

Title	イソプロテレノールによるマウス耳下腺の増殖におけるポリアミンの役割
Author(s)	加藤, 幸夫
Citation	大阪大学, 1977, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/31614
rights	
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

原著

原稿総紙数 59枚

図表の紙数 16枚

別刷希望数 150部

連絡先：大阪市北区常安町32（〒530）

大阪大学歯学部生化学

加藤幸夫

論文表題

イソプロテレノールによるマウス耳下腺
の増殖におけるポリアミンの役割

大阪大学大学院歯学研究科基礎系生化学

加藤幸夫

緒言

プロトレッシン、スペルミジン及びスペルミンなどのポリアミンは動物組織のみならず、微生物、植物など生物界に普遍的に分布する生体アミンである。ポリアミンの発見の歴史は古く、スペルミンはすでに17世紀後半にヒト精液中より、プロトレッシンは1880年代に腐敗した動物屍体より発見されている。また、スペルミジンは1927年 Dudleyらによって牛の心臓から分離されている¹⁾。しかしながら、これらのポリアミンは生理的機能の面において、研究の対象としてはほとんど注目されなかった。ところが最近、核酸及び蛋白合成の盛んな組織でポリアミン含量が高く、特に胚^{2,3)}、再生肝^{3,4)}、腫瘍組織^{3,5)}などの増殖の盛んな組織では、増殖の開始時にRNA量の増加に先行あるいはこれと並行してポリアミンの合成活性及びポリアミンレベルが著明に上昇することが明らかにされ、核酸、蛋白合成の調節因子として、また組織増殖の誘発因子と

してポリアミンが大きな注目を浴びるようになってきた^{6,7)}。

図1に動物組織におけるポリアミンの合成経路を示したが、これらの経路を触媒する酵素のうち、オルニチン脱炭酸酵素及びS-アデノシルメチオニン脱炭酸酵素は組織増殖時には例外なく著明な活性上昇を示し、ポリアミン合成の律速酵素として重視されている。特にオルニチン脱炭酸酵素は活性変動がもっともすみやかかつ顕著であり、またその反応生成物であるプロレツシンがスペルミジン及びスペルミンの合成素材となるのみならず、S-アデノシルメチオニン脱炭酸酵素を強く活性化することから、ポリアミン合成のもっとも重要な律速酵素とされている^{6,7)}。

一方、ラットやマウスなどの齧歯動物にイソプロテレノール(IPR)を投与すると、直後にみられる唾液分泌の促進のほかに、唾液腺の増殖肥大をきたすことが知られている

8-14)。この増殖系は構造の明らかな化合物の
/回投与で同調度の高い一過性のDNA合成
が誘導されること、またIPRの作用が投与
/時間以内に消失する唾液腺に対する直接作
用であって、ホルモンなどの体液性因子を介
するものではないことなどの特徴を有してい
る。したがって、この系は細胞増殖機構の研
究、特にDNA合成と密接に関係する複製前
期(G₁期)の生化学的変化を追求するのにき
わめて適した実験系であると考えられる。著
者らはすでにこのIPRによるマウス耳下腺
の増殖の際、核酸合成に先行してポリアミン
合成活性、特にオルニチン脱炭酸酵素活性及
び7⁰Tレッシンレベルが著明に上昇すること
を明らかにし、さらにポリアミン合成活性の
上昇とIPRによる耳下腺の増殖肥大との間
に密接な関連のあることを示唆した^{13,14)}。

以上のように、ポリアミンの合成活性及び
組織内濃度の変動と組織の成長、増殖との間
に密接な関連のあることを示唆する多くの実

験的証拠が得られているが、ポリアミンの生理的役割については未だ不明な点が多く、したがってポリアミン合成活性の高進が細胞増殖に不可欠であるか否かも明らかではない。

そこで著者はポリアミン合成のもっとも重要な律速酵素であるオルニチン脱炭酸酵素に着目して、本酵素の特異的阻害剤の開発を試み、これを用いてポリアミンの生理的意義を追求しようとした。本研究はオルニチンの誘導体であるDL- α -ヒドラジノーδ-アミノバレリアン酸(DL-HAVA, 図2)がオルニチン脱炭酸酵素の特異性の高い強力な阻害剤であることを示すとともに、イソプロテレノールによるマウス耳下腺増殖時のポリアミン代謝、核酸合成ならびに細胞分裂に対する本阻害剤の影響を検討し、あわせてポリアミンの生理的意義を追求したものである。

図2

実験方法

1. 動物の処置

実験には体重 28 ~ 32 g の ddO 系雄性マウスを用いた。実験期間中、固型飼料と水を自由に摂取させたが、咀嚼による唾液分泌および日内リズムの影響を考慮して、屠殺は2時間絶食後 10 時から 14 時までの間に行った。なお、薬物はすべて投与直前に 0.1 ~ 0.3 ml の生理食塩水に溶解し腹腔内に注射し、対照群には同量の生理食塩水を投与した。

2. 酵素活性の測定法

マウス両側耳下腺を 10 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.0)、5 mM ジチオスレイトール、0.1 mM EDTA を含む氷冷した 0.25 M 蔗糖液 2 ml 中でホモジナイズし、 $105,000 \times g$ で 30 分間遠心した上清を酵素活性測定に供した。オルニチン脱炭酸酵素及び S-アデノシルメチオニン脱炭酸酵素の活性測定はそれぞれ、DL-[1- ^{14}C]オルニチン¹³⁻¹⁵⁾あるいは S-アデノシル-L-[カルボキシ- ^{14}C]

メチオニン^{13, 14, 16)}より放出される ^{14}C O_2 を測定して行った。またヒスチジン脱炭酸酵素活性も同様にDL- $[\text{1-}^{14}\text{C}]$ ヒスチジンを基質として測定した¹⁷⁾。

オルニチンカルバミルトランスフェラーゼの活性測定は Caravaca と Grisolia の方法¹⁸⁾にしたがって行い、生成したシトルリン量を測定した¹⁹⁾。

オルニチントランスアミラーゼ, GPT, 及び GOT は, それぞれ Katunuma²⁰⁾, Segal²¹⁾, 及び Karmen²²⁾の方法によって活性測定をした。

3. ポリアミンの定量及びポリアミン合成能の測定

マウス(3匹)より摘出した胃下腺を氷冷した15 mlの2%過塩素酸でホモジナイズし、 $20,000 \times g$ で20分間遠心する。上清中のポリアミンを Inoue と Mizutani の方法²³⁾にしたがって、Dowex-50カラムにより分離し、濾紙電気泳動法にて分画した後、ニンヒドリンで

発色させて比色定量した。

また、プロレツシン生成の測定にはDL-[3-³H]オルニチン(1.95 Ci/m mole)を、またスベルミジンの生成測定には[2,3-³H]プロレツシン(182.8 mCi/m mole)を腹腔内に投与(1 μ Ci/g 体重)し、1時間後に耳下腺を摘出、上記の方法にしたがって、濾紙電気泳動法でプロレツシン及びスベルミジンを分離した。ポリアミン中に取りこまれた放射能は、同時に展開したニンヒドリンにて発色もしない濾紙よりそれぞれのポリアミンに相当する画分を切りとり、0.01 N HClで溶出したのち10 mlのInsta-Gelと混合し測定した。

組織中のオルニチンは2%過塩素酸可溶画分をDowex-50カラムに通し、2 N HClで溶出されるオルニチンを含む画分を、0.05 M ホウ酸緩衝液(pH 9.6)で濾紙電気泳動を行って分離した。ついでポリアミンの場合と同様に濾紙上のオルニチン画分を切り取り、溶

出後、放射能を測定するとともにオルニチン量をフルラムを用いて蛍光測定し²⁴⁾、比活性を求めた。

4. 核酸合成能の測定

DNA合成は耳下腺のスライスを用いて、in vitroで測定した。スライス(0.4×0.4mm)した両側耳下腺を、10 mlの10 mM HEPES (N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-ethane-2-sulfonic acid)を含むEagle's minimum essential medium (pH 7.4)中で20分間70℃インキュベートした後、4 NCiの[メチル-³H]チミジン(11.6 Ci/mmol)を含む5 mlの新鮮溶液に移し、さらに30分間インキュベートした。なおインキュベーションは37℃、100% O₂気相中で、振とうして行った。インキュベーション終了後、スライスを0.5 mMのチミジンを含む生理食塩水中で2度洗滌し、8 mlの2%過塩素酸でホモジナイズした。ついで、遠心分離した沈殿から常法にしたがってRNAとDNAを分離し^{25,26)}、それぞれの

核酸中に取りこまれた放射能を Insta-Gel をシンチレーション溶液として Aloka spectrometer, model LSC 653 を用いて測定した。なお RNA 合成能は in vivo 及び in vitro で測定した。in vivo の実験では チミジンの代りに体重 1 g 当たり $1 \mu\text{Ci}$ の $[5-^3\text{H}]$ ウリジン ($18.3 \text{ Ci}/\text{mole}$) を屠殺 45 分前にマウスに投与し、また in vitro の実験では $5 \mu\text{Ci}$ の $[5-^3\text{H}]$ ウリジンの存在下にインキュベートして上記の方法にしたがって RNA 中に取りこまれた放射能を測定した。

5. 細胞分裂指数

耳下腺を 10% ホルマリンで固定し、パラフィンに包埋後、組織切片 ($5 \mu\text{m}$) を作製し、Mayer のヘマトキシリンとエオジンで染色した。なお核分裂像を呈している腺細胞の比率は少なくとも 20,000 個の細胞を数えることにより算出した。

6. 蛋白及び核酸の定量

蛋白量は牛血清アルブミンを標準液として

Lowry 5 の方法により定量した²⁷⁾。RNA 及び DNA はそれぞれイースト RNA 及び仔牛胸腺の DNA をそれぞれ標準液として用い、Schneider の方法²⁸⁾にしたがって定量した。

7. 試薬と材料

DL-HAVA²⁹⁾ 及び DL-α-メチルオルニチンは大日本製薬株式会社の西村温樹博士により合成され、供与された。また DL-エリスロ-及び DL-スレオ-β-ヒドロキシルニチンは本学理学部の艾哲夫教授により合成され供与された。その他のオルニチン誘導体は中外製薬総合研究所の尾野雅義博士より供与された。

オルニチン脱炭酸酵素はチオアセトアミドで処理したネズミ肝より、Ono 5 の方法¹⁵⁾にしたがって、DEAE-セルロースカラムクロマトグラフィーの段階まで精製したものを用了。オルニチントランスアミナーゼは3日間、高蛋白食で飼育したネズミ肝より、Peraino 5 の方法³⁰⁾にしたがって第2硫酸分

画の段階まで精製したものを用了。オルニチンカルバミルトランスフェラーゼはネズミ肝のミトコンドリア画分のアセトン粉末より、Reichardの方法³¹⁾で精製した。S-アデノシルメチオニン脱炭酸酵素¹⁶⁾ (ネズミ側腹前立腺) 及びヒスチジン脱炭酸酵素³²⁾ (ネズミ胃) はいずれも硫酸分画により部分精製したものを用了。GPT, GOTはブタ心より精製結晶化された標品を大阪大学医学部の鏡山博士から恵与された。

アイソトープ化合物はすべて、New England Nuclear Corporation から購入したものを用了。その他の試薬は市販品を使用した。

実験結果

1. DL-HAVAによるオルニチン脱炭酸酵素活性の阻害

まず、種々のオルニチン誘導体について、オルニチン脱炭酸酵素に対する阻害作用を検討した。その結果、DL- α -ヒドラジノー δ -アミノバレリアン酸(DL-HAVA)がもっとも強い阻害作用を示した。DL- α -メチルオルニチンも若干の阻害効果を示したが、前者に比較すると弱く K_i は 8.14×10^{-5} M である。また α -及び δ -N-ベンゾイル-L-オルニチン、 α -及び δ -オルニチルオルニチン、DL-エリスロー及びDL-スレオ- β -ヒドロオキシオルニチンは、いずれも 1 mM でまったく阻害作用を示さなかった。

図3にDL-HAVAの阻害様式を示したが、その阻害はオルニチンに対して拮抗的であって、 K_i はピリドキサルリン酸(PALP)無添加で 1.5×10^{-7} M、 1×10^{-5} MのPA

LP存在下で $5.2 \times 10^{-7} \text{ M}$ である。

DL-HAVALAの阻害作用の特異性を調べるため、種々のオルニチン代謝酵素及びB₆酵素活性に対する本阻害剤の影響を検討した。表1

DL-HAVALAはオルニチンアミノトランスフェラーゼに対しても、オルニチンと拮抗的に若干の阻害を示すが、その阻害作用はオルニチン脱炭酸酵素に比してはるかに弱く K_i は約 $2.2 \times 10^{-4} \text{ M}$ に過ぎない。そのほか、ヒスチジン脱炭酸酵素、GPT、GOTは $1 \times 10^{-4} \text{ M}$ のDL-HAVALAで7~17%の阻害を受けるが、 $2.5 \times 10^{-5} \text{ M}$ ではほとんど阻害されない。また、オルニチンカルバミルトランスフェラーゼ及びS-アデノシルメチオニン脱炭酸酵素はそれぞれ $1 \times 10^{-3} \text{ M}$ 及び $1 \times 10^{-4} \text{ M}$ のDL-HAVALAで活性の阻害はまったくみられなかった(表1)。

以上の結果から、DL-HAVALAは特異性が高く、かつ強力なオルニチン脱炭酸酵素の阻害剤であるといえる。

2. IPRによるマウス耳下腺の増殖時の ポリアミン代謝に及ぼすDL-HAVALAの影響

まず、IPR投与後のマウス耳下腺のポリアミン合成酵素活性及びポリアミンレベルの経時的変動を検討した。図4に示すように、オルニチン脱炭酸酵素活性はIPR投与後4時間より上昇しはじめ、8時間後には対照の約40倍に達して最大となる。その後、酵素活性は急速に低下して16時間ではほぼ正常値にもどる。またプトレッシンレベルもオルニチン脱炭酸酵素活性とほぼ並行して変動し、IPR投与後10時間で対照の約10倍の最高値となる。

図4

ポリアミン合成のもう一つの律速酵素であるS-アデノシルメチオニン脱炭酸酵素もIPR投与により活性上昇を示すが、オルニチン脱炭酸酵素ほど顕著ではなく、12時間後に約7倍の最大値となり、その後次第に減少して24時間後にほぼ正常値レベルまでもどる。

一方、スベルミンレベルはIPR投与後いったん減少して6時間後では約20%の有意の低下を示す。しかしその後徐々に増加して12時間後では対照に比べて約30%の上昇となる。これに対してスベルミンレベルはIPR投与によってほとんど変動しない^{13,14)}。

次にIPR投与の4時間後、すなわちオルニチン脱炭酸酵素活性が上昇しはじめる時期にDL-HAVAを投与して、耳下腺のプロテッシンレベルの変動を経時的に追跡した。

図5に示すように、DL-HAVAの投与によりプロテッシンレベルの上昇は著明に抑制され、DL-HAVA投与4～6時間後（IPR投与8～10時間後）ではプロテッシンレベルはIPR単独投与に比べて約50%の低値を示した。ついで、このプロテッシンレベルの上昇抑制がDL-HAVAによるオルニチン脱炭酸酵素の阻害によるものであるか否かを検討するため、³H-オルニチンよりのプロテッシンの生成を測定した。この実験では屠

図5

殺1時間前（IPR投与の7時間後）にDL- $[3-^3H]$ オルニチンをマウスに腹腔内注射し、DL-HAVAはIPR投与の4時間後に注射した。（以下、IPR投与4時間後にDL-HAVAを投与した群をDL-HAVA処置群とする。）組織中の放射性オルニチンの比活性とプロテシンの放射能から算出すると、表2に示すようにプロテシンの形成（表の右端）はDL-HAVA投与により著明に抑制され、IPR単独群の約4分の1に低下した。したがって、DL-HAVAは in vitro のみならず in vivo でもオルニチン脱炭酸酵素活性を強力に阻害することは明らかである。

表2

次にスperlミジン合成に対するDL-HAVAの影響を 3H -オルニチンの代りに 3H -プロテシンを用いて上記と同じ実験条件下で検討した。表3より明らかなるように、プロテシンよりのスperlミジンの形成は、生理食塩水を投与した対照に比べて、IPR単独投

与群及びDL-HAVA処置群ではともに約5~6倍の上昇がみられ、DL-HAVAは表Bプロレツシンよりのスペルミジンの形成にはほとんど影響を与えない。

これと一致して、DL-HAVA投与後のスペルミジンとスペルミンのレベルを経時的に定量した結果、表4に示すようにDL-H表4AVA処置群ではIPR単独投与群との間にほとんど有意の差は認められなかった。

3. IPRによる耳下腺のオルニチン及びS-アデノシルメチオニン脱炭酸酵素誘導に及ぼすDL-HAVAの影響

図4に示したように、耳下腺のオルニチン脱炭酸酵素活性はIPR投与後急速に上昇して、8時間後には対照の約40倍にも達する^(13,14)。そこで次に、IPRによるオルニチン脱炭酸酵素誘導に及ぼすDL-HAVAの影響について検討した。

この実験ではIPR投与4時間後にDL-HAVAを投与し、以後4時間毎に動物を屠

殺した。なお酵素活性測定に先立って、混在するDL-HA VAを除去するために耳下腺より得られた可溶画分を、100倍量の7 mM 2-メルカプトエタノール、0.2 mMのPALP, 0.1 mMのEDTAを含む10 mMリン酸緩衝液(pH 7.0)に対して約12時間、4°Cで透析した。

図6,7

図6から明らかなようにDL-HA VA処置群ではオルニチン脱炭酸酵素活性はIPR単独群でみられた8時間のピークを過ぎても減少せず、直線的に上昇してIPRの投与の12時間後ではIPR単独投与群の最大値の約6倍にも達する。

表5

次に、オルニチン脱炭酸酵素の半減期に対するDL-HA VAの影響を検討した。図4、図6でみられたオルニチン脱炭酸酵素の誘導が最大となるIPR投与の8時間後に、蛋白合成阻害剤であるサイクロヘキシミドをマウスに投与すると耳下腺のオルニチン脱炭酸酵素活性は急速に減少し、IPRによって誘

導された耳下腺オルニチン脱炭酸酵素の半減期は約10分と計算された。これに対して、サイクロヘキシミド投与の1時間前にDL-HAVAを腹腔内注射すると、この酵素活性の減少は著しく抑制され、オルニチン脱炭酸酵素の半減期は約4時間に延長される(図7)。

これらの結果は、DL-HAVAによるオルニチン脱炭酸酵素の superinduction が酵素の分解の抑制に起因することを強く示唆するとともに、DL-HAVAの作用が少なくとも8時間持続することを示している。

一方、DL-HAVAはS-アデノシルメチオニン脱炭酸酵素の誘導に対してはほとんど影響を与えない(表5)。

4. IPRによる耳下腺の増殖に及ぼすDL-HAVAの影響

マウスにIPRを1日1回投与すると耳下腺の重量は16時間後から増加しはじめ、24時間後には非処置群に比べて約50%、48時間後

には約2倍に増加する^{13,14)}。一方、DNA合成能はIPRを1回投与するとおおよそ18時間後より上昇しはじめ20~24時間後に最大となり、細胞分裂もおおよそ30時間後に最大の高産を示す。そこでIPR投与によって招来されるこれらの変化に対するDL-HAVAの影響を検討した。

表6に示すように、IPRによる耳下腺重量の増加はDL-HAVA投与により24時間後、48時間後のいずれでも約50%抑制される。また表7に示すように、DNA合成及び細胞分裂もIPR投与4時間後にDL-HAVAを投与して、プロレスシンレベルの上昇を抑制するといずれも50%以下に抑制される。

しかし、IPR投与14時間後、すなわちオルニチン脱炭酸酵素活性及びプロレスシンレベルがピークを過ぎ、ほぼ正常値レベルまで低下した時期(図4)に、DL-HAVAを投与した場合にはDNA合成の阻害はほとんど認められない。これらの結果は、IPR投与

表6,7

後のきわめて早期にみられるプロレスシンレベルの上昇が組織増殖と密接に関連していることを強く示唆している。

もし、上記のDL-HAVALAの増殖阻止効果がオルニチン脱炭酸酵素活性の阻害による組織内プロレスシンレベルの低下に起因するものであるならば、DL-HAVALA処置マウスにプロレスシンを投与して、耳下腺のプロレスシンレベルを上昇させればDL-HAVALAによる増殖抑制は回復するはずである。表8に示すように、DL-HAVALAによるDNA合成の低下はプロレスシンの投与により著しく上昇し、その回復率は60%に達する。これと一致して、DL-HAVALAにより減少した耳下腺の組織重量もプロレスシンの投与によって著明に回復する。しかしプロレスシンを過量に投与（総量が 2mmole/Kg 体重以上）すると、その回復効果は著しく減少する。一方、プロレスシンの構造類似体である1,7-ジアミノヘプタンではDNA合成の回復効果

はほとんどみられな^い。したがって、このようなフォトレシシンの増殖回復効果は特異性の高いものと考えられる。

I P R 投与後のマウス耳下腺では、RNA 合成も I P R 投与の4時間後より上昇しはじめ約16時間後に最大に達する^{13,14)}。そこで次に、DL-H A V A の RNA 合成に対する影響について検討した。表9より明らかたように、マウス耳下腺の全 RNA 画分への³H-ウリジンの取りこみは I P R 投与12時間後に著しく促進するが、この実験条件下では DL-H A V A 処置群と I P R 単独群との間に有意の差は認められな^かった。

表9

考察

著者は本報においてポリアミン合成のもっとも重要な律速酵素であるオルニチン脱炭酸酵素の強力かつ特異的な阻害剤を開発し、これを用いてポリアミンの生理的役割を解明しようとした。種々のオルニチン誘導体について検討した結果、DL-HAVAがもっとも強力かつ特異性の高いオルニチン脱炭酸酵素の阻害剤であることもみいだした(図3, 表1)。

DL-HAVAは in vitro のみならず、in vivo でも有効であって、IPR投与4時間後に投与するとプロレスシンの形成は著明に抑制される(図5, 表2)。これに対して、耳下腺のオルニチン脱炭酸酵素活性はDL-HAVA処置群で逆に著しく増加し、いわゆる superinduction を招来するが(図6)、これはDL-HAVAが基質であるオルニチンと拮抗してオルニチン脱炭酸酵素と結合し、それによって酵素蛋白の分解を阻害し、半減期を

延長するためと考えられる(図7)。

次に、IPRによるマウス耳下腺の細胞増殖に及ぼすDL-HAV Aの影響を、DNA合成能、組織重量の増加率及び細胞分裂を指標として検討したところ、これらはいずれもDL-HAV A投与群で著しく低下していることが明らかとなった(表6,7)。しかし、オルニチン脱炭酸酵素及びS-アデノシルメチオニン脱炭酸酵素の誘導、及びRNA合成の促進はDL-HAV Aの投与によりまったく抑制されず(図6,表5,9)、またIPR投与の14時間後、すなわちオルニチン脱炭酸酵素の活性がすでにピークを過ぎほぼ正常値レベルに低下した時期に、DL-HAV Aを投与しても、DNA合成の抑制が認められない(表7)。これらの事実はDL-HAV Aの増殖抑制作用が蛋白及び核酸合成を直接的に阻害することによるものではないことを示している。

DL-HAV A処置群ではIPRによる70

トレッシンレベルの上昇が阻止され、これと一致してDNA合成能及び組織重量の増加も抑制されるが、これらの抑制はフォトレッシンの投与によって著明に回復し、フォトレッシンの構造類似体である1,7-ジアミノヘプタンでは回復しない(表8)。これらの結果はフォトレッシンの抑制回復効果はかなり特異的であることを示すとともに、DL-HAVAによる細胞増殖の阻害がフォトレッシンレベルの低下を介するものであることを示している。

上記のフォトレッシンの作用機構は現在のところ明らかではないが、DL-HAVAはスperlミジンの合成及びその組織内濃度にはほとんど影響を与えないので(表3,4)、フォトレッシンはスperlミジンの前駆体としてのみならず、より直接的な別の機構で細胞増殖に関与しているのではないかと考えられる。

このようなフォトレッシンの細胞増殖における重要性は、種々の動物組織の増殖時にみられるポリアミン代謝の変動のうちで、フォトレ

ッシンレベルの上昇がもっとも早期にかつ著明に起こることや^{5,7,13,14,33-35)}、細胞増殖の初期にはスベルミジンのプロトレッシンへの分解が促進されること³⁶⁾などからも強く支持される。これに関連して、Williams-Ashman³⁷⁾は種々の Morris 肝癌を用いて、増殖のすみやかなものほどオルニチン脱炭酸酵素活性及びプロトレッシンレベルが高く、より分化した肝癌では低い傾向を示すが、スベルミジン合成に関与する 5-アデノシルメチオニン脱炭酸酵素ではこのような相関が認められないことを報告している。

本研究の進行中、Snyder³⁸⁾は、HAVAと同じ構造をもつ α -ヒドラジノールニチン(α -HO)が特異的かつニチンと拮抗的にオルニチン脱炭酸酵素活性を阻害することを報告した^{38,39)}。また、彼らは培養細胞及び両側腎を摘出したラット肝において、この阻害剤がプロトレッシンレベルを低下させることをみいだしたが、rat hepatoma cell

における3H-チミジンのDNAへの取りこみには影響を与えないと報告している⁴⁰⁾。

Snyderらの α -H Oと本研究で用いたDL-H A V Aとの間には次の諸点で相違がみられる。

1) α -H Oは $[\alpha]_D^{21} 6.56^\circ (c1, H_2O)$ の光学活性をもつが³⁹⁾、DL-H A V Aはラセミ体である。

2) オルニチン脱炭酸酵素に対する K_i が異なる。すなわち、ほぼ同じ条件下で、ネズミ前立腺酵素に対する α -H Oの K_i は $2 \times 10^{-6} M$ であるのに対して^{38, 39)}、DL-H A V Aのそれは肝及び前立腺の酵素に対して $5.2 \times 10^{-7} M$ である。

3) マウスに $200 \sim 2000 \text{ mg} / \text{Kg}$ 体重の α -H Oを投与しても、種々の組織のプロテッシンレベルは有意の変動を示さないが³⁸⁾、IP Rで処置したマウスに $80 \text{ mg} / \text{Kg}$ 体重のDL-H A V Aを投与すると耳下腺のプロテッシン濃度は著明に減少する。また成長ホルモンを

投与したマウス肝でも DL-HAVA はプロ
レシニンレベルの上昇を強く抑制する（未発
表データ）。

以上の事実は、DL-HAVA は恐らくそ
の立体構造の相違のためにオルニチン脱炭酸
酵素活性を α -HO よりもより強力に阻害す
ることを示唆している。これに関連して、動
物のオルニチン脱炭酸酵素が D-オルニチン
よりも L-オルニチンに対してより強い親和
性をもつこと¹⁵⁾、及び動物の DOPA 脱炭酸
酵素は L-メチルドーパによって阻害される
が D-体によっては阻害されないことが報告
されている⁴⁾。本研究で DL-HAVA も入
手する以前に、 α -HO とほぼ同じ旋光度も
つ HAVA を実験に用いたが、この化合物
は DL-HAVA に比べてオルニチン脱炭酸
酵素に対する阻害作用が弱く、 α -HO にほ
ぼ匹敵する K_i を示した。最近、Sawayama⁵
²⁴⁾ は、この光学的に活性な HAVA がほとん
ど D-体よりなることを証明した。したがっ

て、上記のDL-HAVAとSnyderの用いたDL-HOとの相違点も、後者がほとんどDL-1体よりなることによるものと考えられる。

結論

DL- α -ヒドラジノ- δ -アミノバレリアン酸 (DL-HAVA) がポリアミン合成のもっとも重要な律速酵素であるオルニチン脱炭酸酵素を特異的に阻害することをみだし、これを用いてイソプロテレノール (IPR) によるマウス耳下腺の増殖におけるポリアミンの役割を追求し、以下の結果を得た。

1. DL-HAVA はオルニチンと拮抗して、オルニチン脱炭酸酵素を強く阻害するが、他のオルニチン代謝酵素及び民酵素に対する阻害作用は極めて弱い。

2. IPR によるマウス耳下腺増殖時の7 α -トレッシンの合成及び組織内レベルの上昇はDL-HAVAの投与によって著明に抑制される。しかし、7 α -トレッシンよりのスペルミジンの合成及びスペルミジンレベルはほとんど影響をうけない。

3. DL-HAVAを投与して7 α -トレッシンレベルの上昇を抑制するとイソプロテレノ

ールによる耳下腺のDNA合成、重量の増加及び細胞分裂の高進はいずれも著明に阻害される。

4. プロテッシンを投与して耳下腺内のプロテッシンレベルを上昇させると、DL- α -HVAによるDNA合成及び重量増加の抑制は著しく回復する。しかしプロテッシンの構造類似体であるL-7-ジアミノヘプタンは無効である。

以上の結果から、IPRによるマウス耳下腺の増殖にはオルニチン脱炭酸酵素活性の高進、すなわちプロテッシンレベルの上昇が不可欠であることが示された。

稿を終えるにあたり、本研究の御指導、御校閲を賜った生化学講座竹田義朗教授、また本研究の遂行にあたって、終始かわらぬ御指導をいただいた井上秀夫講師に心から謝意を表します。

THE ROLE OF POLYAMINES IN THE GROWTH OF MOUSE PAROTID GLANDS
INDUCED BY ISOPROTERENOL

Yukio KATO

Department of Biochemistry, Osaka University, Dental School,
32 Joan-cho, Kita-ku, Osaka 530, Japan

The effects of DL- α -hydrazino- δ -aminovaleric acid (DL-HAVA) on polyamine metabolism in isoproterenol (IPR)-stimulated mouse parotid glands were investigated both in vitro and in vivo.

Using partially purified enzyme preparations, it was found that DL-HAVA strongly inhibited ornithine decarboxylase.(EC 4.1.1.17) by competing with L-ornithine. Other enzymes metabolizing ornithine and pyridoxal phosphate-dependent enzymes were at least 2 ~ 3 orders of magnitude less sensitive to DL-HAVA than ornithine decarboxylase.

Administration of DL-HAVA greatly depressed the increases in both the putrescine level and putrescine formation from L-ornithine induced by IPR in the mouse parotid glands. Under the same conditions, the stimulation of DNA synthesis and subsequent cell proliferation in the glands were also suppressed. However, the

IPR-dependent increases in S-adenosyl-L-methionine decarboxylase (EC 4.1.1.50) activity, synthesis and the tissue concentration of spermidine, and RNA synthesis in the parotid glands were not affected appreciably by DL-HAVA.

The inhibition of DNA synthesis by DL-HAVA was effectively prevented by putrescine, but not by 1,7-diaminoheptane, given at the time when DL-HAVA inhibited stimulation of putrescine formation by IPR. From these results, it is proposed that putrescine is involved in cell proliferation besides being a precursor of spermidine.

- 1) Tabor, H. and Tabor, C.W. (1964): Spermidine, spermine, and related amines. Pharmacol. Rev. 16, 245~300.
- 2) Caldarera, C.M., Barbiroli, B. and Moruzzi, G.
(1965): Polyamines and nucleic acids during development of the chick embryo. Biochem. J. 97, 84~88.
- 3) Russel, D.H. and Snyder, S.H. (1968): Amine synthesis in rapidly growing tissues: Ornithine decarboxylase activity in regenerating rat liver, chick embryo, and various tumors. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 60, 1420~1427.
- 4) Hannonen, P., Raina, A. and Jänne, J. (1972): Polyamine synthesis in the regenerating rat liver: Stimulation of S-adenosylmethionine decarboxylase, and spermidine and spermine synthetases after partial hepatectomy. Biochim. Biophys. Acta 273, 84~90.

- 5) Heby, O. and Russel, D.H. (1973): Depression of polyamine synthesis in L1210 leukemic mice during treatment with a potent antileukemic agent, 5-azacytidine. Cancer Res. 33, 159~165.
- 6) 竹田義朗, 井上秀夫 (1975): ポリアミンと細胞増殖ホルモンと臨床 23, 111~119. 昭和50.
- 7) Raina, A. and Jänne, J. (1975): Physiology of the natural polyamines putrescine, spermidine and spermine. Medical Biology 53, 121~147.
- 8) Selye, H., Veilleux, R. and Cantin, M. (1961): Excessive stimulation of salivary gland growth by isoproterenol. Science 133, 44~45.
- 9) Brown-Grant, K. (1961): Enlargement of salivary gland in mice treated with isopropyladrenaline. Nature 191, 1076~1078.
- 10) Barka, T. (1965): Stimulation of DNA synthesis by isoproterenol in the salivary gland. Exp. Cell Res. 39, 355~364.

- 11) Sasaki, T., Litwack, G. and Baserga, R. (1969):
Protein synthesis in the early prereplicative
phase of isoproterenol-stimulated synthesis of
deoxyribonucleic acid. J. Biol. Chem. 244, 4831~
4837.

- 12) Ishida, H. and Ahmed, K. (1973): Studies on phosphoproteins of submandibular gland nuclei isolated from isoproterenol-treated rats. Exp. Cell Res. 78, 31~40.

- 13) Inoue, H., Tanioka, H., Shiba, K., Asada, A., Kato, Y. and Takeda, Y. (1974): Effect of isoproterenol on polyamine metabolism in mouse salivary glands. J. Biochem. 75, 679~687.

- 14) 谷岡博昭, 芝 憲三, 井上秀夫, 加藤幸夫, 浅田 彬, 滝川正春, 尾野雅義 (1974): イソプロテノールによるマウス唾腺の増殖とポリアミン代謝.
阪大歯学誌 19, 113~121. 昭和49.

- 15) Ono, M., Inoue, H., Suzuki, F. and Takeda, Y.
(1972): Studies on ornithine decarboxylase from
the liver of thioacetamide-treated rat; Purification
and some properties. Biochim. Biophys. Acta
284, 285~297.
- 16) Jänne, J. and Williams-Ashman, H.G. (1971):
Dissociation of putrescine-activated decarboxylation
of S-adenosyl-L-methionine from the enzymic
synthesis of spermidine and spermine by purified
prostatic enzyme preparations. Biochem. Biophys.
Res. Commun. 42, 222~229.
- 17) Mizutani, A., Inoue, H. and Takeda, Y. (1974):
Changes in polyamine metabolism during wound
healing in rat skin. Biochim. Biophys. Acta
338, 183~190.
- 18) Caravaca, J. and Grisolia, S. (1960): Synthesis
of citrulline with animal and bacterial enzymes.
J. Biol. Chem. 235, 684~693.

- 19) Archibald, R.M. (1944): Determination of citrulline and allantoin and determination of citrulline in blood plasma. J. Biol. Chem. 156, 121~142.
- 20) Katunuma, N., Matsuda, Y. and Tomino, I. (1964):
Studies on ornithine-ketoacid transaminase.
1. Purification and properties. J. Biochem. 56, 499~503.
- 21) Segal, H.L., Beattie, D.S. and Hopper, S. (1962):
Purification and properties of liver glutamic
-alanine transaminase from normal and corticoid
-treated rats. J. Biol. Chem. 237, 1914~1920.
- 22) Karmen, A. (1955): A note on the spectrophotometric
assay of glutamic-oxaloacetic transaminase in human
blood serum. J. Clin. Invest. 34, 131~133.

- 23) Inoue, H. and Mizutani, A. (1973): A new method for isolation of polyamines from animal tissue. Anal. Biochem. 56, 408~416.
- 24) Böhlen, P., Stein, S., Dairman, W. and Udenfriend, S. (1973): Fluometric assay of proteins in the nanogram range. Arch. Biochem. Biophys. 155, 213~220.
- 25) Steele, W.J., Okamura, N. and Busch, H. (1964): Prevention of loss of RNA, DNA and protein into lipid solvents. Biochim. Biophys. Acta 87, 490~495.
- 26) Schmidt, G. and Thannhauser, S.J. (1945): A method for the determination of deoxyribonucleic acid, ribonucleic acid and phosphoproteins in animal tissues. J. Biol. Chem. 161, 83~89.
- 27) Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J. (1951): Protein measurement with the folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193, 265~275.

- 28) Schneider, W.C. (1945): Phosphorus compounds in animal tissue. 1. Extraction and estimation of deoxypentose nucleic acid and pentose nucleic acid. J. Biol. Chem. 161, 293~303.
- 29) Sawayama, T., Kinugasa, H. and Nishimura, H. (1976): Synthesis of ornithine decarboxylase inhibitors; D- and DL-~~α~~-Hydrazinoornithine. Chem. Pharm. Bull. 24, 326~329.
- 30) Peraino, C., Bunville, L.G. and Tahmisian, T.N. (1969): Chemical, physical, and morphological properties of ornithine aminotransferase from rat liver. J. Biol. Chem. 244, 2241~2249.
- 31) Raichard, P. (1957): Ornithine carbamyl transferase from rat liver. Acta Chem. Scand. 11, 523~536.
- 32) Håkanson, R. (1963): Histidine decarboxylase in the fetal rat. Biochem. Pharmacol. 12, 1289~1296.

- 33) Ono, M., Inoue, H. and Takeda, Y. (1973): Effect of thioamide derivatives on induction of ornithine decarboxylase in rat liver. Biochim. Biophys. Acta 304, 495~504.
- 34) Fillingame, R.H. and Morris, D.R. (1973): Polyamine accumulation during lymphocyte transformation and its relation to the synthesis, processing, and accumulation of RNA. Biochemistry 12, 4479~4487.
- 35) Kay, J.E. and Pegg, A.E. (1973): Effect of inhibition of spermidine formation on protein and nucleic acid synthesis during lymphocyte activation. FEBS Lett. 29, 301~304.
- 36) Hölttä, E., Sinervirta, R. and Jänne, J. (1973): Synthesis and accumulation of polyamines in rat liver regenerating after treatment with carbon tetrachloride. Biochem. Biophys. Res. Commun. 54, 350~357.

- 37) Williams-Ashman, H.G., Coppoc, G.L. and Weber, G. (1972): Imbalance in ornithine metabolism in hepatomas of different growth rates as expressed in formation of putrescine, spermidine, and spermine. Cancer Res. 32, 1924~1932.
- 38) Harik, S.I., Pasternak, G.W. and Snyder, S.H. (1973): Putrescine: A sensitive assay and blockage of its synthesis by α -hydrazino ornithine; in Polyamine in normal and neoplastic growth. (Russell, D.H. editor). Raven Press, New York, 307~321.
- 39) Harik, S.I. and Snyder S.H. (1973): Ornithine decarboxylase: Inhibition by α -hydrazinoornithine. Biochim. Biophys. Acta 327, 501~509.
- 40) Harik, S.I., Hollenberg, M.D. and Snyder, S.H. (1974): α -Hydrazino-ornithine blocks net synthesis of putrescine but not of RNA and DNA. Nature 249, 250~251.
- 41) Tristram, E.W., Broeke, J.T., Reinhold, D.F., Slettinger, M. and Williams, D.E. (1964): α -Methyldopa. Resolution and configuration. J. Org. Chem. 29, 2053~2056.

脚注

大阪大学歯学部生化学講座（主任：竹
田義朗教授）

図1 動物組織におけるポリアミン合成経路

図2 α -ヒドロジノーδ-アミノバレリアン酸 (HAVA)

図3 DL-HAVAによるオルニチン脱炭酸酵素活性の阻害

ネズミ肝のオルニチン脱炭酸酵素を、Onoの方法¹⁵⁾で部分精製した酵素(150 μ g 蛋白)を用い、 1×10^{-5} Mのピリドキサルリン酸の存在下で活性を測定した。


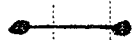
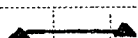
	—DL—HAVA ($K_m = 6.9 \times 10^{-5}$ M)
	4×10^{-6} M DL—HAVA ($K_i = 5.1 \times 10^{-7}$ M)
	8×10^{-6} M DL—HAVA ($K_i = 5.3 \times 10^{-7}$ M)

図4 IPR投与後のマウス耳下腺のポリ
アミンレベル及びオルニチン脱炭酸
酵素ならびにS-アデノシルメチオ
ニン脱炭酸酵素活性の変動

IPRは0.3 mM / Kg体重を投与した。値は
4～10回の実験の平均値±標準誤差。なおこ
れらのデータは文献13, 14に提示したものと
重複している。

●——● アトレッシンレベル

■——■ スペルミジンレベル

▲——▲ スペルミンレベル

○----○ オルニチン脱炭酸酵素活性

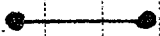
□----□ S-アデノシルメチオニン脱炭酸
酵素活性

図5 IPRによるマウス耳下腺のプロレスシンレベル上昇に及ぼすDL-HAVAの影響

IPRは0.3 mmole/Kg体重を投与した。DL-HAVA (0.34 mmole/Kg体重)はIPR投与の4時間後に腹腔内注射した。値は3~5回の実験の平均値±標準偏差。(矢印はDL-HAVAの投与を示す)



IPR投与群



IPR + DL-HAVA投与群

図6 IPR投与後のマウス耳下腺のオル ニチン脱炭酸酵素レベルに及ぼすD L-HAVALAの影響

IPRは 0.3 mmole/Kg 体重を投与した。DL-HAVALA (0.34 mmole/Kg 体重)はIPR投与の4時間後に腹腔内注射した。なお混在するDL-HAVALAを除去するため、耳下腺の可溶画分は100倍量の 7 mM 2-メルカプトエタノール、 0.2 mM PALP及び 0.1 mM EDTAを含む 10 mM リン酸ナトリウム緩衝液(pH 7.0)中で 4°C で約12時間透析した。値は4匹の平均値±標準偏差。(矢印はDL-HAVALAの投与を示す。)

● — ● DL-HAVALA処置群

○ — ○ 生理食塩水処置群

図7 マウス耳下腺におけるオルニチン脱炭酸酵素の不活化に及ぼすDL-HAVAの影響

IPRは0.3 mmole / Kg 体重を投与した。DL-HAVA及びサイクロヘキシミド(30 mg / Kg 体重)はそれぞれIPR投与後7, 8時間後に腹腔内注射した。値は4匹の平均値±標準偏差。



DL-HAVA処置群



生理的食塩水処置群

表1 種々のオルニチン代謝酵素及びピリ
ドキサルリン酸一依存性酵素に及
ぼすDL-HAVALAの影響

酵素源及び測定条件については実験方法に記
した。ただしヒスチジン脱炭酸酵素は 1×10^{-5}
Mのピリドキサルリン酸の存在下で活性
測定をした。GPT及びGOTの活性測定の
際は酵素と α -ケトグルタル酸を同時に加え
、他の酵素の場合には酵素のみを加えて反応
を開始した。

表2 IPR投与後のマウス耳下腺のフト
レッシン生成に及ぼすDL-HAV
Aの影響

IPRは $0.3 \text{ mmole} / \text{Kg}$ 体重を投与した。DL-HAV A ($0.34 \text{ mmole} / \text{Kg}$ 体重) は IPR 投与の4時間後に投与し、動物はその4時間後に殺した。DL-[3- ^3H] オルニチン ($1 \text{ mCi} / \text{Kg}$ 体重, $1.95 \text{ Ci} / \text{mmole}$) は屠殺の1時間前に腹腔内注射した。生成値はフトレッシンに取り込まれた放射能とオルニチンの比放射能から算出した。他の実験条件は実験方法に記した。数値は4~6回の実験の平均値 \pm 標準偏差。

表3 IPR投与後のマウス耳下腺のスペルミジン生成に及ぼすDL-HAVAの影響

IPRは 0.3 mmole/Kg 体重を投与した。DL-HAVA (0.34 mmole/Kg 体重) はIPR投与の4時間後に腹腔内投与し、マウスはその4時間後に屠殺した。[2,3-³⁴] プロトレスシン (182.8 mCi/mmole) は屠殺の1時間前に 1 mCi/Kg 体重を投与した。生成値はスペルミジンに取り込まれた放射能とプロトレスシンの比放射能から算出した。他の実験条件は実験方法に記した。数値は4回の実験の平均値±標準偏差。

表4 IPR及びDL-HAVA投与後の
マウス耳下腺のスペルミン、スペ
ルミンレベルの変動

IPRは0.3mmole / Kg体重を投与した。DL
-HAVA (0.34mmole / Kg体重)はIPR
投与の4時間後に腹腔内注射した。数値は4
～6回の実験の平均値±標準偏差。

表 5 IPR投与後のマウス胃下腹のS-
アデノシルメチオニン脱炭酸酵素活
性に及ぼすDL-HAVAの影響

IPRは $0.3 \text{ mmole} / \text{Kg}$ 体重を投与した。DL-
HAVA ($0.34 \text{ mmole} / \text{Kg}$ 体重)はIPR
投与の4時間後に腹腔内注射した。酵素活性
の測定法は実験方法に記した。数値は4匹の
平均値±標準偏差。

表 6 I P R 投与によるマウス耳下腺の重量増加に及ぼす DL-HA VA の影響

I P R は $0.3 \text{ mmole} / \text{Kg}$ 体重を投与した。なおマウスを 48 時間後に屠殺する場合には、最初の投与の 24 時間後に 2 度目の I P R 注射 (同量) を行った。DL-HA VA ($0.34 \text{ mmole} / \text{Kg}$ 体重) は各 I P R 投与のそれぞれ 4 時間後に腹腔内注射した。数値は 8 ~ 12 匹の平均値 \pm 標準偏差。

表7 IPRによるマウス耳下腺のDNA
合成及び細胞分裂に及ぼすDL-H
AVAの影響

IPRは $0.3 \text{ mmole} / \text{Kg}$ 体重を投与した。DL-HAVA ($0.34 \text{ mmole} / \text{Kg}$ 体重) は IPR 投与の4あるいは11時間後に腹腔内注射した。数値は5~12匹の平均値±標準偏差。

* IPR投与後の時間(時)を示す。

** IPR投与後、DL-HAVAを投与するまでの時間(時)を示す。

表 8 DL-HAVA により抑制されたマウス耳下腺の DNA 合成及び組織重量の増加に対するアトレッシン投与の効果

マウスは IPR (0.3 mmole/Kg 体重) 投与の 20 あるいは 24 時間後に屠殺した。DL-HAVA (0.34 mmole/Kg 体重) は IPR 投与の 4 時間後に腹腔内注射した。またジアミンは IPR 投与の 4 及び 8 時間後の 2 度、腹腔内投与した。数値は 4~14 回の実験の平均値 \pm 標準偏差。

* IPR 投与後の時間 (時) を示す。

表 9 I P R 投与後のマウス耳下腺の R N
A 合成に及ぼす D L - H A V A の 影
響

I P R は $0.3 \text{ mmole} / \text{kg}$ 体重を投与した。D L
- H A V A ($0.34 \text{ mmole} / \text{kg}$ 体重) は I P R 投
与の 4 時間後に腹腔内注射した。他の実験条
件は実験方法に記した。数値は 4 ~ 6 回の実
験の平均値 \pm 標準偏差。

図 1

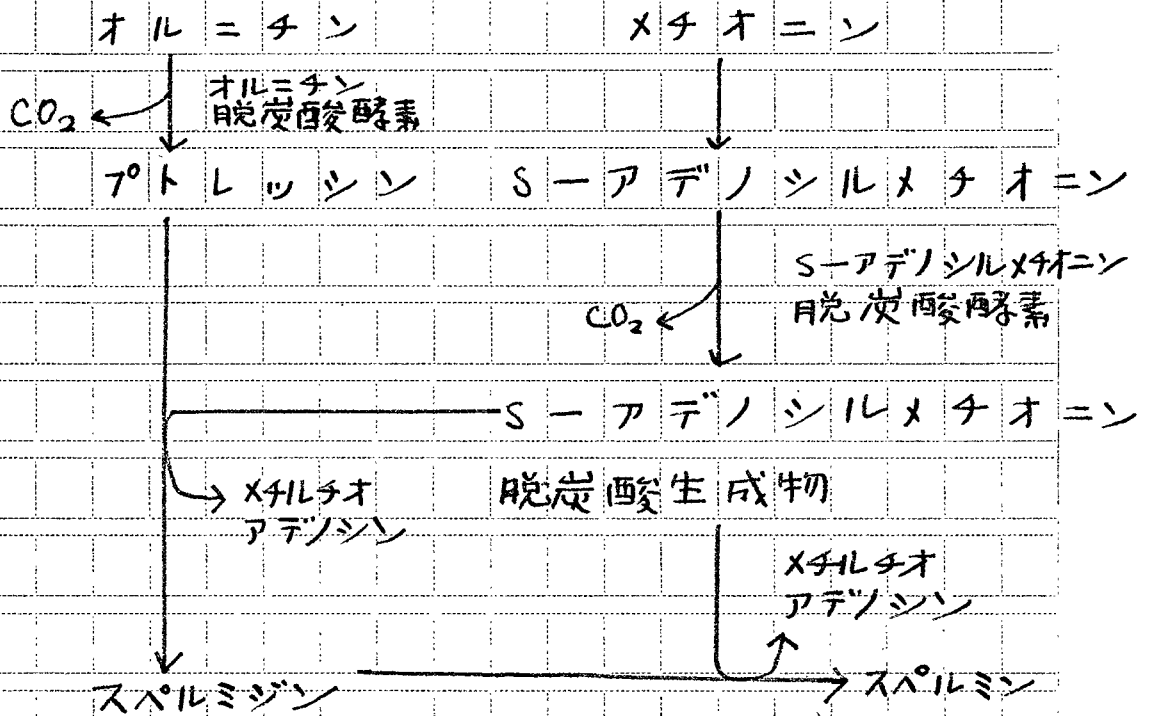


図 2

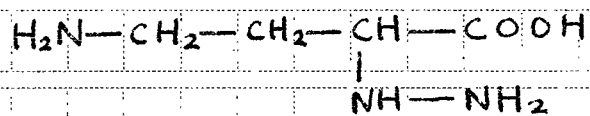


図 3

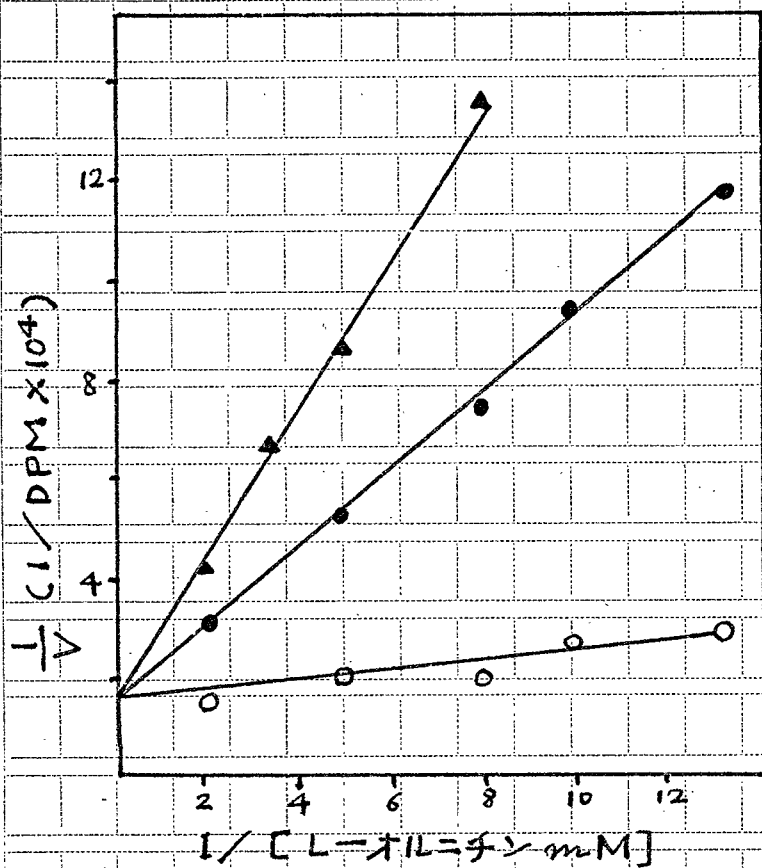


図 4

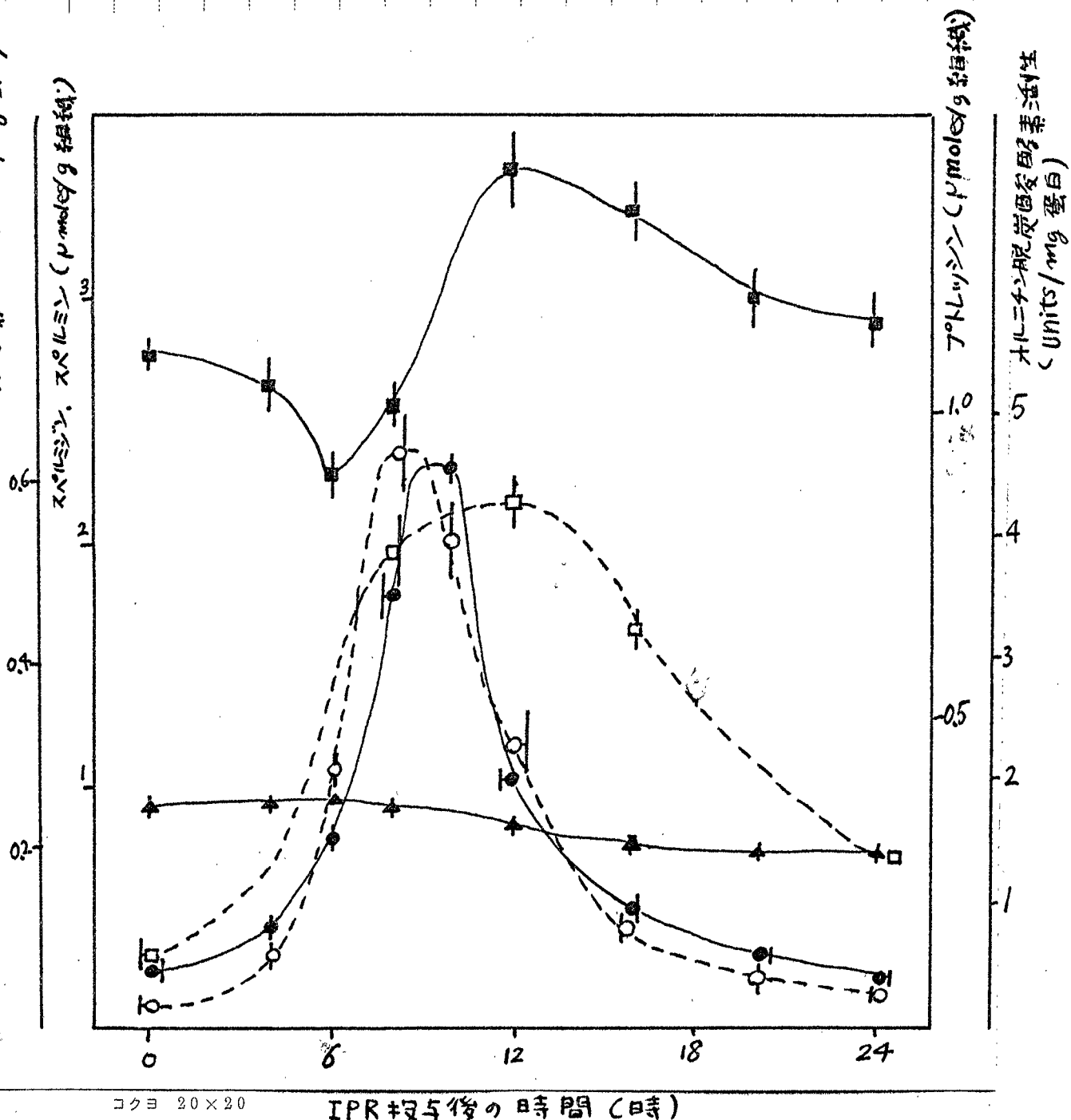


図4 $\frac{1}{T} \left(\times \frac{1}{3} \right)$ 加算

5

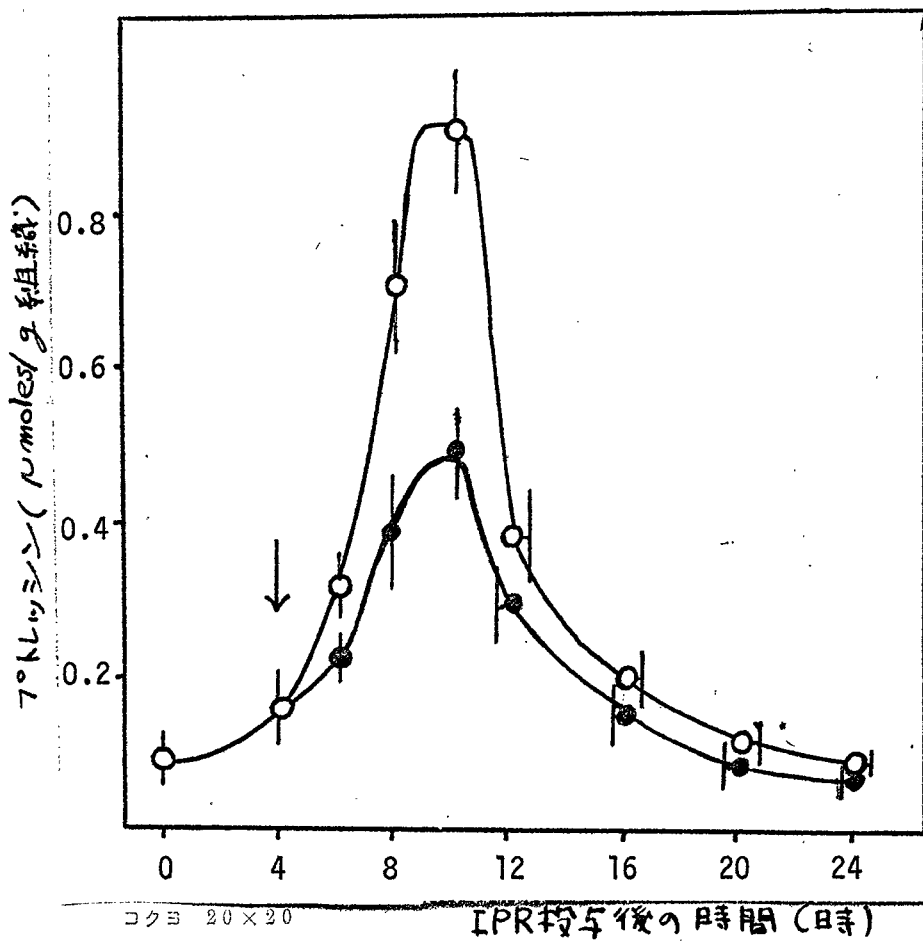


図5 $\frac{1}{K} \left(\times \frac{1}{2} \right)$ の値

図 6

オルニチン脱炭酸酵素活性 (units/mg 蛋白)

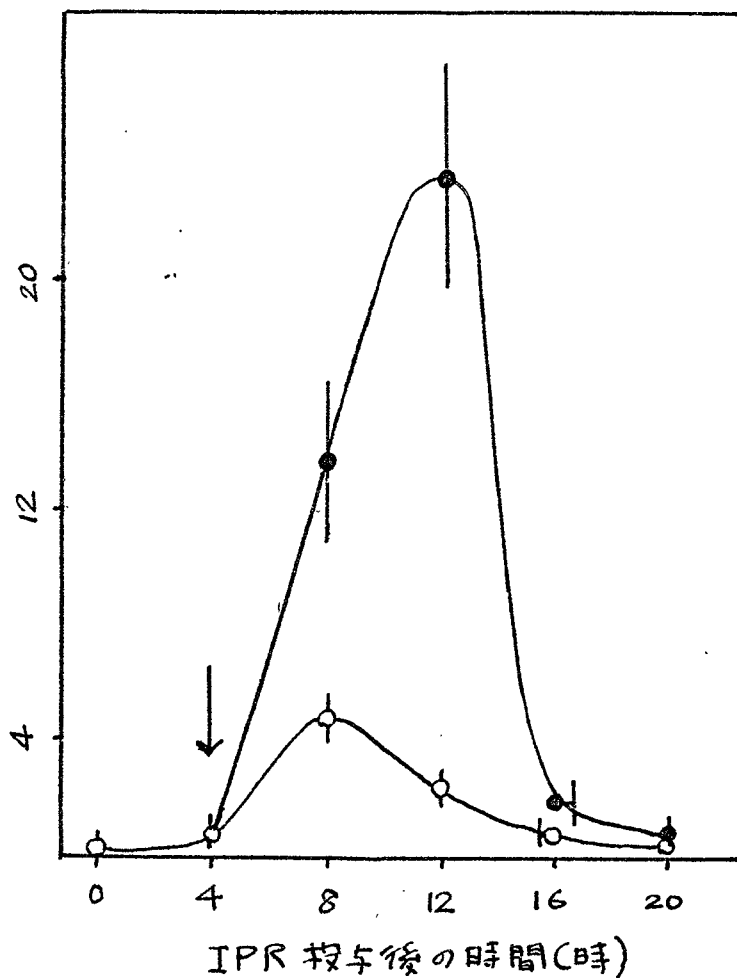


図 7

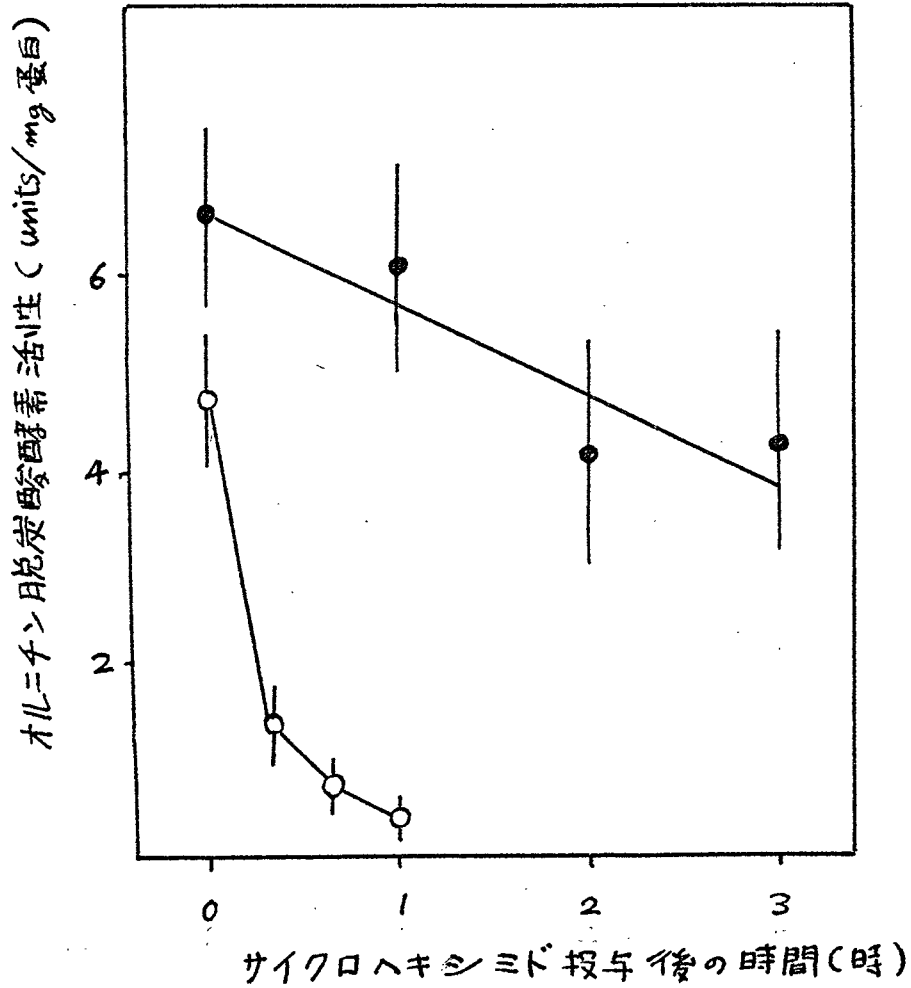


表 1

酵素	DL-HAVA の濃度 (mM)	% 阻害
オルニチンカルバミル トランスフェラーゼ	1	0
ヒスチジン脱炭酸酵素	0.025	0
	0.1	17
G P T	0.025	0
	0.1	9
G O T	0.025	0
	0.1	7
S-アデノシルメチオニン 脱炭酸酵素	0.1	0

表 2

処置	オルニチンレベル		プロレツシン形成量		
	($\mu\text{moles/g}$ 組織)	(DPM/nmole)	(DPM/mg 組織)	(nmole/g 組織)	(%)
生理食塩水	0.344 ± 0.043	1743 ± 378	< 10	< 5	
I P R	0.598 ± 0.054	1088 ± 88	430 ± 83	395 ± 76	100
I P R + DL-HAVA	0.519 ± 0.059	1678 ± 251	178 ± 43	106 ± 26	27

表 3

処置	7°トレッシンレベル		スperlミジン 形成量	
	(nmole/g 組織)	(DPM $\times 10^3$ /nmole)	(DPM $\times 10^3$ /g 組織)	(nmole/g 組織; %)
生理食塩水	110 \pm 13	39.23 \pm 7.81	911 \pm 92	24.4 \pm 7.3
I P R	714 \pm 110	5.31 \pm 0.88	793 \pm 115	146.5 \pm 29.6 100
I P R + D L + H A V A	409 \pm 41	12.28 \pm 1.48	1640 \pm 104	131.4 \pm 28.5 90

表 4

IPR投与後 の時間(時)	スパールミジン (n moles/g 組織)		スパールミン (n moles/g 組織)	
	IPR	IPR + DL-HAVA	IPR	IPR + DL-HAVA
0	2767 ± 100		906 ± 69	
4	2641 ± 214		920 ± 94	
6	2256 ± 144	2107 ± 169	941 ± 89	920 ± 49
8	2446 ± 196	2487 ± 130	889 ± 109	883 ± 64
12	3350 ± 234	3174 ± 174	826 ± 123	820 ± 151
16	3240 ± 150	3030 ± 153	768 ± 17	727 ± 36
20	2936 ± 144	2836 ± 145	720 ± 83	749 ± 66
24	2884 ± 241	2683 ± 192	702 ± 70	691 ± 30

表 5

IPR投与後 の時間(時)	酵素活性 (units/mg 蛋白)	
	I P R	I P R + DL-HAVA
0	0.088 ± 0.008	
8	0.540 ± 0.075	0.525 ± 0.111
12	0.592 ± 0.054	0.627 ± 0.116
16	0.374 ± 0.039	0.460 ± 0.031

表 6

処置	IPR投与後 の時間(時)	皮下腺重量	
		mg / マウス	%
生理食塩水	24	44.8 ± 4.7	100
IPR	24	66.8 ± 4.8	149
IPR+DL-HAVA	24	53.1 ± 5.1	119
生理食塩水	48	48.1 ± 5.0	100
IPR	48	96.2 ± 6.7	200
IPR+DL-HAVA	48	71.2 ± 5.8	148

表 7

処 置	DNA合成(DPM $\times 10^{-3}$ /mg DNA)	細胞分裂指数(%)
	20*	30*
生理食塩水	2.3 \pm 0.6	< 0.01
IPR	63.9 \pm 14.3	0.40 \pm 0.07
IPR+DL-HAVA(4)**	5.4 \pm 3.4	0.19 \pm 0.05
IPR+DL-HAVA(4)**	70.3 \pm 11.6	

表 8

処置	投与量 (mmoles/kg 体重)	DNA合成' (20)* (DPM $\times 10^{-4}$ /mg DNA)	耳下腺重量(24)* (mg/マウス)
生理食塩水	0	0.23 \pm 0.06	44.8 \pm 4.7
I PR	0	6.39 \pm 1.43	68.5 \pm 7.3
I PR + DL-HAVA	0	0.54 \pm 0.34	52.1 \pm 4.3
I PR + DL-HAVA + 7 α -L α -シ	0.25	3.82 \pm 0.88	
〃	0.5	3.83 \pm 1.11	64.4 \pm 8.2
〃	1.0	2.25 \pm 0.33	
〃	2.5	0.44 \pm 0.39	
生理食塩水 + 7 α -L α -シ	0.5	0.24 \pm 0.20	
I PR + 7 α -L α -シ	0.5	6.19 \pm 1.08	
I PR + DL-HAVA + 1,7-ジ α -N α -シ	0.25	0.81 \pm 0.17	

表 9

処置	IPR投与後 の時間(時)	RNA 合成 ($\text{DPM} \times 10^{-4} / \text{mg RNA}$)	
		in vivo	in vitro
生理食塩水		0.51 ± 0.04	1.92 ± 0.60
IPR	12	3.89 ± 0.41	5.88 ± 1.33
IPR + DL-HAVA	12	3.38 ± 0.70	6.08 ± 1.02