

IOM) による「歯のフッ素症」発現防止のための基準値 (UL) 以下の値であった。

4. 水道水フッ化物添加の至適フッ化物濃度に関する研究については、わが国の水道水フッ化物添加地区（京都市山科地区、沖縄本島）と天然飲料水フッ化物含有地区（岡山県笠岡市、北関東、青森県北津軽）の文献報告を中心に、これらの二次資料から飲料水フッ化物濃度と齲蝕および歯のフッ素症発現の有所見者についての知見を疫学的に検証し、わが国における水道水フッ化物添加に際しての至適フッ化物濃度設定のためのガイドラインの基礎資料としての試案を提示した。

#### Project-1 研究担当者

##### 主任研究者

高江洲義矩 東京歯科大学  
教授・副学長

##### 分担研究者

田中 栄 東京大学医学部  
付病院整形外科助手  
西牟田 守 国立健康・栄養研究所  
健康増進部室長

##### 協力研究者

中村 修一 九州歯科大学  
生理学助教授  
筒井 昭仁 福岡歯科大学  
予防歯科学助教授  
佐藤 勉 日本歯科大学  
衛生学助教授  
村上多恵子 愛知学院大学歯学  
口腔衛生学講師  
佐久間汐子 新潟大学歯学部  
予防歯科学講師  
古賀 寛 東京歯科大学  
衛生学助手  
中村 宗達 静岡県健康福祉部  
健康増進室長

フッ化物応用の医学的評価（フッ化物と骨粗鬆症）

分担研究者 田中 栄 東京大学医学部付属病院 整形外科助手

研究要旨: 歯科領域におけるフッ化物応用は齲蝕予防法として実績が評価されている。今後わが国でフッ化物をさらに適正に応用していくためにはその全身的な影響を安全性という点から検討することが重要であると考えられる。本研究においてはフッ化物の骨への影響にターゲットをしばって文献的な検討を行った。その結果、大量のフッ化物摂取、あるいは骨粗鬆症治療薬としてのフッ化物製剤は骨密度、骨折率などに影響を与えること、水道水に添加されるような量（1 ppm 前後）のフッ化物については、骨密度に影響を与える可能性はあるものの、骨折率をも変化させるという明らかなエビデンスには乏しいと考えられる。

A. 研究目的

フッ化物は自然環境に普遍的に存在する元素であり、われわれの生活環境や飲食物に広く存在する。フッ化物の口腔保健への応用は古く、フッ化物洗口、フッ化物添加歯磨剤の齲蝕予防に対する効果は確立されたものであるといえる。また諸外国では水道水へのフッ化物添加が施行されており、やはり齲蝕予防に有効であることが報告されている。今後水道水への添加を含めてわが国でフッ化物をさらに適正に応用していくためには、その全身的な影響をさまざまな面から検討することが重要である。本研究ではフッ化物の全身的な影響、中でも特に骨組織に対する影響を中心に文献的に検討し考察した。

B. 研究方法

フッ化物の全身応用と骨への影響に関連する文献検索を実施した。とくにEBM(Evidence Based Medicine)に基づいた信頼度の高い研究計画条件を満たしている文献を優先的に25編選択して、レビューを行った。

C. 研究結果

1) フッ化物の急性毒性

フッ化物の過剰摂取による影響としては大量摂取による急性中毒、慢性的な過剰摂取による骨フッ素症などが知られている。急性中毒の症状としては嘔吐、腹痛、下痢などの胃腸症状から重篤なものでは循環器、神経症状などを併発し、死に至る可能性もあることが知られている。

このような毒性は、吸収されたフッ化物が血清中の陽イオンを吸着して低カルシウム血症をおこすためであると考えられているが、このような症状は極めて大量のフッ化物を摂取した場合であり、ほとんどはフッ化物製剤や錠剤の誤飲や故意の大量摂取によるものである。公共用水によるフッ化物中毒のケースとしては米国のアラスカ州で1992年5月に発生したものが有名である。これは用水中のフッ化物濃度を正しく測定していなかったなどのミスによって発生したものであるとされている。わが国では京都市内で学校給食中に大量のフッ化ナトリウムを誤って混入したことによるフッ化物中毒が報告されており、この例から美濃口らは急性症状の発現量をフッ化ナトリウムで6-8 mg/kg 体重であると推定している。これは1 ppm のフッ化物を含む飲料水に換算すると50 kg の成人で300リットル以上の飲水ということになる。このような重篤なフッ化物中毒は通常歯科用に用いられているフッ化物製剤では起こり得ないレベルであるが、特に小児による歯磨剤や洗口剤の誤飲などには十分注意を払う必要がある。いずれにしてもこのような事例はあくまでも偶発的な事故とみなすべきであり、フッ化物の適正応用を忌避する理由にはならないであろう。

## 2) フッ化物の骨組織への影響

フッ化物の重要なターゲットの一つは骨組織であり、フッ化物は体内に吸収されると速やかに効率よく(50%程度)骨組織にとりこまれるといわれている。

慢性のフッ化物過剰摂取による骨組織への影響としては骨フッ素症(skeletal fluorosis)が有名である。これはインドなどの熱帯地方や中国の乾燥地帯でフッ化物濃度が高い飲料水を利用している地域での報告が多く、症状が進行すると脊柱靭帯骨化などを原因とする四肢麻痺が進行し、*crippling fluorosis* という病態に到るケースが報告されている。しかしながらこのような病態は10 ppm 以上といった著しく高いフッ化物濃度の飲料水を長期間にわたって摂取した場合にのみ生じると考えられており、むしろ「飲料水中のフッ化物濃度を適切にコントロールできなかった」ことに問題があると考えられる。したがってフッ化物濃度を1 ppm 程度にコントロールした場合に温暖地域における通常の水道水摂取で起こる可能性は極めて低いものと見られる。また症状の発現はフッ化物摂取以外に栄養状態・生活環境にも左右される可能性が示唆されている。いずれにしてもこのような特殊な病態は水道水のフッ化物添加や歯科保健的な問題とは区別して考えるべきであろう。

## 3) 骨粗鬆症治療薬としてのフッ化物

フッ化物による骨密度の増加作用は以前から認識されており、また安価であることなどから多くの国で骨粗鬆症治療薬としてフッ化物が用いられてきた。フッ化物の骨組織に対する効果のメカニズムは、体内に吸収されて骨組織に取り込まれたフッ化物によって骨組織中のハイドロキシアパタイトがフルオロアパタイトと置換されることにより破骨細胞の骨吸収

が阻害されることであると考えられている。フッ化物イオンの骨芽細胞に対する直接作用も細胞培養レベルでは証明されているが、その効果発現に要する濃度は高く、生理的な条件でこのような作用が存在するかどうかについては疑問である。いずれにしてもこのようなフッ化物の効果を期待して古くより欧米では骨粗鬆症治療薬としてフッ化物が用いられてきた。また臨床的な研究もその効果をサポートするような結果であった。しかしながら1990年に Riggs は、大規模な prospective study から閉経後骨粗鬆症の女性に対してフッ化ナトリウム (NaF) は腰椎、大腿骨頸部、大腿骨転子部の骨密度を増加させるものの、橈骨骨幹部の骨密度は逆に低下させること、椎体骨折は NaF 投与群でコントロールと差がなく、椎体以外の骨折はむしろ NaF 投与群で多かったという結果を報告している。このようにフッ化物の骨粗鬆症治療薬としての効果は必ずしも確立されたものであるとはいえないのが現状である。ごく最近 Haguenaer らは閉経後骨粗鬆症に対するフッ化物治療についての meta-analysis を報告した[1]。かれらは1966年から1998年までの報告から以下のような条件を満たすものをセレクトし、データを抽出して検討を加えた。

- ①閉経後骨粗鬆症の女性を対象とし、何らかの形のフッ化物を治療薬として使用している randomized clinical trial (RCT) である
- ②コントロール群としてはカルシウム、ビタミンDのみ許可

③結果として骨折、骨塩量、疼痛、身長  
のどれかを含むもの

結果的には先に述べた Riggs のものを含めて11の RCT が criteria を満たし (表1)、最終的に解析をおこなったのはフッ化物治療群702例、プラセボ群727例であった。これらの報告のうち NaF を用いているものが7つ、monofluorophosphate を用いているものが3つ、両者を用いているものが1つであった。2つの研究は高い用量のフッ化物を用いていた。すべての報告においてカルシウム (400 - 2000 mg/day) がコントロールとして用いられていた。1つの研究はフッ化物の糖衣錠を用いており、1つは除放剤を用いていた。ビタミンDを用いていたのは3つであった。1つの報告は少数の男性を含み、3つの報告は hormone replacement therapy を受けている女性を含んでいた。Christiansen の1980年の報告は2つの placebo 群 (カルシウムのみ、カルシウムとビタミンD) を含んでいたのもこれは2つの異なる trial と見なした。多くの研究において投与期間は24ヶ月 (2年)、48ヶ月 (4年) であったので、すべての結果はこの2つの time point で解析した。データの解析は骨折の発生などについては relative risk (RR) を計算し、骨密度などの連続的なデータについては weighted mean difference (WMD) を計算した。また研究が randomized であるか、double masking になっているか、副作用や drop-out の記載がなされているか、randomization の方法が適切であるか、double masking の方法が適切に記載され

ているかなどによって研究の quality assessment をおこなった (5点満点)。1点が入った、2点が入った、4点が入った、5点が入った。本 meta-analysis の結果として明らかになったことは、以下の点である。

- ① 腰椎の骨密度は2年、4年で増加しており、WMD はそれぞれ 8.1%, 16.1%であった。
- ② 大腿骨頸部骨密度も増加しており、WMD はそれぞれ 3.4%, 5.4%であった。
- ③ 前腕 (橈骨遠位端) 骨密度はフッ化物治療群で低下しており、WMD は-1.7%, -3.3%であった。
- ④ 椎体の骨折危険率については2年で 0.87、4年で 0.90 であったが有意ではなかった。
- ⑤ 椎体以外の骨折危険率 (RR) は2年で 1.20 と有意ではなかったが、4年では 1.85 と有意に上昇しており、特に高用量投与群、除放剤非使用群で高かった。
- ⑥ 胃腸障害は2年で 2.18 と有意ではなかったが、4年ではフッ化物治療群で有意に高かった。とくに高用量投与群、除放剤非使用群で高かった。

以上より閉経後骨粗鬆症に対する治療薬としてのフッ化物投与は腰椎、大腿骨頸部の骨密度を増加させ、椎体骨折を低下させる傾向にあるが、前腕の骨密度は低下させる可能性があり、また高用量投与、あるいは除放剤非使用の場合には椎体以外の部位の骨折はむしろ増加させる傾向にあると考えられる。

#### 4) 水道水フッ化物添加と骨折

飲料水のフッ化物添加と骨粗鬆症、あ

るいは骨粗鬆症に関連した大腿骨頸部骨折や大腿骨転子部骨折などの hip fracture との関係については1990年代に入って注目されるようになってきた。現段階では水道水に添加する程度のフッ化物の骨折率への影響については議論があり、これについては1991年に米国でシンポジウムが開かれてその詳細は Gordon らによって報告されている。過去に報告された主な論文を以下に挙げてみると、

- ① Water fluoridation が骨折を増やすとするもの [2-5]
- ② 無関係とするもの [6-8]
- ③ 減少させるとするもの [9, 10]

これらはいずれも ecological study であり、疾病の発生要因にかかわる交絡因子の影響を考慮することができないという欠点をもつ。Water fluoridation と骨折発症の individual study としては・ Kroger Het al. [11], Cauley JA et al. [12] などがあるが、いずれも water fluoridation と骨折との間に相関が認められなかったとしている。またごく最近大規模な individual study が2つ報告された。

#### 1) Phipps Kret al. [13]

米国のペンシルバニア州に居住する65歳以上の白人女性7129名を対象として、フッ化物添加飲料水への曝露と骨塩量、骨折の発生率との関連を調査した。これらの人々を1971年-1990年の期間における飲料水中のフッ化物への曝露によって no exposure, mixed exposure, continuous exposure の3群に分け、身体各部位における骨塩量を測定

し、椎体骨折、非椎体骨折の発生について調査した。その結果 continuous exposure 群では no exposure 群と比較して平均骨塩量が大腿骨頸部、大腿骨転子部と腰椎において高く、橈骨遠位端において低かった。Mixed exposure 群ではその中間の値を示した。また大腿骨頸部（および転子部）骨折、椎体骨折の risk ratio もそれぞれ 31%、27%減少していたが、手関節骨折には有意差はなく（増加傾向にはあり）、上腕骨骨折の risk にも違いはなかった。

#### 2) Hiller et al. [14]

英国 Cleveland 地方に居住する 50 歳以上の白人女性を対象とし、一定期間に発生した大腿骨頸部骨折症例を対象として調査をおこなった。調査期間内に大腿骨頸部骨折を起こした 514 例と年齢と性別をマッチさせた 527 例を比較した。居住歴からフッ化物への生涯曝露、20 歳までの曝露、最近 20 年間の曝露を算出し、これらを 0.9 ppm 以上、未滿の 2 群に分けて大腿骨頸部骨折の発生率との関係を検討したところ、フッ化物への曝露と骨折の危険度との間に相関関係はなかった。これらの報告を総合すると水道水に添加される程度のフッ化物であっても長期的にはさまざまな骨組織の骨密度に影響を及ぼす可能性があることは否定できないが、骨折率をも変化させる可能性があるかどうかについては未だ明らかなエビデンスに乏しいといわざるを得ず（骨密度と関係していることが明らかな大腿骨転子部骨折と、関係の少ない大腿骨頸部骨折を一緒に混ぜているという欠点もある）、少なくとも大きな影響があ

るとは考えにくい。

#### D. 考察および結論

フッ化物の骨組織に対する影響は古くより知られており、インドや中国など地域的に飲料水中のフッ化物濃度が高いような場所では長期間の飲料水摂取によって骨フッ素症という病態を引き起こすことも報告されている。しかしながらこのようなフッ化物の影響はむしろ「飲料水中のフッ化物濃度が適正にコントロールされていなかった」ことに原因があると考えられ、わが国のような温暖な地域で水道水中のフッ化物濃度をコントロールすることにアゲインストな事実であるとは考えにくい。フッ化物は骨粗鬆症の治療薬として古くより用いられてきたという歴史があり、このような目的で用いられるような高用量のフッ化物の骨組織に対する影響（椎体、大腿骨頸部などの骨密度を増加）はある程度確立されている。しかしながら骨粗鬆症で問題となる骨折発生に対する効果については未だに議論のあるところであり、使用したフッ化物の種類（除放剤かどうか）、用量によってかなり左右される。水道水フッ化物添加の骨組織に対する影響としてはある程度骨密度を変化させる可能性はあるものの、少なくとも骨折の発生率に影響を与えるという明らかなエビデンスは乏しいものと考えられる。

#### E. 文献

1. Haguenaer, D., Welch, V., Shea, B., Tugwell, P., Adachi, J.D., Wells,

- G. Fluoride for the treatment of postmenopausal osteoporotic fractures: a meta-analysis, *Osteoporos Int*, 11: 727-38, 2000
2. Jacobsen, S.J., Goldberg, J., Cooper, C., Lockwood, S.A. The association between water fluoridation and hip fracture among white women and men aged 65 years and older. A national ecologic study, *Ann Epidemiol*, 2: 617-26., 1992
  3. Danielson, C., Lyon, J.L., Egger, M., Goodenough, G.K. Hip fractures and fluoridation in Utah's elderly population, *Jama*, 268: 746-8., 1992
  4. Jacobsen, S.J., Goldberg, J., Miles, T.P., Brody, J.A., Stiers, W., Rimm, A.A. Regional variation in the incidence of hip fracture. US white women aged 65 years and older, *Jama*, 264: 500-2., 1990
  5. Karagas, M.R., Baron, J.A., Barrett, J.A., Jacobsen, S.J. Patterns of fracture among the United States elderly: geographic and fluoride effects, *Ann Epidemiol*, 6: 209-16., 1996
  6. Madans, J., Kleinman, J.C., Cornoni-Huntley, J. The relationship between hip fracture and water fluoridation: an analysis of national data, *Am J Public Health*, 73: 296-8., 1983
  7. Avorn, J., Niessen, L.C. Relationship between long bone fractures and water fluoridation, *Gerodontology*, 2: 175-9., 1986
  8. Arnala, I., Alhava, E.M., Kivivuori, R., Kauranen, P. Hip fracture incidence not affected by fluoridation. Osteofluorosis studied in Finland, *Acta Orthop Scand*, 57: 344-8., 1986
  9. Simonen, O., Laitinen, O. Does fluoridation of drinking-water prevent bone fragility and osteoporosis?, *Lancet*, 2: 432-4., 1985
  10. Jacobsen, S.J., O'Fallon, W.M., Melton, L.J. Hip fracture incidence before and after the fluoridation of the public water supply, Rochester, Minnesota, *Am J Public Health*, 83: 743-5., 1993
  11. Kroger, H., Alhava, E., Honkanen, R., Tuppurainen, M., Saarikoski, S. The effect of fluoridated drinking water on axial bone mineral density-a population-based study, *Bone Miner*, 27: 33-41., 1994
  12. Cauley, J.A., Murphy, P.A., Riley, T.J., Buhari, A.M. Effects of fluoridated drinking water on bone mass and fractures: the study of osteoporotic fractures, *J Bone Miner Res*, 10: 1076-86., 1995
  13. Phipps, K.R., Orwoll, E.S., Mason, J.D., Cauley, J.A. Community water fluoridation, bone mineral density, and fractures: prospective study of effects in older women,

- Bmj, 321: 860-4., 2000
14. Hillier, S., Cooper, C., Kellingray, S., Russell, G., Hughes, H., Coggon, D. :Fluoride in drinking water and risk of hip fracture in the UK: a case-control study, *Lancet*, 355: 265-9., 2000.
  15. Christiansen, C., Christensen, M.S., McNair, P., Hagen, C., Stocklund, K.E., Transbol, I. :Prevention of early postmenopausal bone loss: controlled 2-year study in 315 normal females, *Eur J Clin Invest*, 10: 273-9., 1980.
  16. Gambacciani, M., Spinetti, A., Taponeco, F., Piaggese, L., Cappagli, B., Ciaponi, M., Rovati, L.C., Genazzani, A.R. :Treatment of postmenopausal vertebral osteopenia with monofluorophosphate: a long-term calcium-controlled study, *Osteoporos Int*, 5: 467-71, 1995.
  17. Grove, O., Halver, B. :Relief of osteoporotic backache with fluoride, calcium, and calciferol, *Acta Med Scand*, 209: 469-71, 1981.
  18. Hansson, T., Roos, B. :The effect of fluoride and calcium on spinal bone mineral content: a controlled, prospective (3 years) study, *Calcif Tissue Int*, 40: 315-7., 1987.
  19. Kleerekoper, M., Balena, R. :Fluorides and osteoporosis, *Annu Rev Nutr*, 11: 309-24, 1991.
  20. Meunier, P.J., Sebert, J.L., Reginster, J.Y., Briancon, D., Appelboom, T., Netter, P., Loeb, G., Rouillon, A., Barry, S., Evreux, J.C., Avouac, B., Marchandise, X. :Fluoride salts are no better at preventing new vertebral fractures than calcium-vitamin D in postmenopausal osteoporosis: the FAVOStudy, *Osteoporos Int*, 8: 4-12, 1998.
  21. Pak, C.Y., Sakhaee, K., Adams-Huet, B., Piziak, V., Peterson, R.D., Poindexter, J.R. :Treatment of postmenopausal osteoporosis with slow-release sodium fluoride. Final report of a randomized controlled trial, *Ann Intern Med*, 123: 401-8., 1995.
  22. Reginster, J.Y., Meurmans, L., Zegels, B., Rovati, L.C., Minne, H.W., Giacobelli, G., Taquet, A.N., Setnikar, I., Collette, J., Gosset, C. :The effect of sodium monofluorophosphate plus calcium on vertebral fracture rate in postmenopausal women with moderate osteoporosis. A randomized, controlled trial, *Ann Intern Med*, 129: 1-8., 1998.
  23. Riggs, B.L., Seeman, E., Hodgson, S.F., Taves, D.R., O'Fallon, W.M. :Effect of the fluoride/calcium regimen on vertebral fracture occurrence in postmenopausal osteoporosis. Comparison with conventional therapy, *N Engl J*



Med, 306: 446-50., 1982.

24. Riggs, B.L., Hodgson, S.F., O'Fallon, W.M., Chao, E.Y., Wahner, H.W., Muhs, J.M., Cedel, S.L., Melton, L.J. :Effect of fluoride treatment on the fracture rate in postmenopausal women with osteoporosis, *N Engl J Med*, 322: 802-9., 1990.
25. Sebert, J.L., Richard, P., Mennecier, I., Bisset, J.P., Loeb, G. :Monofluorophosphate increases lumbar bone density in osteopenic patients: a double-masked randomized study, *Osteoporos Int*, 5: 108-14., 1995.

F. 研究発表  
論文発表

1. Miura, T., Tanaka, S., Seichi, A., Arai, M., Goto, T., Katagiri, H., Asano, T., Oda, H., Nakamura, K. :Partial Functional Recovery of Paraplegic Rat by Adenovirus-Mediated Gene Delivery of Constitutively Active MEK1, *Exp Neurol*, 166: 115-126, 2000.
2. Miyazaki, T., Katagiri, H., Kanegae, Y., Takayanagi, H., Sawada, Y., Yamamoto, A., Pando, M.P., Asano, T., Verma, I.M., Oda, H., Nakamura, K., Tanaka, S. :Reciprocal role of ERK and NF-kappaB pathways in survival and activation of osteoclasts, *J Cell*

*Biol*, 148: 333-42, 2000.

3. Miyazaki, T., Takayanagi, H., Isshiki, M., Takahashi, T., Okada, M., Fukui, Y., Oda, H., Nakamura, K., Hirai, H., Kurokawa, T., Tanaka, S. :In vitro and in vivo suppression of osteoclast function by adenovirus vector-induced csk gene, *J Bone Miner Res*, 15: 41-51, 2000.
4. Nakagawa, T., Tanaka, S., Suzuki, H., Takayanagi, H., Miyazaki, T., Nakamura, K., Tsuruo, T. :Overexpression of the csk gene suppresses tumor metastasis in vivo, *Int J Cancer*, 88: 384-391, 2000.
5. Takayanagi, H., Iizuka, H., Juji, T., Nakagawa, T., Yamamoto, A., Miyazaki, T., Koshihara, Y., Oda, H., Nakamura, K., Tanaka, S. :Involvement of receptor activator of nuclear factor kappaB ligand/osteoclast differentiation factor in osteoclastogenesis from synoviocytes in rheumatoid arthritis, *Arthritis Rheum*, 43: 259-69, 2000.

学会発表

1. Eighth Workshop on Cell Biology of Bone and Cartilage in Health and Disease ( 2000.4.1-4 ) タボス Reciprocal role of ERK and NF-kB pathways on survival and activation of osteoclasts.
2. 第 44 回日本リウマチ学会総会

(2000.5.13-15) 横浜 バイポーラ型  
人工肩関節の展望

3. 動物への遺伝子導入とその応用の開  
発研究会 第24回定例会 (2000.6.7)  
東京 破骨細胞機能発現の分子メカ  
ニズム
4. Advances in Tissue & Genetic  
Engineering for the Treatment of  
Arthritic Diseases (2000.9.11-12) ボ  
ストン Supression of arthritic  
bone destruction by adenovirus  
vector-mediated gene transfer6)
5. 第15回日本整形外科学会基礎学術  
集会 (2000.9.28-29) 京都 シンポジ  
ウム「臨床応用のための運動器細胞の  
分化と機能の制御」破骨細胞・骨芽細  
胞の分化と骨粗鬆症

表 1 : Haguenaerらのmeta-analysisに使用された研究の一覧

著者	文献	年	Sample size (Tx/P)	年齢	治療	コントロール	期間 (年)	Quality
Christiansen	[15]	1980	128(25/102) 49(24/25)	50	NaF, 9 mg F+Ca 500 mg NaF, 9 mg, F+Ca500 mg+VitD	Ca 500 mg Ca 500 mg + Vit D	2	4
Gambacciani	[16]	1995	60(30/30)	52	MFP, 20 mg F+Ca 500 mg	Ca 500 mg	2	2
Grove	[17]	1981	28(14/14)	74	NaF, 9 mg F+Ca 500 mg+ VitD	Ca 500 mg+ VitD	0.25	2
Hansson	[18]	1987	50(25/25)	65	NaF, 4.5 mg F+Ca 1000 mg	Ca 1000 mg	3	2
			50(25/25)	66	NaF, 13.6mg F+Ca 1000 mg	Ca 1000 mg		
Kleerekoper	[19]	1991	84(46/38)	67	NaF, 34 mg F+Ca 1500 mg	Ca 1500 mg	4	4
Meunier	[20]	1998	219(73/146)	66	NaF, 22.6 mg F+Ca 1000 mg+VitD	Ca 1000 mg+VitD	2	2
			214(68/146)	66	MFP, 19.8 mg F+Ca 1000 mg+VitD	Ca 1000 mg+VitD		
			213(67/146)	66	MFP, 26.4 mg F+Ca 1000 mg+VitD	Ca 1000 mg+VitD		
Pak	[21]	1995	110(54/56)	68	SR NaF, 27.5 mg F+Ca 400 mg	Ca 400 mg	4	2
Reginster	[22]	1998	164(84/80)	63	MFP, 20 mg F+Ca 500 mg	Ca 500 mg	4	5
Riggs	[23]	1982	165(61/104)	64	NaF, 27.5 mg F+VitD	VitD	4	1
Riggs	[24]	1990	202(101/101)	68	NaF, 41.25 mg F+Ca 1500 mg	Ca 1500 mg	4	2
Sebert	[25]	1991	76(35/41)	60	MFP, 26.4 mg F+Ca 500 mg	Ca 500 mg	2	2

厚生科学研究費（医療技術評価研究事業）  
研究報告書

フッ化物の適正摂取量の推定

フッ化物の細胞レベルでの生体感受性評価

研究協力者 佐藤 勉 日本歯科大学衛生学講座

研究究要旨：フッ化物を齲蝕予防に応用するにあたっては、安全性や毒性を十分に検討する必要がある。この目的で比較的以前より培養細胞を用いた実験が行われているが結論は必ずしも一致しておらず、フッ化物の生体影響について混乱を招く一因にもなっている。その原因として、①使用した細胞の種類や実験条件の違い、②作用させたフッ化物濃度の違い、③データの解釈方法（ヒトへの外挿方法）などが挙げられる。本研究は、我々が行ってきた培養系の実験結果を中心に、フッ化物の安全および毒性について整理した。併せて若干の追加実験を行った。

A. 研究目的

齲蝕予防に応用するフッ化物の生体に対する安全性は、これまでの膨大な研究成果から確認されている。しかしながら、一部の実験データを基にその毒性を危惧する意見がみられるのも事実である。なかでも、培養細胞を用いて行った毒性試験や変異原性試験では研究者により異なった成績が示されており、フッ化物の安全性の評価に混乱を引き起こす要因にもなっている。培養系による *in vitro* の実験では、結果を評価する上で使用する細胞の種類や実験環境が重要となってくる。さらに、作用させるフッ化物濃度や得られたデータのヒトへの外挿法についても十分に検討しなければならない。

我々は十数年前より、種々の培養細胞を用いてフッ化物の細胞レベルでの動態を調べている<sup>1),9)</sup>。特に細胞毒性や変異原性については、ヒト口腔組織由来細胞

3-8)、ヒト末梢血リンパ球<sup>10)</sup>やヒトリンパ芽球系細胞株<sup>11),12)</sup>による実験結果について報告してきた。本研究では、我々がこれまで可及的に同一環境下で行ってきた実験のうち、細胞毒性と変異原性を調べたものについて整理し、フッ化物の安全性に関する混乱を解くための一助としたい。特に、細胞増殖と DNA 合成からみた細胞毒性とフッ化物濃度との関係を細胞別に比較し、ついでフッ化物濃度と染色体異常についてまとめることとする。

B. 研究方法

1. 細胞と培養方法

細胞はすべてヒト由来のものを使用した。このうち、正常組織由来の細胞は酵素処理法または移植片培養法により当教室で分離した。由来組織は胎児歯肉および肺、小児歯肉および歯根膜、成人歯肉および肺で、いずれも線維芽細胞である

が、成人歯肉についてはケラチノサイトも分離した。癌組織由来の細胞は、他施設で樹立された株化細胞を用いた。

表1はこれまでに使用した細胞の一覧である。培養液として正常組織由来の線維芽細胞と癌細胞(浮遊性のものを除く)については、10%(V/V)の非働化牛胎仔血清を含む Eagle's MEM を、ケラチノサイトについては、同細胞用無血清培地を使用した。末梢血リンパ球および急性リンパ芽球性白血病由来の細胞については、20%(V/V)もしくは 10%(V/V)の非働化牛胎仔血清を含む RPMI 1640 培地を使用した。培地と血清はすべて Gibco BRL 社(米国)製である。特に血清は事前に細胞増殖を指標にして厳密なロットチェックを行い、実験に用いた。培養条件はいずれの細胞についても、37℃、5% CO<sub>2</sub>-95%空気、100%湿度に設定した。

## 2. 細胞毒性および変異原性試験

日本組織培養学会では、おもな細胞毒性試験として①細胞増殖阻害、②コロニー形成阻害、③細胞機能阻害を、変異原性試験として①染色体異常試験、②姉妹染色分体交換(SCE)試験、③不定期 DNA 合成試験、④DNA 鎖切断検出試験を挙げている<sup>13)</sup>。我々はこれらの各種試験を基にフッ化物の細胞毒性や変異原性を調べてきたが、今回は最も基本的でかつ比較的初期より検討されている細胞増殖阻害、細胞機能(DNA 合成)阻害および染色体異常試験について報告する。

細胞増殖阻害は、一定の細胞数になるように培養容器に播種し 24 時間の前培養を行った後、各種フッ化物濃度になるようにフッ化ナトリウム(NaF)を添加した培養液と培地交換し、以後経日的に生細胞数を算定することにより測定した。

DNA 合成阻害は以下の方法で測定した。前述のごとく細胞を播種し、前培養を行った後、各種フッ化物濃度になるように NaF を添加した新鮮培養液と培地交換し、引き続き培養を行った。4 時間後に 3H-チミジンを含む培養液を加え、さらに 2 時間培養した。通法に従って細胞を処理し、酸不溶性分画中の放射活性を測定することにより DNA 合成を測定した。

染色体異常試験はヒト末梢血より分離したリンパ球を用い、数的異常と構造異常(ギャップと切断)を観察した。

## C. 結果と考察

### 1. 細胞毒性試験

細胞増殖に及ぼすフッ化物の影響については比較的初期より検討されており、フッ化物濃度がある濃度を超えると濃度依存的に増殖抑制が引き起こされることが確認されている。しかしながら、細胞増殖を明らかに抑制し始めるフッ化物濃度は研究者により異なる。最も低い濃度は、マウス線維芽細胞やヒト胎児由来線維芽細胞を用いた場合の 0.5ppm(0.026mM)であり<sup>13),14)</sup>、高いものは我々が報告した継代数 30~35 の成人歯肉由来の線維芽細胞を用いた場合の 20ppm(1.05mM)である<sup>3)</sup>。当教室で使用した他の細胞については、上記の成人歯肉由来細胞を除くとすべての細胞は 10ppm(0.53mM)以下のフッ化物濃度では細胞増殖の抑制を受けなかった。さらにフッ化物による増殖抑制の機構として、DNA 合成やタンパク質合成の阻害が関係していることが明らかにされている。したがって、我々はヒト由来細胞では 10ppm 以下のフッ化物濃度では DNA 合成やタンパク質合成に影響が出ないもの

と考えている。また注目すべき結果は、歯肉由来の細胞を始めとして 30~50 代の継代が可能な線維芽細胞では、継代数の少ない細胞に比べてこれが多い細胞で増殖抑制を引き起こすフッ化物濃度が高いことである。すなわち、試験管内加齢が生じた細胞ではフッ化物感受性が低下することが観察された。さらに継代数をそろえた場合、細胞のドナー年齢の高いものほどフッ化物感受性が低い傾向にあった<sup>3)</sup>。齲蝕予防のためのフッ化物応用には全身的なものと同局的なものがあり、また適用されるヒトの年齢も広範囲にわたる。したがって、試験管内加齢の程度やドナー年齢によってフッ化物感受性が異なるという結果は、フッ化物応用を進めていく上で重要な知見になるものと思われる。我々はこのようなフッ化物感受性の違いの機序に、細胞が有する増殖能や DNA 合成能が関係するのではないかと考えた。その理由は、正常組織より体外培養した細胞の寿命（継代数または倍加回数）は、ドナー年齢の低い細胞ほど長いことが知られている。ただし、いずれの細胞も継代数が一定の回数を超えると増殖能が低下（試験管内加齢）し、やがて増殖を停止する。そこで細胞のフッ化物感受性が増殖能や DNA 合成能の高低と関連している可能性を考えた。実験としては増殖や DNA 合成が密接に関係する細胞周期に着目し、フッ化物感受性を調べた。ここではフッ化物感受性の指標として、増殖、DNA 合成の他にコロニー形成も測定した。その結果、正常組織由来の線維芽細胞では S 期にある細胞のフッ化物感受性が高く、G0/G1 期細胞で低いことが明らかとなった。つまり、細胞のフッ化物感受性は細胞周期依存的であることが確認された<sup>4),5),7)</sup>。このことか

ら、細胞によりフッ化物感受性が異なる機構として、各細胞集団に存在する S 期細胞と G0/G1 期の割合が異なることが考えられた。先に述べたように培養細胞のフッ化物感受性は研究者により異なった結果が示されている。今後、このような実験の結果を評価する場合、培養環境（広義の）はもちろんのこと、使用した細胞の増殖能や DNA 合成能、そして各細胞周期に存在する細胞の割合についても十分に把握する必要があるものと考えられる。図 1 は細胞の DNA 合成を 50% 阻止するフッ化物濃度からみたフッ化物感受性の高低を、細胞間で比較したものである<sup>9)</sup>。

要するに、フッ化物応用の基礎としての安全性評価を培養細胞を用いて行う際には、細胞のフッ化物感受性が細胞種や年齢で異なることを十分に考慮する必要がある。

## 2. 変異原性試験

フッ化物の変異原性を調べる目的で、微生物や実験動物等を使った種々の試験が行われているが、必ずしも一定の結論が得られていない。

ヒト末梢血リンパ球によるフッ化物の染色体異常誘発は 1978 年に初めて報告されているが<sup>16)</sup>、この実験では、0.6~60ppm のフッ化物濃度(NaF)の 24 時間処理で染色体異常を認めている。我が国の報告では<sup>17)</sup>、3.6ppm フッ化物濃度(NaF)の 24 時間処理で約 10%の細胞に構造異常を検出している。しかしながら、0.45ppm 以下のフッ化物濃度では染色体構造異常がかえって減少することも報告している。また、ヒト末梢血リンパ球の細胞周期と染色体異常誘発との関連を調べた研究も行われている<sup>18)</sup>。この報告では 43ppm~214ppm のフッ化物 (NaF)

を作用させたところ、G1期細胞では染色体異常が認められず、S期細胞では43ppm フッ化物濃度の3時間処理および86ppm フッ化物濃度の1時間処理で染色体異常の誘発がみられたとしている。このような細胞周期と染色体異常誘発能との関連性は、細胞増殖やDNA合成に及ぼすフッ化物の作用が細胞周期依存的であるとする我々の研究結果とかなり一致しており非常に興味のあるところである。

ヒト末梢血リンパ球を用いた我々の実験では<sup>10)</sup>、25ppm フッ化物濃度(NaF)以上で染色体の構造異常が有意に増加したが、そのほとんどはギャップであった。ギャップを構造異常として判定するか否かは必ずしも意見が一致しておらず、さらに追加実験を行う必要がある。現在、ヒト歯肉由来の線維芽細胞を用いた染色体異常試験を実施しているが、50ppm フッ化物濃度(NaF)以下では数的および構造異常を認めていない。またフッ化物徐放剤を含む培養液中で長期間連続培養した成人歯肉由来の線維芽細胞においても染色体異常は観察されなかった<sup>8)</sup>。加えて、アポトーシス等の新たな概念からの遺伝学的アプローチも進行中である。

一方、フッ化物の遺伝学的影響を調べたいいくつかの疫学的研究があるが、対照群の取り方や統計的手法に問題があった等の理由で結果は疑問視されている。近年、疫学的な要素も加味された極めて興味ある *in vitro* の実験結果が中国で報告されている<sup>19)</sup>。4ppm を超える高濃度のフッ化物を含む飲料水を長期間飲み続けた住民の尿や血中等のフッ化物濃度を測定し、ついで住民の末梢血より分離したリンパ球を用いて染色体異常の試験を行ったものである。尿および血中のフッ

化物濃度は、フッ化物濃度の低い飲料水を摂取している対照住民に比べて有意に高かったが、染色体異常は認められなかったとしている。現時点ではフッ化物の遺伝学的作用は完全に解明されているとはいえない。しかしながら、現実に長期間にわたって高濃度のフッ化物を含む飲料水を飲み続けている住民の末梢血リンパ球では、染色体異常がみられなかった事実やフッ化物が遺伝学的障害をもたらしたという本格的な疫学的データがみられないということは、齲蝕予防に用いられるフッ化物濃度ではフッ化物の変異原性を否定できるともものと考ええる。我々は数年前より中国の慢性フッ化物中毒地域における疫学調査を実施しており、今後このような疫学的要因と *in vitro* の実験を組み合わせた研究を実施する予定である。

#### D. 文献

- 1) Sato, T., Niwa, M., Akatsuka, A., Hata, J., Tamaoki, N.: Biochemical and morphological studies of human diploid and fluoride-resistant fibroblasts *in vitro*. Archives oral Biol. 31:717-722, 1986.
- 2) 佐藤 勉、丹羽源男：正常二倍体細胞に及ぼすフッ素の影響 — 細胞増殖、たんぱく質合成、ALP活性、cAMP量 および微細構造について —。口腔衛生 会誌 37: 172-184, 1987.
- 3) Sato, T., Yagori, A., Niwa, M.: Low sensitivity of cultured human young adult and adult gingival fibroblasts to fluoride. I. Relation to doubling time. : Pharmacology & Toxicology. 61: 313-315, 1987.
- 4) 根岸邦雄：成人歯肉由来の二倍体線維

- 芽細胞の加齢によるフッ素感受性に関する研究 —細胞の倍加時間、DNA 合成およびフッ素濃度の検討—。歯学 79 : 591-604、1991.
- 5)市川信一、佐藤 勉、丹羽源男：培養ヒト二倍体細胞のフッ素感受性と細胞周期との関連性について。口腔衛生会誌 43 : 15-27、1993.
- 6)佐藤勝弘：成人歯肉由来線維芽細胞のDNA 合成とタンパク質合成におよぼすカドミウムとフッ素の影響。口腔衛生会誌 44 : 9-21、1994.
- 7)遠藤智彦、佐藤 勉、丹羽源男：ヒト歯肉由来培養線維芽細胞におけるフッ素感受性の細胞周期による違いについて。口腔衛生会誌 45 : 322-333、1995.
- 8)Takahashi,H., Sato,T., Niwa,M. : Cytotoxicity and mutagenicity to human adult gingival cells of sodium fluoride releasing devices. Biomed Res Trace Elements 8 : 45-56、1997.
- 9)Tanaka,T: Effects of fluoride on fibroblasts derived from child gingiva — Fluoride sensitivity, cell cycle and cell death— . Biomed Res Trace Elements 9 : 11-22、 1998.
- 10)西田良和、佐藤 勉、丹羽源男：フッ素のヒトリンパ球におよぼす影響 — 染色体異常、微細構造および生化学的変化の検討—。 : 歯学 78 : 945-958、1991.
- 11)佐藤 勉、中倉忠男、小山 徹、西田良和、西川良一、根岸邦雄、宇江城正 和、丹羽源男：成人 T 白血病由来 T 細胞株の増殖、DNA 合成および表面抗原 におよぼすフッ素の影響。歯学 77 : 1972-1979、1990.
- 12)佐藤 勉、岩崎孝之、弥郡彰彦、市川みゆき、市川信一、小林充明、丹羽源男：フッ素添加培養液で長期間連続的に培養されたヒト急性リンパ芽球性白血病由来 T 細胞株の増殖、DNA 合成、たんぱく質合成と膜抗原について。口腔衛生会誌 40 : 331-338、1990.
- 13)日本組織培養学会編：細胞トキシコロジー試験法、朝倉書店、東京、第1版、1991、66-101 頁、199-246 頁。14) Hongslo,J.K:J Dent Res, 53:410-, 1974.
- 15)Oguro,A.,Cervenka,J.,Horii,K. : Effect of sodium fluoride on growth of human diploid cells in culture. Pharmacology & Toxicology 67:411-414, 1990.
- 1)Jachimczak,D., Skotarczak,B.: The effect of fluoride and lead ions on the chromosomes of human leucocytes in vitro. Genet.Polon 19 : 353-357, 1978.
- 17)松田暁子：染色体（ヒト・リンパ球）に及ぼすフッ素の影響。口腔衛生会誌 30 : 312-328、1980.
- 18)岸 邦和：ヒト・リンパ球の細胞周期各相への短時間処理によるフッ化ナトリウム(NaF)の染色体異常誘発能の検討。杏林医会誌 16 : 199-203、1985.
- 19)Li,Y., Liang,C.K., Katz,B.P., Brizendine,E.J., Stooky,G.K. : Long-term exposure to fluoride in drinking water and sister chromatid exchange frequency in human blood lymphocytes. J Dent Res 74:1468-1474, 1995.



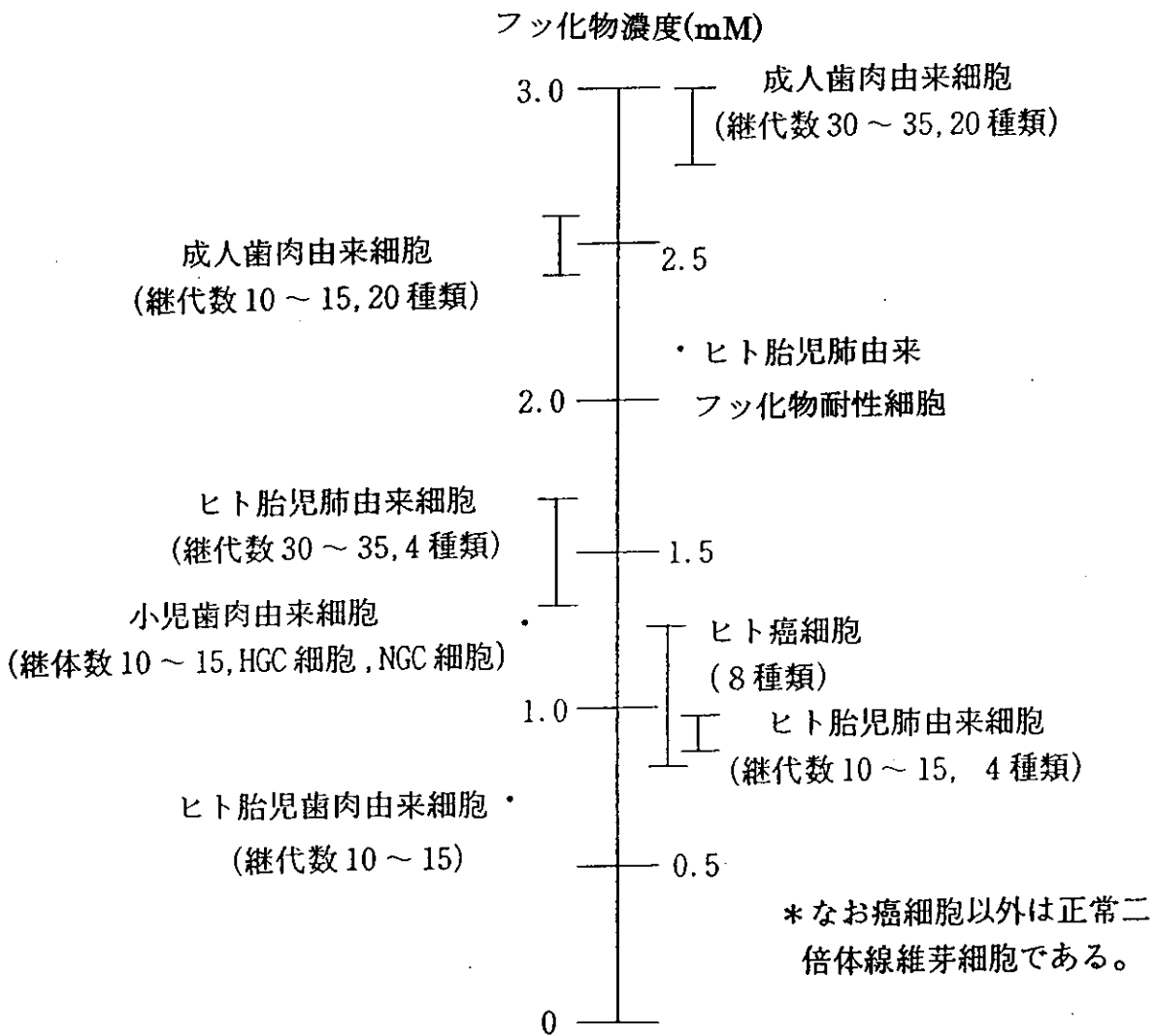


図1 DNA合成を50%抑制する濃度からみたフッ化物感受性の比較(2時間暴露)  
(文献<sup>9)</sup>より引用)

表1 フッ化物の細胞影響を調べる目的で使用されているヒト由来細胞

1. 正常組織

由来	細胞種	可能継代数(1:3)	保有細胞数
胎児歯肉	線維芽細胞	50	2
小児歯肉	線維芽細胞	35	15
	上皮性細胞	8	2
成人歯肉	線維芽細胞	25	80
	上皮性細胞	5	12
小児歯根膜	線維芽細胞	35	5
成人歯根膜	線維芽細胞	25	5

2. 癌組織

由来	細胞種	可能継代数(1:3)	保有細胞数
成人歯肉	上皮性細胞	$\infty$ (?)	1
成人子宮	上皮性細胞	$\infty$ (?)	1
成人T白血病	リンパ芽球	$\infty$ (?)	2

厚生科学研究費補助金（医療技術評価総合研究事業）  
分担研究報告書

フッ化物の適正摂取量（栄養学的評価）

分担研究者 西牟田 守 国立健康・栄養研究所健康増進部室長

研究要旨 フッ化物の摂取基準値を作成するために第六次改定日本人の栄養所要量策定に準じ、マンガンの摂取基準と同様な方法で、作成するための要件を求めた。その結果、飲料水中のフッ化物濃度、飲水量、主要食品中のフッ化物濃度、母乳および人工乳のフッ化物濃度を調査し、国民栄養調査の性年齢別食品群別摂取量を利用して、摂取基準値（平均摂取量）を算定できる可能性を示した。

A. 研究目的

フッ化物は必須栄養素としては確立していないが、齲歯予防効果があるとされ、歯牙の発達段階にある若年者などを対象に高濃度のフッ化物を塗布、フッ化物溶液による口腔洗浄等が実施され有効性が確認されている。一方、飲料水中のフッ化物濃度が低い地域では、公衆衛生学的立場から、水道水へフッ化物を添加したり、食塩中にフッ化物を添加することによって、齲歯対策がとられ、有効性が確立されている。

これとは逆に、飲料水中のフッ化物濃度が高い地方では、斑状歯の発生を見ることがあり、また、フッ化物従事者では高濃度フッ化物暴露による健康障害が知られている。

水道水にフッ化物が添加されている地

域や高濃度のフッ化物が飲料水に含まれる地域で加工された食品には高濃度のフッ化物が混在している可能性もあり、それらの食品中のフッ化物濃度の測定は、食品の安全性を確認する上で必須である。

したがって、公衆衛生学的観点から、フッ化物の摂取量を把握し、摂取基準を策定することが重要である。

B. 研究方法

栄養学的な観点から所要量の概念とその定義について最新の知見をもとにレビューした。また生活環境からのフッ化物摂取源を概観し、フッ化物の許容量の定義について調査した。さらに発達段階における各年齢群のごとの摂取量評価法について年齢特性を考慮して検討を加えた。

## C. 研究結果

### 1. 所要量に準じた摂取基準の策定方法

第六次改定日本人の栄養所要量では、特定の集団のほとんどの人（97～98%）が1日の必要量を満たすのに十分な摂取量（平均必要量+2SD）を「栄養所要量」と定めており、平均必要量を算定するのに十分な科学的知見が得られない場合は、特定の集団においてある一定の栄養状態を維持するのに十分な量を所要量として用いている。

フッ化物の場合、必須栄養素として確立されていないので、平均必要量という概念が成立しない。そこで、摂取基準を策定する場合、後者、すなわち、特定集団の平均的摂取量を求め、これを所要量とすることが現時点で最良の方法と思われる。

### 2. フッ化物の供給源

フッ化物は食品中のみならず、飲料水や食品加工に用いる工業水中にも含まれるので、フッ化物の供給量を把握するためには、両者を同時に評価する必要がある。

#### 2-1. 水由来のフッ化物摂取量

飲料水中のフッ化物濃度は水質基準が定められており、地域ごとのフッ化物濃度に関する情報は集積されている。そこで、次年度以降にそれらを解析し、また、一日の食事などに用いる水道水などを見積もり、地域ごと、および、日本人の平均的な水由来のフッ化物摂取量を算定する予定である。

#### 2-2. 食品由来のフッ化物摂取量

食品中のフッ化物濃度に関しては、いくつかの報告がある。また、食事中的フッ化物供給量に関しては、陰膳方式またはマーケットバスケット方式で得られた食事中的フッ化物含有量の測定値も報告されており、次年度以降、国民栄養調査の性年齢別食品群別摂取量等も利用し、性年齢別のフッ化物摂取量を算定する予定である。なお、食品群別摂取量を算定するに当たり必要で、フッ化物濃度が確定していない食品中のフッ化物濃度は、次年度以降測定する。

### 3. 摂取したフッ化物の生物学的有効性

フッ化物の生物学的有効性（吸収率）に関する日本人を対象とした研究がいくつか報告されている。それらのなかで、フッ化物の吸収は、カルシウムの存在下で吸収が抑制される、化合物はフッ化物イオンに比較して吸収が悪いなど、その存在形態や同時に摂取する栄養素によって吸収が異なるとされている。

今年度は、12名の大学生女子を被験者として、カルシウムの摂取量が所要量を満たさない条件で、フッ化物の出納試験を実施した。尿など水溶液中のフッ化物イオン濃度は電極法での測定法が確立されている。しかし、平衡法による前処理法を含む、食事および糞便中のフッ化物含有量測定は回収率が90%とされているので、この点を含めて検討する予定である。