原	著
---	---

各種甘味料溶液の含嗽が初期のプラーク沈着に及ぼす影響

——臨床的ならびに細菌学的検討——

野 口 俊 英 北 村 滋 泉 澤 勝 憲
福 田 光 男 木 下 四 郎

東京医科歯科大学歯学部第2 歯科保存学教室（主任：木下四郎教授）

（1984年3月27日 受付）

Clinical and Microbial Estimation of the Effect of Coupling Sugar, Sorbitol and Xylitol Rinses on the Early Dental Plaque Formation in Man

Toshihide Noguchi, Shigeru Kitamura, Katsunori Izumizawa,
Mitsuo Fukuda and Shiro Kinoshita

Department of Periodontology, School of Dentistry, Tokyo Medical and Dental University
(Chief: Prof. Shiro Kinoshita)

The purpose of this study was to evaluate the effect of the sugar substitutes on the early dental plaque formation in man. Sugar substitutes used in this study were sorbitol, xylitol and coupling sugar. Ten dental students participated as volunteers and rinsed with a 10% solution of these sugar substitutes, sucrose and distilled water three times a day for 30 seconds each time. The trial was of double-blind cross-over design. Before the beginning of each test period, a thorough oral prophylaxis to remove completely all the plaque and calculus was carried out. The subjects were then instructed to refrain from oral hygiene procedure for 3 days. The dental plaque accumulated on the upper anterior teeth during each test period was evaluated clinically and microbiologically.

The results obtained were as follows:

1. Plaque accumulation was prevented more effectively on the teeth rinsed with coupling sugar, but the differences with the other substitutes were not significant.
2. The significant differences in the number of microbial colonies from the plaque samples could not be found among the sugar substitutes, sucrose and distilled water.

I. 結 言

歯科の二大疾患といわれるウ蝕および歯周疾患が、主としてプラーク中の細菌により引き起こされるということは、広く認められている^{1,2)}。ま

た、食餌中に含まれる Sucrose がプラークの沈着を促進し、さらに、プラークの酸産生を活性化させることもよく知られている^{3,4)}。

したがって、プラーク量を減少させ、疾患の発生を予防するためには、摂取する Sucrose を減ら

すことが効果的と考えられる。

Sucrose の摂取量を減らす方法の1つに、同様の甘味を有し、しかも、細菌によって代謝されることの少ない各種の甘味料を用いる方法がある。しかし、Sucrose のすべてを他の甘味料におきかえるのはむずかしい。そのため、その一部を他の甘味料におきかえることが多く行われている。その際、用いられる代替甘味料には、(1)良質な甘みをもっている、(2)食品に加工されるときに、それ自身が変化することもないし、また食品を変化させることもなく、安定である、(3)細菌により代謝されて、不溶性グルカン合成の基質とならない、(4)同じく、酸発酵の基質とならない、(5)生体を障害するような副作用を示さない、といった一般的な性質のほか、細菌の Sucrose 代謝を抑制するような性質があれば、なお良いこととなる。

Sucrose に代わる代替甘味料には、Fructose, Maltose, Sorbose などの天然甘味料、Xylitol などの各種の糖アルコール類、あるいは、Stevioside などの配糖体、その他がある。

Coupling Sugar[®]^{注1)} は、わが国で開発された新しい甘味料で、澱粉と Sucrose の混合液にアミラーゼを作用させて作られる。したがって、これは、Sucrose に種々の長さの澱粉のグルコース残基が結合した化合物となっている。そのため、Coupling Sugar は、Sucrose に近い良質の甘みと、生体によって代謝されるので副作用を考えにくいといった、優れた特徴を有している。また、この Coupling Sugar や Xylitol には、Str. mutans が Sucrose から不溶性グルカンを合成し、管壁に付着するのを抑制する作用がある、と報告されている^{5,6)}。したがって、Coupling Sugar や Xylitol には、Sucrose を一部置きかえる形で使用された場合、他の代替甘味料以上のプラーク沈着抑制効果を示す可能性があると思われる。

本実験の目的は、口腔清掃停止直後の初期のプラーク形成に及ぼす、各種甘味料溶液含嗽の影響を調べ、かつ、そこに細菌学的検討を加えることであった。

II. 材料と方法

1. 使用した甘味料

今回用いた甘味料は、Sucrose, Sorbose, Xylitol および Coupling Sugar であり、表1に今回の Coupling Sugar 組成を示した。これらの甘味料を蒸留水に溶解し、10%水溶液とした。さらに、これらの水溶液間の味覚差をなくす目的で、Green Peppermint (Suntory 社製) を香料として0.2% 加えた。コントロールとしては、甘味料を含まない、蒸留水と香料のみのものを用いた。

2. 被験者および被験部位

被験者は健康な東京医科歯科大学歯学部男子学生10名(年齢22~31歳;平均23.9歳)とし、実験前および実験中に抗生剤等の服用のないことを確認した。

被験部位は上顎前歯部とし、そこにウ蝕、充填物がなく、また、臨床的に正常と思われる歯周組織を有することを事前に確認した。

3. 実験方法

1) 実験日程

図1に実験日程を示した。実験0日目に、2+2の唇側歯面を浮石沫とブラシコーンで30秒間研磨し、直ちに被験部位の口腔清掃を停止させた。この日から、甘味料溶液 25 ml/ ずつを毎食後1日3回、各30秒間含嗽させた。口腔清掃停止3日後、細菌学的検討を行うために、|2.の唇側歯面から歯肉縁上プラークを、血液その他の混合物が入らないように注意して採取した。ついで、プラークの

表1 今回用いた Coupling Sugar の組成

F	フルクトース	0.3(%)
G	グルコース	6.3
G F	シュクロース	13.1
G ₂	マルトース	10.7
G ₂ F	グルコシルシュクロース	13.8
G ₃	マルトトリオース	8.1
G ₃ F	マルトシルシュクロース	9.0
G ₄	≤ }	38.7
G ₄ F	≤ }	

注1) 林原生物化学研究所

沈着量を測定するために、1|1 を Red-Cote® (Butler 社製) で染色後、図 2 に示す規格撮影装置⁷⁾によって写真撮影を行った。撮影に用いた機材は Medical-Nikkor を装着したニコン F で、フィルムはフジクローム R100 を使用した。

実験期間中の食事は通常どおりとしたが、この期間中の嗜好品の摂取について可能な限り調査した。同時に、下痢等の副作用についてもアンケートをとった。被験者への被験含嗽液の割り付けは、ラテン方格法で行い、各被験者は上記のプログラムを、自由に口腔清掃のできる期間 (4 日) をおいて、5 回くり返した。なお、実験はすべて二重盲検法で行った。

2) プラーク沈着量の測定

プラークの沈着量は、撮影したスライドを10倍で方眼紙上に拡大投影し、歯の外形をトレースした。つぎに染色された沈着物を表 2 に示す判定基準にしたがって 4 段階に分類し、各段階ごとにト

0 日	歯面の研磨
口腔清掃の停止
含嗽開始
3 日	プラークの採取--- 細菌検査
染色, 写真撮影--- 沈着量測定
含嗽停止
口腔清掃の再開

(5 回のくり返し)

図 1 実験日程

図 2 規格撮影装置

レースした。図 3 にその実際例を示す。それぞれの面積算出には、方眼紙上にトレースした歯面と各評価の面積を 25mm^2 のマス目を数えることにより計測し、全歯面に対する割合、すなわち、沈着率で表した。マス目の $1/2$ に満たない部分はマス目の数に入れなかった。

3) 細菌検出法

口腔清掃停止 3 日後、12 の唇側歯面より、ポケット探針で血液、滲出液、唾液が混入しないように注意して歯肉縁上プラークを採取した。直ちに 3ml の滅菌希釈液 (Sodium metaphosphate 10g , L-cystein 0.5g , Resazurin 0.001g に 4 倍希釈した Ringer 液を加えて全量 $1,000\text{ml}$ とした⁸⁾ の入ったフタ付小試験管に投入した。そして Sonicator で 20W , 3 分間超音波処置後、 500nm にて吸光度を測定した。つぎに $10^{-1} \sim 10^{-6}$ までの連続希釈系列を作り、プラークの均質な希釈液とし、以下に述べる培地で分離培養した。

今回用いた培地とそれぞれの培地で分離した細菌名を示すと、

① 血液寒天培地は Brain Heart Infusion Agar (Difco)⁹⁾ に 5% 馬脱繊維血を加えたものを使用

表 2 歯垢沈着量の評価基準

—	: 染まらない
+	: 薄く染まる
++	: 濃く染まる
+++	: 厚く濃く染まる

図 3 プラーク沈着量の評価法

した。この培地に生育した colony を総菌数とした。

② Mitis-salivarius 寒天培地は Mitis Salivarius Agar (Difco) に Chapman Tellurite Solution (Difco) を添加して作った¹⁰⁾。この培地に生育した colony をその形態より連鎖球菌とした。

③ MS-B 培地は、Mitis-salivarius 培地に Sucrose と bacitracin を加えたもの¹¹⁾ で、この培地に生育した colony を *Str. mutans* とした。

④ SL 培地は、Rogosa SL Agar (Difco) で作り、乳酸桿菌、菌数測定用とした。

⑤ VAV 培地は、Veillonella Agar (Difco) に vancomycin を加えたもので Veillonella 菌数測定用とした。

⑥ CF 培地は普通寒天培地（日水製薬）に Basic fucsin, Crystal violet を加えたものであり¹²⁾、*Neisseria* 菌数測定用とした。

細菌の培養には、それぞれの希釈系列より 0.3 ml を①～⑥の各培地に滴下し、コンラージ棒にて均一に塗抹接種した。血液寒天培地は2系列作り、一方を好氣的に、他方を Gas Pack jar (BBL) を用いて嫌氣的に48時間培養した。Mitis-Salivarius 培地、MS-B 培地を candle jar で、SL 培

地、VAV 培地を Gas pack jar で、CF 培地は好氣的に各48時間培養した。各培地上に生育した colony を拡大鏡下で計数した。こうして得られた colony 数に希釈倍数を乗じて菌数を求め、さらに比較のために、Optical Density (O.D.) 値で除去し、1 O.D. あたりの菌数とした。

Ⅲ. 結 果

実験後に被験者から回収したアンケートによれば、下痢等の副作用は、いずれの甘味料溶液を含嗽した場合においてもなかった。

1. プラーク沈着率

全プラークの沈着率、すなわち、十、卅、卅の合計を図4に示した。図中の太い縦線は、平均値を示している。平均値では、Coupling Sugar で含嗽した場合が最も小さい値を示したが、各種甘味料間では、統計学的な有意差は認められなかった。

つぎに、プラークの厚さに対する甘味料の影響を調べるために、厚みのあるプラーク、すなわち、卅、卅の合計を全体の歯垢量で除して、百分率を求めた。その結果を図5に示した。

厚みのあるプラークの割合は、Sucrose で含嗽

図4 全歯垢（十、卅、卅）の沈着率

図5 厚みのある歯垢（卅，卅）の全歯垢（+，卅，卅）に対する割合

表3 甘味料別の細菌組成

	D.W.	Sucrose	C-Sugar	Sorbose	Xylitol
好気性菌	8.68	8.59	8.43	8.48	8.75
嫌気性菌	8.88	8.87	8.72	8.73	8.96
連鎖球菌	8.32	8.23	8.06	8.27	8.04
ミュータンス	0.97	2.36	2.10	1.97	1.68
乳酸桿菌	2.58	1.76	1.85	2.69	2.67
ベイヨネラ	7.55	7.20	7.03	7.65	7.38
ナイセリア	6.07	6.05	6.33	6.37	6.72

log (CFU/O.D.)

した場合に比べて、他の甘味料では小さくなってしたが、統計学的な有意差はなかった。

2. 細菌学的検索

細菌学的検索の結果を表3に示した。これをグラフにしたものが、図6である。

Str. mutans についてみると、Sucrose 溶液で含嗽した場合に一番多く検出され、Coupling Sugar, Sorbose, Xylitol の順に少なくなっていた。ただし、これらに統計学的な有意差はみられなかった。さらに、その他の全好気性菌、全嫌気性

菌、連鎖球菌、乳酸桿菌、Veillonella, Neisseria については、各甘味料溶液の違いによる差は、ほとんど認められなかった。

IV. 考 察

ウ蝕や歯周疾患の原因であるプラークを減らす目的で、Sucrose を他の甘味料におきかえた研究は数多い¹³⁻¹⁸⁾。使用された代替甘味料も、Sorbose¹³⁾、Maltose¹⁴⁾、Coupling Sugar^{15,16)}、Xylitol^{17,18)}、Sorbitol¹⁸⁾ 等々、さまざまである。また、

図6 甘味料別の各細菌数

代替甘味料の投与方法も、食飼に配合するもの¹⁵⁾、トローチ錠¹³⁾で、キャンディとして^{16,18)}、あるいは、チューインガムに含ませて¹⁷⁾、と種々に工夫している。

芳賀¹⁵⁾は、サルを用いて、Coupling Sugar 含有の飼料がプラーク沈着にどのような影響を及ぼすかを調べた。その結果、厚みのあるプラークの沈着率で Coupling Sugar 投与群は、Sucrose 投与群より有意に小さい値を示したと述べ、さらに、有意差は示さなかったが、*Str. mutans* は Sucrose 投与群で多く、Coupling Sugar 投与群で少なかった、と報告している。また、真木¹⁶⁾は、Coupling Sugar 配合キャンディをヒトに摂取させる実験を行い、Sucrose 配合キャンディと

の比較で、厚い成熟したプラークの沈着量が少なかったこと、また、この現象が唾液中の *Str. mutans* レベルの高い者において著しかったことを報告している。

Mühlemann ら¹³⁾は、トローチ錠という形で、Sorbose を1週間にわたりヒトに投与し、コントロール群よりも Sorbose 投与群の方が有意にプラーク沈着が少なかったと報告している。

Mäkinen, Scheinin ら¹⁷⁾は、食物中の Sucrose を Xylitol にかえて種々の研究を行い、プラーク沈着、ウ蝕、細菌叢、その他全身的に与える影響にまで及ぶ報告をしている。それによると、全身的影響は、用いた被験者については、ほとんどなく、プラーク沈着、ウ蝕などには、すばらしい抑

制効果がみられたと述べている。

しかし、これらの研究は、Sucrose を大幅に代替甘味料におきかえた形でなされているように思われる。

Sucrose は甘味料として広く使用されているため、そのすべてを他の甘味料におきかえることは非常にむずかしく、かつ現実的でもない。したがって、代替甘味料としては、Sucrose の一部をおきかえる形で使用される場合が多くなると思われる。そのような使用法をとった場合にも、効果的に作用するには、細菌の Sucrose 代謝を阻害する性質が代替甘味料にあることが望ましい。

今回、わたくし達は、以上の観点から、1日3回30秒含嗽という実験条件で、各種甘味料の検討を行った。

その結果、有意差はなかったが、プラークの広がり(図4)とその厚み(図5)の両者からみて、プラーク量としては、Sucrose が最も多く、Coupling Sugar が最も少なく、Sorbitol, Xylitol の場合は、その中間の値で、蒸留水とほぼ同じ値をとった、と考えることができた。

Coupling Sugar は表1に明らかなように、それ自身 Sucrose を13.1%含んでいる。しかし、同時に含まれている Glucosyl Sucrose や Maltosyl sucrose などが、受容体型阻害機作や拮抗阻害機作を示すため、Str. mutans の不溶性グルカン合成を阻害し、付着を妨げると考えられている¹⁹⁾。

しかし、細菌学的検索の結果では、Str. mutans の値は、Sucrose, Coupling Sugar とともにほとんど同一であった(図6、表3)。

これは、おそらくつぎのような理由によるものではないかと推察される。すなわち、プラークは、多種類の細菌がお互いに複雑に影響を及ぼし合いながら存在する細菌叢であること、あるいは、炭水化物の存在なしでも形成されるものであること¹⁸⁾、また、今回の実験が、研磨された歯面に新たにプラークが形成されていく¹⁾その初期の段階に対する甘味料溶液の含嗽の影響を調べたものであること、などが関係していると考えられる。いずれにしても、Str. mutans については、さらに

検討を加えていく必要があると思われる。

V. 結 論

口腔清掃停止直後の初期のプラーク形成に及ぼす、各種甘味料溶液含嗽の影響を調べ、以下の結果を得た。

1) 全プラークの沈着率は、平均値では Coupling Sugar で含嗽した場合が最も小さい値を示したが、統計学的な有意差はなかった。

2) 同じく、全プラーク中の厚みのあるプラークの割合は、Sucrose で含嗽した場合が最も大きかったが、統計学的な有意差はなかった。

3) しかし、細菌学的検索の結果は、調べた全好気性菌、全嫌気性菌、連鎖球菌、Str. mutans、乳酸桿菌、Veillonella、Neisseria のすべてについて、各甘味料溶液間にほとんど差は認められなかった。

4) したがって、Coupling Sugar や Xylitol について *in vitro* で明らかにされている Str. mutans に対する阻害作用は、必ずしも認められなかった。

謝 辞

本研究にご協力頂いた、東京医科歯科大学歯学部学生諸兄、ならびに第2保存学教室、教室員各位にお礼申し上げます。ご援助を頂いた、国立予防研究所歯科衛生部各位および、林原生物科学研究所に、お礼申し上げます。

本論文をご校閲いただいた歯科薬理学教室主任小椋秀亮教授に感謝申し上げます。

本論文の要旨は第24回春季日本歯周病学会総会にて発表した。

文 献

- 1) Löe, H., Theilade, E. and Jensen, S. B.: Experimental gingivitis in man. J. Periodontol. 36: 177-187, 1965.
- 2) Axelsson, P. and Lindhe, J.: Effect of controlled oral hygiene procedures on caries and periodontal disease in adults. J. Clin. Periodontol. 5: 133-151, 1978.
- 3) Carlsson, J. and Egelberg, J.: Effect of diet on early plaque formation in man. Odont. Revy.

- 16: 112-125, 1965.
- 4) 木下四郎, A. Shait, M. Brebou, Hans R. Mühlemann, 今川与曹: 初期の歯苔と歯石の形成に及ぼすキャラメルの影響. 口病誌 35: 370-375, 1968.
 - 5) 竹内 叶, 今井 奨, 西沢俊樹: Streptococcus mutans の平滑面への付着及び酸発酵に及ぼす Coupling Sugar の影響. 虫歯と Coupling Sugar, 第1回研究会議報告書 14-18, 1975.
 - 6) 池田 正, 大竹繁雄, 渡辺千秋, Tetsuo SHIO-TA: Xylitol の Streptococcus mutans 菌体付着, 不溶性 glucan 生成への影響及び代謝適応性. 日大口腔科学 5: 202-205, 1979.
 - 7) 泉澤勝憲, 福田光男, 野口俊英, 仲島知美, 大出てい子, 北村 滋, 木下四郎: 口腔内規格写真撮影のための簡便な装置について. 日歯周誌 23: 653-658, 1981.
 - 8) Manganiello, A. D., Socransky, S. S., Smith, C. Propas, D., Oram, V. and Dogon, I. L.: Attempts to increase viable count recovery of human supragingival dental plaque. J. Periodont. Res. 12: 107-119, 1977.
 - 9) 医科学研究所学友会編: 細菌学実習提要. 東京, 1976, 丸善, 63.
 - 10) Chapman, G. H.: The isolation and testing of faecal streptococci. Am. J. Digest. Dis. 13: 105-107, 1946.
 - 11) Gold, O. G., Jordan, H. V. and Van Houte, J.: A selective medium for streptococcus mutans. Archs. oral Biol. 18: 1357-1364, 1973.
 - 12) 武井 盈, 深津利雄, 吉木洋二: 口腔内微生物の動態に関する基礎的研究. 3. Neisseria と Str. salivarius の相互関係. 愛院大歯誌 5: 122-217, 1967.
 - 13) Mühlemann, H. R., Iselin, W. and Marthaler, T. M.: Antiplateau effect of sorbose. Helv. Odont. Acta. 21: 69-74, 1977.
 - 14) Skinner, A., Connolly, P. and Naylor, M. N.: The influence of the replacement of dietary sucrose by maltose on the formation and biochemistry of human dental plaque. Archs. oral Biol. 27: 603-608, 1982.
 - 15) 芳賀健輔: Coupling Sugar® の歯垢沈着に及ぼす影響について—蔗糖含有飼料を摂取させた場合との比較について—. 日歯周誌 22: 55-71, 1980.
 - 16) 真木吉信, 石川哲之, 松久保隆, 竹内光春: Coupling Sugar 配合 Candy (CS: 70, Maltose 30) での歯垢形成能について. 虫歯と Coupling Sugar 第5回研究会議報告書 54-58, 1980.
 - 17) Scheinin, A. and Mäkinen, K. K., et al.: Turku sugar studies. Acta. Odont. Scand. 33, Suppl. 70: 1-351, 1975.
 - 18) Rateitschak-Plüss, E. M. and Guggenheim, B.: Effects of a carbohydrate-free diet and sugar substitutes on dental plaque accumulation. J. Clin. Periodontol. 9: 239-251, 1982.
 - 19) 荒谷真平, 竹内光春: カップリングシュガーと虫歯, 東京, 1981, 光琳, 277-289.