

PRG フィラー抽出溶液が
エナメル質脱灰抑制に及ぼす影響に関する
超音波透過法による検討

日本大学大学院歯学研究科歯学専攻

浅野 和正

(指導：宮崎 真至 教授)

概 要

歯質は、口腔内環境において脱灰と再石灰化を繰り返しながら動的平衡を保っている。この動的平衡が崩れて脱灰が進行すると、齲蝕を生じることになるが、実質欠損を生じていない初期齲蝕病変に対しては、再石灰化を促すことによって病変を改善させることが可能とされている。

グラスアイオノマーセメントのフッ素徐放性が、粉末成分の反応相に由来することに着目し、フルオロアルミノシリケートガラスとポリアクリル酸とを水の存在下で予め酸—塩基反応させる pre-reacted glass-ionomer (PRG) 技術が開発された。この技術を応用した surface PRG (S-PRG) フィラーは、フルオロアルミノシリケートガラスを粉砕し、ポリアクリル酸による表面処理を行うことによって、ガラス表層部に安定なグラスアイオノマー相を形成させたものである。S-PRG フィラーからは、F の他にも再石灰化に有利なイオンを徐放することが可能とされており、歯質の脱灰抑制あるいは石灰化に寄与する可能性があるものの、その詳細は不明である。

そこで、PRG フィラー抽出溶液がウシエナメル質の脱灰抑制に及ぼす影響を非破壊的に物質の状態変化を把握することが可能である超音波透過法を用いることによって測定するとともに、走査電子顕微鏡 (SEM) 観察を行った。また、表面性状の変化を観察するために、レーザー走査顕微鏡 (LSM) 観察および表面粗さ測定も併せて行い、検討した。

測定には、ウシエナメル質を $4 \times 4 \times 1$ mm のブロック体に調製し、耐水性シリコンカーバイドペーパーの #600 から #2,000 まで順次研磨したものを用いた。PRG 抽出

溶液は、蒸留水に S-PRG フィラーを 1 : 1 (1 L : 1,000 g) の割合で混合し、十分に攪拌するとともに 24 時間振とうさせた後、遠心分離機を用いてフィラーと水溶液に分離させ、上澄み液を採取し、これを濾過することで調製した。

試片に対する脱灰条件としては、1 日につき 2 回、0.1 M 乳酸緩衝液 (pH 4.75) に 10 分間浸漬を行い、37°C 人工唾液中に保管した。脱灰液への浸漬に先立って、PRG 抽出溶液に 10 分間浸漬し、その後脱灰条件で保管した試片を PRG 群、PRG 溶出液に浸漬せずに、脱灰条件で保管した試片を De 群、脱灰を行うことなく 37°C 人工唾液中に保管した試片を control 群とした。

超音波送受信装置としては、パルサーレシーバー (Model 5900PR, パナメトリクス)、縦波用トランスデューサー (V112, パナメトリクス) およびオシロスコープ (Wave Runner LT584, レクロイ) から構成されるシステムを用いた。測定に際して、試片をサンプルステージに静置してトランスデューサーを垂直に接触させ、超音波伝播時間と試片の厚みとから各試片における縦波音速を求めた。超音波伝播時間の測定時期としては、溶液浸漬前、浸漬から 7, 14, 21 および 28 日後とした。

また、一定期間の浸漬を終えた試片は、LSM (VK-8700, キーエンス) を用いて表面性状の観察を行うとともに、試片の表面粗さ Ra (μm) を求めた。さらに、表面粗さ測定後の試片については、SEM (ERA-8800FE, エリオニクス) を用いてエナメル質表面の形態変化を観察した。

得られた各測定値について、重複測定分散分析および Tukey HSD test を用いて、有意水準 5 % の条件で統計学的検定を行った。

その結果、ウシエナメル質における音速の変化は各群において異なるものであり、control 群における音速は 6,110～6,114 m/s と、実験期間を通じて変化は認められなかった。一方、De 群における音速は浸漬期間の延長に伴って低下し、control 群に比べて測定 7 日後で有意に低下した。PRG 群の音速は実験期間を通じて変化は認められず、浸漬 28 日後でも control 群と比較して有意な変化は認められなかった。このことは、PRG フィラーから抽出された各種イオンの効果によって脱灰が抑制され、石灰化が進んだ可能性を示すものと考えられた。

LSM 観察の結果から、De 群において、エナメル質表面の凹凸は浸漬前よりも 28 日後で顕著に認められた。一方、PRG 群の試片表面の削状痕は不明瞭となり、比較的平坦な像を呈した。表面粗さ (Ra) の変化は、De 群においては浸漬期間の延長に伴って表面粗さは大きくなり、測定 7 日後で有意差が認められた。一方、control 群の表面粗さは、すべての測定時期で変化は認められず、PRG 群においても同様であった。

SEM 観察の結果からは、De 群ではエナメル質表面の典型的な脱灰像が観察されたが、PRG 群では形態的な変化はほとんど認められなかった。このようにエナメル質の表面性状の変化からも、PRG フィラーの再石灰化促進効果が示された。

本実験の結果から、PRG 抽出溶液はエナメル質の脱灰抑制作用および再石灰化促進作用を有することが示された。臨床的には、PRG 抽出溶液を歯質に塗布あるいはマウスリンスとして用いることによって、齲蝕予防や知覚過敏抑制などへの応用が期待される。

なお、本論文は原著論文 Asano K, Kawamoto R, Iino M, Furuichi T, Nojiri K,

Takamizawa T, Miyazaki M. Effect of pre-reacted glass-ionomer filler extraction solution on demineralization of bovine enamel. Oper Dent (in press) を基幹論文とし, これにエナメル質表面のレーザー走査顕微鏡観察および表面粗さ測定の成績を新たな実験データとして加えることによって総括したものである。

緒 言

歯質は、口腔内環境において脱灰と再石灰化を繰り返しながら動的平衡を保っている^{1,2)}。この動的平衡が崩れて脱灰が進行すると、齲蝕を生じることになるが、実質欠損を生じていない初期齲蝕病変に対しては、再石灰化を促すことによって病変を改善させることが可能とされている³⁾。このように脱灰を抑制して再石灰化を促進させる方法として、フッ化物あるいはカゼインホスホペプチド非結晶性リン酸カルシウム (CPP-ACP) などが用いられている^{4,5)}。

グラスアイオノマーセメントのフッ素徐放性が、粉末成分の反応相に由来することに着目し、フルオロアルミノシリケートガラスとポリアクリル酸とを水の存在下で予め酸—塩基反応させる pre-reacted glass-ionomer (PRG) 技術が開発された^{6,7)}。この技術を応用した surface PRG (S-PRG) フィラーは、フルオロアルミノシリケートガラスを粉砕し、ポリアクリル酸による表面処理を行うことによって、ガラス表層部に安定なグラスアイオノマー相を形成させたものである⁸⁾。S-PRG フィラーは、コンポジットレジン、ボンディング材あるいは義歯床用レジンなどに応用されており⁹⁻¹¹⁾、フッ化物徐放性や抗菌性などについても検討されている¹²⁻¹⁵⁾。さらに、このフィラーからは F⁻ の他にも、SiO³⁻ や Sr²⁺ などの再石灰化に有利なイオンを徐放することが可能とされており⁸⁾、歯質の脱灰抑制あるいは石灰化に寄与する可能性があるものの、その詳細は不明である。

そこで、PRG フィラー抽出溶液がウシエナメル質の脱灰抑制に及ぼす影響を、非破壊的に物質の状態変化を把握することが可能である超音波透過法¹⁶⁾を用いることに

よって測定するとともに、走査電子顕微鏡 (SEM) 観察を行った。また、表面性状の変化を観察するために、レーザー走査顕微鏡 (LSM) 観察および表面粗さ測定も併せて行い、検討した。

材料および方法

1. S-PRG フィラー

S-PRG フィラーの基質となるフルオロボロアルミノシリケートガラス (松風) は、silica (SiO_2), mullite ($3\text{Al}_2\text{O}_3 \cdot 2\text{SiO}_2$), boron oxide (B_2O_3), cryolite (Na_3AlF_6), strontium fluoride (SrF_2) および strontium carbonate (SrCO_3) を混合し、融解することで調製されたものである。得られたガラスを、X 線回折装置および蛍光 X 線分析装置を用いて分析した結果、その組成は SiO_2 21.6%, Al_2O_3 21.6%, B_2O_3 16.6%, SrO 27.2%, Na_2O 2.6% および F 10.4% であった。調製されたガラスフリットをボールミルで粉碎した後にシラン処理を施し、さらに表層をポリアクリル酸と一定時間反応をさせることによって、S-PRG フィラー (平均粒径 ; $3.0 \mu\text{m}$) とし、本実験にはこれを用いた。

2. S-PRG 抽出溶液

蒸留水 (pH 5.9) に S-PRG フィラーを 1 : 1 (1 L : 1,000 g) の割合で混合し、十分に攪拌するとともに 24 時間振とうさせた後、遠心分離機を用いてフィラーと水溶液に分離させ、上澄み液を採取し、これを濾過することによって測定液とした。各イオンの濃度 (mg/g) は、Al, B, Na, Si, および Sr については、Inductively Coupled

Plasma (ICP) 発光分光分析装置を用いて、F については、フッ化物イオン電極を pH/ion メータに接続して測定した結果、Al 0.04, B 2.07, F 0.09, Na 0.51, Si 0.03, Sr 0.25 であった。

3. 試片の製作

供試した歯は、ウシ (2~3 歳齢) の下顎前歯で、破折あるいは石灰化不全歯を除いたものを使用した。実験に際して、硬組織精密低速度切断機 (Ecomet 4000, Buehler) を用いて、唇舌的に約 1 mm の厚さに切断し、スーパーファインダイヤモンドポイント (ISO #021, 松風) を用いてブロック体 (4×4×1 mm) に調整した。次いで、各試片の表面を耐水性シリコンカーバイドペーパーの #600 から #2,000 まで注水下で順次研磨し、マイクロメータ (CPM15-25DM, ミットヨ) を用いて最終的な試片の寸法を計測した。

4. 脱灰条件

エナメル質試片を、以下の各群に分けて実験に供した。脱灰条件としては、1 日 2 回、0.1 M 乳酸緩衝液 (pH 4.75, 0.75 mM $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, sodium carboxymethyl cellulose 0.10 g/100 mL) に 10 分間浸漬し、37°C 人工唾液¹⁷⁾中に保管した。

- 1) PRG 群：脱灰液への浸漬に先立って、PRG 抽出溶液に 10 分間浸漬し、その後脱灰条件で保管した。
- 2) 脱灰 (De) 群：脱灰条件で保管した。
- 3) コントロール (Control) 群：実験期間を通じて 37°C 人工唾液中に保管した。

5. 超音波測定

超音波送受信装置としては、パルサーレシーバー (Model 5900PR, パナメトリクス), 縦波用トランスデューサー (V112, パナメトリクス) およびオシロスコープ (Wave Runner LT584, レクロイ) から構成されるシステム¹⁸⁾を用いた (Fig. 1)。

測定に際して、試片をサンプルステージに静置してトランスデューサーを垂直に接触させ、超音波伝搬時間と試片の厚みとから各試片における縦波音速を求めた。超音波伝搬時間の測定時期としては、溶液浸漬前、浸漬から 7, 14, 21 および 28 日後とした。測定は、室温 $23 \pm 1^{\circ}\text{C}$ 、相対湿度 $50 \pm 5\%$ の恒温室で行い、試片の数は各条件について 6 個とした。

6. 統計処理

各条件について得られた値について、異なる保管期間で比較するために重複測定分散分析および Tukey HSD test を用いて、有意水準 5%の条件で統計学的検定を行った。

7. LSM 観察および表面粗さ測定

試片表面の形態的な観察をするために、LSM (VK-8700, キーエンス) を用いて観察するとともに、装置に付属するソフトウェア (VK Analyzer, キーエンス) を用いて試片の表面粗さ Ra (μm) を求めた。測定は、試片中央部付近の異なる 5 点について行い、その平均をもってその試片の Ra 値とした。

8. SEM 観察

表面粗さ測定後の試片について、これを *tert*-ブタノール上昇系列を用いて順次脱水し、臨界点乾燥 (Model ID-3, エリオニクス) を行った。次いで、通法に従って

イオンコーター（Quick Coater Type SC-701，サンヨー電子）で金蒸着を施し，SEM（ERA-8800FE，エリオニクス）を用いて加速電圧 10 kV の条件で観察した。

成 績

超音波測定によって得られたエナメル質試片を透過する音速の変化を Table 1，Fig. 2 に示した。Control 群における音速は 6,110～6,114 m/s と，実験期間を通じて変化は認められなかった。一方，De 群における音速は浸漬期間の延長に伴って低下し，測定 7 日後で有意に低下した。PRG 群の音速は実験期間を通じて変化は認められず，浸漬 28 日後でも Control 群と比較して有意な変化は認められなかった。

LSM 像の代表例を Fig. 3 に示した。De 群において，エナメル質表面の凹凸は浸漬前よりも 28 日後で顕著に認められた。一方，PRG 群の試片表面の削状痕は不明瞭となり，比較的平坦な像を呈した。表面粗さ（Ra）の変化を Table 2 に示した。De 群においては浸漬期間の延長に伴って表面粗さは大きくなり，測定 7 日後で有意差が認められた。一方，Control 群の表面粗さは 0.182～0.195 μm ですべての測定時期で変化は認められず，PRG 群においても同様であった。

実験開始から 28 日後における SEM 像の代表例を Fig. 4 に示した。エナメル質表面は，浸漬条件によってその性状が異なっていた。De 群では，エナメル質表面の典型的な脱灰像が観察されたが，PRG 群では形態的な変化はほとんど認められなかった。

考 察

これまで歯質の脱灰あるいは再石灰化に関する検討としては、マイクロラジオグラム、共焦点レーザー顕微鏡、Quantitative Light-induced Fluorescence 法あるいは SEM を用いた観察が行われてきたが¹⁹⁻²³⁾、装置が大型であったり、試片の前処理が必要であるなどの問題点も有していた。そこで著者は、非破壊的に歯質の脱灰状態を把握できるとともに、装置が比較的小型である超音波透過法に着目した。その応用原理は、硬組織における音速の違いが石灰化の程度と相関があり、無機成分の体積密度に比例して音速が上昇することに基づいている²⁴⁾。すなわち、硬組織中を伝播する超音波の音速が速いということは石灰化の程度が高いことを示しており、本研究ではこの原理を応用して、PRG 抽出溶液がエナメル質の脱灰抑制に及ぼす影響について検討した。

その結果、Control 群におけるエナメル質試片の音速は 6,110~6,114 m/s であったものが、De 群では 7 日間経過した時点で 5,663 m/s と有意に低下した。一方、Control 群と比較して PRG 群における音速はやや上昇する傾向が認められた。このことから、PRG 群においては、PRG フィラー抽出溶液の効果によって脱灰が抑制され、石灰化が進んだ可能性が示唆された。

浸漬 28 日群における試片の LSM 観察からは、Control 群においてエナメル質表層に削状痕が明瞭に認められ、De 群では顕著な凹凸構造が観察された。一方、PRG 群においては、削状痕は不明瞭となり、比較的平坦な像を呈した。LSM による表面粗さ測定においても、De 群では経時的にその値が大きくなる傾向を示したが、Control 群および PRG 群では実験期間を通じて変化は認められなかった。また、SEM 観察の

結果からは、De 群においては典型的な脱灰像が観察されたものの、PRG 群では保管期間が延長してもその表面形態に変化はほとんど認められなかった。

S-PRG フィラーは、多機能ガラスとポリ酸を水分存在下で反応させ、ガラスフィラー表面に安定したガラスアイオノマー相を形成させた後、この相を補強するための表面改質層を形成させた3層構造からなっている。S-PRG フィラーの特徴は、F⁻をはじめとする各種イオンのリリースおよびリチャージが可能なことであり、歯質接着材、コンポジットレジンあるいは歯面コート材など様々な歯科材料に応用されている²⁵⁾。また、抗菌性も有しているところから、義歯床用レジンや根管充填用シーラーへの添加も検討されている⁹⁻¹¹⁾。

S-PRG フィラーからは、F⁻ 以外に Al³⁺、Sr²⁺、SiO³⁻、BO₃³⁻ および Na⁺ が徐放される²⁶⁾。これらのうち、Sr²⁺ および F⁻ は、硬組織中の Ca²⁺ に作用するとともに、ハイドロキシアパタイトに作用し結晶構造を変化させ、耐酸性に優れたフルオロアパタイトあるいはストロンチウムアパタイトを形成する²⁷⁾。F⁻ の存在は歯質に耐酸性を付与するとともに、酸性環境下では脱灰を抑制し、中性環境下では再石灰化を促進することが明らかになっている²⁸⁾。Sr²⁺ は、Ca²⁺ と同じアルカリ土類金属に属し、骨に集積性を示す向骨性元素であり、F⁻ と結合しエナメル質の再石灰化能を増強させる²⁹⁾。SiO³⁻ は、ケイ酸ゲルの存在下でハイドロキシアパタイトの形成に関与する。すなわち、水和ケイ酸ゲルが有するシラノール基によって周囲環境から Ca および P を誘導し、ハイドロキシアパタイトの核形成を促進する³⁰⁾。さらに、Si は陰イオンを形成し、Ca の担体として象牙質に短時間で取り込まれ、連続的なリン酸カルシウム形成に関与

することによって石灰化を促進するとされている³¹⁾。

このように、S-PRG フィラーからは、F 以外にも歯質の石灰化に関与すると考えられている Sr^{2+} および SiO^3 が徐放されており、これらのイオンが石灰化促進作用を示したことによって、エナメル質表層の結晶構造が緻密化し、測定された音速あるいは歯質の表面性状に変化が生じたことが示唆された。

本実験の結果から、PRG 抽出溶液はエナメル質の脱灰抑制作用および再石灰化促進作用を有することが示唆された。臨床的には、PRG 抽出溶液を歯質に塗布あるいはマウスリンスとして用いることによって、齲蝕予防や知覚過敏抑制などへの応用が期待される。

結 論

PRG フィラー抽出溶液がエナメル質の脱灰に及ぼす影響について、超音波透過法によって検討するとともに、LSM 観察、表面粗さ測定および SEM 観察を行った結果、以下の結論を得た。

1. 超音波透過法を用いた音速測定の結果から、De 群においては音速の低下を認められたが、PRG 群では、実験期間を通じて変化は認められなかった。
2. レーザー走査顕微鏡を用いた表面性状の観察結果から、28 日経過後の De 群では顕著な凹凸構造が認められたが、PRG 群では比較的平坦な像を呈した。
3. 表面粗さ測定の結果から、De 群では表面粗さは増大したが、PRG 群では変化は認められなかった。

4. 走査電子顕微鏡を用いた観察から、De 群においては典型的な脱灰像が観察されたものの、PRG 群では形態的な変化はほとんど認められなかった。

文 献

- 1) Featherstone JD. The science and practice of caries prevention. *J Am Dent Assoc* 2000; 131: 887-899.
- 2) Featherstone JD. The continuum of dental caries evidence for a dynamic disease process. *J Dent Res (Spec Iss C)* 2004; 83: C39-C42.
- 3) 飯島洋一, 高木興氏. 歯頸部辺縁のエナメル質ならびに歯根象牙質における脱灰-再石灰化反応. *口腔衛会誌* 1996; 46: 290-296.
- 4) Reynolds EC. Remineralization of enamel subsurface lesions by casein phosphopetide-stabilized calcium phosphate solution. *J Dent Res* 1997; 76: 1587-1595.
- 5) Yamaguchi K, Miyazaki M, Takamizawa T, Inage H, Moore BK. Effect of CPP-ACP paste on mechanical properties of bovine enamel as determined by an ultrasonic device. *J Dent* 2006; 34: 230-236.
- 6) Tay FR, Sano H, Tagami J, Hashimoto M, Moulding KM, Yiu C, Pashley DH. Ultrastructural study of a glass ionomer-based, all-in-one adhesive. *J Dent* 2001; 29: 489-498.
- 7) Ikemura K, Tay FR, Kouro Y, Endo T, Yoshiyama M, Miyai K, Pashley DH. Optimizing filler content in an adhesive system containing pre-reacted glass-ionomer fillers. *Dent Mater* 2003; 19: 137-146.
- 8) Ikemura K, Tay FR, Endo T, Pashley DH. A review of chemical-approach and ultramorphological studies on the development of fluoride-releasing dental adhesives

- comprising new pre-reacted glass ionomer (PRG) fillers. *Dent Mater J* 2008; 27: 315-339.
- 9) Han L, Okamoto A, Fukushima M, Okiji T. Evaluation of a new fluoride-releasing one-step adhesive. *Dent Mater J* 2006; 25: 509-515.
 - 10) Kamijo K, Mukai Y, Tominaga T, Iwaya I, Fujino F, Hirata Y, Teranaka T. Fluoride release and recharge characteristics of denture base resins containing surface pre-reacted glass-ionomer filler. *Dent Mater J* 2009; 28: 227-233.
 - 11) Mukai Y, Kamijo K, Fujino F, Hirata Y, Teranaka T, ten Cate JM. Effect of denture base-resin with prereacted glass-ionomer filler on dentin demineralization. *Eur J Oral Sci* 2009; 117: 750-754.
 - 12) Han L, Cv E, Li M, Niwano K, Ab N, Okamoto A, Honda N, Iwaku M. Effect of fluoride mouth rinse on fluoride releasing and recharging from aesthetic dental materials. *Dent Mater J* 2002; 21: 285-295.
 - 13) Özer F, Karakaya Ş, Ünlü N, Erganiş O, Kav K, Imazato S. Comparison of antibacterial activity of two dentin bonding systems using agar well technique and tooth cavity model. *J Dent* 2003; 31: 111-116.
 - 14) 宮内貴弘. バイオアクティブ修復材料によるう蝕象牙質の再石灰化. *日歯保存誌* 2009; 52: 469-482.
 - 15) Saku S, Kotake H, Scougall-Vilchis RJ, Ohashi S, Hotta M, Horiuchi S, Hamada K, Asaoka K, Tanaka E, Yamamoto K. Antibacterial activity of composite resin with

- glass-ionomer filler particles. *Dent Mater J* 2010; 29: 193-198.
- 16) Miyazaki M, Inage H, Onose H. Use of an ultrasonic device for the determination of elastic modulus of dentin. *J Oral Sci* 2002; 44: 19-26.
 - 17) Adair SM, Whitford GM, McKnight-Hanes C. Effect of artificial saliva and calcium on fluoride output of controlled-release devices. *Caries Res* 1994; 28: 28-34.
 - 18) Watanabe T, Miyazaki M, Inage H, Kurokawa H. Determination of elastic modulus of the components at dentin-resin interface using the ultrasonic device. *Dent Mater J* 2004; 23: 361-367.
 - 19) Huysmans MCDNJM, Longbottom C, Christie AM, Bruce PG, Shellis RP. Temperature dependence of the electrical resistance of sound and carious teeth. *J Dent Res* 2000; 79: 1464-1468.
 - 20) Ando M, van Der Veen MH, Schemehorn BR, Stookey GK. Comparative study to quantify demineralized enamel in deciduous and permanent teeth using laser- and light-induced fluorescence techniques. *Caries Res* 2001; 35: 464-470.
 - 21) Lussi A, Francescusi P. Performance of conventional and new methods for the detection of occlusal caries in deciduous teeth. *Caries Res* 2003; 37: 2-7.
 - 22) Reis A, Zach VL Jr, de Lima Navarro MF, Grande RH. Occlusal caries detection: A comparison of DIAGNOdent and two conventional diagnostic methods. *J Clin Dent* 2004; 15: 76-82.
 - 23) Higham SM, Pretty IA, Edgar WM, Smith PW. The use of in situ models and QLF for

- the study of coronal caries. J Dent 2005; 33: 235-241.
- 24) Ng SY, Ferguson MWJ, Payne PA, Slater P. Ultrasonic studies of unblemished and artificially demineralized enamel in extracted human teeth: A new method for detecting early caries. J Dent 1988; 16: 201-209.
 - 25) Murayama R, Furuichi T, Yokokawa M, Takahashi F, Kawamoto R, Takamizawa T, Kurokawa H, Miyazaki M. Ultrasonic investigation of the effect of S-PRG filler-containing coating material on bovine tooth demineralization. Dent Mater J 2012; 31: 954-959.
 - 26) Fujimoto Y, Iwasa M, Murayama R, Miyazaki M, Nagafuji A, Nakatsuka T. Detection of ions released from S-PRG fillers and their modulation effect. Dent Mater J 2010; 29: 392-397.
 - 27) Featherstone JD, Shields CP, Khademazad B, Oldershaw MD. Acid reactivity of carbonated apatites with strontium and fluoride substitutions. J Dent Res 1983; 62: 1049-1053.
 - 28) Chachra D, Vieira AP, Grynpas MD. Fluoride and mineralized tissues. Crit Rev Biomed Eng 2008; 36: 183-223.
 - 29) Thuy TT, Nakagaki H, Kato K, Hung PA, Inukai J, Tsuboi S, Nakagaki H, Hirose MN, Igarashi S, Robinson C. Effect of strontium in combination with fluoride on enamel remineralization *in vitro*. Arch Oral Biol 2008; 53: 1017-1022.
 - 30) Takahashi M, Yao T, Kokubo T, Minoda M, Miyamoto T, Nakamura T, Yamamuro T.

Apatite coated on organic polymers by biomimetic process: improvement in its adhesion to substrate by NaOH treatment. *J Appl Biomater* 1994; 5: 339-347.

- 31) Forsback AP, Areva S, Salonen JI. Mineralization of dentin induced by treatment with bioactive glass S53P4 *in vitro*. *Acta Odontol Scand* 2004; 62: 14-20.

表および図

Table 1 Ultrasonic velocities (m/s) of bovine enamel specimens.

Group	Treatment time (Day)				
	0 (Baseline)	7	14	21	28
Control	6,110 (80) a,A	6,114 (99) a,A	6,112 (101) a,A	6,113 (105) a,A	6,114 (108) a,A
De	6,050 (165) a,A	5,663 (140) b,B	5,598 (143) b,B	5,580 (146) b,B	5,523 (150) b,B
PRG	6,129 (80) a,A	6,251 (98) a,A	6,267 (92) a,A	6,281 (94) a,A	6,290 (94) a,A

n = 6, values in parenthesis indicate standard deviations.

Within groups, means sharing the same lower-case letter are not significantly different ($P > 0.05$).

Between groups at the same treatment times, means sharing the same upper-case letter are not significantly different ($P > 0.05$).

Table 2 Surface roughness (Ra, μm) of bovine enamel specimens.

Group	Treatment time (Day)				
	0 (Baseline)	7	14	21	28
Control	0.182 (0.02) a,A	0.193 (0.01) a,A	0.190 (0.02) a,A	0.195 (0.02) a,A	0.194 (0.02) a,A
De	0.193 (0.03) a,A	0.290 (0.05) b,B	0.373 (0.07) c,B	0.417 (0.04) d,B	0.464 (0.04) e,B
PRG	0.184 (0.02) a,A	0.197 (0.04) a,A	0.196 (0.03) a,A	0.197 (0.03) a,A	0.191 (0.03) a,A

n = 6, values in parenthesis indicate standard deviations.

Within groups, means sharing the same lower-case letter are not significantly different ($P > 0.05$).

Between groups at the same treatment times, means sharing the same upper-case letter are not significantly different ($P > 0.05$).

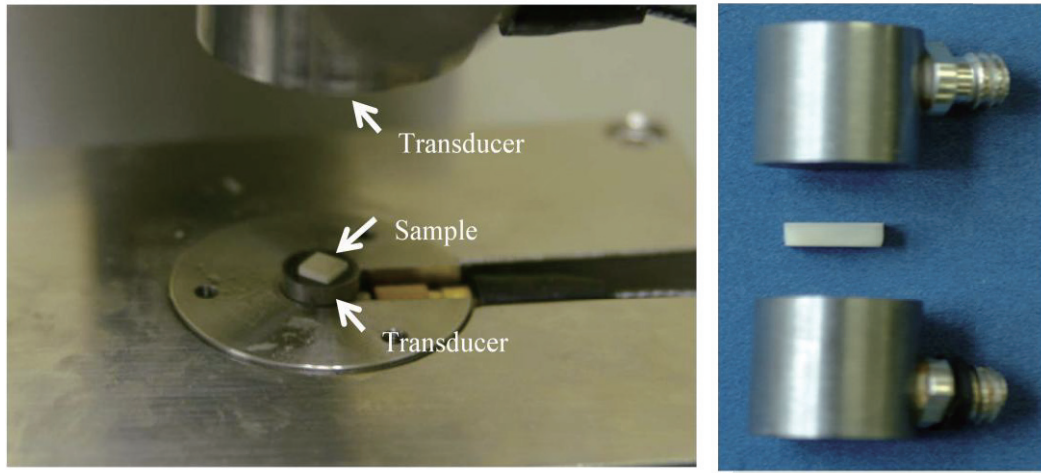
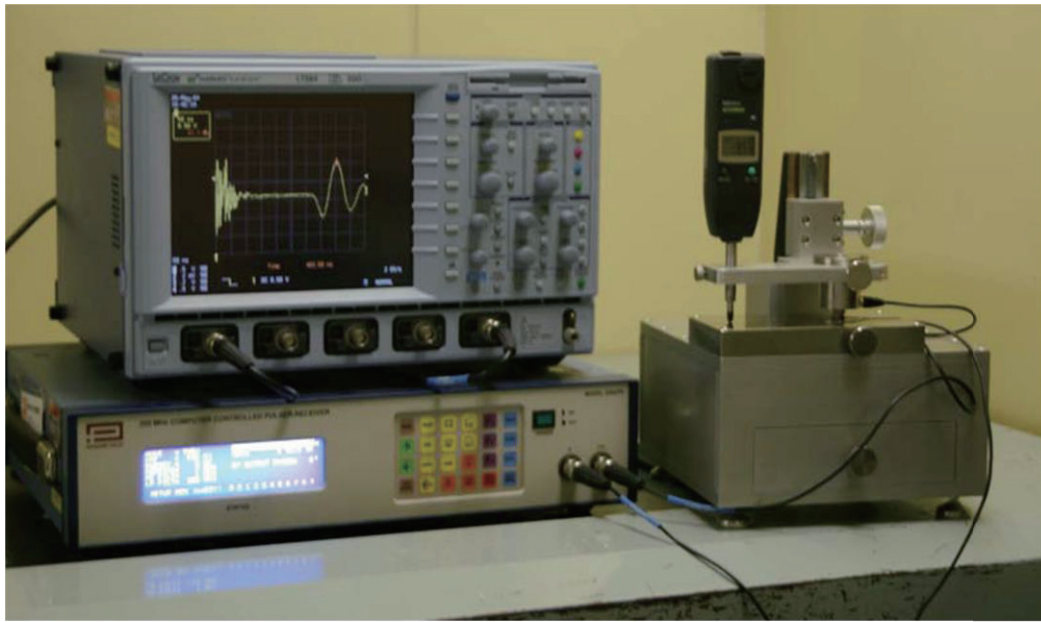


Fig. 1 Experimental set-up of the ultrasonic device for detection of tooth demineralization.

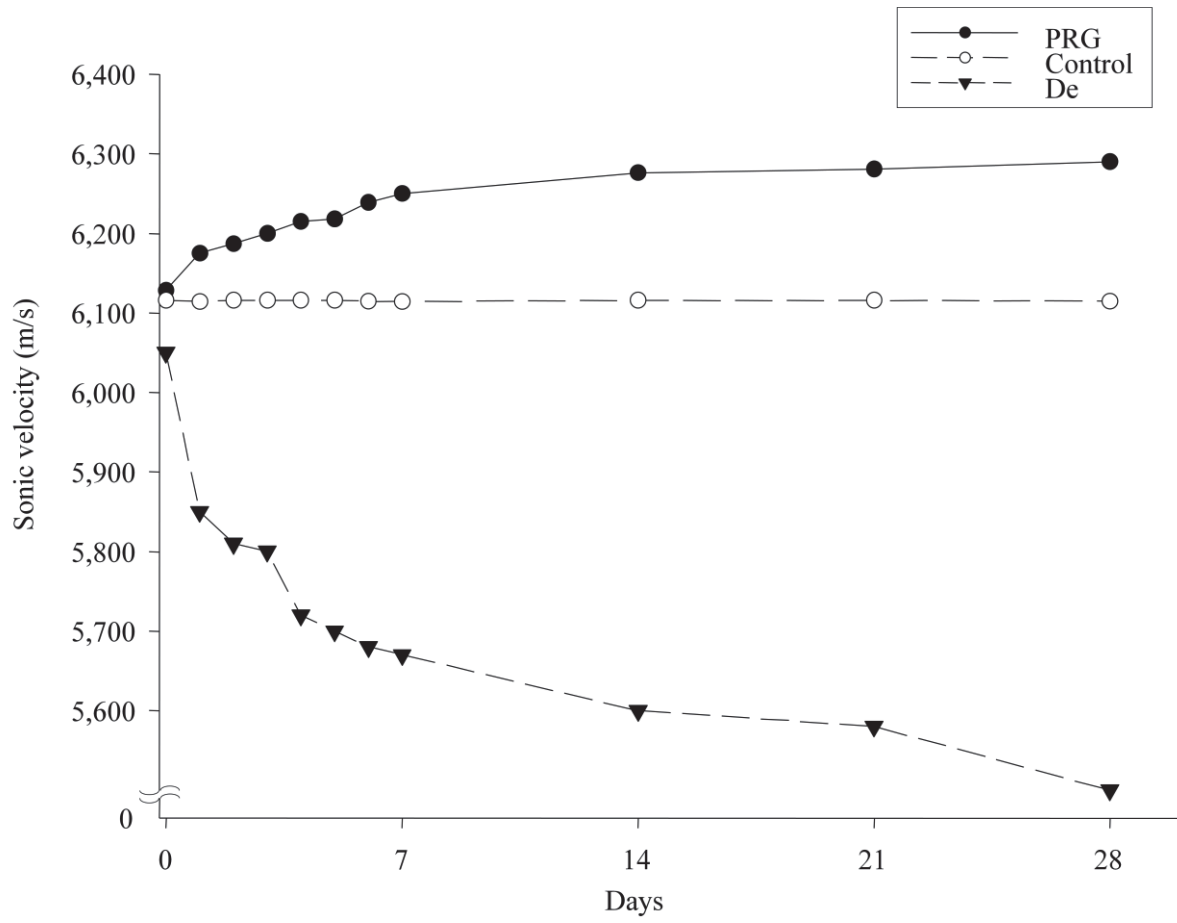


Fig. 2 Changes in sonic velocity in bovine enamel stored in various conditions.

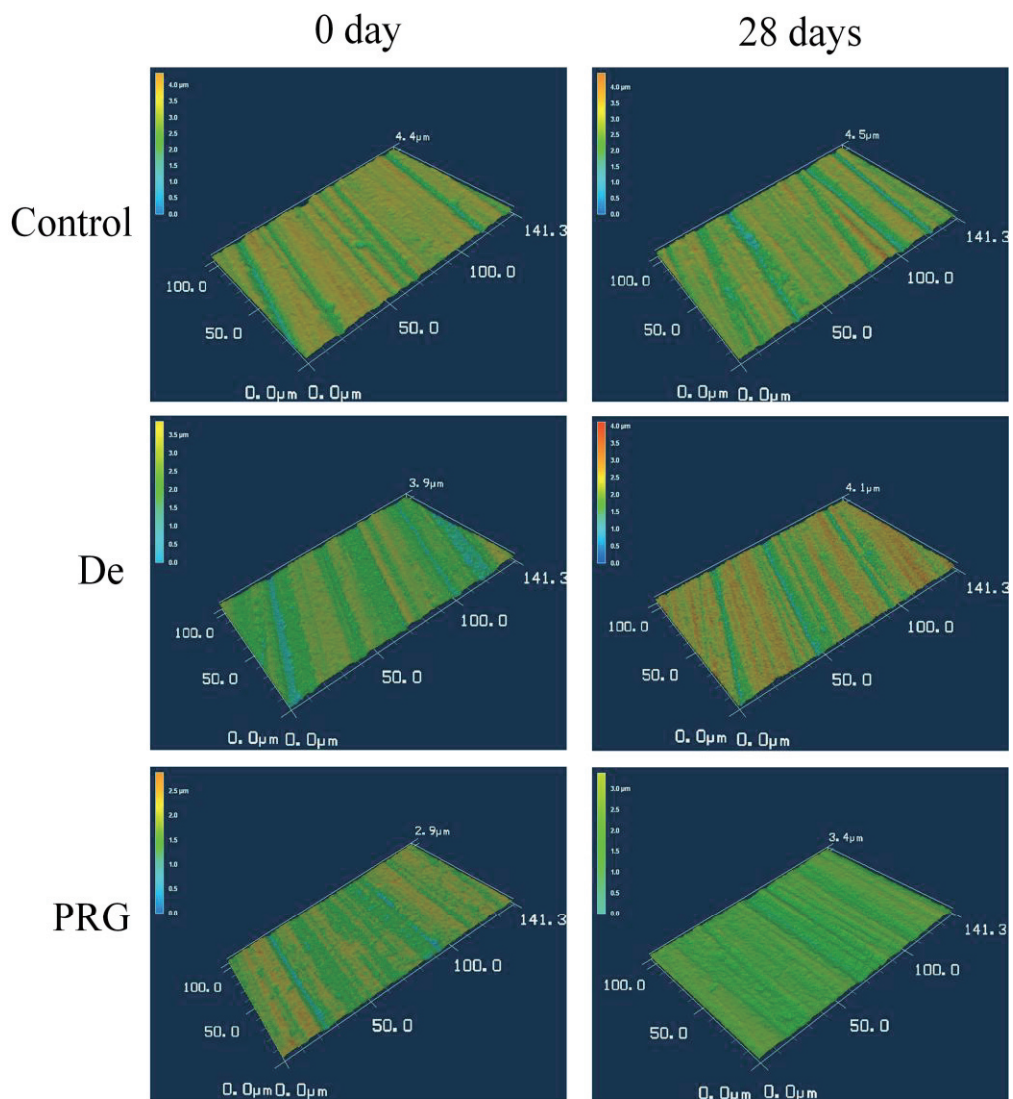


Fig. 3 Laser microscopic observation of enamel surfaces.

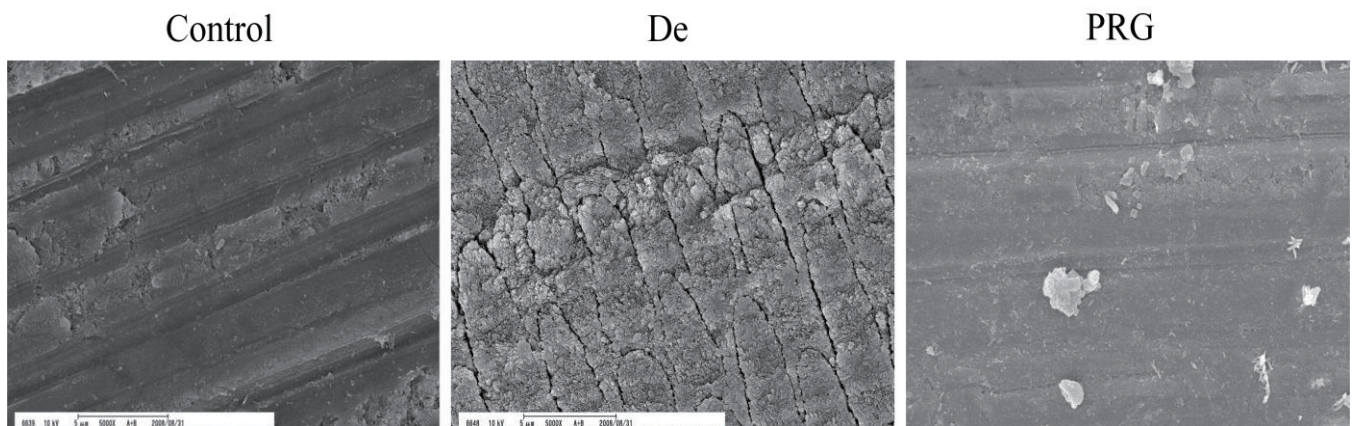


Fig. 4 FE-SEM observations of enamel surfaces after 28 days treatment (original magnification, $\times 5,000$).