

厚生労働科学研究費補助金

食品・化学物質安全総合研究事業

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14年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 花田 信弘

平成15（2003）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) 人工口腔装置による食材、食品の機能性評価方法の確立		
今井 奨	-----	14
2. <i>In vitro</i> 試験に有用な応用 PCR 法の確立		
岸 光男	-----	22
3. pH 微小電極内蔵法を補う簡便な食品酸産生評価法の検討		
高橋 信博	-----	25
4. ヒト唾液浸漬試験 (HSI テスト) による食品の再石灰化促進 性能評価		
稲葉 大輔	-----	31
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	-----	37
IV. 研究成果の刊行物・別刷	-----	39

厚生科学研究費補助金（食品・化学物質安全総合研究事業）
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 国立保健医療科学院・部長

研究要旨：昨年度に引き続き特定保健用食品の素材または食品そのものの機能評価方法を中心に研究を行った。食品の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 sobrinus* とミュータンスレンサ球菌の GTF 阻害剤であるキシロシルフルクトシドを用いて検討した。対照（スクロース滴下）の場合には、人工バイオフィーム形成量、pH 低下、エナメル質脱灰度のいずれも顕著であったが、キシロシルフルクトシドをスクロースと共存させて滴下した場合、キシロシルフルクトシドの濃度によって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対照よりも有意に低下させることがわかった。これ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。

また、臨床サンプルの MSB 培地上でのミュータンスレンサ球菌の検出を迅速に行うため、Single step colony direct PCR 法を確立した。これまで検討してきた液体培地による培養法と本方法を組み合わせることにより、種々のう蝕関連の有効性評価に対応することが可能になると考えられた。また、食品の有効性評価の指標としての舌苔の有用性を検討するためその基礎的検討を行った。その結果、歯科疾患健全者においても舌苔から、相当な頻度で歯周病原性細菌、う蝕病原性細菌が検出された。

さらに、前年度の検討によって、食品の酸産生性の評価法としてのヒト口腔 pH 微小電極内蔵法の有用性が確認された。しかし、同時に、この方法に内在する高コスト性を補う簡便法の開発の必要性が明らかになった。そこでヒト歯垢を用いた簡便な酸産生性評価法を構築しその有用性を検討した結果、採取したヒト歯垢を懸濁し、それに糖溶液等を加え pH 低下を見る方法はより妥当であると判断された。

エナメル質再石灰化試験法については、ヒト唾液浸漬試験（Human Saliva Immersion Test, HSI テスト）によって検討した。POs-Ca 含有ガム処理群では、 $1d$ 、 ΔZ がコントロール群の $1d$ および ΔZ に比べて有意に低値で ($P < 0.001$)、明らかな再石灰化作用が確認された。採取した唾液の分析から、この POs-Ca の再石灰化促進効果は、ガム咀嚼によって唾液分泌が促され、微アルカリ (7.0~7.5) となった唾液 pH 領域において、カルシウム (Ca) のイオン状態が POs-Ca により維持された結果、Ca/P 比が再石灰化に最適なハイドロキシアパタイトの比率 (1.67) 付近にまで上昇したことによると考えられた。同じガムを用いた口腔内実験でも、同様の結果が得られたことから、HSI テストは、食品の再石灰化促進機能の評価に有用であることが示唆された。

分担研究者氏名・所属施設名及び所属施設における職名

今井 奨・国立保健医療科学院・
室長
岸 光男・岩手医科大学・講師
高橋信博・東北大学大学院・教授
稲葉大輔・岩手医科大学・助教授

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必ずしも完成された評価システムではない。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、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、複雑な口腔内細菌叢の動向をできるだけ正確に捉えるための手法を開発すること、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、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

昨年度に本研究のために作製した人工口腔装置を用いてその有用性を検討した。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（対照群）。これに対してミュータンスレンサ球菌のグルカン合成酵素阻害剤であるキシロシルフルクトシドをスクロースに共存させて滴下して対照群との比較を行った。滴下終了後、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してグルカン合成酵素阻害剤であるキシロシルフルクトシドの評価により人工口腔装置の有用性を検討した。

種々の機能性食材の応用により口腔内細菌叢が変動することが考えられる。そこでミュータンスレンサ球菌に対する Single step colony direct PCR 法の開発を試みた。BHI 液体培地で培養した菌液を MSB 寒天培地上に接種、培養した。形成された単一コロニーを直接 PCR mixture に投入し、菌種特異的プライマーによる PCR 法を行い、BHI 液体培地で培養した菌体ペレットから抽出したゲノ

ム DNA をテンプレートとした通法の PCR 法と比較した。

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、いくつかの欠点を内在することが確認されたことから、プラーク pH テレメトリー法に替わる簡便法の開発を試みた。そのため、ヒト歯垢を用いた簡便な酸産生性評価法を構築し、その有用性について検討した。被験者は歯垢採取日前夜から歯磨きをせず、採取日の朝、歯磨きおよび朝食前に歯垢を採取した。氷冷したリン酸緩衝液の入ったマイクロ遠心用チューブに歯垢を入れ、ホモジナイザーで懸濁後、緩衝液で 2 回洗浄し、同様の緩衝液に懸濁して歯垢懸濁液とした。これに各種糖質を加えてイオン感受性電界効果型トランジスタ電極を組み込んだ簡易 pH メータを用いて pH を測定した。

エナメル質再石灰化能の評価に関しては、リン酸化オリゴ糖-カルシウム (POs-Ca) 配合ガムを用い、これを咀嚼した時のヒトの分泌唾液を用いたヒト唾液浸漬試験 (Human Saliva Immersion Test, HSI テスト) により、再石灰化促進効果を検討した。健常な被験者 12 名に +POs ガムあるいは -POs ガムを 20 分間咀嚼してもらい、ガム咀嚼開始後前半の 10 分までの全唾液 (唾液 A) 及び後半 10 分の全唾液 (唾液 B) を採取した。人工う蝕を発生させたエナメル質ブロック包埋プレートを唾液 A に 10 分間、続いて唾液 B に 10 分間浸漬した。この浸漬操作は 37°C で実施し、この一連の操作を 1 日 4 回連続して繰り返した。エナメル質ブロックのマイクロラジオグラ

フを撮影し、脱灰深度 (Ld, μm) 及びミネラル損失量 ΔZ ($\text{vol}\% \cdot \mu\text{m}$) を計測した。

C. 研究結果

1) 人工口腔装置の有用性の検討:

う蝕誘発と深い関わりをもつ 3 つのパラメーター (バイオフィルム形成量、バイオフィルム下 pH、エナメル質硬度変化量) を同時に測定できる人工口腔装置の有用性を検討した。う蝕原性細菌である *S. sobrinus* 6715 株菌体を 1% スクロースとともに供給すると人工バイオフィルムが形成され、人工バイオフィルム下 pH は滴下 18 時間で 4.3 に低下した。エナメル質脱灰度の変化量 (ΔH) は 220 であった。一方、*S. sobrinus* 菌体を 1% スクロースおよび 2.5% キシロシルフルクトシド (GTF 阻害剤) と共に供給すると、人工バイオフィルム形成が遅れ、人工バイオフィルム下 pH は滴下 18 時間後でも 6.7 であった。エナメル質の ΔH は 18 で、キシロシルフルクトシドによる顕著な脱灰抑制が認められた。食材の有効性評価に本装置が有用であることが示唆された。

2) Single step colony direct PCR 法の確立:

食品の有効性評価の際、臨床サンプルの MSB 培地上でのミュータンスレンサ球菌の検出を迅速に行うため、Single step colony direct PCR 法を確立した。MSB 寒天培地上に形成された単一コロニーを、直接 PCR mixture に投入し、菌種特異的プライマーによる PCR 法を行い、BHI 液体培地で培養した菌体ペレットから抽出したゲノム DNA をテンプレートとした通法の PCR 法と比較し

た結果、両者は完全に一致し、Single step colony direct PCR 法の有用性が示唆された。また、検体サンプルとして唾液のみならず舌苔も有用であることが示唆された。

3) プラーク pH テレメトリー法（電極内蔵法）に替わる方法の確立：

単一歯菌関連細菌（*Streptococcus mutans*）あるいはヒト歯垢を用いた簡便な酸産生性評価法を構築しその有用性を検討した。その結果、単一細菌では、培養する培地に含まれる糖質の種類によって糖質からの酸産生能が大きく変動し、歯垢内での細菌の培養環境（とくに供給される糖質の種類と頻度）が不明である現段階では、この方法の酸産生評価法への応用は困難であることが確認された。一方、採取したヒト歯垢を懸濁し、それに糖溶液等を加え pH 低下を見る方法はより妥当であると判断された。なお、pH 低下曲線の比較は必ずしも簡単ではないので、歯垢懸濁液の pH 低下曲線を水素イオン濃度に換算し、その増加直線の平均勾配を求めることによって、複数の糖の酸産生能を比較し評価することが可能と考えられた。

4) ヒト唾液浸漬試験によるエナメル質再石灰化試験法の検討：

健常な 12 名（男性 5 名；平均年齢 35.2 歳、女性 7 名；平均年齢 29.9 歳）の被験者について、ガム咀嚼時の唾液を用いて再石灰化促進効果を確かめるため、ヒト唾液浸漬試験

（Human Saliva Immersion Test, HSI テスト）を実施した。リン酸化オリゴ糖カルシウム塩（POs-Ca）を 2.5% 配合したノンシュガーガム（+POs ガム；46% xylitol 含有）、及び POs 非含有ノンシュガーガム

（-POs ガム；48.5% xylitol 含有）の 2 種類の粒タイプのガム（1.5g / 個）を用いた。その結果、+POs ガムに有意な再石灰化促進作用が認められた。同じガムを用いた口腔内実験でも、同様の結果が得られたことから、HSI テストは、食品の再石灰化促進機能の評価に有用であることが示唆された。

D. 考察

食品あるいは食品素材の歯蝕原性を評価するための方法には一般に *in vivo* と *in vitro* の方法が存在する。*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) などがあり、*in vitro* の方法には細菌懸濁液による酸産生試験、グルカン生成試験、エナメル質脱灰試験などがあり、これらが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、単独の方法で歯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。

本研究で用いた人工口腔装置は、う蝕誘発と深い関わりをもつ3つのパラメーター、すなわち、人工バイオフィルム量、人工バイオフィルム下 pH、エナメル質硬度を同時に測定、ないし定量することが可能な比較的簡単な構造をした装置である。スクロース存在下で *S. sobrinus* 6715 株の菌体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ルムが形成されていくと考えられる。人工バイオフィルムの下ではミュータンスレンサ球菌による酸産生が起り、その酸でエナメル質は脱灰され硬度の低下をきたす。これが初期う蝕と考えられる。今回の試験に用いた人工口腔装置では、*S. sobrinus* 6715 株の菌体懸濁液と培地、スクロースを滴下することにより、本菌がエナメル質表面にグルカンを介して固着し、人工バイオフィルムを形成して pH 低下をきたしエナメル質を脱灰し、初期エナメル質脱灰が再現されたと考えられた。しかし、ミュータンスレンサ球菌の GTF 阻害剤である XF を共存させると、XF の濃度により人工バイオフィルム形成、pH 低下、エナメル質脱灰のいずれも顕著に阻害されたことより、本装置にう蝕原性評価系としての可能性のあ

ることが示唆されたと思われる。

MSB 培地によるミュータンスレンサ球菌の分離培養は現在も広く行われている同定・定量方法である。しかし、本研究で示されたようにヒト口腔内から採取した唾液や歯垢検体を培養した場合、ときに *S. mutans* と *S. sobrinus* の判別が困難なコロニー形態が出現する。本研究で検討した Single step colony direct PCR 法は MSB 培地上のコロニーを直接採取して PCR に供する方法であり、そのような不定形コロニーの同定をゲノム抽出のステップなしで行える利点を持つ。今後、唾液や歯垢を検体として食品のう蝕関連の有効性評価を行う際、有効な手段となりうると考えられた。

歯科疾患健全者の舌苔試料の検討から、歯科疾患に罹患していない健康者の舌苔中にもかなりの頻度で歯科疾患関連細菌が存在していた。各菌種の舌苔への定着については他菌種と相互の関連を呈するもの、舌苔量等の他の要因に関連するもの、およびいずれとも関連性が認められないものの3群に分類され、菌種間に違いのあることが明らかとなった。さらに85歳高齢者の舌苔中歯周病原性細菌は残存歯が少ない者ほど検出されないという結果などから、舌苔が歯科疾患と関連するものであることが示唆された。これらの結果から今後食品の有効性評価における *in vitro* 試験において舌苔が有効な試料となりうるということが示唆された。

単一菌 *S. mutans* NCTC10449 の酸産生能は、その増殖条件（とりわけ増殖基質として培地に含まれる糖の種類）によって大きく変動した。これはどんな単一菌を用いても避けられない問題である。このことから、

歯垢内での細菌の増殖環境（とくに供給される糖質の種類と頻度）に関する情報が不十分である現段階では、単一菌を用いた方法を酸産生評価法として採用することは困難であると考えられる。

一方、ヒト歯垢を用いた歯垢懸濁法では、複数のヒトからの歯垢を混合することで個体差が平均化されることから、単一菌を用いた場合に生ずる「増殖条件の問題」を回避することができる。さらに、pH 低下曲線を水素イオン濃度増加直線に換算し、その勾配から酸産性能を比較・評価することによって、複数の糖を容易に相対評価できるものと考えられる。以上のことから、ヒト歯垢を懸濁し、それに糖溶液等を加え pH 低下を見る歯垢懸濁法は、現時点で妥当な方法の一つであると判断される。

しかし、ヒト歯垢の持つ個人差はまだ十分に検討されておらず、また、ヒト歯垢の保存法も必ずしも容易ではない。さらに、唾液など実際の口腔内で歯垢 pH に影響を与える因子の考慮など、今後さらに検討することが必要である。

一般に、歯垢懸濁液法で得られる pH 低下曲線は電極内臓法で得られる pH 低下曲線よりも、pH 低下の程度がはるかに大きい。この pH 低下曲線の違いはヒト口腔内環境を考えることにより説明が付く。電極内臓法では唾液による洗浄作用・中和作用などの影響のもとで歯垢 pH を測定しているのに対して、歯垢懸濁液法では産生された酸が外界との交通のない反応系に蓄積されていくためである。しかし、これら 2 つの測定法は、共にヒト歯垢の酸産性能を見ているものであり、測定結果に

高い相関があることが期待される。今後、電極内蔵法の結果との比較・検討を蓄積することで、歯垢懸濁法の実用性および信頼性を高めていく必要があると考えられる。

従来、オリゴ糖においては、腸内細菌叢の改善による整腸作用、低齶蝕原性、及び、低カロリー等の機能が開発され報告されてきた。新しいオリゴ糖であるリン酸化オリゴ糖 (POs) には、Ca イオンと複合体を形成することで、Ca・P の不溶化及び沈澱形成を阻害する働きがある。POs 配合ガムは非配合ガムに比較して、有意に再石灰化を促進していた。ガム咀嚼時の唾液を分析した結果、両方のガムにおいて分泌唾液量、唾液 pH 値の変化、及び、唾液中の P 含量においては全く違いが無かった。もちろん、性差による違いも無かった。一方、Ca 含量は POs 配合ガムにおいて有意に高値で推移した。結果、Ca/P 比が高く推移し、エナメル質のハイドロキシアパタイトの組成比である 1.67 値に近い値をガム咀嚼開始時には示した。このように、ガム咀嚼により唾液の分泌を促し、唾液 pH を高値 (7.0→7.5) に推移させ、更に、唾液中の可溶性の Ca と P 含量を高く維持し、Ca/P 比をハイドロキシアパタイトの組成比に近づけることが、再石灰化には大切な因子であると考えられた。一般的に pH 値が上昇すると Ca と P は不溶化し易く POs の Ca・P の不溶化阻害効果が機能していると考えられる。これらの結果から POs を配合したガム製品を日常的に摂取することが、初期齶蝕の再石灰化を促し、齶蝕予防に有効であることが確認できた。また、歯の再石灰化機能確認のためには、ヒトボランティア

アによるオーラルデバイスを装着させる口腔内試験が一般的である。しかし、ヒトボランティアでの試験にはヘルシンキ宣言を考慮した場合、かなりの負担を与えることとなる。その上、食生活の個人差により実験精度と再現性も低くなりがちである。ここに報告したヒト唾液を用いた試験方法である HIS テストは、そのような観点からもヒト口腔内試験に代わる手法として食品のう蝕予防効果、とくに再石灰化促進効果の評価にきわめて有用性が高いと考えられた。

過去2年間の成果をもとに、次年度は各検討項目のまとめとなる研究を行い、う蝕予防に関連した特定保健用食品の機能評価のためのマニュアル案作成を目指したい。

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) う蝕原性細菌である *Streptococcus sobrinus* とミュータンスレンサ球菌の GTF 阻害剤であるキシロシルフルクトシドを用いて人工口腔装置で検討した結果、対照（スクロース滴下）では、人工バイオフィーム形成量、pH 低下、エナメル質脱灰度のいずれも顕著であったが、キシロシルフルクトシドをスクロースと共存させて滴下した場合、キシロシルフルクトシドの濃度によって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対照よりも有意に低下させることがわかった。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。
- 2) 本研究により確立した Single step

colony direct PCR 法は今後、食品の有効性評価に関する *in vitro* 試験方法に応用しうるものと考えられた。また、舌苔はその微生物学的特性から食品の有効性を評価するための指標として非常に有望であることが示唆された。

- 3) 単一う蝕関連細菌 (*Streptococcus mutans*) あるいはヒト歯垢を用いた簡便な酸産生性評価法を構築し、その有用性を検討した結果、単一細菌では、培養する培地に含まれる糖質の種類によって糖質からの酸産生能が大きく変動し、この方法の酸産生評価法への応用は困難であることが確認された。一方、採取したヒト歯垢を懸濁し、それに糖溶液等を加え pH 低下を見る方法はより妥当であると判断された。また、歯垢懸濁液の pH 低下曲線を水素イオン濃度に換算し、その増加直線の平均勾配を求めることによって、複数の糖の酸産生能を比較し評価することが可能と考えられた。
- 4) ヒト唾液を用いた試験方法である HIS テストにより、POs-Ca 配合ガムの再石灰化促進作用が確認された。HIS テストはヒト口腔内試験に代わる手法として食品のう蝕予防効果、とくに再石灰化促進効果の評価にきわめて有用性が高いと考えられた。

F. 健康危険情報 特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Yano A, Kaneko N, Ida H, Yamaguchi T, Hanada N. Real-time PCR for

- quantification of *Streptococcus mutans*. FEMS Microbiol Lett 2002;217(1):23-30
2. Tada A, Hanada N. Sexual differences in smoking behaviour and dental caries experience in young adults. Public Health 2002;116(6):341-6
 3. Senpuku H, Asano T, Matin K, Salam MA, Tsuha Y, Horibata S, Shimazu Y, Soeno Y, Aoba T, Sata T, Hanada N, Honda M. Effects of human interleukin-18 and interleukin-12 treatment on human lymphocyte engraftment in NOD-scid mouse. Immunology 2002; 107(2): 232-42
 4. Matin K, Salam MA, Akhter J, Hanada N, Senpuku H. Role of stromal-cell derived factor-1 in the development of autoimmune diseases in non-obese diabetic mice. Immunology 2002; 107(2): 222-32
 5. Tada A, Watanabe T, Yokoe H, Hanada N, Tanzawa H. Oral bacteria influenced by the functional status of the elderly people and the type and quality of facilities for the bedridden. J Appl Microbiol 2002;93(3):487-91
 6. Sato Y, Senpuku H, Okamoto K, Hanada N, Kizaki H. *Streptococcus mutans* binding to solid phase dextran mediated by the glucan-binding protein C. Oral Microbiol Immunol 2002; 17(4):252-6
 7. Nomura Y, Eto A, Hanada N, Senpuku H. Identification of the peptide motifs that interact with HLA-DR8 (DRB1*0802) in *Streptococcus mutans* proteins. Oral Microbiol Immunol 2002;17(4):209-14
 8. Nomura Y, Takeuchi H, Senpuku H, Ida H, Yoshikawa E, Kóyama K, Kanazawa N, Hanada N. Survey of dental hygienists and healthcare workers for microorganisms in the oral cavity. J Infect Chemother 2002;8(2):163-7
 9. Senpuku H, Tada A, Takada M, Sato T, Hanada N. Reproducibility of oral bacterial isolation in the elderly. Jpn J Infect Dis 2002;55(2):61-2
 10. Hanada N, Fukushima K, Nomura Y, Senpuku H, Hayakawa M, Mukasa H, Shiroza T, Abiko Y. Cloning and nucleotide sequence analysis of the *Streptococcus sobrinus gtfU* gene that produces a highly branched water-soluble glucan. Biochim Biophys Acta 2002;1570(1):75-9
 11. Yoshihara A, Hanada N, Miyazaki H. Association between Serum Albumin and Root Caries in Community-dwelling Older Adults. J Dent Res 2003;82(3):218-22
 12. 花田信弘、歯周病、臨床スポーツ医学 2002 年臨時増刊号 生活習慣病の予防と治療 運動・食事・薬物療法と効果的なコンビネーションの実際「臨床スポーツ医学」編集委員会 編、文光堂、東京、2002 年
 13. H. Kamasaka, D. Inaba, K. Minami, T. Nishimura, T. Kuriki, S. Imai and M. Yonemitsu: Remineralization of enamel by phosphoryl-oligosaccharides (Pos) supplied by chewing gum; Part I. Salivary assessment in vitro. J. Dent. Hlth. 52:105-111, 2002.
 14. D. Inaba, H. Kamasaka, K. Minami, T. Nishimura, T. Kuriki, S. Imai and M. Yonemitsu: Remineralization of enamel by phosphoryl-

- oligosaccharides (Pos) supplied by chewing gum; Part II. Intraoral evaluation. *J. Dent. Hlth.* 52:112-118, 2002.
15. Takahashi N. Biochemical approach to dental plaque ecosystem. *Tohoku Univ Dent J* 21: 18-32, 2002. (in Japanese)
16. Iwami Y, Kawarada K, Kojima I, Miyasawa H, Kakuta H, Mayanagi H, Takahashi N. Intracellular and extracellular pHs of *Streptococcus mutans* after addition of acids: loading and efflux of a fluorescent pH indicator in streptococcal cells. *Oral Microbiol Immunol* 17: 239-244, 2002.
17. Tada H, Sugawara S, Nemoto E, Takahashi N, Imamura T, Potempa J, Travis J, Shimauchi H, Takada H. Proteolysis of CD14 on human gingival fibroblasts by arginine-specific cysteine proteinases (gingipains-R) from *Porphyromonas gingivalis* leading to down regulation of lipopolysaccharide-induced interleukin-8 production. *Infect Immun* 70: 3304-3307, 2002.
18. 高橋信博：プラーク細菌への糖アルコール・インパクト、*Dental Diamond* 27: 64-69, 2002.
19. 砂糖と虫歯のサイエンス・ノンフィクション、*砂糖と健康の科学*、90-103、2002.
20. D. Inaba, K. Minami, H. Kamasaka and M. Yonemitsu: Effects of phosphoryl-oligosaccharides (Pos) on remineralization of enamel lesions in vitro. *Dent. J. Iwate Med. Univ.* 27: 197-202, 2002.
21. D. Inaba, K. Minami, H. Kamasaka and M. Yonemitsu: Remineralization of enamel and dentin by a chewing gum containing phosphoryl-oligosaccharide calcium (Pos-Ca) in situ. *Dent. J. Iwate Med. Univ.* 27: 203-209, 2002.
2. 学会発表
1. 松本直子、Salam Nd Abdus,野村義明、花田信弘、泉福英信、唾液分泌低下マウスを用いた *Streptococcus mutans* による口腔感染モデル実験系の確立、第75回日本細菌学会総会、横浜、2002. 4
 2. 西川原総生、野村義明、金子昇、泉福英信、花田信弘、簡易キットによるう蝕原性菌測定結果の対応、第75回日本細菌学会総会、横浜、2002. 4
 3. 泉福英信、Salam Nd Abdus、野村義明、花田信弘、微小重力環境における *Streptococcus mutans* の口腔感染に関する研究、第75回日本細菌学会総会、横浜、2002. 4
 4. 森屋一雄、諸石早苗、今井奨、花田信弘、う蝕細菌の保護者幼児間垂直感染調査について、第75回日本細菌学会総会、横浜、2002. 4
 5. 金子昇、泉福英信、宮崎秀夫、花田信弘、高齢者血漿における抗 Pac ペプチド (361-386) IgG 抗体とう蝕経験との関連性、第75回日本細菌学会総会、横浜、2002. 4
 6. 早川浩生、武内博朗、泉福英信、日高睦代、川辺良一、花田信弘、新しい3DSのためのドラッグ・リテーナーの簡便な作製法、第24回歯科技工学会学術大会、埼玉県、2002. 8
 7. 後藤祥二、今井奨、西沢俊樹、花田信弘人工口腔装置によるグルカン合成阻害剤のう蝕誘発阻害活性の基礎的検討、第51回日本口腔衛生学会総会、大阪、2002.9
 8. 嶋田剛司、今井敏夫、佐藤 勉、樋出守世、西沢俊樹、今井 奨、花田信弘：人工口腔装置におけるスクロースのう蝕誘発性に及ぼす二糖類キシロシルフルクトシドの影響。第51回日本口腔衛生学会・総会、大阪、2002. 9

9. 山中克之、佐藤拓也、吉居英一、花田信弘、泉福英信、微小重力環境における歯磨材を使用した口腔バイオフィルムの除去技術の開発その 1、第 51 回日本口腔衛生学会総会、大阪、2002.9
10. 泉福英信、山崎統資、山中克之、佐藤拓也、吉居英一、花田信弘、微小重力環境における歯磨材を使用した口腔バイオフィルムの除去技術の開発その 2、第 51 回日本口腔衛生学会総会、大阪、2002.9
11. 金子昇、泉福英信、花田信弘、宮崎秀夫 80 歳高齢者における血漿中抗 PAc(361-386)抗体価と DMFT との関連、第 51 回日本口腔衛生学会総会、大阪、2002.9
12. 安部井寿人、山口幸子、花田信弘、泉福英信、PMTC+3DS によるミュータンスレンサ球菌除菌の臨床研究、第 51 回日本口腔衛生学会総会、大阪、2002.9
13. K. Matin, S. Imai, H. Takeuchi, M. Uruguchi and N. Hanada: Behavior of *S. mutans* biofilm on implant materials formed in an artificial oral system. 第 32 回日本口腔インプラント学会、広島、2002.9
14. 多田章夫、花田信弘、丹沢秀樹、寝たきり高齢者の口腔細菌叢について、第 61 回日本公衆衛生学会総会、埼玉、2002.10
15. 中尾龍馬、天笠光雄、浅野敏彦、花田信弘、本田三男、泉福英信、hu-PBL を移植したマウスの HIV-1 口腔感染に対する抵抗性、第 16 回日本エイズ学会学術集会・総会、名古屋、2002、11
16. 稲葉大輔、南 健太郎、釜坂 寛、今井 奨、米満正美：リン酸化オリゴ糖配合ガムの口腔内における再石灰化促進効果。第 51 回日本口腔衛生学会・総会、大阪、2002.9
17. H. Kamasaka, D. Inaba, K. Minami, S. Imai and M. Yonemitsu: Increased remineralization of enamel by saliva stimulated with a sugar-free gum containing phosphoryl-oligosaccharides calcium (Pos-Ca). 50th Annual meeting of Japanese Association for Dental Research, Sendai, 2002.11
18. D. Inaba, K. Minami, H. Kamasaka, S. Imai and M. Yonemitsu: Intraoral effects of phosphoryl-oligosaccharides calcium (Pos-Ca) on remineralization in enamel and dentin lesions. 50th Annual meeting of Japanese Association for Dental Research, Sendai, 2002.11
19. 岸 香代、根本優子、岸 光男、木村重信：PCR 法を用いたヒト舌苔細菌叢の検討、第 44 回歯科基礎医学会、2002 年 10 月、東京
20. 角田初恵、高橋信博、真柳秀昭。ミュータンスレンサ球菌の各種糖質における増殖と酸産生に及ぼすキシリトールの影響。小児歯科学雑誌 40S: 308, 2002
21. 加藤一夫、佐藤拓一、高橋信博、山本恭子、福井敬子、中垣晴男。Nested PCR を利用した歯垢内のう蝕関連菌の層別分布の分析。第 51 回日本口腔衛生学会 (大阪) 2002 年 9 月 14 日 日口衛誌: , 2002.
22. 鷲尾純平、佐藤拓一、高橋信博。舌苔細菌叢中の硫化水素産生菌の検出法に関する研究。第 17 回口腔嫌気性菌研究会 (東京)。口腔嫌気性菌研究会抄録集 17: 2, 2002. 2002 年 10 月 3 日
23. 佐藤廉也、佐藤拓一、高橋一郎、山浦みゆき、高橋信博。PCR-RFLP 法を用いた口腔細菌の同定の実際。第 17 回口腔嫌気性菌研究会 (東京)。口腔嫌気性菌研究会抄録集 17: 4, 2002. 2002 年 10 月 3 日
24. 岩見憲道、宮澤はるみ、角田初恵、前原裕子、真柳秀昭、高橋信博。キシリトールは *Streptococcus mutans* のホスホエノールピルビン酸依存性グルコース取込を抑制する。歯基礎誌 44(5): 461, 2002.
25. 前原裕子、岩見憲道、真柳秀昭、高橋信博。フッ素によるミュータンスレンサ球菌の糖代謝抑制効果はキシリトール併用により増強するか。歯基礎誌 44(5): 462, 2002.
26. 山浦みゆき、佐藤拓一、長坂 浩、越後成志、高橋信博。顎顔面領域の慢性感染病巣からの PCR 法による細菌検出。歯基礎誌 44(5): 464, 2002.
27. 真柳 弦、佐藤拓一、根本英二、島内英俊、高橋信博。慢性辺縁性歯周炎病

- 巢からの歯周炎関連細菌 26 菌種の nested PCR 法による検出。歯基礎誌 44(5): 464, 2002.
28. 松山順子、佐藤拓一、高橋信博。小児歯垢中に存在する *S. mutans* と *S. sobrinus* の PCR 法による検出頻度の各年齢層別の比較。歯基礎誌 44(5): 467, 2002.
29. 佐藤拓一、真柳 弦、山浦みゆき、松山順子、高橋信博。う蝕及び歯周病関連細菌の 16S rRNA genes nested PCR 法による高感度検出。歯基礎誌 44(5): 470, 2002.
30. Kato K, Sato T, Takahashi N, Nakagaki H. Distribution of cariogenic streptococci within dental plaque analyzed by nested PCR technique. 第 5 回 Aisan Academy of Preventive Dentistry (AAPD) (Pgimer, Chandigarh, India) 2002 年 11 月 14 日.

H. 知的財産権の出願・登録状況
特になし。

厚生労働科学研究費補助金（食品・化学物質安全総合研究事業）
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

人工口腔装置による食材、食品の機能性評価方法の確立

分担研究者 今井 奨 国立保健医療科学院口腔保健部・室長

研究要旨：食品の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、昨年度に引き続いてう蝕原性細菌である *Streptococcus sobrinus* とミュータンスレンサ球菌の GTF 阻害剤であるキシロシルフルクトシドを用いて検討した。対照（スクロース滴下）の場合には、人工バイオフィーム形成量、pH 低下、エナメル質脱灰度のいずれも顕著であったが、キシロシルフルクトシドをスクロースと共存させて滴下した場合、キシロシルフルクトシドの濃度によって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対照よりも有意に低下させることがわかった。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

昨年度に引き続き、*in vitro* における食品のう蝕原性評価技術の確立のため、人工口腔装置を用いた評価系について検討した。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、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。人工口腔装置は人工バイオフィーム形成量、

バイオフィーム直下の pH 値、エナメル質脱灰度を定量できるように設計されているので、本装置を用いて食品のう蝕原性評価系としての有用性をミュータンスレンサ球菌の GTF 阻害剤であるキシロシルフルクトシド (XF) を用いて検討する。

B.研究方法

1) 人工口腔装置

人工口腔装置は 2 つの人工口腔中心部分と恒温器、pH メーター、ローラーポンプ、冷却攪拌器から構成されている（図 1）。温水を環流させたウォータージャケットで人工口腔部分（図 2）の周囲を包むことにより装置内部を 37℃に維持した。人工口腔の上部が

ら 5 本のステンレスチューブと温度計を付けたシリコン栓を、下部から逆さにした平面 pH 電極と排水管を付けたシリコン栓をそれぞれ装着した。平面 pH 電極周囲に直径 24mm のポリエチレン製ホルダーを固定し、ホルダー上面に 4 枚のウシエナメル質切片をユーティリティワックスを用いて電極面と同一平面上になるように固定した。ステンレスチューブにはシリコンチューブを接続し、糖質、細菌懸濁液、培地をローラーポンプによって連続的に滴下した。(6ml/hr/チューブ)。各試料溶液が平面 pH 電極およびエナメル質切片上に一定時間混在しながら貯留するように送液した。実験中、各試料溶液は冷却攪拌器によって 4℃に保温された。またステンレスチューブは 5 本のうち、1 本を細菌懸濁液用に、2 本を培地用に、残りの 2 本を糖質用に用いた(図 3)。また、2 つの人工口腔の 1 つを実験群、他方を対照群とした。

2) ウシエナメル質切片の作製

子ウシの未萌出下顎前歯の唇側面中央部からエナメル質をエナメル象牙境付近の象牙質を含めた部位まで一辺が 3~4mm の方形になるように切削器具を用いて切断した。切り出した切片を耐水ペーパーを用いて厚さが 1.5mm になるまで研磨し、平滑なエナメル質表面にした。各々のエナメル質切片の表面に Vickers 硬度計を用いて対称的な 9 箇所の硬度を 200g の荷重で測定し、その平均値が 320~280 までのエナメル質切片を実験に用いた。また、使用するエナメル質の面積をノギスで測定した。

3) 使用菌株と糖質

BHI 液体培地で前培養した *Streptococcus sobrinus* 6715 株を BHI 液体培地 1000ml に植菌し、37℃で 14 時間培養後、遠心分離(6000rpm,20min)により集菌し、菌体を PBS で洗浄してから分光光度計を用いて OD₅₀₀ の濁度を測定し、そこに PBS を加えて OD₅₀₀=2.0 に調整して細菌懸濁液とした。培地には 2.5%スクロース含有 HI 液体培地を、糖質は 2.5%および 6.25%の濃度の XF を用いて、平面電極上における割合を 1%スクロース+1%XF、1%スクロース+2.5%XF とするにした。また対照群は糖質の代わりに PBS とし、平面電極上における割合をスクロース 1%のみとした。

4) 評価方法

形成された人工バイオフィーム下の pH 変化を平面 pH 電極により連続的に測定し pH レコーダーに記録した。滴下終了後、形成された人工バイオフィームの状態を観察するため、平面 pH 電極上面より写真撮影を行った。エナメル質切片上および pH 平面電極上に形成された人工バイオフィームを丁寧に取り外し、0.5N の水酸化ナトリウム溶液 2ml を加えて人工バイオフィームを溶解した後、遠心分離(6000rpm,20min)によって菌体と上清に分けた。菌体の濁度を OD₅₀₀ で測定し、エナメル質切片上の単位面積当たりの人工バイオフィームの菌体量を求めた。上清中の非水溶性グルカン量は、フェノール硫酸法により定量した。さらに実験後のエナメル質切片の硬度を Vickers 硬度計を用いて測定し、実験前後に硬度変化(ΔH)からエナメル質の脱

灰度を評価した。

C. 研究結果

1) 人工口腔装置を用いた滴下実験による pH の変化

S. sobrinus 6715 株において、1%スクロース単独または 1%スクロースと 1%XF を共存させて滴下した場合、1%スクロース単独では pH は滴下開始約 5 時間後に低下しはじめ、約 8 時間後には pH5.5 となり、18 時間後の滴下終了時には pH4.2 となった。1%スクロースと 1%XF 共存下でも pH 曲線は 1%スクロース単独の対照群とほぼ同様の時間経過で低下した。

次いで 1%スクロース単独または 1%スクロースと 2.5%XF を共存させて滴下した場合、1%スクロース単独の対照群では pH は滴下開始約 5 時間後に低下しはじめ、約 9 時間後には pH5.5 となり、18 時間後の滴下終了時には pH4.3 となった。実験群では、滴下開始 5 時間後に pH7.4 となり、9 時間後に pH7.3 となり、18 時間後の滴下終了時には pH6.7 であった (図 4)。XF の共存により pH の低下は顕著に抑制された。

2) 人工バイオフィルム形成量の評価

滴下終了後の平面 pH 電極およびエナメル質切片上に形成された人工バイオフィルム量を菌体濁度の測定と非水溶性グルカン量の定量から評価した。*S. sobrinus* 6715 株において、1%スクロース単独の対照群の菌体濁度は 0.01 ± 0.004 、非水溶性グルカン量は 5.34 ± 2.00 であった。1%スクロースと 1%XF を共存させた実験群の菌体濁度は $0.02 \pm$

0.007 で、非水溶性グルカン量は 5.18 ± 2.50 であった。菌体濁度と非水溶性グルカン量は両群において有意な差を示さなかった

一方、1%スクロースと 2.5%XF 共存下の場合では、1%スクロース単独の場合の菌体濁度は 0.01 ± 0.002 、非水溶性グルカン量は 1.85 ± 0.69 であった。1%スクロースと 2.5%XF 共存の場合の菌体濁度は 0.001 ± 0.0001 、非水溶性グルカン量は認められなかった。2.5%XF 共存下では人工バイオフィルム形成量は 1%スクロース単独の場合より有意に低下した (表 1)。

3) エナメル質切片の硬度変化

S. sobrinus 6715 株において、1%スクロース単独または 1%スクロースと 1%XF を共存させて滴下した場合のウシエナメル質切片の硬度変化量は、1%スクロース単独の対照群で 240.8 ± 9.7 、実験群で 260.7 ± 8.5 となり有意な差は認められなかった。

一方、1%スクロース単独または 1%スクロースと 2.5%XF を共存させて滴下した場合、1%スクロース単独の対照群の硬度変化量は 219.8 ± 8.9 であるのに対して実験群のそれは 18.0 ± 11.1 で、2.5%XF 共存下で硬度変化量の有意な低下が見られた (表 1)。

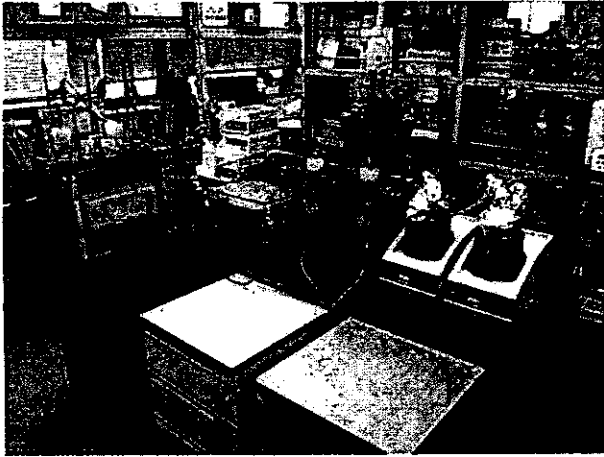


図1.人工口腔装置

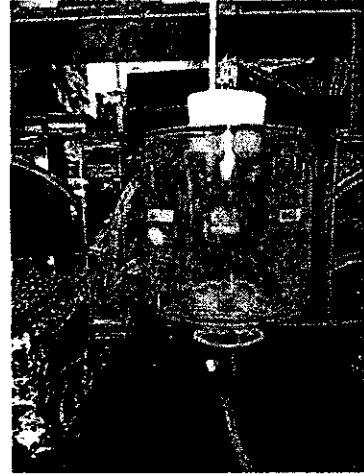


図2.人工口腔装置中心部

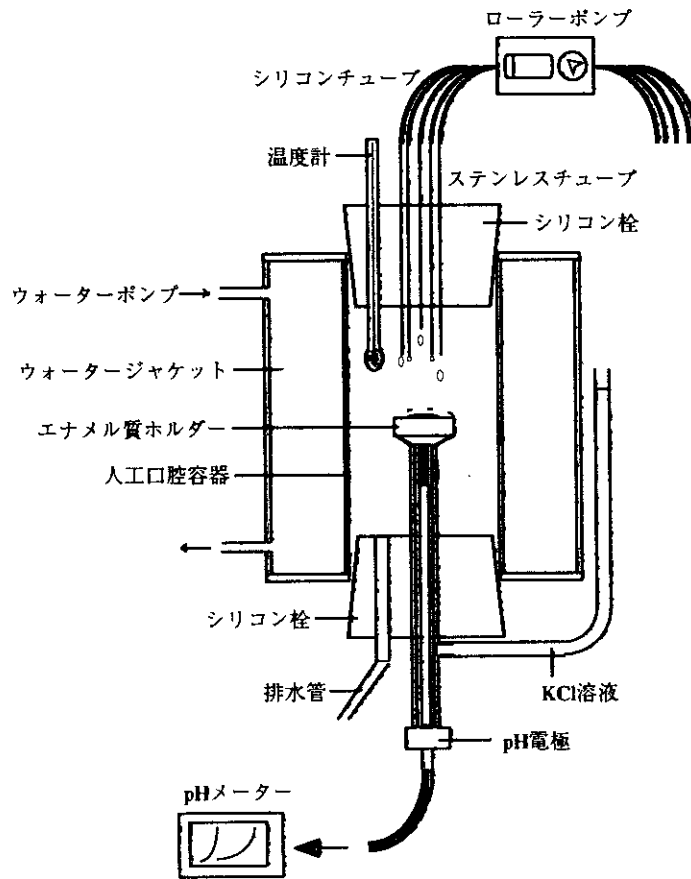


図3.人工口腔装置中心部の断面図

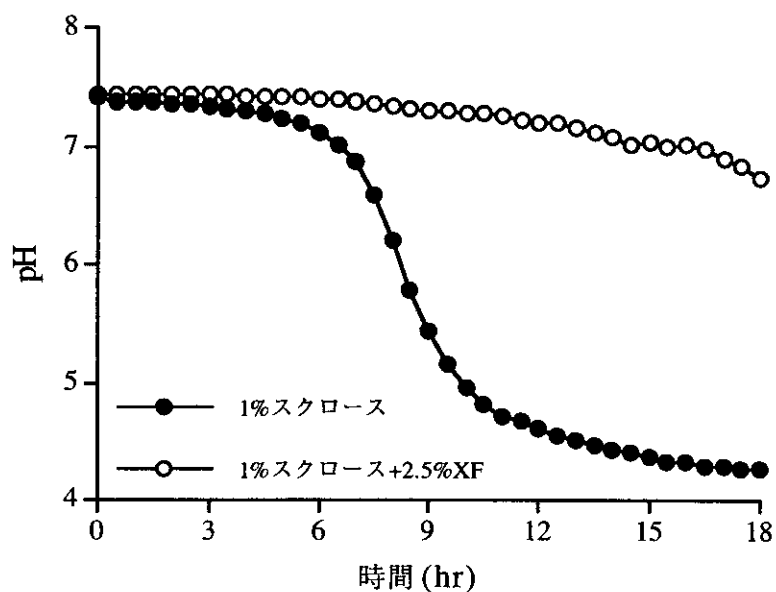


図4. *S. sobrinus* 6715 株菌体懸濁液の滴下によって形成される人工バイオフィルム下のpH変化

表1 *S. sobrinus* 6715 株菌体懸濁液滴下時の人工バイオフィルム量とエナメル質硬度変化

Control (1%スクロース)			Experiment (1%スクロース+2.5%XF)				
	ΔH	OD_{500}/mm^2	Glucan (μ/mm^2)	ΔH	OD_{500}/mm^2	Glucan (μ/mm^2)	
Electrode 1	-	0.012	3.088	Electrode 2	-	0.0012	0.082
E-1	219.88	0.016	5.208	E-5	11.00	0.0005	0.075
E-2	211.05	0.011	3.165	E-6	7.60	0.0004	0.217
E-3	231.89	0.015	4.173	E-7	32.30	0.0006	0.420
E-4	216.20	0.008	2.642	E-8	21.20	0.0006	0.519
Mean \pm SD*	219.76 \pm 8.86	0.013 \pm 0.004	3.797 \pm 1.135	Mean \pm SD*	18.03 \pm 11.13	0.0005 \pm 0.0001	0.308 \pm 0.200

* : エナメル切片4枚の平均と標準偏差

D. 考察

本研究で用いた人工口腔装置は、う蝕誘発と深い関わりをもつ3つのパラメーター、すなわち、人工バイオフィルム量、人工バイオフィルム下 pH、エナメル質硬度を同時に測定、ないし定量することが可能な比較的簡単な構造をした装置である。スクロース存在下で *S. sobrinus* 6715 株の菌体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ルムが形成されていくと考えられる。人工バイオフィル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。これが初期う蝕と考えられる。

食品あるいは食品素材のう蝕原性を評価するための方法には一般に *in vivo* と *in vitro* の方法が存在する。*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) などがあり、*in vitro* の方法には細菌懸濁液による酸産生試験、グルカン生成試験、エナメル質脱灰試験などがあり、これらが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。

今回の試験に用いた人工口腔装置では、*S. sobrinus* 6715 株の菌体懸濁液と培地、スクロースを滴下することにより、本菌がエナメル質表面にグルカンを介して固着し、人工バイオフィルムを形成して pH 低下をきたしエナメル質を脱灰し、初期エナメル質脱灰が再現されたと考えられた。しかし、ミュータンスレンサ球菌の GTF 阻害剤である XF を共存させると、XF の濃度により人工バイオフィルム形成、pH 低下、エナメル質脱灰のいずれも顕著に阻害されたことより、本装置にう蝕原性評価系としての可能性のあることが示唆されたと思われる。

E. 結論

食品の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 sobrinus とミュータンスレンサ球菌の GTF 阻害剤であるキシロシルフルクトシドを用いて検討した結果、対照(スクロース滴下) の場合には、人工バイオフィルム形成量、pH 低下、エナメル質脱灰度のいずれも顕著であったが、キシロシルフルクトシドをスクロースと共存させて滴下した場合、キシロシルフルクトシドの濃度によっては人工バイオフィルム形成量、pH 低下、エナメル質脱灰度を対照よりも有意に低下させることがわかった。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。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. H. Kamasaka, D. Inaba, K. Minami, T. Nishimura, T. Kuriki, S. Imai and M. Yonemitsu: Remineralization of enamel by phosphoryl-oligosaccharides (Pos) supplied by chewing gum; Part I. Salivary assessment in vitro. J. Dent. Hlth. 52:105-111, 2002.
2. D. Inaba, H. Kamasaka, K. Minami, T. Nishimura, T. Kuriki, S. Imai and M. Yonemitsu: Remineralization of enamel by phosphoryl-oligosaccharides (Pos) supplied by chewing gum; Part II. Intraoral

evaluation. J. Dent. Hlth. 52:112-118, 2002.

2. 学会発表

1. 鴨田剛司、今井敏夫、佐藤 勉、樋出守世、西沢俊樹、今井 奨、花田信弘：人工口腔装置におけるスクロースのう蝕誘発性に及ぼす二糖類キシロシルフルクトシドの影響。第51回日本口腔衛生学会・総会、大阪、2002.9.
2. 稲葉大輔、南 健太郎、釜阪 寛、今井 奨、米満正美：リン酸化オリゴ糖配合ガムの口腔内における再石灰化促進効果。第51回日本口腔衛生学会・総会、大阪、2002.9.
3. H. Kamasaka, D. Inaba, K. Minami, S. Imai and M. Yonemitsu: Increased remineralization of enamel by saliva stimulated with a sugar-free gum containing phosphoryl-oligosaccharides calcium (Pos-Ca). 50th Annual meeting of Japanese Association for Dental Research, Sendai, 2002.11.
4. D. Inaba, K. Minami, H. Kamasaka, S. Imai and M. Yonemitsu: Intraoral effects of phosphoryl-oligosaccharides calcium (Pos-Ca) on remineralization in enamel and dentin lesions. 50th Annual meeting of Japanese Association for Dental Research, Sendai, 2002.11.
5. K. Matin, S. Imai, H. Takeuchi, M. Uruguchi and N. Hanada: Behavior