

討した。

### 実験材料および方法

#### 1. 鏡面研磨エナメル質試料の作製

初期う蝕試料はウシ下顎切歯の唇側面からダイヤモンドドリル (Continental Diamond Tool Co, 米国) を用い、注水下で直径 4 mm 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) に即時重合型レジン (プロピナイス, 松風, 京都) を用いて包埋し、耐水ペーパー (#1000; ウィンゴー商事, 大阪) にて 15 分間、ゲル状研磨剤 (Gamma Alumina, 0.05  $\mu\text{m}$ , Buehler, 米国) にて 90 分間鏡面研磨を行い、200~400  $\mu\text{m}$  の表層エナメル質を除去したのちに、蒸留水中で超音波洗浄を 15 分間行い、鏡面研磨エナメル質試料とした。<sup>14, 15</sup>

#### 2. 初期う蝕試料の作製

エナメル質試料の表面中央に初期う蝕を作製するため、2×2 mm の脱灰予定窓以外をネイルパーニッシュで被覆したのち、脱灰溶液 (乳酸 (キシダ化学, 大阪): 100 mM, ハイドロキシアパタイト (生化学工業, 東京): 3 g/L, カルボキシメチルセルロース (キシダ化学, 大阪): 0.2 g/L, pH: 5.0) に 37°C で 24, 48, 72, 96 時間の浸漬を行い、脱灰程度の異なる試料を各群 40 試料、合計 160 試料作製した。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パーニッシュを除去した。

#### 3. 初期う蝕試料の再石灰化

初期う蝕試料は再石灰化溶液 (KCl (和光純薬工業, 大阪): 130 mM,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (和光純薬工業, 大阪): 0.9 mM,  $\text{CaCl}_2$  (和光純薬工業, 大阪): 1.5 mM, HEPES (同仁化学, 熊本): 20 mM, pH: 7.0) に 37°C にて合計 28 日間浸漬した。再石灰化溶液は 5 日ごとに新たに調製し交換した。

#### 4. フッ化物の応用

脱灰程度の異なる各群 40 試料の初期う蝕試料に対し、10 試料ずつ以下に示すフッ化物応用を行った。①コントロール群: 初期う蝕試料を継続的に再石灰化溶液のみに浸漬する。②フッ化物配合歯磨剤群: 1 日 3 回、フッ化物配合歯磨剤溶液 (1 g/14 mL; チェックアップ® (950 ppmF), ライオン, 東京) に初期う蝕試料を 5 分間浸漬する。③APF 群: 実験開始前、および実験開始後 14 日目に APF ゲル (9,000 ppmF; フロアーゲル®, 米国) を初期う蝕試料に 5 分間作用させる。④フッ化物配合歯磨剤+APF 群: ②および③両方の処理を行う。

#### 5. QLF 法による脱灰および再石灰化程度の評価

Inspektor Pro QLF システム (QLF™, Inspektor Research Systems, オランダ) により初期う蝕試料の脱灰および再石灰化程度の評価を行った。デジタル画像の取得は試料表面についた水滴を吸い取り、室温 (25°C) にて 15 分間乾燥させたのちに撮影した。<sup>16</sup> 得られたデジタル画像は Inspektor Pro QLF システムに付属している専用の画像解析ソフト (QLF 200 h) により解析した。今回は脱灰程度の指標として、初期う蝕部の蛍光強度の平均減少量を示すパラメータである  $\Delta F$  値を用いて解析を行った。<sup>5</sup>

QLF 法によるデジタル画像の取得ならびに  $\Delta F$  値の算出は、脱灰前および脱灰後、そして再石灰化開始後、3, 6, 9, 12, 15, 21, 28 日に行った。

#### 6. 統計分析および回復率の算出

得られた  $\Delta F$  値の多重比較はチューキー検定によって行った ( $p < 0.05$ )。統計分析はコンピュータ・ソフトウェア (SPSS® 10.0 J for Windows) を用いた。初期脱灰値の異なる 4 群の初期う蝕試料を比較するため、再石灰化前後の脱灰程度の変化は回復率を算出して評価した。n 日目の回復率は以下の計算式によって求めた。

$$\frac{\text{脱灰溶液浸漬後の } \Delta F \text{ 値} - \Delta F_0 \text{ 値}}{\text{脱灰溶液浸漬後の } \Delta F \text{ 値} - \text{脱灰溶液浸漬後前の } \Delta F \text{ 値}}$$

## 結 果

#### 1. 初期う蝕試料の $\Delta F$ 値

脱灰溶液への浸漬時間の違いにより、4 種類の脱灰程度をもつ初期う蝕試料を作製した。それぞれの初期う蝕試料における  $\Delta F$  値は 24 時間脱灰群で  $-9.0 \pm 1.5$ , 48 時間脱灰群で  $-17.2 \pm 1.9$ , 72 時間脱灰群で  $-25.4 \pm 2.8$ , 96 時間脱灰群で  $-32.6 \pm 2.2$  であり、脱灰溶液浸漬時間と  $\Delta F$  値の間に良好な直線関係が観察できた ( $R^2 = 0.999$ )。4 種類の脱灰程度をもつ初期う蝕試料群は、4 種類のフッ化物応用を行うため、さらに 4 群へとランダムに 10 試料ずつ群分けを行ったが、各群の  $\Delta F$  値に統計的有意差はみられず、適切に群分けされていることが確認できた。

#### 2. 初期う蝕試料の再石灰化

コントロール群および各種フッ化物処理群、すなわち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 群の各群において、28 日間の再石灰化処理を行うことにより得られた経時的な回復率の変化を Fig. 1~4 に、 $\Delta F$  値において多重比較を行った結果を Table

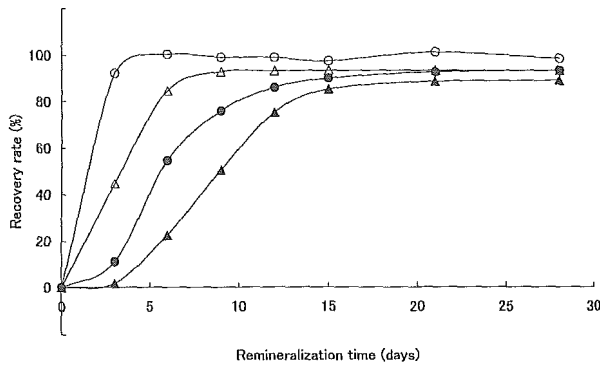


Fig. 1 The remineralization recovery rate of the control group treated for 28 days after exposure to 24 (○), 48 (△), 72 (◻) or 96 (◊) hours of demineralization.

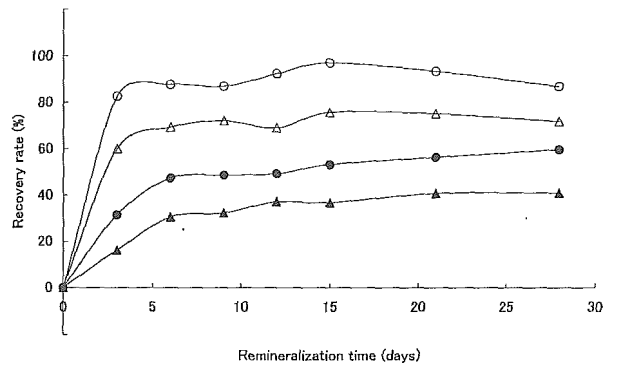


Fig. 3 The remineralization recovery rate of the group treated with APF.

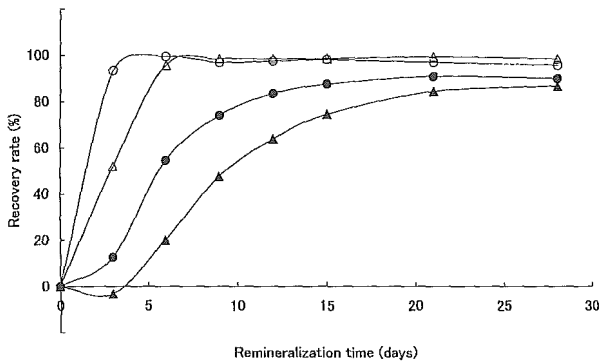


Fig. 2 The remineralization recovery rate of the group treated with fluoride dentifrice.

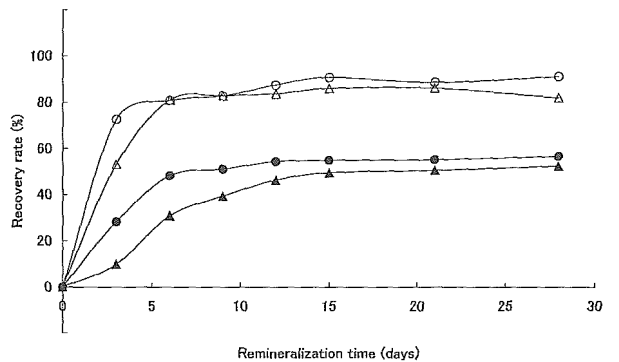


Fig. 4 The remineralization recovery rate of the group treated with fluoride dentifrice and APF.

1に示す。

コントロール群においては、再石灰化処理3日目で24時間脱灰群は90%以上の再石灰化を示し、48時間脱灰群で9日目に、72時間脱灰群でも15日目には90%以上の再石灰化を示したが、28日目においても96時間脱灰群はわずかに90%に達しなかった。すなわち、24時間脱灰群および48時間脱灰群は再石灰化処理早期から高い回復率を示したが、72時間脱灰群および96時間脱灰群では初期の回復率は低く、次第に回復率が高くなっていく傾向を示した。また、脱灰群間においては、96時間脱灰群と他のすべての脱灰群に統計的有意差がみられ、回復率としては96時間脱灰群と他の脱灰群が近似するものの、 $\Delta F$ 値においては同等の回復を示さなかった。しかし、96時間脱灰群以外の3群の $\Delta F$ 値は、12日目以降は統計的有意差がみられず、初期脱灰値が異なっても同等の $\Delta F$ 値を示すまでに各群における再石灰化が進んでいた。フッ化物配合歯磨剤群において

は、コントロール群と近似した経時的な回復率の変化を示した。しかし、48時間脱灰群において、コントロール群では28日目で93%程度の回復であったが、フッ化物配合歯磨剤群では6日目に96%の回復率を示しており、初期の再石灰化に違いが観察された。

APFを応用した2群、すなわちAPF群およびフッ化物配合歯磨剤+APF群の経時的な回復率の傾向は比較的近似していたが、コントロール群およびフッ化物配合歯磨剤群にみられた回復率の変化とは異なる傾向を示した。APF群における28日目の回復率は、24時間脱灰群で87%、48時間脱灰群で72%、72時間脱灰群で59%、96時間脱灰群で41%の回復率であり、初期脱灰の程度が大きいほど再石灰化は観察されなかった。さらに、24時間脱灰群と48時間脱灰群以外のすべての群間に統計的有意差がみられ、APF群では再石灰化処理を行っても、脱灰溶液浸漬時間に依存する初期う蝕試料の脱灰程度が異なると、28日間のすべての再石灰化程度

**Table 1** The significance of differences in remineralization between samples that had been demineralized for different times

Group	Demineralization times (hrs)	Duration of remineralization (days)						
		3	6	9	12	15	21	28
Control	24-48	*						
	24-72	*	*	*				
	24-96	*	*	*	*	*	*	*
	48-72	*	*	*				
	72-96	*	*	*	*	*	*	*
	48-96	*	*	*	*	*	*	*
Fluoride dentifrice	24-48	*						
	24-72	*	*	*	*	*	*	*
	24-96	*	*	*	*	*	*	*
	48-72	*	*	*	*	*		
	72-96	*	*	*	*	*	*	*
	48-96	*	*	*	*	*		
APF	24-48	*						
	24-72	*	*	*	*	*	*	*
	24-96	*	*	*	*	*	*	*
	48-72	*	*	*	*	*	*	*
	72-96	*	*	*	*	*	*	*
	48-96	*	*	*	*	*	*	*
Fluoride dentifrice and APF	24-48	*						
	24-72	*	*	*	*	*	*	*
	24-96	*	*	*	*	*	*	*
	48-72	*	*	*	*	*	*	*
	72-96	*	*	*	*	*	*	*
	48-96	*	*	*				

\*P<0.05

の測定において同等の回復を示さないことが分かった。フッ化物配合歯磨剤+APF群においては、APF群と近似した経時的な回復率の変化を示した。しかし、48時間脱灰群において、APF群では28日目においても72%程度の回復であったが、フッ化物配合歯磨剤+APF群では6日目に81%の回復率を示しており、APF群よりも高い再石灰化が観察された。

### 考 察

#### 1. 初期う蝕試料の作製について

ヒトエナメル質には、その石灰化度や無機質の組成などに大きな個体差が観察されることが知られており、<sup>17</sup> ヒトエナメル質を用いた本講座における過去の研究においても、同じ時間の脱灰処理が同程度のΔF値をもたらさないことを報告している。<sup>18</sup> さらに、歯科疾患実態調査などの結果からも歯の寿命が延伸していることは明

らかであり、ミニマム・インターベンションのコンセプトが膾炙しつつある現状では、今後はさらにヒトエナメル質の入手が困難となることが予測される。そのため、本研究では試料としてウシエナメル質を使用した。ウシエナメル質はサイズの大きさから試料の作製が容易であることや、ヒトと比較すると個体差が少ないことなどから、ウシエナメル質を試料とした研究は過去より数多く行われている。<sup>1, 19-22</sup> 本研究におけるウシエナメル質の脱灰試料は、ヒトエナメル質によるものに比べてばらつきも少なく、浸漬時間に伴って増加するΔF値は非常に良好な直線性を示しており、Koulouridesら<sup>23</sup>の脱灰や再石灰化についてウシエナメル質はヒトエナメル質と近似していることを示した報告からも裏付けられるように、とくに*in vitro*の実験系においてウシエナメル質は有用な試料であることが明らかとなった。

#### 2. フッ化物応用の違いによる初期う蝕試料の再石灰化

本研究の結果、コントロール群およびフッ化物配合歯磨剤群では28日間の再石灰化処理によって非常に高い回復率を示した。これは本研究で行った*in vitro*環境下においては、条件を整えれば高い再石灰化を導くことが可能であることを意味しており、再石灰化を促進させる環境が整っていれば、コントロール群のようにフッ化物を含まずとも高い再石灰化がみられることが明らかとなった。すなわち、健康増進を念頭に置いた初期う蝕の処置においては、いかに再石灰化に向かわせる環境を整えるかが重要であるといえる。

しかし、APF処理を行うと72および96時間脱灰群のような、とくに脱灰の程度が高い群においては、回復率が有意に低下し再石灰化過程において早い段階で平衡に達することが明らかとなった。Arendsら<sup>24</sup>は初期う蝕の表層は多孔性であると報告しており、エナメル表面の多孔度は再石灰化過程に影響することが明らかとなっている。そして、APFの応用により表層にフルオロオパタイトが生成されることはよく知られているが、<sup>25</sup>フルオロオパタイトが初期う蝕表面の多孔性をブロックし、初期う蝕部へのミネラルの拡散を制限したため回復率が減少したと考えている。24時間脱灰群においてΔF値は早期に80%以上の回復を示して平衡に達したが、これは低脱灰のエナメル質では表面の多孔度が低いため、APF処理が行われた場合であってもミネラルによる初期う蝕部の修復が行われたものと考えている。

以上のことからΔF値が-25以上の高い値を示す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。これらの結果は、臨床の現場で QLF 法を応用し再石灰化療法プログラムを構築するために不可欠な基本的データであり、こうした知見は QLF 法の応用によってはじめて明らかになる事柄である。かかりつけ歯科医を基礎として光学的診査を援用した今後の歯科保健システムに貢献するため、本 *in vitro* 研究で得られた知見を臨床試験により確認することが不可欠であると考えている。

なお、本研究では 48 時間脱灰群の再石灰化処理初期段階を除き、コントロール群とフッ化物配合歯磨剤群は近似した傾向を示した。しかしながらこの四半世紀になされた数多くの研究において、フッ化物配合歯磨剤の有用性は確認されつづけている<sup>11, 26</sup>。この理由として、Arends ら<sup>27</sup> が指摘するように *in vitro* と *in vivo* における環境が大きく異なっていることが挙げられる。実際の口腔内環境においては、唾液、微生物、食事などの多様な要因が修飾していると考えられ、とくにスタセリン<sup>28</sup> や高プロリンタンパク質<sup>29</sup> などの再石灰化抑制に働くタンパク質の影響が大きいことが考えられる。今後、タンパク質の介在した実験系の検索が必要であると考えている。

以上の結果から、 $\Delta F$  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。

本研究の一部は平成 17 年度厚生労働省科学研究費補助金医療技術評価総合研究事業 (H15-医療-019)、平成 17 年度文部科学省科学研究費補助金 (若手研究 (B) 16791151) によって行われた。本研究の要旨は、第 54 回日本口腔衛生学会総会 (2005 年 10 月 8 日、東京都) にて発表した。

## 引用文献

- 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.
- 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.
- Marthaler TM. Changes in dental Caries 1953-2003. *Caries Res* 2004; **38**: 173-181.
- Hafstrom-Bjorkman U, Sundstrom F, de Josselin de Jong E, Oliveby A, Angmar-Mansson B. Comparison of laser fluorescence and longitudinal microradiography for quantitative assessment of *in vitro* enamel caries. *Caries Res* 1992; **26**: 241-247.
- 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.
- 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.
- Borsboom PCF, van der Mei HC, Arends J. Enamel lesion formation with and without 0.12 ppmF in solution. *Caries Res* 1985; **19**: 396-402.
- Page DJ. A study of the effect of fluoride delivered from solution and dentifrices on enamel demineralization. *Caries Res* 1991; **25**: 251-255.
- Lammers PC, Borggreven JMPM, Driessens FCM. Influence of fluoride and pH on *in vitro* remineralization of bovine enamel. *Caries Res* 1992; **26**: 8-13.
- Ten Cate JM: Review on fluoride, with special emphasis on calcium fluoride mechanisms in caries prevention. *Eur J Oral Sci* 1997; **105**: 461-465.
- Featherstone JDB. Prevention and reversal of dental caries: role of low level fluoride. *Community Dent Oral Epidemiol* 1999; **27**: 31-40.
- Mellberg R. Relationship of original mineral loss in caries-like lesions to mineral changes *in situ*. *Caries Res* 1991; **25**: 459-461.
- Al-Khateeb S, Exterkate R, Angmar-Mansson B, ten Cate JM. Effect of acid-etching on remineralization of enamel white spot lesions. *Acta Odontol Scand* 2000; **58**: 31-36.
- Lagerweij MD, van der Veen MH, Ando M, Lukantsova L, Stookey GK. The validity and repeatability of three light-induced fluorescence systems: An *in vitro* study. *Caries Res* 1999; **33**: 220-226.
- 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. 口腔衛生学会雑誌 1996; **46**: 187-198.
- Al-Khateeb S, Exterkate RA, de Josselin de Jong E, Angmar-Mansson B, ten Cate JM. Light-induced fluorescence studies on dehydration of incipient enamel lesions. *Caries Res* 2002; **36**: 25-30.
- 中嶋省志. ヒトエナメル質の脱灰感受性について. *Cariology Today* 2000; **1**: 52-56.
- 高島隆太郎, 川崎弘二, 上村参生, 酒井玲子, 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. 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. 口腔衛生学会雑誌 2005; **55**: 41-49.
- Silverstone LM. The effect of fluoride ions on the remin-

- eralization of enamel lesions *in vitro*. *Caries Res* 1977 ; **11** : 134.
20. Amjad Z, Nancollas GH. A kinetic and morphological study of mineralization of bovine tooth enamel surfaces. *Archs oral Biol* 1980 ; **25** : 95–101.
21. ten Cate JM, Duijsters PPE. Alternating demineralization and remineralization of artificial enamel lesions. *Caries Res* 1982 ; **16** : 201–210.
22. Iijima Y, Takagi O, Ruben J, Arends J. In vitro remineralization of *in vivo* and *in vitro* formed enamel lesion. *Caries Res* 1999 ; **33** : 206–213.
23. Koulourides T, Housch T. Hardness testing and micro-radiography of enamel in relation to intraoral de- and remineralisation. Edgar WM, Leach SA, eds. *Demineralisation and Remineralisation of the teeth*. Oxford: IRL Press, 1983 : 255–272.
24. Arends J. The nature of early caries lesions in enamel. *J Dent Res* 1986 ; **65** : 2–11.
25. ten Cate JM, Arends J. Remineralization of artificial enamel lesions *in vitro*. *Caries Res* 1977 ; **11** : 277–286.
26. Arends J, Christoffersen. Nature and role of loosely bound fluoride in dental caries. *J Dent Res* 1991 ; **69** : 601–605.
27. Arends H, Ten Bosch JJ. *In vivo* de- and remineralization of dental enamel. Leach SA eds. *Factors relating to demineralization and remineralization of the teeth*. Oxford: IRL Press, 1986 : 1–11.
28. Schlesinger DH, Hay DI. Complete covalent structure of statherin, a tyrosine-rich acidic peptide which inhibits calcium phosphate precipitation from human parotid saliva. *J Biol Chem* 1977 ; **252** : 1689–1695.
29. Hay DI, Carlson ER, Schluckebier SK, Moreno EC, Schlesinger DH. Inhibition of calcium phosphate precipitation by human salivary acidic proline-rich proteins : structure-activity relationships. *Calcif Tissue Int* 1987 ; **40** : 126–132.

*In vitro* influence of different topical fluoride applications on remineralization of enamel observed by the quantitative light-induced fluorescence method

Tomikiyo Kawakami, Koji Kawasaki and Masaki Kambara

Department of Preventive and Community Dentistry, Osaka Dental University, 8-1 Kuzuhahanazono-cho, Hirakata-shi, Osaka 573-1121, Japan

**Abstract** Abstract We did an *in vitro* study using quantitative light-induced fluorescence (QLF) to evaluate enamel remineralization caused by application of topical fluoride. Artificial incipient carious lesions were formed in bovine dental enamel by immersion for 24, 48, 72 or 96 hours in a demineralizing solution. Each demineralization group was then divided into four subgroups based on the type of fluoride application : the controls (no application), fluoride dentifrice, APF-gel, and fluoride dentifrice with APF-gel. The remineralization recovery rate of the carious lesions was calculated on days 3, 6, 9, 12, 15, 21 and 28 using data obtained with QLF. The recovery rate of the controls and the fluoride dentifrice group were approximately 90% for each demineralization group at 28 days. The recovery rate for the two APF treated groups was about 85% for the group demineralized for 24 hours. However, the subgroup treated with APF-gel that had been demineralized for 96-hours had only a 40% recovery rate. We concluded from this *in vitro* study that APF-gel treatment inhibited remineralization in highly demineralized carious lesions. **Shika Igaku (J Osaka Odontol Soc) 2006 Mar ; 69(2) : 110–115.**

**Key words** : Bovine dental enamel ; Fluoride ; *In vitro* study ; QLF ; Remineralization

# 齲蝕の診断と検出

柘植紳平\*1 上村参生\*2  
Shinpei Tsuge Mibu Uemura

\*1つげ歯科医院 〒509-8231 岐阜県恵那市中野方町 3384-5 Tel. 0573-23-2112

\*2大阪歯科大学口腔衛生学講座 〒573-1121 大阪府枚方市楠葉花園町 8-1 Tel. 072-864-3059

## 本連載のねらい

European Organisation for Caries Research (ORCA) が 2003 年の 50th Anniversary ORCA Congress において開催したシンポジウム “Cariology in the 21st Century” では、世界中の研究者によってカリオロジーの『現在』が議論され、大きな注目を集めました。本企画では第一線の研究に従事する先生方に、このシンポジウム的一端を抄録の抄訳という形でご紹介いただくとともに、臨床医が提示する身近な疑問に、解説を加えていただきます。

## 問題提起編

### ●初期齲蝕診断の今日的な意義と意味は

われわれ臨床家にとって、齲蝕診断は最も基本的で一般的な仕事です。臨床における齲蝕診断の目的は治療方針の決定ですが、治療方法の変化とともに齲蝕診断も変化してきているように感じます。筆者は大学時代、齲蝕は不可逆性の疾病で、早期発見・早期治療が大切だと教えられました。そしてこの当時の「治療」とは切削修復を意味していたと思います。

開業当初の筆者の齲蝕診断の基礎となっていたのは、齲蝕を C<sub>1</sub>、C<sub>2</sub>、C<sub>3</sub>、C<sub>4</sub>に分類する島田の基準<sup>1)</sup>でした。現在もおそらく多くの歯科医師の診断基準となっている病理組織学的基準です。そんな筆者の考え方に大きく影響を与えたのは、1986年に日本学校歯科医会から示された「シーオー (CO=questionable Caries under Observation)」の考え方<sup>2)</sup>と、そのころから活発になってきたカリオロジー理論の整備でした。

CO とは「白濁、着色、粗造面などの初期齲蝕

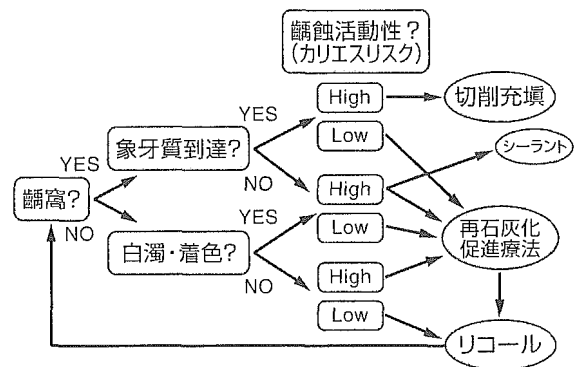


図 1 処置決定の診断の流れ

の兆候が認められ、そのまま放置すると齲蝕が進行する可能性があるため、経時的に観察する必要がある歯」です。そして、最近の筆者の臨床場においては「観察するだけでなく、カリエスリスクを低下させるように積極的にアプローチし、再石灰化を促進して齲蝕の進行を食い止める治療法を必要とする歯」となっています。学校歯科から生まれた考え方が、現在では一般の臨床の場においても、「切削修復しないで初期齲蝕の歯を保存す

症例 1 (I-1~I-4)



I-1 11歳7カ月女子の右下第一大臼歯、経過観察中

I-2, I-3 4カ月後、I-1と比較すると、遠心裂溝部の黒色の着色部が消失している。DIAGNOdent(遠心部測定値99, 中央部測定値23)とX線写真で象牙質に到達する齲窩を確認

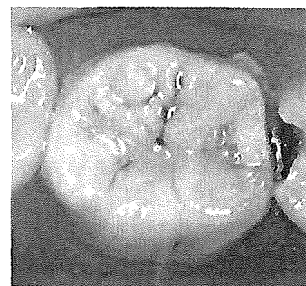
I-4 切削後、遠心部は軟化象牙質が認められて進行中であることがわかるが、中央部は着色し齲蝕の進行が停止しているのがわかる

る治療法」として確固たる地位を築き、この治療法が初期齲蝕診断を病理組織学的診断から、より臨床的な診断へと移行させているように思います。

また、カリオロジーの理論では Pitts<sup>3)</sup>が「齲蝕とは歯面と唾液との間で起きている脱灰と再石灰化の間を揺れ動くダイナミックなプロセスのことで、齲窩や白濁や着色はプロセスの結果現れた症状」と定義しています。筆者はそれまで齲蝕とは齲窩のことで、白濁や着色などが初期齲蝕のことだと思っていましたから、この考え方には驚かされました。そしてプロセスを診断するために経時的変化を重視するようになりました。

現在、筆者は図1のような診断基準で治療方法を決定していますが、日々の臨床では、切削修復しようかどうか迷う症例がたくさんあります。「疑わしきは罰せず」の原則で、できるだけ切削修復をしない方針で治療していますが、100%成功しているわけではありません。症例1を見てください。診断に基づいて切削してみたところ、同じ歯面においても進行中の齲蝕像と停止している齲蝕像が見られます。こんな場合、実際にはどうしたらよかったのでしょうか。

初期齲蝕診断に関する世界的な基準はどうなっているのでしょうか。また、最新の初期齲蝕診断



症例2 右下第一大臼歯  
近心部は白濁し、近心隣接面から齲窩があることが推測される。ほとんどの歯科医師が経験上齲蝕と判定するであろう

の今日的な意義と意味についてもきちんと整理して教えていただきたいと思います。

●個対応の臨床と集団対応の保健政策における診断の意味の違いとは？

臨床の間では診断は治療法に直結します。したがって確定的な診断が必要になります。また、診断のための情報もX線撮影をはじめとして、電気、可視光、レーザー光などさまざまな機器が実用化されています。これに対して、たとえば学校検診の診断は事後措置のためのスクリーニングです。検診においては主として視診で健全、CO、要精密検査(分類上はCO)、Cの4つにふり分けただけで、確定的な診断は必要とされていません。

症例2を見てください。右下第二小臼歯は明らかな齲窩が認められるので診断は一致するでしょうが、第一大臼歯の近心はどうでしょうか。おそらく視診だけで経験的に齲蝕であると判定される

でしょう。筆者もそうと思いますが、学校検診の場合には、視診で明らかな齲窩が確認できない場合、CO（要精密検査）と判定することになっています。学校においては、要精密検査、あるいはCがあると判定された場合、治療勧告（検診結果のお知らせ）をしますが、その目的はむし歯をどう治療するかではなくて、むし歯という課題に対し、「歯科医院へ行く」という保健行動をとれる子供たちを育成することだからなのです。

一例として学校検診について筆者の知るところ

を述べましたが、個対応の臨床とさまざまな集団対応の保健政策における診断の意味の違いを教えてくださいたいと思います。（柘植）

#### 参考文献

- 1) 島田義弘：集団における齲蝕検出上の諸問題。口衛誌，20：257-271，1971。
- 2) 日本学校歯科医会：初期う蝕の検出基準ならびに要観察歯の基準とその取扱いに関する報告書（学術第二委員会），1986。
- 3) Pitts NB：Diagnostic and measurements impact on appropriate care：Community Dent Oral Epidemiol，25：24-35，1997。

## ORCA 抄訳および解説編

初期齲蝕診断に関する世界的な基準はどうなっているか、そして、最新の初期齲蝕診断の今日的な意義と意味についてということですが、WHOの齲蝕検出基準（1998）によれば、「明らかな齲窩、脱灰・侵食されたエナメル質、軟化底、軟化壁が探知できる小窩裂溝、平滑面の病変を齲蝕とする。咬合面、頬舌面の齲蝕を確認するためにWHOのCPIプローブを用いる。疑わしいものは齲蝕としてはならない。一方、健全歯は、修復処置もしくは臨床的齲蝕の認められないものをいう。齲窩を形成するまでにいたらない齲蝕は、初期齲蝕病変に類似した状態の歯と同様に齲蝕とはしない」と決められています。

また、歯科疾患実態調査の検出基準（1999）では、「未処置歯は、C<sub>1</sub>からC<sub>3</sub>の3段階に分けられ、エナメル質から象牙質にかけての齲窩形成の認められるものとする。一方、健全歯は、齲蝕あるいは歯科的処置の認められないものをいう」とあり、その注釈で、「歯質の変化がなく単に小窩裂溝の内容物だけが黒褐色に着色しているもの、平滑面で表面的に淡褐色の着色を認めるが歯質は透明で触診しても滑沢なもの、また、エナメル質形成不全

と考えられるものなどは、すべて健全歯とする」とあります。

現在用いられているこれら2つの齲蝕検出基準は、歯面での齲窩形成が基準となっており、表層がインタクトな（齲窩がない）初期齲蝕の検出基準は定められていません。

初期齲蝕の検出基準については、Nyvadら<sup>1)</sup>の報告では、エナメル質表面の状態での初期齲蝕の検出を行い、さらに、検出された初期齲蝕の活動性（進行性・非進行性）を判断し、処置方針を決めることにより、初期齲蝕診断としています。

Pitts<sup>2)</sup>はORCAシンポジウムの中で、図2の「現代の患者への推奨と処置の必要性に基づく齲蝕の冰山」により、初期齲蝕の診断とその管理方法を説明しています。すなわち、臨床的に検出される齲蝕は冰山の一角にすぎず、海面下にはより多くの潜在的齲蝕と考えられる初期齲蝕が存在し、それらを診断・管理することが重要であるとしています（ICDAS<sup>3)</sup>：International Caries Detection & Assessment System）。柘植先生が診断基準にそって治療方針を決定することは、正しいことだと思いますが、診断基準の齲蝕活動性（初期齲蝕の進



## 「齲蝕の診断と検出」

Nyvad B: Diagnosis versus Detection of Caries. *Caries Res*, 38(3): 192-198, 2004.

本論文の目的は二つあり、一つ目は齲蝕診断方法の評価について再考すること、また、2つ目は齲蝕診断の決定プロセスと予防処置に密接に関係している、臨床的齲蝕診断の開発に注目することである。

### 診断へ、あるいは、検出へ

診断技術は、疾病が徴候と症状から判断できるという前提で成立している。臨床家は治療を必要とする疾病を見逃してはならないのと同様に、根拠のない診断を決定してはならない。

齲蝕診断は医科的疾患の診断とは異なり、徴候がないため(少なくとも齲蝕プロセスの早期段階)、診断を進める手順がなく、その結果として、診断がないことに問題が生じている(Bader and Shugars, 1996)。つまり、齲蝕の診査は、齲蝕があるかないかの検出になってしまっている。こうして、歯科医は治療計画の決定と、診断とを混同してしまっているのである(Beck, 1995)。

また、これは、われわれが科学的根拠に基づく齲蝕予防処置を行っていないということでもある。このように、現在、あるいは将来にかけて、齲蝕になるかどうかを示せる診断がないのなら、一般の歯科医が、容易に治療を行ってしまうのも無理はない。

### どれくらい早く齲蝕病巣を検出すべきか?

齲蝕検出の定量方法の開発により、齲窩が生じる前に、できるかぎり早く病巣を検出しようとする動きがある。そして、より早期の齲蝕の検出により、齲蝕が正しく評価でき、予防処置が成功する可能性を高めることができるとしている(Stokey, 2000; Pitts, 2001)。

しかし、臨床的視点からみると、これは疑問の出るところである。診断閾が低いことで、より小さな齲蝕病巣を検出するだけでなく、より間違った診断を行ってしまう場合があるからである。さらに、早期齲蝕の大多数は、専門的予防処置がなくても、その病巣が停止性か回復性であったと報告されており(Backer Dirks, 1966; Baelum et al., 2003)このような早期齲蝕の検出には、費用に見合った効果がないかもしれない。

そのため、このような診断閾の設定には疑問が残るところである。現在の臨床目的としては、肉眼で見えないほど早い段階ではなく、齲窩がない段階で齲蝕病巣を診断することが重要であるようだ。齲窩のない齲蝕病巣は、治療ではなく、フッ化物の歯面塗布のような予防処置によって十分管理できるためである。

### 最近の臨床的齲蝕診断の発展

多くの先進国において齲蝕病巣の進行率は低くなっているため、過去10年以上、力が注がれている研究は、齲窩のない病巣の活動性を評価するための、臨床的齲蝕診断基準の開発である。

その理論基盤(Nyvad et al., 1999)として、病巣の活動性というのは、進行性あるいは回復性として説明されるという研究(Fejerskov and Manji, 1990)や、つや

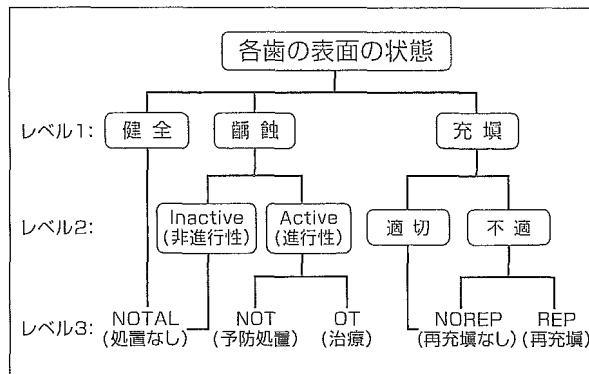
消し状表面(進行性であるチョーク様、もしくは粗造なエナメル質病巣)、光沢のある表面(非進行性か停止性である滑沢なエナメル質病巣)といった齲蝕病巣の表面性状(Thylstrup et al., 1994)に、進行性、回復性が反映されているという研究がある。このような齲蝕診断基準によって、齲蝕病巣の活動性を評価することができると考えられる。

また、さらなる知見から(Nyvad et al., 2003)、齲窩のない進行性病巣は、齲窩のない非進行性病巣よりも齲窩になるまで進行するリスクが高く、それは定期的なフッ化物の応用をしなかった進行性病巣に顕著に認められている。すなわち、齲蝕活動性の評価は、その病巣の処置方針を決めるのに役立つと思われる。

診断プロセスのキーファクターとして、齲蝕病巣の活動性の評価を用いることによる齲蝕の診断、処置方針の決定系図を図Aに示す。

このように、診断とは、診断することが目標ではないということを中心に留めておくべきである。つまり、診断決定の最終目標は、常にできるかぎり最善の処置の選択である。

(抄訳: 上村)



図A NyvadとFejerskov (1977) による齲蝕に対する診断処置方針決定系図

たとえば、診断・処置方針決定プロセスのレベル1は、歯の表面の状態、すなわち、健全かどうか、齲蝕病巣があるかどうか、また、充填されているかどうかを検討することである。齲蝕病巣があると判断した場合、レベル2に進み、病巣の活動性の状態、すなわち、inactive(非進行性)かactive(進行性)かを評価する。レベル3では、適切な処置決定を行うことである。非進行性病巣の場合、進行しないか、非常に進行が遅いため、専門的処置は必要としない。進行性病巣のときは、専門的処置が必要である。

進行性病巣の専門的処置はブラーク除去のしやすさ次第である。もし、齲窩をもつ病巣のように、ブラークコントロールが十分できないのであれば、その齲蝕は充填すべきである。

しかし、齲窩のない進行性病巣では、充填のような治療ではなく、予防処置を選ぶべきである。この例は、重要な診断方法としての齲蝕活動性の評価が、科学的根拠に基づく処置方針の決定に役立つことを示している。

表 1-1 初期齲蝕病巣の追跡結果

Placebo歯磨剤使用	
実験開始時	1年後
初期齲蝕 (65)	進行性病巣 53.8% (35)
	停止性病巣 3.1% (2)
	回復性病巣 43.1% (28)

表 1-2 初期齲蝕病巣の追跡結果

フッ化物配合歯磨剤の使用	
実験開始時	1年後
初期齲蝕 (64)	進行性病巣 6.3% (4)
	停止性病巣 6.3% (4)
	回復性病巣 87.5% (56)

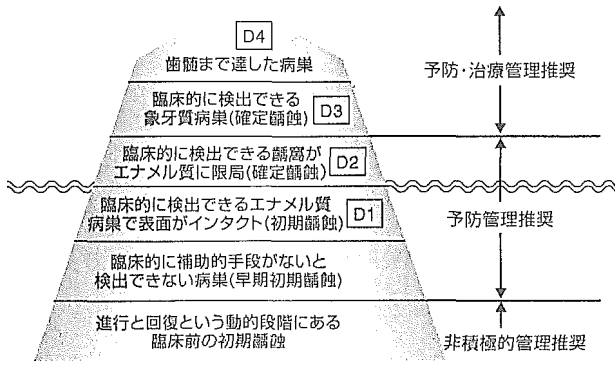


図 2 現代の患者への推奨と治療の必要性に基づく齲蝕の氷山(The iceberg of dental caries) (1995)

行性、停止性あるいは回復性)をどのようにして決めるかが重要になります。Nyvad や Pitts の診断方法に基づいて管理してはどうでしょうか。

カリオロジー(齲蝕学)の最新情報として、「早期齲蝕診断」という言葉が聞かれるようになってきました。これは、「初期齲蝕の検出と初期齲蝕病巣の状態を診断する」ということを指します。臨床の場合において、単に、白斑として認められる初期齲蝕の検出だけではなく、白斑以前の初期齲蝕の検出や初期齲蝕かどうかの判定(科学的な初期齲蝕の検出)、あるいは、初期齲蝕病巣の動的プロセス(進行性、停止性、回復性)の把握(初期齲蝕のモニタリング)が重要であることを指しています。この早期齲蝕診断が可能になれば、おのずと各歯の齲蝕リスク判定に基づく齲蝕予防プログラムが構築でき、効率のよい齲蝕予防が可能となるわけです。つまり、早期齲蝕診断の可能性を探ることが現在の齲蝕予防の最前線であると思われま

す。歯の表面にみられるすべての白斑部分が、初期齲蝕の白斑なのかどうかの判断は、現在のところ、白斑の部位、Nyvad ら<sup>1)</sup>のいう表面の透明感やざらつき感など、経験でしか判断できません。また、

初期齲蝕と判断しても、その病巣が進行性、停止性、あるいは回復性なのかの判断が口腔内診査だけでは診断が難しいのが現状です。

実際、歯の診査時に歯の表面の状態を観察するため、鋭利な探針で触診すると、初期齲蝕病巣の表層を破壊してしまい、人為的に齲蝕窩を形成してしまうことを経験します。初期齲蝕の表層の重要性を知らずに、触診した結果であり、より慎重に診査すべきであるといえます。

最近、視診で判定した白斑が初期齲蝕であるのか、あるいは、どの程度の初期齲蝕なのかを判断できる診査機器が開発されてきました。これら診査機器の出現により、初期齲蝕診断の可能性がみえてきました。すなわち、機器を用いることにより、初期齲蝕病巣の定量による初期齲蝕診断が客観的になり、診断精度が高くなっていくといえます。

現在市販されている DIAGNOdent (KaVo) の特徴は、短時間で初期齲蝕診断が可能であること、咬合面小窩裂溝部の診断ができることがあげられます。しかし、診断精度にやや疑問があること、また、レーザー光の当て方によって、精度が落ちるなどの欠点があります。



また、早期齲蝕診断機器のなかでも、現在注目されているのがQLFです。Quantitative Light-induced Fluorescenceの略称で、直訳すると「光誘導蛍光定量法」となります。原理は、光によって蛍光を発する歯質の特性を利用して、健全歯質と初期齲蝕歯質の蛍光強度の差を測定し、初期齲蝕部を特定するといった機器です。すなわち、早期段階で初期齲蝕の検出が可能であり、初期齲蝕病巣の程度を把握できる機器とされています。

では、QLFが、どのように使用することができるか、われわれが行った臨床研究<sup>4)</sup>から説明すると、表1-1に示すように、初期齲蝕の活動性の評価ができるということです。これは実験開始から1年後の結果ですが、3カ月後でも、評価が可能です。

また、表1-2に示すように、フッ化物配合の歯磨剤を患者さんに使っていただくと、初期齲蝕の回復性病巣の割合が上がるといった、齲蝕予防効果の判定にも使用できる例です。このように多数の患者さんの調査結果だけでなく、個人の初期齲蝕の変化を画像でとらえて、その初期齲蝕を診断できるのが特徴ですから、臨床応用にも適していると思います。咬合面および隣接面に発生する初期齲蝕の診断については、現在研究が進んでおり、応用可能になる日が近いと思います。

一方、個対応の臨床と集団対応の保健政策における診断の意味の違いについてですが、齲蝕診断の目的は、臨床の場である個対応と公衆歯科衛生といった集団対応の場合では異なっています。個対応では治療方針を決定するためのものであり、集団対応では、スクリーニングと疫学的評価が目的です。つまり、集団対応になると、齲蝕診断はスクリーニング検査であることの認識が必要かと思えます。個対応のような確定診断は必要としないわけです。

スクリーニング検査においては、敏感度（齲蝕の歯を齲蝕であると判断する率）および、特異度（齲蝕でない歯を齲蝕でないと判断する率）が優れていることが重要であるとされています。これは事後措置として、健康の保持増進のために精密検査、保健指導や保健管理が行われるからです。現在の齲蝕の診査や齲蝕検出基準を用いると、齲蝕かどうかわからない歯がCO分類され、敏感度が低くなってしまいます。そこで、初期齲蝕の検出を確かな基準に基づいて、あるいは、機器を用いて行えば、飛躍的に、スクリーニングレベルが上がると考えられます。

現在、齲蝕検出機器のみならずさまざまな診察・診療機器が入手可能であり、今後、新たな機器が入手可能になると思います。われわれが医療人として決して忘れてはならないことは、それら機器の長所のみならず短所をもしっかり把握することです。先生方がこれまで集積された知識と経験、さらに、新しい科学的根拠の収集そして限らない挑戦を、予防歯科診療へとぜひ生かしていただきたいと思えます。

(上村)

#### 参考文献

- 1) Nyvad B, Fejerskov O : Assessing the stage of caries lesion activity on the basis of clinical and microbiological examination. *Community Dent Oral Epidemiol*, 25 : 69-75, 1997.
- 2) Pitts NB : Are we ready to move from operative to non-operative/preventive treatment of dental caries in clinical practice? *Caries Res*, 38 : 294-304, 2004.
- 3) Pitts NB : Review of the ICW-CCT meeting, the importance of early detection and the philosophy/approach of ICDAS (International Caries Detection & Assessment System). Early Detection of Dental Caries III. Stookey GK (ed), Proceedings of the 6th Indiana Conference, May 22-23, 2003, Indiana University School of Dentistry, Indianapolis, 2005, 1-17.
- 4) Kambara M, Uemura M, Miyake T, Doi T, Nakashima S, Eckert GJ, Stookey GK : Results of clinical trial of fluoride dentifrice using QLF. Early Detection of Dental Caries III. Stookey GK (ed), Proceedings of the 6th Indiana Conference, May 22-23, 2003, Indiana University School of Dentistry, Indianapolis, 2005, 229-235.



## Protein adsorption and wetting of the protein adsorbed surfaces studied by a new type of laser reflectometer

Hideo Matsumura\*, Masahisa Saburi

National Institute of Advanced Industrial Science & Technology, Photonics Research Institute, Central 2, Tsukuba 305-8568, Japan

Received 29 September 2005; received in revised form 1 December 2005; accepted 11 December 2005

### Abstract

We have devised a new type of laser reflectometer that can measure adsorption behavior of (bio)-polymers, such as proteins, on the substrate surface and also the wetting for the surface of adsorbed layer of such (bio)-polymers. The adsorption and the wetting experiments can be conducted in a sequential manner using the same sample by this apparatus. So, the wetting of the surface of protein-adsorbed layer can be measured in virtually intact state. The reflectometry is based on the traditional optical polarimetry and the wetting measurement is due to the dropping time method (DTM) that has been reported before by the authors. The two methods are combined in an apparatus and hence we can correlate the wetting of protein layer adsorbed on the substrate surfaces with the amounts of protein molecules on the surface. As a model case we demonstrate the adsorption of several typical water soluble globular proteins on stainless steel surfaces. For this combination of the adsorbent with adsorbates, it is found that the water wetting of the protein adsorbed surface is closely related with the adsorbed amounts of proteins not depending on species. © 2006 Elsevier B.V. All rights reserved.

**Keywords:** Wetting; Protein adsorption; Reflectometry; Contact angle; Hydrophilic/hydrophobic

### 1. Introduction

Protein adsorption is a general phenomenon in various systems where a biological fluid contacts with any material. To date, various types of studies on the protein adsorption from solution onto surfaces have been conducted both in fundamental science and practical fields such as artificial implants in medicine or dentistry. Non-specific adsorption of protein molecules is an important event even in recent developing fields of biotechnology, e.g., bio-tips or biosensors. One kind of the studies on protein adsorption is how to prevent the adsorption of protein on surfaces, i.e., the object is how to modify the surface of materials for preventing the protein adsorption. In the process of protein adsorption, the electrostatic (or electrical double layer) and hydrophobic interactions are dominant factors in macroscopic physicochemical sense. Therefore, the control of these properties of material surface is important. Various types of surface modification have been tried for many years. Nevertheless the protein molecules can adsorb on various kinds of

surfaces ranging from hydrophobic to hydrophilic ones because of hydrophobic dehydration effect of protein molecule itself at the interfacial region between protein and surface of materials. It comes from the structural feature of protein molecules, i.e., they contain hydrophobic and hydrophilic amino acid residues and they carry negative and/or positive electric charges. Hence, electrostatic and hydrophobic interactions are significant factors in the adsorption of proteins at interfaces. The water molecules that face to the hydrophobic domain of protein molecules have a tendency of leaving the surface to the bulk aqueous region. Until nowadays only some type of polymer brush on the surfaces have been found to prevent the adsorption so that the brushed surfaces are extensively studied in recent years [1–3].

Another type of study is to characterize the protein layers on the surface. Conformation, orientation, and distribution of protein molecules on the surface are keywords in this type of studies. Various types of spectroscopic studies are conducted [4].

Although the above mentioned studies have revealed the feature of protein adsorption, we have not much information on surface properties of protein layer on the substrate surfaces. The surface physicochemical properties such as electrostatic (or electrical double layer) and hydrophobic/hydrophilic ones of the protein adsorbed layer are practically important for further

\* Corresponding author. Tel.: +81 298 61 5534; fax: +81 298 61 5540.  
E-mail address: [hideo-matsumura@aist.go.jp](mailto:hideo-matsumura@aist.go.jp) (H. Matsumura).

adsorption of next coming objects (molecules, cells, etc.) to the surface through the interactions between them. For example, in dentistry, it is generally believed that the first stage of formation of dental plaque is the adsorption of proteins on the surface of teeth. This phenomenon is called pellicle formation and the proceeding step involves adhesion of oral bacteria. Also, various synthetic materials are used as artificial teeth. These materials interact with saliva in the mouth and they become readily covered with saliva proteins. Oral bacteria interact with the surface of protein-covered artificial materials in the mouth. It can influence the activity of the bacteria and therewith the health condition of the human body. It is therefore important to elucidate the surface properties of the adsorbed protein layers on these materials. The hydrophobic/hydrophilic and electric properties of the outer surface of the adsorbed protein layer depend on the orientation and conformation of the protein molecules on the adsorbent surface. In other words, the kind of amino acid residues of the adsorbed protein that faces the solution side determines the surface properties in the sense of surface chemistry. So, it is valuable to measure these surface properties of adsorbed protein layers without disturbing the adsorbed state. In previous papers, we proposed the method that can measure the water wetting of a protein layer on a solid surface without crucial damage of the conformation and orientation of the adsorbed protein molecules. It is based on the measurement of the motion of a thin liquid film along the solid surface. We call this method the dropping time method (DTM). In this report, we will describe a new apparatus that can monitor the adsorption behavior in time course with succeeding detection of the wetting of protein adsorbed material surface by DTM, and some experimental results by the apparatus for typical protein molecules are shown. It is the first report that can reveal the relationship between the adsorption amounts of protein molecules and the wetting of the surface of protein adsorbed surfaces using the same sample in a virtually intact way.

## 2. Experimental

### 2.1. Measuring method and apparatus

#### 2.1.1. Reflectometry

The adsorption behavior of proteins on the material surfaces has been monitored by a light reflectometer based on the optical polarimetry [5–8]. A linearly polarized light beam from a He–Ne laser (1 mW, Showa Optorotics Co. Ltd., Japan) is passed through a polarizer prism of which orientation of polarization is at 45° to a sample plate, which gives an equal light intensity to parallel ( $R_p$ ) and perpendicular ( $R_s$ ) components of the laser beam against the incident plane. The incident light angle and reflected one can be scanned automatically from 45° to 85° against the sample plate. The reflected light is divided to two components through a beam splitting prism and both intensities of the components are detected by two silicon photodiodes (0.58A/W, S2387-1010R, Hamamatsu Photonics Co. Ltd., Japan). The electrical signals converted from the light intensity by photodiodes are led to an electric amplifiers and then to a notebook computer (PC-LG26SUMMF, Windows Xp, Pentium

4, NEC Co. Ltd., Japan) through an A/D converter (CBI-3133A, 12 bits, 10  $\mu$ s, Interface Co. Ltd., Japan). The motorized stage (CSG-602R, 12.5 kpps, 2.5°/10000 pulses, Sigma Koki Co. Ltd., Japan) to change the light incident angle is controlled by the computer using a communication method called the RS232C standard. Most of other optical parts were purchased from Sigma Koki Co. Ltd., Japan. The optical constants: refractive index ( $n$ ) and absorption coefficient ( $k$ ) of substrate material were determined by the measurements of the dependency of the ratio,  $R_p/R_s$ , on the light incident angle in air. The analyzing program is based on the simple three layer model of reflection/refraction optics. The experiments of protein adsorption were conducted utilizing a solution cell (Fig. 1a). In this case the incident light angle was set at 75° to get rather high signal ratio (near the Brewster angle). The adsorption experiment was started by replacing pure water in the vessel cell by protein aqueous solution of certain concentration. The aqueous solution in the cell was continuously stirred by a magnetic stirrer with a tip. The cell has two water inlets/outlets at upper and lower side. The ratio of  $R_p/R_s$  was continuously monitored against elapsed time. The change in  $R_p/R_s$  can be related to the thickness ( $d$ ) and the refractive index ( $n_p$ ) of the adsorbed protein layer on substrate surface. The adsorption amount per unit area ( $\Gamma$ ) can be calculated utilizing the equation:  $\Gamma = (n_p - n_w)d/(dn/dC)$ , where  $n_w$  is refractive index of aqueous solution (1.33),  $dn/dC$  is the dependence of refractive index of protein aqueous solution on protein concentration, and others are mentioned before.

#### 2.1.2. Wetting measurements (dropping time method)

The hydrophobic/hydrophilic character of a surface can be probed by its water wetting, which is usually assessed by conducting the contact angle measurements utilizing a sessile drop of water or an air bubble on the surface that is immersed in water, etc. However, protein molecules adsorbed on surfaces easily change their conformation on drying, so there is high possibility that we measure the contact angle for denatured protein layer by the sessile drop method. Or in another situation, the water molecules at three phase contact line of a water drop interact with two kinds of surfaces, i.e., one is natural protein layer at solid/liquid interface and the other is denatured protein layer at solid/gas interface by the sessile drop method. Therefore, it is not confirmed that the measured values reflect the surface as it is when immersed in an aqueous environment. So, we have devised a method that can measure the wetting in a virtually intact situation. It is called dropping time method. The basic concept of this method and also some experimental examples were described in previously published papers [9–12]. Briefly, to detect the wetting of the surface of a protein layer adsorbed on a solid substrate, the motion of a thin liquid film dropping along the protein layer is measured by means of light reflection of laser beams. Typically, two laser beams are impinged on two positions separated by  $X$  distance on the solid surface and the reflected light beams are detected by two photo-detector diodes, respectively. A vessel cell containing a protein solution is mounted below the vertically suspended sample plate. By ascending the vessel cell, the sample plate is immersed into the solution until the two light beams are under the air/protein solution interface in the vessel.

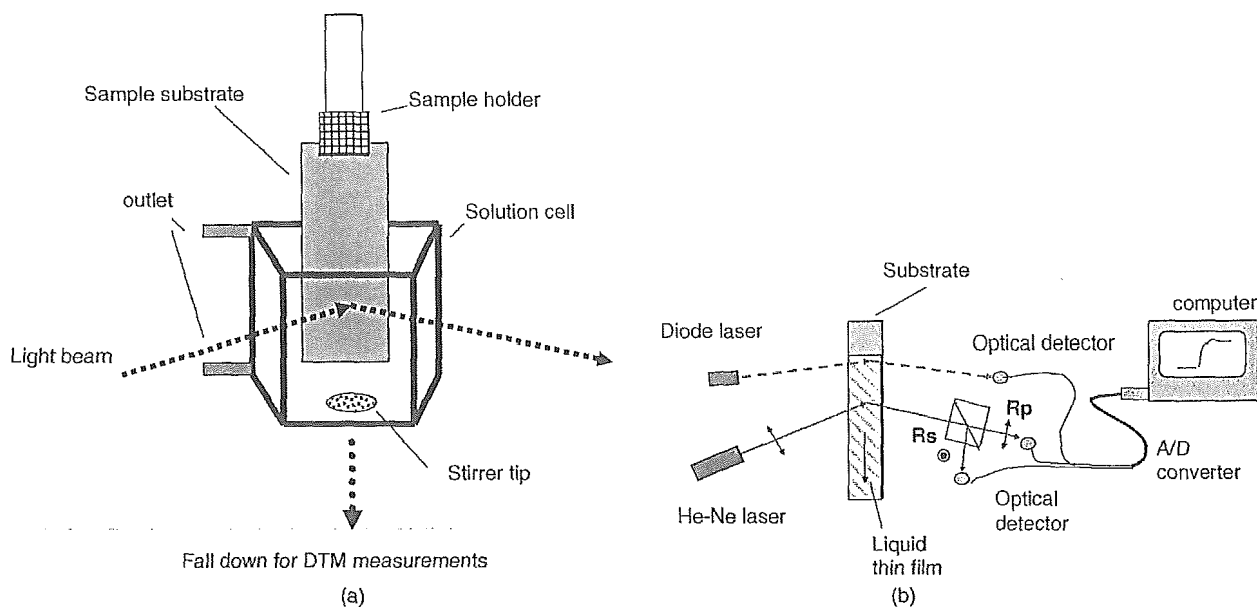


Fig. 1. (a) Schematic representation of the vessel of protein solution for the reflectometry and the dropping time method (DTM). (b) Schematic representation of the devised reflectometer for the adsorption and the wetting measurements.

After a desired dipping time period, the vessel is suddenly fallen down by gravitation to a certain position where the two beams are in the air but the lower edge of the sample plate is still in the solution. A part of the solution remains on the plate in a thin liquid film which drops down into the bulk solution gradually. The motion of the thin liquid film is determined by the balance of gravitational force, viscous force, and force by interfacial tension. When the upper edge of the liquid film passes the positions where the light beams impinge the surface, the intensities of the reflected light beams suddenly change and thereafter they show the constant values in air. The time ( $\Delta t$ ) required for the movement of the edge of the liquid film between two positions  $X$  mm apart is measured. This time, which we call the dropping time (DT), is taken as a measure of wetting. That is, the longer the DT, the more wetting the surface is.

### 2.1.3. Combination of the both methods

To relate the adsorption of protein and wetting precisely in the same sample, we have combined the reflectometry with DTM in a devised apparatus (Fig. 1b). That is, one additional light source, a diode-laser (1 mW, Applied Techno. Co. Ltd., Japan) is jointed with the above mentioned reflectometer. The laser beam from the diode-laser was impinged at the position on the sample plate at 4 mm above the impinging point of the He-Ne laser beam. That is,  $X=4$  mm in this setup. The third photo-detector diode was mounted to detect the reflected light

of the diode-laser. The electrical signal from the photo-sensor was also combined with the computer system described above. The fastest DT limit in this apparatus using the empty cell is 20 ms. That is, we cannot measure faster DT than this value using this apparatus. At first the protein adsorption experiment was conducted as mentioned above. After that, at certain desired time the vessel cell containing protein solution was suddenly lowered to detect the DT. By this successive procedure, we can detect the wetting of protein adsorbed surface at any adsorption amounts in real time.

### 2.2. Materials

We used stainless steel (SUS 304, Ni: 8–11%, Cr: 18–20%) as the substrate material and the size of it is 50 mm  $\times$  20 mm  $\times$  1 mm. The surface of it is optically flat. Before protein adsorption, each plate sample was pretreated by washing it with a detergent solution (RBS-25, Junsei Chemical Co., Japan) under ultrasonic vibration. The plate was rinsed with distilled water and dried in an oven at 60 °C.

Several typical proteins were used. Hen's egg lysozyme (LSZ: L6876), human serum albumin (HSA: A3782), bovine milk  $\beta$ -lactoglobulin (LG: L0130), and hen's egg ovalbumin (OVA: A2512) were purchased from Sigma Chemical Co. and they were used without further purification. Characteristics of these proteins are listed in Table 1. Protein aqueous solu-

Table 1  
Physical properties of proteins used in this study

	LG	OVA	HSA	LSZ
Molecular weight	18,300	45,000	69,000	14,600
Iso-electric point (pH)	5.1	4.7	4.6	11.1
Dimension	6.5 nm $\times$ 3.6 nm $\times$ 3.6 nm	4.8 nm $\times$ 4.8 nm $\times$ 4.8 nm	12.0 nm $\times$ 2.7 nm $\times$ 2.7 nm	4.6 nm $\times$ 3.0 nm $\times$ 3.0 nm
Diffusion coefficient (m <sup>2</sup> /s)	$1.0 \times 10^{-10}$	$0.7 \times 10^{-10}$	$0.7 \times 10^{-10}$	$1.04 \times 10^{-10}$

Table 2  
Optical constants for four SUS 304 sample plates obtained by the reflectometer and the ellipsometer

Sample no. (SUS304)	Ellipsometer				Reflectometer			
	1	2	3	4	1	2	3	4
Optical constants								
$n_3$	2.52	2.52	2.52	2.55	2.37	2.42	2.32	2.48
$k_3$	4.25	4.25	4.26	4.27	4.22	4.16	4.14	4.31

tions were prepared using freshly distilled and deionized water obtained by Autostill system (WG 240 Yamato Co., Japan). No pH buffer reagent was used because of avoiding surface active behavior if any.

### 3. Results and discussion

Before adsorption experiments of proteins, we must know the optical constants of substrate: SUS to estimate the adsorption thickness of the protein layer. That is, the discussion on each protein adsorption experiment can be done by using optical constants obtained for each SUS plate. The refractive index ( $n_s$ ) and absorption coefficient ( $k_s$ ) of the substrate were determined by the reflectometry. The incident angle of He-Ne laser beam was varied from 45° to 85° and the dependence of Rp/Rs on the incident angle was measured. The theoretical curve fitting to the data points was processed through a computer program based on the method of least squares. For example, some obtained data for four sample plates are listed with the data obtained by a commercial type ellipsometer in Table 2. The values obtained by the both apparatus were closely similar ones. This confirms that our devised machine works in a successful way. Before adsorption experiments, the wetting of the bare SUS surface for water was also examined by DTM. The obtained datum is shown in Fig. 2. The DT for SUS is about 100 ms. The contact angle of a water drop for this SUS sample was also measured by the usual sessile drop method and it was estimated as about 75°.

Protein adsorption experiments on the SUS from the protein aqueous solution were conducted at the concentration of 0.05 mg/ml for each protein species. Adsorption process was monitored in the view window on the display screen of the computer. A typical figure for adsorption process for HSA is

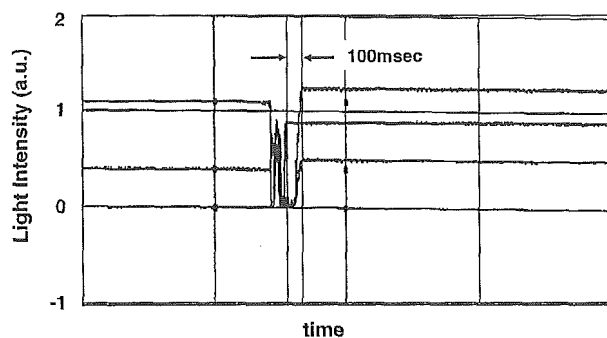


Fig. 2. A graph on display screen of the dropping time (DT) measurements for the bare SUS 304 plate in pure water.

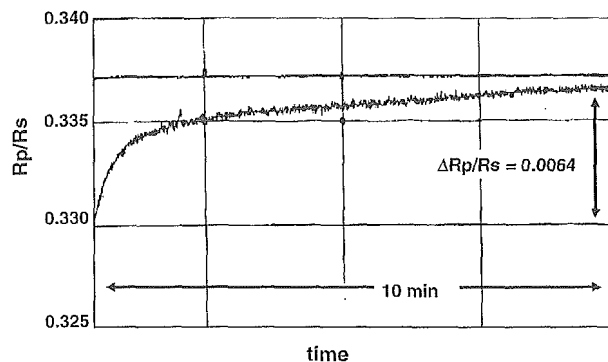


Fig. 3. A graph on display screen of the adsorption measurement for HSA from aqueous solution at the concentration of 0.05 mg/ml.

shown in Fig. 3. The protein adsorption is rather rapid process. It has at least two processes. The rate of protein adsorption is determined by the transportation process from bulk solution to the surface and the kinetic process to the surfaces. The later is due to the interaction of proteins with the surfaces of substrates and also with pre-adsorbed proteins. The interaction between protein molecules and the substrate determines the rate in the extremely early stage. After that time the rate is influenced by the protein–protein interaction. Random sequential adsorption (RSA) model indicates that the rate of adsorption is described by

$$\frac{d\Gamma}{dt} = kCs\phi, \tag{1}$$

where  $\Gamma$  is the adsorbed surface density of proteins,  $k$  the kinetic constant,  $C_s$  is the surface concentration of protein, and  $\phi$  is the effective vacant density of the surface and a function of the surface coverage ( $\theta_a$ ) [13]. Roughly speaking, RSA model consists of two stages. One continues up to several minute, and the other one is much slower process in some 10 min range.  $\phi$  is proportional to  $1-4\theta_a$  in the early stage of adsorption and gradually it changes to  $1-\theta_a$  (Langmuir type) because of the presence of pre-adsorbed molecules. In the figure we find that the protein–protein interaction already starts in a few minute. It agrees with the general feature of protein adsorption above mentioned model. Around 10 min (depending on the sample) after starting of adsorption, the vessel cell that contains protein solution was rapidly fallen down in order to measure the wetting of the substrate surface that protein adsorbed at this time point. DT is automatically measured and displayed in another view window on the computer screen (Fig. 4). In this case DT is about 2 min. It is rather longer than that for bare SUS surface. That is, the protein adsorbed surface can hold much water molecules, and the removing time of water layer from the surface is elongated, i.e., the wetting is promoted. For further detail discussion of the wetting, we need some theoretical consideration. Theoretically, the wetting is defined as the difference of the surface tension at solid–gas interface ( $\gamma_{sg}$ ) from that at solid–liquid interface ( $\gamma_{sl}$ ). That is, the wetting =  $\gamma_{sg} - \gamma_{sl}$ . This value is corresponding to the value of  $\gamma_{lg} \cos \theta$  from the equation of Young and Dupre, and it can be calculated if we know the equilibrium contact angle ( $\theta$ ) of a sessile water drop. The relationship between the equi-

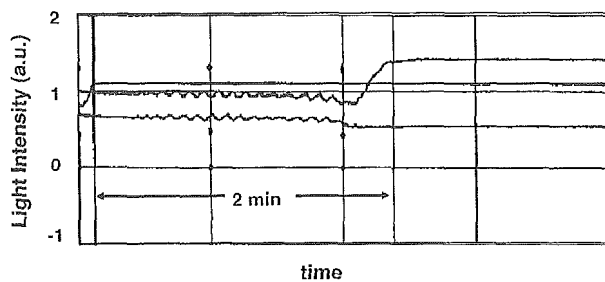


Fig. 4. A graph on display screen of the dropping time (DT) measurements for the HSA adsorbed SUS 304 plate in the aqueous solution of HSA at the concentration of 0.05 mg/ml after 10 min from the start of adsorption experiment (at the end point of the adsorption experiment in Fig. 3).

librium contact angle and the reciprocal of DT, i.e., the velocity of dropping thin liquid film ( $V$ ) is described as follows (see ref. [11]).

$$\cos \theta = 0.34 - 0.07V - 0.18 \ln V, \quad \text{for pure water } (\gamma_{lg} = 72 \text{ mN/m}) \quad (2)$$

$$\cos \theta = 0.32 - 0.40V - 0.15 \ln V, \quad \text{for protein solution } (\gamma_{lg} = 51 \text{ mN/m, protein monolayer adsorption at gas/liquid interface}). \quad (3)$$

For the intermediate condition between them, the  $\gamma_{lg}$  is taken the value between 72 and 51 mN/m, and the similar calculation is conducted. The relationship between the wetting and DT was calculated through the above described equations and is depicted in Fig. 5. In this figure two arrows are inset. The arrow 1 is for the bare SUS surface in pure water (datum in Fig. 2) and arrow 2 is for the HSA adsorbed surface in the protein solution (datum in Fig. 4). As found from the figure, the wetting ( $\gamma_{lg} \cos \theta$ ) is larger for arrow 2 than that for arrow 1. That is, HSA adsorption

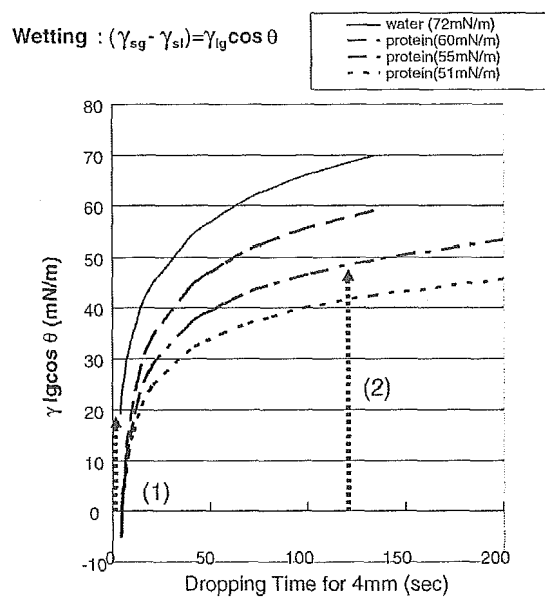


Fig. 5. Relationship between the wetting and the dropping time (DT) calculated by the Eqs. (2) or (3), etc. The arrow 1 corresponds to the data in Fig. 2 and the arrow 2 corresponds to the data in Fig. 4.

on SUS substrate brings the surface to much wetting nature than that before adsorption.

The adsorption amount can be evaluated through the value of  $\Delta R_p/R_s$ , the change in  $R_p/R_s$ , from the value for the bare substrate surface. Using the optical constants  $n=2.4$  and  $k=4.2$  for SUS,  $n=1.5$  for protein layer, and  $n=1.33$  for aqueous solution, the change of 0.001 in  $R_p/R_s$  is corresponding to the value of 0.25 nm for thickness of adsorbed protein layer at the light incident angle  $75^\circ$  (see Fig. 6). In real the refractive index ( $n_p$ ) for the adsorbed protein layer depends on the adsorbed situation of protein molecules and it varies from 1.4 to 1.7. Here we

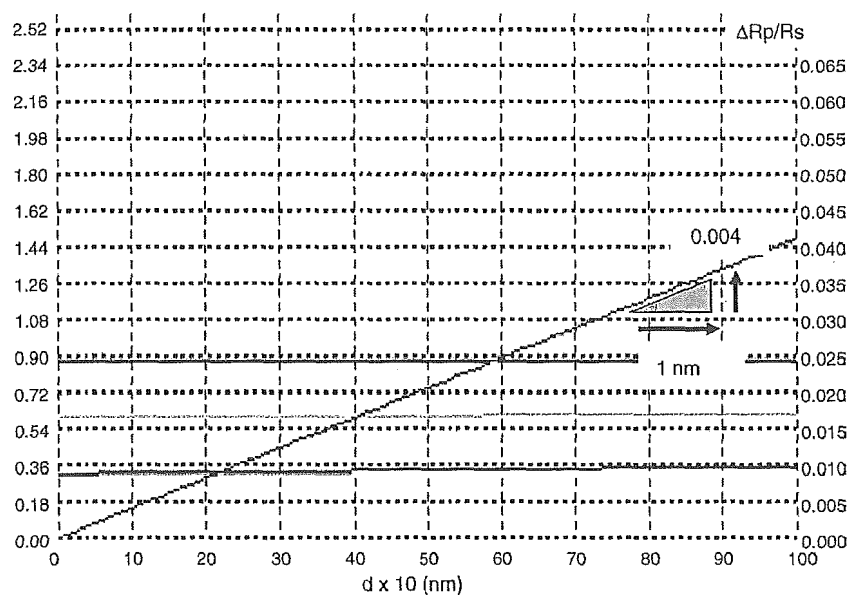


Fig. 6. Relationship between  $\Delta R_p/R_s$  and thickness of protein layer ( $d$ ) calculated by the reflection/refraction optics of three layers structure.



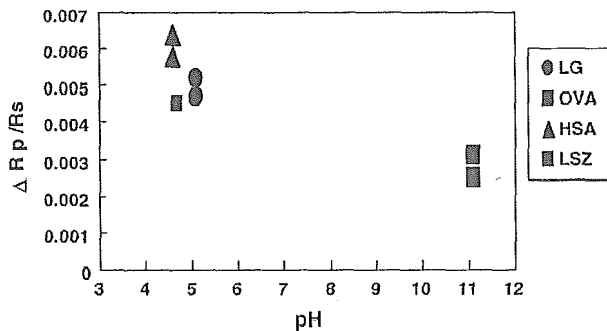


Fig. 7. Relationship between the adsorption amount expressed by  $\Delta R_p/R_s$  and iso-electric point for each protein species.

approximated that the refractive index of protein is 1.5 which are typical values for proteins. The adsorption amount per unit area is calculated by the following equation:

$$\Gamma = d \cdot \frac{\Delta n}{dn/dC}, \quad (4)$$

where  $d$  is the thickness of protein adsorbed layer,  $\Delta n$  the difference in the refractive index between protein layer and aqueous solution, and  $dn/dC$  is the dependency of the refractive index of protein aqueous solution on the concentration of protein molecules in the solution. The value of  $dn/dC$  is taken from the reference [14], that is,  $dn/dC = 1.7 \times 10^{-4} \text{ ml/mg} = 1.7 \times 10^{-10} \text{ m}^3/\text{mg}$ . After calculation using these values, 0.001 of  $\Delta R_p/R_s$  is corresponding to  $0.25 \text{ mg/m}^2$  of  $\Gamma$ . However in this report we represent the adsorption amount by  $\Delta R_p/R_s$  value as an indicator for adsorption extent because  $R_p/R_s$  is a directly obtained value not depending on the assumption in the calculation of  $\Gamma$  above mentioned. Fig. 7 shows  $\Delta R_p/R_s$  for four type of protein molecules (LG, OVA, HSA, LSZ, in  $0.05 \text{ mg/ml}$  aqueous solution) after about 10 min, depending on experiments, after starting of adsorption experiments against their iso-electric point pH. Around that time scale the protein adsorption enters the Langmuir adsorption stage where the fraction of vacant surface area is proportional to  $1-\theta_a$  because of pre-adsorbed molecules. Those experiments were conducted in pure water not using pH buffer, so experimental pH was about 6. This value did not change in such a protein concentration from that in pure water. The proteins (HSA, OVA, and LG) that have an iso-electric point near pH 6 showed a larger increase in  $R_p/R_s$  than LSZ that has an iso-electric point far from pH6. This implies that in the longer range of adsorption time, the charged state of protein molecules is important. That is, at iso-electric point, protein molecules have net zero electric charges on them, so the repulsive electrostatic interaction between them is at the minimum. In such a situation, the densest packing of protein molecules is possible. Fig. 8 shows the rate of protein adsorption process on SUS in the early stage for four proteins as a function of their iso-electric pH point. LG has a rather rapid adsorption behavior comparing with others and LS shows the slowest rate. This can be interpreted as follows. LG has the nearest i.e.p. to the experimental pH condition (around pH 6) and i.e.p. of LSZ is far from it. The rate

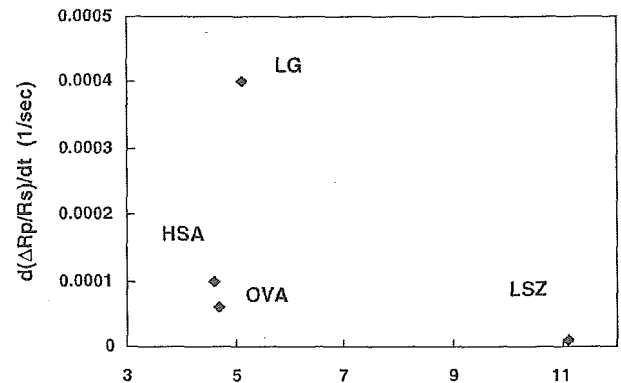


Fig. 8. Relationship between the rate of adsorption expressed by  $d(\Delta R_p/R_s)/dt$  and iso-electric point for each protein species.

in the case of LSZ is the slowest. It suggests that the repulsive protein–protein interaction between LSZ molecules is significant over the attractive substrate–protein interactions even in the early adsorption stage. Judging from electrophoretic measurements of SUS particles and streaming potential measurements of the plates, the SUS sample bears slight negative charges. Therefore, the electrostatic interaction between the SUS substrate and LSZ bearing net positive charges is the most prefer one to the adsorption among the four proteins. Experimental data shows the opposite results. If the adsorption is in obey to the RSA model described above, the rate of adsorption is influenced from the protein–protein interaction between adsorbed molecules and next coming molecules through steric hindrance including the electric double layer repulsion even in the early adsorption stage. LSZ has larger effective radius including electrical double layer by charging at pH 6, which affects the adsorption rate through the value of  $\phi$  [13]. The reason of the fastest rate of LG can be attributed to the effective smaller charging at pH 6 and its smallest molecular size. It has the largest diffusion coefficient among the three acidic proteins (see Table 1) and then the transportation process is also contributed to the fast rate of the adsorption.

In order to find the relationship between the wettings for protein adsorbed surfaces and adsorption amounts, DT is plotted against  $\Delta R_p/R_s$  in Fig. 9. This figure shows clear correlation between the wetting and the adsorption amount of proteins on the substrate surface. That is, the wetting is increased as the increase in the adsorbed amount of protein molecules without

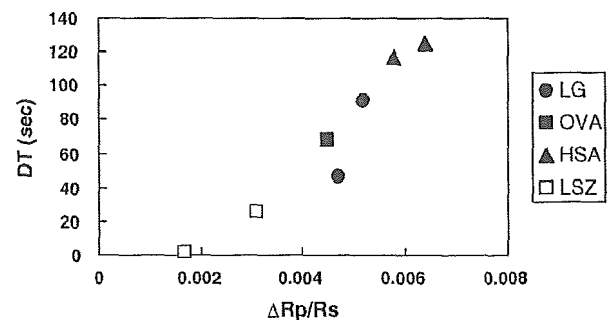


Fig. 9. Relationship between the wetting expressed by DT and the adsorption amount expressed by  $\Delta R_p/R_s$ .

concerning to protein species. The similar data for hydroxyapatite plates and particles were reported in the previous paper [15]. However, the data were obtained by the independent experiments using different samples, plate for the wetting and particles for the adsorption. From the both studies, it can be said that rather hydrophobic surfaces (SUS: ca. 75° and hydroxyapatite: 65° by the sessile drop method) become more hydrophilic nature according as proceed of adsorption of protein molecules.

#### 4. Conclusions

By utilizing the devised apparatus reported here, we can correlate the wetting of protein adsorbed substrate surface with the adsorption amounts of protein molecules. The wetting is promoted with proceeding of protein adsorption at least in the case of the combination of popular globular protein utilized here with the SUS substrates. This method has a possibility for extending the study of protein adsorption concerning to the wetting problem for various combination of substrates with proteins.

#### References

- [1] J. Lee, P.A. Martic, J.S. Tan, *J. Colloid Interface Sci.* 131 (1989) 252–266.
- [2] E.P.K. Currie, J. Van der Gucht, O.V. Borisov, M.A. Cohen Stuart, *Pure Appl. Chem.* 71 (1999) 1227–1241.
- [3] K. Kawasaki, M. Kambara, H. Matsumura, W. Norde, *Biofouling* 19 (2003) 355–363.
- [4] For example: V. Hladay, J. Buijs, Local and global optical spectroscopic probes of adsorbed proteins, in: M. Malmsten (Ed.), *Biopolymers at Interfaces*, Marcel Dekker Inc., 1998, pp. 181–220.
- [5] W.N. Hansen, *J. Opt. Soc. Am.* 58 (1968) 380–390.
- [6] J.C. Dijt, *Kinetics of Polymer Adsorption, Desorption, and Exchange Thesis*, Wageningen University, The Netherlands, 1993.
- [7] J.C. Dijt, M.A. Cohen Stuart, G.J. Fleer, *Adv. Colloid Interface Sci.* 50 (1994) 79–101.
- [8] J. Buijs, P.A.W. Van der Berg, J.W.Th. Lichtenbelt, W. Norde, J. Lyklema, *J. Colloid Interface Sci.* 177 (1996) 594–605.
- [9] H. Matsumura, K. Kawasaki, M. Kambara, *Colloids Surf. B Biointerfaces* 8 (1997) 181–188.
- [10] K. Kawasaki, M. Kambara, H. Matsumura, *Colloid Polym. Sci.* 277 (1999) 846–855.
- [11] R. Tsekov, H. Matsumura, K. Kawasaki, M. Kambara, *J. Colloid Interface Sci.* 233 (2001) 136–141.
- [12] H. Matsumura, K. Kawasaki, N. Okumura, M. Kambara, W. Norde, *Colloids Surf. B Biointerfaces* 32 (2003) 97–103.
- [13] J.J. Ramsden, *Kinetics of protein adsorption*, in: M. Malmsten (Ed.), *Biopolymers at Interfaces*, Marcel Dekker Inc., 1998, pp. 321–361.
- [14] W. Norde, *Adv. Colloid Interface Sci.* 25 (1986) 267–340.
- [15] K. Kawasaki, M. Kambara, H. Matsumura, W. Norde, *Colloids Surf. B Biointerfaces* 32 (2003) 321–334.

## 16. QLF 法による根面齲蝕の観察

田中 秀直, 伊津 元博, 高島隆太郎, 西島 典幸,  
川上 富清, 田治米元信, 川崎 弘二, 上村 参生,  
神原 正樹 (大歯大・口腔衛生)

超高齢化社会を向かえ, 高齢者にみられる根面齲蝕への対応は, 今後の歯科医療の大きな課題である. しかし, 根面齲蝕の診査基準, 検出, 処置などいまだ明確でないのが現状である. 今回, 初期齲蝕の早期検出に有効な QLF (Quantitative light-induced fluorescence) 法を用い, 根面齲蝕の観察を行った. 前歯部唇側根面に根面齲蝕を有する被験者に, インフォームドコンセントを取得した後, QLF 測定を行った. QLF で分析した結果, 根面齲蝕齲窩は, 上端がエナメル質歯頸線に沿い, 下顎が根尖に向かい拡大していた. その蛍光強度は上端に沿って強いことから, この部分の齲窩の深いことがわかった. また  $\Delta R$  の蛍光は齲窩に一樣にみられるものから, 点在するものまで多様であった. エナメル質と同様に根面の齲蝕にも QLF を応用することが可能であることがわかった.

# 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  
大阪歯科大学口腔衛生学講座

(索引用語: QLF, 初期う蝕, フッ化物)

口腔衛生会誌 55 (4), 2005

## 目的:

近年, 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. 光誘導蛍光定量法 (QLF 法) は初期う蝕を検出し, 得られたデジタル画像をコンピュータによって解析することによって, 初期う蝕を定量的に評価することが可能である. しかし, 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* 環境下で検討した.

## 方法:

### 1. 初期う蝕試料の作製

初期う蝕試料はウシ下顎切歯の唇側面から直径 4mm のディスクを取り出し, 鏡面研磨を行い作製した. 試料の脱灰予定窓以外をネイルバーニッシュで被覆し, 脱灰溶液 (乳酸; 100mM, 50% 飽和ハイドロキシアパタイト, カルボキハメチルセルロース; 0.2g/L, pH: 5.0) に 37°C で 24, 48, 72, 96 時間の浸漬を行い, 四種類の脱灰程度が異なる試料を各 40 試料作製した.

### 2. フッ化物の応用

脱灰程度の異なる各群 40 試料の初期う蝕試料に対し, 10 試料ずつ以下の四種類のフッ化物応用を行った.

- 1) 対照群: 再石灰化溶液のみに浸漬した.
- 2) フッ化物配合歯磨剤群: 一日 3 回, フッ化物配合歯磨剤溶液 (1g/14mL, 950ppmF) に初期う蝕試料を 5 分間浸漬した.
- 3) APF 群: 実験開始前, および実験開始後 14 日目に APF ゲル (9,000ppmF) を初期う蝕試料に 5 分間作用させた.
- 4) フッ化物配合歯磨剤 + APF 群: 2 および 3 両方の処理

を行った.

### 3. 初期う蝕試料の再石灰化および QLF 法による評価

すべての初期う蝕試料は再石灰化溶液 (HEPES; 20mM, CaCl<sub>2</sub>; 1.5mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 0.9mM, KCl; 130mM, pH: 7.0) に 37°C にて合計 28 日間浸漬した. 初期う蝕試料の再石灰化程度は Inspektor Pro システム (Inspektor Research Systems 社, オランダ) により評価を行った. 得られたデジタル画像は付属の画像解析ソフト (QLF200h) により解析し, 脱灰量を示す  $\Delta Q$  (% $\cdot$ mm<sup>2</sup>) 値を算出した.

## 結果および考察:

脱灰時間の増加に伴い  $\Delta Q$  値は増加し, 各群において統計的有意差は見られなかった (各脱灰群の平均値 24 時間群; -32.8% $\cdot$ mm<sup>2</sup>, 48 時間群; -84.8% $\cdot$ mm<sup>2</sup>, 72 時間群; -130.9% $\cdot$ mm<sup>2</sup>, 96 時間群; -168.4% $\cdot$ mm<sup>2</sup>). 再石灰化の過程において, 対照群とフッ化物配合歯磨剤群のあいだ, および二つの APF 処理群のあいだには統計的な有意差は見られなかったが, 対照群と二つの APF 処理群のあいだ, およびフッ化物配合歯磨剤群と二つの APF 処理群のあいだには統計的な有意差が観察された ( $p > 0.05$ ). 24 時間脱灰群において, 対照群とフッ化物配合歯磨剤群は最終的に 95% 以上の回復がみられ, 脱灰時間が増加するにつれ回復率は低下していったものの, 96 時間脱灰群においても 80% 以上の回復がみられた. 一方, 二つの APF 処理群においては, 24 時間脱灰群において 70% の回復がみられたが, 96 時間脱灰群では 40% 台の回復であった.

以上の結果から,  $\Delta Q$  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がより高い回復を導く可能性があることが明らかとなった.