原 著

エナメル質表面被膜の構造とアミノ酸組成

吉 村 満

東京医科歯科大学 第1歯科保存学教室 (主任指導: 総山孝雄教授)

(昭和46年11月10日受付)

The Structure and Amino-acid Composition of the Integuments of the Enamel Surface of Teeth

Mitsuru Yoshimura

Department of Operative Dentistry, School of Dentistry,
Tokyo Medical and Dental University
(Director: Prof. Takao Fusayama)

要旨: 新しく抜去された埋伏歯・半埋伏歯および萌出歯のエナメル質表面の被膜を裂溝部と歯冠表面部とに分けて採取し、光学顕微鏡を用いて組織学的に検索し、また加水分解後、液体クロマトグラフによってアミノ酸組成を調べた。またそれら歯牙の縦断面よりエナメル質表層部を走査型電子顕微鏡を用いて観察し、次のような知見を得た。

1. 被膜を光学顕微鏡で見ると、歯冠表面部の被膜は、埋伏歯では細胞性の被膜であり、半埋伏歯では細胞性の部分と核が変性し無構造化の移行形を示す部分とがあり、萌出歯では硝子様無構造な部分とその上に濃染する物質が付着した部分とがあった。裂溝部の被膜は、埋伏歯では細胞性で核が密集しており、半埋伏歯では萌出歯と同様に硝子様無構造な膜に濃染する顆粒様物の付着した像を呈していた。

2. 被膜を構成する蛋白は、そのアミノ酸組成よりケラチン性でもコラーゲン性でもなく、またヘモグロビンに由来するものでもない判断された。

3. 萌出歯と半埋伏歯の被膜のアミノ酸組成は同じであったが、埋伏歯とはやや異なっていた。

4. 被膜のアミノ酸組成を歯冠表面部と裂溝部とで比較すると、萌出歯や半埋伏歯では差はなかったが、埋伏歯では差があった。

5. 歯冠断面を走査型電子顕微鏡で見ると、埋伏歯では絹のようになめらかな薄膜があり、半埋伏歯では凹凸や亀裂が生じており、萌出歯では沈着物が厚く付着していた。

結 論

う蝕の98%は臼歯の小窩裂溝や前臼歯の隣接面などに初発し¹⁾、とくに大白歯の咬合面裂溝に集中するといわれている²⁻⁸⁾。臨床的にう蝕がないと思われる小窩裂溝にも病理組織学的に検討してみると、すでに初期う蝕が認められることが多いという報告もある⁹⁻¹⁶⁾。かように小窩裂溝にう蝕が

多発するのは、ここは発育葉の癒合部にできた陥没部であって食物残渣が停滞し易く、エナメル葉などの有機質に富む構造上の欠陥が多いためであろう¹⁷⁻²⁷⁾。

裂溝う蝕の予防について、古くは James Truman²⁸⁾をはじめ多くの人^{29,30)}がう蝕に罹患する前に裂溝を充填すべきだと唱えた。Bödecker^{31) 32) 33)}は裂溝を拡げて自浄作用が完全に行なわれるよう

にすればよいと考えた。Hyatt³⁾はう蝕に罹患し易い裂溝を切開して予防的に充填するという有名な prophylactic odontotomy を提唱した。最近総山³⁴⁾はかような予防充填による歯質侵襲を最少限に止めるために、う蝕が象牙質に及んでいない小窩裂溝の充填のためには削除をエナメル質内にとどめたいわゆるエナメル窩洞を提唱した。

一方歯を全く削らずにう蝕を予防する方法として鍍銀法やフッ素塗布が行なわれているが、小窩裂溝におけるう蝕予防効果は必ずしも適確でないようである³⁵⁾。また近年接着性レジンによる予防充填³⁶⁻⁴¹⁾が試みられているが、Takeuchi³⁶⁾ 37)によるとその効果は半年くらいが限度のようであり、Winter と Parkhouse⁴¹⁾はレジンが早期に脱落した症例が多かったことを報告した。

かように小窩裂溝のう蝕予防処置が効果を発揮しにくい原因として、Besic⁴²⁾は予め唾液などによってみたされた狭隙には薬材が進入しにくいという事実を指摘している。また小窩裂溝内には唾液のみならず有機物や無機物がつままっていて、これらが薬材の進入固着を障げる故、これらを清掃除去しないかぎり安定したう蝕予防効果は期待しにくいと考えられる。

そこで本研究では有効な裂溝内清掃法を発見するための前段階として、裂溝および歯冠表面をおおっている被膜の構造および組成を組織学的ならびに生化学的に検討し、興味ある知見を得た。

材料と方法

1. 試料

本学附属病院で抜去された健全な永久歯を完全埋伏歯・半埋伏歯および萌出歯に分ち、抜去後直ちによく水洗し、歯頸部に付着する軟組織を取り除き、歯根を切断し、歯冠歯髄を除去して試料とした。

2. エナメル質表面被膜の採取

上記抜去歯の咬合歯に対して小窩裂溝部と他の歯冠表面部とを分離するために、エアタービンにつけたカーバイトバー(#69)を用いて、あたかも一級窩洞の外形線を描くように溝をほりこんだ

図1 咬合面に溝を切りこみ、裂溝部と歯冠表面部との被膜を分離した。

(図1)。これらの歯冠を5% HClで満たしたシャーレに数分間浸し、エナメル質表面から薄膜が裂溝部のもととそれ以外の歯冠表面部分のもの(以下裂溝部・歯冠表面部と称する)とに分離して浮上してくるのを採取して水洗した後、埋伏歯・半埋伏歯および萌出歯に分け、これを裂溝部と歯冠表面部とに分けた6群として50%エタノール中に保存した。

3. 被膜の光学顕微鏡による観察

エタノール中に保存してある6種の試料から各被膜を無作為に取りだし、ヘマトキシリン-エオジン染色した後オリンパス光学社製の生物顕微鏡で比較観察した。

4. 被膜のアミノ酸分析⁴³⁾

エタノール中に保存した試料を真空中 P_2O_5 で乾燥し、乾燥重量を正確に測定した試料の各群数mgを再蒸留した共沸塩酸(20% wt/wt, 6N)中に入れて減圧封管内で 110°C , 24時間加水分解した。加水分解後、反応液はロータリーエバポレーターで蒸発乾固し、塩酸を除去した。水解物のアミノ酸分析は日立株式会社製の034形液体クロマトグラフを用いて行なった。

5. 走査型電子顕微鏡による歯冠断面の観察

埋伏歯・半埋伏歯および萌出歯の各群よりそれぞれ無作為に選んだ新鮮抜去歯牙をダイヤモンドジスクで頬舌的に切断した。その断面を注水下で砥石研磨し3% HClで軽くエッチングし、日本電子株式会社製の真空蒸着装置により金蒸着を行

図2 歯冠表面部のエナメル質被膜の光学顕微鏡像(×600)

- a 埋伏歯
- b 半埋伏歯(1)
- c 半埋伏歯(2)
- d 萌出歯(1)
- e 萌出歯(2)

ない、裂溝部と歯冠表面部のエナメル質表面を日本電子株式会社製 JSM 型走査電子顕微鏡の 600 倍で比較観察した。

成 績

1. エナメル質表面被膜の光学顕微鏡像

埋伏歯・半埋伏歯および萌出歯から、裂溝部と歯冠表面部とを分離して剝離されたエナメル質被膜のヘマトキシリン-エオジン染色標本の光学顕微鏡観察により次のような所見が得られた。

a) 歯冠表面部の被膜

裂溝部を除いた歯冠表面部の被膜(図2)は、埋伏歯では円形ないしは卵円形の紫色に染まった核を中心とし、ピンク色に染まった原形質をもった一層の細胞組織からなっていた(図の a)。

半埋伏歯では、埋伏歯のように全面が細胞組織からなっている部分(b)も観られたが、核が縮小し不規則な濃染性塊となり、やがて染色性を減じて遂には消失し、全く無構造化して硝子様膜とな

った部分(c)も観られた。

萌出歯では、染色性の減じた核が極めてわずかにあるほかは全く均一な硝子様無構造を呈する像(d)が一般に観られ、また硝子様膜の上に細胞構造を有しない小顆粒の集まった紫色に濃染する物質が網状に付着し、時には幅広く融合して全面的におおったような像(e)も観られた。

b) 裂溝部の被膜

裂溝部の被膜(図3)は、埋伏歯ではやはり原形質がピンク色に、核が紫色に染まった一層の細胞組織よりなっていたが、歯冠表面部よりもいっそう密集して核が互いに近接していた(図の a)。

ところが萌出歯では核が消失して硝子様無構造を呈し、裂溝内部と思われる部分には顆粒状に濃染するものが密集付着していた(c)。これは半埋伏歯でも同様であったが、濃染する付着物の量はやや少なかった(b)。

2. エナメル質表面被膜のアミノ酸組成

各抜去歯のエナメル質表面被膜には、多量の

埋伏歯

埋半伏歯

萌出歯

図3 裂溝部のエナメル質被膜の光学顕微鏡像(×600)

表1 埋伏歯, 半埋伏歯および萌出歯の歯冠表面部と裂溝部の被膜のアミノ酸組成
(数値はアミノ酸1000残基中の各アミノ酸の残基数を示す)

	Unerupted		Partly Erupted		Erupted	
	Pit and fissure	Crown surface	Pit and fissure	Crown surface	Pit and fissure	Crown surface
Aspartic acid	90	80	93	86	95	95
Glutamic acid	144	127	152	158	147	150
Threonine	54	43	52	52	50	53
Serine	68	63	52	57	52	55
Proline	82	82	50	50	50	51
Hydroxyproline	trace	trace	0	0	0	0
Alanine	100	107	161	145	156	140
Glycine	99	184	86	90	93	91
Valine	75	55	70	68	70	66
Isoleucine	36	32	41	41	41	49
Leucine	110	87	82	90	82	85
Phenylalanine	51	42	39	45	36	40
Lysine	36	34	59	50	54	53
Histidine	5	11	18	7	14	9
Arginine	30	40	34	48	43	38
Cystine	0	0	0	0	0	0
Methionine	19	11	13	14	14	19

glutamic acid, alanine と, 相当量の aspartic acid, glycine, valine, leucine と, 少量の threonine, serine, proline, isoleucine, phenylalanine, lysine, histidine, arginine, methionine とがあり, hydroxyproline が埋伏歯にのみ痕跡的に認められたが, cystine は全く認められなかった。それらの量をアミノ酸 1000 残基中の各アミノ酸残基数により表示比較した(表 1, 図 4)。各群各部の

組成には次のような差違があった。

a) 歯冠表面部の被膜のアミノ酸組成

歯冠表面部の被膜のアミノ酸組成について, 萌出歯を埋伏歯に比較すると, 萌出歯は proline がやや, そして glycine が著しく少なく, alanine が逆に多くなっていた。また埋伏歯には極微量ながら hydroxyproline が検出された。

半埋伏歯の被膜のアミノ酸組成は 萌出歯のそれ

図4 埋伏歯、半埋伏歯および萌出歯の歯冠表面部と裂溝部の被膜のアミノ酸組成
(数値はアミノ酸 1000 残基中の各アミノ酸残基数を示す)

と酷似していた。

b) 裂溝部の被膜のアミノ酸組成

裂溝部の被膜のアミノ酸組成について、萌出歯を埋伏歯に比較すると、歯冠表面部と同様に、萌出歯では proline がやや少なく、alanine が多くなっていた。しかし glycine はほとんど変わらず leucine がやや少なくなっていた。埋伏歯にはやはり極微量ながら hydroxyproline が検出された。

裂溝部を歯冠表面部に比較すると、埋伏歯では歯冠表面部の方が裂溝部よりもはるかに多量の glycine を有していたが、leucine は逆に裂溝部の方に多かった。しかしかような歯冠表面部と裂溝部とのアミノ酸組成のちがいは、萌出歯や半埋伏歯では見られなかった。

3. 歯冠断面の走査型電子顕微鏡像

埋伏歯・半埋伏歯および萌出歯の歯冠の縦断面の走査型電子顕微鏡像(図5)により次のようなことが認められた。

a) 歯冠表面部

歯冠表面部のエナメル質表面は、埋伏歯では凹凸の全くない絹のようになめらかな膜で被覆されていた(図の a)。これに対して半埋伏歯の新らしく露出した部分では被膜に凹凸や亀裂が生じており(b)、萌出歯では網目状凹凸をもった厚みのある沈着物様のものが一面にあってはいたが、その中に被膜と沈着物というような2層を区別することはできなかった(c)。

b) 裂溝部

裂溝部のエナメル質表面は、埋伏歯では凹凸や亀裂のない膜でおおわれていた(図の d)。半埋伏歯では、埋伏歯と同様な被膜の上に沈着物様のものが少し付着していた(e)。萌出歯では裂溝にいったそう多くの沈着物が充満しており、時にはその下に亀裂の生じた膜が沈着物から分れてエナメル質面に付着している像が見られることがあった(f)。

考 察

1. エナメル質表面被膜のアミノ酸組成

歯冠表面部について、エナメル質表面をおおう被膜のアミノ酸組成を検討すると、埋伏歯・半埋伏歯および萌出歯では、2・3のアミノ酸を除いては一般に比較的共通な組成をもっていた。特に半埋伏歯と萌出歯の組成は全般にきわめてよく似ていた。

半埋伏歯と萌出歯の被膜には hydroxyproline は全く含まれていなかったものでこれらの被膜はコラーゲン性のものではないと考えられる。しかし埋伏歯の被膜から極微量の hydroxyproline が検出された。Glimcher⁴⁴⁾は埋伏歯を EDTA を用いて徐々に脱灰して被膜を採取し、これをアミノ酸分析したが、この膜には多量の glycine と hydroxyproline が検出され、またX線回折からもコラーゲンを主成分とする構造物であると推論している。しかし本研究で採取された被膜は組織学的には上皮性のものしか認められなかったし、検出された hydroxyproline は痕跡的な微量であった故、単に歯小のうの結合組織の一部がたまたま混入したためと考えられる。従ってこの埋伏歯の被膜

図5 埋伏歯、半埋伏歯および萌出歯の歯冠断面の走査型電子顕微鏡(×600)

歯冠表面部：a. 埋伏歯 b. 半埋伏歯 c. 萌出歯
裂 溝 部：d. 埋伏歯 e. 半埋伏歯 f. 萌出歯

も半埋伏歯や萌出歯のそれと同様に コラーゲン性ではないと考えられる。本研究と Glimcher の分析結果の差異は分離方法のちがいによるものと思われる。

またケラチンに特有なアミノ酸⁴⁵⁾として知られる cystine が埋伏歯・半埋伏歯および萌出歯のいずれの被膜にも検出されなかったことは、これらがケラチン性の膜でないことを示している。

Hodson⁴⁶⁾ は萌出歯の被膜はヘモグロビンに由来すると唱えたが、人のヘモグロビンには多量の leucine が含まれ、isoleucine は無いかあってもわずかであるといわれている⁴⁷⁾。本研究では萌出歯はもちろん埋伏歯・半埋伏歯においても、leucine は全アミノ酸量の8%位で特に多いとはいえ、isoleucine は leucine のおよそ半分位含まれているので、いずれもヘモグロビンに由来するものではないと考えられる。

2. 萌出によるエナメル質表面被膜の変化

Nasmyth⁴⁸⁾ が萌出歯の表面に被膜が存在することを報告して以来、この被膜の由来などについていろいろ探究された。Paul⁴⁹⁾ は未萌出の人の歯の表面から酸の脱灰により遊離した膜に細胞組織を顕て、これは Nasmyth 膜を形成するものであると考えた。Mummery⁵⁰⁾ も埋伏歯のエナメル質表面をおおう細胞性の被膜を認め、これが Paul のいう Nasmyth 膜の細胞組織であると考え、さらにその由来については、かような細胞を有する上皮はエナメル器の上皮以外に考えられないと述べた。歯の発生学的見地から、Orban⁵¹⁾ はエナメル質が形成され、エナメル器がその機能を終るとその上皮は退行変性し、扁平な細胞層に変じて、エナメル質の表面をおおうようになると説明している。本研究でも、採取された埋伏歯の被膜は細胞の一層のみよりなっていた。これはエナメル質が完成してエナメル器の機能が終了したために、その各層が消失あるいは融合して一層になったもの

と考えられる。したがってこの埋伏歯をおおっていた細胞性の膜は Orban のいうように退行変性したエナメル器の上皮に由来するものと思われる。

ところが萌出歯から採取された被膜は全く様相の異なった無細胞性のものとなるので、多くの人々はこれを元来の上皮性被膜が消失して新しく外来性の物質による膜が形成されるものと考え、*acquired pellicle*⁵²⁾という名称が用いられるようになった。本研究でも採取された萌出歯の被膜は、核がなく細胞構造が全く見られぬ均一で無構造な膜であった。しかし半埋伏歯の被膜を詳細に観察すると、核が変性し、やがて消失して細胞構造が失われ、ついには無構造化する過程の移行形が見られたので、この萌出歯の無構造な被膜が全く新しい外来性の被膜なのか、あるいは元来の細胞性の膜が変性して無構造化したものかは断定しえないと思う。

しかし萌出歯の被膜の由来を知るために、萌出歯と埋伏歯との被膜のアミノ酸組成を比較すると、両組成はかなり似ているが、萌出歯の方に *alanine* が多いことが注目された。この *alanine* の由来としては唾液蛋白や *bacteria* の成分などが考えられる。*Armstrong*⁵³⁾はアパタイトに特異的に吸着する唾液蛋白があったが、その中には *alanine* は少なかったと報告している。また *Armstrong*⁵⁴⁾はよく研磨した歯面に早期のうちに多くの *bacteria* が付着しているのを電子顕微鏡で認めており、*Cummins*⁵⁵⁾は細菌の *cell-wall* には *alanine* が多く含まれていることを確かめている。従って本研究の萌出歯に多くみられた *alanine* は唾液の蛋白に由来するものではなく、*bacteria* の *cell-wall* に由来するものであらうと思われる。

すなわち歯牙が萌出すると細胞性の膜はその上に付着した *bacteria* に喰われて無構造化の過程をたどりつつやがて *bacteria* の *cell-wall* を含む *bacterial* な膜に置き換ってしまったと考えられる。実際走査型電子顕微鏡像によると、埋伏歯の被膜が絹のようにしなやかな外観を呈していたのに比べて、半埋伏歯および萌出歯の被膜では、金

蒸着などの影響によると思われる人工的な亀裂が生じやすかった。また萌出後ある程度時を経た被膜には凹凸不整の沈着物様のものが大量に見られて著しく厚さを増しており、その中に2層を識別することはできなかった。これらのことは萌出後の被膜が埋伏時のものとはかなり性質の異なったものであることを示すものと考えられる。

かように萌出歯の被膜は埋伏歯の細胞性の膜が単に無構造化したものではなく、細胞性の膜が *bacteria* に消化されてなくなり、外来性のものと置き換えていくと考えた方が妥当に富むように思われるが、しかし半埋伏歯で細胞性の膜が核を消失して無構造化する過程の移行形が観察されているし、萌出後の被膜でもアミノ酸組成の大部分にはあまり著しい変化を生じていないので、少なくとも当初は元来の被膜が一挙に全くなくなってしまつて外来性の被膜で置き換えられてしまうものとは考えがたく、場合によっては元来の被膜の変性したものの一部が外来のものとは融合して残存する可能性も否定できないように思われる。

3. 裂溝部の被膜

埋伏歯では歯冠表面部と裂溝部の被膜のアミノ酸組成はやや異なっていた。*Pincus*⁵⁶⁾も両者間で化学試薬に対する反応が異なっていたと報告している。しかし組織学的に鏡見すると、両者とも同じような形状の核を有する上皮性の被膜であり、かような生化学的組成の差異の原因を解明することはできなかった。

ところが萌出歯では、裂溝部でも歯冠表面部でも被膜は同じアミノ酸組成を示した。従来、歯牙が萌出しても裂溝部は咬合その他による機械的作用が及ばないので先天性の被膜が温存される可能性があると言われていたが、本研究の成績は裂溝部も歯冠表面部と同様の変化・変性を受けることを示すものと思われる。特にかような萌出歯における裂溝部と歯冠表面部の被膜のアミノ酸組成の相似性が、萌出直後の半埋伏歯にも同様に認められた事実は、歯牙がいったん口腔環境にさらされるとエナメル質表面をおおう被膜の変化・変性がかなり急速に起ることを示すものと思われる。

このように脱灰によって浮上した萌出歯の被膜については、裂溝部と歯冠表面部との間にアミノ酸組成の差はなかったが、未脱灰歯断面の裂溝内には全く構造の異なった沈着物様のものが被膜内にぎっしり填まっていた。本研究ではこれが何であるかを確かめることはできなかったが、これは多分 Schroeder⁵⁷⁾らのいうように主として細菌性のものであり、また時にはそれに小野²¹⁾のいうようにカルシウム塩が沈着していることもありうると思われる。走査型電子顕微鏡で見られた裂溝内では、中に充満した沈着物が真空蒸着時の収縮によって、エナメル質面にはりついた薄膜を残して分離している像が時々見られた。これは裂溝内の沈着物が被膜と十分融合していないことを示すようにも思われる。しかしこの像はすべての歯に見られたわけではない故、時間がたてば完全に融合した一塊になるのかも知れない。この沈着物はエナメル質から酸によって分離採取された被膜の光学顕微鏡像に符合しているようである。

総括ならびに結論

小窩裂溝のう蝕予防効果を有効ならしめるため、裂溝内清掃法を発見する前段階として、裂溝内にいかなる物質が存在するかを知るために、新らしく抜去された埋伏歯・半埋伏歯および萌出歯のエナメル質表面の被膜を裂溝部と歯冠表面部とに分けて酸によって遊離させて採取し、光学顕微鏡を用いて組織学的に検索し、また加水分解後、液体クロマトグラフによってアミノ酸組成を調べた。またそれら歯牙の縦断面よりエナメル質表層部を走査型電子顕微鏡を用いて観察し、次のような知見を得た。

1. 被膜を光学顕微鏡で見ると、歯冠表面部の被膜は、埋伏歯では細胞性の被膜であり、半埋伏歯では細胞性の部分と核が変性し無構造化の移行形を示す部分とがあり、萌出歯では硝子様無構造な部分とその上に濃染する物質が付着した部分とがあった。

裂溝部の被膜は、埋伏歯では細胞性で細胞核が密集しており、半埋伏歯では萌出歯と同様に硝子

様無構造な膜に濃染する顆粒様物の付着した像を呈していた。

2. 各抜去歯の被膜には多量の glutamic acid, alanine と、相当量の aspartic acid, glycine, valine, leucine と、少量の threonine, serine, proline, isoleucine, phenylalanine, lysine, histidine, arginine, methionine とがあり、hydroxy-proline が埋伏歯にのみ痕跡的に認められたが、cystine は全く認められなかった。

3. 萌出歯と半埋伏歯の被膜のアミノ酸組成は同じであり、埋伏歯とは次の点で異なっていた。歯冠表面部では alanine が萌出歯の方が多く、glycine と proline が埋伏歯の方に多かった。裂溝部では alanine が萌出歯の方に多く、leucine と proline が埋伏歯の方に多かった。また被膜のアミノ酸組成を歯冠表面部と裂溝部とで比較すると、埋伏歯では glycine が歯冠表面部の方に多く、そのアミノ酸組成に差があったが、萌出歯や半埋伏歯ではこのような差がなかった。

4. 被膜を構成する蛋白は、そのアミノ酸組成よりケラチン性でもコラーゲン性でもなく、またヘモグロビンに由来するものでもないと判断された。

5. 歯冠断面を走査型電子顕微鏡で見ると、歯冠表面部の被膜は、埋伏歯では絹のようになめらかな被膜であり、半埋伏歯では凹凸や亀裂を生じており、萌出歯では網目状凹凸をもった厚みのある沈着物が一面に付着していてその下に膜を識別することができなかった。

裂溝部の被膜は、埋伏歯では凹凸や亀裂のない薄膜であったが、半埋伏歯では埋伏歯と同じような膜の上に沈着物様のものが少し付着しており、萌出歯では大量に充満した沈着物の下に亀裂の生じた薄膜が識別されることもあり識別されないこともあった。

謝 辞

稿の終りに際して、終始御懇篤な御指導、御校閲をいただいた東京医科歯科大学第一保存学教室の総山孝雄教授ならびに生化学教室の佐々木教授に深く感謝いたします。

す。また種々御助言や御援助をいただいた解剖学教室の桐野教授や、生化学教室・第一保存学教室ならびに医用器材研究所無機材料部の皆様に心から御礼申し上げます。そして液体クロマトグラフを使用させていただいた日立株式会社の御好意にも心からお礼申し上げます。

文 献

- 1) Black, G. V.: Operative Dentistry, 3rd ed., London, 1917, Claudius Ash, Sons & Co., Ltd., p. 75.
- 2) Hyatt, T. P.: Report of an Examination Made of Two Thousand One Hundred and One High School Pupils, Dent. Cos., 62: 507-511, 1920.
- 3) Hyatt, T. P.: Prophylactic Odontotomy, Dent. Cos., 65: 234-241, 1923.
- 4) Hyatt, T. P.: Some Further Considerations of the Possibilities of Permanent Molars through Occlusal Pits and Fissures, Dent. Cos., 65: 623-626, 1923.
- 5) Hyatt, T. P.: Cavities, Grooves, Sulci and Fissures, Dent. Cos., 65: 1219-1222, 1923.
- 6) Hyatt, T. P.: Occlusal Fissures, Dent. Items Int., 46: 493-507, 1924.
- 7) Hyatt, T. P.: Prophylactic Odontotomy, J. Dent. Res., 6: 393, 1925.
- 8) Hyatt, T. P.: A New Aspect of Prophylactic Odontotomy, J. Amer. Dent. Ass., 18: 1356-1360, 1931.
- 9) 三輪盛文: 窩溝齲蝕初発に関する臨床的および鏡見的診査成績の対照, 歯科月報, 21: 1-12, 1941.
- 10) Burket, L. W.: The Accuracy of Clinical and Roentgenologic Diagnosis of Dental Caries as Determined by Microscopic Studies, J. Dent. Res., 20: 71-76, 1941.
- 11) Frisbie, H. E. and Nuckolls, J.: Caries of the Enamel, J. Dent. Res., 26: 181-202, 1947.
- 12) 佐藤知自: 初期裂溝う蝕の診断に関する研究, 日本口腔科学会雑誌, 5: 142, 1956.
- 13) Miller, J. and Hobson, P.: Denermination of presence of caries in fissures, Brit. Dent. Jour., 100: 15-19, 1956.
- 14) Newbrum, E., Brudevold, F. and Mermagen, H.: A Microradiographic Evaluation of Occlusal Fissures and Grooves, J. Amer. Dent. Ass., 58: 26-30, 1959.
- 15) 倉橋和啓: 珐瑯質初期齲蝕の肉眼所見と組織所見との関係, 歯科学報, 58: 558-559, 1958.
- 16) 岩沢正和: 小窩裂溝における初期齲蝕の臨床的診断法に関する研究, 口病誌, 26: 677-692, 1959.
- 17) Robertson, W.: A Practical Treatise on The Human Teeth, 2nd ed., London, 1839, p. 17.
- 18) McQuillan, J. H.: Microscopical Fissures in the Masticating Surface of Molars and Bicuspids, Dent. Cos., 13: 300-302, 1871.
- 19) Johnson, C. N.: A New Consideration in Filling Teeth, Dent. Cos., 41: 729-734, 1899.
- 20) Black, G. V.: Operative Dentistry, 3rd ed., London, 1917, p. 74.
- 21) 小野寅之助: 発育溝と齲蝕との関係に就て, 歯科学報, 23: 1-30, 1918.
- 22) Bödecker, C. F.: Microscopic Study of Enamel Fissures With Reference to Their Operative Treatment, Dent. Cos., 66: 1054-1067, 1924.
- 23) Bödecker, C. F.: The Cause of the Rapid Decay of Occlusal Enamel Fissures, Dent. Items Int., 53: 21-29, 1931.
- 24) Diamond, M.: A Revision of Terminology for the Study of Detailed Description of Crown Forms, Dent. Items Int., 50: 944-960, 1928.
- 25) 五井道夫: 齲蝕好発部位としての歯冠窩溝の形状に関する知見補遺, 歯科新報, 22: 376-381, 1929.
- 26) 小野寅之助: 齲蝕の初発部位と齲蝕成立後の進行様相(1), 現代の歯学, 3: 1-9, 1951.
- 27) Hutton, W. E. and Nuckolls, J.: Organic Tracts in Enamel of Completely Unerupted Human Third Molars, Os. Om. Op., 6: 1015-1019, 1953.
- 28) Truman, J.: Fissures, Dent. Cos., 12: 1-5, 1870.
- 29) Huff, N. D.: Present-Day Problems of Operative Dentistry, Dent. Cos., 69: 143-147, 1927.
- 30) Sutcliffe, H. D.: School Dentistry, Brit. Dent. Jous., 51: 9-13, 1930.
- 31) Bödecker, C. F.: The Eradication of Enamel Fissures, Dent. Items Int., 51: 859-866, 1929.
- 32) Bödecker, C. F.: Enamel Fissure Eradication, New York Dent. Jour., 30: 149-154, 1964.
- 33) Bödecker, C. F.: Dental Caries Immunization without Filling, New York Dent. Jour., 30: 337-339, 1964.
- 34) 総山・高津・清水: エナメル窩洞アマルガム充填, 保存学誌, 13: 171-175, 1971.
- 35) Mühler, C. J., Hine, K. and Day, G. H.: Preventive Dentistry, St. Louis, 1954, The C. V. Mosby Co., p. 165-175.
- 36) Takeuchi, M. and Kizu, T.: Sealing of the Pit and Fissure with Resin Adhesive, I. Results of Sealing on Extracted Teeth, Bull.

- Tokyo Dent. Col., 7 : 50-59, 1966.
- 37) Takeuchi, M., Kizu, T., Shimizu, T., Eto, M. and Amano, F. : Sealing of the Pit and Fissure with Resin Adhesive, II. Results of Nine Months' Field Work, an Investigation of Electric Conductivity on Teeth, Bull. Tokyo Dent. Col., 7 : 60-71, 1966.
 - 38) Bounocore, M. G. : Sealing of Pits and Fissures with an Adhesive Resin, J. Amer. Dent. Ass., 75 : 121-128, 1967.
 - 39) Bounocore, M. G. : Adhesivi Sealing of Pits and Fissures for Caries Prevention, with Use of Ultraviolet Light, J. Amer. Dent. Ass., 80 : 324-328, 1970.
 - 40) Lee, H. D. and Swartz, M. L. : Sealing of Developmental Pits and Fissures : in vitro study, J. Dent. Res., 50 : 133-140, 1971.
 - 40) Parkhouse, R. C. and Winter, G. B. : A Fissure Sealant Containing Methyl-2-Cyanoacrylate as a Caries Preventive Agent, Brit. Dent. Jour., 130 : 16-19, 1971.
 - 42) Basic, F. C. : Molecular Transport in Micro-Volumes Simulating Salivary Retention Areas. J. Dent. Res., 45 : 1499-1510, 1966.
 - 43) 実験化学講座 23, 1957, 丸善, p. 102.
 - 44) Levine, P. T., Glimcher, M. J. and Bonar, L. C. : Collagenous Layer Covering the Crown Enamel of Unerupted Permanent Human Teeth, Science, 146 : 1676-1678, 1964.
 - 45) Ward, W. H. and Lundgren, H. P. : The Formation, Composition and Properties of the Keratins, Advanc. Protein Chem., 9 : 243-297, 1954.
 - 46) Hodson, J. J. : Origin and Nature of the Cuticula Dentis, Nature, 209 : 990-993, 1966.
 - 47) Armstrong, W. G. : The Composition of Organic Films Formed on Human Teeth, Caries Res., 1 : 89-103, 1967.
 - 48) Nasmyth, A. : Researches on the Development, Structure and Disease of the Teeth, London, 1849, p. 113.
 - 49) Paul, F. T. : Nasmyth's membrane, Brit. J. dent. Sci., 37 : 1021-1030, 1894.
 - 50) Mummery, J. H. : Studies in Dental Histology, Dent. Cos., 64 : 32-40, 1922.
 - 51) Orban, B. J. : Orban's Oral Histology and Embryology, 3rd ed., Saint Louis, 1962, p. 236.
 - 52) Dawes, D., Jenkins, G. W. and Tonge, C. H. : The Nomenclature of the Integuments of the Enamel Surface of Teeth, Brit. Dent. Jour., 115 : 65-68, 1963.
 - 53) Armstrong, W. G. : Amino Acid Composition of Human Parotid Salivary Proteins Selectively Adsorbed By Hydroxyapatite, Archs. oral Biol., 15 : 1001-1003, 1970.
 - 54) Hayward, A. F. and Armstrong, W. G. : Dental Plaque, London, 1970, p. 190.
 - 55) Cummins, C. S. : Chemical Composition and Antigenic Structure of Cell Walls of Corynebacterium, Mycobacterium, Nocardia, Actinomyces and Arthrobacter, J. gen. Microbiol., 28 : 35-50, 1962.
 - 56) Pincus, P. : Further Tests on Human Enamel Protein, Biochemical Jour., 42 : 219-221, 1948.
 - 57) Schroeder, H. E. and Jan de Boever, Dental Plaque, London, 1970, p. 71.