

厚生科学研究費補助金

医療技術評価総合研究事業

低・非・抗う蝕性食品の検定評価法の確立と
その応用・普及に関する研究
(H12-医療-005)

平成13年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 星野 悦郎

平成14(2002)年 3月

厚生科学研究費補助金

医療技術評価総合研究事業

低・非・抗う蝕性食品の検定評価法の確立と
その応用・普及に関する研究
(H12-医療-005)

平成13年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 星野 悦郎

平成14(2002)年 3月

目 次

I. 総括研究報告	
低・非・抗う蝕性食品の検定評価法の確立とその応用・普及に関する研究 星野悦郎	-----3
II. 分担研究報告	
1. 歯垢細菌の培養による非う蝕性の評価 星野 悦郎、佐藤（松山） 順子	-----10
2. キシリトールなどの糖アルコールの持つ歯垢細菌糖代謝阻害作用 －とくにミュータンスレンサ球菌のグルコース以外の糖代謝活性に対 するキシリトールの阻害効果について－ 高橋 信博	-----12
3. <i>n vitro</i> における食品のう蝕原性評価技術の確立 今井 奨 + （西沢 俊樹）	-----16
4. 保育園児の父母における齲蝕に関する食品表示の意識調査 松久保 隆、兼平 孝、石井 拓男、 （小林義昌、櫻井みわ、小林佳代、 大久保留加、森田 学）	-----19
5. ICT(Intra-oral cariogenicity test)を用いての CPP-ACP ガムの再石灰化能評価 飯島 洋一	-----21
6. 齲蝕病原性評価における唾液の関与 渡部 茂	-----26
7. 食品の抗う蝕性を評価するための微生物学的試験法の検討 福島 和雄 + （竹内 武男、篠崎 紀子）	-----28
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	-----31
IV. 研究成果の刊行物・別刷	-----34

厚生科学研究費補助金（医療技術評価総合研究事業）
（総括）研究報告書

低・非・抗う蝕性食品の検定評価法の確立と
その応用・普及に関する研究
（H12-医療-005）

主任研究者：星野 悦郎・新潟大学・教授

研究要旨

う蝕の軽減を利する食品を普及させるために、適切なう蝕誘発性の評価の基準と消費者へのその適切な情報（表示方法）提供を目的として本研究が計画された。本年度は、食品のう蝕誘発性の評価方法、特に、*in vitro* の系、人工口腔装置による評価、*in situ* での現象を加味した口腔内脱灰再石灰化法を検討した。また、これらの表示に関する消費者のニーズ、理解を知るため、東京、札幌の保育園の父母を対象に、アンケート調査を行ったが、高い関心と正確な情報提供の重要性が示唆された。う蝕誘発性に関連した情報提示に関しては、「低う蝕性食品」「非う蝕性食品」「抗う蝕性食品」の区別とその基準、わかりやすい表示や表現について検討し、さらに「抗う蝕性食品」については、その表示に誤解のない様にする検討を続けている。

分担研究者氏名・所属施設名及び所属施設における職名

石井 拓男・東京歯科大学・教授
西沢 俊樹・感染症研究所・室長
今井 奨・感染症研究所・主任研究員
福島 和雄・日本大学松戸・教授
飯島 洋一・長崎大学・助教授
松久保 隆・東京歯科大学・教授
高橋 信博・東北大学・教授
兼平 孝・北海道大学・講師
渡部 茂・明海大学・教授
佐藤（松山）順子・新潟大学・助手

う蝕誘発性の有無・程度の科学的な評価方法の確立を目指している。近年は、「う蝕を防ぐ」側面を売り物にした食品の出現もあり、その摂取でう蝕発生が防止される、と誤解される可能性もある。

「歯周疾患予防」や「口腔の健康保持」の表示も出現している。このような食品による「う蝕予防」など口腔疾患予防や口腔の正常な状態を保つ目的の機能性食品の応用とその普及・拡大についても極めて多面的な検討を心掛ける必要がある。また、経済活動の国際化により、このような表示や基準が国際化される必要性をもっており、海外のその分野の専門家との連携も視野に入れる必要が生じている。

本研究の成果を実用化することによって、う蝕の軽減を考慮した食品の消費者による適切な選択に必要な基準と科学的な情報の提供が可能とすることができる。また、本研究の成果を基準として「口腔の健康」に関する機能性食品の評価と表示への対応に備えることができる。

A. 研究の目的

本研究は、食品のう蝕誘発性の評価法と低・非・抗う蝕性食品の実際の応用のための普及を図る政策的検討を目的としている。

その背景として、代用甘味料含有食品をはじめとする多くの種類の「虫歯にならない」を売り物にした食品の市場へ登場と、う蝕と食品との関連に対する消費者の関心の高まりがあり、日頃う蝕に関連する研究、とくにう蝕原性、う蝕誘発性についての先端的な研究者、あるいは食品関連の専門科学者による研究組織により、これらの食品の

B. 研究方法

本研究では、各研究者の研究成果を持ち寄り相互に多方面から検討し、課題を持ち帰ってさらに研究を進め、研究組織として協議した内容に沿ってさらに研究した結果を再度持ち寄り、さらに検討を重ねる方式をとっている。したがって、研究実施の方法として、各研究機関での実際の研究と、

会議による検討が中心となっている。

1. 食品のう蝕誘発性の評価法の検討

従来のヒト口腔内での測定法と共に、より簡便な、しかし精度の高い *in vitro* の評価法を検討する目的で、歯垢細菌を被検食品の水溶液存在下で培養し、pH、増殖、代謝産物の変化を評価するシステム、あるいは人工口腔装置による評価、また、口腔内脱灰再石灰化法による検定を行った。(それぞれの分担研究報告参照)。また、これらの評価法には唾液の作用を加味する必要があり、内臓電極法による口腔内唾液の中和作用に与える影響を調べた。(分担研究報告参照)。

2. 低・非・抗う蝕性食品に対する消費者の動向調査

低・非・抗う蝕性食品の評価や表示などを検討するためには、食品にラベルされる齲蝕に関する表示に対する意識や表示の理解度などについて調査する必要があるとの昨年度の纏めに対応して、東京、札幌の保育園の父母を対象に、アンケート調査を行った。

3. 低・非・抗う蝕性食品の評価や表示の一般化・国際化

その評価方法は、適切であると多方面から認められる必要がある。分担研究者のみならず、多彩な研究協力者、食品会社関係者、行政官等との検討、海外での研究者、専門家との議論を行った。米国でのテロ事件の影響で、外国人研究者の招へいを断念せざるを得ず、キャンセルとなったのは残念であった。

4. う蝕病原性に関連する基礎的研究

う蝕病原性の評価法は、上記のように幅広い理解と了解を必要とし、その結果、普及がはかれる。う蝕病原性に関連する基礎的研究は、その説得力として必須のものであり、上記1-3の実際的な検討と平行して実施した。特に、近年、その機能が重要視されるキシリトールの酸産生阻害、再石灰化に関わる機構、う蝕リスクに関する研究、唾液作用の口腔内部位差、等について検討した。

(倫理面への配慮)

本研究では、特に倫理的に配慮が必要な研究計画は含まれていないが、研究実施に当たって研究組織の研究者は十分な配慮を払っている。特にヒトを用いる系(アンケート調査を含め)では、十分な説明と、研究・調査への自主的な参加の確認を行った。

C. 研究結果

D. 考察

E. 本年度の結論

(本年度報告書としては、下記の項目毎のそれぞれに、C. 研究結果、D. 考察、E. 本年度の結論を含めて記載した)

1. 食品のう蝕誘発性の評価法の検討

従来のう蝕原性の基礎研究結果を踏まえ、食品のう蝕原性評価方法を検討した。

う蝕の発生の機構を考慮すると、歯垢の中で細菌が作る酸が極めて重要な要素であることから、また、その酸も直接エナメル質を脱灰している歯垢最深部のエナメル質と接する部分の酸量が重要であると認識されてきた。したがって、内臓電極法による、この部の pH 測定が極めて有効であると考えられてきた。一方、この方法は、自発的に参加する測定に適した被験者が必要で、試験機関も限られることから、これに代わる有効な評価方法の検討が必要となっていた。

近年の実験技術の進歩・進展により、人工口腔による *in vitro* での評価、口腔内脱灰再石灰化法等の方法の精度が上昇していることが示され、評価法として有効であることが示された。また、口腔細菌の培養法を含めこれらの評価方法がどのような定義の評価に最も適切かをさらに検討する必要がある。

・抗う蝕性の検討

抗う蝕性食品についてはその定義を含め、評価方法について検討した。

特に、口腔内脱灰再石灰化法では、人工脱灰歯質の食品による再石灰化能を測定することによりう蝕修復作用を評価できる可能性が示され、「抗う蝕性食品」に関連する評価・表示を次年度さらに検討することになっている。ただ、「抗う蝕原性」に関しては特定の条件下では評価可能であるが、別途、分担研究が示す様に、多種多様な細菌種が混在している歯垢では、それが実際のう蝕の発生に抑制的に働くかどうかの評価に関して、さらに詳しい検討が必要と判断され、「抗う蝕原性」の表現ではなく、「再石灰化促進」等の表現にとどめることなどを含め、次年度にさらに検討を続けることとした。

2. 低・非・抗う蝕性食品に対する消費者の動向調査

低・非・抗う蝕性食品に対する消費者の認識度、理解度が重要であろうという観点から、また、この様な食品を選択し購入する中心的な階層として若い母親層を選択し、その関心を調査・検討するためアンケート調査を実施した。

含有甘味料に関する表示(「シュガーレス」「砂糖不使用」など)のある食品に対する関心は、子どもに齲蝕がある父母・ない父母ともに、70%以上が「とても関心がある」「関心がある」と回答した。また、子どもの齲蝕の有無にかかわらず90%以上の父母が、齲蝕に関する食品表示で、「マー

ク」や「ことば」の「両方必要」「、あるいはいずれかが必要であると回答した。この「マーク」や「ことば」を「信用している」「少し信用している」父母は80%に近い。

食品のラベルの重要性、特に、情報の正確さと理解しやすい表示の重要性が示された。

3. 低・非・抗う蝕性食品の評価や表示の一般化・国際化

食品の特定の機能の表示に関しては、その評価方法が適切であると多方面から認められる必要がある。

本研究の代表・分担研究者は、う蝕病原性研究、う蝕予防の専門家であり、それぞれ多彩な研究協力者、食品会社関係者、行政官等との検討、海外での研究者、専門家との議論を行った。

ごく最近、特に英国を中心として、食品自身が持つ脱灰能 (Erosion と表現)、また、低 pH の食品が歯にまわりつく Tooth wear の作用の意義を、子供等に食品を与える際の留意点として重要視する動きがある。これらは従来、酸蝕症としてう蝕とは別の観点で考えられてきた事項であるが、食品の歯質脱灰という観点では、低・非・抗う蝕性食品の評価に加味する必要があると思われる。

4. う蝕病原性に関連する基礎的研究

近年のう蝕は、従来のような歯冠部平滑面や咬合面ばかりでなく、歯根部の根面う蝕も増えている。この場合、エナメル質の破壊という歯垢細菌の作用ばかりでなく、最初から象牙質う蝕として進行するため、象牙質う蝕内の細菌作用についても考慮する必要がある。象牙細管内に侵入する細菌群は付着性を必ずしも必要としないが、その細菌種は基本的に歯垢構成細菌と同様であることが示され、歯垢細菌を試験菌とする事の適切さが示された。

近年、その機能が重要視されるキシリトールに関しては、従来から知られていたグルコース代謝阻害に加え、ガラクトース、スクロース、マルトース、ラクトースの代謝を阻害する事が明らかになった。しかし、フルクトースの代謝は阻害されなかった。キシリトールによって糖代謝阻害が起こる場合、キシリトール 5-リン酸が菌体内に蓄積している事が示された。また、キシリトールの再石灰化促進作用が、リカルデントと共に評価することが示された。

個人的な要素が多い唾液の機能については、食品摂取に伴って分泌され、食品による口腔内 pH の中和に重要であり、この作用によって、食品のう蝕病原性の実際の口腔内での閾値は下がるとおもわれる。これに関連して、食品による酸性 pH の唾液によるクリアランスを検討し、部位特異性による影響を認めた。

なお、口腔内のう蝕原因菌レベルを従来法より

的確に評価可能な培養技法及びサンドイッチ ELISA 技法を確立することに成功している。

F. 健康危険情報
特にない。

G. 研究発表

1. 論文発表

E. V. Cruz, Kota K., J. Huque, Iwaku M., Hoshino E.:
Penetration of propylene glycol through dentine. International Endodontic Journal, in Press

Nakazawa F., S. E. Poco Jr., Sato M., Ikeda T., S. Kalfas, G. Sundqvist, Hoshino E.:
Taxonomic characterization of *Mogibacterium diversum* sp. nov. and *Mogibacterium neglectum* sp. nov., isolated from human oral cavities. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 52: 115-122, 2002

Hashimura, T., Sato M. & Hoshino E:
Detection of *Slackia exigua*, *Mogibacterium timidum* and *Eubacterium saphenum* from pulpal and periradicular samples using the polymerase chain reaction (PCR) method International Endodontic Journal 34 (6): 463-470, 2001

Takenaka S., Iwaku M., Hoshino E.:
Artificial *Pseudomonas aeruginosa* biofilms and the confocal laser scanning microscopic analysis. Journal of Infection and Chemotherapy, 7: 87-93, 2001

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.

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.

岡田珠美, 富田行秀, 福島和雄 ら:
高う蝕者と無う蝕者から分離した *Streptococcus mutans* の in vitro う蝕原性試験.
日本歯科保存学雑誌, 43(5): 1113 - 1120, 2000.

Shinozaki-Kuwahara, N., Hayakawa, M., Fukushima, K. et al.:
Purification and characterization of an oligo-isomaltosaccharide synthetase from a

Streptococcus sobrinus glucosyltransferase-I deficient mutant.

Biosci. Biotechnol. Biochem., 65: 1290-1295, 2001.

Hashimoto, K., Yamagi, K., Fukushima, K., Uda, Y.:
Effect of 3-hydroxymethylene -2-thioxo-pyrrolidone on growth of two species of mutans streptococci and their in vitro plaque formation.
Int. J. Antimicrob. Agents. 17: 97-102, 2001.

Neta, T., Inokuchi, R., Shinozaki-Kuwabara, N., Kouno, Y., Ikemi, T., Fukushima, K.:
Investigation and microbiological methods of estimating individual caries risk. - Evaluation of sampling methods and materials-
Int. J. Oral Biol. Med. In press.

古賀 寛、眞木吉信、松久保 隆、高江洲義矩:
市販フッ化物洗口剤作用後のエナメル質および歯根面への fluoride uptake の in vitro における検討。
口腔衛生学会誌 52: 28-35, 2001

吉野浩一、松久保 隆、高江洲義矩:
成人の歯の喪失の初発部位。
口腔衛生学会誌 52: 258-262, 2001

吉野浩一、鈴木啓介、小山安徳、松久保 隆、高江洲義矩:
職場における成人の歯科受療行動調査_「歯の治療を受けないでがまんする」の応答。
口腔衛生学会誌 52: 275-280, 2001

Sano, H., Shibasaki, K., Matsukubo, T., Takaesu, Y.:
Comparison of the activity of four chitosan derivatives in reducing initial adherence of oral bacteria onto tooth surface.
Bull Tokyo Dental College 42: 243-250, 2001

Sano, H., Shibasaki, K., Matsukubo, T., Takaesu, Y.:
Effect of rinsing with phosphorylated chitosan on four-day plaque regrowth.
Bull Tokyo Dental College 42: 251-256, 2001

長坂 斉、松久保 隆、高江洲義矩、小林義昌、佐藤 亨、石川達也:
歯科処置および左右均等噛み指導による聴力の均衡化。
日本全身咬合学会雑誌 (印刷中)

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

Takahashi N., Takuichi Sato T.:

Preferential utilization of dipeptides by *Porphyromonas gingivalis*.

J Dent Res 80(5): 1425-1429, 2001.

Takahashi-Abbe S., Abbe K., Takahashi N., Tamazawa Y., Yamada T.:
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.

Saito K., Takahashi N., Horiuchi H., Yamada T.:
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.

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.

Sato T., Hu JinPing, Matsuyama J., Takahashi N.:
Rapid identification of cariogenic bacteria by 16S rRNA genes PCR-RFLP analysis.
Cariology Today 2: 8-13, 2001.

鈴木欣考、渡部 茂:
口腔内各部位の pH の変動に与える唾液の影響。
小児歯誌 39: 1095-1099, 2001

Suzuki Y., Watanabe S.:
The influence of saliva on pH changes in the mouth. in press

2. 学会発表:

宅重豊彦、星野悦郎:
垂直性歯根骨折症例に対する LSTR 3Mix-MP 療法の臨床経過。
第114回日本歯科保存学会2001年春季学会、
日本保存学会雑誌44(春季特別号): 47, 2001.

小柳 明、岩久正明、佐藤尚美、星野悦郎:
コンポジットレジンからの Bisphenol-A の溶出に関する臨床的検討。
第114回日本歯科保存学会2001年春季学会、
日本保存学会雑誌44(春季特別号): 68, 2001.

Takusige T., Hoshino E.:
LSTR-3Mix-MP Therapy for teeth with prolonged perforation to periradicular areas.
79th General Session of the International Association for Dental Research.

Sato M., Nakazawa F., E.V. Cruz, Hoshino E.:
Isolation of So-called 'Jodococcus (Miller) from dental plaque.

79th General Session of the International Association for Dental Research.

Fukuda T., Takenaka S., Iwaku M., Hoshino E.: Bacterial Aerotolerance Assay with a Artificial Biofilm Model.

79th General Session of the International Association for Dental Research.

S. E. Poco, Jr., Nakazawa F., Sato M., Ikeda T., Teanpaisan R., Hoshino E.:

PCR detection of *Mogibacterium* from subgingival plaque of humans.

79th General Session of the International Association for Dental Research.

上松弘幸、佐藤尚美、星野悦郎:
歯周ポケットで優勢な酪酸産生性 AAGPR のアルギニン代謝系、
第 4 3 回基礎歯科医学会、
基礎歯科医学会雑誌 43(5)、p.84(532), 2001.

中澤 太、星野悦郎:
AAGPR 及び *Mogibacterium* 属特異的 PCR primer の構築、
第 4 3 回基礎歯科医学会、
基礎歯科医学会雑誌 43(5)、155(603), 2001.

T. Alam, Nakazawa F., Uematsu H., Sato M., Hoshino E.:

Susceptibility of *Enterococcus faecalis* to a combination of antibacterial drugs (3Mix) in vitro, 第 4 3 回基礎歯科医学会、
基礎歯科医学会雑誌 43(5)、155(603), 2001.

佐野明彦、能登久美子、真野直子、中澤 太、上松弘幸、星野悦郎:
ヒト口腔細菌叢に及ぼすフッ素の影響、
第 1 6 回口腔嫌気性菌研究会、

Hoshino E., M.A.A. Moral, Sato M., Kota K.: Periradicular lesions and Actinomyces. 80th General Session of the International Association for Dental Research, J Dent Res, 81(Special issue): A283, 2002.

Hashimura T., Sato M., Nakazawa F., E. Hoshino E. Phylogenetic analysis of 16S rDNA of *Eubacterium exiguum* and the species-specific regions for primer designation. Japanese Journal of Oral Biology, 42(6), 555-562, 2000

Nakazawa F., S. E. Poco Jr., Sato M., S. Kalfas, G. Sundqvist, E. Hoshino: Taxonomic characterization of *Mogibacterium diversum* sp. nov. and *Mogibacterium neglectoum* sp. nov. 80th General Session of the International

Association for Dental Research, J Dent Res, 81(Special issue):A114, 2002

Imai S., Kamasaka H., Inaba D., Hinoide M., Nisizawa T., N. Hanada N.: Inhibitory effect of phosphoryl oligosaccharides against enamel demineralization by mutans streptococci. 80th General Session of the IADR, San Diego, 2002.

Kamasaka H., INABA D., Minami K., To-o K., Nisimura T., Kuriki T., Imai S., Yonemitsu M.: 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.

Inaba D., Minami K., Yonemitsu M., KAMASAKA H., Imai S.: Enhanced remineralization of enamel by a chewing gum containing phosphoryl-oligosaccharides (POs) in situ. 80th General Session of the IADR, San Diego, 2002.

Shinozaki, N., Takeuchi, T., Yoshio, M., Fukushima, K. et al.: Development and application of sandwich-ELISA for direct determination of *S.mutans* GTF-B in human plaque samples. J. Dent. Res. 81(Special Issue): A-116, 2002.

福島和雄:
GTF 遺伝子組換え体を用いたう蝕誘発性バイオフィルム形成機序の解析、
日本細菌学雑誌, 56(1)(抄録集) : p114、2001

福島和雄、吉尾雅子、竹内武男ら:
Mutans streptococci の検出・算定用に最良の選択培地 -MSB 改良培地-、
歯基礎誌 43(5) (抄録集) : p160(608)。2001.

篠崎紀子、竹内武男、福島和雄ら:
歯垢懸濁液における *S.mutans* 菌数レベルと GTF - B 存在量との相関について、
歯基礎誌 43(5) (抄録集) : p161(609)。2001.

小堀樹一郎、牛澤幸司、篠崎紀子、福島和雄:
歯垢・唾液中の主要う蝕リスク因子 |GTF-B| 量を直接測定する ELISA 系の構築、
歯基礎誌 43(5) (抄録集) : p115(558)。2001.

岡田珠美、池見宅司、福島和雄ら:
う蝕原因菌除去法に関する基礎研究、
日本歯科保存学会誌, 44(秋季特別号)(抄録集): p70、2000.

- 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
- 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，東北大歯誌 21(1): in press, 2002.
- 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。
- 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。
- 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，歯基礎誌 43(5): 532, 2001.
- 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，歯基礎誌 43(5): 603, 2001.
- 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，歯基礎誌 43(5): 607, 2001.
- 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，歯基礎誌 43(5): 606, 2001.
- 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，歯基礎誌 43(5): 614, 2001.
- 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。
- Matsuyama J., Sato T., Takahashi N.:
Comparison between PCR-RFLP and biochemical analyses for identification of *Actinomyces*. 第79回 IADR, J Dent Res 80 (Special Issue): 766, 2001.
- Kakuta H., Iwami Y., Mayanagi H., Takahashi N.:
Xylitol inhibition on acid production from various sugars by *Streptococcus mutans*. 第79回 IADR, J Dent Res 80 (Special Issue): 723, 2001.
- Sato T., Matsuyama J., Takahashi N.:
Rapid identification of oral mutans streptococci by 16S rRNA genes PCR-RFLP. 第79回 IADR, J Dent Res 80 (Special Issue): 722, 2001.
- Miyasawa H., Iwami Y., Sato T., Mayanagi H., Takahashi N.:
pH-dependent xylitol-uptake and subsequent glycolysis-inhibition in *Streptococcus mutans*. 第79回 IADR, J Dent Res 80 (Special Issue): 722, 2001.
- Takahashi N., Sato T.:
Utilization of dipeptides by periodontal pathogens, *Porphyromonas*, *Prevotella* and *Fusobacterium*. 第79回 IADR, J Dent Res 80 (Special Issue): 677, 2001.
- 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，東北大歯誌 20(2): 115, 2001.
- 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，小児歯誌 39(2): 333, 2001.
- 鈴木欣孝、渡部 茂、五十嵐公英：
口腔内各部位における pH の経時的測定。第50回日本口腔衛生学会。
- Suzuki, Y., and Watanabe, S.:
The Influence of Saliva on pH Changes in the Mouth. 80th IADR.

3. 書籍・雑誌

- 松久保 隆、吉野浩一
8020 地域歯科保健活動の現場から、
成人（職域）歯科保健における口腔保健指標: pp.265-273, HYORON, 東京 2001.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許申請

特願 2001 - 118483

発明の名称：う蝕性リスクの判定方法及び判定薬、発明者：小堀樹一郎、牛澤幸司、福島和雄

特願 2001 - 393970

発明の名称：臨床細菌検査方法

発明者：平田広一郎、羽生尚宏、福島和雄

厚生科学研究費補助金（医療技術評価総合研究事業）
低・非・抗う蝕性食品の検定評価法の確立と
その応用・普及に関する研究
（H12-医療-005）

分担研究報告書

歯垢細菌の培養による非う蝕性の評価

分担研究者：星野 悦郎・新潟大学・教授
松山 順子・新潟大学・助手

研究要旨

食品のう蝕誘発性の評価のために、口腔細菌と甘味食品の水溶液を添加した培地で培養し、増殖、pH 低下、あるいは代謝産物を検討することで、*in vivo* の系としてう蝕病原性の評価、特に非う蝕性の食品の評価に導入できるように検討した。口腔細菌が栄養基質として利用し得ない素材、あるいは食品は「非う蝕性」として評価しうることが示された。

A. 研究目的

代用糖のう蝕誘発性の評価のために、従来のヒト口腔内での測定による *in vivo* での評価に代えて、細菌学的手法を用いた *in vitro* の評価の可能性を探る。

B. 研究方法

被検食品の水溶液を Peptone + Yeast-Extract を主成分とした PY 基礎培地に混合し、歯垢細菌を培養する。また、血液加 PY 寒天培地を利用した。

歯垢細菌による被検食品の利用能を、細菌増殖（液体培地での吸光度の上昇、固形培地でのコロニー径の増大）、培養の pH 低下、最終代謝産物の種類と量の変化）を測定することで、被検食品のう蝕誘発性を評価した。

C. 研究結果と考察

内臓電極法など、歯垢 pH の測定で、陰性対照とされるソルビトールも、歯垢細菌の培養に栄養基質として添加した場合、細菌の増殖が認められる。ソルビトールを利用できる細菌菌種が歯垢中に生育していること、また同時に、添加したソルビトールに関係なく、基礎培地で生育可能な細菌菌種も多いことを示している。対照としてソルビトールを添加しない PY 培地のみで培養した場合、増殖速度が遅く、また、培養の pH 低下が少ないが、これに比較ベソルビトール存在下では細菌増殖による培地の吸光度が強いこと、pH の中程度の低下が見られた。被験者を代えて採取する歯垢を違えても、同様であった。また、最終代謝産物を比

較すると、ソルビトール (-) では、芳香族脂肪酸等のアミノ酸代謝の結果と思われる産物が見られるがソルビトール (+) では乳酸やギ酸、酢酸等の代謝産物が中心となっていた。

ソルビトールより酸産生源となりにくいキシリトールの場合、一人の被験者を除いて、対照の PY 培地のみの場合より増殖したり、pH が低下することはなかった。その例外も、繰り返し試験した場合、再現性は無かった。当然、最終代謝産物にも差が認められなかった。

内臓電極法など、歯垢 pH の測定で、陽性対照とされるスクロースの場合、全例で増殖促進と培養の pH 4 レベルへの低下が認められた。また、最終代謝産物は、乳酸やギ酸、酢酸等で、大量に産生されていた。

綿羊血液を 4% の割合で加えた PY-血液寒天培地上のコロニーを観察すると、対照培地上のコロニーに比して、被検糖質を加えた培地では、この被検糖質を利用していると思われる細菌株のコロニーは早く、大きく成長しており、利用しない細菌株との鑑別は比較的容易であった。

D. 考察

本研究班には、「非う蝕性」食品に関して、その成分分析（あるいは、提示資料）により、その素材が酸産生原性で無いことが証明されているものは、書類審査で「非う蝕性」性状を認定しようとする意見がある。食品の場合、その素材の中には由来の不明な成分が含まれることも稀ではない。このような場合を含めて、歯垢細菌が利用しない事を、本研究のようなシステムで確認することが可能と思われた。

本研究の結果からは、ソルビトールの様なわずかな

数の口腔細菌に利用される糖質、素材の評価には適切でない可能性があるが、増殖支持能、あるいは代謝産物の測定により、例えばソルビトールを陰性対照として利用することにより評価が可能であるかもしれない。このような「低う蝕性」の食品に対しては、昨年度の我々の研究による、口腔細菌をそのまま利用した人工バイオフィルムを使用し、被検食品を与えた後の pH を蛍光測定するシステムが有効と思われる。また、「低う蝕性」食品に対しては、従来の口腔内 pH 測定等を併用して確実に「低う蝕性」であることを複数の測定系で確認することが重要であろう。

近年では、人工甘味料や砂糖以外の自然甘味料の様な、歯垢内での酸産生のメカニズムに関連する物質以外にも、「う蝕予防に有効」とする食品が出現している。歯垢細菌の糖代謝を抑えたり、その付着や増殖を抑えたりと歯垢細菌に作用するもの、脱灰歯質に働いて再石灰化を促すものなど歯質に作用するもの、等がある。今後も、従来の概念とは違った機構で、「う蝕に有効である」をうたい文句とする食品の出現が考えられる。本研究の結果は、このような食品の1部の評価にも有効であろうと思われる。

なお、繰り返し培養を行うと、はじめから歯垢内にいた被検物質利用可能菌や酵素誘導によって利用可能になった細菌種などが選択され、その増殖が経代培養

によって増強される。このような細菌の分析によって、その食品の口腔細菌による適応による効果の低下や無効化を推定することができる。

今後、種々の健康に関わる機能食品の開発、提案があると思われるが、少なくともう蝕誘発性でないベースが必要と思われ、このような検定が有用と思われる。

E. 結論

歯垢細菌の培養試験という、極めて単純な、簡単な評価法によって、特に、「非う蝕性」食品の認定が可能であろうと思われた。

F. 健康危険情報

特にない。

G. 研究発表

特にない。

2. 学会発表

特にない。

H. 知的財産権の出願・登録状況

特にない。

厚生科学研究費補助金（医療技術評価総合研究事業）
低・非・抗う蝕性食品の検定評価法の確立と
その応用・普及に関する研究
(H12-医療-005)

分担研究報告書

キシリトールなどの糖アルコールの持つ歯垢細菌糖代謝阻害作用
—とくにミュータンスレンサ球菌のグルコース以外の糖代謝活性に対する
キシリトールの阻害効果について—

分担研究者：高橋 信博・東北大学・教授

研究要旨

キシリトールは、従来から知られていたグルコース代謝阻害に加え、ガラクトース、スクロース、マルトース、ラクトースの代謝を阻害する事が明らかになった。しかし、フルクトースの代謝は阻害されなかった。キシリトールによって糖代謝阻害が起こる場合、キシリトール 5-リン酸が菌体内に蓄積していた。

A. 研究目的

前年度の研究から、キシリトールはミュータンスレンサ球菌のグルコースからの酸産生を阻害し、その阻害の程度は中性付近の pH で大きく、酸性 pH では小さい傾向にあることが明らかになった。また、キシリトールによる酸産生阻害に伴い、乳酸主体から蟻酸・酢酸主体への代謝産物のシフトが生ずることがわかった。これらの現象の原因として、(1)中性 pH で効率的に菌体内に蓄積したキシリトール 5-リン酸が解糖系上流の代謝酵素を阻害し、解糖系全体の代謝速度を低下させること、(2)これに伴う解糖系上流の代謝中間体の減少、とくに乳酸脱水素酵素の活性発現に必須であるフルクトース 1,6-二リン酸の減少が乳酸脱水素酵素活性を低下させ、結果として乳酸産生が減少し、乳酸の代替最終産物である蟻酸・酢酸の割合が増加したことが生化学的解析から推測された。

しかし、ヒトが日常的に頻繁に摂取する糖質はグルコースに限らない。そこで本年度は、ミュータンスレンサ球菌のグルコース以外の糖質（フルクトース、ガラクトース、スクロース、マルトース、ラクトース）からの酸産生に対する、キシリトールの阻害効果について検討した。

B. 研究方法

(1) 使用菌株と細菌の増殖：

齲蝕誘発性の高い代表的歯垢細菌としてミュー

タンスレンサ球菌 (*Streptococcus mutans* NCTC 10449) を用いた。細菌は 0.2% の糖を含むペプトン培地で嫌気培養 (N₂ 80%, H₂ 10%, CO₂ 10%) した。糖として、グルコース、フルクトース、ガラクトース、スクロース、マルトース、ラクトースの 6 種を用いた。以下の実験は特に断らない限り全て嫌気ボックス内 (N₂ 90%, H₂ 10%) で行った。

(2) 細菌の酸産生活性の測定と菌体内キシリトール 5-リン酸の抽出：

対数増殖期の早期で細菌を集め、150 mM KCl と 5 mM MgCl₂ を含む 2 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.0) で 2 回洗浄後、同じ緩衝液に懸濁した。

細菌懸濁液を pH 電位差滴定計にセットし 4 分間 37℃ で予備振蕩後、糖溶液 (終濃度 10 mM) あるいはこれにキシリトール (終濃度 60 mM) を添加した糖・キシリトール混合溶液を加え、細菌が産生する酸量をモニターした。

4 分間代謝させた後、反応液をフィルターで濾過し (孔径 0.22 μm; Millex GV, Millipore) 細菌をフィルター膜上に捕捉した。直ちにそのフィルター膜に上記緩衝液を通して菌を洗い、次いで 0.6N 過塩素酸を通して菌体内に含まれるキシリトール 5-リン酸を抽出した。抽出液を中和後、以下の方法でキシリトール 5-リン酸を定量した。

(3) キシリトール 5-リン酸の定量：

キシリトール 5-リン酸は大気下、37°C で分光光度計を用いて定量した。酵素活性測定系は、1.1 mM NAD、5 mM MgCl₂、0.1 mM EDTA、50 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.5) および抽出液を含む。反応は 1.4 U sorbitol dehydrogenase を加えることで開始し、測定系に混在するキシリトールを完全に酸化した後、43 U alkaline phosphatase を加えた。この alkaline phosphatase の添加に伴う 340 nm での吸光度の増加をキシリトール 5-リン酸濃度とした。

(4) キシリトール: Phosphoenolpyruvate phosphotransferase system (キシリトール: PEP-PTS) 活性の測定：

上記の凍結菌体を溶かし、660 nm における濁度が 5 になるように 150 mM KCl と 5 mM MgCl₂ を含む 2 mM リン酸緩衝液 (pH 7.0) に懸濁した。これに 1/100 体積のトルエンを加え、1 分間激しく攪拌した。遠心後上清を捨て、これに 1/10 体積の上記リン酸カリウム緩衝液を加え懸濁しトルエン処理菌とした。

PEP-PTS 活性は大気下、37°C で分光光度計を用いて測定した。酵素活性測定系 (1 ml) は、0.1 mM NADH、10 mM phosphoenolpyruvate、10 U lactate dehydrogenase、100 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.0)、5 μ l トルエン処理菌および 60 mM キシリトールを含む。反応はキシリトール溶液の添加で開始させ、その時の 340 nm での吸光度の減少をキシリトール: PEP-PTS 活性とした。

C. 研究結果

(1) キシリトールは、グルコース代謝に加えガラクトース、スクロース、マルトース、ラクトース代謝を阻害するが、フルクトース代謝は阻害しない：

6 種の糖で増殖した *S. mutans* NCTC 10449 は全て、グルコース、フルクトース、スクロース、マルトースを代謝し酸を産生した。キシリトールはフルクトース代謝を除く全ての代謝を阻害し、その阻害率は 17–83% であった。ガラクトースあるいはラクトースで増殖した菌だけがガラクトースとラクトースを代謝し、キシリトールはそのいずれの代謝も阻害した (阻害率 12–46%)。

(2) キシリトールの糖代謝阻害に伴い、キシリトール 5-リン酸が菌体内に蓄積する：

キシリトールの代謝阻害に伴い、*S. mutans* NCTC10449 の菌体内にはキシリトール 5-リン酸が蓄積していた (3.0–4.8 nmol per mg of

cells)。一方、阻害が見られなかったフルクトース代謝の場合の菌体内キシリトール 5-リン酸濃度は低かった (0.7–1.3 nmol per mg of cells)。

グルコース、フルクトース、ガラクトース、スクロース、マルトースおよびラクトースで増殖した菌はすべてキシリトール: PEP-PTS 活性を持っていた。

D. 考察および結論

以上のことから、キシリトールは、ミュータンスレンサ球菌のグルコース代謝に加えガラクトース、スクロース、マルトース、ラクトース代謝を阻害することが明らかになった。ミュータンスレンサ球菌の糖代謝はキシリトールの中間代謝産物であるキシリトール-5-リン酸で阻害されると報告されている。ミュータンスレンサ球菌は xyliitol: PEP-PTS 活性を持っていたことから、キシリトールをリン酸化しキシリトール 5-リン酸として菌体内に取り込んで蓄積し、その結果、糖代謝を阻害したものと考えられる。

一方、キシリトールは、ミュータンスレンサ球菌のフルクトース代謝を阻害しなかった。これは、キシリトール 5-リン酸の菌体内蓄積量が少なかったことが一因と考えられる。

フルクトースで増殖した菌はキシリトール: PEP-PTS 活性を持つにもかかわらずキシリトール 5-リン酸の菌体内蓄積量が少ない。これは一見矛盾した結果であるが、Trahan (Int Dent J, 45: 77-92, 1995) が推測しているように、ミュータンスレンサ球菌のキシリトールリン酸化活性はフルクトース: PEP-PTS 酵素によってもたらされると考えることで説明できる。すなわち、ミュータンスレンサ球菌のフルクトース: PEP-PTS 酵素はフルクトースを基質としてリン酸化するだけでなく、キシリトールをも基質としてリン酸化してしまうという性質を持つ。フルクトース以外の糖とキシリトールの混合液をミュータンスレンサ球菌に加えた場合は、キシリトールはフルクトース: PEP-PTS を介してリン酸化されキシリトール 5-リン酸となって菌体内に蓄積する。しかし、フルクトースとキシリトールの混合物の場合は、フルクトース: PEP-PTS をめぐってフルクトースとキシリトールが競合し、基質親和性のより高いフルクトースがフルクトース: PEP-PTS を占有し、その結果、キシリトール 5-リン酸の菌体内蓄積量は低くなると考えられる。

しかし、今回の結果で見落としてはならないことは、キシリトール阻害効果が全く見られなかったフルクトースとキシリトールの混合物の場合でも、キシリトール 5-リン酸は少ないながらも菌体内に蓄積されていたという事実である。これはフルクトース代謝酵素系のキシリトール 5-リン酸に対する感受性がその他の糖代謝酵素系よりも低い

ことを示しているのかもしれない、今後さらなる検討を要すると思われる。

F. 健康危険情報
特にない。

G. 研究発表

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) 宮澤はるみ、高橋信博、佐藤拓一、真柳秀昭、山田正。(2000)

Xylitol による Mutans streptococci の酸産生阻害効果：増殖条件と pH の影響。

東北大歯誌 19: 80.

2) 佐藤拓一、宮澤はるみ、高橋信博。(2000)

Multiplex-PCR による歯周病関連細菌の迅速同定。
東北大歯誌 19: 81.

3) Miyasawa H, Takahashi N, Sato T, Iwami Y, Mayanagi H, Yamada T. (2000) Growth phase- and pH-dependent xylitol inhibition on acid production of *Streptococcus mutans*.

J Dent Res 79: 224.

4) Takahashi N, Sato T, Yamada T. (2000) Metabolic pathways for cytotoxic end-products formation by *Porphyromonas gingivalis*. J Dent Res 79: 394.

5) Sato T, Matsuyama J, Takahashi N. (2000) Rapid detection of periodontal pathogens by multiplex PCR.

J Dent Res 79: 396.

6) 阿部昌子、玉澤佳純、阿部一彦、高橋信博、五十嵐公英、渡辺 誠、山田 正。(2000) 食品及び代用糖からの酸産生測定法。

日歯医師会誌 52: 1352.

7) 高橋信博。(2000)

最新研究紹介：エコシステムとしてのデンタルプラークー生化学の視点からー

東北大歯誌 19: 85.

8) 宮澤はるみ、高橋信博、岩見憲道、佐藤拓一、真柳秀昭。(2000)

Xylitol によるミュータンスレンサ球菌酸産生阻害とそれに及ぼす pH の影響。

歯基礎誌 42:428.

9) 高橋信博、佐藤拓一。(2000)

歯周病関連菌 *Porphyromonas gingivalis* はジペプチドを効率的に利用する。

歯基礎誌 42:498.

10) 岩見憲道、佐藤拓一、宮澤はるみ、阿部昌子、高橋信博、真柳秀昭。(2000)

口腔レンサ球菌の糖代謝に伴う pH 低下時の菌体内での酸産生と菌体外への酸排出。

歯基礎誌 42:508.

11) 佐藤拓一、胡錦平、松山順子、高橋信博。

(2000) 歯周病関連グラム陰性桿菌の PCR-RFLP による迅速同定法。

歯基礎誌 42:511.

3. 書籍・雑誌

1) 高橋信博。

歯肉縁下プラークという生態系。先端医療シリーズ・歯科医学2 歯周病ー新しい治療を求めて。岡田宏、石川烈、村山洋二(監修)

先端医療技術研究所, 230-238 (2000).

2) 高橋信博。

Acidogenicity and acid tolerance of non-mutans streptococci. Proceedings for 1st

Workshop of
Cariology Today in Japan. 神原正樹（編集）.
永末書店, 25-30 (2000).

H. 知的財産権の出願・登録状況
特にない

厚生科学研究費補助金（医療技術評価総合研究事業）
低・非・抗う蝕性食品の検定評価法の確立と
その応用・普及に関する研究
(H12-医療-005)

分担研究報告書

In vitro における食品のう蝕原性評価技術の確立

分担研究者：今井 奨・国立感染症研究所・主任研究員
(西沢 俊樹・国立感染症研究所・室長)

研究概要

昨年度に引き続いて、う蝕誘発性評価のモデルとしての人工口腔装置の性状を、う蝕原性細菌である *Streptococcus mutans*、*Streptococcus sobrinus* を用いて検討した。また、本装置を食品や甘味料などのう蝕誘発性評価に応用可能かどうかをキャンデー抽出液を試料とし、*S. mutans* を用いて検討した。スクロース含有キャンデー抽出液の場合には、人工バイオフィーム形成、pH 低下、エナメル質脱灰のいずれも顕著であったが、シュガーレスキャンデー抽出液の場合には、人工バイオフィーム形成、pH 低下、エナメル質脱灰ともに極く軽微であり、これらの結果はう蝕誘発性評価モデルとしての人工口腔装置の有用性を示唆するものであった。

A. 研究目的

現在、食品のう蝕原性を単独で評価できる万能の方法は国外にも国内にも存在しないが、う蝕発生過程の一側面を対象とした複数の in vitro および in vivo の方法は存在する。ヒト被験者や動物を用いた 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。そこで、in vitro の方法で、できるだけ in vivo の結果を反映できるような方法を考案できれば上記制約の解決に近づくことが期待される。本研究は人工プラーク形成量、プラーク下 pH 値、エナメル質脱灰度を定量できるような人工口腔装置を試作し、食品のう蝕原性評価系としての有用性を検討することを目的とする。

B. 研究方法

キャンデー抽出液の調製：スクロース含有キャンデーおよびシュガーレスキャンデーの重量をそれぞれ測定し、10倍重量の60℃の温水に溶解した。0.22 μm のフィルターでろ過滅菌し試料溶液とした。

人工口腔装置の稼働：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、ウォータージャケットで包まれた装置内部を37℃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枚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、500nmにおける濁度が2.0の細菌懸濁液、PBSを連続的に滴下した。糖質として1～5%スクロースを、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15～20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ームを0.5N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500nm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

S. mutans MT8148 懸濁液または *S. sobrinus* 6715 懸濁液と最終濃度2%のスクロ

ース含有ハートインフュージョン培地を滴下して、人工バイオフィーム形成、人工バイオフィーム直下の pH 値の推移、エナメル質脱灰度を調べた。*S. sobrinus* 6715 株の場合、滴下後約 8 時間で pH が低下し始め、約 11 時間で pH 5.5 になり、18 時間後には pH 4.42 になった。一方、*S. mutans* MT8148 株の場合、滴下後約 10 時間で pH が低下し始め、約 14 時間で pH 5.5 になり、21 時間後には pH 4.66 に低下した。電極、ホルダー、歯片上にはほぼ一様に菌体、グルカンからなる人工バイオフィームが形成された。歯片上に固着した菌体量、非水溶性グルカン量、エナメル歯片の硬度変化 (ΔH) について *S. sobrinus* と *S. mutans* で比較すると、非水溶性グルカン量 ($\mu\text{g}/\text{mm}^2$) は *S. sobrinus* と *S. mutans* でそれぞれ 0.64 ± 0.22 および 1.27 ± 0.35 、菌体量 ($\text{OD}_{500}/\text{mm}^2$) はそれぞれ 0.006 ± 0.002 および 0.014 ± 0.001 、エナメル質の硬度変化 (ΔH) はそれぞれ 201.25 ± 2.63 および 255.75 ± 17.59 であった。

一方、本装置を食品や甘味料などのう蝕誘発性評価に応用可能かどうかをスクロース含有キャンデーとシュガーレスキャンデーについてそれらの抽出液を試料とし、*S. mutans* を用いて比較検討した。スクロース含有キャンデー抽出液の場合には、人工バイオフィーム形成に伴って pH 低下が約 9 時間後に始まり、16 時間後に pH 5.5 に低下し、20 時間で 4.8 となった。人工バイオフィーム形成量、エナメル質脱灰度のいずれも顕著であったが、シュガーレスキャンデー抽出液の場合には、pH は 20 時間にわたってほとんど変化せず、人工バイオフィーム形成量、エナメル質脱灰度ともに極く軽微であった。

D. 考察

食品あるいは食品素材のう蝕原性を評価するための *in vivo* の方法には動物試験、ヒト被験者による pH 測定試験、ヒト被験者による Intraoral cariogenicity test (ICT) とがあり、*in vitro* の方法と併用されているのが現状である。*in vitro* および *in vivo* の方法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による *in vivo* の方法を凌ぐ *in vitro* の方法が今のところ存在しない。*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、再石灰化促進物質のような抗う蝕活性物質を含む機能性食品も創出され始めている。今後、さらに新しい働きをもった機能性食品が創出されることも想定される。将来的には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。

本実験で用いた人工口腔装置は比較的簡単な構造をしているが、人工バイオフィーム量、バイオフィーム下 pH、エナメル質硬度という、う蝕誘発と深い関わりをもつ 3 つのパラメーターを同時に測定、ないし定量することが可能な装置である。スクロース存在下で *S. mutans* または *S. sobrinus* 懸濁液を滴下することにより、電極表面で非水溶性グルカンが合成されて菌体の固着が始まり、それに伴って pH の低下が始まる。電極と同一微小環境下にあるエナメル質表面でも同様のことが起こり次第に人工バイオフィームが形成されていくと考えられる。人工バイオフィームの下ではミュータンスレンサ球菌による酸産生が起こり、その酸でエナメル質は脱灰され硬度の低下をきたす。今回の試験でも *S. sobrinus* 6715 株、*S. mutans* MT8148 株ともにエナメル質表面に固着して pH 低下をきたしエナメル質を脱灰している。この結果はそれぞれの標準株である *S. sobrinus* ATCC33478 および *S. mutans* ATCC25175 がともにエナメル質表面に固着して pH 低下をきたしエナメル質の脱灰を引きおこした従来の結果と一致している。

一方、食品のう蝕誘発性を本装置で評価できるかをキャンディーで検討した。スクロース含有のど飴とシュガーレスキャンディーの温水抽出液を用いて検討した結果、シュガーレスキャンディーでは、pH は 20 時間にわたってほとんど変化せず、人工バイオフィーム形成量、エナメル質脱灰度ともに極く軽微であった。このシュガーレスキャンディーはヒト被験者による電極内蔵法でも摂取後 30 分の歯垢 pH が 5.7 以下に低下しないことが分かっていることから、本装置を用いた結果が *in vitro* の結果を反映していると示唆された。

E. 結論

う蝕誘発性評価のモデルとしての人工口腔装置の性状を、う蝕原性細菌である *Streptococcus mutans*、*Streptococcus sobrinus* を用いて検討した結果、両菌ともにエナメル質表面に固着して人工バイオフィームを形成し、pH 低下をきたしエナメル質を脱灰した。また、本装置を食品や甘味料などのう蝕誘発性評価に応用可能かどうかをキャンデー抽出液を試料とし、*S. mutans* を用いて検討した結果、スクロース含有キャンデー抽出液の場合には、人工バイオフィーム形成、pH 低下、

エナメル質脱灰のいずれも顕著であったが、シュガーレスキャンデー抽出液の場合には、人工バイオフィーム形成、pH 低下、エナメル質脱灰ともに極く軽微であり、これらの結果はう蝕誘発性評価モデルとしての人工口腔装置の有用性を示唆している。

F. 健康危険情報
特にない。

G. 研究発表

1. 論文発表
特にない。

2. 学会発表
特にない。

H. 知的財産権の出願・登録状況
特にない。

厚生科学研究費補助金（医療技術評価総合研究事業）
低・非・抗う蝕性食品の検定評価法の確立と
その応用・普及に関する研究
（H12-医療-005）

分担研究報告書

保育園児の父母における齲蝕に関する食品表示の意識調査

分担研究者：

松久保 隆・東京歯科大学・教授
兼 平 孝・北海道大学・講師
石井 拓男・東京歯科大学・教授

研究協力者：

小林義昌・東京歯科大学・衛生学講座
櫻井みわ・東京歯科大学・衛生学講座
小林佳代・東京歯科大学・社会歯科学研究室
大久保留加・北海道大学・口腔健康科学講座
森田 学・北海道大学・口腔健康科学講座

研究要旨：

東京都と札幌市の乳幼児を持つ父母を対象に、齲蝕に関する食品表示に対する意識や表示の理解度などについて調査した。また、齲蝕の有無についても調査票で調べ、表示に対する意識との関連性についても検討した。

含有甘味料に関する表示（「シュガーレス」「砂糖不使用」など）のある食品に対する関心は、子どもに齲蝕がある父母・ない父母ともに、70%以上が「とても関心がある」「関心がある」、すると回答した。また、齲蝕に関する食品表示で、「マーク」や「ことば」を必要だと思うかという設問に対しては、「両方必要」「マークのみ」「ことばのみ」といういずれかは必要であると回答した父母は、子どもの齲蝕の有無にかかわらず90%以上であった。この「マーク」や「ことば」を「信用している」「少し信用している」父母は80%に近い。

A. 研究目的

わが国では、いろいろな目的を持つ食品の表示が多く存在する^{1)~4)}。その中に、齲蝕に関する食品表示があり、明確な根拠を持った表示から根拠の曖昧な表示まで多岐にわたっている⁵⁾。そこで本研究は、乳幼児を持つ父母を対象に、齲蝕に関する食品表示に対する意識や表示の理解度などについて調査した。また、齲蝕の有無についても調査票で調べ、表示に対する意識との関連性についても検討することを目的とした。

B. 方法

調査対象者は、東京都と札幌市の保育園の0歳児から5歳児（東京都：総園児数143名・世帯数124世帯、札幌市：1,240名・世帯数1,042世帯）までの乳幼児を持つ父母を対象とした。調査票の回収率は、東京70.6%（101名）、札幌市67.5%（703名）であった。調査項目は、父母・園児の齲蝕の有無について、健康情報の重要性に関する設問、食品の齲蝕に関する表示のに関する設問など27項目について、自己記入法で行った。有意差の検定には、 χ^2 検定（Windows版SASシステムVer 8.1）を用いた。

C. 結果と考察

東京都と札幌市の対象者について、子どもの齲