

【206】

氏名	水川展吉
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 3326号
学位授与の日付	平成11年3月25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	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
論文審査委員	教授 古田裕昭 教授 松村智弘 教授 菅原利夫

学位論文内容の要旨

[緒言]

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が、これら唾液成分と口腔内疾患との関連性についての研究は少ない。

本研究は高速液体クロマトグラフィー(HPLC)を用いてヒト唾液中のペプチド成分を分析中に口腔癌患者の唾液中に顕著に出現するピーク(P14)を見いだしたことから、この成分を同定し、その測定法を確立して癌疾患との関連性を追究する目的で行った。

P14成分は塩基性の低分子ペプチドでデフェンシンファミリーに属するヒト型デフェンシン1(HNP-1)であった。デフェンシン類は好中球や小腸上皮組織などに見いだされたペプチドで、広範囲な抗菌作用、抗ウイルス作用、抗腫瘍作用など多彩な生物作用をもつ生体防御物質として近年注目されている。

[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術前および術後の口腔扁平上皮癌患者16名(年齢41-79)の協力を得た。対照としては口腔疾患のない18名の健常者(年齢23-78)の協力をえた。
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らの方法で採取し、顎舌下腺唾液は岸本らの方法によってえた。唾液はクエン酸でpH3.0に調整し、-20℃以下に保存して試料に供した。
3. 唾液中ペプチド(HNP-1)の測定
唾液は遠心分離(15,000 rpm/5分間)して上清液を得た。その10 μ lについて逆相HPLC(C18-AMカラム)で分析した。
① HPLCの条件とP14の精製: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により溶離し、波長225nmで検出した。分取したP14は再びHPLCを行い精製した。

⑥分子量およびアミノ酸配列の測定：ペプチドの分子量は質量分析計によって測定し、アミノ酸配列は気相エドマン法によるプロテインシーケンサーによって行った。システインは試料を還元S-ピリジルエチル化した後に測定した。

⑦HNP-1の定量法：合成HNP-1（ペプチド研）を用いHPLCのクロマトグラムのピーク高から検量線を作成し定量した。

[結果]

1. 口腔癌患者唾液のHPLC：口腔癌患者の術前、術後の混合唾液中には、保持時間約14分後に顕著なピーク(P14)が認められたが、このP14は健常者の唾液中には非常に微小か、殆ど認められなかった。また耳下腺および顎舌下腺唾液中には微小にしか認められなかった。
2. P14成分の同定
 - ①P14の光学的性質：P14は波長278nmにおいて吸収極大を示した。また蛍光スペクトル（励起波長278nm）において304および348nmに極大を示したので、チロシンおよびトリプトファンを含むペプチドであることが予測された。
 - ②P14の分子量：3名の口腔癌患者から、それぞれ精製したP14の平均分子量は3,441.8daltonsであった。
 - ③P14のアミノ酸配列：P14のアミノ酸配列は、ACYCRIPACIAGERRYGTCIYQ
GRLWAECCであった。アミノ酸配列のホモロジー検索から、P14はヒト型デフェンシン1(HNP-1)のそれと一致していた。
 - ④合成HNP-1との比較：合成HNP-1および抽出P14のHPLCにおける保持時間は、両者共14.4分で完全に一致していた。
3. HNP-1の定量
 - ①回収率と変動係数(C.V.)：健常者の唾液に添加したHNP-1の回収率は89以上でC.V.値は3%以下であった。
 - ②癌患者唾液中のHNP-1濃度：癌患者唾液中のHNP-1濃度は、術前、術後それぞれ 11.3 ± 7.8 , $5.9 \pm 5.6 \mu\text{g/ml}$ (mean \pm S.D.)で健常者群 $0.8 \pm 0.6 \mu\text{g/ml}$ (mean \pm S.D.)に比較して有意に高い濃度を示した($P < 0.01$)。また術前の方が術後に比較して有意に高かった($P < 0.005$)。唾液中HNP-1濃度は術後の経過とともに減弱したが、3年以上持続する例もあった。

[結語]

1. 口腔癌患者の唾液中にデフェンシンファミリーの一つであるHNP-1が存在することを発見し同定した。
2. 唾液中のHNP-1はHPLCを用いて、少量の試料で迅速、簡便に定量できた。
3. 口腔癌患者の唾液中のHNP-1濃度は、術前の方が術後より高い値を示し、術後の時間経過とともに減弱した。

論文審査結果の要旨

デフェンシン類は好中球や小腸上皮組織などに見いだされたペプチドで、広範囲な抗菌作用や抗腫瘍作用など多彩な生物作用をもつ生体防御物質として近年注目されている。

本研究は高速液体クロマトグラフィー（HPLC）を用いて、ヒト唾液中のペプチド成分を分析中に口腔癌患者の唾液のクロマトグラムに顕著に出現するピーク（P14）を見いだしたことから、この成分を光学的性質、分子量、アミノ酸配列の測定、合成ペプチドとの比較から塩基性の低分子ペプチドのヒト型デフェンシン1（HN P-1）であると同定し、その測定法を確立して癌疾患との関連性を追究したものである。担癌患者の唾液中にHN P-1が高値に認められ、癌疾患における防御機構への何らかの関与が示唆された。現在までヒト唾液中におけるHN P-1に関する報告はなく、本研究は定量法に関しても、HPLCによって数 μ lの試料で短時間に測定可能な簡便な新しい方法を確立している。今回の研究の成果は、HN P-1が文献的に抗腫瘍作用を有していることから、唾液中のHN P-1が、生体の有する口腔癌に対する防御機構に関与する可能性を示唆したもので、極めて意義のあるものである。従って、本論文は博士（歯学）の学位授与に十分値するものと認めた。