



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	自動pHサイクル装置を用いた歯冠修復材料の脱灰抑制の影響
Author(s)	遠藤, 一樹
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(歯学)
Dissertation Number	甲第12142号
Issue Date	2016-03-24
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k12142
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/61899
Type	doctoral thesis
File Information	Kazuki_Endo.pdf



博 士 論 文

自動 pH サイクル装置を用いた歯冠修復材料の
脱灰抑制の影響

平成 28 年 3 月申請

北海道大学

大学院歯学研究科口腔医学専攻

遠 藤 一 樹

緒言

歯冠修復材料は、現在に至るまで多くの材料が開発されており、著しい発展を遂げている。特に最近では、ミニマルインターベンションの考えに基づき、接着性材料やフッ素徐放性材料の開発が進んでいる^{1,2)}。近年注目されている surface pre-reacted glassionomer (S-PRG) フィラーはガラスアイオノマーセメントの粉末であるフルオロアルミノシリケートガラスを粉砕し、熱加工した後、ポリアクリル酸による表面処理を行い、ガラス表層部に安定したガラスアイオノマー層を形成させたもので、種々の元素を溶出することが知られている³⁻⁵⁾。S-PRG フィラーやガラスアイオノマーセメントから溶出される代表的な元素としては、フッ素やストロンチウムが挙げられる。また、S-PRG フィラーやガラスアイオノマーセメントはフッ素のリチャージ能があり、フッ素をリチャージすることにより持続的にフッ素を溶出させることができる⁶⁾。フッ素はエナメル質の強化や初期う蝕の再石灰化など、う蝕の発生や進行に対して効果があることが知られている^{7,8)}。ストロンチウムはフッ素と共に作用し、エナメル質の再石灰化を促進する⁹⁻¹¹⁾、エナメル質に取り込まれる際はカルシウムと置き換わる¹²⁾。また、象牙細管を封鎖することにより知覚過敏を抑制することが報告されている¹³⁾。

一方で、エナメル質の脱灰を評価する研究は、口腔内の経時的な pH 変化を再現することなく、単純に pH の低い溶液に浸漬することにより、人工的な脱灰を起こし評価する研究がほとんどであった¹⁴⁻¹⁶⁾。そこで松田ら¹⁷⁻¹⁹⁾はステファンカーブ²⁰⁾で代表されるような連続的な pH 変化を再現し、経時的な脱灰と再石灰化を試料に加えることができる自動 pH サイクル装置を開発した。これにより様々な材料の脱灰抑制効果を *in vitro* ながらも可能な限り口腔内環境に近い状態で比較検討することが可能になり、歯冠修復材料周囲のエナメル質への影響に関する研究が進んでいる。しかし、自動 pH サイクル装置を使用した研究で、歯冠修復材料から溶出されるフッ素やストロンチウムの影響や、フッ化物処理の脱灰抑制効果を検討したものは未だ行われていない。

そこで本研究は自動 pH サイクル装置を用いて、歯冠修復材料周囲エナメル質の脱灰量を測定し、歯冠修復材料ならびにフッ化物処理による影響について評価した。また歯冠修復材料からのフッ素ならびにストロンチウムの溶出量の測定やカルシウムリン比 (Ca/P) の測定を行い、脱灰量との相関について検討した。

材料および方法

① 使用材料

本研究は、歯冠修復材料である S-PRG フィラー含有コンポジットレジン（ビューティフィール II (BF: 松風, 京都), 従来型コンポジットレジンの Z100 (3M ESPE, USA), グラスアイオノマーセメントのフジ IXGP エクストラカプセル (フジ IX: ジーシー, 東京) の 3 種類を使用した。また、歯面処理材はクリアフィル®メガボンド® (クラレノリタケデンタル, 東京) を添付文書に従い BF と Z100 に使用した。

研究に用いた歯はう蝕が無く、修復処置のされていない健全なヒト大臼歯を使用した。歯は抜去後、直ちに脱イオン水に浸漬し、使用まで 4 °C で保管した。なお本研究における抜去歯の使用に関しては患者に使用許諾を得て、北海道大学大学院歯学研究科臨床疫学研究倫理審査委員会において審査承認された（承認番号 2014 第 3 号）。

② Transverse Microradiography (TMR) 撮影および分析

脱灰量は TMR 撮影像から材料周囲のミネラルプロファイルを算出し Δ Integrated Mineral Loss (Δ IML) を求めて比較した。

試料の作製方法は松田ら^{17,18)}の方法に従い作製した。抜去歯のエナメル質表層のフッ素濃度を均一にする為に前処理として 2.0 mol/L 過塩素酸に 30 秒間浸漬し、最表層部エナメル質を除去した。その後、アルミナ懸濁液 (ALPHA MICROPOLISH ALMINA C, BUEHLER, USA) を用いてロビンソンブラシで表層を研磨した。ダイヤモンドポイント

(FT90, ピーディーアール, 愛知) を用いて頬舌側面に歯軸に垂直になるように幅 1 mm, 長さ 5 mm, 深さ 1 mm の窩洞を形成し各材料を充填した. 試料は, BF を充填した試料を BF 群, Z100 を充填した試料を Z100 群, フジ IX を充填した試料をフジ IX 群とした. また, 窩洞形成や充填をしなかったものをコントロール群とした.

材料の充填後 (コントロール群を含む), 湿度 100 % で 24 時間保存し, マイクロカッティングマシン (BS-300CP, 盟和商事, 東京) を用いて歯軸に対して平行に切断し厚さ 200 μm の切片を作製した. 自動 pH サイクル装置にかける試料は, 切断面に銅製メッシュ (GILDER GRID G100, 日新 EM, 東京) を設置した後, スティッキークワックスで被覆した.

自動 pH サイクル装置の模式図を図 1 に示す. 装置は, 松田ら^{17,18)}の方法に従い設定した. 脱灰溶液 (0.2 M Lactic acid, 3.0 mM CaCl_2 , 1.8 mM KH_2PO_4 , pH 4.5), 再石灰化溶液 (0.02 M HEPES, 3.0 mM CaCl_2 , 1.8 mM KH_2PO_4 , pH 7.0) を用いた. 各サイクルにおける pH 5.5 以下である時間 (脱灰時間) を平均 18 分, 初期の pH に戻るまでの時間 (回復時間) を平均 52 分とした. サイクル数は 1 日 6 回 (6, 9, 12, 15, 18, 21 時), 各サイクルの間隔は 120 分とし, この期間以外は再石灰化溶液に浸漬した. サイクル期間は 4 週間とした. フッ化物処理は一般的な歯磨剤のフッ素濃度 1000 $\mu\text{g F/g}$ の 30 % (wt/v)

の濃度である 18.4 mM (350 μ g/F) の NaF 溶液を使用した^{21, 22)}. 溶液に各試料を 1 日 1 回 5 分間浸漬させた.

TMR 撮影は, 実験開始前と pH サイクル開始後 1, 2, 3, 4 週目に行った. 各試料はアルミステップウェッジとともに, コンタクトマイクロラジオグラフィー撮影装置 (CSM-2, Softex, 神奈川) を用いて撮影した. 加速電圧 14 kV, 加速電流 4 mA, 試料-焦点間距離 100 mm, 照射時間 20 分の条件下で TMR 撮影を行った. 撮影にはガラス乾板 (High Precision Photo Plate, コニカミノルタ, 東京) を用い, 現像定着は専用現像液 (CDH-100, コニカミノルタ) および専用定着液 (CFL-881, コニカミノルタ) を用いて行った.

TMR 画像を光学顕微鏡 (BX50, OLYMPUS, 東京) に接続した CCD カメラと汎用画像処理ソフトウェア (Win RooF, 三谷商事, 福井) を用いて取り込み, デジタル化処理を行った. デジタル化した画像は Adobe Photoshop 8.0 (Adobe Systems Incorporated, USA) を使用し, 試料側面に設置した銅製メッシュを基準に重ね合わせを行った. 材料からの距離が 50 ~100 μ m のエナメル質部分の黒化度を汎用画像解析ソフトウェア (ImageJ, National Institutes of Health, USA) により測定した. 得られた黒化度は, アルミニウムステップウェッジの黒化度を基準として補正し, Angmar らの式に基づいて解析を行い, ミネラルプロファイルを算出し, Δ IML を求めた.

③ 材料から溶出する元素の定量

材料を 6 mm×6 mm×3 mm のブロック上に成形し、# 400, # 800 の耐水研磨紙を用いて表面を研磨した。24 時間室温で放置後、脱灰溶液に浸漬させ脱灰溶液のフッ素をフッ素イオン計 (F-10Z, 笠原理化工業, 埼玉) にて、ストロンチウム元素を Inductively coupled plasma atomic emission spectrometer (P-4010, HITACHI, 東京) を用いて定量した。

④ Ca/P の測定

ヒトエナメル質を TMR に使用した試料と同じ方法で処理した後に、表面が 5 mm×5 mm になるようにマイクロカッティングマシンにて切断し、# 400 の耐水研磨紙で平坦になるように研磨した。6 mm×6 mm×3 mm のブロック上に成形した材料をエナメル質を平坦にした部分から 0.1 mm 離れた状態でモデルリペア (デンツプライ三金, 栃木) で固定し、TMR と同じ自動 pH サイクル装置の設定で 4 週間処理した。自動 pH サイクル装置で処理する前後のエナメル質を Energy dispersive X-ray spectrometry (S2380N, HITACHI, 東京) を用いて元素解析を行い、Ca/P を測定した。

⑤ 統計処理

すべての統計処理は $p < 0.05$ の有意差で行った。有意差検定は two-way ANOVA, ボンフェローニの方法を用いて比較検討を行った。

結果

① Δ IML

フッ化物未処理群では 2~3 週において Z100 群がすべての群と比較して Δ IML が有意に高かった。4 週において Z100 群とコントロール群との間に有意差は認められず、BF 群やフジ IX 群と比較して Δ IML が有意に高かった。すべての週において BF 群とフジ IX 群との間に有意差は認められなかった (図 2)。

フッ化物処理群では 1 週目においてコントロール群がすべての群と比較して Δ IML が有意に高かった。2~4 週において Z100 群は BF 群、フジ IX 群と比較して Δ IML が有意に高かった。BF 群とフジ IX 群との間に有意差は認められなかった (図 3)。

フッ化物処理の有無で比較した場合、同一材料間では BF 群とフジ IX の 1 週目においてフッ化物未処理群の Δ IML が有意に高かった (図 2, 3)。

② 元素の溶出量

フッ素の溶出は、BF 群、フジ IX 群で認められた。すべての週においてフジ IX 群は BF 群より溶出量が有意に多かった。Z100 群からの溶出は認められなかった (図 4)。

ストロンチウムの溶出は、すべての週においてフジ IX 群が他の群と比較して有意に多か

った。BF 群は 1 週においてストロンチウムを多く溶出したが、2 週においては減少し、2~4 週ではほぼ一定の値での溶出が認められた。Z100 群からの溶出は認められなかった(図 5)。

③ Ca/P

コントロール群の Ca/P は 1.47, Z100 群は 1.44, BF 群は 1.24, フジ IX 群は 0.87 となった(図 6)。

考察

従来, *in vitro* で行われていた研究は, 試料を脱灰溶液と再石灰化溶液に交互に浸漬する断続的な研究が主であった。そこで松田ら¹⁷⁻¹⁹⁾はステファンカーブのような連続的な pH 変化を再現した自動 pH サイクル装置を開発した。自動 pH サイクル装置を使用したエナメル質の脱灰に関する研究において, ΔIML はサイクル期間が長くなるに従い増加する傾向にある²³⁾。本研究においても同様にサイクル期間が長くなるに従い ΔIML は増加した。また, フッ化物未処理群では, BF 群とフジ IX 群が Z100 群と比較して ΔIML が有意に低いという結果を得た。これらの材料の違いにはフッ素とストロンチウムの溶出の有無があり, 本研究の結果より歯冠修復材料から溶出したフッ素やストロンチウムがエナメル質の耐酸性を

向上されることが示唆された。材料から溶出した元素が近接するエナメル質に取り込まれるという報告はあるものの²⁴⁾、本研究においても同様の現象が起こったかどうかは元素分析などによる検証が必要である。

本研究でΔIMLを減少させたBF群とフジIX群はそれぞれ、BFがS-PRGフィラー含有コンポジットレジン、フジIXがガラスアイオノマーセメントである。S-PRGフィラーは表層部がゲル状構造となっており、フッ素、ストロンチウム、ナトリウム、ホウ素、アルミニウム、ケイ素を溶出することが知られている⁵⁾。さらにコンポジットレジンなどの材料に添加されてもフッ素などの溶出がスムーズに行える特徴をもつ²⁵⁾。本研究においてもBF群からはフッ素とストロンチウム、さらにデータには示さないがナトリウム、ホウ素、アルミニウムの溶出が確認されている。ガラスアイオノマーセメントはフッ素徐放性を有しており、抗う蝕作用を期待して広く臨床で用いられている。ガラスアイオノマーセメントによるフッ素の溶出は、フルオロアルミノシリケートガラスとポリアクリル酸の酸-塩基反応によって生成されたガラスアイオノマー反応相によるものと考えられている。ガラスアイオノマーセメントからはフッ素、ストロンチウム、ナトリウム、アルミニウムが溶出することが知られている²⁶⁾。本研究においてもフジIX群からはフッ素とストロンチウム、データには示さないがナトリウム、アルミニウムの溶出が確認されている。

フッ化物処理の有無で比較した場合、同一材料間においてフッ化物処理により Δ IMLが有意に減少したのはBF群とフジIX群の1週目のみであり、ほかの材料、週においては有意差が認められなかった。本研究でのフッ化物処理は歯磨剤に含まれるフッ素がブラッシング後に口腔内に残留する濃度を参考にして18.4mMのNaF溶液に1日1回5分間浸漬させて行った^{21,22)}。過去の研究においてフッ素濃度が低濃度よりも高濃度の場合に、また、中性条件よりも酸性条件においてエナメル質に取り込まれるフッ素の量が増加し、脱灰量やエナメル質の硬さに影響を及ぼすことが報告されている²⁶⁻²⁸⁾。さらにフッ素濃度が高い条件で検討した場合には異なる結果が得られるかもしれない。また、自動pHサイクル装置によりpH変化はコントロールしていたが、フッ化物処理に用いたNaF溶液はpH6.8であり、NaF溶液を酸性にした場合には Δ IMLが減少する可能性も考えられる。

グラスアイオノマーセメントやS-PRGフィラー含有コンポジットレジンからのフッ素の溶出は、脱イオン水に浸漬した場合、浸漬後24時間をピークにその後は急激に減少すると報告されている⁶⁾。本研究においてもBF群ならびにフジIX群から脱灰溶液中に溶出したフッ素は1週目から2週目にかけて急激に減少し、その後はなだらかに減少した。自動pHサイクル装置に使用する脱灰溶液に浸漬した場合も、脱イオン水に浸漬した場合と似たフッ素の溶出パターンを示すことが分かった。また、フジIX群のフッ素溶出量はBF群と比

較して有意に多かった。Mellberg ら²⁹⁾はフッ素徐放性材料からのフッ素溶出量とエナメル質に対するフッ素の取り込み量は作用時間と濃度に比例すると報告しており、それに従うとフッ素溶出量の多いフジ IX 群において BF 群よりも ΔIML が低くなると考えられるが、本研究では有意差は認められなかった。

ハイドロキシアパタイトは化学式が $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{OH}_2$ で表されるイオン結晶である。生体内ではカルシウムイオンが鉄イオンやマグネシウムイオンに置換されていることがある。ハイドロキシアパタイト中のカルシウムイオンの配置は 2 種類ある。ひとつは **screw axis** カルシウムと呼ばれ、三角形の各頂点にカルシウムイオンが存在する構造になっている。もうひとつは **columnar** カルシウムと呼ばれ、トンネル構造となっており、動きやすいものとなっている。そのため、**columnar** カルシウムは他のイオンと置換しやすいと考えられている³⁰⁾。また、ストロンチウムはハイドロキシアパタイトのカルシウムイオンと置換することが報告されている⁹⁻¹¹⁾。本研究ではストロンチウムの溶出量が多いほど **Ca/P** が低下するという結果を得たが、**Ca/P** が低下した原因としてはストロンチウムが **columnar** カルシウムと置き換わった可能性が考えられる。しかし、本研究ではストロンチウムのエナメル質への取り込みは確認できておらず、今後解明していく必要がある。

本研究では歯冠修復材料の違いによる脱灰抑制効果は認められたが、フッ化物処理による違いは一部でしか認められなかった。また、pH は自動 pH サイクル装置を用いて口腔内を想定した連続的な変化を再現したが、フッ化物処理は試料を NaF 溶液に浸漬する方法で行っているため、口腔内のフッ素動態を再現できていない。口腔内のフッ素濃度はブラッシング後 2 時間で元の濃度に戻るという報告もあり³¹⁾、今後は口腔内の pH のみではなく、フッ化物の濃度の推移を再現し、より口腔内に近い環境での検討が必要となると考えられる。

結論

自動 pH サイクル装置を使用して歯冠修復材料やフッ化物処理が材料周囲エナメル質に及ぼす影響を調べた。その結果、以下の結論を得た。

1. BF 群とフジ IX 群では周囲エナメル質の ΔIML が減少した。
2. フッ化物処理を行った場合、BF 群とフジ IX 群において ΔIML が有意に減少した。
3. BF 群とフジ IX 群からはフッ素とストロンチウムの溶出が認められた。

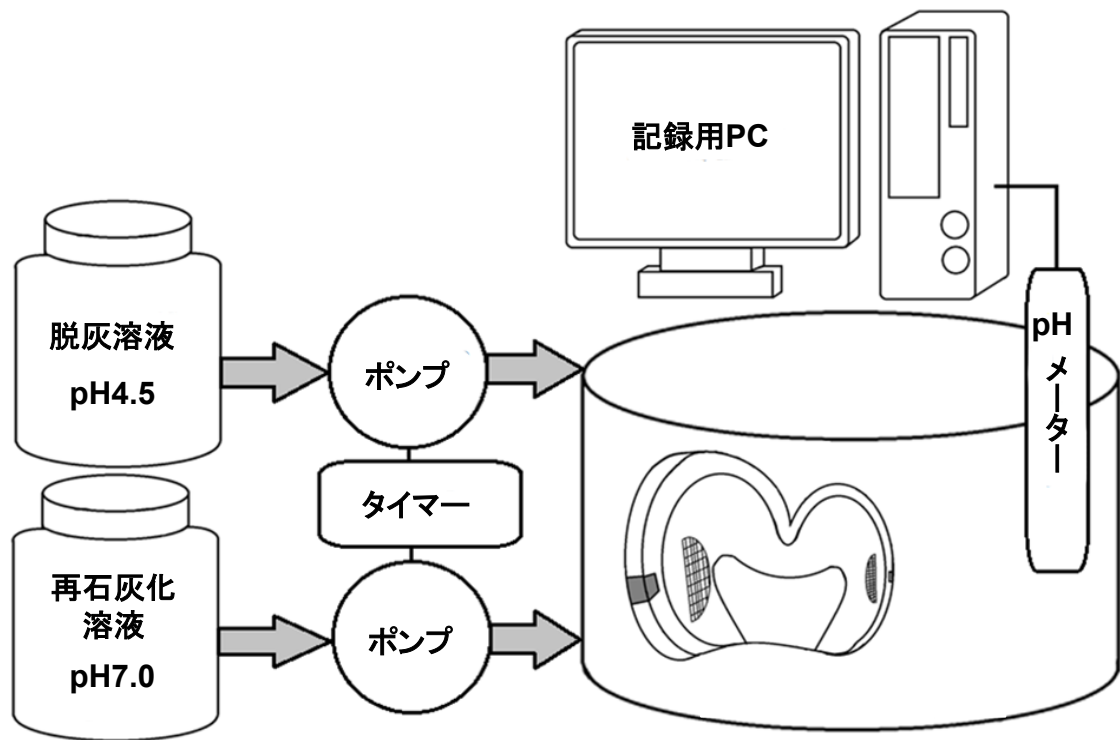


図1 自動pHサイクル装置

脱灰溶液および再石灰化溶液はタイマーで制御されたポンプによりビーカーに注入した。

溶液濃度が均一になるように、ビーカー内の溶液は常時マグネットスターラーで攪拌した。

溶液の pH は pH メーターによって 1 分ごとに PC に記録した。

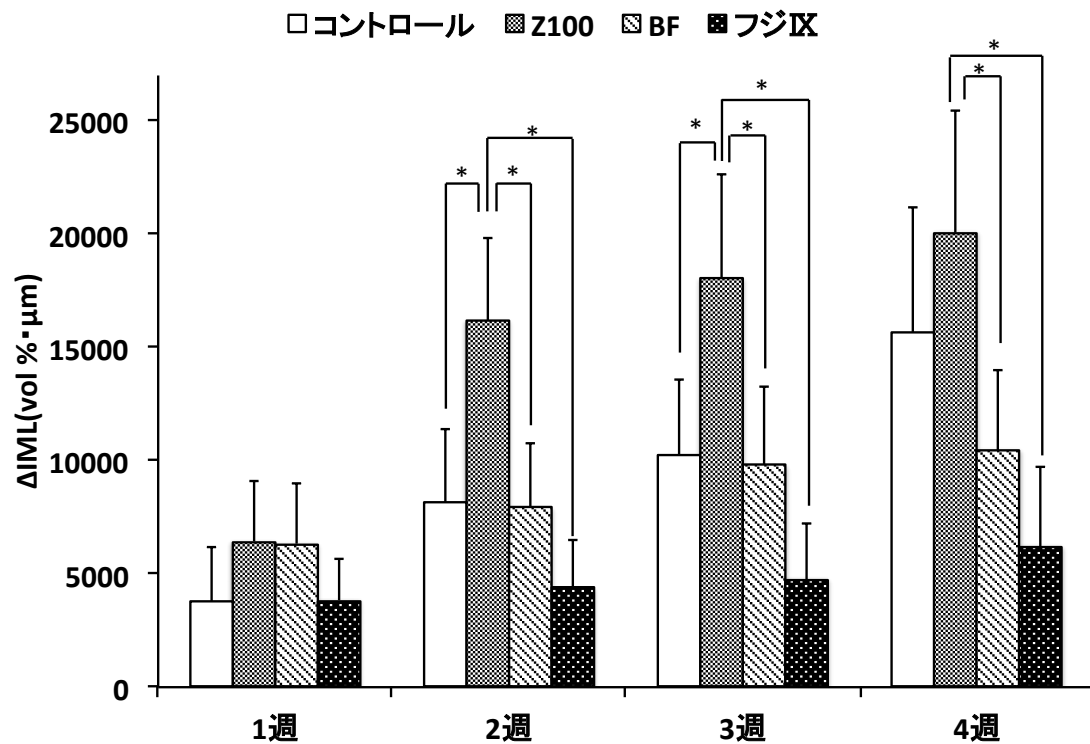


図2 フッ化物未処理群のIntegrated Mineral Loss (ΔIML) * p<0.05

線で結ばれているものは有意差があるものを示す (p<0.05). 縦線 ($\bar{I}$) は SD を示す. 1

週目では有意差は認められなかった. 2,3 週目では Z100 群が他の群より有意に高い脱灰量

を示した. 4 週目では Z100 が BF 群, フジ IX 群より有意に高い脱灰量を示した.

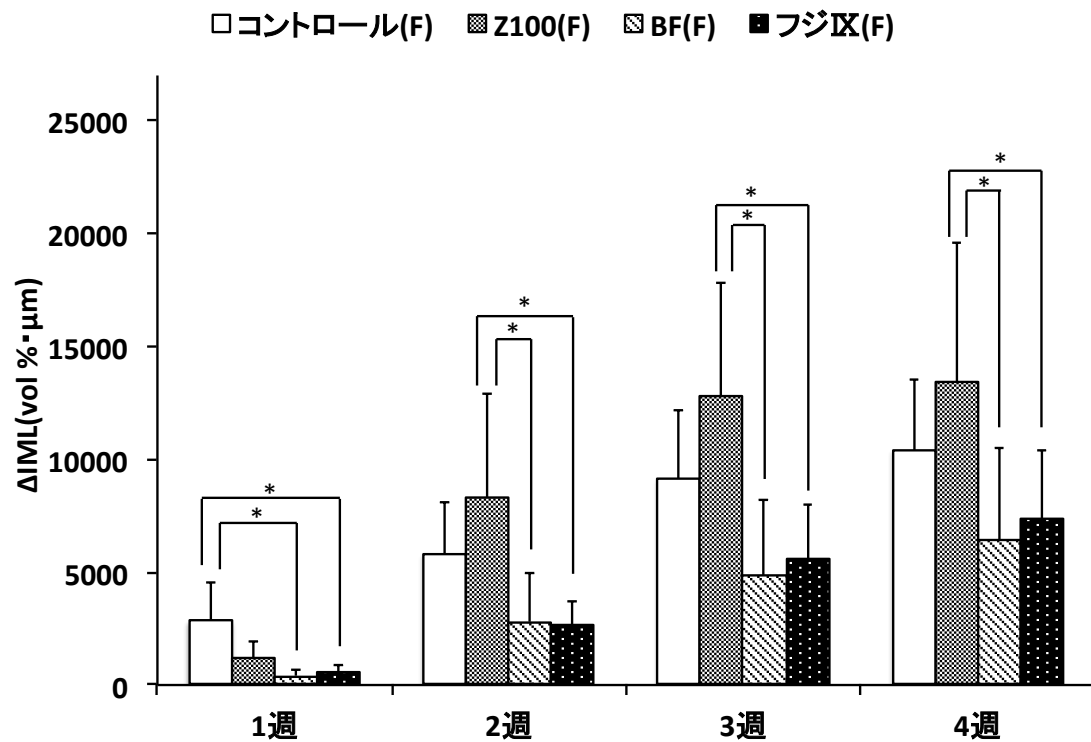


図3 フッ化物処理群のIntegrated Mineral Loss (ΔIML) * p<0.05

線で結ばれているものは有意差があるものを示す (p<0.05). 縦線 ($\bar{I}$) は SD を示す. 1 週

目ではコントロール群が BF 群, フジ IX 群より有意に高い脱灰量を示した. 2-4 週では Z100

群が BF 群, フジ IX 群より有意に高い脱灰量を示した.

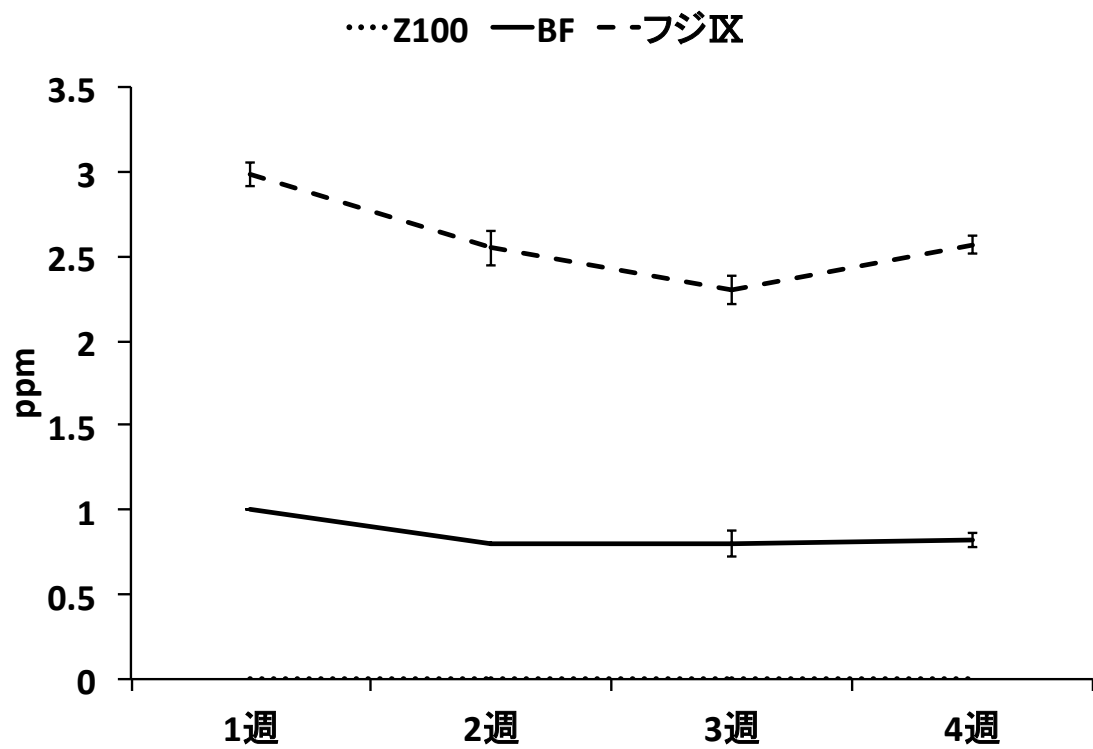


図4 フッ素溶出量

すべての週，すべての群において有意差が認められた($p<0.05$)．すべての週においてフジ

IX 群が有意に多いフッ素の溶出を認めた．Z100 群からの溶出は認められなかった．

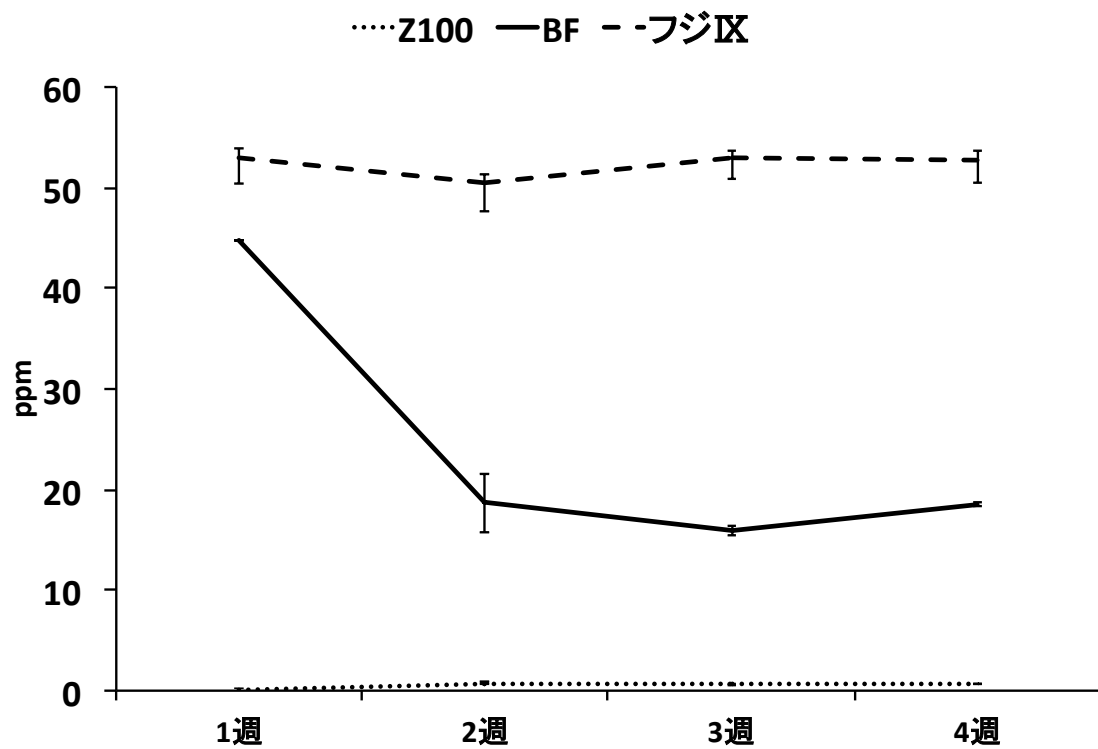


図5 ストロンチウム溶出量

すべての週，すべての群において有意差が認められた($p<0.05$)．すべての週においてフジ

IX 群が有意に多いフッ素の溶出を認めた．BF 群は 1 週目に多くの溶出を認めたが，2 週目

以降では溶出量が減少した．Z100 群からの溶出は認められなかった．

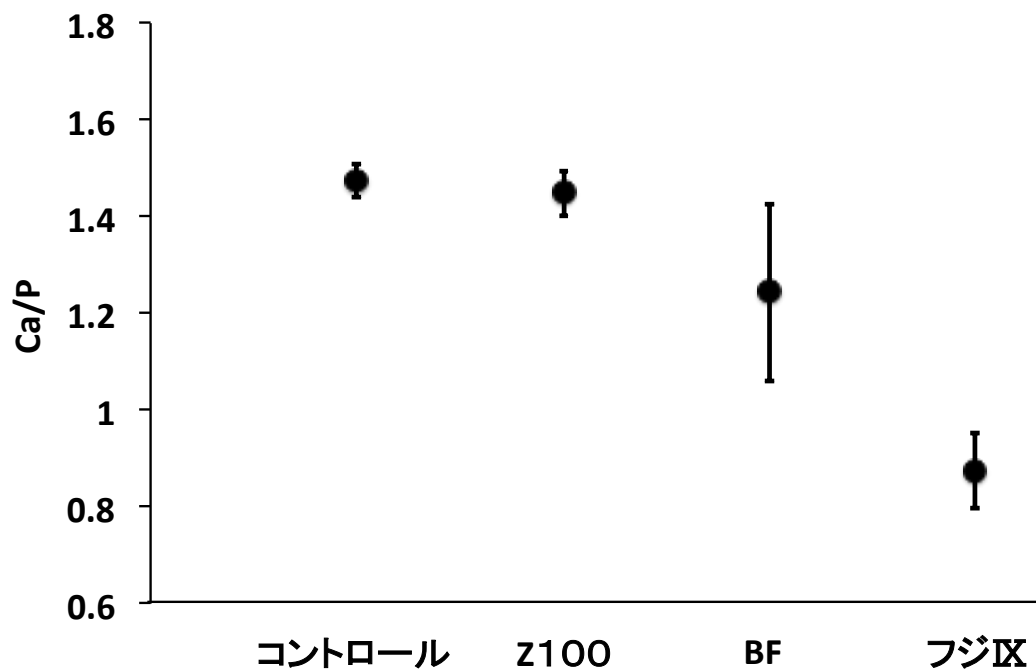


図6 エナメル質表面のCa/P

図 6. エナメル質表面の Ca/P

EDS で元素分析を行い，Ca/P を求めた．コントロール，Z100 と比較して BF，フジ IX は低い値となった．

参考文献

- 1) Simonsen RJ: From prevention to therapy: minimal intervention with sealants and resin restorative materials. J Dent 39: 27-33, 2011.
- 2) Frencken JE, Peters MC, Manton DJ, Leal SC, Gordan VV, Eden E: Minimal intervention dentistry for managing dental caries - a review: report of a FDI task group. Int Dent J 62: 223-243, 2012.
- 3) 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 29: 392-397, 2010.
- 4) Kaga M, Masuta J, Hoshino M, Genchou M, Minamikawa H, Hashimoto M, Yawaka Y: Mechanical Properties and Ions Release of S-PRG filler-containing pit and fissure sealant. Nano Biomed 3: 191-199, 2011.
- 5) 韓臨麟, 興地隆史: S-PRG フィラー抽出液の人工脱灰象牙質に対する象牙細管封鎖効果. 日歯保存誌, 58: 17-25, 2015.
- 6) Dionysopoulos D, Koliniotou-Koumpia E, Helvatzoglou-Antoniades M, Kotsanos N: Fluoride release and recharge abilities of contemporary

fluoride-containing restorative materials and dental adhesives. *Dent Mater J* 32: 296-304, 2013.

- 7) Iijima Y, Koulourides T: Fluoride incorporation into and retention in remineralized enamel. *J Dent Res* 68: 1289-1292, 1989.
- 8) Cochrane NJ, Saranathan S, Cai F, Cross KJ, Reynolds EC: Enamel subsurface lesion remineralisation with casein phosphopeptide stabilised solutions of calcium, phosphate and fluoride. *Caries Res* 42: 88-97, 2008.
- 9) Spets-Happonen S, Luoma H, Seppä L, Räisänen J: The effect of different strontium concentrations on the efficacy of chlorhexidine-fluoride-strontium gel in preventing enamel softening in vitro. *Arch Oral Biol* 38, 107-112, 1993.
- 10) Alvira F, Ramirez Rozzi F, Torchia G, Roso L, Bilmes G: A new method for relative Sr determination in human teeth enamel. *J Anthropol Sci* 89, 153-160, 2011.
- 11) Lippert F: The effects of lesion baseline characteristics and different Sr:Ca ratios in plaque fluid-like solutions on caries lesion de- and

remineralization. Arch Oral Biol 57, 1299-1306, 2012.

- 12) Kim TG, Park B: Synthesis and growth mechanisms of one-dimensional strontium hydroxyapatite nanostructures. Inorg Chem 44: 9895-9901, 2005.
- 13) West N, Newcombe RG, Hughes N, Mason S, Maggio B, Sufi F, Claydon N: A 3-day randomised clinical study investigating the efficacy of two toothpastes, designed to occlude dentine tubules, for the treatment of dentine hypersensitivity. J Dent 41: 187-194, 2013.
- 14) Islam SM, Hiraishi N, Nassar M, Sono R, Otsuki M, Takatsura T, Yiu C, Tagami J: In vitro effect of hesperidin on root dentin collagen and de/re-mineralization. Dent Mater J 31: 362-367, 2012.
- 15) Amaechi BT, Porteous N, Ramalingam K, Mensinkai PK, Ccahuana Vasquez RA, Sadeghpour A, Nakamoto T: Remineralization of artificial enamel lesions by theobromine. Caries Res 47: 399-405, 2013.
- 16) Borges AB, Scaramucci T, Lippert F, Zero DT, Hara AT: Erosion protection by calcium lactate/sodium fluoride rinses under different

salivary flows in vitro. Caries Res 48: 193-199, 2014.

17) Stephan RM : Changes in Hydrogen-Ion Concentration on Tooth Surfaces and in Carious Lesions. J Am Dent Assoc 27 : 718-723, 1940.

18) 松田康裕, 小松 久憲, 村田 幸枝, 田中 享, 佐野 英彦: 自動 pH サイクル装置を用いた人工裂溝う蝕においてその幅が及ぼす影響. 日歯保存, 48 : 828-834, 2005.

19) Matsuda Y, Komatsu H, Murata Y, Tanaka T, Sano H: A newly designed automatic pH-cycling system to simulate daily pH fluctuations. Dent Mater J 25: 280-285, 2006.

20) Matsuda Y, Murata Y, Tanaka T, Komatsu H, Sano H: Development of new software as a convenient analysis method for dental microradiography. Dent Mater J 26: 280-285, 2007.

21) Damen JJ, Exterkate RA, ten Cate JM: Reproducibility of TMR for the determination of longitudinal mineral changes in dental hard tissues. Adv Dent Res 11: 415-419, 1997.

22) ten Cate JM, Exterkate RA, Buijs MJ: The relative efficacy of fluoride toothpastes assessed with pH cycling. Caries Res 40: 136-141, 2006.

23) Komatsu H, Yamamoto H, Nomachi M, Yasuda K, Matsuda Y, Kinugawa

M, Kijimura T, Sano H, Satou T, Oikawa S, Kamiya T: Fluorine uptake into human enamel around fluoride-containing dental materials during cariogenic pH cycling. Nucl Instr and Meth B 267:2136-2139, 2009.

24) Komatsu H, Yamamoto H, Matsuda Y, Kijimura T, Kinugawa M, Okuyama K, Nomachi M, Yasuda K, Satou T, Oikawa S: Fluorine analysis of human enamel around fluoride-containing materials under different pH-cycling by PIGE/PIXE system. Nucl Instr and Meth B 269: 2274-2277, 2011.

25) Czarnecka B, Limanowska-Shaw H, Hatton R, Nicholson JW: Ion release by endodontic grade glass-ionomer cement. J Mater Sci Mater Med 18: 649-652, 2007.

26) Yu F, Kubo S, Yakushiji M: Effect of three fluoride agents on remineralization and fluoride uptake on enamel lesion. Pediatr Dent J 15: 165-170, 2005.

27) Brighenti FL, Delbem AC, Buzalaf MA, Oliveira FA, Ribeiro DB, Sasaki KT: In vitro evaluation of acidified toothpastes with low fluoride content.

Caries Res 40: 239-244, 2006.

28) Nobre-dos-Santos M, Rodrigues LK, Del-Bel-Cury AA, Cury JA: In situ effect of a dentifrice with low fluoride concentration and low pH on enamel remineralization and fluoride uptake. J Oral Sci 49: 147-54, 2007.

29) Mellberg JR: Rate of fluorine uptake by surface and subsurface sound enamel from sodium monofluorophosphate. Caries Res 14: 50-55, 1980.

30) Okazaki M1, Sato M, Takahashi J: Space-cutting model of hydroxyapatite: Biomaterials 16: 45-49, 1995.

31) Pessan JP1, Conceição JM, Grizzo LT, Székely M, Fazakas Z, Buzalaf MA: Intraoral fluoride levels after use of conventional and high-fluoride dentifrices. Clin Oral Investig 19: 955-958, 2015.