

各種代用糖ならびに食品の *in vitro* 齲蝕誘発性評価方法としての ミュータンスレンサ球菌培養試験に関する基礎的研究

岸 光男, 安藤 歩,* 今井 奨
**林 勝彦, 米満 正美

岩手医科大学歯学部予防歯科学講座

*国立感染症研究所口腔科学部

**㈱日健総本社開発管理部

(主任: 米満 正美 教授)

(受付: 1998年6月15日)

(受理: 1998年7月6日)

Abstract : To develop the cariogenicity test for sugar substitutes and foods *in vitro*, the growing system of mutans streptococci was examined in this study. Four strains of mutans streptococci were cultured under aerobic or anaerobic conditions, and the time course of changes in pH value, cell growth and insoluble glucan synthesis were analysed. In all bacterial strains, either pH decrement, cell growth and insoluble glucan synthesis showed slightly higher values under anaerobic conditions compared with those under aerobic conditions after 5 to 7 hours of incubation. However, a difference of oxygen conditions did not have remarkable effects on data after a long incubations over 9 hours. After 23 hours of incubation, sorbitol was fermented by all strains of mutans streptococci used in this study, especially by *Streptococcus mutans*. Yet, after 9 hours of incubation, the fermentation was not very notable, but the difference in fermentability from sucrose was shown clearly. These results suggest that the optimal incubation time for evaluation might be approximately 9 hours under the conditions used in this study.

The time course of changes in pH and cell growth showed a similar pattern, so the capacity to grow mutans streptococci in sugar substitutes and foods were evaluated directly and indirectly. In addition, we analysed insoluble glucan synthesis in this test system. The capacity of sugar substitutes and foods to form dental plaque were assessed by the integration of data from the three ways of analysis in this test system.

Maltitol, xylitol and a food sample were tested by this system. The results suggested that either two sugar substitutes or a food sample were non-cariogenic.

Key word : sugar substitute, cariogenicity of food, mutans streptococci

Basic studies on development of *in vitro* cariogenicity test for sugar substitutes and foods using growing system of mutans streptococci.

Mitsuo KISHI, Ayumi ANDO, *Susumu IMAI,

**Katsuhiko HAYASHI and Masami YONEMITSU.

(Department of Preventive Dentistry, School of Dentistry, Iwate Medical University, Morioka, 020-8505, Japan, *Department of Oral Science, National Institute of Infectious Diseases, Tokyo, 162-8640, Japan, **Department of Research and Development, Nikken Sohonssha Corporation, Hajima, 501-6255, Japan)

緒 言

従来より食品の齧蝕誘発性を評価する方法として多くのものが考えられているが¹⁻¹⁵⁾、現在では主として電極内蔵法による歯垢下 pH 連続測定^{8, 9, 17, 18)}が用いられている。これはヒト口腔内におけるいわゆる *in vivo* での試験方法であり、プラークによる歯質表面の pH 変化をよく表現するものとして信頼性が高い一方、被験者への負担の大きさおよび被験者数の制限、子供の被験者への適用の困難さ、歯垢形成に関する情報が得られないなどの問題点を持つものと考えられる^{2, 10, 18)}。また、これらの点を補足するものとして *in vitro* ではヒト歯垢懸濁液を用いて食品の酸産生性を評価する方法が検討されているが、そこにおいてもヒト歯垢を検体とすることによる検体収集の困難さについては解消されず、また歯垢形成に関する情報が得られないことに関しては歯垢下 pH 連続測定法と同様である^{8, 10)}。そこで我々は検体収集に困難がなく評価結果の再現性が高い方法と考えられるミュータンスレンサ球菌の培養試験に注目した。本試験法は従来より食品や糖質の酸発酵性を評価する指標のひとつとして用いられているが^{2, 19)}、他の試験方法との比較や、より口腔内の条件に近づけるための検討あるいは歯垢形成に関する情報を得るための試みはほとんどなされていない。そこで歯垢下 pH 連続測定法で、pH をもっとも低下せしめる positive control の糖質として用いられているスクロースと、pH を低下させない negative control の糖質として用いられているソルビトール¹⁸⁾を本試験に充て、その結果を分析することで本試験法の特徴を明らかにした。同時に現在一般に齧蝕原性が否定されている糖質であるマルチトール、キシリトールについて本試験による評価を行い、本試験と他の齧蝕誘発性試験との評価の一致性を検討した。さらにマルチトールを主成分とするキャンディについても本試験による評価を試み、含糖食品試料と糖質そのものの本試験による評価結果を比較した。

材料及び方法

1. ミュータンスレンサ球菌

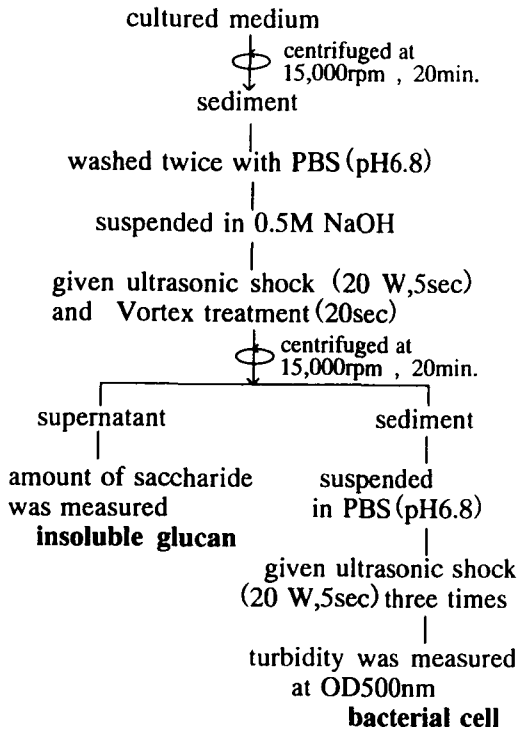
齧蝕原性菌として用いたのは *Streptococcus mutans* MT 8148, *Streptococcus mutans* ATCC 25175, *Streptococcus sobrinus* ATCC 33478 (SL-1), *Streptococcus sobrinus* 6715 の 4 種のミュータンスレンサ球菌株であり、*Streptococcus mutans* MT 8148 及び *Streptococcus sobrinus* 6715 は国立感染症研究所口腔科学部において、また *Streptococcus mutans* ATCC 25175 と *Streptococcus sobrinus* ATCC 33478 (SL-1) は岩手医科大学歯学部予防歯科学講座において、50% グリセロールを含む BHI 培地中に -20°C で保存されている菌株である。また、これ以後 *Streptococcus sobrinus* ATCC 33478 (SL-1) は *Streptococcus sobrinus* SL-1 と記す。

2. 糖質及び食品試料

スクロースとソルビトールは(株)和光純薬工業より購入した製品を、マルチトールとキシリトールは東和化成工業(株)より供与された粉末製品を使用した。マルチトールおよびキシリトールの純度はそれぞれ 93.5% 以上、98.0% である。食品試料の形態は固形キャンディで主成分は前記東和化成工業のマルチトール材料であ

Table 1. Composition of candy (weight/weight).

Raw materials name	Content
Maltitol (liquid)	74.2%
Maltitol (powder)	22.6%
Reduction starch syrup	1.2%
Ginseng powder	
Chinese quince extract	
Chlorella flavor extract	
β -carotene	
Stevia	
L-menthol	
Peppermint	
Arabic gum	
Color (chlorophyll)	
Carnauba wax	Total 2%



* All procedures were performed at 4 °C or on ice .

Fig. 1. Fractionation and analysis of insoluble glucan and bacterial cell.

る。Table 1 にキャンディの配合表を記す。液体状マルクトールは純度 75.0% 以上であり粉末に比べ生成過程に生じるマルトオリゴ糖などの低分子デキストリンを多く含んでいる。

3. 糖質溶液及びキャンディ抽出液

各糖質を蒸留水中に4%濃度に溶解し、その後径 0.45 μm の Millipore filter (Millipore 社) による濾過滅菌を行った。また、キャンディは10倍重量の温蒸留水 (60°C) に溶解した後、蒸留水で4%濃度に希釈し、糖質溶液同様に濾過滅菌を行った。

4. 前培養液

各 20°C 保存菌株から 4 ml BHI 液体培地 (Difco 社) 中に径 2 mm の白金耳にて植菌後、37°C で 18 時間嫌気培養し、その培養液を再度 4 ml BHI 液体培地に対し 40 μl 接種し、37°C、18 時間嫌気培養した培養液を用いた。

5. 各種糖質及びキャンディ抽出液を基質とした細菌培養

2 倍濃度に調整した糖不含 HI 液体培地 (Difco 社) 500 μl、4%濃度の各種糖質溶液またはキャンディ抽出液 500 μl および前培養液 10 μl からなる培養混液を 1.5 ml 容量のマイクロ遠心管内で 37°C 静置培養した。0, 5, 7, 9, 12, 23 時間培養後の培養液に対し、それぞれ pH, 非水溶性グルカン合成量および菌体増殖量の測定を行った。嫌気培養には Gas Pac System 100 型 (BBL 社) を用い、同社のインディケータにより培養ジャー内の酸素濃度が 0.03% 以下²⁰⁾であることを随時確認した。これに対し孵卵器中にそのまま静置培養したものを本研究では便宜的に好気培養と称した。

6. pH, 非水溶性グルカン, 菌体量の測定

培養後の培養液を Vortex mixer により攪拌し、その中に直接セミマイクロ pH 電極 (ORION 社) を挿入して pH を測定後、15,000 rpm、20 分間遠心分離した。菌体と非水溶性グルカンからなる沈渣を PBS (pH 6.8) で洗浄し、培地成分を除去した後 0.5 M NaOH 1 ml に懸濁し、超音波 (20 W、5 秒) と Vortex mixer (10 秒 × 2 回) により攪拌して非水溶性グルカンを溶解抽出し、遠心分離した上清中の全糖量をフェノール硫酸法²¹⁾で定量し、グルコース換算量として表したものを非水溶性グルカン合成量とした。また、その沈渣を 2 ml の PBS (pH 6.8) に懸濁し、超音波による攪拌 (20 W、5 秒 × 3 回) 後、500 nm で濁度を測定し、その吸光度を菌体量の指標²²⁾とした (Fig. 1)。

結 果

1. 本試験における菌株、培養条件の差異による比較

Streptococcus mutans MT8148 と *Streptococcus sobrinus* SL-1 におけるスクロースとソルビトールを基質とした場合の培養時間に対する pH 変化を Fig. 2 に示した。菌株間の比較では、スクロースの発酵速度は 7 時間以下の培養時間で *Streptococcus mutans* MT 8148 の方が

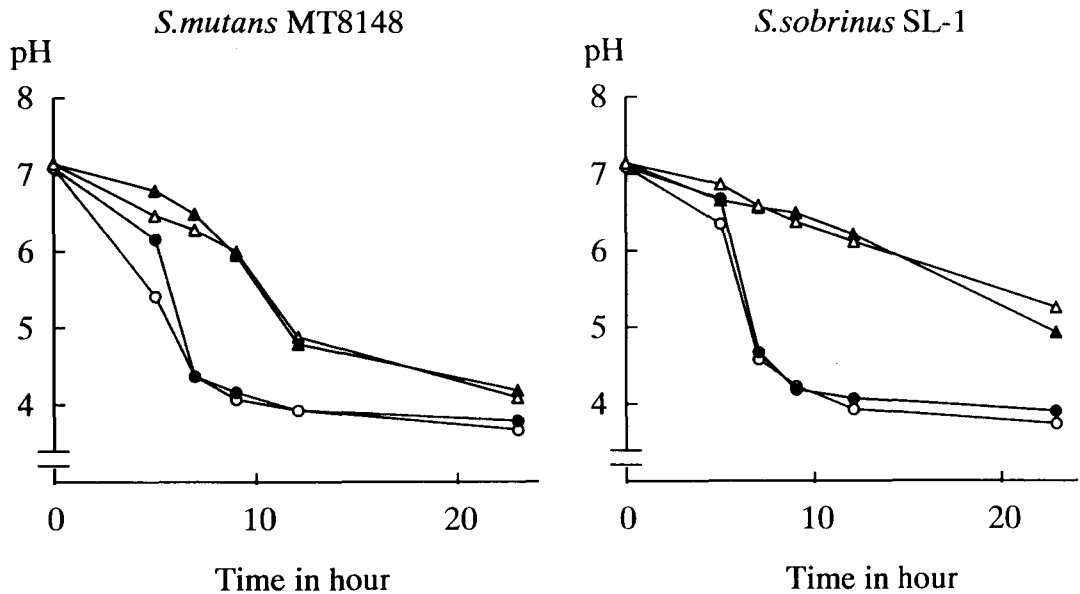


Fig. 2. Time course of changes in pH of cultured broth. The broth containing 2% sucrose or 2% sorbitol was incubated under aerobic or anaerobic condition.

- sucrose, aerobic.
- sucrose, anaerobic.
- △— sorbitol, aerobic.
- ▲— sorbitol, anaerobic.

Streptococcus sobrinus SL-1 よりも速かったが、9 時間を超える長時間培養になるといずれも pH が 4 以下に低下し、最低 pH に差はなかった。ソルビトールはいずれの菌種によっても発酵されたが *Streptococcus mutans* MT8148 では 23 時間培養後の pH は 4 付近まで低下した。*Streptococcus sobrinus* SL-1 による発酵速度はそれに比べ緩やかであったが培養時間と共に pH は低下し、23 時間培養後の pH は 5 付近まで低下した。

Fig. 3 にすべての供試菌株の 5 時間培養後と 12 時間培養後の pH 低下量を表す。図の縦軸は培地の培養前の pH から培養後の pH を差し引いた値である。いずれの菌株でも、スクロースとソルビトールのどちらを基質とした場合においても短時間培養では嫌気培養の方が好気培養に比べ pH 低下量が大きく、特に酸発酵速度が速い菌株でそれが顕著であった。しかし、12 時間培養では嫌気培養と好気培養の差はほとんど認めらず、23 時間においても同様であった。

Streptococcus mutans MT8148 と *Streptococcus sobrinus* SL-1 におけるスクロースとソルビトールを基質とした場合の菌体増殖量の培養時間による変化を Fig. 4 に、pH 低下量の培養時間による変化を Fig. 5 に、また非水溶性グルカン合成量の培養時間による変化を Fig. 6 にそれぞれ示した。菌体増殖量の推移は pH の低下量の変化とほぼ並行した推移を示しており、pH 低下量の大きい場合ほど菌体の増殖量も多かった。非水溶性グルカン合成量は菌株間の差が顕著であった。また、非水溶性グルカン合成量の培養条件の比較では短時間培養では嫌気培養の方が好気培養に比べて合成量が多く、12 時間を超える培養時間では同等、もしくは好気培養の方が多い結果となった。これらの傾向は *Streptococcus mutans* ATCC25175、*Streptococcus sobrinus* 6715 についても同様に認められた。Fig. 7 にすべての供試菌株の 5 時間培養後と 12 時間培養後の非水溶性グルカン合成量を示す。

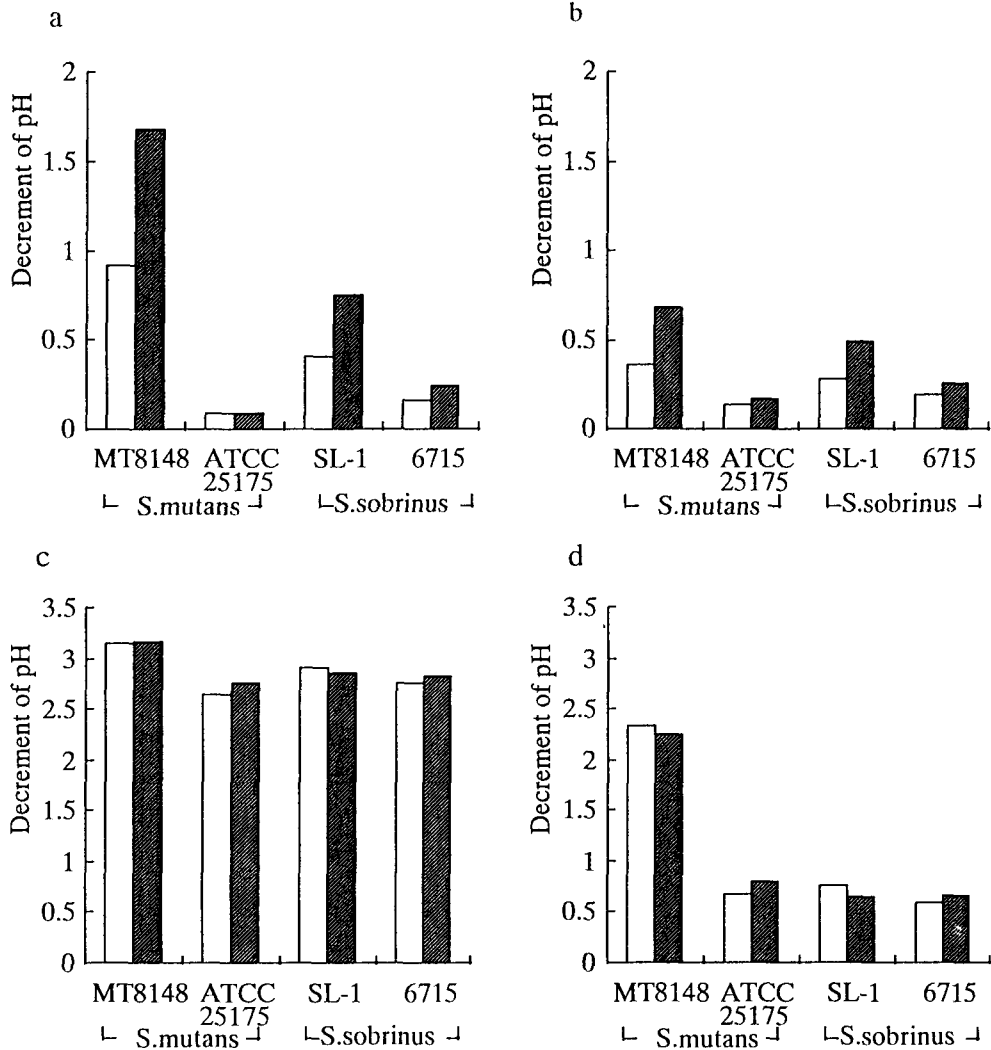


Fig. 3. Decrement of pH of cultured broth after 5 hours incubation (a, b) and 12 hours incubation (c, d) under aerobic condition (□) or anaerobic condition (■). Cultured broth contained 2% sucrose (a, c) or 2% sorbitol (b, d).

2. 本試験によるマルチトール, キシリトール, 食品試料の評価

Fig. 8~10 に, 9 時間培養後と 23 時間培養後のマルチトール, キシリトールおよび食品試料の pH 低下量, 菌体量および非水溶性グルカン合成量をスクロースおよびソルビトールの場合と比較した結果を示す。図に示したのは *Streptococcus mutans* MT8148 および *Streptococcus sobrinus* SL-1 を用いた好気培

養および嫌気培養の結果である。供試した糖質および食品試料ではいずれにおいても pH 低下, 菌体増殖はスクロース, ソルビトールに比べ著しく低く, 非水溶性グルカン合成は認められなかった。また, その他の菌株においても結果は同様であった。

考 察

1. 各種代用糖ならびに食品の齲蝕誘発性試験

S.mutans MT8148

S.sobrinus SL-1

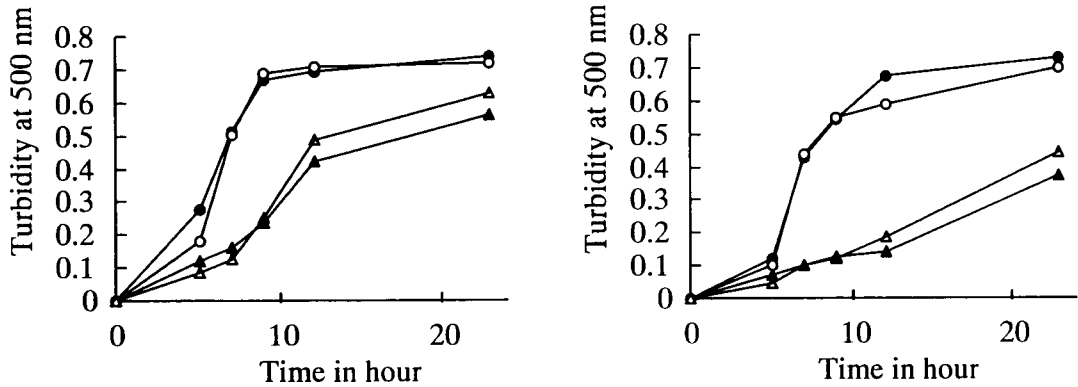


Fig. 4. Time course of changes in cell growth. Tie incubation mixture containing 2% sucrose or 2% sorbitol was incubated under aerobic or anaerobic condition.

- sucrose, aerobic.
- sucrose, anaerobic.
- △— sorbitol, aerobic.
- ▲— sorbitol, anaerobic.

S.mutans MT8148

S.sobrinus SL-1

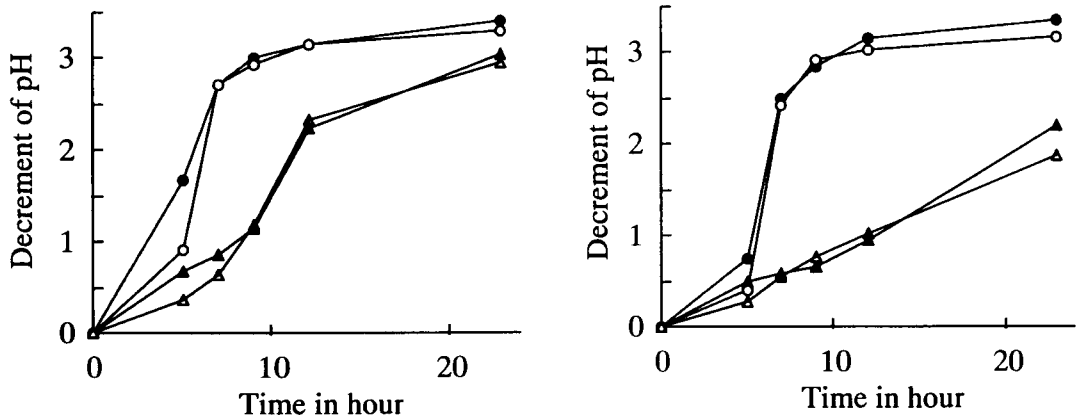


Fig. 5. Time course of changes in pH decrement of broth. The broth containing 2% sucrose or 2% sorbitol was incubated under aerobic or anaerobic condition. Values of decrement were obtained from the way to deduct pH after incubation from pH before incubation.

- sucrose, aerobic.
- sucrose, anaerobic.
- △— sorbitol, aerobic.
- ▲— sorbitol, anaerobic.

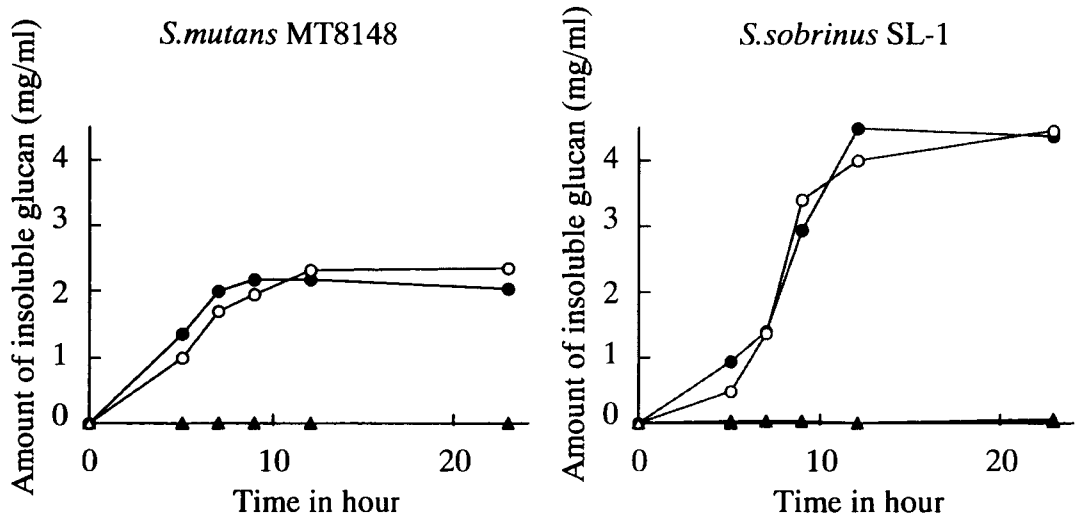


Fig. 6. Time course of changes in insoluble glucan synthesis by mutans streptococci. growth. The incubation mixture containing 2% sucrose or 2% sorbitol was incubated under aerobic or anaerobic condition.

- sucrose, aerobic.
- sucrose, anaerobic.
- ▲— sorbitol, aerobic.
- △— sorbitol, anaerobic.

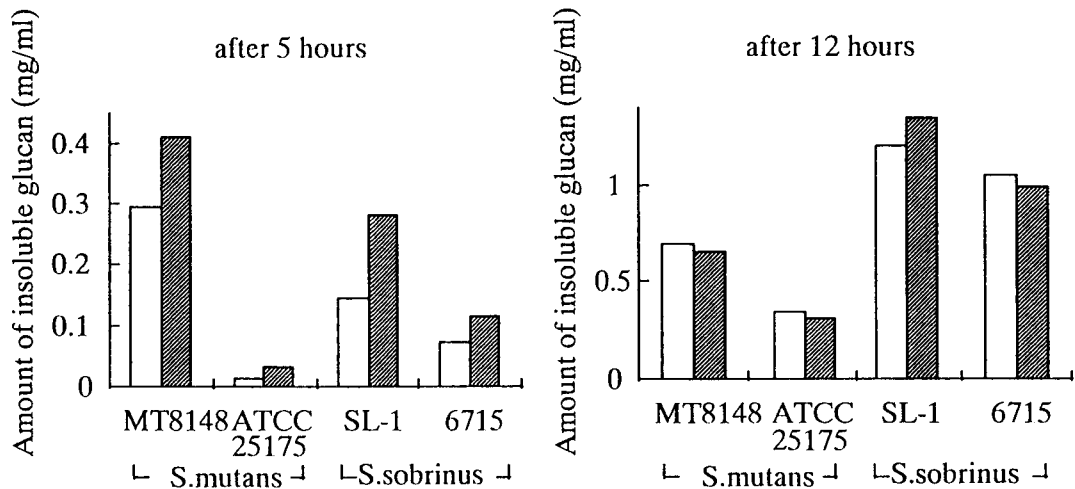


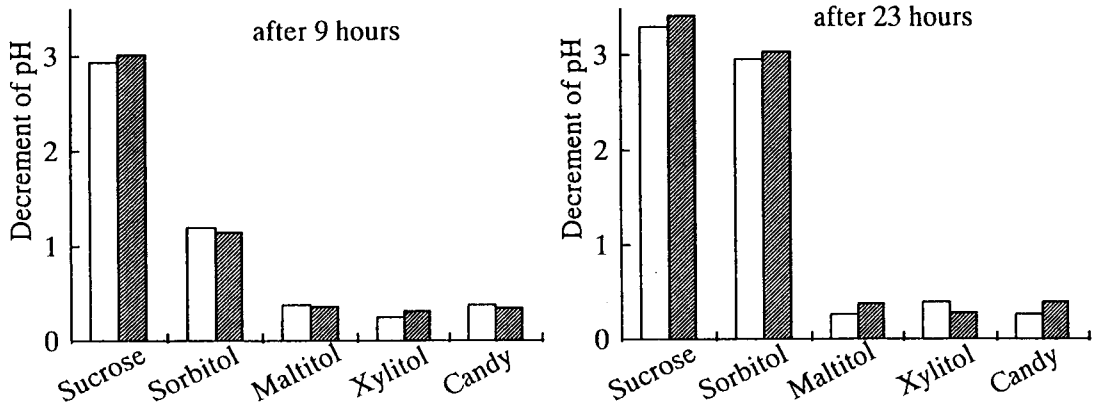
Fig. 7. Amount of insoluble glucan synthesis by mutans streptococci after 5 hours and 12 hours incubation under aerobic condition (□) or anaerobic condition (■) in cultured broth containing 2% sucrose

としての齲蝕原性細菌培養試験法について

Streptococcus mutans, *Streptococcus sobrinus* は齲蝕原性菌としてもっとも有力な菌種であり^{23~27)}, *in vitro*での細菌培養試験にそれらを用

いることは、食品や糖質の齲蝕誘発性を評価するうえで妥当性の高い方法と思われる。*in vitro*での食品の齲蝕誘発性試験は口腔内とくに歯質と口腔内環境の接触する部分での食品の代謝を

S.mutans MT8148



S.sobrinus SL-1

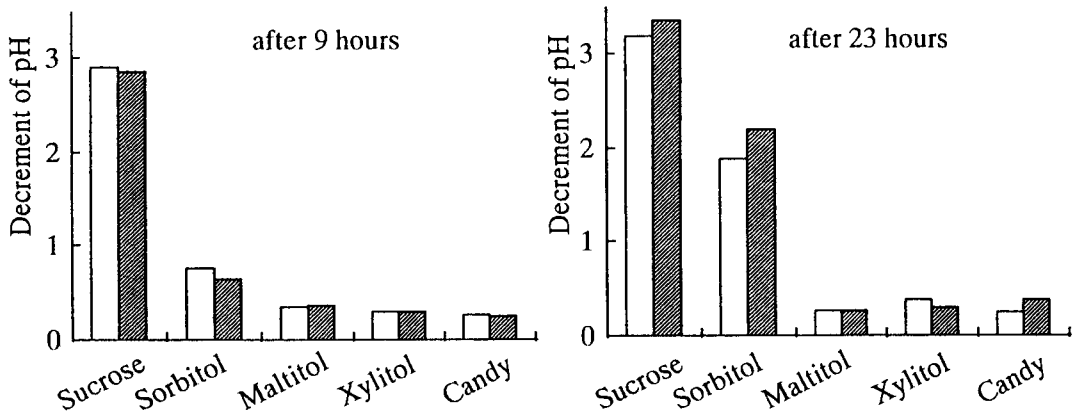


Fig. 8. Decrement of pH of cultured broth after 9 hours incubation and 23 hours incubation under aerobic condition (□) or anaerobic condition (■). Cultured broth contained 2% sucrose or sorbitol or maltitol or xylitol or candy extract.

再現するものであることが望ましいと考えられる。*Streptococcus mutans* は酸素の存在する好気条件と酸素のない嫌気条件での培養で糖代謝に違いがあることが知られており²⁸⁻³⁰⁾、細菌が産生した酸によりエナメル質が脱灰される場が歯垢深層であることを考えると *in vitro* における細菌培養試験においても試験結果に及ぼす酸素の影響を検討する必要があるものと思われる。今回通常の静置培養 (好気培養) と BBL 社の Gas Pac System による嫌気培養を比較したところ、供試菌株のいずれにおいても短時間の

培養ではわずかに嫌気培養の方が酸産生が高い結果となった。しかし長時間の培養では差は認められなくなり、本試験時間における最終 pH は同一糖質については培養条件の違いに関わらずほぼ一定であった。このことから本試験法ではある程度長時間の培養時間で評価することにより培養条件における酸素量の差は、細菌による酸産生の評価にそれ程大きな影響を及ぼさないものと考えられた。一方、本試験における pH の低下と菌体の増殖量は同一菌株においてほぼ並行した動向を示しており (Fig. 4, 5), こ

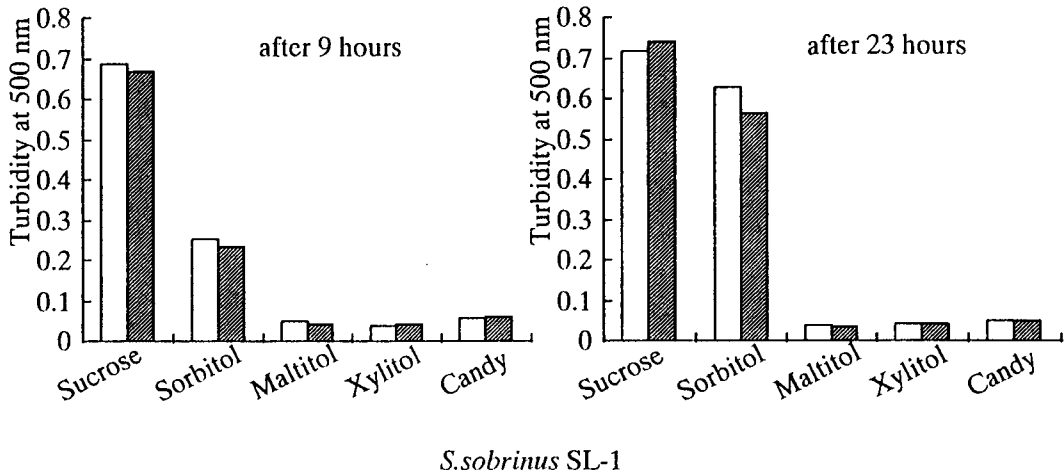
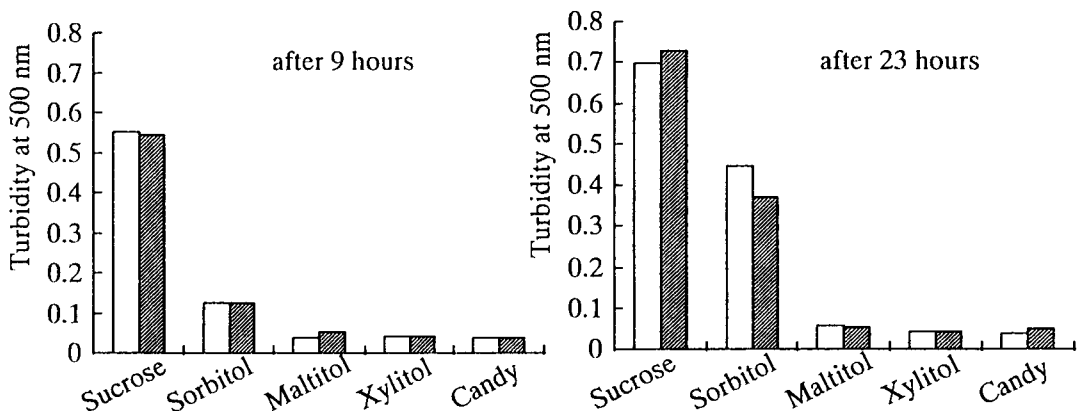
S. mutans MT8148*S. sobrinus* SL-1

Fig. 9. Cell growth of mutans streptococci after 9 hours incubation and 23 hours incubation under aerobic condition (□) or anaerobic condition (▨). Cultured broth contained 2% sucrose or sorbitol or maltitol or xylitol or candy extract.

のことから本試験で観察している pH 変化は間接的に細菌の増殖を表しているものと考えられた。歯垢下 pH 測定法が、すでに存在する豊富な細菌がある糖質を利用して短時間に産生する酸を測定しているのに対し、本試験法はある齶蝕原性菌株がある糖質を利用して増殖する増殖速度を観察しているものと考えられる。また本試験では同時に非水溶性グルカン合成量も測定しており、本試験法が、食品や糖質の酸発酵性ととも歯垢形成への寄与を評価する有効な方

法である可能性が示唆された。

歯垢下 pH 測定法で pH の低下しない negative control として用いられ、その低齶蝕原性が広く認められている^{7, 31, 32}ソルビトールについても本試験法では相当の酸発酵性を示した。とくに *Streptococcus mutans* の培養ではいずれの菌株でも 23 時間培養後にエナメル質脱灰の臨界 pH 5.5³⁹ を下回り、この培養時間で見える限りソルビトールを negative control として用いることに不都合が生じる結果となった。

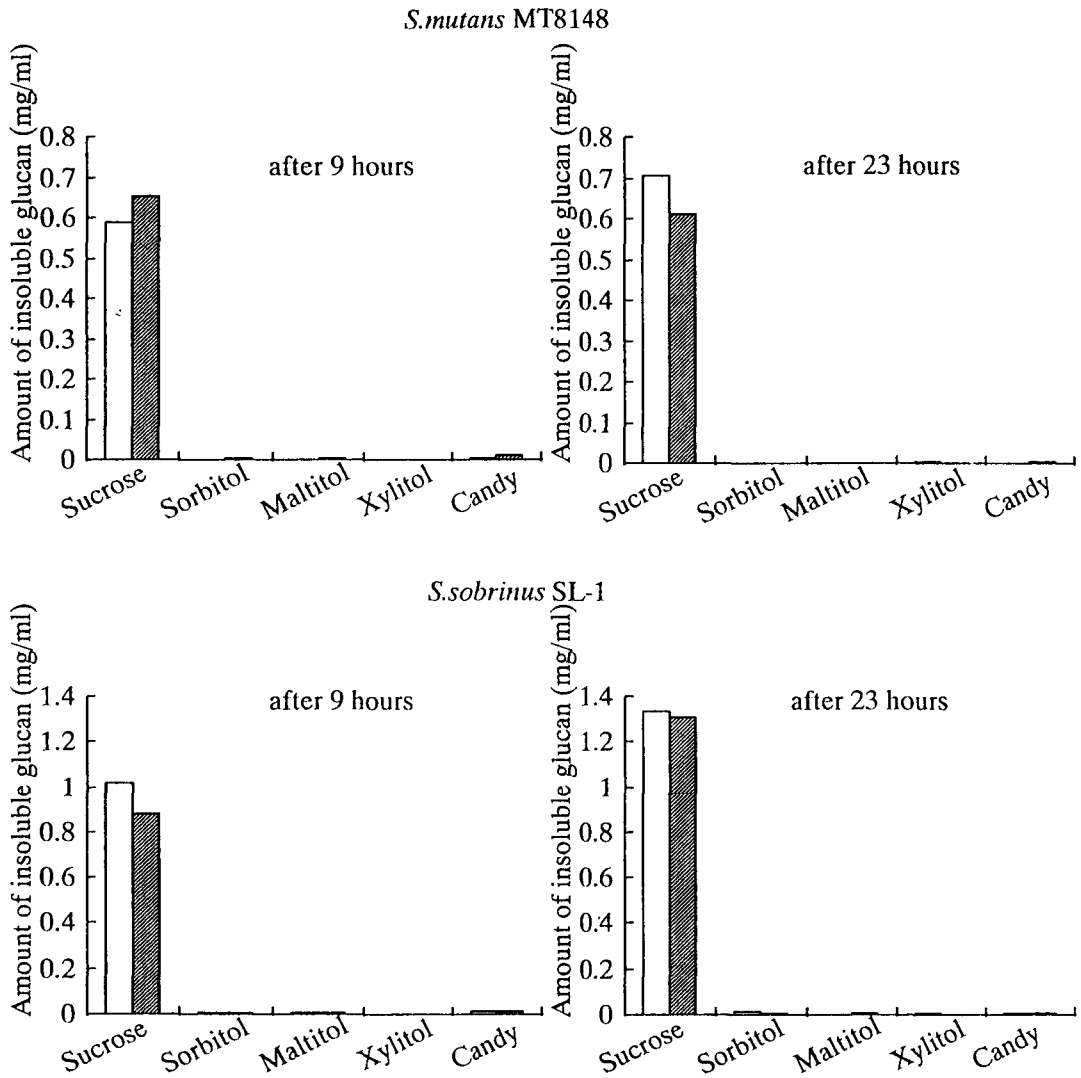


Fig. 10. Amount of insoluble glucan synthesis by mutans streptococci after 9 hours incubation and 23 hours incubation under aerobic condition (□) or anaerobic condition (■). Cultured broth contained 2% sucrose or sorbitol or maltitol or xylitol or candy extract.

しかし培養時間が9時間の場合にはスクロースより著しくpH低下量が少ないことは明らかであり (Fig. 2, 8), それより短時間では前述のように存在する酸素量の試験結果に対する影響が大きいことを併せて考慮すると, 本試験法で培養時間を定めて評価する場合には, 9時間程度の培養時間が適当ではないかと思われた。その際, 細菌の増殖が stationary phase に到達していないこと, 前培養の条件により同一菌株で

もある程度の時間的差が生じることなどに留意して, 対照とする糖質としてスクロースとソルビトールを用いた培養を同時に行うこと, また非水溶性グルカン合成能については菌株による差が顕著なことから, あらかじめ菌株の特性を検討して供試菌株を選択することが必要であると考えられた。

2. マルチトール, キシリトール, 食品試料の本試験による評価について

本試験においてマルチトールあるいはキシリトール含有培地での培養では pH 低下, 菌体増殖, 非水溶性グルカン合成のいずれも認められず, これら糖質が非齲蝕原性であることが示唆された。マルチトール, キシリトールは従来より非齲蝕原性であることが示されており³⁴⁻³⁶⁾, 本試験においても同様の結果となった (Fig. 8~9)。またマルチトールを主成分とするキャンディの抽出液についてはほぼマルチトールと同じ結果となり, この食品試料中のマルチトール原料以外の成分 (Table 1.) の齲蝕誘発性への影響は本試験において認められなかった。

以上より, 齲蝕原性細菌の培養試験は各種代用糖及び食品の齲蝕誘発性試験としてある程度の有用性が認められるものと考えられた。さらに今後, より高度嫌気条件での培養試験の検討および被験者由来の唾液・歯垢サンプルを用いた *in vitro* での培養試験の検討などが必要と思われる。

結 論

各種代用糖ならびに食品の齲蝕誘発性を評価するための *in vitro* での方法としてミュータンスレンサ球菌の培養試験について検討し, その試験法により 2 種の代用糖および 1 種の食品試料を評価した。その結果以下のことが明らかになった。

1. 7 時間以内の培養時間では好気培養と嫌気培養の培養条件の差がわずかに認められたが, 9 時間を超える培養では両条件間の相違は無視し得ることが判明した。またいずれの培養条件・菌株においてもソルビトールが発酵されたが, 9 時間以内の培養ではその発酵程度はスクロースに比べて著しく低いことが明らかになった。これらより適切な培養時間で評価することで, 本試験法が齲蝕誘発性を評価するための有効な方法となりうると考えられた。
2. いずれの菌株においても pH と菌体量の時間変化はほぼ同様の推移を示し, 本試験が直接および間接に供試糖質の菌体増殖への寄与を評価しているものと考えられ, 非水溶性グルカン

合成量と併せて評価することで本試験法が供試糖質の酸発酵性と同時にミュータンスレンサ球菌による歯垢形成能を評価しうる試験法であることが示唆された。

3. 本試験法でマルチトールおよびキシリトールの齲蝕誘発性を評価した結果, 両者とも非齲蝕原性であると考えられ, マルチトールを主成分とする食品試料についても同様に非齲蝕原性であると考えられた。

本論文の要旨は, 1998 年 5 月 23 日, 第 10 回日本口腔衛生学会東北地方会において発表した。

文 献

- 1) M. E. J. CURZON : Integration of Methods for Determining the Cariogenic Potential of Foods : Is This Possible with Present Technologies ? *J. Dent. Res.* 65 : 1520-1524, 1986.
- 2) 大嶋 隆; 大嶋 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まで, 医歯薬出版, 東京, 58-76 ページ, 1995.
- 3) B. G. Bibby, S. A. Mundorff : Enamel demineralization by snack foods. *J. Dent. Res.* 54 : 461-470, 1975.
- 3) B. G. Bibby : Methods for comparing the cariogenicity of foodstuffs. *J. Dent. Res.* 49 : 1334-8, 1970.
- 4) S. IMAI, M. KISHI, and T. NISHIZAWA : *In vitro* and Intra-oral Demineralization Models. *J. A.D.R.* 44th Annual Meeting, Abstracts of Papers, 4, 1996.
- 5) 飯島洋一, 田口円裕 : エナメル質脱灰装置を用いた齲蝕誘発性の評価の基礎的検討, 食品および代用糖の齲蝕誘発性を総合的に評価するための基礎的研究 (山田 正代表), 平成 5 年度科学研究費補助金 (総合研究 A) 研究成果報告書, 105-119 ページ, 1995.
- 6) N. Taguchi, Y. Iijima and O. Takagi : Evaluation of cariogenic potential of sugar and substitutes using a modified enamel demineralization device. *J. Dent. Health.* 44 : 185-193, 1994.
- 7) 飯島洋一, 田口円裕, 高木興氏 : ショ糖ならびにソルビトール溶液のエナメル質脱灰におよぼす影響 - 口腔内脱灰装置に基づく評価 -, 口腔衛生会誌, 44, 286-293, 1994.
- 8) 阿部一彦 : 食品の齲蝕誘発性の評価 - 歯垢 pH 測定試験 -, 歯界展望, 90, 650-654, 1997.
- 9) P. Lingstrom, T. Imfeld and D. Birkhed : Comparison of three different methods for measure-

- ment of plaque-pH in humans after consumption of soft bread and potato chips. *J. Dent. Res.* 72 : 865-709, 1993.
- 10) 斎藤晴臣, 阿部一彦, 山田 正 : 歯垢懸濁液を用いた食品ならびに代用糖の酸産生性の検定—スクリーニング検定法に関して—, 食品および代用糖の齧蝕誘発性を総合的に評価するための基礎的研究 (山田 正代表), 平成5年度科学研究費補助金 (総合研究A) 研究成果報告書, 83-89 ページ, 1995.
- 11) K. Fukushima, Y. Namiki and T. Ikemi : Semi-quantitative cross-dot assay for three glucosyltransferases of *Streptococcus mutans*. *Dentistry in Japan* 31 : 27-29, 1994.
- 12) 大嶋 隆; 浜田茂幸 (編) : う蝕と歯周病—研究の進歩—第2巻, 日本歯科評論社, 東京, 1-29 ページ, 1982.
- 13) 兼平 孝, 大久保留加, 請井繁樹 : 実験動物を用いた齧蝕誘発性の評価, 食品および代用糖の齧蝕誘発性を総合的に評価するための基礎的研究 (山田 正代表), 平成5年度科学研究費補助金 (総合研究A) 研究成果報告書, 115-119 ページ, 1995.
- 14) D. S. Harper, J. C. Osborn, J. J. Hefferren, T. P. Muller : Dental cariogenic evaluation of foods using human plaque pH and an experimental rat - caries model. *Arch. Oral Biol.* 30 : 455-460, 1985.
- 15) T. Kaneko, T. Matsukubo, T. Yatake, Y. Muramatsu and Y. Takaesu : Evaluation of acidogenicity of commercial isomaltooligosaccharides mixture and its hydrogenated derivative by measurement of pH response under human dental plaque. *Biosci. Biotech. Biochem.* 59 : 372-377, 1995.
- 16) T. Yamada, K. Igarashi and M. Mitsutomi : Evaluation of cariogenicity of glycosylsucrose by a new method to measure pH under human dental plaque *in vivo*. *J. Dent. Res.* 59 : 2157-2162, 1980.
- 17) 山田 正, 五十嵐公英 : 歯垢下 pH 測定によるう蝕誘発性の評価, 歯界展望, 59 : 847-855, 1981.
- 18) 山田 正 : 「食品のう蝕誘発性を検定するための基礎的研究」のまとめ, 食品および代用糖の齧蝕誘発性を総合的に評価するための基礎的研究 (山田 正代表), 平成5年度科学研究費補助金 (総合研究A) 研究成果報告書, 11-17 ページ, 1995.
- 19) T. Ooshima, T. Fujiwara, T. Takei, A. Izumitani, S. Sobue and S. Hamada : The caries inhibitory effects of GOS-sugar *in vitro* and in a rat experiments. *Microbiol. Immunol.* 32 : 1093-1105, 1988.
- 20) C. M. Gibson and M. G. Caparon : Insertional Inactivation of *Streptococcus pyogenes* sod Suggests that *prtF* Is Regulated in Response to a Superoxide Signal. *J. Bacteriol.* 178 : 4688-4695, 1996.
- 21) M. Dubois, K. A. Gilles, J. K. Hamilton, P.A. Rebers and F. Smith : Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analyt. Chem.*, 28 : 350-356, 1956.
- 22) 今井 奨 : *Streptococcus mutans* のシュクロース依存性の平滑面付着およびそれに関与する菌体外グルカンの化学構造, 日歯周誌, 23 : 86-105, 1980.
- 23) Howard K. Kuramitsu : Virulence Factors of Mutans Streptococci : Role of Molecular Genetics. *Critical Reviews in Oral Biology and Medicine*, 4 : 159-176, 1993.
- 24) GUNNAR ROLLA : Why is sucrose so cariogenic? The role of glucosyltransferase and polysaccharides. *Scand. J. Dent. Res.*, 97 : 115-119, 1989.
- 25) 福島和雄 : *Streptococcus mutans* 群 Glucosyltransferase の分子生物学—虫歯発症機序の解析—, 応用糖質科学, 42 : 157-167, 1995.
- 26) 今井 奨 : う蝕発生のメカニズム, Food Style 21, 1 : 31-35, 1997.
- 27) 武笠英彦; 武笠英彦 (監修) : う蝕細菌の分子生物学 研究の成果と展望, クインテッセンス出版, 東京, 63-76 ページ, 1997.
- 28) 山田 正; 浜田茂幸 (編) : う蝕と歯周病—研究の進歩—第3巻, 日本歯科評論社, 東京, 93-117 ページ, 1985.
- 29) T. Yamada, S. Takahashi and K. Abbe : Effects of oxygen on the pyruvate formate-lyase *in situ* and on the sugar metabolism of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sanguis*. *Infect. Immun.* 47 : 129-134, 1985.
- 30) Y. Iwami, K. Abbe, S. Takahashi-Abbe, T. Yamada : Acid production by streptococci growing at low pH in a chemostat under anaerobic conditions. *Oral Microbiol. Immunol.* 7 : 304-308, 1992.
- 31) 阿部一彦, 阿部昌子, 高橋信博, 山田 正 : 歯垢細菌のスクロースまたはグルコース代謝に対するソルビトールの抑制効果, 食品および代用糖の齧蝕誘発性を総合的に評価するための基礎的研究 (山田 正代表), 平成5年度科学研究費補助金 (総合研究A) 研究成果報告書, 41-49 ページ, 1995.
- 32) 松久保隆, 高江洲義矩, 飯島洋一, 常広 淳 : 糖アルコール類の再石灰化作用に与える影響, 口腔衛生会誌, 46 : 442-443, 1997.
- 33) 山田 正; 須賀昭一 (編) : 図説齧蝕学, 医歯薬出版, 東京, 120-138 ページ, 1990.
- 34) 奥 恒行; 大嶋 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まで, 医歯薬出版, 東京, 182-187 ページ, 1996.
- 35) 松久保 隆, 高江洲義矩 : 非齧蝕性甘味料としてのマルチトール, 食の科学, 94 : 1-8, 1985.
- 36) 鈴木 章 : キシリトールのすべて, 日本フィンランドむし歯予防研究会, 東京, 39-60 ページ, 1997.