

zation of enamel lesions with remineralization rate of 30-50%

Acknowledgement This study was supported in part by Grants in Aid for High Performance Bio-Medical Materials Research by the Ministry of Education Culture Sports Science and Technology (2001) Japan

References

- 1) Takeda C Takeda Y Hizukuri S Structure of the amylopectin fraction of amylo maize Carbohydr Res 246 273 281 1993
- 2) Takeda Y Hizukuri S Location of phosphate groups in potato amylopectin Carbohydr Res 102 321 327 1982
- 3) Kamasaka H Uchida M Kusaka K et al Inhibitory effect of phosphorylated oligosaccharides prepared from potato starch on the formation of calcium phosphate Biosci Biotech Biochem 59 1412 1416 1995
- 4) Kamasaka H To o K Kusaka K et al The structures of phosphoryl oligosaccharides prepared from potato starch Biosci Biotech Biochem 61 238 244 1997
- 5) Kamasaka H To o K Kusaka K et al A way of enhancing the inhibitory effect of phosphoryl oligosaccharides on the formation of calcium phosphate precipitate by using the coupling reaction of cyclomaltodextrin glucanotransferase J Appl Glycosci 44 285 293 1997
- 6) Kamasaka H To-o K Kusaka K et al Effect of phosphoryl oligosaccharides on iron solubility under neutral conditions Biosci Biotech Biochem 61 1209 1210 1997
- 7) Kamasaka H Imai S Nishimura T et al Effects of phosphoryl oligosaccharides from potato starch on acid production by mutans streptococci J Dent Hlth 52 66 71 2002 (in Japanese)
- 8) Kamasaka H Inaba D Minami K et al Remineralization of enamel by phosphoryl oligosaccharides (POs) supplied by a chewing gum Part I Salivary assessment in vitro J Dent Hlth 52 105 111 2002
- 9) Inaba D Kamasaka H Minami K et al Remineralization of enamel by phosphoryl oligosaccharides (POs) supplied by a chewing gum Part II Intraoral evaluation J Dent Hlth 52 112 118 2002
- 10) Inaba D Takagi O Arends J A computer assisted videodensitometric method to visualize mineral distributions in in vitro and in vivo formed root caries lesions Eur J Oral Sci 105 74 84 1997
- 11) Inaba D Tanaka R Takagi O et al Computerized measurements of microradiographic mineral parameters of de and remineralized dental hard tissues J Dent Hlth 47 67 74 1997
- 12) Okazaki M Fujikawa S Matsumoto N Effect of xylooligosaccharide on the growth of bifidobacteria Bifidobact Microflora 9 77 86 1990
- 13) Terada A Hara H Kataoka M et al Effect of lactulose on the composition and metabolic activity of the human faecal flora Microb Ecol Hlth Dis 5 43 50 1992
- 14) Oku T Available energy of nondigestible and/or nonabsorbable saccharides Jpn J Nutr 54 143 150 1996
- 15) Kaneko T Matsukubo T Yatake T et al Evaluation of acidogenicity of commercial isomaltooligosaccharides mixture and its hydrogenated derivative by measurement of pH response under human dental plaque Biosci Biotech Biochem 59 372 377 1995

Reprint requests to D INABA Department of Preventive Dentistry Iwate Medical University School of Dentistry 1-3-27 Chuo-dori Morioka 020-8505 Japan
TEL 019 651-5111 (Ext 4516)
FAX 019-622 2228
E mail dinaba@iwate.med.ac.jp

エナメル質齲蝕病巣の再石灰化に及ぼすリン酸化オリゴ糖の 口腔内における効果

稲葉 大輔 南 健太郎 釜阪 寛*
栗木 隆* 今井 奨** 米満 正美

岩手医科大学歯学部予防歯科学講座
江崎グリコ株式会社生物化学研究所
国立保健医療科学院口腔保健部口腔保健技術室

概要 著者らは リン酸化オリゴ糖カルシウム塩 (POs Ca) が馬鈴薯デンプンの加水分解物より抽出でき カルシウムの溶解性を高めることを先に報告した 本研究の目的は POs Ca 配合ニューカーレスカムのエナメル質再石灰化に及ぼす効果を口腔内実験により確認することである 12名のオランダ人 (男性6名 女性6名 平均21歳) をランダムに3群 (N=4/群) に分け 二重盲検 クロスオーバーデザインの口腔内実験を行った 各被験者は 脱灰した牛歯エナメル質ディスクを取り付けた上顎口蓋プレートを装着し キンリトールカム 2 45%POs-Ca 配合キンリトールカム およびノヨ糖ガムのいずれかを 1日4回噛んだ (期間 2週間/ガム) 実験期間中 フッ化物は使用せず エナメル質ディスクが乾燥しないよう注意した エナメル質ディスクのマイクログラフから、ネオラル濃度分布を評価した POsカム群の脱灰深度 ld (Mean \pm SD=37 \pm 7 μ m) は ノヨ糖カム (75 \pm 19 μ m p <0.01) よりも51% またキンリトールカム (66 \pm 28 μ m p <0.05) よりも44% それぞれ有意に減少していた この、ネオラル蓄積のメカニズムは POs Ca が唾液の Ca/P 比をハイトロキニアタイトの比率 (1.67) に向けて高め エナメル質に対して過飽和な、ネオラル状態を維持させたことによると考えられた 本研究より 2 45%POs-Ca 配合ニューカーレスカムを毎日利用することは エナメル質初期齲蝕病巣の再石灰化を強く促進し 齲蝕予防に有効であることが示唆された

口腔衛生会誌 53 8-12 2003

索引用語 リン酸化オリゴ糖 再石灰化 エナメル質 ガム 口腔内実験

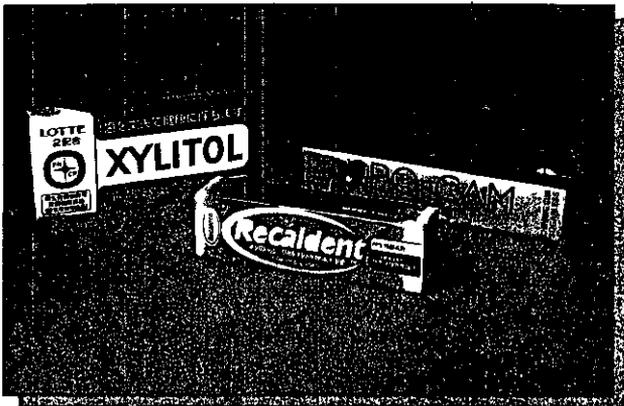
著者への連絡先 稲葉大輔 〒020-8505 岩手県盛岡市中央通1-3-27 岩手医科大学歯学部予防歯科学講座
TEL 019-651 5111 (内線 4516) / FAX 019-622-2228 / E-mail dinaba@iwate-med.ac.jp

『日本歯科評論 (THE NIPPON Dental Review)』2003年9月号 (Vol 63 (9)/通刊第731号) 別刷

日本歯科評論 9

THE
NIPPON **Dental Review**

キシリトールなどの効果は？



再石灰化機能をもつ3種のカム

回答 / 今井 奨

国立保健医療科学院口腔保健部 口腔保健技術室長
〒162-8640
東京都新宿区戸山1-23-1

市民からのお尋ね

私は現在会社勤めをしている40代の男性です。主には事務系の仕事をしており、時には営業をサポートするために外出することもあります。私は自分の歯の健康には気を遣っているつもりですが、それでも昼食後の歯磨きはてきないでいます。場所も時間もないので仕方ありません。そこで歯磨きの代わりに食後にカムを噛むことにしており、これは日課にしています。すいふん前からコンビニでL社のキシリトール配合のカムか、その時の気分によってはリカルテントカムを買ったりしています。

歯を丈夫で健康に保つためにはキシリトール入りのカムが適していると聞いてはいるものの、その効果のほどはあまりわからずに購入しているのです。まずはその効果について教えてください。配合量とか使用のタイミングによって予防効果が異なるとも聞いたことがありますか。実際はとつななのでしょうか。また、テレビのCMで記憶に残っていたカム(?)のことですか。最近仕事の関係でたまたま手に入った資料によると、特定保健用食品の第3号としてG

社の「オスカム」という商品が販売され、口の中を再石灰化する力かキシリトールの約5倍もあるという、高い効果を売り物にしているのたそうです。私自身はまたその現物を見たことかないし、価格も不明ですか、もし宣伝文句とおりの商品であるなら早速にも購入したいと思つてのすか。とここで買うことかてきるのでしょつか。

私に限らず、外に出ていくサラリーマンにとっては、カムのよつにくく手軽に歯磨き代わりになるものかとても便利です。同じ噛むなら、効果の高いものを、効果の高いタイミングで噛みたいと思つています。ところか素人の私には商品の善し悪しまではわからないのか現実てす。そうした観点から、現在一般の消費者か手に入れることかてきる商品について、具体的にそして率直なご意見を伺いたいと思つますので、よろしくお願いいたします。

回答

キシリトール入りカムとは

キシリトールという言葉か一般に知られるよつになりました。最近ては小さな園児てもキシリトール



図 特定保健食品の許可マーク (左) と歯に信頼マーク (右)

表1 再石灰化機能をもつ特定保健用食品 (カム)

商品名	許可年	許可表示
リカルテント	2000年	歯の脱灰を抑制するだけでなく再石灰化を増強する CPP ACP を配合しているため 歯を丈夫で健康にします
+2 配合 キシリトール	2001年	このカムは 虫歯の原因にならない甘味料 (キシリトール 及び還元ハラチノース) を使用しています また 歯の再石灰化を増強するキシリトール フクロノリ抽出物 (フノラン) リン酸-水素カルシウムを配合しているため 歯を丈夫で健康に保ちます
ザスカム	2003年	本品は リン酸化オリゴ糖カルシウム (POs Ca) を配合しているため 口内を再石灰化しやすい環境に整え 歯を丈夫で健康にします

入りカムの存在を知っていて 歯によいことを知っていることも珍しくないよってす 幼稚園, 保育園などにおける指導の賜でしよつ

キシリトールというのは糖アルコールの一種で 砂糖と同じ甘味度をもった化合物です 商品名にキシリトールという化合物名をそのまま使ったカムまであります 虫歯菌のミュータンスレンサ球菌をはじめとする多くの口腔内細菌は砂糖, ふとつ糖 果糖などを分解して歯を溶かす (脱灰する) 乳酸 キ酸などを産生しますが, キシリトールからはこのような酸はつくられません そのため 虫歯にならない または虫歯になりにくいカムとして甘味料にキシリトールを含み 砂糖 ふとつ糖 果糖などを含まないカムがつくられています

なお 虫歯になりにくい甘味糖質にはキシリトールのほかにマルチトール (還元麦芽糖) ハラチノース 還元ハラチノースなどがあり キシリトール入りカムといってもこれらの甘味糖質を含んでいたり甘味増強にアスハルテーム アセスルファムを含んだカムもあります 砂糖 ふとつ糖 果糖など酸産生の材料になる糖質の含量が0.5%以下のカムを「ニューカレスカム」ともいいます

キシリトール入りカムの種類

すへてを網羅することはできませんが, スーパーやコンビニのカム売り場の棚を見ると キシリトール入りカムを含めたニューカレスカムは 約半数を占めているよってす M社の「キシリノニュ」 L社

の「キシリトール」 G社の「ウォータリンクキシミント」 K社の「歯みかきカム」などのいわゆるニューカレスカムと, ニューカレスカムに新たな機能を付加したF社の「リカルテント」 L社の「+2 配合キシリトール」, G社の「ザスカム」などがあります

厚生労働省は, メーカーから機能表示について申請された食品について その機能か科学的に証明され 安全性等か確かめられている場合には その食品のパッケージに効能と専用マーク (図-左) を表示することを許可する特定保健用食品の制度を1991年から開始しました これまで特定保健用食品に許可された食品は350種を越えていますか そのうちカムは5種にすぎません また 日本トウモロコシ協会か歯に安全であることを認めて「歯に信頼マーク」 (図-右) をつけるのを認めたカムも数種類存在します 特定保健用食品のマークと「歯に信頼マーク」の両方ついたカムもあります カムを購入するときにパッケージをよく見る習慣をつけるとよいてしよつ

キシリトール入りカムの効果

口腔衛生におけるカムの効果としては唾液分泌促進か まず挙げられます これはものを噛むことによつて得られる効果ですから カム以外のものを噛んでも同じことですか, カムには甘味料や風味が含まれていますので より効果的に唾液分泌を促進します そして 唾液は中性で緩衝能をもっています

表2 再石灰化機能をもつ3種のカムの性状

商品名	名称 (内容量)	主成分	再石灰化増強成分	甘味料
リカルテント	ニューカレス板カム (10枚 25g)	マルチトール 還元水飴 CPP ACP など	キシリトール CPP ACP	キシリトール (35.6%) アスハルテーム L フェ ニルアラニン化合物
+2 配合 キシリトール	チューインガム (8枚 20g)	還元ハラチノース 還元麦芽糖水飴など	キシリトール フクロノリ抽出物 (フノラン) リン酸一水素カルシウム	キシリトール (41%) アスハルテーム L フェ ニルアラニン化合物
ザスカム	チューインカム (14粒 20g)	マルチトール 還元ハラチノース POs Ca など	キシリトール リン酸化オリゴ糖カルシウム	キシリトール (42.5%) アスハルテーム L フェ ニルアラニン化合物

ので 歯にとって不利な酸性環境を中性にまでもと
してくれます 砂糖入りカムでも唾液分泌を刺激し
ますか 砂糖は口腔内細菌の酸産生反応やハイオフィ
ルム形成 (いわゆる, 細菌の固まり) に関与する
グルカン合成反応の材料になりますので, 望ましく
ありません 砂糖の代わりにキシリトールを用いる
ことにより, 効果的で歯に安心な唾液分泌が達成さ
れます

また, 効果は弱いことからキシリトール入りカムを
噛むことにより虫歯菌が減少するといった報告や, 再
石灰化が起こるといった報告もあります 「歯みかき」
とか「フロンク」を連想させるカムもありますか
一般にカムの摂取により物理的に除去される歯
垢の量は10~20%程度で キシリトールを添加して
も決して歯磨きの代わりにはならないので注意か
必要ですむしろ 前述のように唾液分泌による口腔
内環境の改善 つまり食後に酸性に傾く歯垢内 pH
を中性にもとすことに意味があります したがって
カムを噛むタイミングとしては食後か最も効果的と
いえるでしょう

再石灰化作用をもつカム

単に虫歯になりにくいたけでなく キシリトール
をベースにして これに機能性食材を添加すること
により再石灰化作用を発揮するような新しいカムが
創出されています F社の「リカルテント」 L社の
「+2 配合キシリトール」 G社の「ザスカム」かそ

れてす 「リカルテント」, 「+2 配合キシリトール」
は2~3年前から発売されていますか, 「ザスカム」
は本年5月下旬から関東甲信越のスーパー コンビ
ニで売られています いずれも厚生労働省の特定保
健用食品として許可されています(表1) これらの
カムには 「リカルテント」では牛乳由来の CPP
ACP (カゼインナスフォヘプチド-非結晶性リン酸
カルシウム複合体) か, 「+2 配合キシリトール」で
はフクロノリ抽出物 (フノラン) とリン酸一水素カ
ルシウムか そして「ザスカム」では馬鈴薯由来の
POs Ca (リン酸化オリゴ糖カルシウム) か再石灰化
増強成分として加えられています (表2)

それぞれ異なる試験方法で調べられ 再石灰化作
用が2倍とか5倍といった宣伝かなされていますか
再石灰化の標準試験方法が確立されていないので一
般消費者が効能の差を見極めるのは難しい状況です
むしろそれぞれ異なる成分を含有しなからいすれも
再石灰化作用を示す点で興味深いので 消費者は差
を問題にするのではなく, これらを上手に組み合わ
せて用いることか賢明と思われれます われわれ研究
者の側から見ると 「再石灰化」という言葉をもっと
消費者に認知してもらったために メーカー側はもっ
と仲間を増やす努力をして頂ければと思います 甘
味料でもそうですか 種類が多く, 機能発揮のメカ
ニズムの異なるものが多いほうか それらの組み合
わせによって相乗的効果も期待できると考えます

歯科衛生士

THE JOURNAL OF DENTAL HYGIENIST

Volume 27 No 12 2003年 12 月 10 日発行

「特定保健用食品」を最近よく耳にしますが、「特定保健用食品」とはどのような食品でしょうか? (OMさん 東京都)

キーワード 特定保健用食品 トクナ 保健機能食品 代用甘味料 再石灰化 健康日本21

今井 奨先生(国立保健医療科学院口腔保健部)に聞きました

●はじめに

現在「特定保健用食品」として厚生労働省に認可されている食品は394商品にのぼります。テレビのコマーシャルにもときとき出てくる特定保健用食品とは一体どんな食品なのか気になる方も多いと思います。そこで特定保健用食品の制度がどのような経緯で創設され、どのような位置付けにあるのか、また歯科保健における特定保健用食品の役割はどのようなものかについて簡単に解説します。

●「特定保健用食品」制度

昭和59年から始まった文部省の生体調節機能食品に関する特定研究を契機として、生体調節機能を食品の第三次機能とする新しい概念が提唱されました。また、世の中に健康食

品ブームが巻き起こり、多くの健康食品が出回りました。基準もあいまいて消費者に正しい情報が伝わりませんでした。そこで厚生省(当時)は、1991年7月に栄養改善法施行規則の一部を改正して、特定保健用食品の制度を制定しました。

特定保健用食品は、病者用食品、妊産婦用授乳婦用粉乳、乳児用調製粉乳、高齢者用食品と並んで「特別用途食品」の中に位置付けられました。そして特定保健用食品は「特別用途食品のうち、食生活において特定の保健の目的で摂取をする者に対し、その摂取により当該保健の目的が期待できる旨の表示をするもの」と定義されました^①。ことばが堅くて難解ですが、要するに「健康の維持・増進が図れるように設計され

その機能が科学的に証明された場合に健康強調表示を国が認めた食品」ということです。「健康強調表示」とはその食品が健康の維持・増進にどのような良い機能を持っているかを文で示したものです。また、文で示さず特別な許可マーク(図1)の表示も認めています。その一方で消費者に誤解を与えるような根拠の薄い機能表示に対する規制を強めました。国が食品に健康への効用を示す表現を許可する世界で初めての画期的な制度で、世界各国から注目されています(特定保健用食品は親しみを込めて「トクナ」といって愛称で呼ばれている)。

トクナは一方で、2001年4月より施行された保健機能食品制度の中にも規定されました。「保健機能食品」とは、食品衛生法および健康増進法に根拠を持ち、個別に厚生労働大臣が表示許可をする「特定保健用食品」と規格基準を満たすものであれば個別に許可を受けることなく表示を行うことのできる「栄養機能食品」の二つのカテゴリーからなっています。これらは医薬品と一般食品の中間に位置するもので、どちらも国から表示を認められています。

つまりトクナは、栄養改善法にも



図1 特定保健用食品の許可マーク

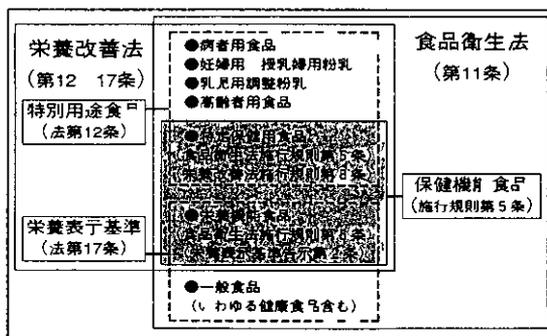


図2 特定保健用食品の位置付け。特定保健用食品は特別用途食品の一つとして栄養改善法に、また保健機能食品の一つとして食品衛生法に規定されている。

食品衛生法にも規定された食品なのです(図2)

●歯科におけるトクホの役割

歯科関連でトクホとして許可されているものは 24商品あります(表1) トクホ全体の6.1%にあたります³⁾ 商品別にみると チョコレート2種 飴1種 カム20種 清涼菓子1種です では これらの食品が歯科保健とどのように関わっているかを見ていきます

まず すべてに共通しているのは これらの食品を摂取しても 歯蝕の原因にならないことです これは大事なことです このうちチョコレート2種 飴1種 カム1種は 甘味料としてスクロースの代わりにハラチノースやマルチトールやエリスリトールなどを用いて 食品全体としても酸発酵の材料となるような成分を含んでおらず ヒトの口腔内で酸を産生しないことが立証されています 残りの19種のカムと1種の清涼菓子は 代用甘味料として主としてキシリトールを含んでいて さらに再石灰化を促進する成分を含んでいます これらも酸を産生しないことに加え エナメル質の再石灰化を促進することか立正されています

このように歯科関連でこれまでに許可されたトクホは それ自身が

表1 歯科関連で許可されている特定保健用食品(2003年10月現在)

	食品の種類	食品数	商品名 ()は個数を示す
歯蝕の原因になりにくい食 ¹⁾	チョコレート	2	ワノノーヘロディ ナチュラブ
	カム	1	キスミントガムホワイト
歯蝕の原因になりにくい再石灰化作用をもつ食 ²⁾	飴	1	クロスタニンキャンディ
	カム	19	リカルデント(4) リカルデント キノス(2) キシリトール ガム(9) ガスカム(4)
	清涼菓子	1	キシリトール タブレット

「歯蝕の原因にならない群」と「歯蝕にならないだけでなく再石灰化作用を持つ群」に大別されます この区別にはハノケーンに表示されている「許可表示(健康強調表示)」をよく読むしかありません いずれもハノケーンには特定保健用食品の文字と許可マークが載っていますか それを見ただけでは区別できないということです さらに言えば 歯科領域以外のトクホにも特定保健用食品の文字と許可マークが載っていますので ますます許可表示を読むことが重要になります

ところで 再石灰化を謳ったトクホのカムは 3社から19種が発売されています 再石灰化促進物質は3社3様で キシリトールを共通に含み 「リカルデント」はCPP ACP(カゼインナソオヘプチド 非結晶性リン酸カルニウム複合体)を 「キシリトール+2」はフクロノリ抽出物(フノラン)とリン酸一水素カルニウムを 「ガスカム」はリン酸化オリゴ糖カルニウムをそれぞれ含んでいます これらのカムを噛むことにより 唾液

分泌が促進され 唾液と再石灰化促進物質の作用でエナメル質の初期歯蝕(表層下脱灰)が再石灰化されるのです

●あわりに

我国における急速な高齢化の進展や疾病構造の変化に伴い 国民の健康増進の重要性が認識される中 2000年3月 「21世紀における国民健康づくり運動(健康日本21)」が始まりました また その法的環境整備のため2002年8月に健康増進法が公布されました 健康日本21の中の目標値の一つに歯の健康が入っており 例えば現在2.9本の12歳児の歯数を2010年には1本に また3歳児で歯のない人の割合を現在の59.5%から2010年には80%にするなどの目標が掲げられています この目標達成のためにもトクホかその機能を十分に発揮することを望みたいですし そのためには さらに多くの特定保健用食品が開発されることを望みたいと思います

.....参考文献および、詳しく知りたい人に、これがおすすめ！.....

①日本の健康機能性食品 トクホ「特定保健用食品」
 中川邦男 著 1999年 フクマン社

本書は 財団法人日本健康 栄養食品協会の特定保健用食品部長として特定保健用食品の開発 申請に指導 相談を長年経験された著者が 特定保健用食品について分かりやすく解説している好書 栄養と健康から始まってトクホの制度 表示 健康効用 将来まで幅広く解説しています

②保健機能食品 健康食品関連情報
http://www.mhlw.go.jp/topics/bukyoku/yaku/syoku_zenzen/hokenkinou/

厚生労働省のホームページから入って トピックスから医薬食品局を選び 「特定保健用食品の表示許可等一覧について」にたどりつくことができます これは厚生労働省医薬食品局食品安全部基準審査課新開発食品保健対策室が管理しているページで 健康増進法第26条第1項の条文や特定保健用食品の定義 位置付けと実際に許可されている特定保健用食品の一覧表 (<http://www.mhlw.go.jp/topics/0102/tp02212.html>) を見ることができます

歯科衛生士

THE JOURNAL OF DENTAL HYGIENIST

Volume 28 No 2 2004年2月10日発行

Q&A

あなたの質問に答えます! No 14

監修 眞木吉信 東京歯科大学歯生学講座教授

Question No.14

さまざまな甘味料がありますが 患者さんに勧めるにあたって どのようなものが良く どのようなものが悪いのでしょうか? またトクホに使用されている甘味料は本当に安全なのでしょうか?(HMさん 静岡県)

キーワード 代用甘味料 キンリトール 特定保健用食品 保健機能食品

Answer No.14

今井 奨先生(国立保健医療科学院口腔保健部)に聞きました

●歯に良い甘味料 悪い甘味料

人間にとって甘味料はなくてはならないものかもしれません。それは甘味料のない世界を想像すると理解しやすいでしょう。疲れたとき、リラックスしたいとき、甘味物質は我々の肉体的、精神的疲れを癒してくれます。しかし一方で、スクロース(蔗糖)と疾病との関連があげられ、スクロースは唯一の歯の原因になると認識されています。それは、スクロースが歯蝕原性細菌である、ミュータンスレンサ球菌のグルカン合成反応の基質になるばかりでなく、エナメル質を脱灰する有機酸の産生反応の基質にもなるからです。ちなみに、ミュータンスレンサ球菌のグルカン合成の基質になる糖質は、スクロースのみです。

平成9年4月、キンリトールが食品添加物として厚生省(当時)に認可

されて以来、代用甘味料が脚光を浴び、歯蝕の心配のないニューカース食品が多数創出されました。一口に代用甘味料といっても、糖質から合成品まで多数存在します。

歯蝕の観点から歯に良い甘味料と歯に悪い甘味料に分けてみると、表1に示したように歯に良い甘味料には、ハラチノースやトレハロースなどのオリゴ糖、エリスリトール、キンリトール、ノルビトール、マンニトール、マルチトール、ハラチニトなどの糖アルコール、さらに人工甘味料のアスハルテムや天然甘味料のステビアなどがあります。分けるポイントは、その甘味料が口腔内細菌、とりわけミュータンスレンサ球菌によって利用され、乳酸、ギ酸などの有機酸に代謝されるかどうかにあります。これらはミュータンスレンサ球菌のグルカン合成にも

酸発酵にも利用されません。一方、歯に悪い甘味料はスクロースやグルコース(ブドウ糖)、そしてフルクトース(果糖)、転化糖、蜂蜜などです。グルコースの歯蝕原性はスクロースの歯蝕原性の約15%くらいといふ動物試験の結果もあります。フルクトースもミュータンスレンサ球菌の菌体内に取り込まれて酸発酵の基質となります。転化糖は異性化糖あるいはブドウ糖果糖液糖ともいって、グルコースの半分を化学的にフルクトースに変えたもの。すなわち、グルコースとフルクトースの等量混合液です。ニューースなどによく使われています。このほか日常的になしみの深い蜂蜜は、糖質やビタミン、ミネラルなどを含んだ複雑な物質で、フルクトース(約40%)、グルコース(約35%)を主成分とし、スクロースも数%含まれていますので、歯に安全とはいえません。

歯に良い甘味料の中でも注意が必要なものもあります。糖アルコールの仲間です。キンリトール、ノルビトール、マンニトール、マルチトール、ハラチニト(還元ハラチノース)は摂取し過ぎると一過性の下痢の心配がありますので、体重kg当たり0.3g(例えば15g/50kg)以上取らないようにすることか大事です。エリス

表1 歯に良い甘味料 悪い甘味料

歯に良い甘味料	歯に悪い甘味料
ハラチノース	スクロース(蔗糖)
トレハロース	グルコース(ブドウ糖)
エリスリトール	フルクトース(果糖)
キンリトール	転化糖(異性化糖、ブドウ糖果糖液糖)
ノルビトール	蜂蜜
マンニトール	
マルチトール	
ハラチニト	
アスハルテム	
ステビア	

リトールは 腸管で吸収された後
その約90%は代謝されることなく尿
中に排泄されるので 一過性の下痢
のし配はほとんといわれてい
ます キンリトールに関しては 適
応をおこると通常の糖アルコールの
5倍程度まで安全といわれています

●歯に良いトクホでも

体にとって良質な食品を選択する
基準として「特定保健用食品(トク
ホ)」があります この制度につて
は 本誌2003年12月号の本コーナ
ーをご参照ください 現在までに394
商品が特定保健用食品として認可さ
れています 歯科関連で認められ
た25商品(チョコレート2種 カム20
種 飴2種 清涼菓子1種)につて
は 厚生労働省のカイトラインに
添った検討がなされており いずれ
もそれ自身はつ蝕の原因になりにく
いことが立証されています また
このうち20種についてはエナメル質
の再石灰化を促進することも認めら
れています とはいえ 再石灰化を
調べるためのカイトラインはまたで
きていません 各社それぞれの方法
で調べています 今後 早期のガイ
トライン作りが望まれます

ところで歯に良いトクホでも 腸
には優しくないことがあります 特
に糖アルコールを含んだものは食へ
過ぎに対する注意が必要です 糖ア

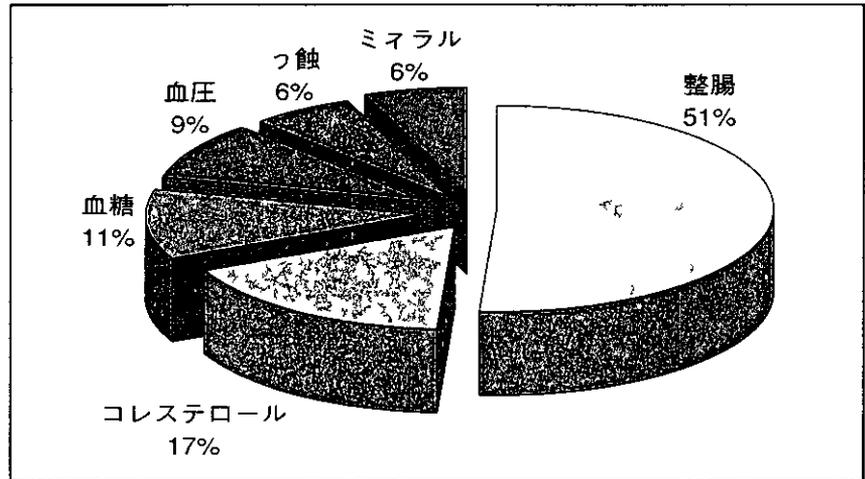


図1 特定保健用食品のカテゴリー別比率

ルアルコールの中でもキンリトールを含
んだ商品が多いよつてすか ハノ
ケーンには「食へ過ぎによりおなか
かゆるくなることかあります」と書
かれていますので 日頃からハノ
ケーンの細かい文字を読む習慣は大
切です 一般に1ハノケーンを一度
に食へても量的には大丈夫のよつて
すか 個人差があることも事実です

歯科関連のトクホは63%に過ぎ
ず 残りの9割以上は他の分野のト
クホということになります その分
野は整腸 コレステロール ミネラ
ル 血圧 血糖などです(図1) こ
れらの中には確かにある分野では機
能を発揮しても 例えば発酵性の糖
質を含むために歯にはよくない場合
もあります トクホの9割以上を占
める歯科関連以外の食品に使用され
ている甘味料は スクロース以外に

もいくつかありますので 何を使用
しているのかを見る視角を持つこと
が大切です 今後はメーカー側も全
身的な影響を考慮して保健機能食品
をデザインしていくことも必要だと
思われます

●あわりに

歯科関連のトクホに使用されてい
る甘味料は つ蝕の原因になりにく
い代用糖を使用しているのて安全と
いえるとしよつ たたしトクホは菓
てではなく あくまでも食品ですから
トクホを食へたからとつて病気が
治るものではありません トクホは
一般の食品と菓の中間に位置する食
品ですから 効能も大事ですか他の
病気の原因にならないよつ注意す
ることか大切です

参考文献および詳しく知りたい人に、これがおすすめ!

①う蝕細菌の分子生物学—研究の成果と展望

武笠英彦 編 1997年 クインテッセンス出版株式会社

本書は つ蝕学概論からミュータンスレンサ球菌の分子生物学 つ蝕
予防研究のフロンティアまでを教科書的にまとめてあり その中には代
用糖の章もあつて 種々の代用糖の性質やミュータンスレンサ球菌との
関係が分かりやすく解説されています

②う蝕予防のための食品科学—甘味糖質から酵素阻害剤まで

大嶋 隆/兵田茂幸 編 1996年 医歯薬出版

本書は う蝕予防をめざした甘味糖質の開発とその応用について 糖
質ごとに合成から物性 つ蝕予防作用の検定まで述べていて 甘味糖質
について幅広く知るうえで参考になります

Acid-neutralizing activity during amino acid fermentation by *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia* and *Fusobacterium nucleatum*

N Takahashi

Division of Oral Biochemistry Department of Oral Biology Tohoku University Graduate School of Dentistry Sendai Japan

Takahashi N Acid neutralizing activity during amino acid fermentation by *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia* and *Fusobacterium nucleatum* *Oral Microbiol Immunol* 2003 18 109–113 © Blackwell Munksgaard 2003

Acid neutralizing activity during amino acid fermentation by washed cells of *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia* and *Fusobacterium nucleatum* was studied. When the washed cells of these strains were anaerobically incubated in the presence of aspartylaspartic acid or glutamylglutamic acid for *P. gingivalis*, aspartic acid for *P. intermedia* and glutamic acid for *F. nucleatum* at an initial pH of 5.0 or 5.5, the pH of the incubation mixtures rose toward neutral. *F. nucleatum* had the highest acid neutralizing activity, followed by *P. intermedia* and *P. gingivalis*. The *P. intermedia* and *F. nucleatum* cells were used to measure the amounts of base produced at a fixed pH of 5.0. These cells generated significant amounts of base at pH 5.0 along with the production of organic acids and ammonia from aspartic or glutamic acid. Acid–base balance theoretically calculated from the amounts of consumed substrate and end products implies that the acid neutralizing activity was derived from the decrease in acidity during the fermentation of amino acid into organic acids and ammonia.

Key words: acid neutralizing activity, Amino acid fermentation, *Fusobacterium nucleatum*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*

Nobuhiro Takahashi, Division of Oral Biochemistry, Department of Oral Biology, Tohoku University Graduate School of Dentistry, 4-1 Seiryomachi, Aoba-ku, Sendai 980-8575, Japan.
Tel: +81 22 717 8294; fax: +81 22 717 8297; e-mail: nobu_t@mail.cc.tohoku.ac.jp
Accepted for publication September 19, 2002

Porphyromonas gingivalis, *Prevotella intermedia* and *Fusobacterium nucleatum* are considered to be periodontopathic bacteria (7, 21–23). Increased numbers of *P. gingivalis* are found in plaque from sites in adults with periodontitis, while this bacterium is usually absent in healthy gingival sulci (20, 22) and scarce in gingival lesions (20). Unlike *P. gingivalis*, *F. nucleatum* and *P. intermedia* are isolated from not only the lesions of periodontitis but also the lesions of gingivitis (20) or healthy sites (38). The observation that strains of *F. nucleatum* and *P. intermedia* are able to grow at wide pH ranges of 5.0–7.0 (12, 32, 36), whereas *P. gingivalis* grows at pH 6.5–7.0 (19, 32, 36), indicates the flexibility

of *F. nucleatum* and *P. intermedia* to the fluctuation of pH in oral environment.

In addition, strains of *P. gingivalis*, *P. intermedia* and *F. nucleatum* raise the pH of the culture during growth (32, 36), and the washed cells of these bacteria neutralize the environmental pH along with the production of organic acids and ammonia in the presence of tryptone or casamino acids (32). These findings suggest that through degradation of nitrogenous compounds, these bacteria are capable of producing base and consequently modifying the environment of dental plaque. However, the mechanism of the base production has not been elucidated since stoichiometric calculation of substrates and end products is difficult

due to the complexity of the composition of nitrogenous compounds such as tryptone and casamino acids.

Recently, it has been reported by the author and his collaborators (33–35) that *P. gingivalis* utilizes dipeptides, aspartylaspartic acid or glutamylglutamic acid, as a fermentation substrate, while *P. intermedia* and *F. nucleatum* utilize aspartic acid (37, 42) and glutamic acid (3, 10), respectively. In this study, the acid neutralizing activity of *P. gingivalis*, *P. intermedia* and *F. nucleatum* during fermentation of these amino acids and dipeptides was measured. Further, the involvement of amino acid fermentation in the acid neutralization was proved by theoretical

calculation of acid-base balance during the fermentation

Material and methods

Microorganisms and growth conditions

P. gingivalis ATCC 33277 *P. gingivalis* W 83 *P. intermedia* ATCC 25611 and *F. nucleatum* ATCC 25586 were used in this study. These bacterial strains were precultured in modified BM medium consisting of 1% tryptone, 1% proteose peptone and 0.5% yeast extract (26–32) without glucose for 2 days at 37°C in an anaerobic chamber (N₂ 80% H₂ 10% CO₂ 10% NHC type Hirasawa Works Tokyo Japan). The precultures of the bacterial strains were transferred into modified BM medium without glucose at 37°C in the anaerobic chamber.

Assay for acid neutralizing activity of washed cells

The following experiments using washed cells were carried out in another anaerobic chamber (N₂ 90% H₂ 10% NH type Hirasawa Works). The bacterial cells were harvested during exponential growth phase and washed twice with 2 mM potassium phosphate buffer (pH 7.0) containing 75 mM NaCl, 75 mM KCl and 2 mM MgCl₂. The cells were suspended in the same buffer solution at an optical density of 5 at 660 nm.

The acid neutralizing activity was measured by the change of pH in the cell

suspension in the presence of aspartylaspartic acid or glutamylglutamic acid for *P. gingivalis*, aspartic acid for *P. intermedia* and glutamic acid for *F. nucleatum*. The cell suspension (0.8 ml) was preincubated at 35°C and pH 5.0 or 5.5 for 5 min and the reaction was started by the addition of 0.8 ml of 100 mM sodium salt of amino acid or 50 mM sodium salt of dipeptide. The pH of reaction mixture was monitored at 1 h intervals for 6 h. Before and after the 6 h incubation, 0.5 ml of the reaction mixture was mixed with 0.05 ml of 60% perchloric acid and stored at 4°C more than 1 h.

The amount of base produced was also measured at a fixed pH by a pH stat using 10 mM HCl as titrant. The cell suspension (2.7 ml) was preincubated at 35°C and pH 5.0 for 5 min and the reaction was started by the addition of 0.3 ml of 100 mM sodium salt of amino acid. The amounts of base produced were calculated from the amounts of titrant consumed. Before and after a 14- or 20-min incubation, 0.5 ml of the reaction mixture was mixed with 0.05 ml of 60% perchloric acid and stored at 4°C more than 1 h.

Assay for ammonia and carboxylic acids

The samples mixed with perchloric acid were centrifuged for the removal of cell debris (8000 × g, 4°C, 10 min) and then neutralized with 5 M potassium carbonate. Ammonia in the samples was assayed enzymatically with glutamate dehydrogenase (1). Formic, acetic, lactic, malic, propionic

butyric and succinic acids in the samples were assayed by a carboxylic acid analyzer (model S 3000X Tokyo Rikakai Tokyo Japan) (31–35). Fumaric acid was determined fluorometrically using enzymatic reaction (4).

Detection of β-alanine and γ-aminobutyric acid

A part of the sample (3–10 μl) was separated on a thin layer chromatography plate (Silicagel 70 plate Wako Pure Chemical Industries Osaka Japan) using *n*-butanol-acetic acid-water (4:1:1). Aspartic acid, glutamic acid, aspartylaspartic acid, glutamylglutamic acid, β-alanine and γ-aminobutyric acid contained in the samples were confirmed by cochromatography. After drying these amino acids and amino acid derivatives were visualized by spraying 1% ninhydrin dissolved in methanol containing 3% acetic acid.

Theoretical calculation of acid-base balance

Acid-base balance during amino acid fermentation was calculated according to the Henderson-Hasselbalch equation (Table 1).

$$\text{pH} = \text{pK} + \log \frac{[\text{A}^-]}{[\text{AH}]} \text{ when } \text{AH} \rightleftharpoons \text{A}^- + \text{H}^+$$

For instance, aspartic acid has four forms differing in the dissociation of carboxyl and amino groups. The distribution of

Table 1 Amount of H⁺ liberated from 1 mol of amino acid, carboxylic acids, carbonic acid and ammonia at a pH value of *A*

	Forms	Amount (mol)	H ⁺ amount (mol)
Amino acid	HOOCH(NH ₃ ⁺)(CH ₂) COOH + OH ⁻	1/S ₃	-1/S ₃ [#]
<i>n</i> = 1 aspartic acid	⁻ OOCH(NH ₃ ⁺)(CH ₂) COOH	C ₁ /S ₃	0
<i>n</i> = 2 glutamic acid	⁻ OOCH(NH ₃ ⁺)(CH ₂) COO ⁻ + H ⁺	C ₁ C ₂ /S ₃	C ₁ C ₂ /S ₃
	⁻ OOCH(NH ₂)(CH ₂) COO ⁻ + 2H ⁺	C ₁ C ₂ C ₃ /S ₃	2C ₁ C ₂ C ₃ /S ₃
			Σ[H ⁺] = (C ₁ C ₂ + 2C ₁ C ₂ C ₃ - 1)/S ₃
Monocarboxylic acid	H(CH ₂) COOH	1/S ₁	0
<i>n</i> = 0 formic acid	H(CH ₂) COO ⁻ + H ⁺	C ₁ /S ₁	C ₁ /S ₁
<i>n</i> = 1 acetic acid			Σ[H ⁺] = C ₁ /S ₁
<i>n</i> = 2 propionic acid			
<i>n</i> = 3 butyric acid			
Dicarboxylic acid	HOOC(CH ₂) ₂ COOH	1/S ₂	0
<i>n</i> = 1 fumaric acid	OO(CH ₂) ₂ COOH + H ⁺	C ₁ /S ₂	C ₁ /S ₂
<i>n</i> = 2 succinic acid	⁻ OO(CH ₂) ₂ COO ⁻ + 2H ⁺	C ₁ C ₂ /S ₂	2C ₁ C ₂ /S ₂
			Σ(H ⁺) = (C ₁ + 2C ₁ C ₂)/S ₂
Carbonic acid	H ₂ CO ₃	1/S ₂	0
	HCO ₃ ⁻ + H ⁺	C ₁ /S ₂	C ₁ /S ₂
	CO ₃ ²⁻ + 2H ⁺	C ₁ C ₂ /S ₂	2C ₁ C ₂ /S ₂
			Σ[H ⁺] = (C ₁ + 2C ₁ C ₂)/S ₂
Ammonia	NH ₄ ⁺ + OH ⁻	1/S ₁	-1/S ₁ [#]
	NH ₃	C ₁ /S ₁	0
			Σ[H ⁺] = -1/S ₁

$$C_1 = 10^{(A - \text{pK})} \quad C_2 = 10^{(A - \text{pK})} \quad C_3 = 10^{(A - \text{pK})} \quad S_1 = 1 + C_1 \quad S_2 = 1 + C_1 + C_1C_2 \quad S_3 = 1 + C_1 + C_1C_2 + C_1C_2C_3$$

[#]Amounts of OH⁻ were calculated as minus values

pK values see Material and methods

these forms at a pH value of A is calculated from the following equations

$$(pK_1 = 4.18 \quad pK_2 = 5.6) \text{ ammonia } (pK_1 = 9.26) \quad (25)$$

$$A = pK_1 + \log \frac{[\text{OOCCH}(\text{NH}_3^+)\text{CH}_2\text{COOH}]}{[\text{HOOCCH}(\text{NH}_3^+)\text{CH}_2\text{COOH}]}$$

$$A = pK_2 + \log \frac{[\text{OOCCH}(\text{NH}_3^+)\text{CH}_2\text{COO}^-]}{[\text{OOCCH}(\text{NH}_3^+)\text{CH}_2\text{COOH}]}$$

$$A = pK_3 + \log \frac{[\text{OOCCH}(\text{NH}_2)\text{CH}_2\text{COO}^-]}{[\text{OOCCH}(\text{NH}_3^+)\text{CH}_2\text{COO}^-]}$$

Thereby the total H^+ derived from 1 mol of aspartic acid at pH A ($\sum [\text{H}^+]_{\text{aspart}}$) is calculated as $(C_1 C_2 + 2C_1 C_2 C_3 - 1)/S_3$ when $C_1 = 10^{(A - pK_1)}$, $C_2 = 10^{(A - pK_2)}$, $C_3 = 10^{(A - pK_3)}$ and $S_3 = 1 + C_1 + C_1 C_2 + C_1 C_2 C_3$ (Table 1). Similar calculations were performed for end products from aspartic acid fermentation: formic acid ($\sum [\text{H}^+]_{\text{form}}$), acetic acid ($\sum [\text{H}^+]_{\text{acet}}$), fumaric acid ($\sum [\text{H}^+]_{\text{fumar}}$), succinic acid ($\sum [\text{H}^+]_{\text{succin}}$), carbonic acid ($\sum [\text{H}^+]_{\text{carbon}}$) and ammonia ($\sum [\text{H}^+]_{\text{ammon}}$). From these calculations the change in H^+ during aspartic acid degradation by *P. intermedia* at pH A (p mol of aspartic acid $\Rightarrow q$ mol of formic acid + r mol of acetic acid + s mol of fumaric acid + t mol of succinic acid + u mol of carbonic acid + v mol of ammonia) was estimated as

$$\left\{ (q \sum [\text{H}^+]_{\text{form}} + r \sum [\text{H}^+]_{\text{acet}} + s \sum [\text{H}^+]_{\text{fumar}} + t \sum [\text{H}^+]_{\text{succin}} + u \sum [\text{H}^+]_{\text{carbon}} + v \sum [\text{H}^+]_{\text{ammon}}) - p \sum [\text{H}^+]_{\text{aspart}} \right\}$$

The following pK values were applied for calculation: aspartic acid ($pK_1 = 1.88$, $pK_2 = 3.65$, $pK_3 = 9.60$), glutamic acid ($pK_1 = 2.19$, $pK_2 = 4.25$, $pK_3 = 9.67$), carbonic acid ($pK_1 = 6.37$, $pK_2 = 10.25$), formic acid ($pK_1 = 3.75$), acetic acid ($pK_1 = 4.76$), butyric acid ($pK_1 = 4.82$), fumaric acid ($pK_1 = 3.02$, $pK_2 = 4.4$), succinic acid

rapidly while *P. intermedia* and *P. gingivalis* increased the pH slowly but their final pH was higher than *F. nucleatum*. During the neutralization *F. nucleatum* produced formic acid, acetic acid, butyric acid and ammonia while *P. intermedia* produced formic acid, acetic acid, fumaric acid, succinic acid and ammonia. *P. gingivalis* pro-

duced butyric acid, acetic acid, propionic acid, succinic acid and ammonia except for *P. gingivalis* ATCC 33277 at an initial pH of 5.0. These end product profiles were similar to those reported previously (data not shown) (34, 35, 37). Neither β -alanine nor γ -aminobutyric acid was detected as an end product.

These results clearly show that the washed cells of these bacteria produced base during amino acid degradation. Previous studies demonstrated that base production in dental plaque is due to degradation of urea (ureolysis) (17, 29, 40, 41), degradation of arginine (arginolysis) (5, 15, 18, 40, 41) and decarboxylation of amino acid (9, 11, 13, 17, 39). The base production by ureolysis and arginolysis has been explained mainly by ammonia liberation from urea and arginine respectively (6, 27). Decarboxylation of amino acid produces amine and carbonic acid. During this reaction H^+ is trapped into carbonic acid and the carbonic acid is released as carbon dioxide leading to neutralization (9, 17, 27). Particularly at low pH the decarboxylation of amino acid has been considered a main bacterial metabolic activity producing base (9, 11, 13). In this study however no amine (β -alanine or γ -aminobutyric acid) was produced, excluding the possibility of base production by decarboxylation. Instead a significant production of organic acids and ammonia indicates that the amino acids were fermented into organic acids and ammonia (Table 2) and strongly implies the involvement of amino acid fermentation in the base production.

In order to prove this assumption the theoretical calculation of acid-base balance during the amino acid fermentation by *P. intermedia* and *F. nucleatum* was performed according to the Henderson-Hasselbalch equation (Table 1). The base production was quantified by a pH stat method using HCl as titrant (Fig. 2) and the amounts of end products were quantified by a carboxylic acid analyzer (Table 2). The production of carbonic acid was estimated from stoichiometric calculation of carbon recovery according to the previous reports concerning the metabolic pathway of *P. intermedia* (37, 42) and *F. nucleatum* (3, 10).

For instance at pH 5.0 *P. intermedia* consumed 0.870 μmol of aspartic acid and produced 0.095 μmol of formic acid, 0.284 μmol of acetic acid, 0.098 μmol of fumaric acid, 0.520 μmol of succinic acid, 0.346 μmol of carbonic acid and 0.870 μmol of ammonia (Table 2). According to the equations in Table 1, 1.00 mol

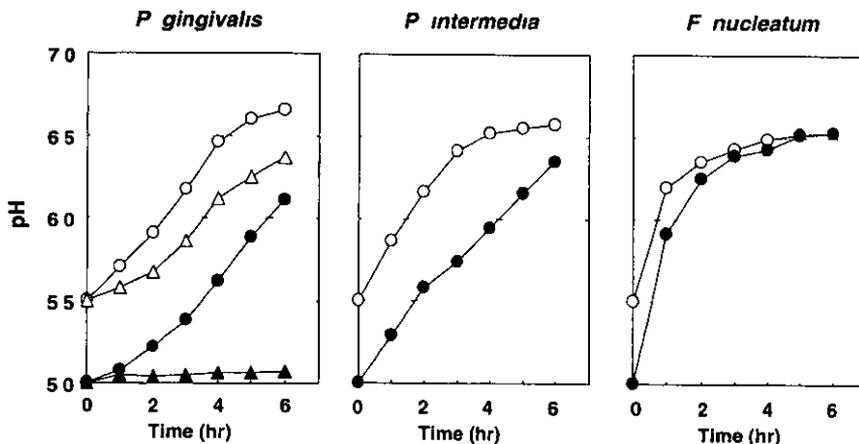


Fig. 1. Acid neutralizing activity of *P. gingivalis*, *P. intermedia* and *F. nucleatum*. In the panel for *P. gingivalis* ATCC 33277 (\blacktriangle , \triangle) and W 83 (\bullet , \circ). One representative set of results is given from three independent experiments and is similar to the other two sets of results.

Table 2 End product formation base production and acid-base balance during amino acid fermentation by *P intermedia* ATCC 25611 and *F nucleatum* ATCC 25586 at pH 5.0

	<i>P intermedia</i>	<i>F nucleatum</i>
End products from aspartic or glutamic acid (μmol) ^a		
Formic acid	0.095 ± 0.026	0.36 ± 0.08
Acetic acid	0.284 ± 0.047	3.24 ± 0.74
Butyric acid	nd	2.00 ± 0.45
Fumaric acid	0.098 ± 0.021	nd
Succinic acid	0.520 ± 0.061	nd
Carbonic acid	0.346 ± 0.282 ^b	9.26 ± 2.10
Ammonia	0.870 ± 0.129	4.82 ± 1.09
Aspartic or glutamic acid consumed (μmol) ^d	0.870 ± 0.129	4.82 ± 1.09
Amount of base expected (μmol)	0.684 ± 0.147	4.89 ± 1.11
Amount of base produced (μmol) ^f	0.560 ± 0.090	4.24 ± 0.83

The means ± standard deviations of three experimental values were given
nd not detected

^aProduction for 20 min from aspartic acid and 14 min from glutamic acid

^bObtained from stoichiometric calculation of carbon [=5 × mol of ammonia - 1 × mol of formic acid - 2 × mol of acetic acid - 4 × mol of butyric acid]

^cObtained from stoichiometric calculation of carbon [=4 × mol of ammonia - 1 × mol of formic acid - 2 × mol of acetic acid - 4 × mol of succinic acid]

^dAssumed as the same amounts of ammonia produced

^eCalculated from the amounts of amino acid consumed and end products detected using Henderson-Hasselbalch equations (Table 1)

^fProduction (μmol of OH^-) obtained from the data presented in Fig. 2) for 20 min from aspartic acid and 14 min from glutamic acid

No significant difference from the amount of base produced (paired Student *t* test)

of aspartic acid consists of 0.957 mol of $^- \text{OOCCH}(\text{NH}_3^+) \text{CH}_2 \text{COO}^- + \text{H}^+$ and 0.043 mol of $^- \text{OOCCH}(\text{NH}_3^+) \text{CH}_2 \text{COOH}$ at pH 5.0 so that total H^+ is calculated as 0.957 mol. Therefore the amount of H^+ liberated from 0.870 μmol of aspartic acid is calculated as 0.833 μmol (0.870 × 0.957 μmol). Similarly each mol of formic, acetic, fumaric, succinic and carbonic

acids liberates 0.944, 0.645, 1.79, 1.07 and 0.042 mol of H^+ respectively while 1 mol of ammonia liberates 1.00 mol of OH^- (namely production of -1.00 mol of H^+). Thus the total H^+ liberated from the end products is calculated as 0.149 μmol [(0.095 × 0.944 μmol from formic acid) + (0.284 × 0.645 μmol from acetic acid) + (0.098 × 1.79 μmol from fumaric acid) +

(0.520 × 1.07 μmol from succinic acid) + (0.346 × 0.042 μmol from carbonic acid) + (0.870 × -1.00 μmol from ammonia)]. The change in H^+ during the degradation of glutamic acid to formic, acetic, fumaric, succinic, carbonic acids and ammonia is calculated as -0.684 (=0.149 - 0.833) μmol , meaning that 0.684 μmol of OH^- is expected to be produced (amount of base expected in Table 2). A similar calculation was performed for *F nucleatum* (Table 2).

The theoretically calculated amounts of base (base expected in Table 2) were similar to the detected amounts of base (Table 2). These results indicate that the base production by *P intermedia* and *F nucleatum* at acidic pH was derived from the decrease in acidity during the fermentation of amino acid into organic acids and ammonia. The acid neutralizing activity of *P gingivalis* (Fig. 1) can also be explained in the same manner though the calculation for *P gingivalis* is difficult due to the lack of information on *pK* values of dipeptides. The neutralizing activity slowed down after reaching about pH 6.5 (Fig. 1). This could be due to the ability of even organic acids with high *pK* values to mostly dissociate around neutral pH and subsequently produce a significant amount of H^+ .

Acid-base balance during amino acid fermentation can be more generalized. The *pK* value of carboxyl group of amino acid is 2-3 so that the carboxyl group dissociates completely at pH 5. Both the amino group of amino acid and the ammonia produced from amino acid also dissociate completely at pH 5. On the other hand, most organic acids such as acetic and butyric acids produced from amino acid fermentation have higher *pK* values so that they only partially dissociate at pH 5. Therefore during the fermentation of amino acid into organic acid and ammonia around pH 5, H^+ could be consumed (namely net base production) depending on how many moles and what kinds of organic acids are produced from 1 mol of amino acid. The base production by *F nucleatum*, *P intermedia* and *P gingivalis* from peptide mixture at acidic pH as observed previously (32) may also be explained in the same manner since these bacteria produced large amounts of organic acids and ammonia from peptide mixtures (32).

There are various amino acids available in dental plaque of which glutamic and aspartic acids make up the major part (14, 28). Both these amino acids increase in gingival fluid from periodontal sites (30)

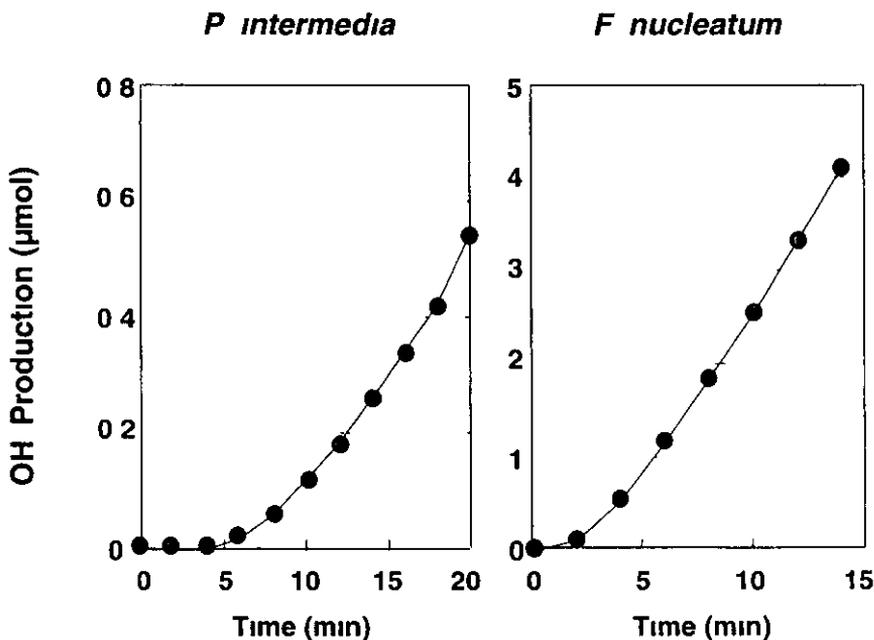


Fig. 2 Base production by *P intermedia* ATCC 25611 and *F nucleatum* ATCC 25586 at pH 5.0. One representative result is given from three independent experiments and is similar to the other results.

Peptides are also supplied from saliva and crevicular fluid and through bacterial protein degradation. Asaccharolytic bacteria such as *F. nucleatum*, *P. intermedia* and *P. gingivalis* in the dental plaque ecosystem can incorporate and ferment these nitrogenous compounds into organic acids and ammonia. This activity may partly contribute to the acid neutralizing activity in dental plaque as shown in this study and play a role in maintaining a neutral dental plaque pH (2.8–16) as well as the activity of ureolysis, arginolysis and decarboxylation of amino acid. Furthermore, the ability of these bacteria to neutralize the environment of dental plaque could protect them, especially acid sensitive bacteria such as *P. gingivalis* (19, 32, 36) from acid attack when fermentable carbohydrates are supplied to the oral cavity and the plaque pH decreases rapidly (24).

Acknowledgments

This study was supported partly by the Inamori Foundation and Grants in Aid 07307018, 07557116, 07771650, 08771601, 11470386 and 11877321 from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology, Japan.

References

- Bergmeyer HU, Beutler HO. Ammonia. *Methods Enzymol* 1984; **8**: 454–461.
- Bickel M, Cimasoni G. The pH of human crevicular fluid measured by a new microanalytical technique. *J Periodont Res* 1985; **20**: 35–40.
- Buckel W, Barker HA. Two pathways of glutamate fermentation by anaerobic bacteria. *J Bacteriol* 1974; **117**: 1248–1260.
- Burlina A. Fumarate. *Method Enzymol* 1985; **7**: 34–38.
- Burne RA, Marquis RE. Alkali production by oral bacteria and protection against dental caries. *FEMS Microbiol Lett* 2000; **193**: 1–6.
- Carlsson J. Metabolic activity of oral bacteria. In: Thylstrup A, Fejerskov O, eds. *Textbook of cariology*. Copenhagen: Munksgaard, 1986: 4–106.
- Dzink JL, Socransky SS, Haffjue AD. The predominant cultivable microbiota of active and inactive lesions of destructive periodontal diseases. *J Clin Periodontol* 1988; **15**: 316–323.
- Eggert FM, Drewell L, Bigelow JA, Speck JE, Goldner M. The pH of gingival crevices and periodontal pockets in children, teenagers and adults. *Arch Oral Biol* 1991; **36**: 233–238.
- Gale EF. The bacterial amino acid decarboxylases. *Adv Enzymol* 1946; **6**: 1–32.
- Gharbia SE, Shah HN. Pathways of glutamate catabolism among *Fusobacterium* species. *J Gen Microbiol* 1991; **137**: 1201–1206.
- Gochman N, Meyer RK, Blackwell RQ, Fosdick LS. The amino acid decarboxylase of salivary sediment. *J Dent Res* 1959; **38**: 998–1003.
- Hamilton IR, McKee AS, Bowden GH. Growth and metabolic properties of *Bacteroides intermedius* in anaerobic continuous culture. *Oral Microbiol Immunol* 1989; **4**: 89–97.
- Hayes ML, Hyatt AT. The decarboxylation of amino acids by bacteria derived from human dental plaque. *Arch Oral Biol* 1974; **19**: 361–369.
- Hyatt AT, Hayes ML. Free amino acids and amines in human dental plaque. *Arch Oral Biol* 1975; **20**: 203–209.
- Kanapka JA, Kleinberg I. Catabolism of arginine by the mixed bacteria in human salivary sediment under conditions of low and high glucose concentration. *Arch Oral Biol* 1983; **28**: 1007–1015.
- Kleinberg I, Hall G. pH and depth of gingival crevices in different areas of the mouths of fasting humans. *J Periodont Res* 1968; **3**: 109–117.
- Kleinberg I. Regulation of the acid-base metabolism of the dento gingival plaque and its relation to dental caries and periodontal disease. *Int Dent J* 1970; **20**: 451–471.
- Marquis RE, Bender GR, Murray DR, Wong A. Arginine deiminase system and bacterial adaptation to acid environment. *Appl Environ Microbiol* 1987; **53**: 198–200.
- McDermid AS, McKee AS, Marsh PD. Effect of environmental pH on enzyme activity and growth of *Bacteroides gingivalis* W50. *Infect Immun* 1988; **56**: 1096–1100.
- Moore WEC, Holdeman LV, Cato EP, Smibert RM, Burmeister JA, Best AM, Ranney RR. Bacteriology of human gingivitis. *J Dent Res* 1987; **66**: 989–995.
- Moore WEC, Holdeman LV, Cato EP, Smibert RM, Burmeister JA, Palcanis KG, Ranney RR. Comparative bacteriology of juvenile periodontitis. *Infect Immun* 1985; **48**: 507–519.
- Moore WEC, Holdeman LV, Cato EP, Smibert RM, Burmeister JA, Ranney RR. Bacteriology of moderate (chronic) periodontitis in mature adult human. *Infect Immun* 1983; **42**: 510–515.
- Moore WEC, Holdeman LV, Smibert RM, Good IJ, Burmeister JA, Palcanis KG, Ranney RR. Bacteriology of experimental gingivitis in young adult humans. *Infect Immun* 1982; **38**: 651–667.
- Schachtele CF, Jensen ME. Comparison of methods for monitoring changes in the pH of human dental plaque. *J Dent Res* 1982; **61**: 1117–1125.
- Segel IH. Supplement I. In: Segel IH, ed. *Biochemical calculations* (Japanese language edition, translation authorized by Hirokawa Publishing Co, Tokyo). New York: John Wiley & Sons, 1968: 293–322.
- Shah HN, Williams RAD, Bowden GH, Hardie JM. Comparison of the biochemical properties of *Bacteroides melanogenicus* from human dental plaque and other sites. *J Appl Bacteriol* 1976; **41**: 473–492.
- Silverstone LMN, Johnson W, Hardie JM, Williams RAD. Biochemical events in dental plaque. In: Silverstone LM, Johnson NW, Hardie JM, Williams RAD, eds. *Dental caries: aetiology, pathology and prevention*. London: The Macmillan Press, 1981: 103–132.
- Singer DL, Kleinberg I. The free amino acid in human dental plaque. *Arch Oral Biol* 1983; **28**: 873–878.
- Sissons CH, Cutress TW. pH changes during simultaneous metabolism of urea and carbohydrate by human salivary bacteria *in vitro*. *Arch Oral Biol* 1988; **33**: 579–587.
- Syrjanen SM, Ala L, Alkuikalaakujala P, Markkanen SO, Markkanen H. Free amino acid levels in oral fluids of normal subjects and patients with periodontal disease. *Arch Oral Biol* 1990; **35**: 189–193.
- Takahashi N, Abbe K, Takahashi S, Yamada T. Oxygen sensitivity of sugar metabolism and interconversion of pyruvate formate lyase in intact cells of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sanguis*. *Infect Immun* 1987; **55**: 652–656.
- Takahashi N, Saito K, Schachtele CF, Yamada T. Acid tolerance and neutralizing activity of *Porphyrionomonas gingivalis*, *Prevotella intermedia* and *Fusobacterium nucleatum*. *Oral Microbiol Immunol* 1997; **12**: 323–328.
- Takahashi N, Sato T. Preferential utilization of dipeptides by *Porphyrionomonas gingivalis*. *J Dent Res* 2001; **80**: 1425–1429.
- Takahashi N, Sato T. Dipeptide utilization by periodontopathic bacteria *Porphyrionomonas*, *Prevotella* and *Fusobacterium*. *Oral Microbiol Immunol* 2002; **17**: 50–54.
- Takahashi N, Sato T, Yamada T. Metabolic pathways for cytotoxic end product formation from glutamate and aspartate containing peptides by *Porphyrionomonas gingivalis*. *J Bacteriol* 2000; **182**: 4704–4710.
- Takahashi N, Schachtele CF. Effect of pH on the growth and proteolytic activity of *Porphyrionomonas gingivalis* and *Bacteroides intermedius*. *J Dent Res* 1990; **69**: 1266–1269.
- Takahashi N, Yamada T. Pathways for amino acid metabolism by *Prevotella intermedia* and *Prevotella nigrescens*. *Oral Microbiol Immunol* 2000; **15**: 96–102.
- Teapaisorn R, Douglas CW, Walsh TF. Characteristics of black pigmented anaerobes isolated from diseased and healthy periodontal sites. *J Periodont Res* 1995; **30**: 245–251.
- Vratsanos SM, Mandel ID. Polyamines of dental plaque in caries resistant vs caries susceptible adults. *J Dent Res* 1985; **64**: 422–424.
- Wijeyeweera RJ, Kleinberg I. Acid-base pH curves *in vitro* with mixtures of pure cultures of human oral microorganisms. *Arch Oral Biol* 1989; **34**: 55–64.
- Wijeyeweera RJ, Kleinberg I. Arginolytic and ureolytic activities of pure cultures of human oral bacteria and their effects on the pH response of salivary sediment and dental plaque *in vitro*. *Arch Oral Biol* 1989; **45**: 43–53.
- Wong JC, Dyer JK, Tribble JL. Fermentation of L-aspartate by a saccharolytic strain of *Bacteroides melanogenicus*. *Appl Environ Microbiol* 1997; **33**: 69–73.

Nested PCR for detection of mutans streptococci in dental plaque

T Sato¹, J Matsuyama², T Kumagai¹, G Mayanagi¹, M Yamaura¹, J Washio¹ and N Takahashi¹

¹Division of Oral Ecology and Biochemistry Tohoku University Graduate School of Dentistry, Sendai, Japan, and ²Division of Pediatric Dentistry, Niigata University Graduate School of Medical and Dental Sciences, Niigata, Japan

2003/0048 received 19 January 2003 revised 19 March 2003 and accepted 7 April 2003

ABSTRACT

T SATO, J MATSUYAMA, T KUMAGAI, G MAYANAGI M YAMAURA, J WASHIO AND N TAKAHASHI 2003

Aims Mutans streptococci such as *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* have been implicated in human dental caries. In an attempt to develop a rapid and sensitive method for detecting *Strep mutans* and *Strep sobrinus* in dental plaque, a nested PCR amplification based on the 16S rRNA gene was employed.

Methods and Results A universal set of PCR primers for bacterial 16S rRNA gene was introduced for the first PCR, and then two sets of primers specific for the 16S rRNA gene sequences of either *Strep mutans* or *Strep sobrinus* were used for the second PCR. Eighteen plaque samples were analyzed, and a nested PCR was shown to be more sensitive for detecting *Strep mutans* and *Strep sobrinus* than direct PCR.

Conclusions, Significance and Impact of the Study The 16S rRNA gene-based nested PCR method is a rapid and sensitive method for the detection of mutans streptococci, and may also be suitable for carrying out large-scale studies on the cariogenicity of mutans streptococci.

Keywords 16S rRNA gene, detection, PCR, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sobrinus*

INTRODUCTION

Mutans streptococci have been implicated as cariogenic bacteria in the oral cavity because they have biological properties such as high productivity of dental caries-causing lactic acid and extracellular polysaccharides (Loesche 1986, Maiden *et al* 1992). Among these bacteria, *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* are frequently isolated from dental caries lesions (Loesche 1986, Maiden *et al* 1992).

Presently, molecular approaches have been developed for the detection and identification of mutans streptococci in oral samples. We previously reported a method using restriction fragment length polymorphism analysis of PCR-amplified 16S rRNA genes to identify *Strep mutans* and *Strep sobrinus* followed by the culture and isolation of colonies on the agar plates (Sato *et al* 2001). However, this method is time-consuming and requires culturing and

isolating target bacteria on agar plates. On the contrary, a direct PCR method has been developed to detect mutans streptococci directly from dental plaque samples using specific PCR primers without the need to culture and isolate bacteria (Igarashi *et al* 2000, Oho *et al* 2000, Rupp *et al* 2003). However, specific bacterial DNA amplification may be influenced by the presence of other bacterial DNA extracted from dental plaque samples, and this may result in reduced sensitivity (Bamford *et al* 1998, Sugita *et al* 2001).

Nested PCR amplification has been developed to increase the sensitivity of detecting periodontal bacteria directly from dental plaque samples (Leys *et al* 1994, Wilts *et al* 1999). This method consists of a first-step amplification with universal primers and a second-step PCR with species-specific primers, and it allows amplification of specific DNA regions of the target bacteria with high sensitivity.

In the present study, we developed a nested PCR method for rapid and sensitive detection of *Strep mutans* and *Strep sobrinus*, and 18 human dental plaque samples were analysed for the presence of these two species.

Correspondence to: Takuchi Sato, Division of Oral Ecology and Biochemistry, Tohoku University Graduate School of Dentistry, Sendai 980-8575, Japan.
(e-mail: tal@mail.cc.tohoku.ac.jp)

MATERIALS AND METHODS

Bacterial culture and genomic DNA purification

Streptococcus mutans NCTC 10449 and *Strep sobrinus* JCM 5176 were cultured on Fastidious Anaerobe Agar (IDG Limited, Bury, UK) supplemented with 5% defibrinated rabbit blood, and incubated at 37°C for 3 days in an anaerobic glove box (model AZ-Hard, Hirasawa, Tokyo, Japan) in an atmosphere of 80% N₂, 10% H₂ and 10% CO₂. Bacteria were harvested from the plates and genomic DNA was extracted using the InstaGene Matrix Kit (Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA, USA) according to the manufacturer's instructions.

Dental plaque sample collection and preparation

Eighteen supragingival plaque samples (*ca* 1 mg) formed on healthy enamel surfaces of 18 patients (27–81 years) were collected. No patients had taken antibiotics for 3 months prior to sampling. All patients were treated as specified under the university human subjects protocol. Sterile explorers were used to collect dental plaque. Plaque samples were stored in 1.5 ml sampling tubes at –20°C prior to analysis.

Nested and direct PCR

Plaque samples were washed once with 1 ml of sterile distilled water and DNA was extracted with the InstaGene Matrix Kit (Bio-Rad Laboratories) according to the manufacturer's instructions.

In the first amplification, the 16S rRNA genes were amplified by PCR with universal primers 8UA and 1492R (Sato *et al* 1997, 2001) and *Taq* DNA polymerase (HotStarTaq Master Mix, Qiagen GmbH, Hilden, Germany) according to the manufacturer's instructions. Each PCR mixture comprised 5 µl of either plaque sample DNA or bacterial genomic DNA and 95 µl of reaction mixture containing 1.5 mM MgCl₂. PCR amplification was performed in a PCR Thermal Cycler MP (TaKaRa Biomedicals, Ohtsu, Shiga, Japan) programmed for 15 min at 95°C for initial heat activation and 35 cycles of 1 min at 94°C for denaturation, 1 min at 55°C for annealing, and 1.5 min at 72°C for extension, followed by 10 min at 72°C for final extension. The predicted PCR product with the universal primers was 1505 bp in length.

Subsequently, detection of *Strep mutans* and *Strep sobrinus* were performed by a second amplification of the first amplification mixture (1 µl) using species-specific primers based on the 16S rRNA gene sequences. The second PCR was carried out for 35 cycles with either the *Strep mutans*-specific primers, sm1 and sm2, or the *Strep sobrinus*-specific primers, SobF and SobR (Rupf *et al* 2001,

Sato *et al* 2001) and *Taq* DNA polymerase (HotStarTaq Master Mix, Qiagen GmbH) according to the manufacturer's instructions. The predicted PCR products with *Strep mutans*- or *Strep sobrinus*-specific primers were 282 and 546 bp in length, respectively.

Direct PCR was also conducted using the specific primers to detect *Strep mutans* or *Strep sobrinus* DNA directly from a dental plaque sample without PCR amplification with universal primers.

The PCR products were separated on 2% agarose gels (High Strength Analytical Grade Agarose, Bio-Rad Laboratories) in Tris–borate EDTA buffer (100 mM Tris, 90 mM borate, 1 mM EDTA, pH 8.4) stained with ethidium bromide and photographed under UV light. A 100-bp DNA Ladder (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA, USA) was used as a molecular size marker.

DNA quantification

The sensitivity of the nested PCR method and the direct PCR method was compared using standardized amounts of genomic DNA extracted from *Strep mutans* NCTC 10449 and *Strep sobrinus* JCM 5176 DNA as a template. The concentration of chromosomal DNA was determined photometrically at 260 nm using a spectrophotometer (Smart-Spec 3000, Bio-Rad Laboratories).

RESULTS

Sensitivity of the nested PCR

Serial dilutions of genomic DNA extracted from *Strep mutans* NCTC 10449 and *Strep sobrinus* JCM 5176 (range 10 ng to 1 fg) were carried out to compare the sensitivity of the nested and direct PCR methods. Nested PCR for *Strep mutans* and *Strep sobrinus* allowed the detection of 100 and 10 fg DNA, respectively (Fig 1). For direct PCR, the detection limits of *Strep mutans* and *Strep sobrinus* were 100 pg and 100 fg DNA, respectively (Fig 1).

Nested PCR detection of *Strep mutans* and *Strep sobrinus* in dental plaque samples

Nested and direct PCR was applied to detect *Strep mutans* and *Strep sobrinus* in dental plaque samples. In the first amplification with universal primers, bacterial 16S rRNA genes were amplified in all 18 samples tested (data not shown). In the second amplification, *Strep mutans* DNA was detected in all 18 samples tested (detection rate 100%). With direct PCR, however, no signal was detected in samples 1, 2 and 11–18 (detection rate 44%). Furthermore, *Strep sobrinus* DNA was detected by nested PCR in 4 of 18 samples tested (samples 8, 9, 13 and 14, detection rate

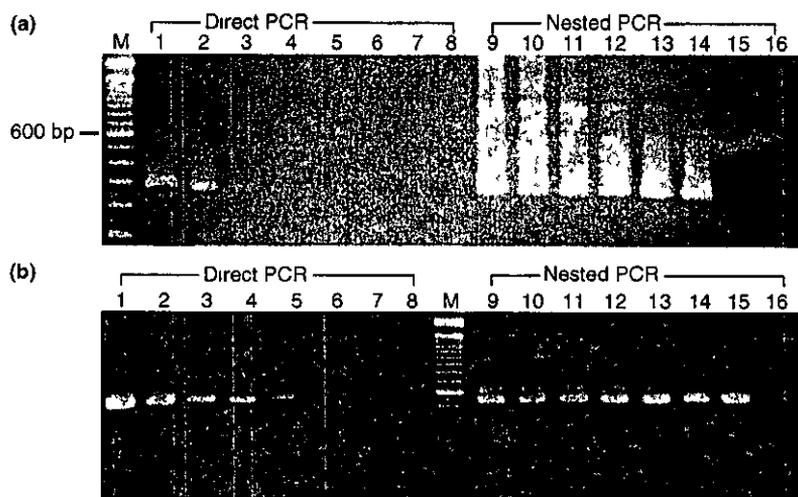


Fig 1 The detection limits of direct and nested PCR amplification with *Streptococcus mutans*-specific (panel a) and *Strep. sobrinus*-specific (panel b) primers. Lanes 1–16 DNA of either *Strep. mutans* NCTC 10449 or *Strep. sobrinus* JCM 5176, at 10 ng (lanes 1 and 9), 1 ng (lanes 2 and 10), 100 pg (lanes 3 and 11), 10 pg (lanes 4 and 12), 1 pg (lanes 5 and 13), 100 fg (lanes 6 and 14), 10 fg (lanes 7 and 15) and 1 fg (lanes 8 and 16), M, molecular size markers (100 bp DNA Ladder)

22%), while by direct PCR, only samples 8 and 9 had positive signals (detection rate 11%)

DISCUSSION

Streptococcus mutans and *Strep. sobrinus* are recognized as the most common cariogenic bacteria associated with human dental caries, and due to different initial colonization and acidogenic properties, detection and differentiation of these bacteria are important (Loesche 1986, Hirose *et al.* 1993). To understand the relationship between the incidence of caries and the existence of *Strep. mutans* and *Strep. sobrinus*, it is first necessary to develop a rapid and sensitive method for detecting these bacteria in dental plaque.

The detection of *Strep. mutans* and *Strep. sobrinus* has been accomplished by the conventional culture methods including biochemical and serological analyses, e.g. production of acids from *N*-acetylglucosamine, arbutin and melibiose, and the presence of α -galactosidase and α -glucosidase (Beighton *et al.* 1991, Maiden *et al.* 1992, Whaley and Beighton 1998). Conventional methods are followed by the isolation of colonies on the mitis-salivarius agar, so that the methods are time-consuming and sometimes unstable because they depend upon morphology and susceptibility to bacitracin. Therefore, genetic approaches such as a species-specific PCR based on the dextranase (Igarashi *et al.* 2000, Okada *et al.* 2002) or glucosyltransferase (Oho *et al.* 2000, Yano *et al.* 2002), gene sequences have been reported to be useful for detecting *Strep. mutans* and *Strep. sobrinus*. In addition to these target genes, bacterial 16S rRNA gene is known to be highly conserved within bacterial species and is widely used as a tool of bacterial taxonomy (Tanner *et al.* 1994). At present, analysis based on the 16S rRNA gene sequence is considered to be a standard in bacterial identification and detection. A direct PCR using specific primers based on the

16S rRNA gene, as well as dextranase and glucosyltransferase genes, can differentially detect *Strep. mutans* and *Strep. sobrinus* (Rupf *et al.* 2001). However, the disadvantage of these direct PCR methods is the potentially low sensitivity for directly detecting bacteria from clinical samples. Thus, in this study the nested PCR with the 16S rRNA genes was employed for the detection of *Strep. mutans* and *Strep. sobrinus*.

Our results (Fig 1) revealed that the detection using nested PCR was highly sensitive to *Strep. mutans* and *Strep. sobrinus* (detection limits 100 fg and 10 fg DNA, respectively) when compared with direct PCR (detection limits 100 pg and 100 fg DNA, respectively). This could be because selective amplification of the 16S rRNA gene by the first PCR increased the sensitivity of the second PCR using specific primers designed for the 16S rRNA gene. This procedure may also reduce interference from other DNA extracted from plaque samples. In addition, the difference of detection limits of the nested PCR between *Strep. mutans* and *Strep. sobrinus* were smaller than those of the direct PCR. These results suggest that the nested PCR in this study are suitable for the simultaneous detection of *Strep. mutans* and *Strep. sobrinus* rather than the direct PCR, and may also be suitable for carrying out large-scale studies on the cariogenicity of mutans streptococci.

In nested PCR amplification, universally conserved sequences were used as the first PCR primers in order to amplify variable regions of the 16S rRNA gene in all bacteria present in the plaque sample. Sequences unique to a single bacterial species were used as the second PCR primers in order to generate a species-specific DNA fragment. Therefore, the method described here can potentially detect not only *Strep. mutans* and *Strep. sobrinus* but also other oral bacterial species, such as periodontopathic bacteria, by