

厚生科学研究費補助金

生活安全総合研究事業

特定保健用食材の安全性および有用性
に関する研究
(H13-生活-038)

平成 13 年度 総括研究報告書

主任研究者 花田 信弘

平成 14 (2002) 年 3 月

厚生科学研究費補助金

生活安全総合研究事業

特定保健用食材の安全性および有用性
に関する研究
(H13-生活-038)

平成13年度 総括研究報告書

主任研究者 花田 信弘

平成14(2002)年 3月

目 次

I. 総括研究報告		
特定保健用食材の安全性および有用性に関する研究		
花田信弘	-----	3
II. 分担研究報告		
1. 人工口腔装置を用いた食品の機能評価技術の確立		
今井 奨	-----	11
2. 試験管内における食品の機能性評価法の確立		
岸 光男	-----	16
3. プラーク pH テレメトリー（電極内蔵法）の現状分析 に関する研究		
高橋 信博	-----	19
4. 再石灰化評価法の確立		
1. 歯質ミネラル画像定量法の検討		
稲葉 大輔	-----	25
2. 再石灰化評価法の確立		
2. 歯質ミネラル画像定量法の応用		
稲葉 大輔	-----	30
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	-----	33
IV. 研究成果の刊行物・別刷	-----	34

厚生科学研究費補助金（生活安全総合研究事業）
総括研究報告書

特定保健用食材の安全性および有用性に関する研究

主任研究者 花田信弘 国立感染症研究所・部長

研究要旨:口腔領域における特定保健用食品の承認の判定は、キャンディー・ガムについて、主としてヒト口腔に装着した微小pH電極によるプラークpHテレメトリー法（電極内蔵法）と *in vitro* システムが使われてきた。しかし、ヒトを用いる方法は、経済的負担が大きいことと、年齢差、個体差が大きいことなどから評価システムとして改良の余地がある。また、ヒトの歯の表面のpHを測定するだけでは、複雑な口腔細菌叢の動きを正確に捉えることが要求される細菌の定着阻害剤や増殖阻害剤の有効性の評価はできない。また、歯周病など他の口腔疾患を予防する機能性食品の判定はできない。さらに、エナメル質再石灰化促進物質を含む食品の機能評価もできない。これらの問題に厚生労働省が対応するには、現在の評価方法を再検討する必要がある。この問題を将来的に解決するために我々はこれまで人工口腔装置による評価方法を検討してきた。本研究ではこの人工口腔装置の実用化を目指す。人工口腔装置を特定保健用食品の評価に用いるためには、これまで用いてきたヒト口腔と *in vitro* システムとのデータの相同性に関する基礎試験が必要なため、初年度はその点の検討を進めた。さらに、現行のキャンディー・ガムの評価のためのガイドラインに記されている *in vitro* の評価方法にも改良の余地があり、また、エナメル質再石灰化促進機能のような新しい機能をもった食品の機能評価にはどのような評価系が適しているか等の検討を進めた。これらの基礎試験のデータに基づいて新しい有効性評価のマニュアルをつくることにより、健康づくりに役立つ新しい機能性食品の開発が可能になると考える。

分担研究者氏名・所属施設名及び所属施設における職名

稲葉大輔・岩手医科大学・助教授
今井 奨・国立感染症研究所・主任
研究官

岸 光男・岩手医科大学・講師
高橋信博・東北大学・教授

A. 研究目的

口腔領域における特定保健用食

品の承認の判定、特にキャンディー・ガムの判定についてはマニュアルが作成されているが、その他の菓子類については評価の基準があいまいでマニュアル化された方法がない。キャンディー・ガムについてもヒト口腔におけるプラークpHテレメトリー法と *in vitro* システムが使われているが、両システムとも改良を要する点があり完成された評価システムとはいえない。また、ヒトの歯の

表面の pH を測定するだけでは、複雑な口腔細菌叢の動きを正確に捉えることが要求される細菌の定着阻害剤や増殖阻害剤の有効性の評価は行うことができない。また、歯周病など他の口腔疾患を予防する機能性食品の判定はできない。さらに、エナメル質再石灰化促進物質を含むような新しい機能性食品の評価もできない。これらの問題に対応するには、現在の評価方法を大きく見直す必要がある。

本研究は、上記の問題点を将来的に解決するため、従来の *in vitro* システムとヒトでのプラーク pH テレメトリー法につき再検討すること、人工口腔装置の実用化のための検討を種々行い、本装置を用いた評価系を確立すること、エナメル質再石灰化促進機能の評価系を確立すること、そして、これらの成果を基に新しい有効性評価マニュアルを作成し、健康づくりに役立つ新しい機能性食品の開発を促すことを目的とする。

B. 研究方法

本研究のために作製した人工口腔装置は、人工口腔部分、送液用ポンプ、恒温槽、冷却攪拌器、pH レコーダから構成されている。人工口腔部分の平面 pH 電極周囲にはテフロン製ホルダーを固定し、そのホルダーにウシエナメル質歯片を固定した。その上部からスクロース含有培地、ミュータンスレンサ球菌懸濁液を連続的に滴下した。人工バイオフィーム量、バイオフィーム下 pH、エナメル質の脱灰度を定量、評価した。*in vitro* システムの検討のためには、ミュータンスレンサ球菌およびヒト唾液サンプルを用いた食品の酸発酵試験、非水溶性グルカン合成試験を

行い、その評価系としての可能性を検討した。また、プラーク pH 測定法に関しては、プラーク pH テレメトリー法が最も厳密で優れた方法であることに異論はないものの、①被験者の確保が困難、②被験者の負担大、③測定者の負担大、④測定システムが高価などの問題があるため、これまでに行われてきたプラーク pH テレメトリー法を例として現状を分析し、その長所と短所を検討した。さらに、エナメル質再石灰化評価法に関しては、歯質ミネラル濃度分布の評価方法を標準化するため、マイクロラジオグラフ (顕微 X 線写真) のデジタル画像定量法を構築し、その特性を検討した。また、人工口腔装置で形成した人工プラーク下のエナメル質にどのような脱灰病巣が生じるのかをミネラル画像定量法で評価するとともに、ミュータンスレンサ球菌標準株由来の人工プラーク形成にともなうエナメル質脱灰状態の再現性を検討した。

C. 研究結果

う蝕誘発と深い関わりをもつ 3 つのパラメーター (人工バイオフィーム形成量、バイオフィーム下 pH、エナメル質硬度) を同時に測定できる人工口腔装置を構築し、その性状を調べた。う蝕原性細菌である *S. mutans* と *S. sobrinus* 菌体をスクロースとともに供給すると人工バイオフィームが形成され、pH 低下が観察された。また、*S. sobrinus* 菌体をスクロースまたはオリゴ糖と共に供給すると、対照のスクロースでは顕著な人工バイオフィーム形成、pH 低下、エナメル質脱灰が認められたが、オリゴ糖ではいずれも低値

が観察され、このオリゴ糖の低う蝕原性が示唆された。しかし、人工口腔装置による方法を評価技術として確立するためにはさらなる検討を必要とする。また、特定保健用食品のうち「虫歯にならない」旨を表示するために必要な *in vitro* 試験の検討を、ヒトう蝕原性レンサ球菌培養試験とヒトから採取した唾液に試験糖質を添加して培養する唾液糖質添加培養試験の両方法について行った。その結果、ヒトう蝕原性レンサ球菌培養試験については、常に培養時の嫌気条件を一定とし、培養後9時間程度で評価することが適当な培養条件であり、対照糖質としてソルビトールを用いることについては今後さらに検討すべきであると考えられた。唾液糖質添加培養試験については、採取後4時間程度冷蔵保存した後、必要に応じた前処置を行うことが適当であることが示唆され、今後当該評価方法について、さらなる妥当性の検討が必要であると考えられた。さらに、近年の急速な食品の多様化・多品目化など食品検定を取り巻く環境の変化を鑑み、ヒトでのプラーク pH テレメトリー法について再検討した。今後、特定保健用食材を普及させていくためには、できるだけ多くの食品を、できるだけ簡便に、かつできるだけ安価に検定する必要がある。この点から、プラーク pH テレメトリー法は将来において何らかの工夫、例えば、①プラーク pH テレメトリー法の高コストを補う簡便法の開発、あるいは②プラーク pH テレメトリー法を効率的に行う専門の検定機関の設置などが必要と思われた。また、食品のもつ歯質保護機能の評価にあたっては、その効果判

定法として脱灰・再石灰化にともなう歯質ミネラル濃度の変化を適切に定量評価する方法を確立しておくことが必須である。そこで機能性食品の試験分野で歯質ミネラル濃度分布の評価方法を標準化するため、マイクロラジオグラフ（顕微X線写真）のデジタル画像定量法を構築し、必要なソフトウェアを開発した。また、この方法を用いて人工口腔装置で形成した人工プラーク下のエナメル質脱灰病巣の再現性を検討した結果、エナメル質の脱灰に関して実用上妥当な再現性を有し、5日間の人工プラーク形成で溶解型の人工初期う蝕が形成されることが確認された。

D. 考察

食品素材あるいはそれを含有する食品のう蝕原性を評価するための方法には *in vitro* および *in vivo* のいくつかの方法があるが、それらにはそれぞれ長所と短所があり、単独の方法でう蝕原性を評価することは今のところ難しい。*in vivo* の方法には倫理的、時間的、経済的制約があり、汎用評価系とするには限界がある。そこでできるだけ *in vivo* の結果を反映できるような *in vitro* の評価系の確立が待たれる。また、将来的には代用甘味料のみならず抗う蝕活性をもった機能性食品も創出されることを想定して、そうした食品でも評価できるような *in vitro* 評価系の確立が必要となる。今回構築した人工口腔装置によってスクロースとミュータンスレンサ球菌の共存下で初期段階のエナメル質脱灰を惹起する条件を設定できた。より口腔に近い環境をつくり出すのにこの装置にどのような培地、細菌種等を滴下すればよいか、これから多くの検討を

必要とする。

特定保健用食品のうち、「虫歯にならない」等の旨を表示するための指針（1998年、厚生省生活衛生局食品保健課新開発食品保健対策室長通知）の中に *in vitro* での酸発酵性試験、非水溶性グルカン合成試験が試験すべき内容に含まれている。ミュータンスレンサ球菌培養試験については、常に培養時の嫌気条件を一定とし、培養後9時間程度で評価することが適当な培養条件であると考えられた。ソルビトールは従来、う蝕誘発性がないことが認められていることから対照糖質として用いられてきたが、う蝕原性レンサ球菌によって徐々にではあるが発酵を受けることから、対照糖質として用いることの妥当性が検討されるべきと考えられた。唾液糖質添加培養試験については、採取後4時間程度冷蔵保存した後、必要に応じた前処置を行うことが適当であることが示唆され、今後当該評価方法について、さらなる妥当性の検討が必要であると考えられた。

プラーク pH テレメトリー法は口腔内でプラーク非破壊的にプラーク pH を測定できる方法である。そのため、咀嚼の影響、唾液による洗い流しや中和の影響、唾液に含まれるアミラーゼの影響など、実際の食品摂取時に起こる様々な口腔内環境因子の影響を加味して食品の検定が可能となる。この特徴は他のどの方法でも代替することができず、プラーク pH テレメトリー法がプラーク pH 測定の最も厳密で優れた方法であるといわれる根拠である。しかし、被験者、検定者、測定システムに関して、次のような短所も存在する。即

ち、被験者の確保が難しいこと、被験者の負担が大きいこと、測定者の負担が大きいこと、測定システムが高価であること等である。これらの短所の中で、被験者の確保が難しいという現実には、被験者を限定し、その結果、個体差の問題や測定部位の限定の問題を生み出しやすい。また被験者や測定者への負担が大きいことは、多検体測定を困難にしている。今後、特定保健用食材を普及させていくためには、プラーク pH テレメトリー法を用いた検定システムを改良し、できるだけ多くの食品を、できるだけ簡便にかつできるだけ安価に検定できるようにすることが望まれる。

歯質保護の基本機構は、脱灰の抑制と初期う蝕病巣の再石灰化促進に集約される。食品のもつ歯質保護機能の評価にあたっては、その効果判定法として、脱灰・再石灰化にともなう歯質ミネラル濃度の変化を適切に定量評価する方法を確立しておくことが必須である。本研究で構築した画像定量法はきわめて高い精度と再現性を示し、顕微 X 線写真法に基づく歯質ミネラルの標準評価方法として実用可能であると判断された。なお、本法では、これまでグラフ上でしか比較できなかった歯質ミネラルの分布が定量的な画像として二次元的に視覚化される点が特徴である。とくにミネラル分布が不均一な *in situ* 実験試料や病理試料においてこの意義は大きい。また、各種の画像処理や画像間演算により詳細な観察と変化の追跡が可能となる。さらに従来のデンシトメーターによる場合に比べ、二次元画像の構築と解析作業が格段に効率化されることも特徴である。このミネラル画像定量法を

用いて、人工口腔装置で形成した人工プラーク下のエナメル質にどのような脱灰病巣が生じるのかを評価するとともに、ミュータンスレンサ球菌標準株由来の人工プラーク形成にともなうエナメル質脱灰状態の再現性を検討した結果、本研究の人工口腔装置はエナメル質の脱灰に関して実用上妥当な再現性を有し、5日間の人工プラーク形成で溶解型の人工初期齲蝕が形成されることが確認された。各種食品の再石灰化促進効果の試験のためには、人工プラーク形成期間を短縮して表層下脱灰を形成するなどの最適化が必要と考えられた。

E. 本年度での結論

本年度の研究により以下の結論が得られた。

1. う蝕誘発と深い関わりをもつ3つのパラメーター（人工バイオフィルム量、バイオフィルム下 pH、エナメル質硬度）を同時に測定できる人工口腔装置を構築し、スクロースとミュータンスレンサ球菌の共存下で初期段階のエナメル質脱灰を惹起する条件を設定した。オリゴ糖のう蝕原性評価における本装置の有用性が示唆されたが、評価系として確立するにはなお検討を要する。
2. *in vitro* 試験としてのミュータンスレンサ球菌培養試験により糖質の酸発酵性、非水溶性グルカン合成を評価する場合、培養時の嫌気条件を常に同一にすれば、その嫌気度による影響は無視しうると考えられた。また、唾液に糖質を添加してその酸発酵性、非水溶性グルカン合成を評価する場合、採取後 4 時間程度冷蔵保存した後行うのが適当であると考えられた。また、唾液中の多糖体はほとんどが不溶物に含まれて存在しており、評価対象に応じた前処理が必要であることが示唆された。今後さらに検討を要する。
3. これまでの研究報告、検定期間での実績から、プラーク pH テレメトリー法（電極内蔵法）がプラーク pH 測定の最も厳密で優れた方法であることに異論はない。しかし、今後、特定保健用食材を普及させていくためには、できるだけ多くの食品を、できるだけ簡便に、かつできるだけ安価に検定する必要がある。この点から、プラーク pH テレメトリー法は将来において何らかの工夫を要する。例えば、プラーク pH テレメトリー法の高コストを補う簡便法の開発、あるいはプラーク pH テレメトリー法を効率的に行う専門の検定機関の設置などが必要と思われる。
4. 顕微 X 線写真法による歯質ミネラル濃度分布評価方法を標準化するため、簡便かつ汎用性および再現性の高いミネラル画像定量法を構築し、必要なソフトウェアを開発した。本法は脱灰・再石灰化を定量的に評価するための標準法として応用が可能と考えられた。この方法を用いて人工口腔装置で形成した人工プラーク下のエナメル質脱灰病巣の再現

性を検討した結果、エナメル質の脱灰に関して実用上妥当な再現性を有し、溶解型の人工初期う蝕が形成されることが確認された。各種食品の再石灰化促進効果の試験のためには、人工プラーク形成期間を短縮して表層下脱灰を形成するなど、なおいくつかの検討を要すると考えられた。

F. 健康危険情報
特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. 今井 奨：う蝕予防と非う蝕性甘味料および抗う蝕性素材の機能効果、*ジャパンフードサイエンス*、40、45-51、2001.
2. Oishi Y., Onozuka A., Kato H., Shimura N., Imai S., Nisizawa T.: The effect of amino acid spacers on the antigenicity of dimeric peptide-inducing cross-reacting antibodies to a cell surface protein antigen of *Streptococcus mutans*. *Oral Microbiol Immunol*, 16: 40-44, 2001.
3. 釜阪 寛、今井 奨、西村隆久、栗木 隆、西沢俊樹；馬鈴薯デンプン由来リン酸化オリゴ糖のミュータンスレンサ球菌への影響、*口腔衛生学会雑誌*、52、66-71、2002.
4. N. Takahashi and T. Sato: Dipeptide utilization by periodontal pathogens, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Prevotella nigrescens* and *Fusobacterium nucleatum*. *Oral Microbiol Immunol* 17(1): 50-54, 2002.
5. N. Takahashi and T. Sato: Preferential utilization of dipeptides by *Porphyromonas gingivalis*. *J Dent Res* 80(5): 1425-1429, 2001.
6. S. Takahashi-Abbe, K. Abbe, N. Takahashi, Y. Tamazawa and T. Yamada: Inhibitory effect of sorbitol on sugar metabolism of *Streptococcus mutans* in vitro and on acid production in dental plaque in vivo. *Oral Microbiol Immunol* 16(2): 94-99, 2001.
7. K. Saito, N. Takahashi, H. Horiuchi and T. Yamada: Effects of glucose on formation of cytotoxic end-products and proteolytic activity of *Prevotella intermedia*, *Prevotella nigrescens* and *Porphyromonas gingivalis*. *J Periodontal Res* 36(6): 355-360, 2001.
8. 阿部昌子、玉澤佳純、阿部一彦、高橋信博：口腔内 pH 電極内臓法によるチューインガムの酸蝕性およびヒト歯垢における酸産生性の検討。日本食品新素材研究会誌 4(2): 13-19, 2001.
9. T. Sato, J. Hu, J. Matsuyama and N. Takahashi: Rapid

identification of cariogenic bacteria by 16S rRNA genes PCR-RFLP analysis. *Cariology Today* 2: 8-13, 2001.

2. 学会発表

1. S. Imai, H. Kamasaka, D. Inaba, M. Hinoide, T. Nisizwa and N. Hanada, Inhibitory effect of phosphoryl oligosaccharides against enamel demineralization by mutans streptococci. 80th General Session of the IADR, San Diego, 2002.
2. H. Kamasaka, D. Inaba, K. Minami, K. To-o, T. Nisimura, T. Kuriki, S. Imai and M. Yonemitsu, Enhanced remineralization of enamel by saliva stimulated by a sugar-free gum containing phosphoryl-oligosaccharides (POs), 80th General Session of the IADR, San Diego, 2002.
3. D. Inaba, K. Minami, M. Yonemitsu, H. Kamasaka and S. Imai, Enhanced remineralization of enamel by a chewing gum containing phosphoryl-oligosaccharides (POs) in situ, 80th General Session of the IADR, San Diego, 2002.
4. 高橋信博：口腔生態系への糖アルコール・インパクト. *Cariology Today in Japan* 第3回ワークショップ・シンポジウム（埼玉県坂戸市）2001年12月1日
5. 前原裕子、岩見憲道、真柳秀昭、高橋信博：フッ素とキシリトールの併用による *Streptococcus mutans* の代謝阻害効果について. 第40回東北大学歯学会（仙台）2001年12月14日 *東北歯誌* 21(1): in press, 2002.
6. 清水弘一、五十嵐公英、高橋信博：新しいカリエスリスク・ファクターとしての歯垢内アンモニア濃度. *Cariology Today in Japan* 第3回ワークショップ（埼玉県坂戸市）2001年12月1日
7. 佐藤拓一、高橋信博：Nested PCRによる齲蝕関連細菌の高感度検出法. *Cariology Today in Japan* 第3回ワークショップ（埼玉県坂戸市）2001年12月1日
8. 佐藤拓一、松山順子、高橋信博：16S rRNA genes PCR-RFLP法を用いた口腔細菌の迅速同定. 第43回歯科基礎医学会学術大会（さいたま市大宮）2001年9月20日 *歯基礎誌* 43(5): 532, 2001.
9. 大内真美子、佐藤拓一、高橋一郎、梅森美嘉子、菅原準二、長坂浩、三谷英夫、高橋信博：矯正用アンカープレート周囲滲出液中の歯周病関連細菌のPCR法による検出. 第43回歯科基礎医学会学術大会（さいたま市大宮）2001年9月20日-21日 *歯基礎誌* 43(5): 603, 2001.
10. 岩見憲道、宮澤はるみ、角田初恵、真柳秀昭、高橋信博：*Streptococcus mutans* に乳酸、酢酸、塩酸を添加したときの菌体内pH. 第43回歯科基礎医学会学術大会（さいたま市大宮）2001年9月20日-21日 *歯基礎誌* 43(5): 607, 2001.
11. 角田初恵、岩見憲道、宮澤はるみ、真柳秀昭、高橋信博：*Streptococcus mutans* のキシリ

- ツールによる酸産生阻害および増殖抑制と菌体内キシリトール5リン酸蓄積との関係. 第43回歯科基礎医学会学術大会(さいたま市大宮)2001年9月20日-21日 歯基礎誌 43(5): 606, 2001.
12. 多田浩之、菅原俊二、高橋信博、島内英俊、高田春比古: *Porphyromonas gingivalis* のジンジバインによるヒト歯肉繊維芽細胞にCD14分子分解とLPS不応答性の誘導. 第43回歯科基礎医学会学術大会(さいたま市大宮)2001年9月20日-21日 歯基礎誌 43(5): 614, 2001.
 13. 和久井とわ子、中野雅子、矢島美雪、桃井保子、前田伸子、佐藤拓一、高橋信博: 滑沢で硬い根面う蝕病変から分離された細菌について. 第16回口腔嫌気性菌研究会(さいたま市大宮)2001年9月19日
 14. J. Matsuyama, T. Sato and N. Takahashi: Comparison between PCR-RFLP and biochemical analyses for identification of *Actinomyces*. 第79回IADR (Makuhari) 2001年6月30日 J Dent Res 80 (Special Issue): 766, 2001.
 15. H. Kakuta, Y. Iwami, H. Mayanagi and N. Takahashi: Xylitol inhibition on acid production from various sugars by *Streptococcus mutans*. 第79回IADR (Makuhari) 2001年6月29日 J Dent Res 80 (Special Issue): 723, 2001.
 16. T. Sato, J. Matsuyama and N. Takahashi: Rapid identification of oral mutans streptococci by 16S rRNA genes PCR-RFLP. 第79回IADR (Makuhari) 2001年6月29日 J Dent Res 80 (Special Issue): 722, 2001.
 17. H. Miyasawa, Y. Iwami, T. Sato, H. Mayanagi and N. Takahashi: pH-dependent xylitol-uptake and subsequent glycolysis-inhibition in *Streptococcus mutans*. 第79回IADR (Makuhari) 2001年6月29日 J Dent Res 80 (Special Issue): 722, 2001.
 18. N. Takahashi and T. Sato: Utilization of dipeptides by periodontal pathogens, *Porphyromonas*, *Prevotella* and *Fusobacterium*. 第79回IADR (Makuhari) 2001年6月29日 J Dent Res 80 (Special Issue): 677, 2001.
 19. 岩見憲道、阿部昌子、宮澤はるみ、角田初恵、真柳秀昭、高橋信博: ソルビツールが *Streptococcus mutans* のグルコース代謝を阻害する機構. 第39回東北大学歯学会(仙台) 2001年6月22日 東北歯誌 20(2): 115, 2001.
 20. 宮澤はるみ、高橋信博、真柳秀昭: キシリトールによるミュータンスレンサ球菌の酸産生抑制効果 -pHの影響とその生化学的機構- 第39回日本小児歯科学会大会(大阪) 2001年5月18日 小児歯誌 39(2): 333, 2001.
- H. 知的財産権の出願・登録状況
特になし。

厚生科学研究費補助金（生活安全総合研究事業）
分担研究報告書

特定保健用食材の安全性および有用性に関する研究

人工口腔装置を用いた食品の機能評価技術の確立

分担研究者 今井 奨 国立感染症研究所・主任研究官

研究要旨: 機能性食材およびそれを用いた機能性食品の機能評価のための人工口腔装置を構築し、その性状、適性を調べた。また、代用甘味料候補である糖質（XF）の機能を本装置を用いて評価しうるか否かを検討した。う蝕原性細菌である *S. mutans* と *S. sobrinus* 菌体をスクロースとともに供給すると人工バイオフィームが形成され、pH 低下が観察された。また、*S. sobrinus* 菌体をスクロースまたは XF と共に供給すると、対照のスクロースでは顕著な人工バイオフィーム形成、pH 低下、エナメル質脱灰が認められたが、XF ではいずれも低値が観察され、糖質のう蝕原性評価における本装置の有用性が示唆された。しかし、評価技術として確立するためにはさらなる検討を必要とする。

A.研究目的

近年、健康の維持・増進に役立つ機能をもった食品が多数創出されてきている。このような機能性食品の中には、歯科領域においてその機能（非う蝕性、再石灰化能）が注目されている食品も含まれている。これまでに複数のガム、キャンデーがその機能性を科学的に認められ、特定保健用食品として厚生労働省より認可されている。このような状況下で問題になっているのが食品のもつ機能性の評価方法である。現状では動物やヒト被験者による in vivo 試験と in vitro 試験を組み合わせる評価している。動物やヒト被験者を用いた in vivo の方法には倫理的、時間的、経済的制約があり、汎用評価系とするには限界があると考え

られる。そこで、in vitro の方法で、従来の in vivo の結果をできるだけ反映できるような方法を考案できればさまざまな制約を解決できると期待される。

本分担研究は、人工バイオフィーム形成量、pH 低下、エナメル質脱灰度を同時に測定できる人工口腔装置を構築し、その性状を解析することと、歯科領域での機能評価系としての本装置の適性、有用性を検討することを目的とする。

B.研究方法

人工口腔装置：本装置は人工口腔部分、送液用ポンプ、恒温槽、冷却攪拌器、pH レコーダからなる。上部からは5本のステンレスチューブを固定したシリコン栓を、下

部からはドレイン用チューブと平面 pH 電極を逆さに固定したシリコン栓を装着して密閉した。人工口腔部分のウォータージャケットに温水を循環して装置内部を 37°C に維持した。平面 pH 電極周囲にはテフロン製ホルダーを固定し、そのホルダーにユーティリティーワックスを用いて 4 個のウシエナメル質歯片 (3.5mm × 3.5mm × 1.5mm) を固定した。その上部から糖質含有ハートインフュージョン培地、細菌懸濁液、PBS を連続的に滴下した。糖質としてスクロースまたはキシロシルフルクトシド (XF) を、細菌として *Streptococcus mutans* MT8148 株または *Streptococcus sobrinus* 6715 株を用いた。pH を連続的に記録しながら 15~34 時間滴下を続け、人工プラーク形成に伴って pH が 4 付近まで低下した時滴下を終了した。エナメル質歯片上および pH 電極上に形成された人工バイオフィルムを 0.5 N 水酸化ナトリウム溶液で処理して遠心分離し、沈澱物の濁度を 500 nm で測定して菌体量とした。その上清をフェノール硫酸法によって定量し非水溶性グルカン(WIG) 量とした。エナメル質の脱灰度を実験前後の硬度変化 (ΔH) から評価した。

C. 研究結果

はじめに、平面電極にエナメル歯片ホルダーのみを装着して、エナメル歯片なしで pH 変化を検討した。電極面に対して *S. mutans* MT8148 株の菌体懸濁液 (OD500=1.0)、培地、2%スクロースを供給し、人工バイオフィル

ムが形成されるか否か、また、pH はどのような曲線をたどるかを調べた。また、2 台の人工口腔を同時に稼働することで、2 台における人工バイオフィルム形成に伴う pH 曲線に再現性があるかを検討した。その結果、2 台ともほぼ類似した pH 低下曲線を示した。即ち、滴下開始時の pH (7.3) は約 15~16 時間で低下を始め、それぞれ 21.5 時間および 23 時間でエナメル質脱灰の臨界 pH といわれる 5.5 に達し、34 時間後にはそれぞれ 4.6 および 4.5 に達した。

2 台の人工口腔でほぼ同様の pH 曲線が得られたが、滴下開始から終了までに時間がかかり過ぎることが分かったので、次に菌体懸濁液濃度を 2 倍 (OD500=2.0) にして、それぞれの人工口腔に *S. mutans* MT8148 と *S. sobrinus* 6715 を供給し、両菌による人工バイオフィルム形成に伴う pH 曲線の差異を検討した。その結果、*S. mutans* の場合、滴下開始約 11 時間から pH 低下が始まり、約 16 時間で pH5.5 に、24 時間後に pH4.6 に達した。滴下する菌体量を増加することで明らかに人工バイオフィルム形成が促進され、pH 低下も早くなり、24 時間での評価が可能になった。一方、*S. sobrinus* の場合、*S. mutans* よりも明らかに早く電極面に人工バイオフィルム形成が始まり、それに伴って pH 低下も早くなった。即ち、滴下開始約 3 時間で pH 低下が始まり、7 時間後に pH5.5 に達し、24 時間後には pH4.1 に達した。これらから、使用した *S. sobrinus* と *S. mutans* には人工バイオフィルム形成に伴う pH 低下に明らかな差

異のあることが分かった。

続いて、う蝕誘発因子の一つであるグルコシルトランスフェラーゼ (GTF) に対して阻害作用を示し、代用糖候補の一つでもあるキシロシルフルクトシド (XF) を供給した場合、この人工口腔装置ではどのような pH 曲線が得られるかを検討した。1台の人工口腔には対照として 2%スクロースを、もう1台には 2%XF を *S. sobrinus* (OD500=2.0) と共に供給した。また、電極周囲にはエナメル歯片を4個固定した。その結果、スクロースの場合、pH は約3時間で低下し始め、7時間後に 5.5 になり、14時間後に 4.3 に達した。一方、XF の場合、初期 pH (7.3) はほとんど変化なく、14時間後も pH7.2 であった。歯片上に形成された人工バイオフィルム量を菌体量 (OD500/mm²) を指標としてみると、スクロース供給および XF 供給でそれぞれ 0.009 および 0.00006 であり、非水溶性グルカン (WIG) 量を指標としてみると、それぞれ 2.3 および 0.047 (μ g/mm²) であった。この結果は、XF が対照のスクロースに比較して *S. sobrinus* のバイオフィルム形成に著しく利用されにくいことを示している。さらにエナメル質脱灰度の指標としてのエナメル質の硬度 (ΔH) においても、スクロースの場合が 129.8 で顕著な脱灰があったのに対して、XF の場合 3.8 であり、エナメル質脱灰をほとんど起こさないことが分かった。

D. 考察

本研究で構築した人工口腔装

置は、中央部の人工口腔部分と周辺部 (送液ポンプ、恒温槽、冷却攪拌器、pH レコーダ) からなっていて、全体的には比較的簡単な構成といえるが、う蝕誘発に係わる3つのパラメーター (バイオフィルム形成、pH 低下、エナメル質脱灰) を同時に定量的に測定できるように設計された装置である。ヒト口腔から検出されるミュータンスレンサ球菌の *S. mutans* または *S. sobrinus* 懸濁液をスクロース培地と共に電極面に滴下することにより、ミュータンスレンサ球菌のもつグルカン合成酵素 (GTF) により徐々に人工バイオフィルムが形成され、それに伴ってバイオフィルム直下では糖質の発酵によってつくられる有機酸により pH 低下が起こる。本装置の長所は、この pH 変化を連続的にモニターできることである。また、電極周辺にエナメル質歯片を装着すると、歯片上にも人工バイオフィルムが形成され pH 低下が起こると考えられる。歯片での pH 変化は直接測定することができないが、電極と歯片が同一の液滴の中に存在する微小環境下では歯片上でも電極面と同様の pH 変化が起こっていると想定される。このことは、電極面と歯片の単位面積当りの人工バイオフィルム量が近似していることから類推される。人工バイオフィルム量は 500nm の濁度で測定した菌体量と、フェノール硫酸法で測定した非水溶性グルカン量とで表すことができる。そして、エナメル質の脱灰度を実験前後の歯片の硬度差から知ることができる。この一連の過程が再現性よく起こっていることは、本

実験でも示されたように 2 台の人工口腔を同一条件で稼動したときに、ほぼ同様の pH 低下曲線を示すことから裏付けられる。したがって、2 台の人工口腔のうち、1 台をスクロース滴下の対照側とし、もう 1 台を実験側とすることが可能となる。代用甘味料のう蝕原性を検討するような場合 1 台をスクロースに、もう 1 台を代用甘味料とすることで比較検討することができる。本実験で検討したように、代用甘味料候補のキシロシルフルクトシド (XF) は、pH 低下もきたさず、エナメル質脱灰も起こさないことから、少なくとも本条件下では、極めてう蝕を誘発しにくい糖質であることが示唆された。

食品素材あるいはそれを含有する食品のう蝕原性を評価するための方法には *in vitro* および *in vivo* のいくつかの方法があるが、それらにはそれぞれ長所と短所があり、単独の方法でう蝕原性を評価することは今のところ難しい。ただし、代用甘味料あるいは代用甘味料含有食品のようにそれ自身が口腔内細菌に資化されなければよい、というものであれば、ヒト被験者での電極内蔵法単独でも評価はできるかもしれないが、pH のカットオフ値次第では基準が厳しくなりすぎて好ましい食品を見落とす可能性はある。とは言え、動物試験やヒト被験者での *in vivo* の方法を凌ぐ *in vitro* の方法が存在しないのが現状である。*in vivo* の方法には倫理的、時間的、経済的制約があり、汎用評価系とするには限界がある。そこでできるだけ *in vivo* の結果を反映できるような *in vitro* の評価系の確立が待たれる。

また、将来的には代用甘味料のみならず抗う蝕活性をもった機能性食品も創出されることを想定して、そうした食品でも評価できるような *in vitro* 評価系の確立が待たれる。今回構築した人工口腔装置によってスクロースとミュータンスレンサ球菌の共存下で初期段階のエナメル質脱灰を惹起する状態をつくり出すことができた。より口腔に近い環境をつくり出すのにこの装置にどのような培地、細菌種等を滴下すればよいか、これから多くの検討を必要とする。

E. 結論

う蝕誘発と深い関わりをもつ 3 つのパラメーター（人工バイオフィルム量、バイオフィルム下 pH、エナメル質硬度）を同時に測定できる人工口腔装置を構築し、その条件を設定した。糖質のう蝕原性評価における本装置の有用性が示唆されたが、評価系として確立するにはなお検討を要する。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. 今井 奨：う蝕予防と非う蝕性甘味料および抗う蝕性素材の機能効果、ジャパンフードサイエンス、40、45-51、2001.
2. Oishi Y., Onozuka A., Kato H., Shimura N., Imai S., Nisizawa T.: The effect of amino acid spacers on the antigenicity of dimeric peptide-inducing

cross-reacting antibodies to a cell surface protein antigen of *Streptococcus mutans*. *Oral Microbiol Immunol*, 16: 40-44, 2001.

3. 釜阪 寛、今井 奨、西村隆久、栗木 隆、西沢俊樹；馬鈴薯デンプン由来リン酸化オリゴ糖のミュータンスレンサ球菌への影響、口腔衛生学会雑誌、52、66-71、2002.

2.学会発表

1. S. Imai, H. Kamasaka, D. Inaba, M. Hinoide, T. Nisizwa and N. Hanada, Inhibitory effect of phosphoryl oligosaccharides against enamel demineralization by mutans streptococci. 80th General Session of the IADR, San Diego, 2002.
2. H. Kamasaka, D. Inaba, K. Minami, K. To-o, T. Nisimura, T. Kuriki, S. Imai and M. Yonemitsu, Enhanced remineralization of enamel by saliva stimulated by a sugar-free gum containing phosphoryl-oligosaccharides (POs), 80th General Session of the IADR, San Diego, 2002.
3. D. Inaba, K. Minami, M. Yonemitsu, H. Kamasaka and S. Imai, Enhanced remineralization of enamel by a chewing gum containing phosphoryl-oligosaccharides (POs) in

situ, 80th General Session of the IADR, San Diego, 2002.

H.知的財産権の出願・登録状況
特になし。

厚生科学研究補助金（生活安全総合事業）
分担研究者報告書

特定保健用食材の安全性および有用性に関する研究

試験管内における食品の機能性評価法の確立

分担研究者 岸 光男 岩手医科大学・講師

研究要旨：特定保健用食品のうち「虫菌にならない」旨を表示するために必要な in vitro 試験の検討を、ヒトう蝕原性レンサ球菌培養試験とヒトから採取した唾液に試験糖質を添加して培養する唾液糖質添加培養試験の両方法について行った。その結果、ヒトう蝕原性レンサ球菌培養試験については、常に培養時の嫌気条件を一定とし、培養後 9 時間程度で評価することが適当な培養条件であり、対照糖質としてソルビトールを用いることについては今後さらに検討すべきであると考えられた。唾液糖質添加培養試験については、採取後 4 時間程度冷蔵保存した後、必要に応じた前処置を行うことが適当であることが示唆され、今後当該評価方法について、さらなる妥当性の検討が必要であると考えられた。

A. 研究目的

特定保健用食品のうち、「虫菌にならない」等の旨を表示するための指針の中に in vitro での酸発酵性試験、非水溶性グルカン合成試験が試験すべき内容に含まれている（1998 年、厚生省生活衛生局食品保健課新開発食品保健対策室長通知）。この試験はヒトう蝕病原性レンサ球菌である *Streptococcus mutans* と *Streptococcus sobrinus* の培養によって行われることとされているが、食品評価のための適切な培養条件についての検討が不足していたため、その検討を目的とした研究を行った。また近年、ウシを原材料に使用した

食品、医療品の摂取によるヒト海綿状脳症(BSE)の発症の危険性が指摘されており、これまで当該培養試験に用いられてきた Brain Heart Infusion Broth の代替品が求められている。そこでヒト唾液サンプルを用いた食品の酸発酵試験、非水溶性グルカン合成試験の可能性を検討した。

B. 研究方法

i ヒトう蝕原性レンサ球菌の培養条件

種々の糖質添加した HI 液体培地での培養により、嫌気条件、培養時間および対照糖質として適した糖質の

検討を行った。嫌気条件は静置培養、BBL ガスパックシステム（嫌気条件）、嫌気ボックス内での培養（高度嫌気条件）の 3 種についての比較検討を行った。

ii 唾液糖質添加培養試験

唾液サンプルに種々の糖質を添加して pH 変化とグルカン合成量を測定するための条件の検討を行った。ヒト唾液サンプルを放置した場合の pH 変化、および唾液の前処理の違いによる測定結果の差違について検討した。唾液前処置は、採取した全唾液、不溶物を遠心分離した上清、全唾液を超音波処理した後の上清の 3 種について比較した。唾液サンプルは成人ボランティア 9 名から採取した。

C. 研究結果

i ヒトう蝕原性レンサ球菌の培養条件

各種糖質のう蝕原性レンサ球菌による pH 低下量と非水溶性グルカン合成量は、各測定時点で嫌気条件による差違が認められ、概ね高度嫌気条件ほどベースラインからの変化量は大きくなった。しかし、嫌気条件ごとの経時変下は平行関係にあり、交絡する因子は認められなかった。非水溶性グルカン合成量と pH 低下量を同時に測定する場合、糖質による差がもっとも感度よく検出された培養時間は 9 時間であった。ソルビトールは、*S. mutans*、*S. sobrinus* の両菌種により発酵された。その程

度はショ糖やブドウ糖に比べて低く、マルチトールに比べると高く、キシロシルフルクトシドと同程度であった。

ii 唾液糖質添加培養試験

唾液サンプルを放置した場合、pH は経時的に上昇し、検体によってその速度は異なっていた。しかし、採取後 4 時間を経過するとすべての検体の pH は上昇しなくなった。スクロース添加による pH 低下を採取後 5 分以内、4℃、4 時間保存後、24 時間保存後、96 時間保存後で比較した場合、5 分以内と 4 時間後の差は統計学的に認められず、24 時間後では有意に pH 低下量が減少した。さらに 96 時間後では pH 低下はいずれの検体においてもほとんど観察されなかった。しかし、スクラーゼ活性は 96 時間を経過しても採取 5 分後と同程度の認められた。3 種の前処理の比較では、pH 低下は全唾液に観察され、遠心後の上清では超音波処理の有無に関わらずほとんど観察されなかった。非水溶性グルカン合成量は全唾液と超音波処理後の上清に認められ、超音波処理しない上清での合成量はわずかであった。

D. 考察

i ヒトう蝕原性レンサ球菌の培養条件

ヒトう蝕原性レンサ球菌の培養では嫌気条件による測定結果の差違は認められたものの、交絡因子が認められなかったため、評価方法として

常に一定の嫌気条件をで行えばその差違は考慮する必要はないと考えられる。また、ソルビトールは従来、う蝕誘発性がないことが認められていることから対照糖質として用いられてきたが、う蝕原性レンサ球菌によって相当な発酵を受けることから、対照糖質として用いることの妥当性が検討されるべきと考えられる。

ii 唾液糖質添加培養試験

唾液は放置すると CO₂ の消失などにより pH が上昇する。pH 変化を測定する際に、この pH の上昇の個人差が結果に影響を与えると考えられたが、放置後 4 時間で pH は安定し、かつ酸発酵能は有意に低下しないことから、唾液採取から 4 時間経過後に糖質添加して pH の経時変下を評価することが妥当と考えられた。

3 種の前処理サンプルからの非水溶性グルカン合成量は、全唾液がもっとも多く、次いで超音波処理した唾液の遠心上清サンプルであり、遠心上清のみの唾液サンプルのグルカン合成はほとんど認められなかった。また、グルカン合成酵素活性をスクラーゼ活性で評価する場合は全唾液の不溶物が発色反応を阻害する傾向が認められた。合成された非水溶性グルカンを回収して測定する場合には、合成量とベースラインの不溶物

を区別するため、超音波処理した唾液の遠心上清サンプルで近似させるのが適当ではないかと考えられた。

E. 結論

ヒトう蝕原性レンサ球菌培養試験により糖質の酸発酵性、非水溶性グルカン合成を評価する場合、培養時の嫌気条件を常に同じにすれば、その嫌気度による影響は無視しうると考えられた。

唾液に糖質を添加してその酸発酵性、非水溶性グルカン合成を評価する場合、採取後 4 時間程度冷蔵保存した後行うのが適当であると考えられた。また、唾液中の多糖体はほとんどが不溶物に含まれて存在しており、評価対象に応じた前処理が必要であることが示唆された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

厚生科学研究補助金（生活安全総合研究事業）
分担研究報告書

特定保健用食材の安全性および有用性に関する研究

プラーク pH テレメトリー（電極内蔵法）の現状分析に関する研究

分担研究者 高橋 信博 東北大学大学院・教授

研究要旨：最も信頼性の高いプラーク pH 測定法の一つとしてプラーク pH テレメトリー法（電極内蔵法）が挙げられている。しかし、近年の急速な食品の多様化・多品目化など食品検定を取り巻く環境の変化を鑑み、プラーク pH テレメトリー法を再検討した。プラーク pH テレメトリー法が最も厳密で優れた方法であることに異論はないものの、①被験者の確保が困難、②被験者の負担大、③測定者の負担大、④測定システムが高価などの問題があることがわかった。今後、特定保健用食材を普及させていくためには、プラーク pH テレメトリー法を用いた検定システムを改良し、できるだけ多くの食品を、できるだけ簡便にかつできるだけ安価に検定できるようにすることが望まれる。

AおよびB. 研究目的および方法

米国 San Antonio で 1986 年に開催された食品う蝕誘発性に関する会議（Schachtele *et al.*, *J. Dent. Res.*, **65**: 1530-1531, 1986）、平成 4～6 年度総合研究 A（食品および代用糖のう蝕誘発性を総合的に評価するための基礎的研究：代表 山田正）、さらには英国 London で 1999 年に開催された食品う蝕誘発性および酸蝕性に関する会議（Curzon and Hefferren, *Br. Dent. J.*, **191**: 41-46, 2001）のいずれでも、食品のう蝕誘発性能を評価する方法の一つとしてプラーク pH を測定することが推奨されている。プラーク pH 測定法には様々な手法があるが、最も信頼性の高い方法の一つとして「ヒト口腔内に微小電極を設置し、そこにプラークを形成させ、*in vivo* で直接プラーク pH を測定できる“プラーク pH テレメトリー法（電極内蔵法）”」が挙げられている。実際、国際トゥースフレンドリー協会による「う蝕

をおこしにくい食品（歯に信頼マーク）」の検定や、厚生労働省による「う蝕予防機能を持つ特定保健用食品」の検定などに用いられ、その信頼性は検証されてきた。

しかし、近年、食品の多様化、多品目化など食品検定を取り巻く環境が急速に変化していることから、プラーク pH テレメトリー法をもう一度見直すことが求められている。そこで、長年、東北大学大学院歯学研究科で行われてきたプラーク pH テレメトリーを例として、プラーク pH テレメトリー法の現状を分析し、その長所と短所を検討した。

CおよびD. 研究結果および考察

1. プラーク pH テレメトリーの実際

(1) 測定装置の作製

図 1 に示すように、下顎臼歯部欠損用部分床義歯の歯牙欠損部に人工的歯間部を形成し、同部に埋め込んだエナメル質小片上に微小 pH