

불화물 복합적용이 법랑질의 재석회화에 미치는 영향에 관한 연구

조민정, 이향님¹

광주보건대학 치위생과, ¹목포과학대학 치위생과

색인 : NaF, SnF₂, APF, 복합적용, 재석회화

1. 서 론

치아우식증을 예방하기 위한 대책의 일환으로 많은 임상연구를 통해 효과가 입증된 불화물이 다양한 방법으로 사용되고 있다¹⁾. 불화물은 전신적 복용법과 국소적인 도포방법으로 이용되고 있으며, 불화된 도시관 급수를 공급받지 못하는 지역에서는 불소 국소도포가 치아우식증을 감소시키는 중요한 술식 중의 하나이다.

불화물 국소도포법은 전문가 도포와 자가 도포로 분류한다.

불화물을 도포해주는 방법으로 Knutson²⁾과 Bibby³⁾가 2% NaF(불화나트륨) 용액을 임상적용한 이래, 최근에 이르기까지 다양한 도포방법과 불화물이 널리 사용되어 왔으며, NaF외에 SnF₂(불화석)와 APF(산성불화인산염) 등이 있다.

NaF는 2% 용액을 사용할 경우 항우식효과를

얻을 수 있다고 하였으며²⁾, 면봉으로 도포하기도 하고 이온도입법 또는 양치용액 등으로 다양하게 이용되고 있다.

SnF₂는 짙은 맛과 치아에 약간의 변색이나 치은에 미치는 자극성 등과 같은 부작용이 있으며⁴⁾ 2% NaF 용액에 인산을 섞어서 만든 APF 도포법은 국소도포 효과가 높으므로 현재 임상에서 주로 사용되고 있다⁵⁾.

Koulouride⁶⁾는 불소의 농도보다는 도포횟수가 우식저항에 영향을 미치는 큰 요소이므로 저농도이지만 자주 도포하는 것이 바람직하다고 하였다.

한편, 자가 불소도포법은 전문가의 도움없이 실시할 수 있다는 장점이 있으며 불화물을 배합한 용액으로 양치하는 방법과 불소세치제를 사용하는 방법 등을 들 수 있다.

이중 불화물 용액 양치는 주로 학교구강보건사업의 일환으로 이루어지며, 0.2% NaF 용액으

로 1주에 1회 양치하는 방법과 0.05% NaF 용액으로 매일 1회 양치하는 방법이 있다.

결국 불소도포는 치아 결정구조인 수산화인회석을 보다 안정적인 불화인회석으로 치환시킴으로써 내산성을 증가시키는 효과⁷⁾가 있지만, 그 효과는 사용하는 불화물의 종류, 농도, 도포 방법 및 도포기간, 도포빈도 등에 따라 다르게 나타난다.

이제까지 국소도포에는 통상적으로 단일 불소제제가 사용되어 왔으나 불소보유량과 국소도포의 효과를 향상시킬 목적으로 Crall과 Bjerga⁸⁾는 APF와 SnF_2 를 단독적용, 순차적용 및 혼합적용으로 실험해 본 결과 APF를 적용한 후 SnF_2 용액을 순차적용했을 때가 단독적용이나 혼합적용시보다 법랑질 표면에 불화물이 부착되어 유지된 양의 수준이 가장 높은 것으로 나타났다고 발표하였으며, Shannon⁹⁾도 APF 혹은 SnF_2 의 국소도포시 APF나 SnF_2 의 단독적용으로 얻어진 보호효과는 물리적인 자극에 의해 소멸되었고, APF- SnF_2 를 순차적용한 것이 초음파에 의한 법랑질 제거에 높은 저항성을 보였다고 보고한 바 있다.

이와 같이 불화물의 도포방법에 따라 우식저항에 대한 효과가 다양하므로 본 연구에서는 국소도포용 불화물 제제인 NaF, SnF_2 , APF의 3가지 불화물을 가지고 각 단계별 적용시간을 달리하여 복합 및 단독적용을 한 후 NaF 용액에 침적하여 실험함으로써 법랑질내에 안정된 형태의 불소를 침착시킬 수 있는 능력을 비교하고자 하였다. 즉 각 실험군에 대한 법랑질 표면의 경도변화를 측정한 후 결과치를 상호 비교 검토함으로써 치아우식증을 효과적으로 예방할 수 있는 방안을 모색하는 데 그 목적이 있다.

2. 연구재료 및 방법

1.1. 시편제작

건전한 소의 발거치아로부터 직경 2 mm의 원통형 법랑질 시편을 취한 후 자가중합반응레진을 이용하여 원기동형 플렉시글라스에 붙였다. 제작된 시편을 600그릿(grit) 샌드페이퍼(sand paper)와 감마산화알루미나(γ alumina oxide)를 사용하여 광택이 나게 연마하였다. 각 실험군의 시편수는 미국치과의사회에서 정한 통계상의 요구조건(statistical requirements)에 맞게 I~V군은 12개 시편을 제작하였다(VI군은 11개).

2.2. 탈회용액 제작

1.0 mol 젖산(lactic acid)을 90°C로 8시간 가열한 후에 사용하였다. 1% carbopol stock solution을 900 ml의 증류수에 10 g의 Carbopol 907을 넣고 용해시켰다. Carbopol이 용해됨에 따라 pH가 2~3으로 되게 하였고, NaOH를 사용하여 pH를 7.0으로 조절한 다음, 최종 용액을 1,000 ml가 되게 하였다. 포화된 수산화인회석(hydroxyapatite : HAP/0.1 mol lactic acid) 용액을 먼저 100 ml의 1 mol 젖산을 1,000 ml 용적 플라스크(volumetric flask)에 넣고 증류수를 1,000 ml가 되게 채우고, 이 용액을 2,000 ml 비커(beaker)에 넣고 50% NaOH를 사용하여 pH가 5.0이 되게 조절한 후 3g의 수산화인회석을 넣고 pH를 5.0으로 유지하면서 30분간 용해시켰다. 여분의 수산화인회석은 Whatman 42 여과지(filter paper)를 이용하여 여과하였다. 여과용액에 100 ml의 1 mol 젖산, 400 ml 1% carbopol과 450 ml의 증류수를 첨가한 후, 용액의 pH를 5.0으로 다시 조절하였다. 최종 용액의 양이 2,000 ml가 되게 증류수를 첨

가하고 pH를 5.0이 되게 재차 조절하였다^{10,11)}.

2.3. 인공우식 법랑질 형성

인공우식병소는 pH 5.0의 50% 포화 수산화 인회석(BioRad, Cat#130-0420), 0.1mol 젖산(Mallinckroft, Lot #2676) 그리고 0.2% Carbopol C907을 함유한 용액에서 48시간 처리하였다. 탈회된 시편은 표면경도계(Micromet Digital Microhardness Tester, Buehler, USA)로 4부위에서 법랑질 표면경도를 측정하여 평균 법랑질 표면경도가 30~40 범위의 경도인 시편만을 실험에 이용하였다.

2.4. 불화물 도포

NaF(Sigma Chemical Co. USA), SnF₂(Sigma Chemical Co. USA), APF(Pascal Chemical Co. USA) 3가지의 불화물을 가지고 첫날만 복합 및 단독적용하고 그 다음부터 14일 동안은 하루에 1분씩 NaF 용액에 침적하였다[표 1].

2.5. 시편처리

법랑질 시편처리는 15일 동안 매일 3시간씩 pH 5.0의 50% 포화 수산화인회석, 0.1 mol 젖산 그리고 0.2% Carbopol C907을 함유한 용액

으로 산처리를 하고 이외의 시간은 재광화 용액에 담가두었다. 재광화 용액은 50%의 사람 타액과 50%의 인공 타액으로 구성되었다. 인공 타액은 gastric mucin(0.22%), NaCl(0.038%), CaCl₂ 2H₂O(0.0213%), KH₂PO₄(0.0738%) 그리고 KCL(0.114%)로 구성되었다.

2.6. 법랑질 표면의 경도 측정

불화물 처리 전과 후에 미소 경도측정기(Futer-Tech. Corp. Fm-7, Tokyo, JAPAN)로 법랑질 표면 경도를 측정하였다. 포매된 시편을 미소 경도측정기의 압인 방향에 대해 법랑질 표면이 직각이 되도록 위치시킨 다음 법랑질 표면에 200 gm 하중을 가한 후 계측 현미경으로 10초 동안 압흔의 크기를 계측하여 Vickers 법랑질 경도를 측정하였다¹²⁾. 각 법랑질의 시편에 대해 처리전 법랑질 표면경도 측정부의 인접 부위에서 재차 법랑질 표면경도를 측정하여 전후의 법랑질 표면경도 차이를 효과로 산정하였다.

이상의 자료에 대한 통계처리는 SAS (Statistical Analysis System)^{6,12)} 통계 프로그램을 이용하여 각 군의 평균과 표준편차를 계산하였으며, 각 군간의 차이를 ANOVA와 Tukey 다중분석법으로 분석하였다.

표 1. Grouping of Specimen by treatment regimen

Group Code	No. of Specimen	Treatment Regimen
I	12	2% NaF(1min) + 1.23% APF(3min) + 0.05% NaF(1min)
II	12	10% SnF ₂ (1min) + 1.23% APF(3min) + 0.05% NaF(1min)
III	12	10% SnF ₂ (2min) + 1.23% APF(2min) + 0.05% NaF(1min)
IV	12	2% NaF(2min) + 1.23% APF(2min) + 0.05% NaF(1min)
V	12	1.23% APF(4min) + 0.05% NaF(1min)
VI	11	0.05% NaF(1min)

*; Sodium Fluoride(NaF)

**; Stannous Fluoride(SnF₂)

***; Acidulate Phosphate Fluoride(APF)

3. 연구결과

3.1. 법랑질 표면의 경도 변화

인공우식병소가 형성된 법랑질 시편의 불화물 처리 전의 표면경도는 I군이 34.95 ± 4.56 , II군이 34.96 ± 4.55 , III군이 34.94 ± 4.57 , IV군이 34.95 ± 4.58 , V군이 34.95 ± 4.57 , VI군이 34.93 ± 4.63 이었으며, 각 군간에 유의한 차이는 없었다($P > 0.05$).

불화물을 복합 및 단독적용을 한 후 이어서 불화물 용액에 침적한 후의 법랑질 시편의 표면경도는 I군이 123.11 ± 30.84 , II군이 126.05 ± 17.71 , III군이 97.91 ± 20.06 , IV군이 115.68 ± 7.08 , V군이 114.87 ± 24.13 , VI군이 63.80 ± 18.13 이었으며, 법랑질 시편의 불화물 처리 전과 후의 표면경도 변화(ΔVHN)는 II군이 91.09 ± 18.35 로 가장 높은 증가를 보였으며 그 다음이 I군으로 88.16 ± 27.67 이었고, IV군이 80.73 ± 7.39 , V군이 79.91 ± 20.34 , III군이 62.96 ± 18.50 으로 증가 순서를 나타내었으며, VI군은 28.87 ± 15.72 로 가장 낮았다.

표면경도 변화에 대한 각 군간의 결과를 비교한 결과 I, II, IV, V군은 III군과 VI군보다는

유의한 차이를 보였으며($P < 0.05$), III군과 VI군 간에도 유의한 차이가 있었다($P < 0.05$).

그러나 I, II, IV, V간에는 서로 유의한 차이를 보이지 않았다($P > 0.05$) [표 2].

4. 종합 및 고찰

근래에는 우식예방과 관련된 불소의 역할이 전전한 법랑질내 불소 함량의 증진보다는 재석회화 법랑질과 우식병소에 불소량이 증가하는 것과 관련이 있다고 보고되고 있으며^{13,14)}, 따라서 불소의 존재하에서는 탈회된 법랑질의 재광화가 촉진되며 이러한 재광화의 촉진이 불소의 가장 큰 효과로 설명되고 있다. 재광화에 의해서 법랑질에서는 용해도의 감소가 나타나는데 특히 탈회된 법랑질부위에서는 재광화 후 결정의 크기가 커져 산에 대한 저항성이 증가된다. 그러므로 재광화에 의해서 정지된 우식부위는 전전한 법랑질에 비해서 오히려 보다 높은 우식저항성을 갖는다고 보고되었다¹⁵⁾.

치과 진료실에서 이루어지는 전문가에 의한 불화물 국소도포 방법은 고농도의 불화물을 일정기간 동안 치면에 도포하여 치아우식 억제효

표 2 Microhardness Changes of Enamel Surface before and treatment(Mean $\pm$ S.D) by VHN

Treated Group	Before treatment	After treatment	Delta	Tukey Grouping
	VHN SD	VHN SD	VHN SD	
I	34.95 ± 4.56	123.11 ± 30.84	88.16 ± 27.67	a
II	34.96 ± 4.55	126.05 ± 17.71	91.09 ± 18.35	a
III	34.94 ± 4.57	97.91 ± 20.06	62.96 ± 18.50	b
IV	34.95 ± 4.58	115.68 ± 7.08	80.73 ± 7.39	a
V	34.95 ± 4.57	114.87 ± 24.13	79.91 ± 20.34	a
VI	34.93 ± 4.63	63.80 ± 18.13	28.87 ± 15.72	c

Mean $\pm$ SD (n=12)

*; Vicker Hardness Number(VHN)

**; Means With the same letter are not significantly different ($P > 0.05$)

과를 도포하고자 하는 술식으로 일반적으로 임상에서는 단일 불화물이 국소도포에 사용된다. 그러나 불화물 용액을 법랑질 표면에 도포하는 과정이나 도포한 직후에 대부분의 불소이온은 치질과 결합되지 않고 극히 다량의 불소이온만이 표층의 법랑질과 결합된다. 그러므로 불소도포법의 치아우식증 예방효과를 높일 목적으로 불화물을 도포하는 과정에서 가급적 많은 양의 불화물이 법랑질에 침투 결합하도록 하는 여러 가지 방법을 연구개발 해 왔다. Shannon⁹⁾은 APF와 SnF_2 를 2단계 연속적용이나 혼합적용의 형태로서 사용했을 때가 단독적용하는 것보다 법랑질 용해를 막는 효과가 더 크다고 주장하였으며, 또한 Crall¹⁶⁾도 APF와 SnF_2 의 복합적용이 건전 법랑질에 미치는 영향에 대하여 연구한 결과 2단계 복합적용 또는 혼합적용이 단독적용에 비하여 우식 예방효과가 큼을 시사하였던 바, 본 연구에서는 NaF, SnF_2 , APF를 가지고 도포시간을 달리하여 복합 및 단독적용을 하고 이어서 NaF 용액에 침적시켜 불화물 처리 전과 후의 법랑질 표면의 경도변화를 측정하였다.

법랑질 표면의 경도변화를 측정하는 것은 불화물이 치아 표면과 결합하여 법랑질내 불소함량을 증가시키고 산에 대한 용해도를 감소시키며 우식법랑질을 재석화시키는 정도를 비교하는데 필요하다. 그러므로 법랑질 표면의 미세경도측정법은 국소도포한 불소가 재석화에 미치는 효과를 평가하는 여러 방법 중 하나로 초기우식병소의 재석회화에 미치는 효과를 정확하고 간단히 측정하는 방법이라고 볼 수 있다¹⁷⁾. 이 방법에 따라 먼저 시편에 인공우식병소를 형성시켜 법랑질 표면의 경도를 측정하고 불화물 처리 후에 다시 인접부위에서 법랑질 표면의 경도변화를 측정하여 불화물이 치아 법랑질과 화학적인 반응을 일으켜 형성된 결과를

알아보았다.

불화물의 효과를 정확히 비교하기 위해서는 치아 시편간의 차이가 적어야 하기 때문에 법랑질이 균질한 소의 영구절치를 사용하였으며, 실험군(I~IV군)은 불화물 복합적용을 한 후 NaF 용액에 침적시킨 4개 군과 불화물을 단독도포한 후 NaF 용액에 침적시킨 군(V군) 및 NaF 용액에만 침적시킨 군(VI군)으로 정하였다. 법랑질 표면의 경도 변화는 NaF와 SnF_2 각 1분에 APF를 각각 3분간 처리한 후 0.05% NaF 용액에 1분간 침적시킨 I, II군과 NaF와 APF를 각각 2분간 연속적으로 도포한 후 NaF 용액에 1분간 침적시킨 IV군 및 APF만 4분간 적용한 후 NaF 용액에 1분간 침적시킨 V군이 SnF_2 와 APF를 2분간 적용하고 NaF 용액에 1분간 침적시킨 III군, NaF 용액에만 1분간 침적시킨 VI군보다는 법랑질 경도변화가 큰 것으로 보아 불화물의 단독적용보다는 복합적용이, 복합적용 중에서도 SnF_2 의 적용시간이 짧은 경우에 효과가 큼을 알 수 있으며, 불화물의 종류와 적용순서, 접촉시간에 따라서 효과의 차이가 있으나 불화물의 복합적용 단계수(횟수)와는 별 관계가 없는 것으로 사료된다.

이와 같은 결과는 서로 다른 불화물들을 순차적으로 적용하면 각각 단독적용하는 것보다 우식 예방능력이 더 크다고 한 Held와 Spirgi¹⁸⁾의 주장과도 일치하나 SnF_2 의 적용시간을 늘리고 APF의 적용시간을 줄인 III군이 APF만 단독적용하고 NaF 용액으로 침적시킨 V군보다 효과가 적은 것은 SnF_2 는 단독적용시 15~30초간 도포할 때 법랑질 표면경도 변화가 가장 현저하다고 한 보고¹⁹⁾와 유사함을 보이고 있다.

또한, 이²⁰⁾도 NaF 2분 후 SnF_2 2분 적용한 것이 SnF_2 4분 단독적용한 것보다 법랑질의 내산성 효과가 크게 나타났다고 하였다. 그리고

불화물 용액의 단독적용시에도 접촉시간에 의한 영향이 가장 크다고 한 Ogaard 등²¹⁾의 주장과도 일치하고 있다.

한편, 불화물 용액 양치로 저농도의 불소를 빈번히 치아에 접촉시킴으로써 초기우식증의 재광화를 강화하는 기능을 발휘하여 우식증을 예방한다고 하나 불화물의 복합적용 후 양치용액에 침적시켜 비교한 본 실험의 결과로 볼 때 양치용액의 단독 접촉만으로는 치아 표면 정도의 변화가 상대적으로 훨씬 작음을 알 수 있다.

총괄적으로 보아, 본 실험은 불화물 3가지(NaF, SnF₂, APF) 중 적용시간을 달리하여 복합 또는 단독적용한 후 0.05% NaF 용액에 침적시킨 5개 군을 0.05% NaF 용액에만 단독침적시킨 대조군과 비교하여 법랑질 표면 정도가 어떻게 변화하는지를 살펴 본 결과 복합적용한 5개 군이 대조군보다 변화가 훨씬 컸으며 5개 군 중에서는 SnF₂를 2분간 적용한 III군이 상대적으로 적용시간이 짧은(1분) II군에 비해 효과가 떨어지는 것으로 나타났다. 따라서 이와 같은 실험을 통해 나타난 우식 예방효과가 높은 불화물 도포방법을 장차 소아나 교정 장치물 장착자 또는 우식 활성이 높은 환자에게 임상적으로 적용할 수 있도록 임상실험 연구가 뒷따라야 할 것으로 사료된다.

V. 결 론

불화물의 복합 및 단독 도포 후 0.05% NaF 용액 침적이 초기 법랑질 탈회 병소의 재석회화에 미치는 영향을 알아보기로 소의 시편에 초기 인공우식병소를 형성한 후 NaF, SnF₂, APF를 가지고 적용시간을 각각 달리하여 2단계 도포한 후 0.05% NaF 용액에 침적시킨 4개 군(I, II, III, IV군)과 APF 단독 도포 후 NaF

용액에 침적시킨 군(V군) 및 NaF 용액에 침적만 시킨 대조군(VI군)으로 분류하여 6개 군에 대한 불화물 처리 전·후의 법랑질 표면경도를 측정하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 법랑질 표면경도 변화는 I군(NaF 1분+APF 3분+0.05% NaF 용액 1분(이하 용액 1분으로 표기)), II군(SnF₂ 1분+APF 3분+용액 1분), III군(SnF₂ 2분+APF 2분+용액 1분), IV군(NaF 2분+APF 2분+용액 1분) 및 V군(APF 4분+용액 1분)이 VI군(용액 1분)에 비해 통계적으로 유의한 차이를 보였다($P<0.05$).
2. SnF₂의 적용시간이 짧은 II군이 상대적으로 긴 III군에 비해 표면경도 변화가 유의하게 큰 차이를 나타냈다($P<0.05$).
3. 불화물의 종류, 적용순서, 접촉시간에 따라 변화의 크기가 달랐으나 불화물의 복합 적용횟수와는 별 상관관계가 없었다.

참고문헌

1. Duckworth RM. The science behind caries prevention. *Int Dent J* 1993; 43:529-539
2. Knutson JW, Armstrong WD. The effect of topically applied Sodium fluoride on dental caries experience I. Report of findings for the first study year. *Public Health Rep* 1943; 8:1701
3. Bibby BG. Use of fluoride in the prevention of dental caries I. Rationale and approach. *J Am Dent Assoc* 1944; 1:228-236
4. LeCompte EJ. Clinical application of topical fluoride products-Risks, benefits, and recommendations. *J Dent Res*

- 1987; 6 : 1066-1671
5. James S. Wefel. Critical assessment of professional application of topical fluorides. In Clinical Uses of fluorides, Edited by SHY wei philadelphia : Led & Febiger 1985; 18-20
6. Koulourides T. Summary of session II. fluoride and the caries process. J Dent Res 1990; 69(spec. issue); 558
7. White DJ, Nancollas GH. Physical and chemical considerations of the role of firmly and loosely bound fluoride in caries prevention. J Dent Res 1990; 69 : 587-594
8. Crall JJ, Bjerga JM. Fluoride uptake and retention following combined application of APF and stannous fluoride in Vitro. pediatric Dent 1984; 6 : 222-229
9. Shannon IL. Antisolubility effects of acidulated Phosphate fluoride and Stannous fluoride in the treatment of crown and root surface. Aust Dent J 1971; 16 : 240-242
10. 홍석진, 박기철, Stookey GK. 인공우식 법랑질에 대한 불소함유 치약의 효과. 대한구강보건학회지 1996; 20 : 1-10
11. 홍석진, 박기철, 이상대, 정성숙. 미생물 작용과 화학적 방법을 이용한 치약의 우식예방 효과연구. 대한구강보건학회지 1997; 21 : 563-571
12. White DJ. Reactivity of fluoride dentifrices with artificial caries. II. Effects on subsurface lesions : F, uptake, F distribution, Surface hardening and remineralization. Caries Res 1988; 22(1) : 27-36.
13. Ögaard B, Rolla G, Helgeland K. Alkali soluble and alkali insoluble fluoride retention in demineralized enamel lesions in vivo. Scand J Dent Res 1983; 91 : 200-204
14. Gelhard TBFM, ten Cate JM, Arends J. Rehardening of artificial enamel lesions in vivo. Caries Res 1979; 13 : 80-83
15. Silverston LM. Remineralization phenomena Caries Res 11(supp1.1): 1977; 59-84
16. Crall JJ, Silverstone LM, Wei SHY. Effects of combined APF and SnF₂ applications to sound enamel. IADR program and Abstracts, 1982(283)
17. White DJ. Reactivity of fluoride dentifrice with artificial caries. Caries Res 1987; 126-140
18. Held AJ, Spirgi M. Three years of Clinical observations with fluoridated dentifrices. Bull Group Int Rech Sci Stomatol Odontol 1968; 11 : 539-570.(Oral Res Abs 1964; 4 : 1085)
19. 박기철. 예방치과학. 정문각, 1997 : 308
20. 이광희. 불화석과 불화나트륨의 혼합적용이 법랑질의 내산성에 미치는 영향에 관한 생체외 연구. 대한구강보건학회지 1993; 17(2) : 417-426
21. Ogaard B, Rølla G, Ruben J, Arends J. Relative cariostatic effects of KOH-Soluble and KOH-insoluble fluoride in situ. J Dent Res 1990; 69(8) : 1505-1507

Abstract

A Study on the Effect of Multi-Application of Fluoride on Enamel Remineralization

Min-Jung Cho, Hyang-Lim Lee¹

Dept. of Dental Hygiene, Kwangju Health College, Dept. of Dental Hygiene, Mokpo Science College¹

Key words : NaF, SnF₂, APF. Multi-Application, Remineralization.

This study was carried out to investigate the effect of multi or single application of fluoride plus 0.05% NaF solution on the remineralization of dental caries lesion.

The microhardness changes of enamel surface were measured after application of fluoride and precipitation of 0.05% NaF solution on 6 groups of cow's tooth on which the artificial carious lesions were formed first.

Test groups were classified into two step application with NaF, SnF₂ and APF under different application time conditions plus 0.05% NaF solution (group I, II, III, IV) and single application with APF plus 0.05% NaF solution (group V) and control (0.05% NaF solution only, group VI).

The obtained results were as follows.

1. Regarding microhardness change of enamel surface, microhardness increments in group I (NaF for 1 minute + APF for 3 minutes + 0.05% NaF solution for 1 minute), II (SnF₂ 1 min + APF 3 min + NaF sol.), III (SnF₂ 2 min + APF 2 min + NaF sol.), IV (NaF 2 min + APF 2 min + NaF sol.) and V (APF 4 min + NaF sol.) were significantly greater than group VI. ($P < 0.05$)
2. Microhardness changes of shorter application time of SnF₂ (group II) were significantly greater than group III. ($P < 0.05$)
3. Microhardness changes were variable with kinds of fluoride, application sequence and application time of fluoride, but had no relation with the number of fluoride application.