ヒト小唾液腺培養細胞から腺房細胞の樹立

清 信 成 一

東北大学・歯学部・口腔細菌学講座（主任：熊谷勝男教授）

〔受付：昭和63年12月13日〕

Establishment of acinar cells from human salivary gland tissue by transformation of SV₄₀

Seiichi Kiyonobu

Department of Oral Bacteriology, Tohoku University
School of Dentistry 4-1 Seiryō-machi, Sendai 980
(Chief: Prof. K. Kumagai)

〔Accepted for publication: December 13, 1988〕

Key words: Human acinar cells / transformation / saliva

Abstract: A piece of minor salivary gland tissue obtained from the lip of a 16 years old female was minced to about 3 mm³ by fine pincettes and cultured with 10 % FCS containing MEM supplemented with EGF (10 ng/ml), fungizon (10 mcg/ml) and kanamycin (60 mcg/ml) in a 5 % CO₂ incubator. Many small bubbles of saliva were found on the surface of the fragments after 3 to 4 days of incubation and outgrowth of cells from the fragments was observed from 7 days of incubation. Monolayer cells of the outgrowth were trypsinized and passaged with fresh culture medium. At the 8th passage, monolayer cells were infected with SV₄₀ at moi 100PFU/cell. After 18 hour-incubation, the suspension of the infected cells was incubated at densities of 10⁴ and 10⁵ cells/dish within 0.33 % agar containing culture medium. Transformed colonies were picked up from soft agar medium and 3 of the 28 colonies were identified as being acinar cells of the salivary gland, since secretory granules and mucosubstances were specifically proved in the cytoplasm of these cells after 2 to 4 days of incubation. One of the typical clone cells was named HA-16 cells. However, the appearances of the secretory granules and mucins in the cytoplasm of the HA-16 cells depended on the cellular growth cycle, i. e. secretory granules and mucins were not found in the growing cells (G₁—S—G₂—M phase) but many secretory granules and mucins could be recognized in the non-dividing cells (G₀ phase). These results suggest that a clonal acinar cell line can be established from human minor salivary gland and that this cell line is useful for the investigation of the mechanism of saliva production.

緒 言

唾液腺は終末部の部位とその大小などによって、耳下腺、顎下腺、舌下腺の三大唾液腺と、口唇腺、頬腺、臼歯腺、口蓋腺、舌腺などの小唾液腺に分けられている。また終末部の分泌細胞の差によって、漿液腺、粘液腺、混合腺の三種類に分類され、漿液腺には耳下腺とエブネル腺、粘液腺には口蓋腺、頬腺、舌口蓋腺と口唇腺、混合腺には顎

下腺と舌下腺などが含まれる。これ等の唾液分泌機構に関しては、自律神経支配下にあり副交感神経刺激により漿液性唾液が分泌され、また交感神経刺激では粘液性唾液の分泌が促されるとされている。この様な漿液性や粘液性の唾液の組成について、Mason and Chisholm¹⁾等の報告があるが、混合唾液の組成は各唾液腺の活動状態により変わってくる。1916年、Lashley により考案されたカニューレを耳下腺導管開口部に挿入する Clarlson-Crittenden 法や1953年、Curby により改良された内環と外環を持つ Curby cup 法が古い唾

液採取法としてあるが Schneyer²⁾ によって開発された顎下腺と舌下腺からの唾液採取器が報告され、さらに Truelove 等³⁾により本装置の改良型も報告されている。しかし、これ等の方法で採取された唾液の組成を調べても、Shannon and Prigmore⁴⁾の報告にある様に唾液分泌には日常リズムがあり、採取する日と時間により唾液組成と分泌量は変化する。この様に唾液組成は刺激の種類により唾液分泌速度が異なる事と各唾液腺からの分泌量も変動する事から、正確な唾液の組成は把握されていない。また、舌下腺と小唾液腺から分泌される唾液の組成については採取する事が困難である為に十分に研究されていない。

この様な事から、ヒトまたはマウスの唾液腺組織を培養して細胞レベルで唾液分泌の機構を解析する試みがなされてきた⁵⁻⁷⁾。しかし、正常組織細胞は分裂回数が25～55回の範囲で life span を生じて死滅する事⁸⁻¹⁰⁾と、唾液腺を構成する種々の細胞から唾液分泌細胞のみを選択的に培養しクローン化する事は困難である事¹¹⁾等が唾液分泌機構を細胞レベルで研究するにあたり問題となっている。

本研究ではヒト(16歳、女性)の口唇から小唾液腺組織を摘出し、ピンセットで細分してから、組織培養し、8代継代培養時に腫瘍ウイルスである Simian Virus 40 (SV₄₀) を感染させ、トランスフォームしたコロニーを取り出し、酸性ムコ多糖体を細胞質内に産生するクローン細胞が得られた。この細胞は樹立細胞として継代可能であり、小唾液腺の腺房細胞と考えられる事から、唾液組成の研究及び細胞レベルでの唾液産生機構の研究に有用と考えられたので、この細胞の性状について報告する。

材料と方法

1. 培養材料

培養材料は東北大学・歯学部附属病院・口腔診断科に来院した16歳女性の口唇粘液のう胞患者からのう胞を摘出した際、切除した部分から小唾液腺組織を分離して使用した。組織片はただちに氷冷した MEM 培地に入れ、無菌室内でピンセットを用いて約3mm³の大きさに細分し、新しい

MEM 培地に小片を移し変える事により脱血した。

2. 唾液腺組織片の細胞培養

小唾液腺の組織片は10% fetal bovine serum (FBS), 10 μ g/ml のファンギゾン(シグマ社), 10ng/ml の epidermal growth factor (EGF; 日本ケミカルリサーチ社)¹²⁾, 100U/ml の penicillin 及び100 μ g/ml の streptomycin を加えた MEM 培地を用いて、37°C, 5% CO₂ インキュベーターで培養した¹³⁾。

組織片より outgrowth¹⁴⁾した細胞はトリプシン(0.25%)—EDTA(0.02%)処理にて分散し、初代継代培養した。2代から8代継代時には、トリプシン—EDTA 処理時間を短くし、線維芽系細胞が培養容器から離脱した時に PBS で洗浄し、残った上皮系細胞を再びトリプシン—EDTA 処理を行い、出来る限り上皮系細胞を継代する様にした。8代継代時に約80%は上皮系細胞の形態を示していた。

3. トランスフォーメーション

マイコプラズマ陰性の CV-1 細胞で増殖した SV₄₀ を実験に供した。SV₄₀ の感染価は 10^{7.8} PFU/ml を示し、8代継代培養細胞の1細胞あたり 100 PFU の感染価 (multiplicity of infection 100: moi=100) の割合で感染させ、18時間、37°C で培養した。この感染細胞をトリプシン—EDTA 処理にて分散した後、0.33%寒天含 MEM 培地(10% FBS, 10ng/ml EGF 加)中で培養した。コロニーを形成した細胞をトランスフォーム細胞¹⁵⁾として採取し、各コロニー毎に継代培養し、クローン細胞とした。

4. 腺房細胞の同定

トランスフォーム細胞として得られたクローン細胞について、分泌顆粒を同定する為に4°Cホルマリン蒸気固定後五重染色(Alcian Blue, 0.5%過ヨウ素酸 Schiff, Haematoxylin, Orange G, ライト Green)及びPAS染色を行った。酸性ムコ多糖体(ムチン)染色としてコロイド鉄染色法により、細胞内ムチン産生を調べた。また、培養細胞をグルタルアルデヒド固定後に金蒸着し走査型電子顕微鏡(日立570型)により細胞表面の分泌物の観察を行った。また、正常ヒト小唾液腺

組織のパラフィン包埋切片を用いて五重染色による分泌顆粒及びコロイド鉄によるムチン染色を行い、唾液腺組織細胞に見られるムチン陽性である腺房細胞の染色像とクローニングされた細胞の染色像と比較した。

5. 増殖曲線の作成

クローン細胞のうち腺房細胞と同定されたものについて増殖曲線を作成し、同時に細胞質内の分泌顆粒及びムチンの関係も調べた。トリプシン-EDTA で細胞分散後、 10^5 cells/ml に細胞濃度を10% FBS 含 MEM 培地で調整し、2 ml を組織培養用 dish (35mm ϕ) に入れて5% CO_2 インキュベーターで培養した。経日的に dish を取り出して、トリプシン-EDTA 処理をして細胞数を血球計算盤にて測定した。

結 果

1. 腺房細胞のクローニング

小唾液腺の組織片を培養開始してから48時間後にはプラスチック面に接着した。その後3~4日目から接着組織片の表面に唾液の分泌と思われる泡状の分泌物が認められる組織片 (Fig. 1) が観察された。この水泡状のものは培養開始時には認められなかったことから、培養状態になってから出現したものと考えられた。培養1週間にて組織片の周辺部より線維芽系細胞の outgrowth が始まり、培養日数の増加と共に組織片の周囲からの outgrowth した単層細胞は広がりを示した (Fig. 2)。培養後4週間では組織片の塊はプラスチック面から脱落し outgrowth で形成された単層細胞のみとなった。この培養細胞をトリプシン-EDTA 処理により、 10^5 cells/ml の細胞濃度で継代培養した。この細胞は1週間の培養で単層細胞を形成し形態的に大部分が線維芽系細胞であった。線維芽系細胞は上皮系細胞よりトリプシン感受性が高い事を利用し、単層細胞をトリプシン-EDTA 処理後、プラスチック面より離脱した細胞を PBS で洗浄し、再びトリプシン-EDTA 処理をして、出来る限り上皮系細胞を継代する様に試みた。この方法で8代継代した時の単層細胞は80%が形態的に上皮系細胞であった。この細胞に SV_{40} を moi SV_{40} 100 PFU/cell の割合で感染さ

Fig. 1 Small bubbles of saliva shown on the fragments of salivary gland tissue after 3 days of culture. ($\times 100$)

Fig. 2 Outgrowth of cells from the fragments after 14 days of culture. ($\times 200$)

せ、18時間後にトリプシン-EDTA処理し、分散した細胞を0.33%寒天含 MEM 培地に混合し、 10^4 または 10^8 cells/dish (6 cm ϕ) の条件で培養し、10日毎に0.5ml の MEM 培地を補充した。約2週間培養頃からコロニー形成が認められ、4週間後には肉眼的に認められるコロニーまでに成長した (Fig. 3)。また一部の細胞は MEM 培地を用いて9 cm 径 dish で培養した。コロニーを形成したトランスフォーム細胞はクローニング・リングを用いて取り出し、トリプシン-EDTA 処理して細胞分散を行い、各コロニー毎に MEM 培地にて継代培養した。最終的に継代可能になった28個のクローン細胞の中で細胞表面から粘液物質を産生している3個のクローン細胞が見い出された。この事は培養した小唾液腺の組織片から増殖した細胞の中で腺房細胞がトランスフォームして、これがクローン化された可能性があり、粘液様物質の産生が多くて細胞増殖のよいクローンを選びコ

Fig. 3 Colony of transformed cells infected with SV₄₀ from the culture cells of minor salivary gland tissue after 21 days of culture. ($\times 200$)

Fig. 4 May-Gruenwald's and Giemsa's stained HA-16 cells after 5 days of culture. ($\times 400$)

ロニーのコード番号から HA-16 細胞と称してこの細胞の性状について解析を進めた。本実験に用いた段階での HA-16 細胞は軟寒天培地でコロニー形成後、プラスチック・フラスコで 18~24 代継代培養されたものである。

2. 腺房細胞の同定

HA-16 細胞をトリプシン-EDTA で分散後、スライドガラス上で 5 日間培養し、メタノール固定後、ギムザ染色した細胞を Fig. 4 に示した。細胞質内に特異的に大きな空胞が見られ、他のクローン細胞にはこのような空胞は認められなかった。同様にスライドガラス上に培養した HA-16 細胞を 1 日、2 日、3 日と経日的に取り出し、中性ホルマリンで固定後、分泌顆粒を染色する目的で五重染色した時、Fig. 5 に示した様に細胞質内に分泌顆粒が明瞭に染色された。この分泌顆粒は培養後、1 日目の細胞では弱く、3 日目の培養細胞は分泌顆

Fig. 5 Haematoxylin-Alcian blue Pass-Masson stained HA-16 cells after 3 days of culture. ($\times 400$)

Fig. 6 Colloidal iron stained HA-16 cells after 3 days of culture. ($\times 400$)

粒を保有する細胞の数及び細胞内に認められる分泌顆粒の数ともに最高を示した。5 日目以降の培養細胞は細胞質内に空泡が多く分泌顆粒の判別は困難であった。この HA-16 細胞は分泌顆粒を保有する事が確認されたが、ギムザ染色で示された空胞の組成を調べる目的でムチンを特異的に染色するコロイド鉄染色を試みた。実験試料として培養 1 日、2 日、3 日、5 日及び 7 日の HA-16 細胞とヒト小唾液腺組織のパラフィン包埋切片を用いた。Fig. 6 に 3 日培養した HA-16 細胞のコロイド鉄染色像を示し、Fig. 7 にパラフィン包埋の小唾液腺組織切片の同染色像を示した。HA-16 細胞に示されたムチン顆粒は核周辺から細胞質膜にかけて広く分布しているが、核周辺に密に分布する傾向が認められ一部ムチンの細胞外への遊出を思わせる部分もあった。また、小唾液腺組織切片では明らかに腺房細胞のみがムチン陽性であり、他

Fig. 7 Colloidal iron stained thin section of human minor salivary gland tissue. ($\times 400$)

考 察

唾液の産生に関する研究は古くから行われているが、いずれも動物またはヒトを用いた *in vivo* の実験であり、細胞レベルでの実験は不可能であった。電子顕微鏡の発達により、細胞レベルの観察は可能になったが、唾液腺組織細胞中での細胞であり、腺房細胞にはひだ状のインフォールディングがあって細胞表面積を増やして吸水反応を高めている事、細胞質内には分泌顆粒がある事、また唾液を細胞外に放出する為に多数のマイクロビライがある事等の形態的特徴があげられているにすぎない。この様に電子顕微鏡では形態的な観察は出来ても、細胞レベルでの唾液分泌機構の解析は不可能である。丸茂等の研究¹³⁾でヒト小唾液腺組織片の培養の報告があるが、正常細胞の培養には細胞自身の持つ life span⁸⁻¹⁰⁾があり、クローン化して継代細胞株として樹立する事は不可能である。本研究では腫瘍ウイルスである SV₄₀ を用いて細胞をトランスフォームさせ、その中から特異な唾液分泌機能を有する細胞のクローン化を試みた。唾液腺組織には構築組織として多く含まれる線維芽系細胞と導管・介在部導管及び腺房細胞を構成する上皮系細胞がある。培養開始時には線維芽系細胞が大部分であった事から、トリプシン感受性は線維芽系細胞が高い事を利用し、出来る限り線維芽系細胞を培養細胞から排除するよう努力した。SV₄₀ 感染により軟寒天培地で形成したコロニーの内、28個のクローン細胞が得られたが、3つのクローン細胞が細胞表面に粘液様物質を産生し、この3つのクローン細胞にのみ五重染色で分泌顆粒が細胞質内に認められた。この中から細胞増殖の良いクローン番号16である細胞を HA-16 細胞として、その性状を代表的線維芽細胞である HEL 細胞と比較した。HA-16 細胞には細胞質内に分泌顆粒が認められると共にコロイド鉄染色により細胞質内にムチンが産生されている事が確認された。他方、HEL 細胞にはいずれも認められなかった。また、ヒト小唾液腺組織のパラフィン切片では腺房細胞のみにムチン陽性細胞が認められた事から、HA-16 細胞はヒト小唾液腺の腺房細胞がその機能を保持したまま SV₄₀ でトラン

の組織細胞にはムチン陽性細胞は認められなかった。HA-16 細胞に示されたムチンも培養開始から1日目は弱く、その後は培養日数と共に細胞内のムチン量は増加の傾向を示した。しかし、細胞内に認められたのみで、細胞表面にはムチンを認める事が出来なかった。この事は固定及び染色中に細胞外のムチンは洗い流された結果と思われるため、走査型電子顕微鏡により HA-16 細胞の表面を観察した。3日及び5日間培養した HA-16 細胞と非分泌細胞としてヒト胎児肺 (HEL) 細胞をコントロールとして用いた。Fig. 8 a, b, c, d に HA-16 細胞を示し、Fig. 9 に HEL 細胞を示した。Fig. 8 はいずれも HA-16 細胞表面に分泌物状の小胞が見られ、a は分泌初期と思われる、b, c の順で細胞表面に分泌物が多くなっている。また5日間培養した HA-16 細胞は d に示したが、細胞表面は分泌物様物質で覆われていた。Fig. 9 に示した HEL 細胞には分泌物状のものは細胞表面に何等認められなかった。

HA-16 細胞の増殖曲線と細胞質内の分泌顆粒及びムチンの関係を Fig. 10 に示した。トリプシン-EDTA で細胞分散後、 10^5 cells/ml に細胞濃度を調整し、2 ml を組織培養用 dish (35mm ϕ) で培養した。細胞は培養開始後、1日目で減少を示し、2日目から5日目まで増殖を示し、6日目から急速に減少が始まり、10日目では生細胞は認められなくなった。この事から HA-16 細胞の継代維持には3~4日毎に培養細胞を継代する事が必要であることが示された。

Fig. 8 Observation of the surface of HA-16 cells by electron microscopy after 3 days (abc) and 5 days (d) of culture. (a; $\times 3500$, b: $\times 5000$, c; $\times 2200$, d; $\times 700$)

スフォームして、クローン細胞として樹立されたと考えられる。HA-16細胞は培養開始から3日までの間に分泌顆粒とムチンを細胞質内に経日的に蓄積する事、5日培養では走査型電子顕微鏡で認められた様に細胞表面に多くの分泌物が排出されている事、HA-16細胞の細胞増殖曲線で示された様に培養開始から4日まで細胞増殖を行い、その

後増殖停止した後で生細胞数が減少する事と考え合わせると、HA-16細胞は G_1 相 $\rightarrow$ S相 $\rightarrow G_2$ 相 $\rightarrow$ M 相のサイクルで細胞分裂を行い増殖するが、単層細胞形成が近づき分裂サイクルを停止する G_0 相になると細胞の分泌機能発現が行われ、分泌顆粒とムチン合成が活発となり細胞外にムチンを分泌し続ける状態になるものと考えられる。こ

Fig. 9 Observation of the surface of HEL cells by electron microscopy after 3 days of culture. ($\times 3000$)

Fig.10 Comparison of HA-16 cells growth with appearances of secretory granules and mucins in cytoplasm of HA-16 cells.

の事から HA-16 細胞を継代培養する時は腺房細胞として機能を発現する前に継代する必要性を示している。

唾液の産生に関しては細胞には pinocytosis による細胞吸水作用があることや、小胞で合成される酵素や糖タンパク質はゴルジ装置に送られてか

ら分泌顆粒に取り込まれて唾液が作られることが明らかになっている。この唾液の産生はピロカルピンで増加し、アトロピンによって抑制される¹⁶⁾が、HA-16細胞は G₀ 相になってから細胞質内に分泌顆粒及びムチンが認められる事はこれ等の薬剤による抑制ではなく、細胞増殖停止に伴う細胞機能の発現と考えられる。

唾液中には消化作用物質としてアミラーゼ^{17,18)}があり、また、抗菌作用物質¹⁹⁾も含まれており、リゾチーム^{20,21)}、ペルオキシダーゼ²²⁾、IgA 抗体²³⁾、ロイコタキシン²⁴⁾及びオプソニン²⁵⁾が研究されている。しかし、これ等の物質は3大唾液腺及び小唾液腺から分泌された混合唾液によるもので、どのような唾液腺でこれ等の物質が産生されているか不明である。HA-16細胞から分泌されている物質にこれ等の物質のどれが含まれているか解析していないが、小唾液腺組織の腺房細胞由来である HA-16 細胞の分泌物にどのような物質が含まれているか興味ある事である。また、唾液腺組織の抽出物には神経成長促進因子 (NGF)²⁶⁾ や上皮成長促進因子 (EGF)²⁷⁾ が含まれて未分化細胞から分化促進する為の組織形成に重要な因子であるが、唾液腺組織細胞でこれ等の物質の生成場所は不明とされている。一般に線維芽系細胞から colony stimulating factor (CSF)²⁸⁾ が産生されているが、HA-16細胞の様な分泌機能を有する上皮系細胞が NGF または EGF 産生に関与しているか否かを調べる事で、これ等の因子の生成細胞を同定する上で腺房細胞の関わり合いを追求出来るものと思われる。

唾液は漿液性唾液と粘液性唾液に分けられ、HA-16細胞は口唇の小唾液腺からクローニングされたので粘液性唾液を産生する腺房細胞由来と考えられる。ヒトの小唾液腺組織切片のコロイド鉄染色によって特異的に腺房細胞に認められたムチン陽性細胞と同じ様に、HA-16細胞にムチンが認められ分泌機能を保有していることが示された。唾液成分の組成についてはヒトや動物から採取された唾液が用いられているが、常に細菌汚染があり唾液成分は細菌により唾液の蛋白分解²⁹⁾や糖分解³⁰⁾を受けていると報告されている。この事は正確な唾液組成を測定する事は困難であること

を示している。。また、細胞レベルでの唾液の産生機構について解析されていない。HA-16細胞はSV₄₀によりトランスフォームされたクローン細胞であるが、分泌顆粒及びムチンが細胞質内に認められ、細胞表面には分泌物の蓄積があったことから、HA-16細胞は唾液産生及びそれを細胞外に分泌する機能を保持していると考えられる。以上よりHA-16細胞は正常ヒト唾液腺組織の腺房細胞がSV₄₀によりトランスフォームし、軟寒天培地中で1個の細胞からコロニーを形成した事は正常細胞は軟寒天培地中でコロニーを形成し得ない事から、SV₄₀によりトランスフォームした細胞と云える。また、この細胞は継代可能な事から唾液組成及び唾液産生機構を細胞レベルで解析する事が可能になるものと思われる。

結 論

ヒト口唇の小唾液腺組織片を細分して培養し、増殖した細胞を8代継代培養後、SV₄₀でトラン

スフォームして28個のコロニーが得られた。これ等のコロニーを継代培養して、その性状を調べた所、3個のコロニーから由来した細胞の細胞質内に分泌顆粒とムチンを有する事が認められた。また、走査型電子顕微鏡により細胞表面に分泌物と見られる小胞が認められ、培養5日目では細胞全体を覆うまでになった。ヒト口唇の小唾液腺組織切片では腺房細胞のみムチン陽性であり、ヒト胎児肺細胞では分泌顆粒及びムチンが認められなかった。これ等の事実からSV₄₀でトランスフォームとして得られた細胞は小唾液腺の腺房細胞であると結論した。

謝辞：稿を絶えるにあたり、この研究の御指導を賜りました当教室主任の熊谷勝男教授に謹んで感謝の意を表します。また実験指導に助言をいただいた清水義信助教及び菅野恵美様に感謝いたします。細胞染色に御協力いただきました口腔診断科の丸茂町子講師及び電子顕微鏡写真に御協力いただきました第二保存科の笹崎弘己講師の各位に感謝いたします。

抄録：口唇の小唾液腺組織（16歳・女性）を培養した時、組織片の表面に唾液の分泌が見られ、その後唾液組織片の周辺から細胞増殖が見られた。この細胞を8代継代培養し、SV₄₀を感染させトランスフォーム細胞を作り、28個のコロニーが得られたが、その内3個のコロニーは細胞質内に分泌顆粒とムチンの産生が認められた。また、ヒト口唇の小唾液腺組織切片では、腺房細胞のみがムチン陽性であった。この事から分泌顆粒とムチン陽性を示した細胞は小唾液腺の腺房細胞がトランスフォームした細胞と結論した。この細胞を継代培養した時、培養初期の細胞増殖期では分泌顆粒の出現とムチンの産生は細胞質内に弱く認められたが、単層細胞を形成しつつある細胞では細胞質内と細胞表面にムチンの産生が強く認められた。これ等の事実は小唾液腺の腺房細胞が唾液分泌機能を保有してトランスフォームし、クローン細胞として樹立された事を示している。

文 献

- 1) Mason, D. K. and Chisholm, D. M.: Salivary glands in health and disease. Saunders London, 1975.
- 2) Schneyer, L. H.: Method for the collection of separate submaxillary and sublingual salivas in man. J. Dent. Res. 34: 257-261, 1955.
- 3) Truelove, E. L. Bixler, D. and Merritt, A. D.: Simplified method for collection of pure submandibular saliva in large volumes. J. Dent. Res. 46: 1400-1403, 1967.
- 4) Shannon, I. R. and Prigmore, J.R.: Parotid fluid as a medium for the determination of human adrenocorticoid status. Oral Surg. Med. Path. 13: 878-882, 1962.
- 5) Shirasuna, K. Sato, M. and Miyazaki, T.: A myoepithelial cell line established from a human pleomorphic adenoma arising in minor salivary gland. Cancer 45: 297-305, 1980.
- 6) 飯塚桂司：ヒト耳下腺導管細胞のパロチン吸着現象。医学のあゆみ 116: 1002-1004, 1981.
- 7) 田隅泰信, 久米川正好：唾液腺の培養。組織培養 3: 8-20, 1977.
- 8) Hayflick, L.: The limited in vitro lifetime of human diploid cell stain. Exp. Cell Res. 37: 614-636, 1965.
- 9) Hayflick, L. and Moorehead, P. S.: The serial cultivation of human diploid cell strains. Exp. Cell Res. 25: 585-621, 1961.
- 10) 黒田行昭：培養細胞の老化。細胞 9: 13-21,

- 1977.
- 11) Oliver, C. : Isolation and maintenance of differentiated exocrine gland acinar cells in vitro. *16* : 279-305, 1980.
- 12) Cohen, S. and Elliot, G. A. : The stimulation of epidermal keratinization by a protein isolated from the submaxillary gland of mouse. *J. Invest. Dermatol.* **40** : 1-5, 1963.
- 13) Marumo, M. Furuuchi, T. Sanjo, D. Shimizu, Y. and Kumagai, K. : Cell culture of normal human salivary gland. *Jpn. J. Oral Biol.* **28** : 62-68, 1986.
- 14) Brown, A. M. : In vitro transformation of submandibular gland epithelial cells and fibroblasts of adult rats by methylcholanthrene. *Cancer Res.* **33** : 2779-2785, 1973.
- 15) MacPherson, I. and Montagnier, L. : Agar suspension culture for the selective assay of cells transformed by polyoma virus. *Virology* **23** : 291-294, 1964.
- 16) Schneyer, C. A. and Schneyer, L. R. : Secretion by salivary glands deficient in acini. *Am. J. Physiol.* **201** : 939-944, 1961.
- 17) Newbrun, E. : Observations on the amylase content and flow rate of human saliva following gustatory stimulation. *J. Dent. Res.* **41** : 459-465, 1962.
- 18) Jacobsen, N. : Salivary amylase. II. Alpha-amylase in salivary glands of the *Macaca irus* monkey, the *Cercopithecus aethiops* monkey, and man. *Caries Res.* **4** : 200-205, 1970.
- 19) Radden, H. G. : Mouth wounds. *Brit. Dent. J.* **113** : 112-119, 1962.
- 20) Coleman, S. E. Rijn, I. V. and Bleiweis, A. S. : Lysis of cariogenic and non-cariogenic oral streptococci with lysozyme. *J. Dent. Res.* **50** : 939-943, 1971.
- 21) Helderman, W. H. : Lysozyme concentrations in the gingival crevice and at other oral sites in human subjects with and without gingivitis. *Arch. Oral Biol.* **21** : 251-255, 1976.
- 22) Dogon, I. L. and Amdur, B. H. : Evidence of the presence of two thiocyanate dependent antibacterial systems in human saliva. *Arch. Oral Biol.* **15** : 987-992, 1970.
- 23) Shillito, E. J. and Lehner, T. : Immunoglobulins and complement in crevicular fluid, serum and saliva in man. *Arch. Oral Biol.* **17** : 241-247, 1972.
- 24) Wright, W. E. and Tempel, T. R. : Effect of oral hygiene on the clearance of soluble chemotactic bacterial products from human saliva. *J. Periodont.* **45** : 134-138, 1974.
- 25) Hammond, C. W. and Weinman, J. P. : Opsonin in saliva. *J. Dent. Res.* **21** : 279-283, 1942.
- 26) Levi-Montalcini, R. and Angeletti, P. V. : Nerve growth factor. *Physiol. Rev.* **48** : 534, 1968.
- 27) Gregory, H. : Isolation and structure of urogastrone and its relationship to epidermal growth factor. *Nature* **257** : 325-327, 1975.
- 28) Burgess, A. W., Camakaris, J. and Metcalf, D. : Purification and properties of colony stimulating factor from mouse lung-conditioned medium. *J. Biol. Chem.* **252** : 1998-2002, 1977.
- 29) MoLan, P. C. and Hartles, R. L. : The nature of the intrinsic salivary substrates used by the human oral flora. *Arch. Oral Biol.* **16** : 1449-1462, 1971.
- 30) MoLan, P. C. and Hartles, R. L. : A study of the enhancement of glycolysis in human saliva. *Arch. oral Biol.* **17** : 1671-1678, 1972.