

厚生科学研究補助金（医療技術評価総合研究事業）
分担研究報告書

フッ化物の適正摂取量

食品中フッ化物分析法の基礎的検討
- Collaborate Study -

分担研究者 高江洲義矩 東京歯科大学 名誉教授
西牟田 守 国立健康・栄養研究所微量栄養素所要量研究部室長

研究要旨：本研究は、汎用されている微量拡散 - F イオン電極によるフッ化物定量法を同一の食品試料を用いて、3 研究室で比較・検討することにより、信頼性と妥当性の検索を行ったものである。コラッポレーションスタディの結果は次の通りである。灰化しない微量拡散法のブランク値は、20hr 以内の拡散時間でも 0.03 μ g 以下であり、低濃度 F 試料にも適用可能であった。灰化を行わない微量拡散法による低濃度 F 分析値の比較では、調整粉乳 2 種と「野菜がゆ」および Bovine muscle においてほぼ同じような F 値が得られたので、3 研究室による灰化しない微量拡散法による F 分析値は信頼できるものと考えられる。「野菜がゆ」と Bovine muscle では灰化を行った微量拡散法の方が F 分析値は高くなり、とくに Bovine muscle ではその差が顕著であった。F 添加回収実験では、NaF ならびに難溶性 HAP の F 添加において灰化および灰化を行わなかった微量拡散法にかかわらず F 回収率は 91% から 110% の範囲となり良好であった。食品のフッ化物分析において、灰化の有無については両法で比較・評価して、比率の傾向性を把握しておく必要性が認められた。これらの結果に基づき次年度では、各食品のフッ化物濃度の一覧表作成と各年齢群における一日フッ化物摂取量の推定値を検討し、フッ化物適正摂取量(AI)の閾値を評価する。

A.研究目的

フッ化物(以下 F と略記する)の全身応用による齲蝕予防効果と過剰摂取による歯のフッ素症を防ぐためには各年齢群の一日フッ化物摂取量を推定することにより、適正摂取量 (AI) および許容上限摂取量(ULI)を評価しておくことが重要である。それに先立って食品や食事の F

分析法を確立しておくことが要請されているが、食品や生体試料などの有機物を多量に含む試料についての F 分析法は、前処理も含めて煩雑な定量操作を必要とし、とくに食品や食事などの低濃度 F 試料を精度よく分析する統一的方法のコンセンサスが得られていないのが現状であった。従来から食品や生物試料などの F

分析は、検出器として F イオン電極を使用することは共通していたが、食品の前処理、灰化法（有無）、拡散容器、酸の種類と濃度や温度などの緒条件は研究室ごとに異なっており、各研究室で同一試料を測定・比較した報告もほとんどなかった。そこでプロゼクト-1 では 3 研究室（A：愛知学院大学歯学部口腔衛生学，B：神奈川歯科大学口腔衛生学，C：東京歯科大学衛生学）で同一食品試料をそれぞれの F 分析法で測定して比較検討することにより、F 分析法の信頼性と妥当性を再評価することにした。

各研究室に与えられた F 分析評価項目は、拡散法の概略と精度管理、分析条件の検討および共通の食品試料の F 分析値についてである。

B. 研究方法

食品試料を各研究室に配布後に、各研究室で実施した食品中フッ化物分析法の研究報告をもとにして、それぞれの評価項目について比較した。各研究室に配布された食品試料と微量拡散法の評価項目は次の通りである。

1. 食品試料

- 1) 調製粉乳 A（和光堂、レーベンス、Lot. No. 1F28）
- 2) 調製粉乳 B（明治乳業，Step, Lot. No. 1E08）
- 3) 野菜がゆ（和光堂，freeze dry）
- 4) Bovine Muscle(BM と略；National Institute of Standards and Technology, Canada, 8414, 参照値 0.22ppm, method : extraction ion selective electrode)

2. 微量拡散法の評価項目

- 1) 微量拡散装置の構造
- 2) 拡散条件：

酸の種類と濃度(精製法)，量
 拡散の方法（室温振盪，加温）
 拡散時間
 灰化の有無
 食品の採取量
 F イオン検出
 F 添加回収
 F 標準回収

3) 食品中 F 分析値

C. 研究結果と考察

1. 拡散容器の構造（表 1）

3 研究室で採用したフッ化物の微量拡散容器の構造は表 1 にまとめている。

微量拡散容器の構造は、各研究室の間では参考にした研究者によって若干異なっている。A 研究室では Watershouse¹⁾を基にして使い捨てのペトリデッシュを使用し、B 研究室では Sara²⁾を参考に箱型のプラスチック容器を作製して微量拡散容器としている。また C 研究室においては樋出らの開発した Conway³⁾型のテフロン製微量拡散容器を用いている。Waterhouse¹⁾や Sara²⁾の微量拡散装置は、室温で振盪させて、F 拡散を行うことを目的に設計されているのに対して、Conway³⁾型のテフロン製微量拡散装置は、加温に適用できる構造になっている。

2. F 拡散の原理

F 拡散の基本原理は、食品試料（または灰化試料）を強酸の条件下において Taves⁴⁾の見出した有機リシカ化合物である HMDS (hexamethyldisiloxane) 存在における F の選択的拡散と捕集液への吸収である。

この F 拡散反応メカニズムにおいては、強酸存在下において試料から放出されて

きた F イオンが水素(H)イオンと結合するよりも HMDS と結合しやすく(すなわち結合エネルギーが低く), 結果として TMFS(trimethylfluorsilane)を形成する。この TMFS は溶液反応系(液相)から選択的に揮発して気相に移動していくようになるが, この一連の F 拡散反応は自発的に進行するという仮説に基づいている。このような液相から気相への F 拡散反応(相転位反応)に影響を与えるのが, 振動や温度そして時間である。

3. 拡散条件の比較(表2)

3 研究室で実施した食品中 F 分析法の拡散条件については表2にまとめてある。試料の灰化を実施して微量拡散法を行ったのは B 研究室のみであり, 他の2研究室では灰化を行わない微量拡散法を採用している。以下順に拡散条件について説明していく。

食品試料の処理: 今回の食品試料は, ほとんどが乾燥粉末試料であり 0.5g-4g 使用している。液状での拡散法をルーチン化している A 研究室では食事に蒸留水を適量加えて混和し, 液状化して試料としており, 個別食品ではなく食事分析に特化しているのが特徴である。

試料の灰化: これは B 研究室のみで実施している。その灰化条件⁵⁾は灰化容器; 磁性ルツボ, 固定剤; 1M-Mg(CH₃COOH)₂ (コハク酸マグネシウム)2ml, 固定は 80℃, 24 時間とし, 灰化は電気マッフル炉を用いて 400℃ で 24 時間行っている。

分離拡散溶液: HMDS 過飽和 5M-HClO₄ または 6MHCl-HMDS を使用している。塩酸は過塩素酸よりも蒸気圧が低く, しかも低温で揮発しやすいので室温における拡散に適していると考えら

れる。一方, 過塩素酸は熱に対して非常に安定しており, 加温による拡散にも応用できる。

フッ化物捕集液: いずれの研究室においても NaOH 溶液を使用しており, その濃度は, F イオン電極による最終測定段階において約 0.1M NaOH に調整されている。

振動の有無: A および B 研究室では, 室温で振動を行っており, その振動速度はそれぞれ 60 回/分と 70 回/分である。C 研究室では, 振動はしないで(静置), 温度を 60℃ にして拡散を行っている。

F イオン検出: いずれの研究室でも, 複合型 F イオン電極^{6,7)} (model 96-09, Orion Reseach Inc, MA) を使用している。全イオン強度補正緩衝液(TISAB)については, TISAB あるいは TISAB を使用している。

F イオン標準液: F イオン標準液は, B・C 研究室では, 外部標準として, 低濃度 閾 0.01-0.1ppm と高濃度 閾 0.1-1.0-10ppm の系列を使用している。A 研究室では, 内部標準を採用しているのでブランク値は相殺される。また試料量が 10g あるので回収 F 量も 0.1μg 以上あり, 低濃度閾ではない F イオン標準液(0.1-1.0-10ppm)で評価できる利点がある。

拡散時間: B および C 研究室では, 3-20hr に設定して, 灰化/灰化を行わない微量拡散法による F 分析値の時間的推移を観察した。A 研究室では 16 時間以上の拡散でサンプルからの F 回収が十分得られることが確認⁸⁾されているので, 拡散時間を 20hr に固定して評価している。

以上が, 各研究室によって採用された微量拡散法の条件である。

4. 灰化を行わなかった微量拡散法による食品中 F 濃度の比較 (表 4)

調整粉乳 A (レーベンス, 和光堂) では, 各研究室ともに 0.20-0.23ppm の濃度範囲であり, 統計的な差は認められなかった。調整粉乳 B (ステップ, 明治) について 0.43-0.48ppm の濃度範囲であり, 3 研究室ではほぼ同じ F レベルを示していた。

野菜がゆ (和光堂) では灰化を行わない微量拡散法による F 濃度は 0.19-0.195ppm となり, 3 研究室でほぼ同じ値となっている。

一方, Bovine muscle (参照値 0.22ppm) について F 値は, 研究室 A:0.225ppm, B:0.21ppm (20hr) および C:0.217ppm (12hr) であり, 3 研究室ともに差は認められずさらに参照値 0.22ppm との比較でもほぼ同値であった。

このように灰化を行わなかった微量拡散法によって測定された調整粉乳 2 種, 「野菜がゆ」および Bovine muscle の F 値を比較してみると 3 研究室では統計的差は認められなかった。

5. 灰化と灰化を行わなかった微量拡散法による食品中 F 濃度の比較 (表 5)

調整粉乳 A について, 灰化を行った微量拡散法と行わなかった微量拡散法による F 値について大きな差はなかったが, 微量拡散法による F 値は, 拡散時間が長くなるにつれて上昇する傾向にあった。「野菜がゆ」について灰化を行った微量拡散法では, 振盪時間の延長と共にフッ化物値が上昇し, しかもピーク値 (0.53ppm, 20hr) は灰化を行わなかった微量拡散法 (0.193ppm, 9hr) より高い値を示した。

Bovine Muscle は「野菜がゆ」より, 灰

化を行わなかった微量拡散法のピーク値 0.211ppm(20hr)に対して, 灰化を行った微量拡散法のピーク値 69.3ppm(20hr)と比較して顕著な差が認められた。

これに関して, Taves⁹⁾ は黒胡椒(black pepper)や市販穀類(2種)において両者の比率が 150%から 600%と非常に高率になったと報告しているが, それ以外の市販食品では概して約 80-120%の率であり, 有機フッ素は考慮しなくてもよいと考察している。

6. フッ化物添加回収実験 (表 6)

F 添加回収実験で添加されたフッ化物は, NaF および HAP である。F 添加量は, 秤取した食品の F 量と等量になるようにした。調整粉乳 A については, B 研究室で灰化の有無, 添加物質の種類にかかわらず 94.9-110%と良好な F 回収率であった。また C 研究室では灰化を行わない HAP 添加 F 回収率は 95.1%であった。また調整粉乳 B に関して, A および C 研究室において灰化を行わない F 添加回収は, HAP 添加ではそれぞれ 91.1%と 101%であり, NaF 添加においては 101%の値であった。同様に Bovine Muscle においても 99.7-104%と良好な F 回収率を得ている。

7. 微量拡散法のブランク値 (表 3)

微量拡散法におけるブランク値をみると, B 研究室においては, 灰化を行わない拡散法について拡散時間 3-20hr では 0.01 μ gF 未満であり, ほとんどないとみてよいが, 灰化を行った拡散法のブランク値は 0.08-0.09 μ gF となり, 両者を比較すると灰化を行った拡散法のブランク値がやや高くなっているものの既報値よりも若干低いようである⁸⁾。C 研究室で

は灰化を行わない3-20hrの拡散時間では0.011-0.026 μg のFブランク量となり、さらにA研究室でも20hr拡散で0.02 μg 以下であった。したがって3研究室における灰化を行わない拡散法のブランク値は、いずれも非常に低いので低濃度F試料測定への影響も少ないと考えられる。

A研究室では内部標準を採用し、そのFイオン標準液の回収実験を行っている。Fイオン濃度0.1-10ppmの回収率は、89.6 - 101%の範囲となり、0.1ppmで変動係数(CV)が10.4%とやや高くなるものの、その他は2.0-4.4%と低くきわめて安定していた。したがって外部標準を用いても実際には評価が可能であると考察している。

D. 結論

本研究は3研究室において採用している食品中F分析法について、拡散法の概略と精度管理、分析条件の検討、および共通の食品試料のF分析値を比較し、F分析法の信頼性と妥当性について検討することであり、以下のような結果が得られた。

- 1) 各研究室によるF拡散原理は、Taves³⁾の方法に準じていることは共通しているが、その構造は拡散条件である室温・振動あるいは加温/静置に適しているかで選択される材質と形状がそれぞれ異なっていた。
- 2) フッ化物捕集液はすべての研究室で最終測定において0.1M NaOH溶液であった。
- 3) 灰化しない微量拡散法のブランク値は、20hr以内の拡散時間でも0.03 μg 以下であり低濃度F試料にも適用可能であった。
- 4) 灰化を行わない微量拡散による食品

中Fの拡散時間は60・振動なしでは12-20hr要し、一方室温・振動でも9-20hr必要となる。

- 5) 灰化を行わない微量拡散法によるF分析値の比較では、調整粉乳2種と野菜がゆおよびBovine muscleにおいてほぼ同じようなF値が得られたので3研究室による灰化を行わない微量拡散法による低濃度F分析値は信頼できるものと考えられる。
- 6) 一方、野菜がゆとBovine muscleでは灰化を行った微量拡散法の方がF分析値が高くなり、とくにBovine muscleではその差が顕著であった。
- 7) F添加回収実験では、NaFならびに難溶性HAPによるF添加において、灰化および灰化を行わなかった微量拡散法にかかわらず91%から110%の範囲となり良好であった。
- 8) 食品のフッ化物分析において、灰化の有無については両法で比較・評価して、比率の傾向性を把握しておく必要性が認められた。

E. 文献

- 1) Waterhouse, C., Taves, D., Munzer, A. : Serum inorganic fluoride changes related to previous fluoride intake, renal function and bone resorption, Clin Sci (Colch), 58(2) : 145-152, 1980.
- 2) Sara, R., Wanninen, E. : Separation and determination of fluoride by diffusion with hexamethyldisiloxane and use of fluoride-sensitive electrode, Talanta, 22 : 1033-1036, 1975.
- 3) Singer, L. and Armstrong : Modified diffusion method for analysis of

- fluoride, J dent Res., 40 : 910, 1956
- 4) Taves, D.R. : Separation of fluoride by rapid diffusion using hexamethyldisiloxane, Talanta, 15 : 969-974, 1968.
 - 5) 原康二, 飯塚喜一, 堀内俊孝 : フッ化物の灰化に関する基礎的検討, 口腔衛生会誌, 44 : 122-124, 1994.
 - 6) Frant, M.S., Ross, J.W. : Electrode for sensing fluoride ion activity in solution, Science, 154 : 1553-1555, 1966.
 - 7) Thermo Orion : Fluoride/fluoride combination electrode instruction manual, Orion Research Inc, MA.
 - 8) Guha-Chowdhury, N., Drummond, B.K., Smillie, A.C. : Total fluoride intake in children aged 3 to 4 years-a longitudinal study, J Dent Res., 75(7) : 1451-1457, 1996.
 - 9) Taves, D.R. : Dietary intake fluoride ashed (total fluoride) vs. unashed (inorganic fluoride) analysis of individual foods, Br J Nutr, 49 : 295-301, 1983.
 - 10) 渡辺 猛, 椿田直也, 宮城昌治, 岩本義史 : 食品中のフッ素に関する研究 第1報 乳児用調製粉乳中の総フッ素量の定量, 口腔衛生会誌, 38: 387-392, 1989.

F . 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

論文発表

- 1) 西牟田守、萩原清和、山下光雄、渡邊智子: 100kcal/100g 日本食品成分表、(株) 建帛社、東京、2001 .

- 2) 渡邊智子、鈴木亜夕帆、西牟田守: 液状食品の 100ml 成分表 五訂成分表収載食品について . 栄養学雑誌: 59(4): 197-202, 2001.
- 3) 西牟田守: 「五訂日本食品標準成分表」その特色と効果的活用 栄養学研究の立場から ビタミン・ミネラル . 臨床栄養: 98(5): 530-534, 2001.5
- 4) 西牟田守: マグネシウムの必要量と中毒量 (輸液も含める) . JJPEN: 23(9): 471-475, 2001.

H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし。

Project-1 フッ化物の適正摂取量

研究スタッフ

総括研究者 高江洲義矩(東歯大名誉教授)

分担研究者 西牟田 守 (国立健康栄研究所微量栄養素所要量研究部室長)

分担研究者 渡辺達夫 (岡山大学医歯学研究科口腔保健学教授)

協力研究者 平田幸夫 (神奈川歯科大学口腔衛生学助教授)

協力研究者 中村修一 (九州歯科大学生理学講座助教授)

協力研究者 佐藤 勉 (日本歯科大学衛生学講座助教授)

協力研究者 村上多恵子 (愛知学院大学歯学部口腔衛生学講座講師)

協力研究者 佐久間汐子 (新潟大学歯学部附属病院口腔保健科予防歯科講師)

協力研究者 古賀 寛 (東京歯科大学衛生学講座助手)

協力研究者 戸田直司 (神奈川歯科大学衛生学講座助手)

表1 拡散容器の構造

研究室	拡散容器の原型	形状	捕集容器
A	Waterhouseら (1980)	ペトリデッシュ (90×20mm) (ディスプレイ)	ポリプロピレンサンプルチューブ (MURUEMU 21mm)
B	Saraら (1975)	外形 58×87×14mm 内室 30×30×14mm 蓋部分 58×87×8mm	内室を捕集容器とする。
C	Conway (1956)	テフロン製拡散装置 外形：50×27.5mm 外室 幅10mm 蓋部材：60×18.5mm	内形：13×13mm (容量約1.5ml, テフロン製)

A: 村上 (愛知学院大学歯学部口腔衛生学講座)

B: 戸田 (神奈川歯科大学口腔衛生学講座)

C: 古賀 (東歯大衛生学講座)

表2 拡散分析条件 (微量拡散 - Fイオン電極)

項目	研究室		
	A	B	C
試料の灰化	なし	あり/なし 灰化 固定剤 Mg(CH ₃ COO) ₂	なし
拡散分析容器	トリジャーレ拡散容器 (ディスプレイ)	Saraらの改良型拡散容器	テフロン製微量拡散容器
分離拡散液	6M HCl/ HMDS, 2ml	HMDS過飽和5M過塩素酸, 6ml	HMDS過飽和5M過塩素酸, 4ml
フッ化物捕集液	1M NaOH, 0.1mL 105 dry3hr 1ml water + 0.2mLTISAB	0.1M NaOH, 4ml 2ml+TISAB	0.1M NaOH, 1ml +TISAB
拡散時間	16 hr 以上	3, 6, 9, 20hr	3, 6, 12, 20 hr
拡散温度	室温	室温	60
振盪	60回 / 分	70回 / 分	なし
フッ化物検出	複合型Fイオン電極 (Orion 9609)	複合型Fイオン電極 (Orion 9609)	複合型Fイオン電極 (Orion 9609)
TISAB	TISAB	TISAB	TISAB
F標準液	内部標準	外部標準	外部標準
フッ化物添加回収	HAP	NaF, HAP	HAP
試料の状態	液状が主	乾燥, 液状	乾燥, 液状
試料の重量	液状 :10 g	0.5-1.0g	液状2 g, 粉末0.5g

A: 村上 (愛知学院大学歯学部口腔衛生学講座)

B: 戸田 (神奈川歯科大学口腔衛生学講座)

C: 古賀 (東歯大衛生学講座)

表3 拡散法によるブランク値 (µg)

研究室	拡散時間 処理法	3hr	6hr	9/12hr	20hr
A	非灰化	-	-	-	0.02µg
B	非灰化	0.01 未満	0.01 未満	0.01未満*	0.01 未満
	灰化	0.08 (0.00)	0.07 (0.00)	0.06* (0.01)	0.09 (0.01)
C	非灰化	0.0140 (0.01)	0.0112(0.001)	0.0194(0.0027)	0.0259(0.0039)

* 9hr

表4 非灰化－拡散法による食品中F濃度(ppm)

食品	機関	試料量	n	3hr	6hr	9/12hr*	20hr
調整粉乳A (レーベンス)	A	1.0g	4	-	-	-	0.20 (0.01)
	B	0.5 g	3	0.14 (0.00)	0.15 (0.02)	0.15 (0.00)	0.23 (0.06)
	C	0.5 g	3	0.148(0.008)	0.182 (0.028)	0.225 (0.036)	0.177 (0.010)
調整粉乳B (ステップ)	A	1.0 g	4	-	-	-	0.43 (0.01)
	B	0.5 g	3	0.35 (0.08)	0.47 (0.03)	0.46 (0.03)	0.48 (0.02)
	C	0.5 g	3	0.415(0.020)	0.402(0.027)	0.452(0.021)	0.423(0.016)
野菜がゆ	A	1.0 g	4	-	-	-	0.19 (0.01)
	B	0.5 g	3	0.13 (0.03)	0.16 (0.02)	0.19 (0.03)	0.16 (0.00)
	C	0.5 g	4	0.154(0.022)	0.183(0.035)	0.195(0.022)	0.168(0.017)
Bovine muscle (R : 0.22 ppm)	A	1.0 g	4	-	-	-	0.225(0.005)
	B	0.5 g	3	0.17 (0.01)	0.17 (0.01)	0.18 (0.01)	0.21 (0.02)
	C	0.5 g	3	0.176(0.008)	0.210(0.026)	0.217(0.018)	0.255(0.002)

* : B ; 9hr, C; 12hr, () :SD

表5 灰化/非灰化 - 拡散法による食品中F濃度(ppm)*

食品	前処理	試料量	n	3hr	6hr	9hr	20hr
調整粉乳A (レーベンス)	非灰化	0.5 g	3	0.14 (0.00)	0.15 (0.02)	0.15 (0.00)	0.23 (0.06)
	灰化	1.0 g	3	0.13 (0.02)	0.14 (0.02)	0.14 (0.01)	0.14 (0.03)
野菜がゆ	非灰化	0.5 g	3	0.13 (0.03)	0.16 (0.02)	0.19 (0.03)	0.16 (0.00)
	灰化	1.0g	3	0.38 (0.02)	0.34 (0.12)	0.50 (0.00)	0.53 (0.05)
Bovine muscle (R : 0.22 ppm)	非灰化	0.5 g	3	0.17 (0.01)	0.17 (0.01)	0.18 (0.01)	0.21 (0.02)
	灰化	1.0g	3	59.4 (3.71)	63.4 (0.82)	55.8 (3.78)	69.3 (1.55)

* B 研究機関
() :SD

表6 食品へのフッ化物添加回収率*

食品	研究室	前処理	試料量	添加量, 添加物	回収率(%)**
調整粉乳A (レーベンス)	A	-	-	-	-
	B	非灰化	0.5 g	0.1 μ g NaF	94.9 (3.69)
	B	非灰化	0.5 g	0.148 μ g HAP	110 (11.2)
	B	灰化	1.0 g	0.2 μ g NaF	94.9 (7.96)
	B	灰化	1.0 g	0.295 μ g HAP	95.6 (0.03)
調整粉乳B (ステップ)	C	非灰化	0.5 g	0.1 μ g HAP	95.1 (12.3)
	A	非灰化	1.0 g	0.1 μ g HAP	91.1 (1.9)
	A	非灰化	1.0g	0.1 μ g NaF	101.0(10.3)
	B	-	-	-	-
Bovine muscle (R : 0.22ppm)	C	非灰化	0.5 g	0.2 μ g HAP	100.7 (4.75)
	A	非灰化	2.0g	0.4 μ g NaF	102.8 (0.5)
	A	非灰化	2.0g	0.59 μ g HAP	103.9 (2.8)
	B	-	-	-	-
	C	非灰化	0.5 g	0.1 μ g HAP	99.7 (5.0)

* HAP中F濃度 ;A, B 9.36ppm, C; 9.60ppm

** mean (SD), n=4