口腔癌患者の唾液中に見いだしたペプチド、デフェンシンに関する研究

水川 展吉

Defensin, a peptide detected in the saliva of patients with oral cancer patients

Nobuyoshi MIZUKAWA

Abstract: The saliva of patients with oral cancer was subjected to reversed-phase HPLC and a peak (P14) eluted with a linear gradient of acetonitrile. In contrast, minimal P14 was detected in the saliva of healthy volunteers. P14 showed strong absorbance at a λ max of 278nm, and showed high fluorescence at λ em of 304nm and 348nm with a λ ex of 278nm. It seemed that P14 was a peptide containing tryptophan and tyrosine. The molecular weight of P14 was 3,442 daltons on a mass spectrometry. Amino acid analysis by Edman degradation and homology studies showed that P14 was consistent with human α -defensin 1 (HNP-1), a peptide that belongs to the defensin family. HNP-1 was detected in the whole saliva of cancer patients, but only low levels were found in the serum, the parotid saliva, and the submandibular and sublingual saliva. The concentrations of HNP-1 in the whole saliva of the 8 preoperative and 13 postoperative carcinoma patients were 11.3 ± 7.8 and $5.9 \pm 5.6 \mu\text{g/ml}$ (mean $\pm$ S. D.), respectively. The concentration in the preoperative patients was higher than that in the postoperative patients and gradually decreased after operation. However, HNP-1 was found in the saliva of patients even a half year after operation. The origin of HNP-1 in the saliva of oral cancer patients was not clear, but it was suggested that HNP-1 might act as a defensive substance against carcinoma.

Key words: saliva (唾液), oral cancer (口腔癌), reversed-phase HPLC (逆相高速液体クロマトグラフィー), defensin (デフェンシン), HNP-1 (ヒト型デフェンシン1)

緒 言

唾液は口腔内の潤滑作用や口腔粘膜の保護作用、唾液中の殺菌性蛋白質や IgA などによる抗微生物作用および酵素による消化作用など種々の生理作用によって口腔内環境を維持する重要な働きをしていると考えられている¹⁾。現在までヒト唾液中には40種類以上の蛋白質やペプチドが分泌されていることが報告されている²⁾。それに加え唾液中には歯肉溝浸出液由来と思

われる抗菌物質ミエロペルオキシダーゼなど唾液腺以外から分泌されるペプチドも混在している³⁾。

唾液中のそのような成分が全身疾患や口腔疾患時にその分泌成分の質や量に変動がおこることが示唆されており⁴⁾、これらの成分を簡便に測定してその変動と疾患との関連性を明らかにすることは疾患の早期発見や予後診断、治療に役立つものと考えられるが、この領域における研究は非常に少ない。

本研究は逆相高速液体クロマトグラフィー (HPLC) を用いてヒト唾液を試料とし、塩基性の低分子ペプチドを分析中に偶然に口腔癌患者唾液中に特異的に出現するピーク (P14) を見いだしたことから⁵⁾、この成分を同定し癌疾患との関連性を追及する目的で行った。精製した P14 成分の光学的性質、分子量およびアミノ酸配列の測定から P14 は分子内に 3 つのジスルフィド

岡山大学歯学部口腔外科学第一講座

(主任：菅原利夫教授)

Department of Oral and Maxillofacial Surgery 1,
Okayama University Dental School (Chief: Prof.
Toshio Sugahara)

受付日：平成10年1月22日

結合をもつ塩基性の低分子ペプチドで、現在デフェンシンファミリーとして分類されているデフェンシン1 (HNP-1) に一致するものであった。デフェンシンは好中球や小腸上皮組織などに見いだされたペプチド^{6, 7)}で細菌、真菌、ウイルスなどに対する広範囲な抗微生物作用および抗腫瘍作用など多彩な生物活性をもち生態防御物質として近年注目されている⁸⁾。本研究では口腔癌患者の全唾液からP14成分を分離、精製し、その構造を決定し、更に簡便な定量法を考案して癌患者の唾液内 HNP-1 の変動から病態的役割について考察した。

材料および方法

1. 被験者

岡山大学歯学部附属病院第一口腔外科に来院した口腔扁平上皮癌 (CA) 患者16名 (年齢41~79, 男性6名, 女性10名) の協力を得た (Table 1)。術前の被験者唾液 (手術前1週間以内) は抗癌剤治療および放射線治療を受けていないものを用いた。また術後の被験者唾液は、観血的治療により肉眼的ならびに X 線学的に腫瘍の存在を認めないものを用いた。

2. 唾液の採取と調整

被験者の混合唾液は手術の前後においてクエン酸刺激によるスピitting法によって採取した。耳下腺唾液は久保木⁹⁾らの方法で採取し、顎舌下腺唾液は岸本¹⁰⁾らの方法によって得た。採取した唾液は、ただちにクエン酸で pH3.0 に調整し、-20℃以下に保存して試料に供した。対照として口腔疾患のない健常者 (年齢23~78, 男性14名, 女性4名) からクエン酸刺激で得た混合唾液を用いた。

3. 血清

ヘパリンを添加した患者血液から血清を分離し、クエン酸で pH3.0 に調整して-20℃に保存した。

4. 唾液および血清中のペプチド (HNP-1) の測定

唾液および血清試料は室温で融解し、遠心分離 (15,000rpm/5分間) して上清液を得た。その10 μ l について逆相高速液体クロマトグラフィー (HPLC) で分析した。HPLC は C18-AM カラム (4.6 $\times$ 250mm, nacalai tesque, Japan) および送液ポンプ (島津製作所・LC-10AS) を用い、A 液: 0.05% トリフルオロ酢酸 (TFA) を含む10% アセトニトリル, B 液: 0.05% TFA を含む50% アセトニトリルの A 液から B 液における20分間の直線濃度勾配法 (流速, 1ml/min) によって行った。HNP-1 の定量は、合成 HNP-1 (ペプチド研究所, Japan) を用いて HPLC のクロマトグラムにおけるピーク高から検量線を作り、唾液および血清中の HNP-1 量を測定した。

5. HNP-1 の分離、精製

唾液からの HNP-1 の分離には、セミ分取用カラム (C18-AM, 7.6 $\times$ 250mm, nacalai tesque, Japan) を使用して分析におけるのと同じ溶離液の A 液と B 液を用いて20分間の直線濃度勾配法 (流速, 2.3ml/min) によって HPLC を行い HNP-1 を分取した。この分画をさらに同じ条件下に再 HPLC を行い HNP-1 を精製した。精製した HNP-1 は濃縮後、凍結乾燥し保存した。

6. HNP-1 の光学的性質

HNP-1 を A 液に溶解し分光光度計 (UV-180, 島津製作所, Japan) で紫外外部吸収スペクトルを測定した。蛍光スペクトルは分光蛍光光度計 (RF-500, 島津製作所) を用いて励起波長278nm における蛍光を測定した。

7. 分子量の測定

トリプルステージ四重極型 TSQ700 (Finnigan MA 社 U.S.A.) を用いエレクトロスプレー質量分析法によって測定した。

8. アミノ酸配列の測定

プロテインシーケンサー (Applied Biosystems 社, U.S.A.) を用いて気相エドマン法によってアミノ酸配列を測定した。またシステインの測定は試料をトリ-n-ブチルホスフィンと 4-ビニルピリジンを用いて還元 s-ピリジルエチル化した後プロテインシーケンサーによって行った¹¹⁾。

9. ホモロジー検索

蛋白質のアミノ酸配列のホモロジー検索は SWISS-PROT データベースを用いて行った。

10. 統計学的検討

実験結果の数値は、平均値 $\pm$ 標準偏差 (S.D.) で示し、CA 患者 (術前と術後の癌患者) と健常者の唾液中の HNP-1 濃度の有意差の検定は Welch の検定 (両側検定)、術前と術後の癌患者唾液中の HNP-1 濃度の有意差の検定は、Student の paired t 検定 (片側検定) を用いて行った。

11. TNM 分類

TNM 分類は、1987年 UICC 分類¹²⁾に従った。

結 果

1. 唾液の HPLC

1) 健常者と CA 患者唾液の比較

Fig. 1 は、代表的な手術前の CA 患者の混合唾液および対照として健常者の唾液についての HPLC のクロマトグラムを示す。CA 患者唾液には、保持時間約14分後に顕著なピーク (P14) が認められたが (Fig. 1, CA, 矢印)、健常者の唾液には、P14は非常に微小かほとんど認められなかった。

2) 耳下腺および顎舌下腺唾液の HPLC

CA 患者唾液中に見られる P14が耳下腺あるいは顎

Fig. 1 Reversed-phase HPLC of the whole saliva of a healthy volunteer and a patient with oral carcinoma

Ten microliters of the saliva sample was applied on a column (C₁₈ AM) and a linear gradient of 10-50% acetonitrile in 0.05% trifluoroacetic acid was carried out for 20 min. The flow rate was 1.0ml/min. A unique peak (P14, arrow) was detected in the saliva of a cancer patient after about 14min, and P14 was little detected in the saliva of a healthy volunteer. The broken line indicates the gradient concentration of acetonitrile.

Fig. 2 HPLC of the parotid saliva, submandibular and sublingual gland saliva and whole saliva of an oral carcinoma patient

P14 was detected in the whole saliva of a patient, but was minimal in the parotid saliva and the submandibular and sublingual saliva.

Fig. 3 HPLC of the whole saliva and the serum of a patient with oral carcinoma
P14 was detected in the whole saliva of a patient, but was minimal in the serum.

Fig. 4 HPLC of purified P14

P14 was rechromatographed on a C₁₈ AM column (7.6×250mm) in a linear gradient 10-50% acetonitrile in 0.05% trifluoroacetic acid. The flow rate was 2.3ml/min.

舌下腺からの分泌成分に由来するものかどうかを検討した。Fig. 2は、術後13か月の同一人の耳下腺、顎舌下腺および混合唾液について HPLC の結果を示す。P14は混合唾液中には顕著に認められたが、耳下腺と顎舌下腺唾液中には微小にしか認められなかった。

2. 血清中の P14

CA 患者の唾液中に見出された P14成分について患者血清中にも存在するかどうかを検索した。測定した4例において、唾液中の P14は顕著に認められたが、血清中にはほとんど P14は認められなかった。Fig. 3は、その内の1例で、唾液中には高濃度の P14が、存在したが、血清中には測定できなかった。

3. P14成分の同定

1) P14の光学的性質

CA 患者から分離、精製した P14は HPLC において単一のピークを示した (Fig. 4)。この P14について光学的性質を検討した。Fig. 5に P14の紫外吸収および蛍光スペクトルを示す。P14は波長278nm において吸収極大を示したので蛋白質であることが予想された。また励起波長278nm における蛍光は波長304nm と348 nm に極大を示す2相性のスペクトルを示し、前者はチロシン、後者はトリプトファンのそれに一致していた。

2) P14の分子量

3名の CA 患者からそれぞれ精製した P14について質量分析法によって分子量を測定した。その結果、P14の分子量はそれぞれ3442.8, 3443.6, および3439.0 daltons で平均分子量は3,441.8 daltons であった。Fig. 6に代表的な P14のマスマスペクトルを示した。

3) P14のアミノ酸配列の測定

気相プロテインシーケンサーによって直接的に P14のアミノ酸配列を測定した結果、N 末端から測定可能なアミノ酸残基は A-Y-RIPA-IGERRYGT-

Fig. 5 Ultraviolet absorption and fluorescence spectra of P14
A: absorption curve of P14 B: fluorescence spectrum (λ ex, 278nm)

Fig. 6 Mass spectrum of P14

IYQGRLWAFーであった。このアミノ酸配列は3名の患者からえたP14についてすべて同一の配列であった。アミノ酸配列のホモロジー検索から、89%のホモロジーにおいてヒト型デフェンシン1 (HNP-1) のそれと一致していた。次いでP14を還元S-ピリジリエチル化した後シーケンサーで測定した結果、未決定アミノ酸残基はすべてシステインであった。P14の分子内の3つのジスルフィド結合を考慮した分子量の計算値は3,442.1 daltons となりこの値はほぼ実測値と一致していた。

Fig. 7 HPLC of synthesized human defensin 1 (HNP-1) and purified P14
A: synthesized HNP-1 B: purified P14

4) 合成 HNP-1 と P14 の HPLC

Fig. 7 は合成 HNP-1 と唾液 P14 の HPLC におけるクロマトグラムを示す。両者の保持時間は14.4分で完全に一致していた。以上の結果は P14 が HNP-1 と同一のペプチドであることを示すものである。Fig. 8 にヒト型デフェンシン 1 (HNP-1) の構造式を示し

Fig. 8 Structure of human defensin 1 (HNP-1)
A: alanine, C: cysteine, E: glutamic acid, F: phenylalanine, G: glycine, I: isoleucine, L: leucine, P: proline, Q: glutamine, R: arginine, T: threonine, Y: tyrosine, W: tryptophan

Fig. 9 Calibration curve for HNP-1

2) 健常者およびCA患者唾液中のHNP-1
Table 1に健常者とCA患者唾液中のHNP-1の濃度を示す。健常者唾液中のHNP-1濃度は測定した18名のいずれも1.5 μg/ml以下であった。一方CA患者群において術前患者群は健常者群に比較して有意に高い濃度を示し(P<0.01), また術後患者群においても健常者群に比較して有意に高い濃度を示した(P<0.01)。また同一患者5人の術前, 術後のHNP-1濃度はそれぞれ9.3±5.1, 4.6±4.7 μg/ml (Mean±S. D.)で術前の方が術後に比較して有意に高い濃度を示した(P<0.005)。癌発症部位との関連性は見られなかった。また唾液内HNP-1濃度は, 術後日数の経過とともに減弱する傾向を示した(**Fig. 10**)。しかし術後3年2か月経過観察中で, 肉眼的およびX線的に再発の症状のない患者において唾液中HNP-1が健常者のレベル以上に存在するのが認められた(**Table 1**)。

考 察

CA患者の混合唾液中にHPLCによって見いだした特異なピーク(P14)は光学的性質からトリプトファンとチロシンを含むペプチド成分であることが推測された。質量分析によってこのP14の分子量は3,442 daltonsであり, N末端からのアミノ酸配列の解析, および合成ペプチドとの比較においてP14がヒトデフェンシン¹³⁾に属するペプチドであることが確定できた。このP14はCA患者の術前および術後の唾液中に顕著に出現するが, 健常者の唾液中には微量にしか存在せず, HPLCではほとんど認めることができなかった。現在までヒト全唾液中のデフェンシンの存在に関する報告はない。

た¹³⁾。
4. 唾液中のHNP-1の定量
1) 定量法の検討

合成HNP-1の0.1~1 μg/10 μlの濃度においてHPLCを行いそれぞれのピーク高から検量線を作った。**Fig. 9**に示すように0.1~1 μgの濃度範囲でHNP-1のピーク高には直線関係が認められた。次に健常者の唾液に既知濃度の合成HNP-1を加え, HPLCによる回収率と変動係数(C.V.)を測定した(**Table 2**)。その結果, 10および25 μg/mlにおいて添加したHNP-1の回収率はそれぞれ89および98%を示し, それらのC.V.値は3%以下であった。

Table 1 CONCENTRATION OF HNP-1 IN THE SALIVA OF ORAL CANCER PATIENTS

	Age (Sex)	TNM	Site	HNP-1 (μg/ml)	Follow up
H (n=18)	23-78	—	—	0.8±0.6 (Mean±S.D.)	—
Pre-Op (SCC)					
1★	41 (M)	T ₄ N ₀ M ₀	UG	17.2	—
2★★	75 (F)	T ₂ N ₀ M ₀	UG	9.8	—
3★★★	41 (M)	T ₂ N ₀ M ₀	T	2.9	—
4★★★★	65 (F)	T ₂ N ₀ M ₀	UG	11.8	—
5★★★★★	64 (F)	T ₁ N ₀ M ₀	T	4.9	—
6	53 (F)	T ₄ N _X M _X	UG	17.2	—
7	64 (F)	T ₄ N _{2b} M _X	ULG	25.5	—
8	56 (M)	T ₁ N ₀ M ₀	MF	1.0	—
				11.3±7.8 (Mean±S.D.)	
Post-Op (SCC)					
1★	41 (M)	T ₄ N ₀ M ₀	UG	13.7	6 M
2★★	75 (F)	T ₂ N ₀ M ₀	UG	2.9	6 M
3★★★	41 (M)	T ₂ N ₀ M ₀	T	1.0	8 M
4★★★★	65 (F)	T ₂ N ₀ M ₀	UG	1.5	5 M
5★★★★★	64 (F)	T ₁ N ₀ M ₀	T	4.0	4 M
6	68 (F)	T ₁ N ₀ M ₀	T	18.6	8 M
7	52 (F)	T ₁ N ₀ M ₀	T	3.2	11M
8	43 (M)	T ₂ N ₀ M ₀	T	2.5	1 Y 9 M
9	69 (F)	T ₂ N ₁ M ₀	ULG	6.4	1 Y 9 M
10	79 (M)	T ₂ N ₀ M ₀	T	0.0	1 Y 10 M
11	64 (F)	T ₁ N ₀ M ₀	LG	2.9	2 Y 8 M
12	75 (F)	T ₄ N ₀ M ₀	UG	6.4	2 Y 11 M
13	70 (M)	T ₂ N ₀ M ₀	MF	14.2	3 Y 2 M
				5.9±5.6 (Mean±S.D.)	

H: healthy volunteer, SCC: squamous cell carcinoma, UG: upper gingiva,
LG: lower gingiva, ULG: upper and lower gingiva, T: tongue, MF: mouth floor.
S.D.: standard deviation, M: month, Y: year, ★, ★★, ★★★, ★★★★, ★★★★★: same patient

Table 2 RECOVERY OF HNP-1
ADDED TO HUMAN WHOLE SALIVE

HNP-1 (μg/ml)	Recovery (%) (mean±S.D., n=4)	C.V. (%)
10	88.8±2.5	2.9
25	98.7±1.6	1.6

デフェンシンはデフェンシンファミリーとして分類されているアミノ酸29～34残基からなる一群のペプチドでアルギニンを多く含む塩基性のペプチドである。その分子内には3つのS—S結合を作る6個のシステ

イン残基をもつ共通の基本構造があり、この基本構造は種を超えた進化の過程でよく保存されていると考えられている⁸⁾。最近、この分子内S—S結合の位置の相異から立体構造の違うデフェンシン(β-デフェンシン)が見いだされたので、従来のものをα型として区別している¹⁴⁻¹⁷⁾。デフェンシンは最初ウサギの肺胞マクロファージにおいて見いだされ¹⁸⁾、その後ヒト⁶⁾、ラット¹⁹⁾、モルモット²⁰⁾およびウサギ²¹⁾の好中球で証明された。好中球においては細胞内アズール顆粒中に貯蔵されている²²⁾。またマウスおよびヒトの小腸粘膜のPaneth細胞の顆粒内にも存在が認められている^{7, 23, 24)}。しかしウサギ以外のマクロファージ、単球、好酸球およびリンパ球にはデフェンシンは証明されて

Fig. 10 Time course of the concentration of HNP-1 in the saliva of postoperative patients. The concentration of HNP-1 in the saliva of carcinoma patients decreased after operation. However, the concentration in the saliva of the cancer patients after operation much higher than that in the control saliva.

いない^{25, 26)}。

デフェンシンの生物活性としては細菌¹³⁾、真菌²⁷⁾、スピロヘーター²⁸⁾、マイコバクテリア²⁹⁾ およびウイルス³⁰⁾ に対する殺菌的作用がよく知られており、癌細胞などの腫瘍細胞や上皮細胞、内皮細胞に対しても強い細胞障害作用がある^{31, 32)}。また肥満細胞からのヒスタミン遊離活性³³⁾や単球走化作用³⁴⁾および抗 ACTH 作用³⁵⁾など非常に幅広い生物活性が報告されている³⁶⁾。

好中球におけるヒト α 型デフェンシンは HNP-1 - 4 の 4 種類⁸⁾と腸管上皮からの HD-5 および 6^{7, 23, 24)}の 2 種類の存在が確認されており、ヒト白血病細胞株 HL-60 を用いてデフェンシン遺伝子 (def 遺伝子) の全構造も決定されている³⁷⁾。その塩基配列の解析からデフェンシンはアミノ酸 93~95 残基の前駆体から蛋白分解酵素によってプロセッシングを受け最終的にアミノ酸 29~34 残基のデフェンシンになると考えられている³⁸⁾。ヒト好中球においてはその骨髓芽球の def 遺伝子はわずかにしか発現していないが、前骨髓球および骨髓球では顕著に発現しており、成熟好中球ではほとんど発現が認められなくなる。したがって、デフェンシンは未分化な好中球によって合成された後にアズール顆粒に貯蔵されるものと考えられている²²⁾。アズール顆粒内では HNP-1 が最も多く存在し、HNP-3 および 4 は微量にしか存在しない。HNP-2 は HNP-1 の N 末端のアラニン 1 残基のみを欠く構造であるので HNP-1 から二次的に生成されるものと考えられる。実際 HNP-1 と -3 をコードする def 遺伝子の存在は証明されているが、HNP-2 の遺伝子は確認さ

れていない⁸⁾。これらデフェンシンは白血球のアズール顆粒のタンパク質の 30~50% を占め、また白血球総蛋白の 5~7% を占めている⁸⁾。

本研究において CA 患者唾液中に見いだした P14 はヒト型 HNP-1 であると同定できたが、P14 分画のマスペクトルにおいて HNP-2 の質量数に相当するシグナルも認められるので、P14 には微量の HNP-2 が含まれていることが考えられる。しかし逆相 HPLC において種々の条件下で分析したが P14 は単一のピークを示した (Fig. 4)。したがって HPLC を用いてピーク高を指標とし、合成 HNP-1 の検量線から可及的、迅速に唾液中の HNP-1 を定量する方法を考案した。この方法において唾液に添加した HNP-1 の回収率は 89~98% で C. V. 値は 3% 以下の低い値を示し、唾液中の HNP-1 の濃度 0.1~1.0 $\mu\text{g}/10\mu\text{l}$ の範囲内で定量することができた。デフェンシンの定量法としては最近 radioimmunoassay (RIA) が開発され高感度で測定が可能となったが³⁹⁾、この方法はデフェンシン類の構造類似性から個々のデフェンシンを分別して測定することができない。これに対して HPLC を用いる本研究の方法は HNP-2 の混在は避けられないが HNP-1 を唾液中の他の成分と分別して定量することができ、唾液試料も 10 μl を要するのみで短時間に測定ができた。

CA 患者の術前、術後の唾液中にはヒト好中球に存在する α 型デフェンシンのみで現在まで β 型デフェンシンを確認することはできなかった。また HNP-1 は CA 患者の混合唾液には非常に顕著に見られたが、耳下腺唾液中にはほとんど認められず、顎舌下腺唾液においては微量にしか認められなかった (Fig. 2)。このことは CA 患者唾液中のデフェンシンがこれら大唾液腺からの分泌成分ではないことを示唆するもので、おそらく CA 患者唾液中のデフェンシンは口腔内の白血球⁴⁰⁾に由来するものか、他の小唾液腺からの分泌、または口腔粘膜や舌上皮細胞から分泌される可能性が考えられる。CA 患者以外にも口腔内の炎症時の唾液中に HNP-1 が認められるが、この場合には炎症の治療とともに完全に消失した (第 52 回日本口腔科学会総会、愛媛、1998 発表)。Shiomi ら³⁹⁾による RIA 法を用いたヒト血清中のデフェンシンの濃度は健康者においては約 0.04 $\mu\text{g}/\text{ml}$ であり、同じ方法で Panyutich ら⁴¹⁾は急性膵膜炎や敗血症患者の血清デフェンシン濃度が 0.12 μg から 170 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の範囲にまで増大することを報告している。本研究においては CA 患者の唾液内 HNP-1 濃度が 25.2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ においてさえその血清中の HNP-1 を確認することはできなかった。それゆえ、唾液中の HNP-1 が血清に由来しているとは考え難い。Schonwetter ら¹⁶⁾は、ウシの血清および好中球に β 型デフェンシンが存在することを証明し、さらにウシの舌上皮組織においても β 型デフェンシンが

存在し、舌の炎症時に増大すると報告している。ヒトにおいて口腔内 CA 患者の唾液中にデフェンシンが増大するのは癌発症時において何らかの刺激が舌上皮組織に α 型デフェンシンの発現機構を誘導する可能性も考えられるが、このことに関する実験的な裏付けはない。興味あることは CA 患者の術後半年以上経過し再発の症状もない患者唾液中にも術前よりは低いデフェンシンが顕著に認められることである。デフェンシンには抗腫瘍作用^{31, 32)}があることから癌再発の防御機構に何らかの役割を演じているものと考えられる。CA 患者唾液中のデフェンシンが癌発症のどのような時期に出現するのか、その由来や発現機構を明らかにすることは癌再発との関連性や早期診断への指針を得ることに役立つものと考えられる。

結 語

逆相 HPLC によって口腔癌患者の唾液中に出現するピーク (P14) を見だし、以下の結果を得た。

1. P14 は、その光学的性質からペプチド様成分であることが、推測され、質量分析、分子量の測定およびアミノ酸配列の解析とホモロジー検索の結果から合成ペプチドとの比較において P14 がヒト α 型デフェンシン 1 (HNP-1) であることを確認した。

2. 混合唾液中の HNP-1 は HPLC を用いて迅速、簡便に定量できた。

3. 口腔癌患者の混合唾液中に HNP-1 が認められたが、耳下腺唾液、顎下腺唾液、および血清中にはほとんど認められなかった。

4. 口腔癌患者の手術前および術後の唾液中の HNP-1 の濃度は術前の方が術後より高い傾向を示し、術後半年以上の経過においても HNP-1 の存在が認められた。

謝辞

この稿を終えるに臨み、本研究の機会を与えて下さり、御指導と御校閲を賜った岡山大学歯学部口腔外科学第一講座 菅原利夫教授に衷心から感謝いたします。また終始御懇篤なる御指導ならびに御校閲を賜りました岡山大学歯学部歯科薬理学教室 杉山勝三助教授に深甚なる感謝の意を表します。さらに本研究を進めるにあたり、終始御援助、御助言いただきました口腔外科学第一講座の皆様ならびに、歯科薬理学教室の皆様にご心から感謝いたします。

本論文の要旨は、第45回 JADR 総会 (1997年12月、徳島) において発表した。

引 用 文 献

1) Mandel, I.D.: The role of saliva in maintaining oral homeostasis. *J Am Dent*

- Assoc 119: 298-304 1989.
- 2) Hay, D.I.: CRC handbook of experimental aspects of oral biochemistry. CRC press Inc Boca Raton FL: 319-335 1983.
- 3) 河野正司: 唾液 菌と口腔の健康. 第1版, 医歯薬出版, 東京 1997, 108頁.
- 4) James, P.M. and Carl, H.S.: Arachidonic acid metabolites in saliva of patients with squamous cell carcinoma of the head and neck. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 77: 636-640 1994.
- 5) Mizukawa, N., Sugiyama, K., et al.: A peptide detected in the saliva of oral-cancer patients. *JDR* 77: 1309 1998.
- 6) Ganz, T., Selsted, M.E., et al.: Defensins: Natural peptide antibiotics of human neutrophils. *J clin Invest* 76: 1427-1435 1985.
- 7) Eisenhauer, P.B., Harwig, S.S.L., et al.: Cryptdins: antimicrobial defensins of the small intestine. *Infect Immun* 60: 3556-3565 1992.
- 8) Lehrer, R.I., Ganz, T., et al.: Defensins: Endogenous Antibiotic Peptides of animal cells. *Cell* 64: 229-230 1991.
- 9) 久保木芳徳, 兼平 孝: ヒスタチンの口腔内防御メカニズム. *日本唾液腺学会誌* 32: 1-10 1991.
- 10) Kishimoto, E., Hay, D.I., et al.: A human salivary Protein Which Promotes Adhesion of Streptococcus mutans Serotype c Strains to Hydroxyapatite. *Infect Immun* 57: 3702-3707 1989.
- 11) 滝尾弘士: タンパク質 II (新化学実験講座 1) 日本生化学会編, 第1版, 東京化学同人, 東京 1990, 167頁.
- 12) UICC: TNM Klassifikation maligner Tumoren. Vierte Auflage. Springer-Verlag, Berlin, 1987, P 7.
- 13) Ganz, T., Selsted, M.E., et al.: Defensins. *Eur J Haematol* 44: 1-8 1990.
- 14) Selsted, M.E., Tang, Y.-Q., et al.: Purification, Primary Structures, and Antibacterial Activities of β -Defensins, a New Family of Antimicrobial Peptides from Bovine Neutrophils. *J Biol Chem* 268: 6641-6648 1993.
- 15) Tang, Y.-Q. and Selsted, M.E.: Characterization of the Disulfide Motif in BNBD-12, an Antimicrobial β -Defensin Peptide from Bovine Neutrophils. *J Biol Chem* 268: 6649-6653 1993.
- 16) Schonwetter, B.S., Stolzenberg, E, D., et al.: Epithelial antibiotics induced at sites of inflammation. *Science* 267: 1645-1648

- 1995.
- 17) Bensch, K.W., Raida, M., et al.: hBD-1 : a novel β -defensin from human plasma. *FEBS Lett* 368: 331-335 1995.
- 18) Patterson-Delafield, J., Martinez, R.J., et al.: Microbicidal cationic protein in rabbit alveolar macrophages: a potential host defense mechanism. *Infect Immun* 30: 180-192 1980.
- 19) Eisenhauer, P.B., Harwig, S.S.L., et al.: Purification and antimicrobial properties of three defensins from rat neutrophils. *Infect Immun* 57: 2021-2027 1989.
- 20) Selsted, M.E. and Harwig, S.S.L.: Purification, primary structure, and antimicrobial activities of a guinea pig neutrophil defensin. *Infect Immun* 55: 2281-2286 1987.
- 21) Selsted, M.E. Szklarek, D., et al.: Purification and antibacterial activity of antimicrobial peptides of rabbit granulocytes. *Infect Immun* 45: 150-154 1984.
- 22) Ganz, T.: Extracellular release of antimicrobial defensins by human polymorphonuclear leukocytes. *Infect Immun* 55: 568-571 1987.
- 23) Jones, D.E. and Bevins, C.L. : Paneth cells of the small human intestine express an antimicrobial peptide gene. *J Biol Chem* 267: 23216-23225 1992.
- 24) Jones, D.E. and Bevins, C.L.: Defensin-6 mRNA in human Paneth cells: implications for antimicrobial peptides in host defense of the human bowel. *FEBS Lett* 315: 187-192 1993.
- 25) Ganz, T., Rayner, J.R., et al.: The structure of the rabbit macrophage defensin genes and their organ-specific expression. *J Immunol* 143: 1358-1365 1989.
- 26) Eisenhauer, P.B. and Lehrer, R.I.: Mouse neutrophils lack defensins. *Infect Immun* 60: 3446-3447 1992.
- 27) Selsted, M.E., Szklarek, D., et al.: Activity of rabbit leukocyte peptides against *Candida albicans*. *Infect Immun* 49: 202-206 1985.
- 28) Borenstein, L.A., Selsted, M.E., et al.: Antimicrobial activity of rabbit leukocyte defensin against *Treponema pallidum* subsp. *pallidum*. *Infect Immun* 59: 1359-1367 1991.
- 29) Ogata, K., Linzer, B.A., et al.: Activity defensins from human neutrophilic granulocyte against *Mycobacterium avium-Mycobacterium traccellulare*. *Infect Immun* 60: 4720-4725 1992.
- 30) Daher, K.E., Selsted, M.E., et al.: Direct inactivation of viruses by human granulocyte defensins. *J Virol* 60: 1068-1074 1986.
- 31) Lichtenstein, A.K., Ganz, T., et al.: In vitro tumor cell cytotoxicity mediated by peptide defensins of human and rabbit granulocyte. *Blood* 68: 1407-1410 1986.
- 32) Okrent, D.G., Lichtenstein, A.K., et al.: Direct cytotoxicity of polymorphonuclear leukocyte granule proteins to human lung dermal cells and endothelial cells. *Am Rev Respir Dis* 141: 179-185 1990.
- 33) Yamashita, T., Saito, K.: Purification, Primary Structure, and Biological activity of Guinea Pig Neutrophil Cationic Peptides. *Infect Immun* 57: 2405-2409 1989.
- 34) Territo, M.C., Ganz, T., et al.: Monocyte chemotactic activity of defensins from human neutrophils. *J Clin Invest* 84: 2017-2020 1989.
- 35) Zhu, Q.Z., Hu, J., et al.: Isolation and structure of corticostatin peptides from rabbit fetal and adult lung. *Proc Natl Acad Sci USA* 85: 592-596 1988.
- 36) 菊池雅子, 浦 陽子, 他 : 殺菌性物質 Defensins について. *生体防御* 10: 113-121 1993.
- 37) Daher, K.A., Lehrer, R.I., et al.: Isolation and characterization of human defensin cDNA clones. *Proc Natl Acad Sci U. S. A.* 85: 7327-7331 1988.
- 38) Valore, E.V. and Ganz, T.: Posttranslational processing of defensins in immature human myeloid cells. *Blood* 79: 1538-1544 1992.
- 39) Shiomi, K., Nakazato, M., et al.: Establishment of radioimmunoassay for human neutrophil peptides and their increase in plasma and neutrophil in infection. *Biochem Biophys Res Commun* 195: 1336 1993.
- 40) Ashkenazi, M. and Dennison, D.K.: A new method for isolation of salivary neutrophils and determination of their functional activity. *J Dent Res* 68: 1256-1261 1989.
- 41) Panyutich, A.V., Panyutich, E.A., et al.: Plasma defensin concentrations are elevated in patients with septicemia or bacterial meningitis. *J Lab Clin Med* 122: 202-207 1993.