

令和元年6月19日現在

機関番号：32667

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K11375

研究課題名(和文) 幼児の唾液中フッ化物イオンの至適濃度とそのコントロール法の検討

研究課題名(英文) Examination of optimum concentration of fluoride ion in saliva and control method in infants

研究代表者

内川 喜盛 (Uchikawa, Yoshimori)

日本歯科大学・生命歯学部・教授

研究者番号：00176679

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：唾液中のフッ化物(F)イオン濃度を把握することは、その時点の歯の周囲環境、特に抗う蝕性が確認でき、さらにF製剤の使用状況も評価できる。そこで、日本人幼児4～5歳児の平衡時唾液のFイオン濃度をフローインジェクション分析装置を用いて測定した結果、平均値は0.0082(最大0.017、最小0.0025)ppmであった。その結果から、日本人幼児において日常的なF製剤の使用の必要性が示唆された。幼児の平衡時唾液中Fイオン濃度におよぼす生活習慣との関連性を調べたところ、歯みがき習慣との関連性が示唆された。一方、幼児の唾液中Fイオン濃度と唾液中う蝕原性細菌レベルとの関連性は認められなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、フローインジェクション分析装置を用いて日本人幼児の唾液中のフッ化物(F)イオン濃度の平均値は0.0082ppmF(最大0.017、最小0.0025ppm)であったことを報告した。これは、Fのう蝕予防効果として期待される脱灰の抑制や再石灰化の促進に必要な歯の周囲のFイオン濃度0.014-0.02ppmにさえも達していない。このことから、日本人幼児においてう蝕予防を目的としてF製剤の使用を積極的に推進する根拠を示せた。また、口腔衛生習慣との関連性から、歯みがきとの関連性が挙げられ、F製剤を用いて歯みがきを継続することによりう蝕予防効果が上がることを改めて示した。

研究成果の概要(英文)：Understanding the fluoride (F) ion concentration in saliva can confirm the environment surrounding the tooth, in particular, the caries resistance, and can also evaluate the use status of F preparation. We measured the F ion concentration in the saliva of Japanese infants aged 4 - 5 years using a flow injection analyzer. The average value was 0.0082 (maximum: 0.017; minimum: 0.0025) ppm. The results confirmed the need for F preparation use in Japanese infants. The association between infants' lifestyle and the F ion concentration in saliva was examined. The salivary F ion concentration was associated with the brushing habit but not with the salivary level of cariogenic bacteria in infants.

研究分野：小児歯科

キーワード：幼児 唾液 フッ化物イオン濃度 フローインジェクション分析装置 う蝕原性細菌 口腔衛生習慣

## 1. 研究開始当初の背景

幼児向けのフッ化物（F）製剤は多数販売され、使用機会は増加しているが、残念ながらその使用方法の確かな指針は存在しない。また、F製剤使用の適正を検査する方法はなく、医療面接において聴取した使用経験のみとなる。そこで、本研究では唾液中Fイオン濃度に着目した。F製剤使用後の唾液中Fイオン濃度の変化についての報告は多数認められるが、そのほとんどが成人を対象としたものであり、幼児についての検討はなされていない。

さらに、唾液中のFイオン濃度は0.02ppm F (20 µg/L) 以下と低濃度のため、通法のFイオン電極（測定限界 20 µg/L）では正確な測定は不可能であった。そこで本研究では、フローインジェクション法（測定限界 0.3 µg/L）を用いることにより少量サンプルにて正確な唾液中Fイオン濃度の測定が可能となった。この方法を用い、幼児唾液中のFイオン濃度を正確に測定し、実際のF製剤の使用状況および口腔内環境と関連づけることにより、幼児におけるF製剤の唾液中Fイオン濃度への影響とその効果が確認できる。また、その結果からFの適正摂取量の推定が可能となる。このことは、小児歯科臨床の場において唾液中のFイオン濃度を測定することにより、F製剤使用の適否の評価ができ、それを基に客観的な指導が可能となることを示す。

## 2. 研究の目的

日常生活において実際に使用するF製剤が幼児口腔内においてどのような動態を示すのかを唾液中Fイオン濃度を用いて明らかにし、その濃度が脱灰の抑制、再石灰化の促進に及ぼす影響を確認しながら、日本人小児に必要な唾液中至適Fイオン濃度を設定する。その濃度を指標としてF製剤の処方することで、幼児のより安全で効果的なFの使用が可能になると考えられる。

## 3. 研究の方法

### (1) 幼児唾液中Fイオン濃度と生活習慣および口腔環境との関連性の研究

日本人小児の平衡時唾液中Fイオン濃度の基礎データの蓄積と関連する口腔内、生活環境との関連性を検討するために、幼児を対象として口腔内診察、アンケート、唾液の採得を行った。

#### 被験児

4歳から6歳児 68名（男児26名、女児42名、平均年齢 $5.6 \pm 0.78$ 歳）横浜市、2つの保育園  
1つの保育園は、39名フッ化物洗口を昼食後行っている。しかし、2つの園児間での齲蝕罹患率に差が無く、また、他にも家庭や専門家の治療下においてフッ化物製剤の使用で差は認めず、一つのグループとして扱った。本研究は、保育園の許可および保護者の同意を得て行った。

#### 口腔内診察

口腔内診察は、経験豊富な一人の歯科医師が、それぞれの園において行い、う蝕はWHOの基準に従い、dmfsにて集計した。

#### 唾液試料

唾液の採取は、パラフィンワックスを咀嚼し、刺激唾液を plastic 容器に約5分間、約5 mlを目標に行った。

採取された唾液中0.2 mlは、ミュータンスレンサ球菌、乳酸桿菌の培養に用いられた。

残りの唾液サンプルは、唾液中フッ化物濃度の測定直前まで冷凍して保存された。唾液サンプルは、測定直前に1062 × g 20分にて遠心分離し、上清をフッ化物イオン濃度の測定資料とした。

尚、横浜市の水道水中のフッ化物イオン濃度は0.8ppm未満とされ平均0.06ppmと報告されている。

フローインジェクション分析装置 (flow injection analysis device) による F イオン濃度の測定

a. 装置の構造

F イオン電極を検出器とするフローインジェクション分析装置は、ポンプ、試料注入装置、混合用コイル、F イオン電極、イオンメーター・インテグレーターとレコーダーで構成され、配管は内径 0.5mm のテフロンチューブを使用し、緩衝液とキャリアを送り出すポンプにはプランジャーポンプを用いた。キャリアには超純水 (Milli Q, 日本ミリポア, 東京) を使用した。緩衝液と超純水の流量比は 1 : 1 とし、測定用の F イオン電極 (Model Orion 94-09, Thermo scientific) を装着したセル内を通過後、テフロンチューブより廃棄される。F イオン電極を安定するため、緩衝液を毎分 0.8ml の流速で電極セルに流し、電極の安定後、試料を注入し測定を行った。試料は、試料注入装置の 6 方バルブから約 0.2ml の注入を行い、超純水をキャリアとして毎分 1.2ml の流速で電極セルに流した。注入された試料の F イオン電極に発生した電位差をピークとして記録し、ピーク高から F イオン濃度を決定した。電位差はイオンメーターとインテグレーターを用いて測定し、記録計により、ベースラインの安定を確認後、ピーク形状、ピーク高をモニターした。

b. 緩衝液

試薬はすべて和光純薬製の特級を使用し、試薬の調整および緩衝液の作製には超純水を使用した。緩衝液は、Itai らの方法に準じ、超純水 900ml、酢酸ナトリウム三水和物 136g、塩化ナトリウム 117g、硝酸ナトリウム 170g、リン酸二水ナトリウム 3.6g、EDTA・4Na28g を溶解後、塩酸にて pH を 5.4 ± 0.1 に調整、1000ppmF の F 標準液を 0.02ml 加え、1L にし 0.45 μm のメンブランフィルターで濾過、これに Triton-X100 を 1g 加え作製した。

c. 各種 F 標準液の測定

F 標準液は、NaF 粉末 (特級, 和光純薬, 東京) を超純水に溶解し、0.001, 0.005, 0.01, 0.05, 0.1ppmF の各 F イオン濃度溶液とした。フローインジェクションシステムを使用しそれぞれの標準液約 0.2ml から得られた電位差のピーク高を測定し、検量線 (2 次回帰曲線) を作成後、試料の F イオン濃度の算出を行った。

d. 幼児唾液中 F イオン濃度の測定

フローインジェクション分析装置を用いて幼児唾液中 F イオン濃度を測定した。唾液試料 (約 0.2ml) の測定は 3 回行い、その平均値を唾液中 F イオン濃度とした。各試料の結果は記録紙上にピーク形状で得られる。このピーク時の電位差をインテグレーターで読み取りピーク高から、あらかじめ F 標準液より作成した検量線により唾液試料中の F イオン濃度を求めた。

う蝕原性菌の測定

ワックス咀嚼にて採取した唾液にめん棒を浸漬し約 0.2 ml の唾液を吸収させたのち、輸送培地に埋没させ、株式会社 BML に輸送した。う蝕原性菌として、ミュータンスレンサ球菌 (以下 MS) および乳酸桿菌 (以下 LB) の測定を依頼した。

アンケート

被験児の日常の口腔衛生活動に関する調査を、アンケート用紙を用いて行った。調査項目は、歯みがき習慣、フッ化物使用状況等とした。

統計処理

パラメトリックの比較には、ANOVA, Student の t 検定を、ノンパラメトリックの比較には Mann-Whitney U 検定と Kruskal-Wallis 検定を用いた。また、アンケート項目との関連性については

Spearman の順位相関係数を用いた .尚 ,有意水準は 5%とした .統計処理には ,統計ソフト IBM SPSS 21.0J を用いて行った .

#### 4 . 研究成果

##### ( 1 ) 唾液中フッ化物イオン濃度

唾液中フッ化物イオン濃度のレンジは , 0.211 0.947  $\mu\text{mol/L}$  ( 0.004 0.018ppm ) で , 平均 0.421  $\pm$  0.158  $\mu\text{mol/L}$  ( 0.008  $\pm$  0.003ppm ) であった ( 表 1 ) .

**表 1** 日本人幼児 ( 4 歳 ~ 6 歳 ) における唾液中フッ化物イオン濃度とう蝕罹患状況

|                                  | 平均    | SD    | 最小    | 最大    |
|----------------------------------|-------|-------|-------|-------|
| 年齢                               | 5.6   | 0.78  | 4.1   | 6.9   |
| 唾液中フッ化物イオン濃度 ( $\text{Imol/L}$ ) | 0.421 | 0.158 | 0.211 | 0.947 |
| う蝕歯面数 ( dmfs )                   | 3.68  | 7.882 | 0     | 37    |

dmfs decayed, missing, or filled surfaces, SD standard deviation

##### ( 2 ) 唾液中フッ化物イオン濃度とう蝕指数 , う蝕原性細菌 , 口腔衛生習慣との関連性

被験児の dmfs の平均は , 3.68  $\pm$  7.882 ( 範囲 0-37 ) であり , う蝕を有した幼児のう蝕歯面数は多く , う蝕が無い幼児と一方多数のう蝕を有した幼児との完全な 2 極化を呈していた ( 表 1 ) . 45 人は ( 66.18 % ) はう蝕が無く , 唾液中フッ化物濃度は 0.421  $\pm$  0.105  $\text{Imol/L}$  ( 0.008  $\pm$  0.002 ppm ) . 残りのう蝕を有した 23 人 ( 33.82 % ) の唾液中フッ化物濃度は 0.421  $\pm$  0.158  $\text{Imol/L}$  ( 0.008  $\pm$  0.003 ppm ) であり , 唾液中フッ化物濃度においては差が認められなかった .

表 2 に MS と LB scores の計測結果を示す . 高い MS と LB scores は , dmfs scores との有意な関連性を示した . しかしながら , MS と LB scores と唾液中フッ化物濃度との関連性は認められなかった .

**表 2** 日本人幼児 ( 4 歳 ~ 6 歳 ) における MS と LB レベルの違いによる唾液中フッ化物イオン濃度の比較

| Score<br>(CFU/mL)   | N<br>(68)                        | dmfs |       | F イオン濃度<br>( $\mu\text{mol/L}$ ) |       |       |
|---|----------------------------------|------|-------|----------------------------------|-------|-------|
|   |                                  | Mean | SD    | Mean                             | SD    |       |
| MS  | Undetected                       | 41   | 0.46  | 1.42                             | 0.421 | 0.158 |
|   | <10 <sup>3</sup>                 | 8    | 4.12  | 6.6                              | 0.474 | 0.158 |
|   | 10 <sup>3</sup> -10 <sup>4</sup> | 12   | 7.75  | 10.52                            | 0.474 | 0.158 |
|   | 10 <sup>4</sup> <                | 7    | 15.00 | 13.17                            | 0.421 | 0.158 |
| <i>Kruskal-Wallis test, p &lt; 0.001</i><br><i>Spearman ' s rank correlation = 0.633 ( p &lt; 0.01 )</i>    |                                  |      |       |                                  |       |       |
| LB  | Undetected                       | 48   | 1.79  | 4.52                             | 0.421 | 0.158 |
|   | <10 <sup>3</sup>                 | 8    | 3.00  | 4.38                             | 0.421 | 0.053 |
|   | 10 <sup>3</sup> -10 <sup>4</sup> | 7    | 11.14 | 17.05                            | 0.474 | 0.158 |
|   | 10 <sup>4</sup> <                | 5    | 12.40 | 9.71                             | 0.474 | 0.158 |
| <i>Kruskal-Wallis test, p &lt; 0.05 and</i><br><i>Spearman ' s rank correlation = 0.374 ( p &lt; 0.05 )</i> |                                  |      |       |                                  |       |       |

MS: *Mutans streptococci*; LB: *Lactobacilli*; dmfs: decayed, missing, or filled surfaces

SD: Standard Deviation

保護者へのアンケート結果を表3に示す。保護者による仕上げ磨きを1日2回以上と唾液中フッ化物イオン濃度とに有意な相関が認められた。その他、歯磨きの頻度、歯みがき剤の使用量、と唾液中フッ化物イオンの濃度との関連が認められた。フッ化物使用頻度によるグループ間での唾液中フッ化物イオン濃度の差は認められなかった(表4)。

日に2回以上仕上げ磨きを行っている18人の保護者は、朝食後と就寝前に行っていた。1日1回の仕上げ磨きを行う保護者は就寝前に23人が行っていた。

日に2回以上仕上げ磨きを行う18人は、歯磨剤の使用は、毎回15名、ときどき2名、使用していない1名であった。一方、1日1回の23人は、毎回12名、ときどき3名、使用していない8名であった。

**表3** 日本人幼児(4歳~6歳)における唾液中フッ化物濃度イオン濃度と保護者のアンケート結果との関連性

| 質問項目            | 回答        | N (68) | Fイオン濃度<br>( $\mu\text{mol/L}$ )<br>Mean $\pm$ SD | p値                | rs<br>(p value)   |
|-----------------|-----------|--------|--|-------------------|-------------------|
| 保護者による仕上げ磨きの頻度  | 2回/日*     | 18     | 0.526 $\pm$ 0.158                                | 0.003*<br>(ANOVA) | 0.276*<br>(0.023) |
|                 | 1回/日      | 23     | 0.421 $\pm$ 0.105                                |                   |                   |
|                 | 時々している    | 20     | 0.421 $\pm$ 0.158                                |                   |                   |
|                 | ほとんどしていない | 7      | 0.421 $\pm$ 0.105                                |                   |                   |
| 本人磨きの頻度         | 2回以上/日    | 43     | 0.474 $\pm$ 0.158                                | 0.007<br>(t-test) | 0.228<br>(0.061)  |
|                 | 1回以下/日    | 25     | 0.421 $\pm$ 0.105                                |                   |                   |
| 歯ブラシにのせる歯磨剤のサイズ | >1/2      | 11     | 0.526 $\pm$ 0.211                                | 0.074<br>(ANOVA)  | 0.195<br>(0.154)  |
|                 | 1/3-1/2   | 18     | 0.421 $\pm$ 0.158                                |                   |                   |
|                 | <1/3      | 26     | 0.421 $\pm$ 0.105                                |                   |                   |
|                 | 無回答       | 13     |  |                   |                   |

\*p < 0.05

**表4** 日本人幼児(4歳~6歳)におけるフッ化物製剤の使用状況についてのアンケート結果

| 質問項目  | 回答      | N (68) | Rate (%) |
|---|---------|--------|----------|
| フッ化物洗口  | あり      | 39     | 57.4     |
|   | なし      | 29     | 42.6     |
| フッ化物配合歯磨剤の使用頻度  | 毎回使用    | 45     | 66.2     |
|   | 時々使用    | 10     | 14.7     |
|   | 使用していない | 13     | 19.1     |
| 歯科医院におけるフッ化物歯面塗布の経験の有無<br>(9000 $\mu\text{g/g}$ of APF) | 経験なし    | 23     | 33.8     |
|   | 1-3回    | 26     | 38.2     |
|   | 4-5回    | 9      | 13.2     |
|   | 6回以上    | 9      | 13.2     |
|   | 無回答     | 1      | 1.5      |

ANOVA: analysis of variance; SD: Standard Deviation

### (3) 結論

本研究から、本研究被験幼児の唾液中Fイオン濃度は、0.211から0.947  $\mu\text{mol/L}$  (0.004-0.018ppm)

であり、平均は $0.421 \pm 0.158 \text{ Imol/L}$  ( $0.008 \pm 0.003\text{ppm}$ )であった。これらの値は、歯の表面におけるう蝕予防のために必要なフッ化物イオン濃度には明らかに低値であった。また、う蝕指数およびう蝕原性細菌(MS, LB)レベルと唾液中Fイオン濃度との間に関連性は認められなかった。一方、幼児の口腔衛生習慣との関連性については、唯一、保護者による仕上げ磨きの頻度との関連性が認められた。以上から、F製剤の使用に関して、さらに適切な情報を保護者に提供する必要性が示唆された。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計2件)

Iwasaki T, Uchikawa Y, Shirase T: Salivary-free fluoride ion concentration measured using a flow-injection analysis device and oral environment in 4-6-year-old children, *Odontology* (査読あり), 104, 2016, 372-379.

Terumi Iwasaki and Yoshimori Uchikawa: Changes in Salivary Free Fluoride Ion Concentration after Adding Low-Concentration Fluoride, *JSM Dentistry* (査読あり), 4, 2016, 1060(Online Journal)

[学会発表](計4件)

Yoshimori Uchikawa, Hidenori Yoh, Terumi Iwasaki: Caries predictive ability for the salivary mutans streptococci level in preschool children, The 45th Annual meeting & exhibition of the AADR, 2016.

Uchikawa Y, Yamazaki T, Shirase T: Predicting caries in preschool children using salivary mutans streptococci, *FDI, Int. Dent. J.*, 67 (Suppl. 1), 113, 2017.

Yoshimori Uchikawa, Terumi Yamazaki, Toshiomi Shirase: Predicting caries in preschool children using salivary mutans streptococci, IADR General Session, (<https://iadr2018.zerista.com/event/member/491817>):3262, 2018.

Yoshimori Uchikawa, Terumi Yamazaki, Yuko Umezu, Toshiomi Shirase: Effect of Oral Behavior and Maintenance on Salivary Mutans Streptococci Levels in Infants, The International Association of Paediatric Dentistry Global Summit on Early Childhood Caries, 2018.

## 6. 研究組織

(1) 研究分担者

(2) 研究協力者

研究協力者氏名: 山崎 てるみ

ローマ字氏名: YAMAZAKI TERUMI

研究協力者氏名: 白瀬 敏臣

ローマ字氏名: SHIRASE TOSHIOMI