

〔原 著〕

Percoll遠心分離法によるラット顎下腺導管細胞の単離

根津 顕弘, 谷村 明彦, 東城 庸介

北海道医療大学歯学部歯科薬理学講座

(主任: 東城 庸介教授)

Isolation of rat submandibular ductal cells by Percoll centrifugation

Akihiro NEZU, Akihiko TANIMURA and Yosuke TOJYO

Department of Dental Pharmacology, School of Dentistry,
Health Sciences University of Hokkaido

(Chief: Prof. Yosuke TOJYO)

Abstract

Ductal cells were purified by Percoll centrifugation after collagenase digestion of rat submandibular glands. After centrifugation, the cells were separated into two distinct fractions. A cell fraction obtained from the interphase of the centrifuge tube contained predominantly duct-like tubular structures, while the acini sedimented to the bottom. The ductal fraction was highly enriched in kallikrein, a ductal maker. To test the functional integrity of the prepared ductal cells, the effects of the membrane receptor agonists on intracellular free calcium concentration ($[Ca^{2+}]_i$) were examined using the Ca^{2+} fluorescent indicator fura-2. Stimulation with carbachol, phenylephrine or isoproterenol increased significantly $[Ca^{2+}]_i$ in the ductal cells. These results indicate that the Percoll centrifugation may be used to isolate ductal cells after digestion of submandibular glands.

Key words: Submandibular gland, Ductal cell, Aciner cell, Intracellular Ca^{2+} concentration.

緒 言

唾液腺は分泌物を生成・放出する腺房細胞と

分泌物を口腔へと輸送する導管細胞から構成されている。導管細胞系は分泌物を輸送する単なる通路ではなく、導管細胞自体がカリクレイン

受付: 平成12年3月30日

や成長因子などのタンパク質分泌能, Na^+ 再吸収などの電解質輸送能を有しており, 腺房細胞から放出された原唾液は導管を通過する際に大きくその組成を変化させることが知られている^{1,2)}. 導管細胞には α -, β -アドレナリン受容体, ムスカリン受容体などの種々の受容体が存在することから, 導管細胞におけるタンパク質分泌や電解質輸送は, 腺房細胞における分泌調節と同様, 自律神経系による調節を受けていると考えられている^{1,2)}.

1970年代にコラゲナーゼやトリプシン等の消化酵素を用いて唾液腺細胞を単離調製する方法が開発され, 唾液腺細胞における情報伝達機構は飛躍的に進歩した. しかし, この方法により調製された細胞の大部分 (80-95%) が腺房細胞であり³⁾, 得られた実験結果は腺房細胞の細胞応答を反映していると考えられている. 導管細胞のみの調製は技術的に困難であるため, 導管系の情報伝達機構の研究は, 腺房細胞に比べて非常に遅れている.

近年, Percollを用いた遠心分離法によりラット顎下腺の導管細胞を単離・調製する方法が報告された⁴⁻⁶⁾. 精製された導管細胞標本を得ることは, 導管系における分泌調節機構や情報伝達機構を解明する上で, 極めて有用である. 本研究ではPercoll遠心分離法によるラット顎下腺導管細胞の単離を試み, この分離法の有効性を明らかにするとともに, 調製された細胞のアゴニストに対する反応性を調べた.

材料と方法

1) 顎下腺導管細胞の調製

動物実験は「北海道医療大学動物実験の指針」に従って行った. 実験動物には, 生後8~10週令のWistar-ST系雄性ラット (体重200-300 g) を用いた. ラットは金属製飼育箱内で, 固形飼料MF (オリエンタル酵母工業) と水道水を自由に与えて飼育した. ラット顎下腺導管細胞の調

製手順を図1に示す. ラットをエーテル麻酔下で屠殺し, ただちに顎下腺を摘出した. 屠殺は午前10~11時に行った. 摘出した顎下腺は, 氷冷下にて眼科用ハサミを用いて5分間十分に細切した後, 1.57U/mlコラゲナーゼP (Boeringer Mannheim), 2.0mMグルタミン酸および0.2%ウシ血清アルブミン (BSA) を含むDulbecco's Modified Eagle Medium 20ml中に懸濁し, 37°C恒温槽中にて振とうしながら20分間酵素処理を行った. 酵素処理開始後10分および20分で5 mlのガラスピペットを用いて20回ピペッティングを行い, 組織片を十分に攪拌した. 酵素処理終了後, ただちにナイロンメッシュにて濾過し, 組織片を除いた後, 4°C, 400 gで5秒間遠心分離して濾液中の細胞を集めた. 上清を除いた後, 0.2%BSAを含む20mMのHEPESで緩衝化したHanks' balanced salt solution (HBSS-H) 20mlを加え, 細胞を再懸濁した後, 4°C, 100 gで1分間の遠心分離を行った. 同様の操作を2回行い, コラゲナーゼPを完全に除去した. さらにBSAおよび Ca^{2+} を含まないHBSS-Hで細胞を2回洗浄し, 最終的にBSAと Ca^{2+} を含まない6 mlのHBSS-Hに懸濁した.

顎下腺腺房細胞と導管細胞との分離はDehayeら⁶⁾の改良した方法に従って行った. 40% Percollを含む等張化した Ca^{2+} -free HBSS-Hを6 mlずつ, 15mlのポリエチレン遠心管に分注し, 先に調製した顎下腺細胞懸濁液を3 mlずつ40%Percollを含むHBSS-Hの上部に層状になるように注入した (図1 A). 分注後4°C, 4,000 gで10分間遠心分離を行なった. 遠心後, 細胞は遠心管の中位置に留まった細胞層と遠心管の底部に沈降した細胞層に分離した (図1 B). それぞれの細胞層を丁寧に採取し, Percollを含まないHBSS-Hに再懸濁した. 4°C, 400 gで1分間の遠心分離により細胞を集め, 上清を除いた後, 細胞をBSAと Ca^{2+} を含むHBSS-Hに再度懸濁した. この洗浄操作を2回繰り返す, 最終

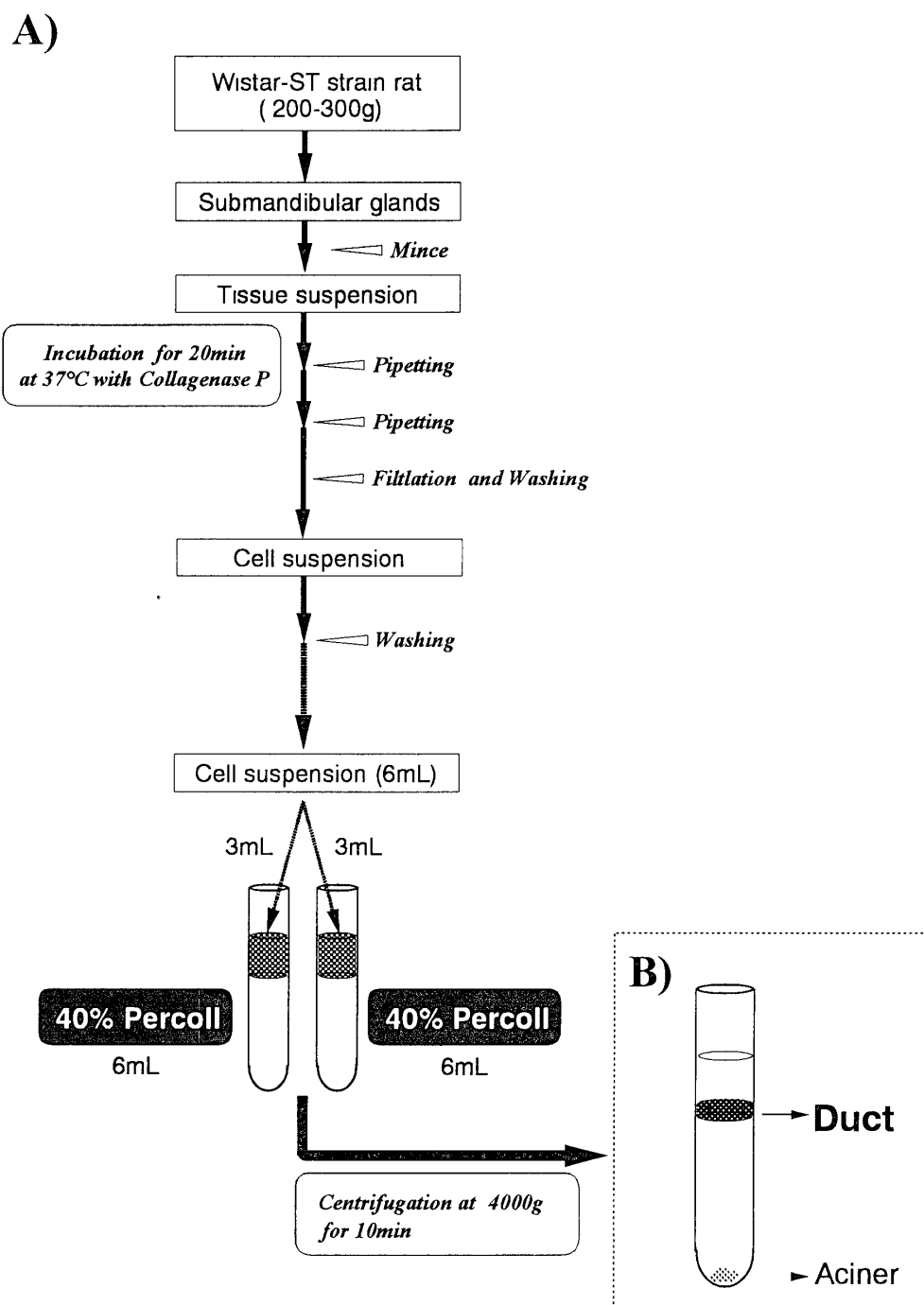


Fig. 1 Procedure for isolation of rat submandibular ductal cells.

(A) Preparation of submandibular digest. (B) Two distinct fractions (ducts and acini) separated by the Percoll centrifugation.

的な細胞懸濁液を調製した。

2) カリクレイン活性測定

細胞をポリトロンホモジナイザーでホモジナイズし、遠心分離後、その上清をカリクレイン

活性の測定に用いた。カリクレイン活性測定は Geiger らの方法⁷⁾に従って行った。上清400 μ lを比色定量測定用セルに入れ、それに0.5M Tris 緩衝液 (pH=8.5) 100 μ lを加えてサンプルのpHを調整した。発色基質である2.0mg/ml N α -ベン

ゾイル-DL-アルギニン-*p*-ニトロアリニド塩酸塩(和光純薬)を200 μ l加えて攪拌し、ただちに日立分光光度計(U-2000:日立)にて405nmの吸光度を経時的に10分間測定した。

3) タンパク定量

タンパク質の定量は、BSAをスタンダードとしてBio-Radタンパク質測定キットを用いて行った。

4) 細胞内遊離カルシウム濃度([Ca²⁺]_i)測定

カルシウム蛍光指示薬であるfura-2/AM (2 μ M)(同仁科学研究所)を含むHBSS-Hに細胞を懸濁し、室温にて30分間、低速で振とうしながら細胞内にfura-2を取り込ませた。fura-2を含まない新しいHBSS-Hで2回細胞を洗浄して細胞外のfura-2を除去した後、細胞懸濁液を[Ca²⁺]_i測定の実験に供した。Fura-2の蛍光強度は、日立蛍光光度計(F-2000:日立)を用いて測定した。細胞懸濁液の一定量を蛍光光度測定用の石英セルに注入し、37°Cで連続的に攪拌しながら励起波長340nmと380nmによって発生する540nmの蛍光強度を1秒間隔でモニターした。[Ca²⁺]_iは、Grynkiewiczらの方法⁸⁾に従い、340nm/380nmの蛍光比から算出した。

結 果

1) 光学顕微鏡観察

Percoll濃度勾配法により分離調製した細胞サンプルを光学顕微鏡を使って観察した。図2に遠心管の上部から採取した細胞群(A)と遠心管の底部から採取した細胞群(B)の光学顕微鏡写真を示す。A細胞群は特徴的な管状構造を有する導管様の細胞を多く含んでいたのに対し、B細胞群には5-10個の細胞が塊状に集合した腺房様の構造が多く見られた。

2) カリクレイン活性測定

顎下腺の導管細胞はプロテアーゼの一種であるカリクレインを多く含んでいる事が知られている⁹⁾。一方、腺房細胞のカリクレイン活性は確認されていない。そこで、導管細胞が主にA細胞群に存在している事を示すために、分離した細胞群ごとにカリクレイン活性を測定し、A細胞群、B細胞群および遠心分離前の細胞群との活性の違いを比較した。

「材料と方法」で記述したようにカリクレインの発色基質N α -ベンゾイル-DL-アルギニン-*p*-ニトロアリニド塩酸塩を細胞ホモジネートの上清サンプルに添加し、直ちに発色変化を分光光度計を使って経時的にモニターした。図3Aに典型的な測定結果を示す。A細胞群の上清サンプルを添加した場合、添加600秒まで急速な発色上昇が見られた。B細胞群サンプルの添加あるいは遠心分離前の細胞サンプルの添加の場合も発色上昇が見られたが、その程度はA細胞群の上清添加の場合よりかなり緩やかであった。

各サンプルのカリクレイン活性を比較するため、測定開始300秒での吸光度を算出し、0秒からの上昇分を便宜的に各サンプルの相対的なカリクレイン活性とした(図3B)。各サンプルの細胞数は必ずしも一定ではないので、各サンプルのタンパク量を測定し、その値に基づいて活性値を補正した。こうして算出したA細胞群のカリクレイン活性は遠心分離前の2.3倍、B細胞群の4.5倍であった。

3) 受容体アゴニストに対する導管細胞の反応性

ラットの顎下腺導管細胞には、 α -、 β -アドレナリン受容体、ムスカリン受容体など、様々な受容体が存在している事が知られている^{1,2)}。今回の分離法で調製した導管細胞が受容体アゴニストに対する反応性を保持しているかどうかを

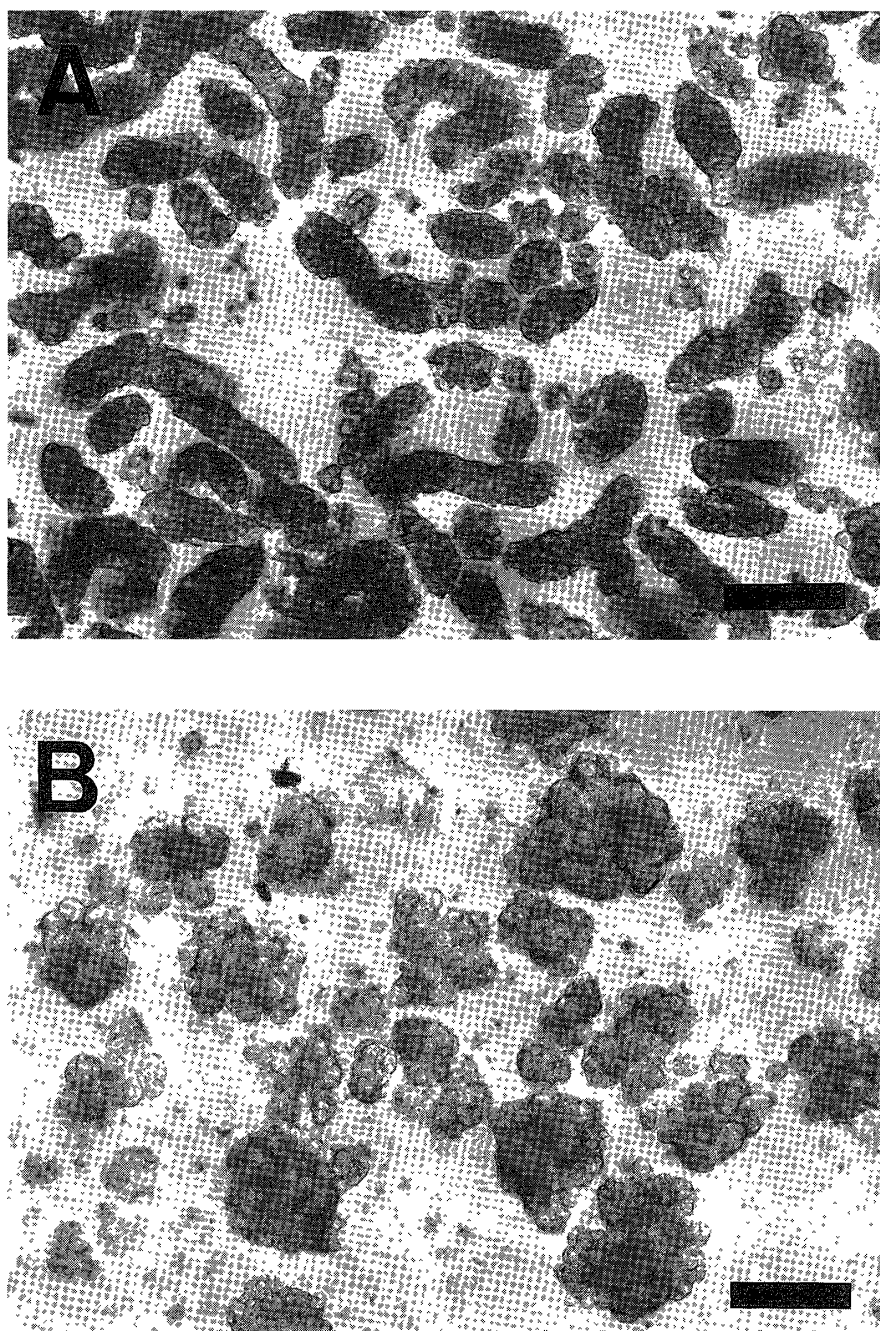


Fig. 2 Light micrographs of the upper fraction (A) and bottom fraction (B) obtained from the Percoll centrifugation.
The scale bar indicates 500 μ m.

確認するため、アゴニスト刺激による細胞内カルシウム濃度 ($[Ca^{2+}]_i$) の変化を調べた。

Fura-2を取り込ませた導管細胞 (A細胞群) をムスカリン受容体アゴニストであるカルバコール (CCh) あるいは α -アドレナリン受容体アゴニストであるフェニレフリン (PhL) の10

μ Mで刺激したところ、 $[Ca^{2+}]_i$ の速やかな上昇が見られた (図4 A, B)。また、 β -アドレナリン受容体アゴニストであるイソプロテレノール (ISO) の10 μ Mは、CChやPhLよりは弱い、有意な $[Ca^{2+}]_i$ 上昇作用を起こした (図4 C)。高濃度のISOは弱い α -アドレナリン受容体刺

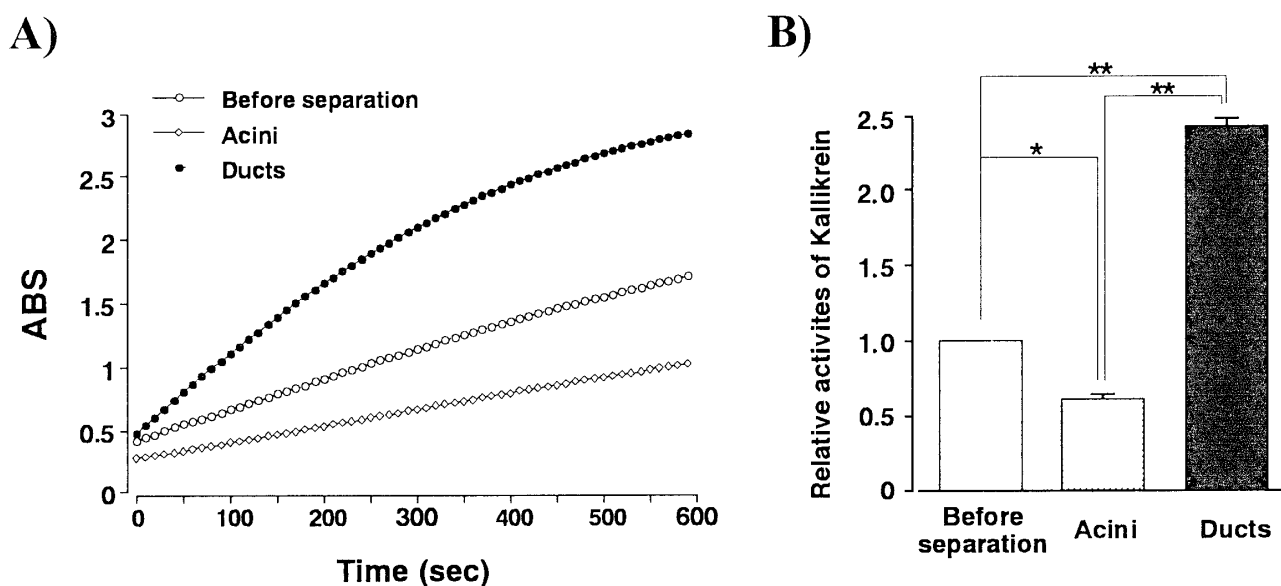


Fig. 3 Activities of kallikrein in the initial digest before isolation and in the two cell fractions obtained from the Percoll centrifugation.

(A) Time course of absorption at 405nm. (B) Relative activities of kallikrein determined as described in MATERIALS AND METHODS. Values are mean \pm SE of 7 experiments. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ (Student-*t* test)

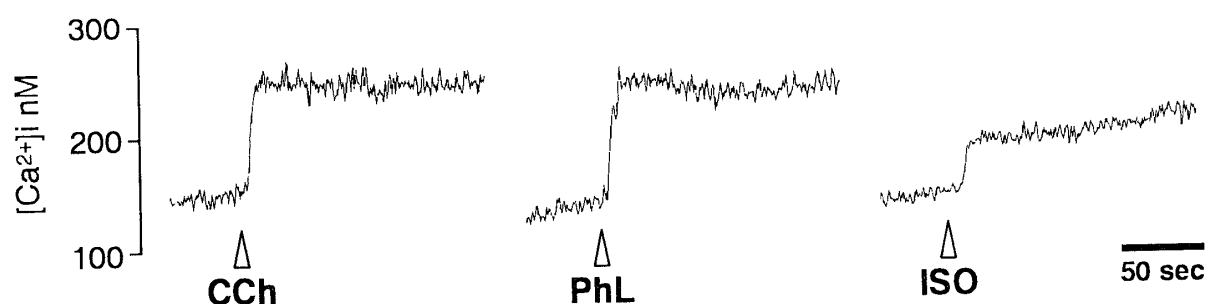


Fig. 4 Effect of membrane receptor agonists on intracellular Ca^{2+} concentration ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) on submandibular ductal cells

Isolated ductal cells were stimulated with $10\mu\text{M}$ carbachol (CCh), $10\mu\text{M}$ phenylephrine (PhL) and $10\mu\text{M}$ isoproterenol (ISO). The agonists were added to the fura-2 loaded cells as indicated by arrowheads. These results are representatives of 6 experiments

Table 1 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ measured before and after stimulation with agonists.

Values are mean \pm SE of 6 independent preparations * $p < 0.001$, compared with the values before stimulation (Student-*t* test).

	$[\text{Ca}^{2+}]_i$ (nM)		ΔCa^{2+} (nM)
	Before stimulation	After stimulation	
$10\mu\text{M}$ CCh	167.1 ± 6.7	251.9 ± 12.1 *	84.8 ± 6.7
$10\mu\text{M}$ PhL	161.8 ± 7.1	240.4 ± 8.5 *	80.1 ± 6.2
$10\mu\text{M}$ ISO	167.7 ± 12.1	228.4 ± 16.1 *	55.4 ± 7.4

mean \pm S.E. (n=6), * $p < 0.001$ vs Before stimulation

激作用を有することが知られているので^{10,11)}, より低濃度(1 μ M)のISOで刺激したところ, 10 μ M刺激時よりもやや小さい $[Ca^{2+}]_i$ 上昇反応が見られた(data not shown).

6例の実験結果から得られた刺激前後の $[Ca^{2+}]_i$ 値および $[Ca^{2+}]_i$ 上昇量(ΔCa^{2+})を表1に示す. 今回の実験で分離調製された顎下腺導管細胞は受容体アゴニストに対して十分な反応性を保持していることを示していた.

考 察

Percollによる遠心分離法は比重の異なる細胞や細胞内小器官の分離法として広く用いられている. 今回の実験は, 腺房細胞と導管細胞の比重の違いを利用して導管細胞を分離・精製しようとする試みであり, 1991年にDehay⁴⁾によって初めて報告された. この方法は極めて注目すべき方法であるにも関わらず, Dehayのグループ以外にはほとんど試みられてはいない.

今回の実験で, 顎下腺細胞は遠心管の上部に留まる細胞層と遠心管の底部に沈降する細胞層に別れた. 光学顕微鏡像から判定して, 上部の細胞層は主に導管細胞からなり, 混在する腺房細胞は少数であった. 導管細胞が上部細胞層に多いことは, 上部細胞層のカリクレイン活性が底部細胞層の活性より4.5倍高いことによって確かめられた. しかし, Dehay⁴⁾は導管細胞分画と腺房細胞分画とのカリクレイン活性の差は16倍であると報告しており⁴⁾, 我々の結果と必ずしも一致しない. 今回の分離法は基本的にDehay⁴⁻⁶⁾に準じて行ったので, 不一致の原因は今のところ明らかではないが, 実験者の経験や熟達度が分離の精度に影響を与える可能性は十分考えられる.

本実験で調製された導管細胞は, コラゲナーゼ処理や比較的高速の遠心分離などの過程を経て精製された. 従って, 細胞が様々な傷害を受け, アゴニストに対する反応性を失っている可

能性がある. そこでイノシトールリン脂質代謝を介して Ca^{2+} 動員を起こす α -アドレナリン受容体アゴニストとムスカリン受容体アゴニストを作用させ, $[Ca^{2+}]_i$ 上昇を惹起するか否かを確かめた. 実験結果はいずれのアゴニストも導管細胞の $[Ca^{2+}]_i$ を有意に上昇させた. この結果は今回調製した導管細胞の α -アドレナリン受容体とムスカリン受容体はアゴニストに対する十分な反応性を保持していることを示している.

導管細胞の β -アドレナリン受容体を刺激すると $[Ca^{2+}]_i$ の上昇反応が惹起されることが知られている^{5,12)}. β -受容体を介する $[Ca^{2+}]_i$ 上昇反応は腺房細胞では見られない^{10,11,13)}. 本実験で調製した導管細胞は, 比較的低濃度のイソプロテレノールに反応して $[Ca^{2+}]_i$ の有意な上昇を起こした. この結果は, 調製された導管細胞が β -受容体アゴニストに対する反応性も十分保持している事を示している.

今回の研究から, 顎下腺導管細胞の精製にPercoll遠心分離法が極めて有効であることが明らかになった. この細胞を用いて導管系の調節機構を本格的に解析するには, 今後, Percollの濃度, 遠心管に注入するサンプル量, 遠心分離の回転数や時間などに改良を加え, より精度を上げる必要があるものと考ええる.

結 語

Percoll遠心分離法によりラット顎下腺導管細胞の単離・精製を試みた.

- 1) コラゲナーゼ処理により, 分散化した顎下腺細胞を40%Percollで遠心分離したところ, 遠心管の上部と底部の二層に分離した.
- 2) 光学顕微鏡観察の結果, 上部細胞群には特徴的な管状構造を持つ導管様細胞が多く見られた.
- 3) 導管細胞のマーカー酵素であるカリクレイン活性を測定したところ, 上部細胞群のカリクレイン活性は底部細胞群の4.5倍を示した.

- 4) 上部細胞群をカルバコール、フェニレフリンおよびイソプロテレノールで刺激すると、いずれのアゴニスト刺激によっても有意な $[Ca^{2+}]_i$ 上昇反応を示した。

以上の結果より、Percoll遠心分離法によって調製された上部細胞群は大部分が導管細胞である事が示された。得られた導管細胞は、受容体刺激に対して十分な反応性を保持していた。本分離法による導管細胞の調製は、導管系の情報伝達機構の解析に極めて有用である。

参考文献

1. Cook DI, Van Lennep EW, Roberts ML et al : Secretion by the major salivary glands. In Physiology of the Gastrointestinal Tract, Edited by Johnson LR, Raven Press, New York, 1994, 1061-1117.
2. Baum BJ: Principles of saliva secretion. *Ann NY Acad Sci*, **694**, 1993, 17-23.
3. Mangos JA, McSherry NR, Butcher F et al. : Dispersed rat parotid acinar cells I Morphological and functional characterization *Am J Physiol*, **229**, 553-559, 1975.
4. Dehaye JP and Turner RJ: Isolation and characterization of rat submandibular intralobular ducts *Am J Physiol*, **261**, C490-C496, 1991.
5. Dehaye JP, Valdez IH and Turner RJ: β -Adrenergic stimulation and cAMP mobilize Ca^{2+} from an IP_3 -insensitive pool in rat submandibular granular ducts. *Am J Physiol*, **265**, C1356-C1362, 1993.
6. Amsallem H, Metioui M, Abeeel VA et al. : Presence of a metabotropic and an ionotropic purinergic receptor on rat submandibular ductal cells *Am J Physiol*, **271**, C1546-C1555, 1996.
7. Geiger R and Fritz H: Human urinary kallikrein. *Methods enzymol*, **80**, 465-492, 1981.
8. Grynkiewicz G, Poenie M and Tsien RY: A new generation of Ca^{2+} indicators with greatly improved fluorescence properties *J Biol Chem*, **260**, 3440-3450, 1985.
9. Simson JAV, Spicer SS, Chao J et al. : Kallikrein localization in rodent salivary glands and kidney with the immunoglobulin-enzyme bridge technique. *J Histochem Cytochem*, **27**, 1567-1576, 1979.
10. Tanimura A, Matsumoto Y and Tojyo Y: Evidence that isoproterenol-induced Ca^{2+} -mobilization in rat parotid acinar cells is not mediated by activation of β -adrenoceptors. *Biochim Biophys Acta*, **1055**, 273-277, 1990.
11. Tojyo Y, Tanimura A, Nezu A et al. : Activation of β -adrenoceptors does not cause any change in cytosolic Ca^{2+} distribution in rat parotid acinar cells. *Eur J Pharmacol*, **360**, 73-79, 1998.
12. Xu X, Diaz J, Zhao H et al. : Characterization, localization and axial distribution of Ca^{2+} signaling receptors in the rat submandibular salivary gland ducts. *J Physiol*, **491**, 647-662, 1996.
13. Hughes AR, Takemura H and Putney Jr JW: Does β -adrenoceptor activation stimulate Ca^{2+} mobilization and inositol trisphosphate formation in parotid acinar cells? *Cell Calcium*, **10**, 519-525, 1989.