



|              |                                                                                     |
|--------------|-------------------------------------------------------------------------------------|
| Title        | 人唾液抗菌性因子 (S. A. Factor) に対する血清アルブミン及びSH化合物の阻害作用に関する研究                               |
| Author(s)    | 上田, 正夫                                                                              |
| Citation     | 大阪大学, 1965, 博士論文                                                                    |
| Version Type | VoR                                                                                 |
| URL          | <a href="https://hdl.handle.net/11094/28716">https://hdl.handle.net/11094/28716</a> |
| rights       |                                                                                     |
| Note         |                                                                                     |

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

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

The University of Osaka

【 5 】

|           |                                                             |   |      |     |
|-----------|-------------------------------------------------------------|---|------|-----|
| 氏 名・(本籍)  | 上                                                           | 田 | 正    | 夫   |
|           | うえ                                                          | だ | まさ   | お   |
| 学 位 の 種 類 | 歯                                                           | 学 | 博    | 士   |
| 学 位 記 番 号 | 第                                                           | 7 | 0    | 6 号 |
| 学位授与の日付   | 昭 和 40 年 3 月 26 日                                           |   |      |     |
| 学位授与の要件   | 歯学研究科歯学臨床系<br>学位規則第5条第1項該当                                  |   |      |     |
| 学位論文題目    | 人唾液抗菌性因子 (S. A. Factor) に対する血清アルブミン<br>及び SH 化合物の阻害作用に関する研究 |   |      |     |
|           | (主査)                                                        |   | (副査) |     |
| 論文審査委員    | 教 授 松村 敏治 教 授 小谷 尚三 教 授 竹田 義朗                               |   |      |     |

論 文 内 容 の 要 旨

人唾液抗菌性因子 (S. A. Factor) は人および数種の動物の唾液中に存在する Lactobacilli, Streptococci に対する抗菌性因子で、唾液 lysozyme, bacteriophage, specific antibody, saliva parotin 等とはその本態を異にし (Zeldow 1959, 松村等1960, 1962), thiocyanate を cofactor として必要とすること (Kerr 等 1962, Zeldow 1962 及び 1963, 大西 1962), および分子量 8~10 万の抗菌性蛋白であること (岩本 1964) は、既に明かにされている。一方, S. A. Factor 活性は人血清には認められず、血清中には逆に S. A. Factor 活性を阻害する因子が含まれていることが報告され (松村, 森岡, 大西1962) ついでこの阻害因子は人以外の数種の哺乳動物の血清中にも存在することが明かにされ, serum depressor と名付けられた (森岡, Zeldow 1962)。Serum depressor は非透析性で, cofactor を inactivate することによって作用するのではないことが示されている。

しかしながら depressor の本態並びにその作用機作はなお不明のままに残されている。著者は、血清中にみられる depressor 活性がどのようにして発現するかを明かにしようとして以下にのべる研究を実施した。

供試菌： Lactobacillus plantarum ATCC 8014。

菌 液： 上記供試菌を Rogosa(1951)の SL 培地 (pH 5.4) から寒天を除いたものに 18 時間前培養し、ついでこの培養菌を同培地に再接種して 6 時間静置培養したものを材料とした。Coleman junior spectrophotometer を用いて濁度をはかり、SL 液体培地で適当に稀釈して O. D 550 m $\mu$  = 0.04 になるように菌濃度 (1.5 $\times$ 10<sup>8</sup>/ml 生菌に相当する) を調整した。

S. A. Factor： 食後 3 時間の人の安静混合唾液を採取し岩本 (1964) の方法により精製した標品を実験に供した。cofactor としては KSCN 溶液を用いた。

血 清： 人, 牛, 馬及び家兎より常法にしたがってえた血清を 56 $^{\circ}$ C で 30 分加熱して用いた。

S. A. Factor 活性の測定法： 滅菌した 17 mm (内径)×100 mm の比色用試験管に S. A. Factor (濃度は後述) 1.0ml, KSCN 溶液 (2 mg/ml) 0.5ml, 菌液 0.5 ml, depressor 或いは蒸溜水 0.5ml, SL 培地 3.5ml を混合し全量を 6 ml とした。37°C で 6 時間培養したのち、対照 (S. A. Factor は含むが, cofactor を除いたもの) 及び反応混合液の 550m $\mu$  での濁度 (O. D) を Erma spectrophotometer Type CT で測定し、培養前の濁度 (O. D) と 6 時間培養後の濁度 (O. D) との差 (対照の場合 C とし、反応混合液の場合 T とする) から  $\% \text{ inhibition} = 100 \left( 1 - \frac{T}{C} \right)$  を算出した。

Depressor 活性： 検体を含め対照管での  $\% \text{ inhibition}$  と検体を含む反応系での  $\% \text{ inhibition}$  との差をもとめ、この値によって depressor 活性を表現した。ちなみに今回の実験では常に 90~100  $\% \text{ inhibition}$  を示すに必要最少量の S. A. Factor を使用し、depressor 活性の測定の感度を高めようよう配慮した。

SH 基の定量： Boyer (1954) 及び Benesch (1962) の PCMB を用いる spectrophotometric method によった。Standard としては純度およそ 100% の glutathione (Kirin Brewery Co.) を用いた。

えられた実験結果を要約すると次の通りである。

1. Serum 各画分とそれらの depressor 活性： 人、家兎、牛、馬の各血清のうち最も depressor 活性が高く、かつ入手しやすい牛血清を muco-protein, albumin 及び globulin に分画し、各画分について depressor 活性をしらべた結果、albumin 画分のみ活性が認められることが明かにされた。albumin 画分の depressor 活性は精製 bovine plasma albumin (Fr. V, Sigma Chemical Co.) 及び結晶 bovine serum albumin (Sigma Chemical Co.) についても認められた。

2. Serum albumin の depressor としての活性基： albumin の depressor 活性の本態についての手掛りをえる目的で、蛋白質の種々の反応性基のうちできわめて反応性に富み、かつ酸化、還元が可能である SH 基が depressor 活性の発現に関与するかどうかをしらべた。すなわち bovine albumin (Fr. V) を SH 基試薬と反応させ、depressor 活性の変化の有無について検討を加えたところ、CdSO<sub>4</sub> を除き他の代表的な 5 種の SH 基試薬、すなわち PCMB, HgCl<sub>2</sub>, CuSO<sub>4</sub>, AgNO<sub>3</sub> 及び monoiodoacetate はそのいずれもが albumin の depressor 活性を強く阻害することが示された。

3. Serum albumin の SH 基の定量と depressor 活性：

上述のような結果がえられたので、depressor 活性を異にする牛、人、および卵アルブミン (いずれも結晶) について reactive SH 基を定量した結果、牛では  $34.5 \times 10^{-6} \text{M}$ 、人では  $21.0 \times 10^{-6} \text{M}$ 、卵アルブミンでは  $4.2 \times 10^{-6} \text{M}$  (いずれも終末濃度 0.33 % において) となり、depressor 活性の強弱と SH 基濃度との間には対応関係の認められることが明かにされた。一方 depressor 活性の認められない人血清  $\alpha$ -,  $\gamma$ -globulin には定量しうだけの reactive SH 基は存在しないことが認められた。なお、reactive SH 基濃度が一定になるように濃度を加減すると牛、人、卵アルブミンの示す depressor 活性がほぼ一致することが示されたが、この事実も SH 基の重要性を裏書きしている。

4. Serum albumin 以外の sulfhydryl compounds の depressor 活性： Serum depressor の活性の発現に SH 基が重要な役割を演ずることが示されたので、低分子の sulfhydryl compounds 即ち cysteine, glutathione, BAL, thioglycollic acid 2-mercapto-ethanol 及び sodium thiosulfate

の6種について depressor 活性の有無をしらべたところ、そのいずれもが終末濃度  $8 \times 10^{-6} \text{M}$  以上の濃度において明かに S. A. Factor 活性を阻害する事実が認められた。

5. S. A. Factor の還元、酸化：SH 基がどのようにして S. A. Factor の作用を阻害するかは上述の実験では明かでない。この点について本実験では系統的な研究は行なわなかったが、過剰量の cysteine による還元で著しく活性の低下した S. A. Factor を  $\text{H}_2\text{O}_2$  で再酸化すると、かなりの活性回復がみとめられた。

以上の実験成績は次のように要約される。

- (1) 人及び数種の動物の血清の非透析性部分にみとめられる S. A. Factor に対する阻害作用は serum albumin による。
- (2) このような albumin の depressor 活性発現には SH 基がきわめて重要な役割を果している。
- (3) S. A. Factor 活性は低分子の sulfhydryl compounds によっても強く阻害され、また cysteine で還元することにより著しくその活性の低下した S. A. Factor は  $\text{H}_2\text{O}_2$  で再酸化することによりある程度その抗菌作用を回復する。

#### 論文の審査結果の要旨

本学予防歯科学教室での一連の研究の結果 *Lactobacillus* 等に作用する人唾液中の抗菌性蛋白質、S. A. Factor を阻害する因子がヒト、ウシ等の血清中に存在すること、この阻害因子は非透析性であり、又 S. A. Factor の活性発現に必要な cofactor を inactivate することによって作用するのではないことが明かにされ、serum depressor と名付けられた。しかしながら、この depressor の本態ならびに S. A. Factor 活性阻害機序は不明のままに残されている。

本論文は、このような serum depressor の実態および S. A. Factor 活性阻害機序の一端を明かにしたものである。

即ち、まず血清の非透析性部分にみとめられる depressor 活性の主体が albumin であることを明かにするとともに、albumin を SH 基反応剤で処理するとその depressor 活性が失われること、又 depressor 活性を異にする各種 albumin の反応性 SH 基の量と depressor 活性との間には対応関係がみとめられることから、albumin の反応性 SH 基が depressor 活性発現に重要な役割を果していることを明かにした。ついで S. A. Factor 活性は低分子の SH 化合物によっても強く阻害されることが、さらに cysteine による還元の結果著しく活性の低下した S. A. Factor は、 $\text{H}_2\text{O}_2$  で再酸化することによりその抗菌作用をある程度回復することを示した。

本研究の成績は、将来 S. A. Factor の活性構造を考究して行く上で固力な手掛りを与えることが期待され、又 S. A. Factor が血清に由来するか、唾液腺で産生される固有の物質であるか等の問題を追究して行くための基礎実験としても有意義な知見を提供するものである。

人唾液の示す抗菌作用の研究の進展に寄与するところが極めて大きいと考える。