

蝕の有無によって分けた時の応答を図1～6に示した。図1に「かかりつけ医師・歯科医師からの保健情報の重要性に対する応答」を示した。子どもに齲蝕がある父母・ない父母ともに、「非常に重要」「重要」と回答した父母は80%を超えていた。図2に子どものお菓子を購入する際「菌に安心」「むし菌になりにくい」などの表示を参考にしているかの設問に対する応答を示した。子どもに齲蝕のある父母の方が、子どもに齲蝕がない父母よりも有意に「参考にしている」「ときどき参考にしている」と回答した ( $p<0.05$ )。図3に「むし菌になりにくいお菓子」があれば子どもに食べさせたいかという設問に対する応答を示した。子どもに齲蝕のある父母の方が、ない父母よりも明らかに「食べさせたい」と答えた ( $p<0.05$ )。図4に砂糖に関する表示(「シュガーレス」「砂糖不使用」など)が書いてある食品に関心があるかとの設問に対する応答を示した。子どもに齲蝕がある・なしに関わらず、70%前後の父母が「とても関心がある」「関心がある」と回答した。図5に、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する応答を示した。「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%以上の父母が必要と回答した。図6にこれらの「マーク」や「ことば」を信用しているかの設問に対する応答を示した。子どもに齲蝕の有無にかかわらず、80%近くの父母が「信用している」「少し信用している」と回答した。

#### D. 考察

本研究は、乳幼児をもつ保護者は齲蝕に関する食品の表示に対する関心と期待が大きく、とくに子どもに齲蝕のある者の関心が高いことを示している。また、健康情報について「かかりつけ医師

や歯科医師からの情報」を重要とする父母が90%近くに達している。これらの結果は、歯科医師は、歯に関する食品の表示の正確な情報<sup>2~4)</sup>をもった上で患者と接する必要があることを示している。そして、食品メーカーにはむし菌に関する表示を食品に示す場合には、歯科医学的に明確な根拠<sup>2~4)</sup>に従って行うべきだと考えられた。

本研究は、厚生科学研究費補助金(医療技術評価総合事業)(H12-医療-005)によった。

#### 文献

- 1) 国民生活センター:キシリトールを使用した菓子, たしかな目, 149:6-18, 1998.
- 2) 松久保隆:非う蝕誘発性食品のう蝕予防プログラムにおける位置づけ, 日本歯科評論, 668:63-75, 1998.
- 3) 松久保隆:非齲蝕誘発性甘味料の歯科医学的特性:「歯を守る」甘味料(高添一郎編), TP Japan Inc., 東京, 1997.
- 4) 松久保隆, 櫻井みわ, 高添一郎:非齲蝕誘発性に関わる食品表示:「歯を守る」甘味料(高添一郎編), TP Japan Inc., 東京, 1997.

#### 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

ICT(Intra-oral cariogenicity test)を用いての CPP-ACP ガムの再石灰化能評価

分担研究者：飯島 洋一・長崎大学・助教授

研究要旨

CPP-ACP を配合した市販ガムの再石灰化能の程度を ICT を用いて明らかにした。リカルデント(CPP-ACP の複合体)のう蝕予防メカニズムの本質は、第1に口腔内環境を過飽和状態に近づける機能による歯表面での脱灰抑制。第2に表層下脱灰病変がある場合、再石灰化促進機能と考えられる。

A. 研究目的

CPP-ACP (Casein phosphopeptide-amorphous calcium phosphate) は、ヒトにおいてもう蝕予防効果をもたらすと考えられる特性を有することが報告されている。実験動物<sup>1)</sup>におけるう蝕活動性の低下、*in vitro*<sup>2)</sup>での表層下脱灰病変の再石灰化、さらに、CPP-ACP 配合ガムを用いての *in situ*<sup>3, 4)</sup>での再石灰化能に関する報告である。わが国においても CPP-ACP 配合ガムは市販（リカルデント<sup>TM</sup>）されており、再石灰化を増強する CPP-ACP を配合しているので歯を丈夫で健康にすると表示されている。効果に関しては、一日に4枚を、1枚あたり20分間を目安に2週間噛むとしている。

昨年の報告で ICT モデル実験の特徴について検討し、日常の食品摂取形態で、ヒト・エナメル質を用いて、食品の脱灰・再石灰化能の評価が可能であることを指摘した。今回は唾液と十分に接触することが可能なように試作した ICT 装置を用いて、CPP-ACP 配合ガムの再石灰化能の評価を試みた。

本研究の目的は、CPP-ACP を配合した市販ガムの再石灰化能の程度を ICT を用いて明らかにすることである。

B. 研究方法

ICT 装置：歯質試料の着脱が可能で、ICT 装置を試作した(図1)。下顎小臼歯から第一大臼歯の根尖方向の付着歯肉から歯肉類移行部にかけて2個の歯質試料(各4 x 5 mm 前後)が装着できる ICT

装置である。今回は不織布で被覆した積極的ブラーク付着条件下と、被覆しない試料条件で検討した。ICT 装置は3度の食事時間中のみ外すこととし(湿らせた専用容器に保管)、就寝中も装着し口腔内環境に保持した。

エナメル質試料：エナメル質試料は第三大臼歯由来のエナメル質の表層を400 $\mu$ m 削除し、鏡面仕上げを行った後、3日間 pH4.5 の脱灰液(0.1 M 乳酸緩衝液, Ca 3 mM, P 1.8 mM 含有)で脱灰病変を形成後、水洗・乾燥し装置に装着した。試料はステイキーワックスで床型装置に形成した凹部(5 x 7 x 2 mm 前後のくぼみ)に固定されている。

CPP-ACP 配合ガムの摂取方法と量：被験者は唾液の分泌や、口腔内細菌に影響を与える薬物の服用のない4名の健康成人(男2, 女2)である。CPP-ACP 配合ガム(以下; 配合ガム)と CPP-ACP を配合していないプラセボーガム(以下; プラセボー; 甘味料の種類, 量は配合ガムと同じ)を用意した。摂取の順番を、配合ガムにプラセボー, プラセボーに配合ガムの2群とし、男女各1名をそれぞれの群に割り当てた。

図1 ICT 口腔内装置



2個の歯質試料の装着が可能(前方は不織布で被覆しブラーク蓄積環境, 後方は被覆していない)

摂取量はいずれのガムとも、表示されている方法に準じた。一日に4枚を、1枚あたり20分間を目安に2週間噛むこととした。食事、間食、嗜好飲料の摂取制限は行わなかった。フッ化物配合歯磨剤の1日2回以上使用した。

再石灰化の評価：マイクロラジオグラフからミネラルの喪失量、回復量、ミネラル分布を定量評価した<sup>5)</sup>。今回の Intra-oral cariogenicity test は pilot study であり、例数の少なさも統計的評価は行わずに傾向の把握に努めた。

唾液分泌量の測定：市販の CPP-ACP 配合ガム(リカルデント™)を5分間咀嚼して刺激唾液量 (ml/min) を測定した。ならびに、5分間の安静唾液量も計測した。

表1 安静唾液量と刺激唾液量

被験者数 (N)	安静唾液量 (ml/min)	刺激唾液量 (ml/min)
4	0.3 ± 0.2	2.5 ± 0.7

### C. 研究結果

唾液分泌量は5分間の刺激唾液量は安静唾液量に比較して約8倍高い値を示した(表1)。

CPP-ACP 配合ガム(リカルデント™)による再石灰化の発現(ΔZの減少)が認められた。しかも、placebo ガムよりも再石灰化度が高い傾向を認めた(表2)。ミネラルの分布状態からは、いずれのガムともベースライン時の脱灰病変の全層に及ぶミネラルの回復状況であった(図2, 3)。

プラーク存在下では表2の数字データには両者間で著しい差は認められないが分布の傾向は異なっていた。すなわち、CPP-ACP 配合ガムは表層約100μmまでベースライン時の脱灰病変よりも高いミネラルを維持していた。一方、placebo ガムは約100μmまでベースライン時の脱灰病変よりも低いミネラル分布であった(図2, 3)。

### D. 考察

CPP-ACP 配合ガム(リカルデント™)による再石灰化の発現が確認された理由は、表層下脱灰病変内部でのカルシウムやリンの濃度の持続的増加と維持が CPP-ACP 配合ガムによってもたらされた結果と考えられる。しかも、フッ化物配合歯磨剤を併用している効果が加味されている。

1%(W/V)のCPPは、pH7.0の環境では60mMのカルシウムと36mMのリンをCPP-ACPの複合体として安定化させることが知られている<sup>2)</sup>。唾液は本来、ハイドロキシアパタイトに対して過飽和にカルシウムとリンを含んでいるが、その濃度は最も高い顎下腺の刺激唾液でカルシウムは2.4mM、リン酸塩は5.5mM<sup>6)</sup>である。6倍以上の共通イオン濃度は、口腔内環境のpHに依存的ではあるが、歯面周囲の限局した唾液あるいは歯垢環境を過飽和状態に近づけるのに貢献していることが十分に考えられる。

プラーク存在下のミネラルの分布状態は、そのようなメカニズム発現の可能性を示唆する結果であった。CPP-ACP 配合ガムの場合、表層ではベースライン時の脱灰病変よりもさらなる脱灰進行性は抑制されており、ベースライン時の脱灰病変と同程度のミネラル分布が維持されていた(図2)。これに対し、placebo ガムは表層において脱灰進行性の所見であった(図3)。

これらの結果は、最新の in situ<sup>4)</sup> 結果をほぼ支持する傾向にある。すなわち、リカルデント(CPP-ACPの複合体)のう蝕予防メカニズムの本質は、第1に口腔内環境を過飽和状態に近づける機能によって歯表面での脱灰を抑制し、第2に表層下脱灰病変がある場合には、再石灰化機能を発現する。脱灰-再石灰化の両方に作用する予防メカニズムである。

実験期間は短期ではあるが、CPP-ACP 配合ガムの摂取によって歯石形成等の臨床症状は特に認められなかった。

表2 CPP-ACP ガム摂取による in situ 実験後のミネラル量変化

脱灰 ΔZ (vol%・μm) [Depth (μm)]	口腔内環境 プラーク蓄積	
	(-)	(+)
CPP-ACP ガム摂取	4,090 ± 1,056 [136 ± 16]	7,423 ± 1,077 [161 ± 16]
6,950 ± 863 [139 ± 7]		
Placebo ガム摂取	5,293 ± 1,766 [140 ± 16]	7,667 ± 1,393 [141 ± 24]

E. 結論

リカルデント (CPP - ACP の複合体) のう蝕予防メカニズムの本質は、第1に口腔内環境を過飽和状態に近づける機能による歯表面での脱灰抑制機能と考えられる。

F. 健康危険情報

特がない。

G. 研究発表

特がない。

H. 知的財産権の出願・登録状況

特がない。

文献

- 1) E.C. Reynolds et al.:  
Anticariogenicity of calcium phosphate complexes of tryptic casein phosphopeptides in the rat.  
J. Dent. Res. 74: 1272-1279, 1995.
- 2) E.C. Reynolds :

Remineralization of enamel subsurface lesions by casein phosphopeptide - stabilized calcium phosphate solutions.  
J. Dent. Res. 76: 1587-1595, 1997.

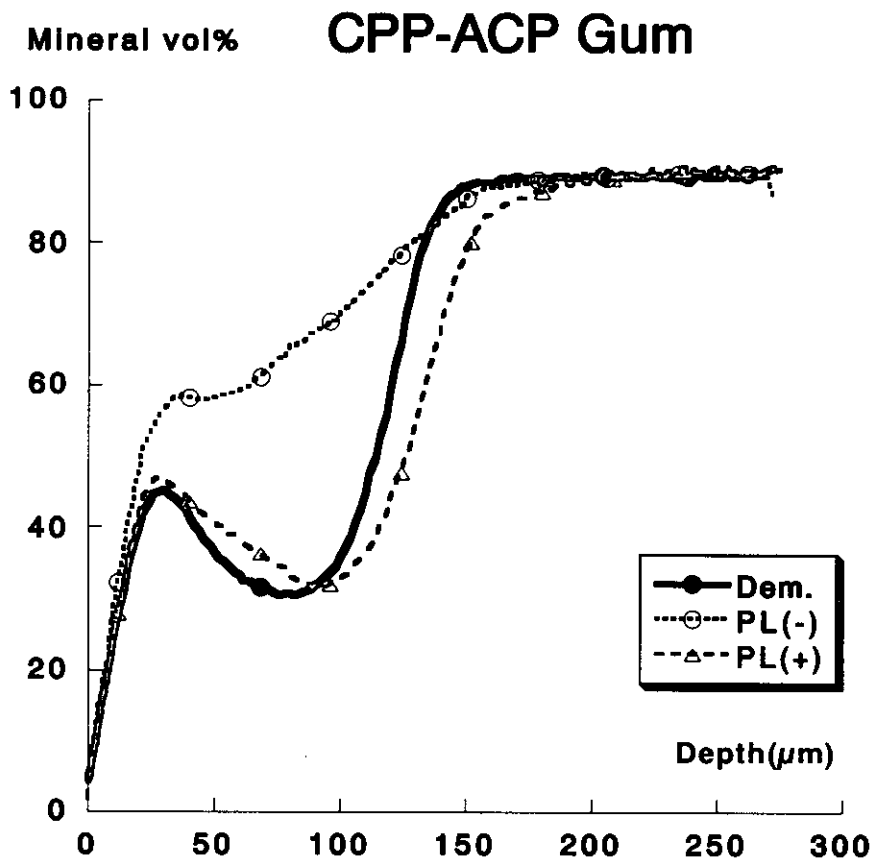
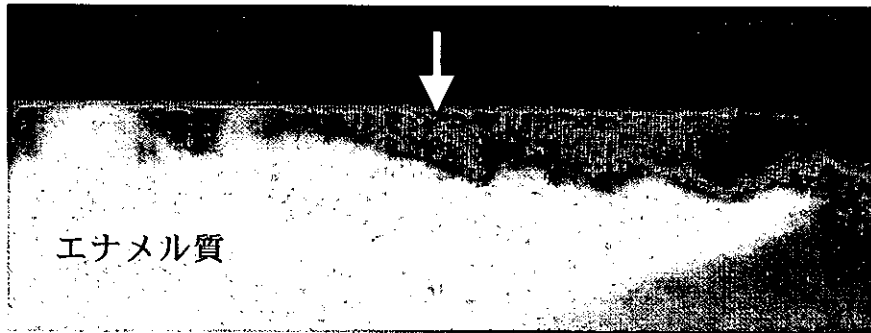
3) E.C. Reynolds et al.:  
Advances in enamel remineralization: Casein phosphopeptide-Amorphous calcium phosphate.  
The J Clin Dent. X (Special Issue): 86-88, 1999.

4) P. Shen et al.:  
Remineralization of enamel subsurface lesions by sugar-free chewing gum containing casein phosphopeptide-amorphous calcium phosphate.  
J. Dent. Res. 80: 2066-2070, 2001.

5) Y. Iijima et al.:  
In situ acid resistance of in vivo formed white spot lesions.  
Caries Res. 34: 388-394, 2000.

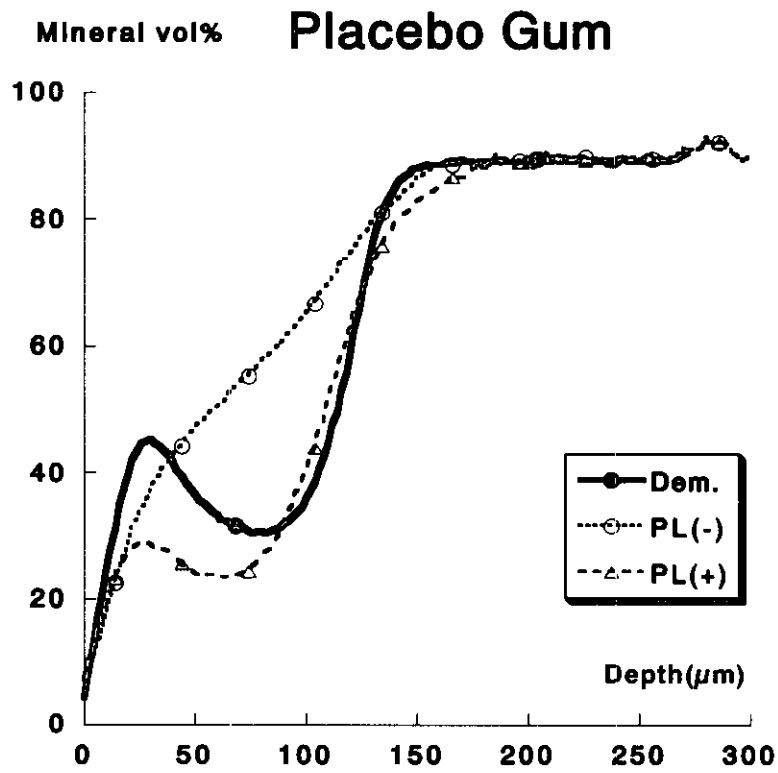
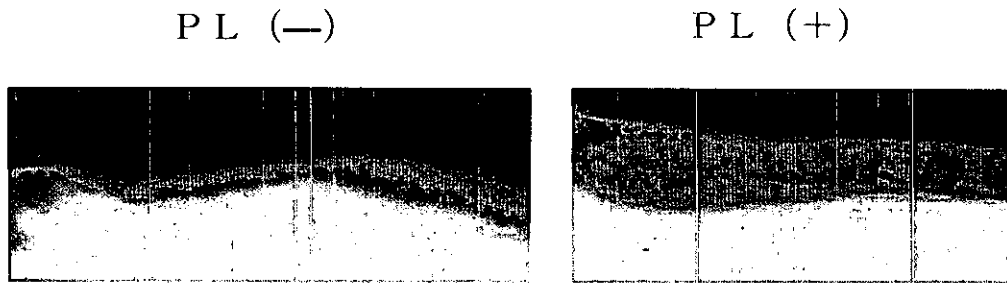
6) 石川達也・高江洲 義矩 (監訳):  
唾液の科学, 一世出版, pp64, 1998.

図2. CPP-ACP ガム摂取による再石灰化 in situ 実験後のミネラル分布状態とマイクロラジオグラフィの写真[プラーク蓄積環境における残存している再石灰化部位 (矢印の左) と再溶解部位 (矢印の右)。



Dem はベースライン時の脱灰病変；PL(+)はプラーク蓄積環境；  
PL(-)はプラーク非蓄積環境

図3 Placebo ガム摂取による再石灰化 in situ 実験後のミネラル分布状態とマイクロラジオグラフの写真[プラーク非蓄積環境 (左) と蓄積環境 (右) ]



Dem はベースライン時の脱灰病変；PL(+)はプラーク蓄積環境；  
PL(-)はプラーク非蓄積環境

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

齲蝕病原性評価における唾液の関与

分担研究者：渡部 茂・明海大学・教授

分担研究要旨

唾液中の重炭酸塩は分泌速度に依存し、濃度が高くなれば唾液 pH も上昇することが知られている。しかしこの pH の上昇を実際に口腔内で確認した報告はほとんどみられない。歯面上の pH の変化に唾液がどのように関わっているかについて検討するために本研究を行った。

1). 片側の上顎第一大臼歯頬側面 (UPB) に水素イオン感応性電界トランジスタ電極 (ISFET 電極) を固定し、反対側の耳下腺唾液開口部より耳下腺唾液分泌速度を測定した。舌尖クエン酸刺激に対し、両者の変化を同時にモニターした結果、分泌速度は刺激後約  $6.6 \pm 2.1$  秒後に上昇を開始し、それ以後約 13 秒後まで最も速い速度が持続し、約 2 分 50 秒後に安静時に戻った。一方 pH は安静時 5.8 を示していたが刺激後約 10 秒後に上昇を開始し、2 分 33 秒後に最大値  $6.41 \pm 0.43$  まで上昇を示した。

2). UPB、上顎中切歯唇側面 (UAB)、下顎中切歯舌側面 (LALi) の 3 箇所において ISFET 電極を固定し、清涼飲料水 (pH 3.4) にて先口した後の pH の変化を同時にモニターした。その結果、先口直後各部位の pH は清涼飲料水の pH まで低下したが、その後の変化は各部位で異なった。すなわち LALi では約 92 秒後に元の pH に回復したが、UPB、UAB では 30 分経過後の pH はそれぞれ  $5.08 \pm 0.30$ 、 $4.69 \pm 0.30$  であった。これは唾液クリアランスの部位特異性による影響と考えられた。

A. 研究目的

酸性食品あるいは酸産生食品の摂食に対し、歯牙表面の pH 変動に唾液がどのように関わっているかを明らかにすることを目的に本研究を行った。

B. 研究方法

1) Dry chips (Molnlycke 社製) を用いて両側耳下腺唾液分泌量を測定し、耳下腺唾液分泌量に左右差がないことを確認できた成人男女 6 名 (男 4 名、女 2 名) を対象とした。片側の上顎第一大臼歯頬側面 (UPB) に水素イオン感応性電界トランジスタ電極 (ISFET 電極) を固定し、反対側の耳下腺唾液開口部に Lashley Cup を装着し、耳下腺唾液分泌速度を測定した。PH 測定のキャリブレーション後、舌尖にクエン酸刺激を行い、両者の変化を同時にモニターした。

2) UPB、上顎中切歯唇側面 (UAB)、下顎中切歯舌側面 (LALi) の 3 箇所において ISFET 電極を固定し、清涼飲料水 (pH 3.4) にて先口した後の pH の変化を同時にモニターした。

C. 研究結果

1) 分泌速度は刺激後約  $6.6 \pm 2.1$  秒後に上昇を開始し、それ以後約 13 秒後まで最も速い速度が持続し、約 2 分 50 秒後に安静時に戻った。一方 pH は安静時 5.8 を示していたが刺激後約 10 秒後に上昇を開始し、2 分 33 秒後に最大値  $6.41 \pm 0.43$  まで上昇を示した。

2) 先口直後各部位の pH は清涼飲料水の pH まで低下したが、その後の変化は各部位で異なった。すなわち LALi では約 92 秒後に元の pH に回復したが、UPB、UAB では 30 分経過後の pH はそれぞれ  $5.08 \pm 0.30$ 、 $4.69 \pm 0.30$  であった。30 分後の UPB-LALi 間、LALi-UAB 間に危険率 0.1% 以下で、UAB-UPB 間に同 5% 以下で有意差が認められた。これは唾液クリアランスの部位特異性による影響と考えられた。

D. 考察

1) 測定部位について

Lecomte ら Weatherell ら, Watanabe は寒天中のカリウムが唾液中に拡散する率を測定し、口腔内各部位における唾液クリアランス率には差があることを報告している。そして、唾液クリアランス速度は下顎前歯舌側面が最も速く、次に上顎臼歯頬側面、最も遅い部位は上顎前歯唇側面であると述べている。これらの報告から、大唾液腺唾液の影響を受けやすいと考えられる上顎第一大臼歯頬側面と下顎中切歯舌側面、そして、受けにくい上顎中切歯唇側面を測定部位とした。

## 2) 口腔内 pH 測定結果について

安静時の pH については、今回、UPB で  $\text{pH}6.04 \pm 0.33$ , LALi で  $\text{pH}6.70 \pm 0.31$ , UAB で  $\text{pH}5.92 \pm 0.32$  あった。Suddick らによると安静時の唾液 pH は耳下腺で 5.8, 顎舌下腺で 6.5 であったと報告している。UPB は耳下腺, LALi は顎舌下腺開口部に近い部位に位置するため、今回の結果はほぼ同様な結果になったと考えられる。酸性清涼飲料水飲用後の pH の変化は、20 秒間の洗口により、各部位ともに酸性清涼飲料水の pH 付近まで下がり、嚥下後はそれぞれの部位で異なる回復を示した。LALi においては安静時の pH に回復したが、30 分後の pH 値はそれぞれ LALi が  $6.34 \pm 0.36$ , UPB が  $5.08 \pm 0.30$ , UAB が  $4.69 \pm 0.30$  であり、UPB と UAB は臨界 pH とされている  $\text{pH}5.5$  以下であった。特に UPB は耳下腺開口部付近にも関わらず、意外に回復の程度は少なかった。この結果から、歯垢の形成がない状態においても部位によっては 30 分間、臨界 pH 以下を維持することがわかった。LALi は他の部位と比較して、著しく pH の回復が良好であるが、これは安静時唾液分泌量の 70% は顎舌下腺唾液によるものといわれていることから容易に推察できる。その反面、約 30% を占める耳下腺唾液は左右に分かれているため各々 15% ずつとなり、UPB は開口部付近にもかかわらず、それほど pH の回復が良

好ではなかったことが考えられる。

## E. 結論:

飲料水などで低下した歯面上の pH が唾液によって回復する様相を実際に確認することができた。その程度は口腔内各部位によって異なっていることが明らかとなった。このことは歯面上プラークの酸産生にも影響を及ぼすと考えられる。

## F. 健康危険情報

特にない。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表:

#### 1) 鈴木欣孝, 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

#### 2) Y. Suzuki and S. Watanabe:

The Influence of Saliva on pH Changes in the Mouth.

In print

### 2. 学会発表:

#### 1) 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, 名古屋市, 2001 年 9 月

#### 2) Suzuki, Y., and Watanabe, S.:

The Influence of Saliva on pH Changes in the Mouth.

80<sup>th</sup> IADR, San Diego, U.S.A. March, 2002.

## 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

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

分担研究者：福島 和雄・日本大学松戸・教授  
（竹内 武男・日本大学松戸・助手）  
（篠崎 紀子・日本大学松戸・副手）

研究要旨

食品の抗う蝕性を評価するための微生物学的試験法を開発する研究の一環として、被検体試料の調製法と保存法の検討、ミュータンスレンサ球菌用選択培地の検討、及び歯垢サンプル中主要病原因子レベルの免疫学的測定法の検討を行った。その結果、口腔内のう蝕原因菌レベルを従来法よりの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た。

A. 研究目的

ヒトう蝕の主要原因菌はミュータンスレンサ球菌群に属す *S. mutans* と *S. sobrinus* の 2 菌種である。食品中には *S. mutans* や *S. sobrinus* の増殖や定着に影響を与える多くの成分が存在することが知られている。また、それらう蝕原因菌の増殖や定着を抑制する抗菌性物質や定着抑制物質などを添加した抗う蝕性食品の開発研究が進められており、キシリトール入りやポリフェノール入りの菓子など、その幾つかは既に市販され多用されている。従って、長期間の食品摂取後の *S. mutans* 及び *S. sobrinus* の口腔内レベルを摂取前のそれと比較する、或は摂取後の菌数レベルの消長を追跡するという手段が、食品或いは食品素材の抗う蝕性を評価する一手法になり得るものと思われる。本研究は、そのような観点に立って、口腔内の *S. mutans* 及び *S. sobrinus* レベルを的確かつ迅速に測定するための細菌学的手法の確立をめざし、被験試料（歯垢と唾液）の調製・保存法及びミュータンスレンサ球菌用選択培地について培養技法に関する検討を試みた。さらに、歯垢サンプル中の主要病原因子 GTF-B 量を迅速に検出定量するための免疫学的手法—サンドイッチ ELISA 法—の検討を行った。

B. 研究方法

1) 被験者

昨年度の被験者とは異なる学生集団約 140 名を口

腔診査し、高う蝕者（DMF 歯数；14～25）18 名、中等度う蝕者（DMF 歯数；7～11）17 名、低う蝕者（DMF 歯数；1～4）19 名、無う蝕者（DMF 歯数；0）7 名を選定した。

2) 供試培地

総レンサ球菌の算定に MS 平板培地を、*S. mutans* 数と *S. sobrinus* 数の算定に MSB 平板培地（従来培地）及び BML（株）により改良された MSB 平板培地（改良培地）を、分離菌種の純培養に BHI 液体培地を、分離菌株の固着性試験に 5% ショ糖加 THB 液体培地を使用した。

3) 唾液及び歯垢サンプルの調製と保存

日本大学松戸歯学部倫理委員会の承認及び十分な説明と了解（インフォームド・コンセント）の下に、本学部学生から情報により常法によりパラフィン刺激唾液を採取後、平成 12 年度報告書記載の方法（ブラッシング 1 分間処理）により歯垢サンプルを採取した。採取試料は、分析時まで、企業研究所と共同開発した臨床分離株保存法（特許申請中）により保存した（保存法の詳細は省略）。

4) 総レンサ球菌、*S. mutans* 及び *S. sobrinus* の菌数レベル算定法

歯垢サンプルを超音波処理（50W、20 秒）後、直ちに滅菌生理食塩水で連続 10 倍段階希釈し、その 50  $\mu$ l を MS 培地、従来型及び改良型の MSB 培地にスパイラルシステムにて播種し、37℃で 48 時間ローソク培養、次いで 24 時間好気培養後、MS 平板上の集落数を肉眼下で、MSB 平板上の典型的 *S. mutans* 様集落、典型的 *S. sobrinus* 様集落及び

非ミュータンスレンサ球菌集落 (Non-MS) を実顕微鏡下で数え、歯垢サンプル 1 ml 当りの総レンサ球菌数、*S. mutans* 数、*S. sobrinus* 数及び Non-MS 数を算定した。

#### 5) 非典型集落株の同定

MSB 平板上に形成された非典型 *S. mutans* 様及び *S. sobrinus* 様集落株の同定は、ショ糖依存性菌体固着性試験、ストレプトグラム試験、及び特異抗体に対する反応性試験 (菌体凝集、オクタロニー、ELISA) 等により行った。

#### 6) サンドイッチ ELISA 法の構築と歯垢サンプルへの適用

*S. mutans* の GTF-B 酵素に対するマウス単クローン抗体及びウサギ抗血清 (ポリクローナル抗体) を用いてサンドイッチ ELISA 測定系を構築した (企業との共同開発、特許申請中のため詳細は省略)。本測定系により歯垢サンプル中の GTF-B 量を直接定量し、培養法から算定した *S. mutans* レベルとの相関性を調べた。

### C. 研究結果

#### 1. 培養法の検討結果:

昨年度の被検集団とは異なる学生集団から選別したう蝕罹患経験を異にする 4 成人群 61 名から採取した歯垢及び唾液サンプルにつき、MSB 培地及び改良 MSB 培地を用いてミュータンス連鎖球菌種の分離・同定を行ない、*S. mutans* と *S. sobrinus* の分布状況とう蝕罹患との関連性を追及した結果、以下のような知見が得られた。

1) 歯垢サンプルと唾液サンプルの総レンサ球菌に対するミュータンスレンサ球菌比 (MS 比) は同等ではなく、個人間で顕著な差異 (歯垢 MS 比 / 唾液 MS 比: 0.08~80) が認められた。

2) 培養法により算定した歯垢及び唾液サンプル中の総レンサ球菌数、*S. mutans* 数及 *S. sobrinus* 数は、サンプルを長期間保存処理 (少なくとも 3 ヶ月間) してもほぼ一定に保たれていた。

3) 従来型と改良型のいずれの MSB 培地においても 61 名中 57 名の試料から *S. mutans* が、そのうちの 19 試料から *S. sobrinus* が検出された。両者の検出菌数は両培地間で大差は無かったが、いずれの菌も改良培地のほうが若干高い値を示した。一方、改良培地と従来培地における Non-MS の検出頻度と検出菌数比には顕著な差異 (それぞれ 22% : 96%、1 : 176) が認められ、改良培地の高選択性が確認された。

4) *S. sobrinus* は高う蝕者 18 名中の 8 名 (44%)、中等度う蝕者 17 名中の 8 名 (47%)、低う蝕者 19 名中の 3 名 (16%)、無う蝕者 7 名中 1 名 (14%) の歯垢サンプルから検出され、*S. sobrinus* の存在とう蝕罹患との間に正の相関関係があることが確認された。

#### 2. サンドイッチ ELISA 法の検討結果:

構築したサンドイッチ ELISA による GTF-B 測定系は *S. mutans* PS14 株由来の精製 GTF-B を標準物質に用いた場合、10~1000 ng/ml の範囲で良好な直線性を示した。また、GTF-B 以外の歯垢懸濁液或いは唾液成分のこの測定系への干渉は全く認められず、直接測定が可能であった。上記培養法により *S. mutans* レベルの判明している 32 歯垢サンプルにつき GTF-B 量の定量を行った結果、*S. mutans* 菌数レベルとの間に良好な相関関係 ( $R^2 = 0.9$ ) があることが観察された。

### D.E. 考察及び結論

口腔内に棲息しているう蝕原因菌ミュータンスレンサ球菌の菌種構成と菌数レベルを知ることは、個々人のう蝕リスクを判定するための最重要ポイントである。最近、う蝕原因菌の口腔内レベルを低減化することを意図した抗う蝕性食品の開発が進められており、口腔内の *S. mutans* 及び *S. sobrinus* レベルを的確かつ迅速に測定するための実験法の確立が急務となっている。本研究は、その目的にかなう細菌学的手法 (培養法及びサンドイッチ ELISA 法) の確立をめざし、被験試料 (歯垢と唾液) の調製・保存法及びミュータンスレンサ球菌用選択培地の検討を行うと共に、歯垢サンプル中の主要病原因子 (GTF-B) レベルの免疫学的測定法の検討を行った。その結果、培養法に関しては、個々人の歯垢と唾液の MS 比比率に大差があること、両試料を菌数レベルの低減化なしに長期間保存できること、改良型 MSB 培地にはほとんど非ミュータンスレンサ球菌は増殖しないこと等が明らかとなり、口腔内レベルを調べるための被験試料としてはブラッシング採取後の保存歯垢サンプルが唾液サンプルより優れていること、*S. mutans* と *S. sobrinus* の菌数算定用培地としては改良培地が最良であることが強く示唆された。免疫学的測定法に関しては、構築したサンドイッチ ELISA 法の GTF-B に対する感度及び特異性が極めて高いこと、唾液や歯垢サンプルを用いて直接定量が可能であること、測定値と *S. mutans* 菌数レベルとの間に良好な相関関係があることが判明し、本 ELISA 測定系により、歯垢・唾液中の最重要う蝕リスク因子 (GTF-B) 量を直接定量できる可能性が示唆された。現在、本研究により確立した培養技法及び ELISA 測定法の有用性を、さらに多数の臨床検体を用いて実証中である。

### F. 健康危険情報

無し

### G. 研究発表

#### 1. 論文発表

1) 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 第43巻第5号、1113 - 1120 (2000).

2) Shinozaki-Kuwahara, N., Hayakawa, M., Fukushima, K. et al. :

Purification and characterization of an oligo-isomaltosaccharide synthase from a *Streptococcus sobrinus* glucosyltransferase-I deficient mutant.

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

3) Hashimoto, K., Yamagi, K., Fukushima, K., Uda, Y.:

Effect of 3-hydroxymethylene -2-thioxopyrrolidone on growth of two species of mutans streptococci and their in vitro plaque formation.

Int. J. Antimicrob. Agents. 17:97-102 (2001).

4) 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.

## 2. 学会発表

1) 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.

2) 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

3) 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.

4) 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.

5) 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.

6) 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.

## H. 知的財産権の出願・登録状況

### 1. 特許申請

1) 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

2) 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

## 研究成果の刊行に関する一覧表

### 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.

### 論文

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

Hashimura, T., Sato M. Nakazawa F., 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

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, 2002
- 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 齊、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)
- Kanehira T., Okubo R., Honda O., Morita M.:  
Relationship of prevalence of dental caries in nursery schoolchildren with frequency intake and types of sugarless products given by their parents.  
Dentistry in Japan, 38: 92-94, 2002.
- 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

上記業績の内、印刷中のもの、又は別刷がまだ入手できていないものは別刷を添付していない。

添付：研究成果の刊行物・別刷

2001177

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。