Streptococcus mutans における
サイクロデキストランの齲蝕抑制
機能とその役割の解明

岡山大学大学院医歯薬学総合研究科　社会環境生命科学専攻

小児歯科学分野

浅海　春華

(令和 3 年 12 月 10 日受付)

緒言

Streptococcus mutans は，グラム陽性通性嫌気性細菌であり，ヒトロ腔内に存在する，齲蝕の原因菌である[1]. その表層にはその病原性に関与するタンパク構成成分が多数存在し，グルコシルトランスフェラーゼ (Glucosyltransferase ; GTF), 高分子タンパク抗原 *c* (Protein Antigen *c* ; PA*c*)，グルカン結合タンパク質 (Glucan binding protein ; Gbp) などが知られている. PA*c* がペリクル中の唾液成分と疎水結合することで，*S. mutans* は歯面に吸着し[2]，菌が自ら産生する GTF がスクロースからグルカンを合成することにより *S. mutans* 同士が付着し[3]，さらにそのグルカンと Gbp が結合することによって *S. mutans* と歯面の付着を強固にし, 堆積することでバイオフィルムが成立する[4]. 成熟したバイオフィルム中で, *S. mutans* がさらにスクロースを分解し，酸を産生することによって歯の表面が脱灰され，齲蝕発生の端緒となる[5].

GTF には GTFB, GTFC, および GTFD の 3 つのタイプが存在し，それぞれをコードする遺伝子 *gtfB*，*gtfC*，および *gtfD* がクローニングされ，それらの塩基配列が決定されている[6]. GTF によって合成されるグルカンは α-1,6 結合と α-1,3 結合を持つ. α-1,6 結合の多いグルカンは水溶性になり，α-1,3 結合の多い

グルカンは非水溶性となる[7]. GTFB は菌体表面に結合して存在し，スクロースから分解されて生成したグルコースを，α-1,3 結合することで非水溶性グルカンを合成する. GTFC も同様に菌体表面に結合して存在し，非水溶性グルカンを合成するが，グルコースが α-1,6 結合した水溶性のグルカンも混在している[8]. GTFD は培養上清中に分泌され，グルコースが α-1,6 結合した水溶性グルカンを合成する[9]. これら 3 つの GTF が相互に作用することが, バイオフィルム形成に重要である[10].

GTFB には 2 つの機能ドメインが存在する[11]. 酵素活性の中心となる触媒領域である Catalytic domain (CAT) にスクロースが結合し，グルコースとフルクトースに分解される. そして，生じたグルコースはグルカン結合領域である Glucan binding domain (GBD) に転移し，2 個以上のグルコースが結合することによってグルカンが合成される (図 1)[12].

齲蝕を予防するためには，スクロースの代わりとなる代用糖の利用があげられる[13]. 代用糖の中でも糖質系甘味料は，スクロース構造異性体，糖アルコール類, およびオリゴ糖類の大きく 3 つに分類される[14]. スクロース構造異性体は, 分解されても酸をほとんど産生しないことがわかっており，スクロースと同量

のエネルギーが得られる．しかし，甘味度はスクロースの半分である[15]。糖アルコール類については，酸産生性はないが，多量に摂取すると下痢を起こすことが知られているため，摂取量に充分気を付ける必要がある[16]．オリゴ糖は胃や小腸で消化，吸収されにくい難消化性の性質を持ち，腸内環境を整える効果がある．また，自然界に存在する食品の中にオリゴ糖は存在するものであるため，代用糖としては有効な使い方ができると考えられている．しかし，多量に摂取すると腹部膨満感や下痢を起こすことが知られている[17]．このようにこれらの代用糖にはそれぞれ長所と短所があり，栄養価の高い新しい代替食品を開発し，代用糖を含む食品の種類を増やすことは，齲蝕予防及び口腔衛生管理においての今後の課題である[18]．

オリゴ糖は単糖が 2 個から 10 個重合した糖質を示す[19]．そのなかでも環状オリゴ糖として，サイクロデキストリン (cyclodextrin ; CD) が広く用いられており，6-8 個のグルコースが α-1,4 結合で環状に連結した構造を示す[20]. CD は，環状の内側が疎水性，外側が親水性であることから，包接性を持つ[21]．包接性とは，他の原子や分子を取り込み，光や熱，酸から保護することであり，疎水性分子を水に溶けやすくする働きもあるため，この性質をもつ CD は医薬品，化粧

品，食品および繊維産業などで多くの用途がある [22]. しかし，この CD では包接できない難溶性物質があり，これらの難溶性物質を包接する新規の環状オリゴ糖を開発する過程で発見されたものが，サイクロデキストラン (Cycloisomaltooligosaccharide；CI) である [23]. *Bacillus circulans* T-3040 株をデキストランを含む培地で培養すると，シクロイソマルトオリゴ糖グルカノトランスフェラーゼ (CITase) の発現が誘導，分泌される [24]. CI は CITase がデキストランの分子内糖鎖転移反応を触媒することで合成される [25].

CI は 7 ~ 12 個のグルコースが α-1,6 結合で環状に連結した構造を示す [26]. 結合様式の違いから, CD と CI では同じ数のグルコース分子が結合しても環の径が CI の方が大きく，極めて高い水溶性を示す [27]. CI には難溶性物質可溶化作用，抗ヒト免疫不全ウイルス作用，抗潰瘍作用，そして抗齲蝕作用が認められており，多機能オリゴ糖であると考えられる [28]. CI はスクロースと同時に存在すると，GTF の働きを阻害することで非水溶性グルカンの合成を抑制し，抗齲蝕作用を示す可能性が示唆されている [23]. しかしながら, その詳細なメカニズムはいまだ明らかとなっていない.

本研究では，CI の齲蝕に対する効果を調べるために，*S. mutans* の菌体表層に

ある GTFB のリコンビナントタンパクを作成し，CI の酵素活性阻害様式の検討とバイオフィルム形成に対する影響について検討した．さらにラット齲蝕実験モデルにて，CI の齲蝕発症に対する効果を検討した．

材料と方法

１．供試菌株と培養条件

日本人小児の口腔より分離された *S. mutans* MT8148 株 [29] を用いた．本研究に用いたプラスミドを表 1 に示す. *S. mutans* の培養には Brain Heart Infusion (BHI) 液体培地 (Becton Dickinson and Company，Franklin Lakes，NJ，USA)と Todd Hewitt (TH) 液体培地 (Becton Dickinson and Company) を用い，37℃で静置培養した. *Esherichia coli* の培養には，Luria-Bertani (LB) 液体培地 (1％ Triptone，0.5％ Yeast Extract; Becton Dickinson and Company，0.5％ NaCl; 和光純薬，大阪) あるいはこの培地に 1.5%になるように Agar (和光純薬) を添加した LB 寒天培地を用いて培養した．必要に応じて Ampicillin (Amp) (和光純薬) を 100 μg / mL となるよう添加した.

２．リコンビナント GTFB (recombinant GTFB : rGTFB) の調製

gtfB をクローニングベクター pMW119 に挿入したプラスミド pSK6 を保有する *E. coli* XL-2 を, Amp を含む LB 液体培地で，37°C で 16 時間培養した。遠心分離により菌体を回収し，10 mM のリン酸カリウム緩衝液 (pH 6.5) (10 mM KH_2PO_4; 和光純薬，10 mM K_2HPO_4; ナカライテスク，京都) に懸濁した．その懸

濁液を Handy Sonic model UR-21P (TOMY SEIKO，LTD，東京) で超音波処理し，遠心分離により上清を rGTF として実験に供試した．

３. rCAT 断片リコンビナントタンパク発現用プラスミドの作製

供試菌を BHI 液体培地にて 37 °Cで 18 時間培養後，遠心分離し，250 μL の Glu-TE 緩衝液〔1 M グルコース，10 mM tris-hydroxymethyl-aminomethane，1 mM EDTA; 和光純薬〕に懸濁した．この懸濁菌液 250 μL に，N-acetylmuramidase SG (2.0 mg / mL; Sigma-Aldrich，St. Louis，MO，USA) とリゾチウム (10 mg / mL; 和光純薬) 0.25μL を加え，37°C で 90 分間反応させた. Puregene® Yeast / Bact. Kit B (QIAGEN Sciences，Germantown，MD，USA) を用いて DNA を抽出した. DNA 溶液は波長 260 nm で測定した吸光度をもとに濃度を調整し，使用した．

S. mutans UA159 株の *gtfB* 全塩基配列をもとに，オリゴヌクレオチドプライマー GTFB (CAT) -F と GTFB (CAT) -R を設計した (表 2). また，タンパク発現用プライマー pGEX6P-1 (CAT) -F と pGEX6P-1 (CAT) -R を設計し，上記で得られた DNA に PrimeSTAR® Max DNA Polymerase (タカラバイオ株式会社，滋賀) を加え，98℃ で 5 秒の反応後，98℃ で 10 秒，60℃ で 10 秒，72℃ で 15 秒を 29 回繰り返す PCR を行った．増幅した PCR 産物を 0.7% Agarose S (ニッ

ポンジーン，東京) を使用し，アガロース電気泳動を行った. DNA サイズマーカーは 100 bp ラダー (New England Biolabs，Bevery，MA，USA) を使用した. 泳動用のゲルをエチジウムブロマイド (1 μg / mL; 和光純薬) 溶液で 15 分間染色後, 波長 312 nm の紫外線で DNA のバンドを可視化し検出した. 泳動後のゲルを切り出し，DNA Freeze 'N Squeeze DNA Gel Extraction Spin Columns (BIO-RAD Laboratories, Hercules, CA, USA) に入れた後, 遠心分離を行った. 水層に 10 分の 1 量の 3 M 酢酸ナトリウム (pH 5.2) と 2.5 倍量のエタノールを加えて DNA を共沈させた. 70% エタノール (Sigma-Aldrich) で洗浄後，滅菌精製水に溶解した.

精製した DNA 断片を pGEX6P-1 に挿入する (図 2) ため，GeneArt™ Seamless Cloning and Assembly Enzyme Mix (Thermo Fisher Scientific，MA，USA) を 4 μL 入れ，室温で 30 分静置した. その後，*E. coli* TOP10® (Thermo Fisher Scientific) を 50 μL 入れ, 42℃ で 45 秒間反応させ, 氷水中で 3 分間冷却した. この反応液に 250 μL の SOC 培地 (2% Triptone，0.5% Yeast Extract，2.5 mM KCl; Sigma-Aldrich，10 mM NaCl，20 mM $MgCl_2$，10 mM $MgSO_4$，20 mM スクロース; 和光純薬) を加え，37℃ で 1 時間震盪培養した. Amp 含有 LB 寒天培

地に播種し，37℃ で一晩培養しコロニーを得た．得られたコロニーを，SapphireAmp® Fast PCR Master Mix (タカラバイオ) を用いて 94℃ で 1 分間の反応後，98℃ で 10 秒，60℃ で 10 秒，72℃ で 30 秒を 30 回繰り返す PCR により，CAT が挿入されていることを確認した．さらにそのコロニーを Amp 含有 LB 液体培地に播種し，37℃ で一晩培養して得られた菌液から Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification Systems (Promega，Madison，WI，USA) を用いてプラスミドの精製を行った．

４.リコンビナント CAT (rCAT) 断片タンパクの作製

得られたプラスミドをタンパク発現用大腸菌 *E. coli* BL21 に形質転換し，Amp を含む LB 液体培地で，37°C で 16 時間培養した．培養液の濁度が波長 600 nm で 0.8 に達した時点で，1 mM Isopropyl-β-D-l-thiogalactopyranoside (和光純薬) を加え，16°C で 24 時間培養した．遠心分離により得られた菌体を PBS に懸濁した後，懸濁液を Handy Sonic model UR-21P で超音波処理した．遠心分離により上清を得た後，Glutathione Sepharose 4B® カラム (GE Healthcare) に通した．0.5 ~ 4 M のグルタチオン塩酸塩で溶出して，カラムに結合したタンパクを回収し，GST-rCAT とした。得られた GST-rCAT は超純水で透析した後，凍結乾

燥を行い，実験に供するまで保存した.

精製した GST-rCAT の確認は，Laemmil (1970) [30] の方法に従って行った SDS-PAGE により確認した. 電気泳動には Mini-PROTEAN Tetra System (BIO-RAD) を用いて，室温で 200 V 定電圧で行った. 分子量測定マーカーとして，Precision Plus Protein Dual Color standards (BIO-RAD) を用いた. 泳動後，50% メタノール (Sigma-Aldrich)，5% acetic acid (和光純薬)，2.5 g / L Coomassie Brilliant Blue R250 (和光純薬) で 30 分染色した後, 5% メタノール, 7% acetic acid で一晩脱色し，バンドを可視化した. また，ウエスタンブロット分析を使用し，GTF に特異的なタンパクの発現を確認した. SDS-PAGE による泳動後，iBot 2Dry Blotting System (Thermo Fisher Scientific) を用い，1 時間通電することによりアクリルアミドゲル層から iBot™ 2 Transfer Stacks, PVDF, min (Thermo Fisher Scientific) へ転写した. この PVDF 膜を 5% Skim Milk (Becton Dickinson and company) を添加した 0.05% TritonX-100 (和光純薬) を含むリン酸緩衝生理食塩水(PBST)〔Phosphate buffered saline (PBS); 137 mM NaCl，8.1 mM Na_2HPO_4，10 mM NaH_2PO_4; 和光純薬〕中にて 1 時間反応させた. PBST で 3 回洗浄後， PBST で 1,000 倍希釈したウサギ抗 CA-GTF 抗体 [31] を使用し，室温で 1 時間反応させた. 反応

後，PBST で 3 回洗浄し，PBST で 1,000 倍希釈した Alkaline Phosphatase (AP) 標識ヤギ抗ウサギ免疫グロブリン抗体 (Dako Denmark A/S，Glostrup，Denmark) を使用し，室温で 1 時間反応させた．反応後の PVDF 膜を洗浄し，5-Bromo-4-chloro-3-indolylphosphate-*p*-toluidine (和光純薬) と Nitro Blue Tetrazolium (和光純薬) を発色基質として添加した AP 緩衝液 (100 mM NaCl, 5 mM $MgCl_2$, 100 mM Tris，pH 9.5; 和光純薬) を加えて発色させ，バンドを視覚化した．

５. rGTFB を用いた CI の阻害効果の検討

CI を最終濃度が 0 ~ 1% となるように添加した 200 mM リン酸緩衝液 (NaPB) (pH 6.8) (200 mM NaH_2PO_4，200 mM Na_2HPO_4; 和光純薬) に 1% スクロース (和光純薬) と rGTFB を添加し，37°C で 16 時間反応させた．その後，生成されたグルカンの濁度を測定するために，可視分光光度計 (Novaspec plus; GE Healthcare，Fairfield，CT，USA) を使用し，波長 550 nm における吸光度を測定した．

６. 酵素活性阻害様式の検討

スクロース濃度を 1 ~ 25 mM に変化させた 200 mM NaPB に 0% あるいは 0.25% CI および，rGTFB を添加し，37°C で 16 時間培養した．その後，可視

分光光度計を用いて，波長 550 nm における吸光度を測定した.

７. Somogyi-Nelson 法[32] を用いたグルコースの定量

GST-rCAT と, 2.5% スクロースを添加した滅菌精製水に CI を 0～1.25% になるように段階希釈し添加した. Somogyi 銅液 (和光純薬) を添加し, 20 分煮沸した後，さらに Nelson 液 (和光純薬) を添加し，15 分静置した. その後，波長 500 nm の吸光度を測定した.

８．バイオフィルム形成量の測定

供試菌を 10 mL の TH 液体培地にて 37°C で 18 時間培養後，培養した供試菌液を CI の最終濃度が 0 ～ 10% となるように段階希釈して添加した 1% スクロース含有化学合成培地〔Chemically defined medium (CDM); 58 mM K_2HPO_4, 15 mM KH_2PO_4，10 mM $(NH_4)_2SO_4$，35 mM NaCl，0.2% Casamino acids，100 μM $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ (pH7.4), 20 mM Nicotinic acid, 50 mM Pyridoxine HCl, 5 mM Pantothenic acid，0.5 mM Riboflavin，0.15 mM Thiamin HCl，0.015 mM D-biotin，50 mM L-glutamic acid，12.5 mM L-arginine HCl，16.25 mM L-cysteine HCl，1.25 mM L-tryptophan，1 M $MgSO_4 \cdot 7H_2O$; 和光純薬〕に希釈し，96 穴平底細胞培養用マイクロタイタープレート (FALCON，Franklin Lakes，NJ，USA) の各ウェルに 100

μL ずつ分注して，37°C で 2 日間嫌気的に培養した．各ウェルの浮遊菌液を取り除いた後に，25 μL の 1% クリスタルバイオレット溶液 (Sigma-Aldrich) を加えて 15 分間室温に静置し，蒸留水で 6 回洗浄を行った．その後，95% エタノールを加えて洗浄し，乾燥後，蒸留水を加えて波長 570 nm における吸光度を測定した．

９．バイオフィルム構造の観察

バイオフィルム構造の変化を，Koo ら[33] の方法に従って観察した．供試菌を TH 液体培地で 37℃，18 時間培養後，遠心分離により菌体を回収した．10 mM のヨウ化ヘキシジウム (Thermo Fisher Scientific) で菌体を染色し，CI の最終濃度が 0 ~ 10% となるように段階希釈して添加した 1% スクロース含有 CDM にて，波長 600 nm における濁度が 0.1 となるよう調整した．この菌液をポリスチレン製 8 穴 Lab-Tek チャンバースライドシステム (Nunc, Rochester, NY, USA) に 200 μL ずつ播種し，嫌気下で 37℃，24 時間培養した．形成されたバイオフィルムを共焦点走査型レーザー顕微鏡 LSM780 (Version 4.2，Carl Zeiss MicroImaging Co.，Oberkochen，Germany) にて観察した．バイオフィルムの密度は ImageJ® (Version 10.2，Macintosh computer application，Bethesda，MD，USA) に

より数値化し評価した．測定は，1 画像につき各 3 箇所を無作為に抽出して行った．

１０．バイオフィルム中の菌と菌体外多糖の観察

菌体外多糖グルカンの産生とそれに伴うバイオフィルム構造の変化を，Koo ら[33] の方法に従って観察した．供試菌を TH 液体培地で 37°C, 18 時間培養後，遠心分離により菌体を回収した．その後，2.5 mM の SYTO 9 green fluorescent nucleic acid stain (Thermo Fisher Scientific) により菌体を染色し，1 μM の Alexa Fluor 647-labeled dextran (Thermo Fisher Scientific) にてラベリングした，CI の最終濃度が 0 ~ 10% となるように段階希釈して添加した 1% スクロース含有 CDM にて，波長 600 nm における濁度が 0.1 となるよう調整した．この菌液をポリスチレン製 8 穴 Lab-Tek チャンバースライドシステムの各ウェルに 200 μL ずつ播種し，嫌気下，37°C で 24 時間培養した．形成されたバイオフィルムを共焦点走査型レーザー顕微鏡 LSM510 (Version 4.2，Carl Zeiss MicroImaging Co.) にて観察し，形成されたバイオフィルムの密度と厚さを ImageJ® を用いて数値化した．

１１．バイオフィルム破砕試験

供試菌を TH 液体培地にて 37℃，18 時間培養後，培養した供試菌液 100 μL を CI の最終濃度が 0 ~ 1% となるように段階希釈して添加した 1% スクロース含有 TH 液体培地に播種し，6 穴細胞培養用マルチウェルプレート (FALCON) に分注し，嫌気下で 37℃，24 時間培養した. PBS にて洗浄後，PBS に再懸濁し，Handy Sonic model UR-21P で 2 分間，レベル 7 で超音波処理した. PBS で洗浄後，PBS に再懸濁し，セルスクレーパー (スミロン，住友ベークライト, 東京) を使用し, 形成されたバイオフィルムを剥離した. 剥離したバイオフィルムを滅菌生理食塩水にて段階的に希釈し，Trypticase Soy 寒天培地 (Becton Dickinson and company) に播種し，嫌気下で 37℃，2 日間培養した. コントロールには，超音波未処理のバイオフィルムとして，超音波処理をせずに同様に菌体を回収したものを Trypticase Soy 寒天培地に播種して用いた. 培養後，コロニー数を計測し，菌数に対する超音波処理後の残存菌数の割合をその菌の菌体間結合力を表す指標として算出した.

１２. ラット動物齲蝕モデルを用いた CI の阻害効果の検討

実験動物として，生後 15 日目に強制離乳させた Specific pathogen–free (SPF) の Sprague Dawley 系ラットの雄を使用し, 一群を 15 匹として実験に供試した.

生後 15 日および 16 日に，供試菌の定着を容易にするために，以下の抗生物質処理を行った．4000 U / mL のペニシリン G カリウム (明治製菓，東京) 100 μL をマイクロピペットを用いて 1 日 1 回ラットの口腔内に直接投与した．さらに，200 U / mL の濃度でペニシリンを飲料水中に添加し，自由に摂取させ，ラット飼育用普通粉末飼料 (CE-2; 日本クレア，大阪) 中にも 4 mg / g の塩酸テトラサイクリン (和光純薬) を添加した．

生後 18 日目から 22 日までの 5 日間に供試菌の定着を行なった．供試菌を BHI 液体培地で，37°C で 18 時間培養した．遠心分離により細胞を回収し，1 / 100 量の滅菌生理食塩水で懸濁したものを接種菌液とした．菌液 100 μL を 1 日 1 回ラットの口腔内に直接投与した．供試菌の感染当日から CI の最終濃度が 0 ~ 5% となるように添加した 56% スクロース含有齲蝕誘発性飼料 Diet 2000 (日本クレア) を与え，実験が終了するまで自由に摂取させた．飲料水としては，蒸留水を自由に摂取させた．

生後 72 日目にイソフルラン (ファイザー株式会社，東京) 麻酔下でラットを屠殺し，顎骨を無菌的に摘出した．上顎の歯牙を歯垢染色液 DENT. リキッドプラークテスター AR (ライオン株式会社) を用いて染色し，プラークの付着量を

Regorati と Hotz [34] の方法で求めた．さらに上下顎臼歯の齲蝕スコアを Keyes [35,36] の方法を Ooshima ら [37] がラット用に改変したもので算出した．

また同様に，飲料水に CI を添加した場合の歯面へのバイオフィルムに与える影響を検討した．供試菌の感染当日から 56% スクロース含有齲蝕誘発性飼料 Diet 2000 を与え，実験が終了するまで自由に摂取させた．飲料水としては蒸留水に CI の最終濃度が 0～5% となるように添加し，自由に摂取させた．生後 72 日目にラットを屠殺し，プラークスコアと齲蝕スコアを求めた．

１３．統計処理

得られた結果は平均 ± 標準偏差で示し，有意差検定は一元配置分散分析（その後の検定には Dunnett 検定），あるいは Student *t* 検定を用いて行った．医療統計ソフト GraphPad Prism8 (有限会社エムデーエフ，東京) を使用した．一元配置分散分析および Dunnett 検定では有意水準を 5%，Student *t* 検定では 1%とした．

結果

１. CI の GTF 活性に対する阻害効果

rGTFB を使用し，CI の GTF の酵素活性に対する阻害効果を検討した. CI の濃度依存的に，グルカンの合成量は減少していた ($P < 0.001$，$P < 0.0001$) (図 3). CI を添加しない場合と比較して，CI を 1% 添加した場合では，グルカンの合成量は，約 75%低下した. また，スクロース濃度を変動させ，CI を添加しない場合と 0.25% 添加した場合のグルカン合成量を比較したところ，CI を添加しない場合と比較して 0.25% 添加した場合では，グルカンの合成量が約 50% 低下した ($P < 0.001$，$P < 0.0001$) (図 4). また，Michaelis-Menten の式を基に，Lineweaver-Burk プロットを作成し，グルカン合成阻害効果の速度論的解析を行った (図 5). CI 非存在下では，最大反応速度 (Vmax) は 0.44 nmol / min で，ミカエリス定数 (Km 値；反応速度が Vmax の 1 / 2 のときの基質濃度) は 1.54 mM であった. 一方で CI 存在下では，Vmax は 0.57 nmol / min で，Km 値は 4.43 mM であった.

２. Somogyi-Nelson 法を用いたグルコースの定量

rCAT は GST タンパクとの融合タンパクとして，約 140 KDa の位置に確認

された(図 6).この rCAT とスクロースを反応させ、CI を添加したところ，グルコースの産生量は CI の添加に伴い減少した ($P < 0.05$，$P < 0.0001$) (図 7). CI を添加しない場合と比較して, CI を 0.125% 以上添加した場合では約 65% の産生量の低下が認められた.

３. バイオフィルム形成量

バイオフィルム形成量を測定したところ，CI の濃度依存的に形成量は減少していた ($P < 0.0001$) (図 8). CI を添加しない場合と比較して，CI を 10% 添加した場合では約 70% の形成量の低下が認められた.

４. バイオフィルムの構造

CI の存在が形成されるバイオフィルムの密度と厚みに与える影響を検討するために，共焦点レーザー顕微鏡を用いて，バイオフィルムを観察した. バイオフィルムの厚みは CI の濃度が上昇するにつれて減少していた. CI を添加していない場合に比較して CI を 10% 添加した場合では，厚みは 55% 減少していた (図 9-A). 密度は CI の濃度が上昇するにつれて疎になり，CI を添加しない場合と 10% 添加した場合とを比較すると，10% 添加した場合には約 65% の密度の低下が認められた ($P < 0.05$，$P < 0.001$，$P < 0.0001$) (図 9-B).

５．バイオフィルム中の菌量およびグルカン量

CI の濃度が上昇するにつれバイオフィルム中のグルカン生成量は著明に減少し，バイオフィルムの厚みが減少した (図 10).

６．バイオフィルム破砕試験

菌体間の結合力をみるために，バイオフィルムの破砕試験を行った. CI の濃度が上昇するにつれ，バイオフィルム中の菌数は減少した. CI を添加しない場合と 1% 添加した場合を比較すると，1% 添加した場合ではバイオフィルム中の菌数は約 65% の低下が認められた ($P < 0.05$，$P < 0.01$) (図 11).

７．ラット動物齲蝕モデルを用いた CI の阻害効果の検討

ラット動物齲蝕モデルを用いて，歯面のバイオフィルムに与える影響を検討した. 飼料に CI を添加したすべての CI 添加群において，歯面へのプラーク付着量が CI を添加しない場合に比べて低下していた ($P < 0.01$，$P < 0.0001$) (図 12). また，齲蝕罹患率も CI を添加しない場合に比べて CI を添加したすべての群で低下していた ($P < 0.0001$) (図 13). 飲料水に CI を添加した場合においても同様に，CI を添加したすべての群でプラークスコア($P < 0.001$，$P < 0.0001$) (図 14) と齲蝕罹患率が低下していた ($P < 0.05$，$P < 0.0001$) (図 15).

考察

現在，宿主・細菌・食物の 3 つの要因が重なると齲蝕が発生するという，Keyes (1960) が提唱した Keyes の 3 つの輪という概念が広く受け入れられている[38]. 近年では Newburn (1989) が提唱する，時間の要因が加わり 4 つの輪とするものもある[39]. 宿主要因としては，歯の質・唾液の質・歯並びなど，宿主となる本人が生まれ持った性質に加え，年齢や生活習慣，服用する薬の種類なども影響する[40]. 細菌要因としては，*S. mutans* が齲蝕の原因菌のひとつとして挙げられ，食物要因である糖から非水溶性グルカンを合成し，宿主要因である歯面にバイオフィルムを形成する[41]. 食物要因の中でも，特にスクロースが，齲蝕の発症に大きく関わることが報告されている[42]. Ruottinen (2004) の調査によると，8 ~ 11 歳児のスクロース高摂取群の子どもとスクロース低摂取群の子どもの齲蝕罹患率を比較すると，2 倍以上の差が生じたことがわかっている[43]. しかしながら，糖質は 3 大栄養素の 1 つであり，エネルギー源として身体活動や体内の内部環境を維持するために必要である[44]. そのため，齲蝕を抑制するためには，スクロースと代用甘味料を併用した食品の開発が求められる.

B. circulans T-3040 株をデキストランを含む培地で培養することにより産生される CI は代用甘味料の一種であり，これまでに，スクロースと同時に存在すると，*S. mutans* の産生する GTF の働きを阻害することで齲蝕の発症を抑制することが報告されている[23]．しかしながら，その詳細なメカニズムについては明らかとなっていない．本研究では，CI の GTF 活性抑制に焦点を当て，齲蝕の発症抑制メカニズムを検討した．はじめに rGTFB を用いて CI の活性抑制効果を調べたところ，スクロースの存在下で CI の濃度が上昇するにつれ，グルカン合成量は低下した (図 3)．このことから，CI は GTFB による非水溶性グルカンの合成を抑制したことが示された．

酵素基質反応では，まず，酵素と基質が結合することで酵素基質複合体が形成され，次に反応生成物を生じるとともに酵素が遊離される[45]．酵素基質反応の生成物の生成速度に関する速度論として，1913 年にドイツの生化学者 Leonor Michaelis とカナダの生化学者 Maud L. Menten によって Michaelis-Menten の式が提唱された[46]．この式を変形し，直線で表したプロット法が Lineweaver-Burk プロットである．Lineweaver-Burk プロットでは直線が Y 軸と交わる点が 1 / Vmax を表し，傾きが Km / Vmax を表すため，ここから Vmax と Km 値を求

められる[47]. そこでスクロースの存在下における CI の GTFB 活性阻害様式を検討するために，スクロース濃度を変動させ，CI 非添加群 (0%) もしくは CI 添加群 (0.25%) の観察を行ったところ，CI 添加群では最終的なグルカンの合成量は低下した (図 4). この結果から，Lineweaver-Burk プロットを用いて，速度論的分析を行った.

酵素活性の阻害様式には，拮抗阻害，非拮抗阻害，および不拮抗阻害の 3 種類の形式が存在する[48]. 拮抗阻害は, 阻害剤が酵素の活性部位に結合し基質の結合を妨げる阻害様式である. 基質と阻害剤が競って活性部位に結合するため, Km 値は大きくなるが Vmax は変化しない[49]. 非拮抗阻害は，阻害剤が酵素の活性部位以外に結合し酵素の立体構造を変えることで基質の結合を妨げる阻害様式である. 阻害剤は活性部位以外に結合するため, 基質の親和性には変化がなく Km 値は変わらないが, 酵素の立体構造が変化するため Vmax は低下する[50]. 不拮抗阻害は酵素基質複合体に阻害剤が結合し反応を妨げる阻害様式である. 酵素と基質が結合した後に阻害剤が結合するため，Km 値と Vmax はともに変化する[51]. 本研究の結果では Km 値が大きくなり 1 / Vmax に変化がなかったため，CI の GTFB への阻害効果は拮抗阻害である可能性が示唆された (図 5).

GTFB にはスクロース結合部位である CAT と，グルコースを転位させてグルカンを合成する GBD の 2 つの機能ドメインが存在する[11]. 本研究の結果は, CI が CAT に結合し，スクロースが CAT に結合することを阻害している可能性が考えられた. そこで，CAT の部分タンパク rGTFB (CAT) を作成し，スクロースと反応させ, 生成したグルコースを, 銅試薬を用いたグルコースの定量法である Somogyi-Nelson 法[32] により測定したところ， CI の添加により分解されたグルコース量は減少した (図 7). 以上の結果から，CI は GTFB の CAT にスクロースと拮抗して結合することで，スクロースのグルコースとフルクトースへの分解を阻害し, その結果, グルカンの合成を抑制したことが明らかとなった.

CI がグルカンの合成を抑制したため，CI が *S. mutans* のバイオフィルム形成に影響を与えるかを検討した. *S. mutans* を CI を添加したスクロースを含む培地で培養し，形成されたバイオフィルムの量を検討したところ，CI の濃度依存的にその形成量は低下した (図 8). また, 共焦点走査型レーザー顕微鏡でバイオフィルムの構造を観察したところ，CI の濃度が上昇するにつれてバイオフィルムの密度は明確に疎になり，厚みも減少した (図 9). 同様に，バイオフィルムを構成するグルカンの合成量を観察したところ，CI の濃度依存的にその合成量は

減少した (図 10). これらの結果から，CI はスクロースと同時に存在すると，GTFB に対する拮抗阻害により, 合成されるグルカンの量を減少させ, バイオフィルム形成量を低下させたことが明らかとなった.

S. mutans はグルカンによって歯面に強固に付着し[51]，合成されたグルカンと *S. mutans* の表層に存在する Gbp が結合することによって，菌は堆積することから，CI のグルカン合成抑制効果が，Gbp を介する菌体間結合に与える影響を検討した. 形成されたバイオフィルムに超音波処理を行うことで, 菌体間結合力を算出したところ，超音波処理によってバイオフィルム中の菌数は CI の濃度が上昇するにつれ減少していた (図 11). このことは，バイオフィルムの菌体間結合が脆弱し，剥がれやすい状態になったことが考えられる.

最後に, ラット動物齲蝕モデルを用いて CI の齲蝕抑制効果を検討した. CI を食餌あるいは飲料水に添加したいずれの実験系においても，すべての CI 添加群において，歯面へのプラーク付着量が CI を添加しない群に比べて低下していた (図 12，図 14). また齲蝕スコアも，すべての CI 添加群において，CI を添加しない群に比べて低下していた (図 13，図 15). これらの結果から CI は，いずれの摂取方法でも，齲蝕抑制効果を発揮することが明らかとなった.

今回の研究により，CI はスクロースと拮抗することで，グルカンの合成を抑制し，また，バイオフィルムの形成を阻害し，さらに *S. mutans* の菌体間結合を脆弱化させることが明らかになり，齲蝕の発症を抑制することが示唆された．これらの結果より，CI は齲蝕発症を予防する代用甘味料として有用であると考えられる．今後は，CI の実用化に向けて，ヒトに対してのプラーク沈着および齲蝕抑制効果を検討する必要がある．

謝辞

稿を終えるにあたり，終始御懇篤なるご指導と御校閲を賜った岡山大学学術研究院医歯薬学領域小児歯科学分野の仲野道代教授に心から感謝致します．また，様々な面にわたり貴重な御助言と御協力を下さいました，岡山大学学術研究院医歯薬学領域小児歯科学分野の諸先生に厚く御礼申し上げます．

文献

1) Selwitz RH, Ismail AI, Pitts NB. Dental caries. *Lancet* **369**: 51-59, 2007.

2) Koga T, Okahashi N, Takahashi I, Kanamoto T, Asakawa H, Iwaki M. Surface hydrophobicity, adherence, and aggregation of cell surface protein antigen mutants of *Streptococcus mutans* serotype *c*. *Infect. Immun.* **58**: 289-296, 1990.

3) Cross ES, Kreth J, Zhu L, Richard S, Shi W, Qi F, Gimzewski KJ. Nanomechanical properties of glucans and associated cell-surface adhesion of *Streptococcus mutans* probed by atomic force microscopy under in situ conditions. *Microbiology*. **153**: 3124-3132, 2007.

4) Banas JA, Vickerman MM. Glucan-binding proteins of the oral streptococci. *Crit. Rev. Oral. Biol. Med.* **14**: 89-99, 2003.

5) Ccahuana-Vasquez AR, Cury AJ. *S. mutans* biofilm model to evaluate antimicrobial substances and enamel demineralization. *Brazilian Oral Res.* **24**: 135-141, 2010.

6) Ooshima T, Matsumura M, Hoshino T, Kawabata S, Sobue S, Fujiwara T. Contributions of three glucosyltransferases to sucrose-dependent adherence of *Streptococcus mutans*. *J. Dent. Res.* **80**: 1672-1677, 2001.

7) Komatsu H, Abe Y, Eguchi K, Matsuno H, Matsuoka Y, Sadakane T, Inoue T, Fukui K, Kodama T. Kinetics of dextran-independent α-(1→3)-glucan synthesis by *Streptococcus sobrinus* glucosyltransferase I. *FEBS J*. **278**: 531-540, 2011.

8) Fukushima K, Ikeda T, Kuramitsu HK. Expression of *Streptococcus mutans gtf* Genes in *Streptococcus milleri*. *Infect*. *Immun*. **60**: 2815-2822, 1992.

9) Vacca-Smith AM , Bowen WH. Binding properties of streptococcal glucosyltransferases for hydroxyapatite, saliva-coated hydroxyapatite, and bacterial surfaces. *Crit*. *Rev*. *Oral*. *Biol*. *Med*. **43**: 103-110, 1998.

10) Venkitaraman RA, Vacca-Smith AM, Kopec KL, Bowen WH. Characterization of GlucosyltransferaseB, GtfC, and GtfD in Solution and on the Surface of Hydroxyapatite. *J*. *Dent*. *Res*. **74**: 1695-1701, 1995.

11) Kato C, Nakano Y, Lis M, Kuramitsu HK. Molecular genetic analysis of the catalytic site of *Streptococcus mutans* glucosyltransferases. *Biochem*. *Biophys*. *Res*. *Commun*. **189**: 1184-1188, 1992.

12) Matsumoto M, Hamada S, Ooshima T. Molecular analysis of the inhibitory effects of oolong tea polyphenols on glucan-binding domain of recombinant

glucosyltransferases from *Streptococcus mutans* MT8148. *FEMS Microbiol. Lett.* **228**: 73-80, 2003.

13) Giacaman AR, Campos P, Sandval MC, Castro JR. Cariogenic potential of commercial sweeteners in an experimental biofilm caries model on enamel. *Arch. Oral Biol.* **58**: 1116-1122, 2013.

14) Moynihan PJ. Update on the nomenclature of carbohydrates and their dental effects. *J. Dent.* **26**: 209-218, 1998.

15) Matsukubo T, Takazoe I. Sucrose substitutes and their role in caries prevention. *Int. Dent. J.* **56**: 119-130, 2006.

16) Oku T, Nakamura S. Threshold for transitory diarrhea induced by ingestion of xylitol and lactitol in young male and female adults. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* **53**: 13-20, 2007.

17) Crittenden GR, Playne JM. Production, properties and applications of food-grade oligosaccharides. *Trends Food Sci. Technol.* **7**: 353-361, 1996.

18) Makinen KK. Sugar alcohol sweeteners as alternatives to sugar with special consideration of xylitol. *Med. Princ. Pract.* **20**: 303-320, 2011.

19) Mantovani V, Galeotti F, Maccari F, Volpi N. Recent advances in capillary electrophoresis separation of monosaccharides, oligosaccharides, and polysaccharides. *Electrophoresis* **39**: 179-189, 2018.

20) Harata K, Uedaira H. Structure of α-cyclodextrin-*p*-iodoaniline complex. *Nature* **253**: 190-191, 1975.

21) Eguchi K, Niether D, Wiegand S, Kita R. Thermophoresis of cyclic oligosaccharides in polar solvents. *Eur. Phys. J. E* **39**: 86, 2016.

22) Leemhuis H, Kelly MR, Dijkhuizen L. Engineering of cyclodextrin glucanotransferases and the impact for biotechnological applications. *Appl Microbiol. Biotechnol.* **85**: 823-835, 2010.

23) Funane K, Tokashiki T, Gibu S, Kawabata Y, Oguma T, Ito H, Nakachi M, Miyagi S, Kobayashi M. Finding of cyclodextrans and attempts of their industrialization for cariostatic oligosaccharides. *J. appl. glycosci.* **54**: 103-107, 2007.

24) Oguma T, Tobe K, Kobayashi M. Purification and properties of a novel enzyme from *Bacillus* spp. T-3040, which catalyzes the con- version of dextran to cyclic

isomaltooligosaccharides. *FEBS Lett*. **345**: 135-138, 1994.

25) Funane K, Ichinose H, Araki M, Suzuki R, Kimura K, Fujimoto Z, Kobayashi M, Kimura A. Evidence for cycloisomaltooligosaccharide production from starch by *Bacillus circulans* T-3040. *Appl. Microbiol. Biotechnol*. **98**: 3947-3954, 2014.

26) Funane K, Terasawa K, Mizuno Y, Ono H, Miyagi T, Gibu S, Tokashiki T, Kawabata Y, Kim MY, Kimura A, Kobayashi M. A novel cyclic isomaltooligosaccharide (cycloisomaltodecaose, CI-10) produced by *Bacillus circulans* T-3040 displays remarkable inclusion ability compared with cyclodextrins. *J. Biotechnol*. **130**: 188-192, 2007.

27) Funane K, Kawabata Y, Suzuki R, Kim MY, Kang KH, Suzuki N, Fujimoto Z, Kimura A, Kobayashi M. Deletion analysis of regions at the C-terminal part of cycloisomaltooligosaccharide glucanotransferase from *Bacillus circulans* T-3040. *Biochim. Biophys. Acta*. **1814**: 428-434, 2011.

28) Yamamoto T, Terasawa K, Kim MY, Kimura A, Kitamura Y, Kobayashi M, Funana K. Identification of catalytic amino acids of cyclodextran glucanotransferase from *Bacillus circulans* T-3040. *Biosci. Biotechnol. Biochem*. **70**: 1947-1953,

2006.

29) Ooshima T, Izumitani A, Sobue S, Hamada S. Cariostatic effect of palatinose on experimental dental caries in rats. *Jpn. J. Med. Sci. Biol.* **36**: 219-223, 1983.

30) Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685, 1970.

31) Hamada S, Hirokoshi T, Minami T, Okahashi N, Koga T. Purification and characterization of cell-associated glucosyltransferase synthesizing water-insoluble glucan from serotype *c Streptococcus mutans*. *J. Gen. Microbiol.* **135**: 335-344, 1989.

32) Deng SP, Tabatabai MA. Colorimetric determination of reducing sugars in soils. *Soil Biol. Biochem.* **26**: 473-477, 1994.

33) Koo H, Xiao J, Klein IM, Jeon GJ. Exopolysaccharides produced by *Streptococcus mutans* glucosyltransferases modulate the establishment of microcolonies within multispecies biofilms. *J. Bacteriol.* **192**: 3024-3032, 2010.

34) Hotz P, Guggenheim B, Schmid R. Carbohydrate in pooled dental plaque. *Caries Res.* **6**: 103-121, 1972.

35) Keyes HP. A method of recording and scoring gross carious lesions in the molar teeth of Syrian hamsters. *J. Dent. Res.* **23**: 439-444, 1944.

36) Keyes HP. Dental caries in the molar teeth of rats: II. a method for diagnosing and scoring several types of lesions simultaneously. *J. Dent. Res.* **37**: 1088-1099, 1958.

37) Ooshima T, Sobue S, Hamada S, Kotani S. Susceptibility of rats, hamsters, and mice to carious infection by *Streptococcus mutans* serotype *c* and *d* organisms. *J. Dent. Res.* **60**: 855-859, 1981.

38) Keyes HP. The infectious and transmissible nature of experimental dental caries. *Arch. oral Biol.* **1**: 304-320, 1960.

39) Newburn E. Effectiveness of water fluoridation. *J. Public Health Dent.* **49**: 279-289, 1989.

40) Sakki KT, Knuuttila EM, Vimpari SS, Kivwla LS. Lifestyle, dental caries and number of teeth. *Community Dent Oral Epidemiol.* **22**: 298-302, 1994.

41) Kang SM, Chung J, Kim MS, Yang HK, Oh SJ. Effect of *Weissella cibaria* isolates on the formation of *Streptococcus mutans* biofilm. *Caries Res.* **40**: 418-425, 2006.

42) Cai NJ, Choi MH, Jeon GJ. Relationship between sucrose concentration and bacteria

proportion in a multispecies biofilm. *J. Oral. Microbiol.* **13**: 1-9, 2021.

43) Ruottien S, Karjalainen S, Pienihakkinen K, Lagstrom H, Niinikoski H, Salminen M, Ronnemaa T, Simell O. Sucrose intake since infancy and dental health in 10-Year-Old Children. *Caries Res.* **38**: 142-148, 2004.

44) Mann J, Cummings HJ, Englyse NH, Key T, Liu S, Riccardi G, Summerbell C, Uauy R, Van Dam MR, Venn B, Vorster HH, Wiseman M. FAO/WHO Scientific update on carbohydrates in human nutrition: conclusions. *Eur J Clin Nutr* **61**: 132-137, 2007.

45) Bernhand OP. On the dynamics of the irreversible Michaelis-Menten reaction mechanism. *Chem. Eng. Sci.* **42**: 447-458, 1987.

46) Segal HL. The development of enzyme kinetics. *Academic Pres.* **1**: 1-48, 1959.

47) Van Dyck S, Van Schepdael A, Hoogmartens J. Michaelis-Menten analysis of bovine plasma amine oxidase by capillary electrophoresis using electrophoretically mediated microanalysis in a partially filled capillary. *Electrophoresis* **22**: 1436-1442, 2001.

48) Sur D. Kinetics of enzyme inhibition. *Nat. Sci.* **1**: 1-10, 2014.

49) Person Ingrid AL. The pharmacological mechanism of angiotensin-converting enzyme inhibition by green tea, Rooibos and enalaprilat – A study on enzyme kinetics. *Phytother. Res*. **26**: 517-521, 2012.

50) Blat Y. Non-competitive inhibition by active site binders. *Chem. Biol. Drug. Des*. **75**: 535-540, 2010.

51) Wen TZ, Yates D, Ahn SJ, Burne RA. Biofilm formation and virulence expression by *Streptococcus mutans* are altered when grown in dual-species model. *BMC Microbiol*. **10**: 1471-2180, 2010.

表題脚注

岡山大学大学院医歯薬学総合研究科　社会環境生命科学専攻　小児歯科学分野

(指導：仲野道代教授)

図の説明

図 1 グルコシルトランスフェラーゼ (Glucosyltransferase ; *gtf*) *B* の機能ドメイン

GTFB の 2 つの機能ドメインを示す. 酵素活性中心となる触媒領域である Catalytic domain (CAT) にスクロースが結合し，グルコースとフルクトースに分解され，グルカン結合領域である Glucan binding domain (GBD) に転移し，2 個以上のグルコースが結合することによってグルカンを合成する.

図 2 リコンビナント CAT（rCAT）産生プラスミドの作製

A : *Streptococcus. mutans* UA159 株の *gtfB* 全塩基配列における，CAT 領域の図

B : *S. mutans* UA159 株の *gtfB* 全塩基配列をもとに，オリゴヌクレオチドプライマーを設計し，PCR 法により増幅した *gtfB* (CAT) 断片を作製し，pGEX6P-1 にライゲーションした図を示す.

図 3 CI の rGTFB に対する抑制効果

CI を 0 ~ 1% 添加した 1% スクロース含有リン酸緩衝液に rGTFB を添加し，

37℃ で 24 時間培養後，波長 550 nm における吸光度を測定した. CI 0% との間で有意差検定を行った (Dunnett 検定 $^{*}P < 0.001$,$^{**}P < 0.0001$) (n = 3).

図 4　CI が rGTFB の酵素基質反応速度に与える影響

CI を 0% あるいは 0.25% 添加したスクロース含有リン酸緩衝液に rGTFB を添加し，37℃ で 24 時間培養後，波長 550 nm における吸光度を測定した. CI 0% との間で有意差検定を行った (Student *t* 検定 $^{*}P < 0.001$,$^{**}P < 0.0001$) (n = 3).

図 5　Lineweaver-Burk プロットを用いた rGTFB による酵素活性阻害様式の検討

Lineweaver-Burk プロットを用いて，rGTFB によるグルカン合成阻害効果の速度論的解析を行った.

図 6　精製した rCAT の確認

A：SDS-PAGE による分析.

B : ウエスタンブロッティングによる分析。rCAT は GST タグと合わせて約 140 kDa の位置に確認された.

図 7　CI がグルコースの生成に与える影響

rCAT と，2.5% スクロースを添加した滅菌精製水に CI を 0 ~ 1.25% 添加した後，ソモギー銅液を添加し，20 分煮沸した. ネルソン液を添加し，15 分静置した後，波長 500 nm における吸光度を測定した. CI 0% との間で有意差検定を行った (Dunnett 検定 $^{*}P < 0.05$, $^{**}P < 0.0001$) (n = 3).

図 8　CI が *S. mutans* MT8148 株のバイオフィルム形成量に与える影響

CI を 0 ~ 1% 添加した供試菌を 1% スクロース含有化学合成培地で培養し，バイオフィルムを形成させた後，クリスタルバイオレットで染色し，波長 570 nm における吸光度を測定した. CI 0% との間で有意差検定を行った (Dunnett 検定 $^{*}P < 0.0001$) (n = 3).

図 9-A　CI が *S. mutans* MT8148 株のバイオフィルム構造に与える影響

(1) CI 非添加，(2) CI 2.5％ 添加，(3) CI 5％ 添加，(4) CI 10％ 添加し，形成したバイオフィルムの共焦点レーザー顕微鏡像を示す. 菌体をヨウ化ヘキシジウムを用いて染色後，CI を 0～10％ 添加し，37℃ で 24 時間培養し，バイオフィルムを形成した.

図 9-B　CI が *S. mutans* MT8148 株のバイオフィルムの密度に与える影響

Image J® を使用して，共焦点レーザー顕微鏡像の，バイオフィルムの厚みの数値化を行った. CI 0％ との間で有意差検定を行った (Dunnett 検定 $^{*}P < 0.05$,$^{**}P < 0.001$,$^{**}P < 0.0001$) (n = 3).

図 10　CI が *S. mutans* MT8148 株のバイオフィルムのグルカンおよび菌量に与える影響

(1) CI 非添加，(2) CI 2.5％ 添加，(3) CI 5％ 添加，(4) CI 10％ 添加し，形成したバイオフィルムの共焦点レーザー顕微鏡像を示す. 菌体を SYTO® 9 green fluorescent nucleic acid stain にて染色し，Alexa Fluor® 647 にてラベリングしたグルコースを添加した 1％ スクロース含有化学合成培地にて，37℃ で 24 時間

培養し，バイオフィルムを形成した.

図 11　CI が *S. mutans* MT8148 株のバイオフィルムの菌体間結合力に与える影響

バイオフィルムを形成した CI を 0 ~ 1% 添加した供試菌を超音波処理し，残存した菌体を Trypticase Soy 寒天培地に播種した. コロニー数をカウントすることにより，各濃度のバイオフィルムの強度として評価を行った. CI 0% との間で有意差検定を行った (Dunnett 検定 $^{*}P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$) (n = 3).

図 12　飼料に CI を添加したラット動物実験モデルにおけるプラーク沈着抑制効果

飼料に CI の最終濃度が 0 ~ 5% となるように添加し，ラット動物実験モデルに自由に摂取させ，生後 72 日目にクロロホルム麻酔下でラットを屠殺し，顎骨を無菌的に摘出した. 上顎の歯牙を歯垢染色液を用いて染色し，プラークを Regorati と Hotz [34] の方法で求めた (Dunnett 検定 $^{*}P < 0.01$, $^{**}P < 0.0001$).

図 13　飼料に CI を添加したラット動物実験モデルにおける齲蝕抑制効果

図 12 と同様に飼育したラットから摘出した顎骨の上下顎臼歯の齲蝕スコアを，Keyes [35,36] の方法を Ooshima ら [37] がラット用に改変したもので算出した (Dunnett 検定 $^{*}P < 0.0001$).

図 14　飲料水に CI を添加したラット動物実験モデルにおけるプラーク沈着抑制効果

滅菌蒸留水に CI の最終濃度が 0～5% となるように添加し，ラット動物実験モデルに飲料水として自由に摂取させ，生後 72 日目にクロロホルム麻酔下でラットを屠殺し，顎骨を無菌的に摘出した．上顎の歯牙を歯垢染色液を用いて染色し，プラークを Regorati と Hotz[34] の方法で求めた (Dunnett 検定 $^{*}P < 0.001$, $^{**}P < 0.0001$).

図 15　飲料水に CI を添加したラット動物実験モデルにおける齲蝕抑制効果

図 14 と同様に飼育したラットから摘出した顎骨の上下顎臼歯の齲蝕スコアを，Keyes [35,36] の方法を Ooshima ら [37] がラット用に改変したもので算出した

(Dunnett 検定 $^{*}P < 0.05, ^{**}P < 0.0001$).