短 報

ヒト耳下腺唾液のヨウ素結合力, 総タンパク量, amylase 活性および thiocyanate 濃度の日内変動

Diurnal variations of the binding amounts of iodine, total proteins, amylase activities and concentrations of thiocyanate in human parotid saliva.

渋谷 睦*, 真木吉信*, 高江洲義矩*
Mutsumi SHIBUYA*, Yoshinobu MAKI*
and Yoshinori TAKAESU*

緒 言

著者らは, Polyvinylpyrrolidone-iodine (PVP-I) の口腔内局所応用時に観察される PVP-I の退色現象は唾液中に存在するヨウ素結合因子 (IBF: iodine binding factor) に起因し, この IBF は混合唾液中よりも耳下腺唾液中に多く存在する可溶性タンパク成分の一部であることを既に報告した¹⁾。

唾液成分の変動に circadian rhythm が観察されることは Ferguson ら²⁾により報告されている。そこで, 起床直後から就寝に至る耳下腺唾液のヨウ素結合力, 総タンパク量および amylase 活性値の変動について検討を行なった。同時に, 生体内におけるタンパクの酵素的ヨウ素化を阻害し³⁾, 喫煙者の唾液中に高濃度で検出される thiocyanate ion (SCN^-)⁴⁾ についての検討を加えた。さらに, SDS-Polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) による泳動パターンの変化を検索した。

材料および方法

耳下腺唾液: 成人男子 (35歳, 喫煙者) について, Curby cup を用いて 2% クエン酸刺激下で耳下腺唾液 10 ml を起床直後 (6:00) から 2 時間間隔で 20:00 まで 3 時間にわたり採取し直ちに氷冷した。なお, 8:00, 12:00 および 20:00 の採取は各食事直後に行い, 食事内容は特に制限しなかった。

ヨウ素結合力の測定: 唾液試料 1 ml に 1% PVP-I

* 東京歯科大学口腔衛生学教室 (主任: 高江洲義矩教授)

* Department of Preventive and Community Dentistry, Tokyo Dental College (Director: Prof. Yoshinori TAKAESU)

(BASF, A. G., West-Germany) 溶液 2 ml を加え, 密栓 37°C 10 分間反応させ, 0.005N チオ硫酸ナトリウム試液 (指示薬: デンプン試液) で蒸留水 1 ml を対照に滴定を行い, 対照の I_2 量から唾液試料 1 ml のヨウ素結合力を算出した。

総タンパク量の測定: Lowry の方法に準拠し, ヒト・アルブミン (Sigma Chem. Co., U.S.A.) で検量線を作成し, 唾液試料 1 ml 当りの総タンパク量を求めた。

Amylase 活性の測定: 唾液試料を 10,000 倍に希釈後, Caraway の方法に準拠して測定を行い, amylase 活性は Somogyi 単位で算出した。

Thiocyanate 濃度の測定: Densen⁵⁾ の方法に準拠し, 唾液試料 1 ml 中 thiocyanate 濃度の比色定量を行った。

SDS-PAGE: 唾液試料 1 ml に冷メチルアルコール 1 ml を加え 1 時間氷冷後, 3,000r.p.m. 5 分間遠心分離を行なった。この上清について, Laemmli の方法に準拠して 10~20% polyacrylamide gradient gel (第一化学薬品, 東京) を用いて電気泳動を行なった。泳動後, gel は Oakley の方法に準じて銀染色を行なった。なお, 分子量マーカーは M. W. range 12,300~78,000, calibration kit (BDH Chem. LTD., U. K.) を使用した。

結 果

Fig. 1 は, 唾液試料のヨウ素結合力, 総タンパク量, amylase 活性値および thiocyanate 濃度の日内変動を 3 日間の平均値で示したものである。いずれの測定項目も, 起床直後が日内における最低値を示し, thiocyanate 濃度以外は食後に測定値が増加する傾向を示した。ヨウ素結合力と各測定項目の単相関係数は, 総タンパク量: 0.607, amylase 活性値: 0.414 および thiocyanate 濃度: 0.119 であった。ヨウ素結合力と他の 3 項目との間の重相関係数は 0.833 ($p < 0.01$) で各単相関係数よりも高い相関性を示した。また, 総タンパク量と amylase 活性値および thiocyanate 濃度の単相関係数は 0.956 および 0.169 を示し, amylase 活性値と thiocyanate 濃度では 0.124 であった。

Fig. 2 は, 耳下腺唾液成分の日内変動を SDS-PAGE で検討した泳動像である。起床直後の band は他の採取時間の唾液試料と比較し不明瞭であったが, 泳動パターンに変化は認められなかった。また, 約 60kd に認められる amylase の band は Fig. 1 で示した活性値の変動と同様に食後の試料に濃く現れていたが, これを日内変動で見ると特に新たな band の出現と消失は見られな

Fig. 1 Diurnal variations of binding amounts of iodine, total proteins, amylase activities and concentrations of thiocyanate in human stimulated parotid saliva.
a) Lowry method, b) Caraway method (Somogyi units), c) Colorimetric method, d) Immediately after rising, e, f, g) Immediately after meal.

かった。

考 察

唾液中の総タンパク量が血清中の1/30程度であるのに対して、唾液のヨウ素結合量は血清の1/3であることについては既に報告した¹⁾。これは、ヨウ素と結合する因子 (IBF) が血清中に比べて唾液中に特異的に多く存在する可能性を示唆している。しかし、唾液の成分は採取時間あるいは刺激の種類により変動する^{2, 6)}。また、唾液の無機成分は唾液腺により異なり⁷⁾、さらに混合唾液中では細菌数に日内変動が観察される⁸⁾。

そこで今回は、漿液性の耳下腺唾液について一定の刺激 (2%クエン酸) により得られた試料の日内変動を検討した。その結果、thiocyanate 濃度以外ではいずれも類似した変動パターンを示したが、起床直後と日内における最大値との変動幅は、ヨウ素結合量が1.2倍に対して総タンパク量および amylase 活性値は2.7倍および2.6倍であった。ヨウ素結合量と各測定項目の単相関係数が0.1~0.6程度であったのは各項目の変動幅の相違によるものと考えられる。

Thiocyanate は喫煙者の唾液中に非喫煙者と比較し有意に高濃度で検出される^{4, 7)}。今回の被験者の喫煙本数は2本/hr. であったが、日内において経時的に thiocyanate 濃度は上昇する傾向を示した。Thiocyanate は

Fig. 2 SDS-polyacrylamide gel (10-20% gradient gel) electrophoretic patterns of diurnal variation of human stimulated parotid saliva. The gel was stained with silver. Lane 1 and 11, molecular weight markers; lane 2, 6:00 (immediately after rising); lane 3, 8:00 (after meal); lane 4, 10:00; lane 5, 12:00 (after meal); lane 6, 14:00; lane 7, 16:00; lane 8, 18:00; lane 9, 20:00 (after meal); lane 10, 22:00.

甲状腺で tyrosine のヨウ素化を阻害することが知られているが、これは peroxidase が触媒するヨウ素イオンの酸化を阻害し、活性型のヨウ素 (I_2 , HOI 等) の形成が抑制されるためである⁹⁾。今回の実験系では、ヨウ素は活性型で存在しており thiocyanate 濃度がヨウ素結合量に直接関係しているとは考えられず、ヨウ素結合量と thiocyanate 濃度の変動にも相関性は見られなかった。しかし、唾液タンパクは酵素的にヨウ素化されることが知られており⁹⁾、今回の反応系において一部イオン化したヨウ素のタンパクへの結合を thiocyanate が阻害していることも考えられる。この推定は、ヨウ素結合量と各測定項目の単相関係数よりも総タンパク量および amylase 活性値に thiocyanate 濃度の変動を加えた重相関係数が0.833 ($p < 0.01$) と高くなることから支持される。

唾液流出速度は、今回の実験系が刺激唾液であったため、採取時間による変動はほとんど認められず ($0.69 \pm 0.08 \text{ ml/min}$)、各測定項目は流速に影響されていないと考える。食後に観察される総タンパク量の増加は amylase の増加が関与しているが、唾液中の amylase 分泌は流速に影響されず、神経性やホルモンの調節を受けているため¹⁰⁾、今回の観測された変動は、食事 (咀嚼、食品) による刺激に対する生体反射と考えられる。

食後にヨウ素結合量が上昇することから、ヨウ素結合量の変動に総タンパク量あるいは amylase 活性値が関与していることが類推される。しかし、総タンパク量および amylase 活性値の高い食後以外の時間帯においてヨウ素結合量が起床直後とほぼ同一のレベルにあることは、耳下腺唾液中の amylase 以外の因子が IBF として関与している可能性を示唆している。そこで、SDS-PAGE による泳動 band の日内変動パターンを観察したが、起床直後の泳動像が他に比較し amylase をはじめとして全体的に不明瞭であった他は新たな band の出現や消失などの大きな変化は認められなかった。今後は各 band に対応するタンパクを分離し、これらのヨウ素結合量の検索が必要であると考えられた。

結 論

刺激耳下腺唾液のヨウ素結合量、総タンパク量、amylase 活性および thiocyanate 濃度の日内変動について検討し以下の結論を得た。

1. いずれの測定項目も起床直後に日内の最低値を記録し、thiocyanate 濃度以外は食後に上昇する類似した変動パターンを示した。

2. ヨウ素結合量と他の3項目の単相関係数は、総タンパク量: 0.607, amylase 活性値: 0.414および thiocyanate 濃度: 0.119であった。また、ヨウ素結合量と他の3項目全ての重相関係数が0.833 ($p < 0.01$) と高い値を示したことは、タンパクのヨウ素化の抑制因子と考えられる thiocyanate も反応系に関与していることが示唆された。

3. 総タンパク量と amylase 活性値の単相関係数が0.956を示したことは、総タンパク量の変動が amylase 分泌量に依存しているものと考えられた。

4. SDS-PAGE による泳動 band の日内変動パターン観察では、起床直後の泳動像が不明瞭であるが、他に新たな band の出現あるいは消失は認められなかった。

文 献

- 1) 渋谷 睦: PVP-I 溶液中有効ヨウ素 I_2 と唾液の反応性に関する基礎的研究, 口腔衛生会誌, 38; 172-179, 1988.
- 2) Ferguson, D. B., Fort, A., Elliott, A. L. and Potts, A. J.: Circadian rhythms in

human parotid saliva flow rate and composition, Archs oral Biol., 18; 1155-1173, 1973.

- 3) Tenovuo, J.: Inhibition by thiocyanate of lactoperoxidase-catalysed oxidation and iodination reactions, Archs oral Biol., 23; 899-903, 1978.
- 4) Azen, E. A.: Salivary peroxidase activity and thiocyanate concentration in human subjects with genetic variants of salivary peroxidase, Archs oral Biol., 23; 801-805, 1978.
- 5) Densen, P. M., Davidow, B., Bass, H. E. and Jones, E. W.: A chemical test for smoking exposure, Arch Environ Health 14; 865-874, 1967.
- 6) Dawes, C.: The effects of flow rate and duration of stimulation on the concentrations of protein and the main electrolytes in human parotid saliva Archs oral Biol., 14; 277-294, 1969.
- 7) Menaker, L. (ed): The biologic basis of dental caries, Harper & Row. Publishers Inc., 1980, p. 132-147.
- 8) Shibuya, M., Maki, Y. and Takaesu, Y.: Diurnal variation of caries activity test score with the RD test, Bull. Tokyo Dent. Coll., 27; 87-93, 1986.
- 9) Sarimo, S. S. and Tenovuo, J.: Enzymically iodinated human salivary proteins, Biochem. J., 167; 23-29, 1977.
- 10) Newbrun, E.: Observations on the amylase content and flow rate of human saliva following gustatory stimulation, J. Dent. Res., 41; 459-465, 1962.

Key words: Diurnal variation, Parotid Saliva, Iodine, Salivary protein, Amylase, Thiocyanate

索引用語: 日内変動, 耳下腺唾液, ヨウ素, 唾液タンパク, アミラーゼ, チオシアネート