ヒト唾液中のヒスタチンに関する研究

——分離、精製とヒスタミン遊離——

緒 方 憲 一 郎

岡山大学歯学部口腔外科学第1講座（主任：西嶋克巳教授）

〔受付：平成2年6月27日〕

Histatins, a family of histidine-rich polypeptides in human saliva ; isolation and histamine-releasing activity

Ken-ichiro Ogata

*Department of Oral and Maxillofacial Surgery I, Okayama University
Dental School, 2-5-1 Shikata-cho, Okayama 700
(Chief: Prof. Katsumi Nishijima)*

〔Accepted for publication: June 27, 1990〕

Key words: Human saliva / histatins / heparin / histamine release / mast cells

Abstract: Histidine-rich polypeptides with histamine-releasing activity from rat peritoneal mast cells were isolated from human saliva by heparin-Ultrogel affinity chromatography and reverse-phase high performance liquid chromatography (HPLC). The amino acid composition of these peptides showed high proportions of histidine, lysine and arginine. The amino acid sequences determined by automated Edman degradation revealed that these peptides were completely identical to histatins 1, 3 and 5, respectively. Histatins 3 and 5 induced the histamine release from isolated rat mast cells accompanied with degranulation in a dose-dependent manner over the concentration range 5-40 μ M, while histatin 1 was weakly active. The histamine release by histatin 5 was completed within 10 sec at 37°C. The temperature optimum for histatin 5-induced histamine release was in the range of 25-37°C, and the release was suppressed at temperature below 15°C and above 45°C. This activity was observed at acid to neutral pH's in the medium, but decreased at alkaline pH's. Their actions did not require extracellular calcium. This histamine release was not accompanied by leakage of lactate dehydrogenase. These results indicate that histatins 1, 3 and 5 can be isolated rapidly from human saliva by using a heparin column and HPLC, and that histatin 5 induces histamine release by means of calcium-independent exocytosis from the mast cells. It is suggested that histatins may possibly play a role in an early stage of inflammation in the oral cavity as naturally occurring host-defensive substances.

緒 言

唾液には食物の化学的消化作用や咀嚼，味覚，嚥下および発音の補助作用，あるいは洗浄，中和作用による口腔粘膜の保護作用，有害物質の排泄作用および唾液中の酵素や免疫グロブリンなどによる抗菌作用など多くの生理作用があり，これら

の作用は口腔内環境を維持（oral homeostasis）するのに役立っている^{1,2)}。

唾液中には蛋白質，脂質，糖質および尿素などの有機成分や電解質，塩などの無機成分のほかに細胞成分や微生物が含まれている³⁾。そのうち蛋白質やペプチド類は種類も多く，現在電気泳動的に40種類以上の存在が認められている³⁾。しかし，これらの蛋白質やペプチド類で生理的な機能が明

らかにされているものは非常に少なく⁴⁾、上記の唾液の生理作用との関係についても不明の点が多い。

近年ヒト唾液中にユニークなアミノ酸組成を持つペプチド群があることが見いだされてきた⁵⁾。これらのペプチド類はそれぞれプロリン、ヒスチジンおよびチロシンなどのアミノ酸を異常に多く含んでいることが特徴的であり、またこれらはヒドロキシアパタイトに強い親和性を持っているため、歯の表面の獲得被膜形成に関与するペプチドとして注目されてきた⁶⁻¹³⁾。これらのペプチドのうち、現在一次構造が解明されているものには proline-rich protein (PRPs)^{14,15)} (高プロリン含有ペプチド類)、statherin¹³⁾ (高チロシン含有ペプチド)、および本研究の対象であるヒスタチン類¹⁶⁻¹⁸⁾ (高ヒスチジン含有ペプチド類)がある。

ヒスタチン類は唾液中に分泌されるヒスチジンに富んだ分子量3,000~5,000程度の一群のポリペプチドであり、これらは1970年代初めにヒト耳下腺唾液中において遺伝的に多形性を示す塩基性のペプチドとして発見された¹⁹⁾。そしてこれらがヒトを含む霊長類にのみ存在し²⁰⁾、分子内にヒスチジンを多く含むことが確認された^{21,22)}。その後、多くの研究者によって様々な分離、精製法が試みられ²³⁻³⁰⁾、parotid basic protein (Pb)、post-parotid basic protein (PPb)¹⁹⁻²²⁾ や histidine-rich polypeptides (HRPs)^{10,25)} などの名称が提唱され混乱していた。これは、ヒスタチン類が類似の大きさと組成を持つ低分子ペプチドの集団として存在することや、非常に塩基性の強いものを含むことに加えて、精製の指標となる適当な生物活性がなかったため、それらの分離と精製が困難であったことが原因と考えられる。1988年になって、Oppenheim ら¹⁷⁾はこれらのペプチドの主要な成分を分離、精製することに成功し、これらのペプチド群に対して“ヒスタチン”と命名し、名称を統一した。

現在電気泳動的に12種類のヒスタチン類が認められており、一次構造が決定されている¹⁸⁾。これらはすべて類似のアミノ酸組成を持ち、そのうちヒスタチン1、3および5の3つのペプチドで唾液中の総ヒスタチン量の85~90%を占めてい

る¹⁷⁾。

これらヒスタチン類の生物活性に関しては長い間明らかにされていなかったが、最近になって *in vitro* においてヒスタチン類が *C. albicans* に対する抗真菌作用^{16,17,31-33)} および *S. mutans* に対する抗菌作用^{34,35)} を示すことが報告された。これらの知見からヒスタチン類は唾液中の自然の殺菌物質として、口腔内において生体防御作用に役立っていることが示唆されている。

一方、Sugiyama ら^{36,37)}はヒト唾液がラット肥満細胞からヒスタミン (Hi) を遊離することを見だし、唾液中から Hi 遊離活性ペプチド (F-A) を分離、精製し、その一次構造を明らかにした。このペプチドは分子内にヒスチジン残基を多量に含有するポリペプチドであり、アミノ酸組成はHRPsの1つに非常に類似していたため、HRPsとの関連に興味を持たれていた。このペプチドは、後に Oppenheim ら¹⁷⁾の報告によって、彼らの提唱するヒスタチン5と同一のものであることが明らかとなった。そこで本研究は、従来ヒト唾液からの分離と精製が極めて困難であったヒスタチン類を、Hi 遊離活性を指標として、ヘパリンアフィニティークロマトグラフィーと高速液体クロマトグラフィーを用いて、迅速、かつ高収率に分離、精製することを可能にした。またこれらヒスタチン類の口腔生物学的な意義を明らかにすることを目的として、ヒスタチン類によるラット肥満細胞からの Hi 遊離機構について詳細に検討した。

材料および方法

1. 実験動物

体重300~350gの雄性 Wistar 系ラットを使用した。

2. 唾液

クエン酸刺激によって同一人から得た混合唾液を用いた。唾液は久保木の方法³⁸⁾を用いて採取後、ただちに酢酸で pH 3~4 に調製し-20°C 以下に貯蔵した。

3. 肥満細胞

肥満細胞はラットの腹腔内細胞³⁹⁾から Percoll を用いた重層遠心法⁴⁰⁾によって分離した。ラットをエーテル麻酔下に頸動脈を切断、脱血致死さ

せ、その腹腔内に37°C に加温した生理的塩溶液 (PS) (組成: 154mM NaCl, 2.7mM KCl, 0.9 mM CaCl₂, 6.7mM KH₂PO₄-Na₂HPO₄, pH 7.2) 15ml を注入し、腹部を90秒間軽くマッサージしてから腹部正中線に沿って切開し、腹水をピペットで採取した。これを45×g で3分間遠心して腹腔内細胞を得た。細胞は0.01%牛血清アルブミンを含む PS (PSB) に浮遊させ遠心操作によって2回洗浄した。この細胞を1.6ml の PSB に浮遊させ、1.5M の NaCl を含む90% Percoll 4 ml と混和しその上部に1 ml の PSB を重層して4°C において15分間200×g で遠心した。遠心管の底部に集まった肥満細胞を他の細胞から分離し、精製した肥満細胞を得た。肥満細胞の純度は90%以上であった。得られた細胞は PSB で2回洗浄したのち実験に用いた。

4. ヒスタチン類の調製

唾液からのヒスタチン類はヘパリンのアフィニティークロマトグラフィー⁴¹⁾と逆相高速液体クロマトグラフィー (HPLC) によって分離、精製した。酢酸で pH 3.5に調製したヒト唾液を100°C で5分間加熱した後、4°C において10,000×g で30分間遠心した。その上清を2 M Tris で pH 7.0に調製し、0.01M Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.0) で3倍に希釈した。この試料を0.01M Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.0) で平衡化した heparin-Ultrogel カラム (LKB 社製、1.5×80mm) に吸着させ、200ml の同緩衝液と1.5M の NaCl を用いて直線濃度勾配法によって溶出した。溶出成分は試験管あたり5 ml ずつ分画し、それぞれ235nm における吸光度によって測定した。ヒスタチンを含む分画はヒスタミン遊離活性を指標にして採集し、脱塩、凍結乾燥したのち逆相 HPLC によって精製した。逆相 HPLC は Chemcosorb 5-ODS-H (7.5×250mm) のカラムを用い0.05%のトリフルオロ酢酸 (TFA) を含む10%アセトニトリルと0.05% TFA を含む50%アセトニトリルで50分間の直線濃度勾配法によって流速1.5ml/min で分離した。

5. アミノ酸分析および一次構造

逆相 HPLC によって精製したヒスタチン類はそれぞれ減圧下に6 N HCl 中で110°C, 24時間加

水分解した後、日立高速自動アミノ酸分析機を使用してアミノ酸分析を行った。

アミノ酸配列は Applied Biosystem model 835 シークエンサーを用い、自動 Edman 分解⁴²⁾によって行った。C末端のアミノ酸残基はカルボキシペプチダーゼA を用いて分解して確認した。PTH-アミノ酸の測定は Applied Biosystem model 120A PTH-分析機 を用いて行った。

ホスホセリンの確認はヒスタチン1をトリプシンで分解して得られたN末端の1位から6位までのペプチド (T-1) を減圧下に6 N HCl 中で110°C, 2時間加水分解した試料について行った。

6. Hi 遊離活性の測定

分離した肥満細胞の浮遊液 (10⁵細胞/ml) 0.5 ml を37°C で5分間保温したのちヒスタチン類を加えて10分間反応させた。反応は1.5ml の氷冷した PS を加えて停止させ、4°C において3,000×g, 15分間遠心した。その上清および沈渣を分離しそれぞれに0.1N になるように HCl を加え、100°C で3分間加熱したものを Hi 定量の試料とした。

Hi 遊離の時間経過の測定は反応液の10倍容量の氷冷 PS を加えて反応を停止させた⁴³⁾。この方法によって短い反応経過の測定ができた。

Hi 遊離の pH の影響を測定するために pH 4.0~8.0の範囲ではリン酸緩衝液, pH 8.5~9.0の場合は N-[2-hydroxyethyl] piperazine-N-2-ethanesulfonic acid (HEPES)-NaOH 緩衝液100 mM を用いて行った。

7. Hi の定量

Hi の定量は Shore らの蛍光法⁴⁴⁾によって行った。3.0ml の試料に1 N NaOH を0.6ml 加え、メタノールに溶かした0.15ml の0.5% o-フタルアルデヒドを加え室温で4分間反応させた。反応後、0.3ml の2 M クエン酸を加えて励起波長358 nm, 蛍光波長446nm で測定した。Hi 遊離は下式に従って細胞に含まれる総 Hi 量に対する上清の Hi 量の%として表した。

$$\text{Hi 遊離率} = \frac{\text{上清の Hi 量}}{\text{上清の Hi 量} + \text{沈渣の Hi 量}} \times 100$$

ED₅₀ は、最大の Hi 遊離の50%を示すヒスタチンの濃度を、濃度と遊離率の関係から簡易的に

グラフから求めた。

8. 乳酸脱水素酵素 (LDH) の測定

LDH の測定は Roy らの方法⁴⁵⁾に従って行った。Hi 遊離反応後、遠心して得た上清0.5ml に 1 mM NAD を0.5ml 加え、その反応液0.5ml に 5 mM 乳酸を50 μ l 加えた。他の0.5ml は対照として脱イオン水50 μ l を加えそれぞれ25°C で20分間保温した。反応後脱イオン水をそれぞれ2.5 ml ずつ加えた後、励起波長340nm, 蛍光波長460 nm における蛍光強度を測定した。

LDH の遊離は、0.01% の Triton X-100 を肥満細胞浮遊液に添加した場合の遊離を100%として計算した。

結 果

1. ヒスタチン類の精製

ヒト唾液をヘパリンカラムにかけると、唾液中の Hi 遊離活性は認められなくなる。これは、唾液中の Hi 遊離成分がヘパリンに吸着されることによるものと考えられた。そこで、NaCl の直接濃度勾配法によってこれを溶出すると A, B および C の3つの分画に分かれた (Fig. 1)。肥満細胞からの Hi 遊離活性は B と C の分画に認められたが、A の分画には認められなかった。

A, B および C の分画について脱塩後、それぞれについて逆相 HPLC を行くと Fig. 2 に示すパターンが得られた。Hi 遊離活性のある B 分画は2つのピークに分かれたが最初のピーク、H-1 にのみ Hi 遊離活性が認められた。C 分画は多数のピークに分かれたが主な2つのピーク、H-3 および H-5 に Hi 遊離活性が認められた。H-1, H-3 および H-5 の分画を集め、それぞれ凍結乾燥して Hi 遊離およびアミノ酸分析の試料とした。収量は唾液200ml 当たり、総ペプチド量19mg であり、H-1, 3 および 5 の構成比は1:1:2 であった。

2. ヒスタチンの一次構造

H-1, 3 および 5 についてそれぞれのアミノ酸分析 (Table 1), および自動 Edman 分析法から推定される一次構造を Fig. 3 に示す。

H-1, 3 および 5 のアミノ酸残基の数はそれぞれ38, 32および24であった。これらのペプチドは

Fig. 1 Elution profile of human saliva proteins from heparin-Ultrogel column equilibrated in 0.01M Tris-HCl, pH 7.0. Elution was carried out applying a linear gradient 0-1.5M NaCl in the same buffer. 5 ml fractions were collected and the eluate was monitored for absorbance at 235nm. Hatched area represents histamine-releasing activity.

Fig. 2 Reverse-phase HPLC of fractions eluted from heparin-Ultrogel column. The sample was applied to a column (Chemco-sorb 5-ODS-H) and a linear gradient 10-50% acetonitrile in 0.05% trifluoroacetic acid was applied for 50 min. The flow rate was 1.5ml/min.

それぞれヒスチジン残基を分子内に7つ含んでいた。H-3 と H-5 の末端の1位から24位までのアミノ酸配列は同じであり、H-1 は4位の Glu と11位の Arg を除いて22位までは H-5 の構造と同じであった。また H-1 の32~38位と H-3 の

26~32位の構造も同じであった。H-1のN末端の2位のSerはリン酸基を持つ phosphoserine (Pse) であった。これに対し、H-3とH-5には

Table 1 Amino acid composition of H-1, 3, 5 and tryptic peptide of H-1 (T-1: Asp-Ser-His-Glu-Lyse). Values in parenthesis are data identified by automated Edman degradation.

Amino acid	H-1	T-1	H-3	H-5
Asp	5.6(5)	1.4(1)	3.5(4)	1.2(1)
Ser	2.7(3)	1.2(1)	2.5(3)	1.8(2)
Glu	3.4(3)	1.3(1)	1.0(1)	1.0(1)
Pro	1.1(1)	0	0	0
Gly	3.1(3)	0	2.1(2)	2.3(2)
Ala	0	0	1.0(1)	1.3(1)
Leu	1.0(1)	0	1.1(1)	0
Tyr	5.3(5)	0	3.7(4)	2.6(2)
Phe	3.2(3)	0	1.3(1)	1.2(1)
Lys	2.9(3)	0.8(1)	4.3(4)	4.3(4)
His	7.0(7)	1.0(1)	7.0(7)	7.0(7)
Arg	4.0(4)	1.3(1)	4.0(4)	3.1(3)
Total	38	6	32	24

リン酸基は存在しなかった。H-5の構造はすでに Sugiyama ら³⁷⁾ が報告した唾液ペプチド、F-Aと同一であり、H-1およびH-3はOppenheimらの報告しているヒスタチン1と3に完全に一致していた^{16,17)}。

3. ヒスタチン類によるHi遊離

a) 用量依存性

ヒスタチン類(H-1, 3および5)はFig. 4に示すようにラット分離肥満細胞から $5\mu\text{M}$ から $150\mu\text{M}$ の濃度範囲において用量依存的にHiを遊離した。H-3およびH-5はほぼ同程度のHi遊離活性を示し、それらの ED_{50} は約 $15\mu\text{M}$ であった。一方、H-1の ED_{50} は約 $100\mu\text{M}$ であり、H-3およびH-5に比較してHi遊離活性は弱かった。

b) Hi遊離の時間経過

37°C においてH-5によるHi遊離は10秒以内に最大に達した(Fig. 5)。反応時間5秒後の時点ですでに約80%のHi遊離が起こり、10秒後に反応は最大に達した。それ以後のHi遊離には変化がみられなかった。他のヒスタチンについても同様の結果であった。

Fig. 3 Amino acid sequences of histatins 1, 3 and 5. Identical residues are enclosed by the circle or the solid line. P-Ser represents phosphoserine.

Fig. 4 Histamine release from isolated rat mast cells induced by histatins 1, 3 and 5. Mast cells were incubated for 10 min at 37°C with H-1 (○), H-3 (△) and H-5 (●). Values represent the mean $\pm$ S. E. of three experiments corrected for spontaneous release.

Fig. 5 Time course of histamine release induced by H-5. Mast cells were incubated with H-5 (40 μ M) (●) or without H-5 (○) at 37°C. Values represent the mean $\pm$ S.E. of three experiments corrected for spontaneous release.

c) 反応温度の影響

Fig. 6 は H-5 による Hi 遊離の温度の影響を示すもので、この遊離反応の至適温度は 25°C から 37°C の範囲に存在し、10°C 以下または 45°C 以上では反応は抑制された。また、肥満細胞を 45°C で 10 分間保温した後、37°C において H-5 を添加しても Hi 遊離は起こらず、45°C の保温によって Hi 遊離反応は不可逆的に抑制された。

d) pH の影響

H-5 による Hi 遊離は Fig. 7 に示すように反応液の pH が中性から酸性側においては顕著に

Fig. 6 Effect of temperature on the histamine release induced by H-5. Mast cells were preincubated at various temperatures for 10 min, and further incubation was made for 10 min with H-5 (40 μ M) (●) or without H-5 (○). Values represent the mean $\pm$ S. E. of three experiments corrected for spontaneous release.

Fig. 7 Effect of pH on the histamine release induced by H-5. Mast cells were incubated for 10 min at 37°C with H-5 (40 μ M) (●) or without H-5 (○) in an incubation medium with various pH's. Values represent the mean $\pm$ S.E. of three experiments corrected for spontaneous release.

起こったが、アルカリ側では抑制され、Hi 遊離の至適 pH は 6.5~7.2 であった。

e) カルシウムイオンの影響

反応液中の Ca^{2+} 濃度の OM から 10^{-3}M の範囲において Hi 遊離活性を調べたが、H-5 による Hi 遊離に対する Ca^{2+} の影響は認められなかった。また Ca^{2+} を含まない反応液に 1 mM EDTA を加えた場合にも Hi 遊離に影響は認められなかった (Fig. 8)。

Fig. 8 Effect of extracellular calcium ions on the histamine release induced by H-5. Mast cells were incubated at 37°C for 10min with H-5 (40 μ M) (●) in a medium containing CaCl₂ at various concentrations, and with 1mM EDTA (○). Values represent the mean of two experiments.

Fig. 9 Release of intracellular LDH accompanied with histamine release induced by H-5. Mast cells were incubated at 37°C for 10min with H-5 (40 μ M) and Triton-X 0.01%. LDH was assayed as described in text. Values represent the mean of two experiments.

4. LDH の遊離に対する影響

H-5 による肥満細胞からの Hi 遊離が細胞の崩壊によるものでないことを確認するために細胞質からの LDH の遊離を測定した。その結果、Hi 遊離に伴う LDH の遊離は認められず、Fig. 9 に示すように H-5 による肥満細胞からの Hi 遊離が約60%である場合においても LDH の遊離は起こらなかった。これに対して細胞の lysis を起こす Triton-X の場合には Hi 遊離に伴って LDH の遊離が著明に認められた。

考 察

ヒト唾液成分を電気泳動的に分析する試みは古くから行われており、Hoerman⁴⁶⁾、Meyer ら⁴⁷⁾、および Bellavia⁴⁸⁾ はヒト唾液を電気泳動することによって塩基性の成分の存在を認め、Bonilla ら⁴⁹⁾ は、これらの成分が低分子の蛋白質であることを報告している。

Azen¹⁹⁾ は、ヒト唾液を尿素存在下に酸性条件で澱粉ゲル電気泳動を行い、多種類の塩基性蛋白を分離した。彼はこれらの蛋白を家族的に調査し、遺伝的に多形性を示すことを見いだした。そしてこれらの蛋白に耳下腺由来の塩基性蛋白質という意味で parotid basic protein (Pb) という名称を提唱した。その後、彼はこれらの蛋白がヒトを含む霊長類にのみ存在し、犬やラットには認められないことを報告した²⁰⁾。以上のことからこれらの蛋白は人類遺伝学や進化の面から興味を持たれていた。

一方、Balekjian ら²³⁾ は、弱酸性のイオン交換クロマトグラフィーによってヒト耳下腺唾液から高ヒスチジン含有のペプチドを分離し、これらがヒストンであることを主張した。これらのペプチドはポリアクリルアミド電気泳動において 6～8 本のバンドに分かれ、アミノ酸分析の結果、ヒスチジンを17～30%含んでいた。

また、Holbrook ら⁵⁰⁾ は、ヒト耳下腺唾液から塩基性アミノ酸を50%以上も含む低分子の塩基性ペプチドを分離し、これらが口腔内細菌の糖分解活性を上昇させることを報告している。このような経過でヒト唾液中の高ヒスチジン含有ペプチドの存在が次第に明らかにされてきた。その後、Hay¹⁰⁾ によってこれらのペプチドに対して histidine-rich polypeptides (HRPs) という名称が最初に用いられた。彼はヒト耳下腺唾液から酸性の高ヒスチジン含有ペプチドを分離し、これがヒドロキシアパタイトに強い親和性を示すことを見いだした。そしてこのペプチドがエナメル質表面の獲得被膜 (acquired enamel pellicle) の形成に関与することを示唆した。

続いて Baum ら²⁵⁻²⁹⁾ は塩基性 HRPs の分離に初めて成功した。彼らはヒト耳下腺唾液からイオ

ン交換クロマトグラフィーとゲル濾過法により HRP_s を分離し、カチオン電気泳動において HRP_s が 1～7 までの成分に分かれることを見いだした。また Peters ら^{21,22)}は前述の Pb をヒト耳下腺唾液から分離するとともに、類似の構造を示す post-Pb protein (PPb) を分離した。彼らは Pb および PPb が高ヒスチジン含有ペプチドであることを確認し、また Pbs がさらに 4 つの成分に分かれることを報告している。

その後、HRP_s の最初の標品が MacKay ら³⁰⁾によって得られた。彼らはイオン交換クロマトグラフィーとゲル濾過法によってヒト耳下腺唾液から mg の単位で HRP_s の粗標品を得ることに成功した。彼らはこの方法によって唾液 100ml から乾燥重量 6 mg の HRP_s の標品を精製した。しかし、この粗標品は主として HRP-3 および 5 を含んだ HRP-1～7 の混合物であり、均一に精製されたものではなかった。

HRP_s の 1 つについて初めて一次構造を明らかにしたのは Sugiyama ら^{36,37)}である。彼らはヒト耳下腺唾液から肥満細胞に対して Hi 遊離活性を有するペプチド、F-A を分離しその一次構造を報告した。この F-A は高ヒスチジン含有ポリペプチドであり、その一次構造はその後報告されたヒスタチン 5 (HRP-5)¹⁷⁾と同一のものであった。

近年になって、Oppenheim ら^{16,17)}は、ヒト耳下腺唾液から HRP-1, 3 および 5 を分離し、それらの一次構造を明らかにした。最初にその一次構造を報告したのはヒト耳下腺唾液からのいわゆる中性 HRP¹⁶⁾であり、この中性 HRP はリン酸残基を含んでおり溶液中においてリン酸カルシウムの形成を阻害した。それ故、彼らはこの HRP が獲得被膜形成に関与するペプチドであることを示唆した。続いて彼ら¹⁷⁾は、ヒト耳下腺唾液を Bio-gel P2 カラムでゲル濾過を行い、唾液中のすべての HRP_s が Bio-gel に非特異的に吸着され、他の蛋白や塩よりはるかに遅れて溶出されることを見いだした。彼らはこの Bio-gel P2 カラムによって得られた分画を逆相 HPLC で精製し、HRP-1, 3 および 5 に関する一次構造から従来中性 HRP と言われていたペプチドが

HRP-1 と一致することを確認した。そして従来から個々の研究者によって分離法や分析法の違いから種々の名称がつけられていた高ヒスチジン含有ペプチド類に対し、“ヒスタチン”と命名し、名称を統一した。そして電気泳動上の陽極からの易動度に従ってヒスタチン類を 1～7 まで分類した。最近彼らはヒスタチン類を 1～12 まで精製し、それらの一次構造を明らかにしている¹⁸⁾。この Bio-gel P2 を用いるヒスタチン類の分離法は確かに one-step での分離が可能であるが、Bio-gel に対するヒスタチン類の非特異的な吸着を利用したものであることやゲル濾過に長時間を要する欠点がある。

これに対して、本研究のヒスタチン類分離法は非常に簡便な方法であり、しかも迅速にかつ高収率な分離を可能にした。

本分離法の特徴は、1) ヘパリンカラムを用いるアフィニティークロマトグラフィーを利用する、2) Hi 遊離活性を分離、精製の指標とする、3) 唾液試料を酸性条件下で前もって短時間加熱処理することにある。ヘパリンカラムを唾液中のヒスタチン類の分離に応用したのは、著者らが血清アルブミンのペプシン分解物から Hi 遊離活性のあるペプチド、P-1 を分離するのに非常に有効であったことによる⁴¹⁾。Figs. 1, 2 に示したようにヘパリンカラムを用いて唾液中のすべてのヒスタチン類を one step で分離することを可能にした。このヘパリンカラムを用いることによって分離に要する時間を大幅に短縮でき、再現性よく、高収量にヒスタチン類を分離できる利点がある。

分離、精製の指標として Hi 遊離活性を測定することはすでに杉山らがヒト唾液中の Hi 遊離活性ペプチド、F-A の分離やマウス顎下腺の Hi 遊離活性因子の分離に用いた方法を適用したことによる^{31,52)}。Oppenheim ら¹⁷⁾の報告により、F-A とヒスタチン 5 が同一物質であることが確認されたので、ヒスタチン類の分離に Hi 遊離活性を指標として応用することは有効な手段である。

本研究で著者が行った唾液試料の加熱処理は、加熱しない場合に比べヒスタチン類の収量が多いこと、およびヒスタチン類の構成比が一定になる傾向があった。ヒスタチン類の構成比が一定にな

らない傾向は、従来からとりわけ全唾液において顕著であることが報告されていた²⁵⁾。これは唾液中に存在する種々のプロテアーゼなどによってヒスタチン類が口腔内において酵素的に分解を受けることによるものと考えられていた^{17,19-22,25)}。最近、顎下腺からのいわゆる塩基性 HRP の cDNA のクローニングによってその塩基配列から一次構造が推定された⁵³⁾。その構造は現在のヒスタチン 3 と一致するものであった。また、耳下腺や顎下腺からのヒスタチン 1 および 3 の cDNA の解析から、これらの 2 種のヒスタチンが異なる遺伝子から生成されること、および他のヒスタチン類はこれら 2 種のヒスタチンから酵素的に分解を受けて生成されたものであると考えられている⁵⁴⁻⁵⁶⁾。そこで著者は、酸性条件下で唾液試料を短時間加熱することによって、分離時における口腔内のプロテアーゼの影響を極力少なくすることができた。その結果、ヒスタチン 1 および 3 を収率よく得ることができた。

したがって、本分離法は従来のヒスタチンの分離法と比較して迅速性、再現性および収率において非常に有用であった。

現在までヒスタチン類には種々の生物活性が報告されているが、これらの活性について最初に記載したのは Balekjian ら²⁴⁾であろう。彼らはいくく患者の耳下腺唾液を電気泳動することによって、唾液中の塩基性の蛋白がう蝕のない患者と比較して有意に少ないことを見いだした。これは後に MacKay ら³⁵⁾および Iacono ら⁵⁷⁾によっても認められたが、彼らの報告はいずれもヒスタチン類の正確な同定および定量によって行われた結果ではなかった。その後、ヒスタチン類の標品の精製が可能になり、これらを用いて *S. mutans* に対する抗菌作用および *C. albicans* に対する抗真菌作用が見いだされた。MacKay ら³⁴⁾および Pollock ら³¹⁾は、*S. mutans* や *C. albicans* をヒスタチン類の粗標品と保温することによって、ヒスタチン類が菌の増殖を阻止し、また高濃度では殺菌的に働くことを見いだした。彼らはこのことから、ヒスタチン類が唾液中において自然の殺菌成分として存在している可能性を示唆した。その後、Oppenheim ら^{16,17)}は、精製したヒスタチン 1、

3 および 5 を用いてそれぞれ *C. albicans* の発芽阻止作用および殺菌作用を見だし、抗真菌作用はヒスタチン 5 が最も強く、次いでヒスタチン 3、1 の順であることを報告している。そして、このことからヒスタチン類が免疫を介さない直接的な生体防御機構 (host's non-immune defense system) に関与していることを示唆した。また Sanarpia III ら³³⁾も、精製したヒスタチン 5 が *C. albicans* に対して pH 依存性に静菌的または殺菌的に作用することを報告している。

ヒスタチン類によるラット肥満細胞からの Hi 遊離活性は Sugiyama ら³⁶⁾によって見いだされたが、彼らが分離したペプチドはヒスタチン 5 のみであり、その他のヒスタチン類についての検討はなされていなかった。そこで本研究においては精製したヒスタチン 1 および 3 に関してヒスタチン 5 と比較しながら Hi 遊離活性を検討した。

本研究におけるヒスタチン類によるラット肥満細胞からの Hi 遊離に関して、精製したヒスタチン 1 および 3 がヒスタチン 5 と同様に分離ラット肥満細胞から脱顆粒を伴って用量依存的に Hi を遊離することを確認した。この遊離反応はきわめて短時間に完了し、温度や pH に著しく依存していた。しかし細胞外のカルシウムは必要ではなかった。またヒスタチン 5 による Hi 遊離に際しては細胞質内の LDH の漏出は認められなかった。これらの結果は、ヒスタチン 5 によるラット肥満細胞からの Hi 遊離が細胞外カルシウムに依存しない開口分泌様式によるものであることを示すものである。

肥満細胞からのペプチド類による Hi 遊離については、サブスタンス P⁵⁸⁾、ニューロテンシン⁵⁹⁾、ブラジキニン⁶⁰⁾、ソマトスタチン⁶¹⁾およびダイノルフィン⁶²⁾などの内因性ペプチドや、メリチン⁶³⁾およびポリミキシン B⁶⁴⁾などの外因性ペプチドについて多くの報告がある。これらの多くは塩基性のペプチドであり、また両親媒性の構造をもつものが多い⁶⁵⁾。これらペプチドによる Hi 遊離反応の共通点としては、反応が瞬時に完了し、温度と pH に依存性が強く、細胞外カルシウムを必要としないことである。これらは合成 Hi 遊離物質である compound 48/80 による Hi 遊離と共通した

機構によることが考えられる⁶⁵⁾。Hi 遊離活性のあるペプチドがその活性を示すための構造的な条件としては、Lys, Arg および His などの塩基性アミノ酸残基がその分子内に介在することが必須であり、さらに分子内に疎水性の残基が局在することが活性を増強するものと考えられている^{45,66-68)}。これらのペプチドの膜レベルでの反応機構としては、分子内の疎水性部分が肥満細胞の膜脂質層に侵入し、次いで正の電荷を有する塩基性アミノ酸残基の部分が膜の負の電荷を示す部位と相互作用を起こすことにより膜の攪乱を誘発し、脱顆粒が惹起されることが示唆されている^{69,70)}。

そこで Hi 遊離活性ペプチドの疎水性度と Hi 遊離活性の関係を知るために、ハチ毒ペプチドであるメリチンとヒスタチン3の疎水性度を Kyte と Doolittle のパラメータ⁷¹⁾に従って比較した (Fig. 10)。

メリチンはC末端側に親水性の塩基性アミノ酸残基を含み、そのN末端側には疎水性のアミノ酸残基が局在する典型的な両親媒性のペプチドであり、きわめて強い Hi 遊離活性を持つことが知られている^{63,72)}。このメリチンの両親媒性は、Fig. 10に示すように疎水性度パラメータにより明らかであるが、ヒスタチン3はメリチンとは異なり、完全に親水性のペプチドである。ヒスタチン5はヒスタチン3の1~24位までの構造と全く同じであるため疎水性度は同程度と考えられる。またヒスタチン1に関してはヒスタチン3と比較して構造的に大きな差異は認められないが、2位の Ser に親水性のリン酸基が結合していることからヒスタチン3より若干親水性が強い傾向が推察される。

これらのことからヒスタチン3の疎水性度が低く、前述の脱顆粒モデルの条件を完全には満たしてはいないことがわかる。しかし本研究におけるヒスタチン類による Hi 遊離機構は細胞外カルシウムに依存しないこと、温度、pH への依存性、および反応の時間経過の類似性から一連のペプチド性の Hi 遊離物質と類似の機構によるものであることが推察される。それ故、ヒスタチン3とメリチンとの疎水性度の比較から、ヒスタチン類による Hi 遊離は他の両親媒性のペプチドによる

Fig. 10 Hydropathy profile of mellitin and histatin-3. Each plot indicates the mean value of hydropathy index of 7 residues according to the method of Kyte and Doolittle.

Hi 遊離と比較して厳密には膜レベルにおいて機構の異なる可能性も示唆される。

ヒスタチン5による Hi 遊離は温度依存性が強く、特に10°C 以下および45°C 以上の温度では反応が抑制される。このことはおそらく肥満細胞膜の流動性が関係しており、流動性の低下する温度では膜の攪乱が抑制されて反応性が低下するものと思われる。膜の攪乱に関しては、ヒスタチン類が膜の疎水性部分で α -helix 構造をとることによって起こるとされ、抗カンジダ活性もこの現象が関係していると考えられている⁷³⁾。

また、この Hi 遊離反応は溶液の pH が中性側から酸性側で顕著にみられる。これはヒスタチン類がこれらの pH の範囲では解離型として存在するために反応しやすい状態にあることが推察される。

構造と活性相関についての詳細な解析は、ヒスタチン類の Hi 遊離に必要な活性部位 (essential moiety) を決定する必要がある。現在著者はヒスタチン類を種々の蛋白分解酵素などで分解して活性部位の検索を行っているが、ヒスタチン5はヒスタチン3のN末端1位から24位までの構造であり、この二者の Hi 遊離活性の強さは同程度であることから、Hi 遊離活性に必要な分子構造はヒスタチン5の分子中に存在することが示唆される。また、ヒスタチン1は2位の Ser に結合したリン酸基によって活性が減弱されることが推察される。このリン酸基の存在は、Oppenheim ら¹⁶⁾のヒドロキシアパタイトに対する結合性に関与する部位でもあるので、Hi 遊離活性の発現とは異なっており興味深い。

従来多くの研究がなされてきた Hi 遊離物質の細胞レベルでの反応機構は、肥満細胞膜に与えられた刺激情報が膜に存在するホスホリパーゼCを活性化し、イノシトールリン脂質の代謝変化を引き起こし、これによって細胞内の遊離カルシウム濃度が上昇し、脱顆粒現象が惹起させることが示唆されている⁷⁴⁾。最近、compound 48/80およびトロンビンによる肥満細胞からの Hi 遊離が百日咳毒素処理により著しく抑制されることが見いだされ、肥満細胞における Hi 遊離刺激によるホスホリパーゼCの活性化に百日咳毒素感受性G蛋白が関与する可能性が指摘されている⁷⁵⁾。この現象はサブスタンスPやハチ毒マストパランにおいても確認され⁷⁶⁾、マストパランは人工脂質膜中で直接G蛋白を活性化することが認められている⁷⁷⁾。このG蛋白は、IgEを介する Hi 遊離においては関与しないことが明らかにされており^{78,79)}、IgEを介さないペプチド性 Hi 遊離物質による非免疫的刺激での Hi 遊離機構を解明するための重要な知見であり、本研究のヒスタチン類による Hi 遊離とこのG蛋白とがどのような関連性にあるのか興味深い。

ヒスタチン類の口腔生物学的意義に関してはまだ不明の点が多いが、ヒスタチン類が肥満細胞から遊離する Hi は、哺乳動物のほとんどすべての臓器組織中に存在し、特に肥満細胞や好塩基球の顆粒内に多く貯蔵されている。そして本来は体内に恒存する生理的作用物質の1つとみなされるがアレルギー反応や種々の刺激作用によって Hi が遊離されると、毛細血管の拡張や、透過性を亢進させ、これに伴う浮腫や発赤、および知覚神経終末の刺激による搔痒感や痛みを招来し炎症を惹起することから急性炎症初期のケミカルメディエーターと考えられている⁸⁰⁾。また一方でヒスタチン類の mRNA は耳下腺と顎下腺にのみ存在することが最近判明した^{55,81)}。これらのことからヒスタチン類の口腔生物学的意義として、唾液中に特異的に分泌される自然の生体防御物質として抗菌作用、抗真菌作用を示すとともに口腔内の炎症の初期過程に関与している可能性が示唆される。

結 論

ヒト混合唾液からラット腹腔肥満細胞からの Hi 遊離活性を有するペプチドを分離し、それらの Hi 遊離機構に関して詳細に検討し、以下の結果を得た。

1) ヘパリンアフィニティークロマトグラフィーによりヒト唾液蛋白は3つの分画(A, B および C)に分かれ、そのうちBとCの分画に Hi 遊離活性が認められた。

2) 逆相 HPLC を用いてヘパリンカラムB, C分画から Hi 遊離活性を指標にして H-1, 3, および5の3つのピークを分離した。

3) H-1, 3 および5のアミノ酸分析および一次構造を測定した。これらのペプチドはそれぞれ分子内にヒスチジン残基を7つ含んでおり、ヒスタチン1, 3および5と完全に一致する構造であることを確認した。

4) H-3 および5は分離ラット肥満細胞から5~40 μ Mの濃度範囲で脱顆粒を伴って用量依存的に Hi を遊離した。これらの ED₅₀ は両者共ほぼ同じ値で約15 μ Mであった。一方 H-1 も Hi 遊離活性を示したが ED₅₀ は100 μ Mであり、H-3 および H-5 に比べ活性は弱かった。

5) H-5 による Hi 遊離は37°Cで10秒以内に完了し、至適温度は25°C~37°Cの範囲であった。反応温度が15°C以下および45°C以上では Hi 遊離は抑制された。この遊離はメジウムの pH が中性から酸性側で顕著に起こり、アルカリ側では抑制された。またこの遊離はメジウム中のカルシウムを必要としなかった。

6) H-5 による Hi 遊離に際して肥満細胞からの乳酸脱水素酵素の漏出は認められなかった。

以上の結果は Hi 遊離を指標にして、ヘパリンアフィニティークロマトグラフィーと逆相 HPLC によって迅速、簡便にヒト混合唾液からヒスタチン1, 3および5を分離できることを示すものである。またヒスタチン5は肥満細胞から細胞外液のカルシウムに依存しない開口分泌様式によって Hi を遊離することがわかった。おそらくヒスタチン類は自然の生体防御物質として口腔内の炎症の初期過程に何らかの役割を果たしているも

のと考えられる。

謝辞：稿を終えるに臨み、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古田裕昭教授、杉山勝三助教授に深甚なる感謝の意を表します。また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1講座西嶋克

已教授に衷心から感謝致します。

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歯科薬理学教室の皆様、ならびに口腔外科学第1講座の皆様に心から感謝致します。

本論文の要旨は、第62回日本薬理学会総会（1989年3月、京都）において発表した。

抄録：ラット肥満細胞からのヒスタミン（Hi）遊離活性を有するペプチドをヒト唾液からヘパリンアフィニティークロマトグラフィーと逆相高速液体クロマトグラフィー（HPLC）を用いて分離した。

ヘパリンカラムからの唾液ペプチドの溶出分画は A, B および C の3つの分画に分かれ、そのうち B および C の分画にヒスタミン遊離活性が認められた。これらの分画についてさらに逆相 HPLC で精製し、Hi 遊離活性を持つ3つのピーク（H-1, 3 および 5）を得た。これらのピークのペプチドについてアミノ酸組成および一次構造を測定した。その結果 H-1, 3 および 5 はそれぞれヒスタチン 1, 3 および 5 に一致していた。

H-3 および H-5 は 5~40 μ M の濃度範囲で分離ラット肥満細胞から脱顆粒を伴って濃度依存的に Hi を遊離した。H-1 も Hi 遊離活性を示したが、その活性は H-3 や H-5 に比べて弱かった。H-5 による Hi 遊離は 37°C では 10 秒以内に最大に達し、その至適温度は 25°C から 37°C の範囲にあった。反応温度が 15°C 以下および 45°C 以上では遊離は抑制された。この遊離反応は溶液の pH が中性側から酸性側で顕著であり、アルカリ側では抑制された。また Hi 遊離反応はメジウム中のカルシウムを必要としなかった。H-5 による Hi 遊離に際して肥満細胞からの LDH の漏出は認められなかった。以上の結果はヘパリンカラム法と逆相 HPLC の併用によってヒト唾液中からヒスタチン 1, 3 および 5 を迅速に分離、精製することができること、およびヒスタチン 5 が肥満細胞から細胞外液中のカルシウムに依存しない開口分泌様式によって Hi を遊離することを示すものである。この Hi 遊離作用の生理的な意義は不明であるが自然の生体防御物質として口腔内の炎症の初期過程に関与しているものと考えられる。

文 献

- 1) Mandel, I. D.: The role of saliva in maintaining oral homeostasis. J. Am. Dent. Assoc. **119**: 298-304, 1989.
- 2) 市岡正道, 齊藤忠義, 河村洋二郎, 覚道幸男, 坂田三弥編: 最新歯学生理学, 第2版, pp. 452-455, 医歯薬出版, 東京, 1983.
- 3) Hay, D. I.: CRC handbook of experimental aspects of oral biochemistry, pp. 319-335, CRC press, Inc., Boca Raton, FL., 1983.
- 4) 真田一男: 唾液ペプチドの構造と口腔内における機能. 歯科ジャーナル **16**: 589-597, 1982.
- 5) Minaguchi, K. and Bennick, A.: Genetics of human salivary proteins. J. Dent. Res. **68**: 2-15, 1989.
- 6) 久保木芳徳, 寺岡加代: 歯質表面のアパタイトと唾液タンパク質—う蝕征服の鍵. Quintessence **4**: 27-36, 1985.
- 7) Hay, D. I.: The interaction of human parotid salivary proteins with hydroxyapatite. Arch. Oral Biol. **18**: 1517-1529, 1973.
- 8) Moreno, E. C., Kresak, M. and Hay, D. I.: Adsorption thermodynamics of acidic proline-rich human salivary proteins onto calcium apatites. J. Biol. Chem. **257**: 2981-2989, 1982.
- 9) Hay, D. I.: The isolation from human parotid saliva of a tyrosine-rich acidic peptide which exhibits high affinity for hydroxyapatite surfaces. Arch. Oral Biol. **18**: 1531-1541, 1973.
- 10) Hay, D. I.: Fractionation of human parotid salivary proteins and the isolation of an histidine-rich acidic peptide which shows high affinity for hydroxyapatite surfaces. Arch. Oral Biol. **20**: 553-558, 1975.
- 11) Miyake, M., Sanjo, O., Kuboki, Y. and Sasaki, S.: A histidine-rich protein isolated from human parotid saliva having a high affinity to hydroxyapatite. Jpn. J. Oral Biol. **29**: 477-481, 1987.
- 12) Bennick, A., Chau, G., Goodlin, R., Abrams, S., Tustian, D. and Madapallimattam, G.: The role of human salivary acidic proline-rich proteins in the formation of acquired dental pellicle *in vivo* and their fate

- after adsorption to the human enamel surface. Arch. Oral Biol. **28** : 19-27, 1983.
- 13) Schlesinger, D. H. and Hay, D. I.: Complete structure of statherin, a tyrosin-rich acidic peptide which inhibits calcium phosphate precipitation from human parotid saliva. J. Biol Chem. **252** : 1689-1695, 1977.
 - 14) Hay, D. I., Bennick, A., Schlesinger, D. H., Minaguchi, K., Madapallimattam, G. and Schluckebier, S. K.: The primary structures of six human salivary acidic proline-rich proteins (PRP-1, PRP-2, PRP-3, PRP-4, PIF-s, PIF-f). Biochem. J. **255** : 15-21, 1988.
 - 15) Bennick, A.: Structural and genetic aspects of proline-rich proteins. J. Dent. Res. **66** : 457-461, 1987.
 - 16) Oppenheim, F. G., Yang, Y.-C., Diamond, R. D., Hyslop, D., Offner, G. D. and Troxer, R. F.: The primary structure and functional characterization of the neutral histidine-rich polypeptide from human parotid secretion. J. Biol. Chem. **261** : 1177-1182, 1986.
 - 17) Oppenheim, F. G., Xu, T., McMillian, F. M., Levitz, S. M., Diamond, R. D., Offner, G. D. and Troxler, R. F.: Histatins, a novel family of histidine-rich proteins in human parotid secretion. J. Biol. Chem. **263** : 7472-7477, 1988.
 - 18) Troxler, R. F., Offner, G. D., Xu, T., vanderSpek, J. C. and Oppenheim, F. G.: Structural relationship between human salivary histatins. J. Dent. Res. **69** : 2-6, 1990.
 - 19) Azen, E. A.: Genetic polymorphism of basic proteins from parotid saliva. Science **176** : 673-674, 1972.
 - 20) Azen, E. A.: Properties of salivary basic proteins showing polymorphism. Biochem. Genet. **9** : 69-86, 1973.
 - 21) Peters, E. H. and Azen, E. A.: Isolation and partial characterization of human parotid basic proteins. Biochem. Genet. **15** : 925-946, 1977.
 - 22) Peters, E. H., Goodfriend, T. and Azen, E. A.: Human Pb, human post-Pb, and nonhuman primate Pb proteins: Immunological and biochemical relationships. Biochem. Genet. **15** : 947-962, 1977.
 - 23) Balekjian, A. Y. and Longton, R. W.: Histones isolated from human parotid fluid. Biochem. Biophys. Res. Commun. **50** : 676-682, 1973.
 - 24) Balekjian, A. Y., Meyer, T. S., Montague, M. E. and Longton, R. W.: Electrophoretic patterns of parotid fluid proteins from caries-susceptible individuals. J. Dent. Res. **54** : 850-856, 1975.
 - 25) Baum, B. J., Bird, J. L., Millar, D. B. and Longton, R. W.: Studies on histidine-rich polypeptides from human parotid saliva. Arch. Biochem. Biophys. **177** : 427-436, 1976.
 - 26) Baum, B. J., Bird, J. L., Millar, D. B. and Longton, R. W.: Isolation and partial characterization of an histidine-rich polypeptide from parotid saliva of the monkey, *macaca nemestrina*. Comp. Biochem. Physiol. **56A** : 115-120, 1977.
 - 27) Baum, B. J., Bird, J. L. and Longton, R. W.: Histidine-rich-polypeptides in macaque parotid saliva are not nuclear histones. Arch. Oral Biol. **22** : 455-456, 1977.
 - 28) Baum, B. J., Bird, J. L. and Longton, R. W.: Polyacrylamide gel electrophoresis of human salivary histidine-rich-polypeptides. J. Dent. Res. **56** : 1115-1118, 1977.
 - 29) Baum, B. J., Bird, J. L. and Longton, R. W.: Evidence that the histidine-rich polypeptides of human parotid saliva are acinar secretory products of the parotid gland. J. Dent. Res. **56** : 877, 1977.
 - 30) MacKay, B. J., Pollock, J. J., Iacono, V. J. and Baum, B. J.: Isolation of milligram quantities of a group of histidine-rich polypeptides from human parotid saliva. Infect. Immun. **44** : 688-694, 1984.
 - 31) Pollock, J. J., Denepitiya, L., MacKay, B. J. and Iacono, V. J.: Fungistatic and fungicidal activity of human parotid salivary histidine-rich polypeptides on *Candida albicans*. Infect. Immun. **44** : 702-707, 1984.
 - 32) Pollock, J. J., MacKay, B. J., Denepitiya, L., Iacono, V. J. and Renner, R. P.: Anticandida properties of natural salivary histidine-rich and synthetic histidine peptides: relevance to denture stomatitis, XXXIInd colloquium, protides of the biological fluids, pp. 309-314, Pergamon press, Oxford, 1984.
 - 33) Santarpia III, R. P., Brant, E. C., Lal, K., Brasseur, M. M., Hong, A. L. and Pollock, J. J.: A comparison of the inhibition of blastospore viability and germ-tube development in *Candida albicans* by histidine peptides and ketoconazole. Arch. Oral Biol. **33** : 567-573, 1988.
 - 34) MacKay, B. J., Denepitiya, L., Iacono, V. J., Krost, S. B. and Pollock, J. J.: Growth-inhibitory and bactericidal effects of human parotid salivary histidine-rich polypeptides on *Streptococcus mutans*. Infect. Immun. **44** : 695-701, 1984.
 - 35) MacKay, B. J., Iacono, V. J., Baum, B.

- J. and Pollock, J. J.: Effect of salivary cationic polypeptides on permeability of bacterial membranes. *J. Dent. Res. (Abstr.)* **58** : 256, 1979.
- 36) Sugiyama, K., Suzuki, Y. and Furuta, H.: Isolation and characterization of histamine-releasing peptides from human parotid saliva. *Life Sci.* **37** : 475-480, 1985.
- 37) Sugiyama, K., Miyoshi, S. and Furuta, H.: The amino acid sequence of a salivary peptide (F-A) with histamine-releasing property. *Jpn. J. Oral Biol.* **27** : 1252-1253, 1985.
- 38) 久保木芳徳: 採唾法と唾液の生化学検査. *歯科ジャーナル* **16** : 725-732, 1982.
- 39) Sugiyama, K.: Calcium-dependent histamine release with degranulation from isolated rat mast cells by adenosine 5'-triphosphate. *Jpn. J. Pharmacol.* **21** : 209-226, 1971.
- 40) Enerbäck, L. and Svensson, I.: Isolation of rat peritoneal mast cells by centrifugation on density gradients of percoll. *J. Immunol. Methods* **39** : 135-145, 1980.
- 41) Sugiyama, K., Ogino, T. and Ogata, K.: Histamine release induced by proteolytic digests of human serum albumin: Isolation and structure of an active peptide from pepsin treatment. *Jpn. J. Pharmacol.* **49** : 165-175, 1989.
- 42) Edman, P. and Begg, G.: A protein sequenator. *Eur. J. Biochem.* **1** : 80-91, 1967.
- 43) Bloom, G. D., Fredholm, B. and Haegermark, Ö.: Studies on the time course of histamine release and morphological changes induced by histamine liberators in rat peritoneal mast cells. *Acta Physiol. Scand.* **71** : 270-282, 1967.
- 44) Shore, P. A., Burkhalter, A. and Cohn, V. H., Jr.: A method for the fluorometric assay of histamine in tissues. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **127** : 182-186, 1959.
- 45) Roy, P. D., Moran, D. M., Bryant, V., Stevenson, R. and Stanworth, D. R.: Further studies on histamine release from rat mast cells *in vitro* induced by peptides. *Biochem. J.* **191** : 233-237, 1980.
- 46) Hoerman, K. C.: On the zone electrophoresis of human parotid saliva in starch gels. *J. Lab. Clin. Med.* **53** : 64-68, 1959.
- 47) Meyer, T. S. and Lamberts, B. L.: Zone electrophoresis of human parotid saliva in acrylamide gel. *Nature* **205** : 1215-1216, 1965.
- 48) Bellavia, S. L.: Electrophoresis of proteins from human parotid saliva. *Arch. Oral Biol.* **16** : 751-758, 1971.
- 49) Bonilla, C. A. and Stringham, R. M., Jr.: Electrophoresis of human salivary secretions at acid pH. *J. Chromatogr.* **50** : 345-348, 1970.
- 50) Holbrook, I. B. and Molan, P. C.: The identification of a peptide in human parotid saliva particularly active in enhancing the glycolytic activity of the salivary micro-organisms. *Biochem. J.* **149** : 489-492, 1975.
- 51) 杉山勝三, 鈴木幸雄, 森田孝子, 古田裕昭: マウス顎下腺のヒスタミン遊離物質に関する研究. *歯基礎誌* **26** : 1144-1151, 1984.
- 52) Sugiyama, K., Suzuki, Y. and Furuta, H.: Histamine-release induced by 7S nerve-growth factor of mouse submandibular salivary glands. *Arch. Oral Biol.* **30** : 93-95, 1985.
- 53) Dickinson, D. P., Ridall, A. L. and Levine, M. J.: Human submandibular gland statherin and basic histidine-rich peptide are encoded by highly abundant mRNA's derived from a common ancestral sequence. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **149**, 784-790, 1987.
- 54) Sabatini, L. M. and Azen, E. A.: Histatins, a family of salivary histidine-rich proteins, are encoded by at least two loci (*HIS1* and *HIS2*). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **160** : 495-502, 1989.
- 55) vanderSpek, J. C., Offner, G. D., Troxler, R. F. and Oppenheim, F. G.: Molecular cloning of human submandibular histatins. *Arch. Oral Biol.* **35** : 137-143, 1990.
- 56) vanderSpek, J. C., Wyandt, H. E., Skare, J. C., Milunsky, A., Oppenheim, F. G. and Troxler, R. F.: Localization of the genes for histatins to human chromosome 4q13 and tissue distribution of the mRNAs. *Am. J. Hum. Genet.* **45** : 381-387, 1989.
- 57) Iacono, V. J., MacKay, B. J., Denepitiya, L., Pollock, J. J., Petropoulou, K. and Mandel, I. D.: Salivary histidine-rich polypeptide profiles of caries-resistant and -susceptible adults. *J. Dent. Res. (Abstr.)* **62** : 516, 1983.
- 58) Erjavec, F., Lembeck, F., Florjanc-Irman, T., Skofitsch, G., Donnerer, J., Saria, A. and Holzer, P.: Release of histamine by substance P. *Naunyn-Schmied. Arch. Pharmacol.* **317** : 67-70, 1981.
- 59) Carraway, R., Cochrane, D. E., Lansman, J. B., Leeman, S. E., Paterson, B. M. and Welch, H. J.: Neurotensin stimulates exocytotic histamine secretion from rat mast cells and elevates plasma histamine levels. *J. Physiol. (Lond.)* **323** : 403-414, 1982.
- 60) Devillier, P., Renoux, M., Giroud, J-P. and Regoli, D.: Peptides and histamine release from rat peritoneal mast cells. *Eur. J. Phar-*

- macol. **117** : 89-96, 1985.
- 61) Theoharides, T. C. and Douglas, W. W. : Mast cell histamine secretion in response to somatostatin analogues: structural considerations. *Eur. J. Pharmacol.* **73** : 131-136, 1981.
 - 62) Sugiyama, K. and Furuta, H. : Histamine release induced by dynorphin- (1-13) from rat mast cells. *Jpn. J. Pharmacol.* **35** : 247-252, 1984.
 - 63) 杉山勝三, 古田裕昭 : ハチ毒による肥満細胞からのヒスタミン遊離とセファランチンによる抑制作用. *基礎と臨床* **18** : 33-36, 1984.
 - 64) Peachell, P. T. and Pearce, F. L. : Some studies on the release of histamine from mast cells treated with polymyxin. *Agents Actions* **14** : 379-385, 1984.
 - 65) Lagunoff, D., Martin, T. W. and Read, G. : Agents that release histamine from mast cells. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **23** : 331-351, 1983.
 - 66) Johnson, A. R. and Erdős, E. G. : Release of histamine from mast cells by vasoactive peptides, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **142** : 1252-1256, 1973.
 - 67) Jasani, B., Kreil, G., Mackler, B. F. and Stanworth, D. R. : Further studies on the structural requirements for polypeptide-mediated histamine release from rat mast cells. *Biochem. J.* **181** : 623-632, 1979.
 - 68) Foreman, J. C., Jordan, C. C., Oehme, P. and Renner, H. : Structure-activity relationship for some substance P-related peptides that cause wheal and flare reactions in human skin. *J. Physiol. (Lond.)* **335** : 449-465, 1983.
 - 69) Repke, H., Piotrowski, W., Bienert, M. and Foreman, J. C. : Histamine release induced by Arg-Pro-Lys-Pro (CH₂)₁₁CH₃ from rat peritoneal mast cells. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **243** : 317-321, 1987.
 - 70) Repke, H. and Bienert, M. : Structural requirements for mast cell triggering by substance P-like peptides. *Agents Actions* **23** : 207-210, 1988.
 - 71) Kyte, J. and Doolittle, R. F. : A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J. Mol. Biol.* **157** : 105-132, 1982.
 - 72) Habermann, E. : Bee and wasp venoms. *Science* **177** : 314-322, 1972.
 - 73) Raj, P. A., Edgerton, M. and Levine, M. J. : Salivary histatin 5 : dependence of sequence, chain length, and helical conformation for candidacidal activity. *J. Biol. Chem.* **265** : 3898-3905, 1990.
 - 74) 岡島史和 : GTP 結合蛋白質とイノシトールリン脂質代謝. *代謝* **25** : 237-248, 1988.
 - 75) Saito, H., Okajima, F., Molski, T. F. P., Sha'afi, R. I., Ui, M. and Ishizaka, T. : Effects of ADP-ribosylation of GTP-binding protein by pertussis toxin on immunoglobulin E-dependent and -independent histamine release from mast cells and basophils. *J. Immunol.* **11** : 3927-3934, 1987.
 - 76) Mousli, M., Bronner, C., Bueb, J.-L., Tschirhart, E., Gies, J.-P. and Landry, Y. : Activation of rat mast cells by substance P and mastoparan. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **250** : 329-335, 1989.
 - 77) Higashijima, T., Uzu, S., Nakajima, T. and Ross, E. M. : Mastoparan, a peptide toxin from wasp venom, mimics receptors by activating GTP-binding regulatory proteins (G proteins). *J. Biol. Chem.* **263** : 6491-6494, 1988.
 - 78) Saito, H., Okajima, F., Molski, T. F. P., Sha'afi, R. I., Ui, M. and Ishizaka, T. : Effect of cholera toxin on histamine release from bone marrow-derived mouse mast cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **85** : 2504-2508, 1988.
 - 79) Ishizaka, T. : Role of GTP-binding protein in histamine release from mast cells. *Clin. Immunol. Immunopathol.* **50** : 20-29, 1989.
 - 80) 木村義民 : ヒスタミン研究の史的展望と近年の知見. *治療学* **18** : 147-149, 1987.
 - 81) Sabatini, L. M., Warner, T. F., Saitoh, E. and Azen, E. A. : Tissue distribution of RNAs for cystatins, histatins, statherin, and proline-rich salivary proteins in humans and macaques. *J. Dent. Res.* **68** : 1138-1145, 1989.