元パラチノース［パラチニット］、マルチトール）を用いた。細菌として *Streptococcus mutans* MT8148 株と *Streptococcus sobrinus* 6715 株を用いた。各菌株をBHI培地で37℃、15時間培養し，遠心分離（6,000 rpm、20 min）により集菌し、その菌体をPBSで洗浄(6,000 rpm、20 min）した後、PBSに懸濁し、500nmでの濁度を1.0に調整した。pHを連続的に記録しながら16ー20時間滴下を続け、人工プラーク形成に伴ってpHが４付近まで低下した時滴下を終了した。

エナメル質歯片上およびpH電極上に形成された人工バイオフィルムを０．５Ｎ水酸化ナトリウム溶液で処理して遠心分離し、沈澱した菌体の PBS 懸濁液の濁度を５００nmで測定して菌体量とした。その上清をフェノール硫酸法によって定量し非水溶性グルカン(WIG)量とした。エナメル質の脱灰度は実験前後の硬度変化から評価した。エナメル質表面の対称的な９点の硬度を Vicker's 硬度計で測定した。実験後にその９点の近傍の硬度を測定して実験前後の硬度差（ΔH）を脱灰度とした。

1-C. 研究結果

１．パラチノースのエナメル質脱灰性について

スクロースの構造異性体であるパラチノースは、動物試験によりそれ自身 SPF のSDラットにう蝕をほとんど引き起こさないことが報告されている二糖類である。そこで、このパラチノースが人工口腔装置でどのように評価されるのか、動物試験と同様の評価がなされるのかを検討した。図２は *S. mutans* MT8148R 株を用いて1%スクロース(対照)、1%パラチノース、1%スクロース＋2.5%パラチノースを連続的に滴下供給したとき、電極上に形成されたバイオフィルム直下のpHを連続的に記録したものである。対照では８時間位から pH が低下し始め、17 時間後に 4.8 になるのに対して、1%パラチノースでは 17 時間たっても pH はほとんど低下しなかった。1%スクロース＋2.5%パラチノースでは対照よりもpH低下が鈍化していた。1%パラチノースではエナメル質表面に形成されたバイオフィルム量（図３）もエナメル質の脱灰度も対照よりも有意に低かった（図４）。

S. sobrinus 6715 株を用いた場合も同様に 1%パラチノースでは 16 時間たってもpHはほとんど低下せず（図５）、エナメル質の脱灰もほとんどみられなかった（図６）。

２．パラチニット、マルチトールのエナメル質脱灰性について

糖アルコールであるパラチニットとマルチトールのエナメル質脱灰性を *S. mutans* MT8148R 株と *S. sobrinus* 6715 株を用いて人工口腔装置で検討した。図７は *S. sobrinus* 6715 株で検討した場合のバイオフィルム直下の pH 曲線である。対照の 1%スクロースでは pH 低下が顕著なのに比べて 1%パラチニット、1%マルチ

pH 低下はみられなかった。1%パラチニット、1%マルチトールの場合にはエナメル質表面のバイオフィルム形成量は対照よりも有意に少なく（図８）、エナメル質の脱灰はベースラインレベルであった（図９）。*S. mutans* MT8148R 株でもまったく同様の結果であった。

1-D. 考察

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スクロースを対照として人工口腔装置で評価した結果、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ル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いる。すなわち、Ooshima らはラットを用いた動物試験で、パラチノース郡ではう蝕の発生が小麦粉を与えたネガティブコントロール群と同レベルで、う蝕が発生しないことを観察している。また、パラチニット、マルチトールのう蝕原性をラットで調べた結果でも、両糖アルコールがう蝕誘発性をもたないことが示されている。これらの実験に用いたう蝕原性細菌は我々の実験と同じ *S. mutans* MT8148R 株と *S. sobrinus* 6715 株であった。このように人工口腔装置を用いた甘味糖質の評価と動物試験による同じ甘味糖質の評価がほぼ一致しており、人工口腔装置による評価の妥当性が示唆された。動物試験で糖アルコールのう蝕誘発性評価を行う際には糖アルコールの濃度に注意しないと、下痢を起こして実験が成立しないことがある。人工口腔装置を用いた評価系ではその心配をする必要がない。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る。

1-E. 結論

人工口腔装置を用いた甘味糖質（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評価の結果は、動物試験で得られた同甘味糖質のう蝕誘発性評価の結果とほぼ一致し、人工口腔装置による評価の妥当性が示唆された。

図 1. 人工口腔装置全体図

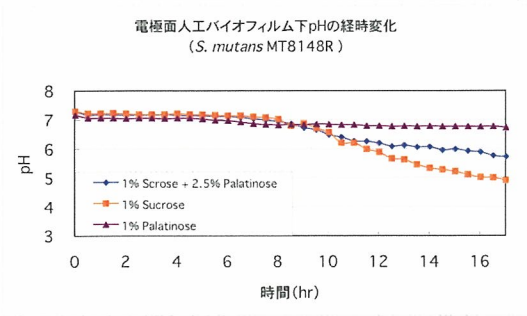

図２. *S. mutans*により形成された人工バイオフィルム下 pH の経時変化

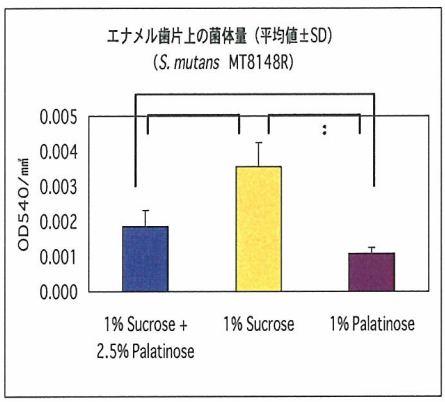

図３. *S. mutans* により形成されたエナメル質歯片上のバイオフィルム量

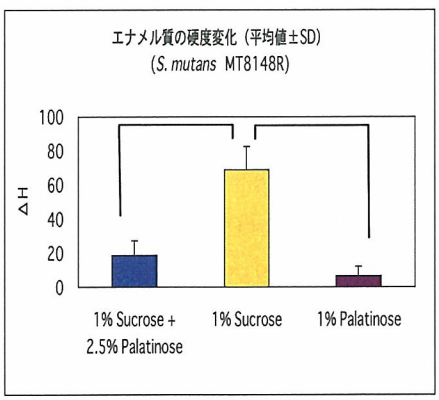

図４. *S. mutans* によるエナメル質歯片の硬度変化

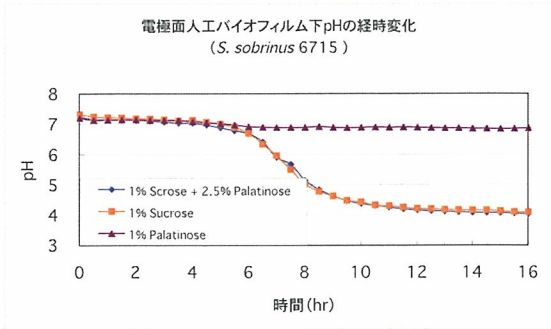

図５. *S. sobrinus* により形成された人工バイオフィルム下 pH の経時変化

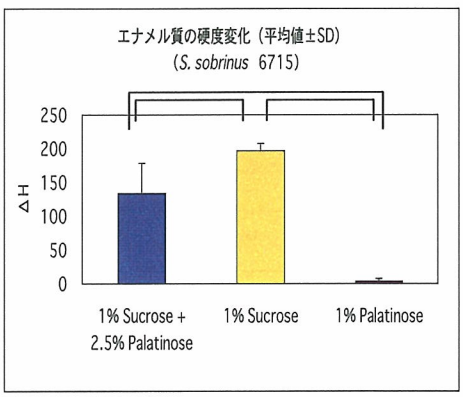

図６. *S. sobrinus* によるエナメル質歯片の硬度変化

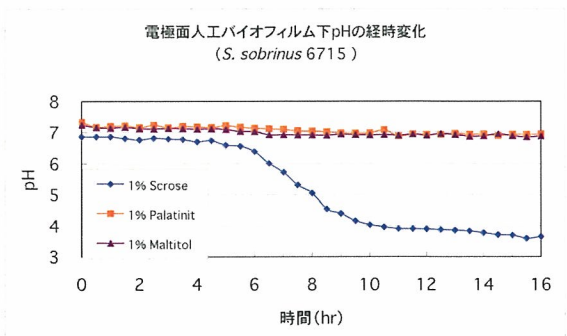

図７. *S. sobrinus* により形成された人工バイオフィルム下 pH の経時変化

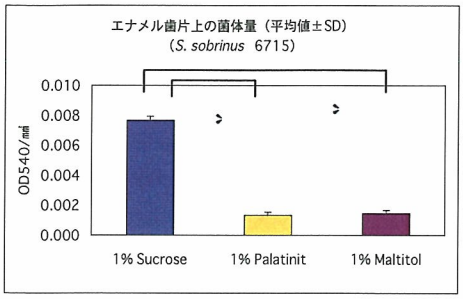

図８．*S. sobrinus* により形成されたエナメル質歯片上のバイオフィルム量

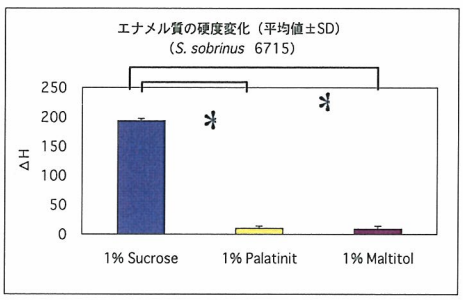

図９．*S. sobrinus* によるエナメル質歯片の硬度変化

２．健康食品の舌バイオフィル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）

2-A．研究目的

これまでに、舌苔試料中の細菌数を定量的 PCR 法により評価する方法を確立した。しかしその方法は複雑かつ費用がかかるため、より簡便に舌苔中細菌数を推定する方法として、口臭測定の有用性を検討することを目的とした。

2-B．研究方法

① 対象：岩手県内某リハビリテーション病院入院した者 27 名（男性 21 名、女性 6 名、平均年齢：58.7±16.5 歳）を対象とし、初診時および入院２か月後に口臭測定と舌苔採取を行った。

② 口臭測定法：ポータブルガスクロマトグラフィ（Oral Chroma®, ABILIT, 大阪）を用いて口中気体の硫化水素（H_2S）とメチルメルカプタン（CH_3SH）を弁別定量した。

②舌苔中細菌数の評価：滅菌歯ブラシで舌背から可及的に舌苔を採取後、一定量の舌苔試料からゲノム DNA を抽出し、16S rRNA をプライマーとした定量的 PCR 法(ABI 7700 System)により、1mg 当たりのゲノムコピー数を算出した。また、舌苔 1 mg 中の細菌数に採取した舌苔付着量を乗じ，採取総舌苔中細菌数とした。

（倫理面への配慮）

研究対象者に事前に研究に関する説明を行ったうえ，同意書を採得した。また、研究計画については岩手医科大学歯学部研究倫理委員会の承認を得て行った。

2-C．研究結果

入院時及び入院２か月後の両時点で、口中気体の H_2S 濃度と舌苔 1 mg 中細菌数および舌苔中総細菌数の間に有意な相関を認めた。両時点におけるそれらの関連を図 10、11 に示す。CH_3SH 濃度は H_2S 濃度と高い相関を呈したが舌苔中細菌数との関連は有意ではなかった。

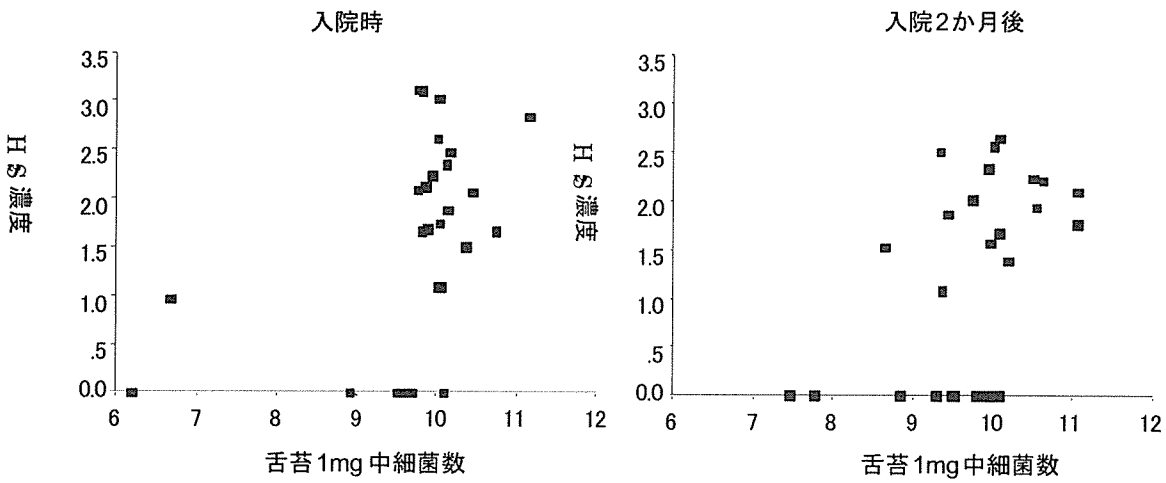

図 10.　入院時と入院 2 か月後における口中 H_2S 濃度と舌苔 1mg 中細菌数の関連

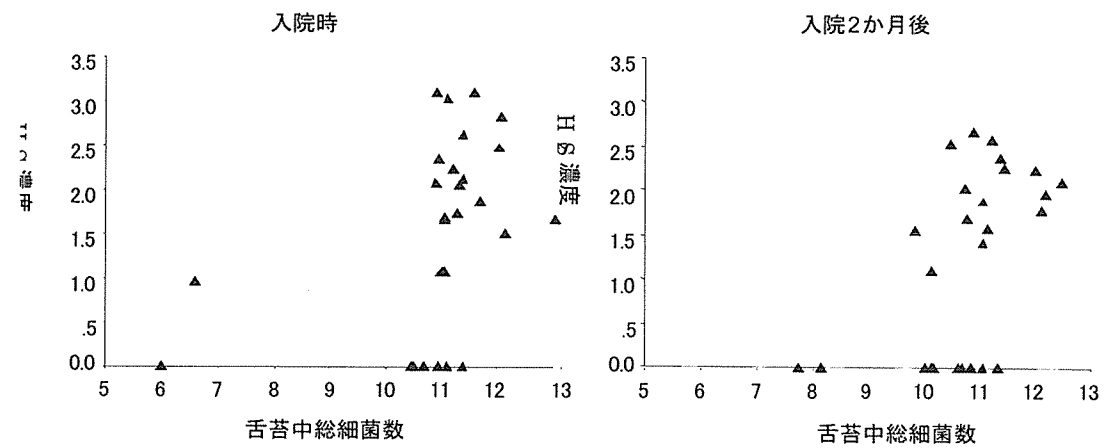

図 11.　入院時と入院 2 か月後における口中 H_2S 濃度と採取総舌苔中細菌数の関連

2-D. 考察

近年、H_2S は偏性嫌気性菌のみならず、口腔レンサ球菌も産生することが報告されており、そのため舌苔の全細菌数と口中気体の H_2S 濃度が有意に相関したものと考えられた。このことより、口中気体の H_2S 濃度は舌苔中細菌量を反映することが示唆された。

2-E. 結論

本研究結果から、口臭測定が口腔内細菌量を間接的に評価するうえで有用性があることが示唆された。

F. 健康危惧情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

(1) Kamoda T, Imai T, Sato T, Imai S, Nisizawa T, and Hanada N. Effect of disaccharide xylosylfructoside on sucrose cariogenicity in an artificial mouth system. J Dental Health 2006; 56:281-288.

(2) 岸　光男，高橋雅洋，岸　香代，晴山婦美子，田村光平，阿部晶子，杉浦　剛，相澤文恵，米満正美：口腔ケアの評価指標とreal-time PCRによる舌苔中細菌数との関連，口腔衛生学会誌，56(5)：665-672，2006.

2. 学会発表

(1) T. Arai, S. Imai, N. Hanada, K. Yaegaki, K. Kamoi, Y. Numabe. Evaluation of Periodontopathic Microorganisms in Subgingival Plaque by Mouth Air. The 3rd Conference of Asian Association for Breath Odor Research, Okayama, November, 2006.

(2) S. Imai, M. Tagashira, T. Kanda, Y. Ohtake, M. Itayama, Y. Yamamoto, and N. Hanada. Inhibition of Streptococcus Mutans Activity by Hop Bract Polyphenols. 84th International Association for Dental Research General Session & Exhibition, Brisbane, Australia, June, 2006.

(3) N. Hanada, M. Hiramatsu, M. Kimura, and S. Imai. Inhibitory Effect of Lactobacilli against Growth of Mutans Streptococci. 84th International Association for Dental Research General Session & Exhibition, Brisbane, Australia, June, 2006.

(4) Y. Usui, S. Imai, E. Kaeriyama, N. Hanada and H. Uematsu. Evaluation of $Ag(NH_3)_2F$ Solution as an Inhibitor of Dentin Demineralization. 84th International Association for Dental Research General Session & Exhibition, Brisbane, Australia, June, 2006.

(5) H. Takeuchi, K. Okuda, H. Okayama, S. Imai, H. Senpuku and N. Hanada. New fluorescence method to detect periodontopathic biofilm. 84th International Association for Dental Research General Session & Exhibition, Brisbane, Australia, June, 2006.

(6) Takahashi, M., Kishi, M.,

Ohara-Nemoto, Y., Kimura, S. and Yonemitsu, M.: Distribution of periodontopathic bacteria in tongue coats in aged subjects. 84th International Association for Dental Research General Session & Exhibition, Brisbane, Australia, June, 2006.

(7) 今井　奨.　食品のエナメル質脱灰性の評価と展望.　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、2006年10月.

(8) 福島和雄、門澤久美子、河内太吉、井田博久、西山佳秀、小林清吾、今井　奨、花田信弘. S. mutans とS. sobrinus の口腔内レベルを同時評価できる集団歯科検診用の簡便・低コスト培養システムの確立.　第55回日本口腔衛生学会・総会.　大阪、2006年10月.

(9) 薄井由枝、今井　奨、花田信弘、植松　宏. 要介護者における口腔細菌数の経時的変化に関する研究.　第23回日本障害者歯科学会総会、仙台、2006年10月.

(10) 高橋光恵，岸　光男，佐々木勝忠，清水　潤，岸　香代，米満正美：歯科衛生士による訪問口腔ケアが家庭介護に及ぼす影響　第1報　事業概要と著明な効果のみられた1例. 第55回日本口腔衛生学会総会，2005年10月8日，大阪.

(11) 岸　光男，高橋光恵，岸　香代，相澤文恵，佐々木勝忠，清水　潤，高橋雅洋，米満正美：歯科衛生士による訪問口腔ケアが家庭介護に及ぼす影響　第2報　要介護高齢者の口腔内と介護家族の QOL の変化. 第55回日本口腔衛生学会総会,2005年10月8日，大阪.

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし。

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. 健康食品の酸産生性の評価方法に関する検討
2. 健康食品のバイオフィルム形成に及ぼす影響に関する検討
（DNA マイクロアレイによる口腔微生物叢の検討）

分担研究者　高橋 信博（東北大学大学院歯学研究科・教授）
研究協力者　佐藤 拓一（東北大学大学院歯学研究科・講師）

研究要旨：

1．現行の「食品の酸産生性検定システム」に対し、これまで行ってきた信頼性と実用性についての検討に基づき、1) 酸産生性評価法の実用性向上のための方策、及び 2) 将来における酸産生評価の位置付けについて、具体的提言を策定した。

検定システムの実用性向上の方策として、①効率性の確保に加え、②信頼性の確保、及び③公益性の確保が可能な検定評価業務を専門的に行う「酸産生性検定評価機構」の設置が提言された。多角的考察から、機構の運営形態としては、大学寄附講座の設置による検定評価業務の委託や、行政関連研究機関への委託が妥当であると結論された。さらに、トクホと国際トゥースフレンドリー協会が連携協力することによってよりよい食品評価システムの一助となり得ると考えらえる。

歯科用トクホ食品検定における酸産生性検定の位置付けについては、今後、機能性の評価指標が増えるに従って、歯科用トクホの前段階検定へ機能分化して行くものと予測された。しかし、口腔から食品が摂取される以上、トクホ食品全体に対して、前段階検定としての酸産生性検定を行い、歯表面を脱灰する可能性のある酸産生性食品に対しその危険性を明示する必要があると判断された。さらに、歯表面脱灰の原因となるのは酸産生性食品だけではなく酸蝕性食品も含まれることから、今後、酸蝕性食品検定についての検討が必要である。

2．口腔疾患に関連する口腔微生物種を選択し、その 16S ribosomal RNA gene の塩基配列から、各種微生物種特異的 DNA プローブを作成し、これら DNA プローブを特殊紙面上に固定し、DNA マイクロアレイ化を行った。その際、う蝕・歯内疾患・口腔感染症に関連する菌群（20 菌種）と歯周炎に関連する菌群（23 菌種）というカテゴリーに分け、微生物種特異性ならびに検出感度を検討した。完成した DNA マイクロアレイに対して、標準口腔微生物株を用い、PCR—ハイブリダイゼーション法の種々の実験条件を検討した結果、プライマー濃度および増幅 cycle 面の改良により、検出可能な菌種数ならびにシグナル強度を増加させることができた。

1．健康食品の酸産生性の評価方法に関する検討

1－A．研究目的

食品摂取に伴うプラーク細菌の糖代謝による酸産生が、直接歯表面を脱灰し「う蝕」を発生させる原因となることから、健康食品全般においても酸の原因とならないこと、すなわち「う蝕」の原因とならないことが望まれる。過去3回の国際会議（米国 San Antonio：1986年、仙台：1994年、英国 London：1999年）のいずれでも、食品のう蝕誘発性能（＝酸産生性）を評価する方法の一つとして、食品摂取後のヒト・プラーク pH を測定することが「科学的に正しい方法」として推奨されている。

これまでの検討で、現在、厚生労働省特定保健用食品（トクホ食品）認定を目的に東北大学大学院歯学研究科口腔生物学講座口腔生化学分野にて行われている食品酸産生性の検定システム「電極内臓法（プラーク pH テレメトリー法）」は、信頼性は高いが、運用性としては「コストが高い」「検定業務の効率が悪い」という欠点をもつことが分かった。しかし、これらの欠点は、大学の一研究室で検定業務が行われているために生ずるものと結論された。また、トクホ食品検定における酸産生性検定は、今後、トクホ食品の機能性の評価指標が増えるに従って、より相対化され、その位置付けが変化して行くものと考えられた。

最終年度にあたる本年度は、これまでの検討結果に基づき、1）酸産生性評価法の実用性向上のための方策、及び2）将来における酸産生評価の位置付けについて、具体的提言を策定することを目的とした。

1－B．研究方法

1）現在、東北大学大学院歯学研究科口腔生物学講座口腔生化学分野にて行われている食品酸産生性の検定システムの実用性を高める具体的方策を検討し、さらに2）将来における食品酸産生評価の位置付けについて検討し、具体的提言にまとめる。

1－C．研究結果

1－D．考　　察

1）　食品酸産生性検定システムの実用性向上について

食品酸産生性検定評価機構の設置

食品酸産生性検定システムを効率的に運用するためには、現在の大学の一研究室での検定評価業務ではなく、検定評価業務を専門的に行う「機構」の構築が必須であり、以下の要件を満たす「食品酸産生性検定評価機構」の設置を提言する。

酸産生性検定評価機構の要件は、①効率性の確保に加え、②信頼性の確保、及び③公益性の確保と考えられる（図 1-1）。

①効率性の確保は、独立した検定評価室を設置し、専任の検定評価員及び連絡事務員を置くことで担保される。

②信頼性の確保は、②-1 科学的信頼性及び②-2 社会的信頼性（不正防止）に分けられる。

②-1 科学的信頼性は、長年にわたる検定評価実績を持つ東北大学大学院歯学研究科の検定評価技術を基盤とすることで確保できる。検定員は東北大学大学院歯学研究科にて技術を習得し、定期的な検定技術の確認あるいは更新を受けることで、質の維持が保証される。

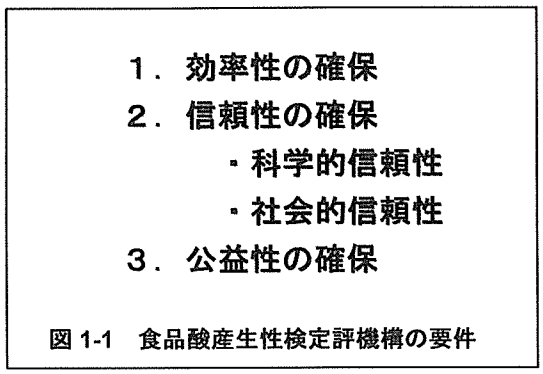

図 1-1　食品酸産生性検定評機構の要件

②-2 社会的信頼性は、評価部門（評価要員）を検定要員から独立させることで確保しうる。評価要員は、食品科学とりわけ食品の酸産生性に対する学識のある専門家複数名とし、専門家複数名の合議により評価基準に則って評価することが望まれる。

③公益性の確保は、機構運営の透明性を高めることで担保される。運営の透明性は、運営費とその運営に係る。

運営費は、公的資金及び関連団体・企業からの拠出が考えられる。公的資金は機構立ち上げの際の重要度が高く、一方、関連団体・企業からの拠金は機構立ち上げ後の機構の安定した運営のために重要であると考えられる。公的資金としては厚生労働省科学研究費等を基盤とした資金が主眼となると思われる。

一方、関連団体・企業からの拠金については、恣意的運用を回避するシステムが不可欠である。例えば、一関連団体や一企業による拠金ではなく、食品関連団体、食品関連企業、酸産生性測定技術関連企業、歯科医師会等、多数の関連団体・企業による合同拠金による基金の設立等が望ましいと考えられる。しかし現時点では、歯科用トクホ食品に対する検定法が特殊であること及び歯科食品市場がまだあまり大きくないこと等から、この基金を用いて独自の検定評価室という「ハード」を設置することは容易ではないと考えられる。大学寄附講座の設置による検定評価業務の委託や、行政関連研究機関への委託が妥当であると思われる。さらに、大学寄附講座や行政関連研究機関へ委託することで、第三者評価の対象となり、運営の透明性は担保されるものと考えられる。

将来への課題

本研究の対象としている食品酸産生性検定評価法は、国際トゥースフレンドリー協会（本部スイス・バーゼル）が、「う蝕の原因になりにくい食品」の検定法として、1982 年より採用しているものであり、この方法は現在に至るまで、ヨーロッパとアジアを中心として、う蝕予防用食品検定法のスタンダードとなっている。現在行われている歯科用トクホ食品認定のための酸産生性検定の要件は、国際トゥースフレンドリー協会の検定要件に準拠しており、ほぼ同等である。

国際トゥースフレンドリー協会は、①「う蝕の原因になりにくい間食用食品」（いわゆるレス食品）を検定対象とし、②酸産生性検定に合格した食品について「歯に信頼マーク」表示許可を与えることを業務としている。また、運営も政府機関とは独立した NPO 的運営形態であり、「歯に信頼マーク」表示により食品製造元から一定のロイヤリティーを得、それを運営費としている。一方、検定機関は協会と独立しており、検定評価費を運営費にあてている。

国際トゥースフレンドリー協会は、その対象食品及び運営形態がトクホとは異なるものの、検定基準がほぼ共通であること、さらに対象商品がトクホに包含され得ること等から、少なくとも日本国内においては、トクホと国際トゥースフレンドリー協会が連携協力し、国民の利となることが望まれる。

また、トクホにおいても、すでに国際市場を持つ国際トゥースフレンドリー協会と連携協

力することで、国際市場への展開を進めることが可能と思われる。トクホは食品産業における日本の優位性を目指す施策の一つであると理解されることからも、国際化への対応は考慮に値するものと思われる。

2) 酸産生性検定の位置付けについて

「歯表面脱灰を起こさない安全な食品」を選定する「前段階検定」の可能性

今後、歯科用トクホ食品評価指標が増加するに従って、これまで先行して行われてきた酸産生性評価指標はその位置付けが変化して行くものと思われる。とくに、歯科用トクホ食品が単に「酸を産生しない」というようないわゆる「レス食品」ではなく、より積極的な機能をもつ「機能性食品」を評価の対象とすることで、歯科用トクホ食品の酸産生性評価は、これまでのような十分条件ではなく、機能性食品検定へ至るための必要条件、すなわち「歯表面脱灰を起こさない安全な食品」を選定する「前段階検定」という位置へ機能分化して行くものと思われる（図 1-2）。

一方、トクホ食品全体を対象とした場合、口腔から食品が摂取される以上、歯表面の脱灰を引き起こすおそれのある酸産生性食品はその危険性を明示されなければならないと判断される。このような観点から、酸産生性検定は、歯科用トクホ食品に対する「前段階検定」だけではなく、トクホ食品全体に対しても行われるべき「前段階　検定」ではないかと思われる。

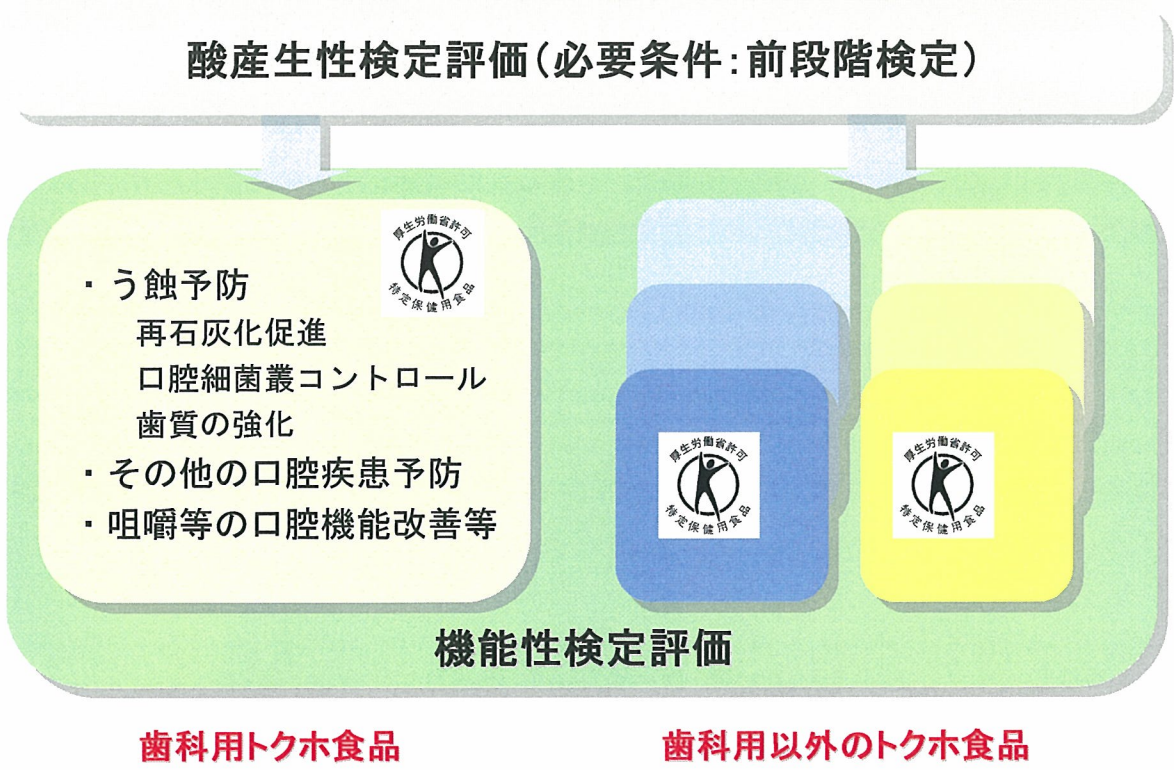

図 1-2　将来における酸産生性検定評価の位置付け．将来においては「歯表面脱灰を起こさない安全な食品」を選定する「前段階検定」への移行する可能性がある．

将来への課題

酸産生性という評価指標は、新たな食品機能を対象とする評価指標とは異なり、これまでに十分な科学的裏付けがなされていることから、その信頼性は高い。従って、酸産生性検定に関してはより簡略化した検定手順等を考慮することが考えられる。例えば、被験者の数をより少なくすることも可能と思われる。とくに酸産生性検定をトクホ食品の前段階検定として捉えるならば、種々のコスト削減の観点から、簡略化は必須であろう。

さらに、歯表面の脱灰を引き起こすおそれのある食品は酸産生性食品（＝プラーク細菌によって発酵され酸を産生する）だけではなく、自らが酸性である食品も含む。酸性を示す食品を摂取することによって歯表面の脱灰を来すことを「酸蝕」あるいは「酸蝕症」というが、酸産生性だけではなく酸蝕性を検定し評価するシステムを構築することが、今後の重要な課題であると考えられる。

1－E．結　　論

現在、東北大学大学院歯学研究科口腔生物学講座口腔生化学分野にて行われている食品酸産生性の検定システムの実用性を高める具体的方策として、①効率性の確保に加え、②信頼性の確保、及び③公益性の確保が可能な検定評価業務を専門的に行う「酸産生性検定評価機構」の設置を提言する。多角的考察から、機構の運営は、大学寄附講座の設置による検定評価業務の委託や、行政関連研究機関への委託が妥当であると結論される。さらに、トクホと国際トゥースフレンドリー協会が連携協力することによってよりよい食品評価システムの一助となり得ることが考えらえる。

また、歯科用トクホ食品検定における酸産生性検定は、今後、機能性の評価指標が増えるに従って、歯科用トクホの前段階検定へ機能分化して行くものと予測される。しかし、口腔から食品が摂取される以上、トクホ食品全体に対して、前段階検定としての酸産生性検定を行い、歯表面を脱灰する可能性のある酸産生性食品に対しその危険性を明示する必要があると判断される。さらに、歯表面脱灰の原因となるのは酸産生性食品だけではなく酸蝕性食品も含まれることから、今後、酸蝕性食品検定についての検討が必要である。

２．健康食品のバイオフィルム形成に及ぼす影響に関する検討

（DNA マイクロアレイによる口腔微生物叢の検討）

２－Ａ．研究目的

う蝕や歯周病などの口腔内細菌性疾患の発症は、口腔表面に形成されるバイオフィルム微生物叢によって惹起される。口腔バイオフィルムは、膨大な数と種類の微生物によって構成される微生物叢生態系であり、この微生物叢をコントロールすることがこれらの疾患を予防する一方法となる。

本研究では、口腔疾患に深く関連するとされる口腔微生物種を選択し、その 16S ribosomal RNA gene の塩基配列から、各種微生物種特異的 DNA プローブを作成し、これら DNA プローブを特殊紙面上に固定し、DNA マイクロアレイ化を、共同研究企業とともに行った。さらに、本格的な臨床応用を踏まえ、PCR—ハイブリダイゼーション法の種々の実験条件を検討・改良し、検出可能な菌種数ならびにシグナル強度を増加させることを試みた。

２－Ｂ．研究方法

口腔疾患に関連する口腔微生物種を選択し、その 16S ribosomal RNA gene の塩基配列から、各種微生物種特異的 DNA プローブを作成し、これら DNA プローブを特殊紙面上に固定し、DNA マイクロアレイ化を行った。その際、う蝕・歯内疾患・口腔感染症に関連する菌群（20 菌種）と歯周炎に関連する菌群（23 菌種）という、２つのカテゴリーに大きく分け、微生

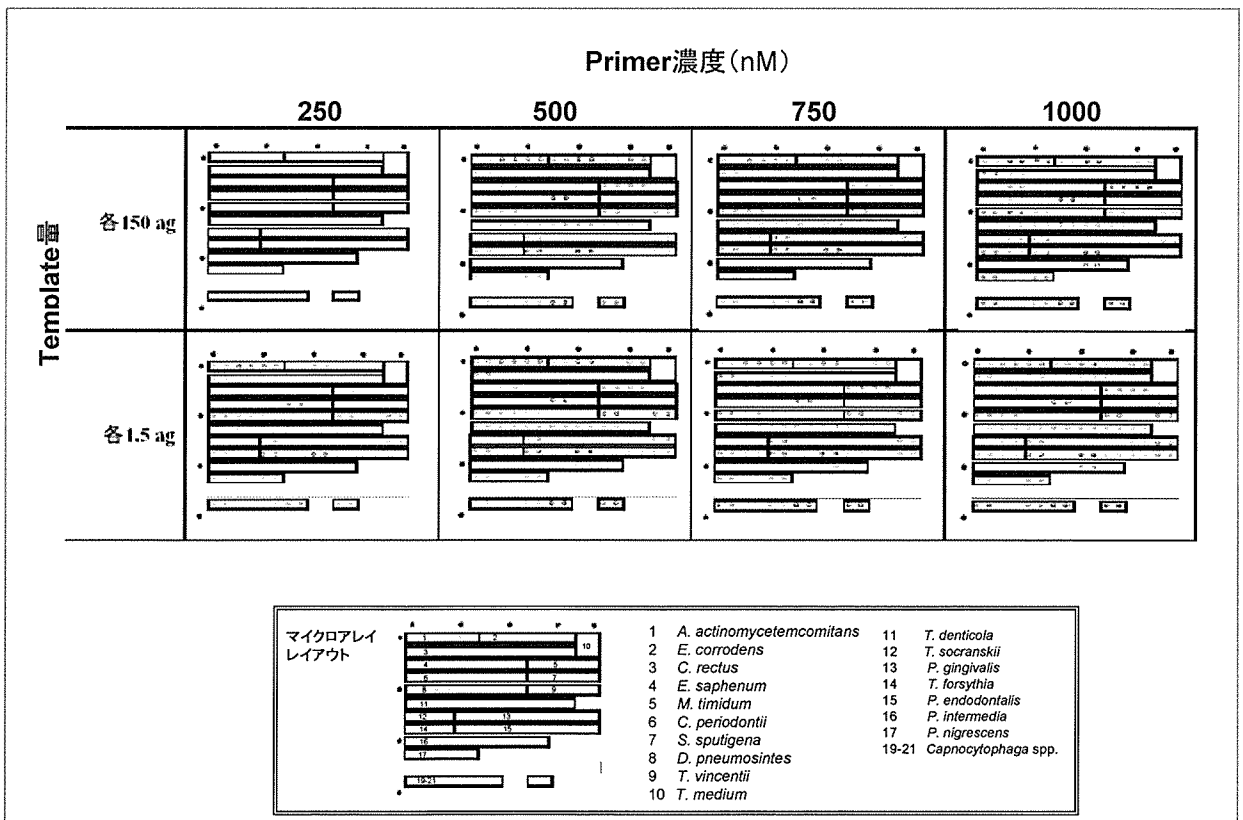

図 2-1　プライマー濃度を増加させた場合の PCR—ハイブリダイゼーション検出結果（DNA マイクロアレイ）．DNA マイクロアレイの一部を示す．プライマー濃度を 250 nM（従来法），500 nM，750 nM，1000 nM と増加させることによって、検出可能な菌種数ならびにシグナル強度が増加していることがわかる．

物種特異性ならびに検出感度を検討した。さらに、完成したDNAマイクロアレイに対して、標準口腔微生物株を用い、検出可能な菌種数ならびにシグナル強度を増加させるために、PCR—ハイブリダイゼーション法の種々の実験条件を検討した。

2－C．研究結果
2－D．考　　察

複数の口腔疾患にそれぞれ対応できるDNAマイクロアレイの作成を目指し、う蝕・歯内疾患・口腔感染症に関連する菌群と歯周炎に関連する菌群に2分類し、微生物種の種特異的DNAプローブを作成し、DNAマイクロアレイ化を行った。完成したDNAマイクロアレイに対して、標準口腔微生物株を用い、PCR—ハイブリダイゼーション法の種々の実験条件を検討した結果、増幅cycle数を従来の40から50 cyclesに増やし、さらにプライマー濃度を従来の250 nMから750 nMあるいは1000 nMに増加させることによって、検出可能な菌種数ならびにシグナル強度を増加させることができた（図2-1）。現在、本格的な臨床応用・実用化に向けて、歯肉縁下プラークバイオフィルム（慢性辺縁性歯周炎罹患者14名、コントロールの、健康な被験者80名）を用いて、従来法である、定性的な検出（Direct PCR）ならびに定量的な検出（Real-time PCR）結果との検討を進めている。

なお、本DNAマイクロアレイおよび検出装置については、現在「口腔バイオフィルム微生物叢DNAマイクロアレイ解析システム」として、共同研究企業とともに特許取得の準備を進めている。

2－E．結　　論

口腔疾患に関連する口腔微生物種を選択し、その16S ribosomal RNA geneの塩基配列から、各種微生物種特異的DNAプローブを作成し、これらDNAプローブを特殊紙面上に固定し、DNAマイクロアレイ化を行った。完成したDNAマイクロアレイに対して、標準口腔微生物株を用い、PCR—ハイブリダイゼーション法の種々の実験条件を検討した結果、プライマー濃度および増幅cycle面の改良により、検出可能な菌種数ならびにシグナル強度を増加させることができた。

慢性辺縁性歯周炎罹患者ならびに健康な被験者の歯肉縁下プラークバイオフィルムを用いた、定性的・定量的な検出法（Direct PCR、Real-time PCR）との比較検討を経て、本格的な臨床応用・実用化を目指させる段階に入った。

F．健康危険情報：特になし

G．研究発表（囲みは関連の強いもの）

研究発表（原著のみ）

1. Nakajo K, Komori R, Ishikawa S, Ueno T, Suzuki Y, Iwami Y, Takahashi N. Resistance to acidic and alkaline environments in the endodontic pathogen *Enterococcus faecalis*. *Oral Microbiol Immunol* 21(5): 283-288, 2006.

2. Miyasawa-Hori H, Aizawa S, Takahashi N. Difference in the xylitol sensitivity of

acid production among *Streptococcus mutans* strains, and its biochemical mechanism. *Oral Microbiol Immunol* **21(4)**: 201-205, 2006.

3. Mitani H, Takahashi I, Onodera K, Bae J-W, Sato T, Takahashi N, Sasano Y, Igarashi K and Mitani H. Comparison of age-dependent expression of aggrecan and ADAMTSs in mandibular condylar cartilage, tibial growth plate, and articular cartilage in rats. *Histochem Cell Biol* **126(3)**: 371-380, 2006.

4. Sato R, Sato T, Takahashi I, Sugawara J, Takahashi N. Profiling of bacterial flora in crevices around titanium orthodontic anchor plates. *Clin Oral Implants Res* **18(1)**: 21-26, 2007.

5. Shimonishi M, Takahashi N, Komatsu M. *In vitro* differentiation of epithelial cells cultured from human periodontal ligament. *J Periodontal Res* **42**: (in press), 2007.

6. 佐藤充太、下西充、高橋信博、小松正志：培養ヒト歯根膜細胞由来上皮細胞と線維芽細胞の境界面におけるオステオポンチンおよびオステオカルシンの発現. *日歯保存誌* **49(1)**: 92-98, 2006.

学会発表

1. 高橋信博：食品の口腔における酸産生性及びバイオフィルム細菌叢の評価と展望. 第55回日本口腔衛星学会・総会（大阪）シンポジウム1（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）2006年10月7日 *口腔衛生会誌* **56(4)**: 416, 2006.

2. 高橋信博：口腔環境と微生物生態系－多様で微細な小宇宙（ミクロコスモス）. 第48回歯科基礎医学会学術大会（鶴見）サテライトシンポジウム（SS-6） 2006年9月21日 *J Oral Biosci* **48(S)**: 96, 2006.

3. Takahashi N: Mutans streptococci and non-mutans streptococci. ORCA Symposium Japan, Dental Caries and tooth erosion: some current perspective (Nagoya, Japan) 2006年11月13-14日.

4. Nakajo K, Washio J, Aizawa S, Miyasawa-Hori H, Sato T, Takahashi N. pH-tolerant acid production from glucose by *Enterococcus faecalis*. 第84回 IADR (Brisbane, Australia) 2006年6月30日 *J Dent Res* **85 (Special Issue B)**: #2338, 2006.

5. Washio J, Nakajo K, Sato T, Matoba S, Seki T, Yamamoto M, Yamamoto N, Takahashi N. Metabolic properties of hydrogen sulfide production by oral *Veillonella*. 第84回 IADR (Brisbane, Australia) 2006年6月30日 *J Dent Res* **85 (Special Issue B)**: #1853, 2006.

6. Abiko Y, Sato T, Mayanagi G, Takahashi N. Quantification of periodontopathic bacteria from periodontal sites by

real-time PCR. 第84回IADR (Brisbane, Australia) 2006年6月30日 *J Dent Res* **85 (Special Issue B)**: #1855, 2006.

7. Ito Y, Sato T, Mayanagi G, Yamaki K, Shimauchi H, Takahashi N. Profiling of root-canal microflora before and after root-canal treatments. 第84回IADR (Brisbane, Australia) 2006年6月29日 *J Dent Res* **85 (Special Issue B)**: #1384, 2006.

8. Aizawa S, Miyasawa-Hori H, Takahashi N. α-amylase and its inhibitors affect starch fermentation by *Streptococcus mutans*. 第84回IADR (Brisbane, Australia) 2006年6月30日 *J Dent Res* **85 (Special Issue B)**: #2305, 2006.

9. Sato R, Sato T, Takahashi I, Sugawara J , Takahashi N. Predominance of anaerobes in crevices around titanium orthodontic anchor plates. 第84回IADR (Brisbane, Australia) 2006年6月29日 *J Dent Res* **85 (Special Issue B)**: #1383, 2006.

10. Shimonishi M, Hatakeyama J, Sasano Y, Takahashi N, Komatsu M. Non-collagenous bone proteins at interface of epithelial cells and fibroblasts. 第84回IADR (Brisbane, Australia) 2006年6月29日 *J Dent Res* **85 (Special Issue B)**: #1418, 2006.

11. Nakajo K, Takahashi Y, Kiba W, Imazato S, Takahashi N. Fluoride released from glass-ionomer cement is responsible to inhibit the acid production of caries-related oral streptococci. The 2nd International Symposium for Interface Oral Health Science (Sendai, Japan) 2007年2月19日

12. Washio J, Nakajo K, Sato T, Matoba S, Seki T, Yamamoto N, Yamamoto M, Takahashi N. The hydrogen sulfide production by oral *Veillonella*: effects of substrate and environmental pH. The 2nd International Symposium for Interface Oral Health Science (Sendai, Japan) 2007年2月19日

13. Miyasawa-Hori H, Aizawa S, Washio J, Takahashi N. Inhibitory effects of maltotriitol on the growth and the adhesion of mutans streptococci. The 2nd International Symposium for Interface Oral Health Science (Sendai, Japan) 2007年2月19日

14. Abiko Y, Sato T, Mayanagi G, Takahashi N. Profiling of subgingival plaque biofilm microflora of healthy and periodontitis subjects by real-time PCR. The 2nd International Symposium for Interface Oral Health Science (Sendai, Japan) 2007年2月19日

15. Ito Y, Sato T, Mayanagi G, Yamaki K,

Shimauchi H, Takahashi N. Microflora profiling of root canal utilizing real-time PCR and cloning-sequence analyses based on 16S rRNA genes -Differences between before and after root canal treatments-. The 2nd International Symposium for Interface Oral Health Science (Sendai, Japan) 2007年2月19日

16. Masaki M, Sato T, Sugawara Y, Sasano T, Takahashi N. *Candida* species as members of oral microflora in oral lichen planus. The 2nd International Symposium for Interface Oral Health Science (Sendai) , Japan) 2007年2月19日

17. Miyoshi Y, Watanabe M, Takahashi N. Gelatinase activity in human saliva and its fluctuation in the oral cavity. The 2nd International Symposium for Interface Oral Health Science (Sendai, Japan) 2007年2月19日

19. Aizawa S, Miyasawa-Hori H, Mayanagi H, Takahashi N. The effect of amylase and its inhibitors on acid production from starch by *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sanguinis*. The 2nd International Symposium for Interface Oral Health Science (Sendai, Japan) 2007年2月19日

20. Matsuyama J, Sato T, Takahashi N, Sato M, Hoshino E. Real-time PCR analysis of genera *Veillonella* and *Streptococcus* in healthy supragingival plaque biofilm microflora of children. The 2nd International Symposium for Interface Oral Health Science (Sendai, Japan) 2007年2月19日

21. 中條和子、川嶋順子、丸尾将太、山下宗、高橋信博：フッ化物は酸性環境、エタノールはアルカリ環境でう蝕関連菌 *Enterococcus faecalis* と *Streptococcus mutans* の糖代謝を阻害する．第48回歯科基礎医学会学術大会（鶴見）2006年9月23日 *J Oral Biosci* **48(S)**: 208, 2006.

22. 鷲尾純平、高橋信博：口腔 *Veillonella* による硫化水素産生に関する検討—菌種・基質・環境 pH による違い—．第48回歯科基礎医学会学術大会（鶴見）2006年9月23日 *J Oral Biosci* **48(S)**: 200, 2006.

23. 宮澤一堀はるみ、相澤志津子、高橋信博：マルトトリイトールのミュータンス連鎖球菌に対する増殖及び菌体付着抑制効果．第48回歯科基礎医学会学術大会（鶴見）2006年9月22日 *J Oral Biosci* **48(S)**: 147, 2006.

24. 安彦友希、佐藤拓一、真柳弦、高橋信博：歯肉縁下プラークバイオフィルムの多様性解析から見た *Porphyromonas gingivalis* と *Streptoccocus gordonii* の関連性．第48回歯科基礎医学会学術大会（鶴

見) 2006年9月23日 *J Oral Biosci* **48(S)**: 202, 2006.

25. 三好慶忠、渡辺誠、高橋信博：唾液ゲラチナーゼ活性とその口腔内での活性変動. 第48回歯科基礎医学会学術大会(鶴見) 2006年9月23日 *J Oral Biosci* **48(S)**: 181, 2006.

26. 相澤志津子、宮澤一堀はるみ、真柳秀昭、高橋信博：ミュータンスレンサ球菌のデンプンからの酸産生とそのアミラーゼ阻害剤による影響. 第48回歯科基礎医学会学術大会（鶴見）2006年9月22日 *J Oral Biosci* **48(S)**: 140, 2006.

27. 松山順子、佐藤拓一、高橋信博、佐藤ミチ子、星野悦郎：小児の歯垢細菌叢の *Streptococcus, Veillonella* の定量的解析. 第48回歯科基礎医学会学術大会（鶴見）2006年9月23日 *J Oral Biosci* **48(S)**: 208, 2006.

28. 鷲尾純平、佐藤拓一、竹内裕尚、高橋信博：唾液細菌および口腔 *Veillonella* による口臭成分の一つ硫化水素の産生とその唾液や口腔環境との関わり. 第55回日本口腔衛生学会・総会（大阪）2006年10月8日 *口腔衛生会誌* **56(4)**: 609, 2006.

29. 清水弘一、五十嵐公英、熊耳隆洋、高橋信博：乳幼児プラークの酸産生能、アルカリ産生能と齲蝕増加との関連. 第55回日本口腔衛生学会・総会（大阪）2006年10月8日 *口腔衛生会誌* **56(4)**: 578, 2006.

30. 中條和子, 高橋雄介, 騎馬和歌子, 今里　聡, 高橋信博：フッ化物徐放性修復材料溶出液は齲蝕関連菌の酸産生を抑制する. 第125回日本歯科保存学会2006年度秋季学術大会（鹿児島）2006年11月10日 *日歯保存誌* **49(秋季特別号)**: 62, 2006.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許出願（予定）

(1) 口腔バイオフィルム微生物叢 DNA マイクロアレイ解析システム

研究成果の刊行に関する一覧表

書　籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書　籍　名	出版社名	出版地	出版年	ページ
細野朗・上野川修一	第2編 機能性食品・素材，第6章 免疫アレルギーから見た機能性食品.	吉川敏一 大澤俊彦	アンチエイジングと機能性食品—今なぜバイオマーカーか—	シーエムシー出版	東京	2006	191-205 (総頁数：234)
高橋信博	ミュータンスレンサ球菌の糖代謝	浜田茂幸、大嶋隆	新・う蝕の科学	医歯薬出版	東京	2006	55-66
Nakajo K, Takahashi Y, Kiba W, Imazato S, Takahashi N	Fluoride released from glass-ionomer cement is responsible to inhibit the acid production of caries-related oral streptococci.	Watanabe M, Takahashi N, Takada H	International Symposium for Interface Oral Health Science	Springer	Tokyo	2007	in press
Washio J, Nakajo K, Sato T, Matoba S, Seki T, Yamamoto N, Yamamoto M, Takahashi N	The hydrogen sulfide production by oral *Veillonella*: effects of substrate and environmental pH.	Watanabe M, Takahashi N, Takada H	International Symposium for Interface Oral Health Science	Springer	Tokyo	2007	in press
Miyasawa-Hori H, Aizawa S, Washio J, Takahashi N	Inhibitory effects of maltotriitol on the growth and the adhesion of mutans streptococci.	Watanabe M, Takahashi N, Takada H	International Symposium for Interface Oral Health Science	Springer	Tokyo	2007	in press
Abiko Y, Sato T, Mayanagi G, Takahashi N	Profiling of subgingival plaque biofilm microflora of healthy and periodontitis subjects by real-time PCR.	Watanabe M, Takahashi N, Takada H	International Symposium for Interface Oral Health Science	Springer	Tokyo	2007	in press
Ito Y, Sato T, Mayanagi G, Yamaki K, Shimauchi H, Takahashi N	Microflora profiling of root canal utilizing real-time PCR and cloning- sequence analyses based on 16S rRNA genes - Differences between before and after root canal treatments-	Watanabe M, Takahashi N, Takada H	International Symposium for Interface Oral Health Science	Springer	Tokyo	2007	in press
Masaki M, Sato T, Sugawara Y, Sasano T, Takahashi N	*Candida* species as members of oral microflora in oral lichen planus.	Watanabe M, Takahashi N, Takada H	International Symposium for Interface Oral Health Science	Springer	Tokyo	2007	in press
Miyoshi Y, Watanabe M, Takahashi N	Gelatinase activity in human saliva and its fluctuation in the oral cavity.	Watanabe M, Takahashi N, Takada H	International Symposium for Interface Oral Health Science	Springer	Tokyo	2007	in press

Aizawa S, Miyasawa-Hori H, Mayanagi H, Takahashi N	The effect of amylase and its inhibitors on acid production from starch by *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sanguinis*.	Watanabe M, Takahashi N, Takada H	International Symposium for Interface Oral Health Science	Springer	Tokyo	2007	in press
Matsuyama J, Sato T, Takahashi N, Sato M, Hoshino E	Real-time PCR analysis of genera *Veillonella* and *Streptococcus* in healthy supragingival plaque biofilm microflora of children.	Watanabe M, Takahashi N, Takada H	International Symposium for Interface Oral Health Science	Springer	Tokyo	2007	in press

雑　誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Nakajima-Adachi H, Ebihara A, Kikuchi A, Ishida T, Sasaki K, Hirano K, Watanabe H, Asai K, Takahashi Y, Kanamori Y, Shimojo N, Matsuda H, Kohno Y, Hachimura S, and Kaminogawa S,	Food antigen causes TH2-dependent enteropathy followed by tissue repair in T-cell receptor transgenic mice.	*J. Allergy Clin. Immunol.*	117	1125-1132	(2006).