The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	う蝕病巣におけるWhitlockite, Brushiteの生成機序に関する研究
Author(s)	野々村, 榮二
Citation	大阪大学, 1980, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/32975
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

う蝕病巣における Whitlockite , Brushite の生成機序に関する研究

野々村栄二
大阪大学歯学部 小児歯科学講座*
（主任：祖父江鎮雄教授）

原稿用紙　64枚
図　16枚
表　16枚

LIFE C156

緒言

う蝕病巣では、歯質アパタイトの脱灰と再石灰化の現象が複雑にからみ合って生じているものと考えられている。そして、このう蝕病巣内には歯質アパタイトとは異なる結晶、いわゆる caries crystal の見出されることが多くの研究者によって報告されている[1~8]。1955年 Lenz[1,2] が電子顕微鏡によって象牙質う蝕病巣を観察した際、歯質アパタイトとは異なる大きな菱形の結晶を見出し、これをう蝕病巣に固有のものと考え、caries crystal と名づけた。それ以後、Helmke[3]、Torell[4]、片山[5]、Höhlng[6,7]、Frank ら[8] も同じく電子顕微鏡によって caries crystal を観察している。これらの電子顕微鏡による研究では、caries crystal は象牙質う蝕病巣の象牙細管内や管周基質[1,2,3,5,6,8] ならびにエナメル質う蝕病巣の小柱辺縁部に多く観察される[4,7] と報告されている。そして、その形態学的な特徴から判断して、caries crystal は Whitlockite (β-Tricalcium phosphate $\beta\text{-}Ca_3(PO_4)_2$) であ

ろうと推察されていた。

caries crystal が最初に結晶学的に同定されたのは、象牙質う蝕病巣について検討したJackson[9]による粉末X線回折法およびHöhlingら[10]やVahlら[11]の電子線回折法による結果であって、それはWhitlockiteであるとされていた。しかしその後、Rowlesら[12]はう蝕象牙質を粉末X線回折法によって検討した結果、う蝕病巣には歯質アパタイト以外にWhitlockiteやBrushite $CaHPO_4 \cdot 2H_2O$, Octacalcium phosphate $Ca_8H_2(PO_4)_6 \cdot 5H_2O$, Calcite $CaCO_3$, Weddellite $CaC_2O_4 \cdot 2H_2O$などが検出されたと報告している。しかしながら、これらの粉末X線回折法ではう蝕病巣部を粉砕して得た粉末を試料としているため、う蝕病巣の組織学的な変化と対応させてcaries crystalを同定し、その局在性について検討することは不可能であった。

元来、Whitlockiteはβ-Tricalcium phosphateに名づけられた鉱物名であり、鉱物として認められた歴史的背景から[13]、高温度下でのみ生成さ

れるものと考えられていた。しかし、歯石[14,15]や唾石[16]そしてう蝕病巣内にもWhitlockiteが検出されるという事実から，生体温度条件下でも生成されることがわかった。そして，その生成にはマグネシウムイオンや鉄イオンなどの2価の陽イオンの共存が必要とされている[10,17]。Hayekら[18]は、マグネシウムイオンを含むカルシウムイオンとリン酸イオンの溶液から70°CでWhitlockiteが生成されたと報告しており，Schroeder[19]は歯石に関する研究からマグネシウムイオンの存在によりBrushiteはWhitlockiteへ転化すると述べている。

一方、Brushiteは歯石[14,15]や尿石[20]，骨[21]などにも存在することが報告されている。山本[22]は37°Cにて健全エナメル質をpH 4.5の脱灰液に浸漬することによって人工白斑を形成し、微小焦点X線回折法を用いて反応生成物を検討した。その結果，エナメル質人工白斑部にBrushiteが生成されていたと報告し、実際のう蝕病巣内にもBrushiteは生成されうると述べて

いる。また、岡崎ら[23]は合成Hydroxyapatite $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$（以下HAと略記する）を加圧成型したペレット表面をリン酸イオンを含むpH 4.0の酢酸緩衝液で脱灰した結果、脱灰表層部においてBrushiteの生成が認められたと報告している。さらに、青葉ら[24]はエナメル質アパタイト表面にBrushite、Whitlockiteの結晶を析出させ、HAとの配向関係を調べた結果、BrushiteはHAと(010)面においてepitaxyが起こりうることを確め、さらにWhitlockiteとHAとの間にもepitaxyが起こりうることが考えられると述べている。

これらのcaries crystalは、歯質アパタイトの脱灰と再石灰化の現象が複雑に生じているう蝕病巣内で生成されるものであり、caries crystalの生成機序を究明することは、う蝕病巣での再石灰化現象を考察するうえで意義あることと思われる。しかしながら、う蝕病巣内におけるcaries crystalの生成機序については、現在なお明らかでない。

そこで本研究では、う蝕病巣内における caries crystal の生成機序を明らかにすることを目的として、まずう蝕病巣を非破壊的に分析することが可能な微小焦点X線回折法を用い、エナメル質および象牙質う蝕病巣内における caries crystal の同定とその局在性について検索した。さらに、健全エナメル質および象牙質を人工脱灰し、生成される caries crystal の同定とその局在性について調べた。そして、これらの実験結果から caries crystal として検出された Whitlockite、Brushite について、それらの生成条件を *in vitro* の実験により検討した。

材料および方法

実験1. う蝕病巣における caries crystal について

う蝕罹患乳歯の研磨切片を用い、偏光顕微鏡およびマイクロラジオグラフィによる観察ならびに微小焦点X線回折法により、エナメル質および象牙質う蝕病巣における caries crystal

の同定とその局在性について検討した。

材料には大阪大学歯学部附属病院小児歯科に来院した小児患者より得た、充塡修復処置のなされていない う蝕罹患乳歯47歯を用いた。

これらの新鮮抜去歯牙を歯科用ダイヤモンドディスクにて、流水下で う蝕病巣を含むように長軸方向に切断し、エタノールに2日間浸漬，脱水処理後、B.P.S.レジン（Bio-plastic Specimen 樹脂の略称、京都科学標本社製）で包埋し、約50～100μm の平行な厚さの研磨切片を作製した。

このようにして得た各試料についてう蝕病巣の、主として無機質相の変化を観察することを目的として、偏光顕微鏡およびマイクロラジオグラフィを用い、組織学的な検討を行った。マイクロラジオグラフィの撮影条件は表1に示す。

つぎに、これらの観察結果をもとに、う蝕病巣の表層から内層にわたって、組織像の異なると考えられる部位を選択し、X線回折を

行った。すなわち、それらの各部位について微小焦点X線回折装置を用い、直径100μmのX線ビームを照射しX線回折を行った。表2が微小焦点X線回折法の測定条件である。結晶の同定は、得られたX線回折像から回折角2θを算出し、A.S.T.M.カード[25]を用いて行った。

さらに、象牙質う蝕については、臨床所見を分類基準としたMillerら[26]の方法に従い、材料として用いたう蝕歯をactive caries とarrested caries とに分類し、う蝕病巣の臨床像と検出されたcaries crystalの種類との関連性について調べた。

実験2、人工脱灰によるWhitlockite, Brushiteの生成について

健全エナメル質および象牙質を人工的に脱灰し、生成されてくるcaries crystalについて検討した。すなわち、種々なpHの脱灰液中に健全歯牙を浸漬し、各々の脱灰されたエナメル質と象牙質における反応生成物について実験1と同様の方法で調べた。

材料には、矯正治療の目的で抜歯された新鮮な健全幼若第1小臼歯と埋伏智歯を用いた。まず、各歯牙の歯冠部歯面をフッ素を含まない歯磨剤をつけたラバーカップで十分に清掃後、歯科用ディスクを用い流水下で長軸方向に分割した。得られた各歯牙片はエナメル質と象牙質とを同時に脱灰することができるように、歯科用ダイヤモンドポイントを用いて注水下で一部のエナメル質を完全に削除し、象牙質を露出させた。そしてエナメル質と象牙質を含むwindow部（3×4 mm^2）を除いてインレーワックスで被覆した。

脱灰液としてはSperberら[コク]の酢酸緩衝液（0.10 M酢酸＋0.01 Mアスパラギン酸）を用い、pHをそれぞれ3.5，4.0，4.5，5.0，5.5に調整した。そしてこれらの酢酸緩衝液各200 ml中に歯牙試験片を浸漬し、37°Cで人工脱灰した。この際の浸漬時間は、pH 3.5と4.0の脱灰液では2日間、pH 4.5では2日間および3日間、pH 5.0では3日間および6日間、pH 5.5では

3日間、6日間および12日間とした。

このようにして得た歯牙試験片について、実験Iと同様の方法でエタノールにて脱水処理後、B.P.S.レジンに包埋し、約50～100μmの平行な厚さの研磨切片を作製した。

そして、各試料のエナメル質および象牙質脱灰部を偏光顕微鏡およびマイクロラジオグラフィで観察し、組織学的な特徴の認められた各部位について、微小焦点X線回折法により、反応生成物の同定とその局在性について検討を行った。

実験3、*in vitro* でのWhitlockite、Brushiteの生成条件について

実験1，2においてう蝕病巣ならびに人工脱灰されたエナメル質および象牙質にcaries crystalとしてWhitlockiteとBrushiteが検出された。そこで、本実験ではWhitlockite、Brushiteの生体温度条件下における生成条件について*in vitro*の実験により検討した。

Whitlockiteが、生体温度条件下で生成される

には、マグネシウムイオンや鉄イオンなどの2価の陽イオンの共存が必要とされている[10,17]。そこで、まず予備実験としてマグネシウムイオンが共存するという条件下でWhitlockiteの生成に及ぼす反応温度の影響について調べた。すなわち、70°CでWhitlockiteを生成したHayekら[18]の実験条件を参考に、Mg/Caのモル比を1/6とし、反応温度を変えて実験を行った。その結果、反応温度が37°Cおよび45°CではBrushiteのみが生成され、50°CではBrushiteとともにWhitlockiteが生成し、55°C以上ではBrushiteは生成されず、Whitlockiteのみが生成された。

そこで、本実験では37°CにおけるWhitlockite、Brushiteの生成条件を以下の項目について検討した。すなわち、(1) カルシウムイオンとリン酸イオンの濃度、(2) マグネシウムイオンとカルシウムイオンのモル比、(3) pH、(4) フッ素イオンが共存する場合の影響について調べた。

試薬には、酢酸カルシウム $Ca(CH_3COO)_2 \cdot H_2O$,

酢酸マグネシウム $Mg(CH_3COO)_2 \cdot 4H_2O$ および第一リン酸アンモニウム $NH_4H_2PO_4$（いずれも試薬特級）を用いた。歯質アパタイトの Ca/P モル比は1.50～1.67であり[22]，これが脱灰された場合を想定して、上記試薬の各水溶液を (Ca+Mg)/P モル比を1.5の割合とし、37℃で2日間撹拌反応させた。各反応生成物は4000 r.p.m. にて遠心分離し、蒸留水にて3回水洗後、37℃にて24時間乾燥した。つぎに、これらの各反応生成物をメノウ乳鉢で微粉砕し、200 mesh の標準篩を通過させたものを試料として、粉末X線回折法により同定を行った。表3が粉末X線回折法の測定条件である。

(1) カルシウムイオンとリン酸イオンの濃度について

まず、カルシウムイオンとリン酸イオンの濃度を変えて反応させた場合の反応生成物について検討した。すなわち、Mg/Ca のモル比を1/6とし、カルシウムイオンとリン酸イオンの濃度をそれぞれ表4に示す濃度として反応

させた。なお、反応時のpHはアンモニア水にてpH7.4に調整した。

(2) マグネシウムイオンとカルシウムイオンのモル比について

(1)の実験結果から、WhitlockiteとHAの生成が認められた条件下（$[Ca^{2+}]$ = 60.0 mM）で、Whitlockiteの生成に及ぼすマグネシウムイオンとカルシウムイオンのモル比の影響について検討した。すなわち、Mg/Caのモル比が0から1/2の各モル比となるように、表5に示す各イオン濃度で反応させた。反応時のpHはアンモニア水にてpH7.4に調整した。

(3) pHについて

(2)の実験結果から、Whitlockiteの生成が明確に認められたMg/Caのモル比1/5の実験条件を用いて、pHの影響について検討した。すなわち、カルシウムイオン濃度を60.0 mM、Mg/Caのモル比が1/5となるようにマグネシウムイオン、リン酸イオンの各濃度を12.0 mM、48.0 mMとし、反応時のpHを変えて反応させた。反応時のpH

は、酢酸あるいはアンモニア水にてpH 4.5, 5.4, 5.8, 6.0, 6.2, 6.6, 7.0, 7.4および7.8にそれぞれ調整した。

(4) フッ素イオンが共存する場合の影響について

生成されたBrushiteはフッ素イオンが存在するとたやすくHAへと転化することが報告されているが[24,28], Whitlockiteに及ぼすフッ素イオンの影響についてはほとんど研究されていない。

そこで、(3)の実験結果からWhitlockiteあるいはBrushiteの生成が認められた実験条件下に、フッ素イオンが共存する場合の影響について検討した。すなわち、(3)の実験系において反応時のpHをBrushiteの生成される条件としてpH 5.4, Whitlockiteの生成される条件としてpH 6.2と7.4を選んで実験を行った。フッ素イオンにはフッ化ナトリウムNaFを用い、それぞれ表6に示すフッ素イオン濃度として反応させた。

結果

実験Ⅰ．う蝕病巣における caries crystal について

(1) caries crystal の同定結果

表7，8は caries crystal の検出されたエナメル質および象牙質う蝕病巣についてまとめたものである。すなわち、エナメル質う蝕病巣では16例について、95ケ所の部位をX線回折法により検索し、象牙質う蝕病巣では42例について、168ケ所の部位をX線回折した。その結果、caries crystal として Whitlockite と Brushite が検出された。Whitlockite は3例のエナメル質う蝕病巣と6例の象牙質う蝕病巣において検出が認められた。一方、Brushite はエナメル質う蝕病巣では検出されなかったが、4例の象牙質う蝕病巣に検出された。

図1が微小焦点X線回折法によって得られたマイクロラウエカメラによるX線回折像である。検出された Whitlockite のX線回折像は，すべて明瞭な spot 状の回折像として認められ

た（図1－a,b）。一方，Brushiteのそれはすべて Brushiteの特性線である（021）面のring状の回折像として認めることができた（図1－C）。図1および表7,8に示すように Whitlockite、Brushite のX線回折像がそれぞれspot状、ring状であるところから，う蝕病巣内では Whitlockiteは比較的大きな結晶として存在しているのに対し，Brushiteは非常に微細な結晶として存在していることがわかった[29]。

（2） caries crystal の検出部位

1. Whitlockite の検出部位

図2－a,bは Whitlockiteの検出された象牙質う蝕病巣の偏光顕微鏡像とマイクロラジオグラムである。この歯牙は咬合面にう蝕の見られた乳臼歯で、Millerらの分類法[26]から arrested caries と診断されたものである。図2－bのマイクロラジオグラムで観察されるように、う蝕病巣の表層および内層のほとんど全域にわたって再石灰化している像が観察された。このう蝕病巣の表層から内層、さらに深部にわた

る、X線透過像やX線不透過像を示す各部位（丸印の部位，ハケ所）についてX線回折を行った。その結果、矢印で示した再石灰化していると思われるX線不透過像を示す部位や、境界の不明瞭なX線透過像を示す部位にWhitlockiteが検出された。

また、図3−a，bの偏光顕微鏡像とマイクロラジオグラムは、Whitlockiteの検出されたエナメル質う蝕病巣の例である。この試料は両隣接面にう蝕の見られた乳前歯の遠心側エナメル質う蝕病巣である。図3−bの丸印で示した8ケ所の部位についてX線回折を行った。その結果、矢印で示した部位においてWhitlockiteが検出された。

これらのう蝕病巣におけるWhitlockiteの検出部位は、マイクロラジオグラムの所見から再石灰化していると思われるX線不透過像を示す部位や、境界の不明瞭なX線透過像を示す部位であった。

(2) Brushiteの検出部位

図4-a, b, cの偏光顕微鏡像とマイクロラジオグラムは、Millerらの分類法[26]からarrested cariesと見られた乳犬歯の遠心側隣接面に認められた象牙質う蝕病巣である。図4-bの丸印で示した16ケ所の部位についてX線回折を行った。その結果、矢印で示したtransverse cleftと思われる、境界の明瞭なX線透過像を示す部位にのみBrushiteが検出された。図4-cのマイクロラジオグラムがその部位の拡大像である。

また、図5-a, b, cもBrushiteの検出された象牙質う蝕病巣の偏光顕微鏡像とマイクロラジオグラムである。この歯牙は唇面にう蝕の見られた乳前歯で、Millerらの分類法[26]からarrested cariesと分類された。図5-bの丸印で示した部位についてX線回折したところ、同じく矢印で示したtransverse cleftの部位にのみBrushite

が検出された。図5-cがその拡大像である。この他にも図6、7のマイクロラジオグラムに示す象牙質う蝕病巣（active caries）にBrushite

が検出された。

これらのBrushiteが検出された部位の共通したマイクロラジオグラムの所見は、transverse cleftのような境界明瞭でX線透過像を示す部位であった。

(3) う蝕病巣の臨床像とcaries crystalの種類について

象牙質う蝕病巣をMillerらの分類法[26]に従って分類し、active caries のう蝕病巣18例、arrested caries のう蝕病巣24例について、Whitlockite あるいはBrushiteの検出されたう蝕病巣の例数を調べた。表9がその結果をまとめたものである。すなわち、active caries のう蝕病巣では、Brushite のみが2例のう蝕病巣に検出されたにすぎず、Whitlockite は検出されなかった。一方、arrested caries のう蝕病巣では、6例のう蝕病巣にWhitlockite が検出され、2例のう蝕病巣にBrushite が検出された。なお、これらのうちBrushite が検出されたarrested caries のう蝕病巣における、その検出部位はいずれもtransverse

cleft の部位であった（図 4-c, 5-c）。

実験2、人工脱灰による Whitlockite 、Brushite の生成について

（1） 生成された Whitlockite 、Brushite の同定

表10はエナメル質および象牙質を種々の pH の酢酸緩衝液で脱灰し、その脱灰部における反応生成物を微小焦点X線回折法により同定し、検出された Whitlockite 、Brushite についてまとめたものである。すなわち、pH 4.0 の酢酸緩衝液で2日間脱灰した象牙質に Brushite が検出された。一方、pH のより高い pH 5.0 の酢酸緩衝液で6日間脱灰した象牙質と、pH 5.5 の酢酸緩衝液で3，6および12日間脱灰したエナメル質に Whitlockite が検出された。また、これらの Whitlockite と Brushite のX線回折像は、それぞれ spot 状と ring 状のX線回折像を示し、実際のう蝕病巣から得られた Whitlockite 、Brushite のX線回折像と一致していた。

これらの結果から、実際のう蝕病巣内で検出された caries crystal（Whitlockite 、Brushite）が

健全な歯牙を人工脱灰することによっても生成することが認められ、さらに結晶の種類を決めるのはpHによる脱灰条件であることがわかった。

(2) Whitlockite 、Brushite の生成部位

図8はBrushiteの生成が認められた象牙質試料(pH 4.0の酢酸緩衝液で2日間脱灰)のマイクロラジオグラムである。このマイクロラジオグラムで見られるように、X線透過像を示す脱灰部には、最表層の高度に脱灰された層とその下部の比較的脱灰程度の低い層の2層が観察された。これらの各層は加藤[30]やOhgushiら[31]の報告している、いわゆる第1脱灰層と第2脱灰層に相当するものと考えられた。そこで、図8の丸印で示した第1脱灰層,第2脱灰層および脱灰されていない象牙質の各部分についてX線回折を行った。その結果、矢印で示した第2脱灰層においてBrushiteの生成が認められた。また,Whitlockiteの生成が認められた象牙質試料においても、やはり同様

に第2脱灰層でWhitlockiteの生成が認められた。

図9はWhitlockiteの生成が認められたエナメル質試料(pH 5.5の酢酸緩衝液で6日間脱灰)のマイクロラジオグラムである。このマイクロラジオグラムに示されるように、表層下脱灰の像が観察され、丸印の各部位についてX線回折を行った。その結果、矢印で示したX線透過像を示す表層下脱灰部において、Whitlockiteの生成が認められた。X線不透過像を示す最表層部ではWhitlockiteは検出されず、エナメル質アパタイトのみが認められた。

他のWhitlockiteが検出されたエナメル質試料においても、同様に表層下脱灰部においてのみWhitlockiteの生成が認められた。

実験3 *in vitro* でのWhitlockite、Brushiteの生成条件について

(1) カルシウムイオンとリン酸イオンの濃度について

表11はカルシウムイオンとリン酸イオンの濃度を変えて反応させた結果、生成した反応

生成物についてまとめたものである。カルシウムイオンとリン酸イオンの濃度が最も低い場合（ $[Ca^{2+}] = 5.0$ mM 、 $[PO_4^{3-}] = 3.9$ mM ）には、HAのみが生成された。両イオン濃度が高くなるに従い（ $[Ca^{2+}] = 60.0$ mM 、 $[PO_4^{3-}] = 46.6$ mM ）HAとともにWhitlockiteが生成し、より高濃度（ $[Ca^{2+}] = 120.0$ mM 、 $[PO_4^{3-}] = 90.0$ mM ）では、HAは生成されず、Whitlockiteとともに Brushite が生成された。そして、さらに高濃度（ $[Ca^{2+}] = 180.0$ mM 、 $[PO_4^{3-}] = 140.0$ mM ）になると Whitlockite は生成されず、Brushite とともにわずかな Octa-calcium phosphate が生成された。

図10が各反応生成物のX線回折像である。カルシウムイオンとリン酸イオンの濃度が最も低い場合には、HAの特性回折線である(002)、(211)、(112)、(300)面の各回折線が認められた（図10-1）。そして、濃度が高くなるに従い、HAとともにWhitlockiteの(110)、(214)、(220)面の明瞭な回折線が認められた（図10-2）。さらに、高濃度ではHAの回折

線は消失し、Whitlockiteの回折線とともにBrushiteの特性回折線である(020)、(021)、(040)、(111)面などの回折線が認められた(図10-3)。最も高い濃度ではWhitlockiteの回折線は見られず、Brushiteの回折線とともにOctacalcium phosphateの(100)面回折線がわずかであるが認められた(図10-4)。

(2) マグネシウムイオンとカルシウムイオンのモル比について

表12はマグネシウムイオンとカルシウムイオンのモル比を変えて反応させた結果、生成した反応生成物についてまとめたものである。すなわち、Mg/Caのモル比を1/8以下で反応させた場合には、HAのみが生成されたが、1/7から1/3の範囲ではHAとともにWhitlockiteの生成が認められた。さらにマグネシウムイオンの濃度が高くなると(Mg/Ca≒1/2)、Whitlockiteは生成されず、HAとともに$MgNH_4PO_4 \cdot 6H_2O$が生成された。図11はMg/Caのモル比を0, 1/8, 1/5として反応させた場合の反応生成物のX線

回折像である。なお、この図11に見られるように、マグネシウムイオン共存下に生成したHAの結晶性は、マグネシウムイオンが共存しない条件下で生成したHAの結晶性に比べて悪くなっているのが認められた。

(3) pHについて

表13は反応時のpHを変えて反応させた結果、生成した反応生成物についてまとめたものである。すなわち、反応時のpHがpH 4.5から5.8ではBrushiteのみが生成され、pH 6.0ではBrushiteとともにわずかなWhitlockiteの生成が認められた。そして、pH 6.2になるとBrushiteの生成は認められず、Whitlockiteのみが生成された。さらに、それより高いpH 6.6以上ではWhitlockiteとともにHAが生成され、pH 7.8ではHAとわずかなWhitlockiteの生成が認められた。このように反応時のpHがpH 6.0以下ではBrushiteが生成され、pH 6.0以上ではWhitlockiteの生成が認められた。図12は反応時のpHを5.8, 6.0, 6.2, 6.6にして反応させた場合の各反応

生成物のX線回折像である。

(4) フッ素イオンが共存する場合の影響について

表14は反応時のpHをpH5.4に調整し、Brushiteが生成される条件下に、種々の濃度のフッ素イオンを共存させて反応させた結果、生成した反応生成物についてまとめたものである。すなわち、共存するフッ素イオンの濃度が10ppm以下ではBrushiteのみが生成されたが、フッ素イオン濃度が20, 50ppmになると、Brushiteとともにわずかな HAの生成が認められた。そして、100ppm以上のフッ素イオンでは、Brushiteの生成は認められずHAのみが生成された。図13がフッ素イオン濃度を10, 50, 100ppmにして反応させた場合の各反応生成物のX線回折像である。

一方、表15、16はそれぞれ反応時のpHをpH6.2, 7.4に調整し、Whitlockiteが生成される条件下に、種々の濃度のフッ素イオンを共存させて反応させた結果、生成した反応生成物に

ついてまとめたものである。Whitlockiteのみが生成される条件下にフッ素イオンが共存する場合（表15）、その濃度が2 ppm 以下ではWhitlockiteのみが生成された。しかし、フッ素イオン濃度が高くなるにつれ、5，10，20 ppm の濃度ではWhitlockite とともにHA の生成がわずかに認められ、50 ppm 以上になるとWhitlockiteは生成されず、HA のみが生成された。図14は2，20，50 ppm のフッ素イオン濃度で反応させた場合の各反応生成物のX線回折像である。また，Whitlockite とHA の生成される条件下（表16）では、共存するフッ素イオン濃度が5 ppm 以下でWhitlockite とHA の生成が認められた。しかし、その濃度が10 ppm 以上になるとWhitlockite は生成されず、HA のみが生成された。図15が2，5，10 ppm のフッ素イオン濃度で反応させた場合の反応生成物のX線回折像である。

このようにWhitlockite あるいはBrushite の生成条件下に、ある濃度以上のフッ素イオンが共

存する場合には、Whitlockite、Brushiteは生成されず、HAのみが生成されることがわかった。そして、その際に必要な最低フッ素イオン濃度はpH域が高くなるほど低濃度で十分であることが判明した。

考　察

従来、caries crystalの同定に用いられてきたX線回折法は、試料としてう蝕病巣より得た歯牙硬組織の粉末を用いる、いわゆる粉末X線回折法により行われてきた。そのため、光学顕微鏡下で観察されるう蝕病巣の組織学的な変化とcaries crystalの局在性やその種類との関連性について検討することは不可能であった。また、粉末X線回折法では試料全体を粉末化して分析するため、caries crystalがう蝕病巣のきわめて限局した部分に生成している場合は、同定に必要な回折線強度が得られず同定されないこともある。一方、本研究で用いた微小焦点X線回折法では、実際のう蝕病巣を破壊

することなく、う蝕歯牙切片そのものを試料とすることができ、それに100μm径という微小な部分にX線ビームを照射することができる。したがって、従来の粉末X線回折法とは異なり、微小焦点X線回折法は偏光顕微鏡像やマイクロラジオグラムと対比しながら、う蝕病巣内の組織学的な変化を示す微小部分について、非破壊的にX線回折を行うことが可能であることを特徴としている。本研究ではこの微小焦点X線回折法を用いてう蝕病巣をX線結晶学的に検討した結果、caries crystal としてWhitlockite およびBrushite が検出された。以下本研究結果に対して考察を加えてみたい。

1. う蝕病巣におけるWhitlockite 、Brushite の検出部位について

caries crystal として認められたWhitlockite 、Brushite の検出部位には、その組織像に差が認められた。すなわち、Whitlockite が検出された部位は、マイクロラジオグラムによる所見で、再石灰化していると思われるX線不透過像を

示す部位や、境界不明瞭なX線透過像を示す部位であった。一方，Brushiteの検出部位は、transverse cleftのような境界明瞭なX線透過像を示す部位であった。

これらの検出部位について、本研究のin vitroで得られた結果（実験3）と合わせ考察すると、まずWhitlockiteはマグネシウムイオンが$Mg/Ca = 1/7 \sim 1/3$（モル比）の条件下で生成され（表12）、pH 6.0以上の高いpH領域で生成されていた（表13）。このことから考えると、Whitlockiteの検出された部位には必ずマグネシウムイオンが存在し、しかも脱灰後pHが高まり、口腔内のpH領域に近づいた状態であろうと思われる。つまり、Whitlockiteの検出部位は、脱灰がほとんど停止した再石灰化しやすい状態にある部位であろうと推測される。一方、Brushiteの生成条件に関するin vitroの結果ではカルシウムイオンとリン酸イオンの濃度が比較的高い場合（表11）や，pH 6.0以下の低いpH領域で生成されていた（表13）。このことから、

Brushite が検出された transverse cleft のような部位は低いpH領域にあり、しかも歯質アパタイトから溶解したカルシウムイオンやリン酸イオンが速やかに拡散されず、比較的高濃度に保たれた場所であろうと思われる。すなわち、Brushite の認められた部位では、脱灰がおそらく active に生じているのであろうと考えられる。

なお、本研究では同一のう蝕病巣あるいは同一部位において Whitlockite と Brushite の両方の結晶が検出された試料は認められなかった。このことは、*in vitro* での本研究結果（実験3）からも推測されるように、Whitlockite あるいは Brushite の生成条件がそれぞれ異なること、特にそれらが混在して生成される条件は非常に限定されること（表11，13）などが原因と考えられる。

臨床所見に基づいて分類した Miller らの方法[26]に従って、象牙質う蝕を active caries と arrested caries とに分類し、う蝕病巣の臨床所見

と検出されたcaries crystalの種類との関連性について調べた。その結果、Whitlockiteはactive cariesのう蝕病巣では検出されず、arrested cariesのう蝕病巣にのみ検出されていた。一方、Brushiteはactive caries とarrested cariesの両者に検出された。*in vitro*での本研究（実験３）において、WhitlockiteはpH 6.0以上のpH領域で生成され、BrushiteはpH 6.0以下の低いpH領域で生成されていたことを考慮すると、Whitlockiteがactive cariesで検出されず、arrested cariesのみで検出されたこと、Brushiteがactive cariesで検出されたことは妥当な結果であろう。しかし、Brushiteは２例のarrested cariesにおいても検出が認められた。このことについては、Brushiteの検出部位がいずれもtransverse cleftであった（図４、５）ことを考慮しなくてはならない。すなわち、transverse cleftの部位では、おそらく脱灰がactiveに生じている低いpH領域にあり、しかも脱灰により生成したイオンが速やかに拡散されにくい状態にあって、Brushiteの

生成条件に合致したためにBrushiteが生成したのであろうと考えられる。つまり、これらのarrested caries のう蝕病巣では、一部の限局したtransverse cleft の部位においてう蝕が進行していたのであろうと推察される。なお、arrested caries のう蝕病巣に transverse cleft が認められたことについては、高橋[32]の報告によるとう蝕病巣の組織像はう蝕病変の進行の速度、進展の程度（う蝕病巣の深さ）、経過した時間の長さなどによって多様に変化するといわれている。したがって、実際のう蝕病巣では非常に複雑な組織像を示していることが考えられ、arrested caries のう蝕病巣に transverse cleft が認められたことも理解できる。このように、う蝕病巣の臨床所見と caries crystal として検出されたWhitlockite、Brushite との間には対応しうる関連性が認められたことは興味深いことである。

2. 人工脱灰による Whitlockite、Brushite の生成について

健全歯牙を人工的に脱灰した場合にも、う蝕病巣内で検出されたものと同じ Whitlockite、Brushite が生成することがわかった。そして、それらの生成部位は象牙質では第2脱灰層、エナメル質では表層下脱灰部であった。人工脱灰された象牙質では、いわゆる第1脱灰層と第2脱灰層が観察された。Ohgushi ら[31]は、これらの層を電子顕微鏡で観察した結果、第1脱灰層には変性したコラーゲン線維とわずかな顆粒状あるいは板状の無機質結晶が観察され、第2脱灰層では変性していないコラーゲン線維とアパタイトの結晶が観察されたと報告している。このような脱灰層のうち、第2脱灰層において Whitlockite あるいは Brushite が生成されていた。このことについては次のように考えられる。すなわち、*in vitro* での本研究結果（実験3）から、カルシウムイオン、リン酸イオンの濃度が非常に低い場合には HA が生成し、Whitlockite や Brushite の生成にはある程度以上の濃度が必要である。このこと

から考えると、第1脱灰層では第2脱灰層に比べてイオンが拡散しやすく、カルシウムイオンやリン酸イオンなどの濃度がWhitlockiteやBrushiteが生成しうる濃度にまで高まりにくいことがまず第一に考えられる。さらに、Whitlockiteや Brushite とHAとの間には epitaxy が生じうると報告されていることから[24]、第2脱灰層では脱灰されずに多く残存していると考えられるアパタイトとの epitaxy によって、Whitlockite や Brushite がより生成しやすいことが考えられる。なお、加藤[30]は第1脱灰層では再石灰化は起こらず、第2脱灰層でのみ再石灰化が起こると報告しているが、このことは第2脱灰層にのみ Whitlockite や Brushite の生成が認められた本研究結果と一致するものである。一方、エナメル質では表層下脱灰部に Whitlockite が生成されていた。この表層下脱灰部の成因については種々の考え方がなされてきたが、あらかじめ表層を削除したエナメル質[33,34]や合成HAのペレット[23]においても、表層

下脱灰部を実験的に作ることが可能なことから、それは脱灰エナメル質の表層における再石灰化によって生ずるものと考えられている。本研究において、表層下脱灰部にWhitlockiteが生成されたことを考察すると、カルシウムイオンやリン酸イオンの濃度が高まりにくいと考えられる表層においては、まずこれらのイオンが低濃度条件でも生成しうるアパタイトが再石灰化するものと考えられる。そして、そのために生じた表層下脱灰部では、表層の再石灰化によって次第にイオンの拡散が起りにくくなり、カルシウムイオン、リン酸イオン、マグネシウムイオンなどの濃度が高まり、Whitlockiteの生成条件に達したものと考えられる。

ところで、本研究ではエナメル質う蝕病巣や、人工脱灰されたエナメル質においてBrushiteは検出されなかった。この理由について考察すると、*in vitro*での本研究結果（実験3）から、Brushiteの生成にはWhitlockiteの場合に

比べてより高濃度のカルシウムイオンやリン酸イオンを必要とすることがわかった。すなわち、Brushite はう蝕病巣内でも特にこれらのイオンが拡散されにくく、高濃度に保たれる場所においてのみ生成するものと考えられた。このことから考えると、エナメル質と象牙質における化学組成や組織構造などの相違によって、おそらくエナメル質では象牙質に比べてイオンが比較的拡散されやすいためであろうと推察される。文献的にも Brushite が実際のエナメル質う蝕病巣に検出されたという報告は見あたらない。しかし、山本[22]はエナメル質の人工白斑部を微小焦点X線回折法により検討した結果、Brushite の比較的大きな結晶が配向して生成していたと報告している。また、Arends ら[35]は健全エナメル質と人工脱灰したエナメル質における HPO_4^{2-} を赤外線吸収スペクトル法により定量した結果、それは健全エナメル質では5%であったのに対し、人工脱灰されたエナメル質では15%に増加して

いたと報告している。したがって、実際のエナメル質う蝕病巣内では HPO_4^{2-} としてはかなり多く存在していることが考えられる。

3、Whitlockite、Brushite の生成条件について

Whitlockite は斜方面体の構造をもつ結晶であり[36]、鉱物として最初に報告[13]されて以来、高温度下でのみ生成されると考えられていた。しかし、歯石やう蝕病巣内でも検出されて以来、Whitlockite は生体温度条件下でも生成されると考えられ、その生成にはマグネシウム、鉄、マンガンなどの2価の陽イオンが必要であるとされている[10、17]。これらの陽イオンの中でも、歯石中に認められた Whitlockite は Tricalcium phosphate $Ca_3(PO_4)_2$ のカルシウムの一部がマグネシウムと置きかわった Magnesian whitlockite $(Ca,Mg)_3(PO_4)_2$ であることから、特にマグネシウムイオンが注目されてきた。Hayek ら[18]は、70°C の温度でマグネシウムイオンを加えたカルシウムイオンとリン酸イオンの溶液内で Whitlockite が生成されたと報告している。また

歯石の研究から、その沈着初期にはBrushiteが生成され、時間の経過とともに次第にBrushiteからWhitlockiteあるいはOctacalcium phosphateやHAが生成されてくることが報告されており[14]、Schroeder[19]はマグネシウムイオンの存在によってBrushiteはWhitlockiteへ転化すると述べている。また、WhitlockiteとHAとの間にはepitaxyの起こりうることも報告されている[24]。しかしながら、生体温度条件下におけるWhitlockiteの生成については今まで不明な点が多く、本研究によってはじめて生体温度条件下でのWhitlockiteの生成に関する諸条件を明らかにすることができた。

生体温度条件下でWhitlockiteが生成されるにはマグネシウムイオンが必要であるが、その歯質における含有量は、平均乾燥重量で永久歯エナメル質で0.54%、象牙質で0.83%であり[37]、乳歯エナメル質で0.22%，象牙質で0.50%であるとされている[38]。また、エナメル質内のマグネシウム濃度は、表層から歯髄

側へ向かうにつれて増加することが知られている[39]。そして、Suga ら[40]はう蝕の進行に際して、カルシウムやリンの濃度の減少が認められた部位よりもさらに深部において、すでにマグネシウムの濃度が減少しているのが認められたと報告している。また、Johansen[41]もう蝕病巣内のマグネシウム量は健全部のそれよりも減少していたと述べている。このマグネシウムイオンは主にアパタイトの結晶表面にある水和殻に存在すると考えられており[42]，Hendricks ら[43]は $MgOH^-$ の形でアパタイトの結晶表面に存在すると述べている。したがって、マグネシウムと歯質アパタイトとの結合は弱く、わずかの脱灰によってもマグネシウムイオンは溶出しやすく、実際のう蝕病巣内ではかなりの濃度のマグネシウムイオンが遊離していることが考えられる。このようなう蝕病巣内では、カルシウムイオンやリン酸イオンの濃度の高まりと共に、pHの上昇とあいまって、Whitlockite が生成しうる諸条件が満足され

て、はじめてWhitlockiteの析出が起こるのであろう。また、Whitlockiteは歯石の場合と同じくマグネシウムイオンの存在によってBrushiteから転化することによって生成されたり、歯質アパタイトとのepitaxyによって生成されることなども考えられる。なお、マグネシウムイオンについてJensenら[15]は、それがアパタイトの結晶成長を阻害し、Whitlockiteの生成を促進するよりもむしろ、いったん生成されたWhitlockiteを安定に保つように作用すると述べている。本研究においてもマグネシウムイオンはHAの結晶性を低下させているのが認められた（図11）。また、実際のう蝕病巣で検出されたWhitlockiteの結晶は比較的大きなものであったこと（図1，表7，8）を考えると、生成されたWhitlockiteはこのマグネシウムイオンの存在によって大きく成長しうるものと思われる。

一方、Brushiteは単斜晶系を示す結晶であり[36]、歯石[14,15]や尿石[20]、骨[21]などに認められ

ていたが、これまで実際のう蝕病巣内ではほとんど認められていなかった。しかし、山本[22]は健全エナメル質をpH 4.5の脱灰液中に浸漬し脱灰することによってBrushiteの生成が認められたと報告している。また、岡崎ら[23]は合成HAのペレットをpH 4.0の脱灰液に浸漬しておいた結果、Brushiteが生成されたと報告している。これらの実験はいずれも低いpH条件で脱灰を行っていることや、BrushiteはpH 4.0～6.0で安定であるという報告[44～46]を考慮すると、*in vitro*での本研究結果（実験3）でBrushiteがpH 6.0より低いpH領域で生成されていた事実はこれらの報告と一致するものである。また、Francisら[28]はBrushiteとHAの原子配置を比較し、それらの(010)面および(110)面が非常に似かよっており、epitaxyの可能性があると報告していた。その後、青葉ら[24]はBrushiteとHAとが互いに(010)面でepitaxyが起こることを実験的に確めている。したがって、う蝕病巣内で歯質アパタイトが

脱灰されずに残存する場合，Brushite が歯質アパタイトとの epitaxy によって生成することも十分考えられよう。

Brushite は，口腔内のような高いpH領域にさらされた場合，加水分解してHAに転化するといわれている[28]。また，pH7.4の条件下で極く微量のフッ素イオンが共存すると，Brushite は速やかにHAへ転化すると報告されている[24]。実際のう蝕病巣内ではフッ素塗布や歯磨剤などからフッ素イオンが Brushite に作用する可能性は大きいものと考えられる。そこで，著者は Brushite に及ぼすフッ素イオンの影響についてさらに検討を行った。すなわち，37℃でpH 5.5とpH 6.5の酢酸緩衝液内で撹拌下に20 ppm のフッ素イオンを Brushite に作用させた結果，Brushite はHAへ転化していくのが認められた。また，Schroeder[19] は Brushite はマグネシウムイオンの存在下では Whitlockite へ転化すると報告している。これらのことから考察すると，う蝕病巣内でたとえ Brushite が生成

されても、口腔内はBrushiteにとって不安定なpHの高い状態にあり、さらにフッ素イオンやマグネシウムイオンなどにより、HAやWhitlockiteへと転化することが考えられる。Brushiteが実際のう蝕病巣で検出されにくいことや、その結晶が大きく成長しないで微細な結晶として存在していた（図1，表8）ことは、このような理由によるものとも思われる。

なお、*in vitro*での実験において生成が認められたOctacalcium phosphate（表11）は、実際のう蝕病巣内では検出されなかった。しかし、すでにRowlesら[12]はこの結晶がう蝕病巣に存在することを粉末X線回折法により認めている。またOctacalcium phosphateは歯石[14,15]や骨[47]などにも存在することが報告されており、*in vitro*での本研究結果から考えると、このOctacalcium phosphateはカルシウムイオンやリン酸イオンの濃度がかなり高まった場所に生成されると推察される。また、著者がBrushiteをpH7.0の酢酸緩衝液中に37℃で攪拌下に保ったところ、

Brushite は Octacalcium phosphate に転化しているのが認められた。したがって、低いpH領域で Brushite が生成しても、pHが高くなるにつれて Octacalcium phosphate に転化する可能性も考えられる。しかし、たとえ Octacalcium phosphate が生成されても、この結晶は加水分解されやすく、フッ素イオンが極く微量でも存在するとたやすくHAへ転化することが知られている[48,49]。したがって、Octacalcium phosphate がう蝕病巣内に存在することは十分に考えられるが、このような理由によって本研究では、う蝕病巣内に検出されなかったものと思われる。

4、再石灰化現象における Whitlockite、Brushite について

arrested caries の成因については、臨床上非常に興味ある問題にもかかわらず、今なお明確にされていない。う蝕の病因については、う蝕原性菌，う蝕誘発性食品、歯牙のう蝕感受性の3つの基本的な因子が相互に影響していることが広く知られている[50]。このような観

点から、う蝕の予防や進行抑制を行うために、プラークコントロールやう蝕誘発性食品の摂取頻度の制限、フッ化物の塗布などの方法が広く行なわれている。しかし、う蝕の進行抑制に関しては、一部のフッ化物による効果が報告されているのみである[51～54]。臨床上、う蝕の進行が抑制されたと思われる arrested caries のう蝕病巣表層部は、平滑で硬くなっているのが観察される。これは、前述した種々な方法により口腔内環境が改善され、加えてう蝕病巣内で再石灰化が生じていった結果であろうと考えられる。したがって、う蝕病巣における再石灰化現象はう蝕の進行抑制に大きく関与しているものと思われる。う蝕の進行抑制の面から考えれば、再石灰化する際の結晶は、耐脱灰性のある化学的に安定な結晶であることが望ましい。　本研究結果から考察すると、再石灰化する際に生成する無機質結晶は、アパタイトや caries crystal といわれる Whitlockite 、Brushite などであることがわかっ

た。結晶の化学的安定性はその溶解度からもうかがわれるが、HA、Whitlockite、Brushite の溶解度積はそれぞれ、2.57×10^{-50}, 1.37×10^{-20} 2.57×10^{-7} であることから[55〜57]、これらの中で最も化学的に安定な結晶はHAである。Andrès ら[58]はHAとWhitlockiteとについてクエン酸に対する溶解性を比較した結果、Whitlockiteは HA に比べ高い溶解性を示したと報告している。したがって、う蝕病巣内ではアパタイト結晶として少しでも多く再石灰化させていくことが、う蝕の進行抑制を考える上で重要であると思われる。

HAの生成については、*in vitro* での本研究結果（実験3）からpHが高いほど生成されやすいことが認められた。また、たとえ Whitlockite や Brushite の生成条件下であっても、ある濃度以上のフッ素イオンが共存すると、それらは生成されずHAのみが生成されることもわかった。もし、Brushite が生成されても高いpH領域にさらされたり、フッ素イオンが存在

するとHAへ転化することが知られている[24,28]。これらのことを考慮すると、アパタイトとして再石灰化させう蝕の進行を抑制していくには、う蝕病巣内のpHを上昇させることや、フッ素イオンを作用させることなどの方法が考えられよう。

フッ素の歯質における平均含有量は、健全永久歯のエナメル質で0.03%、象牙質では0.047%であり、健全乳歯のエナメル質で0.03%、象牙質では0.052%である[59]。Levine[60]はactive caries とarrested caries の象牙質う蝕病巣におけるフッ素濃度について調べ、active caries のう蝕病巣におけるフッ素濃度は健全部のそれと著明な差を認めなかったのに対し、arrested caries では健全部に比べてフッ素濃度は著明に増加していたと報告している。一般にフッ素イオンが作用して生成されてくるアパタイトは、Fluorhydroxyapatite や Fluorapatite であると考えられ、これらの溶解度積はHAよりもさらに小さく[61,62]、より化学的に安定な結晶

である。これらのことからも、フッ素イオンはう蝕の進行抑制に非常に重要な役割を果たしていることが推察された。

以上本研究結果から、う蝕病巣におけるWhitlockite、Brushiteの生成機序について考察し、模式図としてまとめたものが図16である。う蝕病巣内で、BrushiteはpHの低い脱灰過程で、しかもカルシウムイオンやリン酸イオンが拡散されにくく、比較的高濃度に保たれた場合に生成する。一方，WhitlockiteはpHの高まった再石灰化過程で、マグネシウムイオンの共存する場合に生成される。しかしながら、このようなWhitlockiteあるいはBrushiteの生成条件下に、ある濃度以上のフッ素イオンが共存すると、いわゆるcaries crystalと呼ばれるWhitlockiteやBrushiteは生成されず、アパタイトとして再石灰化するものと考えられる。

また、う蝕病巣において生成されたWhitlockite、Brushiteの果たす役割についてはつぎの

ように考えられる。まず、再石灰化過程で生成されるWhitlockiteは、口腔内条件で安定であり、著者がWhitlockiteに100 ppmのフッ素イオンをpH 7.4の酢酸緩衝液内で撹拌下に37°Cで作用させた場合にも、ほとんど変化せずわずかなHAの生成が認められたのみであった。したがって、一度生成されたWhitlockiteは比較的安定であり、たとえフッ素イオンが存在してもより化学的に安定なアパタイトには転化しにくいものと思われる。しかし、再び脱灰が生じた際には、Whitlockiteはアパタイトに比べてたやすく溶解されてしまうことが考えられる。一方、脱灰過程で生成されるBrushiteについては、Brushiteが生成されることによって脱灰過程でのカルシウムイオンやリン酸イオンなどのう蝕病巣外への溶出を防いでいると考えることができる。さらに、再石灰化過程においては、BrushiteはpHの上昇によりたやすくHAへ転化することや[28]、マグネシウムイオンの存在下ではWhitlockiteに転化するという

報告[19]を考慮すると、再石灰化過程においてBrushiteはアパタイトやWhitlockiteが再石灰化する際の、カルシウムイオンやリン酸イオンの供給源になっているものと思われる。また、BrushiteはHAよりもフッ素イオンと反応しやすく、フッ素の取り込みをよくするためにはBrushiteを多く生成させた方が良いという考え[63]もあり、Brushiteは う蝕病巣内におけるフッ素の取り込みにも関与していることが考えられる。このように今までほとんどcaries crystalとして報告されていなかったBrushiteは、う蝕病巣における脱灰と再石灰化の過程で非常に重要な役割を果たしているものと思われる。また、う蝕の進行抑制を考える上で、再石灰化する際の結晶としてはcaries crystalであるWhitlockite、Brushiteではなく、化学的に安定なアパタイトが生成することが望ましいと考えられた。

総括および結論

う蝕病巣における caries crystal の生成機序を明らかにすることを目的として本研究を行った。すなわち、う蝕病巣を非破壊的に分析できる微小焦点X線回折法により、う蝕病巣における caries crystal の同定とその局在性を検索し、さらに *in vitro* の実験により Whitlockite 、Brushite の生成条件を検討した。その結果、つぎの知見が得られた。

1). う蝕罹患乳歯のう蝕病巣には、caries crystal として Whitlockite あるいは Brushite が検出された。そして、それらのX線回折像から、う蝕病巣内では Whitlockite は比較的大きな結晶として、Brushite は微細な結晶として存在することがわかった。

また、従来の caries crystal に関する電子線回折法やX線回折法による研究は、象牙質う蝕病巣についてなされたものであったが、本研究によりエナメル質う蝕病巣における caries crystal の結晶学的な検討を行うことができた。

2) Whitlockite の検出部位はマイクロラジオグラムの所見から、再石灰化していると思われるX線不透過像を示す部位や、境界不明瞭なX線透過像を示す部位であった。そして、その部位では う蝕による脱灰がほとんど停止した状態にあると思われた。一方、Brushite は transverse cleft のような境界明瞭でX線透過像を示す部位にのみ検出された。Brushite の検出部位では う蝕による脱灰が active に生じていると考えられた。

3) 象牙質う蝕のうち active caries のう蝕病巣では、Brushite のみが検出され、Whitlockite は検出されなかった。一方、arrested caries のう蝕病巣では、Whitlockite と Brushite が検出された。ただし、Brushite の検出された arrested caries のう蝕病巣では、いずれも transverse cleft にその検出を認めた。

4) エナメル質および象牙質表層を人工脱灰した結果、pH の低い脱灰条件の場合に Brushite が生成し、pH の高い脱灰条件の場合に

Whitlockite が生成された。また、それらの生成部位は象牙質では第2脱灰層、エナメル質では表層下脱灰部であった。

5) 生体温度における *in vitro* での Whitlockite, Brushite の生成条件について検討した。その結果、カルシウムイオンとリン酸イオンの濃度が低い場合にはHAのみが生成され、高くなるに従いHAとともに Whitlockite が生成し、さらに高濃度ではHAは生成せず、Whitlockite と Brushite、ついで Brushite と Octacalcium phosphate が生成した。マグネシウムイオンとカルシウムイオンのモル比については、Mg/Ca = 1/8 以下ではHAのみが生成し、Mg/Ca = 1/7 ～ 1/3 でHAとともに Whitlockite の生成が認められた。また、反応時のpHが5.8以下では Brushite が生成され、pH 6.0 では Brushite とともに Whitlockite がわずかに生成された。そして、pH 6.2 では Whitlockite のみが、pH 6.6 以上では Whitlockite とHAが生成した。

6) 上記の Whitlockite、Brushite の生成条件下

において、極く低濃度のフッ素イオンが共存すればWhitlockite、Brushiteは生成されず、HAのみが生成された。

以上の結果から、う蝕病巣内でcaries crystalとして検出されたWhitlockite、Brushiteの生成機序について考察すると、BrushiteはpHの低い脱灰過程で、しかも脱灰により生じたカルシウムイオンやリン酸イオンが拡散されにくく、比較的高濃度に保たれた場合に生成されると考えられた。一方、WhitlockiteはpHの高まった再石灰化過程で生成されると考えられた。しかしながら、フッ素イオンがある濃度以上共存する場合には、caries crystalと言われるこれらのWhitlockiteやBrushiteは生成されず、アパタイトとして再石灰化することがわかった。

稿を終るに臨み、ご指導、ご校閲を賜わった小児歯科学講座祖父江鎮雄教授ならびに歯科理工学講座森脇豊助教授に深謝の意を表わします。また、この研究に際し終始有益なご

助言、ご教示を頂いた口腔病理学講座青葉孝昭博士に深く感謝いたします。さらに、さまざまなご援助を下さった小児歯科学講座、および歯科理工学講座の諸先生に厚くお礼を申し上げます。

文献

1) Lenz, H. : Elektronenmikroskopische Untersuchungen am normalen und Kariösen Dentin, Berl. Gesundheitsblatt, 19:498-502, 1955.

2) Lenz, H. : Elektronenmikroskopischer Nachweisder Dentinveränderungen durch Karies, Dtsch. Zahn-, Mund- und Kieferheik, 22:24-33, 1955.

3) Helmcke, J.G. : Neue Wege der Karies forschung Die Umschaw in Wissenschaft und Technik, 56:243-245, 1956.

4) Torell, p. : Direct observation of ultrastructural details in carious dental enamel, Odont. Tidsk., 65:24-27, 1957.

5) 片山伊九右衛門：人乳歯象牙質齲蝕の電子顕微鏡的研究，歯医学，23:837-861, 1960.

6) Höhing,H.J. : Elekronenmikroskopische Untersuchungen am gesunden und Kaiösen Dentin mit Hilfe der Abdruckmethode und der Schnittmethode, Z. Zellforsch., 53:192-200, 1961.

7) Höhling, H.J. : Elektronenmikroskopische Untersuchungen am gesunden und Kariösen Zahnschmelz unter besonderer Berucksichtigung der Ultramikrotomschnitt-technik an nicht entmineralizieren Substanz, Dtsch. Zahnärztl. Zschr.,

16:694-705, 1961.

8) Frank, R.M., et al. : Microscopic electronique de la caries an nivean de la dentin hunaine, Archs. oral Biol., 9:163-179, 1964.

9) Jackson, D. : Initial considerations on the phenomenon of arrested dental caries, J. Dent. Res., 35:95-96, 1956.

10) Höhling, H.J., et al. : Kristallisationsversuche und Elektronenbeugungsuntersuchungen zur Anflärung der chemischen Verbindung der Karieskristalle , D. D. Z.(München), 15:706-710, 1961.

11) Vahl, J., et al. : Elektronenstrahlbeugung an rhomboedrisch ansshenden Mineralbildungen in Kariösen Dentin, Archs. oral Biol., 9:315-320, 1964.

12) Rowles, S.L., et al. : The inorganic composition of arrested carious dentin, Caries Res., 7:360-367, 1973.

13) Frondel, C. : Whitlockite: a new calcium phosphate, $Ca_3(PO_4)_2$, Amer. Mineral., 26:145-152, 1941.

14) Jensen, A.T., et al. : Crystallography of dental calculus and the precipitation of certain calcium phosphate, J. Dent. Res., 33:741-750, 1954.

20×20

15) Jensen, A.T., et al. : Magnesian whitlockite, a major constituent of dental calculus, Acta. odont. Scand., 15:121-139, 1957.

16) 福田健：人唾石の性状に関する物理化学的研究，阪大歯誌，12:59-66，1967.

17) Dickens, B., et al. : Crystallographic studies of the role of Mg as a stabilizing impurity in β-$Ca_3(PO_4)_2$, J. Solid State Chem., 10: 232-248, 1974.

18) Hayek, E., et al. : Über die Existenz von Tricalcium phosphat in wäßriger Lösung, Mh. Chem. Bd., 89:88-95, 1958.

19) Schroeder, H.E. : Formation and inhibition of dental calculus, Hans Huber, Berne, Stuttgart and Vienna, 1969.

20) Moriss, R.H., et al. : X-ray diffraction analysis of 464 urinary calculi, Amer. J. Clin. Path., 48:413-417, 1967.

21) Roufosse, A.H., et al. : Identification of brushite in newly deposited bone mineral from embryonic chicks, J. Ultrast. Res., 68:235-255, 1979.

22) 山本順子：白斑部エナメル質の物理化学的研究，小児歯誌，11:181-195，1973.

23) 岡崎正之ほか：合成ヒドロキシアパタイ

トペレット表面での固ー液界面現象ー2. 酸脱灰に及ぼすイオン選択性透過膜の影響ー, 歯基礎誌, 21:279-284, 1979.

24) 青葉孝昭ほか：歯質アパタイトにおける Brushite および Whitlockite の配向析出, 歯基礎誌, 16:252-259, 1974.

25) A. S. T. M. カード : Amer. Soc. Testing Materials, Philadelphia / X-ray diffraction Data Index, No. 9-432, 13-404, 9-77, 11-184.

26) Miller, W.A., et al. : Permeability and staining of active and arrested lesions in dentine, Bri. dent. J., 112:187-197, 1962.

27) Sperber, G.H., et al. : Effect of different acids on character of demineralization of enamel surface, J. Dent. Res., 42:707-723, 1963.

28) Francis, M.D., et al. : Hydroxyapatite formation from a hydrated calcium monohydrogen phosphate precursor, Calc. Tiss. Res., 6:335-342, 1971.

29) Klug, H.P. : X-ray diffraction procedures for polycrystalline and amorphous materials, John Wiley & Sons, New York,

1966, p.491-538.

30) 加藤慎一：生犬の歯の人工軟化象牙質の再石灰化について，口病誌，35:613-625, 1968.

31) Ohgushi, K. et al. : Electron microscopic structure of the two layers of carious dentin, J. Dent. Res., 54:1019-1026, 1975.

32) 高橋誠一：乳歯象牙質齲蝕病変の microradiography による研究，歯学，63:375-404, 1976.

33) Von der Fehr, F.R. : A study of carious lesions produced in vivo in unabraded, abraded, exposed and F-treated human enamel surfaces, with emphasis on the X-ray dense outer layer, Archs. oral Biol., 12:797-814, 1967.

34) Silverstone, L. : The influence of acidified organic gels on the enamel surface in vitro ; in Tooth Enamel, John Wright & Sons, Bristol, 1971, p.197-206.

35) Arends, J., et al. : HPO_4^{2-} content in enamel and artificial carious lesions, Calc. Tiss. Res., 18:65-79, 1975.

36) Arne, R.H. : Structural features of biologically involved phosphates, Acta. Odont. Scand., 31:149-173, 1973.

37) Lazzari, E.P., et al. : Dental biochemistry, Lea & Febriger, Philadelphia, 1968, p.15.

38) 福島万寿雄：邦人乳歯の化学組成，日歯学誌，26:641-644，1933.

39) 須賀昭一ほか：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ーによる観察，歯基礎誌，13:85-94，1971.

40) Suga, S., et al. : Electron probe X-ray microanalysis of developing,erupted and carious dental hard tissues, J. Dent. Res., 46:1251-1252, 1967.

41) Johansen, E. : The nature of the carious lesion, Dent. Clin. N. Amer. 1962, p.305-320.

42) Trantz, O.R. : X-ray diffraction of biological and synthetic apatites, Ann. N.Y. Acad. Sci., 60:696-712, 1955.

43) Hendricks,S.B., et al. : The nature of bone and phosphate rock, Proc. nat. Acad. Sci., 36:731-737, 1950.

44) Francis, M.D. : Solubility behavior of dental enamel, Amer. N.Y. Acad. Sci., 131:694-712, 1965.

45) Moreno, F.C. : Solubility and thermodynamic data for calcium phosphates, Intern. Symp. on structural properties of hydro-

xyapatite, New York, 1969, chap.15.

46) Brown, W. : Physiochemical aspects of decay and decalcification, Proceed of an intern. Symp. on calcified tissues, Nijmegen, 1971, p.71-99.

47) Pellegrino, E.D., et al. : Mineralization in the chick embryo, Calc. Tiss. Res., 10:128-135, 1972.

48) Brown, W.E., et al. : Crystal growth of bone mineral, Clin. Orthop., 44:205-220, 1966.

49) 青葉孝昭ほか： Octacalcium phosphate の Hydroxyapatite への転化に関する X 線回折法による検討，歯基礎誌，17:1-7，1975.

50) Keyes, P.H. : Present and future measures for dental caries control, J. A. D. A., 79:1395-1404, 1969.

51) MacDonald, R.E., et al. : Superiority of topical application of stannous fluoride on primary teeth, J. Dent. Child., 24: 84-86, 1957.

52) 西野瑞穂：ふっ化ジアンミン銀による乳歯齲蝕の進行抑制に関する研究，阪大歯誌，14:1-14，1969.

53) 祖父江鎮雄：床型保隙装置の隣接面に填

塞したSrF2配合セメントの白斑形成に対する抑制効果について，小児歯誌，9: 197-216，1971.

54) 森脇豊ほか：フッ化ジアンミン銀の作用に関する微小焦点X線回折法による検討，歯理工誌，15:142-148，1974.

55) McDowell, H., et al. : The solubility of hydroxyapatite at 5, 15, 25 and 37°C, IADR Program and Abstracts of Papers, No. 340, 1969.

56) Moreno, E.C., et al. : Solubility of whitlockite, β-$Ca_3(PO_4)_2$, IADR Program and Abstracts of Papers, No. 183, 1970.

57) Gregory, T.M., et al. : Solubility of $CaHPO_4 \cdot 2H_2O$ in the system $Ca(OH)_2$ - H_3PO_4 - H_2O at 5, 15, 25, 37.5°C, J. Res. Natl. Bur. Stand., 74A:461-475, 1970.

58) Andrès, L., et al. : De l'influence de l'addition de certains sels minerax sur la precipitation des phosphates de calcium, C. R. Acad. Sci., 234:2285-2287, 1952.

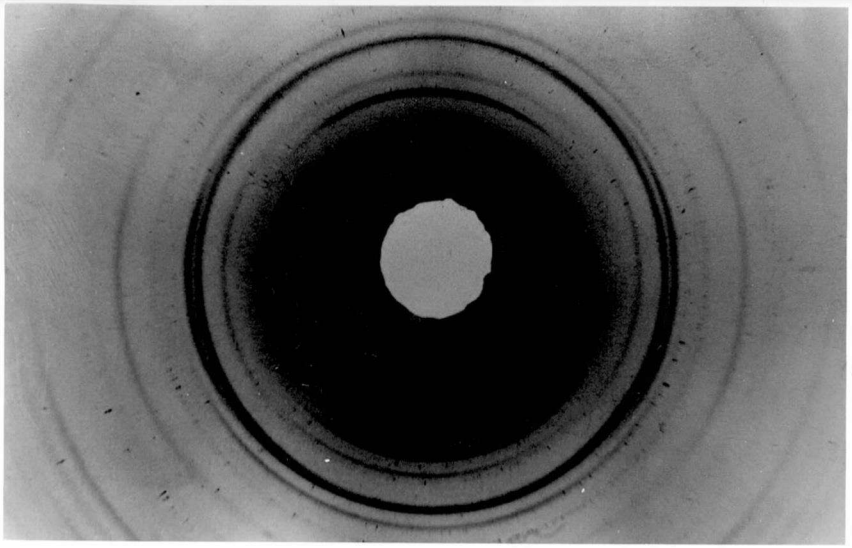
59) Ohmori, I., et al. : Biochemical studies on human deciduous tooth substances [II] Application of stannous fluoride, Bull. Tokyo med. dent. Univ., 9:175-189,1962.

60) Levine, R.S. : Distribution of fluoride in active and arrested carious lesions in dentine, J. Dent. Res., 51:1025-1029, 1972.

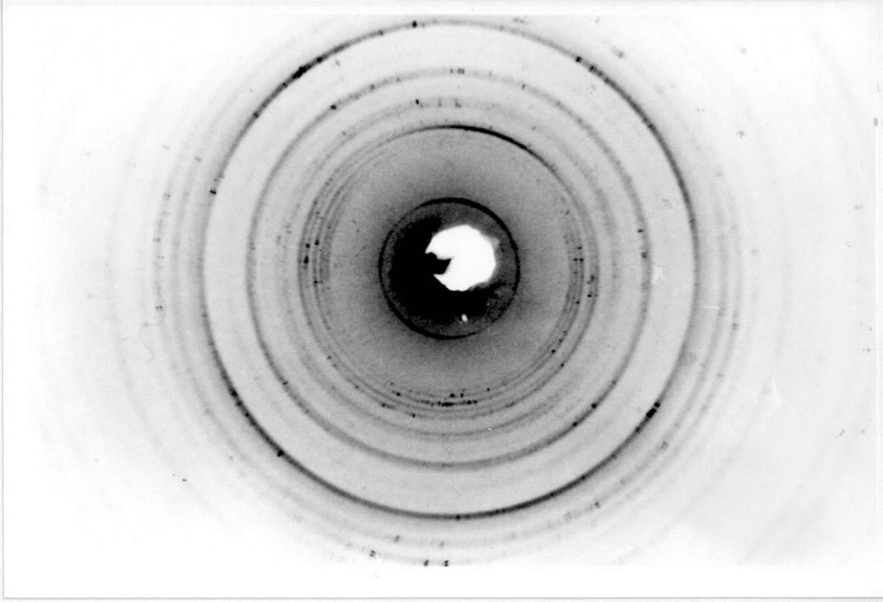
61) Moreno, E.C., et al. : Fluoridated hydroxyapatite solubility and caries formation, Nature, 247:64-65, 1974.

62) McCann, H.G. : The solubility of fluorapatite and its relationship to that of calcium fluoride, Archs. oral Biol., 13: 987-1001, 1968.

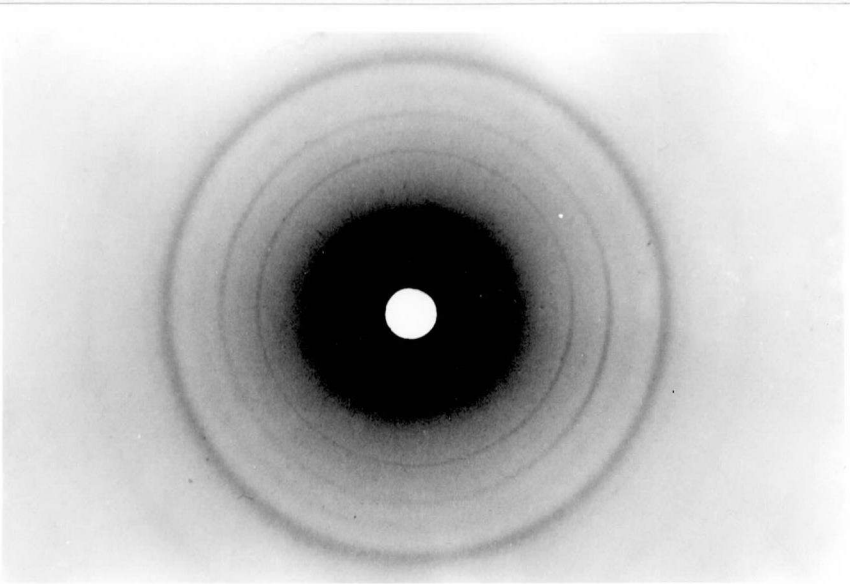
63) Chow, L.C., et al. : Reaction of dicalcium phosphate dihydrate with fluoride, J. Dent. Res., 52:1220-1227, 1973.



a.



b.



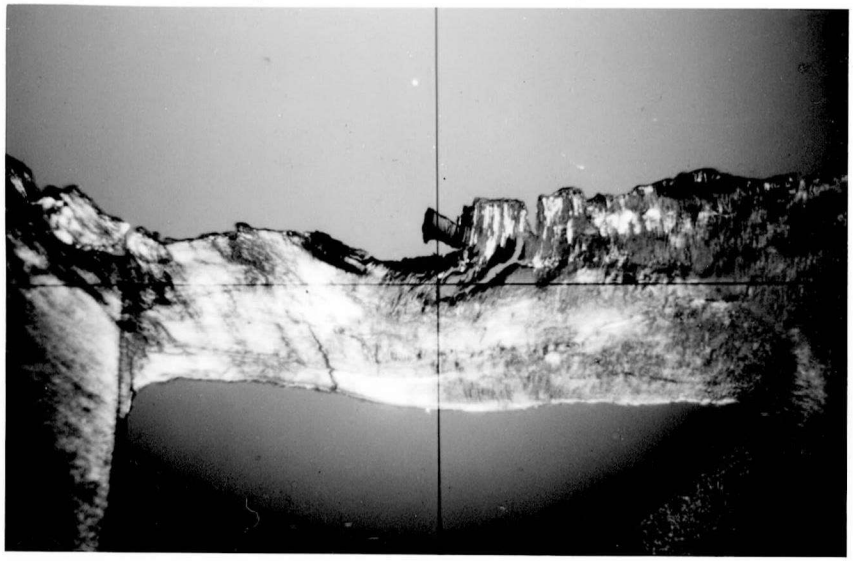
c.

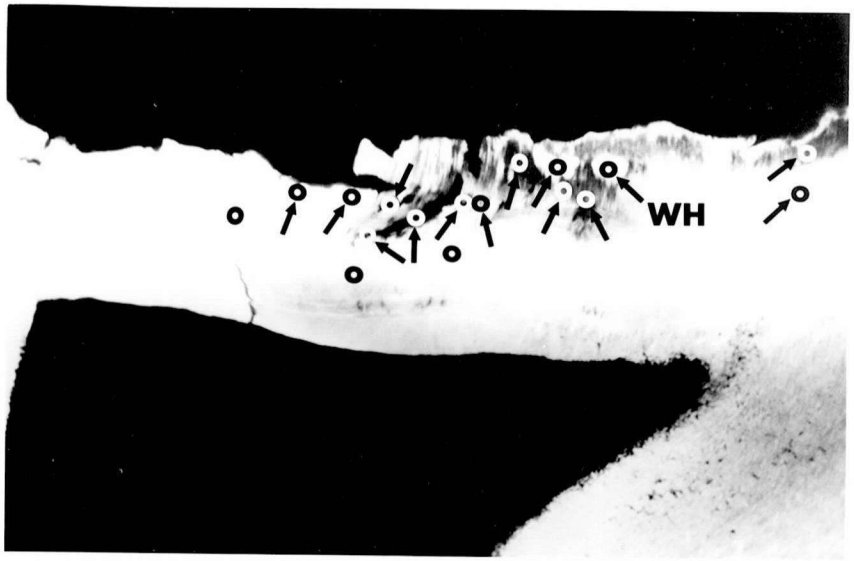
図1. マイクロラウエカメラによるX線回折像

a. Whitlockiteが確認されたエナメル質う蝕病巣部のX線回折像

b. Whitlockiteが確認された象牙質う蝕病巣部のX線回折像

c. Brushiteが確認された象牙質う蝕病巣部のX線回折像



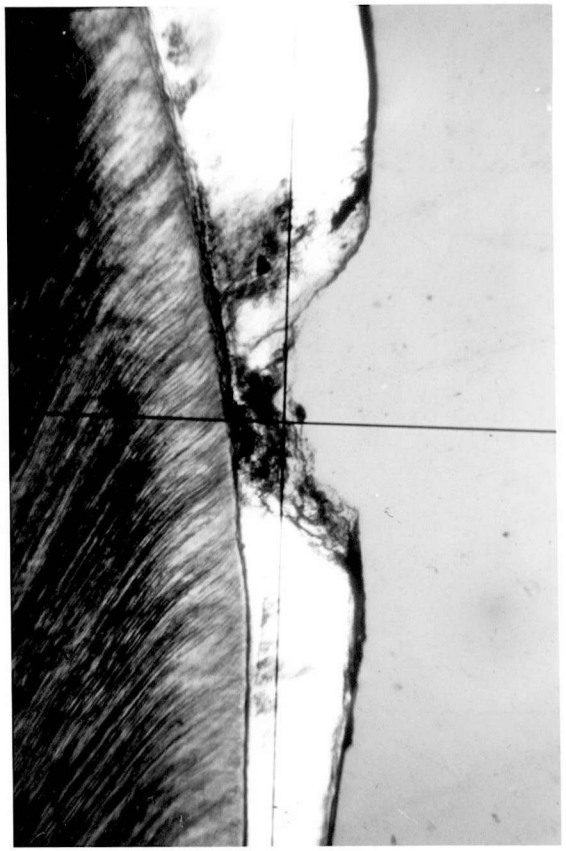


a.　　b.

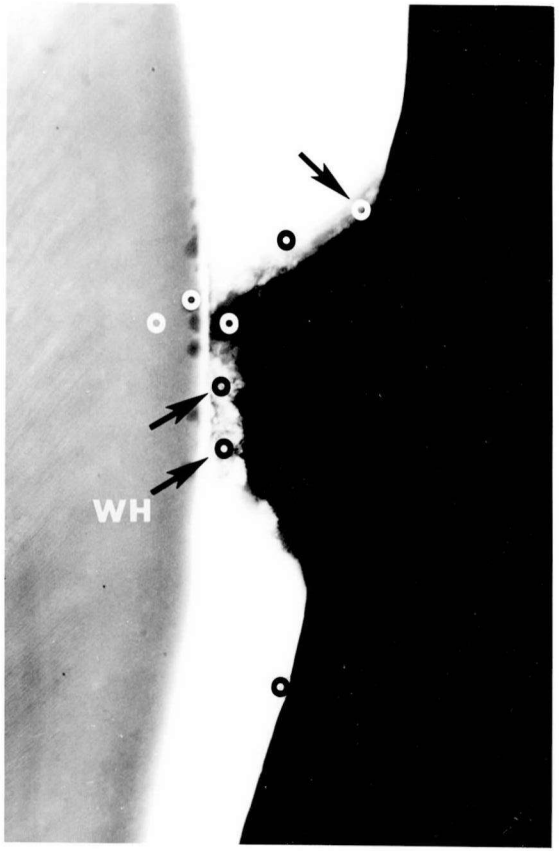
図2. Whitlockiteが検出された象牙質う蝕病巣

a. 偏光顕微鏡像　(×20)

b. マイクロラジオグラム　(丸印がX線回折部位で，矢印がWhitlockiteの検出された部位，WH=Whitlockite，×20)



a.

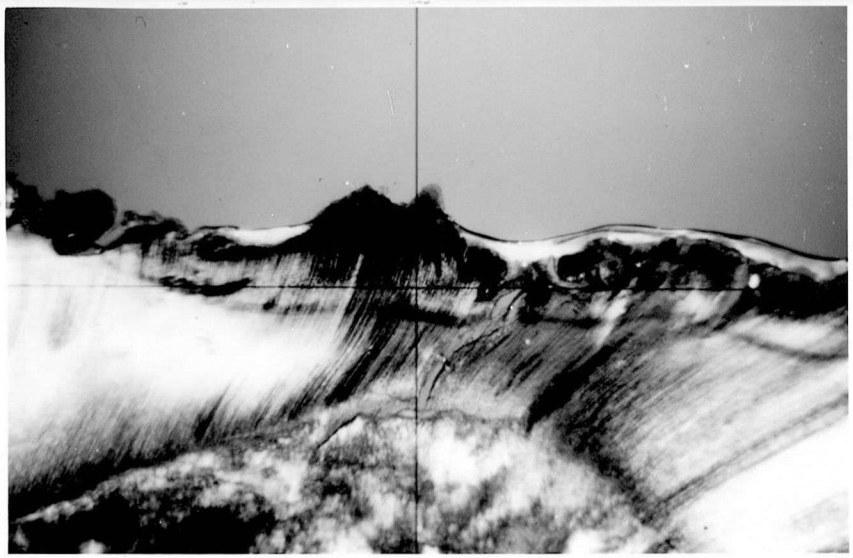


b.

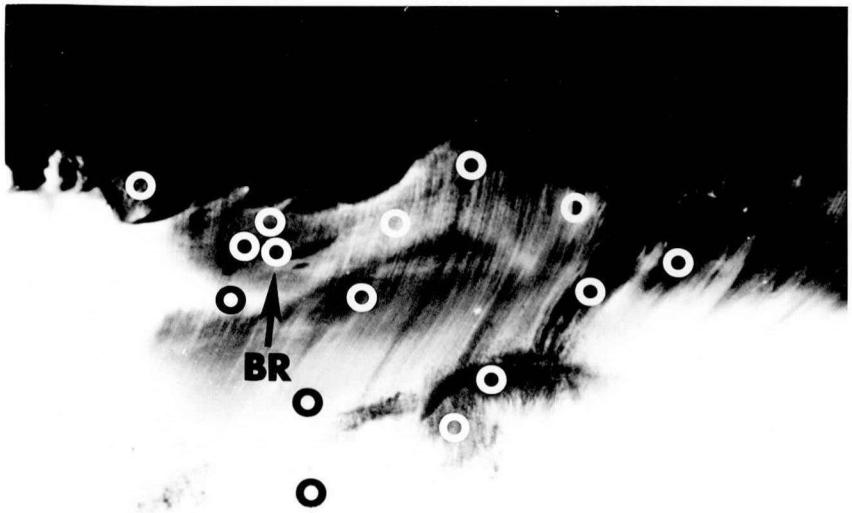
図3. Whitlockiteが検出されたエナメル質う蝕病巣

a. 偏光顕微鏡像　（×20）

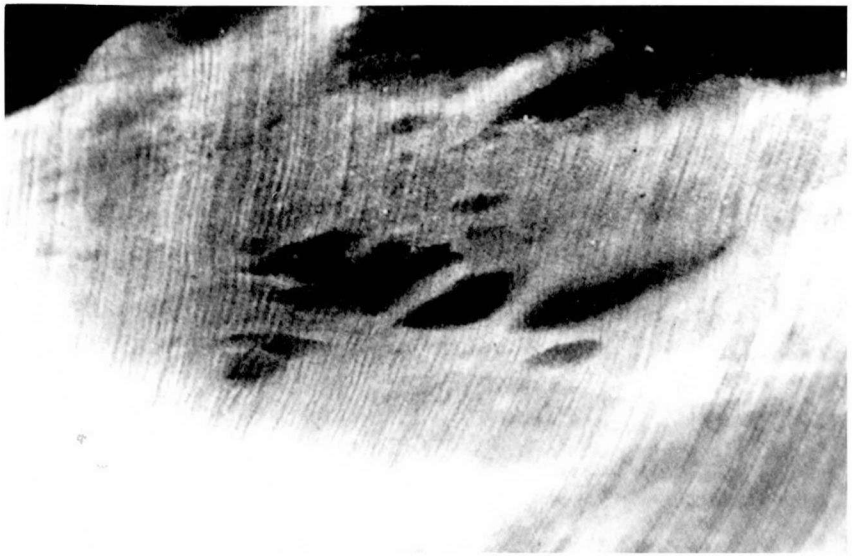
b. マイクロラジオグラム（×20）



a.



b.



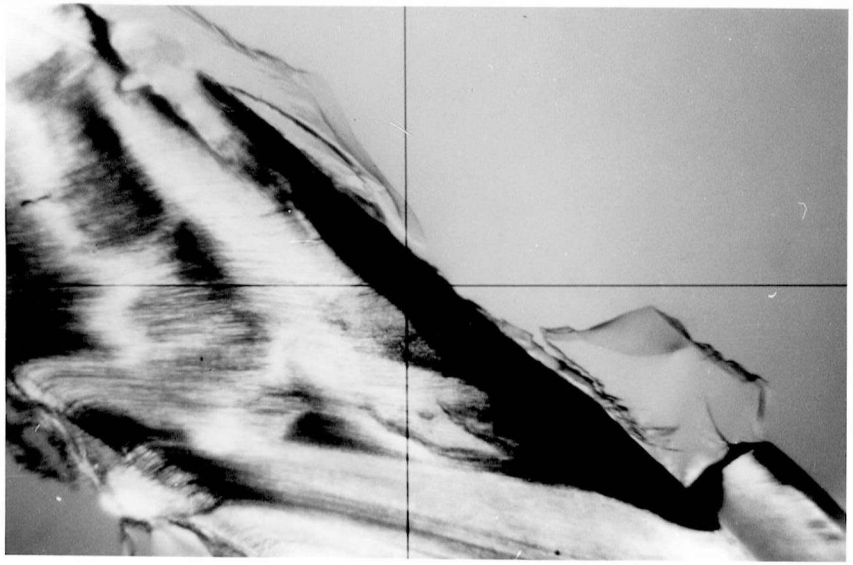
c.

図4. Brushiteが検出された象牙質う蝕病巣

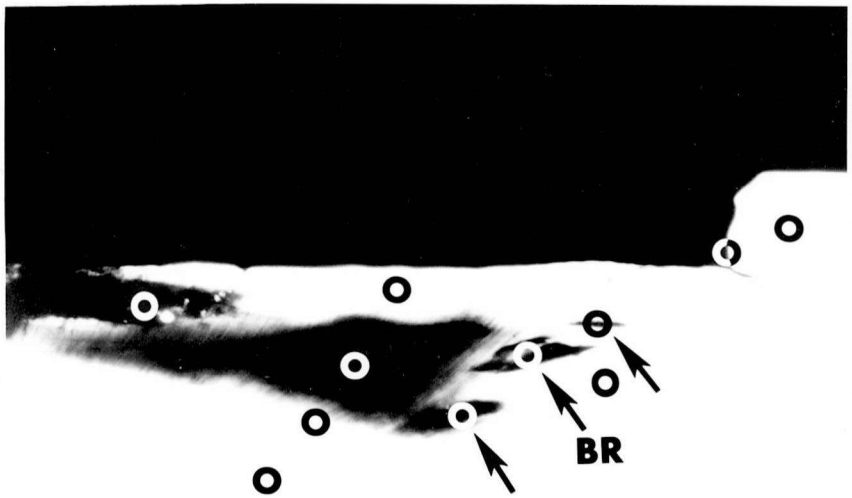
a. 偏光顕微鏡 (×20)

b. マイクロラジオグラム (BR= Brushite, ×20)

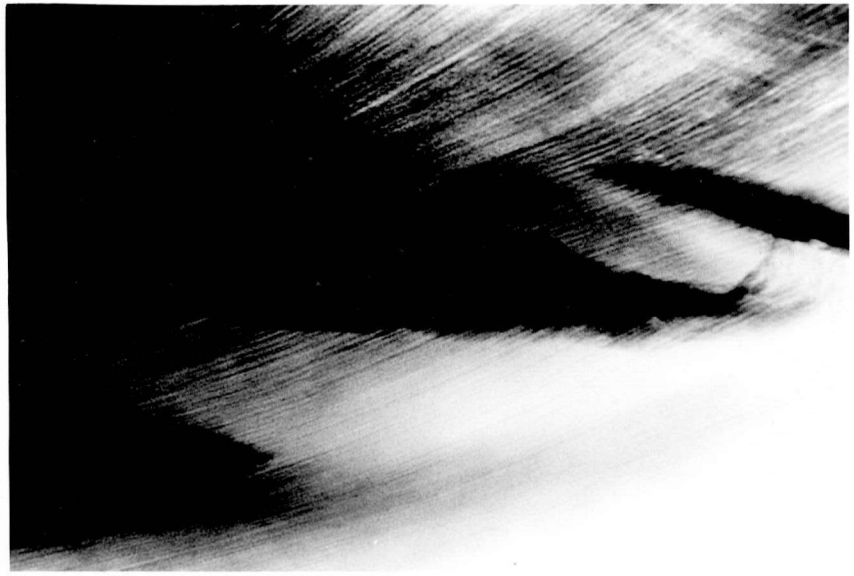
c. Brushiteが検出されたtransverse cleftのマイクロラジオグラム (×100)



a.



b.



c.

図5. Brushiteが検出された象牙質う蝕病巣

a. 偏光顕微鏡像（×20）

b. マイクロラジオグラム（×20）

c. Brushiteが検出されたtransverse cleftのマイクロラジオグラム（×100）

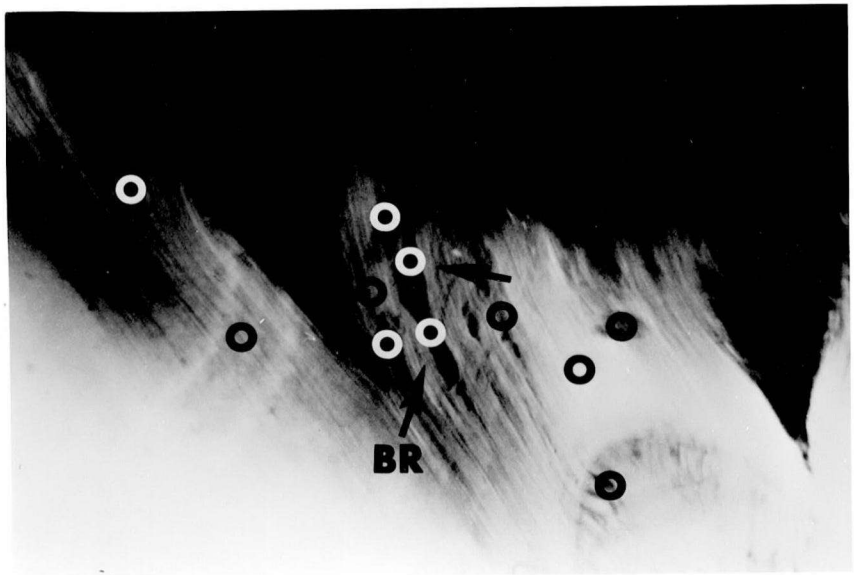


図6. Brushiteが検出された象牙質う蝕病巣のマイクロラジオグラム (×20)

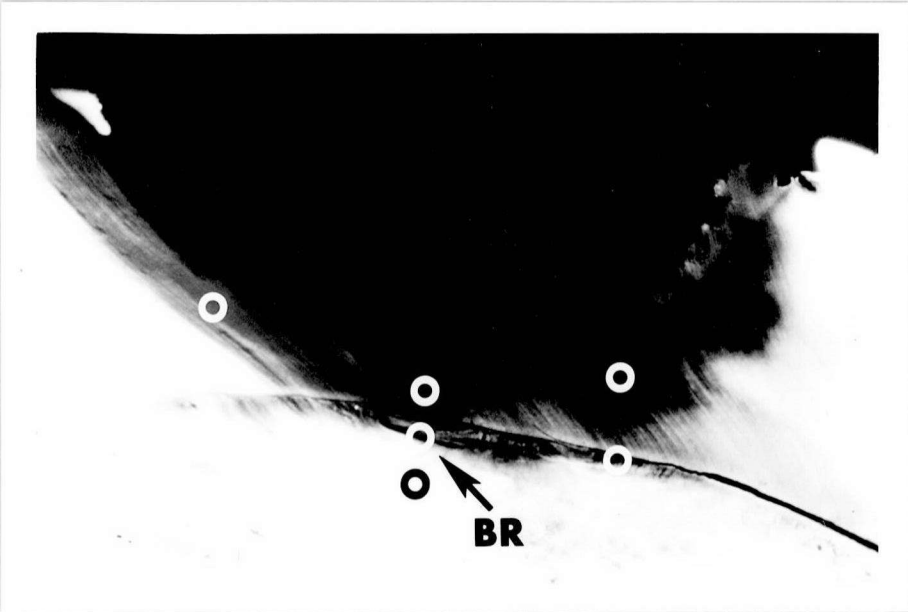


図7. Brushiteが検出された象牙質う蝕病巣のマイクロラジオグラム (×20)

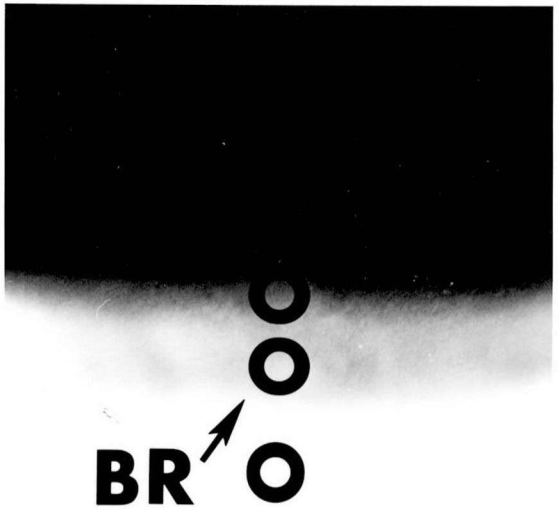


図8. Brushiteの生成が認められた
象牙質人工脱灰試料のマイクロラジオグラム
(pH 4.0, 2日間脱灰, ×100)

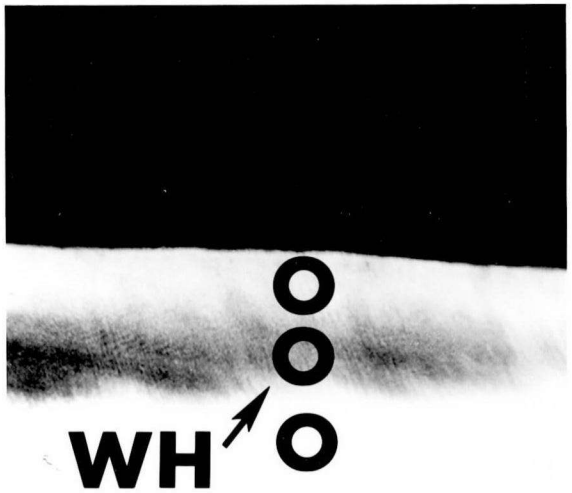


図9. Whitlockiteの生成が認められた
エナメル質人工脱灰試料のマイクロラジオ
グラム（pH 5.5, 6日間脱灰, ×100）

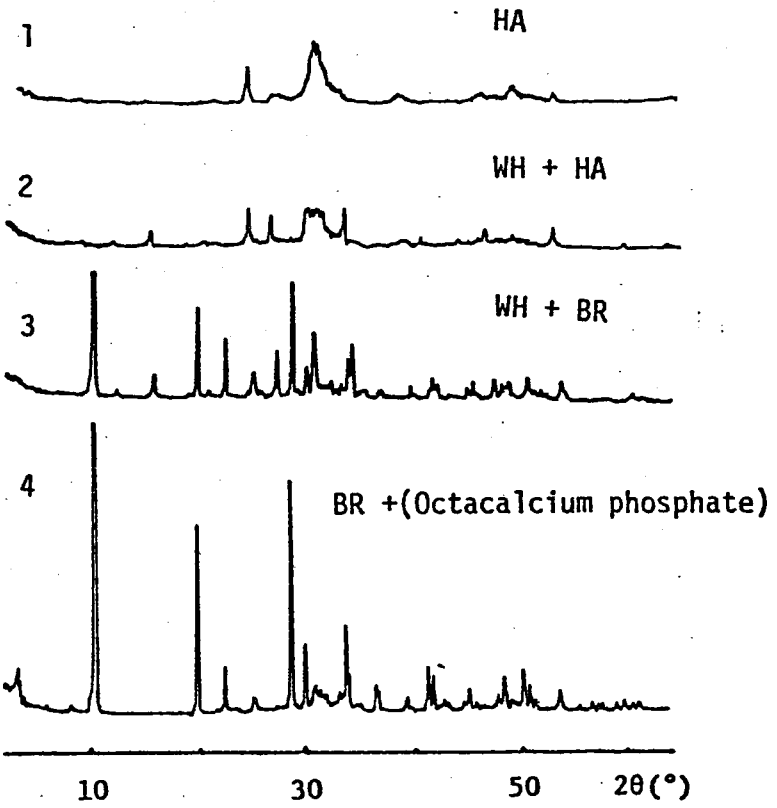


図10. カルシウムイオン，リン酸イオン濃度を変えた場合の反応生成物のX線回折像
（図中1～4は、表IIの試料No.を示す）

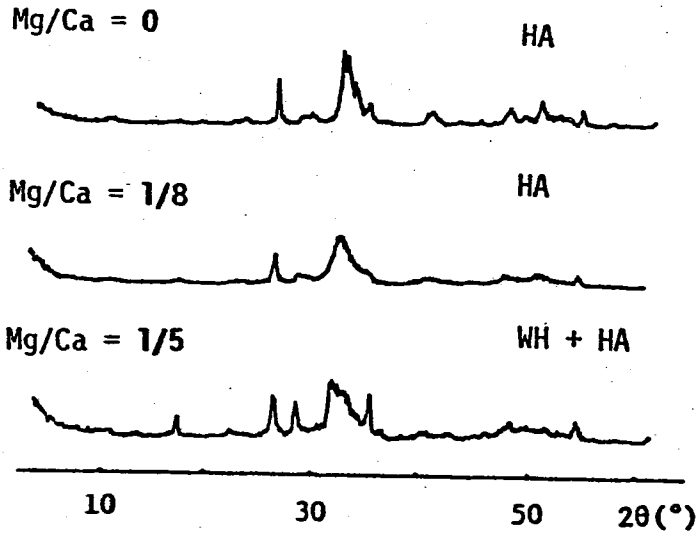


図11. Mg/Caのモル比を変えた場合の反応生成物のX線回折像

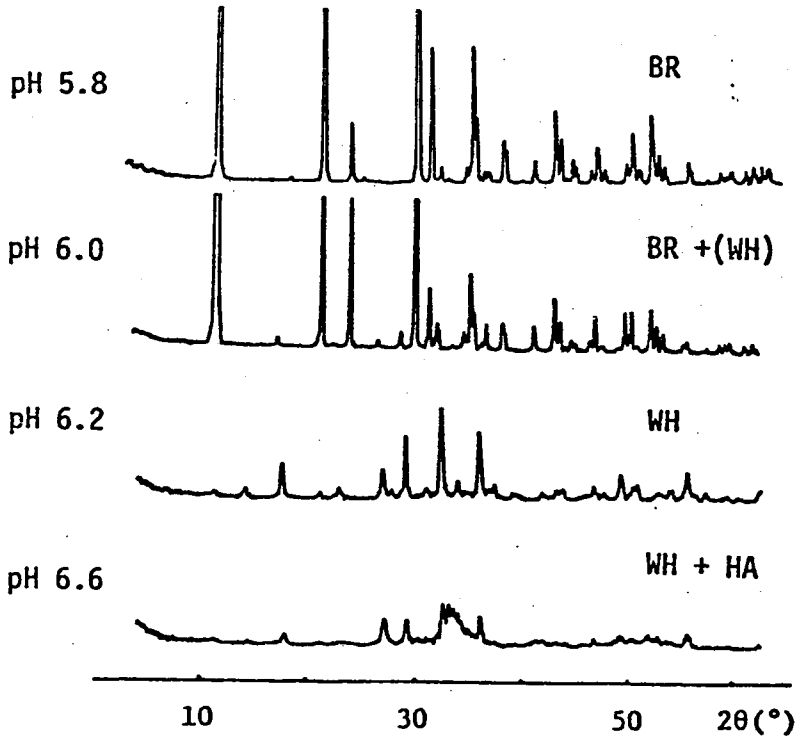


図12、反応時のpHを変えた場合の反応生成物のX線回折像

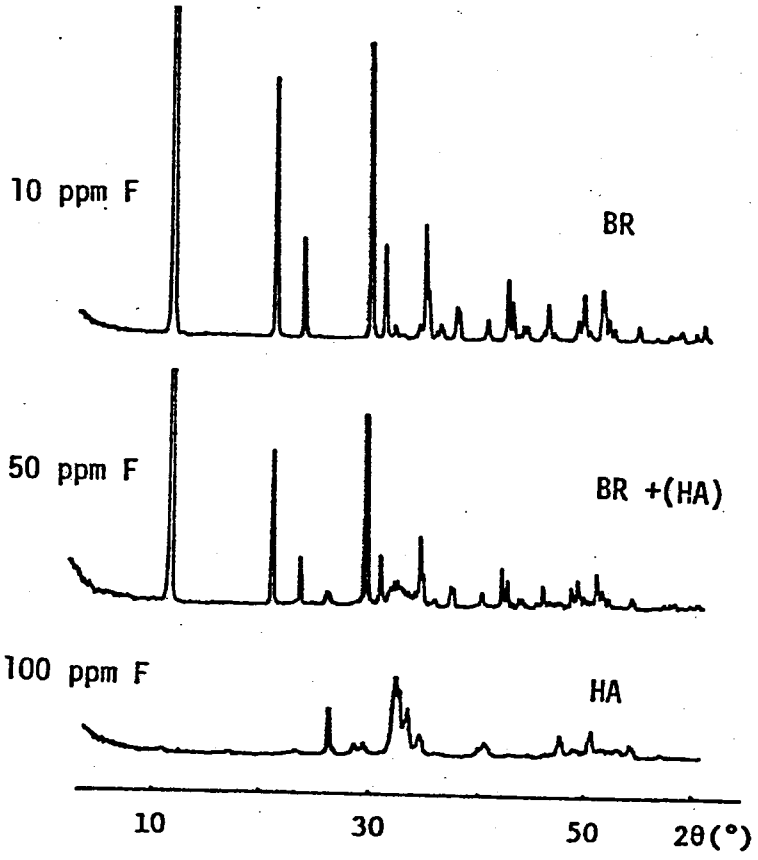


図13. Brushiteの生成条件下（pH 5.4）に，フッ素イオンが共存した場合の反応生成物のX線回折像

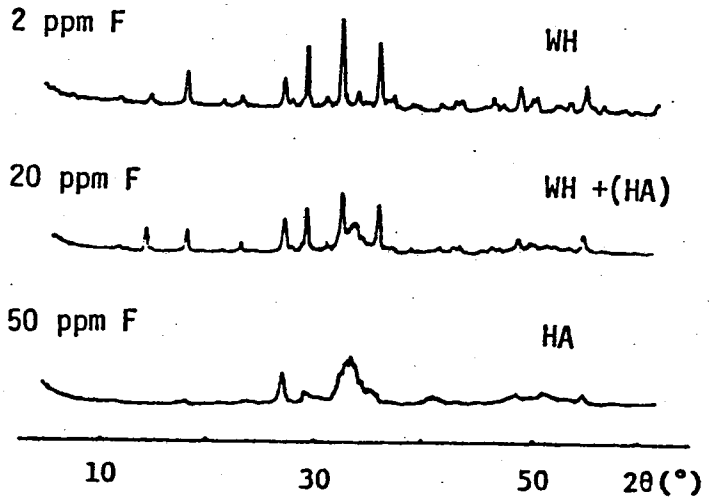


図14. Whitlockiteの生成条件下(pH6.2)に，フッ素イオンが共存した場合の反応生成物のX線回折像

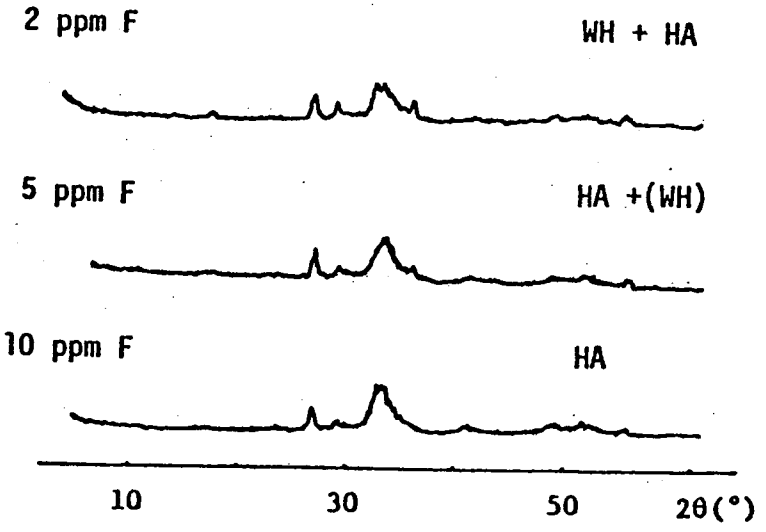


図15. Whitlockite と HAの生成条件下（pH 7.4）に，フッ素イオンが共存した場合の反応生成物のX線回折像

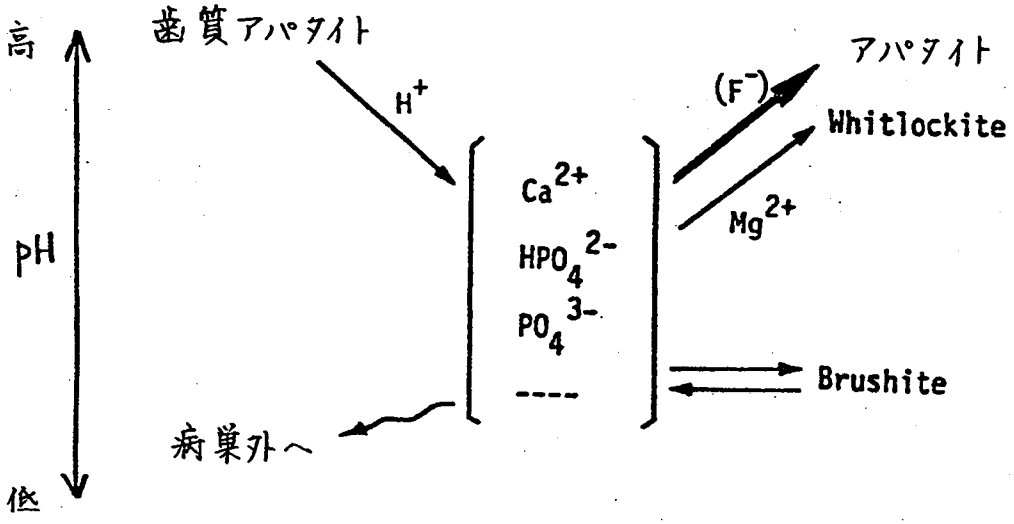


図16. う蝕病巣における Whitlockite, Brushiteの生成機序を示す模式図

表1. マイクロラジオグラフィの撮影条件

Target	Cu
Voltage	7 kV
Current	3 mA
Target-Specimen Distance	80 mm
Exposure Time	1/2～2 h
Film	Kodak 649-0
Softex CMR (Nippon Softex)	

表2. 微小焦点X線回折法の測定条件

Radiation	Cu Kα
Voltage	50 kV
Current	1.8 mA
Collimeter	100 μm
Film-Specimen Distance	15 mm
Exposure Time	4～8 h
Film	Fuji Industrial#150

Microfocus Laue Camera & Microflex (RIGAKU)

表3. 粉末X線回折法の測定条件

Target	Cu
Monochrometer	Graphite
Voltage	35 kV
Current	23 mA
Time Constant	1 sec
Scanning Speed	2°/min
Chart Speed	10 mm/min
Divergency	1°
Receiving Slit	0.2 mm
Counter	Proportional Counter
Diffractometer	Geigerflex D-1 (RIGAKU)

表4. 反応溶液中のカルシウムイオンとリン酸イオンの濃度

試料 No.	カルシウムイオン (mM)	リン酸イオン (mM)
1	5.0	3.9
2	60.0	46.6
3	120.0	90.0
4	180.0	140.0

表5. 反応溶液中のカルシウムイオン，マグネシウムイオン，リン酸イオンの濃度

	Mg/Ca（モル比）								
	0	1/9	1/8	1/7	1/6	1/5	1/4	1/3	1/2
カルシウムイオン (mM)	60.0	60.0	60.0	60.0	60.0	60.0	60.0	60.0	60.0
マグネシウムイオン(mM)	0	6.7	7.5	8.6	10.0	12.0	15.0	20.0	30.0
リン酸イオン(mM)	40.0	44.4	45.0	45.7	46.6	48.0	50.0	53.3	60.0

表6.　反応時のpHとフッ素イオン濃度

pH	フッ素イオン (ppm)							
5.4	0	2	5	10	20	50	100	200
6.2	0	2	5	10	20	50	100	
7.4	0	0.01	0.1	1	2	5	50	

表7. 微小焦点X線回折法により, caries crystalの検出されたエナメル質う蝕病巣

エナメル質う蝕病巣* 試料 No.	Caries crystal	X線回折像
E 2	WH	Spot
E 6	WH	Spot
E15	WH	Spot

WH = Whitlockite

* 試料総数 : 16

X線回折部位総数 : 95

表8. 微小焦点X線回折法によりcaries crystalが検出された象牙質う蝕病巣

象牙質う蝕病巣*		Caries crystals	X線回折像
試料No.	病巣の分類**		
D 5	Arrested	WH	Spot
D18	Arrested	WH	Spot
D28	Arrested	WH	Spot
D29	Arrested	WH	Spot
D38	Arrested	WH	Spot
D41	Arrested	WH	Spot
D12	Active	BR	Ring
D23	Active	BR	Ring
D24	Arrested	BR	Ring
D27	Arrested	BR	Ring

WH = Whitlockite, BR = Brushite

* 試料総数：42

X線回折部位総数：168

** Millerと Masslerの分類法（1962）

表9. 象牙質の active caries と arrested caries における Whitlockite と Brushite の検出例数

う蝕病巣の分類*	総数	検出例数	
		WH	BR
Active caries	18	0	2
Arrested caries	24	6	2

WH = Whitlockite, BR = Brushite

* Miller と Massler の分類法 (1962)

表10. 人工脱灰によるWhitlockite, Brushiteの生成

pH	脱灰時間（日）			
	2	3	6	12
3.5	N.D.			
4.0	BR (D)			
4.5	N.D.	N.D.		
5.0		N.D.	WH (D)	
5.5		WH (E)	WH (E)	WH (E)

WH = Whitlockite, BR = Brushite
N.D.：検出されず
(D)：象牙質に検出
(E)：エナメル質に検出

表11. カルシウムイオン，リン酸イオン濃度と反応生成物

試料 No.	カルシウムイオン (mM)	リン酸イオン (mM)	反応生成物
1	5.0	3.9	HA
2	60.0	46.6	WH + HA
3	120.0	90.0	WH + BR
4	180.0	140.0	BR +(OCP)

(Ca+Mg)/P = 1.5, Mg/Ca = 1/6, pH 7.4 ,
WH = Whitlockite, BR = Brushite ,
OCP = Octacalcium phosphate, HA = Hydroxyapatite,
( ) 内は、わずかに生成が認められたもの

表12. マグネシウムイオンとカルシウムイオンのモル比と反応生成物

Mg/Ca (モル比)	反応生成物
0	HA
1/9	HA
1/8	HA
1/7	HA +(WH)
1/6	WH + HA
1/5	WH + HA
1/4	WH + HA
1/3	WH + HA
1/2	HA +($MgNH_4PO_4 \cdot 6H_2O$)

$[Ca^{2+}]$ = 60.0 mM, pH7.4 ,

WH = Whitlockite, HA = Hydroxyapatite,

( )内は、わずかに生成が認められたもの

表13、反応時のpHと反応生成物

pH	反応生成物
4.5	BR
5.4	BR
5.8	BR
6.0	BR +(WH)
6.2	WH
6.6	WH + HA
7.0	WH + HA
7.4	WH + HA
7.8	HA +(WH)

$[Ca^{2+}]$ = 60.0 mM, Mg/Ca = 1/5 .
WH = Whitlockite, BR = Brushite ,
HA = Hydroxyapatite ,
( )は、わずかに生成が認められたもの

表14. Brushiteの生成条件下（pH 5.4）に，フッ素イオンが共存した場合の反応生成物

フッ素イオン (ppm)	反応生成物
0	BR
2	BR
5	BR
10	BR
20	BR +(HA)
50	BR +(HA)
100	HA
200	HA

$[Ca^{2+}]$ = 60.0 mM, Mg/Ca = 1/5,
BR = Brushite, HA = Hydroxyapatite.
（ ）内は，わずかに生成が認められたもの

表15. Whitlockiteの生成条件下(pH6.2)に，フッ素イオンが共存した場合の反応生成物

フッ素イオン (ppm)	反応生成物
0	WH
2	WH
5	WH +(HA)
10	WH +(HA)
20	WH +(HA)
50	HA
100	HA

$[Ca^{2+}]$ = 60.0 mM, Mg/Ca = 1/5,
WH = Whitlockite, HA = Hydroxyapatite,
( )内は，わずかに生成が認められたもの

表16. Whitlockite と HAの生成条件下 (pH 7.4)に、
フッ素イオンが共存した場合の反応生成物

フッ素イオン (ppm)	反応生成物
0	WH + HA
0.01	WH + HA
0.1	WH + HA
1	WH + HA
2	WH + HA
5	HA +(WH)
10	HA
50	HA

$[Ca^{2+}]$ = 60.0 mM, Mg/Ca = 1/5,
WH = Whitlockite, HA = Hydroxyaptite,
( )内は、わずかに生成が認められたもの