

# 電極内蔵法 (In-dwelling electrode method) を用いた歯垢の糖代謝活性の測定

高橋 信博

東北大学歯学部口腔生化学講座

(主任: 山田 正教授)

(昭和 62 年 9 月 16 日受付, 昭和 62 年 9 月 22 日受理)

## Evaluation of the acidogenic activity of dental plaque *in vivo* by an in-dwelling electrode method

Nobuhiro Takahashi

Department of Oral Biochemistry, Tohoku University School of Dentistry, Sendai

(Director: Prof. Tadashi Yamada)

**内容要旨:** 電極内蔵法を用いて, *in vivo* での歯垢の酸産生過程を検討した。エナメル質小片にのせた水素イオン感受性トランジスタ電極を上顎第一大臼歯頬側部に取り付け, 4 日間歯垢を蓄積させ, 電極直上に形成された歯垢に糖溶液を与え, そのときの pH 低下カーブを記録した。同一歯垢に糖を 5% 以上の濃度で与えた場合, pH 低下の初期の過程は再現性に優れ, さらに, この pH 低下過程を水素イオン濃度 ( $10^{-\text{pH}}$  M) に置き換えると, その増加はほぼ直線的になり, 歯垢の糖代謝による酸産生過程がより明確に表せることがわかった。以上のことから, この測定法は, *in vivo* での糖の酸産生性や抗ウ蝕剤の効果などを評価するうえで有用であると考えられた。

### 緒 言

ウ蝕は, 歯垢内の細菌が糖を代謝して産生した有機酸によって引き起こされることから, 歯垢内細菌の糖代謝による酸産生過程を詳細に調べることは, ウ蝕の発症を考えるうえで重要である。過去, 歯垢内細菌の糖代謝による酸産生過程については多くの研究が行われてきたが, 大部分は, サンプルした歯垢の懸濁液に糖を加えたときの pH 低下<sup>1)</sup> や, 産生した酸の滴定に要したアルカリの消費速度<sup>2,3)</sup> から推察している。しかしこれらの方法では, 歯垢細菌叢や構造などの歯の表面に付着した歯垢細菌が糖代謝を行っている環境を, サンプルの際に著しく破壊するために, 実際の歯垢の糖代謝の様相を正確に推察することは難しい。

電極内蔵法 (In-dwelling electrode method) は歯垢菌叢を破壊しないで歯垢内 pH の変化を測定できるため, 歯垢の糖代謝による酸産生を忠実に表すと考え

られる。このため, 多くの研究者が, この方法によって糖摂取に伴う歯垢内の pH 変化を測定してきた<sup>4-7)</sup>。さらに, これによって得られた pH 低下カーブから最低 pH, あるいは, それに加えて pH 低下の初期速度, pH 回復時間(糖摂取時に pH が低下し, その後 pH が中性付近にまで回復するのに要した時間)<sup>8)</sup> や pH 面積 (pH 低下カーブと pH 6<sup>8)</sup> あるいは pH 5.5<sup>9)</sup> の線で囲まれる部分の面積) を求め, これらの結果に基づいて, 歯垢の酸産生能や食品の酸産生性について検討してきた。しかし, この方法にも種々の問題点がある。すなわち, *in vivo* で得られる pH 低下カーブには酸の産生の他にも様々な因子, (1) 糖の歯垢への浸透速度, (2) 唾液による糖や酸の洗い流し, あるいは酸の中和<sup>10,11)</sup>, (3) 歯垢そのものの緩衝能<sup>12)</sup>, (4) エナメル質の溶出による酸の中和などが関与しており, 歯垢内細菌の糖代謝による酸産生過程だけを取り出して論ずるのは困難である。しかし, 歯垢内への唾液の流入をできるだけ少なくし, かつ糖の供給を十分にすると, 歯垢

内の pH 低下のごく初期に焦点を絞って検討することにより、歯垢を一種の閉鎖系と見なし、そこに糖が加えられ酸が産生され、pH が低下していく様子を観察できることが期待される。

そこで本研究では電極内蔵法で得られた糖代謝時の歯垢内 pH 低下カーブを分析することによって *in vivo* での歯垢細菌叢の糖代謝の様相を推定することを試みた。

## 材料および方法

### 歯垢内 pH 測定装置

千田らの方法<sup>13,14)</sup> に準じた装置を用い、アクリル板で作成したボックス内に水素イオン感受性トランジスタ電極（以下 FET pH-センサーと略す、pH 6010；クラレ）をエナメル小片にのせて固定し、そのボックスを矯正用維持装置(ST-lock；三金工業)にて、上顎第一大臼歯頰側面に固定した。比較電極(pH 8010；クラレ)は測定時に上記の装置に固定し、FET pH-センサーとできるだけ近接するようにした。

### 被検者および pH の測定法

被検者は、歯の欠損のない3人の成人（23, 27歳；男, 28歳；女）である。

前記装置を被検者の口腔内に4日間装着し、歯垢を蓄積させた後、口腔外で装置に比較電極を固定し、FET pH-センサーおよび比較電極を専用のモニターに接続した後、再び口腔内に戻した。このとき測定した pH の値を安静時 pH とした。

パラフィンシート（パラフィルム；アメリカンカン

社：米国）を約5分間良く噛ませ、唾液の分泌を促進して歯垢内の酸を十分に洗い流し、その pH が約7で安定した後、FET pH-センサーの水素イオン感受性部に蓄積した歯垢の上に糖溶液 100  $\mu$ l を滴下し、経時的に pH の変化を測定した。測定中、被検者はできるだけ体動を避けて安静を保った。歯垢下の pH が最低値を記録した後、回復し始めたところで測定を終了した。再び約10分間パラフィンシートを噛ませ、pH が低下しないことを確認したのち、次の測定を開始した。なお、測定の最初と最後には5%のスクロース溶液を用いて pH 変化を測定し、歯垢の糖代謝活性が実験中に変化しなかったことを確認した。

pH の校正は、測定終了後、比較電極を固定したまま装置を口腔から外し、35°C の pH 標準液に浸漬することにより行った。

### 歯垢および刺激唾液の酸による滴定

24時間歯口清掃を控えて歯垢を蓄積させ、5分間パラフィンシートを噛ませ、歯垢内に蓄積している酸を十分に洗い流したのち、歯垢を採集した。これに、採集した歯垢の湿重量(mg)の10倍の重量の脱イオン水を加えて速やかにホモジナイズし、歯垢懸濁液とした。刺激唾液は5分間パラフィンシートを噛ませた後に採取し、速やかに脱イオン水で10倍に希釈した。直ちに歯垢懸濁液あるいは希釈した刺激唾液を小さなプラスチック容器に50  $\mu$ l 取り、そこに FET pH-センサーを比較電極と共に挿入し、次いで歯垢あるいは唾液に含まれる重炭酸イオンが炭酸ガスとなって放散しないように液状パラフィンを重ねた。標準化した0.01 N の乳酸をマイクロシリンジを用いて加え、FET pH-セン

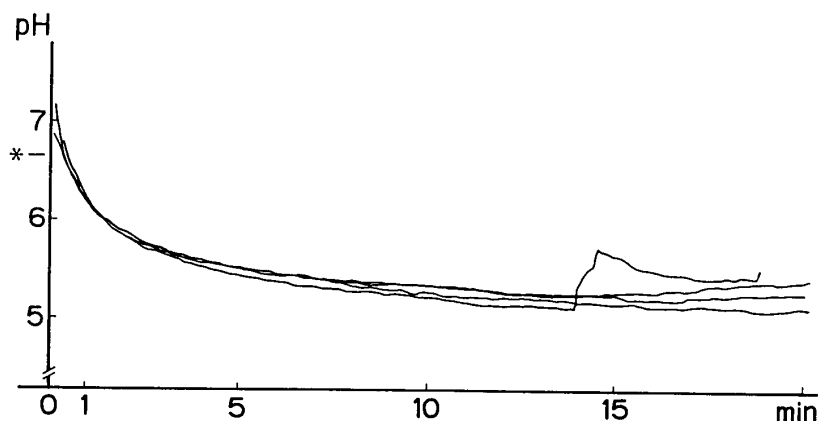


図1 電極内蔵法で得られる歯垢内 pH 低下カーブの再現性。0分において5%スクロース溶液を100  $\mu$ l 滴下した。同一歯垢を用い、約40分間隔で4回測定した。\*は安静時 pH を示す。

サーと比較電極を用いてサンプルを十分に攪拌したのちその pH 値を読み取った。

### 糖類

測定に用いた糖は以下の通りである。

スクロース, グルコース, 乳糖(以上和光純薬), ソルビトール(メルク社; 米国), グルコシルスクロース(0- $\alpha$ -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)-0- $\alpha$ -D-glucopyranosyl- $\beta$ -D-fructofuranoside: カップリング

シュガーの構成成分であり, 以下 G<sub>2</sub>F と略す, 林原生物化学研究所), ニストース(0- $\alpha$ -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)- $\beta$ -D-fructofuranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)- $\beta$ -D-fructofuranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)- $\beta$ -D-fructofuranoside: ネオシュガーの構成成分であり, 以下 GF<sub>3</sub> と略す, 明治製菓), パラチノース(イソマルチュロース: 0- $\alpha$ -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 6)-D-fructose, 三井精糖)。

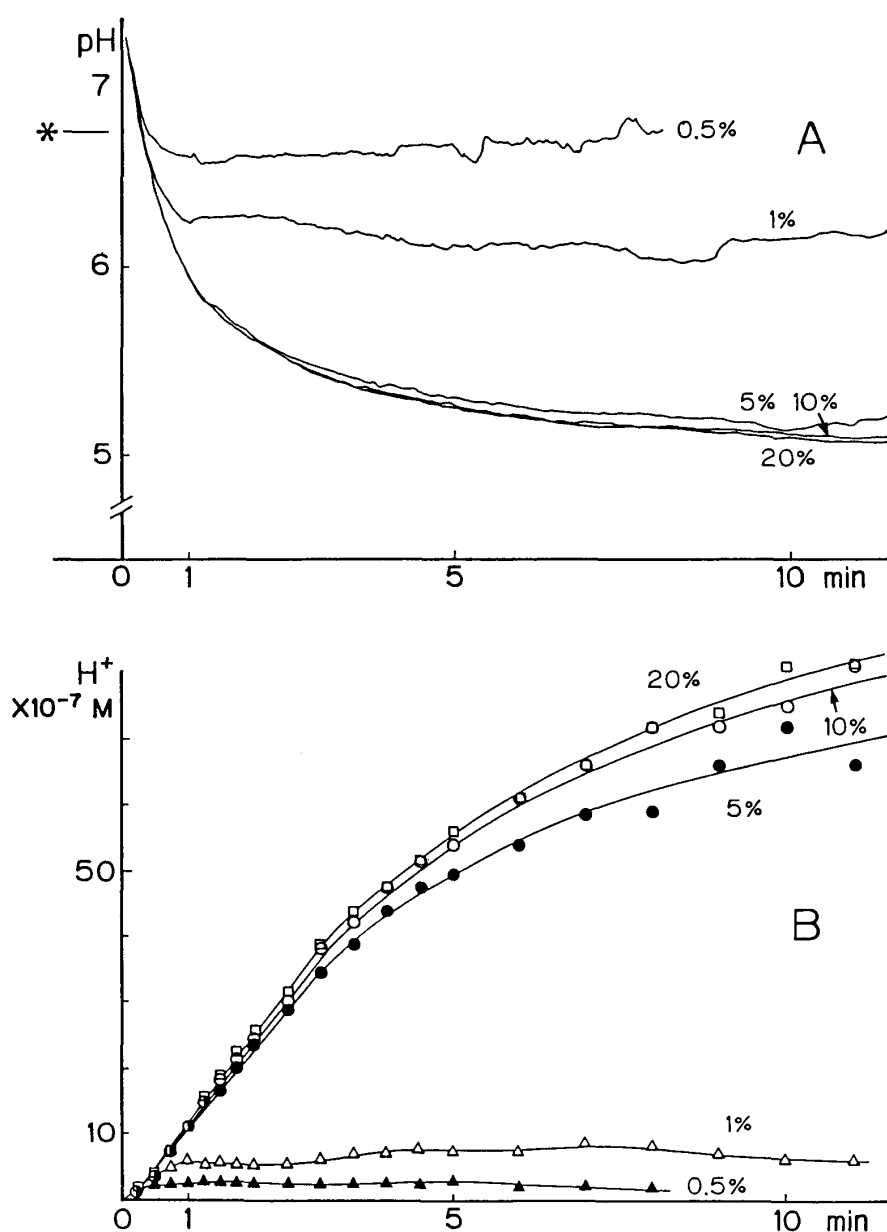


図2 A: スクロース溶液を濃度を変えて100  $\mu$ l 滴下したときの歯垢内 pH 低下カーブ。\* は安静時 pH を示す。B: 図 2A から求めた歯垢内水素イオン濃度の変化。

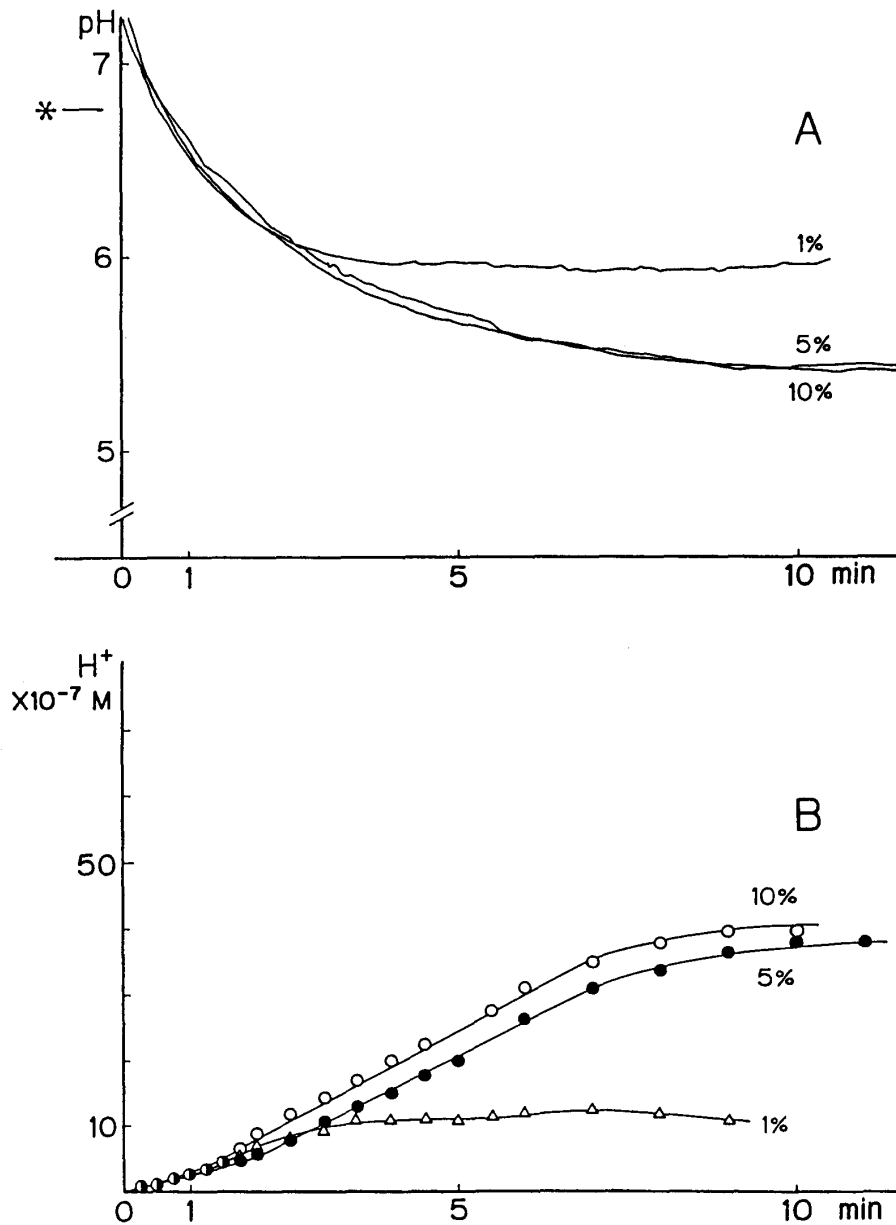


図3 A: 乳糖溶液を濃度を変えて100  $\mu$ l 滴下したときの歯垢内 pH 低下カーブ。\* は安静時 pH を示す。  
 B: 図3A から求めた歯垢内水素イオン濃度の変化。

### 結 果

#### 電極内蔵法で得られた歯垢内 pH 低下カーブの再現性

図1は同一歯垢に5% スクロース溶液を100  $\mu$ l 与えたときの歯垢内 pH 低下カーブを示したものである。約40分間隔で4回測定を行ったが、得られた pH 低下カーブは再現性があった。特に pH 低下カーブの初期の過程の再現性は非常に優れていた。

#### 糖溶液を濃度を変えて与えたときの歯垢内 pH 低下カーブとそのときの水素イオン濃度の変化

同一歯垢にスクロース溶液および乳糖溶液を濃度を変えて与えて歯垢内 pH の低下を測定したところ、糖濃度が高くなるにつれて最低 pH が低くなり (図2A, 3A), pH 回復時間も長くなった(データは図示せず)。しかし、糖濃度5% 以上では、pH 初期低下速度は飽和に達し、最低 pH もほぼ一定であった。

このときの pH 測定値から歯垢内水素イオン濃度の

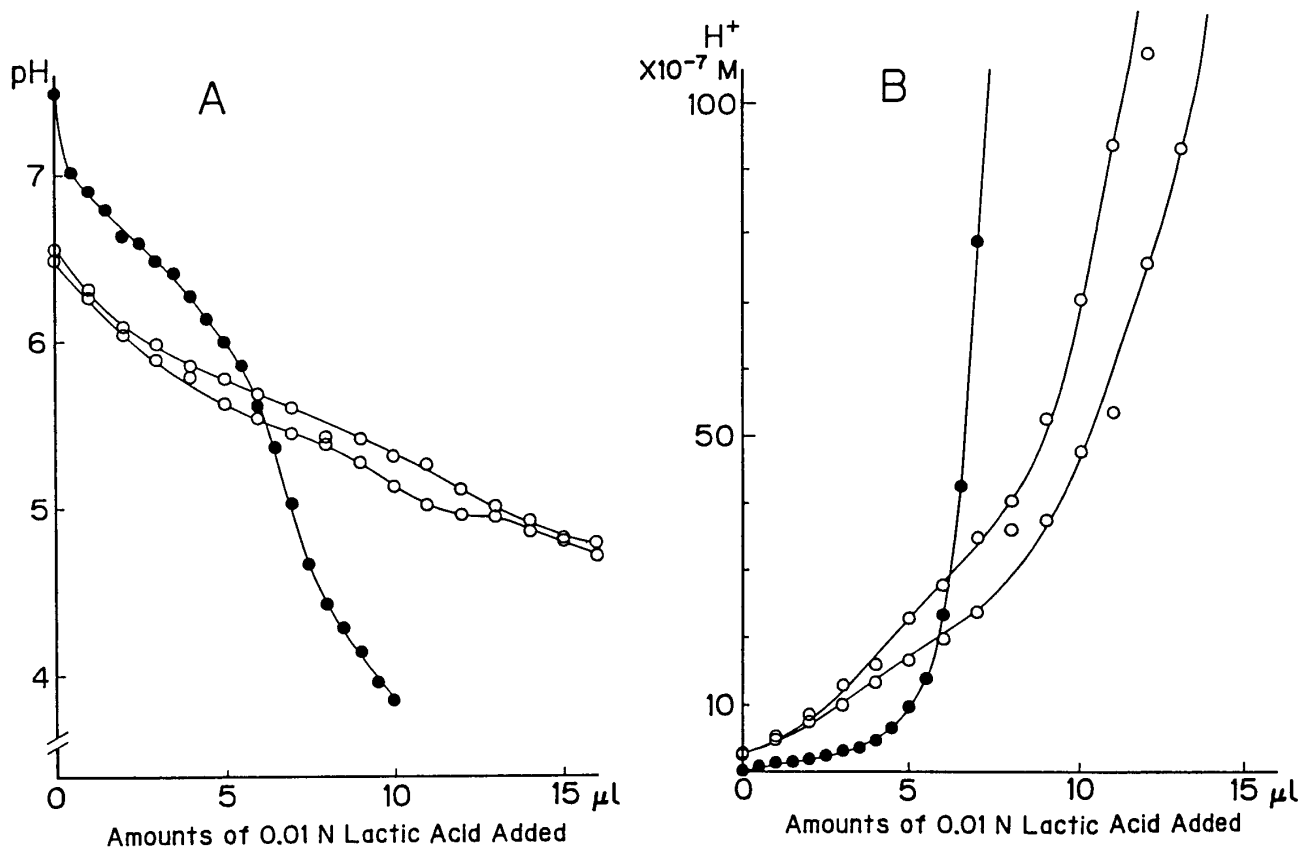


図4 A: 歯垢懸濁液, および刺激唾液に乳酸を加えたときの pH の変化。歯垢懸濁液については 2 回の独立した実験結果を示した。B: 図 4A から求めた歯垢懸濁液, および刺激唾液に乳酸を加えたときの水素イオン濃度の変化。  
 $\circ$  歯垢懸濁液,  $\bullet$  刺激唾液。

変化を計算によって求めた (図 2B, 3B) ところ, スクロース, 乳糖ともに歯垢内水素イオン濃度は  $2.5 \times 10^{-7}$  M (pH 6.6) から  $32 \times 10^{-7}$  M (pH 5.5) までほぼ直線的に増加し, エナメル質の臨界 pH と考えられている pH 5.5 を超えると, その増加速度は減少することがわかった。また, pH 低下のごく初期, すなわち, pH 7.0 ( $\text{H}^+ = 1.0 \times 10^{-7}$  M) 付近ではその増加速度は小さかった。このことから, 糖濃度が 5% 以上であれば歯垢内 pH 低下の初期の過程は安定し, また, そのときの水素イオン濃度の増加はほぼ直線的であることがわかった。

#### 歯垢懸濁液, および刺激唾液の緩衝能

刺激唾液に酸を加えていくと pH 6.5 前後で緩衝作用を示し, これは唾液に含まれる重炭酸イオン ( $\text{pK}_a = 6.1$ ) によるものと考えられた。一方, 歯垢懸濁液は刺激唾液に比べ緩衝能が高く, また, 特異的な緩衝点を持たなかった (図 4A)。これを水素イオン濃度に置き

換えて表すと, 刺激唾液の場合には水素イオン濃度が  $10 \times 10^{-7}$  M (pH 6.0) を超したところから急激な水素イオンの増加がみられるのに対し, 歯垢懸濁液では  $5.0 \times 10^{-7} - 32 \times 10^{-7}$  M (pH 6.3-5.5) にかけてほぼ直線的に増加していることがわかった (図 4B)。

#### 種々の糖溶液を与えたときの歯垢内水素イオン濃度の変化

種々の糖の 5% 溶液を  $100 \mu\text{l}$  与えたときの歯垢内 pH 低下カーブを記録し, そこから歯垢内水素イオン濃度の変化を求めたところ, いずれの糖でも歯垢内水素イオン濃度はほぼ直線的に増加していた (図 5)。スクロースやグルコースは酸産生速度 (歯垢内水素イオン濃度の増加速度) が大きく, ソルビトール, パラチノースではほとんど酸産生がみられなかった。乳糖,  $\text{G}_2\text{F}$ ,  $\text{GF}_3$  の酸産生速度はそれらのほぼ中間に位置していた。また, これらの糖種間での相違は全ての被検者にほぼ共通であった。

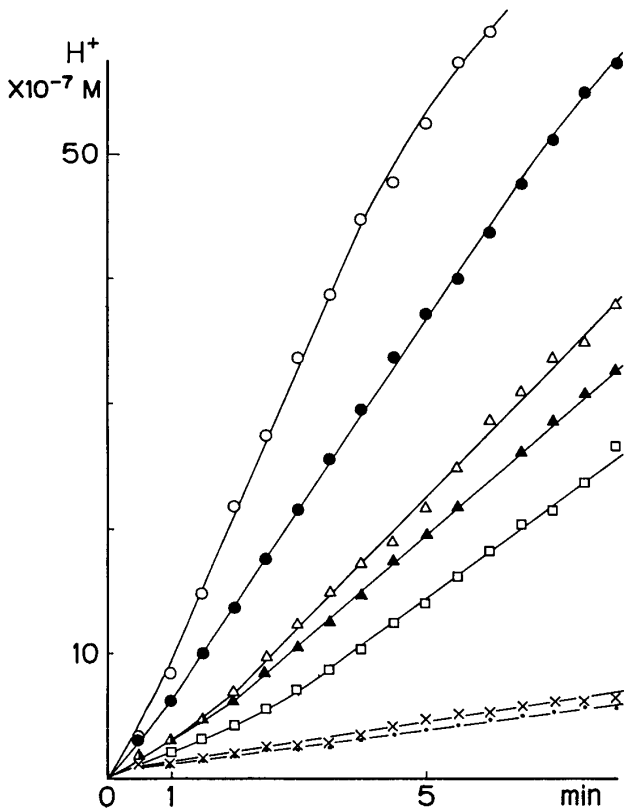


図5 種々の5%糖溶液を与えたときの歯垢内水素イオン濃度の変化。  
○ スクロース, ● グルコース, △ 乳糖,  
▲ G<sub>2</sub>F, □ GF<sub>3</sub>, × ソルビトール,  
• パラチノース。

## 考 察

FET pH-センサー感受性部直上に形成された歯垢に糖を加えると、そこに生息する細菌が糖を代謝し酸を産生し、その結果pHが低下する。そのときに得られたpH低下カーブは特にpH低下の初期の過程において再現性に優れていた(図1)。これらのことから、本研究の実験条件では、FET pH-センサー上に形成された歯垢の糖代謝活性は数回の糖代謝の過程で安定に保たれ、一つの歯垢をほぼ同一条件で、数回にわたり使用できることがわかった。

pH低下の初期の過程での再現性が優れていることから、この過程では糖の供給が十分であり、また急速に酸が産生されるため、唾液の流入による糖や酸の洗い流しや酸の中和の影響をほとんど受けないものと思われた。特に今回の実験条件では、上顎臼歯頰側部に装着したアクリルボックス内部にFET pH-センサーが設置されているため、唾液がこの部分に入り込む機会が少ないと考えられた。それを反映して、pH回復時

間が約2時間(データは図示せず)と非常に長くなったものと思われる。また糖は、100  $\mu$ lの糖溶液をFET pH-センサー感受性部直上の歯垢だけに滴下して与えているため、糖の甘味などによる唾液分泌の促進は考えられなかった。さらに、FET pH-センサーのpH変化に対する応答性は微小ガラス電極に比べはるかに優れているため<sup>15)</sup>、初期の急速な歯垢内pHの低下を確実に測定できたものと考えられる。

歯垢に濃度を変えて糖を与えたとき、歯垢内pHの初期低下速度は5%の糖濃度でほぼ飽和に達した(図2A, 図3A)。このことから、5%以上の糖溶液を与えればpH初期低下過程を十分に測定でき、かつ再現性の良い結果が得られることがわかった。0.5%, 1%の糖濃度でも、ごく初期のpH低下の速さは5%のものと同じであり、歯垢内細菌の糖の取り込み系および糖代謝酵素系は糖に対しかなり親和性が高いと考えられた。0.5%, 1%の糖溶液では、糖添加後1分以内で酸産生が鈍ってしまうが、これは歯垢内細菌によって糖が短時間のうちにごく低濃度になるまで消費されたためと思われた。

pH低下カーブの各時点から求めた水素イオン濃度の変化から(図2B, 3B), pH 6.6 ( $H^+ = 2.5 \times 10^{-7}$  M) から pH 5.5 ( $H^+ = 32 \times 10^{-7}$  M) までは歯垢内水素イオン濃度の増加はほぼ直線的になることがわかった。しかし、ある緩衝液に酸を加えていく場合、その緩衝作用のため水素イオン濃度の増加は必ずしも直線的にはならない。例えば、刺激唾液は緩衝作用を示すものとして主に重炭酸イオンを含んでいるため、これに酸を加えていった場合、重炭酸イオンのpKa (=6.1) 付近では水素イオン濃度はそれほど増加しないがpH 6以下では急激な増加を示した<sup>16)</sup>(図4A, 4B)。これに対して歯垢懸濁液は緩衝能が高く、また特異的な緩衝点がなく<sup>12)</sup>(図4A), これに酸を加えていった場合にはpHの広い範囲で穏やかな水素イオンの増加がみられた。特に、pH 6から5付近まではほぼ直線的な水素イオン濃度の増加がみられ(図4B), これは糖を与えたときの歯垢内の水素イオン濃度の増加(図2B, 3B)と類似していた。このことから歯垢内pH低下の初期の過程、すなわちpH 6.6-5.5付近での歯垢の酸産生速度はほぼ一定であると推察され、さらにpH低下カーブを水素イオン濃度で表すことによって、歯垢内細菌の酸産生過程をより明確に表すことができると考えられた。pH 5.5以下になると、歯垢内水素イオン濃度の増加速度が減少したが、これはpH 5.5以下では歯垢内細菌の

糖代謝活性が減少すること、また、エナメル質が脱灰され始め、産生された酸が中和されることなどによるためと考えられた。また、pH低下のごく初期では歯垢内水素イオン濃度の増加速度が小さいが、これは糖や産生された酸が歯垢深部、すなわちFET pH-センサー感受性部に達するまでに時間がかかるためと思われた。

次いで、各種糖を同一歯垢に与えたときの歯垢内pH低下カーブを測定し、そこから水素イオン濃度の変化を求めたところ、歯垢内でどのような糖が代謝され酸が産生される場合でも、歯垢内水素イオン濃度の増加はほぼ直線的になることがわかった(図5)。その増加速度はスクロース、グルコースで大きく、ソルビトール、パラチノースでは小さく、乳糖、G<sub>2</sub>F、GF<sub>3</sub>ではその中間であった。このことから歯垢内細菌は摂取の機会が多いスクロース、グルコースの取り込み系、代謝酵素系とも十分に誘導されているが、ソルビトール、パラチノースに対する取り込み系、代謝酵素系はほとんど持っていないことが推察された。

以上のことから、FET pH-センサーを用いた電極内蔵法により同一歯垢内の糖代謝による酸産生過程を再現性よく数回にわたって測定でき、さらに歯垢内のpH低下カーブから水素イオン濃度増加速度を求めることにより、歯垢内細菌の糖代謝活性を明確に表せることがわかった。このことは歯垢内細菌の*in vivo*での糖代謝の様相を知るうえで重要であるばかりではなく、フッ素など糖代謝阻害剤の*in vivo*での歯垢内細菌に対する効果や、各種糖の酸産生性や各種糖に対する歯垢内細菌の適応を評価するうえで重要な指標になると考えられる。

稿を終えるにあたり、御懇切なる御指導、御校閲を賜った東北大学歯学部口腔生化学講座山田 正教授、阿部一彦助教授に深く感謝の意を表します。また、本研究を行うにあたり、御教示、御助言を賜った東北大学歯学部小児歯科学講座五十嵐公英講師、畑 弘子助手に感謝いたします。

本研究の一部は、文部省科学研究・総合研究(A)(60304074)の補助を受けた。

## 文 献

- 1) Bibby, B.G. and Krobicka, A.: An *in vitro* method for making repeated pH measurements on human dental plaque. *J. Dent. Res.* **63**: 906-909, 1984.
- 2) Frostell, G.: Quantitative determination of the acid production from different carbohydrates in suspensions of dental plaque material. *Acta Odont. Scand.* **22**: 457-475, 1964.
- 3) Birkhed, D.: Automatic titration method for determination of acid production from sugars and sugar alcohols in small samples of dental plaque material. *Caries Res.* **12**: 128-136, 1978.
- 4) Graf, H. and Mühlemann, H.R.: Telemetry of plaque pH from interdental area. *Helv. Odont. Acta* **10**: 94-102, 1966.
- 5) Imfeld, T.: Evaluation of the cariogenicity of confectionery by intra-oral wire-telemetry. *Helv. Odont. Acta* **21**: 437-464, 1977.
- 6) Newman, P., MacFadyen, E.E., Gillespie, F.C. and Stephen, K.W.: An in-dwelling electrode for *in vivo* measurement of the pH of dental plaque in man. *Arch. Oral Biol.* **24**: 501-507, 1979.
- 7) Igarashi, K., Kamiyama, K. and Yamada, T.: Measurement of pH in human dental plaque *in vivo* with an ion-sensitive transistor electrode. *Arch. Oral Biol.* **26**: 203-207, 1981.
- 8) 千田隆一: 電極内蔵法による成人での歯垢内酸産生能に関する研究. II. 乳糖による歯垢のpH変化ならびに電極表面に形成された歯垢の細菌学的検討. *小児歯誌* **22**: 811-827, 1984.
- 9) Jensen, M.E., Polansky, P.J. and Schachtele, C. F.: Plaque sampling and telemetry for monitoring acid production on human buccal tooth surfaces. *Arch. Oral Biol.* **27**: 21-31, 1984.
- 10) Edgar, W.M.: The role of saliva in the control of pH changes in human dental plaque. *Caries Res.* **10**: 241-254, 1976.
- 11) Jenkins, G.N.: Salivary effects on plaque pH. Kleinberg, I., Ellison, S.A. and Mandel, I.D. (edit.): *Saliva and dental caries*. Information Retrieval Inc., New York, 1979, pp. 307-322.
- 12) Strålfors, A.: Studies of the microbiology of caries. *J. Dent. Res.* **27**: 587-592, 1948.
- 13) 千田隆一: 電極内蔵法による小児および成人での歯垢内酸産生能に関する研究. I. 歯垢内pH測定装置と電極表面に形成された歯垢の走査電子顕微

- 鏡による観察. 小児歯誌 22: 125-136, 1984.
- 14) Chida, R., Igarashi, K., Kamiyama, K., Hoshino, E. and Esashi, M.: Characterization of human dental plaque formed on hydrogen-ion-sensitive field-effect-transistor electrodes. J. Dent. Res. 65: 448-451, 1986.
- 15) Yamada, T., Igarashi, K. and Kamiyama, K.: Advantages and disadvantages of using an ion-sensitive transistor electrode for measuring pH in human dental plaque *in vivo*. Frank, R.M. and Leach, S.A. (edit.): Surface and colloid phenomena in the oral cavity: Methodological aspects. Information Retrieval Inc., London, 1982, pp. 157-166.
- 16) Lilienthal, B.: An analysis of the buffer systems in saliva. J. Dent. Res. 34: 516-530, 1955.