

関があることを報告している。また、緑茶やウーロン茶と正の相関 (Spearman  $\gamma = 0.406$ ,  $p = 0.000$ ;  $\gamma = 0.274$ ,  $p = 0.000$ )、麦茶と負の相関 ( $\gamma = -0.243$ ,  $p = 0.000$ )がある。緑茶やウーロン茶摂取量から推定したフッ化物摂取量と飲食物から実測したフッ化物摂取量の重回帰分析は、重相関係数  $R = 0.73$  ( $p = 0.000$ )、調整済み決定係数  $R^2 = 0.53$  である。

そして、飲料の摂取量や食品摂取量は村上ら(2003)<sup>6)</sup>の調査では3-5歳児においては、飲食物の総摂取量も飲料の総摂取量も、ともに最高気温 ( $\gamma_s = 0.299$ ,  $p < 0.001$ ;  $\gamma_s = 0.472$ ,  $p < 0.001$ )と最低気温 ( $\gamma_s = 0.278$ ,  $p < 0.001$ ;  $\gamma_s = 0.442$ ,  $p < 0.001$ )に相関し、飲料は、夏 580g (SD 200)、秋 697g (269g)、冬 367g (SD 176)で、有意な季節差がみられる ( $p < 0.01$ )。Zohouri FV と Rugg-Gunn AJ (2000)<sup>8,9)</sup>のイランの4歳児の結果でも、飲料の摂取量は気温に影響を受け夏に多く、フッ化物摂取量に季節差がある。しかしながら、Y市 ( $< 0.16$  ppmF)での飲食物からのフッ化物摂取量 (F mg/day) そのものは最高気温や最低気温と相関していない。有意な季節差も認められない<sup>5,6)</sup>。Kimuraら(2001)<sup>10)</sup>の1-6歳児の結果でも同様に有意な季節差はみられない。年間の四季気温の変化が近似する日本の両地域の幼児の場合には、夏や秋にはフッ化物濃度の低い麦茶が多飲され、冬にはフッ化物濃度の高い緑茶が飲用されている食文化が影響することで、飲料の摂取量には季節差や温度差がありながらフッ化物摂取量ではそれらの差が相殺されたと推測する。

陰膳法による日本の幼児の食事からのフッ化物摂取量は、Y地区(年平均気温  $16.4^\circ\text{C}$ ,  $< 0.16$  ppmF<sup>-</sup>, 3-5歳児)で、平均  $0.29$  mg/day ( $0.017$  mg/kg BW)<sup>1)</sup>、これは年平均気温がほぼ同じ ( $16.3^\circ\text{C}$ )であるKimuraら(2001)<sup>10)</sup>の報告に一致している。日本の水道水のF濃度は  $0.16$  ppm未満地区が  $93.7\%$ で<sup>11)</sup>、これらの摂取量は日本の幼児の平均的な食事からのフッ化物摂取量と推察でき、同じく非フッ化物添加地域でのUSAやハンガリーの食事調査値  $0.21-0.22$  mg/day (Ophaugら<sup>12)</sup>、Schamschlaら<sup>13)</sup>)やニュージーランドの陰膳法値  $0.15$  mg/day (Chowdhuryら<sup>14)</sup>)より高い。

このことは、日本人は海藻、魚やお茶などフッ化物の多い食品を摂取する頻度が高い食文化をもっていることによると考える。日本の幼児のフッ化物摂取量は、食品群との相関でも他のミネラルと比較して特異的で、他のミネラルと異なり、魚介類の摂取量に特異的に相関していると言える。

フッ化物の飲み込み量(口腔内残留量)を加えても最大値で米国のULを超えることなく、平均値で米国AIの1/2程度である。食事からに限定すると、平均値で米国AIの1/3程度と少ないが、この程度の量であっても5歳児のd菌数と有意な負の相関 ( $r = -0.324$ )を示しており、う蝕予防に関連していると推察する。

## E. 結論

1) 日本の3~5歳児における飲食物からのカルシウム、マグネシウム、カリウム、ナトリウム、鉄、亜鉛、マンガン、銅、

リンおよびフッ化物の各ミネラル摂取量は、亜鉛とフッ化物間を除くすべてのミネラル間に有意な相関を認めた。

- 2) 他のミネラルが相互にかなり相関しているのに比較すると、フッ化物は Mn ( $r = 0.45$ ) と Mg ( $r = 0.43$ ) とはかなりの相関があるものの他とはやや相関がある程度で低い。3) 食品群においては肉、豆・豆製品、緑黄色野菜やその他の野菜などが多くのミネラルと有意な相関があったが、魚介類はフッ化物と特異的に有意な相関 ( $r = 0.372$ ) を示した。
- 4) 砂糖摂取量は d や d f 歯数と正の相関を、フッ化物、リン、マグネシウム、カリウムと鉄などのミネラル摂取量は f や d f 歯数と負の相関を示した。

#### F. 文献

- 1) Murakami T, Narita N, Nakagaki H, Shibata T, Robinson C.: Fluoride intake in Japanese children aged 3-5 years by the duplicate-diet technique. *Caries Res.* 36(6):386-90, 2002.
- 2) Chen P.S., Toribara T. Y. and Warner H.: Micro-determination of phosphorus. *Analyt. Chem.*, 28: 1756-1758, 1956.
- 3) 健康・栄養情報研究会 編集：第六次改定 日本人の栄養所要量—食事摂取基準—, p21-26, 258-259. 2000.
- 4) 第一出版編集部 編集：厚生労働省策定 日本人の食事摂取基準 [2005年版], 第一出版, 2005.
- 5) Standing Committee on the Scientific Evaluation of Dietary Reference Intakes Food and Nutrition Board Institute of Medicine.: Dietary reference intakes for calcium, phosphorus, magnesium, vitamin D, and fluoride. NATIONAL ACADEMY PRESS Washington, D.C., Fluoride:301-311, 1997. 8.
- 6) 村上多恵子：日本の 3~5 歳児におけるフッ化物摂取量（陰膳法による測定値）への茶系飲料を中心とした飲料および食品別摂取量（食事調査値）の影響、厚生科学研究費補助金「フッ化物応用の総合的研究」平成 14 年度研究報告:43-59, 2003.
- 7) 村上多恵子ら：幼児における食事からのフッ化物摂取量 文献値からみる水道水フッ化物濃度とフッ化物摂取量および水道水フッ化物濃度によるフッ化物摂取量の試算、厚生科学研究費補助金「フッ化物応用の総合的研究」平成 15 年度研究報告:65-77, 2004.
- 8) Zohouri FV, Rugg-Gunn AJ.: Total fluoride intake and urinary excretion in 4-year-old Iranian children residing in low-fluoride areas. *Br J Nutr.* 83(1):15-25, 2000-a.
- 9) Zohouri FV, Rugg-Gunn AJ.: Sources of dietary fluoride intake in 4-year-old children residing in low, medium and high fluoride areas in Iran. *Int J Food Sci Nutr.* 51(5):317-26, 2000-b.
- 10) Kimura T., Morita M., Kinoshita T., Tsuneishi M., Akagi T., Yamashita F., Watanabe T.: Fluoride intake from food and drink in Japanese children aged 1-6 years. *Caries Res.*, 35:47-49, 2001.
- 11) Japan Water Works Association:

Database of Water Quality of Aqueduct.  
www.jwwa.or.jp/mizu/, 2005.

- 12) Ophaug,R.H., Singer,L., Harland,B.F.:  
Dietary fluoride intake of 6- month and  
2-year-old children in four dietary  
regions of the United States, Am J Clin  
Nutr, 42:701-7, 1985.
- 13) Schamschla,R.G., Un,P.S.H., Sugar,E.,  
Duppenhaler,J.L.,Toth,K.,  
Barnes,D.E.: Daily fluoride intake  
from the diet of Hungarian children in  
fluoride deficient and naturally  
fluoridated areas, Acta Physiol Hung ,  
72:229-35, 1988.
- 14) Guha-Chowdhury N, Drummond BK,  
Smillie AC. Total fluoride intake in  
children aged 3 to 4 years--a  
longitudinal study. J Dent Res.  
75(7):1451-7, 1996.

- intakes in Japanese children aged 3  
to 5 years. Asia Pac Clin Nutr. 2008;  
17(3): 441-5
- 2.Goshima M, Murakami T, Nakagaki  
H, Shibata T, Sugiyama T, Kato  
Kazuo, Narita N, Nishimuta M. Iron,  
zinc, manganese and copper intakes  
in Japanese children aged 3 to 5  
years. J Nutr Sci Vitaminol. 2008;  
54:476-483

(2009.3.17)

#### G.2006-2008 年度

##### 学会発表

1. 杉山知子、村上多恵子、芝田登美子、  
五島三保、成田直樹、中垣晴男、西牟  
田 守、  
日本の 3~5 歳児における陰膳法によ  
る P の年平均 1 日摂取量と、他のミネ  
ラルおよび食品群別摂取量の関連、第  
55 回日本口腔衛生学会総会 2006.10.8,  
大阪、口腔衛生会誌, 56(4):589, 2006

##### 論文

- 1.Shibata T, Murakami T, Nakagaki H,  
Narita N, Goshima M, Sugiyama  
T, Nishimuta M. Calcium,  
magnesium, potassium and sodium

表1. 3~5歳児における飲食物からの年平均一日あたりのミネラル(Ca, Mg, K, Na, Fe, Zn, Mn, Cu)とP摂取量 (n=90人)

無機質	年齢	Ca, Mg, Fe, Zn, Mn, Cu and P, mg/day				年齢間有意水準	mg/day/BW			年齢間有意水準
		K and Na, g/day					mg/day/BW			
		50(中央値)	25-75	レンジ	平均±SD		50(中央値)	25-75	レンジ	
Total		432	292-533	100-875	425±163		25.2	17.3-31.1	6.14-52.5	25.4±10.3
Ca	3	424	300-507	129-760	416±150		27.9	20.7-33.5	10.3-49.3	27.8±10.2
	4	461	367-621	100-875	477±177	P=0.065	29.0	19.8-35.1	6.13-52.5	28.1±10.7
	5	364	270-463	190-812	383±151		19.1	13.5-24.8	10.3-43.9	20.2±7.98
Mg	3	108	76.8-125	61.4-161	104±27.7		7.04	5.78-7.89	3.87-11.9	6.97±1.88
	4	110	93.4-135	62.7-194	115±31.1	P=0.092	6.27	5.77-7.60	3.84-11.6	6.76±1.90
	5	115	103-141	87.7-154	120±21.5		5.97	5.36-7.13	4.66-9.82	6.35±1.30
K	3	1.18	0.872-1.36	0.690-1.66	1.13±0.310		6.38	5.49-7.54	3.84-11.9	6.69±1.71
	4	1.13	1.00-1.40	0.654-2.22	1.22±0.355	P=0.407	71.0	62.5-89.3	41.5-122	75.8±22.0
	5	1.21	0.993-1.41	0.793-1.87	1.22±0.280		65.2	56.3-82.0	40.0-133	72.3±22.3
Na	3	1.37	1.08-1.86	0.909-3.84	1.53±0.65		61.7	53.1-73.4	38.6-109	64.4±15.5
	4	1.56	1.31-1.77	0.930-2.78	1.60±0.433	P=0.002**	66.8	56.3-81.4	38.6-133	70.9±20.5
	5	1.93	1.55-2.32	1.15-3.27	1.95±0.576		85.0	73.5-124	63.3-282	102±43.3
Fe	3	2.8	2.1-3.5	1.5-4.4	2.8±0.93		89.1	79.4-107	54.2-167	93.9±24.0
	4	3.1	2.5-3.5	1.6-6.0	3.2±1.0	P=0.109	103	85.0-117	47.3-158	103±28.0
	5	3.2	2.8-3.6	1.9-6.1	3.3±0.82		94.1	77.8-115	47.3-282	99.8±32.7
Zn	3	3.4	2.6-4.4	1.7-5.8	3.5±1.1		0.18	0.14-0.23	0.094-0.30	0.19±0.057
	4	4.1	3.7-4.5	2.8-5.5	4.1±0.79	P=0.003**	0.19	0.15-0.21	0.086-0.36	0.19±0.060
	5	4.2	3.7-4.8	2.6-7.2	4.4±1.0		0.17	0.14-0.18	0.11-0.28	0.17±0.041
Mn	3	1.1	0.95-1.4	0.63-2.2	1.2±0.41		0.17	0.15-0.22	0.086-0.36	0.18±0.053
	4	1.2	1.1-1.5	0.89-2.7	1.4±0.43	P=0.005**	0.22	0.18-0.28	0.13-0.36	0.23±0.065
	5	1.4	1.2-1.7	0.97-2.5	1.5±0.35		0.24	0.21-0.27	0.16-0.35	0.24±0.050
Cu	3	0.43	0.29-0.50	0.21-0.66	0.42±0.13		0.23	0.20-0.26	0.14-0.33	0.23±0.046
	4	0.45	0.34-0.60	0.26-0.86	0.48±0.17	P=0.064	0.23	0.20-0.27	0.13-0.36	0.23±0.054
	5	0.48	0.40-0.56	0.33-1.0	0.51±0.15		0.075	0.062-0.094	0.054-0.15	0.082±0.0026
P	3	643	477-752	319-1654	677±289		0.074	0.063-0.094	0.048-0.16	0.080±0.0024
	4	702	536-973	352-1635	778±317	P=0.180	0.073	0.069-0.091	0.053-0.13	0.079±0.0017
	5	771	549-923	456-1728	783±284		0.074	0.064-0.092	0.048-0.16	0.080±0.0022
All	674	534-900	319-1728	746±298		0.029	0.020-0.031	0.014-0.045	0.028±0.0087	

表2. ミネラル間におけるSpearmanの相関 (除腫法による飲食物からの年平均一日摂取量) (n=90人)

	Ca	Mg	K	Na	Fe	Zn	Mn	Cu	P	F
Ca	1.000									
Mg	0.621***	1.000								
K	0.656***	0.901***	1.000							
Na	0.276**	0.615***	0.524***	1.000						
Fe	0.462***	0.624***	0.555***	0.533***	1.000					
Zn	0.481**	0.644***	0.662***	0.522***	0.688***	1.000				
Mn	0.279**	0.508***	0.526***	0.498***	0.548***	0.625***	1.000			
Cu	0.361**	0.592***	0.554***	0.431**	0.581***	0.642***	0.622***	1.000		
P	0.634***	0.758***	0.756***	0.507***	0.561***	0.639***	0.412**	0.497***	1.000	
F	0.232*	0.441***	0.266*	0.359**	0.332**	0.152	0.449***	0.233*	0.259**	1.000

\*. p<0.05  
\*\* p<0.01  
\*\*\* p<0.001

表3. ミネラルと食品群間におけるSpearmanの相関 (除腫法による飲食物からの年平均一日摂取量) (n=90人)

ミネラル	相関係数	食品群平均										
		飲食物平均	乳・乳製品平均	卵平均	魚介類平均	肉平均	豆・豆製品平均	緑黄色野菜平均	他の野菜平均	きのこ・海藻平均	果物平均	穀物平均
Ca	0.436	0.686	-0.182	-0.033	0.172	0.203	0.314	0.219	-0.046	0.038	0.217	-0.069
Mg	0.756	0.353	-0.030	0.175	0.207	0.542	0.469	0.345	0.221	0.161	0.374	0.233
K	0.749	0.488	-0.105	0.048	0.257	0.395	0.498	0.395	0.142	0.209	0.454	0.132
Na	0.650	0.039	0.089	0.200	0.543	0.315	0.418	0.550	0.112	0.059	0.041	0.494
Fe	0.552	0.232	0.170	0.006	0.488	0.371	0.228	0.310	0.063	0.014	0.142	0.153
Zn	0.668	0.393	0.134	0.097	0.322	0.242	0.172	0.284	0.144	0.033	0.142	0.278
Mn	0.578	0.145	-0.033	0.172	0.227	0.448	0.337	0.295	0.171	0.084	0.076	0.354
Cu	0.595	0.180	-0.016	0.101	0.320	0.362	0.217	0.271	0.033	0.236	0.066	0.341
P	0.641	0.470	-0.038	0.201	0.322	0.408	0.389	0.250	0.137	-0.011	0.266	0.089
F	0.366	0.001	0.065	0.372	0.011	0.384	0.234	0.103	0.100	0.009	0.099	0.090

\*p<0.05 \*\*p<0.01 \*\*\*p<0.001

表4. 3~5歳児における飲食物からの年平均一日あたりのミネラル(Ca, Mg, K, Na, Fe, Zn, Mn, CuとP)摂取量(除糖法)および蔗糖摂取量(食事調査法),とう蝕との関連 (N=80人)

	飲食物	Ca	P	Mg	K	Fe	Zn	Mn	Cu	F	ケルコース	シュクロース		
		g/day	mg/day	mg/day	mg/day	mg/day	μg/day	μg/day	μg/day	mg/day	g/day	g/d		
3歳	d	相関係数	0.093	0.199	0.211	0.273	0.305	0.261	0.249	0.142	0.358	0.116	0.426	0.476
		有意確率	0.627	0.292	0.262	0.144	0.101	0.163	0.185	0.455	0.052	0.543	0.019	0.008
	f	相関係数	-0.023	-0.225	-0.203	0.041	0.113	0.023	-0.070	-0.039	-0.111	0.165	0.290	0.292
		有意確率	0.904	0.233	0.283	0.830	0.553	0.904	0.712	0.836	0.558	0.384	0.120	0.117
	d+f計	相関係数	0.010	0.029	0.062	0.201	0.260	0.199	0.158	0.097	0.231	0.167	0.532	0.587
		有意確率	0.960	0.881	0.744	0.287	0.165	0.291	0.404	0.609	0.220	0.378	0.002	0.001
4歳	d	相関係数	0.093	0.199	0.211	0.273	0.305	0.261	0.249	0.142	0.358	0.116	0.426	0.476
		有意確率	0.627	0.292	0.262	0.144	0.101	0.163	0.185	0.455	0.052	0.543	0.019	0.008
	f	相関係数	-0.023	-0.225	-0.203	0.041	0.113	0.023	-0.070	-0.039	-0.111	0.165	0.290	0.292
		有意確率	0.904	0.233	0.283	0.830	0.553	0.904	0.712	0.836	0.558	0.384	0.120	0.117
	d+f計	相関係数	0.010	0.029	0.062	0.201	0.260	0.199	0.158	0.097	0.231	0.167	0.532	0.587
		有意確率	0.960	0.881	0.744	0.287	0.165	0.291	0.404	0.609	0.220	0.378	0.002	0.001
5歳	d	相関係数	-0.356	-0.082	-0.128	-0.164	-0.364	0.047	-0.200	-0.018	0.028	-0.159	-0.107	-0.048
		有意確率	0.054	0.667	0.501	0.387	0.048	0.805	0.290	0.926	0.883	0.401	0.572	0.800
	f	相関係数	-0.213	-0.219	-0.448	-0.444	-0.558	-0.324	-0.159	-0.098	0.178	-0.379	0.016	0.087
		有意確率	0.258	0.245	0.013	0.014	0.052	0.080	0.401	0.605	0.348	0.039	0.935	0.647
	d+f計	相関係数	-0.273	-0.126	-0.418	-0.379	-0.447	-0.182	-0.197	-0.062	0.131	-0.329	-0.013	-0.012
		有意確率	0.145	0.506	0.022	0.039	0.013	0.337	0.296	0.745	0.491	0.076	0.947	0.949

\* 食事調査値

(Murakami et al. Caries Res 2002;36:386-390)

cf-表1. 日本(Y市)の3~5歳児における飲食物からのフッ化物摂取量

Age <sup>a</sup> (years)	No. of Subjects	mg/day				mg/kg BW			
		Mean	SD	Range	95%C.I.	Mean	SD	Range	95%C.I.
3	29	0.30	0.19	0.12-0.83	0.22-0.37	0.020	0.013	0.007-0.052	0.015-0.025
4	30	0.28	0.19	0.11-0.82	0.21-0.34	0.016	0.011	0.007-0.048	0.012-0.020
5	34	0.30	0.19	0.14-1.01	0.24-0.39	0.016	0.011	0.007-0.059	0.012-0.021
All	93	0.29	0.19	0.11-1.01	0.25-0.33	0.017	0.011	0.007-0.059	0.015-0.020

<sup>a</sup> As of the beginning of the preschool year (April 2, 1999).

Note: Values within brackets are not significantly different ( $p>0.05$ ) as determined by one-way ANOVA.

## 研究課題 2：フッ化物局所応用のう蝕予防プログラム

### 新たな初期齲蝕の診断法とその有用性

分担研究者 中垣晴男 愛知学院大学歯学部口腔衛生学 教授  
研究協力者 稲葉大輔 岩手医科大学歯学部予防歯科学講座・准教授

#### 研究要旨：

酸蝕症は非細菌性の酸による侵襲で生じる歯表面の溶解で、齲蝕の減少にもなって最近注目されている。そこで、本研究では、酸性溶液へのミネラルまたはフッ化物添加の効果を、歯質の蛍光減少率を測定することにより検討した。その結果、フッ化物を添加した酸性溶液はエナメル質の酸蝕症に対して抑制効果を発揮するが、事前・事後の唾液処理はエナメル質の酸蝕性変化に対して確実な効果を示さないことが示唆された。

#### A. 研究目的

酸蝕症は非細菌性の酸による侵襲で生じる歯表面の溶解で、齲蝕の減少にもなって最近注目されている。そこで、本研究では、酸性溶液へのミネラルまたはフッ化物添加の効果を、歯質の蛍光減少率を測定することにより検討した。

#### B. 研究方法

1. 本研究では、材料として牛歯エナメル質ブロック (n=6/群) を用い、15 分間の 0.1% クエン酸 (pH 2.74) による処理を実験的な酸蝕症形成モデルとした (図 1)。実験は次の 3 区分で実施した。

① 実験 1: 試料をカルシウム、フッ化

物または緩衝剤の有無別に 0.1% クエン酸または市販飲料に 37°C で 15 分間浸漬した (表 1)。

② 実験 2: 試料をヒト唾液に 37°C で 2 時間浸漬してペリクルを形成し、カルシウム添加の有無別に 0.1% クエン酸を 37°C で 15 分間作用させた。

③ 実験 3: 試料を 37°C で 15 分間 0.1% クエン酸により処理し、ついで表 2 に示す唾液に 37°C で 24 時間浸漬した。

2. 最終的に、すべての試料について健全部に対する相対的な蛍光減少率 ( $\Delta F$ , %) を測定した。

### C. 研究結果

1. 実験1では、すべての試料で対照群(A)よりも有意に低い $\Delta F$ 値を認め( $p < 0.05$ , 図2)、酸蝕の抑制が認められた。
2. 実験2および3では、処理群の間で $\Delta F$ 値に有意差は認められなかった(表2)。

### D. 考察

本研究の結果は、酸性溶液へのカルシウムまたはフッ化物の添加が酸蝕症の抑制にきわめて有効であることを示している。一方、唾液による事後処理は、齲蝕病巣(表層下脱灰)とは異なり、酸蝕症に対しては明確な効果を示さなかった。このことは、酸蝕による組織変化がきわめて侵襲的であるため唾液のみでは病変が回復しにくいことを意味している。よって、酸蝕症の予防には酸性飲料の成分調整(カルシウムまたはフッ化物の添加)が推奨される。

### E. 文献

1. Lussi A, Hellwig E: Risk assessment and preventive measures; in Lussi A (ed): Dental Erosion: From Diagnosis to Therapy. Basel, Karger, pp. 190-199, 2006.
2. Pretty IA, Edgar WM, Higham SM: The validation of quantitative light-induced fluorescence to

quantify acid erosion of human enamel, Arch Oral Biol, 49:285-294, 2004.

### F. 学術報告

#### 論文なし

#### 学会発表

1. Inaba, D.: Application of QLF in Experimental Cariology. 2008 Autumn Conference of Korean Academy of Dental Health, November 1, 2008. (Kyongju, South Korea)
2. Inaba, D., Tamura K., Orisaka, M., Yonemitsu, M.: Distributions of Salivary Calcium and Phosphate among 5,304 Japanese Populations. 55th European Organisation for Caries Research (ORCA), July 4, 2008. (Groningen, The Netherlands)
3. Ishizuki, N., Inaba, D., Yonemitsu, M.: Impact of Mineral Supplementation to Acidic Solutions on Enamel Erosion, 56th Annual Meeting of the Japanese Association for Dental Research (JADR), November 29, 2008. (Nagoya, Japan)
4. 稲葉大輔、角田初恵、米満正美: QLF法による唾液再石灰化能の評価. 第46回日本小児歯科学会総会、2008年6月12日(さいたま市)

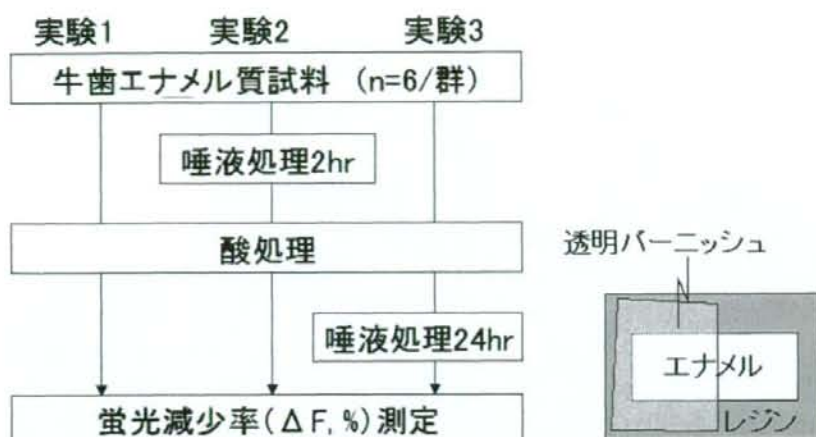


図1 実験フローチャートと試料の外観模式図

表1 実験1の酸処理条件

群	酸処理溶液
A	0.1% クエン酸 15分浸漬
B	A +1.5mM $\text{CaCl}_2$ (Ca/P=0.3)
C	A +8.35mM $\text{CaCl}_2$ (Ca/P = 1.67)
D	A +チーズ溶液
E	A +1ppmF
F	A +0.1% Ca-POs
G	A +1.2% $\text{NaHCO}_3$

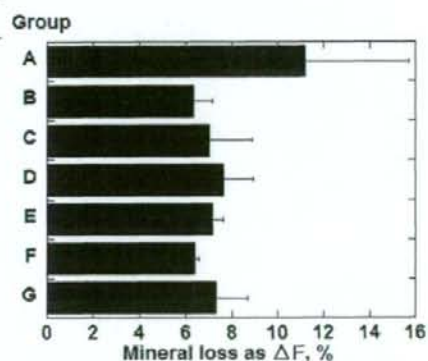


図2 実験1の蛍光減少率  $\Delta F$  の比較

表2 実験3の唾液処理条件と  $\Delta F$  回復値

群	唾液条件	$\Delta F$ 回復値
P	咀嚼刺激唾液	-0.47%
Q	CPP-ACP*配合ガム咀嚼唾液	0.14%
R	POs-Ca <sup>TM</sup> **配合ガム咀嚼唾液	0.24%
S	P+1ppmF	-0.63%

\* Casein phosphopeptide-amorphous calcium phosphate

\*\* リン酸化オリゴ糖カルシウム



## 研究課題 2：フッ化物局所応用のう蝕予防プログラム

### フッ化物洗口によるプラーク細菌の酸産生抑制効果

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

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

**研究要旨：**フッ化物は、*in vitro* でミュータンスレンサ球菌の酸産生を抑制するのに対し、洗口による口腔内 (*in vivo*) での酸産生抑制効果は少ないと報告されている。この矛盾に答えるため、フッ化ナトリウム (NaF) 洗口後のヒトプラークにおける pH 低下能と残留 F 濃度を経時的に測定した。インフォームドコンセントを得た 9 名 (27±5 歳) に対し、24 時間、口腔内の刷掃を停止してプラークを形成させた。NaF 洗口前 (コントロール)、NaF (250、500、900 ppm F/10 ml) 洗口後 15 分、30 分及び 60 分の歯肉縁上プラークを採取し、10 mM グルコース添加後の pH 低下と残留 F 濃度を、それぞれ簡易型 pH メーター及び微量フッ素イオン測定装置を用いて測定した。グルコース添加 25 分後、コントロールの pH は 4.3±0.3 まで低下したが、250、500、900 ppm 洗口後 15 分に採取したプラークでは、それぞれ 4.8±0.3、5.3±0.2、5.4±0.5 まで低下するに留まった。洗口後 30 分でも 250 ppm 及び 900 ppm 洗口において同様の結果が得られたが、250 ppm 洗口では 4.1±0.4 まで低下した。さらに洗口後 60 分では、900 ppm 洗口のみが pH4.9±0.2 を保った。残留 F 濃度は、洗口後 15 分ではそれぞれ 17.3±4.6、25.3±10.2、85.8±30.6 ppm、30 分では 10.1±9.9、13.9±4.4、66.6±25.8 ppm、60 分では 9.91±9.85、8.95±7.35、40.96±4.77 ppm と時間とともに低下したが、コントロール (3.2±2.8 ppm) よりは高かった。以上のことから、NaF 洗口はプラーク酸産生能を短時間にわたり抑制すること、過去の研究では洗口数時間後の測定であったためその効果が看過されていたことが分かった。NaF 抑制効果はプラークに残存する F によるものと考えられ、*in vivo* におけるフッ化物洗口においても、プラーク酸産生抑制によるう蝕予防効果が期待される。

#### 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、低濃度フッ化物はフッ素配合歯

磨剤 (1000 ppm F) 及びフッ化物洗口液 (100-900 ppm F) として、高濃度フッ化物はフッ化物歯面塗布剤 (9000-12300

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作用及び歯周関連菌に対する酸産生抑制作用による歯周予防効果を期待するものである。部分的にエナメル質のヒドロキシアパタイトの OH 基がフッ素と置換され、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<sup>1)</sup>。これが歯質強化作用であり、現在、フッ化物局所応用の主な目的となっている。

さらに *in vitro* の実験では、8 ppm 程度のフッ化物がミュータンスレンサ球菌の糖代謝を抑制することが分かっており<sup>2)</sup>、結果として、歯面脱灰の原因となる歯周関連菌による酸の産生を抑制すると考えられている<sup>3, 4)</sup>。低濃度フッ化物洗口は、歯科医師の指導のもと、家庭での実施が可能であり、*in vitro* におけるミュータンスレンサ球菌の酸産生を抑制する F 濃度である 8 ppm をはるかに超える濃度のフッ化物が含まれており、口腔内のミュータンスレンサ球菌等への酸産生抑制効果が期待される。しかし、225 ppm フッ化ナトリウム (NaF) 洗口液を用い、洗口 30 分後に採取したヒトプラークにおける酸産生抑制効果は認められないことから、洗口による口腔内 (*in vivo*) での酸産生抑制効果は少ないと報告されている<sup>5)</sup>。

そこで本研究では、これら *in vivo* と *in vitro* の実験結果における矛盾に答えるために以下の 2 点について検討を行った。

- ・異なる F 濃度の NaF 洗口後のヒトプラークにおける「pH 低下能」の経時的な検討。
- ・異なる F 濃度の NaF 洗口後のヒトプラ

ークにおける「残留 F 濃度」の経時的な検討。

## B. 研究方法

### 1. 被験者

インフォームドコンセントを得た 9 名 (27±5 歳、男性 4 名、女性 5 名) に対し 24 時間、口腔清掃を停止させ、プラークを形成させた。

### 2. 異なる F 濃度の NaF 洗口後のヒトプラークにおける「pH 低下能」の経時的な検討

#### ・NaF 洗口液

NaF を蒸留水にて 250、500、900 ppm F/10 ml に調整し、プラスチックチューブに分注した。

#### ・洗口条件

10 ml のいずれかの F 濃度の洗口液を全量口に含み、1 分間口腔内全体に行き渡るように洗口後、吐き出し、プラークの採取までの間、飲食は中止した。

#### ・プラークの採取

ランダムイズドブロック法を用い、プラーク採取のデザインを行った。各 F 濃度ごとに洗口後 5 分、15 分、30 分及び 60 分に被験者が 3 名ずつ、被験者 1 名につき 4 回の採取に該当するよう、ランダムに配置を行った。但し、洗口後 5 分の採取はデザイン上のみの設定とし、今回の実験では行わなかった。洗口の後、所定時間を経過した歯肉縁上プラークの採取 (約 7.0 mg) を、滅菌楊枝を用いて行った。いずれも洗口前に採取したプラークをコントロールとした。

・ブラーク懸濁液の調整

1 mM リン酸緩衝液 (pH 7.0) にブラークを懸濁し、約 27  $\mu$ L のブラーク懸濁液を調整した。

・ブラーク pH の測定

簡易型 pH メーターのセンサー部 (ウェル形状: 容量約 30  $\mu$ L) にブラーク懸濁液を全量のごせ、10 mM グルコース溶液を 3  $\mu$ L 添加し、小型インキュベーター内にて 37°C で 25 分間インキュベートを行った。pH 値はグルコース溶液添加時を 0-time とし、1 分経過毎に 25 分まで記録を行った。

3. 異なる F 濃度の NaF 洗口後のヒトブラークにおける「残留 F 濃度」の経時的な検討

NaF 洗口液、洗口条件は「pH 低下能」の経時的な検討の場合と同様とした。

・ブラークの採取

各 F 濃度ごとに被験者を 1 名ずつ配置し、洗口前、洗口後 15 分、30 分及び 60 分に、ブラーク採取を行った。採取の手法は「pH 低下能」の経時的な検討の場合と同様とした。

・フッ化物の抽出

採取後のブラークに 1 M 酢酸緩衝液 (pH 5.0) をブラーク湿重量の 5 倍量加え、ボルテックス後、4°C で保管した。60 分後に再度ボルテックスした後、遠心分離を行い、上清を回収した。上清に含まれる残留 F 濃度は、微量フッ素イオン測定装置<sup>6)</sup>を用いて測定した。

C. 結果

異なる F 濃度の NaF 洗口後のヒトブラーク

における「pH 低下能」の経時的な検討

洗口後 15 分に採取したブラークでは、それぞれ  $4.8 \pm 0.3$ 、 $5.3 \pm 0.2$ 、 $5.4 \pm 0.5$  まで低下するに留まった。洗口後 30 分でも 250 ppm 及び 900 ppm 洗口において同様の結果が得られたが、250 ppm 洗口では  $4.1 \pm 0.4$  まで低下した。さらに洗口後 60 分では、900 ppm 洗口のみが  $\text{pH} 4.9 \pm 0.2$  を保った。

以上のことから、250 ppm の洗口液では洗口後 15 分、500 ppm で 30 分、900 ppm で 60 分の間、ブラーク酸産生が抑制され、さらにフッ化物洗口によってブラークの酸産生が抑制される場合、pH 低下は pH 5 付近で停止することが示された。

異なる F 濃度の NaF 洗口後のヒトブラークにおける「残留 F 濃度」の経時的な検討

残留 F 濃度は、洗口後 15 分ではそれぞれ  $17.3 \pm 4.6$ 、 $25.3 \pm 10.2$ 、 $85.8 \pm 30.6$  ppm、30 分では  $10.1 \pm 9.9$ 、 $13.9 \pm 4.4$ 、 $66.6 \pm 25.8$  ppm、60 分では  $9.91 \pm 9.85$ 、 $8.95 \pm 7.35$ 、 $40.96 \pm 4.77$  ppm と時間とともに低下したが、コントロール ( $3.2 \pm 2.8$  ppm) よりも高かった。

以上のことから、洗口したフッ化物濃度にほぼ比例して、ブラーク残留フッ素イオン濃度は増加し、フッ化物洗口後の時間経過にしたがって、ブラークに取り込まれたフッ素イオン濃度は減少することが示された。

D. 考察

本研究では、実際のフッ化物洗口による

抑制効果を検討することで、フッ化物洗口がブラークの酸産生を 15 分から 60 分という短い時間に限り抑制するということを、初めて明らかにした。さらにこのブラークの酸産生抑制は、フッ化物洗口後にブラーク中に残留するフッ化物(≧14ppm F)に由来すると考えられる。

*In vitro* の研究から、フッ化物はフッ化水素(HF)となって菌体内に侵入し、再び解離してフッ素イオン(F<sup>-</sup>)となり、エノラーゼ等の糖代謝関連酵素を阻害することで糖代謝を抑制し、結果として酸産生を抑制することが知られている<sup>7)</sup>。HF の生成は酸性 pH ほど促進されることから、このメカニズムは酸性 pH ほどよく働くと考えられる。今回のフッ化物洗口による実験でも、酸性で効率的に pH 低下が抑制され、pH 5 付近で酸産生が停止していることから、同様のメカニズムが働いたものと考えられる

#### E. 結論

以上のことから、NaF 洗口はブラーク酸産生能を短時間にわたり抑制すること、さらに過去の研究では洗口数時間後の測定であったために効果が看過されていたことが明らかになった。

NaF による pH 低下抑制効果はブラークに残存するフッ素イオンによるものと考えられ、*in vivo* におけるフッ化物洗口においても、ブラーク酸産生抑制によるう蝕予防効果が期待される。

#### F. 参考文献

- 1) Chow LC, Brown WE: Reaction of dicalcium phosphate dihydrate with fluoride. *J Dent Res* 1973; 52: 1220-1227.
- 2) Maehara H, Iwami Y, Mayanagi H, Takahashi N: Synergistic inhibition by combination of fluoride and xylitol on glycolysis by mutans streptococci and its biochemical mechanism. *Caries Res* 2005; 39: 521-528.
- 3) Kaufmann M, Bartholmes P: Purification, characterization and inhibition by fluoride of enolase from *Streptococcus mutans* DSM 320523. *Caries Res* 1992; 26: 110-116.
- 4) Curran TM, Buckley DH, Marquis RE: Quasi-irreversible inhibition of enolase of *Streptococcus mutans* by fluoride. *FEMS Microbiol Lett* 1994; 119: 283-288.
- 5) Giertsen E, Emberland H, Scheie AA: Effects of mouth rinses with xylitol and fluoride on dental plaque and saliva. *Caries Res*. 1999; 33:23-31.
- 6) Hallsworth AS, Weatherell JA, Deutsch D: Determination of subnanogram amounts of fluoride with the fluoride electrode. *Anal Chem*. 1976; 48:1160-1164.
- 7) Gutknecht J, Walter A: Hydrofluoric and nitric acid transport through lipid bilayer membranes. *Biochim Biophys Acta*. 1981; 644:153-156.

#### G. 研究発表

## 1. 論文

- 1) 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 Periodontal Res* **43(1)**: 64-75, 2008.
- 2) Shimizu K, Igarashi K, Takahashi N: Chairside-evaluation of pH-lowering activity and lactic acid production of dental plaque: Correlation with caries-experience and incidence in preschool children. *Quintessence Int* **39(2)**: 151-158, 2008.
- 3) Takahashi N, Nyvad B: Caries ecology revisited: microbial dynamics and the caries process. *Caries Res* **42(6)**: 409-418, 2008.
- 4) Aizawa S, Miyasawa-Hori H, Nakajo K, Washio J, Mayanagi H, Fukumoto S, Takahashi N: Effects of alpha-amylase and its inhibitors on acid production from cooked starch by oral streptococci. *Caries Res* **43(1)**: 17-24, 2009.
- 5) Nakajo K, Imazato S, Takahashi Y, Kiba W, Ebisu S, Takahashi N: Fluoride released from glass-ionomer cement is responsible to inhibit the acid production of caries-related oral streptococci. *Dental Materials* **25**: (in press).
- 6) Horiuchi M, Washio J, Mayanagi H, Takahashi N: Transient acid-impairment of growth ability of oral *Streptococcus*, *Actinomyces* and *Lactobacillus*: a possible ecological

determinant in dental plaque. *Oral Microbiol Immunol* **24**: (in press).

## 2. 著書

- 1) 高橋信博. 第21章 器官の生化学 硬組織 1. 骨/2. 歯と歯周組織, In: 「シンプル生化学」改訂第5版 林典夫, 廣野治子 (編), 南江堂, p.305-307, 2008.
- 2) 高橋信博. 第5章 う蝕とミュータンスレンサ球菌 1. ミュータンスレンサ球菌の自然史/2. ミュータンスレンサ球菌のう蝕病原性/3. 生態学的視点から見たう蝕とミュータンスレンサ球菌. In: 「う蝕学—チェアサイドの予防と回復のプログラム—」田上順次, 花田信弘, 桃井保子 (編), 永末書店 p. 207-212, 2008.

## 3. 学会発表

- 1) 高橋信博: う蝕予防ツールとしてのトクホ食品—これまでとこれから—, 第13回国際食品素材/添加物展・会議 (東京). 口腔ケアセミナー トクホ開発への提案. 2008年5月23日.
- 2) 中條和子, 土門ひと美, 川嶋順子, 柳下陽子, 高橋信博: 細菌代謝コントロールによる口腔疾患予防戦略—フッ化物が有する静菌作用とその生化学的メカニズム. 第50回歯科基礎医学会学術大会 (東京). サテライトシンポジウム「基礎と臨床を繋ぐ研究を求めて—口腔細菌研究の未来を見据えて—」. 2008年9月23日 (SS4-6).
- 3) Takahashi N: Plaque pH telemetry method of tooth friendly international and Japanese Dental FOSHU. Workshop

- on Oral Health (Beijing, China). 10 November, 2008.
- 4) Takahashi N: Interface Oral Health Science - A concept of future dental research from Tohoku University Graduate School of Dentistry-The 3 rd International Symposium for Interface Oral Health Science (Sendai) 15 January, 2009 Program and Abstracts of the International Symposium for Interface Oral Health Science.
  - 5) Takeuchi Y, Nakajo K, Sato T, Sakuma Y, Sasaki K, Takahashi N: Quantification and identification of bacteria within acrylic resin denture bases. The 86 th IADR (Toronto, Canada) 3 July, 2008 J Dent Res 87 (Special Issue B): abstract #1319, 2008.
  - 6) Nakajo K, Asanoumi T, Shibata A, Yagishita Y, Kato K, Takahashi N: Short-term effect of NaF-mouthrinse on glucose-induced pH fall in plaque. The 86 th IADR (Toronto, Canada) 3 July, 2008 J Dent Res 87 (Special Issue B): abstract #1343, 2008.
  - 7) Hashimoto K, Sato T, Shimauchi H and Takahashi N: Profiling of dental plaque microflora of root-caries lesions. The 86 th IADR (Toronto, Canada) 4 July, 2008. J Dent Res 87 (Special Issue B): abstract #2104, 2008.
  - 8) Washio J, Fukushima A, Ogawa T, Okada S, Takahashi N: Lactate enhances the production of hydrogen sulfide by oral *Veillonella*. The 86 th IADR (Toronto, Canada) 5 July, 2008. J Dent Res 87 (Special Issue B): abstract #2978, 2008.
  - 9) Abiko Y, Sato T, Matsushita K, Sakashita R, Takahashi N: Presence of *Porphyromonas gingivalis* in subgingival plaque-biofilm of elderly people. The 86 th IADR (Toronto, Canada) 5 July, 2008. J Dent Res 87 (Special Issue B): abstract #3404, 2008.
  - 10) Sakuma Y, Washio J, Takeuchi Y, Sasaki K, Takahashi N: New quantitative fluorometry for evaluating oral bacteria adhesion to biomaterials. The 3 rd International Symposium for Interface Oral Health Science (Sendai) 15-16 January, 2009. Program and Abstracts of the International Symposium for Interface Oral Health Science, p. 62 (abstract# P44).
  - 11) Takeuchi Y, Nakajo K, Sato T, Sakuma Y, Sasaki K, Takahashi N: Detection of viable bacterial cells in acrylic resin denture bases. The 3 rd International Symposium for Interface Oral Health Science (Sendai) 15-16 January, 2009. Program and Abstracts of the International Symposium for Interface Oral Health Science, p. 65 (abstract# P50).
  - 12) Abiko Y, Sato T, Matsushita K, Sakashita R, Takahashi N: *Porphyromonas gingivalis* is widely distributed in subgingival plaque biofilm of elderly people. The 3 rd International Symposium for Interface Oral Health Science (Sendai) 15-16 January, 2009.

- Program and Abstracts of the International Symposium for Interface Oral Health Science, p. 67 (abstract# P55).
- 13) Hashimoto K, Sato T, Shimauchi H, Takahashi N: Profiling of dental plaque microflora of root caries lesions and the proteolytic activity of these bacteria. The 3 rd International Symposium for Interface Oral Health Science (Sendai) 15-16 January, 2009. Program and Abstracts of the International Symposium for Interface Oral Health Science, p. 68 (abstract# P56).
- 14) Komori R, Sato T, Takano-Yamamoto T, Takahashi N: Profiling of dental plaque biofilm on first molar with orthodontic bands and brackets, and biochemical characteristics of their plaque bacteria. The 3 rd International Symposium for Interface Oral Health Science (Sendai) 15-16 January, 2009. Program and Abstracts of the International Symposium for Interface Oral Health Science, p. 69 (abstract# P58).
- 15) Nakajo K, Asanoumi T, Shibata A, Yagishita Y, Kato K, Takahashi N: Short-term effect of single NaF-mouthrinse on glucose-induced pH fall in dental plaque. The 3 rd International Symposium for Interface Oral Health Science (Sendai) 15-16 January, 2009. Program and Abstracts of the International Symposium for Interface Oral Health Science, p. 73 (abstract# P66).
- 16) Domon H, Nakajo K, Washo J, Miyasawa-Hori H, Fukumoto S, Takahashi N: Short-term effect of fluoride on acid production by *Streptococcus mutans*. The 3 rd International Symposium for Interface Oral Health Science (Sendai) 15-16 January, 2009. Program and Abstracts of the International Symposium for Interface Oral Health Science, p. 73 (abstract# P67).
- 17) Sato T, Hoshikawa Y, Kondo T, Hashimoto K, Hasegawa A, Matsuyama J, Takahashi N: Involvement of cough reflex impairment and silent aspiration of oral bacteria in postoperative pneumonia: A model of aspiration pneumonia. The 3 rd International Symposium for Interface Oral Health Science (Sendai) 15-16, January 2009. Program and Abstracts of the International Symposium for Interface Oral Health Science, p. 74-75 (abstract# P69).
- 18) Takahashi M, Nakajo K, Takahashi N, Sasaki K, Okuno O: Experimental Ti-Ag alloys inhibit biofilm adhesion. The 3 rd International Symposium for Interface Oral Health Science (Sendai) 15-16, January 2009. Program and Abstracts of the International Symposium for Interface Oral Health Science, p. 77 (abstract# P73).
- 19) 三好慶忠, 渡辺誠, 高橋信博: ヒト唾液に含まれるタンパク質分解酵素活

- 性とその活性化現象, 及び口腔疾患との関連性について. 第5回東北大学バイオサイエンスシンポジウム(仙台). 2008年5月19日. 第5回東北大学バイオサイエンスシンポジウム及び第12回学際ライフサイエンスシンポジウム講演要旨集 p. 74, 2008. (Abstract # PS-022).
- 20) 小森亮, 佐藤拓一, 山本照子, 高橋信博: 歯科矯正用バンド及びマルチブラケット装着歯のプラークバイオフィルム細菌叢プロファイリング. 第5回東北大学バイオサイエンスシンポジウム(仙台). 2008年5月19日. 第5回東北大学バイオサイエンスシンポジウム及び第12回学際ライフサイエンスシンポジウム講演要旨集 p. 128, 2008. (Abstract # PS-076).
- 21) 竹内裕尚, 中條和子, 佐藤拓一, 佐久間陽子, 佐々木啓一, 高橋信博: アクリルレジン製の入れ歯(レジン床義歯)の内部に潜む細菌の解析. 第5回東北大学バイオサイエンスシンポジウム(仙台). 2008年5月19日. 第5回東北大学バイオサイエンスシンポジウム及び第12回学際ライフサイエンスシンポジウム講演要旨集 p. 129, 2008. (Abstract # PS-077).
- 22) 鷺尾純平, 島田裕子, 坂巻良一, 山田雅一, 岡田諭, 小川珠生, 福島梓, 高橋信博: 口腔常在菌 *Veillonella* はシステイン含有ペプチドから口臭の原因となる硫化水素を産生し, その産生量は口腔内の乳酸によって増加する. 第5回東北大学バイオサイエンスシンポジウム(仙台) 2008年5月19日. 第5回東北大学バイオサイエンスシンポジウム及び第12回学際ライフサイエンスシンポジウム講演要旨集 p. 131, 2008. (Abstract # PS-079).
- 23) 中條和子, 高橋雄介, 騎馬和歌子, 今里聡, 高橋信博: 歯科用充填材料・ガラスアイオノマーセメントは齲蝕の原因となる酸産生を抑制する. 第5回東北大学バイオサイエンスシンポジウム(仙台). 2008年5月19日. 第5回東北大学バイオサイエンスシンポジウム及び第12回学際ライフサイエンスシンポジウム講演要旨集 p. 133, 2008. (Abstract # PS-081).
- 24) 土門ひと美, 中條和子, 宮澤-堀はるみ, 福本 敏, 高橋信博: 短時間フッ化物応用による齲蝕関連菌 *Streptococcus mutans* の酸産生抑制効果. 第50回歯科基礎医学会学術大会(東京). 2008年9月23日. J Oral Biosci 50(S): 151, 2008. (Abstract #P-63).
- 25) 小森亮, 佐藤拓一, 山本照子, 高橋信博: 矯正用バンド及びブラケット装着歯面のプラークバイオフィルム細菌叢プロファイリングとその構成菌の生化学的性質. 第50回歯科基礎医学会学術大会(東京). 2008年9月23日. J Oral Biosci 50(S): 152, 2008. (Abstract #P-67).
- 26) 佐久間陽子, 鷺尾純平, 竹内裕尚, 佐々木啓一, 高橋信博: バイオマテリアル表面への各種口腔細菌付着量の評価法. 第50回歯科基礎医学会学術大会(東京). 2008年9月23日. J Oral Biosci 50(S): 153, 2008. (Abstract #P-71).



- 27) 柳下陽子, 柴田哲伸, 浅海友文, 中條和子, 高橋信博: フッ化物洗口はブラークの酸産生を短時間において抑制する. 第50回歯科基礎医学会学術大会 (東京). 2008年9月23日. J Oral Biosci 50(S): 176, 2008. (Abstract #P-163).
- 28) 鷺尾純平, 佐久間陽子, 島田裕子, 高橋信博: 口腔 *Veillonella* は cysteine 含有ペプチドから硫化水素を産生し, 乳酸はその硫化水素産生を促進する. 第50回歯科基礎医学会学術大会 (東京). 2008年9月25日. J Oral Biosci 50(S): 214, 2008. (Abstract #P-315)
- 29) 佐藤拓一, 星川 康, 近藤 丘, 高橋信博: 全身麻酔手術後の上気道防御反射低下と口腔細菌不顕性誤嚥: 誤嚥性肺炎のモデルとして. 第50回歯科基礎医学会学術大会 (東京). 2008年9月25日. J Oral Biosci 50(S): 219, 2008. (Abstract #P-333).
- 30) 清水弘一, 五十嵐公英, 高橋信博: テレメトリー法による2週間にわたるブラーク酸産生能とアルカリ産生能の測定. 第57回日本口腔衛生学会・総会 (さいたま). 2008年10月4日. 口腔衛生会誌 58(4): 441, 2008. (Abstract #P-123).
- 31) Takahashi N: Mutans streptococci and non-mutans streptococci in oral biofilm. The 56th JADR (Nagoya) 29 November, 2008 Abstract #S1-4 (Symposium 1: Oral Biofilm Today).
- 32) Takahashi N: Oral microbial ecosystem and dental caries—on the basis of Interface Oral Health Science, a new concept of dentistry in the 21st century proposed by Tohoku University Graduate School of Dentistry—. International Symposium for State Key Laboratory of Oral Diseases, Sichuan University (Chengdu, China). 11 September, 2008.
- 33) 高橋信博: フッ化物局所応用の口腔細菌に対する影響. 厚生労働科学研究フッ化物応用による歯科疾患予防プログラムの構築と社会経済的評価に関する総合的研究(H18-医療-一般-019) ワークショップ (東京). 2009年3月8日.
- 34) Takahashi N, Sato T: Metabolic activity of oral microbial ecosystem in health and disease. The 1<sup>st</sup> Tohoku-Forsyth Symposium (Boston, USA). 11 March, 2009.
- H. 知的財産権の出願・登録状況  
なし

## 研究課題 2 フッ化物局所応用のう蝕予防プログラム

### 抗菌剤配合グラスアイオノマーセメントの mutans streptococci 抑制作用の評価

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）

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：**本研究では、フッ化物と抗菌成分の共存的な局所応用の有用性を評価することを目的として、グラスアイオノマーセメント（GIC）に chlorhexidine diacetate を配合した試作材料を用い、抗菌剤、フッ素ならびに金属成分の溶出性を *in vitro* で評価するとともに、材料表面における mutans streptococci に対する抑制作用を *in vivo* にて検討した。

その結果、試作 GIC は、24 時間後で約 3.4  $\mu\text{g/mL}$ 、28 日後で約 5.7  $\mu\text{g/mL}$  の chlorhexidine の溶出を示すが、フッ素や Al, Sr の溶出濃度には chlorhexidine 非配合のコントロールと差がないことが分かった。また、試作 GIC では、口腔内で 1 ヶ月間経過後に表面に付着しているプラーク中の mutans streptococci 数がコントロールよりも有意に少ないことが明らかとなった。

以上より、chlorhexidine の配合は、細菌抑制作用という点での GIC の抗う蝕性の向上に有効であり、修復材をベースとしたフッ化物と chlorhexidine の併用が二次う蝕予防に有用な手段となる可能性のあることが示唆された。

#### A. 研究目的

フッ化物には、歯質の脱灰の抑制や再石灰化効果のほかに、細菌に対する抑制作用があることが知られている<sup>1)</sup>。われわれは、フッ化物の局所応用の観点から、修復治療におけるグラスアイオノマーセメント（GIC）の有用性に着目し、これまでに、GIC から溶出するフッ素によって *Streptococcus mutans* や *S. sanguinis* の糖代謝が抑制され、乳酸産生量が低下することを明らかにしてきた<sup>2)</sup>。しかし

ながら、GIC からのフッ素徐放濃度は強い抗菌効果をもたらすレベルではなく、細菌に対する作用という意味では、より積極的な抗菌的アプローチを組み合わせることが望ましいと考えられる。

一方、非侵襲的なう蝕治療としての Atraumatic Restorative Treatment（ART）に使用する修復材に窩洞殺菌作用をもたせる目的で、われわれは、従来型 GIC に chlorhexidine を配合した試作材料について、*in vitro* および *in vivo* 両

系での抗菌性試験を行い、chlorhexidine diacetate 配合 GIC が *S. mutans* や *Lactobacilli* をはじめとするう蝕関連細菌に対して明らかな抗菌性を有することを確認してきた<sup>3,4)</sup>。この試作 GIC は、湿润環境下で chlorhexidine を溶出することにより抗菌作用を発揮するタイプであることから、窩洞内面のみならず、口腔内に露出した修復物表面においても明瞭な抗う蝕性を発現できる可能性が高い。

そこで本研究では、フッ化物と抗菌成分の共存的な局所応用の有用性を評価することを目的に、chlorhexidine diacetate を配合した試作 GIC からの成分溶出性を評価するとともに、本 GIC 表面での *mutans streptococci* に対する抑制作用を *in vivo* にて検討した。

## B. 研究方法

### 1. GIC 試料の調整

従来型 GIC である Fuji IX (GC) をコントロールとし、粉末に chlorhexidine diacetate を 1% の濃度で配合した試作抗菌性 GIC を調整した。

### 2. chlorhexidine 溶出濃度の測定

各 GIC を練和 (粉液比 3.6) 後、モールドに填入し、セルロイドストリップスとスライドガラスで圧接して室温で 30 分間硬化させ、直径 10 mm、厚さ 2 mm のディスク状硬化体を作製した。

試料を、硬化後ただちに滅菌超純水 1 mL に浸漬して 37°C 下で保管し、24 時間、7 日および 28 日間経過後に、高速液体クロマトグラフィーにより溶出した

chlorhexidine の濃度を測定した。移動相には 100 mM sodium perchlorate を含む acetonitrile の phosphate buffer solution を使用し、逆相カラム (Shim-pack VP-ODS, Shimadzu) を用いて分離を行い、絶対検量線法により濃度を算出した。試料数は 3 とした。

### 3. フッ素および Al, Sr 溶出濃度の測定

各 GIC 硬化体を 5 mL の PBS (Dulbecco's PBS, GibcoBRLA) に浸漬し、37°C で 24 時間保管後、溶出液を直径 0.22  $\mu\text{m}$  のフィルター (MILLEX GP, MILLIPORE) にて濾過した。得られた試料を TISAB 溶液 (関東化学) にて希釈した後、pH/イオンメーター (F-53, HORIBA) を用いて溶出したフッ素イオン濃度の測定を行った。

また、溶出液中の Al と Sr の濃度を、原子吸光分光光度計 (AA-6800F, Shimadzu) を用いて測定した。

試料数はいずれも 3 とした。

### 4. *In vivo* 試験

トルコ共和国 Ege 大学歯学部倫理委員会の承認のもと、両側乳臼歯の隣接面う蝕を有する 6~10 歳の小児 23 人を対象に、う蝕を除去後、片側をコントロール GIC にて、反対側を chlorhexidine diacetate 配合試作 GIC にて充填した。1 ヶ月間経過後、フロスをういて修復物の隣接面部分に付着したプラークを採取し、1 mL の Reduced transport fluid に浸漬して実験室に輸送した。試料を 0.05 M リン酸緩衝液 (pH 7.1) にて希釈・

攪拌後、MSB 寒天平板培地に播種し、37°C で 48 時間嫌気培養を行い、コロニー数を計測した。

## C. 結果

### 1. chlorhexidine 溶出濃度の測定

各浸漬期間における chlorhexidine 溶出濃度の平均値と標準偏差を表 1 に示す。7 日後には、24 時間後よりも溶出濃度の増加が認められたが、7 日後と 28 日後を比較した場合、濃度の増加はわずかであった。

### 2. フッ素および Al, Sr 溶出濃度の測定

コントロールおよび試作 GIC 硬化体からの各成分の溶出濃度の平均値と標準偏差を表 2 に示す。フッ素, Al, Sr のいずれについても、二材料間に有意差は認められなかった (Student's *t*-test,  $p < 0.05$ )。

### 3. *In vivo* 試験

各 GIC 表面に付着したプラーク中の *mutans streptococci* 数は、コントロール GIC では  $(2.69 \pm 0.82) \times 10^4$  CFU/sample, 試作 chlorhexidine 配合 GIC では  $(1.88 \pm 0.62) \times 10^4$  CFU/sample であり、試作 GIC において有意に低い結果となった (MannWhitney's *U* test,  $p < 0.05$ )。

## D. 考察

*In vivo* での試験結果より、chlorhexidine を配合した試作 GIC は、その表面に形成されるプラーク中の

*mutans streptococci* 数を低下させる効果を有することが示された。試作 GIC からのフッ素の溶出濃度は、コントロール GIC と差がなく、また抗菌性に関する可能性のある Al や Sr といった金属成分の溶出性にも二材料間には差が認められなかったことから、試作 GIC での細菌数の低下は、含有する chlorhexidine の溶出によるものであると考えられた。chlorhexidine は *mutans streptococci* に対して低濃度で強い殺菌効果を示す抗菌剤であることが知られている。Pallanza ら<sup>5)</sup>は、*S. mutans* に対する chlorhexidine の最小発育阻止濃度 (MIC) および最小殺菌濃度 (MBC) は、それぞれ 0.5~4  $\mu\text{g/mL}$ , 0.5~16  $\mu\text{g/mL}$  であったと報告しており、また、われわれが *S. mutans* NCTC10449 に対する chlorhexidine diacetate の MIC, MBC を調べた結果では、それぞれ、3.91  $\mu\text{g/mL}$ , 31.3  $\mu\text{g/mL}$  であった。したがって、試作 GIC では、充填から 24 時間のうちに、*mutans streptococci* を抑制できるレベルの濃度の chlorhexidine の溶出が生じるものと判断してよいであろう。

しかしながら、平均値でコントロール GIC の約 70%には低下したものの、試作 GIC の *mutans streptococci* 抑制作用は、対数的なレベルの菌数減少をもたらすほどではなかった。硬化体からの chlorhexidine の溶出による細菌抑制は、ペースト状の GIC を填入し、その硬化途上から抗菌効果が発揮される窩洞内面への適用の場合とは異なり、殺菌的に働くほど強いものではないことが示唆された。