

平成 21 年 5 月 22 日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2006～2008

課題番号：18592253

研究課題名（和文） フッ素が幼児の口腔内細菌叢と齲蝕原性細菌に及ぼす影響

研究課題名（英文） Influence of fluoride on infant's bacterial flora of the mouth and cariogenic bacterium.

研究代表者：

内川 喜盛（UCHIKAWA YOSHIMORI）

日本歯科大学・生命歯学部・准教授

研究者番号：00176679

研究成果の概要：

本研究では、齲蝕原性細菌レベルと齲蝕経験との間には有意な関連性は認められたが、唾液中フッ素（F）イオンと齲蝕経験および齲蝕原性細菌との関連性は認められなかった。一方、親の仕上げ磨きの頻度と唾液中Fイオン濃度との関連性が認められ、唾液中Fと口腔衛生習慣との関連性が確認された。しかし、幼児の平衡時唾液中Fイオン濃度は歯の脱灰抑制・再石灰化が期待できる濃度には至っておらず、フッ化物製剤の積極的な応用プログラムの作成が必要と考えた。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	2,000,000	0	2,000,000
2007年度	800,000	240,000	1,040,000
2008年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	450,000	3,950,000

研究分野：小児歯科学

科研費の分科・細目：歯学・矯正・小児系歯学

キーワード：幼児，唾液，フッ素イオン濃度，口腔細菌，齲蝕，齲蝕原性細菌，口腔衛生習慣，フローインジェクション法

1. 研究開始当初の背景

日本におけるフッ化物配合歯磨剤のマーケットシェアの上昇やフッ化物の洗口の実施の増加に伴い、フッ化物の応用の機会は年々増え、近年小児齲蝕が減少した大きな理由のひとつと考えられている。

フッ化物の齲蝕予防機序は、齲蝕発症過程における再石灰化の促進、脱灰の抑制、プラーク中細菌の活性の抑制などが考えられている。再石灰化の促進、脱灰の抑制は0.014-0.03ppmの低濃度のフッ素が唾液中に

存在することで生じると報告されており、そのことから低濃度のフッ化物製剤を頻繁に摂取することが望ましく、フッ素の効果的な利用法はホームケアにおける持続的な使用が基本となる。

一方、フッ素の口腔内細菌に及ぼす影響は、*in vitro*の研究において数多く報告されている。しかし、*in vivo*の研究はわずかであり、未だ明確な結論は得られていない。申請者は、フッ化物の洗口を開始して1か月後から小児唾液中のフッ素濃度が上昇し、3か月後に

ミュータンスレンサ球菌レベルが減少することを既に確認している。この事実はフッ素の口腔内細菌叢への影響を示唆していると考えている。

口腔内細菌に及ぼすフッ素の影響は 20 年以上にわたり国内外において研究されている。フッ素は口腔内細菌に直接的、間接的に多くの影響を及ぼしており、糖代謝系の炭水化物の輸送、酵素の活性、macromolecular 合成および多糖の精製等に対する抑制効果など報告されている。しかし、これらは *in vitro* の研究において説明されてきたものである。また、フッ素に対する耐性ミュータンスレンサ球菌の存在の報告もあるがその菌の特徴については検討されていない。一方、*in vivo* における研究では比較的高いフッ素レベルでのプラーク代謝と組成への影響の可能性を示した報告はあるが、ホームケアで使われるフッ化物製剤のフッ素濃度が口腔内細菌の種類や特性について及ぼす *in vivo* での報告は見あたらない。そこで、今回の研究は、日本人幼児を対象にフッ化物製剤の使用など口腔衛生習慣、唾液中フッ素濃度および口腔内細菌の変化を詳細に検討することにより、フッ素の口腔内への影響を確認し臨床に応用したいと考えた。

2. 研究の目的

フッ化物製剤が唾液中フッ素濃度に及ぼす影響、およびフッ素が口腔内で齲蝕原性細菌に及ぼす影響を明らかにするために下記の研究を計画した。

(1) 幼児の唾液中無機イオン濃度と齲蝕状況、齲蝕原性細菌との関係について調べる。

(2) 超微量フッ素の測定が可能とされているフローインジェクションシステムを応用したフッ素電極を用い幼児唾液中の遊離型フッ素イオン濃度を測定し、口腔内での唾液中フッ素イオンの影響を検討する際の基礎的データを供する。

(3) 低濃度フッ素イオン濃度測定が可能なフローインジェクションシステムにて幼児唾液中の遊離型フッ素イオン濃度を測定し、フッ化物使用状況、口腔衛生習慣、齲蝕原性細菌レベルおよび齲蝕経験との関連性を検討する。

3. 研究の方法

(1) 幼児の唾液中無機イオン濃度と齲蝕原性細菌との関連について

① 対象および調査方法

横浜市内の 2 つの保育園に通う 4 歳～6 歳の園児のうち唾液採取が可能であった 66 名を対象とし、口腔内検査と唾液の採取を行

った。

口腔内診査は、1 名の歯科医師が仰臥位の対象児に対し、スタンドライトの照明下で、歯科用ミラーを用いて行った。診査は WHO の基準に従い、齲蝕経験歯面数 (以下 dmfs) を求めた。

唾液は、小片にしたパラフィンワックスを咀嚼し、チューブに刺激唾液を採取した。採取時間は朝食後 2 時間以上経過後の午前中に行った。採取後可及的早期に齲蝕原性細菌レベルのために選択培地に塗抹し、残りは無機イオン測定のため測定時まで冷凍保存した。

② 齲蝕原性細菌レベルの測定

齲蝕原性細菌として、ミュータンスレンサ球菌 (以下 MS) と乳酸桿菌 (以下 LB) の唾液中レベルを測定した。採取唾液を 10 倍希釈法にて滅菌生食液で希釈し、改良 MSB 培地と ROGOSA 培地に塗抹、48 時間培養後、コロニー数を算定し、それぞれ唾液中ミュータンスレンサ球菌と乳酸桿菌のレベルとした。

③ 無機イオンの定量

採取唾液を遠心分離後、上清を孔径 0.22 μm の濾過膜 (ミリポア社) にて濾過し、その濾液を固相抽出カラム (ボンドエルト, Varian 社) にて除タンパク処理した。処理唾液を精製水にて 5 倍に希釈したものを試料とし、イオンクロマトグラフ (Shimadzu 社) にてイオンの測定を行った。今回測定したイオンは、塩素 (Cl^-)、リン酸 (PO_4^{3-})、臭素 (Br^-)、ナトリウム (Na^+)、アンモニア (NH_4^+)、カリウム (K^+)、マグネシウム (Mg^{2+})、カルシウム (Ca^{2+}) などについて測定した。

得られた結果を、dmfs と齲蝕原性細菌レベルとの結果と合わせ統計学的に検討した。

(2) フローインジェクションシステムを応用した幼児唾液中の遊離型フッ素 (F) イオン濃度の測定

① 唾液試料

対象は、横浜市の 2 つの保育園 A, B の 4 歳から 6 歳の園児 56 名 (男児 28 名, 女児 27 名) とした。A 保育園では週 5 日フッ化物漱口を昼食後に行っている。

唾液採取時間は朝食後 2 時間以上経過後の午前中とし、パラフィンワックス咀嚼にてチューブに刺激全唾液を採取した。採取唾液は冷凍保存し、測定直前に自然解凍した後、20, 400 \times g で 20 分間遠心分離し、上清を唾液試料とした。

なお、両保育園の水道水の水源は同一で、水道水の F 濃度は平均 0.06mg/l であった。

② F イオン濃度の測定

F イオン濃度の測定は、F 電極 (Model 94-09,

Orion) セルに接続するフローインジェクション分析装置 (FAU2200, 大和電子, 図 1) を用いて行った。F 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。

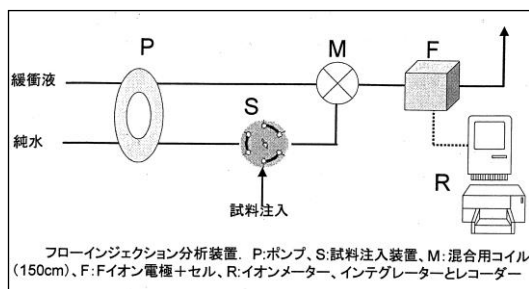


図 1 フローインジェクションシステム

F 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, 0.2ml の試料の注入は, 試料注入装置の 6 方バルブから行い, 純水をキャリアーとして毎分 1.2ml の流速で電極セルに流した。キャリアーと緩衝液の混合比は 1 : 1 とした。注入された試料は混合用コイルで前処理を行い, その後 F イオン電極に発生した電位差をピークとして記録し, ピーク高からイオン濃度を決定した。

緩衝液は, 蒸留水 900ml に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 3.6 g, EDTA・4Na 28 g 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, $0.45 \mu\text{m}$ のメンブランフィルターで濾過後, これに Triton-X100 を 1g 加え使用した。

F 標準液は, NaF 粉末 (特級, 和光純薬, 東京) を純水に溶解し, 0.001, 0.005, 0.01, 0.05, 0.1ppmF の各 F イオン濃度溶液とし, F 電極に発生したそれぞれの電位差のピーク高から検量線を算出した。

③ 唾液中 F イオン濃度の測定

唾液試料 0.2ml 注入により得られた電位差のピーク高を測定し, 標準液から得られた検量線より濃度を算出した。

④ 唾液への F 添加後の F イオン濃度の経時的变化の測定

標準液 (0.05, 0.01, 0.5ppmF) を唾液試料に 1:9 の割合で添加し, 5 分および 1 時間後の F イオン濃度を測定した。

(3) 幼児唾液中の遊離型フッ素イオン濃度とフッ化物使用状況, 口腔衛生習慣, 齲蝕原性細菌レベルおよび齲蝕経験との関連性の検討

① 対象・唾液試料

対象は, 横浜市の 2 つの保育園 A, B の 4

歳～6 歳の園児でフッ化物使用状況について保護者に質問紙調査を行い, あわせて刺激唾液の採取および口腔内診察が可能であった 68 名 (男児 26 名, 女児 42 名, 平均年齢 5.6 歳) とした。

唾液試料は, パラフィンワックス咀嚼にて刺激全唾液を採取した。採取時間は朝食後 2 時間以上経過後の午前中に行った。採取唾液は冷凍保存し, 測定直前に自然解凍した後, $3,060 \times \text{g}$ で 20 分間遠心分離し, 上清を唾液試料とした。なお, この地域の水道水の F 化合物濃度は平均 0.06mg/L (ppm) で二つの保育園の水道水は同じ水源である。

② F イオン濃度の測定

F イオン濃度の測定には, F 電極 (Orion 94-09, Thermo scientific) セルに接続するフローインジェクション分析装置 (FAU2200, 大和電子) を用い, NaF 粉末 (特級, 和光純薬, 東京) を純水に溶解した 0.001, 0.005, 0.01, 0.02, 0.05ppm の各標準液 0.2ml から得られた電位差のピーク高を測定し, 検量線を作成後, 濃度の算出を行った。

唾液試料 (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。

③ 齲蝕原性細菌レベルの測定

齲蝕原性細菌として, ミュータンスレンサ球菌 (以下 MS) と乳酸桿菌 (以下 LB) の唾液中レベルを測定した。採取唾液は滅菌生食液を用いて 10 倍希釈法にて希釈し, それぞれの選択培地である改良 MSB 培地と Rogasa 培地に塗抹, 48 時間培養後, CFU/ml でコロニー数を算定した。測定したコロニー数は, Undetected = 0, $\sim 10^2 = 1$, $10^3 \sim 10^4 = 2$, 10^4 以上 = 3 とコロニー数が少ない順にレベル 0, 1, 2, 3 とした。

④ 質問紙調査

質問紙調査の内容は, 家庭での歯磨き・保護者の仕上げ磨きの頻度, またいつ行っているか。歯磨剤の使用頻度, フッ化物添加の有無, 使用量, 使用後の含嗽の回数, フッ化物歯面塗布の経験, また家庭でのその他フッ化物配合製品の使用の有無などを質問した。

⑤ 統計処理

統計処理は, SPSS 16.0J を使用し, パラメトリックのデータには t 検定および ANOVA, Turkey 法を, ノンパラトリックのデータには Mann-Whitney の U 検定および Kruskal Wallis 検定を, 調査項目間の関連性の確認には Spearman の順位相関係数を用い, 有意水準は 5% とした。

4. 研究成果

(1) 幼児の唾液中無機イオン濃度と齲蝕原性細菌との関連について

① 被験者のうち 37 名は齲蝕経験がなく、dmfs の平均は 3.7 ± 8.0 で、最高は 42 であった。本研究の対象者は、齲蝕有病者率 44% と 2005 年歯科疾患実態調査全国平均と比較して低い値を示していた。しかし、齲蝕経験者のみの dmfs は 6.56 と高い値を示し、二極分化を示していた。

② MS レベルの分布は 10^5 (CFU/ml) 以上が 20 名 (30%) と最も多く、続いて 10^2 (CFU/ml) 未満が 19 名 (28.8%) であった。LB レベルの分布は、 10^2 (CFU/ml) 未満が 30 名 (45.5%) と最も多く、 $10^2 \sim 10^5$ (CFU/ml) のグループは 8 ~ 10 人と均等に分布していた。

MS と LB の唾液中のレベルは、未検出児の割合が高い値を示した。しかし、MS においては 10^5 以上の高レベルの幼児の割合がもっとも高い値を示していた。特に MS が 10^4 以上を示した児は齲蝕経験数が多く、2 極化の原因として MS の定着が強く関係していると考えられた。

③ MS および LB 間と齲蝕経験との間で有意な相関係数が認められた (Spearman, $p < 0.01$)。

MS と LB は、ともに dmfs と関連が認められ、齲蝕との関連が改めて確認された。LB においては ds との間に最も高い有意な相関が認められたことから、齲窩の存在が両菌の唾液中レベルに強く関係があることが分かった。

④ 本研究で定量した唾液無機イオン濃度と齲蝕経験との間に有意な相関係数 (Spearman) は認められなかった。

⑤ 唾液無機イオン濃度と齲蝕原性細菌レベルの間では、LB と Ca^{2+} との間に有意な相関係数が得られた。

⑥ 調査した無機イオン中には齲蝕経験と相関関係のあるイオンは存在しなかった。同様に MS にも相関関係が認められなかった。しかし、LB と Ca^{2+} との間に有意な相関が認められ、LB と Ca^{2+} との間に何らかの関係があることが示唆された。

(2) フローインジェクションシステムを応用した幼児唾液中の遊離型 F (F イオン) 濃度の測定

① フローインジェクション法にて測定した F イオン濃度は、0.001ppmF から安定した値が得られた (図 2)。

縦軸に F イオン濃度、横軸にピーク高さをプロットし、2 次回帰曲線へ良好に適合させることが出来た。

フローインジェクション法による F イオン濃度の測定限界は $0.3 \mu\text{g/L}$ (0.0003ppmF) とされ、本研究においても唾液中の F イオン濃度測定に应用できることが確認できた。

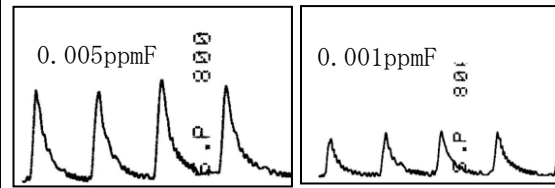


図 2 フローインジェクション分析装置レコーダーによる記録例

② 被験者の採取唾液中 F イオン濃度の測定結果を図 3 に示す。全体の平均値は 0.008, 最大 0.017, 最小 0.0025 ppmF であった。フッ化物洗口を行っている園児群の唾液中 F イオン濃度の平均値は、行っていない園児群と比較して有意に高い濃度を示した。幼児の唾液中 F イオン濃度は個人間にて差が認められ、また、F 洗口群と非洗口群との間に有意な差が認められたことから、F 化合物応用が平衡時唾液中 F 濃度に影響を与えることが示唆された。今後、ホームケアにおけるフッ化物応用が幼児唾液中 F イオン濃度に与える影響も併せて、詳細に検討していく予定である。

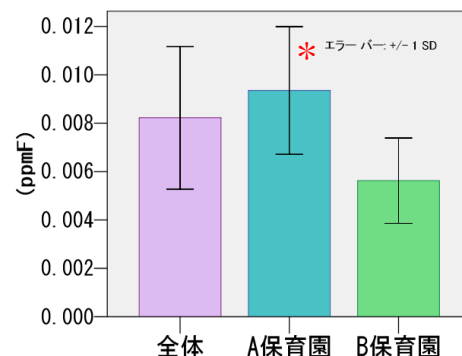


図 3 被験者の採取唾液中 F イオン濃度の測定結果

* : A 保育園 vs B 保育園 $p < 0.001$ (t-test)

③ F 添加後の唾液中 F イオン濃度は、添加された F から予定される濃度と比較して 17 ~ 45% の減少が認められ、その減少率は添加 F イオン濃度が低いほど有意に高かった。また、5 分後と 1 時間後の値では差は認められなかった。

唾液中に添加された F の濃度は純水のそれと比較して有意に少ない値を示した。このことから、唾液中に添加された F は唾液中の蛋白質などと速やかに結合することが推察された。今後、どの濃度のフッ化物の使用が齲蝕予防に最も効果的であるのか、安全であるのかを長期にわたる唾液中のフッ化物の動

態を調べ明確にすることにより、さらに安全で効果的なフッ化物の応用が可能となり、フッ化物の適正摂取量の確定にも寄与できると考えている。

(3) 幼児唾液中の遊離型Fイオン濃度とフッ化物使用状況、口腔衛生習慣、齶蝕原性細菌レベルおよび齶蝕経験との関連性の検討

① 本研究の被験者の dmft および dmfs の平均はそれぞれ 0.68, 3.68 であり、平成 17 年歯科疾患実態調査結果の同年齢と比較して低い値を示した。しかし、dmfs が 1 以上の幼児の平均値は 10.87 と高く 2 極化が認められた。

② 被験者の採取唾液中 F イオン濃度は、平均値 0.0083 ± 0.0026 、最大 0.018、最小 0.0035 (ppm) であり、すべてが通常の F 電極の測定限界である 0.02ppm よりも低い値であった (図 4)。

③ 質問用紙集計結果は、「毎日みがく」は対象者全体の 98.5% で、「日に 2 回」が 51.5% と最も多かった。また、保護者による仕上げみがきは毎日 1 回が最も多く、毎日 2 回以上は 27% であった。歯磨剤の使用状況は「毎回使用」は 66.2% で、「まったく使わない」が 19.1% であった。ペーストの使用量は歯ブラシの 1/3 以内が 47.3% と最も多く、続いて 1/3~1/2 が 32.7% であった。

④ 質問用紙項目とう蝕経験 (dmfs, ds, fs) および唾液中 F イオン濃度との間に関連性は認められなかった。

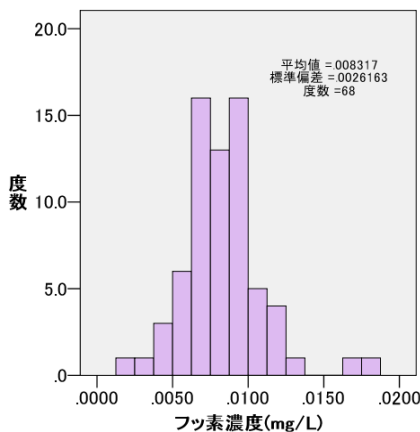


図 4 唾液中 F イオン濃度別 度数分布

⑤ 質問用紙結果と唾液中 F イオン濃度との関連性では、歯みがきペースト、フッ化物塗布、フッ素洗口等のフッ化物剤の頻度や料が多い程、唾液中 F イオン濃度は高い傾向は示したが、有意な関連性は認められなかった。

⑥ 一方、「保護者の仕上げみがきの回数」と F イオン濃度との間に有意な関連性が認められ、そのうち「日に 2 回以上」の場合に有意に高い値が認められた。これは、「2 回以上」の被験者は全員「朝」に 1 回行っており、唾液採取日の朝の仕上げみがき時の歯みがきペーストの影響によるものではないかと推測した (図 5)。

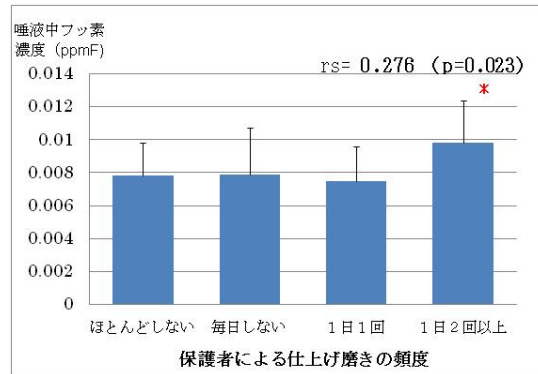


図 5 保護者による仕上げ磨きの頻度と唾液中フッ素濃度との関連性 (* : $p < 0.05$ (ANOVA, turkey))

表 1 齶蝕、齶蝕原性細菌と唾液中 F イオン濃度

	Group	N	dmfs	F 濃度
齶蝕の有無	dmfs=0	45	0	.0084
	dmfs>0	23	10.87	.0082
MS レベル	0	41	0.46	.0082
	1	8	4.12	.0089
	2	12	7.75	.0087
	3	7	15.00	.0079
LB レベル	0	48	1.79	.0082
	1	8	3.00	.0081
	2	7	11.14	.0087
	3	5	12.40	.0087

MS レベル and dmfs: $p < 0.01$ (Kruskal Wallis), $rs=0.633$ ($p < 0.01$)

LB レベル and dmfs: $p < 0.05$ (Kruskal Wallis), $rs=0.374$ ($p < 0.01$)

dmfs and 唾液中フッ素濃度: N.S.

MS レベル and 唾液中フッ素濃度: N.S.

LB レベル and 唾液中フッ素濃度: N.S.

⑦ 表 1 は齶蝕の有・無別、齶蝕原性細菌レベル別の F イオン濃度を示す。

齶蝕経験と唾液中 F イオン濃度には有意な差は認められなかった。

MS のレベルを少ない順に 0, 1, 2, 3

と分類したところ、スコア 0 が 60.3% と最も高い割合を示し、dmfs はスコア 0 で最も少なく、MS レベルが高いほど高く、MS レベルと dmfs には有意な相関が認められた。

一方、MS レベルと唾液中フッ素イオン濃度との間には関連性は認められなかった。

唾液中 L B レベルでは、スコア 0 が 70.6% と最も高い割合を示した。L B レベル別に dmfs の分布を示すとスコア 0 で最も少なく、L B レベルが高いほど dmfs が大きく、有意な相関が認められた。L B レベル別に F イオン濃度の分布を示すと、L B レベルと唾液中フッ素イオン濃度との間には相関は認められなかった。

⑧ 唾液中フッ素イオン濃度と口腔衛生習慣との関連性が確認され、仕上げみがき時の歯磨剤の使用回数が影響することが示唆された。しかし、本研究の被験者の唾液中 F イオン濃度は最大 0.018ppm と低濃度であり、歯の脱灰抑制・再石灰化が期待できる濃度には至っておらず、フッ化物製剤の積極的なプログラムの作成が必要と思われた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[学会発表] (計 5 件)

1. UCHIKAWA Y., IWASAKI T., YOSHINO S., and SHIRASE T. : Relationship between Oral Hygiene Habits and Salivary F-concentrations in Infants, IADR 87th General Session 1178, 2009 年 3 月 31 日~4 月 3 日, マイアミ, 米国.
2. 岩崎てるみ, 吉野園子, 増田理紗, 石川力哉, 上原正美, 白瀬敏臣, 内川喜盛: 幼児のフッ化物製剤使用経験と唾液中フッ素イオン濃度との関係について, 第 23 回小児歯科学会関東地方会, 2008 年 10 月 20 日, 千葉市.
3. 岩崎てるみ, 内川喜盛, 白瀬敏臣, 吉野園子: フローインジェクション法による小児の唾液中フッ素イオン濃度の検討, 第 46 回日本小児歯科学会大会, 2008 年 6 月 12~13 日, 大宮市.
4. 岩崎てるみ, 庄内聡子, 吉田素子, 吉野園子, 楊 秀慶, 内川喜盛: 幼児の唾液中無機イオン濃度と齲蝕原性細菌との関連について, 第 45 回日本小児歯科学会大会, 2007 年 7 月 19~20 日, 東京都江戸川区.
5. 庄内聡子, 割田幸恵, 小方清和, 白瀬敏臣, 内川喜盛: 幼児の唾液中無機陰イオン濃度と齲蝕原性細菌との関連性について, 第 44 回日本小児歯科学会大会, 2006 年 5 月 25~26 日, 松本市.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

内川 喜盛

日本歯科大学・生命歯学部・准教授

研究者番号: 00176679

(2) 研究分担者

古西 清司

日本歯科大学・生命歯学部・教授

研究者番号: 20178289