

参考文献

1. Theilade E, Loe H, Jensen. Experimental Gingivitis in man. *J Periodontol* 1965; 36: 177-187.
2. 伊津元博, 神原正樹. 画像解析を応用した初期歯肉炎診査. *歯科医学* 2005; 68: 投稿中.
3. H.C. Benedict. Note on the fluorescence of teeth in ultra-violet rays. *Science* 1928; 67: 442.
4. Armstrong WG. Fluorescence characteristics of sound and carious human dentine preparations. *Arch Oral Biol* 1963; 8: 79-90.
5. Foreman PC. The excitation of emission spectra of fluorescent components of human dentine. *Arch Oral Biol* 1980; 25: 641-647.
6. Spitzer D, ten Bosch JJ. The total Luminescence of bovine and human dental enamel. *Calcif Tissue Res* 1976; 20: 201-208.
7. Early Detection of Dental Caries II. Stookey GK(edit), Proceedings of the 4th Annual Indiana Conference, Indiana University School of Dentistry, 2000.
8. Early detection of Dental Caries III, Indiana Conference, Indiana University School of Dentistry, Indianapolis, Indiana, 2003.
9. 神原正樹. 予防歯科へのストラテジー — 齲蝕予防における早期齲蝕診断—. *日本歯科医師会雑誌* 2004; 56: 611-618.
10. 上村参生, 神原正樹. 早期齲蝕診断への機器応用の必要性. *The Nippon Dental Review* 2003; 63: 161-165.
11. Uemura M, Kambara M. Results of clinical trials of fluoride dentifrices using quantitative light fluorescence; Early Detection of Dental Caries III, Indiana Conference, 2003.
12. 坂本吉史, 上村参生, 神原正樹. In vivo における QLF による早期齲蝕診断に関する研究 — 初期齲蝕病巣の定量評価について—. *歯科医学* 2004; 67: 257-265.
13. 大塚秀人, 三宅達郎, 神原正樹. In vivo における QLF による早期齲蝕診断に関する研究 — 初期齲蝕病巣の1年間の追跡結果について—. *歯科医学* 2004; 67: 266-273.
14. de Josselin de Jong E, Sundstrom F, Westerling H et al. A new method for in vivo quantification of changes in initial enamel caries with laser fluorescence. *Caries Res* 1995; 29: 2-7.
15. van der Veen MH, de Josselin de Jong E. Application of quantitative light-induced fluorescence for assessing early caries lesions. *Asses of Oral Health* 2000; 17: 144-162.
16. 高島隆太郎, 川崎弘二, 上村参生ら. エナメル質人工う蝕試料の再石灰化における QLF 観察. *日本口腔衛生学会雑誌* 2005; 55: 投稿中.

■最新号案内■

THE INTERNATIONAL JOURNAL
OF

PERIODONTICS & RESTORATIVE DENTISTRY

ペリオのスペシャリストが
臨床家における国際誌

A4判変形
1部定価4,410円
(本体4,200円・税5%)
年間購読料 定価26,460円
(本体25,200円・税5%)

Volume 13 Number 1 目次より

- ・直径を減じたインプラント体における応力の伝達状況: 生体力学的分析 By Çehrelli MC et al
 - ・歯肉弁を最大限に減張し, 歯冠側移動を可能にする表層部分層弁: 外科的手法 By Greenwell H et al
 - ・歯周病治療における, 抗菌作用を示す有効量以下のドキシサイクリン投与の効果について: 詳細な評価検討 By Greenstein G
 - ・抜歯後のティッシュマネージメント: 軟組織へのパンチテクニック By Jung RE et al
 - ・生体吸収性遮蔽膜と除タンパクしたウシ骨を併用した粘膜貫通型インプラント即時埋入: 短期間の比較対照臨床試験 By Cornellini R et al
 - ・上顎洞への移植術を行った部位に埋入したインプラントの生存率に関するレビュー By Del Fabbro M et al
 - ・rhBMP-2の骨再生効果の測定: 市販のソフトウェアプログラムを使用したX線学的研究 By Bianchi J et al
 - ・濃縮血小板を応用した歯肉退縮の治療: 2症例の報告 By Griffin TJ et al
- 日本オリジナル企画—米国歯周病学会誌から知る最新情報

クインテッセンス出版株式会社



〒113-0033 東京都文京区本郷3丁目2番6号 クイントハウスビル
Tel (03) 5842-2272 Homepage <http://www.quint-j.co.jp/> E-mail info@quint-j.co.jp

原 著

エナメル質人工初期う蝕試料の再石灰化における QLF 観察

高島隆太郎 川崎 弘二* 上村 参生* 酒井 怜子
川上 富清* 小室 崇* 西島 典幸* 田治米元信*
多名部 実* 小室 美樹* 神原 正樹*

概要：ヒトエナメル質を用いて初期う蝕低脱灰試料群（低脱灰群）および、初期う蝕高脱灰試料群（高脱灰群）を作製し、異なるフッ化物イオン濃度（0 ppmF, 0.1 ppmF, 1 ppmF）の再石灰化溶液に 15 日間浸漬し、再石灰化の過程を QLF（quantitative light-induced fluorescence）法により経日的に観察した。その結果、再石灰化溶液浸漬 15 日後には、低脱灰群において 0 ppmF 群は 47%、0.1 ppmF 群は 43%、1 ppmF 群は 89% の回復率、高脱灰群において 0 ppmF 群は 33%、0.1 ppmF 群は 39%、1 ppmF 群は 52% の回復率を示した。今回の *in vitro* 研究においては、再石灰化溶液中の 1 ppmF フッ化物イオンが低脱灰群のヒトエナメル質初期う蝕に対して、特に再石灰化を促進していることがわかり、QLF 法はエナメル質試料における脱灰/再石灰化観察に有用であることがわかった。

索引用語：初期う蝕，脱灰，再石灰化，QLF（quantitative light-induced fluorescence）

口腔衛生会誌 55 : 41-49, 2005

（受付：平成 16 年 8 月 10 日／受理：平成 16 年 11 月 15 日）

緒 言

近年、若年層において象牙質にまで達するう蝕の数は減少傾向にあるものの、う蝕を伴わないエナメル質初期う蝕（以下、初期う蝕と略）は増加傾向にあるといわれている¹²⁾。そのため、21 世紀の歯科保健は初期う蝕に対し一層の対応が求められているのが現状である。

初期う蝕の再石灰化にフッ化物イオンが与える影響は数多くの研究で検討され、低濃度フッ化物イオンの存在下で再石灰化は促進されると報告されている^{1,3-7)}。現在、初期う蝕に対してフッ化物応用をはじめとする再石灰化治療が行われているものの、治療後に初期う蝕が健全な状態にまで回復しなかったという報告は多い⁸⁻¹¹⁾。これは初期う蝕が再石灰化する過程において、初期う蝕表層のエナメル質に唾液由来の無機成分が沈着し過石灰化することにより、病体部の再石灰化に必要なミネラルの拡散が起こらないためと考えられており¹²⁾、特にフッ化物を応用することで無機成分が表層へ沈着しやすくなり、それ以上は脱灰や再石灰化が進行しない停止性の初期う蝕となることが知られている^{1,8,9,13)}。さらに初期う

蝕における脱灰病変の大きさやミネラル喪失量^{14,15)}、初期う蝕表層のエナメル質性状⁹⁾が再石灰化量に影響を与えるという報告もあり、初期う蝕の再石灰化機構についてはいまだ不明な点も多い。それゆえ初期う蝕の再石灰化治療において、より高い回復量を得る方法についてはコンセンサスが得られていないのが現状である。

In vivo で認められる初期う蝕は出現部位、進行程度、口腔内環境によりさまざまな様相を示す¹³⁾ことが知られているが、侵襲を与えることなく初期う蝕の様相を観察する手段は限られている。初期う蝕の脱灰程度を非破壊的に観察する手段として QLF（quantitative light-induced fluorescence）法がある¹⁶⁻¹⁸⁾。QLF 法はエナメル象牙境付近に多く存在するといわれる蛍光物質を利用し、歯に励起光を照射して得られる自家蛍光のうち、健全部と初期う蝕部の蛍光強度差をもとに初期う蝕を検出し、コンピュータに取り込んだうえで画像処理を行い、初期う蝕を定量的に分析する方法である。初期う蝕の形態学的な観察におけるゴールド・スタンダードとしてマイクロ・ラジオグラフ（MR）法がある¹⁹⁾。この MR 法における初期う蝕部のミネラル喪失量と、QLF 法における健全

大阪歯科大学大学院歯学研究科口腔衛生学専攻

・大阪歯科大学口腔衛生学講座

部と初期う蝕部の蛍光強度差には、強い相関(R=0.97)があることが報告されている¹⁶⁾。MR法では、超薄切片としたエナメル質試料に軟X線を照射することでフィルム上に得られたX線画像から脱灰により喪失した無機成分量・脱灰部の性状を観察する。MR法では超薄切片を作製し観察を行うため、試料の部分的な情報しか得られず、得られる情報は二次元的である。しかしながら、QLF法では上記のように初期う蝕部における蛍光強度の減少量により脱灰程度を算出するため、得られる情報より初期う蝕全体の動態を三次元的に捉えることができる。また、QLF法ではX線を用いるMR法よりも早い時期に表層下脱灰を検出できるとの報告もある¹⁹⁾。非破壊的に三次元的な初期う蝕病変の動態観察が可能なQLF法は臨床のみならず、*in vivo*研究、臨床疫学的な調査においても有用と考えられる。しかしながら、QLF法を用いた初期う蝕における再石灰化の観察を行った基礎的な研究^{8,20)}は十分になされていないのが現状である。

本研究では、再石灰化溶液中のフッ化物イオン濃度が*in vitro*条件にて作製した脱灰程度の異なるエナメル質初期う蝕脱灰試料(以下、初期う蝕試料と略)の再石灰化に及ぼす影響をQLF法により観察した。

材料および方法

1. 鏡面研磨エナメル質試料の作製

ヒト天然抜去歯上顎中切歯30本(肉眼的に認められる大きな破折線、テトラサイクリン歯、フッ素症、修復、減形成、う蝕のあるものは除外した)の頬側面からダイヤモンドドリル(Continental Diamond Tool, New Heaven, アメリカ)を用い、流水下で直径4mmのエナメル質ディスクを取り出した。エナメル質ディスクは中空のアクリリックロッド(森コルク, 大阪)に即時型重合レジン(プロビナイス, 松風, 京都)を用いて包埋し、耐水ペーパー#1000(ウインゴ-商事, 大阪)にて15分間、ゲル状研磨剤(Gamma Alumina, 0.05 μm, Buehler, アメリカ)にて研磨を90分間行い、200~400 μmの表層エナメル質を除去した後に、超音波洗浄を蒸留水中で15分間行い鏡面研磨エナメル質試料とした^{20,21)}。

2. エナメル質人工初期う蝕試料の作製

鏡面研磨エナメル質試料の表面中央に初期う蝕を作製するため、2×2mmの脱灰予定窓以外をネイルバーニッシュで被覆したのち、脱灰溶液(100mM塩化ナトリウム, 10mMリン酸一カリウム, 3mM塩化カルシウム, 100mM乳酸, pH;4.5)にそれぞれ12, 48時間の間、37℃下で浸漬し、2種類の脱灰程度をもつ試料を15試料ずつ作製した。作製した初期う蝕試料は蒸留水にて洗浄

したのち、アセトンによりネイルバーニッシュを除去した。

3. QLF法による初期う蝕脱灰程度の評価

QLF法^{16,17,22)}(QLF™ Clin System, Inspektor Research Systems, オランダ)により初期う蝕試料の脱灰程度の観察を行った。観察は試料表面についた水滴を濾紙にて吸いとったのちに、25℃の室温環境にて15分間自然乾燥させたのちに行った²³⁾。

QLF法により得た画像は画像解析ソフト(QLF™ Clin Software Ver 2.00 f, Inspektor Research Systems)により解析した。

QLF法による初期う蝕脱灰程度の評価には、ΔF(%) [健全部に対する初期う蝕病変部の平均蛍光強度減少率¹⁸⁾]、Area(mm²) [検出した初期う蝕病変部の面積¹⁸⁾]、ΔQ [ΔFをAreaに乗じたもので初期う蝕病変部全体の蛍光減少量を示す²⁴⁾]という3つの指標が用いられている。今回は脱灰程度の指標としてΔFを用い解析を行った。なお、QLF法による測定は鏡面研磨エナメル質試料作製後および初期う蝕試料作製後に行った。

4. 再石灰化溶液への浸漬

3種類の異なるフッ化物イオン濃度(0, 0.1, 1 ppmF)の再石灰化溶液(100mM塩化ナトリウム, 5mMリン酸一カリウム, 1.5mM塩化カルシウム, 20ppmカゼイン, 0.2%アジ化ナトリウム, フッ化ナトリウム, pH;6.5)に初期う蝕試料を37℃にて合計15日間浸漬した。再石灰化溶液は3日ごとに新たに調製し交換した。

5. QLF法による再石灰化程度の評価

再石灰化後の初期う蝕試料の状態をQLF法にて観察した。観察は再石灰化溶液交換時(3, 6, 9, 12日目)および再石灰化過程終了時(15日目)の合計5回行った。再石灰化程度の指標としてΔF値を解析に用いた。

6. QLF法による再石灰化過程における回復率の評価

再石灰化前と後の脱灰程度の変化は、次に示す回復率という指標を算出し、評価を行った。回復率は次のように設定した。

回復率:

$$\frac{\text{脱灰溶液浸漬後の}\Delta F\text{値}-\text{再石灰化}n\text{日後の}\Delta F\text{値}}{\text{脱灰溶液浸漬後の}\Delta F\text{値}-\text{脱灰溶液浸漬前の}\Delta F\text{値}} \times 100$$

(n=3, 6, 9, 12, 15)

7. 統計・分析方法

ΔF値の経時的変化および各条件群間でのΔF値を比較検討する際の統計学的分析は一元配置分散分析を行ったのちに、Schefféの方法により分析を行った。有意水準はp=0.05および0.01とした。なお、分析には統計ソフト(SPSS®10.0J for Windows)を用いた。

表1 脱灰試料における脱灰操作前後のΔF値

	脱灰前試料	脱灰後試料
	ΔF値の平均値±SD	ΔF値の平均値±SD
低脱灰群 (n = 15)	- 2.8 ± 0.7	- 14.9 ± 4.0
高脱灰群 (n = 15)	- 2.9 ± 0.9	- 32.4 ± 5.7

(%)

表2 脱灰試料を再石灰化溶液に15日間浸漬した際の経時的なΔF値の変化

再石灰化溶液中のフッ化物イオン濃度 (ppm)	脱灰前試料		ΔF値 (Mean ± SD)					
	脱灰前試料	脱灰後試料 (ベースライン)	再石灰化溶液浸漬後の試料					
			3日目	6日目	9日目	12日目	15日目	
0	-2.3 ± 0.4	-14.4 ± 3.6	-9.2 ± 2.7	-9.3 ± 2.4	-8.8 ± 2.0	-8.4 ± 2.1*	-8.5 ± 2.2	
低脱灰群	0.1	-3.1 ± 0.7	-18.1 ± 2.2	-12.4 ± 1.2**	-11.7 ± 1.9**	-11.8 ± 1.6**	-12.1 ± 2.0**	-11.4 ± 1.7**
	1	-3.2 ± 0.7	-12.4 ± 4.2	-5.7 ± 0.9**	-4.5 ± 1.3**	-5.1 ± 2.2**	-4.7 ± 1.4**	-4.3 ± 1.5**
0	-3.0 ± 1.2	-35.0 ± 7.2	-31.3 ± 7.4	-27.0 ± 5.4	-25.8 ± 4.3	-25.0 ± 4.8	-24.5 ± 4.5	
高脱灰群	0.1	-2.7 ± 0.8	-27.9 ± 3.3	-30.0 ± 7.8	-24.3 ± 5.9	-21.1 ± 4.7	-19.2 ± 3.7	-18.3 ± 4.4
	1	-2.9 ± 0.6	-34.3 ± 3.3	-34.3 ± 2.1	-28.8 ± 1.6	-22.5 ± 4.9**	-19.6 ± 4.0**	-17.5 ± 4.8**

ベースラインと3, 6, 9, 12, 15日目の比較, *: p < 0.05, **: p < 0.01

結 果

1. 初期う蝕試料脱灰程度の評価

QLF法により得られた初期う蝕試料のΔF値の変化, すなわち脱灰程度の変化を表1に示す. 12時間脱灰試料群(以下, 低脱灰群と略)および48時間脱灰試料群(以下, 高脱灰群と略)の平均ΔF値はそれぞれ-14.9, -32.4%であり, 脱灰時間に伴い, 低いΔF値を示す様子が観察された.

2. ΔF値と再石灰化溶液中のフッ化物イオン濃度および脱灰程度の関係

再石灰化溶液に浸漬した後の, 低脱灰試料群および高脱灰試料群におけるΔF値の変化を表2に示す. 表2に示すように低脱灰群における全ての濃度群において, ベースラインと比較してΔF値は再石灰化溶液浸漬後に統計学的に有意な増加を示し(p < 0.05), 特に0.1 ppmF群と1 ppmF群においては増加が顕著であった(p < 0.01). また, 3から6日の比較的早い時期に平衡に達する様子が認められた. 高脱灰群ではいずれのフッ化物イオ

ン濃度群においても平衡に達することなく, わずかにΔF値が上昇する傾向が認められ, ベースラインと比較して有意な増加が1 ppmF群においてのみみられた(p < 0.01).

再石灰化溶液浸漬日数ごとに各フッ化物イオン濃度群間でΔF値において群間比較を行った(表3).

表3に示すように群間のΔF値の比較においては, 低脱灰群0 ppmF群と1 ppmF群間(p < 0.05)(6日目のみp < 0.01), 0.1 ppmF群と1 ppmF群間(p < 0.01)で再石灰化過程3, 6, 9, 12, 15日後のすべての観察において統計学的に有意な差が観察され, 0 ppmF群と0.1 ppmF群間では再石灰化過程3, 12日後の観察において統計学的に有意な差が観察された(p < 0.05). 一方, 高脱灰群では0 ppmF, 0.1 ppmF群, 1 ppmF群の3群間に有意な差は認めなかった(p > 0.05).

3. 回復率とフッ化物イオン濃度および脱灰時間の関係

再石灰化溶液に浸漬したのちの, 低脱灰群における回復率の変化および高脱灰群における回復率の変化をそれぞれ図1, 2に示す. 低脱灰群において回復率は3から6

表3 再石灰化溶液浸漬日数別の各フッ化物イオン濃度群間でのΔF値の比較

群間比較	再石灰化溶液への浸漬日数					
	0日目	3日目	6日目	9日目	12日目	15日目
低脱灰群内での比較	0 ppmF 群と 0.1 ppmF 群間	*			*	
	0.1 ppmF 群と 1 ppmF 群間	**	**	**	**	**
	0 ppmF 群と 1 ppmF 群間	*	**	*	*	*
高脱灰群内での比較	0 ppmF 群と 0.1 ppmF 群間					
	0.1 ppmF 群と 1 ppmF 群間					
	0 ppmF 群と 1 ppmF 群間					

* : p < 0.05, ** : p < 0.01

日後に平衡に達したのに対し、高脱灰群では再石灰化15日後まで平衡に達することなく回復率の上昇の様子が観察できた。低脱灰群において1 ppmF群の回復率は0 ppmF, 0.1 ppmF群の2群の回復率よりも高かった。なお、高脱灰群においては0 ppmF, 0.1 ppmF群, 1 ppmF群の3群間においては回復率に大きな違いは観察されなかった。

考 察

1. 初期う蝕試料の作製について

本研究で作製した初期う蝕試料は表1に示すように同じ時間脱灰溶液に浸漬しても、得られた脱灰試料のΔF値に大きなばらつきがみられた。これは本研究に用いたヒトエナメル質における個体差によるものと考えている。われわれは過去の研究において、表層エナメルの削除条件の異なるエナメル質サンプルを成分の異なる各種脱灰溶液に浸漬すると、ΔF値の減少速度とΔF値のばらつき程度に差がみられることを報告している^{25,26}。本研究には、過去の研究においてばらつきの少なかった鏡面研磨エナメル質試料を用い、安定した脱灰程度が得られる脱灰溶液を用いた。エナメル質に個体差が大きいことはよく知られており²⁷、ヒトエナメル質は入手が困難なこと、倫理的な理由から個体差が少なく、試料作成も容易である牛歯エナメル質を試料として用いた研究も多くみられる^{1,2,9,28-30}。牛歯研磨エナメル質は*in vitro*での脱灰/再石灰化研究にてヒト歯研磨エナメル質とよく似た性質を示したとの報告もあり^{11,31}、牛歯では脱灰がヒト歯と較べ早期に生じるため有用である¹¹との報告もある。今後は試料として牛歯を代用することも視野に入れ、ΔF値のばらつきの少ない試料を作製することも課題のひとつであると考えている。

2. 再石灰化に適切なフッ化物イオン濃度について

唾液中または歯垢中の低濃度フッ化物イオンが十分に

初期う蝕の再石灰化を促進するという多くの報告^{2,6}から、脱灰/再石灰化における低濃度フッ化物イオンの存在の重要性が強調されてきている。しかしながら、再石灰化を促進するフッ化物イオン濃度の値は個人のう蝕罹患性や、炭水化物摂取に伴う歯垢中pHの低下度の違いにより異なる²との報告がなされており、再石灰化の促進に適切なフッ化物イオン濃度について統一した見解が得られていないのが現状である^{32,33}。

フッ化物イオン含有の再石灰化溶液を用いた*in vitro*研究では、溶液中フッ化物イオン濃度が1 ppmFで再石灰化を促進することが報告されており^{28,34-37}、本研究の結果はこれらの報告と一致する。しかし、本研究においては0.1 ppmF条件下で再石灰化が促進される様子は観察されなかった。これまでに、0.03 ppmF条件下で再石灰化が促進された³⁸との報告がある一方、0.2 ppmF条件下では再石灰化は促進されなかったとの報告もある^{28,39}。すなわち、低濃度のフッ化物イオンの存在が再石灰化に及ぼす影響についてはさらなる検討の余地がある。

本研究で採用した再石灰化溶液のフッ化物イオン濃度モデルは、ヒト唾液中のフッ化物イオン濃度についての数多くの報告を根拠としている。これらの報告は水道水フッ化物濃度調整などの全身的にフッ化物を応用した後の唾液中フッ化物イオン濃度に関するものと、フッ化物歯面塗布/フッ化物歯磨剤/フッ化物洗口などの局所的応用後の唾液中フッ化物イオン濃度に関するものに大きく分けられる。ヒトの唾液中フッ化物イオン濃度は日中変動があるため一定の値を示すわけではないものの水道水フッ化物濃度調整が行われていない地域では唾液中フッ化物イオン濃度は0.02 ppmF以下との報告⁴⁰がある。それに対して水道水フッ化物濃度調整が行われている地域では0.04 ppmF程度と報告されている⁴⁰。一方、フッ化物の局所的応用を口腔内に行った際に、唾液中のフッ化物イオン濃度は応用直後から指数関数的な著しい減少を

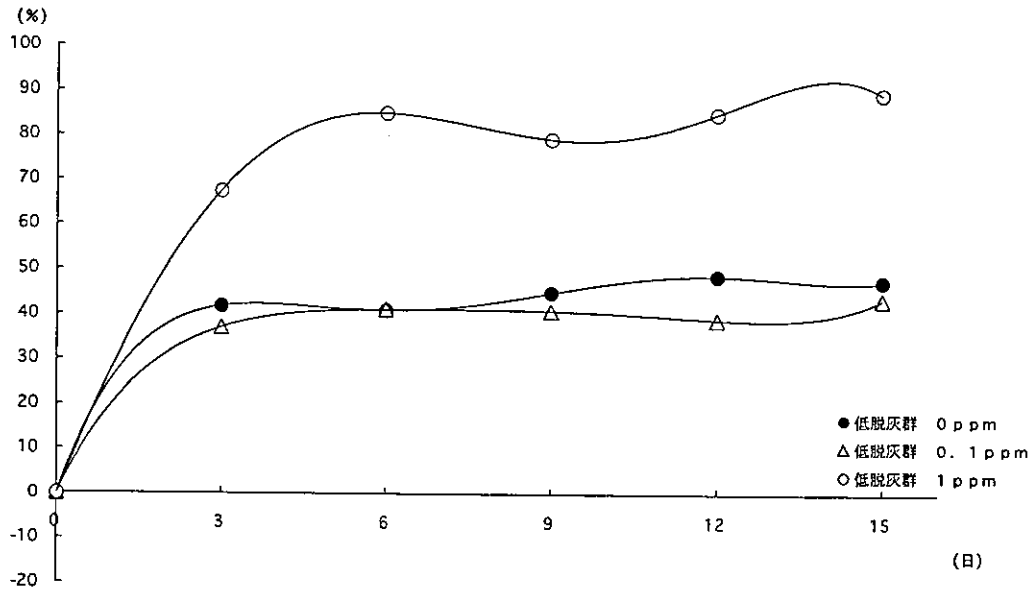


図1 再石灰化溶液浸漬過程における経時的な回復率の変化（低脱灰試料群）

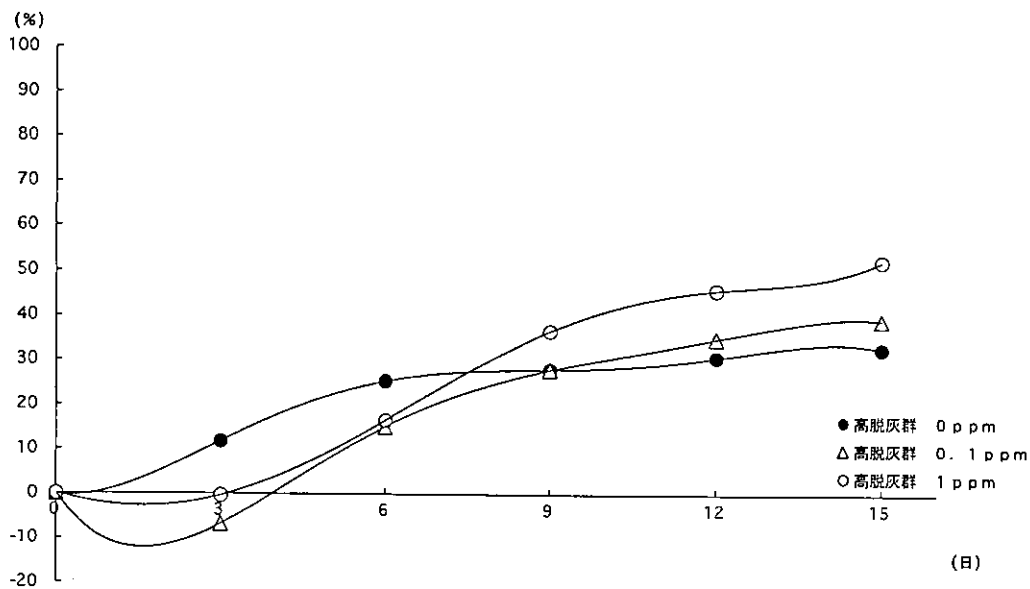


図2 再石灰化溶液浸漬過程における経時的な回復率の変化（高脱灰試料群）

示すことが報告されている⁴¹⁾。フッ化物含有ガムを用いた研究ではガムを噛んだ後の唾液中フッ化物イオン濃度が10分で1/10程度に、3~6時間すると元の値に戻ってしまうと報告している⁴²⁾。フッ化物含有歯磨剤を用いてブラッシングを行った際の唾液中フッ化物イオン濃度は、ブラッシング後30分から1時間後には1 ppmF程度であり、2時間後にはほぼ通常の値に戻ることが報告さ

れている⁴³⁾。フッ化物パーニッシュ/フッ化物歯面塗布/フッ化物洗口の1時間後の唾液中フッ化物イオン濃度はそれぞれ20 ppmF、10 ppmF、3 ppmFであるが、応用後3時間ではいずれも1 ppmF程度までフッ化物イオン濃度が減少してしまう^{43,44)}。またPrivate careにおいてフッ化物含有歯磨剤の使用を継続すると口腔内のフッ化物イオン濃度を0.1 ppmF程度に保つことができる^{44,45)}

との報告もある。

以上より、われわれは Private care, Professional care を想定し、再石灰化溶液のフッ化物イオン濃度をそれぞれ 0.1 ppmF, 1 ppmF と設定した。本 *in vitro* 研究の結果では低脱灰初期う蝕群において 0.1 ppmF のフッ化物イオン存在下で再石灰化が促進されなかったのに比べ、1 ppmF のフッ化物イオン存在下で再石灰化が促進されたため、初期う蝕に十分な再石灰化を起こすには Private care に加えて Professional care を行う重要性が示唆されたものと考えている。

3. 初期う蝕試料における再石灰化後の回復率について

初期う蝕試料を作製し *in vitro*, *in situ* 環境で再石灰化を観察した研究は多い¹⁰。初期う蝕試料の再石灰化による脱灰程度の変化は化学的分析法・微小硬度計・MR 法・QLF 法などにより評価される。しかしながら、評価手段に用いられる指標はそれぞれ異なり、得られた結果を比較する際の指標として、初期う蝕試料における脱灰程度に対し、再石灰化により回復した程度を表す回復率という指標が用いられる^{8,15,47,48}。さらに、回復率という指標を用いることにより、病変の大きさが異なる場合でも再石灰化による脱灰程度の変化を観察することが可能である。なお、初期う蝕試料の脱灰度の大きさが再石灰化に影響を与えるとの報告もあり^{14,15}、初期う蝕に生じた再石灰化を評価するうえで回復率という指標を用いることは有用であると考えている。

Pretty ら⁴⁹は、*in vitro* における初期う蝕の回復率を QLF 法にて観察しており、12 日間脱灰したエナメル質表層下脱灰試料を 54 日、0.2 ppmF のフッ化物イオンを含む再石灰化溶液に浸漬した際、58% の回復率が観察されたと報告している。本研究では 0.1 ppmF 群における回復率は高脱灰群にて 39%、低脱灰群にて 43% と、Pretty らの報告においてより高い回復率が観察されている。これはわれわれがフッ化物イオン濃度 0.1 ppmF の再石灰化溶液に浸漬しているのに対して、Pretty らが浸漬している溶液は 0.2 ppmF で実施していること、われわれが再石灰化溶液へ 15 日浸漬しているのに対して 54 日間浸漬していることが原因と考えている。

Mellberg¹⁰はさまざまな脱灰程度を有するエナメル質試料をヒト口腔内に設置し、フッ化物配合歯磨剤とプラセボ歯磨剤を作用させた *in situ* 研究にて、脱灰程度の小さい試料では再石灰化は観察されずに脱灰が観察され、脱灰程度の大きい試料では再石灰化が観察されたと報告している。Mellberg は脱灰程度の低い(脱灰深度の浅い)病変では、脱灰病変底部の無機質が拡散し容易に外部へ到達するのに比べ、脱灰程度の高い(脱灰深度の深い)病

変では脱灰病変底部の無機質が拡散しても底部から表層までの距離が長いことにより外部には外部に到達せず、到達する前に再度無機質が沈着する結果であると研究結果について考察している。本研究では、再石灰化溶液中フッ化物イオン濃度 1 ppmF 群において再石灰化溶液浸漬 15 日後に高脱灰群で 52% の回復率が得られたのに対し、低脱灰群では 89% と高い回復率を観察し、低脱灰群にて特に高い回復率が観察された。すなわち、本研究では初期脱灰程度の少ない試料においてより高い回復率が認められた。このように本研究では Mellberg の報告と全く反対の状態を示した。*in vitro* 研究と *in situ (in vivo)* 研究の結果に大きなずれが生じることについては、Arends ら⁵⁰が報告している。この差異については *in vivo* において歯垢中の pH は食事の摂取などにより揺れ動くのに対し、*in vitro* では浸漬している再石灰化溶液の pH が一定であるために、より安定した再石灰化が起こり、結果として高い回復率が生じるためであると考えている。また、*in vivo* 環境では唾液中の有機成分が無機成分と競合し、再石灰化の程度が *in vitro* 環境よりも低下する⁵¹、すなわち唾液成分が再石灰化を抑制している可能性が考えられる¹¹。唾液中のタンパク質、脂質などの有機成分がエナメル質の脱灰、再石灰化現象に与える働きは解明されたとはいえず、今後の研究課題と考えている。

低脱灰試料群のいずれのフッ素濃度イオン群も 3 日から 6 日後の間で平衡に達した。一方、高脱灰試料では回復率は初期の上昇度は低脱灰群よりも小さいが、浸漬を続けるあいだ回復率は平衡に達することなく上昇し続けた。これは高脱灰試料においては回復率が平衡に達するまで 15 日以上期間を要したためと考えている。脱灰したエナメル質試料を再石灰化した際、再石灰化による回復率が比較的初期に平衡に達してしまい、完全な回復が得られなかった理由はエナメル表層に無機質が沈着することで表層エナメル質の微小な間隙を塞いでしまい、初期う蝕病変部へのミネラル供給が阻害される^{8,9,12,20}ためと考えている。なお表層エナメル質を酸処理することにより、人工的に表層エナメル質の微小な間隙を増加させて再石灰化を行った際には、酸処理しない場合に比べ明らかに高い回復率を示したとの報告もあり⁸、初期う蝕試料表面の状態をどのようにコントロールして再石灰化による高い回復率を実現するのが今後の課題である。

結 論

1. QLF 法は経時的に人工的ヒトエナメル質脱灰試料における再石灰化過程を観察することができ、QLF 法は

ヒトエナメル質における脱灰/再石灰化の観察に有用であることがわかった。

2. 本 *in vitro* 研究にて、脱灰程度の低い初期う蝕に対しては再石灰化溶液中の 1 ppmF のフッ化物イオンの存在が特に再石灰化を促進することがわかった。

3. 0 ppmF と 0.1 ppmF のフッ化物イオン濃度の再石灰化溶液に浸漬した試料間では回復率に差が認められず、0.1 ppmF のフッ化物イオン濃度は再石灰化を促進しなかったことが示唆された。

謝辞：本研究を行うにあたり終始ご協力を賜りました大阪歯科大学口腔衛生学講座の三宅達郎講師、上根昌子研究技術員、土居貴士非常勤講師に厚くお礼申し上げます。

なお本研究の一部は、厚生労働科学研究費補助金(医療技術評価総合研究事業：課題番号 H15-医療-019)、文部科学省科学研究費補助金(基盤研究 B2：課題番号 15390658) および平成 15 年度、平成 16 年度大阪歯科大学共同研究助成(課題番号：B 02-02)によって行われた。

文 献

- 1) Iijima Y, Takagi O, Ruben J et al. : *In vitro* remineralization of *in vivo* and *in vitro* formed enamel lesion. *Caries Res* 33 : 206-213, 1999.
- 2) Ismail AI, Brodeur JM, Gagnon P et al. : Prevalence of non-cavitated and cavitated carious lesions in a random sample of 7-9 year school children in Montreal Quebec. *Community Dent Oral Epidemiol* 20 : 250-255, 1992.
- 3) Lammers PC, Borggreven JMPM, Driessens FCM : Influence of fluoride and pH on *in vitro* remineralization of bovine enamel. *Caries Res* 26 : 8-13, 1992.
- 4) Featherstone JDB : Prevention and reversal of dental caries : Role of low level fluoride. *Community Dent Oral Epidemiol* 27 : 31-40, 1999.
- 5) ten Cate JM : Review on fluoride, with special emphasis on calcium fluoride mechanisms in caries prevention. *Eur J Oral Sci* 105 : 461-465, 1997.
- 6) Borsboom PCF, van der Mei HC, Arends J : Enamel lesion formation with and without 0. 12 ppmF in solution. *Caries Res* 19 : 396-402, 1985.
- 7) Page DJ : A study of the effect of fluoride delivered from solution and dentifrices on enamel demineralization. *Caries Res* 25 : 251-255, 1991.
- 8) Al-Khateeb S, Exterkate R, Angmar-Mansson B et al. : Effect of acid-etching on remineralization of enamel white spot lesions. *Acta Odontol Scand* 58 : 31-36, 2000.
- 9) ten Cate JM, Duijsters PPE : Alternating demineralization and remineralization of artificial enamel lesions. *Caries Res* 16 : 201-210, 1982.
- 10) Backer Dirks. Post-eruptive changes in dental enamel. *J Dent Res* 45 : 503-511, 1966.
- 11) ØGAARD B, RØLLA G : Intra-oral models : Comparison of *in situ* substrates. *J Dent Res* 71 : 920-923, 1992.
- 12) Arends J, Christoffersen J : The nature of early caries lesions in enamel. *J Dent Res* 65 : 2-11, 1986.
- 13) Iijima Y, Takagi, O. *In situ* acid resistance of *in vivo* formed white spot lesions. *Caries Res* 34 : 388-394, 2000.
- 14) Mellberg R : Relationship of original mineral loss in caries-like lesions to mineral changes *in situ*. *Caries Res* 25 : 459-461, 1991.
- 15) Strang R, Damato FA, Creanor SL : The effect of baseline lesion mineral loss on *in situ* remineralization. *J Dent Res* 66 : 1644-1646, 1987.
- 16) Hafstorm-Bjorkman U, Sundstorm F, de Josselin de Jong E et al. : Comparison of laser fluorescence and longitudinal microradiography for quantitative assessment of *in vitro* enamel caries. *Caries Res* 26 : 241-247, 1992.
- 17) Al-Khateeb S, ten Cate JM, Angmar-Mansson B et al. : Quantification of formation and remineralization of artificial enamel lesions with a new portable fluorescence device. *Adv Dent Res* 11 : 502-506, 1997.
- 18) de Josselin de Jong E, Sundstorm F, Westerling H et al. : A new method for *in vivo* quantification of changes in initial enamel caries with laser fluorescence. *Caries Res* 29 : 2-7, 1995.
- 19) Ten Bosch JJ. : Summary of research of quantitative light-induced fluorescence. Early detection of dental caries II. Indianapolis, Indiana University, 2000, pp. 261-277.
- 20) Lagerweij MD, van der Veen MH, Ando M et al. : The validity and repeatability of three light-induced fluorescence systems : An *in vitro* study. *Caries Res* 33 : 220-226, 1999.
- 21) 野村裕信, 上村参生 : 原子間力顕微鏡によるエナメル質表層下脱灰部表面の微細構造およびその表面性状. *口腔衛生会誌* 46 : 187-198, 1996.
- 22) ten Bosch JJ, Angmar-Mansson B : A review of quantitative methods for studies of mineral content of intra-oral incipient caries lesions. *J Dent Res*. 90 : 2-14, 1991.
- 23) Al-Khateeb S, Exterkate RAM, de Josselin de Jong E et al. : Light-induced fluorescence studies on dehydration of incipient enamel lesions. *Caries Res* 36 : 25-30, 2002.
- 24) Fontana M, Yanikoglu FC, Ozturk F et al. : Comparison of QLF, ultrasound and confocal microscopy in the measurement of demineralization/remineralization of enamel lesions developed on natural smooth surfaces. Early detection of dental caries II. Indianapolis, Indiana University, 2000, pp. 301-316.
- 25) 川崎弘二, 高島隆太郎, 上村参生ほか : エナメル質初期脱灰試料作成法に対するQLF観察. *口腔衛生会誌* 53 : 376, 2003.
- 26) 高島隆太郎, 川崎弘二, 神原正樹 : エナメル質表層下脱灰試料の作成に及ぼす脱灰溶液の影響. *歯基礎誌* 45 : 297, 2003.
- 27) 中嶋省志 : ヒトエナメル質の脱灰感受性について. *Cariology Today* 1 : 52, 2000.
- 28) Silverstone LM : The effect of fluoride ions on the remineralization of enamel lesions *in vitro*. *Caries Res* 11 : 134, 1977.
- 29) Amjad Z, Nancollas GH : A kinetic and morphological study of mineralization of bovine tooth enamel surfaces. *Archs Oral Biol* 25 : 95-101, 1980.
- 30) Lammers PC, Borggreven J, Driessens FCM : The influence

- of fluoride on *in vitro* remineralization of bovine enamel. Bull Group Int Rech Sci Stomatol Et Odontol 32 : 199-203, 1989.
- 31) Koulourides T, Housch T : Hardness testing and microradiography of enamel in relation to intraoral de- and remineralisation. In : Edgar WM and Leach SA editors. Demineralisation and remineralisation of the teeth. IRL press, Oxford, 1986, pp 255-272.
 - 32) Hellwig E, Lussi A : What is the optimum fluoride concentration needed for the remineralization process? Caries Res 35 (Suppl. 1) : 57-59, 2001.
 - 33) Ismail AL. What is the effective concentration of fluoride? Community Dent Oral Epidemiol 23 : 246-251, 1995.
 - 34) Feagin FF, Jeansonne BG : Effective fluoride concentrations to promote apatite mineralization at the enamel surface. Ala J Med Sci 10 : 107-114, 1973.
 - 35) ten Cate JM, Arends J : Remineralization of artificial enamel lesions *in vitro*. Caries Res 11 : 277-286, 1977.
 - 36) Wei SHY, Wefel JS : *In vitro* interactions between the surfaces of enamel white spots and calcifying solution. J Dent Res 55 : 135-141, 1976.
 - 37) Arends J, De Vries J, Ruben J : The effect of an experimental mouthrinse on enamel lesion remineralization *in vitro*. J Biol Buccale 20 : 63-67, 1992.
 - 38) Featherstone JDB, O' Reilly MM, Shariati M et al. : Enhancement of remineralization *in vitro* and *in vivo*. In : Leach SA, editor. Factors relating to demineralization and remineralization of the teeth. IRL press, Oxford, 1986, pp 23-34.
 - 39) Varughese K, Moreno EC : Crystal growth of calcium apatites in dilute solutions containing fluoride. Calcified Tiss Int 33 : 431-439, 1981.
 - 40) Oliveby A, Ekstrand J, Lagerlof F : Effect of salivary flow rate on salivary fluoride clearance after use of a fluoride-containing chewing gum. Caries Res 8 : 146-149, 1987.
 - 41) Fejerskov O, Ekstrand J, Burt BA : Fluoride in Dentistry. Munksgaard, Copenhagen, 2nd ed., 1996, pp. 216-219.
 - 42) Ekstrand J, Lagerlof F, Oliveby A. : Factors relating to demineralization and remineralization of the teeth. In : Leach SA editor. IRL press, Oxford, 1986, pp. 91-99.
 - 43) Ekstrand J, Spark CJ, Vogel G : Pharmacokinetics of fluoride in man and its clinical relevance. J Dent Res 69 (Special issue) : 550-555, 1990.
 - 44) Twetman S, Larsson KS, Modeer T : Fluoride concentration in whole saliva and separate gland secretions after topical treatment with three different fluoride varnishes. Acta Odontol Scand 57 : 263-266, 1999.
 - 45) ten Cate JM, Duijsters PP : Influence of fluoride in solution on tooth demineralization. II. Microradiographic data. Caries Res 17 : 513-519, 1983.
 - 46) Campus G, Lallai MR, Carboni R : Fluoride concentration in saliva after use of oral hygiene products. Caries Res 37 : 66-70, 2003.
 - 47) Iijima Y, Koulourides T : Mineral density and fluoride content of *in vitro* remineralized lesions. J Dent Res 67 : 577-581, 1988.
 - 48) Lagerweij MD, ten Cate JM : Remineralisation of enamel lesions with daily application of a high-concentration fluoride gel and a fluoridated toothpaste : An *in situ* study. Caries Res 36 : 270-274, 2002.
 - 49) Pretty IA, Pender N, Edgar WM et al. : The *in vitro* detection of early enamel de- and re-mineralization adjacent to bonded orthodontic cleats using quantitative light-induced fluorescence. Eur J Orthod 25 : 217-223, 2003.
 - 50) Arends H, ten Bosch JJ : *In vivo* de- and remineralization of dental enamel. In : Leach SA, editor. Factors relating to demineralization and remineralization of the teeth. IRL press, Oxford, 1986, pp 1-11.
 - 51) Gelhard TBFM, Arends J : *In vivo* remineralization of artificial subsurface lesions in human enamel I. J Biol Buccale 12 : 49-57, 1984.

著者への連絡先 : 高島隆太郎 〒573-1121 大阪府枚方市
楠葉花園町 8-1 大阪歯科大学口腔衛生学講座
TEL : 072-864-3059
FAX : 072-864-3159
E-mail : takasima@stu.osaka-dent.ac.jp

The QLF Observation of Remineralization on Artificial Enamel Lesions

Ryutaro TAKASHIMA, Koji KAWASAKI*, Mibu UEMURA*, Reiko SAKAI,
Tomikiyo KAWAKAMI*, Takashi KOMURO*, Noriyuki NISHIJIMA*,
Motonobu TAJIME*, Minoru TANABE*, Miki KOMURO* and Masaki KAMBARA*

Division of Preventive and Community Dentistry,
Osaka Dental University, Graduate School of Dentistry

*Department of Preventive and Community Dentistry, Osaka Dental University

Abstract : The purpose of this study is to investigate the remineralization process with QLF (quantitative light-induced fluorescence ; Inspektor Research Systems, The Netherlands) method on artificial enamel lesions. 30 human enamel specimens (4 mm in diameter) were mounted on an acrylic rod and polished. Lesions (low demineralization and high demineralization) were formed in specimens by immersion for 12 and 48 hours respectively in demineralizing solution (Lactic acid ; 100 mM, CaCl₂ ; 3 mM, KH₂PO₄ ; 10 mM, NaCl ; 100 mM, pH 4.5). Lesion severity in the two groups were measured by the QLF method. QLF is a method to quantify the severity of incipient caries lesions in the smooth tooth surface without affecting the tooth. It is based on the decrease in the intensity of Enamel-Dentin auto-fluorescence as lesions are formed. The specimens were immersed for 15 days in remineralizing solution (CaCl₂ ; 1.5 mM, KH₂PO₄ ; 5 mM, NaCl ; 100 mM, casein ; 20 ppm, NaNO₃ ; 0.2%, sodium fluoride, pH 6.5) which contained 0, 0.1 and 1 ppm fluoride (renewed every 3 days). The surface images of the specimens were recorded with QLF on days 3, 6, 9, 12 and 15 during the remineralizing process, and the remineralization rate was calculated from the variations in the fluorescence intensity. A high remineralization rate was observed in the 1 ppm F group (low demineralized specimens ; 89%, high demineralized specimens ; 52%). For the low demineralized specimens, the remineralization rate at 1 ppm F was higher than the rates at 0 and 0.1 ppm F. In contrast, the high demineralized specimens showed no significant difference between the remineralization rates in each of the 0, 0.1 and 1 ppm F groups. The remineralization rate at 0 ppm F was not different from 0.1 ppm F in both the low and high demineralized specimens. It was concluded that the 1 ppm fluoride ion works as an accelerator of remineralization in relatively low demineralized enamel lesions in this *in vitro* study.

J Dent Hlth 55 : 41 – 49, 2005

Key words : Incipient caries, Demineralization, Remineralization, QLF (quantitative light-induced fluorescence)

Reprint requests to R. TAKASHIMA, Department of Preventive and Community Dentistry, Osaka Dental University, 8-1 Kuzuhahanazono-cho, Hirakata, Osaka 573-1121, Japan
TEL : 072-864-3059/FAX : 072-864-3159/E-mail : takasima@stu.osaka-dent.ac.jp

***8 画像解析を応用した初期歯肉炎診査**

○伊津 元博・神原 正樹* (大阪歯大・大学院・口腔衛生, *大阪歯大・口腔衛生)

歯肉炎の診査は、視診による色調の変化や腫脹・発赤の有無、WHO プローブを用いた歯肉の出血など客観的診査を中心として行われてきているが、これらの診査は診査結果の信頼性・再現性・妥当性が低いのが現状である。歯肉の客観的な診査方法を確立することは、歯肉炎や歯周疾患の予防に必要不可欠であり、歯肉炎のリスク診断の予測精度を向上させることにつながる。これまで行われてきた歯肉の客観的観察方法には、特定部位の歯肉を写真撮影し、得られた画像を解析して得られた定量値で評価する方法がある。本研究は、2種類の特殊な条件下で撮影した歯肉のデジタル画像を各々の解析方法で得られた定量値により、炎症性歯肉の経日的変化を客観的に観察する目的で行った。

23~25歳の成人15人の上顎右側中切歯歯肉を照明条件と撮影距離を一定に保つためのアタッチメントを有したCCDカメラ(41万画素)(コアフロント社製, 東京)を用いて撮影した。次に、同部位の歯肉をQuantitative Light-Induced Fluorescence (QLF)法の撮影条件下にてINSPEKTOR PRO™ (Inspektor Research Systems B.V. 社製, オランダ)を用いて撮影した。その

後、被験者には7日間口腔内清掃の停止を指示した。口腔内清掃停止1日, 2日, 3日, 5日, 7日後に口腔内診査およびQLF撮影を行った。得られた口腔内写真のデジタル画像は画像解析ソフト IMAQ Vision Builder 6 (National Instruments 社製, アメリカ)を用い、歯肉の表面状態を定量化するとともに、仮想三次元処理により歯肉を視覚化した。また、QLF デジタル画像はQLF法画像解析ソフト Inspektor Pro 1.2.0.4™ (Inspektor Research Systems B.V. 社製, オランダ)を用い、歯肉の色調の強さを定量化し、歯肉の変化の検討を行った。

口腔内写真から仮想3次元処理を行った結果、歯肉の表面的形状の経日的変化が定量化されるとともに視覚的に歯肉炎症の広がりを見ることができた。また、QLF法による画像解析より、歯肉の色調として赤色部分の経日的変化を定量化することができ、この値から健全から炎症への歯肉の変動は歯肉中央部から辺縁歯肉、さらに付着歯肉側へ変化することが明らかになった。

これらの結果より、歯肉のデジタル画像を解析して得られた定量値により客観的に歯肉の状態を表現することができ、炎症性歯肉の経日的変化を観察できたことにより、これらの方法が歯肉の客観的診査に有効であることが示唆されたと考えている。

Early detection of gingivitis by image analysis

Motohiro Izu and Masaki Kambara* (Graduate Sch. Dentistry (Dept. Preventive and Community Dentistry) and *Dept. Preventive and Community Dentistry, Osaka Dental Univ.)

We investigated the use of two types of digital image analysis to objectively evaluate gingival condition. Digital im-

ages were taken of gingiva using two special CCD camera systems. The subjects were requested not to brush for 7 days. Analysis of the gingival images showed that changes in the surface form and color could be objectively expressed. We found that this apparatus could be useful for the objective evaluation of gingivitis because changes could be expressed quantitatively.



Ca ion permeation through liposome membranes with heat generation by square-wave electric field

Hideo Matsumura^{a,*}, Vassil Neytchev^b, Nelly Terezova^b, Iana Tsoneva^b

^a *Life-Electronics/Photonics, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology, Central 2, Tsukuba Center, Tsukuba-shi 305-8568, Japan*

^b *Institute of Biophysics, Bulgarian Academy of Sciences, 1113 Sofia, Bulgaria*

Received 5 September 2003; accepted 17 October 2003

Abstract

Phospholipid liposomes that contain Ca ions in inside compartment were subjected to external alternating electric fields of square wave form at several frequencies: 10, 100 Hz, 1, 10, 100 kHz. The leakage of Ca ions from inside to bulk solution caused by the electric fields was detected by the fluorescence change due to Ca-Quin 2 (fluorescent dye) complex formation in the bulk aqueous solution. The temperature increments of the sample solution in the chamber were also measured. The amplitude of the electric field and time interval between application of the electric field were varied. The frequency dependency of both the leakage of Ca ion and the temperature increments was observed. It was observed that the efficiency of the leakage had a minimum at 1 kHz. The origin of the frequency dependency of the leakage is discussed, and it is concluded that the energy consumption on a microscopic scale in the liposome membrane zone can be the reason for membrane permeation in this experimental system.

© 2003 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Electroporation; Electroporation; Liposome; Electric field; Permeation; Membrane

1. Introduction

Until now a number of researchers have studied electroporation or electroporation of biological cells and model lipid vesicles (or black lipid membranes), both experimentally and theoretically [1–5]. The generally accepted concept of permeation in lipid membranes caused by externally applied electric fields is based on stochastic pore formation in the membranes followed by a molecular transport through the pores by diffusion, electromigration, and/or electroosmosis [6]. The pore formation is reversible, i.e. the pore is sealed again in some time elapsed after switching off the external fields. It has been shown that the electric field intensity and its duration are crucial factors for electroporation by pulse application. The critical voltage between the membranes (the transmembrane potential), 200 mV to 1 V depending on the sample, is lower than that of dielectric break down of the lipid bilayer membranes. Electric field applied for microseconds to milliseconds is needed for

sufficient transport of some molecules through the membrane pore. When a pulse electric field is applied to the sample, the wave form and the number of pulse are also important factors [7–9]. Another factor is the solution condition [10,11]. Deformation of membrane particle has been reported connected with the electroporation [12,13]. Also, some endocytotic-like process has been observed in connection with electric incorporation of molecules into cells and vesicles at low electric fields [14]. However, the detailed mechanism of electroporation has not yet completely understood, and various extensive studies have been made until now.

Besides the fundamental studies aimed to elucidate the physicochemical mechanism of electroporation, the effect of electric fields on membrane systems finds applications such as in electrochemotherapy [15–17] or electric gene insertion into cells [18]. Another promising field nowadays is the sterilization of various substances [19,20].

Liposomes have been studied to utilize as drug delivery capsules. We have tried to combine the electric treatment with the drug delivery concept. That is, it is valuable that we can release pharmacies when we need them in a certain location at a certain time by application of electric fields, for

* Corresponding author. Tel.: +81-298-61-5534; fax: +81-298-61-5540.

E-mail address: hideo-matsumura@aist.go.jp (H. Matsumura).

example just before the treatment of electrochemotherapy. The purpose of present study is how the applied electric field releases molecules from the inside of liposomes. We have already reported the release of fluorescent molecules from liposomes [21]. Here, Ca ion release from the liposomes at different values of the parameters such as frequency of the alternating square wave electric fields is reported.

2. Materials and methods

2.1. Materials

Egg yolk phosphatidylcholine (PC) which was purchased from Sigma Chemical Co. Ltd., was used as liposome forming lipid without further purification. The lipid was dissolved in ethanol and then the solvent was removed by N₂ gas blowing and the lipid thick membrane was deposited on the wall of glass test tube. Liposomes were prepared by using the vortex mixing with a CaCl₂ aqueous solution (0.2 M) and the resulting dispersion produced was treated with the extruder apparatus, i.e. it was filtrated repeatedly four times through 1 and 0.2 μm pore nuclear pore membrane filters by using high pressure of N₂ gas. The sample dispersion was then dialyzed against NaCl aqueous solution (typically 0.2 M) by semi-permeable tube (cut off M.W.: 10,000, Spectra Pore Co.) to remove Ca ions outside of liposome particles. The size of liposome particles produced was measured by a dynamic light scattering apparatus (Photal Otsuka, LPA 3000) and the diameter was around 200 nm. The lipid content in the dispersion was about 10 mg/ml. Fluorescent dye, Quin 2, was purchased from Dojindo (Japan) and used for the detection of Ca ions. All inorganic chemicals were analytical grade purchased from Wako Chemical, Co. (Japan). All of the aqueous solutions were prepared by using deionized and distilled water produced by the Autostill system (WG 240, Yamato Co., Japan).

2.2. Apparatus of electropermealization

A synthesized functional generator (WAVETEK model 23), was used as a signal source to produce 10–100 kHz square wave alternating electric fields. The signal was amplified by a high speed-bipolar amplifier (NF ELECTRONIC INSTRUMENTS, Japan, HSA4014). Typically the voltage used was up to 140 V peak to peak (abbreviated as 140 Vpp). The duration of electric field application was controlled by a timer system, and was usually 1 s. The voltage was applied between two Pt-wire electrodes 1 mm apart, 1 mm \varnothing \times 5 mm length. Because of this electrode configuration, electric fields are inhomogeneous. Therefore, in this report the “filed” is usually represented by the applied voltage. In some case the filed intensity is formally calculated as (Vpp/2) divided by the electrode separation (1 mm). The sample chamber contained 2–3 ml of sample solution that was stirred continuously by a magnetic bar. The chamber was immersed in

water bath which was temperature controlled by a cooled water circulating system (LAUDA RC6). The temperature of the sample solution was measured with a thermometer of thermocouple type (Sato Keiryoki, Japan, Delta). The temperature of the sample before application of the voltage was controlled to be 7 or 25 °C.

2.3. Protocol of electropermealization

Generally, the liposome membrane does not show permeation for metal cation like Ca ion, but the application of electric fields results in membrane permeation for Ca ion. This can be detected by measuring Ca ion leakage from liposome utilizing Quin 2. The content of the Ca-Quin 2 complex was measured with a spectrofluorimeter (Jasco, Japan, FP-550A) by exciting it at light wavelength of 339 nm and detecting at 492 nm.

The regular electropermealization protocol in this study was as follows: 0.2 ml dispersion of the liposome which contains 0.2 M CaCl₂ aqueous solution inside liposomes was mixed with 1 ml of NaCl aqueous solution and 1 ml of Quin 2 aqueous solution (8×10^{-4} M). Upon mixing, the fluorescent intensity (FI) was measured and set as the reference intensity of FI. The mixed sample dispersion was poured into a small glass test tube in the water bath and the temperature of the sample was measured with the thermometer. After a few minutes, the Pt electrodes were immersed in the dispersion and the electric voltage was applied to the sample. During the experiments, the sample solution in the tube was continuously stirred with a small magnetic bar. The temperature and FI were then measured. The differences of FI and those of temperature before and after the application of electric voltage, ΔE_m and ΔT were calculated, respectively. The values of FI approached a stationary level after several tens minutes, because the FI had a temperature dependency. The experiments were conducted at least two times. Some control experiments were made such as the electric effects on Quin 2 molecule itself. There showed no detectable effects on FI.

2.4. Impedance measurements

The impedance of the system of two Pt wire electrodes with salt aqueous solution was measured by changing the applied voltage with a frequency response analyzer (Solartron, 1260) through an impedance interface (Solartron, 1294), which was controlled and the data were collected by a computer system (IBM PC).

3. Results

3.1. Time dependency of the leakage of Ca ions

Liposome membranes make a barrier against the ion permeation through the membranes because of hydrophobic

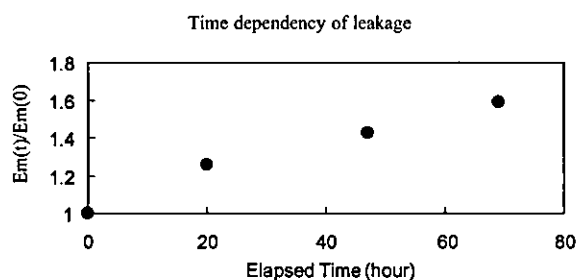


Fig. 1. Time dependency of Ca ion leakage from PC liposome inside to bulk aqueous solution.

nature of hydrocarbon chains of lipid molecules. However, its ability depends on their contents of molecule species in the membranes. PC membranes utilized in this study showed small leakage for Ca ions. Fig. 1 shows a typical time dependence of the leakage of Ca ions through the membranes. The increase in fluorescence intensity caused by the complex formation of leaked Ca ions from the liposomes with Q2 was observed. However, the electric field effects on Ca ion permeation could be observed at each point of the time course. This means the natural leakage can be ignored in electro-permeation experiments.

3.2. Frequency dependency of electropermeabilization

To observe the effects of frequency of electric fields and compare the results with the previous report, we have conducted experiments at similar experimental condition to those we have already reported [21]. The situation is now reversed in that the liposomes contain Ca ions inside them (the concentration is 0.1 M), while in [21] the liposomes contained Quin 2 molecules inside. Fig. 2 shows the typical frequency dependencies of FI (ΔE_m). In these experiments, the applied voltage was 125 V peak to peak. The salt condition of outside solution was 0.02 M NaCl. The duration of the electric field application was 30 s. Initial temperature of the samples was 25 °C. We can see a minimum efficiency

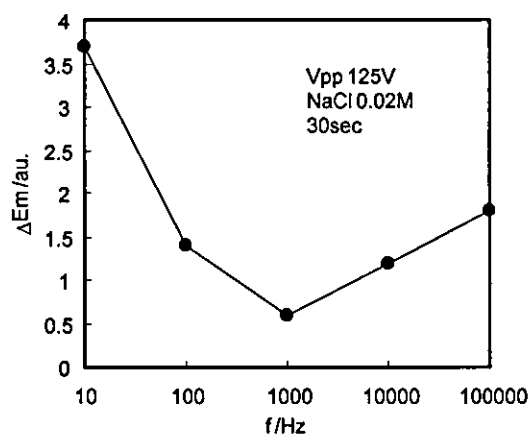


Fig. 2. Frequency dependency of electropermeation efficiency.

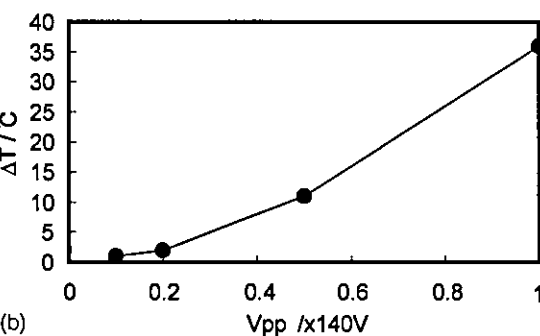
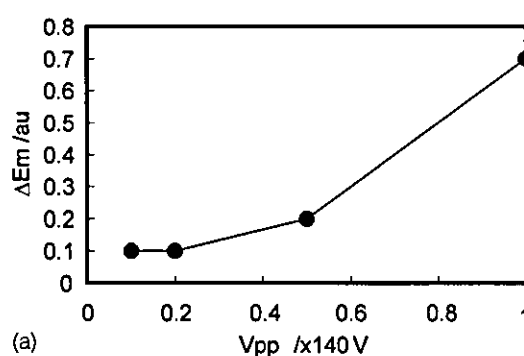


Fig. 3. Voltage dependency of (a) electropermeation efficiency and (b) temperature increment.

of electropermeabilization at 1 kHz. Similar tendency with a minimum was previously reported.

3.3. Scheme of application of electric fields

The frequency of electric field was selected to be 100 kHz to diminish any electrode reaction and to increase permeation effects. The applied voltage was 140 V peak to peak. The duration of electric field application was 1 s (ON time) followed by a pause (zero electric field) of 5 s (OFF time). This sequence was repeated N times within the same experiment. The sample was immersed in water bath controlled at 7 °C. The sample was the mixture of 0.2 ml of the liposomes which contains 0.2 M $CaCl_2$ aqueous solution in inside and are dispersed in 0.2 M NaCl solution, 1 ml of NaCl aqueous solution (0.2 M), and 1 ml of Quin 2 aqueous solution (8×10^{-4} M).

3.3.1. Effect of the intensity of electric fields

Fig. 3a and b show the effect of intensity of electric field on ΔE_m and ΔT , respectively. Above 75 Vpp (peak to peak) the effect was significant for the both quantities, ΔE_m and ΔT . This corresponds to the field intensity of 375 (750/2) V/cm. The both quantities have a similar tendency for the intensity of the fields.

3.3.2. Effect of the OFF time

Fig. 4a and b show the dependency of ΔE_m and ΔT on the switch off time between two ON times of the electric fields. The number of the sequence of the electric fields was 7.

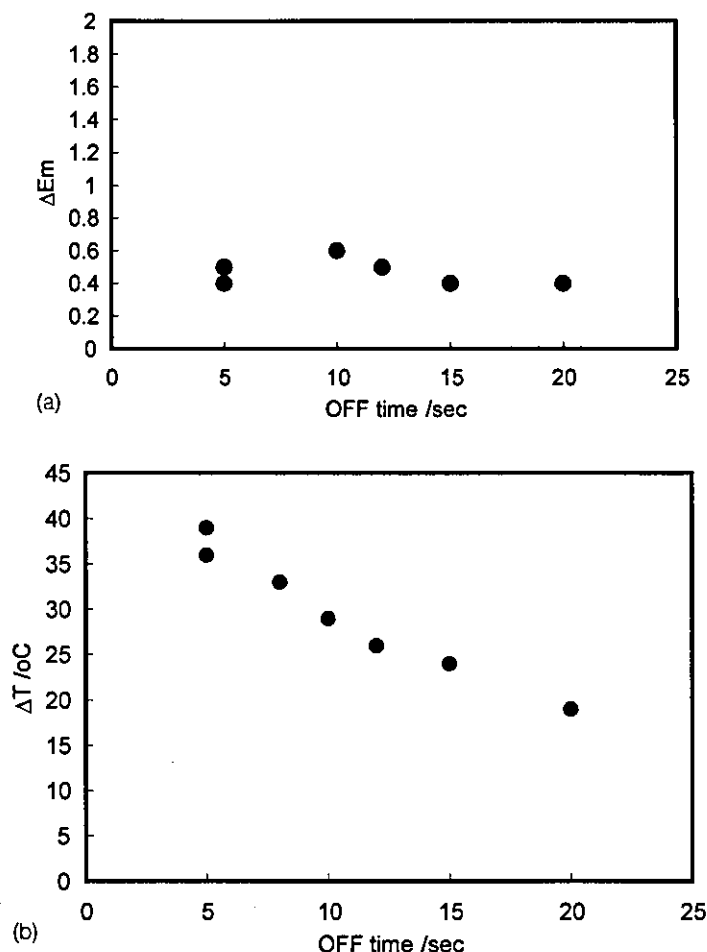


Fig. 4. (a) Electroporation efficiency vs. time interval between two applied square wave voltages. (b) Temperature increment vs. time interval between two applied square wave voltages.

There was almost no effect on ΔE_m but ΔT decreases with the increase in OFF time. No relationship between ΔE_m and ΔT was observed.

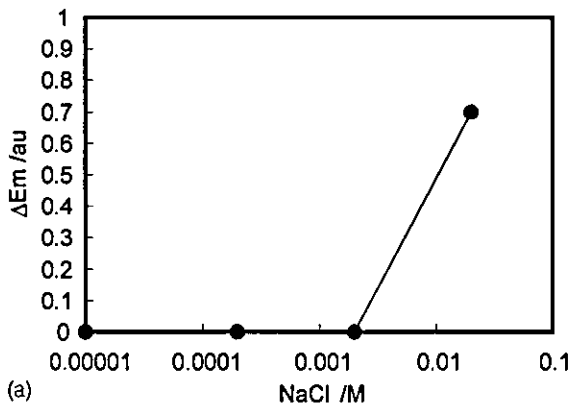
3.4. Effect of the solution condition

Ionic condition can alter the feature of electroporation. We tried to conduct experiments with changing ionic concentration of ambient solution. Fig. 5a and b show the dependency of concentration of NaCl in ambient solution on ΔE_m and ΔT , respectively. In this case, the liposomes contain 0.1 M CaCl_2 and are dispersed in 0.01 M sucrose aqueous solution to reduce osmotic pressure effect on permeation. Various concentrations of NaCl in 0.01 M sucrose aqueous solutions were utilized. The electric voltage was 125 V peak to peak and the frequency was 100 kHz. The duration of electric field application was 30 min. The experiments were conducted at 25 °C. The most concentrated condition in this experiment showed drastic increase in both ΔE_m and ΔT . The features of the both dependencies were similar. To avoid such greater increase in sample temperature at higher ionic conditions, additional experiments were

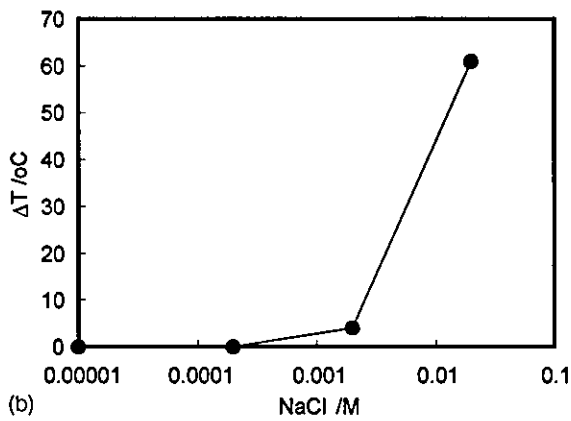
conducted by the set of ON–OFF sequence of the electric fields at 7 °C. The voltage was 140 V peak to peak, the frequency was 100 kHz, ON time 1 s, OFF time 5 s and $N = 7$. Again, ΔE_m and ΔT clearly increased with the increase in NaCl concentration in a similar manner.

3.5. Electrode reaction

It has been reported that even short high pulse application causes the dissolution of ferrous ions from stainless steel electrodes [22,23]. Therefore, to observe the effect of electrode reaction, impedance measurements at various voltages applied between the two Pt electrodes in the same salt condition for electroporation experiments were conducted. Fig. 6 shows the impedance of the electrode–solution system versus frequency at various voltages (0.01, 1, 2, and 3 V peak to peak) of sinusoidal signal and 0.01 M aqueous solution of NaCl. The impedance decreased greatly in the lower frequency region. These data imply that some electrolysis occurred both in electrodes and electrolytes and the resulted ionic compounds were dissolved in the sample solution, which increased the conductivity of the samples.



(a)

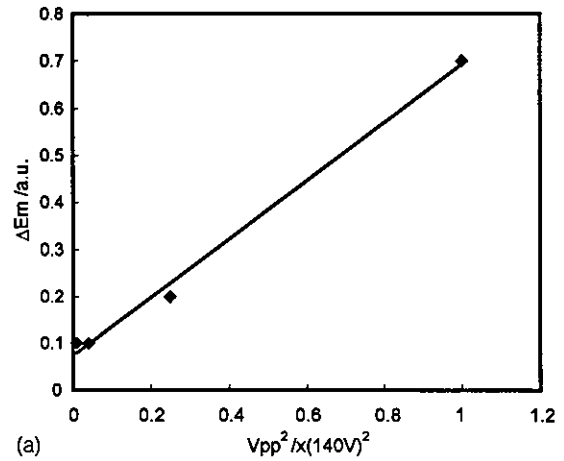


(b)

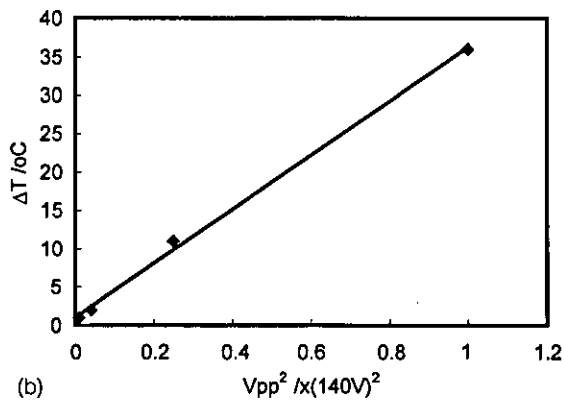
Fig. 5. Effects of salt concentration on (a) electropermeation efficiency and (b) temperature increment.

4. Discussion

Fig. 2 shows a frequency dependency of the electropermeation similar to the results of our previous report [21] with a minimum effect at 1 kHz. In our experiments, square wave voltage of 125 or 140 V peak to peak (V_{pp}) was applied between the two Pt electrodes placed 1 mm apart. This corresponds to about 62.5 or 75 V dc (effective) voltage, on about 10 mV of the trans-membrane potential



(a)



(b)

Fig. 7. Quadratic dependency of (a) electropermeation efficiency and (b) temperature increment on applied voltage.

(V_m) at maximum. This value is estimated by the equation: $V_m = -1.5aE \cos \theta$, where a is the radius of the liposome ($a = 100$ nm), E is the intensity of external electric field ($E = 625$ or 750 V/cm), and θ is the angle between vector E and radius vector a [1,2,24]. The experimental data obtained here clearly show that lower intensity of electric field than the critical trans-membrane electric potential in the usual pulse application (ranging from about 200–1000 mV of trans-membrane potential) can cause membrane permeation

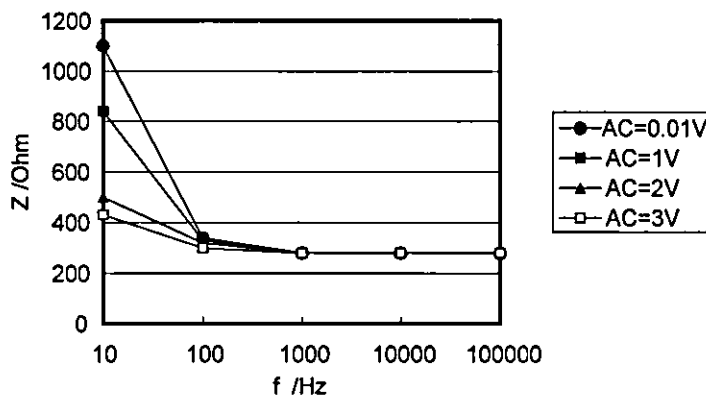


Fig. 6. Frequency dependency of impedance of the system of electrodes with solution for various applied voltages.

Table 1
Salt concentration effect on permeation and temperature

NaCl (M)	ΔE_m (a.u.)	ΔT (°C)
0.02	0.1	7
0.1	0.4	35

[1,2]. This is two-orders of magnitude smaller than the voltage of dielectric break down of lipid bilayer membranes. Such low level electric field induced permeation was also observed in the case of fluorescent molecules (Quin 2) in our previous report. When we change the intensity of the applied field, the similar dependency of both ΔE_m and ΔT on the V_{pp} was observed. This feature indicates that the mechanism of the permeation can be closely related with the energy dissipation by the sample dispersion. If we re-plot these data to the quadratic value of V_{pp} , we see that ΔE_m roughly depends on the quadratic value of V_{pp} . It is much clear in the plot of ΔT versus $(V_{pp})^2$ (Fig. 7a and b). The deviation of the line from the graph origin in Fig. 7a can be due to the bias leakage of Ca ions without electric fields. It is likely that the permeation has a close relationship with the macroscopic temperature increase, therefore Joule-heating of the sample solution can be important. The energy absorption of electric fields by medium is described by using the specific absorption rate (SAR) defined as:

$$\text{SAR (W/kg)} = \frac{\sigma_{\text{eff}} E^2}{\rho} \quad (1)$$

for the case of square wave electric field [25]. Here, σ_{eff} is effective conductivity (S/m), E the electric field intensity (V/m), and ρ the mass density in kg/m^3 . The quadratic dependency on the electric field in Fig. 7a and b can be explained by Eq. (1). The NaCl concentration dependency also gives the similar feature in ΔE_m and ΔT (Fig. 3a and b, or Table 1). It confirms that the Joule-heating of the sample solution through changing σ_{eff} and E is truly important for electroporation.

The mechanism of the electroporation is based on the electroporation of lipid bilayer membranes, which assumes that the applied electric field facilitates pore formation in the membrane. The reaction between production and extinction (resealing) of pore is continuous and is a thermally activated stochastic process. The electric fields render a longer-life time of pore in the membrane. Monte Carlo simulation of thermally induced pore generation in the model membrane has been reported [26].

Although there observed some relationship between ΔE_m and ΔT in the frequency dependency (Fig. 2), it is not so good correlated, especially in the lower frequency range. We think the frequency dependency consists of two phenomena separated by the border at 1 kHz. In real, we found a gas production in the sample solution at the lowest frequency condition, which comes from the electrode reaction. To clarify this phenomenon, the experiments shown in Fig. 6 were conducted. The results showed that the Pt electrodes easily

produce ionic carrier by electrolysis of salt, water, or, Pt itself even at low voltage shown in Fig. 6. The impedance in the low frequency region largely reduced already at $V_{pp} = 3$ V. This shows that such ionic species are produced. At voltage needed for electroporation 125 or 140 Vpp, Pt ion can be dissolved into the sample solution. This explains the great increase of the optical density of the solution at 10 Hz. The increased ionic components increase the energy absorption by the sample, on the other hand the gas production can release the thermal energy out to the ambient. They can be the origin of the discrepancy between the feature between ΔE_m and ΔT in low frequency region. The feature of ΔE_m and ΔT in the high frequency region above 1 kHz can be explained by SAR without significant electrode reaction, since, the effective conductivity (σ_{eff}) of the liposome dispersion increases with the increase in the frequency. In general, the conductivity of colloidal dispersion sample (radius a) is a function of the ratio k/aK , where k is the surface conductivity around the particle and K is the conductivity of the bulk solution. And it has a frequency dependency, because of the relaxation phenomenon due to the concentration polarization process caused by the electric polarization on the particles. That is, the electric polarization on the particle is based on the ionic concentration polarization. The effective conductivity of the colloid dispersion sample increases with the frequency of electric field, even in the case that the surface conductivity in the electrical double layer around colloid particle is lower than the conductivity of the bulk solution [27,28]. The energy absorption of the liposome sample is higher at higher frequency, hence ΔE_m and ΔT increases with frequency.

The temperature increase ΔT measured by us is practically macroscopic temperature of the sample solution. It is determined by the balance between two processes, i.e. heat generation by the electric energy absorption and heat transportation from the sample to the ambient by conduction, diffusion, convection, or evaporation, etc. Therefore, the experimental factors such as the volume of the sample solution, the electrode configuration, water bath volume, etc. are all responsible for the temperature increase. The macroscopic temperature measured depends on the time course of the electric field application. When we apply the electric field of ON-OFF sequence by changing the length of OFF time, the heat transportation effect on the permeation and temperature increase can be observed. When OFF time was changed from 5 to 20 s, ΔE_m is almost constant, but ΔT decreases considerably with longer OFF time (Fig. 4a and b). The longer OFF time gives sufficient time for the generated heat to be transported to the ambient. From these results, we can say that the microscopic (local) heating of the liposome particle or membrane is a source for the electroporation. Of course, the macroscopic temperature is related with the local heating but it is not directly the same one and depends on experimental configurations. The microscopic temperature distribution, especially around the liposome particle and between liposome membranes may cause instability of the

membrane by the motive force of the temperature gradient. This can be a subject of future research. Studies have already been attempted with focusing on local heating [29].

5. Conclusions

It is demonstrated that the electropermeabilization by the low electric fields shown here is related to the heat generation. Also, we have shown here and in the previous report that the liposome particles can easily release some chemicals from inside of liposomes to the outer space by using common electric equipments with controlled thermal conditions. We believe this approach can be utilized in the electrochemotherapy with liposomes systems as drug carrier capsules.

Acknowledgements

The authors wish to thank Prof. B.E. Djakov from Bulgarian Academy of Sciences for critical reading of this manuscript.

References

- [1] J.C. Weaver, Yu.A. Chizmadzhev, *Bioelectrochem. Bioenerget.* 41 (1996) 16–135.
- [2] E. Neumann, S. Kakorin, K. Toensing, *Bioelectrochem. Bioenerget.* 48 (1999) 3–16.
- [3] J.C. Neu, W. Krassowska, *Phys. Rev. E* 59 (1999) 3471–3482.
- [4] M.-P. Rols, J. Teissié, *Biophys. J.* 75 (1998) 1415–1423.
- [5] E. Tekle, R.D. Astumian, W.A. Friauf, P.B. Chock, *Biophys. J.* 81 (2002) 960–968.
- [6] D.S. Dimitrov, A.E. Sowers, *Biochim. Biophys. Acta* 1022 (1990) 381–392.
- [7] M.-C. Vernhes, P.A. Cabanes, J. Teissié, *Bioelectrochem. Bioenerget.* 48 (1999) 17–25.
- [8] E. Tekle, R. Dean Astumian, P. Boon Chock, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 88 (1991) 4230–4234.
- [9] A.O. Biliska, K.A. DeBruin, W. Krassowska, *Bioelectrochemistry* 51 (2000) 133–143.
- [10] D.C. Chang, P.G. Gao, B.L. Maxwell, *Biochim. Biophys. Acta* 1992 (1991) 153–160.
- [11] G. Pucihar, T. Kotnik, M. Kanduđer, D. Miklavčič, *Bioelectrochemistry* 54 (2001) 107–115.
- [12] S. Kakorin, E. Redeker, E. Neumann, *Eur. Biophys. J.* 27 (1998) 43–53.
- [13] B.B. Pucihar, L.M. Mir, D. Miklavcic, *Bioelectrochemistry* 57 (2002) 167–172.
- [14] Y. Rosemberg, R. Korenstein, *Bioelectrochem. Bioenerget.* 42 (1997) 275–281.
- [15] I. Daskalov, N. Mudrov, E. Peycheva, *IEEE Eng. Med. Biol.* (1999) 62–66.
- [16] E. Peycheva, I. Daskalov, *J. BUON* 5 (2000) 85–87.
- [17] L.M. Mir, *Biochemistry* 33 (2000) 1–10.
- [18] M. Golzio, M.-P. Mora, C. Raynaud, C. Delteil, J. Teissié, M.-P. Rols, *Biophys. J.* 74 (1998) 3015–3022.
- [19] M. Puc, K. Flisar, S. Redebersek, D. Miklavcic, *Radiol. Oncol.* (2001) 203–207.
- [20] J. Teissié, N. Eynard, M.C. Vernhes, A. Bénichou, V. Ganeva, B. Galutzov, P.A. Cabanes, *Bioelectrochemistry* 55 (2002) 107–112.
- [21] V. Natchev, N. Terezova, H. Matsumura, T. Tomov, *Histol. Histopathol.* 17 (2002) 649–656.
- [22] T. Tomov, I. Tsoneva, *Bioelectrochemistry* 51 (2000) 207–209.
- [23] T. Kotnik, D. Miklavčič, L.M. Mir, *Bioelectrochemistry* 54 (2001) 91–95.
- [24] E. Neumann, K. Rosenheck, *J. Membr. Biol.* 14 (1973) 194–196.
- [25] C.H. Durney, D.A. Christensen, *Basic Introduction to Bioelectromagnetics*, CRC Press, 2000, p. 10.
- [26] J.C. Shillcock, U. Seifert, *Biophys. J.* 74 (1998) 1754–1766.
- [27] H. Matsumura, Surface conductivity, in: H. Ohashima, K. Furusawa (Eds.), *Electrical Phenomena at Interfaces*, Marcel Dekker, Inc., 1998, pp. 305–321.
- [28] J. Lyklema, *Fundam. Interf. Coll. Sci. II* (1995) 4.110–4.122.
- [29] U.F. Pliquett, G.T. Martin, J.C. Weaver, *Bioelectrochemistry* 57 (2002) 63–72.

In vivo における QLF による早期う蝕診断に関する研究

——初期う蝕病巣の1年間の追跡結果について——

大塚秀人 三宅達郎 神原正樹
おおつか ひで と み やけ たつ ちゅう かん ばら まさ き

大阪歯科大学口腔衛生学講座

歯科医学 第67巻 第3/4合併号 別刷
(平成16年12月25日発行)

Reprinted from *Shika Igaku* (J Osaka Odontol Soc)
Vol. 67, No. 3/4 combined, 266–273, 2004