

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.

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および有用性に関する研究

*In vitro* 試験に有用な応用 PCR 法の確立

分担研究者 岸 光男 岩手医科大学歯学部・講師

研究要旨：今年度は臨床サンプルの 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。また、85 歳高齢者の舌苔を検討したところ舌苔中歯周病原性細菌の検出率が無歯顎者で有意に低いことが示された。さらに舌苔の付着量には地域特性があり、今後地域ごとの食生活習慣との関連を検討することにより、食品評価のための指標となりうる可能性が示唆された。

A. 研究目的

われわれはこれまで特定保健用食品のうち「虫歯にならない」旨を表示するために必要な *in vitro* 試験の検討を行ってきた。しかし近年、より積極的にう蝕予防効果を持つことを示唆する「再石灰化を促進する」といった表示が認められるなど、今後さまざまな口腔保健関連の表示申請に対応していく必要があるものと考えられる。これまで *in vitro* 試験のための検体として、主として唾液を利用し、液体培地による培養試験について検討してきた。本年度は唾液検体をミュータンスレンサ球菌選択寒天培地で培養することによる試験法の開発を目的とし、ミュータンスレンサ球菌の簡便な弁別定性法の開発を試みた。さらに、成人においては修復物の多さなどにより歯垢

付着状況と口腔の清潔が単純には相関しないことなどから、唾液や歯垢に替わる *in vitro* 試験の検体として、無歯顎者においても存在する舌苔に注目し、その微生物学的意義について検討を加え、特定保健用食品の有効性評価のための新たな指標になりうるかを検討した。

B. 研究方法

I ミュータンスレンサ球菌に対する Single step colony direct PCR 法の開発  
a. 標準株による検討： *S. mutans* MT8148 株と *S. sobrinus* 6715 株を 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。

b. 唾液検体への適用の検討：幼児の刺激唾液を MSB 培地に接種，培養し，コロニーカウント後，複数の検査者がコロニー形態を観察した。検査者間でコロニー形態の評価が一致したコロニーと一致しなかったコロニーを Single step colony direct PCR 法に供した。

## II 舌苔サンプルの検討

a. 歯科疾患健全者の舌苔細菌叢の検討：歯周疾患および活動性のう蝕を有さない成人集団の舌苔を可及的全量採取，定量した後，一定量の舌苔試料からゲノム DNA を抽出し，菌種特異的プライマーを用いた PCR 法により 5 種の歯周病原性細菌 (*Porphyromonas gingivalis*, *Bacteroides forsythus*, *Prevotella intermedia*, *Treponema denticola*, *Fusobacterium nucleatum*)，2 種のう蝕病原性細菌 (*S. mutans*, *S. sobrinus*) および 1 種の根尖性歯周炎病原性細菌 (*Porphyromonas endodontalis*) を検出し，それら細菌の分布の変動要因を分析した。

b. 85 歳高齢者の舌苔付着要因ならびに細菌叢の検討：85 歳の高齢者から舌苔を一定方法により採取し，定量した後 3 種の歯周病原性細菌 (*Porphyromonas gingivalis*, *Bacteroides forsythus*, *Treponema denticola*) を検出し，それら分布を残存歯数などと比較検討した。

## C. 研究結果

I -a ミュータンスレンサ球菌の Single

step colony direct PCR 法に対する標準株による検討結果：*S. mutans* と *S. sobrinus* 両方の標準株において，Single step colony direct PCR 法とゲノム抽出した従来の PCR 法の結果は完全に一致し，かつ目視できる大きさのコロニーで DNA を増幅したバンドの確認が困難な例は存在しなかった。

I -b MSB 培地上に生育したコロニーをその形態から *S. mutans* と *S. sobrinus* に分類したところ，3 名の評価者の結果は 12.5 % のコロニーで一致しなかった。これらコロニーについて Single step colony direct PCR 法と従来の PCR 法による同定を行ったところ，両方法の同定結果は完全に一致した。

II -a 歯科疾患健全者の舌苔細菌叢の検討：対象者 56 名の舌苔付着量の平均は 133.4 ± 62.76 mg であった。歯周病原性細菌のうち，*F. nucleatum* はすべての被験者舌苔から検出され，次いでと *B. forsythus* の検出率が高かった (78.6%)。根尖性歯周炎の原因菌である *P. endodontalis* は，いずれの舌苔からも検出されなかった。*S. mutans* は 50% の舌苔サンプル中で検出されたが，*S. sobrinus* の検出率は低かった (8.9%)。被験者ごとの各菌種の検出の有無，被験者属性および口腔内データ（舌苔量および唾液量）を変数として因子分析を行った結果，*P. intermedia* と *S. sobrinus* の検出と，舌苔量，喫煙習慣が関連した。また，*B. forsythus* の検出と *S. mutans* の検出は関連することが認められた。一方，*P. gingivalis* および *T. denticola* の検出は，今回調べたいずれの変数とも関連しなかった。また，唾液量の多寡は，今回調べたい

ずれの菌種の分布とも関連しないことが示された。

II-b 85 歳高齢者の舌苔付着要因ならびに細菌叢の検討：85 歳高齢者の舌苔付着量には地域差が認められたが、残存歯数との関連はなかった。調べた 3 種の歯周病原性細菌はいずれの菌種においても無歯顎者での検出率が有意に低いことが示された。

#### D. 考察

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。舌苔付着量には地域差があり、これが食生活習慣と関連があるものかどうかは今後分析予定である。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ことが示唆された。

#### E. 結論

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。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

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

2003 年 6 月, IADR 81st General Session において 2 報発表予定

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

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および有用性に関する研究

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

分担研究者 高橋 信博 東北大学大学院歯学研究科・教授

研究要旨：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。そこで本年度は、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。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。しかし、ヒト歯垢の持つ個人差と保存の困難さからくる再現性および均質性の問題、そして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等、今後さらなる検討が必要である。

A. 研究目的

米国 San Antonio で 1986 年に開催された食品う蝕誘発性に関する会議 (Schachtele et al., J. Dent. Res., 65: 1530-1531, 1986)、平成 4～6 年度総合研究 A (食品および代用糖のう蝕誘発性を総合的に評価するための基礎的研究：代表 山田正)、さらには英国 London で 1999 年に開催された食品う蝕誘発性および酸蝕性に関する会議 (Curzon and Hefferren, Br. Dent. J., 191: 41-46, 2001) のいずれでも、食品のう蝕誘発性能を評価する方法の一つとしてプラーク pH を測定することが推奨されている。

前年度の検討で、「ヒト口腔内に微小電極を設置し、そこにプラークを形成させ、*in vivo* で直接プラーク pH を測定できる“プラーク pH

テレメトリー法 (電極内蔵法)”」が、プラーク pH 測定する方法として最も信頼性の高い方法の一つであることが確認された。

しかし、この方法は①被験者の確保が難しいこと、②被験者の負担が大きいこと、③測定者の負担が大きいこと、さらには④測定システムが高価であることなどの欠点を内在することから、①プラーク pH テレメトリー法の高コスト性を補う簡便法の開発、そして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等が必要であるとの結論に達した。

そこで本年度は、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、その有用性について検討した。

## B. 研究方法

### 1. 単一う蝕関連細菌を用いた酸産生能評価

#### (1) 細菌の選択と培養

う蝕誘発性の高い代表的口腔細菌として *Streptococcus mutans* NCTC 10449 (= ATCC) 株を選択した。この菌株は *S. mutans* の基準株 (type strain) として入手が容易であり、これまでに世界中で多くの研究がなされてきている。

細菌は 0.2% の糖を添加したペプトン培地で嫌気培養 ( $N_2$  80%,  $H_2$  10%,  $CO_2$  10%) した。添加した糖は、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 種であった。以下の実験は特に断らない限り全て嫌気ボックス内 ( $N_2$  90%,  $H_2$  10%) で行った。

#### (2) 細菌の酸産生活性の測定

対数増殖期の早期で細菌を集め、150 mM KCl と 5 mM  $MgCl_2$  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°C で予備振蕩後、糖溶液 (終濃度 10 mM) を加え、細菌が産生する酸量をモニターした。酸産生の基質として、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、キシリトールの 7 種を用いた。

### 2. ヒト歯垢を用いた酸産生能評価

斎藤らが報告した「スクリーニング検定法」(平成 5 年度科学研究費補助金 (総合研究 A 代表: 山田 正) 研究成果報告書: 食品および代用糖のう蝕誘発性を総合的に評価するための基礎的研究. 86-89, 1995) を改変した。

#### (1) 歯垢の採取と歯垢懸濁液の調整

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、氷冷したリン酸緩衝液 (2.0 mM リン酸カリウム、150 mM KCl、5 mM  $MgCl_2$ 、pH 7.0) の入ったマイクロ遠心用チューブに入れる。

歯垢をホモジナイザーで懸濁後、緩衝液で 2 回洗浄後、同様の緩衝液に懸濁し歯垢懸濁液とする。

#### (2) pH 低下測定

測定には、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 (pHBOY-P2、新電元) を用いた。

35°C 恒温器内で、簡易 pH メータ測定部に歯垢懸濁液 15  $\mu$ l を滴下し、1 分後、糖溶液 15  $\mu$ l を加え緩やかに攪拌した (糖終濃度 5%、ラクトースのみ終濃度 4%)。糖溶液は、10% 糖溶液 (ラクトースのみ 8%) に 130 mM KCl、0.44 mM  $MgCl_2$ 、20 mM NaCl を含む。糖溶液添加から 1 分間隔で 20 分間、pH 変化を記録した。使用した糖は、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、ソルビトール、マンニトール、キシリトール、マルチトールの 10 種であった。

なお、全ての歯垢懸濁液はスクロースによって pH が 5.0 以下まで下げる糖代謝活性を持つことを確認している。また、歯垢懸濁液は採取後 8 時間以内に使用した。

## C. 研究結果

### 1. 単一う蝕関連細菌を用いた酸産生能評価

*S. mutans* NCTC10449 の各種糖からの酸産生速度は、この菌株がどの糖で増殖したかによって大きく異なることが分かった。グルコース、フルクトース、スクロースで増殖した

菌株は、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が、ガラクトース、ラクトースからは酸を産生しなかった。一方、ガラクトース、ラクトースで増殖した菌株は、グルコース、フルクトース、スクロース、マルトースに加え、ガラクトース、ラクトースからも酸を産生した（表1）。

表1 *S. mutans* NCTC10449の各種糖からの酸産生速度（スクロースを100とした相対値）

酸産生基質	増殖基質					
	G	F	Gal	S	M	L
G	108	195	105	133	93.6	164
F	90.0	192	79.4	83.9	69.6	70.5
Gal	tr	tr	66.7	tr	tr	71.7
S	100	100	100	100	100	100
M	77.5	66.4	68.1	40.7	126	92.3
L	tr	tr	107	tr	tr	161
X	nd	nd	nd	nd	nd	nd

G: グルコース、F: フルクトース、Gal: ガラクトース、S: スクロース、M: マルトース、L: ラクトース、X: キシリトール、tr: 微量、nd: 検出されず

さらに、各種糖からの酸産生速度は、増殖に使われた糖によって大きく変動し、従って、スクロースからの酸産生速度を100とした時の各種糖からの相対酸産生速度は一定にはならなかった（表1）。

また、*S. mutans* NCTC10449 はどの糖で増殖したものでもキシリトールからは酸は産生しなかった。

## 2. ヒト歯垢を用いた酸産生能評価

歯垢懸濁液の pH 低下の一例を示す（図1-1）。スクロースが最も pH 低下が大きく、次いで、マルトース、ラクトースの順であった。また、脱イオン水を加えた場合は、pH 低下はほとんど見られなかった。しかし、20 分間の測定では最低 pH まで至っていないこと、さらにはス

クロースとマルトースの結果に見られるように pH 低下曲線の比較は必ずしも簡単ではない。

筆者（高橋、東北大学歯学会雑誌 6: 91-98, 1987）は、pH を水素イオン濃度に換算することによって、pH 曲線は水素イオン濃度増加直線となり、pH 低下の比較やその評価が容易になることを示している。

図1-1 歯垢懸濁法によるpH低下曲線

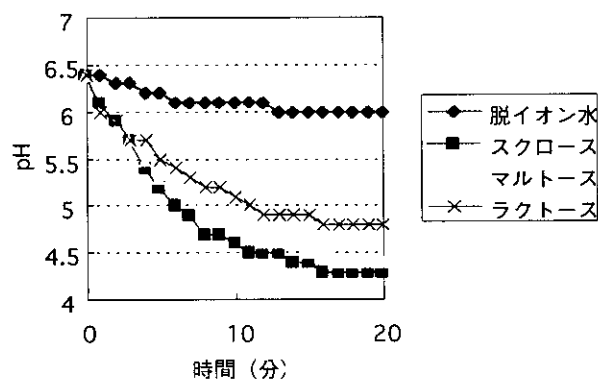
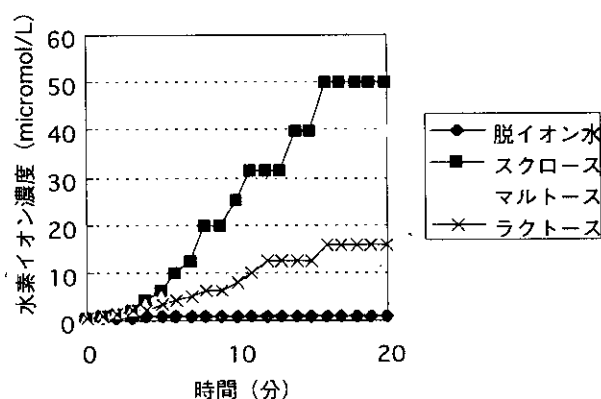


図1-2 水素イオン濃度換算直線



そこで、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た（図1-2）。さらに、スクロースの勾配を100とし、各種糖からの水素イオン濃度増加勾配の相対値を求めた（表2）。この評価法によって、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。

表2 歯垢懸濁法で得られた各種糖からの酸産性能  
(スクロースを100とした相対値)

酸産生基質	相対水素イオン増加勾配
グルコース	84.1
フルクトース	77.6
ガラクトース	11.3
スクロース	100
マルトース	75.0
ラクトース	29.5
ソルビトール	1.9
マンニトール	2.2
キシリトール	1.3
マルチトール	1.2

#### D. 考察

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 *S. mutans* NCTC10449 に限らず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、電極内臓法の結果との比較・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。

#### E. 結論

単一歯垢関連細菌 (*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。

#### 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） 論文発表

1. Takahashi N, Sato T. Dipeptide utilization by periodontopathic bacteria, *Porphyromonas*,



*Prevotella* and *Fusobacterium*. *Oral Microbiol Immunol* 17: 50-54, 2002.

2. Takahashi N. Biochemical approach to dental plaque ecosystem. *Tohoku Univ Dent J* 21: 18-32, 2002. (in Japanese)
3. 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.
4. 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.
5. Takahashi N. Acid-neutralizing activity during amino acid fermentation by *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, and *Fusobacterium nucleatum*. *Oral Microbiol Immunol* (in press).
6. Miyasawa H, Iwami Y, Mayanagi H, Takahashi N. Xylitol inhibition on anaerobic acid production by *Streptococcus mutans* at various pH levels. *Oral Microbiol Immunol* (in press).

学会発表

1. 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

2. 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.
3. 鷺尾純平、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
4. 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
5. 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.
6. 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.
7. 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.
8. 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巣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.
9. 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.

10. 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.
  11. 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.
  12. 熊谷 崇、重光竜二、太郎丸 毅、鷺尾純平、小関健由、佐藤拓一、高橋信博。歯垢中の mutans streptococci の PCR 法による検出について。第 42 回東北大学歯学会(仙台)2001 年 12 月 13 日。東北歯誌 22 (1): (in press).
- 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

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

分担研究者 稲葉大輔 岩手医科大学歯学部予防歯科学講座・助教授

研究要旨：ヒト唾液浸漬試験（Human Saliva Immersion Test, HSI テスト）によるエナメル質再石灰化試験法について検討した。POs-Ca 含有ガム処理群では、 $I_d$ ,  $\Delta Z$  がコントロール群の  $I_d$  および  $\Delta Z$  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ヒ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。

A. 研究目的

植物起原の澱粉はリン酸エステル結合を含むものが多く存在し、中でも馬鈴薯澱粉の含有量は高く、およそ 200 から 500 グルコース残基に 1 個の割合でリン酸エステル結合を含んでいることが知られている。馬鈴薯澱粉の酵素的分解物からリン酸化オリゴ糖 (POs) を調製する方法が近年、確立された。澱粉分解酵素はリン酸エステル結合部分で加水分解反応が抑制されるため、POs は澱粉分解酵素の未消化物として調製してきた。

この POs は結合リン酸基を有するために、カルシウムや鉄と複合体をつくって可溶化する性質を有しており、カルシウム (Ca)・リン (P) の沈澱形成阻害効果を有していることが確認されている。一方、POs は齲蝕原因菌であるミュ

ータンスレンサ球菌に資化されず、スクロースによって産生された酸による pH 低下を防ぐ緩衝作用を有しており、人工口腔装置を用いたスクロースとの共存系においてもプラーク形成抑制能及び歯の脱灰抑制効果が報告されてきている。更に、POs にはキシリトールのような糖アルコールにおいて報告されているような初期齲蝕の再石灰化促進効果もあることを *in vitro* の試験で見出してきた。今回は、POs-Ca 配合ガム咀嚼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、シュガーレスガムに配合した POs-Ca の再石灰化促進効果を確認することを目的として本研究を行った。

B. 試料と方法

### 1. 試料

リン酸化オリゴ糖カルシウム塩 (POs-Ca, 5wt% Ca 含有) を馬鈴薯澱粉の加水分解物より調製した。この 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) を実験用に調製した。

### 2. 牛エナメル歯片の脱灰方法

歯材料には牛歯の歯冠部エナメル部分を使用し、ダイヤモンドソー (LUXO 製) を用いて規格化した実験面を切断してエナメル質ブロックを調製した (7×7×3mm)。これらのエナメル質ブロック 6 試料を常温重合レジン (UNIFAST Trad, GC 製) に包埋し、全体を大きさ 15×50mm、厚さ 7mm のプレートに整えた。ついで、800 番の耐水ペーパーで表面を研磨することにより平滑な新鮮エナメル質を露出させた。一方、象牙質面側は予め印象用コンパウンド (GC 製) で包埋した。このようにして調製したエナメル質ブロック包埋プレート 1 枚に対し、0.1M 乳酸ゲル (6wt% carboxymethylcellulose, pH5.0) 100ml に 4 週間 37°C 条件下で浸漬させることで人工齲蝕を形成させた。

### 3. ヒト被験者

試験の目的、方法を説明した後、自発的に本試験に参加することに同意した健常な被験者 17 名 (男性 9 名, 平均年齢 34.7 歳, 女性 8 名, 平均年齢 29.0 歳) においてガム咀嚼唾液の分析試験を実施した。更に内 12 名 (男性 5 名; 平均年齢 35.2 歳, 女性 7 名; 平均年齢 29.9 歳) の被験者については、ガム咀嚼時の唾液を用いて再石灰化促進効果確認試験を実施した。

### 4. ガム咀嚼唾液の分析試験方法

健常な被験者 17 名において、+POs ガムあるいは -POs ガム 2 粒 (3.0g) を 20 分間咀嚼しても

らった。ガム咀嚼開始後 1 分まで、続いて 3 分、6 分、10 分、20 分までの全ての唾液を、プラスチックロートを用いて 10ml のプラスチック試験管に分取して採取した。これらの唾液について、唾液量、唾液 pH 値を直ぐに測定した後、唾液中清を蒸留水で 10 倍希釈した後、0.45 μm 膜 (Milipore 製) の濾液について Ca 及び無機 P 含量を、OCPC 法 (カルシウム C テストワコー; 和光純薬製) 及びモリブデン酸法によって定量した。

### 5. ガム咀嚼唾液を用いた再石灰化促進効果検証試験方法

健常な被験者 12 名において、+POs ガムあるいは -POs ガム 2 粒 (3.0g) を 20 分間咀嚼してもらった。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、プラスチックロートを用いて 50ml プラスチック試験管にそれぞれ採取した。これらの採取唾液について、唾液量、唾液 pH 値を直ぐに測定した直後、人工齲蝕を発生させたエナメル質ブロック包埋プレート 1 枚を予め入れたプラスチック容器 (10×30×60mm) にそれぞれの唾液を注入した。唾液 A に 10 分間浸漬した後、続いて唾液 B に 10 分間浸漬した。その後、蒸留水で十分にプレート表面を洗浄した。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。1 日の操作終了後は、エナメル質ブロック包埋プレートを湿度 100% 下で冷蔵保存した。本試験は、毎日新しいヒト唾液を同様に採取することで 4 日間連続して行なった。尚、試験に用いた唾液については上清の一部を用いて、蒸留水で 10 倍希釈した後、0.45 μm 膜 (Milipore 製) の濾液について Ca 及び無機 P 含量を、上述の方法によって毎日定量した。

6. 歯エナメル質のミネラル濃度分布の評価方法  
先の 4 日間連続したヒト唾液への浸漬後の各

歯エナメル質は、硬組織カッター(Isomet, Buhler, USA) を用いて、厚さ約 500  $\mu\text{m}$  の切片を切出し、それらの切片を 800 番の耐水ペーパーで約 200  $\mu\text{m}$  厚まで研磨した。各切片のマイクロラジオグラフを撮影した(PW-1830, Philips, The Netherlands)。撮影条件は管電圧 25kV、管電流 25mA、管球・被写体距離 370mm とした。ついで、稲葉ら の画像定量法により脱灰深度(Ld,  $\mu\text{m}$ )及びミネラル損失量 $\Delta Z$  (vol% $\cdot\mu\text{m}$ )を計測した(図1)。

### 7.統計解析方法

分散分析を用いた。

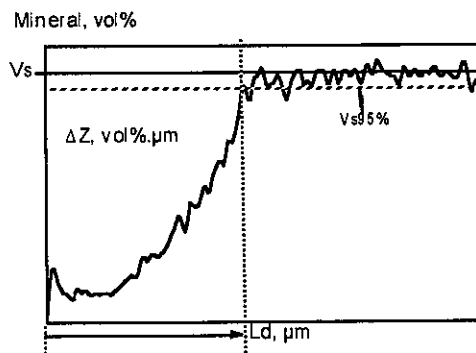


図1 ミネラル濃度分布模式図と計測パラメーター  
 $\Delta Z$ : ミネラル損失量 (vol% $\cdot\mu\text{m}$ )  
 Ld, 脱灰深度 ( $\mu\text{m}$ )

### C. 研究結果

#### 1. ガム咀嚼唾液の分析試験方法

健康な被験者 17 名において、+POs ガムあるいは-POs ガム 2 粒 (3.0g) を 20 分間咀嚼してもらった。この際の、唾液量、唾液 pH 値、唾液中の Ca 含量、及び、唾液中の無機 P 含量を経時的に測定した。その結果、唾液の分泌量(図2)、pH 変化(図3)、及び、P 含量の変化(図4)について、ガム種による統計的な差は得られなかった。20 分間のガムの咀嚼において、唾液はおよそ 30ml 分泌され、唾液 pH はガム咀嚼により、7.0 から 7.5 程度まで上昇した。唾液中の P 含量は 5mg 程度分泌され、十分量存在してい

ることが明らかとなった。一方、Ca 含量は、POs 非含有ガムに比較して POs 含有ガムにおいて有意に ( $p<0.001$ ) 高値となった(図5)。P が唾液中には十分量存在するために、Ca/P 比も POs 含有ガムにおいて有意に ( $p<0.001$ ) 高値となった(図6)。また、以上の分析結果において、性差による統計的な有意差は得られなかった。

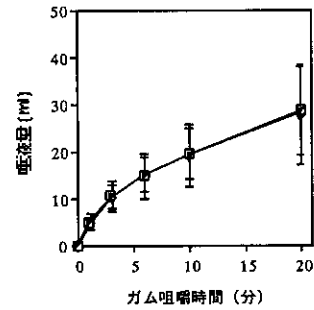


図2 +POs-Caガム (□) あるいは-POs-Caガム (◇) 咀嚼時の分泌唾液量の積算値

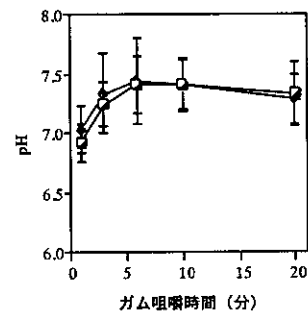


図3 +POs-Caガム (□) あるいは-POs-Caガム (◇) 咀嚼時のpH変化

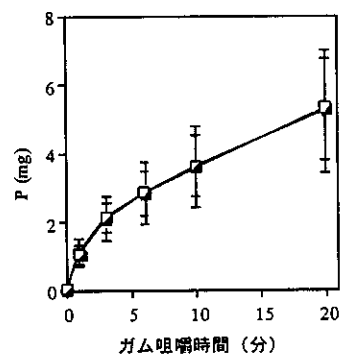


図4 +POs-Caガム (□) あるいは-POs-Caガム (◇) 咀嚼時の唾液リン量の積算値

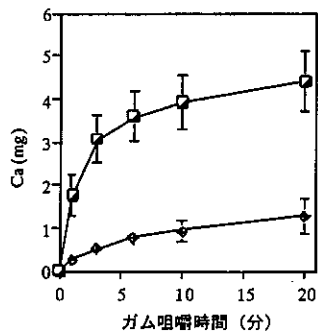


図5 +POs-Caガム (□)あるいは-POs-Caガム (◇) 咀嚼時の唾液カルシウム量の積算値

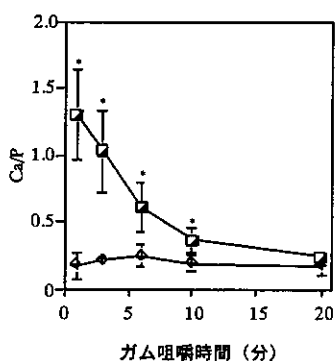


図6 +POs-Caガム (□)あるいは-POs-Caガム (◇) 咀嚼時の唾液中Ca/P濃度 (mM) 比変化

## 2. ガム咀嚼唾液を用いた再石灰化促進効果検証試験

健康な被験者 12 名において、+POs ガムあるいは-POs ガム 2 粒 (3.0g) を 20 分間咀嚼した際の唾液 A 及び唾液 B の分析結果を表 1 に示した。先の唾液分析と同様に唾液量、唾液中の P 含量には有意な差は無く、POs 非含有ガムに比較して POs 含有ガムにおいて Ca 含量に有意な差が得られた。結果、Ca/P 比も POs 含有ガムにおいて有意に高値となった。続いて、12 名における各処理歯での再石灰化促進効果を評価した結果、POs 非含有ガムに比較して POs 含有ガムにおいて有意に脱灰深度 (Ld) 及びミネラル損失量共に、脱灰したエナメル歯の回復が観察された (図 7A, B)。つまり、POs 含有ガムにおいて、再石灰化が促進している結果が得られた ( $p < 0.001$ )。

表 1 ガム咀嚼分泌唾液量、唾液pH、唾液中Ca及びP含量

	ガム種	A唾液	B唾液
唾液量 (ml)	+ POs-Ca	20.34 ± 4.13	9.35 ± 3.24
	- POs-Ca	20.74 ± 4.43	9.65 ± 3.35
Ca (mM)	+ POs-Ca	6.29 ± 2.44 **	1.72 ± 0.53*
	- POs-Ca	1.69 ± 0.41	1.51 ± 0.42
P (mM)	+ POs-Ca	5.62 ± 1.41	6.22 ± 1.31
	- POs-Ca	6.15 ± 1.35	6.49 ± 1.15
Ca/P	+ POs-Ca	1.12 ± 0.31 **	0.28 ± 0.08
	- POs-Ca	0.28 ± 0.08	0.23 ± 0.06

平均値 ± SD, \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.001$ ,  $n = 12$

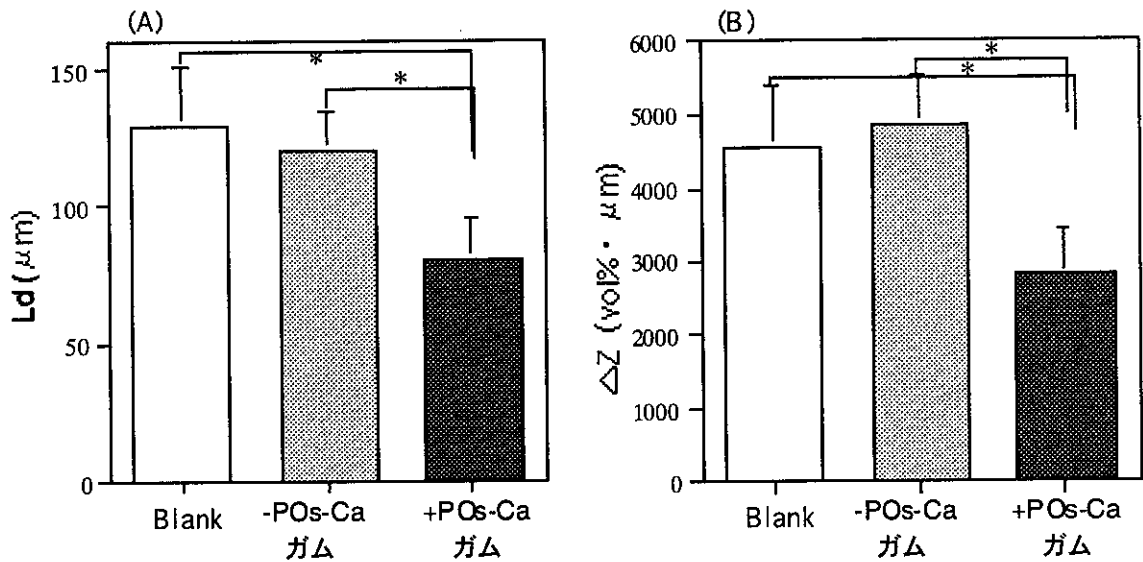


図7 +POs-Caガムあるいは-POs-Caガム咀嚼唾液で人工初期齲蝕 (Blank)を処理した際の脱灰深度 (A) あるいはミネラル損失量 (B) の変化

Vertical bar = SD, \* p<0.001, n=12

#### D. 考察

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、低齲蝕原性、及び、低カロリー等の機能が開発され報告されてきた。ここにおいて、著者等はオリゴ糖の全く新しい機能として初期齲蝕におけるエナメル質の再石灰化促進効果について報告してきた。この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ことを見出してきた。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。

以上の結果から POs を配合したガム製品を日常的に摂取することが、初期齲蝕の再石灰化を促し、齲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。

#### E. 結論

1. POs-Ca を配合したガム製品を日常的に摂取することが、初期齲蝕の再石灰化を促し、齲蝕予防に有効であることが確認された。
2. 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。

#### 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.
3. 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.

4. 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. 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.
2. 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.
3. 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.

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし。



### Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表

学術雑誌

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-DRB (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, Koyama 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.

20020986

以降は雑誌/図書に掲載された論文となりますので、  
P.37- P.38の「研究成果の刊行に関する一覧表」をご参照ください。