原 著

In vitro における Transgalactosylated oligosaccharide のう蝕原性の評価*

The Evaluation of *in vitro* Cariogenicity of Transgalactosylated Oligosaccharide

福 島 久 典 豊 嶋 ゆ か り 井 上 純 一
諸 井 英 徳 寺 岡 靖 之 尾 上 孝 利
佐 川 寛 典

Hisanori FUKUSHIMA, Yukari TOYOSHIMA, Jun-ichi INOUE,
Hidenori MOROI, Yasuyuki TERAOKA, Takatoshi ONOE
and Hirosuke SAGAWA

Received September 20, 1989; accepted December 7, 1989

Abstract: *In vitro* cariogenicity of transgalactosylated oligosaccharide (TOS) was examined using oral streptococci. The results were as follows:

1. Purified TOS(TOS-P) was not utilized for growth and production of lactic acid by oral streptococci. The utilization value of TOS-P was lower than that of neosugar-P.
2. Association of TOS-P and TOS-50 with adherence in oral streptococci was not recognized.
3. Insoluble and soluble glucans from TOS-P and TOS-50 were not produced by GTase derived from *S. mutans* ATCC 25175 and *S. sobrinus* ATCC 33478.

These results indicate that TOS is useful as a non-cariogenic sugar.

索引用語: ガラクトオリゴ糖, う蝕原性, 口腔 *Streptococcus*

Key words: Transgalactosylated oligosaccharide, Cariogenicity, Oral *Streptococcus*

緒 言

う蝕の発症には食餌要因が大きく関与している¹⁾。なかでも、甘味料として広く使用されている sucrose は、う蝕原性糖とみなされている^{2,3)}。それは、sucrose が、口腔内細菌によって発酵されやすく、乳酸産生の基質となつて歯面の脱灰に関与すること⁴⁾、代表的なう蝕原性細菌である *Streptococcus mutans* の産生するグルコシ

ルトランスフェラーゼの基質となり、不溶性グルカンの産生を引き起こし、歯面上に歯垢を形成する原因となること⁵⁾、などによる。これらの性質を持たない非う蝕原性糖類の開発は、う蝕予防学的見地から強く望まれている。

一方、ヒトの健康と腸内フローラとの密接な関係が明らかにされるにつれ、腸内フローラを *Bifidobacterium* 優勢フローラへと改善する作用を有する各種オリゴ糖が

大阪歯科大学細菌学教室 (主任: 佐川寛典教授)

Department of Bacteriology, Osaka Dental University (Director: Prof. Hirosuke SAGAWA)

* 本論文の要旨は第62回日本細菌学会総会 (1989年3月, 東京) において発表した。

注目されてきている。Transgalactosylated oligosaccharide (以下、TOS と略す) は、このようなオリゴ糖の一種で⁵⁻⁷⁾、lactose に galactose が1個から4個結合した構造を有するガラクトオリゴ糖である。TOS の甘味度は sucrose の5分の1であるが、上品な甘味質を有している。この甘味を生かして、飲料や菓子などに TOS を応用し、腸内フローラの改善を図る試みがある。

本実験では、口腔 *Streptococcus* を対象に、TOS のう蝕原性および TOS の非う蝕原性甘味料としての可能性について、*in vitro* で検討を行なった。

実験材料および方法

1. 供試菌株

実験には、標準菌株として、*Streptococcus mutans* (以下、*S. mutans*) ATCC 25285, BHT, GS-5, OMZ49, OMZ175, K1-R, SL-1, 6715-15 0H10, *S. rattus* ATCC 19645, *S. sobrinus* ATCC 33478, *S. ferus* ATCC 33477, *S. oralis* ATCC 35037, *S. sanguis* ATCC 10556, *S. mitis* ATCC 33399および *S. salivarius* ATCC 25975の15菌株を供試した。また、口腔内分離菌株としては、小児の唾液から分離し、Facklam の方法⁸⁾に従って同定した *S. sanguis* type I C-002, C-004, C-074, *S. sanguis* type II C-010, C-018, *S. salivarius* C-032, C-053, C-094, *S. morbillorium* C-009, *S. MG-intermedius* C-070および *S. anginosus-constellatus* C-013の11菌株を用いた。なお、*S. mutans* ATCC 25285, *S. rattus* ATCC 19645, *S. sobrinus* ATCC 33478, *S. ferus* ATCC 33477, *S. oralis* ATCC 35037, *S. sanguis* ATCC 10556, *S. mitis* ATCC 33399および *S. salivarius* ATCC 25975は、岐阜大学医学部微生物学教室より分与を受けた。

各菌株は、0.5%の yeast extract を含む trypticase soy broth (BBL) で24時間培養したものに、等量の滅菌グリセリンを加え、よく混合後、 -20°C で保存し、使用時にその1滴を培地に滴下して、培養増殖させて用いた。

2. 供試糖

TOS は、lactose に *Aspergillus oryzae* の β -ガラクトシダーゼを作用させることによって作られるガラクトオリゴ糖で、lactose に galactose が主として β -1, 6 結合により1個から4個結合した構造をしており、三糖 $55 \pm 2\%$ 、四糖 $33 \pm 2\%$ 、五糖および六糖 $12 \pm 2\%$ から成る (Fig. 1)。本実験には、TOS 標品として、TOS の純品である TOS-P, TOS を約50%含有する TOS-

Fig. 1 The main structural formula of transgalactosylated oligosaccharide (TOS)
 $n=1$: 55 ~ 65%. $n=2$: 25 ~ 35%.
 $n=3 \sim 4$: 10 ~ 35%

50の2種類を供試した。これらの TOS 標品と低う蝕性甘味料として既に市販されているフラクトオリゴ糖の neosugar-P⁹⁾ は、ともにヤクルト中央研究所より供与を受けた。なお、TOS-50の組成は TOS-P: 52%, glucose: 30%, galactose: 10%, lactose: 8% で、甘味度は sucrose の5分の2である。Neosugar-P の組成は、sucrose (GF): 1.4%, 1-ktose (GF₂): 37.6%, nyctose (GF₃): 49.7%, 1- β -D-fructofuranosyl nystose (GF₄): 11.2%である。また、その他の糖として、glucose と sucrose (ともに半井化学社製) を使用した。

糖類は、培地に添加する際、全て濾過滅菌を行って使用した。

3. TOS の発育への利用性の測定

合成培地である M4 medium¹⁰⁾ より glucose を除いたものを基礎培地とし、 121°C 、15分間滅菌を行った後、それぞれ、炭素源として、TOS-P, TOS-50, neosugar-P, glucose の各糖を、濾過滅菌後、各々0.5%の濃度になるように添加した培地、および糖無添加の培地を作製し、滅菌試験管に4 ml ずつ分注した。これらの各培地に、trypticase soy broth without dextrose (BBL) で24時間前培養した各菌株を20 μl ずつ接種して、 37°C 、嫌気ボックス (平沢製作所) 内で培養を行った。各培地の濁度 (OD550nm) を24時間ごとに5日間、Spectronic 20 (島津製作所) で測定し、その最高値を各培地における発育量とした。

4. TOS による平滑面付着量の測定

Sucrose, TOS-P, TOS-50, neosugar-P および glucose を濾過滅菌後、 121°C 、15分間滅菌を行った brain heart infusion broth (BBL) に各々5%の割合に添加した。これを、あらかじめ重量を測定し、乾熱滅菌した小試験管に5 ml ずつ分注し、各菌株を接種後、嫌気ボックス内で培養を行った。24時間ごとに新鮮な培地に交換しながら5日間培養した後、蒸留水で試験管内部をよく洗い、 37°C のふらん器で3日間乾燥させた。各試験管の重量を再び測定し、試験管壁に付着した人工プラーク

の重量を算出した。

5. TOS からの乳酸産生量の測定

0.5% yeast extract, 5mg/l hemin, 400mg/l l-cystine および 10mg/l vitamin K₁ を添加した trypticase soy broth without dextrose (BBL) を滅菌し、各糖を 1% の割に添加した培地 5 ml に、各菌株を接種し、5 日間嫌氣的に培養を行った後、培養上清中に産生された乳酸の定量および pH の測定を行った。乳酸量は、培養上清 1 ml に 100mM のフマル酸溶液を正確に 50 μ l 加え、通法にしたがって不揮発酸用試料を作製し、日立 561 型記

録計に接続した日立 163 型ガスクロマトグラフィ（カラム：ガラスキャピラリーカラム SP-1000）で分析した後、乳酸とフマル酸のピークの高さの比から算出した。各培地の pH は、M-7E 型 pH メーター（堀場製作所）を用いて測定した。

6. 粗グルコシルトランスフェラーゼの調製

S. mutans ATCC 25175 と *S. sobrinus* ATCC 33478 の 2 株を用いて、Koga *et al.*¹¹⁾ の方法により粗グルコシルトランスフェラーゼ（以下、粗 GTase と略す）を調製した。すなわち、2% trypticase, 1% glucose お

Table 1 Utilization of TOS for growth of oral streptococci

Bacterial strains		Growth (%)				
		TOS -P	TOS -50	Neosugar -P	Glucose	None
Standard strains						
<i>S. mutans</i>	ATCC25175	2.6	50.0	96.7	100(1.45)*	1.1
	BHT	3.2	46.0	93.3	100(1.5)	2.1
	GS-5	2.9	49.2	91.7	100(1.2)	0.8
	OMZ49	1.7	35.3	86.7	100(1.5)	0.8
	OMZ175	2.0	48.0	96.7	100(1.5)	1.2
	K1	2.6	43.4	89.7	100(1.45)	4.1
	K1-R	1.9	41.4	96.6	100(1.45)	1.2
	6715-15	2.2	48.3	75.9	100(1.45)	1.7
<i>S. sobrinus</i>	ATCC33478	1.0	52.1	78.6	100(1.4)	1.1
<i>S. rattus</i>	ATCC19645	5.2	60.7	100.0	100(1.45)	5.5
<i>S. ferus</i>	ATCC33477	1.8	38.5	68.5	100(1.3)	1.2
<i>S. oralis</i>	ATCC35037	7.6	65.3	23.5	100(0.98)	3.1
<i>S. sanguis</i>	ATCC10556	7.6	68.4	70.4	100(0.76)	3.1
<i>S. mitis</i>	ATCC33399	4.5	61.2	141.2	100(0.85)	1.5
<i>S. salivarius</i>	ATCC25975	1.6	37.2	103.4	100(1.45)	1.2
Clinical strains						
<i>S. sanguis</i> I	C-002	5.2	45.4	73.1	100(1.3)*	1.5
	C-004	4.5	46.2	96.2	100(1.3)	1.8
	C-074	4.6	51.5	92.3	100(1.3)	1.5
<i>S. sanguis</i> II	C-010	3.8	62.0	27.1	100(0.92)	6.5
	C-018	2.0	43.0	28.0	100(1.0)	1.3
<i>S. salivarius</i>	C-032	56.6	75.9	100.0	100(1.45)	1.8
	C-053	1.8	72.5	108.3	100(1.2)	2.0
	C-094	64.3	78.6	103.8	100(1.4)	1.7
<i>S. morbillorium</i>	C-009	4.7	49.2	80.8	100(1.3)	2.3
<i>S. MG-intermedius</i>	C-070	19.0	56.0	72.0	100(1.0)	8.4
<i>S. angi.-const.**</i>	C-013	2.1	35.0	107.1	100(1.4)	2.0

Clinical strains were identified according to the method of Facklam.

* ; Optical density at 550 nm

** ; *S. anginosus-constellatus*

Medium : M 4 broth

よび各種塩類を含む trypticase-glucose broth 1 l に、一夜前培養した各菌株を接種し、嫌氣的に37°C、16時間培養を行った。培養菌液は4°C、6,000×g、20分間の遠心により菌体を除いた後、50%飽和になるように(NH₄)₂SO₄を加え、4°Cで一夜放置後、12,000×g、60分間遠心を行った。得られた沈渣を、0.02%の merthiolate を含む0.05M phosphate buffer (pH 6.0) 25ml に溶解し、同 buffer で透析後、再度遠心して得た上清を粗 GTase 標品とし、-80°C で凍結保存した。なお、実験には、*S. mutans* ATCC 25175では1.76mg protein/ml、*S. sobrinus* ATCC 33478では0.82mg protein/ml の粗酵素標品をそれぞれ使用した。

7. 粗 GTase によるグルカン合成

100mM 酢酸緩衝液 (pH 5.5) 600ul、粗 GTase 標品 150ul および糖液250ul からなる反応メディウムを37°Cの恒温槽で所定時間培養した後、20,000×g、15分間遠心した。糖液としては、2.5% TOS, 2.5% sucrose, 2.5% sucrose と2.5% TOS の混合液, 2.5% sucrose と5.0% TOS の混合液, 2.5% sucrose と7.5% TOS の

混合液を使用した。沈渣は蒸留水1ml で洗浄後、再び遠心し、上清画分は先の上清に加えた。沈渣はさらに71.4%のエタノールで洗浄し、不溶性グルカン（以下、IG と略す）画分とした。上清は5ml のエタノールを添加して-20°C、一夜放置後、遠心して得られた沈渣を71.4%のエタノールで2回遠心洗浄し、可溶性グルカン（以下、SG と略す）画分とした。両グルカンは乾燥後、1N NaOH 1ml を加えて溶解し、アンスロン硫酸法¹²⁾でグルコースを対照として定量を行った。

結 果

1. TOS の発育への利用性

TOS が口腔 *Streptococcus* の発育にどの程度利用されるかを検討した結果は、Table 1 に示した。標準菌株では、全供試菌株とも TOS を炭素源とした場合の OD 値は、glucose を炭素源とした場合に比較して非常に低く、TOS-P 存在下での OD 値は glucose の場合の1.0%から7.6%であった。TOS-50での値は、TOS-P より高く、glucose の35.3%から68.4%であった。一方、

Table 2 Utilization of TOS for plaque formation

Bacterial strains		Adherence of plaque (mg)				
		TOS -P	TOS -50	Neosugar -P	Glucose	Sucrose
Standard strains						
<i>S. mutans</i>	ATCC25175	0.2	0.1	20.6	0.7	88.3
	GS-5	0.3	0.1	8.9	0.6	66.7
	OMZ49	0.3	3.2	9.1	0.8	46.9
	K1	0.2	0.1	10.6	0	91.7
	K1-R	0.2	0	7.6	0	104.1
<i>S. sobrinus</i>	ATCC33478	0.1	6.4	17.6	6.9	112.3
<i>S. oralis</i>	ATCC35037	0.5	6.4	0.5	0.6	0.5
<i>S. sanguis</i>	ATCC10556	0	0.5	5.1	1.3	4.6
<i>S. mitis</i>	ATCC33399	0.8	1.4	0.4	0.2	0.2
<i>S. salivarius</i>	ATCC25975	0	0.1	0.2	0.3	0.4
Clinical strains						
<i>S. sanguis</i> I	C-200	0.3	0.5	9.9	1.2	8.5
<i>S. sanguis</i> II	C-010	0	5.1	0.6	3.7	28.5
<i>S. salivarius</i>	C-032	0.2	1.1	0.5	0.4	2.4
	C-053	0.4	0.3	2.0	0.2	0.7
	C-094	0.4	1.3	4.5	1.5	7.8
<i>S. morbillorium</i>	C-009	0.2	0.5	10.2	0.4	17.5
<i>S. MG-intermedius</i>	C-070	0.4	0.4	1.1	0.3	164.3
<i>S. angio.-const.*</i>	C-013	0.1	0.6	3.0	0.3	5.7

*; *S. anginosus-constellatus*

Medium: brain heart infusion broth (Difco)

neosugar-P は, *S. oralis* を除いて各菌株の OD 値は TOS-50よりさらに高く, glucose に近い値を示しており, glucose の場合より高い OD 値を示す菌株も認められた。

口腔内分離菌株においては, TOS-P 存在下での OD 値は, *S. salivarius* C-032, C-094の2株では glucose の約60%, *S. MG-intermedius* C-070では19.0%とやや高い値であったが, 全体的には標準菌株と同様に, TOS-P 存在下でのOD 値は低く, 各糖の発育への利用度は TOS-P が最も低く, ついで TOS-50, neosugar-P, glucose の順に高い値を示した。

2. TOS による平滑面への付着性

口腔 *Streptococcus* が TOS によってどの程度平滑面に付着するかを検討した結果は, Table 2 に示した。

標準菌株における *S. mutans* グループの菌株は, sucrose 添加で46.9mg から112.3mg の人工ブラークを平滑面上に形成したが, TOS-P 添加では, これらの菌株を含めた全ての菌株に付着性は認められなかった。平滑面への付着量は, TOS-P 存在下での付着量が最も少なく, TOS-50, neosugar-P, sucrose の順に高い値を示した。

口腔内分離菌株においても, sucrose 添加では, 高い付着性を示す菌株が認められたが, TOS-P 添加では, 標準菌株と同様に平滑面への付着はほとんど認められなかった。

3. TOS からの乳酸産生性

口腔 *Streptococcus* による各糖からの乳酸産生量は供試全菌株の発育が最大となる接種5日後に測定した。TOS による乳酸産生性は sucrose 添加培地での産生量を100%として Table 3 に示した。TOS-P からの乳酸産生性は, 標準菌株では供試した5菌株とも sucrose の20%以下であり, TOS-50 や neosugar-P からの産生量と比較して低い値であった。口腔内分離菌株では, *S. salivarius* C-032と *S. MG-intermedius* C-070が sucrose の約60%の産生量を示した以外は標準菌株と同様の傾向を示し, TOS-P での乳酸産生性に他の糖より低い傾向が見られた。

乳酸の定量を行なった各糖添加培地の最終 pH は, Table 4 に示した。Sucrose および glucose 添加培地の pH は, 全ての菌株で pH 3.9から4.4までの値に低下していたのに対し, TOS-P では乳酸産生量の高かった *S. salivarius* C-032 と *S. MG-intermedius* C-070で pH 4.3を示した以外は pH は全て5.0以上であった。pH は TOS-P, TOS-50, neosugar-P の順に低下する傾向であり, TOS-P での pH の低下が最も少なかった。

4. 粗 GTase による TOS からの IG および SG 産生性

S. mutans ATCC 25175の培養上清から調製した粗 GTase によって sucrose, TOS-P, TOS-50 から産生される IG および SG を経時的に測定した結果は, Fig. 2 に示した。Sucrose を基質とした場合, 時間の経過とともに, IG 量と SG 量の増加が認められたが, TOS-

Table 3 Production of lactic acid from TOS

Bacterial strains		Lactic acid (%)				
		TOS -P	TOS -50	Neosugar -P	Glucose	Sucrose
Standard strains						
<i>S. mutans</i>	ATCC25175	9	46	99	67	100
<i>S. oralis</i>	ATCC35037	13	68	20	132	100
<i>S. sanguis</i>	ATCC10556	16	79	110	108	100
<i>S. mitis</i>	ATCC33399	8	73	112	130	100
<i>S. salivarius</i>	ATCC25975	10	79	68	115	100
Clinical strains						
<i>S. sanguis</i> I	C-074	12	82	95	116	100
<i>S. sanguis</i> II	C-010	16	69	23	76	100
<i>S. morbillorium</i>	C-009	27	103	118	159	100
<i>S. salivarius</i>	C-032	61	51	52	83	100
<i>S. MG-intermedius</i>	C-070	57	71	49	87	100

Each carbohydrate was added at the concentration of 1%.

Medium: trypticase soy broth without dextrose (BBL)

Incubation period: 5 days

Table 4 Decrease of pH by various carbohydrates

Bacterial strains		pH				
		TOS -P	TOS -50	Neosugar -P	Glucose	Sucrose
Standard strains						
<i>S. mutans</i>	ATCC25175	5.8	4.3	3.9	4.0	3.9
<i>S. oralis</i>	ATCC35037	5.2	4.7	5.0	4.2	4.3
<i>S. sanguis</i>	ATCC10556	6.3	4.7	4.4	4.4	4.4
<i>S. mitis</i>	ATCC33399	6.1	4.8	4.3	4.3	4.3
<i>S. salivarius</i>	ATCC25975	6.3	4.7	4.2	4.1	4.0
Clinical strains						
<i>S. sanguis</i> I	C-074	6.2	4.7	4.5	4.3	4.4
<i>S. sanguis</i> II	C-010	5.1	4.5	5.5	4.1	4.2
<i>S. morbillorium</i>	C-009	5.9	4.7	4.4	4.4	4.4
<i>S. salivarius</i>	C-032	4.3	4.6	4.3	4.1	4.1
<i>S. MG-intermedius</i>	C-070	4.3	4.3	4.3	4.1	4.1

Each carbohydrate was added at the concentration of 1%.
Medium : trypticase soy broth without dextrose (BBL)
Incubation period : 5 days

Fig. 2 Glucan synthesis from sucrose and TOS by glucosyltransferase of *S. mutans* ATCC 25175. Open symbols indicate insoluble glucan, and closed symbols indicate soluble glucan.

P, TOS-50 を基質とした場合には、グルカンの産生は認められなかった。

S. sobrinus ATCC 33478由来の粗 GTase においても、sucrose を基質とした場合には両グルカンの産生がみられた (Fig. 3)。しかし、TOS-P および TOS-50

Fig. 3 Glucan synthesis from sucrose and TOS by glucosyltransferase of *S. sobrinus* ATCC 33478. Open symbols indicate insoluble glucan, and closed symbols indicate soluble glucan.

からはグルカンはほとんど産生されなかった (Fig. 3)。

5. IG 産生に及ぼす TOS の影響

各粗 GTase による sucrose からの IG 産生に対し、TOS が及ぼす影響について検討した結果は、Table 5 に示した。

S. mutans ATCC 25175由来の粗 GTase による IG

Table 5 Effect of TOS on the insoluble glucan-synthesis from sucrose by glucosyltransferase (GTase)

Origin of GTase	Substrates	Insoluble glucan (μ g)
<i>S. mutans</i> ATCC25175	2.5% TOS	0.0 $\pm$ 0.0
	2.5% sucrose	135.4 $\pm$ 24.3
	2.5% sucrose+2.5% TOS	139.9 $\pm$ 9.4
	2.5% sucrose+5.0% TOS	101.4 $\pm$ 10.3*
	2.5% sucrose+7.5% TOS	80.0 $\pm$ 4.6**
<i>S. sobrinus</i> ATCC33478	2.5% TOS	0.0 $\pm$ 0.0
	2.5% sucrose	131.4 $\pm$ 4.8
	2.5% sucrose+2.5% TOS	141.7 $\pm$ 7.5
	2.5% sucrose+5.0% TOS	140.1 $\pm$ 6.0
	2.5% sucrose+7.5% TOS	146.2 $\pm$ 10.8*

Each value is the mean of four experiments+standard error.

Significant difference from the value of sucrose

alone is indicated by * ($p<0.05$) and ** ($p<0.01$).

産生量は、2.5% sucrose のみを基質とした場合、135.4 μ g であったが、基質に TOS-P を添加すると産生量の減少がみられ、5.0%添加では101.4 μ g、7.5%添加では80.0 μ g で、それぞれ5%および1%の危険率で有意の差が認められた。一方、*S. sobrinus* ATCC 33478由来の粗 GTase では、sucrose 単独の場合131.4 μ g の IG が産生されたが、7.5%の TOS-P を添加することにより146.2 μ g に増加した ($p<0.01$)。

考 察

非う蝕原性あるいは低う蝕原性糖の条件としては、口腔内細菌により発育に利用されないこと、乳酸産生の基質とならず、pH の低下を引き起こさないこと、*S. mutans* が産生する GTase の基質とならず、不溶性多糖の産生を引き起こさないことなどが挙げられる。また、良好な甘味と食品としての安定した物性を有し、医学的にも問題がないものでなければならない。

現在報告されている非う蝕原性あるいは抗う蝕原性糖類としては、maltitol¹⁸⁾、sorbitol¹⁴⁾、xylitol¹⁵⁾ などの糖アルコール類、lactulose¹⁶⁾、palatinose¹⁷⁻¹⁹⁾、coupling sugar^{20,21)}、neosugar^{22,23)} などのオリゴ糖および配糖体の stevioside²⁴⁾ などがある。これらのうち、オリゴ糖類は良好な非う蝕原性糖として実用化されつつあるが、糖アルコール類は、一度にある量を越えて摂取すると、一過性に下痢を生じることが報告され²⁵⁾、配糖体の stevioside は、甘味の点で問題があるといわれている²⁴⁾。

TOS は、母乳中に存在するオリゴ糖成分の一部と同

一構造を有し、天然成分である。ラットを用いた急性毒性試験の LD₅₀ 値は15g/kg 以上であり、悪急性および慢性毒性試験においても安全性に問題がないことが確認されている²⁶⁾。また、TOS は上品な甘味を有し、100°C、3時間、120°C、30分間でも分解されず、酸性域で加熱しても極めて安定であり、蔗糖やフラクトオリゴ糖よりも分解されにくい。さらに、保存安定性も優れており、pH 2.0~3.0、5~37°C の条件下で保存した場合、60日後でもほとんど分解しない。従って、TOS の食品加工過程や保存中での分解はほとんど考える必要はないと報告されている²⁶⁾。成人が TOS を経口的に摂取すると、非吸収性の糖として下部消化管に到達し、腸内において腸内腐敗を引き起こす *Bacteroides* 属を有意に減少させ、*Bifidobacterium* を増加させることも示されている⁵⁾。また、TOS を *Bifidobacterium breve* とともに投与することにより、腸内腐敗の抑制⁶⁾や便秘症の改善²⁷⁾、肝機能の向上²⁸⁾、放射線障害の改善²⁹⁾などの効果があることが報告されている。本実験では、TOS が sucrose に代わる非う蝕原性糖となり得るか否かを検討することを目的として、既に低う蝕原性が報告され、甘味料として市販されているフラクトオリゴ糖の neosugar-P を対照として、口腔 *Streptococcus* を用いて TOS のう蝕原性の検討を行った。

口腔 *Streptococcus* による TOS の発育への利用性を検討した結果、TOS-P は口腔 *Streptococcus* により発育のためのエネルギー源としてほとんど利用されなかった。TOS-50も発育への利用度は小さく、neosugar-P

よりその利用性は低かった。また、TOS-P は、人工ブランクの平滑面付着をほとんど引き起こさなかった。平滑面への付着量は TOS-P, TOP-50, neosugar-P, sucrose の順に増加する傾向がみられた。さらに、TOS-P からの乳酸産生性および pH の低下度は、菌株間で若干の差は認められたが、TOS-50, neosugar-P に比べ弱かった。

また、*S. mutans* ATCC 25175 と *S. sobrinus* ATCC 33478 の 2 株から調製した粗 GTase を用いて、TOS からの IG および SG 産生性を検討したところ、TOS-P, TOS-50 とともに、両グルカンの産生は認められなかった。このように、TOS, とくに TOS-P は、非う蝕原性糖として期待できる結果が得られた。一方、neosugar-P は、その主要構成糖である nystose について非う蝕原性が報告されているが^{22,23)}、本実験で使用する neosugar-P 標品には、う蝕原性糖の sucrose が 1.4% の割合で含まれている。このために、平滑面付着や乳酸産生などが引き起こされたものと考えられる。また、泉谷ら¹⁸⁾は、coupling sugar にも 10% 以上の sucrose が含まれていることから強い乳酸産生が認められたと述べており、neosugar-P や coupling sugar と比較すると、TOS-P は、二糖以下の糖を全く含んでいないことから、より低う蝕原性であると考えられる。

オリゴ糖の lactulose¹⁶⁾, palatinose^{17,18)}, coupling sugar²⁰⁾, neosugar^{22,23)} や糖アルコール²⁰⁾ は、GTase の基質として sucrose とともに添加すると、sucrose からの IG 合成を効果的に抑制することが報告されている。しかし、TOS の場合、*S. mutans* ATCC 25175 由来の粗 GTase では、産生 IG 量が、sucrose 単独よりも有意に減少したのに対し、*S. sobrinus* ATCC 33478 由来の粗 GTase では、産生量は増加していた。この結果は、GTase の由来によって、sucrose からの IG 産生性に対する TOS の影響が異なることを示唆しており、さらに検討する必要がある。

一般に、非う蝕原性糖に関する報告は、*S. mutans* の標準菌株を用いて検討を行ったものがほとんどである。本実験では、口腔 *Streptococcus* の標準菌株以外に口腔分離菌株を用いて実験を行ったところ、数株が、TOS を発育に利用し、乳酸を産生していた。このように、口腔分離菌株が多様な性状を有することを考えると、糖のう蝕原性を検討する場合、標準菌株ばかりでなく、より多数の分離菌株を対象に検討してみる必要がある。

最後に、TOS の甘味度は sucrose の 20% で、palatinose の約 50%、lactulose の約 60% などと比べるとやや

低く、他の甘味料と併用する必要も考えられる。事実、TOS-50 の抗う蝕原性は、TOS-P のそれより劣るが、neosugar-P と同等か若干優れていた。いずれにしても、本実験結果で示したように、非う蝕性の糖であること、さらに、*Bifidobacterium* 増殖因子として各種の長所を有することを考え併せると、TOS を甘味料として積極的に食品に応用していくことは、口腔衛生学的見地からもあり意義である。

結 論

Bifidobacterium 増殖性のガラクトオリゴ糖である Transgalactosylated oligosaccharide (TOS) のう蝕原性を、*S. mutans* をはじめとする口腔 *Streptococcus* を対象に *in vitro* で検討し、以下の成績を得た。

1. TOS-P は、口腔 *Streptococcus* の発育にほとんど利用されていなかった。TOS-50 の利用性も neosugar-P に比較して弱かった。
2. TOS-P および TOS-50 は、口腔 *Streptococcus* の平滑面への付着にほとんど関与していなかった。
3. TOS-P からの乳酸産生性は、全体的に低く、培地 pH の低下も少なかった。
4. 2 菌株から調製した粗 GTase を用いて不溶性グルカンおよび可溶性グルカンの産生性を検討した結果、TOS-P および TOS-50 からの両グルカンの産生は認められなかった。

以上の結果、TOS は、明確な抗う蝕原性を認めることはできなかったが、非う蝕原性が期待できる糖であることが示唆された。

引用文献

- 1) Keyes, P. H.: Present and future measures for dental caries control, J. Am. Dent. Assoc., 79; 1395-1404, 1969.
- 2) Makinen, K. K.: The role of sucrose and other sugars in the developing of dental caries, Int. Dent. J., 22; 362-386, 1972.
- 3) Newbrun, E.: Sucrose, the arch criminal of dental caries, Odontol. Revy., 18; 373-386, 1967.
- 4) van Houte, J.: Bacterial specificity in etiology of dental caries, Int. Dent. J., 30; 305-326, 1980.
- 5) Tanaka, R., Takayama, H., Morotomi, M., Kuroshima, T., Ueyama, S., Matsumoto, K., Kuroda, A., Mutai, M.: Effects of administration of TOS and *Bifidobacterium breve* 4006 on human fecal flora, Bifidobacteria Microflora, 2; 17-24, 1983.

- 6) Tohyama, K., Tanaka, R., Kobayashi, Y., Mutai, M.: Relationship between the metabolic regulation of intestinal microflora by feeding Bifidobacterium and host hepatic function, *Bifidobacteria Microflora*, **1**; 45-50, 1982.
- 7) 田中隆一郎: ビフィズス菌の効用, *生活衛生*, **28**; 324-332, 1984.
- 8) Facklam, R. R.: Physiological differentiation on viridans streptococci, *J. Clin. Microbiol.*, **5**; 184-201, 1977.
- 9) 日高秀昌: 健康志向の新しい食品素材フラクトオリゴ糖, *化学と生物*, **21**; 291-293, 1983.
- 10) Fukushima, K., Motoda, R., Ikeda, T.: Effects of exogenous insoluble glucan primer on insoluble glucan synthesis by *Streptococcus mutans*, *J. Dent. Res.*, **60**; 1707-1712, 1981.
- 11) Koga, T. and Inoue, M.: Cellular adherence, glucosyltransferase adsorption and glucan synthesis of *Streptococcus mutans* AHT mutants, *Infect. Immun.*, **19**; 402-410, 1978.
- 12) 由岐英剛 編: 生化学分析法, 南江堂, 東京, 1984, 198頁.
- 13) 武笠寿彦: Maltitol および SE 58 の非う蝕性糖類としての可能性について, *Streptococcus mutans* による Insoluble glucan の生成とラットに対するう蝕誘発性, *日大口腔科学*, **3**; 266-275, 1977.
- 14) Birkhed, D.: Automatic titration method for determination of acid production from sugars and sugar alcohol in small samples of dental plaque material, *Caries Res.*, **12**; 128-136, 1978.
- 15) 池田 正, 大竹繁雄, 渡辺千秋: Xilitol の *Streptococcus mutans* 菌体付着, 不溶性グルカン生成への影響および代謝不適応性, *日大口腔科学*, **5**; 202-205, 1979.
- 16) 久保寺徳利: Lactulose の基質としてのう蝕原性, *口腔衛生学会雑誌*, **33**; 110-117, 1983.
- 17) 泉谷 明: パラチノースのう蝕誘発能に関する研究, *小児歯科学雑誌*, **23**; 678-694, 1985.
- 18) 泉谷 明, 墨 典夫, 大嶋 隆, 祖父江鎮雄: パラチノース蜜のう蝕誘発能, *小児歯科学雑誌*, **23**; 592-599, 1985.
- 19) Ohta, K. and Takazoe, I.: Effect of isomaltulose on acid production and insoluble glucan synthesis by *Streptococcus mutans*, *Bull. Tokyo Dent. Coll.*, **24**; 1-11, 1983.
- 20) 竹内 叶: *Streptococcus mutans* の不溶性グルカン合成を抑制する低発酵性糖質について, *歯科基礎医学会雑誌*, **26**; 698-713, 1983.
- 21) Ikeda, T., Shiota, T., McGhee, J. R., Otake, S., Michalek, S. M., Ochiai, K., Hirasawa, M. and Sugimoto, K.: Virulence of *Streptococcus mutans*: comparison of effects of a coupling sugar and sucrose on certain metabolic activities and cariogenicity, *Infect. Immun.*, **19**; 477-480, 1978.
- 22) Ikeda, T., Hirasawa, M., Kurita, T. and Yasuda, S.: Cariogenicity of nystose as a substrate *in vitro*, *J. Dent. Res.*, **61** (IADR Abst); No. 22, 1982.
- 23) 池田 正, 平沢正知, 栗田智子: Nystose の試験管内における基質としてのう蝕原性, 細谷憲政編, ネオシュガー研究会報告, 東京, ネオシュガー研究会事務局, 1982, 77頁.
- 24) 池田 正, 岡田英子, 元田龍一: *Streptococcus mutans* による Stevioside の利用: 発育, 酸産生および insoluble glucan の生成について, *日大口腔科学*, **9**; 24-27, 1978.
- 25) Guggenheim, B.: Health and sugar substitutes. In Proceedings of the ERGOB conference on sugar substitutes, S. Karger, Basel, 1978, p. 1.
- 26) 住原泰雄: ガラクトオリゴ糖の機能と食品への応用, *フードケミカル*, **6**; 87-94, 1987.
- 27) 下山 孝, 田村和民, 谷田憲俊, 西村正二, 堀信治, 細見基信, 岸本吉己, 川浦昭彦, 山村誠, 中村正樹, 百々元昭, 林 宗茂, 今泉太郎, 沢田康史, 田中 守, 山崎喜久雄: 便通異常者の腸内細菌叢—ビフィズス菌を中心に—, *基礎と臨床*, **18**; 4067-4080, 1984.
- 28) 佐々木裕, 藤田峻作, 吉岡博昭, 石津弘視, 中透, 柏木 徹, 竜門敬二, 赤木克子, 満谷夏樹, 小泉岳夫: TOS & BBG の長期投与の肝機能に及ぼす効果, *厚生年金病院年報*, **9**; 305-309, 1982.
- 29) 横倉輝男, 尾上正治, 務台方彦: マウスの放射線障害に対するビフィズス菌投与の影響, *医学のあゆみ*, **116**; 153-155, 1981.