唾液中の Metabolic factor の bioassay

に関する研究

浜 田 節 男

東北歯科大学歯科薬理学講座（主任：川崎 徹教授）

〔受付：昭和58年11月15日〕

Studies on the bioassay of metabolic factor in human saliva

Setsuo Hamada

Department of Dental Pharmacology, Tohoku Dental University, Koriyama, Fukushima, 963

(Chief: Prof. Tohru Kawasaki)

[Accepted for publication: November 15, 1983]

Key words: metabolic factor / glycolysis / salivary supernatant / salivary sediment / Sephadex column

Abstract: In order to establish a simple method for determining the activity of metabolic factors in the saliva, measurement of the glucose consumption (rate) in a mixture of salivary sediment and various preparations of salivary supernatant was carried out by a tube-culture method under aerobic condition.

In comparison with the Warburg manometric method under anaerobic condition (a well-known method for measuring the activity of metabolic factors in the saliva proposed by Hartles and others), the usefulness of the tube-culture method as a routine bioassay for metabolic factors was evaluated.

1) The results of the tube-culture method to measure the aerobic glucose consumption rate showed an excellent positive correlation with those of the Warburg method over a wide range of specimens such as whole saliva, salivary supernatant, mixture of salivary supernatant and sediment, dialyzed preparation of supernatant, and heat-treated supernatant. In addition, the tube-culture method was easy to manipulate, and it may be useful as a routine method for the bioassay of activities of metabolic factors in the saliva.

2) Optimal incubation time for this method appeared to be between 1 and 2 hours.

3) The maximum activity of metabolic factors in the salivary supernatant was reached when they were concentrated two- or three-fold. At higher concentrations than this, no increase in activity was observed.

4) The salivary supernatant was dialyzed and its outer solution subjected to chromatography on a Sephadex G-25 column and separated into four fractions (Fr. I ~ IV). Fraction II was positive for the ninhydrin reaction, and showed a high rate of glucose consumption which was dose-dependent, indicating that this fraction contained most of the metabolic factors. Fraction III showed weak activity for glucose consumption, but no dose-dependency was recognized.

5) The activity of a mixture of Fr. I ~ IV approximately corresponded to the sum of those of Fr. II and III in a range of one- to two-fold concentrations, implying a positive additive effect of Fr. II and III.

6) The molecular weight of the metabolic factor was estimated as less than 1000.

緒 言

ヒト混合唾液遠沈上清中には、口腔細菌叢を含
福島県郡山市富田町三角堂 31の1 (〒963)

むところの唾液遠沈沈渣の呼吸および解糖作用を促進する物質が存在していることが、1955年、Hartles ら¹⁾によって報告され、追試確認がなされた²⁻⁸⁾。

1963年に至り、Hartles⁹⁾は、本活性物質は口腔細菌の炭水化物の代謝過程に関与して、促進的に作用する代謝の補助因子であるとして、この物質を“Metabolic factor”と名付けた。さらに、Hay ら¹⁰⁾(1966)は、この“Metabolic factor”の作用の本質は、短時間に、しかも、活性測定が極端な低栄養反応系で唾液沈渣の代謝を促進することからみて、その作用は口腔細菌の発育に伴うものではないとした。

一方、本物質の特性^{2-5, 7, 8, 11, 12)}、ゲルろ過法による活性画分の分画^{10, 13-18)}についての報告、唾液沈渣の代換物として、純培養菌を用いて、唾液上清の塩酸、酵素、プレインキュベーションによる唾液由来成分の分解生成物についての報告^{10, 14-16, 19-27)}、さらに、唾液成分以外の物質として、アミノ酸、ペプチドあるいはたんぱく加水分解産物の添加実験^{6, 10, 14, 16, 26-32)}などが報告された。

以上、Metabolic factor に関する数多くの報告を総括すると、水溶性、耐熱性、透析性でニンヒドリン反応陽性物質に関係があり、唾液由来のアミノ酸、ペプチド、たんぱくなどがそれぞれ関与している多元的なものであることが示されている。しかし、数多くの報告があるにもかかわらず化学的構造および代謝促進の機序等は、いまだ明確ではない。

唾液中に、Metabolic factor と炭水化物が共存した場合は、その解糖作用を促進することによって、極めて短時間に代謝生成物である酸の産生を促すことから、唾液中の酸濃度の増加、すなわち歯質の脱灰を促進することが考えられる。しかし、一方、唾液中に含まれる炭水化物あるいは、新たに摂取された炭水化物が極めて短時間に急速に消費される結果、歯垢中への炭水化物の拡散が抑制され、間接的に歯質の脱灰を阻止する方向に作用することも考えられる。いずれにしても Metabolic factor の存在は、う蝕の発生に何らかの影響を与えるものであり、口腔衛生学的に重要な意味を持つものと思われる。

従来、Metabolic factor の活性測定は、Hartles and Wasdell¹⁾、Hartles⁹⁾、Kawasaki¹³⁾らが提唱する Warburg 検圧法が用いられていた。この測定条件は、口腔細菌の発育を伴わない代謝活

性のみの測定法としては、極めて合理的な方法であるが、操作性および多数試料の測定法としては、種々難点がある。従って、これらの難点を解消すべく、種々の検定法が検討された。すなわち、好気培養条件、一定時間後の乳酸生成量を測定する方法²⁴⁾、唾液沈渣の代換として純培養乳酸菌を用い、完全合成培地での乳酸生成量を測定する方法^{25, 28, 29, 33)}などが報告された。

天野³⁴⁾、浜田ら³⁵⁾は純培養乳酸菌の発育を指標とした pulp-disc 法、cup 法および比濁法を検討し、Metabolic factor の活性測定の routine work としての有用性について報告している。

一方、川崎³⁶⁾は唾液中の Metabolic factor と Growth factor は本質的に異なる物質であることを報告した。すなわち、唾液沈渣の代りに純培養菌を用いた bioassay について、口腔衛生学的価値は評価しながらも、純培養菌を菌体材料として供試することは、唾液沈渣の生物学的な特殊性を排除することになり、得られた結果は、in vivo における現象とかけ離れたものになる可能性があり、唾液沈渣は純培養菌に代換され得ないことを示唆した。さらに、培養時間の延長、完全合成培地の使用等は、発育を伴わない Metabolic factor の検定というよりは、むしろ菌の発育に伴った解糖作用を測定することになり、Growth factor の検定法であることを指摘した。

本研究は、Metabolic factor の routine bioassay の開発を目的としたものである。

すなわち、従来報告された Metabolic factor の諸物性を考慮して調製した唾液上清試料および菌体材料として唾液沈渣を用い、グルコース消費量、乳酸生成量、たんぱく量を測定項目として Warburg 検圧法による成績と、好气的条件下の試験管法による成績とを比較し、試験管法の routine bioassay としての価値について検討し、若干の知見を得たので報告する。

研究材料

1. 唾液材料

唾液材料は、う蝕罹患の著しくない成人の無刺激混合唾液を昼食前に蒸留水で含嗽したのち、氷冷試験管中に採取したものをを用い、採取後直ち

に、遠沈 (15000rpm, 20min) した。

唾液上清は必要量になるまで -20°C の氷室中に凍結保存した。以下これを上清と略称する。

唾液沈渣は 0.9% 生理食塩液で 2 回洗浄、遠沈したのち、採取時の唾液量と同量の生理食塩液に均等に懸濁混和した。以下これを沈渣と略称する。なお、沈渣は測定のためごとに、実験の当日に採取した新鮮沈渣を用いた。

2. 上清のセロファン透析試料

1) セロファンチューブの前処理

セロファンチューブ (Spectra · por 6, $\phi 38\text{mm}$, M.W. cut off: 1000, reorder no.: 132638) を常法^{37,38)}に従ってあらかじめ、蒸留水で膨潤させたのち、洗浄したものを用いた。

2) 透析内液・外液試料

上清を室温で氷解したのち、 4°C の恒温室内で、20 倍量の蒸留水中で攪拌しながら 24 時間透析を行った。透析内液はさらに、同量の蒸留水中で、引き続き 24 時間透析をくり返した。

透析内液および透析外液を合したものの (40 倍量) を、それぞれ一定量に減圧濃縮したのち、凍結保存し、透析内液・外液の試料とした。

3. 上清の加熱処理試料

上清を沸騰水浴中 (98°C) で、10 分、30 分間加熱したものを用いた。なお、未処理のものを対照とした。

4. 上清の Sephadex G-25 カラムによる分画試料

1) Sephadex G-25 カラムの調製

常法³⁹⁾に従って、あらかじめ Sephadex G-25 fine (ファルマシア) 56g を 0.5M 酢酸 ($\text{pH } 2.7$) で充分に膨潤させたのち、直径 2.6cm のカラム管に充填した。

2) Sephadex ゲルろ過

透析外液 10ml (上清 100ml に相当) を Sephadex カラムにセットし (ゲル長さ 51cm, $V_t = 270\text{ml}$, $V_o = 119\text{ml}$, $V_i = 129\text{ml}$)、溶出液を 0.5M 酢酸溶液 ($\text{pH } 2.7$)、溶出速度 63ml/hr, の条件

Fig. 1 Preparation of salivary samples

で、フラクシオンコレクターを用いて4 ml ずつ分取した。

分取した画分について、たんぱく量、紫外部280 nm の吸光度、尿酸、ニンヒドリン陽性物質をそれぞれ測定した。

さらに、フラクシオン No. 30~No. 130 (以下 fr. no. 30~130 と記す) の101 フラクシオンを大きく4画分にし、Fr. I~Fr. IVを得た。すなわち、Fr. I (fr. no. 30~55), Fr. II (fr. no. 56~74), Fr. III (fr. no. 75~90), Fr. IV (fr. no. 91~130) で、それぞれの画分を一括して合したものを濃縮、凍結乾燥して -20°C の氷室に保存した。それぞれの画分は、好気培養下でのグルコース消費量測定用試料とした。

以上、唾液試料の処理、分画方法を Fig. 1 に示した。

研究方法

1. Metabolic factor の代謝促進作用の測定

好気、嫌気両培養条件下における Metabolic factor の代謝促進作用を比較するために唾液材料、上清の透析試料、上清の加熱処理試料および Sephadex ゲルろ過分画試料の4試料について、試験管法(好気培養)および Warburg 検圧法(嫌気培養)を用いて、 37°C 、3時間培養した。

測定項目は、グルコース量、乳酸量、たんぱく量である。なお、Sephadex ゲルろ過した全フラクシオンについては、さらにたんぱく量、尿酸量、ニンヒドリン陽性物質量をそれぞれ測定した。

1) 好気培養および嫌気培養法

好気、嫌気両条件下における測定方法を4試料のうち、唾液材料を用いた場合について述べる。

(1) 好気培養による測定法(試験管法：以下T法と略記する)

10ml 容量のポリエチレン栓付きスピッツ管に全唾液、上清、沈渣および上清と沈渣の等量混合液をそれぞれ1 ml、0.02M グルコース溶液0.3mlを加え、 37°C で、3時間振盪培養する。1試料について2本ずつ調製し、グルコース量を測定した。

(2) 嫌気培養による測定法(Warburg 検圧法：

以下W法と略記する)

Hartles and Wasdell¹⁾, Hartles⁹⁾, Kawasaki¹³⁾の方法に従い、Warburg 検圧計(大岳製)を用いて、 CO_2 -bicarbonate 緩衝系⁴⁰⁾で、グルコースを基質として測定した。すなわち、検圧計の主室に全唾液、上清、沈渣および上清と沈渣の等量混合液1 ml(対照は蒸留水1 ml)および0.1M Krebs-Ringer bicarbonate buffer 溶液(pH 6.8~7.2) 0.25ml、側室に0.02M グルコース溶液0.3mlを加えたのち、主室に蒸留水を加えて、容器内全容量を3 mlとする。容器内の空気を CO_2 5%、 N_2 95%の混合ガスで減圧法⁴¹⁾によって完全に置換して嫌气的条件とし、 37°C の恒温槽内で10分間振盪して温度平衡としたのち、側室内のグルコース溶液を主室内に注入する。

注入後30分間隔で3時間、経時的に CO_2 発生量(μl)を測定し、 CO_2 発生量をもって代謝促進効果の値とした。これと平行してグルコース量、乳酸量、たんぱく量をそれぞれ測定した。

検圧計の容器内の試料組成を Table 1 に示した。なお、その他の処理試料については、唾液材料と全く同様であり、T法、W法ともに、唾液材料を処理試料と置き換えた組成のものについて測定した。

2) グルコースの定量法

グルコース量はグルコースオキシダーゼ法⁴²⁾によって測定した。すなわち、被検試料0.05mlを一定時間後、ただちに試験管に採取し、グルコース測定用酵素液3 mlを加えて、 37°C の恒温槽中で20分間振盪して発色させたのち、波長505nmにおける吸光度を測定し、別に作成した検量線によりグルコース量を算出した。

3) 乳酸の定量法

乳酸量は酵素法⁴³⁾によって測定した。すなわち、0.6N 過塩素酸1 mlを遠沈管にとり、被検試料0.5mlを加え、混和したのち、氷水中に10分間放置、遠沈(3000rpm, 10min)し、その除たんぱく上清を用いた。

ついで、0.5M グリシン、0.4M 抱水ヒドラジン緩衝液(pH 9.0) 2 ml、除たんぱく遠沈上清0.2ml、27mM NAD (Nicotinamideadenine dinucleotide) 0.2ml、650U/ml L-LDH (L-Lactate

Table 1 Composition of specimens

Method		Whole saliva	Supernatant	Sediment	Supernatant + Sediment	Control (ml)
Aerobic condition (Tube culture method)	Whole saliva	1.0				
	Supernatant		1.0		1.0	
	Sediment			1.0	1.0	
	0.02M Glucose	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3
	H ₂ O	1.7	1.7	1.7	0.7	2.7
	Total volume	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0
Anaerobic condition (Warburg manometric method)	Whole saliva	1.0				
	Supernatant		1.0		1.0	
	Sediment			1.0	1.0	
	0.02M Glucose	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3
	Bicarbonate buffer	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25
	H ₂ O	1.45	1.45	1.45	0.45	2.45
	Total volume	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0

dehydrogenase) 0.02 ml を試験管に加え、25°C の恒温槽中で60分間放置したのち、365nm における吸光度を測定し、これを実測値とした。また、被検試料の代りに蒸留水を用いて、同様の操作を行ったものを盲検液とし、その吸光度を実測値から差し引いた値を測定値として、別に作成した検量線から乳酸量を算出した。なお、盲検液は、各試験群ごとに調製した。

4) たんぱくの定量法

Lowry ら⁴⁴⁾の方法に従って測定した。被検試料0.5ml を試験管にとり、炭酸ナトリウム—アルカリ銅溶液 5 ml を加えて混和した。室温で10分間放置したのち、2倍希釈したフェノール試薬 0.5ml を加えてただちに混和し、室温で30分間放置したのち、波長750nm における吸光度を測定した。

検量線は標準物質としてウシ血清アルブミン (Sigma) を用いて作成し、たんぱく量を算出した。

5) 尿酸の定量法

尿酸量はウリカーゼ法⁴⁵⁾により測定した。被検試料 0.05 ml を試験管にとり、発色試薬 3 ml を加えて、混和し、37°C の恒温槽中で5分間振盪したのち、波長 550nm における吸光度を測定した。別に作成した検量線により尿酸量を算出した。

6) ニンヒドリン陽性物質の定量法

ニンヒドリン陽性物質は、塩化スズ法⁴⁶⁾により測定した。被検試料0.1ml を試験管にとり、クエン酸緩衝液 (pH 5.0) 3.5 ml、ニンヒドリン試薬 2.5ml を加えて混和し、15分間沸騰水浴中で加熱したのち、放冷し、波長 570nm における吸光度を測定した。

検量線は標準物質として L-ロイシンを用いて作成した。

研究成績

1. 唾液材料を用いた成績

1) Warburg 検圧法による CO₂ 発生量の経時的变化

Warburg 検圧計による CO₂ 発生量を、経時的に観察した成績が Fig. 2 で、横軸に培養時間、縦軸に CO₂ 発生量を μ l で示した。沈渣、上清単独では CO₂ 発生は殆んど認められないが、上清と沈渣の等量混合したものは、全唾液と同程度の CO₂ 発生を示した。

2) グルコース消費量

T法 (好気)、W法 (嫌気) における、培養3時間後のグルコース消費量の成績を Fig. 3 に示した。横軸に唾液材料、縦軸に測定値から mg/dl に換算した値を示した。

T法、W法の成績を比較すると、沈渣のみの場

Fig. 2 Metabolic activity of salivary samples by Warburg manometric method
Changes in CO₂ evolution for 3 hours incubation

Fig. 3 Glucose consumption of salivary samples after 3 hours incubation by tube culture method (T-method) and Warburg manometric method (W-method)
A; Whole saliva, B; Supernatant, C; Sediment, D; Supernatant+Sediment

合、T法では殆んどグルコース消費がみられないが、W法では約10mg/dlで培養条件の違いによる差が認められた。これ以外の3試料は殆んど同程度の値を示し、とくに全唾液、上清と沈渣の等量混合液では31mg/dl前後の値を示した。

3) 乳酸生成量

T法、W法の培養3時間後の乳酸生成量の成績

Fig. 4 Lactic acid production of salivary samples after 3 hours incubation by tube culture method and Warburg manometric method
A; Whole saliva, B; Supernatant, C; Sediment, D; Supernatant+Sediment

を Fig. 4 に示した。

W法はT法に比較して一般に低い値を示したが、上清と沈渣の等量混合したものでは全唾液よりもやや高い乳酸生成量が認められ、上清および沈渣では、乳酸生成量はわずかであった。また、W法の沈渣は前項同様にT法よりやや高い値を示した。

4) たんぱく量

T法、W法で培養開始直前(0時間)と培養3時間後の、それぞれ4試料のたんぱく量の変化を示した成績が Fig. 5 である。

図中各試料の上段カラムが0時間、下段カラムが3時間後のたんぱく量を示している。

沈渣を除く全唾液、上清および上清と沈渣の等量混合液では、T法、W法の培養条件の変化にかかわらず、培養3時間後にたんぱく量の減少傾向を認めた。とくに、全唾液、上清と沈渣の等量混合液は、両法ともに減少傾向が大きいことが認められた。

5) 試験管法によるグルコース消費量の経時的変化

Fig. 3のグルコース消費量の成績から、両法の値に極めて類似した傾向が認められたことから、グルコース消費量の経時的変化を測定した。

Fig. 5 Protein concentration of salivary samples before and after 3 hours incubation by tube culture method and Warburg manometric method

Fig. 6 Glucose consumption rate of salivary samples for 3 hours incubation by tube culture method

T法での唾液材料すなわち、全唾液、上清、沈渣および上清と沈渣の等量混合したもの各グルコース消費量から消費率を算出し、その成績をFig. 6に示した。

上清、沈渣単独では、グルコース消費は殆んど認められないが、上清に沈渣を混合したものは全唾液と同程度で、しかも、時間経過と共に直線的な消費傾向が認められた。培養3時間後では約85%のグルコース消費率を示した。

Fig. 7 Metabolic activity of dialyzed salivary supernatant by Warburg manometric method. Changes in CO₂ evolution for 3 hours incubation

2. 透析試料を用いた成績

1) Warburg 傾圧法による CO₂ 発生量の経時的变化

上清のセロファンチューブによる透析内液、外液試料のW法による CO₂ 発生量の経時的变化を測定した成績を Fig. 7 に示した。

Fig. 8 Glucose consumption rate of dialyzed salivary supernatant for 3 hours incubation by tube culture method and Warburg manometric method

培養3時間後の CO_2 発生量は、透析内液+沈渣では約55 μl 前後であった。

透析外液+沈渣、透析内液+外液+沈渣では同程度の上昇傾向を示し、3時間後の値は透析内液+沈渣の約2.5倍量に達した。

2) 試験管法によるグルコース消費率の経時的变化

Fig. 8 はT法, W法でのグルコース消費率の成績を示したものである。

T法の透析内液+外液+沈渣、透析外液+沈渣のグルコース消費率は類似した上昇傾向を示し、3時間後ではいずれも80%前後の値を示し、差は認められなかった。透析内液+沈渣では消費率は20%とわずかであった。

W法においても、透析内液+外液+沈渣、透析外液+沈渣の消費率は共に90%、透析内液+沈渣では35%であった。T法と同様なグルコース消費率の傾向が認められた。

3) グルコース消費量

T法, W法における、培養3時間後のグルコース消費量の成績を Fig. 9 に示した。

W法では、T法よりも全般にわずかに高い値を示した。

T法では、透析内液+外液+沈渣と透析外液+沈渣の値は、それぞれ 31.0mg/dl, 26.4mg/dl で

Fig. 9 Glucose consumption of dialyzed salivary supernatant after 3 hours incubation by tube culture method and Warburg manometric method
A; Mixture solution + Sediment
B; Inner solution + Sediment
C; Outer solution + Sediment

差は認められないが、透析内液+沈渣は6.7mg/dl で、透析内液+外液+沈渣の約 $\frac{1}{3}$ であった。

W法でも同様に、透析内液+外液+沈渣 31.8 mg/dl, 透析外液+沈渣 31.9mg/dl で、差は認められなかった。透析内液+沈渣は12.5mg/dl で透析内液+外液+沈渣の約 $\frac{1}{3}$, およびT法の場合の2倍強のグルコース消費量を示した。

4) 乳酸生成量

T法, W法の透析試料の培養3時間後の乳酸生成量を比較した成績を Fig. 10 に示した。

T法の透析内液+外液+沈渣は 8.5mg/dl, 透析

Fig. 10 Lactic acid production of dialyzed salivary supernatant after 3 hours incubation by tube culture method and Warburg manometric method
A ; Mixture solution + Sediment
B ; Inner solution + Sediment
C ; Outer solution + Sediment

外液+沈渣は8.6mg/dl で差はなく、透析内液+沈渣の乳酸生成量は1.5mg/dl と低く、透析内液+外液+沈渣の約 $\frac{1}{6}$ 程度であった。

W法では、透析内液+外液+沈渣が7.4mg/dl、透析外液+沈渣は6.5mg/dl で差はなく、透析内液+沈渣は3.7mg/dl と低く、透析内液+外液+沈渣の約 $\frac{1}{2}$ 程度であった。平均値で比較すると、前項のグルコース消費量の傾向と類似性を示したが、乳酸生成量は測定のパラツキが大きいことが認められた。

5) たんぱく量

T法、W法の培養3時間後のたんぱく量の成績を Fig. 11 に示した。

Fig. 11 Protein concentration of dialyzed salivary supernatant before and after 3 hours incubation by tube culture method and Warburg manometric method

図中の上段カラムは培養前、下段カラムは3時間後のたんぱく量である。T法、W法の透析内液+外液+沈渣および透析外液+沈渣のたんぱく量の減少は透析内液+沈渣よりも大きいことが認められた。

3. 上清の加熱処理試料を用いた成績

上清を10分、30分間加熱処理した試料および未

Fig. 12 Metabolic activity of heat-treated supernatant by Warburg manometric method
Changes in CO₂ evolution for 3 hours incubation

Fig. 13 Glucose consumption rate of heat-treated supernatant for 3 hours incubation by tube culture method and Warburg manometric method

処理の対照について、W法による CO_2 発生量を測定した成績を Fig. 12 に示した。

上清を加熱処理した場合と未処理の対照とでは、 CO_2 発生量に差は全く認められなかった。

また、同一試料についてT法、W法でのグルコース消費率の経時的变化の成績を Fig. 13 に示した。

いずれの培養条件とも消費率は類似した傾向を示し、対照との差は認められなかった。このこと

から、本研究の加熱条件では失活がなく、Metabolic factor は耐熱性であることが認められた。

4. 上清の濃度変化による成績

上清濃度を8倍濃度から $1/32$ 倍まで段階希釈した9種の試料を用い、それに等量の沈渣を加えて、T法でグルコース消費量を測定し、消費率に換算した成績を Fig. 14 に示した。左グラフは全唾液、上清、沈渣の成績である。

上清、沈渣単独ではグルコース消費率は殆んど

Fig. 14 Changes in glucose consumption rate at each concentration of supernatant for 3 hours incubation by tube culture method

Fig. 15 Chromatography of dialyzed salivary supernatant on Sephadex G-25 column (2.6×51cm)
Elution was carried out using 0.5M acetic acid, and fractions of 4ml each were collected
Vo; Void volume, Vt; Total bed volume

0%であった。一方、全唾液は培養3時間で約74%の消費率を示した。中央グラフの×1で示したオリジナルでは約75%の消費率で直線的な上昇傾向を示した。上清2倍～8倍濃縮濃度では培養2時間で、すでに消費率90%を示し、上昇傾向は殆んど同程度で、濃度による差は認められなかった。さらに、2時間以上ではプラトーを保っている。左グラフは、上清を $1/2 \sim 1/32$ 濃度まで5段階に希釈した場合の成績である。

上清の希釈倍率に従って消費率も低下しており、明らかに濃度による差が認められた。

5. 上清の透析外液の Sephadex G-25 カラムによる分画試料の成績

透析外液の Sephadex G-25 ゲルろ過で得た fr. no. 30～fr. no. 130 の101分画について、たんぱく量、波長280nmの吸光度、尿酸、ニンヒドリン陽性物質をそれぞれ測定した。成績を Fig. 15に示した。たんぱくは fr. no. 49～59の大きいピークを含む fr. no. 34～70の主要ピークと、fr. no. 80および fr. no. 84～85に中等度のピークとして分画された。

また、紫外部280nmの吸収は fr. no. 60, 71, 78, 84に比較的低いピークおよび fr. no. 102を最大ピークとする fr. no. 95～123におよぶ、大

きなピークが認められた。また、fr. no. 97～107にわたって尿酸が含まれており、最大ピークは fr. no. 101, 102 (fr. no. 101: 4.4mg/dl) で、このピークは280nmのピークと一致した。

ニンヒドリン陽性物質は fr. no. 63, 64に最大ピークをもつシャープな単峰として認められた。

この各フラクションを大きく4つに分画した試料すなわち、Fr. I (fr. no. 30～55), Fr. II (fr. no. 56～74), Fr. III (fr. no. 75～90) および Fr. IV (fr. no. 91～130) の4画分について等量の沈渣を混合して、T法でのグルコース消費量を測定し消費率を算出した。その成績を Fig. 16に示した。

なお、各画分のたんぱく量は、Fr. I: 6.6mg/dl, Fr. II: 8.3mg/dl, Fr. III: 4.5mg/dl, Fr. IV: 4.2mg/dl であった。

左のグラフの×1は、透析前の上清に相当する濃度にした各画分と、Fr. I～IVを混合した試料(以下、Fr. I～IV mix と略称する) および全唾液を用いて1時間ごとに5時間測定した成績を示したものである。

各画分の培養3時間後のグルコース消費率をみると、全唾液87.9%, Fr. I～IV mix 59.3%, Fr. I 4.8%, Fr. II 36.3%, Fr. III 18.7%,

Fig. 16 Changes in glucose consumption rate at each concentration of fraction I~fraction IV by tube culture method at 5 hours incubation

Fr. IV 1.5% であった。

Fr. I~Fr. IV のそれぞれ試料間の比較では Fr. II が最高値を示し、ついで、Fr. III が高い活性を示し、Fr. I および Fr. IV は殆んど活性は認められなかった。また、培養3時間で Fr. II は Fr. III の約2倍のグルコース消費率を示した。

Fr. II および Fr. III のグルコース消費率を合計すると Fr. I~IV mix の成績と殆んど一致することが認められた。また、Fr. I~IV mix は全唾液の値の約68%であった。さらに、全唾液、Fr. II および Fr. III は3時間以降は、カーブが横這いあるいはやや減少傾向が認められたが、Fr. I~IV mix では5時間後でも上昇傾向が認められた。

中央グラフの×2は、透析前上清の2倍濃度にした Fr. I~Fr. IV の4試料および Fr. I~IV mix についての成績である。

各画分の培養3時間後のグルコース消費率は、Fr. I~IV mix は81.6%，Fr. I は0.3%，Fr. II 56.3%，Fr. III 23.7%，Fr. IV 0.8%であった。

×1濃度の場合と同様に、Fr. I と Fr. IV の活性は全く認められなかった。

Fr. II および Fr. III はともに高い消費率を示し、×1の成績と同様に、Fr. II および Fr. III のグルコース消費率を合計すると Fr. I~IV

mix の値と殆んど一致することが認められた。

また、2倍濃度にしても Fr. III はあまり活性の変化は認められなかった。Fr. II および Fr. I~IV mix は共に活性の増加が認められた。Fr. I~IV mix の値は全唾液の93%の値を示し上昇傾向も類似していた。×2の Fr. II の3時間値は×1の Fr. I~IV mix の値と殆んど一致していた。3時間以降は、Fr. I~IV mix では横這い状態を示し、Fr. II および Fr. III はゆるやかな上昇傾向が認められた。

右グラフの×5は、透析前上清の5倍濃度にした Fr. I~Fr. IV の4試料および Fr. I~IV mix の成績である。

各画分の培養3時間後のグルコース消費率は、Fr. I~IV mix は85.8%，Fr. I は-2.0%，Fr. II 75.5%，Fr. III 15.6%，Fr. IV 2.2%であった。

×1および×2の場合と全く同様に Fr. I と Fr. IV には活性が認められなかった。

試料濃度を5倍にしても、Fr. III および Fr. I~IV mix は×2の成績と殆んど変わらなかったが、Fr. II は消費率の増加を示し、Fr. I~IV mix と極めてよく一致した上昇パターンを示した。

また、Fr. II および Fr. I~IV mix は4時間

まで直線的に上昇し、以降横這い傾向を示したが、Fr. III は1時間以降5時間までゆるやかな上昇傾向を示した。

考 察

1. Warburg 検圧法と試験管法について

Metabolic factor の活性測定は、Hartles ら^{1,9,13)} が提唱するW法が従来から用いられていた。本法の測定条件については、Table 1に容器内の試料組成と研究方法で述べている。すなわち、培養時間が1～3時間で、栄養的には基質のグルコースと唾液遠沈沈渣中の食物残渣などの不溶性物質が添加されているにすぎず、濃度的にもこの反応系は極めて低栄養培地と考えられる。したがって、この反応時間内における口腔内細菌の発育に伴う解糖作用は殆んど無視できる範囲にあるものと思われ、代謝活性のみの測定法とみなすことができると考えられる。しかし、本法は、特殊な装置を必要とすること、操作が煩雑であること、測定試料数に限度があること、さらに容器内を嫌気的条件下にすることから、ガス交換装置とそれに伴う操作が要求されることなどの種々の難点がある。このことから、測定法の簡易化、とくに公衆衛生的に多数唾液試料の活性を測定しうる routine bioassay の開発が望まれる。そこで、本研究では、好気的条件下でのT法について、すでに多数の研究者によって報告され、確認された Metabolic factor の諸物性を基盤として調製された唾液上清試料を用いて、W法による成績との対比を試みた。すなわち、嫌気、好気条件の相違はあっても、多数唾液処理試料について両法の成績間に有意の相関性があり、さらに、操作が簡易であれば Metabolic factor のみの routine bioassay としての価値は充分あるものと考えられる。

2. 唾液材料について

Fig. 2の成績は、すでに Hartles ら¹⁾その他²⁻⁸⁾によって報告された成績の追試であり、これらの報告と一致した結果が得られた。この成績から、Hartles らが Metabolic factor の存在を確認し、以降の研究の端緒となったものである。したがって、全唾液、沈渣、上清および上清+沈渣の試料についてT法による測定を平行して行った。

さらに、Metabolic factor の性質が透析性、耐熱性、ニンヒドリン陽性のペプチドであるとの報告をふまえて、唾液上清を処理、分画した試料、すなわち、上清の透析内液および外液試料、上清の加熱処理試料、上清を Sephadex ゲルろ過によって分画したフラクションのニンヒドリン陽性画分およびその他の画分試料について同様の活性測定を行った。

また、ヒト混合唾液の呼吸能および解糖作用は、唾液中の口腔細菌叢に依存しており、本質的には細菌自体の代謝過程に基づいている^{1,47-52)}。したがって、菌体材料としては、唾液遠沈沈渣および純培養菌の2つを考慮することができる。しかし、川崎³⁶⁾によれば、純培養菌は唾液沈渣と代換され得ないことが報告された。すなわち、唾液上清を Sephadex G-50で分画した Metabolic factor を含む画分を用いて、唾液沈渣と純培養菌に対する解糖作用をW法によって測定したところ、結果が一致しないばかりでなく逆の所見が得られた。このことから、唾液沈渣の細菌組成は極めて複雑で、純培養菌の場合と全く異なるとして、純培養菌を使用することは in vivo の条件を反映し得ないことを指摘した。このことから、本研究では、唾液沈渣を菌体材料として使用した。

3. 測定項目について

前項の唾液材料を用いて、嫌気的条件下でのW法および好気的条件下でのT法について、それぞれつぎの3項目について測定を行い、両成績の比較を行った。すなわち、①グルコース消費量、②乳酸生成量、③たんぱく消費量である。

①グルコース消費量；基質にグルコースを用いていることから、反応系内のグルコースの消長は代謝活性の指標になり得ることは容易に考えられるところである。

また、基質として、グルコース^{1,5,6,9,10-14)}の代りにシュクロース²⁴⁾を用いた報告がある。しかし、シュクロースの定量法には呈色反応や各種クロマトグラフィを用いた方法⁵³⁾があるが、いずれも操作が煩雑で、routine bioassay としては応用し難い面が多い。したがって、測定操作の点から、本研究では、定量法が確立されているグルコースを基質として用いた。

②乳酸生成量；グルコースの代謝生成物として乳酸を主体とする酸の生成が考えられることから、測定項目の1つとした。石原ら^{24,29,33)}は乳酸量を指標とし Barker-Summerson 法³⁴⁾で定量している。

この定量法は、測定に長時間を要することから試料数が限定され非能率的なこと⁵⁵⁾、また、濃硫酸の添加および攪拌の方法によって呈色が微妙に変化して再現性がとばしいこと、などから routine bioassay としては不適當である。したがって、本研究では酵素法⁴³⁾を採用した。

③たんぱく消費量；Metabolic factor はニンヒドリン陽性ペプチド^{2-5,7,8,11,12)}、誘導たんぱく¹³⁾、オリゴペプチド³⁵⁾、唾液たんぱくの endopetidease によって分解されたペプチド²⁶⁾であるなどの報告がある。このことから、代謝過程における Metabolic factor の消費という観点から、本研究における測定項目とした。

4. グルコース消費量の成績について

好氣的条件下における T 法のグルコース消費量の成績は Metabolic factor の routine bioassay として最も適しているように思われる。なぜならば、以下の唾液試料を用いた T 法のグルコース消費量の成績は、高い再現性を有し、かつ W 法の成績に対して高度の相関性が得られたからである。

すなわち、全唾液、上清、沈渣、上清+沈渣を唾液試料とした場合の3時間後のグルコース消費量 (Fig. 3)、乳酸生成量 (Fig. 4) およびたんぱく量の変化 (Fig. 5) について T 法および W 法の成績と比較した結果、乳酸生成量は変動係数 2.51% (N=5) であるのに対し、グルコース消費量は 1.52% (N=5) と極めて再現性の高い測定法であることが認められた。一方、たんぱく量の変化は高濃度の全唾液 および上清+沈渣で減少傾向が大きく、たんぱくが代謝に関与していることが示唆されたが、減少量が少ないために検定法の項目としては不適當であると思われた。

このことは、透析試料を用いた3時間後の成績 (Figs. 9, 10, 11) でも全く同様の傾向が認められた。

以上のことから、再現性の高いグルコース消費量を測定項目に設定し、T 法によるグルコース消

費率の経時的変化の成績 (Fig. 6) が得られた。この成績を W 法の CO₂ 発生量の成績 (Fig. 2) に対する相関性の検定を全唾液、上清、沈渣、上清+沈渣のそれぞれについて行った。その結果、全唾液； $r=0.90$, $P<0.001$ ($Y=2.23+0.51X$)、上清+沈渣； $r=0.90$, $P<0.001$ ($Y=-0.45+0.57X$)、上清； $r=0.76$, $P<0.001$ ($Y=-3.30+0.85X$)、沈渣； $r=0.29$, $P>0.05$ が得られ、沈渣の場合は相関性が認められなかったが、他の3試料では高度の相関性が認められた。同様に、上清の透析試料および上清の加熱処理試料について、W 法の CO₂ 発生量と T 法のグルコース消費率について相関性を検定した。すなわち、透析試料の W 法の成績 (Fig. 7) と T 法の成績 (Fig. 8) では、透析内液+外液； $r=0.86$, $P<0.001$ ($Y=-6.98+0.50X$)、透析内液； $r=0.86$, $P<0.001$ ($Y=3.67+0.24X$)、透析外液； $r=0.84$, $P<0.01$ ($Y=-0.29+0.46X$)。さらに、上清の加熱試料の W 法 (Fig. 12) と T 法 (Fig. 13) の場合は、10 分間煮沸試料； $r=0.89$, $P<0.001$ ($Y=8.86+0.15X$)、30 分間煮沸試料； $r=0.93$, $P<0.001$ ($Y=7.55+0.53X$) といずれも高度に有意な相関性が認められた。

以上を小括すると、好氣的条件下の T 法によるグルコース消費率の測定結果は W 法の CO₂ 発生量と高度の相関性を有し、Metabolic factor の検定法として in vivo の条件を反映するものと思われる。

5. 上清の濃度変化による成績について

T 法によるグルコース消費量を経時的に測定することによって、Metabolic factor の bioassay として適當であることが認められた。したがって、T 法のみで以下の唾液試料の測定を行った。

上清の8倍 $\sim$ $1/32$ 倍まで濃縮あるいは倍数希釈した9試料の成績を Fig. 14 に示した。これを培養時間ごとに、上清濃度 (横軸、対数目盛) とグルコース消費率 (縦軸) の関係を示したのが Fig. 17 である。

1 時間では $1/8$ 倍 $\rightarrow$ 8 倍まで、ゆるやかな上昇傾向を示した。2 時間では $1/32$ 倍 $\rightarrow$ 4 倍まで上昇し、4 倍 $\rightarrow$ 8 倍まで横這いを示した。3 時間では $1/32$ 倍 $\rightarrow$ 2 倍まで上昇し、2 倍 $\rightarrow$ 8 倍で横這いが

Fig. 17 Relation between glucose consumption rate and concentration of salivary supernatant with each incubation time

認められた。また、1時間と2時間の傾斜の差の幅は大きい、2時間と3時間とでは、前者ほど差は認められなかった。

本研究の唾液提供者の採取時の唾液上清の活性を×1として基準値と考え、本法を用いて Metabolic factor の活性の検定を行うための測定範囲と培養時間の関係はつぎのとおりである。すなわち、3時間では $1/32$ 倍→2倍まで、2時間では $1/32$ 倍→4倍まで、1時間では $1/8$ 倍→8倍となる。しかし、 $1/8$ 倍以下の濃度では、いずれも測定誤差範囲に入り、その差は明確に現われないと思われる。

また、2倍以上の濃度の測定には2時間以上培養することは不適當で、培養時間を短縮する必要があると認められた。一方、低濃度では培養時間を延長することによって、濃度の差が現われ易くなる。また、1時間培養では高濃度でも測定できるが、全般に傾斜がゆるやかで、濃度による差が現われにくくなる。

以上のことから、本法における培養時間を1～2時間の間に設定することが適當であると思われる。

6. 上清の透析外液の Sephadex G-25 カラムによる分画試料の成績について

Sephadex G-25によって分画した fr. no. 30～fr. no. 130を分けた Fr. I～Fr. IV および Fr. I～IV mix の5試料について、T法を用いてグルコース消費率を測定した。Fr. I (fr. no. 30～55)

はゲルろ過の初期溶出部分でたんぱくの大きいピーク、Fr. II (fr. no. 56～74) はニンヒドリン陽性部分の大きくシャープなピークおよびたんぱくのピークの一部、Fr. III (fr. no. 75～90) はたんぱくの中等度のピークおよび280nmの低いピーク、Fr. IV (fr. no. 91～130) は280nmの大きな尿酸のピークを、それぞれ含んでいる。

Fig. 16の成績から、活性はFr. II および Fr. III にあり、Fr. I および Fr. IV には存在しないことが認められた。また、Fr. II は2倍、5倍と濃度の増加と共に上昇を示し、濃度依存性が認められることから、活性の主体はFr. IIにあることが推察される。このことは、Metabolic factor はニンヒドリン陽性画分に関係があるとする報告^{2-5, 7, 8, 11, 12)}と一致している。さらに5倍濃度のFr. II はFr. I～IV mix と全く同じ上昇傾向を示し、Fig. 14の唾液上清を濃縮した場合の成績と一致した傾向が認められた。このことは、Metabolic factor の上清中の濃度が、本研究の範囲内で、3～4倍以上増加しても、活性の上昇は全く認められないこと、すなわち、最大活性を出現させるための濃度の限界は、2倍よりやや高濃度の附近に存在するものと推定される。

ついで、×1、×2濃度の場合は、Fr. II と Fr. III の値を合計するとほぼ Fr. I～IV mix の値と一致することから、Fr. I～IV mix の値はFr. II と Fr. III の相加作用と考えられる。一方、Fr. III は濃度が増加しても、殆んど活性に

変化がなく濃度依存性は認められなかった。さらに、セロファンチューブに対する透析性の検討から、Fr. II に含まれていると思われる Metabolic factor の分子量は1000以下と推定される。

Metabolic factor の分子量に関しては、Kawasaki¹³⁾は7000~11000 の誘導たんぱく、三代ら²⁵⁾および森永²⁶⁾は endopeptidase によって分解された試料を用いて800~4000 のペプチドであるとした。また、金子²⁷⁾はプレインキュベート全唾液を用いて1000~4000 および500以下のペプチドの存在を報告した。本研究では、三代らおよび金子の成績の一部を支持するものである。

以上を総括すると、好氣的条件下で菌体材料として唾液沈渣を用いた場合のグルコース消費量(率)を測定するT法は、Metabolic factor に対する検定法として適用し得ることが認められた。

さらに、グルコースの定量は、方法が確立されており再現性が高く、操作性も簡単であることから、本検定法の routine work としての有用性は高いものと考えられる。

このことは、実験的な検定方法としてはもとより、臨床的な分野においても充分適用し得ることを示唆するものと思われる。

結 論

本研究は、ヒト混合唾液遠沈上清中に存在する Metabolic factor の活性を検定する方法の簡易化を目的とした。すなわち、好氣的条件下で試験管法による唾液遠沈沈渣を用いたグルコース消費量(率)を指標とした。

従来、Metabolic factor の活性の検定法は、その合理性が確立されている Warburg 検圧法によって行われた。そこで、Metabolic factor の諸物性を考慮して調製した試料の活性を Warburg 検圧法と試験管法で測定しその成績を比較し、試験管法の routine bioassay の有用性について、つぎの結論が得られた。また、本法を用いて Metabolic

factor の性状に関する新たな研究成績もつけ加えた。

1) 唾液材料、上清の透析試料、上清の加熱処理試料の試験管法によるグルコース消費量(率)の成績は、Warburg 検圧法の成績に対して高度な相関性を示した。さらに、試験管法によるグルコースの測定は、操作も簡易なことから Metabolic factor の活性測定の routine bioassay 法として適用できることが認められた。

2) 本法の培養時間は、1~2時間の間に設定するのが妥当であることが認められた。

3) 上清中の Metabolic factor の活性は、上清濃度が0.1~4.0倍の間にあり、かつ Metabolic factor の最大活性は、2~3倍の上清濃度に認められた。

4) 透析外液を Sephadex G-25 によってゲルろ過し、Fr. I~Fr. IV の4画分を得た。Metabolic factor は Fr. II のニンヒドリン陽性画分に含まれ、濃度依存性を示し、活性の主体であることが認められた。また、Fr. III はやや弱い活性を示したが、濃度依存性は認められなかった。

5) Fr. I~Fr. IV を混合した場合の活性は、上清濃度が1~2倍の範囲内で、Fr. II と Fr. III が相加的に作用することが示唆された。

6) Metabolic factor の分子量を1000以下と推定した。

謝辞：終りにのぞみ、ご懇篤なご校閲を賜った大阪歯科大学口腔衛生学講座小西浩二教授に深謝するとともに、終始ご指導、ご校閲を賜った東北歯科大学歯科薬理学講座川崎 徹教授ならびに種々ご助言をいただいた東北歯科大学口腔衛生学講座清水秋雄教授、宮沢忠蔵講師に感謝いたします。また、ご協力いただいた東北歯科大学歯科薬理学講座佐藤陽子助手ならびに教室員各位に感謝いたします。

本論文の要旨は、第56回日本薬理学会総会(1983年3月31日)、第25回歯科基礎医学会総会(1983年10月2日)において発表した。

抄録：ヒト混合唾液遠沈上清中に含まれる Metabolic factor の活性の測定方法の簡易化を目的として、唾液遠沈沈渣に、種々の上清処理試料を添加して、好氣的条件下で、試験管法によるグルコース消費量(率)を指標とする検定法について検討した。

Metabolic factor の活性の測定法として従来から用いられている Warburg 検圧法(嫌気条件)による成

績と試験管法による成績の比較を行い、試験管法の routine bioassay としての有用性について検討し、つぎの結論が得られた。

1) 全唾液、唾液上清、唾液上清と沈渣の混合物、上清の透析試料、上清の加熱処理試料を用いた試験管法によるグルコース消費量(率)の成績は、Warburg 検圧法の成績に対し高度な相関性を示した。また、操作法も極めて簡便であった。

このことから、Metabolic factor の活性の routine bioassay 法として適用できる可能性が認められた。

2) 本法の培養時間は1~2時間の間に設定するのが妥当であると思われた。

3) 最大活性を示す Metabolic factor の上清中の濃度は2倍~3倍濃度の間にあり、それ以上の濃度では活性の上昇は認められなかった。

4) 透析外液を Sephadex G-25 によってゲルろ過し、Fr. I~Fr. IV の4画分を得た。Fr. II はニンヒドリン陽性画分で、高活性を示し、濃度依存性があり、Metabolic factor は主としてこの分画に含まれていることが認められた。Fr. III にも活性はあるが弱く、濃度依存性は認められなかった。

5) Fr. I~Fr. IV を混合した試料の活性は、1倍~2倍濃度の範囲内で、Fr. II と Fr. III が相加的に作用することが示唆された。

6) Metabolic factor の分子量を1000以下と推定した。

文 献

- Hartles, R. L. and Wasdell, M. R.: The metabolism of the oral flora. VI. Preliminary observations on a water-soluble factor in saliva which enhances the respiratory and glycolytic activity of the salivary flora. *Brit. Dent. J.* **99**: 334-337, 1955.
- Bramstedt, F., Kröncke, A. und Naujoks, R.: Über ein den anaeroben Kohlenhydratabbau aktivierendes Prinzip im menschlichen Speichel. *Naturwissenschaften.* **44**: 331, 1957.
- Bramstedt, F., Kröncke, A. und Naujoks, R.: Über den Einfluss von Fluor auf den Glukoseabbau isolierter Mundbakterienstämme. *Odont. Revy.* **8**: 355-360, 1957.
- Kröncke, A.: Ergebnisse und Probleme biochemischer Speichelforschung. *Dtsch. Zahnärzteblatt.* **14**: 523-528, 1963.
- Wasdell, M. R.: Manometric measurement of acid and gas production by the salivary flora. *J. Dent. Res.* **39**: 1105-1106, 1960.
- Wasdell, M. R.: The effect of amino acids and related compounds on the metabolism of saliva. *Archs. Oral Biol.* **7**: 25-38, 1962.
- Beck, D. J. and Bibby, B. G.: Whole saliva, salivary sediment, and supernatant as fermenting agents for foods. *J. Dent. Res.* **40**: 479-485, 1961.
- 黒沢秋雄: 混合唾液による炭水化物の酸産生について。(第2報), *歯科学報* **61**: 149-150, 1961.
- Hartles, R. L.: Metabolic factors in saliva. *J. Dent. Res.* **42**: 553-558, 1963.
- Hay, D. I. and Hartles, R. L.: Studies on the glycolytic-enhancing properties of human saliva. *Archs. Oral Biol.* **11**: 337-347, 1966.
- Molan, P. C. and Hartles, R. L.: The identification of a glycolysis-enhancing factor in human parotid saliva. *Archs. Oral Biol.* **14**: 421-426, 1969.
- Molan, P. C. and Hartles, R. L.: A study of the enhancement of glycolysis in human saliva. *Archs. Oral Biol.* **17**: 1671-1678, 1972.
- Kawasaki, T.: Über die activating factor in human saliva for acid fermentative bacterial metabolism (Report I). *Bull. Tokyo dent. Coll.* **5**: 25-32, 1964.
- Hay, D. I. and Hartles, R. L.: The effect of saliva on the metabolism of the oral flora. *Archs. Oral Biol.* **10**: 485-498, 1965.
- Guggenheim, B.: Über die Wirkung verschiedener Speichelfractionen auf die Atmung von Mundbakterien. *Helv. Odont. Acta* **10**: Suppl. III. 59-93, 1966.
- Mishiro, Y., Kirimura, K. and Ishihara, H.: Observation on the saliva factor that enhances the production of lactic acid by the oral flora. *J. Dent. Res.* **45**: 1824, 1966.
- Holbrook, I. B. and Molan, P. C.: A further study of the factors enhancing glycolysis in human saliva. *Archs. Oral Biol.* **18**: 1275-1282, 1973.
- Kleinberg, I., Craw, D. and Komiyama, K.: Effect of salivary supernatant on the glycolytic activity of the bacteria in salivary sediment. *Archs. Oral Biol.* **18**: 787-798, 1973.
- Weisberger, D.: Whole saliva as a source of certain growth factors for an oral strain of lactobacillus. *J. Dent. Res.* **25**: 83-87, 1946.
- Weisberger, D.: Role of glucose in promot-

- ing growth of lactobacilli in saliva. Science **105** : 290, 1947.
- 21) Dreizen, S., Reed, A. I. and Spies, T. D. : Salivary mucin as a source of essential amino acids for the lactobacillus acidophilus (Hadley). J. Dent. Res. **29** : 774-778, 1950.
- 22) Lightfoot, L. H. and Coolidge, T. B. : The role of acidity of saliva in the nutrition of oral acidogens. J. Dent. Res. **38** : 96-100, 1959.
- 23) Melville, T. H. and Hartles, R. L. : A preliminary study of the effect of saliva supernatant on the glycolytic activity of a pure culture of a streptococcus. Archs. Oral Biol. **11** : 877-882, 1966.
- 24) 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.
- 25) 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.
- 26) 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.
- 27) 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.
- 28) Kirimura, K., Morita, M. and Mishiro, Y. : Effect of protein hydrolysates on the fermentative activity of streptococcus salivarius. J. Dent. Res. **49** : 890, 1970.
- 29) 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.
- 30) Calandra, J. C. and Fosdick, L. S. : The effect of amino acids on the rate of acid formation in saliva. J. Dent. Res. **26** : 303-308, 1947.
- 31) Kröncke, A., Bramstedt, F., Naujoks, R. und Marg, H. : Biochemische Speicheluntersuchungen. : XI. Peptide im menschlichen Speichels. J. dent. Belge. **49** : 391-402, 1958.
- 32) Fosdick, L. S. and Blackwell, R. Q. : The effect of peptides and amino acid derivatives on acid formation in sugar-saliva mixtures. J. Dent. Res. **38** : 519-524, 1959.
- 33) Mishiro, Y., Morita, M. and Kirimura, K. : Promoting effect of saliva dialyzate on the lactate production of streptococcus salivarius. Archs. Oral Biol. **15** : 465-467, 1970.
- 34) 天野文枝：唾液中の 酸産生菌代謝促進因子の bioassay. 口腔衛生会誌 **24** : 267-285, 1974.
- 35) 浜田節男, 佐藤陽子, 浦井仁子, 滝田芳子, 遠藤初恵, 五十嵐治義, 川崎 徹：唾液中の Metabolic factor に関する研究 (I). Lact. casei を用いた bioassay. 東北歯大誌 **6** : 276-283, 1979.
- 36) 川崎 徹：唾液中の Metabolic factor と Growth factor との相違について. 東北歯大誌 **6** : 244-259, 1979.
- 37) 山岸安子：電気泳動法のすべて. (月刊 Medical Technology 編), 第1版, 23-29, 医歯薬出版, 東京, 1981.
- 38) 左右田健次：生化学実験講座5, 酵素研究法上, (日本生化学会編), 第1版, 247-249, 東京化学同人, 東京, 1975.
- 39) 志村憲助, 江尻慎一郎, 吉田充輝, 石原弘章：ゲル濾過法, 第1版, 49-50, 学会出版センター, 東京, 1978.
- 40) 阿南功一：ワールブルグ検圧計, 化学の領域, 増刊13号, 第1版, 85-147, 南江堂, 1954.
- 41) 阿南功一：ワールブルグ検圧計, 化学の領域, 増刊13号, 第1版, 74-84, 南江堂, 1954.
- 42) 北村元仕：Glucose Oxidase 法, 臨床病理, 臨増第15号, 35-44, 1968.
- 43) Scholz, R., Schmitz, H., Bücher, Th. und Lampen, J. O. : Über die Wirkung von Nystatin auf Bäckerhefe, Biochem. Z. **331** : 71-86, 1959.
- 44) Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J. : Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem. **193** : 265-275, 1951.
- 45) 馬場茂明, 奥田 清：臨床化学Ⅱ, 医化学実験法講座3B, 第1版, 89-94, 中山書店, 東京, 1973.
- 46) Moore, S. and Stein, W. H. : Photometric ninhydrin method for use in the chromatography of amino acids. J. Biol. Chem. **176** : 367-388, 1948.
- 47) Hartles, R. L. and McDonald, N. D. : The metabolism of the oral flora. I. The oxygen uptake and acid production by mixed human saliva in the presence and absence of glucose. Biochem. J. **47** : 60-64, 1950.
- 48) Neuwirth, I. and Summerson, W. H. : The production of acids from glucose by oral microorganisms: Lactic and pyruvic acids. J. Dent. Res. **30** : 100-111, 1951.
- 49) Burnett, G. W. : The respiration rate of human saliva. J. Dent. Res. **31** : 468-469, 1952.
- 50) Burnett, G. W. : The effect of carbohydrates and inhibitors on the respiration rate of human saliva. J. Dent. Res. **32** : 640, 1953.
- 51) Hartles, R. L. and Wasdell, M. R. : The metabolism of the oral flora. IV. The invertase activity of mixed human saliva. Brit. Dent. J. **97** : 231-235, 1954.
- 52) Burnett, G. W. : Studies of the respiration of the microbial flora of human saliva. J. Dent. Res. **33** : 469-480, 1954.
- 53) 瀬野信子, 阿武喜美子：生化学実験講座4, 糖質の化学 下 (日本生化学会編), 第1版, 283-

352, 東京化学同人, 東京, 1976.

- 54) Barker, S. B. and Summerson, W. H. :
The colorimetric determination of lactic acid
in biological material. J. Biol. Chem. **138** :

535-554, 1941.

- 55) 玄番昭夫 : 臨床検査技術全書, 臨床化学検査Ⅱ
第6巻 (石井 暢編), 第1版, 181-184, 医
学書院, 東京, 1975.