

Effects of α -Amylase and Its Inhibitors on Acid Production from Cooked Starch by Oral Streptococci

S. Aizawa^{a,b} H. Miyasawa-Hori^b K. Nakajo^b J. Washio^b H. Mayanagi^a
S. Fukumoto^a N. Takahashi^b

Divisions of ^aPediatric Dentistry and ^bOral Ecology and Biochemistry, Tohoku University Graduate School of Dentistry, Sendai, Japan

Key Words

α -Amylase · Acarbose · Acid production · Maltotriitol · Oral streptococci · Starch · Xylitol

Abstract

This study evaluated acid production from cooked starch by *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sobrinus*, *Streptococcus sanguinis* and *Streptococcus mitis*, and the effects of α -amylase inhibitors (maltotriitol and acarbose) and xylitol on acid production. Streptococcal cell suspensions were anaerobically incubated with various carbohydrates that included cooked potato starch in the presence or absence of α -amylase. Subsequently, the fall in pH and the acid production rate at pH 7.0 were measured. In addition, the effects of adding α -amylase inhibitors and xylitol to the reaction mixture were evaluated. In the absence of α -amylase, both the fall in pH and the acid production rate from cooked starch were small. On the other hand, in the presence of α -amylase, the pH fell to 3.9–4.4 and the acid production rate was 0.61–0.92 μ mol per optical density unit per min. These values were comparable to those for maltose. When using cooked starch, the fall in pH by *S. sanguinis* and *S. mitis* was similar to that by *S. mutans* and *S. sobrinus*. For all streptococci, α -amylase inhibitors caused a decrease in acid production from cooked starch, although xylitol only decreased acid production by

S. mutans and *S. sobrinus*. These results suggest that cooked starch is potentially acidogenic in the presence of α -amylase, which occurs in the oral cavity. In terms of the acidogenic potential of cooked starch, *S. sanguinis* and *S. mitis* were comparable to *S. mutans* and *S. sobrinus*. α -Amylase inhibitors and xylitol might moderate this activity.

Copyright © 2009 S. Karger AG, Basel

Once the cariogenicity of monosaccharides and disaccharides were recognized [Scheinin et al., 1976], strategies to prevent caries have included controlling the intake of these sugars and using nonfermentable sugar substitutes. However, the cariogenicity of starch contained in rice, wheat and potatoes, which are eaten frequently not only as staple foods but also as snacks, has yet to be determined [Glor et al., 1988; Lingström et al., 2000].

Raw starch has been used in most animal experiments, and results have demonstrated that raw starch is not cariogenic, as it cannot be easily degraded by salivary amylase [Havenaar et al., 1984; Grenby, 1990]. It has also been shown that oral bacteria such as *Streptococcus mutans*, *Streptococcus mitis* and *Actinomyces viscosus* do not cause a fall in the pH due to raw starch [Ellen and Onose, 1978]. Furthermore, it has been reported that acid production

KARGER

Fax +41 61 306 12 34
E-Mail karger@karger.ch
www.karger.com

© 2009 S. Karger AG, Basel
0008-6568/09/0431-0017\$26.00/0

Accessible online at:
www.karger.com/crc

Nobuhiro Takahashi, DDS, PhD
Division of Oral Ecology and Biochemistry, Department of Oral Biology
Tohoku University Graduate School of Dentistry
4-1 Seiryō-machi, Aoba-ku, Sendai, Miyagi 980-8575 (Japan)
Tel. +81 22 717 8294, Fax +81 22 717 8297, E-Mail nobu-t@mail.tains.tohoku.ac.jp

from raw starch in the oral cavity is too small to be able to demineralize the surfaces of the teeth [Brudevold et al., 1985]. However, it is not realistic to consider evaluating raw starch cariogenicity in modern society since cooked starch rather than raw starch is used today, and cooked starch is easily degraded by amylase.

In the animal experiments, cooked starch has been shown to be noncariogenic in monkeys [Beighton and Hayday, 1984], although it is cariogenic in rats [Firestone et al., 1982, 1984]. The discrepancy for cooked starch cariogenicity may be due not only to the type of animal species used, which involves saliva properties and bacterial flora, but also the experimental conditions, such as the quantity and frequency of intake and the physical properties of the foods, such as the food shape [Lingström et al., 2000]. In humans, it has been reported that upon intake of cooked starch, dental plaque is able to lower the pH to levels that allow enamel demineralization [Lingström et al., 1994; Pollard, 1995; Lingström et al., 2000]. Thus, since starchy foods such as potato chips, popcorn and rice crackers are now being consumed as snacks between meals around the world, it is necessary to evaluate the acidogenic potential of cooked starch in human oral bacteria, including mutans streptococci. Previous studies [Clarkson et al., 1987; Duarte et al., 2008] suggested that *Streptococcus mutans* produces acid from starch in the presence of α -amylase.

Therefore, the present study attempted to evaluate the acid production by representative oral streptococci when exposed to cooked starch in the presence of salivary α -amylase. In addition, α -amylase inhibitors, such as acarbose, maltotriitol and xylitol, were examined in order to determine whether they can disturb the starch metabolism of oral streptococci. Acarbose is an inhibitor of α -glucosidases including α -amylase [Truscheit et al., 1981], and is used as a medicine for diabetes by retarding the digestion of carbohydrates and absorption of glucose [Mörmann et al., 1983; Raimband et al., 1992], while maltotriitol is an indigestible sugar alcohol known to inhibit the maltose metabolism of mutans streptococci [Wursch et al., 1982].

Materials and Methods

Bacterial Strains

Streptococcus mutans NCTC10449, *Streptococcus sobrinus* ATCC6715 were used as representatives of caries-related bacteria. *Streptococcus sanguinis* ATCC10556 and *Streptococcus mitis* NCTC3165, which represented non-mutans streptococci that are predominant in dental plaque, were also used in this study.

Culture Media

Basal culture medium (1 liter) contained 17 g of tryptone (Difco Laboratories, Detroit, Mich., USA), 3 g of yeast extract (Difco) and 5 g of NaCl. After autoclaving, 0.3% glucose and 14 mM K_2HPO_4 were added separately through a sterile membrane filter (pore size 0.22 μ m; Pall Gelman Laboratory, Ann Arbor, Mich., USA). This medium was designated as a TYE culture medium.

Anaerobic Procedure

All the experiments for bacterial cultivation and metabolism were conducted under strictly anaerobic conditions. The storage and cultivation of bacteria were performed in an anaerobic chamber (type NHC, gas phase: N_2 , 80%; H_2 , 10%; CO_2 , 10%; Hirasawa Works, Tokyo, Japan). Preparation of bacterial cell suspensions and bacterial metabolism experiments were carried out in another anaerobic chamber (type NH, gas phase: N_2 , 90%; H_2 , 10%; Hirasawa Works). During centrifugation outside of the anaerobic chamber for harvesting and washing, the bacterial cells were protected from exposure to air by double-sealed centrifuge tubes (Kubota Commercial Affairs, Tokyo, Japan) [Miyasawa et al., 2003]. To remove oxygen, culture media and solutions were kept in the anaerobic chambers for at least 3 days prior to use, while powdered reagents and experimental instruments were placed in the anaerobic chamber for at least 1 day prior to use.

Bacterial Growth Conditions

The bacterial strains, which were cultured on blood agar plates and stored at 4°C in the anaerobic chamber, were inoculated into 8 ml of TYE culture media, and then incubated anaerobically at 37°C overnight. The bacterial suspension was subcultured in another 100 ml of TYE culture medium overnight, and then further cultured in 800 ml of TYE culture medium. Bacterial growth was monitored by measuring the optical density at 660 nm with a spectrophotometer (model UV-160, Shimadzu, Kyoto, Japan). The cells were harvested at the early exponential phase of growth by centrifugation (6,500 g for 15 min at 4°C). The cells were washed twice with 2 mM potassium phosphate buffer solution (pH 7.0) containing 150 mM KCl and 5 mM $MgCl_2$ (4°C). Washed cells were finally resuspended in the same solution at a concentration of 1.9 mg dry weight of cells per ml. The cell suspensions were stored at 4°C under anaerobic conditions until the following experiments were performed.

Preparation of Starch Solution and Salivary α -Amylase

Starch powder prepared from cooked potatoes (Wako Pure Chemical Industries, Osaka, Japan) was suspended in deionized water at a concentration of 5%, and heated at 95°C for 15 min. To remove small oligosaccharides that coexisted in the starch solution, the solution was placed in a cellulose tube (Viskase Sales, Willowbrook, Ill., USA) and dialyzed against deionized water.

Human stimulated saliva was collected from 2 people. The samples were centrifuged and then filtered through a membrane filter, pore size 0.20 μ m (Advantec, polypropylene; Toyo Roshi, Tokyo, Japan). The saliva samples were stored at 4°C and used within 1 h. The α -amylase activity in the saliva was measured by using an assay kit (amylase test, Wako). Commercially available human salivary α -amylase (type VIII-A, Sigma, Tokyo, Japan) was suspended in deionized water at the same enzymic activity. In the following experiments, the salivary α -amylase solution was used.

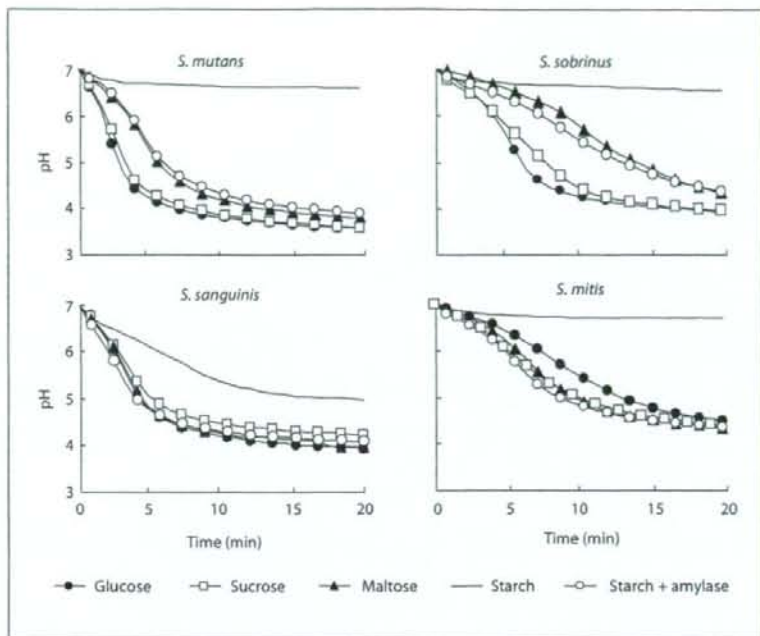


Fig. 1. The pH fall by the acid production from various sugars and cooked starch for 20 min. The results were similar among 3 independent experiments.

Measurement of pH Fall and Acid Production

Cells suspended in 2 mM potassium phosphate buffer solution (pH 7.0) containing 150 mM KCl and 5 mM MgCl₂ as described above (2.70 ml) were preincubated at pH 7.0 and 35°C for 4 min by titration with 60 mM KOH using a pH stat (Auto pH Stat; model AUT-211S, Toa Electronics, Tokyo, Japan) with a magnetic stirrer. The reaction was started in the cell suspensions by addition of a mixture (0.30 ml) containing 0.5% glucose, maltose, sucrose or deionized water. The pH fall from the initial pH 7.0 was monitored for 20 min by using a pH electrode without pH titration. The acid production rate was monitored at pH 7.0 for 10 min by using an automatic pH titration. The experiments were carried out 3 times independently.

Analysis of Acidic End Products from Various Sugar Fermentations

At 10 min after the addition of various sugars in the pH titration experiment, the cell suspensions (1.00 ml) were sampled and mixed immediately with 0.10 ml 6 N perchloric acid. The resultant mixtures were brought out from the anaerobic chamber and filtered (pore size 0.20 μm; Advantec, polypropylene) to remove cell debris. The cell-free filtrates were diluted with 0.2 N HCl and stored at 4°C for the assay of acidic end products. Acidic end products, which included lactic, acetic, formic and pyruvic acids, were quantified with a carboxylic acid analyzer (model Eyela S-3000X, Tokyo Rikakikai, Tokyo, Japan), as described previously [Takahashi et al., 1987].

Effects of Acarbose, Maltotriitol and Xylitol

As α-amylase inhibitors, acarbose (LKT Laboratories, St. Paul, Minn., USA) and maltotriitol (a gift from Mitsubishi Foodtech, Tokyo, Japan) were examined. Furthermore, we also used xylitol (Wako), which is known to be non-fermentable by oral bacteria [Ghring et al., 1974; Trahan, 1995] and to disturb the sugar metabolism of the mutans streptococci [Kakuta et al., 2003; Miyasawa et al., 2003]. In addition, we used an assay kit (amylase test, Wako) to determine whether acarbose, maltotriitol and xylitol could inhibit α-amylase activity.

Statistical Analysis

All numerical data are given as means ± standard deviations. Comparison between substrates was made by the one-way repeated-measures ANOVA, and significance was examined by the Scheffé post hoc test. Statistical analysis was performed using StatFlex software version 5.0 (Artech, Osaka, Japan). Differences were considered significant at the level $p < 0.05$.

Results

pH Fall in Cell Suspensions

After addition of glucose and sucrose to *S. mutans* suspensions there was a rapid fall in pH, which reached 3.58 at 20 min (fig. 1). While the pH fall from cooked starch in the absence of α-amylase was negligible, in the pres-

Table 1. Acid production rate from various sugars and cooked starch by streptococcal cells

Strains	Substrate							
	glucose	sucrose	maltose	starch	starch + amylase	starch + amylase + acarbose	starch + amylase + maltotriitol	starch + amylase + xylitol
<i>S. mutans</i>								
Acid production rate, $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$	0.87 ± 0.43	0.78 ± 0.35	0.62 ± 0.26	0.09 ± 0.02	0.69 ± 0.28	0.19 ± 0.03	0.20 ± 0.06	0.22 ± 0.03
Glucose rate, %	100 ^a	90 \pm 2 ^a	73 \pm 5 ^b	11 \pm 2 ^c	81 \pm 6 ^b	38 \pm 1 ^b	43 \pm 17 ^b	52 \pm 12 ^b
Starch + amylase rate, %					100 ^a			
<i>S. sobrinus</i>								
Acid production rate, $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$	1.17 ± 0.12	1.01 ± 0.06	0.58 ± 0.08	0.05 ± 0.01	0.61 ± 0.08	0.18 ± 0.03	0.39 ± 0.10	0.42 ± 0.07
Glucose rate, %	100 ^a	87 \pm 4 ^b	49 \pm 4 ^c	4 \pm 0 ^d	52 \pm 4 ^c	30 \pm 6 ^b	65 \pm 12 ^b	70 \pm 5 ^b
Starch + amylase rate, %					100 ^a			
<i>S. sanguinis</i>								
Acid production rate, $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$	0.89 ± 0.25	0.76 ± 0.27	0.61 ± 0.22	0.30 ± 0.21	0.92 ± 0.31	0.27 ± 0.09	0.64 ± 0.19	0.96 ± 0.32
Glucose rate, %	100 ^a	85 \pm 6 ^a	67 \pm 16 ^a	32 \pm 17 ^b	103 \pm 5 ^a	30 \pm 4 ^b	70 \pm 9 ^a	83 \pm 7 ^a
Starch + amylase rate, %					100 ^a			
<i>S. mitis</i>								
Acid production rate, $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$	0.47 ± 0.03	0.51 ± 0.03	0.52 ± 0.03	0.09 ± 0.02	0.61 ± 0.05	0.17 ± 0.02	0.27 ± 0.17	0.56 ± 0.06
Glucose rate, %	100 ^a	108 \pm 12 ^a	111 \pm 12 ^a	20 \pm 6 ^b	131 \pm 1 ^a	27 \pm 3 ^b	42 \pm 26 ^a	91 \pm 3 ^a
Starch + amylase rate, %					100 ^a			

Data presented are means \pm SD for 3 experiments. Acid production rates from all the substrates with and without inhibitors were statistically analyzed in the same group.

A set of experiments was performed with the different substrates at the same time using the same culture of bacteria.

Data with different superscript letters in the same row are statistically different ($p < 0.05$).

ence of α -amylase the pH fall was almost equal to that from maltose, which reached 3.80 at 20 min. The pH value at 20 min observed for both glucose and sucrose was significantly larger ($p < 0.01$) than that for maltose and cooked starch in the presence of α -amylase. Similar results were obtained for *S. sobrinus*, with the exception that the pH fall noted with cooked starch in the presence of α -amylase was a little larger than that for maltose.

On the other hand, the pH values at 20 min after the addition of glucose, sucrose and maltose to *S. sanguinis* suspensions were 3.95, 4.25 and 4.00, respectively, with none of the differences exhibiting significance. In the absence of α -amylase, an obvious pH fall was observed for the cooked starch, though it was smaller than that observed for glucose, sucrose and maltose. In the presence of amylase, the pH fall was closer to that observed for glucose, sucrose and maltose. Similar results were obtained in *S. mitis* with the exception that the pH fall noted for cooked starch in the absence of α -amylase was negligible, while the pH fall for cooked starch in the presence of α -amylase was comparable to the other carbohydrates.

The Rate of Acid Production by Cell Suspensions at pH 7.0

With the rate of acid production from glucose regarded as being 100%, the rates for sucrose, maltose and cooked starch in the absence of α -amylase by *S. mutans* were 90 \pm 2, 73 \pm 5 and 11 \pm 2%, respectively (table 1). In the presence of α -amylase, the acid production from cooked starch was 81 \pm 6%, which was almost the same as seen for maltose. Similar results were obtained for *S. sobrinus*.

Similarly, the acid production rates for cooked starch observed in *S. sanguinis* and *S. mitis* were increased by the presence of α -amylase and exceeded those seen for glucose, sucrose and maltose.

Acidic End Products

For *S. mutans*, approximately one half of the total amount of the acidic end products from glucose and sucrose was lactic acid. In contrast, there was a low proportion of lactic acid in the acidic end products from cooked starch, which was the same for maltose (fig. 2). Similar

Fig. 2. Amounts of acidic end products and relative amounts of acidic end products for 10 min by the cells of *S. mutans* NCTC 10449 at pH 7.0. The data are the means of 3 independent experiments. Error bars indicate standard deviations.

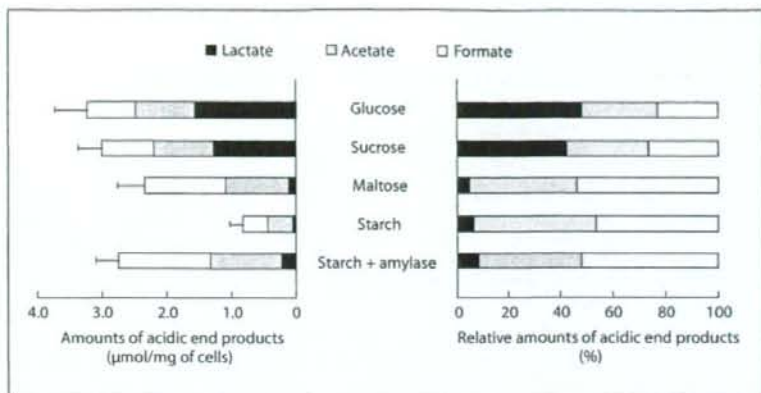
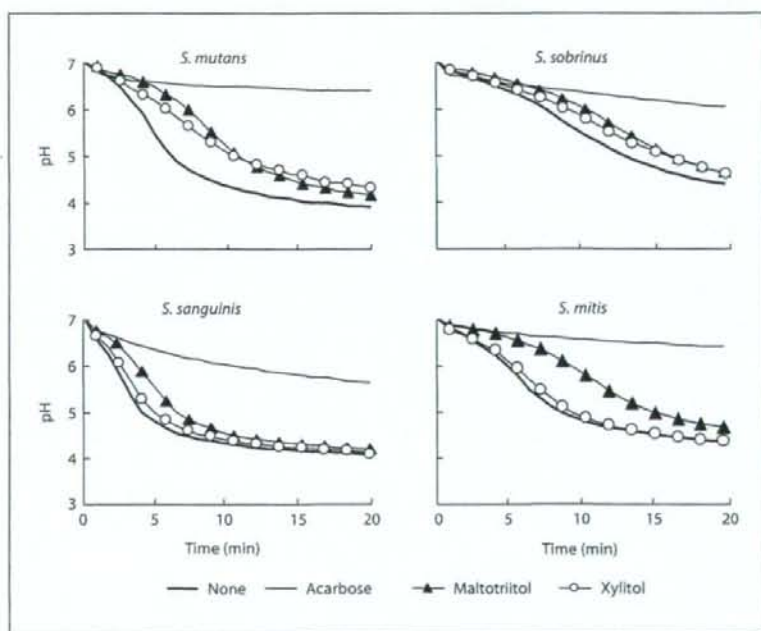


Fig. 3. Effects of acarbose, maltotriitol and xylitol on the pH fall by the acid production from cooked starch in the presence of amylase for 20 min. The results were similar among 3 independent experiments.



results were obtained in *S. sobrinus*, *S. sanguinis* and *S. mitis* (data not shown).

Effects of α -Amylase Inhibitors and Xylitol on pH Fall and Acid Production Rate from Cooked Starch

The addition of 1 mM acarbose inhibited the pH fall from cooked starch in the presence of α -amylase (fig. 3). While 60 mM maltotriitol also inhibited the pH fall, the inhibitory effect was lower than that seen for 1 mM acarbose. In *S. mutans* and *S. sobrinus*, 60 mM xylitol moder-

ately inhibited the pH fall, while no effect was observed with *S. sanguinis* and *S. mitis*.

Acarbose, maltotriitol and xylitol inhibited the acid production rate of *S. mutans* from cooked starch in the presence of α -amylase (table 1). Similar results were obtained in *S. sobrinus*. While acarbose and maltotriitol inhibited the acid production by *S. sanguinis* and *S. mitis*, xylitol only had a small effect.

While acarbose and maltotriitol only had small inhibitory effects on the acid production rates by *S. mutans*

from glucose ($5 \pm 6\%$, $4 \pm 4\%$, respectively), sucrose ($16 \pm 13\%$, $4 \pm 4\%$, respectively) and maltose ($8 \pm 2\%$, $10 \pm 1\%$, respectively), xylitol efficiently inhibited the acid production from glucose ($21 \pm 10\%$), sucrose ($31 \pm 9\%$) and maltose ($47 \pm 5\%$). *S. sobrinus* exhibited similar results. In addition, *S. sanguinis* and *S. mitis* showed similar results except that xylitol had no inhibitory effect (data not shown).

Effects of Acarbose, Maltotriitol and Xylitol on α -Amylase Activity

There were 87 and 32% inhibitions of α -amylase activity (619 Caraway unit) by 1 mM acarbose and 60 mM maltotriitol, respectively. Xylitol, however, exhibited no inhibitory effect on α -amylase activity.

Discussion

It is known that α -amylase hydrolyzes cooked starch mainly to maltose and maltotriose in addition to various other low-molecular-weight dextrans [Mörmann and Mühlemann, 1981; Kashket et al., 1996]. Oral streptococci are known to possess a multiple sugar transport system that transports low-molecular-weight dextrans into cells [Russell et al., 1992; Tao et al., 1993]. This allows for the cells to grow by utilizing maltotriose, maltotetraose, maltopentaose and maltohexaose [Glor et al., 1988; Russell et al., 1992; Tao et al., 1993]. In the present study, the acid production from cooked starch in the presence of α -amylase tended to be higher than that observed for maltose (table 1, fig. 1), suggesting that the oral streptococci incorporate low-molecular-weight dextrans derived from cooked starch more efficiently than maltose, and are thus able to convert them into acids.

S. sanguinis was the only strain that showed both a pH fall and acid production from cooked starch in the absence of α -amylase, suggesting that this strain possesses an extracellular α -glucosidase activity, but this activity was much smaller than that observed for the salivary α -amylase. This result supports a previous study that some oral streptococcal strains have α -amylase activity [Glor et al., 1988].

Both the pH fall and the acid production from glucose and sucrose by *S. mutans* and *S. sobrinus* exceeded those by *S. sanguinis* and *S. mitis* (table 1, fig. 1). This clearly indicates that mutans streptococci are more acidogenic than the non-mutans streptococci. However, with cooked starch in the presence of α -amylase, *S. sanguinis* and *S. mitis* were acidogenic as compared to *S. mutans* and *S.*

sobrinus. These results suggest that there is involvement of non-mutans streptococci in the cariogenic potential of cooked starch.

The main end products from maltose and cooked starch are formate and acetate, while lactate is the main end product from sucrose and glucose (fig. 2), suggesting that there is a difference in metabolic regulation between maltose/cooked starch and sucrose/glucose. Oral streptococci metabolize carbohydrates to pyruvate through the Embden-Meyerhof-Parnas pathway, and convert pyruvate into lactate via lactate dehydrogenase. This enzyme is activated by fructose 1,6-bisphosphate (FBP), one of the glycolytic intermediates [Brown and Wittenberger, 1972; Yamada and Carlsson, 1975]. Intracellular accumulation of FBP has been observed during streptococcal glucose and sucrose metabolism [Yamada and Carlsson, 1975], which explains the lactic acid production observed during glucose and sucrose metabolism. The profile of intracellular glycolytic intermediates during maltose and cooked starch metabolism might be different, i.e. there might be low levels of intracellular FBP present, and, if so, pyruvate would be converted into formate and acetate by a series of reactions initiated by pyruvate formate lyase instead of by lactate dehydrogenase [Abbe et al., 1982]. This speculation may explain the observation that acetate and formate accumulated with lactate in the retained particles of starchy food (potato chips) in the dentition [Kashket et al., 1996], while only lactate increased after sucrose intake [Gao et al., 2001]. It is suggested that high pK_a acids, such as acetic acid, diffuse efficiently in the unionized form into the tooth surface layer [Featherstone and Rodgers, 1981; Geddes et al., 1984]. If there was then dissociation of the unionized acetic acid, this could result in the release of protons inside the tooth, thereby promoting the formation of subsurface demineralization [Featherstone and Rodgers, 1981].

In the current study, 1 mM acarbose effectively inhibited the metabolism of cooked starch by oral streptococci, particularly by the mutans streptococci, while 60 mM maltotriitol only moderately inhibited the metabolism (table 1, fig. 3). Since acarbose and maltotriitol did not inhibit streptococcal sugar fermentation by themselves, but only exhibited inhibition when α -amylase was present, the inhibitory effects can be considered to be indirect and occur mainly through α -amylase inhibition. Acarbose has been reported to inhibit the incidence of caries in rats fed a processed starch diet [Mörmann et al., 1983], while maltotriitol has been reported to inhibit acid production in human dental plaque in the presence of saliva [Wursch and Koellreutter, 1982]. Thus, it is possible that

α -amylase inhibitors such as acarbose and maltotriitol are capable of moderating starch cariogenicity in humans.

The acarbose inhibition in *S. sanguinis* was weaker than for the other streptococci. This could possibly be attributed to the starch-degrading activity of *S. sanguinis* (fig. 1), which might tolerate acarbose. Meanwhile, xylitol inhibited the starch metabolism by the mutans streptococci through a direct inhibition of bacterial glycolysis. It has been reported that xylitol is incorporated into mutans streptococci as xylitol 5-phosphate and inhibits several intracellular glycolytic enzymes including glucose phosphate isomerase and phosphofructokinase, which leads to inhibition of glycolysis [Trahan, 1995; Miyasawa, 2003]. Xylitol did not inhibit starch metabolism of the non-mutans streptococci, as xylitol has no effect on either the glycolysis of the non-mutans streptococci [Vadeboncoeur et al., 1983] or the activity of α -amylase as shown in the present study.

In conclusion, the present study clearly showed that cooked starch in the presence of salivary α -amylase was a potential source of acids that could be produced by oral streptococci. In addition, non-mutans streptococci as well as mutans streptococci can be significant acid producers from cooked starch since they have similar acidogenicity. The acidogenicity might be controlled by α -amylase inhibitors and xylitol.

References

- Abbe K, Takahashi S, Yamada T: Involvement of oxygen-sensitive pyruvate formate-lyase in mixed-acid fermentation by *Streptococcus mutans* under strictly anaerobic conditions. *J Bacteriol* 1982;152:175-182.
- Beighton D, Hayday H: The establishment of the bacterium *Streptococcus mutans* in dental plaque and the induction of caries in macaque monkeys (*Macaca fascicularis*) fed a diet containing cooked-wheat flour. *Arch Oral Biol* 1984;29:369-372.
- Brown AT, Wittenberger CL: Fructose-1,6-diphosphate-dependent lactate dehydrogenase from a cariogenic streptococcus: purification and regulatory properties. *J Bacteriol* 1972;110:604-615.
- Brudevold F, Goulet D, Tehrani A, Attarzadeh F, van Houte J: Intraoral demineralization and maltose clearance from wheat starch. *Caries Res* 1985;19:136-144.
- Clarkson BH, Krell D, Wefel JS, Crall J, Feagin FF: In vitro caries-like lesion production by *Streptococcus mutans* and *Actinomyces viscosus* using sucrose and starch. *J Dent Res* 1987;66:795-798.
- Duarte S, Klein MI, Aires CP, Cury JA, Bowen WH, Koo H: Influences of starch and sucrose on *Streptococcus mutans* biofilms. *Oral Microbiol Immunol* 2008;23:206-212.
- Ellen RP, Onose H: pH measurements of *Actinomyces viscosus* colonies grown on media containing dietary carbohydrates. *Arch Oral Biol* 1978;23:105-109.
- Featherstone JDB, Rodgers BE: Effects of acetic, lactic and other organic acids on the formation of artificial caries lesions. *Caries Res* 1981;15:377-385.
- Firestone AR, Schmid R, Mühlemann HR: Cariogenic effects of cooked wheat starch alone or with sucrose and frequency-controlled feedings in rats. *Arch Oral Biol* 1982;27:759-763.
- Firestone AR, Schmid R, Mühlemann HR: Effect of the length and number of intervals between meals on caries in rats. *Caries Res* 1984;18:128-133.
- Gao XJ, Fan Y, Kent RL Jr, Van Houte J, Margois HC: Association of caries activity with the composition of dental plaque fluid. *J Dent Res* 2001;80:1834-1839.
- Geddes DA, Weetman DA, Featherstone JDB: Preferential loss of acetic acid from plaque fermentation in the presence of enamel. *Caries Res* 1984;18:430-433.
- Ghring F, Makinen KK, Larmas M, Scheinin A: Turku sugar studies. IV. An intermediate report on the differentiation of polysaccharide-forming streptococci (*S. mutans*). *Acta Odontol Scand* 1974;32:435-444.
- Glor EB, Miller CH, Spandau DF: Degradation of starch and its hydrolytic products by oral bacteria. *J Dent Res* 1988;67:75-81.
- Grenby TH: Snack foods and dental caries: investigations using laboratory animals. *Br Dent J* 1990;168:353-361.
- Havenaar R, Drost JS, de Stoppelaar JD, Huis in't Veld JH, Dirks OB: Potential cariogenicity of Lycasin 80/55 in comparison to starch, sucrose, xylitol, sorbitol and L-sorbitol in rats. *Caries Res* 1984;18:375-384.

Acknowledgment

This study was supported in part by Grants-in-Aid for Scientific Research B (No. 16390601 and 19390539 to N.T.) from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology of Japan.

- Kakuta H, Iwami Y, Mayanagi H, Takahashi N: Xylitol inhibition of acid production and growth of mutans streptococci in the presence of various dietary sugars under strictly anaerobic conditions. *Caries Res* 2003;37:404-409.
- Kashket S, Yaskell T, Murphy JE: Delayed effect of wheat starch in foods on the intraoral demineralization of enamel. *Caries Res* 1994;28:291-296.
- Kashket S, Zhang J, Van Houte J: Accumulation of fermentable sugars and metabolic acids in food particles that become entrapped on the dentition. *J Dent Res* 1996;75:1885-1891.
- Lingström P, Birkhed D: Plaque pH and oral retention after consumption of starchy snack products at normal and low salivary secretion rate. *Acta Odontol Scand* 1993;51:379-388.
- Lingström P, Birkhed D, Ruben J, Arends J: Effect of frequent consumption of starchy food items on enamel and dentin demineralization and on plaque pH in situ. *J Dent Res* 1994;73:652-660.
- Lingström P, van Houte J, Kashket S: Food starches and dental caries. *Crit Rev Oral Biol Med* 2000;11:366-380.
- Miyasawa H, Iwami Y, Mayanagi H, Takahashi N: Xylitol inhibition of anaerobic acid production by *Streptococcus mutans* at various pH levels. *Oral Microbiol Immunol* 2003;18:215-219.
- Mörmann JE, Mühlemann HR: Oral starch degradation and its influence on acid production in human dental plaque. *Caries Res* 1981;15:166-175.
- Mörmann JE, Schmid R, Mühlemann HR: Effect of alpha-amylase and alpha-glucosidase inhibitors on caries incidence and plaque accumulation in rats. *Caries Res* 1983;17:353-356.
- Pollard MA: Potential cariogenicity of starches and fruits as assessed by the plaque-sampling method and an intraoral cariogenicity test. *Caries Res* 1995;29:68-74.
- Raimbaud E, Buleon A, Perez S: Molecular modelling of acarviosine, the pseudo-disaccharide moiety of acarbose, and other inhibitors of alpha-amylases. *Carbohydr Res* 1992;227:351-363.
- Russell RR, Aduse-Opoku J, Sutcliffe IC, Tao L, Ferretti JJ: A binding protein-dependent transport system in *Streptococcus mutans* responsible for multiple sugar metabolism. *J Biol Chem* 1992;267:4631-4637.
- Scheinin A, Mäkinen KK, Ylitalo K: Turku sugar studies. V. Final report on the effect of sucrose, fructose and xylitol diets on the caries incidence in man. *Acta Odontol Scand* 1976;34:179-216.
- Takahashi N, Abbe K, Takahashi-Abbe S, Yamada T: Oxygen sensitivity of sugar metabolism and interconversion of pyruvate formate-lyase in intact cells of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sanguis*. *Infect Immun* 1987;55:652-656.
- Tao L, Sutcliffe IC, Russell RR, Ferretti JJ: Cloning and expression of the multiple sugar metabolism (*msm*) operon of *Streptococcus mutans* in heterologous streptococcal hosts. *Infect Immun* 1993;61:1121-1125.
- Trahan L: Xylitol: a review of its action on mutans streptococci and dental plaque - its clinical significance. *Int Dent J* 1995;45:77-92.
- Truscheit E, Frommer W, Junge B, Müller L, Schmidt DD, Wingender W: Chemistry and biochemistry of microbial α -glucosidase inhibitors. *Angew Chem* 1981;20:744-761.
- Vadeboncoeur C, Trahan L, Mouton C, Mayrand D: Effect of xylitol on the growth and glycolysis of acidogenic oral bacteria. *J Dent Res* 1983;62:882-884.
- Wursch P, Koellreutter B: Maltitol and maltotriitol as inhibitors of acid production in human dental plaque. *Caries Res* 1982;16:90-95.
- Yamada T, Carlsson J: Regulation of lactate dehydrogenase and change of fermentation products in streptococci. *J Bacteriol* 1975;124:55-61.

厚生労働科学研究費補助金
(循環器等生活習慣病対策総合研究事業)

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

(H20-循環器等(歯科)一般-001)

平成20年度
総括研究報告書

平成21年4月

発行責任者：厚生労働科学研究
「フッ化物応用の総合的研究」班
主任研究者 眞木吉信

印刷：千葉孔版(株)

@本書内容の無断掲載を禁じます。

厚生労働科学研究費補助金
(医療安全・医療技術評価総合研究事業)

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)

平成 19 年度総括研究報告書

主任研究者 眞木吉信

(東京歯科大学)

平成 20 年 4 月

厚生労働科学研究費補助金（医療安全・医療技術評価総合研究事業）

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)

平成 19 年度研究班

主任研究者

眞木 吉信 東京歯科大学衛生学 教授

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
西牟田 守	国立健康栄養研究所栄養疫学プログラム	上級研究員
小林 清吾	日本大学松戸歯学部社会口腔保健学	教授
花田 信弘	国立保健医療科学院口腔保健部	部長
高橋 信博	東北大学歯学研究科口腔生化学	教授
岡本 浩一	東洋英和女学院大学人間科学部	教授
二宮 一枝	岡山県立大学保健福祉学部	教授
古賀 寛	東京歯科大学衛生学	助教

厚生労働科学研究
フッ化物応用の総合的研究班事務局

東京歯科大学衛生学講座

教授 眞木 吉信

助手 古賀 寛

261-8502 千葉市美浜区真砂 1-2-2
Tel 043-270-3746, Fax 043-270-3748

厚生科学研究費補助金（医療技術評価総合研究事業）
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評価に関する総合的研究
（平成 19 年度研究者一覧）

主任研究者	眞木 吉信	東京歯科大学衛生学	教授
1. 日本人のフッ化物摂取基準			
分担研究者	西牟田 守	国立健康・栄養研究所栄養疫学プログラム	上級研究員
	古賀 寛	東京歯科大学衛生学	助教 j
協力研究者	佐藤 勉	日本歯科大学衛生学	准教授
	板井 一好	岩手医科大学医学部衛生公衆衛生学	助教授
	村上多恵子	愛知学院大学歯学部口腔衛生学	講師
2. 地域自治体のフロリデーション事業の展開			
分担研究者	小林 清吾	日本大学松戸歯学部社会口腔保健学	教授
協力研究者	磯崎 篤則	朝日大学歯学部社会口腔保健学	教授
3. フッ化物局所応用のう蝕予防プログラム			
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
	眞木 吉信	東京歯科大学衛生学	教授
	高橋 信博	東北大学歯学研究科口腔生物学講座生化学	教授
協力研究者	荒川 浩久	神奈川歯科大学口腔保健学	教授
	福島 正義	新潟大学歯学部口腔生命福祉学科	教授
	稲葉 大輔	岩手医科大学歯学部予防歯科学	准教授
	今里 聡	大阪大学大学院歯学研究科分子病態口腔科学専攻	准教授
	飯島 洋一	長崎大学医歯薬学総合研究科口腔保健学分野	准教授
4. フッ化物洗口剤の OTC 制度化			
分担研究者	花田 信弘	国立保健医療科学院口腔保健部	部長
協力研究者	薄井 由枝	国立保健医療科学院口腔保健部	協力研究員
5. 母子保健とフッ化物応用（う蝕予防）			
協力研究者	藤山 友紀	新潟市保健所保健予防課	技師
6. フッ化物とリスク心理学			
分担研究者	岡本 浩一	東洋英和女学院大学人間科学部	教授
分担研究者	二宮 一枝	岡山県立大学健康福祉部	教授
協力研究者	平田 幸夫	神奈川歯科大学歯科医療社会学	教授
顧問	高江洲義矩	東京歯科大学	名誉教授
	山本 正治	新潟大学医学部	学部長・教授
	堀井 欣一	新潟大学歯学部	名誉教授
	斎藤 寛	長崎大学医学部	学長・教授
	境 脩	福岡歯科大学	名誉教授
	可児 徳子	朝日大学歯学部社会口腔保健学	名誉教授
	飯塚 喜一	神奈川歯科大学	名誉教授（故人）

厚生労働科学研究費補助金（医療安全・医療技術評価総合研究事業）
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）平成19年度総括研究報告書

目次

I. 総括研究報告

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

真木吉信・・・1

II. 分担研究報告

1 日本人におけるフッ化物摂取基準案 ―日本口腔衛生学会承認支援―

真木吉信、西牟田 守、中垣晴男、小林清吾、古賀 寛・・・・・・・・・・・・・・18

2 ヒトのフッ化物平衡維持摂取量

西牟田 守・・・30

3 コミュニティ・ケアにおけるフッ化物応用プログラム

―地域自治体におけるフロリデーション事業の展開(2)―

小林清吾・・・32

4 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
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

高橋信博・・・42

5 高濃度フッ化物の口腔内細菌に対する生存抑制効果

高橋信博・・・51

6 エナメル質へのフッ化物取り込みと口腔内フッ化物濃度を指標とした

思春期以降のフッ化物配合歯磨剤の有効使用量

古賀 寛・・・60

7 ライフステージ別フッ化物応用プログラム

真木吉信・・・67

8 ヨーロッパ3国のフッ化物含有洗口剤利用状況の調査研究と薬事法改正からみる
フッ化物含有洗口剤の一般用医薬品への可能性

花田信弘・・・72

9	水道水フロリデーション啓発のためのDVDの開発—一般市民向け— 岡本浩一、小林清吾、眞木吉信、古賀 寛	78
10	フッ化物濃度調整事業におけるインフォームド・コンセント —具志川村におけるフッ化物調整事業中止事例のプロセス— 二宮一枝	84
Ⅲ.	平成 19 年度研究成果一覧	100

厚生労働科学研究費補助金（医療安全・医療技術評価総合研究事業）
総括研究報告書

フッ化物応用による歯科疾患の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

主任研究者 眞木 吉信 東京歯科大学歯生学 教授

研究要旨：本研究は平成18年度を初年度とした3年計画に基づいたものであり、本年度は4つの研究課題に取り組み、それぞれ以下のような研究成果が得られた。

研究課題1：日本人のフッ化物摂取基準

1) 本研究班が作成した「日本人におけるフッ化物摂取基準（案）」を日本口腔衛生学会で承認支援の手続きを行い、その結果、若干の修正・追加を行い、承認支援された。その後、この承認案を日本歯科医学会へ提出し、推奨の依頼を要請した。また、追加の研究として、フッ化物摂取における健康リスクやフッ化物平衡摂取量の実験も行った。

2) フッ化物摂取基準を決めるの健康リスクの評価の方法について概説した。

3) コミュニティにおけるフッ化物応用では、群馬県内の一つの町を対象として、水道水フッリデーションに関する住民への啓発活動を継続して行い、意識向上の効果を調査した。

研究課題2：フッ化物局所応用のう蝕予防プログラム

ライフステージに応じたフッ化物応用プログラムの試案を提示するとともに、その構築の基礎となる実験研究を行った。すなわち、高濃度フッ化物のう蝕原生菌および歯周病菌の生存抑制率の検討、根面でのフッ化物徐放性システムの接着安定性やフッ化物徐放性S-PRGフィラー根管の評価である。また、フッ化物配合歯磨剤の最適有効使用量を探索した。

研究課題3：フッ化物洗口剤のOTC化に向けて

フッ化物洗口液の認可と販売に関する欧米諸国の調査を実施し、フッ化物洗口液のOTC化の可能性を探った。

研究課題4：リスク・コミュニケーションの手法による保健政策プロセスの構築

水道水フッ化物添加や集団フッ化物洗口事業を推進するに際してフッ化物のリスクイメージが阻害要因としてクローズアップされてきた。本年度は、社会心理学の手法を用いて、フッリデーションの普及を目的としたDVDを作成した。さらに、医療倫理学の立場から、一つの地域を対象としたフッリデーションのリスクコミュニケーションのあり方を検討した。

分担研究者

小林 清吾	日本大学松戸歯学部社会保健学
西牟田 守	国立健康栄養研究所栄養疫学プログラム
中垣 晴男	愛知学院大学歯学部口腔衛生学
花田 信弘	国立保健医療科学院口腔保健学
高橋 信博	東北大学大学院歯学研究科口腔生化学
岡本 浩一	東洋英和女学院大学人間科学部
二宮 一枝	岡山県立大学保健福祉学部
古賀 寛	東京歯科大学衛生学

A. 研究目的

歯科保健における齲蝕予防方法としての各種フッ化物応用の有効性はすでに認められており、日本歯科医学会医療環境問題検討委員会フッ化物検討部会では、平成9年から3年間にわたる委員会の報告として、平成11年11月に「フッ化物応用についての総合的な見解」を公表し、①国民の口腔保健向上のためフッ化物の応用を推奨すること、②わが国におけるフッ化物の適正摂取量を確定するための研究の推進を奨励することを結論としている。本研究は、これを受けてフッ化物応用を3つの場面、すなわち、①コミュニティ・ケア、②プロフェッショナル・ケアおよび③セルフ（ホーム）・ケアに分けて、それぞれ生涯を通じたフッ化物応用の齲蝕予防プログラムを構築するとともに歯学、医学および栄養学的立場から、その健康リスクとベネフィットを評価することにした。さらに、プロフェッショナル・ケア（臨床）ならびにコミュニティ・ケア（地域歯科保健）におけるフッ化物応用施策

に関するインフォームド・コンセントを確立するために、リスクコミュニケーションのあり方を生命倫理学ならびに社会心理学の成果を援用しつつ、臨床と保健政策プロセスの中に制度として組み込むことを今日的な要請課題であると考えた。以上の研究課題を追究することにより、フッ化物応用による齲蝕予防の有効性と安全性を担保することが可能となり、新たな医療供給体制の普及と「健康日本21」に謳われているように口腔保健領域の目標達成に貢献するものと考えられる。

B. 研究方法

本研究は「フッ化物応用による歯科疾患の予防プログラムの構築と社会経済的評価」を3年間の計画で遂行するものである。2年目となる本年度は以下に示す研究計画（達成目標）を立案し、その方法を示す。

研究課題1：コミュニティ・ケアにおけるフッ化物応用プログラム

- 1) 日本人のフッ化物摂取基準の提示と健康リスク指標の確立。
- 2) 水道水フッ化物添加技術の調査・開発

ならびに地域人口規模に対応した添加技術について、調査を行い、規模別技術選択の基準を提示する。

研究課題2：フッ化物応用による予防プログラムの確立

- 1) フッ化物徐放性修復材の臨床疫学的研究の継続。
- 2) 歯根面齲蝕のためのフッ化物製剤の実験的研究の実施。
- 3) ライフステージにおける予防プログラムの試案を提示する。

研究課題3：セルフ・ケアとしてのフッ化物応用による予防プログラム

- 1) フッ化物配合歯磨剤の有効性を多面的に評価する。
- 2) フッ化物洗口剤のOTCとしての可能性に関する調査分析。

研究課題4：リスクコミュニケーションの手法による保健政策プロセスの構築

- 1) 医療倫理学の成果と社会心理学手法を用いて、他国との比較検討を行いながら、わが国の政治風土に適合した合意形成の枠組みを提示する。保健政策の対象は、水道水フッ化物添加と学校保健におけるフッ化物洗口事業である。方法としては、政策プロセス、医療倫理、リスクの心理等の文献調査を行い問題点を抽出する。またフロリダーションのための啓発用DVDの作成である。

C. 研究結果

研究課題1：コミュニティ・ケアにおけるフッ化物応用プログラム

1. 日本人におけるフッ化物摂取基準案の承認支援

フッ化物摂取基準の策定は歯科保健を推進する上で必須であり、ライフステー

ジごとに飲食物からのフッ化物摂取量と歯磨剤の口腔内残留量も加味して、目安量(AI)と摂取上限量(UL)を設定した。

フッ化物摂取の目安量の基準は、疫学的調査からう蝕罹患率を有意に減少させる体重1kgあたり0.02から0.05 mg/kgである事実に基づいて、その高い値である0.05 mg/kgとした。また上限量(UL)の基準は、LOAEL値を参照した。すなわち、MO(Deanの分類のmoderate)の発現頻度が飲料水中フッ化物濃度2 ppm未満の場合では5%未満であるという疫学的事実に基づいている。すなわち、上限量の範囲は、0.08-0.12 mg/kg/dayとなる。そして、その平均値をとると0.1 mg/kg/dayとなる。なぜ8歳児を基準としたかは永久歯の発生学的解釈から成熟期と密接に関連している。したがって上限量は0.1 mg/kg/dayと設定した。この上限量はフッ化物摂取による健康障害の発現ではなく歯の審美的副作用である。この体重あたりの目安量と上限量に各年齢層の日本人の基準体重を乗じて男女別に8歳までの摂取基準値を設定した。

さらに「歯のフッ素症」のmoderateが進行する臨界副作用(critical adverse effect)の感受性年齢(susceptible age groups)は病理学的には8歳までである。したがって10歳以上の上限量は、成人の体重を60 kgと仮定して、 $0.1 \text{ mg/kg} \times 60 \text{ kg} = 6 \text{ mg/day}$ と推定し、男女ともに6 mg/dayに統一した。また、妊婦と授乳婦における目安量と上限量の範囲では、母乳にはフッ化物は移行しない事実、胎児への移行も制限されるという事実から15-29歳の目安量と上限量と同じ値に設定した。

目安量と上限量は、食品、飲料水、栄養補助食品およびフッ化物配合歯磨剤からの摂取量である。この案を、日本口腔衛生学会へ承認支援を上申して、理事会にて諮問したところ、一部修正、追加した案を再提出後、承認支援を受けることができた。この承認支援案を、日本歯科医学会（会長：江藤一洋）へ推奨願いを、日本口腔衛生学会理事長と本研究の主任研究者の連名で提出した。

2. フッ化物総摂取量に対するリスク評価

今日の手法は既存のフッ化物摂取量データをいかにリスク評価すべきかであるかという視点が加えられたことである。フッ化物総摂取量評価に関しては、特に乳幼児で曝露可能性のある経路を列挙し、各経路の年齢を考慮したフッ化物摂取量を基準量と定め、1日当たりの推定摂取を次式に基づいて算出している。詳細はGuidelines for Exposure Assessment (1992) に収録されているが $EDI = (C \times IR \times EF \times ED \times AF \times CF) / (Bw \times AT)$ を用いて算出する。各略語の意味は、EDI (estimated daily intake) : 1日当たりの推定摂取量、単位はmg/day/Kg; C (concentration) : 特定媒体中の濃度、単位はmg/Lあるいはmg/Kg; IR (ingestion or intake rate) : 摂取割合、単位はmg/day; EF (exposure frequency) : 曝露頻度、単位は日数/年; ED (exposure duration) : 曝露期間、単位は年; AF (absorption factor) : 吸収係数、単位はナシ; CF (conversion factor) : 変換係数、単位は 10^{-6} Kg / mg; Bw (body weight) : 体重、単位はKg; AT (averaging time) : 平均曝露期間、単位はED \times 365day/

年である。

3. 日本人のフッ化物平衡量

現在までに青年子女を対象にしたフッ化物出納実験をこれまでに数十人おこなってきた。方法としては、2週間程度、食事によるフッ化物摂取量を一日あたりを管理してする。さらに、対象も変わるが、年毎に、多少、フッ化物摂取量を変化させながらその出納を観察することで、平衡量が見つけれられるが、いまだ十分なデータが得られれていないので、最終年度にすべての結果をだしたい。全般的には、フッ化物出納は負になる傾向が見られる。

4. 地域自治体におけるフロリデーショナル事業の展開

1) 住民学習活動

住民学習活動の実施回数は、講演会：3回、グループ学習会・説明会：7回、定期的保健事業に合わせた説明会：42回、フロリデーショナル水を使用した料理実習：48回。参加対象人数は、概略で延べ3,800名。他、フロリデーショナル水の飲用体験は、保健センター、町内の3歯科医院、4薬局、1整骨医院、1寄り合い所（「いこい処」）、1こんにやく店において実施された。人数は不明であるが、これらは現在も日常的に実施された。

2) 新型サチュレーターの開発

稼働開始より、10時間後、または12時間後までの範囲で、回収液のNaF濃度は、3.96g~4.03gで安定していた。NaFの飽和溶液を100cc中に4gのNaFが溶解しているものとする、これに比した飽和度は、99.0%~100.1%となる。

研究課題2：フッ化物局所応用による予防

プログラム

1) 高濃度フッ化物の各種口腔内細菌の生存抑制効果

(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) 二種類のフッ化物徐放性システムの接着システムの安定性

(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, $p > 0.05$), R

E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、レプ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, $p > 0.05$)。

3) フッ化物徐放性S-PRGフィラー根管の評価

(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、5 mm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。

4) エナメル質へのF取込と口腔内F濃度を指標としたフッ化物配合歯磨剤の有効使用量

一般の人々の歯磨時間に近似している120秒間での作用濃度別にF取り込みを多重比較で検定した。対照群は他のすべての群と有意に低値を示した。100ppmF群は、300ppmF群、500ppmFおよび1000ppmF群で有意に低い濃度であった ($p < 0.05$)。一方、300ppmF群と500ppmF群には差はなかった。1000ppmF群と500ppmF群との比較では1000ppmF群が有意に高いF取り込みを示した。

また、F配合液体歯磨剤1000ppmFの使用量と被検者8名の口腔内F濃度は、歯磨時間が長くなりにつれて指数関数的に減少した。30秒後の歯磨使用量0.1gでは最小 52.1 ± 13.0 ppmであるが、1.5gでは最大 394.8 ± 67.3 ppmを示した。歯磨剤使用量が増加しても口腔内F濃度も同じ倍率で増加しなかった。使用量群間での多重比較では使用量0.1gと0.3gの群間、および0.7gと1.0gの群間で口腔内F濃度の有意差が認められた。1.0gと1.5g群間では統計的違いはなかった。

5) ライフステージに応じたフッ化物応用プログラムの試案

我が国の現実に即した0歳から老年期まで

のライフステージに応じたフッ化物の応用方法を、プロフェッショナルケア (professional care)、ホームケア (home care)、及びコミュニティケア (community care) の三つの場に分けて一覧表にしたものである。高濃度のフッ化物を使用する歯面塗布やフッ化物徐放性シーラントの応用は、歯科医院や病院でのプロフェッショナルケアであり、個別に家庭で行うフッ化物洗口や歯麻剤はホームケア (セルフケア)、幼稚園、学校及び職場でのフッ化物洗口はコミュニティケアの範疇に入る。さらに、下線の引いてあるフッ化物はハイリスク児・者へのフッ化物応用の手段を表している。

研究課題3 セルフケアとしてフッ化物応用

フッ化物洗口剤のOTC化についてヨーロッパ3国のフッ化物洗口剤利用状況の調査研究と薬事法改正からみるフッ化物含有洗口剤の一般用医薬品への可能性を検討した。

薬剤師や登録販売者に対し、今まで確立されているフッ化物応用の予防的役割や医療経済的効果などの情報をあまねく提供することで、う蝕予防を中心としたオーラルヘルスプロモーションの普及を拡大することが予想される。そのことにより、フッ化物洗口剤が、世界の国々と同様に一般用医薬品として販売される可能性も考えられるかもしれない。

さらに、ヨーロッパ諸国においてフッ化物洗口剤は、薬局で容易に入手可能であり、これらの法的根拠を明確にし、日本の薬事法との相違を比較することで、OTC化が可能になるかもしれない。