

電極を設置して、「プラーク pH 測定装置」を作製する(玉澤佳純ら, 日本補綴歯科学会雑誌, 40: 147, 1996 抄録; 阿部昌子ら, 歯界展望増刊号「歯科医学と健康の創造」, 264, 2001 抄録)。なお、この装置は、電極部が隣接歯面と接することで歯間部を形成していた Igarashi *et al.* (Arch. Oral Biol. 26:203-207, 1981) の装置を改良したものであり、人工的歯間部を用いることによって被験者の隣接歯への為害作用(プラーク pH 測定にともなう脱灰作用)を避けることができる。また、ここで用いた微小 pH 電極は水素イオン感受性電界効果型トランジスタ電極 (ion-sensitive field effect transistor pH electrode; ISFET pH 電極) であり、センサー部が微小で、かつガラス微小電極よりも感度と反応性に優れている。

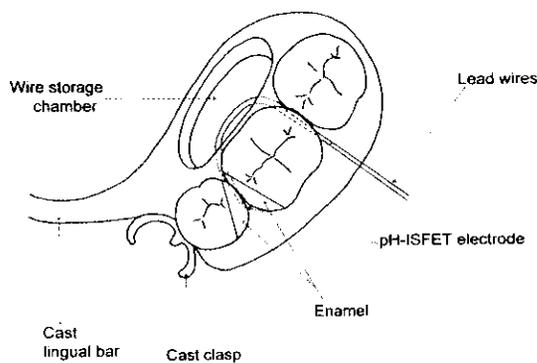


図1 プラーク pH 測定装置 (部分)

(2) 測定

プラーク pH 測定装置を 3~4 日被験者口腔内に設置し、食習慣を変えることなく電極センサー部にプラークを蓄積させる。実験当日の測定開始 2 時間前からは、水以外の飲食物を摂取しないように被験者に指示しておく。測定開始直前に pH 電極を校正する (pH 7 のみ)。ついで被験者に種々の食品を摂取させ、その時のプラーク pH を連続的に測定し記録する。10%スクロース溶液 10 ml による 2 分

間のリンス後のプラーク pH をポジティブコントロールとする。測定終了後に pH 電極の再校正 (pH 7 と pH 4) を行う。

なお被験者には、事前に実験の目的・プラーク pH 測定方法について十分に説明し同意を得ておく。

(3) データ解析

国際トゥースフレンドリー協会の場合、4 名の異なる被験者において、検定対象となる食品を摂取後、30 分間以内にプラーク pH が 5.7 より低下しなければ、その食品のう蝕誘発性はないと判定している。

厚生労働省特定保健用食品の場合も国際トゥースフレンドリー協会と同様であるが、プラーク pH テレメトリー法以外の *in vitro* 試験 (口腔内細菌による酸発酵性試験、非水溶性グルカン合成試験、必要に応じ付着試験) も行い、総合的に判断している。

測定結果の例を図 2 に示す。

2. プラーク pH テレメトリー法の長所と短所

(1) 長所

in vivo で、すなわち口腔内でプラーク pH をプラーク非破壊的に測定することが可能である。このため、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。

(2) 短所

被験者、検定者、測定システムに関して、

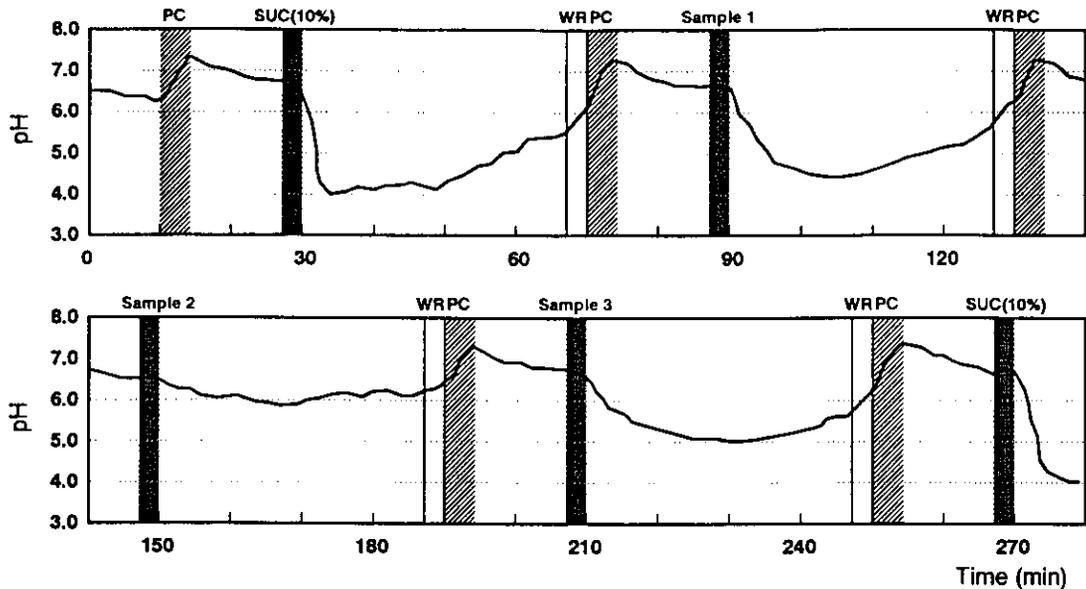


図2 プラーク pH 測定例 (抜粋)

以下のような短所が挙げられる。

①被験者の確保が難しいこと

下顎に欠損部を持つ被験者を常に検定のために確保しておくことは容易ではない。とくに欠損部を持つ被験者の多くが高齢者であり、体調不調などのため検定が滞ることがある。

また測定前の校正、測定中だけではなく、義歯のメンテナンス等、被験者の拘束時間が長い。これだけの時間を割いてもらえる被験者は限りがある。

②被験者の負担が大きいこと

測定開始2時間前からは水以外の飲食物を摂取できない上、測定中は飲食ができないため、被験者の身体への負担を考慮しなければならない。そのため測定時間には自ずと限界がでてくる。

③測定者の負担が大きいこと

大学などの研究機関に所属する測定者が測定を行うには時間的な制約がある。また、測定やその管理に専門的かつ高度な知識・技術が要求され、複数名の測定者で分担することは容易ではない。

④測定システムが高価であること

ISFET pH 電極をはじめ、測定装置が高価であり、そのメンテナンスも時間がかかる。また、拘束時間に応じた被験者への謝金も決して安価ではない。

これらの短所の中で、①被験者の確保が難しいという現実、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②被験者や③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。

E. 結論

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、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る。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表（囲みは関連の強いもの）

1. 論文発表

1. Nobuhiro Takahashi and Takuichi Sato:

Dipeptide utilization by periodontal pathogens, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Prevotella nigrescens* and *Fusobacterium nucleatum*. *Oral Microbiol Immunol* 17(1): 50-54, 2002.

2. Nobuhiro Takahashi and Takuichi Sato:

Preferential utilization of dipeptides by *Porphyromonas gingivalis*. *J Dent Res* 80(5): 1425-1429, 2001.

③ Shoko Takahashi-Abbe, Kazuhiko Abbe,

Nobuhiro Takahashi, Yoshinori Tamazawa and Tadashi 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.

4. Kaoru Saito, Nobuhiro Takahashi,

Hiroshi Horiuchi and Tadashi 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.

⑤ 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.

6. Takuichi Sato, JinPing Hu, Junko Matsuyama and Nobuhiro 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 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

② 前原裕子、岩見熹道、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.

③ 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

4. 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

5. 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.

6. 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.
7. 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.
8. 角田初恵、岩見憲道、宮澤はるみ、真柳秀昭、高橋信博：*Streptococcus mutans*のキシリト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.
9. 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.
10. 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
11. Junko Matsuyama, Takuichi Sato and Nobuhiro 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.
12. Hatsue Kakuta, Yoshimichi Iwami, Hideaki Mayanagi and Nobuhiro 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.
13. Takuichi Sato, Junko Matsuyama and Nobuhiro 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.
14. Harumi Miyasawa, Yoshimichi Iwami, Takuichi Sato, Hideaki Mayanagi and Nobuhiro 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.
15. Nobuhiro Takahashi and Takuichi 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.
16. 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：ソルビトールが *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 東北大歯誌 20(2): 115, 2001.
17. 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。

特定保健用食材の安全性及び有用性に関する研究

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

分担研究者 稲葉大輔 岩手医科大学・助教授

研究要旨：歯質保護の基本機構は、脱灰の抑制と初期齲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。本研究では、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ィ（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。

A. 研究目的

歯質保護の基本機構は、脱灰の抑制と初期齲蝕病巣の再石灰化促進に集約される。したがって、食品のもつ歯質保護機能の評価および作用条件の最適化にあたっては、その判定法として、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についても標準化しておくことが必須である。

再石灰化の判定には従来より多くの方法が考案され、歯質の微小硬度、放射性元素吸収度、あるいは散乱光の計測などが応用されてきた。ただし、これらは歯質のミネラル濃度変化を間接的に知る方法である。一方、定量的なマイクロラジオグラフィ（顕微X線写真法）は、カリオロジーの分野で脱灰・再石灰化評価にともなう歯質ミネラル濃度を定量評価する標準法となっており、歯質ミネラル濃度分布評価の Gold Standard として現在広く適用されている。ただし、撮影された microradiograph（MR）のフィルム濃度からミネラル濃度への換算、さらにミネラルパラメータを計測する手順やツールは、齲蝕学分野でも共通化がなされていない。

そこで、本研究では、TMR による歯質ミネラル濃度分布評価方法を齲蝕学分野で標準化するため、簡便かつ汎用性の高い画像定量法を構築し、その特性を検討した。

B. 研究方法

材料には純度 99.99% のアルミニウム箔で作製したステップウェッジ（ALW; 15.45 μm x 10 段階）、ならびに 0.1M 乳酸ゲル（pH5, 6wt% カルボキシメチルセルロース含有）で 2 週間脱灰したヒト歯根象牙質の平行研磨切片（厚さ約 100 μm ）を用い、次の手順で画像定量を行った（図 1）。

手順 1 MR の撮影：

ALW と歯質切片を適切な X 線フィルムに密着させ MR を得る（図 2）。撮影条件は、ALW 各ステップの厚さとデンシトメーターで計測された各ステップのフィルム濃度が直線的関係をもち、かつ ALW のフィルム濃度範囲が歯質のフィルム濃度を完全に包含しているよう設定されなければならない。この設定には被写体-管球間距離、管電圧、管電流、照射時間、照射軸-フィルム角度、現像条件についてキャリブレーション

ヨンを慎重に行い、最適化しておくことが必須である。

手順2 画像入力：

MR 内の ALW 各段階，ブランクならびに象牙質脱灰部の MR 像を，標準化した光学的条件のもとで顕微鏡(対物レンズ 20 倍；1 画素=1x1 μ m 程度)により拡大後，CCD カメラ (30 万画素程度) で撮影して，ビデオ入力アダプタを介してパーソナルコンピュータに 8bit のモノクロデジタル画像として入力する。「標準化した光学的条件」は，アルミニウム厚さと各ステップのグレイ値がほぼ直線的な関係をもち，かつ顕微鏡視野内の光学強度が均一となる設定ことを基準として設定する。

手順3 画像変換回帰式の決定：

次に画像解析ソフトウェア (NIH Image 等) 上に保存した画像を読み込み，まず ALW 各ステップとブランクのグレイ値を計測し，アルミニウム厚さとグレイ値の変換テーブルを決定する (図3；4 次回帰式， $r=0.997\sim 0.998$)。アルミニウム厚さとグレイ値はほぼ直線的な関係にあることを確認する。

手順4 画像変換1：

ついで，評価対象領域の原画像を手順3.の回帰式でアルミニウム厚さ等価のグレイ値 (ETa 値) で構成された定量的な画像に変換する。

手順5 画像変換2：

次に ETa 画像を，健全部 ETa 値を歯質の健全レベルのミネラル vol%濃度 (エナメル質：89vol%，象牙質：48vol%)，ブランク領域 Eta 値をゼロ vol%とする直線回帰式で変換し，ミネラル vol%等価のグレイ値で構成された画像を得る。この段階で定量的なミネラル濃度画像をモニター上で直接観察しつつ任意の部位を計測することが可能となる。

手順6 ミネラルパラメータの計測：

最後に，計測領域を画像計測し，ミネラルパラメータ計測ソフトウェアに入力し，脱灰深度 ld とミネラル喪失量 ΔZ を得る (図4)。今回試作したソフトウェア (MDA for Macintosh, ver.0.9) では，自動計測ルーチンを採用したため，計測手順でのオペータ内/間の誤差は完全に解消された。

本法の測定精度は，手順 1~6.を独立反復して得た 10 枚の MR のうち任意の 2 枚を対象に，表 1 に示す ALW 各段階について，アルミニウム厚さの画像定量値 (ETa 値) と実測値を比較することにより評価した。

再現性は，これら 10 枚の各 MR について，ALW 第 4 段階の ETa 値，ならびに象牙質脱灰部の脱灰深度 ld (μ m) とミネラル喪失量 ΔZ (vol% $\cdot\mu$ m) を計測し，その変動係数 CV から検討した。また，1 枚の MR について手順 2-6.を 20 回反復して画像計測のみの再現性を評価した。

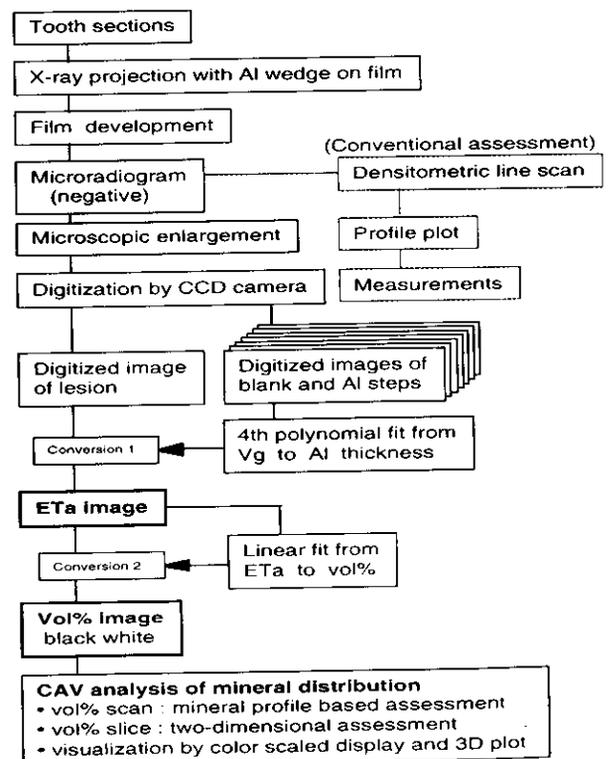


図1 TMR によるミネラル濃度画像計測の

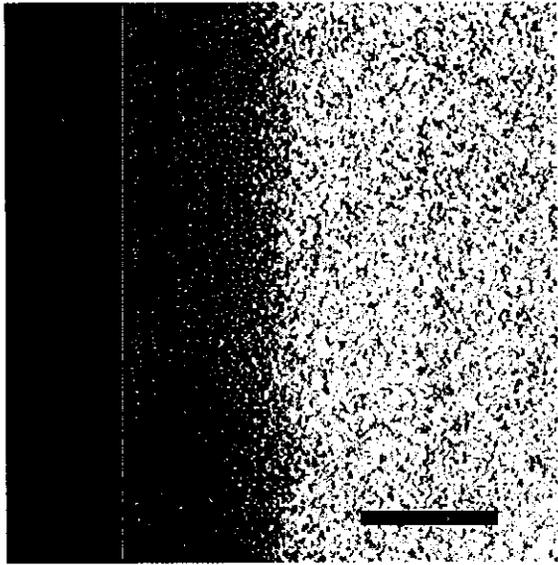


図2 脱灰試料のMR例 (Bar = 100 μm)

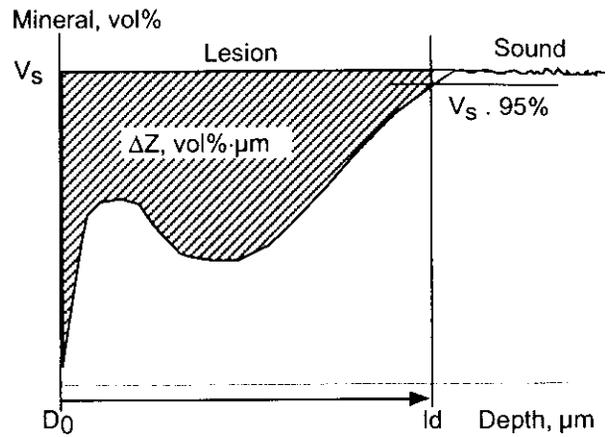


図4 ミネラル濃度分布曲線の模式図と基本的な計測パラメータ. V_s = 健全レベル, D_0 = 表層位置, l_d = 脱灰深度 lesion depth (μm), ΔZ = ミネラル喪失量 mineral loss value (vol% · μm)

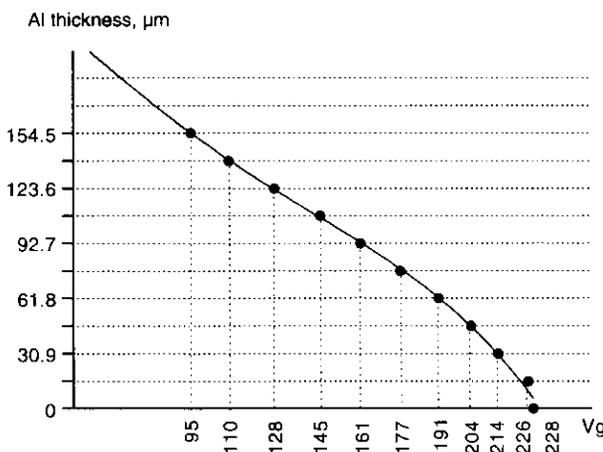


図3 グレイ値からアルミニウム厚さへの変換テーブル (4次回帰)

C. 研究結果

測定精度の検討結果を表1に示した。5種のALW領域の画像計測値/実測値の比は0.93~1.02で、実測値との誤差は1.9 μm以内であった。また、表2に示すとおり、ALW厚さ計測値の変動係数は、全過程10回反復で1.4%、画像計測20回反復で1.1%と低く、脱灰象牙質のミネラル指標についても変動係数は3.6~5.4%と、良好な再現性が得られた。

D. 考察

結果から明らかなように、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、MR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の特徴である。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で、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。

E. 結論

TMR による歯質ミネラル濃度分布評価方法を齲蝕学分野で標準化することを目的として、簡便かつ汎用性の高い画像定量法を構築し、必要なソフトウェアを開発した。本法は測定精度および再現性に優れ、操作の簡易性から、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。

F. 健康危険情報

特になし。

文献

1. ten Bosch, J.J., Angmar-Mansson, B.: A review of quantitative methods for studies of mineral content of intra-oral incipient caries lesions. *J. Dent. Res.* 1991 ; **70** : 2-14.
2. Arends, J., ten Bosch, J.J.: Demineralization and remineralization evaluation technique. *J Dent. Res.*, 71 (Spec Iss) : 924-928, 1992.
3. Angmar B, Carlstrom D, Glas JE: Studies on the ultrastructure of dental enamel, VI. The mineralization of normal human enamel. *J Ultra Res* 8:12-23, 1963.
4. de Josselin de Jong, E., ten Bosch, J.J. and Noordmans, J.: Optimized microcomputer guided quantitative microradiography on dental mineral slice, *Phys. Med. Biol.*, 32 ; 106-110, 1987.
5. de Josselin de Jong, E., ten Bosch, J.J. and Noordmans, J.: Optimized microcomputer guided quantitative microradiography on dental mineral slice, *Phys. Med. Biol.*, **32** ; 106-110, 1987.
6. Øgaard, B., Rølla, G. and Arends, J. : *In vivo* progress of enamel and root surface lesion under plaque as a function of time, *Caries Res.*, **22** ; 302-305, 1988.
7. Arends, J., ten Bosch, J.J.: Demineralization and remineralization evaluation technique. *J Dent Res.*, 71 (Spec Iss) : 924-928, 1992.
8. 稲葉大輔, 高木興氏: 根面再石灰化の初期過程にをけるミネラル量の変化 — 単一切片法と画像定量法による評価 —, *口腔衛生会誌*, 42: 393-398, 1992,.
9. Inaba D, Takagi O, Arends J : A computer-assisted videodensitometric method to visualize mineral distributions in in vitro and in vivo formed root caries lesions, *Eur J Oral Sci*, 105: 74-84, 1997.
10. Inaba D, Tanaka R, Takagi O, Yonemitsu M, Arends J: Computerized measurements of microradiographic mineral parameters of de- and remineralized dental hard tissues, *口腔衛生会誌*, 47: 67-74, 1997.
11. Arends J, Ruben JL, Inaba D: Major topics in quantitative microradiography of enamel and dentin : R parameter, mineral distribution visualization, and hyper-remineralization, *Advances in Dental Research*, 11: 403-414, 1997.
12. Verdonschot EH, Angmar-Mansson B, ten Bosch JJ, Deery CH, Huysmans MC, Pitts NB, Waller E: Developments in caries diagnosis and their relationship to treatment decisions and quality of care: ORCA Saturday Afternoon

- Symposium 1997., Caries Res, 33:32-40,1999.
13. ten Bosch JJ, Angmar-Mansson B: A review of quantitative methods for studies of mineral content of intraoral incipient caries lesions. J Dent Res 70: 2-14,1991.
 14. Angmar-Mansson B, ten Bosch JJ: Advances in methods for diagnosing coronal caries: A review. Adv Dent Res 7: 70-79, 1993.
 15. Hafstrom-Bjorkman U, Sundstrom F, de Josselin de Jong E, Oliveby A, Angmar-Mansson B: Comparison of laser fluorescence and longitudinal microradiography for quantitative assessment of in vitro enamel caries. Caries Res 26: 241-247, 1992.
 16. Ando M, Hall AF, Eckert GJ, Schemehorn BR, Analoui M, Stookey GK: Relative ability of laser fluorescence techniques to quantitate early mineral loss in vitro. Caries Res 31:125-131, 1997.
 17. Ekstrand KR, Ricketts DNJ, Kidd EAM: Reproducibility and accuracy of three methods for assessment of demineralization depth on the occlusal surface: An in vitro examination. Caries Res 31: 224-231, 1997.
- G. 研究発表
1. 論文発表

Inaba D, Someya Y, Yonemitsu M: Intraoral Changes in NaOCl-treated Root Dentin Lesions: A Pilot Study, J Dent Health, 50: ,2000.
 2. 学会発表
 1. Ruben J, Huysmans, MCDNJM, Inaba D : Flowcell-TMR: A longitudinal study of surface changes in tooth material, Caries Res, 34:329, 2000.
 2. Inaba D, Nagai Y, Minami K, Yonemitsu Y : Combined effects of APF and Carisolv application on acid resistance of dentine lesions in vitro, Caries Res, 34:334, 2000. (47th Annual Congress of European Organisation for Caries Research (ORCA), Alghero- Italy)
 3. 稲葉大輔, 南健太郎, 米満正美 : 齲蝕プロセス連続画像定量システムの開発, 口腔衛生学会雑誌, 50:548-549, 2000. (第49回口腔衛生学会・総会, 札幌)
- 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及び有用性に関する研究

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

分担研究者 稲葉大輔 岩手医科大学・助教授

研究要旨：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前節（1. 歯質ミネラル画像定量法の検討）で確立した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。その結果、5日間の人工プラーク形成でエナメル質に脱灰深度が約 120 μm の溶解型の人工初期齲蝕が形成され、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することが確認された。

A. 研究目的

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前節（1. 歯質ミネラル画像定量法の検討）で確立した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。

B. 研究方法

(1) 材料

材料には牛歯エナメル質を使用し、規格化した面積の実験面を得るためスラードリル（SVH-1，盟和商事）によって直径 6mm の円柱状エナメル質ブロックを作製した。これらを 1 群 6 試料として常温重合レジン（Unifast-Trad，GC）に包埋し、全体を直径 35mm，厚さ 7mm の円盤状プレートに整えた（図 1）。ついで 800 番の耐水ペーパーで表面を研磨して平滑な新鮮エナメル質を露出させた。さらに各種反応液の試料面における貯留・排出状態を規

格化するため、高さ 3mm のラバー製フレーム（枠）をプレート外周に印象用コンパウンド(GC)で接着した。

(2) 生物学的実験齲蝕モデル（人工口腔装置）

人工口腔装置本体は 120ml 容量のポリプロピレン製容器を反応槽本体とし、上部から 2 本のステンレスチューブ（内径 0.8mm）を挿入，その直下にエナメル質試料を設置した（図 1）。このステンレスチューブにシリコンチューブを接続し，各種反応液を高精度液送ポンプ（7550-20，Masterflex）で試料上に供給滴下した。また，本体下方からはフラット型 pH 電極（GST-5723S，東亜電波工業）を，そのイオン選択性ガラス膜面が試料プレートの上面に一致するよう固定し，専用プログラム(G-LOG II，DKK・TOA)でエナメル質表面付近の pH を連続的に計測できるように設定した。この装置全体を 37℃の恒温槽内に設置して以下の実験を行った。

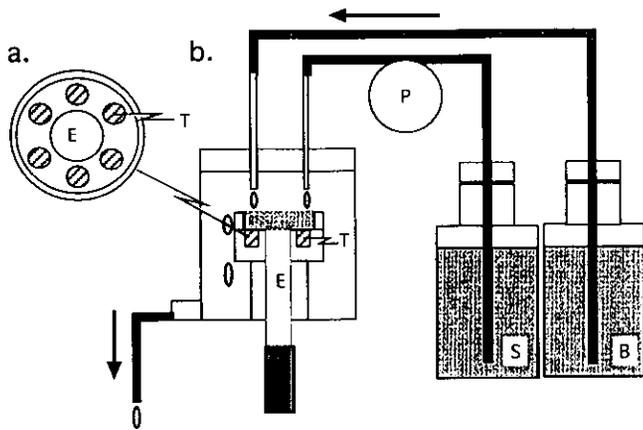


図1
人工口腔装置 a: 試料プレート上面図,
b: 装置模式図 (S=15% Sucrose, B=細菌
懸濁液, P=液送ポンプ, T=サンプル, E=pH
電極)

(3) 人工プラーク形成と脱灰処理

人工プラーク形成のための細菌懸濁液には
ミュータンスレンサ球菌 (MS 菌) の標準
株として *Streptococcus mutans* MT8148
株の BHI 培養液を使用した。

凍結保存していた *S. mutans* MT8148
株 37℃で 10 時間前培養し, その 700 μ l を
50%グリセロール 250 μ l に分注後, -20℃
で凍結して保存菌液とした。実験の都度,
この保存菌液の 2 白金耳を 5ml の BHI に
とり, 24 時間培養した後, 全量を 500ml
の BHI に混合, 37℃で 10 時間培養して
OD₆₆₀=1.2, pH=5.7~5.9 に達した時点で
実験に供した。人工プラークはこの細菌
懸濁液と 15%スクロース液を液送ポンプで
シリコンチューブから連続的に毎分 0.1ml
の速度で人工口腔装置内にセットしたエナ
メル質試料に 5 日間, 供給滴下すること
により形成した。

人工プラーク形成にともなう脱灰程度の
再現性を確認するため, エナメル質ブロッ
ク 6 個を 1 群として 4 群の試料 (合計 24
個) を準備し, 各群について 5 日間の混合
唾液由来プラーク形成処理を行った。

(4) ミネラル濃度分布の評価

各エナメル質ディスクの中央から, 厚さ約
100 μ m の平行切片を切り出し, 前節に述
べた画像定量法によりミネラル濃度分布曲
線を得て, 図 2 に示す二つのミネラルパラ
メータ, すなわち ld (脱灰深度, μ m),
 ΔZ (ミネラル喪失量, vol% $\cdot\mu$ m) を測
定した。

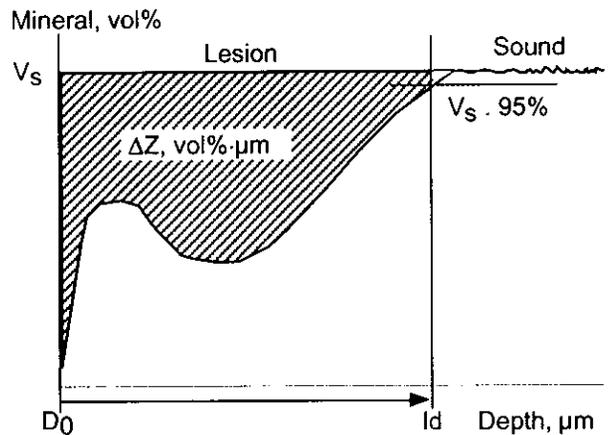


図2 ミネラル濃度分布曲線の模式図と基
本的な計測パラメータ. Vs = 健全レベル,
D0 = 表層位置, ld=脱灰深度 lesion depth
(μ m), ΔZ =ミネラル喪失量 mineral loss
value (vol% $\cdot\mu$ m)

C. 研究結果

5 日間の混合唾液由来プラーク形成を 4
群の試料 (n=6/群) で繰り返した結果,
脱灰深度の平均値が 121 μ m に対して, 標
準誤差 (SE) は 6.1 μ m と測定値に集中傾
向が認められた。

D および E. 考察ならびに結論

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脱灰深度が約
120 μ m の人工初期齲蝕が形成されることが
確認された。この齲蝕病巣は溶解型であ
った。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。

参考文献

1. Hinoide, M., Imai, S., Nisizawa, T. :
New artificial mouth for evaluation
of plaque accumulation, pH changes
underneath the plaque, and enamel
demineralization. *Jpn. J. Oral Biol.*
26: 288-291, 1984.
2. Sissons, C. H. : Artificial dental
plaque biofilm model system. *Adv.*
Dent. Res. 12:72-76,1997.
3. 南健太郎：エナメル質の脱灰・再石灰
化に果たす人工プラークの役割に關す

る in vitro 研究, 口腔衛生会誌,
52:1-11, 2002.

G. 研究発表

学会発表

南健太郎, 稲葉大輔, 米満正美：プラーク下におけるエナメル質再石灰化の検討
(第 49 回日本口腔衛生学会総会, 2000, 札幌)

H. 知的財産権の出願・登録状況 特になし。

研究成果の刊行に関する一覧表

学術雑誌

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
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.

「研究成果の刊行に関する一覧表」

エナメル質の脱灰・再石灰化に果たす人工プラークの役割に関する *in vitro* 研究

南健太郎

口腔衛生学会雑誌(0023-2831)52 巻 1 号 Page48-58(2002.01)

20010904

以降のページは雑誌/図書等に掲載された論文となりますので、
「研究成果の刊行に関する一覧表」をご参照ください。