

氏名	多田徹
授与した学位	博士
専攻分野の名称	歯学
学位授与番号	博乙第 3398号
学位授与の日付	平成11年9月30日
学位授与の要件	博士の学位論文提出者(学位規則第4条第2項該当)
学位論文題名	ヒト耳下腺唾液のリン酸カルシウム結晶成長抑制タンパクに関する研究
論文審査委員	教授 村山洋二 教授 鈴木一臣 教授 渡邊達夫

## 学位論文内容の要旨

### 【緒言】

唾液はハイドロキシアパタイトに対して過飽和であるにもかかわらずリン酸カルシウムの沈殿は起こらない。それは、唾液に含まれる、カルシウム結合タンパク(スタセリン, ヒスタチン, および高プロリン含有タンパク(PRPs))がリン酸カルシウムの結晶成長を抑制するためと考えられている。しかし、これらの唾液タンパクの抑制能については定量化されていない。

本研究の目的は、リン酸カルシウム結晶成長抑制能を定量化する方法を確立し、ヒト耳下腺唾液タンパクの性質をリン酸カルシウム結晶成長抑制能の面から調べることである。

### 【材料ならびに方法】

#### 1. リン酸カルシウム結晶成長の定量法

##### (1) Grön と Hay(1976)の方法

ハイドロキシアパタイトの結晶を 1mg/ml となるように懸濁した 50mM イミダゾール緩衝液 0.25ml と 11mM リン酸塩溶液 2.5ml の混合液に、24mM カルシウム溶液( $\text{CaCO}_3$  を HCl で溶解後、イミダゾール緩衝液で希釈したもの)0.5ml とイミダゾール緩衝液または唾液試料 0.25ml を混合したものを添加し、25℃で反応させた。

##### (2) Grön と Hay の方法の改良法

$\text{CaCO}_3$  を HCl で溶解したカルシウム溶液の代わりに、 $\text{CaCl}_2$  を 125mM イミダゾール緩衝液に溶解したものを使用した。また、リン酸塩溶液、カルシウム溶液、125mM イミダゾール緩衝液に溶存する気体を  $\text{N}_2$  に置換した。

##### (3) リン酸カルシウム析出量の測定

前述の2つの方法で反応させた後、生じた沈殿物を  $\phi = 0.45 \mu\text{m}$  セルロースメンブレンフィルターで濾過し、濾液のカルシウム濃度を原子吸光分析法により測定した。反応後の濾液のカルシウム濃度と初期濃度との差をリン酸カルシウム析出量とした。

#### 2. ヒト耳下腺唾液のリン酸カルシウム結晶成長抑制タンパクの精製

##### (1) 唾液採取

健康成人の耳下腺開口部より刺激唾液を吸引採取した。採取した唾液(約 2L)の遠心上清を蒸留水で透析し、凍結乾燥後 -20℃で保存した。使用する直前に緩衝液に溶解した。

## (2) リン酸カルシウム結晶成長抑制タンパクの分画

Hay の方法(1975)に従って、ヒト耳下腺唾液中から陰イオン交換クロマトグラフィー(DEAE Sephadex<sup>®</sup> A-25), ゲル濾過クロマトグラフィー(Biogel<sup>®</sup> P-10 medium)によって、スタセリン, ヒスタチン, PRPs を分画した。

### 3. タンパクの定量

Lowry らの方法を改良した Hartree の方法(1972)に従った。標準タンパクは牛血清アルブミンを用いた。

### 4. 電気泳動

Schagger と von Jagow の方法(1987)に準じた電気泳動を行った。

#### 【結果】

1. リン酸カルシウム結晶成長の定量化において Grøn と Hay の方法を、(1)溶存気体を N<sub>2</sub> に置換したカルシウム溶液, リン酸塩溶液, およびイミダゾール緩衝液を使用する, (2)CaCl<sub>2</sub> をイミダゾール緩衝液に溶解したカルシウム溶液を用いる, (3)イミダゾール緩衝液の濃度を 125mM とすることにより測定感度は 1.6 倍に上昇し, かつ変動係数は 1/25 に下がった。
2. ヒト耳下腺唾液試料, スタセリン, および PRPs のカルシウム析出抑制量は, 反応開始後 30 分までほぼ直線的に増加し, かつ反応時間 30 分において量-反応関係が得られた。
3. ヒト耳下腺唾液試料のカルシウム結晶成長抑制能を 1 とすると, スタセリン: 17.35, ヒスタチン: 0.10 および PRPs: 1.23 であった。

#### 【考察】

唾液のリン酸カルシウム結晶成長抑制物質の活性測定法として, 従来, Grøn と Hay の方法が用いられてきた。しかし, この方法は測定結果にばらつきが大きく, 再現性に問題があった。そこで本研究では活性測定法の確立をはじめに試みた。

リン酸カルシウム結晶成長抑制能を定量化するためには, 1)過飽和溶液からのリン酸カルシウム結晶析出量を一定にさせること, 2)結晶成長抑制能について量-反応関係が得られること, という2つの問題を解決しなければならない。

使用溶液に溶存する気体を N<sub>2</sub> で置換すること, CaCl<sub>2</sub> を使用すること, および緩衝液の濃度を規定することでリン酸カルシウムの析出量に再現性をもたすことができた。リン酸カルシウムの析出は溶液の pH に依存することから, この改良法では反応系の pH の変動を少なくすることができたと考えられる。改良した実験系に, 唾液試料を添加すると, リン酸カルシウムの析出が抑制された。唾液によるカルシウム析出抑制量は 30 分まで時間依存性に, ほぼ直線的に増加し, しかも, 量-反応関係が得られた。以上の改良により, タンパクのカルシウム結晶成長抑制能を定量化することができた。

唾液タンパクは, リン酸カルシウム結晶成長を抑制するが, それぞれの単位タンパク量あたりの抑制能を比較することができた。その結果, スタセリンは PRPs の 14 倍高い抑制能をもつことが示された。

#### 【結論】

1. ヒト耳下腺唾液タンパクのリン酸カルシウム結晶成長抑制能の定量法を確立した。
2. 各唾液タンパクのリン酸カルシウム結晶成長抑制能は, 反応開始後 30 分ではスタセリン, PRPs の順に高かった。一方, ヒスタチンは反応開始後 90 分以降でカルシウム析出を抑制した。

## 論文審査結果の要旨

本研究は、ヒト耳下腺唾液タンパクの性状を、リン酸カルシウム結晶成長抑制能の定量法を新たに確立し、結晶成長抑制能の面から調べたものである。

ヒト耳下腺唾液のリン酸カルシウム結晶成長抑制能は以下の実験条件を設定することによって定量化することができた。1) 溶存気体を  $N_2$  で置換したカルシウム溶液、リン酸塩溶液、イミダゾール緩衝液を使用する、2)  $CaCl_2$  をイミダゾール緩衝液に溶解したカルシウム溶液を使用する、3) イミダゾール緩衝液の濃度は  $125mM$  とする。本方法では、従来の測定感度を 1.6 倍上げ、そして変動係数を  $1/25$  にし得た。

この測定法を用いて、以下の結果を得た。

1. ヒト耳下腺唾液のリン酸カルシウム結晶成長抑制能は、反応開始後 30 分まで時間依存性に高まり、かつ直線的な量-反応関係を示した。
2.  $25^{\circ}C$ でのリン酸カルシウム結晶成長反応開始後 30 分での、精製したカルシウム結合タンパクの抑制能は、粗なヒト耳下腺唾液を 1 とした時、スタセリン：17.35、高プロリン含有タンパク：1.23、およびヒスタチン：0.10 であった。
3. スタセリン、および高プロリン含有タンパクは反応開始後 30 分で抑制能が最大となったが、ヒスタチンでは 90 分以降から抑制がみられた。

結論は次の通りである。

1. リン酸カルシウム結晶成長抑制能を定量化したことにより、由来を一にするヒト耳下腺唾液タンパク相互の作用を比較することが可能となった。
2. 本研究は、個体毎の構成各唾液タンパクの相対的性状をリン酸カルシウム結晶成長抑制能の面から示した。

以上のことより、審査委員は一致して本論文は博士（歯学）の学位を与える基準を満たしているものと判定した。