

Title	唾液抗菌因子S. A. Factor (唾液peroxidase) の Lactobacillus plantarumに対する殺菌作用に関する 研究
Author(s)	井上, 昌一
Citation	
Issue Date	
Text Version	none
URL	http://hdl.handle.net/11094/29637
DOI	
rights	
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

【 2 】

氏名・(本籍)	井 上 昌 一 いの うえ まさ かず
学位の種類	歯 学 博 士
学位記番号	第 1 4 0 3 号
学位授与の日付	昭 和 4 3 年 3 月 2 8 日
学位授与の要件	歯学研究科歯学臨床系 学位規則第5条第1項該当
学位論文名	唾液抗菌因子 S. A. Factor (唾液 peroxidase) の <i>Lactobacillus plantarum</i> に対する殺菌作用に関する研究
論文審査委員	(主査) 教授 松村 敏治 (副査) 教授 小谷 尚三 教授 竹田 義朗

論 文 内 容 の 要 旨

人唾液に認められる抗乳酸菌作用は、易熱性成分(分子量約9万の塩基性蛋白質)と耐熱性の透析性成分(SCN⁻)との働きによることが明かにされている。

最近, Klebanoff 等 (1965, 1966), Oram 等 (1966) および岩本等 (1967) により, 唾液抗菌因子の (S. A. Factor) の *Lactobacillus plantarum* に対する抗菌作用は, KSCN および H₂O₂ の存在下に, その peroxidase 作用を介して発現することを示唆する結果が報告されている。

著者は, 本研究で, まず *L. plantarum* 細胞壁によって S. A. Factor が吸着されることを認め, ついで S. A. Factor を吸着した菌は適当な条件下で著しくその viability を減ずることを明らかにし, さらにこのような事実を基礎にして S. A. Factor の抗菌作用の発現機序についての手掛りを得ようと試みた。

実験に供試した菌は, SL broth に培養した *L. plantarum* ATCC 8014株である。その細胞壁標品は, 菌体を Braun の cell homogenizer で機械的に破壊したのから分画遠沈により分離した。

S. A. Factor としては, 人の安静混合唾液を硫酸で塩析して得た 30~60%飽和沈澱画分, およびこの画分を CM-cellulose column chromatography および Sephadex による gel filtration によって部分精製した lysozyme 活性を示さない標品を使用し, lysozyme としては, 上述の唾液の硫酸濃縮画分を CM-cellulose column chromatography にかけて得た S. A. Factor 活性を欠く唾液 lysozyme および結晶卵白 lysozyme 標品を用いた。

S. A. Factor の *L. plantarum* に対する増殖阻止作用の検定は, SL broth を用いる岩本 (1964) の記載に従い, 一方殺菌作用の検定のための生菌数の算定は SL 寒天培地を用いる混釈培養法によった。

また peroxidase 活性は, *o*-dianisidine を基質として用い, Klebanoff (1965) の方法に従って測

定した。

得られた実験結果は次のとおりである。

I *L. plantarum* 細胞表面による S. A. Factor の吸着

高分子の抗菌因子の活性発現には、一般に被検菌表面への接触あるいは結合が極めて重要な段階をなすものと考えられる。この点について検討を加え、次の結果を得た。

1. *L. plantarum* から分離した細胞壁標品は、0.01M, pH5.4 の磷酸緩衝液 (p-buffer) 中で強い S. A. Factor 吸着能を示した。

2. 細胞壁の示す S. A. Factor 吸着活性は、細胞壁標品を trypsin で消化しあるいは pH5.4 で 130°C, 30分間加熱してもそこなわれなかったが、三塩化醋酸で teichoic acid を抽出除去することにより消失した。

3. S. A. Factor の細胞壁による吸着は、吸着時の pH が中性ではほぼ半減し、pH7.8 では著しく弱まった。また pH5.4 でも、0.05M の NaCl を添加すると吸着は殆ど認められなくなった。

4. 細胞壁は、濃縮唾液中に認められる lysozyme および peroxidase 活性をも吸着により除去した。peroxidase 活性の吸着は、吸着時の pH および塩濃度により S. A. Factor 活性の場合と同様な阻害を受けることが示された。

5. 細胞壁に一旦吸着された S. A. Factor および peroxidase 活性は pH 7.8 の p-buffer により溶出されたが、lysozyme 活性の溶出は認められなかった。一方、0.15M NaCl を加えた pH5.4 の 0.01M p-buffer によっては、S. A. Factor および lysozyme の両活性が、ともに溶出された。

6. 生菌にも、細胞壁標品と本質的に同様な、S. A. Factor 吸着作用が認められた。

II S. A. Factor の *L. plantarum* に対する殺菌作用

L. plantarum による上述のような S. A. Factor の吸着は、SL broth 中では著しく阻害され、また S. A. Factor は SL broth 中ですみやかに失活する (ただし、この失活は KSCN の存在により保護される)。これらの所見は SL broth を用いる従来の検定方法では S. A. Factor 活性が過少に評価される可能性のあることを示唆している。そこで I の結果、および Klebanoff 等ならびに Oram 等の報告を参考にして、殺菌効果を指標とすると次のような新しい検定方法を考案した。

1. 175 μ M の KSCN, 35 μ M の H₂O₂ および/あるいは 2.5mM の glucose を含む 0.01M, pH 5.4 の p-buffer 中で、*L. plantarum* 生菌と種々の量の S. A. Factor とを所定時間 37°C で反応させることにより、S. A. Factor が *L. plantarum* に対して極めて強い殺菌作用を有することが明らかにされた。

2. S. A. Factor の殺菌効果は、使用した S. A. Factor 量にほぼ比例し、十分量の S. A. Factor を用いた場合には、10⁸個/ml の *L. plantarum* は3時間の反応で 10²個/ml に減少した。またその殺菌効果は、中性では殆ど完全に消失し、NaCl を加えることにより大幅に減弱した。

3. S. A. Factor の殺菌作用は、被検菌と S. A. Factor とをセロファン膜で隔てることにより著しく弱められた。また S. A. Factor を表面に吸着した *L. plantarum* は、過剰の S. A. Factor を洗滌除去したのちにも、0.01M, pH 5.4 の p-buffer 中ですみやかに死滅した。これらの事実は、S. A. Factor の殺菌作用の発現に、S. A. Factor が被検菌表面に吸着されることの重要性を示すも

のと考えられる。

4. しかし他面, S. A. Factor と被検菌との接触を妨げた場合にも弱いながら殺菌作用がみられ, また被検菌を含まず S. A. Factor, KSCN および H_2O_2 の3者のみよりなる反応系で, 直接的な殺菌物質の産生が認められた。ただしこの殺菌性物質は極めて不安定であった。

以上の所見から, S. A. Factor の *L. plantarum* 細胞を面への吸着結合は, その殺菌作用の発現に必須な条件ではないが, 上述の不安定な殺菌物質にその作用を効率よく発揮させるという意味で, S. A. Factor の活性発現のための重要な段階であると考えられる。

Ⅲ S. A. Factor と lysozyme との共同作用

唾液ならびに卵白 lysozyme は, KSCN および H_2O_2 の存在しない条件で, *L. plantarum* に対して殺菌作用を示した。しかしこの作用は, lysozyme の特異な酵素作用である *N*-acetyl muramidase によるものではなく, その塩基性蛋白質としての特性に基くと考えられ, protamine sulfate にも同様な殺菌作用が認められた。S. A. Factor とこれら塩基性蛋白質の間には, *L. plantarum* に対する殺菌効果において, 相加, 条件によっては相剰的な効果が認められた。

Ⅳ 混合唾液中における *L. plantarum* 殺菌作用

混合唾液についても, 以上述べた p-buffer 中での場合と同様な機序による明瞭な *L. plantarum* 殺菌作用が認められた。

Ⅴ *L. plantarum* に対する horseradish peroxidase の作用

pH5.4 の 0.01M p-buffer 中において, horseradish peroxidase は, S. A. Factor と同様, *L. plantarum* により吸着された。しかし horseradish peroxidase は *L. plantarum* に対して, SL broth 中における増殖阻止ならびに p-buffer 中における殺菌作用のいずれをも示さなかった。

以上を要するに, 著者の実験の結果, (1)唾液中の S. A. Factor が, *L. plantarum* に対して従来認められなかった明瞭な殺菌作用を示すこと, (2)この際, 細胞表面への S. A. Factor の吸着は, S. A. Factor 作用発現の必須な条件ではないが, 殺菌作用を最も効率よく行わせる点で, 極めて重要な段階であること, (3)この事実を反映して, S. A. Factor の殺菌作用は, 反応系の pH あるいは塩濃度により著しく影響されること, さらに(4) S. A. Factor と lysozyme とは, *L. plantarum* に対する殺菌作用において, 共同作用を示すことなどの事実が明らかにされた。

論文の審査結果の要旨

本研究は, 唾液抗菌因子 S. A. Factor (唾液 peroxidase) の抗菌機序について検討を加えたものであり, 特に, 該因子は *Lactobacillus plantarum* の細胞表面に吸着されること, および適当な条件下で, 従来認められなかった明瞭な殺菌作用を示すこと, を明らかにした点で価値ある業績であると考えられる。

よって, 本研究者は歯学協士の学位を得る資格があるものと認める。