

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 2 日現在

機関番号：16201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25463248

研究課題名(和文)新規希少糖ガムの作製とその口腔内常在性菌に対する作用の研究

研究課題名(英文) Production of novel rare sugar gum and study effects on resident bacteria in oral cavity with rare sugar gums

研究代表者

小川 尊明 (OGAWA, TAKAAKI)

香川大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：50325338

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：大量生産可能な希少糖の内、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を探索し、D-タガトースが最も適していることを発見した。In vitroにおいて、D-タガトースを培養液中に添加したところGS5などのミュータンス菌に対する増殖、酸および不溶性グルカン産生を著明に抑制し、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-タガトースガムの製造に成功し、In vivo(臨床試験)により4週間使用した。被験者に副作用は全く認めず、口腔内細菌、特にミュータンス菌数を減少させた。この結果は、In vitroの結果と一致した。

研究成果の概要(英文)：D-tagatose is the most suitable for selecting rare sugars that are readily soluble in water, sugars with a degree of sweetness of 60% or more, and the effect for resident bacteria in the oral cavity. In vitro, when D-tagatose was added to the culture broth, proliferation against *S. mutans* such as GS5, acid and insoluble glucan production was markedly inhibited, biofilm formation was inhibited, and glucosyltransferase activity was inhibited. The production of D-tagatose gum was succeeded, and in vivo, used for 4 weeks of clinical trial. No side effects were observed in the subject. No. of oral bacteria, in particular No. of *S. mutans* were decreased with the gums. This result was consistent with in vitro results.

研究分野：歯科口腔外科

キーワード：D-タガトース キシリトール *Streptococcus mutans* 口腔内細菌 ガム

1. 研究開始当初の背景

歯牙う蝕は罹患率が高く、その予防や治療は人類の古くからの課題である。一方、キシリトールは日常生活において嗜好品・食品に添加使用されており、砂糖(ショ糖)の減量や高いう蝕予防効果を示すことは広く一般に知られている。しかし、キシリトールはショ糖の4割程度のカロリーを持つ。さらに、キシリトールは副作用として「下痢」を生じやすい。そのため、より低カロリーで、副作用の少ないう蝕予防糖の開発が重要とされている。

一方、平成14~18年に文部科学省知的クラスター創成事業により、当大学では、多種類の希少糖(自然界に微量にしか存在しない50種類以上の単糖)の生産や生理機能の解明が進んだ。グループの一人である Tom Birger Granström は、各種の新しい希少糖を、イズモリング (Izumoring) として連携図を Journal of Bioscience and Bioengineering Volume 97, Issue 2, 2004, P89-94 で発表している。そして、希少糖のうち、D-プシコース、D-ソルボース、D-タガトース、L-フラクトース、L-プシコース、L-タガトースなどの大量生産に成功した。例えば、希少糖のうちD-プシコースのカロリーはゼロであることが証明されている。その他の希少糖についても、低カロリーであると推定された。

我々のこれまでの研究により、これらの希少糖は甘味があり、ショ糖の代用糖となる可能性がある。

2. 研究の目的

我々は初期実験において、*in vitro* で細菌培地に添加し、D-タガトースや D-プシコースの希少糖が、う蝕の原因菌の *Streptococcus mutans* (ミュータンス菌)の増殖抑制に関与していることを見出している。本研究は、初期実験の内容を以下の2系統の実験にて希少糖のう蝕予防糖としての可能性を探索する。  
(1) 新規希少糖のうち D-タガトースをはじめとする糖が「う蝕予防」効果を示すことをミュータンス菌株を用いた *in vitro* で明らかにする。

(2) D-タガトースを中心に「新規希少糖ガム」を作成して口腔内細菌に対する作用を評価し、臨床試験による *in vivo* で証明する。

3. 研究の方法

(1) ショ糖の代替甘味料として口腔内使用に適する希少糖を選択した。

(2) ミュータンス菌株 GS5 を 10% (w/v) のキシリトールまたは D-プシコース、L-プシコース、D-タガトース、L-タガトースの培地で培養を行い、増殖、酸生成、不溶性グルカン合成に対する阻害効果を検討した。

(3) GS5 において、細菌増殖の基となるバイオフィーム形成と、不溶性グルカン形成酵素のグルコシルトランスフェラーゼ活性の D-タガトースによる阻害の測定を行った。

(4) D-タガトースガムを製造した。

(5) D-タガトースガムによる口腔内細菌に対する臨床試験(初期的二重盲検試験): キシリトールまたは D-タガトース、キシリトールと D-タガトースの混合ガムにより口腔内細菌の変化を測定した。

4. 研究成果

(1) 大量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-タガトースが最も適していることを発見した。

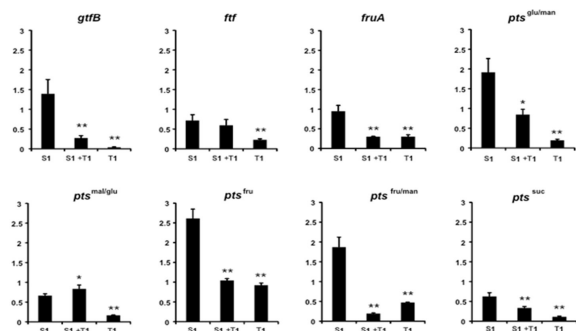
(2) D-タガトースを培養液中に添加したところ GS5 などのミュータンス菌に対する増殖、酸および不溶性グルカン産生を著明に抑制した(表1)。

表1: GS5 における細菌増殖、酸産生、不溶性グルカン抑制の実験結果 + : 阻害の強さを示す。

	細菌増殖	酸産生 (+ショ糖)	不溶性グルカン産生 (+ショ糖)
キシリトール	++	++	+
D-プシコース	+	+++	-
L-プシコース	+	+	-
D-タガトース	+++	+++	+
L-タガトース	+	+	-

(3) D-タガトースは 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(図1)。

図1: glucosyltransferase (gtfB), fructosyltransferase (ftf) and EII components of phosphotransferase system specific for sucrose (pts<sup>suc</sup>), D-fructose (pts<sup>fru</sup>), D-fructose/D-mannose (pts<sup>fru/man</sup>), D-maltose/D-glucose (pts<sup>mal/glu</sup>) and D-glucose/D-mannose (pts<sup>glu/man</sup>) のそれぞれの発現レベルを qPCR により測定。S1: 1%ショ糖添加、T1: 1%タガトース添加、S1 + T1: 1%ショ糖 + 1%タガトース添加を示す。



(4) 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製造した(表2)。

表 2 :

ガム配合組成

原料	重量割合 (%)	備考
希少糖	61.5	①キシリトール ②D-タガトース ③D-タガトースとキシリトール各50%
ガムベース	30.0	レギュラータイプ
還元水飴	5.0	水分、マルチトール、ソルビトール等
グリセリン	1.0	軟化剤
アスパルテーム	0.5	呈味持続性素材
ペパーミントオイル	1.0	香料
メントールパウダー	1.0	香料
合計	100.0	

(5) *In vivo* (臨床試験) にて、開発したガムを 19 人に対してそれぞれ 1 回 2 個 (3g) 1 日 3 回食後 10 分間、4 週間使用した。副作用は全く認めず、口腔内細菌を減少させた (図 2 - 1、2 )

図 2 - 1

BHI 培地 (唾液中細菌)

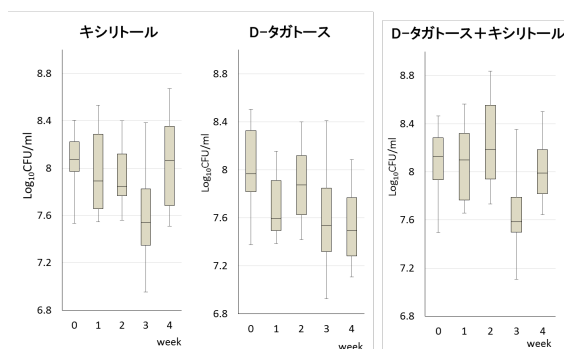
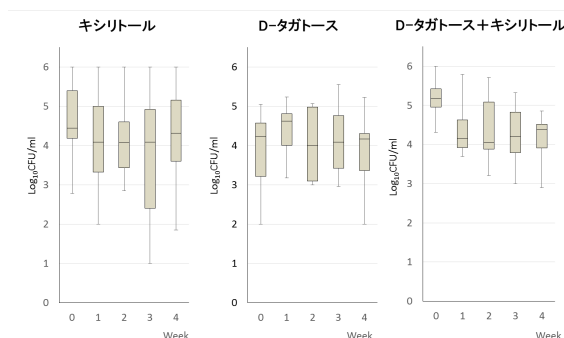


図 2 - 2

MSB 培地 (唾液中ミュータンス菌)



上記の *In vitro* と *In vivo* の試験結果が一致し、D-タガトースはキシリトールとは異なる作用を有し、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。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 2 件)

(1) Khaleque Hasibul, Haruyuki Nakayama-Imahji, Masahito Hashimoto, Hisashi Yamasaki, Takaaki Ogawa, Junpei Waki, Ayano Tada, Soari Yoneda, Masaaki Tokuda, Minoru Miyake, Tomomi Kuwahara, “D-tagatose inhibits the growth and

biofilm formation of *Streptococcus mutans*”, Molecular Medicine Reports (2017), 査読有

(2) Daijo Sawada, Takaaki Ogawa, Minoru Miyake, Yoshinori Hasui, Fuminori Yamaguchi, Ken Izumori, Masaaki Tokuda, “Potent Inhibitory Effects of D-tagatose on the Acid production and Water-insoluble Glucan Synthesis of *Streptococcus mutans* GS5 in the Presence of Sucrose”, Acta Medica Okayama, 69, 105-111, (2015), 査読有

〔学会発表〕(計 7 件)

(1) Khaleque Hasibul, Haruyuki Nakayama-Imahji, Masahito Hashimoto, Hisashi Yamasaki, Takaaki Ogawa, Junpei Waki, Ayano Tada, Soari Yoneda, Masaaki Tokuda, Minoru Miyake, Tomomi Kuwahara “Effects of D-tagatose in dental caries prevention a combined approach that conjoins oral biofilm studies and a randomized clinical trial” 第 4 回国際希少糖学, 2016 年 11 月 24-26 日, かがわ国際会議場 (高松)

(2) Khaleque Hasibul, Haruyuki Nakayama-Imahji, Masahito Hashimoto, Hisashi Yamasaki, Takaaki Ogawa, Yuichi Nagamine, Junpei Waki, Ayano Tada, Soari Yoneda, Masaaki Tokuda, Minoru Miyake, Tomomi Kuwahara

“D-Tagatose inhibits the growth and biofilm formation in *Streptococcus mutans*” 第 4 回国際希少糖学, 2016 年 11 月 24-26 日, かがわ国際会議場 (高松)

(3) Khaleque Hasibul, Takaaki Ogawa, Ayano Tada, Masaaki Tokuda, Minoru Miyake, Tomomi Kuwahara “Combined chewing gum of D-Tagatose and Xylitol strongly reduces the number of *Streptococcus mutans* in saliva: A pilot study” 第 4 回国際希少糖学, 2016 年 11 月 24-26 日, かがわ国際会議場 (高松)

(4) Khaleque Hasibul, Takaaki Ogawa, Haruyuki Nakayama-Imahji, Tomomi Kuwahara, Minoru Miyake, Masaaki Tokuda “D-Tagatose inhibits biofilm formation in *Streptococcus mutans*” 2016 年国際微生物学会, 2016 年 6 月 16-20 日, ボストン (USA)

(5) 小川 尊明, Khaleque Hasibul, 多田 彩乃, 中井 史, 田中 麻央, 岩崎 昭憲, 大林 由美子, 三宅 実, 「D-タガトースとキシリトールの混合ガムが唾液中の *Streptococcus mutans* を減少させる」第 36 回歯科薬物療法学会, 2016 年 6 月 1 日, 日本歯科大学新潟生

命歯学部（新潟）

(6) Hasibul Khaleque, 多田 彩乃, 中井 康博, 中井 史, 岩崎 昭恵, 小川 尊明, 大林 由美子, 桑原 知巳, 三宅 実, "Effects of D-tagatose on oral microbial composition and biofilm formation" 第35回日本薬物療法学会, 2015年6月20・21日, 鶴見大学会館（横浜）

(7) 澤田 大定, 小川 尊明, 三宅 実, 大林 由美子, 岩崎 昭恵, 松井 義郎, 蓮井 義則, 「D-tagatose は *S. mutans* の酸および不溶性グルカン産生を抑制する」第33回日本薬物療法学会, 2013年6月14-16日, 東京医科歯科大学 M&D タワー2階講堂（東京）

〔産業財産権〕

出願状況（計 1件）

名称：D-タガトースとキシリトールを含む非う蝕性素材

発明者：小川 尊明

権利者：松谷化学工業、松谷 晴世

種類：特許

番号：2013-91566

出願年月日：2013年4月24日

国内外の別：国内

〔その他〕

ホームページ等

国際希少糖研究機構：

<http://www.kagawa-u.ac.jp/IIRSRE/>

国際希少糖学会：

<http://isrs.kagawa-u.ac.jp/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

小川 尊明 (OGAWA, Takaaki)

香川大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：50325338

### (2) 研究分担者

徳田 雅明 (TOKUDA, Masaaki)

香川大学・医学部医学科・教授

研究者番号：10163974

三宅 実 (MIYAKE, Minoru)

香川大学・医学部医学科・教授

研究者番号：20239370

桑原 知巳 (KUWAHARA, Tomomi)

香川大学・医学部医学科・教授

研究者番号：60263810

### (3) 連携研究者

何森 健 (IZUMORI, Ken)

香川大学・農学部・名誉教授

研究者番号：80035998

### (4) 研究協力者

澤田 大乘 (SAWADA, Daijyou)

香川大学・医学部医学科・大学院生

多田 順子 (TADA, Jyunko)

香川大学・医学部医学科・大学院生

カレック ハシブル (KHALEQUE, Hasibul)

香川大学・医学部医学科・大学院生