



Title	D-プシコースのミュータンス菌に対するう蝕原生抑制効果についての検討
Author(s)	
Citation	令和5（2023）年度学部学生による自主研究奨励事業研究成果報告書．2024
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/95176
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

令和5年度大阪大学未来基金「学部学生による自主研究奨励事業」研究成果報告書

ふりがな 氏名	ささき たいせい 佐々木 大誠	学部 学科	歯学部 歯学科	学年	3 年
ふりがな 共同 研究者氏名		学部 学科		学年	年
					年
					年
アドバイザー教員 氏名	歯学研究科 仲野 和彦	所属	歯学研究科 小児歯科学講座		
研究課題名	D-プシコースのミュータンス菌に対するう蝕原生抑制効果についての検討				
研究成果の概要	研究目的、研究計画、研究方法、研究経過、研究成果等について記述すること。必要に応じて用紙を追加してもよい。(先行する研究を引用する場合は、「阪大生のためのアカデミックライティング入門」に従い、盗作剽窃にならないように引用部分を明示し文末に参考文献リストをつけること。)				

研究目的

・着想に至った経緯

ミュータンス菌は、菓子に多く含まれている砂糖（スクロース）から不溶性グルカンを形成して歯質に付着し、スクロースを代謝して酸を産生することでう蝕（むし歯）の原因となる。このため、う蝕罹患リスクを下げる一端として砂糖を使用しない菓子が流通しており、その多くは人工甘味料が含有されている。しかし、人工甘味料は多量摂取による心血管疾患リスクの上昇が報告されていることから、ミュータンス菌によって代謝されないことでう蝕を誘発しないだけでなく、全身への影響が少ない甘味料である希少糖に興味を持った。希少糖に関する情報収集を行う中で、血糖値上昇抑制作用や抗肥満作用を有する D-プシコースに着目し、ミュータンス菌に対するう蝕原性抑制効果について分析することとした。

・何をどこまで明らかにしようとするのか

ミュータンス菌に対するう蝕病原性抑制効果として、ミュータンス菌の増殖能に対する抑制効果が挙げられる。また、ミュータンス菌は不溶性グルカンをもとにバイオフィルムを形成して歯に定着することから、ミュータンス菌のバイオフィルム形成能に対する抑制効果もう蝕病原性抑制効果の1つといえる。本研究では、D-プシコースがミュータンス菌増殖能およびバイオフィルム形成能をはじめとするう蝕病原性の抑制効果を有するかどうかを明らかとすることを目的としている。

・本研究の特色・予想される結果と意義

D-プシコースは 1990 年代に発見されたケトースに属する D-フラクトースの異性体で、次世代の希少糖である。D-プシコースの代謝機序など全身への影響は報告されているが、ミュータンス菌に対するう蝕病原性抑制効果についての報告はほとんどないことから、本研究は独自性および新規性が高いと言える。さらに、本研究を行うことで D-プシコースのう蝕病原性抑制効果を実証することによって、D-プシコースを使用して生産された食品の市場への流通へとつながる可能性が期待できる。さらに、D-プシコースの使用を啓発することでう蝕の罹患リスクを下げるだけでなく、糖尿病や肥満をはじめとする生活習慣病の予防一助となりたいと考えている。

研究計画および研究方法

D-プシコースのミュータンス菌に対するう蝕病原性抑制効果を検討するために、増殖抑制効果およびバイオフィーム形成能の抑制効果を吸光度を測定することにより分析する。また、バイオフィーム形成性能の分析に関しては、ミュータンス菌が形成したバイオフィームを共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察する。

① D-プシコースのミュータンス菌に対する増殖抑制効果の分析

Brain Heart Infusion(BHI) 液体培地を用いて 37℃ で 18 時間培養したミュータンス菌を 1.0×10^3 CFU/mL 相当の菌液となるように調整した。次に、これらの菌液に D-プシコースを 0%、0.01%、0.1%、1%および 10%の濃度になるように添加した。その後、37℃ で 3、6、12 および 24 時間培養し、各時間ごとに 550nm の波長で吸光度をそれぞれ 4 回ずつ測定して D-プシコースが作用したミュータンス菌の増殖能を評価した。

② D-プシコースがミュータンス菌のバイオフィーム形成能に及ぼす抑制効果の分析

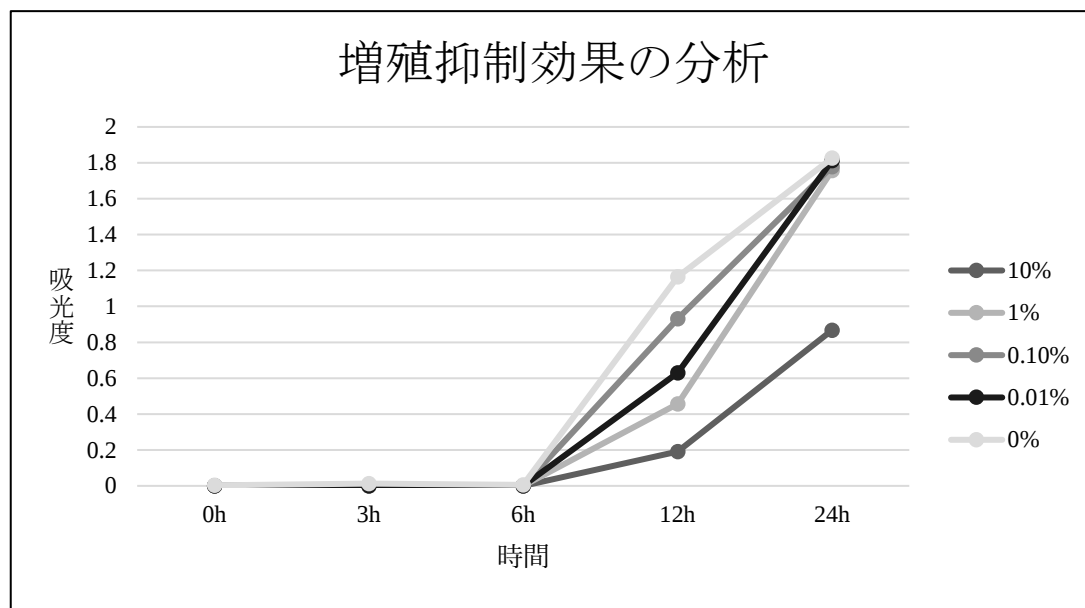
BHI 液体培地を用いて 37℃ で 18 時間培養したミュータンス菌を 3000rpm、4℃ で 10 分間遠心分離することにより集菌した。ミュータンス菌を 0.25%スクロース含有 BHI 液体培地を用いて 1.0×10^6 CFU/mL になるよう調整し、0%、0.01%、0.1%、1%および 10%の各濃度になるよう D-プシコースを添加したものを準備した。一方で、健常者より採取し唾液を滅菌蒸留水で 25%の濃度となるよう調整し、孔径 0.45μm のフィルターを用いてろ過したものを 96 ウェルのマイクロタイタープレートに 200μL ずつ分注して 37℃ で 2 時間静置した。各ウェルからヒト唾液を取り除いた後、調整した菌液を 200μL ずつ分注し、37℃ にて 18 時間培養した後プレートを Phosphate-buffered saline(PBS) を用いて 3 回洗浄し、形成されたバイオフィームを 25%ホルムアルデヒドにより 10 分間固定後、各ウェルに 0.05%クリスタルバイオレット水溶液を 200μL ずつ分注し 5 分間室温で染色した。染色後プレートを PBS を用いて 3 回洗浄し、バイオフィームを 95%エタノールを用いて溶解させた後にマイクロプレートリーダーを用いて各ウェルの 595nm の波長の吸光度をそれぞれ 4 回ずつ測定して D-プシコースが作用したミュータンス菌のバイオフィーム形成能を評価した。統計学的分析は GraphPad Prism ソフトの Ordinary one-way ANOVA を用いた。

③ 共焦点レーザー顕微鏡による D-プシコースが作用したミュータンス菌のバイオフィームの観察

10mL の BHI 液体培地にて 37℃ で 18 時間培養したミュータンス菌を 3000rpm、4℃ で 10 分間遠心分離することにより集菌して、0%もしくは 10%の濃度になるよう D-プシコースを添加した 0.25%スクロース含有 BHI 液体培地を用いて 1.0×10^6 CFU/mL になるよう調整した。一方で、健常者より採取した唾液を滅菌蒸留水で 25%の濃度となるよう調整し、孔径 0.45μm のフィルターを用いてろ過したものを 8 ウェルのチャンバースライドに 200μL ずつ分注して 37℃ で 2 時間静置した。チャンバースライドからヒト唾液を取り除いた後に、各ウェルに調整した菌液を 200μL ずつ分注して 37℃ で 18 時間培養した。その後、形成されたバイオフィームを 25%ホルムアルデヒドにより 15 分間固定後、Hanks' Balanced Salt Solution(HBSS) を用いて 1 回洗浄し、各ウェルに 0.5%の 10mM Hexidium Iodide 水溶液を 200μL ずつ分注して遮光した状態で 15 分間室温で染色した。染色後チャンバースライドの各ウェルを HBSS を用いて 1 回洗浄し、浮遊液を取り除き、HBSS を 200μL 加えたチャンバースライドに形成されたバイオフィームを、543nm の波長のレーザー光線を検出する共焦点レーザー स्क्यान顕微鏡 LSM-510 の 63×油浸対物レンズにて観察した。

研究経過および研究結果

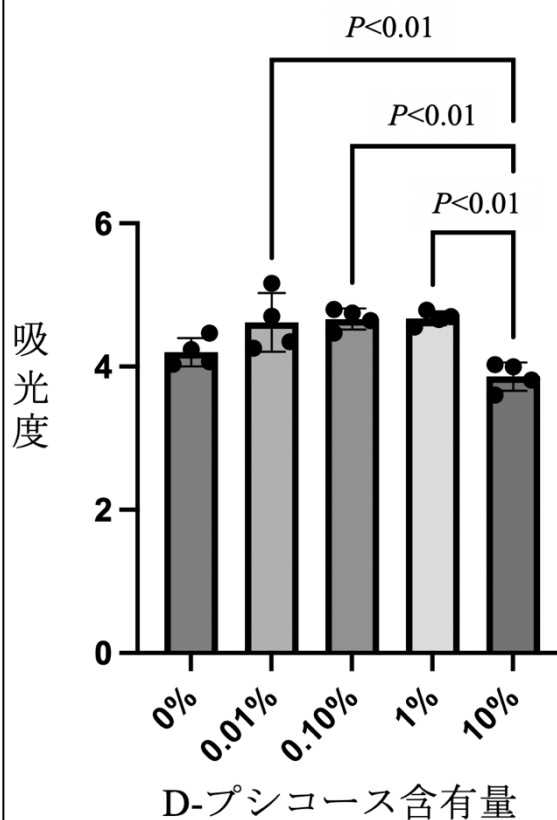
① D-ブシコースのミュータンス菌に対する増殖抑制効果を分析した結果、下図に示す通り、6 時間経過時までは添加した D-ブシコースの濃度に関係なく吸光度は 0 に近い値を示し、ミュータンス菌の増殖は認められなかった。一方で、12 時間経過時においては D-ブシコースの濃度が高いほど吸光度は低値を示した。さらに、24 時間経過時においては、10%の濃度の D-ブシコースを添加した場合、0%、0.01%、0.1%、1%の濃度になるよう D-ブシコースを添加した場合と比較して吸光度は低値を示した。吸光度が低いほどミュータンス菌の増殖が抑制されていることを示すため、本結果から、10%の濃度の D-ブシコースはミュータンス菌に対して増殖抑制効果を示すことが明らかとなった。



② D-ブシコースがミュータンス菌のバイオフィルム形成能に及ぼす抑制効果を分析した結果、右図に示す通り、10%の濃度の D-ブシコースを添加した場合 0%、0.01%、0.1%、1%の濃度になるよう D-ブシコースを添加した場合と比較して吸光度の値が有意に低い値を示した。吸光度の値が低いほどミュータンス菌のバイオフィルム形成が抑制されていることを示すため、本結果から 10%の濃度の D-ブシコースはミュータンス菌のバイオフィルム形成能を抑制することが示された。

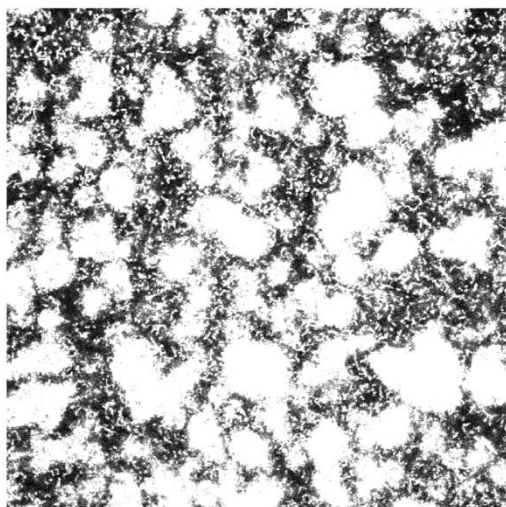
③ 0%および 10%の各濃度の D-ブシコースを作用させたミュータンス菌が形成したバイオフィルムを共焦点レーザー顕微鏡により観察した結果、次項の図に示す通り、0%と比較して 10%の濃度の D-ブシコースを作用させたミュータンス菌はバイオフィルムの形成量が少なく、10%の濃度の D-ブシコースが作用することでミュータンス菌のバイオフィルムの形成が抑制されることが示された。

バイオフィルム抑制効果の分析

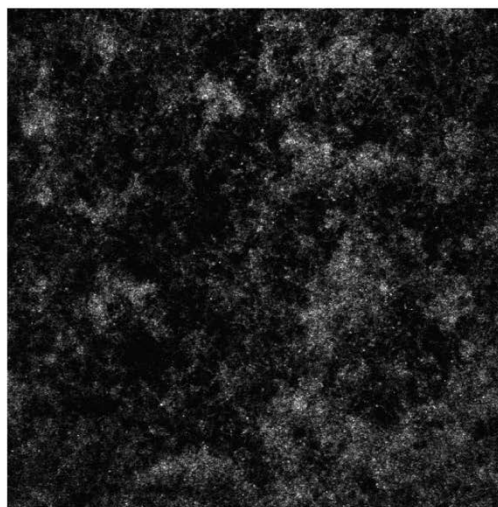


ミュータンス菌が形成したバイオフィルムの共焦点レーザー顕微鏡像

D-ブシコース 0%



D-ブシコース 10%



白の部分がミュータンス菌が形成したバイオフィルムを示す

上記結果から、10%の濃度の D-ブシコースはミュータンス菌のう蝕病原性因子である増殖能を抑制するだけでなく、ミュータンス菌のバイオフィルム形性能を抑制することが示されたため、10%の濃度の D-ブシコースを含有する食品は、一般的に甘味料として食品に添加されているスクロースを含有する食品と比較してう蝕病原性が低い可能性が示された。D-ブシコースのう蝕病原性抑制効果さらに詳細に分析するため、10%より高濃度の D-ブシコースをミュータンス菌に作用させた場合にミュータンス菌の増殖能およびバイオフィルム形性能はどのような影響を受けるのか検討する必要があると考えている。

参考文献

- Nomura, R., Y. Morita, S. Matayoshi and K. Nakano. 2018. Inhibitory effect of surface pre-reacted glass-ionomer (S-PRG) eluate against adhesion and colonization by *Streptococcus mutans*. Sci. Rep. 8, 5056.
- Nomura, R., J. Ohata, M. Otsugu, R. Okawa, S. Naka, M. Matsumoto-Nakano and K. Nakano. 2021. Inhibitory effects of flavedo, albedo, fruits, and leaves of *Citrus unshiu* extracts on *Streptococcus mutans*. Arch. Oral Biol. 124, 105056.
- Nomura, R., J. Ohata, M. Otsugu, R. Okawa, S. Naka, M. Matsumoto-Nakano and K. Nakano. 2021. Inhibitory effects of flavedo, albedo, fruits, and leaves of *Citrus unshiu* extracts on *Streptococcus mutans*. Arch. Oral Biol. 124, 105056.
- Yuto, S., R. Nomura, S. Matayoshi, M. Otsugu, N. Iwashita, K. Nakano. 2022. Evaluation of the collagen-binding properties and virulence of killed *Streptococcus mutans* in a silkworm model. Sci. Rep. 12(1), 2800.