

グルカン産生能を指標とした 市販キャンディーのう蝕誘発性評価

橋 口 美智留
吉 川 秀 樹

I 序

う蝕は、宿主因子、基質因子、細菌因子の3つの因子からなる多因性の生活習慣病の一つで、これらの因子がある程度の期間共存することによって初めて発生すると考えられている¹⁾。ヒトの口腔内にはレンサ球菌や乳酸桿菌をはじめ、400種以上もの常在菌が生息している。ヒトのう蝕にはミュータンスレンサ球菌の中でも *Streptococcus mutans* (*S. mutans*) および *Streptococcus sobrinus* (*S. sobrinus*) が深く関わっている²⁾。ミュータンスレンサ球菌が持つグルコース転移酵素、Glucosyltransferase (GTase) は、スクロースを基質とし、スクロースからグルコースを遊離すると同時に、プラーク（菌垢）の基となる高分子多糖のグルカンを合成する。プラークが形成されると、プラークに取り込まれた細菌によってつくられた乳酸などの酸性物質の菌垢外への流出が妨げられるとともに、唾液による酸に対する中和作用が阻害される³⁾。食事由来の糖質から産生された酸性物質が菌垢内に長時間滞留することによって、歯面のpHがおよそ5.5以下になると、歯のエナメル質の脱灰が引き起こされる⁴⁾。これがう蝕の始まりと考えられている。

このように、う蝕の直接の原因はグルカンによる菌垢の形成ならびに口腔内細菌による糖質からの酸発酵にあると考えられる。食事によって糖質を摂取すると、口腔内細菌によって発酵を受けて酸性物質が産生されるが、その発酵による酸産生速度は糖質の種類によって異なる⁴⁾。スクロースはきわめて酸発酵されやすい物質であると同時に、GTaseによるグルカン合成における唯一の基質である。GTaseはスクロース由来のグルコースのみを基質とし、他の糖質はもちろん、スクロースの構成単糖であるグルコースやフルクトースを単独で摂取してもグルカン合成の基質にはならない⁵⁾。したがって、う蝕予防において、スクロースの

これらの性質を抑制することは非常に重要であると考
えられている。実際に、う蝕予防を目的として、
GTaseの基質にならないスクロース代替甘味料や
GTase阻害作用を持つ物質などについて多くの研究
がされている。スクロース代替甘味料としては、スク
ロースの構造異性体^{6,7)}を始め、糖アルコールやオリ
ゴ糖などがある⁸⁻¹⁰⁾。また、GTase阻害物質としては、
茶ポリフェノール¹¹⁻¹³⁾やプロポリスなどが知られてい
る¹⁴⁾。これらの中には、既に商品化され、主に菓子類
などに添加されているものも多数存在する。しかし、
う蝕誘発抑制作用を持つ物質を添加した商品の中
には、特定保健用食品のようにその効果が科学的に証明
されているものもある一方で、「菌にやさしい」ある
いは「菌を大切に」等の曖昧な表示がされているもの
も存在する。そこで、本研究では市販されている菓子、
特にスクロースを主成分とするキャンディーについて
う蝕菌由来のGTaseを用いてグルカン生成量の比較
を行った。

II 実験材料ならびに方法

1. 試験物質

本研究で使用した市販キャンディーは以下の3種である。

原材料がスクロースと水あめのみで構成されている試料A、甘味料としてスクロースおよび果汁ペーストを含み、さらにGTaseを阻害することが既に明らかになっている緑茶ポリフェノールを含む試料B、スクロースは含まず、甘味料としてスクロース代替甘味料であるパラチノースおよびキシリトールを含む試料Cを用いた。

これらの試料をそれぞれ糖質（甘味料）量として10g秤量し、熱水に溶解したものを試料原液として、後のグルカン生成実験に使用した。

2. 使用菌株

本研究では、今井奨博士（鶴見大学歯学部・講師）のご好意により分与された *Streptococcus sobrinus* 6715 (*S. sobrinus*) を使用した。

3. GTase の調製

S. sobrinus 由来 GTase は培養液上清より調製した^{15,16)}。Brain Heart Infusion (BHI) (Difco, USA) 液体培地 450 mL を用いて 37℃, 24 時間, 酸素吸収・炭酸ガス発生剤（アネロパック, 三菱ガス化学（株）, 東京）を用いた静置・嫌気培養を行った。

培養終了後, 培養液を遠心分離 (12,000 × g, 4℃, 30 分) し, 菌体を除去した。その上清を 60% 硫酸アンモニウムで塩析した (4℃, 24 時間) 後, 遠心分離 (12,000 × g, 4℃, 30 分) を行い, 得られた沈殿物を 0.01 M リン酸緩衝液 (pH 6.8) に溶解し, 同緩衝液にて透析を行った。この濃縮液を *S. sobrinus* 由来の粗 GTase とした。

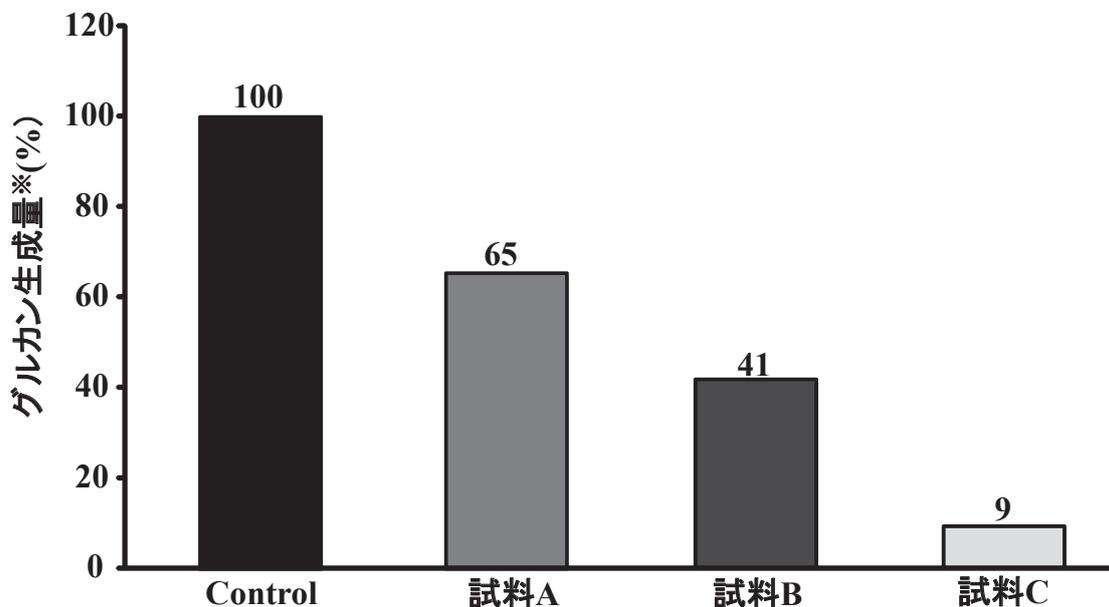
4. GTase によるグルカンの生成および定量

小試験管に粗 GTase 1.0 mL, 試験物質溶液 1.5 mL, 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 6.8) 0.5 mL を添加し

混合した。なお, グルカン生成量の指標として試料中の糖質量と同濃度になるよう調整したスクロース溶液を用いた。これらを仰角 20 度になるよう静置し, 37℃ で 24 時間反応させた。反応終了後, 反応液を沸騰水浴中で 5 分間加温し, 酵素反応を停止した。その後, 反応液容量の 3 倍量のエチルアルコール (99% 以上) を加え一晩静置した後に, 遠心分離 (2,110 × g, 25℃, 20 分) を行い, 沈殿物を回収した。これを GTase によって生成されたグルカン画分とし, 1N NaOH で適当に希釈した後にフェノール硫酸法によって全糖量を測定した¹⁷⁾。糖質標準液として, グルコースを 1N NaOH で調整したものを用いた。

Ⅲ 結果および考察

図 1 は, 各試料を基質とした *S. sobrinus* 由来 GTase によるグルカンの生成量をコントロールに対する比率で示したものである。各試料のグルカン産生量は, 甘味料としてスクロースと水あめが含まれている試料 A では 65%, スクロースおよび GTase 抑制作用を持つ緑茶ポリフェノールが含まれている試料 B では 41%, 甘味料としてスクロース代替甘味料であ



Control:スクロース溶液

試料A:スクロース, 水飴

試料B:スクロース, 果汁ペースト, 緑茶ポリフェノール

試料C:パラチノース, キシリトール

※:グルカン生成量はコントロールを100とした場合の比率で示した。

図 1 キャンディーを基質とした *S. sobrinus*6715 由来 GTase によるグルカン生成量の比較

るキシリトールおよびパラチノースを含む試料 C では 9%であった。

試料 A に含まれる水あめの主成分であるマルトースは、グルコースが α -1, 4 結合した二糖類である。スクロースと同様に構成糖にグルコースを含むが、GTase はスクロース由来のグルコースを唯一の基質とし、マルトース由来のグルコースはグルカン合成の基質には利用されない。本研究では、試料中のスクロース単独の糖質量ではなく、試料に含まれる全ての甘味料の合計量を統一にした反応系で実験を行ったため、GTase 阻害剤やスクロース代替甘味料を含まない試料 A においてもコントロールに比べてグルカン生成量が減少する結果になったと考えられる。試料 B において、グルカン生成量がコントロールや試料 A よりも少なくなったのは、緑茶ポリフェノールの GTase 阻害作用が影響したためであると考えられる。しかし、添加されている緑茶ポリフェノールの濃度では、グルカンの生成を完全に抑制することは出来なかった。また、試料 B 中の緑茶ポリフェノール量を GTase によるグルカン生成が完全に抑えられる濃度まで増加したとしても、緑茶ポリフェノールは酸産生に対する抑制効果を持たないため、口腔内細菌によるスクロースからの酸産生によって口腔内 pH が低下する可能性がある。そのため、緑茶やウーロン茶由来のポリフェノールはポリフェノール類の中でも特に GTase 阻害作用が強く、特定保健用食品の「歯の健康維持に役立つ」食品の関与成分として認可されているが、茶ポリフェノールのみを添加した食品で特定保健用食品として認可されているものは未だ存在しない。現在、茶ポリフェノールを含む食品は、糖アルコールなどの酸産生の基質として利用されない甘味料などを組み合わせることによって、特定保健用食品として認可されている。

一方、試料 C は、グルカン生成量が顕著に抑制された。試料 C に含まれる甘味料は、スクロースの構造異性体であるパラチノース（グルコースとフルクトースが α -1, 6 結合）と糖アルコールであるキシリトールであり、スクロースを一切含まない。前述のように GTase はスクロース由来のグルコースを唯一の基質としてグルカンを合成するため、試料 C ではグルカンが生成されなかったと考えられる。図 1 では、試料 C によるグルカン生成量が 9%と微量ながら検出されているのは、試料溶液中のパラチノースがフェ

ノール硫酸法の反応系によって一部検出されたためであると考えられる。ポリフェノール類とは異なり、試料 C に含まれるパラチノースはグルカン生成の基質にならないだけでなく、酸発酵性も非常に低い。しかしながら、その甘味度はスクロースに比べると半分以下である。一方で、試料 C 中のもう一つの甘味料として使用されているキシリトールは、グルカン生成の基質にならないだけでなく、酸発酵も受けない。さらに、その甘味度はスクロースと同程度であるとされている。しかしながら、糖アルコールであるキシリトールにも欠点は少なからず存在する。キシリトールのような難消化性糖質を一度に多量摂取すると高浸透圧性の下痢を誘発する可能性がある¹⁸⁾。試料 C は、2種類の甘味料を組み合わせることによって両者の欠点を補足しつつ、う蝕誘発作用を持ち合わせているといえる。

う蝕予防を目的とした機能性食品成分としては、前述したグルカン生成抑制作用および酸産生抑制作用の他に、歯の再石灰化促進作用を持つフノリ抽出物¹⁹⁾およびリン酸化オリゴ糖カルシウム (Pos-Ca)^{20,21)}などがすでに開発され、ガムなどに添加されている。本研究では、グルカン生成を指標として市販品のう蝕誘発性を検証したが、仮にグルカン産生を完全に抑制することが出来たとしても、う蝕の誘発予防に有用であるとは言い切れない。糖質からの酸産生抑制および歯の再石灰化促進作用など、複数のう蝕誘発抑制作用を有する成分と組み合わせることで、より効果的な活用が出来るのではないかと考える。

IV 要約

市販されている菓子、特にスクロースを主成分とするキャンディーについて、ヒト口腔内に存在する代表的なう蝕菌の一つである *S. sobrinus* 由来の GTase を用いてグルカン生成量の比較を行った。その結果、GTase 阻害作用を持つ緑茶ポリフェノールを含む試料およびスクロース代替甘味料を使用した試料ではグルカンの生成量が減少した。GTase 阻害物質を活用することでグルカン産生を抑制することは出来るが、市販品に含まれている GTase 阻害物質の濃度では必ずしもブラーク生成を抑えることが出来なかった。また、スクロース代替甘味料の利用はグルカン生成抑制には非常に有効であるが、グルカン

生成抑制だけではう蝕を完全に防止することは出来な
いため、複数の機能性食品素材を併用するなど、その
活用には吟味が必要である。

V 謝辞

本研究を行うにあたり、実験にご協力頂いた本学卒
業生の岡田典子氏および松見唯加氏に心より感謝申し
上げます。

VI 文献

- 1) Keys PH (1962) Recent advance in dental caries
research. *Int Dent J* 12: 443-64.
- 2) 福島和雄 (2000) う蝕：口腔微生物学・免疫学
第2版 (浜田茂幸 編), p.256-82. 医歯薬出版, 東京.
- 3) John H, Franklin G, Catherine F (2003)
Biological factors in dental caries: role of saliva
and dental plaque in the dynamic process of
demineralization and remineralization (part1).
J Clin Pediatr Dent 28:47-52.
- 4) 北畑寿美雄 (1996) 糖質の機能 三次機能：糖質
の科学 (新家龍, 南浦能至, 北畑寿美雄, 大西正健
編), p.88-95. 朝倉書店, 東京.
- 5) 池田正 (1984) 砂糖とう蝕：転移糖と栄養 新し
く開発された糖とその作用 (細谷憲政, 福場博保
編), p.137-40. 第一出版, 東京.
- 6) Matsuyama J, Sato T, Hoshino E, Noda T,
Takahashi N (2003) Fermentation of five
sucrose isomers by human dental plaque
bacteria. *Caries Res* 37: 410-5.
- 7) Ooshima T, Izumitani A, Minami T, Fujiwara T,
Nakajima Y, Hamada S (1991) Trehalulose does
not induce dental caries in rats infected with
mutans streptococci. *Caries Res* 25: 277-82.
- 8) Van Loveren C (2004) Sugar alcohols: what is
the evidence for caries-preventive and caries-
therapeutic effects? *Caries Res* 38: 286-93.
- 9) Makinen KK, Bennett CA, Hujoel PP, Isokangas
PJ, Isotupa KP, Pape HR Jr, Makinen PL
(1995) Xylitol chewing gums and caries rates: a
40-month cohort study. *J Dent Res* 74: 1904-13.
- 10) Kawanabe J, Hirasawa M, Takeuchi T, Oda T,
Ikeda T (1992) Noncariogenicity of erythritol as
a substrate. *Caries Res* 26: 358-62.
- 11) Hamilton-Miller J M (2001) Anti-cariogenic
properties of tea (*Camellia sinensis*). *J Med
Microbiol* 50: 299-302.
- 12) Nakahara K, Kawabata S, Ono H, Ogura K,
Tanaka T, Ooshima T, Hamada S (1993)
Inhibitory effect of oolong tea polyphenols on
glucosyltransferases of mutans Streptococci.
Appl Environ Microbiol 59: 968-973.
- 13) 紺谷昌仙 (2001) ウーロン茶ポリフェノールのう
蝕抑制作用. 日本食品新素材研究会誌 3: 27-31.
- 14) Hayacibara MF, Koo H, Rosalen PL, Duarte S,
Franco EM, Bowen WH, Ikegaki M, Cury JA
(2005) In vitro and in vivo effects of isolated
fractions of Brazilian propolis on caries
development. *J Ethnopharmacol* 101: 110-115.
- 15) Hashiguchi-Ishiguro M, Nakamura S, Oku T
(2009) Inhibitory effects of partially
decomposed alginate on production of glucan
and organic acid by *Streptococcus sobrinus* 6715.
J Clin Biochem Nutr 44: 275-279.
- 16) 大嶋隆 (1996) う蝕予防作用の検定：う蝕予防の
ための食品科学 甘味糖質から酵素阻害剤まで
(大嶋隆, 浜田茂幸編), p.57-74. 医歯薬出版, 東京.
- 17) Vacca-Smith AM, Ng-Evans L, Wunder D,
Bowen WH (2000) Studies concerning the
glucosyltransferase of *Streptococcus sanguis*.
Caries Res 34: 295-302.
- 18) 奥恒行 (2005) 難消化吸収性糖質の消化・発酵・
吸収ならびに許容量に関する研究. 日本栄養・食
糧学会誌 58: 337-42.
- 19) 佐伯洋二, 高橋満, 川上慎吾, 徳本匠, 見明康雄,
奥田克爾, 柳澤孝彰 (2000) フノリ抽出物と第2
リン酸カルシウムを配合したキシリトールチュー
インガムの実験的初期齲蝕エナメル質に及ぼす再
石灰化促進効果. 歯科基礎医学会雑誌 42: 590-
600.
- 20) Kamasaka H, Inaba D, Minami K, Nishimura T,
Kuriki T, Imai S, Yonemitsu M (2002)
Remineralization of enamel by phosphoryl-

oligosaccharides (POs) supplied by chewing gum; Part I. Salivary assessment in vitro. *J Dent Hlth* 52: 105-111.

- 21) Inaba D, Kamasaka H, Minami K, Nishimura T, Kuriki T, Imai S, Yonemitsu M (2002) Remineralization of enamel by phosphoryl-oligosaccharides (POs) supplied by chewing gum; Part II. Intraoral evaluation. *J Appl Glycosci* 44: 112-118.

