

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 17 日現在

機関番号：32667

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2014

課題番号：23593047

研究課題名(和文) 幼児における唾液中フッ化物イオン濃度を用いた効果的なフッ化物製剤応用法の検討

研究課題名(英文) Study of effective fluoride preparation application method using a saliva fluoride ion concentration 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) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：幼児唾液中のフッ化物イオン(F)濃度を詳細に測定し、口腔衛生習慣との関連性、低濃度F製剤添加後の唾液中Fの動態を検討した。その結果、日本人幼児唾液中のF濃度は平均0.0083ppmFであり、再石灰化が期待できる濃度には達しておらずF製剤の積極的な使用の必要性が示唆された。この濃度に影響する因子として歯みがき習慣との関連性が認められ、F配合歯みがきペーストの使用と頻度が唾液中のF濃度を上げていた。また、唾液中へ低濃度F製剤を添加した時、陽イオン、タンパクから影響を受け遊離型F濃度の上昇は抑えられていた。これらの結果から、幼児唾液中の至適F濃度のコントロール法確立の可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：We measured the fluoride (F) ion concentration in infant saliva and examined the relationship between the F ion concentration and oral hygiene habits. The F ion dynamics in the saliva after the addition of a low-concentration F formulation in the saliva was also examined. We found that the average F ion concentration in Japanese infant saliva was 0.0083 ppmF. This concentration does not reach the minimum concentration necessary for remineralization. Therefore, Japanese infants required an aggressive use of the F formulation. A relationship between the brushing habits and the salivary F ion concentration was observed. The frequency of F formulated toothpaste use raised the F ion concentration in the saliva. When a low-concentration F formulation was introduced into the saliva, cations and proteins were found to decrease the free F ion concentration. According to these results, strategies to maintain the optimal F ion concentration in infant saliva must be developed and implemented.

研究分野：小児歯科

キーワード：幼児 唾液 フッ化物 齲蝕予防 フッ化物製剤

1. 研究開始当初の背景

日本におけるF配合歯磨剤のマーケットシェアの上昇やF洗口の実施増加に伴い、F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。一方、低年齢から重症齲蝕を発症し、齲蝕リスクが高く、早期からFの応用が必要な小児も少なくない。Fの重要な齲蝕予防機序として、齲蝕発症過程における脱灰の抑制、再石灰化の促進が考えられている。この再石灰化の促進、脱灰の抑制は0.014-0.02ppm Fと僅かなFが唾液中に存在することで生じると報告されており¹⁾、このことから唾液中のF濃度を一定以上に維持することが重要な齲蝕予防の戦略と考えられる。具体的には低濃度のF製剤を持続的に摂取することが望ましいと考えられるが、最も低濃度で齲蝕予防効果が高いとされている水道水へのF添加は日本では実施されておらず、家庭におけるF製剤の使用が基本となる。しかし、現在のところF製剤使用の具体的な指針はなく、齲蝕の危険度が高い幼児にはより多くの、より濃度の高い製剤の応用が指導される。しかし、これらは余剰なF摂取の危険性もあり、一方、家庭においてFの齲蝕予防効果が十分に発揮されているのが把握できない。

F製剤応用後の唾液中Fイオン濃度変化の報告はみられるが、それらの多くは計測期間がF製剤塗布後数時間と短く、濃度平衡状態(以後平衡時)となった際の濃度測定は少ない上、F電極法にて調査した結果である。平衡時唾液中のFイオン濃度は0.02 ppm F以下という低濃度で、これは従来のF電極法の測定限界(0.02 ppm F)以下であり、実際、正確な測定は困難で唾液中のFイオン濃度の正確かつ詳細な検討はなされていない。そこで申請者は、幼児の唾液中Fイオン濃度を正確に測定するため、測定限界が0.3 µg/Lのフローインジェクション分析装置²⁾を応用し、少量の唾液でFイオン濃度測定が可能であったことを報告している³⁾。

また、申請者が行った別の実験で、再石灰化が期待できる濃度のFを唾液中に添加したところ、期待されたFイオン濃度を維持することができず17~45%の減少が認められた³⁾。これは、電気陰性度が高いFは他の物質との結合力が強く、唾液中の夾雑物と結合することにより遊離型Fイオンの割合が減

少するためと考えられる。再石灰化、脱灰抑制の作用が期待できるFは遊離型イオンの状態であるため、齲蝕予防効果を期待するためには実際の唾液中遊離型Fイオンの濃度が重要となる。したがって、低濃度F添加後の唾液中Fイオンの動態を知ることは幼児の適正なF製剤使用方法の確立に重要な要因となると考えた。

2. 研究の目的

本研究では、超微量Fの測定が可能なフローインジェクションシステムを応用し、次の項目について明らかにすることを目的に行われた。

(1) 4~5歳幼児を対象として平衡時唾液中のFイオン濃度を精密に測定し、F製剤使用習慣と唾液中Fイオン濃度との関連性を検討することにより平衡時唾液中F濃度の上昇に影響を及ぼすF製剤の摂取方法を明らかにする。(研究1)

(2) 唾液中への低濃度F製剤の添加によるFイオンの動態(唾液性状との関連性)を検討することにより、試適濃度維持のための添加Fイオン濃度および必要添加量を明らかにする。(研究2)

3. 研究の方法

(1) 研究1の方法

超微量Fの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F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した。

対象は、横浜市の2つの保育園の4歳~6歳の園児のうち、フッ化物使用状況、口腔衛生習慣について保護者にアンケートを行い、併せて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、20,400×gで20分間遠心分離し、上清を唾液試料とした。

Fイオン濃度の測定には、F電極セル(Orion 94-09, Thermo scientific)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,0.001,0.005,0.01,0.02ppm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。

齲蝕原性細菌として,採取唾液を改良MSB培地およびROGOSA培地に塗抹・培養し,コロニー数からそれぞれミュータンスレンサ球菌と乳酸桿菌の唾液中レベルを算定した。

(2) 研究2の方法

人工唾液中における低濃度フッ素の動態 - タンパク質との結合性について -

本研究では,超微量Fイオン濃度の測定可能なフローインジェクション分析装置を応用し,人工唾液中のタンパク質と低濃度Fとの結合性について検討した。

A. 試料

試薬はすべて和光純薬工業(株)製を使用し,試薬の調製および緩衝液の作製には超純水(Milli Q,日本ミリポア,東京)を使用した。

a. タンパク質溶液

リン酸緩衝生理食塩水(pH7.2)にブタ胃由来ムチン,ウシ血清由来アルブミンをそれぞれ溶解し,タンパク質溶液を作製した。

b. F標準液

NaF粉末を超純水に溶解し,0.001,0.005,0.01,0.05,0.1,0.5mg/L(ppmF)の各Fイオン濃度溶液を作製し,F標準液とした。

B. Fイオン濃度の測定

標準液(0.05,0.1,0.5ppmF)を1:9(F:溶液)の割合で0.3%タンパク質溶液と超純水に添加し,Fイオン濃度の変化を測定した。Fイオンの測定は,フローインジェクション分析装置(FAU2200,大和電子)を用いて行った¹⁾。

C. 統計処理

F添加後のイオン濃度の比較はt検定を使用し,有意水準は5%とした。

人工唾液中における低濃度フッ化物の動態 - 唾液中無機イオンとの関連性について -

本研究では,溶液中遊離型Fイオンとタンパク質,カルシウムイオン(Ca),カリウムイオン(K)およびナトリウムイオン(Na)の関連性を詳細に検討した。

A. 試薬はすべて和光純薬工業(株)製を使用し,試薬の調製および緩衝液の作製には超純水(Milli Q,日本ミリポア,東京)を使用した。

a. 人工唾液

・タンパク質溶液

リン酸緩衝生理食塩水(pH7.2)にブタ胃由来ムチンとウシ血清由来アルブミンをそれぞれ溶解し,タンパク質溶液とした。

b. イオン溶液

炭酸カルシウムと炭酸カリウムおよび炭酸ナトリウムを,希塩酸を用いて溶解し,1,10mM/LのCaとKおよびNaの各イオン濃度溶液を作製した。

c. F標準液

NaF粉末を超純水に溶解し0.002,0.005,0.01,0.05,0.1mg/L(ppm)の各Fイオン濃度溶液とした。

B. Fイオン濃度の測定

F標準液0.1ppmを1:9(F:溶液)の割合で,イオン溶液とタンパク質溶液および人工唾液(イオン添加0.3%タンパク質溶液)または超純水に添加し,それぞれFイオン濃度の変化を測定した。Fイオン濃度の測定はフローインジェクション分析装置(FAU2200,大和電子)を用いて行った。

C. 統計処理

Fイオン濃度の比較にはt検定を使用し,有意水準は5%とした。減少率は,超純水中のFイオン濃度0.01ppmに対する減少量を%で示した。

4. 研究成果

(1) 研究1の成果

被験者のdmftとdmfsの平均はそれぞれ0.68,3.68であった。齲蝕経験(dmfs,ds,fs)と齲蝕原性細菌レベルとの間に有意な相関が認められた($p<0.01$)。

採取唾液中Fイオン濃度は,平均 0.0083 ± 0.0026 ,最大0.018,最小0.0035(ppmF)であった。唾液中Fイオン濃度とアン

表1 幼児唾液中フッ化物イオン濃度とアンケート結果との関連性

Item	Grouping	N (68)	唾液中遊離型 Fイオン濃度 (ppm)	p value	rs (p value)
			Mean ± SD		
保護者による仕上げ 磨きの頻度	一日2回以上*	18	0.010 ± 0.003	0.003* (ANOVA)	0.276* (0.023)
	一日1回	23	0.008 ± 0.002		
	時々 ほとんどしない	20	0.008 ± 0.003		
本人磨きの頻度	一日2回以上	43	0.009 ± 0.003	0.007 (t-test)	0.228 (0.061)
	一日1回以下	25	0.008 ± 0.002		
歯磨剤使用量 (乳歯列期用歯ブラシ の毛先に対して)	>1/2	11	0.010 ± 0.004	0.074 (ANOVA)	0.195 (0.154)
	1/3-1/2	18	0.008 ± 0.003		
	<1/3	26	0.008 ± 0.002		
	無回答	13			

*p < 0.05

アンケート結果との関連性のうち「保護者の仕上げ磨きの回数」との間に有意な相関が認められ、「日に2回以上」の場合に有意に高い値が認められた(p<0.05, ANOVA) (表1)。一方、唾液中Fイオン濃度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。

以上から、唾液中Fイオン濃度と口腔衛生習慣との関連性が確認され、仕上げ磨き時の歯みがきペースト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Fイオン濃度は、最大 0.018ppm と低濃度であり、歯の脱灰の抑制、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が必要と思われた。

本研究では唾液中Fイオン濃度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。

(2) 研究2の成果

(2) -

F 添加ムチンおよびアルブミン溶液中の F イオン濃度の測定結果を表2に示す。

A. F 添加ムチン溶液は、同量添加の純水と比較して有意に低いFイオン濃度を示した。

B. F 添加アルブミン溶液は、添加F濃度 0.05, 0.1ppmF において、同量添加の純水と比較して有意に低いFイオン濃度を示した。

C. F 添加ムチンおよびアルブミン溶液間のFイオン濃度に差は認められなかった。

D. 純水と比較したタンパク質溶液の F イオン濃度減少率は 2.8~20.9%で、0.1ppmF 添加時が最も減少率が高かった。

以上の結果より、唾液中Fイオンの一部は唾液成分であるムチンおよびアルブミンと結合することが示唆された。しかし、唾液にF添加した時のFイオン濃度の減少率を計測した岩崎らの報告³⁾と比較すると、本研究の

タンパク質溶液中での減少率は低い値を示していた。

表2 mucin および albumin への低濃度フッ素の濃度変化(ppm) (*:p < 0.05)

		0.05	0.1	0.5
添加F濃度				
純水中F濃度		0.005	0.001	0.05
mucin 溶液	Mean	0.0040*	0.0079*	0.0486*
	SD	0.0001	9.8E-5	0.0005
	減少%	18.6	20.9	2.8
albumin 溶液	Mean	0.0042*	0.0081*	0.04947
	SD	0.0002	7.7E-5	0.0007
	減少%	15.7	19.1	1.1

(2) - の成果

表3 F添加人工唾液中の遊離型Fイオン濃度測定結果

0.3% タンパク質溶液	添加イオン (10mM/L)	添加F濃度 (ppm)	予定最終F濃度 (ppm)	Mean (ppm)	減少率 (%)
mucin	nothing	0.1	0.01	0.0086	14
	Ca	0.1	0.01	0.0063	37
	K	0.1	0.01	0.0088	12
	Na	0.1	0.01	0.0080	20
albumin	nothing	0.1	0.01	0.0091	9
	Ca	0.1	0.01	0.0060	40
	K	0.1	0.01	0.0085	15
	Na	0.1	0.01	0.0077	23

*: P<0.05

Caイオン添加0.3%ムチン溶液中のFイオン濃度は、同量F添加の超純水と比較して有意に低い値を示した(表3)。

以上の結果から 研究(2) - の結果と同様に、本研究でも溶液中におけるFイオンとの結合において、カルシウムイオンにタンパク質が加わることで遊離型Fイオン濃度が減少する傾向がみられた。しかし、他のイオンとの関連性も今後詳細に検討していく必要があると考える。

<引用文献>

Featherstone JDB.: Prevention and reversal of dental caries: role of low level fluoride, Community Dent Oral Epidemiol.,27:31-40,1999.

Itai K et al. : Highly sensitive and rapid method for determination for fluoride ion concentration in serum and urine using flow injection analysis with a fluoride ion-selective electrode, Clinica Chimica Acta, 308 : 163-171, 2001.
岩崎てるみ,内川喜盛,石川力哉,上原正美,吉野園子,白瀬敏臣:フローインジェク

ション法をによる幼児唾液中フッ素イオン濃度の測定, 小児歯誌, 47: 760-766, 2009.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計1件)

内川喜盛: 特集, 知っておきたい小児歯科 UP DATE4, う蝕 予防と治療, 小児科, 査読無, 56, 2: 137-146, 2015.

〔学会発表〕(計4件)

岩崎てるみ, 内川喜盛, Salivary fluoride concentration and oral environment in young children, 2015 IADR/AADR/CADR General Session Exhibition, 2015年3月11日~14日, John B. Hynes Veterans Memorial Convention Center, マサチューセッツ州ボストン, アメリカ

岩崎てるみ, 内川喜盛, The oral environment and salivary fluoride concentration in 4-6-year-old children, 日本歯科大学歯学会第1回ウインターミーティング, 2014年12月13日, 日本歯科大学, 千代田区, 東京

岩崎てるみ, 内川喜盛, 石川力哉, 上原正美, 浜地宏哉, 田村文誉, 人工唾液中における低濃度フッ化物の動態 唾液中無機イオンとの関連について, 第50回日本小児歯科学会大会 2012年5月12日~13日, 東京国際フォーラム, 千代田区, 東京

岩崎てるみ, 内川喜盛, Changes in the Salivary Fluoride Concentration after Adding Low-concentrated Fluoride, AADR(American Association for Dental Research), 2012年3月21日~24日, TAMPA CONVENTION CENTER, フロリダ州タンパ, アメリカ

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
取得年月日:
国内外の別:

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 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

(2) 研究分担者

岩崎 てるみ (IWASAKI, Terumi)
日本歯科大学・生命歯学部・講師
研究者番号: 60515609

白瀬 敏臣 (SHIRASE, Toshiomi1)
日本歯科大学・生命歯学部・准教授
研究者番号: 20237018

三井 園子 (MITUI, Sonoko)
日本歯科大学・生命歯学部・助教
研究者番号: 10549083