

Induction of White Spot Enamel Lesion by *S. mutans* Biofilm in an Artificial Mouth System and Quantification by QLF

Khairul Matin^{1, 2}, Shamim Sultana¹, Masahiro Ono¹, Junji Tagami^{1, 2}

¹ Cariology and Operative Dentistry, Department of Restorative Sciences

² COE program for FRMDRTB, Tokyo Medical and Dental University, Tokyo

Objective: Aspects of an Artificial Mouth System (AMS) to model the caries process in bovine enamel biofilm induced white spot enamel lesions (WSEL) were analyzed.

Methods: Square shaped and polished bovine enamel slabs were covered with modeling wax and 2.5 mm diameter window was prepared to expose enamel surface at the center of each slab. Artificial biofilms were grown inside an AMS on the slabs using freshly cultured *S. mutans* (MT8148) in suspended in phosphate buffered saline (PBS), heart infusion (HI) with 1% sucrose and PBS for 20, 30 and 40 hrs at 37°C. The severity of demineralization was quantified by Quantitative Light-induced Fluorescence (QLF, Inspector, Netherlands), nano-mechanical property changes were studied by a Nanoindenter (ENT-1100, Elionix, Japan), fine-structural change was observed by SEM after argon ion-etching. All experiments were repeated three times (n=5 for each group).

Results: A circular WSEL could clearly be detected at the center of each slab by naked eyes, which was prominent after dehydration by mild air drying. QLF data showed that severity of demineralization occurred with the increase of time interval, after 40 hours both ΔF (23 \pm 2.9) and ΔQ (148.75 \pm 26.78) were significantly more compared to ΔF (10.14 \pm 2.3) and ΔQ (47.63 \pm 30.67) of 20 hours. Hardness measured by nanoindenter at the center of all lesions was significantly reduced from unaffected enamel, 40-hr sample showed about 95% reductions. Perpendicularly trimmed surface topography after argon ion-etching by SEM clearly visualized depth of demineralized WSEL, widened inter-enamel prism channels, dislodgement of prism crystals and perforated prism structure at outer most layers.

Conclusion: An advanced in vitro model of biofilm induced WSEL was developed that showed promises to be useful in studying enamel demineralization.

エナメル質初期齲蝕の再石灰化に及ぼす Nd:YAG レーザー及びフッ素の影響

何 陽介¹、本川 渉¹、宮崎光治²

¹ 福岡歯科大学成長発達歯学講座成育小児歯科学分野

² 福岡歯科大学歯科医療工学講座生体工学分野

【目的】近年の小児歯科の日常臨床において、重篤な齲蝕は減少傾向にあるものの、エナメル質初期齲蝕病変である white spot を目にする機会はいまだ多い。また、white spot は初期う蝕からう窩形成へと進行するため、その対応に苦慮することが多い。そこで、我々は white spot の再石灰化に対するフッ素塗布およびレーザー照射の影響を検討するため、ヒト抜去歯牙に人工的に white spot を作製し、フッ素塗布および Nd:YAG レーザー照射を行ったのち、石灰化溶液に浸漬し、QLF 装置（定量的光誘導蛍光装置）を用いて ΔF 、 ΔA および ΔQ の変化を経時的に測定し、若干の知見が得たので報告する。

【材料及び方法】臨床的理由により抜去され、生理食塩水中に保存されていたヒトの大白歯と小白歯の中から舌側および頬側面に白濁、亀裂、齲蝕のないものを選び、ロビンソンブラシで歯石、色素、沈着物を除去し、さらに #600~1500 の耐水研磨紙を用いて研磨したのち、マニキュアを用いて 3~4 mm 角の窓を形成した。そして、この歯牙を 0.1M 乳酸緩衝溶液（pH: 4.5, Ca: 3.0mM, P: 1.8mM, CMC: 1%, Thymol: 0.01%）20ml 中に浸漬し、37°C の恒温槽内で 72 時間脱灰を行った。脱灰後、アセトンを用いてマニキュアを溶解、除去し表層下脱灰試料とした。実験は下記の 4 群に分けた。

- Nd:YAG レーザー照射のみ（DLR 群）
- フッ化物（APF）塗布のみ（DFR 群）
- Nd:YAG レーザー照射後、フッ化物塗布（DLFR 群）
- フッ化物塗布後、Nd:YAG レーザー照射（DFLR 群）

各群の試料を再石灰化溶液（pH: 7.4, Ca: 3.0mM, P: 1.8mM, CMC: 1%,）に浸漬し、石灰化状態の変化を 48 時間おきに 240 時間まで、QLF（Inspeceor Pro Ver2.0.0.16）を用いて測定した。なお、再石灰化溶液は 48 時間毎に新しいものと交換した。

【結果および考察】ヒトエナメル質に作製した white spot の ΔQ は、DLFR 群において特に日数の増加に伴う顕著な減少傾向が見られた。これは、レーザー照射後に APF を作用させるとフッ素の取り込みが増大し、耐酸性が増したという Tagomori らの報告¹⁾や、フッ素がエナメル質の再石灰化を促進する²⁾といわれていることなどに起因するものと思われる。また、DFLR 群では、レーザー照射後 2 日目に一旦増大したのち、日数の増加に伴って減少傾向を示し、DFR 群は日数の増加に伴って僅かに減少傾向を示したが、DLR 群は 2 日後に一旦増大し、その後変化が見られなかった。

【文献】

- 1) Tagomi S, Morioka T *et al.*: Combined Effects of Laser and Fluoride on Acid Resistance of Human Dental Enamel, *Caries Res.*,23:225~231,1989
- 2) Whitford G *et al.*: Effects on Physiologic and Biochemical Processor, *J Dent Res*,66:1072-1078,1987

唾液タンパクが初期う蝕の再石灰化に及ぼす影響について

藤川晴彦^{1,2}、内山 章¹、中嶋省志^{1,2}、氏家高志¹、利倉隆浩³、杉森康二³、渡部英夫⁴

1 ライオン株式会社オーラルケア研究所 2 九州大学大学院歯学研究院口腔保健開発学講座
 3 株式会社島津製作所 4 島津サイエンス東日本株式会社

【目的】初期う蝕の再石灰化に影響を及ぼす因子のひとつとして唾液成分がある。唾液中のタンパク成分は、ハイドロキシアパタイト等のリン酸カルシウムの結晶化や結晶成長を抑制することが知られている^{1,2)}。そのメカニズムとして、タンパク成分と唾液中の無機イオンとの結合、または結晶成長部位への吸着等が指摘されている。本研究では、ヒト唾液のタンパク成分が初期う蝕の再石灰化進行に及ぼす影響を明確にすることを目的とし、ヒトエナメル質に人工的に作製した初期う蝕の再石灰化試験を行った。

【方法】

1) 脱灰サンプルの調製：エナメル表面を研磨し、約7×7mmのブロックに切断後、2mm×2mmのウィンドウを除いて、マニキュアで被覆した。エナメルブロックを37°Cの脱灰液(CaCl₂:12mM, KH₂PO₄:10mM, NaCl:100mM, 乳酸:50mM, 酢酸:100mM; pH4.5)に浸漬し、初期う蝕を形成させた。2) 再石灰化液の調製：ヒト(6人)からパラフィン刺激によって吐出させた全唾液を混合、遠心分離(12000×g, 4°C, 20min)後、上清液を透析チューブ(Spectra/por MW1000)に注入し、4°Cのリン酸緩衝液(NaH₂PO₄:5mM; pH6.9)および再石灰化液(CaCl₂:1mM, KH₂PO₄:3mM, NaCl:100mM, 酢酸:100mM, NaN₃:0.02%; pH6.3)に対して透析した。透析後、チューブ内部液に蒸留水またはフッ化物イオン水溶液を添加し、唾液タンパク含有(P(+))再石灰化液とした(以下、P(+)/0ppmF、P(+)/1ppmF群)。また唾液タンパクを含まない(P(-))再石灰化液を調製した(以下、P(-)/0ppmF、P(-)/1ppmF群)。3) 再石灰化試験：脱灰サンプルを37°Cの各再石灰化液に浸漬した(n=10/群)。液は7日毎に交換し、試験は4週間行った。4) 初期う蝕の評価：QLFシステムを用いて、経時的に蛍光強度を測定した。またマイクロCTシステム(SMX-100CT-SV; 島津製作所)を用いて、ハーフスキャンモードにて各群のCT画像を取得し、アルミニウムのStep wedgeによりCT値を補正した。

【成績】各群の平均蛍光値(ΔF)を表1に示す。F⁻を1ppm含む系において、唾液タンパクの添加により再石灰化反応は顕著に進行した(p<0.01)。一方、F⁻を含まない系において、唾液タンパクの添加により再石灰化反応は抑制された(p<0.01)。マイクロCTによる非破壊画像観察においては、TMR法と同様に初期う蝕を二次元で鮮明に視認でき、さらに各群の特徴的な再石灰化現象を確認した。

【結論】唾液タンパク成分は、再石灰化反応に大きな影響を及ぼす因子であり、フッ化物の再石灰化促進効果を増大させることが明らかになった。マイクロCTシステムは、新たな非破壊型の再石灰化評価法として有用であることが示唆された。

【文献】

- 1) Moreno EC *et al.*: Calcif Tissue Int. 28: 7-16, 1979
 2) Gliman H *et al.*: J Inorg Biochem. 55: 21-30, 1994

表. 各群の平均蛍光値(ΔF)の経時変化

| | 0W | 1W | 2W | 3W | 4W |
|-------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| P(+)/0ppmF群 | -36.1±2.3 | -33.1±1.8 | -31.6±2.0 | -31.3±1.8 | -29.9±1.9 |
| P(-)/0ppmF群 | -36.4±1.6 | -33.5±1.7 | -31.9±2.2 | -28.5±3.2 | -25.0±3.9 |
| P(+)/1ppmF群 | -36.4±2.5 | -31.6±3.6 | -27.1±4.1 | -24.9±4.3 | -22.6±4.3 |
| P(-)/1ppmF群 | -36.3±1.6 | -32.5±1.7 | -32.2±2.6 | -29.9±3.7 | -31.6±3.3 |

QLF法とデジタル写真の相関関係の検討

山岸 敦

花王株式会社 ヘルスケア研究所

【目的】QLF法は非侵襲的に初期う蝕の検出が可能であり、我々もフッ化物の応用等が初期う蝕の再石灰化に及ぼす影響を調べるために活用している。通常、QLF法での測定にデジタルカメラによる写真撮影を組み合わせて調査を行っているが、QLF法で検出される初期う蝕は写真でも判別できることが多い。そこで、QLF法によって得られる各種パラメーターとデジタル写真から得られるパラメーターの相関関係を調べることにより、それぞれの特性を把握しより有効に活用すべく検討を開始した。QLFのデータと比較するための今回はデジタル写真の前処理について報告する。

【方法】初期う蝕は表層下で脱灰であるため、情報をデジタル写真で得るためには表面反射光が阻害因子になるため取り除く必要がある。そこで、光源（ストロボ）レンズにそれぞれ直線偏光フィルタを装着し、偏光の向きを垂直にすることにより表面反射を除去できるようにしたデジタルカメラを用いた。このカメラとQLF装置を用いて抜去歯の隣接面に生じた初期う蝕を撮影した。QLF法は通常通りの解析を行い、デジタル写真は色分解および2値化により初期う蝕の部位の抽出を行った。

【結果】デジタル写真（図1）をRGB各チャンネルに分離したところ（図2-1, 2, 3）、初期う蝕と思われる部位のコントラストが一番高いのはBで一番低く判別が困難だったのはRであった。そこで、Bの画像を解析した。2値化は隣接する健全部の輝度より10%高い値を閾値として用いた。検出された部分の形状は、デジタル写真とQLFでは若干異なっていた（図3-2, 4）。初期う蝕の面積は 1.54mm^2 となり、QLF法で求めた 1.25mm^2 と比較して約20%大きくなっていた。

これらの結果から、蛍光を用いて測定するQLF法と可視光を使用するデジタル写真では初期う蝕の検出については、類似性はあるものの同一ではないことが明らかになった。今後は輝度に関しても検討を加え、更にサンプル数を増やして相関関係の検討を行う予定。

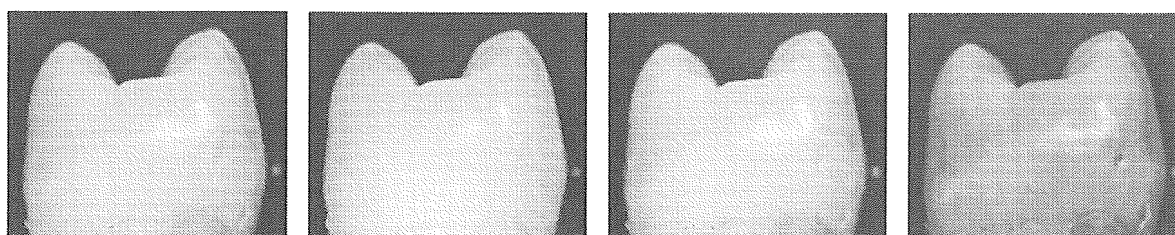


図1 元画像

図2-1 Rチャンネル

図2-2 Gチャンネル

図2-3 Bチャンネル

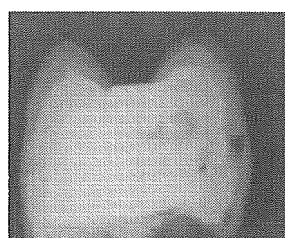


図3-1 QLF像

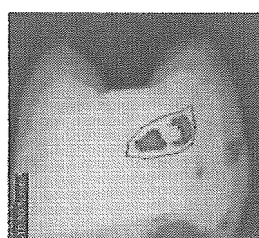


図3-2 QLF解析

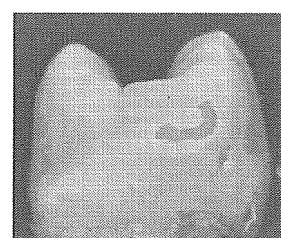


図4 Bチャンネル解析

QLFの特徴と今日のMI Dentistryの接点

飯島洋一

長崎大学大学院医歯薬学総合研究科医療科学専攻
健康予防科学講座口腔保健管理学分野

QLFの特徴に関しては、ミネラル喪失量とQLFデータとの関連を文献的に考察した結果について、ならびに臨床応用する際にQLFの留意点となる事項についても報告する。また今日のMI dentistryの概念に照らしてQLFはどのような役割が期待され、果たしているのか両者の接点について感想を含めてご紹介をいたします。

第2節

リポソームの固体微粒子との複合化と エレクトロ・パーミエーション

1. はじめに

リポソームは脂質二分子膜の微粒子であり、その内部の液相や膜内に種々の生体機能性分子を保持できるため薬物を配達するキャリアとして研究されている。このリポソームと他の微粒子を組み合わせることにより高機能を持つ複合微粒子の開発が可能である。例えば、任意の場所で任意の時間に薬物を放出・供給するツールの開発も可能であろう。

我々が病気になったとき、すなわち、組織細胞が正常でなくなったときにその回復のため薬をなんらかの手段で病細胞まで送る。通常行われる薬物輸送の方法にはいくつかある。一つは口から内服し消化器や粘膜から、あるいは静脈注射にて血管系に入れ毛細血管から組織細胞へ送る方法。一つは皮下注射や湿布により直に患部へ送る方法である。

先の一歩目の方法で患部だけに集中的に薬物を投与することを目指すには、薬物を内包するカプセル(リポソームなど)の表面に患部細胞にだけ結合(認識)する分子を付けて利用することである。これはミサイル試薬とも呼ばれ研究展開されている。一方、リポソームを先の二歩目の方法に利用することも可能であろう。疾患部の場所がはっきりしているときにはそこだけに薬を投与すれば十分であるし、余分な副作用も少なくなるはずである。例えば、リポソーム微粒子と磁性微粒子との複合体を用いれば、磁性針によりその存在場所のコントロールができ、針電極を用いて電場を印加することにより、リポソーム内部に保持していた薬物の局部放出を可能にするであろう。近年、X線CTやMRIなどの物理検査法により体内の病巣の場所がより詳細に分かるようになってきている。外科的手法と内科的手法の

ドッキングは有用な方法であると考えられる。これまでも、薬物療法において注射器を用いて薬物を直に患部へ投与することと物理的手法とを組み合わせたものが研究されてきた。その一つに、エレクトロ・ケモセラピーという方法がある。これはパルス電場のアシストで細胞膜を通して薬を細胞内へ輸送する方法である。とくに表層癌治療に有効で治癒率が90%以上を超える成果をあげているそうである。通常の有効濃度より低い濃度で効果が期待できるため副作用防止をも期待される。これにリポソーム系を利用することは十分可能であろう。

ここでは、上記の視点から、リポソームと固体微粒子からなる複合化微粒子の作製法とリポソーム膜の電場による物質透過能変化についての研究を紹介する。

2. リポソームと固体微粒子の複合微粒子

2.1 金平糖型複合粒子作製の指針

1個の固体微粒子を中心に、その周りにリポソーム粒子が複数個付着した金平糖型複合微粒子の作製について述べる。構造の基本となる中心固体微粒子は単一粒子として溶液中に安定分散している必要がある。これを実現するには粒子間に強い反発力が働いていなければならない。これには粒子表面の電気二重層間反発力や水和反発力が利用される。種々の粒子のなかでシリカ粒子は表面解離基-OHがあるため、この二つの特性を持ち非常によく水系に分散する粒子である。一方、周囲に付けるリポソーム粒子も単一粒子として分散していなければならない。種々の脂質から形成されるリポソームの多くは単一粒子として分散性のよいものである。親水基側に水

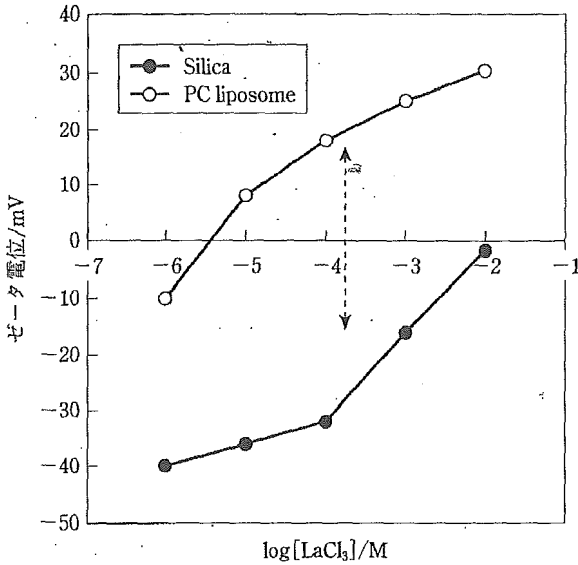


図1 シリカ粒子とPCリポソーム(負荷電の不純物を含む)のゼータ電位の塩化ランタン濃度依存性

和性のコリンを持つ脂質と電荷を持つ脂質の混合系は分散性の点からはとくに良い。これらの一次粒子からの複合微粒子の作製においては、中心微粒子と周辺微粒子との接合(会合)が必要であるが、その条件設定にはコロイド科学における異種粒子間の相互作用(ヘテロ凝集)の概念が利用できる。すなわち、2種類の微粒子が存在する系の溶液条件には同種粒子間には反発力が、異種粒子間には引力が生ずる条件を利用する。電気二重層間相互作用を利用するときは、単に異種粒子表面がそれぞれ反対符号に帯電しているだけでは不十分である。なぜならば、相互作用力が引力になるか反発力になるかは、両者の電気二重層が重なったときどのように電気二重層エネルギーが緩和されるかに依存するからである。簡便には両者の持つ表面電位(あるいはゼータ電位)がある程度大きくそれぞれ正負の電位を持ち、同程度の大きさである点を選ぶと良い。例えば、図1はシリカ微粒子とPCリポソーム(Sigma社のegg phosphatidylcholine, 負荷電の不純物を含む)の場合に塩化ランタン水溶液中での両粒子が持つゼータ電位であるが、塩化ランタン濃度 10^{-4} M付近で両粒子は正と負で同程度の電位を示す。この条件で粒子間は引力になりヘテロ凝集は進行する。また、カチオン性脂質をリポソームに混入しヘテロ凝集の条件を実現することもできる。

きれいな金平糖型複合粒子を作製するためにはさ

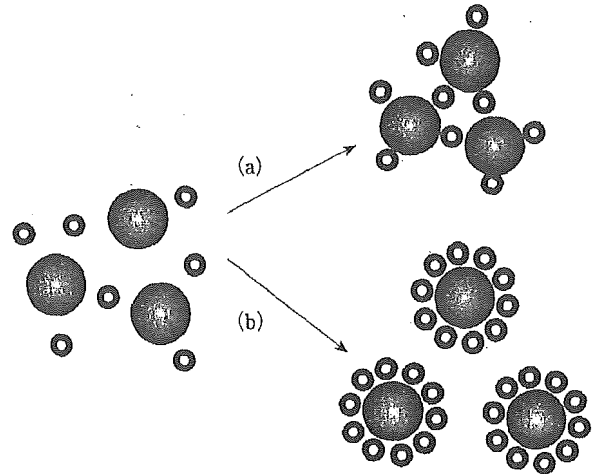


図2 大きな凝集体(フロック)の形成(a)と金平糖型複合粒子の形成(b)

らなる条件として、周囲に配するリポソーム粒子数が過剰であること、リポソーム粒子径が中心粒子径の $1/3$ 以下であることが望ましい。これにより異種粒子間の架橋反応による大きなフロック形成(図2(a))を抑えるのと、中心粒子に付着している周辺粒子間反発力を中心粒子との引力に比べ小さくすると共に配置構造的にも望ましい状況が実現される(図2(b)参照)。

さらに、複合微粒子の構造を安定化するためには異種粒子間に架橋を形成するとよい。電気二重層相互作用の引力による会合体(凝集体)は溶液の電解質濃度の変化で影響を受けやすいが、異種粒子間にバインダー(架橋分子)を用いることにより複合体構造を安定化することができる。高分子やタンパク質などはこの役目を担うものである。

2.2 リポソームを含む複合微粒子の作製例

2.2.1 シリカ/PCリポソーム系

中心にシリカ粒子、その周りにリポソーム粒子、さらにその周りにシリカ粒子を付着させた複合微粒子について述べる。塩化ランタン濃度 10^{-4} Mの水溶液中で中心粒子となるシリカ粒子(粒子径 $1.5\ \mu\text{m}$)にPCリポソーム(粒子径 $200\ \text{nm}$)を付け、さらに $0.5\ \mu\text{m}$ のシリカ粒子をその上に付着させた系の写真を図3に示す。中心となるシリカ粒子分散液(塩化ランタン濃度 10^{-4} M)にシリカ粒子数に比べ過剰粒子数のPCリポソーム分散液(塩化ランタン濃度 10^{-4} M)を加え、2時間ほど攪拌し、金平糖型シリ

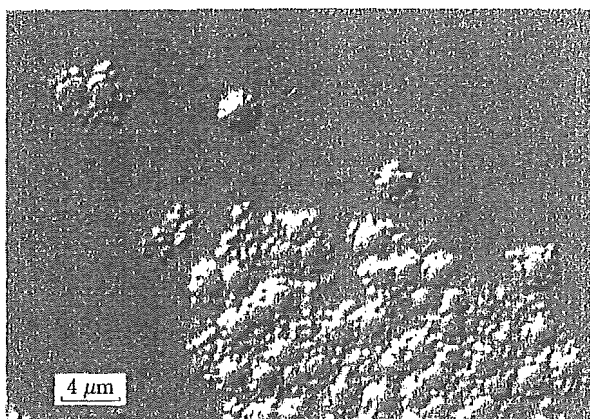


図3 シリカ/リポソーム/シリカ3層複合粒子の光学顕微鏡像

カ/PCリポソーム複合粒子を形成させる。過剰に残ったリポソームは遠心処理や限外ろ過などで取り除く。ここで使用するリポソームはリン脂質(PC, 卵黄ホスファチジルコリン: Sigma社から購入)から形成したものである。PCをエタノール溶液とし、窒素ガス風乾により試験管壁面に付着させた後、高速攪拌により純水に分散、その後フィルタリングやエクストルージョン法により約200 nmサイズまで粒子サイズを下げたものである。このように出来た複合微粒子分散液にさらに0.5 μmのシリカ粒子分散液(塩化ランタン濃度 10^{-4} M)を粒子過剰量加え同様に攪拌処理と過剰粒子の分離処理を行うとシリカ/PCリポソーム/シリカの3層複合微粒子ができる¹⁾。作製過程の各段階で電気泳動測定を行うと粒子表面が負→正→負と変換されていることが分かる(図4参照)。これは複合粒子表面にある粒子種に対応している。きれいな3層構造になることから、2層構造においてもきれいな構造ができていることが分かる。シリカ粒子の表面に付いたリポソームがリポソーム状であるか、崩壊して二分子膜状になっているかは(図5)、シリカ粒子上へのリン脂質の吸着量測定(リンの定量)や動的光散乱による粒子径の増加量を調べることにより判別できる。この場合はシリカ粒子表面上にリポソームの粒子が単層で吸着していることが示されている²⁾。

2.2.2 磁性微粒子/PCリポソーム系(マグネット・リポソーム)

磁気微粒子の周囲にリポソーム粒子が付着した複合微粒子の作製について述べる。

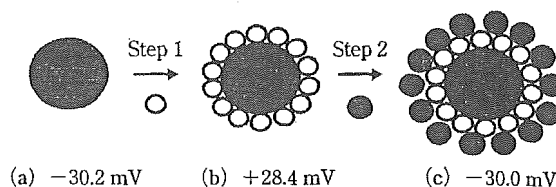


図4 シリカ/リポソーム/シリカ 3層構造形成過程における粒子表面電位(ゼータ電位)の変化

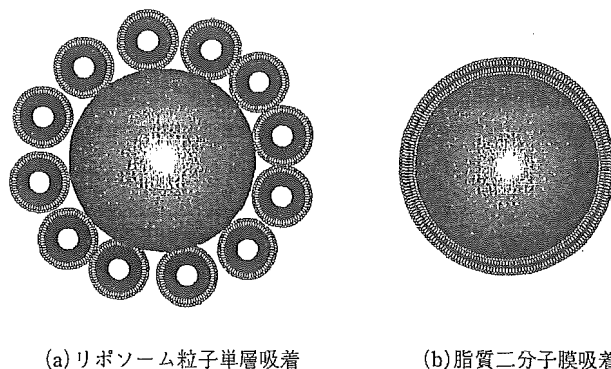
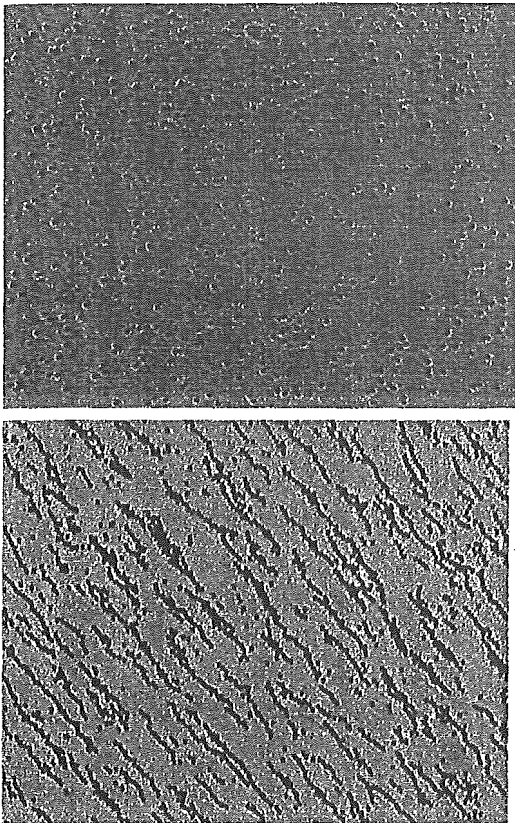


図5 中心粒子上の(a)リポソーム粒子単層吸着と(b)脂質二分子膜吸着の模式図

磁性微粒子であるヘマタイトは酸化鉄の一種である。塩化鉄を原料に粒子径1 μm前後のヘマタイト微粒子を合成し中心粒子として使用する。まず、各種濃度の FeCl_3 水溶液を密栓瓶中で100℃で各時間処理する³⁾。粒子サイズは仕込みの塩化鉄濃度と反応時間で決まる。粒子径1 μm前後のヘマタイト微粒子分散液を選択し、粒子サイズを揃えるために沈降分離処理を数回~十数回繰り返す。ヘマタイトは超常磁性微粒子であるため磁氣的相互作用による自己凝集が少なく、外的磁場がかからない限り単粒子として水中に分散する傾向にある。これは均一磁場により会合し線状構造をとる。また、勾配磁場を用いれば磁場強度の大きい所へ集めることができる。我々が作製したヘマタイト粒子は磁気泳動速度係数として約0.01(cm/s)(T/cm)程度のものである(Tは磁場強度テスラ)。さらに、ヘマタイト粒子の水中での単粒子としての分散性を上げるために、表面にシリカ層を合成する。この処理で負の表面電荷量を増加させ静電的反発力を増すと同時に水和反発力を加え非常によい単粒子状態で水中に分散させることができる(図6参照)。シリカ層合成はテトラエトキシシランを加水分解することで行う。表面がシリカでコーティングされた状況は粒子の電気泳動度測定

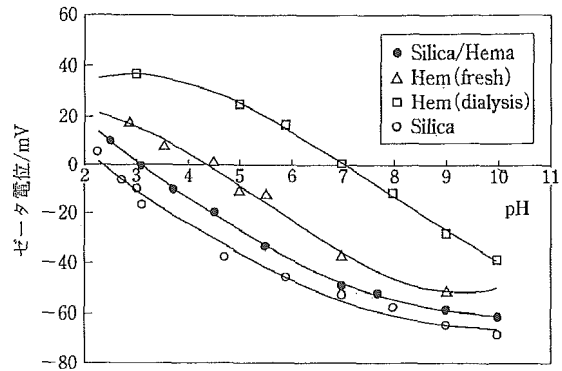


上：磁場がかかっていないとき。単粒子としてブラウン運動をしている。下：数百ガウス程度の磁場による磁気微粒子の集積と配向。線状会合体として蛇行運動している

図6 シリカをコートしたヘマトイト

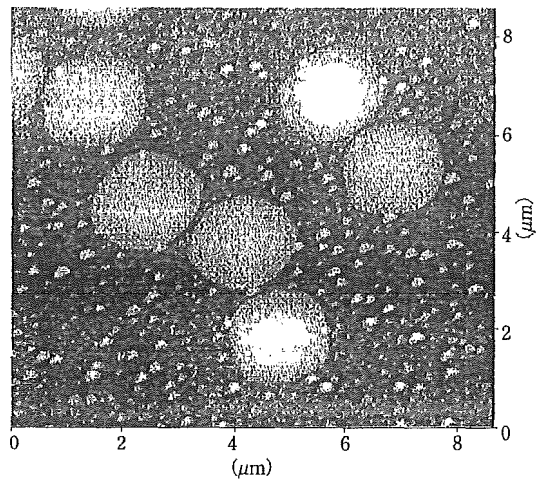
により知ることができる。図7にヘマトイト粒子、シリカ粒子、シリカ層を持つヘマトイト粒子の表面電位(ゼータ電位)のpH依存性を示す。透析を繰り返した後の表面をきれいにしたシリカ層を持つヘマトイトはシリカ粒子とほぼ同じ等電点を示し、シリカコーティングが完成されていることが分かる。このシリカ層を表面に合成した粒子はpH中性領域では大きな負電荷を持ち、粒子間反発力を持つことが分かる。これは光学顕微鏡観察により非常によい単粒子状態で水中に分散することも確認される。また、X線顕微鏡(図8)や透過型電子顕微鏡により、シリカ層が滑らかにヘマトイト粒子表面に形成されていることについても確認できる。

この粒子表面上にさらにリポソーム粒子を付着させる方法としてはヘテロ凝集法やタンパク質を架橋分子としたブリッジング法を使う。タンパク質は種々の表面に物理吸着し、その過程は多くの場合不



Hem (fresh) : 合成直後のヘマトイト粒子, Hem (dialysis) : 純水で長時間透析した後のヘマトイト, Silica : シリカ粒子, Silica/Hema : シリカ層を持つヘマトイト

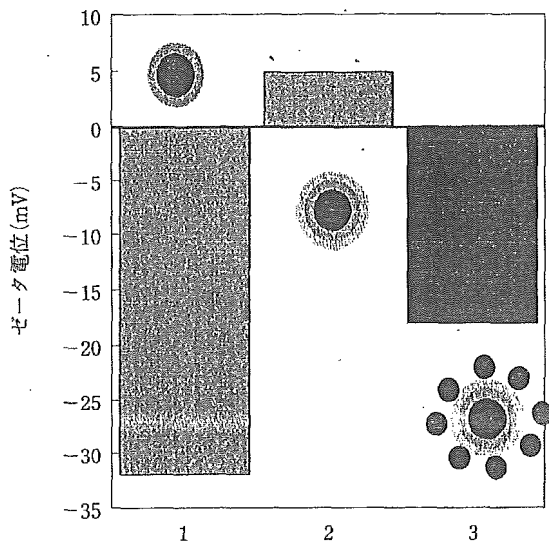
図7 種々の粒子のゼータ電位のpH依存性



密着型X線透過像のPMMA樹脂のレプリカをAFMで読み出した像(産業技術総合研究所, 眞島利和氏の撮影)

図8 シリカコートされたヘマトイト粒子のX線顕微鏡像(口絵参照)

可逆吸着であることが知られている。タンパク質としてはpH中性領域で正味の正電荷を持つ塩基性タンパク質のcytochrome Cやlysozymeを用い、電気的相互作用と架橋効果を利用する。タンパク質濃度1 mg/mlの水溶液とシリカコートされた磁気微粒子を混合し、数時間吸着処理した後、タンパク質が吸着した微粒子を沈降させ上澄みをそのつど除去する。これを繰り返して得られた沈降粒子をタンパク質吸着微粒子試料とする。さらに、この試料粒子とリポソーム分散液と混合し、上記と同様な処理で金平糖型複合微粒子マグネト・リポソームが作製できる。作製プロセスを確認するため、各ステップで形



1: シリカコートされたヘマタイト, 2: さらにリゾチーム吸着された粒子, 3: さらにリポソームが吸着した複合粒子(マグネット・リポソーム)

図9 マグネット・リポソームの作製過程における各段階のゼータ電位

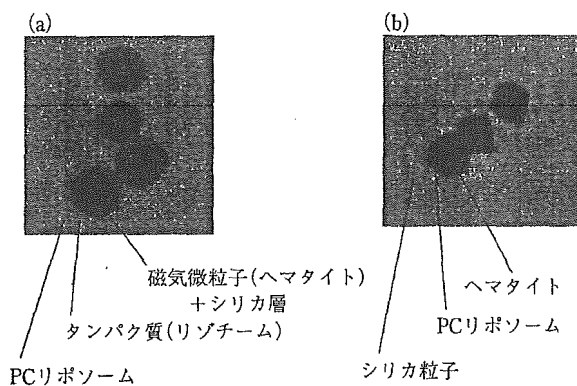


図10 (a)マグネット・リポソームの光学顕微鏡像
(b)シリカ粒子をさらに吸着させたもの

成される微粒子表面の電荷符合の測定を電気泳動測定法でしらべると、表面に付く分子や粒子の種類に対応して表面電荷(および表面電位)の正負が変わることが示され、目的のものが出来たことが確認される(図9参照)。光学顕微鏡観察を容易にするためにさらに0.4 μm程度のシリカ粒子を外側に付着させたものの像を図10に示す。

3. リポソームのエレクトロ・パーミエーション

細胞やリポソームに電場を印加すると、これらの膜の基本構造である脂質二分子膜の物質透過能が増加することが古くから知られている。これはエレクトロ・ポレーションとして細胞融合や遺伝子導入などの *in vitro* 実験では今日広く使用される技術になっている。*in vivo*(臨床的)には先に述べたエレクトロ・ケモセラピーとして研究と臨床実験が展開されている。リポソームやリポソーム含有複合微粒子をエレクトロ・ケモセラピーに利用することを考えると、リポソームの膜透過能と印加電場との関係を明らかにすることが重要である。ここでは、Caイオンのリポソーム膜透過の電場依存性について紹介する。

3.1 Caイオンを内相に含むリポソームの作製

この実験に使用するリポソームの作製は以下のようである。リン脂質(卵黄ホスファチジルコリン; Sigma社)をエタノール溶液とし、窒素ガスを吹き付けて風乾しながら試験管を高速回転することにより試験管壁面に厚膜状態で付着させた後、Caイオン0.2 Mの水溶液を加え高速攪拌により分散する。その後、フィルターリングとエクストルージョン法(1 μmと0.2 μmポア径のメンブランフィルターを使用)によりサイジングし約0.2 μm粒子径のリポソームを得る。さらに-20℃↔+40℃の温度履歴を2回施し、膜の分子パッキングを良くする。外相の溶液からCaイオンを取り除くため、透析チューブ(分画分子量10,000)を用い蒸留水に対して透析を4℃において5~6回繰り返す。こうして出来たりポソーム粒子径の確認は動的光散乱法で行う(粒子径は約200 nmのリポソームであることが確認される)。

リポソーム内相から外溶液中へのCaイオン流出の程度はCaに対する選択性蛍光分子(Quin 2)を用い両者の結合反応による蛍光強度増加で検出する(図11参照)。この場合外相溶液に蛍光分子Quin 2を含む溶液を用いる(この逆の組み合わせの試料系も実験可能)。蛍光測定は通常の蛍光分光光度計を用い励起波長は339 nm, 観測波長は492 nmで行う。

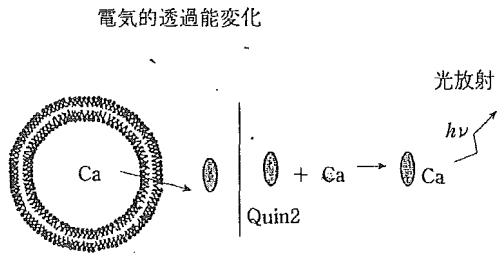
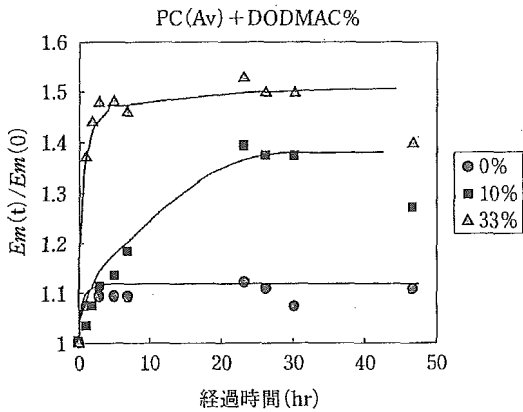


図11 Caイオン流出によるQuin 2との結合反応と蛍光



Caイオン流出による蛍光強度の増加の時間変化。%はカチオン性脂質分子の重量混合率

図12 リポソーム膜の安定性

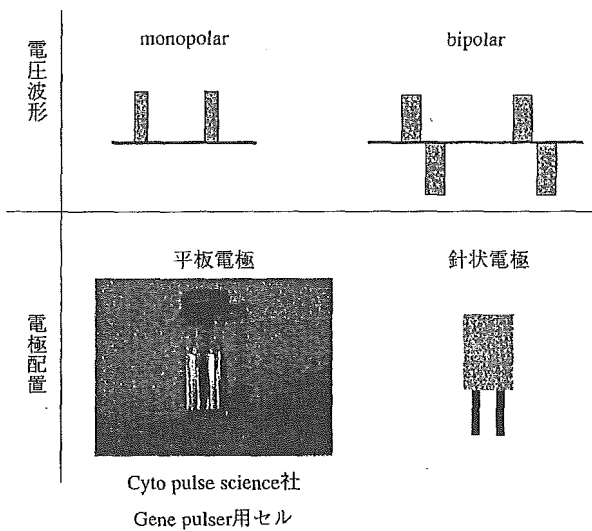


図13 電圧波形と電極形状の例

冷暗所(4℃)に放置保存したリポソーム試料の内相から流出してくるCaの量の経時変化を測定することによりリポソーム膜の安定性を評価する。PCのみのリポソームの場合はCaイオン保持能が高い。比較のためカチオン性脂質(ジオクタデシルジメチ

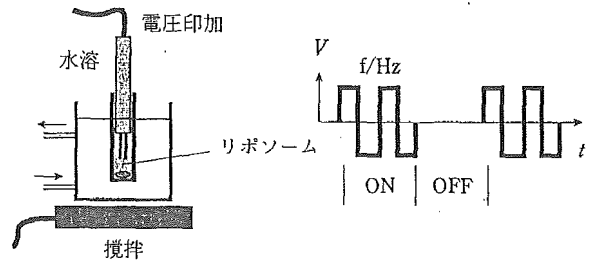


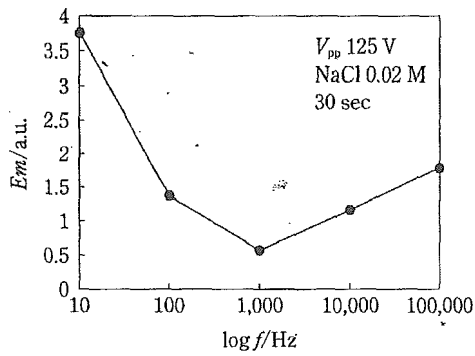
図14 この研究で使用した電極、セル、電場波形

ルアンモニウムクロライド)を混ぜたりポソームを作製しその安定性を調べると、Caイオン保持能は混合濃度と共に急激に下がる。二分子膜のパッキング状態が悪くなっている。図12に3種類のリポソームについての蛍光強度の経時変化の様子を示す。カチオン性脂質の混合がないものは長期安定性を持つが、混入量が増えるに従い蛍光強度が急激に増加し長期安定性に欠ける様子が見られる。

3.2 電場印加

現在、エレクトロ・ケモセラピーでは針状電極や線状電極が使用されている。また、電場波形としてはmonopolar型パルス(米国Genetronics社等)とbipolar型(ブルガリア科学アカデミー, Daskalov教授)が使用されている(図13参照)。エレクトロ・パーミエーションに使用した我々の実験セットは以下のようなものである(図14参照)⁴⁾⁵⁾。電極構造と電場波形は針状電極、交流矩形波を使用する。ファンクションジェネレーターで発生させた交流矩形波信号をバイポーラー型電圧・電流増幅器で増幅する。周波数は10~100 kHzを用い電場強度のピーク間電圧は最大140 Vで、これを1 mm間隔の白金線電極に加える。白金線の径は1 mmである。電場印加されるリポソーム分散サンプル量は約3 mlでマグネチックスターラーにより常時攪拌すると共に水浴にて温度コントロールする(水浴温度は7℃)。試料溶液の温度上昇は電子温度計を投入して計る。

図15は典型的な蛍光強度の増加(Caイオンの流出量に対応)の電場周波数依存性である(ピーク間電圧: 125 V, 30秒印加, 外液の電解質NaCl濃度0.02 M)。膜透過能の周波数依存性が1 kHzに極小を持ち両サイドで増加することを示す。これは低周波側での増加が電極による電気分解効果の結果起こるサンプル溶液の実効電気伝導度の増加によるもの(印加電圧を増加するにつれて100 Hz以下の電極を



印加電圧 125 V_{pp}, 外液の NaCl 濃度 0.02 M, 印加時間 30 秒

図 15 電場印加後の試料溶液の蛍光強度増加量の電場周波数依存性

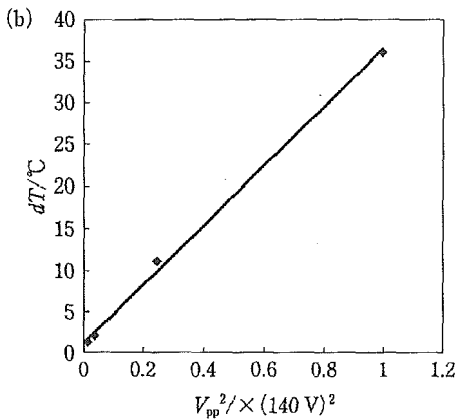
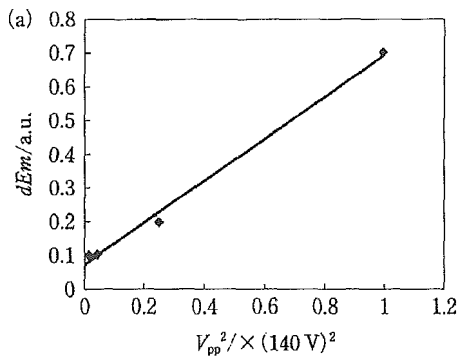


図 16 蛍光強度増加(a)と温度増加(b)の電圧 2 乗依存性

含むセルインピーダンスは極端に減少することが示される), また, 高周波側での増加はコロイド分散系の実効電気伝導度の周波数依存性によるものと解釈することができる(電気二重層を持つコロイド分散系の電気伝導度は粒子表面の電気伝導が大きな役割をはたし, この周波数領域では高周波になるほど増加する傾向にある)。実際この実験系ではサンプルの温度上昇が大きく, 電気伝導度の上昇に

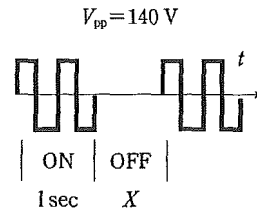
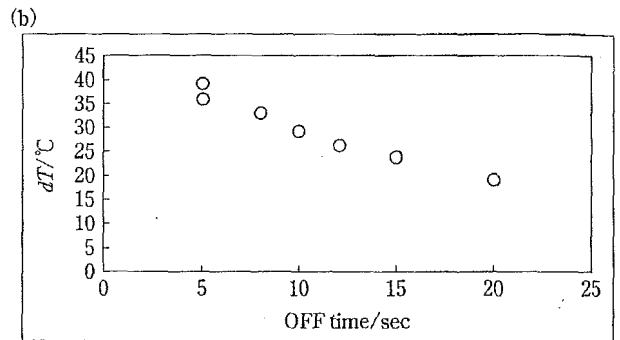
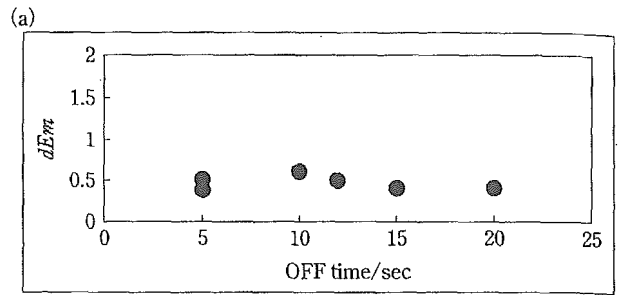


図 17 蛍光強度増加(a)と温度増加(b)の電場印加間隔(X)に対する変化

より電気エネルギーが温度へと転換されていることが示される。

ところで, 交流矩形波の turn on と turn off を繰り返すことで過剰な温度上昇は避けることができる。そこで, 標準的な実験のプロトコルとして 100 kHz 矩形波で 1 秒間の ON, 5 秒間の OFF の繰り返し 7 回を選択している(図 14 参照)。

先に述べた周波数依存性をサンプルによる電気エネルギー消費すなわち実効電気伝導度の変化によるとの解釈は膜透過能の電圧強度依存性とサンプル温度上昇のそれとを調べ比較することにより確認される。図 16 に示すように蛍光強度の変化分が電圧の 2 乗に比例すると同様に試料セル全体の温度上昇も電圧の 2 乗に比例することが分かる。これは電気エネルギーの消費が実効電気伝導度と電場強度の 2 乗の積で表される関係式に合致し, 温度上昇は電気伝導度に起因するいわゆるジュール熱, 同様に, 蛍光強度上昇も電気伝導度増加に起因する膜透過能の変化と理解される。この系で使用された電場強度は

ピーク間125 V/1 mmすなわち、直流分としては62.5 V/1 mmであり、これは2分子膜間では約10 mV程度である。この大きさは、エレクトロ・ポレーションで使用されるパルス電場での有効強度(200~1,000 mV/膜間)より一桁も少ない。

一方、電場印加のturn off時間を変化させて同様な実験を行うと異なった結果が得られる。図17に蛍光強度変化と温度上昇のOFF時間依存性を示す。膜透過能すなわち蛍光強度の変化分はOFF時間を長くしても不変であるが、温度上昇はOFF時間が長くなるほど減少する傾向を示す。これは電場印加で発生する熱は、周囲への熱拡散が行える十分な時間間隔をとれば温度上昇を押さえることができ、同時に膜透過機能変化に十分効果を与えるプロトコルが存在するというを示している。すなわち、膜

透過能はマイクロな領域でのエネルギー消費と密接な関係にあることが示唆される。

【参考・引用文献】

- 1) B. Yang, H. Matsumura, K. Katoh, H. Kise and K. Furusawa : *Langmuir*, **17**, 2283-2286 (2001).
- 2) B. Yang, K. Furusawa and H. Matsumura : *Langmuir*, **19**, 9023-9027 (2003).
- 3) K. Furusawa, H. Matsumura and T. Majima : *J. Colloid Interface Sci.*, **264**, 95-100 (2003).
- 4) H. Matsumura, V. Neytchev, N. Terezova and I. Tsoneva : *Colloids & Surfaces B*, **33**, 243-249 (2004).
- 5) V. Neytchev, N. Terezova, H. Matsumura and T. Tomov : *Histol. Histopathol.*, **17**, 649-656 (2002).

<松村 英夫>

Effect of various fluoride applications on remineralization of bovine tooth enamel using quantitative light-induced fluorescence *in vitro*

K. Kawasaki, T. Kawakami, M. Kambara

Preventive and Community Dentistry, Osaka Dental University, Japan

Key Words

Enamel, Fluoride, In vitro study, QLF, De-Re-mineralization

Abstract

The purpose of this *in vitro* study is to evaluate the remineralization process in relation to different topical fluoride applications with QLF. 160 bovine enamel specimens were mounted in acrylic rod and polished. Incipient lesions were formed in specimens by immersion for 12, 24, 48 or 96 hours in a demineralizing solution. The lesions were quantified with parameter ΔQ (total mineral loss from the lesions). Then specimens in each group were divided into 4 subgroups receiving different fluoride treatments (control, fluoridated dentifrice, APF-gel, and fluoridated dentifrice plus APF-gel). All specimens were immersed in artificial saliva for 28 days, except for the duration of the respective fluoride treatments. Lesions in all groups remineralized. In the 24-hour demineralization group, remineralization reached a plateau after 6 days. For groups with longer demineralization times such a plateau was reached after a longer time. For each demineralization period, the recovery of control and F⁻dentifrice groups was higher than for both APF-gel treated groups ($p < 0.05$). There was no difference between the remineralization rates of the two APF treated groups. It is concluded that the chosen

treatment modality for APF-gels was inhibiting remineralization in comparison to F⁻ dentifrice treatments or artificial saliva alone.

Introduction

In recent years, early caries lesions or precavitated lesions are more prevalent than cavitated tooth lesions. This fact has been established in many epidemiological studies [e.g. Ismail *et al.*, 1992; Clark *et al.*, 1995; Marthaler, 2004]. When creating an *in vivo* preventive care program, it is important to investigate strategies to repair incipient carious tooth enamel lesions. Inhibition of demineralization and the promotion of remineralization of these lesions are therefore considered to be one of the most important targets in preventive dentistry in the 21st century.

Quantitative light-induced fluorescence (QLF) has been found to be of use to detect and quantify de- and remineralizing lesions in tooth enamel longitudinally in time [de Josselin de Jong *et al.*, 1995; al-Khateeb *et al.*, 1997; Heinrich-Weltzien *et al.*, 2003]. In previous (*in vitro*) studies mineral loss or gain could be measured only in a destructive way e.g. with transverse microradiography [de Josselin de Jong *et al.*, 1987] providing endpoint

measurements. Because QLF is non-destructive, it allows longitudinal follow-up of the de- and remineralization process in time, providing not only information about the total remineralization level at the conclusion of the study but also about the rate of remineralization.

Topical fluorides cover a large variety of products. Both the use of low-concentrated fluoride products at high frequency (such as fluoridated dentifrice) by patients as well as the professional use of high-concentrated products at low frequency (such as acidulated phosphate fluoride solution/gel) have, in most cases, proved effective in reducing caries [Featherstone, 1999]. Given the research designs, these studies have shown the efficacy of fluoride on the inhibition of demineralization or the development of new caries occurring. The effect of different treatment modalities of fluoride on remineralization is relatively unexplored.

In the present study we longitudinally monitored the remineralization process of previously demineralized enamel lesions in relation to different kinds of fluoride applications and different demineralization degrees.

Materials and Methods

Preparation of Enamel Specimens

160 extracted bovine incisor teeth were used. Using a core drill, bovine enamel specimens (5 mm in diameter) were prepared to obtain specimens with an enamel layer of approximately 1.0 mm thick and a dentine layer of approximately 2.0 mm thick. The enamel surfaces were abraded using carbide papers of 600 - 1,500 grid and then polished with polishing paste (gamma alumina, grain

diameter 0.05 micrometer).

Demineralization

Each specimen was painted with an acid-resistant non-fluorescent varnish leaving an enamel window of approximately 2 x 2 mm² exposed to 14 ml of a demineralization solution for 24 , 46 , 72 or 96 hours at 37.0 °C. The demineralizing solution contained 0.1 M lactic acid (Kishida Chemical, Japan) and 0.2 g/L carboxymethyl cellulose sodium salt (Kishida Chemical) and was 50 % saturated with hydroxyapatite (Nihon Chemical, Japan) and adjusted to a pH of 5.0. In this way 4 groups of 40 enamel specimens were obtained, each group having incipient caries lesions with a different degree of demineralization. The mineral loss of the specimens was evaluated by measuring the fluorescence loss and lesion area of each lesion using the QLF system (QLF Clin, Inspektor Research Systems B.V., Amsterdam, The Netherlands).

Remineralization

All demineralized samples were immersed for a period of 4 weeks in 14 ml of a remineralization solution at pH 7.0 containing 20 mM HEPES (Dojindo Laboratories, Japan), 1.5 mM CaCl₂ (Wako Pure Chemical, Japan), 0.9 mM KH₂PO₄ (Wako Pure Chemical) and 130 mM KCl (Wako Pure Chemical) at 37°C. The solution was changed every 5 days. The mineral changes in the lesions, reflected by changes in fluorescence radiance and lesion area, were evaluated with QLF on 3, 6, 9, 12, 15, 21 and 28 days after the start of the remineralization process.

Fluoride application

During remineralization the specimens in

each demineralizing group were treated with one of four different fluoride applications (control group, fluoridated dentifrice treated group, acidulated phosphate fluoride (APF) treated group, and the group treated with fluoridated dentifrice and APF together). The control group was immersed in the remineralization solution. The fluoridated dentifrice group was immersed in a solution of 1 g dentifrice in 14 ml demineralized water (Check up Standard, Lion, Japan; contains 950 ppm F) for 5 minutes, three times per day. The APF group had APF gel (Florident Gel, Stone Pharmaceuticals, PA; contains 9,000 ppm F) applied to the surface for five minutes before the start of the remineralization period and after 14 days in the remineralization solution. The group treated with both the fluoridated dentifrice and APF gel, combined the process of the fluoridated dentifrice group and APF group. All fluoride treatment groups were immersed in remineralization solution except during the fluoride application period.

QLF measurement

Images of specimens containing white spot lesions were acquired with a QLF-Clin system (Inspektor Research Systems B.V., Amsterdam, The Netherlands) equipped with evaluation software QLF.exe version 2.00h to digitize and quantify the images. The Specimens were illuminated with violet-blue light ($\lambda = 390 - 430$ nm). A hand-piece with CCD-camera and a yellow high pass filter ($\lambda = 520$ nm) was fixed in a stand providing for optimal illumination of the specimen surfaces. Quantitative results were obtained of the following parameters: the mean fluorescence loss over the lesion (ΔF in %), the area of the lesion (A in mm^2), and total fluorescence loss over the lesion (ΔQ in $\text{mm}^2\%$).

These parameters were determined using a threshold of 5% fluorescence radiance loss [van der Veen and de Josselin de Jong, 2000]. ΔQ is comparable to the total mineral loss from the lesions as measured by longitudinal microradiography [Emami *et al.*, 1996].

Statistics

Statistical calculations, analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's all-pairwise-comparison test, were made with software package SPSS 11.0J for Windows (SPSS Inc, Chicago).

Results

The mean of ΔQ for the four groups immediately after demineralization, or day 0 of the remineralization process, are presented in Fig 1 to 4. The mean of ΔQ was found to be $-32.8 (\pm 14.9) \text{ \%} \cdot \text{mm}^2$ for the specimens in the 24 hours demineralized sample, $-84.8 (\pm 23.8) \text{ \%} \cdot \text{mm}^2$ for the 48 hours demineralized sample, $-130.9 (\pm 31.1) \text{ \%} \cdot \text{mm}^2$ for the 72 hours demineralized sample and $-168.4 (\pm 29.8) \text{ \%} \cdot \text{mm}^2$ for the 96 hours demineralized sample. The differences between the different demineralization times were statistically significant ($p < 0.05$).

There were no statistically significant differences found in ΔQ between the different remineralization groups at day = 0 for each of the demineralization periods. Remineralization was observed in all specimens. The remineralization process over 28 days for the different treatments is shown in Fig. 1 to 4. A comparison of the curves shows that regardless of fluoride treatment, for the 24 hours demineralized specimens the remineralization curve reaches a plateau after approximately 6 days. For the 48 hours demineralized groups a

plateau is reached after approximately 9 days, and for the 72 and 96 hours demineralized groups such a plateau is reached after approximately 15 days.

The remineralization curves in Fig. 1 to 4 show furthermore that the specimens treated with APF gel or APF gel and fluoride dentifrice behave different from those in the control group or fluoride dentifrice group.

The statistical significance of differences between different fluoride treatments groups at each measurement time during the remineralization period separated for each demineralization period is shown in Table 1. There were no statistical significant differences found between the control group and fluoridated dentifrice group ($p>0.05$) at any time and for any demineralization period. In the short-time demineralized samples (demineralized for 24 and 48 hours), the difference between a) the two APF treated groups and b) the fluoride dentifrice group and control group became significant from 6 days remineralization, with the exception of day 15 in the 24-hours demineralized group which was one day after the 2nd APF gel application. In the prolonged demineralized samples (demineralized for 72 and 96 hours), the statistical difference between a) the two APF treated groups and b) the fluoride dentifrice group and control group was significant from 12 days remineralization, except for the 96-hours demineralized APF and F-dentifrice group that became significantly different from the fluoride-dentifrice group after 15 days of remineralization.

For the 24 hours demineralized groups, the final ΔQ value had recovered more than 95 % for both the control group and fluoridated dentifrice group, with the APF treated grouped

lagging behind reaching a recovery of the final ΔQ value of about 70%. For longer demineralization times, recovery of the ΔQ value in the control group and fluoridated dentifrice group was less, and reached to about 80% after 28 days for the 96-hours demineralized group. In contrast, for the APF treated samples in the 96-hours demineralized group the recovery of the ΔQ value was less than 50%.

Discussion

Many *in vitro* and *in vivo* studies have been conducted to investigate which fluoride therapy is best for the prevention of dental caries [van Rijkom *et al.*, 1998]. Hausen *et al.* [2000] reported that there is no good evidence of the effect in controlling caries of high-risk individuals. Other researchers indicated that high concentrated fluoride agents are more effective in caries control in patients that have high caries activity and rampant caries [Schuller and Kalsbeek, 2003, Zimmer *et al.*, 2003]. In individuals with low caries activity however, the remineralization of existing carious lesions may be preferred over the inhibition of new caries. This study focused on the effect of high concentrated fluoride on the remineralization of caries. The current study showed that the lesions in the control group and fluoridated dentifrice group were more remineralized than in the two APF treated groups. Although, APF is effective in reducing dental caries [Ogaard *et al.*, 1994; van Rijkom *et al.*, 1998], the mechanism involved may rather be the reduction of enamel demineralization than the enhancement of enamel remineralization. This was also suggested by ten Cate *et al.* [1981], who indicated that increased remineralization of the surface layer

may imply that the outer surface of the lesion becomes filled and thereby inhibits the inward diffusion of mineral ions into the lesion. This mechanism could explain the outcome of our *in vitro* study, where using optimum conditions for remineralization, the inhibiting effect of high fluoride dosage on mineral uptake was observed very clearly.

The outcome of our study differs from the findings of Lagerweij and ten Cate [2002], who concluded that fluoride toothpaste combined with fluoride gel treatments showed high remineralization compared with the fluoride toothpaste only in their *in situ* study. In their study the remineralization advances in the process of demineralization and remineralization, where the conditions in our study allow only remineralization. In low risk individuals, the result of our research and the situation of an actual oral cavity may correlate.

High-frequency use of low concentrations of fluoride agents has been considered most beneficial [Featherstone, 1999]. In this study, the lesions in the control group and fluoridated dentifrice group both showed high remineralization and groups other than the 96-hour demineralized group recovered almost completely. No significant differences between the control group and fluoridated toothpaste group were found. This may have been caused by the high remineralization properties of the artificial saliva used in this *in vitro* study. The different behavior of the groups treated with high dosage APF-gels were apparent almost from the start of the remineralization period. The APF-gel inhibited the remineralising potential of the artificial saliva. In order to obtain high remineralization, it seems important to eliminate the influence of an inhibition factor as much as possible.

Iijima *et al.* [1999] investigated that the initial lesion size and mineral loss at baseline play an important role in the remineralization process. They reported that a lower mineral content at baseline results in a greater mineral increase for remineralization. Although, QLF can not observe the proportion of the mineral uptake, we observed a slowing down of the remineralization process for APF treated groups with increasing demineralization times. A change that was to a lesser extent also observed for the control and fluoride dentifrice groups as well.

The results from the study show what kind of remineralization approach should be selected by the difference in the ΔQ value observed by QLF. The information acquired by QLF also gives important information to establish of a custom-made preventive care program for each individual.

Acknowledgments

The Authors wish to thank Dr. Monique H. van der Veen, Academic Center for Dentistry Amsterdam, The Netherlands, and Dr. Elbert de Josselin de Jong, Inspektor Research Systems, The Netherlands, for their helpful advise. This study was supported, in part, from Scientific Research from Ministry of Health, Labour and Welfare of Japan (grant no. H15-Iryou-019), and Scientific Research from Ministry of Education, Science and Culture of Japan (grant no. 15390658 and 16791151).

References

al-Khateeb S, ten Cate JM, Angmar-Mansson B, de Josselin de Jong E, Sundstrom G, Exterkate RA, Oliveby A: Quantification of formation and remineralization of artificial enamel lesions with a new portable

- fluorescence device. *Adv Dent Res* 1997; 11: 502-506.
- Clark DC, Hann HJ, Williamson MF, Berkowitz J. Effects of lifelong consumption of fluoridated water or use of fluoride supplements on dental caries prevalence. *Community Dent Oral Epidemiol* 1995; 23: 20-24.
- de Josselin de Jong E, van der Linden AH, ten Bosch JJ: Longitudinal microradiography: a non-destructive automated quantitative method to follow mineral changes in mineralised tissue slices. *Phys Med Biol* 1987; 32: 1209-1220.
- de Josselin de Jong E, Sundstrom F, Westerling H, Tranaeus S, ten Bosch JJ, Angmar-Mansson B: A new method for in vivo quantification of changes in initial enamel caries with laser fluorescence. *Caries Res* 1995; 29: 2-7.
- Emami Z, Al-Khateeb S, de Josselin de Jong E, Sundström F, Trollsås K, Angmar-Månsson B: Mineral loss in incipient caries lesions quantified with laser fluorescence and longitudinal microradiography. A methodologic study. *Acta Odontol Scand* 1996; 54: 8-13.
- Featherstone JD: Prevention and reversal of dental caries: role of low level fluoride. *Community Dent Oral Epidemiol* 1999; 27: 31-40.
- Hausen H, Karkkainen S, Seppa L: Application of the high-risk strategy to control dental caries. *Community Dent Oral Epidemiol* 2000; 28: 26-34.
- Heinrich-Weltzien R, Kuhnisch J, van der Veen M, de Josselin de Jong E, Stosser L: Quantitative light-induced fluorescence (QLF) - a potential method for the dental practitioner. *Quintessence Int* 2003; 34: 181-188.
- Iijima Y, Takagi O, Ruben J, Arends J: In vitro remineralization of in vivo and in vitro formed enamel lesions. *Caries Res*. 1999; 33: 206-213.
- Ismail AI, Brodeur JM, Gagnon P, Payette M, Picard D, Hamalian T, Olivier M, Eastwood BJ: Prevalence of non-cavitated and cavitated carious lesions in a random sample of 7-9-year-old schoolchildren in Montreal, Quebec. *Community Dent Oral Epidemiol* 1992; 20: 250-255.
- Lagerweij MD, ten Cate JM: Remineralisation of enamel lesions with daily applications of a high-concentration fluoride gel and a fluoridated toothpaste: an in situ study. *Caries Res* 2002; 36: 270-274.
- Marthaler TM: Changes in dental Caries 1953-2003. *Caries Res* 2004; 38: 173-181.
- Ogaard B, Seppa L, Rolla G: Professional topical fluoride applications - clinical efficacy and mechanism of action. *Adv Dent Res* 1994; 8: 190-201.
- Schuller AA, Kalsbeek H: Effect of the routine professional application of topical fluoride on caries and treatment experience in adolescents of low socio-economic status in the Netherlands. *Caries Res* 2003; 37: 172-177.
- ten Cate JM, Jongebloed WL, Arends J: Remineralization of artificial enamel lesions in

vitro. IV. Influence of fluorides and diphosphonates on short- and long-term remineralization. *Caries Res* 1981; 15: 60-69.

van der Veen MH, de Josselin de Jong E: Application of quantitative light-induced fluorescence for assessing early caries lesions; in Faller RV (ed): *Assessment Oral Health*, Basel, Karger, 2000, pp144-162.

van Rijkom HM, Truin GJ, van 't Hof MA: A meta-analysis of clinical studies on the caries-inhibiting effect of fluoride gel treatment. *Caries Res* 1998; 32: 83-92.

Zimmer S, Jahn KR, Barthel CR: Recommendations for the use of fluoride in caries prevention. *Oral Health Prev Dent* 2003; 1: 45-51.