アパタイトへのタンパク吸着に対する塩類の影響

伊 藤 隆
い と う たかし

日本歯科大学生化学教室 (主任 三代幸彦教授)*

〔受付: 昭和45年12月28日〕

歯とくにエナメル質表面の後天性構造物としては, acquired pellicle, dental plaque, calculus, food debris がある¹⁾。これらは歯の直接の外部環境をなして歯学上重要な領域であり, その生成機序の研究は物質代謝の研究とともに口腔生物学における興味ある課題である。

後天性皮膜として最初に形成されるのが, 歯面にじかに接する acquired pellicle (獲得皮膜) である。分析結果によると細菌細胞壁物質 murein の構成因子である muramic acid, teichoic acid, D-glutamic acid, L-および D-alanine が検出されるほか, 2, 6-diaminopimelic acid, lysine, glycine, serine, aspartic acid も常に含まれるという²⁻⁴⁾。他方, acquired pellicle のタンパク質のアミノ酸組成を調べた成績によると, dental plaque のそれと非常によく似ていて同時に, 顎・舌下腺唾液あるいは全唾液の酸沈澱物のアミノ酸組成と類似するという (耳下腺唾液の酸沈澱物との間にはこの関係はない)^{3, 4)}。LEACH⁵⁾の言うように, acquired pellicle のタンパク質が, ついで生じる dental plaque と同様に, 唾液タンパクとくにムチン由来であることが示唆される [もっとも, ARMSTRONG⁶⁾ HAYWARD⁷⁾によると, ごく初期を除いて, acquired pellicle の形成 (成熟過程) には細菌の関与を無視できない]。同じく口腔内で生じる denture pellicle (義歯表面に沈着する褐色のペリクル様構造物) は6%に糖質を含む糖タンパクであるという⁹⁾。しかしそのアミノ酸組成は, 唾液糖タンパクとはかなり異なってい

る⁹⁾。唾液糖タンパクが破壊されてから一部が沈着するのか, あるいは歯面の場合とは違うタンパク質が沈着するのではないかという。いずれにしても, 歯面にできる acquired pellicle には, hydroxylapatite の特性が何か関係していると思われる。

以前からタンパク質や酵素の分離法の1つとして, 磷酸カルシウム化合物によるクロマトグラフィーがある。ZITTLE¹⁰⁾は $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ や hydroxylapatite にタンパク質が吸着されることをしめし, しかもタンパク質によって吸着に差があるところから, 酵素の純化や生物試料タンパクの分離が可能であることを示唆した。また, TISELIUS¹¹⁾ や BERNARDI¹²⁾ もタンパク質やポリペプチドについて hydroxylapatite のカラムクロマトグラフィーを行ない, HJERTEN¹³⁾ は血清タンパクについて, ELLISON¹⁴⁾ は唾液タンパクについて応用を試みている。

歯の主成分は hydroxylapatite であるから, これらの知見は歯の表面に唾液タンパクが容易に吸着することを考えさせる。PEARCE¹⁵⁾ は 100-200mesh の牛歯エナメル粉に対する11種のタンパク質 (casein, gelatin, β -lactoglobulin, human serum β -lipoprotein, egg albumin, bovine haemoglobin, bovine serum albumin, bovine serum $\alpha \cdot \beta \cdot \gamma$ -globulin, gastric mucin) の吸着を調べ, それぞれに差はあるが, どのタンパク質も吸着されることをしめした。さらに casein や gelatin を用いて, 接触時間, pH, 粒度などの影響をみ

Effects of some salts on protein adsorption by hydroxylapatite

T. ITO (Department of Biochemistry, Nippon Dental College, Fujimi, Chiyoda-ku, Tokyo)

* 東京都千代田区富士見 1-9-20 (〒102)

Jap. J. Oral Biol. 13: 70-84, 1971.

ている¹⁶⁾。JAMIESON¹⁷⁾は amylase, lysozyme, neuraminidase など酵素のエナメル粉への吸着を, RÖLLA ら¹⁸⁾は唾液タンパク (amylase, lysozyme, virus inhibiting glycoprotein, blood group substance)や dextran の hydroxylapatite への吸着をくわしく調べている。

先に述べたように, acquired pellicle はそのアミノ酸組成が唾液の酸沈澱物に似ていて, dental plaque 同様に唾液ムチンに由来するのように思われる。McGAUGHEY ら¹⁹⁾も, hydroxylapatite やエナメル粉に吸着するおもな画分は唾液ムチンであろうと述べている。しかし, 唾液にはいろいろのタンパク質が含まれているし, 唾液ムチンの精製は困難であるから, 結論はまだえられていない²⁰⁻²²⁾。HAY²²⁾は hydroxylapatite やエナメル粉への唾液タンパクの吸着をディスク電気泳動法によって追究し, band 4 の画分がもっともよく吸着すると述べている。しかし, このタンパク画分が何であるかは同定されていないし, また吸着タンパクのシアル酸を定量したところでは, その含有量は非常に少ないという。はたして吸着タンパクが唾液ムチンであるのか, あるいは neuraminidase をもつ細菌の作用でシアル酸がすでにムチンから離れてしまっているのか明らかでない(シアル酸は口腔内では容易にムチンから離れる²³⁻²⁷⁾)。PIGMAN ら²⁸⁾によると, 牛頸下腺唾液成分のなかで, シアル酸含有の多い画分は吸着しないが, シアル酸の少ない画分はよく吸着するという。また ARMSTRONG²⁹⁾は耳下腺唾液糖タンパクの吸着を示唆している。しかし他方 RÖLLA ら¹⁸⁾は, 人唾液のシアル酸含有糖タンパクが非常に高い親和性を持つと述べている。

唾液には無機陽イオンとして, K, Na, Mg, Ca などが含まれている。これらのうち, とくに 2 価イオンはタンパク質との相互作用が考えられる。これらの塩類がアパタイトへのタンパク吸着にどのような影響を及ぼすかを知りたいと考え, 唾液にも存在する albumin, lysozyme, γ -globulin の各純品を用いて $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, hydroxylapatite への吸着実験を行なった。

基礎実験

アパタイトなど固相へのタンパク吸着量を調べるには, 固相に吸着しているタンパク質を phosphate buffer 中で分離させてこれを定量する方法と, 液相のタンパク濃度の減少を測定する方法がある。前者は, 唾液などのように液相にいろいろのタンパク質が含まれている場合に適用される。しかし, 単一タンパク試料の実験では後者の方法で十分と考えられ, 吸着タンパク分離能についての心配はいらない。反面, 沈澱などの吸着以外の現象を考慮する必要があるが, 特種のタンパク質でない限り通常は無視してよいであろう。

また吸着操作には, 固相をカラムにつめて液相を流す方法と, 固相と液相を混合攪拌後遠心沈澱する方法がある。前者は混合タンパク試料の場合に有利であるが, 単一タンパク試料の場合は後者の方が便利である。

著者の実験は単一タンパク試料の吸着を調べるのであるから, 吸着量測定も吸着操作とともに後者の方法を用いることにし, そのための基礎的実験をまず行なった。

1) 唾液の光吸収スペクトル

人全唾液をセロファン膜によって $4 \sim 5^\circ\text{C}$ で 24 時間透析したのち, 内液をさらに水で 4 倍に希釈し, 久保田卓上遠心器 (FT-9S あるいは KCF-624) を用い 10,000g で 15 分間遠心沈澱する。30ml 容量共栓付試験管にとった上澄 10ml に 100mesh $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ [和光純薬, 大阪] あるいは hydroxylapatite [HYPATITE C, Clarkson Chemical Co., Williamsport, Pennsylvania] 0.1g あてを混入し, Thermomixer [サーモニクス, 東京] の speed 5 で 1 分間攪拌したのち再び遠心沈澱する。上澄の光吸収スペクトルを日立自記分光光度計 124 型で求める。hydroxylapatite などの混入前の透析内液のスペクトル(対照)とくらべたのが図 1 である。唾液をあらかじめ透析した理由は, 尿酸・遊離芳香族アミノ酸・カフェイン(湯茶に由来)などの紫外線吸収物質を除くためである³⁰⁾。図示したように, 固相である $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ や hydroxylapatite の粉末によって, 唾液の光吸収スペクトル

図 1 hydroxylapatite や $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ への唾液タンパクの吸着

ルは低下した。これは唾液タンパクの一部が吸着除去されたためと思われる。

2) タンパク質の光吸収スペクトル

3 種類のタンパク質, bovine serum albumin (Daiichi-Pure Chemicals, Tokyo), lysozyme (Nutritional Biochemicals, Cleveland, Ohio), human γ -globulin (Fraction II, 東京化成, 東京) は, いずれもディスク電気泳動で混在タンパクを無視できる。これらを水溶液にしたものは, 極大吸収を $280\text{m}\mu$ 付近に持つそれぞれ異なった光吸収スペクトルをしめす。これらのタンパク液 10ml に, $100\text{ mesh } \text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ あるいは hydroxylapatite を 0.2g あて混入し, 唾液の場合と同様に操作してスペクトルをくらべたのが図 2, 3, 4 である。図には hydroxylapatite の場合だけを図示したが, $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ でもほぼ同様の結果がえられ, 対照の無処理にくらべスペクトルは低下をしめた。タンパク質が固相である hydroxylapatite や $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ の粉末に吸着したことをしめすものであろう。

これらの現象は, 磷酸カルシウム化合物に対するタンパク質の吸着を, その紫外光吸収スペクトルの低下によって追究できることを示唆する。

図 2 hydroxylapatite への bovine serum albumin の吸着 (albumin 100mg/dl)

図 3 hydroxylapatite への lysozyme の吸着 (lysozyme 20mg/dl)

試みに, hydroxylapatite のかわりに澱粉粒を用いて図 2 と同様の実験を行なったが, この場合には澱粉処理前後のスペクトルに全く差がみられなかった。すなわちタンパク質の吸着はなかった。

3) タンパク質の光吸収に対するタンパク濃度, pH, 塩類の影響

albumin は 100mg/dl 以下, lysozyme は 20mg/dl 以下, γ -globulin は 25mg/dl 以下の濃度につい

図4 hydroxylapatite への human serum γ -globulin の吸着 (globulin 25mg/dl)

て調べたが、どのタンパク質においても、濃度と吸光度との間には原点を通る直線関係がみられた。

また、どのタンパク質のスペクトルも、M/10 phosphate buffer を用いて調べるに、pH 3から9の間では変化をしめさなかった（少なくとも極大吸収波長の吸光度に変動はみられなかった）。

つぎに各タンパク液に、NaCl, KCl, MgCl_2 , CaCl_2 を終濃度 160mM になるように別々に加え、スペクトルを求めたが、すべてのタンパク質において、どの塩類も全く影響がなかった。

4) 固相の量および固相と液相の接触時間

100mg/dl の albumin 液10ml に、固相として 100mesh の hydroxylapatite 0.2g を加え、Thermomixer の指示 speed をいろいろ変えて1分間攪拌操作する。10,000g で遠心沈澱し、上澄の光吸収スペクトルを求める。極大吸収波長における処理前の吸光度を E_1 、固相による処理後のそれを E_2 とし、 $(E_1 - E_2) \times 100 / E_1$ を算出する。これは固相に対する吸着%である。表1のように、どの speed でも吸着%はほぼ同じであった。表中の放置とは、固相添加後に Thermomixer につけないでそのまま遠心沈澱した場合をさす。

また表2は、Thermomixer の指示 speed を5に固定して、他は表1と同様に操作することにし、攪拌時間を15秒から10分間にわたって変化したものである。表のように、攪拌時間30秒から

表1 攪拌と吸着%の関係

Thermomixer の指示 speed	吸着 %
放置	24.1
speed 1	45.2
" 2	43.5
" 3	44.0
" 4	43.7
" 5	45.9

表2 hydroxylapatite を albumin 液に接触させた時間と吸着%の関係

時間(分)	吸着 %
1/4	37.2
2/4	40.6
3/4	40.8
1	40.6
1 1/2	41.0
3	50.1
5	59.5
10	74.4

90秒までは吸着%はほぼ一定であった。3分以上の攪拌では吸着%が増加をしめしたが、これは攪拌によって固相の粒子が細くなるためと思われる。

次に Thermomixer の指示 speed を5、攪拌時間を1分間として、他は表1と同様に操作することにし、hydroxylapatite 量を albumin 液10ml について0.1から0.5g まで変えてみた。図5にし

図5 hydroxylapatite の量と albumin の吸着%

めすように、横軸の固相量と縦軸の吸着%の間には、凸部を上に向けた曲線関係がみられた。しかし、0.2 g 以下のところでは近似的に直線関係があると思われる。

5) 固相添加とタンパク液の pH

タンパク質の水溶液に磷酸カルシウム化合物を加えると pH の変化が起こる。表 3 は 100mg/dl の bovine serum albumin 20ml に hydroxylapatite を 0.3g あて加えた場合の成績である。初期 pH は HCl ないし NaOH で変化させ、pH は東亜電波 HM-5 A 型 pH 計によって測定した。

表 3 hydroxylapatite 添加による albumin 液の pH 変動

添加前 pH	添加後 pH
1) 3.20	5.72
2) 4.38	6.10
3) 5.35	6.30
4) 6.00	6.35
5) 6.40	6.35
6) 7.20	6.46
7) 8.70	6.60

表のように、初期 pH 6.4 の付近を界にして、それよりアルカリ性側の場合は固相添加によって pH が低下し、それより酸性側の場合は同様の添加によって pH が上昇していた。このような現象は、 $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ の場合にもみられ、また液相が lysozyme や γ -globulin でも同様であった。なお、固相添加後は放置してもその後の pH 変動はなかった。

6) タンパク質の吸着と pH

表 3 の albumin の実験について、hydroxylapatite を遠心除去した上澄のスペクトルを求め、前述の吸着%を計算したのが表 4 である。初期 pH が酸性側の場合には、pH が低いほど吸着は次第に増加するが、アルカリ性側では変化がみられなかった。

これに反して lysozyme の場合 (20mg/dl 液 20 ml に対し 0.4g の hydroxylapatite 添加) には表 5 のようであった。すなわち、albumin の場合と

表 4 hydroxylapatite への albumin 吸着と pH との関係

表 3 に対応する番号	吸着 %
1)	34.0
2)	33.1
3)	32.7
4)	32.7
5)	31.5
6)	29.3
7)	29.3

表 5 hydroxylapatite への lysozyme 吸着と pH との関係

アパタイト添加前後の pH		吸着 %
前	後	
3.45	6.02	26.9
5.05	6.20	33.1
6.41	6.22	40.7
7.70	6.27	40.9
8.62	6.30	40.9
9.92	6.30	48.2

は逆に、初期 pH がアルカリ性であるほど吸着が増加した。

また、25mg/dl human serum γ -globulin 20ml に 0.3g の hydroxylapatite を用い、以下 albumin の場合と同様に操作したが、pH に伴う吸着%の変化傾向はあまり著明ではなかった (表 6)。

表 6 hydroxylapatite への γ -globulin 吸着と pH との関係

アパタイト添加前後の pH		吸着 %
前	後	
3.10	6.10	62.8
4.00	6.40	64.4
5.12	6.47	63.6
6.29	6.50	66.7
7.01	6.50	66.7
7.74	6.61	62.0
9.14	6.58	64.4

一般に hydroxylapatite へのタンパク吸着は等電点で高いという¹⁶⁾。表 4 ~ 6 の成績にもこの傾

向が窺えた。しかし、このほかに hydroxylapatite の酸溶解すなわちカルシウムイオンや磷酸イオンの溶出が関与するかもしれない。ただし磷酸イオンのような陰イオンは hydroxylapatite に対するタンパク吸着を抑制することがわかっているから³¹⁾、この際は陽イオン効果を考える必要があると思われる。

7) 塩類添加時における pH 変化

NaCl および KCl は中性塩であるが、MgCl₂ および CaCl₂ はそうでない。したがって、それらの水溶液では加水分解によって pH が変化すると思われる。また 2 価陽イオンは、タンパク質および hydroxylapatite の双方に対し一定の interaction を有するから、pH の問題はさらに複雑になるであろう。

100mg/dl bovine serum albumin, 20mg/dl lysozyme, 25mg/dl human γ -globulin の各20ml あてに、水 2ml (対照) あるいは 0.1M の各塩類を 2ml 加えて pH を測定し、ついでにこれに hydroxylapatite 0.2g を混入したときの pH を再び測定する。その成績を表 7, 8, 9 にあげた。どのタンパク質においても、NaCl および KCl の場合は対照 (塩類無添加) とほとんど同じ程度

表 7 albumin 液に種々の塩類, ついで hydroxylapatite を添加したときの pH

塩 類 (終濃度 9 mM)	塩類添加タン パク液の pH	さらにアパタイト 添加後の pH
対 照	5.11	6.37
NaCl	5.12	6.37
KCl	5.10	6.36
MgCl ₂	4.98	6.18
CaCl ₂	4.99	5.58

表 8 lysozyme 液に種々の塩類, ついで hydroxylapatite を添加したときの pH

塩 類 (終濃度 9 mM)	塩類添加タン パク液の pH	さらにアパタイト 添加後の pH
対 照	4.99	6.44
NaCl	5.00	6.41
KCl	4.98	6.42
MgCl ₂	5.00	6.15
CaCl ₂	5.02	5.69

表 9 γ -globulin 液に種々の塩類, ついで hydroxylapatite を添加したときの pH

塩 類 (終濃度 9 mM)	塩類添加タン パク液の pH	さらにアパタイト 添加後の pH
対 照	5.83	6.45
NaCl	6.00	6.47
KCl	5.95	6.41
MgCl ₂	5.80	6.18
CaCl ₂	5.70	5.73

の pH 上昇をしめしていた。しかし MgCl₂ および CaCl₂ の場合は、この上昇が少なく、とくに CaCl₂ がそうであった。

次に 3 種類のタンパク質について、MgCl₂ および CaCl₂ の濃度を変えたときの pH 変化を調べた。100mg/dl albumin においては、表 10 のよう

表 10 albumin の場合の塩類濃度と pH 変化との関係

塩類の終濃度 (mM)	塩類添加タン パク液の pH	さらにアパタイト 添加後の pH
CaCl ₂ 対 照	5.20	6.30
0.09	5.15	6.18
0.9	5.05	5.91
9	5.00	5.46
90	5.01	5.02
MgCl ₂ 対 照	5.11	6.37
0.09	5.10	6.32
0.9	5.00	6.30
9	4.98	6.17
90	5.00	6.06
KCl 対 照	5.12	6.36
0.09	5.11	6.34
0.9	5.10	6.34
9	5.11	6.35
90	5.12	6.36

に、KCl の場合その添加濃度のいかによらず pH 変化は対照と同じであった (塩を添加しても当然のことであるが pH に変動がなく、さらに hydroxylapatite を添加したときの pH 上昇は KCl 濃度とは関係がなく常に対照と全く同じ程度)。しかし、CaCl₂ や MgCl₂ の場合は、その添加によって僅かに pH が低下し、さらに hydroxyl-

apatite 添加時の pH 上昇は塩類濃度が高いほど減少していた。とくに CaCl_2 の場合にははっきり現われていて、 CaCl_2 の濃度が 90mM では hydroxylapatite 添加時の pH 変化はほとんどなかった。

同様の実験を 20mg/dl lysozyme や 25mg/dl γ -globulin について行なったのが表 11, 12 である。hydroxylapatite を添加したときの pH 上昇は、表 10 の albumin の場合と同じ傾向であり、塩類濃度が高いときにはこの pH 上昇は少なく、とくに CaCl_2 でそうであった。しかし、タンパク液に塩類を加えただけの場合の pH 変動は、albumin の場合のようにはっきりしていなかった（無変化とも思われる）。

表 11 lysozyme の場合の塩類濃度と pH 変化との関係

塩類の終濃度 (mM)	塩類添加タンパク液の pH	さらにアパタイト添加後の pH
CaCl_2 対 照	4.99	6.44
0.09	5.03	6.40
0.9	5.02	6.19
9	5.02	5.69
90	5.06	5.20
MgCl_2 対 照	5.00	6.42
0.09	5.03	6.40
0.9	4.99	6.31
9	5.00	6.15
90	4.97	6.02

表 12 γ -globulin の場合の塩類濃度と pH 変化との関係

塩類の終濃度 (mM)	塩類添加タンパク液の pH	さらにアパタイト添加後の pH
CaCl_2 対 照	5.83	6.45
0.09	5.83	6.42
0.9	5.88	6.40
9	5.70	5.73
90	5.73	5.27
MgCl_2 対 照	5.80	6.48
0.09	5.80	6.40
0.9	5.88	6.37
9	5.80	6.18
90	5.75	5.95

実験方法

唾液透析内液や種々のタンパク液に、固相として $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ あるいは hydroxylapatite を加え攪拌遠心沈澱の後、上澄の紫外部光吸収スペクトルを求めると、処理前にくらべてスペクトルが著明に低下する。従来諸報告からみて、この低下は固相に対するタンパク質の吸着に起因するものといえよう。この現象に対する NaCl , KCl , MgCl_2 , CaCl_2 の塩類の影響を探ることが本論文の目的であるので、そのための種々の基礎的実験を行ない、前記各項に述べたような結果がえられた。そこでこれらの基礎的知見をもとにして、hydroxylapatite あるいは $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ の粉末へのタンパク質の吸着を、次に述べる方法で追究することにした。

タンパク液の調製

前述の bovine serum albumin, lysozyme, human γ -globulin (Fraction II) の 3 種類のタンパク質を、それぞれ 100mg/dl, 20mg/dl, 25mg/dl の濃度になるように純水にとかす。約 30ml 容量の共栓付試験管に各タンパク液の一定量（おもに 10ml）をとり、さらに純水あるいは塩類液の一定量（1ml あるいは 2ml）を混和する。

固相との接触

これらに hydroxylapatite あるいは $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ の粉末 (100mesh) の一定量 (0.1g あるいは 0.2g) を添加する。Thermomixer の指示 speed 5 で 1 分間振盪攪拌する。

遠心沈澱

ただちに久保田卓上遠心沈澱器 (FT-9 S あるいは KCF-624) の 10,000g で 15 分間遠心沈澱する。その上澄について次のように光吸収スペクトルを求める。

光吸収スペクトル

日立自記分光光度計 124 型で紫外部光吸収スペクトルを求め、同時に極大吸収波長の吸光度を知る。

吸着%

固相による処理前の吸光度 (E_{max}) を E_1 , 処理後のそれを E_2 とする。タンパク質の吸着%は

$$(E_1 - E_2) \times 100 / E_1$$

によって算出される。

タンパク質の吸着と塩類

1) albumin の吸着

100mg/dl の bovine serum albumin 液 10 ml に純水(対照)あるいは塩類液(NaCl, KCl, MgCl₂, CaCl₂) 2 ml を混和し, Ca₃(PO₄)₂ 0.2 g と接触させる (albumin の終濃度は約83mg/dl になっている)。albumin の Ca₃(PO₄)₂ 粉に対する吸着と各種塩類濃度との関係をしめすのが図6, 7である。図6には NaCl と CaCl₂ の場合を, 図7には KCl と MgCl₂ の場合をあげた。図のように, 塩類が存在するときにはどの塩類においても albumin の Ca₃(PO₄)₂ への吸着が増加した。NaCl や KCl では約15mM のときが最大になり, さらに濃度が高くなっても変動は少なかった。しかし, CaCl₂ や MgCl₂ では2~15mM で最大に達し, さらに濃度が高くなると, 吸着は次第に減少した。しかも, NaCl や KCl の吸着促進にくらべ, MgCl₂ や CaCl₂ とくに後者のそれが大きいように思われた。そこで, 4種の塩類の影響を同じ mM で比較してみた。終濃度が16mM の場合

図6 Ca₃(PO₄)₂ への albumin の吸着と NaCl, CaCl₂ の濃度

図7 Ca₃(PO₄)₂ への albumin の吸着と KCl, MgCl₂ の濃度

図8 Ca₃(PO₄)₂ への albumin の吸着に対する塩類の促進効果 (塩類の終濃度はすべて16mM)
1) 未処理 (固相処理及び塩類添加なし)
2) 対照 (塩類添加なし) 3) NaCl, 4) KCl, 5) MgCl₂, 6) CaCl₂

について, 図8ならびに表13にしめした。対照 (塩類無添加) にくらべ, 塩類が存在するときは吸着が増大するが, その影響は KCl や NaCl (両者はよく似た成績) のときよりも MgCl₂ や CaCl₂

表 13 $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ への albumin の吸着に対する塩類の促進効果比較

塩 類 (終濃度 16mM)	吸 着 %
対 照	54.1
NaCl	62.7
KCl	61.5
MgCl ₂	71.6
CaCl ₂	78.4

(図 8 の吸光度から計算した)

のときに大きかった。対照の吸着%が54.1%であったのに対し、MgCl₂ または CaCl₂ 添加時には71.6%, 78.4%と著明な増加がみられた。

同様のことを、固相として hydroxylapatite を用いて行なった。しかしこの場合は、 $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ にくらべ塩類の影響は少なかった。NaCl や KCl の添加は吸着%にほとんど影響がなかった。ただ MgCl₂ や CaCl₂ は、 $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ の場合にくらべると少ないが、やはりたしかに albumin の吸着を促進した。図 9 に CaCl₂ の場合を代表としてしめし、図10、表14に4種の塩類について終濃度16 mM の促進効果を比較した。図や表に明らかなように、NaCl や KCl は無添加の対照と同様の成

図 9 hydroxylapatite への albumin 吸着と CaCl₂ の濃度

図 10 hydroxylapatite への albumin 吸着に対する塩類の促進効果 (塩類の終濃度はすべて 16mM)

- 1) 未処理 (固相処理及び塩類添加なし)
 2) 対照 (塩類添加なし) 3) NaCl,
 4) KCl, 5) MgCl₂, 6) CaCl₂

表 14 hydroxylapatite への albumin の吸着に対する塩類の促進効果比較

塩 類 (終濃度 16mM)	吸 着 %
対 照	49.4
NaCl	49.7
KCl	50.3
MgCl ₂	55.0
CaCl ₂	57.9

(図10の吸光度から計算した)

績であるが、MgCl₂ や CaCl₂ の添加時には吸着は促進されていた。

2) lysozyme の吸着

図 3 にしめしたように、hydroxylapatite で処理することによって、lysozyme の光吸収スペクトルはかなり低下した。これは lysozyme も albumin 同様 hydroxylapatite に吸着することをしめす。20mg/dl の lysozyme 液10ml に純水(対照)あるいは種々の濃度の塩類液(NaCl, KCl, MgCl₂, CaCl₂) 1 ml あてを混和し、hydroxylapatite 0.2

図 11 hydroxylapatite への lysozyme の吸着と塩類の濃度

図 12 hydroxylapatite への lysozyme の吸着に対する塩類の抑制効果 (塩類の濃度はすべて 1 mM)

- 1) 未処理 (固相処理及び塩類添加なし)
 2) 対照 (塩類添加なし) 3) NaCl,
 4) KCl, 5) MgCl₂, 6) CaCl₂

g と接触させる (lysozyme の終濃度は約 18mg/dl になっている)。図 11 のように、albumin の場合

とは違って、塩類はどの濃度でも lysozyme の吸着をつねに抑制していた。けっして吸着を促進することはなかった。しかも抑制効果は MgCl₂ や CaCl₂ が強かった。また、lysozyme の hydroxylapatite への吸着は、この実験の条件下では、NaCl や KCl では 50mM において、MgCl₂ や CaCl₂ では 5 mM においてほぼ完全に抑制された。

表 15 hydroxylapatite への lysozyme の吸着に対する塩類の抑制効果比較

塩 類 (終濃度 1 mM)	吸 着 %
対 照	27.2
NaCl	22.1
KCl	21.9
MgCl ₂	12.6
CaCl ₂	7.3

(図 12 の吸光度から計算した)

次に 4 種の塩類が終濃度 1 mM のときの吸着抑制効果を比較した。図 12、表 15 にその成績をあげた。

Ca₃(PO₄)₂ の場合も、以上とほぼ同じ結果であった。

図 13 hydroxylapatite への γ -globulin の吸着と KCl, NaCl の濃度

図 14 hydroxylapatite への γ -globulin の吸着と $MgCl_2$, $CaCl_2$ の濃度

3) γ -globulin の吸着

γ -globulin も hydroxylapatite によく吸着するように思われる。25mg/dl の γ -globulin 液 10ml に種々の濃度の塩類液 (NaCl, KCl, $MgCl_2$, $CaCl_2$) 1 ml あてを添加し, hydroxylapatite の 0.2 g と接触させ, 図 13, 14 に結果をしめす。図 13 は NaCl と KCl の場合であるが, albumin と lysozyme とも異なって, ごく低濃度では吸着抑制があり, さらに濃度が高くなると逆に吸着促進がみられた。しかし図 14 にしめたように, $MgCl_2$ の場合は吸着の抑制だけが著明であり, すべての濃度にわたって強い抑制がみられた。 $CaCl_2$ は NaCl や KCl と $MgCl_2$ との中間の傾向をしめし, 抑制も促進もそれほど著明ではなく, どの濃度においても対照とほぼ同程度の吸着がみられた。

図 15, 表 16 は 4 種の塩類の終濃度を 45mM としたときの塩類効果を比較したものであり, KCl や NaCl を添加したときがもっとも吸着が多く, ついで $CaCl_2$ であり (対照と同程度), $MgCl_2$ の場合がもっとも吸着が少なかった。

以上の現象は, $Ca_3(PO_4)_2$ を用いた場合にもみられた。ただしこの場合には, 液相 11 ml に対し $Ca_3(PO_4)_2$ 0.2g を用いたのではすべての γ -globulin が吸着してしまい塩類効果を比較できないの

図 15 hydroxylapatite への γ -globulin の吸着に対する塩類の効果 (塩類の濃度はすべて 45 mM)

- 1) 未処理 (固相処理及び塩類添加なし)
2) 対照 (塩類添加なし) 3) NaCl,
4) KCl, 5) $MgCl_2$, 6) $CaCl_2$

表 16 hydroxylapatite への γ -globulin の吸着に対する塩類の効果比較

塩 類 (終濃度 45mM)	吸 着 %
対 照	84.1
NaCl	90.5
KCl	90.1
$MgCl_2$	42.8
$CaCl_2$	85.2

(図 15 の吸光度から計算した)

で, 0.03g を用いる必要があった。

唾液タンパクの吸着と塩類

$Ca_3(PO_4)_2$ や hydroxylapatite の粉末を用いたときの単一タンパク質の吸着について述べてきたが, 最後に唾液について試みに実験を行なってみたので付記する。ただしこの場合には, 光吸収性の低いタンパク質が吸着したとき, これを見逃すという欠点が考えられる。

1) hydroxylapatite に対する吸着

人全唾液をセロファン膜によって 4 ~ 5°C で 24 時間透析する。内液を水で 4 倍に希釈し, 10,000g で 15 分間遠心沈澱する。上澄を用いて, 各塩類の終濃度を 5 mM としたときの, hydroxylapatite

表 17 hydroxylapatite への唾液タンパクの吸着と塩類の効果

塩 類 (終濃度 5 mM)	吸 着 %
対 照	44.0
NaCl	43.5
KCl	41.6
MgCl ₂	42.2
CaCl ₂	41.1

(透析 4 倍希釈唾液 10ml に hydroxylapatite 0.2g 添加)

への唾液タンパクの吸着を比較した。

表17にしめすように、NaCl, KCl, MgCl₂, CaCl₂があっても吸着%は対照の無添加の場合とあまり変わらなかった。すなわち、塩類の効果はほとんどみられなかった。おそらく唾液タンパクが種々のタンパク質の混合であるためであろう。

2) 各種タンパク質と唾液タンパクの吸着比較

前述の各種のタンパク質の吸着実験において、もっとも異色の態度をしめしたのは MgCl₂ である。そこでこの塩の濃度を变化させたときの唾液タンパクの吸着を、単一のタンパク質の前述の成績とくらべた。

透析 4 倍希釈唾液 10ml に水あるいは種々の濃度の MgCl₂ 液 1ml あてを加え、hydroxylapatite 0.1g を添加した。図16にその成績をしめしたが、これは吸着%の値を単一のタンパク質の

図 16 MgCl₂ の濃度を变化させたときの唾液タンパクの吸着と単一のタンパク質の吸着との比較(固相: hydroxylapatite)

場合と比較するためのものではない。単に傾向をくらべるものである。

唾液タンパクの吸着は、MgCl₂ の濃度が増すと多少減少気味であるが、ほとんど影響をうけなかった。しかるに図の濃度範囲では、albumin の吸着は MgCl₂ の濃度が増すと増大し、lysozyme や γ-globulin の吸着は全く反対に減少する。したがって、唾液タンパクの吸着はこれらの丁度中間の傾向をとっていることになる(近似するものをあえて拾えば γ-globulin であるが)。

このように、唾液タンパクについても一応の成績はえられたが、唾液のようなタンパク質の混合試料の場合には、タンパク質の定量法を検討する必要があると同時に、吸着しているタンパク質を直接測定する必要もあると思われる。さらに追究してみたいと考えている。

考 察

牛歯エナメル粉への gelatin 吸着を調べた PEARCE ら¹⁶⁾によると、Ca イオン (CaCl₂) は促進的に作用し、PO₄ イオン (K₂HPO₄ ならびに KH₂PO₄ の混液) やクエン酸イオン (クエン酸とその塩液) は抑制的に作用するという。Ca イオンがタンパク質の吸着を増進させることは、すでに TISELIUS ら¹¹⁾によって報告され、また逆に吸着タンパクの溶出には磷酸塩が実際に使用されている²²⁾。さらに MCGAUGHEY ら¹⁹⁾は、hydroxylapatite に対する人唾液タンパクの吸着と離脱が、pH, NaCl, 尿素, Ca によってどう変わるかを追究している。それによると、1) pH が上昇すると吸着量は減少する、2) NaOH や Na₂HPO₄ は吸着タンパクの大部分を遊離させる、3) NaCl や尿素は影響がほとんどない、4) 豚の submaxillary mucin (PSM) も、人唾液タンパクと似た結果を与える、5) PSM や人唾液から Ca を除くと吸着量は減少する、という。

これらの報告からみると、1 価のものを除いて陰イオンは吸着抑制、陽イオンは吸着促進効果があるように思われる。そこで著者は、陰イオンとしては 1 価の Cl を持つ塩類を用いることによって、Na, K, Mg, Ca などの陽イオン効果を知り

たいと考え、唾液中にも存在する3種のタンパク質について hydroxylapatite および $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ への吸着実験を行なった。

とくに興味のある現象は、タンパク質の種類が異なれば同じ塩類でもその効果は全く違ってくることである。すなわち、albumin の吸着は NaCl , KCl , MgCl_2 , CaCl_2 のどの塩類の添加によっても促進されたのに、lysozyme では全く逆に抑制された。また γ -globulin は両者の中間型であり、 KCl や NaCl では一般に促進されるが、ごく微量では抑制され、 MgCl_2 では常に抑制され、 CaCl_2 では影響がほとんどなかった。すなわち、塩類が必ずしも吸着促進効果をしめすとは限らず、またタンパク質によっては、同一の塩類でも促進をしめす濃度と抑制をしめす濃度のあることもわかった。

CaCl_2 や MgCl_2 のような水解性の塩類では、その添加によって pH が変わることを考えねばならない。しかし、タンパク質の吸着量の塩類添加による変動は、pH の差による変動よりも大きいと思われる。このことはまた、中性塩である NaCl や KCl も吸着に対して一定の効果を持つこと、および CaCl_2 と MgCl_2 とが全く逆の効果を現わす場合のあること、などからも首肯される。

例外はあるが、総体的にみた場合、 NaCl や KCl よりも MgCl_2 や CaCl_2 の方が効果が一般に大であった。従来陰イオンには吸着抑制効果知られている^{16,22)}。 Cl^- は1価の陰イオンであるからその効果は小さいと思われるが、たとえあったとしても、この実験における塩類効果については陽イオンが重要であり、 NaCl , KCl , MgCl_2 , CaCl_2 の作用に差が生じるのは主として陽イオンによるものと思われる。固相として用いた磷酸カルシウム化合物との相互作用のほか、タンパク質との関連も考えられる。一般にタンパク質との相互作用は2価の陽イオンが強いが、等電点が酸性側にある albumin では吸着促進、アルカリ性側にある lysozyme では吸着抑制、中性付近にある γ -globulin では促進と抑制の両方が現われたことからみて、陽イオンの作用をタンパク質の荷電状

態との関係で論じることができるかもしれない。それには 磷酸イオンやクエン酸イオンなどの2価以上の陰イオンについてもその作用を種々のタンパク質を用いて比較する必要がある。

結 論

タンパク質の hydroxylapatite への吸着は、エナメル質表面の acquired pellicle の生成と関連して注目される現象である。著者は、唾液内に存在する Na , K , Mg , Ca などの塩類がこのタンパク質の吸着にどのような影響を与えるかを知りたいと考え、hydroxylapatite や $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ の粉末への bovine serum albumin, lysozyme, human γ -globulin などの吸着を模型実験として選んだ。

1) タンパク質の溶液に固相として hydroxylapatite を添加し、その上澄の紫外部光吸収スペクトルをとると、固相添加前よりもスペクトルが著明に低下する。この現象を利用して、固相へのタンパク質の吸着を追うための基礎的実験をまず行なった。

2) タンパク質の濃度と吸光度との間には原点を通る直線関係があった。また、どのタンパク質のスペクトルも、pH 3から9の間では変化がなかった(少なくとも極大吸収波長での吸光度に変動はなかった)。さらに、 NaCl , KCl , MgCl_2 , CaCl_2 はタンパク質のスペクトルには全く影響がなかった。

3) 固相との接触には Thermomixer を用いたが、その指示 speed 5 で1分間振盪攪拌することにした。固相量は液相量約10ml に対して0.1~0.2 g が便利であった。

4) MgCl_2 や CaCl_2 は水解性の塩であるが、これをタンパク質の溶液に添加したときの pH 変化は僅かであった。

5) タンパク質の溶液に hydroxylapatite や $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ を加えると pH の変化が起こる。初期 pH 6.4 を界にして、それよりアルカリ性側の場合は固相添加によって pH が低下し、それより酸性側の場合は pH が上昇した。

6) タンパク質の溶液に塩類について固相を添加したときの pH 変化をみるに、 NaCl や KCl の

場合は対照(塩類無添加)とほとんど同じ程度の pH 上昇であるのに、 $MgCl_2$ や $CaCl_2$ の場合はこの上昇が少なかった。

7) pH と吸着との関係を見ると、等電点に近いほど吸着が増すような傾向が窺えた。以上の成績をもとにして、タンパク質の吸着に対する塩類の影響を調べ、次の結果をえた。

8) $NaCl$, KCl , $MgCl_2$, $CaCl_2$ などの塩類があると albumin の吸着は増加した。 $NaCl$ や KCl では約 15mM のとき最大になり、さらに濃度が高くなっても変動は少なかった。これに対して $CaCl_2$ や $MgCl_2$ では 2~15mM で最大になり、さらに濃度が高いときは吸着が次第に減少した。吸着促進効果は $NaCl \approx KCl \ll MgCl_2 < CaCl_2$ の順であり、 $CaCl_2$ が最も効果が強かった。

9) これに反して、lysozyme の吸着は塩類添加によって減少した。本報告の条件下において、 $NaCl$ や KCl では 50mM で、 $MgCl_2$ や $CaCl_2$ では 5 mM で吸着はほぼ完全に抑制された。抑制効果は $NaCl \approx KCl \ll MgCl_2 < CaCl_2$ であった。

10) γ -globulin の吸着においては、 $NaCl$ や KCl では非常に低濃度で吸着抑制があり、さらに濃度が高くなると逆に吸着促進がみられた。しかし、 $MgCl_2$ の場合は吸着抑制だけがすべての濃度にわたってみられた。 $CaCl_2$ はこれらの中間の傾向をしめし、抑制も促進も著明ではなかった。 γ -globulin では、 $MgCl_2$ 添加のときの吸着がとびぬけて少ないことになる。

11) 理論的な難点はあるが、以上と同じ方法で、タンパク質の混合試料である唾液タンパクの hydroxylapatite への吸着を試みに調べた。 $NaCl$, KCl , $MgCl_2$, $CaCl_2$ などどの塩もほとんど影響がなかった。これは唾液タンパクのなかに、吸着が抑制されるもの促進されるものが混在していることも一因であろう。

終始御指導と御校閲をいただいた三代幸彦教授に深謝いたします。なお本報告の要旨は昭和45年度日本歯科大学歯学会総会において口演発表した。

文 献

1) DAWES, C., JENKINS, G. N. and TONGE, C.

- H.: The nomenclature of the integuments of the enamel surface of teeth. *Brit. dent. J.*, **115**: 65-68, 1963.
- 2) KLEINBERG, I.: Biochemistry of the dental plaque. *Advances in Oral Biology* (edited by Staple, P. H.), **4**: 43-90, Academic Press, New York and London, 1970.
- 3) ARMSTRONG, W. G.: Amino-acid composition of the acquired pellicle of human tooth enamel. *Nature* (London), **210**: 197-198, 1966.
- 4) ARMSTRONG, W. G.: The composition of organic films formed on human teeth. *Caries Res.*, **1**: 89-103, 1967.
- 5) LEACH, S. A.: The acquired integuments of the teeth. *Brit. dent. J.*, **122**: 537-544, 1967.
- 6) ARMSTRONG, W. G. and HAYWARD, A. F.: Acquired organic integuments of human enamel; a comparison of analytical studies with optical, phase-contrast and electron microscope examinations. *Caries Res.*, **2**: 294-305, 1968.
- 7) HAYWARD, A. F. and ARMSTRONG, W. G.: Parallel electron microscope and analytical investigations of enamel integuments. *Dental Plaque* (edited by McHugh, W. D.), pp. 187-197, E & S Livingstone Ltd., Edinburgh and London, 1970.
- 8) MILLIN, D. J. and SMITH, M. H.: Nature and composition of dental plaque. *Nature* (London), **189**: 664-665, 1961.
- 9) SMITH, M. H.: Amino acid analysis of denture pellicle and a glycoprotein-containing component of saliva. *J. dent. Res.*, **43**: 302, 1964.
- 10) ZITTLE, C. A.: Adsorption studies of enzymes and other proteins. *Advanc. Enzymol.*, **14**: 319-374, 1953.
- 11) TISELIUS, A., HJERTEN, S. and LEVIN, O.: Protein chromatography on calcium phosphate columns. *Arch. Biochem. Biophys.*, **65**: 132-155, 1956.
- 12) BERNARDI, G. and KAWASKI, T.: Chromatography of polypeptides and proteins on hydroxylapatite columns. *Biochim. biophys. Acta*, **160**: 301-310, 1968.
- 13) HJERTEN, S.: Calcium phosphate chromatography of normal human serum and of electrophoretically isolated serum proteins. *Biochim. biophys. Acta*, **31**: 216-235, 1959.
- 14) ELLISON, S. A. and MANDEL, I. D.: Chromatographic separation of human salivary protein. *J. dent. Res.*, **40**: 747-748, 1961.

- 15) PEARCE, E. I. F. and BIBBY, B. G. : Protein adsorption on bovine enamel. *Arch. oral Biol.*, **11** : 329-336, 1966.
- 16) PEARCE, E. I. F. and BIBBY, B. G. : Effects of time, surface area, pH and some ions on protein adsorption by bovine enamel. *Arch. oral Biol.*, **11** : 825-832, 1966.
- 17) JAMIESON, A. D. : Enzymes adsorbed on human enamel. *Alabama J. med. Sci.*, **6** : 294, 1969. cf. *Oral Research Abstracts*, **5** : 686, 1970.
- 18) RÖLLA, G. and MATHIESEN, P. : The adsorption of salivary proteins and dextrans to hydroxylapatite. *Dental Plaque* (edited by McHugh, W. D.), pp. 129-140, E & S Livingstone Ltd., Edinburgh and London, 1970.
- 19) MCGAUGHEY, C. and STOWELL, E. C. : The adsorption of human salivary proteins and porcine submaxillary mucin by hydroxylapatite. *Arch. oral Biol.*, **12** : 815-828, 1967.
- 20) ERICSON, T. : Adsorption to hydroxylapatite of proteins and conjugated proteins from human saliva. *Caries Res.*, **1** : 52-58, 1967.
- 21) RÖLLA, G., KORNSTAD, L., MATHIESEN, P. and POVATONG, L. : The adsorption by an acidic salivary glycoprotein to tooth surfaces *in vitro*. *J. periodont. Res. Suppl.* No. 7, 8-9, 1969. cf. 18)
- 22) HAY, D. I. : The adsorption of salivary proteins by hydroxyapatite and enamel. *Arch. oral Biol.*, **12** : 937-946, 1967.
- 23) LEACH, S. A. and CRITCHLEY, P. : Bacterial degradation of glycoprotein sugars in human saliva. *Nature* (London), **209** : 506, 1966.
- 24) LEACH, S. A. : Release and breakdown of sialic acid from human salivary mucin and its role in the formation of dental plaque. *Nature* (London), **199** : 486, 1963.
- 25) LEACH, S. A. : Some observations on the state of sialic acid in human saliva. *Arch. oral Biol.*, **9** : 461-467, 1964.
- 26) MISHIRO, Y. and KIRIMURA, K. : Accumulation of free sialic acid in the mixture of whole saliva and sugar. *J. dent. Res.*, **43** : 1258, 1964.
- 27) 鈴木徳四郎 : シアル酸の口腔生化学的研究(II). 歯学, **51** : 214-225, 1963.
- 28) PIGMAN, W. and TETTAMANTI, G. : Chemistry of the mucins. *Biochemistry of Glycoproteins and Related Substances*. pp. 117-140, S. Karger, Basel, New York, 1968. cf. 18)
- 29) ARMSTRONG, W. G. : Amino acid composition of human parotid salivary protein selectively adsorbed by hydroxyapatite. *Arch. oral Biol.*, **15** : 1001-1003, 1970.
- 30) 岩谷緑 : 唾液の分光学的研究. 歯学, **56** : 265-277, 1968.
- 31) 三代幸彦 : Acquired pellicle (獲得皮膜) について. 歯学, **57** : 260-264, 1969.