原 著

ラット顎下腺組織内の α -Amylase 活性に対する
神経伝達物質の役割について

岸 文 隆

大阪歯科大学 生理学教室* (主任: 覚道幸男教授)

〔受付: 昭和51年9月29日〕

抄録: 唾液腺から分泌される α -Amylase の分泌機構には未解決の分野がある。たとえば, 分泌刺激後の唾液腺組織内 α -Amylase の活性の消長についてまったく相反する成績 (すなわちラットの顎下腺では pilocarpine 刺激によって腺組織内 α -Amylase 活性は急激に上昇するが, 耳下腺では isoproterenol 刺激により活性はほとんど消失する) が認められる。

そこで, 腺細胞内の α -Amylase 活性に作用する各種の分泌刺激およびその阻害薬の影響から, とくに神経伝達物質について検討し, 次の結論を得た。

顎下腺における pilocarpine 刺激による α -Amylase 活性の急激な上昇現象は, 細胞内で合成・蓄積されていた α -Amylase が pilocarpine 刺激により活性化された結果であり, その作用機構は pilocarpine 刺激が交感神経節 (muscarine 受容体) に作用して, 節後線維の終末から noradrenaline を遊離させ, 顎下腺細胞の β -受容体に働くことである。なお, この活性化作用は耳下腺にも存在するが, 耳下腺では活性化された α -Amylase は急速に唾液中に放出される結果, 腺組織内では減少する。それに反して, 顎下腺では, 耳下腺に比べて, pilocarpine 刺激によって α -Amylase が放出される速度が小さいので, 活性化した α -Amylase が腺組織内に残留蓄積するため, 腺組織内で増加を示すのである。

結 言

唾液腺から分泌される 各種の 酵素のうち, α -Amylase はきわめて古くからその存在が知られていた代表的なものである。そして, 1950 年代の後半から現在までの数多くの研究により, α -Amylase の分泌機構はかなり解明されてきた。

しかしながら, なかには未解決の問題もいくつかは認められる。たとえば, 分泌刺激後の唾液腺組織内における α -Amylase の活性の消長にまったく相反する成績が認められる。

すなわち, pilocarpine 刺激後のラット顎下腺組織内の α -Amylase 活性が短時間 (投与後約 4 時間) 内に急激に上昇し, しかも α -Amylase 活

性のこの急激な上昇現象が atropine の投与によって明らかに抑制されたという実験結果から, Schneyer, L. H. and Schneyer, C. A. (1956)¹⁾, (1960)²⁾ および Schneyer, C. A. and Schneyer, L. H. (1957)³⁾ は, 1) ラット顎下腺組織内の α -Amylase 活性の上昇現象には, 副交感神経の調節作用が関与していることが考えられ, また, 2) その上昇現象は副交感神経の調節作用によって腺組織における α -Amylase の生合成が促進された結果であろうと結論している。

これに対して, Byrt, P. (1966)⁴⁾ および Lillie, J. H. (1972)⁵⁾ は, ラットの耳下腺においては isoproterenol 刺激後 1~2 時間でその α -Amylase 活性の 93~98% が腺組織から消失してしまうこと

Role of neurotransmitter in regulation of α -Amylase activities in rat submaxillary gland
Fumitaka KISHI (Department of Physiology, Osaka Dental University, Osaka)

* 大阪市東区京橋 1-47 (〒 540)

Jap. J. oral Biol., 19: 19-36, 1977.

を観察し, Byrt, P. N. and Glanvill, S. (1967)⁶⁾は, 顎下腺においてやはり isoproterenol 刺激後 2~4 時間で分泌蛋白質の 38~42% が腺組織から消失することを確認している。

そして, 耳下腺でも顎下腺でも, 消失した腺組織内の α -Amylase 活性および分泌蛋白質の回復の開始は, isoproterenol 刺激後 4~6 時間までには, ほとんどといってよいほど認められないといっている。

以上の Schneyer, L. H. らの実験結果と Byrt, P. らの成績とを比較すると,^{*} 両者間で投与した分泌刺激薬に差異はあるとしても, その結果はあまりにも対称的である。このことは, 両者の実験結果に明らかな差異が認められるのか, 唾液腺組織における分泌物質の合成, 蓄積および放出の過程に対する両実験者の分析に根本的な相違があるためであるのか, あるいはまた腺組織内 α -Amylase 活性の発現に特殊な機構に関連していることによるのであるのかという点で強い疑問をいだかせるものである。

そこで, 著者はまず Schneyer らの実験成績を詳細に追試するとともに, 続いて各種の分泌刺激や自律神経遮断薬を投与して, ラット顎下腺組織内 α -Amylase 活性の変動を観察して, 唾液腺組織内の α -Amylase 活性に影響を与えと思われる諸因子のうち, とくに神経伝達物質の役割について, 検討と考察とを加えた。

以下, その実験結果について報告する。

実験材料と実験方法

A 実験材料

1. 実験動物

Wistar 系の成熟雄性 ラット (体重: 300 g 前後) を使用した。なお, ラットは普通飼料, すなわちオリエンタル固形飼料 (MF) と水とを与えて飼育した。また, 実験開始前の 24 時間は動物に水のみを与え, 絶食状態においた。

2. 投与した薬物

1) 分泌刺激薬

副交感神経刺激薬: pilocarpine (Pilocarpine hydrochloride, 半井化学)

2) 自律神経遮断薬

a) 副交感神経遮断薬: atropine (硫酸アトロピン注射液, 扶桑薬品)

b) 交感神経 (β -アドレナリン 効果) 遮断薬: propranolol (Inderal; Propranolol hydrochloride, 住友化学)

c) 神経節遮断薬: hexamethonium (Hexamethonium chloride, キット薬品)

B 実験方法

1. 実験動物の麻酔

sodium pentobarbital (Nembutal, Abbott) を 50mg/kg の割合で, ラットの腹腔内に投与して麻酔した。

2. カニューレーション⁷⁻⁹⁾

唾液採取用, 薬物の静脈内投与用 およびラットの実験中にしばしば認められる呼吸障害の防止用の各カニューレを, それぞれ以下述べる方法によって, カニューレーションした。

1) 唾液採取用の腺外導管カニューレ

一側 (左側) の顎下腺の腺外導管の口腔内開口部に, 細いポリエチレンチューブ (Clay Adams: PE 10, 外径 0.7mm) を挿入した。

2) 薬物の静脈内投与用の大腿静脈カニューレ
任意の一側の大腿静脈を露出させ, ポリエチレンチューブ (Clay Adams: PE 50, 外径 1.0mm) を静脈内に挿入して結紮した。

3) 呼吸障害の防止用の気管カニューレ

気管を切開し, ほぼ気管と同様の大きさのポリエチレンチューブ (Igarashi: No. 40, 外径約 2.2 mm) を気管内に挿入結紮した。

3. 顎下腺唾液の採取

唾液を, その分泌時間を測定しながら, 腺外導管カニューレからマイクロピペットで採取した。

4. 顎下腺の摘出

顎下腺組織内の α -Amylase 活性を測定するために, ラットを麻酔させた後で頸部の皮膚を切開し, さらに顎下腺組織を取り囲んでいる薄い被膜を除去してから, 顎下腺を摘出した。

1) 顎下腺組織内の α -Amylase を測定する試料として, 同一個体の左右一对の顎下腺のうち, 一側 (右側) を対照実験に, また他側 (左側) を処置実験に使用した。そして, 通常の場合, 対照実験に用いる顎下腺組織は処置実験開始直後に,

また、処置実験用の顎下腺組織は処置実験終了時に摘出した。

なお、対照実験用の顎下腺組織はその摘出後定量操作を行うまで（処置実験用の顎下腺組織を摘出するまで）冷生理食塩液中に浸漬保存した。また、顎下腺摘出後は微温生理食塩液を浸した消毒綿またはガーゼで、その創面を保護しておいた。

2) 処置実験側の顎下腺の摘出は、処置実験の種類によって異なるが、一般に pilocarpine 刺激では刺激後 30分、60分および 120分に、また神経刺激では刺激直後に摘出を行った。

5. 腺外導管（鼓索神経）の分離^{10,11)}

頸部の皮膚を切開して、顎下腺および舌下腺を完全に露出しておいてから、顎下腺と舌下腺とをいねいに分離し（舌下腺の導管は腺門部の位置で結紮する）、つぎに実験側の咬筋と顎二腹筋前腹との間を前下方に走っている顎下腺腺外導管を傷つけないように露出していくと、腺外導管の全体とその外側からそれと交叉して走っている舌神経とを確認することができる。

6. 交感神経幹の露出¹²⁾

下顎骨下縁から約15mm下方で、刺激側の胸鎖乳突筋と胸骨舌骨筋とが重なり合っている部位を押し広げて、筋膜に包まれている総頸動脈をまず露出すると、その中枢側で総頸動脈が内外の両頸動脈に分歧する分歧部にはさまれて、帯黄白色の交感神経幹の上頸神経節を確認することができる。

7. 顎下腺の分泌刺激の投与方法

1) pilocarpine 刺激 (one shot 投与)

1% Pilocarpine hydrochloride 水溶液を 8 mg/kg の割合で腹腔内に one shot で投与した。

2) 鼓索神経電気刺激（以下 Chorda 電気刺激と省略する）

腺外導管と舌神経とが交叉している部位の直下にあたる部分の腺外導管上の鼓索神経を、電子管刺激装置（MSE-3 型：日本光電工業社製）および双極性白金針電極を用い、矩形波（頻度：20 Hz, 持続時間：5 msec, および電圧：2～5 V）で刺激（30分間、60分間、および120分間の連続刺激）した。

なお、刺激時間によって、30分間群、60分間群および120分間群の三群の実験群に分けた。

3) 交感神経電気刺激（以下 SCG 電気刺激と省略する）

上頸神経節を電子管刺激装置および双極性白金針電極を用いて、Chorda 電気刺激の場合と同一条件の矩形波で刺激した。

ただし、刺激を加えた時間と方法とは、Chorda 電気刺激の場合とは異なる。すなわち、30秒間の連続刺激の後に4分30秒間の休みをとる間歇刺激法によって連続60分間刺激した。だから SCG 電気刺激においては実験群は60分間群だけである。

8. 自律神経遮断薬の投与方法

以下述べる各自律神経遮断薬はすべて唾液腺の分泌刺激の投与前に投与（すなわち前処置）したのであるが、各遮断薬の種類によってその投与量および投与方法などは異なっている、各遮断薬の効果が発現するまでの時間（投与後5～10分）を経てから、その後の各実験操作に移った。

1) 副交感神経遮断薬

硫酸アトロピン注射液を100μg/kg の割合で腹腔内に注射投与した。

2) 交感神経（β-アドレナリン効果）遮断薬

1% Inderal 水溶液を 5 mg/kg の割合で腹腔内に注射投与した。

3) 神経節遮断薬

1% Hexamethonium chloride 水溶液を 2 mg/kg の割合で大腿静脈内にカニューレによって注入した。

9. 副腎摘出法

1) Nembutal 麻醉下でラットを横臥位に固定して、脊柱から約10mm へだたった最下端の肋骨の肋骨弓下の位置を中心にして背中を毛を刈り取る。

2) つぎに局所をヨードチンキとアルコールとで清拭消毒したのち、縦に約15mm の皮膚切開をほどこし、腰筋の側縁から深部の脂肪組織まで分離する。

3) そして、脂肪組織の内方にある両側の腎臓とその上方に付着している副腎とを鉈的に分離してから、副腎を指ではさんでもぎとるように摘出したのち、直ちに筋膜と皮膚とを縫合する。

10. 脱血法

1) Nembutal 麻醉下でラット腹部の皮膚に切

開を加え、露出した腹部内臓を左右に排除すると、脊柱に沿って、腹大動脈と下大静脈とを認めることができる。

2) つぎに、 $\frac{1}{1}$ の注射針を付けた 20ml 注射器 (テルモディスポーザブルシリンジ: Jintan Ter-mo) で、手ばやく下大静脈から 10~20ml の血液を穿刺脱血する。

11. 顎下腺組織内および顎下腺唾液中の α -Amylase 活性の測定操作

1) 顎下腺組織の細切およびホモジナイズ (顎下腺組織のホモジナイズ濾液の作製)

a) 摘出した顎下腺に付着しているリンパ、脂肪組織および結合組織を取り除いた後、直ちに腺の湿重量 (ほぼ一定しており、260 mg 前後である) を計量し、 α -Amylase 活性の測定を行うまで氷冷した生理食塩液中に浸漬保存する。

b) つづいて、 -4°C に冷却した氷室 (冷凍恒温槽—SHARP: Thermo Electric Model 20-K) 内で、腺実質をガラス製ポッター型ホモジナイザーの容器内に移し、はさみで細切したあと、数 ml の冷生理食塩液とともに約 5 分間ホモジナイズする。

c) つぎに、ホモジナイズした腺組織に冷生理食塩液を加えて、全量がちょうど 10ml になるように希釈してから、濾紙 (東洋濾紙: No. 2) で濾過し、その濾液を被検液とした。

2) 顎下腺組織内および顎下腺唾液中の α -Amylase 活性の測定法

腺組織 1g 内および唾液 1 ml 中の α -Amylase 活性は、Jamieson, A. D. et al. (1969)¹²⁾ の結晶 Amylase 活性測定法を改良した岡 (1971)⁹⁾ の方法によって、測定した (表 1)。

a) なお、 α -Amylase の活性は、 25°C 1 分間に $1\mu\text{M}$ の Maltose を遊離させることのできる酵素力を 1 単位 (Unit) として表わした。

b) 定量に使用した腺組織の濾液量は 0.5 ml、唾液量は 0.05ml である。

c) Maltose の比色測定には分光光電比色計 (自記分光光電計 323 型: 日立製作所) を用いた (測定波長: 470nm) (表 1)。

d) Maltose の標準液には、Maltose の粉末 (半井化学) の磷酸ナトリウム緩衝液の倍数希釈

表 1 ラット顎下腺組織内および顎下腺唾液中の α -Amylase 活性の測定法

被検試料 (腺組織ホモジネート: 0.5ml, 唾液: 0.05ml)
↓
反応基質 (0.5% 可溶性でんぷん液)
1.0ml を加える
↓
25°C (pH 6.9) で 30 分間インキュベートする
↓
呈色試薬 (0.1% 3,5 dinitrosalicylic acid)
1.0ml を加える
↓
沸騰水浴中で 5 分間加熱する
↓
流水中で冷却する
↓
反応液を純水で 10 倍にうすめる
↓
室温に 2 時間放置する
↓
測定波長 470nm で透過度を読む

列 (0.025~1.5 mg/ml) を、そして Blank には Maltose を含まない磷酸ナトリウム緩衝液を用いた。

実験成績

A 顎下腺組織内の α -Amylase 活性

1. 左側と右側との顎下腺組織内の α -Amylase 活性の差

同一個体のラットの左側と右側とにおける顎下腺組織内の α -Amylase 活性には有意の差はまったく認められなかった (表 2)。

2. 血液の有無による顎下腺組織内の α -Amylase 活性の差

同一個体のラットにおいて、脱血せずに摘出し

表 2 左側と右側との顎下腺組織内の α -Amylase 活性の差

実験例数	右側 顎下腺	左側 顎下腺	t	有意差 (信頼度: 99%)
21	0.00352 ± 0.00132	0.00359 ± 0.00132	0.2684	—

表 3 血液の有無による顎下腺組織内の α -Amylase 活性の差

実験例数	脱血 しないとき	脱血 したとき	t	有意差 (信頼度: 99%)
10	0.00134 ± 0.00021	0.00144 ± 0.00152	0.5234	—

表 4 Pilocarpine 刺激前と刺激後における
顎下腺組織内 α -Amylase 活性の差

実験 例数	刺激後 の時間 (分)	刺激前	刺激後	t	有意差 (信頼度 : 99%)
9	30	0.00103 ± 0.00021	0.00139 ± 0.00030	1.8595	-
9	60	0.00142 ± 0.00021	0.00230 ± 0.00021	4.6143	+
10	120	0.00144 ± 0.00025	0.00217 ± 0.00033	5.3655	+

表 5 Chorda 電気刺激前と刺激後における
顎下腺組織内の α -Amylase 活性の差

実験 例数	刺激後 の時間 (分)	刺激前	刺激後	t	有意差 (信頼度 : 99%)
8	30	0.00125 ± 0.00013	0.00158 ± 0.00033	1.4224	-
10	60	0.00126 ± 0.00018	0.00143 ± 0.00015	1.0554	-
9	120	0.00108 ± 0.00021	0.00151 ± 0.00028	1.5617	-

た一側の顎下腺組織内の α -Amylase 活性と、脱血してから摘出した他側の顎下腺組織内の α -Amylase 活性との間には有意の差は認められなかった (表 3)。

3. Pilocarpine 刺激前と刺激後 における 顎下腺組織内の α -Amylase 活性の差

Pilocarpine 刺激前と刺激後 における顎下腺組織内の α -Amylase 活性には刺激後 30 分では有意の差は認められなかったが、刺激後 60 分および 120 分では、刺激後の活性のほうが有意に上昇することが認められた (表 4)。

4. Chorda 電気刺激前と 刺激後 における 顎下腺組織内の α -Amylase 活性の差

Chorda 電気刺激前と 刺激後 における顎下腺組織内の α -Amylase 活性には、3 つのどの刺激群 (30 分間刺激群、60 分間刺激群 および 120 分間刺激群) でも、有意差はまったく認められなかった (表 5)。

5. Pilocarpine 刺激後の顎下腺組織内の α -Amylase 活性に対する自律神経遮断薬の影響

1) 副交感神経遮断薬 (atropine)

Atropine の前処置後に、pilocarpine 刺激をしたとき、atropine 前処置も pilocarpine 刺激も行わないときとの顎下腺組織内の α -Amylase 活性

表 6 Pilocarpine 刺激後の顎下腺組織内の
 α -Amylase 活性に対する atropine の
影響

実験 例数	刺激後 の時間 (分)	刺激前	刺激後	t	有意差 (信頼度 : 99%)
8	60	0.00078 ± 0.00014	0.00069 ± 0.00008	0.7027	-
8	120	0.00142 ± 0.00022	0.00153 ± 0.00020	0.8304	-

表 7 Pilocarpine 刺激後の顎下腺組織内の
 α -Amylase 活性に対する propranolol
の影響

実験 例数	刺激後 の時間 (分)	刺激前	刺激後	t	有意差 (信頼度 : 99%)
7	60	0.00073 ± 0.00016	0.00071 ± 0.00016	0.1013	-
8	120	0.00091 ± 0.00014	0.00098 ± 0.00012	0.2515	-

表 8 副腎を摘出したラットについて pilocarpine 刺激後の顎下腺組織内の α -Amylase 活性に対する propranolol の影響

実験 例数	刺激後 の時間 (分)	刺激前	刺激後	t	有意差 (信頼度 : 99%)
6	120	0.00166 ± 0.00013	0.00164 ± 0.00013	0.8715	-

には、刺激後 60 分および 120 分でも有意の差は認められなかった (表 6)。

2) 交感神経 (β -アドレナリン 効果) 遮断薬 (propranolol)

副腎を摘出したラットおよび摘出しないラットに、propranolol の前処置および pilocarpine の刺激をしたとき、propranolol 前処置も pilocarpine 刺激もしないときとの顎下腺組織内の α -Amylase 活性にも有意の差は認められなかった (表 7, 8)。

3) 神経節遮断薬 (hexamethonium)

副腎を摘出したラットに、hexamethonium (2 mg/kg) の前処置および pilocarpine の刺激をしたとき、hexamethonium の前処置も pilocarpine 刺激も行わないときとの顎下腺組織内の α -Amylase 活性には、刺激後 120 分において有意差が認められた (表 9)。

6. Chorda 電気刺激後の 顎下腺組織内の α -Amylase 活性に対する 自律神経遮断薬 の

表 9 副腎を摘出したラットについて pilocarpine 刺激後の顎下腺組織内の α -Amylase 活性に対する hexamethonium の影響

実験例数	刺激後の時間(分)	刺激前	刺激後	t	有意差(信頼度: 99%)
12	120	0.00166 ± 0.00018	0.00431 ± 0.00084	3.3544	+

表 10 Chorda 電気刺激後の顎下腺組織内の α -Amylase 活性に対する atropine の影響

実験例数	刺激後の時間(分)	刺激前	刺激後	t	有意差(信頼度: 99%)
7	60	0.00160 ± 0.00033	0.00154 ± 0.00029	0.3023	-
7	120	0.00136 ± 0.00017	0.00144 ± 0.00028	0.3241	-

表 11 Chorda 電気刺激後の顎下腺組織内の α -Amylase 活性に対する propranolol の影響

実験例数	刺激後の時間(分)	刺激前	刺激後	t	有意差(信頼度: 99%)
7	60	0.00123 ± 0.00040	0.00141 ± 0.00065	0.2883	-
7	120	0.00069 ± 0.00012	0.00094 ± 0.00018	0.4004	-

影響

1) 副交感神経遮断薬 (atropine)

Atropine の前処置および Chorda 電気刺激をするとき、atropine の前処置も Chorda 電気刺激もしないときとの顎下腺組織内の α -Amylase 活性には有意差は認められなかった (表10)。

2) 交感神経 (β -アドレナリン効果) 遮断薬 (propranolol)

Propranolol の前処置および Chorda 電気刺激をしたとき、propranolol 前処置も Chorda 電気刺激もしないときとの顎下腺組織内の α -Amylase 活性にも有意差は認められなかった (表11)。

7. 副腎摘出ラットの顎下腺組織内の α -Amylase 活性

1) 副腎の摘出前と摘出後とにおける α -Amylase 活性の差

同一個体のラットにおいて、副腎の摘出前と摘出後とでは顎下腺組織内の α -Amylase 活性には

表 12 副腎の摘出前と摘出後とにおける α -Amylase 活性の差

実験例数	副腎を摘出しないとき	副腎を摘出するとき	t	有意差(信頼度: 99%)
7	0.00188 ± 0.00014	0.00210 ± 0.00014	1.4136	-

表 13 副腎摘出ラットに対する pilocarpine の刺激前と刺激後との α -Amylase 活性の差(副腎摘出を対照側の顎下腺の摘出前に行う)

実験例数	刺激後の時間(分)	刺激前	刺激後	t	有意差(信頼度: 99%)
9	120	0.00288 ± 0.00085	0.00541 ± 0.00070	3.5107	+

表 14 副腎摘出ラットに対する pilocarpine の刺激前と刺激後との α -Amylase 活性の差(副腎摘出を対照側の顎下腺の摘出後に行う)

実験例数	刺激後の時間(分)	刺激前	刺激後	t	有意差(信頼度: 99%)
20	120	0.00169 ± 0.00039	0.00349 ± 0.00058	3.7246	+

有意差はまったく認められなかった (表12)。

2) 副腎摘出ラットに対する pilocarpine 刺激前と刺激後との α -Amylase 活性の差

副腎を摘出したラットに pilocarpine 刺激をしたとき、副腎摘出も pilocarpine 刺激も行わないときとの顎下腺組織内の α -Amylase 活性には、刺激後 120 分において有意の差が認められた (表 13, 14)。

なお、この実験結果は副腎摘出を対照側の顎下腺の摘出前に行っても (表 13)、また摘出後に行っても (表14) 同様に認められる。

3) 副腎摘出ラットに対する Chorda 電気刺激前と刺激後との α -Amylase 活性の差

副腎摘出 (まず副腎を摘出してから、対照側の顎下腺を摘出した) ラットにおいては、Chorda 電気刺激 (120 分間連続刺激後に実験側の顎下腺を摘出する) によっては、顎下腺組織内の α -Amylase 活性には有意の変化は認められなかった (表 15)。

8. SCG 電気刺激前と刺激後との顎下腺組織内の α -Amylase 活性

表 15 副腎摘出ラットに対する Chorda 電気刺激前と刺激後との α -Amylase 活性の差

実験例数	刺激後の時間(分)	刺激前	刺激後	t	有意差(信頼度: 99%)
9	120	0.00305 ± 0.00076	0.00351 ± 0.00112	1.0889	—

表 16 SCG 電気刺激前と刺激後との顎下腺組織内の α -Amylase 活性

実験例数	刺激後の時間(分)	刺激前	刺激後	t	有意差(信頼度: 99%)
4	60	0.00089 ± 0.00036	0.00096 ± 0.00034	1.4316	—

SCG 電気刺激前と刺激後とで顎下腺組織内の α -Amylase 活性には、有意差は認められなかった(表16)。

9. Atropineの投与前と投与後とにおける顎下腺組織内の α -Amylase 活性の差

Atropineの単独投与前と投与後とにおける顎下腺組織内の α -Amylase 活性には、atropine 投与後 120 分においても、有意の差はまったく認められなかった(表17)。

B 顎下腺唾液中の α -Amylase 活性、とくに SCG 電気刺激唾液中の α -Amylase 活性値 SCG 電気刺激によって分泌する唾液における α -Amylase 活性は、 $7.17 \times 10^{-1} \sim 2.13 \times 10^0$ であった(表18)。

考 察

A 顎下腺組織内の α -Amylase 活性の上昇現象に關する副交感神経の作用について

Schneyer, L. H. and Schneyer, C. A. (1956)¹⁾, (1960)²⁾および Schneyer, C. A. and Schneyer, L. H. (1957)³⁾は、ラットに30分ごとに1回、270分間にわたって pilocarpine (2 mg/body) を反復皮下投与すると、顎下腺組織内の α -Amylase 活性は、対照の顎下腺組織に比較して、腺重量の増加を伴わずに、20倍上昇を示すことを観察している。

そこで、著者は本実験の目的上、まず Schneyer, L. H. らの以上の実験を追試したが、その前に Wistar 系ラットの顎下腺組織内の α -Amylase

表 17 Atropine の投与前と投与後とにおける顎下腺組織内の α -Amylase 活性の差

実験例数	刺激前	刺激後	t	有意差(信頼度: 99%)
6	0.00135 ± 0.00015	0.00169 ± 0.00027	1.8666	—

表 18 SCG 電気刺激による顎下腺唾液中の α -Amylase 活性値とそのときの唾液分泌速度

実験例	α -Amylase 活性 (Units/ml)	唾液分泌速度 (μ l/min/mg)
1	7.17×10^{-1}	0.00316
2	2.13×10^0	0.00227
3	2.05×10^0	0.00558

活性が左右側の顎下腺で差があるかどうかを確かめ、また血液中に認められる膵臓由来の α -Amylase 活性が顎下腺組織内の α -Amylase 活性に影響を及ぼす可能性のないこと(すでに、Schneyer, L. H. and Schneyer, C. A. (1960)²⁾は血清中の α -Amylase は顎下腺組織内の α -Amylase の上昇には直接影響を及ぼさないことを明らかにしている)を再確認するために、脱血の有無による顎下腺組織内の α -Amylase 活性の変動について検討した(表3)。

そして、とくに同一個体のラットでは左右側の顎下腺組織内の α -Amylase 活性には有意差が認められないこと、またその α -Amylase 活性は血液の有無によって変動しないことを確認することができた。

そこで、以後の実験では、脱血をしない同一個体のラットで、両側の顎下腺のうち、その一侧を対照側とし、他側を実験側として用いるという実験システムを採用した。

ところで、pilocarpine 刺激に基づく顎下腺組織内の α -Amylase 活性の急激な上昇現象の観察をするために、著者は、Schneyer, L. H. らのように、pilocarpine を連続投与せずに、pilocarpine の one shot 投与 (8 mg/kg) によって実験を行った(表14)。

その結果、pilocarpine 刺激後 30 分で顎下腺組織内の α -Amylase 活性には有意な変動は認めら

れなかったが、刺激後60分および120分では、対照側の顎下腺組織内の α -Amylase活性との間に有意差が認められるようになり、対照側に比較して、50%以上の活性の上昇を示すことが判明した。

したがって、Schneyer, L. H. らが認めた pilocarpine 刺激による顎下腺組織内の α -Amylase活性の急激な上昇現象は pilocarpine の one shot 刺激によっても短時間内で起こることが確認できた。

つぎに、Schneyer, L. H. らは pilocarpine のもつ顎下腺組織内の α -Amylase活性の上昇作用が atropine の前処置 (20 mg/body: 皮下投与) によって、完全に抑制されることを報告しているので、著者は atropine そのものが顎下腺組織内 α -Amylase活性に影響を与えないことを予め確かめておいてから(表17), pilocarpine の α -Amylase活性上昇効果に対する atropine の作用 (0.1 mg/kg: 前処置投与) を観察したところ(表6), pilocarpine の one shot 刺激による顎下腺組織内の α -Amylase活性の上昇現象は、刺激後60分と120分において完全に抑制されることも確認することができた。

以上の2つの追試実験の結果は、ラット顎下腺組織内の α -Amylase活性が分泌刺激の投与 (pilocarpine 刺激¹⁻³⁾, 食物の自由摂取^{2,13)} および acetylcholine の刺激^{2,13)} によって、顎下腺組織内の α -Amylase活性の上昇が認められている) により、短時間内に急激に上昇を示すことを明らかに証明したと考えられるものであり、またその α -Amylase活性の上昇作用には、副交感神経性刺激が関与していることを強く示唆しているものであると考えられた。

しかしながら、Yoshida, Y. et al. (1967)¹¹⁾ が開発したラットの Chorda 電気刺激は純粹の副交感神経電気刺激であると認められているので、この Chorda 電気刺激を行ったときにも pilocarpine の one shot 刺激の場合のように、顎下腺組織内の α -Amylase活性が上昇するかどうかを調べたが、Chorda 電気刺激ではまったく上昇を示さないという実験結果を得た(表15)。

また、予め前処置した atropine は Chorda 電

気刺激に対しては α -Amylase活性上昇の抑制作用を現わさなかった(表10)。

すなわち、ラット顎下腺組織内の α -Amylase活性に対する pilocarpine 刺激効果と Chorda 電気刺激作用とのこの明らかな相違は、この両刺激の作用機序に根本的な差異のあることを想像させるものであり、また薬物刺激である pilocarpine 刺激それ自体に、顎下腺組織内の α -Amylase活性に強い影響(すなわち、活性上昇作用)を与える因子を含んでいるという新たな予想も起こさせるものである。

それと同時に、Schneyer, L. H. らが想定していた顎下腺組織内の α -Amylase活性に影響を与える副交感神経の調節作用の存在の可能性は、著者のこの実験結果から、根本的に否定されなければならないものであると考えられる。

B 顎下腺組織内の分泌物質の合成・蓄積およ

び放出現象と分泌刺激との関連性について

古くから、消化管の外分泌腺、とくに膵臓を用いた実験によって外分泌腺細胞の分泌機構が詳細に検討されてきた¹⁴⁻¹⁸⁾。なかでも、secretory cell cycle についての研究では、耳下腺細胞の分泌機序は膵臓の場合と本質的にはほとんど差が認められていないことが確かめられている²⁾。すなわち、腺組織における外分泌物質の合成反応は、腺組織内ですでに合成されていた外分泌物質が腺組織内に十分蓄積され、貯蔵された後に、分泌刺激によって腺細胞外に放出されてしまってから、次の合成が開始されるものであると理解されているし、また、自律神経は膵臓および耳下腺の細胞における外分泌酵素や蛋白質の生合成には直接関係していないことが判明している。

このことは、分泌刺激というものが外分泌腺細胞内に蓄積されている外分泌物質を腺細胞外に放出するための刺激であって、その放出現象がつぎの分泌物質の合成反応を引き起こすのであるから、もちろん間接的には分泌刺激が外分泌物質の合成に関係しているとみても間違いではないともいえるけれども、とくに遠心性自律神経のインパルス(分泌刺激)そのものが腺細胞における外分泌物質の合成反応を直接に調節してはいないということである。

さらに、膵臓および耳下腺の外分泌腺細胞における正常な secretory cell cycle では、腺細胞外への外分泌物質の放出現象の進行とまったく同時に、腺細胞内での分泌物質の合成現象が進行する可能性のないことが判明している。

すなわち、腺細胞内に認められるこのような分泌物質の放出現象と合成、蓄積現象との切り替り機構を解明しようとしたごく最近の研究としては、ラット耳下腺を対象とした Lillie, J. H. (1972)⁵⁾ および Lillie, J. H. and Han, S. G. (1973)¹⁹⁾ の業績がある。

彼らは、isoproterenol 刺激時のラット耳下腺組織における分泌蛋白質あるいは α -Amylase への ^{14}C -phenylalanine の取り込みとその合成・蓄積、さらには放出の過程とを、電気泳動法や電子顕微鏡による組織化学的検索法によって総合的に実験した結果、1) 分泌物質を放出させる作用があるどのような分泌刺激でも、刺激そのものには決して分泌物質の合成を直接引き起こさせる働きはなく、分泌物質の腺細胞外への放出に基づく分泌物質の腺細胞内蓄積量の低下現象そのものが、つぎの分泌物質の合成活動を爆発的に引き起こす因子であると結論するとともに、2) 分泌物質の放出後、腺細胞内に残ったごく少量の分泌物質が次の分泌物質の合成系の連続的な反応を誘起させて、腺細胞内に分泌物質を蓄積していくという positive feed back system が存在することを指摘している。

ところが、positive feed back system が存在するという彼らの仮定は、腺細胞内に分泌物質が一定量以上蓄積されてくると、その分泌物質の合成反応が抑制され、やがてはそれが停止をするという、従来からよく知られている分泌物質の合成速度と蓄積量との間の制御機構である negative feed back system (あるいは feed back inhibition, この機構はまた、酵素のアロステリック効果—allosteric effect の機序として、説明されなければならないのかも知れない)^{20,21)} とともに考えあわせると非常にたくみに説明することができるので、negative feed back system に対して好一対をなすものと考えられるものである。

さて、Schneyer, L. H. らの実験結果および

彼らの追試実験である著者の観察結果、すなわち pilocarpine 投与後のラット顎下腺組織内の α -Amylase 活性の急激な上昇現象は、前述のほぼ定説化している外分泌腺細胞の secretory cell cycle の機序とはきわめて対称的な現象であるので、 α -Amylase 活性の急激な上昇現象の機構を説明することはきわめてむずかしいことである。

しかし、Schneyer, L. H. and Schneyer, C. A. (1960)²²⁾ は、 α -Amylase 活性の急激な上昇現象は、ラット顎下腺組織だけに認められる特有な現象であり、また、pilocarpine 刺激(しかし、この pilocarpine 刺激は純副交感性神経刺激ではないということは著者の Chorda 電気刺激の実験結果から証明されている)下における新しい α -Amylase の生合成に基づく現象であろうと推測している。

そこで、著者は Schneyer, L. H. and Schneyer, C. A. (1956)¹⁾, (1960)²²⁾ が推測したように、pilocarpine 刺激後短時間で α -Amylase が生合成されるという可能性が果してあるかどうかを考察するために、唾液腺細胞における分泌蛋白質および α -Amylase の合成時間について先人の実験結果から検討を加えた。

なお、著者がここで用いた分泌物質の合成時間というのは、in vivo の腺組織において、分泌刺激後に減少した分泌物質の蓄積レベルが、分泌刺激投与前のものと蓄積レベルにまで回復するまでの時間を指している。

だから、著者が用いた合成時間の定義はあるいは厳密な意味における分泌物質の合成時間を指してはいないというそりはあるかも知れない。しかし、1) 一般に唾液ムチンと総称されている唾液蛋白質や α -Amylase はいずれも糖蛋白質であるから、腺細胞内ではコア蛋白質の合成とともに、糖側鎖の合成とそのコア蛋白質との結合反応の過程を経なければ完成した分泌物質とはならない²²⁾ことは明白な事実であり、また2) 腺細胞内でのコア蛋白質の合成の過程だけを考えても、腺細胞内へのアミノ酸の取り込みとそのアミノ酸のコア蛋白質への合成との二つの過程が考えられるので、アミノ酸の腺細胞への取り込み時間の観察からだけでは、当然合成の全時間は推定できない

表 19 唾液腺における分泌物質の合成時間

唾液腺	分泌物質	合成時間	研究者
顎下腺	唾液蛋白質	48~72時間	Anrep, G. V. et al. (1923) ²⁴⁾
耳下腺	唾液蛋白質	16~22時間	Gromet-Elhanan, Z. and Winnick, T. (1963) ²⁵⁾
耳下腺	α -Amylase	16~18時間	Byrt, P. (1966) ⁴⁾
顎下腺	唾液蛋白質	4~22時間	Byrt, P. N. and Glanvill, S. (1967) ⁶⁾
耳下腺	α -Amylase	10時間以上	Lillie, J.H. (1972) ⁵⁾

と考えているので、著者は今まで一般的によく用いられている in vivo における広義の合成時間を取りあげたわけである（なお、唾液腺において、Lillie, J. H. and Han, S. S. (1973)¹⁹⁾ は分泌刺激投与後 2 時間で、¹⁴C-phenylalanine の取り込みが開始され、6 時間で最大となり、10 時間で取り込みは停止することを観察しており、Castle, J. D. et al. (1972)²³⁾ は、³H-leucine の腺細胞内の成熟分泌顆粒への蓄積はインキューベーションを開始してから 2~6 時間後に認められたと報告している）。

表 19^{4, 5, 6, 24, 25)} に示すように、唾液腺における分泌物質の合成に要する最小時間は 4 時間であるので、pilocarpine 刺激後 1~2 時間ですでに認められる α -Amylase 活性の急激な上昇現象が α -Amylase の生合成の結果であるという考え方を肯定することはできない。

すなわち、Schneyer らはもちろん著者の実験においても、pilocarpine 刺激前 12~48 時間ラットを fasting させているので、顎下腺組織内における α -Amylase の合成反応は、pilocarpine の刺激を行う直前の時点では一度完全に終了し、停止してしまっていると考えて間違いはない。

したがって、pilocarpine が投与され α -Amylase の合成がはじまるときには、まずアミノ酸の取り込みからスタートすることになる。だから、pilocarpine の投与後 α -Amylase の合成が直ちに開始されると仮定しても、pilocarpine 刺激後 1~2 時間の短時間内に α -Amylase は生合成され、蓄積されて、その活性が刺激前の値以上にまで急激に上昇したとは、まったく考えられない。

また、pilocarpine 刺激は強力な唾液分泌作用

をもっているから、顎下腺が刺激されると腺組織内の α -Amylase がかなりの濃度で腺組織外に放出されること（表 22）が認められているから、 α -Amylase の合成によってその活性が上昇するためには、 α -Amylase の放出による腺組織内 α -Amylase 活性の減少を補ったうえにさらに活性が急激に上昇を示さなければならない。しかし、この現象が起こる可能性もきわめてうすい。このことから pilocarpine 投与直後における α -Amylase の生合成の可能性を否定しなければならないと考えられる。

C pilocarpine のもつ顎下腺組織内の α -Amylase の活性化作用とそのルートとについて Schneyer, L. H. らおよび著者が認めた pilocarpine 刺激後短時間内にみられる急激な α -Amylase 活性の上昇現象はその原因が α -Amylase の生合成の結果によるものではないとするならば、どうしても潜在酵素 (latent enzyme: 活性をもたない状態で存在している酵素) の活性化という機序で説明されなければならないと考えられる。すなわち、生体内における酵素活性の調節作用の一つとして、活性をもたない状態の酵素がなんらかの機序によって活性化されるという現象があるが、このような調節作用は、生体の要求に短時間で対応できるという点できわめて重要な意味をもっていると解釈されている²⁶⁾。

そして、この潜在酵素の代表的なものとしては、trypsinogen や pepsinogen がよく知られているが、Amylase が潜在酵素であることを報告した論文については、大麦中に含まれる植物性の zymogen β -Amylase は潜在酵素であって、その活性化の機構をめぐって現在トピック的な討論がなされていることを示した文献²⁷⁾ 以外は、著者がさがした範囲内ではまったく見当らなかった。

しかしながら、自律神経系の刺激によって活性化されたものであることが証明されている潜在酵素が、現在つぎつぎに発見されている状況であるから、著者は α -Amylase も絶対に潜在酵素ではないと断言できないと考えている。

それは、たとえば、肝臓の glycogen の分解の律速酵素である phosphorylase の活性は交感神経である内臓神経の電気刺激によって、短時間内に

著明に上昇を示すが、これは不活性型の dephosphophosphorylase が交感神経刺激によって活性型に転換した結果であるということが確められている²⁸⁾し、逆に肝臓のグリコーゲン合成の律速酵素と考えられる glycogen synthetase の活性化が迷走神経の刺激によって、引き起こされるという事実も知られている²⁹⁾からである。

そしてまた、すでに考察したとおり、腺細胞内における α -Amylase の合成反応に自律神経系が関与していることはまったく否定されなければならないが、 α -Amylase が潜在酵素であって、それが自律神経の刺激によって活性化されるという機序が存在するならば、自律神経の関与はむしろ当然のことであると考えられるからである。

ところで、自律神経の刺激作用は、自律神経の終末から遊離される acetylcholine あるいは noradrenaline の示す生理作用に帰着されているから、自律神経が刺激された場合と類似の作用を示す物質 (sympatho, parasympathomimetic substances) を投与したときにも、神経刺激のときとまったく同様に α -Amylase の活性化が急速に発現する状態が観察できるに違いないと、推察される。

これらの著者の推察は、pilocarpine 刺激後の顎下腺組織内の α -Amylase 活性の急激な上昇現象を説明するときに、きわめて都合のよい hypothesis と考えられるものであるから、顎下腺組織内の α -Amylase は潜在酵素であるという仮定のもとに、潜在性 α -Amylase を活性化させる pilocarpine 刺激の作用経路について検討を加えた。

pilocarpine 刺激の代表的な作用は、コリン作動性副交感神経の節後線維を刺激したときとまったく同じ効果を現わす (pilocarpine は副交感神経の節後線維に作用して、acetylcholine を遊離する³⁰⁾のか、あるいはまた自律神経奏効細胞を直接刺激するためである³¹⁾のかは明らかではないが、とにかく副交感神経刺激作用を示すものと考えられていることはよく知られている事実である。しかし、この刺激作用によって α -Amylase が活性化されるのではないかということについては、Chorda 電気刺激による実験 (表5) で完全に否定できるという結果を得た。

つぎに、pilocarpine 刺激の第2の作用として pilocarpine 刺激には、副腎髄質細胞に働いて catecholamine を分泌させる作用のあることが認められている^{32,33)}。

しかし、副腎を摘出したラットに pilocarpine 刺激を与えても、 α -Amylase が急速に活性化されることを観察できた (表13)。なお、副腎の摘出によって、顎下腺組織内 α -Amylase 活性が変動しない (表12)、副腎摘出と対照側の顎下腺組織の摘出との操作の手順 (副腎を先に摘出するか、あるいは顎下腺組織の摘出を先に行うかという手順) を変えても、顎下腺組織内の α -Amylase が pilocarpine 刺激によって活性化されるという実験結果にはまったく違いは認められなかった (表14)。

以上の各実験結果は、pilocarpine 刺激によって分泌される副腎髄質からの catecholamine が、血行を介して顎下腺組織に達し、 α -Amylase を活性化する可能性のないことを示している。しかも、この実験結果を支持すると考えられる報告も認められている。すなわち、pilocarpine によって副腎髄質から分泌された catecholamine が血中に入ると、交感神経線維を多く含む臓器に直ちに切り込まれてしまったり³⁴⁾、あるいはその強力な分解酵素である catechol-O-methyl transferase (COMT) によって O-methyl 化されて、血流中から急速に消失してしまったりする³⁵⁾。この結果、標的臓器である顎下腺に有効量の catecholamine が到達できないのではないかと考えられる。

だから、この機序によって、顎下腺組織では α -Amylase の活性化が認められないという現象が認められたのであろう。

さらにまた、catecholamine の大部分は adrenaline (体内に存在する adrenaline は、その大部分が副腎髄質中に認められ、noradrenaline から phenylethanolamine-N-methyl transferase (PNMT) により合成される) であり、noradrenaline の分泌は少ないことが判明している^{36,37)}ので、これらの生体アミンの量とその作用機序の差とが顎下腺組織の α -Amylase の活性化に影響した結果であるのかも知れない。

さて、pilocarpine 刺激の第3の作用として、

pilocarpine 刺激には交感神経刺激類似作用が認められることである（とくに、交感神経節の刺激作用があることによって、交感神経刺激類似作用を示すものと考えられている³⁸⁻⁴⁰⁾）。

そして、pilocarpine のこの作用は、唾液の組成⁴¹⁻⁴³⁾ や唾液腺組織の代謝および肥大現象⁴⁴⁾ と密接に関係していることがすでに報告されている。

そこで、副腎摘出ラットにおいて、神経節遮断薬である hexamethonium で前処置してから、pilocarpine 刺激を行ったが、顎下腺組織内の α -Amylase 活性は神経節遮断薬で前処置してもしなくても明らかに有意に上昇（活性化）することが観察された（表9）。

ところが、副腎摘出ラットに、交感神経 β -アドレナリン効果遮断薬（adrenergic β -receptor blocker）である propranolol で前処置しておく、pilocarpine 刺激によって認められる顎下腺組織内の α -Amylase の急激な活性化現象は完全に抑制されるという結果（表8）を得た。この α -Amylase の活性化の阻止作用は、副腎摘出を行っていないラットについても、認められた（表7）。

以上の実験結果と、atropine の前処置に基づく pilocarpine の顎下腺組織内の α -Amylase 活性の上昇現象の停止実験（Schneyer ら（1957）³⁾、（1960）²⁾ および著者の追試実験（表6））の結果とを併せて考察すると、pilocarpine 刺激によって引き起こされるラット顎下腺組織内の α -Amylase の活性化の作用ルートは、完全に解明できたと考えられる。

すなわち、交感性および副交感性の神経節の伝達物質としては、現在ははっきりと確証されている acetylcholine を挙げることができるが、その作用には nicotine 様作用と muscarine 様作用とがあるといわれている⁴⁵⁾。

この nicotine 様作用は atropine によって影響を受けないが、hexamethonium によって遮断を受け、逆に muscarine 様作用は hexamethonium などの通常の節遮断薬の作用を受けないが、しかし少量の atropine によって阻害されることが明らかとなっている⁴⁶⁾（現在、高濃度の atropine では交感神経節の nicotine 性受容体も遮断することが報告されている⁴⁷⁾ ので、著者の実験ではき

わめて低濃度の atropine を用いた（表17））。

また、pilocarpine の神経節刺激作用は、神経節における muscarine 性受容体刺激であるという最近の報告がある⁴⁸⁾。だから、本論文における著者の実験結果は、pilocarpine のもつその神経節刺激作用そのものを、改めて証明しているものであると考えられる。

そして、pilocarpine のこの刺激作用が、とくに交感神経節を介して交感神経節後線維の興奮を引き起こし、続いて腺細胞に分布している交感神経の終末から noradrenaline を遊離させるということには間違いはない。

そして、遊離された noradrenaline は、腺細胞膜の β -受容体と反応して、腺組織ことに腺細胞内で、 α -Amylase を活性化させるものであろうと、著者は推定した（図1）。

図1 pilocarpine によるラット顎下腺組織内の α -Amylase の活性化のルートの模式図

D まとめ

唾液腺細胞内の α -Amylase が交感性 β -受容体を介する刺激すなわち、末梢性交感神経伝達物質の noradrenaline の作用によって、活性化されるのであれば、pilocarpine の交感神経節を経由する薬物刺激だけではなく、むしろ正常の交感神経のインパルスにより分泌される noradrenaline によっても活性化されるはずである。

この点を再検討するために、もっとも生理的な交感神経興奮に近い刺激であると考えられる交感神経節の電気刺激を行ったときの α -Amylase の活性化現象を観察した。

表 20 各種の唾液分泌刺激の投与後における耳下腺、顎下腺組織内の α -Amylase 活性と耳下腺、顎下腺唾液中の α -Amylase 活性との関係

唾液腺の種類	分泌刺激	α -Amylase 活性		研究者
		腺組織	唾液	
耳下腺	Isoproterenol	非常に減少 ^{4,5)} (1~2時間以内)	高活性 ⁴⁾	Byrt, P. (1966) ⁴⁾ Lillie, J. H. (1972) ⁵⁾
	Pilocarpine	減少(約 $1/2$) ¹⁾ (6時間以内)	中活性 ¹⁾	Schneyer, L. H. et al. (1956) ¹⁾
顎下腺	Isoproterenol	注	高活性 ⁹⁾ (約5倍)	Byrt, P. N. et al. (1967) ⁶⁾ 岡(1971) ⁹⁾
	SCG 電気刺激	変化なし (1時間以内)	きわめて高活性 (約100倍)	岸(1976)
	Pilocarpine	非常に増加 ^{1,2)} (1~2時間以内)	中活性 ⁹⁾ (標準値)	Schneyer, L. H. et al. (1956) ¹⁾ (1960) ²⁾ 岸(1976) 岡(1976) ⁹⁾
	Chorda 電気刺激	変化なし (1~2時間以内)	低活性 ⁹⁾ (約 $1/3 \sim 1/2$ 倍)	岸(1976) 岡(1971) ⁹⁾

注： α -Amylase 活性については記載していないが、唾液蛋白質が4時間以内に約 $1/2$ に減少する⁶⁾といっている。

表 21 Pilocarpine 刺激唾液中の α -Amylase 活性とその唾液分泌速度 (岡(1971)⁹⁾から引用)

	α -Amylase 活性 (Units)	唾液分泌速度 (μ l/min/mg)
1	1.91×10^{-2}	0.00768
2	9.53×10^{-3}	0.00691
3	9.90×10^{-3}	0.00751
4	9.34×10^{-3}	0.02030
5	9.53×10^{-3}	0.01506
6	1.16×10^{-2}	0.02071
7	1.16×10^{-2}	0.01128
8	1.20×10^{-2}	0.01387
9	1.16×10^{-2}	0.01266
10	6.01×10^{-3}	0.01355
11	7.68×10^{-3}	0.06757
12	6.94×10^{-3}	0.02117
13	5.55×10^{-3}	0.02494
14	8.14×10^{-3}	0.02894
15	7.40×10^{-3}	0.03423
16	6.94×10^{-3}	0.04835
17	8.05×10^{-3}	0.05648
18	5.55×10^{-3}	0.06241

すなわち、intact のラットの上顎神経節の刺激(SCG 電気刺激)前および刺激後の顎下腺組織内および SCG 電気刺激によって分泌された顎下腺唾液中の α -Amylase の活性について測定した(表16, 18)。

その実験成績は、SCG 電気刺激の前後の腺組織内 α -Amylase 活性にはまったく有意差は認められなかった(活性値の平均値では刺激後にわずかに上昇(約8%)を示す)。

すなわち、SCG 電気刺激によって α -Amylase の活性は上昇も減少も示さない。しかしながら、SCG 電気刺激による分泌唾液中の α -Amylase 活性はきわめて高く、Chorda 電気刺激唾液、pilocarpine 刺激唾液および isoproterenol 刺激唾液における α -Amylase 活性のどの値(表21~23)よりも、はるかに高いことが明らかとなった。

そこで、著者のこの実験ならびにこれまでに報告された分泌刺激後の唾液腺組織内および唾液中の α -Amylase 活性についての各実験の結果をまとめると(表20)、唾液腺組織と唾液との相互間における α -Amylase 活性の消長の状態を十分に比較できることが判明した。すなわち、耳下腺組織とその唾液とについては、分泌刺激後の腺組織内の α -Amylase 活性の低下が大きいときほど唾液中の α -Amylase の活性が高く、 α -Amylase が腺組織からスムーズに唾液中に分泌されていることが明らかになった。

一方、顎下腺組織では、Chorda 電気刺激前後の α -Amylase の活性に差は認められない。

それは Chorda 電気刺激によって、 α -Amylase

表 22 Chorda 電気刺激唾液中の α -Amylase 活性とその唾液分泌速度 (岡(1971)⁹⁾から引用)

	α -Amylase 活性 (Units)	唾液分泌速度 (μ l/min/mg)
1	4.81×10^{-8}	0.18592
2	6.01×10^{-8}	0.16424
3	9.90×10^{-8}	0.15000
4	7.86×10^{-8}	0.13570
5	6.75×10^{-8}	0.12029
6	5.37×10^{-8}	0.08184
7	6.75×10^{-8}	0.08032
8	5.37×10^{-8}	0.06059
9	4.63×10^{-8}	0.06061
10	4.81×10^{-8}	0.04589
11	7.86×10^{-8}	0.04156
12	7.59×10^{-8}	0.04141
13	4.81×10^{-8}	0.03260
14	7.68×10^{-8}	0.03028
15	7.86×10^{-8}	0.02446
16	8.60×10^{-8}	0.02805
17	7.90×10^{-8}	0.01080
18	6.94×10^{-8}	0.01429
19	7.86×10^{-8}	0.01357
20	4.68×10^{-8}	0.00909

はごくわずかに唾液中に分泌されるけれども、顎下腺組織内の α -Amylase を明らかに減少させるまでに至らないので、腺組織内の α -Amylase 活性のわずかな変動を測定することができなかったためであると考えられる。

ところが、SCG 電気刺激による交感性 β -受容体を介した α -Amylase の活性化によって顎下腺組織内で α -Amylase 活性が上昇しても、SCG 電気刺激では、顎下腺唾液中には α -Amylase が非常に高活性に分泌されている（しかし一般的に、同一の分泌刺激では、ラットの唾液中の α -Amylase 活性値は顎下腺唾液よりも耳下腺唾液のほうが $10^4 \sim 10^5$ 倍ほど高い⁴⁹⁾）ので、見かけ上腺組織内の α -Amylase の活性上昇現象が認められないことになるのであろうと解釈される。そして、pilocarpine 刺激の場合は、Chorda 電気刺激のときよりもかなり高い活性で唾液中に α -Amylase が分泌しているものの、SCG 電気刺激の場合と比べてかなり低い（pilocarpine 刺激唾液の活性は SCG 電気刺激のときのほぼ $1/100$ の値である）

表 23 Isoproterenol 刺激唾液中の α -Amylase 活性とその唾液分泌速度(岡(1971)⁹⁾から引用)

	α -Amylase 活性 (Units)	唾液分泌速度 (μ l/min/mg)
1	7.77×10^{-2}	0.00663
2	6.61×10^{-2}	0.00666
3	5.74×10^{-2}	0.00682
4	5.74×10^{-2}	0.00638
5	5.74×10^{-2}	0.00374
6	5.64×10^{-2}	0.00548
7	5.83×10^{-2}	0.00680
8	4.95×10^{-2}	0.00711
9	4.86×10^{-2}	0.00765
10	4.67×10^{-2}	0.01321
11	4.76×10^{-2}	0.00808
12	4.02×10^{-2}	0.00790
13	3.38×10^{-2}	0.00536
14	3.47×10^{-2}	0.00389
15	3.65×10^{-2}	0.00823
16	3.61×10^{-2}	0.01400
17	3.52×10^{-2}	0.00659
18	2.73×10^{-2}	0.00436
19	1.25×10^{-2}	0.01318
20	1.39×10^{-2}	0.00929
21	1.16×10^{-2}	0.00822
22	1.16×10^{-2}	0.01375
23	1.16×10^{-2}	0.00939
24	1.25×10^{-2}	0.00853
25	1.20×10^{-2}	0.00989
26	1.80×10^{-2}	0.00726

ので、唾液中の α -Amylase 活性の大小は顎下腺組織から唾液中に放出された α -Amylase 量の大小に比例すると解釈すると、pilocarpine 刺激のときには SCG 電気刺激のときよりも腺組織内に α -Amylase が大量に残留してしまっており、急激な活性上昇現象が観察されるのであろうと考えられる。

さらに、上記の現象の機序を耳下腺組織と顎下腺組織とについて比較検討すると、次のように考察される。

唾液腺細胞に分泌刺激が与えられると、それが副交感神経性刺激 (acetylcholine による腺細胞の muscarine 性受容体刺激) であっても、また交感神経性刺激 (一般的に、noradrenaline による腺細胞の α -受容体刺激) であっても、ともに水分お

よびイオンの細胞膜を介する移動を引き起こして、その分泌が開始されると考えられる。

また、交感神経性刺激の伝達物質である nor-adrenaline は、同時に唾液腺細胞の β -受容体を刺激して、 α -Amylase を含む外分泌蛋白質の成熟顆粒を腺腔側に移動させ、これを細胞外に放出させることで、いわゆる唾液蛋白質 (sialo-protein) の分泌を行っていると考えられる。

このとき、ラットの耳下腺組織と顎下腺組織では、 β -受容体の感受性が明らかに異なる（とくに両組織において、 β -受容体の分布が異なる、すなわち耳下腺組織のほうが β -受容体の含有量が多いと考えたい）か、あるいは交感神経の分布度に差があると仮定すると、ラットの交感性分泌中枢が興奮して、同時に同一強度の遠心性のインパルスが耳下腺と顎下腺とへ送られても、両腺組織のこの相違によって、とくに分泌蛋白質の放出状態に明らかに差異が認められることになる。

このことは、 α -Amylase の放出現象についてもいえる。すなわち β -受容体を介する反応において、著者が推定した成熟分泌顆粒内の α -Amylase が活性化される機構がたとえ存在していても、耳下腺組織では活性化と同時に腺細胞外に α -Amylase そのものが速かに放出されてしまっ、腺組織ではその活性が急に低下するために、腺組織内で α -Amylase 活性の上昇（活性化）が観察できないが、顎下腺組織では、 β -受容体を介する α -Amylase の唾液中への放出現象が耳下腺よりも弱く、ことに pilocarpine に基づく神経節の muscarine 性受容体だけを介する交感神経性の刺激では α -Amylase の放出速度がとくに小さいと想像されるので、pilocarpine 刺激後の顎下腺組織内には活性化された α -Amylase が急速に蓄積される（同じ β -受容体を介する反応である α -Amylase の放出現象と活性化現象とは、後者のほうが弱い刺激によって起こる反応であるとする）結果、 α -Amylase 活性の急激な上昇現象が現われるのであると推測される。

また、SCG 電気刺激時および Chorda 電気刺激時における顎下腺組織内と唾液中の α -Amylase 活性の相互関係やその分泌機構の説明については、すでに前述したとおりである。

さて、Schneyer, L. H. and Schneyer, C. A. (1958)¹³⁾, (1960)²⁾ は、ラットの顎下腺組織において、自然の摂食刺激あるいは acetylcholine (10 mg/rat body) によって、pilocarpine 刺激のときとまったく同様に腺組織内 α -Amylase 活性の上昇現象が認められていることを報告しているが、この現象についてはつぎのように説明できると考える。すなわち、自然の摂食刺激には、 β -受容体を介する交感神経刺激が混在しないとは断言できないと考えられるので、摂食刺激で顎下腺組織内の α -Amylase が活性化される現象がみられても矛盾しない。むしろ、岡 (1971)⁹⁾ が指摘しているように、本来の自然な味覚刺激はその刺激が与えられる瞬間のきわめて複雑な生体の要因（とくに、視床下部の機能に密接に関係した交感神経性刺激と副交感神経性刺激とが種々に入り混った状態）によって形成されるものであると想像されるから、生理的な交感神経性刺激が味覚刺激による遠心性インパルスの中に存在していることは、当然のことと考えなければならない。

外因性の acetylcholine が体内で交感神経刺激作用を示すことは、かなり以前から知られていた事実⁵⁰⁾ であり、それが atropine の前処置によって阻害される^{2,13)} とすれば、外因性の acetylcholine の交感神経刺激作用には pilocarpine 刺激における交感神経節の muscarine 性受容体の刺激作用とまったく同じ作用機序が含まれているのであろうと考えられる。

したがって、投与された外因性の acetylcholine の刺激によって顎下腺組織内で α -Amylase の活性化が観察されたとしても、少しも問題にはならない。

また、本論文で推察することができた分泌刺激投与後の唾液腺組織（腺細胞）内での α -Amylase の急激な活性化現象は、唾液中に放出された α -Amylase が、直ちにその酵素活性を示すことができるという意味において、十分な合目的性をもったきわめてたくみな生理機構であるということが出来る。

しかしながら、本論文における著者の推測を完全に証明するためには、唾液腺細胞内における α -Amylase 活性化そのものに関係した詳細な実験

を行うことが今後の課題である。とくに、交感神経刺激前と刺激後における唾液腺細胞の *adenylate cyclase* 酵素の *Lineweaver-Burk* プロットによる *K_m* 値の変動の比較、および *cyclic AMP* 濃度と *zymogen α -Amylase* の活性値との比較などが残された重要なポイントであると考えられる。

結 論

分泌刺激を与えると、ラット唾液腺組織内の α -Amylase 活性は、耳下腺では刺激直後から明らかに減少を示すが、顎下腺では刺激後短時間内に急激に上昇する。

このように、耳下腺と顎下腺とでは、刺激による腺内 α -Amylase 活性の変動の様相がきわめて対称的である。

そこで、著者は *intact* ラットおよび副腎を摘出したラットにおける顎下腺組織内の α -Amylase 活性に対する 1) 各種の分泌刺激の影響および 2) 種々の自律神経遮断薬と分泌刺激との併用投与の影響を観察し、唾液腺細胞内の α -Amylase 活性に作用すると考えられる因子、とくに神経伝達物質について総合的に検討と考察を加えた。そして、次の結論を得た。

1) *intact* のラットでもまた副腎摘出ラットでも、副交感神経の刺激 (*Chorda* 電気刺激) によつては、顎下腺組織内の α -Amylase 活性はまったく変動を示さなかった。

2) しかし、*pilocarpine* 刺激によつては、顎下腺組織内の α -Amylase 活性は刺激直後短時間内に急激に上昇する。

3) ところが、2) の現象は *pilocarpine* 刺激前に *atropine* あるいは *propranolol* の前処置をしておくと、認められなくなる。

4) これに対して、神経節遮断薬である *hexamethonium* の前処置では、*pilocarpine* 刺激に基づく顎下腺組織内の α -Amylase 活性の上昇は認められる。

5) ところで、交感神経を刺激 (*SCG* 電気刺激) しても、顎下腺組織内の α -Amylase 活性はまったく上昇も減少も示さない。

6) しかし、交感神経刺激では、顎下腺唾液中

の α -Amylase 活性値はきわめて高い。

7) 以上 1) ~ 6) の各実験結果から *pilocarpine* 刺激直後短時間内に認められるラット顎下腺組織内の α -Amylase 活性の急激な上昇現象は、*pilocarpine* 刺激前にすでに腺組織 (細胞) 内で合成・蓄積されていた α -Amylase が *pilocarpine* 刺激によって活性化された結果である。

8) そして、*pilocarpine* のこの作用機構を次のように推測した。すなわち、*pilocarpine* 刺激が交感神経節 (*muscarine* 受容体) に作用して、交感神経節後線維の終末から *noradrenaline* を遊離させ、それが顎下腺細胞の β -受容体に働くと考えられる。

9) 8) で述べた交感性 β -受容体を介すると考えられる α -Amylase の活性化作用は、耳下腺組織においても存在すると思われる。

しかし、この活性化された α -Amylase は分泌刺激によつて耳下腺では急速に唾液中に放出される結果、腺内 α -Amylase 活性は急激に減少する。

ところが、顎下腺では、とくに *pilocarpine* 刺激において、耳下腺に比べて α -Amylase の放出される速度が小さいので、活性化した α -Amylase が腺組織内に残留蓄積する結果、腺内 α -Amylase 活性が急激に増加を示すのであると考えられる。

稿を終るにあたり、終始ご指導とご校閲とを賜りました覚道幸男教授および吉田 洋助教授に、またご協力願った教室員各位に深く感謝いたします。

この論文の要旨は、第16回歯科基礎医学会総会 (昭和49年9月24日、仙台)、第52回日本生理学会大会 (昭和50年4月2日、津) および第237回大阪歯科学会例会 (昭和51年3月13日、大阪) で発表した。

文 献

- 1) SCHNEYER, L. H. and SCHNEYER, C. A.: Apparent synthesis of submaxillary gland amylase during *pilocarpine* administration. *Amer. J. Physiol.*, 187: 403-406, 1956.
- 2) SCHNEYER, L. H. and SCHNEYER, C. A.: Regulation of salivary gland amylase activity. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 85: 189-200, 1960.
- 3) SCHNEYER, C. A. and SCHNEYER, L. H.: Time course of active amylase accumulation by rat submaxillary gland during continuous *pilocarpine* stimulation. *Amer. J. Physiol.*, 189: 129-131, 1957.

- 4) BYRT, P.: Secretion and synthesis of amylase in the rat parotid gland after isoprenaline. *Nature Lond.*, **212** : 1212-1215, 1966.
- 5) LILLIE, J. H.: Effects of prostaglandin E_1 on normal and stimulated rat parotid glands: An electron microscopic and biochemical study. *Thesis*, 1-117: University of Michigan, 1972.
- 6) BYRT, P. N. and GLANVILL, S.: Effect of isoprenaline on the secretion of sialoproteins from rat salivary glands. *Biochim. biophys. acta*, **148** : 215-221, 1967.
- 7) 向井 浄: 炭酸脱水酵素阻害からみた唾液腺陽イオン転送機構の検討. 歯基礎誌, **11** : 65-81, 1969.
- 8) 内尾政信: 分泌刺激の種類と唾液中への Sulfanilamide の分泌様式からみた唾液分泌機構の検討. 歯基礎誌, **32** : 405-431, 1969.
- 9) 岡 好甫: ラット顎下腺における α -Amylase, 陽イオンおよび水分に関する唾液分泌刺激についての検討. 歯基礎誌, **13** : 515-538, 1971.
- 10) SPRECHER, R. L., YOSHIDA, Y. and SCHNEYER, L. H.: Partial isolation and perfusion of rat submaxillary gland. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, **125** : 1227-1229, 1967.
- 11) YOSHIDA, Y., SPRECHER, R. L., SCHNEYER, C. A. and SCHNEYER, L. H.: Role of β -receptors in sympathetic regulation of electrolytes in rat submaxillary saliva. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, **126** : 912-916, 1967.
- 12) JAMIESON, A. D., PRUITT, K. M. and CALDWELL, R. C.: An improved amylase assay. *J. dent. Res.*, **48** : 483, 1969.
- 13) SCHNEYER, L. H., SCHNEYER, C. A.: Increase in amylase of the submaxillary gland in response to acetylcholine or feeding. *Amer. J. Physiol.*, **193** : 1-3, 1958.
- 14) HOKIN, M. R. and HOKIN, L. E.: Enzyme secretion and the incorporation of P^{32} into phospholipides of pancreas slices. *J. biol. Chem.*, **203** : 967-977, 1953.
- 15) FARBER, E. and SIDRANSKY, H.: Changes in protein metabolism in the rat pancreas on stimulation. *J. biol. Chem.*, **222** : 237-248, 1956.
- 16) JAMIESON, J. D. and PALADE, G.: Intracellular transport of secretory proteins in the pancreatic exocrine cell. II. Transport to condensing vacuoles and zymogen granules. *J. Cell Biol.*, **34** : 597-614, 1967.
- 17) PRESHAW, R. W.: Pancreatic exocrine secretion. *MTP Int. Rev. of Sci.; Gastrointestinal Physiology* (ed. by JACOBSON, E. D. and SHANBOUR, L. L.), Physiology Series One, 4, 265-291, Butterworths and University Park Press, London and Baltimore, 1974.
- 18) 菅野富夫: 唾液分泌機構. 代謝, **12** : 1115-1120, 1975.
- 19) LILLIE, J. H. and HAN, S. G.: Secretory protein synthesis in the stimulated rat parotid gland. Temporal dissociation of the maximal response from secretion. *J. Cell Biol.*, **59** : 708-721, 1973.
- 20) MONOD, J., CHANGEUX, J. P. and JACOB, F.: Allosteric proteins and cellular control systems. *J. mol. Biol.*, **6** : 306-329, 1963.
- 21) MONOD, J., WYMAN, J. and CHANGEUX, J. P.: On the nature of allosteric transitions: A plausible model. *J. mol. Biol.*, **12** : 88-118, 1965.
- 22) MANDEL, I. D.: Relation of saliva and plaque to caries. *J. dent. Res.*, **53** : 246-266, 1974.
- 23) CASTLE, J. D., JAMIESON, J. D. and PALADE, G. E.: Radioautographic analysis of the secretory process in the parotid acinar cell of the rabbit. *J. Cell Biol.*, **53** : 290-311, 1972.
- 24) ANREP, G. V. and KHAN, H. N. (LAHORE): The metabolism of the salivary glands. V. The process of reconstruction of the submaxillary gland. *J. Physiol.*, **58** : 302-309, 1923.
- 25) GROMET-ELHANAN, Z. and WINNICK, T.: Microsomes as sites of α -amylase synthesis in the rat-parotid gland. *Biochim. biophys. acta*, **69** : 85-96, 1963.
- 26) 勝沼信彦: 代謝調節概説, 代謝調節 (勝沼信彦および市原 明編集), 28-32, 朝倉書店, 東京, 1971.
- 27) 新家 竜: 潜在型 β -アミラーゼとその活性化機構. 化学と生物, **10** : 426-437, 1973.
- 28) SHIMAZU, T. and AMAKAWA, A.: Regulation of glycogen metabolism in liver by the autonomic nervous system. III. Differential effects of sympathetic-nerve stimulation and of catecholamines on liver phosphorylase. *Biochim. biophys. acta*, **165** : 349-356, 1968.
- 29) MERSMANN, H. J. and SEGAL, H. L.: An on-off mechanism for liver glycogen synthetase activity. *Proc. nat. Acad. Sci.*, **58** : 1688-1695, 1967.
- 30) TAKAGI, K., TAKAYANAGI, I. and SHIH, C. K.: A new view on the site of action of pilocarpine and arecoline in the isolated guinea pig ileum. *Chem. Pharm. Bull.*, **15** : 1744-1748, 1967.
- 31) PFEIFFER, C. C.: Nature and spatial relationship of the prosthetic chemical groups required for maximal muscarinic action. *Science*, **107** : 94-96, 1948.

- 32) WATANABE, F.: Über den Einfluss des Pilocarpins auf die Epinephrinabgabe aus den Nebennieren und auf den Blutzuckergehalt beim Hunde. *Tohoku J. exp. Med.*, **27**: 390-403, 1935.
- 33) DOUGLAS, W. W.: The mechanism of release of catecholamines from the adrenal medulla. *Pharmac. Rev.*, **18**: 471-480, 1966.
- 34) POTTER, L. T. and AXELROD, J.: Subcellular localization of catecholamines in tissues of the rat. *J. Pharmacol. exp. Therap.*, **142**: 291-298, 1963.
- 35) AXELROD, J. and TOMCHICK, R.: Enzymatic *o*-methylation of epinephrine and other catechols. *J. biol. Chem.*, **233**: 702-705, 1958.
- 36) DOUGLAS, W. W. and POISNER, A. M.: Preferential release of adrenaline from the adrenal medulla by muscarine and pilocarpine. *Nature Lond.*, **208**: 1102-1103, 1965.
- 37) RUBIN, R. P. and MIELE, E.: A study of the differential secretion of epinephrine and norepinephrine from the perfused cat adrenal gland. *J. Pharmacol. exp. Therap.*, **164**: 115-121, 1968.
- 38) KOPPANYI, T.: Studies on the synergism and antagonism of drugs. I. The non-parasympathetic antagonism between atropine and the miotic alkaloids. *J. Pharmacol. exp. Therap.*, **46**: 395-405, 1932.
- 39) ROOT, M. A.: Certain aspects of the vasopressor action of pilocarpine. *J. Pharmacol. exp. Therap.*, **101**: 125-131, 1951.
- 40) TRENDLENBURG, U.: The action of histamine and pilocarpine on the superior cervical ganglion and the adrenal glands of the cat. *Brit. J. Pharmacol.*, **9**: 481-487, 1954.
- 41) SCHNEYER, C. A. and HALL, H. D.: Comparison of rat salivas evoked by auriculo-temporal and pilocarpine stimulation. *Amer. J. Physiol.*, **209**: 484-488, 1965.
- 42) SCHNEYER, C. A. and HALL, H. D.: Autonomic pathways involved in a sympathetic-like action of pilocarpine on salivary composition. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, **121**: 96-100, 1966.
- 43) SCHNEYER, C. A.: Modification of the action of pilocarpine by adrenergic blocking agents. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, **120**: 230-232, 1965.
- 44) SCHNEYER, C. A.: β -Adrenergic effects by autonomic agents on mitosis and hypertrophy in rat parotid. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, **131**: 71-75, 1969.
- 45) 杉山博之: 脳・神経系の代謝と機能 (V). シナプス c) アセチルコリン受容体. 代謝, **12**: 247-255, 1975.
- 46) ECCLES, R. M. and LIBET, B.: Origin and blockade of the synaptic responses of curarized sympathetic ganglia. *J. Physiol.*, **157**: 484-503, 1961.
- 47) BERÁNEK, R. and VYSKOCIL, F.: The action of tubocurarine and atropine on the normal and denervated rat diaphragm. *J. Physiol.*, **188**: 53-66, 1967.
- 48) 藤原元始: 副交感神経作働薬と遮断薬, 生化学的薬理学 (吉田 博および田中正三編集), 219-236, 朝倉書店, 東京, 1971.
- 49) 岸 文隆, 吉田 洋, 覚道幸男: 同時採取法によるラット耳下腺および顎下腺唾液中の Protein 量ならびに Amylase 活性の比較検討. 唾液腺シンポジウム, **17**: 32-33, 1972.
- 50) DALE, H. H.: The action of certain esters and ethers of choline, and their relation to muscarine. *J. Pharmacol. exp. Therap.*, **6**: 147-190, 1914.