

Title	Acetylcholineによる耳下線amylaseの分泌機作
Author(s)	石田, 甫
Citation	大阪大学, 1968, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/29640">https://hdl.handle.net/11094/29640</a>
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">＜a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"&gt;https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed</a> >大阪大学の博士論文について</a>をご参照ください。

***Osaka University Knowledge Archive : OUKA***

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

【 1 】

氏名・(本籍)	石	田	南
	いし	だ	はしめ
学位の種類	歯	学	博 士
学位記番号	第	1 4 0 2	号
学位授与の日付	昭 和 43 年 3 月 28 日		
学位授与の要件	歯学研究科歯学基礎系 学位規則第5条第1項該当		
学位論文名	<b>Acetylcholine</b> による耳下線 <b>amylase</b> の分泌機作		
論文審査委員	(主査) 教 授 山本 巖		
	(副査) 教 授 竹田 義朗 教 授 河村洋二郎		

論 文 内 容 の 要 旨

唾液分泌機作に関しては、全動物、臓器灌流、臓器切片を用いて種々の実験がなされているが、系が複雑なためより詳細な検討は困難であり、特に腺細胞膜の興奮と腺分泌との関連性については何ら本質的に解明されていないのが現状である。耳下腺は交感、副交感両神経の二重支配をうけており、この分泌唾液の主成分である **amylase** は当該腺細胞内で合成されて、**zymogen granule** に貯蔵され、**acetylcholine** の添加により、分泌される。

そこで、本研究に於いては、**amylase** の分泌におよぼす **acetylcholine** の作用機作を **cell level** および **subcellular level** の両面から検討するとともに、腺細胞膜の興奮と腺分泌との関連性に検索を加えた。

実験動物はウイスター系雄性ラットを用い、無麻酔下で耳下腺を摘出し、これを氷冷した **Ca<sup>++</sup> free Krebs Ringer Tris** 液中に集め、結合組織、脂肪、リンパ腺等を除去し、耳下腺切片を調製した。湿重量約 100mg の切片を上記 **medium** 10ml 中で 37°C 15 分間 **Pre-incubation** し、直ちに **incubation medium** に移して 37°C 5 分間 **incubation** を行い、その後この **medium** を濾紙にて濾過し、濾液を **amylase** 活性測定に供した。なお **incubation medium** には **Krebs Ringer Tris** 液を用いた。**zymogen granule** は **Schramm** らの方法により得、0.25M **sucrose suspension** として使用した。耳下腺細胞上清は耳下腺に氷冷した 0.25M **sucrose** を加えて 5 倍量の **homogenate** を得、100,000×g 30' 遠心して 1ml 当り 5mg 蛋白量の上清を得た。また耳下腺に氷冷した 5mM **Tris-HCl Buf. (pH 7.4)** を加えて 5 倍量の **homogenate** を得、100,000×g 30' 遠心して得た上清に **NH<sub>4</sub>OH** にて pH 7.4 に調整した飽和硫酸を加えて、硫酸分画した。各画分に氷冷した 5mM **Tris-HCl Buf. (pH 7.4)** を加え、溶解させ、**cellulose tube** にて透析後 1ml 当り 5mg 蛋白量の溶液として使用した。なお透析外液には 5mM **TrisHCl Buf. (pH 7.4)** を使用した。**incubation medium**

には KCl, Tris-HCl Buf. (pH 7.4),  $MgCl_2$ , ATP,  $CaCl_2$ , 前記上清または前記硫安画分水溶液, さらに zymogen granule suspension を加えて final volume 1.0ml の medium を使用した。この medium を  $37^\circ C$  5分間 incubation し, incubation 終了後直ちに氷冷した 0.25M sucrose, 4.0ml を加えて,  $4,500 \times g$  10' 遠心し, 上清を amylase 活性および蛋白量の測定に供した。蛋白量は Lowry 法により, amylase 活性は不破法にて測定した。

細胞構造をもった耳下腺切片からの amylase の分泌は acetylcholine  $10^{-5}M$  の添加により 2 倍に促進されたが, こうした分泌促進効果を得るためには細胞外液に  $Ca^{++}$  が存在していることが必要であり, その至適濃度は  $3mM$  であった。また, acetylcholine による amylase の分泌促進は atropine  $10^{-4}M$  により完全に抑えられた。さらに, 細胞外液の  $K^+$  濃度を  $60mM$  に上昇させると, 耳下腺切片からの amylase の分泌は 2 倍促進されたが, acetylcholine による分泌促進の場合と同様に細胞外液に  $Ca^{++}$  が存在していることが必要であり, この分泌促進は cocaine  $1mM$  により抑えられた。

以上の結果から, amylase は腺細胞膜の興奮により分泌され, 興奮分泌連関に  $Ca^{++}$  が必要であることが明確にされた。

そこで, 耳下腺細胞膜の興奮と amylase の分泌との関連性を追求するために subcellular level での実験を行った。zymogen granule からの amylase の遊離は温度に依存し,  $37^\circ C$  では  $0^\circ C$  に比して 15 倍促進された。また, ATP  $3mM$ ,  $Mg^{++} 3mM$  存在下では ATP が存在しない場合に比して 2 倍の遊離促進が認められた。しかしながら, ATP  $3mM$ ,  $Mg^{++} 3mM$  存在下に  $Ca^{++}$  を加えても zymogen granule からの amylase の遊離は zymogen granule の glycoetherdiaminetetracetic acid 処理の有無にかかわらず促進されなかった。ところが, ATP  $3mM$ ,  $Mg^{++} 3mM$  存在下に耳下腺細胞から得た上清を加えると,  $Ca^{++} 10^{-6}M$  添加により zymogen granule からの amylase の遊離は  $Ca^{++}$  を添加しない場合に比して 2 倍促進された。次に, 耳下腺細胞上清を飽和硫安にて硫安分画し, 0~40% 画分と 40~80% 画分を得, この画分および ATP  $3mM$ ,  $Mg^{++} 3mM$  存在下で  $Ca^{++}$  による zymogen granule からの amylase の遊離促進効果を検討した。0~40% 硫安画分では  $Ca^{++}$  によって amylase の遊離は促進されなかったが, 40~80% 硫安画分の存在下では  $Ca^{++} 10^{-6}, 10^{-7}M$  によって amylase の遊離促進が認められ,  $Ca^{++} 10^{-8}M$  では促進効果は認められなかった。また, ATP が存在しない場合には 40~80% 硫安画分および  $Ca^{++}$  による amylase の遊離促進は認められなかった。

以上を要約すると, acetylcholine によって耳下腺細胞膜が興奮し, 細胞外  $Ca^{++}$  の流入により細胞内  $Ca^{++}$  濃度が上昇して, 蛋白様成分の存在下で zymogen granule から amylase が遊離する。こうした zymogen granule からの amylase の遊離現象が cell level での amylase の分泌機作解明の一段階をなすものと考えている。

## 論文の審査結果の要旨

本論文は acetylcholine によって耳下腺細胞膜が興奮し, 細胞外  $Ca^{++}$  の流入によって, 細胞内  $Ca^{++}$  濃度が上昇して蛋白様成分の存在下で zymogen granule から amylase が遊離することを明ら

かにしており，唾液分泌機作に重要な知見を加えたものであって，今後この方面の研究に貢献するところが大きいと考える。

よって，本研究者は歯学博士の学位を得る資格があると認める。