ヒト唾液腺初代培養細胞の増殖性に及ぼすイソプロテレノールの影響

宮田 和幸・岩上好伸・和田 健・原田 昌和
高木 健次・森田展雄・坂本 忠幸

The effects of isoproterenol on the growth of human salivary gland cells in primary culture

Kazuyuki MIYATA · Koshin IWAGAMI · Takeshi WADA
Masakazu HARADA · Kenji TAKAGI · Nobuo MORITA
Tadayuki SAKAMOTO

Abstract: The effects of isoproterenol on the outgrowth from human salivary gland explants were studied in primary culture.

Isoproterenol was added to the growth medium to produce a graded series of concentrations of 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} and 10^{-7} g/ml.

In the absence of isoproterenol, the cellular outgrowths from salivary gland were easily degenerated after 4-6 weeks of culture, and in most cases fibroblastic growth exceeded epithelial outgrowth.

Isoproterenol did not increase the growth of salivary gland cells when used at doses of 10^{-4} , 10^{-5} and 10^{-6} g/ml.

At 10^{-5} g/ml, isoproterenol appeared to have the property of maintaining the sheet-like structure of cellular outgrowth.

The inhibitory effect on fibroblastic growth was observed in doses of 10^{-4} , 10^{-5} and 10^{-6} g/ml.

These results show that isoproterenol may act as a regulatory factor in the control of the proliferation and differentiation of human salivary gland cells.

Key words: salivary gland, culture, human, isoproterenol

緒 言

アドレナリン作動性薬物の1つであるイソプロテレノールは、マウス・ラットに大量投与するとその唾液腺に肥大をきたすことが、従来より注目されている^{1,2)}。in vitro においては、イソプロテレノールがマウス、ラットの唾液腺由来細胞に対して、その増殖を促進するとい

う報告が多いものの^{3,4)}、逆に抑制的に働くとする報告もなされている⁵⁾。

一方、マウス・ラットを用いた唾液腺発癌実験においても、イソプロテレノールがこれを促進する⁶⁾、および、抑制する⁷⁾、という報告がなされており、結論は出ていない。また、臨床的にも、イソプロテレノールの長期投与を受けている喘息患者において唾液腺の腫脹をきたした症例が報告されているが、因果関係は必ずしも明らかではない⁸⁾。

しかしながら、以上の実験結果や症例報告から、ヒト唾液腺細胞の増殖過程に対しても、イソプロテレノールが何らかの影響を及ぼしている可能性は大きいものと考えられる。

そこで、われわれは、ヒト唾液腺由来細胞を用いて、培養液中に種々の濃度のイソプロテレノールを添加し、

和歌山県立医科大学歯科口腔外科学教室
(主任：坂本忠幸教授)

Department of Dentistry and Oral Surgery,
Wakayama Medical College (Chief: Prof. Tadayuki Sakamoto)

受付日：昭和62年7月25日

上皮様細胞および線維芽細胞様細胞の増殖・形態に及ぼす影響について検討を加えた。

実験方法

(1) 採取材料

培養材料としては、手術時に得られたヒト顎下腺、口唇腺を用いた。採取症例は、顎下腺の場合は、口腔癌の頸部郭清に伴うもの、腺体内唾石で摘出されたものなどであり、口唇腺の場合は、大部分が下唇部粘液嚢胞の摘出に伴うものである。材料採取に際しては特に無菌操作に留意し、また、採取材料の中でも、できるだけ、変性・萎縮をきたしていない部分を選択した。

(2) 培養方法

無菌的に得られた顎下腺・口唇腺をメスで 1 mm^3 以下に細切し、カバーガラス（マツナミ、 22 mm ）上に直接貼りつけて、それを 35 mm 径プラスチックシャーレ（Falcon）内に静置して、BME 培地（GIBCO）を加えた。なお、BME 培地には新生仔牛血清（中標準血清、三菱化成）を最終濃度20%となるように加え、さらに抗生物質として、ペニシリン 100 U/ml 、ストレプトマイシン $100\text{ }\mu\text{g/ml}$ 、ファンギゾン $0.25\text{ }\mu\text{g/ml}$ （いずれも GIBCO 製、最終濃度）を添加し、pH を $7.2\sim 7.4$ となるよう調整した。これらのシャーレを 5% CO_2 、飽和湿度と 37°C に調節された炭酸ガスインキュベータ（ヤマト、IP-31）内で培養した。培地の交換は週2回行った。

イソプロテレノールは、DL-イソプロテレノール塩酸塩（Sigma）を、最終濃度 10^{-4} 、 10^{-5} 、 10^{-6} 、 10^{-7} g/ml となるように培地中に添加した。

(3) 増殖の測定

組織片からの細胞遊走は培養3～12日後頃より始まり、しだいに充実性の細胞性シートを形成したため、その輪郭を、実体顕微鏡（ニコン、SMZ-10）に装着した描画装置でスケッチし、プランメータ（牛方商会）を用いて面積を測定した（図1）。

(4) DNA 合成能の測定

継代中のヒト顎下腺由来線維芽細胞様細胞を1 wellあたり 10^4 個ずつ microtestplate（Falcon, 3042）に播種し、48時間インキュベートした。さらに各濃度のイソプロテレノールを添加して48時間インキュベートした後、 ^3H -チミジン（ $0.8\text{ }\mu\text{Ci/ml}$ ）を添加し、さらに18時間インキュベートした。Multiple cell harvester（WAKEN, Mark II）で cell harvest した後、 5% トリクロール酢酸、 95% エタノールで洗浄し、液体シンチレーションカウンター（Packard, 3310）にて、とりこまれた ^3H -チミジンをカウントした（図2）。

(5) 形態の観察

増殖細胞の形態観察には、倒立位相差顕微鏡の他、カ

図1 細胞性シートの輪郭の経日的変化

図2 線維芽細胞様細胞のDNA合成能の測定

バーガラスをとり出してメタノールまたは中性ホルマリン固定の後、ヘマトキシリン・エオジンまたはギムザ染色を施して検鏡した。

結果

(1) イソプロテレノール非添加の場合の増殖の経過

組織片からの細胞の遊出は、培養開始3～12日後頃からみられ、しだいに類円形の上皮細胞性シートを形成した（写真1）。このシートの面積を実体顕微鏡に装着した描画装置でスケッチして計測した結果、培養開始後約20日で最大となる例が多かった。この段階でシート内細胞を観察すると、多角形ないし不定形の上皮様細胞が単層状に増殖し、これらの細胞は、“pave” “jigsaw” または “wheel or cord” 状の配列状態を呈していた（写真2, 3）。

培養開始3～4週以後は、かえってシート内の細胞の欠損が目立ち始め、シートの輪郭も凹凸不整となってい

写真 1 培養5日後の細胞性シート

写真 4 線維芽細胞様細胞の増殖(継代2代目)

写真 2 “pave” 状に配列した上皮様細胞

写真 3 “jigsaw” 状に配列した上皮様細胞

った。また、その頃より、周辺より線維芽細胞様細胞の増殖がさかんになり、しだいに、シート内の上皮様細胞に駆逐されていった(写真4)。

(2) 細胞性シートの面積の比較

培養開始約30日後に、イソプロテレノール添加群(10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} g/ml)および非添加群の細胞性シートの面積を比較した。 10^{-5} g/ml 添加群では、非添加群の46~79%, 10^{-6} g/ml 添加群では43~83%であ

図 3 細胞性シートの面積の比較

った。 10^{-7} g/ml では非添加群との間に有意差は認められなかった。また、 10^{-4} g/ml では、0~4.8%と、著明な抑制が認められた(図3)。

(3) 細胞性シートの形態の比較

培養開始約30日後に、細胞性シートの輪廓およびシート内部の細胞の配列状態を比較した。その結果、イソプロテレノール添加群では、上皮性細胞が充実に増殖して類円形の輪廓を呈していたのに対し、同非添加群では、シートの輪廓が凹凸不整となり、内部での細胞欠損を認めることが多かった。

図4 シートのスコア (シェーマ)

これらの細胞性シートの輪廓と充実性を比較するため、次のごとく score を与えた (図4)。

score I: シート内の細胞が充実性に増殖し、シートの輪廓明瞭なるもの (写真5)。

score II: ところどころに細胞の消失を認めるも、概してシートの輪廓をとどめるもの (写真6)。

score III: 細胞の消失が多く、シートとしての輪廓をとどめないもの (写真7)。

すなわち、score の低いもののほど、本来の細胞性シートとしての性格がよく保たれていると考えられる。

この score の平均値を培養開始約30日後に各シャーレごとに計算して比較した結果、イソプロテレノール添加群では、大部分が score II 以下であり、シート内で細胞消失を認めたり、輪廓が凹凸不整となるものはほとんど認められなかった (図5)。

(4) 線維芽細胞様細胞が優位を占める頻度

培養30日後、シャーレ中の各組織片ごとに細胞性シートを観察して、細胞遊走のパターンを“上皮型”“線維芽細胞型”“未分化型”に三分類した。各シート内で優位を占める細胞を観察して、そのシートの遊走パターンを決定し、症例ごとに頻度を計算した。

その結果、線維芽細胞様細胞が優位を占めたものは、イソプロテレノール非添加群では2.2~37%であった。ところが、イソプロテレノール添加群では、0~5.8%であり、著明な線維芽細胞抑制効果を示した (図6)。

写真5 score I のシート

写真6 score II のシート

写真7 score III のシート

この作用は 10^{-5} g/ml の濃度において最も顕著であり、 10^{-7} g/ml では、非添加群との差を認めなかった。一方、 10^{-4} g/ml の場合は、上皮様細胞、線維芽細胞様細胞がともに障害されていた。

(5) 線維芽細胞様細胞の DNA 合成能

継代5代目の顎下腺由来の線維芽細胞様細胞をマイクロテストプレートに播種し、 ^3H -チミジンのとりこみを

図 5 シートのスコアの比較

図 6 線維芽細胞様細胞が優位を占める頻度

図 7 線維芽細胞様細胞の DNA 合成能

ノールの作用について、多くの動物実験がなされている^{3-5,9-11)}

これまでの動物実験により、唾液腺の細胞増殖は、イソプロテレノールのβ効果によるものであり、その刺激がアデニルシクラーゼを活性化し、それによって、cyclic AMP (adenosine 3',5'-cyclic monophosphate) の細胞内濃度上昇の起こることが知られている¹¹⁾。cyclic AMP はアデニルシクラーゼによって ATP より生成され、cyclic AMP-phosphodiesterase (PDE) によって 5' AMP に分解される。PDE の阻害剤であるテオフィリンの前処置により、イソプロテレノールによる唾液腺 DNA 合成は増強することが認められている¹²⁾。

cyclic AMP と細胞増殖との関係については、Southernland によって cyclic AMP が分離されて以来、多くの報告があるが、その効果は、種により、また、器官により異なっているようである¹⁰⁾。しかし、一般的に、線維芽細胞の増殖に対して、cyclic AMP は阻害的にはたらく、上皮細胞に対しては促進的に作用する傾向が認められている。イソプロテレノールのほか、コレラ毒素、プロスタグランディン E_1 、グルカゴンなどのアデニルシクラーゼ活性化剤、cyclic AMP 類似物質のジブチル cyclic AMP、あるいは 8-bromo cyclic AMP なども細胞内 cyclic AMP 濃度を上昇させて、上皮細胞の増殖を促進することが知られている¹³⁾。

一方、ヒト唾液腺に対するイソプロテレノールの作用は、ほとんど明らかにされていない。Borsanyi はイソプロテレノール長期投与患者における耳下腺の腫大を報

測定した。各 well あたりの cpm を比較した結果、イソプロテレノール 10^{-9} g/ml 添加群では、非添加群の59%、同 10^{-8} g/ml 添加群では74%であり、著明な DNA 合成能の抑制が認められた (図 7)。

考 察

イソプロテレノール投与により齧歯類の唾液腺に著明な肥大および細胞増殖が起こる事実は、1961年、Brown-Grant がマウスにおいて¹⁾、Selye がラットにおいて²⁾、初めて報告を行った。本来細胞分裂増殖能がきわめて低いとされる成熟動物の唾液腺において、このような活発な増殖が起こるという事実は、広く注目され、以後、マウス・ラットの唾液腺に対するイソプロテレ

告しているが、因果関係は明らかでない⁸⁾ イソプロテレノールを始めとする細胞成長因子の作用は、細胞種によって大きく異なるものであり、ヒト唾液腺に対する効果は、ヒト唾液腺細胞を用いた実験系が必要である。ところが、唾液腺に限らず、ヒト正常実質細胞（特に上皮性組織）の培養は困難であり、とりわけ、遊離細胞を得て増殖させることは、難しい。そこで、本研究では、宮田の報告した培養条件に従い¹⁴⁾、ヒト顎下腺・口唇腺の組織片培養を行って、シート状に増殖した初代培養細胞について、イソプロテレノールの作用を検討した。組織片培養の採用は、遊離細胞を得るのが困難であるというだけでなく、この培養法が、細胞培養と器官培養の2面を合わせ持っている、という積極的な意味をも考慮しているわけである。

唾液腺培養細胞の増殖性に対するイソプロテレノールの作用については、実験動物（マウス、ラット）細胞を用いたいくつかの報告がある。Kreider はラット顎下腺培養細胞で ³H-チミジンのとりこみを観察し、DNA 合成の促進がみられたとしている³⁾ また、本間は、ラットの耳下腺・顎下腺細胞を用いて、イソプロテレノールによる増殖を、細胞数のカウントにより確認している⁴⁾。これに対し、Lamey らは、マウス顎下腺を組織片培養に供し、イソプロテレノール投与によって増殖抑制効果が出現し、それは dose-dependent であった、と報告している⁵⁾。

本実験においては、ヒト唾液腺の組織片培養の結果、形成された細胞性シートの面積は、一般に、イソプロテレノール添加群 (10^{-5} 、 10^{-6} g/ml) のものが、非添加群にくらべて抑制される傾向を認めた。明確に dose-dependent であることは示されていないが、 10^{-7} g/ml ではその効果は現われず、 10^{-4} g/ml では、細胞の遊出そのものが強く抑制された。また、細胞性シートを用いてオートラジオグラフを作成し、イソプロテレノールの添加、非添加による ³H-チミジンのシート内へのとりこみの差を検討したが、シートを形成する上皮様細胞における labelling index 自体がきわめて低く、(L.I. = 0 ~ 10.9)、有意差を認めることができなかった。これらの結果より、組織片培養の細胞性シートで検討した限りでは、ヒト唾液腺細胞に対するイソプロテレノールの増殖促進作用は認められなかった。

従来の動物実験の報告と異なるこの結果の原因としては、ヒトとマウス、ラットという種の違いの他に、腺房細胞の含有率の差をも考慮しなければならない。Mangos らは、ラット耳下腺組織をコラゲナーゼ、ヒアルロニダーゼ、トリプシンで酵素処理して得られた細胞には、95% の腺房細胞が含まれていた、と報告している¹⁵⁾。これに対して、ヒト唾液腺を組織片培養した場合、シートを形成した細胞の大半は導管由来と考えられ¹⁴⁾、自ずから、イソプロテレノールの反応性に差のある可能性もあ

る。

一方、線維芽細胞に対するイソプロテレノールの作用としては、初代培養細胞の線維芽細胞様細胞の遊出頻度、継代細胞の DNA 合成能について、検討を加えた。培養30日後の各細胞性シートを観察して、線維芽細胞様細胞が優位を占める頻度を計算した結果、イソプロテレノール添加群では、著明な線維芽細胞抑制効果を認めている。さらに、継代5代目の線維芽細胞様細胞（顎下腺由来）の DNA 合成能についても、強い抑制が認められた。これらの結果より、ヒト唾液腺由来細胞においても、イソプロテレノールは、細胞内 cyclic AMP の上昇の結果、線維芽細胞には抑制的に働いていることが考えられる。

なお、培養開始3~4週後の時点で、一定の細胞性シートの周囲から線維芽細胞様細胞が増殖を始めたとき、 10^{-4} ないし 10^{-5} g/ml のイソプロテレノールを数日間ないし数週間（濃度および期間は、シートの状態および線維芽細胞様細胞の増殖状態により、適宜増減する。ただし、必ず毎日位相差顕微鏡で観察を行う）作用させることにより、線維芽細胞様細胞のみを選択的に除去することも可能であった。唾液腺に限らず、上皮性細胞を選択的に培養しようとする場合、線維芽細胞様細胞の過剰増殖が大きな障害となることが少なくない。培地中に一定濃度のイソプロテレノールを最初から添加することによって線維芽細胞様細胞の遊出、増殖を抑制し、また、通常培地で線維芽細胞様細胞が増殖を始めても、イソプロテレノールを添加することにより、これを抑制、除去する効果を期待できるのである。

イソプロテレノールのこのような効果は、マウス、ラットの唾液腺培養細胞においては報告されていない。しかし、Lamey らは、マウス顎下腺の組織片培養において、上皮様細胞 (E) と線維芽細胞様細胞 (F) の比率 (E/F ratio) を計算し、イソプロテレノール (10^{-4} ~ 10^{-6} M) 添加によって、E/F ratio は変化しなかった、と述べている⁵⁾。しかし、 10^{-3} M のイソプロテレノール添加により、移植片が organotypic structure に維持された、と報告し、イソプロテレノールの特異的な性質を強調している。

本実験においても、細胞性シートの状態を score をつけて検討した結果、 10^{-5} g/ml のイソプロテレノール添加により、ヒト唾液腺由来細胞シートが長期間にわたって良好に維持されたことは、正常細胞の維持という観点から、興味深いものがある。培養甲状腺で正常な濾胞構造を持続するには、TSH、プロスタグランディン E_2 、ジブチリル cyclic AMP など濾胞上皮細胞の働きを刺激する物質を培地中に加えることが大切であるとされている^{16,17)}。また、唾液腺においても、Oliver は、ラット耳下腺細胞を培養し、培地中につねに 10^{-6} M のイソプロテレノールを添加しておくことによって、腺房細胞の

分泌能が長期間維持された、と報告している¹⁸⁾

今日、唾液腺分泌機構には、 β -アドレナリン受容体を介する反応、および、 α -アドレナリン、ムスカリン受容体を介する反応が知られている¹⁹⁾。イソプロテレンオールなどの β -アドレナリン作動性刺激薬は、膜のアデニルシクラーゼを活性化し、細胞内 cyclic AMP が上昇して、cyclic AMP は protein kinase を活性化し、開口分泌の機序によりアミラーゼなどの蛋白またはムコ蛋白の分泌を促進する。このように、カテコールアミンの β -効果により、唾液腺細胞増殖促進、唾液分泌促進、線維芽細胞抑制などの一見異なる作用が惹起されるわけであり、これら β -作用の関連性については、今後解明されるべき課題となっている。

また、イソプロテレンオール投与により細胞性シートが良好に維持される効果については、腺上皮細胞に対する直接作用、および、線維芽細胞抑制による二次的效果、の2通りの可能性が考えられる。しかし、イソプロテレンオールによる β -効果は、上述したごとくさまざまな作用を及ぼす可能性があるわけであり、唾液腺の上皮様細胞、線維芽細胞様細胞の両者に作用した結果、細胞性シートが長期間良好に維持される、と考えるのが妥当であろう。

結 論

ヒト唾液腺初代培養細胞(組織片培養)を用いて、その増殖性に及ぼすイソプロテレンオールの効果を検討した。イソプロテレンオールは、最終濃度 10^{-4} 、 10^{-5} 、 10^{-6} 、 10^{-7} g/ml となるように培地中に添加した。

イソプロテレンオール非添加の場合、形成された細胞性シートは、4~6週後頃より変性し、多くの場合、線維芽細胞様細胞が優性となった。これに対して、 10^{-5} g/ml のイソプロテレンオール添加群では、上皮性細胞が充実性に増殖し、凹凸や細胞消失の少ない細胞性シートが形成され、かつ、その状態が長期間維持されることが明らかになった。一方、線維芽細胞様細胞の増殖に対しては、著明な抑制効果が認められた。イソプロテレンオールのこれらの作用は、 β -効果による細胞内 cyclic AMP 濃度上昇に関連したものと考えられた。

本研究の要旨の一部は、第4回ヒト細胞研究会(昭和61年8月、東京)、および第31回日本口腔外科学会総会(昭和61年10月、久留米)において発表した。

本研究費の一部は、昭和59年度文部省科学研究費補助金(奨励研究 A No. 59771528)によっている。

引 用 文 献

- 1) Brown-Grant, K.: Enlargement of salivary

- gland in mice treated with isopropylnoradrenaline. *Nature* 191: 1076-1078 1961.
- 2) Selye, H., Veilleux, R., et al.: Excessive stimulation of salivary gland growth by isoproterenol. *Science* 133: 44-45 1961.
- 3) Kreider, J.W.: Stimulation of DNA synthesis of rat salivary gland cells in monolayer cultures by isoproterenol. *Cancer Res.* 30: 980-983 1970.
- 4) 本間壽晴: ラット耳下腺ならびに顎下腺細胞の初代培養に対する Isoproterenol の作用について. *歯学* 65: 524-538 1977.
- 5) Lamey, P.J., Ferguson, M.M., et al.: The growth and ductal epithelial cell response of mouse submandibular salivary glands to selected neurotransmitters *in vitro*. *Arch Oral Biol* 27: 747-751 1982.
- 6) 武市宣雄: X線照射によるラット唾液腺腫瘍の誘発 その2. 長期実験における唾液腺腫瘍の発生. *广大医誌* 23: 391-411 1975.
- 7) Shklar, G. and Cataldo, E.: Effects of a chemical carcinogen on the submaxillary gland of albino rats treated with isoproterenol. *Cancer Res* 26: 1319-1323 1966.
- 8) Borsanyi, S.J.: Chronic asymptomatic enlargement of the parotid glands. *Ann Otol* 71: 857-867 1962.
- 9) 井上秀夫, 小西洋太郎, 他: 培養ラット耳下腺のホルモン応答性に関する研究. *歯基礎誌* 24: 370-378 1982.
- 10) 竹村晴夫, 大鹿英世: α -および β -アドレナリン作動薬に対するラット耳下腺分離細胞の反応性について. *杉帆医誌* 51: 429-437 1982.
- 11) 山本 巖, 石田 甫: カテコールアミンと唾液腺細胞増殖. *歯基礎誌* 18: 379-395 1976.
- 12) 日本組織培養学会編: 細胞成長因子 第1版. 朝倉書店, 東京, 130-134頁, 1984.
- 13) 山田雅保, 沖垣 達: 上皮細胞の増殖と成長因子. *生体の科学* 331: 381-388, 1982.
- 14) 宮田和幸: ヒト唾液腺由来細胞の培養条件および増殖動態に関する研究. *和歌山医学* 36: 255-268 1985.
- 15) Mangos, J.A., McSherry, N.R., et al.: Dispersed rat parotid acinar cells. I. Morphological and functional characterization. *Am J Physiol* 229: 553-559 1975.
- 16) Inoue, K., Horiuchi, R., et al.: Effect of thyrotropin on cell orientation and follicle reconstruction in rotated suspension culture of hog thyroid cells. *Endocrinology* 107: 1162-1168 1980.
- 17) Mauchamp, J., Margotat, A., et al.: Polarity of threedimensional structures derived from isolated hog thyroid cells in primary culture. *Cell Tiss Res* 204: 417-430 1979.

18) Oliver, C.: Isolation and maintenance of differentiated exocrine gland acinar cells *in vitro*. *In Vitro* 16: 297-305 1980.

19) 岩月矩之, 西山明德: 外分泌腺房細胞の電気生理—ラット・マウスの膵臓, 唾液腺, 涙腺を中心として— *生体の科学* 31: 410-421 1980.