原 著

歯質フッ素が表層下脱灰病変の成立機序に及ぼす影響：
哺乳類エナメル質とサメエナメロイドを比較した *in vitro* う蝕実験

北 島 俊 秀 磯 川 晶 子 平 野 透 子 青 葉 孝 昭

日本歯科大学歯学部病理学教室（主任：青葉孝昭教授）

〔受付：平成6年12月22日，受理：平成7年4月7日〕

Effect of endogenous fluoride on *in vitro* formation of subsurface carious lesions :
Comparison of mammalian enamel and shark enameloid

Toshihide Kitajima, Akiko Isokawa, Yukiko Hirano and Takaaki Aoba

Department of Pathology, Nippon Dental University, School of Dentistry at Tokyo

(Chief : Prof. Takaaki Aoba)

1-9-20, Fujimi, Chiyoda-ku, Tokyo 102, Japan

〔Received on December 22, 1994 ; Accepted on April 6, 1995〕

Key words : enamel caries/fluoride/remineralization/shark enameloid

Abstract : To determine the effects of endogenous fluoride on caries-like lesion formation *in vitro*, we conducted demineralization experiments using mammalian enamel (human, monkey, pig and dog) and shark enameloid. The latter material was selected because of its high fluoride content (3.6 wt%). After preparing windows with nail varnish on the smooth surfaces, the teeth were placed in 10% acid gelatin solutions (pH 4.5 or 3.5, 25°C) for 10 to 64 days. Ground sections were then prepared and examined by microradiography and X-ray microanalysis. In parallel studies, we determined the chemical composition and solubility of these enamel and enameloid samples, as well as synthetic references. The results showed that : (1) all mammalian enamel showed typical subsurface lesions at both pH conditions, while shark enameloid lesions were characterized as cavitation at both pH levels ; (2) a marked increase in fluoride was found in the enamel lesions, whereas no apparent redistribution of fluoride ions was detected in the shark enameloid lesions ; and (3) the solubility of shark enameloid was much lower than those of the mammalian enamels, and was close to that of francolite or fluorapatite. These findings suggest that the endogenous fluoride in enamel or enameloid does not warrant the formation of subsurface lesions, since the driving force for remineralization is retained at lower levels.

抄録：本研究では再石灰化反応における歯質に含まれるフッ素の役割を明らかにする目的で，哺乳類（ヒト，サル，ブタ，イヌ）の歯とサメの歯を材料に選び，*in vitro* において乳酸を含む酸性ゼラチン溶液を用いて pH 4.5 と pH 3.5 の条件下で酸脱灰を行った。また，これら哺乳類エナメル質およびサメエナメロイドの化学組成と溶解度を測定した。本研究で得られた結果として，1）哺乳類エナメル質においては，いずれの pH 条件におい

でも表層部に高石灰化層を伴う表層下脱灰病巣が形成されたが、サメエナメロイドにおいてはいずれの pH 条件においても脱灰病巣の表層部と脱灰前線部において石灰化の高まりを示す層は形成されなかった。2) ヒトエナメル質での脱灰病巣部では顕著な元素組成の変化 (F 量は増加し, Mg 量は減少) が認められたが、サメエナメロイドの脱灰病巣では F 量の増加を検知することはできなかった。3) エナメル質結晶は炭酸アパタイト (CA) と類似した溶解度を持ち、その溶解度はハイドロキシアパタイト (HA) や合成アパタイト (FCA, FA) の溶解度より高いこと、またサメのエナメロイド結晶は FCA に類似した溶解度をもつことがわかった。以上のことから、歯質に含まれているフッ素は歯質の溶解性を低下させ、う蝕病変の進行を遅らせるが、他方、高濃度の F を含む歯質表面では脱灰に併って溶出される格子イオン濃度が低く抑えられるため、再石灰化反応の駆動力が小さくなり、必ずしも表層下脱灰病変の成立に結びつかないことが明らかにされた。

緒 言

エナメル質初期う蝕病変は、臨床的には白斑として観察され、病理組織学的には表層下脱灰病巣として特徴づけられる。このようなう蝕病変の成立と進行過程で、脱灰とともに再石灰化現象が重要な役割を果たしていることが知られてきた。すなわち、脱灰病巣で溶出した Ca イオンやリン酸イオンが歯質内を表層と歯質深部に向かって拡散することにより、う蝕病巣の周辺 (エナメル質う蝕の場合には表層部と不透明層に相当する) で新たにリン酸カルシウムの沈殿が生じたり、また既存のアパタイト結晶の成長が起こると考えられている¹⁻⁴⁾。この再石灰化現象に関して論議されてきた課題のひとつに、フッ素イオンが歯質脱灰の過程で表層部での高石灰化層を保持するうえで不可欠であるか否かが挙げられる。ヒトエナメル質の場合には比較的低濃度ではあるがフッ素を含有しており、う蝕侵襲によるエナメル質結晶の溶解に伴ってフッ素イオンも溶出してくる。この歯質から溶出した内因性 (endogenous) フッ素イオンは 0.05 ppm 程度の非常に低濃度においてもアパタイトの結晶成長を促進させる作用をもつため⁵⁾、外因性 (exogenous) のフッ素イオンを考えなくても、フッ素イオンが再石灰化反応には必ず寄与していると考えられる研究者が多い^{6,7)}。他方、フッ素を含まない合成アパタイトでペレットを成型し、それらのペレット表面でも表層下脱灰現象が再現され得ることが確かめられている⁸⁾。これら *in vitro* の実験結果は、フッ素イオンが表層部での高石灰化層の保持に不可欠という考え方を支持していない。

本研究では、再石灰化反応における歯質に含まれるフッ素イオンの役割を明らかにする目的で、フッ素含有量の異なる哺乳類とサメの歯を材料に選び *in vitro* におけるう蝕実験を行った。ついで、表層下脱灰現象のメカニズムを解明する目的で、エナメル質とエナメロイド試料の溶解度を測定した。さらに、これら生体試料の性状をより理解するため、合成した炭酸アパタイト (CA)、

フッ素化炭酸アパタイト (FCA) とフルオロアパタイト (FA) 試料についても溶解度を測定した。

材料および方法

1. 哺乳動物とサメの歯

フッ素含有の異なる試料としてヒト、カニクイザル、ブタ、ビーグル成犬の永久歯エナメル質と、サメ (アオザメ, *Isurus glaucus*) のエナメロイドを用いた。ヒト材料として、矯正学的治療の目的で抜去された歯を用いた。サル歯は霊長類研究所より供与されたものである。ブタの顎骨は近隣の屠殺所にて集められた。成犬は業者より購入し、深麻酔下で屠殺後、顎骨を摘出した。サメの顎骨は水産大学の臨海実験所より供与された。なお、歯の材料を集めるに際しては、動物個体の年齢や性別あるいは歯種については特に留意しなかった。いずれの歯も乾燥に伴う亀裂を防ぐため、抜去後あるいは顎骨から摘出後ただちに 10% の中性ホルマリンで固定、保存した。さらに個々の歯を実験に供するに先立って、エナメル質あるいはエナメロイド表面にはう蝕や形成異常、実質欠損などが無いことを肉眼的に確かめた。

2. 人工う蝕病巣の作製

われわれの教室では、これまでにエナメル質深層にまで及ぶ表層下脱灰病巣を *in vitro* で再現する目的で、酸性ゼラチン溶液を用いた長期間の脱灰実験を行ってきた。そこで、本実験においても清田と須賀⁹⁾が報告した処方に従い、Bacto-Gelatin (Difco 社) を使用して 10% のゼラチン液を作製した。溶液の pH は 0.035N の乳酸を添加して 4.5 または 3.5 (± 0.2) に調整した。これらの酸性ゼラチン液には細菌の発育を防ぐために thymol の小片を投入した。歯冠部歯面の歯垢等を除去、清掃した後頬側および舌側の平滑な面に約 4×1.5 mm の window を残して nail varnish を塗布した。その後、上記の酸性ゼラチン溶液を入れた反応容器中に実験歯を糸でつるし、25°C の恒温槽に 12 日から 60 日の間静置した。

所定の実験期間を通して同じ脱灰液を使用し、定時的に溶液の pH に大きな変動がないことを確かめた。なお、今回の人工う蝕実験では、1) 哺乳類動物のあいだの比較病理学的な目的でサル、ブタ、イヌの歯を一群として同じ脱灰条件下で処理し、2) 歯質内のフッ素含有量の違いによる影響を比較する目的で、ヒトとサメの歯を同一溶液内に浸漬した。脱灰終了後、アセトンにて nail varnish を除去したのち、須賀らの方法¹⁰⁾に準じてポリエステル樹脂 (Rigolac, 応研) に包埋した。樹脂包埋した各実験歯から、脱灰液にさらされた window 部を含む厚さ 350 μm の複数の縦断片を硬組織薄切装置 (バンドソー BS-3000, EXAKT) で切り出し、次いで、それぞれの薄切切片を砥石上で研磨し、最終的には両面平行な厚さ約 50 μm の研磨標本を作製した。これらの研磨標本のマイクロラジオグラム (MR) をソフテックス社 (東京) 製の CSM 特注型を用いて撮影した。

3. 生体粉末試料と合成アパタイト試料の作製

ヒト、ブタ、イヌのエナメル質およびサメのエナメロイドについて、X線回折法による歯質成分の同定と化学組成と溶解度の測定のために、各動物群において任意に選んだ歯から粉末試料を作製した。なお、サルの歯については入手しえた材料に限りがあったため、粉末試料の作製は行わなかった。哺乳類の歯についてはまず歯根を切断し、ついで歯冠部を数ブロックに分割した後、象牙質を除去することにより、最終的にエナメル質殻のみを集めた。これらの歯質切削には、歯科用エンジンと切削ホイールやポイント器具を使用し、流水下で試料の加熱を防いだ。サメの歯についても象牙質部分を切削除去することにより、エナメロイド殻のみを得た。集められたエナメル質殻あるいはエナメロイド殻について、個々に象牙質部分の遺残がないように注意深く検査した。その後、それぞれの試料をメノウ乳鉢内で微粉碎した。今回の溶解度実験に用いた CA, FCA, FA のアパタイト粉末試料は先に Shimoda ら¹¹⁾によって 80°C で合成されたものである。実験に使用するに先立って、各合成粉末試料について 200 メッシュを通過させた。

4. X線回折, X線マイクロアナライザ, 化学分析

生体粉末試料について粉末 X線回折装置 (D-Max, 理學電機) により回折像を測定した。銅ターゲットを使用し、5°から 60° (2 θ) の範囲を 0.01°の間隔で各 1 秒間 step-scanning した。

X線マイクロアナライザによる元素分析 (Ca, Mg, Na, Cl, F) には Shimadzu EPMA-8705 を用いた。分析

に先立って研磨切片を試料台に貼り付け、試料表面を滑沢にしたのち、カーボン薄膜を蒸着した。各研磨切片の MR 像と対応させながら分析部位を選び、脱灰病変部とその周辺の健全部 (脱灰期間中は nail varnish で覆われていた) の歯質についてそれぞれ表層から深層に向けての線分析を行った。実験に使用した装置では 3 元素の同時分析が可能のため、最初に Ca, Mg, F について、次いで 10 から 15 μm 程度隔てた部位 (同様の MR 像所見を呈する) において Ca, Na, Cl の分析を行った。また、特定した微小領域 (例えば脱灰病巣と表層部) について、各元素のカウント数を計測した。これらの計測されたカウント数の比 (cpm/cpm) から歯質内の Ca 濃度に対する各元素の相対的濃度比を推定した。

化学分析に際しては、各粉末試料を精秤したのち、最小必要量の 1N 塩酸で溶解し、脱イオン-蒸留水にて所定の濃度に希釈した。Ca, Mg, Na 含有量は原子吸光法、P 含有量はリン-モリブデン酸法¹²⁾による吸光光度計での定量、CO₃ 量は Conway の微小拡散法¹³⁾による滴定、F 量は hexamethyl disiloxane を併用した微小拡散法¹⁴⁾により濃縮操作を加えたのちにイオン電極で定量した。

5. 溶解度の測定

各粉末試料の溶解度は Moreno と Aoba の方法¹⁵⁾に準じて、25°C で測定した。秤量した各粉末試料 (70~100 mg) を希薄リン酸溶液 (100 ml) 中でマグネチックスターラによって攪拌した。実験期間中はペリスタリックポンプを用いて一定速度で CO₂/N₂ 混合ガスを反応容器に送り込み、容器内のガス分圧は排出口側にとりつけたマノスタットによって大気圧よりわずかに高くなるように調節した。本実験では形成期エナメル質における溶液相の CO₂ 分圧¹⁶⁾を擬して、1.86% の CO₂ 条件を選んだ。反応に用いたリン酸溶液の初期濃度は 0.06 mM から 1.0 mM、またイオン強度を保つ目的で各反応溶液には 100 mM の KNO₃ を加えた。実験期間中、定期的に懸濁液内の pH と Ca²⁺ 濃度をそれぞれイオン電極を用いて測定し、これらの測定値が一定の値 ([Ca²⁺] で 0.02 mM 以下, pH 値での 0.02 以下の変動幅) を示すようになった場合に反応が平衡に達したと判断した。通常、平衡化に達するまで 20~25 日を要した。平衡時の溶液の結晶格子イオン濃度 ([Ca], [P], pH, [F]) を測定し、それらの分析値に基づいて各イオンの活量と所定の化学組成に対応したイオン活量積 (例えばハイドロキシアパタイトの組成に基づく場合には (Ca²⁺)⁵(PO₄³⁻)³(OH⁻)) を求めた。

以上の計算に用いたプログラムと定数は Moreno と

Margolis の報告¹⁷⁾を参照した。

結 果

本実験で作製した生体および合成粉末試料の化学組成を Table 1 に示した。哺乳類エナメル質はいずれも 3.2 から 3.6% (重量比) の炭酸イオンを含んでおり、他方、フッ素含有量は 0.1% 以下であった。本実験に用いた CA はこれらのエナメル質試料に比べて、Ca 含有量がやや低い (Ca-deficient な結晶構造をもつ) ことを除くと、Mg, Na, CO₃ 含有量について類似した組成を示した。サメエナメロイド試料では炭酸イオン含有量は低く、逆に極めて高いフッ素含有量 (3.6%) を示した。哺乳類エナメル質とサメエナメロイドはいずれも Ca-deficient な組成をもつが、両者の Ca/P モル比を比較すると、哺乳類エナメル質では 1.63~1.64 であるのに対し、サメエナメロイドは 1.70 とやや大きな値を示した。同様の化学組成における特徴は合成した FCA の分析結果でも認められた。合成した FA 試料は CO₃ 等の異種イオンを含んでおらず、フルオロアパタイトの化学量論的組成に近似していた。

Figure 1 はエナメル質とエナメロイド試料の X 線回折像を示す。哺乳類エナメル質の例としてヒトとブタの回折像を示したが、板状のエナメル質結晶の配向に伴い (300) 回折線が強く現われているなど、いずれの回折像も類似した特徴を呈した。サメエナメロイドの回折像では、エナメル質試料ほど強い (300) 回折線の配向による影響は認められないが、(211) と (300) 回折線が高角度寄りに移動し、その結果として (211) と (112) 回折線との重なりを生じていた。

哺乳類エナメル質を酸性ゼラチン溶液で 10 日から 15 日間脱灰すると、pH 4.5 と pH 3.5 のいずれの条件においても白斑病巣が肉眼的にも識別されるようになった。サル、ブタ、イヌの永久歯のエナメル質に形成された人

工う蝕病変のマイクロラジオグラム (MR) の代表例を Figure 2 に示す。形成された人工う蝕病巣の微細な特徴については、各動物種の間、あるいは同じ動物種でも個々の歯の間に差異は認められたが、共通する所見として、いずれのエナメル質病変でも表層下では強い脱灰が生じているのに対して、表面に沿って幅の狭い高石灰化層が保持されていた。pH 4.5 の条件下で形成された表層下脱灰病変の特徴として、1) 脱灰病巣のエナメル質内層への拡がりの程度は小さく、2) 脱灰病巣体部では発育線が顕著になっており、3) 脱灰前線 (病変の深部) で石灰化度の比較的高い層 (以後、石灰化反応層と呼ぶ) が幅広く形成されていた。あるいは数層に及ぶ石灰化度の異なる領域が縞状に観察されたことが挙げられる。

pH 3.5 条件下では、脱灰病巣が拡がり (ブタやイヌの歯でエナメル質の幅が薄いため、脱灰病変は象牙質にまで及んでいた)、脱灰前線に沿う石灰化反応層が不明瞭に

Fig. 1 X-ray diffraction patterns of (A) human enamel, (B) pig enamel and (C) shark enameloid.

Table 1 Chemical composition of biological and synthetic apatites

Sample	weight percent					
	Ca	P	Mg	Na	CO ₃	F
Human enamel	37.6	17.9	0.35	0.72	3.6	0.08
Pig enamel	36.5	17.3	0.40	0.70	3.2	0.09
Dog enamel	37.0	17.5	0.32	0.85	3.3	0.09
Shark enameloid	37.8	17.2	0.35	0.55	1.8	3.6
Carbonated apatite (CA)	36.0	17.7	0.39	0.80	3.0	0.0
Fluoridated carbonatoapatite (FCA)	36.3	16.6	0.48	0.70	2.4	3.4
Fluorapatite (FA)	39.0	18.0	0.0	0.0	0.0	3.6

Fig. 2 Microradiograms of mammalian tooth ground sections showing the formation of subsurface caries-like lesions. (A) Monkey ; (B) Pig ; (C) Dog. Left : The lesions developed after 40 days incubation in the acid-gelatin solution at pH 4.5. Right : The lesions developed after 14 days at pH 3.5.

なっていた。ただし、このような進行した脱灰病巣の表層部では石灰化度の高い層が依然として認められ、むしろ pH 4.5 の場合より幅も広く顕著となっている例(サルやブタ)も観察された。ただし、表層部の高石灰化層や脱灰前線において局部的に弧線状の脱灰が生じていたり、元のエナメル質表面に凹みを生じ、nail vanishにより覆われていたエナメル質表面との境界で段差を認める場合もあった。注目される所見として、この凹み状の欠損を生じた脱灰病巣においても、溶液と接していた表層部には高石灰化層が明瞭に観察された。

Figure 3 はヒトエナメル質で形成された人工う蝕病巣を示す MR 像の代表例と、EPMA による各元素の線分析プロファイルを示している。実験方法の項で述べたように、Figure 3 に示したエナメル質病変は pH 4.5 で 35 日間、pH 3.5 で 15 日間脱灰した場合に生成された例で、後に Figure 4 に示すサメエナメロイドのそれぞれの病変と対をなすものである。ヒトエナメル質においても他の哺乳類エナメル質と同様に、pH 4.5 では表層部が保存された浅い表層下脱灰病巣が形成されており、pH 3.5 では凹み状の欠損を伴った深い脱灰病巣が形成され、その表層部には高石灰化層が明瞭に認められた。EPMA による線分析部位を MR 像内に 2 本線として示した。nail vanish によって被覆されていた健全部エナメル質においては、Ca は表層から深層まで変動幅が極めて小さく一定の濃度分布を示した。Mg, Na, Cl, F の微量元素の濃度分布の詳細については、同一歯内においても部位によって若干の違いが認められたが、複数の分析部位で得られた共通する所見として、1) F 濃度は幅の狭い表層でわずかに高く、それより内層では著明な濃度変化を示さず、2) Mg と Na は表層から内層に向かって徐々に増加し、逆に、3) Cl は表層から内層に向かって漸次減少していく傾向を示した。人工う蝕病巣部の EPMA による線分析結果では、F 量は増加しており、Mg 量は減少していることが注目された。特に、F の増加は pH 4.5 で形成された脱灰病巣内で顕著であり、Mg の減少は pH 3.5 で形成された広範囲の脱灰病巣内で特に顕著であった。脱灰病巣における Na と Cl の線分析プロファイルでは Na と Cl は見かけ上減少しているが、脱灰に伴う石灰化度の変動に対応した所見とみなすこともできる。この点に関しては Na/Ca, Cl/Ca の濃度比の測定結果の項で詳細に検討する。

サメエナメロイドの最表層はいわゆる“shiny layer”として、肉眼的には光沢をもった滑らかな外観を呈する。pH 4.5 で 35 日間あるいは pH 3.5 で 15 日間脱灰した歯質表面を観察すると、光沢が失われ粗造感が増していた。

Figure 4 の MR 像に示したように、pH 4.5 の実験系では脱灰病巣の幅も狭く、最表層のいわゆる“shiny layer”のみが強く脱灰されているのに対して、pH 3.5 の実験系では表面から歯質が溶解した“う窩”(erosion)が形成されていた。哺乳類エナメル質での脱灰病変と大きく異なる特徴として、軟 X 線の照射時間を変えて黒化度の異なる MR 像を撮影しても表層部での比較的高い石灰化度を示す層は同定されず、また脱灰病巣深部においても石灰化度の高まりを示す層は全く認められなかった。EPMA による健全部エナメロイドの元素分析から、1) F は表層で高く、内層に向かって減少する濃度勾配を示し、2) Mg と Cl は表層から内層に向けてほぼ平坦なプロファイルを示し、3) Na は逆に内層に向けてその濃度が高まる傾向を示した。なお、4) エナメロイド最表層の shiny layer は高い Mg 濃度をもつ(局所的には F 量の高まりを伴う)ことがわかった。サメエナメロイドの脱灰病巣の分析結果では、1) MR 像でのう窩形成の所見に対応して、Ca は最表層で最も低く、脱灰病巣深部に向かうにつれて高まり、未脱灰層では健全部での濃度レベルに達した。2) このような Ca 濃度勾配と一致して、F, Mg, Na, Cl のいずれの元素も表層部で最も低くなっており、3) エナメル質で認められたような脱灰病巣におけるフッ素の再分配を示唆する証拠は得られなかった。

Table 2 には EPMA で計測されたカウント数に基づき、人工う蝕病変の成立に伴う歯質内の元素成分比を示す。ヒトエナメル質の脱灰病巣部で著しい高まりを示したフッ素について注目してみると、pH 4.5 と pH 3.5 のいずれの実験系においても単位 Ca 量に対する F 量 (F/Ca 比) は健全部エナメル質での値に比べて大きくなっていった。特に、pH 4.5 の実験系では F/Ca 値は著しく増加していた。他の元素に関しては、Mg/Ca の値が F/Ca とは逆に脱灰病巣で著しく小さい (pH 3.5 の実験系で顕著であった) ことと、Na/Ca と Cl/Ca の値については脱灰病巣と健全部エナメル質で大差がみられなかったことが注目された。他方、サメエナメロイドを用いた実験系で注目された所見として、F/Ca の値は脱灰病巣と健全部エナメロイドとの間に差が認められなかった。他の元素については、哺乳類エナメル質での結果と一致して、Mg/Ca の値は脱灰病巣で低下する傾向が認められ、Na/Ca と Cl/Ca の値については健全部エナメロイドとほぼ同じ値を示した。

以上の人工う蝕実験において哺乳類エナメル質とサメエナメロイドの間で脱灰病変の組織学的特徴に大きな差異が認められたため、次に、著者らはこれらの歯質を構

Fig. 3 (A) Microradiograms of human tooth ground sections showing the formation of subsurface caries-like lesions. Left : The lesions developed after 35 days incubation in the acid-gelatin solution at pH 4.5. Right : The lesions developed after 15 days at pH 3.5. Two sets of the parallel lines indicate the sites of line-scanning for separate analyses of Ca/F/Mg and Ca/Na/Cl. Also, asterisks indicate the locations for signal counting of those elements ; the data obtained are shown in Table III. (B and C) Line-scanning profiles obtained from the sound enamel indicated by line 1 in the microradiogram. (D and E) Line-scanning profiles obtained from the caries-like lesions indicated by line 2.

Fig. 4 (A) Microradiograms of human tooth ground sections showing the formation of subsurface caries-like lesions. Left : The lesions developed after 35days incubation in the acid-gelatin solution at pH 4.5. Right : The lesions developed after 15 days at pH 3.5. The parallel lines and asterisks are the same as explained in Figure 3. (B and C) Line-scanning profiles obtained from the sound enamel indicated by line 1 in the microradiogram. (D and E) Line-scanning profiles obtained from the caries-like lesions indicated by line 2. Note that the unit for the fluoride on the ordinate is two order higher than the corresponding unit in Figure 5 because of the high fluoride contents of the enameloid sample.

Table 2 Changes in chemical composition of human enamel and shark enameloid associated with caries-like lesion development¹⁾

Sample and analytical sites ²⁾		F/Ca × 10 ²		Mg/Ca × 10 ³		Na/Ca		Cl/Ca	
Human enamel									
pH4.5	C ³⁾	2.0	(0.1)	7.5	(0.8)	0.19	(0.04)	0.13	(0.02)
	S ⁴⁾	0.56	(0.04)	9.9	(0.6)	0.22	(0.05)	0.12	(0.03)
pH3.5	C	1.5	(0.1)	4.6	(0.5)	0.16	(0.02)	0.09	(0.02)
	S	0.45	(0.05)	9.8	(0.8)	0.18	(0.03)	0.10	(0.02)
Shark enameloid									
pH4.5	C	7.9	(0.4)	7.9	(0.8)	0.24	(0.02)	0.11	(0.05)
	S	7.9	(0.5)	10.0	(0.7)	0.27	(0.04)	0.11	(0.06)
pH3.5	C	8.0	(0.4)	7.6	(0.4)	0.24	(0.05)	0.10	(0.04)
	S	8.1	(0.6)	9.0	(0.5)	0.33	(0.06)	0.10	(0.03)

1) The contents of F, Mg, Na, or Cl relative to unit mass of Ca were represented in terms of the count ratio (cpm/cpm) obtained for the corresponding elements by EPMA.

2) The sites selected for analysis are shown in Figure 3 (for human enamel) and Figure 4 (for shark enameloid).

3) C, caries-like lesion developed after exposure to acidic demineralization solution.

4) S, sound enamel that was covered by nail varnish during the experimental period. The sites analyzed were similar in depth from the original enamel surface to site C.

5) The data were presented by the average (S.D.) of three determinations.

Table 3 Typical results of chemical analyses of experimental solution after equilibration with each of the biological and synthetic samples at 25 °C

試料	[Ca] mM	[P] mM	pH	[F] mM×10 ³	[Mg] mM	[Na] mM
Human enamel	0.92	0.78	6.52	N. D.	0.05	0.11
Pig enamel	0.97	0.79	6.54	N. D.	0.05	0.10
Dog enamel	1.05	0.78	6.40	N. D.	0.08	0.12
Shark enameloid	0.38	0.38	6.02	0.13	0.03	0.08
CA	1.33	0.90	6.62	N. D.	0.05	0.13
FCA	0.39	0.48	5.85	0.14	N. D.	N. D.
FA	0.36	0.38	5.70	0.14	N. D.	N. D.

N. D., not detected. Initial solution composition were : [H₃PO₄] = 0.1 mM, [KNO₃] = 100 mM, Pco₂ = 1.86%.

成する結晶相の溶解度について検索した。Table 3 では、各生体および合成アパタイトの平衡時におけるイオン濃度の分析例を示した。哺乳類エナメル質あるいは合成した炭酸アパタイト (CA) を平衡化させた溶液では、Ca 濃度も 1 mM 程度にまで高まっており、アパタイト格子に由来する OH⁻ の溶出に伴って pH も 6.3 から 6.6 と高い値を示した。他方、サメエナメルイドや合成フッ化アパタイト (FCA, FA) を平衡化させた場合には、溶液

内の Ca と P 濃度は低く抑えられており、pH の上昇も 6.0 あるいはそれ以下にとどまっていた。また、生体試料と CA からは、側定可能な濃度の Mg と Na が溶出しており、さらにサメエナメルイドと FCA, FA の反応系では F も極めて低濃度ではあるが検知された。

今回の溶解度実験では、それぞれの粉末試料について異なる初期濃度の H₃PO₄ 溶液中で平衡化させ、Table 3 にその代表例を示したように平衡に達した溶液中での格

Fig. 5 Potential plots showing the solubility behavior of the biomineral and synthetic samples at 25 °C.

子イオン濃度を測定した。それらの分析値に基づいて自由イオン濃度 (free ionic concentration) と活量 (ionic activity) を計算し、それらの結果を $\log \{ (Ca^{2+})(OH^{-})^2 \}$ vs. $\log \{ (H^{+})^3(PO_4^{3-}) \}$ の potential plots として Figure 5 に示した。() は格子イオンの活量を意味している。CA, FCA および FA のいずれの合成試料についても、異なる実験溶液から得られた実験データは回帰直線 (いずれの場合も $r^2 > 0.98$) によって表わされ、一連の実験系において平衡状態が得られていたことが確かめられた。また、同一試料より求められた結果ではないが、哺乳類エナメル質の溶解度データも単一の回帰直線で表わすことが可能であり、この場合の回帰直線の勾配は CA 試料で得られた値と近似していた。サメエナメロイドについては、試料量に限りがあったためその溶解度は単一の測定に終わっているが、得られた結果は FCA の回帰直線上に載ってくることがわかった。

考 察

表層下脱灰のメカニズムに関してこれまでの諸説を大別してみると、エナメル質表層の構造や化学的性状 (高石灰化、高 F と低 CO_3 に起因した低い溶解度、あるいは無柱エナメル質の存在) を重視する考え方と、う蝕進行

過程での再石灰化現象を最も基本的な要因とみなす考え方の二つをあげることができる。表層を削除したエナメル質²⁾や、合成アパタイトを成型したペレット³⁾を酸脱灰した場合にも表層下脱灰病巣が形成されることは、後者の考え方を支持する実験の根拠となっている。今回の実験結果では、1) 化学組成が類似した哺乳類エナメル質においては、動物種間の微細な差異を別にすれば、pH 4.5 と pH 3.5 のいずれの条件下でも表層下脱灰の病変が生成され、特に pH 4.5 では表層部および脱灰前線において顕著な再石灰化反応が生じていることが確認された。他方、2) FCA を構成成分とするサメエナメロイドではう窩の形成が起こり、表層部での再石灰化反応は同定できなかった。これまでのいくつかの研究においても、サメエナメロイドがヒトエナメル質とともに *in vitro* でのう蝕実験に用いられてきた¹⁸⁻²¹⁾。それらの報告では、サメエナメロイドにおける脱灰病巣の進行はヒトエナメル質の場合よりも著しく遅延されることが注目されており、本研究で明らかにしたようなサメエナメロイドでの脱灰病巣の組織像や化学組成の変化についての詳細な検索はなされていない。

In vivo あるいは *in vitro* のエナメル質う蝕病変で生じる再石灰化現象の内容を分類してみると、(a) アパタイト結晶の沈殿として新たな結晶生成 (nucleation, 高度の過飽和条件を必要とする) が生じる場合と、(b) 既存のエナメル質アパタイトが結晶成長する場合 (適度の過飽和条件下で起こる)、さらに (c) アパタイト結晶以外のリン酸カルシウムが沈殿する場合とに区別される。(c) の例として、whitlockite $(Ca, Mg)_3(PO_4)_2$ 、あるいは brushite $CaHPO_4 \cdot 2H_2O$ (DCPD) の沈殿が挙げられる。先に Moreno ら^{1,22)}は、白斑エナメル質う蝕の表層部での再石灰化現象について、以下の様な仮説を提唱した。プラーク内で生産された有機酸がエナメル質表層内に拡散し、解離することによってエナメル質は最初わずかに脱灰され、小隙が増加する。この小隙腔表面ではエナメル質結晶の溶解に伴って、fluorapatite (FA) あるいは DCPD の沈殿が生じる。この場合には、結晶表面での溶解と沈殿速度に比べて溶出したイオンのエナメル質内での拡散速度が遅いため、小隙腔を満たす溶液ではエナメル質結晶、FA, DCPD の間で擬平衡状態にあると考えられる。また溶出された Ca イオンやリン酸イオンのうち沈殿過程に関与しなかった過剰のイオンはペリクル膜を通過して外部溶液 (プラーク、唾液) に失われていく。

Moreno らの仮説によれば、表層下脱灰現象を可能にする条件として、熱力学的な要因として表層部の小隙腔を満たす溶液相において FA あるいは DCPD に対する

過飽和状態が存在することと、動力学的な要因としてエナメル質表層部から外部溶液への溶出イオンの拡散速度が重要となってくる。

エナメル質う蝕の表層部での小隙腔を満たす溶液のイオン組成を測定した例は無いが、Vogel²³⁾ は 100~700 μm 厚さのエナメル質研磨切片に小さなドリルで縦穴 (Well) を作製し、エナメル質表層から酸脱灰を施した場合に、脱灰病巣内に作られた縦穴を満たす溶液組成はエナメル質結晶に対して飽和状態にあったと報告している。彼らの報告は先の Moreno らの仮説を支持しており、さらにエナメル質脱灰の律速段階がエナメル質結晶の溶解速度ではなく、エナメル質内のイオンの拡散過程にあることを示唆している。また、小隙腔表面でのエナメル質結晶の溶解後に推定されている DCPD の沈殿に関連して、X線回折法によるエナメル質う蝕病巣を調べた報告では DCPD が同定されることは極めて稀であった²⁴⁾。この事実は必ずしも小隙腔での DCPD の沈殿を否定するものではなく、仮に DCPD がいったん沈殿したとしても、ブラークからの有機酸の供給が停止し小隙腔内の溶液相の pH が上昇すると、DCPD は不安定となり hydroxyapatite (HA) や FA、あるいは過剰の Mg イオンが共存する場合 (例えば象牙質う蝕) には whitlockite に転換してしまうと考えられる²⁵⁾。他方、再石灰化の生じた脱灰病巣 (表層部や不透明層) の X線回折法や電子顕微鏡による観察では、エナメル質アパタイトの粒子径が大きくなっていることが確かめられており、再石灰化現象の主たる内容がエナメル質結晶の成長反応であることが示唆されている^{26,27)}。

表層下脱灰病変と歯面を囲む溶液相 (外部環境) の過飽和度との関わりについて、Larsen²⁾ は *in vitro* のう蝕実験において、(i) 外部環境が HA に対して不飽和でも、FA に対して過飽和ならば表層部の高石灰化層は保持されうが、(ii) 外部環境が HA と FA のいずれに対しても不飽和になると歯質表面からう蝕形成が生じることを明らかにした。彼の実験結果は、FA 様の結晶から成り立っているサメエナメロイドも外部環境が FA に対して不飽和な条件下では限定された抵抗性しかもたないことや、また今回の実験で pH 4.5 の条件下においてもう蝕が形成された (初期溶液には Ca^{2+} や PO_4^{3-} を加えておらず、FA に対しても不飽和となっている) ことを説明することができる。ただし、同じ pH の酸性ゼラチン溶液を用いた場合に哺乳類エナメル質で表層下脱灰病変が成立した理由を説明することはできない。また、HA と FA の溶解度の差にのみ注目する Larsen の説によれば、外因性あるいは内因性のフッ素イオンの存在が再石

灰化反応に必須な条件となるが、このようなフッ素イオン依存性は全てのう蝕実験系にあてはまらないことは前述したとおりである。

何故、フッ素を高濃度に含むサメエナメロイドにおいてう蝕形成が生じ、むしろフッ素含有量の低い哺乳類エナメル質で再石灰化反応の特徴が顕著に現われたかを考察するに先立って、う蝕病変の成立過程におけるフッ素の役割について明確にしておく必要がある。とりわけ強調すべき点は、フッ素の存在様式に留意すること、すなわち溶液中でフリーな状態にあるイオンと結晶格子内に置換したイオンを区別して考えることである。これまでの *in vitro* での沈殿・溶解実験から、フリーなフッ素イオンの働きとして、1) 高度の過飽和溶液ではアパタイトの核形成を促進し¹¹⁾、2) 希薄な過飽和溶液においてはアパタイト結晶表面での結晶成長を促進し⁵⁾、さらに3) アパタイト表面の OH^- と置換することにより結晶表面を安定化し、不飽和溶液においても酸脱灰に対する抵抗性を高める²⁸⁾ことが知られている。これらのフッ素イオンによる作用はう蝕発生の抑制と再石灰化反応の促進に直接的に結びついている。先に引用した Ogaard ら²¹⁾ のヒトエナメル質とサメエナメロイドを使った *in vitro* でのう蝕実験において、NaF を共存させた実験系ではエナメル質はエナメロイドに劣らないう蝕抵抗性を示すことが明らかにされている。他方、結晶格子内に取り込まれたフッ素イオンはアパタイト結晶格子を安定化させ、本研究でも示したように溶解度を下げる働きを示す。この溶解度の低下は酸脱灰に対する抵抗力を増強させるとともに、過飽和条件下での沈殿・結晶成長においても重要な効果を持つことに留意する必要がある。すなわち、リン酸カルシウム結晶の結晶成長 (沈殿) 反応の駆動力 (driving force) は反応溶液の過飽和度 (degree of supersaturation, DS) であることはよく知られているが、この過飽和度は沈殿してくる結晶相に対して反応溶液中のイオン活量積 (ionic activity product, IP) と熱力学的な溶解度積 (K_s) との比、すなわち $\text{DS} = \text{IP}/K_s$ 、によって表わされる^{29,30)}。したがって、フッ素イオンによる沈殿・結晶成長の促進効果は、沈殿してくる結晶の K_s を低くする効果によると言える。ただし、溶液内のフッ素イオンは沈殿・結晶成長とともに格子内に取り込まれたり、または結晶表面に吸着することにより、閉鎖系においては反応の進行に伴ってフッ素イオンは消費され、その作用は消失する。付け加えれば、う蝕予防の観点ではこのことを考慮して、恒常的にいかに低濃度のフッ素イオンを供給するかが重要となってくる。

以上述べてきた再石灰化現象と F イオンの役割に関す

る実験的根拠を踏まえて、エナメル質とエナメロイドにみられた脱灰病巣の差異を統一的に説明するうえで、われわれは哺乳類エナメル質が HA とは異なる炭酸アパタイトの性状をもち、サメエナメロイドが FA とは異なる FCA の性状をもつことに注目した。すなわち、アパタイト結晶格子内に置換した炭酸イオンは結晶格子の歪みを大きくし不安定性を増す³¹⁾ため、炭酸アパタイトの溶解度は HA の溶解度より有意に高くなることが報告されている^{15,32)}。また今回の溶解度の測定実験において、サメエナメロイドに近似した組成をもつ FCA と炭酸イオンを含まない化学量論的組成に近い FA の間においても溶解度に違いのあることが確かめられた。Figure 6 に示した模式図は、エナメル質とエナメロイド結晶の溶解度が再石灰化反応に及ぼす影響についてのわれわれの考えをまとめたものである。酸性ゼラチン溶液に含まれる乳酸によって哺乳類のエナメル質結晶が溶かされ、Moreno らが提唱するように表層部の小隙腔内において結晶と溶液間で擬平衡状態が達せられたと仮定する。溶解度の測定結果から、このエナメル質結晶に対して擬平衡状態に達した溶液組成は炭酸イオンを含まない HA に対しては過飽和状態となる。特に、CO₂/N₂ 混合ガスを不断に供給した溶解度実験と異なり、人工う蝕実験系では CO₂ 分圧は一定に保たれていないため、エナメル質結晶から溶解した炭酸イオンは CO₂ ガスとして外部に放出される。そのため、この反応系においては本来の意味での平衡に達することができず、エナメル質結晶の溶解は不飽和条件が存在する限り継続することになる。Figure 6 では、エナメル質アパタイトの平衡時におけるイオン活量積 (IP, ここでは便宜上 HA の組成式を用いた) と HA の溶解度積 (K_{sHA}) の差を ΔG_1 として示した。先に引用した Larsen の考え方²⁾と異なり、われわれはこの ΔG_1 が表層部の小隙腔内で HA の沈殿 (より正確には、エナメル質結晶表面での成長) による再石灰化反応のための駆動力と成りうると考えている。事実、フッ素イオンを添加しない *in vitro* のう蝕実験において、de Rooji と Nancollas は再石灰化層で他の結晶相を含まない HA のみの沈殿が生じ得ることを示し、その際の再石灰化速度として $10^{-7} \sim 10^{-8}$ mol HA/m²・sec (エナメル質単位表面積 (m²) 当たり沈殿した HA 量) の値を報告している³³⁾。この再石灰化速度の値は唾液の過飽和度に類似した溶液条件のもとでの HA の結晶成長速度に近似している³⁴⁾ことは注目される。留意すべきこととして、実測された再石灰化速度 (あるいは HA の結晶成長速度) は極めて小さく、またエナメル質では結晶成長に利用される表面積が小さい (0.2~0.4 m²/g) ために、再

Fig. 6 A mechanistic model for the subsurface lesion formation. A key issue is that remineralization depends primarily on the solubility property of tooth mineral, which, in turn, is affected substantially by the endogenous fluoride. Ordinate represents the ionic activity product at equilibrium of the individual samples, which is calculated on the basis of (Ca)₅(PO₄)₃(OH) stoichiometry. The presumed driving force (DS) for remineralization is expressed by ΔG_1 , ΔG_2 , and ΔG_3 . ΔG_1 and ΔG_2 correspond to the DS for precipitation of HA and FA, respectively, after dissolution of enamel, whereas ΔG_3 corresponds to the DS for precipitation of FA after dissolution of shark enameloid.

石灰化の進行は非常にゆっくりとしたプロセスにならざるを得ない。今回の *in vitro* での実験においても、表層部での高石灰化層が明瞭に識別されうるまでに数日から10日前後を要した。

炭酸アパタイトと HA との溶解度の違いに加えて、歯質に含まれていたフッ素イオンが再石灰化過程に寄与する場合 (FA の沈殿、あるいは既存のエナメル質結晶表面での FA の成長反応) には、エナメル質アパタイトと FA との溶解度積の差によって表わされる ΔG_2 が再石灰化反応の駆動力となりうる。このフッ素イオンが共存する反応系においては、 ΔG_2 は ΔG_1 に比べて非常に大きくなるため、いったん溶出した Ca²⁺ や PO₄³⁻ イオンは FA あるいは FHA (fluoridated hydroxyapatite) として再沈殿しやすいと考えられる。今回の EPMA による分析でも、エナメル質の脱灰病巣の F 濃度 (Ca 当たりの F 量) は健全部に比べて高まっていることが確かめら

れている。他方、サメエナメロイドにおいてはもともとフッ素含有アパタイトで構成されているため、Table 3に示したように、平衡時における格子イオン濃度（より厳密に言えば、その活量）は低く、HA に対して不飽和であり（したがって HA の沈殿は起こらない）。FA に対してもわずかに過飽和であるにすぎない。このサメエナメロイド（FCA）と FA との溶解度積の差（ ΔG_3 ）が小さいために、エナメロイド結晶の溶解に伴う再石灰化反応は起こりにくいことが理解される。

なお、本研究においては比較病理学的な観点からヒト、サル、ブタ、イヌの動物種の間でのエナメル質う蝕病変の発生過程を調べたが、いずれの動物材料においても類似の病巣が得られた。このことは表層下脱灰病変の成立は歯質の構造に起因するというよりも、主に外部環境に依存していることの傍証となっている。ただし、pH 4.5 の比較的緩徐な脱灰条件下ではいずれの動物群においても類似の表層下脱灰病巣が形成されたのに対して、pH 3.5 の脱灰条件下ではブタやヒトのエナメル質の例で示したように、もともとエナメル質表面が保持されていた場合と、エナメル質表層に欠損を生じる場合が観察された。これらの組織学的所見の差異は、動物種や年齢その他の条件に由来する化学的性状の違いを反映しているとも考えられるが、pH 3.5 という過酷な脱灰条件下では pH のわずかな変動（ $[H^+]$ 濃度としては指数関数的に変化する）も不飽和度に大きな影響を与えることは無視できない。

結 論

本研究は、初期エナメル質う蝕にみられる再石灰化機構と歯質に含まれるフッ素との関わりを明らかにする目的で、哺乳類とサメの歯を材料に選び *in vitro* でう蝕実験を行った。さらに表層下脱灰現象のメカニズムを考察する目的で、エナメル質とエナメロイド並びに合成した CA, FCA と FA について溶解度を測定し、以下のことを明らかにした。

1. 哺乳類エナメル質を 10% の酸性ゼラチン溶液にて 25°C で 12 日から 60 日間脱灰すると、pH 4.5 と pH 3.5 のいずれの条件においても白斑う蝕病巣が形成された。pH 4.5 の条件下で形成された表層下脱灰病変では、脱灰病巣のエナメル質内層への拡がりの程度は小さく、脱灰前線（病変の深部）でも再石灰化反応が顕著に認められた。pH 3.5 の条件下では、脱灰病巣はより大きく拡がり、脱灰前線に沿った石灰化反応層は不明瞭になっていた。ただし、このような進行した脱灰病巣の表層部では石灰

化度の高い層が依然として認められ、むしろ pH 4.5 の場合より幅も広く顕著となっている例も観察された。

2. これらのエナメル質で形成された人工う蝕病巣においては、元素組成に変化（F 量は増加し、Mg 量は減少）が生じていた。特に、F の増加は pH 4.5 で形成された脱灰病巣内で著しく、Mg の減少は pH 3.5 で形成された脱灰病巣において著明であった。

3. サメエナメロイドを用いた脱灰実験系では、pH 4.5 と pH 3.5 のいずれにおいてもう窩が形成され、表層部での比較的高い石灰化度を示す層や、脱灰病巣深部において再石灰化反応の特徴は認められなかった。また、EPMA による分析結果でも、エナメル質で認められたような脱灰病巣におけるフッ素の再分配を示唆する証拠は得られなかった。

4. 溶解度実験においては、哺乳類エナメル質あるいは合成した炭酸アパタイト（CA）とサメエナメロイドあるいは合成フッ化アパタイト（FCA, FA）との間で、平衡時における溶液のイオン組成に顕著な差異が認められた。エナメル質結晶は CA と類似した溶解度をもち、その溶解度はこれまでに報告されている HA の溶解度や、本実験で測定した FCA や FA の溶解度より高いことが確かめられた。他方、サメのエナメロイド結晶は FCA に類似した溶解度をもつことがわかった。

5. 以上の実験結果に基づき、歯質の熱力学的安定さと溶液の過飽和度が再石灰化反応を規定する要因として重要なことと、歯質内のフッ素は溶解性を低下させるうえで重要な役割を果たしているが、高いフッ素含有量は必ずしも表層下脱灰病変の成立に結びつかないことを論証した。

稿を終えるにあたり、人工う蝕実験においてご指導を賜った故須賀昭一教授に深く感謝いたします。また、EPMA での元素分析でご協力をいただいた本学共同利用研究所の小川正明助教授に感謝いたします。最後に終始惜しみないご協力をいただいた日本歯科大学病理学教室の諸先生方に感謝いたします。

文 献

- 1) Moreno, E. C. and Zahradnik, R. T. : Chemistry of enamel subsurface demineralization. J. Dent. Res. 53 : 226~235, 1974.
- 2) Larsen, M. J. : Chemically induced *in vitro* lesions in dental enamel. Scand. J. Dent. Res. 82 : 496~509, 1974.
- 3) Brown, W. E. : Physicochemical mechanisms of

- dental caries. J. Dent. Res. **53** : 204~216, 1974.
- 4) Featherstone, D. J. B., Duncan, J. F. and Cutress, T. W. : A mechanism for dental caries based on chemical process and diffusion phenomena during *in vitro* caries simulation on human tooth enamel. Archs Oral Biol. **24** : 101~112, 1979.
 - 5) Varughese, K. and Moreno, E. C. : Crystal growth of calcium apatites in dilute solutions containing fluoride. Calcif. Tissue Int. **33** : 431~439, 1981.
 - 6) ten Cate, J. M. and Arends, J. : Remineralization of artificial enamel lesions *in vivo*. III. A study of the deposition mechanism. Caries Res. **14** : 351~358, 1980.
 - 7) Christoffersen, J., Christoffersen, M. R. and Arends, J. : A simple model for remineralization of subsurface lesions in tooth enamel. J. Crystal Growth **60** : 255~258, 1982.
 - 8) Aoba, T., Okazaki, M., Takahashi, J. and Moriwaki, Y. : X-ray diffraction study on remineralization using synthetic hydroxyapatite pellets. Caries Res. **12** : 223~230, 1987.
 - 9) 清田芳枝, 須賀昭一 : 人工齲蝕によるエナメル質の脱灰像. その脱灰条件との関係. 歯基礎誌 **27** : 494~827, 1985.
 - 10) 須賀昭一, 近藤 稔, 小野寺 章, 久保田安則, 大塚倫治 : 各種動物エナメル質内での Cl, Mg, Na の分布のX線マイクロアナライザによる観察. 歯基礎誌 **13** : 85~94, 1977.
 - 11) Shimoda, S., Aoba, T., Moreno, E. C. and Miake, Y. : Effect of solution composition on morphological and structural features of carbonated calcium apatites. J. Dent. Res. **69** : 1731~1740, 1990.
 - 12) Vogel, G. L. : Quantitative Inorganic Analysis. 3rd ed., p 810, John Wiley & Sons, New York, 1961.
 - 13) Conway, E. J. : Microdiffusion Analysis and Volumetric Error, 5th ed., pp. 201~214, Corsby Lockwood & Son LTD, London, 1962.
 - 14) Aoba, T., Collins, J. and Moreno, E. C. : Possible function of matrix proteins in fluoride incorporation into enamel mineral during porcine amelogenesis. J. Dent. Res. **68** : 1162~1168, 1989.
 - 15) Moreno, E. C. and Aoba, T. : Comparative solubility of human dental enamel, dentin, and hydroxyapatite. Calcif. Tissue Int. **49** : 6~13, 1990.
 - 16) Aoba, T. and Moreno, E. C. : The enamel fluid in the early secretory stage of porcine amelogenesis. Chemical composition and saturation with respect to enamel mineral. Calcif. Tissue Int. **41** : 86~94, 1987.
 - 17) Moreno, E. C. and Margolis, H. C. : Composition of human plaque fluid. J. Dent. Res. **67** : 1181~1189, 1988.
 - 18) LeGeros, R. Z., Silverstone, L. M., Daculsi, G. and Kerebel, L. M. : *In vitro* caries-like lesion formation in F-containing tooth enamel. J. Dent. Res. **62** : 138~144, 1983.
 - 19) Clememt, J. G., Langdon, D. J. and Thistleton, A. : The production of artificial caries-like lesions in shark enamloid *in vitro*. Caries Res. **15** : 451~452, 1981.
 - 20) Ogaard, B., Rolla, G., Ruben, J., Dijkman, T. and Arends, J. : Microradiographic study of demineralization of shark enamel in a human caries model. Scand. J. Dent. Res. **96** : 209~211, 1988.
 - 21) Ogaard, B., Rolla, G., Dijkman, T., Ruben, J. and Arends, J. : Effect of fluoride mouth-rinsing on caries lesion development in shark enamel : An *in situ* caries model study. Scand. J. Dent. Res. **99** : 372~377, 1991.
 - 22) Margolis, H. C., Murphy, B. J. and Moreno, E. C. : Development of caries-like lesions in partially saturated lactate buffers. Caries Res. **19** : 36~35, 1985.
 - 23) Vogel, G. L., Carey, C. M., Chow, L. C., Gregory, T. M. and Brown, W. E. : Ultramicro analysis of the fluid in human enamel during *in vitro* caries attack by hydrochloric acid. Caries Res **21** : 310~325, 1987.
 - 24) 野々村栄二 : う蝕病巣における Whitlockite, Brushite の生成機序に関する研究. 小児歯誌 **18** : 393~412, 1980.
 - 25) 青葉孝昭, 石田 武, 長谷川 清, 森脇 豊, 山内孝行 : 歯質アパタイトにおける Brushite 及び Whitlockite の配向析出. 歯基礎誌 **16** : 252~259, 1974.
 - 26) Aoba, T., Moriwaki, Y., Doi, Y., Okazaki, M., Takahashi, J. and Yagi, T. : The intact surface layer in natural enamel caries and acid-dissolved hydroxyapatite pellets. An X-ray diffraction study. J Oral Path. **10** : 32~39, 1981.
 - 27) Takuma, S. : Demineralization and remineralization of tooth substance : An ultrastructural basis for caries prevention. J. Dent. Res. **59** : 2146~2156, 1980.
 - 28) Christoffersen, M. R., Christoffersen, J. and

- Arends, J. : Kinetics of dissolution of calcium hydroxyapatite. VII. The effect of fluoride ions. *J. Crystal Growth* **67** : 107~114, 1984.
- 29) 青葉孝昭, 八木俊雄 : 希薄水溶液中での Hydroxyapatite の結晶成長に関する研究. I. 沈殿速度. *歯基礎誌* **26** : 358~366, 1984.
- 30) 青葉孝昭, 八木俊雄 : 希薄水溶液中での Hydroxyapatite の結晶成長に関する研究. II. 過飽和度. *歯基礎誌* **26** : 367~375, 1984.
- 31) Moriwaki, Y., Aoba, O., Tsutsumi, S. and Yamaga, R. : X-ray diffraction studies on the lattice imperfection of biological apatites. *J. Osaka Univ. Dent. Sch.* **16** : 33~45, 1976.
- 32) LeGeros, R. Z. and Tung, M. S. : Chemical stability of carbonate-and fluoride-containing apatites. *Caries Res.* **17** : 419~429, 1983.
- 33) de Rooji, J. F. and Nancollas, G. H. : The formation and remineralization of artificial white spot lesions ; A constant composition approach. *J. Dent. Res.* **63** : 864~867, 1984.
- 34) Aoba, T. and Moreno, E. C. : Preparation of hydroxyapatite crystals and their behavior as seeds for crystal growth. *J. Dent. Res.* **63** : 874~880, 1984.