抗ヒト唾液 α -Amylase 血清によるヒト唾液の
免疫化学的証明に関する基礎的研究

沢田 英夫

岐阜大学医学部法医学教室¹⁾

Studies on Immunochemical Identification of Human Saliva
by Anti-Human Salivary α -Amylase Serum

HIDEO SAWADA

Department of Legal Medicine, Gifu University School of Medicine¹⁾

(Received May 22, 1969)

Isolation and purification of α -amylase from human saliva were carried out by column chromatography on Sephadex G-25 and on DEAE-cellulose. A specific antiserum was obtained from rabbits by intramuscular administration of purified α -amylase mixed with equal volume of complete Freund's adjuvant. This antiserum showed positive reactions in agarose gel immunodiffusion against human saliva and purified α -amylase at the minimum protein concentration of 25 μ g/ml and 10 μ g/ml, respectively.

The amylase prepared from human saliva, pancreas and Fallopian tube cyst showed different electrophoretic mobilities on thin-layer gel of agarose, but the antigenicity of each amylase preparation to the anti- α -amylase obtained above was identical.

The anti- α -amylase inhibited 72 to 76% of the enzymatic activity of the amylases of human saliva, pancreas and Fallopian tube cyst fluid and 54 to 57% of the enzymatic activity of the amylases of human serum and urine. Human liver and seminal plasma amylases were not inhibited by this antiserum, suggesting that these enzymes are different structurally and immunologically from the amylases of human saliva, pancreas and Fallopian tube cyst fluid as well as human serum and urine.

緒 言

裁判化学の実地上、証拠物件の鑑定に唾液および唾液斑の検査を行なう場合がしばしばある。唾液の証明には唾液腺分泌液に含まれている α -amylase の検出が広く実際面に利用されていて、本酵素の検出には、試薬による化学的方法²⁾のほか、抗ヒト唾液免疫血清を用いる免疫学的方法³⁾が行なわれている。しかし、ヒト唾液蛋白には、ヒト血清蛋白と共通な蛋白成分⁴⁾、たとえば albumin, Ig A, Ig G などの存在が知られ、唾液以外の他の体液に対しても副反応を示し、したがって、ヒト唾液に対して特異性が低く、その確実な証明が困難である。

著者は、唾液中に特に多量含まれる α -amylase を Sephadex および DEAE-cellulose column chromatography により分離精製し、えられた α -amylase を抗原として家兎に免疫して抗血清を作製し、本抗血清を用いて、ヒト唾液 α -amylase とヒト体液（精漿、血清、尿、卵管囊胞液）、肝および脾 α -amylase との免疫学的差異について薄層アガロースゲル電気泳動、免疫電気泳動、免疫拡散を行ない、抗ヒト唾液 α -amylase 血清の特異性について検討し、ヒト唾液の検出への利用を試みたので報告する。

1) Location : Tsukasamachi 40, Gifu (岐阜市司町40)。

2) 吉田一美, 長崎医学会雑誌, **35**, 30 (1960); K. Thoma, *Archiv für Kriminologie*, **128**, 38 (1961)。

3) G. J. Revis, *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, **128**, 1110 (1968); 古屋義人, 犯罪学雑誌, **34**, 155 (1968)。

4) P. L. Masson, A. O. Carbonara, J. F. Hermans, *Biochim. Biophys. Acta*, **107**, 458 (1965); H. E. Schultze, J. F. Hermans, "Molecular Biology of Human Proteins," Vol. 1, Elsevier Publishing Company, Amsterdam, 1966, p. 766; 原三郎, 井上徳治, 小柳嘉子, 医学のあゆみ, **67**, 561 (1968)。

実験材料および方法

唾液 清水でよく含嗽後、全唾液を試験管に採取し、ガラス綿でろ過し、3000rpm、15分間遠心沈殿してその上清を用いた。

精漿 射精後、30分間室温に放置し、液化させたのち3000rpm、15分間遠心沈殿してその上清を用いた。

血清および尿 正常健康人から採取した新鮮なものをを用いた。

卵管囊胞液 手術時剔出した卵管周辺に存在する囊胞から採取した新鮮な透明液を用いた。

肝、脾の抽出液 解剖時剔出した新鮮な臓器を用い、10倍量の0.15M NaClを加えて氷冷しながら、ガラスホモジナイザーでホモジナイズし、10000rpm、30分間冷却遠心沈殿してその上清を用いた。

α -Amylaseの活性測定 Bernfeld 法⁵⁾にしたがって行なった。すなわち、基質液 (Merck 製可溶性澱粉を1%の割合に0.0067M NaClを含む0.02M phosphate buffer, pH 6.9に溶解したもの) 1mlに酵素液 (適当な濃度に希釈したもの) 1mlを加えて37°, 3分間 incubate し、3,5-dinitrosalicylic acid 試薬 (3,5-dinitrosalicylic acid 1gに2N NaOH 20ml, 純水 50mlを加えて溶解させ、これに Rochelle 塩 30gを加え、純水を加えて全量を100mlとしたもの) 2mlを加えて反応を停止させ、流水中で冷却し、純水 10mlをさらに加えて希釈したのち、540m μ における吸光度を測定した。生成した maltose 1mgに相当する酵素活性値を1 amylase 単位 (AU) とした。

薄層アガロースゲル電気泳動 アガロースゲルの作製は Ogita 等⁶⁾の方法にしたがって行なった。すなわち、0.3M potassium phosphate buffer (pH 6.8) 250mlを純水で3 literに希釈し、この stock buffer solution 10mlに純水 90mlを加え、これにアガロース 0.7g, hydroxyethylcellulose 0.1gを加えて加熱溶解し、0.9mmの厚さのゲル板 (8cm $\times$ 20cm) を作製し、1夜氷室に保存後用いた。電極槽は、stock buffer solution を純水で2倍に希釈したものを用いた。試料は、2mm $\times$ 10mmのろ紙片に付着させ、ゲル板上に30分間放置してゲルに試料を十分吸着させたのち、ろ紙片を除去し、泳動を行なった。また、ゲル板上での免疫電気泳動は、予め幅2mmのろ紙片2枚で、ゲル板に溝を作り、試料をこの原点に毛細管を用いて入れ、泳動したのち、抗血清の溝を

作り、抗血清を入れて室温に放置し、沈降線の出現を観察した。

アガロースゲル免疫電気泳動 1%の割合にアガロースを veronal-HCl buffer, pH 8.2 ($\mu=0.05$)に溶解してゲルを作製し、LKB 製 (Sweden) 装置を用い、200V, 2時間の条件で泳動を行ない、抗原抗体反応により沈降線を観察した。

免疫拡散 1%の割合にアガロースを0.15M NaClに溶解し、ゲルを作製して中央の穴に抗体をおき、周囲に抗原をおいて24—48時間後の沈降線を観察した。

Amylase およびその特異沈降線の検出 ゲル板を澱粉溶液⁷⁾ (Michaelis buffer, pH 8.6, $\mu=0.05$, 30mlに純水 70mlを加え、これに可溶性澱粉 3gを加えて加熱溶解したもの) に37°, 30分間浸したのち、液を流去し、つぎに、20% sulfosalicylic acid に室温で10分間浸したのち、液を流去して0.01N I₂-KI 液を加えて反応させ、amylase 活性部位は脱色し透明なスポットまたは沈降線として確認した。Amylase 活性部位は、ゲル板下に直接印画紙をおいて接写を行なった。

抗ヒト血清免疫血清および抗ヒト血清各分画免疫家兔血清 Behringwerke 製 (Germany) の各種抗血清を用いた。

実験成績

ヒト唾液 α -Amylase の精製

数人のヒト全唾液を採取し、氷室に1夜静置したのち、ガラス綿を用いてろ過し、ろ液を遠心沈殿し、その上清を原唾液として、Shainkin & Birk 法⁸⁾により分離精製した。最初、原唾液 100—200mlを、予め純水で十分水洗した Sephadex G-25 (coarse, Pharmacia, Sweden) を用いてcolumn chromatography (3.5cm $\times$ 50cm) を行ない、純水で溶出し、溶出液を6—8mlずつ fraction collector で分取し、各分画の蛋白量、amylase 活性を測定し、粗 amylase 分画をえた。唾液蛋白は、2分画に分離され、最初の分画 (I) に amylase 活性を認めたが、分画 (II) は活性を認めなかった (Fig. 1)。最初の amylase 分画を次に DEAE-cellulose column chromatography (2.5cm $\times$ 30cm) を開始液として0.005M ammonium acetate (pH 6.7)、最終液として0.1M ammonium acetate (pH 6.7)を用いて gradient 溶出を行ない、amylase 活性蛋白分画をえた。さらに DEAE-cellulose column

5) P. Bernfeld, "Methods in Enzymology," Vol. 1, ed. by S. P. Colowick, N. O. Kaplan, Academic Press, New York, 1955, p. 149.

6) Z. Ogita, *Med. J. Osaka Univ.*, **15**, 141 (1964); S. Ogita, *Med. J. Osaka Univ.*, **17**, 271 (1966).

7) F. Scheiffarth, H. Goetz, *Klin. Wochschr.*, **42**, 130 (1964).

8) R. Shainkin, Y. Birk, *Biochem. Biophys. Acta*, **122**, 153 (1966).

Fig. 1. Elution Diagram of a Chromatography of Filtered Human Saliva (100 ml) on Sephadex G-25 Column (3.0 cm x 40.0 cm)

Elution was performed with distilled water at a flow-rate of 400 ml/h and 6 ml-fractions were collected.

—: E_{280} m μ , protein content
---: enzyme activity (amylase unit)

(1.5 cm x 20 cm) により再 chromatography を開始液 0.005M ammonium acetate (pH 6.7), 最終液 0.03M ammonium acetate (pH 6.7) を用いて同様 gradient 溶出を行ない精製した。各精製 amylase 活性分画の酵素比活性 (3 例平均値) は, それぞれ原唾液 104 AU/mg, Sephadex G-25 I 分画 1390 AU/mg, 第 1 回 DEAE-cellulose 精製分画 2782 AU/mg, 第 2 回 DEAE-cellulose 精製分画 3818 AU/mg であった。

抗ヒト唾液 α -Amylase 血清の作製

前記の第 2 回 DEAE-cellulose 精製分画を抗原として家兎に体重 1 kg 当り 1 mg を complete adjuvant (Iatron 製) とともに 1 週間ごとに 4 回筋注射し, 最終注射 10 日後に頸動脈から全採血し, 抗血清を分離した。えられた抗血清は, 免疫拡散法により観察した結果, 抗血清原液に対し, ヒト唾液, 精製 α -amylase はそれぞれ, 25 μ g/ml, 10 μ g/ml の希釈蛋白濃度まで反応陽性を示した。

ヒト唾液 α -Amylase とその精製各分画の免疫電気泳動的所見

ヒト唾液 α -amylase の精製過程における amylase 活性パターンを薄層アガロースゲル電気泳動を行なって観察した結果, Fig. 2 に示すように, 唾液中には原点より陽極側に 1 個, 原点付近に 1 個, 原点より陰極側に 2 個計 4 個の isozyme を認めた。Sephadex G-25 column chromatography でえられた amylase 分画は, 陰極側の isozyme が主で, 精製 α -amylase は, そのうち原点

Fig. 2. Thin-Layer Agarose Gel Electrophoretic Patterns of Human Salivary and Pancreatic Amylases

Agarose gel electrophoresis employing a potassium phosphate buffer of pH 6.8, $\mu=0.01$.

constant current : 1 mA/cm

Duration of run : 90 min

Amylase position was indicated by clear zone on a purple field of starch iodine complex after the incubated starch-agar gel slide had been developed in an iodine-potassium iodine solution.

1, 2, 5, 6 : human saliva

3, 4 : crude α -amylase fraction from Sephadex G-25

7, 8 : human pancreas extract

9, 10 : pure α -amylase (rechromatographed fraction from DEAE-cellulose column)

より陰極側に移動する最も酵素活性の強いパターンのみからなることがわかり, 膵 amylase と明らかにその易動度が異なっている。なお, 卵管嚢胞液中の amylase 活性部位は, 原点より僅かに陽極側に移動することを認め, 精漿, 血清, 尿, 肝抽出液についても同様, 泳動を行なって amylase の検出を行なったが, いずれも活性が弱く, 明らかな amylase 活性部位を認めなかった。

精製過程における各分画中のヒト血清蛋白の混在を, アガロースゲル免疫電気泳動により, 抗ヒト血清, 抗ヒト血清各分画免疫血清を用いて観察した結果, Fig. 3 に示すように, Sephadex G-25 I 分画は, アルブミン, Ig A, Ig G を検出し, 第 1 回 DEAE-cellulose 精製分画にもなお Ig G の混在を認めたが, 第 2 回 DEAE-cellulose 精製分画には血清蛋白の混在を認めなかった。

抗ヒト唾液 α -Amylase 血清の免疫化学的検討

抗原として, 唾液, 膵抽出液および精製 α -amylase を用いて薄層アガロースゲル板により免疫電気泳動を行な

Fig. 3. Agarose Gel Immunoelectrophoresis of Various Fractions Obtained during the Isolation of Salivary α -Amylase

S : human saliva
A : active fraction from Sephadex G-25 column
B : active fraction from DEAE-cellulose column
C : rechromatographed fraction from DEAE-cellulose column
Developed with antiserum against human serum proteins.

って観察した結果, Fig. 4 に示すように, 唾液には原点より陰極側に 3 本の沈降線を認め, うち 1 本は強く反応し, いずれの沈降線も, I_2 -KI 澱粉試薬により α -amylase 活性を認めた. 精製 α -Amylase は, Fig. 2 に示した易

Fig. 4. Thin-Layer Agarose Gel Immunoelectrophoretic Analysis of Human Salivary and Pancreatic Amylases

A : human saliva
B : human pancreas extract
C : pure α -amylase (rechromatographed fraction from DEAE-cellulose column)
Developed with rabbit anti-human salivary α -amylase.

動度に相当する部位に強い 1 本の沈降線を検出し. 膵 amylase の沈降線とその易動度が異なることが判明した.

免疫拡散により, 精漿, 血清, 尿, 卵管囊胞液, 肝および膵抽出液を抗原として, 沈降線を観察した結果, Fig. 5 に示すように, 精漿, 血清, 尿, 肝抽出液はいずれも反応陰性であったが, 卵管囊胞液は唾液, 膵抽出液の沈降線と融合し, いずれの沈降線も amylase 活性を示した.

Fig. 5. Double Immunodiffusion in Agarose Gel

The plate with rabbit anti-human salivary α -amylase in the central well and various human antigens in peripheral wells.

H.S. : saliva
F : Fallopian tube cyst
P : pancreas extract
S : serum
S.P. : seminal plasma
L : liver extract

抗ヒト唾液 α -Amylase 血清による酵素活性阻害実験

McGeachin & Reynolds 法⁹⁾に従って行なった. 0.15M NaCl で 20 倍に希釈した抗血清を用い, これに α -amylase を含む試料 (試料の amylase 活性が 0.4—2.0 AU/ml になるように調製) を同量加えて, 37°, 0—100 分間 (20 分間隔) で incubate したのち, 前記の α -amylase 活性測定法に従って, 酵素活性を求め, 対照家兔血清 (免疫前血清) を用いて同様操作を行ない, 60 分間 incubate したのちの抗血清の酵素活性阻害率を求めた. その結果は Table I に示すように, 唾液, 卵管囊胞液, 膵抽出液に対して, ほぼ同程度の強い阻害作用 (72—76%) を示し, 血清, 尿には中等度 (54—57%), 肝抽出液, 精漿にはほとんど阻害が認められなかった.

考 察

ヒト唾液中には, 血清蛋白に共通な成分の他, 唾液特有な蛋白成分⁴⁾として double component (DC), cathodic

9) R.L. McGeachin, J.M. Reynolds, *J. Biol. Chem.*, **234**, 1456 (1959).

TABLE I. Inhibition of Amylases by Rabbit Antiserum against Human Salivary α -Amylase

Origins of amylase	Percent inhibition at 1:20 dilution of antiserum
Saliva	72
Pancreas	72
Fallopian tube cyst fluid	76
Serum	57
Urine	54
Liver	7
Seminal plasma	0

Equal volumes of the amylase-containing solution (antigen solution) and diluted antiserum (1:20 dilution in 0.15M NaCl) were mixed, and allowed to stand for 60 min. The amylase-containing solution was prepared by dilution of the original body fluids or tissue extracts with 0.15M NaCl so as to give the equal amylase activity level.

component(CC), 唾液 α_1 -globulin, 唾液 α_2 -globulin, 唾液 β_1 -globulin, blood group substance などが含まれ, 唾液酵素¹⁰⁾ として α -amylase, acid phosphatase, β -glucuronidase, lysozyme などの他, 10 種類以上の多数の酵素が存在している. 特に, ヒト唾液 α -amylase は主として耳下腺から分泌され, ヒトの他, ブタ, けつ歯類動物等の唾液中でも多量の amylase が存在するが, ウマ, イヌ, ネコ等の動物の唾液には分泌されないことが知られている. ヒト唾液には, 4-7 個の isozyme¹¹⁾ が存在し, 年齢および個人差について興味ある研究¹²⁾ が報告されている.

ヒト唾液の証明には, amylase を検出する酵素化学的方法が広く行なわれているが, 本酵素はほとんどすべての動物, 植物, 微生物に広く分布し, したがって, 非特異的な化学的呈色反応によって, その異同を判別することは非常に困難である.

著者は, 唾液中に特に多量含まれる α -amylase を, 従来行なわれてきたアセトン, 硫酸分画法^{5,13)} に代る Sephadex G-25 および DEAE-cellulose column chromatography により短時間に分離精製し, 原唾液の約 40 倍の酵素比活性を有し, 電気泳動的に単一な α -amylase をえた. 本酵素を家兎に免疫してえた抗血清について, そ

の免疫学的特異性を検討した.

抗血清との反応を薄層アガロースゲル免疫電気泳動により観察した結果, ヒト唾液に対し, 3 本の amylase 活性を有する isozyme の沈降線を認め, うち 1 本の強い沈降線は, 抗原に相当する amylase であり, 膵 amylase とその易動度には明らかな差異がみられたが, 抗原性は同一であった. また, ヒト卵管囊胞液中に含まれる amylase¹⁴⁾ は, 血清 amylase の数百倍強い活性を有し, 膵 amylase と同様, 電気泳動による易動度は異なるが, いずれも抗ヒト唾液 α -amylase 血清によって唾液 amylase とほぼ同程度の阻害作用を示し, 免疫拡散法により, その抗原性の異同を観察したが, それらの沈降線が唾液 amylase といずれも融合し, 抗原性が同一で, その沈降線には I_2 -KI 澱粉試薬により明らかに amylase 活性を認めた. 血清, 尿 amylase に対する抗血清の阻害率は, 肝 amylase と唾液, 膵 amylase とのほぼ中間値を示し, 尿 amylase は, 血清から腎の糸球体を通過して, 尿中に移行するという McGeachin 等¹⁵⁾ の見解と一致した成績をえた. 肝および精漿 amylase はほとんど阻害作用をうけず, 唾液 amylase とその起源が異なり, 免疫学的にも著しい差異がみられ, 臓器特異性のあることを認めた. したがって, これらの結果から amylase の抗原性と活性構造について考察すると, 唾液, 膵, 卵管囊胞に存在する amylase の酵素活性基は, amylase の抗原基に接近して, 抗体分子によって掩われるため, 大部分の酵素活性が阻害されるものと考えられる.

ヒト唾液の証明に, 抗ヒト唾液 α -amylase 血清を用いる酵素免疫学的方法は, 鋭敏度が高く, 従来行なわれている化学的呈色反応および, 抗ヒト唾液免疫血清を用いる方法と比較して, 臓器特異性の点で優れていることから, 微量唾液の確実な証明法として十分利用できると思われる.

結 論

1. ヒト唾液から α -amylase を Sephadex G-25 および DEAE-cellulose を用いて column chromatography を行なって精製した. 本酵素を家兎に免疫して, 特異性の高い抗ヒト唾液 α -amylase 血清をえた. 本抗血清は

- 10) H.H. Chauncey, *J. Am. Dent. Ass.*, **63**, 361 (1961).
- 11) R.O. Wolf, L. L. Taylor, *Nature*, **213**, 1128 (1967); J. Muus, J. M. Venenchak, *Nature*, **204**, 284 (1964).
- 12) S. Ogita, *Med. J. Osaka Univ.*, **17**, 271 (1996).
- 13) E.H. Fischer, E.A. Stein, "Biochemical Preparation," Vol. 18, ed. by A. Meister, Jon Wiley & Sons.
- 14) C. L. Green, *Am. J. Obst. Gynec.*, **73**, 402 (1957); R. L. McGeachin, L. A. Hargen, B. A. Potter, New York; A. T. Daus, Jr., *Proc. Soc. Exptl. Med.*, **99**, 130 (1958).
- 15) R. L. McGeachin, J. M. Reynolds, J. I. Huddleston, Jr., *Arch. Biochem. Biophys.*, **93**, 387 (1961).

ヒト唾液, 抗原の α -amylase に対してそれぞれ, 免疫拡散により 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の蛋白濃度まで反応陽性であった.

2. 薄層アガロースゲル免疫電気泳動, 免疫拡散により抗血清の免疫学的特異性について検討した結果, ヒト唾液, 脾, 卵管囊胞液に存在する amylase は, いずれも易動度に明らかな差異を認めたが, 同一抗原性を示した. また, 精漿, 血清, 尿, 肝 amylase は唾液 amylase とその抗原性が異なることを認めた.

3. 抗血清による阻害実験の結果, 唾液, 脾, 卵管囊胞 amylase は 72—76 %, 血清, 尿 amylase は 54—57 %, 肝 amylase は 7 %, 精漿 amylase は 0 % のそれぞれ阻害率を示し, ヒト唾液, 脾, 卵管囊胞 amylase はいずれも分泌器官は異なるが, amylase 抗原構造が非常に類似しているものと考えられる.

謝辞 終わりに, 御助言, 御校閲をいただいた矢田昭一教授, ならびに御協力いただいた坂井田幸子学士に感謝いたします.