123	.4
125 μm	1: I 90432	$\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})$	Hydroxylapatite, syn	5/ 6	71%	444	1.0
	2: D340010	$\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})$	Hydroxylfluoroxyapatite, syn	9/10	81%	402	.7
	3: * 150876	$\text{Ca}_5\text{F}(\text{PO}_4)_3$	Fluorapatite, syn	4/ 5	66%	334	.8
	4: 180303	$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot \text{X}_7\text{HO}$		6/ 8	66%	266	.7
	5: D340011	$\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{F}$	Fluorapatite, syn	5/ 6	71%	250	.5
	6: D110232	$\text{Ca}_4\text{P}_2\text{O}_9$		4/ 7	50%	119	.4
175 μm	1: I 90432	$\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})$	Hydroxylapatite, syn	4/ 6	57%	322	1.0
	2: D340010	$\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})$	Hydroxylfluoroxyapatite, syn	6/10	54%	290	.7
	3: * 150876	$\text{Ca}_5\text{F}(\text{PO}_4)_3$	Fluorapatite, syn	3/ 5	50%	214	.7
	4: D110232	$\text{Ca}_4\text{P}_2\text{O}_9$		4/ 7	50%	115	.4
225 μm	1: D340010	$\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})$	Hydroxylfluoroxyapatite, syn	7/10	63%	341	.8
	2: I 90432	$\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})$	Hydroxylapatite, syn	4/ 6	57%	273	.9
	3: 180303	$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot \text{XH}_2\text{O}$		3/ 5	50%	270	.8
	4: * 150876	$\text{Ca}_5\text{F}(\text{PO}_4)_3$	Fluorapatite, syn	4/ 6	57%	144	.4
	5: D110232	$\text{Ca}_4\text{P}_2\text{O}_9$		4/ 7	50%	129	.5

にフルオルアパタイトおよびアパタイト前駆物質の存在が同定されたが、それぞれ信頼値に相異が認められ、結晶性に違いがあることが示唆された。一般に、ハイドロキシアパタイトとフルオルアパタイトが混在する場合、いずれも六方晶系に属する結晶でありアパタイト型のX線回折像を呈するため、両者の識別は困難であるが、結晶のa軸格子定数がハイドロキシアパタイトにおいて9.418 Å (JCPDS No. 90432), フルオルアパタイトは9.368 Å (JCPDS No. 150876) と僅かに異なるため、フルオルアパタイトの含有量の多い置換固溶体のX線回折像は(hk0)の方向においてhigh angle 側へ peak shift を生じるのである。

Ⅱ群およびⅢ群はⅠ群に比べて、僅かに high angle 側へ peak shift していることが確認され、Ⅰ群よりF含有率の高い置換固溶体であると考えられた。Ⅱ群とⅢ群を比較すると、ピークシフトの変化はほとんど確認されなかった。ハイドロキシエチルセルロースゲル法によりエナメル質表面へのフルオルアパタイト付着生成および歯質強化を行った矢口ら¹⁵⁾の報告においても僅かに high angle 側にピークシフトの変化で認められ、トレー法を応用したゼラチンゲル法および凍結乾燥ゼラチンゲル法を行った吉田²⁰⁾の報告では、凍結乾燥ゼラチンゲル法より、ゼラチンゲル法において high angle 側にピークシフトの変化が認められ

Table 13 Result of 1st search match (Group III)

in depth	JCPDS No.	Chemical formula		Peaks of matching	Percent of matching	Reliability factor	Error
25 μm	1: I 90432	$\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})$	Hydroxylapatite, syn	5/ 6	71%	531	1.0
	2: D 340010	$\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})$	Hydroxylfluoroxapatite, syn	8/10	72%	469	.8
	3: 180303	$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot \text{XH}_2\text{O}$		4/ 5	66%	345	.8
	4: D 340011	$\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{F}$	Fluorapatite, syn	5/ 8	55%	339	.7
	5: * 150876	$\text{Ca}_3\text{F}(\text{PO}_4)_3$	Fluorapatite, syn	5/ 6	71%	309	.5
	6: D 110232	$\text{Ca}_4\text{P}_2\text{O}_9$		4/ 7	50%	151	.4
75 μm	1: I 90432	$\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})$	Hydroxylapatite, syn	5/ 6	71%	434	.9
	2: D 340010	$\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})$	Hydroxylfluoroxapatite, syn	8/10	72%	368	.8
	3: D 340011	$\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{F}$	Fluorapatite, syn	5/ 8	55%	323	.7
	4: * 150876	$\text{Ca}_3\text{F}(\text{PO}_4)_3$	Fluorapatite, syn	5/ 6	71%	291	.5
	5: 180303	$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot \text{X}_2\text{HO}$		4/ 5	66%	273	.6
	6: D 110232	$\text{Ca}_4\text{P}_2\text{O}_9$		4/ 7	50%	123	.3
125 μm	1: I 90432	$\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})$	Hydroxylapatite, syn	5/ 6	71%	425	.8
	2: D 340010	$\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})$	Hydroxylfluoroxapatite, syn	8/10	72%	403	.7
	3: * 150876	$\text{Ca}_3\text{F}(\text{PO}_4)_3$	Fluorapatite, syn	4/ 6	57%	323	.7
	4: D 340011	$\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{F}$	Fluorapatite, syn	5/ 8	55%	275	.7
	5: 180303	$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot \text{XH}_2\text{O}$		4/ 5	66%	242	.5
	6: D 110232	$\text{Ca}_4\text{P}_2\text{O}_9$		4/ 7	50%	88	.3
175 μm	1: D 340010	$\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})$	Hydroxylfluoroxapatite, syn	8/10	72%	407	.7
	2: I 90432	$\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})$	Hydroxylapatite, syn	5/ 6	71%	386	.8
	3: D 340011	$\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{F}$	Fluorapatite, syn	5/ 8	55%	285	.7
	4: * 150876	$\text{Ca}_3\text{F}(\text{PO}_4)_3$	Fluorapatite, syn	5/ 6	71%	224	.5
	5: 180303	$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot \text{XH}_2\text{O}$		4/ 5	66%	208	.7
	6: D 110232	$\text{Ca}_4\text{P}_2\text{O}_9$		4/ 7	50%	110	.3
225 μm	1: I 90432	$\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})$	Hydroxylapatite, syn	5/ 6	71%	421	.9
	2: D 340010	$\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})$	Hydroxylfluoroxapatite, syn	8/10	72%	374	.7
	3: D 340011	$\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{F}$	Fluorapatite, syn	5/ 8	55%	265	.6
	4: 180303	$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot \text{XH}_2\text{O}$		4/ 5	66%	249	.8
	5: * 150876	$\text{Ca}_3\text{F}(\text{PO}_4)_3$	Fluorapatite, syn	5/ 6	71%	201	.5
	6: D 110232	$\text{Ca}_4\text{P}_2\text{O}_9$		4/ 7	50%	115	.3

Table 11~13 The cross-sectioned enamel surface of groups I, II and III examined by microarea X-ray diffraction. Fluorapatite and hydroxyapatite were identified at every analyzed site of each group.

たと述べている。

(3) 結晶性の評価

結晶子の大きさと結晶構造の完全さから、結晶性で評価される。結晶構造における異種イオンの置換や原子配列の乱れ、構成原子の欠陥など結晶構造上の不完全さを総合して格子不整と表現されている。結晶性の高い物質は、結晶子の大きさが大きく格子不整が少なく、そのX線回折像は鮮鋭

で拡がりが少ない。そこで、回折線の拡がりを経晶子の大きさと格子不整とに分離して評価するHallの解析法を行った結果、結晶子の大きさと格子不整は、それぞれI群において750 Å, 0.09%, II群において800 Å, 0.09%, III群において1000 Å, 0.02%となった。I群と比較して、II群は結晶子の大きさが大きく、格子不整は同じ値となった。III群は、I群およびII群と比較しても、

結晶子の大きさおよび格子不整ともに結晶性の良好な結晶であることが示唆された。

一方、薄膜X線回折測定法で評価が行われたエナメル質表面へのフルオルアパタイト付着生成実験において、秦ら¹³⁾がシリカハイドロゲル法およびゼラチンゲル法について報告しているが、シリカハイドロゲル法においては結晶子の大きさが、 $>10^4$ 、格子不整が0.004、ゼラチンゲル法ではそれぞれ 3000 Å, 0.004であったと報告している。エナメル質に5%ハイドロキシエチルセルロースゲル法を適用した矢口ら¹⁵⁾によると、結晶子の大きさが 2100 Å, 格子不整は0.11であったと述べている。トレー法を応用したゼラチンゲル法および凍結乾燥ゼラチンゲル法におけるエナメル質表面へのフルオルアパタイト付着生成を行った吉田²⁰⁾によると、ゼラチンゲル法において結晶子の大きさが 1200 Å, 格子不整が 0.0026, 凍結乾燥ゼラチンゲル法において 1100 Å, 0.0028 であった。それぞれの実験の条件の相違により比較検討は困難であるが、ゲル界面の面積に対して反応に供するイオンの量が多いゲル法において生成された結晶の方が大きな結晶が得られることから、トレー法においては、歯をゲル中に埋入するときの界面からの位置、あるいはトレー内壁からの距離なども適切に反応が生じる部位に位置付けることも考慮する必要があると考えられた。また、ゲル内における結晶分布の系統的な研究も行う必要があらう。

(4) 格子定数

ハイドロキシアパタイトとフルオルアパタイトのa軸格子定数が異なっており、両者が置換固溶体として混在している場合、格子定数を算出し、その短縮あるいは延長から結晶性の検討を行うことができる。Kay ら²⁸⁾は、ハイドロキシアパタイトの格子定数の値を $a=9.424$ Å, $c=6.879$ Å, フルオルアパタイトは $a=9.368$ Å, $c=6.884$ Å と報告している。LeGeros ら^{29,30)}によると、アパタイトのa軸格子定数は F^- , CO_3^{2-} により短縮し、 HPO_4^{2-} , Cl^- により延長し、c軸格子定数は CO_3^{2-} により延長すると述べている。

本研究においては、a軸格子定数は、I群で、9.42 Å, II群で 9.41 Å, III群で 9.38 Å, c軸格

子定数はすべての群で 6.88 Å であった。すなわちI群と比較して、II群およびIII群のa軸格子定数が僅かであるが短縮していること、およびc軸格子定数においては各群とも同じ値を示していることから、III群はII群よりフッ素含有率の高いアパタイトであることが示唆された。

3) FT-IR による組成解析

従来、透過赤外分光分析法を用い、ゲル法により生成した粉体フルオルアパタイト結晶の組成解析を行ってきたが、エナメル質を研究対象としたフルオルアパタイトの生成および歯質強化に関する研究においては、試料作製上の問題があった。FT-IR は、光学系に二光束干渉計を用いており、得られるスペクトルの特徴として、波数精度、再現性が極めて高く、スペクトル全域にわたり一定で高い分解能の測定が行えること、干渉計を用いるため測定時間が大幅に短縮されていることが特徴として上げられる。また光学系に各種アタッチメントを付与することにより種々の測定で行える³¹⁾。

本実験で用いた PAS の原理は、試料に光が照射されると、試料に取り込まれた光エネルギーの一部は試料内に熱を発生し、引き続き起こる熱拡散により熱エネルギーの一部は周囲の気体に伝達され、疎密波(音波)を発生し、この疎密度を高感度マイクロホンで検知することを基本原理としている。PAS の利点は透過型の KBr 錠剤法における試料のかき取り、粉碎、KBr との混合、加圧などの前処理を必要とせず、試料を非破壊で測定、回収が可能である。また固体試料表面からの μm オーダーのデプスプロファイル分析も行える、などが考えられる³¹⁾。

I群からIII群の光音響スペクトルの吸収バンドの位置から、組成解析を行うと、各群に共通して認められた $3,300\sim 2,900\text{ cm}^{-1}$, $1,650\text{ cm}^{-1}$ は H_2O に、 $2,140\text{ cm}^{-1}$, $2,080\text{ cm}^{-1}$, $2,000\text{ cm}^{-1}$ はアミノ酸に、 $1,450\text{ cm}^{-1}$, $1,410\text{ cm}^{-1}$, 880 cm^{-1} は CO_3^{2-} に、 $1,080\text{ cm}^{-1}$, $1,010\text{ cm}^{-1}$, 960 cm^{-1} , 610 cm^{-1} , 580 cm^{-1} は PO_4^{3-} に、 $1,550\text{ cm}^{-1}$ は Amide II (N-H, 振角振動) に帰属する吸収バンドであると考えられた。また、 $2,000\text{ cm}^{-1}$ は CO_2 に、 $1,650\text{ cm}^{-1}$ は Amide I (C=O, 伸縮振動) に帰

属する吸収バンドの可能性も示唆された。Ⅰ群およびⅡ群に認められた $3,560\text{ cm}^{-1}$ は OH^- に、 $1,740\text{ cm}^{-1}$ はアミノ酸に、Ⅰ群およびⅢ群に認められた 470 cm^{-1} は PO_4^{3-} に帰属する吸収バンドであると考えられた。Ⅰ群からⅢ群ともに、 PO_4^{3-} 、 OH^- 、 H_2O 、 CO_3^{2-} の存在で認められ、X線回折法からフルオルアパタイト、ハイドロキシアパタイト、 $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot \text{XH}_2\text{O}$ が同定された所見と一致したが、 CO_3^{2-} を含有した炭酸アパタイトは検索されなかった。鈴木³²⁾は、核磁気共鳴で生体アパタイトの H_2O 、 OH^- の状態を研究した結果、エナメル質は吸着水でなく band water あるいは結晶水を含有し、OH の位置に他のイオンの置換を推定し、そのイオンは主に CO_3^{2-} であろうと報告しており、また粉体反射赤外によりエナメル質の CO_3^{2-} は結晶中と表面に存在していると述べている。一般に湿式法で合成されたアパタイトは CO_3^{2-} の含有量が多く、結晶性が悪いとされているが、高分子合成粘質物混合ゲルを用いてフルオルアパタイト生成を行った岡ら²⁴⁾によると、ゲル基質中のヒドロキシエチルセルロース含有率が高くなるにつれ、赤外線吸収スペクトル像の CO_3^{2-} に帰属するピークが非常に弱い吸収に変化することが確認されている。矢口ら¹⁵⁾は、ヒドロキシエチルセルロースゲル法によるエナメル質表面へのフルオルアパタイト付着生成および歯質強化を行い、FT-IR に PAS のアタッチメントを付与してエナメル質表面における赤外分光分析を行っており、この CO_3^{2-} の定量分析の検討を加え、その結晶性の良否あるいはエナメル質表面へのフルオルアパタイト生成の初期反応(結晶生成)の解明に役立つであろうと考察している。

2. エナメル質切断面の観察および分析

1) CMR および偏光顕微鏡による観察

石灰化硬組織内での石灰塩の分布、部位による石灰化度の違いを、CMR および偏光顕微鏡により組織学的に観察した。偏光顕微鏡は、微細構造の示す光学的な諸性質から、微細構造を構成する種類、配列方向、その量の変化、他の物質との混合状態などを推定しようとするものであり、歯の石灰化像、無機塩結晶の配列の微細構造、基質の

線維成分の配列構造の観察などに用いられる³³⁾。

CMR の所見から、Ⅱ群およびⅢ群のエナメル質表層にX線吸収度の高い高石灰化を示す層が認められ、その下方においては、表層部と比較してX線透過性の高い石灰化度の低い領域で認められたが、表層部エナメル質はゲル法によるフルオルアパタイト結晶の生成、およびオリジナルエナメル質へのFの取り込みによりフルオルアパタイトへ転化して良好な結晶を示した結果であると考えられる。

偏光顕微鏡所見では、Ⅱ群およびⅢ群のエナメル質表層部において強い負の複屈折性を示し、その直下に負の複屈折性を示さない領域が認められ、さらに下層においては対照群と同様なリターデーションを示した。Ⅱ群と比較して、Ⅲ群は表層部の強い負の複屈折性を示す領域が狭く、その直下の複屈折性を示さない領域も少なかった。

以上から、CMR と偏光顕微鏡の所見により比較検討すると、CMR 所見の、最表層エナメル質のX線不透過性の強い部分と偏光顕微鏡所見の強い負の複屈折性を示す部位は、ヒドロキシエチルセルロースゲル法および凍結乾燥ヒドロキシエチルセルロースゲル法により歯質強化が示唆された。表層下のX線不透過性の減弱している部位は偏光顕微鏡所見において複屈折性を示さないが、典型的な表層下脱灰の像と異なりエナメル質小柱の走行も確認できることからエナメル質の溶解を生じるほどではない軽度の脱灰が生じているか、石灰化度の違いおよび結晶配列の違いなどにより生じたものと考えられ、EPMA およびX線回折の結果と併せて考察される必要がある。一連のゲル法による歯質強化の研究報告において、亀田ら⁸⁾は表層下エナメル質において断続的な脱灰減少を生じたと述べているが、武田ら¹²⁾は表層においてフルオルアパタイトの付着生成ならびにオリジナルエナメル質の結晶性の向上が示唆され、脱灰現象を認めていない。千葉ら¹⁴⁾は、セルロース系ゲルによるフルオルアパタイト生成に最適なゲルの反応層の pH 値は 2.2~2.5 前後を示し、これはセルロース系ゲル基質によるフルオルアパタイト生成法が、

の化学反応を起こし、pH 低下の原因として、反応系に生じる H^+ が速やかにゲル基質に拡散することによって考えられると述べている。ゲル法によるフルオルアパタイト生成に際して pH が低下することは、青木ら³⁴⁾、亀田ら⁸⁾、遠藤¹¹⁾ が指摘するように、一度ゲル法により生成された化学的安定性(耐溶解性)の劣るフルオルアパタイトすなわち各種イオンの置換や原子配列の乱れ、構成原子の欠落などによる結晶構造の不完全なアパタイトを溶解し、再び良好な結晶を生成し、結晶性の向上に pH 低下は役立つであろうと考察している。吉田²⁰⁾は、セラチンゲル法および凍結乾燥セラチンゲル法を適用したエナメル質強化において、表層下エナメル質の脱灰現象を疑わせる所見が観察されたと報告し、この原因としてフルオルアパタイト生成時の pH 低下とフルオルアパタイト生成というエナメル質表面の脱灰－石灰化の動的平衡状態下にあること、および生体アパタイトが Ca, P の供給源になることによると考察している。矢口ら¹⁵⁾は、ハイドロキシエチルセルロースゲル法による歯質強化実験の結果、CMR において表層下に X 線不透過性の若干減弱した状態で、偏光顕微鏡所見において負の複屈折性を示さない領域で認められたが、エナメル質小柱の破壊つまり溶解を伴うものではなく、かつ EPMA を用いた形態観察および元素分析により脱灰現象は確認されなかったと述べており、さらに透過型電子顕微鏡によるその部位のアパタイト結晶の変化について検討する必要があることを考察している。

以上からゲル法によるフルオルアパタイト生成時の pH 低下とそれに伴う表層下の結晶構造の変化について、今後、初期反応および経時的变化を含めて、最適な歯質強化が成されるための条件を検討する必要があると思われる。

2) EPMA による形態観察および元素分析

(1) 形態観察

電子線を試料表面に照射すると、電子と物質との相互作用の結果、元素分析に利用される特性 X 線の他に、物質の構成元素やその結合状態を示す情報の媒体である二次電子、反射電子、吸収電

子、透過電子などの量子が発生し、形態観察が可能となる。特に反射電子組成像は、反射電子の試料による凹凸成分と試料組成の平均原子番号に依存する情報から、凹凸成分を減算した電子像であり分析部位を決定するのに光学顕微鏡や二次電子像にもまして有効な方法であるといわれており³⁵⁾、EPMA による元素分析を行う場合、分析領域の二次電子像および反射電子組成像の観察を行い、試料表面の異物やエナメル質の亀裂、脱灰など分析に影響を与える部位が存在しないことを確認し、分析領域の決定に応用されている。

I 群において、切断面エナメル質表層部のエッジに丸みを生じていたが組成像と併せて観察したところ比較的良好的な状態であった。II 群および III 群においては、研磨時の傷が若干確認されたが分析に大きな影響を及ぼすほどではなく概ね良好であり、分析部位とした。

(2) 元素分析

① I 群から III 群の特性 X 線のスペクトルデータから元素同定を行った結果、各群ともに含有元素として、Ca, P, F, Cl, Na, Mg, O が同定され、本研究の分析対象元素を Ca, P, F とした。一般に、歯は主要元素 Ca, P, CO_2 , Mg 以外に、多数の微量元素を含んでおり³⁶⁾、Cutres³⁷⁾ は、エナメル質の微量元素として 1,000 ppm 以上で Na, Cl, 100~1,000 ppm の範囲で K, S, Zn, Si, F, Sr など、10~100 ppm の範囲で Fe, Al, B, Ba など、1~10 ppm の範囲で Pb, Cu, Mo, Cd, Ti, Mn などが存在すると報告している。吉田²⁰⁾ および矢口ら¹⁵⁾ はエナメル質表面へのフルオルアパタイト付着生成において、その主役は Ca, P, F であるが微量元素も複雑に関連している可能性が推測されると考察している。

② 面分析

本研究に用いた EPMA は、広領域の高速度分析が可能な CMA (Computer-aided Micro-Analyzer) を用い、 $350 \times 350 \mu\text{m}$ の領域について、元素濃度レベルをカラー表示により比較検討できる面分析を行った。

各群の Ca および P の濃度分布所見について、I 群では、ほぼ均一な濃度分布を示しており、Ca は深部に向かいその濃度を少しずつ増加して

おりPはその濃度を徐々に減少しているように観察され、その結果Ca/P原子比も深部において高い状態を示すカラー表示が増加していた。Ⅱ群では、Caの濃度が表層において高い濃度レベルを示す領域が存在し、それに対応する部位のPの濃度が低下しており、表層下100~150 μm 付近においてもCa濃度の高い領域に対応してPの濃度が低い状態を示すカラー表示が散在している状態であり、Ca/P比はそれを反映するように全体的に高い状態として観察された。Ⅲ群では、表層においてⅡ群と同様な濃度分布の傾向を示したが、表層下の変化はⅡ群とⅠ群を比較したときのような大きな変化が認められないものの、分析領域の全体を比較するとⅠ群よりCa/P比が高い状態であることが確認された。このようにPのX線強度の減少について武田¹²⁾は、F含有の石灰化度の高い部位に一致してPのX線強度の減少が認められたと報告し、F含有のリン酸カルシウム化合物が存在すると、PのX線波長がCaのそれより2倍ほどあるので、結晶中においてPの波長のX線の吸収が生じることも影響すると考察しており、また宮井⁷⁾はエナメル質表面の脱灰-石灰化の動的平衡状態下におけるゲル法によるフルオルアパタイト生成の過程、および生体硬組織アパタイト中の Ca^{2+} イオン交換、ならびに電子線の試料内への浸透する深さの違いにより論じている。

Fについては、Ⅰ群において均一に分析領域全体が低いレベルであり、その平均は0.02%であった。Ⅱ群およびⅢ群においては、表層付近で、1.0~2.5%を示す領域が存在しており、特に濃度レベルが高い部位の分布はⅡ群においてより広く表層付近に確認され、それ以下の分析領域においては0.6~1.0%を示す濃度レベルの領域が大部分を占め、深部に移行するに従い徐々に濃度が低下して行く傾向を有することが確認された。亀田³⁹⁾はカラーマップによる面分析の結果からCa, P, Fともかなりの個体差が認められたと報告し、研究に際して同一個体の歯を用いることの必要性を指摘している。一般にエナメル質における種々な化学成分はその元素によって、個体差、年齢あるいはエナメル質の部位によって分布濃度異なると考えられており、Robinson³⁸⁾は、Ca

とPの分布状態を調べた結果、複雑なパターンを示し、小窩裂溝部、エナメル象牙境、切縁、咬頭頂部、歯頸部が低い傾向で、唇舌側面表層部は石灰化が良いと報告している。今後、*in vivo*でゲル法を適用する場合に、石灰化が低く、齲蝕の好発部位であるとされる歯頸部、小窩裂溝部においても歯質強化が十分成される必要がある。ハイドロキシエチルセルロースゲルは流動性を有しており、本研究で行った浸漬法において有効性が確認されたが、複雑な口腔内において流動性のあるゲル基質で良好な結果が得られる可能性がある。

Ⅱ群およびⅢ群の偏光顕微鏡所見との比較検討を行うと、表層下における屈折性の変化が表層下脱灰であるならば、その領域に、 Ca^{2+} , PO_4^{3-} の溶質などの複雑な変化が確認されるべきであるが、EPMA面分析においては確認されなかった。シリカハイドロゲル法による歯質強化を行った宮井⁷⁾の報告によると、反応領域においてpHが低下することと、ゲル法によるフルオルアパタイト生成という両者が、抜去歯エナメル質表面においては脱灰-石灰化という相反する現象として動的平衡状態に達していること、シリカハイドロゲル法によるフルオルアパタイト生成においてbrushite ($\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)がCa, Pの供給源となり F^- の作用でフルオルアパタイトに変化するだけでなく、オリジナルエナメル質もこのゲル法においては重要なCa, Pの供給源となり得ることによると考えられ、このようなCa, PとFとの相互作用で、フルオルアパタイトを生成させ、かつFのオリジナルエナメル質内への取り込みが生じていると考察している。生体アパタイトは結晶性が低く、かなり大きな格子不整をもつ構造的に欠陥を有する不完全な結晶であるといわれている。このような結晶にFが取り込まれると、結晶性の向上と耐溶解性が増加するが、Endo²⁵⁾はゲル中からのFの取り込み、フルオルアパタイト層の生成、および生成されたフルオルアパタイト層からのfluoride-releasing効果⁴⁰⁾による結晶性の向上の可能性を考察している。

③線分析

Ca, Pについては各群とも明らかな相違は観察されなかった。武田¹²⁾はシリカハイドロゲル法

およびゼラチンゲル法適用歯において Ca, P の X線強度の変化は観察されなかったと報告している。亀田ら³⁹⁾は, Ca の分析結果において, シリカハイドロゲル法適用歯について深度 150 μm まで, ゼラチンゲル法適用歯について深度 75 μm まで濃度の上昇を認め, 再結晶化による Ca 濃度の上昇によると考察している。トレー法応用のゼラチンゲル法および凍結乾燥ゼラチンゲル法を行った吉田²⁰⁾は Ca, P ともに有意な変化は認められなかったと報告している。矢口ら¹⁵⁾は, ハイドロキシエチルセルロースゲル法適用歯において, Ca, P の最低濃度と最高濃度の濃度差が認められた以外に明らかな変化は観察されなかったと述べている。

F 濃度に関しては, I 群と比較して, II 群および III 群ともにその濃度が高濃度であり表層から深層に向かい濃度勾配が認められた。亀田ら³⁹⁾はシリカハイドロゲル法適用歯で表層から 200 μm まで, 吉田²⁰⁾はゼラチンゲル法適用歯で約 150 μm , 凍結乾燥ゼラチンゲル法で約 200 μm まで, 矢口ら¹⁵⁾は HEC ゲル法適用歯で約 200 μm まで, それぞれ F の取り込みを認めている。Jenkins ら⁴¹⁾, Brudevold ら⁴²⁾はエナメル質のフッ素濃度は表層で高く内部に行くに従い低くなる F-gradient があり, 年齢, 歯面, 部位によって変化すると報告している。吉田²⁰⁾は, 逆にこのことはゲル法をエナメル質表面に同一条件で適用したとしても, 年齢, 歯面, 部位によって F⁻ の効果が異なると考えられると述べ, トレー法の適用時期 および 期間, 適用部位 などの検討が必要だと指摘している。

④定量分析

線分析において表層下約 550 μm の深度まで計測を行った結果, 深度約 400 μm 付近において II 群および III 群の F 取り込みの濃度が一定となったので, 表層から深部へ 400 μm の範囲の測定を行うこととした。すなわち, 20 μm 間隔で 20 点測定を行い元素濃度の定量分析を行った。その結果, Ca および F については I 群と比較し, II 群および III 群ともに, 平均濃度の上昇が認められ, 平均値の差の検定において危険率 1% で有意差を確認した。P についても I 群と比較し, II 群およ

び III 群ともに平均濃度が減少し, 平均値の差の検定において 1% で有意差が確認された。II 群および III 群間において各元素とも平均値の差の検定において有意差を認めなかった。測定した Ca および P の重量% から Ca/P 重量比を算出してみると (括弧内はモル比換算), I 群において平均値が 2.04 (1.59), 最大値 2.06 (1.60), 最小値 2.02 (1.57), II 群において平均値が 2.36 (1.83), 最大値 2.84 (2.21), 最小値 2.02 (1.57), III 群において平均値 2.37 (1.84), 最大値 2.75 (2.14), 最小値 2.03 (1.58) であった。エナメル質は乾燥重量で, カルシウム 36%, リン (P) 17.5%, Ca/P 比は重量比で 2.08, モル比で 1.67 であり, 純粋なハイドロキシアパタイトにおいて Ca/P 重量比は 2.15 である⁴³⁾。定量結果より算出した II 群および III 群の Ca/P 比の変化において, モル比の理論値 1.67 よりも Ca-sufficient な状態であった。I 群と比較して II 群および III 群は平均値の差の検定において有意差が認められたものの, P および Ca の平均値の変化を比較検討すると, Ca の増加と P の僅かな減少であり脱灰現象を認めるものでなく, アパタイト中のリン酸イオンが他のイオンと置換しやすいという報告がないことから, Ca/P 比の高い Ca 化合物の存在も考えられ, 微小領域 X 線回折測定結果から各群の各測定部位において, $\text{Ca}_4\text{P}_2\text{O}_9$ の (JCPDS No. 110232) 生成が示唆されている。亀田ら³⁹⁾はゼラチンゲル法適用歯において Ca が危険率 5% で有意に増加し, このことについて F の作用による再結晶に伴う Ca 濃度の上昇, 複雑な分布状態³⁷⁾あるいは個体差による影響であろうと考察している。F については, I 群と比較して II 群および III 群ともに有意にその濃度の上昇が認められた。

3) 微小領域 X 線回折法

表面観察分析用実験歯において薄膜 X 線回折測定を行いフルオルアパタイトの存在と結晶性の向上が示唆されたが, 微小領域 X 線回折法を用いて切断面観察分析用実験歯について, ハイドロキシエチルセルロースゲル法による歯質強化の X 線結晶学的検討を行った。

(1) X 線回折像およびデータ検索 (同定)

I 群から III 群の微小領域において, ハイドロキ

シアパタイト $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$ (JCPDS No. I 90432), ハイドロキシフルオロキシアパタイト $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$ (JCPDS No. D340010), フルオルアパタイト $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{F}$ (JCPDS No. D340011), フルオルアパタイト $\text{Ca}_5\text{F}(\text{PO}_4)_3$ (JCPDS No. * 150876), $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot \text{XH}_2\text{O}$ (JCPDS No. 180303), $\text{Ca}_4\text{P}_2\text{O}_9$ (JCPDS No. D110232) が同定された。ただし、Ⅱ群の表層下 $175 \mu\text{m}$ および $225 \mu\text{m}$ において、ハイドロキシアパタイト $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$ (JCPDS No. I 90432), ハイドロキシフルオロキシアパタイト $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$ (JCPDS No. D340010), フルオルアパタイト $\text{Ca}_5\text{F}(\text{PO}_4)_3$ (JCPDS No. * 150876), $\text{Ca}_4\text{P}_2\text{O}_9$ (JCPDS No. D110232) が同定されたが、この部位の信頼値が低く、Ca および P の複雑な分布状態³⁹⁾などによる石灰化の不良な部位が計測された可能性が考えられた。Ⅰ群とⅡ群およびⅠ群とⅢ群を比較した場合、Ⅱ群の表層下 $175 \mu\text{m}$ の部位を除き、全体的により信頼値が高い結果となった。このことは、ゲル法により F がエナメル質表面から浸透しアパタイト内部において置換反応へと進行してフルオルアパタイトへ転化し、より良好な結晶の存在が高い確率を占めることによると考えられた。一般に生体アパタイトは結晶性が低く格子不整が大きいといわれており、結晶構造の OH^- に F^- が置換することにより結晶性が向上するとされている。Endo ら²⁵⁾ はゲル法によるエナメル質歯質強化の要因として、エナメル質表面へのフルオルアパタイト生成、ゲル中からの F の取り込み、および生成されたフルオルアパタイト層からの fluoride-releasing 効果⁴⁰⁾ による結晶性の向上の可能性が考えられると報告している。また、遠藤ら⁴⁴⁾ は、シリカハイドロゲル法およびゼラチンゲル法を適用したエナメル質切断面に微小領域 X 線回折法による定性分析を行った結果、line profile の変化を認められなかったと報告し、抜去歯エナメル質がすでに熟成している場合、格子不整が修復され結晶の大きさが多少増大しても、その客観的な分析は困難なこともあると述べている。岡崎⁴⁵⁾ は、 F^- の供給量に比例して取り込まれるが、アパタイトの水酸基の位置にすべてが置換するとは限らないと報告し、可児⁴⁶⁾ は F の存在は石灰化において結晶成長を促進

するが、すでに形成され熟成した結晶の大きさの増大には余り影響を及ぼさないと論じている。吉田²⁰⁾ は、トレー法を応用した、ゼラチンゲル法および凍結乾燥ゼラチンゲル法を適用した切断面エナメル質において、微小領域 X 線回折法を行った結果、結晶性の向上が示唆されたと報告している。Temin ら⁴⁷⁾ は fluoride-releasing 作用をもつ修復物を施したエナメル質表面において、フッ素濃度の増加を認め、適用時間が長いほど、また表層部ほど高濃度を示し、深度が深くなるにつれて、濃度が減少したと報告している。

(2) Line profile と peak shift

各群の line profile および peak shift の変化に関して各深度において比較検討すると、いずれの群とも line profile について顕著な差異は認められなかった。Peak shift については、Ⅰ群と比較して、Ⅱ群およびⅢ群において、表層部ほど high angle 側への peak shift が、僅かであるが認められたことから、表層部ほどフルオルアパタイトの含有率が高いと考えられるが、一次検索結果の信頼値と併せて考察すると、Ⅱ群およびⅢ群においては、ハイドロキシアパタイト $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$ (JCPDS No. I 90432), ハイドロキシフルオロキシアパタイト $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$ (JCPDS No. D340010), フルオルアパタイト $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{F}$ (JCPDS No. D340011), フルオルアパタイト $\text{Ca}_5\text{F}(\text{PO}_4)_3$ (JCPDS No. * 150876) および $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot \text{XH}_2\text{O}$ (JCPDS No. 180303), $\text{Ca}_4\text{P}_2\text{O}_9$ (JCPDS No. D110232) の信頼値も高い結果となり、より良好な結晶性を示唆するものと考えられた。

結 論

矯正治療中・後のエナメル質の白濁、脱灰および二次齲蝕の予防あるいは歯質強化・歯面回復を目的として、トレー法を用いて凍結乾燥ハイドロキシエチルセルロースゲル法による歯質強化の有効性を検討する目的として、本研究を行い、以下の結果を得た。

1. エナメル質表面の観察および分析

1) SEM による形態観察の結果

Ⅰ群においてはエナメル小柱構造が確認された

が、Ⅱ群およびⅢ群において、c 軸方向によく発達したアパタイト型の六角柱状結晶が観察された。

2) 薄膜X線回折測定法による定性分析の結果

(1) X線回折像より、Ⅱ群が回折強度、鮮鋭度とも良好であり、Ⅰ群およびⅢ群において明らかな差が認められなかった。データ検索の結果、各群ともにフルオルアパタイトの存在が確認された。

(2) peak shift の変化では、Ⅱ群およびⅢ群において僅かに high angle 側への shift を示した。またⅠ群およびⅢ群と比較して、Ⅱ群の回折強度がやや強い結果であった。

(3) Hall の解析法を用いた結晶性の評価により、結晶子の大きさは、Ⅰ群 750 Å, Ⅱ群 800 Å, Ⅲ群 1000 Å, 格子不整は、Ⅰ群0.09, Ⅱ群0.09, Ⅲ群0.02であった。

(4) a 軸格子定数は、Ⅰ群 9.42 Å, Ⅱ群 9.41 Å, Ⅲ群 9.38 Å, c 軸格子定数は、各群ともに、6.88 Å であった。

3) FT-IR による組成解析の結果、各群ともに H_2O , PO_4^{3-} , CO_3^{2-} , OH^- の存在が確認された。

2. エナメル質切断面の観察および分析

1) CMR および偏光顕微鏡による組織学的観察の結果、Ⅰ群と比較して、Ⅱ群およびⅢ群の最表層エナメル質では強いX線不透過性と負の複屈折を認めた。

2) EPMA による形態観察および元素分析の結果

(1) 二次電子像および反射電子組成像による形態観察により、Ⅱ群およびⅢ群において、研磨時の傷が少々みられたが分析に大きな影響を及ぼすほどでなく、分析部位として比較的良好な状態であった。

(2) 定性分析より各群ともに含有元素として Ca, P, F, Cl, Na, Mg, O の存在が認められた。

(3) 面分析により、Ⅰ群においては、Ca, P, F, Ca/P ともにほぼ均一な濃度分布を示した。Ⅱ群においては、表層直下の Ca の濃度が高濃度であり、それに対応する部位の P の濃度が低濃度で示され、Ⅲ群よりも深部にまで及んでいた。Ca/

P についても同部位において高い値であった。F については、表層直下において高濃度であり深部に移行するにつれて徐々にその濃度が減少していた。Ⅲ群においては、表層直下において Ca 濃度が高濃度を示し、それに対応する部位の P の濃度が低濃度を示した、Ⅱ群の結果と異なり表層直下のみに観察され、表層下においては、ほぼⅠ群と同様な所見であった。F については表層直下において高濃度を示し、深部に移行するにつれて徐々にその濃度が減少していた。

(4) 線分析により、Ca, P については各群ともに明らかな差は認められなかった。F については、Ⅱ群およびⅢ群において、表層直下で高濃度を示し、深部に移行するにつれ、徐々にその濃度を減少していた。

(5) 定量分析により、Ca および F の濃度増加、P の濃度減少についてⅠ～Ⅱ群間およびⅠ～Ⅲ群間で危険率 1% で有意差を認めた。

3) 微小領域X線回折法による定性分析の結果

(1) データ検索により、各群ともにハイドロキシアパタイト、フルオルアパタイトの存在が示された、Ⅰ群と比較してⅡ群およびⅢ群の信頼値が高く、より良好な結晶性を有することが示唆された。

(2) 回折線の peak shift の変化では、Ⅰ群に対して、Ⅱ群およびⅢ群において僅かであるが high angle 側への shift が認められた。

以上の結果から、トレー法を応用した凍結乾燥ハイドロキシエチルセルロースゲル法は、ハイドロキシエチルセルロースゲル法と同様に、エナメル質表面へのフルオルアパタイト生成法およびエナメル質歯質強化法として有効な方法であることが示唆された。

稿を終えるに臨み、本研究の機会を与えて下さり、ご指導とご校閲を賜った日本歯科大学新潟歯学部矯正学教室、亀田 晃教授に謹んで深厚なる謝意を表します。また、有益なご指導とご助言を頂いた矯正学教室、遠藤敏哉助教授に深謝致します。さらに、コンタクトマイクロラジオグラフィーについてご助言を頂いた日本歯科大学新潟歯学部第Ⅱ解剖学教室、石山巳喜夫講師に謝意を表するとともに、電子プローブマイクロアナライザについてご助言を頂いた日本電子㈱、高橋秀行氏およびX線回折についてご助言を頂いた安藤

和人氏ならびに湊 一郎氏に深く感謝致します。

抄録：ゲル法を簡便に臨床応用するためトレーを用い、新たに開発された凍結乾燥ハイドロキシエチルセルロースゲル法(Ⅲ群)およびハイドロキシエチルセルロースゲル法(Ⅱ群)を抜去歯エナメル質表面に適用し、フルオルアパタイト結晶生成およびFの取り込みによる歯質強化を行った後、未処置歯(Ⅰ群)とともにエナメル質表面および切断面を対象として、走査型電子顕微鏡による形態観察、薄膜X線回折測定法による定性分析、赤外分光分析による組成解析、コンタクトマイクロラジオグラムおよび偏光顕微鏡による観察、電子線プローブマイクロアナライザによる元素分析および微小領域X線回折法による定性分析を行った。その結果、凍結乾燥ハイドロキシエチルセルロースゲル法はハイドロキシエチルセルロースゲル法と同様にフルオルアパタイト生成法および歯質強化法として、トレーを用いた *in vivo* 応用に際して有効な方法であることが示唆された。

文 献

- 1) 亀田 晃, 小菅直樹: フルオルアパタイトの生成に関する研究. 日矯歯誌 39: 407-426, 1980.
- 2) 小菅直樹: エナメル質表面に *in vivo* で発生したフルオルアパタイトに関するX線結晶学的研究. 日矯歯誌 41: 314-329, 1982.
- 3) 川島文雄: ケイ酸ゲルを用いたフルオルアパタイトの生成法におけるゲルのpHの影響に関する研究. 日矯歯誌 41: 723-736, 1982.
- 4) 栄枝浩介: ゲル法におけるフルオルアパタイトの生成に唾液の及ぼす影響. 日矯歯誌 42: 336-353, 1983.
- 5) 小川正昭, 亀田 晃, 栄枝浩介: フルオルアパタイト生成過程における反応液のpHの変動と結晶成長に関する研究. 日矯歯誌 43: 222-236, 1984.
- 6) 広瀬征也, 亀田 晃, 栄枝浩介: ゲル法による抜去歯牙表面上へのフルオルアパタイト付着生成に唾液の及ぼす影響. 日矯歯誌 44: 230-250, 1985.
- 7) 宮井 敏, 亀田 晃, 遠藤敏哉: 抜去歯牙表面上へのフルオルアパタイト付着生成に及ぼす反応液量に関する研究. 日矯歯誌 45: 552-567, 1986.
- 8) 亀田 晃, 比佐進吉, 遠藤敏哉, 吉田 満, 坪井秀介: *In vivo* におけるシリカハイドロゲル法を用いたフルオルアパタイトの生成に関する研究. 日矯歯誌 46: 486-499, 1987.
- 9) 藤沢幸三郎, 亀田 晃, 比佐進吉: シリカハイドロゲル法とフッ化物洗口法のう蝕予防効果の比較による実験的研究. 日矯歯誌 46: 465-485, 1987.
- 10) 亀田 晃, 進藤敏哉, 吉田 満, 栄枝浩介, 比佐進吉, 神賀利典, 門井隆典: セラチンゲル法によるフルオルアパタイト生成に関する研究. 日矯歯誌 45: 429-449, 1986.
- 11) 遠藤敏哉: シリカハイドロゲル法およびセラチンゲル法により生成したフルオルアパタイトの比較検討に関する研究. 日矯歯誌 46: 163-182, 1987.
- 12) 武田守生, 亀田 晃, 遠藤敏哉: シリカハイドロゲル法およびセラチンゲル法により歯牙エナメル質表面上に生成したフルオルアパタイトの比較検討に関する研究. 歯学 75: 766-781, 1987.
- 13) 秦紀一郎, 亀田 晃, 遠藤敏哉: ゲル法により歯牙エナメル質表面に生成したフルオルアパタイトの薄膜X線結晶学的研究. 歯学 76: 911-924, 1988.
- 14) 千葉 亮, 亀田 晃, 遠藤敏哉: セルロース系ゲルによるフルオルアパタイト生成に関する研究. 歯学 75: 1358-1375, 1988.
- 15) 矢口満徳, 亀田 晃, 遠藤敏哉: ハイドロキシエチルセルロースゲル法によるエナメル質強化に関する研究. 歯学 78: 1179-1206, 1991.
- 16) 亀田 晃, 吉田 満, 遠藤敏哉, 峰岸孝安, 平形浩喜, 和田仁志: ポリアクリル酸ゲル剤によるフルオルアパタイト生成に関する研究. 歯学 75: 1376-1393, 1988.
- 17) 佐藤幹雄, 亀田 晃, 遠藤敏哉: 凍結乾燥シリカハイドロゲル法によるフルオルアパタイト生成に関する研究. 歯学 77: 1327-1342, 1989.
- 18) 遠藤敏哉, 岡 健治, 村上一志, 吉田 満, 小菅直樹, 亀田 晃: 凍結乾燥セラチンゲル法(トレー法)に用いるフッ化物ゲルの物理化学的特性に関する研究. 歯学 77: 1408-1415, 1989.
- 19) 村上一志, 亀田 晃, 遠藤敏哉: 凍結乾燥セラチンゲル法によるフルオルアパタイト生成による研究. 歯基礎誌 32: 256-269, 1990.
- 20) 吉田 満: 凍結乾燥セラチンゲル法による歯質強化に関する研究. 歯基礎誌 32: 509-533, 1990.
- 21) Rachinger, W.A.: A correction for the $\alpha_1 \alpha_2$ doublet in the measurement of widths of X-ray diffraction lines. J. Sci. Instr. 25: 254-255, 1948.
- 22) 日本化学会編: 実験化学講座 4, 1版, 238-250,

- 丸善, 東京, 1956.
- 23) Hall, W.H.: X-ray line broadening in metals, *Proc. Phys. Soc. A*. **62**: 741-743, 1949.
- 24) 岡 健治, 亀田 晃, 遠藤敏哉: 高分子合成粘質混合ゲルを用いたフルオールアパタイト生成に関する研究. *歯学* **76**: 85-106, 1988.
- 25) Endo, T., Murakami, H., Amano, N., Takahashi, A., Sugihara, Y., Kameda, A.: A study on the physicochemical properties of fluoride gel using the freeze-dried hydroxyethylcellulose gel method *shigaku* **79**: 413-421, 1991.
- 26) Rathje, W.: The formation of hydroxyfluorapatite in tooth enamel under influence of drinking water containing fluoride. *J. Dent. Res.* **31**: 761-766, 1952.
- 27) Moreno, E.C., Kresak, M. and Zahradnik, R.T.: Fluoridated hydroxyapatite solubility and caries formation. *Nature* **247**: 64-65, 1974.
- 28) Kay, M.I., Young, R.A. and Posner, A.S.: Crystal structure hydroxyapatite. *Nature*. **204**: 1050-1052, 1964.
- 29) LeGeros, R.Z.: Effect of carbonate on the lattice parameters of apatite. *Nature*. **206**: 403-404, 1965.
- 30) LeGeros, R.Z., LeGeros, J.P. and Trauz, O.R.: The effect of various ions on the unit cell dimensions and crystallinity of the apatites. *J. Dent Res.* **43**: 775-776, 1966.
- 31) 田隅三生: FT-IR の基礎と実際, 1 版, 1-20, 114-123, 東京化学同人, 東京, 1986.
- 32) 鈴木 貢: 生体硬組織無機質の性状に関する理化学的研究. *口科誌* **24**: 145-166, 1975.
- 33) 三好作一郎: 硬組織の偏光顕微鏡法. *歯界展望* **35**: 491-496, 1976.
- 34) 青木秀希, 加藤一男: 水熱法による OH アパタイト合成に関する研究 (第 2 報) pH と温度が OH アパタイト生成におよぼす影響. *歯理工誌* **14**: 36-39, 1973.
- 35) 安藤芳昭, 赤岩祐一, 中嶋 裕, 石田浩平, 日野輝雄, 橋本弘一: 新しい手法による EPMA 分析, とくにアマルガムの内部構造について. *歯材器* **4**: 213-218, 1985.
- 36) 中垣晴男: エナメル質内化学成分の分布と萌出後の変化, エナメル質, その形成, 構造, 組成と進化 (須賀昭一編), 1 版, 36-44 頁, クインテッセンス出版, 東京, 1987.
- 37) Cutres, T.W.: Teeth, calculus, and bone, in: Trace elements and dental disease, (edited by Curzon, M. E.J. and Cutress T.W.), pp. 33-105, John Wright-PSG Inc, London, 1983.
- 38) Robinson, C., Weatherell, J.A. and Hallsworth, A.S.: Alterations in the composition of permanent human enamel during carious attack. In: ed. by Leach, S.A. and Edger, W.M., *Demineralization and Remineralization of the Teeth*. pp. 209-223, IRL, Oxford, 1982.
- 39) 亀田 晃, 遠藤敏哉, 吉田 満, 天野憲人, 岡健治, 長井健二, 安井滋一: ゲル法による矯正治療中のエナメル質強化に関する研究—第一報: 電子プローブマイクロアナライザによる検討—. *日矯歯誌* **48**: 193-204, 1989.
- 40) Sonis, A.L. and Snell, W.: An evaluation of fluoride-releasing, visible light-activated bonding system for orthodontic bracket placement. *Am J. Orthod. Dentofac. Orthop.* **95**: 306-311, 1989.
- 41) Jenkins, G.N. and Speirs, R.L.: Distribution of fluorine in human enamel, *J. Physiol* **121**: 21-23, 1953.
- 42) Brudevold, F., Gardner, D.E. and Smith, F. A.: The distribution of fluoride in human enamel. *J. Dent Res.* **35**: 420-429, 1956.
- 43) 荒谷真平, 鈴木芳太郎: 歯学生化学, 押鐘 篤監修, 1 版, 139-158, 医歯薬出版, 東京, 1966.
- 44) 遠藤敏哉, 吉田 満, 天野憲人, 村上一志, 鈴木葉一, 野口靖夫, 小菅直樹, 亀田 晃: ゲル法による矯正治療中のエナメル質強化に関する研究—第 2 報: 微小領域 X 線回折法による検討—. *歯学* **76**: 1352-1361, 1989.
- 45) 岡崎正之: アパタイト結晶成長に対するフッ素の影響, エナメル質, その形成, 構造, 組成, と進化, 須賀昭一, 1 版, 298-307, クインテッセンス出版, 東京, 1987.
- 46) 可児徳子: 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**: 42-55, 1970.
- 47) Temin, S.C., Csuros, Z. and Mellberg, J.R.: Fluoride uptake from a composite restorative by enamel. *Dent Mater* **5**: 64-65, 1989.