

This is the pre-peer reviewed version of the following article: [Kuramochi E, Iizuka J, Mukai Y, Influences of bicarbonate on processes of enamel subsurface remineralization and demineralization: assessment using micro-Raman spectroscopy and transverse microradiography. Eur J Oral Sci. 2016 Oct 4.], which has been published in final form at [10.1111/eos.12301]. This article may be used for non-commercial purposes in accordance with Wiley Terms and Conditions for Self-Archiving.

神奈川歯科大学大学院歯学研究科
2015年度 博士論文

エナメル質表層下病巣の再石灰化および
脱灰過程における重炭酸塩の影響
-顕微ラマン分光法と Transverse Microradiography 分析による検討-

**Influences of Bicarbonate in the Process of Enamel Subsurface
Remineralization and Demineralization
-Micro-Raman Spectroscopy and Transverse Microradiography Assessments-**

倉持 江里香
Kuramochi Erika

神奈川歯科大学大学院歯学研究科
う蝕制御修復学講座
向井義晴准教授 指導

目次

緒言	1
材料および方法	3
結果	7
考察	9
結論	15
謝辞	15
文献	16
付図説明	22
表および図	
表 1	24
表 2	25
図 1	26
図 2	27
図 3	28
図 4	29
図 5	30
図 6	31

緒 言

1
2 エナメル質白斑病変は，表層下脱灰の形態を有し，カルシウムや
3 リン酸およびフッ化物など唾液に含まれるイオンが存在する環境下
4 に必要時間置かれることで再石灰化可能である¹⁻³⁾．フッ化物を含む
5 環境で再石灰化した場合はフルオロアパタイトが形成され，耐酸性
6 が向上することが確認されている⁴⁾が，フッ化物を添加せずカルシウ
7 ムとリン酸イオンのみの溶液を用いた場合においても，再石灰化し
8 たエナメル質は健全エナメル質に比較し，ハイドロキシアパタイト
9 (HAP) 結晶中の炭酸基がリン酸基によって置換され，耐酸性が増大
10 すると報告されている⁵⁾．

11 生体はエナメル質の防御を唾液に依存しており，特異的な役割を
12 持つ多くの成分を含んでいる．唾液に含まれる重炭酸イオンやリン
13 酸イオンおよびペプチドによる緩衝作用を有しており⁶⁻⁸⁾，その中で
14 主となる重炭酸イオン存在下における再石灰化ならびに，その後の
15 耐酸性様相を観察することは，エナメル質の再石灰化および脱灰過
16 程における重炭酸イオンの役割を解明する上で重要である．しかし
17 ながら，前述の研究⁵⁾においては，唾液に含まれる重炭酸イオンが存
18 在する環境下でのエナメル質の再石灰化について明らかにしなかつ

1 た．重炭酸イオンとフッ化物イオンの相互作用は，エナメル質表層
2 下脱灰病巣の再石灰化率を上昇させる^{9,10}，あるいは，まず重炭酸イ
3 オンにより脱灰病変内部の酸性条件を緩和，その後フッ化物を作用
4 させる二段階処置法という臨床応用法が考案されている¹¹．その一
5 方で，重炭酸イオンの存在が再石灰化を遅延させるという報告も存
6 在する¹²．これらの様々な報告は，唾液あるいは予防法に含まれる
7 重炭酸イオンの役割を理解するのに混乱を招く可能性がある．これ
8 までに当講座では，顕微ラマン分光法 (Raman)分析および Transverse
9 Microradiography (TMR) 分析を用い，重炭酸イオン非存在下でのエナ
10メル質表層下脱灰病巣の再石灰化について報告しており⁵，エナメル
11質再石灰化過程におけるリン酸基と炭酸基の変化を，これらの分析
12によって詳細に観察可能であることを示した．

13 TMR 分析は，顕微エックス線装置を用い脱灰・再石灰化に伴う歯
14質ミネラルの変化を定量的に評価する標準法である¹³．一方，Raman
15分光法は，振動分光法の一つで，物質に赤外光を照射して得られる
16散乱光の振動数と入射光の振動数の差に対して散乱光強度を計測し，
17分子構造を分析する方法である^{5,14-18}．

18 本研究の目的は，安静時および刺激時唾液レベルの重炭酸イオン

1 濃度が存在する再石灰化環境におけるエナメル質表層下脱灰病巣の
2 部位特異的なリン酸基および炭酸基の取り込みを Raman 分析にて、
3 また再石灰化と耐酸性試験後のミネラル様相を TMR 分析にて観察
4 することにより脱灰・再石灰化過程における重炭酸イオンの影響を
5 検討することである。

6

7

材料および方法

8 実験過程を、図 1 に模式的に示す。

9 1 試料作製 (図 2)

10 ウシ下顎中切歯をセメント - エナメル境にて切断後 (Isomet,
11 Buehler, Rosemont, IL, USA), 直径 5 mm のエナメル質円板を切り出し
12 た (DP-375 V; Fujiwara Industry, Hyogo). 耐水研磨紙 2,000 番まで研磨
13 (Fuji Star; Sankyo Rikagaku, Co. Ltd., Saitama) することにより平坦な
14 面を作製後, 脱イオン水 (DW) に浸漬しながら 15 分間超音波洗浄
15 (US-2R; AS ONE, Osaka) を行った. その後, 耐酸性バーニッシュに
16 て試験面を 2×3 mm に規定し, 50 ml の円筒形プラスチック容器
17 (352070; Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, USA) の
18 底部に 3 個ずつスティッキーワックスを用いて固定した.

1 2 基準病巣の作製と再石灰化 (図 2)

2 各容器に 20 ml の 8%メチルセルロースゲル (Methocel MCgel,
3 Fluka, Buchs, Switzerland) を注入し, 37 °C で 24 時間静置後, 0.1 M
4 の乳酸を 20 ml 加え, 37 °C で 10 日間浸漬することにより基準とな
5 る表層下脱灰病巣 (基準病巣) を作製した^{18,19)}. 続いて, 3 種類の再
6 石灰化溶液, すなわちコントロール (Cont) として重炭酸イオン非含
7 有再石灰化溶液 (1.5 mM CaCl₂, 0.9 mM KH₂PO₄, 130 mM KCl, 20 mM
8 Hepes, pH7.0)^{20,21)}, ならびに安静時または刺激時唾液を想定して 5
9 mM または 50 mM (Resting saliva [Rest], Stimulated saliva [Stim]) の
10 NaHCO₃ を添加²²⁾したものを用意した. これらの溶液を使用し, 空気
11 の影響を軽減するために容器を溶液で完全に満たした状態 (60 ml)
12 にて 37 °C で 10 週間浸漬した. なお, 再石灰化溶液の交換は 7 日間
13 毎に行い, NaHCO₃ の添加もその都度行なった.

14

15 3 耐酸性試験(図 2)

16 再石灰化後の試料と未処理の健全エナメル質 (Sound enamel
17 [Sound])を, 脱灰溶液 (1.5 mM CaCl₂, 0.9 mM KH₂PO₄, and 25.0 mM
18 CH₃COOH; pH 4.6) 10 ml に 37°C で 3 日間浸漬し耐酸性試験を行った

1 20). なお, 再石灰化試料は DW で水洗, 乾燥後に脱灰液に浸漬した.

2

3 4 顕微ラマン分光法 (Raman) 分析 (図 3)

4 再石灰化後の試料, Sound 群および基準病巣 (各群 $n = 6$) をワイ
5 ヤー式精密切断機 (Well 3242; Walter-Ebner, Mannheim, Germany) を
6 用いて試験面に垂直に歯軸の方向に半切した. 試料は, 顕微ラマン
7 分光光度計 (Nicolet Almega XR Dispersive Raman microspectroscopy
8 system; Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, MA, USA) を用い, 露光
9 時間 10 秒, 露光回数 10 回, 励起波長 780 nm, 出力レベル 10 mW,
10 グレーティング 360 lines/mm, アパーチャー 100 μm の条件下で測定
11 した¹⁸⁾. 1 試料において病巣の表層から 10 μm および 40 μm のそれ
12 ぞれで 6 点測定し, ν_1 (961 cm^{-1}) のリン酸基, B-type carbonate (1070
13 cm^{-1}) の炭酸基のピーク高さ²³⁻²⁶⁾を平均した. さらに, 再石灰化エナ
14 メル質中の炭酸塩の割合を Mohanty らの報告¹⁷⁾を参考に 1070 cm^{-1} /
15 961 cm^{-1} より算定した. 取得されたスペクトルの分析には, OMNIC
16 ソフトウェア (OMNIC; Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, MA,
17 USA) を用いた.

18

1 5 Transverse Microradiography (TMR) 分析 (図 4)

2 基準病巣, 再石灰化および耐酸性試験後の試料 (各群 $n = 6$) は 70 ~
3 100% のエタノール系列にて順次脱水後, 包埋用レジ
4 (Low-Viscosity Embedding Kit; Polysciences, Inc., Warrington, PA, USA)
5 にて包埋した. 加熱重合後, ワイヤソーにて厚さ 150 μm の薄切片
6 を, 各ブロックから 2 枚ずつ歯軸方向に切り出した. 各切片は発生
7 源に Cu およびフィルターに Ni を使用した顕微エックス線装置
8 (PW3830, Spectris, Surrey, UK) および High resolution X-ray glass plate
9 (Konica Minolta, Tokyo) を用いて, 13 段階のステップウェッジととも
10 に TMR 撮影 (管電圧 25 kV, 管電流 15 mA, 焦点-試片間距離 570
11 mm, 照射時間 20 分)した^{19,20}. 通法により現像, 定着, 水洗, 乾燥
12 後, セットアップされた microscope-videocamera-microcomputer シス
13 テム, およびミネラル量分析ソフト (TMR2000, Inspektor Research
14 System, Amsterdam, The Netherlands) を使用してミネラルプロファイ
15 ルを作成した. 個々の薄切切片については病巣の中央をスキャンし,
16 2 つの薄切切片から得られた値を平均して 1 試料のものとした. 得ら
17 れたデータは, 各群の平均ミネラルプロファイル, 平均ミネラル喪
18 失量 (integrated mineral loss; IML, $\text{vol}\% \times \mu\text{m}$.), 表層のミネラル密度

1 (vol% of the surface layer; MSL) および病巣体部のミネラル密度
2 (vol% of the body of lesion; MBL) である.

3

4 6 統計分析

5 統計分析は, Kruskal–Wallis and Steel–Dwass tests (EZRVer.1.27;
6 Saitama Medical Center, Jichi Medical University, Saitama)²⁷⁾を用い, 有意
7 水準 5%で行った. なお, 再石灰化後の IML は, 基準病巣を加え統
8 計分析を行った.

9

10 結 果

11 1 Raman 分光法を使用した再石灰化エナメル質に取り込まれた炭
12 酸基およびリン酸基の評価 (表 1, 図 5)

13 表層付近 (10 μm) における炭酸基 (B-type carbonate; 1070 cm^{-1})
14 のピーク高さは, 基準病巣および Cont 群で有意に低く, Sound, Rest
15 および Stim 群間に有意差が認められなかった. 病巣体部 (40 μm) で
16 は, 基準病巣が有意に低く Stim 群が有意に高かった. リン酸基 (ν_1 ;
17 961 cm^{-1}) のピーク高さは表層付近および病巣体部の両方で, 基準病
18 巣のみが有意に低く他群間に有意差は認められなかった.

1 表層付近の $1070\text{ cm}^{-1}/961\text{ cm}^{-1}$ は, Sound 群に比較し Stim 群は有意
2 に高い値を示し, Rest 群は同等, Cont 群は有意に低い値を示した.
3 病巣体部では, Sound 群に比較し Stim および Rest 群は有意に高い値
4 を示し, Cont 群は有意に低い値を示した.

5

6 2 TMR 分析による再石灰化ならびにその後の脱灰様相の評価 (表 2,
7 図 6)

8 再石灰化後の平均ミネラルプロファイルから, 再石灰化群はミネ
9 ラル密度の上昇が確認され, 基準病巣と明らかに異なった様相を示
10 した (図 6-a). また, IML についても, 再石灰化群間に有意な差は
11 認められなかったが, 基準病巣より有意に低い値を示した (表 2).

12 さらに, 耐酸性試験後の全ての群間の IML には有意差は認められ
13 なかったものの(表 2), 再石灰化群の平均ミネラルプロファイルは
14 Sound 群とは異なり, 表層付近 ($10\ \mu\text{m}$) と病巣体部 ($40\ \mu\text{m}$) におけ
15 るミネラル密度の著しい低下は認められず(図 6-b), 再石灰化群の
16 MSL と MBL は, Sound 群より有意に高い値であった (表 2).

17

18

1 考 察

2 本研究では，エナメル質表層下脱灰病巣の再石灰化における炭酸
3 基およびリン酸基の取り込み様相を Raman 分析にて，再石灰化とそ
4 の後の耐酸性試験によるミネラルプロファイルの変化を TMR 分析
5 を用い，安静時および刺激時唾液レベルの重炭酸イオン濃度の影響
6 を検討した．Raman 分析は，重炭酸イオンの存在下での再石灰化時
7 に表層と病巣体部の両方に重炭酸イオンが取り込まれることを示し，
8 またリン酸基のピーク高さは Sound 群および再石灰化 3 群間で有意
9 差を認めなかった．重炭酸イオン含有条件での再石灰化および耐酸
10 性試験後の IML は，重炭酸イオンが存在しない条件と同等であった
11 が，再石灰化群の耐酸性試験後ミネラルプロファイルは Sound 群と
12 は異なり，著しいミネラル密度の低下は認められなかった．

13 TMR 分析は，脱灰および再石灰化におけるミネラルの変化を定量
14 的に評価するための国際的な標準手法である¹³⁾．Raman 分析は，試
15 料作製が容易であり，極めて狭小な範囲における定量分析が可能な
16 ことから研究の場で広く使用されてきた¹⁴⁾．歯科分野における研究
17 への応用は 2000 年以降に増加し，健全エナメル質と表層下脱灰病巣
18 の特性を評価出来るとの報告もある^{5,15-18)}．これまでに当講座では，

1 両分析法を組み合わせるにより、エナメル質再石灰化過程にお
2 けるリン酸基と炭酸基の変化を詳細に観察可能であることを示した。
3 そこで今回我々は、これらの分析法を組み合わせて用いることによ
4 り、脱灰と再石灰化におけるエナメル質表層下脱灰病巣の改質への
5 重碳酸イオンの関わりを明らかにすることとした。

6 HAP は、生体内にあるリン酸カルシウムのなかで最も不溶性であ
7 るが、エナメル質のミネラル相は純粋な HAP のみで構成されている
8 訳ではない^{28,29)}。これまでに天然アパタイトおよび合成アパタイト
9 の結晶性や溶解性について多くの研究があるが、そのほとんどは理
10 論的な HAP と想定して行ったものである²⁹⁾。エナメル質には重量で
11 約 4%の水分が存在すると推定され³⁰⁾、そのうち強固に結合した水分
12 は、概念的に提唱されている HAP 結晶周囲の水和層に相当し HAP
13 はこの水和層を介して周囲環境よりもたらされた各種イオンを結晶
14 表面に吸着している^{30,31)}。HAP の結晶格子を形成しているイオンは
15 表面に吸着されているイオンと活発な交換を起し、このイオン交
16 換には同種と異種がある³⁰⁾。同種イオン交換は、格子中の Ca^{2+} と周
17 囲の Ca^{2+} が置換する現象であり、異種イオン交換は格子中の Ca^{2+} が
18 Na^+ 、 K^+ 、 Mg^{2+} 、 Zn^{2+} および Sr^{2+} などと、また OH^- が F^- 、 Cl^- および他

1 の陰イオンと，さらに PO_4^{3-} が HPO_4^{2-} および CO_3^{2-} などとそれぞれ置
2 換する現象である²⁹⁻³⁵⁾．これらのミネラルの変化は，溶解性に関し
3 て促進および抑制のいずれかの効果を発揮する．カルシウムおよび
4 リン酸イオンを含む溶液で再石灰化したエナメル質再石灰化部位の
5 健全エナメル質と比較した耐酸性の上昇は，結晶中の炭酸基がリン
6 酸基と置換することにより生じる可能性がある⁵⁾．一方，唾液には重
7 炭酸イオンによる緩衝能が存在する⁶⁻⁸⁾ことから，重炭酸イオン存在
8 下における再石灰化ならびにその後の耐酸性様相を観察することは
9 再石灰化および脱灰過程において重要である．しかしながら，前述
10 の研究においては唾液に含まれる重炭酸イオンが存在する環境下で
11 のエナメル質の再石灰化について明らかにしなかった．

12 ヒトエナメル質の炭酸基の含有量は3 - 4%であり，そのうち90%
13 を占めるB-typeの炭酸基³⁶⁾はリン酸基と置換する可能性を有してい
14 る²⁴⁾．一般的に炭酸基が多いほどエナメル質結晶構造に歪みを生じ，
15 溶解度が増すと言われている^{29,31-33)}．今回我々は再石灰化後のB-type
16 炭酸基をRaman分析するとともに，その後の耐酸性試験の結果から，
17 病巣内の重炭酸イオンの状態を考察した．

18 Raman分析の結果より，再石灰化の際に重炭酸イオンは表層と病

1 巢体部の両方に取り込まれていることが確認された。また過去の研
2 究¹⁰⁾と比較し、表層よりも病巢体部においてより顕著に増加すると
3 いう部位特異的な特徴を示した。エナメル質表層下脱灰病巢は、エ
4 ナメル質表層の低溶解性のため、表層下でミネラルが消失し表層に
5 は小柱間に一致した部位に微小孔が形成されるのが特徴である^{37,38)}。
6 これらの微小孔を通じ酸はエナメル質の深部まで到達し、溶解した
7 イオンは溶出する。再石灰化の初期の段階ではこの微小孔を通じて
8 ある程度、病巢体部と外部環境間の移動は可能である^{34,37)}。再石灰
9 化溶液に存在する重炭酸イオンは、これらの孔を通過して病巢に拡
10 散するが、さらなる再石灰化進行によって外部環境との行き来が制
11 限され、病巢体部に沈着したものと考えられる。

12 次に取りこまれた重炭酸イオンの再石灰化への影響であるが、
13 TMR 分析の結果より、再石灰化後の IML に Cont, Rest および Stim
14 群間には差が無く、基準病巢とは有意な差があったことから、再石
15 灰化を抑制する影響はなかったと考えられる。

16 耐酸性への影響については、耐酸性試験後の IML に全群間での差
17 は無く、Rest, Stim 群の MSL および MBL は Sound 群よりも有意に
18 高く、Cont 群と同等であったことから、こちらも低下させる影響は

1 無かったと考えられる。Raman 分析によって再石灰化 3 群間でリン
2 酸基のピーク高さに有意差は認められなかったが、Rest, Stim 群の
3 MSL および MBL の部位に炭酸基が多いことが確認され、この範囲
4 において炭酸基 / リン酸基の増加が確認された。Tanaka ら³⁹⁾は再石
5 灰化の際に取り込まれたリン酸イオンは HAP の結晶化に寄与すると
6 報告していることから、Rest および Stim 群では Cont 群と同程度の
7 HAP が形成されている可能性がある。一方、取りこまれた重炭酸イ
8 オンの状態としてはいくつか考えられる。過去の研究において、HAP
9 と炭酸イオンとの反応については炭酸塩として沈着または HAP 結晶
10 表面にイオンとして吸着している可能性が述べられている⁴⁰⁾。Nelson
11 ら³¹⁾は、炭酸イオンがアパタイト結晶の結晶構造に取り込まれるか
12 結晶表面に吸着するかによって異なる影響を及ぼし、更なる酸の侵
13 襲において前者は溶解性を増大し、後者は溶解性を減少すると報告
14 している。これらの報告および本研究の結果より、Rest および Stim
15 群では Cont 群と同様に再石灰化によって純粋な HAP が形成されて
16 おり、取り込まれた重炭酸イオンの多くは後者、すなわち HAP 結晶
17 の水和層に吸着あるいは炭酸塩として沈着している可能性が示唆さ
18 れた。また、酸侵襲の際にはこれらが、HAP に先行して溶解するこ

1 とにより緩衝作用を示す可能性が考えられるが、今後更なる検証が
2 必要である。

3 本研究は、歯質の脱灰および再石灰化を定量評価できる TMR 分析
4 と物質構成を詳細に分析可能な Raman 分析を用い、エナメル質う蝕
5 の初期に見られる表層下脱灰病巣と重炭酸イオンの関わりを明らか
6 にした。これらの結果は、脱灰と再石灰化を繰り返す口腔内でエナ
7メル質表層が成熟していくメカニズムを解明するための一助になる
8と共に、臨床の場において重炭酸イオンをより積極的に利用できる
9可能性を示したものである。

10 う蝕予防のメカニズムにおいて、唾液に含まれる重炭酸イオンの
11 緩衝能は重要な役割を示す。また近年、高齢者増加にともなう口腔
12 乾燥症の有病率は増加しており、この現状を医療関係者は認識して
13 おく必要がある。唾液分泌速度が低下して緩衝能が発揮されず、口
14 腔内環境が酸性に傾く期間が長いとう蝕感受性が高まることから、
15 積極的な予防処置が講じられるべきである。

16 本研究の結果より、安静時および刺激時唾液中の重炭酸イオンの存
17 在は、持続的な再石灰化に重要であることが示された。今後、口腔
18 内環境をう蝕予防に適した環境に維持するため、重炭酸イオンの多

1 角的な応用が期待される。

2

3

結 論

4 重炭酸イオンは再石灰化においてエナメル質表層下脱灰病巣の表
5 層および病巣体部の両方に取り込まれ炭酸基 / リン酸基の増加をも
6 たらずが，再石灰化の進行は抑制しなかった。さらに，重炭酸イオ
7 ンの吸着あるいは炭酸塩としての沈着は耐酸性に影響せず，緩衝作
8 用を示すことが示唆された。

9

10

謝 辞

11 本稿を終えるにあたり，終始御懇篤なる御指導と御校閲を賜りま
12 したう蝕制御修復学講座 向井義晴准教授に深甚なる感謝の意を表
13 します。ならびに本研究の遂行に対し，御指導と御鞭撻を戴いたう
14 蝕制御修復学講座 飯塚純子博士，および教室員の皆様に感謝いた
15 します。

16

17

18

参考文献

1. ten Cate JM, Arends J. Remineralization of artificial enamel lesions in vitro. III. A study of the deposition mechanism. *Caries Res* **14**: 351-358, 1980.
2. Lammers PC, Borggreven JPM, Driessens FCM. Influence of fluoride on in vitro remineralization of artificial subsurface lesions determined with a sandwich technique. *Caries Res* **24**: 81-85, 1990.
3. Lammers PC, Borggreven JPM, Driessens FCM. The influence of fluoride on in vitro remineralization of bovine enamel. *Bull Group Int Rech Sci Stomatol Odontol* **33**: 199-203, 1990.
4. ten Cate JM. In vitro studies on the effects of fluoride on de- and remineralization. *J Dent Res* **69**: 614-619, 1990.
5. 富永貴俊, 向井義晴, 杉崎新一郎, 岩谷いずみ, 寺中敏夫: エナメル質再石灰化病巣の物理的・化学的安定性. *日歯保存誌* **51**: 226-235, 2008.
6. Mamdel ID. The function of saliva. *J Dent Res* **66**: 623-627, 1987.
7. Mamdel ID. The role of saliva in maintaining oral homeostasis. *J Am Dent Assoc* **119**: 298-304, 1989.
8. Lagerlöf F, Oliveby A. Caries-protective factors in saliva. *Adv Dent Res* **8**: 229-238, 1994.

- 1 9. Feagin F, Thiradilok S, Aponte-Merced L, Bradley E. Effects of
2 bicarbonate on remineralization of enamel. J Oral Pathol **6**: 331-337,
3 1977.
- 4 10. Feagin F, Thiradilok S, Aponte-Merced L. The carbonate and fluoride
5 in surfaces of remineralized enamel. J Oral Pathol **6**: 338-342, 1977.
- 6 11. Tanaka K, Iijima Y. Acid resistance of human enamel in vitro after
7 bicarbonate application during remineralization. J Dent **29**: 421-426,
8 2001.
- 9 12. Lammers PC, Borggreven JMPM, Driessens FCM, van Dijk JWE.
10 Influence of fluoride and carbonate on *in vitro* remineralization of
11 bovine enamel. J Dent Res **70**: 970-974, 1991.
- 12 13. ten Cate JM, Dundon KA, Vernon PG, Damato FA, Huntington E,
13 Exterkate RAM, Wefel JS, Jordan T, Stephen KW, Roberts AJ.
14 Preparation and measurement of artificial enamel lesions, a
15 four-laboratory ring test. Caries Res **30**: 400-407, 1996.
- 16 14. Tarnowski CP, Ignelzi MA Jr, Wang W, Taboas JM, Goldstein SA,
17 Morris MD. Earliest mineral and matrix change in force-induced
18 musculoskeletal disease as revealed by Raman microspectroscopic
19 imaging. J Bone Miner Res **19**: 64-71, 2004.
- 20 15. Ko AC, Choo-Smith LP, Hewko M, Leonardi L, Sowa MG, Dong CCS,

- 1 Williams P, Cleghorn B. Ex vivo detection and characterization of early
2 dental caries by optical coherence tomography and Raman spectroscopy.
3 J Biomed Opt **10**: 031118, 2005.
- 4 16. Venkatesan SM, Narayan GS, Ramachandran AK, Indira R. The effect
5 of two bleaching agents on the phosphate concentration of the enamel
6 evaluated by Raman spectroscopy: An ex vivo study. Contemp Clin
7 Dent **3 (suppl 2)**, s172-176, 2012.
- 8 17. Mohanty B, Dadlani D, Mahoney D, Mann AB. Characterizing and
9 identifying incipient carious lesions in dental enamel using
10 micro-raman spectroscopy. Caries Res **47**: 27-33, 2013.
- 11 18. Iizuka J, Mukai Y, Taniguchi M, Mikuni-Takagaki Y, ten Cate JM,
12 Teranaka T. Chemical alteration by tooth bleaching of human salivary
13 proteins that infiltrated subsurface enamel lesions -experimental study
14 with bovine lesion model systems-. Dent Mater J **33**: 663-668, 2014.
- 15 19. Lagerweij MD, de Josselin de Jong E, ten Cate JM. The video camera
16 compared with the densitometer as a scanning device for
17 microradiography. Caries Res **28**: 353-362, 1994.
- 18 20. Mukai Y, Lagerweij MD, ten Cate JM. Effect of a solution with high
19 fluoride concentration on remineralization of shallow and deep root
20 surface caries in vitro. Caries Res **35**: 317-324, 2001.

- 1 21. Shiiya T, Mukai Y, Tomiyama K, Teranaka T. Anti-demineralization
2 effect of a novel fluoride-releasing varnish on dentin. *Am J Dent* **25**:
3 347-350, 2012.
- 4 22. Bardow A, Madsen J, Nauntofte B. The bicarbonate concentration in
5 human saliva does not exceed the plasma level under normal
6 physiological conditions. *Clin Oral Invest* **4**: 245-253, 2000.
- 7 23. Kirchner MT, Edwards HG, Lucy D, Pollard AM. Ancient and modern
8 specimens of human teeth: a Fourier-transform Raman spectroscopic
9 study. *J Raman Spectrosc* **28**: 171-178, 1997.
- 10 24 Penel G, Leroy G, Ray C, Bres E. MicroRaman spectral study of the
11 PO_4 and CO_3 vibrational modes in synthetic and biological apatites.
12 *Calcif Tissue Int* **63**: 475-481, 1998.
- 13 25. Edwards HGM, Farwell DW, Wynn-Williams DD. FT-Raman
14 spectroscopy of avian mummified tissue of archaeological relevance.
15 *Spectrochim Acta A* **55**: 2691-2703, 1999.
- 16 26. Miyagawa K, Kozai Y, Ito Y, Furuhashi T, Naruse K, Nonaka K, Nagai
17 Y, Yamato H, Kashima I, Ohya K, Aoki K, Mikuni-Takagaki Y. A novel
18 underuse model shows that inactivity but not ovariectomy determines
19 the deteriorated material properties and geometry of cortical bone in the
20 tibia of adult rat. *J Bone Miner Metab* **29**: 422-436, 2011.

- 1 27. Kanda Y. Investigation of the freely available easy-to-use software
2 'EZR' for medical statistics. *Bone Marrow Transplant* **48**: 452-458,
3 2013.
- 4 28. Posner AS, Beebe RA. The surface chemistry of bone mineral and
5 related calcium phosphates. *Semin Arthritis Rheum* **4**: 267-291, 1975.
- 6 29. 岡崎正之. 歯と骨をつくるアパタイトの化学. 東海大学出版会,
7 東京, 17-120, 1998.
- 8 30. Jenkins GN. 監訳: 河村洋二郎; 口腔の生理・生化学. 医歯薬出
9 版, 東京, 54, 1981.
- 10 31. Nelson DGA, Featherstone JDB, Duncan JF, Cutress TW. Effect of
11 carbonate and fluoride on the dissolution behavior of synthetic apatite.
12 *Caries Res* **17**: 200-211, 1983.
- 13 32. Ingram GS. The role of carbonate in dental mineral. *Caries Res* **7**:
14 217-230, 1973.
- 15 33. Nelson DGA. The influence of carbonate on the atomic structure and
16 reactivity of hydroxyapatite. *J Dent Res* **60 (C)**: 1621-1629, 1981.
- 17 34. Curzon MEJ, Cutress TW. Trace elements and dental disease. Bristol,
18 John Wright, 229-231, 1983.
- 19 35. Larsen MJ, Pearce EIF, Jensen SJ. Notes on the dissolution of human
20 dental enamel in dilute acid solutions at high solid/solution ratio. *Caries*

- 1 Res **27**: 87-95, 1993.
- 2 36. Elliott JG. Structure and chemistry of the apatites and other calcium
3 orthophosphates. Elsevier: Amsterdam, 63-230, 1994.
- 4 37. Arends J, Christoffersen J. The nature of early caries lesions in enamel.
5 J Dent Res **65**: 2-11, 1986.
- 6 38. Arends J, Christoffersen J, Christoffersen MR, Ogaard B, Dijkman AG,
7 Jonebloed WL. Rate and mechanism of enamel demineralization in situ.
8 Caries Res **26**: 18-21, 1992.
- 9 39. Tanaka T, Yagi N, Ohta T, Matsuo Y, Terada H, Kamasaka K, To-o K,
10 Kometani T, Kuriki T. Evaluation of the distribution and orientation of
11 remineralized enamel crystallites in subsurface lesions by X-ray
12 diffraction. Caries Res **44**: 253-259, 2010.
- 13 40. 末次 寧 : アパタイト構造中の炭酸基 ; 無機マテリアル **3**: 48-54,
14 1996.
- 15

付図説明

表 1 顕微ラマン分光法 (Raman) 分析の結果

表 2 Transverse Microradiography (TMR) 分析の結果

平均ミネラル喪失量 (IML) = integrated mineral loss (vol% × μm),

表層のミネラル密度 (MSL) = vol% of the surface layer (vol%),

病巣体部のミネラル密度 (MBL) = vol% of the body of lesion (vol%).

図 1 実験過程

図 2 試料作製, 基準病巣の作製, 再石灰化および耐酸性試験

図 3 顕微ラマン分光法 (Raman)分析

図 4 Transverse Microradiography (TMR) 分析分析

図 5 再石灰化後の顕微ラマン分光法 (Raman) 分析によって得られ

たスペクトル

1 図 6 各群の平均ミネラルプロファイル (a. 基準病巣および再石灰
2 化後, b. 耐酸性試験後)

3

4

5

6

7

8

9

10

11

12

13

14

15

16

17

18

19

20

1 表 1

群	<i>n</i>	NaHCO ₃ mM	B-type carbonate 1070 cm ⁻¹ (cps; mean±SD)	ν_1 PO ₄ ⁻³ 961 cm ⁻¹ (cps; mean±SD)	1070 cm ⁻¹ /961 cm ⁻¹ (mean±SD)
表層付近 (10 μm)					
基準病巣	6	-	5 ± 1 ^a	182 ± 19 ^a	0.03 ± 0.004 ^b
Sound	6	-	15 ± 4 ^b	429 ± 55 ^b	0.03 ± 0.004 ^b
Cont	6	0.0	8 ± 2 ^a	386 ± 63 ^b	0.02 ± 0.003 ^a
Rest	6	5.0	11 ± 3 ^b	306 ± 58 ^b	0.03 ± 0.004 ^b
Stim	6	50.0	18 ± 4 ^b	295 ± 43 ^b	0.06 ± 0.010 ^c
病巣体部 (40 μm)					
基準病巣	6	-	5 ± 1 ^a	199 ± 45 ^a	0.03 ± 0.003 ^{ab}
Sound	6	-	15 ± 4 ^b	426 ± 70 ^b	0.03 ± 0.004 ^b
Cont	6	0.0	8 ± 2 ^a	359 ± 76 ^b	0.02 ± 0.004 ^a
Rest	6	5.0	15 ± 1 ^b	389 ± 19 ^b	0.04 ± 0.002 ^c
Stim	6	50.0	27 ± 3 ^c	371 ± 26 ^b	0.07 ± 0.010 ^d
各群の異符号間に有意差あり (Kruskal–Wallis and Steel–Dwass tests. <i>p</i> < 0.05).					

2

3

4

5

6

7

8

9

10

11

12

13

1 表 2

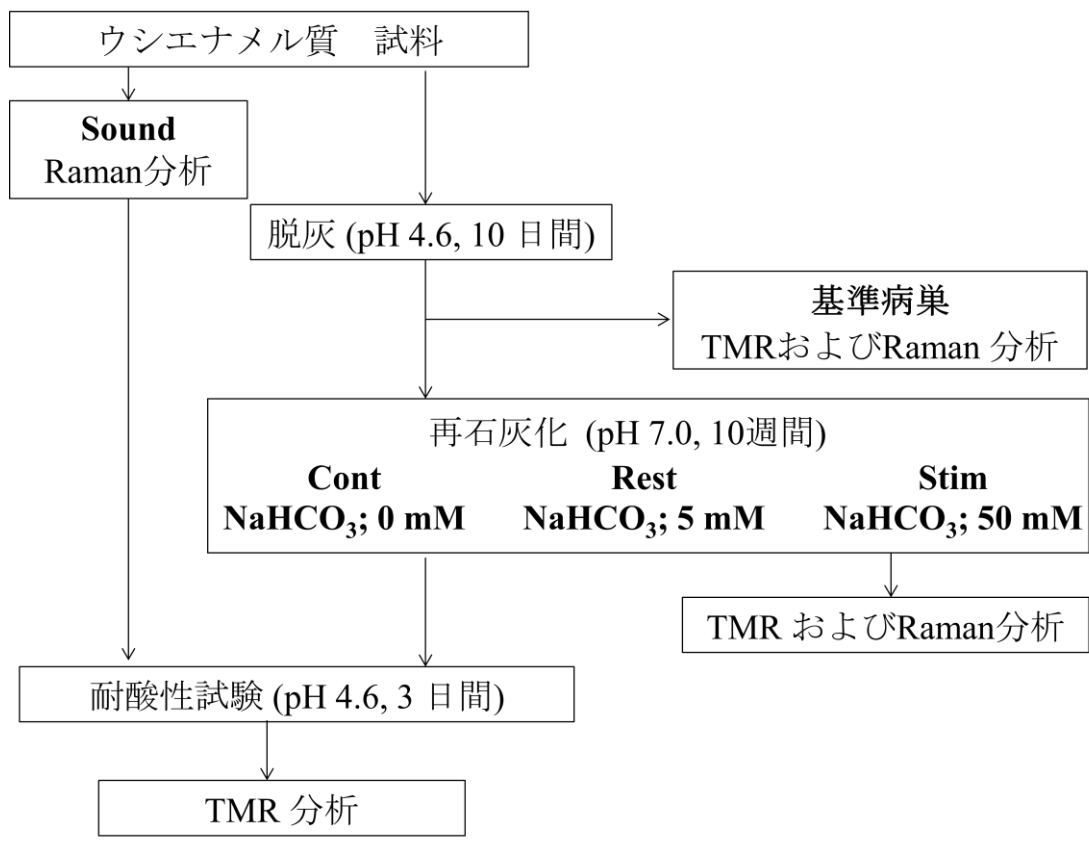
群	n	NaHCO ₃ mM	基準病巣	再石灰化後	耐酸性試験後		
			IML (vol%×μm; mean±SD)	IML (vol%×μm; mean±SD)	IML (vol%×μm; mean±SD)	MSL (vol%; mean±SD)	MBL (vol%; mean±SD)
基準病巣	6	-	3547 ± 224 ^b	-	-	-	-
Sound	6	-	-	-	5012 ± 828 ^a	6 ± 2 ^a	6 ± 3 ^a
Cont	6	0.0	-	1996 ± 445 ^a	3819 ± 1457 ^a	56 ± 12 ^b	42 ± 9 ^b
Rest	6	5.0	-	2002 ± 956 ^a	3903 ± 1036 ^a	59 ± 6 ^b	38 ± 15 ^b
Stim	6	50.0	-	1922 ± 581 ^a	4413 ± 1071 ^a	58 ± 8 ^b	35 ± 7 ^b

各群の異符号間に有意差あり (Kruskal–Wallis and Steel–Dwass tests. $p < 0.05$).

再石灰化後のIMLは、基準病巣を加え統計分析を行った。

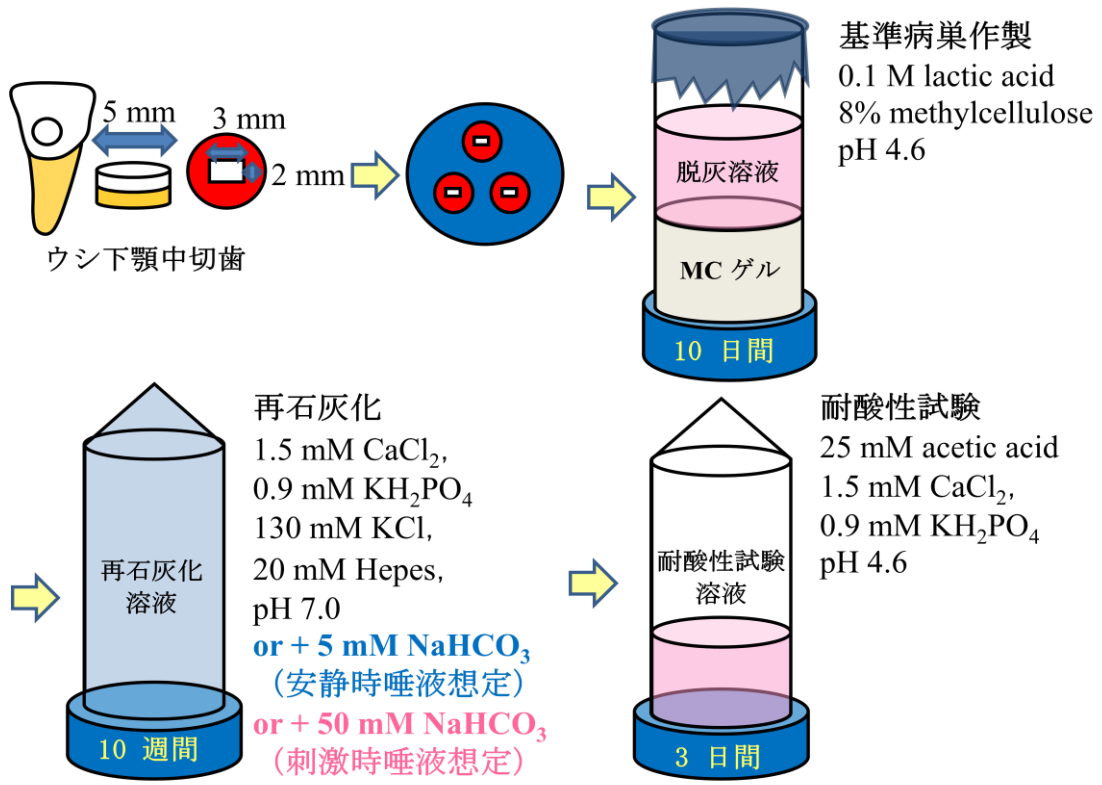
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20

1 図 1



- 2
- 3
- 4
- 5
- 6
- 7
- 8
- 9
- 10
- 11
- 12

1 図 2



2

3

4

5

6

7

8

9

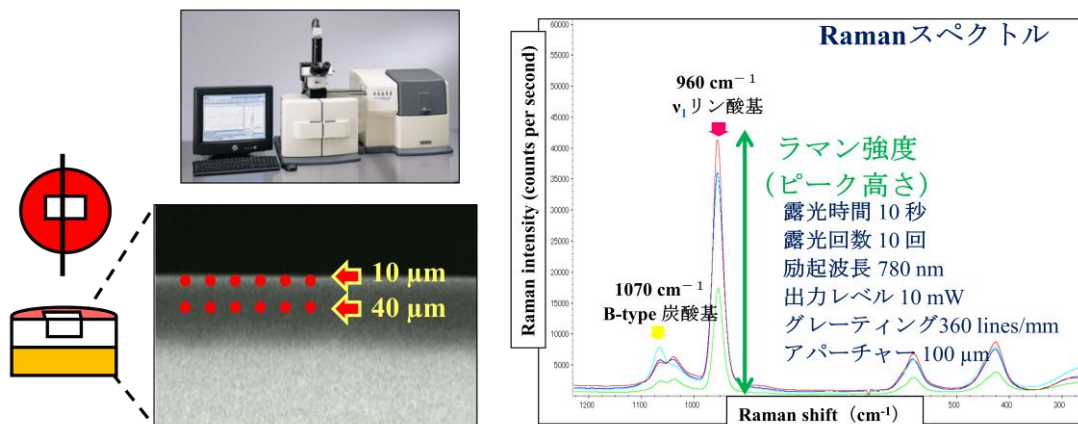
10

11

12

13

Raman分析



評価 (10 μm ; 表層付近, 40 μm ; 病巣体部)

1. 基準病巣と再石灰化後の炭酸基のピーク高さ
2. 基準病巣と再石灰化後のリン酸基のピーク高さ
3. 基準病巣と再石灰化後の炭酸基とリン酸基比
炭酸基のピーク高さ / リン酸基のピーク高さ

2

3

4

5

6

7

8

9

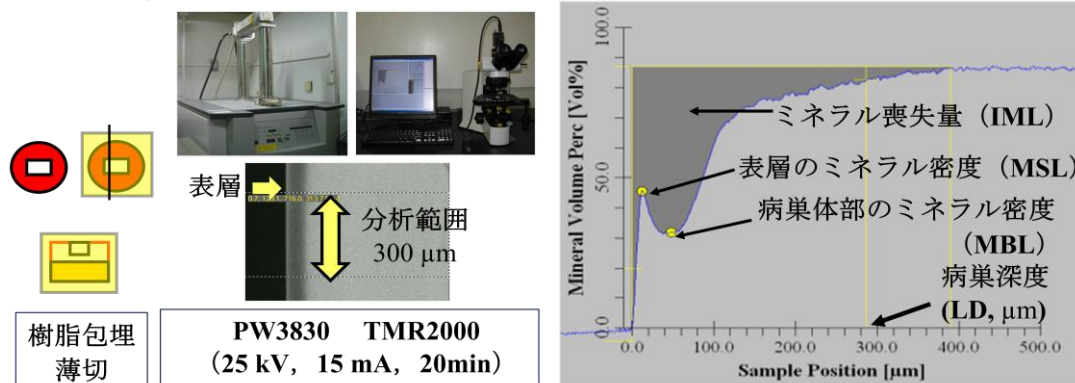
10

11

12

1 図 4

TMR分析



評価

- 1.各群の平均ミネラルプロファイル (基準病巣と再石灰化後, 耐酸性試験後)
- 2.再石灰化後のIML
- 3.耐酸性試験後のIML
- 4.耐酸性試験後の表層のミネラル密度 (MSL), 病巣体部のミネラル密度 (MBL)

2

3

4

5

6

7

8

9

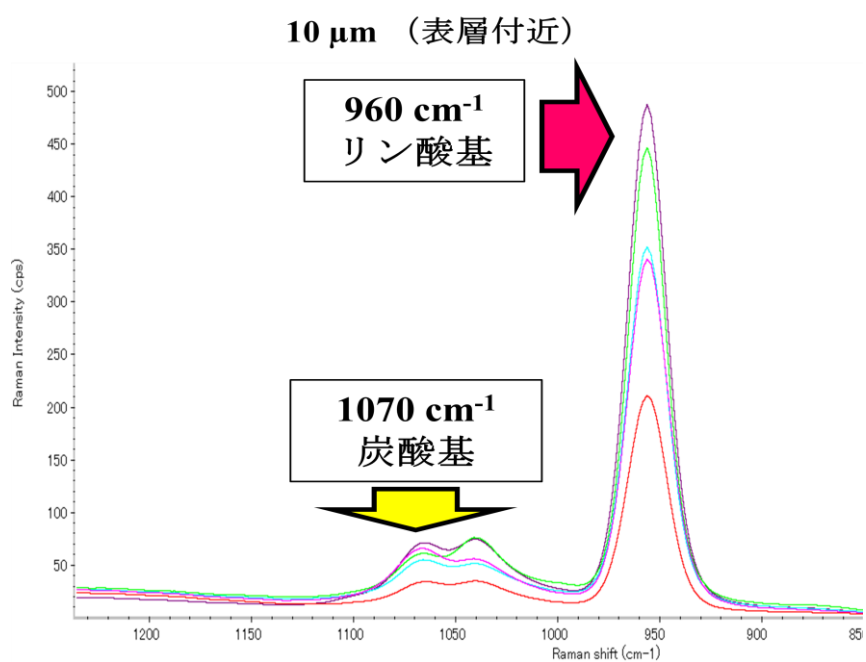
10

11

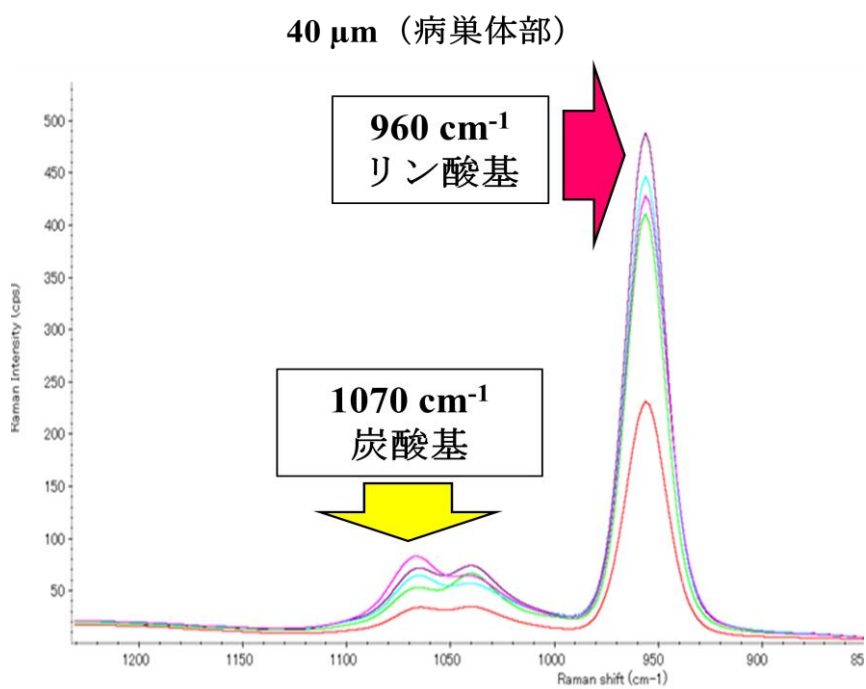
12

13

1 図 5



2



3

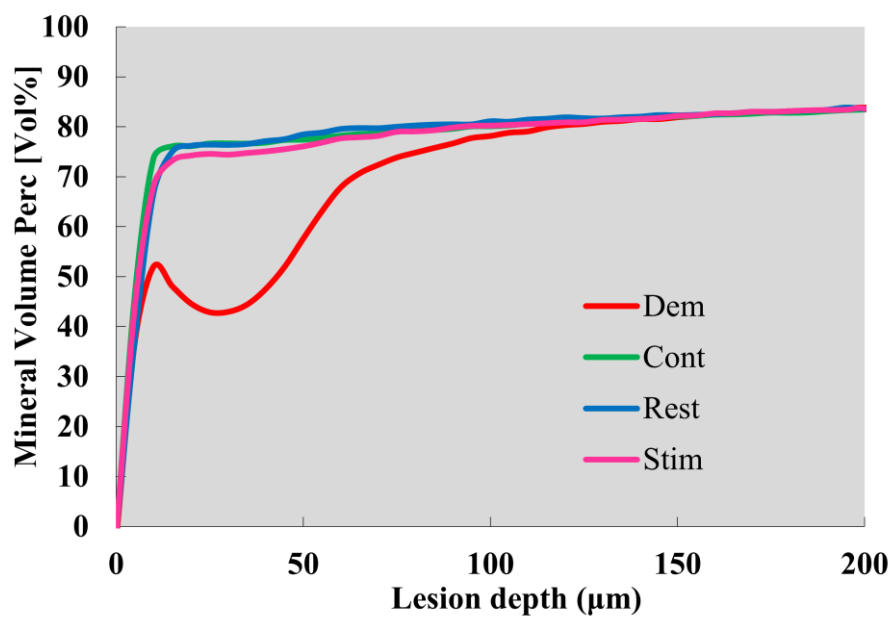
赤→基準病巣, 紫→Sound, 緑→Rem, 青→Rest, ピンク→Stim

4

5

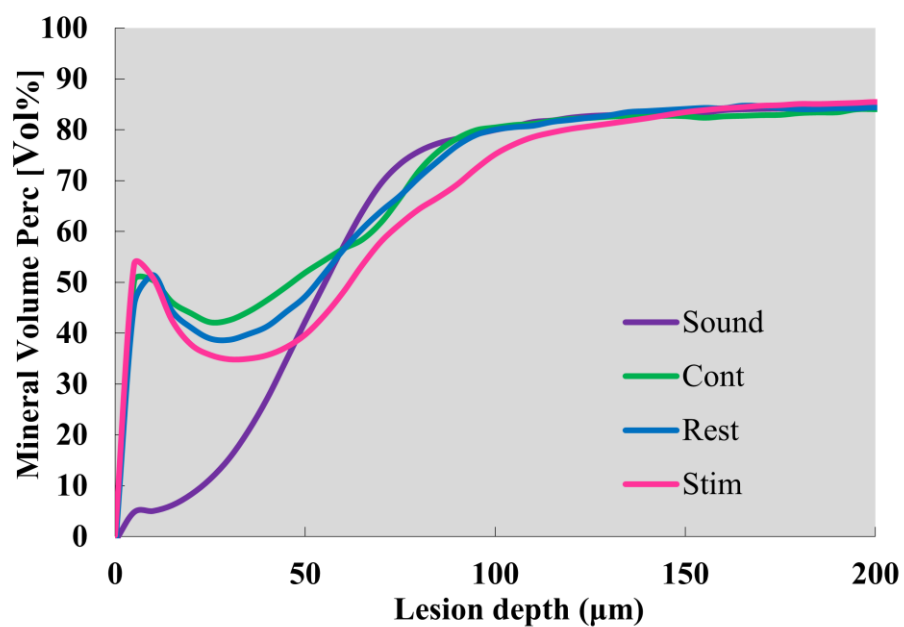
1 図 6

a. 基準病巣および再石灰化後



2

b. 耐酸性試験後



3