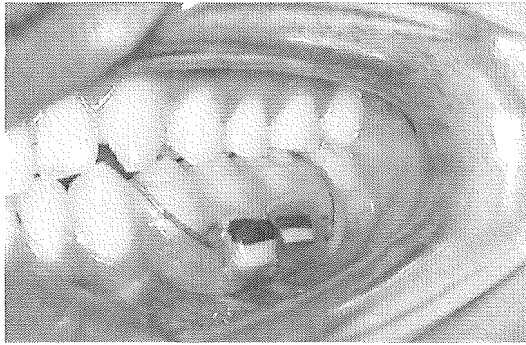


図2. 脱灰試料切片の種類と口腔内装置の組合せ

ブロック試料を義歯タイプの  
口腔内装置に装着



薄切切片試料タイプを義歯タイプの  
口腔内装置に装着

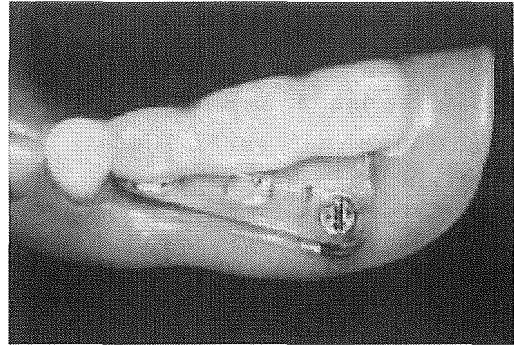


表1. In vitro と in vivo の脱灰病変の特徴

	In vitro 条件	In vivo 条件
脱灰深度	100 $\mu\text{m}$ 前後	最大 1000 $\mu\text{m}$ に及ぶ
脱灰底部の形状	均一な脱灰底部	円錐形や 不均一な脱灰底部
脱灰病変のタイプ	表層下脱灰病変	表層下脱灰病変

表2. 各種口腔内装置の主な種類とその特徴

タイプ	記載文献	特徴
義歯タイプ	J Biol Buccale. 3; 185-196, 1974. J Dent Res. 71(Sp): 822-827, 1992. Caries Res. 18; 421-429, 1984. Caries Res. 19; 126-135, 1985. Caries Res. 34; 388-394, 2000.	口腔内での着脱がいつでも可能。 ブロック試料, 薄切切片ともに装着 が可能。 全部床義歯と局部床義歯のタイプが ある。 上顎あるいは下顎のいずれにも装着 が可能。 最も一般的に用いられる。 口腔内環境が小児ではない。
クラウン タイプ	J Dent Res. 71(Sp): 860-863, 1992. J Dent Res. 69: 626-633, 1990.	口腔内に固定されるため着脱は実験 終了時。 薄切切片, ブロック試料の装着にも 適している。 装着可能な被験者の選択に難点
矯正バンド タイプ	Am J Orthod Dentofac Orthop. 94; 68-73, 1988. J Dent Res. 71(Sp): 832-835, 1992.	生活歯を被験歯に使用する (矯正理 由の抜去予定歯)。 実際の口腔環内境で検討可能 (小児 の口腔内環境)。 多くの被験者の確保が困難。
口腔内装置 タイプ	口衛誌 44; 286-293, 1994. 口衛誌 44; 185-193, 1994.	口腔内に固定されるため着脱は実験 終了時。 上顎あるいは下顎のいずれにも装着 が可能。 薄切切片, ブロック試料の装着にも 適している。 装着可能な被験者の選択が容易。 装着までの手順が煩雑。

87 Remineralization of Enamel by Chewing Gum Containing CPP-ACP.  
Y. IJIMA\* and F. SHINSHO (Nagasaki University Graduate School of  
Biomedical Sciences, Nagasaki, Japan)

The aim of this study was to assess the difference in remineralizing potential of CPP-ACP (casein phosphopeptide-amorphous calcium phosphate) in sugar-free chewing gum on enamel using *in situ* model with and without dental plaque. Eight subjects in cross-over, double-blind studies wore removable intra-oral appliances with two enamel lesion samples. All subjects chewed 1% CPP-ACP and placebo gums (not containing CPP-ACP) for 20 min 4 times daily for 2 weeks. The samples were sectioned, microradiographed and the level of remineralization and mineral profiles were evaluated. Placebo gum resulted in an increase in enamel mineral through remineralization without plaque. However, remineralized mineral in the placebo gum was lost from the surface of the enamel with plaque condition. Compared with the demineralized enamel as a control, the mineral values of CPP-ACP groups resulted in a significant increase ( $p < 0.05$ ) of ca. 3000 vol%  $\cdot \mu\text{m}$ . CPP-ACP gum has a remineralizing effect on enamel lesions without plaque. Remineralized mineral profile of CPP-ACP gum was retained at the surface (less than 100  $\mu\text{m}$ ) even with plaque remaining condition. The proposed mechanism of mineral gain by CPP-ACP is that they contribute to an elevated salivary flow rate while chewing and to maintaining a level of super-saturation with respect to enamel enhancing remineralization. This research was supported in part by a Grant H12-IRYOU-005 from the Ministry of Health, Labour and Welfare of Japan.

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

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

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

昨年度に引き続いて、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 mutans* 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) ウシエナメル質切片的の作製

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、平滑した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。

2) 人工口腔装置

人工口腔装置は 2 つの人工口腔部分と恒温器、pH メーター、ローラーポンプ、冷却攪拌器から構成した。人工口腔部分は周囲をウォータージャケットで包まれていて、恒温器により装置内部を 37℃ に維持した。人工口腔の上部に 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シリコンゴムによって固定し、ホルダー上面に 4 枚のウシエナメル質切片をコ

一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 (6ml/hr/チューブ) して、各試料が平面 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固定した (図 1)。実験中、各試料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 本を糖質用にした。また、2 つある人工口腔の 1 つを実験群、もう 1 つを対照群とした。

### 3) 使用菌株と糖質

BHI 液体培地で前培養した *Streptococcus mutans* MT8148 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 OD<sub>500</sub> の濁度を測定し、そこに PBS を加えて OD<sub>500</sub>=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 OD<sub>500</sub> 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) 滴下実験による pH の変化

*Streptococcus mutans* MT8148 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 を合わせて滴下した場合、1% スクロース単独では pH は滴下開始約 8 時間後に低下しはじめ、約 14 時間後には pH5.5 となり、22 時間後の滴下終了時には pH4.5 となった。1% スクロースと 1% XF 共存下では、pH は滴下開始約 8 時間後に低下しはじめ、約 17 時間後には pH5.5 となり、22 時間後の滴下終了時には pH4.7 となった。さらに 1% スクロース単独または 1% スクロースと 2.5% XF を合わせて滴下した場合、1% スクロース単独では pH は滴下開始約 8 時間後に低下しはじめ、約 16 時間後には pH5.5 となり、22 時間後の滴下終了時には pH4.7 となり 1% スクロースと 2.5% XF 共存下では、滴下開始 8 時間後に pH7.2 となり、16 時間後に pH7.0 となり、22 時間後の滴下終了時には pH6.8 であった (図 2)。

エナメル質切片の硬度変化

*Streptococcus mutans* MT8148 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は、1% スクロース単独では  $245.8 \pm 8.4$ 、1% スクロースと 1% XF の共存では  $244.2 \pm 11.3$  で有意な差は認められなかった。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% スクロース単独では  $242.7 \pm 5.4$  で、1% スクロースと 2.5% XF の共存では  $11.1 \pm 3.0$  で 2.5% XF 共存下で硬度変化の有意な低下が見られた。

### 3) 人工バイオフィーム形成量の評価

滴下後の平面 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ーム量を菌体濁度の測定とグルカン量の定量から評価した。

*Streptococcus mutans* MT8148 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% スクロース単独の濁度は  $0.01 \pm 0.005$ 、グルカン量は  $4.53 \pm 0.99$  であった。1% スクロースと 1% XF 共存下の濁度は  $0.01 \pm 0.002$  で、グルカン量は  $4.18 \pm 0.63$  であった。1% XF 共存下での菌体濁度とグルカン量は共に 1% スクロース単独の場合に比べ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  $0.01 \pm 0.002$ 、グルカン量は  $1.85 \pm 0.69$  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  $0.001 \pm 0.0001$ 、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ーム形成量は 1% スクロース単独の場合より有意に低下した。

## D. 考察

本実験で用いた人工口腔装置は、人工バイオフィルム量、人工バイオフィルム下 pH、エナメル質硬度という、う蝕誘発と深い関わりをもつ 3つのパラメーターを同時に測定、ないし定量することが可能な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. mutans* 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。

食品あるいは食品素材のう蝕原性を評価するための *in vivo* の方法には動物試験、ヒト被験者による pH 測定試験、ヒト被験者による Intraoral cariogenicity test (ICT) とがあり、*in vitro* の方法と併用されているのが現状である。*in vitro* および *in vivo* の方法にはそれぞれ長所と短所があり、単独の方法でう蝕原性を評価することは今のところ難しい。ただし、代用甘味料あるいは代用甘味料含有食品のようにそれ自身が口腔内細菌に資化されなければよい、というものであれば、ヒト被験者での電極内蔵法単独でも評価はできるかもしれないが、pH のカットオフ値次第では基準が厳しくなりすぎて好ましい食品を見落とす可能性はある。とは言え、動物試験やヒト被験者による *in vivo* の方法を凌ぐ *in vitro* の方法が今のところ存在しない。*in vivo* の方法には倫理的、時間的、経済的制約があり、汎用評価系とするには限界がある。そこでできるだけ *in vivo* の結果を反映できるような *in vitro* の評価系の確立が待たれる。また、再石灰化促進物質のような抗う蝕活性物質を含む機能性食品も創出され始めている。今後、さらに新しい働きをもった機能性食品が創出されることも想定される。将来的にはそうした食品でも評価できるような *in vitro* 評価系の確立が待たれる。

今回の試験に用いた人工口腔装置では、*S. mutans* MT8148 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

人工バイオフィルム量、バイオフィルム下 pH、エナメル質脱灰度を定量できる人工口腔装置を用いて、ミュータンスレンサ球菌の GTF に対して阻害活性をもつキシロシルフルクトシドの人工バイオフィルム形成量、バイオフィルム下 pH、エナメル質脱灰度に及ぼす影響を調べた結果、キシロシルフルクトシドは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

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.

### 2. 学会発表

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.

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)

分担研究報告書

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

分担研究者：高橋 信博・東北大学・教授  
(大学院歯学研究科 口腔生物学講座 口腔生化学分野)

研究要旨

キシリトールはフッ素のもつミュータンスレンサ球菌糖代謝阻害作用を増強した。糖代謝中間体の解析からキシリトールとフッ素は異なる機序で糖代謝を阻害し、それが相乗効果をもたらす原因と考えられた。キシリトールの併用でフッ素使用濃度の低減化が可能であることが示唆される。

A. 研究目的

前年度までの研究から、キシリトールの阻害効果とその生化学的機構について解明が進んだ。しかし、キシリトール以外にも歯垢細菌の糖代謝阻害効果の報告されている化合物は数多い。実際の臨床応用を考えた場合には、キシリトール単独だけではなく他の糖代謝阻害剤と併用することによってより高い阻害効果を持つものの方が有用であろう。そこで今年度は、キシリトールに代表的な歯垢細菌糖代謝阻害剤としてフッ素を添加し、その糖代謝阻害効果が増強するかどうかを検討することとした。

B. 研究方法

(1) 使用菌株と細菌の増殖：

齲蝕誘発性の高い代表的歯垢細菌としてミュータンスレンサ球菌 (*Streptococcus mutans* NCTC 10449 および *Streptococcus sobrinus* 6715) を用いた。細菌は 0.2% のグルコースを含むペプトン培地で嫌氣的に培養 ( $N_2$  80%,  $H_2$  10%,  $CO_2$  10%) した。

(2) 細菌の酸産生活性の測定：

特に断らない限り以下の実験は全て嫌気ボツ

クス内 ( $N_2$  90%,  $H_2$  10%) で行った。

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、フッ素 (0~6.4 mM) のみ、キシリトール (60 mM) のみ、およびそれらの混合液を加え、4 分間 37°C で予備振蕩後、グルコース (10 mM) を加え、10 分間、細菌が産生する酸量をモニターした。反応の pH として安静時歯垢を模した 7.0 と酸産生時を模した 5.5 の 2 種を採用した。

(3) 菌体内糖代謝中間体の定量

*S. mutans* NCTC 10449 を用いた pH 7.0 の実験系では、グルコース添加してから 2、4 および 6 分後に、反応液をフィルターで濾過し (孔径 0.22  $\mu m$ ; Millex GV, Millipore) 細菌をフィルター膜上に捕捉した。直ちにそのフィルター膜に上記緩衝液を通して菌を洗い、次いで 0.6 N 過塩素酸を通して菌体内に含まれる糖代謝中間体を抽出した。抽出液を中和後、酵素法で各糖代謝中間体を測定した。酵素反応に伴い糖代謝中間体量は NAD(P)H の増加もしくは減少量として表される。この NAD(P)H 量の



増減は蛍光分光光度計を用いて定量した。

### C. 研究結果

(1) pH 7.0 および pH 5.5 で、フッ素は濃度依存的に *S. mutans*、*S. sobrinus* の酸産生を低下させた。

(2) *S. mutans*、*S. sobrinus* はともに、フッ素単独よりもキシリトールと併用した方が酸産生量は少なくなった。例えば pH 5.5 で 0.2 mM のフッ素単独の場合、*S. mutans* の酸産生量を 21.8% 阻害したが、60 mM のキシリトールと併用するとその阻害率は 88.5% に増強した。*S. sobrinus* でも、同様のキシリトール併用によるフッ素阻害増強効果が見られた。

(3) キシリトールの添加により、*S. mutans* の糖代謝中間体は、fructose 1,6-bisphosphate (FBP) レベルが著しく減少し、その上流の glucose 6-phosphate (G6P) と fructose 6-phosphate (F6P) も減少する傾向が見られた。一方、フッ素添加では 3-phosphoglycerate (3PG) と 2-phosphoglycerate (2PG) レベルが増加した。キシリトールとフッ素を併用した場合は、G6P、F6P、FBP の減少と 3PG、2PG の増加がみられ、ちょうどキシリトール添加時の中間体プロファイルとフッ素添加時の中間体プロファイルが重なり合った形となった。

### D. 考察及び E. 結論

以上のことから、キシリトールは、ミュータンスレンサ球菌の糖代謝に対するフッ素の阻害効果を増強すると考えられた。

糖代謝中間体プロファイルの解析から、キシリトールは主に糖代謝上流の代謝反応を阻害するのに対し、フッ素は主にその下流とくにエノラーゼ反応を阻害することが確認された。フッ素はエノラーゼ阻害を介して糖取り込みに必要な phosphoenolpyruvate (PEP) の供給を減少させ、その結果、糖代謝阻害が起こすと考えられており、その阻害効果は糖代謝開始前の PEP ポテンシャル (PEP に、PEP の前駆体である 3PG、2PG を加えた合計量) レベルが低くなっている時ほど大きくなると報告されている。フッ素とともにキシリトールが存在する場合、予備振蕩の間に PEP がキシリトールのリン酸化基質として消費され、PEP ポテンシャルが低下してしまうことが予測され、このことがフッ素の阻害効果を増強させたものと考えられる。一方、キシ

リトール単独でも同様の PEP ポテンシャルの低下が考えられるが、エノラーゼは阻害されないことから、グルコース添加後の糖代謝開始に伴い直ちに PEP ポテンシャルの回復 (あるいは PEP の供給) が可能であり、糖代謝阻害の程度は低くなるものと考えられる。

フッ素とキシリトールはともにエナメル質再石灰化効果があると報告されており、その併用により再石灰化効果は増強することが示されている。本研究で、再石灰化増強に加え、この 2 者の併用はミュータンスレンサ球菌の糖代謝阻害効果を増強することを明らかにしたことから、う蝕予防を目的としたこの 2 者を併用した洗口剤等は、臨床的にその効果が期待できるものと思われる。

う蝕予防に対するフッ素の効果についてはほぼ異論がないものの、その安全性についてはいまだ議論の決着を見ない。このような現状下、フッ素の長所を生かすためには、できるだけ低い濃度のフッ素を使用し最大の効果を得る方法を模索することが重要であろう。キシリトールがフッ素の糖代謝阻害効果を増強することは、キシリトールの併用によってフッ素使用濃度の低減化が可能であることを示唆する。

### F. 健康危険情報

特になし。

### G. 研究発表

#### 1. 論文発表

Takahashi N, Sato T. Dipeptide utilization by periodontopathic bacteria, *Porphyromonas*, *Prevotella* and *Fusobacterium*. *Oral Microbiol Immunol* 17: 50-54, 2002.

Takahashi N. Biochemical approach to dental plaque ecosystem. *Tohoku Univ Dent J* 21: 18-32, 2002. (in Japanese)

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* (in press).

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).

## 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。東北歯誌 22(1): (in press).

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

研究要旨

齲蝕病原性を有する食品が口腔に摂取された際、その病原性は口腔全体の歯牙に等しく及ぶと考えるとよいのであろうか。もし口腔各部位においてその病原性に差が見られるのであれば、その病原性の及ぶ程度の範囲を把握すると共に、病原性が最も著しく及ぶ部位を想定した病原性評価を行わなければならない。

本研究では食品の口腔内齲蝕病原性評価における唾液の関与について明らかにすることを目的に、食品の代わりにフッ化物を用い、フッ素溶液洗口後のフッ素の口腔に停滞する時間、および口腔内各部位における停滞量を測定し、若干の考察を行った。

A. 研究目的

前年度までの研究から、キシリトールの阻害効果とその生化学的機構について解明が進んだ。しかし、キシリトール以外にも歯垢細菌の糖代謝阻害効果の報告されている化合物は数多い。実際の臨床応用を考えた場合には、キシリトール単独だけではなく他の糖代謝阻害剤と併用することによってより高い阻害効果を持つものの方が有用であろう。そこで今年度は、キシリトールに代表的な歯垢細菌糖代謝阻害剤としてフッ素を添加し、その糖代謝阻害効果が増強するかどうかを検討することとした。

B. 研究方法

【対象と方法】

(1) フッ素溶液洗口後の唾液中フッ素濃度の継続的測定について：

実験 1. 覚睡時での実験

本研究に理解を示した健康な被験者 6 名（平均年齢 32 歳、男性 5 名、女性 1 名）を対象に、ブラッシング後、安静時唾液分泌速度を通法に

より計測し、450 ppm フッ素溶液 10 ml で 30 秒間洗口させた。その後 15、30、60、120、150 分後に安静時唾液分泌速度を測定し、それぞれ採取した唾液 1 ml にイオン強度調整剤

(TISABIII、Thermo Orion 社製) 0.1 ml を攪拌混和してフッ素濃度を測定した。実験開始時刻は唾液分泌速度の日内変動を考慮して午後 2 時とし、フッ素濃度測定には Thermo Orion 社製フッ素複合電極およびイオンメーターを用いた。実験中は飲食、喫煙を禁じた。

実験 2. 睡眠時での実験

次に睡眠時、唾液分泌量が低下したときの状態を把握するために、同じ被験者を対象に、実験を行った。すなわち午前零時にブラッシング後、覚睡時と同様、450 ppm フッ素溶液で 30 秒間フッ素洗口を行わせ、直ちに就寝させ、午前 6 時 30 分、起床直後に安静時唾液分泌速度、ならびに唾液中フッ素濃度を同様に測定した。

(2) 口腔に停滞するフッ素濃度の部位特性について：

直径 4 mm、深さ 1 mm の円筒形アクリル製の寒天ホルダーを作成し、寒天 0.15 g、フッ

化ナトリウム 0.01g、蒸留水 5ml をボイルし、スポイトで寒天ホルダーに注入して凝固させた。予備実験として、寒天ホルダーをスターラーで攪拌した蒸留水中にそれぞれ浸し、フッ化ナトリウムが寒天から蒸留水中に溶出する量と時間の関係を確認した。寒天中のフッ化ナトリウム濃度の測定は、口腔内に一定時間留置した後、ホルダーから寒天を取り出し、2ml の蒸留水中に入れ、寒天中のフッ化ナトリウムを溶出させた。その後 0.2ml のイオン強度剤を加え、フッ素濃度を通法により測定した。口腔内各部位のフッ素濃度の差は、初めのフッ素濃度が 1/2 の濃度になる時間 half-time を求めて比較した。口腔内に寒天を留置する方法は以下のように行った。同被験者 6 名を対象に上下顎石膏模型を作成し、厚さ 0.5 mm のセルロイド板による各被験者の実験用シーネを作成した。シーネには上顎前歯部唇面部 (UAB)、左右上顎臼歯部頰側面部 (UPB-L、UPB-R)、下顎前歯部舌側面部 (LAL) に予備実験で用いた円筒形アクリル製寒天ホルダーを接着させた。

#### 実験 1.

被験者の安静時唾液分泌速度を通法により測定した後、ホルダーに寒天が注入された上下顎のシーネを時間を変えて (30 分、60 分、90 分、120 分) 口腔に装着し、それぞれの時間に引き上げた寒天中に含まれるフッ素濃度を計測して half-time を求めた。

#### 実験 2

午前零時に同様にして上下顎のシーネを口腔

に装着し、直ちに就寝させ、朝 6 時半に上下顎のシー

ネを取り出し、同様に各々の寒天中フッ素濃度を測定した。実験は 1, 2 とも 3 回行い平均値を求めた。

#### C. 研究結果

フッ素溶液洗口後の継時的な唾液中フッ素濃度研究結果と起床時の測定結果を表 1 に示した。それによると洗口直後は被験者 4 を除いて、各被験者は 10ppm 以上の濃度を示した。しかしその後速やかに濃度は減少し、洗口 15 分後には被験者 4 を除いた各被験者は 1ppm 以下の濃度に下がった。起床時の状態は覚睡時のほぼ 15 分から 30 分間の値に一致していた。

表 2 には各部位におけるフッ素濃度の half-time を示した。

各被験者とも UAB の half-time がもっとも長く、フッ素の残留率が多いことを示している。被験者 4 5 6 は LAL が最も half-time が短かった。

表 3 は各被験者の起床時におけるフッ素濃度の割合を示している。数値は time 0 すなわち口腔に入れなかった寒天中フッ素濃度を 100 とした割合で示した。被験者 1 を除いて、各被験者とも UAB がもっとも残留率が多く、他の 3 部位との間に有意差が認められたが、他の 3 部位間には有為差が認められなかった。

表 1 フッ素溶液洗口後の唾液中フッ素濃度の変化 (単位 : ppm)

被験者		平常時	洗口直後	15分後	30分後	60分後	120分後	起床時
Sub1	mean	0.077	12.722	0.434	0.219	0.127	0.114	0.549
	(SD)	0.052	9.334	0.135	0.046	0.079	0.070	0.255
Sub2	mean	0.077	47.233	0.908	0.243	0.162	0.060	0.469
	(SD)	0.051	42.927	0.313	0.129	0.090	0.026	0.248
Sub3	mean	0.025	22.000	0.511	0.138	0.059	0.040	0.728
	(SD)	0.012	6.083	0.310	0.077	0.016	0.021	0.051
Sub4	mean	0.011	2.370	1.296	0.070	0.093	0.013	0.627
	(SD)	0.015	3.501	1.886	0.098	0.125	0.017	0.390
Sub5	mean	0.103	27.100	0.833	0.298	0.156	0.126	0.327
	(SD)	0.083	8.314	0.241	0.062	0.094	0.071	0.160
Sub6	mean	0.033	17.157	0.967	0.169	0.103	0.060	0.557
	(SD)	0.022	22.055	0.909	0.026	0.055	0.004	0.364

表2 口腔内各部位におけるフッ素濃度の half-time(分)

	UAB	UPB-L	UPB-R	LAL
Sub. 1	70.0	30.3	59.2	41.3
Sub. 2	28.4	16.6	19.2	21.2
Sub. 3	30.3	17.4	15.8	19.6
Sub. 4	37.5	31.2	23.3	21.1
Sub. 5	31.2	22.8	21.8	19.3
Sub. 6	59.8	38.5	24.3	22.7

UAB:上顎前歯部唇側, UPB-L:上顎臼歯部頬側一左側,  
UPB-R:上顎臼歯部頬側一右側, LAL:下顎前歯部舌側

表3 起床時の口腔内各部位におけるフッ素濃度(%)

	UAB	UPB-L	UPB-R	LAL
Sub. 1	17.1±7.6	10.6±0.2	23.9±8.9	36.0± 4.2
Sub. 2	24.8±6.3	2.3±0.7	2.2±0.5	2.4± 0.5
Sub. 3	19.5±7.6	7.7±1.8	3.2±1.8	9.2± 3.0
Sub. 4	11.4±1.8	9.2±4.1	6.7±2.9	6.2± 2.3
Sub. 5	27.1±9.4	17.2±3.5	9.0±0.0	8.1± 4.6
Sub.	21.7±0.7	10.9±0.3	7.4±2.4	4.9± 1.6
平均	20.8±7.8	9.6±4.6	8.7±8.2	10.9±11.8

UAB:上顎前歯部唇側, UPB-L:上顎臼歯部頬側一左側  
UPB-R:上顎臼歯部頬側一右側, LAL:下顎前歯部舌側

#### D. 考察及びE. 結論

450ppm のフッ素溶液で30 秒間洗口した場合、直後の全唾液中には平均21ppm のフッ化物が残留し、15分後にはそれが平均0.8ppm にまで減少していた。一般に刺激によって唾液分泌速度が上昇すると嚥下回数と1回に嚥下される唾液量が増加<sup>1)</sup> することが知られている。15分後においては唾液分泌速度はほぼ安静時唾液に戻っていると思われるが、その間の口腔の洗浄能力は著しいものがある。口腔細菌が食品の成分を取り込むことが考えられるが、この点については Dawes<sup>2)</sup> らは dead bacteria を含む人口プラークを用いた in vitro の実験において、ショ糖添加による pH 低下に対し、人口プラーク上を流れる蒸留水の速さによってその後のステファンカーブが影響されることを示している。

一方口腔内各部位のクリアランスを見ると、各被験者とも UAB が最も残留率が多く、

LAL が最も少なかった。このことはある食品を摂取直後においては、食品はほぼ口腔全体に等しくいきわたるものの、その後の食品の歯に及ぼす影響は部位によって異なることを示唆していると思われる。現在、口腔内での食品の影響による pH 測定は主に下顎臼歯部において行われているが<sup>3)</sup>、最も影響の強く現れる部位は上顎前歯部唇側面と考えられた。

#### 文献

Lagerlof F, Dawes C: The volume of saliva in the mouth before and after swallowing. *J Dent Res* 1984;63:618-621

Macpherson L, Dawes C: Effects of salivary film velocity on pH changes in an artificial plaque containing streptococcus oralis, after exposure to sucrose. *J. Dent. Res* 70:1230-1234, 1991

Imfeld, T: Interdental plaque-pH-telemetry. In "Surface and colloid

phenomena in the oral cavity: Methodological aspects." Proceedings of a workshop on saliva-dental plaque and enamel surface interactions, Eds. Frankand Leach, IRL Press Ltd., London, pp.143-156,1982.

#### F. 健康危険情報

特にない。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

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

##### 2. 学会発表

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. 知的財産権の所有権の出願・登録状況

特にない。

## 研究成果の刊行に関する一覧表

### 雑誌

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 互、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.



200201356

以降は雑誌/図書等に掲載された論文となりますので  
P34-P35「研究成果の刊行に関する一覧表」をご参照ください