

るのではないかと考えている。

#### 14. $^{32}\text{P}$ で誘発したラット骨肉腫由来の培養細胞(MSK)における PTH による cAMP 量の変化

秋月一城, 佐藤研一, 藤村真示\*  
(千葉大医・歯口外, 生化学 I\*)

われわれは, F-344ラット腹腔内への $^{32}\text{P}$  投与により骨肉腫を誘発させ, in vivo で継代するとともに培養細胞系へ移行して樹立した MSK 細胞の各種骨代謝調節ホルモンに対する応答性について検討してきた。本細胞はヒト副甲状腺ホルモン (hPTH (1-34) peptide: 以下 PTH と略す) に対し著しい応答性を有する。骨芽細胞の PTH に対する応答として, 細胞内 cAMP 量の増加あるいは Alkaline Phosphatase 活性の抑制が挙げられるが, 今回は cAMP 量の変化について報告する。細胞内 cAMP 量は  $1 \times 10^{-8}\text{M}$  の PTH 添加後 5 分で最大値を示し, 無添加対象の約 140 倍に増加することがわかった。また, あらかじめ  $1 \alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$  を添加した培地中で 6 時間以上培養した細胞に PTH を添加した場合の細胞内 cAMP 量の増加は  $1 \alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$  で処理しない場合の

約 50% に抑制されていた。これらのことは従来報告されている骨芽細胞様骨肉腫培養細胞の特性に近似しており, MSK 細胞が骨芽細胞様の特性を有する骨肉腫培養細胞であることが示唆された。この PTH による細胞内 cAMP 量の増加に, Tyrosine Kinase の特異的阻害剤 ST638 添加により変化が認められた。細胞内 cAMP 量は PTH と ST638 を共存させることにより, PTH 単独添加による上昇のさらに約 3 倍に増加する。この時, MSK 細胞膜画分の adenylate cyclase 活性も上昇していることがわかった。また, MSK 細胞の Tyrosine Kinase 活性は ST638 細胞レベルに添加する処理, あるいは膜画分レベルに添加する処理, いずれの場合も抑制された。これらのことから MSK 細胞に対する PTH の作用発現の一部に Tyrosine Kinase の関与が示唆された。

#### 15. DMBA 塗布によるハムスター頬嚢粘膜上皮の細胞増殖と細胞表現形質

—とくにケラチンについて—

大内知之, 中出 修, 関智香子  
菅野秀俊, 阿部英二, 八重樫和秀  
賀来 亨, 奥山富三, 小田真理子\*  
(口腔病理, 薬・生化学\*)

細胞骨格を構成する細胞内線維性構造物のうちの, 中間 (径) フィラメント (IF) のひとつであるケラチンは, 種々の上皮細胞に幅広く分布し, その種類は組織・細胞により異なり, また発生や分化過程によっても含まれるケラチンの種類は微妙に変化していると言われている。われわれはこれまでに, ハムスター頬嚢における前癌, 癌病変についての組織化学的および免疫組織化学的検索に加え, これらの病変におけるケラチンの分布と細胞増殖との関連について検討した。

実験動物, は 0.5%DMBA ミネラルオイル溶液を週 2 回頬嚢に塗布した, 6 週間の雄, G・ハムスターを用い, 適時屠殺し, 冷アセトン固定, 軟パラフィン包埋し連続切片とした。抗体はヒト全ケラチンに対するポリクロ-

ナル抗体 (TK) 及び, プタ腎上皮細胞由来の PKK 1, PKK 2 モノクローナル抗体にてケラチンの局在を, また, 細胞増殖の解析には抗 BrdU 抗体を使用し免疫組織化学染色を行なった。(ケラチン・モノクローナル抗体についてはトリプシンの短時間処理を行なった。) その結果, ① TK では前癌, 癌病変において染色性の低下が認められた。② TK によるケラチン染色の弱い部分では, BrdU でラベルされた S 期細胞の増加が認められた。③ 基底細胞層に染色性の認められる PKK 1 は基底細胞様細胞の増殖を示す異形成のある病変で, 強い染色性を示しその部位には BrdU の取り込みの増加が認められた。④ PKK 1 抗体によるケラチンの局在は, 細胞増殖のある細胞部分に認められ, 細胞増殖とよく相関し, 細胞表

現形質と細胞能を検索するのに有効なマーカーと思われた。⑤ PKK 2 は, PKK 1 より上層において局在が認められ, 細胞増殖能との相関は認められなかった。⑥冷ア

セント固定・軟パラフィン包埋切片を用いる場合, 短時間でのトリプシン処理は PKK 1, PKK 2 の免疫組織化学染色では非常に有効と思われた。

## 16. ヒト混合唾液中の酵素活性

— 歯口清掃状態との関連について —

脇坂仁美\*, 上田五男\*, 磯貝恵美子\*

三浦宏子\*, 井藤信義\*, 藤井健男\*\*

石井克枝\*\*, 小鷲悠典\*\*, 星 和明\*\*\*

猪股孝四郎\*\*\*

(口腔衛生\*, 歯科保存 I \*\*口腔生理\*\*\*)

〈目的〉 混合唾液中の19種類の酵素活性を測定し, 歯口清掃状態との関係およびその由来について検討した。

〈方法〉 歯学部有志学生に7日間の歯口清掃の中止を指示し, 清掃中止前と中止後の混合唾液上清中の酵素活性を測定した。また, 歯科外来初診患者の混合唾液上清中の酵素活性を測定した。さらに, 耳下腺唾液, 顎下腺唾液, 血清, 多形核白血球, 混合唾液沈渣, 唾液細菌の酵素活性を測定した。酵素活性の測定には簡易迅速酵素活性測定システム (API ZYM システム) を使用した。

〈結果および考察〉 混合唾液上清中のトリプシンやシ

スティン・アミノペプチターゼなどの活性は7日間の歯口清掃の中止後や外来初診患者で認められたのに対して, 良好な歯口清掃状態の者では認められなかった。また, これらの活性は混合唾液沈渣や唾液細菌に認められたのに対して, 耳下腺唾液, 顎下腺唾液, 血清, 多形核白血球には認められなかった。これらの結果から, 主に唾液細菌に由来していることが示唆された混合唾液上清中のトリプシンやシスティン・アミノペプチターゼの活性が歯口清掃状態を評価する指標となる可能性が示唆された。

## 17. ヒト唾液ムチン画分中における脂肪酸について 第2報

石塚祐司, 市田篤郎 (口腔生化学)

前回の本学会で, われわれはヒト唾液ムチン画分中に結合した脂肪酸が GLC によって検出される事を報告した。

この脂肪酸が唾液タンパク質のどのような画分に結合しているのかを明らかにするために今回の実験を行なった。

約500g, 12週齢, オスのウィスター系ラットにエーテル導入麻酔, ネンプタール全身麻酔下で<sup>14</sup>C パルミテート約50 $\mu$ Ci を Na 塩として, またはフリーの形でイソプロピレングリコール溶液としてラット股静脈より注入し, 直ちに塩酸ピロカルピンで唾液分泌を刺激して得られる混合唾液を, パスツールピペットを用いて<sup>14</sup>C パルミテート注射後約1時間採取した。この採取した唾液の一部を液体シンチレーションカウンター (LSC-900) で計測し, 他をディスクタイプのポリアクリルアミドゲル

泳動により電気泳動を行なった。

この泳動後のゲルを Fuji Type100 中感度 X 線フィルムに密着させて24時間感光し, オートラジオグラフィーを行なった。

ラット唾液中には約3650dpm/ml の放射活性が回収され, これは50 $\mu$ Ci 注入した放射能からラット唾液 1 ml 中に, 約0.2%が回収された事を示す。

このラット唾液を用いたディスクタイプポリアクリルアミドゲル泳動後のオートラジオグラフィーでは, マイナス極側約1/4のところに著明な巾広い放射活性を認め, 又, プラス極側約1/5の所にややシャープな2本の放射活性のバンドが認められた。

脂肪酸結合タンパク質の推定分子量, 血清アルブミンとの異同等についてはさらに検索を進める予定である。