

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14年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 星野 悦郎

平成15(2003)年 3月

## 目 次

<b>I. 総括研究報告</b>	
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
<b>II. 分担研究報告</b>	
1. 歯垢細菌による Sucrose 構造異性体の代謝 松山 順子・星野 悦郎・高橋 信博	-----10
2. 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	-----12
3. 食品の再石灰化能をどのように評価すべきか？ 飯島 洋一	-----16
4. 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 今井 奨	-----23
5. キシリトールなどの糖アルコールとその他の歯垢細菌糖代謝阻害剤の併用効果について 高橋 信博	-----27
6. 齲蝕病原性評価における唾液の関与 渡部 茂	-----30
<b>III. 研究成果の刊行に関する一覧表</b>	-----34
<b>IV. 研究成果の刊行物・別刷</b>	-----36

厚生科学研究費補助金（医療技術評価総合研究事業）

（総合）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  
(H-12-医療-005)

主任研究者：星野 悦郎・新潟大学・教授

研究要旨

本研究は、食品のう蝕誘発性の評価法に関する基礎的歯学的検討と、その情報提示の方法、また、低・非・抗う蝕性食品の実際の応用のための普及を図る方法論的、政策的検討を目的としている。

3年間の研究実施に当たっては、これらの研究を同時並行的に行い、3年目の最終纏めの時点で、低・非・抗う蝕性食品の実際の応用のための具体的な評価方法、表示方法、普及方法等の取りまとめを目標とした。

3年目の本年度は、その纏めの時期に当たる。したがって、3年間の各研究者の関連分担研究を踏まえ、研究組織として、評価方法、表示方法等を協議し合意を得て、その普及のための具体的方法を提言としてまとめた。

分担研究者氏名・所属施設名及び所属施設における職名

石井 拓男・東京歯科大学・教授  
今井 奨・国立保健医療科学院・室長  
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  
松山 順子・新潟大学・助手

A. 研究目的

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方法論的、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、と誤解される側面も生じてきた。また、従来、子供に安心として与えられていた天然ジュースなど歯に付着性の酸性物が歯の表面に酸蝕を起こす事も知られてきており、これらの食品についても検討が必要となっていた。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、「歯周疾患予防」や「口腔の健康保持」の表示も出現している。このような食品についても、その他の健康保持・促進の目的の特定機能性食品についても、う蝕誘発性の観点から検討する必要もある。

この様な観点から、日頃う蝕に関連する研究、とくにう蝕病原性、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歯学者による研究組織により、これらの食品のう蝕誘発性の有無・程度の科学的な評価方法の確立を目指している。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ち、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。

本研究課題の下、過去2年間、食品のう蝕誘発性の評価法に関して分担研究者が個々に、また協調して実施してきた成果をさらに進めると共に、その評価法をより現実的な評価法として具体化する協議を行う事で、低・非・抗う蝕性食品の評価を実際に行いうる態勢を取る事を1つの目的とした。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「う蝕誘発性の無い、あるいは、う蝕誘発性の低い食品」、「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。

## 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。

(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. 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、引き続き、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、歯垢懸濁液を用いて、食品添加時の pH 低下の測定系、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測定系の研究を行った。実験技術の進歩・進展により、これらの方法が、従来から最良とされる電極内蔵法に代用となる評価法として有効であることが示された。

#### 2. 低・非・抗う蝕性食品に対する消費者の意識調査：

う蝕誘発性のないあるいは少ない食品としての評価や表示などは、表示から消費者の受け取る意識に留意しなければならない。アンケート調査により、含有甘味料に関する表示のある食品、齲蝕に関する食品表示で、「マーク」や「ことば」の重要性について、消費者としての認識(意識)の調査を続行した。

特に、「う蝕を防ぐ」という表現については、う蝕の誘発される環境下にあってもその食品の摂取でう蝕発生が防止される、と誤解される可能性があり、その表示の使用には留意が必要と思われる。

#### 3. 評価と表示の実施のための方法、内容の纏めと科学的裏付けの検討

分担研究者が個々に、また協調して実施してきた食品のう蝕誘発性の評価法に関する成果を基に、その現実的な評価法として具体化する目的で、検討と協議を行った。また、低・非・抗う蝕性食品の評価を実際に行いうる態勢を確立する事とした。

下記が、「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」の纏めの概要である。

##### I. 評価の対象

下記に分類される食品についてう蝕誘発性を評価し、評価にしたがって適切な表示を行う事ができる。

1. 非う蝕誘発性食品
2. 低う蝕誘発性食品
3. 抗う蝕原性機能性食品(う蝕発生のメカニズムに働くもの)
4. う蝕の考慮した添加物など(微量含有成分の効果)

・食品としての評価である事(食品としての評価であるから、酸産生源としての評価を優先する：酸産生をする歯垢があるという前提での評価：その食品を摂取する消費者の歯垢の蓄積の

程度にかかわらず、う蝕誘発性がない食品として摂取する事ができる食品としての評価。最悪の条件でも安心の概念)。

・食品の形態をしているもので、添加物として効果のあるもの(経口効果品)は上記の4の項目として扱う。

## II. 評価の方法

### 1. 非う蝕誘発性食品

#### (1) 食品成分による評価

1) 全く酸産生の基質にならない成分のみの場合

2) 酸産生源になるか不明の成分が0.1%未満の含有の場合

3) 下記の方法により、非う蝕誘発性が確立している成分であるもの

4) 歯垢を用いた培養により、酸産生、増殖のどちらも無い場合

・摂取の頻度により、酸産生活性の誘導が考えられるため、10年ごとの再評価を要する。  
・既に非う蝕誘発性食品であると認定されている食品と異なる点が上記に相当する場合も、その成分についてだけ新たな評価を行い認定する。

#### (2) 酸産生性(pH測定)による評価

1) 内臓電極法による評価(pH $\geq$ 5.7)は常に他の評価に優先する。酸産生のないものは非う蝕誘発性と評価する。

2) 特定の細菌を用いた評価(酸産生基質としてスクリーニング)

#### 3) 歯垢を用いた評価

食間(食後2時間以上後、あるいは数回うがい後に採取した歯垢(3人以上の歯垢の混合)を生食に懸濁し、最終濃度で砂糖5%を陽性コントロールとして、よく管理された嫌気グローブボックス内でpH5.0未満に低下する系を用いる。食品の粉末を最終50%の割に混合し、最低pHが5.7以上である場合、う蝕誘発性が低いと評価するが、全く酸産生がない場合、非う蝕誘発性と表現する事ができる。

・pH上昇成分によるものは、別途、3の機能性食品の評価を行う。

#### (1)(2)とも

・歯垢細菌の栄養分となるもの、歯石の形成などの副作用のあるものは、別途評価する。

・Tooth Wear(歯の酸蝕、erosion、を起こすもの)不含有のこと。

この簡便評価法としては、最終濃度で50%の粉末試料が、pHが5.5未満にならないこと。正確には、ICTなどによって評価する。(歯に付着性(例えばキレート性)の、酸などの低pHのものを含まない事を要求している)

### 2. 低う蝕誘発性食品

#### (1) 食品成分による評価

1) 酸産生性の成分(pH $<$ 5.7の酸産生の成分)が0.1%以下(クレアランス検査により、その歯垢中の残留が20%以下と低い場合、0.5%以下の含有も可)で、摂取単位当たり(ガムなら1枚、飴なら1個、まんじゅうなら1個のように、1回あたり摂取する単位)で総量0.5g未満のもの。

#### (2) 酸産生性(pH測定)による評価(pH $\geq$ 5.5)

1) 内臓電極法による評価(pH $\geq$ 5.7)は常に他の評価に優先する。

2) 特定の細菌を用いた評価(酸産生基質としてスクリーニング)

#### 3) 歯垢を用いた評価

食間(食後2時間以上後、あるいは数回うがい後に採取した歯垢(3人以上の歯垢の混合)を生食に懸濁し、最終濃度で砂糖5%を陽性コントロールとして、よく管理された嫌気グローブボックス内でpH5.0未満に低下する系を用いる。食品の粉末を最終50%の割に混合し、最低pHが5.7以上である場合、う蝕誘発性が低いと評価する。

#### (1)(2)とも

・歯垢細菌の栄養分となるもの、歯石の形成などの副作用のあるものは、別途評価する。

・Tooth Wear(歯の酸蝕、erosion、を起こすもの)不含有のこと。この簡便評価法としては、最終濃度で50%の粉末試料が、pHが5.5未満にならないこと。正確には、ICTなどによって評価する。(歯に付着性(例えばキレート性)の、酸などの低pHのものを含まない事を要求している)

### 3. う蝕病原性を軽減する機能を持つ食品(ハープなども含む)

ミュータンスレンサ球菌の個々のう蝕原性の抑制効果

歯垢形成の抑制効果

口腔細菌(歯垢あるいは特定細菌名)の増殖抑制

口腔細菌（歯垢あるいは特定細菌名）のう蝕  
原性抑制

pH 上昇（アルカリ性誘導）作用

緩衝作用

唾液の分泌促進

歯（エナメル質、象牙質）脱灰の抑制効果

脱灰部の再石灰化の促進効果（その耐酸性を  
考慮する）

口臭予防、あるいは軽減効果

口腔環境に働いて「歯に健康」あるいは「口  
に健康」を標榜するの食品などが考えられるが、  
種々の評価の申請が考えられるため、その申請  
に応じてその評価法、表示等を検討する事を基  
本とする。

・摂取単位で効果がある事。とり続ける事によ  
る効果は別記する。

・いずれの場合も、消毒剤、抗菌剤を含め、食  
品添加物として認められていない場合、評価の  
対象外とする。

・う蝕病原性を軽減する機能の評価は、その学  
術的な発表成果を用いる事ができる。必要な場  
合、評価委員会の判断で実際の再評価を行う。

・う蝕病原性を軽減する機能の表示については、  
個々の例で判定する。

・表示は、その機能を的確に表すもので、「う蝕  
を抑える」等の表現を用いない。

#### 4. う蝕に考慮した添加物などを含む食品 （ハーブなどの天然成分の抽出物を含む）

・上記に準じて評価された成分を、添加物等に  
使用している事を表示する事ができる。

・この場合、主成分が1または2である事が必  
要。

#### 5. 口腔機能など他の機能の評価の食品に含ま れる成分のう蝕誘発性に考慮することが必要で ある。これらの成分にたいして、上記を適用す る。

#### 6. 抗う蝕性食品

・消費者の多くが、「う蝕を防ぐ」あるいはこれ  
に類似した表現から、この食品の摂取によって、  
たとえ現状の飲食がう蝕誘発性の食品であって  
もこのう蝕誘発性を防ぐ、と誤解する可能性が  
高い。したがって、現時点では「抗う蝕誘発性  
食品」としての評価は行わない。

・また、う蝕の発生を防ぐと言う評価のため  
には、ヒトの口腔で現実にもう蝕を起こす陽性コ  
ントロールが必要となるが、倫理的な配慮からこ  
の系は不可能である。しかしながら、例えば、

0.1%の添加によって、10%スクロースからの  
酸産生を抑える様な食品が開発され提示される  
ような場合、再考する事とする。

### III. 表示の例

#### 1. 非う蝕誘発性食品

「この食品ではう蝕（むし歯）にならない」

#### 2. 低う蝕誘発性食品

「う蝕（むし歯）になりにくい（必要なら追  
加表示）」

#### 3. う蝕病原性機能軽減性食品

表示は、その機能を的確に表すもので、「う蝕  
を抑える」等の表現を用いない。

#### 4. う蝕の考慮した添加物など

その添加物を使用している事を、その機能と  
共に表示

#### 5. 非う蝕誘発性および低う蝕誘発性食品

「歯に安全」（キレート作用等も含めて）

### IV. 評価判定機関

・本研究組織を残存させ、取り敢えずに評価判  
定機関とする。必要に応じて再  
構成する。

・特定保健用食品の評価と区別するシステムと  
する。

特定保健用食品の評価は、食品中の機能性の  
成分について評価を行うが、上

記 1、2について、less食品としての  
評価、即ち、う蝕誘発性のない、

あるいは少ない、と言う評価となる。また、

3、4については、機能評価と

なるが、この場合も、全体としてう蝕誘発性  
について考慮する。

#### 評価可能機関

現時点では、本研究組織にある下記の機関で  
評価試験が可能である。

#### 食品成分による食品評価

残存させる本研究組織

#### 歯垢による食品評価

新潟大学大学院医歯学総合研究科

東北大学大学院歯学研究科

日大松戸歯学部

う蝕病原性機能軽減の食品の評価およびう蝕  
に考慮した添加物など

長崎大学大学院医歯薬学総合研究科

日大松戸歯学部

新潟大学大学院医歯学総合研究科  
国立保健医療科学院  
明海大学歯学部  
東京歯科大学

F. 健康危険情報  
特にない。

G. 研究発表

1. 論文発表

Takahashi N.

Biochemical approach to dental plaque ecosystem.

*Tohoku Univ Dent J* 21: 18-32, 2002.

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.

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.

Takahashi N.

Acid-neutralizing activity during amino acid fermentation by *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, and *Fusobacterium nucleatum*. *Oral Microbiol Immunol* 18: 109-113, 2003.

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).

Y.Suzuki and S.Watanabe

The Influence of Saliva on pH Changes in the Mouth,  
*Pediatric Dental J.* 13:89-93,2003

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.

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.

F. Nakazawa, E. Hoshino, M. Fukunaga, T. Jinno, Y Arai, H. Yamamoto, T. Ogawa. Amended biochemical and phylogenetic position of *Treponema medium*. *Oral Microbiology and Immunology*, 18(1): 127-130, 2003

Hanada,N., Fukushima,K., Nomura,Y., Senpuku,H *et al.*:

Cloning and nucleotide sequence analysis of the *Streptococcus sobrinus* *gtfU* gene that produces a highly branched water-soluble glucan.

*Biochim.Biophys.Acta* 1570:75-79, 2002.

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-Med. Sci.* 1(1):29-32, 2002.

Shiroza,T., Shinozaki-Kuwabara,N.,Hayakawa,M., Shibata,Y., Hashizume,T., Fukushima,K.

Udaka,S.,Abiko,Y.:

Production of a single-chain variable

fraction capable of inhibiting the *Streptococcus mutans* glucosyltransferase in *Bacillus brevis*: construction of chimeric shuttle plasmid secreting its gene product. *Biochim. Biophys. Acta* 93785:1-8, 2003.

岡田珠美、熱田 亙、河野善治、池見宅司、門沢久美子、福島和雄：  
ブラッシング歯垢及び刺激唾液中のミュータンスレンサ球菌レベルにおよぼすクロルヘキシジン短期間処理の効果。  
日本歯科保存学雑誌 第44巻、印刷中、2003.

Ito, K., Nakamura, Y., Tokunaga, T., Takeuchi, T., Fukushima, K.:  
Anti-cariogenic properties of polyphenolic compounds from cacao. *Caries Res. in press*. 2003.

## 2. 学会発表

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

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.

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

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験。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

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.

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.

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.

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.

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.

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.

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.

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。東北大歯誌 22(1): (in press).

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.

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.

S.Watanabe, T.Ichikawa, M.Minami, T.Thunoda, A.Suzuki, Individual variations of salivary Buffer Capacity and Some Components in children. 50th Annual Meeting of JADR, 2002

S.Watanabe, T.Akasaka, M.Minami, T.Son, A.Suzuki: Effect of Salivary Flow Rate on Fluoride Retention in the Mouth after Fluoride Mothrinsing. 81th IADR,2003.

A.Suzuki, T.Akasaka, M.Minami, T.Son, S.Watanabe: The Site-specificity of Fluoride Clearance from Different Locations in the Moth. 81th IADR,2003.

H. Kamasaka, D. Inaba, K. Minami, S. Imai and M. Yonemitsu: Increased remineralization pf 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.

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. 知的財産権の所有権の出願・登録状況

1. 特許申請

特願2003 - 19952

発明の名称：免疫学的測定方法及び免疫クロマトグラフィー法測定キット

発明者：平田広一郎、宇梶文緒、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  
(H-12-医療-005)

分担研究報告

歯垢細菌による Sucrose 構造異性体の代謝

分担研究者：松山 順子・新潟大学・助手  
星野 悦郎・新潟大学・教授  
高橋 信博・東北大学・教授

研究要旨

歯垢から優勢菌として分離された細菌による、二糖類である sucrose の構造異性体からの酸産生について検討した。

A. 研究目的

代用糖のう蝕誘発性の評価方法の一つとして、口腔細菌による代用糖からの酸産生性の検討がある。口腔内には多種類の細菌種が存在していることから、特定の細菌種のみならず、歯垢の優勢菌による代用糖からの酸産生を検討する必要がある。そこで、歯垢から分離された優勢菌による、sucrose の構造異性体を基質としたときの増殖と酸産生性について検討した。

B. 研究方法

(1) 使用した糖質

以下に示す sucrose の構造異性体を基質として用いた。

Palatinose

[-D-glucopyranosyl- (1,6) -  
D-fructofranose]

Trehalulose

[-D- glucopyranosyl- (1,1) -  
D-fructofranose]

Turanose

[-D-glucopyranosyl- (1,3) -  
D-fructofranose]

Malturose

[-D- glucopyranosyl- (1,4) -  
D-fructofranose]

Leucrose

[-D-glucopyranosyl- (1,5) -  
D-fructofranose]

(2) 使用菌株

3名の被験者から採取した歯垢を、嫌気グローブボックス中で緩衝液に懸濁し、連続10倍希釈後BHI血液寒天平板に接種し1週間培養後、優勢菌として分離した146菌株を用いた。

Glucose を1%添加した peptone-yeast extract (PY media) 培地に各菌株を接種し前培養(1日)後、培養液20 $\mu$ Lを上記基質1%添加した5種類のPY mediaに植え継ぎ1日培養し、培養後のpHと660nmにおける濁度を測定した。

C. 研究結果

(1) 歯垢の優勢菌について

歯垢から分離された146株のうち96株(66%)が *Actinomyces* であった。

(2) palatinose からの酸産生について

146 株中 33% の菌株が、palatinose を基質とした培地で増殖し、pH が 5.5 以下に低下した。palatinose 分解菌のうち 69% が *Actinomyces* であった。

(3) 他の構造異性体からの酸産生性について palatinose 分解菌のうち、すべての菌が trehalulose を、25% の菌株が turanose を、70% の菌が maltulose を、23% の菌株が leucrose を分解し、pH が 5.5 以下に低下した。

#### D. 考察及び E. 結論

以上のことから、歯垢には sucrose の構造異性体を分解する細菌が存在していること、またその多くは *Actinomyces* であることが明らかとなった。細菌を用いた培養法による代用糖の評価には、*S. mutans* などの特定の細菌種が用いられることが多いが、歯垢中にはそれ以外の酸産生菌が存在することや、その菌によって分解される糖があることを考慮しなければならない。さらに、種々の性状をもつ細菌種が混在している口腔内では、新しい栄養基質に対する代謝活性が誘導されたり、そのような性質をもつ

細菌種が選択され、増殖したりする可能性があることを考えると、今回の結果は口腔細菌叢の誘導、選択を評価する上で非常に興味深い。

#### F. 健康危険情報

特にない。

#### G. 研究発表

Junko Matsuyama, Takuichi Sato, Etsuro Hoshino, Tadashi Noda and Nobuhiro Takahashi: Fermentation of five isomers of sucrose by dental plaque bacteria. 第 81 回 IADR (Goteborg, Sweden) 2003 年 6 月 28 日発表予定、J Dent Res 82 (Special Issue): in press, 2003. (Abstract #2801)

#### H. 知的財産権の所有権の出願・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  
(H-12-医療-005)

分担研究報告

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：日本大学松戸歯学部細菌学講座、教授

(研究補助者：竹内武男、日本大学松戸歯学部細菌学講座、助手)

(研究補助者：篠崎紀子、日本大学松戸歯学部細菌学講座、副手)

研究要旨

前年度までに確立した *S. mutans* と *S. sobrinus* を分別定量するための培養技法及び試料中 *S. mutans* GTF-B 量を迅速に直接定量できるサンドイッチ ELISA 法に改良を加え、それらの有用性を多数の臨床試料の微生物分析を通して確認した。また、ポリクローナル抗体使用の免疫クロマト法による *S. mutans* の簡便迅速測定キットを企業研究者と共同で開発した。さらに、抗菌剤シクロヘキシジン及びイカキトサン使用の口腔清掃処理に伴うミュータンスレンサ球菌(MS)比率 (MS 比、総レンサ球菌に占める MS 菌の割合) の変動を改良培養法により調べ、当該法が食品の抗う蝕性を評価する試験法として使用できることを示した。また、歯垢又はその懸濁液の酸産生能の変化を調べる簡便試験法を提案した。

A. 研究目的

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等に関する培養技法の検討と、歯垢サンプル中の主要病原因子 GTF-B 量及び *S. mutans* 菌体を迅速に検出定量するための免疫学的手法の検討を行なう。さらに、確立した手法を用いてクロルヘキシジンやキトサン等の抗菌成分のう蝕原因菌除去効果をヒト試験により行い、食品の持つ抗う蝕性を評価する試験法としての有用性を調べる。

B. 研究方法

試料調製及び菌数レベル算定法：

昨年度の研究報告書に記載の方法により行った。

純化リコンビナント(r)GTF-Bの調製：

*S. anginosus* KSB8 形質転換株培養上清より調整用 SDS-PAGE 等の分画操作を行って rGTF-B 精製し、MAb126 使用の Western-blot 法により均一性を調べた。

GTF-Bの抽出と測定：

培養菌体使用の場合は 8M 尿素で攪拌（室温、5 分間）抽出、唾液及び歯垢試料の場合は 0.5N NaOH で攪拌（室温、1 分間）抽出を行った。GTF-B 量の測定は、特許申請書（特 2001-393970）記載のサンドイッチ ELISA 法に準じて行った。

クロルヘキシジン (CHX) 処理：

4名の *S. mutans* 保有者を対象に、0.36% CHX 含有のコンクール F を使用したブラッシングとフロッシング処理（各 1 分間）を

朝晩2回2日間（計4回）行ない、経日的に刺激唾液とブラッシング歯垢を採取し、改良培養法にてMS比の変動を追跡した。

イカキトサン処理：

3名の*S. mutans*保有者を対象に、イカ軟甲キトサンを0.5%含有及び非含有のプルランゲル溶液を使用したブラッシングとフロッシング処理（各1分間）を朝晩2回7日間行い、毎日昼食の2時間後にブラッシング歯垢を採取し、改良培養法にてMS比を求め、平均値を比較した。

### C. 研究結果

(1) 試料の凍結保存条件の検討  
ブラッシング歯垢及び刺激唾液中の*S. mutans*、*S. sobrinus*及び総レンサ球菌は、試料に凍結保護剤（DMSO-スキムミルク混液）を添加して-80℃のフリーザー中で凍結保存する方法で、少なくとも1年間は生菌数の著しい低下無しに保存可能であった。

(2) *S. mutans* と*S. sobrinus*の分布状況とう蝕発病との関係

DMF歯数15以上の高う蝕者36名、8~12の中等度う蝕者66名、1~5の低う蝕者58名、ゼロの無う蝕者36名から採取した歯垢懸濁液（ブラッシング歯垢）につき、*S. mutans*と*S. sobrinus*の存否及び菌数レベルを厳密に算定、比較した。その結果、*S. sobrinus*の検出者率及び*S. mutans*と*S. sobrinus*の検出菌数レベルはいずれも、う蝕経験歯数が高い群ほど有意に高いことが認められた。

(3) サンドイッチELISA法の測定条件の検討

本定量法の測定条件に検討を加え、各種*S. mutans*保存・分離株につきGTF-Bの産生性の解析を試みた。KSB8形質転換株の培養上清より精製した標品はSDS-PAGE的に均一であった。純化rGTF-B標品を用いて作成した標準曲線は0.25~5 ngタンパクの範囲でほぼ直線性を示した。菌体結合性酵素の可溶化は8M尿素抽出が最良であった。*S. mutans*分離株のGTF-B産生性は菌株間で大差が認められた。

(4) 臨床試料中GTF-B量の定量

*S. mutans*レベルの判明している30数名からの刺激唾液試料中のGTF-B量をサンドイッチELISA法により定量した結果、*S. mutans*生菌数との間に明らかな相関（ $R^2=0.7$ ）が認めら

れた。

(5) *S. mutans*迅速測定キットの作製

表層多糖抗原に対するポリクローナル抗体使用の免疫クロマト法による*S. mutans*測定キットの構築に成功し（企業との共同開発、特許申請中のため詳細は省略）、現在その有用性を試験中である。

(6) 抗菌剤処理によるMS比の変動

被験者4名からの刺激唾液及びブラッシング歯垢の全試料におけるMS比はCHXの短期間処理直後に急減（1/10~1/100）し、約1週間後に元のレベルに回復した。被験者3名からのブラッシング歯垢におけるイカキトサン処理後のMS比は処理前のその1/2~1/4に低下した。これらの結果から、抗菌成分含有食品の摂取前後におけるMS比の変動を当該法により調べることにより、食品の持つ抗う蝕性を評価できる可能性が示唆された。

### D. 考察及びE. 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、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下げてう蝕リスクを軽減化することを意図した抗う蝕性機能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、その目的にかなうことが期待される昨年度に確立した培養技法及びELISA技法の完成と実用化をめざし、被験試料（歯垢と唾液）の保存法及びミュータンスレンサ球菌用選択培地等に関する培養技法の改良と、試料中の主要病原因子GTF-B量及び*S. mutans*菌体を迅速に検出定量するための免疫学的技法の改良を行い、多数の臨床試料の分析を通してそれら改良技法の有用性を確認した。さらに、改良培養法を用いて抗菌剤クロルヘキシジン（GHX）のう蝕原因菌除去効果をヒト試験により行い、CHX短期処理後のブラッシング歯垢と刺激唾液のMS比はほとんどパラレルに推移すること、そして、ブラッシング歯垢中のMS比は抗菌性食品添加剤であるキトサンによる連続処理により明らかに低下する事実を明らかにした。これらの結果から、抗菌成分を含有した機能性食品の摂取前後における歯垢試料中のミュータンスレンサ球菌数或いはGTF-B量を改良培養法或いはサンドイッチELISA法にて

定量し比較することにより、食品の持つ抗う蝕性を評価できる可能性が示唆された。

最近、Aranibar Quirozらは、唾液中ミュータンスレンサ球菌レベルが $10^4$ cfu/ml以下のヒト(8名)の歯垢の酸産生能(10%ショ糖含そう後のpH低下を微小電極法にて計測)は $10^6$ cfu/ml以上のヒト(8名)の歯垢のそれより有意に低い事実を見出し報告(Caries Res. 37:51-57, 2003)している。従って、そのような知見から、食品の長期摂取前後における歯垢の酸産生能(ショ糖含そう後のpH低下)の変化を歯垢或いは歯垢懸濁液を用いて調べる方法が、ミュータンスレンサ球菌数或いはその産生物(GTF-B)を測定する上記の方法に代わるより簡便で有用な*In vivo*の抗う蝕性試験法になり得る可能性が示唆される。現在、このような観点に立って、ブラッシング歯垢を用いた酸産生能測定法に関する検討を進めている。

#### F. 健康危険情報

特がない。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

Hanada,N., Fukushima,K., Nomura,Y., Senpuku,H *et al.*: Cloning and nucleotide sequence analysis of the *Streptococcus sobrinus* *gtfU* gene that produces a highly branched water-soluble glucan. *Biochim.Biophys.Acta* 1570:75-79, 2002.

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-Med. Sci.* 1(1):29-32, 2002.

Shiroza,T., Shinozaki-Kuwabara,N., Hayakawa,M., Shibata,Y., Hashizume,T., Fukushima,K. Udaka,S., Abiko,Y.: Production of a single-chain variable fraction capable of inhibiting the *Streptococcus mutans* glucosyltransferase in *Bacillus brevis*: construction of chimeric shuttle plasmid secreting its gene product. *Biochim.*

*Biophys. Acta* 93785:1-8, 2003.

岡田珠美、熱田 亙、河野善治、池見宅司、門沢久美子、福島和雄：ブラッシング歯垢及び刺激唾液中のミュータンスレンサ球菌レベルにおよぼすクロルヘキシジン短期間処理の効果。日本歯科保存学雑誌 第44巻、印刷中、2003.

Ito,K., Nakamura,Y., Tokunaga,T., Takeuchi,T., Fukushima,K.: Anticariogenic properties of polyphenolic compounds from cacao. *Caries Res. in press.* 2003.

##### 2. 学会発表

竹内武男、篠崎紀子、後藤田宏也、上江洲香実、小林清吾、福島和雄：う蝕罹患経験を異にする4学生群からの歯垢懸濁液中ミュータンスレンサ球菌種の検出者率及び菌数レベルの比較。口腔衛生学会誌 52(抄録号):330-331, 2002

飯島大典、篠崎紀子、竹内武男、福島和雄：ブラッシング処理により回収した歯垢懸濁液のう蝕リスク判定用試料としての有用性。口腔衛生学会誌 52(抄録号):332-333, 2002

後藤田宏也、水野恭子、田口千恵子、鈴木瑠美、有川量崇、竹内武男、篠崎紀子、井田博久、福島和雄、小林清吾：歯垢中の*S.sobrinus*の存否、*S.mutans*のレベル及びイオン希釈法による唾液の緩衝能とう蝕リスクとの関連性。口腔衛生学会誌 52(抄録号):326-327, 2002

竹内武男、吉尾雅子、斉藤美芽子、篠崎紀子、水野恭子、藤田宏也、上江洲香実、小林清吾、福島和雄：う蝕罹患経験の異なる4学生群における*S.mutans*と*S.sobrinus*の検出者率及び歯垢中レベルの比較。歯科基礎医学会雑誌 44(5)(抄録集):p156(468), 2002

福島和雄、斉藤美芽子、吉尾雅子、飯島大典、平田広一郎、羽生尚宏、井田博久：個人レベルのう蝕リスク判定に有用な歯垢試料の採取法、保存法及び菌数算定法の検討。歯科基礎医学会雑誌 44(5)(抄録集):p93(405), 2002

熱田 亙、橋爪智美、篠崎紀子、落合智子、小堀樹一郎、牛澤幸司、池見宅司、福島和雄：サンドイッチELISA法による*S.mutans*株のGTF-B産生性の解析。歯科基礎医学会雑誌 44(5)(抄

録集) : p156(468)、2002

水野恭子、後藤田宏也、吉尾雅子、斎藤美芽子、竹内武男、井田博久、福島和雄、小林清吾：唾液中ミュータンスレンサ球菌レベルとう蝕有病との相関 — 改良型MSB培地の疫学的臨床応用 — . 歯科基礎医学会雑誌 44(5) (抄録集) : p154(466)、2002

H. 知的財産権の所有権の出願・登録状況

1. 特許申請

特願2003 - 19952

発明の名称：免疫学的測定方法及び免疫クロマトグラフィー法測定キット

発明者：平田広一郎、宇梶文緒、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  
(H-12-医療-005)

分担研究報告書

食品の再石灰化能をどのように評価すべきか？

分担研究者：飯島 洋一 長崎大学・助教授

研究要旨

食品の有する再石灰化能をどのように評価すべきか、その具体的方法と可能性について検討した。主な検討事項は、Intra-oral cariogenicity test（以下ICTと略）装置を用いる場合の条件設定についてである。ICT装置を用いて食品の再石灰化能を評価する理想的条件は以下の通りである。

1. フッ化物応用の既往が明確なヒト・エナメル質にin vitroで表層下脱灰病変を形成した試料（Bulk）を用いる。
2. 口腔内装置は試料を長期間装着可能で、しかも唾液ならびにプラークとの反応が可能な装置を用いる。
3. 再石灰化能の評価は、ミネラル量の変化が、数値的にも視覚的にも直接モニターできるTMR法で行う。撮影された典型的なMR写真を添付する。

A. 研究目的

食品の素材に関するう蝕誘発性能はin vitroで評価可能であるが、食品そのもののう蝕誘発性能は最終的には口腔環境下で検討されなければ真の効果は評価できない。しかも、食品のう蝕誘発性を評価することと、食品の脱灰—再石灰化能を評価することは表裏一体の関係にある。このような関連から食品のう蝕誘発性を脱灰—再石灰化能の側から評価するためには口腔内環境下で検討することが必要不可欠となる。口腔内環境下で実験を行うための装置はIntra-oral cariogenicity test, ICTである。口腔環境を実験条件として食品の脱灰—再石灰化能を検討してきた研究報告は多く散見される。1992年, Vol. 71; Special Issue, pp 804-956, Journal of Dental Researchの約150頁はIntra-oral Modelに関し国際合意が得られた事項を網羅した研究報告書である<sup>1)</sup>。著者はこれまでICT装置の特徴<sup>2)</sup>、さらには試作したICT装置を使用し、代表的食品としてガムを用いて再

石灰化能に関し評価を試みた報告をしてきた<sup>3)</sup>。ここでは前述の研究報告書<sup>1)</sup>とこれまでの実践から食品の有する再石灰化能をどのように評価すべきか、その具体的方法と可能性について検討した。

本研究の目的は、ICT(Intra-oral cariogenicity test)装置を用いて食品の再石灰化能を評価する理想的な条件設定について明らかにすることである。

B. 研究方法

再石灰化現象の前提として脱灰病変の存在は必須である。う蝕診断に関する最新の国際的合意事項の中でこの脱灰—再石灰化現象を臨床的にどのように評価すべきかについて記述している<sup>4)</sup>。食品の再石灰化能を評価する際、脱灰病変をどのように準備するか、どのような口腔環境条件を用意するか、さらに再石灰化現象は脱灰病変にどのような臨床的变化を与えるのかを



理解しておく必要がある。脱灰-再石灰化現象に関する合意事項をふまえて、口腔環境を実験条件としてICT装置を用いて食品の再石灰化能を評価する際の設定条件、また ICT装置を用いて食品の再石灰化能を評価する際の留意点について文献的に報告されてきた事実に基づき検討した。

## C. 研究結果

ICT装置を用いて食品の再石灰化能評価を行う手順(図1)に準じて設定条件、ならびに留意点についてまとめた。

### I. 試料の準備

口腔内で食品の再石灰化能評価を行うにしても、脱灰病変の準備は口腔外で行うのが一般的である。

#### 1. 歯質の選択:

エナメル質試料を用いるか象牙質であるかは評価の目的によって異なるが、う蝕モデルとして象牙質を用いて口腔内で再石灰化能を評価する場合は失活歯としての象牙質の位置づけとなる。象牙質が生活歯の場合、歯髄液(再石灰化能を有する<sup>5)</sup>)由来の歯髄側からの陽圧下における再石灰化現象が認められるが、この内側からの再石灰化現象を口腔環境で再現・評価することは残念ながらできない。In vitroでは陽圧条件下で検討することは可能であるが<sup>5)</sup>、飲料を除いて食品一般の再石灰化能評価には適さない。エナメル質の場合、唾液由来の外側からの再石灰化現象を考慮すればいいことから、食品の再石灰化能評価に適している。従って特に断わらない限り、以下の記載はエナメル質に関しての内容である。

#### 2. 脱灰病変の形成(表面の処理):

脱灰病変の形成には2つの方法がある。本来あるオリジナルなエナメル質表面を削除して脱灰する、削除しないで脱灰する場合である。脱灰-再石灰化現象を忠実に再現・評価するためにはエナメル質表面を削除しないで脱灰することが望ましい。しかしながら削除しないで脱灰の場合、エナメル質が本来有するフッ化物濃度の影響を受けることになる。そのため実験に使用するエナメル質に関しフッ化物応用の既往(フッ化物塗布、フッ化物洗口、フッ化物配合歯磨剤の使用の有無)が明らかな試料を使用しなければならない。フッ化物応用法の普及により、このようなフッ化物応用の既往の無い試料を収集することが現実には困難になっている。

#### 3. 脱灰病変の形成(期間と病変のタイプ):

実験う蝕モデル(in vitro)では脱灰病変の形成期間は、乳酸緩衝液を用いて多くの場合2~3日間、長い場合であっても1ヶ月以内である文献)。実際の口腔内でブラーク直下(in vivo)に表層下脱灰病変が形成されるまでの期間は数ヶ月から数年単位であると考えられている。この差は、形成される表層下脱灰病変の深さと病変の形態に反映される(表1)。In vitroで形成する脱灰病変は均一の深さ100 $\mu$ m前後であり、in vivoで形成される脱灰病変は円錐形ないし不成型で深さ1000 $\mu$ m近くに及ぶことがある<sup>6)</sup>。脱灰-再石灰化反応の解明には脱灰病変のこの違いを実際には考慮しなければならないが、in vivoで形成される脱灰病変を使用する場合、生物学的多様性(Biological variation)のため評価には煩雑な専門的方法が必要とされる<sup>6)</sup>。この理由から実験う蝕モデルとしてin vivoで形成された脱灰病変を使用するのは実際的でない。

またin vivoならびにin vitroの脱灰病変の違いだけでなく、in vitroの脱灰病変においても脱灰病変のタイプとしてよく知られている表層下脱灰病変(Subsurface lesion)と、いわゆる軟化型脱灰病変(Softened lesion)がある<sup>7)</sup>。Ca/P過飽和・萌出後のエナメル質成熟を経験する口腔内環境で形成される脱灰病変のタイプは一般的に表層下脱灰病変であることを考慮すると、表層下脱灰病変を実験う蝕モデルとして試験に供用することが望ましい。

#### 4. 脱灰試料切片のタイプ:

脱灰試料を一塊のブロック(bulk)あるいは薄切切片(Single section)(図2)として実験に供するかによってそれぞれの利点・欠点が異なる。ブロックの場合、試料面積が大きく確保(2x2 mm以上)できるため実際の口腔内条件に近似している。一塊として試料を取り扱うことにより破損の恐れがない。一方、口腔内実験条件下では同じ反応が試料全体何処でも起きているとは限らない。部位により反応が異なるため何処を解析するかによって評価値が異なることがある。

薄切切片の場合、試料面積が小さいため(幅100 $\mu$ m前後)実際の口腔内条件に近似しているか不安がある。一方、口腔内実験条件下では脱灰-再石灰化のたびに薄切切片試料を取り扱うことによる破損の恐れがある。ただし最大の長所は、同一の薄切切片試料を脱灰から再石灰化まで一貫して実験に供することによる試料間のバ

ラツキを最小化することができること。さらには統計学的検定では対応のある検定（対応の無い場合に比較して、有意の差が得やすい）が可能になるなどの特徴がある。

## II. 口腔内装置の準備

1. 装置の概要：各種口腔内装置（表2）を考案し、工夫する理由は、いかに口腔内環境そのものに近い状態で食品の再石灰化能の評価をすることがポイントである。したがって口腔内環境を変更することになる装置は望ましくない。しかも、食品の再石灰化能の評価には、被検査食品が通常摂取される状況下が再現できる装置で通常の摂取頻度を逸脱しない摂取頻度で実施することが望ましい。理想的には24時間装着が可能で、1ヶ月程度は口腔内環境に保持できる装置により長期間にわたる効果を検討できることが望ましい。

### 2. 唾液との反応：

特に唾液の要因は、脱灰の抑制-再石灰化の促進の両方に関与している重要な因子である。唾液がエナメル質試料と十分に接触できる配慮が必要不可欠である。食品摂取時の刺激唾液との反応のみならず、その後の安静唾液との反応時間も確保されていることが望ましい。そのためには唾液が溜まり流れる部位である下顎臼歯部頬側は唾液との反応部位としては最適であると思われる。上顎口蓋部は通常は歯が存在しない部位であると同時に、唾液の流れは舌の動きに影響されやすい部位である。

### 3. プラークとの反応：

唾液と同様にプラークの要因は、酸生成時は脱灰の促進に強く関連している重要な因子である。一般的にエナメル質試料面はプラークに覆われることなく実験に使用される。しかしながら、コンタクトの隣接面や咬合面の小窩裂溝は常にプラークが存在していると考えられる部位である。したがってプラーク存在下でも再石灰化能が継続していることを実証できれば、被検査食品の再石灰化能の一般化（いかなる口腔環境下であってもという意味）のみならず耐酸性を有している可能性が示唆されることになる。プラーク被覆条件は、次のようにして行う。

①in situ 条件下では、エナメル質表面を装置表面よりも1mmほど凹ませて装置に装着する。

②装置表面を不織布やガーゼで被覆し、プラーク生育の場を確保する。エナメル質表面と不織布の間のスペースにプラークが付着・生育する。プラークの厚さが均一となるためにはスペース

も浅い所、深い場所など偏りがないように配慮する。

③プラークがエナメル質表面に付着・生育しやすいように最初の3日間は積極的に砂糖菓子を摂取させる。

食品の耐酸性能を簡便に評価する方法は、脱灰病変を形成するときに使用した乳酸緩衝液に再石灰化後の試料を再度・同じ期間 in vitro で浸漬し、エナメル喪失量を定量することで評価が可能である。In vitro で酸に浸漬させることで、in situ 条件とは異なりエナメル質表面に酸が均一に作用する特徴がある。

## III. 実験デザイン

1. 通常の商品摂取方法ならびに食品形態で実施する：被験食品の特異的な再石灰化能を評価するわけではない。日常的に被験食品を摂取する程度（量、回数、時間）を越えない摂取計画をデザインする必要がある。

2. ダブルブラインド・クロスオーバー試験：ダブルブラインド（二重盲検法）は測定バイアスを減らす上で不可欠な方法である。評価者、被験者の両方に情報が伏せられて実験が行われる。評価終了後に実験群が対照群であるかを照合する方法である。第3者であるコントローラーが情報を管理することが望ましい。

クロスオーバー試験：クロスオーバー試験は時間依存性の交絡の影響を減らすことができる。被験者をランダムに割り付け、1群には第1期にはブラシーボ、第2期に被験食品を、2群ではこれと逆の順序で行うという試験である。被験食品の影響が介入を中止した後も尾を引いて残る場合、第1期と第2期の間に回復期間

（Washout periods）を設ける必要がある。期間の長短は介入前と同じ状態に戻るまでの時間に依存する。

3. ポジティブコントロールとして唾液による再石灰化能と同様あるいは、それを超える効果が認められることが必要：食品摂取の過程で唾液が関与する。唾液は液体エナメルと称されるように、歯質と共通イオン（Ca/P）を過飽和に含有しており文献）、本来的に再石灰化能を有している。したがって、食品の再石灰化能の評価には最低限、この唾液本来の影響の程度を評価するポジティブコントロールの設定ならびに被験食品による影響を評価する実験群を設定し、両者を比較する必要がある。

4. 口腔清掃製品等の使用制限：再石灰化促進に関与するフッ化物配合歯磨剤やフッ化物洗口

剤等は実験期間中の使用を制限することが望ましい。日常の飲食・間食等（茶、紅茶、ミネラルウォーター等）は実験の目的にもよるが制限をすることが困難なこともあり、一般的には制限をする必要はない。ただし摂取した飲食・間食等の記録をしておくことは、評価の際の参考となる。

#### IV. 再石灰化の評価

1. 脱灰-再石灰化現象の評価法には国際基準が定められている<sup>8)</sup>。その詳細な全様は文献に記載されている。脱灰-再石灰化はミネラルの選択的溶出と回復を基礎とした現象であり、従ってミネラル量の変化を直接・間接的に定量することが最優先となる。これまでの方法で直接的にミネラル量进行评估できる方法は、透過タイプのマイクロラジオグラフ (TMR; Transverse microradiography) である。TMRの評価で必要とされる指標は、撮影されたMR写真から、第一に喪失ミネラル量を意味する $Z$  (vol%  $\times \mu\text{m}$ ) であり、第二にはミネラルの分布を表すプロファイルである。前者は数値データであり、後者はX軸に表層から健在部までの深さ、Y軸に深さに対応したミネラル量をプロットしたミネラルの変化曲線であり、どの部位にミネラル量が多いか少ないかが視覚的に理解できる。その他、偏光顕微鏡による脱灰-再石灰化部の空隙の程度 (Porosity Change) を計測する方法や、脱灰-再石灰化部の硬度を歯質表面ならびに試料断面から計測する方法がある。これらはいずれもミネラル変化を間接的に評価する方法である。

2. 統計学的検定：有意差検定の検定には、3群以上の場合は $t$ 検定の繰り返しを行ってはならない<sup>9)</sup>。 $t$ 検定は2群のみの比較だけに用いられることに注意が必要である。3群以上の多群の比較には、一般的には多重比較法に準じて行う。ただし、3群以上の多群であっても常に対照群とだけ比較をする場合にはDunnnett法による検定を行う必要がある。

#### D. 考察及び

必要不可欠なICT(Intra-oral cariogenicity test)装置を用いて食品の脱灰-再石灰化能を評価する理想的なデザインは、以下の諸点を配慮した条件設定で行うことが望ましいと思われる。フッ化物応用の既往が明確なヒト・エナメル質にin vitroで表層下脱灰病変を形成した試料

(Bulk)を用いる。

2. 口腔内装置は試料を長期間装着可能で、しかも唾液ならびにプラークとの反応が可能な装置を用いる。

3. 再石灰化能の評価は、ミネラル量の変化が、数値的にも視覚的にも直接モニターできるTMR法で行う。撮影された典型的なMR写真を提示することは理解を深めることになる。

しかしながら、ICT装置を用いてTMR法で評価を行うことに問題が無いわけではない。その方法の限界について考察を行う。ICT装置を用いてTMR法の限界に関連した報告<sup>10)</sup> 1例しか存在しない。この方法では再石灰化の発現を確認できない場合がある。この事実には2つの意味が包含されている。1つは再石灰化の発現を確認できないのは、被験者の口腔内環境が再石灰化優勢な条件でなかった事実由来すること。著者らは、再石灰化能の低いあるいは無い被験者が存在していることを主な理由と考えている。しかしながら、2つめは方法自体に内在する短所があると考えられる。この方法でミネラル量の回復を確認するにはMR写真上で明らかかな程度にまでミネラルの回復が発現しなければならない。この評価法は微細なミネラルの変化がモニターできる程には感度は高くない。したがって、明らかかな変化が確認できる実験デザイン(再石灰化期間やフッ化物応用等)を考慮する必要がある。

また象牙質を被験試料としてTMR法で評価を行う際には、象牙質試料は乾燥によって収縮する性状にある<sup>11)</sup>。象牙質試料のMR写真はミネラル量と深さ、いずれの指標とも乾燥・収縮によって影響を受ける。乾燥を回避するために、試料を水や相対湿度100%状態にしながらMR写真を撮影するなどの特別な配慮が必要となる。

#### E. 結論

ICT(Intra-oral cariogenicity test)装置を用いて食品の再石灰化能を評価する理想的な条件設定は以下の通りであった。

1. フッ化物応用の既往が明確なヒト・エナメル質にin vitroで表層下脱灰病変を形成した試料 (Bulk)を用いる。

2. 口腔内装置は試料を長期間装着可能で、しかも唾液ならびにプラークとの反応が可能な装置を用いる。

3. 再石灰化能の評価は、ミネラル量の変化が、

数値的にも視覚的にも直接モニターできるTM R法で行う。撮影された典型的なMR写真を添付する。

F. 健康危険情報

特にない。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Daisuke Inaba, Koji Kawasaki, Youichi Iijima, Nobuhiro Taguchi, Hideaki Hayashida, Tadash Yoshikawa, Reiko Furugen, Emiko Fukumoto, Takashi Nishiyama, Keiko Tanaka, Okiuji Takagi: Enamel fluoride uptake from

mouthrins solutions with different NaF concentration, Community Dent Oral Epidemiol.vol. 30, No.4,p.248-253, 2002.  
2. 飯島洋一：再石灰化処置の臨床, デンタルダイヤモンド 27 (16) :63-67, 2002.

2. 学会発表

第51回口腔衛生学会総会で発表予定。  
Y.IIJIMA, F. SHINSHO : Remineralization of enamel by chewing gum containing CPP-ACP, 50<sup>TH</sup> Japanese Association for Dental Research, Sendai, 2002.

H. 知的財産権の所有権の出願・登録状況  
特にない。

図1. ICT装置を用いて食品の再石灰化能評価を行う手順

