



根面齲蝕の予防には、どのようなフッ化物応用方法が効果的ですか？

根面齲蝕の予防には、フッ化物局所応用法（フッ化物配合歯磨剤、フッ化物洗口、フッ化物歯面塗布）のいずれも効果があります。一般家庭で行われるフッ化物配合歯磨剤の応用は、日常的に簡便に実施できるという利点があります。フッ化物洗口は、継続的に実施できれば効果は高いと考えられます。フッ化物歯面塗布は、必要な部位に確実に塗布できるので効果が期待できます。そのほかに、知覚過敏抑制に用いるフッ化物バーニッシュも、ほかのフッ化物局所応用法より患部での停滞性が高く、齲蝕予防効

果が期待できます（図2）。

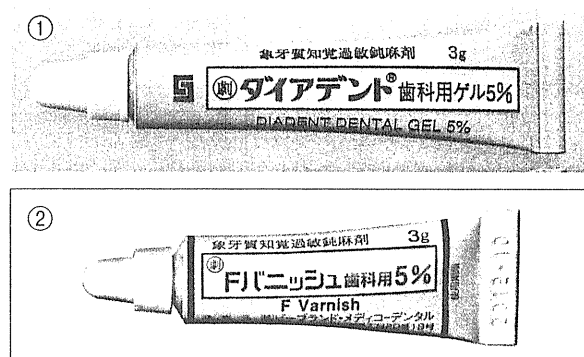


図2 フッ化物バーニッシュ

- ①ダイアデント歯科用ゲル5%（昭和薬品化工）
- ②Fバニッシュ歯科用5%（ビーブランド・メディコーデンタル）



診療室では、フッ化物洗口剤をどのように取り扱えばよいのでしょうか？

2000年の歯科診療報酬改定で新設された「う蝕多発傾向者に対するフッ化物洗口指導料」の導入に伴い、現場では少し混乱が生じました。このとき、日歯広報から「フッ化物洗口剤の取り扱い」について都道府県歯会長に協力依頼が提示されました（2000年5月24日付、表2）。

①保険医療機関における取り扱い

1) 「う蝕多発傾向者に対するフッ化物洗口指導料（加算）」とは？

これは、主治の歯科医師が、患者さんおよび保護者にフッ化物洗口に係る指導を行った場合に算定されるものであり、フッ化物洗口剤を患者さんに投与するまでは想定していません（仮に投与した場合であっても、フッ化物洗口剤は薬価に収載されておらず、保険において別途の費用徴収は認められません）。したがって、当該指導のもとに患者さんおよび保護者がフッ化物洗口を行う場合に用いる薬剤は、患者さん自身が薬局で購入することとなります。

2) 非う蝕多発傾向者に対するフッ化物洗口の指導

自費の取り扱いとし、保険診療と明確な区別をしたうえで、自費診療の指導に薬剤の投与を含む形態であれば、患者さんが当該保険医療機関でフッ化物洗口剤を入手することが可能です。

②保険医療機関における取り扱い

自費診療の指導に薬剤の投与を含む形態であれば、当該保険医療機関でフッ化物洗口剤を患者さんが入手することが可能です。

表2 フッ化物洗口に係る取り扱い

医療機関等の種別	指導の有無	患者の種別	保険医療機関での患者入手の可否
保険医療機関	無		販売又は授与の形態になるので、不可
	有	う蝕多発傾向者	指導料は保険給付できるので、指導料に薬剤を含めることができない
		非う蝕多発傾向者	保険診療と明確な区別がなされ、指導（自費）に薬剤の投与を含む形態であれば可
非保険医療機関	無		販売又は授与の形態になるので不可
	有		指導（自費）に薬剤の授与を含む形態であれば可

注) 薬事法二十四条では、「薬局開設者又は医薬品の販売業の許可を受けた者でなければ、業として、医薬品を販売し、授与し、又は販売若しくは授与目的で貯蔵し、若しくは陳列(配置することを含む、以下同じ)してはならない(以下省略)」と定められており、販売業の許可なくして、医薬品を販売、

授与することは認められていません。歯科医療機関は、通常、販売業の許可を得ていないことから、原価での販売や無償の授与も、この薬事法に抵触すると考えられます。ただし、歯科医師が処方箋や処方によって患者に薬剤を投与することは、販売に当たらないとされています。



診療室での取り扱いについて、
しっかり理解しておきましょう！



6 市販のフッ化物配合歯磨剤と歯科医院専売のものとの違いは何ですか？

歯磨剤には、薬事法により医薬部外品と化粧品があり、市販されています。市場で見られる歯磨剤の多くは医薬部外品であり、これにはスーパーや薬局で販売されているものと歯科医院専用として販売されているものがあります。

しかしながら、歯科医院専売の歯磨剤のほうが薬効効果が高いというわけではありません。歯科医院専売の歯磨剤の特徴としては、通常の

ペースト状に加え、フォーム(泡)状などの形態があること、研磨剤や発泡剤無配合のものなど、スーパーや薬局などでは手に入らない種類のものが販売されていることがあります。

また、専門家である歯科医師、歯科衛生士による指導のもと、正しい使い方を理解したうえで購入できる、というメリットも大きいでしょう。



図3 歯科医院専売のフッ化物配合歯磨剤の一例

- ①Check-up フォーム(ライオン歯科材)。フォームタイプなので、同じ体積のペースト状歯磨剤に比べてフッ化物の量も少なく、吐き出しができない低年齢児への応用に適している
- ②システムセンシティブ(ライオン歯科材)。ほかの歯磨剤と比較して、低研磨性、低発泡性が特徴
- ③Check-up kodomo(ライオン歯科材)。研磨剤無配合の子ども用歯磨剤
- ④キャナリーナー900Pw(ビーブランド・メディコーデンタル)。フッ化ナトリウムとともに抗菌成分CPCを配合。低研磨性
- ⑤プロクト子どもペースト(サンスター)。CPC配合の子ども用歯磨剤



患者さんに正しい使い方をお伝えしてから
買っていただきましょう！

原 著

リスク・コントロールに基づく歯科医療に関する研究

—小児期の定期健診患者におけるカリエス・リスク・テスト導入の有用性—

A Study on Risk Control Dentistry

—The Effect of Caries Risk Test for Children with Routine Check-up in Dental Clinic—

白石奈々子 ^{1,2)} Nanako Shiraishi	二川祐子 ^{1,2)} Yuko Futakawa	虎谷知美 ^{1,2)} Tomomi Toratani	佐々木江美 ¹⁾ Emi Sasaki
河野有里 ¹⁾ Yuri Kono	武田 香 ^{1,2)} Kaori Takeda	石川正夫 ¹⁾ Masao Ishikawa	高田康二 ¹⁾ Koji Takada
眞木吉信 ^{1,3)} Yoshinobu Maki			

¹⁾ 公益財団法人ライオン歯科衛生研究所

²⁾ 東京都歯科衛生士会

³⁾ 東京歯科大学社会歯科学研究室

和文抄録

定期健診を継続して受けている小児患者について、う蝕リスクの判定に基づいたう蝕予防の効果を調査した。対象は東京都内の歯科診療所に、2006年6月から2008年12月に来院した4～11歳の小児で、定期的にかリエス・リスク・テストを実施し、それに対応した予防処置をしている患者72名（A群）とリスク・テストを行わずに定期的に予防処置をしている患者52名（B群）であった。カリエス・リスク・テストは、唾液分泌量、総菌数、*S.mutans*菌数の3項目と、それらの結果に基づいたう蝕リスクの総合評価を行った。う蝕の有病・発病状況は患者を4～7歳と8～11歳の2グループに分け、前者は乳歯（df）を、後者は乳歯（df）と永久歯（DMF）を調べた。その結果、A群の唾液分泌量において、4～7歳の初回の唾液分泌量は低かったが、総菌数、*S.mutans*菌数および総合リスク評価で有意な変化はなかった。う蝕発病者率は、A群とB群の4～7歳で有意な差は認められなかったが、8～11歳ではB群の乳歯、永久歯ともう蝕発病者率が明らかに高い値を示した（乳歯 $p < 0.05$, 永久歯 $p < 0.01$ ）。以上の結果より、8～11歳ではカリエス・リスク・テストに対応した予防処置の有効性が確認された。

キーワード カリエス・リスク・テスト, 小児う蝕, 予防処置

【緒言】

歯科疾患の予防は1回の処置で解決できるものではなく、常に発病のリスクをモニタリングしながら対応する必要がある。う蝕に限って言えば、現在のう蝕発病リスクに対し、どのような予防手

段で対応するかが問われ、このリスクを回避して健康な口腔を保持増進していくことが求められている。したがって、予防も治療も定期的にリスクを評価し、そのリスクに適応した適切な処置を継続していくことが重要となる^{1,2)}。特に小児期は第一大臼歯の萌出や乳歯から永久歯への交換の時期でもあり、リスク判定に基づいたう蝕予防処置

受付日 2011年9月9日

受理 2011年12月9日

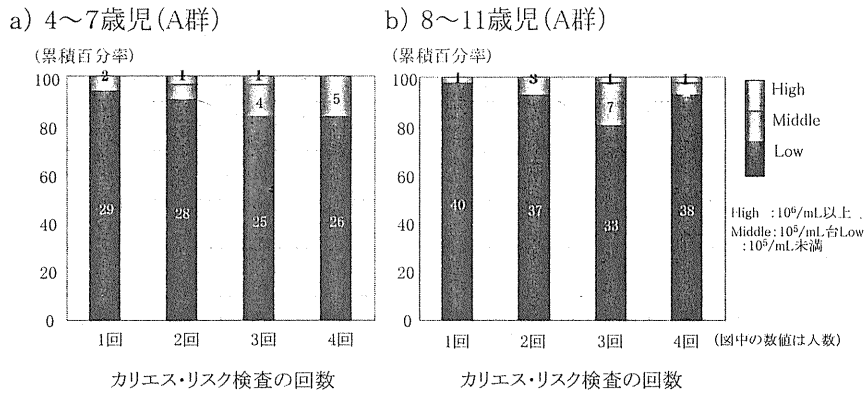


図3 カリエス・リスク検査回数と *S. mutans* 菌数（サリバチェック SM®）との関係

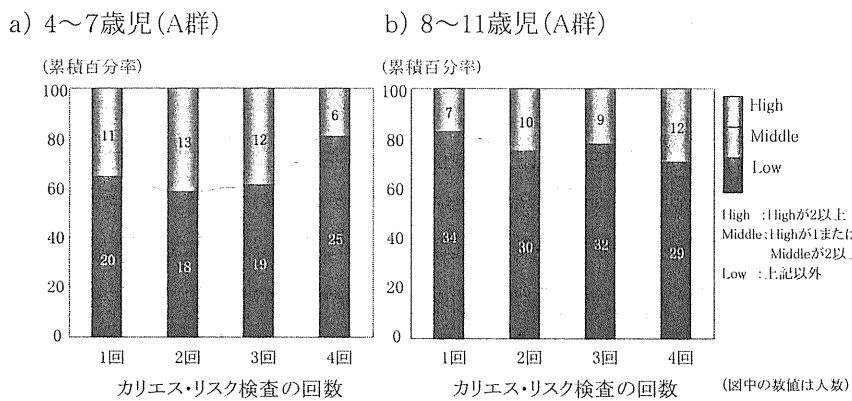


図4 カリエス・リスク検査回数と総合リスク評価との関係

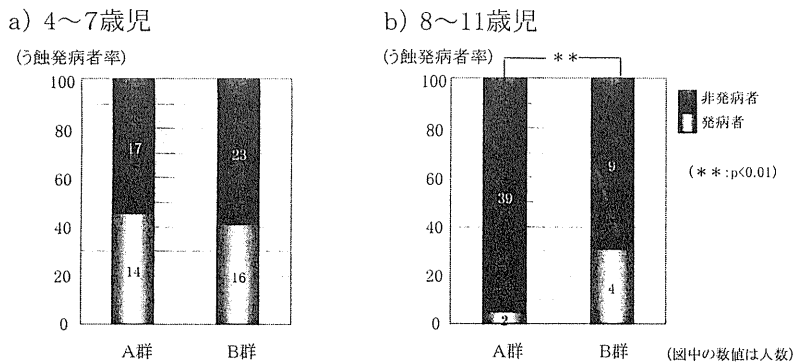


図5 調査期間中の乳歯う蝕発病者率の比較

がLowリスクを示した。

さらに4~7歳の患者と8~11歳の患者の唾液分泌量、総菌数および *S. mutans* 菌数の3項目のリスク判定結果より求めた総合リスク評価の結果を図4-a)と図4-b)に示した。

両グループの4回にわたる総合リスク評価は、Lowリスクが多くを占め、検査回数の増加による総合リスク評価の明確な改善は認められなかった。

2) う蝕発病状況

4~7歳と8~11歳のグループについて、A群とB群の乳歯う蝕の発病者数について比較したところ、4~7歳のグループでは図5-a)に示したようにA群とB群の発病者数に有意な差は認められなかった。8~11歳のグループは、図5-b)に示したように、B群の発病者数が有意に増加した ($p < 0.01$)。

また、永久歯う蝕の発病者数は、4~7歳のグ

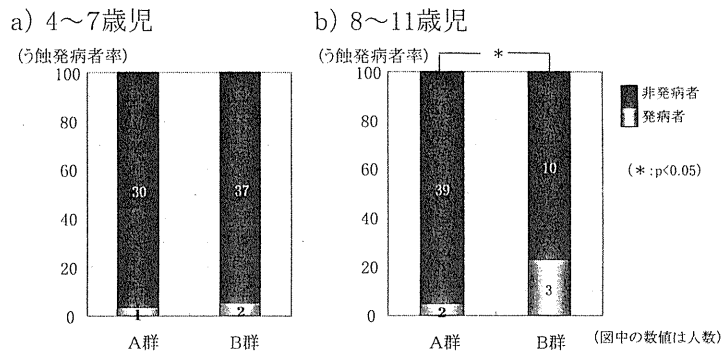


図6 調査期間中の永久歯う蝕発病者率の比較

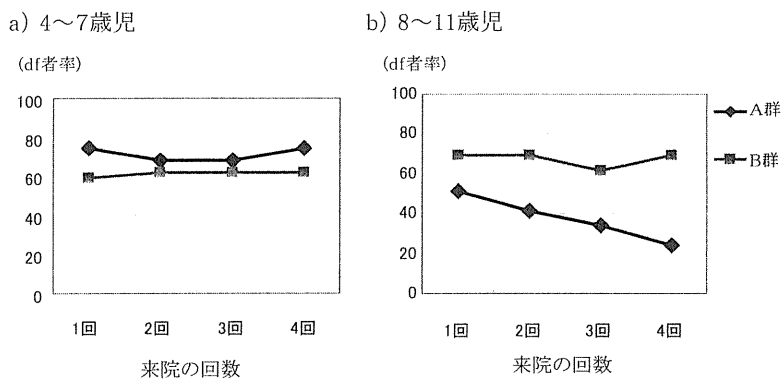


図7 A群およびB群の来院回数と乳歯う蝕有病状況 (df者率) の変化

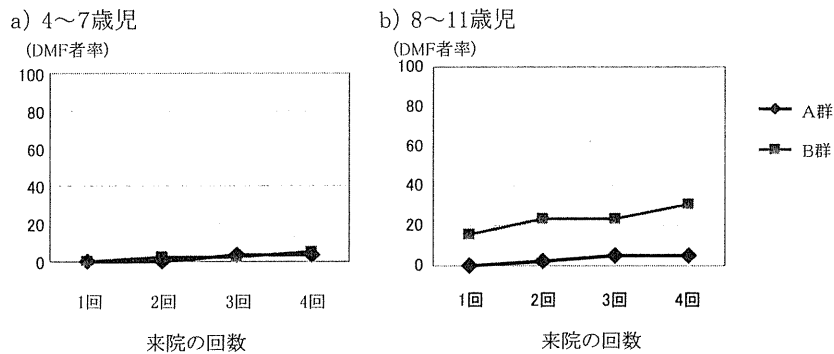


図8 A群およびB群の来院回数と永久歯う蝕有病状況 (DMF者率) の変化

ループで図6-a) に示したようにA群とB群の発病者数に有意な差は認められなかった。8~11歳のグループは、図6-b) に示したように、B群の発病者数が有意に増加した ($p < 0.05$)。さらに、来院回数ごとの乳歯う蝕の有病状況 (df者率) の変化を調べた結果を図7-a), b) に、永久歯う蝕の有病状況 (DMF者率) の変化を調べた結果を図8-a), b) に示した。

A群とB群のdf者率、DMF者率は4~7歳のdf者率を除き、いずれもカリエス・リスク・

テストを実施していないB群が高い傾向を示した。

【考察】

小児期のう蝕は、小児への感染症であり、食習慣、口腔衛生の悪化に起因する。また、小児う蝕は、乳歯にとどまらず、今後萌出する永久歯はじめ、子どもの健康と幸福にも重大な影響を及ぼすと考えられる⁶⁾。

そこで今回、混合歯列期の小児に着目し、カリ

エス・リスクのモニタリングとその判定評価に基づいた予防処置が適切であるかを、定期的にCRC-Pを実施し、それに対応した予防処置をしている患者とCRC-Pを行わずに定期的に予防処置をしている患者でう蝕の罹患状況を追跡調査した。

本診療所はもともと小児歯科を標榜した都内の歴史ある歯科医療機関⁷⁾で、1日の来院小児患者は20名前後である。定期的なう蝕予防を受診している者が多い。そのため今回は対象者を保護者の希望でカリエス・リスク・テストを継続的に実施して予防処置を受けている者(A群)とリスクテストなしで予防処置のみ定期的に受けている者(B群)の2群に分けることができた。また、う蝕の発病調査に関して、4～7歳と8～11歳の2つの年齢群を設定したのは、乳歯う蝕と永久歯う蝕の発病時期を考慮したためである。

カリエス・リスク・テストには、咀嚼刺激唾液を用いたテストが多く用いられている。今回用いた唾液分泌量、総菌数(RDテスト[®])、*S. mutans*菌数(サリバチェックSM[®])は、培養などの操作がなく、30分以内の短時間で精度よく判定・予測できる方法であり、リコール間隔の決定にはこれら3種類のテストを総合的に判定した結果を用いた。この方法は、スウェーデンを中心とした北欧の研究者らが用いている細菌培養を中心としたカリオグラムモデル⁸⁾とも異なり、3種類のハンディなテストキットによって、来院時のチェアタイムに30分間で、カリエスリスクを判定できるため、フッ化物応用やシーラントなどの予防処置と保健指導が即刻実施できるという大きなメリットがある。

結果の中では、A群のカリエス・リスク・テストの推移を見ると、総菌数および*S. mutans*菌数のレベルには大きな変化は認められなかった。これは、*S. mutans*菌数に関しては、90%以上の者が当初から低いリスクであったことと、総菌数も高いリスクの者が少なかったことに起因すると思われる。さらに図1に示した唾液分泌量に関しては、4～7歳児の採唾できた者が6名であり、4回目でも12名で唾液採取可能な被験者が半数に満たなかった。4～7歳児では自分で刺激唾液

を吐出することの困難さと、その後の慣れによる採取量増加が要因と推測された。また、8～11歳児でも採唾可能な被験者は各回で、半数前後と少なかった。本来、このような唾液分泌量の推移を評価する場合には4回すべて採唾可能であった同一被験者で統一して分析することが望ましいが、今回はこの原則に従うと4～7歳児は4名、8～11歳児では12名と統計学的な比較に耐えられない部分も出でくるため、唾液分泌量の概要を把握することに主眼をおきそれぞれの回で採唾できた被験者の分泌量を比較することとした。さらに、図3、図4においても検査回により1名の欠損値が生じていたが、4回すべて検査を受けた40名のデータと有意な違いは認められなかったので図1、図2と同様の形式とした。

同一集団を対象としてう蝕の発病状況を調査するには少なくとも6か月以上の期間で複数回継続して追跡することが望ましいので、本調査の設定期間を2年6か月とした。今回の調査結果から、8～11歳の乳歯および永久歯の発病率において、カリエス・リスク・テストとその評価に基づく予防処置を受けているA群に比較して、予防処置のみのB群では有意に高い値を示したことから、う蝕予防にとっての定期的なリスクモニタリングの有用性が明らかにされたと考えられる。ただし、4～7歳児におけるう蝕発病者率には両群間に有意な差は認められなかった。この要因としては、唾液分泌量の測定にも支障をきたしたように、この年齢では唾液採取方法が一定の咀嚼刺激のみでは不可能な場合が多かったため、とくに*S. mutans*菌数レベルの測定が正確にできたかどうか疑問がある。同様に、その後の予防処置に関しても防湿や口腔内操作の点で適切な方法を実行できなかった可能性は否定できない。

さらに、今回の研究においては、カリエス・リスクの項目ごとの発病菌数の相違、部位別分析ならびに菌種・菌面別分析は統計的な手法の点で十分でなかった。今後の課題として残されている。

【結 論】

4回にわたるカリエス・リスク・テスト評価に基づいた予防処置を実施したA群は予防処置の

みのB群に比べ、乳歯から永久歯へ生え変わる時期の永久歯う蝕の発病者数を有意に抑制した。このことから、予防処置におけるカリエス・リスク・テストの有用性が得られたと考えた。

【引用文献】

- 1) 二川祐子, 白石奈々子, 林菜穂子, 虎谷知美, 大江未久, 北村実子, 奥澤やすよ, 佐々木江美, 河野有里, 石川正夫, 高田康二, 眞木吉信: リスク・コントロールに基づく歯科医療の導入 - 第1報 定期健診患者のライフステージ別カリエス・リスクの結果について -, 日衛学誌, 2(1): 230, 231, 2007.
- 2) 白石奈々子, 二川祐子, 大江未久, 林菜穂子, 佐々木江美, 萩原雅明, 武田 香, 石川正夫, 山崎洋治, 高田康二, 眞木吉信: カリエス・リスク・コントロールに基づく歯科医療 - リスクテストの有無による成人定期健診患者のう蝕発病 -, 口腔衛生会誌 59(4), 448, 2009.
- 3) Ericsson, Y. and Hardwick, L., Individual diagnosis, prognosis and counselling for caries prevention, *Caries Res.*, 12 (Suppl.1), 94, 1978.
- 4) 眞木吉信, 山本秀樹, 松久保 隆, 高江洲義矩, 渋谷 睦, 木下雄一, 齊藤 斉, 田中文夫, 浅見邦明: 唾液による齲蝕活動性迅速判定法としての Resazurin Disc の変色特異性 口腔衛生会誌, 33(2), 61-74, 1983.
- 5) Matsumoto Y, Sugihara N, Koseki M, Maki Y: A rapid and quantitative detection system for *Streptococcus mutans* in saliva using monoclonal antibodies. *Caries Res.* 40(1), 15-19, 2006.
- 6) 本間 達, 若松秀俊: 子供の生活習慣と虫歯の関連, 日本健康科学学会 19(2), 127-135, 2003.
- 7) 眞木吉信, 河野有里, 竹屋江美, 奥澤やすよ, 林 菜穂子, 虎谷知美, 白石奈々子, 二川祐子, 北村実子, 若尾裕子: Risk Control Dentistry のすすめ 1—ライオン歯科衛生研究所東京診療所の新たなビジョン—, 歯界展望, 東京, 115(1): 153-159, 2010.
- 8) Bratthall D, Hänsel Petersson G.: Cariogram—a multifactorial risk assessment model for a multifactorial disease. *Community Dent Oral Epidemiol.* 33(4), 256-264, 2005.

著者への連絡先

白石奈々子
〒141-0021 東京都品川区上大崎 3-1-7 目黒東宝ビル 5F
(公財) ライオン歯科衛生研究所附属ライオン目黒駅前歯科診療所
TEL: 03-3473-6721
FAX: 03-3473-6725
E-mail: dh-nana@lion.co.jp

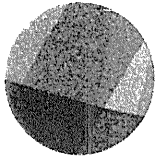
英文抄録

The preventive effects for dental caries of childhood patients with routine dental health check-ups using caries risk control program (CRC-P) was studied in dental clinic. The patients ranged from 4 to 11 years old who came to the dental office in the Tokyo metropolitan area from June, 2006 to December, 2008, and included 72 patients with CRC-P regularly (A group), and 52 patients with preventive treatments by using professional application of fluoride and tooth brushing training (B group).

The salivary flow rate by paraffin wax chewing stimulation, number of total microorganisms and number of *Streptococcus mutans* in saliva samples were tested as caries risk. The prevalence and the incidence of dental caries were assessed with dft for 4-7 years and DMFT for 8-11 years, respectively, were assessed with deciduous teeth df for 4-7 years and deciduous and permanent teeth df, DMF for 8-11 years, respectively.

These results showed that the 4-7 years old group had a lower salivary flow rate than the 8-11 years old group in the first CRC-P test, but there were no significant differences in the total number of microorganisms, and the number of *S. mutans* in saliva. In the 4-7 years old group, the incidence of dental caries was not difference between A group and B group. In 8-11 years old, both of deciduous teeth and permanent teeth, caries incidence was increased for B group more than A group ($p < 0.05$, $p < 0.01$).

In conclusion, it was confirmed that CRC-P and preventive treatment were effective in caries prevention in childhood.



05. 小児う蝕症

う蝕予防——年齢に応じたフッ化物応用の新しい知識

東京歯科大学 社会歯科学研究室 眞木吉信



フッ化物の応用には、全身応用と局所応用がある。本項では、日本の臨床現場で用いられる局所応用の新しい知識を紹介する。

フッ化物配合歯磨剤

1. フッ化物配合歯磨剤の見分け方：歯磨剤には、化粧品と医薬部外品があり、フッ化物が配合されているものは「医薬部外品」である。成分表示の薬用成分の欄に、「モノフルオロリン酸ナトリウム」(Sodium monofluorophosphate, $\text{Na}_2\text{PO}_3\text{F}$, MFP)、「フッ化ナトリウム」(Sodium fluoride, NaF)、「フッ化第一スズ」(Stannous fluoride, SnF_2)と表示してあり、外箱などの成分表示で確認できる。フッ化物配合歯磨剤には「むし歯の発生及び進行の予防」、または「むし歯を防ぐ」という効能・効果の記載が認められている。

2. フッ化物配合歯磨剤の効果的な使い方：フッ化物配合歯磨剤を用いたブラッシング方法を表1に示した。回数は、1日2、3回と頻度が高いことが望ましい。

3. フッ化物配合歯磨剤の年齢別応用量：これまで報告された知見に基づく年齢別応用量の詳細について、表2に示した。6ヵ月(歯の萌出)から2

歳までの応用について、スウェーデンではこれまでの生後6ヵ月からのフッ化物錠剤の服用に代え、500ppmのフッ化物配合歯磨剤の使用を推奨し始めた。全身応用の全くない我が国でも、歯の萌出直後からの低濃度(500ppm、ただし100ppmなど500ppm未満の濃度のフッ化物配合歯磨剤にはう蝕の予防効果が認められていない)フッ化物配合歯磨剤の応用が積極的に推奨されるべきである。

フッ化物歯面塗布

フッ化物歯面塗布は、萌出後の歯のエナメル質表面に直接フッ化物を作用させることによって、う蝕抵抗性を与える方法である。年数回の実施でう蝕予防効果があることから、小児自身にとっては負担の軽いフッ化物応用方法といえる。

1. 効果的な塗布時期：フッ化物歯面塗布は、萌出直後の歯に行うのが最も効果的である。これは、萌出して間もない歯は反応性が高く、フッ化物塗布による歯の表層へのフッ素の取り込み量が大きいからである。また、う蝕に最も罹患しやすいのは、歯が萌出してから2、3年の間であるといわれているため、萌出直後からフッ化物歯面塗布を実施する必要がある。それには個々の歯が萌出するたびに塗布を行うことが望ましく、また何度も塗布を繰り返すことで効果が上がるので、歯の萌出時期に併せ、乳前歯が萌出する1歳ごろから永久歯第2大臼歯の萌出が終わる13歳ごろまでの間、6ヵ月ごとに口腔内に萌出してくるすべての歯にフッ化物塗布を行うことが効果的である。

2. 歯面塗布に用いられる市販フッ化物

① 2%フッ化ナトリウム溶液・フォーム

② リン酸酸性フッ化ナトリウム溶液・ゲル (APF)

表① フッ化物配合歯磨剤の効果的な使い方

①歯ブラシに年齢に応じた量の歯磨剤をつける(表2)
②磨く前に歯磨剤を歯面全体に広げる
③2～3分間歯磨剤による泡立ちを保つような歯磨きをする(特に歯磨き方法にはこだわらない)
④歯磨剤を吐き出す
⑤5～15mLの水を口に含む
⑥5秒間程度ブクブクうがいをする
⑦洗口は1回のみとし、吐き出した後はうがいをしない
⑧その後1～2時間程度は飲食をしないことが望ましい

表② フッ化物配合歯磨剤の年齢別応用量(使用量はペースト状の歯磨剤を想定)

年齢	使用量	歯磨剤のF濃度	洗口その他の注意事項
6ヵ月(歯の萌出)～2歳	切った爪程度の少量	500ppm(泡状歯磨剤であれば1,000ppmでも可)	仕上げ磨き時に保護者が行う
3～5歳	5mm以下	500ppm(泡状またはMFP歯磨剤であれば1,000ppmでも可)	就寝前が効果的。歯磨き後5～10mLの水で1回のみ洗口
6～14歳	1cm程度	1,000ppm	就寝前が効果的。歯磨き後10～15mLの水で1回のみ洗口
15歳以上	2cm程度	1,000ppm	就寝前が効果的。歯磨き後10～15mLの水で1回のみ洗口

溶液・ゲル)

3. フッ化物歯面塗布の術式：綿球塗布法(一般法)、トレー法、イオン導入法などがあり、一般的には通法に従って実施する。その際の注意点は下記のとおりである。

- ①歯面清掃；完璧な歯垢除去にこだわらず、ブラッシング程度でも効果はある。
- ②フッ化物溶液、ゲルの塗布；2mL以下のフッ化物溶液に小綿球または綿棒を十分浸し、3～4分間歯面が湿潤状態を保つように溶液を綿球または綿棒に含ませながら何回も歯面に塗りつける。ゲルの場合はディスポーザブルシリンジなどで2mLを計量し、歯面全体に塗布したことを確認して3～4分間そのままの状態を保つ。繰り返しの塗布は必要ない。トレー法では歯列弓に適合したトレーを選び、2mL以下の溶液・ゲルを計量し、3～4分間トレーを口腔内に保持する。

③塗布後の注意；

- ❶フッ化物塗布後30分は唾液を吐かせる程度にとどめ、飲食や洗口(うがい)をさせない
- ❷フッ化物応用の効果と限界を説明し、日常の口腔ケアの重要性を指導する
- ❸次回のリコールを決める

④イオン導入法；微小電圧を用いて人体を(+)に荷電し、歯の表面からフッ素(-)イオンを浸透させようとするものである。この方法では2%フッ化ナトリウム溶液を用い、リン酸酸性フッ化ナトリウム溶液の使用は避けるとされている。

4. その他の局所応用フッ化物製剤：う蝕発病リスクの高い小児には、フッ化物バーニッシュ(22,600ppmF)の応用が望ましいが、フッ化物イオン濃度が高いので、応用量と頻度には注意を要する。また、近年はフッ化物添加のデンタルフロスやトゥースピックも市販されている。

フッ化物洗口

フッ化物洗口法は、毎日または週1回の頻度で、萌出後の歯の表面にフッ化物イオンを作用させることを狙いとした局所応用法の一つである。この

方法は家庭で個人的に行う他に、学校などの施設単位で集団的な実施もできる。このフッ化物洗口の公式な見解として、2003年1月に厚生労働省が、医政局長・健康局長連名の通知として「フッ化物洗口ガイドライン」を発表した。

1. 対象年齢：4歳から成人、老人まで広く適用される。特に、4歳(保育・幼稚園児)から開始し、14歳(中学生)まで継続することが望ましい。その後の年齢においても、フッ化物は生涯にわたって歯に作用させることが効果的である。

2. う蝕発生リスクの高い児(者)への対応：修復処置した歯のう蝕再発防止や歯列矯正装置装着児の口腔衛生管理など、う蝕の発生リスクの高まった人への利用も効果的である。

3. 洗口に用いる薬剤と溶液：洗口に用いるフッ化物として、現在はフッ化ナトリウム(NaF)溶液が一般に用いられている。フッ化物イオン濃度は洗口頻度と対応して決められる。標準的な処方として、1日1回洗口する毎日法では、0.05% NaF(226ppmF)、または0.1% NaF(450ppmF)の溶液を用い、週1回法では0.2% NaF(900ppmF)の溶液を用いる。いずれも5～10mLの溶液を口に含み、30秒から1分間ブクブクうがいを行う。

4. フッ化物応用による組み合わせ予防の考え方：2種類以上のフッ化物応用を組み合わせることは、一般的には相乗効果をもたらす。しかし、場合によっては費用—便益効果が低かったり、また全身応用法との併用によって歯のフッ素症の潜在的な増加も考慮しなくてはならないことが、海外で報告されている。しかし、日本では全身応用が実施されていないので、フッ化物洗口と他の局所応用法を組み合わせる実施しても、フッ化物の過剰摂取になることはない。

【参考文献】

- 1) フッ化物応用研究会編：う蝕予防のためのフッ化物洗口実施マニュアル。社会保険研究所，東京，2003。
- 2) フッ化物応用研究会編：う蝕予防のためのフッ化物配合歯磨剤応用マニュアル。社会保険研究所，東京，2006。
- 3) フッ化物応用研究会編：う蝕予防のためのフッ化物歯面塗布実施マニュアル。社会保険研究所，東京，2007。
- 4) 日本口腔衛生学会フッ化物応用委員会編：フッ化物応用の科学。口腔保健協会，東京，2010。



●編集委員略歴

吉田 昊哲 (よしだ ひろのり)

1946年 神奈川県生まれ
 1972年 東京歯科大学卒業
 1976年 東京歯科大学大学院歯学研究科(小児歯科学専攻)修了
 1977年 東京歯科大学 小児歯科学講座 講師
 1982年 神奈川県横浜市にて開業
 現在に至る

.....
 東京歯科大学 小児歯科学講座 非常勤講師
 日本小児歯科学会 副理事長 専門医指導医
 (1981年より日本小児歯科学会 評議員、理事、常務理事、監事を歴任)
 日本小児歯科学会関東地方会 監事
 2004～2007年、日本小児歯科学会関東地方会 会長

嘉ノ海龍三 (かのみ りゅうぞう)

1952年 兵庫県生まれ
 1977年 大阪歯科大学卒業、小児歯科講座入局
 1980年 兵庫県姫路市にて開業
 1989年 歯学博士(大歯大乙1001号)小児歯科学
 2002年 大阪大学大学院(矯正学)卒業・学位受領
 2008年 大阪大学歯学部 臨床教授
 現在に至る

.....
 日本小児歯科学会 理事 専門医指導医
 日本矯正歯科学会 理事 認定医・専門医
 成育歯科医療研究会(旧咬合誘導研究会)1996年創立より常務理事
 2002～2004年、日本小児歯科学会近畿地方会 会長
 2010～2011年、近畿東海矯正歯科学会 会長
 アメリカ合衆国 E. H. Angle Society Affiliate 会員 (Midwest)
 ヨーロッパ矯正歯科学会 Board 会員

山崎 要一 (やまさき よういち)

1957年 福岡県生まれ
 1983年 九州大学歯学部卒業
 1989年 九州大学大学院歯学研究科(小児歯科学専攻)修了
 1997年 九州大学歯学部附属病院 講師
 2003年 鹿児島大学大学院歯学総合研究科 小児歯科学分野教授
 現在に至る

.....
 日本小児歯科学会 副理事長 専門医指導医
 日本顎口腔機能学会 常務理事
 成育歯科医療研究会 常務理事
 日本顎関節学会 専門医指導医
 認定NPO法人 こども医療ネットワーク 理事
 鹿児島県小児保健学会 副会長
 日本歯科医学会 評議員

D_o | DENTAL DIAMOND 増刊号

**小児歯科は成育医療へ
 今を知れば未来がわかる**

発行日——2011年4月1日 通巻第520号
 編集委員——吉田昊哲 | 嘉ノ海龍三 | 山崎要一
 発行人——牧野英敏
 発行所——株式会社デンタルダイヤモンド社
 〒101-0054
 東京都千代田区神田錦町1-14-13 錦町デンタルビル
 TEL 03-3219-2571 (代)
<http://www.dental-diamond.co.jp/>
 振替口座 00160-3-10768
 印刷所——株式会社エス・ケイ・ジェイ

- ・本誌に掲載する著作物の複製権・翻訳権・上映権・譲渡権・公衆送信権(送信可能化権を含む)は、(株)デンタルダイヤモンド社が保有します。
- ・**©copy** <(株)出版者著作権管理機構 委託出版物>
 本誌の無断複写は著作権法上での例外を除き禁じられています。複写される場合は、そのつど事前(株)出版者著作権管理機構(TEL:03-3513-6969、FAX:03-3513-6979、e-mail:info@jcopy.or.jp)の許諾を得てください。



T-Fix

筆積み操作が簡単で、

T-Fix に適した接着強度が得られます。

水洗不要の前処理材は各被着

歯科動揺歯固定用接着材料
トクヤママルチボンドⅡ **フィックスフォース**



標準医院価格・・・¥18,000

- 粉/クリア(3g).....1個
- 液(8mL).....1本
- プライマー(3mL).....1本
- ダッキングラス.....1個
- ディスプレイブラシ ハンドル.....1本
- 粉用スプーン.....1本
- ディスプレイ(N).....8本
- ディスプレイ(S).....8本
- スポンジ片.....1箱

(管理医療機器) 認証番号 222AFBZX00089000

トクヤママルチボンドⅡ フィックスフォースは、歯周疾患または外傷により動揺している歯牙の固定に用いるPMMA系接着材料です。

筆積み性に優れ、硬化がシャープなため、動揺歯固定(T-Fix)が簡単に、しかもスピーディに行えます。

また、プライマーは、水洗不要のセルフエッチングタイプで、エナメル質、金属(貴金属・非貴金属)、レジン(硬質レジン・ハイブリッド型硬質レジン・CR等)、セラミックス※ に対して共通で使用できます。

※ セラミックスに対しては、事前に「トクソーセラミックスプライマー」等によるシラン処理が必要です。

株式会社 **トクヤマデンタル**

本社：〒110-0016 東京都台東区台東1-38-9

営業所：札幌 (011)812-5690 / 仙台 (022)717-6444 / 東京 (03)3835-7201 / 名古屋 (052)932-6851 / 大阪 (06)6386-0700 / 福岡 (092)412-3240

資料請求・お問い合わせ「インフォメーションサービス」 受付時間(土・日祭日を除く)

0120-54-1182

9:00~12:00
13:00~17:30

トクヤマデンタル ホームページ
www.tokuyama-dental.co.jp

Remineralization and acid resistance of enamel lesions after chewing gum containing fluoride extracted from green tea

E Suyama,* ‡ T Tamura, † T Ozawa,* A Suzuki,* Y Iijima, ‡ T Saito ‡

*Meiji Seika Kaisha Ltd, Food and Health Research and Development Laboratories, Saitama, Japan.

†Meiji Seika Kaisha Ltd, Strategic Information and Ingredient Development Department, Tokyo, Japan.

‡Graduate School of Biomedical Sciences, Unit of Social Medicine, Department of Oral Health, Nagasaki University, Nagasaki, Japan.

ABSTRACT

Background: The aim of this study was to evaluate enamel remineralization and the acquisition of acid resistance by using sugar-free chewing gum containing fluoride extracted from green tea.

Methods: Forty-five volunteers participated in a crossover, double-blind study and wore intraoral appliances with human demineralized enamel. Subjects chewed fluoride chewing gum (FCG: 50 µg fluoride) or placebo gum. Remineralization and acid resistance were evaluated using the mineral change value (ΔZ , in vol%µm). Fluoride concentrations in saliva and remineralized enamel were analysed.

Results: The peak salivary fluoride concentration was 3.93 ± 1.28 ppm (mean \pm SD). The elevated salivary fluoride concentration resulted in a higher fluoride concentration of 656 ± 95 ppm in the remineralized region versus 159 ± 26 ppm for placebo gum ($p < 0.001$). After remineralization, the ΔZ of the FCG group was higher than that of the placebo gum group. After an acid challenge, ΔZ of the FCG group was lower than the placebo gum group. Both ΔZ were statistically significant.

Conclusions: FCG produced a superior level of remineralization and acid resistance, as compared to the placebo gum. The *in situ* results suggest that regular use of FCG is useful for preventing dental caries.

Keywords: Green tea extract, fluoride chewing gum, enamel, remineralization, acid resistance, sugar-free gum, dental caries.

Abbreviations and acronyms: ACT = acid challenge test; DEM = demineralized; FCG = fluoride containing gum; REM = remineralized; TISAB = total ion strength adjustment buffer.

(Accepted for publication 21 March 2011.)

INTRODUCTION

The use of fluorides has proved to be clinically effective in controlling dental caries in a large number of clinical trials, literature reviews and, more recently, meta analyses of studies involving the use of rinses, gels, varnishes and dentifrices.¹ The continual presence and availability of low levels of fluoride ions in the oral environment, especially at the saliva/enamel interface, helps to prevent dental caries and promote the remineralization of enamel that has been demineralized by acids produced by cariogenic bacteria.^{2,3} Methods that maintain a constantly elevated intraoral fluoride concentration should have a preventive effect on dental caries. For this purpose, fluoride-containing chewing gum (FCG) and slow fluoride-releasing devices can be used as delivery methods. Unfortunately, no commer-

cial slow fluoride-releasing device is available in Japan, and while FCG has been marketed in European Union countries, it is not available in Japan.⁴ The active fluoride component of FCG is usually NaF. In Japan, the Pharmaceutical Affairs Act prohibits the use of chemical fluoride materials as food additives. However, plant-derived fluoride for eating or drinking on a daily basis can be used as food additives. Plants in the family *Theaceae*, such as *Camellia sinensis*, the so-called tea tree, contain high concentrations of fluoride in their leaves and infusions.⁵

Traditionally, *in vitro* or animal studies of the relationship between dental caries and tea extracts have focused on the antibacterial activity of polyphenolic compounds.^{6–9} Recently, *in situ* studies have begun to explore the effects of tea extracts as a promising preventive measure to reduce dentine erosion

and abrasion.¹⁰ However, little is known about the effects of tea extracts on the remineralization of enamel and the acquisition of acid resistance. Camellia extract MJ (Taiyo Kagaku) is a green tea extract that has a high fluoride content and can be used as a food additive in Japan. It contains over 1500 ppm of fluoride. It was previously reported that a cup of green tea contains 0.5–1 g of catechins/L.¹¹ In contrast, Camellia extract MJ contains approximately 0.06 g of catechins/L.

Using Camellia extract MJ as the source of fluoride in chewing gum, this study investigated its effects on demineralized enamel to improve dental health. We evaluated enamel remineralization and the acquisition of acid resistance using sugar-free chewing gum containing the green tea extract.

SUBJECTS AND METHODS

Study design and subjects

This study was a double-blind, randomized, crossover design. It was approved by the Dental Research Ethics Committee of Nagasaki University (authorization no. 0735) and the Koseikai Yostubashi Clinic Human Research Ethics Committee (authorization no. 20070326-4-01). Informed consent was obtained from each subject and the study was conducted under the principles of the Declaration of Helsinki. This study recruited 45 healthy adults (20 males, 25 females; age 23–55 years) from university students (10 males, 11 females; age 23–35 years) and the general public (10 males, 14 females; age 32–55 years). None of the subjects were using medication that might have affected the salivary flow rate.

Preparation of intraoral appliances and enamel subsurface lesions

Removable mandibular appliances were prepared for each subject. From human sound first premolar teeth extracted for orthodontic purposes, two enamel blocks (ca. 3 × 4 × 2 mm) were cut and covered with acid-resistant nail varnish, except for the enamel surfaces. Experimental subsurface lesions were created using demineralizing buffer containing 0.1 M lactic acid, 1% carboxymethyl cellulose, 3.0 mM calcium, 1.8 mM phosphate, and pH 4.5 for 72 hours at 37 °C (20 ml/specimen).¹² After demineralization (DEM), one-third of each enamel specimen was covered with nail varnish as the DEM area and the specimen was mounted in an appliance with dental sticky wax (Fig 1).

In situ experimental protocol

The experimental procedure is outlined in Fig 2. Pairs of enamel specimens derived from the same tooth were



Fig 1. Intraoral photograph showing the intraoral appliance with a subsurface lesion in the enamel.

used for each trial period. The sugar-free chewing gums were provided by Meiji Seika Kaisha. The gums were pellet type with a maltitol coating and weighed 1.4 ± 0.1 g/piece. One of the gums contained 1.17% (w/w) green tea extract, “Camellia Extract MJ” (25 µg fluoride /piece), but was identical to the placebo gum in all other respects. The composition of the sugar-free gums are shown in Table 1. Subjects were instructed to chew two pieces of the sugar-free gum at the same time for 20 minutes, twice per day for four weeks. The intraoral appliances were put in the mouth just before chewing and kept in the oral environment for another 20 minutes after chewing. In total, the appliances were kept in the oral environment for 80 minutes per day, and when the appliances were removed, they were stored in a moist plastic container at room temperature. The subjects were instructed not to eat, drink, smoke, or perform oral hygiene procedures while wearing the appliances and were prohibited from using dentifrices or mouthwashes containing fluoride throughout the study period. Each treatment period lasted four weeks with a one-week wash out period between treatments.

Acid challenge test

After the intraoral treatment phase, the enamel specimens were removed from the appliances. Another one-third of each enamel surface was covered with nail varnish as the remineralized (REM) area and the remaining one-third of the surface was treated with the demineralizing buffer again as the acid challenge test (ACT) area for 72 hours at 37 °C.

Microradiography

After the ACT, the enamel specimens were cut into approximately 200 µm sections with a water-cooled diamond microtome for hard tissues (Series 1000

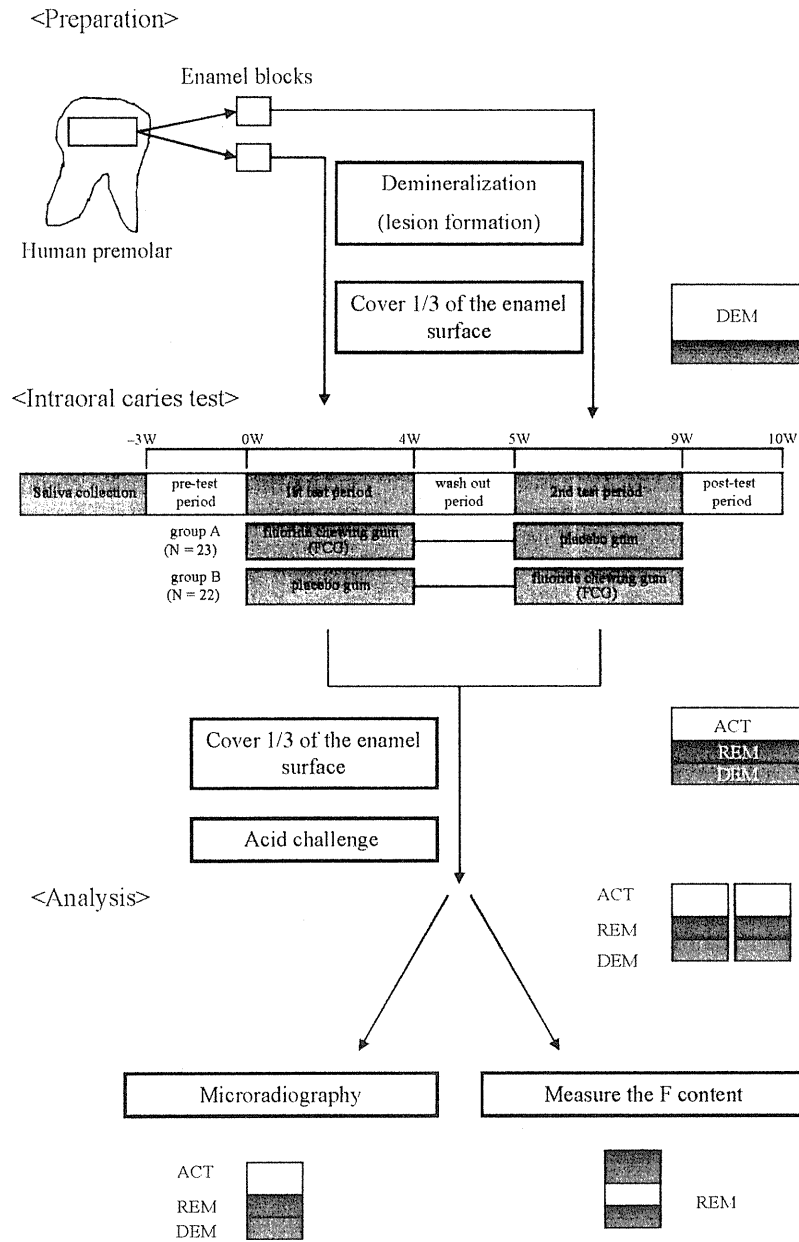


Fig 2. Outline of the experimental procedure. Patients were randomized to a double-blind crossover protocol with a one-week washout.

Table 1. Composition of the sugar-free chewing gums (pellet type)

	FCG (%)	Placebo gum (%)
Xylitol	41	41
Maltitol	33	33
Gum base	17	17
Flavours	3	3
Camellia extract MJ	1	0
Colours	0	1
Others	5	5
Total	100	100

Deluxe, USA). Microradiography was then performed as described previously,^{13,14} using an X-ray radiation system (HB-50, Hitex, Japan) at 2 kV, 20 mA, for 20 minutes. Each radiographic image of a lesion was scanned three times at different locations with a density meter (PDM-5, Konica Minolta, Japan). The lesion parameters such as mineral loss values (ΔZ in vol%· μm) and lesion depth (μm) obtained from these three scans were averaged and the mineral loss values were used as the main parameter for the specimens. ΔZ of each area of specimen (DEM, REM and ACT) were represented in ΔZ_{dem} , ΔZ_{rem} , and ΔZ_{act} , respectively. The

mineral change values during the *in situ* remineralization ($\Delta Z_{REM} = \Delta Z_{dem} - \Delta Z_{rem}$) and the ACT ($\Delta Z_{ACT} = \Delta Z_{act} - \Delta Z_{rem}$) were analysed.

Saliva collection and measuring the salivary fluoride concentrations

Whole mixed saliva samples for fluoride measurements were collected before (unstimulated saliva) and 0.5, 1, 3, 5, 10, 15 and 20 minutes after chewing two pieces of FCG. Saliva collection was performed one week ahead of the test period. The subjects were prohibited from eating, drinking, and using dentifrices or mouthwashes containing fluoride for one hour before the start of collection. In each case, twice the volume of total ion strength adjustment buffer (TISAB) IV¹⁵ was added to the collected saliva sample before measurement. Deposit-free supernatants were analysed using a fluoride ion-specific electrode (F-53/6561-10C, Horiba, Japan). The mean amount of fluoride released from the FCG group (μg) was calculated from the salivary fluoride concentration and the volume of the saliva samples.

Measuring the fluoride content of remineralized enamel

From each treatment group, 10 enamel specimens with sufficient remaining REM area for analysis were selected. The specimens were dissolved in 1 ml of 0.5 M HClO₄ for two minutes for surface layer analysis and for an additional six minutes for the subsurface layer analysis. After each etching, 2 ml of TISAB IV was added and the fluoride ion concentration was measured using a fluoride ion-specific electrode in the same manner as described above. The calcium ion concentration of each sample was measured with 0.5% LaCl₃, using an atomic absorption spectrometer (Z-5300, Hitachi, Japan). The following equations were used to calculate the acid-etched depth and the fluoride content of each layer sampled from the enamel specimens. The calculations used a density of 2.95 g/cm³ for enamel¹⁶ and a 37.5% calcium concentration of the enamel. Since the exact density of partially demineralized enamel is not known, the two parameters calculated are approximations: (1) acid-etched depth (μm) = mass of calcium (μg) / $[37.5\% \times 2.95 \text{ (g/cm}^3\text{)} \times \text{surface area (mm}^2\text{)}] \times 10^3$; and (2) fluoride content (ppm) = [Mass of fluoride (μg) / Mass of enamel in specimen (μg)] $\times 10^6$.

Statistical analysis

The parameters ΔZ_{REM} and ΔZ_{ACT} were evaluated using analysis of variance with Tukey's honestly significant difference for multiple comparisons (SPSS for

Windows, Version 12.0J; SPSS Inc., Tokyo, Japan). Independent t-tests were used to compare the fluoride concentrations of enamel between the two treatments. Statistically significant differences were set at a probability level below 5%.

RESULTS

All 45 subjects finished the test period without dropping out. During sample preparation, one enamel specimen was damaged mechanically and was excluded from the analysis set. Ultimately, there were 44 subjects in the FCG group (20 males, 24 females; mean age 35.3 years) and 45 in the placebo group (20 males, 25 females; mean age 35.1 years). The mineral change values during the *in situ* remineralization and the ACT are shown in Table 2. The increase of the ΔZ_{REM} was significantly greater for the FCG ($p < 0.05$). And FCG resulted in significant resistance to the acid challenge compared with the placebo gum ($p < 0.05$).

The mean salivary fluoride concentration while chewing two pieces of FCG was plotted as a function of time (Fig 3). Salivary fluoride concentration peaked at 3.93 ± 1.28 ppm for 0.5–1 minute and remained above 0.18 ± 0.20 ppm while chewing for 20 minutes. These fluoride concentrations were markedly higher than the baseline fluoride concentration in saliva (0.05 ± 0.03 ppm). The fluoride content of the remineralized regions are shown in Table 3. The fluoride content in the FCG group was markedly higher ($p < 0.001$) than in the placebo group, both in the surface layers (depth ca. 30 μm) and in the subsurface layers (depth ca. 30–120 μm). Figure 4 shows typical mineral profiles (Fig 4A and B) and microradiographs

Table 2. Values of ΔZ_{REM} and ΔZ_{ACT} (Mean \pm SD)

	FCG group	Placebo group	
ΔZ_{REM}	467 \pm 418	270 \pm 427	$p = 0.030$
ΔZ_{ACT}	1699 \pm 1194	2216 \pm 964	$p = 0.026$

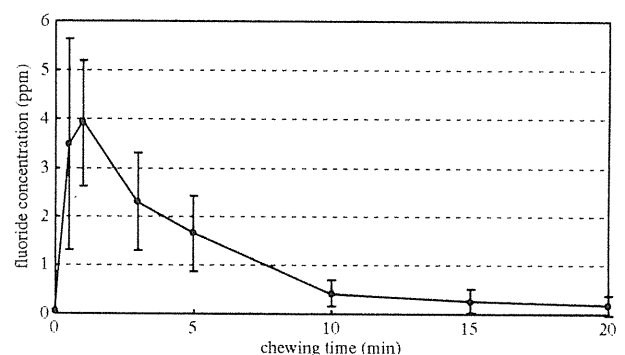


Fig 3. Fluoride concentration (ppm) in saliva after chewing fluoride gum. The vertical bars represent 1 SD.

Table 3. Fluoride concentration (ppm) in enamel after chewing fluoride and placebo gum. The fluoride levels with FCG were significantly higher than with placebo gum at both depths, i.e. the surface 0~30 μm and subsurface 30~120 μm ($p < 0.001$)

	Surface layer depth (μm)	F concentration (ppm)	t-test
FCG group	34.98 \pm 3.80	711.74 \pm 137.14	$p < 0.001$
Placebo group	32.87 \pm 4.05	378.03 \pm 70.82	
	Subsurface layer depth (μm)	F concentration (ppm)	t-test
FCG group	126.62 \pm 6.80	655.87 \pm 94.56	$p < 0.001$
Placebo group	126.71 \pm 6.82	158.99 \pm 25.88	

after the ACT (Fig 4C and D); there was a laminar structure in the FCG group (arrowed in Fig 4D), but not in the placebo group (Fig 4C). The laminar structure was seen in 29 of the 45 samples from the FCG group and in 17 of the 46 samples from the placebo group.

DISCUSSION

The continuous use of two pieces of FCG (25 μg fluoride/piece) for 20 minutes, twice per day for four weeks, maintained markedly higher salivary fluoride concentrations than the baseline in this study. The significant elevation in the salivary fluoride concentrations (Fig 3) probably contributed to the significant promotion of remineralization of early enamel lesions (Table 2). Importantly, exposure to FCG produced significantly higher acid-resistance from the surface to a depth of ca. 120 μm , presumably due to the promotion

of remineralization and fluoride intake to the remineralized enamel. Since the use of dentifrices and mouth-washes containing fluoride was prohibited during this study, the deposition of acid-resistant mineral was attributed to the fluoride ions released by the FCG. Supporting this finding, the fluoride content of the remineralized enamel lesions treated with FCG was at least twice as high as in the controls, from the surface to a depth of 120 μm .

Our study is premised on the hypothesis that ongoing exposure to low levels of fluoride enables significant remineralization of early enamel lesions. This concept has already been suggested by Featherstone¹⁷ and ten Cate,¹⁸ i.e. the frequent application of low level fluorides effectively inhibits demineralization and enhances remineralization. In our study, appliances were kept in the oral environment for 80 minutes/day and during this period the subjects were instructed not to eat or drink. Consequently, the clearance rate of fluoride would be much slower. Other FCG studies have demonstrated that the salivary fluoride concentration remained elevated for over one hour after chewing 0.25 mg F,¹⁹ or 0.5 mg F²⁰ and for up to four hours after chewing 0.25 mg F.²¹ Considering the promotion of remineralization and formation of acid-resistant mineral, we observed a very low fluoride content in early enamel lesions, i.e. 0.05 mg F in FCG in the oral environment is satisfactory. Our findings concurred with those of Lamb *et al.*²² who found that when salivary fluoride levels increased after using FCG, remineralization was promoted and significant resistance to acid challenge conferred. They also found that fluoride uptake was significantly higher for FCG-treated enamel lesions compared with both control and

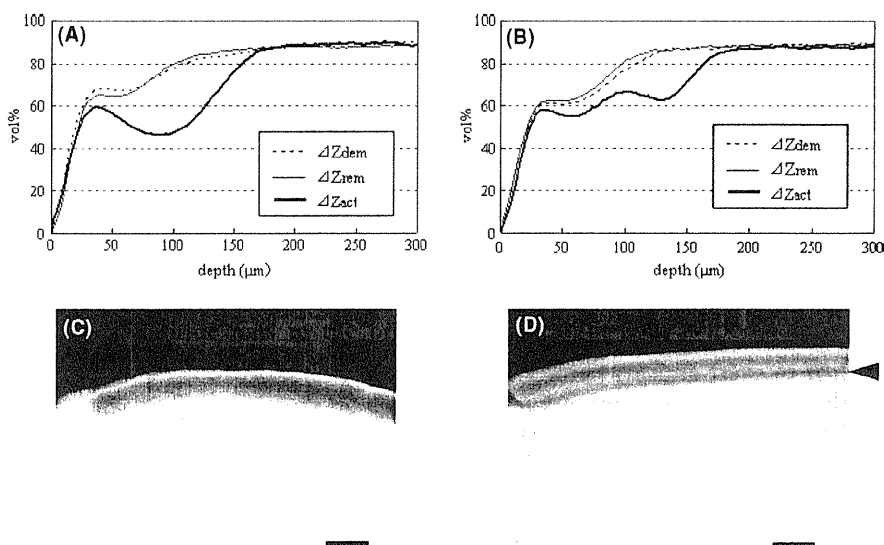


Fig 4. Typical mineral profile of the placebo (A) and FCG (B) groups and microradiographs of the placebo (C) and FCG (D) groups. The laminar structure is indicated by the arrow. Bar = 200 μm .

sorbitol-treated lesions, up to a depth of 70 μm . Moreover, the mean peak salivary fluoride concentration was 4.19 ppm after chewing FCG containing 0.1 mg F/stick. The peak fluoride level is similar to our results.

The main reason for the acquisition of acid-resistant minerals might be related to the effects of fluoride ions during remineralization. Our study examined the effects of using FCG on demineralized enamel. The peak fluoride concentration in saliva was ca. 4 ppm and levels over 0.1 ppm were maintained while chewing FCG for 20 minutes. In this study, the elution rate of fluoride from the FCG was calculated to be about 77% (data not shown). Therefore, a fluoride-rich acid-resistant mineral probably formed within the crystal spaces of the remineralized enamel samples. The reduction in lesion porosity caused by the fluoride-rich mineral increases the enamel resistance to subsequent acid challenge. As Fig 4 shows, even after remineralization, the surface mineral vol% is not as high as that of sound enamel (87 vol%). This means that remineralized lesions still have microspaces in the surface region. During the second acid challenge, the acids bypass the acid-resistant minerals located in the microspaces near the surface of the remineralized lesions and dissolve the underlining intact enamel that is not affected by demineralization/remineralization, where the acid resistance is lower than in the remineralized enamel. We found that the fluoride concentration in the surface and subsurface regions was two to four times higher (Table 3) respectively, which supports the concept that fluoride-rich mineral coat the intraprismatic spaces in remineralized lesions. These results agree with reports of higher acid resistance and fluoride content in arrested enamel caries than in sound enamel,^{23–25} and is probably one reason why the laminar pattern underneath the remineralized lesions was more pronounced in the FCG group after the acid challenge (Fig 4). This laminar pattern was present in some of the control group because the original enamel probably contained high fluoride levels. This laminar structure is believed to be evidence of resistance to the demineralization of remineralized enamel.^{26–28} Green tea catechins are known to have many anticariogenic effects.^{11,29} In this study, the peak and bottom salivary concentrations of total catechins were estimated to be 0.12 and 0.006 g/L, respectively. These concentrations seemed to be unrealistically low to exert anticariogenic effects in the human mouth. Therefore, the promotion of remineralization and the acquisition of acid-resistant property of enamel was mainly due to fluoride ion released from the FCG, and the effects of catechins were minor. The FCG results are most applicable on the tooth to promote post-eruptive maturation at and shortly after eruption, or on early enamel caries without cavitation to arrest and even regress through reminer-

alization. The resulting increased salivary flow rate also means FCG may be suitable for patients who suffer from dry mouth.

We designed the chewing gum to release over 0.1 ppm fluoride in saliva after 20 minutes based on the study by Tumba and Curzon³⁰ who used a glass slow release device and concluded that both deciduous and permanent caries indexes were significantly reduced in schoolchildren over two years. On completion of their trial, there were highly significant differences in salivary fluoride concentrations at both one year and at the end of the trial. They found that the mean salivary fluoride concentration was 0.11 ppm in the test group. From a clinical perspective, our data support the finding that the protective effect on demineralization derived from fluoride reactivity in early carious lesions – i.e. acquired acid resistance, as popularized by Koulourides²³ – is the main factor affecting the decay-preventive effects of topical fluoride. FCG derived from green tea extract would be useful for providing topical fluoride to prevent dental caries.

REFERENCES

1. Marinho VC. Evidence-based effectiveness of topical fluorides. *Adv Dent Res* 2008;20:3–7.
2. ten Cate JM, Featherstone JD. Mechanistic aspects of the interactions between fluoride and dental enamel. *Crit Rev Oral Biol Med* 1991;2:283–296.
3. Featherstone JD. Prevention and reversal of dental caries: role of low level fluoride. *Community Dent Oral Epidemiol* 1999;27:31–40.
4. Imfeld T. Chewing gum—facts and fiction: a review of gum-chewing and oral health. *Crit Rev Oral Biol Med* 1999;10:405–419.
5. Malinowska E, Inkielewicz I, Czarnowski W, Szefer P. Assessment of fluoride concentration and daily intake by humans from tea and herbal infusions. *Food Chem Toxicol* 2008;46:1055–1061.
6. Otake S, Makimura M, Kuroki T, Nishihara Y, Hirasawa M. Anticaries effects of polyphenolic compounds from Japanese green tea. *Caries Res* 1991;25:438–443.
7. Ooshima T, Minami T, Aono W, *et al.* Oolong tea polyphenols inhibit experimental dental caries in SPF rats infected with mutans streptococci. *Caries Res* 1993;27:124–129.
8. Matsumoto M, Minami T, Sasaki H, Sobue S, Hamada S, Ooshima T. Inhibitory effects of oolong tea extract on caries-inducing properties of mutans streptococci. *Caries Res* 1999;33:441–445.
9. Smullen J, Koutsou GA, Foster HA, Zumbé A, Storey DM. The antibacterial activity of plant extracts containing polyphenols against *Streptococcus mutans*. *Caries Res* 2007;41:342–349.
10. Magalhães AC, Wiegand A, Rios D, Hannas A, Attin T, Buzalaf MA. Chlorhexidine and green tea extract reduce dentin erosion and abrasion *in situ*. *J Dent* 2009;37:994–998.
11. Hamilton-Miller JMT. Anti-cariogenic properties of tea (*Camellia sinensis*). *J Med Microbiol* 2001;50:299–302.
12. Iijima Y, Koulourides T. Fluoride incorporation into and retention in remineralized enamel. *J Dent Res* 1989;68:1289–1292.
13. Tanaka K, Iijima Y. Acid resistance of human enamel *in vitro* after bicarbonate application during remineralization. *J Dent* 2001;29:421–426.

14. Lammers PC, Borggreven JM, Driessens FC, van't Hof MA. Acid-susceptibility of lesions in bovine enamel after remineralization in the presence of fluoride and/or carbonate. *Caries Res* 1992;26:1-7.
15. Santos JR, Lapa RAS, Lima LFC. Development of a tubular fluoride potentiometric detector for flow analysis evaluation and analytical applications. *Analytica Chimica Acta* 2007;583:429-436.
16. Manly RS, Hodge HC, Ange LE. Density and refractive index studies of dental hard tissue: II. Density distribution curves 1,2. *J Dent Res* 1939;18:203-211.
17. Featherstone JD, ten Cate JM. Physicochemical aspects of fluoride-enamel interactions. In: Ekstrand J, Fejerskov O, Silverstone LM, eds. *Fluoride in Dentistry*. Copenhagen: Munksgaard, 1988: 125-149.
18. ten Cate JM. Current concepts on the theories of the mechanism of action of fluoride. *Acta Odontol Scand* 1999;57:325-329.
19. Bruun C, Givskov H. Release of fluoride from fluoride-containing chewing gum. *Community Dent Oral Epidemiol* 1978;6:27-29.
20. Hattab FN, Green RM, Pang KM, Mok YC. Effect of fluoride containing chewing gum on remineralization of carious lesions and on fluoride uptake in man. *Clin Prev Dent* 1989;11:6-11.
21. Oliveby A, Ekstrand J, Lagerlöf F. Effect of salivary flow rate on salivary fluoride clearance after use of a fluoride-containing chewing gum. *Caries Res* 1987;21:393-401.
22. Lamb WJ, Corpron RE, More FG, Beltran ED, Strachan DS, Kowalski CJ. In situ remineralization of subsurface enamel lesion after the use of a fluoride chewing gum. *Caries Res* 1993;27: 111-116.
23. Koulourides T. Increasing tooth resistance to caries through remineralization. *Foods Nutr Dent Health* 1983;2:193-207.
24. Pearce EI, Coote GE, Larsen MJ. The distribution of fluoride in carious human enamel. *J Dent Res* 1995;74:1775-1782.
25. Pearce E, Larsen M, Coote G. Fluoride in enamel lining pits and fissures of the occlusal groove-fossa system in human molar teeth. *Caries Res* 1999;33:196-205.
26. Palamara J, Phakey PP, Rachinger WA, Orams HJ. Laminated zones in carious human dental enamel. *J Oral Pathol* 1986;15: 109-114.
27. Driessens FC, Theuns HM, Heijligers HJ, Borggreven JM. Microradiography and electron microprobe analysis of some natural white and brown spot enamel lesions with and without laminations. *Caries Res* 1986;20:398-405.
28. Gängler P, Krenniczky T, Arnold WH. In vitro effect of fluoride oral hygiene tablets on artificial caries lesion formation and remineralization in human enamel. *BMC Oral Health* 2009;9:25.
29. Taylor PW, Hamilton-Miller JMT, Stapleton PD. Antimicrobial properties of green tea catechins. *Food Sci Technol Bull* 2005; 2:71-81.
30. Tumba KJ, Curzon M. A clinical trial of a slow-releasing fluoride device in children. *Caries Res* 2005;39:195-200.

Address for correspondence:

Dr Youichi Iijima

Department of Oral Health

Nagasaki University

Graduate School of Biomedical Sciences

1-7-1 Sakamoto

Nagasaki 852-8588

Japan

Email: iijima@nagasaki-u.ac.jp



ELSEVIER

available at www.sciencedirect.comjournal homepage: <http://www.elsevier.com/locate/aob>

Involvement of HMGB1 and RAGE in IL-1 β -induced gingival inflammation

Yumi Ito^a, Ujjal K. Bhawal^{b,c,d,*}, Tomonori Sasahira^c, Toshizo Toyama^e, Takenori Sato^f,
Daisuke Matsuda^a, Harue Nishikiori^a, Masaru Kobayashi^g, Masaru Sugiyama^h,
Nobushiro Hamada^e, Hirohisa Arakawa^d, Hiroki Kuniyasu^c

^a Department of Comprehensive Dentistry, Kanagawa Dental College, Yokosuka 238-8580, Japan

^b Department of Biochemistry and Molecular Biology, Nihon University School of Dentistry at Matsudo, Matsudo 271-8587, Japan

^c Department of Molecular Pathology, Nara Medical University, Kashihara 634-8521, Japan

^d Department of Health Science, Division of Oral Health, Kanagawa Dental College, Yokosuka 238-8580, Japan

^e Department of Infection Control, Division of Microbiology, Kanagawa Dental College, Yokosuka 238-8580, Japan

^f Department of Oral Medicine, Division of Endodontics, Kanagawa Dental College, Yokosuka 238-8580, Japan

^g Department of Oral and Maxillofacial Surgery, Kanagawa Dental College, Yokosuka 238-8580, Japan

^h Department of Oral Health Research, Division of Oral Health Sciences, Graduate School of Biomedical Sciences, Hiroshima University, Hiroshima 734-8551, Japan

ARTICLE INFO

Article history:

Accepted 2 August 2011

Keywords:

IL-1 β
Gingiva
HMGB1
RAGE

ABSTRACT

Objective: Extracellularly released high mobility group box 1 (HMGB1) protein behaves as a cytokine, promotes inflammation and participates in the pathogenesis of several disorders in peripheral organs. The role of HMGB1 and receptor for advanced glycation end products (RAGE) expressed in gingival inflammatory tissues was explored.

Methods: Real time PCR was applied to assay HMGB1 and RAGE mRNA expression in gingival epithelial and fibroblast cells induced by interleukin-1 β (IL-1 β). A highly selective inhibitor of inducible nitric oxide (iNOS) was employed. ELISA was done for measurement of HMGB1 concentrations in cell culture media of gingival epithelial and fibroblast cells. Immunohistochemistry was performed to analyse the expression and sub-cellular localization of HMGB1, together with RAGE, in specimens obtained from patients with chronic inflammation.

Results: A time-dependent response of HMGB1 and RAGE expression in gingival cells to IL-1 β induction was observed. IL-1 β promotes HMGB1 production in human gingival epithelial cells in a nitric oxide-dependent manner. HMGB1 and RAGE appeared highly expressed in gingival inflammatory tissues.

Conclusion: These results demonstrate that HMGB1 and RAGE are abundantly expressed in gingiva and promptly released during gingival inflammation. We suggest a role for HMGB1/RAGE/iNOS signalling on inflamed gingival epithelial cells.

© 2011 Elsevier Ltd. All rights reserved.

* Corresponding author at: Department of Biochemistry and Molecular Biology, Nihon University School of Dentistry at Matsudo, Matsudo 271-8587, Japan. Tel.: +81 47 360 9328; fax: +81 47 360 9329.

E-mail addresses: bhawal.ujjal.kumar@nihon-u.ac.jp, bhawal@kdcnet.ac.jp (U.K. Bhawal).

0003-9969/\$ – see front matter © 2011 Elsevier Ltd. All rights reserved.

doi:10.1016/j.archoralbio.2011.08.001

1. Introduction

Epithelial cells are the first lines of host defence against invading bacteria and other pathogens. In addition to serving as a physical barrier, epithelial cells can contribute to the initiation of innate and adaptive host defence through the production of cytokines, chemokines, and anti-microbial peptides.¹

The cytokines released during chronic inflammation are of major importance with regard to the way in which the inflammation develops and is sustained. High mobility group box chromosomal protein 1 (HMGB1) is a novel pro-inflammatory cytokine that has been shown to play a role in the pathogenesis of several rheumatic diseases.² HMGB1 is a ubiquitous nuclear protein which, under normal conditions, is located in the cell nucleus, where it organizes the chromatin structure, DNA replication, and transcription. However, it has been recognized that HMGB1 can be actively secreted into the extracellular space by activated monocyte/macrophages, or passively released from the nuclei of necrotic or damaged cells.³ The active secretion of HMGB1 involves translocation from the nucleus to secretory lysosomes in the cytoplasm, and then exocytosis.⁴ In the extracellular area, HMGB1 regulates several different biologic processes, such as cell differentiation, cell migration, metastasis, and inflammatory responses.⁵ Interestingly, extracellular HMGB1 may be a part of a pro-inflammatory loop, since activated monocyte/macrophages secrete HMGB1 when stimulated with other pro-inflammatory cytokines, including tumour necrosis factor (TNF) and interleukin-1 β (IL-1 β).⁶ In turn, HMGB1 is a potent stimulator of both TNF and IL-1 β secretion. HMGB1 is continuously released from the gingival epithelial cells modulated by TNF- α .⁷

The macrophage-derived cytokine IL-1 is the major regulator of inducible nitric oxide (iNOS) expression by β -cells, IL-1 alone is sufficient to stimulate iNOS expression by rat β -cells, and combinations of IL-1 and Interferon-gamma (IFN- γ) stimulate β -cell expression of iNOS in most mouse strains and in human islets.⁸ iNOS expression has been demonstrated within the joint fluid of patients with osteoarthritis chondrocytes,⁹ and it is up-regulated by diverse pro-inflammatory stimuli such as IL-1 β , TNF- α and lipopolysaccharide (LPS). Both HMGB1 and its B box domain induced iNOS messenger RNA expression and nitric oxide synthesis in Caco-2 enterocytes, which resulted in the hypermeability of Caco-2 enterocytic monolayers.¹⁰

The receptor for advanced glycation end products (RAGE) is a multiligand receptor expressed on various cell membranes, including immune, endothelial, and epithelial, and cells of the central nervous system. This receptor, which is frequently associated with pro-inflammatory responses, has been shown to be activated by various ligands such as HMGB1, amyloid fibrils, transthyretin, Mac-1 (Integrin Mac-1), as well as advanced glycation end products (AGEs). Signalling through RAGE has been implicated as an underlying condition in diverse pathologies including periodontal disease, cardiovascular diseases, diabetes mellitus, Alzheimer disease, cancer, and neurologic conditions. RAGE expression has been detected in human gingival tissues from subjects with chronic

periodontitis, with or without type 2 diabetes.¹¹ RAGE has been demonstrated to be overexpressed in the gingival tissues of smokers with periodontal diseases compared to nonsmokers with periodontal disease.¹² Overexpression of RAGE after stimulation of AGEs and normocotine was also demonstrated in fibroblasts and epithelial cell lines originated from human gingival tissues.¹³ We previously reported co-expression of HMGB1 and RAGE is significantly associated with tumour progression and metastasis^{14,15} and suppression of tumour-associated macrophages.^{16,17} Although HMGB1 has been proposed to potently induce acute inflammatory processes, the mechanisms through which it activates cells and increases expression of pro-inflammatory mediators, including cytokines and reactive oxygen and nitrogen species, have not been completely characterised.

In the present study, we demonstrated that human gingival epithelial and fibroblast cells responded to IL-1 β stimulation through HMGB1/RAGE, and elucidated the partial molecular mechanisms for such response.

2. Materials and methods

2.1. Reagents

Human recombinant IL-1 β was purchased from R&D Systems (Minneapolis, MN). S-methylisothiourea sulphate (SMT) was purchased from Calbiochem (San Diego, CA).

2.2. Preparation of cells

Human primary epithelial and fibroblast cells were prepared from healthy gingival tissues from donors ($n = 3$) with their informed consent. Briefly, the gingiva was treated with 0.025% trypsin and 0.02% EDTA overnight at 4 °C and epithelial and fibroblast cells were isolated.¹⁸ The cell suspension was centrifuged at $120 \times g$ for 5 min, and the pellet was suspended in medium for epithelial cells containing 0.4% V/V bovine pituitary extract, 10 μ g/ml insulin, 0.1 ng/ml hEGF, 0.5 μ g/ml hydrocortisone, 50 μ g/ml gentamicin and 50 ng/ml amphotericin B (HuMedia-KG2, KURABO, Tokyo, Japan) and for fibroblasts in DMEM/10%FBS. The cells were seeded in 60-mm plastic tissue culture plates and incubated in 5% CO₂/95% air at 37 °C. When the cells reached sub-confluence, they were harvested and sub-cultured in 6-wellplates (2×10^5 cells/well). IL-1 β (10 ng/ml) was added to the cells for 24 h. Cells were treated with SMT (10 μ M) for 1 h prior to IL-1 β treatment.

2.3. MTS assay and LDH cytotoxicity assay

Human gingival epithelial and fibroblast cells in 96-wellplates (5×10^3 cells/well) were treated with different concentrations of SMT for 24 h and cell numbers were counted in triplicate assays with Cell Titer 96 AQueous One Solution Cell Proliferation Assay (Promega Corporation, Madison, WI). The lactate dehydrogenase (LDH) assay (CytoTox 96R Non-Radioactive Cytotoxicity Assay; Promega Corporation, Madison, WI) was used for evaluating cellular damage after treatment with IL-1 β (10 ng/ml) for 24 h. The absorbance (OD_{490 nm}) was measured using a Microplate reader (iMark™, Bio-Rad).