

壹、前言

牙齒保健食品，其功能係以能降低齲齒之發生率或牙菌斑形成現象；但不應有明顯化學刺激而直接會造成口腔黏膜或牙齒之傷害，或過於堅硬而易造成牙齒磨耗、破折或牙周傷害之情形。

齲齒是屬於多因子所造成的疾病 (multifactorial disease)，其發生應考慮牙齒組成元素、形態、位置、涎液組成成份、酸鹼值、分泌量、粘度、抗菌因子、飲食中的碳水化合物含量、氟化物、維生素以及其物理性質。齲齒盛行率方面之評估，在傳統上多以流行病學上之觀察為主，但是牙齒保健功能食品之評估，如從流行病學上齲齒盛行率方面加以評估，必然會耗費過多的人力、時間及金錢，而且在精確度方面，亦會受到質疑，因此，本評估方法採用動物抗齲齒實驗及人體牙菌斑實驗二項。

關於動物抗齲齒實驗，由於目前引發動物齲齒技術的成熟及一致化，對食品降低齲齒發生率方面之評估，應有相當高的精確度，除此之外，尚可排除流行病學上多重因子所造成的干擾，並且可以減少大量的費用，以及實驗執行及結果判斷上的困難。

降低口腔內細菌的數量，可減少齲齒及細菌造成的牙周病之發生率。而會影響到牙齒保健的細菌，皆是以牙菌斑 (plaque) 形式存在。牙菌斑是一層附著在口腔內牙齒表面上的一層膜，外表變化可以從透明的外觀到白色堆積物 (的外表變化)。牙菌斑內的細菌包括有各種球菌，桿菌及纖毛菌，其中最容易引發齲齒或導致牙周發炎的主要牙菌斑細菌有 *Streptococcus utans*, *Streptococcus sanguis*, *Actinomyces viscosus* 及 *Porphyromonas gingivalis*。牙菌斑可由人體直接取樣、觀察、分析，其實驗之方法及結果之判斷已有公認之一致性步驟。

因此，人體實驗部分以檢測人體牙菌斑之三種變化 (酸鹼值、堆積量及 *Streptococcus mutans* 數量) 來評估食品之牙齒保健功能。

貳、實驗方法

一、動物抗齲齒實驗

(一) 原理：利用會在動物引發齲齒之細菌和蔗糖來引發齲齒，而用來評估測試食品之抗齲效果。

(二) 方法：

1. 分設實驗組及對照組，每組各 40 隻大鼠。
2. 二組之飲水中，皆添加 5% 蔗糖，採用自由餵食。
3. 二組之實驗鼠，皆應接種細菌，使用 *Streptococcus sobrinus* 6715 (10^8 cell/ml) 之菌株，可於口腔塗拭或或添入於飲用之糖水中。
4. 接種二天後，使用口腔棉花擦拭法 (oral swab method) 採得檢體，並用含 200 μ g/ml streptomycin sulfate 之 Mitis Salivarius Agar 培養，檢視是否接種成功。
5. 接種成功後，實驗組投予混合有測試食品之飼料，而對照組仍給與大鼠飼料 Lab Chow 500I。
6. 測試食品餵飼 20 日後，各犧牲第一批五隻，以後每隔 20 日犧牲一批。
7. 大鼠犧牲後，牙齒採用 Keyes caries score 方式記錄，並比較二組之差

異。

8. Keyes caries score 之記錄，應採用 **Keyes caries score card** 之方式 (Animal Models in Dental Research, J.M. Navia, p.289, the University of Alabama School of Dentistry, 1977, Alabama, U.S.A.)。
9. 大鼠犧牲後，應將上下顎骨切下，清除周圍軟組織，並將之乾燥，使牙齒部位便於觀察及操作。
10. 觀察白齒之頰側、舌側、咬合面、鄰接面及牙溝之齲齒變化。
11. 觀察牙溝時，應用環狀鋸將白齒近遠心縱切。
12. 齲齒之嚴重程度，E 為 1，DS 為 2，DM 為 3，DX 為 4。
 - E 為齲齒之部位只限於牙釉質
 - DS 侵犯至牙釉牙本質交界處
 - DM 侵犯至牙本質
 - DX 牙本質嚴重破壞
13. 經統計其數值後，再比較實驗組及對照組之差異，如果實驗組之數值較對照組為低，經 Student's T-test 統計，若 $P < 0.05$ 時，該測試食品有抗齲效果。

- 註：1. 為避免遭 *Streptococcus mutans* 污染，應採用 specified pathogen-free 之大鼠。
2. 飼料及飲水應經消毒。
 3. 為便於齲齒部位之觀察，可將顎骨浸泡於 Kernechtrot B salt 飽和溶液中 6 小時。
 4. 如果使用接種之菌種為一般 *Streptococcus mutans* 菌種，應在實驗中證明未遭致其他菌種之污染。
 5. 大鼠可採用任何品種之出生四週後之大鼠。

二、人體牙菌斑檢驗

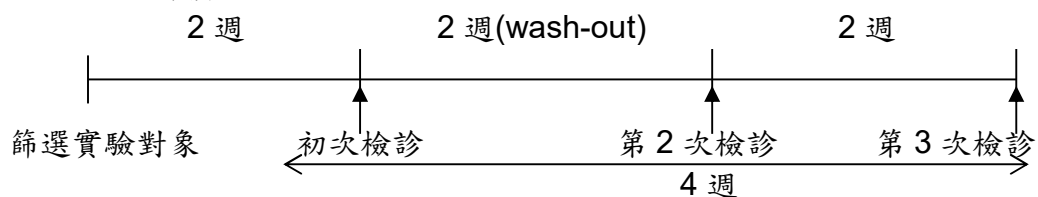
(一) 原理：利用牙菌斑酸鹼值之變化，牙菌斑堆積量之變化，及牙菌斑內 *Streptococcus mutans* 數量之變化來評估食品的牙齒保健功能。

(二) 方法：人體試驗

1. 實驗對象：不抽煙、無全身疾病、年齡為 20 至 40 歲之間且每毫升唾液中有 10^5 個以上之 *Streptococcus mutans* 之健康成人，隨機分成實驗組與對照組，每組 10 人以上。

2. 實驗設計：

- (1) 實驗期間為四週，在實驗期間，實驗對象仍維持平日之飲食習慣及口腔衛生習慣，不可用藥用漱口水且用同一品牌之牙膏，不可吃與實驗有相關之其他食品。在第二次檢診及第三次檢診前 48 小時開始，實驗對象不可刷牙及使用牙線至檢診完後始恢復原來之口腔衛生習慣。



- (2) 初次檢診之二週前，先從自願參予實驗之對象中，依唾液中突變形鏈球菌數及實驗對象之 DMFS index，篩選出符合條件之實驗對象，並施與全口洗牙。

- (3) 初次檢診，告知實驗對象有關實驗內容、方法及目的，並取得實驗對象之同意書。
- (4) 初次檢診二週後 (wash-out period) 的第二次檢診時，測量實驗對象口內牙菌斑酸鹼值並取得實驗對象口內之牙菌斑樣本，第二次檢診取得之測量值為基準值 (baseline level)。
- (5) 在第二次檢診時發給實驗對象二週份之測試食品 (分成實驗組與對照組)。測試食品每日吃若干次，每次吃一定量，並將食品含於口中或咀嚼一定之時間 (其食用方式視測試食品而定)。
- (6) 第二次檢診二週後 (experimental period) 的第三次檢診時，取得樣本之測量值為實驗值 (experimental level)。
- (7) 第二、三次檢診在早上進行，檢診前 6 小時，實驗對象不可進食但可喝水。檢診前 2 小時，實驗對象不可進食及喝水。

3. 檢測牙菌斑酸鹼值之變化

- (1) 牙菌斑酸鹼值之測量由同一位牙醫師執行，利用酸鹼值測量器 (Model 701, Orion Research, Cambridge, Mass. USA) 接上鉑電極 (Beetrotde, MEPH-3L; W-I Instruments, New Haven, Conn., U.S.A) 測定實驗對象上下左右顎共四側之犬齒與第一小白齒之間牙菌斑的酸鹼值。
- (2) 檢測測試食品對口內靜止狀態之牙菌斑酸鹼值之影響 (Resting pH value)：在未進行檢測測試食品對食入蔗糖水後牙菌斑酸鹼值之影響前，先測定口內靜止狀態之牙菌斑酸鹼值。第三次檢診所得之實驗值與第二次檢診所得之基準值比較，所得結果為測試食品對口內靜止狀態之牙菌斑酸鹼值的影響。若牙菌斑的酸鹼值有上升 ($p < 0.05$)，則認定該測試食品對口腔保健有正向之效果，若對口內靜止狀態之牙菌斑酸鹼值無正或負之影響，則認定測試食品對食入蔗糖水後牙菌斑酸鹼值之影響結果而定。
- (3) 檢測測試食品對食入蔗糖水後牙菌斑酸鹼值之影響
此項實驗若須執行，則需延長實驗期間 2 週，於第 4 次檢診時進行單項之實驗，實驗對象檢測完口內靜止狀態之牙菌斑酸鹼值後，含 15 ml 的 10% 蔗糖水 2 分鐘後，吐出蔗糖水後，食入測試食品一定之時間。在吐出蔗糖水後的第 2, 5, 10, 20, 30, 45, 60 分鐘，分別測牙菌斑酸鹼值。若測試食品組食入蔗糖水後牙菌斑的酸鹼值較對照組上升 ($p < 0.05$)，則認定該測試食品對口腔保健有正向之效果。
- (4) 測試食品對第 (2) 項口內靜止狀態之牙菌斑酸鹼值之影響或對第 (3) 項食入蔗糖水後牙菌斑酸鹼值之影響，其中任何一項有正向之效果，則認定該測試食品對牙菌斑酸鹼值之影響有正向之效果。

4. 檢測牙菌斑堆積量之變化

- (1) 牙菌斑之收集由同一位牙醫師執行。
- (2) 檢測完牙菌斑酸鹼值之變化後。用牙周刮匙 (periodontal curette) 將牙齒上所有可收集之牙齦上牙菌斑 (supragingival plaque) 刮下收集，並馬上秤重 (wet weight)。
- (3) 牙菌斑堆積量之變化的統計結果，以實驗組堆積量之減少較對照組高 20% 以上 ($p < 0.05$) 則認定該實驗食品有減少牙菌斑堆積量之效果。

5. 檢測牙菌斑內突變形鏈球菌數量之變化

- (1) 突變形鏈球菌數量之變化：將 1mg 牙菌斑溶於 1 ml 0.05M phosphate

buffer(pH 7.3)中，並輕輕攪拌 30 秒後，經連續稀釋後之牙菌斑溶液塗於 MSB agar 上，培養於 37°C 之 5% CO₂ 及 95% N₂ 的環境下三天後，計算菌落數 (CFU/ml)，統計時以牙菌斑內之突 *Streptococcus mutans* 之菌落數除以牙菌斑內之全菌數之菌落數來代表牙菌斑內之 *Streptococcus mutans* 之數量。

- (2) 全菌數之菌落數：將於第 (1) 項步驟中已連續稀釋後之牙菌斑溶液塗於 Brain heart infusion agar 上，培養於 37°C 之 5% CO₂ 及 95% N₂ 的環境下五天後，計算全菌數之菌落數。
- (3) 第三次檢診所得之實驗值與第二次檢診所得之基準值比較，所得結果為測試食品對口內突變形鏈球菌之數量變化之影響，若實驗組中有 50% 以上之受試者有突變形鏈球菌數量減少 ($p < 0.05$)，則認定該測試食品有減少牙菌斑內突變形鏈球菌數量之效果。

6. 統計分析

- (1) 牙菌斑堆積量之變化，利用 Student's paired t test 及 Wilcoxon rank sum test 分析。
- (2) 牙菌斑酸鹼值之變化，利用 Wilcoxon test for paired difference 分析。
- (3) 牙菌斑內突變形鏈球菌之變化，利用 Pearson, Chi-square test, 及 Student's paired t test 分析。
- (4) Correlation coefficients 利用 Spearman test 計算。
- (5) Statistical significance $p < 0.05$ 。

7. 結果判定之基準

牙菌斑酸鹼值之變化、牙菌斑堆積量之變化及牙菌斑內突 *Streptococcus mutans* 數量的變化，三種檢測中有兩種檢測結果為正向即為對人體牙菌斑檢驗有正向效果。

註：

本實驗所使用之 Dentocult®-SM: Orion Diagnostica, Espoo, Finland), 酸鹼值測量器 (Model 701, Orion Research, Cambridge, Mass. USA), 及鉑電極 (Beetron, MEPH-3L, W.P.I. New Haven, Conn. USA), 可使用性質功能相同之其它品牌產品。

參、評估方法之原則要求

可選動物抗齲齒實驗或人體牙菌斑檢驗之其中一項評估食品之牙齒保健功能。

肆、結果判定基準

凡動物抗齲齒實驗有正向意義或人體牙菌斑檢驗之三項檢測中有兩種檢測結果為正向即可評估為具有牙齒保健功能之食品。