培養ラット耳下腺のホルモン応答性に関する研究

井 上 秀 夫 小 西 洋 太 郎 滝 川 啓 子
上 野 明 道 竹 田 義 朗

徳島大学歯学部口腔生化学講座* (主任：竹田義朗教授)

[受付：昭和57年3月13日]

Studies on hormonal responses in the rat parotid gland in culture

Hideo Inoue, Yotaro Konishi, Keiko Takigawa,
Akemichi Ueno and Yoshiro Takeda

Department of Biochemistry, School of Dentistry, Tokushima University
Kuramoto-cho 3-18-15, Tokushima 770
(Chief: Prof. Yoshiro Takeda)

[Accepted for publication: March 13, 1982]

Key words: parotid explant/isoproterenol/amylase/DNA synthesis/ornithine decarboxylase

Abstract: The effects of hormones on biochemical functions in the parotid glands were studied *in vitro* using rat parotid explants which were supported by siliconized lens papers at the surface of the chemically defined synthetic medium.

Isoproterenol (IPR) stimulated amylase secretion from the explants which had been cultured for 48 hours in Medium 199 and total amylase activity in the culture system increased gradually during the culture period. IPR also stimulated DNA synthesis in the presence or absence of insulin and dexamethasone. This stimulation was preceded by enhanced syntheses of RNA and protein and marked induction of ornithine decarboxylase (ODC). Similar effects on DNA synthesis and ODC activity were observed with epinephrine or norepinephrine but the responses were less pronounced than in those with IPR. DNA synthesis was also stimulated by insulin and dexamethasone. In this case, however, increases of RNA and protein synthesis and ODC activity in the prereplicative phase were not so remarkable as in the case of IPR. Dibutyl cAMP raised ODC activity but was inhibitory on DNA synthesis.

These results suggest that the rat parotid explants maintain hormonal responsiveness for at least 48 hours and can be used as experimental tools for study of physiology of the parotid glands.

緒 言

耳下腺の生理を *in vitro* の系で研究する方法として、耳下腺のスライスや酵素法で調製した腺房細胞が繁用されている。例えば、これらの系を用いて、ホルモンによるアミラーゼ分泌の促進とカ

ルシウムイオンや環状ヌクレオチドの細胞内レベルあるいは蛋白のリン酸化との関連を追求した研究が報告されている¹⁻⁶⁾。しかし、これらの実験は、何れも耳下腺に対するホルモンの短期間の作用を追求したもので、効果発現に比較的時間を要するホルモン作用、例えば、イソプロテレノールによる耳下腺の増殖促進を *in vitro* で検討した報

* 徳島市蔵本町3丁目 18-15 (〒770)

告は極めて少ない。

著者らは、先にイソプロテレノールによるマウス唾液腺の増殖時のポリアミン代謝の変動を *in vivo* で検索し、複製前期にポリアミン合成の律速酵素であるオルニチン脱炭酸酵素が著明に誘導されることを示すと共に、本酵素の特異的阻害剤を用いて耳下腺の増殖でのポリアミンの重要性を指摘した^{7,8)}。しかし、現在のところ、イソプロテレノールによるオルニチン脱炭酸酵素の誘導や増殖の機構については不明な点が多い。

これらの解明には、耳下腺の機能を長期に *in vitro* で保持しうる培養法の確立が不可欠であると考えられる。そこで我々は、耳下腺の培養法を種々検討した結果、シリコナイズしたレンズペーパー上で耳下腺の explant を培養すると、血清やアルブミンを添加しない完全合成培地でも少なくとも2日間耳下腺としての機能が保持されることをみいだした。

本論文では、この培養耳下腺の生化学的機能に対するホルモンの影響について検討した結果を報告する。

実験材料および方法

1. 試薬および培地

放射性同位元素、 $[6\text{-}^3\text{H}]$ チミジン (5 Ci/mmole)、 $[5\text{-}^3\text{H}]$ ウリジン (30 Ci/mmole)、 $\text{L-[4, 5-}^3\text{H}]$ ロイシン (70 Ci/mmole)、 $\text{DL-[1-}^{14}\text{C}]$ オルニチン (39 mCi/mmole) は、何れも Radiochemical Centre, Amersham より購入した。ウシの結晶インシュリン (24 I.U./mg)、カテコールアミン類、ジチオスレイトール、 $\text{N-2-Hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic acid}$ (HEPES) および $\text{N}^6, \text{O}^{2'}$ -Dibutyryl adenosine $3':5'$ -cyclic monophosphate は Sigma 社製のものを用いた。グルココルチコイドとして使用した硫酸デキサメサゾン (Dexa-Scheron) はシュERING社 (西独) 製である。

培養に使用した199培地 (M-199) は、蒸留水を Millipore 社製の Milli-Q で処理した精製水に粉末培地 (日本製薬) を溶解し、これに NaHCO_3 (1.5 g/l)、ペニシリンGカリウム (20 mg/l , 明治製薬) および硫酸ストレプトマイシン (100 mg/l , 明治製薬) を加え、濾過滅菌して調製した。

2. 耳下腺 explant の調製および培養方法

雄性ウイスター系ラット (体重 $200\sim 250\text{ g}$) を40時間絶食後、頸部脱臼して摘出した耳下腺を 10 mM HEPES を含む M-199 ($\text{pH } 7.4$) 中で、眼科用剪刀を用いて約 1 mg の組織片に細切し、explant を調製した。この explant を培地に浮べたシリコン処理レンズペーパー上に 4 mm 間隔でのせ、 3% CO_2 - 97% 空気の気相下、 37°C で培養した。培地量は explant 10 個当り 5 ml とし、24時間毎に培地を交換した。培地中のホルモンの濃度は、 10 mU/ml インシュリン、 10^{-6} M 硫酸デキサメサゾン、 10^{-5} M DL-イソプロテレノールである。これらの濃度は、予試験 (DNA 合成) でえられた至適濃度である。なお、レンズペーパーは、富士システムズ社の水溶性シリコン (商品名: シリコナイザー) を用いて Topper らの方法⁹⁾ に準じてシリコナイズした。また、培養操作は全て無菌的に行なった。

3. 組織切片作製法

耳下腺の explant を常法により中性ホルマリンで固定後、パラフィン包埋して厚さ $2\text{ }\mu$ の切片とし、ヘマトキシリン-エオジンで染色した。

4. 核酸および蛋白合成能の測定法

約 10 mg の explant を 10 mM HEPES と1種類の放射性前駆体を含む M-199 ($\text{pH } 7.4$, 重曹不含) 0.5 ml 中で、 37°C 、気相空気で2時間軽く振とうしながらインキュベートした。ついで、explant を集め、重量を測定した後、核酸および蛋白を Schmidt-Thaunhauser の方法¹⁰⁾ で分画した。各画分の一定量を Triton を含むシンチレーションカクテル¹¹⁾ に溶解し、放射能を液体シンチレーションカウンター (Beckman LS 9000) で測定した。反応液中の ^3H -前駆体の量は $1\text{ }\mu\text{Ci/ml}$ ウリジン (RNA)、 $2\text{ }\mu\text{Ci/ml}$ チミジン (DNA) および $1\text{ }\mu\text{Ci/ml}$ ロイシン (蛋白) である (2-h labeling method)。なお、DNA 合成能は、より長時間の標識でも測定したが、このさいは培養開始24時間後の培地交換を ^3H -チミジン ($0.2\text{ }\mu\text{Ci/ml}$) を含む新鮮培地で行ない、その後24時間培養して DNA にとりこまれた放射能を測定した (24-h labeling method)。

5. 酵素活性の測定法

Fig. 1 Light micrographs of the rat parotid explants.
Left: explant before culture (original mag. $\times 400$)
Right: explant cultured for 48h in Medium 199 (original mag. $\times 400$)

α -アミラーゼ活性は Bernfeld の方法¹²⁾で測定した。

オルニチン脱炭酸酵素活性は先に報告した方法¹³⁾を一部変更して測定した。すなわち、約20mgの explant を0.3mlの緩衝液(40mM リン酸ナトリウム pH 7.0, 7mM ジチオスレイトール, 0.1mM ピリドキサルリン酸, 0.1mM EDTA)でホモゲナイズし、105,000 $\times g$ で30分遠心した上清0.15mlに DL-[1-¹⁴C] オルニチンを含む基質を加え、37°Cで1時間反応させた。反応液量は0.2mlで L-[1-¹⁴C] オルニチンとしての最終濃度は0.2mM (2.5mCi/mmol)である。

実験結果

1. 培養耳下腺の組織像

Fig. 1はヘマトキシリン-エオジンで染色した耳下腺 explant の組織像である。培養前の explant (左)にくらべ、199培地のみで48時間培養した explant (右)では、多少の変性像がみとめられるが、腺房細胞の構造はほぼ保持されている。

2. α -アミラーゼ活性

Fig. 2は培地中のアミラーゼ活性の経時変化を示したものである。培養開始時に 10^{-5} Mの DL-イソプロテレンールを培地に加えておくと、2時間後には培地中の活性は著明に上昇し、以後48時間まで漸増した。一方、イソプロテレンールを添加しない場合には、アミラーゼ分泌は低いが、その速度は48時間後まで一定である。また、イソプロ

Fig. 2 Effect of DL-isoproterenol on amylase activity in the culture medium.

Ten parotid explants were cultured in 5ml of Medium 119 in the presence (●) or absence (○) of 10^{-5} M DL-isoproterenol. The medium was exchanged every 24h. At the indicated time points, amylase activity in the medium was determined as under "Materials and Methods". Each point represents an average of three separate experiments. Standard error for each point was less than 10% of the average.

テレンールを加えない培地で48時間培養した explant をイソプロテレンールを含む培地に移すと、3時間後には explant 内に残存したアミラーゼの90%以上が培地中に放出された。この事実は、199培地のみで48時間培養した explant でもイソプロ

Table 1 Effects of hormones on total amylase activity in rat parotid explants

Addition	Total activity (medium+explant)	
	$\mu\text{mol/mg tissue/min}$	%
(Fresh explants before culture)	10.8	100
None	22.8	211
10 mU/ml Insulin (I)	24.6	228
10^{-6} M Dexamethasone sulfate (D)	18.0	167
I+D	23.3	216
10^{-5} M DL-Isoproterenol (IPR)	24.6	228
I+D+IPR	28.8	277

Parotid explants were cultured for 48 h in Medium 199 containing the indicated hormones. Total amylase activity in the medium and explants was determined as described under "Materials and Methods".

Each value is the mean of three experiments. Standard error in each case was less than 6 % of the mean.

テレノールに対するアミラーゼ分泌の応答性を維持していることを示している。

Fig. 2 に示した結果から培地および組織に含まれる総アミラーゼ活性が、48時間の培養中に増加していることが予知されたので、次にこの点について検討した。なお、この実験では、マウスの培養乳腺¹⁴⁾やラットの初代培養肝細胞¹⁵⁾あるいは培養脂肪組織¹⁶⁾の機能維持に重要であることが知られているインシュリンとグルココルチコイドの影響も併せて検討し、その結果を Table 1 に示した。総アミラーゼ活性は、ホルモン無添加(対照)でも48時間の培養で約2倍に増加した。この増加はグルココルチコイドのみの添加で若干抑制されるが、これにインシュリンとイソプロテレノールを加えると逆に約30%の促進がみられ、他の条件下では対照と差はない。これらの結果は、ホルモンの影響は著明ではないが、培養耳下腺 explant がアミラーゼ合成能をも保持していることを示唆している。

3. RNA および蛋白合成

Fig. 3 に示す如く、RNA 合成能は M-199のみの培養では、12時間の培養で若干低下するが、以後上昇し、48時間後では培養前の約2倍に増加する。インシュリンとグルココルチコイドを加えても無添加と差はみられないが、これにイソプロテレノールを加えると合成能は促進され、24時間の培養で培養前の2倍、48時間では約4倍に達する。

Fig. 3 Effects of hormones on syntheses of RNA and protein in rat parotid explants.

Parotid explants were cultured in Medium 199 containing 10mU/ml insulin + 10^{-6} M dexamethasone sulfate + 10^{-5} M DL-isoproterenol (●), or 10mU/ml insulin + 10^{-6} M dexamethasone sulfate (▲), or no addition (○). At the indicated time points, RNA and protein syntheses were determined by 2-h labeling method. Each point is the mean of two separate experiments performed in duplicate. Standard error for each point was less than 7 % of the mean.

一方、蛋白合成能も RNA とほぼ同様の経時変化を示し、3種のホルモンを添加すると48時間後には培養前にくらべ約50%の促進がみられる。

4. DNA 合成およびオルニチン脱炭酸酵素活

性

ラットやマウスなどのげっ歯動物の唾液腺の生化学的特性としてイソプロテレノールの1回投与による一過性の細胞増殖があげられる¹⁷⁾。他方、ポリアミン合成の律速酵素として最も重要なオルニチン脱炭酸酵素は、種々の組織でホルモンや薬物で活性が上昇することが知られており、特に増殖刺激を受けた組織では例外なく著明な誘導がみられる¹⁸⁾。緒言でも記した如く、我々は、すでに唾液腺の増殖時にも本酵素活性が複製前期の早期に著明に上昇することを報告⁷⁾した。

Fig. 4は耳下腺 explant の DNA 合成およびオルニチン脱炭酸酵素活性におよぼすイソプロテレノールの効果の経時変動を示したものである。

DNA 合成は、培養開始24時間後までは培養前と変わらず、その合成速度は低い。しかし、ホルモンを加えない場合でも36時間より48時間後までDNA合成能は直線的に上昇する。この上昇はインシュリンとグルコルチコイドの添加で増加し、これにイソプロテレノールを加えると更に増加する。その結果、48時間後では3種のホルモンを添加した場合、無添加にくらべ約4倍の合成速度となる。データを示さないが、この48時間後のDNA合成速度の上昇はイソプロテレノールの濃度に依存し、 $10^{-5} \sim 10^{-4} \text{ M}$ で最大となる。 10^{-7} M ではイソプロテレノールによる合成速度の増加はみられず、 10^{-6} M での増加は 10^{-5} M の約50%であり、 10^{-3} M はむしろ抑制的に働く。なお、この実験で測定したDNAへの ^3H -チミジンのとりこみは、反応液に加えた25mMのヒドロキシウレアで完全に阻害されるので、DNAの修復のためのとりこみではなく、DNAの複製に関与するものと考えられる。

一方、オルニチン脱炭酸酵素活性は3種のホルモン存在下では3時間の培養で10倍以上の活性上昇がみられ、6時間後には約60倍に達する。以後活性は急速に低下し、培養開始12時間後では6時間後の5分の1に減少する。この上昇度と経時変化は、マウスにイソプロテレノールを投与した時の耳下腺⁷⁾のそれとほぼ類似している。これに対し、無添加又はインシュリンとグルコルチコイドの添加では3時間後に培養前より2~3倍高い

Fig. 4 Effects of hormones on DNA synthesis and ornithine decarboxylase activity (ODC) in rat parotid explants. Parotid explants were cultured in Medium 199 containing the following additions; insulin + dexamethasone sulfate + DL-isoproterenol (●), or insulin + dexamethasone sulfate (▲), or no addition (○). The concentrations of these hormones were the same as in Fig. 3. DNA synthesis was determined by 2-h labeling method. Each point is the mean of three separate experiments. Standard error for each point was less than 10%.

活性となるが、以後著明な活性のピークはみられず、12時間後まで4~6倍の活性が維持される。なお、培養開始時、培地に $30 \mu\text{M}$ のサイクロヘキシイミドを加えると3種のホルモン添加による4.5時間後の活性上昇は完全に消失するので、イソプロテレノールによる活性上昇は酵素誘導によるものと考えられる。また、この酵素誘導の濃度依存性はDNA合成促進のそれと一致し、 10^{-7} M のDL-イソプロテレノールでは殆んど誘導はみられず、 10^{-6} M では 10^{-5} M の約半分の活性上昇を示す。

以上のように、培養耳下腺でも *in vivo* と同様にイソプロテレノールによりDNA合成が促進され、かつ、その複製前期に著明なオルニチン脱炭酸酵素の誘導がみられる。そこでこの促進効果を更に解析する目的で、種々の条件下で耳下腺 explant を培養し、DNA合成能を24-h labeling methodで、オルニチン脱炭酸酵素活性を培養開始6時間後に測定し、その結果をTable 2に示し

Table 2 Effects of hormones and dibutyryl cAMP on DNA synthesis and ornithine decarboxylase activity in rat parotid explants

Addition	DNA synthesis		Ornithine decarboxylase	
	dpm/mg tissue	%	pmol/mg tissue/h	%
None	1,137	100	5.0	100
10 ⁻⁵ M DL-Isoproterenol (IPR)	2,715	239	44.8	839
10 ⁻⁵ M L-Epinephrine (EN)	1,650	145	ND*	
10 ⁻⁵ M L-Norepinephrine (NEN)	1,905	168	ND	
10 ⁻³ M Dibutyryl cAMP	230	20	25.7	514
10 mU/ml Insulin (I)	1,705	150	ND	
I+10 ⁻⁶ M Dexamethasone sulfate (D)	2,810	247	8.0	160
I+D+IPR	6,814	599	84.4	1688
I+D+EN	4,298	378	53.9	1078
I+D+NEN	5,432	478	41.8	836

* ND=not determined

DNA synthesis was measured by 24-h labeling method. Ornithine decarboxylase activity was determined at 6 h. The activity at 0 h was 1.3 pmol/mg tissue/h.

Each value is the mean of three to five separate experiments. Standard error in each case was less than 6.5 % of the mean.

た。

DNA 合成はインシュリン単独でも上昇するが、グルココルチコイドの添加により更に上昇する。両ホルモン存在下でのイソプロテレノールによる促進は、2-h labeling method で測定した結果 (Fig. 4) と一致し、対照 (I+D) の2.4倍に達する。しかし、イソプロテレノールの促進には必ずしも両ホルモンの共存は必要ではなく、イソプロテレノール単独添加でも発現する。この場合は、DNA へのチミジンのとりこみの絶対値は低くなるが、対照に対する増加率では両ホルモンを添加した場合と大差はみられない。

次に、本培養系でのイソプロテレノールの特異性を検索するため、他のカテコールアミンとしてエピネフィリンとノルエピネフィリンについて検討した。L 型としてイソプロテレノールの2倍量を添加すると両カテコールアミンともイソプロテレノールより弱いが有意の DNA 合成の促進効果を示す。かつ、この促進作用はイソプロテレノールと同様にインシュリンとグルココルチコイドの有無に関係なく発現される。しかもこれら3種のアミンは何れもその DNA 合成の促進効果にほぼ呼応したオルニチン脱炭酸酵素の誘導能を示す。

最近のイソプロテレノールによる唾液腺増殖の

機構に関する研究で Mengato ら¹⁹⁾および Tsang ら²⁰⁾はサイクリック AMP の関与を示唆している。そこで本培養系でのジブチリルサイクリック AMP の影響については検討したところ、0.1mM では DNA 合成とオルニチン脱炭酸酵素活性に対して殆んど作用を示さなかった。しかし、より高濃度 (1 mM) では Table 2 に示すように、脱炭酸酵素は対照の5倍 (培養前の20倍) の活性上昇がみられる。これに反し、DNA 合成は逆に著明に抑制され、対照の5分の1に低下する。なお、この実験で explant を培養開始後24時間のみこのヌクレオチドを含む培地で培養し、その後の培養 (標識期間) をヌクレオチドを含まない培地で行なっても同程度の DNA 合成の阻害がみられた。

考 察

これまで *in vitro* の系におけるイソプロテレノールによる唾液腺 DNA 合成の促進は、Kreider²¹⁾ および Mengato ら¹⁹⁾により耳下腺由来細胞を用いて観察しえたと報告されている。しかし、前者が用いた継代培養細胞は、脱分化によりアミラーゼ活性を保持せず、また、イソプロテレノールによる促進効果も低い。後者らは、酵素法で調製した初代培養細胞のオートラジオグラフィーにより

核 DNA への ^3H -チミジンのとりこみがイソプロテレノールにより増加すると報告しているが、学会報告の抄録のため実験方法や細胞の特性などの詳細は不明である。ともあれ、このような細胞系では、肝など他の組織由来の細胞系も含め、通常その特有の生理活性を長期に維持するためには殆んどの場合培地に未知成分を含む血清などの添加を必要とする。一方、本実験で用いたような explant 系は細胞系とくらべ、細胞種や培地成分の explant 内への透過の不均一性などの欠点が指摘される。しかし、前者の欠点は、異種細胞間の相互作用も含めた組織の生理反応を観察しうる点で必ずしも短所とはいえない。また、後者の難点が本実験で用いた約 1 mg の explant を調製することにより克服されることは、核酸および蛋白への ^3H -前駆体のとりこみが殆んど lag なしに少なくとも 2 時間まで直線的に増加することやレンズペーパー上で培養した時のイソプロテレノールによるオルニチン脱炭酸酵素活性の上昇度とその経時変動 (Fig. 4) が *in vivo* の結果⁷⁾と一致することからも明らかである。

本実験で採用した培養法の最大の長所は、完全合成培地を使用できることである。すなわち、血清無添加培地で 48 時間培養する間に総アミラーゼ活性の増加 (Table 1)、イソプロテレノールによるアミラーゼ分泌 (Fig. 2) と DNA 合成 (Fig. 4, Table 2) の促進に加え、複製前期をも含めた RNA と蛋白合成がイソプロテレノールにより上昇する (Fig. 3)。更に、*in vivo* では、イソプロテレノールによる唾液腺増殖の促進は副腎²²⁾あるいは下垂体²³⁾の摘出動物でもみられるが、本実験でもカテコールアミンは他のホルモンを添加しなくても DNA 合成の促進を示した。これらの結果は、本培養法により少なくとも 48 時間完全合成培地のみで耳下腺の特性を維持しうることを示唆すると共に、DNA 合成の促進はカテコールアミン又はその代謝産物の耳下腺に対する直接作用によるものと推察させる。なお、本培養法によるホルモン応答性の長期保持はマウス乳腺^{14, 24)}やラット脂肪組織¹⁶⁾でも観察されている。

培養耳下腺の DNA 合成に関して *in vivo* と異なる結果としてホルモン無添加でも弱いながら

促進がみられ、エピネフィリンおよびノルエピネフィリンもイソプロテレノールより低い促進効果を示すことがあげられる。前者の原因として組織の細切、培養系への移行あるいは培地に含まれる成分が増殖刺激となる可能性が考えられる。本実験では培地として M-199 を使用したが、他の培地 (Waymouth MB, Williams E, NCTC 135) でも大差はみられなかった。一方、後者については、カテコールアミンによる細胞増殖の促進は、その β -作用によると考えられており、両アミンの単独投与では *in vivo* で増殖促進はみられない。しかし、 α -遮断剤を併用すると増殖促進を示す¹⁷⁾。従って、本培養系では両アミンの β -作用が α -作用より強く発現するものと考えられる。このような培養系でのアミン受容体の感受性の変化は、初代培養肝細胞でも報告²⁵⁾されている。

培養耳下腺の DNA 合成は、インシュリンあるいはグルココルチコイドとの共存により促進され、至適濃度の両ホルモンの存在下でもイソプロテレノールより更に増強される (Fig. 4, Table 2)。また、イソプロテレノールによる DNA 合成の促進では RNA と蛋白合成の上昇とオルニチン脱炭酸酵素の著明な誘導がみられるが、両ホルモンでは無添加と大差はない (Fig. 3 と 4, Table 2)。これらの結果から両ホルモンによる DNA 合成促進では応答する細胞種あるいは促進の機構がイソプロテレノールと異なると推察されるが、インシュリンの DNA 合成促進効果が他の組織由来の培養細胞でも認められている事実^{24, 26, 27)}は、後者の可能性を強く示唆している。

最後に、本培養系ではジブチリル cAMP はオルニチン脱炭酸酵素活性を上昇させるが、DNA 合成をむしろ抑制し、耳下腺増殖刺激のセカンドメッセンジャーとしての cAMP の役割は確認できなかった。この点については、ヌクレオチドと explant との接触時間など、より詳細な検討が必要と考えられるので、唾液腺増殖との相関が指摘されている cGMP²⁸⁾やカルシウムイオン²⁹⁾の関与も含め、今後追求して行きたい。

結 論

約 1 mg のラット耳下腺 explant を培地に浮べ

たレンズペーパー上で培養することにより、完全合成培地でも少なくとも48時間耳下腺としての機能を保持しうることが明らかとなった。

謝 辞

本研究の組織学的検索に御協力いただいた本学部口腔

病理学講座の小守昭教授と小池正夫助教授に感謝いたします。

また、本研究は、昭和56年度文部省科学研究費補助金、がん特別研究（課題番号501054）の補助による。

抄録：唾液腺の機能を完全合成培地で長期に保持させる培養法の確立をめざし、ラット耳下腺の explant を199培地に浮べたシリコン処理レンズペーパー上で48時間培養し、その生化学的機能におよぼすホルモンの影響を検討した。

1) 48時間培養後でもイソプロテレノール (IPR) によるアミラーゼ分泌の促進がみられる。また、培養の間にアミラーゼ活性が増加する。

2) IPR は DNA 合成も促進し、この促進に先行して RNA と蛋白の合成上昇とオルニチン脱炭酸酵素 (ODC) の著明な誘導がみられる。

3) エピネフィリンとノルエピネフィリンも IPR より弱い DNA 合成を促進し、ODC 活性を上昇する。

4) インシュリンとグルココルチコイドは DNA 合成を上昇するが、この際の RNA と蛋白合成の促進および ODC 活性の上昇は IPR より弱い。

5) ジブチリル cAMP は ODC 活性を上昇させるが、DNA 合成をむしろ抑制する。

文 献

- 1) Kanagasuntheram, P. and Randle, P. J.: Calcium metabolism and amylase release in rat parotid cells. *Biochem. J.*, **10**: 547-564, 1976.
- 2) 近藤 繁：耳下腺 Protein kinase に関する研究. 大阪大学歯学雑誌, **23**: 59-77, 1978.
- 3) Putney, J. W., Jr., VanDeWalle, C. M. and Leslie, B. A.: Receptor control of calcium influx in parotid acinar cells. *Mol. Pharmacol.*, **14**: 1046-1053, 1978.
- 4) Butcher, F. R.: Regulation of calcium efflux from isolated rat parotid cells. *Biochim. Biophys. Acta*, **630**: 254-260, 1980.
- 5) Mangos, J. A., Boyd, R. L., Bouchlas, D. and Farnham, W.: Calcium and cGMP in isolated rat parotid cells. *J. Dent. Res.*, **59**: 1442-1446, 1980.
- 6) Baum, B. J., Freiberg, J. M., Ito, H., Roth, G. S. and Filburn, C. R.: β -Adrenergic regulation of protein phosphorylation and its relationship to exocrine secretion in dispersed rat parotid gland acinar cells. *J. Biol. Chem.*, **256**: 9731-9736, 1981.
- 7) Inoue, H., Tanioka, H., Shiba, K., Asada, A., Kato, Y. and Takeda, Y.: Effect of isoproterenol on polyamine metabolism in mouse salivary glands. *J. Biochem.*, **75**: 679-687, 1974.
- 8) Inoue, H., Kato, Y., Takigawa, M., Adachi, K. and Takeda, Y.: Effect of DL- α -hydrazino- δ -aminovaleric acid, an inhibitor of ornithine decarboxylase, on polyamine metabolism in isoproterenol-stimulated mouse parotid glands. *J. Biochem.*, **77**: 879-893, 1975.
- 9) Topper, Y. J., Oka, T. and Vonderhaar, B. K.: Techniques for studying development of normal mammary epithelial cells in organ culture. *Methods Enzymol.*, **39**: 443-454, 1975.
- 10) Schmidt, G. and Thunhauser, S. J.: A method for the determination of deoxyribonucleic acid, ribonucleic acid, and phosphoproteins in animal tissue. *J. Biol. Chem.*, **161**: 83-89, 1945.
- 11) Anderson, L. E. and McClure, W. O.: An improved scintillation cocktail of high-solubilizing power. *Anal. Biochem.*, **51**: 173-179, 1973.
- 12) Bernfeld, P.: Amylase, α and β . *Methods Enzymol.*, **1**: 149-158, 1955.
- 13) Ono, M., Inoue, H., Suzuki, F. and Takeda, Y.: Studies on ornithine decarboxylase from the liver of thioacetamide-treated rats. *Biochim. Biophys. Acta*, **284**: 285-297, 1972.
- 14) Ono, M. and Oka, T.: The differential actions of cortisol on the accumulation of α -lactalbumin and casein in midpregnant mouse mammary gland in culture. *Cell*, **19**: 473-480,

- 1980.
- 15) 田中啓二, 市原 明 : 成熟ラット肝細胞の分離と初代培養. 蛋白質 核酸 酵素, **23** : 1259-1271, 1978.
 - 16) 井上秀夫, 滝川啓子, 竹田義朗 : 培養脂肪組織の脂肪酸合成に及ぼすホルモンの影響. 生化学 **53** : 1014, 1981.
 - 17) 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.
 - 18) 井上秀夫, 竹田義朗 : ポリアミンの生合成. 蛋白質 核酸 酵素, **26** : 1462-1470, 1981.
 - 19) Mengato, L., Armato, U., Draghi, E. and Andreis, P. G. : Isoproterenol stimulates the growth of in vitro adult rat parotid acinar cells. *In Vitro*, **15** : 195, 1979.
 - 20) Tsang, B. K., Rixon, R. H. and Whitfield J. F. : 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.
 - 21) Kreider, J. W. : Stimulation of DNA synthesis of rat salivary gland cells in monolayer cultures by isoproterenol. *Cancer Res.*, **30** : 980-983, 1970.
 - 22) Malamud, D. and Baserga, R. : On the mechanism of action of isoproterenol in stimulating DNA synthesis in salivary glands of rats and mice. *Life Sci.*, **6** : 1765-1769, 1967.
 - 23) Argonz, J. J. : The action of isoproterenol on the salivary glands. *Acta Physiol. Latinoamer.*, **12** : 231-242, 1962.
 - 24) Inoue, H. and Oka, T. : The effects of inhibitors of ornithine decarboxylase on DNA synthesis in mouse mammary gland in culture. *J. Biol. Chem.*, **255** : 3308-3312, 1980.
 - 25) 岡島史和, 宇井理生 : 成熟ラット肝細胞初代培養系におけるアドレナリン作用の「 $\alpha \rightarrow \beta$ 転換」について. 生化学, **53** : 1013, 1981.
 - 26) Kato, Y., Nasu, N., Takase, T., Daikuhara Y. and Suzuki, F. : A serum-free medium supplemented with multiplication-stimulating activity (MSA) supports both proliferation and differentiation of chondrocytes in primary culture. *Exp. Cell Res.*, **125** : 167-174, 1980.
 - 27) Tomita, Y., Nakamura, T. and Ichihara, A. : Control of DNA synthesis and ornithine decarboxylase activity by hormones and amino acids in primary cultures of adult rat hepatocytes. *Exp. Cell Res.*, **135** : 363-371, 1981.
 - 28) Butcher, F. R. and Putney, J. W., Jr. : Regulation of parotid gland function by cyclic nucleotides and calcium. *Advances in Nucleotide Research*, Vol. **13**, edited by Greengard, P. and Robison, G. A., pp. 215-249, Raven Press, New York, 1980.
 - 29) Tsang, B. K., Whitfield, J. F. and Rixon, R. H. : The reversible inability of isoproterenol-activated parotid gland cells to initiate DNA synthesis in the hypocalcemic thyroparathyroidectomized rat. *J. Cell. Physiol.*, **107** : 41-46, 1981.