

**<講演抄録>2. 耳下腺細胞からのアミラーゼ遊離に及ぼすカルシウムとEGTAの効果(東日本学園大学歯学会第6回学術大会(昭和62年度総会))**

著者名(日)	相良 りか子, 松井 聡子, 東城 庸介
雑誌名	東日本歯学雑誌
巻	7
号	1
ページ	42-43
発行年	1988-06-30
URL	<a href="http://id.nii.ac.jp/1145/00007350/">http://id.nii.ac.jp/1145/00007350/</a>

## 一 般 講 演

### 1. ラット耳下腺遊離細胞を用いた局所麻酔薬の細胞毒性試験の試み

内田雅巳, 東城庸介, 松本仁人  
(歯科薬理)

局所麻酔薬はラット耳下腺遊離細胞からのアミラーゼ溶出を引き起こす。細胞のトリパンブルー染色性や乳酸脱水素酵素 (LDH) の溶出が増大することから, この作用は薬物の細胞膜毒性によると思われる。

今回, 耳下腺細胞を用いた毒性試験確立のための基礎的知見を得るため, ラットの耳下腺細胞からのアミラーゼ溶出に対する各種局所麻酔薬の効果を *in vitro* で調べ, 従来から知られている毒性や麻酔効力と比較した。局所麻酔薬としては, コカイン, プロカイン, リドカイン, テトラカイン及びジブカインを用いた。

1. ジブカインは 1 mM 以上で, テトラカインは 2.5mM 以上で, 顕著なアミラーゼ溶出増加を引き起こした。
2. コカイン, リドカインは 10~20mM, プロカインは 20~40mM で溶出をひき起こしたが, その程度は低かった。
3. 各局所麻酔薬のアミラーゼ溶出能は, ジブカイン > テトラカイン > コカイン  $\geq$  リドカイン > プロカインの順であった。これは, LD<sub>50</sub> 値に基づく毒性試験の結果

とよく一致する。

4. pH の上昇に伴ない, アミラーゼ溶出増加の傾向がみられたことから, 局所麻酔薬の非イオン型が細胞毒性を起こすものと思われる。

今回の実験は, 局所麻酔薬の毒性を知る為の新しい試験法の試みであり, まだ予備実験の段階である。この方法では各種局所麻酔薬のおおまかな毒性を知る事は可能だが, 正確に定量化する事は困難だと思われる。今後, 更なる実験と検討が必要であろうと考える。

質 問 田隈 泰信 (口腔生化)

1. 毒性のメカニズムをどうお考えか。
2. Ca-free 液で毒性チェックをしましたか。

テトラカインは Ca transport を変化させるので, 局所麻酔薬の究極の毒性は Ca の流入によるのではないか。

回 答 内田 雅巳 (薬理)

1. 現在のところ, 細胞膜に対する直接的な障害と考えます。
2. Ca-free 系では検索しておりません。

### 2. 耳下腺細胞からのアミラーゼ遊離に及ぼすカルシウムと EGTA の効果

相良りか子, 松井聡子, 東城庸介  
松本仁人 (歯科薬理)

ラット耳下腺からのアミラーゼ分泌は主に交感神経の  $\beta$ -受容体刺激により促進され, その際の細胞内セカンドメッセンジャーは, サイクリック AMP (cAMP) であると考えられている。しかし, Ca<sup>2+</sup>の重要性を指適する研究者も多く, 必ずしも充分には解明されていない。そこで, 我々はアミラーゼ分泌過程における Ca<sup>2+</sup>の意義を検索するため外液 Ca<sup>2+</sup>と Ca キレート剤のアミラーゼ分泌に対する影響をラット耳下腺細胞を用いて *in vitro* で調べた。

結果: 耳下腺細胞を Ca 無添加ハンクス液にサスペンションし, Ca キレート剤 EGTA (2 mM) あるいは CaCl<sub>2</sub> (50  $\mu$ M - 1 mM) で 30 分間処置した。続いて 1  $\mu$ M

イソプロテレノール (Iso) で分泌刺激したところ, EGTA 前処置したものは前処置なしに比べアミラーゼ分泌量は有意に減少した。逆に CaCl<sub>2</sub> で前処置したものは分泌が著しく促進された。アミラーゼ分泌の増強効果は, わずか 50  $\mu$ M CaCl<sub>2</sub> で前処置することにより誘起され, 0.25 mM でほぼ最大の分泌量に達した。刺激薬として 1 mM ジブチリル cAMP (DBcAMP) を用いた場合も, EGTA 前処置でアミラーゼ分泌は減少し CaCl<sub>2</sub> 前処置で有意に促進された。次に, 細胞膜を容易に透過し細胞内の Ca<sup>2+</sup> をキレートすると考えられている BAPTA-AM (100  $\mu$ M) の効果を調べた。30 分間 BAPTA-AM で前処置したところ, Iso あるいは DBcAMP 刺激によるアミラー

ゼ分泌は有意に減少した。一方、細胞膜を透過できない BAPTA 中での前処置は、アミラーゼ分泌量にほとんど影響を与えなかった。以上の結果より、交感神経の  $\beta$ -受容体を介する耳下腺アミラーゼ分泌には、cAMP だけではなく、 $\text{Ca}^{2+}$  が何らかの重要な役割を果たしているものと思われる。Iso と DBcAMP のいずれの刺激分泌とも、 $\text{Ca}^{2+}$  やキレート剤により影響を受けたことから、 $\text{Ca}^{2+}$  は cAMP 生成系以外の分泌過程に関与しているのかもしれない。

**質問** 小田島武志 (口腔生化)

- ① EDTA でお調べになられたか。
- ②  $\text{Ca}^{2+}$  のかわりに  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  などの 2 価の陽イオンの影響をお調べになったことはありますか。
- ③ 細胞外液の  $\text{Ca}^{2+}$  が取り除かれるので、平衡がずれて、細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度は結果的に減少するのではないので

しょうか。

- 回答** 相良りか子 (薬理)
- ① EDTA は  $\text{Ca}^{2+}$  の他に  $\text{Mg}^{2+}$  とのキレート能が高いため、使用しませんでした。
  - ②  $\text{Ca}^{2+}$  がアミラーゼ分泌に影響を与えているといわれ、 $\text{Ca}^{2+}$  を実験目的としているので、調べたことはありません。
  - ③ 当然、そういうことは考えられると思います。

**質問** 日景 盛 (補綴II)  
耳下腺遊離細胞は何代目まで分離培養をしたのでしょうか。

**回答** 相良りか子 (薬理)  
培養は使っていません。  
ラット耳下腺細胞をそのまま使用しました。

### 3. ヒト唾液ムチン画分中の脂肪酸について

石塚祐司, 市田篤郎 (口腔生化)

ヒト唾液中の糖タンパク質については、種々な特性をもつものが分離され、それらの生理的意義も明らかにされつつある。脂質の結合は、これらの糖タンパク質の物理化学的特性に、大きな影響を与えるものと考えられるが、その存在についての報告は殆んどされていない。

我々はヒトムチン画分中に脂質が微量成分として存在していることを明らかにするために、脂肪酸分析を行った。すなわち、細胞成分の混入を避けて得たヒト唾液約 500ml を酸性エタノール処理により、ムチン画分を沈澱させ同法を繰り返した後、透析、凍結乾燥により精製ムチン約 0.09g を得た。このムチンをメタノリシス後、クロロホルムにより抽出して常法によりガスクロマトグラフィによる分析を行なった。今回の分析によりムチン画分にエステル結合した脂肪酸が、微量ながら存在する事を示す事が出来た。

同定された脂肪酸は  $\text{C}_{14}$  ミリスチン酸,  $\text{C}_{18-1}$  オレイン

酸,  $\text{C}_{18}$  ステアリン酸で未確認ではあるが,  $\text{C}_{16}$  パルミチン酸と思われる脂肪酸も検出された。 $\text{C}_{18-2}$  のリノール酸については今回は検出されなかった。

この結果、全脂肪酸含量はムチンの 0.13% と算定された。

脂肪酸の糖タンパク質における分布、生理的意義については、今後検討を進めたい。

**質問** 田隈 泰信 (口腔生化)  
ムチンには脂質結合能があると考えていますか。それとも合成段階で結合したと考えていますか。

**回答** 市田篤郎 (口腔生化)  
ムチンのコアタンパク質のセリンや、スレオニン残基の -OH との結合の可能性が最も考えられると思いますが、この場合でしたら合成段階ということになります。しかしタンパク質と比較的弱い結合でついている可能性も除外はできません。