歯周疾患々者および健康者における全唾液中の Lysozyme

渡 辺 洋

愛知学院大学歯学研究科歯周治療学専攻

(主任・指導：中静 正教授)

(昭和57年9月20日受付)

The Study of Saliva Lysozyme on Periodontal Disease

Yoh WATANABE

Department of Periodontology, Aichigakuin University

(Chief and Director : Prof. Tadashi NAKASHIZUKA)

Whole saliva was collected from patients suffering from periodontal disease (diseased group) and from clinically healthy subjects (normal group), homogenized (homogenized with a Voltex mixer) and the homogenate separated by centrifugation (centrifuged at 3,000 rpm for 10 minutes). The activity and content of lysozyme in the homogenate, supernatant and precipitate were measured by a modified method of Kakizaki's turbidimetric assay and the enzyme immuno-assay method of Yuzuriha et al.. The relationships between these values and the clinical findings, such as the GI-score, the DI-score, the pocket depth and the bone loss score, were studied.

The following results were obtained :

1. In the precipitate, the activity and content of lysozyme were found to be 70-80% of those in the homogenate.

2. The activity of lysozyme in the homogenate and precipitate was most stable when measured by the turbidimetric method after 1.5% bovine serum albumin had been added to a 1/15M phosphate buffer

having a 6.0 pH; however, the supernatant was not changed. Further the activity of lysozyme was inhibited by the addition of NaCl to the buffer.

3. Storage of the saliva at -20°C increased the activity of lysozyme in the precipitate and decreased it in the supernatant; however, in the homogenate it remained unchanged.

4. The addition of mucin to whole saliva slight increased the activity of lysozyme in the supernatant. The addition of plaque bacteria to whole saliva inhibited the activity of lysozyme in the homogenate by approximately 20%. The addition of human serum to whole saliva increased the activity of lysozyme in the supernatant approximately five fold.

5. The lysozyme content in the homogenate and precipitate from the diseased group as measured by the enzyme immuno-assay were statistically higher than that from the normal group ($p < 0.05$).

6. No statistically significant correlation between all the measured values and the clinical findings could be found.

緒 言

Fleming¹⁾ によって発見された Lysozyme (EC 3.2.1.17)は、アミノ酸配列²⁾、3 次構造の解明³⁾などにより今日その物理化学的性質がもっとも明らかにされている酵素の 1 つである。その特徴として、分子量が約 14,000⁴⁾、等電点⁵⁾が pH 10.5~11.0 で非常に塩基性の強いタンパク質であり、酸性下では安定であることが知られている。

Lysozyme は、細菌の細胞膜などのムコ多糖を分解するほか、感染防御機能促進^{6,7)}、組織修復促進⁸⁾、膿粘液分解⁹⁾、纖毛運動賦活¹⁰⁾、免疫機能賦活^{11,12)}などの作用が推定されている。

全唾液中の Lysozyme は、大小唾液腺、肉肉溝滲出液、および遊走白血球に由来¹³⁾し、口腔内疾患と密接な関係があるといわれている。

さて、歯周疾患と全唾液中の Lysozyme との関係について、Rovelstad¹⁴⁾、Ferrare¹⁵⁾、Tempestini¹⁶⁾、森本¹⁷⁾、太田¹⁸⁾は、歯周疾患々者の全唾液を遠心処理した上清中の Lysozyme を測定した結果、歯周疾患の進行にともなって減少する傾向があると報告している。また Tempestini¹⁶⁾、Brandtzaeg ら¹⁹⁾、太田¹⁸⁾は、唾液中の Lysozyme 活性の変動が血清中のそれに比べ極めて大きく、かつ不安定であり、さらに個人差が大きいと報告している。また Simmons²⁰⁾、Virella ら²¹⁾、Creeth ら²²⁾は、全唾液中には、Lysozyme と複合体を作ると考えられるムチンが含まれており、全唾液中の Lysozyme は遠心処理した上清中だけでなく、沈渣中にも多量の Lysozyme が存在していることを示唆している。

そこで著者は、全唾液中の Lysozyme 測定にあたって、全唾液をホモジネート唾液、唾液沈渣および唾液上清の 3 画分に分けた。そして従来から行なわれている比濁法²³⁾について種々の検討を加え、改良した活性測定法と Yuzuriha ら²⁴⁾の開発した酵素免疫測定法を用いて、健康者と歯周疾患々者の上記画分中の Lysozyme について測定し、両者ならびに臨床所見との関係について検討した。さらに、唾液中のタンパク量および 2、3、の唾液含有成分の Lysozyme に対する影響についても検討した。

実験の材料と方法

1. 試料の採取と処理

従来の Lysozyme 測定法と全唾液中の Lysozyme の

Fig 1 Procedure for Modified Method of Kakizaki's Turbidimetric Assay

変動を検討するために全唾液を、つぎの 3 つの被検液に分けた。

(1) ホモジネート唾液 安静無刺激全唾液を氷水中の試験管内に採取し、直ちにボルテックスミキサー®にて均一化したもの。

(2) 唾液沈渣 ホモジネート唾液 1 ml を取り、3,000 回転、10 分間遠心処理したときの沈渣を 3% ウシ血清アルブミン含有のリン酸緩衝液 (pH 6.0) で 3 回洗滌し、全量 1 ml になるよう同緩衝液を加えたもの。

(3) 唾液上清 (2) の遠心処理したときの上清。

2. Lysozyme 量の測定法

1) 活性測定法による定量

柿崎²³⁾や太田¹⁸⁾が行なった *Micrococcus lysodeikticus* を基質とする比濁法について、いくつかの予備実験を行い、その結果にもとづいて測定した。

まず 3% ウシ血清アルブミン含有の 1/15 M リン酸緩衝液 (pH 6.0) にてホモジネート唾液および唾液沈渣は各 1,000 倍に、また唾液上清は 200 倍に希釈し、それぞれの測定試料とした。

基質液は、1/15 M リン酸緩衝液に *Micrococcus lysodeikticus* 乾燥粉末菌体 (生化学工業社製) を 0.1% の割合で懸濁させ、分光光電比色計の波長 640 nm で 10% の透過率を示すように調整したものをを用いた。

測定方法は、Fig. 1 に示した。

検量線は、結晶卵白 Lysozyme (エーザイ社製) を用いて作製し、この検量線より被検液中の Lysozyme 活性を卵白 Lysozyme 当量に換算した。

2) 酵素免疫測定法による定量

Yuzuriha ら²⁴⁾の開発した酵素免疫測定法によりタンパク量としての Lysozyme を定量した。本法は、ヒト母乳より高精製した Lysozyme を抗原としその家兎より得られた抗ヒト母乳 Lysozyme 抗体を用いたもので

Fig 2 Procedure for Enzyme Immuno-assay Method of Yuzuriha et al.

ある。

測定方法は、Fig. 2 に示した。

検量線は、ヒト母乳 Lysozyme を用いて測定の都度作製し、この検量線より被検液中の Lysozyme 量をヒト母乳 Lysozyme 当量に換算して示した。

なお、今回の実験に使用したヒト母乳 Lysozyme, 抗ヒト母乳 Lysozyme 抗体、ホースラディッシュペルオキシダーゼ標識抗ヒト母乳 Lysozyme 抗体は杠より提供されたものである。

3) 全唾液の保存実験

全唾液を採取した後、ボルテックスミキサーで均一化したホモジネート唾液を -20°C で凍結保存したものを、活性測定法では0, 1, 3, 8日目に、また酵素免疫測定法では0, 1, 3日目にそれぞれ測定した。なお、0日目は凍結しないものを測定した。

4) 超音波処理

ホモジネート唾液 1.5 ml 中に超音波発生器のチップを入れ、30 KHz, 60 秒間処理した後、前述の試料の採取と処理の項と同様に3つの被検液に分け、測定試料とし、活性測定法によって測定した。

5) 界面活性剤の添加

各測定試料に終濃度 0.1% になるよう Tween 80, Brij 35, Triton X-100 Biosal BBS-2, を添加し、両測定法によって測定した。

6) 酸処理

Petit ら²⁵⁾の方法に準じて行なった。すなわち、全唾液を蒸留水で5倍に希釈し、酢酸にて pH 4.5 に修整して、 100°C 、2 分間インキュベートしたものを酸処理ホモジネート被検液とした。またその一部を 3,000 回転、10 分間遠心処理して、前述の試料の採取と処理の項と同様

に沈渣と上清に分離し、それぞれ酸処理沈渣被検液、酸処理上清被検液とし、両測定法によって測定した。

7) ムチン添加

シグマ社製ウシ顎舌下腺ムチンを卵白 Lysozyme 溶液 (500 μg 卵白 Lysozyme/ml 3% ウシ血清アルブミン含有 1/15 M リン酸緩衝液) およびホモジネート唾液に 4 mg/ml の割合で添加し、活性測定法によって測定した。

8) 培養歯垢細菌の添加

ヒト歯垢をブレインハートインフュージョン寒天培地 (栄研化学社製) にて嫌氣的に 48 時間培養した歯垢細菌を卵白 Lysozyme 溶液およびホモジネート唾液に 20 mg/ml の割合で添加し活性測定法によって測定した。

9) ヒト血清の添加

ヒト血清を卵白 Lysozyme 溶液およびホモジネート唾液に 1:1 の割合で添加し、活性測定法によって測定した。なお、ホモジネート唾液に添加した血清は各被検者のものを用いた。

10) タンパク量の測定

ホモジネート唾液中のタンパク量は、ウシ血清アルブミンを標準とした Hartree 法²⁶⁾ によって測定した。

3. 被検者と臨床所見

1) 被検者

被検者は、臨床的に健康な歯周組織を有する本学歯学部学生および医局員 (健康群) と本学附属病院歯周科を訪れた特定の内科的疾患のないと思われる歯周疾患々者 (疾患群) より選択した。

被検者は、健康群では年齢 23~27 歳の男子 6 名、疾患群では年齢 20~52 歳の男子 5 名、女子 6 名の計 11 名とした。

Fig 3 Effect of Bovine Serum Albumin on Saliva Lysozyme Activity

2) 臨床所見

各被検者の臨床所見は、 $\frac{6}{6} \mid \frac{6}{16}$ 部位についてそれぞれつぎの基準によって、記録した。

(1) 歯垢指数 (DI-S)

Greene-Vermillion²⁷⁾ の OHI-S を参考にして記録し、1 歯当りの平均値で示した。

(2) 歯石指数 (CI-S)

歯垢指数と同様に Greene-Vermillion²⁷⁾ の OHI-S を参考にして記録し、1 歯当りの平均値で示した。

上記の 2 つの指数の範囲は最小値 0，最大値 3 である。

(3) 歯肉炎指数 (GI)

Löe-Silness²⁸⁾ の GI を参考にして記録し、1 歯当りの平均値で示した。指数の範囲は最小値 0，最大値 3 である。

(4) 歯周ポケットの深さ (mm)

目盛付き歯周ポケット測定器を用い、各被検歯を 6 点法によりそれぞれ測定して平均し、さらに 1 歯当りの平均値で示した。

(5) 歯槽骨消失度 (%)

Schei ら²⁹⁾ の歯槽骨消失度の測定法を参考にして、各被検歯の近心側と遠心側の歯槽骨消失度をそれぞれ測定して平均し、さらに 1 歯当りの平均値で示した。

実験成績

1. 活性測定法の検討

1) ウシ血清アルブミン添加による酵素の安定化

Lysozyme が低濃度の場合や均一化操作などの機械的

刺激による酵素の不安定化を防ぐ目的で、測定試料の調整に用いる希釈液に濃度の異なるウシ血清アルブミンを添加した。実験結果は、Fig. 3 に示すように、唾液上清ではほとんど影響はなかったが、ホモジネート唾液および唾液沈渣中の Lysozyme 量は、ウシ血清アルブミン濃度 1% まで急激に上昇し、その後はほとんど変わらずに安定した。この実験結果から終濃度 1.5% になるよう試料希釈用緩衝液に 3% のウシ血清アルブミンを添加した。

2) pH による影響

健康者のホモジネート唾液中の Lysozyme 活性の pH による影響を調べた。実験結果は、Fig. 4 に示すように、pH 6.0 が最大値であったので、試料希釈用と基質調整用緩衝液の pH を 6.0 とした。

3) リン酸緩衝液濃度による影響

健康者のホモジネート唾液中の Lysozyme 活性のリン酸緩衝液による影響について調べた。実験結果は、Fig. 5 に示すように、1/15 M (0.067 M) リン酸緩衝液が最大値の 90% 以上の値を示したので、この濃度の緩衝液を用いた。

4) NaCl 添加による影響

健康者のホモジネート唾液に各濃度の NaCl 添加による影響について調べた。実験結果は、Fig. 6 に示すように、Lysozyme 活性は低下したので本実験では NaCl 添加は行わなかった。

2. 凍結保存による影響

凍結保存による影響は、健康者のホモジネート唾液、唾液沈渣および唾液上清について活性測定法と酵素免疫測定法により測定した。実験結果は、Fig. 7-1, 7-2 に示すように、保存期間に従い、唾液上清中の Lysozyme

Fig 4 pH Dependence of Saliva Lysozyme Activity

Fig 5 Effect of Phosphate Buffer Concentration on Saliva Lysozyme Activity

量は減少し、唾液沈渣中のそれは増加したが、ホモジネート唾液中の Lysozyme 量は保存期間を通じてほぼ一定であった。この実験結果から採取した全唾液は、凍結せずに採取後、直ちに測定した。

3. 健康者および歯周疾患患者の全唾液中の Lysozyme

健康者および歯周疾患患者の各臨床所見、活性測定法と酵素免疫測定法によるホモジネート唾液、唾液沈渣および唾液上清中の Lysozyme 量は Table 1, 2, 3, に示した。

1) ホモジネート唾液中の Lysozyme 量

活性測定法では、健康群は平均 $157.8 \pm 27.1 \mu\text{g/ml}$ 疾患群は平均 $195.0 \pm 59.4 \mu\text{g/ml}$ 、また酵素免疫測定法で

は、健康群は平均 $66.8 \pm 10.4 \mu\text{g/ml}$ 、疾患群は平均 $111.0 \pm 44.4 \mu\text{g/ml}$ であり、両測定法とも疾患群の方が高い値を示した。しかも酵素免疫測定法では、両群の間に危険率 5% で有意差が認められた。さらに Table 7 に示すように両測定法による Lysozyme 量の間に危険率 1% で有意の相関性が認められた。

2) 唾液沈渣中の Lysozyme 量

活性測定法では、健康群は平均 $112.0 \pm 22.0 \mu\text{g/ml}$ 、疾患群は平均 $160.7 \pm 66.0 \mu\text{g/ml}$ 、また酵素免疫測定法では、健康群は平均 $47.3 \pm 8.4 \mu\text{g/ml}$ 、疾患群は平均 $85.0 \pm 37.3 \mu\text{g/ml}$ であり、両測定法とも疾患群の方が高い値を示した。しかも酵素免疫測定法では、健康群と疾患群の間に危険率 5% で有意差が認められた。さらに

Fig 6 Effect of NaCl Addition on Saliva on Lysozyme Activity

Lysozyme activity in homogenate at the start of measurement indicate 100 percent

Fig 7-1 Change of Lysozyme Activity in Homogenate, Precipitate and Supernatant During Storage of Saliva at -20°C

Lysozyme content in homogenate at the start of measurement indicate 100 percent

Fig 7-2 Change of Lysozyme Contents in Homogenate, Precipitate and Supernatant During Storage of Saliva at -20°C

Table 7 に示すように両測定法によるホモジネート唾液
中と唾液沈渣中の Lysozyme 量の間にいずれも危険率
1% で有意の相関性が認められた。

3) 唾液上清中の Lysozyme 量
活性測定法では、健康群は平均 $31.5 \pm 15.4 \mu\text{g/ml}$, 疾
患群は平均 $24.8 \pm 15.9 \mu\text{g/ml}$ であり、健康群の方が高
い値を示した。しかし酵素免疫測定法では健康群は平均
 $10.8 \pm 4.8 \mu\text{g/ml}$, 疾患群は平均 $13.1 \pm 8.9 \mu\text{g/ml}$ であ
り、逆に疾患群の方が高い値を示した。両測定法とも
健康群、疾患群の間に有意差は認められなかった。
Table 7 に示すように両測定法による Lysozyme 量の間
に危険率 1% で有意の相関性が認められた。しかし唾液
上清とホモジネート唾液および唾液沈渣中の Lysozyme
量との間には、いずれも有意の相関性は認められなかつ

た。
4) 全唾液中の Lysozyme 分布
Table 4 に示すように、ホモジネート唾液に対する唾
液沈渣中および唾液上清中の Lysozyme 量の割合は、活
性測定法では、健康群は平均 $71.1 \pm 8.6\%$ と 19.2 ± 5.9
%, 疾患群は $80.4 \pm 15.7\%$ と $12.5 \pm 7.8\%$, また酸素免
疫測定法では、健康群は 69.7 ± 16.7 と $14.7 \pm 4.7\%$, 疾
患群は $77.0 \pm 13.0\%$ と $12.1 \pm 8.6\%$ であった。
両測定法とも健康群と疾患群の間には、有意差は認め
られなかった。
5) 全唾液中のタンパク量
Table 1, 2, 5 に示すように、ホモジネート唾液中のタ
ンパク量は、健康群では $3.0 \pm 0.5 \text{ mg/ml}$, 疾患群では
 $7.7 \pm 2.9 \text{ mg/ml}$ で、疾患群の方が高い値を示し、両群

Table 1 Clinical Findings and Measured Values from Clinically Healthy Subjects

No.	Name	Age	Sex	Clinical findings				Lysozyme (μg/ml)						T.P.(mg/ml)
				DI-S	CI-S	GI	P.D.	H-A	P-A	S-A	H-E	P-E	S-E	
1.		24	M	0.8	0.5	0	1.3	170.0	108.0	32.8	63.0	33.0	6.5	2.5
2.		24	M	0.8	1.0	0	1.3	160.0	132.0	25.6	81.0	46.5	7.5	3.3
3.		24	M	1.3	1.2	0	1.3	140.0	86.0	26.4	57.0	57.0	9.0	2.7
4.		26	M	1.1	0.3	0	1.3	140.0	112.0	27.0	64.5	48.0	12.0	3.1
5.		24	M	1.0	0.3	0	1.4	132.0	92.0	16.0	57.0	45.0	6.3	3.7
6.		27	M	0.3	0.8	0	1.6	205.0	142.5	61.0	78.0	54.0	17.0	2.4

DI-S : Debris index score CI-S : Calculus index score GI : Gingival index
P.D. : Pocket depth (mm) B.L. : Bone loss (%) H-A : Activity of homogenate
P-A : Activity of precipitate S-A : Activity of supernatant H-E : Content of homogenate
P-E : Content of precipitate S-E : Content of supernatant T.P. : Total protein in whole saliva

Table 2 Clinical Findings and Measured Values from Periodontal Diseased Patients

No.	Name	Age	Sex	Clinical findings				Lysozyme (μg/ml)						T.P. (mg/ml)
				DI-S	CI-S	GI	P.D.	B.L.	H-A	P-A	S-A	H-E	P-E	S-E
1.		36	M	1.5	2.8	1.5	4.5	36.0	246.0	232.0	40.4	150.0	133.0	9.3
2.		49	M	0.8	0.3	0.7	2.8	37.8	245.0	212.0	31.6	126.0	96.0	21.0
3.		51	F	0.4	2.0	0.2	1.8	24.2	264.0	226.0	26.8	150.0	102.0	10.5
4.		50	F	1.5	1.7	0.3	1.7	22.7	133.0	128.0	8.2	72.0	63.0	4.6
5.		50	F	0.8	1.0	1.0	1.7	9.4	150.0	110.0	8.0	78.0	51.0	5.0
6.		20	F	1.3	2.2	0.6	1.8	6.9	130.0	108.0	7.2	39.0	34.0	2.5
7.		35	M	0.7	1.7	1.9	4.0	28.8	298.0	268.0	28.8	195.0	156.0	16.5
8.		42	M	1.1	1.2	0.8	1.9	40.9	172.0	124.0	26.8	120.0	120.0	30.0
9.		51	F	1.8	2.0	0.9	3.0	51.0	132.0	52.0	16.4	120.0	63.0	11.5
10.		52	F	1.4	1.3	1.4	2.7	14.1	180.0	140.0	59.6	78.0	54.0	24.5
11.		42	M	1.3	2.0	0.7	5.2	64.3	194.0	168.0	19.2	93.0	72.0	8.5

Table 3 Mean Values of Lysozyme in Homogenate, Precipitate and Supernatant

Lysozyme (μg/ml)		Homogenate	Precipitate	Supernatant
Activity assay	C.H. (n = 6)	157.8 ± 27.1	112.0 ± 22.0	31.5 ± 15.4
	P.D. (n = 11)	195.0 ± 59.4	160.7 ± 66.0	24.8 ± 15.9
Enzyme immuno-assay	C.H. (n = 6)	66.8 ± 10.4 *	47.3 ± 8.4 *	10.8 ± 4.8
	P.D. (n = 11)	111.0 ± 44.4 *	85.0 ± 37.3 *	13.1 ± 8.9

C.H. : Clinical health P.D. : Periodontal disease
* : Significant difference between C.H. and P.D. (p<0.05)

間に危険率1%で有意差が認められた。
また、ホモジネート唾液中の単位タンパク量当りに占める Lysozyme 量の割合は、活性測定法では、健康群は 5.6±1.8%, 疾患群は 2.9±1.3%, また酵素免疫測定法では、健康群は 2.5±0.7%, 疾患群は 1.6±0.5% であって、両測定法とも健康群の方が高い値を示し、2群間の差の検定では、両測定法とも危険率1%で有意差が認められた。

6) 臨床所見との関連

各臨床所見と兩測定法による各被検液中の Lysozyme 量およびホモジネート唾液中のタンパク量の間には、い

Table 4 Mean of Percentage of Lysozyme in Percipitate and Supernatant

(%)		Precipitate Homogenate	Supernatant Homogenate
Activity assay	C.H. (n = 6)	71.1±8.6	19.2±5.9
	P.D. (n =11)	80.4±15.7	12.5±7.8
Enzyme immuno- assay	C.H. (n = 6)	69.7±16.7	14.7±4.7
	P.D. (n =11)	77.0±13.0	12.1±8.6

ずれも有意の相関性は認められなかった。

4. 超音波処理, 界面活性剤の影響

Table 6 に示すように, 活性測定法では, 超音波処理と界面活性剤の Tween 80 と Brij 35 による大きな変化は認められなかった。しかし, 界面活性剤の Triton X-100 は, ホモジネート唾液に対して約 50 % の活性阻害が認められ, また Biosal BBS-2 は被検液を混濁させた。

5. 酸処理による影響

Fig. 8-1, 8-2 に示すように, 酸処理によりホモジネート唾液中の Lysozyme は約 20 % 減少した。唾液沈渣中の Lysozyme は減少し, ホモジネート唾液に対する割合は, 約 70 % から約 25 % に減少した。唾液上清中の Lysozyme は増加し, ホモジネート唾液に対する割合も約 20 % から約 70 % に増加した。

Table 5 Mean Values of Protein Contents in Saliva and Percentage of Lysozyme in Homogenate to Protein Contents

	Total protein (mg/ml)	$\frac{\text{H-A}}{\text{Total protein}} (\%)$	$\frac{\text{H-E}}{\text{Total protein}} (\%)$
C.H. (n = 6)	3.0±0.5 * *	5.6±1.8 * *	2.5±0.7 * *
P.D. (n =11)	7.7±2.9 * *	2.9±1.3 * *	1.6±0.5 * *

** : Significant difference between C.H. and P.D. (p<0.01)

Table 6 Effect of Ultrasonics and Detergent on Lysozyme

Activity (%)		—	Ultrasonics 30kHz, 60sec	Tween 80 0.1 %	Brij 35 0.1 %
	Homogenate	100	100.4	107.3	91.7
	Supernatant	100	79.2	106.9	99.0
	Precipitate	100	96.4	105.7	116.7
E.I.A.(%)	Homogenate	100	—	51.7	25.4

E.I.A. : Enzyme immuno-assay

Table 7 Analysis of Correlation between Measured Values Each Other

H-A	0.9488**	0.4255	0.8473**	0.7531**	0.3680	0.4795
	P-A	0.2860	0.7795**	0.7404**	0.2498	0.4641
		S-A	0.1501	0.0688	0.6562**	0.1929
			H-E	0.9075**	0.4037	0.6893**
				P-E	0.4847*	0.5995*
					S-E	0.4275
						T.P.

* : p<0.05

** : p<0.01

Lysozyme activity in homogenate at no treatment indicate 100 percent

Fig 8-1 Effect of Acid Treatment on Lysozyme Activity

Lysozyme content in homogenate at no treatment indicate 100 percent

Fig 8-2 Effect of Acid Treatment on Lysozyme Contents

Egg white lysozyme : Lysozyme activity in homogenate after addition indicate 100 percent

Whole saliva lysozyme : Lysozyme activity in homogenate before addition indicate 100 percent

Fig 9 Effect of Mucin Addition on Egg White Lysozyme Activity and Saliva Lysozyme Activity

Egg white lysozyme : Lysozyme activity in homogenate after addition indicate 100 percent

Whole saliva lysozyme : Lysozyme activity in homogenate before addition indicate 100 percent

Fig 10 Effect of Plaque Bacteria Addition on Egg White Lysozyme Activity and Saliva Lysozyme Activity

6. ムチンによる影響

Fig. 9 に示すように、卵白 Lysozyme にウシ顎舌下腺ムチンを 4 mg/ml の割合で添加した場合には、ホモジネート被検液中の Lysozyme 活性は 106.3% になった。この場合のホモジネート被検液中の Lysozyme に対する遠心沈渣中のその割合は 51.7%，遠心上清中の割合は 44.8% であった。

ホモジネート唾液にウシ顎舌下腺ムチンを同じく 4 mg/ml の割合で添加した場合には、添加前の値に比べてホモジネート唾液中の Lysozyme 活性は 90.4% であった。この場合のホモジネート唾液中の Lysozyme に対する唾液沈渣中の割合は 77.8% から 61.3% に減少し、逆に唾液上清中の割合は 16.5% から 27.8% に増加した。

なお、ウシ顎舌下腺ムチンには、Lysozyme 活性は認められなかった。

7. 培養歯垢細菌による影響

Fig. 10 に示すように、卵白 Lysozyme 溶液に嫌氣的に培養したヒト歯垢細菌を 20 mg/ml の割合で添加した場合には、ホモジネート被検液中の Lysozyme 活性に対する遠心沈渣中のその割合は 32.6% であった。

ホモジネート唾液に同じくヒト歯垢細菌を 20 mg/ml の割合で添加した場合には、ホモジネート唾液中の Lysozyme 活性は 85.8% に減少した。この場合のホモジネート唾液中の Lysozyme 活性に対する唾液沈渣中のその割合は 77.9% から 84.3% になり、唾液上清中のその割合は 12.2% から 5.2% に減少した。

なお、添加したヒト歯垢細菌中には Lysozyme 活性は認められなかった。

8. ヒト血清による影響

Fig. 11 に示すように、卵白 Lysozyme 溶液にヒト血清を 1:1 の割合で添加した場合には、ホモジネート被検液中の Lysozyme 活性は 97.7% とほとんど変りなかつた。

Fig 11 Effect of Human Serum Addition on Saliva Lysozyme Activity

った。また、この被検液を3,000回転、10分間遠心処理しても沈渣は認められなかった。

ホモジネート唾液中にヒト血清を同じく1:1の割合で添加した場合には、ホモジネート唾液中のLysozyme活性は92.3%に減少した。この場合のホモジネート唾液中のLysozyme活性に対する唾液沈渣中のその割合は75.7%から31.3%に減少し、唾液上清中のその割合は8.1%から63.7%に増加した。

さらに100°C、20分間の前処理をした血清の遠心処理上清を添加した場合にも同様の影響がみられた。

なお、添加したヒト血清中のLysozymeは平均4.4 µg/mlであった。

考 察

全唾液は、耳下腺、舌下腺、顎下腺などからの分泌液のほか、口腔内微生物やその産生物、血液、剝離細胞、歯肉溝滲出液、食物残渣などを含んでいる。従って唾液中Lysozymeは唾液成分やその他の含有物によって、また測定にあたって唾液の採取方法、処理方法、保存方法などによって影響されやすいことが考えられる。

Simmons²⁰⁾、Brandtzaegら¹⁹⁾、Virellaら²¹⁾は唾液中のLysozyme活性は遠心処理しない唾液の方が唾液上清よりも約2倍高く、また唾液中のムチンは上清中のLysozyme活性を低下させると報告している。Brandtzaegら¹⁹⁾、太田¹⁸⁾は、唾液中のLysozyme活性は血清のそれに比べてバラツキが大きく、不安定であると報告している。

そこで著者は、まず唾液中Lysozymeの安定化について比濁法による活性測定法によって検討した。その結果、希釈液として従来の1/15 M リン酸緩衝液を用いた

場合と終濃度1.0% ウシ血清アルブミン添加の1/15 M リン酸緩衝液を用いた場合を比較すると、Lysozyme活性はホモジネート唾液中では後者の方が約2倍高い値を示し、唾液沈渣では約3倍高い値を示したが、唾液上清ではほとんど変化を示さなかった。しかもホモジネート唾液中Lysozyme活性に対する唾液沈渣中と唾液上清中Lysozyme活性の和の割合について比較すると、緩衝液にウシ血清アルブミンを添加しなかった場合は57.9±15.5%であったが、ウシ血清アルブミンを添加した場合は100.3±3.8%で活性値のバラツキも少なく、安定していた。この結果から唾液中Lysozymeの測定には、ウシ血清アルブミン添加の1/15 M リン酸緩衝液を用いた方がバラツキが少なく、安定した値が得られることが判明した。

太田¹⁸⁾はpH 6.2で、またBrandtzaegら¹⁹⁾はpH 7.0でヒト唾液中のLysozyme活性を比濁法により測定しているが、とくに唾液中のLysozymeの至適pHについては述べていない。Kimuraら⁴⁾は、ヒト母乳中および白血球中より精製したLysozymeの至適pHについて、pH 6.2と8.0にピークを持つ2相性を示すと報告している。

著者は、ホモジネート唾液を試料として唾液中Lysozymeの至適pHを調べたところ、ピークはpH 6.0にみられ、pH 8.0付近にはみられなかった。これは唾液中のLysozymeが母乳中および白血球中Lysozymeとは由来を異にしているか、あるいは唾液中の他の成分と結合して表面荷電が変化しているかによるものと推察される。

日根ら³⁰⁾は、NaClがLysozymeに対して活性促進作用があり、その至適濃度は10⁻¹~10⁻² Mにあると報告している。しかし著者のホモジネート唾液中のLysozymeに対する実験では、NaCl濃度が高くなるに従ってLysozyme活性が阻害され、日根らの報告とは異なっていた。

採取後の全唾液において、唾液上清中のLysozymeは経日的に減少し、逆に唾液沈渣中のLysozymeは経日的に増加した。この結果は保存期間中も唾液中のLysozymeと唾液中の他の成分または含有物と複合体を形成する反応が持続していたものと考えられる。唾液上清中のLysozymeの保存期間中の減少については、太田¹⁸⁾、Virellaら²¹⁾も同様の結果を報告している。しかし、著者の実験結果から、単位唾液量当りのLysozyme総量は減少していなかった。このことは両測定法により同じ結果が得られたので、唾液中のLysozymeはその

保存期中に活性中心や抗原認識部位に対して影響を受けなかったと考えられる。

以上、著者の実験結果から、従来の唾液上清中の Lysozyme の測定だけでは、唾液中の Lysozyme 量の動態を明らかにすることはできない。また唾液を3分画しても従来の比濁法による活性測定では沈渣中の Lysozyme 活性を十分に測定することはできない。これらの欠点を補うためには、リン酸緩衝液にウシ血清アルブミンを添加することによって、ホモジネート唾液中と唾液沈渣中の Lysozyme 活性の安定を得ること、そしてさらにリン酸緩衝液の pH を 6.0 にすることが必要である。

なお、この改良活性測定法によって超音波処理したり、数種類の界面活性剤を添加した唾液中の Lysozyme 活性を測定した結果、活性は上昇しなかったが、界面活性剤の中には活性を阻害するものがみられた。

以上の結果から、他の処理や添加を行わずに、全唾液中の Lysozyme のほとんどが測定できるものと考えられる。

両測定法について、著者の実験結果から得られた唾液中 Lysozyme 量は、活性測定法で得られた値の方が酵素免疫測定法で得られた値より 2～3 倍高い値を示した。このことについて、Kimura ら⁴⁾は、ヒト母乳中および白血球中 Lysozyme が卵白 Lysozyme に比べ 2～3 倍の活性があると報告している。この報告から、もしヒト唾液中の Lysozyme も卵白 Lysozyme に比べて高い比活性があると考えれば、著者の実験において卵白 Lysozyme 当量で表わした活性測定法での値が酵素免疫測定法での値よりも 2～3 倍高い値を示したことは妥当な結果であると考えられる。そのほか、細菌由来の Lysozyme や Lysozyme 様活性を示す唾液中の含有物によって活性測定法の方が高い値を示したことも考えられる。

歯周疾患と唾液中の Lysozyme との関係について、著者の実験では、ホモジネート唾液および唾液沈渣中の Lysozyme 量は、両測定法とも疾患群の方が健康群よりも高い値を示した。しかし Helderma³¹⁾は、無刺激全唾液（ホモジネート唾液）を lyso-plate 法で測定した結果、歯周疾患の進行に従い、Lysozyme 量は減少したと報告しており、著者とは逆の結果を示している。

唾液上清中の Lysozyme は、活性測定法では健康群の方が疾患群より高い値を示したが、酵素免疫測定法では疾患群の方が健康群よりも高い値を示したこと、また唾液上清中の Lysozyme 量とホモジネート唾液中のそれとの間に有意の相関性がなかったことから、唾液上清中の Lysozyme が歯周疾患の変化を反映しているとは

考えられない。

全唾液中の Lysozyme の大部分は、遠心処理した沈渣中に存在していることが判明したので、全唾液中の成分や含有物との関係について検討した。

まず酸処理後、唾液上清中へ遊離してくる Lysozyme が増加したことから、Lysozyme と複合体を形成している物質は、酸処理により破壊されるような物質であると考えられる。そのような物質として考えられているものに、ムチンがある。ムチン中で比較的破壊されやすいシアル酸の部分が酸処理により破壊され、その結果、その部分に結合していた Lysozyme が遊離したためと推察される。

Helderma³¹⁾は、豚胃粘膜ムチン、歯垢細菌、血清の全てに遊離の Lysozyme を遠心沈渣に移行させる働きがあり、さらに Lysozyme 活性を約 70% 阻害すると報告している。しかし、著者の精製卵白 Lysozyme に対しての実験結果から、ウシ顎舌下腺ムチンは遊離している Lysozyme の一部を遠心沈渣中へ移行させる働きはあるが、Lysozyme 活性を阻害する働きはないと考えられる。また培養歯垢細菌は Lysozyme の一部を遠心沈渣中へ移行させ、活性の一部を阻害するように考えられ、さらにヒト血清は影響しないと考えられる。Helderma³¹⁾との違いは、測定法と添加した材料の違いや牛血清アルブミンの影響ではないかと考えられる。

さらに著者の全唾液中の Lysozyme に対するムチン、歯垢細菌、血清の影響は、卵白 Lysozyme に対するそれらの影響とは異なっていた。すなわち、ウシ顎舌下腺ムチンの添加によって、約 10% のホモジネート唾液中の Lysozyme 活性が阻害され、唾液沈渣中の Lysozyme 活性も減少し、唾液上清中へ遊離してくる Lysozyme が増加した。また血清添加によって、ホモジネート唾液中の Lysozyme 活性はほとんど変わらなかったが、唾液上清中へ遊離してくる Lysozyme は増加し、逆に唾液沈渣中 Lysozyme は減少した。これらの違いは、単に卵白 Lysozyme と唾液 Lysozyme の違いによるだけでなく、全唾液中には種々の成分が存在しているため、緩衝液中に溶かした卵白 Lysozyme に対するのとは異なる作用を示したと考えられる。血清添加によって唾液上清中の Lysozyme が増加したことは、血清中に増加させるような何らかの因子の存在が推察される。このような因子は血清を 100°C、20 分間処理した後も存在していることから血清タンパク以外の成分ではないかと考えられる。

培養歯垢細菌は唾液中 Lysozyme の活性を阻害した

が、唾液沈渣中の Lysozyme 活性の減少に比べ唾液上清中の活性の減少の方がはるかに多かったことから、歯垢細菌は全唾液中に遊離している Lysozyme に対してその活性を阻害すると考えられる。

結 論

1) 全唾液中の Lysozyme は、唾液沈渣中に 70~80 %, 唾液上清中に約 15% 含まれており、大部分は唾液沈渣中に含まれていた。

2) 活性測定法によるホモジネート唾液、唾液沈渣および唾液上清中の Lysozyme 測定には、緩衝液として終濃度 1.5% ウシ血清アルブミン含有の 1/15 M リン酸緩衝液 pH 6.0 を用いたときに最も安定していた。しかしホモジネート唾液に NaCl を添加すると、活性は阻害された。

3) 唾液を凍結保存すると、両測定法とも保存期間に従って唾液沈渣中の Lysozyme は増加し、逆に唾液上清中のそれは減少したが、ホモジネート唾液はほぼ一定であった。

4) 健康群と疾患群について

(1) ホモジネート唾液中の Lysozyme 量は、両測定法とも疾患群の方が高い値を示した。とくに酵素免疫測定法では両群の間に危険率 5% で有意差が認められた。

(2) 唾液沈渣中の Lysozyme 量は両測定法とも疾患群の方が高い値を示した。とくに酵素免疫測定法では両群の間に危険率 5% で有意差が認められた。

(3) 唾液上清中の Lysozyme 量は、活性測定法では健康群の方が、また酵素免疫測定法では疾患群の方が高い値を示した。

5) ホモジネート唾液中の Lysozyme に対する唾液沈渣中のその割合は、両測定法とも疾患群の方が高かった。

6) ホモジネート唾液中のタンパク量は、疾患群の方が高い値を示し、両群の間に危険率 1% で有意差が認められた。

また、ホモジネート唾液中の単位タンパク量当りに占める Lysozyme 量の割合は、両測定法とも健康群の方が高く、両群の間に危険率 1% で有意差が認められた。

7) 各臨床所見と Lysozyme 量およびタンパク量との間には、有意の相関性は認められなかった。

8) 前処理による Lysozyme の影響について

(1) 両測定法とも超音波処理による影響は受けなかった。

(2) 希釈用緩衝液に界面活性剤 Tween 80, Brij 35 を添加すると、活性測定法では影響されなかったが、酵素免疫測定法では阻害された。

9) 全唾液を酸処理すると、ホモジネート唾液中の Lysozyme は約 20%, 唾液沈渣中のそれは約 50% 減少したが、唾液上清は 3~6 倍に増加した。

10) 全唾液にウシ顎舌下腺ムチンを添加すると、ホモジネート唾液中の Lysozyme 活性は約 10% 減少し、この場合のホモジネート唾液中の Lysozyme 活性に対する唾液沈渣中のその割合も減少したが、逆に唾液上清中のその割合は増加した。

11) 全唾液に嫌氣的に培養した歯垢細菌を添加すると、ホモジネート唾液中の Lysozyme 活性は約 15% 減少し、この場合のホモジネート唾液中の Lysozyme 活性に対する唾液沈渣中のその割合はほとんど変らなかったが、唾液上清中のその割合は減少した。

12) 全唾液に血清を添加すると、ホモジネート唾液中の Lysozyme 活性はほとんど変らなかったが、ホモジネート唾液中の Lysozyme 活性に対する唾液沈渣中のその割合も減少したが、唾液上清中のそれは大幅に増加した。

謝 辞

稿を終るに臨んで、終始熱心なご指導とご校閲を頂いた恩師中静正教授に深く感謝致します。さらにいろいろご助言を頂いた生化学教室飯塚憲一博士に深く感謝致しますとともに試料採取にご協力を頂いた教室員諸兄に感謝致します。合せて、酵素免疫測定の方法を提供していただいたエーザイ研究室杠博士に深謝致します。

文 献

- 1) Fleming, A. : On a remarkable bacteriolytic element found in tissues and secretion, Proc. Roy. Soc., 93 : 306-317, 1922.
- 2) Jolles, J., Adell, J.J. and Jolles, P. : Preliminary contribution to the study of the disulfide bonds in hen's egg-white lysozyme, Biochim. Biophys. Acta, 71 : 488-490, 1963.
- 3) Blake, C.C.F., Koenig, D.F., Mair, G.A., North, A.C.T., Phillips, D.C. and Sarma, V.R. : Structure of hen egg-white lysozyme, Nature, 206 : 757-761, 1965.
- 4) Kimura, M., Otaki, N., Murayama, K., Ogawa, H. and Kobayashi, S. : Study on lysozyme III Isolation and characterization of human milk

- and leucocytes lysozymes, *Ind. Health*, 8 : 22-30, 1970.
- 5) Alderton, G., Ward, W.H. and Fevold, H.L. : Isolation of lysozyme from egg white, *J. Biol. Chem.*, 157 : 43-58, 1944.
 - 6) Inoue, K., Tanigawa, Y., Takubo, M., Satani, M. and Amano, T. : Quantitative studies on immune bacteriolysis, *Biken's Journal*, 2 : 1-20, 1959.
 - 7) 犬養恭四郎, 内山幸昌 : リソゾームの眼科的応用, *臨床眼科*, 25 : 1312-1323, 1971.
 - 8) Takaoka, T., Katuta, H., Ishiki, S. and Konishi, T. : Effect of lysozyme on the proliferation of fibroblasts in tissue culture, *Japan. J. Exp. Med.*, 42 : 221-232, 1972.
 - 9) 今村忠司, 齊藤 等, 川本 智, 鈴木政昭 : 副鼻腔膿性分泌物に関する組織化学的研究, *耳鼻臨床*, 61 : 748-755, 1968.
 - 10) 中村一壽 : 腺毛機能よりみた慢性副鼻腔炎の局所薬物療法に関する研究, *耳鼻臨床*, 61 : 1135-1155, 1968.
 - 11) 難波祐三郎, 小松靖広, 日高義雄, 滝 和夫, 守本富昭 : 溶菌酵素の新しい生理活性, *医学のあゆみ*, 111 : 154-156, 1979.
 - 12) Jolles, P. : A possible physiological function of lysozyme, *Biomedicine*, 25 : 275-276, 1976.
 - 13) Reitamo, S., Klockars, M., Adinolfi, M. Osserman, E.F. : Human lysozyme, *La Ricerca Clin. Lab.*, 8 : 211-231, 1978.
 - 14) Rovelstad, G.H. et al. : The hyaluronidase activity of saliva. (2) The relationship of hyaluronidase activity to dental caries experience, gingivitis and oral hygiene in young male adults, *J. Dent. Res.*, 37 : 114-118, 1958.
 - 15) Ferrare, R. : Il Lisozima carie et nelle Paradenzipatie, *Annali di Stomatologia*, 369-375, 1960.
 - 16) Tempestini, O. : Cotenuto del lisozima salivare in individui affetti da paradenziopatie prima e dopo trattamento con lisozima, *Atti II Symposium Inter. sul Lisozima X VII Milano*, 1961.
 - 17) 森本清治 : 唾液の酵素学的研究, 歯槽膿漏患者混合唾液の腺溶能および Lysozyme 活性について, *名市大医学会雑誌*, 17 : 875-881, 1967.
 - 18) 太田紀雄 : 歯周疾患における Lysozyme 活性の消長に関する研究, *日歯周誌*, 13 : 15-47, 1971.
 - 19) Brandtzaeg, P. and Mann, W.V.Jr. : A comparative study of the lysozyme activity of human gingival pocket fluid, serum and saliva, *Acta Odont. scand.*, 22 : 443-455, 1964.
 - 20) Simmons, N.S. : Studies on the defense mechanisms of the mucous membranes with particular reference to the oral cavity, *Oral Surg.*, 5 : 513-526, 1952.
 - 21) Virella, G. and Goudswaard, J. : Measurement of salivary lysozyme, *J. Dent. Res.*, 57 : 326-328, 1978.
 - 22) Creeth, M., Bridge, J.L. and Horton, J.R. : An interaction between lysozyme and mucus glycoproteins, *Biochem. J.*, 181 : 717-724, 1979.
 - 23) 柿崎善明 : 糞便 lysozyme 測定法に関する研究, 特にアセトン処理菌体を基質とする新測定法, *日内会誌*, 48 : 591-598, 1959.
 - 24) Yuzuriha, T., Katayama, K., Tsutsumi, J. and Kimura, M. : Sensitive immunoassays for the measurement of human lysozyme, *Chem. Pharm. Bull.*, 27 : 2802-2806.
 - 25) Petit, J.F. and Jolles, P. : Purification and analysis of human saliva lysozyme, *Nature*, 200 : 168-169, 1963.
 - 26) Hartree, E.F. : Determination of protein. A modification of the Lowry method that gives a linear photometric response, *Analytical Biochem.*, 48 : 422-427, 1972.
 - 27) Greene, J.C. and Vermillion, J.R. : The simplified oral hygiene index, *J.A.D.A.*, 68 : 7-13, 1964.
 - 28) L, H. and Silness, J. : Periodontal disease in pregnancy 1. Prevalance and severity, *Acta Odont. Scand.*, 21 : 533-551, 1963.
 - 29) Schei, O., Waerhung, J., Lovdal, A. and Arno, A. : Alveolar bone loss as related to oral hygiene and age, *J. Periodont.*, 30 : 7-16, 1959.
 - 30) 日根其二, 森川道也 : 慢性副鼻腔炎上顎洞粘膜の Lysozyme 活性 (Lysozyme 測定法に関する考察), *耳喉*, 37 : 887-894, 1965.
 - 31) Helderman, W.H.P. : Lysozyme concentrations in the gingival crevice and at other oral sites in human subjects with and without gingivitis, *Archs. Oral Biol.*, 21 : 251-255, 1976.