

唾液の成分：酸性ホスファターゼ（血清との比較）

三橋百合子*、植田 伸夫**

帝京短期大学ライフケア学科臨床検査専攻*
介護老人保健施設エスコートタウン静清**

Component of saliva : Acid phosphatase
(comparison with serum)

Yuriko Mitsuhashi, Nobuo Ueta

Teikyo Junior College *
Long-Term CareHealth Facility "Escort-town Seisei" **

要 旨

Acid phosphatase (ACP) in saliva was analyzed.
Saliva ACP activities of healthy persons were higher than serum ACP. It was about 6 times in average.
Saliva ACP activities were big difference among individuals and distributed in logarithmic normal.
Tartaric acid check, optimum pH of saliva ACP were simila to these of prostate ACP but the molecular weight of saliva ACP was smaller than that of prostate ACP.
Chemical hindering tests were introduced that the origin of saliva ACP was not singular.

唾液中の酸性ホスファターゼ（ACP）の分析をした。
健常人の唾液 ACP の活性値は血清 ACP より高く、平均値で約 6 倍の値であった。
唾液 ACP 活性は個人差が大きく対数正規分布を示した。
酒石酸による阻害、至適 pH は前立腺 ACP と似ていたが分子量は前立腺 ACP より小さかった。
薬剤耐性試験の結果、唾液 ACP は単一のものではないことを示した。

【緒 言】

酸性ホスファターゼ（Acid phosphatase ; EC3.1.3.2 以下 ACP と略す）はリン酸モノエステルを基質とし、酸性側に至適 pH (pH5付近) をもつ分子量約10万の加水分解酵素である。

ヒトではほとんどの細胞で発現している。健常人血清には由来の異なる ACP が混在する。その約1/3は血小板由来、約2/3は破骨細胞由来である。前立腺由来の ACP はごく僅かに認められる程度であるが、前立腺癌で血中に増加することより、古くから前立腺障害のマーカーとして臨床の場で利用されてきた。

唾液の成分が血液成分と様々な点で異なることを報告してきたが、今回は唾液 ACP についての所見を血清と比較検討したので報告する。

【方 法】

1) 材 料

唾液は自然流出の混合唾液を使用した。採取前に水で口腔内をゆすいだ後、脱脂綿を口に流れ出る唾液を含ませた後、注射器に脱脂綿を移し内筒で押し出した唾液を使用した。今回の唾液採取は健常人を対象にした。

また ACP は赤血球中に多量に存在することから、使用した唾液は尿潜血反応試験紙で潜血陰性のチェックをした。

血清は唾液を採取した同一健常人のものを使用した。

2) 測定法

① ACP の総活性値はフェニルリン酸法（酸性ホスファ K・テスト（和光純薬株式会社）を使用し測定した。測定原理¹⁾を図1に示す。測定法は現在主流の方法ではなく測定当時の基質を使用

した測定法なので ACP 活性値の単位は K-A 単位 (king-Armstrong 単位) を使用する。

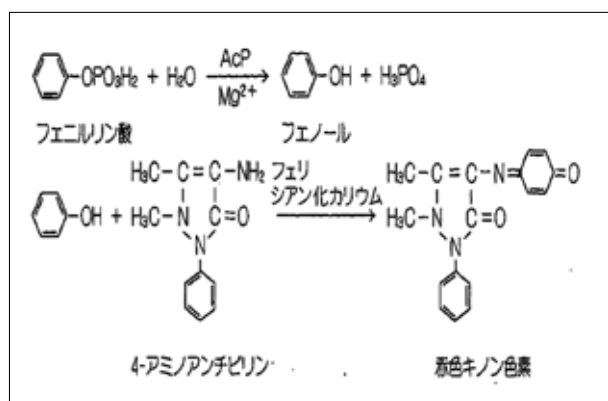


図 1. 酸性ホスファターゼ測定の原理

- ②唾液 ACP の至適 pH 測定は McIlvaine 緩衝液と炭酸 - 重炭酸緩衝液にて行った。
- ③ ACP のアイソザイム分析は電気泳動法を行った。支持体は寒天ゲル膜 (セルロゲル)、電気泳動用緩衝液は pH5.2 の酢酸緩衝液、通電は 180V、40 分行い、泳動後の染色はリンパ球染色で使用される Fast garnet GBC 法で行った。
- ④ ACP のカラムクロマトグラフィー分析はセファクリル S-200 を充填剤とし、pH4.9 のクエン酸緩衝液を加えて溶出した分画液について総蛋白濃度と ACP 活性値を測定した。
- ⑤ ACP の阻害試験は阻害剤として L-酒石酸、ホルムアルデヒド、2 価銅を使用した。使用法は ACP 活性値の測定時、基質緩衝液の後に加え測定し、阻害薬剤を添加しない総 ACP 活性値と比較した。

【結 果】

1) 唾液の ACP 活性値について

唾液 83 検体の総 ACP 活性値は、最小値 2.4K-A 単位、最大値 30.5K-A 単位、平均活性値 11.0K-A 単位であった。図 2 に総 ACP 活性値のヒストグラムを示す。分布型より対数正規確率紙で求めた今回の唾液総 ACP の基準値範囲は 3.4 ~ 30.0K-A 単位となった。

健常人血清の総 ACP 活性値は 1.0 ~ 4.0 K-A 単位²⁾、であり今回使用した血清はすべてその範囲内であった。唾液総 ACP 活性値はその平均値で比べると約 6 倍も高値であり、個人差も大きく非常に高値を示す検体もあった。またその範囲も血清と比べ幅広い。

唾液の酒石酸阻害性 ACP 活性値は最小値 1.5K-A 単位、最大値 29.2 K-A 単位、平均活性値 10.1K-A 単位であった。図 3 にヒストグラムを示す。分布型は唾液総 ACP と同様対数正規分布を示した。対数正規確

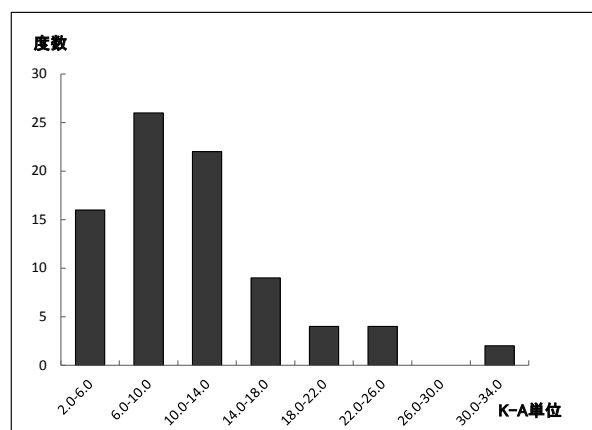


図 2. 唾液総酸性ホスファターゼ活性のヒストグラム

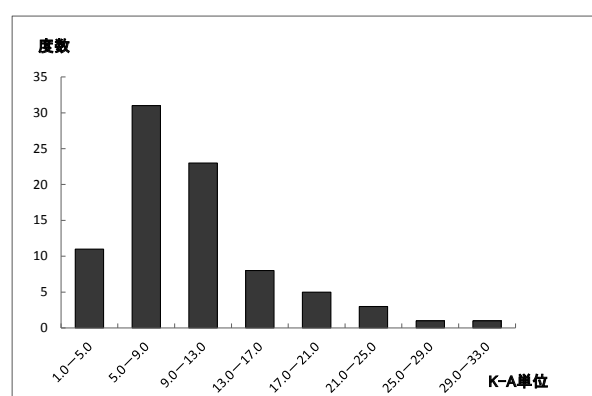


図 3. 唾液酒石酸阻害酸性ホスファターゼ活性のヒストグラム

率紙で求めた唾液の酒石酸阻害性 ACP 活性の基準範囲は 2.9 ~ 26.0K-A 単位となった。血清の酒石酸阻害性 (前立腺由来) ACP 活性値は 0 ~ 0.5K-A 単位³⁾ で血清に比べ唾液の酒石酸阻害性 ACP 活性値は非常に高値であり、総 ACP 活性値の約 91.8% の活性を占める。また個人差が大きく活性値の幅も広い。

2) 唾液 ACP の至適 pH について

図 4 に唾液総 ACP と酒石酸阻害性 ACP の至適 pH を示す。両方とも pH4.0 付近に至適 pH が得られた。

3) 唾液 ACP の電気泳動分析について

唾液および血清の分画は検出できなかった。おそらく染色液の検出感度の問題と思われる。唾液の酒石酸阻害性 ACP に関して前立腺 ACP と比較のため精液を検体として同時に分析したところ、前立腺 ACP は蛋白分画の α 1 分画に染色バンドを検出した。

4) 唾液 ACP のカラムクロマトグラフィーについて

唾液 ACP の結果を図 5 に示す。唾液総 ACP は分画 No10 付近から No30 の間に ACP 活性が検出された。

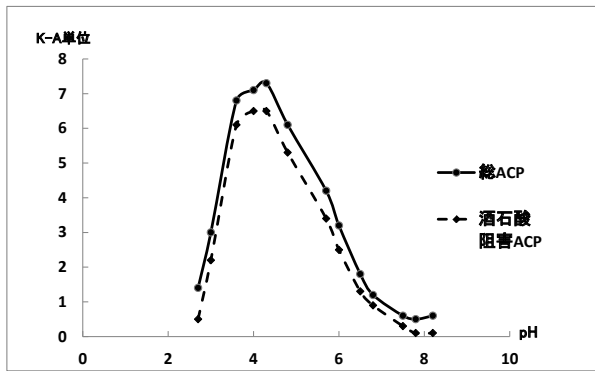


図4. 唾液の酸性ホスファターゼの至適 pH

活性のピークは唾液検体により異なるが No15前後にみられた。

前立腺 ACP は図 6 に示すように分画 No5付近から No19まで高活性が得られた。

唾液 ACP と前立腺由来 ACP の分子量を比較すると前立腺由来 ACP に比べ唾液 ACP は分子量が小さいと推定された。

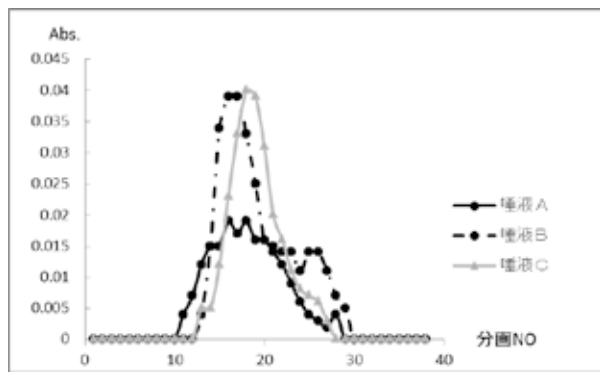


図5. 唾液総酸性ホスファターゼのカラムクロマトグラフィー

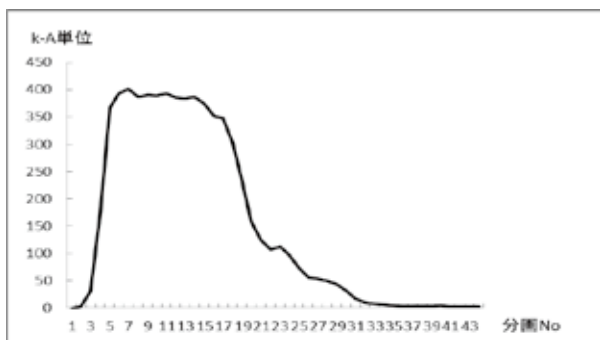


図6. 前立腺由来総酸性ホスファターゼのカラムクロマトグラフィー

5) ACP の薬剤阻害試験について

唾液、血清、前立腺の ACP について酒石酸、ホルムアルデヒド、銅について阻害試験を行った結果を表

1 に示す。

表 1. 各種薬剤の総酸性ホスファターゼ活性の阻害率

	L-酒石酸	ホルムアルデヒド	銅
唾液	92%	46%	9%
血清	0.5%	41%	0%
赤血球	5%	100%	69%
前立腺	97%	27%	3%

比較対象の前立腺由来 ACP は酒石酸でほぼ失活したが、唾液は酒石酸で約88%が失活ホルムアルデヒド阻害では約46%となった。血清 ACP は酒石酸での失活率が低く、ホルムアルデヒドでは41%であった。溶血液（赤血球）ではホルムアルデヒドで100%失活した。

【考察】

1) 唾液 ACP 活性値について

唾液総 ACP 活性値は血清の約6倍の高値を示すこと。活性値の幅が広く個人差が大きいこと。ただヒストグラムより2.0～18.0K-A単位の範囲が多く、それ以上の高活性に関しては少ないことから口腔内環境条件、たとえば pH や各唾液の含有成分状況などの違いが高活性の要因と考えられる。

唾液の酒石酸阻害は血清と比べ非常に高値である。多くは1.0～17.0K-A単位の範囲である。17K-A単位以上の高活性は少ないので総 ACP 活性と同様の要因が考えられる。

ヒト血清中の酒石酸阻害 ACP は非常に低値でその成分は前立腺由来であるが前立腺由来が唾液に分泌されるとは考えにくい。酒石酸に阻害される ACP は前立腺の他、リンパ球・血小板、芽球細胞、顆粒細胞、破骨細胞由来がある。血清の2/3を占める破骨細胞由来も酒石酸に全く阻害されないわけではなく、阻害率の程度は前立腺に比べると低いので、歯の形成などを考えると唾液にも破骨細胞由来の ACP が含まれる可能性は大きい。前立腺以外の何かは別の方法で特定する必要があるが、唾液 ACP の酒石酸阻害 ACP 活性値は総活性値の91.8%（平均値）となる。つまり唾液 ACP の大きな特徴はほとんどが酒石酸阻害 ACP であると言える。

2) 唾液総 ACP と酒石酸阻害 ACP の至適 pH について

今回の結果では pH4.3付近にそのピークが得られたが、組織由来により至適 pH は4.5～6.0とそれぞれ

れ少し異なる。例えば前立腺由来は pH5.0～6.0、顆粒球由来は pH4.5～5.0、赤血球由来は pH5.5、破骨細胞由来は pH5.0であり⁴⁾、今回の4.3という結果は少し酸性よりなのでそれが本来の唾液 ACP の至適 pH とするか否かは、もう少し pH4～5付近の pH の変化を細かくして再検討する必要があると考える。それぞれの組織由来により至適 pH は酸性領域でも少し異なるが、至適 pH だけではその組織由来は決定できない。

3) 電気泳動法による分画について

今回の実験では染色感度の問題から唾液や血清の分画は検出できなかった。前立腺由来(精液)の検体は非常に高活性であり染色検出が可能であった。検出された分画は血清蛋白分画の $\alpha 1 \sim \alpha 2$ 位であった。

臨床現場では通常 ACP の電気泳動分析は行われないうが、寒天ゲルなどで分析した結果では前立腺では $\alpha 1$ 、 $\alpha 2$ 分画にバンドが検出されている。また血清では γ 分画、 β 分画、 $\alpha 1 \sim \alpha 2$ 分画の3バンドが検出され、その割合は γ 分画に検出されるバンドが約67%で最も多く、 $\alpha 1 \sim \alpha 2$ 分画のバンドは8%であるとの報告⁵⁾がある。

4) カラムクロマトグラフィー分析について

セファクリル S200を使用した結果では前立腺由来(精液)と比べ唾液 ACP の分子量は小さいことがわかった。同様の条件で、赤血球を溶血させた検体を分析するとその蛋白の検出分画は唾液とほぼ同じ分画に検出された。溶血液の蛋白の主成分がヘモグロビンと考えるとヘモグロビンの分子量は約64000であることから、唾液 ACP の分子量もそれに近いと考えられる。酒石酸阻害を受けるが前立腺由来とは分子量が異なるので、唾液 ACP は前立腺以外の由来と考える。

5) 薬剤阻害試験について

今回の薬剤阻害試験では、文献により阻害率が少し異なるが、血清の ACP と比べると、酒石酸阻害率が大きく異なるので血清の ACP の性状とは一致しない唾液独自の特徴ある酒石酸阻害性 ACP の可能性が考えられる。

【まとめ】

唾液は主として三大唾液腺より口腔内に分泌される(耳下腺25%顎下腺70%舌下腺5%)がそれ以外にも口腔内上皮細胞、歯肉溝滲出液、細菌等も含まれる。ヒトの唾液分泌量は個人差が大きい約1.5 l / 日前後と言われている⁶⁾。

酸性ホスファターゼ(ACP)はリン酸モノエステルを基質とし酸性側に至適 pH をもつ加水分解酵素でリン酸基転移反応も触媒する。ほとんどすべての臓器に存在しているが、特に前立腺、赤血球、破骨細胞、肝などに多く存在している。細胞では細胞内可溶性分画、リソソームに存在し、由来臓器、細胞局在の違いで性質が異なる。

可溶分画に存在している可溶性 ACP は前立腺組織、単球、膵臓などに存在する。リソソームに存在するリソソーム型はリンパ球、血小板、肝臓、腎臓などに存在している。これらには酒石酸阻害が認められる。また酒石酸抵抗型の ACP はマクロファージ系、赤血球系に存在している。

ヒト血清の ACP は約1/3は血小板由来、約2/3は破骨細胞由来である。血清中の ACP は前立腺癌患者で高い活性が認められたことから、前立腺癌のマーカー酵素として利用されてきたが、現在では前立腺癌以外の前立腺肥大や炎症などでも高値となり前立腺癌に対する特異性が低いことから、ACP に代わり前立腺特異抗原(PSA)が臨床現場で利用される。

しかし、最近では酒石酸を添加して測定した残存 ACP 活性値を破骨細胞由来 ACP として骨代謝マーカーとして利用されている。

今回の結果から唾液には血清より高い活性がみとめられ、その大部分が酒石酸に阻害される ACP であることがわかった。ただ血清と異なり、酒石酸に阻害される ACP は分子量が小さいこと、口腔内という環境から前立腺由来 ACP ではないと考えられる。唾液 ACP も以前報告した乳酸脱水素酵素⁷⁾やアスパラギン酸トランスアミナーゼ⁸⁾と同様に血清を反映しているものではなく、唾液独自の ACP と考える。

口腔内で考えると歯の構成元素はカルシウムとリン酸が中心で健常人のエナメル質のミネラル量の約60%を構成し、ホスファターゼの存在によりエナメル質へのリン酸イオンとカルシウムイオンの取り込みが強化される。

さらにプラーク形成の際にカルシウムとリン酸イオンのやりとりに ACP が関与しているとの報告がある。プラークが石灰化する要因のひとつに酸性ホスファターゼやピロホスファターがリン酸濃度を高めることが言われている。

また正常ラットを使用した実験では唾液腺の ACP は唾液腺の種類により差異のあること、薬剤阻害性も細胞内分布により差があることが報告されている。⁹⁾

これらのことから唾液中に ACP が高活性に認められるのは歯やプラークの形成での役割を担っているためと考えられる。また唾液腺での消化酵素としての働きもあると考えられる。

唾液は各唾液腺の混合物でありまた口内上皮細胞や細菌の混合物でもあるので、それぞれ性状が異なるタイプの ACP が含まれると考えられる。

唾液の pH も ACP 活性に影響を与える要因となる。食後は口腔内の pH は酸性になり、歯の表面の成分のカルシウムやリンが溶かされ、再び再石灰化が行われる際に酸性 ACP やその他のホスファターゼが関与していると思われる。さらにプラーク形成量や歯茎からの出血による赤血球由来の ACP も唾液の活性値を高める要因の一つにもなる。赤血球には血清の約70倍の ACP が存在するので微量の出血の影響も今後は考慮する必要がある。

今回の検討法のみでは唾液中の ACP の由来や性質が特定されないので、今後基質に対する反応性の違いや阻害剤の再検討を行い、唾液 ACP の臨床応用の可能性を探りたい。

参考文献

- 1) 酸性ホスファターゼ測定試薬（酸性ホスファ K テストワコー：和光純薬株式会社）試薬説明書の原理より引用
- 2) 3) 白井敏明、その他：（新臨床検査技師講座9・臨床化学第3版）：p259, 医学書院
- 4) 石橋みどり：酸性、臨床病理レビュー特集第116号（最新酵素・アイソザイム検査 - 測定法とその臨床的意義 -）：p100 ~ 109, 2001
- 5) 高橋浩、その他：正常人血清 Acid phosphatase Isozymes 寒天電気泳動法 - アゾ色素法による検出：医学と生物学, 第66巻第6号, p307 ~ 311, 1963
- 6) 鈴木裕子、東城庸介：唾液腺の構造と唾液の機能：臨床検査, 第53巻第7号, p761 ~ 766, 2009
- 7) 三橋百合子、植田伸夫：唾液の成分（血清との比較）. 帝京短期大学紀要17：p115 ~ 120, 2012
- 8) 三橋百合子、植田伸夫：唾液の成分：AST（血清との比較）：帝京短期大学紀要18：p153 ~ 157, 2014
- 9) 多和敏一、その他：正常ラット唾液腺の酸性ホスファターゼについて：歯科基礎医学会雑誌, 16巻第1号, p22 ~ 33, 1974

