

厚生労働科学研究費補助金

食品安全確保研究事業

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15年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 花田 信弘

平成16(2004)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 | 工口腔装置を用いた食品の有用性評価技術の確立 | | |
| | 今井 奨 | ----- | 18 |
| 2 | I 高齢者舌苔中ミュータンスレンサ球菌の検出結果と 義歯装着状態との関連分析 | | |
| | II 根面う蝕に関する食品の評価方法開発のための 基礎的検討 | | |
| | 岸 光男 | ----- | 25 |
| 3 | pH 微小電極内蔵法を補う簡便な食品酸産生評価法の 検討とその評価 | | |
| | 高橋 信博 | ----- | 28 |
| 4 | 再石灰化機能の評価系の検討 | | |
| | (1)人工プラーク下エナメル質に及ぼす食品成分効果の評価 | | |
| | (2)再石灰化促進性食品の in vitro スクリーニング方法の 検討 | | |
| | 稲葉 大輔 | ----- | 37 |
| III | 研究成果の刊行に関する一覧表 | ----- | 44 |
| IV | 研究成果の刊行物 別刷 | ----- | 47 |

厚生科学研究費補助金（食品安全確保研究事業）
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の機能評価方法の確立に関する研究を行った。特に人工口腔装置を用いた食品の機能評価の検討 機能性食品の口腔内細菌に及ぼす影響の細菌学的検討 特定保健用食品検定における「酸産生測定」の位置付けとその将来のあり方についての検討、および機能性食品素材または食品の再石灰化機能の検討などを行った。

食品のう蝕誘発性のモデルとしての人工口腔装置を用いて ミュータンスレンサ球菌のグルカン合成酵素（GTF）阻害剤であるキンロンフルクトンド（XF）をスクロースとの共存下で滴下すると スクロース単独の対照に比べて人工ハイオフィルム下の pH 低下が鈍化し 人工ハイオフィルム量も有意に少なく エナメル質脱灰度も有意に低いことが示された。また 同しく GTF 阻害剤であるポリフェノールをスクロースとの共存下で滴下すると スクロース単独の対照に比べて人工ハイオフィルム下の pH 低下が鈍化し 人工ハイオフィルム量 エナメル質脱灰度も有意に低いことがわかった。これらの結果は 試験管内での人工ハイオフィルム形成実験の結果とよく一致した。人工口腔装置が機能性食材の評価系として有用であることが示唆された。

また 舌苔を試料とした食品の機能評価のための in vitro 試験の可能性を検討するため 高齢者舌苔中のミュータンスレンサ球菌の Single step colony direct PCR 法による弁別検出と義歯装着状態との関連ならびに根面う蝕に関する食品の評価方法開発のための基礎的検討を行った結果 舌苔はその付着状態の分布および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または試料として有望であることが示唆された。

さらに「ヒト歯垢懸濁法」を特定保健用食品の検定に用いてその有用性を検討し さらに特定保健用食品検定における「酸産生測定」の位置付けとその将来のあり方について最終的な検討を行った。その結果 「ヒト歯垢懸濁法」を用いることで 各種糖や食品の酸産生を相対的に評価することが可能と考えられた。しかし ヒト歯垢の個人差の検討 ヒト歯垢の保存法の確立 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 食品水抽出液の pH 及び緩衝能など 検討事項は多々存在し 「電極内臓法の欠点を完全に補いかつ簡便な食品酸産生検定法」の実現は容易ではないことが分かった。以上のことから「ヒト歯垢懸濁法」は電極内臓法に置き換えることのできる方法ではなく、「簡便であることを主眼としたスクリーニング法」として電極内臓法を補助する方法であると考えられた。

人工プラークに再石灰化促進食品素材であるリン酸化オリゴ糖カルノウム（POs-Ca）を作用させた場合に その直下にあるエナメル質の脱灰にとのような影響を及ぼすのかを人工口腔モデルにより検討した。また 食品成分の再石灰

化促進性能をスクリーニングする *in vitro* 試験として 人工初期う蝕を形成したエナメル質を人工唾液に7日間保管しつつ 毎日1時間 定時に被検成分(乳製品)に浸漬処理する方法を検討した。その結果 人工プラークへの被検物質の供給は 主としてプラーク下にある歯質の脱灰抑制効果を判定することか可能であり また、人工唾液と食品の交互処理は 製品状態の食品の再石灰化促進性能の有無を簡便にスクリーニングできる可能性が示唆された。

以上のように各検討項目とも大いに進展したと考えるが 食品素材または食品の機能評価のためのマニュアル作成までは至らなかった。しかし 今後の検討でマニュアル作成も近いと考えている。

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 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る。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 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 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 機能性食品の口腔内細菌に及ぼす影響を細菌学的に検討する方法を確立すること 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

(1) 人工口腔装置による検討 本研究のために作製した人工口腔装置は 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 そのホルダーにウレタン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。人工バイオフィルム量 ハイオフィルム下 pH エナメル質の脱灰度を定量し 糖質のう蝕誘発性を評価した。また グルカン合成酵

素の阻害剤であるキンロンフルクトントやホリフェノールをスクロースと共存下で供給して これら阻害剤のう蝕誘発阻害効果を検討した。

(2) 細菌学的評価方法の検討 昨年度 85 歳高齢者の舌苔を検討し 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を示した 今年度さらに舌苔中のミュータンスレンサ球菌の検出を試み 義歯装着との関連を検討した。また ミュータンスレンサ球菌の義歯床用レンンへの付着量の評価方法を確立し、高齢者の歯根面齲蝕と食品の関連を調べる方法開発のための基礎的検討を行った。

(3) 食品酸産生評価法の検討 前年度の予備的検討によって 電極内臓法を補完する方法として「ヒト歯垢懸濁法—採取したヒト歯垢を懸濁し それに糖溶液や食品水溶液を加え pH 低下を見る方法」の妥当性が示唆されたので 本年度は「ヒト歯垢懸濁法」を 実際に特定保健用食品の検定に用いてその有用性を検討し さらに特定保健用食品検定における「酸産生測定」の位置付けとその将来のあり方について最終的な検討を行った。ヒト歯垢懸濁液の pH 測定には イオン感受性電界効果型トラン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。

(4) エナメル質再石灰化評価法の検討 人工プラークにリン酸化オリゴ糖カルノウム (POs-Ca) を作用させた場合に その直下にあるエナメル質の脱灰にどのような影響を及ぼすのかを人工口腔モデルにより検討した 人工プラークは *S. mutans* MT8148 株の 18 時間培養液と 5%スクロース溶液を毎分 0.1 ml の速度で牛歯エナメル質に 5 日間 37℃にて

滴下することにより形成した。再石灰化能スクリーニング試験は予め作製した人工初期う蝕歯片を人工唾液に 7 日間浸漬し その間 チーズ 10% 懸濁液 チーズ 30% 懸濁液 ミルクに 37℃で 1 日 1 回 60 分間浸漬した。実験終了後 歯質試料より厚さ約 200 μm の平行切片を作製してマイクロラジオグラフを撮影し Inaba らの方法によりミネラル濃度分布を定量評価した。ハラメータとしてう蝕病巣深度 Id とミネラル喪失量 ΔZ を計測した。

C 研究結果

(1) 人工口腔装置による検討 人工口腔装置を用いて 1%スクロース培地 ミュータンスレンサ球菌の菌体懸濁液を滴下すると 十数時間で人工ハイオフィームが形成され、pH も 5.5 以下に低下し 脱灰が起こってエナメル質硬度が低下することを既にみているが ここに GTF 阻害剤である二糖類 XF (2.5%) を共存させると人工ハイオフィーム量 人工バイオフィーム下での pH 低下 エナメル質歯片の脱灰がいずれも阻害されることか観察された。昨年度は *S. sobrinus* 6715 株でこの阻害を観察したか 今回 *S. mutans* MT8148 株においても人工ハイオフィーム量 人工ハイオフィーム下での pH 低下、エナメル質歯片の脱灰がいずれも阻害された

GTF 阻害作用をもつポリフェノール (HBT) の 人工口腔装置における人工ハイオフィーム形成とエナメル質脱灰に及ぼす影響を調べた。1%スクロースを対照側とし 1%スクロース+0.02% HBT を実験側として HI 培地 *S. sobrinus* 6715 株菌体懸濁液とともに連続的に滴下した。対照

側では滴下 8 時間くらいから pH が低下し始め 10 時間で pH5.5 16 時間で pH4.3 となった。一方 実験側では pH 低下は遅延し 10 時間くらいから低下し始め 14 時間で pH5.5 16 時間で pH5.2 であった。また エナメル質の硬度変化 (ΔH) で表した脱灰度は対照側に比べて実験側で有意に低かった。このように、少なくとも用いた条件下でホリフェノールはスクロースと共存しても人工バイオフィルム形成を阻害し、そのためにハイオフィルム直下の pH 低下を阻害し エナメル質の脱灰を抑制していることが分かった。

(2) 細菌学的評価方法の検討 高齢者舌苔中ミュータンスレンサ球菌の検出結果と義歯装着状態との関連を分析した。舌苔試料からの *S. mutans* と *S. sobrinus* の弁別検出状況を分析した結果 *S. mutans* と *S. sobrinus* はそれぞれ全体の 51.8% 45.7% から検出され (N = 164) た。さらに *S. sobrinus* の検出率は有床義歯装着者では 48.7% なのに対し、有床義歯被装着者では 14.3% と有床義歯の装着状況によって有意な差を呈した。

また 根面う蝕に関する食品の評価方法開発のために基礎的検討を行った。標準菌株とともに義歯床用レジン加工し Dentcult® SM の培地中で培養したところ *S. mutans* のコロニーは義歯床用レジン片への付着が弱く、コロニーカウントが困難であった。これに対し *S. sobrinus* のコロニーは義歯床用レジン片への付着が強固であり、床用レジンの表面研磨状態に依存した付着状況を呈した。すなわち *S. sobrinus* は研磨や表面処理により表面疎水性が高い場合に付着コロニー数が少なく、反対

に研磨が粗造である場合や表面疎水処理をしていない場合には付着コロニー数が多かった。

(3) ヒト歯垢を用いた酸産生能評価 歯垢懸濁液に各種糖質を添加して pH 低下曲線を調べた。スクロースが最も pH 低下が大きく、次いで、グルコース、フルクトース、ラクトース、ガラクトースの順であった。また、キンリトール、ソルビトール、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。PH 値の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たところ、複数の糖の酸産生能を相対評価することが簡便になることが確認された。

ヒト歯垢懸濁液にチューインガム抽出液を加えて pH 低下曲線を調べた場合でも pH 低下曲線を水素イオン濃度に換算すると複数のチューインガム抽出液の酸産生能を相対評価することが簡便になることが確認された。

(4) エナメル質再石灰化評価法の検討 人工プラークに POs-Ca を作用させた場合に、その直下にあるエナメル質の脱灰にとどのような影響を及ぼすのかを人工口腔モデルにより検討した結果、人工プラーク形成直後 ($ld = 73 \pm 25 \mu m$, $\Delta Z = 2513 \pm 886 \text{ vol\% } \mu m$) に比較して、POs-Ca 未処理群は有意に高いハラメータ値 ($ld = 118 \pm 12 \mu m$, $\Delta Z = 4400 \pm 800 \text{ vol\% } \mu m$) を示した。すなわち、明らかに脱灰が進行したことが確認された。一方、POs-Ca 作用群 ($ld = 71 \pm 22 \mu m$, $\Delta Z = 2400 \pm 960 \text{ vol\% } \mu m$) ではプラーク形成直後とほぼ同等の値を示しており、脱灰が進行しなかったことが確認された。

また、乳製品かエナメル質の再石灰化に及ぼす効果を *in vitro* で評価

するシステムを検討した結果 用いたシステムは食品の再石灰化促進効果の評価に応用でき チーズには低濃度フッ化物に匹敵する再石灰化促進能があることが示唆された。

D 考察

機能性食品素材あるいはそれを含有する食品の機能性 有用性を評価するための方法には *in vitro* および *in vivo* のいくつかの方法があるが それらにはそれぞれ長所と短所があり 単独の方法で機能性（例えば非う蝕原性 抗う蝕原性など）を評価することは今のところ難しい。*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 将来的には代用甘味料のみならず抗う蝕活性をもった機能性食品も創出されることも想定され 事実 再石灰化促進物質を含有したチューインガムが既に特定保健用食品として認可され市販されている。しかし 再石灰化機能の評価には今のところ標準法がないのが現状である。そうした食品でも評価できるような標準の *in vitro* 評価系の確立が必要と思われる。

今回構築した人工口腔装置によってスクロースとミュータンスレンサ球菌の共存下で初期段階のエナメル質脱灰を惹起する条件を設定できた また GTF 阻害剤であるキノロンフルクトントやホリフェノールをスクロースと共存させて供給することにより スクロースのもつう蝕原性を部分的に抑制できることも分かった 本人工口腔装置は種々の糖質のう蝕誘発性だけでなく多くの物質の

抗う蝕誘発性も評価できる可能性が示唆されたと考えられる。しかしそれを結論つけるにはなお検討の余地がある。また より口腔に近い環境をつくり出すのにこの装置にどのような培地 細菌種等を滴下すればよいかはまだ完全に解決されたわけではない。今後さらに検討を続ける必要がある。

高齢者の舌苔からの *S. sobrinus* の検出率は以前調査した 20 歳台成人のそれ（約 9%、岸 他 2002）に比べて有意に高かった。とくに床義歯装着者での検出率が高く 義歯非装着者では 20 歳台と検出率に比べて有意な差は認めなかった。一方 義歯床用レジンへのミュータンスレンサ球菌の *in vitro* 付着実験では *S. sobrinus* の床用レジンへの付着力は *S. mutans* に比べてはるかに強かった 以上より これら 2 つの研究で得られた観察結果の整合性は高く 高齢者で残存歯があり 床義歯を装着している者については *S. sobrinus* の検出率が齲蝕リスクの指標として重要であることが考えられた。これらの結論を導き出すのに用いた細菌学的手法である Single step colony direct PCR 法の有用性が再確認された。

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 この方法は現時点で妥当な方法の一つであると判断される。

実際 市販されているチューインガムの水抽出液を調整し pH 低下能を

測定したところ 砂糖やブドウ糖という発酵性糖質を含有する表示を持つチューインガム抽出液では pH 低下が見られたことから ヒト歯垢懸濁法は十分にチューインガムの酸産生能を測定できることが分かる。一方 特定保健用食品の認定を受けているチューインガムでは全く pH 低下が見られないことから ヒト歯垢懸濁法によってヒト歯垢 pH 微小電極内蔵法と同等の評価結果を得られることが期待できる。

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 この方法そのものを検討することが必要となろう。

また 今回はチューインガムの水抽出液を用いたか 実際の口腔内で歯垢中に入り込む場合と成分か同等ではないことが予測される。食品成分の濃度の違いはもちろんのこと デンプンなどの食品含有成分か唾液アミラーゼによって分解され発酵性糖質を生ずる可能性の有無など 実際の口腔内とは大きく異なる条件での測定であることは留意すべきである。さらに 食品そのものが高い緩衝能を持つ場合 ヒト歯垢懸濁法では pH 低下を検知できないことも重要な留意点となろう。

ヒト歯垢懸濁法はヒト歯垢 pH 微小電極内蔵法と同様に 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。しかし 上述のような種々の要因から ヒト歯垢 pH 電極内蔵法に置き換えることかできる方法とは言えず 「簡便であることを主眼としたスクリーニング法」として有効利用

することが望ましいと考える。

食品の再石灰化促進能あるいは脱灰抑制能を評価する反応システムとしては 次のような分類が考えられる。

in vitro システム

- 化学的人工口腔（試薬使用）
 - 生物学的人工口腔（微生物使用）
- 中間型システム
- ヒト唾液浸漬試験（HSIテスト）

in situ システム

- 歯質接着法（歯質試料を直接歯面に接着）
- 口腔内装置法（装置に歯質試料を接着）

このうち in situ システムは ヒト口腔で起こる変化を評価する点で妥当性が高い。しかし 多大な労力と時間を要するうえ しかも不特定の因子の関与を受けることから 再現性や精度に問題が残る。また 口腔内では 再石灰化能とともに 脱灰能が被検者ごとに異なるという特質があるため 再石灰化と脱灰にかかわるとの因子で 歯質のミネラル出納が影響されたのかが きわめて判定しにくいのも事実である。口腔内試験が最良とは単純には結論できないことに留意しなければならない。

ところで 歯の再石灰化は 表層の連続性を失っていない初期う蝕病巣が 唾液 すなわち歯質に対して過飽和なミネラル体液に接触するという比較的単純なメカニズムで発現する。したがって 被検食品の再石灰化能を端的に評価するには 終日口腔内に接触させ 複雑な因子を介在させるよりは むしろ単純に唾液に被検物質を添加して、再石灰化のみの反応を主として観察するほうが 物質の特性を把握しやすいとい

える。

そこで 初期のスクリーニングには化学的人工口腔（本研究の食品スクリーニング試験）を また プラークに作用して間接的に歯質に影響を及ぼすメカニズムである場合は生物学的人工口腔（本研究の人工プラーク試験を また ヒト口腔内試験の予備試験として ヒト唾液浸漬試験（HSIテスト）を 段階的に適用することが 食品の再石灰化促進性能試験として妥当と考えられる

最終的に ヒト口腔内での試験により効果を確認することは重要である。ただし 口腔はきわめて変化に富む環境であることから その試験結果が必ずしも 食品の性能を高い精度で反映しているかどうかはさらに検討が必要であろう。

以上のように各検討項目とも大いに進展したと考えるか 食品素材または食品の機能評価のためのマニュアル作成までは至らなかった。しかし 今後の検討でマニュアル作成も近いと考えている。

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 う蝕原性細菌によるう蝕誘発に深い関わりをもつ3つのハラメーター（人工バイオフィルム量 ハイオフィルム下 pH エナメル質脱灰度）を同時に測定できる人工口腔装置を構築し 糖質のう蝕誘発性やグルカン合成酵素阻害剤のエナメル質脱灰抑制作用について検討した。その結果 本装置の評価システムとしての有用性が示唆された

2 口腔内細菌に及ぼす機能性食品の影響を細菌学的に検討するために 高齢者の舌苔から *S mutans* *S*

sobrinus の弁別検出を Single step colony direct PCR 法で行い その有用性が確認された。また 根面う蝕に関する食品の評価方法開発のための基礎的検討を行い ミュータンスレンサ球菌の義歯床用レジンへの付着量の評価方法を確立した。

3 ヒト口腔 pH 微小電極内蔵法を補う簡便法として 妥当性が示唆されている「ヒト歯垢懸濁法」は 電極内臓法に置き換えることができる方法ではなく「簡便であることを主眼としたスクリーニング法」として電極内臓法を補助する方法であると考えられた

4 人工プラークへの被検物質の供給は 主としてプラーク下にある歯質に対する脱灰抑制効果の判定を可能にしており また 人工唾液と食品の交互処理は 製品状態の食品の再石灰化促進性能の有無を簡便にスクリーニングできる方法である可能性が示唆された。

F 健康危険情報

特になし。

G 研究発表

1 論文発表

1 Oral streptococci exhibit diverse susceptibility to human b-defensin-2 Antimicrobial Effects of hBD-2 on Oral Streptococci Nishimura E Eto A Kato M Hashizume S Imai S Nisizawa T and Hanada N Current Microbiology, (in press)

2 RGD motif enhances immunogenicity and adjuvanicity of peptide antigens in intranasal immunization Yano A Onozuka A, Matin K Imai S Hanada N

- Nisizawa T *Vaccine* 22 237-243
2003
- 3 Systemic diseases in association with microbial species in oral biofilm from elderly requiring care Senpuku H, Sogame A Inoshita E, Tsuha Y Miyazaki H, Hanada N *Gerontology* 2003 49(5) 301-9
- 4 Relationship between the number of remaining teeth and physical activity in community-dwelling elderly Tada A, Watanabe T Yokoe H, Hanada N Tanzawa H *Arch Gerontol Geriatr* 2003,37(2) 109-17
- 5 Different frequencies of *Streptococcus anginosus* infection in oral cancer and esophageal cancer Morita E Narikiyo M Yano A Nishimura E, Igaki H Sasaki H Terada M Hanada N Kawabe R *Cancer Sci* 2003 94(6) 492-6
- 6 Real-time interaction of oral streptococci with human salivary components Kawashima M Hanada N, Hamada T Tagami J Senpuku H *Oral Microbiol Immunol* 2003 18(4) 220-5
- 7 Assessment of oral transmission using cell-free human immunodeficiency virus-1 in mice reconstituted with human peripheral blood leucocyte Nakao R, Hanada N Asano T Hara T Abdus Salam M, Matin K et al *Immunology* 2003,109(2) 271-82
- 8 Bone Regeneration by Recombinant Human Bone Morphogenetic Protein-2 (rhBMP-2) around Immediate Implants A pilot Study in Rats Matin K Senpuku H Hanada N Ozawa H Ejiri S *Int J Oral Maxillofac Implants* 2003 18(2) 211-7
- 9 Association between serum albumin and root caries in community-dwelling older adults Yoshihara A Hanada N, Miyazaki H *J Dent Res* 2003,82(3) 218-222
- 10 高野尚子 葭原明弘, 安藤雄一 小川祐司, 廣富敏伸 山賀孝之 花田信弘 宮崎秀夫 高齢者の根面う蝕の有病状況と歯冠部う蝕との関連, *口腔衛生会誌*, 53 592-598, 2003
- 11 H Kamasaka D Inaba K Minami K To-o T Nishimura, T Kuriki, S Imai, N Hanada and M Yonemitsu Application of phosphoryl oligosaccharides of calcium (Pos-Ca) for oral health (in press)
- 12 D Inaba, K, Minami H Kamasaka T Kuriki S Imai and M Yonemitsu Intraoral Effects of Phosphoryl-Oligosaccharide Calcium on Remineralization of Enamel Lesions, *J Dent Health* 53 8-12 2003
- 13 今井 奨 キンリトールなどの効果は? *日本歯科評論* 63(9) 13-15, 2003
- 14 今井 奨 あなたの質問に答えます (No 11) *歯科衛生士* Vol 27 72-73 2003
- 15 今井 奨 あなたの質問に答えます (No 14) *歯科衛生士* Vol 28, 84-85 2003
- 16 Nobuhiro Takahashi Acid-neutralizing activity during amino acid fermentation by *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia* and *Fusobacterium nucleatum* *Oral Microbiology and Immunology*

18(2) 109-113 2003

[17] Takuichi Sato, Junko Matsuyama Takashi Kumagai Gen Mayanagi Miyuki Yamaura, Junpei Washio and Nobuhiro Takahashi Nested PCR for detection of mutans streptococci in dental plaque Letters in Applied Microbiology 37(1) 66-69 2003

[18] Takuichi Sato, JingPing Hu Kousuke Ohki, Miyuki Yamaura Junpei Washio Junko Matsuyama and Nobuhiro Takahashi Identification of mutans streptococci by restriction fragment length polymorphism analysis of polymerase chain reaction-amplified 16S ribosomal RNA genes Oral Microbiology and Immunology 18(5) 323-326 2003

[19] Shoko Takahashi-Abbe Kazuhiko Abbe and Nobuhiro Takahashi Biochemical and functional properties of pyruvate formate-lyase (PFL)-activating system in *Streptococcus mutans* Oral Microbiology and Immunology 18(5) 293-297, 2003

[20] Harumi Miyasawa Yoshimichi Iwami Hideaki Mayanagi and Nobuhiro Takahashi Xylitol inhibition on anaerobic acid production by *Streptococcus mutans* at various pH levels Oral Microbiology and Immunology 18(4) 215-219, 2003
21 Junko Matsuyama Takuichi Sato, Etsuro Hoshino Tadashi Noda and Nobuhiro Takahashi Fermentation of five sucrose isomers by human dental plaque

bacteria Caries Research 37(6) 410-415, 2003

22 Hatsue Kakuta, Yoshimichi Iwami, Hideaki Mayanagi and Nobuhiro Takahashi Xylitol inhibition on acid-production and growth of mutans streptococci in the presence of various dietary sugars under strictly anaerobic conditions Caries Research 37(6) 404-409 2003

23 Inaba D Someya Y, Minami, K and Yonemitsu M The effects of fluoridated sodium hypochlorite gel on dentin remineralization in vitro, Dentistry in Japan 39 90-92 2003

24 Kamasaka H Inaba D Minami K Nishimura T Kuriki T and Yonemitsu M Production and Application of Phosphoryl Oligosaccharides Prepared from Potato Starch Trends in Glycoscience and Glycotechnology 15 75-89 2003

25 稲葉大輔 リン酸化オリゴ糖カルノウム配合ガム「ホスカム」の再石灰化促進機能 食品工業 46 (24), 48-53 2003

26 稲葉大輔 根面齲蝕の再石灰化促進療法 サ クインテッセンス 22 2172-2180 2003

27 稲葉大輔, 南健太郎, 米満正美 リン酸化オリゴ糖カルノウム配合ガム「ホスカム」の再石灰化促進効果 The Dental Monthly Report (DMR), 207, 1-6, 2003

28 釜坂寛 稲葉大輔, 米満正美 新しいテントラルガム「ホスカム」 デンタルマガジン 110 Winter 18-23 2003

29 釜坂 寛 西村隆久 栗木 隆

稲葉大輔 う蝕予防とリン酸化オリ
コ糖カルシウム ジャハンフートサ
イエンス 142 30-35 2003

2 学会発表

1 A longitudinal study of the relationship between periodontal disease and bone mineral density in community-dwelling older adults, Yoshihara, A Hanada N and Miyazaki H 81st General Session of the International Association for Dental Research (IADR) June 2003 Goteborg Sweden

2 Inhibitory effect of hop bract polyphenols against artificial biofilm formation and enamel demineralization by mutans streptococci Imai S Matsunaga M, Kanda, T Nishizawa T and Hanada, N 81st General Session of the International Association for Dental Research (IADR) June 2003, Goteborg Sweden

3 Interaction of small crystal form of hydroxyapatite with mutans streptococci Arakawa, T Ishizaki, T, Hayman, R E Hanada N and Senpuku, H 81st General Session of the International Association for Dental Research (IADR) June 2003 Goteborg Sweden

4 Relation of *Streptococcus mutans* on the tooth surface in microgravity, Senpuku, H, Tsuha, Y, Salam M A and Hanada N 81st General Session of the International Association for Dental Research (IADR) June 2003 Goteborg Sweden

5 Assessment of oral transmission using cell-free HIV in mouse models reconstituted with human peripheral blood leukocytes Nakao R Amagasa T Aoba, T Hanada N, and Senpuku, H 81st General Session of the International Association for Dental Research (IADR) June 2003 Goteborg Sweden

6 Dental caries prediction model by data-mining Nomura Y Tsurumoto, A, Hanada, N and Kumagai, T 81st General Session of the International Association for Dental Research (IADR) June 2003 Goteborg Sweden

7 DRB1 Genotypes associated with indication of the inhibiting antibody to *Streptococcus mutans* in humans Thuha Y Salam M A Hanada N Kurosaki N and Senpuku H 81st General Session of the International Association for Dental Research (IADR) June, 2003, Goteborg Sweden

8 The current status of oral transmission of S mutans from mother to 3-year-old child in Japan Motegi M, Takagi, Y Sato T Tanaka T Hanada N and Senpuku H 81st General Session of the International Association for Dental Research (IADR) June, 2003, Goteborg Sweden

9 Human T-cell responses to oral biofilm bacteria in humanized NOD/SCID mice Salam M A Tsuha Y Nakao R Matsumoto N, Hanada, N and Senpuku H 81st General Session of the

International Association for Dental Research (IADR) June 2003, Goteborg Sweden

10 Biofilm adherence to implant materials formed in an artificial mouth Matin, K Imai, S Takeuchi, H Uraguchi M, Hanada N and Tagami, J 82nd General Session of the International Association for Dental Research (IADR) March 2004, Honolulu USA

11 Relationship between oral malodor and clinical status of Periodontal diseases Arai T Hayashida A, Hoshi K Nawashiro, A Kishi M Imai S Hanada N and Kamo K 82nd General Session of the International Association for Dental Research (IADR) March, 2004 Honolulu, USA

12 Reduction of oral mutans streptococci by small-crystal hydroxyapatite Arakawa T Ishizaki T Hayman, R Hanada, N and Senpuku H 82nd General Session of the International Association for Dental Research (IADR) March 2004, Honolulu USA

13 Analyzing the gases in breath odor with an electronic nose Hayashida, A Hoshi K, Sato, Y Ito, J Arai T Imai S Hanada N and Uematsu, H 82nd General Session of the International Association for Dental Research (IADR) March 2004 Honolulu USA

14 Identification on mutans streptococci Lactobacilli in the

Lowest-pH caries dentin Maeda T Kitasako, Y Senpuku H Hanada, N and Tagami J 82nd General Session of the International Association for Dental Research (IADR) March 2004 Honolulu USA

15 Comparison of root cariogenic bacteria in artificial mouth system Usui Y Imai, S Hanada N and Uematsu, H 82nd General Session of the International Association for Dental Research (IADR) March, 2004 Honolulu USA

16 A new method to eliminate *Streptococcus mutans* from the oral cavity, Symposium-Oral Microbiology 2004 A tribute to Toshihiko Koga Hanada N 82nd General Session of the International Association for Dental Research (IADR) March 2004 Honolulu USA

17 特別講演 ミュータンスレンサ球菌の伝播, 感染とその対策 花田信弘 日本歯科保存学会 2003 年度春季学会 (第 118 回) 千葉 2003 年 6 月

18 ノンホジウム「ハイオフィルムと口腔疾患」ハイオフィルムとう蝕 花田信弘 第 17 回 Bacterial Adherence & Biofilm 学術集会 岡山 2003 年 7 月

19 *Actinomyces viscosus* と *Actinomyces naeslundii* による象牙質脱灰の経時的変化 薄井由枝 今井奨 樋出守世 西沢俊樹 花田信弘 植松宏 日本口腔衛生学会総会 北九州 2003 年 9 月

20 人工口腔装置における *S. mutans* および *S. sobrinus* のう蝕原性要因の比較 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 日本口腔衛生学会総会 北九州 2003年9月

21 3DS (Dental Drug Delivery System) によるミュータンスレンサ球菌の臨床的除菌法の問題点と対策 武内博朗 井田亮 野邑浩美 早川浩生 奥田健太郎 由川英二 野村義明 泉福英信 花田信弘 日本口腔衛生学会総会 北九州 2003年9月

22 イギリスの歯磨剤 野村義明 西川原総生 田中とも子 北田加代美 佐藤勉 鶴本明久 花田信弘 日本口腔衛生学会総会 北九州 2003年9月

23 定期的な口腔ケアを実施している特別養護老人ホーム入所者 (4施設) における口腔微生物検出状況 中村諭 佐藤勉 泉福英信 花田信弘 由川英二 井田博久 日本口腔衛生学会総会 北九州 2003年9月

24 モノクローナル抗体を応用した *S. mutans* の迅速検出キットの評価 岡田淳一 松久保隆 杉原直樹 小林義昌 山内幸司 花田信弘 日本口腔衛生学会総会 北九州 2003年9月

25 唾液を用いた歯周疾患診断のための臨床診断の可能性 第1報 基準値設定のための解析 野村義明 田中とも子 北田加代美 泉福英信 花田信弘 佐藤勉 桐村和子、鴨井久一 日本口腔衛生学会総会 北九州 2003年9月

26 唾液を用いた歯周疾患診断のための臨床診断の可能性 第2報 歯周疾患治療に対する予後因子の解析 北田加代美 田中とも子 野村義明 泉福英信 佐藤勉 花田信弘 桐村和子 鴨井久一 日本口腔衛生学会総会 北九州 2003年9月

27 唾液を用いた歯周疾患診断のために臨床検査の可能性 第3報、疫学診断応用のためのアンケート調査結果の分析 田中とも子 北田加代美 野村義明 泉福英信、佐藤勉 花田信弘 桐村和子 鴨井久一 日本口腔衛生学会総会 北九州 2003年9月

28 テータマイニングによる齲蝕発症予測モデルの構築 野村義明 花田信弘 鶴本明久 熊谷崇 日本口腔衛生学会総会 北九州 2003年9月

29 ンホジウム「急性期の歯周病をどう捉えるか」成り立ち～微生物の観点から 花田信弘 第12回日本口腔感染症学会総会 東京 2003年11月

30 簡易キットを用いたう蝕原性菌の検出 西川原総生 野村義明 花田信弘 千田彰 第63回愛知学院大学歯学会学術大会 名古屋 2003年12月

31 3DS(Dental Drug Delivery System)による口腔病原細菌の臨床的制御法の検討 武内博朗 石塚義彰 小俣好子 弦間文士 鄭堯仁 中村秀範 山本正昭 由川英二 武内悟朗、杉山順一 花田信弘 大館満 神奈川県歯科医師会第二回学術大会 横浜 2004年1月

32 K MINAMI, D INABA, H KAMASAKA S IMAI and M YONEMITSU Intra-oral Effect of Phosphoryl-Oligosaccharide Calcium (POs-Ca) on Remineralization of Enamel and Dentin 81st General Session of the International Association for Dental Research, June 2003 Goteborg, Sweden

33 H KAMASAKA D INABA, K

MINAMI, Y KUROKI K TO-O T
NISHIMURA, T KURIKI S IMAI
and M YONEMITSU Assessment
of Enamel Remineralization Using
Whole Saliva Collected from
Children by Chewing Gum
Containing Calcium Salt of
Phosphoryl-Oligosaccharides
(POs-Ca) 81st General Session of
the International Association for
Dental Research June 2003
Goteborg Sweden

34 今井 奨 シンホジウム 口腔保
健における臨床検査技術の最前線
う蝕臨床検査技術の現状と問題点
第52回日本口腔衛生学会総会 2
003年9月 北九州市。

35 Ayumi ANDO Mitsuo KISHI
Fumie AIZAWA and Masami
YONEMITSU The validity of
saliva tests for caries
administration in adults 82nd
General Session of the
International Association for
Dental Research March 2004
Honolulu USA

36 多田浩之 菅原俊二 根本英二
今村隆寿 高橋信博 島内英俊 高
田春比古 *Porphyromonas*
gingivalis ジンジハインはヒト歯肉
線維芽細胞 CD14 を分解して LPS
不応答性を誘導する 第76回日本細
菌学会総会(熊本市) 2003年4月
2日 日本細菌学雑誌 58(1) 158,
2003

大木宏介 熊本裕行 佐藤拓一 高
橋信博 一迫玲 大家清 歯原性角
化嚢胞における PTC 遺伝子変異及
び SHH ノグナル伝達関連分子の検
索 第57回日本口腔科学会総会(福
岡市) 2003年5月8日 第57回日
本口腔科学会総会プログラム 抄録

集 p 190 口科誌 52(6) in press,
2003

37 Hiroyuki Tada, Shunji
Sugawara, Eiji Nemoto, Nobuhiro
Takahashi Takahisa Imamura,
Jan Potempa James Travis
Hidetoshi Shimauchi and
Haruhiko Takada Proteolysis of
ICAM-1 on human oral epithelial
cells by cysteine proteinases
(Gingipains) from *Porphyromonas*
gingivalis leading to down-
regulation of neutrophil adhesion
第81回 IADR (Goteborg Sweden)
2003年6月26日 J Dent Res 82
(Special Issue B) B-41 2003
(#0225) 【IADR Lion Awards 受
賞】

38 Takuichi Sato Miyuki
Yamaura Junko Matsuyama and
Nobuhiro Takahashi
Combination of genus-specific
PCR and RFLP analysis for
identification of oral streptococci
第81回 IADR (Goteborg, Sweden)
2003年6月26日 J Dent Res 82
(Special Issue B) B-80 2003
(#0542)

39 Gen Mayanagi Takuichi Sato
Hidetoshi Shimauchi and
Nobuhiro Takahashi Detection of
25 periodontopathic bacteria from
periodontal sites by nested PCR
第81回 IADR (Goteborg Sweden)
2003年6月26日 J Dent Res 82
(Special Issue B) B-153 2003
(#1128)

40 Mitsuru Shimonishi, Juta Sato
Nobuhiro Takahashi and Masashi
Komatsu Expression of type IV
collagen and laminin in the
interface between epithelial cells
and fibroblasts from human

periodontal ligament 第81回 IADR (Goteborg, Sweden) 2003年6月27日 J Dent Res 82 (Special Issue B) B-287, 2003 (#2212)

[41] 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 J Dent Res 82 (Special Issue B) B-360, 2003 (#2801)

[42] Nobuhiro Takahashi Takuichi Sato and Junko Matsuyama Metabolic pathway for palatinose of oral *Actinomyces* species 第81回 IADR (Goteborg, Sweden) 2003年6月28日 J Dent Res 82 (Special Issue B) B-360 2003 (#2802)

[43] Kazuo Kato, Keiko Fukui, Haruo Nakagaki, Takuichi Sato and Nobuhiro Takahashi Distribution profiles of cariogenic streptococci within dental plaque treated with stannous fluoride gel The 50th Congress of the European Organization for Caries Research (ORCA) (Konstanz Germany) 2003年7月3日 Caries Res 37(Special Issue) in press, 2003

[44] 佐藤拓一 高橋信博 口腔細菌叢の網羅的解析について 第18回口腔嫌気性菌研究会 (盛岡) 2003年9月17日 口腔嫌気性菌研究会プログラム集 18 6, 2003

45 佐藤廉也 佐藤拓一 高橋一郎、高橋信博 矯正用アンカープレート周囲溝内の細菌叢のプロファイリング 第45回歯科基礎医学会学術大会 (盛岡) 2003年9月18日 歯基礎

誌 45(5) 271, 2003 (#029)

[46] 佐藤拓一 山浦みゆき 松山順子 高橋信博 菌属特異的なPCRとRFLP解析による口腔レンサ球菌種の同定 第45回歯科基礎医学会学術大会 (盛岡) 2003年9月18日 歯基礎誌 45(5) 271, 2003 (#030) 47 大島勇人 佐藤拓一 監物新一 高橋信博 抗菌性薬剤に対するラクト白歯感染歯髓の反応 第45回歯科基礎医学会学術大会 (盛岡) 2003年9月19日 歯基礎誌 45(5) 287 2003 (#094)

[48] 阿部昌子 阿部一彦 高橋信博 ミュータンスレンサ球菌乳酸脱水素酵素の活性調節に対する環境pHの影響 第45回歯科基礎医学会学術大会 (盛岡) 2003年9月18日 歯基礎誌 45(5) 325, 2003 (#246)

[49] 角田初恵、岩見憲道 真柳秀昭 高橋信博 キンリトールによる *Streptococcus mutans* 増殖抑制効果 第45回歯科基礎医学会学術大会 (盛岡) 2003年9月18日 歯基礎誌 45(5) 326 2003 (#249)

[50] 堀はるみ 堀克昌 真柳秀昭 岩見憲道 高橋信博 *Streptococcus mutans* 酸産生能のキンリトール感受性の多様性とその生化学的機構第45回歯科基礎医学会学術大会 (盛岡) 2003年9月18日 歯基礎誌 45(5) 326 2003 (#250)

[51] 加藤一夫 福井敬子 中垣晴男 佐藤拓一 高橋信博 real-time 定量PCRを利用した歯垢内細菌の層別密度分布の分析 第52回口腔衛生学会 総会 (北九州) 2003年9月26日 口腔衛生会誌 53(4) 340, 2003 (Abstract # 1E0940)

52 鷺尾純平、佐藤拓一 井川恭子、丹田奈緒子 岩倉政城 小関健由 高橋信博 口臭と舌苔中の総菌数および硫化水素産生菌数との関係 第

52 回口腔衛生学会 総会 (北九州)
2003 年 9 月 26 日 口腔衛生会誌
53(4) 344 2003 (Abstract #
1E1040)

53 五十嵐公英 浅沼慎 清水弘一
高橋信博 小児から高齢者に至る広
範囲年齢層プラーク酸産生能のチェ
アースイトでの評価 第 52 回口腔衛
生学会 総会 (北九州) 2003 年 9
月 26 日 口腔衛生会誌 53(4) 381
2003

54 Jumpei Washio, Takuichi Sato
Takeyoshi Koseki and Nobuhiro
Takahashi Hydrogen sulfide-
producing bacteria in tongue
coating and oral malodor 第 82
回 IADR (Honolulu Hawaii USA)
2004 年 3 月 12 日 J Dent Res 83
(Special Issue) in press 2004

55 Mitsuru Shimonishi Juta Sato
Nobuhiro Takahashi and Masashi
Komatsu 第 82 回 IADR (Honolulu
Hawaii USA) 2004 年 3 月 12 日 J
Dent Res 83 (Special Issue) in
press, 2004

56 Juta Sato, Mitsuru Shimonishi,
Nobuhiro Takahashi and Masashi
Komatsu 第 82 回 IADR (Honolulu
Hawaii, USA) 2004 年 3 月 12 日 J
Dent Res 83 (Special Issue) in
press 2004

57 Inaba D, Hirota K
Yonemitsu M Evaluation of
Caries Risk Test Developed by
Species-specific Monoclonal
Antibodies against Streptococcus
mutans, 50th Annual meeting of
European Organisation for Caries
Research (ORCA) 2002

58 Inaba D Satoh T,
Yonemitsu M Salivary Mutans
Streptococci Levels and Caries
Incidence in Japanese High School

Students, 51st Annual Meeting of
JADR 2003

57 稲葉大輔 米満正美 フロー
セルシステムによるヘリクルへの細
菌初期付着の定量評価 第 52 回日
本口腔衛生学会総会, 北九州市, 2003
(日本口腔衛生学会雑誌 (0023-
2831)53 巻 4 号)Page339(2003 08)

60 南健太郎, 稲葉大輔 小金井
恵 小田宗宏 米満正美 食品に由
来する再石灰化促進効果の評価法
第 52 回日本口腔衛生学会総会, 北
九州市, 2003(口腔衛生学会雑誌

61 稲葉大輔 歯質における脱
灰 再石灰化の調節機構 一口腔保
健の支援にむけた現状と課題— 岩
手医科大学歯学会第 29 回総会 特
別講演 盛岡 2003

62 稲葉大輔 岸光男 阿部晶子
染谷美子 森谷俊樹 南健太郎 高
橋雅洋 相澤文恵 米満正美 佐藤
保 箱崎守男 田沢光正 岩手県 85
歳追跡調査の概要 一口腔診査の結
果一, 第 56 回東北地区歯科医学会
盛岡, 2003

63 稲葉大輔 佐藤保, 久保宮幸,
倉田英生 山本正徳 橋浦礼次郎
狩野裕史 岩淵壮之助 米満正美
歯科臨床検査を活用した口腔保健の
支援 第 3 報 思春期歯科保健への
導入事例, 第 15 回日本口腔衛生学
会東北地方会 盛岡 2003

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（食品安全確保研究事業）
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

人工口腔装置を用いた食品の有用性評価技術の確立

分担研究者 今井 奨 国立保健医療科学院 室長

研究要旨 昨年度に引き続き人工口腔装置による食品の機能評価について検討した。人工口腔装置を用いて ミュータンスレンサ球菌のグルカン合成酵素 (GTF) 阻害剤であるキノロンフルクトノト (XF) をスクロースとの共存下で滴下すると スクロース単独の対照に比べて人工ハイオフィルム下の pH 低下が鈍化し 人工バイオフィルム量も有意に少なく エナメル質脱灰度も有意に低いことが示された。また、同しく GTF 阻害剤であるポリフェノールをスクロースとの共存下で滴下すると スクロース単独の対照に比べて人工ハイオフィルム下の pH 低下が鈍化し 人工ハイオフィルム量 エナメル質脱灰度も有意に低いことがわかった。これらの結果は 試験管内での人工バイオフィルム形成実験の結果とよく一致し 評価系としての人工口腔装置の有用性が示唆された。

A 研究目的

昨年度に引き続き 食品のう蝕原性評価技術の確立のため、in vitro での人工口腔装置を用いた評価系について検討した。近年 食品のもつ第3次機能 すなわち健康の維持 増進に役立つ保健機能か注目され、機能性食品が多数創出されてきている。このような機能性食品の中には 歯科領域においてその機能が注目されている食品も多数含まれている。これまでに複数のガム キャンデーについてそれらの機能性が科学的に認められ 特定保健用食品として厚生労働省より認可されている。従来は非う蝕原性であることか機能として認められていたか、最近ではそれに加えて再石灰化機能が認められた特定保健用食品も創出されている。このような状況下で問題になっている

のが食品のもつ機能性の評価方法である。現状では動物やヒト被験者による in vivo 試験と in vitro 試験を組み合わせる評価しているが 動物やヒト被験者を用いた in vivo の方法には倫理的 時間的 経済的制約があり 一般的評価系とするには限界があると考えられる。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

本分担研究は 人工ハイオフィルム形成量 人工ハイオフィルム直下での pH 低下およびエナメル質脱灰度を同時に測定できる人工口腔装置を用いてその性状を解析することと 歯科領域での機能評価系としての本装置の適性有用性を検討することを目的とする。

B 研究方法

試験管壁付着試験 1%スクロース 1%スクロース+1%XF 1%スクロース+2.5%XF 1%スクロース+5%XF または 1%XF を含む HI 液体培地を 13×100mm のガラス試験管(IWAKI) にそれぞれ 2ml つつ分注し そこに BHI 液体培地で前培養した *S. mutans* 株と *S. sobrinus* 株を各試験管にそれぞれ 20 μl 植菌し 試験管を傾斜させ 37℃で 17 時間培養した。培養後 試験管に付着しなかった人工プラークを培養液と共に別の試験管に移し 試験管に付着した人工プラークを PBS 2ml で静かに洗浄後 その洗浄液を合わせて非付着(non adherent)画分とした。さらに試験管に付着した人工プラークにリン酸緩衝液(PBS) 2ml を加え ミキサー (Scientific Industries G-560)で 10 秒間攪拌し 剥離してくる弱い付着を(loose adherent)画分とし なお強固に付着している人工プラークを(firm adherent)画分とした。この firm adherent 画分および遠心分離(2500rpm 20min)によって沈殿させた loose adherent と non adherent の菌体に 0.5N の水酸化ナトリウム溶液 1ml を加えて菌体表層の非水溶性グルカンを溶解した後 遠心分離(2500rpm 20min)によって菌体と上清に分けた。菌体に PBS 1ml を加えて懸濁し 540nm における濁度をプレートリーダーで測定して菌体量の指標とした。また 上清中のグルカン量は

フェノール硫酸法によって測定した。

人工口腔装置 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 レコーダからなる (図 1)。上部からは 5 本のステンレスチューブを固定したノリコン栓を 下部からはドレイン用チューブと平面 pH 電極を逆さに固定したノリコン栓を装着して密閉した。人工口腔部分のウォータージャケットに温水を循環して装置内部を 37℃に維持した。平面 pH 電極周囲にはテフロン製ホルダーを固定し そのホルダーにユーティリティワックスを用いて 4 個のウンエナメル質歯片 (3.5mm ×3.5mm ×1.5mm) を固定した。その上部から糖質含有ハートインフュージョン培地 細菌懸濁液 PBS を連続的に滴下した。糖質としてスクロースまたはキノロンフルクトント (XF) を 細菌として *Streptococcus mutans* MT8148 株または *Streptococcus sobrinus* 6715 株を用いた。pH を連続的に記録しながら 1.5~3.4 時間滴下を続け、人工プラーク形成に伴って pH が 4 付近まで低下した時滴下を終了した。エナメル質歯片上および pH 電極上に形成された人工ハイオフィルムを 0.5N 水酸化ナトリウム溶液で処理して遠心分離し 沈殿物の濁度を 500nm で測定して菌体量とした。その上清をフェノール硫酸法によって定量し非水溶性グルカン(WIG) 量とした。エナメル質の脱灰度を実験前後の硬度変化 (ΔH) から評価した。

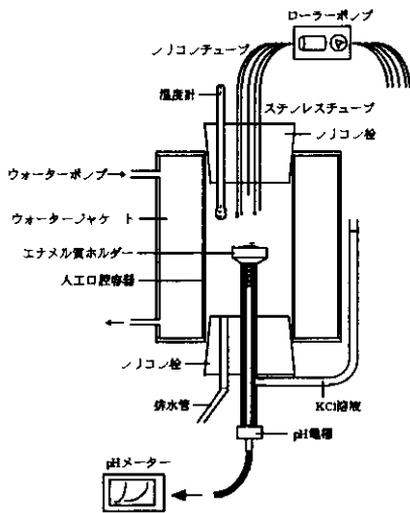


図1 人工口腔装置中心部の断面図

C 研究結果

試験管壁付着試験 図2はスクロース存在下における *S. mutans* MT8148株の試験管壁への強固な付着に及ぼすXFの影響を調べた結果である。XFの濃度に依存して人工ハイオフィルム形成が阻害されている

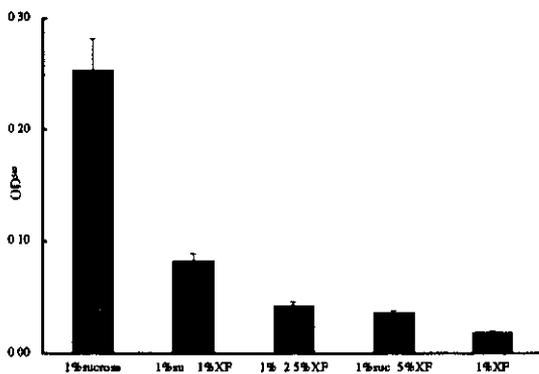


図2 *S. mutans* MT8148株を各糖質濃度で培養した時の強固な付着画分の菌体量

人工口腔装置による検討(1) 人工口腔装置を用いて1%スクロース 培地 ミュータンスレンサ球菌の菌体懸濁液を滴下すると 十数時間で人工ハ

イオフィルムが形成され、pHも5.5以下に低下し、脱灰が起こってエナメル質硬度が低下することを既にみているか、ここにGTF阻害剤であるXF(25%)を共存させると人工ハイオフィルム量 人工バイオフィルム下でのpH低下、エナメル質歯片の脱灰がいずれも阻害されることか観察された。昨年度は *S. sobrinus* 6715株でこの阻害を観察したが、今回、*S. mutans* MT8148株においても人工バイオフィルム量 人工ハイオフィルム下でのpH低下、エナメル質歯片の脱灰がいずれも阻害された(図3 4 5)

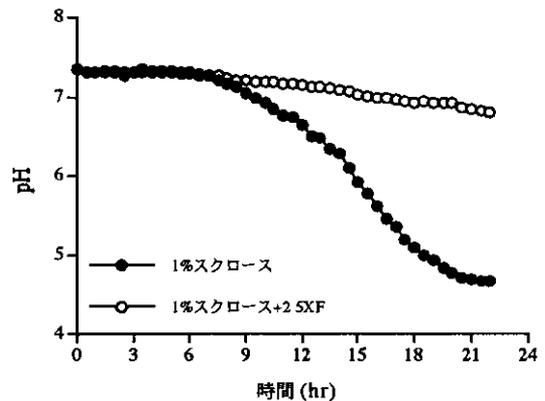


図3 *S. mutans* MT8148株によって1%スクロースまたは1%スクロース+2.5%XFで形成された人工ハイオフィルム直下のpH変化

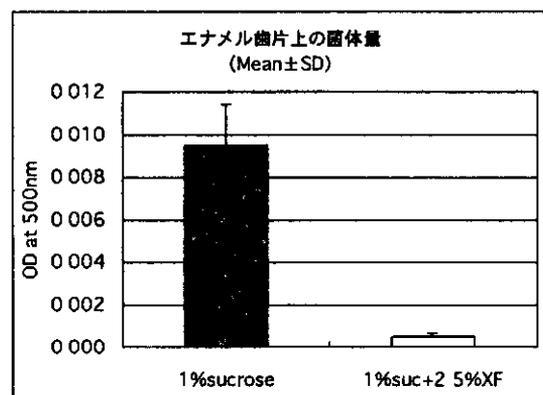


図4 *S. mutans* MT8148株によってエナメル質歯片上に形成されたバイオフィルム量