

平成22年5月17日現在

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2007～2009

課題番号：19592423

研究課題名（和文） 毎日の食事と食物成分が歯石形成を促進する可能性

研究課題名（英文） Possibility of increase of dental calculus formation by daily meals and food ingredients.

研究代表者

日高 三郎 (HIDAKA SABURO)

福岡医療短期大学歯科衛生学科・教授

研究者番号：00082452

研究成果の概要（和文）：4種類の日常的な食事献立の試験管内石灰化への影響につき pH 低落法を用いて研究した。主食のごはんは石灰化を促進させたが、食パン（トースト）は抑制した。献立1～3のじゃがいもなど2～3の料理と食材、さらに洋食的な献立4のバターなど2～3の料理と食材は石灰化を促進した。しかし、促進効果は口腔内では唾液の影響で発揮されないと考えられるので、われわれの日常的な食事は歯石形成に抑制的であることが示唆される。

研究成果の概要（英文）： The effects of four kinds of daily meals on the in vitro calcification were studied using the pH drop method. Boiled rice increased the calcification, while toasted bread decreased it. A few dishes and food ingredients from meal 1 – 3 (e.g. potato) and Western-type meal 4 (e.g. butter) increased the calcification. However, since saliva in oral cavity inhibits their promoting effect, it is suggested that our daily meals may be inhibitory on the dental calculus formation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	700,000	210,000	910,000
2008年度	500,000	150,000	650,000
2009年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	1,700,000	510,000	2,210,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・社会系歯学

キーワード：口腔衛生学（含公衆衛生学・栄養学）

1. 研究開始当初の背景

食事に関連する疾患としては、心臓血管系疾患、肥満、癌、う蝕などが知られている。これらのうち、食事が口腔疾患に与える影響としてはう蝕と酸蝕があるが、う蝕は食物、特にショ糖と強い関連がある。また、食物は口腔内石灰化とも強く関連しており、歯石形成に食物の形状、粘着性などの影響が知られている。しかし、食物成分との関係は知られていなかった。そこで、食事と歯石形成の関係を研究する目的で各種デンプンのリン酸カルシウム形成に対する *in vitro* 促進効果を研究し、その結果を受けて、実際の日常献立を作成して、主食、主菜、副菜、汁物の *in vivo* 歯石形成への可能性につき研究を行った。

2. 研究の目的

口腔内石灰化としてはエナメル質の再石灰化と歯石形成があるが、再石灰化は唾液の流量と唾液含有の無機・有機成分、さらに、抗生物質、フッ化物、食物成分などの内・外因性の要因によって惹き起こされる。一方、歯垢の石灰化である歯石はリン酸カルシウム塩で構成されており、その形成は歯周病と結びついている。歯石形成に影響を与える要因としては年齢、性別、食物、口腔衛生状態、糖尿病などが考えられている。最近、著者等は試薬レベルのトウモロコシ、米、ジャガイモ由来のデンプンを用いた *in vitro* 実験で、それらが無定形リン酸カルシウム (ACP) から hidroキシアパタイト (HAP) への転換反応を促進することを報告した。しかし、試薬レベルのデンプンはわれわれが日常的に食物から摂取するデンプンに比較すれば高度に精製されたものである。そこで、より日常的な口腔内石灰化の効果に近づくために、市販のトウモロコシ、米、ジャガイモ、葛などの数種類のデンプン粉を用いて *in vitro* 実験を行ったところ、同様に ACP 形成から HAP への転換反応を促進することが見出された。このように著者等は食物成分と口腔内石灰化との可能的関係を研究している中で、デンプンにリン酸カルシウム沈殿物形成促進効果を、タンパク質には抑制効果を、脂質には弱い促進効果がある結果を得ている。今回、これらの研究の続きとして、より身近な日常

的食事と口腔内石灰化との関係を解明する研究を試みた。

3. 研究の方法

(1) 食材と試薬

主食材料としては、米 [ひのひかり (大分県)] と食パン [㈱ リョウユーパン、福岡] を用いた。主菜、副菜、汁物の材料としての鯖肉、鶏肉、小松菜、にんじん、かぶ、レタス、さやいんげん、しいたけ、しらす、なす、ジャガイモ、ブロッコリー、紫キャベツ、マッシュルーム [(有) ミツクラ農林、岡山]、もめん豆腐 [(株) 三好食品工業、福岡]、絹ごし豆腐 [㈱ 筑豊食品、福岡]、麦みそ

表 1. 使用した主食、主菜、副菜、汁物献立

献立	主食	主菜	副菜	汁物
1	ごはん	鯖の柚香焼き	小松菜とにんじんの白和え	豆腐のみそ汁
2	ごはん	鯖の竜田揚げ	かぶのサラダ	豆腐のすまし汁
3	ごはん	鶏肉の干草巻き	なすの煮物	みそ汁
4	食パン	鶏肉のクリームシチュー	ブロッコリーのサラダ	野菜スープ

[㈱ チョーコー醤油、長崎]、バター [㈱ 雪印乳業、北海道]、だし汁 (コンブとカツオ節)、クリームシチューの材料と野菜スープの材料の数種類の野菜は近隣のスーパーマーケットで購入した。また、小麦粉の薄力粉、中力粉、強力粉は日清フーズ株式会社 (東京) の製品を用いた。小麦タンパク質グルテンはシグマ・アルドリッチ・ジャパン (東京) から購入した。その他の試薬は ㈱ アビオス (大阪) から購入した。

(2) pH 測定

記録計に接続した pH メーター (F-21, HORIBA, 東京) と pH 電極 (6378-10D,

HORIBA, 東京)を用いた。反応液の容量は 2 ml, 温度は 37 ± 0.1°C、反応液は攪拌し、pH の変化を記録した。

(3) pH 変化による無定形リン酸カルシウム (ACP) 形成とハイドロキシアパタイト (HAP) への転換反応の測定

100 mM の硝酸カルシウムと 100 mM のリン酸二水素カリウムのストック溶液を 2 mM Hepes 緩衝液 (pH 7.4) で作製した。2 mM Hepes の 1.88 ml に、60 μl の 100 mM 硝酸カルシウム溶液を加え、次いで 60 μl の 100 mM リン酸二水素カリウム溶液を加えて反応を開始した。カルシウム、リン酸共に 3 mM を最終濃度として用いた。日常的食事として考案した 4 種類の献立 (表 1) の主食と主菜、副菜とそれらの固形食材の重量 (g) に 4 倍量の蒸留水を加えて、ブレンダーまたは乳鉢で破碎、磨り潰して懸濁液を調製した。食事時の咀嚼状態では食物のカスを含んでいるので、これらの懸濁液と、汁物と液体または半流動状の食材の効果的な適切量 (μl または mg/ml) を、リン酸を加えて反応を開始する 5 分前に反応液に加えた。また、この pH 低落法で測定した ACP 形成と HAP への転換反応の 1 分当たりの pH 変化を消費カルシウム濃度 (ppm/min) に換算した。誘導時間 (min) は第 2 の pH 低落スロープに対する接線の延長とベースラインとの交点より決定した。

4. 研究成果

(1) ごはんと食パン (トースト) のリン酸カルシウム沈殿物形成への影響

表 2 に示したように、ごはんは 160 - 320 μl (1/12.5 - 1/6.25) の濃度で、無定形リン酸カルシウム (ACP) からハイドロキシアパタイト (HAP) への転換反応速度が対照に比べ 24 - 33% 増加し、誘導時間は 1.3 - 1.5 倍となった。食パン (トースト) は 80 - 160 μl (1/25 - 1/12.5) の濃度で HAP への転換反応速度が対照の 38 - 27% となり、誘導時間は 1.7 - 4.6 倍となった。なお、ごはん、トーストとも ACP 形成速度には影響がなかった。

(2) 献立 1 の主菜、副菜、汁物のリン酸カルシウム沈殿物形成への影響

鯖の柚香焼きは 100 - 400 μl の濃度範囲でリン酸カルシウム沈殿物形成を抑制した。小

松菜は 50 - 400 μl の濃度範囲で抑制した。にんじんは 100 - 400 μl の濃度範囲で抑制した。小松菜とにんじんの白和え [小松菜: にんじん: もめん豆腐 = 1 : 1 : 1 (重量比)] では、にんじん同様に、100 - 400 μl

表 2. 無定形リン酸カルシウム (ACP) 形成とそのハイドロキシアパタイト (HAP) への転換反応に対する主食のごはんと食パン (トースト) の効果

添加物	使用濃度 (μl)	Ca ²⁺ 消費量 (ppm/min)		誘導時間 (min)
		ACP	HAP	
対照	0	123 ± 12	13.0 ± 1.3	14.8 ± 1.5
ごはん	40	123 ± 11	14.0 ± 1.3	15.6 ± 1.5
	80	125 ± 11	15.0 ± 1.4	16.9 ± 1.5
	160	121 ± 11	16.1 ± 1.5*	19.7 ± 1.7*
	320	123 ± 12	17.3 ± 1.6*	21.9 ± 2.0*
食パン	40	121 ± 13	11.2 ± 1.0	21.4 ± 2.0*
	80	123 ± 12	4.89 ± 0.35*	25.5 ± 2.3*
	160	123 ± 12	3.49 ± 0.30*	68.2 ± 6.0*

ACP 形成、HAP への転換反応、誘導時間は pH 低落法で測定した。カルシウムの開始濃度は 3 mM であった。添加物は 3 mM リン酸を加える 5 分前に反応液に加えた。2 mM Hepes 緩衝液 (pH 7.4) を含んだ反応液の最終量は 2 ml であり、37 ± 0.1°C の温度条件で攪拌した。値は 1 分当たりのカルシウム消費量 (parts/10⁶/min) として表した。*対照 (無添加) と比較して有意差あり (p < 0.05)。

の濃度範囲で抑制した。もめん豆腐は 20 - 80 μl の濃度範囲で、みそ汁は 8.0 - 40 μl の濃度範囲で抑制した。みそ汁を作るだし汁は濃度範囲 8.0 - 40 μl で抑制した。

(3) 献立 2 の主菜、副菜、汁物のリン酸カルシウム沈殿物形成への影響

鯖の竜田揚げは 100 - 400 μl の濃度範囲で、かぶは 50 - 200 μl の濃度範囲で、レタスは 13 - 52 μl の濃度範囲で抑制した。また、かぶとレタスのサラダ (重量比で 1 : 1) は 13 - 52 μl の濃度範囲で、絹ごし豆腐は 20 - 80 μl の濃度範囲で、すまし汁は濃度範囲 50 - 100 μl で、それぞれ抑制効果を示した。

(4) 献立 3 の主菜、副菜、汁物のリン酸カルシウム沈殿物形成への影響

鶏肉は 65 - 260 μl の濃度範囲で抑制した

が、さやいんげんは 100 - 400 μ l の濃度範囲で ACP 形成速度には影響がなかったが、促進した。にんじんは 100 - 400 μ l の濃度範囲で、しいたけは、25 - 100 μ l の濃度範囲で、抑制効果を示した。鶏肉の千草巻きは、2.0 - 4.0 μ l の濃度範囲で抑制した。しらすは 20 - 40 μ l の濃度範囲で ACP 形成速度が対照の 120 - 124% となった。なすの煮物は 200 - 400 μ l の濃度範囲で抑制した。ジャガイモは 25 - 100 μ l の濃度範囲で促進した。みそ汁は 8.0 - 40 μ l の濃度範囲で抑制した。ジャガイモ入りみそ汁 (みそ汁 : ジャガイモ = 1 : 3) では、みそ汁の ACP 形成速度が 83.7 \pm 8.0 の時、ジャガイモとの共存では 86.1 \pm 8.0 となり、ACP から HAP への転換反応速度に関してはみそ汁が 4.46 \pm 3.5 の時、ジャガイモとの共存では 7.04 \pm 6.6 となり、誘導時間はみそ汁が 80.0 \pm 7.9 の時、ジャガイモとの共存では 112 \pm 10 となった。

(5) 献立 4 の主菜、副菜、汁物のリン酸カルシウム沈殿物形成への影響

鶏肉は 65 - 260 μ l の濃度範囲で抑制した。ジャガイモは 25 - 100 μ l の濃度範囲で促進した。マッシュルームは 25 - 100 μ l の濃度範囲で、小麦粉 (薄力粉) は ACP 形成速度にはまったく影響がなかったが、2.0 - 5.0 mg/ml の濃度範囲で抑制した。牛乳は 4.0 - 8.0 μ l の濃度範囲で抑制した。鶏肉のクリームシチュー (重量比で、鶏肉 : マッシュルーム : ジャガイモ : ブールマニエ = 1 : 1 : 1 : 1) では、HAP への転換反応速度に影響がなかったが、20 - 40 μ l の濃度範囲で誘導時間を 3.1 - 3.4 倍に増加させた。ブロッコリーは ACP 形成速度にはまったく影響がなかったが、50 - 100 μ l の濃度範囲で、紫キャベツは 20 - 40 μ l の濃度範囲で抑制的であった。ブロッコリーのサラダ (重量比で、ブロッコリー : 紫キャベツ = 1 : 1) では、20 - 40 μ l の濃度範囲で ACP から HAP への転換反応速度は対照の 71 - 15% となり、誘導時間は 1.7 - 9.0 倍となった。バターは ACP 形成速度にはまったく影響がなかったが、5.0 - 10 mg/ml の濃度範囲で ACP から HAP への転換反応速度は対照の 218 - 143% となり、誘導時間は 1.5 - 2.1 倍となった。野菜スープ (重量比で、たまねぎ : キャベツ : にんじん : セロリ : さやえんどう = 1 : 1 : 1 : 1 : 1) では 10 - 40 μ l の濃度範囲で、ACP から HAP への転換反応速度は対照

の 78 - 26% となり、誘導時間は 1.8 - 4.8 倍となった。

(6) さやいんげんのリン酸カルシウム沈殿物形成への影響

表 3 に示したように、さやいんげん懸濁液は 200 μ l の濃度で、ACP から HAP への転換反応速度を対照に比べ 26% 増加させ、誘導時間を対照の 3.6 倍に延長させた。一方、遠心した上清では 200 μ l の濃度で、ACP から HAP への転換反応速度は対照の 55% となり、誘導時間は対照の 5.6 倍となった。さやいんげん沈渣は 5.0 - 20 mg/ml の濃度範囲で、ACP から HAP への転換反応速度を対照に比べ 75 -

表 3. 無定形リン酸カルシウム (ACP) 形成とそのハイドロキシアパタイト (HAP) への転換反応に対するさやいんげん懸濁液と上清液、その沈渣と煮沸沈渣及び、莢部、豆部沈渣の効果

添加物	使用濃度	Ca ²⁺ 消費量 (ppm/min)		誘導時間 (min)
		ACP	HAP	
対照	0	123 \pm 12	13.0 \pm 1.3	14.8 \pm 1.5
さやいんげん				
懸濁液	200 μ l	128 \pm 12	16.4 \pm 1.3*	53.2 \pm 4.5*
上清液	200 μ l	123 \pm 12	7.09 \pm 0.6*	82.3 \pm 7.5*
さやいんげん				
沈渣	5.0 mg/ml	123 \pm 12	22.8 \pm 2.0*	22.6 \pm 2.0*
	10 mg/ml	122 \pm 12	27.4 \pm 2.5*	23.0 \pm 2.0*
	20 mg/ml	124 \pm 12	29.1 \pm 2.5*	24.1 \pm 2.0*
さやいんげん				
沈渣 (97°C、15 分処理)				
	10 mg/ml	123 \pm 12	13.1 \pm 1.3	37.0 \pm 3.5*
莢部沈渣				
	10 mg/ml	123 \pm 12	28.3 \pm 2.5*	27.9 \pm 2.0*
豆部沈渣				
	10 mg/ml	122 \pm 12	25.3 \pm 2.5*	24.2 \pm 2.0*

実験の詳細は表 2 に同じ。遠心は 8,700g \times 5 分の条件で行った。沈渣重量は湿重量である。*対照 (無添加) と比較して有意差あり (P<0.05)。

124% 増加させ、誘導時間を対照の 1.5 - 1.6 倍に延長させた。しかし、97°C で 15 分間処理すると ACP から HAP への転換反応速度は対照 (13.0 \pm 1.3) とほぼ同じとなり (13.1

士 1.3)、誘導時間は 2.5 倍となった。さらに、さやいんげんの莢部と豆部の沈渣は 10 mg/ml の濃度の時、ACP から HAP への転換反応速度は対照に比べそれぞれ 118%と 95%増加となり、誘導時間は対照のそれぞれ 1.9 倍と 1.6 倍となった。

(7) 考察

植物の種子や根から抽出されるデンプンはわれわれの食事にとって非常に大切な栄養源であり、日本人は摂取する糖質の 76%をごはんの米デンプンに依存している(厚労働省、2005)。試薬レベルのデンプンとその構成成分として 2 種類のグルコース結合 (α 1,4 結合と α 1,6 結合)を持つ粘着性のアミロペクチンには促進効果があり、他方、1 種類のグルコース結合 (α 1,4 結合)を持ち可溶性のアミロースには抑制効果があること、さらに数種類の市販デンプン粉にも促進効果が見られることを報告している(Hidaka et al, 2007;2008)。今回、4 種類の日常的食事献立の料理を作り試験を行ったが、デンプンが主成分の米ごはんも明らかに試薬デンプンや市販デンプン粉と同じようにリン酸カルシウム沈殿物形成反応に対し促進効果を示した。しかし、トーストはその主成分がデンプンであるにもかかわらず抑制効果を示した。トーストの抑制効果はそれに含有される比較的多量のグルテンによる阻害効果がデンプンによる促進効果を打ち消したと考えられる。また、献立 3 と 4 のジャガイモにもごはん同様の促進効果が見られたが、その効果は主成分のジャガイモデンプンによるものと思われる(Hidaka et al, 2007;2008)。

促進効果の分子機構に関しては、Hunter et al (1986)はコラーゲン、ゼラチン、アガロースのゲルがそれらの拡散速度に比例してハイドロキシアパタイト (HAP) 形成を促進させることを報告している。また、TenHuisen and Brown (1992) はゼラチンが石膏(硫酸カルシウム)形成の動力学と微小構造に影響を与えることを報告している。このゼラチンがリン酸カルシウム沈殿物形成反応を促進するが、ゼラチナーゼ処理でその効果が消失することから、高分子の存在が促進効果に必須であることが報告されている(Hidaka and Liu, 2003)。デンプンの無定形リン酸カルシウム (ACP) から HAP への転換反応速度の促進効果も、アミラーゼ処理で失活することから、ゼラチンの効果と同様に、高分子のリン

酸カルシウム結晶への吸着によるものであろう。ところで、ラウリル硫酸ナトリウムの酸化的分解物、ケイ素と粘土鉱物、さらに 2 種類の金属陽イオンによる HAP への転換反応に対する促進効果は誘導時間の短縮を必ず伴っている(Blumenthal, 1989; LeGeros, 1991; Okamoto and Hidaka, 1994)。一方、デンプン、ゼラチン、フッ化物による促進反応は延長した誘導時間を伴っている(Hidaka and Oishi, 2007; Hidaka and Liu, 2003; Hidka et al., 2008);陰イオンのフッ素は結晶の成長点に吸着することで促進効果を発揮するが、デンプン、ゼラチン、さやいんげんでも促進パターンが類似していることから、これらはフッ化物と類似のメカニズムが働くのではないかと推測される。また、フッ化物の再石灰化能はよく知られていて、再石灰化促進剤として開発されているように(Hidaka et al., 1993)、促進効果を有する食物成分のデンプンとさやいんげん沈渣も再石灰化剤として開発される可能性がある。

抑制的効果が強いことが見出された。

リン酸カルシウム沈殿物形成に対する抑制効果についてはカゼイン、プロテオグリカン、リンタンパク質、大豆粉など、ほとんどのタンパク質はこの沈殿物形成反応に対し抑制的であることが知られている(Hidaka and Oishi, 2007; Hidaka et al., 1991)。タンパク質による分子レベルの抑制メカニズムとしては、プロテオグリカンはその立体配置の効果で、また血清タンパク質は ACP 表面への吸着作用、リンタンパク質は結晶成長点である HAP 結晶の表面への吸着作用によることが提唱されている。マグネシウム、亜鉛、2 価銅、2 価鉄、マンガンなど多数の無機イオンにも抑制効果があることが報告されている。さらに、お茶や生薬類のタンニンやポリフェノールにも強力な抑制効果が報告されているので、野菜類のポリフェノール類も原因物質の候補として挙げられる。

今回試験に用いた 4 種類の献立では、ごはん、ジャガイモ、薄力粉、さやいんげんとバターのみが促進効果を有していて、その他はすべて抑制的であった。このことは日常食事の料理と食物成分が口腔内石灰化に対し、総じて抑制的である可能性を示している。その上、促進効果のあるデンプンは唾液アミラーゼによって加水分解されると促

進効果を失い、さやいんげんの促進作用は調理時の熱処理によって失活し、バターとの促進効果もパンによって打ち消されるので、口腔内では石灰化に対して抑制的効果が支配的であることが考えられる。これらのことから考えると、口腔内石灰化に対する食事の影響は直接的な石灰化促進または抑制能でなく、食事の料理や食物成分のバイオフィーム形成に寄与する物理的な形状、粘着性や高蔗糖・高脂質含有量などに注目すべきと考えられる。即ち、食事の料理と食物成分はすでに形成されたバイオフィーム上でしかもピンホール的に、唾液に洗われるチャンスがないかもしくは少ない場合、石灰化調節に関与する可能性が高いと考えられる。

(8) 結論

日常的食事の口腔内石灰化への可能的な効果を調査するため、主食、主菜、副菜、汁物で構成される4種類の日常的食事献立による *in vitro* リン酸カルシウム沈殿物形成に対する影響につき、pH 低落法を用いて研究した。その結果、主食と副菜食材のごはん、ジャガイモ、薄力粉、さやいんげんとバターにリン酸カルシウム沈殿物形成に対する促進効果があったが、これら以外はすべて抑制的であった。しかし、これらの促進効果も実際の食事では調理時か口腔内での唾液との混合で、その効果を失うと考えられる。そのため、われわれの日常的食事の効果は直接的な石灰化に対する作用でなく、むしろその粘着性や高蔗糖・高脂質成分などによるバイオフィーム形成促進作用が重要である可能性が示唆される。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計3件)

日高三郎、大石明子：毎日の食事が口腔内リン酸カルシウム形成に与える影響。福岡歯科大学・福岡医療短期大学紀要，2009；No 36:1-14. (査読無)

Hidaka S., Okamoto S. & Liu SY Natural products effective on the *in vitro* formation of calcium phosphate precipitates. J Trad Med, 2009:26: 201-209. (査読有)

Hidaka S., Okamoto Y., Tsukamoto S., Oishi A.

The possible role of starch in oral calcification: Their *in vitro* formation of hydroxyapatite is regulated by a combination of protein and mineral content in dietary starch flour. The Open Food Sci. J. 2008; 2: 10-22. (査読有)

[学会発表] (計1件)

口腔リン酸カルシウム沈殿物形成に対する自然物由来の促進剤と阻害剤。

日高三郎、岡本佳三、劉 勝彦 第26回和漢医薬学会学術大会、8月30日、千葉、2009.

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年月日：

国内外の別：

○取得状況 (計◇件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

日高 三郎 (HIDAKA SABURO)

福岡医療短期大学・歯科衛生学科・教授
研究者番号：00084252

(2) 研究分担者

大石 明子 (OISHI AKIKO)

福岡医療短期大学・保健福祉学科・准教授
研究者番号：40331912

(3) 連携研究者

()

研究者番号：