原 著

Sorbose の基質としての齲蝕原性*

Cariogenicity of Sorbose as a Substrate

平澤 正知** 竹内 武男** 佐藤 晴彦**
清水 俊雄*** 池田 正**

Masatomo HIRASAWA**, Takeo TAKEUCHI**, Haruhiko SATOH**,
Toshio SHIMIZU*** and Tadashi IKEDA**

Received March 26, 1990; accepted June 13, 1990

Abstract: Sorbose is a 2-ketohexose, differing from fructose in configuration at C-3 and C-4. It is obtained through a cultivation of sorbitol and *Gluconobacter (Acetobacter) suboxydans*. The sugar is about 80~90 % as sweet as sucrose and is also non-hygroscopic. The effect of sorbose on the cariogenicity of mutans streptococci (serotype *a~h*) and certain oral microorganisms was studied. Sorbose was not utilized as a substrate for the growth, lactic acid production, and plaque formation of mutans streptococci (serotype *a~h*). It did not serve as a substrate for cellular aggregation of mutans streptococci and was not utilized in water-insoluble glucan synthesis and cellular adherence by glucosyltransferase from *Streptococcus mutans* PS-14 (*c*) or *S. sobrinus* 6715 (*g*). Sorbose was also not utilized for the growth and lactic acid production of certain oral microorganisms although some growth was seen with *Lactobacillus casei* and *L. acidophilus*. Two groups of SPF SD rats infected with *S. mutans* PS-14 were fed with a diet containing 30 % sorbose and 30 % sucrose for 58 days. A significantly ($p < 0.01$) lower caries score (mean $\pm$ SE; 17.5 ± 2.0) was obtained in the rats fed with a diet containing 30 % sorbose than in the rats fed with a diet containing 30 % sucrose (82.1 ± 4.4). The caries inhibition rate was 78.7 %.

索引用語：ソルボース，低齲蝕原性糖，代替甘味料，ストレプトコッカスミュータンス

Key words: Sorbose, Low-cariogenic sugar. Sugar substitute, *Streptococcus mutans*

緒 言

砂糖の主成分である sucrose に代表される糖類（基質）は，齲蝕罹患の主な 3 因子の一つにあげられてい

る。特に齲蝕の主要原因菌である *Streptococcus mutans* (*S. mutans*) の特徴的な齲蝕原性作用は sucrose に依存している^{1,2)}。さらに sucrose は歯垢細菌による酸生成の基質となる。*S. mutans* を始めとする歯垢細菌

* 本論文の要旨は，第67回 IADR Annual Meeting (1989年) において発表した。

** 日本大学松戸歯学部細菌学教室（主任：池田 正）

** Department of Microbiology, Nihon University School of Dentistry at Matsudo (Chief: Prof. Tadashi IKEDA)

*** 旭化成工業（株）食品技術研究室

*** Asahi Chemical Industry Co. Foods Research Laboratory

の齧蝕原性発揮に、基質として利用されない sucrose 代替甘味料の使用は、齧蝕予防に有効な一手段である。加えて、その使用には専門的知識や専門家の手を煩わせないで実施できる大きな利点がある。この見地から当教室³⁻¹³⁾では、齧蝕の原因となりにくい sucrose 代替甘味料の検索と開発について一連の研究を行っており、それらの数種はすでに実用化されている。

現在、非・低齧蝕原性糖類として糖アルコール類の sorbitol¹⁴⁻¹⁶⁾, xylitol^{7,15,17)}, maltitol^{8,9,18)}, erythritol¹²⁾ など、少糖類の coupling sugar¹⁾, fructooligosaccharide¹⁹⁾, palatinose^{19,20)} など、および配糖体の stevioside⁵⁾ などがある。それらは齧蝕原性を含め砂糖がもつ医学的欠点のいくつかは改善されているが、甘味の質、甘味度、価格あるいは食品工業的理由などで砂糖と比較すれば多少なりとも劣る面がある。したがって用途はある程度限定されているのが現状であり、より良い代替甘味料の開発が望まれている。

本研究は、fructose の異性体で ketohexose の一種である sorbose について、現在の齧蝕病因論に基づきその基質としての齧蝕原性を追究した。天然の sorbose は *Sorbus aucuparia* の成熟果実に含まれる sorbitol が、同果実に増殖する数種の細菌²¹⁾の脱水素化作用により sorbose となり存在している。工業的には sorbitol を原料として *Gluconobacter* (*Acetobacter*) *suboxydans* の発酵作用によりつくられ、テイリングのない良質の甘味をもち、その甘味度は sucrose の80~90%で吸湿性のない白色無臭の熱に安定な結晶体である。

材料と方法

1. 供試 sorbose

旭化成工業(株)食品技術研究室から提供された純度99%以上の L-sorbose を標品として使用した。

2. 使用菌株と培地

教室保存の *S. mutans* 群: *S. cricetus* OMZ-61 (血清型 a), *S. rattus* BHT (b), *S. mutans* PS-14 (c), LM-7 (e), OMZ-175 (f), *S. sobrinus* OMZ-176 (d), 6715 (g), serotype “h” 11391 (h), および口腔細菌 7 菌種: *S. sanguis* ATCC 10556, *S. mitior* NCTC 3168, *S. salivarius* ATCC 9222, *Lactobacillus casei* ATCC 4646, *L. acidophilus* ATCC 4962, *Actinomyces viscosus* ATCC 19246, *A. naeslundii* ATCC 12104を使用した。培地は実験目的によって半合成培地 M4²²⁾, trypticase soy broth (Becton-Dickinson) から glucose を除いた組成 (TSB-GF) に供試基質を加えた

培地, brain heart infusion (BHI, Difco) および *Mitis Salivarius* 寒天 (MS 寒天, Difco) を用いた。嫌気培養は N₂ 95%, CO₂ 5%のガス置換法で行った。供試菌はすべて BHI に18時間嫌気前培養してから使用した。

3. 実験方法

1) 人工歯垢形成。供試菌液0.05ml を、あらかじめ重量測定してある試験管を用いて5% sucrose または5% sorbose 加 BHI 5ml に移植し、嫌気培養した。24時間ごとに新しい同培地と交換し、4日後に管壁に附着している菌体を蒸留水で3回洗浄後、80°C で5時間乾燥し重量測定を行い歯垢量を求めた。

2) 菌体凝集。Ikeda²³⁾らの方法に準じて行った。供試菌を M4 培地に18時間嫌気培養し、遠沈による収集菌体を0.8%生食水で3回洗浄後、0.2M glycine-NaOH 緩衝液 (pH 8.5) で濁度1.0 (A_{540nm}) の菌浮遊液とした。菌液0.4ml に1mg/ml の sorbose または dextran T2000 (Pharmacia Fine Chemicals Inc.) を0.2ml 混和し、ミキサー (サーモニクス KK, TM-100) で攪拌後37°C の恒温槽中でインキュベートし、18時間後の菌体凝集性を観察した。結果は0 (無凝集) から4 (最大凝集) の5段階で判定した。

3) 乳酸生成。供試菌の BHI 18時間嫌気培養菌体を遠沈で収集し、0.05M phosphate 緩衝液 (pH 6.8) で洗浄後、同緩衝液で菌浮遊液 (5×10⁸ colony forming unit/ml) とした。その0.5ml, 1%基質溶液0.2ml, 22.5mM MgCl₂ 0.4ml, 0.2M phosphate 緩衝液 (pH 6.8) 0.9ml からなる反応液を、37°C の恒温槽中で30分間振盪インキュベートし、100°C 10分間の加熱により反応停止後、遠沈してその上清の乳酸量を酵素法²⁴⁾ (Lactate-UV-test, ベーリンガー・マンハイム山之内) で定量した。

4) glucosyltransferase (GTase) の調製と非水溶性 glucan 生成およびその阻害。Fukushima ら²⁵⁾の方法に準じて行った。供試菌を M4 培地に37°C 20時間好気培養し、遠沈後その上清の40% cold ethanol 沈殿物を、5mM triethanolamine 液 (pH 9.0) に透析して得た可溶性画分を、粗 GTase として使用した。PS-14 株の GTase 標品は0.7μmole/min/ml, 6715株の同標品は0.5μmole/min/ml の glucose 転移活性を示した。

非水溶性 glucan 量の測定は2種の方法で行った。連続濁度法は、GTase 液100μl, 0.15M sucrose または sorbose 100μl, 0.6M acetate 緩衝液 (pH 5.5) 50μl, 非水溶性 glucan プライマー (0.2mg/ml) 50μl からなる

反応液を、25°C に保温した分光光度計（日立136型）のマイクロセル内で反応させ、非水溶性 glucan 生成に伴う 340nm の吸光度変化を記録した。生成量は、反応パターンの直線部分の吸光度変化量 (Δ 340nm/min) より、1 分間あたり生成される非水溶性 glucan 量を、各供試菌 GTase が作る非水溶性 glucan の検量線から算出し、glucose 当量として示した。また、上記反応液を 37°C 24 時間インキュベートし、遠沈による沈渣を蒸留水で 3 回洗浄後、フェノール硫酸法²⁵⁾で測定する方法でも行った。非水溶性 glucan 生成阻害実験では、所要濃度の sorbose を sucrose 溶液に混和したものを基質液として使用した。

5) ^3H 標識菌体の調製と菌体付着およびその阻害。 ^3H 標識菌体の調製は、Schachtele ら²⁶⁾の方法を改変した Ikeda ら²⁸⁾の方法に準じて行った。92.5kBq/ml の [$4.5\text{-}^3\text{H}$ (N)]-L-leucine を含む M4 培地に、供試菌を 37°C 18 時間好気培養し、遠沈による収集菌体を 0.05M phosphate 緩衝液 (pH 6.8) で 3 回洗浄後 100°C 15 分間加熱して死菌体とした。これを 0.2% に sodium merthiolate を含む同緩衝液に懸濁し、濁度 1.0 ($A_{540\text{nm}}$) の菌浮遊液とした。 ^3H 標識菌液 200 μl と GTase 液、0.15M 基質液および 0.2% に sodium merthiolate を含む 0.05M phosphate 緩衝液各 100 μl を mini screw cap vial (日電理化硝子) にとり、25° の傾斜を保ち 37°C 18 時間インキュベートした。vial 壁に付着していない菌体を吸引除去し、付着菌体を蒸留水で 3 回洗浄後乾燥し、Bray's scintillation fluid²⁷⁾を加えて放射活性を測定した。その値から GTase を含まない反応液で付着した菌体の放射活性値を差し引き、基質依存的付着菌体量を求めた。

6) ラット齦蝕。生後 18 日齢の JCL・Sprague-Dawley ラット (雄) を強制離乳させて 3 群に別け、A 群は diet 2000²⁹⁾ の 56% sucrose を 56% starch に、B 群は同じく 26% starch と 30% sucrose に、C 群は 26% starch と 30% sorbose に置き換えた飼料で飼育した。18 日齢からの 3 日間は、各群の飼料に carbenicillin (藤沢薬品)、ampicillin (明治製薬) および chloramphenicol (三共製薬) を各 1 g/kg に添加して与え、口腔常在菌の抑制を行った。22 日齢に、streptomycin 耐性 (10mg/ml) の *S. mutans* PS-14 株をラット口腔に感染し、翌日 streptomycin (1mg/ml) 加 MS 寒天で感染菌の口腔内定着を確認した。未定着ラットは定着するまで同操作を繰り返した。76 日齢に屠殺し、Ikeda ら²⁸⁾の方法により下顎の齦蝕スコアを測定した。

結 果

1. *S. mutans* 群と他の口腔細菌の発育への利用性
0.5% glucose を炭素源とする半合成培地 M4 と、glucose の代わりに同濃度 sorbose を加えた培地に、*S. mutans* 群血清型 b~h の 7 菌株を 18 時間好気培養した結果と、*S. cricetus* (a 型) 菌株、*Lactobacillus* 属菌、*Actinomyces* 属菌は M4 培地に発育不良なため、TSB-GF に同濃度の glucose または sorbose を加えた培地に供試菌株を嫌気培養し、それらの発育度を glucose と比較した結果を Table 1 に示した。sorbose は供試した *S. mutans* 群のすべての血清型菌株によって、発育のための炭素源として利用されなかった。また供試した *Lactobacillus* 属菌株は多少の発育を認めたが、*Actinomyces* 属菌および *S. mutans* 群以外の *Streptococcus* 属菌の各菌株により発育には利用されなかった。

Table 1 Utilization of sorbose for growth of oral microorganisms

Microorganism	Strain (serotype)	Growth (A 540 nm)		
		Glucose	Sorbose	
<i>Streptococcus</i>				
<i>S. cricetus</i>	OMZ-61 (a)	0.70	0.00	
<i>S. rattus</i>	BHT (b)	1.09	0.02	
<i>S. mutans</i>	PS-14 (c)	1.19	0.00	
<i>S. sobrinus</i>	OMZ-176(d)	1.05	0.01	
<i>S. mutans</i>	LM-7 (e)	1.40	0.00	
<i>S. mutans</i>	OMZ-175(f)	1.40	0.00	
<i>S. sobrinus</i>	6715 (g)	1.10	0.01	
<i>S. serotype "h"</i>	11391 (h)	1.30	0.01	
<i>S. salivarius</i>	9222	1.10	0.00	
<i>S. sanguis</i>	10556	1.15	0.00	
<i>S. mitior</i>	3168	1.10	0.00	
<i>Lactobacillus</i>				
<i>L. casei</i>	4646	0.99	0.58(0.05)	
<i>L. acidophilus</i>	4962	0.88	0.45(0.27)	
<i>Actinomyces</i>				
<i>A. viscosus</i>	19246	1.05	0.40(0.40)	
<i>A. naeslundii</i>	12104	1.10	0.48(0.48)	

Aerobic incubation in defined medium M4 containing 0.5% substrate for 18hr, except *S. cricetus*, *Lactobacillus* and *Actinomyces* (used trypticase soy broth without glucose containing 0.5% substrate).

Each value represents mean of duplicate

() : no substrate added.

Table 2 Utilization of sorbose for plaque formation of mutans streptococci

Strain (serotype)	Plaque (mg, dry weight)	
	Sucrose	Sorbose
OMZ-61 (a)	36.5	0.6
BHT (b)	0.0*	0.0
PS-14 (c)	57.5	0.2
OMZ-176 (d)	50.5	0.2
LM-7 (e)	24.4	0.5
OMZ-175 (f)	20.3	0.1
6715 (g)	36.4	0.1
11391 (h)	53.5	0.0

Each strain was incubated in BHI containing either 5 % sucrose or 5 % sorbose and anaerobically incubated at 37°C with the medium being replaced by a fresh one daily for 4 days and the adherent material measured.

Each value represents mean of duplicate

* This BHT strain does not form plaque.

Table 3 Utilization of sorbose for cellular aggregation of certain mutans streptococci

Strain (serotype)	Aggregation*	
	Dextran	Sorbose
OMZ-176 (d)	+4	0
6715 (g)	+4	0
11391 (h)	+4	0

* Results were scored 0 (no aggregation) to 4 (maximum aggregation)

2. 人工歯垢形成への利用性

S. mutans 群の *in vitro* における歯垢形成に, sorbose が基質として利用されるかを実験した結果を Table 2 に示した。対照基質として用いた sucrose 例では, 供試菌株によって量的にかなりの差を示しているが, BHT 株を除く各血清型菌株は20.3~57.5mg の人工歯垢を形成した。しかし, sorbose では各血清型菌株とも明らかな歯垢形成を認めなかった。

3. 菌体凝集作用

S. mutans 群の菌体凝集に sorbose が基質として利用されるかを, 血清型 *d, g, h* 菌株を用いて実験した結果を Table 3 に示した。対照として用いた dextran によって供試各菌株は明らかな菌体凝集を認めたが, sorbose では各菌株ともに菌体凝集を全く認めなかった。

Table 4 Production of lactic acid from sorbose by oral microorganisms

Microorganism	Strain (serotype)	Lactic acid (μ mole/ml)	
		Glucose	Sorbose
<i>Streptococcus</i>			
<i>S. cricetus</i>	OMZ-61 (a)	3.6	0.0
<i>S. rattus</i>	BHT (b)	4.2	0.0
<i>S. mutans</i>	PS-14 (c)	3.5	0.0
<i>S. sobrinus</i>	OMZ-176(d)	3.4	0.0
<i>S. mutans</i>	LM-7 (e)	3.8	0.0
<i>S. mutans</i>	OMZ-175(f)	3.6	0.0
<i>S. sobrinus</i>	6715 (g)	3.6	0.0
<i>S. serotype "h"</i>	11391 (h)	3.3	0.0
<i>S. salivarius</i>	9222	3.7	0.0
<i>S. sanguis</i>	10556	3.4	0.0
<i>S. mitior</i>	3168	3.9	0.0
<i>Lactobacillus</i>			
<i>L. casei</i>	4646	3.5	0.0
<i>L. acidophilus</i>	4962	3.1	0.0
<i>Actinomyces</i>			
<i>A. viscosus</i>	19246	0.7	0.0
<i>A. naeslundii</i>	12104	0.8	0.0

Each value represents mean of duplicate

4. 乳酸生成への利用性

S. mutans 群による sorbose からの乳酸生成を実験した結果を Table 4 に示した。*S. mutans* 群各血清型菌株の glucose を基質としたときの乳酸生成量は3.3~4.2 μ mole/ml であったが, sorbose からは全く認められなかった。同様に供試した *Streptococcus* 属菌, *Lactobacillus* 属菌および *Actinomyces* 属菌の各菌株による同標品からの乳酸生成も全く認められなかった。なお, *S. mutans* などは菌体内貯蔵多糖 (intracellular polysaccharide) を保有し, それによる内因性の酸産生が少量認められるので, 基質無添加系の反応液の値を基質添加系の測定値から引き実験値として表示した。

5. 非水溶性 glucan 生成と菌体の平滑面付着への利用性

Table 5 は, sorbose が非水溶性 glucan 生成に基質として利用されるかを2種の実験方法で測定した結果と, *S. mutans* PS-14 株および *S. sobrinus* 6715株菌体の平滑面付着に対する sorbose の利用性を, sucrose と比較した結果である。

非水溶性グルカン生成は *S. mutans* PS-14株および *S. sobrinus* 6715株より調製した GTase を用い, 供試

Table 5 Utilization of sorbose for water-insoluble glucan formation and cellular adherence by GTase from *S. mutans* or *S. sobrinus*

GTase Source (serotype)	Insoluble glucan synthesis				Cell adherence*	
	μ mole glucose/min $\times 10^{-2}$		μ g glucan/24h		(Bq $\pm$ SE)	
	sucrose	sorbose	sucrose	sorbose	sucrose	sorbose
PS-14 (c)	3.0	0	48.0	0	179.8 $\pm$ 5.4	0.0
6715 (g)	3.5	0	55.0	0	1203.2 $\pm$ 43.3	0.0

* Radioactivity of cells adhering to the glass surface without GTase was subtracted from the result. Each value of insoluble glucan synthesis represents mean of duplicate.

Table 6 Inhibition of sucrose-dependent insoluble glucan formation and cellular adherence caused by sorbose

GTase Source	Condition	Insoluble glucan synthesis	Cell adherence*
		μ mole glucose/min $\times 10^{-2}$	Bq $\pm$ SE
PS-14	sucrose	3.0	179.8 $\pm$ 5.4
	sucrose + sorbose (1 : 1)	2.7 [10.0]	169.1 $\pm$ 4.4 [6.0]
	sucrose + sorbose (1 : 2)	2.5 [16.7]	162.7 $\pm$ 4.4 [6.0]
	sucrose + sorbose (1 : 4)	2.2 [26.7]	145.7 $\pm$ 10.8 [19.0]
6715	sucrose	3.5	1203.2 $\pm$ 43.3
	sucrose + sorbose (1 : 1)	3.5 [0.0]	1103.4 $\pm$ 50.1 [8.3]
	sucrose + sorbose (1 : 2)	3.0 [14.3]	1096.8 $\pm$ 17.2 [8.8]
	sucrose + sorbose (1 : 4)	2.8 [20.0]	956.9 $\pm$ 53.7 [20.5]

[] inhibition, %

* Radioactivity of cells adhering to the glass surface without GTase was subtracted from the result.

Each value of insoluble glucan synthesis represents mean of duplicate.

基質からの非水溶性 glucan 生成を連続濁度法で測定した結果、基質が sucrose では PS-14 株酵素で 1 分間当たり 0.030 μ mole (glucose 当量)、6715 株酵素では、0.035 μ mole (同) の非水溶性 glucan を検出したが、sorbose では両菌株酵素例とも全くその生成を認めなかった。反応液のインキュベーションを 24 時間と延長し、生成される非水溶性 glucan をフェノール硫酸法で定量した結果では、sucrose から PS-14 株酵素で 48 μ g、6715 株酵素で 55 μ g の非水溶性 glucan を検出したが、sorbose では両菌株酵素例とも検出されなかった。菌体の平滑面付着への利用性は GTase、 3 H ラベル加熱死菌体、sucrose または sorbose などからなる反応液を screw cap vial 中で約 25 度の傾斜を保ち一昼夜インキュベート後、管壁に付着した菌体量を放射活性から求めたものである。なお、第 2 対照である GTase 無添加の反応系の測定値を、第 1 対照の sucrose 添加系および sorbose 添加系の測定値から引き実験値として示した。

sucrose を基質としたとき PS-14 株および 6715 株酵素例とも大量の菌体付着を認めたが、sorbose では両酵素例とも菌体付着は認められなかった。

6. 非水溶性 glucan 生成および菌体付着の抑制

PS-14 株および 6715 株の GTase による sucrose からの非水溶性 glucan 生成、および本菌の sucrose 依存菌体付着におよぼす sorbose の影響を実験した結果を Table 6 に示した。Table 5 の実験に用いた内容と同じ両反応液に、基質として添加した sucrose 液にその同量から 4 倍量の sorbose を追加混和した実験で、非水溶性 glucan 生成阻害が最高に認められたのは 4 倍量添加の PS-14 株酵素例であり、その阻害率は sucrose 単独の 26.7% であった。菌体付着阻害においても、最高を認めたのは両酵素とも 4 倍量添加例で 20% 程度であった。したがって、sorbose はそれらに対する顕著な阻害を示さなかった。

7. ラット齧蝕実験

Table 7 Caries scores of SPF SD rats infected with *S. mutans* PS-14 (c) and fed with a diet containing sorbose or sucrose for 58 days

Group	Diet	No. of rat	Mean caries score (mandible)			
			Buccal	Sulcal	Approximal	Total
A	56% starch	12	0	8.3±2.4	0	8.3±2.4
B	26% starch + 30% sucrose	12	8.4±2.2	71.9±2.6	1.8±0.8	82.1±4.4
C	26% starch + 30% sorbose	16	0.4±0.4	17.1±1.9	0	17.5±2.0

Values for buccal, sulcal and mean total from group C are significantly less ($p<0.01$) than those from group B.

ラットに *S. mutans* PS-14株を経口感染させ、diet 2000の56% sucrose をA群は同量の starch で(第2対照)、B群は26% starch と30% sucrose で(第1対照)、C群は26% starch と30% sorbose で、それぞれ置き換えた飼料で58日間飼育した下顎の群別平均齲蝕スコアと標準誤差を、Table 7 と Fig. 1 に示した。第1対照である sucrose 加飼料のB群における平均齲蝕スコアは頰側平滑面 8.4 ± 2.2 、咬合面小窩裂溝 71.9 ± 2.6 、隣接面 1.8 ± 0.8 で合計 82.1 ± 4.4 と高い値を示した。sorbose 加飼料のC群は頰側平滑面 0.4 ± 0.4 、咬合面小窩裂溝 17.1 ± 1.9 、隣接面0で合計 17.5 ± 2.0 と sucrose 飼料群と比較して顕著に低い値を示した。両群間の差は、頰側平滑面、咬合面小窩裂溝および合計において有意($p<0.01$)であった。sucrose 添加のB群の齲蝕スコアを100とすると、sorbose 添加のC群は21.3で78.7%の齲蝕抑制率を認めた。また、第2対照群である56% starch を含む基礎飼料で飼育したA群の平均齲蝕スコアは 8.3 ± 2.4 であり、その値をB、C群から差引き添加した糖について比較すると、sorbose は sucrose に対して87.6%の齲蝕抑制を認めた。なお、Fig. 1 の斜線部分は sorbose 飼料群と比較して sucrose 飼料群の増加した平均齲蝕スコアを示している。

考 察

砂糖は食生活において広く安定して使用されている主要な甘味料である。しかし、近年に至り食品工業上の理由以外に過剰摂取による肥満や、糖尿病、循環器障害の一因となるなど砂糖がもつ医学的短所²⁰⁾が明らかにされ、最近における国民の低甘味嗜好も相まって、その価値観に変化がみられている。歯科領域でも砂糖が齲蝕罹患に大きな影響を与えていることは周知の事実であり、これらの医学的理由から砂糖に代りうる甘味料が強く望まれている。現在、非齲蝕原性ないし低齲蝕原性糖類としては sorbitol¹⁴⁻¹⁶⁾, xylitol^{7,15,17)}, maltitol^{3,6,18)}, ery-

Fig. 1 Mandibular mean total caries score of SPF rats fed with a diet containing sucrose or sorbose

thritol¹²⁾などの糖アルコール類、coupling sugar⁴⁾, fructooligosaccharide¹³⁾, palatinose^{19,20)}など少糖類および配糖体である stevioside⁵⁾などが報告されている。それらは前述したように甘味度と甘味の質、価格あるいは食品工業的理由などで、砂糖と比較すればいくつかの劣る性状をもっている。したがって、食品への利用は他の甘味料と併用してそれらの欠点を補っているが、用途はある程度限定され、より良質の甘味料が必要と思われる。

Sorbose については、唾液および歯垢を用いての pH 測定試験^{21,30)}、非水溶性 glucan への合成性³¹⁾、Osborne-Mendel ラットを使用しての齲蝕実験³²⁾などで、その基質としての齲蝕原性程度が報告されている。しかし、これらの報告は、個々の特定因子に対する齲蝕原性を明らかにしたことで意義があるものの、各報告は供試菌株を含めた実験方法に異があり、sorbose の齲蝕原性を総合的に判断するには、一連の系統的研究が必要と思われる。本研究は、この目的のため当教室で長年改善を行ってきた一連の系統的研究方法を使用して、sorbose が sucrose と比較して齲蝕になりにくい糖である証拠を、現在の齲蝕病因論に基づいて検討した。

sorbose は、供試した *S. mutans* 群のすべての血清型菌株により発育のための炭素源として利用されず、乳酸生成にも基質として利用されず、供試した7菌種の口腔細菌によっても乳酸へ代謝されなかった。これらの結果は、Bibby ら³⁰⁾の供試歯垢を1% sorbose 溶液に混

和し20分後の pH がほとんど変化しなかったことを支持するものである。さらに、著者らの実験で *S. mutans* 群各血清型菌株による人工歯垢形成にも利用されず、血清型 *d, g, h* 菌株への菌体凝集性も認められなかった。なお、供試した BHT 株は歯垢形成能と菌体凝集性を欠如しており、血清型 *d, g, h* 菌株以外の教室保存 *S. mutans* 群菌株も、長年人工的に保存されたためか、菌体凝集性を欠如した菌株となっている。また、sorbitose は、*S. mutans* PS-14株 (*c*) と *S. sobrinus* 6715株 (*g*) の GTase により非水溶性 glucan へ生成されず、同物質が関与する平滑面への本菌体付着にも基質として利用されなかった。これらの *in vitro* 実験結果は、sorbitose が基質として非齲蝕原性であることを強く示唆している。また、sucrose 依存の非水溶性 glucan 生成および平滑面への菌体付着に対する阻害作用は顕著でなかった。この結果は Imai ら³¹⁾の報告と類似しており、両阻害作用は maltose⁹⁾, palatinose²⁰⁾, maltosylsucrose^{4), 9)}, lactulose⁹⁾, nystose¹³⁾ などの少糖類に認められているので、単糖類である sorbitose にはその明らかな作用がないと思われる。

一方、ラットを用いた *in vivo* 実験において、sorbitose 飼料群の平均齲蝕スコア17.5は、第1対照である sucrose 飼料群の平均齲蝕スコア82.1と比較して、顕著に齲蝕が抑制（抑制率78.7%）されその差は有意（ $p < 0.01$ ）であった。しかし、同スコアは第2対照である sucrose 無添加の starch 飼料群の平均齲蝕スコア8.3よりも高かった。このことは、Lohmann ら³²⁾の無菌ラットに *L. casei* を感染し sorbitose 含有飼料で飼育した実験において、顕著に齲蝕が誘発されたこと、また、sorbitose が *L. casei* により発酵され乳酸を生成すること、および著者らの発育試験においても sorbitose 含有培地で *L. casei* を18時間培養後 glucose と比較して約56%程度の発育が認められたことなどから、ラット歯垢中の *Lactobacillus* 属菌が何らかの影響をおよぼしていることも推定される。しかし、実験方法で述べた著者らの同菌 resting cell を用いた乳酸生成試験では sorbitose から乳酸生成が認められていない。また、ヒトにおいては *Lactobacillus* 属菌の歯垢からの分離頻度はきわめて低く、齲蝕を初発させる原因にはならないものと考えられている³⁴⁾。

以上の *in vitro* およびラット齲蝕実験結果から、sorbitose は非齲蝕原性に近い低齲蝕性糖類と判断される。sorbitose は sucrose の80~90%の甘味度を持ち、テイリングおよび吸湿性のない熱に安定な白色の結晶体であ

る。糖尿病や肥満などに対する低エネルギー甘味料、および食品素材³⁵⁾（バルキングエージェント）としての用途開発が行われている。加えて、非齲蝕原性に近い低齲蝕原性甘味料としてかなり広範囲の利用が期待される。

結 論

sorbitose の基質としての齲蝕原性を現在の病因論に基づき、齲蝕の主要原因菌である *Streptococcus mutans* 群および7菌種の口腔細菌を用い *in vitro* と *in vivo* で実験し、次の結果を得た。

sorbitose は：

1. 供試した *S. mutans* 群のすべての血清型 (*a~h*) 菌株によりエネルギー源として利用されず、発育を認めなかった。他の口腔細菌では、*Lactobacillus* 属菌が多少の発育を認めた以外、*S. mutans* 群以外の *Streptococcus* 属菌、*Actinomyces* 属菌の供試菌株により発育のために利用されなかった。
2. *S. mutans* 群を用いて行った試験管内歯垢形成実験で、各血清型菌株とも歯垢の形成は認められなかった。また、菌体凝集作用も認めなかった。
3. *S. mutans* 群の各菌種をはじめ歯垢の優勢菌である *S. sanguis*, *S. mitior*, *A. viscosus*, *A. naeslundii*, 象牙質齲蝕の主要原因菌である *L. casei*, *L. acidophilus*, その他 *S. salivarius* により乳酸への生成は認められなかった。
4. *S. mutans* 群菌株の glucosyltransferase により非水溶性 glucan への合成は認められなかった。さらに、同反応が関与する本菌体の平滑面への付着にも基質として利用されなかった。
5. *S. mutans* 群菌株の GTase による sucrose 依存の非水溶性 glucan 合成と菌体付着を抑制する作用は、顕著でなかった。
6. ラット齲蝕実験において、sorbitose 飼料群の平均齲蝕スコアは 17.4 ± 2.0 であり、対照の sucrose 飼料群の同スコア 81.9 ± 4.4 と比較して顕著に齲蝕が抑制され、その差は有意（ $p < 0.01$ ）であった。

以上の実験結果から、sorbitose は非齲蝕原性に近い低齲蝕原性糖類と認める。

文 献

- 1) Loesche, W. J.: Role of *Streptococcus mutans* in human dental decay, Microbiol. Rev., 50 ; 353-380, 1986.
- 2) 池田 正：齲蝕の病因，歯界展望，74 ; 1107-1115, 1989.

- 3) 武笠寿彦: Maltitol および SE 58 の非齲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 齲蝕誘発性, 日大口腔科学, **3**; 266-275, 1977.
- 4) 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 the effects of a coupling sugar and sucrose on certain metabolic activities and cariogenicity, *Infect. Immun.*, **19**; 477-480, 1978.
- 5) 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, **4**; 24-27, 1978.
- 6) 八木精一: *Streptococcus mutans* の insoluble glucan 生成およびエナメル質の硬度変化に及ぼす maltitol の影響, 日大口腔科学, **4**; 136-144, 1978.
- 7) 池田 正, 大竹繁雄, 渡辺千秋: Xylitol の *Streptococcus mutans* 菌体付着, 不溶性 glucan 生成への影響および代謝適応性, 日大口腔科学, **5**; 202-205, 1979.
- 8) Ikeda, T.: Sugar substitutes: Reasons and indications for their use, *Int. dent. J.*, **32**; 33-43, 1982.
- 9) 久保寺徳利: Lactulose の基質としての齲蝕原性, 口腔衛生会誌, **33**; 110-117, 1983.
- 10) 池田 正: 歯科領域から見た甘味料—う蝕予防の立場から—, 臨床栄養, **71**; 736-741, 1987.
- 11) 節 英司: Polydextrose および精製 polydextrose の基質としての齲蝕原性, 日大口腔科学, **15**; 1-11, 1989.
- 12) 川名部淳: Erythritol の基質としての非齲蝕原性, 日大口腔科学, **16**; 27-36, 1990.
- 13) Ikeda, T., Kurita, T., Hidaka, H., Michalek, S. M. and Hirasawa, M.: Low-cariogenicity of the tetrasaccharide nystose, *Gen. Pharmacol.*, **21**; 175-179, 1990.
- 14) Frostell, G., Keyes, P. H. and Larson, R. H.: Effect of various sugars and sugar substitutes on dental caries in hamsters and rats, *J. Nutr.*, **93**; 65-76, 1967.
- 15) Mühlemann, H. R., Regolati, B. and Marthaler, T. M.: The effect on rat fissure caries of xylitol and sorbitol, *Helv. Odontol. Acta*, **14**; 48-50, 1970.
- 16) Birkhed, D.: Automatic titration method for determination of acid production from sugars and sugar alcohols in small samples of dental plaque material, *Caries Res.*, **12**; 128-136, 1978.
- 17) Scheinin, A. and Mäkinen, K. K. (Ed): *Turku sugar studies I-XXI*, *Acta Odont. Scand.*, **33**(Suppl. 70): 5-348, 1975.
- 18) Rundegren, J., Koulourides, T. and Ericson, T.: Contribution of maltitol and lycasin to experimental enamel demineralization in the human mouth, *Caries Res.*, **14**; 67-74, 1980.
- 19) Maki, Y., Ohta, K., Takazoe, I., Matsukubo, Y., Takaesu, Y., Topitsoglou, V. and Frostell, G.: Acid production from isomaltulose, sucrose, sorbitol, and xylitol in suspensions of human dental plaque, *Caries Res.*, **17**; 335-339, 1983.
- 20) Ooshima, T., Izumitani, A., Sobue, S., Okahashi, N. and Hamada, S.: Non-cariogenicity of the disaccharide palatinose in experimental dental caries of rats, *Infect. Immun.*, **39**; 43-49, 1983.
- 21) Mühlemann, H. R. and Schneider, Ph.: The effect of sorbose on pH of mixed saliva and interproximal plaque, *Helv. Odontol. Acta*, **19**; 76-80, 1975.
- 22) Fukushima, K., Motoda, R. and Ikeda, T.: Effects of exogenous insoluble glucan primer on insoluble glucan synthesis by *Streptococcus mutans*, *J. dent. Res.*, **60**; 1707-1712, 1981.
- 23) Ikeda, T., Otake, S., Hirasawa, M., Williams, K., Kiyono, H., McGhee, J. R. and Shiota, T.: Virulence of *Streptococcus mutans*: Revertants of mutant C4, *Infect. Immun.*, **27**; 25-31, 1980.
- 24) Bergmeyer, H. U. (Ed): *Methods of enzymatic analysis*, Vol. III Verlag Chemie, Weinheim, 2nd English Ed., 1974, 1464-1468.
- 25) Dubois, M., Gilles, A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A. and Smith, F.: Colorimetric method for determination of sugars and related substances, *Anal. Chem.*, **28**; 350-356, 1956.
- 26) Schachtele, C. F., Staat, R. H. and Harlander, S. K.: Dextranase from oral bacteria: inhibition of water-insoluble glucan production and adherence to smooth surfaces by *Streptococcus mutans*, *Infect. Immun.*, **12**; 309-317, 1975.
- 27) Bray, G. A.: A simple efficient liquid scintillator for counting aqueous solutions in a liquid scintillation counter, *Anal. Biochem.*, **1**; 279-285, 1960.
- 28) Keyes, P. H. and Jordan, H. V.: Periodontal lesions in the syrian hamster-III. Findings related to an infections and transmissible component, *Archs oral Biol.*, **9**; 377-400, 1964.
- 29) 関本 博, 松谷芳英, 森本悦司: 砂糖摂取と血

- 管障害, 糖尿病学, 診断と治療社, 東京, 1986, 162-185.
- 30) Bibby, B. G. and FU, J.: Changes in plaque pH *in vitro* by Sweeteners, J. dent. Res., **64**; 1130-1133, 1985.
 - 31) Imai, S., Takeuchi, K., Shibata, K., Yoshikawa, S., Kitahata, S., Okada, S., Araya, S. and Nisizawa, T.: Screening of sugars inhibitory against sucrose-dependent synthesis and adherence of insoluble glucan and acid production by *Streptococcus mutans*, J. dent. Res., **63**; 1293-1297, 1984.
 - 32) Mühlemann, H. R.: The effects of a sorbose/sucrose diet on experimental caries and body weight gains, Helv. Odontol. Acta, **86**; 1339-1345, 1976.
 - 33) Lohmann, D., Gehring, F. and Karle, E.: J.: Fermentation of L-sorbose by microorganisms of the human dental plaque, Caries Res., **15**; 263-271, 1981.
 - 34) Ikeda, T., Sandham, H. J. and Bradley, Jr. E. L.: Changes in *Streptococcus mutans* and Lactobacilli in plaque in relation to the initiation of dental caries in negro children, Archs oral Biol., **18**; 555-566, 1973.
 - 35) Furuse, M., Tamura, Y., Matsuda, S., Shimizu, T. and Okumura, J.: Lower fat deposition and energy utilization of growing rats fed diets containing sorbose, Comp. Biochem. Physiol., **94A**; 813-817, 1989.