唾液内乳酸代謝に対するアミンの作用

和田 垣 裕 一

日本歯科大学学生化学教室*

(主任: 三代幸彦教授)

(指導: 桐村和子助教授)

[受付: 昭和52年9月21日]

抄録: 唾液内でアミンを産生するといわれている5種のアミノ酸(ヒスチジン, オルニチン, アルギニン, グルタミン酸およびリジン)を唾液に添加しインキュベートを行ない, 乳酸量, pH を調べた。ヒスチジン, オルニチンを添加した場合, 特に乳酸量の増加が認められ, しかも pH の低下は抑制された。

ヒスチジンを添加した場合の pH 低下抑制はそのイミダゾール基による酸緩衝作用と考えられる。一方オルニチン添加による同効果は脱炭酸生成物であるブトレッシンのアルカリとしての酸中和作用と考えられた。いずれの場合も pH 低下が抑制され乳酸生成に適した中性から弱酸性の範囲に長く保持された結果乳酸量が増加したと思われる。しかし, さらにブトレッシンの唾液微生物乳酸生成に対する影響を調べたところ, 微量で乳酸生成を促進することがわかった。また, ブトレッシン添加濃度と乳酸生成との関係は, streptococci と lactobacilli では異なることもわかった。

緒 言

口腔内には種々の微生物が生息し, 摂取された糖質から乳酸などを産生している。歯垢内で産生された有機酸とくに乳酸による pH 低下が齲蝕発生の最大の原因とされている。この pH の変化はまた微生物の分布, 代謝や増殖などに重要な影響をあたえる因子のひとつである。たとえば, 唾液内には streptococci, lactobacilli, staphylococci, neisseriae その他が存在するが, pH が低下して 5~4.5 になると, 活動できるのはこれらの4種のうちでは, streptococci と lactobacilli だけであるという¹⁾。さらに口腔内の乳酸代謝をみると, 生成と分解が同時に行なわれているが, 唾液内での好適 pH は乳酸生成²⁾も乳酸分解³⁾もともに中性付近にある。したがって, このような pH 域では多量の乳酸が生成され, また同時によく分解されるが, pH が4程度まで低下すると生成も分解もともに起こらなくなる。また一般に, 口腔内の

タンパク質の分解は中性ないし弱アルカリ性で起こりやすいとされている(ただし酸性でよく作用するタンパク質分解酵素も存在するという⁴⁾)。

以上のような例のほか, pH 変化を介しての代謝と代謝との関係も考えられる。Kleinberg⁵⁾は, 酸によって低下した pH を上昇させる因子として, アミノ酸が脱炭酸作用を受けて生成されるアミンを考えている。アミンの生成は微生物のアミノ酸脱炭酸酵素の作用によるものであるが, Gochman ら⁶⁾は唾液微生物によって, オルニチン, アルギニン, グルタミン酸, ヒスチジン, リジンが脱炭酸されることを, Hayes ら⁷⁾は, ヒト歯垢由来の微生物により, オルニチン, アルギニン, グルタミン酸, ヒスチジン, リジンのほかアスパラギン酸が脱炭酸され, それぞれブトレッシン, アグマチン, γ -アミノ酪酸, ヒスタミン, カダベリン, β -アラニンが生成されると報告している。しかし, ブトレッシンはオルニチンのほかグルタミン酸やアルギニンからも生成される可能性

Effects of amines on the lactate metabolisms in human saliva.

Yuichi WADAGAKI (Department of Biochemistry, Nippon Dental University, Tokyo)

* 東京都千代田区富士見1-9-20 (〒102)

Jap. J. oral Biol., 19: 587-604, 1977.

がある⁸⁾。さらにこれらのアミノ酸の脱炭酸を触媒する酵素の最適 pH は弱酸性 (pH 5.0~5.5) であると述べている。これらのことから、唾液内で乳酸が産生され pH が低下すると、各アミノ酸に対するアミノ酸脱炭酸酵素の作用が活発となりアミンが生成されと考えられる。この場合、アミンの強アルカリとしての働きにより乳酸の一部が中和され、pH が上昇する。したがって、アミンの生成があると乳酸の産生に好適な範囲に唾液 pH がより長時間保持される結果となり、アミン生成がない場合に比べ、乳酸産生量が増加する可能性がある。そこで著者は、オルニチン、アルギニン、グルタミン酸、リジン、ヒスチジンの5種のアミノ酸添加が唾液内乳酸生成にどのような影響をあたえるかを調べた。またオルニチンの脱炭酸により産生されるプトレッシンは、動、植物を問わず広く自然界に分布し、一般に核酸やタンパク質の合成が盛んな組織でそのレベルが高く、悪性腫瘍患者では尿中濃度が高くなることが知られている⁹⁾。また歯周炎回復期の歯肉組織ではオルニチン脱炭酸酵素活性が高く、プトレッシン産生が盛んになるといわれる¹⁰⁾。さらに微生物においてもプトレッシンは、*Hemophilus parainfluenzae*¹¹⁾、*Neisseria perflava*¹²⁾ の成長促進因子として知られている。したがって、アルカリとしての作用の他に、プトレッシン自体の唾液内微生物乳酸代謝に対する影響を調べることは興味深い。そこで唾液にプトレッシンを加えた場合、生成乳酸量にどのような影響があるかを、また、唾液中に存在する個々の細菌の乳酸生成に対する影響も検討した。

実験方法

1) 唾液の採取

口腔内を刷掃した後、脱イオン水で含嗽し、自然に流出するヒト汚染全唾液を採取した。なお個々の唾液について比較する場合以外は、定まった4名の唾液を一定量ずつ混合して使用した。

2) 唾液沈渣の濃縮

唾液をグラスフィルター (40~50mesh, 遠藤製作所) で濾過し、食物残渣、剝離上皮などをできるだけ除去した後、久保田高速遠心機 KCF 62 A

型で10,000G 10分間遠心分離を行なう。上清の²/₃を除去した後、サーモミキサー (シナノ製作所) で1分間振盪して沈渣を再び浮遊させ沈渣を3倍量含む唾液を調製した。これを濃縮唾液と呼ぶ。

3) 供試細菌

Streptococcus salivarius IID 9758

Streptococcus faecalis 10541 (日歯大細菌学)

Streptococcus mutans: JC2, B13, BHT, Ingbritt

Lactobacillus acidophilus (日歯大細菌学)

Lactobacillus casei IAM 1118

Lactobacillus fermenti IFO 3954

4) 増菌用培地

Streptococcus salivarius, *Lactobacillus acidophilus* にはグルコース加ブイオン培地, *Streptococcus faecalis* にはハートインフュージョン培地, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus fermenti* にはチオグリコール酸加ハートインフュージョン培地, *Streptococcus mutans* の各菌株にはグルコース加 TEP ブイオン培地を用いた。

各培地の組成を表1に示す。

5) 細菌浮遊液の調製

各細菌を前項4) に示したそれぞれの増菌用培地で18時間培養した後、10,000G 10分間遠心分離を

表1 増菌用培地の組成

1) グルコース加ブイオン培地 (pH 7.0, 100ml 中)	
粉末ブイオン*	2.0 g
グルコース**	1.0 g
2) チオグリコール酸加ハートインフュージョン培地 (pH 7.0~7.2, 100ml 中)	
ハートインフュージョンブイオン*	2.5 g
グルコース**	1.0 g
チオグリコール酸ナトリウム**	0.1 g
酢酸ナトリウム**	1.0 g
3) ハートインフュージョン培地 (pH 7.3~7.5, 100ml 中)	
ハートインフュージョンブイオン*	2.5 g
4) グルコース加 TEP ブイオン培地 (pH 7.2, 100ml 中)	
TEP ブイオン培地*	2.5 g
グルコース**	1.0 g

* 栄研・東京

** 小宗化学・東京

行なった。沈渣を約10ml の0.6g/100ml 塩化ナトリウム水溶液で3回洗浄した後、同濃度の塩化ナトリウム水溶液に浮遊させ、分光光度計(日立101型)を使用し、660nm の濁度を0.200になるように調整した。

6) 唾液乳酸生成系

2) 項の方法により調製した濃縮唾液3.0ml に1.5g/100ml グルコース水溶液3.0ml および脱イオン水または、添加物水溶液(各種アミノ酸、またはプトレッシン)3.0ml を加え混和しpH を2N HCl または NaOH で7.40に調整後、2.0ml ずつ共栓付スピットグラスに分注する。この系のグルコース終濃度は500mg/100ml である。これらを好気静置の条件下、37℃ で一定時間インキュベートした後、1.0ml を取り出し、これを乳酸定量用の試料とし、残部をpH 測定用とした。

7)細菌の乳酸生成系

細菌浮遊液4.0ml に脱イオン水またはプトレッシン水溶液4.0ml および Willett and Mose 培地(表2) 8.0ml を加え混和後に4.0ml ずつ共栓付スピットグラスに分注し、好気静置下、37℃ で

4時間インキュベートした後、1.0ml 取り出し、乳酸定量用の試料とし、残部を濁度およびpH 測定用とした。

8) 唾液乳酸分解系

濃縮唾液2.0ml, 90mg/100ml 乳酸ナトリウム水溶液2.0ml, 脱イオン水または、添加物水溶液(アミノ酸、またはプトレッシン)2.0ml を加え混和し、2.0ml ずつ共栓付スピットグラスに分注する。この系の乳酸ナトリウムの終濃度は30mg/100ml である。これらを37℃ 好気静置下でインキュベートし、経時的に1.0ml を取り出し乳酸の定量を行なった。

9) アミンの薄層クロマトグラフィー

① 試料および標準アミンのダンシル化

唾液より調製した試料(実験結果の項参照)および1mM ヒスタミン二塩酸塩(和光純薬)、またはプトレッシン二塩酸塩(和光純薬)水溶液0.3ml に0.1M 炭酸ナトリウム水溶液0.1ml を加えpH を8~9とする。これに2.5mg/ml ダンシルクロライド(BDH Chemicals Ltd, England)アセトン溶液0.3ml を加え37℃, 2.5時間暗所で反応させる。反応後ダンシル化アミンを1.0ml のベンゼンで抽出する。

② 薄層クロマトグラフィー

プレート: シリカゲル, 20×20cm (厚さ0.25mm)
(DC-Alufolien Kieselgel, E. Merk AG Darmstadt, Germany)
展開溶媒: i) シクロヘキサン-酢酸エチル(2:3)
ii) 酢酸ブチル-酢酸エチル(1:5)
展開: 室温・暗所・約1時間(約10cm 展開)

10) 乳酸の定量

Barker-Summerson法¹⁴⁾ によった。試料1.0ml に10g/100ml トリクロル酢酸水溶液4.0ml を加えて除タンパクした後、その1.0ml を共栓付スピットグラスにとり、2.5g/100ml 硫酸銅水溶液4.0ml を加え、さらに水酸化カルシウム1.0g を加えて振盪混和し、30分間放置後5分間遠心分離を行なう。つぎに上清1.0ml を試験管にとり、これに4g/100ml 硫酸銅水溶液0.05ml を加え、氷水中で冷却しながら、濃硫酸6.0ml を加え振盪混和し、沸騰水中で5分間加熱した後、冷水で20℃ 以下に冷却する。1.5g/100ml パラヒドロキシジフェニ

表 2 合成培地の組成

Willett and Mose 培地 (μg/ml) ¹³⁾ pH 7.5			
L-Alanine	250	K ₂ HPO ₄	1,000
L-Arginine	320	KH ₂ PO ₄	1,000
L-Aspartic acid	500	FeSO ₄ ·7H ₂ O	10
DL-Asparagine	100	MnCl ₂	25
L-Cystine	600	NaCl	10
L-Cysteine HCl	600	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	10
L-Glutamic acid	400	MgSO ₄ ·7H ₂ O	80
Glycine	200	NaHCO ₃	500
L-Glutamine	100	Glucose	10,000
L-Histidine	320	Guanine	10
L-Leucine	200	Xanthine(Na salt)	10
L-Lysine	320	Uracil	10
L-Isoleucine	200	Adenine	10
DL-Methionine	200	Nicotinic acid	10
L-Phenylalanine	200	Calcium pantothenate	10
L-Proline	200		
DL-Serine	400	Pyridoxal HCl	10
L-Tryptophan	200	Thiamine HCl	0.6
L-Threonine	200	Riboflavin	1.0
L-Tyrosine	200	Biotin	0.2
L-Valine	200	Folic acid	0.02

ル水溶液0.1mlを加えよく混和する。30°Cの水浴中に30分間保持し、さらに沸騰水中で90秒間加熱した後、冷却する。発色した青紫色を分光光度計を用いて570nmで比色する。

11) pHの測定

東亜電波 HM-5 A型を用いた。

結 果

1. 唾液内乳酸生成に対するアミン産生性アミノ酸の影響

オルニチン、ヒスチジン、アルギニン、グルタミン酸およびリジンの5種のアミノ酸は口腔内の微生物によって脱炭酸され、それぞれのアミンになるといわれているが、前述のようにアミンはアルカリ性であるため乳酸生成によるpHの低下を抑える作用がある。したがって、アミンが生成されると、乳酸の生成量が増すことが考えられる。そこで、これらのアミノ酸が唾液内乳酸生成に対しどんな影響をおよぼすかを調べた。

終濃度5mMのアミン産生性アミノ酸、オルニチン、ヒスチジン、アルギニン、グルタミン酸、リジン、およびアミン非産生性アミノ酸、アラニン、セリン、バリンを含む唾液乳酸生成系を37°Cで0, 3, 6時間インキュベートし乳酸量およびpHの測定を行なった。

1) アミノ酸添加時の乳酸生成

図1に示すように、6時間値をみると、上記のアミノ酸を添加した場合は、無添加の場合より乳酸量が多く、とくにヒスチジンおよびオルニチンの乳酸生成促進効果が大きいことがわかった。

しかし、3時間値をみると、ヒスチジン以外は対照とほとんど同じ乳酸量をしめしている。3時間値と6時間値を比較すると、インキュベーション3時間以降においてはアミノ酸が代謝し、その代謝産物が乳酸生成に促進的に作用することがうかがえる。

2) アミノ酸添加時のpHの低下

しかし図2のpHの変化をみると、ヒスチジン添加の場合では、乳酸量をもっとも大きいにもかかわらず、pHの低下はもっとも小さく、オルニチンがこれにつぎ、他のアミノ酸添加では無添加の場合とほぼ同程度のpH低下を示した。

図1 乳酸生成に対するアミノ酸の影響

図2 pH低下に対するアミノ酸の影響

このようにヒスチジンおよびオルニチンは他のアミノ酸に比較して乳酸生成促進作用が大きく、またこれにともなうpH低下を抑制する作用も大きいことがわかった。

2. 唾液内乳酸生成に対するヒスチジンおよびオルニチン濃度の影響

つぎにヒスチジンおよびオルニチンの添加濃度

図 3 乳酸生成に対するヒスチジン濃度の影響

図 4 pH 低下に対するヒスチジン濃度の影響

をかえて、乳酸生成促進効果および pH 低下抑制効果を比較した。

ヒスチジンおよびオルニチンの添加終濃度を 0, 3, 6, 12mM とした唾液乳酸生成系を 0, 3, 6 時間インキュベートし、乳酸量および、pH の測定を行なった。

図 5 乳酸生成に対するオルニチン濃度の影響

図 6 pH 低下に対するオルニチン濃度の影響

図 3 に示すように、ヒスチジンを添加した場合には、濃度とともに乳酸量が増加することがわかった。また図 4 のように、pH 低下は添加濃度が高いほど小さかった。

一方オルニチン添加の場合でも濃度とともに乳酸量が増加し、pH 低下が抑制される傾向がみられたが、ヒスチジン添加の場合のような著明な差はみられなかった (図 5, 6)。

図 7 乳酸生成および pH に対する低濃度オルニチンの影響(インキュベーション: 6 時間)

3. 唾液内乳酸生成 に対するオルニチン低濃度の影響

オルニチンはプロレシンの前駆物質であるが、プロレシンには低濃度で細菌の増殖を促進する作用があることが知られている^{11,12)}。そこでオルニチンの効果をさらに低濃度で調べることにした。

8 例の唾液についてそれぞれ調製した乳酸生成系に、終濃度 0, 0.6, 1.8, 3, 6, 12mM のオルニチンを加えて 6 時間 インキュベートし、乳酸量および pH の測定を行った。

図 7 に示すように、乳酸生成におよぼすオルニチンの影響は多様であった。すなわち、8 例中オルニチン添加濃度の増加とともに乳酸量が増加し

たもの（図のA）が4例、0.6mM で最大の乳酸生成促進効果を示し、1.8mM~12mM では同程度の効果を示したもの（図のB）が2例、1.8mM で最大の効果を示し、0.6, 3, 6mMではほとんど効果が認められず、12mM では幾分乳酸生成が抑制されたもの（図のC）が1例、0.6, 1.8, 3mMではほとんど効果がなく、6, 12mMで乳酸生成が抑制されたのが1例（図のD）であった。またオルニチンによる pH 低下抑制効果は、ヒスチジンの効果より、はるかに小さいが、オルニチン濃度の増加とともに大きくなる傾向がみられた。

以上の結果からヒスチジンおよびオルニチンを添加した場合、乳酸量は無添加のものより大きくなっても、pH は無添加のものより低下はしないことがわかった。この原因のひとつとして、各アミノ酸からのアミン産生が考えられる。すなわちアミノ酸からアミンが産生されると酸が中和され、乳酸の生成に適した pH 範囲により長く保持される結果、乳酸生成量が増すという考えである。しかし、唾液内微生物のアミノ酸炭酸酵素の量は限られており、アミノ酸の添加量の増加とともにアミン産生量が大きく増加するとは考えにくい。実際にオルニチン添加の場合には、添加濃度による効果の差は小さいので、アミンすなわちプトレッシンが産生され乳酸が中和されるため pH 低下が抑制された可能性が考えられる。しかしヒスチジンの場合には添加量とともに乳酸量が大きく増加するが、pH低下は抑制されていた。したがって、この効果はヒスチジンから産生されたヒスタミンのアルカリとしての効果のみとは考えられない。むしろヒスチジンの場合は、そのイミダゾール基のために、中性付近での酸緩衝作用が大きく、濃度の増加とともにこの効果が大きくなり pH 変化（低下）を抑制すると考えられる。

4. アミン産生性アミノ酸の酸緩衝作用

前記5種のアミン産生性アミノ酸および3種のアミン非産生性アミノ酸について、その酸緩衝作用を比較した。すなわち、それらの5mM あてを含む pH 7.40の唾液乳酸生成系3.0ml に pH 計のガラス電極を挿入して、 $N/20$ 乳酸を滴下し、pH が5.50になるまでに要した $N/20$ 乳酸量を測定した。図8に示すように、ヒスチジン以外のアミノ

図8 唾液乳酸生成系におけるアミノ酸の酸緩衝作用

酸を添加した場合の消費乳酸量は無添加の場合より、わずかに大きい程度であった。これに対しヒスチジンを添加した場合には、2倍強の乳酸が消費された。したがってヒスチジンだけは唾液乳酸生成系でとくに強い酸緩衝作用を示すことが示唆された。

なおヒスタミンやプトレッシンも、あらかじめ初期 pH を7.4にすると、それぞれヒスチジンやオルニチンと酸緩衝作用は同じになった。

5. 炭酸水素ナトリウムの酸緩衝作用と乳酸生成促進効果

ヒスチジンが唾液乳酸生成系で強い酸緩衝作用を有することから、ヒスチジン添加の場合の乳酸生成促進および pH 低下抑制効果は主として、その酸緩衝作用にもとづくものと考えられる。そこでモデル実験として、唾液内乳酸生成系に生体緩衝系の構成成分である炭酸水素ナトリウムを終濃度0, 1, 5, 10mM となるように添加して、0, 3, 6時間インキュベートし、乳酸量を測定した。図9, 10に示すように、炭酸水素ナトリウムの濃度が高いものほど乳酸量が大きく、pH の低下の割合は逆に小さいことがわかった。この系の酸緩衝作用を測定したところ、図11に示すように、pH を7.40から5.50に低下させるのに要した $N/20$ 乳酸の量は炭酸水素ナトリウムの添加濃度が高いほど大であった。このモデル実験により炭酸水素ナトリウムの効果はヒスチジンの効果とよく似ており、ヒスチジンの効果はその強力な緩衝作用に起

図9 唾液乳酸生成に対する炭酸水素ナトリウムの影響

図10 唾液 pH 変化に対する炭酸水素ナトリウムの影響

因していることがうかがえた。

6. 唾液内乳酸分解に対する ヒスチジンおよびオルニチンの影響

唾液内には乳酸を生成する微生物とともにこれを分解する微生物も存在する。本報告で測定して

図11 唾液乳酸生成系における炭酸水素ナトリウムの酸緩衝作用

表 3 唾液内乳酸分解に対するヒスチジンおよびオルニチンの影響 (表中の数字は分解乳酸量 mg/100ml を示す)

添加物 (5mM)	インキュベート 時間	
	6 時 間	9 時 間
無 添 加	7.2	11.8
ヒスチジン	6.8	11.4
オルニチン	6.6	12.3

いる乳酸量は、実際には生成量と分解量の差である。したがって、ヒスチジンあるいはオルニチンが乳酸分解を抑制した場合も相対的に乳酸量は増加となってあらわれる。そこで、唾液内乳酸分解系にヒスチジンまたはオルニチンをそれぞれ終濃度 5 mM となるように添加して、6、9 時間インキュベートし、分解乳酸量を調べた (表 3)。さらにオルニチンについては、乳酸生成に対する影響を広範囲の濃度にわたり検討しているので、乳酸分解に対する影響も 0.5、1、5、10 mM 添加した場合について調べた (表 4)。

5 mM のヒスチジンまたはオルニチン添加の場合、6 または 9 時間インキュベート後の分解乳酸量は無添加の場合と比べて差がなく、唾液内では 5 mM のヒスチジンまたはオルニチンには乳酸分解抑制作用のないことがわかった。またオルニチ

表 4 唾液内乳酸分解に対するオルニチン濃度の影響 (表の数字は分解乳酸量 mg/100ml を示す)

インキュベート時間 オルニチン終濃度 (mM)	6 時 間	9 時 間
0	7.1	12.9
0.5	8.1	12.4
1	7.5	12.6
5	7.8	12.4
10	7.9	13.2

ンの添加濃度を 0.5~10mM とかえてみたが、分解乳酸量に影響をあたえないことがわかった。したがって、ヒスチジンおよびオルニチンの乳酸生成促進効果は、これらのアミノ酸の乳酸分解抑制作用によるみかけ上のものではないことがわかった。

7. 唾液内におけるヒスチジンおよびオルニチンの脱炭酸の可能性について

つぎに唾液内でヒスチジンおよびオルニチンが脱炭酸され、それぞれのアミンが産生するかどうかを、pH の上昇を指標として調べてみた。

アミノ酸脱炭酸酵素の最適 pH は弱酸性 (pH 5~6) にあるので、ヒスチジンまたはオルニチンを含む唾液の初期 pH を HCl で 5.00, 6.00, 7.00 に調整して 24 時間インキュベートし、この間、経時的に pH を記録した。各アミノ酸は終濃度 5 mM とし、対照としては、アミノ酸無添加唾液を各 pH に調整し、インキュベートした。低 pH でアミン産生が大きければ、対照よりも pH が大きく上昇するものと期待される。

図12に示すように、無添加およびヒスチジン添加唾液ともに、どの初期 pH でインキュベートを開始しても、pH は経時的に上昇している。しかし、上昇の度合はヒスチジン添加唾液の方が小さく、これはヒスチジンの酸緩衝作用によるものと思われる。したがってこの系ではヒスチジンからのアミン生成を pH 変化でとらえることは不可能であった。

一方オルニチン添加唾液では、図13に示すように、どの初期 pH でインキュベートを開始しても、無添加の場合より pH の上昇が大きく、その度合

図12 唾液 pH 変化に対するヒスチジンの影響

図13 唾液 pH 変化に対するオルニチンの影響

は特に初期 pH 5.00 のときが大であった。これを水素イオン濃度 $[H^+]$ の減少 (初期と 24 時間インキュベート時の差) で比較すると、初期 pH 5.00 の場合 $1.92 \times 10^{-7} M$, 6.00 の場合 $0.12 \times 10^{-7} M$, 7.00 の場合 $0.03 \times 10^{-7} M$ であった。オルニチン脱炭酸酵素の最適 pH が 5.5⁷⁾ 付近であることを考慮すると、CO₂ の逃出によるほかプロテシンの産生が加味されていることが示唆される。

8. 薄層クロマトグラフィーによるインキュベート唾液中アミンの検出

さきの実験で、オルニチン添加唾液からプロテシンの産生することが示唆されたが、プロテシンがあらゆる組織で産生されること、歯垢中にはかなりの量が検出されること¹⁵⁾、唾液中にオルニチンが存在すること^{16,17)}、などから、唾液中にプロテシンがもともと含有されている可能性があり、また、インキュベーションにより増量することが考えられる。

またヒスチジンからのヒスタミン産生も pH 変化としてはとらえられなかったが、産生されてい

る可能性もある。そこで唾液を48時間インキュベートし、アミンが産生されるかどうかを薄層クロマトグラフィーで調べてみた。

インキュベート前の唾液および48時間インキュベート唾液の各20mlに少量の2N HClを加え酸性(pH 5.5付近)にしたのち、メタノール100mlを加えて1夜放置後、東洋濾紙 No. 6で濾過し、濾液を減圧乾固した。これに脱イオン水4.0mlを加えて溶解し、10,000G 10分間遠心分離し、その上清を前記の方法でダンシル化し、薄層クロマトグラフィーを行なった。薄層プレートに添加した試料は2 μ l、一次元展開溶媒には、シクロヘキサン—酢酸エチル(2:3)を、二次元展開溶媒には、酢酸ブチル—酢酸エチル(1:5)を使用し、それぞれ10cm展開させた。

スポットの検出は紫外線照射(PUV-1A, 東京光学機械)時に発する蛍光によった。なお標準のダンシル化プトレッシンのスポットは青白色、ダンシル化ヒスタミンのスポットは黄白色であった。図14に示すように、インキュベート前の唾液

図14 薄層クロマトグラフィーによる唾液内アミンの検出

試料においても、はっきりしたプトレッシンのスポットが検出され、ヒスタミンの位置にかすかな蛍光がみられた。また48時間インキュベートした唾液試料では、プトレッシンが幾分増量しているように思われたが、ヒスタミンの位置の蛍光の増

図15 唾液内乳酸生成に対するプトレッシンの影響(1)

強はみとめられなかった。以上からプトレッシンはもともと唾液中に含まれ、インキュベーションにより増量することがうかがえた。

9. 唾液内乳酸生成に対するプトレッシンの影響

さきの実験から唾液中では、オルニチン脱炭酸酵素の作用によりプトレッシンが生成されているものと思われる。そこで唾液内乳酸生成にあたるプトレッシンの影響を4例について調べた。

唾液乳酸生成系にプトレッシンを終濃度、0, 2.5, 5, 10mM となるようにそれぞれ添加し、3, 6時間インキュベート後の乳酸量を測定してみた(図15~18)。図15はすべての濃度で乳酸生成が抑制され、図16, 17, 18は2.5mMでは乳酸生成にほとんど影響がなかったが、5mM, 10mM, では乳酸生成が抑制され、添加濃度が高いほど抑制効果が大いことがわかった。ついで図16と図18の唾液について、プトレッシン添加終濃度を低くし、0, 0.25, 1, 10mMとしてその影響を調べた。

図19, 20に示したように、さきの4例と同様に、この場合も10mMでは著明に乳酸生成が抑制されたが、0.25mMでは乳酸生成の促進がみられ、1mMではほとんど影響がみられなかった。微量のプトレッシンは乳酸生成を促進することがうかがえるので、さらにプトレッシンの微量添加の場合

図16 唾液内乳酸生成に対するプロテッシンの影響 (2) 一棒グラフの説明は図15に同じ

図18 唾液内乳酸生成に対するプロテッシンの影響 (4) 一棒グラフの説明は図15に同じ

図17 唾液内乳酸生成に対するプロテッシンの影響 (3) 一棒グラフの説明は図15に同じ

図19 唾液内乳酸生成に対するプロテッシンの影響 (5) 一棒グラフの説明は図15に同じ

について検討を行なった。

2例の唾液 (図16と図18) について、プロテッシンの添加終濃度を0, 0.01, 0.1, 0.5mM とし乳酸生成に対する影響を調べたところ (図21, 22), これらすべての濃度で唾液内乳酸生成が促進された。しかし最大効果の得られる濃度は異なり、図21では0.01mM, 図22では0.1mM であった。0.5 mM では両例とも、0.01または0.1mM 添加時よ

り乳酸量は小さかった。

これらの実験からプロテッシンは、低濃度では唾液内乳酸生成を促進し、高濃度ではこれを抑制するものと思われる。

10. 唾液内乳酸分解に対するプロテッシンの影響

唾液内乳酸分解系にプロテッシンを終濃度0～10mM となるように添加し、6および9時間イン

図20 唾液内乳酸生成に対するブトレッシンの影響 (6) 一棒グラフの説明は図15に同じ

図22 唾液内乳酸生成に対するブトレッシンの影響 (8) 一棒グラフの説明は図15に同じ

図21 唾液内乳酸生成に対するブトレッシンの影響 (7) 一棒グラフの説明は図15に同じ

表 5 唾液内乳酸分解に対するブトレッシン濃度の影響 (表中の数字は乳酸分解量 mg/100ml を示す)

ブトレッシン 終濃度 (mM)	インキュベート 時間	
	6 時間	9 時間
0	6.3	9.5
0.01	6.5	9.3
0.1	6.3	9.7
0.5	6.2	9.2
1	6.2	9.2
2.5	5.6	9.0
5	5.3	8.3
10	4.9	9.0

キューベートして分解乳酸量を調べた。表5に示すように、6時間インキュベートした場合には、2.5 mM 以上の濃度では幾分分解抑制がみられたが、9時間ではいずれの濃度でもブトレッシンは唾液内乳酸分解に影響をあたえないことがわかった。

11. 合成培地中における唾液微生物乳酸生成に対するブトレッシンの影響

唾液内乳酸生成に対するブトレッシンの作用濃

度が唾液によってかなり異なっているのは、唾液における微生物叢の差も、もちろん重要な原因であろうが、その他に唾液にもともと含まれているブトレッシン量の差も影響しているものと思われる。そこでブトレッシンを含まない培地中に一定量のブトレッシンを添加し、この中での唾液微生物の乳酸生成に対するブトレッシンの影響を調べることにした。

合成培地としては Willett and Mose 培地を選んだ。ガラスフィルターにより濾過した唾液を 10,000G で10分間遠心分離し、沈渣を約 10ml の 0.6g/100ml 塩化ナトリウム水溶液で 3 回洗浄した

図23 合成培地中における唾液内微生物の乳酸生成に対するブトレッシンの影響 (1)
(インキュベーション: 6時間)

図24 合成培地中における唾液内微生物の乳酸生成に対するブトレッシンの影響 (2)
(インキュベーション: 6時間)

のち、もとの唾液量と等しくなるように塩化ナトリウム水溶液に浮遊させた。この唾液沈渣浮遊液 3.0ml にブトレッシン水溶液 3.0ml, および Willett and Mose 培地 6.0ml を加えたものを調製し、共栓付スピッツグラスに 2.0ml ずつ分注し 6 時間インキュベートした後乳酸量を測定した。ブトレッシンの添加終濃度は 0, 0.005, 0.05, 0.5, 5, 10mM とし、2 種の唾液沈渣 (それぞれ 4 名より採取した唾液沈渣) について調べた。

図23, 24に示すように、0.005~5mM のブトレッシン濃度では乳酸生成の促進が、10mM では抑制が認められた。一方さきの唾液内乳酸生成においては (図15~22) 5 mM では促進はみられず逆に抑制がみとめられている。

このように唾液沈渣の乳酸生成に対するブトレッシン添加量の影響を、唾液中で観察した場合と Willett and Mose 培地中で観察した場合とで異なるのは、唾液中にすでに含まれているブトレッシン量、またはインキュベート中に生成されるブトレッシン量が添加量に加算されるためと思

われる。

また、図23と図24とでは、ブトレッシンの乳酸生成促進作用の最適濃度に差があるように思われるが、これは微生物の種類および量が異なり、それぞれの微生物のブトレッシン要求性または感受性に差があるためと思われる。

そこでつぎに、口腔内にも存在するといわれている streptococci および lactobacilli の数種のものについて、その乳酸生成がブトレッシン添加濃度により、いかなる影響を受けるかを調べてみた。

12. 各種細菌の乳酸生成に対するブトレッシンの影響

培地として Willett and Mose 培地を使用し、ブトレッシンを終濃度 0, 0.05, 0.1, 0.5, 1, 5, 10mM となるように添加し、4 時間インキュベート後、乳酸量、細菌増殖度 (濁度) を調べたところ、図25~29に示すように細菌によりブトレッシンの影響がかなり異なっていた。

Streptococcus salivarius (図25) では、0.05~

図25 *Streptococcus salivarius* の乳酸生成に対するブトレッシンの影響

図27 *Lactobacillus fermenti* の乳酸生成に対するブトレッシンの影響

図26 *Streptococcus faecalis* の乳酸生成に対するブトレッシンの影響

図28 *Streptococcus mutans* JC 2 の乳酸生成に対するブトレッシンの影響

0.5mM のブトレッシン添加でほとんど乳酸生成の促進はみられなかったが、1～10mM 添加では、添加濃度とともに乳酸生成が促進された。

Streptococcus faecalis (図26) では0.05～0.1mM 添加では乳酸量は、無添加の場合とほとんどかわらなかったが(わずかに増加の傾向があったが)、1～10mM では乳酸生成が添加濃度とともにやや抑制気味であった。

Lactobacillus fermenti ではブトレッシン添加濃度とともに乳酸量が著明に減少した。類似の成績をしめすものに、*Lactobacillus casei*, *Lactobacillus acidophilus* があった。

Streptococcus mutans では、図28の JC 2 はブトレッシンの0.1～5 mM でやや促進気味であり、10mM での抑制はわずかであったが、図29の B13 では低濃度ブトレッシンによる促進傾向が小さく、かつ1 mM 以上ではあきらかに抑制された。図28と類似の成績は BHT, 図29と類似の成績は Ingbritt でもみられた。なお、一般に濁度と乳酸量は平行していた。

およその傾向としては lactobacilli は高濃度のブトレッシンで一般に抑制されるが、streptococci には抑制されにくいものと抑制されやすいものがあることがわかった。

図29 Streptococcus mutans B13 の乳酸生成に対するプトレッシンの影響

考 察

タンパク質の代謝と糖質の代謝は口腔内の主要な代謝であり、歯周疾患と齲蝕をめぐってのかかわり合いは口腔生化学の興味深い課題である。

ヒト唾液沈渣はオルニチン、アルギニン、グルタミン酸、ヒスチジンおよびリジンの脱炭酸酵素を有し⁶⁾、歯垢由来の微生物はオルニチン、アルギニン、グルタミン酸、ヒスチジン、リジン、アスパラギン酸を脱炭酸するといわれている⁷⁾。アミノ酸脱炭酸酵素の最適 pH は弱酸性であるため、口腔内で乳酸が産生し pH が低下するとアミノ酸からアミンが生成し、pH が上昇するという報告がある⁵⁾。

そこで唾液乳酸生成系にアミン産生性アミノ酸（ヒスチジン、オルニチン、アルギニン、グルタミン酸およびリジン）、アミン非産生性アミノ酸（アラニン、セリン、バリン）を添加してインキュベートした場合の生成乳酸量と pH の変化をアミノ酸無添加の場合と比較した。

ヒスチジン、またはオルニチンを添加した場合には、無添加の場合に比べて乳酸の生成量が多いにもかかわらず、pH の低下は小さかった。一方他のアミノ酸の添加では、乳酸量は無添加の場合よりは大きかったが、pH の低下は無添加の場合とほぼ同じであった（図1、2）。

ヒスチジンまたはオルニチン添加で乳酸量が多いにもかかわらず pH の低下が小さい原因として、

それぞれのアミノ酸からのアミンの生成および、各アミノ酸自身の乳酸生成系中での緩衝作用が考えられる。ヒスチジンはイミダゾール基を有し、生体内のタンパク質緩衝系の主因となっている。そこでヒスチジンおよびオルニチンの添加濃度を変えて（3、6、12mM）、唾液内乳酸生成を調べたところ、ヒスチジンでは濃度増加とともに、著明に乳酸量が多くなるが、pH の低下は逆に小さくなった。オルニチンでは濃度を増加させても著明な変化はみられなかった（図3～6）。

これらの成績からみて、ヒスチジンの効果は酸緩衝作用によるものと思われる。そこで、ヒスチジンまたはオルニチンを 5 mM 含む乳酸生成系について pH を 7.40 から 5.50 に低下させるのに要する乳酸量を測定した。

その結果オルニチンの場合には乳酸の消費量は対照と大差はなかったが、ヒスチジンの場合には無添加の 2 倍以上の乳酸の消費がみられ、乳酸生成系中で強い酸緩衝作用を示すものと思われた（図8）。

Gochman ら⁶⁾の報告によると、唾液沈渣中のヒスチジン脱炭酸酵素の活性はオルニチン脱炭酸酵素の $\frac{1}{6} \sim \frac{1}{7}$ で、グルタミン酸およびリジンの脱炭酸酵素活性とはほぼ同じレベルであるという。また、Hayes ら⁷⁾も歯垢由来微生物のヒスチジン脱炭酸酵素活性は、オルニチン脱炭酸酵素活性に比べはるかに小さいことを報告している。

以上のことから、唾液内乳酸生成に対する添加ヒスチジンの効果は主としてその酸緩衝作用にもとづくものと思われる。一方オルニチンの効果は唾液微生物が高いオルニチン脱炭酸酵素活性を有すること、オルニチン自身は唾液乳酸生成系中で大きな酸緩衝作用は示さないことなどから、インキュベーション中に生成されるプトレッシンのアルカリとしての作用もあるものと思われる。これを裏づける実験結果として、唾液の pH をオルニチン脱炭酸酵素の最適 pH 付近に調整してインキュベートした場合、オルニチン添加の場合は無添加唾液より pH の上昇が大きかったこと（図13）、およびインキュベーションにより唾液中のプトレッシンが増量することが薄層クロマトグラフィーで確かめられたことなどがある（図14）。

ところがオルニチンの添加濃度と乳酸量との関係をさらに広範囲の濃度 (0.6, 1.8, 3, 6, 12 mM) で, 8名の唾液について調べたところ, 乳酸量が最大になるオルニチン濃度は唾液により異なっていた (図7)。この原因はいろいろ考えられるが, インキュベート前の唾液中にプトレッシンが存在することが薄層クロマトグラフィーで確かめられたこと (図14), およびある種の細菌の生育にプトレッシンが関係していること^{11,12)} などから考えると, オルニチンの効果は, プトレッシンというアルカリの生成を通して乳酸を中和するためというだけでなく, 生成されたプトレッシンが唾液微生物の生育そのものに影響をあたえることによってあらわれるものと思われる。

したがって, オルニチンを添加したときの効果は, これをプトレッシンにかえる唾液中のオルニチン脱炭酸酵素活性の大小と, 唾液にもともと含まれているプトレッシン量, およびプトレッシンの影響をうける微生物の種類と量などによるものと思われる。そのため, 唾液により, 乳酸生成促進作用が最大になるオルニチン濃度が異なると考えられる。

まず, プトレッシンの唾液微生物への直接的な影響をみるため, 唾液乳酸生成系にオルニチンのかわりにプトレッシン (0.01~10mM) を加えてインキュベートし, その効果を調べた (図15~22)。プトレッシン添加濃度が 5 mM 以上では, 唾液内乳酸生成は抑制され, 0.01~0.25mM 付近では促進傾向がみられたが, 唾液によって最大の乳酸生成がみられるプトレッシン濃度が異なっていた。この原因のひとつとして, もともと唾液中に含まれているプトレッシン量が添加量に加算されたことが考えられる。このことはプトレッシンを含まない合成培地 (Willett and Mose 培地) 中に唾液沈渣を加えてインキュベートした場合, 乳酸生成を促進するプトレッシン濃度が, さきの唾液乳酸生成系で調べた場合より高くなったこと (図23, 24) から推察される。

プトレッシンの作用濃度が唾液により異なるもうひとつの原因として, プトレッシンの影響をうける種々の微生物の種類や量のちがいがあ。そこで, 口腔内にも存在すると思われるいくつか

の細菌について, その乳酸生成に対するプトレッシン作用濃度を比較してみた (図25~29)。Streptococcus salivarius では1~10mMのプトレッシン添加で乳酸量が濃度とともに増加し, Streptococcus mutans JC2, BHT, Ingbritt では低濃度 (0.1~1 mM) で乳酸生成が促進気味であるが 5 mM 以上では抑制され, Streptococcus faecalis, Streptococcus mutans B 13では 1 mM 以上で抑制され, これ以下の濃度ではわずかに乳酸生成を促進気味であり, Lactobacillus fermenti, Lactobacillus casei, Lactobacillus acidophilus ではプトレッシンによる乳酸生成促進はみられず, 高濃度添加では濃度の増加にともなって乳酸生成は抑制された。なお個々の細菌の乳酸量と濁度は一般に平行していた。

このように細菌によりプトレッシンの作用がかなり異なるため, 唾液微生物全体としてプトレッシンの作用をみたときは各種細菌の比率の差が反映され, 唾液により乳酸生成促進および抑制濃度が異なるものと思われる。

さて, 口腔内乳酸生成についてタンパク質の部分水解物 (ペプチド) による促進効果が報告され¹⁸⁻²⁷⁾, とくにオリゴペプチドが注目されている^{25,26)}。また, 齲蝕感受性群の唾液にはペプチド (pH 上昇因子) が少ないであろうとの報告もある²⁸⁾。一般にオリゴペプチドの作用としては従来, 拮抗アミノ酸の妨害がないこと, アミノ酸とは別の機構でかつより早く取り込まれることなどがあげられる²⁹⁾。しかし, streptococci と lactobacilli の比較実験によると, 促進を受けるのは前者だけであるという^{20,21)}。したがって, オリゴペプチドの乳酸生成促進現象においては, ペプチド自身の酸緩衝作用は考えなくてよいとしても, インキュベート中に生ずるアミン, アンモニアなどの酸緩衝作用は考慮する必要があると思われる。

アミンおよびアンモニアのうち, 前者は酸性側で後者はアルカリ性側で生じやすい物質である。糖質からの乳酸生成系においては, pH が低下するのであるから, アルカリとしてはアミンの生成が主なものと考えられる。しかし Streptococcus salivarius の成績によると低濃度プトレッシンには酸緩衝能はないものと考えられる。他方, ジペ

プチドのメチルエステルであるアスパルテーム (アスパルティルフェニルアラニンメチルエステル) は、酸緩衝作用はないのに、インキュベーションによって乳酸生成を促進し、かつ pH 低下を妨害することが知られている³⁰⁾。このようなペプチドが、プトレッシンなどのアミンの生成を促進したりするかどうかなど、ペプチドやアミノ酸の解糖におよぼす作用は、インキュベーション中の各物質の代謝を含めて、さらに追究しなければならない問題であろう。

結 論

唾液内乳酸生成に対するアミン産生性アミノ酸 (ヒスチジン、オルニチン、アルギニン、グルタミン酸、リジン) およびアミン非産生性アミノ酸 (アラニン、セリン、バリン) の影響を調べた。

1) 5 mM のヒスチジンまたはオルニチン添加により乳酸の生成が促進されたが、pH の低下は無添加の場合より小さかった。

2) ヒスチジンまたはオルニチン以外の上記のアミノ酸を 5 mM 添加した場合にも乳酸生成の促進はみられたが、ヒスチジン、オルニチンに比べ小さく、また pH の低下は無添加の場合とほぼ同じであった。

3) ヒスチジンおよびオルニチンには、唾液内乳酸生成促進効果、および pH 低下抑制効果があることがわかった。

4) ヒスチジンの効果は濃度の増加 (3~12 mM) とともに著明に増大したが、一方オルニチンのそれは濃度による差が小さかった。

5) 0.6, 1.8, 3, 6, 12 mM オルニチンの効果を調べたところ、乳酸量が最大になる濃度は唾液によりかなり異なっていた。

6) ヒスチジンの唾液内乳酸生成系での酸緩衝作用は、ここで使用したオルニチンおよび他のアミノ酸よりはるかに大きかった。

7) オルニチンおよびヒスチジンは唾液内乳酸分解には影響をあたえなかった。

8) 唾液をオルニチン脱炭酸酵素の最適 pH 付近 (5.0) に調整し、インキュベートしたところ、pH の上昇はオルニチン添加の場合には無添加の場合より著しく大きかった。

9) 薄層クロマトグラフィーにより、インキュベート前および後 (48時間) の唾液から、プトレッシンに相当するスポットが検出された。

10) プトレッシンは唾液内微生物の乳酸生成に影響をあたえ、終濃度 5 mM 以上では乳酸生成を抑制し、0.01~0.25 mM 付近では促進したが、乳酸生成促進が最大となる濃度は唾液により異なっていた。

11) プトレッシンを含まない合成培地 (Willett and Mose 培地) 中にプトレッシンを添加し、唾液微生物の乳酸生成に対する影響を調べたところ、乳酸生成を促進または抑制する濃度はともにさきの乳酸生成系で調べた場合より高くなった。

12) 合成培地中における細菌の乳酸生成に対するプトレッシンの影響は、*Streptococcus salivarius* では 1 mM 以上で生成量が増加し、*Streptococcus mutans* JC 2, BHT, Ingbritt では低濃度 (0.1~1 mM) で増加し、5 mM 以上では減少し、*Streptococcus faecalis*, *Streptococcus mutans* B 13 では 1 mM 以上で減少した (これ以下の濃度ではわずかに増加した)。 *Lactobacillus fermenti*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus acidophilus* では低濃度における促進傾向はみられず 1 mM 以上において乳酸量はプトレッシンの濃度増加とともに減少した。なお細菌の濁度と乳酸量は一般に平行していた。

13) 唾液内乳酸生成に対するヒスチジンの効果は主としてその酸緩衝作用によるものであり、オルニチンの効果は生成されたプトレッシンの酸中和作用ならびに微生物の乳酸生成促進作用によるものと思われる。

御指導、御校閲を賜った日本歯科大学学生化学教室三代幸彦教授、桐村和子助教授に心から謝意を表します。

また種々の御助言を下さった小山登志江助教授に深謝するとともに、御協力をいただいた生化学教室の方々に感謝します。更に細菌の一部を分与していただいた日本歯科大学細菌学教室渡辺武彦教授に感謝いたします。

なお本論文の要旨の一部は昭和51年9月、昭和51年度日本歯科大学歯学会大会で口演発表した。

文 献

- 1) 三代幸彦：歯学生化学 (押鐘 篤監修)，第3版，471頁，医歯薬出版，東京，1968。

- 2) 川原正紀: 微生物の乳酸生成に対するリン酸塩の作用. 歯学, 63: 223-238, 1975.
- 3) 富塚和彦: 唾液沈渣による乳酸分解. 歯学, 64: 1352-1362, 1977.
- 4) KLEINBERG, I.: Biochemistry of the dental plaque. *Advances in Oral Biology* (Edited by Staple, P. H.), Vol 4, p 43-49, Academic Press, New York and London, 1970.
- 5) KLEINBERG, I.: Regulation of the acid-base metabolism of the dento-gingival plaque and its relation to dental caries and periodontal disease. *Int. Dent. J.*, 20: 451-465, 1970.
- 6) GOCHMAN, N., MEYER, R. K., BLAKWELL, R. Q. and FOSDICK, L. S.: The amino acid decarboxylase of salivary sediment. *J. Dent. Res.*, 38: 998-1003, 1959.
- 7) HAYES, M. L. and HYATT, A. T.: The decarboxylation of amino acids by bacteria derived from human dental plaque. *Archs oral Biol.*, 19: 361-369, 1974.
- 8) 井上秀夫: ポリアミンの生合成とその調節. 代謝, 9: 1010-1017, 1972.
- 9) 竹田義朗: ポリアミンと細胞増殖. 代謝, 9: 1042-1050, 1972.
- 10) 石田 浩, 岩山幸雄, 大工原恭, 竹田義朗: イヌの実験的歯周炎におけるポリアミン代謝について. 歯基礎誌, 19: 408, 1977. (抄)
- 11) HERBST, E. J. and SNELL, E. E.: Putrescine and related compounds as growth factors for *Hemophilus parainfluenzae* 7901. *J. Biol. Chem.*, 181: 47-54, 1949.
- 12) MARTIN, W. H. JR., PELCZAR, M. J. JR. and HANSEN, P. A.: Putrescine as a growth requirement for *Neisseria*. *Science*, 116: 483-484, 1952.
- 13) INWARD, P. W., UPSTONE, D. and VAN HOUTE, J.: Nutritional requirement of oral streptococci. *Dental Plaque* (edited by MC HUGH, W. D.), p 217-224, Livingstone LTD., London, 1969.
- 14) BARKER, S. B. and SUMMERSON, W. H.: The colorimetric determination of lactic acid in biochemical materials. *J. Biol. Chem.*, 138: 535-554, 1941.
- 15) HYATT, A. T. and HAYES, M. L.: Free amino acids and amines in human dental plaque. *Archs oral Biol.*, 20: 203-209, 1975.
- 16) SINGER, D. L. and KLEINBERG, I.: Free amino acids in human dental plaque in situ. *J. Dent. Res.*, 52 (special issue): 91, 1973.
- 17) ARMSTRONG, W. G.: Amino acid composition of human parotid salivary proteins selectively adsorbed by hydroxyapatite. *Archs oral Biol.*, 15: 1001-1003, 1970.
- 18) 石原英夫: 乳酸生成に対する唾液の作用について. 歯学, 54: 320-334, 1967.
- 19) 三代幸彦, 桐村和子, 森田倡子, 伊藤 隆: *Streptococcus salivarius* の乳酸産生を促進する唾液透析外液因子の性状. 歯基礎誌, 11: 24-29, 1969.
- 20) 小山登志江, 高橋徳治, 島田勝彦, 三代幸彦: 微生物の乳酸産生に対する牛血清アルブミン部分水解物の促進効果. 歯学, 59: 265-269, 1971.
- 21) 森永和男: 唾液タンパク部分水解物の乳酸醗酵促進効果. 歯基礎誌, 15: 187-205, 1973.
- 22) MISHIRO, Y., KIRIMURA, K. and ISHIHARA, H.: Observations on the saliva factor that enhances the production of lactic acid by the oral flora. *J. Dent. Res.*, 45: 1824, 1966.
- 23) MISHIRO, Y., KIRIMURA, K. and MORITA, M.: Promoting effect of saliva dialyzate on the lactate production of *Streptococcus salivarius*. *Archs oral Biol.*, 15: 465-467, 1970.
- 24) KIRIMURA, K., MORITA, M. and MISHIRO, Y.: Effect of protein hydrolysates on the fermentative activity of *Streptococcus salivarius*. *J. Dent. Res.*, 49: 890, 1970.
- 25) MISHIRO, Y. and MORINAGA, K.: Lactate production from glucose in preincubated saliva. *J. Dent. Res.*, 53: 767, 1974.
- 26) 金子久幸: レンサ球菌の乳酸生成に対するペプチドの促進作用. 歯基礎誌, 17: 242-267, 1975.
- 27) MISHIRO, Y. and KANEKO, H.: Promotion of lactate production by oligopeptides of partial hydrolysate of bovine serum albumin. *J. Dent. Res.*, 53: 1502, 1974.
- 28) KLEINBERG, I.: Formation and accumulation of acid on the tooth surfaces. *J. Dent. Res.*, 49: 1300-1316, 1970.
- 29) 三代幸彦: ペプチドと微生物. 日歯周誌, 18: 111-116, 1976.
- 30) MISHIRO, Y. and KANEKO, H.: Effect of dipeptide, aspartame, on the lactic acid production in human whole saliva. *J. Dent. Res.*, in press.