



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	https://hdl.handle.net/11094/28716
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

主論文

學位論文

学部 予防科学教室
上田 正夫

人唾液中抗菌性因子(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

上田正夫

緒言

人唾液中に cofactor を必要とする抗乳酸菌因子が存在する²⁰⁾ ことについては、Zeldow (1959),
松村等¹⁰⁾ (1960), Kerr and Dogon⁵⁾ (1961, 1962) の
報告がある。Zeldow²⁰⁾ はこれを bactericidin と名付
け、松村等¹²⁾ は S.A. Factor と呼称し、Kerr 等⁶⁾ は、
antibacterial factor in human parotid secretion と呼んで
いる。いずれも透析によつて分けうる2つ

の成分、すなわち易熱性の非透析性成分と耐熱性の透析性成分とからなり、透析性成分 (cofactor) が SCN^- であることについては、^{2) 6) 21)} ずれの報告も一致している。しかし、非透析性成分の実態については S.A. Factor 以外にはまだ詳しい報告をみない。すなわち、人唾液中にみとめられる前記抗乳酸菌因子が唾液 lysozyme^{10) 20)}, bacteriophage²⁾, specific antibody¹⁰⁾, saliva parotin²⁾ 等とはその本態を異にすることはすでに以前から明かにされていたが、最近著者の属する研究室の岩本 (1964)¹⁾ は S.A. Factor を精製し、これが分子量 8 ~ 10 万の蛋白性物質であることを明かにした。

一方、S.A. Factor 活性が人血清にはみとめられず、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松村等 (1962)¹³⁾ によって報告され、ついで森岡 & Zeldow¹⁴⁾ はこの問題をさらに追究して、この阻害因子が人以外の数種の哺乳動物の血清中にも存在し、非透析性であること、又 SCN^- の cofactor とし

3
ての作用を inactivate する ことによ。て作用するのでははい ことを明かにし、血清中にみられるこの阻害因子を serum depressor と名付けた。

しかしながら、depressor の奥態ならびにその S.A. Factor 活性阻害残序については未だ明かでない。著者は血清中にみとめられる depressor 活性がどのようにして発現する のかを明かに しようとして以下に述べる研究を行った。

実験材料並びに方法

1 供試菌： 全実験を通じ Lactobacillus plantarum ATCC 8014 を被検菌とし、培地は Rogosa et al. (1951)¹⁶⁾ の SL 培地 (pH 5.4) から酸素を除き (以下 SL 液体培地と呼ぶ) autoclave で 15 ポンドにて 10 分間滅菌したものを利用した。

SL 液体培地の組成は次のとおりである。

Trypticase (B. B. L. Inc.)	10 g
Yeast extract (第五栄養化学 K. K.)	5 g
Glucose	20 g
KH_2PO_4	6 g
Ammonium citrate	2 g
Sodium acetate	25 g
Salt solution*	5 ml
Sorbitan monooleate (Atlas Powder Co.)	1 g
Glacial acetic acid	1.32 ml
Distilled water	を加えて 1 liter とする (pH は 5.4)。

* Salt solution の組成は、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (11.5 g),
 $\text{MnSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (2.4 g) および $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0.68 g) に蒸
 留水を加えて全量が 100 ml になるように
 したものである。

菌液： 上記供試菌を SL 液体培地 10 ml に
 18 時間前培養し、ついでこの培養菌の 0.5 ml
 を SL 液体培地 1.0 ml 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 によってこの培養菌液の
 濃度をばかり、SL 液体培地で適当に希釈し

て $O.D._{550\text{ m}\mu} = 0.040$ になるように菌濃度 (1.5×10^8 / ml 生菌に相当する) を調整した。

2. S. A. Factor : 食後 2 ~ 3 時間の人の安静混合唾液を採取し岩本 (1964)¹⁾ の方法により精製した標品を用いた。

S. A. Factor の cofactor としては 2 mg/ml の濃度の KSCN 溶液を反応系 (後述) にその $1/2$ 容量加えた (反応系での終末濃度は 0.17 mg/ml)。

3. 血清 : 人, 牛, 家兎および馬より常法にしたがってえた血清を 56°C で 30 分加熱して用いた。

4. 血清 albumin, globulin および mucoprotein 画分 : 牛血清の albumin および globulin 画分は、 4°C で硫酸アンモニウムによる塩析を行って分画した。血清の mucoprotein 画分は、牛血清を Weimer (1950)¹⁷⁾ の方法に準じて分画した。即ち、牛血清 500 ml に 1 M の sodium acetate 50 ml および緩イオン水 450 ml を加え全量を 1000 ml にした後、 2.73 M になるように硫酸アンモニウムを加え、東洋濾紙 No. 51 を用いて濾過可

る。 濾液を塩酸で pH 4.9 に調整し、東洋濾紙 No. 51 によって濾過し、沈渣は弃てる。 濾液を塩酸で pH 3.7 とし、同じく濾過により沈渣を除く。 最後の濾液に全飽和になるように硫酸アンモニウムを追加し、生じた沈渣を大量の脱イオン水に対して 4°C で 24 時間透析を行ったものを mucoprotein 画分として実験に供した。

5. S.A. Factor および depressor の活性度の算定:

(1) S.A. Factor 活性: 滅菌した 17 mm (内径) $\times$ 100 mm の比色用試験管に Table 1 に示すような組成の反応系 (全量 6 ml) および対照 (全量 6 ml) を調整して、Eryma spectrophotometer type CT を用い $550\text{ m}\mu$ の波長で培養前の浊度 (O.D.) を測定した後、 37°C で 6 時間培養した。

表 1

所定時間培養後の試験反応系および対照 (S.A. Factor はふくむが cofactor を除いたもの) の浊度を培養前の測定条件と同じ条件で測定し、この値 (O.D.) から培養前の O.D. を差しひい

て得られる値をそれぞれ T (反応系), C (対照) とし、次式により抑制率 (% inhibition) を求めた。

$$\% \text{ inhibition} = 100 \left(1 - \frac{T}{C} \right)$$

(2). Depressor 活性: Depressor を含まない反応系が示す % inhibition と depressor を含む反応系の % inhibition との差を求め、この値によって depressor 活性を表現した。この値は今回の実験では常に 90 ~ 100 % inhibition を示す必要最少量の S.A. Factor を反応系に加え、depressor 活性の測定感度を高めるよう配慮した。

6. SH 基の定量: Boyer (1954)⁴⁾ の spectrophotometric method に準じて行った。standard としては glutathione (Kirin Brewery Co.) を用いた。
即ち、PCMB (Sigma Chemical Co.) 溶液 3 ml を microsyringe を用いて被検溶液で滴定し、250 mμ の吸収増加を測定することにより被検材料の SH 基を定量した。

7. 蛋白質定量: Lowry et al. (1951)⁸⁾ の方法に準じて行った。standard としては recrystallized

egg albumin (Merck Co.) を用いた。

実験成績

1. 各種血清の S.A. Factor に対する阻害効果

人及び3種の哺乳動物、すなわち牛、馬、および家兎の血清について S.A. Factor 阻害作用の有無、程度をしらべた。

表 2

Table 2 の実験成績は、4種の血清のいずれもが S.A. Factor 活性を阻害することを示している。阻害の程度は牛の場合最も強く、人および家兎血清がこれにつき、馬血清は最も弱い。そこで以下の実験では多量に入手し易く、かつ阻害作用の最も強い牛血清を用いることにした。

2. 牛血清の albumin, globulin および mucoprotein 画分の S.A. Factor に対する阻害効果

血清の S.A. Factor 阻害作用が血清を 48 時間

4°C で攪拌透析後においても透析内液に認められることから、血清蛋白を albumin, globulin および mucoprotein に分画し、その各画分について depressor 活性の有無、程度をしらべた。

表 3

その結果、mucoprotein および globulin 画分には活性は認められず、albumin 画分にはのみ阻害活性が認められることが明らかとなった。

そこで、精製 bovine albumin Fr. V (Sigma Chemical Co.) および crystalline bovine albumin (Sigma Chemical Co.) についても depressor 活性をしらべた結果、そのいずれにも強い S.A. Factor 阻害作用がみえられた。一方、対照としてしらべた bovine および human globulin α , γ (Fr. IV, II; Nutritional Biochemicals Co.) には同様の depressor 活性は全く認められなかった。

3. Serum albumin の depressor としての活性基

Albumin にみとめられる depressor 活性が albumin のどのような特性によるかについての手掛りをうる目的で、蛋白質の種々の反応性基

のうちで極めて反応性に富み、かつ酸化、還元が可能である SH 基が depressor 活性の発現に關与するかどうかをしらべた。即ち、bovine albumin Fr. V と SH 基試薬と反応させ、反応性 SH 基の消失する結果 depressor 活性がどのように変化するかについて次のようにして検討した。4% albumin 溶液 2 ml と SH 基試薬 2 ml とを、それぞれの SH 基試薬に最も適した条件 (Table 4 参照) で 20°C において 60 分間反応させた後、 4°C で 24 時間、脱イオン水に対して攪拌透析を繰返し行って SH 基試薬をとり除き凍結濃縮し、その depressor 活性 を未処理 albumin のそれと比較した。

表 4

Table 4 に示すように、bovine serum albumin の depressor 活性が CdSO_4 を除き他の代表的な 5 種の SH 基試薬、すなわち CuSO_4 , AsNO_3 , PCMB , HgCl_2 , monoiodoacetate のいずれによっても著明に減弱されることが明らかとなった。以上の実験成績は、血清 albumin が depressor として効

くためには albumin の SH 基が関与するものであることを示唆している。

4. Serum albumin の SH 基の定量と depressor 活性

以上のようは成績がえられたので、さらに depressor 活性と SH 基との関係と stoichiometrical に明らかにするために、まず 3 種の結晶 albumin (bovine serum albumin, Sigma Chemical Co.; human serum albumin, Nutritional Biochemicals Co.; egg albumin, Sigma Chemical Co.) について反応性 SH 基の定量を行った。

図 1

Figure 1 は Boyer (1954)⁴⁾, Bemesch (1962)³⁾ の方法にしたがって、 $1.79 \times 10^{-5} M$ の PCMB 溶液 3 ml を 4% の各種結晶 albumin 溶液で滴定した場合の測定曲線である。いずれの場合にも直線関係が認められた。bovine serum albumin の場合最も少量の albumin 量すなわち 130 μl で終末点に達し、human albumin では 210 μl を要した。又 egg albumin の場合には実際に終末点を

えることができなかったが外挿法によって、およそ $1100 \mu\text{l}$ という値を与えた。このことは bovine albumin は反応性 SH 基含有量が最も多く、egg albumin のそれは最も少ないことを示すものである。

表 5

Table 5 は depressor 活性と SH 基濃度との関係を示したものである。bovine, human および egg albumin (いずれも結晶) について depressor 活性を比較すると (終末濃度 0.33% において), bovine albumin の活性が最も強く、egg albumin のそれが最も弱いことが示されている。一方、各 albumin の SH 基濃度を Figure 1 を用いて算出すると、bovine albumin では $34.5 \times 10^{-6} \text{M}$ と高く、human albumin では $21.0 \times 10^{-6} \text{M}$ とこれにつき、更に egg albumin では $4.2 \times 10^{-6} \text{M}$ と低いことがわかり、depressor 活性の強弱と SH 基濃度との間には明瞭な対応関係が認められる。また depressor 活性の認められない human serum globulin (α, γ) について同様に SH 基を測定したが、定量しうるほどの反応

性 SH 基を検出することができなかった (Table 5)。この事実も SH 基の重要性を裏書きしている。

表 6

そこで、反応性 SH 基濃度と depressor 活性 との関係を別の角度からしらべるための実験として、更に bovine, human 及び egg albumin (いずれも結晶) の各 12 について、いずれも反応性 SH 基の濃度が $16 \times 10^{-6} M$, $8 \times 10^{-6} M$ および $4 \times 10^{-6} M$ (いずれも反応系での終末濃度) にするようにし、それぞれ S.A. Factor に作用させて depressor 活性を比較した。その結果、Table 6 に示すように bovine, human 及び egg albumin の depressor 活性は、その反応性 SH 基濃度を同じにした場合にはよく一致し、又反応性 SH 基濃度が 2 倍になると depressor 活性もほぼ 2 倍になるといいうように、反応性 SH 基濃度と depressor 活性との間には密接な関係があることが確認された。

5. Serum albumin 以外の SH 化合物の

depressor 活性

Serum depressor の活性の発現に S H 基が重要な役割を演ずることを示されたので、低分子の S H 化合物すなわち cysteine, glutathione, 2,3-dimercapto-1-Propanol, thioglycolic acid, 2-mercapto-ethanol および sodium thiosulfate の 6 種について depressor 活性の有無をしらべた。

表 7

Table 7 には実験結果が示されているが、これら S H 化合物のいずれもが終末濃度 8×10^{-6} 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みとめられた。

以上の成績から S. A. Factor 活性の阻害には S H 基が密接な関係をもつことが明かにされた。

しかしながら、S H 基がどのようにして S. A. Factor の作用を阻害するかは以上の実験からは明かでない。この点について、本実験では系統的な研究は行わなかったが、その阻害機序の一端を明らかにする目的で cysteine を用いて S. A. Factor を還元し、ついで H_2O_2 で再酸

化する ことによつて S.A. Factor 活性がどのように影響されるかをしらべた。Figure 2 はその方法の概略を示したものである。

図 2

S.A. Factor (蛋白質として 1 mg) に対し 30 mg の l-cysteine (Sigma Chemical Co.) と 0.1 M の Tris(hydroxymethyl)aminomethane 溶液を加えて pH 8.0 に調整し、総量 2 ml の混合液を 18°C で 6 時間反応させた。反応液を流速 1 ml/分 で Sephadex (G-50, Coarse; Pharmacia Co.) と 2 号充填した column ($10 \text{ mm} \times 240 \text{ mm}$) を通過させ S.A. Factor と cysteine から分離する。分離した S.A. Factor はその一部を reduced S.A. Factor としてそのまま使用した。他の一部は終末濃度 0.005 % の H_2O_2 で酸化し oxidized S.A. Factor とした(ちなみに、この濃度の H_2O_2 は今回の実験条件では何等菌の増殖に影響をおよぼさないことが予備実験によつて確かめられた)。対照実験として、cysteine を加えなかった試料以外は同じ条件で処理した S.A. Factor を用いた。なお還元反応および Sepha-

dex によるゲル濾過は窒素ガス気流で行い、操作中空気による再酸化を極力防止するよう留意した。Figure 3 は cysteine で還元した S. A. Factor, および対照実験としての cysteine を Sephadex (G-50) column にかけ、流出する各 1 ml の fraction について、Lowry et al. (1951)⁸⁾ の方法にしたがって 700 m μ での吸収をばった成績を示している。

図 3

Peak A は S. A. Factor によるもので、Peak B は cysteine によるものであり、この操作により S. A. Factor から完全に cysteine を分離しうることがわかる。

表 8

Control, reduced および oxidized S. A. Factor のそれぞれについて S. A. Factor 活性をしらべた成績が Table 8 に示されている。Control の S. A. Factor 活性にくらべて reduced S. A. Factor では著しい活性の低下がみとめられ、一方還元され活性の減弱した S. A. Factor を H_2O_2 で再酸化したのもので

は完全ではないが明かな活性回復がみられる
ことが示されている。

考 察

松村等は人唾液中にみとめられる抗乳酸菌
因子 (S. A. Factor) が唾液腺において産生される
か、或は血清由来の物質であるかを知る目的
で研究を行い、その結果純唾液 (耳下腺、顎
舌下腺) には S. A. Factor 活性がみとめられるが
血清には活性がみとめられないことを明かに
する (松村等⁽¹²⁾, 1962) とともに、さらに血清中
には S. A. Factor 活性を阻害する因子が含まれて
いることを報告した (松村等⁽¹³⁾, 1962)。血清中
に S. A. Factor 阻害因子が存在するという事実は
教室の森岡によつて Zeldow の研究室において
も確認され、併せて人以外の数種の哺乳動物
の血清にも同様な阻害作用がみとめられるこ
と、又この阻害因子は非透析性で cofactor を

inactivate する = によって作用するものでは
ないことが示され、serum depressor と名付けら
れている (Morioka and Zeldow¹⁴⁾, 1962)。著者は
このような serum depressor の実態、およびその
S.A. Factor 活性阻害秩序を明らかにすべく実験を
行い、血清の非透析性部分にみとめられる dep-
ressor の主体が albumin であり、しかも albumin の
SH 基が depressor 活性にきわめて重要な役割
を果たしていることを明らかにした。更に低分
子の SH 化合物 (cysteine, glutathione 等) にも同
様の depressor 活性が認められることが示され
た。

Jellinek et al. (1939)⁷⁾ および Reid et al. (1948)¹⁵⁾
は iodide titration method により、人および牛の血
液中の reduced GSH を定量し、その濃度が $38 \frac{\text{mg}}{\text{dl}}$
($1.2 \times 10^{-3} \text{ M}$) であること及び reduced GSH は定量
中にも autoxidation されることを報告している。
今回の実験では血清中の反応性 SH 基濃
度は Boyer (1954)⁴⁾ の spectrophotometric titration me-
thod によってはかかったが、その値は血清全体

では $7 \times 10^{-4} M$ であり、serum albumin 画分では $4.8 \times 10^{-4} M$ であった。同様に定量を行った他の血清蛋白画分である globulin 及び mucoprotein 画分には問題とされるほどの反応性 SH 基が存在しないので、およそ $2.2 \times 10^{-4} M$ の反応性 SH 基が血清の透析性成分に含まれると考えられ、今回の実験で明かにされた低分子 SH 化合物の阻害活性についての成績からみて当然透析性成分にも depressor 活性が認められる筈である。松村等 (1962)⁽¹³⁾ は血清の透析性成分には depressor 活性がみとめられなかったと報告しているが、このような成績は透析および透析外液濃縮過程において glutathione その他の還元性物質が autoxidation されその阻害活性を失った結果と考えればわけなく説明できよう。なお本実験では albumin の depressor 活性が $CuSO_4$, PCMB, monoiodoacetate 等の SH 基試薬を作用させることによって消失し、又その由来を異にする各種の albumin についての比較実験の結果それらの depressor 活性と反応性 SH 基濃度と

の間に密接な関係のあることが明らかになり、depressor 活性の発現には反応性 SH 基が主要な役割を演じていることが結論された。しかしこのような結論は必ずしも albumin の depressor 活性の発現にその他の albumin の特性が関与する可能性を否定するものではない。

White (1960¹⁸⁾, 1961¹⁹) が 30~50 mg の purified bovine pancreatic ribonuclease を thioglycolate で還元失活し、更に空気酸化を行うことによりその酵素活性が回復することを報告している。S.A. Factor に反応性 SH 基が存在していることは予備実験によってみとめられていたが(上田、未発表)、還元後の S.A. Factor の SH 基濃度と活性低下度との関係、或は reduced S.A. Factor を酸化した場合の活性回復と SH 基の減少との関係等について今後さらに検討を重ね、S.A. Factor の構造解明の手がかりとしたい。しかしながら、この実験のためにほしくとも 30 mg の purified S.A. Factor を要することになり、これには混合唾液およそ 100 liter が必要で、材料採

取がこのような研究の進展を著しく困難にしている。

最後に松村等¹¹⁾(1960)によって人混合唾液の S.A. Factor 活性に著明な個人差があり、かつ唾液の S.A. Factor 活性の大小と caries susceptibility との間に相関関係がみとめられることが報告されているが、このような個人差が S.A. Factor の量自体の差によるものか、或は唾液中の阻害物質の多少に起因するものかが問題になりうる。しかし、混合唾液中の albumin 含有量については non-mucin protein fraction のおよそ 7.6 % に過ぎないことが報告されており⁹⁾、また混合唾液の反応性 SH 基濃度が血清のおよそ $\frac{1}{20}$ 量にすぎないことが示されたので(上田, 未発表), 唾液の S.A. Factor 濃度の大小が阻害物質の多少に起因する可能性は少いと考えられる。

結 論

1. 人およ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 SH 化合物 によっても強く阻害される。cysteine による還元の結果著しくその活性は低下した S.A. Factor は H_2O_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。

Tab. 1 Activity Test of S.A.Factor and the Depressor

	Reaction mixture		Control
	(1) ml	(2) ml	
S.A.Factor	1.0	1.0	1.0
KSCN (2mg/ml)	0.5	0.5	-
Bacterial suspension	0.5	0.5	0.5
SL medium	3.5	3.5	3.5
Depressor	-	0.5	-
Distilled water	0.5	-	1.0

Tab. 2 Depressor Activity of Serum on the S.A. Factor

Final dilution	Depressor activity (%)		
	1:12	1:24	1:48
Bovine serum	100	80	29
Human serum	100	40	11
Rabbit serum	100	50	13
Horse serum	75	55	9

Tab. 3 Depressor Activity of the Fractions Isolated from
Bovine Serum on the S.A. Factor

	Mucoprotein fraction	Albumin fraction	Globulin fraction	Whole serum
Depressor activity (%)	7	85	9	100

Tab. 4 Effect of -SH Reagents on Depressor Activity of Serum Albumin

-SH reagent*	Depressor activity (%)					
	CuSO ₄	AgNO ₃	CdSO ₄	PCMB	HgCl ₂	Iodoacetate
Treated albumin	10	2	66	19	20	18
Non-treated albumin	100					

* CuSO₄ 10⁻³M in 0.05 M phosphate buffer, pH 6.8
 AgNO₃ 10⁻⁴M in 0.1 M Tris buffer pH 7.4
 CdSO₄ 10⁻⁴M in 0.05 M phosphate buffer, pH 7.0
 PCMB 10⁻⁵M in 0.05 M phosphate buffer, pH 7.4
 HgCl₂ 10⁻⁵M in 0.05 M phosphate buffer, pH 7.0
 Monoiodoacetate 10⁻³M in 0.67 M Tris buffer, pH 7.5

Tab. 5 Depressor Activity of the Albumin and Globulin on the S.A. Factor

	Albumin*			Globulin*	
	Bovine	Human	Egg	Human α	Human δ
Depressor activity (%)	92	75	23	0	0
Reactive -SH group ($\times 10^{-6}$ M)	34.5	21.0	4.2	trace	trace

* Final concentration in the reaction mixture : 0.33 %

Tab. 6 Relationship between Depressor Activity of the Albumin and the Concentration of Reactive -SH Groups

Reactive -SH group*	Depressor activity (%)		
	$4 \times 10^{-6} \text{M}$	$8 \times 10^{-6} \text{M}$	$16 \times 10^{-6} \text{M}$
Bovine albumin	20	44	81
Human albumin	22	46	73
Egg albumin	25	45	78

* Final concentration in the reaction mixture

Tab. 7. Depressing Effect of Sulfhydryl Compounds on the S.A. Factor

	Depressor activity (%)		
	$8 \times 10^{-4} \text{M}$	$8 \times 10^{-5} \text{M}$	$8 \times 10^{-6} \text{M}$ *
Cysteine	100	75	60
Glutathione	100	71	36
B/A L**	100	67	42
Thioglycolic acid	100	68	33
2-Mercapto-ethanol	100	78	39
Sodium thiosulfate	100	38	28

* Final concentration in the reaction mixture

** 2,3-Dimercapto-1-propanol

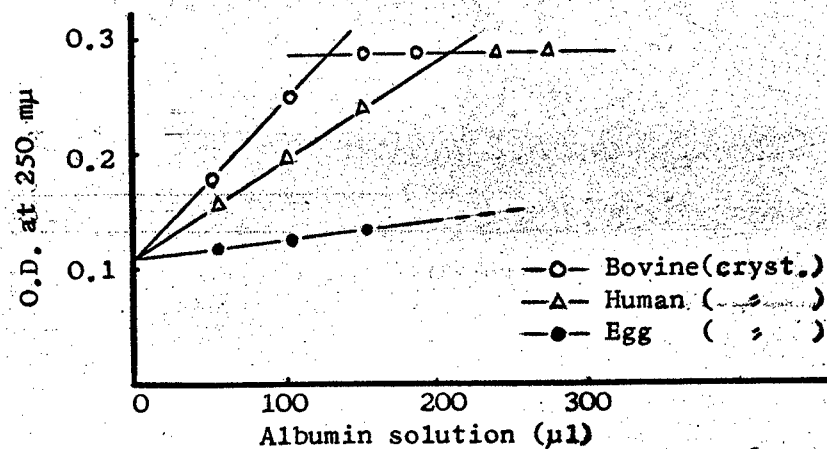
Tab. 8 Regeneration of S.A.Factor Activity by Hydrogen Peroxide Oxidation of Reduced S.A.Factor

Protein * ($\mu\text{g/ml}$)	S.A.Factor activity (% inhibition)		
	Control S.A.Factor	Reduced S.A.Factor	Oxidized S.A.Factor
0.80	100	97	92
0.40	97	48	93
0.20	95	15	65
0.10	45	0	30
0.05	0	0	0

* Final concentration in the reaction mixture

4-4

Fig.1 Spectrophotometric Titration of the Serum Albumin



3.0 ml of $1.79 \times 10^{-5} \text{M}$ p-mercuribenzoate in 0.05M phosphate buffer (pH 7.0) was titrated with 4% albumin solution

Fig. 2 Procedure for Reduction and Oxidation of S.A. Factor

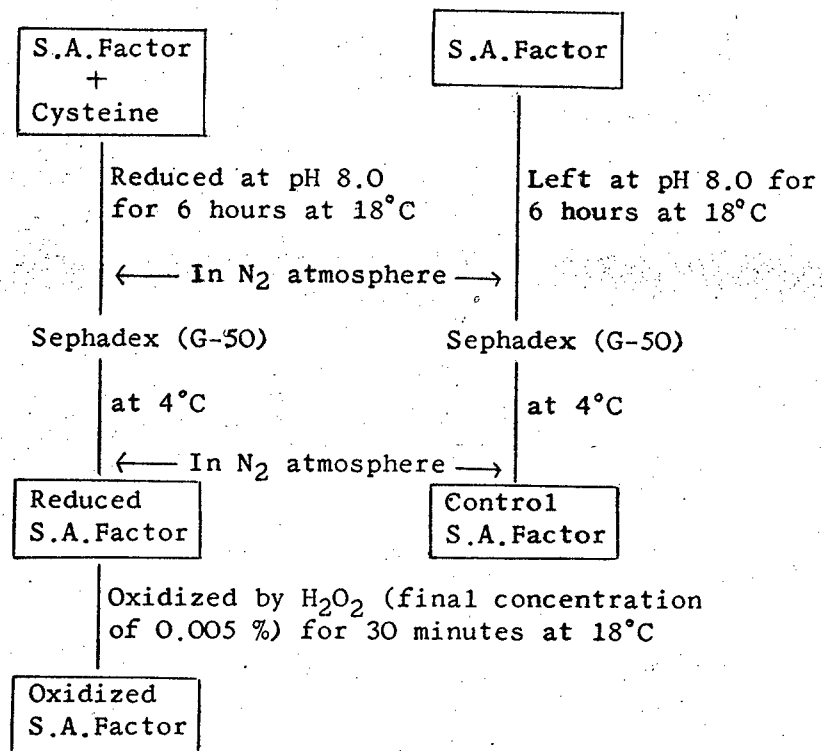
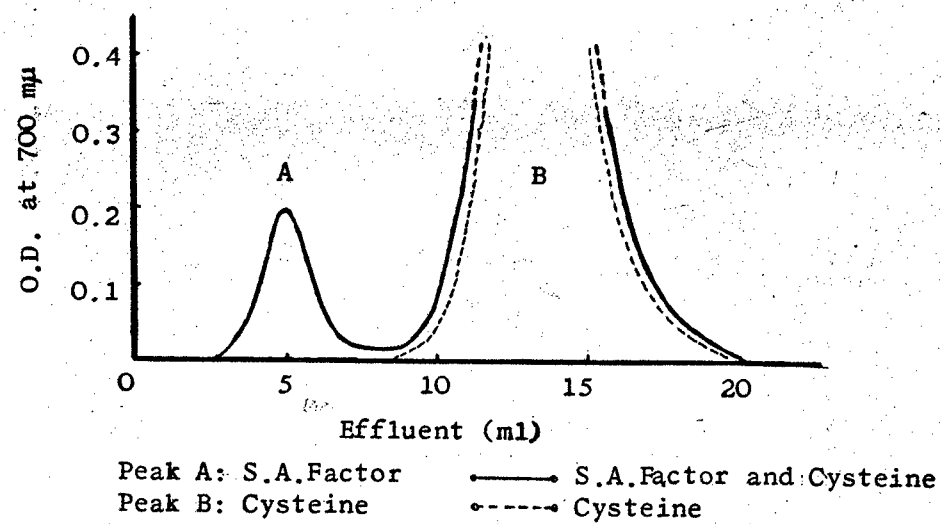


Fig. 3 Separation of Cysteine by Sephadex Column



稿を終るに悩み、終始御指導御校閲を頂いた恩師松村敏治教授に深く感謝いたします。

さらに御校閲、御教示を頂いた口腔細菌学教室小谷尚三教授、生化学教室竹田義郎教授に深謝いたしますと共に、終始御教示頂いた森岡講師並びに御協力いただいた予防歯科学教室諸兄に感謝します。

参考文献

- 1) 岩本義史：人唾液中抗菌性因子(S.A.Factor)の精製並びに特性に関する研究。阪大歯誌 9, 41-50, 1964
- 2) 大西利治：人唾液中の抗菌因子(S.A.Factor)に関する研究。阪大歯誌 7, 61-72, 1962
- 3) Benesch, R. and Benesch, R.E.: Determination of -SH groups in proteins; in Method of biochemical analysis. 10, John Wiley and Sons, Inc., New York, pp 43-70, 1962
- 4) Boyer, P.D. : Spectrophotometric study of the reaction of protein sulfhydryl groups with organic mercurialis. J. Am. Chem. Soc. 76, 4331-4337, 1954
- 5) Kerr, A.C. and Dogon, I.L.: Studies on the inhibition of Lactobacillus casei by parotid secretion. J. dent. Res. 40, 722, 1961
- 6) Dogon, I.L., Kerr, A.C. and Amdur, B.H.: Characterization of an antibacterial factor in human parotid secretions, active against Lactobacillus casei. Arch. oral Biol. 7, 81-90, 1962
- 7) Jellinek, E.M. and Looney, J.M.: Statistics of some biochemical variables on healthy men in the age range of twenty to forty-five years. J. biol. Chem. 128, 621-630, 1939
- 8) Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J.: Protein measurement with the folin phenol reagent. J. biol. Chem. 193, 265-275, 1951
- 9) Lundquist, F.: The chemical composition of saliva; in Biochemists's Handbook, 907-911, 1961

- 2
- 10) Matsumura, T., Morioka, T., Onishi, T. and Go, S.:
Studies on antilactobacillary factor in human saliva.
Dent. Bull. Osaka Univ. 1, 3-11, 1960
- 11) Matsumura, T., Morioka, T., Onishi, T., and Go, S.:
Studies on antilactobacillary factor in human saliva.
II. Relationship between the distribution of antilactobacillary factor and caries susceptibility. J. Osaka Univ. dent. Soc. 5, 147-150, 1960 (in Japanese, summary in English)
- 12) Matsumura, T., Morioka, T., Onishi, T., Iwamoto, Y.,
Ueda, M. and Hamada, K.: Studies on the antibacterial factor in human saliva (S.A. Factor). IV. Properties of the S.A. Factor. J. Osaka Univ. dent. Sch., 2, 73-80, 1962
- 13) Matsumura, T., Morioka, T., Onishi, T., Iwamoto, Y., Ueda, M. and Hamada, K.: Studies on the antibacterial factor in human saliva (S.A. Factor). V. Mode of action of the S.A. Factor. J. Osaka Univ. dent. Sch. 2, 81-88, 1962
- 14) Morioka, T. and Zeldow, B.J. : A serum depressor of the human salivary antilactobacillus factor. J. dent. Res. in press
- 15) Reid, J.T., Ward, G.M. and Salsbury, R.L. : Blood glutathione in the bovine. Amer. J. Physiol. 152, 633-636, 1948
- 16) Rogosa, M., Mitchel, J.A. and Weiseman, R.F.: A selective medium for the isolation and enumeration of oral lactobacilli. J. dent. Res. 30, 682-689, 1951

- 17) Weimer, H.E., Mehl, J.W. and Winzler, R. J.: Studies on the mucoproteins of human plasma. V. Isolation and characterization of a homogenous mucoprotein. J. biol. Chem. 185, 561-568, 1950
- 18) White, F.H., Jr.: Regeneration of Enzyme activity by air-oxidation of reduced ribonuclease with observation on thiolation during reduction with thioglycolate. J. biol. Chem. 235, 383-389, 1960
- 19) White, F.H., Jr. : Regeneration of native secondary and tertiary structures by air-oxidation of reduced ribonuclease. J. biol. Chem. 236, 1353-1360, 1961
- 20) Zeldow, B.J.: Studies on the antibacterial action of human saliva. I. A bactericidin for Lactobacilli. J. dent. Res. 38, 798-804, 1959
- 21) Zeldow, B.J.: Studies on the antibacterial action of human saliva. III. Cofactor requirements of a Lactobacillus Bactericidin. J. Immunol. 90, 12-16, 1963

Characterization of a Serum Depressor on the Human Salivary
Antibacterial Factor (S.A.Factor)

Masao Ueda

Department of Preventive Dentistry, Osaka University Dental
School, Osaka

A substance which depresses the salivary antibacterial factor (S.A.Factor) was found in human and some mammalian sera (Morioka and Zeldow, J. dent. Res., in press). Serum from ox, rabbit and man produced a great depression of the activity of the S.A. Factor. The serum depressor was non-dialyzable and was adsorbed on Bentonite. Crystalline albumin from bovine serum depressed the activity of the S.A.Factor, whereas globulin and mucoprotein had no effect. The activity of this substance was destroyed by sulfhydryl group reagents, such as CuSO_4 , AgNO_3 , CdSO_4 , p-mercuribenzoate, moniodoacetate and HgCl_2 . It is suggested that the sulfhydryl groups of the albumin are essential for the activity of this substance. The reactive sulfhydryl groups of serum albumins were determined by a spectrophotometric method (Boyer, P.D., J. Am. Chem. Soc., 76 : 4331-4337, 1954) for the titration of protein sulfhydryl groups with p-mercuribenzoate.

Crystalline bovine and human albumin contained more sulfhydryl groups than egg albumin. No reactive sulfhydryl groups were detected in human α and γ globulin. There were 34.5×10^{-6} M reactive sulfhydryl group in bovine albumin at a final concentration 0.33 per cent and this was shown to be enough to

have depressor activity. The depressor activity was proportional to the amount of reactive sulfhydryl groups. Sulfhydryl compounds, such as cysteine, glutathione, 2,3-dimercapto-1-propanol, thio-glycolic acid, 2-mercapto-ethanol and sodium thiosulfate, could replace the depressor activity.

Reduced and inactivated S.A. Factor by cysteine could be oxidized by hydrogen peroxide in relatively high yield with an activity approaching that of native S.A. Factor.