

## References

- Boyar RM, Bowden GH. The microflora associated with the progression of incipient carious lesions in teeth of children living in a water fluoridated area. *Caries Res* 1985 19:298-306
- Holdeman LV, Cato EP, Moore WEC. *Anaerobe Laboratory Manual* ed 4. Blacksburg, Virginia: Polytechnic Institute and State University, 1977
- Hoshino E, Horigome T, Kagawa R, Kaketa A, Okuda R. Species identification of *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* and *Actinomyces* isolated from human carious dentine. *Jpn J Oral Biol* 1984 26:496-501
- Hoshino E, Sato M, Sasano T, Kota K. Characterization of bacterial deposits formed in vivo on hydrogen ion sensitive field effect transistor electrodes and enamel surfaces. *Jpn J Oral Biol* 1989 31:102-106
- Ikeda T, Sandham HJ, Takai K. A comparison of cultivable plaque microbiota on buccal surface proximal area and occlusal fissures. *Nihon Univ J Oral Sci* 1978 6:341-347
- Kandler O, Weiss N. Genus *Lactobacillus* in Sneath PHA, Mair NS, Sharpe ME, Holt JG (eds) *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Baltimore: Williams & Wilkins, 1986, pp 1209-1234
- Maki Y, Ohta K, Takazoe I, Matsukubo Y, Takasu Y, Topitsoglou V, Frostell G. Acid production from isomaltulose, sucrose, sorbitol and xylitol in suspension of human dental plaque. *Caries Res* 1983 17:335-339
- Matsuyama J, Sato T, Takahashi N. Comparison between 16S rRNA genes PCR-RFLP analysis and biochemical tests for identification of *Actinomyces naeslundii*. *Int J Oral Biol* 2000 25:83-86
- Milnes AR, Bowden GH, Gates D, Tate R. Normal microbiota on the teeth of preschool children. *Microb Ecol Health Dis* 1993 6:213-227
- Minami T, Fujiwara T, Ooshima T, Nakajima Y, Hamada S. Interaction of structural isomers of sucrose in the reaction between sucrose and glucosyltransferases from mutans streptococci. *Oral Microbiol Immunol* 1990 5:189-194
- Moore LVH, Johnson JL, Moore WEC. Genus *Peptostreptococcus* in Sneath PHA, Mair NS, Sharpe ME, Holt JG (eds) *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Baltimore: Williams & Wilkins, 1986, pp 1083-1092
- Ohta K, Takazoe I. Effect of isomaltulose on acid production and insoluble glucan synthesis by *Streptococcus mutans*. *Bull Tokyo Dent Coll* 1983 24:1-11
- Ooshima T, Izumitani A, Minami T, Fujiwara T, Nakajima Y, Hamada S. Trehalulose does not induce dental caries in rats infected with mutans streptococci. *Caries Res* 1991 25:277-282
- Ooshima T, Izumitani A, Sobue S, Okahashi N, Hamada S. Non-cariogenicity of the disaccharide palatinose in experimental dental caries of rats. *Infect Immun* 1983 39:43-49
- Peltroche Liacsahuanga H, Hauk CJ, Kock R, Lampert F, Luttichen R, Hasse G. Assessment of acid production by various human oral micro-organisms when palatinose and leucrose is utilized. *J Dent Res* 2001 80:378-384
- Pikis A, Immel S, Rorbish SA, Thompson J. Metabolism of sucrose and its five isomers by *Fusobacterium mortiferum*. *Microbiology* 2002 148:843-852
- Sasaki N, Topitsoglou V, Takazoe I, Frostell G. Cariogenicity of isomaltulose (palatinose), sucrose and mixture of these sugars in rats infected with *Streptococcus mutans*. *E 49 Swed Dent J* 1985 9:149-155
- Sato T, Hoshino E, Uematsu E, Noda T. Predominant obligate anaerobes in necrotic pulps of human deciduous teeth. *Microb Ecol Health Dis* 1993 6:269-275
- Sato T, Mitsuyma J, Takahashi N, Sato M, Johnson J, Schachtele C, Hoshino E. Differentiation of oral *Actinomyces* species by 16S rDNA polymerase chain reaction restriction fragment length polymorphism. *Arch Oral Biol* 1998 43:247-252
- Scaal KP. Genus *Actinomyces* in Sneath PHA, Mair NS, Sharpe ME, Holt JG (eds) *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Baltimore: Williams & Wilkins, 1986, pp 1383-1418
- Scardovi V. Genus *Bifidobacterium* in Sneath PHA, Mair NS, Sharpe ME, Holt JG (eds) *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Baltimore: Williams & Wilkins, 1986, pp 1418-1434
- Takazoe I, Frostell G, Ohta K, Topitsoglou V, Sasaki N. Palatinose - a sucrose substitute. *Swed Dent J* 1985 9:81-87
- Thompson J, Rorbish SA, Immel S, Lichtenthaler W, Hall BG, Pikis A. Metabolism of sucrose and its five linkage isomeric  $\alpha$ -D-glucosyl-D-fructoses by *Klebsiella pneumoniae*. *J Biol Chem* 2001a 276:37415-37425
- Thompson J, Rorbish SA, Pikis A, Brust A, Lichtenthaler FW. Phosphorylation and metabolism of sucrose and its five linkage isomeric  $\alpha$ -D-glucosyl-D-fructose by *Klebsiella pneumoniae*. *Carbohydr Res* 2001b 331:149-161
- Topitsoglou V, Sasaki N, Takazoe I, Frostell G. Effect of frequent rinses with isomaltulose (Palatinose®) solution on acid production in human dental plaque. *Caries Res* 1984 18:47-51
- Uematsu H, Hoshino E. Predominant obligate anaerobes in human periodontal pockets. *J Periodontol Res* 1992 27:15-19
- Ziesentz SC, Siebert G, Imfeld T. Cariological assessment of leucrose [*D*-glucopyranosyl  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 5)-*D*-fructopyranose] as a sugar substitute. *Caries Res* 1989 23:351-357

## Xylitol Inhibition of Acid Production and Growth of Mutans Streptococci in the Presence of Various Dietary Sugars under Strictly Anaerobic Conditions

Hatsue Kakuta<sup>a</sup> Yoshimichi Iwami<sup>b</sup> Hideaki Mayanagi<sup>a</sup>  
Nobuhiro Takahashi<sup>b</sup>

Divisions of <sup>a</sup>Pediatric Dentistry and <sup>b</sup>Oral Ecology and Biochemistry Tohoku University  
Graduate School of Dentistry Sendai, Japan

### Key Words

Xylitol Mutans streptococci Xylitol 5 phosphate  
Phosphoenolpyruvate sugar phosphotransferase  
system Acid production Dietary sugars Bacterial  
growth

### Abstract

The aim of this study was to investigate the inhibitory effect of xylitol on the growth of and acid production by mutans streptococci in the presence of various dietary sugars and the relationship between the inhibition and the accumulation of xylitol 5 phosphate (X5P) under strictly anaerobic conditions like those in the deep layers of dental plaque. Xylitol retarded the growth of mutans streptococci in the presence of glucose (G) galactose (Gal) maltose (M) lactose (L) or sucrose (S) as an energy source, though the inhibition of growth on fructose (Fr) was small. Xylitol inhibited acid production by washed cells of *Streptococcus mutans* from G, Gal, M, L or S (12–83% inhibition). *S. mutans* accumulated X5P intracellularly through activity of the phosphoenolpyruvate xylitol phosphotransferase system (PEP xylitol PTS) when they fermented these sugars in the presence of xylitol. However, in the presence of Fr, no inhibition of acid produc-

tion was observed. In addition, the amounts of X5P during the fermentation of Fr were smaller than those of other sugars in spite of the presence of PEP xylitol PTS activity. These results suggest that along with the intracellular accumulation of X5P, xylitol decreases the growth and acid production of mutans streptococci in the presence of various dietary sugars except Fr.

Copyright © 2003 S. Karger AG, Basel

Xylitol is a five carbon sugar alcohol which is produced in low concentration by a variety of fruits and vegetables. Its sweetness is similar to sucrose. Xylitol is not fermented into acids by oral microorganisms including cariogenic bacteria such as *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus*, leaving the final pH neutral in dental plaque and leading to no enamel demineralization [Edwardsson et al., 1977; Grenby et al., 1989; Trahan et al., 1991; Forbord and Osmundsen, 1992; Assev and Rølla, 1993]. Thus, xylitol is widely used as a noncariogenic sugar substitute for confectionery.

In addition, chewing gums containing xylitol have been reported to decrease the formation of dental plaque [Topitsoglou et al., 1983; Soderling et al., 1989, 1997] and the number of mutans streptococci in saliva [Soderling et

al 1989 1997, Wennerholm et al 1994] Further the reduction of the number of mutans streptococci is dependent on xylitol concentration in the chewing gums [Wennerholm et al 1994] These findings indicate that xylitol may have a cariostatic effect

In vitro experiments have shown that xylitol inhibits the growth of *S. mutans* in the presence of glucose [Assev et al, 1980 Gauthier et al 1984 Trahan et al, 1985 Beckers 1988 Rogers and Bert 1992] and that xylitol inhibits acid production from glucose by washed cells of *S. mutans* [Vadeboncoeur et al 1983 Gauthier et al 1984 Trahan et al 1985 Rogers and Bert 1992] Xylitol is converted into xylitol 5 phosphate (X5P) at the expense of phosphoenolpyruvate via the phosphoenolpyruvate xylitol phosphotransferase system (PEP xylitol PTS) in the cells of *S. mutans* [Assev and Rølla 1984 Trahan et al, 1985] It is suggested that the intracellular accumulation of X5P inhibits bacterial glycolytic enzymes and growth [Trahan et al 1985 Assev and Rølla 1986 Trahan 1995]

We eat not only glucose but also various sugars (carbohydrates) in daily life. However, there are few reports on the effects of xylitol on acid production and the growth of *S. mutans* in the presence of various dietary sugars. In addition, it is unknown whether xylitol is transported as X5P in *S. mutans* cells by PEP xylitol PTS in the presence of these sugars. The aim of this study was to investigate the inhibitory effects of xylitol on the growth and acid production of mutans streptococci in the presence of various dietary sugars and the relationship between the inhibition and the accumulation of X5P under strictly anaerobic conditions like those in the deep layers of dental plaque.

## Materials and Methods

### *Microorganisms and Culture Media*

*S. mutans* NCTC10449 and *S. sobrinus* 6715 were used in this study. Basal culture medium (1 liter) contained 17 g of tryptone (Difco Laboratories, Detroit, Mich., USA), 3 g of yeast extract (Difco Laboratories) and 5 g of NaCl [Gauthier et al 1984]. Ten millimolar sugar (glucose, galactose, fructose, maltose, lactose or sucrose) and 14 mM  $K_2HPO_4$  were added through a sterile membrane filter (pore size 0.22  $\mu$ m, Pall Gelman Laboratory, USA) to the autoclaved basal culture medium (TYE culture medium). Brain heart infusion (BHI) medium (Difco Laboratories) was also used as a preculture medium. These culture media were kept in an anaerobic chamber (Anaero box type ANB 180L, Hirasawa Works, Japan, 80%  $N_2$ , 10%  $H_2$  and 10%  $CO_2$ ) for at least 3 days before use to remove oxygen.

### *Inhibitory Effect of Xylitol on Growth*

Bacterial growth was conducted at 35 °C under anaerobic conditions in the anaerobic glove box. *S. mutans* and *S. sobrinus* were inoculated into 5 ml of BHI medium. After incubation for 24 h at 35 °C

the culture (2.5 ml) was transferred to 50 ml of TYE culture medium. After incubation for 24 h, 5 ml of this culture was added to a new TYE culture medium (100 ml) with or without 60 mM xylitol. Bacterial growth was monitored by measuring the optical density (OD) of cultures at 660 nm with a spectrophotometer (UV 160 Shimadzu Ltd, Japan). The pH of cultures was monitored with a pH meter (Toa Electronics Ltd, Japan). Doubling time of growth was estimated from the growth curve at the logarithmic growth phase. All the cultures reached the stationary growth phase within 24 h, except for the culture in the presence of galactose, which took 36 h to reach maximal growth. Furthermore, the growth of *S. sobrinus* in the presence of galactose and xylitol was poor.

### *Inhibitory Effect of Xylitol on Acid Production by Washed Cells of S. mutans*

Bacterial cells were grown in the medium without xylitol as described above, collected by centrifugation (10 000 g for 15 min at 4 °C) at the logarithmic phase of growth, washed twice with a buffer solution [2 mM potassium phosphate buffer (PPB) containing 150 mM KCl and 5 mM  $MgCl_2$ ] and suspended in the buffer solution. A double sealed centrifugation tube (Kubota Corp., Tokyo, Japan) was used for the centrifugation of bacterial cell suspension to protect the cells from air exposure. The bacterial cell suspension (OD = 3.0 at 660 nm) was transferred to a different type of anaerobic chamber (Anaero box type ANB 180L, Hirasawa Works, 90%  $N_2$  and 10%  $H_2$ ) and kept warm for 4 min at 35 °C in the anaerobic chamber. Subsequently, 10 mM sugar substrate or a mixture of sugar and 60 mM xylitol was added. The acid production rate was monitored by automatic titration with 50 mM KOH at pH 7.0 (pH stat AUT 211S, Toa Electronics Ltd). All the solutions used in these experiments were kept for 3 days or more in the anaerobic chamber to remove oxygen.

### *Measurement of Intracellular X5P*

At 4 min after the addition of sugar or sugar xylitol mixture, cells were collected by passing the reaction mixture through a membrane filter (pore size 0.45  $\mu$ m, Pall Gelman Laboratory) and immediately washed with cold buffer solution (2 mM PPB containing 150 mM KCl and 5 mM  $MgCl_2$ ). X5P in the cells was extracted immediately with cold 0.6 N perchloric acid (3.5 ml) as described previously [Iwami et al 2000]. The acid extract was neutralized to pH 6.0 with 5 M  $K_2CO_3$  after addition of 100 mM triethanolamine HCl buffer (pH 7.6). X5P in the neutralized cell extract was measured in air by the method of Miyasawa et al [2003] with a spectrophotometer (type 557, Hitachi Co., Tokyo, Japan) at 340 nm. The assay system for X5P contained 1.1 mM NAD, 5 mM  $MgCl_2$ , 0.1 mM EDTA and the extract in 50 mM Tris HCl buffer (pH 8.5). The amounts of X5P were determined by the sequential addition of 1.4 U/ml sorbitol dehydrogenase (Roche Molecular Biochemicals, Germany) and 43 U/ml alkaline phosphatase (Roche Molecular Biochemicals).

### *Measurement of PEP Sugar PTS and PEP Xylitol PTS*

The activities of PEP sugar PTS and PEP xylitol PTS were measured as described previously [London and Hausman 1982, Iwami et al 2000, Miyasawa et al 2003]. Bacterial cells were harvested as described above, washed with the buffer solution (2 mM PPB containing 150 mM KCl and 5 mM  $MgCl_2$ ) by centrifugation (7 700 g for 10 min) and stored at -20 °C. The frozen cells were thawed at room temperature and suspended to 5.0 of OD (660 nm) with the same

**Table 1** Xylitol inhibition of the growth of *S. mutans* NCTC 10449 and *S. sobrinus* 6715 in TYE culture medium containing various sugars

Sugar contained in TYE culture medium	Xylitol mM	<i>S. mutans</i> NCTC10449			<i>S. sobrinus</i> 6715		
		t <sub>d</sub>	final growth (OD <sub>660</sub> )	final culture pH	t <sub>d</sub>	final growth (OD <sub>660</sub> )	final culture pH
Glucose	0	0.99 ± 0.07	1.34 ± 0.17	5.01 ± 0.02	0.97 ± 0.10	1.47 ± 0.01	5.06 ± 0.06
	60	3.22 ± 0.62**	0.90 ± 0.26*	5.04 ± 0.06	1.54 ± 0.17**	1.31 ± 0.24	5.16 ± 0.06
Galactose	0	2.16 ± 0.05	1.60 ± 0.57	4.79 ± 0.12	6.37 ± 0.38	0.73 ± 0.13	5.05 ± 0.07
	60	5.62 ± 1.38**	0.79 ± 0.01*	4.97 ± 0.04*	n.t.	n.t.	n.t.
Fructose	0	0.99 ± 0.02	1.29 ± 0.08	5.05 ± 0.07	1.00 ± 0.14	1.37 ± 0.06	5.17 ± 0.05
	60	1.25 ± 0.07	1.06 ± 0.03	5.17 ± 0.06*	1.23 ± 0.03*	1.19 ± 0.09*	5.22 ± 0.06
Maltose	0	1.15 ± 0.21	2.27 ± 0.18	4.29 ± 0.02	0.92 ± 0.06	1.18 ± 0.04	4.83 ± 0.05
	60	3.22 ± 0.26**	1.42 ± 0.28**	4.36 ± 0.01**	2.25 ± 0.11**	0.99 ± 0.08*	4.79 ± 0.01
Lactose	0	1.73 ± 0.25	2.16 ± 0.33	4.30 ± 0.00	0.97 ± 0.08	1.60 ± 0.61	4.75 ± 0.35
	60	1.97 ± 0.11**	1.64 ± 0.13*	4.39 ± 0.01**	1.38 ± 0.16**	1.25 ± 0.46	4.78 ± 0.23
Sucrose	0	1.05 ± 0.18	1.95 ± 0.11	4.30 ± 0.01	1.30 ± 0.19	1.44 ± 0.42	4.62 ± 0.25
	60	1.73 ± 0.14**	1.64 ± 0.14	4.43 ± 0.06	1.37 ± 0.14	1.29 ± 0.49	4.67 ± 0.25

Means ± standard deviations from 3 independent experiments. t<sub>d</sub> = Doubling time of logarithmic phase of growth (h). n.t. = not tested because of poor growth. Significant difference between the doubling time in the presence and absence of xylitol. \*p < 0.05, \*\*p < 0.01.

buffer solution. The cells were permeabilized by addition of 0.01 vol of toluene to the cell suspension followed by vigorous agitation for 1 min, centrifuged (7 700 g for 3 min) and resuspended to 50 of OD (660 nm) with the buffer solution. The reaction mixture for measurement of PEP sugar PTS or PEP xylitol PTS activity contained 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1 mM NADH, 1 mM PEP, lactate dehydrogenase (28 U/ml Roche Molecular Biochemicals), the permeabilized cells (0.13 mg dry weight/ml) in 100 mM PPB solution (pH 7.0). The reaction was started by the addition of one of the various sugars (10 mM) or 60 mM xylitol. The activity was estimated by the oxidation of NADH to NAD at 35 °C from the change in absorbance at 340 nm with the spectrophotometer.

#### Statistical Analysis

All numerical data are given as means ± standard deviations. Statistical significance was assessed using a paired t test or Dunnett test analysis. Differences were considered significant at the level p < 0.05.

## Results

### Inhibitory Effect of Xylitol on Bacterial Growth

Xylitol retarded the growth of both *S. mutans* and *S. sobrinus* in the presence of glucose, galactose, fructose, maltose, lactose or sucrose (table 1) except for the growth of *S. sobrinus* in the presence of sucrose. Doubling time of *S. mutans* in the presence of glucose, galactose, maltose, lactose and sucrose increased 1.60–3.25 times, while that of *S. sobrinus* in the presence of glucose, maltose and lactose increased 1.42–2.45 times. Xylitol strongly inhibited the growth of *S. sobrinus* in the presence of galactose and no significant growth was observed during the incubation

for 36 h. Xylitol also retarded the bacterial growth in the presence of fructose, but the increase in doubling time was small (1.23–1.26 times). The addition of xylitol decreased final growth and increased final pH in *S. mutans* significantly except for the final pH of growth with glucose. In case of *S. sobrinus*, xylitol decreased final growth in the presence of fructose and maltose significantly, but did not influence final pH.

### Inhibitory Effect of Xylitol on Acid Production by Washed Cells of *S. mutans*

Xylitol inhibited the acid production from glucose, galactose, maltose, lactose and sucrose (table 2). The relative inhibition by xylitol of acid production from the sugar substrates ranged from 12 to 83%. The inhibition of acid production was significant (p < 0.05), except for the inhibition of acid production from sucrose by the glucose-grown cells, maltose by the maltose-grown cells and lactose by the lactose-grown cells. In addition, acid production from these sugars by fructose-grown cells was inhibited more effectively by xylitol.

On the other hand, xylitol did not inhibit the acid production from fructose. The inhibitory effects of xylitol on the acid production from galactose and lactose by the glucose, fructose, maltose or sucrose-grown cells were unclear since galactose and lactose were little fermented by these cells.

**Table 2** Acid production rate from various sugars (10 mM) in the presence of xylitol (60 mM) by *S. mutans* NCTC 10449 under strictly anaerobic conditions

Substrate for fermentation	Sugar contained in TYE culture medium					
	glucose	galactose	fructose	maltose	lactose	sucrose
Glucose	334 ± 111	214 ± 71	199 ± 66	160 ± 83	272 ± 64	330 ± 28
Glucose + xylitol	237 ± 70 (28) <sup>b</sup> *	159 ± 61 (26)*	89.0 ± 27 (55)*	131 ± 79 (19)*	195 ± 30 (27)*	122 ± 21 (47)*
Galactose	-	136 ± 53	-	-	119 ± 26	-
Galactose + xylitol	-	74.1 ± 30 (46)*	-	-	85.6 ± 18 (28)*	-
Fructose	278 ± 51	162 ± 66	196 ± 60	119 ± 52	117 ± 32	208 ± 27
Fructose + xylitol	277 ± 55 (1)	167 ± 67 (0)	201 ± 62 (-3)	122 ± 57 (-2)	120 ± 37 (-2)	216 ± 33 (-3)
Maltose	238 ± 68	139 ± 56	67.7 ± 19	215 ± 101	153 ± 25	101 ± 18
Maltose + xylitol	125 ± 39 (48)*	65.3 ± 25 (52)*	11.3 ± 4 (83)*	177 ± 93 (17)	92.8 ± 17 (39)*	34.2 ± 14 (67)*
Lactose	-	219 ± 75	-	-	267 ± 38	-
Lactose + xylitol	-	194 ± 70 (12)*	-	-	230 ± 30 (13)*	-
Sucrose	309 ± 67	204 ± 77	102 ± 24	171 ± 78	166 ± 27	248 ± 48
Sucrose + xylitol	237 ± 11 (21)	167 ± 68 (19)*	37.9 ± 10 (63)	145 ± 70 (16)	131 ± 19 (21)*	228 ± 41 (7)

- = Trace amount of acid production. Significant difference between acid production rates in the presence and absence of xylitol \* p < 0.05  
Means ± standard deviations (nmol/min/mg of dry weight of cells) from 3 independent experiments  
<sup>b</sup> Relative inhibition by xylitol (%)

**Table 3** Intracellular X5P (nmol/mg of cells) at 4 min after addition of sugar plus xylitol to the cells of *S. mutans* NCTC 10449

Sugar contained in TYE culture medium	Fermentation substrate					
	glucose	galactose	fructose	maltose	lactose	sucrose
Glucose	3.42 ± 1.02	nt	1.30 ± 1.02*	3.00 ± 1.06	nt	2.91 ± 2.53
Galactose	4.81 ± 1.94	4.71 ± 2.27	1.28 ± 0.78	3.33 ± 2.89	3.22 ± 2.13	3.81 ± 0.37
Fructose	4.45 ± 1.31	nt	0.66 ± 0.58*	3.04 ± 1.70	nt	4.12 ± 1.47

Data were obtained from 3 independent experiments. nt = Not tested because of trace amount of acid production. Significantly lower than in the presence of glucose as fermentation substrate \* p < 0.05

### Intracellular Accumulation of X5P

X5P was accumulated in the cells of *S. mutans* when the cells were fermenting sugars in the presence of xylitol (table 3). The amounts of X5P were 0.66–4.81 nmol/mg dry weight of cells. The amounts of X5P in the presence of fructose (0.66–1.30 nmol/mg dry weight of cells) were smaller than those in the presence of glucose (3.42–4.81 nmol/mg dry weight of cells).

### Activities of PEP Sugar PTS and PEP Xylitol PTS of *S. mutans*

*S. mutans* had PEP sugar PTS activity for glucose, galactose, fructose, maltose, lactose, sucrose and PEP xylitol PTS activity (table 4). However, PEP lactose PTS was not detected in glucose grown and fructose grown cells.

### Discussion

The inhibitory effect of xylitol on the growth of and acid production by mutans streptococci in the presence of glucose has been studied by several investigators [Assev et al 1980, Vadeboncoeur et al 1983, Gauthier et al 1984, Trahan et al 1985, Beckers 1988, Rogers and Bert 1992], and the following mechanisms have been proposed. Xylitol is transported and phosphorylated as X5P by a PEP-xylitol PTS into *S. mutans* cells in the presence of glucose [Assev and Rølla 1984, Trahan et al 1985]. X5P inhibits the activity of glycolytic enzymes [Assev and Rølla, 1986, Trahan, 1995], resulting in the inhibition of acid production and the growth of *S. mutans*. In addition, the accumulated X5P is dephosphorylated to xylitol by an intracellular phosphorylase and then xylitol is expelled.

**Table 4** PEP sugar PTS activity ( $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ ) of *S. mutans* NCTC 10449 cells grown on glucose, galactose or fructose

Sugar contained in TYE culture medium	Enzyme substrate						
	glucose	galactose	fructose	maltose	lactose	sucrose	xylitol
Glucose	4.98 $\pm$ 2.59	n.t.	3.10 $\pm$ 1.16	3.49 $\pm$ 1.59	n.t.	2.99 $\pm$ 1.59	1.79 $\pm$ 1.17
Galactose	4.44 $\pm$ 1.74	3.61 $\pm$ 0.87	4.21 $\pm$ 1.95	4.99 $\pm$ 2.71	5.97 $\pm$ 3.42	5.01 $\pm$ 2.80	2.97 $\pm$ 1.47
Fructose	5.02 $\pm$ 2.31	n.t.	6.13 $\pm$ 1.48	3.00 $\pm$ 1.50	n.t.	3.37 $\pm$ 1.31	4.14 $\pm$ 1.10*

Data were obtained from 3 independent experiments. n.t. = Not tested because of trace amount of acid production. The activity of PEP xylitol PTS of fructose grown cells was significantly larger than that of glucose grown cells. \*  $p = 0.032$ .

outside the cells [Assev et al. 1980, Assev and Rølla 1984, 1986, Rogers et al. 1991, Trahan 1995]. This phosphorylation-dephosphorylation cycle of xylitol is called a futile cycle where PEP is wasted. Since PEP is a phosphoryl donor for ATP synthesis and an energy source for PEP sugar PTS, the existence of the futile cycle can also decrease bacterial growth and acid production.

In the present study, xylitol retarded the growth of and inhibited acid production by mutans streptococci in the presence of various dietary sugars (tables 1, 2). Furthermore, the cells of *S. mutans* grown with the various sugars had PEP xylitol PTS activity (table 4) and converted xylitol into X5P in the presence of these sugars (table 3). These results suggest that through the reaction of X5P formation by PEP xylitol PTS, xylitol decreases acid production and the growth of *S. mutans* in the presence of various dietary sugars as well as glucose.

In the presence of fructose, however, xylitol retarded bacterial growth only slightly (table 1) and did not inhibit acid production (table 2). In addition, the amounts of intracellular X5P in the presence of fructose (0.66–1.30 nmol/mg dry weight of cells) were smaller than those in the presence of the other sugars (2.91–4.81 nmol/mg dry weight of cells) (table 3). In the glucose grown cells of *S. mutans*, xylitol is transported via a constitutive PEP fructose PTS [Trahan et al. 1985] while the affinity of fructose for the PEP fructose PTS is higher than that of xylitol [Trahan et al. 1985, 1991, Trahan 1995]. Thus, when fructose and xylitol coexist, the PEP fructose PTS functions preferentially on fructose and the reaction of X5P formation does not occur efficiently [Trahan et al. 1985]. Our results suggest that the cells of *S. mutans* grown in the presence of various sugars also have the constitutive PEP fructose PTS which functions as a PEP xylitol PTS to produce X5P.

In this study, xylitol influenced not only the doubling time of growth but also final growth and final culture pH (table 1). These phenomena suggest that xylitol caused energy wasting through the futile cycle and that xylitol increased acid sensitivity of mutans streptococci, especially of *S. mutans*. However, since there was no information on sugar utilization during growth in this study, further study is needed to clarify these aspects.

The inhibitory effect of xylitol on acid production by the fructose grown cells was larger than that by the other sugar grown cells (table 2). Though the amounts of intracellular X5P in the fructose grown cells were similar to those in the other sugar-grown cells (table 3), the activities of PEP xylitol PTS in the fructose-grown cells were higher than those in the other sugar grown cells (table 4). These findings suggest that at an initial stage of glycolysis just after the addition of sugar and xylitol, intracellular PEP is consumed more rapidly through the phosphorylation of xylitol by the higher activity of the PEP xylitol PTS in the fructose grown cells, resulting in the decrease of phosphorylation of fermentable sugars by PEP sugar PTS due to the lack of PEP. It is also possible that the glycolytic enzymes of the fructose grown cells are more sensitive to X5P inhibition than those of the other sugar grown cells.

In conclusion, xylitol inhibited the growth and the acid production of mutans streptococci in the presence of various dietary sugars as well as glucose under strictly anaerobic conditions.

#### Acknowledgments

This work was supported by Grants in Aid for Science Research (B) No. 13470446 and No. 14370687 from the Ministry of Education, Science, Sports and Culture, Japan.

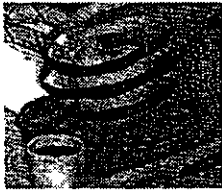
## References

- Assev S Rølla G Evidence for presence of a xylitol phosphotransferase system in *Streptococcus mutans* OMZ 176 Acta Pathol Microbiol Immunol Scand [B] 1984 92 89–92
- Assev S Rølla G Further studies on the growth inhibition of *Streptococcus mutans* OMZ 176 by xylitol Acta Pathol Microbiol Immunol Scand [B] 1986 94 97–102
- Assev S Rølla G Effects of xylitol/sorbitol combinations on bacterial growth and metabolism in *Streptococcus sobrinus* OMZ 176 APMIS 1993 101 933–938
- Assev S Vegarud G Rølla G Growth inhibition of *Streptococcus mutans* strain OMZ 176 by xylitol Acta Pathol Microbiol Scand [B] 1980 88 61–63
- Beckers HJ Influence of xylitol on growth establishment and cariogenicity of *Streptococcus mutans* in dental plaque of rats Caries Res 1988 22 166–173
- Edwardsson S Birkhed D Mejare B Acid production from Lycasin maltitol sorbitol and xylitol by oral streptococci and lactobacilli Acta Odontol Scand 1977 35 257–263
- Forbord B Osmundsen H On the mechanism of xylitol dependent inhibition of glycolysis in *Streptococcus sobrinus* OMZ 176 Int J Biochem 1992 24 509–514
- Gauthier L Vadeboncoeur C Mayrand D Loss of sensitivity to xylitol by *Streptococcus mutans* LG 1 Caries Res 1984 18 289–295
- Grenby TH Phillips A Mistry M Studies of the dental properties of lactitol compared with five other bulk sweeteners in vitro Caries Res 1989 23 315–319
- Iwami Y Takahashi Abbe S Takahashi N Abbe K Yamada T Rate limiting steps of glucose and sorbitol metabolism in *Streptococcus mutans* cells exposed to air Oral Microbiol Immunol 2000 15 325–328
- London J Hausman S Xylitol mediated transient inhibition of ribitol utilization by *Lactobacillus casei* J Bacteriol 1982 150 657–661
- Miyasawa H Iwami Y Mayanagi H Takahashi N Xylitol inhibition of anaerobic acid production by *Streptococcus mutans* at various pH levels Oral Microbiol Immunol 2003 18 215–219
- Rogers AH Bert AG Effects of xylitol and fluoride on the response to glucose pulses of *Streptococcus mutans* T8 growing in continuous culture Oral Microbiol Immunol 1992 7 124–126
- Rogers AH Pilowsky KA Zilm PS Gully NJ Effects of pulsing with xylitol on mixed continuous cultures of oral streptococci Aust Dent J 1991 36 231–235
- Soderling E Makinen KK Chen CY Pape HR J Loesche W Makinen PL Effect of sorbitol xylitol and xylitol/sorbitol chewing gums on dental plaque Caries Res 1989 23 378–384
- Soderling E Trahan L Tammiala Salonen T Hakkinen L Effects of xylitol xylitol sorbitol and placebo chewing gums on the plaque of habitual xylitol consumers Eur J Oral Sci 1997 105 170–177
- Topitsoglou V Birkhed D Larsson LA Frostell G Effect of chewing gums containing xylitol sorbitol or a mixture of xylitol and sorbitol on plaque formation pH changes and acid production in human dental plaque Caries Res 1983 17 369–378
- Trahan L Xylitol A review of its action on mutans streptococci and dental plaque Its clinical significance Int Dent J 1995 45 77–92
- Trahan L Bareil M Gauthier L Vadeboncoeur C Transport and phosphorylation of xylitol by a fructose phosphotransferase system in *Streptococcus mutans* Caries Res 1985 19 53–63
- Trahan L Neron S Bareil M Intracellular xylitol phosphate hydrolysis and efflux of xylitol in *Streptococcus sobrinus* Oral Microbiol Immunol 1991 6 41–50
- Vadeboncoeur C Trahan L Mouton C Mayrand D Effect of xylitol on the growth and glycolysis of acidogenic oral bacteria J Dent Res 1983 62 882–884
- Wennerholm K Arends J Birkhed D Ruben J Emilson CG Dijkman AG Effect of xylitol and sorbitol in chewing gums on mutans streptococci plaque pH and mineral loss of enamel Caries Res 1994 28 48–54

## 特集

### 健康・機能性新素材 II

# リン酸化オリゴ糖カルシウム配合ガム 「ポスカム」の再石灰化促進機能



稲葉大輔／釜阪 寛

はじめに

医学と医療が発達する一方で 生活習慣病や難病が増加するという矛盾のなか 「病気の」治療や「病気の」予防だけでは 健康を維持できないことが認識されつつある。この背景から 国レベルの動きとして 健康日本21の策定や健康増進法の制定などが相次ぎ いまや 健康は国民の義務と定められるに至った。しかし 健康とは何かか明示されていないため 「また健康ではない」「もっと健康にならなければ なるはず」というストレス（健康不安）が国民に広まっている。保健を意図した機能性食品を扱う場合も 関連業界が健康をどう定義するのかが きわめて重要な課題である。ここでひとつの定義を下すならば 語源のHealthかHeal（治る）の名詞であることが示すように 健康とは端的に「生命体が自発的に治癒する性質ないしプロセス」と定義できよう。「病気の」予防だけでは健康になれない理由が実はそこにある

自発治癒といえば つい最近まで う蝕（むし歯）は一度生まれは回復はない不可逆的な疾患であり 自然治癒はないものとされてきた。ゆえに

いなば だいすけ  
岩手医科大学歯学部予防歯科学講座 助教授  
かまさか ひろし  
江崎グリコ(株) 生物化学研究所



【ポスカム (POsCAM) 〈クリアトライ〉】

多くの歯は 少しでもう蝕の初期徴候があれば 即座に周囲の健康組織を含めて削られ 充填されてきた歴史がある。しかし 1970年代からう蝕の回復メカニズムやその効果的な促進方法が熱心に研究され始めた。その結果 現在では う蝕は穴が形成される以前の「初期う蝕」の段階であれば 唾液の作用により再石灰化して回復でき その反応はフッ化物イオンが唾液中に共存するにより高度に促進されること また 再石灰化したエナメル質や象牙質は もとの健全段階よりもさらに耐酸性になること などが明らかにされた<sup>1)</sup>。この再石灰化こそ 自発治癒という意味での健康のメカニズムにほかならない。

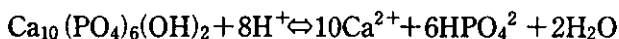
#### う蝕の治癒機構「再石灰化」とは

歯質のミネラル成分は 主としてハイトロキノンアパタイト $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ からなる。この結晶が酸によって溶解するプロセスが脱灰で 最初に齶窩をともしなわれない病巣（以下 初期う蝕とする）が形成される。この初期う蝕は臨床的には脱灰性白斑として観察される。下記の化学式では 右方向矢印の反応が進む。酸 すなわち 水素イオン



はプラーク中細菌による糖の代謝で産生される。やがて糖の供給が終わって細菌の代謝が低下し、また水素イオンが口腔内の緩衝作用や希釈・洗浄作用で減少すると、歯の周囲のpHが中性に復帰する。この段階になると脱灰が止まる。このとき歯質成分であるカルシウムイオン $\text{Ca}^{2+}$ やリン酸イオン（主に $\text{HPO}_4^{2-}$ ）が歯の周囲で過飽和になると、逆方向の反応に転じ、再びハイドロキシアパタイト等の結晶が初期う蝕病巣に形成され、自発的治癒（自然修復）が始まる。この脱灰で喪失したミネラルが回復する過程が再石灰化である。具体的には、口腔内で初期病巣に $\text{Ca}^{2+}$ や $\text{HPO}_4^{2-}$ が過飽和な体液である唾液が接触すると再石灰化が発現する。

このような脱灰・再石灰化のサイクルは日常的に口の中で繰り返されている（図1）<sup>4, 5)</sup>。化学的にみると、歯質を構成するリン酸カルシウム結晶であるハイドロキシアパタイト結晶の溶解（脱灰）と再形成（再石灰化）であらわされる可逆的反応である。



ただし、このサイクルの時間バランスや唾液の分泌量・成分・緩衝能などが個人で異なるため、う蝕の感受性に差が生じることになる。したがって、臨床的には、これらの口腔環境を評価し、再石灰化に向けて最適化することが、健康支援の基本課題となる。再石灰化の基本条件は、歯質周囲に歯質共通イオンであるカルシウムおよびリン酸イオンが過飽和に存在し、かつpHが中性付近に維持されることである。すなわち、口腔内での再石灰化の基本は、あくまでも唾液の存在であることをここで強調しておきたい。

ところで、う蝕には「う窩（穴）のあるう蝕」とう窩の無い「初期う蝕」の2種類に区分される（図1）。前者は歯の表面に穴のあいた、一般に言う「むし歯」で、治療の対象となる。後者はう窩を形成する前の再石灰化で健全な歯に戻る可能性のある病巣を指し、臨床では脱灰性白斑として観察される。つまり、削って詰める必要のないう蝕であり、適切な予防管理をすることで、健全な歯

脱灰 再石灰化サイクル

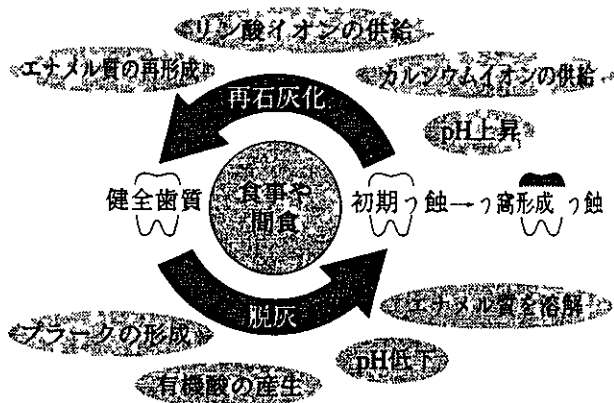


図1 脱灰 再石灰化の循環

に戻すことができる<sup>6)</sup>。食品の摂取がう蝕の原因ならば、摂取方法や摂取する食品種を工夫することで、う蝕を減少させることも可能なはずである。特にスクロースは口腔内細菌の酸産生およびグルカン合成の基質となることから、スクロースの摂取をコントロールすることが大変重要である。

近年、食品の第三次機能（食品の生体調節作用）に着目した機能性食品が多数開発され、糖アルコールなどの代用甘味料を用いた「むし歯の原因となる酸をつくらない食品」（「歯に信頼」の傘マーク・日本トウモロコシフレントリー協会）や厚生労働省の「特定保健用食品」などによって、新しいう蝕予防のあり方が提案されてきている。これらは基本的にリスク因子のコントロールが主体であるが、私たちは1歩踏み込んで、健康因子、つまり「初期う蝕」の自発的治癒機構である再石灰化を促す新しいカム食品として「ポスカム」の研究開発を行ってきた。研究のコンセプトは「唾液環境の再石灰化にむけた最適化」であった。

### 馬鈴薯澱粉から調製した機能性新素材「POs Ca」

澱粉はその組成にリン酸エステル結合を含んでいることが知られており、中でも馬鈴薯のその含量は高いことが知られている<sup>7, 8)</sup>。およそ100～1000ppmのリン酸エステル基を含むことが知られている。私たちは、この馬鈴薯澱粉中のリン酸エステル基に注目し、澱粉の加水分解物から全く新しいオリゴ糖、すなわちリン酸化オリゴ糖をカ

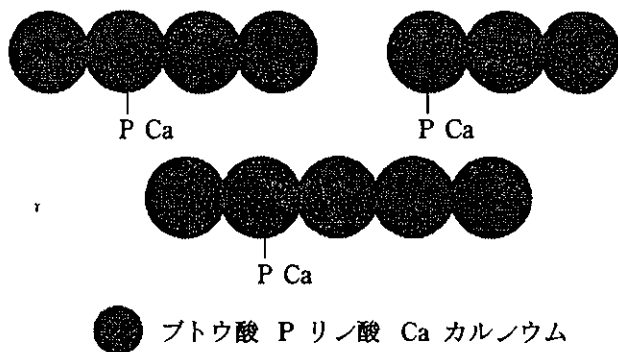


図2 リン酸化オリゴ糖の構造

ルノウム塩 (POs Ca) として調製することに成功した (図2)<sup>9~11)</sup>。現在 POs Caは北海道産の馬鈴薯より生産しており 食品扱いの素材である。高い水溶性を有するカルノウムの供給源としても優れていることが解っている<sup>12)</sup>。このリン酸化オリゴ糖はう蝕原性細菌であるミュータンスレンサ球菌の栄養源にならず ノヨ糖の発酵によるプラーク内のpH低下を緩衝作用によって抑制した<sup>13)</sup>。また POs Caはノヨ糖およびミュータンスレンサ球菌の存在下でも人工プラーク (非水溶性グルカン) 量およびエナメル質の脱灰を抑制させる効果があった<sup>14)</sup>。次に 歯エナメル質の再石灰化効果をin vitroで調べた結果 低濃度でも高い効果が観察された<sup>15)</sup>。一方 キノリトールにも再石灰化促進効果があると言われているが 私たちの実験結果では顕著な効果を検出できなかった。そこで POs Caを関与成分として 再石灰化を促進するノッカーレスカムの開発を行うことにした。

再石灰化度の評価はエナメル歯片のマイクロラノグラフィ (顕微X線写真) を撮影し 脱灰深度  $ld (\mu m)$  とミオラル喪失量  $\Delta Z (vol\% \mu m)$  を計測する著者らの方法<sup>16~18)</sup> で行った。本方法は  $1.28 \mu m$  単位で計測を行える精度の高い国際標準の評価方法である。

### 口内環境を再石灰化し易くする「ポスカム」

唾液は口腔の健康維持にとって重要な役割を果たしている<sup>19 20)</sup>。食物の咀嚼 消化や嚥下作用を助ける作用はもちろんであるが 口腔内の洗浄作用 細菌に対して抑制的に働く作用 pH緩衝作用 および再石灰化促進作用などの多彩な機能

である。1日の総分泌量は成人で約1~15リットルにもなる。歯のエナメル質表面には 唾液成分由来のヘリクルという0.3~1 $\mu m$ の厚さの被膜が形成される。歯面付近の小柱間や結晶間の隙間にも浸透して形成される。細菌の吸着も物理的 化学的な力によりこのヘリクルに第一に吸着することから始まる<sup>21)</sup>。そして 歯の再石灰化に対しても唾液は重要な役割を果たしている。

研究開発に際して 一般的なキノリトール配合ガム (自社製) を作製して 被験者の方に20分間2粒のガムを咀嚼してもらって 全ての唾液を採取した。その唾液について 再石灰化に直接的に影響を及ぼすと考えられる唾液量 唾液pH値 唾液中の可溶性のカルノウム (Ca) 含量およびリン酸 (P) 含量をそれぞれ測定した<sup>22)</sup>。その結果 カム咀嚼時のような刺激唾液は咀嚼後5分以内に微アルカリ性に近いpH値を示すこともわかった。また 唾液中にPは豊富に含まれているのに対して Caはあまり含まれていないことが解った Ca/P値にして 約0.3以下程度の値であった。

一方 歯のエナメル質はリン酸とカルノウムが95%以上から構成されており ハイトロキノアパタイトという基本構造を有している。ハイトロキノアパタイトはCa/P値が1.67という高い値である。そこで 唾液の再石灰化能力を上昇させるには pH緩衝作用に加えて このCa/P比を高値にすることが重要であると考えられた。したがって ポスカムを口腔内で咀嚼した際に唾液中のCa/P比を1.67値に近づくようにPOs Caをガムに配合した。代用甘味料としてはキノリトールを主体に55%以上配合した。こうして作製したポスカムを咀嚼した際の唾液を採取した。その結果 POs Ca配合キノリトールカムは 非配合キノリトールカムに比べて有意に高いCa/P比を咀嚼唾液中で示した (図3)<sup>22)</sup>。

### エナメル質の再石灰化促進効果

このように設計したポスカムを用いて飲食後の酸性に傾いたヒト歯垢下pH値の回復モデル試験をヒト歯垢下電極内蔵法<sup>23)</sup> により行った。10%

の砂糖溶液による2分間の洗口によって急激に低下したプラーク内pHはガムの咀嚼によって中性まで迅速に回復することが確認できた<sup>24)</sup>。ヒトのプラーク内では飲食後の度に酸が生じ pHが低下する。特にpHが低下した状態で就寝すると唾液の分泌が著しく低下するので朝までpHが低下したままになり 歯の脱灰が急激に進むことになる。このように再石灰化の条件として 飲食後のpHを中性に回復させることが大変重要である。

次に 初期う蝕への再石灰化効果の検証を行った。一般的に 歯の再石灰化効果確認のためには被験者に口腔内装置を装着させる口腔内試験 あるいは それに準する方法が一般的に用いられる<sup>25)</sup> 1週 2週 および4週間にわたって 12名の被験者に毎食後と就寝前の1日4回 カム2粒を20分間咀嚼してもらう試験を行った。カムにはPOs Ca配合キノリトールカム POs Ca非配合キノリトールカム および砂糖カムを用いて 二重盲検で被験者に摂取してもらった。

このヒトでの試験の結果 1週目からPOs Ca配合キノリトールカムは他群に比べて有意に ( $p < 0.0001$ ) 高い再石灰化効果が観察された (図4)<sup>26)</sup>。ただし このヒト口腔内試験法は 相当の負担を被験者に強いることとなる。その上 食生活の個人差から 実験精度を高める種々の工夫が必要になってくるが 脱灰試験の日数 カムを

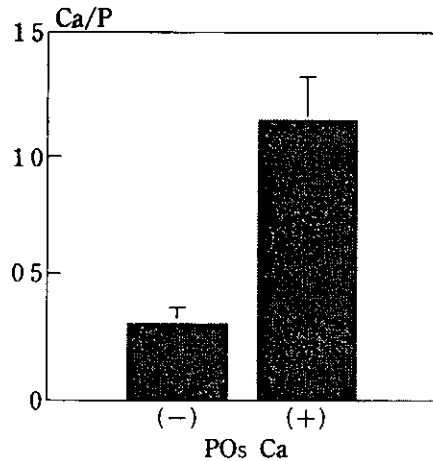


図3 POs Caによる唾液Ca/P比の改善効果

咀嚼時間 および装置デザインなども含めて 国際的にも標準プロトコールが無いのか実情である。そこで 私たちはガム咀嚼時のヒト唾液を用いた再石灰化効果確認試験としてヒト唾液浸漬法<sup>22)</sup>を開発し in vitro系ではあるか ヒト口腔内試験に代替できる可能性のある簡便法として提案してきた。つまり 歯の再石灰化は唾液を介して生じるために ヒトのカム咀嚼時の唾液を全量集め その新鮮なヒト唾液に人工初期う蝕歯を浸漬して再石灰化度を評価した。この試験の結果 POs Ca配合キノリトールカムは POs Ca非配合キノリトールカムに比べて ヒト口腔内試験<sup>26)</sup>と同様に高い再石灰化促進効果が観察された<sup>22)</sup>。

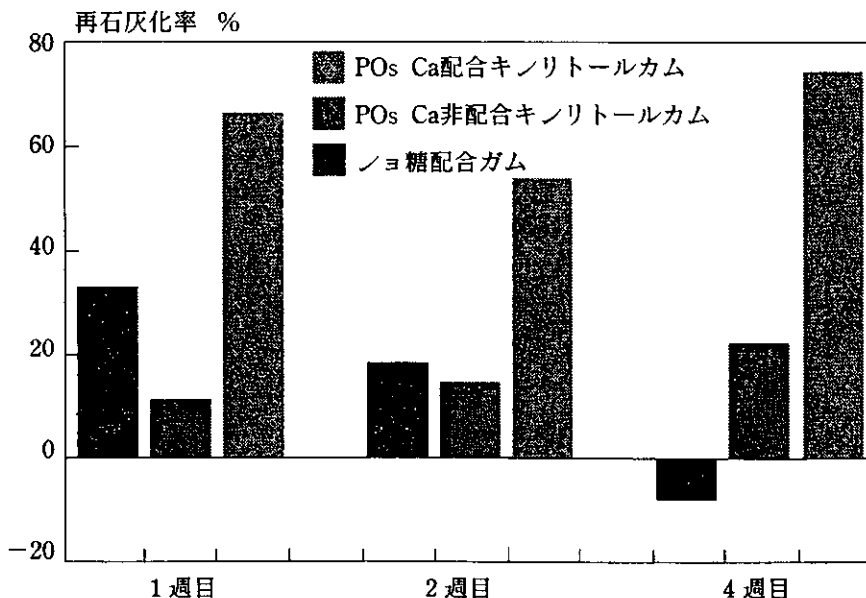


図4 POs Ca配合カムの再石灰化促進効果 (口腔内実験結果)

表 ギスカムの特定保健用食品としての許可内容

商品名	食品の種類	関与する成分	許可を受けた表示内容	摂取量	摂取をする上での注意事項
ギスカム [クリアトライ]	カム	リン酸化オリゴ糖 カルノウム (POs-Ca)	本品は リン酸化オリゴ糖カルノウム (POs Ca) を配合しているのて 口内を歯が再石灰化しやすい環境に整え 歯を丈夫で健康にします	1 回に 2 粒を 20 分噛み 1 H 4 回を目安に 1 週間続けると効果的です	一度に多量に食べると 体質によりお腹がゆるくなる場合があります。

### まとめ

ギスカムの再石灰化促進メカニズムは 以下の 2 点に集約される<sup>20 26 27)</sup>。

- 1 カム咀嚼によって唾液分泌を促し 食後の酸性に傾いたpH環境を微アルカリまで迅速に上昇 回復させる
- 2 唾液中の溶性Ca含量を増加させ Ca/P比を上昇させる

つまり 基本はヒト唾液本来のう蝕治療機構である再石灰化能力を最適化し賦活することにある。一般的なキノリトール配合カムを噛んで唾液の分泌を促すことは 唾液の能力を生かす第一の方法である。しかし POs Ca配合キノリトールガム「ギスカム」の場合は 積極的に唾液を再石灰化しやすい環境に整え 初期う蝕の再石灰化を促進し 齲蝕予防に有効に機能する特徴をもつ もちろん 食生活などの条件によっては これらの機能か十分に発揮されない場合もあり 本食品のみを摂取していれば安心というわけには決してない。基本的には う蝕リスクや唾液のパワーを十分に知り ブラッシングやフッ化物応用などと組み合わせた効果的なセルフケアと 歯科でのプロフェッショナルケアをトータルに最適化することが重要である。

以上の試験データを中心に ギスカムは表に示したような内容の特定保健用食品の許可を厚生労働省より得ている。最近の研究から 高齢者で多い根面う蝕への再石灰化効果を検討する観点から ギスカムの象牙質う蝕への高い再石灰化効果

も実証した<sup>29)</sup>。表のように 摂取目安量としては「1 回に 2 粒を 20 分間」を推奨している 長く咀嚼することは 一見面倒に思えるかもしれないが 再石灰化効果をはしめ 口腔機能の保全一般にとって極めて重要と考えられるからである。健康な成人の方において 個人差は大きいながら 20 分間の咀嚼で平均唾液分泌量は約 30ml にもなることもわかった<sup>22)</sup>。しかし 小児において 20 分間の咀嚼は長すぎるという臨床サイトからの意見もあり 7 歳～15 歳の小児で 1 粒 10 分間の試験を行った。特に小児の場合は口腔内試験を行うことは困難であり 再石灰化を評価する上で最も重要な実際の唾液を使用するヒト唾液浸漬法で行った その結果 小児の唾液量は大人に比べて少なく 1 粒でも比較的高い Ca/P 比を示し POs Ca 配合キノリトールカムは POs Ca 非配合キノリトールガムに比べて有意に高い再石灰化効果を確認できた (表)<sup>30)</sup>。

### おわりに

馬鈴薯より調製した POs Ca を配合成分とするカム製品「ギスカム」はヒト唾液の能力を評価することから商品設計した新しいカム製品である。現在 ギスカムの歯科専用品は 粒タイプの「クリアトライ」「オレンノ&ハナナ」および「フレノニューライム」の 3 品についてホトルとパウチの 2 タイプで全国発売している また 本年 5 月より一般品としては 「オレンノ&バナナ」以外の粒タイプに 板タイプの「ピュアミント」を加えて一部地域で発売を開始し好評を得ている。今後順次全国展開される予定である

参考文献

- 1) 花田信弘 (2002) もう虫歯にならない 新潮社
- 2) Newbrun E (1973) Chapter 2 Current concepts of caries etiology pp 15-43 In *Cariology* The Williams and Wilkins Co Baltimore
- 3) 今井 奨 (2001) *ジャパンフートサイエンス* 40 (12) 45-51
- 4) 飯島洋一 熊谷 崇 (1999) *カリエスコントロール* 医歯薬出版株式会社
- 5) Norman, O H Arden G C "PRIMARY PREVENTIVE DENTISTRY 4th Edition APPLETON&LANG
- 6) 熊谷 崇 熊谷ふし子 藤木省三 岡 賢二 (1999) *クリニカルカリオロジー* 医歯薬出版株式会社
- 7) Takeda C Takeda Y and Hizukuri S (1993) *Carbohydr Res* 246 273-281
- 8) Hizukuri S (1996) In *Carbohydrates in Food* (A C Eliasson ed) pp375-379 New York Marcel Dekker Inc
- 9) Kamasaka H Uchida M Kusaka K Yamamoto K Yoshikawa K Okada S and Ichikawa T (1995) *Biosci Biotech Biochem* 59 1412-1416
- 10) Kamasaka H To o K Kusaka K Kuriki T Kometani T Hayashi H and Okada S (1997) *Biosci Biotech Biochem* 61 238-244
- 11) Kamasaka H To o K Uchida M Kusaka K Kuriki T Kometani T Hayashi H Okada S and Ichikawa T (1997) *J Appl Glycosci* 44 253-261
- 12) To o K Kamasaka H Nishimura T Kuriki T Saeki S and Nakabou Y (2003) *Biosci Biotech Biochem* 67 1713-1718
- 13) Kamasaka H Imai S Nishimura T Kuriki T and Nishizawa T (2002) *J Dent Hlth* 52 66-71
- 14) Imai S Kamasaka H Negishi Y Inaba D Hinoide M Nisizawa T and Hanada N (2001) *J Dent Hlth* 51 372-373
- 15) Inaba D Minami K Kamasaka H and Yonemitsu M (2002) *Dent Soc Iwate Med Univ* 27 197-202
- 16) Inaba D Takagi O and Arends J (1997) *Eur J Oral Sci* 105 74-84
- 17) Inaba D Tanaka R Takagi O Yonemitsu M and Arends J (1997) *J Dent Health* 47 67-74
- 18) 高江洲義矩監修 中垣晴男 眞木吉信編集 (2002) *ガイドブック フノ化物臨床応用のサイエンス* 永末書店 79-81
- 19) Dowd F J (1999) *Dent Clin North Am* 43 579-597
- 20) 稲葉大輔 南健太郎 米満正美 (2003) *The Dental Monthly Report* 207 Morita Co
- 21) Kolenbrander P E and London J (1993) *J Bacteriol* 175 3247-3252
- 22) Kamasaka H Inaba D Minami K Nishimura T Kuriki T Imai S and Yonemitsu M (2002) *J Dent Hlth* 52 105-111
- 23) Takahashi Abbe S Abbe K Takahashi N Tamazawa Y and Yamada T (2001) *Oral Microbiol Immunol* 16 94-99
- 24) 阿部昌子 王澤佳純 阿部一彦 高橋信博 (2001) 東北大学大学院歯学研究科 (\*東北福祉大学) 研究報告書
- 25) 今井 奨 試験管内および口腔内脱灰モデル 歯界展望 90 642-648 1997
- 26) Inaba D Kamasaka H Minami K Nishimura T Kuriki T Imai S and Yonemitsu M (2002) *J Dent Hlth* 52 112-118
- 27) Kamasaka H Inaba D Minami K Nishimura T Kuriki T and Yonemitsu M (2003) *Trends Glycosci Glycosci* 15 75-89
- 28) Inaba D Minami K Kamasaka H S and Yonemitsu M (2002) *Dent Soc Iwate Med Univ* 27 203-209
- 29) Kamasaka H Inaba, D Minami K Kuroki Y To-o K Nishimura T Kuriki T Imai S and Yonemitsu M (2003) *J Dent Res* 82 B-139

# 根面う蝕の再石灰化促進療法

稲葉大輔

岩手医科大学歯学部予防歯科学講座

連絡先 〒020 8505 岩手県盛岡市中央通1 3 27

Enhancement Therapy for Remineralization in Root Caries Lesione

Daisuke Inaba

Department of Preventive Dentistry Iwate Medical University School of Dentistry

address 1 3 27 Cy o dori Mo oka s Iwate 020 8505

キーワード 根面う蝕 再石灰化促進療法 ミニマム インターベンション

## ミニマム・インターベンションの本質

### I 「病気の」予防から「その人の」健康支援へ

現代医療は 対症的治療や過度に侵襲的な療法への反省と病因論の解明に基づいて 治療主体から発病予防主体(発病前管理)へと移行してきた。そしていま医療は 疾患の予防から個々人の健康支援(保健 健康増進)へとフトしつつある。両者の違いは発病予防から主に病因論に基づいてリスクを管理するのに対して 健康支援ではそれに加え 自身の抵抗性と自発的治療(自己修復)の促進を重視する点にある。

これは病気が治る あるいは病気にならないことの本質が自発的治療にあり それが従来の医療だけでは賦活できないことが解明されてきたためである。この意味で ミニマム インターベンション(MI)の本質は 自発的治療の賦活とそのための環境の最適化といえる。歯への主な侵襲は脱灰で それに対する歯の自発的治療とは再石灰化にはかならない。う蝕は最も有病率の高い疾患である一方 自発的治

療のメカニズムが最も解明された疾患のひとつである。いま歯科医療は MI の展開に最も条件が整った段階にあるといえよう。

### II なぜ「その人が」病気になったのかを考える

根面う蝕を前にして MI で考えるのは 「とうとう治療するか」ではなく 「なぜ根面う蝕ができたのか」である。そして「ほかの歯や別の患者さんにはなぜう蝕がきかなかったか」ということである。

根面う蝕が発病した最も根本的な理由 それは根面が露出したからである。なぜ露出を防げなかったのかを考えてみる。生涯積算でみると 歯科医療が主として歯周疾患の管理に失敗したからである。もうひとつの決定的な原因は その個人の根面う蝕のリスクと初期見逃しが見逃されてしまったからである。こうして 医療では狭義のインターベンション=治療を重ねてきた。

なぜリスクと初期見逃しが見逃したのか が問題である。この答えは末尾で提示したい。

このように MI のもうひとつの側面は治療技法や手順ではなく 個々のドクターの医療への考え方で

あるという点である。手技的には MI は医療の手順をよりシンプルにしようとするもので、逆説的にいえば、何もしないで済むようにすることか MI の究極の目標となる。事実、再石灰化促進のための方法は、外科処置や補綴治療に比べると何ら難しいものではない。本稿が、根面う蝕をひとつの題材として MI ではどう考えるか、そのヒントになれば幸いである。

## 根面う蝕の病態および診断

### I 根面う蝕の定義と分類

根面う蝕は、一般に深さが 2 mm 以下で、窩は外形か不明瞭で軟化しており、着色している場合が多く、セメント質の崩壊と象牙質への進行か特徴である。歯肉縁の退縮により根面か口腔環境に露出し、不潔域かセメント、エナメル境に沿って拡大することが発病の契機となる。原発性の歯根面う蝕病巣は、歯肉縁に接した縁上プラークのため、垂直方向よりも水平方向の広がりをもつ。初期の活動性根面う蝕病巣は、触診すると軟化しており、通常はプラークで覆われている。色調は、当初は黄色ないし明るい茶色であるが、食品成分、煙草、細菌などによりやがて濃い茶色ないし黒色に変化する。

根面う蝕はいくつかの定義と分類が提唱されている。Hix と O'Leary (1976) は、根面う蝕を「隣接するエナメル質あるいは、すでにある修復物を含む、または含まない(原発性または二次う蝕病巣)根面の窩または軟化部」と定義している。さらに Nyvad と Fejerskov (1982, 1987) は、活動性と非活動性う蝕病巣を次の基準で分類することを提唱した。なお活動性および非活動性う蝕病巣はともに窩を示すか、後者では辺縁か滑沢である。

#### 活動性根面う蝕病巣

病巣の形状か明らかで、黄色ないし薄茶色に着色したすへての部位、う蝕病巣は視認できるプラークで覆われており、鋭利でない探針による軽い加圧での触診で軟化した。あるいは皮革のような感触がある。

#### 非活動性(停止状態)根面う蝕病巣

病巣の外形か明らかで、濃茶色ないし黒色のすへての部位、う蝕病巣の表面は滑沢で丸沢があり、鋭利でない探針による軽い加圧の触診で硬い状態か触知される。

### II 根面う蝕の進行

根面は、口腔清掃の不足や加齢に伴う歯肉の退縮で、必然的に露出する。適切な口腔清掃を行っている場合でも、ある程度の歯肉退縮か起こるため、根面う蝕か高齢者で発病するといつハターンが特徴的である。

実験的な研究によると、プラークで持続的に覆われた根面は、非常に急速にう蝕か進むことか示されている (Nyvad et al, 1989)。根面う蝕の表層は、ごく初期では細菌か侵入している。細菌はセメント、象牙境のコラーゲン線維を分解するらしく、細菌は初期の根面う蝕でも露出した多くの象牙細管に検出される。象牙質の生活反応は、歯冠う蝕と同一であるか、根面のう蝕病巣は、非活動性であったとしてもエナメル質のそれよりはるかに脆弱である。

たとえば、スクレーリングやルート、プレーニングを行つと再石灰化しつづあるセメント質が医原的に損傷されたり、完全に除去されてしまつ、そのよつな部位では、セメント質の直下にある象牙質で広範な根面う蝕を形成してしまつ、セメント質の厚さは歯冠側 1/3 で、わずか数十  $\mu\text{m}$  ほとしかない。鋭いキュレットタイプスクレーラーで 10~20 回擦過するだけでセメント質は完全に除去されてしまひ、歯根の象牙細管は露出してハイリスク部位となり、細菌か即座に侵入する。したかつて、スクレーリングと歯面清掃については、非侵襲的なアプローチが重要になってくる。

### III 根面う蝕の診断

頬舌面における根面う蝕の有無や活動性と非活動性の判定は詳細な視診で可能である。活動性と非活動性の境界ケースでは、色調よりも表面の性状(軟らかい、皮革様、硬い)か基準として重要になる。軟

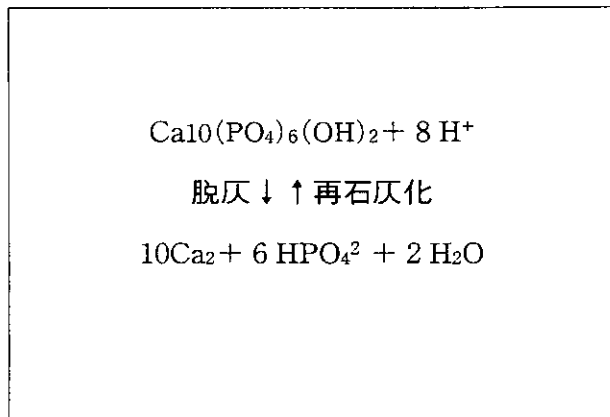


図1 脱灰 再石灰化は可逆性反応

化したう蝕病巣は色調と関係なく 歯肉辺縁に近接しており 硬いう蝕病巣は離れているとの報告もある(LynchとBeighton 1994)

臨床的な診断には 正確で任意深い視診と鋭利でない探針(WHO 歯周プローブなど)の使用が推奨される 根面の鋭利な探針による軽い擦過や触診は禁忌である

診断がもっとも難しいう蝕病巣は 歯周ポケット内に見えないう蝕病巣で ハイトウインクX線写真による診断が必須となる 歯周ポケット内のう蝕病巣は エナメル質う蝕よりも進行が速いため 早期の検出に失敗すると 歯髄炎に進んで歯肉療法も不可能な状況になりかねないので注意を要する

## 根面う蝕の反応特性と対応の方針

活動性の根面う蝕の処置は 予防的で非侵襲的であるべきであり う蝕病巣を停止させ 活動性から非活動性への回復を目指すべきである う窩のある根面う蝕病巣であってもセルフケアでのプラークコントロールを改善し フッ化物配合歯磨剤の使用を始めるだけで 根面う蝕を停止させることが可能であることが確認されている さらに クロルヘキソニンとフッ化物ハニニンを組み合わせて PMTC を繰り返せば 活動性の根面う蝕病巣が停止する可能性をさらに向上させることができる

ただし Axelsson は 黒色となった窩のある非活動性う蝕病巣は 修復の適応とするよう勧めている これはプラークが停滞しやすいことと審美的な理由にもよるものである 修復材料には グラスアイオノマー セメントやレニン配合クラスアイオノマー セメント コンナマーといった歯質と同色のフッ化物徐放性材料が推奨される

もし 根面う蝕を検出した当初より リスクの軽減や効果的な進行停止が疑問である場合は むしろ窩の清掃と一時的な病巣部の保護を目的とした仮封を選択する これは定期観察を前提として行い 口腔環境の改善状況から その除去や充填を後日判断することとする

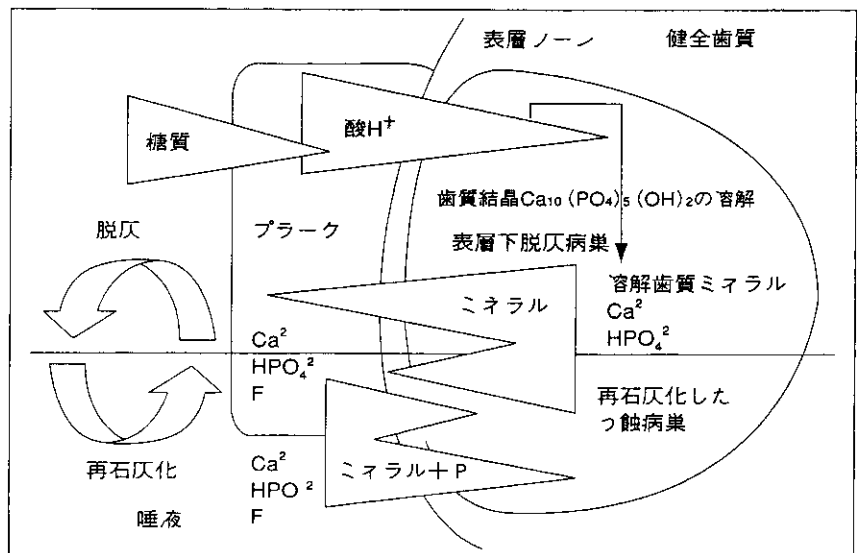
筆者は 病巣を感染源から一時的に遮断する という意味で これをう蝕の包帯と呼んでいる MI においては再石灰化によって活動性う蝕を非活動性へと変化させることが最優先であり 充填による進行阻止を即日行うことは必須ではない

## 再石灰化のメカニズム

エナメル質および象牙質のミネラル成分は 主としてハイトロキシアハタイト  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$  となる この結晶が細菌由来の酸によって溶解されるプロセスが脱灰で 最初に窩をとまわらないう蝕病巣(以下 初期う蝕とする)が形成される この初期う蝕はエナメル質では尤灰の消失や脱灰性白斑として観察される しかし 根面ではその兆候が明らかではない 化学式で表現すると 脱灰の過程では図1の下方向矢印の反応が進む 図2の模式図に示すように 酸 すなわち水素イオンはプラーク中の細菌による糖の代謝により産生される

やがて糖の供給が終わって細菌の代謝が低下し また水素イオンが口腔内の緩衝作用や希釈 洗浄作用で減少すると 歯の周囲の pH が中性に復帰する この段階になると脱灰が止まる このとき 歯質成分であるカルシウムイオン( $\text{Ca}^{2+}$ )やリン酸イオン(主として  $\text{HPO}_4^{2-}$ )が歯の周囲で過飽和になると 逆方向の反応に転じ 再びハイトロキシアハタイトなどの





▶ 図2 口腔内での脱灰 再石灰化の循環模式図

歯質結晶が初期の蝕病巣に形成され、自発的治癒（自然修復）が始まる。この脱灰で喪失した、イオンが新たな結晶形成により回復する過程が再石灰化である（図1で上方向の反応）

口腔内では、初期の蝕病巣に  $\text{Ca}^{2+}$  や  $\text{HPO}_4^{2-}$  が過飽和で、ほぼ pH 7 付近の体液である唾液が接触することにより再石灰化が発現することになる。さらに、フッ化物イオンが唾液中に微量（数 ppm）含まれると再石灰化は高度に促進され、耐酸性が高いフルオロオロアハタイトを主体とした結晶が形成される。その結果、歯質は以前よりも高い蝕抵抗性（耐酸性）を獲得する。

したがって、再石灰化のための臨床的な基本要件は、酸侵襲による脱灰が最小限であること、唾液が歯質に接触できること、フッ化物イオンが唾液に共存することの3点である。

なお日常、口腔内では脱灰、再石灰化が絶えず循環している。このような脱灰、再石灰化の時間バランスや唾液の分泌量、成分、緩衝能などが個人で異なるため、蝕の感受性に大きな差が生じている。口腔内は体外であるため、身体で最も環境変化が激しい臓器ともいえる。したがって、臨床的にはこれらの口腔環境を個別に評価し、再石灰化に向けて最適化することが、健康支援の本質的な課題となる。

## MI う蝕リスクの評価と保健教育

### I う蝕リスクの評価

根面の蝕に関連するリスク因子は多岐にわたる。基本的には感染症との病因論が確立されているので、まず蝕原因菌（ユータンスレンサ球菌と乳酸桿菌）のレベルを確認する。そのために国内で利用できる歯科用の検体検査は、診療室で使う簡易キット（表1）と検査を外注する委託型臨床検査に大別される。簡易キットはこれまで培養法が主体であったが、最近、モノクローナル抗体を応用しユータンスレンサ球菌を高い精度で特異的に半定量できるキット（サリハチェック GC）も開発されている。

一方、医科領域での臨床検査と同様に、歯科クリニックから検体を検査会社に外注できる歯科専用の臨床検査が、ヒー・エム・エル社により2000年から実用化された<sup>6,7</sup>。

現在、提供されている検査は

- ① 培養法による蝕関連菌の検出
  - ② PCR法による蝕、歯周病関連菌の検出
  - ③ 培養法による口腔内日和見感染菌の検出
- の3種類である。

う蝕キットでは、関連菌レベルのほか、う蝕のトータルリスクの判定報告書が検査センターから送

表1 市販のリスク検査キット

商品名	会社名	評価項目	検体	判定器材 時間
ニューカウント	昭和薬工化工	ニュータンスレンサ球菌菌数	唾液	培養器 1日
RD test	昭和薬品化工	レサズノン還元性細菌(主としてグラム陽性菌)の活性	唾液	必要なし 15分
カリオスタント	三金工業	ニュータンスレンサ球菌の酸性	歯垢	培養器 1 or 2日
Dentocult SM	オーラルケア	ニュータンスレンサ球菌菌数測定	歯垢 唾液	培養器 2日
Dentocult LB	オーラルケア	唾液乳酸桿菌数	唾液	培養器 4日/室温 7日
Dentobuff TRIP	オーラルケア	唾液緩衝能	唾液	必要なし 5分間
Oricult N	オーラルケア	カンゾウ菌数	唾液 粘膜	培養器 2日/室温 5日
CRT bacteria	白水貿易	ニュータンスレンサ球菌および乳酸桿菌の菌数	唾液	培養器 2日
CRT buffer	白水貿易	唾液緩衝能	唾液	必要なし 5分
サリバチェノク SM	ノーノー	ニュータンスレンサ球菌菌数(モノクローナル抗体応用)	唾液	必要なし 30分
サリバチェノクハノファ	ノーノー	唾液緩衝能	唾液	必要なし 5分

商品名	会社名	評価項目	検体	判定器材 時間
サノハスター	昭和薬工化工	唾液潜血濃度(ヘモグロビン量)	唾液	必要なし 30秒
ヘリオチェノク	サノスター	歯周疾患関連細菌*のヘパチダーゼ活性	歯肉溝滲出液	培養器 15分

\* Porphyromonas gingivalis Bacteroides forsythus Treponema denticola

付される う蝕リスクは 原因菌レヘル以外に う蝕経験 全身疾患や全身状態 食事内容(砂糖の摂取量) 飲食頻度 プラーク量 フノ化物応用の状況 唾液分泌速度 唾液緩衝能 臨床的判断などが関与する これらを総合的に評価してう蝕を回避できる またはう蝕になる可能性を視覚的に表示するカリオグラム(オーラルケア)や Dental X(フライント)などの利用が有効である(図3)

## II 保健教育

リスク検査の結果説明がそのまま保健教育となるよっていねいな説明と工夫をしかける その際にリスク評価の結果をそのまま保健教育の教材として意図的に活用することが重要である これは自分か経験した検査の結果が教材になるため 説得力が高く 後述するセルフケアを長く続ける強いモチベーションとなる また この検査結果の解説は そのままインフォームトコンセントの前提となる説明責

任を果たすことにもつながる

なお 根面う蝕に関する保健教育は 成人か対象となるので 自己決定と本人の経験や価値観 思いとニーズを尊重した成人教育理論(Andragogy)に則したものでなければならない それは医療を従来の病氣中し disease centered から患者中し patient centered とするためにも不可欠である

## セルフ・ケアによる再石灰化の促進

セルフケアの要旨は 日常生活における脱灰の抑制と唾液分泌の維持 増進 ならびに低濃度フノ化物の自己応用である

### I 脱灰抑制

脱灰抑制の基本は プラーク コントロールによるう蝕原因菌レヘル低下と 砂糖摂取量および頻度の低下である プラーク コントロールはトレー

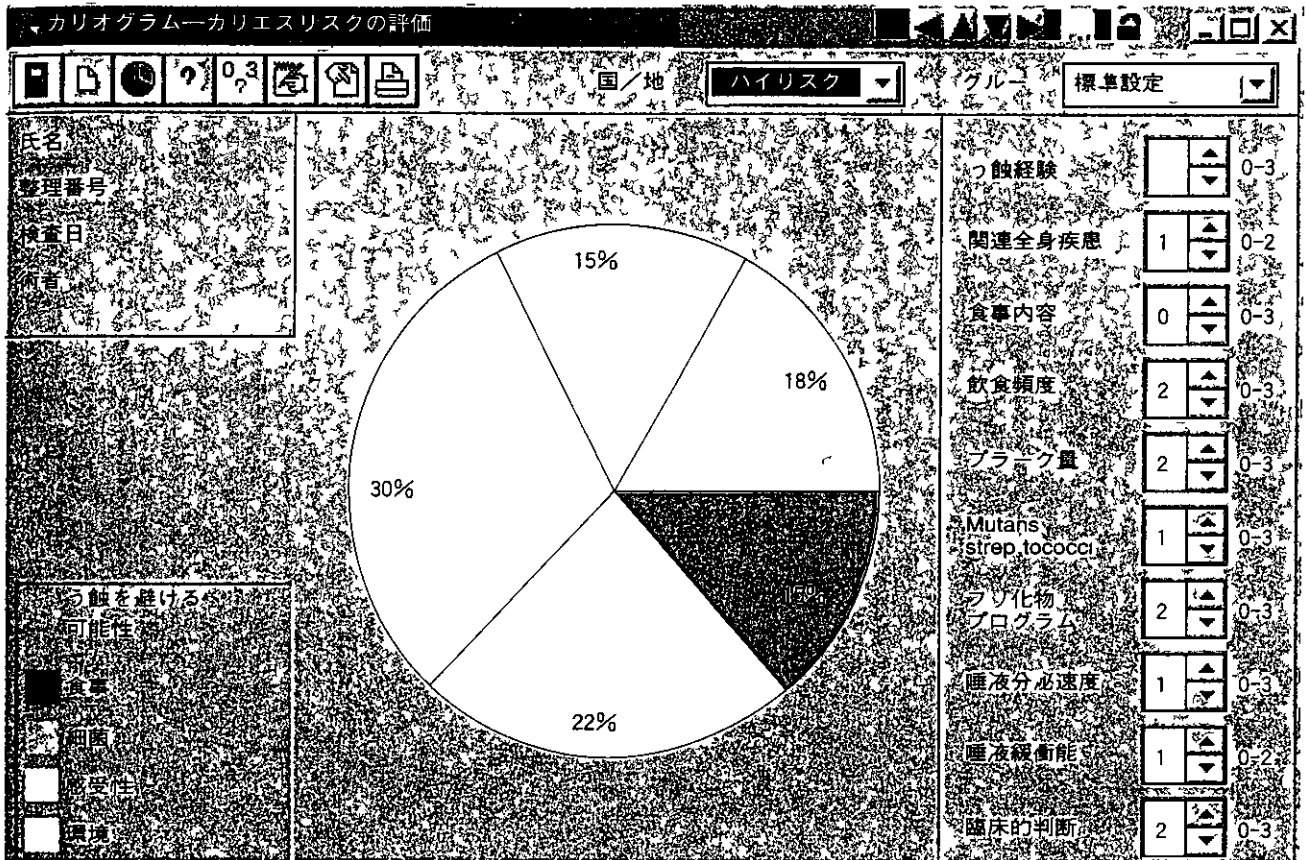


図3 カリオグラムのスクリーン表示

ニングを経て執練したハス法などを主体としたフ  
 ラッシングに加え、歯間ブラシやフロスなどの併用  
 と殺菌効果のあるオーラルケア製品(クロルヘキソ  
 ノール配合洗口剤や歯磨剤など)が有効となる

砂糖摂取の管理では、簡単な食事調査で食事と間  
 食の回数や食品の種類を確認することから重要な参考  
 になる。とくに中高齢者では、甘い菓子類や砂糖入  
 りの紅茶やコーヒーの摂取が毎日の習慣となってい  
 る場合が多々あるので注意する。その個人が日々何  
 を食べているのかは、咀嚼や嚥下など口腔機能の状  
 況にも関連し、また個人の生活習慣改善を支援する  
 重要な資料ともなる

甘いものをほぼ毎日飲食していれば、明らかに摂  
 りすぎてある。全身疾患との関連かなければ、少な  
 くとも毎日の摂取は避ける制限を工夫するべきであ  
 る。なお、フッ化物応用により唾液に供給された  
 フッ化物イオンの存在も、歯質の脱灰を強く抑制す

る重要な因子である

### III 生活歯髄の保護

根面の脱灰防止には、生活歯髄の存在をかきわめて  
 重要である。筆者らの基礎実験によると、歯髄腔の  
 生理的な陽圧に由来する、髄腔内液の根面方向への  
 流れは、根面の脱灰を抑制するとともに、再石灰化  
 を促進する可能性が示唆された。

このような効果は、充填物で封鎖された歯冠象牙  
 質では明確ではないが、少なくとも開放された根面  
 では重要な歯質保護機構と考えられる。

### IV 唾液分泌の維持 増進

唾液分泌の維持 増進は、再石灰化に直接関連す  
 る最重要項目である。唾液の分泌は、咀嚼低下のほ  
 か、長期にわたる過度のストレス、薬剤の常用、口  
 呼吸の習慣、全身疾患、唾液腺障害などにより低下

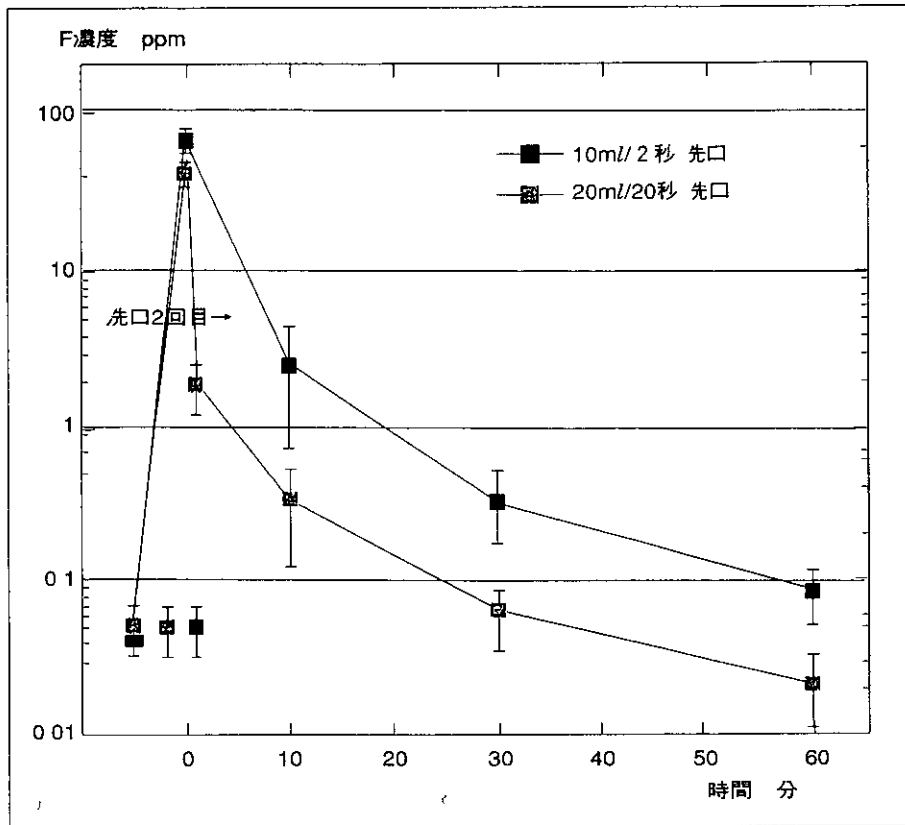


図4 NaF配合歯磨剤使用後におけるフッ化物イオンの口腔内維持

し 増齢とともに原因も複雑になり多様化していく  
咀嚼刺激唾液の分泌量が5分間で1.5ml以下であればハイリスクである原因疾患に対応するとともに日常でできることから改善してさらに専門的に分泌促進を支援しなければならない

舌や口腔周囲の刺激が重要なので食事は1口30回を噛むといった咀嚼回数増加さらに口を閉じた状態で20分以上再石灰化促進機能のあるカムを噛むなどの習慣が有効となる鼻呼吸の習慣化も有効である咀嚼が困難であれば口腔内に食品片を長時間入れておくだけでも唾液分泌が刺激される筆者は2cm角のほどの昆布を噛まずに口腔内に保持するよう勧めている

## V フッ化物の自己応用

再石灰化促進のための微量フッ化物イオンの供給は低濃度かつ高頻度が原則である具体的にはフッ化物配合歯磨剤やフッ化物洗口剤スプレーなどを毎日使用することか有効であるなおフッ化

物はフッ化カルシウムのような化合物ではなくFイオンとして唾液に存在することか重要である

そこで筆者はイオン化しやすいフッ化ナトリウムNaFを配合した歯磨剤を勧めているまた歯磨剤については使用後に唾液中フッ化物イオンをなるべく長時間維持することか効果を高めるために重要であるそのためフラッシュ後の洗口post brushing rinseか効果のカギを握るもしコップ1杯の水で徹底的に何度もつかいするとフッ化物イオンが急速に失われるので再石灰化促進効果はほとんど期待できない

図4ははじめにハラフィン刺激唾液を5分間採取しその量を計測後フッ化物イオン濃度を測定した1gのフッ化ナトリウム配合歯磨剤(Check up®ライオン研磨剤無水ケイ酸)を歯ブラシにつけ1分間通常のフラッシュを行い10mlの脱イオン水で2秒間軽く洗口した場合と20mlの水による10秒間の十分な洗口を2回行った場合で唾液中のフッ化物イオン濃度を比較した結果であ