

図1 高血圧自然発症ラット (SHR) の収縮期血圧 (A) および拡張期血圧 (B) に及ぼすイチョウ葉エキス (GBE) 長期経口摂取の影響

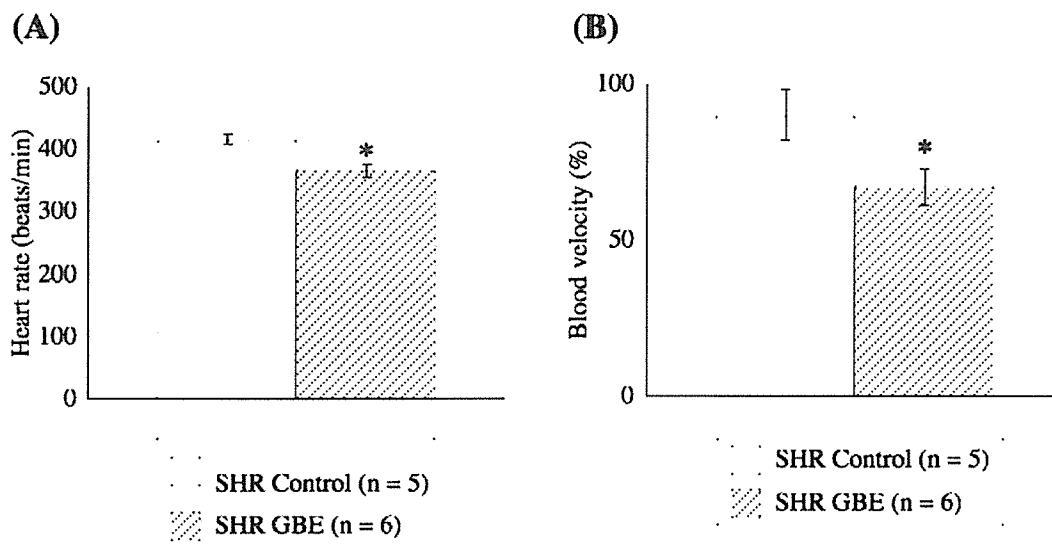


図2 高血圧自然発症ラット (SHR) の心拍数 (A) および血流速度 (B) に及ぼすイチョウ葉エキス (GBE) 長期経口摂取の影響 \* $P < 0.05$  vs. Control.

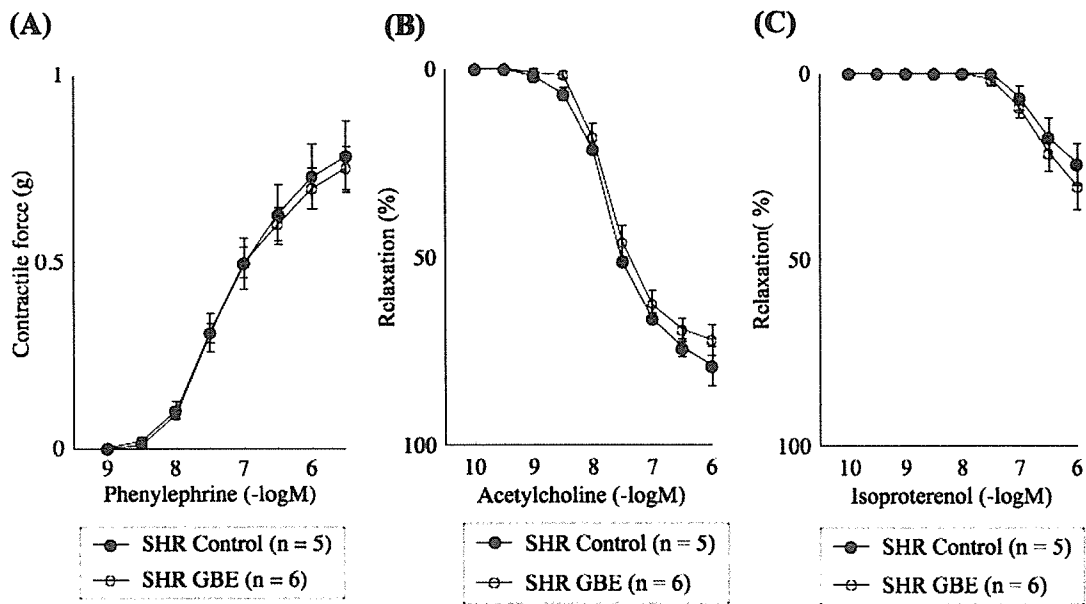


図 3 イチョウ葉エキス (GBE) 長期経口摂取した高血圧自然発症ラット (SHR) の摘出胸部大動脈標本におけるフェニレフリンに対する収縮反応 (A) およびアセチルコリン (B) またはイソプロテレノール (C) に対する弛緩反応

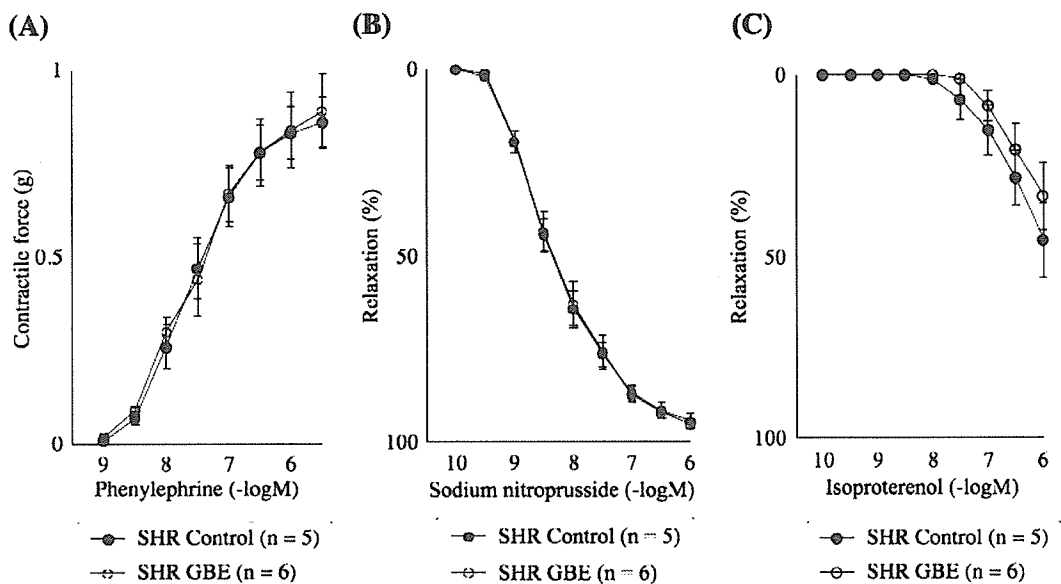


図 4 イチョウ葉エキス (GBE) 長期経口摂取した高血圧自然発症ラット (SHR) の摘出胸部大動脈標本におけるフェニレフリンに対する収縮反応 (A) およびニトロプルシドナトリウム (B) またはイソプロテレノール (C) に対する弛緩反応 (内皮細胞除去標本)

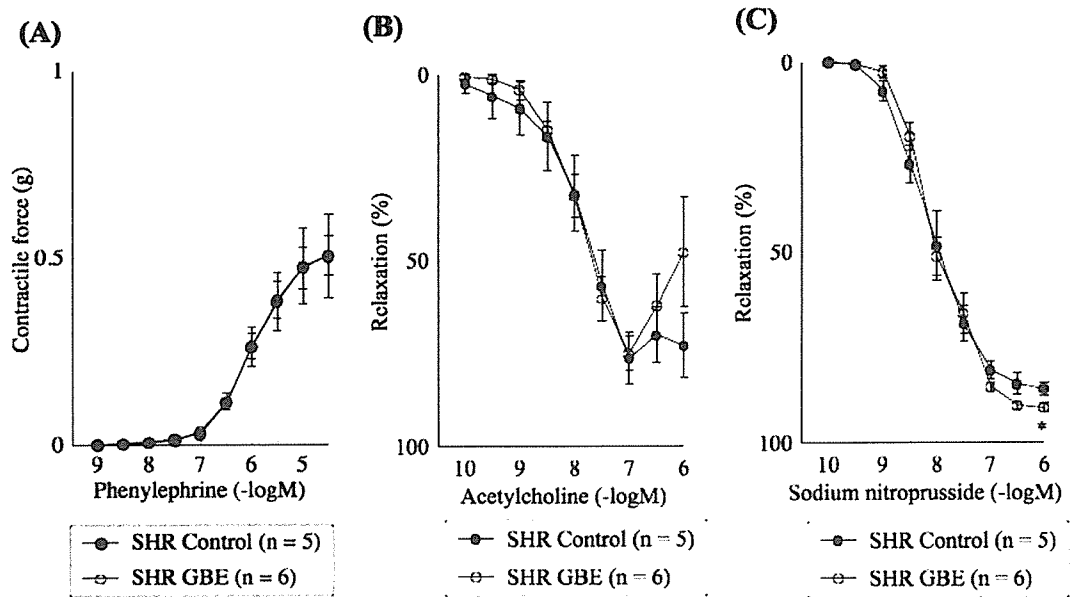


図 5 イチョウ葉エキス (GBE) 長期経口摂取した高血圧自然発症ラット (SHR) の摘出腸間膜動脈標本におけるフェニレフリンに対する収縮反応 (A) およびアセチルコリン (B) またはニトロプルシドナトリウム (C) に対する弛緩反応 \* $P < 0.05$  vs. Control.

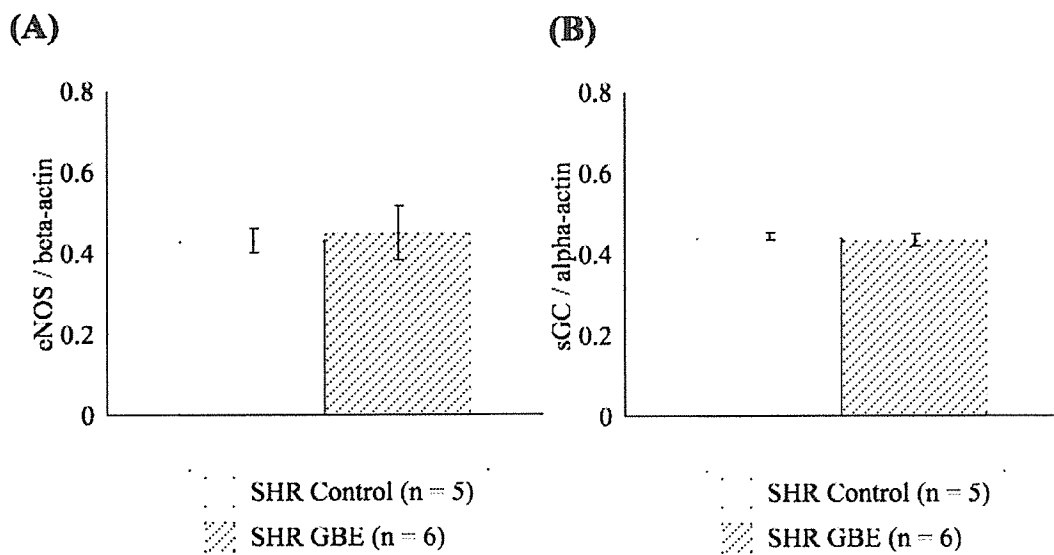


図 6 イチョウ葉エキス (GBE) 長期経口摂取した高血圧自然発症ラット (SHR) の胸部大動脈における内皮型 NO 合成酵素 (A) および可溶性グアニル酸シクラーゼ (B) 蛋白発現量

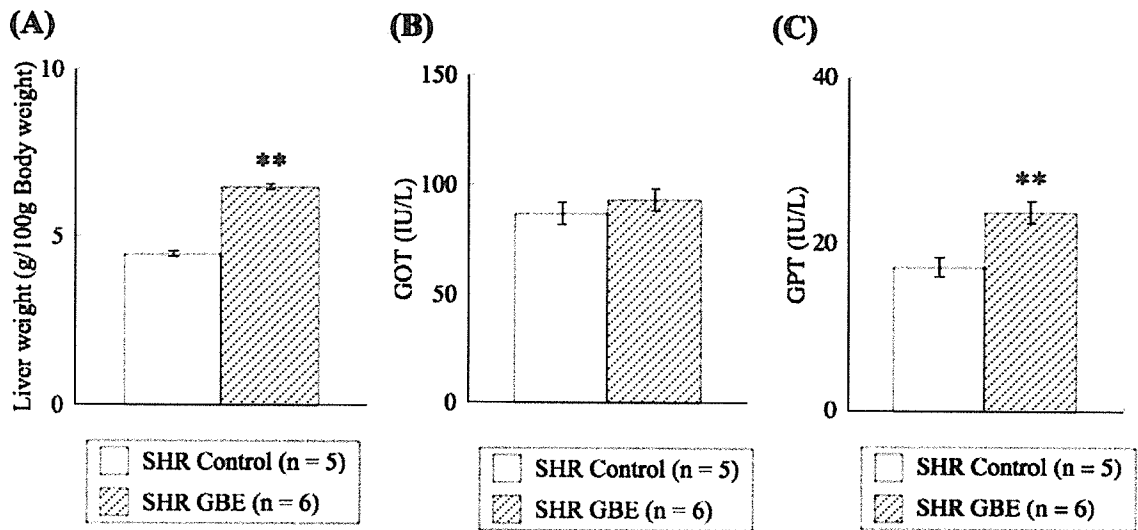


図7 イチョウ葉エキス (GBE) 長期経口摂取した高血圧自然発症ラット (SHR) の肝相対重量 (A) および血清中 GOT (B) または GPT 値 (C) \*\*P<0.01 vs. Control.

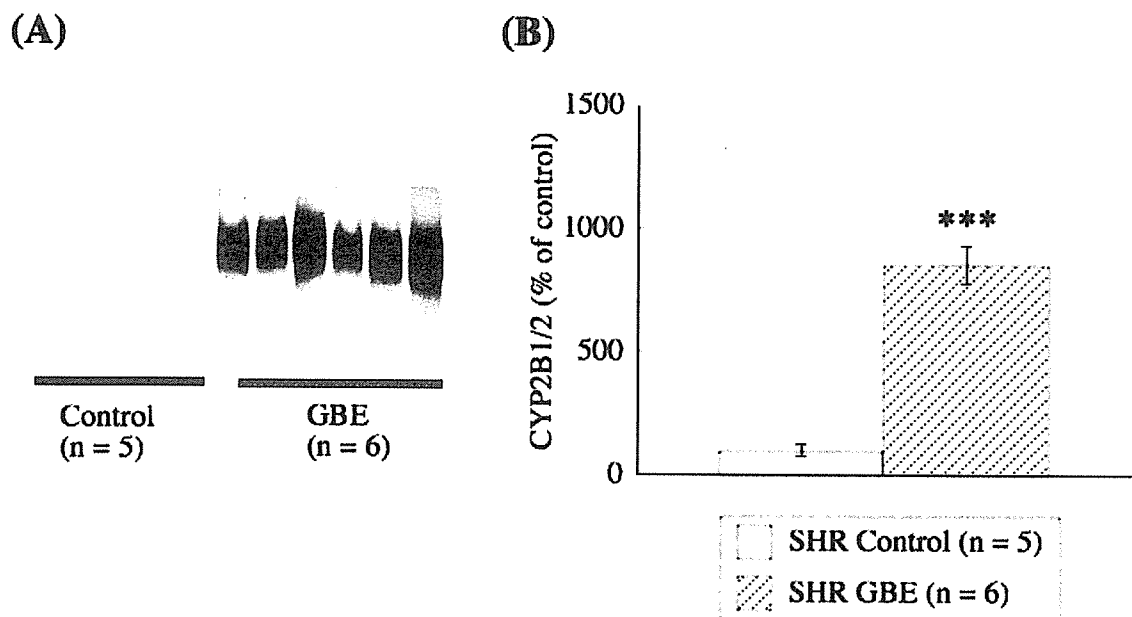


図8 イチョウ葉エキス (GBE) 長期経口摂取した高血圧自然発症ラット (SHR) の肝ミクロソーム中 CYP2B1/2 蛋白発現量 \*\*\*P<0.0001 vs. Control.

表 1 イチョウ葉エキス (GBE) 長期経口摂取した高血圧自然発症ラット (SHR) の血清中各種パラメータ

	Control	0.5% GBE
<i>Serum lipid</i>		
Total-Cholesterol (mg/dL)	139.36 ± 8.75	107.76 ± 2.36**
HDL-Cholesterol (mg/dL)	61.30 ± 1.86	68.29 ± 2.34*
Total-protein (g/dL)	6.36 ± 0.20	6.17 ± 0.09
Albmine (g/dL)	4.12 ± 0.10	4.04 ± 0.09
Globulin (g/dL)	2.24 ± 0.28	2.14 ± 0.23
A / G	1.97 ± 0.29	1.93 ± 0.14
Glucose (mg/dL)	203.34 ± 9.81	164.17 ± 7.97*

\*, \*\* P<0.05, 0.01 vs. Control.

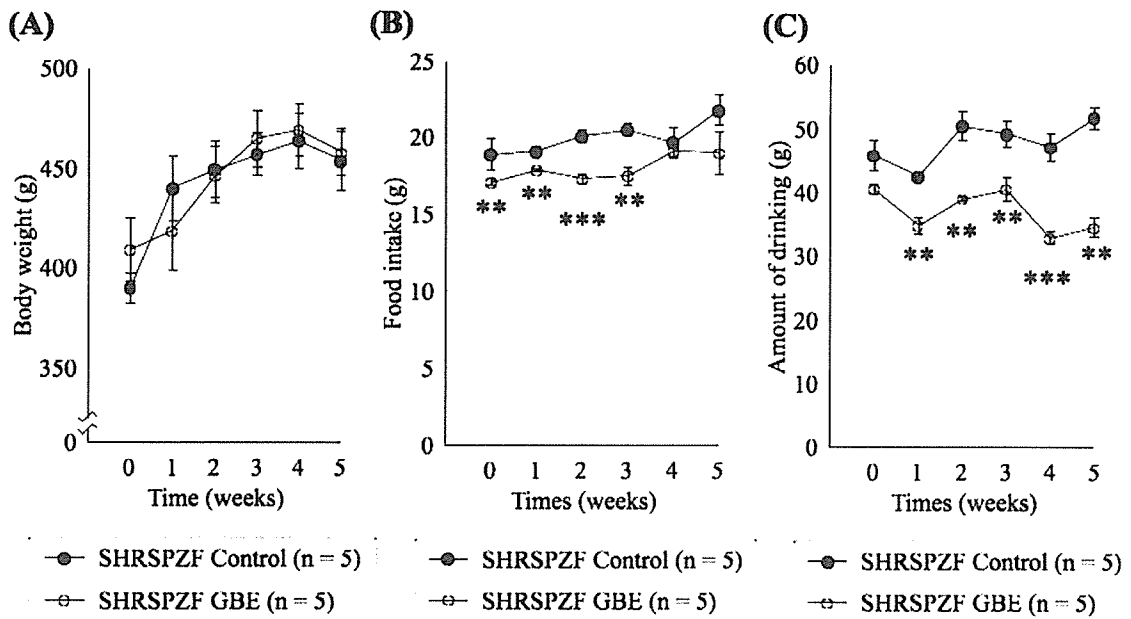


図 9 脳卒中易発性生活習慣病ラット (SHRSPZF) の体重変化 (A)、1日摂餌量 (B) および1日飲水量 (C) に及ぼすイチョウ葉エキス (GBE) 長期経口摂取の影響 \*\*P<0.01 vs. Control, \*\*\*P<0.0001 vs. Control.

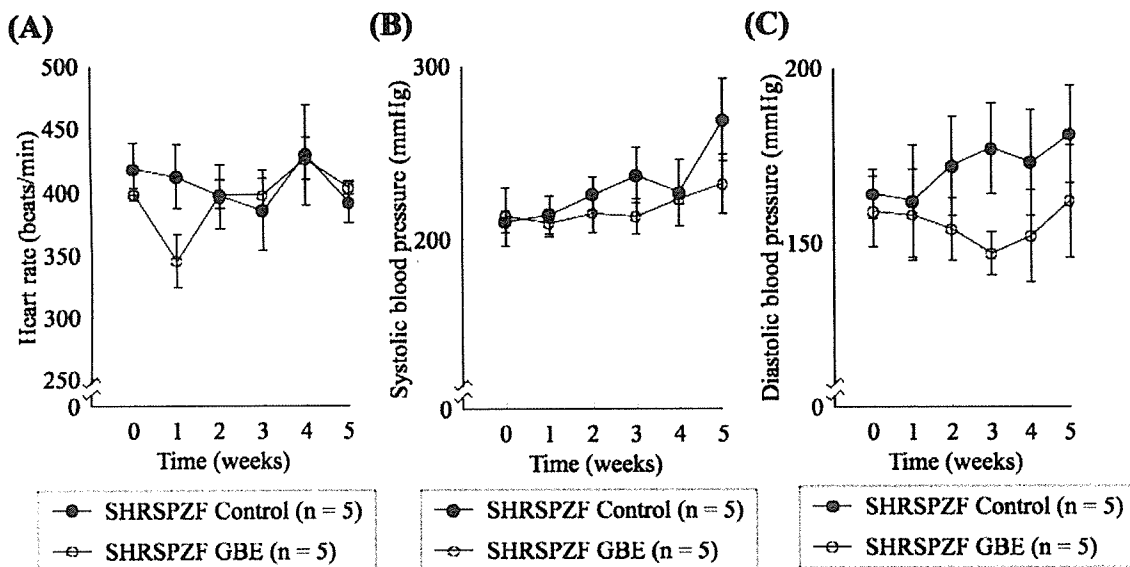


図10 脳卒中易発性生活習慣病ラット (SHRSPZF) の心拍数 (A)、収縮期血圧 (B) および拡張期血圧 (C) に及ぼすイチョウ葉エキス (GBE) 長期経口摂取の影響

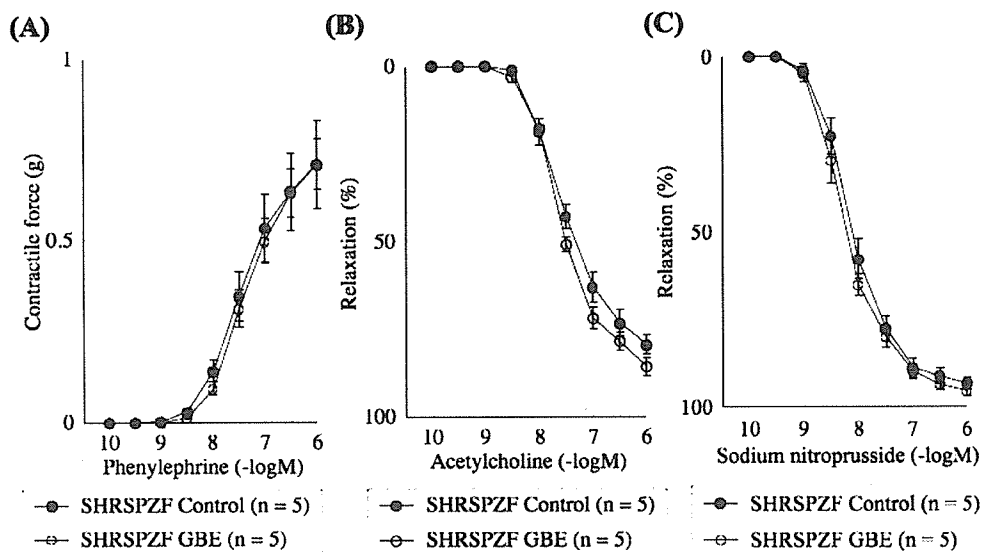


図11 イチョウ葉エキス (GBE) 長期経口摂取した脳卒中易発性生活習慣病ラット (SHRSPZF) の摘出胸部大動脈標本におけるフェニレフリンに対する収縮反応 (A) およびアセチルコリン (B) またはニトロプルシッドナトリウム (C) に対する弛緩反応

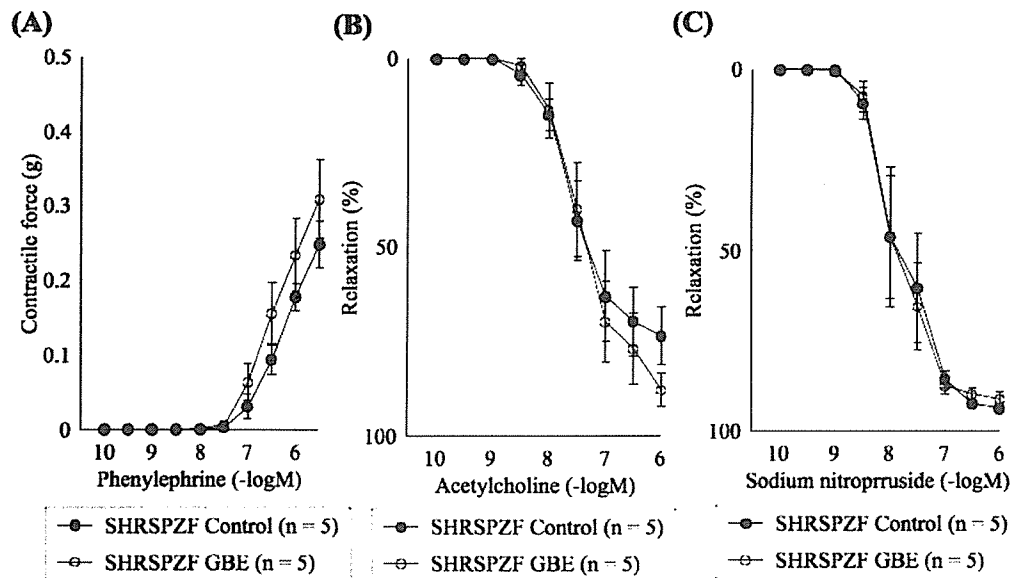


図12 イチョウ葉エキス(GBE)長期経口摂取した脳卒中易発性生活習慣病ラット (SHRSPZF) の摘出腸間膜動脈標本におけるフェニレフリンに対する収縮反応 (A) およびアセチルコリン (B) またはニトロプルシッドナトリウム (C) に対する弛緩反応

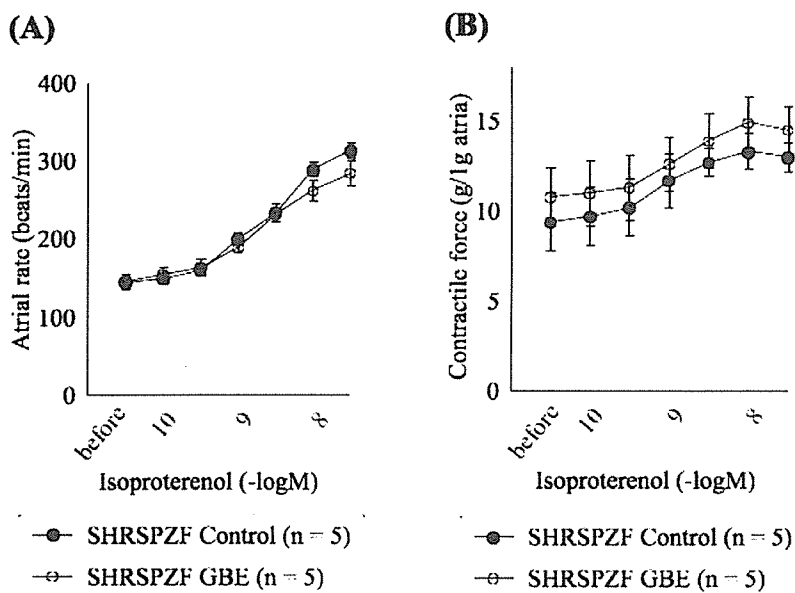


図13 イチョウ葉エキス(GBE)長期経口摂取した脳卒中易発性生活習慣病ラット (SHRSPZF) の摘出心房標本におけるイソプロテレノールに対する心拍数変化 (A) および収縮反応 (B)

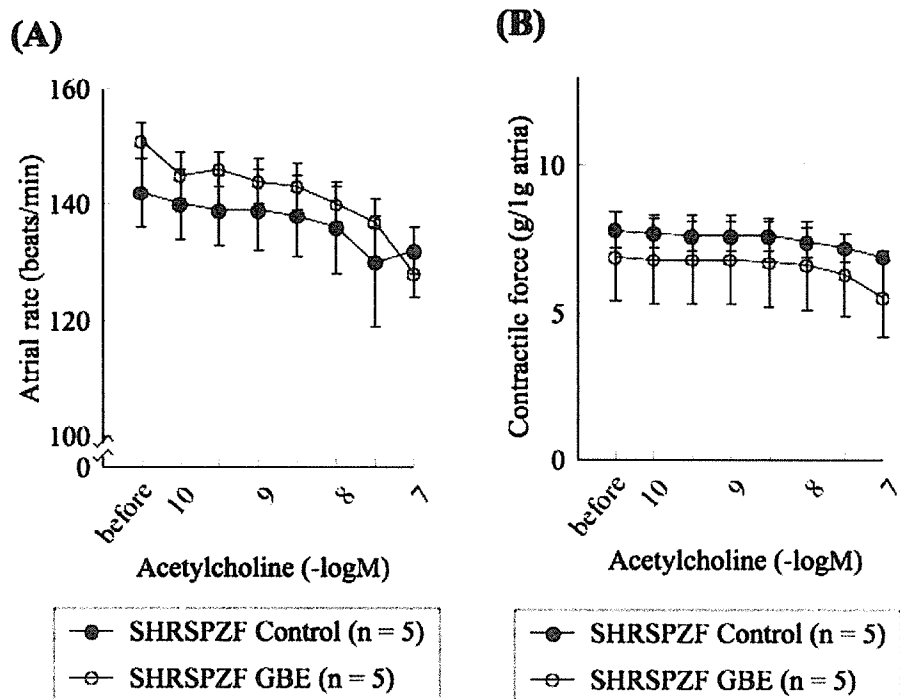


図 14 イチョウ葉エキス (GBE) 長期経口摂取した脳卒中易発性生活習慣病ラット (SHRSPZF) の摘出心房標本におけるアセチルコリンに対する心拍数変化 (A) および収縮反応 (B)

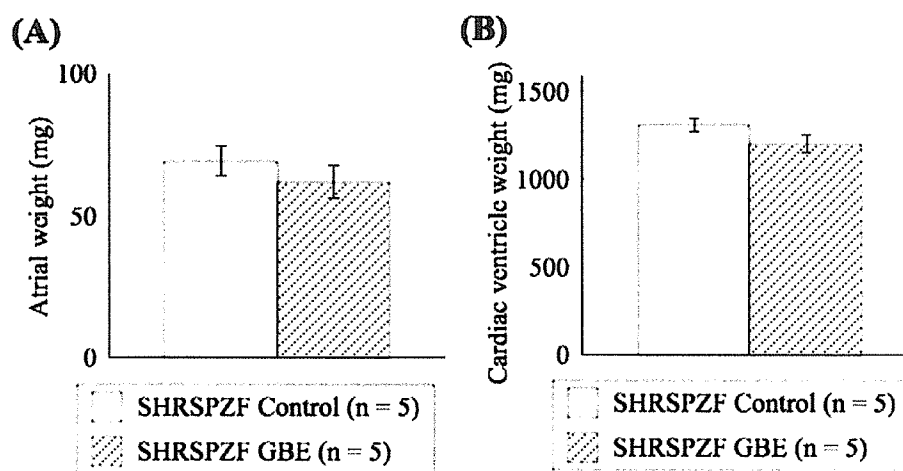


図 15 イチョウ葉エキス (GBE) 長期経口摂取した脳卒中易発性生活習慣病ラット (SHRSPZF) の心房重量 (A) および心室重量 (B)



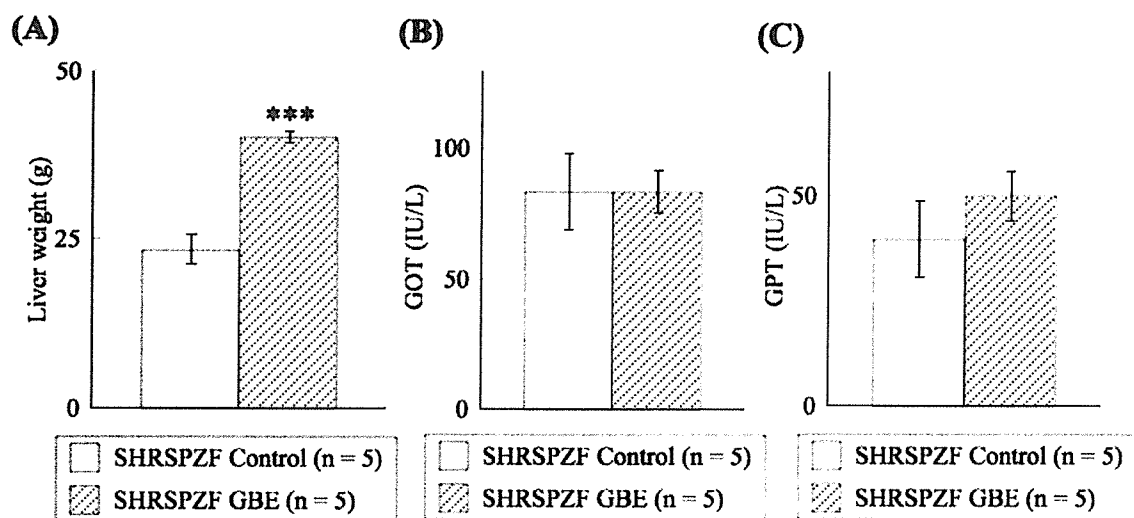


図 16 イチョウ葉エキス (GBE) 長期経口摂取した脳卒中易発性生活習慣病ラット (SHRSPZF) の肝重量 (A)、血清 GOT 値 (B) および GPT 値 (C)

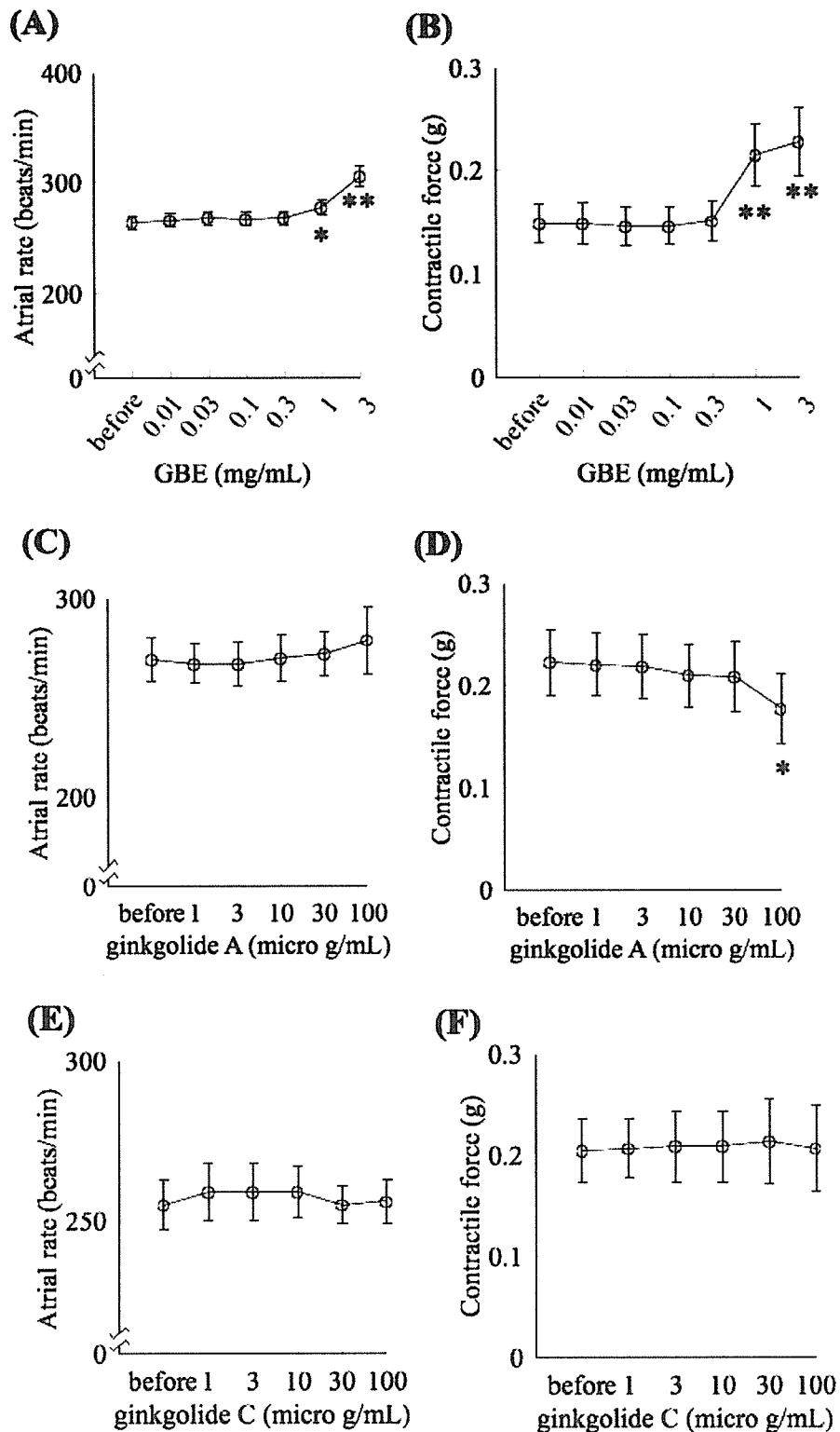


図 17 正常動物 Wistar ラットの摘出心房標本における心拍数 (A、C、E) および収縮反応 (B、D、F) に及ぼすイチョウ葉エキス (GBE)、ギンコリド A およびギンコリド C の影響 \* $P < 0.05$  vs. Control, \*\* $P < 0.01$  vs. Control.

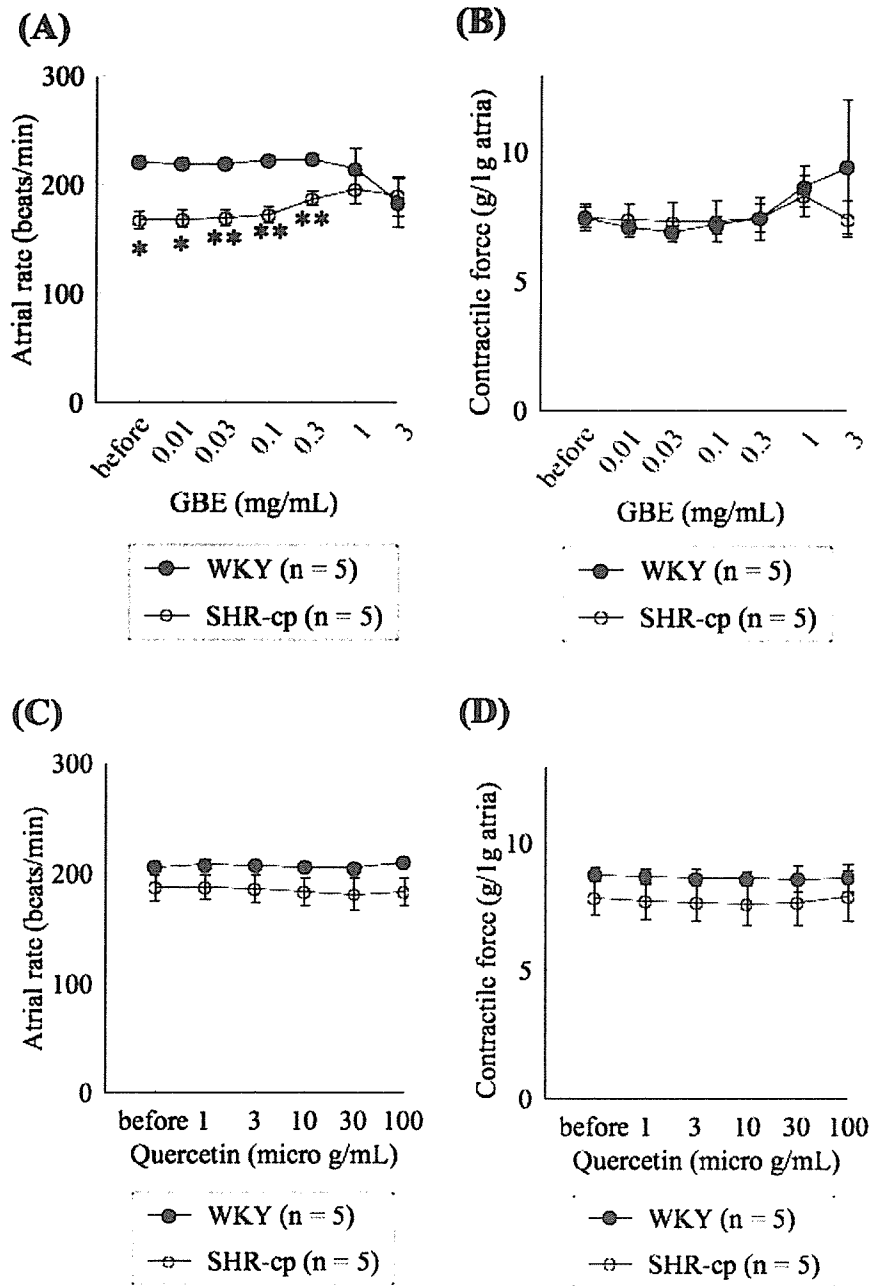


図 18 生活習慣病ラット (SHR-cp) および正常対象ラット Wistar-Kyoto ラット (WKY) の摘出心房標本における心拍数 (A、C) および収縮反応 (B、D) に及ぼすイチョウ葉エキス (GBE) およびケルセチンの影響 \*P<0.05 vs. Control, \*\*P<0.01 vs. Control.

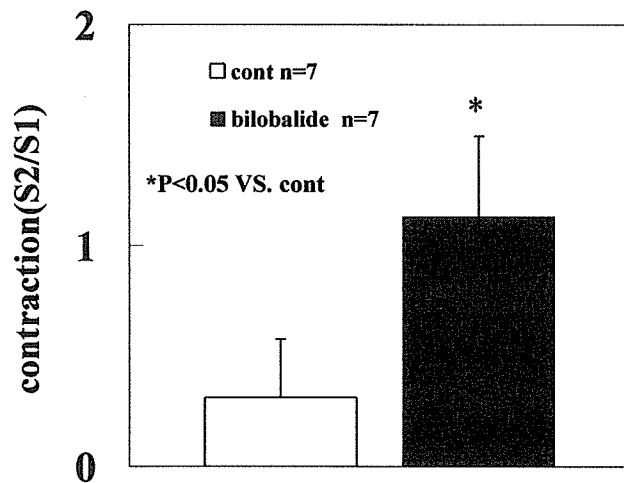


図 19 虚血様処置により減弱した電気刺激による脳卒中易発性生活習慣病ラット (SHRSPZF) の回腸の収縮反応に対するピロパロイド(30  $\mu$ M) の影響

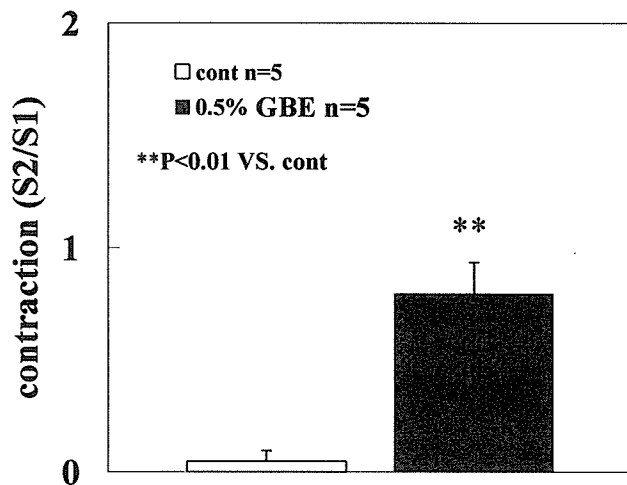


図 20 虚血様処置により減弱した電気刺激による脳卒中易発性生活習慣病ラット (SHRSPZF) の回腸の収縮反応に対する0.5%GBE 5週間摂取の影響

厚生労働科学研究費補助金(食品の安心・安全確保推進研究事業)  
分担研究報告書

いわゆる健康食品の有効性の評価に関する研究  
(主に口腔における保健機能を有する食品の評価に関する検討)  
分担研究者 花田信弘 (国立保健医療科学院口腔保健部)

電子嗅覚装置による口臭指標の臨床応用のための基礎的研究  
研究協力者 雫石 聡 大阪大学大学院歯学研究科

再石灰化促進物質の機能評価のための代替評価系の有用性の確認  
研究協力者 稲葉大輔 岩手医科大学歯学部

研究要旨

研究 1 : 電子嗅覚装置による総臭気指数と 3 点比較式臭袋法による実臭気指数との関係について調べたところ、両者は有意に強い相関を示し、総臭気指数はヒト嗅覚による指標と類似していると考えられた。次に、官能スコアにより 2 群に分けた被験者の口臭を評価したところ、官能スコアが高い群においてトルエン以外の 7 種類の臭気指数が有意に高く、また、総臭気指数と官能スコアとの間に有意の正の相関を示したことから、揮発性硫化物以外の口臭関連物質も口臭に寄与することが示唆された。さらに、官能スコアと総臭気指数は硫化水素、メチルメルカプタン以外にもアンモニア、トリメチルアミンおよびブチルアルデヒドの影響を受けることが明らかとなり、口臭関連物質のうち、硫化水素、メチルメルカプタン、トリメチルアミンは歯周病有病率および舌苔スコアと関連性を示し、アンモニア、プロピオン酸、ブチルアルデヒドは P1. I の影響も受けていた。以上の結果より電子嗅覚装置により測定される総臭気指数はヒト嗅覚による評価指標と類似しており、口臭予防のための保健用機能性食品の評価法として有用であることが示された。また、揮発性硫化物以外の口臭関連物質は歯周病、舌苔や歯垢の付着のいずれかと関連しており、揮発性硫化物以外の物質も口腔細菌により産生される可能性が示唆された。

研究 2. : 再石灰化促進物質の機能評価のための代替評価系(体外試験法)として、ヒト唾液浸漬試験(Human Saliva Immersion Test; HSI 試験)と QLF 法を組み合わせたシステムを検討し同法が既存の再石灰化機能性食品(高溶解性カルシウム食品素材配合ガム)の再石灰化促進能の確認に有用であることを確認した。

しかし、唾液の Ca 濃度は個人により大きな較差があること、ならびに、その濃度に応じて唾液の再石灰化能にも違いがあることが明らかとなった。再石灰化が唾液により生じることから、再石灰化促進物質の機能評価にあたっては、このような個人差(唾液の質的違い)を考慮する必要がある。

## A. 目的

研究 1. 現在、口臭の主な原因物質は歯周病細菌を含む口腔細菌が産生する揮発性硫化物 (Volatile Sulfur Compounds: VSC) であると考えられている。臨床の場で VSC 濃度は口臭評価の指標として実際に用いられているが、VSC 以外のおい物質も含めて口臭を臨床評価しようとする試みは極めて少なく、また、それらにおい物質と口腔保健要因との関連性についてもその詳細は不明である。本研究では、口臭予防のための保健用機能性食品の評価をするために、VSC 以外の情報を含めた新たな口臭の指標を開発することを目的とした。

## 研究 2.

報告者らは、前年度までの研究より、定量的可視光励起蛍光法 (QLF™ 法; Inspektor DentalCare BV, The Netherlands) は TMR 法と同様の精度で歯質のミネラル量を測定できる定量性を有しており、食品成分の再石灰化促進効果の標準評価法として有用であることを示唆した。また、本研究の課題である再石灰化は唾液の作用であるため、食品成分の再石灰化促進効果は、唾液のそれと比較することが必須である。ゆえにヒト唾液を評価系に応用することが理想的となる。そこで、再石灰化促進物質の機能評価のための代替評価系 (体外試験法) として、ヒト唾液浸漬試験 (Human Saliva Immersion Test; HSI 試験) と QLF 法を組み合わせたシステムを検討し、同法が既存の再石灰化機能性食品 (高溶解性カルシウム食品素材配合ガム) の再石灰化促進能の確認に有用であることを確認した。本年度は、唾液を使用する妥当性を検討するため、成人集団を対象として唾液を採取し、そのミネラル濃

度を確認するとともに、Ca 濃度の異なる唾液の再石灰化促進能を QLF により評価した。

## B. 研究方法

### 研究 1.

電子嗅覚装置 (FF-2A, 島津) による総臭気指数とパネラーによる実臭気指数の関係について調べるために、8 種類のおい物質 (硫化水素, メチルメルカプタン, アンモニア, トリメチルアミン, プロピオン酸, ブチルアルデヒド, 酢酸ブチル, トルエン) をテフロンバッグ内で混合し、種々の濃度に調整したサンプルを電子嗅覚装置および 3 人のパネラーによる 3 点比較式臭袋法により評価した。

次に、大阪大学歯学部附属病院口臭外来を受診し、生理的口臭または口腔由来の病的口臭があると診断された官能スコア 2 以上の患者 55 名 (男性 29 名, 女性 26 名, 平均年齢 49.0 歳) に、官能スコアが 2 未満の者 65 名 (男性 7 名, 女性 58 名, 平均年齢 43.3 歳) を加えた計 120 名を対象者とし、官能スコア, 呼気中の VSC 濃度を対数変換したもの ( $\log VSC$ ), および電子嗅覚装置によって測定した総臭気指数を用いて口臭の評価を行った。また、口臭関連物質の臭気強度は、8 種類のおい物質を基準とし、各臭気指数として表した。口腔保健要因は、歯周病の指標として歯周ポケット深さ (PPD) を用い、舌苔附着状態の指標として舌苔スコア (TCS) を、歯垢附着状態の指標として歯垢指数 (Pl. I) を用いた。PPD は 4mm 以上の歯周ポケット深さを有する歯を歯周病有病歯とし、全歯に占める割合を算出した。TCS は視診にて舌苔の広がり を 0~3, 厚みを 0~2 で評価し、両者の積を用いた。

### 研究 2.

合計603人の成人(49.1±12.0歳、範囲23-78歳；男性261名・年齢50.5±11.9歳、女性342名・48.0±12.1歳)からパラフィン咀嚼刺激唾液を採取した。唾液検体は臨床検査センターへ輸送し、全自動生化学分析装置(7700 DDP, 日立)を用い、OCPC法によりCa濃度を、またリンモリブデン酸法によりリン酸濃度をそれぞれ測定した。続いて、唾液の再石灰化能を評価する目的で、人工的に脱灰した牛歯エナメル質を唾液試料に浸漬し、QLF™でミネラル回復量(ΔΔF, %；図1)を評価した。

## C. 結果および考察

### 研究1.

電子嗅覚装置による総臭気指数とパネラーによる実臭気指数は、有意に強い相関を示し、総臭気指数は、ヒト嗅覚による指標と類似していると考えられた。

また、一般に至適基準として用いられている官能スコアが電子嗅覚装置による総臭気指数またはガスクロマトグラフィによるlogVSCとどの程度相関性をもつか検討したところ、総臭気指数との相関係数は、logVSCとの相関係数よりも有意に高い値を示した。また、官能スコアを至適基準として受診者動作特性(receiver operating characteristic : ROC) 曲線をプロットしたところ、総臭気指数のROC曲線は左上方に突出し、そのROC曲線下部面積は、logVSCの下部面積と同程度に高い値を示した。これらの結果から、電子嗅覚装置による総臭気指数が口臭検査の指標として有効であることが示唆された。

被験者を官能スコアによって2群に分けたところ、トルエン以外の7種類の臭気指数は、官能スコアが2以上の群で有意に高い値を示した。さらに、3種類の口臭評価を従属変数とし、8種

類の臭気指数を独立変数として重回帰分析を行ったところ、総臭気指数は、硫化水素、メチルメルカプタン、アンモニア、トリメチルアミンおよびブチルアルデヒドの影響を受け、官能スコアもほぼ同様の結果が得られた。logVSCは硫化水素とメチルメルカプタンから影響を受けることが明らかとなり、官能スコアと総臭気指数は口臭関連物質を包括して評価していると考えられた。次に、口臭関連物質の臭気指数と口腔保健要因との関連性を調べたところ、硫化水素とメチルメルカプタンは歯周病有病歯率、TCSおよびPI.Iと有意の関連性を示した。また、アンモニア、トリメチルアミンや酢酸ブチルはTCSと有意の関連性を示し、さらに、アンモニアはPI.Iと、トリメチルアミンとプロピオン酸は歯周病有病歯率とも関連していた。以上の結果より、電子嗅覚装置による臨床評価はヒト嗅覚による評価と類似しており、口臭の臨床評価として有用であることが示唆された。さらに、電子嗅覚装置で測定されたこれらの物質の臭気指数は歯周病、舌苔や歯垢の付着のいずれかと関連しており、VSC以外のおい物質も口腔細菌により産生される可能性が示唆された。

### 研究2.

唾液中Caの範囲は0.25~2.77 mM(平均1.12±0.31 mM)と広い分布を示し、最大最小で約10倍の違いがあった(図2)。また、リン酸の範囲は2.51~12.27 mM(平均5.05±1.55 mM)で、同じく最大最小で5倍以上の違いがあった(図3)。Ca、リン酸ともに男女間で有意な差はなかった。また、Caとリン酸濃度の相関は低く(r=0.24)、したがって、再石灰化におけるミネラル結晶の形成に大きく関与するCa/P比もまた

Ca濃度が0.92mMの唾液に浸漬した試料のミ

ネラル回復量 ( $\Delta \Delta F$ , %) は  $6.3 \pm 3.9\%$  で、 $0.35 \text{ mM Ca}$  の唾液に浸漬した試料の値 ( $0.6 \pm 0.4\%$ ) より、約 10 倍高く、その差は有意 ( $p < 0.05$ ; unpaired t test with Welch correction) であった。

本研究より、唾液の Ca 濃度は個人により大きな較差があること、ならびに、その濃度に応じて唾液の再石灰化能にも違いがあることが明らかとなった。再石灰化が唾液により生じることから、再石灰化促進物質の機能評価にあたっては、このような個人差（唾液の質的違い）を考慮する必要があるであろう。すなわち、歯質試料の再石灰化状態を評価する以前に、被験者の唾液が再石灰化試験に適切かどうか、また、被験食品（試験物質）の摂取により再石灰化に関与する唾液成分がどう変化するかを評価することが必要であることが示唆される。

#### D. 結論

##### 研究 1.

電子嗅覚装置により測定される総臭気指数はヒト嗅覚による評価指標と類似しており、また、検査指標として有効性も優れており、口臭予防のための保健用機能性食品の評価法として有用であることが示された。また、揮発性硫化物以外の口臭関連物質は歯周病、舌苔や歯垢の付着のいずれかと関連しており、揮発性硫化物以外の物質も口腔細菌により産生される可能性が示唆された。

##### 研究 2.

1. 唾液中 Ca およびリン酸濃度は個別にきわめて広い範囲に分布することが確認された。
2. また、唾液の再石灰化能は、Ca 濃度依存的に異なる可能性が示唆された。

3. したがって、再石灰化促進物質の機能評価にあたっては、試験に供した唾液ミネラルの、試験物質作用前後における濃度を把握しておくことが必要と考えられた。
4. Ca 濃度分析と QLF の組み合わせによる試験は、唾液の再石灰化能が低い個人をスクリーニングするのに有用であることが示唆された。

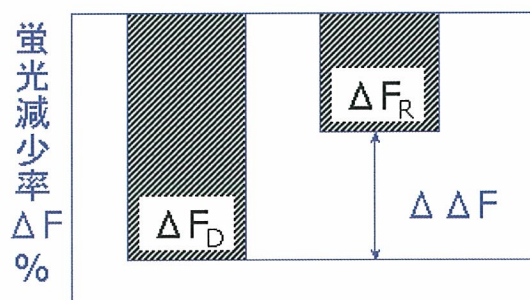
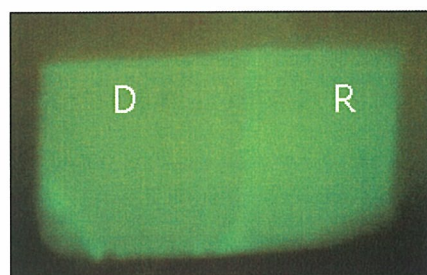


図 1 再石灰化評価の計測パラメータ



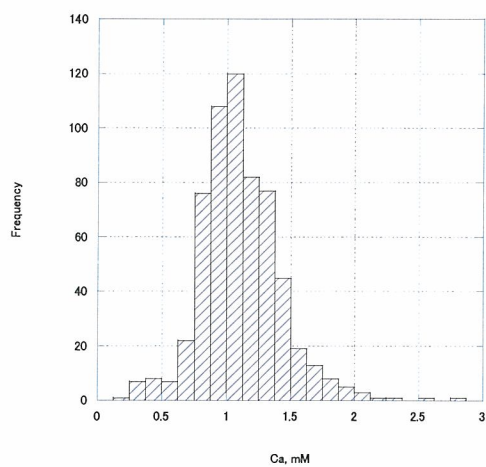


図2 唾液中Ca濃度の分布

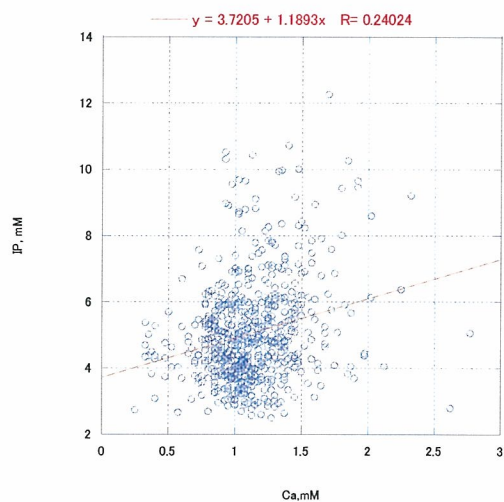


図4 Caとリン酸濃度の相関

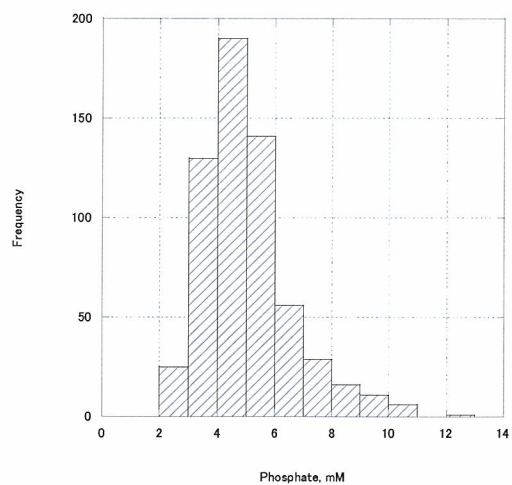


図3 唾液中リン酸濃度の分布

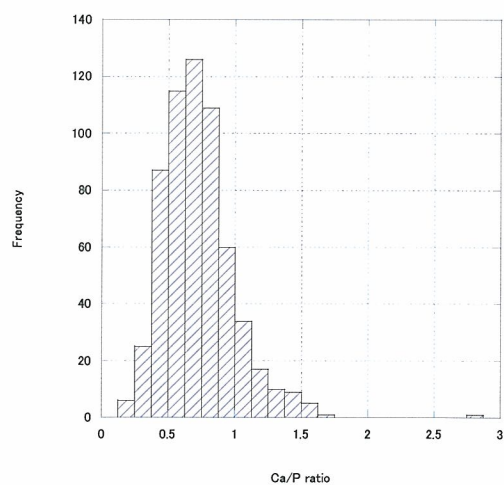


図5 唾液Ca/P比の分布

#### E. 健康危険情報

なし

#### F. 研究発表

##### 1. 学会発表

1. A Nonaka, M Tanaka, M Noda, K Kataoka, J

Kita and S Shizukuishi (2007) Contribution of Volatile Organic Compounds to Oral Malodor. 85<sup>th</sup> General Session and Exhibition of the IADR  
March 2007, New Orleans, USA

2. 稲葉大輔：食品の再石灰化促進能の評価と展望、シンポジウム「厚生労働省許可特定保健用食品の歯科における課題と展望」、第55回日本口腔衛生学会総会、大阪、10月、2006.

3. D. Inaba \*, K. Minami, K. Tamura , M. Yonemitsu : Combined Human Saliva Immersion Test and QLF for Remineralization Assessment of Calcium-enriched Chewing Gum, 53rd Congress of the European Organisation for Caries Research (ORCA), Glasgow, UK, July, 2006.

4. D. Inaba \*, K. Minami, K. Tamura , M. Yonemitsu : Combined Human Saliva Immersion Test and QLF for Remineralization Assessment, 85th General Session & Exhibition of International Association for Dental Research, New Orleans, USA, March, 2007.

厚生科学研究補助金(食品の安全性高度化推進事業)  
分担研究報告書

いわゆる健康食品の有効性の評価に関する研究(H16-食品-003)

1. 人工口腔装置による健康食品のエナメル質脱灰能の評価法に関する検討
2. 健康食品の舌バイオフィーム形成に及ぼす影響に関する検討(PCRによる口腔フローラの検討)

分担研究者 今井 奨 (国立保健医療科学院口腔保健部・室長)

研究協力者 岸 光男 (岩手医科大学歯学部・講師)

研究要旨：歯科関連の機能性食品のう蝕原性、エナメル質脱灰性を人工口腔装置によって評価するための方法を検討すること、また、そのため従来、実験動物で試験されている甘味糖質について、バイオフィーム形成、バイオフィーム下 pH、エナメル質脱灰を評価項目として人工口腔装置で検討し、動物試験の結果と比較することを目的とした。

2種のう蝕原性細菌 (*S. mutans* および *S. sobrinus*) を用いて、甘味糖質であるパラチノース、パラチニット、マルチトールのエナメル質脱灰性を人工口腔装置で評価した。1%スクロースを対照として、各糖質1%を供給したときのバイオフィーム形成量、バイオフィーム下 pH 値、エナメル質脱灰度を定量した。パラチノースについては2.5%パラチノースを1%スクロースと共存させてその阻害効果も検討した。

その結果、2種のう蝕原性細菌によるパラチノース、パラチニット、マルチトールからのバイオフィーム形成量は対照よりも有意に低く、pH低下も引き起こさず、エナメル質脱灰度も対照よりも有意に低かった。これらの結果は動物試験で得られた結果とほぼ一致しており、人工口腔装置による評価の妥当性を支持する結果となった。昨年度までの研究結果も併せると機能性食品のう蝕原性、エナメル質脱灰性評価には動物を用いた *in vivo* 試験に替わって人工口腔装置を用いた方法が有用であることが示唆され、当初目標にかなり近づいたと思われた。

一方、健康食品の舌バイオフィーム形成に及ぼす影響について、舌苔を指標または試料とした保健用食品機能評価のための *in vitro* 試験の可能性を検討した。舌苔中細菌数と口臭の関連を検討した結果、硫化水素濃度が舌苔中細菌数を反映する可能性が示唆された。

## 1. 人工口腔装置による健康食品のエナメル質脱灰能の評価法に関する検討

### 1-A. 研究目的

特定保健用食品の制度が導入されてから15年が経過した。特定保健用食品の数は年々増加し、2007年3月現在で全体の品目数は658品目に達した。歯科関連の特定保健用食品数は43品目で、全体の6.5%にすぎないが、市場規模では約15%と歯科関連の特定保健用食品の重要性は増大していると思われる。従来は非う蝕原性であることが機能として認められていたが、最近ではそれに加えて再石灰化機能が認められた特定保健用食品が主流となっている。このような状況下で問題になっているのが食品のもつ機能性の評価方法である。食品のもつう蝕原性、あるいはエナメル質脱灰性は動物やヒト被験者による *in vivo* 試験と *in vitro* 試験を組み合わせる評価しているのが現状であるが、動物やヒト被験者を用いた *in vivo* の方法には倫理的、時間的、経済的制約があり、一般的評価系とするには限界がある。そこで、*in vitro* の方法で、従来の *in vivo* の結果をできるだけ反映できるようなう蝕原性、あるいはエナメル質脱灰能評価方法を考案できればさまざまな制約を解決できると期待される。

そこで、歯科関連の機能性食品のう蝕原性、エナメル質脱灰性を人工口腔装置によって評価するための方法を検討すること、また、そのため従来、実験動物で試

験されている甘味糖質について、バイオフィーム形成、バイオフィーム下 pH、エナメル質脱灰を評価項目として人工口腔装置で検討し、動物試験の結果と比較して人工口腔装置による評価方法の有用性を検討することを目的とした。

### 1-B. 研究方法

#### 1. 人工口腔装置による脱灰度の検討

本装置は人工バイオフィーム形成量、人工バイオフィーム直下での pH 低下およびエナメル質脱灰度を同時に測定できるように構築されている。本年度は送液用ペリスタポンプ部分を改良して、PC 制御の pH レコーダ兼流量コントローラー 1 台、送液用ペリスタポンプ 3 台、人工口腔 3 台、恒温槽、冷却攪拌器 3 台の構成とした (図 1)。人工口腔上部からは 5 本のステンレスチューブを固定したシリコン栓を、下部からはドレイン用チューブと平面 pH 電極を逆さに固定したシリコン栓を装着して密閉した。人工口腔部分のウォータージャケットに温水を循環して装置内部を 37°C に維持した。平面 pH 電極周囲にはテフロン製ホルダーを固定し、そのホルダーにユーティリティーワックスを用いて 4 個のウシエナメル質歯片 (3.5mm × 3.5mm × 1.5mm) を固定した。その上部から糖質含有ハートインフュージョン培地、細菌懸濁液、PBS を連続的に滴下した。

試料としてスクロース (対照)、低う蝕誘発性であることが動物試験で確かめられている 3 種の糖質 (パラチノース、還