

令和 4 年 5 月 29 日現在

機関番号：16201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2021

課題番号：17K12010

研究課題名(和文)新規希少糖の口腔内常在性菌に対する作用の研究

研究課題名(英文)Study of the effect of novel rare sugars on oral normal bacteria

研究代表者

小川 尊明(Ogawa, Takaaki)

香川大学・医学部・協力研究員

研究者番号：50325338

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：新規希少糖のうちD-タガトースとD-プシコースの唾液や歯垢から採取した口腔内細菌に対する作用を検証する実験を行った。D-タガトースは*S. mutans*等、う蝕原因菌の増殖や活性の抑制を示し、一方、D-プシコースは*P. gingivalis*等、歯周病原菌の増殖や活性の抑制を示した。キシリトールに代わる代替甘味料として、D-タガトースは『う蝕予防甘味料』、一方、D-プシコースは『歯周病予防甘味料』としての応用の可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

世界で初めて『希少糖ガム』の口腔内細菌の抑制効果が証明され、キシリトールガムに代わる『噛むだけで虫歯や歯周病が予防できるガム』の誕生である。技術移転可能となり、将来的には製品化し市場に提供できる。その市場シェアは非常に大きく、菓子、製薬会社と共同研究し、臨床試験の拡大もできる。ガムだけにとどまらず、洗口剤、歯磨き剤、飴、健康食品等への添加、製品開発も可能である。一方、う蝕や歯周疾患は全人類において発生率の高い疾患であり、本実験により、希少糖の口腔内細菌に対する作用が証明され、う蝕や歯周病の発生メカニズムや、希少糖の作用を解明する一助となる。人類の健康保持、医療費削減にもつながると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Among the novel rare sugars, D-tagatose and D-psicose were tested to verify their action on oral bacteria collected from saliva and dental plaque. D-tagatose showed suppression of the growth and activity of caries causative bacteria such as *S. mutans*, while D-psicose showed suppression of the growth and activity of periodontal disease-causing bacteria such as *P. gingivalis*.

As an alternative sweetener to xylitol, D-tagatose has been suggested as a "caries prevention sweetener", while D-psicose has been suggested as a "periodontal disease prevention sweetener".

研究分野：予防歯科学

キーワード：Dタガトース Dプシコース キシリトール ガム ミュータンス連鎖球菌 歯牙う蝕 歯周病 口腔内細菌

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

虫歯(歯牙う蝕、以下う蝕と略す)は砂糖と口腔内常在菌[特にミュータンス連鎖球菌(以下、*S. mutans* と略す)]による不溶性グルカンの産生、および、食渣と不溶性グルカンに共生する口腔内細菌による酸の産生で促される脱灰が原因とされている。

一方、希少糖とは、「自然界にその存在量が少ない単糖とその誘導体」で、これまでに約 50 種類が知られている。しかし、それらは入手が困難で、高価な研究対象だった。現在、ガムや飴に頻用されているキシリトールも希少糖の一つである。本グループの何森名誉教授は自然界に大量に存在する天然型単糖を希少糖に変換する酵素を発見し、キシリトール以外の希少糖も大量生産が可能となり、医薬品、食品、農薬等への応用が進んでいる。

「平成 25~27 年度 基盤研究 C」にて研究課題名「新規希少糖ガムの作成とその口腔内常在性菌に対する作用の研究」により以下の結果が得られた。

in vitro (試験管内)において、生産が可能になった希少糖のうち、水に易溶解性、甘味度が 60%以上の糖を選択し、口腔内細菌を減少させる効果のある糖の探索を開始したところ、D-タガトースまたはD-プシコースが最も適していることを発見した。D-タガトースを培養液中に添加したところ GS5 など特定の *S. mutans* に対する増殖、酸および不溶性グルカン産生を著明に抑制した。GS5 のバイオフィーム形成を阻害し、グルコシルトランスフェラーゼ活性を阻害した。D-タガトースとキシリトールの併用投与は *S. mutans* に対する抑制効果を強く認めた。

また、臨床試験において、D-タガトースガムとキシリトールガム、D-タガトースとキシリトールの混合ガムを独自に開発し、4 週間使用した。副作用は全く認めず、口腔内細菌のうち *S. mutans* を減少させた。

特に、D-タガトースとキシリトールの混合ガムは唾液中の *S. mutans* を著明に減少した(右図)。

上記の臨床試験により、D-タガトースはキシリトールとは異なる作用を有し、両糖を併用することで、新たなう蝕予防または歯周病予防となる可能性が示唆された。

同内容を学会にて発表、学術雑誌への投稿を行い、多数の研究者の理解を得られていたが、学術雑誌への採用・掲載までに至っていなかった。また、D-プシコースも口腔内細菌の増殖抑制効果を認めたが、明らかでなかった。

希少糖ガム使用による唾液中ミュータンス菌の変化

	唾液中ミュータンス菌
キシリトールガム	↓
D-タガトースガム	↓
D-タガトース + キシリトール混合ガム	↓↓

↓:  $p < 0.01$ , ↓↓:  $p < 0.05$

### 2. 研究の目的

*S. mutans* GS-5 の増殖とバイオフィーム形成に対する D-タガトースの阻害効果の測定を継続し、論文を修正・完成させ、学術雑誌掲載を目標とする。

D-タガトースとキシリトールの混合ガムは唾液中の *S. mutans* を著明に減少し、GS-5 の結果からも D-タガトースの *S. mutans* に対する、増殖抑制および不溶性グルカン作成抑制効果が示唆されるが、D-タガトース単独ガムのデータにばらつきがあり、D-タガトースの効果を補足するデータを必要とする。そこで、被検者の口腔内から唾液を採取し、D-タガトースまたはキシリトールを添加した培地に塗抹し、D-タガトースの in vitro における、口腔内の *S. mutans* および細菌の作用を評価する。

D-プシコースはD-タガトースに比較すると、GS5 などミュータンス菌に対する効果は小さいが、歯周病菌に対する抑制効果が示唆された。in vitro にて3種類の代表的な歯周病原菌 *Porphyromonas gingivalis*, *Agregatibacter actinomycetemcomitans*, *Fusobacterium nucleatum* に対する効果を評価する。

口腔細菌叢は 500-700 種類の細菌から構成されている。細菌叢の構成は人により様々で、添加する糖によっても細菌叢は大きく変化すると予想される。しかし、個々の細菌の変化を測定するのは非常に困難である。そこで被検者の口腔内から唾液を採取し、D-タガトースによる口腔内細菌叢の変化をメタゲノム解析にて検討する。

### 3. 研究の方法

GS5 のバイオフィーム形成を阻害し、グルコシルトランスフェラーゼ活性を阻害の追加実験を継続した。

被検者 10 名より唾液を採取し、In vitro により D-タガトースまたはキシリトール、両者の混合を添加した寒天培地に塗布して培養し、コロニーを計数した。寒天培地には、*S. mutans* の全菌株を選択的に培養できる Mitis Salivarius Agar plate (以下 MSB 培地) と、口腔内細菌を全般的に培養できる Brain Heart Infusion Agar plate (以下 BHI 培地) の 2 種を用いた。D-タガトースの添加濃度は、これまでの研究で用いた濃度(30%)よりも低濃度の 5% とした。培養条件は、嫌気性、好気性の 2 条件で行った。

*Porphyromonas gingivalis* ATCC33277 株、*Agregatibacter actinomycetemcomitans* ATCC29523 株、*Fusobacterium nucleatum* ATCC25586 株の 3 種類の歯周病原菌を TSB 液体培地にて培養し、経時的に濁度を測定した。

*P. gingivalis* の増殖抑制効果を見るために、糖を加えたヘミン、メナジオン添加 Trypticase soy broth (以下 TSB) 液体培地にて、ATCC 33277 株を嫌気条件にて培養し、培養開始から 12 または 24、48 時間後の吸光度 (OD 600) を測定した。

gingipains の酵素活性の抑制効果を評価するために、48 時間後の培養液を遠心分離し、TSB 液体培地の吸光度を統一し、2 種類の基質 (Kgp 活性測定に対しては、Z-Lys-pNA、Rgp 活性測定に対しては BAPNA) を各サンプルに添加し、反応させ吸光度 (OD 405) を測定した。

キシリトール (xyl) 、D-タガトース (D-tag)、D-プシコース (D-psi) をそれぞれ 8% を培地に添加し、それぞれの糖の効果について調べた。

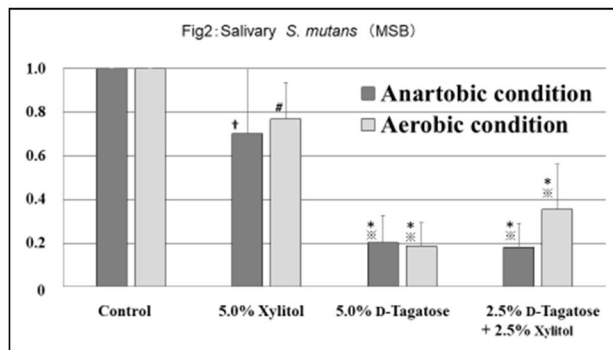
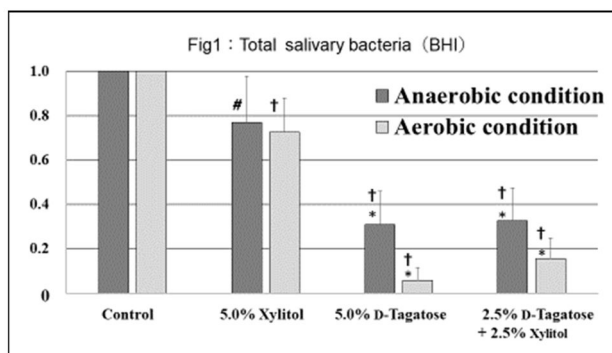
D-タガトースまたはキシリトールを添加した BHI 液体培地にて被検者の唾液内細菌を培養し、これをメタゲノム解析し、細菌叢の変化を測定した。

#### 4. 研究成果

*S. mutans* GS-5 の 24 時間の増殖は、D-タガトースにより著明に抑制した。この増殖抑制は、1% スクロースの存在下でも観察されたが、D-フルクトースの添加によってキャンセルされた。GS-5 のバイオフィルム形成は、ショ糖のみを含む培養物と比較して、D-タガトース (1.0~4.0%) によって有意に阻害され、GS-5 はこの希少糖の存在下で顆粒状のバイオフィルムを形成した。GS-5 のバイオフィルム形成に対する D-タガトースの阻害効果は、キシリトールの阻害効果よりも明白だった。1% D-タガトースの添加は、発酵性炭水化物として 1% スクロースのみを含む培養物と比較して、gtfB、fruA、および D-フルクトース特異的ホストランスフェラーゼ遺伝子の発現を有意に減少させたが、ftf の発現は減少させなかった。グルコシルトランスフェラーゼの活性は、4% D-タガトースによって阻害された。これらの結果は、D-タガトースがグルコシルトランスフェラーゼ活性を阻害することにより、スクロースからの水不溶性グルカン産生を減少させ、このプロセス中に放出される遊離 D-フルクトースへのアクセスを制限し GS-5 の増殖を遅らせることを示した。

上記の結果を学術雑誌に投稿し、Molecular Medicine Reports に掲載された (Mol. Med. Rep. 2018, 17, 843-851.)。

*in vitro* の実験では、BHI、MSB 培地ともに、D-タガトースおよび D-タガトースとキシリトールを混合添加した培地において、コントロールおよびキシリトールのみを添加した培地と比較し、著明に細菌増殖が抑制された。また、嫌気、好気条件ともに著明な抑制を示した。(Fig 1、Fig 2)

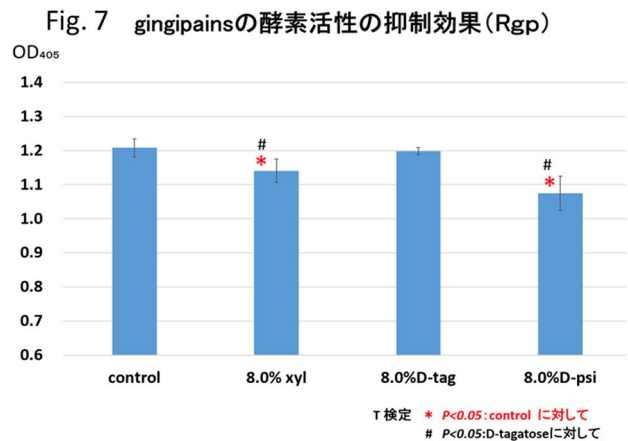
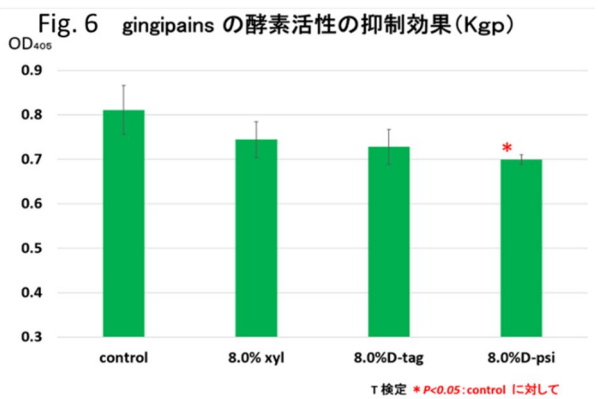
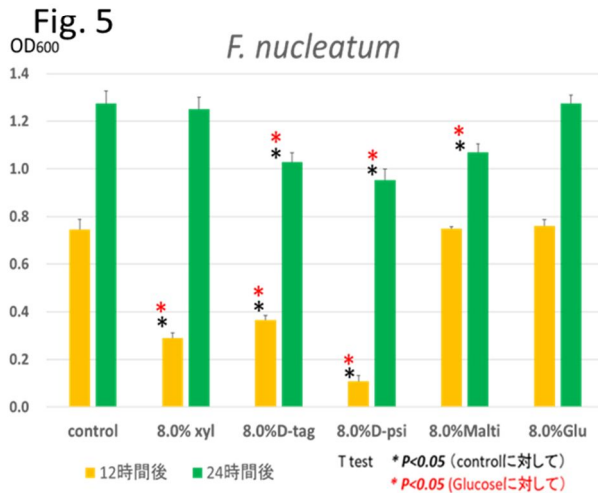
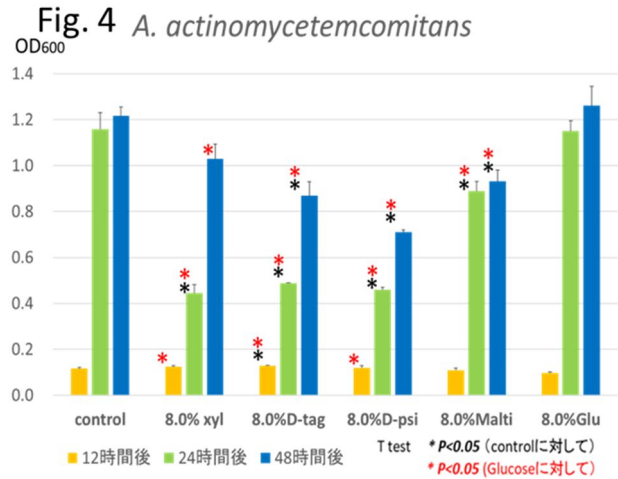
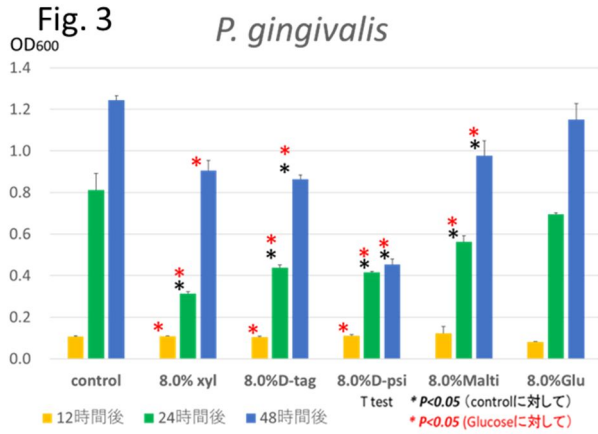


本結果は、D-タガトースガムとキシリトールガム、D-タガトースとキシリトールの混合ガムの臨床試験の結果の裏付けとなり、得られた結果をまとめ、Acta medica Okayama に投稿し、掲載された (Acta medica Okayama 74(4) 307 - 317 Aug, 2020)。

3つの歯周病原菌株を用いて培養を行ったところ、3菌種ともに、D-タガトース、D-プシコースを添加した培地では、コントロールに比べ有意に増殖が抑制され、キシリトールと同等もしくはそれ以上の増殖抑制効果を認めた。培養後 12 時間では、どの糖も差は認めなかったが、24 時間以降はコントロールに対してどの糖を添加した培地も有意に増殖が抑制された。その後、48 時間後には、D-プシコースはコントロール、D-タガトース、キシリトールに対し、有意に増殖抑制が認められた。なお、キシリトールの増殖抑制効果については、他文献と一致した結果となった。(Fig. 3-5)

ジンジパインの Kgp は測定の結果、D-プシコースは、コントロールに比べ有意に活性が抑制された。一方、キシリトール、D-タガトースでは、その差を認めなかった。(Fig. 6)

Rgp については D-プシコースとキシリトールで、コントロール、D-タガトースと比較して有意に増殖が抑制された。(Fig. 7)

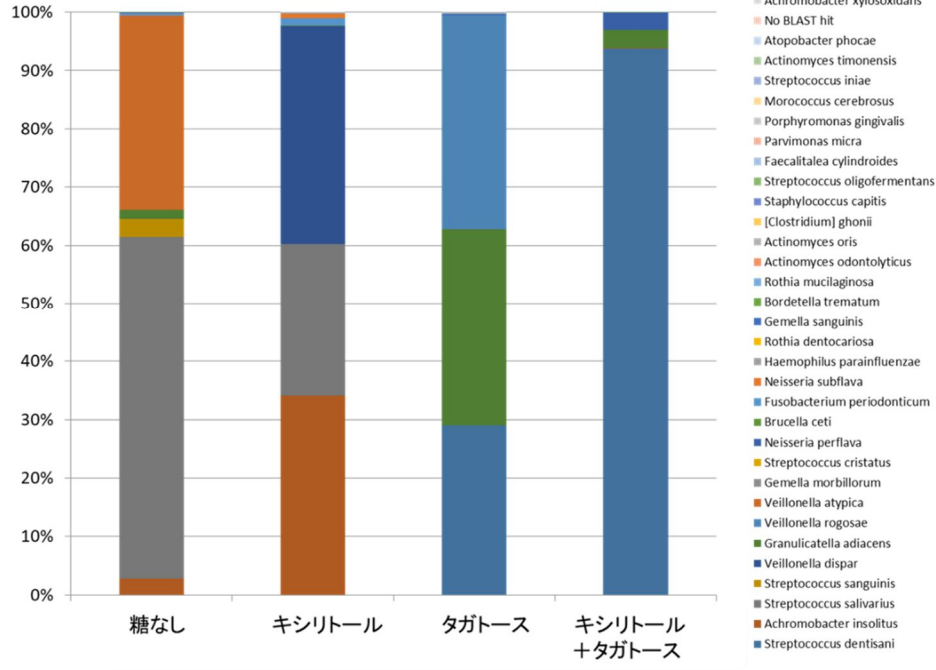


唾液中のメタゲノム解析では、キシリトール、D - タガトースを添加した培地にて培養したものは、口腔内フローラは大きく変化する傾向が認められ、D - タガトースが多くの口腔内細菌に対し、増殖抑制効果を示す可能性が、ここでも示唆された(Fig.8)。被検者数の少ない状況だが、検討を重ねれば、増殖抑制効果のある細菌の特定の一助になると考えられる。

**まとめ**

キシリトールに代わる代替甘味料として、D-タガトースは『う蝕予防甘味料』、一方、D-プシコースは『歯周病予防甘味料』としての応用の可能性が示唆された。

Fig.8



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Yuichi Nagamine, Khaleque Hasibul, Takaaki Ogawa, Ayano Tada, Kazuyo Kamitori, Akram Hossain, Fuminori Yamaguchi, Masaaki Tokuda, Tomomi Kuwahara, Minoru Miyake	4. 巻 74(4)
2. 論文標題 D-Tagatose Effectively Reduces the Number of Streptococcus mutans and Oral Bacteria in Healthy Adult Subjects: A Chewing Gum Pilot Study and Randomized Clinical Trial.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Acta medica Okayama	6. 最初と最後の頁 307 - 317
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.18926/AMO/60369	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Khaleque Hasibul, Haruyuki Nakayama-Imaohji, Masahito Hashimoto, Hisashi Yamasaki, Takaaki Ogawa, Junpei Waki, Ayano Tada, Soari Yoneda, Masaaki Tokuda, Minoru Miyake, Tomomi Kuwahara	4. 巻 17
2. 論文標題 D-Tagatose inhibits the growth and biofilm formation of Streptococcus mutans	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Molecular Medicine Reprints	6. 最初と最後の頁 843 - 851
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3892/mmr.2017.8017. Epub 2017 Nov 8.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 小川尊明、宮崎 亮、安部大輔、木田 聡、今城広治、中井 史、中井康博、岩崎昭憲、大林由美子、三宅 実
2. 発表標題 希少糖のD- ブシコースは歯周病菌Porphyromonas gingivalisの増殖とgingipainの産生を抑制する
3. 学会等名 令和2年度 香川県歯科医学大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小川尊明、永峰優一、宮崎亮、安部大輔、木田 聡、今城広治、秦泉寺紋子、塩屋園 敦、中井 史、岩崎昭憲、大林由美子、三宅 実
2. 発表標題 希少糖のD- タガトースとD- ブシコースは口腔内細菌の増殖を抑制する
3. 学会等名 令和元年香川県歯科医学大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Takaaki Ogawa, Yuichi Nagamine, Khaleque Hasibul, Ayano Tada, Masaaki Tokuda, Tomomi Kuwahara, Fujiwara Yuichiro, Minoru Miyake
2. 発表標題 Potent inhibitory effects of D-tagatose on the growth, acid production, water-insoluble glucan synthesis, and biofilm formation of <i>Streptococcus mutans</i>
3. 学会等名 第7回香川大学・チェンマイ大学合同シンポジウム(国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 永峰優一
2. 発表標題 D-アルロース(ブシコース)の歯周病原菌に対する効果について
3. 学会等名 かがわ糖質バイオフォーラム第11回シンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 永峰優一 小川尊明 高尾健二郎 田中麻央 中井 史 岩崎昭憲 大林由美子 三宅 実
2. 発表標題 D-ブシコースによるPorphyromonas gingivalisに対する増殖抑制効果と、gingipains活性の抑制効果について
3. 学会等名 第39回日本歯科薬物療法学会総会・学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 永峰優一, 小川尊明, 田中麻央, 中井 史, 岩崎昭憲, 大林由美子, 三宅 実
2. 発表標題 DタガトースとDブシコースの口腔内細菌に対する増殖抑制効果
3. 学会等名 第37回 日本歯科薬物療法学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 永峰優一, 小川尊明, 三宅 実, 神鳥 和代, 山口 文徳, 徳田 雅明
2. 発表標題 D-タガトースとD-プシコースの口腔内細菌に対する増殖抑制効果
3. 学会等名 第69回日本生理学会中国四国地方会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 永峰優一, 小川尊明, 三宅 実, 神鳥 和代, 山口 文徳, 徳田 雅明
2. 発表標題 D-タガトースとD-プシコースの口腔内細菌に対する増殖抑制効果
3. 学会等名 かがわ糖質バイオフォーラム 第10回シンポジウム
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>ホームページ等 国際希少糖研究教育機構 <a href="http://www.kagawa-u.ac.jp/IIRSRE/">http://www.kagawa-u.ac.jp/IIRSRE/</a> 国際希少糖学会 <a href="https://isrs.kagawa-u.ac.jp/">https://isrs.kagawa-u.ac.jp/</a></p>
--

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	徳田 雅明  (Tokuda Masaaki)  (10163974)	香川大学・医学部・寄附講座教員   (16201)	



## 6. 研究組織 (つづき)

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	三宅 実  (Miyake Minoru)  (20239370)	香川大学・医学部・教授    (16201)	

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	桑原 知己  (Kuwahara Tomomi)	香川大学・医学部・教授   (16201)	
研究協力者	永峰 優一  (Nagamine Yuichi)	香川大学・医学部・大学院生   (16201)	
研究協力者	多田 彩乃  (Tada Ayano)  (80779463)	香川大学・医学部・助教   (16201)	
研究協力者	山口 文徳  (Yamaguchi Fuminori)	愛媛県立医療技術大学・保健科学部・教授	
研究協力者	神鳥 和代  (Kamitori Kazuyo)	香川大学・医学部・助教   (16201)	
研究協力者	カレック ハシブル  (Khaleque Hasibul)	香川大学・医学部・大学院生   (16201)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	何森 健  (Izumori Ken)	香川大学・農学部・名誉教授    (16201)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関