インキュベート唾液中の低級脂肪酸について

森田 倡子 桐村 和子 小積 昭則
毛利 嘉彦 三代 幸彦

日本歯科大学 生化学教室*

〔受付: 昭和50年8月19日〕

抄録: 唾液中には少量の acetic acid および propionic acid が存在し, これらはインキュベートにより増量した。この他, インキュベートにより isobutyric acid, n-butyric acid, isovaleric acid, n-valeric acid, crotonic acid, isocaproic acid が現われ, 増量した。これらの酸はおもに唾液タンパク質に由来するものと思われる。唾液に glucose や maltose のような醗酵性の糖質を加えると, lactic acid が生成するが, acetic acid から isocaproic acid までの低級脂肪酸の生成は, 糖質を加えない唾液より小さかった。さらにインキュベートすると, lactic acid が消失すると同時に, acetic acid, propionic acid が増量した。これらの酸の一部は, lactic acid に由来するものと思われる。難醗酵性の dextran や isomaltose を加えた場合, 乳酸はほとんど検出されないが, acetic acid から isocaproic acid までの酸は glucose 添加時より多量にできた。

口腔内で産生される糖質代謝物が齲蝕の発生に関係深いことはよく知られ, とくに有機酸による脱灰と, 菌体外多糖による歯苔母質の形成が重視されている。有機酸としては, formic acid, acetic acid, propionic acid, butyric acid, lactic acid などがあり¹⁻³⁾, とくに lactic acid が注目されているが, 唾液中には lactic acid を利用する微生物も生息している。そのために, lactic acid はやがて他の酸 (acetic acid や propionic acid など) やその他の物質に変えられる⁴⁻⁶⁾。したがって, lactic acid が当然生成されている筈であるのに, これを検出できない場合がある。たとえば dextran は 1, 6 型でも口腔内では分解されにくいとされていたが⁷⁾, 著者らは唾液に dextran を加えてインキュベートすると pH が低下し, dextran が減少することを知った⁸⁾。この場合 dextran は isomaltose を経て, さらに glucose 単位となり, ついで lactic acid になると考えられている。しかし実際には lactic acid はインキュベート中ほとんど検出されなかった。dextran の分

解がおそいため, lactic acid の生成速度も小さく, 生成された lactic acid がただちに分解されるためであると思われる。

以上のような現象を含め, 唾液に糖質を加えない場合, すなわち唾液成分のみから生じる酸にはどんなものがあるか, また唾液に種々の糖質を加えた場合どんな酸が産生するかを調べることは歯学上興味のある問題である。今回はとくに acetic acid, propionic acid, isobutyric acid, n-butyric acid, isovaleric acid, n-valeric acid, crotonic acid, isocaproic acid のような低級脂肪酸について検索した。

実験材料および実験方法

1) ヒト全唾液: 3名の被験者から, 口腔内を純水でよく洗浄したのち, 自然流出全唾液を採取し, 等量ずつ混合して使用した。

2) 唾液除タンパク濾液: 上記全唾液をコロジオンフィルター (Sartorius-Membranefilter GmbH, Göttingen) で濾過し, 濾液を使用した。

Lower fatty acids in incubated saliva.

Masako MORITA, Kazuko KIRIMURA, Akinori KOZUMI, Yoshihiko MŌRI and Yukihiko MISHIRO
(Department of Biochemistry, Nippon Dental College, Tokyo)

* 東京都千代田区富士見1-9-20 (〒102)

Jap. J. oral Biol., 17: 385-390, 1975.

3) 唾液沈渣 : 上記全唾液を10,000 G で10分間遠沈し, 沈渣を唾液と同量の0.6%塩化ナトリウム水溶液で2回洗浄した。

4) 糖質 : glucose (小宗化学・東京), maltose (和光純薬・大阪), isomaltose (Research Products Division, Miles Laboratories, U.S.A.), dextran (可溶性, 平均分子量500,000, Pharmacia dextran T 500, Uppsala, Sweden) について調べた。

5) 低級脂肪酸 : acetic acid, propionic acid, isobutyric acid, n-butyric acid, n-valeric acid, isocaproic acid (和光純薬・大阪), isovaleric acid (小宗化学・東京), crotonic acid (第一化学・東京) をそれぞれ1 mg/ml に含む混合溶液を調製した。

6) インキュベーション : 全唾液10.0ml または唾液除タンパク濾液 10.0 ml に沈渣を加えたものに糖質の1 g/100 ml 溶液1.0 ml を加え, 37°C に0, 24, 48時間インキュベート (好気, 静置) する。pH を東亜電波 HM-5 A型 pH メーターで測定し, total sugar を Anthrone 法⁹⁾ で lactic acid 量を Barker-Summerson 法¹⁰⁾ で測定した。

7) ガスクロマトグラフィー : インキュベート唾液10.0 ml 当り, 60 ml のメタノールを加え, 一夜放置後濾過した。濾紙上を更に10 ml のメタノールで洗浄し, 濾液と洗液を合わせた。これに水酸化カリウムの濃溶液を滴下し, pH を8.5~

9.0に調整したのち, 減圧下で乾固した。乾固物に純水1.0 ml 加え溶解しリン酸で pH を約4に調整し, 脂肪酸を遊離させ, 1 μ l でガスクロマトグラフィーを行なった¹¹⁾。その条件は次のようである。

装置 : 島津ガスクロマトグラフ GC-5 A, カラム : 3 mm ϕ $\times$ 2 m (ガラス製), 充てん剤 : FAL-M (support. Shimalite TPA, 和光純薬・大阪), 検出器 : FID, キャリヤース : N₂ 60 ml/min, air : 0.85 l/min, H₂ : 60 ml/min, カラム温度 : 150°C, sens : 10², range : 8-128。

実験結果

1) インキュベート唾液中での酸産生

表1-Aに示すように, 唾液にはもともと acetic acid と propionic acid が含まれており, これらはインキュベートにより非常に増量することがわかった。また, この唾液にはごく少量ではあるが, isobutyric acid, n-butyric acid, isovaleric acid が含まれており, これらの酸もインキュベートすると著明に増量した。ガスクロマトグラフィーによる24時間インキュベート唾液中の各酸の分離の状態を図1に示した。24時間後には isocaproic acid が現われ, 48時間後には n-valeric acid, crotonic acid も出現した。このように, 唾液をインキュベートしておくくと種々の低級脂肪酸が産生することがわかった。

Table 1. Acids production in saliva

incubation (hr) acids (mg/100ml)	A no additives			B glucose added		
	0	24	48	0	24	48
acetic acid	4.18	32.11	51.85	4.18	22.90	56.71
propionic acid	1.18	9.91	18.81	1.18	7.94	23.54
isobutyric acid	0.17	0.58	2.90	0.17	0.88	0.88
n-butyric acid	0.23	4.09	6.13	0.23	0.56	1.38
isovaleric acid	0.11	1.03	3.89	0.11	0.58	1.22
n-valeric acid	trace	trace	0.54	trace	trace	0.15
crotonic acid	"	"	0.67	"	"	0.22
isocaproic acid	"	0.36	2.11	"	0.11	0.79
pH	7.33	6.88	7.15	7.33	6.27	6.10
total sugar	0.00	0.60	1.40	82.99	0.96	0.51
lactic acid	0.63	0.56	0.16	0.63	55.15	35.00

Fig. 1 Gaschromatogram of the lower fatty acids produced from saliva (incubation 37°C, 24 hours)

1. acetic (64) 2. propionic (32)
 3. isobutyric (8) 4. n-butyric (8)
 5. isovaleric (8) 6. n-valeric (8)
 7. crotonic (8) 8. isocaproic (8)
 column: FAL-M, 3 mm ϕ ×2 m (glass),
 carrier gas: N₂ 60 ml/min, column temp.
 : 150°C, sens: 10², range: in parentheses.

2) glucose 添加唾液中の酸産生

つぎに唾液に終濃度約 100 mg/100 ml の glucose を加えてインキュベートしたところ表 1-B に示すように、糖質の減少とともに pH の低下が起こり、24 時間で約 55 mg/100 ml の lactic acid の蓄積がみられた。低級脂肪酸についてみると、24 時間のインキュベートでは、acetic acid と propionic acid が非常に増加したが、glucose を添加しない唾液中のこれらの酸の産生よりはかなり低かった。acetic acid, propionic acid 以外の酸の産生も同様に低かった。48 時間のインキュベートでは、acetic acid, propionic acid は、無添加唾液よりかえって多かったが、これら以外の酸は、24 時間のインキュベートと同様に、無添加唾液より少なかった。48 時間後に acetic acid, pro-

pionic acid が増量し lactic acid が減少していることから、lactic acid から acetic acid および propionic acid が生成したのではないかと思う。

3) 唾液除タンパク濾液中での酸産生

以上の結果から、acetic acid から isocaproic acid までの低級脂肪酸は主として添加した糖質以外の唾液成分に由来するものと思われる。そこで唾液よりタンパク質を除去し、インキュベートしてみた。すなわち、唾液除タンパク濾液 10.0 ml に唾液沈渣 (唾液 10 ml 分) を加えたもの、およびこれにさらに終濃度約 100 mg/100 ml になるように glucose を加えたものを作り、37°C にインキュベートした。

表 2-A に示すように、唾液除タンパク濾液には唾液中とほぼ同量の acetic acid および propionic acid が含まれていた。これをインキュベートすると、acetic acid, propionic acid および n-butyric acid が増量したが、表 1-A のタンパク質を含む唾液の場合よりも生成された脂肪酸の種類および量は、ともにはるかに少なかった。したがって、これら低級脂肪酸のほとんどは唾液タンパク質に由来するものと思われる。つぎに唾液除タンパク濾液に glucose を添加した場合の酸の産生状態を調べた。表 2-B に示すように、glucose を添加した場合には、添加しない場合より、acetic acid, propionic acid の産生が大きかった。24 時間で多量に産生された lactic acid が 48 時間では約 1/8 に減少していること、これに対して、acetic acid, propionic acid は 24 時間より 48 時間の方が著明に増加していることから、lactic acid の一部が acetic acid, propionic acid に変化したものと思われる。isobutyric acid から isocaproic acid の各酸の量は、glucose を添加しなくても、大差はないようである。

4) dextran 添加唾液中の酸産生

唾液に dextran を加えてインキュベートすると、糖質の減少、pH の低下がみられるが、lactic acid はほとんど検出されないことは以前の報告にも示したが、果していったん生成した lactic acid の分解の結果として、acetic acid および propionic acid の増量が起きているかどうか、また、他の低級脂肪酸の産生状態が、糖質無添加および

Table 2. Acids production in deproteinized saliva

incubation (hr) acids (mg/100ml)	A no additives			B glucose added		
	0	24	48	0	24	48
acetic acid	4.41	8.30	10.07	4.41	14.90	25.10
propionic acid	0.75	1.16	1.21	0.75	8.27	20.20
isobutyric acid	trace	0.06	0.09	trace	0.22	1.20
n-butyric acid	"	0.05	1.03	"	0.22	0.75
isovaleric acid	"	0.13	0.19	"	0.11	0.31
n-valeric acid	"	trace	trace	"	trace	trace
crotonic acid	"	"	"	"	"	"
isocaproic acid	"	"	0.08	"	"	"
pH	8.11	8.31	8.23	8.11	6.06	6.18
total sugar	0.24	0.10	0.18	82.99	0.24	0.19
lactic acid	0.00	0.00	0.00	0.00	38.87	4.95

Table 3. Acids production from dextran, isomaltose and maltose in saliva

incubation (hr) acids (mg/100ml)	A saliva + dextran			B saliva + isomaltose			C saliva + maltose		
	0	24	48	0	24	48	0	24	48
acetic acid	4.18	29.06	60.69	4.18	19.31	42.14	4.18	25.25	41.80
propionic acid	1.18	9.92	20.34	1.18	12.24	20.54	1.18	10.57	22.45
isobutyric acid	0.17	0.68	1.08	0.17	1.14	1.22	0.17	0.26	1.19
n-butyric acid	0.23	4.43	9.79	0.23	5.20	9.92	0.23	0.07	0.39
isovaleric acid	0.11	0.81	1.18	0.11	0.90	1.43	0.11	0.22	0.04
n-valeric acid	trace	trace	0.13	trace	0.15	0.27	trace	trace	trace
crotonic acid	"	0.12	0.47	"	0.22	0.44	"	"	"
isocaproic acid	"	0.35	1.21	"	0.26	0.75	"	0.16	0.44
pH	7.33	6.70	5.99	7.33	6.79	6.01	7.33	5.35	5.52
total sugar	103.28	71.34	1.22	100.90	45.67	1.64	101.56	6.67	4.82
lactic acid	0.63	1.40	2.56	0.63	8.84	9.14	0.63	58.36	16.66

glucose 添加唾液等と、どのようにちがうかを調べてみた。

表3-A に示すように、24時間インキュベート後の acetic acid 量は糖質無添加唾液(表1-A)より少ないが、48時間後にはこれよりかなり増量していた。propionic acid についても同様であった。総糖量の変化をみると、24時間内で約30%減少し、48時間ではほとんど消失していた。以上の結果から dextran 添加唾液からも乳酸ができ、これが一部 acetic acid, propionic acid に変化したものと思われる。dextran 添加唾液と、glucose 添加唾液(表1-B)とを比較すると、dex-

tran 添加唾液の方が acetic acid および propionic acid の産生が大きく、とくに n-butyric acid の産生が大きかった。

5) isomaltose 添加唾液中での酸産生

dextran が唾液中で分解される際は、isomaltose を経るものと思われる。そこで、isomaltose 添加唾液中での酸の産生を調べた。

表3-B に示すように acetic acid の産生は dextran 添加唾液より小さかったが、他の酸の産生はほぼ等しく、glucose 添加唾液より、isobutyric acid から isocaproic acid の産生が大きく、とくに n-butyric acid の産生は dextran 添

加唾液と同様に非常に大きかった。

6) maltose 添加唾液液中での酸産生

通常唾液中での lactic acid の産生は glucose より maltose の方が大きいので、maltose 添加唾液についても lactic acid 以外の酸の産生状態を調べた。

表 3-C に示すように、インキュベートによる pH の低下は glucose 添加唾液よりはるかに大きく、24時間後の lactic acid 産生も幾分大きかった。また、24時間後の acetic acid および propionic acid は glucose 添加唾液より多かったが、48時間後には逆に少なくなった。

isobutyric acid から isocaproic acid までの酸の産生は、glucose 添加唾液より小さかった。

考察と結論

唾液の脂肪酸については、後藤^{12,13)}や Bloch¹⁴⁾が新鮮唾液の高級脂肪酸を調べている。著者らはとくにインキュベート唾液について低級脂肪酸の消長を追究した。

唾液中に acetic acid および propionic acid が少量ではあるが検出されたが、唾液をインキュベートしておく、これらの酸が増加することがわかった(表 1-A)。また、インキュベートにより、isobutyric acid, n-butyric acid, isovaleric acid, n-valeric acid, crotonic acid, isocaproic acid が出現し、増量した。しかし表 2-A に示すように、唾液タンパク質を除去した場合、acetic acid, propionic acid および n-butyric acid がわずかに増量するけれども、唾液タンパク質を含む場合(表 1-A)とは比較にならないくらい少量であった。したがって、これら 8 種の酸は唾液タンパク質に由来するものであろう。また、除タンパクしたものでも、わずかに酸が増量したのは、唾液除タンパク濾液中のペプチド、アミノ酸等や唾液沈渣に含まれる変性蛋白質等によるものであろう。

唾液または唾液除タンパク濾液(唾液沈渣添加)に glucose を加えインキュベートすると、lactic acid が生成し、pH が低下する。生成した lactic acid は唾液内の乳酸分解性の微生物により次第に分解され、それにつれて主として acetic acid,

propionic acid が増量してくる。しかし、isobutyric acid から isocaproic acid までの各酸の増加は顕著ではない。このように乳酸生成が起きている場合には、これらの酸の産生は小さいものと思われる。一番はっきりした例は、唾液に maltose を加えてインキュベートした場合で、lactic acid 生成量、pH 低下が非常に大きく、isobutyric acid から isocaproic acid までの各酸の産生は非常に少ない。

タンパク質からこれらの低級脂肪酸が産生するためには、まずタンパク質分解酵素により唾液タンパク質が分解されることが必要である。唾液内微生物を含め、一般にタンパク質分解酵素は中性または弱アルカリ性で活性が高い。glucose や maltose のような醗酵性の糖質を唾液に加えてインキュベートすると醗酵が起り、タンパク質の代謝が起りにくくなり、低級脂肪酸の産生が低いものと思われる。また、醗酵性の糖質を加えた場合でも、acetic acid と propionic acid が lactic acid の消失とともに増加することから、これらの酸には lactic acid の一部が変化し、生成されたものも含まれているであろう。

唾液中で dextran が分解され、系の pH が低下するにもかかわらず lactic acid がほとんど検出されないことから、この系に産生した低級脂肪酸を調べてみた。これと同時に、dextran が分解される場合、isomaltose を経由することを予測し、isomaltose 添加唾液液中での酸の産生とも比較してみた。

表 3-A, B に示したように、pH の低下は dextran 添加でも、isomaltose 添加でも、ほぼ同程度であったが、糖質分解速度および lactic acid 生成量は isomaltose の方がかなり大きかった。しかし、isomaltose の分解速度は glucose の分解速度よりはるかに小さかった。dextran または isomaltose を含む唾液中での低級脂肪酸、とくに isobutyric acid から isocaproic acid までの酸の生成量は、glucose を含む唾液中でのこれらの酸の生成量より大きく、とくに n-butyric acid の生成が大きかった。以上のように、dextran や isomaltose のような難醗酵性の糖質を加えた場合にはタンパク質分解酵素が働き易く、多量のタンパク質由来の酸が産生するものと思われる。

Summary: Whole human saliva was incubated at 37°C for 24 or 48 hours. The lower fatty acids produced were determined by gaschromatography.

Small amounts of acetic and propionic acid were detected before incubation. These acids markedly increased during incubation. The lower fatty acids such as isobutyric, n-butyric, isovaleric, n-valeric, crotonic and isocaproic acid appeared and increased with incubation. On the other hand the acids formation was very small when deproteinized saliva was incubated with salivary sediment. These acids are considered to be derived mainly from salivary proteins.

When fermentative sugar, glucose or maltose, was added to saliva or deproteinized saliva, large amount of lactic acid was produced during incubation. Then acetic and propionic acid were increased with the decomposition of the lactic acid. It seems probable that a portion of the lactic acid is changed into acetic or propionic acid. The development of the acids other than acetic and propionic acid was very small.

Saliva was incubated with low fermentative sugar, dextran or isomaltose. Very small amount of lactic acid was detected, while the production of the acids (acetic~isocaproic acid) were higher than that from glucose containing saliva.

文 献

- 1) MÜNTZ, J. A.: Production of acids from glucose by dental plaque material. *J. Biol. Chem.*, 148 : 225-236, 1943.
- 2) HARTLES, R. L. and MCLEAN, N. D.: Some observations on the biochemical properties of a strain of *Clostridium welchii* isolated from carious teeth. *Brit. dent. J.*, 93 : 147-150, 1952.
- 3) 高野広吉 : 口腔内酪酸醗酵型 *Fusobacterium* の分類に関する研究. 口腔病会誌, 26 : 571-582, 1959.
- 4) WINKLER, K. C. and BACKER, DIRKS, O.: The mechanism of the dental plaque. *Int. dent. J.*, 8 : 561-585, 1958.
- 5) IWAMI, Y., HIGUCHI, M., YAMADA, T. and ARAYA, S.: Degradation of lactate by *Bacterionema matruchotii* under aerobic and anaerobic conditions. *J. dent. Res.*, 51 : 1683, 1972.
- 6) HU, G. and SANDHAM, H. J.: Streptococcal utilization of lactic acid and its effect on pH. *Archs oral Biol.*, 17 : 729-743, 1972.
- 7) GIBBONS, R. J. and BANGHART, S. B.: Synthesis of extracellular dextran by cariogenic bacteria and its presence in human dental plaque. *Archs oral Biol.*, 12 : 11-24, 1967.
- 8) 桐村和子, 森田倡子, 莊司栄太郎, 久場兼順 : 唾液内のデキストラン分解. 歯基礎誌, 16 : 266-274, 1974.
- 9) 阿武喜美子, 瀬野信子 : 糖質実験法, 蛋白質・核酸・酵素, 別冊, 15頁, 共立出版社, 東京, 1968.
- 10) 山中啓 : 光電比色法, 各論1, 化学の領域増刊33号, 109-112頁, 南江堂, 東京, 1968.
- 11) 宮田功一 : 中性脂肪, 脂肪族カルボン酸およびそのエステルのガスクロマトグラフィー (法医学的応用の研究), 島津科学器械ニュース, 11巻2号, クロマトグラフィー特集号 No. 6, 1969.
- 12) 後藤基成 : 唾液中の脂肪酸について. 歯基礎誌, 9 : 96-106, 1968.
- 13) 後藤基成 : 脂肪酸の唾液中への排泄について. 歯基礎誌, 10 : 1-28, 1968.
- 14) BLOCH, A., KREMBEL, J. and FRANK, R. M.: Comparative study of the fatty acids in human dental plaques and whole saliva. *Archs oral Biol.*, 15 : 1385-1386, 1970.