

(図 5, 6) が作製された。装置は円柱状で、① [攪拌槽]、② [分離・循環槽]、③ [上方移動予備静置槽]、④ [下方移動予備静置槽]、⑤ [静置槽] からなる。モーターにより① [攪拌槽] 部で NaF 過飽和溶液が生成される。モーター軸底部には、回転翼が付与され、上方への攪拌をより強化している。また、底部からの吐き出しの影響を最小限にするために、底部に固定翼と底部戻し口整流コイルが設置されている。過飽和混合溶液は移送路を上昇し、② [分離・循環槽] に出る。この時、未飽和溶液は上昇し① [攪拌槽] に戻る。一方、未溶解 NaF 粒子は沈降し、底部の隙間を通過して① [攪拌槽] に戻る。漂っている飽和溶液は底部から③ [上方移動予備静置槽] に移送され、上部から④ [下方移動予備静置槽] に追加移送される。さらに⑤ [静置槽] へと、底部から追加移送される。⑤ [静置槽] に移行した比較的高濃度の溶液は、上澄み液として飽和溶液に純化され回収される。これら装置内部での溶液の動きは、モーターと重力による。(2) NaF 濃度は、生成量 3 リットル以降ではほぼ安定し 3.94%~3.97%であった (図 7)。これらは飽和濃度 4.0%に対して、98.5%~99.3%の達成率であった。

D. 考察

フロリデーションに関する住民学習の成果として、基本事項はかなり浸透してきているといえる。昨年度3月議会には、「フロリデーション (水道水フッ化物濃度調整) の早期実施を求める陳情書」(陳情者: 下仁田フロリデーション推進会議、

代表、市川智旦; 富岡甘楽歯科医師会、会長、鈴木 廣) と 276 名の署名を基にした一般住民からの「フロリデーション (水道水フッ化物濃度調整) の実現を願う要望書」が提出され、審議が行われた。議会の表決は実施については時期尚早との結論であったが、2006 年に町議会・社会常任委員会で趣旨採択された住民への普及啓発についての基本方針は、変更されていない。今年度は、無関心住民への対策について検討してきた。情報伝達の手段として、町内の主要施設、近隣住居へのポスターの掲示が行われた。また、チラシとしてポスターで目にした図柄を目の前にし、手元で読み進めることができることの意味が大きいと考えられ各戸配布に至った。今後さらに、本研究班で作業が進められている DVD を用いた視覚媒体を用いることの意義は大きいと考えられる。また、地場産業であるこんにやくへの影響についての声の一部住民にあったことから、こんにやくの味覚実験を行った。こんにやく作製時の考慮点として水の硬度があげられるが、フロリデーション水は水道水の硬度を変化させることは無く、実際の作業工程上の問題はなかった。今回の実験から、味の区別ができないと答えた者が約 80%であり多数を占めた。しかし、区別できると答えた者が 20%あったこと、その理由に作業工程での灰汁抜きが十分でなかったために条件の統一ができていないことが考えられた。また、実験者に味覚実験の専門的知識が十分でなかったこともあり本実験は参考程度に留めなければならないと考えられた。そこで、味覚実験の専門的ア

ドバイスを受け、フロリデーション水の味覚実験を実施した。結果、フロリデーション水と水道水には変化が生じないことが認められた。今後の体験に加え、情報提供の確かな証拠が得られたものと考えられる。住民の意識・知識調査については、フッ素のむし歯予防効果については、まだ良く理解できていないとの回答が約3割あった。また、天然に存在することを知らない人が約5割、フロリデーションを知らない人が約3割、今回の健康祭までフロリデーション水を飲用しなかった人が約5割であった。今後一層の学習活動の必要性が感じられた。フロリデーション水の味については、「変わらない」「おいしい」が97%に達し、また、今後の飲用、利用についても約90%が望んでいた。以前、我々は、いつも飲んでいる水と「変わらない」、「おいしい」が96%、その後の受け入れとして、「また飲みたい」「どちらでもよい」を選択する割合は97%であったことを報告した²⁾。今回の調査においても、前回調査と同様、住民は、味覚感覚および心理的にも好ましく受け入れていると考えられた。しかし、前回調査以上に今回の意識調査で、50歳代以上が約9割であることから、若年層～壮年層の意見・感想が得られなかった。今後、これらの層を対象とした調査の実施の必要性が考えられた。今後も、住民全体が自分たちの健康保持のため適正な保健行動を選択できるような判断力を育むための支援活動が必要であると思われる。

新型サチュレーターの開発と改良を行うことができた。本装置は、最終的に上

澄み液として回収されるため、4%以上の過飽和溶液は回収されない仕組みとなった。既存サチュレーター（約200リットル容量）は、沈殿NaFの底部に軟水を染込ませ、自然に溶け出す反応を待って溶液を回収する方式³⁾であり、飽和溶液の生成速度は一日10ガロン（38リットル）以下にするとされている⁴⁾。これに比べ、本装置（7.5リットル容量）は生成速度30ml/分で、200リットル規模に換算すると一日1.2トンとなり、約25倍と試算された。10万人口規模での浄水システムにも対応できる。また、中性NaFを用いることから作業環境がより安心できる条件のもと行えるものとして期待される。

E. 文献

- 1) Kleinhesselink RR, Rosa EA: Cognitive representation of risk perceptions :A comparison of Japan and the United States, Journal of Cross-cultural Psychology22;11-28, 1991.
- 2) 小林清吾, 佐久間汐子ら: フロリデーションに関する住民学習活動-3-強い歯を育む住民学習活動の実績, 厚生労働科研「フッ化物応用の総合的研究」報告書; 113-121, 2006.
- 3) Thomas GR: Water Fluoridation A MANUAL FOR ENGINEERS AND TECHNICIANS, U.S. DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES, CDC, 1991.
- 4) CDC: Engineering and Administrative Recommendations for Water Fluoridation, 1995,

RecRecommendations and Reports,
44(RR-13);1-40, 1995.

学術論文
なし

学会発表

1) 田口千恵子, 山内里央, 小林清吾他:
新型フッ化ナトリウム・サチュレーター
の開発, 口腔衛生会誌 57 (4): 466, 2007.

取得状況

申請中: 特願 2007-222374 (平成 19 年 8
月 29 日)

協力研究者

磯崎 篤則 朝日大学歯学部 教授

班外研究者: 田浦勝彦 東北大学講師,
佐久間汐子 新潟大学講師, 八木 稔
新潟大学助教授, 田口千恵子 日本大学
松戸歯学部助手)

知的所有権の

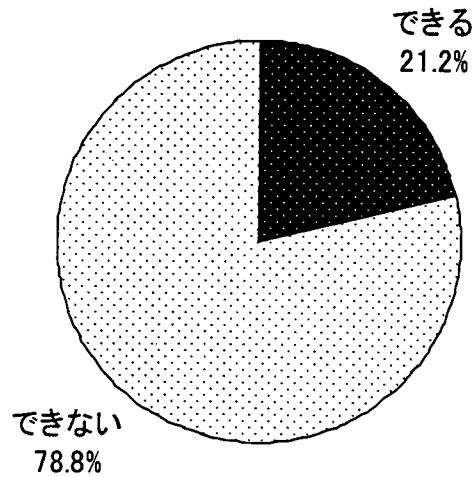


図 1. 2種類のこんにゃくの味の区別の有無

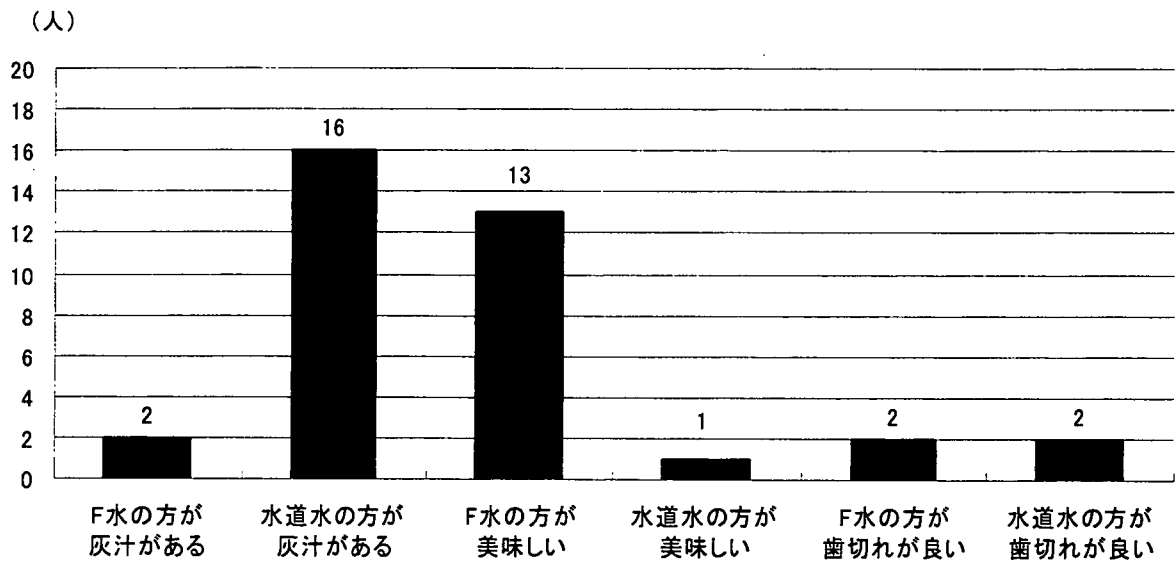


図 2. 区別できると答えた(35人)の理由(重複回答)

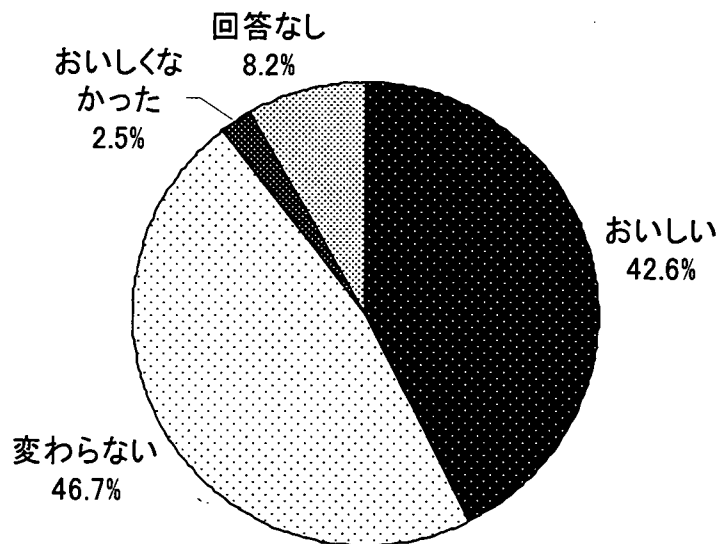


図 3. いつも飲んでいる水と比べて味はどうでしたか? (n=122名)

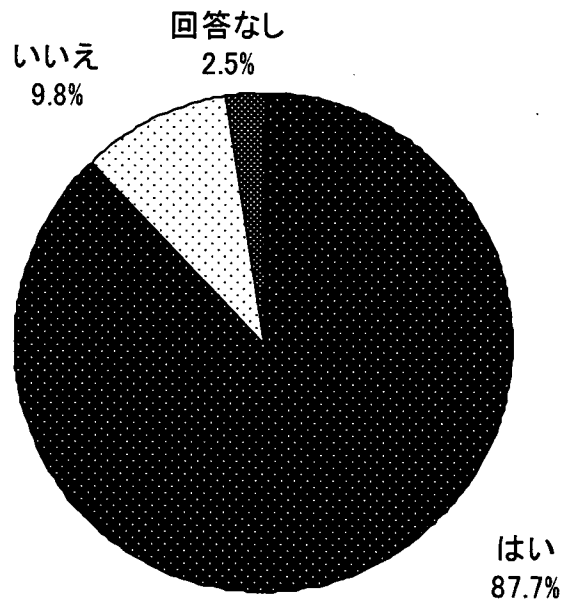


図 4. むし歯予防できるフロリデーション水が近くにあったら、飲んだり利用(料理)したいですか?

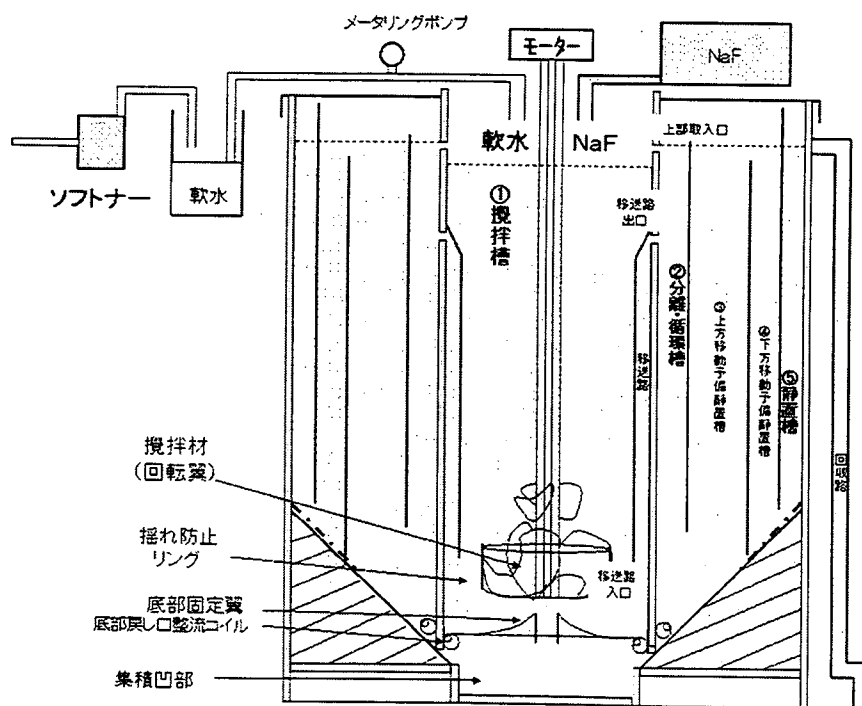


図 5. モデル装置—構造図—

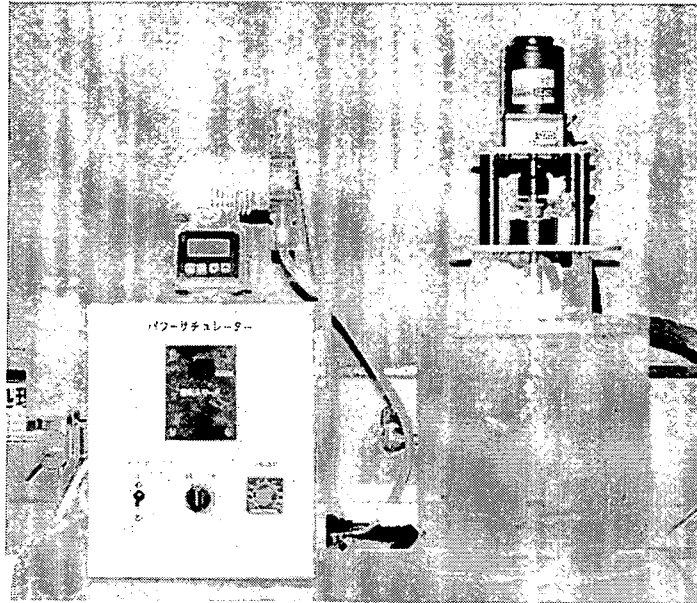


図 6. モデル装置

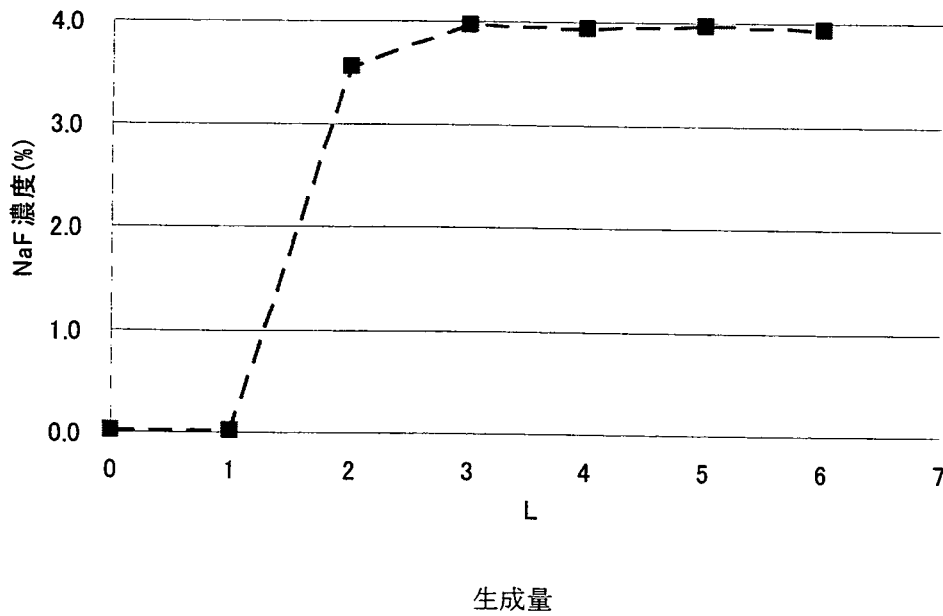


図 7. 生成量とフッ化物濃度

フッ化物局所応用のう蝕予防プログラム

高濃度フッ化物の各種口腔内細菌の生存抑制効果、根面でのフッ化物徐放性システムの接着安定性、およびフッ化物徐放性 S-PRG フィラー根管の評価

分担研究者 高橋信博 東北大学大学院歯学研究科口腔生化学 教授

研究要旨：フッ化物局所応用のう蝕予防プログラムの研究課題は、3つの実験研究で成っている。1) 高濃度フッ化物の各種口腔内細菌の生存抑制効果（高橋報告）、2) 二種類のフッ化物徐放性システムの接着安定性（今里報告）、そして、3) フッ化物徐放性 S-PRG フィラー根管の評価である（福島報告）。研究結果として、1) *S.mutans*, *S.sanguinis*, *P.gingivadli* などの菌種は、900ppmF では死滅は少ないが、9000ppmF では短時間で死滅した。他方、*A.naeshundii* は中性下で 900ppmF で効率的に死滅したが、9000ppmF ではむしろ生存率が上昇した。F 歯面塗布がう蝕ならびに歯周疾患予防に有効であることが示唆された。2) ワンステップ・セルフエッチングシステムを用いて根面の修復を行うと材料からのフッ化物徐放性の有無にかかわらず、初期には安定した接着性が得にくい。3) 本根管を使用しても根管箇所における色素浸透に部位間の差はなかった。また、根管象牙質への F と Sr の取り込みが認められた。そして、本材は、*P.acnes* および *A.israelii*、に抗菌性を示した。以上の結果により、1)高濃度フッ化物は、う蝕と歯周疾患予防に有効性の可能性があること、2)根面フッ化物徐放性接着は初期接着性が悪いこと、3)フッ化物徐放性 S-PRG フィラー根管剤は、F を取り込み、2種の菌種に対して抗菌性を示すことが示唆された。これらの知見はフッ化物のう蝕および歯周疾患予防、根管治療、根面修復の注意と選択基準として活用されることが期待される。

A. 研究目的

フッ化物の歯質強化作用およびう蝕関連菌に対する酸性抑制作用は知られているが、各種口腔内細菌の生存活性へ及ぼす影響については不明な点が多い。高橋報告では、*Streptococcus mutans*, *Streptococcus sanguinis*, *Actinomyces naeshundii*, *Porphyromonas gingivalis*, *Veillonella*

atypica を対象に、高濃度フッ化物の生存活性抑制作用を検討した。今里報告では、根面う蝕の修復治療に適していると考えられるワンステップ・セルフエッチングシステムの中でフッ化物徐放性を有する2種の接着安定性を評価した。さらに、福島報告において新規に試作した S-PRG 根管充填シーラーの、封鎖性、根管壁象牙質への各種イ

オンの取込や抗菌性を評価した。以上が 3 つの実験研究の目的である。

B. 研究方法

高橋実験

1) 使用した菌株および培養条

S. mutans NCTC10449 株、*S. sanguinis* ATCC10556、*Actinomyces naeslundii* WVU 627、*Porphyromonas gingivalis* ATCC33277 及び *Veillonella atypica* ATCC 17744 を用いた。*S. mutans*、*S. sanguinis* 及び *A. naeslundii* は 0.5% グルコースを含む複合液体培地、*P. gingivalis* は 5 μ g/mL ヘミンおよび 0.5 μ g/mL ビタミン K3 を含む複合液体培地、*V. atypica* は 1.8% 乳酸ナトリウムを含む複合液体培地で嫌気条件下（窒素 80%、二酸化炭素 10%、水素 10%）でそれぞれ培養した。

2) 低濃度及び高濃度フッ化物による各種口腔細菌の生存活性に対する阻害作用

(1) 反応系の調整

各細菌懸濁液（OD_{660 nm} = 1.5、0.2 ml）に 0 ppm、900 ppm、9000 ppm となるようにフッ化カリウム溶液を加え、総量をそれぞれ 8.0 mL とした。各反応系を pH 5.5 または 7.0 に調整した後、36°C で攪拌しながらインキュベーションを行った。

(2) 経時的な生存菌数の計測

各反応溶液からインキュベーション前（0 時間）、30 分、1 時間、2 時間後に 0.05 mL を採取、連続段階希釈を行い、寒天培地に播種・培養を行った。培養は全て嫌気条件下（窒素 80%、二酸化炭素 10%、水素 10%）にて行った。*S. mutans*、*S. sanguinis*、*A. naeslundii* および *V. atypica* は培養 4 日後、*P. gingivalis* は培養 7 日後に生育コロニー

数を計測し、コントロール（pH 7.0、0 ppm F⁻、0 時間）の生存率を 100% として、各条件における生存率を算出した。

今里実験

1) 接着界面の形態学的観察

フッ化物徐放性ワンステップ・セルフエッチング接着システムとして、One-Up Bond F（トクヤマデンタル；ON）と Reactmer Bond（松風；RE）の二種を、フッ化物徐放能を有さないコントロールとして Clearfil Tri-S Bond（クラレメディカル；S3）を用いた（表 1）。

ヒト抜去歯の歯頸部よりの唇側根面に、ダイヤモンドバーを用いて 4 mm 幅の round V-shaped 窩洞を形成し、各システムを用いて処理を行った後、それぞれの製造社が市販しているコンポジットレジンを充填した。各システムにつき 6 つの試料を作製し、半数は充填直後に、半数は滅菌蒸留水中に 37°C で 24 時間保管後に、修復物の中心で流水下で半切し、研磨を施して、走査型電子顕微鏡（SEM）により接着界面の観察を行った。

2) 接着強さの測定

ヒト抜去歯の歯頸側 1/3 の唇側根面に、ダイヤモンドバーを用いて箱型窩洞（5 mm x 4 mm、深さ 1 mm）を形成し、前述の実験と同様にして、各システムを用いてコンポジットレジン充填を行った。修復直後または 37°C 下で 24 時間蒸留水中に保管した後、接着面に垂直に薄さ 1 mm の切片を切り出し、1 mm² の接着界面となるようにトリミングした。その後、卓上型万能試験機（EZ Test, シマヅ）を用いて 1 mm/min のクロスヘッドスピードで引張接着試験を

行い、微小引張接着強さ (MTBS) を測定した。1つの修復から1ないし2個の接着試験試料を採取し、2試料の場合はその平均値を算出した。

福島報告

被験材料として、松風社より提供された試作 S-PRG シーラー (SI-R20502; 粉末:ZF-01; 液剤:ZL-05, 松風)を、また、対照材料として酸化亜鉛ユージノール系シーラーである PulpDent® Root Canal Sealer (以下 PulpDent シーラー; 粉末:060926, 液剤:061113, PulpDent, UK) を用いた。

1) 色素浸透試験による歯冠側での根管封鎖性の評価

歯根部根管を15号のK-ファイル(マニ一)で根尖まで穿通し、歯根表面にファイル先端が到達した長さから1mm短縮した長さを作業長とした。次にピーソーリマー(Maillefer)1-3号をそれぞれ約6mm, 4mm, 3mmの作業長で順次用いて根管上部のフレーザー形成を行った後、根管形成用マイクロモーター(Petit End, Dentsply Maillefer)を用いて、ニッケルチタン合金製ファイル(K3, SybronEndo; #40/06テーパー)で作業長まで根管形成を行った。根管洗浄は10%次亜塩素酸ナトリウム液(ネオクリーナ、ネオ製薬)と3%過酸化水素水(オキシドール、吉田製薬)で行った。形成終了後、EDTA含有根管洗浄剤(スメアクリン、日本歯科薬品)を約2分間根管に作用させたのち、再度10%次亜塩素酸ナトリウム液にて根管洗浄した。

これらの試片を無作為に4群(各n=5)にわけ、S-PRGシーラーもしくはPulpDentシーラーとガッタパーチャポイントを併用

した側方加圧根管充填、もしくは、シーラー厚さの影響の検証のためこれらのシーラー単独での糊剤根管充填を行った。また側方加圧根管充填群では、シーラー輸送後、#40/06テーパーのメインポイント(デンツプライ)とアクセサリーポイント(ジーシー)を用いて根管充填し、熱したエクスカーベーターを用いて根管口でポイント切断後、プラグーによる圧接を行い充填終了とした。

作製した試料は、37°C恒温環境下で蒸留水中に60日保管したのち、根尖孔をフロアブルレジン(Filtek Flow, 3M, U.S.A.)で封鎖して、根管口から1mm離れたすべての部分をマニキュアで覆い、0.2%フクシン溶液に24時間浸漬した。根管全周を頬舌、近遠心により四等分し、浸透のみられた区分の数により0から4のスコアを与えた。

得られたデータの統計分析としてKruskal-Wallis検定を行った。

2) 根管象牙質への各種イオンの取り込み観察

実験群の設定及び試片の作製は色素浸透試験と同様に行った。その後、作製した各試片を37°Cの恒温環境下で蒸留水中に7日あるいは60日間保管したのち、根管口から1, 3, 5mmの位置が観察可能となるよう、根管横断面の薄切片を作製した。次いで、波長分散型エックス線マイクロアナライザー(EPMA8705, 島津製作所)を用いて、シーラーとの界面付近の根管壁におけるB, F, Srの分布を観察した。

3) 抗菌性の評価

シーラー硬化試片および練和直後のシーラーについて、培地上での阻止円の形成の有無により抗菌性を評価した。すなわち、硬化試片として、二種のシーラーを練和後、

モールドに注入・硬化させて円盤状試片(直径 10 mm、厚さ 1 mm)とし、これを室温(23 ± 2°C)で 12 時間保管したものをを用いた。また、練和直後のシーラーについては、シーラーを練和し、消毒した CR シリンジにより直ちに培地上に直径 5 mm になるように調整して置くことで作用させた。被験細菌は対数増殖期の *Enterococcus faecalis* ATCC 19433、*Propionibacterium acnes* ATCC 11827 および *Actinomyces israelii* ATCC 10048 の 3 菌種とし、これらの菌数を 10⁵ のオーダーに調整して BHI 血液寒天平板(Becton Dickinson, Maryland, USA)に塗抹したものを実験に供した。寒天平板上にシーラー硬化試片および練和直後のシーラーを静置し、37°C、24 時間嫌気培養を行ったのち、試片周囲の阻止円の有無を観察した。

C. 研究結果

1) 高橋報告

(1) *S. mutans* 及び *S. sanguinis* に対する影響

9000 ppm F は両菌種を効率的に死滅させ、その殺菌効率は、両菌種共に中性環境において弱く、酸性環境において強いことがわかった。

(2) *A. naeslundii* に対する影響

9000 ppm F 及び 900 ppm F のフッ化カリウムの *A. naeslundii* に対する殺菌効率は、中性環境で強く、酸性環境で弱いことがわかった。

(3) *P. gingivalis* に対する影響

900 ppm F 存在下における 2 時間後の生存率は、pH 7.0、5.5 共に 100%を保ったが、9000 ppm F 存在下では pH 7.0、

5.5 共に 30 分後 4.5%以下に低下した。

9000 ppm F は *P. gingivalis* を効率的に死滅させた。その殺菌効率は酸性・中性両 pH 環境において強かった。

(4) *V. atypica* に対する影響

900 ppm F 及び 9000 ppm F 存在下、2 時間後、pH 7.0 及び 5.5 において生存率は 51%以上保たれた。フッ化カリウムの *V. atypica* に対する殺菌効率は、両 pH 環境において弱かった。

2) 今里報告

(1) 接着界面の形態学的観察

修復直後では、ON と S3 で 3 試料のうち 2 試料が、RE では 3 試料すべてに界面の剥離が観察された。有意差は認められなかったものの (Kruskal-Wallis test, $p > 0.05$)、RE では ON と S3 よりも界面剥離の発生率が高めであり、また剥離の幅も 7-10 μm と大きかった。これに対して、24 時間保管後試料では、いずれの接着システムでも剥離はまったく認められなかった。一方、レブリカ試料の観察でも、3 システムとも、被験 2 試料ともに界面の剥離が認められた。しかし、ON と S3 では剥離幅が歯質での界面観察時と同様であったのに対し、RE では歯質試料の場合よりも小さかった。

(2) 接着強さの測定

修復直後と 24 時間後の MTBS では各期間において、3 つの材料間に有意差は認められなかった (ANOVA および Fisher's PLSD test, $p > 0.05$)。また、各システムとも、修復直後と 24 時間後の MTBS に有意差は認められなかった (student *t* test, $p > 0.05$)。

福島報告

(1) S-PRG シーラーの根管封鎖性

S-PRG シーラー、PulpDent シーラーとも、ガッタパーチャポイント併用の有無によらず、根尖側に向かうに従い色素浸透を示す試料数は次第に減少し、5mm の位置では全ての試片で色素浸透は認められなかった。

(2) 各種イオンの取り込み

S-PRG シーラーによる糊剤根管充填群では、根管壁象牙質に F および Sr が 10-50 μm の深さまで取り込まれていることが観察された。PulpDent シーラー充填群では、いずれの実験条件においても三種の元素の取り込みは観察されなかった。

(3) S-PRG シーラーの抗菌性

A. israelii を被験菌種とした場合は、S-PRG シーラーおよび PulpDent シーラーにより、それぞれ最小幅 3-5 mm の阻止円が観察された。また、*P. acnes* に対しても、二種のシーラーを作用させることで最小幅約 2-2.5 mm の阻止円の形成が確認された。一方、*E. faecalis* に対する阻止円の形成はみられなかった。

D, 考察

高橋報告

高濃度のフッ化物 (9000 ppm F) の殺菌作用は、両 pH 環境または中性環境において *S. mutans*、*S. sanguinis*、*A. viscosus*、*P. gingivalis* で強く、*V. atypica* で弱かったことから、同剤は殺菌作用を有すること及び同剤に対する感受性・非感受性菌が存在することが明らかとなった。*A. viscosus* において、中性環境における 900 ppm F への

感受性が高いことは、過去の報告と一致していたが、本研究の結果、その殺菌効率は酸性よりも中性環境において強いことがわかった。従って、同剤の殺菌作用は、環境 pH の酸性化によるフッ素イオンの解離および菌体内への浸透によって生ずる酸産生抑制作用、すなわち酸性環境でその効果が強くなるメカニズムとは、全く異なるメカニズムであることが考えられた。現在、これらフッ化イオンの殺菌効果のメカニズムについて検討中である。

今里報告

ガラスアイオノマー硬化機構の包含は概して界面の安定性には影響を及ぼさないという結果が得られたが、RE では、修復直後にすべての試料で界面の剥離が認められ、また、SEM 観察のための乾燥による剥離幅の増大が確認された。この事実は、RE の硬化にはガラスアイオノマー反応がより強く関わっており、界面の安定性が他のシステムよりもやや損なわれやすいことを意味している。フッ化物徐放という点では、ガラスアイオノマー硬化機構の採用は単純に NaF 等のフッ化物を混入する方法に比べると有利かも知れないが、初期からの接着安定性を獲得するうえでは最適な材料設計デザインではないものと考えられる。

福島報告

今回の実験条件ではシーラー単独 (糊剤根管充填) と側方加圧根管充填との間に封鎖性の有意差は認められなかったが、特に S-PRG シーラーの層が厚い場合の長期的な封鎖性については今後の検討が必要と思われる。今回 EPMA による元素分析を行っ

たところでは、S-PRG シーラーと接触した根管壁象牙質において、F 及び Sr の分布は明瞭に確認された一方、B に関してはシーラー内での存在は確認されたものの、根管壁への取り込みは明瞭には検出できなかった。

他方、Sr の根管壁象牙質への取り込みは明確に示すことができた。S-PRG シーラー、PulpDent シーラーとも *E. faecalis* には抗菌性を示さなかったが、*P. acnes*, *A. israelii* には練和直後のみならず練和後 12 時間経過した硬化体においても概ね同等の抗菌性を示した。このことから、S-PRG シーラーは、感染根管内に認められるすべての細菌に対して抗菌性を示さないと思われるものの、少なくとも硬化後 12 時間までは、根管内に残存した細菌に対して抗菌性を持続させることが示唆された。

E. 結論

高橋報告

高濃度のフッ化物は殺菌作用を有し、同剤による歯面塗布がう蝕、歯肉炎、特に歯周病予防に有効である可能性が示唆された。成人に対する高濃度フッ化物局所応用は一部でしか行われていないが、本研究の結果から、同方法は小児から高齢者に至る、幅広い年齢層において有効な各種口腔疾患予防法になりうることが示唆された。

今里報告

二種のフッ化物徐放性ワンステップタイプ・セルフエッチング接着システムの根面修復における接着安定性は、フッ化物徐放能を有さないシステムと大きな差がなく、いずれも、修復直後では安定性が不十分で、

24 時間経過後には安定した状態となることが明らかになった。

福島報告

多元素徐放性 S-PRG フィラーが添加された試作根管充填用シーラー (S-PRG シーラー) について、封鎖性、歯質への各種元素の取込み、および抗菌性について検討を行い、以下の所見が得られた。

1. 試作 S-PRG シーラーの根管封鎖性は、シーラー単独根管充填、ガッタパーチャポイントを用いた側方加圧根管充填のいずれの場合も、対照として用いた酸化亜鉛ユーージノール系シーラーと同程度であった。
2. S-PRG シーラーを用いた根管充填後に根管壁象牙質への F、Sr の取り込みが確認された。B の取り込みは明瞭には観察されなかった。
3. S-PRG シーラーは、練和直後のみならず練和 12 時間後の硬化体についても、*P. acnes* および *A. israelii* に対し抗菌性を示した。*E. faecali* に対する抗菌性は認められなかった。

F.文献

高橋報告

1) Chow LC, Brown WE. Reaction of dicalcium phosphate dihydrate with fluoride. J Dent Res 1973; 52: 1220-1227.

2) Kaufmann M, Bartholmes P. Purification, characterization and inhibition by fluoride of enolase from *Streptococcus mutans* DSM 320523. Caries Res 1992; 26: 110-116.

- 3) Curran TM, Buckley DH, Marquis RE. Quasi-irreversible inhibition of enolase of *Streptococcus mutans* by fluoride. *FEMS Microbiol Lett* 1994; 119: 283-288.
- 4) Mandell RL. Sodium fluoride susceptibilities of suspected periodontopathic bacteria. *J Dent Res* 1983; 62: 706-708.
- 5) Yotis WW. The action of sodium fluoride on suspected periodontopathogens. *J Periodont Res* 1988; 23: 340-344.
- 6) Malts M. and Emilson CG. Susceptibility of oral bacteria to various fluoride salts. *J Dent Res* 1982; 61: 786-790.

今里報告

- 7) Kaneshiro AV, Imazato S, Ebisu S: Comparison of bonding ability of single-step self-etching adhesives with different etching aggressiveness to root dentin. *Dent Mater J* 26 (6): 773-784, 2007.
- 8) 今里 聡, 桃井保子: 根面う蝕の特徴と処置, 歯科臨床研修マニュアル アドバンス編 ひとつうえをめざす研修医のために (覚道健治, 前田芳信, 栗田賢一, 古谷野 潔, 高橋 哲, 中川種明 編), 永末書店, 東京, pp. 51-54, 2007.
- 9) 今里 聡, 福西一浩: コンポジットレジンのボンディングシステムは何を使用しているか, *The Quintessence YEAR BOOK 2008 現代の治療指針 歯周治療と全治療分野編*, クインテッセンス出版,

東京, pp. 242-243, 2008.

- 10) Frencken JE, Imazato S, Toi C, Mulder J, Mickenautsch S, Takahashi Y, Ebisu S: Antibacterial effect of chlorhexidine containing glass-ionomer cement in vivo; a pilot study. *Caries Res* 41 (2): 102-107, 2007.

福島報告

- 11) Creanor S.L, Carruthers L.M.C, Saunders W.P, Strang R & Foye R.H: Fluoride uptake and release characteristics of glass ionomer cements; *Caries Res* 28 322-328, 1994.
- 12) Creanor S.L, Saunders W.P, Carruthers L.M.C, Strang R, Foye H.R: Effect of extrinsic fluoride concentration on the uptake and release of fluoride from two glass ionomer cement, *Caries Res* 29, 424-426, 1995.
- 13) Forsten L: Short and long-term fluoride release from glass-ionomers and other fluoride-containing filling materials in vitro; *Scand J Dent Res* 98, 179-185, 1990.
- 14) Pommel L, About I, Pashley D, Camps J: Apical leakage of four endodontic sealers; *J Endod* 29, 208-210, 2003.
- 15) Chailertvanitkul P, Saunders WP, MacKenzie D: Coronal leakage in teeth root-filled with gutta-percha and two different sealers after long-term storage; *Endod Dent Traumatol* 13, 82-87. 1997.
- 16) Rohde TR, Bramwell JD, Hutter JW, Roahen, JO: An *in vitro* evaluation of microleakage of a new root canal sealer; *J*

Endod 22, 365-368, 1996.

G. 学術論文

論文

高橋報告

- 1) Sato R, Sato T, Takahashi I, Sugawara J, Takahashi N: Profiling of bacterial flora in crevices around titanium orthodontic anchor plates. *Clin Oral Implants Res* 18(1): 21-26, 2007.
- 2) Shimonishi M, Hatakeyama J, Sasano Y, Takahashi N, Uchida T, Kikuchi M, Komatsu M: *In vitro* differentiation of epithelial cells cultured from human periodontal ligament. *J Periodontal Res* 42(5): 456-465, 2007.
- 3) Shimonishi M, Hatakeyama J, Sasano Y, Takahashi N, Komatsu M, Kikuchi M. Mutual induction of noncollagenous bone proteins at the interface between epithelial cells and fibroblasts from human periodontal ligament. *J Periodont Res* 43(1): 64-75, 2008.
- 4) Shimizu K, Igarashi K, Takahashi N. Chair-side evaluation of pH-lowering activity and lactic acid production of dental plaque: correlation with caries experience and caries incidence in preschool children. *Quint Int* 38(2): in press, 2008.
- 5) Sato T, Matsuyama J, Mayanagi G, Abiko Y, Kato K, Takahashi N: Nested PCR for the sensitive detection of cariogenic bacteria. *Cariology Today* 3(1): in press, 2008.

今里報告 (再掲)

- 6) Kaneshiro AV, Imazato S, Ebisu S: Comparison of bonding ability of single-step self-etching adhesives with different etching aggressiveness to root dentin. *Dent Mater J* 26 (6): 773-784, 2007.
- 7) 今里 聡, 桃井保子: 根面う蝕の特徴と処置, 歯科臨床研修マニュアル アドバンス編 ひとつうえをめざす研修医のために (覚道健治, 前田芳信, 栗田賢一, 古谷野 潔, 高橋 哲, 中川種明 編), 永末書店, 東京, pp. 51-54, 2007.
- 8) 今里 聡, 福西一浩: コンポジットレジンのボンディングシステムは何を使用しているか, The Quintessence YEAR BOOK 2008 現代の治療指針 歯周治療と全治療分野編, クインテッセンス出版, 東京, pp. 242-243, 2008.
- 9) Frencken JE, Imazato S, Toi C, Mulder J, Mickenautsch S, Takahashi Y, Ebisu S: Antibacterial effect of chlorhexidine containing glass-ionomer cement in vivo; a pilot study. *Caries Res* 41 (2): 102-107, 2007.

福島報告

- 10) 試作 S-PRG フィラー含有根管充填用シーラーに関する研究 -根管封鎖性、抗菌性および根管壁への各種イオンの移行について- 韓 臨麟、竹中彰治、興地隆史日本歯科保存学雑誌、50 巻、6 号、713-720, 2007.
- 11) Evaluation of Physical Properties and Surface Degradation of the

Self-adhesive Resin Cement Linlin HAN, Akira OKAMOTO, Masayoshi FUKUSHIMA and Takashi OKIJI. *Dent Mater J* 26(6): 906-914, 2007

学会発表

- 1) Nakajo K, Takahashi Y, Kiba W, Imazato S, Takahashi N: Fluoride released from glass-ionomer cement is responsible to inhibit the acid production of caries-related oral streptococci. The 2nd International Symposium for Interface Oral Health Science (Sendai), February 19, 2007. Program and Abstracts of the International Symposium for Interface Oral Health Science, p. 45, 2007.
- 2) 岡村健司, 林 美加子, 今里 聡, 高橋 豊, Evgeni Koychev: 象牙質接着システムおよびレジンセメントの根管象牙質への接着強さ—根管内の部位が及ぼす影響. 第 49 回日本歯科理工学会・第 25 回接着歯学会合同学術大会, 2007 年 5 月 12 日, 札幌市.
- 3) 韓 臨麟、岡本 明、福島正義、興地隆史: セルフアドヒーシブレジンセメントに関する研究: 第 49 回日本歯科理工学

術大会、2007 年 5 月 11-12 日北海道

協力研究者

今里 聡

大阪大学大学院歯学研究科口腔分子感染制御学講座 准教授

福島正義

新潟大学歯学部口腔生命福祉学科教授

班員外協力研究者

中條 和子 東北大学大学院歯学研究科
口腔生物学講座 助教

鷺尾 純平 東北大学大学院歯学研究
口腔生物学講座 助教

土門ひろ美 東北大学大学院歯学研究科
口腔保健発育学講座 大学院生

堀 はるみ 東北大学大学院歯学研究科
口腔生物学講座 非常勤講師

アンドレア・ビビアナ・カネシロ

大阪大学大学院歯学研究科

COE 特任研究員

高橋雄介 大阪大学大学院歯学研究科
助教

韓 臨麟 新潟大学歯学部 助教

フッ化物局所応用のう蝕予防プログラム

高濃度フッ化物の口腔内細菌に対する生存抑制効果

分担研究者 高橋 信博 東北大学大学院歯学研究科 口腔生物学講座 教授

研究要旨：フッ化物の歯質強化作用及びう蝕関連菌に対する酸産生活性抑制作用は知られているが、各種口腔内細菌の生存活性へ及ぼす影響については不明な点が多い。そこで本研究では、*Streptococcus mutans*、*Streptococcus sanguinis*、*Actinomyces naeslundii*、*Porphyromonas gingivalis*、*Veillonella atypica*を対象に、高濃度フッ化物の生存活性抑制作用を検討した。

900 ppm フッ素イオン（900 ppm F⁻）に30分間曝すと、*S. mutans*、*S. sanguinis*、*P. gingivalis*、*V. atypica*の生存率は69%（pH 7.0、0 ppm F⁻、0分間曝露の生存率を100%とした）以上と高く、フッ素イオンを加えない場合と同程度であった。9000 ppm F⁻に30分間曝すと、*S. mutans*、*S. sanguinis*、*P. gingivalis*はそれぞれpH 7.0では32、23、5%、pH 5.5では15、34、1%と低下したが、*V. atypica*は68%以上を保った。一方、*A. naeslundii*においては、900 ppm F⁻に30分間曝すと、生存率は、pH 7.0では7%と低下したが、pH 5.5では27%であった。しかし、9000 ppm F⁻に30分間曝すと、生存率は、pH 7.0では18%となり、pH 5.5では60%を保った。

以上のことから、*S. mutans*、*S. sanguinis*、*P. gingivalis*は900 ppm F⁻に曝されてもあまり死滅しないが、9000 ppm F⁻に曝されると短時間で死滅すること、*A. naeslundii*は中性環境で900 ppm F⁻に曝されると効率的に死滅し、9000 ppm F⁻ではむしろ生存率が上昇することが明らかになった。同剤による歯面塗布がう蝕及び歯周疾患予防に有効である可能性が示唆された。

A. 研究目的

フッ化物は様々な方法で口腔へ応用されており、フッ素配合歯磨剤（1000 ppm F⁻）及びフッ化物洗口液（100 - 900 ppm F⁻）、フッ化物歯面塗布剤（9000-1230 ppm F⁻）として広く用いられている。これらの局所応用法はいずれもフッ化物の有する

歯質強化及び再石灰化促進作用によるう蝕予防効果を期待するものである。部分的にエナメル質のハイドロキシアパタイトのOH基がフッ素と置換され、あるいは一旦脱灰したハイドロキシアパタイトが再石灰化する際にフルオロアパタイトが形成され、酸に対する溶解性が低下す

ることが報告されている¹⁾。これが歯質強化及び再石灰化促進作用であり、現在、フッ化物局所応用の主な目的として認められている。さらにフッ化物は、う蝕関連菌の糖代謝を阻害し、結果として歯面脱灰の原因となる酸の酸性を抑制すると考えられている^{2, 3)}。

しかし、これらの研究の多くは 1-500 ppm F 程度の低濃度のフッ化物を糖質と共存させ、その時の酸産生の抑制程度を見たものであり、局所的・短時間に用いられる高濃度のフッ化物の抗菌効果についてはほとんど検討されていない。一方、歯周炎関連菌についても低濃度のフッ化物に対する基礎的研究が行われ、フッ化物が共存すると増殖が完全に抑制されると報告されている^{4, 5)}。しかしながら、低濃度及び高濃度フッ化物曝露後のこれら歯周病関連菌をはじめとする各種口腔細菌種への影響については不明である。

そこで本研究では、各種濃度のフッ化物が代表的口腔疾患関連細菌（う蝕・歯肉炎・歯周炎・生理的口臭関連口腔細菌）の生存、増殖にどのような影響を及ぼすかについて検討する。対象とする口腔細菌種として、*Streptococcus mutans*（う蝕関連菌）、*Streptococcus sanguinis*（う蝕関連菌）、*Actinomyces naeslundii*（根面う蝕及び歯肉炎関連菌）、*Porphyromonas gingivalis*（歯周病関連菌）及び *Veillonella atypica*（生理的口臭関連菌）を用いた。

B. 研究方法

1. 使用した菌株および培養条件

S. mutans NCTC10449 株、*S. sanguinis* ATCC10556、*Actinomyces naeslundii* WVU

627、*Porphyromonas gingivalis* ATCC33277 及び *Veillonella atypica* ATCC 17744 を用いた。*S. mutans*、*S. sanguinis* 及び *A. naeslundii* は 0.5% グルコースを含む複合液体培地、*P. gingivalis* は 5 μ g/mL ヘミンおよび 0.5 μ g/mL ビタミン K3 を含む複合液体培地、*V. atypica* は 1.8% 乳酸ナトリウムを含む複合液体培地で嫌気条件下（窒素 80%、二酸化炭素 10%、水素 10%）でそれぞれ培養した。いずれの菌株も OD^{660 nm} = 0.9-1.0 にて集菌、洗菌後、菌懸濁液を 2 mM リン酸緩衝液（150 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 2 mM Potassium phosphate (pH 7.0)）を用いて OD^{660 nm} = 1.5 に調整した。

2. 低濃度及び高濃度フッ化物による各種口腔細菌の生存活性に対する阻害作用

(1) 反応系の調整

各細菌懸濁液（OD^{660 nm} = 1.5、0.2 ml）に 0 ppm、900 ppm、9000 ppm となるようにフッ化カリウム溶液を加え、総量をそれぞれ 8.0 mL とした。各反応系を pH 5.5 または 7.0 に調整した後、36°C で攪拌しながらインキュベーションを行った。反応系の調整およびインキュベーションは、酸素存在下においても生存・増殖可能な *S. mutans* 及び *S. sanguinis* については好気条件にて行ったが、その他の嫌気性菌については嫌気条件（窒素 90%、水素 10%）にて行った。

(2) 経時的な生存菌数の計測

各反応溶液からインキュベーション前（0 時間）、30 分、1 時間、2 時間後に 0.05 mL を採取、連続段階希釈を行い、寒天培地に播種・培養を行った。培養は全て嫌

気条件下（窒素 80%，二酸化炭素 10%，水素 10%）にて行った。なお、寒天培地は、*S. mutans*、*S. sanguinis*、*A. naeslundii* および *V. atypica* は前述の複合液体培地に 1.5% 寒天を加えたものを用い、*P. gingivalis* のみ、5% 羊血液添加寒天培地を用いた。

S. mutans、*S. sanguinis*、*A. naeslundii* および *V. atypica* は培養 4 日後、*P. gingivalis* は培養 7 日後に生育コロニー数を計測し、コントロール（pH 7.0、0 ppm F、0 時間）の生存率を 100% として、各条件における生存率を算出した。

A. 結果

(1) *S. mutans* 及び *S. sanguinis* に対する影響

900 ppm F 存在下、30 分後及び 2 時間後の生存率は、pH に関わらず 2 菌種共に 69% 及び 61% 以上を保ち、フッ化物が存在しない場合（0 ppm F）と同程度であった。9000 ppm F 存在下では、pH 7.0 において *S. mutans* 及び *S. sanguinis* の生存率は 30 分後、それぞれ 32%、23% に低下し、さらに 2 時間後、それぞれ 9%、3% に低下した。pH 5.5 においては、*S. mutans* 及び *S. sanguinis* の生存率は 30 分後、それぞれ 15%、34% に低下し、さらに 2 時間後、両菌種共に 1% まで低下した。

以上のことから、9000 ppm F は両菌種を効率的に死滅させ、その殺菌効率は、両菌種共に中性環境において弱く、酸性環境において強いことがわかった。

(2) *A. naeslundii* に対する影響

900 ppm F 存在下における 30 分後及

び 2 時間後の生存率は、pH 7.0 では 100% 及び 7% と低下したが、pH 5.5 では 100% 及び 27% であった。一方、9000 ppm F 存在下における 30 分後及び 2 時間後の生存率は、pH 7.0 では 18% 及び 3% に低下したが、pH 5.5 では 60% 及び 67% を保った。

以上のことから、9000 ppm F 及び 900 ppm F のフッ化カリウムの *A. naeslundii* に対する殺菌効率は、中性環境で強く、酸性環境で弱いことがわかった。

(3) *P. gingivalis* に対する影響

900 ppm F 存在下における 2 時間後の生存率は、pH 7.0、5.5 共に 100% を保ったが、9000 ppm F 存在下では pH 7.0、5.5 共に 30 分後 4.5% 以下に低下した。

9000 ppm F は *P. gingivalis* を効率的に死滅させた。その殺菌効率は酸性・中性両 pH 環境において強かった。

(4) *V. atypica* に対する影響

900 ppm F 及び 9000 ppm F 存在下、2 時間後、pH 7.0 及び 5.5 において生存率は 51% 以上保たれた。フッ化カリウムの *V. atypica* に対する殺菌効率は、両 pH 環境において弱かった。

C. 考察

高濃度のフッ化物（9000 ppm F）の殺菌作用は、両 pH 環境または中性環境において *S. mutans*、*S. sanguinis*、*A. viscosus*、*P. gingivalis* で強く、*V. atypica* で弱かったことから、同剤は殺菌作用を有すること及び同剤に対する感受性・非感受性菌が存在することが明らかとなった。*A.*

viscosus において、中性環境における 900 ppm F⁻への感受性が高いことは、過去の報告と一致していたが⁶⁾、本研究の結果、その殺菌効率は酸性よりも中性環境において強いことがわかった。従って、同剤の殺菌作用は、環境 pH の酸性化によるフッ素イオンの解離および菌体内への浸透によって生ずる酸産生抑制作用、すなわち酸性環境でその効果が強くなるメカニズムとは、全く異なるメカニズムであることが考えられた。現在、これらフッ化イオンの殺菌効果のメカニズムについて検討中である。

E. 結論

以上のことから、高濃度のフッ化物は殺菌作用を有し、同剤による歯面塗布がう蝕、歯肉炎、特に歯周病予防に有効である可能性が示唆された。成人に対する高濃度フッ化物局所応用は一部でしか行われていないが、本研究の結果から、同方法は小児から高齢者に至る、幅広い年齢層において有効な各種口腔疾患予防法になりうる可能性が示唆された。

F. 文献

- 1) Chow LC, Brown WE. Reaction of dicalcium phosphate dihydrate with fluoride. *J Dent Res* 1973; 52: 1220-1227.
- 2) Kaufmann M, Bartholmes P. Purification, characterization and inhibition by fluoride of enolase from *Streptococcus mutans* DSM 320523. *Caries Res* 1992; 26: 110-116.

- 3) Curran TM, Buckley DH, Marquis RE. Quasi-irreversible inhibition of enolase of *Streptococcus mutans* by fluoride. *FEMS Microbiol Lett* 1994; 119: 283-288.
- 4) Mandell RL. Sodium fluoride susceptibilities of suspected periodontopathic bacteria. *J Dent Res* 1983; 62: 706-708.
- 5) Yotis WW. The action of sodium fluoride on suspected periodontopathogens. *J Periodont Res* 1988; 23: 340-344.
- 6) Malts M. and Emilson CG. Susceptibility of oral bacteria to various fluoride salts. *J Dent Res* 1982; 61: 786-790.

G. 学術論文

論文

- 1) Sato R, Sato T, Takahashi I, Sugawara J, Takahashi N: Profiling of bacterial flora in crevices around titanium orthodontic anchor plates. *Clin Oral Implants Res* 18(1): 21-26, 2007.
- 2) Shimonishi M, Hatakeyama J, Sasano Y, Takahashi N, Uchida T, Kikuchi M, Komatsu M: *In vitro* differentiation of epithelial cells cultured from human periodontal ligament. *J Periodontal Res* 42(5): 456-465, 2007.
- 3) Shimonishi M, Hatakeyama J, Sasano Y, Takahashi N, Komatsu M, Kikuchi M. Mutual induction of noncollagenous bone proteins at the interface between epithelial cells and fibroblasts from human periodontal ligament. *J Periodont Res* 43(1): 64-75, 2008.

- 4) Shimizu K, Igarashi K, Takahashi N.
Chair-side evaluation of pH-lowering activity and lactic acid production of dental plaque: correlation with caries experience and caries incidence in preschool children. *Quint Int* **38(2)**: in press, 2008.
- 5) Sato T, Matsuyama J, Mayanagi G, Abiko Y, Kato K, Takahashi N: Nested PCR for the sensitive detection of cariogenic bacteria. *Cariology Today* **3(1)**: in press, 2008.

著書

- 1) Sato T, Abiko Y, Mayanagi G, Matsuyama J, Takahashi N: Detection of periodontopathic bacteria in periodontal pockets by nested polymerase chain reaction. In: *Interface Oral Health Science 2007*, Springer, Tokyo, in press, 2007.
- 2) Nakajo K, Takahashi Y, Kiba W, Imazato S, Takahashi N: Fluoride released from glass-ionomer cement is responsible to inhibit the acid production of caries-related oral streptococci. In: *Interface Oral Health Science 2007*, Springer, Tokyo, in press, 2007.
- 3) Washio J, Nakajo K, Sato T, Matoba S, Seki T, Yamamoto N, Yamamoto M, Takahashi N: The hydrogen sulfide production by oral *Veillonella*: effects of substrate and environmental pH. In: *Interface Oral Health Science 2007*, Springer, Tokyo, in press, 2007.
- 4) Miyasawa-Hori H, Aizawa S, Washio J, Takahashi N: Inhibitory effects of maltotriitol on the growth and the adhesion of mutans streptococci. In: *Interface Oral Health Science 2007*, Springer, Tokyo, in press, 2007.
- 5) Abiko Y, Sato T, Mayanagi G, Takahashi N: Profiling of subgingival plaque biofilm microflora of healthy and periodontitis subjects by real-time PCR. In: *Interface Oral Health Science 2007*, Springer, Tokyo, in press, 2007.
- 6) Ito Y, Sato T, Mayanagi G, Yamaki K, Shimauchi H, Takahashi N: Microflora profiling of root canal utilizing real-time PCR and cloning-sequence analyses based on 16S rRNA genes -Differences between before and after root canal treatments-. In: *Interface Oral Health Science 2007*, Springer, Tokyo, in press, 2007.
- 7) Masaki M, Sato T, Sugawara Y, Sasano T, Takahashi N: *Candida* species as members of oral microflora in oral lichen planus. In: *Interface Oral Health Science 2007*, Springer, Tokyo, in press, 2007.
- 8) Miyoshi Y, Watanabe M, Takahashi N: Gelatinase activity in human saliva and its fluctuation in the oral cavity. In: *Interface Oral Health Science 2007*, Springer, Tokyo, in press, 2007.
- 9) Aizawa S, Miyasawa-Hori H, Mayanagi H, Takahashi N: The effect of amylase and its inhibitors on acid production from starch by *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sanguinis*. In: *Interface*