

- 14) Lorish CD, Maisiak R : The face scale : A brief nonverbal method for assessing patient mood. *Arthritis Rheum* 29 : 906-909, 1986.
- 15) Beck AT, Ward CH, Mendelsohn M et al. : An inventory for measuring depression. *Arch Gen Psychiatry* 4 : 561-571, 1961.
- 16) Bergner M, Rutta A, Bobbitt WE et al. : The sickness impact profile : Validation of a health status measure. *Med Care* 14 : 57-67, 1976.
- 17) Sloan JA, Loprinzi CL, Kuross SA et al. : Randomized comparison of four tools measuring overall quality of life in patients with advanced cancer. *J Clin Oncol* 16 : 3662-3673, 1998.
- 18) Sheila JJ, Ernest AK, Prashant J et al. : Randomised trial of oral morphine for painful episodes of sickle-cell disease in children. *Lancet* 350 : 1358-1361, 1997.
- 19) 石原陽子, 一和多俊男, 倉光 薫ほか : QOL から見た非小細胞肺癌に対する化学療法 of 4 週間欠投与法と少量分割投与法の無作為比較試験. *癌と化学療法* 25 : 1013-1020, 1998.
- 20) Breslow L, Enstrom JE : Persistence of health habits and their relationship to mortality. *Prev Med* 9 : 469-483, 1980.
- 21) 木村靖夫, 吉武 裕, 島田美恵子ほか : 80 歳高齢者の身体的自立に必要な体力水準について. *Research in Exercise Epidemiology* 2 : 23-31, 2000.
- 22) 古谷野 亘, 柴田 博, 中里克治ほか : 地域老人における活動能力の測定—老研式活動能力指標の開発. *日公衛誌* 34 : 109-114, 1987.
- 23) Stata Press : Stata statistical software : Release 6.0, Stata Corporation, College Station, Texas, 1997.
- 24) 林 博史, 阿彦忠之, 阿村誠司 : 山形県における脳卒中発症者の予後, ならびに生活全体の満足度とその関連要因. *日公衛誌* 42 : 19-30, 1995.
- 25) 寺岡加代, 柴田 博, 渡辺修一郎ほか : 高齢者の咀嚼能力と身体状況との関連について. *老年歯学* 11 : 169-173, 1997.

著者への連絡先 : 葭原明弘 〒951-8510 新潟県新潟市旭町通 1-757 新潟大学大学院医歯学総合研究科口腔保健推進学分野
 TEL : 025-227-2858
 FAX : 025-227-0807
 E-mail : akihiro@dent.niigata-u.ac.jp



An ingenious design for peptide vaccines

Akira Yano^{a,*}, Atsuko Onozuka^a, Yasuko Asahi-Ozaki^b, Susumu Imai^a,
Nobuhiro Hanada^a, Yoshikatsu Miwa^c, Tosiki Nisizawa^{a,c}

^a Department of Oral Health, National Institute of Public Health, Minami 2-3-6, Wako-shi, Saitama 351-0197, Japan

^b Department of Pathology, National Institute of Infectious Diseases, Tokyo, Japan

^c Research and Development Center, Hayashibara Biochemical Laboratories, Inc. Okayama, Japan

Available online 21 January 2005

Abstract

For humoral immunization, it may be possible to make effective and safe peptide vaccines for various diseases by selection of proper B-cell epitopes. However, a lack of T-cell epitopes on short peptides, such as those associated with major histocompatibility complex (MHC)-restriction, is a major problem for peptide vaccine development. We propose a solution for the design of peptide vaccines that involves induction of broadly reactive T-cell epitopes via agretopes. The strategy involves positioning multi-agretope type peptides on the N-terminal side of a di-lysine linker and B-cell epitopes on the C-terminal side. The addition of the arginine–glycine–aspartate (RGD)-motif to the N terminus of the peptide enhances its immunogenicity, and enables nasal immunization without adjuvants.

© 2005 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Keywords: RGD-motif; Multi-agretope; MHC-restriction

1. Introduction

The advantage of a peptide vaccine is that it can induce immune responses to a specific sequence of amino acids. However, the vaccine peptide must contain at least one major histocompatibility complex (MHC) binding motif (agretope) as an antigen, since antigens are presented by the immune system as a short peptide that binds to the MHC. Subsequently, the T-cell receptors recognize the peptide as a T-cell epitope on the MHC molecules [1–3]. For a humoral immune response, a peptide must have B-cell epitopes to induce specific antibodies and at least one agretope/T-cell epitope for presentation by MHC class II (MHC-II) molecules [1–3]. However, there are over 10 haplotypes of MHC-II in human [1] and the agretopes are different for each haplotype. The MHC-restriction is the most critical impediment to the development of peptide vaccines.

A peptide vaccine has another disadvantage. The weak antigenicity of peptide vaccines dictates a need for use of

strong adjuvants, such as Freund's, for induction of antibodies. Several approaches, such as liposome capsulation [4], MAPs [5], and lipopeptides [6] have been used to eliminate the need for strong adjuvants. We have introduced the arginine–glycine–aspartate (RGD)-motif into peptide antigens. The RGD-motif is the most representative cell attachment motif seems to enhance the binding of peptides to specific receptors. Antigenicity of the peptides was enhanced and nasal immunization by peptides was successful without adjuvants [7].

We have proposed a design for peptide vaccines that contain the RGD-motif, and the lysine linker (-KK-) that joins two peptides [7,8]. The lysine linker is the target sequence of the lysosomal protease, cathepsin B, which is one of the important proteases for antigen processing in the context of MHC-II antigen presentation [2]. When two peptide antigens are joined with -KK-, we can avoid induction of antibodies to the amino acid sequence that is generated by joining of two peptides and most antibodies are reactive to each peptide [8]. In our previous report, we have noticed a bias between the peptides, depending upon whether they are on the N- or C-terminal side of -KK- for induction of antibodies [7]. In this study, we have investigated the reason for this bias and pro-

* Corresponding author. Tel.: +81 48 458 6286; fax: +81 48 458 6288.
E-mail address: akiray@niph.go.jp (A. Yano).

pose the use of the bias as a solution to the MHC-restriction problem.

2. Materials and methods

2.1. Peptide synthesis

All peptides used in this study were synthesized by a step-wise solid-phase procedure as described previously [7]. Peptides were verified by MALDI-TOF/MS (Voyager-DETMS TR work station: Applied Biosystems Foster City, CA) when necessary. The single-letter universally accepted notation for amino acids is used throughout the text.

2.2. Immunizations

BALB/c, B10.D2, B10.S, B10.A, and C3H/HeJ mice were obtained from Japan SLC Inc. (Shizuoka, Japan) and were used at 6 weeks of age to begin the immunization in all experiments. Groups of four to six mice were immunized intranasally with 50 µg of a peptide, either with or without 1 µg of cholera toxin (CT: Sigma-Aldrich, Missouri). A micropipettor was used to gently instill 4 µL of immunogen-containing saline solution into the nasal cavities of each mouse (2 µL into each nasal orifice). Two identical booster doses were given at 2-week intervals.

One group of mice was primed subcutaneously with 100 µg of peptides in 100 µL phosphate-buffered saline (PBS) either with or without 100 µL Freund's incomplete adjuvants (FIA: Pierce and Endogen: Funakoshi Co. Ltd., Tokyo, Japan). The same subcutaneous booster dose was given at 2-week intervals.

HA vaccine (split-product virus vaccine) was prepared from influenza virus A/PR/8/34 (A/PR8, H1N1) according to the method of Davenport et al. [9] at the Kitasato Institute (Saitama, Japan). Groups of BALB/c mice were intranasally immunized 1 µg of HA vaccine with 1 µg of peptide or 1 µg of CT. Four booster doses were given at 2-week intervals.

One week after the last booster dose, animals were bled and serum samples were prepared from clotted blood by centrifugation and stored individually with CompleteTM protease inhibitor cocktail (Roche Diagnostics Japan, Tokyo) and 0.05% (w/v) of sodium azide.

2.3. ELISA assays

Protein antigens used for ELISA were BSA, OVA, and PAc. Recombinant PAc was isolated from *Streptococcus mutans* TK18 as described previously [10]. For the ELISA, 96-well microtiter H-plates (Sumitomo Bakelite, Tokyo, Japan) were coated with 2 µg/well peptide or 1 µg/well protein antigen in 100 µL of 50 mM carbonate buffer pH 9.6 and held overnight at 4 °C. All assays were performed with alkaline phosphatase and *p*-nitrophenyl phosphate systems as described previously [7]. The OD_{405–620} was measured using

a microtiter plate reader (Multiskan BICHROMATIC, Labosystem, Helsinki, Finland). The ELISA antibody titer was expressed as the reciprocal of the highest dilution giving an OD_{405–620} of 0.1 unit above that of the control wells without antigen.

3. Results and discussion

3.1. Investigation of B-cell epitopes

SmU, with the amino acid sequence TYEAALKQ-YEADL, is a minimum peptide antigen (Pac365–377) for the induction of antibodies that cross react with the cell surface protein antigen of *S. mutans* [10]. SmU has both a strong B-cell epitope and the helper T-cell epitope for H-2^d haplotype mice, but lacks the T-cell epitope for H-2^s haplotype [11]. OVAp is a peptide antigen (OVA323–336: ISQAVHAA-HAEINE) for induction of antibodies that are cross-reactive to ovalbumin, which has strong epitopes for both B- and the T-cells of H-2^d haplotype mice [11]. To investigate the position bias of the peptide containing lysine linker, we synthesized the long peptides, SmU-KK-OVAp, OVAp-KK-SmU, RGD-SmU-KK-OVAp and RGD-OVAp-KK-SmU. We immunized mice both nasally and subcutaneously with the peptides, either with or without FIA. The serum titers to peptide antigens, PAc and OVA are shown in Fig. 1. In all cases, both SmU and OVAp were good antigens for BALB/c mice (H-2^d) and induced antibodies cross-reactive to PAc and OVA. When we focused on SmU, it was unclear whether the N- or C-terminal side of -KK- linker was the more favorable position for induction of antibodies to PAc. This was also true for OVAp. When the RGD-motif was added to the peptides

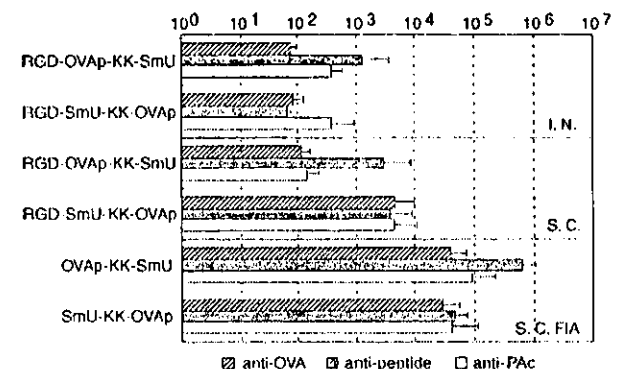


Fig. 1. Serum titres induced by intranasal and subcutaneous immunization with peptides. BALB/c mice were intranasally (I.N.) immunized with 50 µg of RGD added peptides, followed by two booster doses at two-week intervals. One hundred micrograms of peptide with FIA was used for subcutaneous (S.C.) immunization and immunization with RGD added peptides without adjuvant was followed by a booster dose given at a two-week interval. One week after the last booster dose, serum samples were collected and serum antibody titres were determined by ELISA. Average serum titers are shown for anti-OVA (hatched-box), anti-peptide antigen (grey-box) and anti-PAc (open box) with SD bars for each group.

and used for nasal immunization, SmU was a stronger antigen than OVA_p, independent of its position. Those results clearly indicated that if both peptides, placed either on the N- or C-terminal side of -KK- linker, were strong enough as helper T-cell epitopes, antibody titers were dependent upon the strength of B-cell epitopes.

3.2. The position of T-cell epitopes and MHC-restriction

The effects of both the position and the strength of T-cell epitopes in the peptide, including the lysine linker, were examined. During the screening of SmU from the PAC, we had analyzed B- and T-cell epitopes of several peptides. PAC305–318 (NEADYQAKLTAYQT) has weaker B- and T-cell epitopes for H-2^d mice than SmU. However, unlike SmU, it has T-cell epitopes for H-2^s mice [11]. We have synthesized two peptides, SmU-KK-PAC305–318 and PAC305–318-KK-SmU that were used with FIA to subcutaneously immunize B10.D2 (H-2^d) and B10.S (H-2^s) mice (Fig. 2). B10.D2 mice responded with antibodies to both PAC305–318 and SmU in response to both peptides. SmU is a stronger B-cell epitope than PAC305–318, since anti-SmU titers are always higher than those of anti-PAC305–318. When we investigated the importance of the peptide position on either the N- or C-terminal side of the linker, the C-terminal position was best for induction of antibodies. B10.S mice produced antibodies only to the PAC305–318-KK-SmU. In this case, T-cell epitopes for H-2^s haplotype mice existed only on PAC305–318. Thus, we could conclude that T-cell epitopes should be placed on the N-terminal side of -KK- linker. The cause of this phenomenon is not clear. There may be molecular mechanisms that preferentially achieve MHC-II loading of peptides that are placed on the N-terminal side of the lysosomal digestion site. Since SmU lacks T-cell epitopes for H-2^s haplotype, B10.S mice could not produce antibodies by immunization with SmU alone. However, we were able to induce antibodies to SmU by immunization with PAC305–318-KK-SmU.

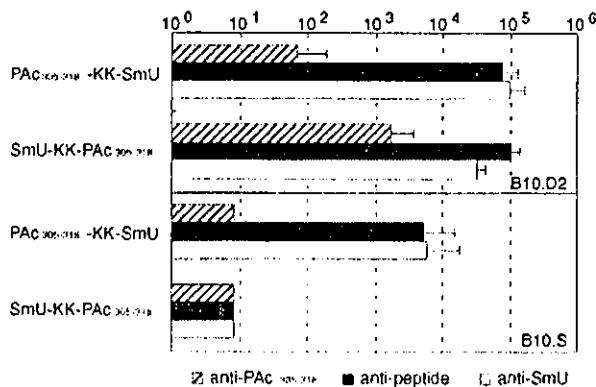


Fig. 2. Serum titers induced by subcutaneous immunization of peptides. B10.D2 and B10.S mice after subcutaneous immunization using peptides with FIA followed by a booster dose. Average serum titers are shown for anti-PAC305–318 (hatched-box), anti-peptide antigen (grey-box) and anti-SmU (open-box) with SD bars for each group.

This result shows a solution to MHC-restriction and points to the possibility of developing peptide vaccines for clinical use.

Thus, T-cell epitopes on the N-terminal side of -KK- linker were sufficient for induction of the antibodies. Therefore, if we placed the multi-agrepto type peptide, broadly cross-reactive T-cell epitopes, such as T1 [12], Gag298–312 (KRWIILGLNKIVRMY)[13], or overlapping multi-agrepto type peptide (OMP: LAVYWELLAKYLL-DRVQKVA) [7], on the N-terminal side of -KK- linker, we should be able to develop broadly effective peptide vaccines for human and veterinary use. However, peptides on the N-terminal side should not induce antibodies. We examined the ability of those peptides to induce antibodies by immunization of several types of mice. OMP and Gag298–312 with FIA were used to immunize B10.BR (H-2^k), B10.D2 (H-2^d), B10.S (H-2^s), BALB/c (H-2^d) and C1H3/HeJ (H-2^k) mice and those peptides seemed to have very weak B-cell epitopes (Fig. 3A). Those peptides are suitable for T-cell epitopes in our peptide vaccines. We have synthesized peptides for induction of antibodies to SmU ((RGD-)OMP-KK-SmU) by immunization of B10.S mice (Fig. 3B). Intranasal immunization with OMP-KK-SmU alone did not induce specific antibodies because of its weak immunogenicity. Immunization with either RGD-added peptide alone or with CT induced

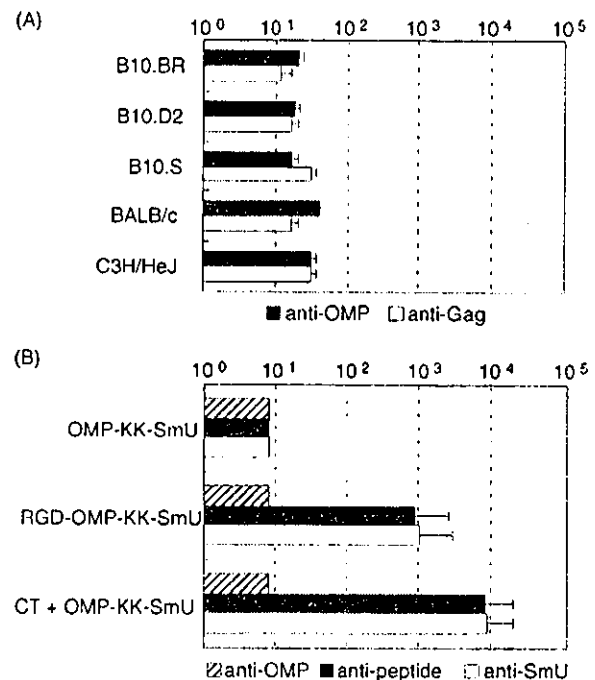


Fig. 3. Effect of multi-agrepto type peptide on peptide antigens. (A) Each group of mice was immunized subcutaneously with FIA, followed by a booster dose, then specific antibody titers were determined by ELISA. Average titers are shown for anti-OMP (hatched-box), and anti-Gag (open-box) with SD bars for each group. (B) B10.S mice were intranasally immunized either with or without CT. Average titers are shown for anti-OMP (hatched-box), anti-peptide antigen (grey-box), and anti-SmU (open-box) with SD bars for each group.

antibodies to SmU. OMP served as a T-cell for MHC-II of H-2^s mice in the same way as Pac305–318.

3.3. Application of the design of peptide vaccines

We have applied our design for peptide vaccines to an influenza vaccine. Several B-cell epitopes were reported that are involved in neutralization of the experimental strains of influenza virus A/PR8, HA1 (VTGLRNIPSIQSR) [14] and M2 (EVETPIRNEWGCRCNGSSD) [15]. We have synthesized peptide vaccines, RGD-Gag298-312-KK-HA1 and RGD-Gag298-312-KK-M2. In order to obtain high titer of antibodies, we immunized several mouse strains (data not shown) and B10.A was found to be the most reactive strain. Nasal immunization with peptides was repeated five times and serum titers were measured (Fig. 4A). In all cases, anti-HA1 and anti-M2 titers were specifically elevated. When two peptides were used for immunization at the same time, HA1 was a major antigen and when CT was used as mucosal adjuvant, M2 was major. It may be necessary to use additional approaches for the induction of antibodies to several peptides at the same time.

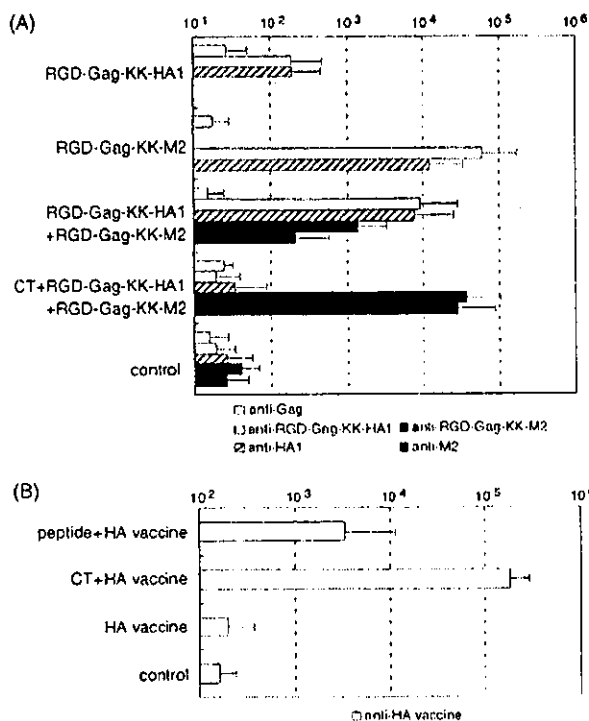


Fig. 4. Intranasal immunization with influenza vaccines. (A) B10.A mice were intranasally immunized with HA1 and M2 peptide vaccines, either with or without CT. Average titres are shown for anti-Gag (open-box), anti-HA1 (light grey-box), anti-RGD-Gag-KK-HA1 (hatched light grey-box), anti-M2 (dark grey-box) and anti-RGD-Gag-KK-M2 (hatched dark grey-box with SD bars for each group. (B) BALB/c mice were intranasally immunized with influenza HA vaccine (1 μ g), with RGD-OMP-KK-OVAp (1 μ g), or CT (1 μ g), followed by four booster doses. Average anti-HA vaccine titres are shown as open-boxes with SD bars for each group.

Our peptide vaccines with the RGD-motif were reported as being useful adjuvants for nasal immunization [7]. When soluble proteins, such as BSA or OVA, were used for intranasal immunization with a small amount of RGD peptide vaccine, antibodies to BSA or OVA were strongly induced. However, background level antibodies to the RGD peptide were detected. In Fig. 4B, we have intranasally immunized mice using HA vaccines either with or without RGD peptide (RGD-OMP-KK-OVAp). The RGD peptide was already confirmed to be a nasal adjuvant in BALB/c mice [7]. After a series of five nasal immunizations, serum titers to HA vaccine were elevated by addition of the peptide, but the effects were weaker than when CT was added. In order to develop clinically useful peptide vaccines and adjuvants, we have to select for strong B-cell epitopes and develop the methods for enhancing the adjuvanticity of peptides.

In conclusion, our approach to the design of a peptide vaccine enables intranasal immunization without the need for adjuvant and solves the problem of MHC-restriction. Specifically, the design places the RGD at the N-terminus, a multi-epitope peptide at the N-terminal side of lysine linker, and a B-cell epitope at the C-terminus. We suggest that our design might be universally applicable to the development of peptide vaccines and adjuvants for intranasal vaccination.

Acknowledgments

We would like to thank Ms Makiko Teramura-Hiramatsu, Ms Miho Sawada and Ms Yukiko Yamamoto for their assistance in performing the study. This work was supported by grants from the Ministry of Health, Labor and Welfare of Japan.

References

- [1] Margulies DH. The major histocompatibility complex. In: Paul WE, editor. *Fundamental immunology*. 4th ed. New York: Lippincott-Raven; 1999. p. 263–85.
- [2] Lennon-Duménil AM, Bakker AH, Wolf-Bryant P, Ploegh HL, Lagaudrière-Gesbert C. A closer look at proteolysis and MHC-class-II-restricted antigen presentation. *Curr Opin Immunol* 2002;14(1):15–21.
- [3] Bjorkman PJ. MHC restriction in three dimensions: a view of T cell receptor/ligand interactions. *Cell* 1997;89(2):167–70.
- [4] Alving CR, Koulchin V, Glenn GM, Rao M. Liposomes as carriers of peptide antigens: induction of antibodies and cytotoxic T lymphocytes to conjugated and unconjugated peptides. *Immunol Rev* 1995;145:5–31.
- [5] Tam JP. Synthetic peptide vaccine design: synthesis and properties of a high-density multiple antigenic peptide system. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988;85(15):5409–13.
- [6] BenMohamed L, Wechsler SL, Nesburn AB. Lipopeptide vaccines—yesterday, today, and tomorrow. *Lancet Infect Dis* 2002;2(7):425–31.
- [7] Yano A, Onozuka A, Matin K, Imai S, Hanada N, Nisizawa T. RGD motif enhances immunogenicity and adjuvanticity of peptide antigens following intranasal immunization. *Vaccine* 2003;22(2):237–43.

- [8] Oishi Y, Onozuka A, Kato H, Shimura N, Imai S, Nisizawa T. The effect of amino acid spacers on the antigenicity of dimeric peptide-inducing cross-reacting antibodies to a cell surface protein antigen of *Streptococcus mutans*. *Oral Microbiol Immunol* 2001;16(1):40–4.
- [9] Davenport FM, Hennessy AV, Brandon FM, Webster RG, Barrett CD, Lease GO. Comparisons of serologic and febrile responses in humans to vaccination with influenza A viruses or their hemagglutinins. *J Lab Clin Med* 1964;63:5–13.
- [10] Senpuku H, Miyauchi T, Hanada N, Nisizawa T. An antigenic peptide inducing the cross-inhibiting antibodies against the interaction of *Streptococcus mutans* PAc with human salivary components. *Infect Immun* 1995;63(12):4695–703.
- [11] Senpuku H, Iizima T, Yamaguchi Y, Nagata S, Ueno Y, Saito M, et al. Immunogenicity of peptides coupled with multiple T-cell epitopes of a surface protein antigen of *Streptococcus mutans*. *Immunology* 1996;88(2):275–83.
- [12] Ahlers JD, Takeshita T, Pendleton CD, Berzofsky JA. Enhanced immunogenicity of HIV-1 vaccine construct by modification of the native peptide sequence. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94(20):10856–61.
- [13] Wilson CC, Palmer B, Southwood S, Sidney J, Higashimoto Y, Appella E, et al. Identification and antigenicity of broadly cross-reactive and conserved human immunodeficiency virus type 1-derived helper T-lymphocyte epitopes. *J Virol* 2001;75(9):4195–207.
- [14] Rajnavölgyi É, Horváth A, Gogolák P, Tóth GK, Fazekas G, Fridkin M, et al. Characterizing immunodominant and protective influenza hemagglutinin epitopes by functional activity and relative binding to major histocompatibility complex class II sites. *Eur J Immunol* 1997;27(12):3105–14.
- [15] Neiryneck S, Deroo T, Saelens X, Vanlandschoot P, Jou WM, Fiers W. A universal influenza A vaccine based on the extracellular domain of the M2 protein. *Nat Med* 1999;5(10):1157–63.

Oral Streptococci Exhibit Diverse Susceptibility to Human β -Defensin-2: Antimicrobial Effects of hBD-2 on Oral Streptococci

Eisaku Nishimura,^{1,2} Akiko Eto,¹ Masatoshi Kato,² Shuichi Hashizume,² Susumu Imai,¹ Tosiki Nisizawa,¹ Nobuhiro Hanada¹

¹Department of Oral Health, National Institute of Public Health, 1-23-1 Toyama, Shinjuku-ku, Tokyo 162-8640, Japan

²Research Institute, Morinaga & Co., Ltd., 2-1-1 Shimosueyoshi, Tsurumi-ku, Yokohama 230-8504, Japan

Received: 11 March 2003 / Accepted: 7 May 2003

Abstract. We examined the antimicrobial effects of human β -defensin-2 (hBD-2) on 17 species of oral streptococci to investigate the involvement of antimicrobial peptide activity in oral microflora development and the clinical use of the antimicrobial peptide for oral microflora control. Oral streptococci exhibit diverse levels of susceptibility to human β -defensin-2 (hBD-2). Two major cariogenic bacterial species, *Streptococcus mutans* (*S. mutans*) and *S. sobrinus*, were found to be susceptible to the peptide, indicating that it is a potential therapeutic agent for preventing dental caries. *S. mitis* exhibited the lowest susceptibility to the peptide. *S. mitis* is a major indigenous bacterium in the oral microflora, and our results suggest that it might possess a certain resistance mechanism against hBD-2.

In the oral cavity, antimicrobial peptides such as defensin, histatin, and cathelicidin play a pivotal role as a first-line defense against a succession of invading bacteria [14]. β -defensins are small, cationic, antimicrobial peptides, and hBD-1, -2, -3 were detected in the salivary gland, gingiva, tongue, and buccal mucosa [4, 5, 11]. β -defensins exert their bactericidal activity by acting on the bacterial membrane, and epithelial cells of the oral mucosal barrier upregulate hBD-2 and hBD-3 upon stimulation by bacterial components or inflammatory mediators [5, 11].

More than 500 different kinds of resident bacteria form a normal flora in the oral region exposed to the action of the host defense system [6]. Therefore, we assumed that commensal bacteria may possess certain mechanisms of escaping the host immune system. Furthermore, oral microflora found in each oral region vary in composition, and antimicrobial peptides could be one of the determinants of development of normal oral flora through their activities. We were also interested in the oral application of antimicrobial peptides for clinical uses, particularly for prevention of dental caries [12]. Dental caries are ideal as a model for the clinical use of antimicrobial peptides, in which the

peptides are easily and directly delivered to the diseased part.

In this study, we examined the antimicrobial effects of hBD-2 on several *Streptococcus* species. This genus includes two cariogenic species, *Streptococcus mutans* (*S. mutans*) and *S. sobrinus*, and their total population comprises the largest percentage of the total population in the oral region [6].

Materials and Methods

Reagents. A synthetic hBD-2 peptide was purchased from the Peptide Institute (Osaka, Japan). The activity of the peptide was confirmed previously [7] and was examined by using an *E. coli* strain IFO15044 as the control in this study. The medium used for the bacterial culture was from Difco (Michigan, USA). Low-melt, low-electro-osmosis ultrapure agarose (Gibco BRL, USA) was used after confirming its suitability for antimicrobial assay. Other reagents used were purchased from Wako or Sigma, unless otherwise specified.

Bacterial strains and antimicrobial assay. The bacterial strains were obtained from American Type Culture Collection (ATCC), Gifu Type Culture Collection (GTC), or Institute for Fermentation OSAKA Collection (IFO) and are listed in Table 1. To determine the antimicrobial activity of hBD-2 against various streptococcal strains, we employed the radial diffusion assay because this method has been described to be sensitive and to yield reproducible results [3, 9, 13]. Briefly, bacterial cells precultured overnight were grown to log phase in trypticase soy broth at 37°C. They were harvested by

Correspondence to: A. Eto; email: eto@nih.go.jp

Table 1. Susceptibilities of oral streptococcal strains and *E. coli* to hBD-2

MBC ^a (μg/mL)	Strain	
<10	<i>E. coli</i>	IFO 15044
	<i>S. salivarius</i>	ATCC9757
	<i>S. gordonii</i>	ATCC10558 ^T
	<i>S. sanguinis</i>	ATCC10556 ^T
	<i>S. mutans</i>	ATCC25175 ^T
	<i>S. sobrinus</i>	ATCC33478 ^T
	<i>S. macacae</i>	ATCC35911 ^T
	<i>S. ferus</i>	ATCC33477 ^T
	<i>S. criceti</i>	ATCC19642 ^T
	<i>S. rattii</i>	ATCC19645 ^T
	<i>S. pyogenes</i>	GTC262 ^T
	<i>S. constellatus</i>	ATCC27823 ^T
	<i>S. intermedius</i>	ATCC27335 ^T
	<i>S. oralis</i>	GTC276 ^T
	<i>S. downei</i>	ATCC33748 ^T
	<i>S. agalactiae</i>	GTC1234 ^T
	10<, <100	<i>S. anginosus</i>
100<	<i>S. mitis</i>	GTC495 ^T

^a MBC, minimal bactericidal concentration.

centrifugation, washed, quickly resuspended in 1% low-melt agarose/10 mM sodium phosphate buffer, and spread onto a culture dish placed on a level platform to obtain a uniform layer. After the bacterial layer was solidified, wells 3 mm in diameter were formed in the layer. The concentration of the peptide in the wells was 0, 1.6, 3.2, 6.3, 12.5, 25, 50, 100, or 200 μg/mL. The resulting diameter of

the clear zone surrounding the wells was measured, expressed in units (0.1 mm = 1 U) and plotted against the logarithm of the hBD-2 concentration [9].

Results

The 17 oral streptococcal strains used in this study are listed in Table 1. *Streptococcus* species were classified into six groups based on serological typing, DNA relatedness including finger-printing, and 16S rRNA sequences: the pyogenic, anginosus, mitis, salivarius, bovis, and mutans groups [8, 10]. We selected representative species for each group, which are frequently found in the oral cavity, except for the bovis group.

The antimicrobial activity of hBD-2 against oral streptococci was determined by the radial diffusion assay with a peptide concentration of 0–200 μg/mL. With the range of peptide concentrations assayed, hBD-2 was found to exert a dose-dependent antimicrobial activity against all strains of oral streptococci (Fig. 1). However, their susceptibilities to the peptide varied. To compare their susceptibilities, we adopted the theoretical minimal bactericidal concentration (MBC) described by Qu et al. [13], which corresponds to the x intercept of the plots, indicating minimal peptide concentration required to form a clear zone [13] (Table 1). The most susceptible species tested was *S. gordonii*; an hBD-2 concentration

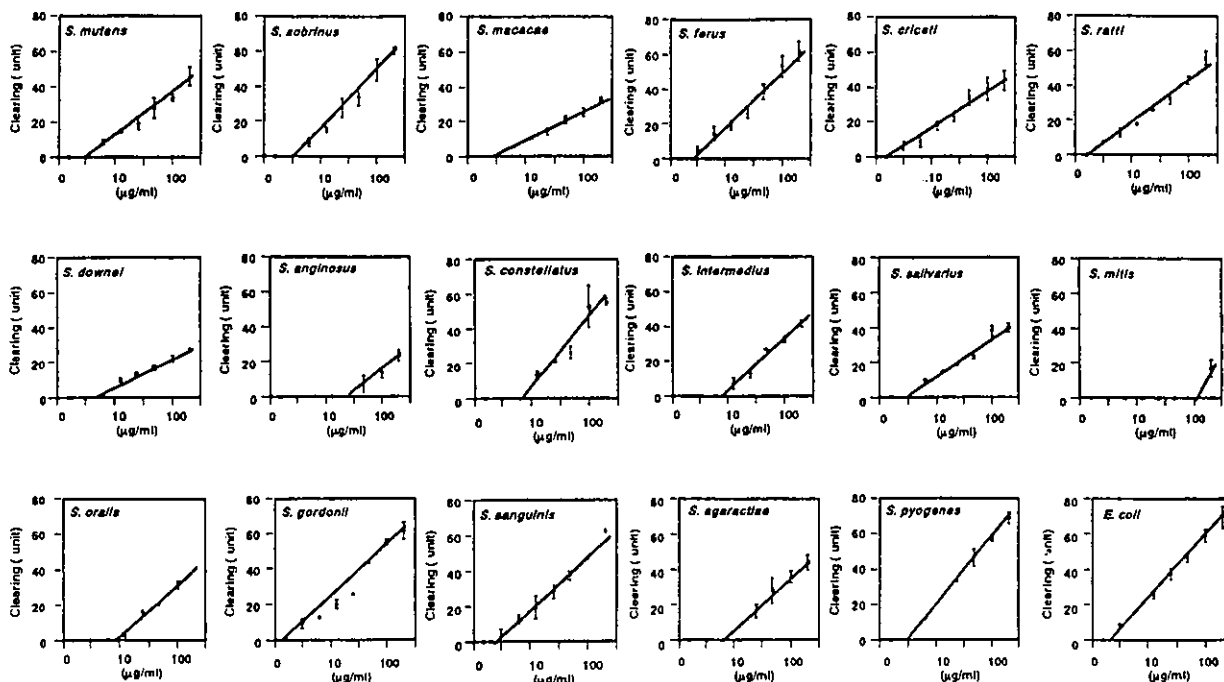


Fig. 1. Dose-dependent effects of hBD-2 on several species of oral streptococci. The antimicrobial activity of hBD-2 was determined by the radial diffusion assay as described in Materials and Methods. Each result is the mean of three experiments, and error bars indicate the standard deviation.

of 1.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ was sufficient to kill this bacterium. On the other hand, two species, *S. anginosus* and *S. mitis*, exhibited low susceptibility to the peptide. In particular, an hBD-2 concentration higher than 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ was necessary to exert its bactericidal activity against *S. mitis*. The low susceptibility of this species to hBD-2 is common to two strains, *S. mitis* GTC495T and *S. mitis* ATCC6249, suggesting that this is a characteristic unique to the species (data not shown). As to its effects against pathogenic bacteria, hBD-2 effectively exerted its antibacterial activity against cariogenic bacteria, *S. mutans* and *S. sobrinus*, and against inflammatory bacteria, *S. agalactiae* and *S. pyogenes*.

Discussion

Our results showed that species of the genus *Streptococcus* exhibited diverse susceptibility to hBD-2. There was no correlation between the group of strains and susceptibility. Although in vivo-mimic conditioned experiments that take into consideration the nature of a biofilm might be necessary, examination of the susceptibility of panels of bacterial species to antimicrobial peptides is the first step toward its clinical application [2, 12]. The bactericidal activity of hBD-2 against *S. mutans* and *S. sobrinus* suggests its potential for clinical use, namely, in the prevention of dental caries.

Our results also revealed that *S. mitis* and *S. anginosus* had significantly low susceptibility to hBD-2, indicating that these bacteria may possess a certain resistance mechanism against the bactericidal action of hBD-2. This peptide is considered to act on bacterial membranes in a nonspecific electrostatic manner; a certain molecule that interacts with hBD-2 before it enters the bacterial membrane could be involved in the resistance mechanism. *S. mitis* is one of the major bacteria in the oral indigenous microflora, and it appears at the earliest stage after birth in the human oral cavity [6]. Although the relationship between the host immune system and healthy normal flora has not been extensively studied [1], it is rational to consider that indigenous bacteria may possess a mechanism to overcome the host defense system, leading to their coevolution.

Acknowledgments

We thank Ms. R. Jitsukawa and Ms. M. Ochiai for technical support, and members of our laboratory for helpful discussion. This work was supported by research grants from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology of Japan.

Literature Cited

1. Boman HG (2000) Innate immunity and the normal microflora. *Immunol Rev* 173:5–16
2. Cate JM, Marsh PD (1994) Procedures for establishing efficacy of antimicrobial agents for chemotherapeutic caries prevention. *J Dent Res*, 73:695–703
3. Cole AM, Ganz T (2000) Human antimicrobial peptides: analysis and application. *Bio-Techniques* 29:822–831
4. Diamond DL, Kimball JR, Krisanaprakomkit S, Ganz T, Dale BA, (2001) Detection of β -defensin secreted by human oral epithelial cells. *J Immunol Methods* 256:65–76
5. Harder J, Bartels J, Christophers E, Schroder JM (2001) Isolation and characterization of human β -defensin-3, a novel human inducible peptide antibiotic. *J Biol Chem* 276:5707–5713
6. Hardie JM, Marsh PD (1978) Streptococci and the human oral flora. *Soc Appl Bacteriol Symp Ser* 7:157–206
7. Hiratsuka T, Nakazato M, Date Y, Ashitani J, Minematsu T, Chino N, Matsukura S (1998) Identification of human β -defensin-2 in respiratory tract and plasma and its increase in bacterial pneumonia. *Biochem Biophys Res Commun* 249:943–947
8. Kawamura Y, Hou XG, Sultana F, Miura H, Ezaki T (1995) Determination of 16S rRNA sequences of *Streptococcus mitis* and *Streptococcus gordonii* and phylogenetic relationships among members of the genus *Streptococcus*. *Int J Syst Bacteriol* 45:406–408
9. Lehrer RI, Rosenman M, Harwig SS, Jackson R, Eisenhauer P (1991) Ultrasensitive assays for endogenous antimicrobial polypeptides. *J Immunol Methods* 137:167–173
10. Marsh P, Martin MV (1999) Oral microbiology, 4th edn. Oxford, Auckland, Boston, Johannesburg, Melbourne, New Delhi: Wright
11. Mathews M, Jia HP, Guttmiller JM, Losh G, Graham S, Johnson GK, Tack BF, McCray PB, Jr (1999) Production of β -defensin antimicrobial peptides by the oral mucosa and salivary gland. *Infect Immun* 67:2740–2745
12. Miyazaki KT, Lehrer RI (1998) β -sheet antibiotic peptides as potential dental therapeutics. *Int J Antimicrob Agents* 9:269–280
13. Qu XD, Harwig SSL, Oren A, Shafer W, Lehrer RI (1996) Susceptibility of *Neisseria gonorrhoeae* to protegrins. *Infect Immun* 64:1240–1245
14. Weinberg A, Krisanaprakornkit S, Dale BA (1998) Epithelial antimicrobial peptides: review and significance for oral applications. *Crit Rev Oral Biol Med* 9:399–414

Dental Caries and Carbohydrates

虫歯と糖

今井 奨

Susumu Imai

国立保健医療科学院口腔保健部
埼玉県和光市南2-3-6Department of Oral Health, National Institute of Public Health
2-3-6, Minami, Wako-shi, Saitama 351-0197, Japan

Summary

Dental caries is defined as destructive phenomenon of tooth induced by direct action of oral bacteria and its metabolic products. A large number of observational studies have shown that there is close correlation between the level of sugar consumption and the prevalence and severity of dental caries. Diet may exert an effect on dental caries by reacting with enamel surface and by serving as a substrate for cariogenic bacteria. In this article, the relationship between dental caries and dietary sucrose is described according to the evidence concerning epidemiological studies and experimental medical studies including animal and human experiments. Interrelationship examined by systematic review between sucrose consumption and dental caries experience especially in modern age of fluoride exposure is also described. Cariogenicity of sucrose is usually explained by its two major

characteristics. Sucrose acts as substrate for sticky water-insoluble glucan production by glucosyltransferase of mutans streptococci, and as substrate for organic acid production by mutans streptococci and other oral bacteria. The prevention of dental caries by xylitol is extensively investigated using chewing gum, and the possibility in the prevention of dental caries induction is demonstrated. Recently, two functional carbohydrates, funoran and phosphoryl-oligosaccharide are developed in Japan. The chewing gums containing these functional carbohydrates are approved as "Hoods for specified health use" by the Ministry of Labour, Health and Welfare. These chewing gums promote remineralization of enamel. The caries preventive effect of these functional hoods should be examined in future research.

1. はじめに

虫歯（う蝕）は“微生物およびその分泌物の直接の作用によって生ずる歯質（硬組織）の崩壊現象”¹⁾と定義されるように、口腔内に棲息する微生物と深い関わりをもつ疾病であると同時に、口腔内微生物のエネルギー代謝、特に糖質代謝と深い関わりをもつ疾病といえる。糖質の中でも虫歯に関する因子として特にスクロースがよく知られている。科学的な証拠はなかったがrampant cariesの患者の食事にはしばしばスクロース含有食品が

含まれていたという特定のパターンが浮上ってきて、スクロースがう蝕の原因の“the arch criminal”つまり主要な犯人と表現されるようになってきた²⁾。本章では虫歯と糖、特にスクロースがどのような関係にあるのかを科学的な証拠を元に考えてみたい。

2. う蝕発症とスクロース

2-1. 疫学的証拠

う蝕は宿主因子、細菌因子、食餌因子が重複し、それ

がある程度長時間共存したときに発症するといわれている³⁾が、食餌因子の中でも特にスクロースがう蝕発症に深く関わることを検証するのに疫学研究は大いに役立った。図1は第二次世界大戦時にスクロース消費量が激減するのに比例して子供のう蝕罹患率が減少し、戦後スクロース消費が上昇するにつれう蝕罹患率も上昇して

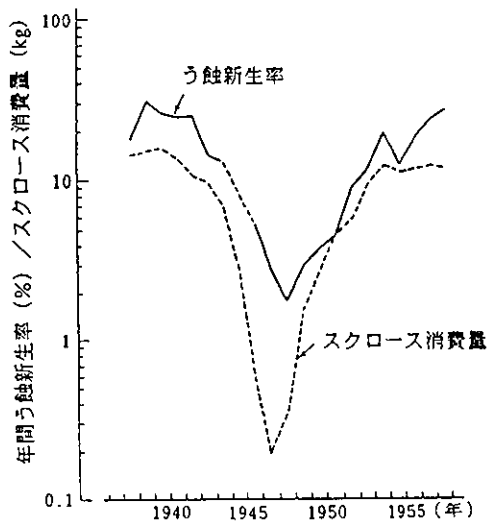


図1. 7~8歳の男児における年度別第一大臼歯年間う蝕新生率と年間スクロース消費量 (文献4より引用)

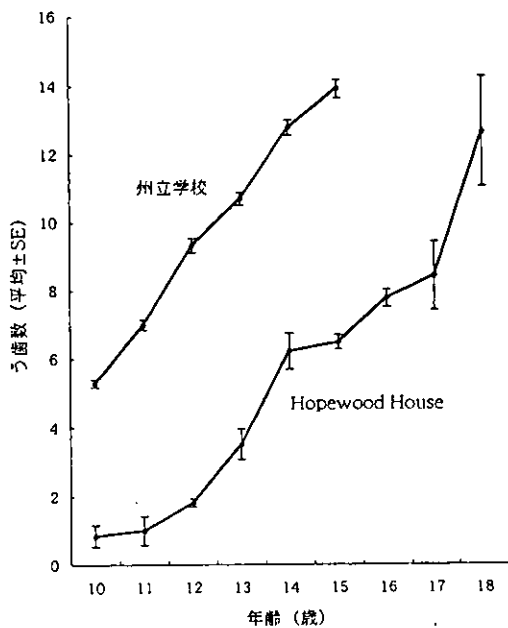


図2. Hopewood Houseと州立学校の子供のう蝕数の比較 (文献5より改変)

いる⁴⁾。このことがう蝕発症にスクロースが直接的に関与していることを必ずしも示すものではないが、う蝕発症がスクロース摂取量という環境要因によって影響を受けることを間接的に示唆するものである。

う蝕発症とスクロースの関係をより明確に示した疫学調査にオーストラリアの孤児院 Hopewood Houseでの調査⁵⁾がある。図2にみられるように、生後間もなくこの施設に預けられ、スクロースと精製した糖質を与えられずに育てられた孤児達のう蝕数は、州立学校に通う同年代の子供達のう蝕数よりも明らかに少なかった。10歳時では州立学校の生徒のう蝕数が5.28本に対して、施設の子供達のう蝕数は0.85本であった。15歳時でも州立学校での13.91本に対して施設では6.46本と約50%のう蝕数であった。もちろん施設の子供達に糖質が与えられなかったわけではなく、ジャガイモ、小麦、大豆等から必要な糖質は十分に確保されていた。その後、施設を出てスクロースを含んだ普通の食事になっていくと一般家庭の子供達と同様にう蝕数は急激に増加していく。この観察からスクロースの摂取がう蝕の発生に深く関わることを示されている。

これとほぼ同時期にスウェーデンのVipeholm 精神病院で行われた5年にわたる疫学研究は、DMF指数でみたう蝕の増加がスクロース摂取およびその摂取の仕方と深く関わることを如実に示した (図3)⁶⁾。標準食のみの対照群のほか、トフィー、チョコレート、キャラメル、パン、スクロースなどを追加摂取する群に分け、また、食事時にのみ摂取する時期と自由に摂取する時期を決めて各群のう蝕数の推移を調べた。その結果、標準食のみではう蝕の発生はごくわずかであったが、食間にスクロース含有のトフィー、チョコレート、キャラメルを摂取す

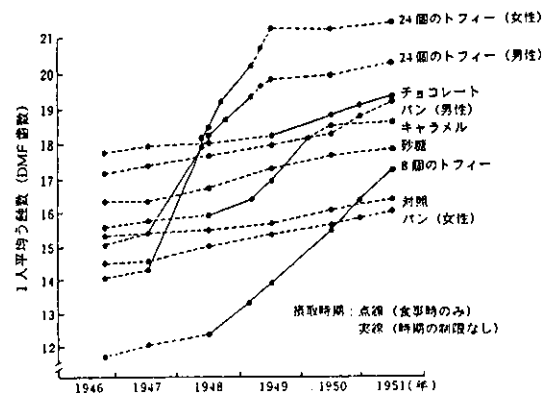


図3. スクロースの摂り方とう蝕の発生 [Vipeholm研究] (文献6より改変)

るとう蝕は急激に増加した。特にトフィーとキャラメルでの増加が顕著であった。同じおやつを食事時に定期的に摂取した群のう蝕の増加は緩やかなものであった。スクロースを食事時に摂取してもやはりう蝕の増加は緩やかであった。これらの結果から、う蝕発生はスクロースの摂取量そのものよりもスクロースを含有する食品の形態とその摂取時期に大きく影響されることが示された。

また、フィンランドのTurku市で、被験者の摂取する食品中の甘味料をすべてスクロース、フルクトース、またはキシリトールに置換して2年間のう蝕菌面数を追跡する大掛かりな調査が行われた⁷⁾ (図4)。スクロース摂取群とフルクトース摂取群では1年後にう蝕菌面数は同程度に増加したが、2年後にはスクロース群でさらに増加、フルクトース群で横ばいとなった。一方、キシリトール群では2年後でもう蝕菌面数の増加はほとんどみられなかった。この結果は、スクロースがう蝕の発生に密接に関与していること、スクロースを非発酵性のキシリトールに置換するとう蝕はほとんど発生しないことを端的に示していると同時に、う蝕予防における代用甘味料の有効性を示唆しており、代用甘味料開発の先駆けになったともいえる。

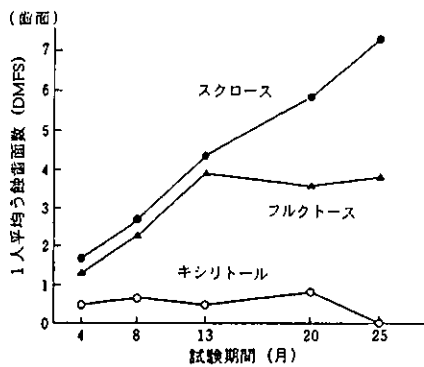


図4. 各糖質のう蝕誘発能の2年間にわたる調査【Turku Sugar研究】(文献7より改変)

2-2. 実験医学的証拠

疾病メカニズムを実験医学的に解明するには動物を用いた研究が有用かつ必要不可欠であり、う蝕においても例外ではない。特定の病原性微生物を持たないSPF (Specific pathogen-free) ラットにう蝕誘発性高スクロース食を与えてもう蝕は発生しないことが確かめられているが、SPFラットやハムスターにミュータンスレンサ球菌を感染させ、適当なう蝕誘発食を与えるとう蝕が発生することが知られている⁸⁾。う蝕誘発食で最も多く使われているのはKeyesらの開発した粉末飼料#2000⁹⁾である。この飼料はスクロースを56%含む高スクロース飼料である。

表1は主な口腔細菌によるスクロースの利用と実験う蝕誘発能を示している⁸⁾。口腔内の各種レンサ球菌、乳酸桿菌、真菌のCandidaなどはいずれもスクロースを利用(代謝)して酸を産生するが、これらの微生物のうち動物で明確な実験う蝕を誘発できるのは2種のミュータンスレンサ球菌 (*Streptococcus mutans*, *Streptococcus sobrinus*) のみである。

Shaw¹⁰⁾は糖質のう蝕誘発性に関する動物実験についての総説の中で、糖質のう蝕誘発能は動物種、年齢、う蝕の部位、口腔フローラ、食餌中の糖質のタイプなど種々の要因によって影響を受けるが、制御された口腔フローラの条件下では、ラットやハムスターにおいてスクロースのう蝕誘発性が他の糖質のう蝕誘発性よりも高いという報告が多いことを示している。また、Ooshima¹¹⁾はSPFラットを用いた実験で、*S. sobrinus*を感染させて、スクロース56%を含むう蝕誘発性飼料で55日間飼育すると明瞭なう蝕が観察されること、この飼料のスクロース部分を小麦粉に置換した対照の飼料ではスクロースの場合の7~8分の1以下の低う蝕スコアしか観察されないこと、スクロースを28%、17%と減らすと濃度依存的にう蝕スコアも減少すること、56%含まれるスクロ-

表1. 主な口腔細菌によるスクロースの利用と実験う蝕誘発能

微生物	スクロースの利用			う蝕誘発	
	酸産生	グルカン生成	菌の付着	裂溝部	平滑面
<i>S. mutans</i>	++	+++	+++	+++	++
<i>S. sobrinus</i>	++	+++	+++	+++	+++
<i>S. sanguis</i>	++	+++	±	±	-
<i>S. mitis</i>	++	-	±	±	-
<i>S. salivarius</i>	++	+++	-	±	-
乳酸桿菌	++	-	-	±	-
<i>Candida</i>	++	-	-	-	-

文献8より引用

スの一部あるいは半分をスクロースの構造異性体であるパラチノースまたはトレハロースで置き換えると、スクロースを56%含む飼料を与えた場合よりも明瞭にう蝕の発生が低下し、しかも小麦粉で置き換えた場合よりもう蝕スコアは減少することを示した。このようにミュータンスレンサ球菌感染ラットにおけるう蝕発生は飼料中のスクロースに強く関連していることがわかる。

上記の動物実験以外にもヒトによる *in vivo* 実験もある。被験者固有のアプライアンスを作製し、それにウシ・エナメル歯片を固定してヒトの口腔内に数日間装着し、糖質のう蝕誘発性を調べた報告がある¹³⁾。エナメル歯片をスクロースで処理すると明らかなエナメル質の脱灰が起こるが、イソマルトースでは脱灰が有意に低いことが示された。この場合の細菌源は被験者の口腔内フローラである。この方法の原法はKoulouridesら¹⁴⁾によってエナメル質の脱灰と再石灰化研究のために考案されたものである。被験者におけるエナメル質の脱灰度を歯片の硬度変化で評価する方法はICT (Intraoral cariogenicity test) と呼ばれており、糖質のう蝕誘発性の評価にも用いられる。彼らは被験者のアプライアンスにウシ・エナメル歯片を固定して1週間口腔内に装着し、実験前後のエナメル質硬度を測定した。歯片へのスクロース処理は口腔外で1日4回、10分間ずつ行った。対照のH₂O処理ではほとんど硬度変化は起こらなかったが、スクロース処理によりエナメル質の脱灰による明瞭な硬度低下が観察された。

以上のようにう蝕誘発とスクロースの関係を実験医学的に調べる際には動物やヒトを用いた *in vivo* の試験が有用であった。スクロース存在下で歯の実質欠損を誘発させたり、エナメル質歯片の脱灰を起こさせることにより、う蝕誘発におけるスクロースの役割をより直接的に検証できるからである。なお、う蝕発生の分子メカニズムの解明には *in vitro* の研究が不可欠であることはいうまでもない。

2-3. systematic reviewによる検証

糖質、特にスクロースがう蝕の誘発と進行に根本的に重要な役割を果たすことは多くの総説^{15)~17)}に報告されており、また前述のように疫学的または実験医学的検証でみられたように疑問の余地はない。しかし、近年の西欧においては1人当たりのスクロース消費量はあまり変化していないにも拘らず学童のう蝕罹患率は減少傾向にあり、また、米国においても1人当たりのスクロース消

費量は増加しているにも拘らず永久歯のう蝕罹患率は減少している。これらの原因は主にフッ化物の利用と口腔衛生の向上と考えられている^{18,19)}。フッ化物を中等度~高度に利用している国において、スクロース消費とう蝕リスクの関係がどのようになっているのかをsystematic reviewで検討した報告がある²⁰⁾。1980年から2000年までの英文論文で、キーワードとしてう蝕とのセットで、集団、糖、スクロース、フルクトース、グルコース、二糖類、単糖類、高フルクトースコーンシロップ、コーンシロップ、食経験、食餌インタビュー、食餌アンケート、甘味料、菓子、キャンデー、蜂蜜、スポーツドリンクを含む論文について検索した。用いたデータベースはMedlineとEMBASEである。最初に809論文が検索されたが、タイトルと要旨から不適切な論文を除いて134論文が残り、さらに除外/採用条件に合致する69論文を研究目的、被験者数など12項目からなるクオリティスコア (Max 100) で表した。最終的にスコア55以上の36論文について詳細に調べた。その結果、スクロース消費とう蝕発生との間に強い関連性の認められたのは2論文、中等度の関連性がみられたのは16論文、関連性がないか弱いのが18論文であった (表2)。以上より、フッ化物を中等度から高度に利用している国では、従来言われているよりもスクロース消費とう蝕発生との間の関連性が弱いことがわかった。しかし、半数の論文ではスクロース消費とう蝕発生との関連性が強い~中等度である。フッ化物を利用しているからスクロース消費について考慮しなくてよいというわけではない。依然としてスクロース消費をコントロールすることがう蝕予防にとって重要であることに変わりはない。とくにフッ化物を取り入れていない国ではなおさらである。

3. その他の糖質のう蝕誘発性

表3、表4はそれぞれ各種オリゴ糖の性状、各種糖アルコールの性状を示したものである²¹⁾。スクロースの構造異性体であるパラチノース、トレハロースは動物実験によってう蝕をほとんど誘発しないことが確かめられている²²⁾。カップリングシュガー、イソマルトオリゴ糖、パノースオリゴ糖は混在する発酵性糖質のため、スクロースよりも弱いながら実験動物にう蝕を誘発させる²³⁾。糖アルコールのソルビトール、マンニトールはミュータンスレンサ球菌によってごく緩やかに発酵されるが、そ

れ以外の糖アルコールは口腔内細菌によって発酵されな
は極めて低う蝕誘発性) であることが動物実験で確かめ
い。表4の糖アルコールはどれも非う蝕誘発性 (あるい
られている²¹⁾。

表2. フッ化物を使用している国のスクロース消費量とう蝕リスクの間の因果関係

歯列	研究デザイン	研究水準スコア	関係の強弱
永久歯	断面調査	60	中等度
永久歯	断面調査	72	弱い
永久歯	断面調査	62	弱い
永久歯	コホート調査	66	弱い
永久歯	断面調査	77	弱い
永久歯(根面う蝕)	症例	59	中等度
乳歯	断面調査	66	弱い
乳歯	コホート調査	59	中等度
永久歯	断面調査	74	中等度
乳歯	断面調査	63	弱い
乳歯	コホート調査	72	弱い
乳歯	コホート調査	70	強い
永久歯	断面調査	55	弱い
乳歯	断面調査	58	弱い
乳歯	断面調査	70	中等度
永久歯	断面調査	79	中等度
永久歯	断面調査	63	中等度
乳歯	断面調査	67	弱い
永久歯	コホート調査	67	中等度
永久歯	断面調査	68	弱い
永久歯	断面調査	55	弱い
永久歯	断面調査	72	弱い
永久歯	断面調査	64	弱い
乳歯	コホート調査	70	中等度
乳歯	コホート調査	60	中等度
乳歯	断面調査	58	中等度
永久歯(根面う蝕)	断面調査	61	中等度
永久歯	断面調査	65	強い
乳歯	コホート調査	57	中等度
永久歯	コホート調査	75	弱い
乳歯	断面調査	60	中等度
乳歯	断面調査	58	中等度
永久歯	断面調査	59	弱い
永久歯	コホート調査	66	弱い
乳歯	コホート調査	71	中等度
乳歯	コホート調査	59	弱い

【関係の強弱】強い：オッズ比(リスク比)=2.5以上、中等度：オッズ比(リスク比)=1.5~2.4、弱い：オッズ比(リスク比)=1.4以下(文献18より改変)

表3. 各種オリゴ糖の性状

	酸産生 基質	糖代謝 阻害	グルカン 生成基質	GTF阻害	う蝕誘発性	う蝕抑制	一過性 下痢	エネルギー値 (kcal/g)
スクロース	++	-	++	-	++	-	-	4
パラチノース	-	-	-	+	-	±	-	4
トレハロース	-	-	-	+	-	±	-	
トレハロース	(±)	-	-	±	(-)	-	-	4
キシロシルフルクトシド	(±)	-	-	++	(-)	(+)	-	
カップリングシュガー	+	-	±	+	±	±	-	4
インマルトオリゴ糖	+	-	-	+	±	±	-	3
パノースオリゴ糖	+	-	-	+	±	±	-	3

()は検討中を、空欄は不明を意味する

単糖類のグルコース、フルクトースは発酵性の糖質であるため、一度プラークが形成されてしまうとプラーク内で資化されてpHをエナメル質脱灰に十分な値にまで低下させる。グルコースのう蝕誘発性はスクロースに比べれば弱いながら実験動物にう蝕を発生させる。その割合はスクロースの約25%程度である²⁰⁾。また、サルやヒトでの研究の中には、スクロースとフルクトースの間、スクロースと異性化糖（グルコースとフルクトースの等量混合物）との間ではう蝕誘発性に差がないという報告もある²¹⁾。前述のTurku市でのヒトでの2年間の疫学研究でも1年目まではスクロースとフルクトースのう蝕誘発性に差はみられなかったが、2年目にはフルクトースの

う蝕誘発性はスクロースのその約1/2であった。

前出のKoulouridesら²²⁾はICT法により9種類の糖質のう蝕誘発性を調べた結果、キシリトールとキシロースは非う蝕誘発性であり、マンニトール、ソルビトール、乳糖、メリビオースは低う蝕誘発性であり、グルコース、フルクトース、ラフィノースはう蝕誘発性だとした。

以上のように、スクロース以外の発酵性糖質、あるいは発酵性糖質を含む混合糖はスクロースほど強くないにしても明らかにう蝕誘発性であるといえる。一方、糖アルコールのう蝕誘発性は一般に極めて低いと考えて差し支えないと思われる。

表4. 各種糖アルコールの性状

	酸産生	糖代謝 阻害	グルカン 生成	GTF 阻害	う蝕誘発性	再石灰化	一過性 下痢	最大無作用量 (g/kg体重)	エネルギー量 (kcal/g)
エリスリトール	-	-	-	-	-	-	-	0.66~0.80	0.3(0)
キシリトール	-	±	-	-	-	+	+	*	2.8~3.6(3)
ソルビトール	±	±	-	-	-	+	+	0.15~0.3	2.8~3.0(3)
マンニトール	±	-	-	-	-	+	+		2.0~2.1(2)
マルチトール	-	-	-	-	-	+	+	0.3	1.8~2.9(2)
バラチニット	-	-	-	-	-	-	+	0.3	1.2~1.6(2)

*適応が起ると1日あたり90g(約1.6g/kg体重)まで安全であるとされる

表5. 糖アルコールについての長期の疫学的臨床研究

試験地域	試験時期	期間(年)	キシリトール摂取量 (g/day)	う蝕発症の減少率 (対照群との比較)
フィンランド トウルク	1972~1974	2	67	キシリトール入り食事:85% フルクトース入り食事:30% (スクロース入り食事)
フィンランド トウルク	1973~1974	1	6.7	キシリトールガム:85% (スクロースガム)
旧ソ連 カザン共和国	1975~1977	2	30	キシリトール菓子:73% (スクロース菓子)
タイ(WHO)	1970年代後半	3	5~7	フッ素含有キシリトールガム :0.2% NaF洗口とほぼ同等の効果
フランス領ポリネシア(WHO)	1980年代初期	2.7	14~20	キシリトールガム:37% (非摂取)
ハンガリー(WHO)	1980年代前半	2~3	14~20	キシリトールガム:35~45% (フッ化物含有牛乳)
カナダ モントリオール	1980年代前半	1	3.4	キシリトールガム:54~59% (非摂取)
フィンランド ユリビエスカ	1982~1985	2~3	10	キシリトールガム:30~80% (非摂取)
ベリーズ共和国	1989~1993	2~3.3	4.3~9	100%キシリトール粒状ガム:71% (非摂取)
エストニア	1994~1997	2.3	5	キシリトール+マルチトール キャンデー:33~59% (非摂取)
		3	5	キシリトールガム:53.5% (非摂取)

4. ミュータンスレンサ球菌の糖代謝

スクロースのう蝕誘発性はミュータンスレンサ球菌のもつ2つの性質によって説明されている²⁰⁾。1つはミュータンスレンサ球菌がスクロースをGTF（グルコシルトランスフェラーゼ）の基質として利用し、粘着性の強い非水溶性グルカンを合成してバイオフィーム形成を促進することであり、もう1つはミュータンスレンサ球菌が細胞膜に存在する糖輸送系（ホスホエノールピルビン酸依存糖ホスホトランスフェラーゼ系：PTS）によってスクロースをリン酸化しながら細胞内に取り込み、一旦加水分解してからエムデン・マイヤー・ホフ経路を経て最終的には有機酸（乳酸、ギ酸、酢酸など）にまで代謝し、歯質の脱灰を起こすことである。

ミュータンスレンサ球菌は他の発酵性糖質（グルコース、フルクトース、マンノース、マルトースなど）もPTSによって細胞内に取り込み、スクロース同様、最終的には有機酸にまで代謝してプラークpHを低下させ、条件が整えば歯質の脱灰を惹起させる。しかし、これらの発酵性糖質はGTFの基質にはならない。その点でこれらの発酵性糖質のう蝕誘発性は一般にスクロースのもつう蝕誘発性よりも弱いと考えられている。

5. 糖質によるう蝕予防

スクロースの代わりにう蝕誘発性のない（またはごく弱い）代用甘味料を用いてう蝕を予防することが可能かどうかを調べた研究がある²¹⁾。表5はキシリトールについての長期の疫学的臨床研究の結果を改変してまとめたものである。この中には前述のTurku市での調査も含まれている。表から分かるように、キシリトールに関しては1970年代前半から1990年代後半まで継続的に調査が行われてきた。食事の甘味料を全てキシリトールに置換した研究のほか、キシリトール含有チューインガムを摂取する研究、キシリトール菓子やキシリトールキャンデーを摂取する研究などである。1年～3.3年の長期間摂取し、う蝕発症の減少率を対照群と比較している。その結果、キシリトール含有食品の摂取によりう蝕発症が30～85%減少しており、う蝕予防におけるキシリトールの有効性が示されている。

キシリトールをラットに摂取させた研究でも対照群に対するう蝕減少率は25～100%であった²²⁾。

以上の結果は食品中にキシリトールを用いることによってう蝕の発生を予防できることを示唆している。

近年、日本において再石灰化能のある糖質食品素材が2種開発され、実際にそれらを含んだガムが創出され、厚生労働省許可の特定保健用食品として市販されている²³⁾。2種の食品素材とは、1つは紅藻フクロノリから抽出されたフノランという多糖類であり、もう1つは馬鈴薯でんぷんから調製されたリン酸化オリゴ糖である。エナメル質再石灰化能をもつキシリトールをベースとしてフノランとリン酸一水素カルシウムを含むチューインガムからの抽出液は、あらかじめ表層下脱灰させたエナメル質歯片の再石灰化を促進することが示された²⁴⁾。また、やはりキシリトールをベースとして馬鈴薯でんぷんの加水分解産物でリン酸化されたオリゴ糖のカルシウム塩を含むチューインガムを摂取し、そのときの唾液に表層下脱灰させたエナメル質歯片を浸漬するとエナメル質の再石灰化が促進されること²⁵⁾、また、同チューインガムを摂取するとヒト口腔内に装着した脱灰エナメル歯片の再石灰化が促進されることが示された²⁶⁾。これら2種の糖質の再石灰化作用のメカニズムはまだ十分に解明されていないが、いずれもカルシウムを可溶化する作用をもつので、これらの糖質はカルシウムイオンと結合することにより、カルシウムがリン酸と沈殿物を形成してしまうのを防ぎ、脱灰部位へカルシウムを運ぶと推察されている。

上記2種のチューインガムは機能性糖質を含む食品として2001年と2003年にそれぞれ特定保健用食品に許可されたが、これらとは別に再石灰化促進作用をもつペプチドを含むチューインガムも2000年に特定保健用食品として許可されている。このチューインガムは牛乳に含まれるカゼイン由来のカゼインホスホペプチド（CPP）と非結晶性リン酸カルシウムの複合体²⁷⁾を再石灰化促進因子として含んでいる。現在までに再石灰化を促す食品として特定保健用食品に許可されているのは3種の食品であるが、異なる構造をもつ糖質とペプチドが同じ機能を発揮しており、今後さらに別の再石灰化促進食材が開発されてくる可能性は高い。

しかし、これら再石灰化促進作用をもつ食品がう蝕予防にどれだけ貢献できるかはまだ調査されていない。今後その点の検討が必要である。

引用文献

- 1) 荒谷真平, "口腔生物学序説—通歴と思索から—", 医歯薬出版, 1980, pp. 299-304.
- 2) E. Newbrun, Substrate:diet and caries, "Cariology". E. Newbrun(ed), The Williams & Wilkins Company, 1978, pp. 76-96.
- 3) E. Newbrun, Current concepts of caries etiology, "Cariology", E. Newbrun(ed), The Williams & Wilkins Company, 1978, pp. 15-43.
- 4) 竹内光春, 歯科学報, 59, 67-74, 219-223, 324-327(1959).
- 5) R. Harris, *J. Dent. Res.*, 42, 1387-1399(1963).
- 6) B. Gustafsson, *Acta Odontol. Scand.*, 11, 232-364(195).
- 7) A. Scheinin and K.K. Mäkinen, *Acta Odontol. Scand.*, 33 (suppl 70), 1-351(1975).
- 8) 浜田茂幸, う蝕の病因論, "う蝕細菌の分子生物学 研究の成果と展望", 武笠英彦(監), クインテッセンス出版, 1997, pp. 38-45.
- 9) P. H. Keyes, *J. Dent. Res.*, 37, 1088-1099(1958).
- 10) J. H. Shaw, *J. Dent.*, 11, 209-213(1983).
- 11) T. Ooshima, A. Izumitani, T. Minami, T. Fujiwara, Y. anakajima and S. Hamada, *Caries. Res.*, 25, 277-282(1991).
- 12) T. Nisizawa, S. Imai, T. Furuta, K. Shibata, K. Takeuchi, S. Yshida, T. Ishii, S. Araya and M. Hinoide, *Jpn. J. Oral Biol.*, 28, 109-119(1986).
- 13) T. Koulourides, R. Bodden, S. Keller, L. Manson-Hing, J. Lastra and T. Housch, *Caries. Res.*, 10, 427-441(1976).
- 14) B. G. Bibby, *J. Am. Dent. Assoc.*, 90, 121-132(1975).
- 15) S. Hamada and H. D. Slade, *Microbiol. Rev.*, 44, 331-384(1980).
- 16) A. J. Rugg-Gunn and W. M. Edgar, *Community Dent. Health.*, 1, 85-92(1984).
- 17) T. A. B. Sanders, *Caries. Res.*, 38(Suppl 1), 3-8(2004).
- 18) B. A. Burt and S. Pai, *J. Dent. Edu.*, 65, 1017-1023(2001).
- 19) 今井奨, むし菌予防と代用甘味料, "イラストでみるこれからのむし菌予防 キシリトールとアバタイトを正しく理解する", 花田信弘(監), 砂齋房, 1997, pp. 5-26.
- 20) 大島隆, 浜田茂幸(編), "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", 医歯薬出版, 1996.
- 21) C. van Loveren, *Caries. Res.*, 38, 286-293(2004).
- 22) 山田正, 食品新素材フォーラム, 5, 37-48(1996).
- 23) 今井奨, 日本歯科評論, 668, 51-62(1998).
- 24) カウコ K マキネン, 鈴木章, 福田雅臣, "キシリトールのすべて", 日本フィンランド虫歯予防研究会, 1997.
- 25) A. Bar, *Wld. Rev. Nutr. Diet.*, 55, 183-209(1988).
- 26) 今井奨, 日本歯科評論, 63(9), 13-15(2003).
- 27) 佐伯洋二, 歯科基礎医学会雑誌, 42, 590-600(2000).
- 28) H. Kamasaka, D. Inaba, K. Minami, T. Nishimura, T. Kuriki, S. Imai and M. Yonemitsu, *J. Dental Health*, 52, 105-111(2002).
- 29) D. Inaba, H. Kamasaka, K. Minami, T. Nishimura, T. Kuriki, S. Imai and M. Yonemitsu, *J. Dental Health*, 52, 112-118(2002).
- 30) E. C. Reynolds, C. J. Cain, F. L. Webber, C. L. Black, P. F. Riley, I. H. Johnson and J. W. Perich, *J. Dent. Res.*, 74, 1272-1279(1995).

【食品による齲蝕予防】

Prevention of Dental Caries by Functional Foods

今井 奨

Imai Susumu

Key words

Dental caries, Functional food, Sucrose, Sugar substitute, Xylitol

Abstract

齲蝕は多因子性疾患であり、その発症には宿主因子、食餌因子、細菌因子、時間因子が関わっている。食餌因子のなかでも特にスクロースの役割は大きい。スクロース含有食品をコントロールすれば完全とはいかないまでも齲蝕を制御できる可能性はある。スクロースの齲蝕誘発性、代用甘味料の齲蝕誘発性について考え、食品による齲蝕予防という概念が実際に有効であるかを考察した結果、キシリトールをはじめとする糖アルコールを中心とした非齲蝕誘発性甘味料配合の食品を上手に摂取することにより齲蝕を幾分かは予防できる可能性が示された。我が国では特定保健用食品の制度が導入され、食品によって疾病を予防しようとする動きが活発になってきており、再石灰化を促進するような機能性食品も創出されて特定保健用食品として許可されている。今後は新機能の再石灰化促進作用をもつ食品群が齲蝕予防にどれだけ貢献できるか、臨床試験等での調査が期待される。

はじめに

キシリトールが日本で食品添加物として厚生省(当時)に認可されたのが1997年4月である。それを4半世紀ほどさかのぼる1970年代初頭にはすでにスウェーデンのTurku市で大掛かりなキシリトールについての疫学研究が始まっていた。食品中のスクロースをすべてキシリトールに置き換えて、2年間にわたり齲蝕歯面数を追跡調査したものである。結果は明らかで、スクロース群の齲蝕歯面数が増加の一途を辿るのに対してキシリトール群では新たな齲蝕歯面はほとんど観察されなかった。この結果は、スクロースが齲蝕発生と密接に関連していること、スクロースを非発酵性の代用甘味料キシリトールに置き換えると齲蝕はほとんど発生しないことを如実

に示しており、その後の代用甘味料研究の端緒となったともいえる。

齲蝕は多因子性疾患であり、その発症には宿主因子、食餌因子、細菌因子、時間因子が関わっている¹⁾。特に食餌因子のなかでもスクロースの役割は大きい。したがって、食品をコントロールすれば完全とはいかないまでも齲蝕を制御できる可能性はある。本稿では、はじめにスクロースの齲蝕誘発性、代用甘味料の齲蝕誘発性に触れ、食品による齲蝕予防という概念が実際に有効であるのかについて考えてみたい。

1. スクロースの齲蝕誘発性

スクロースの齲蝕誘発性は多くの証拠によってゆるぎないものになっている。たとえば証拠の一つに疫学調査がある²⁾。我国の一人当たりの年間スクロース消費量が第2次世界大戦時に激減するのに呼応して子供の齲蝕罹患率が激減し、戦後スクロース消費量が増加するとそれに伴って齲蝕罹患率も増加している。これは間接的な証拠で、これをもって直ちにスクロースと齲蝕の関係を結論づけることはできないが、齲蝕がスクロース消費量という環境要因によっても影響されることを示唆するものである。スクロースと齲蝕の関係をより直接的に明らかにした調査にオーストラリアの孤児院Hopewood Houseでの研究、スウェーデンのVipeholm精神病院での研究、前出のスウェーデンのTurku市での研究などがある。これらはいずれもヒト被験者による複数年にわたる特定の食品の摂取により齲蝕歯数、あるいは齲蝕歯面数がどのように変化していくかを調べたものである。スクロースを多く含んだ食品を摂取したグ

グループでは齲蝕の増加が顕著であるが、スクロースを含まない食品を摂取したグループでの齲蝕発生は非常に低いことが示された。また、Vipeholm研究で示唆されたように、同じスクロース含有おやつを摂取するにしても3度の食事時に食べた方が食間の自由な時間に食べるよりも齲蝕の発生が少ないこともわかった。齲蝕予防には何を食べるかも重要であるが、どのように食べるか、摂取方法も重要であることが示唆された。事実、Weissら³⁾は、就学前の5～6歳児について調べ、スナックなどを間食する回数が増えるほど、齲蝕数が増えることを示している(図)。動物実験においても齲蝕誘発食をラットに規則的に与えた方が自由に食べさせた場合より齲蝕スコアが有意に低いことが報告されている⁴⁾。

スクロースの齲蝕誘発性は実験動物による検討⁵⁾やヒト被験者によるIntraoral Cariogenicity Test⁶⁾でも確かめられている。

スクロースが齲蝕誘発性を発揮するメカニズムは次のように理解されている⁷⁾。スクロースは齲蝕原性細菌のミュータンスレンサ球菌をはじめとする口腔内細菌表層に存在する糖輸送系によって菌体内に取り込まれ、EM経路を経由して最終的にはエナメル質脱灰性の乳酸、ギ酸、酢酸などの有機酸に代謝されると同時に、ミュータンスレンサ球菌のグルコシルトランスフェラーゼ(GTF)の基質となって粘着性の強い非水溶性グルカンへと変換され、バイオフィーム形成を促進する。スクロースはこの2つの性状により齲蝕誘発性を発揮すると考えられている。

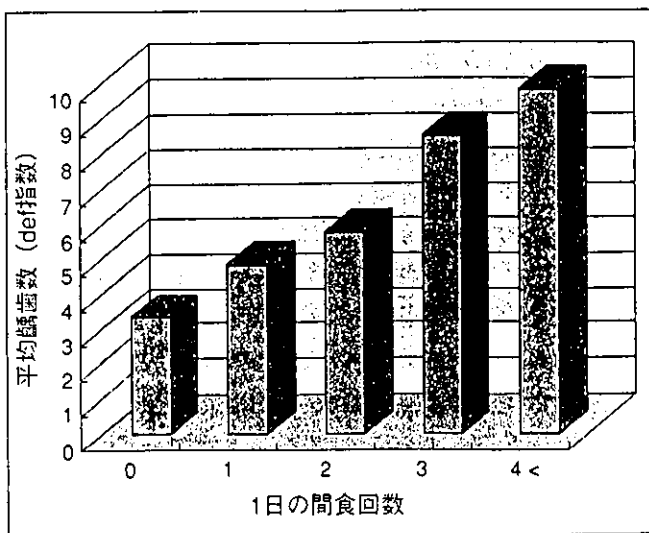


図 1 1日の間食回数と平均齲蝕数との関係

2. 代用甘味料の齲蝕誘発性

代用甘味料には合成品、単糖、オリゴ糖、糖アルコール、その他と多数知られているが、特にオリゴ糖、糖アルコールに重要なものが多い。オリゴ糖のパラチノース、トレハロースは酸産生基質にもグルカン生成基質にもならず、GTF阻害活性をもち、齲蝕誘発性をもたない。カップリングシュガー、イソマルトオリゴ糖、パノースオリゴ糖はいくつかの糖質の混合物でGTF阻害活性をもつが発酵性糖質も含んでいるのでスクロースより弱い酸産生基質になり、弱い齲蝕誘発性をもつ。一方、糖アルコールのエリスリトール、キシリトール、ソルビトール、マンニトール、マルチトール、パラチニットはいずれもグルカン生成基質にならず、齲蝕誘発性をもたない。ソルビトール、マンニトールを除いて酸産生基質にもならない。ソルビトール、マンニトールはミュータンスレンサ球菌に利用されて酸を産生するがその速度は非常に遅い。キシリトール、ソルビトール、マンニトール、マルチトールには再石灰化作用が報告されている。

3. キシリトール含有食品による齲蝕予防

ラットに *Streptococcus mutans*, または *S. mutans* と *Actinomyces viscosus* を植菌して主食にスクロース含有食を与え、間食にスターチ、またはスクロース含有食を与えた群を対照とし、間食にキシリトール含有食を与えた群と比較した多くの研究では、キシリトール群に25～95%の齲蝕抑制が観察されている⁸⁾。

表1はキシリトールの長期疫学臨床研究の結果を示している。1970年代前半から1990年代後半まで継続して調査が行われてきた。前述のTurku市での調査のように食事に含まれる甘味料をすべてキシリトールに置き換えた研究、あるいはキシリトール菓子を摂取する研究、キシリトール含有チューインガムを摂取する研究、キシリトール入り粒状ガムを摂取する研究などが北欧、東南アジア、旧ソ連、北米などで1～3.3年の長期にわたり行われた。その結果、キシリトール入り食事摂取群では対照のスクロース入り食事摂取群に比べ2年間に約85%の齲蝕発症の減少が観察された。キシリトール入りガム摂取の場合には対照を非摂取群とすると、30～80%の

表1 キシリトールに関する長期の疫学的臨床研究

試験地域	試験時期	期間 (年)	齲蝕発症の減少率 (対照群との比較)
フィンランド トゥルク	1972-1974	2	キシリトール入り食事: 85% フルクトース入り食事: 30% (スクロース入り食事)
フィンランド トゥルク	1973-1974	1	キシリトールガム: 85% (スクロースガム)
旧ソ連 カザン共和国	1975-1977	2	キシリトール菓子: 73% (スクロース菓子)
タイ (WHO)	1970年代後半	3	フッ素含有キシリトールガム: 0.2% NaF 洗口とほぼ同等の効果
フランス領ポリネシア (WHO)	1980年代初期	2.7	キシリトールガム: 37% (非摂取)
ハンガリー (WHO)	1980年代前半	2.3	キシリトールガム: 35-45% (フッ化物含有牛乳)
カナダ モントリオール	1980年代前半	1	キシリトールガム: 54-59% (非摂取)
フィンランド ユリビエスカ	1982-1985	2.3	キシリトールガム: 30-80% (非摂取)
ペリイズ共和国	1989-1993	2.3.3	100%キシリトール粒状ガム: 71% (非摂取)
エストニア	1994-1997	2.3	キシリトール+マルチトールキャンデー: 33-59% (非摂取)
		3	キシリトールガム: 53.5% (非摂取)

減少率が、また、対照をスクロース入りガム摂取群とすると、85%の減少率が観察されている。キシリトール菓子摂取群はスクロース菓子摂取群に比べ73%の齲蝕の減少率を示した。また、フッ素含有キシリトールガム摂取は0.2% NaF 洗口とほぼ同等の齲蝕抑制効果を示すことが示された。このように、スクロース含有食品を対照とすると大きな齲蝕発症減少率(73～83%)が得られており、非摂取群を対照とした場合でも研究によりその減少率には幅(30～80%)があるが、いずれの研究でもキシリトール含有食品の摂取により対照よりも顕著に齲蝕発症を抑制することが示唆されている。

van Loveren²¹⁾は糖アルコールの齲蝕予防効果、齲蝕治療効果についての総説の中で、糖アルコールの種類を問わず1日3回以上シュガーレスガムを噛むことにより齲蝕罹患率が低減すること、ポリオール(糖アルコールはこの仲間にはいる)含有ガムまたはポリオール含有キャンデーの齲蝕予防効果はポリオール自身の効果よりも噛むプロセスによって唾液分泌を促すことが効果につながると述べている。ただし、糖アルコールの再石灰化作用は示唆されているが臨床試験では明確ではなく、糖アルコールの齲蝕治療効果については証拠なしとしている。

4. 機能性食品による齲蝕予防

近年、厚生労働省許可の特定保健用食品として再石灰化作用をもつチューインガムが3種市販されている²²⁾。日本で開発された機能性食品素材であり、

紅藻フノリから抽出されたフノランまたは馬鈴薯デンプンから調製されたリン酸化オリゴ糖を含むガム、およびオーストラリアで牛乳から調製された食品素材のカゼインホスホペプチド(CPP)を含むガムである(表2)。エナメル質再石灰化能をもつキシリトールをベースとしてフノランとリン酸—水素カルシウムを含むチューインガムからの抽出液は、あらかじめ表層下脱灰させたエナメル質歯片の再石灰化を促進することが示されている。また、リン酸化オリゴ糖カルシウム塩を含むチューインガムもキシリトールをベースとしており、これを摂取したときに得られる唾液に表層下脱灰させたエナメル質歯片を浸漬するとエナメル質の再石灰化が促進されること、また、ヒト口腔内に装着した脱灰エナメル歯片の再石灰化も同チューインガムを摂取することにより促進されることが示されている。また、CPPは非結晶性リン酸カルシウムの共存下で複合体を形成するが、キシリトールをベースとしてこの複合体を含むガムも脱灰エナメル歯片の再石灰化を促進することが観察されている。

これら3種のガムの再石灰化作用のメカニズムはまだ十分に解明されていないが、いずれもカルシウムを可溶化する作用をもつので、それぞれの機能性素材はカルシウムイオンと結合することにより、カルシウムがリン酸と沈殿物を形成してしまうのを防ぎ、脱灰部位へカルシウムを運ぶ役割をもつと推定されている。上記ガムを含め歯科関連の特定保健用食品は現在31品目で、まだ特定保健用食品の総数の6.5%にすぎない。