微生物定量法による耳下腺 唾液中の B₁, PaA について

九州歯科大学学生化学教室 (主任 松下 義雄)

松 下 義 雄 ・ 於 勢 雅
大 田 康 男

唾液中のビタミンの種類、含量、形態について数種の報告があるが^{1)~6)}、唾液採取法が色々と異なり、測定結果についても著者によってかなりの開きがある。
4).5) 混合唾液には口腔内細菌の産生するビタミンの混入及び食物残渣からのビタミンの混入が考えられるから再現性の乏しい結果となり易い。一定条件の下で採取した純粋唾液はそれらの不利を除き、各個人の唾液腺の機能の一斑をビタミンの立場からうかがう一つの手がかりを与える材料である。本報は耳下腺唾液を材料として微生物法を用いて、パントテン酸とチアミンの含量及びその形態を調べたものである。

1. 基礎培地

基礎培地については、既に種々の組成培地が提出されているが^{8).9).13).14)}、著者等は次のような基礎培地を使用した。(第1表)、この表は定量したビタミンに共通の培地で、定量すべきビタミンの欠培地をそのビタミン定量の基礎培地とする。

基礎培地を調製するには次のような保存原液を作り、使用の都度これを調合して、PH6.8に調整して使用した。(第2表)

2. 接種用菌

定量用の新しい菌体を得るためには、菌体保存培地から寒天を除いたもの10mlに保存菌を植え、37°C、24時間培養した菌体を0.9% NaClの滅菌液で3回以上、洗滌と遠沈を繰返した後、0.9% NaCl溶液で100倍に稀釈したもの (Light inoculum)^{8).9)}を接種菌とする。この接種菌は注射針から一滴宛を接種に供する。

B₁ 定量用には *Lactobacillus fermenti* (東大応微研株) を使用した。また、PaA定量用には *Lactobacillus arabinosus* 17—5 (阪大株) を使用した。

第1表 基礎培地組成
(100ml中、2倍濃度)

カザミノ酸	1g	B ₁ ※	20r
シスチン	20mg	B ₂	20r
トリプトファン	20mg	ピリドキシン	20r
ブドー糖	4g	ピリドキサル	20r
酢酸ソーダ	4g	PaA—Ca ※	20r
塩類液 A	2ml	ニコチン酸	20r
{ K ₂ HPO ₄ 100mg		ビオチン	0.2r
{ KH ₂ PO ₄ 100mg		葉酸	0.2r
塩類液 B	2ml	p—アミノ安息香酸	4r
{ MgSO ₄ • 7H ₂ O 40mg		アデニン	2mg
{ FeSO ₄ • 7H ₂ O 2mg		グアニン	2mg
{ MnSO ₄ • H ₂ O 2mg		キサンチン	2mg
NaCl 2mg		ウラシル	2mg

※ B₁ 測定の場合はB₁を、PaA 測定の場合はPaA を除いた基礎培地を作る。

3. 培養及び菌体繁殖度の測定

培養は1.2×12cmの小試験管に基礎培地1mlと被検液または、標準曲線作成用のビタミン基準液を入れ、全体が2mlになるように水を加える。これに綿栓(またはパラフィン紙で包んだ綿栓)を施して、圧力10ポンドで10分間加熱殺菌し、冷却後、調製した接種菌を一滴宛、注射針から接種し、37°Cで培養する。

第 2 表

基 礎 培 地 用 保 存 原 液

種 類	調 整 方 法	1ml当り濃度
B ₁	2mgを $\frac{1}{100}$ N・HCl 100mlに溶かす、氷室に保存	20 γ
B ₂	2mgを3N・CH ₃ COOH 100mlに溶かす	20 γ
ピリドキシン	各2mgを水100mlに溶かす	20 γ
ピリドキサル		20 γ
PaA—Ca	2mgを水100mlに溶かす	20 γ
ニコチン酸	2mgを水100mlに溶かす	20 γ
ビオチン	各1mgを水50mlに溶かし、その1mlを100mlに溶かす 氷室に保存	0.2 γ
葉酸		0.2 γ
p—アミノ安息香酸	2mgを水500mlに溶す	4 γ
塩 類 液 A	$\left. \begin{array}{l} \text{KH}_2\text{PO}_4 \\ \text{K}_2\text{HPO}_4 \end{array} \right\}$ 各10gを200mlに溶す	50mg
		50mg
塩 類 液 B	$\left. \begin{array}{ll} \text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O} & 4\text{g} \\ \text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O} & 0.2\text{g} \\ \text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O} & 0.2\text{g} \\ \text{NaCl} & 0.2\text{g} \end{array} \right\}$	20mg
		1mg
		1mg
		1mg

培養時間は、B₁……L, ferme, の場合は 18~20 時間。PaA……L, arabi, 17—5 の場合は 48~60 時間で適当であった。

培養終了後、100°C の浴中で10分間加熱殺菌して菌の増殖を止め、産生された乳酸の量を $\frac{1}{20}$ N・NaOH で滴定し、その滴定値から菌の繁殖度を測定した。

4. 標準曲線

各使用菌体のビタミン定量の濃度範囲は、B₁ では 0.005~0.05 γ /ml、PaA では 0.0005~0.05 γ /ml であるから⁹⁾、この濃度範囲内で使用菌に最も都合の良い濃度段階を定めた。そして、各濃度段階毎に二つの平行実験を行ない、その平均値を求めて標準曲線を作成した。

濃 度 段 階

B₁ : — 0、1、2、4、6、8、10、m γ /ml

PaA : — 0、0.01、0.02、0.04、0.06、0.08、0.1、 γ /tube

5. 標準曲線濃度段階の調製

B₁ : —

B₁塩酸塩2mgを1000mlに溶かし、この1mlを100mlに溶かすと、20m γ /ml になる。これを原液として、

第3表に従って夫々試験管に分注する¹¹⁾。

PaA : —

PaA—Ca塩2mgを200mlに溶かし、この1mlを100mlに溶かすと0.1 γ /mlになる。これを原液として、第3表に従って夫々試験管に分注する。

第 3 表 ビタミン標準系列の調整

B₁ 用 : —

B ₁ の量 m γ	0	1	2	4	6	8	10
B ₁ 液 ml (20m γ /ml)	0	0.1	0.2	0.4	0.6	0.8	1.0
水 ml	1.0	0.9	0.8	0.6	0.4	0.2	0
基礎培地 ml	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0

PaA 用 : —

PaAの量 γ	0	0.01	0.02	0.04	0.06	0.08	0.1
PaA液 ml (0.1 γ /ml)	0	0.1	0.2	0.4	0.6	0.8	1.0
水 ml	1.0	0.9	0.8	0.6	0.4	0.2	0
基礎培地 ml	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0

6. 標準曲線

以上のようにして作成した標準系列を、前述の培養条件に従って培養し、酸度滴定によって次のような曲線を得た。(第一図)、(第二図)

第一図 B₁ 標準曲線

第二図 PaA 標準曲線

標準系列と、次のようにして作る試料系列とは同一条件による平行実験を行なうから、試料系列から得る酸度滴定の値をこの曲線に乗せることによって各ビタミンの含量を知り得る。

7. 試料の調製

試料の調製に際しては、各被検液のビタミン濃度が夫々の標準曲線の濃度範囲内に入るようにしなければ

ならない。このために予備実験を行い、試料の稀釈度を決定した。また、試料の濃度段階は同一試料について三段階を作り、夫々二つの平行実験を行なう。即ち、同一試料について合計6個の測定値を得ることになる。この平均値を持って各ビタミンの濃度とした。耳下腺唾液の採取は松下の方法⁷⁾によって行なった。

B₁の場合^{8),9)}：—

1) 耳下腺唾液5~10mlを採取し、HClまたはH₂SO₄でPH 1.2に調整し、約30分間煮沸する。これをPH 4.0~4.5に調整し、これに1.0% Papain+takadiastase 混液0.1mlを加えてトルオールを添加し、37°Cで一昼夜酵素分解を行い、後、濾過しトルオールを除去して、これをPH6.8に調整して試料に供する。唾液の稀釈度は1~2倍が限度であった。

このようにして調製した試料には酵素製品の残りを含んでいて、この中にもB₁の存在が考えられるので、使用した酵素液のみを用いた盲検を行ないこの値を差引かねばならない。著者等の測定では、添加した0.1%酵素液1ml当り0.6mγのB₁を認めた。

2) 遊離型B₁の有無を測定するために、採取した唾液をそのまま無処理で使用した。

PaAの場合^{8),9)}：—

1) 耳下腺唾液を5~10ml採取し、酵素処理を行なった。使用した酵素は Papain+takadiastase である。しかし今日最も良いとされているのは鳩肝 amydase と嚙の腸 Phosphatase の併用であるが^{10),11)}、後者の酵素を使用した実験結果については、CoAの定量として別報の予定である。

耳下腺唾液4~5mlに対して、Papain20mg+takadiastase 20mgを加え、0.2M acetate bufferでPH4.5に調整し、トルオールを添加して45~50°Cで16~24時間消化する。これを濾過しトルオールを除去後、PH6.8に調整し、含まれている PaA 濃度が標準曲線の濃度範囲内に入るように稀釈する。大体4~16倍に稀釈するとこの濃度範囲内になる。酵素中にも若干のPaAが認められるので、B₁の場合同様 blank test を行なった。

2) 上記のように処理した試料とは別に、遊離型のPaAを測定するために、原唾液をそのまま、PHを調整して使用した。この場合除蛋白は、B₁の場合と同様、加圧殺菌の場合に蛋白が凝固して沈澱するので、必ずしも必要と認められなかった。蛋白の沈澱で酸度滴定には支障とならないからである。

このようにして得た試料 (B₁……1)、2)、PaA……

1)、2)、) を夫々、1.0ml、0.5ml、0.2ml を各2本宛試験管に分注し、これに基礎培地を夫々1ml宛加えて、全体が夫々2mlになるように水を加え、標準系列と同一の条件で培養し、その結果の酸量を $\frac{1}{2}$ oN・NaOHで滴定し、これを標準曲線に乗せて各ビタミンの濃度を算定した。

8. 測定結果の検討

耳下腺唾液中のB₁及びPaA量の定量結果は(第4表)及び(第5表)に示した。

第4表 耳下腺唾液中のB₁含量

被検者	全含量 (m _r /ml)	遊離型 (m _r /ml)	被検者	全含量 (m _r /ml)	遊離型 (m _r /ml)
1	4.0		16	2.8	
2	1.4		17	3.6	
3	2.9		18	1.7	
4	1.8	0.0	19	3.4	
5	3.8	0.0	20	1.5	
6	0.8		21	3.2	
7	1.4		22	2.4	
8	0.9		23	2.7	
9	1.8	0.0	24	1.4	
10	8.0		25	3.4	
11	2.8		26	3.6	
12	5.8		27	1.1	0.0
13	3.6	0.0	28	4.4	
14	7.6	0.0	29	2.8	
15	1.6		30	3.4	

第5表 耳下腺唾液中のPaA含量

被検者	全含量 (r/ml)	結 合 型 (r/ml)	遊 離 型 (r/ml)
1	0.101	0.085	0.016
2	0.091	0.056	0.035
3	0.040	0.018	0.022
4	0.042	0.021	0.021
5	0.052	0.028	0.024
6	0.033	0.013	0.020
7	0.040	0.018	0.022

培養試験管に綿栓を施したが、綿栓中には乳酸菌発育因子の存在が認められている。しかし、培養液が綿栓に接触しないようにし、また、加圧殺菌時の凝縮水が綿栓を伝わって入らないようにすれば特に異常な結果を生ずることはない。そしてこのことは、綿栓をパ

ラフィン紙で包むことによって良い結果が得られた。最近では綿栓に代えてアルミニウムのキャップを使用することが推奨されている^{10),11)}。トルオールは濾過することによって簡単に除かれるので菌発育の障害にならない。

培養時間については一般に、B₁……L. ferme、は16~18時間、PaA……L. arabi、は72時間とされているが⁸⁾、前記の培養時間で良好な標準曲線を得た。

上表からわかるように、耳下腺唾液中には結合型としてB₁を0.8~8.0m_r/ml含み、遊離型としてのB₁は認められなかった。PaAについては、結合型として13m_r/ml~85m_r/ml、遊離型として16~35m_r/mlを認めた。このように耳下腺唾液中のB₁、PaA含量は個人差が著しく、B₁においては10倍、PaAにおいては約3.4倍の差が認められた。

唾液中のPaA含量について、Albert. H. Kniesner等⁴⁾は、PaAはすべての唾液中にあって、その含量は12~190m_r/ml、また、T. Shicta等⁵⁾は785m_r/mlの値を報告している。しかしこれらの値は唾液の種類、採取法等が明らかでなく、また、定量法の差違によっても、その定量値にこのような差は生ずる^{12),13)}。

B₁に関して、少例ではあるが遊離型が全く認められなかったことは、唾液腺の特異性考察の一因子として興味のあることと考えられる。

結合型の測定値は酵素分解の程度によって多少の相違を生ずる。特にPaAについては使用した上記酵素では定量値が若干低く出ることとは否めない¹¹⁾。

9. 要 約

1. 耳下腺唾液中のビタミンは、B₁については結合型として、0.8~8.0m_r/ml存在し、遊離型は認められなかった。
2. PaAについては、総量33~101m_r/mlで、遊離型としてその内に16~35m_r/mlを含んでいる。

(本稿の要旨は、昭和32年2月の九州歯科学会例会と、昭和32年5月の口腔衛生学会、及び昭和35年5月の九州歯科学会総会で発表した。)

主 な 文 献

- 1) Samuel Dreizen, D. D. S., and Tom D., Spies M. D.: J. D. Res 32, 65 (1953)
- 2) Stewart A. Koser and Barbara Jane Fisher.: J. D. Res, 29, 760 (1950)
- 3) D. E. Fancher, J. C. Calandra and L. S. Fosdick.: J. D. Res, 23, 23 (1944)

-
4) Albert H. Kniesner, B. S., D. D. S., Arvin W. Mann, B. S., D. D. S., and Tom D., Spies M. D.: J. D. Res., 21, 259 (1944) 5) T. Shiota, M. N. Disraely, and M. Caplow, : J. D. Res., 38, 734 (1959) 6) K. Balogh, Katalin Petrocz. and J. Angyal, : J. D. Res., 39, 886 (1960) 7) 松下義雄: 九州歯科学会誌、9 巻、3 号、63 頁 (昭和31年) 8) 推計学の化学及び生物学への応用、第 2 集、78 頁	(南江堂 1955) 9) 江上不二夫・他編: 標準生化学実験、459 頁 (文光堂、昭和28年) 10) 新村寿夫: ビタミン、12、106 (1957) 11) 福井、坂本各: ビタミン、8、218 (1955) 12) 佐橋佳一・他編: ビタミン学 (金原出版、昭和31年) 13) 藤田秋治: ビタミン定量法 (南江堂、昭和30年) 14) 八木国夫: 最新ビタミン定量法 (医歯薬出版、昭和29年)
-

OCCURRENCE OF THIAMINE AND PANTOTHENIC ACID IN THE HUMAN PAROTID SALIVA

by

Yasuo Ohta, Tadasu Ose and Yoshio Matsushita

Department of Biochemistry (Director Dr. Y. Matsushita)

Kyushu Dental College, Kitakyushu City

Thiamine and pantothenic acid contents in the human saliva directly obtained from the duct of stimulated parotid glands were assayed by the microbiological method.

The amount of thiamine in conjugated form ranged from 0.8 to 8.0 m γ per ml. of the saliva and not a trace of thiamine in the free form existed there.

The total amount of pantothenic acid in the saliva ranged from 33 to 101 m γ per ml. of which 16 to 35 m γ were accounted for by the free acid.