

[H30-1]

## 大気マイクロPIXEの臨床応用による新たな診断・治療・予防戦略の開発

### Development of new diagnostic, therapeutic and preventive strategies by clinical application of in-air micro PIXE

土橋邦生<sup>#,A)</sup>、古賀康彦<sup>B)</sup>、奥山克史<sup>C)</sup>、松田康裕<sup>D)</sup>、山本洋子<sup>E)</sup>、佐藤隆博<sup>F)</sup>、久田剛志<sup>A)</sup>、上村怜央<sup>E)</sup>、内藤克昭<sup>E)</sup>、櫻井雅彦<sup>D)</sup>、斉藤隆史<sup>D)</sup>、林美加子<sup>E)</sup>、玉置幸道<sup>C)</sup>、山田尚人<sup>F)</sup>、山縣諒平<sup>F)</sup>、石井保行<sup>F)</sup>  
 Kunio Dobashi<sup>#,A)</sup>, Yasuhiko Koga<sup>B)</sup>, Katsushi Okuyama<sup>C)</sup>, Yasuhiro Matsuda<sup>D)</sup>, Hiroko Yamamoto<sup>E)</sup>, Takahiro Satoh<sup>F)</sup>, Takeshi Hisada<sup>A)</sup>, Reo Uemura<sup>E)</sup>, Katsuaki Naito<sup>E)</sup>, Masahiko Sakurai<sup>D)</sup>, Takashi Saito<sup>D)</sup>, Mikako Hayashi<sup>E)</sup>, Yukimichi Tamaki<sup>C)</sup>, Naoto Yamada<sup>F)</sup>, Ryohei Yamagata<sup>F)</sup>, Yasuyuki Ishii<sup>F)</sup>

<sup>A)</sup> Gunma University Graduate School of Health Sciences

<sup>B)</sup> Department of Respiratory Medicine, Gunma University Graduate School of Medicine

<sup>C)</sup> Asahi University School of Dentistry,

<sup>D)</sup> School of Dentistry, Health Sciences University of Hokkaido,

<sup>E)</sup> Graduate School of Dentistry, Osaka University,

<sup>F)</sup> Takasaki Advanced Radiation Research Institute, National Institutes for Quantum and Radiological Science and Technology

#### Abstract

In H30-1 project, micro-particle induced X/gamma-ray emission ( $\mu$ -PIXE) analysis using MeV-class proton microbeams found wider application in various field of medicine by the development of the sample preparation and the analytical method in the 2020 fiscal year. The details of the four research projects conducted in fiscal 2020 are described below.

- 1) Collagen disease is a systemic disease in which connective tissue abnormalities of systemic organs such as the skin, kidneys, lungs, and lymph nodes are caused by abnormal functions of the immune system. Despite the cause of collagen disease has not been clarified yet, Previous observational studies have suggested that the exposure to heavy metals like iron and silica are associated with the development of vasculitis and scleroderma. Further study revealed that the concentration of silica in blood is higher in patients with scleroderma compared to the healthy blood samples. Therefore, we performed elemental analysis of surgically resected lung tissue complicated with collagen-vascular associated lung disease (CVD) by in-air micro particle induced X-ray emission and compared the accumulated elements in the lungs between control and CVD patients.
- 2) The purpose of this study was to assess the effects of a low concentration (0.1, 0.25, 0.5, 0.75, and 1%) of titanium fluoride (TiF<sub>4</sub>) on fluorine and titanium distribution and demineralization of root dentin surfaces with subjecting 8w pH cycling(pH:4.5-7.0). The distribution of elements or demineralization was analyzed by micro-PIXE/PIGE or polarized microscopy, respectively. Our limited study indicates that 1% of TiF<sub>4</sub> showed the lowest lesion depth among all groups and higher elements distribution than 0.1% or 0.25%. There was no significant difference among other concentrations on lesion depth and elements distribution except for that 0.1% TiF<sub>4</sub> showed lower titanium value than others. Considering the results of demineralization depth, fluorine and titanium uptake, we speculate that 0.5% titanium fluoride would be the minimum concentration to be effective for caries prevention.
- 3) The purpose of this study is to assess the effect of fluoride varnish containing tricalcium phosphate for acid resistance of root dentin. Three root sound dentin blocks were obtained from a human tooth. Exposed sound dentin surfaces were covered with fluoride releasing materials (FRMs); Fluoride varnish containing tricalcium phosphate (WV), and F Varnish (FV); while dentin without FRMs was served as control (Con). Other sound dentin blocks were immersed in demineralizing solution (pH5.0, 37°C) for 3days to make demineralized dentine surface and these demineralized dentine blocks were prepared same as sound dentine treatment. All Specimens were immersed in saline at 37°C for 1 month. After removing the FRMs, blocks were cut to make a 500 $\mu$ m section. Fluoride concentration and penetration depth were measured using In-air  $\mu$ -PIXE/PIGE analysis. Specimens were then immersed in demineralizing solution for 3days. Mineral densities of the specimens before and after demineralization were analyzed by  $\mu$ CT. Mineral loss and demineralized depth were shown no significant differences between WV and FV both in sound and demineralized dentin, although fluoride concentration in WV group was less than that in FV group. Fluoride varnish containing tricalcium phosphate was shown to be useful for caries prevention.
- 4) This study evaluated the demineralization prevention and zinc (Zn) uptake into human dentin of dental material using automatic pH cycling. Each tooth was divided into four specimens. Their dentin surfaces were exposed, and the other was covered with sticky wax. Each specimen was demineralized in a buffer solution at 37 °C for 72

## [H30-1]

hours. 0.01% zinc-chloride containing mouthwash (i.e., “Listerine” (Li)) and 1% zinc-chloride and 2% tannic acid (Zncl) solution were used in this study. Each specimen was stored in each material at 37°C for 24hours. 150 $\mu$ m sections were prepared from each tooth. Cut surface and half of the exposed area were covered with sticky wax. The automatic pH-cycling system simulated daily acid challenges in the oral cavity; the pH cycling (pH6.8 - pH4.5) was carried out for two weeks. The zinc and calcium distributions in the carious lesion in each specimen were evaluated using the In-air microbeam PIXE/PIGE system. or the evaluation of dentin remineralization, the difference of Ca concentration covered/uncovered area was compared. The Ca and Zn concentration in dentin was showed significant differences among the three groups. The lesion difference significant difference among the three groups. Tannic acid and zinc-containing oral materials to be useful for remineralization of dentin.

**Keyword:**  $\mu$ -PIXE, Silicon (Si), collagen-vascular associated lung disease (CVD), scleroderma, Titanium fluoride, inhibition of demineralization, element distribution, PIXE/PAGE analysis, Root caries,

## 1. はじめに

我々は、大気  $\mu$  PIXE/PIGE 分析技術を使い、医学・生物学的現象の解明で多くの成果を出してきた。今回、その中でも臨床に直結する課題を取り上げ、肺、血液、歯牙の分野で新たな診断・治療・予防戦略を確立し、国民の健康や環境改善に寄与することを目的としている。本プロジェクトでは、各種疾患における微量元素の関与の調査および薬剤や医療材料の効果の検証をおこなってきた。肺では、吸入粉塵による肺線維症や石綿肺の発症や予後に与える影響、吸入粉塵による肺線維症の病態解明、原因不明の肺線維症に潜む吸入粉塵が原因の肺線維症の同定による労災認定の手助け、血液では、骨髄異形成症候群 (MDS)における無効造血および白血化の機序解明と新規治療薬の開発、歯牙では、各元素を含有した歯科材料によるう蝕進行への影響を評価し、う蝕進行抑制におけるフッ素と各元素との相互関係を解析し、新たなう蝕の進行を抑制する方法を開発してきた。2019 年度報告書においては、「In-air micro-PIXE を用いた膠原病肺組織の元素解析」、「大気 Micro-PIXE 法を用いた急性骨髄性白血病細胞株の微量元素動態解析」、「フッ化チタン溶液による歯質脱灰抑制と元素の浸透」、「フッ素含有知覚過敏抑制材から健全象牙質へのフッ素分布測定」について詳述する。いずれも人体の局所領域に分布する複数微量元素を高感度で高い空間分解能で同時に画像化できる  $\mu$  PIXE の特徴を生かした研究である。

## 2. In-air micro-PIXE を用いた正常肺と膠原病肺との元素解析比較

### 2.1 背景

膠原病の原因は未だ明らかになっていないが、発症機序が解明されていないことから副作用を伴う免疫抑制剤治療が唯一の治療方針となっている。古くからの疫学的研究では、重金属やシリカの暴露と血管炎や強皮症の発症関連性が示唆されており、血中のシリカ濃度が高くなっているという報告も見られている。そこで今回我々は、当院で外科的に切除された膠原病肺組織の元素解析を行い、control 肺との元素解析の比較検討を行った。

### 2.2 方法

2008 年から 2014 年までに胸腔鏡下肺生検で外科的に切除された強皮症 5 例、皮膚筋炎 3 例の肺組織標本の元素解析を行った。パラフィン切片を用いて肺内元素解析を in-air microparticle induced X-ray emission (micro PIXE)で行い<sup>[1]</sup>、パラフィン切片内の Al, Mg, Si, S, P, Fe, Ca, Zn の元素濃度を測定した。コントロールとして早期肺癌 8 症例の正常肺部分の元素解析も行った。膠原病肺とコントロール肺との元素分布を Graphpad Prism software を用いて統計学的に比較検討した。

### 2.3 結果

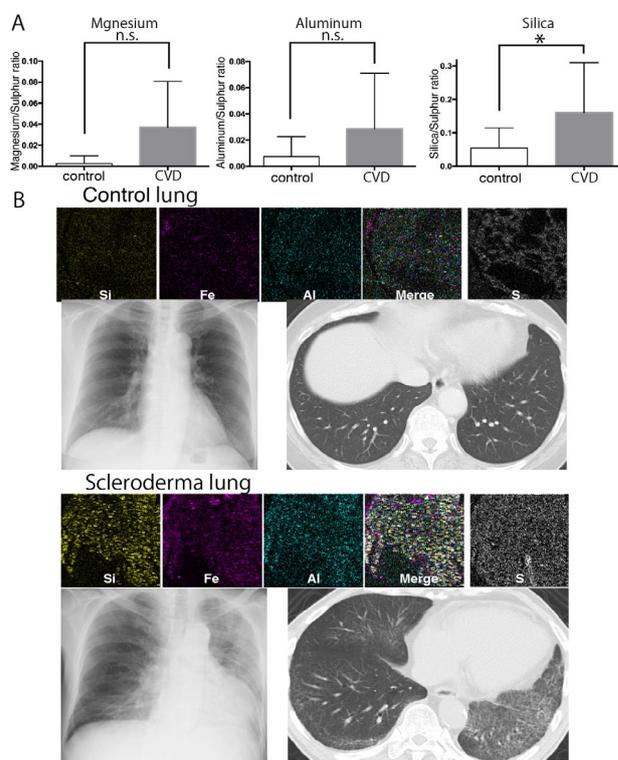


Figure.1 A. Comparison of aluminum, magnesium, and silica in the lungs between control (n=8) and collagen-vascular associated lung disease (CVD) lung (n=8). B. Typical elemental deposition and radiograph imaging in control (up) and CVD lung (down).

## [H30-1]

In-air micro-PIXE を利用した元素解析において膠原病肺 8 症例中の Al, Mg, Si, Fe, Zn などのうち、有意に Si の元素濃度が control 肺と比しての集積量が多かった(Fig. 1)。

さらに膠原病肺の内 5 例は強皮症であった。強皮症肺 5 例で解析したところ有意に Si 濃度が control 肺に比して高かった(Fig. 2)。

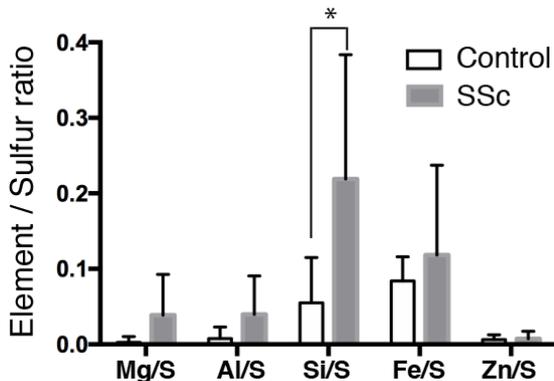


Figure 2. Significant difference between control and scleroderma (SSc) lungs in the relative ratio of silica (Si) to sulfur (S).

## 2.4 考察

膠原病肺、特に強皮症肺においては、シリカの肺組織への沈着が膠原病肺の成因に関わっている可能性が示唆された。

## 3 低濃度フッ化チタン溶液処理による歯質脱灰抑制効果と元素の浸透

## 3.1 背景

フッ化チタン ( $\text{TiF}_4$ ) 溶液の局所的応用により、う蝕抑制が認められるという報告があり<sup>[2]</sup>、任意の濃度の  $\text{TiF}_4$  溶液を象牙質に作用させたところ、1%  $\text{TiF}_4$  溶液の使用が脱灰抑制に効果があることを示し、1%群と 0.1%群の間で脱灰深さやフッ素およびチタン量の取り込み量に大きな差を示した<sup>[3]</sup>。

そこで本研究では、1%よりさらに低濃度の  $\text{TiF}_4$  溶液を象牙質面に適用し、各種イオンの歯質への分布および脱灰深さを評価検討することで、低濃度域における至適濃度検討を目的とした。

## 3.2 方法

ヒト抜去臼歯をエナメル質とセメント質の境目から歯根側方向へ幅 3 mm の範囲について、歯軸に垂直に頬舌的に薄切、約 200 $\mu\text{m}$  の厚さに調整し、頬側象牙質面を除くすべての面をワックスで被覆した。象牙質試料はう蝕発生環境をシミュレートした自動 pH サイクル装置 (pH:4.5-7.0) に 8 週間供した。各群の試料数はいずれも 8 (n=8) とした。サイクルの期間中 1 週間に 1 度 1% (1T)、0.75% (0.75T)、0.5% (0.5T)、0.25% (0.25T)、0.1% (0.1T)  $\text{TiF}_4$  溶液に 5 分間浸漬し、水洗後サイクルに戻した。 $\text{TiF}_4$  処置を行わない群をコントロール (Cont) とした。

サイクル期間終了後、各試料の表層からの脱灰深

さについて偏光顕微鏡 (Nikon OPTIPHOTO) を用い倍率 20 倍で観察、撮影後、ソフトウェア Image J にて測定した。その後大気マイクロ PIXE/PIGE 装置で各試料におけるフッ素、カルシウムおよびチタンの分布を測定した。カルシウムとフッ素は標準試料を測定することで濃度を算出し、チタンは同時に測定している銅のカウント数との比をチタン量として、試料の表層から深さ 100 $\mu\text{m}$  までのフッ素量とチタン量を評価、検討した。得られたデータは Kruskal-Wallis test および Steel-Dwass 法により統計解析 (危険率 5%) を行った。

## 3.3 結果および考察

Fig. 1 に各群の脱灰深さを示す。1T 群が他の群よりも有意に小さく、Cont 群が他の群よりも有意に大きい脱灰深さを認めた。他の 4 群間に有意差は認めなかった。

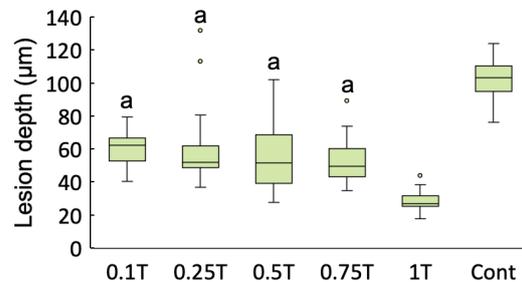


Fig. 1 Lesion depth of each specimen ( $\mu\text{m}$ ). Same letters no indicate significant differences ( $p>0.05$ ).

Fig. 2、3 にフッ素およびチタンの取り込み量をそれぞれ示す。フッ素取り込みでは 1T 群が 0.1T、0.25T 群より有意に高い取り込みを示し、濃度が 1T 未満の群間に有意差を認めなかった。チタンでは、1T および 0.75T 群が 0.1T、0.25T 群に対し有意に高い取り込みを示し、0.1T 群は他の  $\text{TiF}_4$  溶液群よりも有意に低い値を示した。Cont 群は他の群と比較し有意に小さいフッ素およびチタン取り込み量を示した。

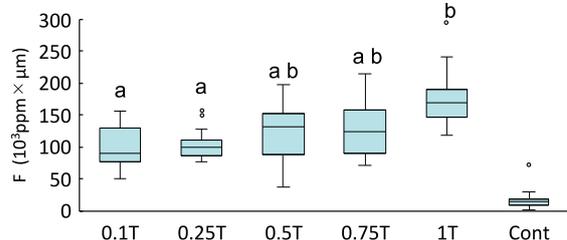


Fig. 2 Concentration of penetrated fluorine into dentin at 100 $\mu\text{m}$  depth area from superficial surface (ppm $\times\mu\text{m}$ ). Same letters no indicate significant differences ( $p>0.05$ ).

これらの結果よりフッ素およびチタン取り込みは溶液の濃度依存性が示され、特にチタンは顕著であった。この 2 つの元素の取り込みの違いは、フッ素とチタンの原子量によるところと考えられる。

[H30-1]

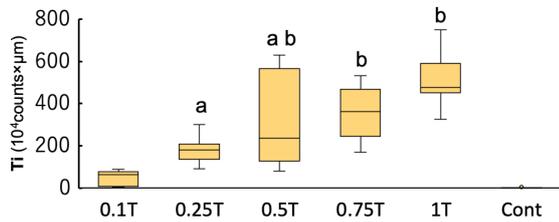


Fig. 3 Concentration of penetrated titanium into dentin at 100µm depth area from superficial surface ( $10^4$  counts/Cu counts×µm). Same letters no indicate significant differences ( $p>0.05$ ).

脱灰深さでは 1T 群だけが他の溶液処理群より低い脱灰深さを示し、元素の取り込みとは異なる傾向を示した。一方、1%以外の処理群について脱灰深さの大小の傾向がフッ素取り込み量と同じ傾向を示し、脱灰深さはフッ素による影響がチタンによる影響より大きいことが示された。

以前の報告<sup>[3]</sup>より同じフッ素濃度を含む NaF 溶液処理と比較して、フッ化チタン処理は小さい脱灰深さを示していることから、チタンによる脱灰抑制効果への影響はあると考えられるが、チタンの濃度による影響は小さいことが示唆された。そして、脱灰深さとフッ素、チタンの取り込み量の結果を総じて考慮すると、フッ化チタン濃度 0.5%が効果を発揮できる最小濃度ではないかと推測できる。

## 4 リン酸三カルシウム配合フッ化物バーニッシュによる根面象牙質の脱灰抑制効果

### 4.1 背景

近年の超高齢社会において、高齢者の歯根面う蝕の増加が大きな問題となっている。根面を含む象牙質は、臨界 pH がエナメル質と比べて高く、また一度う蝕を形成すると歯肉縁下に広がりやすく、治療が困難になりやすい。そのため、根面う蝕を予防および進行抑制することは現代社会において重要な臨床課題である。フッ素は歯の耐酸性および再石灰化を促進するため、う蝕の予防に効果的な材料であることはこれまでに数多く報告され、臨床においても広く用いられている。我々は、In-air  $\mu$ -PIXE/PIGE 法を用いて、健全歯質内へのフッ素イオンの取り込み量が多いほど、またより深くまでイオンが浸透するほど、根面象牙質の耐酸性が向上することを報告した<sup>[4]</sup>。

さらに、我々はフッ素イオンをより効率的に象牙質に作用させるために、歯の構成成分であるリン酸カルシウムを同時に適用し、カルシウムイオンを供給することにより、フッ化物単独より根面象牙質の再石灰化を促進させることができるのではないかと考え、今回、リン酸三カルシウムを配合したフッ化物バーニッシュを作用させた根面象牙質における、フッ素の浸透濃度および浸透深さを In-air  $\mu$ -PIXE/PIGE 法で、フッ素が浸透したその象牙質の耐

酸性を  $\mu$  CT で分析し、各々定量的に評価した。

### 4.2 方法

う蝕のないヒト抜去大白歯のセメントエナメル境付近の頬舌側面を歯軸に平行に切断し、根面象牙質を露出させた 3 ブロックを各歯より切り出し、2 ブロックの露出象牙質面にリン酸三カルシウム配合フッ化物バーニッシュ (以下 WV 群)、F バーニッシュ (ビーブランド・メディコーデンタル、以下 FV 群) を各々塗布した。一方、材料を塗布しない 1 ブロックをコントロール (以下 Con 群) とし、これらを健全試料 (SD) とした。また別のヒト抜去大白歯から同様に根面象牙質ブロックを切り出し、露出象牙質面以外をワックスにて被覆後、pH5.0 の脱灰溶液 (50mmol/l acetate buffer, 2.2mmol/l  $\text{CaCl}_2$ , 2.2mmol/l  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) に 3 日間浸漬させ、初期う蝕を想定した脱灰病変を作成した。その後、健全試料と同様に各材料を塗布し、これらを脱灰試料 (DD) とした。健全、脱灰試料のいずれも 37°C で 1 ヶ月生理食塩水中に浸漬後、塗布材料を除去し、各ブロックの露出象牙質面に垂直に 0.5mm 幅に切断し、測定試料とした。切断面の根面象牙質表層から歯質内方向にフッ素およびカルシウム濃度を In-air  $\mu$ -PIXE/PIGE 法を用いて面分析を行い、表層から 200  $\mu$ m 内に取り込まれたフッ素濃度の積算量を比較検討した (Kruskal-Wallis, Mann-Whitney's U-test,  $\alpha=0.05$ )。In-air  $\mu$ -PIXE/PIGE 法で測定後、それらの試料を  $\mu$  CT (SMX-100CT; Shimadzu) 撮影後、露出象牙質面以外をワックスにて再被覆、脱灰溶液に 3 日間浸漬し、脱灰後に再度  $\mu$  CT 撮影を行い、脱灰前後の数値からミネラルロス及び脱灰深さを解析した (Kruskal-Wallis, Mann-Whitney's U-test,  $\alpha=0.05$ )。さらに、取り込まれたフッ素濃度量とミネラルロス及び脱灰深さとの相関を検定した (Spearman's rank correlation coefficient,  $\alpha=0.05$ )。なお、本研究は、大阪大学大学院歯学研究科倫理委員会の承認下で実施した (承認番号: H30-E36)。

### 4.3 結果および考察

取り込みフッ素濃度積算量及びフッ素イオン浸透深さは、WV 群および FV 群は、SD および DD のいずれにおいても、CO 群と有意差を認めた。また、DD の取り込みフッ素濃度積算量は WV 群および FV 群

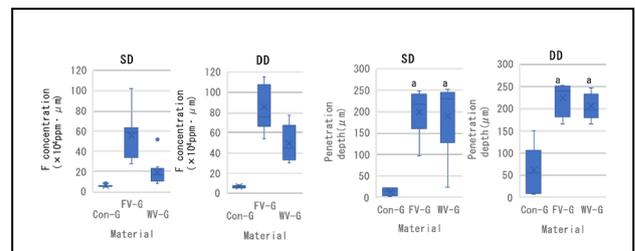


Fig.1. Integrated concentration of F penetrated into dentin at 200µm depth area and F penetration depth from superficial surface. SD:sound dentin, DD:demineralized dentin. Same letters show no significant differences ( $p<0.05$ ).

## [H30-1]

はともに、SD よりも優位に多いことが分かった (Fig.1)。

ミネラル喪失量についてはSDではFV群がCO群と有意差を認めた一方、DDではWV群およびFV群ともにCO群と有意差を認めた。脱灰深さについては、SDではWV群およびFV群はCO群と有意差を認めた。WV群とFV群にはいずれにおいても有意差は認められなかった(Fig.2)。

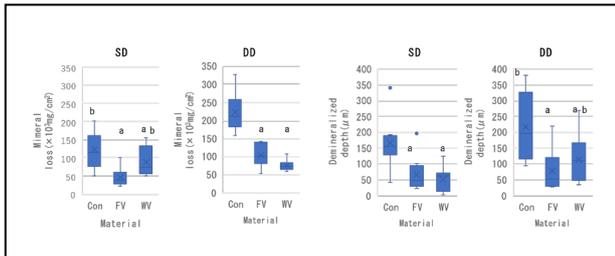


Fig.2. Mineral loss and demineralized depth in SD and DD. SD:sound dentin, DD:demineralized dentin. Same letters show no significant differences( $p < 0.05$ ).

またフッ素濃度積算量と、ミネラル喪失量及び脱灰深さの相関は、SD および DD のいずれにおいても、負の相関を示した(Fig.3)。

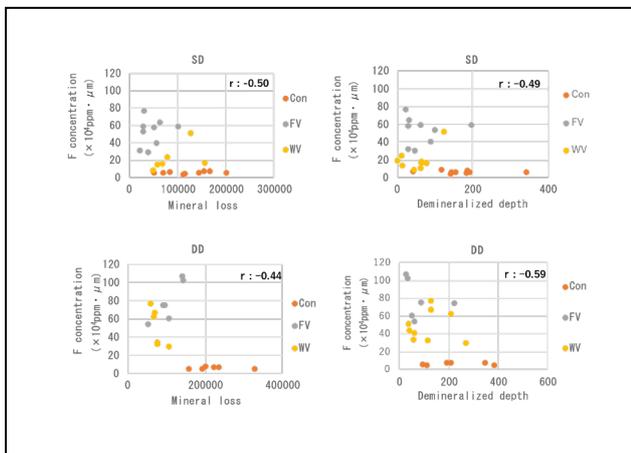


Fig.3. Correlation coefficient between F concentration and mineral loss, and demineralized depth. SD:sound dentin, DD:demineralized dentin.

以上の結果から、健全試料と比較して脱灰試料の方が、よりフッ素イオンが歯質内に取り込まれることがわかった。1ヶ月間根面象牙質に適用したリン酸三カルシウム配合フッ化物バーニッシュは、フッ化物単独のものよりフッ素イオンの歯質内への浸透量は少ないが、浸透深度は同程度までおよび、さらにフッ化物単独のものと同程度に脱灰を抑制し、耐酸性が向上することが示唆され、リン酸三カルシウム配合フッ化物バーニッシュは、新たなう蝕予防・進行抑制材料として有用であると考えられた。

## 5 亜鉛含有口腔ケア剤による脱灰象牙質の再石灰化

### 5.1 背景

平成 28 年歯科疾患実態調査によると高齢者の残存歯数と齲蝕罹患率の増加が報告されている。高齢者の齲蝕は歯肉退縮し露出した根面に好発しやすいことが特徴である。初期の根面齲蝕は再石灰化が期待され、フッ化物配合歯磨材 (1,100~1,400 ppmF) を応用することにより活動性根面齲蝕が回復することが「日本歯科保存学会 う蝕治療ガイドライン第3版 根面う蝕の治療ガイドライン(2020)」で示されている。このようにフッ素による脱灰抑制効果は既に広く知られている。一方、亜鉛には抗菌性と MMP の活性抑制効果があることが知られており、また再石灰化の核を保護する可能性が報告されている。そこで、In-air micro proton-induced X-ray and gamma ray emission (In-air micro PIXE/PIGE)解析法を用いて亜鉛による象牙質の再石灰化促進効果の検討を行うこととした。

### 5.2 方法

材料：材料として 0.01%塩化亜鉛含有含嗽剤 (“Listerine” (Li))、1%塩化亜鉛及び、2%タンニン酸含有溶液 (ZnCl)、コントロールとして脱イオン蒸留水を用いた。

方法：本研究は本学歯学部・歯学研究科倫理委員会の承認を得て行った(承認番号第47号)。ヒト新鮮抜去臼歯を歯軸に平行に4分割した。分割後、それぞれの根面を研磨し象牙質を露出させた後、露出面を除いてスティッキーワックスで被覆した。脱灰液 (0.2mol/l 乳酸, 3.0mmol/l CaCl<sub>2</sub>, 1.8mmol/l KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH4.5, 37°C)に48時間浸漬し、初期根面齲蝕モデル試料(n=3)とした。試料を各材料および脱イオン蒸留水(コントロール群)に浸漬し37°Cで24時間保存した。保存後、脱イオン蒸留水で洗浄後、研磨面を含み150μmの厚さの試料を作製し、切断面および露出象牙質面の半分をスティッキーワックスで被覆し測定試料を作製した。脱灰液と再石灰化溶液 (0.02mol/l HEPES, 3.0mmol/l CaCl<sub>2</sub>, 1.8mmol/l KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH7.0, 37°C)を用いて2週間、自動pHサイクル処理(1日6回脱灰・再石灰化処理)を行った。その後、3MV級シングルエンド加速器(国立研究開発法人量子科学技術研究開発機構 量子ビーム科学研究部門 高崎量子応用研究所)を用いて In-air micro PIXE/PIGE 解析法により、脱灰象牙質表層における亜鉛の取り込み量を測定し、さらに再石灰化の検討を行った。

## [H30-1]

## 5.3 結果および考察

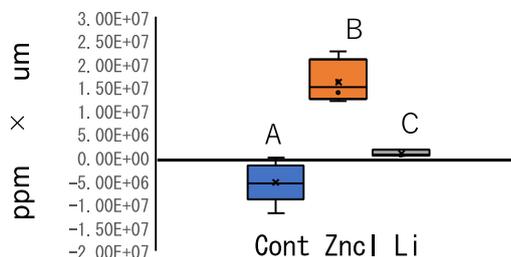


Figure 1. Ca volume differences (ppm x μm).

Same letters indicate no significant differences ( $p > 0.05$ ).

Fig. 1 に各群のカルシウムの増加量を示す。各材料群はコントロール軍と比較してカルシウムの増加量が有意に多く、ZnCl 群が最も高い増加量を示した。

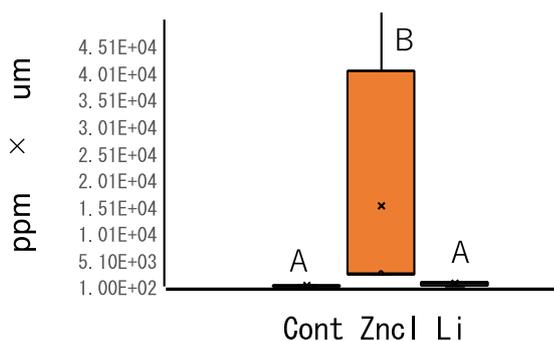


Figure 2. Zn volume differences (ppm x μm).

Same letters indicate no significant differences ( $p > 0.05$ ).

Fig. 2 に各群の亜鉛の取り込み量を示す。ZnCl 群は他の群と比較して有意に多い亜鉛の取り込み量を示した。

このことから、溶液から脱灰象牙質内に取り込まれた亜鉛イオンが象牙質からカルシウムの溶出を抑制することにより再石灰化が促進される可能性が示唆された。

## 参考文献

- [1] Y.Koga, T.Satoh, M.Koka, K.Dobashi et al. Elemental and immunohistochemical analysis of the lungs and hilar lymph node in a patient with asbestos exposure, a pilot study. *Environ Health Prev Med.* 21(6):492-500. 2016
- [2] Vieira AM. et al., *Caries Res* 2011; 45, 142-147.
- [3] 奥山ら 日歯保存誌 2020 ; 春期学術大会抄録集, 71
- [4] K.Yagi, et al., "Use of PIXE/PIGE for sequential Ca and F measurements in root carious model". *Scientific Reports* Volume 7, 2017 DOI: 10.1038/s41598-017-14041-4