マウス唾液腺におけるプロスタグランディン合成能に関する研究

大島和彦

Studies on prostaglandin synthetic activities
in mouse salivary glands

Kazuhiko OHSHIMA

Abstract: Prostaglandin (PG) synthetic activities in mouse salivary glands were studied. When mouse submandibular gland homogenate was incubated with radioactive arachidonic acid, three radioactive metabolites were detected which were identified with PGE_2 , $\text{PGF}_{2\alpha}$ and PGI_2 . Thromboxane A_2 (TXA_2) and PGD_2 were not detected. Optimal biosynthesis was obtained in an 0.05 M sodium phosphate buffer at pH 7.4. Under this condition PG formation was linear up to the arachidonic acid concentration of $40\text{ }\mu\text{M}$. Reduced glutathion did not affect the biosynthesis, but catecholamines i.e. L-adrenaline, L-noradrenaline and L-isoproterenol produced only a small stimulation of all three PG synthesis in the submandibular gland homogenate. Major cyclooxygenase products of the parotid gland and the sublingual gland were also PGE_2 , $\text{PGF}_{2\alpha}$ and PGI_2 . Total PG synthetic activities of three PGs in both the submandibular gland and the parotid gland were higher than those in the pancreas, liver and brain, and that of the submandibular gland was the highest of the examined tissues. Both PGE_2 and PGI_2 synthetic activities were higher in the order of submandibular gland > parotid gland > sublingual gland. $\text{PGF}_{2\alpha}$ synthetic activity was higher in the order of parotid gland > submandibular gland > sublingual gland. PGI_2 synthetic activity in the submandibular gland of male mouse was about 1.5 times higher than that of female one.

Next, the relationship between PG metabolism and DNA synthesis in isoproterenol (IPR)-stimulated salivary glands was investigated. Administration of indomethacin, a PG synthesis inhibitor, suppressed the effect of IPR on the DNA synthesis in the submandibular gland and the parotid gland. Cyclooxygenase activity did not change in IPR-stimulated salivary glands. From these results, it is suggested that PGs are involved in the stimulation of the DNA synthesis by IPR in the salivary glands. It is also possible that IPR activates not a cyclooxygenase, but a phospholipase, in the salivary glands.

Key words: prostaglandin, salivary gland, isoproterenol

広島大学歯学部口腔外科学第1講座

(主任: 高田和彰教授)

The First Department of Oral and Maxillofacial
Surgery, Hiroshima University School of Dentistry
(Chief: Prof. Kazuaki Takada)

受付日: 昭和61年1月25日

緒 言

プロスタグランディン (PGs) は、アラキドン酸のよう
な炭素数20のエイコサポリエン酸から生合成される一
連の不飽和脂肪酸群である。1930年代ヒト精液中の子宮

図1 マウス顎下腺における PGs 合成能を示す薄層ラジオクロマトグラム

A: コントロール, B: インドメサシン 10^{-5}M 添加

展開溶媒: AI 溶媒系 (ベンゼン/ジオキサン/酢酸=20/20/1, v/v)

AA: アラキドン酸, Tx: トロンボキサン B_2 , E: PGE_2 , F: $\text{PGF}_{2\alpha}$, kF: 6-keto $\text{PGF}_{1\alpha}$

図2 マウス顎下腺における PGs 合成能を示す薄層ラジオクロマトグラム

A: コントロール, B: インドメサシン 10^{-5}M 添加

展開溶媒: B溶媒系 (酢酸エチル/イソオクタン/酢酸/水=11/5/2/10, v/v, の有機層)

AA: アラキドン酸, Tx: トロンボキサン B_2 , E: PGE_2 , F: $\text{PGF}_{2\alpha}$, kF: 6-keto $\text{PGF}_{1\alpha}$, D: PGD_2

収縮作用物質として発見され^{1,2)}, 1960年代 Bergströmら³⁾により primary PGs (PGE , PGF)の単離, 構造決定がなされるとともに, 活発な生物活性の研究が行われるようになった。さらに近年トロンボキサン (Tx)⁴⁾, プロスタサイクリン (PGI_2)⁵⁾などが発見され, 多種の PGs が生体内で多彩な生物活性を示すことが明らかになってきた。

1971年 Vane ら⁶⁾によって非ステロイド系の抗炎症薬が PGs の生合成を阻害することが発見されると, 炎症

のメディエーターとしてその病理的側面が強調されてきた。しかし PGs は生体に広く分布し, ほとんどの臓器で生合成され, その臓器に特有な機能に深く関与していることが明らかになってくるにつれ, 生理機能調節因子として重要な位置を占めるようになってきた。

唾液腺, 特に雄マウス顎下腺にはレニン⁷⁾, カリクレイン⁸⁾, 上皮増殖因子⁹⁾, 神経成長因子¹⁰⁾など種々の生理活性因子が高濃度に存在することが確認されているが, これらの因子と PGs との密接な関係を示唆する多

図 3 顎下腺における PGs 合成に対する (A) ホモジネートのタンパク量, (B) 基質濃度, (C) インキュベーション時間, (D) 反応液の pH の影響
(●): PGE₂, (○): PGI₂, (△): PGF_{2α}
—: 0.05 M リン酸緩衝液, ----: 0.05 M トリス塩酸緩衝液

くの報告がなされている¹¹⁻¹⁶⁾。また PGE₂, PGF_{2α} などが唾液分泌促進作用をもつことが報告され、唾液外分泌と PGs との関係も指摘されている¹⁷⁻¹⁹⁾。

一方マウスにイソプロテレノール (IPR) を投与すると、唾液腺 (顎下腺, 耳下腺) は一過性の著明な細胞増殖を起こすことが知られているが²⁰⁾、最近 PGs が細胞増殖調節作用をもつことが示唆されている²¹⁻³³⁾。多くの癌細胞で PGs 合成が増大し²³⁻²⁷⁾、また PGs が細胞増殖を促進する事実が示されている²⁷⁻³³⁾。特に PGF_{2α}, Tx などは細胞増殖促進作用を示し、DNA 合成を開始させる因子として注目されている²⁸⁻³³⁾。

しかし唾液腺における PGs 生合成に関しては、組織化学的に PGs 合成酵素の局在を示した Sirigu ら³⁴⁾の報告と、ウサギの唾液腺抽出液に PGs が含まれるとした Rigas ら³⁵⁾の報告があるが、PGs 生合成能に関する知見はほとんどみられない。そこで著者は唾液腺における PGs 代謝に関する基礎的知見を得る目的で、マウス

唾液腺の PGs 合成能について検討した。さらに唾液腺細胞増殖と PGs との関係を検索するため、IPR 投与時のマウス唾液腺の PGs 合成酵素活性と DNA 合成活性について検討した。

材料ならびに方法

- 1. 実験動物
実験には生後7週齢の ddY 系雄性マウス (体重約30 g) を使用した。
- 2. PGs 合成能の測定
PGs 合成能の測定は Morita ら³⁶⁾の方法に準拠して行った。マウスを頸椎脱臼にて屠殺し、ただちに顎下腺、耳下腺、舌下腺を摘出した。周囲の結合組織およびリンパ節を可及的除去後、4倍量の0.05 M 磷酸緩衝液 (pH 7.4, EDTA 20 mM) をを加えて作成したホモジネート 2 ml (約 80 mg 蛋白量) に、0.18 μCi [1-¹⁴C] アラ

図 4 顎下腺における PGs 合成に対する (A) 還元型グルタチオン, (B) L-アドレナリンの影響

(●) : PGE₂, (○) : PGI₂, (△) : PGF_{2α}

図 5 マウスの三大唾液腺と種々の臓器における PGs 合成能

(各値は 5 例の平均値 ± S.E.)

キドン酸 ([1-¹⁴C] AA, specific activity 58 mCi/mmol) および 40 μM アラキドン酸 (AA) を加え, 37°C 30分インキュベートした. 反応終了後ただちに氷冷し, 1 N 塩酸を滴下し, 反応液の pH を 3 に合わせ, 8 倍量の酢酸エチルにて PGs 画分を抽出した. 減圧乾固後, エタノールに再溶解し試料とした. 本試料を authentic PGs とともに薄層クロマトグラフィー (TLC) にて分析した. すなわち Kiesel Gel 60 (Merck, Germany) plate を用い, AI 溶媒系 (ベンゼン/ジオキサン/酢酸=20/20/1, v/v) および B 溶媒系 (酢酸エチル/イソオクタン/酢酸/水=11/5/2/10, v/v の有機層) にて展開した. ラジオクロマトスキャナー (Aloka, TRM-1 B) にて生成 PGs の種類を分析した後, おおのこの PGs 画分の放射活性を液体シンチレーションカウンター (Aloka, LSC-900) に

て測定した. なお蛋白量は Lowry の方法³⁷⁾に従って定量した.

3. DNA 合成活性の測定

マウスに [メチル-³H] チミジン (³H-TdR, specific activity 25 Ci/mmol), 10 μCi/匹を腹腔内投与し, 30分後屠殺し, ただちに顎下腺, 耳下腺を摘出した. DNA は Schneider の方法³⁸⁾に準じて抽出, 定量した. すなわち摘出した唾液腺に 9 倍量の 10% トリクロロ酢酸 (TCA) を加え, 氷冷下にホモジナイズした試料を, 5% TCA 2.5 ml で 3 回洗浄, 遠心した. その沈渣に 5% TCA 5 ml を加え, 90°C 15 分間加熱し, DNA 画分を抽出した. この DNA 溶液について, DNA 量をジフェニルアミン法にて比色定量を行った. また DNA 中の ³H-TdR の取り込みを, Insta-Gel をシンチレータ

ーとして液体シンチレーションカウンター(Aloka, LSC-900)を用いて測定した。

4. 試薬

実験に使用した主な試薬は以下のとおりである。アラキドン酸, PGE_2 , $\text{PGF}_{2\alpha}$, PGD_2 , 6-keto $\text{PGF}_{1\alpha}$, トロンボキサン B_2 (フナコシ薬品), L-イソプロテレノール, L-アドレナリン, L-ノルアドレナリン, 還元型グルタチオン (Sigma 社), Insta-Gel (Packard 社), $[1-^{14}\text{C}]$ アラキドン酸, $[\text{メチル-}^3\text{H}]$ チミジン (Radiochemical Center)。

結 果

I. 正常マウス唾液腺における PGs 合成能

1. 顎下腺における PGs 合成能

1) AI 溶媒系による TLC の分析結果

図1-Aは顎下腺におけるPGs合成能を示す薄層ラジオクロマトグラムである。 $[1-^{14}\text{C}]$ AAから転換される産物には2つの高い放射活性を示すピークが認められた。ピークⅠはauthenticの PGE_2 に移動度が一致し、ピークⅡは $\text{PGF}_{2\alpha}$ もしくは6-keto $\text{PGF}_{1\alpha}$ (PGI_2 の安定代謝産物)に移動度が一致した。しかし TxB_2 (TxA_2 の安定代謝産物)に相当する位置にピークは認められなかった。

図1-Bはシクロオキシゲナーゼの特異的な阻害剤であるインドメサシン (IND)⁶⁾を 10^{-5}M 添加した時のラジオクロマトグラムである。図1-Aでみられた2つのピークはほぼ完全に消失した。したがってこの産物がシクロオキシゲナーゼ産物、すなわちPGsであることが確認された。

2) B溶媒系による TLC の分析結果

B溶媒系のラジオクロマトグラムでは、3つの高い放射活性を示すピークが認められた。ピークⅠは PGE_2 に、ピークⅡは $\text{PGF}_{2\alpha}$ に、ピークⅢは6-keto $\text{PGF}_{1\alpha}$

に移動度が一致した。 PGD_2 に相当するピークは認められなかった(図2-A)。またIND 10^{-5}M 添加により、図2-Aでみられたピークはほぼ完全に消失した(図2-B)。

なお図1および図2において、AAに近接して存在するピークはIND添加により低下せず、また煮沸したホモジネートによる分析にても認められることから、非酵素的産物を示すものと考えられる。

以上の結果より、マウス顎下腺における主たるシクロオキシゲナーゼ産物は、 PGE_2 , PGI_2 , $\text{PGF}_{2\alpha}$ であることが明らかとなった。

2. 各種条件における PGs 合成能

1) ホモジネート蛋白量

蛋白量20~40 mgまで直線的におおのこのPGs合成

図6 顎下腺, 耳下腺におけるPGs合成能の性差 (各値は5例の平均値 $\pm$ S.E., * $p < 0.05$)

図7 イソプロテレノール (IPR) 投与時のマウス唾液腺のDNA合成の経時的変化 (各値は6~12例の平均値 $\pm$ S.E.)

図8 イソプロテレンール (IPR) 投与時の唾液腺 DNA 合成に対するインドメサシン (IND) 処置の影響
(各値は 6~12 例の平均値 $\pm$ S.E., * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$)

図9 イソプロテレンール (IPR) 投与時の唾液腺の PGs 合成酵素活性と DNA 合成
(各値は 2 例の平均値)

量は増加し、80 mg ではほぼプラトーに達した (図3-A)。

2) 基質濃度

AA 濃度 40~60 μ M まで直線的におおのの PGs 合成量は増加し、100 μ M を過ぎるとプラトーに近づいた (図3-B)。

3) インキュベーション時間

反応開始から 5~10 分間におおのの PGs 合成量は急激に増加し、30分でプラトーに達した (図3-C)。

4) 反応 pH

PGE_2 , PGI_2 , $\text{PGF}_{2\alpha}$ ともに磷酸緩衝液の pH 7.4 で最大の合成量を示した (図3-D)。

以上の結果より、ホモジネート蛋白量 80 mg, AA 40 μ M, pH 7.4 で 37°C 30分インキュベートする反応条件を決定し、以下の検索を行った。

3. 還元型グルタチオン (GSH) およびカテコールアミンの顎下腺 PGs 合成に対する影響

1) GSH の PGs 合成に対する影響

GSH は PGE イソメラーゼの補酵素として知られている^{39,40)}。顎下腺ホモジネートに GSH を 0.1 mM か

ら 5 mM まで添加したが、PGs 合成量の増加はみられなかった。濃度の上昇とともに PGE_2 , PGI_2 合成量はかえって減少する傾向にあった (図4-A)。

2) カテコールアミンの PGs 合成に対する影響

アドレナリンは PGs 合成時生ずるヒドロキシラジカルを捕捉し、PGs 合成を促進すると考えられている^{41,42)}。図4-Bに示すように、アドレナリン添加濃度 1 mM までおおのの PGs 合成量は徐々に増加し、1 mM を過ぎるとほぼプラトーに達した。

アドレナリン同様、ノルアドレナリン、イソプロテレンールをそれぞれ 3 mM 添加することにより、 PGE_2 , $\text{PGF}_{2\alpha}$, PGI_2 の合成量は、いずれもほぼ同率で増加し、総 PGs 合成量は無添加時の約 1.5 から 1.7 倍となった (表1)。

4. 三大唾液腺および種々の臓器における PGs 合成能

マウスの三大唾液腺 (顎下腺, 耳下腺, 舌下腺) と腎臓, 脾臓, 肝臓, 脳における PGs 合成能について検索した。唾液腺以外の臓器では全般に合成能は低く、その

表 1 顎下腺における PGs 合成に対する種々のカテコールアミンの影響
(各値は対照を 1 とした時の相対値)

カテコールアミン (3 mM)	PGE ₂	PGF _{2α}	PGI ₂	総合成量
対 照	1	1	1	1
L-アドレナリン	1.74	1.71	1.68	1.70
L-ノルアドレナリン	1.39	1.71	1.85	1.57
L-イソプロテレノール	1.51	1.58	1.58	1.54

表 2 イソプロテレノール投与時の唾液腺の DNA 合成活性に対するインドメサシン処置の影響
(数値は12例の平均値±S.E., *p<0.05, **p<0.01)

	顎 下 腺 (26hrs)	耳 下 腺 (22hrs)
対 照 群	111.6±6.8	193.7±16.2
インドメサシン投与群		
{ 5 mg/kg×3	96.3±18.0	170.8±24.0
{ 10mg/kg×3	*76.3±11.6	**114.4±17.0

図 10 イソプロテレノール (IPR) 投与時の顎下腺の PGs 合成能および DNA 合成に対するインドメサシン (IND) 処置の影響
(各値は 2 例の平均値)

中では腎臓が高い合成能を示した。腎臓では PGE₂、PGF_{2α} の合成能が PGI₂ に比べ高かった。それに対し、唾液腺の総 PGs 合成能は顎下腺が最も高く、ついで耳下腺、舌下腺の順で、顎下腺、耳下腺は他臓器に比し高い総 PGs 合成能を示した。三大唾液腺の主たるシクロオキシゲナーゼ産物は PGE₂、PGF_{2α}、PGI₂ であるが、そのうちでは PGE₂ の合成能が最も高かった。各種の PGs ごとと比較すると、PGE₂ 合成能は顎下腺>耳下腺>舌下腺の順で、顎下腺、耳下腺の合成能は腎臓のそれより高かった。PGF_{2α} 合成能は PGE₂ 合成能とは異なり、耳下腺が最も高く、ついで顎下腺、舌下腺の順で、腎臓の方が高かった。PGI₂ 合成能は顎下腺>耳下腺>舌下腺の順で、顎下腺は腎臓や他臓器と比し特に高い合成能を示した(図5)。

5. PGs 合成能の性差

マウス唾液腺、特に顎下腺には形態的および生化学的に著しい性差が認められる⁴³⁻⁴⁶⁾。そこで PGs 合成能の性差について検索した。顎下腺では PGE₂ 合成能には雌雄差なく、PGF_{2α} 合成能は雌の方が雄より若干高い傾向を示した。しかし PGI₂ 合成能は雄が雌の約 1.5 倍の

合成能を示し、明らかな雌雄差が存在した。耳下腺においても同様の傾向がみられたが、顎下腺ほど著明な雌雄差は認められなかった(図6)。

II. IPR によって誘導される唾液腺細胞増殖と PGs との関係についての実験結果

1. IPR 投与時の唾液腺の DNA 合成

IPR (80 mg/kg, i.p.) 投与により、顎下腺および耳下腺に図7のごとく DNA 合成が誘導された。顎下腺では投与後22時間より DNA 合成が起こり、26時間で最大値に達し、32時間を過ぎると徐々に減少した。耳下腺では顎下腺より若干早く、投与後16時間より DNA 合成が起こり、22時間で最大値に達し、以後徐々に減少した。DNA 合成は耳下腺の方が大きく、最大値において耳下腺は顎下腺の約 1.7 倍の合成量を示した。

2. インドメサシン (IND) の唾液腺 DNA 合成に対する影響

IPR によって誘導された唾液腺 DNA 合成に対する PGs の関与を検討するため、IND 投与マウスにおける DNA 合成活性を測定した。IND は IPR 投与から DNA 合成開始までの間の PGs 合成を阻害するため、6 時間

図 11 イソプロテノール (IPR) 投与時の耳下腺の PGs 合成能および DNA 合成に対するインドメサシン (IND) 処置の影響 (各値は 2 例の平均値)

おきに 3 回, IPR 投与前 1 時間, 投与後 5 時間, 11 時間に皮下投与した。表 2 は IPR 投与後 DNA 合成が最も増大する時の DNA 合成活性に対する IND の影響を示す。IND 5 mg/kg, 3 回処置では, 顎下腺, 耳下腺ともに DNA 合成活性の若干の抑制がみられたが, 有意差はなかった。しかし IND 10 mg/kg, 3 回処置では, 両唾液腺ともに有意な DNA 合成活性の抑制が認められた。抑制率は顎下腺 32%, 耳下腺 41% であった。そこで IND 10 mg/kg, 3 回処置を行った時の DNA 合成活性の経時的变化を観察したが, 顎下腺, 耳下腺ともに IND 処置で明らかに DNA 合成が抑制された (図 8)。

以上の結果より, IPR によって誘導された唾液腺細胞増殖系における DNA 合成に, PGs が促進的に働いている可能性が示唆された。

3. IPR 投与時の唾液腺の PGs 合成酵素活性の変動
唾液腺における DNA 合成と PGs との関係をさらに検索するため, IPR 投与時の PGs 合成酵素活性を測定した。PGs 合成酵素活性は 40 mg 蛋白量の ホモジネートを 37°C 5 分インキュベートする条件下で求めた。図 9 に示すごとく, 顎下腺および耳下腺において, IPR 投与時から DNA 合成開始までの間の PGE_2 , PGI_2 , $\text{PGF}_{2\alpha}$ の合成酵素活性は, いずれもほとんど変化を認めなかった。このことから, シクロオキシゲナーゼ経路の酵素活性は, IPR によって影響を受けないことが明らかとなった。

4. 唾液腺の PGs 合成能に対する IND 処置の影響
IPR 投与マウスに IND (10 mg/kg, 3 回) 処置を行った時の PGs 合成能について検討した。IND 処置により, 顎下腺, 耳下腺ともに IPR 投与時から DNA 合成

開始までの間の PGE_2 , PGI_2 , $\text{PGF}_{2\alpha}$ 合成能はいずれも約 70% 阻害された (図 10, 11)。以上の結果より, IPR 投与マウスに IND 処置を行うと PGs 合成が阻害され, その際同時に DNA 合成も抑制されることが明らかとなった。

考 察

PGs は生体内に広く分布し, 臓器に特有の機能を充進あるいは抑制する生理機能調節因子として注目を集めている。PGs が精液中の子宮収縮物質として発見^{1,2)}されて以来, PGs の生合成に関する検索は精囊腺を中心に行われてきた。ヒツジ精囊腺ホモジネートを用い van Dorp⁴⁷⁾ や Bergström ら⁴⁸⁾ は, AA から PGE_2 が生合成されることを報告し, さらにその PGs 合成酵素活性がミクロソーム画分に存在することを報告した^{39,40)}。また Änggård ら⁵⁰⁾ はモルモット肺のホモジネートにおいては, PGE_2 とともに $\text{PGF}_{2\alpha}$ が AA から合成されることを報告した。以後腎臓⁵¹⁾, 胃⁵²⁾, 子宮³⁹⁾ など, 種々の臓器における PGs 生合成能が検索され, 生体のほとんどすべての臓器に PGs 生合成能が存在することが明らかとなった。Christ ら⁵³⁾ は種々の臓器の PGs 生合成能を比較し, 精囊腺のほか, 腎臓質や肺, 腸に比較的高い合成能が認められるが, その他の臓器では合成能は低いと報告している。さらに最近になって Tx 合成系⁴⁾ が血小板で, プロスタサイクリン (PGI_2) 合成系⁵⁾ が動脈壁で発見された。前者は血小板のほか, 肺や脾臓, マクロファージなどで見出され, 後者は動脈壁のほか, 胃や肉芽腫, 子宮, 肺, 精囊腺などで見出されている⁵⁴⁾。

しかし唾液腺における PGs 生合成に関する知見はきわめて乏しい。わずかにヒト唾液腺の PGs 合成酵素が導管部に局在するという組織化学的研究³⁴⁾と, ウサギの唾液腺抽出液に PGE_2 , $\text{PGF}_{2\alpha}$, PGI_2 などが含まれるという報告³⁵⁾がみられる。

本実験では, まずマウス顎下腺ホモジネートを用いて [$1-^{14}\text{C}$] AA から転換される PGs を分離, 定量し, その主たるシクロオキシゲナーゼ産物が PGE_2 , PGI_2 , $\text{PGF}_{2\alpha}$ であることを明らかにした。しかし PGD_2 , TxA_2 合成能は認められなかった。

続いて顎下腺ホモジネートにおいて, ホモジネート蛋白量, 基質量, インキュベーション時間, 反応 pH などの PGs 合成に対する影響を検討した。これらの条件の影響は, 胃⁵⁵⁾, 腎臓^{56,57)}, 肝臓³⁸⁾ における諸家の報告とほぼ同様の傾向であった。基質量に関しては, 腎臓のミクロソーム画分においては, 2 mM⁵⁷⁾ あるいは 30~50 μM ⁵⁸⁾ まで直線的に合成量が增加する報告があるが, 本実験では 40~60 μM まで直線的に合成量が增加した。

ついで GSH とカテコールアミンの PGs 合成に対する影響を検索した。GSH は Hugteren ら³⁹⁾によりウサ

ギ精囊腺の PGs 合成を促進することが見い出され、Hayaishi ら⁴⁰⁾により、GSH は PGE イソメラーゼの補酵素として働いていることが明らかにされた。本実験で GSH を 0.1 mM から 5 mM まで添加したが、PGs 合成の促進は認められなかった。このことから顎下腺ホモジネートには補酵素としての GSH はすでに十分含まれているものと考えられる。

アドレナリンなどのカテコールアミン類は、そのカテコール核に PGs 合成反応時生ずるヒドロキシラジカルを捕捉する、いわゆるラジカルスカベンジャーとして作用し、PGs 合成を促進すると考えられている^{41,42)}。カテコールアミン添加で、顎下腺における PGE₂、PGF_{2α}、PGI₂ ともに同じ割合でその合成量が増加したが、ヒドロキシラジカルを遊離する PG ヒドロペルオキシダーゼが 3 種の PGs に共通して関与するためであると考えられる。

続いてマウスの三大唾液腺と種々の臓器における PGs 合成能を比較したところ、顎下腺、耳下腺の総 PGs 合成能は脾臓、肝臓、脳などに比し高い合成能を示した。唾液腺では顎下腺の総 PGs 合成能が最も高く、ついで耳下腺、舌下腺の順で、顎下腺は検索した臓器中最も高い PGs 合成能を示した。また顎下腺において PGE₂、PGF_{2α} の合成能には雌雄差を認めなかったが、PGI₂ 合成能は雄が雌より高く、総 PGs 合成能においても雄の方が雌より高い傾向を示す結果を得た。

他方、マウス顎下腺、特に雄マウス顎下腺には、レニン⁷⁾、カリクレイン⁸⁾、上皮増殖因子⁹⁾、神経成長因子¹⁰⁾などの生理活性因子が高濃度に存在し、酸性ホスファターゼ⁴⁴⁾や N-アセチル、β-グルコサミダーゼ⁴⁵⁾など種々の酵素活性も高いことが知られている。そしてこれらの因子や酵素が性ホルモン依存性を示すことが報告されている^{44~46)}。また最近 Murota ら⁵⁸⁾によって血管の PGI₂ 合成活性が性ホルモンによって上昇することが示された。これらの報告より考察し、著者の確認した前述の結果より、顎下腺においても PGI₂ 合成酵素活性が性ホルモンの調節を受けている可能性が推察される。

唾液腺の分泌機能と PGs との関係についても多くの報告がみられる。金城ら¹⁷⁾は、PGE₂ が顎下腺のムチン分泌を促進すると報告しているが、本研究においてムチンを多く含む唾液を分泌する顎下腺に PGE₂ 合成能が高い結果が得られた。また Hahn ら¹⁸⁾は、PGF_{2α} が唾液腺の水分分泌を促進すると述べているが、著者は漿液腺である耳下腺に高い PGF_{2α} 合成能を認めた。さらに最近 Lin ら¹¹⁾によって、マウス顎下腺スライスにおけるレニン分泌を PGI₂ が促進する報告がなされているが、本研究では顎下腺に特に高い PGI₂ 合成能が認められた。これらの結果は、ムチン分泌や水分分泌、レニン分泌に PGs が関与していることを示唆するものと考えられ興味深い。

次に IPR 投与マウスにおける唾液腺細胞増殖と PGs との関係について検討した。最近 PGs が細胞増殖に影響を及ぼしていることを示唆する数多くの報告がある^{21~33)}。多くのヒト癌組織^{23,24)}や実験腫瘍^{25~27)}において PGs 合成が増大し、また PGs が細胞増殖を促進する事実が示されている^{27~33)}。さらに IND など PGs 合成阻害剤により、細胞増殖の抑制が起こることが報告されている^{27,59)}。種々の PGs のうちで、特に PGF_{2α} はマウス 3 T 3 細胞の DNA 合成開始の引き金となっている可能性が示唆されている^{28,29)}。また再生肝においては、PGE₂ および PGF_{2α}^{30,31)}や、Tx^{32,33)}が DNA 合成を開始させる因子の一つとしてあげられ、多くの裏付けがなされている。

一方マウスに IPR を投与すると唾液腺（顎下腺、耳下腺）は一過性の著明な細胞増殖を起こす²⁰⁾。耳下腺において最も顕著で、IPR の 1 回投与で、約 60% の腺細胞が 20 時間前後の複製前期 (G₁ 期) を経て、DNA 合成を起こすことが知られている⁶⁰⁾。そこで DNA 合成開始にいたる G₁ 期の生化学的研究が盛んに行われている。特に S 期 DNA 合成に関係する G₁ 期の代謝変化として、cyclic AMP の上昇⁶¹⁾、オルニチン脱炭酸酵素 (ODC) の誘導⁶²⁾、グリコーゲン組織内濃度の上昇⁶³⁾、蛋白⁶⁴⁾、RNA および核酸前駆体の合成促進^{60,65)}などが報告されている。

本実験では、まずマウスに IPR を投与すると、22~16 時間の G₁ 期を経て、顎下腺および耳下腺に著明な DNA 合成が起こることを確認し、続いて G₁ 期に PGs 合成の特異的阻害剤である IND 処置を行うと、S 期 DNA 合成が抑制されることを見出した。そしてこの IND 処置によって、G₁ 期の PGs 合成能が阻害されていることを確認した。これらの結果から、PGs が IPR によって誘導される唾液腺細胞増殖系における DNA 合成に促進的に働いている可能性が示唆された。

そこで IPR の作用点としてシクロオキシゲナーゼなどの活性上昇が考えられたが、IPR 投与から DNA 合成開始までの間の PGs 合成酵素活性にはほとんど変化がなかった。したがってシクロオキシゲナーゼ経路の酵素が、直接 IPR によって活性化あるいは誘導されることはないことが示唆された。このことから IPR はシクロオキシゲナーゼ反応の前段階であるホスホリパーゼを活性化している可能性が考えられる。

最後に IND の作用について慎重に考慮すべき問題は、PGs 合成の特異的阻害作用に加え、非特異的作用を示すことである。たとえば、増殖に密接に関係するとされる Ca transport の抑制⁶⁶⁾や、ODC の阻害⁶⁷⁾を介して、唾液腺 DNA 合成を抑制している可能性もあり、PGs と細胞増殖との関係を考察するにあたり、十分な考慮が必要である。

結 語

引 用 文 献

本研究では、唾液腺における PGs 代謝に関する基礎的知見を得る目的で、まずマウス唾液腺における PGs 合成能について検討し、さらにイソプロテレノール(IPR)投与によって誘導された唾液腺細胞増殖系における PGs と DNA 合成との関係について検索し、以下のことが明らかとなった。

1. マウス唾液腺における主たるシクロオキシゲナーゼ産物は PGE_2 , PGI_2 , $\text{PGF}_{2\alpha}$ であった。

2. シクロオキシゲナーゼ阻害剤インドメサシン(IND)添加により、顎下腺における PGs 合成はほぼ完全に抑制された。

3. ラジカスカベンジャーとして知られるカテコールアミン類の PGs 合成系への添加は、PGs 合成をわずかに促進した。

4. 唾液腺の総 PGs 合成能は顎下腺が最も高く、ついで耳下腺、舌下腺の順で、顎下腺、耳下腺の PGs 合成能は脾臓、肝臓、脳などに比し高い合成能を示した。唾液腺で産生される 3 種の PGs のうち、 PGE_2 の合成能が最も高かった。 PGE_2 および PGI_2 の合成能は顎下腺に最も高く、ついで耳下腺、舌下腺の順で、 $\text{PGF}_{2\alpha}$ 合成能は耳下腺>顎下腺>舌下腺の順であった。

5. 顎下腺において PGI_2 は雌より雄の方が高い合成能を示したが、 PGE_2 , $\text{PGF}_{2\alpha}$ 合成能には雌雄差を認めなかった。

6. IPR 投与による顎下腺、耳下腺における DNA 合成の促進は、IND 処置により抑制された。その際同時に、PGs 合成能も阻害されていた。また IPR 投与時のシクロオキシゲナーゼ経路の酵素活性にはほとんど変化がなかった。

以上の結果より、マウス唾液腺における PGs 合成能に関する諸性質が明らかにされた。また IPR による唾液腺細胞増殖において、PGs が促進的に働き、IPR がシクロオキシゲナーゼ以前の部位に作用する可能性が示唆された。

本研究に際し、ご懇篤なるご指導と、ご校閲を賜った広島大学歯学部口腔外科学第1講座高田和彰教授に深厚なる感謝の意を表します。また終始ご教示、ご校閲いただいた同学部歯科薬理学講座辻本明教授ならびにご助言、ご校閲いただいた同学部口腔生化学講座奥田九一郎教授に心からお礼を申し上げます。最後に同学部口腔外科学第1講座の諸氏、同学部歯科薬理学講座ならびに同学部口腔生化学講座の方々に感謝致します。

本論文の要旨は昭和60年5月第39回日本口腔科学会総会において発表した。

- 1) Kurzok, R. and Lieb, C.C.: Biochemical studies of human semen. II. the action of semen on the human uterus. *Proc Soc Exp Biol Med* 28: 268-272 1930.
- 2) von Euler, U.S.: Über die spezifische Blutdrucksenkende Substanz des menschlichen Prost- und Samen-blasensekretes. *Klim Wochenschr* 14: 1182-1183 1935.
- 3) Bergström, S.: Prostaglandins: members of a new hormonal system. *Science* 157: 382-391 1967.
- 4) Hamberg, M., Svenson, J., et al.: Thromboxanes; a new group of biologically compounds derived from prostaglandin endoperoxides. *Proc Natl Acad Sci USA* 72:2994-2998 1975.
- 5) Moncada, S., Grygleski, R., et al.: An enzyme isolated from arteries transforms prostaglandin endoperoxides to an unstable substance that inhibits platelet aggregation. *Nature* 263:663-665 1976.
- 6) Vane, J.R.: Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanisms of action for aspirin-like drugs. *Nature* 231: 232-235 1971.
- 7) Werle, E., Vogel, R., et al.: Über ein Blutdrucksteigerndes Prinzip in Extrakten aus der Glandula submaxillaris der weißer Maus. *Arch exper Path u Pharmacol* 230: 236-244 1957.
- 8) Werle, E. and von Roden, P.: Über des Vorkommen von Kallikrein in der Speicheldrüsen und in Mundspeichel. *Biochem Z* 286: 213-219 1936.
- 9) Cohen, S.: Isolation of a mouse submaxillary gland protein accelerating incisor eruption and eyelid opening in the new-born animal. *J Biol Chem* 237: 1555-1562 1962.
- 10) Cohen, S.: Purification of a nerve-growth promoting protein from the mouse salivary gland and its neuro-cytotoxic antiserum. *Proc Natl Acad Sci USA* 46: 302-311 1960.
- 11) Lin, C-S, Puttkammer, S., et al.: Prostaglandins and renin release from submaxillary glands *in vitro*. *Proc Soc Exp Biol Med* 172: 472-477 1983.
- 12) Gerber, J.G., Branch, R.A., et al.: Prostaglandins and renin release. II. Assesment of renin secretion following infusion of PGI_2 , E_2 and D_2 into the renal artery of anesthetized dogs. *Prostaglandins* 15: 81-88 1978.
- 13) Suzuki, S., Franco-Saenz, R., et al.: Effect of indomethacin on plasma renin activity in the conscious rat. *Am J Physiol* 240:E 286-

- 289 1981.
- 14) Morita, I., Kanayasu, T., et al.: Kallikrein stimulates prostacyclin production in bovine vascular endothelial cells. *Biochim Biophys Acta* 792: 304-309 1984.
 - 15) Levine, L. and Hassid, A.: Epidermal growth factor stimulates prostaglandin biosynthesis by canine kidney(MDCK) cells. *Biochem Biophys Res Commun* 76: 1181-1187 1977.
 - 16) 米田俊之, 北村昌也, 他: 培養ヒト胎児口蓋細胞によるプロスタグランディン E_2 (PGE_2) 合成に対する Epidermal Growth Factor の促進作用. *歯基礎誌* 24: 40-44 1982.
 - 17) 金城賢治: 唾液ムチン分泌機構に関する薬理学的研究. *広大歯誌* 11: 205-217 1979.
 - 18) Hahn, R.A. and Patil, P.N.: Further observations on the interactions of prostaglandin $F_{2\alpha}$ with cholinergic mechanisms in canine salivary glands. *Eur J Pharmacol* 24: 279-286 1974.
 - 19) Yu, J.H., Burns, S., et al.: Prostaglandin E_1 induced salivary secretion. *Experientia* 38: 1077-1078 1982.
 - 20) Brown-Grant, K.: Enlargement of salivary gland in mice treated with isopropylnoradrenaline. *Nature* 191: 1076-1078 1961.
 - 21) Honn, K.V., Bockman, R.S., et al.: Prostaglandin and cancer: a review of tumor initiation through tumor metastasis. *Prostaglandins* 21: 833-864 1981.
 - 22) Levine, L.: Arachidonic acid transformation and tumor promotion. *Adv Cancer Res* 35: 49-79 1981.
 - 23) Williams, E.D., Karim, S.M.M., et al.: Prostaglandin secretion by medullary carcinoma of thyroid. *Lancet* i: 22-23 1968.
 - 24) Bennett, A., Carter, R.L., et al.: Prostaglandin-like material extracted from squamous carcinomas of the head and neck. *Br J Cancer* 41: 204-208 1980.
 - 25) Tan, W.C., Privett, O.S., et al.: Studies of prostaglandins in rat mammary tumors induced by 7, 12-dimethyl-benzanthracene. *Cancer Res* 34: 3224-3231 1974.
 - 26) Hammarström, S.: Prostaglandin production by normal and transformed 3T3 fibroblasts in cell culture. *Eur J Biochem* 74: 7-12 1977.
 - 27) Trevisani, A., Ferretti, E., et al.: Elevated levels of prostaglandin E_2 in Yoshida hepatoma and inhibition of tumor growth by non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Br J Cancer* 41: 341-347 1980.
 - 28) Jimenez de Asua, L., Clingan, D., et al.: Initiation of cell proliferation in cultured mouse fibroblast by prostaglandin $F_{2\alpha}$. *Proc Natl Acad Sci USA* 72: 2724-2728 1975.
 - 29) O'Farrell, M.K., Clingan, D., et al.: Stimulation of the initiation of DNA synthesis and cell proliferation in several cultured mouse cell types. *Exp Cell Res* 118: 311-321 1979.
 - 30) MacManus, J.P. and Baceland, B.M.: A connection between the production of prostaglandins during liver regeneration and the DNA synthetic response. *Prostaglandins* 11: 609-620 1976.
 - 31) Boynton, A.L. and Whitfield, J.: Calmodulin and cyclic AMP-dependent protein kinases mediate calcium-induced stimulation of DNA synthesis by rat liver cells. *Adv Cyclic Nucleotide Res* 14: 411-419 1981.
 - 32) Miura, Y. and Fukui, N.: Pleiotypic response of regenerating liver. *Adv Enzyme Regulation* 14: 393-405 1976.
 - 33) Mahmud, I., Fukui, N., et al.: Arachidonic acid metabolism in normal and regenerating liver and hepatoma. *Adv Enzyme Regulation* 18: 27-37 1980.
 - 34) Sirigu, P., Cossu, M., et al.: Histochemical localization of prostaglandin synthetase in human exocrine glands. *Anat Rec* 204: 101-104 1982.
 - 35) Rigas, B., Lewis, R.A., et al.: Identification and quantitation of arachidonic-acid metabolic products in rabbit, rat and human saliva. *Arch Oral Biol* 20: 531-535 1983.
 - 36) Morita, I. and Murota, S.: Prostaglandin-synthesizing system in rat liver. *Eur J Biochem* 90: 441-449 1978.
 - 37) Lowry, O.H., Losebrough, N.J., et al.: Protein measurement with Folin-Phenol reagent. *J Biol Chem* 193: 265-275 1951.
 - 38) Schneider, W.C.: Phosphorus compounds in animal tissues. I. extraction and estimation of desoxypentose nucleic acid and of pentose nucleic acid. *J Biol Chem* 161: 293-303 1945.
 - 39) Hugteren, D.H., Beerthuis, R.K., et al.: The enzymatic conversion of all-cis 8, 11, 14-eicosatrienoic acid into prostaglandin E_1 . *Rec Trav Chem* 85: 405-419 1966.
 - 40) Ogino, N., Miyamoto, T., et al.: Prostaglandin endoperoxide E isomerase from bovine vascular gland microsomes, a glutathione-requiring enzyme. *J Biol Chem* 252: 890-895 1977.
 - 41) Sir, C.J., Takeguchi, C., et al.: Mechanism of prostaglandin biosynthesis. III. catecholamine of serotonin as coenzymes. *J Amer Chem Soc* 92: 6670 1970.
 - 42) Ohki, S., Ogino, N., et al.: Prostaglandin hydroperoxidase, an integral part of prostaglandin endoperoxide synthetase from bovine

- siminal vesicular gland microsomes. *J Biol Chem* 254: 829-836 1979.
- 43) Caramia, F.: Ultrastructure of mouse salivary gland. 1. sexual dimorphism. *J Ultrastr Res* 16: 505-523 1966.
- 44) Junqueira, L.C., Fajer, A., et al.: Biochemical and histochemical observation on sexual dimorphism in mice. *J Cell Comp Physiol* 34: 129-158 1949.
- 45) Hosoi, K., Kobayashi, S., et al.: Androgenic regulation of N-acetyl β -glucosaminidase activity in the submandibular glands of mice. *J Biochem* 85: 1483-1488 1979.
- 46) Barka, T.: Biologically active polypeptides in submandibular glands. *J Histochem Cytochem* 28: 836-859 1980.
- 47) van Dorp, D.A., Beerthuis, R.K., et al.: The biosynthesis of prostaglandins. *Biochim Biophys Acta* 90: 204-207 1964.
- 48) Bergström, S., Danielsson, H., et al.: The enzymatic formation of prostaglandin E_2 from arachidonic acid. Prostaglandins and related factors. 32. *Biochim Biophys Acta* 90: 207-210 1964.
- 49) Samuelsson, B.: Biosynthesis and metabolism of prostaglandin. *Progr Biochem Pharmacol* 3: 59-70 1967.
- 50) Änggård, E. and Samuelsson, B.: Biosynthesis of prostaglandins from arachidonic acid in guinea pig lung. Prostaglandins and related factors. 38. *J Biol Chem* 240: 3518-3521 1965.
- 51) Hamberg, M.: Biosynthesis of prostaglandins in the ranal medulla of rabbit. *FEBS Lett* 5: 127-130 1969.
- 52) Pace-Asciak, C. and Wolfe, L.S.: Biosynthesis of prostaglandin E_2 and $F_{2\alpha}$ from tritium-labelled arachidonic acid by rat stomach homogenates. *Biochim Biophys Acta* 218: 537-542 1970.
- 53) Christ, E.J., van Dorp, D.A., et al.: Comparative aspect of prostaglandin biosynthesis in animal tissues. *Biochim Biophys Acta* 270: 537-545 1972.
- 54) Sun, F.F., Chapman, J.P., et al.: Metabolism of prostaglandin endoperoxide in animal tissues. *Prostaglandins* 14: 1055-1074 1977.
- 55) Pace-Asciak, C.: Prostaglandin synthetase activity in the rat stomach fungus. Activation by L-norepinephrine and related compounds. *Biochim Biophys Acta* 280: 161-171 1972.
- 56) Schwartzman, M., Gafni, Y., et al.: Properties of prostaglandin synthetase of rabbit kidney medulla. *Eur J Biochem* 64: 527-534 1976.
- 57) Blackwell, G.J., Flower, R.J., et al.: Some characteristics of the prostaglandin synthesizing system in rabbit kidney microsomes. *Biochim Biophys Acta* 398: 178-190 1975.
- 58) Chang, W.C., Nakano, J., et al.: Stimulation of prostacyclin biosynthetic activity by estro-radiol in rat aortic smooth muscle cells in culture. *Biochim Biophys Acta* 619: 107-118 1980.
- 59) Lynch, N.R., Castes, M., et al.: Mechanisms of inhibition of tumor growth by aspirin and indomethacin. *Br J Cancer* 38:503-512 1978.
- 60) Whitlock, J.P., Kaufman, R., et al.: Changes in thymidine kinase and α -amylase activity during isoproterenol-induced DNA synthesis in mouse salivary gland. *Cancer Res* 28: 2211-2216 1968.
- 61) Tsang, B.K., Rixon, R.H., et al.: A possible role for cyclic AMP in the initiation of DNA synthesis by isoproterenol-activated parotid gland cells. *J Cell Physiol* 102: 19-26 1980.
- 62) Inoue, H., Tanioka, H., et al.: Effect of isoproterenol on polyamine metabolism in mouse salivary glands. *J Biochem* 75: 679-687 1974.
- 63) Malamud, D. and Baserga, R.: Glycogen concentration and DNA synthesis in isoproterenol-stimulated salivary glands. *Exp Cell Res* 50: 581-588 1968.
- 64) Sasaki, T., Litwack, C., et al.: Protein synthesis in the early prereplicative phase of isoproterenol-stimulated synthesis of deoxyribonucleic acid. *J Biol Chem* 244: 4831-4837 1969.
- 65) Roux, J.M., Hoggenraad, N.J., et al.: Biosynthesis of pyrimidine nucleotides in mouse salivary glands stimulated with isoproterenol. *J Biol Chem* 248: 1196-1202 1972.
- 66) Northover, B.J.: Indomethacin—a calcium transport antagonist. *Gen Pharmac* 8: 293-296 1977.
- 67) Verma, A.K., Ashendel, C.L., et al.: Inhibition by prostaglandin synthesis inhibitors of the induction of epidermal ornithine decarboxylase activity, the accumulation of prostaglandins, and tumor promotion caused 12-o-tetradecanoylphorbol 13-acetate. *Cancer Res* 40: 308-315 1980.