

学位研究紹介

乳歯歯垢から分離された細菌による代用糖代謝

Acid production from palatinose, palatinit, erythritol and maltitol by bacteria isolated from dental plaque on human deciduous teeth

新潟大学歯学部小児歯科学講座

松山 順子

Department of Pediatric Dentistry,
Niigata University School of Dentistry

Junko Matsuyama

1. 目的

近年、齲蝕予防を目的として、低または非齲蝕誘発性と呼ばれる砂糖に代わる糖質（代用糖）が開発され様々な食品に添加されている。このような代用糖の摂取は、歯垢細菌叢にどのような影響を及ぼすのであろうか。歯垢はそれぞれに特有な酵素活性を持った多種類の細菌の集まりであり、齲蝕の発生にはこれらの細菌が複雑に関与している。代用糖を長期間にわたって頻繁に摂取した場合、歯垢中で代用糖を代謝基質として利用する細菌が選択されたり、従来発現していなかった酵素が誘導されることにより、歯垢の細菌叢が代用糖に適応して変化が生じ、代用糖を分解しやすい状態になることが考えられる。このような代用糖摂取が細菌叢へ及ぼす影響を検討

することは非常に重要である。

本研究では、乳歯歯垢を構成する細菌を明らかにすると共に、それらの細菌による代用糖代謝について検討することを目的とした。

2. 代用糖の分類

代用糖は、その化学構造から糖質を還元した構造をもつ糖アルコール、単糖類の分子が結合してできたオリゴ糖、非糖質性の甘味料に分類される。糖アルコールには maltitol, palatinit, erythritol, lactitol, xylitol, sorbitol などが、オリゴ糖には palatinose などがある。今回の実験には palatinose, palatinit, erythritol, maltitol の4種類の代用糖を用いた。

3. 乳歯歯垢の細菌学的検討

乳歯の歯垢を構成する細菌を調べる目的で、以下の実験を行った。3名の乳歯平滑面から採取した歯垢を、40 mM リン酸緩衝液1ml 中で分散・均一化し、同緩衝液で連続10倍希釈後、各希釈液100 μ l を Brain Heart Infusion 血液寒天平板に接種した。これを37 $^{\circ}$ C で1週間培養後、100個以下のコロニーが生育した平板からすべての細菌を分離し、それぞれの細菌を同定した。一連の操作は、厳密に管理された嫌気グローブボックス中で行った。

3名の歯垢から優勢に分離された細菌は合計 146株で（表1）、そのうち *Actinomyces* 95株(65%)、*Lactobacillus* 14株(10%)、*Streptococcus* 13株(9%)、*Veillonella* 11株(7%)、*Propionibacterium* 8株(5%)、*Peptostreptococcus* 3株(2%)、*Bifidobacterium* 1株(1%)であった。表2はこれらの細菌を、さらに細菌種のレベルまで同定した結果である。この結果から、乳歯の歯垢細

表1 乳歯平滑面の歯垢から分離された細菌

	Sample No.			合計
	1	2	3	
歯垢の質重量(mg)	1.05	0.73	0.68	
CFUs/mg	2.9 \times 10 ⁷	2.7 \times 10 ⁸	1.4 \times 10 ⁷	
分離菌数	30	20	96	146(100%)
<i>Actinomyces</i>	15	13	67	95(65%)
<i>Lactobacillus</i>	0	3	11	14(10%)
<i>Streptococcus</i>	2	1	10	13(9%)
<i>Veillonella</i>	4	0	7	11(7%)
<i>Propionibacterium</i>	5	2	1	8(5%)
<i>Peptostreptococcus</i>	3	0	0	3(2%)
<i>Bifidobacterium</i>	1	0	0	1(1%)
Not identified	0	1	0	1(1%)

表2 乳歯歯垢から分離された細菌種

<i>Actinomyces</i>	95
<i>A. israelii</i>	48
<i>A. naeslundii</i>	20
<i>A. meyeri</i>	13
<i>A. viscosus</i>	9
<i>A. odontolyticus</i>	5
<i>Lactobacillus</i>	14
<i>L. salivarius</i>	5
<i>L. crispatus</i>	5
<i>L. brevis</i>	3
<i>L. sp</i>	1
<i>Streptococcus</i>	13
<i>S. intermedius</i>	6
<i>S. salivarius</i>	4
<i>S. mitis</i>	1
<i>S. sanguis</i>	1
<i>S. parasanguis</i>	1
<i>Veillonella sp.</i>	11
<i>Propionibacterium</i>	8
<i>P. propionicum</i>	5
<i>P. avidum</i>	2
<i>P. acidi-propionici</i>	1
<i>Peptostreptococcus</i>	3
<i>Ps. micros</i>	3
<i>Bifidobacterium</i>	1
<i>B. magnum</i>	1
Not identified	1
Total isolates	146

表3 代用糖を分解して酸を産生する細菌数 (割合)
(分離菌146株中)

	酸産生性(pH)		
	5.5以下	5.5-6.0	6.0以上
palatinose	48(33%)	57(39%)	41(28.0%)
palatinit	17(12%)	29(20%)	100(68%)
erythritol	2(1%)	12(9%)	132(90%)
maltitol	0	9(5%)	137(95%)

菌叢は多種類の細菌で構成されていること、さらに乳歯の歯垢細菌叢を構成する主な細菌は *Actinomyces* であることが示された。

これらの細菌のうち、約90%は糖分解性(glucoseを分解して酸を産生する性質)の細菌で、いずれも齲蝕の発生に関与していると考えられている。細菌による代用糖からの酸産生性の評価には、*S. mutans* などの特定の細菌種を用いることが多いが、歯垢を構成する様々な細菌による代用糖からの酸産生性を検討する必要がある。

4. 歯垢を構成する細菌による代用糖からの酸産生性

そこで前述の実験により得られた細菌が、代用糖を分解して酸を産生する能力があるか否かを、以下の実験により調べた。分離菌146株を、palatinose, palatinit, erythritol, maltitolを1%添加した4種類の Peptone Yeast extract (PY)液体培地に接種し、1週間嫌気培養後の培地のpHを測定した。pHが5.5以下に低下したものは、代用糖を分解して酸を産生する能力のある細菌である。

146株中、palatinose分解菌は48株(全菌株の33%)で、*A. naeslundii*, *A. viscosus*, *A. israelii*, *L. salivarius*, *L. crispatus*, *P. acidi-propionici*, *P. avidum*, *S. intermedius*であった。palatinit分解菌は17株(12%)で、*A. israelii*, *A. naeslundii*, *A. viscosus*, *L. salivarius*, *P. acidi-propionici*, *S. intermedius*であった。erythritol分解菌は2株で、*A. viscosus*, *A. israelii*であった。maltitol分解菌は認められなかった。4種類の代用糖を比較すると、分解菌の割合はpalatinoseが最も多く、次いでpalatinitが多かったが、erythritol, maltitol分解菌はほとんど存在しなかった。これより二糖類であるpalatinoseに比べて、糖アルコールは分解されにくいことが示唆された。

5. palatinose分解酵素活性の測定

最も多かったpalatinoseを分解する *Actinomyces* について、そのpalatinose代謝について検討を行った。palatinoseまたはglucoseを添加したPY液体培地で培養した菌株を集菌し、Tris-HCl緩衝液中で超音波にて破碎したcell-free extractを用いてpalatinose分解酵素活性の測定を行った。一連の操作はすべて嫌気状態にて行った。palatinose培養による菌体の酵素活性は0.78 mU/mg protein, glucose培養による菌体の酵素活性は0.47mU/mg proteinであった。glucose培養菌体でも酵素活性が認められたことから、palatinose分解酵素は完全な誘導酵素ではなくもともと *Actinomyces* の菌体内に存在しているものの、palatinoseで培養することにより活性が高まると考えられた。

これを実際の口腔内にあてはめて考えてみると、代用糖を長期間にわたって頻繁に摂取することにより、代用糖の分解性=代用糖からの酸産生性が高まることが示唆された。

6. まとめ

多種類の細菌により構成される歯垢中には代用糖を分解する能力をもった細菌が存在すること、代用糖の構造によって分解性が異なっていることが明らかとなった。また、代用糖の種類によって、歯垢が代用糖に適応し酸産生能が高まることが示唆された。代用糖を使用するにあたっては、このような細菌叢の変化を考慮し、長期間にわたって頻繁に摂取しないなどの注意が必要であると同時に、それぞれの代用糖がもつ特徴を生かしながら利用していくこと大切であると考えられた。