唾液内の乳酸産生に対する SH 化合物の作用

薄 葉 博 史

日本歯科大学大学院歯学研究科生化学専攻 (指導: 三代幸彦教授)

[受付: 昭和58年12月6日]

Effects of cysteine, glutathione and mercaptans on the lactate production in human whole saliva

Hiroshi Usuba

Department of Biochemistry, Nippon Dental University, Tokyo

1-9-20, Fujimi, Chiyoda-ku, Tokyo 102

(Director: Prof. Yukihiko Mishiro)

[Accepted for publication: December 6, 1983]

Key words: lactate / saliva / cysteine / glutathione / mercaptan

Abstract: This work was undertaken to investigate the effects of some SH compounds on lactate production from glucose in microorganisms under aerobic (unshaken) condition. The lactate production in human whole saliva was decreased with increasing cysteine concentration, in particular 1 to 5 mM. Inhibition by cysteine was seen at all initial pH tested (6-9) and was remarkable at neutral pH. Decrease of lactate production by cysteine was observed under aerobic (shaken and unshaken) and anaerobic condition. On the other hand, additional cysteine did not show any effect on lactate degradation. The inhibitory activity of cysteine on lactate production was diminished by addition of valine or threonine.

Lactate production in pure cultured bacterial strains were also investigated. The strains inhibited by cysteine were *Streptococcus mutans* (BHT, FA1, JC2, PK1, Ingbritt, B13). However these inhibitory activities were affected by a saliva supernatant component.

Lactate production in human whole saliva was accelerated by glutathione (GSH) and mercaptosuccinic acid, but was inhibited by 2-mercapto-2-thiazoline, β -mercaptopropionic acid and mercaptoacetic acid sodium salt. Some mercaptans, such as mercaptomethanol and mercaptoethanol, were ineffective.

緒 言

歯科領域における重要かつ一般的な疾患として齲蝕と歯周病があげられる。これらの病因ないし病態に微生物とその代謝産物が関連していることが明らかである。口腔内微生物によって起こる現象として注目されるのは糖質およびタンパク質の代謝であるが、いずれの代謝も宿主や共存微生物などの口腔内諸因子の影響を強く受けている。すなわち、唾液やプラークのもつ種類の因子 (pH, 酸素分圧, 緩衝能, 栄養素, 抗菌因子など), 微生物の分布とその相互関係 (栄養の競争や代謝産物

などの影響) などが複雑にからみあっている。

唾液は、個体の状態 (精神状態, 自律神経緊張状態なども含め), 刺激の種類や強さによって分泌量, 性状, 組成が異なり, また各種の抗菌因子が含まれている。しかし, 一般に好適な湿度, 温度に加え宿主から食物残渣成分などが供給され, 口腔内には種類の微生物の生息が認められている。加えて, 唾液中には微生物の呼吸や解糖を促進する因子が含まれているという多くの研究, 報告がなされている。

この因子として Hartles^{1,2)} は, 唾液上清中には metabolic factor があるとし, これは水溶性, 耐熱性, 透析性の窒素化合物でニンヒドリン反応

陽性であると報告している。Rae ら³⁾、Molan ら^{4,5)} は解糖促進因子として尿素の関与を報告し、Hay ら^{6,7)} はカゼインの完全水解物やアミノ酸混液に同じ作用があると報告しており、Waddell⁸⁾ は L-グルタミンや L-グルタミン酸単独でも解糖を促進すると報告している。また、Kawasaki⁹⁾ は分子量7,000~11,000の唾液タンパク質が有効であると報告している。

他方、Mishiro ら¹⁰⁾ はアミノ酸とペプチドがあるときに解糖が促進されるとし、石原¹¹⁾ は坂口反応陽性の比較的分子量の低いペプチド画分が有効であると報告している。また、尿素は分解によってアンモニアを産生し、乳酸生成促進性と予想されるが、Mishiro ら¹²⁾ は解糖促進の唾液透析外液因子は尿素ではないとみている。Kirimura ら¹³⁾ は、*Streptococcus salivarius* の乳酸産生がカゼインや牛血清アルブミンの酵素による部分水解物で促進されるが、酸による完全水解物では促進されないとしている。さらに、小山¹⁴⁾ は、種々の streptococci (*Streptococcus salivarius*, *Streptococcus faecalis* など) の乳酸産生が牛血清アルブミンの部分水解物で促進されることを報告している。森永¹⁵⁾、Mishiro ら¹⁶⁾ は、あらかじめインキュベートした唾液では乳酸産生を促進するペプチドの増加が認められ、このペプチド画分にアミノ酸混液を添加することにより促進がより著明になるとしている。金子¹⁷⁾、Mishiro ら¹⁸⁾ は、その有効因子が分子量500以下のオリゴペプチドであると報告している。また Holbrook ら¹⁹⁾ は分子量2,500~3,000の塩基性ペプチドであると報告し、Kleinberg ら²⁰⁾ は唾液の pH 上昇因子 (アルギニンを含むサイアリン sialin と呼ばれるオリゴペプチド, Gly-Gly-Lys-Arg) に注目している。

和田垣²¹⁾ は、アルギニンが口腔内でアミン産生に与かるとし、このことから乳酸産生促進性であるとみなされるが、実際はかならずしもそうではなく、三代^{22,23)}、石見^{24,25)} はアルギニンが乳酸産生をむしろ抑制する例を報告している。

Kröngke ら²⁶⁾ は唾液に含まれるペプチドを分離し、そのうちのひとつが構成アミノ酸にシステインを含むと報告し、最近、Schomers ら^{27,28)} はシステインを含むリントタンパク (cysteine-contain-

ing phosphoprotein, CCP) を分離した。著者ら²⁹⁾ は、含硫アミノ酸であるシステインが、被験14例のすべてにおいて、唾液内微生物の乳酸産生を抑制することを観察している。そこで著者は、システインおよび他の SH 化合物について微生物の乳酸産生におよぼす影響をさらに追究した。

実験方法

1) ヒト全唾液の採取

口腔内を歯磨剤を使用せずに歯ブラシだけで充分に刷掃した後、脱イオン水でよく含嗽する。30分以上経過後、自然流出する全唾液を室温で共栓付試験管に採取し、振盪により均一化してからガラスフィルター (G2: ポアサイズ40~50 μ m, 蕪木科学器械) で吸引濾過した。

2) 唾液上清

採取した全唾液を高速遠心機 (KH-180型, 久保田製作所) によって12,000rpm で10分間遠心分離し、上澄を唾液上清として用いた。

3) 供試菌株

Streptococcus mutans BHT, FA1, JC2, PK1, Ingbritt, B13

Streptococcus salivarius ATCC9758

Streptococcus lactis IID7963

Lactobacillus acidophilus ATCC1084

Lactobacillus casei IAM1118

Lactobacillus fermenti IAM1148

4) 保存用培地

供試菌株と培地の組成 (100ml 中)

① *Streptococcus mutans*

TEP ブイヨン培地 (栄研)	4.6g
カンテン末 (小宗化学)	0.8g
沈降性 CaCO ₃ (和光純薬)	0.5g
pH 7.0~7.2	

② *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus lactis*

普通カンテン培地 (栄研)	3.5g
馬脱線維血 (日生材)	10ml
pH 7.2	

③ *Lactobacillus acidophilus*

普通カンテン培地 (栄研)	3.5g
グルコース (小宗化学)	1g

pH 7.2

④ *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus fermenti*

ハートインフュージョン

ブイオン培地 (栄研)	2.5g
グルコース (小宗化学)	1g
チオグリコール酸ナトリウム (和光純薬)	0.1g
沈降性 CaCO_3 (和光純薬)	2g
カンテン末 (小宗化学)	1.3g

pH 7.0~7.2

5) 増菌用培地

供試菌株と各培地の組成 (100ml 中)

① *Streptococcus mutans*

TEP ブイオン培地 (栄研)	4.6g
-----------------	------

pH 7.2

② *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus lactis*, *Lactobacillus acidophilus*

粉末ブイオン (極東)	2g
グルコース (小宗化学)	1g

pH 7.0

③ *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus fermenti*

ハートインフュージョン

ブイオン培地 (栄研)	2.5g
グルコース (小宗化学)	1g
チオグリコール酸ナトリウム (和光純薬)	0.1g
酢酸ナトリウム (小宗化学)	1g

pH 7.0~7.2

6) 細菌浮遊液の調製

各供試菌株をそれぞれの増菌用培地に接種し、37°C, 18時間増菌培養したのち、よく振盪し、12,000 rpm で10分間遠心分離し沈渣に6 mg/ml 塩化ナトリウム水溶液を加え、振盪し再度12,000 rpm で10分間遠心分離を行う。この操作を3回繰り返した後、沈渣に6 mg/ml 塩化ナトリウム水溶液を加え、分光光度計 (日立 100-10型) によって、660nm の吸光度 (濁度) が0.6の細菌浮遊液を調製した。

7) 乳酸産生系

ヒト全唾液を容量25ml の共栓付試験管に3 ml ずつ分注し、脱イオン水、または各種濃度のシステイン水溶液あるいは SH 化合物の水溶液 1 ml、

5 mg/ml グルコース水溶液 1 ml を加え全量を 5 ml とし、37°C 4時間好気静置条件下でインキュベートした。これらの各試料から1 ml ずつ分取し、100mg/ml のトリクロル酢酸水溶液 4 ml を添加して反応を停止させ、乳酸の定量に供した。各試料の残部 4 ml で pH の測定を行った。

全唾液ではなく、細菌浮遊液を使用する場合には、唾液上清 2 ml、細菌浮遊液 0.5 ml と 6 mg/ml 塩化ナトリウム水溶液 0.5 ml を用いた。

8) 乳酸分解系

ヒト全唾液 3 ml に 2 mg/ml 乳酸ナトリウム水溶液 1 ml と、システイン水溶液または脱イオン水 1 ml を加え、37°C で4時間、6時間インキュベートした。ついで、乳酸産生系と同様に反応を停止させ乳酸量と pH の測定を行った。

9) インキュベート

嫌気：内径約15mm の試験管と滅菌綿栓を用いて、ガスパック嫌気ジャー (ガスパック100, BBL) 中でインキュベートした。

好気静置：容量25ml の共栓付試験管を用いて、インキュベートした。

好気振盪：内径約15mm の試験管にステンレス栓をし、ユニットシェーカー (プラスシェーカー、大洋科学工業) とサーモユニット (ミンダー Jr, 大洋科学工業) を用い、30mm の振幅で90回/min の水平振盪を行った。

10) pH の測定

ガラス電極 pH メーター (HM-5BS型、東亜電波) を使用した。

11) 乳酸の定量

Barker-Summerson 法³⁰⁾によった。これは、あらかじめ試料を $\text{CuSO}_4 \cdot \text{Ca}(\text{OH})_2$ で処理し、乳酸を濃硫酸の存在下で加熱して定量的にアセトアルデヒドに変化させ、パラヒドロキシジフェニルで発色させて硫酸銅で増強させる方法である。

トリクロル酢酸水溶液で除タンパクをし、反応を停止させ、10分間以上放置した試料をスピッツグラスに1 ml ずつ分取し、25mg/ml 硫酸銅水溶液 4 ml と水酸化カルシウム 1 g を加えすぐによく混和し、30分間以上放置後 (1日が限度)、3,000 rpm で10分間遠心沈殿する (除糖操作)。

除糖した上清 1 ml を試験管に分取し、40mg/

ml の硫酸銅0.05ml を加え、氷水中で濃硫酸 6 ml を加え振盪混和する。次いで沸騰水中で 5 分間加熱し、試料中の乳酸をアセトアルデヒドに変化させ冷水中で 20°C 以下に冷却する。十分に冷却させた試料に 15mg/ml パラヒドロキシジフェニル 0.1ml を試験管壁に付けないように管の内部に滴下し、よく混和する。ただちに 30°C 水浴中に 30 分間放置したのち、沸騰水中に正確に 90 秒間浸し、冷却後分光光度計（日立 100-10 型）を用いて、570nm の吸光度を測定する。

12) システインの定量

酸性ニンヒドリン反応（Gaitonde 法）^{31,32)} を使用した。これはトリクロル酢酸で反応を停止した試料 1 ml に 1 ml の氷酢酸と 1 ml の酸性ニンヒドリン試薬（250mg のニンヒドリンを氷酢酸 6 ml と濃塩酸 4 ml の混液に溶かす）を加え、よく混和する。10 分間沸騰水中で加温したのち氷水中で冷却し、95%エタノールで全量を 10ml とし、分光光度計（日立 100-10 型）を用いて 560nm で吸光度を測定する。

13) 還元型 グルタチオンおよびシステインの SH 基の測定

フェリシアニド法³³⁾ によった。この方法は、420nm でフェリシアニドは大きな吸収を示すがフェロシアニドはほとんど吸収を示さないという関係を利用して、SH 基酸化のために消費されたフェリシアニド量から SH 基の量を定量しようとするものである。

1 ml の試料に 0.5ml の 0.5M リン酸緩衝液と 0.5ml の 0.01M $K_3Fe(CN)_6$ を加え振盪し、90°C で 5 分間加温した後 5 分間冷却し、冷却後 5ml の 0.5M リン酸緩衝液を加え 420nm で吸光度を測定する。その際、システインはフェリシアニドを即座に還元してしまうため、0.1mM のパラクロメルクリ安息香酸 (PCMB) を加えて実験を行った。

14) グルコースの定量

アンスロン法³⁴⁾ によった。これは、濃硫酸の存在下で炭水化物から生成されたフルフラール誘導体がアンスロン（9,10-ジヒドロ-9-オキシアントラセン）と反応し青緑色を呈する反応である。アンスロン試薬は氷水中で脱イオン水 25ml に濃硫酸 95ml を加え、冷却してから 200mg の再結晶し

たアンスロンを溶解させて調製した。トリクロル酢酸水溶液を含む試料をあらかじめ 0.005~0.05 mg/ml のグルコース濃度になるように脱イオン水で希釈しておき、5~50 μ g のグルコースを含む試料 1 ml を試験管に分取し、冷水中でアンスロン試薬 6 ml を管壁を伝わらせて層をなすように加え、ただちに激しく振って混和した後、沸騰水中で正確に 10 分間加熱し、ついで冷水中で室温まで冷却し、620nm の吸光度を測定した。

15) 供試アミノ酸と SH 化合物

- i) 各種アミノ酸（日本理化学薬品）：L 型
- ii) 還元型 グルタチオン、メルカプト酢酸ナトリウム、メルカプトエタノール（和光純薬）
- iii) β -メルカプトプロピオン酸、2-チアゾリン-2-チオール、メルカプトコハク酸（関東化学工業）
- iv) メルカプトメタノール（Kodak）

これらの水溶液は 6N の塩酸と 6N の水酸化ナトリウムの微量で pH 7.0 に調整した。

実験結果

1. システインについて

1) システインの濃度と乳酸産生抑制効果

Fig. 1 は、好気静置条件下において 4 時間インキュベートした全唾液の乳酸産生量を測定したものである。システイン濃度 5 mM のところで乳酸産生の抑制が最も強く、以後抑制は弱くなっている。しかし、アンスロン法で測定したグルコース消費を見ると、システインの濃度の上昇にともなって減少している。したがって高濃度のシステインは、Barker-Summerson 法を妨害する（自己発色がある）ことを示唆する。実際に調べてみると、乳酸と同様に青紫色の発色を示すことが確認された。しかし、1 mM から 5 mM 程度の低濃度のシステインで明瞭な乳酸産生抑制効果がみられ、自己発色の影響は少ない。以下システインの濃度としては 1 mM から 5 mM の範囲を使用することにした。

2) システインの影響とインキュベート時間

無添加および 3 mM 濃度のシステインを添加した全唾液について、0 時間から 4 時間の間で 1 時間ごとに乳酸量の測定をした。Fig. 2 であきらかなように、いずれの場合もシステイン添加唾液の

Fig. 1 Relationships between cysteine concentration and glucose decomposition (lactate production and glucose consumption) in incubated saliva. Test mixture: 3ml human whole saliva, 1ml glucose (5mg/ml), and 1 ml cysteine (0-100 mM, pH 7). Incubation: 37°C, 4 hours, aerobic condition (use of 25ml volume test tube, unshaken). Determinations: lactate production, Barker-Summerson's method; glucose consumption, anthron method.

Fig. 2 Inhibitory effect of cysteine on the lactate production in incubated saliva. Test mixture: 3ml human whole saliva, 1ml glucose (5mg/ml), and 1ml cysteine (15mM, pH 7) or 1ml water (control). Incubation: 37°C, 0-4 hours, aerobic(unshaken).

Fig. 3 Influence of initial pH on the decrease of lactate production by cysteine. pH was adjusted with 6N-HCl or 6N-NaOH. Incubation: see the caption to Fig. 1. Test mixture: see the caption to Fig. 2.

方に抑制が認められたが、とくにインキュベート4時間においてはその差が著明になった。以後の実験においては、インキュベートは4時間とした。

3) システインの影響と初期 pH

採取した全唾液の pH をあらかじめ 6N の塩酸や 6N の水酸化ナトリウムの極微量を用いて 6～9 に調整した。Fig. 3 には、被験者 2 名の成績をあげた。対照（システイン無添加）では、被験者 NS のように pH 7 で乳酸産生量がピークを示すものと、HU のように pH 7 以上少なくとも 9 までは産生量にほとんど変化を示さないもの（若干低下）とがあった。しかし、いずれの例においても、3 mM のシステイン添加時には乳酸産生は抑制された。その場合の産生量はどの pH でもほぼ同じであった。

4) 乳酸分解に対するシステインの影響

全唾液を、極微量の 6N の塩酸や 6N の水酸化ナトリウムを用いて pH 6～8.5 に調整し、3 ml ずつ分取し、2 mg/ml の乳酸ナトリウム 1 ml と

Fig. 4 Lactate degradation in cysteine containing saliva at various pH. Test mixture: 3 ml human whole saliva, 1 ml sodium lactate (2 mg/ml), and 1 ml cysteine (15 mM) or 1 ml water (control). Incubation: 37°C 0-6 hours, aerobic, (unshaken). pH adjustment: see the caption to Fig. 3.

15mM のシステイン 1 ml または脱イオン水 1 ml を加え、37°C で2, 4, 6時間インキュベートして乳酸分解を調べた。Fig. 4 に示すように、乳酸は少しずつ分解したが、どの pH においてもインキュベート2, 4, 6時間ともに対照との間に大きな差は認められなかった。また pH 8.5ではシステインを添加したものと対照がまったく同じ値を示した。

5) システインの定量 (酸性ニンヒドリン反応)

システインを添加した場合に唾液の乳酸産生が抑制されることが、上記の各実験によって示されている。しかしその場合、インキュベート中にシステイン量はどのように変わっているかを知る必要がある。そこでインキュベート0時間と4時間の試料から、システイン量を測定した。Fig. 5 のように添加量が 3 mM, 1 mM のいずれの場合も4時間後にはほぼ同量のシステインの減少 (0.3 mM) を認めたが、なお多量のシステインが残っていた。

6) システインと他のアミノ酸の関係

乳酸産生を抑制するシステインに対し、他のアミノ酸がどのように作用するかを知るために、種々のアミノ酸を加えてその影響を調べた。容量25 ml の共栓付試験管にヒト全唾液 3 ml と 5 mg/ml グルコース水溶液 1 ml を分注し、30mM システイン水溶液 0.5 ml, 30mM アミノ酸水溶液 0.5 ml を混合する。対照としては、全唾液 3 ml, グルコース水溶液 1 ml に脱イオン水 1 ml, あるいは15 mM システイン水溶液 1 ml を添加したものをを用いた。これらを37°C で4時間好気静置条件下でインキュベートした。

Fig. 6 の棒グラフに示すように、システインの乳酸産生抑制能を減弱させるアミノ酸は効果の強い順に、スレオニンとバリン、ロイシンとイソロイシンであり、さらにグルタミン、フェニルアラニン、アラニン、プロリン、セリン、アスパラギン酸にもその傾向が認められた。これに対して、トリプトファン、グリシン、アルギニン、グルタ

Fig. 5 Determination of cysteine by Gaitonde's method. Test mixture: 3ml human whole saliva, 1 ml glucose (5mg/ml), 1 ml cysteine (15mM or 5mM). Incubation: see the caption to Fig. 1.

ミン酸、ヒスチジン、アスパラギン、リジンにはシステインの抑制能を弱める作用はほとんどなかった。Fig. 6における丸印は添加アミノ酸単味の場合の対照 I (無アミノ酸試料) に対する乳酸産生百分率である。

7) システインの作用とインキュベートの条件

口腔内では酸素の供給が部位により異なり、嫌気、好気 (静置、振盪) などに相当する各部位が存在する。これらの条件下でグルコースからの乳酸産生に対するシステインの影響を調べた。

Fig. 7 は各条件下で4時間インキュベートを行った被験者2名 (HK, MM) の成績を示したものである。どちらの例でも3mMのシステインを添

加した唾液は、対照に比べて、乳酸産生がどの条件においても抑制されている。とくに HK においてはその抑制が強く認められた。

8) システインの乳酸産生抑制と細菌

全唾液にシステインを加えた場合は、乳酸産生にはすべての被験例において明らかな抑制が認められた。しかし、細菌を用いた場合には被験者の唾液上清のちがいや細菌の種類によって乳酸産生を抑制するものとししないものがあった。3mM システインは、Fig. 8 の HU のように、供試した *Streptococcus mutans* の各菌株すべてにおいて抑制を示すもの、NS のように菌株によって抑制を認めるもの (JC2, BHT, FA1) があった。しかし、Fig. 9 の HK, EH は、*Streptococcus mutans* JC2 を含め、すべての細菌において同濃度のシステインを添加した場合に乳酸産生の抑制は認められなかった。また図にはないが、HU, NS においても *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus lactis*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus fermenti* については抑制は認められなかった。

2. その他の SH 化合物

1) 還元型 グルタチオンの乳酸産生におよぼす影響

グルタチオンは体液、分泌液には含まれないが還元型は生体における代表的 SH 化合物であり、組織細胞において酸化還元に必要な働きをする成分である。Fig. 10は、この還元型グルタチオン (GSH) 1mM の影響をシステイン 1mM と比べたものである。どの例においても、GSH による抑制は認められず、むしろ若干促進的であった。

GSH はグルタミン酸、システイン、グリシンの3種アミノ酸からなるトリペプチドである。これらの各アミノ酸単味とシステインとの混液 (各濃度 3mM)、3種の混液 (各濃度 3mM) について還元型グルタチオン (3mM) との比較を行った (Fig. 11)。被験者2名 (RS, HU) とともに、アミノ酸2および3種の混液はシステインの抑制とほとんど変わらない抑制を示した。しかるに、GSH は逆に乳酸産生の促進を示している。同モル濃度におけるシステインと GSH について SH 基を調べたところ、SH 基の量に差は認められな

Fig. 6 Influence of amino acid on the decrease of lactate production by cysteine. Control mixture: 3 ml human whole saliva, 1 ml glucose (5 mg/ml), and 1 ml water (control I) or 1 ml of 15mM cysteine (control II). Test mixture: 3 ml human whole saliva, 1 ml glucose (5 mg/ml), 0.5 ml of 30mM cysteine and 0.5 ml of 30mM amino acid (ordinate). Incubation: see the caption to Fig. 1.

Fig. 7 Comparison of the decrease of lactate production by cysteine in human whole saliva (HK and MM) under aerobic and anaerobic conditions (at 37°C, 4 hours incubation). Anaerobic: Gas Pak 100 (BBL). Aerobic (unshaken): test tube of volume 25ml. Aerobic (shaken): Plus Shaker (Taiyo Scientific Industrial Co.). Test mixture: see the caption to Fig. 2.

Fig. 8 Effect of cysteine on the lactate production by *Streptococcus mutans* (serotype *b*, *c*, and *d*) in saliva supernatant (NS and HU). Test mixture: 2ml saliva supernatant, 0.5ml of bacterial suspension (6mg/ml NaCl, OD at 660 nm : 0.6), 0.5ml NaCl (6mg/ml), 1ml glucose (5mg/ml), and 1ml cysteine (15mM) or 1ml water (control). Incubation: see the caption to Fig. 1.

Fig. 9 Effect of cysteine on the lactate production by some bacterial strains in saliva supernatant (HK and EH). Test mixture: see the caption to Fig. 8. Incubation: see the caption to Fig. 1.

かった (Fig. 12)。

2) 各種メルカプト化合物の乳酸産生におよぼす影響

歯学において注目されている SH 化合物は、口

臭の主な原因となっているメルカプト化合物である。ここでは、メルカプト化合物のうちメルカプトエタノール (ME), メルカプトメタノール (MM), メルカプトコハク酸 (MSA), 2-メルカプ

Fig. 10 Effect of glutathione (GSH) on the lactate production in incubated saliva. Test mixture: 3ml human whole saliva (MM, RS, MT, and HU), 1ml glucose (5mg/ml), 1ml of 5mM GSH or 1ml of 5mM cysteine or 1ml water (control). Incubation: see the caption to Fig. 1.

Fig. 12 Determination of SH in cysteine and GSH by ferricyanide method.

Fig. 11 Effects of glutathione (GSH) and its constituted amino acids (Glu, Cys, Gly) on the lactate production in incubated saliva. Test mixtures: (1) 3ml human whole saliva, 1ml glucose (5mg/ml), 1ml of 15mM GSH or 1ml of 15mM amino acid (Glu, Cys, or Gly) or 1ml water (control). (2) 3ml human whole saliva, 1ml glucose (5mg/ml), 0.5ml Glu (30mM) and 0.5ml Cys (30mM) or 0.5ml Gly (30mM) and 0.5ml Cys (30mM). (3) 3ml human whole saliva, 1ml glucose (5mg/ml), 1ml GSH constituted amino acids (45mM Glu, 45mM Cys and 45mM Gly). Incubation: see the caption to Fig. 1.

ト-2-チアゾリン (2M2T), β -メルカプトプロピオン酸 (β -MPA), メルカプト酢酸ナトリウム (MAA) の 1 および 3 mM について、唾液内乳酸産生におよぼす影響を調べた。その結果、乳酸産生に対しほとんど影響がないもの、促進的に作用するもの、抑制を示すものの 3 種に分けることができた。

乳酸産生にほとんど影響がないものは、メルカプトエタノール (Fig. 13), メルカプトメタノール (Fig. 14), 促進を示すのはメルカプトコハク酸 (Fig. 15) であった。

乳酸産生をやや抑制するものには、2-メルカプト-2-チアゾリン (Fig. 16), と β -メルカプトプロピオン酸 (Fig. 17) があり、どちらの場合も濃度が 1 mM より 3 mM の方が抑制作用がより著明であった。

実験に使用したメルカプト化合物のうちで最も乳酸産生を抑制した物質は、メルカプト酢酸ナトリウム (Fig. 18) であった。これはチオグリコール酸ナトリウムともよばれ、システインほどではないが、1 mM でも 3 mM でもかなりの抑制を示

Fig. 13 Effect of mercaptoethanol (ME) on the lactate production in incubated saliva. Test mixture: 3ml/ human whole saliva, 1ml/ glucose (5mg/ml), and 1ml/ mercaptoethanol (5 mM, 15 mM) or 1 ml/ cysteine (5 mM, 15 mM) or 1 ml/ water (control). Incubation: see the caption to Fig. 1.

Fig. 14 Effect of mercaptomethanol (MM) on the lactate production in incubated saliva. Test mixture: 3ml/ human whole saliva, 1ml/ glucose (5mg/ml), and 1ml/ mercaptomethanol (5mM, 15mM) or 1ml/ cysteine (5 mM, 15 mM) or 1 ml/ water (control). Incubation: see the caption to Fig. 1.

した。

考 察

窒素源としてアミノ酸とペプチドは微生物の増殖に必要な物質であり、窒素源の増加は糖質代謝など微生物の代謝を促進すると考えられる。解糖促進因子として、種々の因子が報告されているが、それらはいずれも窒素化合物である¹⁻²⁵⁾ (Fig. 2)。初期 pH を 6 ~ 9 の範囲で調整し、3

Fig. 15 Effect of mercaptosuccinic acid (MSA) on the lactate production in incubated saliva. Test mixture: 3ml/ human whole saliva, 1ml/ glucose (5mg/ml), and 1ml/ mercaptosuccinic acid (5mM, 15mM) or 1 ml/ cysteine (5 mM, 15 mM) or 1 ml/ water (control). Incubation: see the caption to Fig. 1.

Fig. 16 Effect of 2-mercapto-2-thiazoline (2M2T) on the lactate production in incubated saliva. Test mixture: 3ml/ human whole saliva, 1ml/ glucose (5mg/ml), and 1ml/ 2-mercapto-2-thiazoline (5 mM, 15 mM) or 1ml/ cysteine (5 mM, 15 mM) or 1 ml/ water (control). Incubation: see the caption to Fig. 1.

SH 化合物は OSCN^- を還元するところから、ラクトペルオキシターゼの抗菌作用を妨害すると考えられており、このことから微生物の増殖に促進的に作用することも考えられる。

しかし、1, 5, 10, 20mM の濃度にシステインを加えた唾液を 4 時間インキュベートすると、濃度 1 mM でもシステインによる抑制が起こった。しかも、その時のグルコース消費をみると、乳酸産生の抑制と同様にシステインによる抑制が認められた (Fig. 1)。また、3 mM のシステインを含む唾液を 1.5 ~ 4 時間インキュベートしても、システインによる明らかな乳酸産生の抑制が認められた

Fig. 17 β-Mercaptopropionic acid (β-MPA) on the lactate production in incubated saliva. Test mixture: 3 ml human whole saliva, 1 ml glucose (5 mg/ml), and 1 ml β-mercaptopropionic acid (5 mM, 15 mM) or 1 ml cysteine (5 mM, 15 mM) or 1 ml water (control). Incubation: see the caption to Fig. 1.

Fig. 18 Effect of mercaptoacetic acid sodium salt (MAA) on the lactate production in incubated saliva. Test mixture: 3 ml human whole saliva, 1 ml glucose (5 mg/ml), and 1 ml mercaptoacetic acid sodium salt (5 mM, 15 mM) or 1 ml cysteine (5 mM, 15 mM) or 1 ml water (control). Incubation: see the caption to Fig. 1.

mM にシステインを添加し、4 時間インキュベートすると、システインを添加した唾液では pH の影響を受けずにどの pH においても、乳酸産生抑制がみられた (Fig. 3)。また、初期 pH 6~8.5 に調整し、4, 6 時間インキュベートしたとき、乳酸分解は、システインの添加によって影響を受けなかった (Fig. 4)。4 時間インキュベートした後のシステイン量をインキュベート前の値と比べる

(Fig. 5) と、システイン濃度 1 mM, 3 mM のどの場合もシステインの減少が認められた。これはシステインの消費を示すものと思われる。以上の諸現象からみて、口腔内微生物の乳酸産生に対してシステインは抑制的に作用するものと考えられる。

生物におけるアミノ酸の相互作用については、古くから調べられているが、今回の実験系におけるシステインと他のアミノ酸の相互関係を知らるために、システインと同モル濃度の他のアミノ酸を添加して調べてみた。その結果、システインの乳酸産生抑制作用を減弱させるものには、アスパラギン酸、セリン、プロリン、アラニン、フェニルアラニン、グルタミン、ロイシン、イソロイシン、スレオニン、バリンがあった。とくに、スレオニンとバリンは、システインの乳酸産生抑制作用を消去するほどの顕著な作用を示した (Fig. 6)。

ところで、口腔内においては部位によって酸素の供給度が異なる。そこで、3 mM のシステインを添加した全唾液を、嫌気、好気静置、好気振盪の各条件下でインキュベートしたところ、どの条件下においても乳酸産生の抑制がみられた (Fig. 7)。

全唾液を用いた実験においては、すべての実験例においてシステインによる乳酸産生の抑制が認められた。そこで次に、種類の供試菌株を用いて唾液上清中の乳酸産生に対するシステインの作用を調べてみた。Fig. 8, 9 のように 3 mM のシステインを添加した場合、細菌の種類、唾液上清のちがいで抑制を示さないものもあった。これらの成績は、システインの乳酸産生抑制の作用には唾液上清および、唾液沈渣微生物叢が関与していることを示す。

生体の酸化還元に関与している還元型 グルタチオンは、グルタミン酸の α-カルボキシル基にシステインがペプチド結合し、さらにシステインの C-末端にグリシンの結合したトリペプチドで、遊離した SH 基をもっている。ところで、オリゴペプチドは、細菌壁の透過性が良く発育因子として有効であるが、さらにアミノ酸の透過においてはアミノ酸間の拮抗現象があること、アミノ酸は菌体外で変化を受けることなどもオリゴペプチドの

有効性に関連する問題である³⁵⁾。しかし、ペプチドは、種々のアミノ酸が共存するときによりよく作用するわけであり¹⁶⁾、結局は菌体内においてアミノ酸になって利用されるのであるから、口腔内微生物の発育に対する作用を論議するためには、構成アミノ酸との比較を参考にする必要がある。Fig. 10は、1 mM のシステインと1 mM の還元型グルタチオンの乳酸産生を比較したものであるが、4例共にシステインは乳酸産生を抑制したのに対し、還元型グルタチオンではむしろやや促進を示した。さらに、Fig. 11では、3 mM の還元型グルタチオンと、同モル濃度のグルタミン酸、システイン、グリシンのアミノ酸単味、またはこれらの混合物を比較したものである。ここでも2例共に還元型グルタチオンは乳酸産生の促進を示したが、グルタミン酸、システイン、グリシンの3種アミノ酸の混液はシステインと同程度の乳酸産生の抑制を示した。そして、Fig. 12では、還元型グルタチオンとシステインの各1 mM と3 mM についてSH基を定量比較したところ、遊離SH基には差がないことが認められた。これらのことから、システインの乳酸産生抑制作用には遊離SH基は少なくとも直接的には関係がないことが結論される。

次に、主にタンパク質の腐敗によって生じる口臭物質のうち、もっとも注目される物質であり、システインから生成されるメルカプト化合物について実験を行ったところ、乳酸産生に対してほとんど影響がないもの、促進的に作用するもの、種の程度抑制的に作用するものの3グループに分けることができた。すなわちほとんど影響がないものにはメルカプトエタノール (Fig. 13)、メル

カプトメタノール (Fig. 14)、促進するものにメルカプトコハク酸 (Fig. 15) があった。やや抑制するものには、2-メルカプト-2-チアゾリン (Fig. 16) と β -メルカプトプロピオン酸 (Fig. 17) があり、どちらの場合も濃度が1 mM より3 mM の方で抑制作用がより著明にあらわれていた。さらに、かなり乳酸産生を抑制するメルカプト化合物は、メルカプト酢酸ナトリウム (Fig. 18) であった。これはシステインほどではないが、1 mM でも3 mM でも相当の抑制を示した。ここで注目されるのは、メルカプト酢酸ナトリウムは、チオグリコール酸ナトリウムとも呼ばれ、細菌の発育培地に用いられていることである。培地にチオグリコール酸ナトリウムを加えることにより、好気条件下での嫌気性菌の発育を可能にするので³⁶⁾これは、乳酸産生の促進を考えさせる。しかし、実際には著者のデータにおいては抑制的に作用している。乳酸産生の抑制を示したメルカプト化合物のうち、 β -メルカプトプロピオン酸、メルカプト酢酸ナトリウムは、システインと類似した化学構造をしており、遊離のSH基とカルボキシル基をもつ。また2-メルカプト-2-チアゾリンは、化学構造はシステインとは異なるが、今回実験に使用したメルカプト化合物のうちでは、システインに最も近い分子量である (Table 1)。これらのことから、乳酸産生の抑制に対し、化学構造や立体構造が関与していると思われる。この方面については、さらに追究の必要がある。

結 論

含硫アミノ酸であるシステインと、数種のSH化合物が、ヒト全唾液中の乳酸産生にどのような

Table 1 Mercaptans

Name	m.w.	Structural formula
mercaptoethanol (ME)	62.13	$\text{CH}_3 \text{CH}_2 \text{SH}$
mercaptomethanol (MM)	48.11	$\text{CH}_3 \text{SH}$
mercaptosuccinic acid (MSA)	150.15	$\text{HOOCCH}(\text{SH})\text{CH}_2\text{COOH}$
2-mercapto-2-thiazoline (2M2T)	119.21	$\text{SCH}_2\text{CH}_2\text{N}:\text{CSH}$
β -mercaptopropionic acid (β -MPA)	106.14	$\text{HSCH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$
mercaptoacetic acid sodium salt (MAA)	114.11	$\text{HSCH}_2\text{COONa}$
cysteine	121.16	$\text{HSCH}_2\text{CH}(\text{NH}_2)\text{COOH}$

作用をおよぼすかを好気静置の条件下で検討し、以下の結果が得られた。

1) システインの濃度が 1 mM から 20 mM においては対照に比べ乳酸産生量は低下を示した。とくに 5 mM で低下が著明であった。その濃度以上で乳酸産生量が一見して増加しているのは、システインの自己発色のためである。

2) この乳酸産生の抑制は、どのインキュベート時間（1～4 時間）においても認められた。しかし、抑制率は、1 時間から 4 時間の範囲において時間が長いほど大きくなった。

3) 初期 pH（6～9）と乳酸産生との関係をみると、システイン無添加の対照において、pH によって乳酸産生にかなりの影響がみられ、酸性、塩基性では産生量が低下した。これにシステインを添加した場合には、どの pH の場合もさらに抑制がみられたが、産生量はほとんど同程度の低い値になった。すなわち、低下量は、中性で最も大であった。

4) 一方、乳酸分解について、初期 pH やインキュベート時間を変えても、システイン添加の影響はほとんどみられなかった。

5) ヒト全唾液の乳酸産生に対するシステインの抑制効果を減弱させるアミノ酸としてアスパラギン酸、セリン、プロリン、アラニン、フェニルアラニン、グルタミン、ロイシン、イソロイシン、スレオニン、バリンがある。これらのアミノ酸のうち、とくにスレオニンとバリンが強力であった。トリプトファン、グリシン、アルギニン、グルタミン酸、ヒスチジン、アスパラギン、リジンはほとんど影響を示さなかった。

6) 以上の実験は、好気静置の条件下で行ったものであるが、インキュベート条件を嫌気、好気振盪とした場合も、システインによる乳酸産生抑

制が認められた。

7) 純培養菌株を用いた実験によると、システインによって乳酸産生抑制を受ける菌株と、まったく受けない菌株があった。乳酸産生抑制を受けない菌株は、*Streptococcus salivarius*, *Streptococcus lactis*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus fermenti* であった。

8) また、乳酸産生抑制を受ける菌株は、*Streptococcus mutans* (BHT, FA1, JC2, Ingbritt, PK1, B13) であった。しかし、唾液上清がことになると、抑制がみられなくなる例があった。

9) 還元型グルタチオンは、どの濃度においても乳酸産生の抑制を示さず、むしろ促進傾向を示した。

10) メルカプト化合物には、ほとんど影響がないもの、乳酸産生を促進するもの、抑制するものがあった。ほとんど影響がないものにはメルカプトエタノール、メルカプトメタノール、促進するものにはメルカプトコハク酸があった。他方、抑制を示すものとしては、2-メルカプト-2-チアゾリン、 β -メルカプトプロピオン酸、メルカプト酢酸ナトリウムがあり、いずれも高濃度ほど抑制効果が強かった。

稿を終るにあたり、ご指導、ご校閲を賜った日本歯科大学生化学教室三代幸彦教授ならびに菌株の一部を分与していただいた細菌学教室渡辺武彦教授に心から謝意を表します。また、ご助言を下された生化学教室の方々とくに桐村和子助教授および森川倡子講師に深謝いたします。

なお、本論文の要旨は昭和57年度日本歯科大学歯学会大会（1982年9月11, 12日, 東京）、第30回 JADR 総会（1982年, 12月2, 3日東京）で口演発表した。

抄録：SH 化合物が、微生物の乳酸産生にどのような影響をおよぼすかを好気静置条件下で検討した。ヒト全唾液の乳酸産生は、システイン濃度が上昇するにしがいい低下し、とくに 1 から 5 mM で著明であった。システインによるこの抑制は、実験した初期 pH（6-9）のすべてにおいて認められ、中性で著明であった。また、システインによる抑制は、好気静置、好気振盪、嫌気各条件下においても認められた。なお、システインの添加は乳酸分解に影響を示さなかった。この乳酸産生のシステインによる抑制作用は、バリンまたはスレオニンの添加によって減弱した。

純培養菌株の乳酸産生についても検討したが、システインにより乳酸産生の抑制を受ける菌株は、*Strep-*

tococcus mutans (BHT, FA1, JC2, PK1, Ingbritt, B13) であった。しかし、唾液上清がことなると、これらの抑制作用はみられなくなる場合があった。

ヒト全唾液の乳酸産生は、還元型グルタチオン、メルカプトコハク酸で促進された。またメルカプトエタノール、メルカプトメタノールは影響がほとんどなかった。しかし、2-メルカプト-2-チアゾリン、 β -メルカプトプロピオン酸、メルカプト酢酸ナトリウムは抑制を示した。

文 献

- Hartles, R. L. and Wasdell, M. R.: The metabolism of the oral flora. *Brit. Dent. J.* **99**: 334-337, 1955.
- Hartles, R. L.: Metabolic factors in saliva. *J. Dent. Res.* **42**: 553-558, 1963.
- Rae, J. J. and Clegg, C. T.: Lactic acid production in saliva. *J. Dent. Res.* **35**: 612-614, 1956.
- 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.: The nature of the intrinsic salivary substrates used by the human oral flora. *Archs. Oral Biol.* **16**: 1449-1462, 1971.
- 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.
- Hay, D. I. and Hartles, R. L.: Studies on the glycolysis-enhancing properties of human saliva. *Archs. Oral Biol.* **11**: 337-347, 1962.
- Wasdell, M. R.: The effect of amino acids and related compounds on the metabolism of saliva. *Archs. Oral Biol.* **7**: 25-38, 1962.
- Kawasaki, T.: On the activating factor in human saliva for acid fermentative bacterial metabolism (report 1). *Bull. Tokyo Dent. Coll.* **5**: 25-32, 1964.
- 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.
- 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.
- 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.
- Kirimura, K., Morita, M. and Mishiro, Y.: Effect of protein hydrolysates on the fermentative activity of *Streptococcus salivarius*. *J. Dent. Res.* **49**: 890, 1970.
- 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.
- 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.
- Mishiro, Y. and Morinaga, K.: Lactate production from glucose in preincubated saliva. *J. Dent. Res.* **53**: 767, 1974.
- 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.
- Mishiro, Y. and Kaneko, H.: Promotion of lactate production by oligopeptides of partial hydrolysate of bovine serum albumin. *J. Dent. Res.* **53**: 1502, 1974.
- Holbrook, I. B. and Molan, P. C.: The identification of a peptide in human parotid saliva particularly active in enhancing the glycolytic activity of the salivary microorganisms. *Biochem. J.* **149**: 489-492, 1975.
- Kleinberg, I., Kanapka, J. A. and Craw, D.: Effect of saliva and salivary factors on the metabolism of the mixed oral flora, in: *Microbial Aspects of Dental Caries*, (edited by Stiles, H. M., Loesche, W. J. and O'Brien, T. C.), pp. 433-464, Information Retrieval Inc., Washington D. C. and London, 1976.
- 和田垣裕一: 唾液内乳酸代謝に対するアミンの作用. *歯基礎誌* **19**: 587-604, 1977.
- 三代幸彦, 石見隆夫: アミノ酸による唾液内乳酸産生の低下. *歯基礎誌* **23**: 576-580, 1981.
- 三代幸彦, 石見隆夫, 境 徳子: 唾液内微生物の乳酸産生に対する Sialin 構成アミノ酸の作用. *歯学* **69**: 1166-1168, 1982.
- 石見隆夫, 西東礼子, 小林 博, 薄葉博史: 細菌の乳酸産生に対するアルギニンの作用. *歯学* **69**: 1163-1165, 1982.
- 石見隆夫: 口腔内微生物の乳酸産生に対するアルギニンの作用. *歯学* **69**: 826-842, 1982.
- Kröngke, A., Bramstedt, F., Naujoks, R. and Marg, M.: Biochemische Speichlundersuchungen XI. Peptide im Menschlichen Speicheln. *J. Dent. Belge.* **49**: 391-402, 1958.
- Shomers, J. P., Tabak, L. A., Levine, M. J., Mandel, I. D. and Hay, D. I.: Properties of cysteine-containing phosphoproteins from human submandibular-sublingual saliva. *J. Dent. Res.* **61**: 397-399, 1982.
- Shomers, J. P., Tabak, L. A., Levine, M. J., Mandel, I. D. and Ellison, S. A.: Characterization of cysteine-containing phosphopro-

- teins from human submandibular-sublingual saliva. *J. Dent. Res.* **61** : 764-767, 1982.
- 29) 三代幸彦, 薄葉博史 : 未発表.
- 30) Barker, S. B. and Summerson, W. H. : The colorimetric determination of lactic acid in biological material. *J. Biol. Chem.* **138** : 535-554, 1941.
- 31) Gaitonde, M. K. : A spectrophotometric method for the direct determination of cysteine in the presence of other naturally occurring. *Biochem. J.* **104** : 627-633, 1967.
- 32) 日本生化学会編 : アミノ酸代謝と生体アミン (中). 生化学実験講座 11, p. 452, 初版, 東京化学同人, 東京, 1976.
- 33) 梶田昭彦 : Ferricyanide 法による蛋白質 SH 基の定量. *生化学* **26** : 547-551, 1954.
- 34) Trevelyan, W. E. and Harrison, J. S. : Fractionation and microdetermination of cell carbohydrates. *Biochem. J.* **50** : 298-303, 1952.
- 35) 三代幸彦 : ペプチドと微生物 *日歯周誌* **18** : 111-116, 1976.
- 36) 坂崎利一 : 培地学各論 (3), 初版, p. 277, 近代医学社, 東京, 1967.