

Fig. 23 Electron micrograph showing hybrid particles of small Silica-20 particles on core PS-740 latex particles: (a) PS-740 lattices; (b) hybrid particles deposited by a single (PLL-19 + Silica-20) layer; (c) hybrid particles deposited by pair (PLL-19 + Silica-20) layers.

From these results, it is concluded that, by combining a multilayer formation of polyelectrolytes and charged colloid particles, we can prepare many new synthetic materials comprising different chemical species, different structures, and different shapes.

CONCLUSION

Here, several preparation processes of composite particles relating to the electrical properties of particles are described: 1) the heterocoagulation process of amphoteric polymer lattices on spherical silica; 2) composite formation comprising silica/vesicle or silica/vesicle/silica particles; and 3) the buildup process of polyelectrolyte or colloid particle multilayers on latex or silica surfaces. All these results indicate that the electrokinetic measurement is an essential and powerful technique for monitoring the formation process of composite particles with different compositions. Finally, the present authors would like to stress that the formation processes described here were concerned with the semimicron-sized particles, but these techniques can be applied to systems, including nanosized particles with slight reversions.

REFERENCES

1. Matijevic, E. *Interfacial Electrokinetics and Electrophoresis*; Delgado, A.V., Ed.; Surfactant Science Series, Marcel Dekker, Inc.: New York, 2002; Vol. 106, 199–218.
2. *Electrical Phenomena at Interfaces*; Ohshima, H., Furusawa, K., Eds.; Surfactant Science Series, Marcel Dekker, Inc.: New York, 1998; Vol. 76.
3. Lyklema, J. *Fundamentals of Interface and Colloid Science*; Academic Press, Inc.: London, 1995; Vol. II.
4. von Smoluchowski, M. *Handbuch der Electricitat und des Magnetismus*; Graetz, W., Ed.; Barth: Leipzig, 1914; Vol. II, 366.
5. Komagata, S. *Nihon Kagaku Kaishi* **1932**, 53, pp. 342, 969.
6. Furusawa, K.; Uchiyama, K. *J. Colloid Interface Sci.* **1998**, *140*, 217.
7. Sasaki, H.; Muramatsu, A.; Arakatsu, H.; Usui, S. *J. Colloid Interface Sci.* **1991**, *142*, 266.
8. Usui, S.; Imamura, Y.; Sasaki, H. *J. Colloid Interface Sci.* **1987**, *118*, 335.
9. Marlow, B.J.; Fairhurst, D.; Pendse, H.P. *Langmuir* **1988**, *4*, 611.
10. O'Brien, R.W.; Midmore, B.R.; Lamb, A.; Hunter, R.J. *Faraday Discuss. Chem. Soc. (London)* **1990**, *90*, 301.
11. Dukhin, A.S.; Shilov, V.N.; Oshima, H.; Goetz, P.J. *Langmuir* **1999**, *15*, pp. 6692, 3445.
12. Hozumi, Y.; Furusawa, K. *Colloid Polym. Sci.* **1990**, *268*, 469.
13. Kotera, A.; Furusawa, K.; Takeda, Y. *Kolloid-Z. Z. Polym.* **1970**, *239*, 677.
14. Juang, M.S.; Krieger, I.M. *J. Polym. Sci.* **1976**, *14*, 2089.
15. Van den Hul, H.J.; Vanderhoff, J.W. *Electroanal. Chem.* **1972**, *37*, 161.
16. Kolthoff, I.M.; Miller, I.K. *J. Am. Chem. Soc.* **1951**, *73*, 3055.
17. Ottewill, R.H.; Shaw, J.N. *Kolloid-Z. Z. Polym.* **1976**, *218*, 34.
18. Hearn, J.; Ottewill, R.H.; Shaw, J.N. *Br. Polym. J.* **1972**, *2*, 116.
19. Levine, S.; Neale, G.; Epstein, N. *J. Colloid Interface Sci.* **1976**, *57*, 427.
20. Greenwood, R.; Bergstrom, L. *J. Eur. Ceram. Soc.* **1997**, *17*, 537.
21. Furusawa, K.; Anzai, C. *Colloid Polym. Sci.* **1987**, *265*, 882.



22. Furusawa, K.; Kimura, Y.; Tagawa, T. J. *Colloid Interface Sci.* **1986**, *109*, 69.
23. Velev, O.D.; Furusawa, K.; Nagayama, K. *Langmuir* **1996**, *12*, pp. 2374, 2385.
24. Wilcox, D.L.; Berg, M. *Hollow and Solid Spheres and Microspheres*. In *Proceedings of the Materials Research Society, Pittsburgh*; Wilcox, P.L., et al., Eds.; Science and Technology Associated with Their Fabrication and Application, 1995; Vol. 372, 3-13.
25. Hier, K.K. J. *Colloid Interface Sci.* **1966**, *21*, 569.
26. Decher, G.; Hong, J.D. *Ber. Bunsenges. Phys. Chem.* **1991**, *95*, 1439.
27. Decher, G. *Science* **1997**, *277*, 1232.
28. Caruso, F.; Mohwald, H. *Langmuir* **1999**, *8276*, 15.
29. Caruso, F.; Caruso, R.A.; Mohwald, H. *Science* **1988**, *1111*, 282.
30. Gherardi, P.; Matijevic, E. *Colloid Interface Sci.* **1986**, *109*, 57.
31. Furusawa, K.; Anzai, C. *Colloids Surf.* **1992**, *63*, 103.
32. Furusawa, K.; Velev, O.D. *Colloids Surf., A Physicochem. Eng. Asp.* **1999**, *159*, 359.
33. Yang, B.; Matsumura, H.; Katoh, K.; Kise, H.; Furusawa, K. *Langmuir* **2001**, *17*, 2283.
34. Lehrmann, R.; Seeling, J. *Biochim. Biophys. Acta* **1994**, *1189*, 89.
35. Furusawa, K.; Satou, S. *Colloids Surf.* **2001**, *195*, 143.
36. Homola, A.; James, R.M. J. *Colloid Interface Sci.* **1977**, *59*, 123.
37. van Duerm, P.; Norde, W.; Lyklema, J. J. *Colloid Interface Sci.* **1977**, *59*, 123.
38. Furusawa, K.; Tomotsu, N. J. *Colloid Interface Sci.* **1983**, *93*, 504.



2.5 リポソーム含有複合微粒子

松村英夫*

2.5.1 はじめに

リポソームは脂質2分子膜の微粒子であり、その内部の空胞（液胞）や膜中に種々の生体機能性分子を保持できることから、薬物等を配達するキャリアーとして研究されている。我々はこのように分子を輸送する機能をもつリポソームと他の機能をもつ微粒子を複合化することで、より高機能をもち医学・医療に貢献できると期待される複合微粒子の研究開発を進めている。ここでは、研究の基盤となるリポソームといくつかの固体微粒子から構成される複合微粒子の作製例について紹介する。

2.5.2 微粒子複合化の基礎

液中で微粒子を複合化させるときの基本的考え方を述べる。多くの微粒子は疎水コロイド粒子であり、粒子間に何らかの反発力が働かない限り集合し塊を形成する（凝集）。一つの粒子の周囲に異種の粒子を順次接合して行くことを考えるとき、中心の核となる粒子も周囲に接着する粒子も単一粒子として液中に存在しなければならない。すなわち、同種粒子間には反発力、異種粒子間には引力が働くような条件を設定する必要がある。粒子間に働く力には、静電反発力・引力、疎水性相互作用引力、水和反発力、粒子表面分子系の熱運動による反発力（低分子炭素鎖、高分子鎖、膜など）、架橋分子の利用による引力等、種々のものがあるが、最も一般的なものは静電反発力・引力の利用であろう。また、これは他の力と共存することが多いので一応考慮しておいたほうが良い。粒子間の静電的相互作用を考えると注意すべきことは、この相互作用は実際にはそれぞれの粒子表面に形成されている電気二重層間の相互作用であることである。すなわち、粒子そのものの帯電の符号のみで相互作用が決るわけではない。それぞれが、正、負に帯電していても相互作用が引力になるとはかぎらず、反発力になることもある。これは、それぞれの表面電荷（電位）の大きさと電気二重層の特性（粒子間接近にともなうエネルギー緩和機構）に依存する。これらの詳細はコロイド科学の専門書に譲るが、複合粒子を作製する上では、中心粒子の表面電荷（電位）と周辺粒子の表面電荷（電位）は異符号で、しかもある程度大きく同等の大きさを持っていることが望ましい。これら成分微粒子の表面電荷（電位）の確認や形成された複合粒子のそれについては電気泳動度測定（ゼータ電位測定）で行う。きれいな構造の複合粒子を作製するための、その他の因子として混合比、粒子径比などの問題がある。周辺粒子が過剰であること（少なくとも凝集塊が出来ない領域にまで）、周辺粒子径がある程度中心粒子に比べ小さい

* Hideo Matsumura 産産業技術総合研究所 光技術研究部門&ライフエレクトロニクス研究ラボ 主任研究員

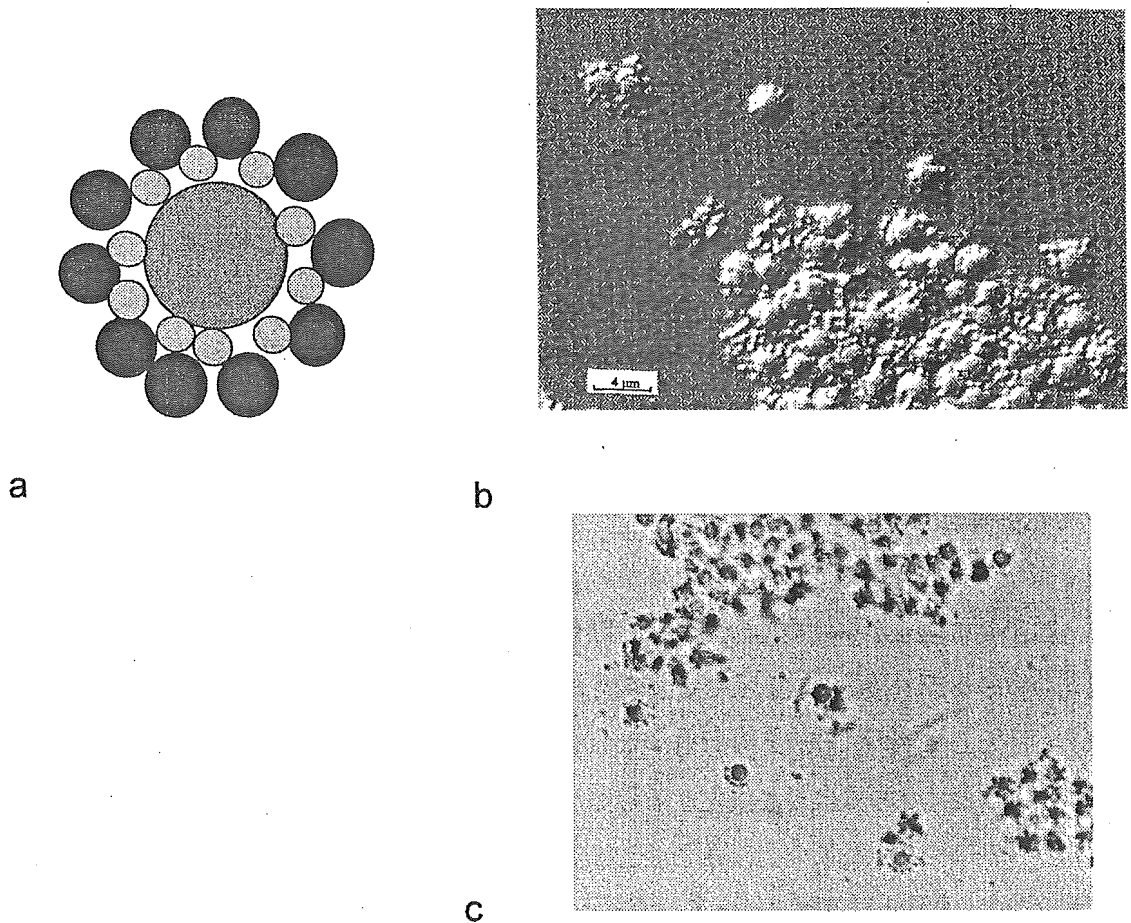


図1 金平糖型複合微粒子 (シリカ/リポソーム/シリカ)

ことなどが必要である (粒径比1:3-4が必要という報告もある)。また、架橋やバインダー分子を用いる場合には中心粒子にバインダーを反応 (付着) させ、それに周辺粒子を付着させるように逐次的反応操作が必要であり、処理過程でそれぞれの成分の分離操作が必要となる。分離操作には遠心分離、ろ過、透析操作などが用いられる。

中心に粒子径 $1.5\mu\text{m}$ のシリカ微粒子、その周りに多くの卵黄ホスファチジルコリンで形成されるリポソーム微粒子 (粒子径 $0.2\mu\text{m}$) を、さらにその周りに粒子径 $0.5\mu\text{m}$ のシリカ微粒子もつ金平糖型複合微粒子の模式図と光学顕微鏡写真を図 1a, b, c に示す。それぞれの微粒子表面の電荷が反対になる溶液条件下 (図 1b, LaCl_3 10^{-4}M)¹⁾ やリポソームにカチオン性の脂質を加えて (図 1c)、ヘテロコアグレーションが起こる条件で作製したものである。シリカ上でこのリポソームが粒子状で吸着していることは実験的に検証された²⁾。

2.5.3 マグネット・リポソーム

磁性をもち外部磁場によりその存在場所がコントロールできる磁気微粒子と機能性分子を運ぶことのできるリポソームとの複合化は興味ある系である。任意の場所で任意の時間に試薬 (薬物

やプローブ分子)を放出,供給するツール開発の可能性がある。すなわち,試薬のターゲティング輸送と制御リリースの両特性を持つ微粒子開発である。金平糖型複合微粒子「マグネト・リポソーム」の作製は,中心の磁気微粒子と周囲のリポソーム微粒子の接続にタンパク質を仲立ちとするブリッジング法を用いる。

磁気微粒子(ヘマタイト微粒子)の作製は以下のようなものである。各種濃度の FeCl_3 水溶液を密栓瓶中で 100°C で各時間処理する。粒子サイズは濃度と反応時間で決る。粒子サイズを揃えるために沈降分離処理を数回繰り返す。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。ヘマタイトの数百 nm - $1\mu\text{m}$ が得られているが,観察の容易さから $0.7\mu\text{m}$ の粒子で検討した。この磁気微粒子は勾配磁場下では磁場強度の大きい所へ泳動しその磁気泳動速度係数として約 $0.01(\text{cm/s})$ (T/cm)程度のものであることが判った。ここで, T は磁場強度テスラを表す。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した。シリカ層の合成はテトラエトキシシランを加水分解することで行った。ヘマタイト表面にシリカ層を合成すれば,粒子表面電荷密度を高め静電的反発力を増すと同時に水和反発力により非常によい単粒子状態で水中に分散させることが出来る。透析をくりかえしたシリカ層を持つヘマタ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わかった。 pH 中性領域では十分な負電荷をもち粒子間反発力をもつことが確認された。さらに,この粒子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た(図2a)。また, X 線顕微鏡や透過型電子顕微鏡により,シリカ層が滑らかにヘマタイト粒子表面に形成されていることについても確認された。さらに,数百ガウスの外部磁場で容易に会合し(図2b),磁場を外せば容易に単粒子に再分離,再分散する。

一方,リポソームは細胞のモデルとして利用されたりドラックデリバリー用のカプセルとして

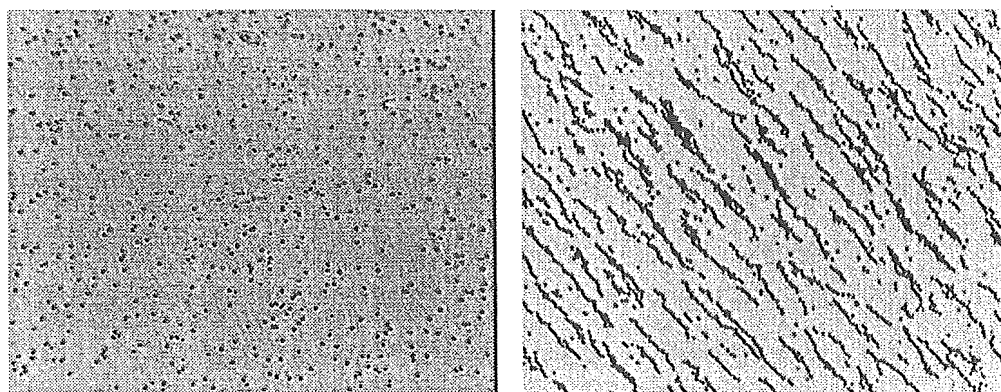


図2 シリカをコートしたヘマタイト

a: 磁場がかかっていないとき。b: 数百ガウス程度の磁場による磁気微粒子の集積と配向。

研究されているもので、脂質2分子膜（厚さ約5nm）の殻中に種々の分子を閉じ込めておける構造をもつ。シリカ層コーティングされた磁気微粒子表面上にリポソーム粒子を付着させる方法として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可逆吸着であることが知られている。これは安定な複合粒子作製やまた生体適合性の観点からも有用である。タンパク質 Cytochrom C や Lysozyme の濃度 1mg/ml の水溶液とシリカコーティング磁気微粒子を混合し、タンパク吸着を施す。その後、沈降分離を繰り返し上澄みをそのつど除去しタンパク吸着微粒子試料とする。これとリポソーム分散液と混合し複合微粒子マグネット・リポソームを作製する。これらの塩基性タンパク質は正味電荷が正でありまた疎水性残基による疎水性相互作用と静電的相互作用の両引力によりバインダーとしての役割をはたす。作製プロセスを確認するため、各ステップで形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3）³⁻⁵。光学顕微鏡観察を容易にするためにさらに0.4ミクロン程度のシリカ粒子を外側に付着させたものの像を図4に示す。リポソームは水溶液中に分散した状態でのみ構造安定なものであるため、出来上がったマグネット・リポソームも水中に分散状態で保存される。

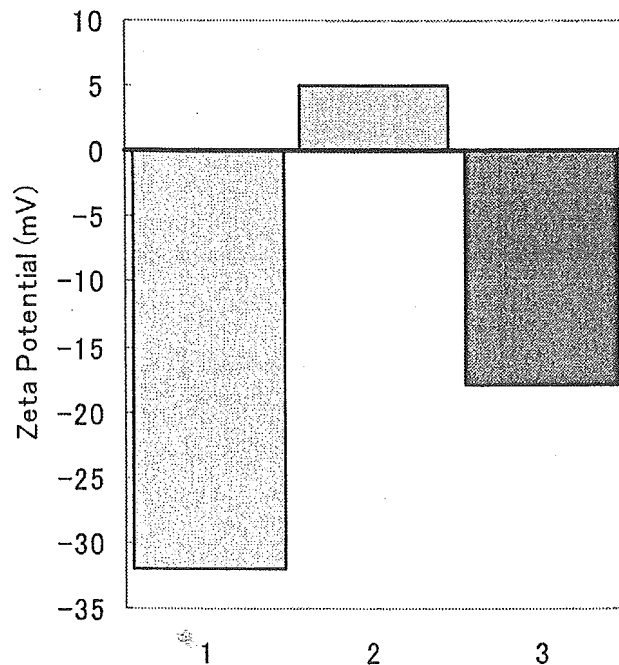


図3 複合微粒子作製過程の各ステップにおける粒子表面の表面電位

1: シリカコートされたヘマタイト, 2: タンパク吸着後, 3: リポソーム吸着後。

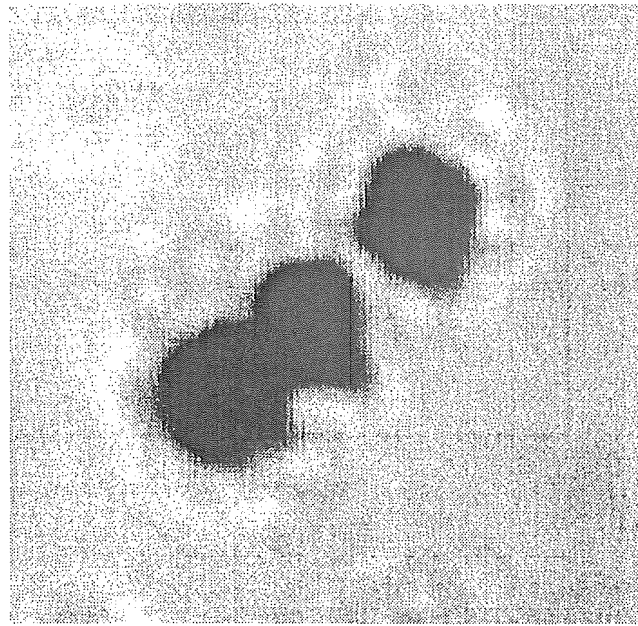


図4 ヘマタイト粒子・リポソーム・シリカの3層構造のマグネット・リポソームの光学顕微鏡像
中心のヘマタイトは0.7ミクロンの場合。

2.5.4 リポソームのエレクトロ・パーミエーション

マグネット・リポソームの医療応用の一つとして、エレクトロケモセラピーへの適用が考えられる。電場印加の際、薬剤を内包するマグネット・リポソームを用いれば磁性針による勾配磁場により薬物投与の場所限定ができ、電場誘導によりリポソームから放出される薬物をその場でエレクトロポレーション機構により細胞へ導入することが出来ると考えられる。これにより薬物投与効率の改善や副作用の低減をはたせられると思われる。

電場印加によるリポソーム内包試薬の放出特性をしらべた。電場は矩形波交流の10-100kHzを用い、電場強度はピーク間電圧最大140Vを1mm間隔の白金電極に加えた。電場印加されるリポソーム分散サンプル量は約3mlでマグネチックスターラーで常時攪拌すると共に、水浴にて温度コントロール(7°C)を施された。この実験に用いたリポソーム試料は、リポソーム内相にCaイオンと結合して蛍光強度が増大する蛍光分子Quin 2を封入し、外相溶液にCaイオンを含む水溶液を用いた⁶⁾。また、この逆の組み合わせの試料系も実験に用いた。内相に封入した分子が電場印加によりリポソーム膜を透過し外相に流出した結果生じるQuin 2-Caイオンコンプレックスの量は増大する蛍光強度の測定にて行った。この測定は通常の蛍光分光光度計を用いた。電場印加によるリポソーム内包のCaイオンの放出特性をしらべると、明らかな周波数依存性が見られた(図5)。1kHzに極小をもち両サイドで蛍光強度の増加量は大きくなっている。より低周波、より高周波において膜透過性が大きいことを示した。膜透過能の周波数依存性は低周波で

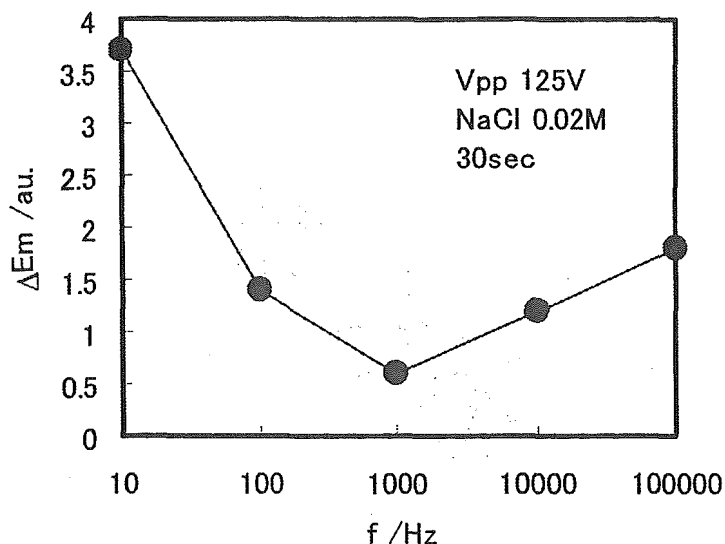


図5 電場印加後の試料溶液の蛍光強度増加量の電場周波数依存性
印加電圧 125V_{p-p}, 外液の NaCl 濃度 0.02M, 印加時間 30 秒。

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、また、高周波側での増加は微粒子の表面に形成されている電気二重層による表面電気伝導が大きな役割をはたす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と解釈することができる⁷⁾。すなわち、膜のエレクトロ・ポレーション（膜穴の開閉）の確率的平衡反応が電場エネルギーの消費の結果として温度上昇が起こり開側へシフトした結果であると解釈できる。これは、局所領域でのジュール熱の発生が主な原因になっている可能性を意味していて、電場強度そのものが必ずしも大きいことが必要でないことを示唆している。

2.5.5 おわりに

分子キャリアーとしての機能をはたすりポソームを含む複合微粒子の作製は、リポソーム粒子が粒子状（ベシクル状）で他の微粒子表面に固定されることが必要である。これは脂質種類や固体粒子の種類に依存する可能性があり今後幅広い組み合わせについての研究開発が必要である。

文 献

- 1) Bo Yang *et al.*, *Langmuir*, 17 2283 (2001).
- 2) Bo Yang *et al.*, *Langmuir*, in press.
- 3) K. Furusawa *et al.*, *J. Colloid Interface Sci.*, 264 (2003) 95.
- 4) 松村英夫ら, 厚生労働省科学研究費補助金報告書 H14-ナノ-018, 73 (2003).

- 5) 松村英夫ら, 機能的に配置された磁気粒子・リポソーム粒子複合体, (特許第 3200704 号), (2001).
- 6) V. Neytchev *et al.*, *Histol Histopathol*, 17 649 (2002).
- 7) H. Matsumura *et al.*, in *Interfacial Electrokinetics and Electrophoresis*, 971 (2002).

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-Remineralization

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, Traanaeus 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.

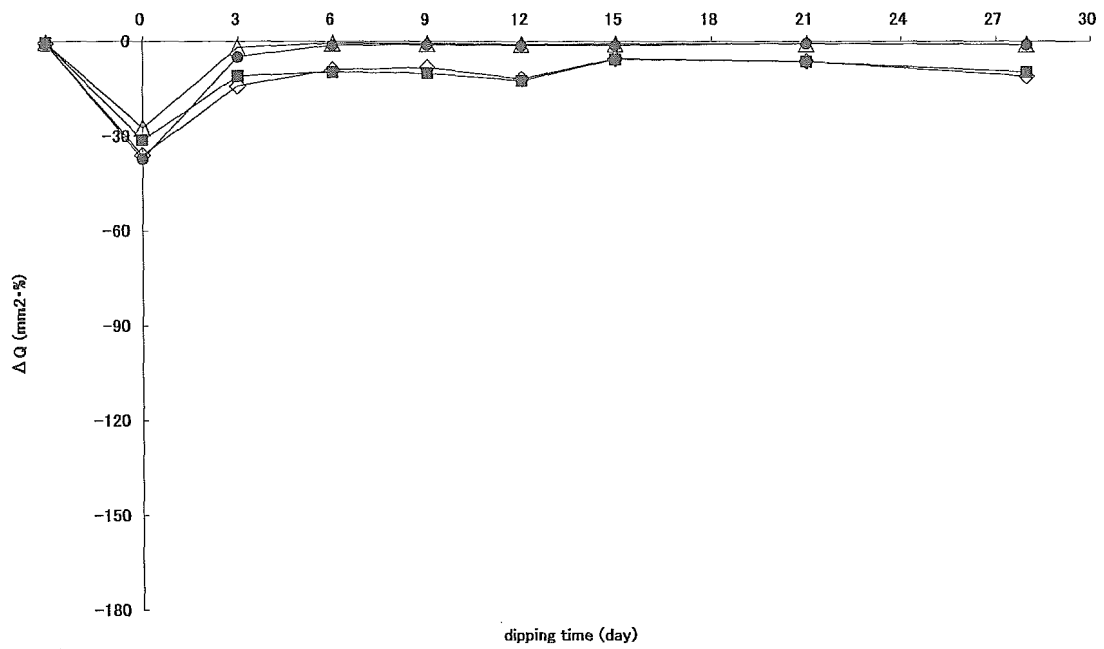


Fig. 1 The mean of ΔQ for the remineralizing process during 28 days of the 24-hour demineralized sample group.

●: control group, Δ : fluoridated dentifrice treated group,
 ■: APF treated group, \diamond : fluoridated dentifrice and APF treated group

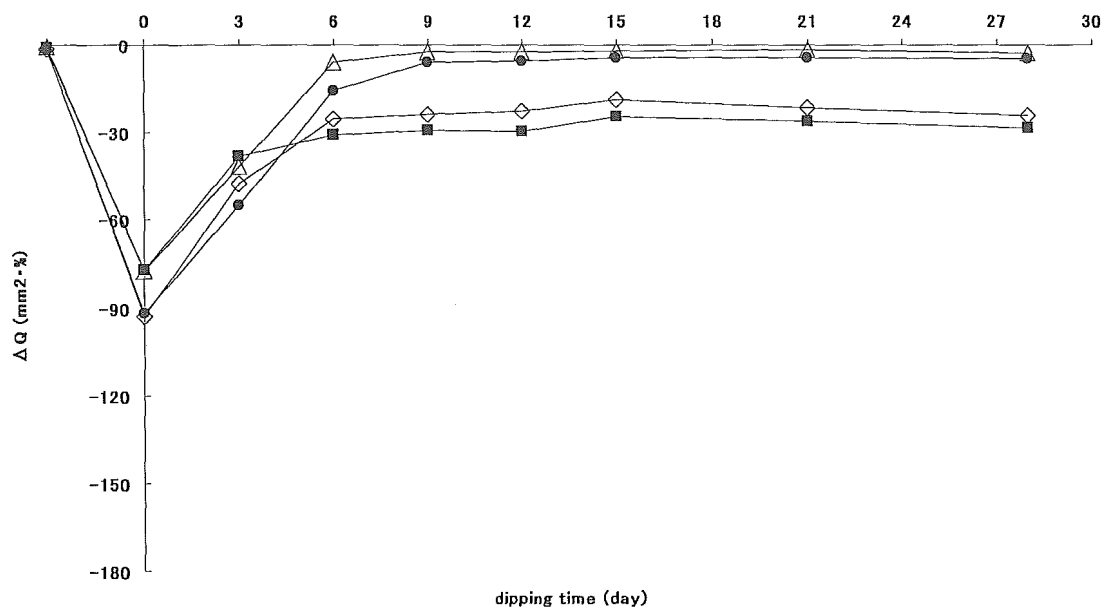


Fig. 2 The mean of ΔQ for the remineralizing process during 28 days of the 48-hour demineralized sample group.

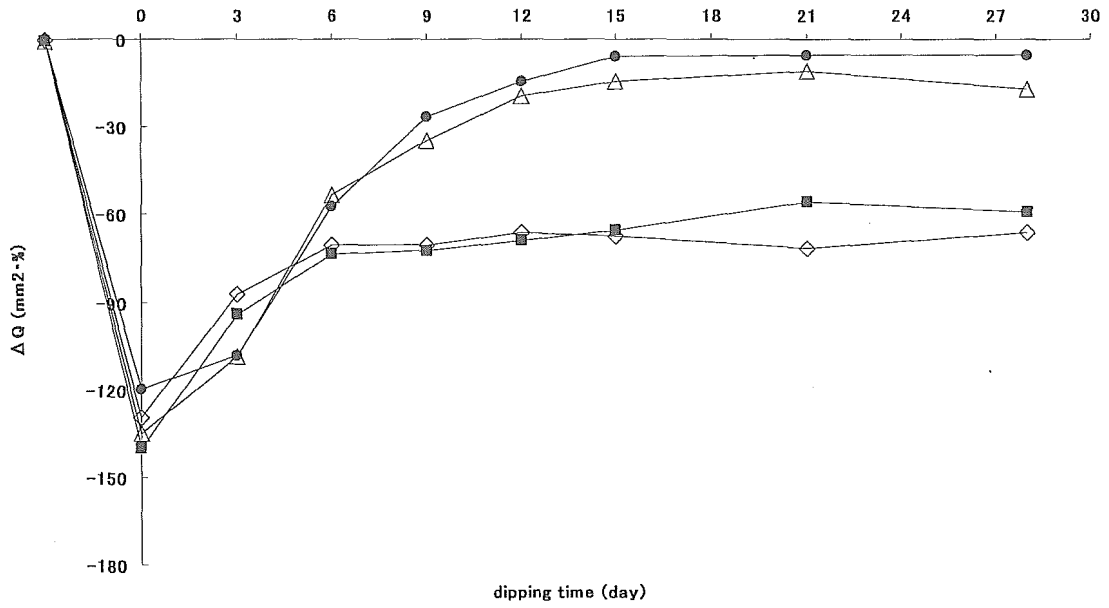


Fig. 3 The mean of ΔQ for the remineralizing process during 28 days of the 72-hour demineralized sample group.

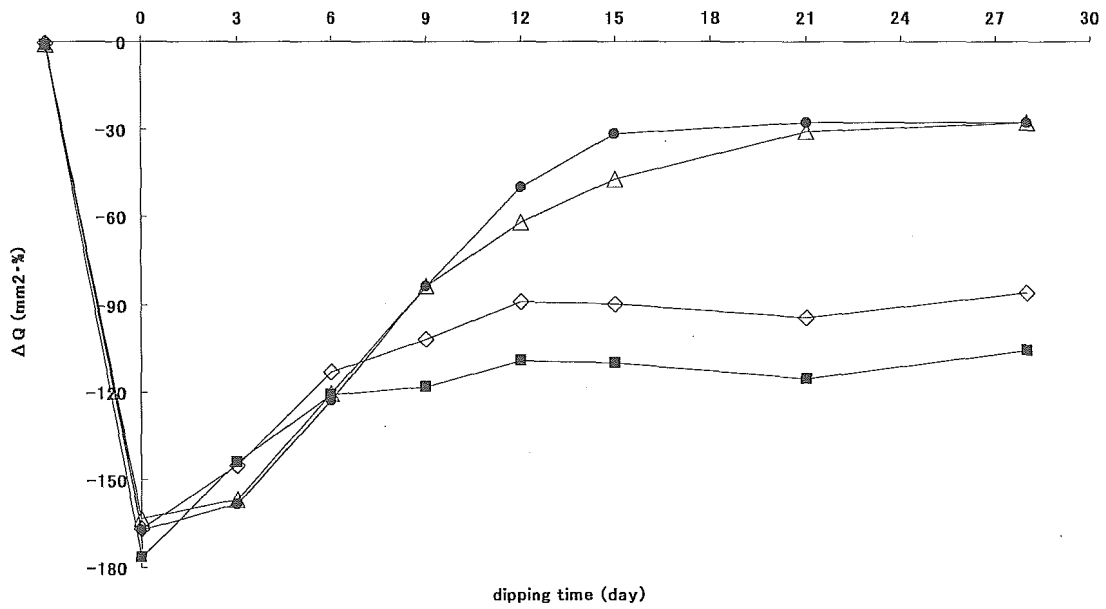


Fig. 4 The mean of ΔQ for the remineralizing process during 28 days of the 96-hour demineralized sample group.

Table 1 Significance of difference in the mean of ΔQ (* p < 0.05).

		fluoridated dentifrice treated group				APF treated group				fluoridated dentifrice and APF treated group			
		demineralization solution dipping time				demineralization solution dipping time				demineralization solution dipping time			
		24 hours	48 hours	72 hours	96 hours	24 hours	48 hours	72 hours	96 hours	24 hours	48 hours	72 hours	96 hours
control group	3rd day												
	6th day					*	*			*			
	9th day					*	*			*	*		
	12th day					*	*	*	*	*	*	*	*
	15th day					*	*	*	*	*	*	*	*
	21st day					*	*	*	*	*	*	*	*
	28th day					*	*	*	*	*	*	*	*
fluoridated dentifrice treated group	3rd day									*			
	6th day					*	*			*	*		
	9th day					*	*			*	*		
	12th day					*	*	*	*	*	*	*	
	15th day					*	*	*	*	*	*	*	*
	21st day					*	*	*	*	*	*	*	*
	28th day					*	*	*	*	*	*	*	*
APF treated group	3rd day												
	6th day												
	9th day												
	12th day												
	15th day												
	21st day												
	28th day												

光誘導蛍光定量法により観察した *in vitro* における エナメル質再石灰化に及ぼす各種フッ化物応用の影響

川上 富清 川崎 弘二 神原 正樹
かわ しみ とみ きよ かわ さき こう じ かん ばら まさ き

抄録：異なる脱灰程度のエナメル質人工初期う蝕試料に対し、それぞれ異なる局所的フッ化物応用を試みたうえで経時的な再石灰化過程のモニタリングを行うことにより、脱灰程度に対するフッ化物応用の至適条件を *in vitro* 環境下で検討した。試料として作製したウシ鏡面研磨エナメル質を 24, 48, 72 および 96 時間脱灰溶液に浸漬して人工初期う蝕試料を作製した。脱灰程度の異なる初期う蝕試料に対し、異なるフッ化物応用、すなわちコントロール群、フッ化物配合歯磨剤群、APF 群およびフッ化物配合歯磨剤+APF 群を設定し、28 日間の再石灰化処理を行った。初期う蝕試料の再石灰化程度は光誘導蛍光定量法 (QLF 法) によって解析し、回復率を算出して評価を行った。その結果、再石灰化の過程において、コントロール群とフッ化物配合歯磨剤群、2 つの APF 処理群はそれぞれ近似した傾向を示し、コントロール群とフッ化物配合歯磨剤群ではすべての脱灰時間群において最終的に 90% 程度の回復がみられた。一方、2 つの APF 処理群においては、24 時間脱灰群においては 85% 以上の回復がみられたが、とくに APF 群の 96 時間脱灰群では 40% 程度の回復であった。以上の結果から、 ΔF 値によって表現される低脱灰の初期う蝕に対しては、フッ化物応用の種類にかかわらず高い再石灰化を促進することができるが、高脱灰の初期う蝕に対しては、高濃度のフッ化物塗布を行わず、低濃度のフッ化物を継続的に作用させることでより高い回復を導く可能性のあることが明らかとなった。

緒 言

近年実施された多くの疫学的研究の結果から、初期う蝕あるいは窩形成前のう蝕は、う窩に至ったものより多く検出されていることが明らかとなっている。¹⁻³ 脱灰によって引き起こされたエナメル質の傷害が再石灰化現象によって修復できるという概念は、う蝕予防を念頭に置いた歯科保健のマネジメントにおいてとくに重要である。

90 年代以降、さまざまな初期う蝕検出機器が発表され、肉眼で評価することが困難な初期う蝕の診断が可能となりつつある。初期う蝕の脱灰程度を非破壊的に観察する手段として光誘導蛍光定量法 (quantitative light-induced fluorescence; QLF) がある。⁴⁻⁶ QLF 法は象牙質に存在す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評価す

る方法である。

初期う蝕の再石灰化にフッ素イオンが与える影響は数多く研究され、低濃度フッ素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。⁷⁻¹¹ しかし、初期う蝕における脱灰病変の大きさやミネラル喪失量、¹² 初期う蝕表層のエナメル質性状¹³ が再石灰化量に影響を与えるという報告もあり、初期う蝕における再石灰化の至適条件について、いまだコンセンサスが得られていないのが現状である。すなわち、QLF 法などの方法により初期う蝕の定量的評価が行えたとしても、評価した初期う蝕に対し、どのような再石灰化を促進させるアプローチを選択すべきかのコンセンサスが得られていないのが現状である。

そこで本研究では、異なる脱灰程度のエナメル質人工初期う蝕試料に対し、それぞれ異なる局所的フッ化物応用を試みたうえで経時的な再石灰化過程のモニタリングを行うことにより、QLF 法によって評価した脱灰程度に対するフッ化物応用の至適条件を *in vitro* 環境下で検