The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

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

学位論文

歯学部　予防歯科学教室
上田　正夫

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

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ことについては、Zeldow (1959)[20], 松村等 (1960)[10], Kerr and Dogon (1961[5], 1962[6]) の報告がある。Zeldow[20]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。いずれも遠析によって分けうる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いずれの報告も一致している。[2) 6) 21)] しかし、非透析性成分の実態についてはS.A.Factor以外には未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)]、bacteriophage[2)]、specific antibody[10)]、saliva parotin[2)]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、ついで森岡及びZeldow[14)]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

ての作用をinactivateすることによって作用するのではないことを明かにし、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の実態ならびにそのS.A.Factor活性阻害機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)から寒天を除き(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用いた。

SL液体培地の組成は次のとおりである。

Tripticase (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 (Atras 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、$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (11.5 g), $MnSO_4 \cdot 2H_2O$ (2.4 g) および $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ (0.68 g) に蒸溜水を加えて全量が 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.$_{550 m\mu}$ = 0.040 になるように菌濃度（1.5 x 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 1/12 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 1M の sodium acetate 50 ml および脱イオン水 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，東洋沪紙 No.51 を用いて沪過す

る。　沪液を塩酸でpH 4.9に調整し、東洋沪紙No.51によって沪過し、沈渣はすてる。　沪液を塩酸でpH 3.7とし、同じく沪過により沈渣を除く。　最後の沪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17mm(内径)×100mmの比色用試験管にTable 1に示すような組成の反応系(全量6ml)および対照(全量6ml)を調整して、Erma spectrophotometer type CTを用い550mμの波長で培養前の濁度(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)の濁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.をさしひい

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。

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

(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。ちなみに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活性の測定の感度を高めるよう配慮した。

6. SH基の定量: Boyer (1954)[4]のspectrophotometric methodに準じて行い、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]の方法に準じて行い、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ぎ、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 で撹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 画分にのみ阻害活性が認められることが明かとなった。

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 阻害作用がみとめられた。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.) には同様な 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活性の発現に関与するかどうかをしらべた。即ち、bovine albumin Fr. Vを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2mlとSH基試薬2ml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撹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$CuSO_4$，$AgNO_3$，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かとなった。以上の実験成績は、血清albuminがdepressorとして仂

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

以上のような成績がえられたので、さらにdepressor活性とSH基との関係をstoichiometricalに明かにするために、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], Benesch (1962)[3]の方法にしたがって、1.79×10^{-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 μlという値をえた。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34.5×10^{-6} Mと高く、human albuminでは21.0×10^{-6} Mとこれにつぎ、更にegg albuminでは4.2×10^{-6} 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およびegg albumin（いずれも結晶）の各々について、いずれも反応性SH基の濃度が $16\times10^{-6}M$, $8\times10^{-6}M$ および $4\times10^{-6}M$（いずれも反応系での終末濃度）になるようにし、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および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活性もほゞ2倍になるというように、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SH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SH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SH基が密接な関係をもつことが明かになった。

しかしながら、SH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

化することによって 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（蛋白量として 1 mg）に対し 30 mg の l-cysteine（Sigma Chemical Co.）を 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.）を 2 g 充填した column（10 mm × 240 mm）を通過させ S.A.Factor を 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って確められた）。 対照実験として、cysteine を加えなかった点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 によるゲル沪過は窒素ガス気流中で行い、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 mμ での吸収をはか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 によるものであって、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、一方還元された活性の減弱した S.A.Factor を H_2O_2 で再酸化したもので

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、その結果耳唾液（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って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 すること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 Zeldow[14], 1962）。著者はこのような serum depressor の実態，およびその S.A. Factor 活性阻害機序を明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 depressor 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していることを明かにした。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 mg/dl（1.2×10^{-3} 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 method によってはかったが、その値は血清全体

では 7×10^{-4} M であり、serum albumin 画分では 4.8 $\times10^{-4}$ 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 2.2×10^{-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かにされ、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らずしも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 (1960[18], 1961[19]) 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基が存在しないことは予備実験によってみとめられているが(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、この実験のためには少くとも 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(1960)[11]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の低下した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 (1) ml	Reaction mixture (2) ml	Control 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

	Depressor activity (%)		
Final dilution	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

	Depressor activity (%)					
-SH reagent*	$CuSO_4$	$AgNO_3$	$CdSO_4$	PCMB	$HgCl_2$	Iodoacetate
Treated albumin	10	2	66	19	20	18
Non-treated albumin	100					

* $CuSO_4$ 10^{-3}M in 0.05 M phosphate buffer, pH 6.8
$AgNO_3$ 10^{-4}M in 0.1 M Tris buffer pH 7.4
$CdSO_4$ 10^{-4}M in 0.05 M phosphate buffer, pH 7.0
PCMB 10^{-5}M in 0.05 M phosphate buffer, pH 7.4
$HgCl_2$ 10^{-5}M in 0.05 M phosphate buffer, pH 7.0
Monoiodoacetate 10^{-3}M 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	γ
Depressor activity (%)	92	75	23	0	0
Reactive -SH group (x 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

	Depressor activity (%)		
Reactive -SH group*	$4x10^{-6}M$	$8x10^{-6}M$	$16x10^{-6}M$
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 (%)		
	$8x10^{-4}M$	$8x10^{-5}M$	$8x10^{-6}M$ *
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

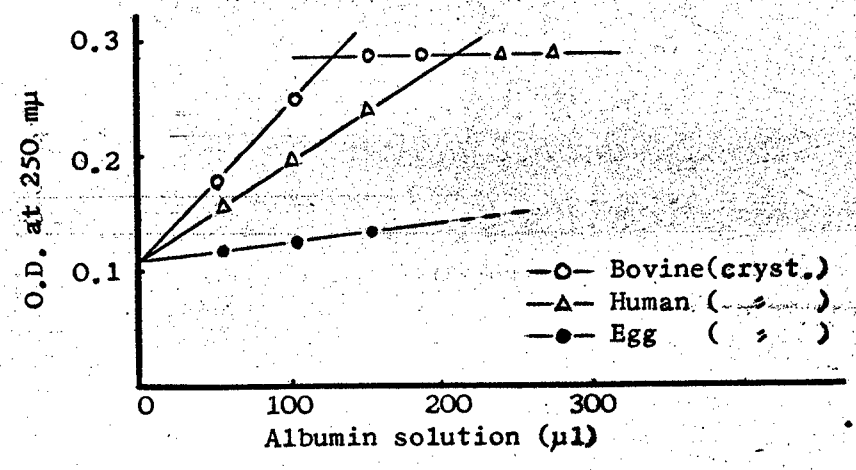
Tab. 8 Regeneration of S.A.Factor Activity by Hydrogen Peroxide Oxidation of Reduced S.A.Factor

	S.A.Factor activity (% inhibition)		
Protein * (μg/ml)	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-A

Fig.1 Spectrophotometric Titration of the Serum Albumin



3.0 ml of 1.79×10^{-5}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

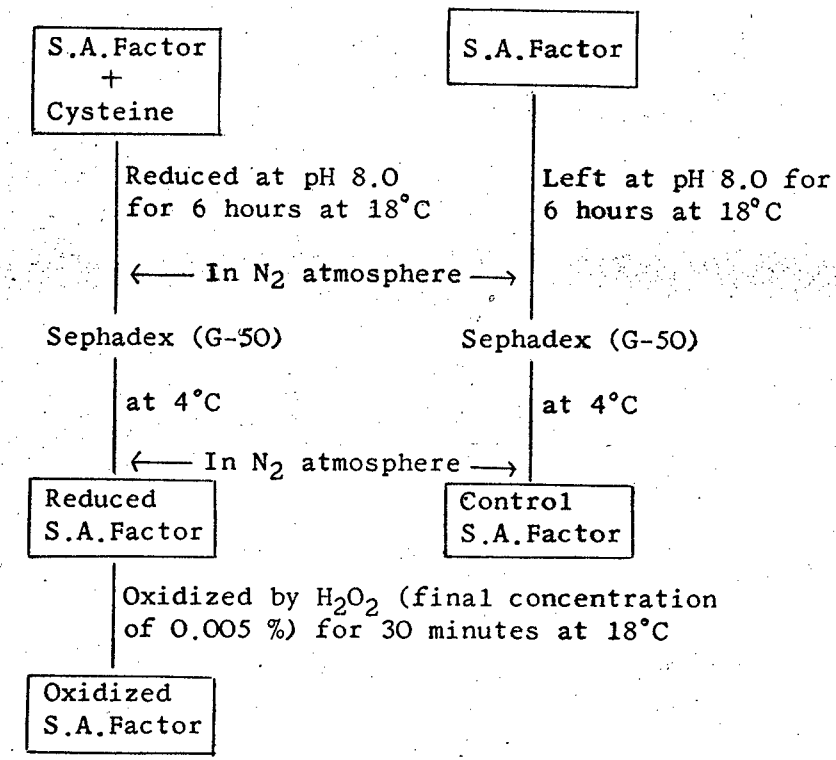
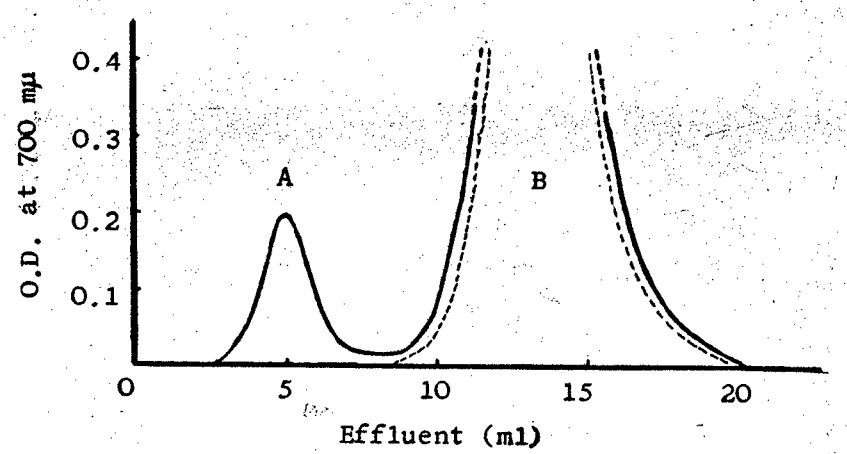


Fig. 3 Separation of Cysteine by Sephadex Column



Peak A: S.A.Factor ——— S.A.Factor and Cysteine
Peak B: Cysteine - - - - - Cysteine

稿を終るに臨み、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, 81-9o, 1962

7) Jellinek, E.M. and Looney, J.M.: Statistics of some biochemcal 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

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, monoiodoacetate 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, thioglycolic 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.