

歯髓組織の Cyclic AMP の抽出法と測定法 に関する基礎的研究

石川市次郎

新潟大学歯学部歯科薬理教学室（指導：鈴木章俊教授）

（昭和54年11月16日受付）

Studies on the Methods for Extraction and Assay of Cyclic AMP
from the Tooth Pulp Tissue

Ichijiro ISHIKAWA

Department of Pharmacology, Niigata University School of Dentistry
(Director: Prof. Akitoshi Suzuki)

緒言

E. W. Sutherland は、肝臓の熱抽出物中に phosphorylase を活性化する物質を発見し、その本体が adenosine 3', 5'-cyclic monophosphate (cyclic AMP=以下 cAMP と省略) であることを明らかにした^{1,2)}。以来、この cAMP がホルモン作用における細胞内伝達物質として protein kinase をはじめとする酵素の活性化にあずかり、広く生物界において多彩な役割を演じていることが明らかにされてきた^{2,3)}。

副甲状腺ホルモン (PTH) と cAMP の関係では、副甲状腺摘出 (PTX) ラットに theophylline, または dibutyryl cAMP (DBcAMP) を投与することにより高 Ca 血症が生じた^{4,5,6)}。その後、PTH の骨吸収作用が DBcAMP によっても同様に起こることが認められた⁷⁻¹²⁾。また、PTH により骨の cAMP 濃度が急速に上昇することも明らかにされ^{8,11)}、PTH の作用に関して cAMP が細胞内の mediator として働いている可能性が強く示された¹⁴⁻¹⁶⁾。近年、Smith らは、PTH によって periosteum, osteoblast, osteocyte の cAMP レベルが増加することを報告した¹⁷⁾。また、Luben らは、PTH が osteoblast 様細胞の cAMP を上昇させることを報告した¹⁸⁾。

鈴木らは、ラットを PTX すると低 Ca 血症をきたし、骨および象牙質の石灰化不全が生じ、これに PTH を数日間継続して注射すると、血漿 Ca レベルの正常化とともに骨および象牙質石灰化が著しく回復することを報告した^{19,20)}。また、PTH の代わりに cAMP および DBcAMP を連続注射し、血漿 Ca レベルの上昇と、骨および象牙質の石灰化の回復をきたすことを報告し^{20,21,22)}、cAMP が骨および象牙質の形成、とくに石灰化に関して PTH の作用を再現しうるものであることを結論し、石灰化の場において cAMP が PTH の細胞内伝達物質として作働している可能性を示唆した²⁰⁾。

本研究において、実際に石灰化の進行している組織部位での内因性の cAMP 濃度の変動を追求するために、ラットの下顎切歯歯髓に着目した。これは次の理由による。①ラットの切歯象牙質が骨のような吸収機構を含まず、常に形成、石灰化されること。②象牙質形成と石灰化に關与する歯髓が他から独立した環境にあり、分離摘出が可能なこと。③血漿の諸因子とは別の意味での象牙質石灰化の直接の因子を求め得る可能性のあること。以上の理由から、本研究者はラットの下顎切歯より歯髓を摘出し、歯髓の cAMP の抽出法と測定法を種々試み、2, 3の新知見を得たので報

告する。

実験材料と方法

1. 使用動物と歯髓分離法

体重300 g 前後の Wistar 系雄ラットを使用し、断頭して全採血し、頭部はただにはドライアイスアセトンで凍結した。凍結した頭部を氷水中で左右の下顎を分離し、ついで冷生理食塩水中に移し、注意深く下顎切歯の象牙質を歯科用ジスクを用いて縦割りに分離して、全歯髓をできるだけ傷つけぬように分離摘出した。これを速かにドライアイス上で冷却したステンレス小皿上で再凍結し、迅速に秤量した。

2. 歯髓 cAMP の抽出法

1) トリクロル酢酸による抽出法²³⁻²⁵⁾

分離した歯髓を冷 6% トリクロル酢酸 (TCA) 1 ml で 5 分間ホモジナイズし、遠心分離 (3,500 rpm, 10分間) した。ついで上清の TCA 除去操作を行なった。すなわち、氷水中で 3 倍容量の水飽和エーテルを加え、激しく混合後、エーテル層を除いた。この操作を 4 回おこない、窒素ガスあるいは 85°C 沸騰水浴上で残余のエーテルを除去した。水層は P₂O₅ 上にて減圧乾燥し、residue を水 1 ml に溶解し、cAMP 測定用試料とした。遠心分離後の沈澱は 1N NaOH に溶解し、Lowry の方法²⁶⁾で蛋白量を測定した。

2) 過塩素酸による抽出法^{23,24)}

歯髓を 25% (v/v) エタノールを含む 0.5 M 過塩素酸 (PCA) 1 ml でホモジナイズし、遠心分離した。上清を冷却しながら少量の KOH で中和した。生成される沈澱は遠心分離により除き、上清を減圧乾燥し、residue を水に溶解し、cAMP 測定用試料とした。

3) 塩酸による抽出法^{27,28)}

歯髓を 0.1 N 塩酸でホモジナイズし、遠心分離後、上清を減圧乾燥し、residue を水に溶解し、cAMP 測定用試料とした。

3. cAMP の測定法

1) Gilman の protein binding assay (PBA) による方法^{29,30)}

種々の動物組織にある cAMP 依存性 protein

kinase と cAMP との結合が cAMP に特異的であることから、これを利用して少量の放射性標識 cAMP に未知な cAMP を含む試料を入れ、上記の protein kinase (binding protein) を加え、結合に対する競合の結果、bound cAMP を Millipore filter に吸着させ、この放射能を測定することにより試料中の cAMP 量を定量するものである。bound cAMP と free の cAMP の分離法には、他に dextran coated charcoal へ free の cAMP の吸着による方法²⁸⁾、硫酸沈澱法等があるが、今回 Millipore filter 法と活性炭法の両者について比較した。

結合蛋白の protein kinase は脳³¹⁾、筋肉³²⁾、副腎^{25,33)}、肝臓³⁴⁾等から抽出されているが、本実験ではウシ筋肉から抽出精製された^{28,35)} protein kinase (binding protein) を含む Boehringer の cAMP 測定キットを使用した。反応系は水に溶解した試料 100 μ l, 40 nM ³H-cAMP (1 μ Ci/ml) 20 μ l, 水 10 μ l, cAMP binding protein 20 μ l で、混合後、0 °C 100 分反応した。反応終了後、filter 法では、冷 20 mM K-P buffer pH 6 を 1 ml 加え、同 buffer で湿らせた Millipore filter (25 mm, HA type, pore size 0.45 μ m) で ³H bound cAMP を吸着させ、冷 buffer 5 ml で 2 回洗滌後、filter を乾燥し、シンチレーションバイアルに入れ、2-methoxy-ethanol (methyl cellosolve) 1 ml で filter を溶解した。ついで、methyl cellosolve 200 ml, 2,5-diphenyl oxazole (PPO) 6.4 g, toluene 800 ml を含む液体シンチレーション溶液 10 ml を加え、Packard TRI-CARB 3320, あるいは TRI-CARB 3255 で放射能を測定した。

活性炭による方法では、反応終了後、冷 dextran coated charcoal 液 0.5 ml を加え、激しく混和し、0 °C にて 15 分間放置後 3,000 rpm, 15 分間室温で遠心分離した。上清 0.5 ml を液体シンチレーション溶液 (PPO 5.5 g, POPOP 0.1 g, Triton X-100 333 ml, toluene 667 ml) 5 ml とよく混合し、放射能を測定した。活性炭液はウシ血清アルブミン Fraction V 500 mg, dextran T-70 75 mg, Norit Extra の活性炭 500 mg を

水 100 ml に入れ調製した。

2) Radioimmunoassay (RIA) による方法³⁶⁻³⁹⁾

2'-O-Succinyl cAMP を抗原として家兎に与えて生成された抗 cAMP 血清を使用し、検体のサクシニル化により生成された succinyl cAMP (ScAMP) と ¹²⁵I-ScAMP tyrosine methyl ester (¹²⁵I-ScAMP-TME) との抗血清に対する競合反応を行ない、抗体に結合しなかった ¹²⁵I-ScAMP-TME を dextran coated charcoal に吸着させて除き、上清の放射能を測定するヤマサの cAMP 測定用キットを使用した⁴⁰⁻⁴²⁾。すなわち試料 100 μ l にサクシニル化試薬 (succinic anhydride 400 mg/dioxane 9 ml + triethylamine 1 ml) 100 μ l を加え室温にて10間放置後、氷水中で 0.3 M Imidazole buffer (pH 6.5) 800 μ l 添加してサクシニル化を終了させた。この試料100 μ l と ¹²⁵I-ScAMP-TME (1 μ Ci/8.5 ml) 100 μ l と cAMP 抗血清 100 μ l と混合し、48時間氷水中に放置後、分離用の活性炭液 500 μ l を加え、室温で遠心分離 (3,000 rpm, 5 分間) し、上清 500 μ l を液体シンチレーションバイアルに入れ、シンチレーション溶液 (PPO 5.5 g, POPOP 0.1 g, Triton X-100 333 ml, toluene 667 ml) 5 ml を加え、Packard TRI-CARB 3255 の ¹²⁵I channel で放射能を測定した。測定は PBA 法と共に1試料を duplicate で調製し、cAMP 測定をおこなった。

4. ラットの肝臓と腎臓の cAMP の測定

ラットを断頭後、全採血し、肝臓および腎臓を摘出し、その一部をドライアイスアセトンで凍結し、-20 °C で保存した。各臓器は融解後、6% TCA 1 ml でホモジナイズし、以下歯髓の TCA 抽出法に準じて処理した。cAMP の測定は同一試料について、PBA 法-Millipore filter 法 (以後、PBA 法とは特記以外 filter 法を示す) と RIA 法で行なった。

5. 摘出歯髓の 37 °C 放置による歯髓 cAMP レベルの変動

ラットを氷水中に断頭し、冷生理食塩水中で下顎切歯より歯髓を分離後、速かに冷却ステンレス

小皿にて秤量した。ついで、isotonic Tris-buffer pH 7.1⁴³⁾ 650 μ l に入れ、37 °C で放置した。対照として、theophylline 10 mM (最終濃度) を添加した。isotonic Tris-buffer の組成は最終濃度 120 mM NaCl, 3 mM K₂HPO₄, 1.25 mM CaCl₂·2H₂O, 1 mM MgSO₄·7H₂O, 30 mM Mannitol, 20 mM Tris, 2 mg/ml の glucose, それに 1 mg/ml のウシ血清アルブミン (Sigma) であった。反応終了後、冷10% TCA 650 ml を加え、3分間冷却しながらホモジナイズし、以下歯髓の TCA 抽出に準じて cAMP を抽出した。歯髓は1個体2歯髓を1試料とし、PBA 法と RIA 法で cAMP を測定した。

6. 歯髓 cAMP の Dowex カラムクロマトグラフィーによる分離

1) ³H-cAMP, ³H-cGMP, ATP の Dowex カラムクロマトグラフィーによる分離

Boehringer の 1 mM ³H-cAMP (0.024 μ Ci/pmole) の 1 ml, および 5 mM ³H-cGMP (0.016 μ Ci/pmole) の 1 ml を、それぞれ Dowex 50 W-X2, H type (200~400 メッシュ) (0.7×6 cm) のカラムクロマトグラフィーにより展開した^{44,45)}。水を溶出溶媒とし、1 ml ずつ分画し、それぞれの 0.1 ml を Bray 溶液⁴⁶⁾に入れ、液体シンチレーションカウンターにて測定した。

1 mM ATP (Sigma) の 1 ml を同様にカラムクロマトグラフィーを行ない、溶出液の各々 0.2 ml を Fiske-Subbarow 法⁴⁷⁾により ATP を定量した。

また、2 mM CaCl₂·2 H₂O 1 ml を同様にカラムクロマトグラフィーで分離し、Trinder の方法⁴⁶⁾および原子吸光法で Ca を測定した。

2) 市販の標準 cAMP のカラムクロマトグラフィーによる分離

20 mM, 5 mM cAMP (ヤマサ) の 1 ml を、各々 Dowex カラムクロマトグラフィーにより展開した。溶出液は PBA 法, RIA 法により cAMP を測定した。また、cAMP (ヤマサ) 20 mM (最終濃度) に ATP (Sigma) 2 mM および 4 mM を添加し、各々 1 ml ずつを Dowex カラムで展開した。

3) ラット歯髓の TCA 抽出試料の Dowex
カラムクロマトグラフィーによる分離

2匹のラットの4歯髓を TCA 抽出し、処理後、水 1 ml に溶解し、Dowex カラムで展開した。溶出液は PBA 法、RIA 法で測定し、Fiske-Subbarow 法⁴⁷⁾により ATP を定量した。

7. cAMP 抽出過程へ市販の cAMP 添加による回収実験

1) ラット歯髓 TCA ホモジネート液へ
cAMP 添加による回収実験

ラット4匹の8歯髓を TCA 4 ml でホモジナイズし、0.5 ml ずつ分割し、市販 cAMP (Boehringer) を各々 20, 100, 200 mM (最終濃度) 添加し、以後、TCA 抽出法に準じ処理し、PBA 法で、さらに同一試料を10倍に希釈後、RIA 法で cAMP を測定した。

2) cAMP 回収率に対する歯髓 cAMP の
抽出溶媒の影響

組織を含まない6% TCA 液、0.5 M PCA/25%エタノール液を各々歯髓の TCA, PCA 抽出処理法に準じて調製し、それぞれに cAMP (Boehringer) 20, 100, 200 mM (最終濃度) 添加し、PBA 法、RIA 法(試料を10倍に希釈後)により cAMP を測定した。

3) cAMP にATP を添加した cAMP 回
収実験

cAMP (ヤマサ) の 2.5, 5, 10, 40, 160 mM (最終濃度) に ATP (Sigma) 0.5, 1, 2, 4 mM (最終濃度) をそれぞれ添加し、PBA 法および RIA 法で cAMP を測定した。

8. TCA 抽出した歯髓試料の phosphodiesterase (PDE) による分解実験

ラット1個体2歯髓を1試料とし、6% TCA 1 ml で抽出し、処理後、水 1 ml に溶解し PDE 反応用試料とした。PDE 反応系⁴⁹⁾は試料 150 μ l, 10 mM Tris buffer (pH 7.4, 5 mM MgCl₂ を含む) 150 ml, 3 mg/ml の calf heart PDE (Boehringer) 10 μ l, 水あるいは cAMP (Boehringer, 500 pmoles/ml) を 100 μ l 混和し、37°C 30分間反応した。ついで沸騰水浴に30秒間入れて反応を終了させ、3000 rpm, 5分間遠心分離し、上清を PBA 法、RIA 法で cAMP を測定した。

実験結果

1. 歯髓 cAMP の抽出溶媒と測定法の比較

ラット歯髓の抽出溶媒と cAMP 測定法の相違による cAMP 測定値を比較した結果を Table 1 に示した。RIA 法による測定値を除いて、PBA

Table 1. Effect of different extraction reagents on the values of cAMP assays in the pulp.

Reagents	Pulp wet wt. (mg)	cAMP detected (pmoles/mg wet wt.)		
		with filter method	by PBA with charcoal method	by RIA
TCA	37.6	0.71	0.69	0.18
	37.9	0.72	0.71	0.22
PCA	39.8	3.11	1.04	0.20
	32.2	3.24	1.46	0.25
HCl	35.3	0.22	0.10	0.17
	33.2	0.25	0.11	0.22

法の filter 法と活性炭法、ともに PCA 抽出による測定値が高く、ついで TCA 抽出試料で、塩酸抽出試料が低い値であった。PCA 抽出試料と塩酸抽出試料の PBA 法での測定値は、filter 法での値が高く、活性炭法では 60~70%低い値であった。TCA 抽出試料では PBA 法の filter 法、活性炭法に差がみられなかった。RIA 法による

測定値では、抽出溶媒の違いによる相違はほとんどみられず、0.21 pmoles 前後であった。塩酸抽出試料の PBA 法-filter 法による測定値は、RIA 法の値に近似した測定値であった。

2. 歯髓の TCA 抽出試料での PBA 法および RIA 法による cAMP 測定値の比較と歯髓重量との関係

ラット歯髓を6% TCAで抽出した試料のPBA法-filter法(以下PBA法とはfilter法を示す)で測定した98匹57例と, RIA法で測定した40匹38例をグラフにプロットし Fig. 1 に示した。歯

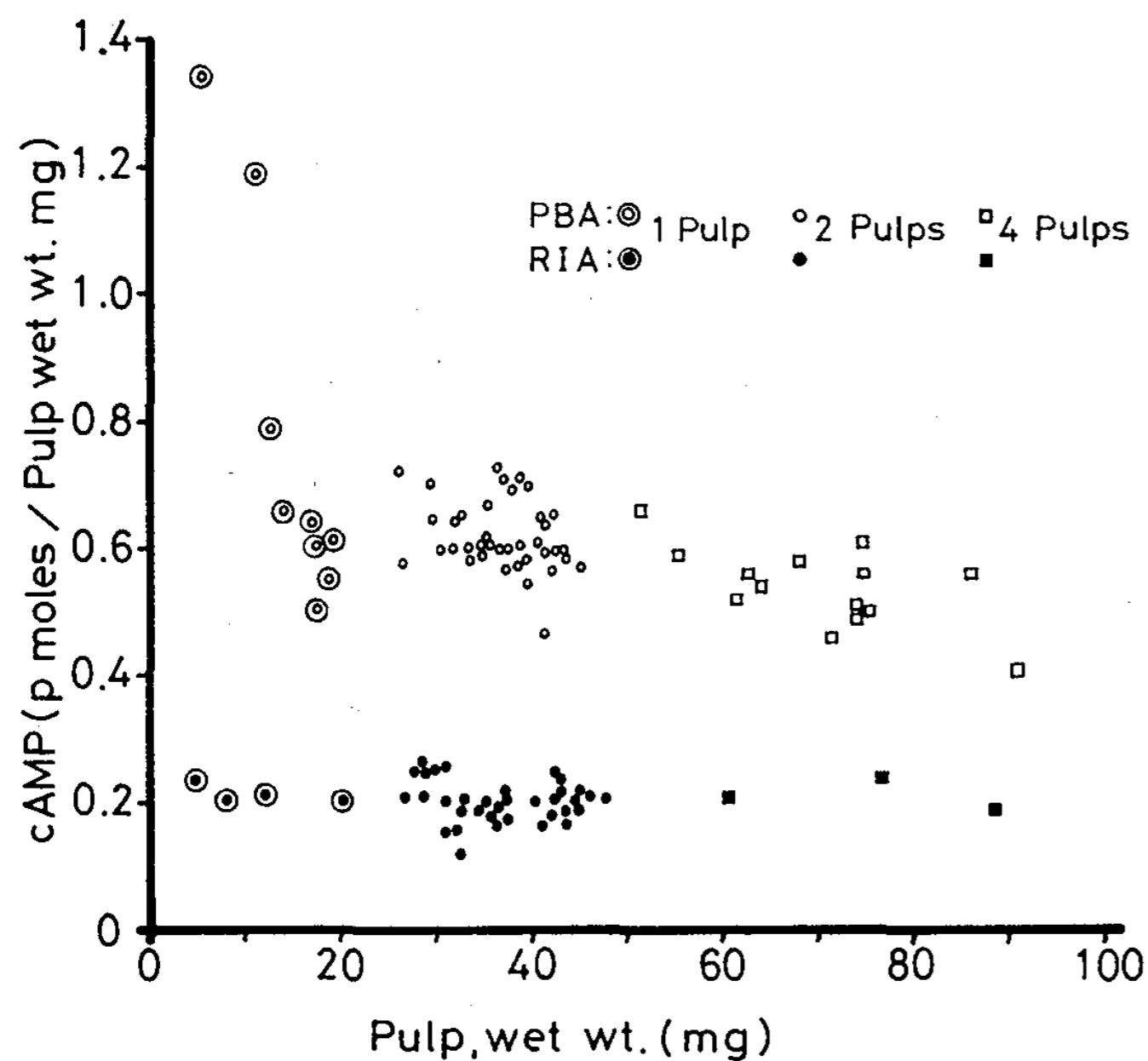


Fig. 1. Comparison of the levels of cAMP in the pulp when determined in single or several pulps by PBA kit or RIA kit.

髓重量の大小は, 歯髓の本数で調製し, 1試料 duplicate で測定した平均値を1点とした。RIA法の測定値は, 重量の大小にかかわらずほぼ一定であった。一方, PBA法では, 歯髓重量が減少すると測定値が増大する傾向がみられた。

3. ラットの歯髓, 肝臓および腎臓の cAMP 測定

ラットの歯髓, 肝臓, 腎臓の PBA法と RIA法による cAMP 測定値 (pmoles/mg wet wt.) を Fig. 2 に示した。歯髓の cAMP 測定値は PBA法で96匹54例から, 0.60 ± 0.01 であり, RIA法では40匹38例から PBA法の1/3の 0.20 ± 0.01 であった。肝臓, 腎臓とも6例で, 肝臓の測定値は PBA法で 0.64 ± 0.04 で, RIA法では PBA法の1/3の 0.22 ± 0.02 であった。腎臓の cAMP 値は PBA法で 0.95 ± 0.02 で, RIA法では PBA法の1/2の 0.40 ± 0.01 であった。

4. 摘出歯髓の 37°C 放置による歯髓 cAMP レベルの変動

摘出歯髓を37°Cで放置し, 30分, 60分後の PBA

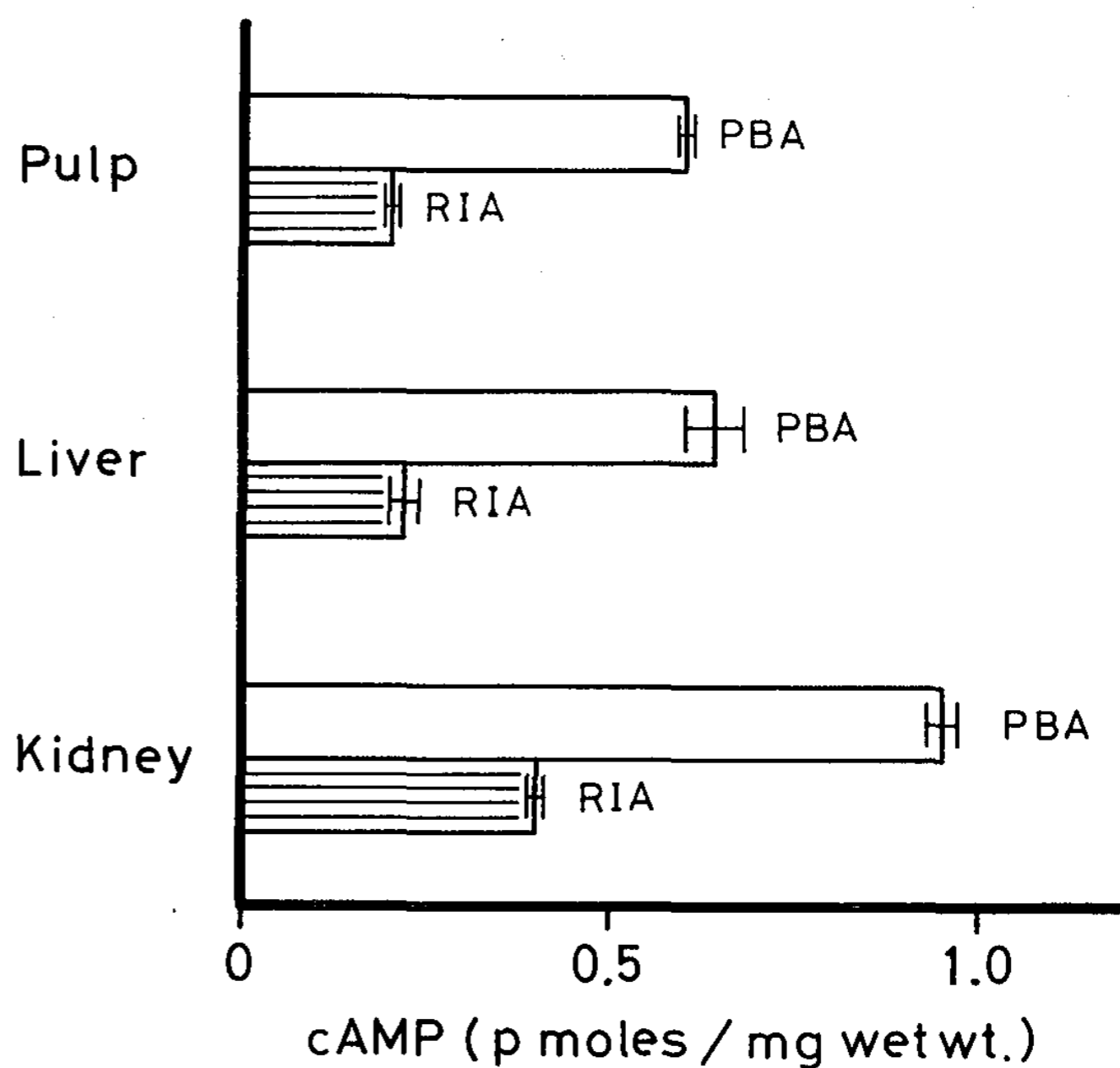


Fig. 2. cAMP levels in rat pulp, liver and kidney detected by PBA kit or RIA kit.

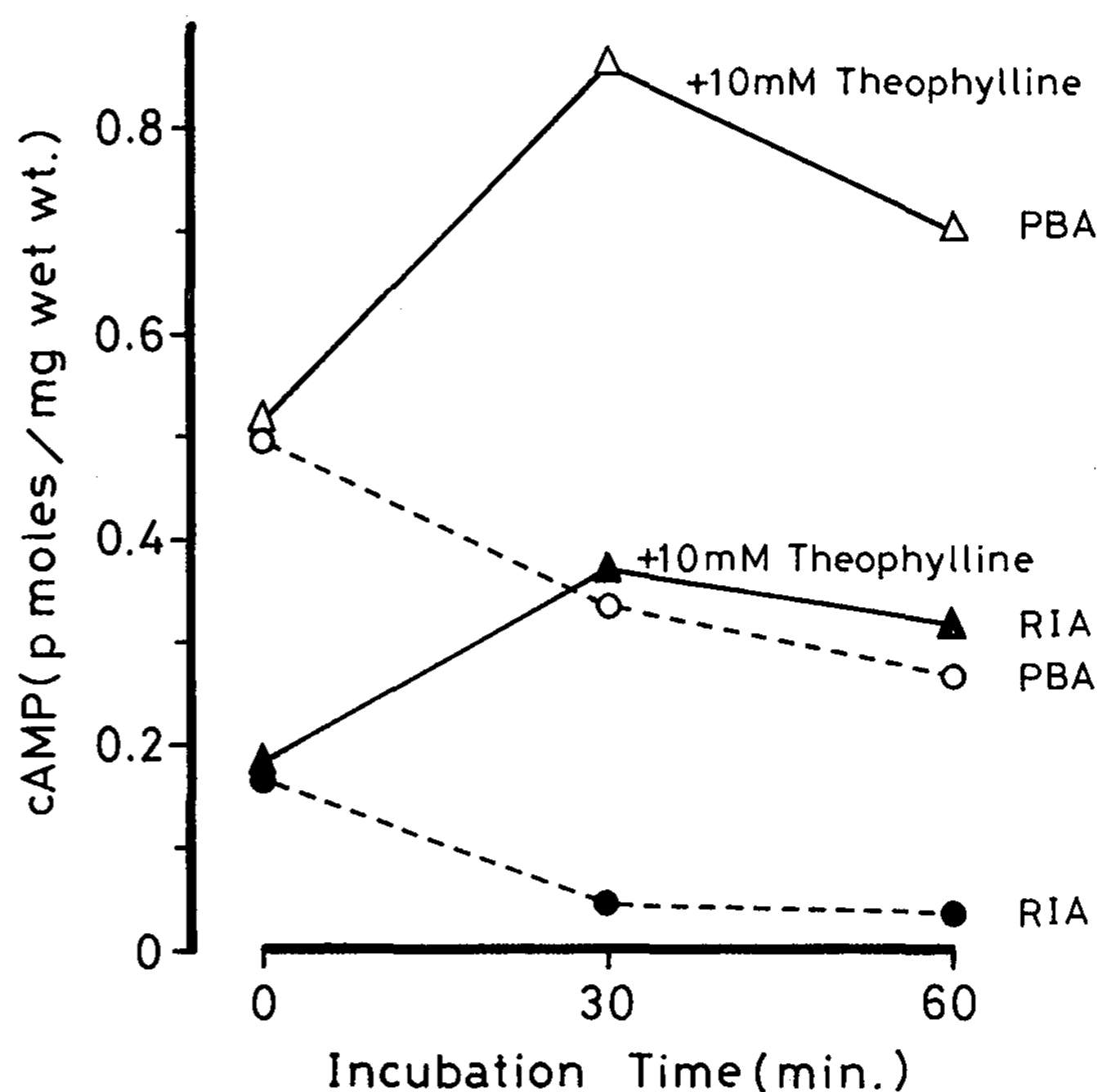


Fig. 3. Changes in cAMP levels in the isolated whole pulp detected by PBA kit or RIA kit.

法, RIA法による測定値を Fig. 3 に示した。摘出直後の測定値は PBA法で 0.51 pmoles/mg wet wt. で RIA法で 0.17 pmoles であった。Theophyllineを添加しない群の PBA法の60分後の減少率は46%であったが, RIA法での減少率は72%で PBA法より著しい低下であった。Theophylline添加群は, PBA法, RIA法ともに平行に変化した, PBA法測定値は RIA

測定値の2~3倍の値であった。

5. Dowex カラムクロマトグラフィーによる 歯髄 cAMP の分離

1) ^3H -cAMP, ^3H -cGMP, ATP の Dowex カラムクロマトグラフィーによる分離

^3H -cAMP, ^3H -cGMP, ATP をそれぞれ Dowex 50 W-X2 に展開し, 同一グラフ上にプロットし, それぞれの溶出パターンを Fig. 4 に示

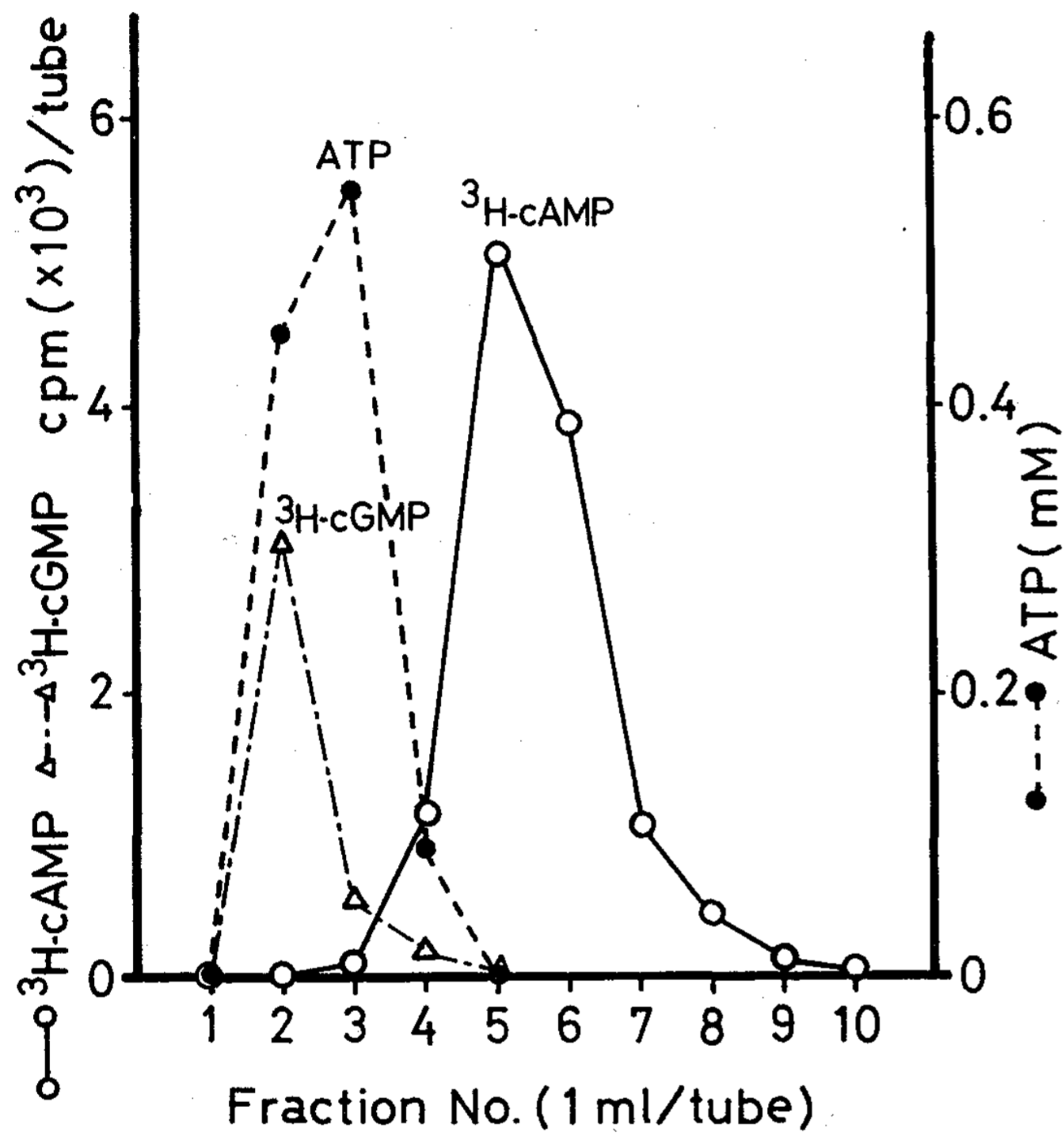


Fig. 4. Elution patterns of authentic ^3H -cAMP, ^3H -cGMP and ATP (Dowex 50W-X2 chromatography).

した。 ^3H -cGMP は fraction No. 2 を, ATP は No. 3 をピークとして溶出され, ^3H -cAMP は No. 5 をピークとして溶出された。 ^3H -cAMP, ^3H -cGMP, ATP のクロマト溶出前後の回収率は, それぞれ 84%, 85%, 109% であった。2 mM の $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ は, No. 1 から No. 10 までのいずれの分画にも検出されなかった。

2) 市販 cAMP の Dowex カラムクロマト グラフィーによる分離

市販 cAMP を展開し, PBA 法と RIA 法とで溶出画分をそれぞれ測定し, 溶出パターンを Fig. 5 に示した。PBA 法, RIA 法いずれの測定法でも溶出パターンは同じであり, 溶出部位も 20 nM, 5 nM それぞれ両測定法ともに同一部位であり, かつ溶出ピークは fraction No. 5 であった。カラムクロマトの回収率は, 両測定法ともにほぼ 100% であった。

3) 市販 cAMP に ATP を添加した試料の Dowex カラムクロマトグラフィーによる 分離

市販 cAMP に ATP をそれぞれ添加し, カラムクロマトで展開し, PBA 法による検出パターンを Fig. 6 に示した。ATP 無添加の溶出パターンは Fig. 5 と同様であったが, ATP 2 mM, 4 mM 添加の検出パターンは fraction No. 2 と No. 5 をピークとする2つの溶出帯に分離され

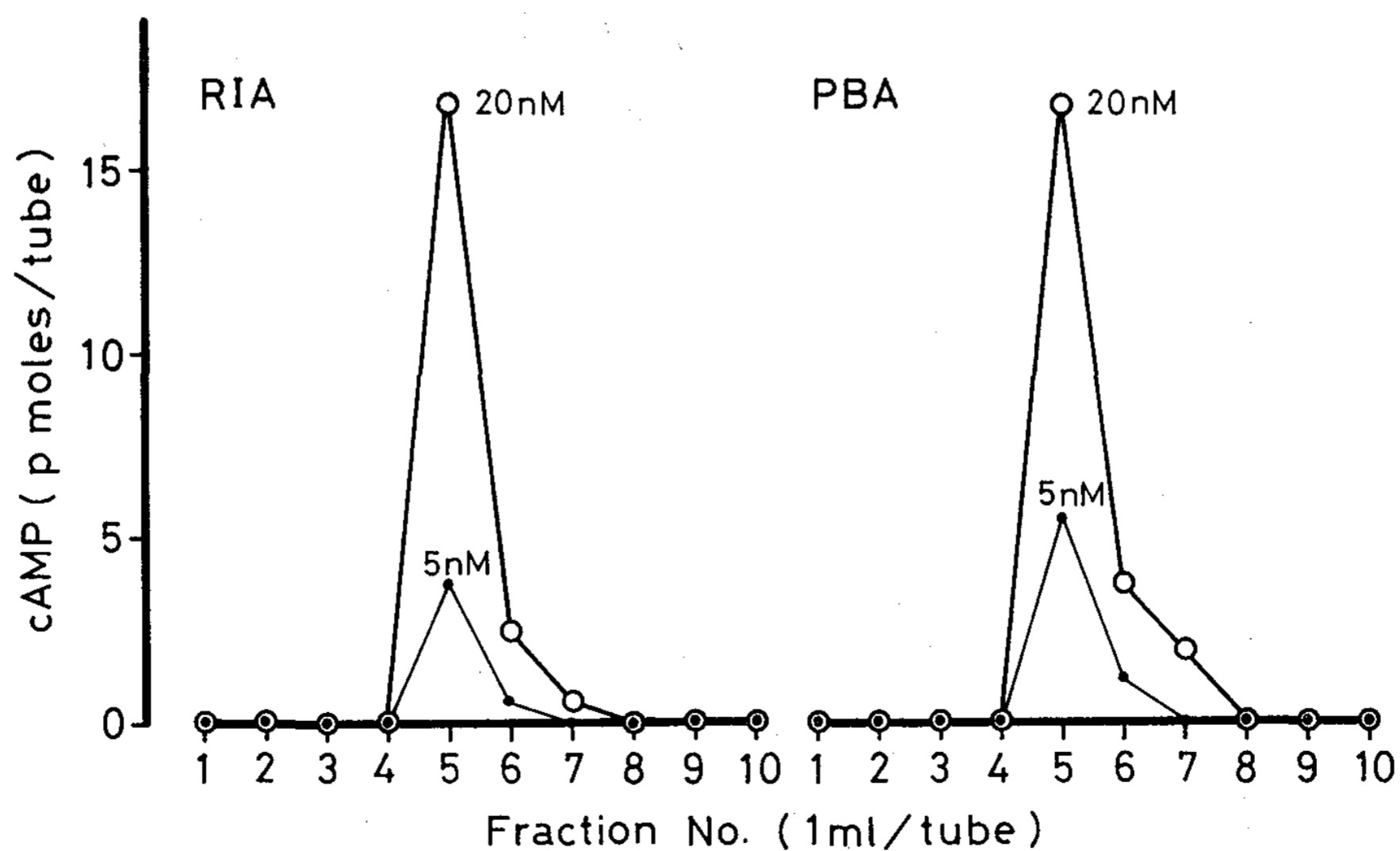


Fig. 5. Elution patterns of authentic cAMP detected by PBA kit or RIA kit (Dowex 50W-X2 chromatography).

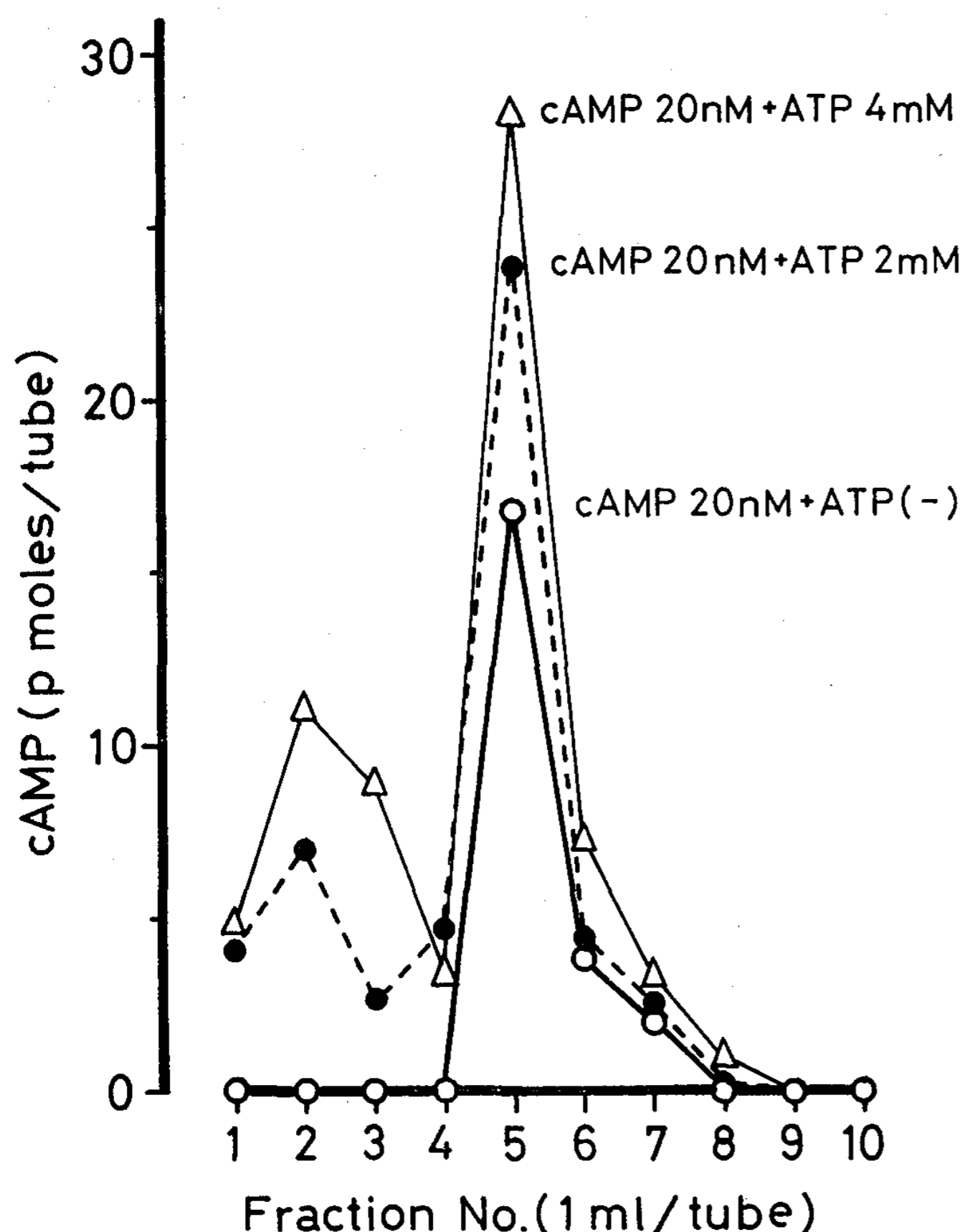


Fig. 6. Changes in elution pattern of authentic cAMP detected by PBA kit after ATP addition (Dowex 50W-X2 chromatography).

た。また、No. 5 のピークは ATP 添加により増大し ATP 2 mM, 4 mM でそれぞれ 42%, 67% の増加率であった。同様に、No. 2 のピークも ATP 添加量に応じて上昇した。カラム回収率は ATP 無添加で 99% が ATP 2 mM, 4 mM 添加で、それぞれ 118%, 128% と増加した。カラム溶出前の同一試料について、(PBA 法測定値/RIA 法測定値) × 100 の値を示すと、ATP 無添加では 101%, が ATP 2 mM, 4 mM でそれぞれ 123%, 143% と、カラム溶出前でも両測定法の cAMP 測定値にすでに差がみられ、それは添加 ATP 量増加とともに増大した。

RIA 法による検出パターンでは ATP 添加による fraction No. 5 のピークの増大はみられず、単一の溶出帯を示した。カラム回収率は RIA 法では、ATP 添加による影響はまったく観察されなかった。

4) 市販 cAMP に市販 cGMP を添加した試料の Dowex カラムクロマトグラフィーによる分離

cAMP 20 nM にその 1/10 量の cGMP 2n M を添加した試料の Dowex カラムクロマトグラフィーの溶出パターンを Fig. 7 に示した。

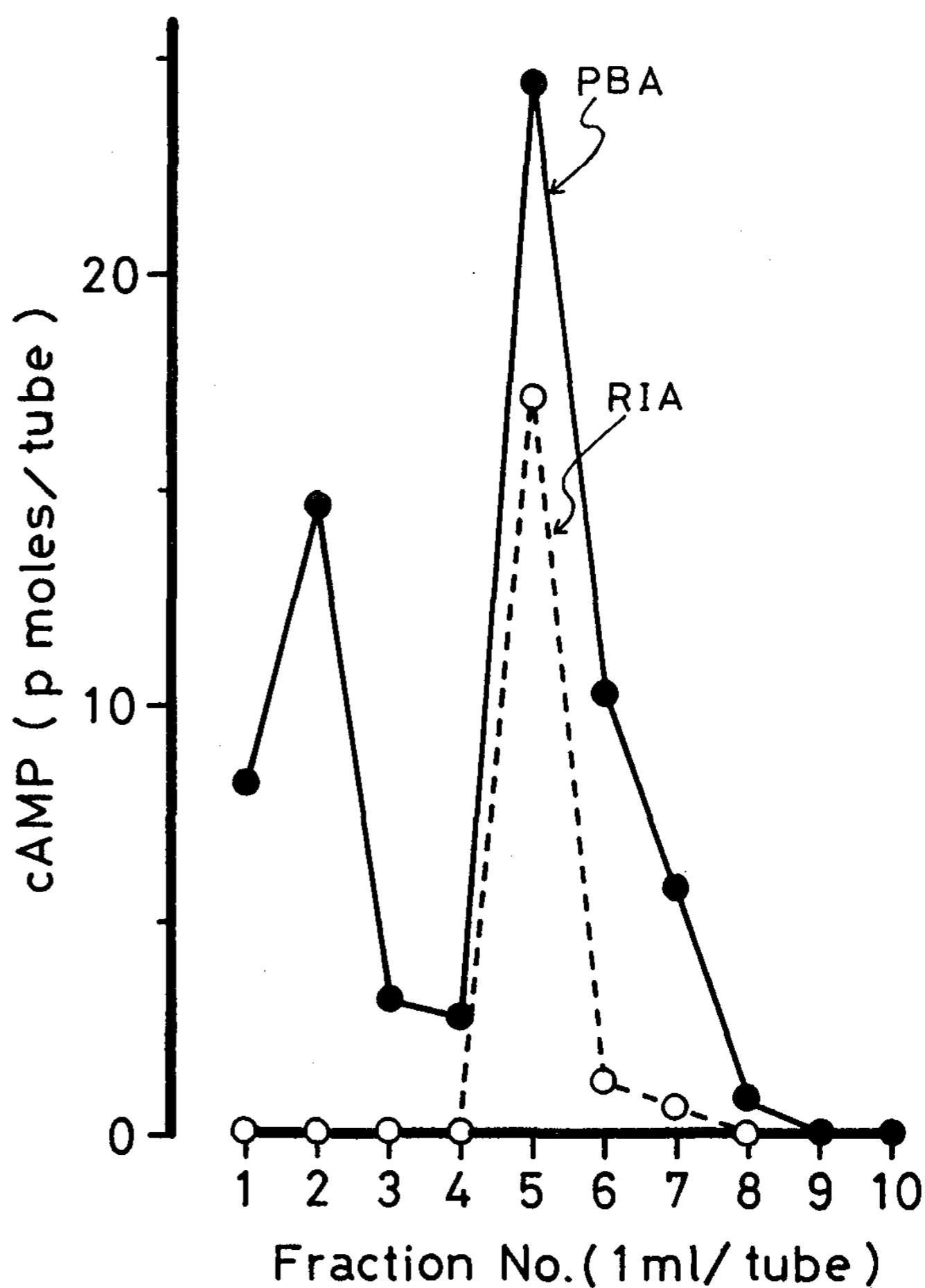


Fig. 7. Changes in elution pattern of authentic cAMP detected by PBA kit or RIA kit after cGMP addition (Dowex 50W-X2 chromatography).

5) 歯髄 TCA 抽出物の Dowex カラムクロマトグラフィーによる分離

歯髄 TCA 抽出物の PBA 法と RIA 法による検出パターンと ATP の検出パターンを Fig. 8 に示した。RIA 法での溶出部位は fraction No. 4, 5, 6 で、No. 5 をピークとする溶出パターンであった。一方、PBA 法での検出パターンは No. 2 と No. 5 をピークとする 2 つの溶出帯に分離され、No. 5 のピークは RIA 法の No. 5 のピークの 2 倍であった。ATP の溶出ピークは No. 3 にみられた。

6. 市販 cAMP の歯髄ホモジネートへの添加による cAMP の回収実験

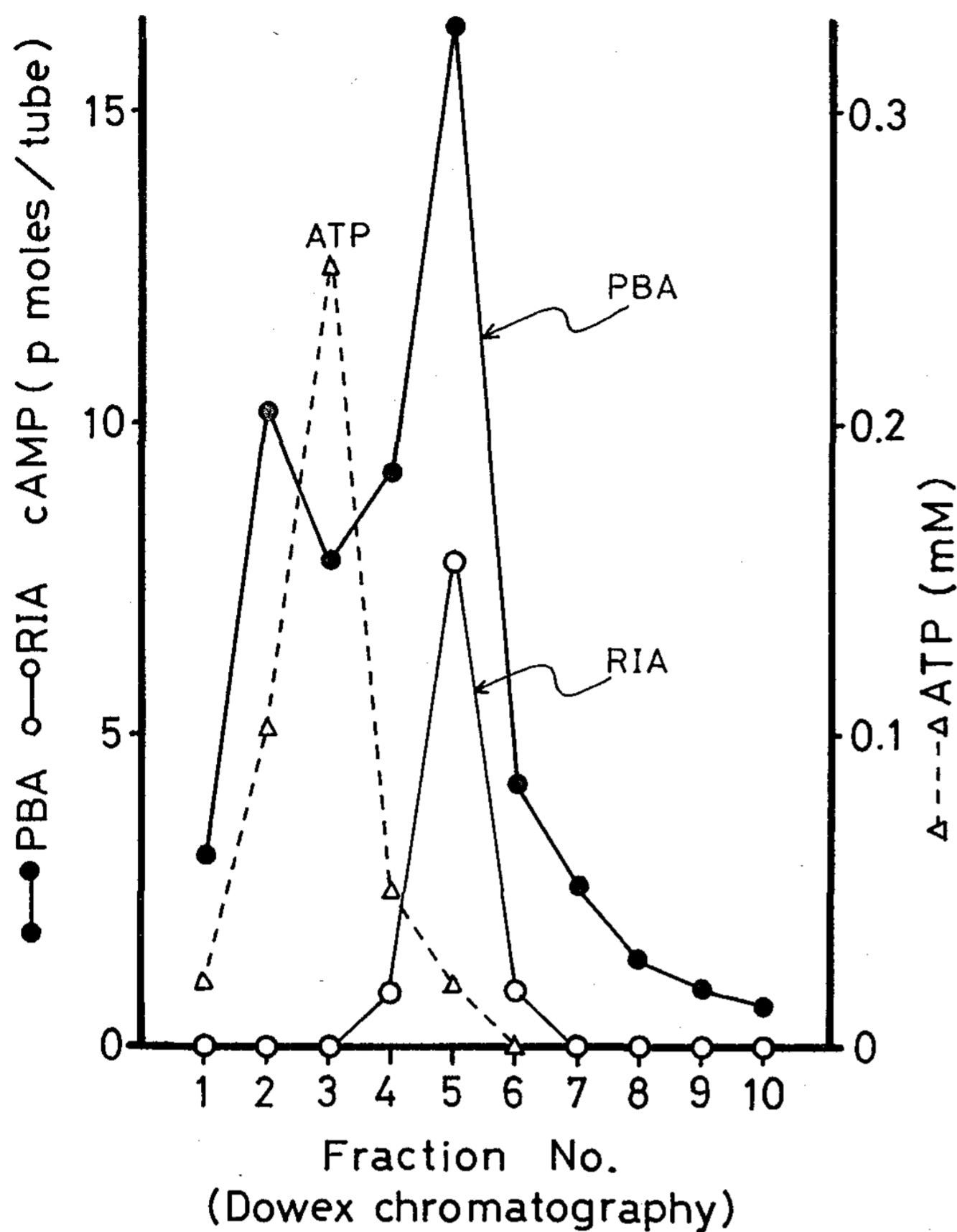


Fig. 8. Elution pattern of TCA extract of pulp detected as cAMP using PBA kit and RIA kit.

1) cAMP 抽出溶媒が cAMP の回収率に及ぼす影響

TCA 又は PCA 抽出溶媒にそれぞれ市販の cAMP を直接に添加し、PBA 法と RIA 法とで測定し、その回収率を Fig. 9 に示した。RIA 法

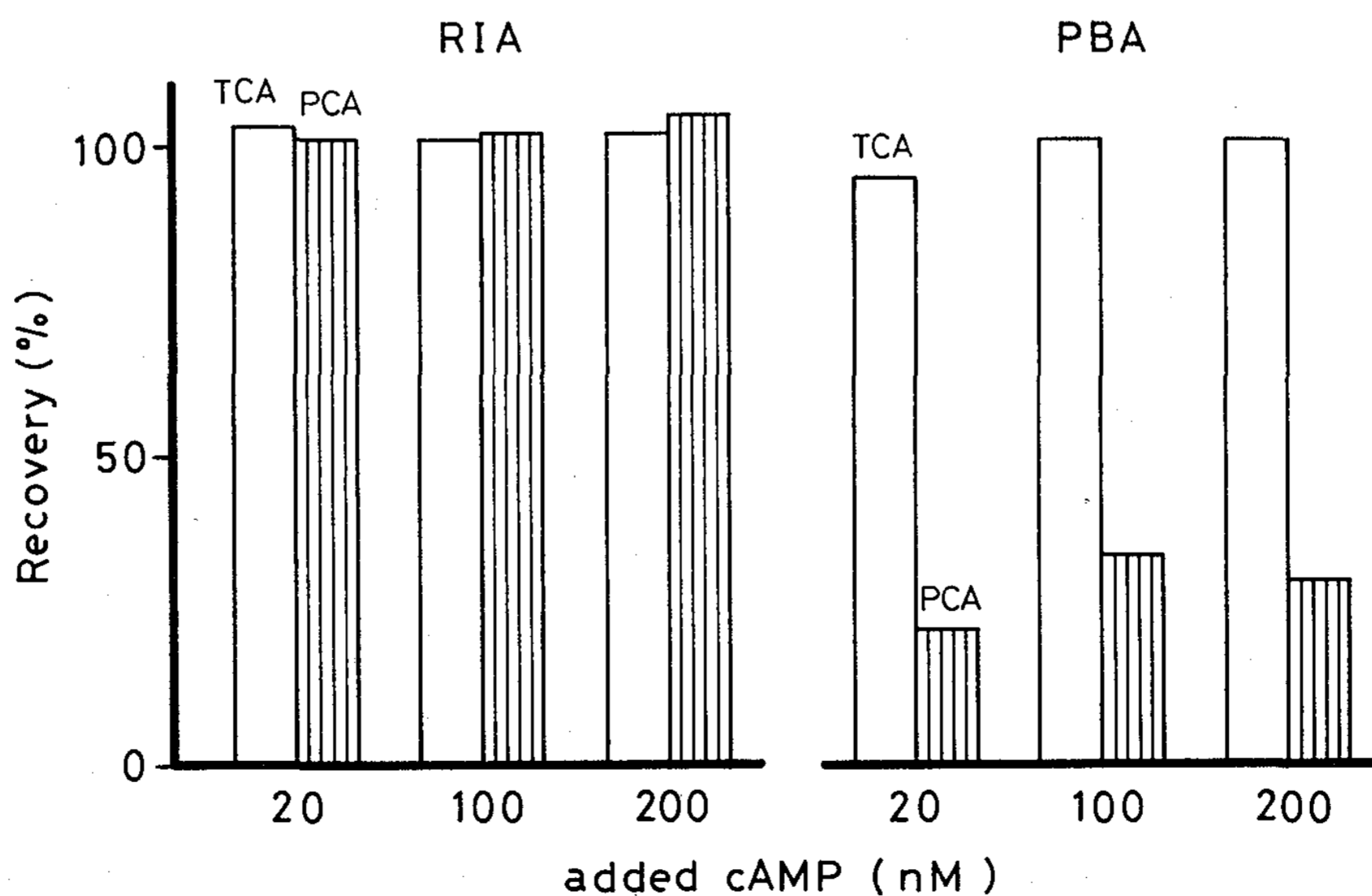


Fig. 9. Effect of extraction reagents on the PBA kit or RIA kit for cAMP.

による測定では TCA, PCA 共に 100% の回収率であった。一方、PBA 法での測定では、TCA へ添加した cAMP はほぼ 100% の回収率であったが、PCA へ添加した cAMP は 20~30% と非常に低い回収率を示した。

2) ラット歯髓の TCA ホモジネートの市販 cAMP 添加による回収実験

TCA ホモジネート液に cAMP を添加し、PBA 法と RIA 法による回収率を Table 2 に示した。2 pmole の添加では PBA 法で 81%, RIA 法では 69% の低い回収率であったが、添加 cAMP 濃度の高い例では、PBA 法、RIA 法ともに 100% であった。

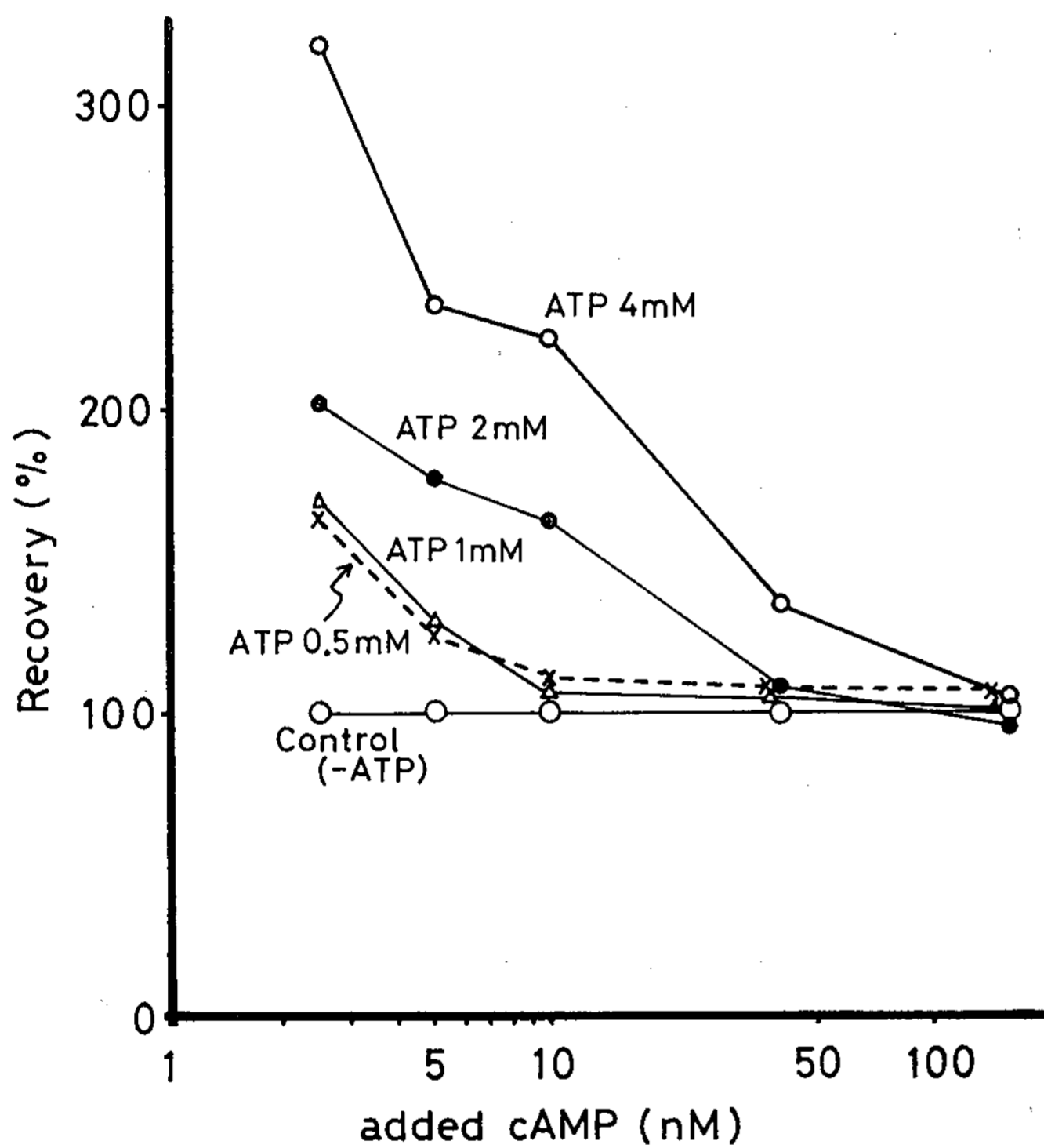
3) 市販 cAMP に ATP を添加した時の cAMP 回収率に与える影響

市販の cAMP に ATP を添加し、PBA 法で cAMP を測定し、cAMP 回収率におよぼす ATP の影響を Fig. 10 に示した。ATP 無添加群は 100% の回収率であった。一方、ATP をそれぞれ 1, 2, 4 mM 添加すると、2.5 nM cAMP の回収率は、それぞれ 170, 200, 320% と添加 ATP 濃度に比例して増大した。しかし高濃度の cAMP (160 nM) では、ATP 添加による影響はまったくなかった。

7. 歯髓を TCA 抽出した cAMP 測定用試料の phosphodiesterase (PDE) による分解実験

Table 2. Recovery of added cAMP from TCA homogenate of the pulp

added cAMP (p moles/tube)	cAMP detected (pmoles/tube)			
	cAMP by PBA	Recovery (%)	cAMP by RIA	Recovery (%)
Homogenate alone	2.58	—	0.75	—
Homogenate +2 p moles	4.20	81	2.13	69
Homogenate +10 p moles	12.73	102	10.85	101
Homogenate +20 p moles	26.19	118	20.85	101

**Fig. 10.** Effect of added ATP on the protein binding assay (PBA) for cAMP.

ラット歯髓の TCA 抽出物の PDE 処理による cAMP の増減を PBA 法と RIA 法とで測定し、**Table 3** に結果を示した。水に cAMP を添加した試料では、PDE により 100% 消失した。歯髓の TCA 抽出物と、それに cAMP を添加した試料とでは、PDE 処理後では、PBA 法、RIA 法いずれの測定法でも 95% 台の消失を示した。

考 察

動物組織の取り出し方、組織からの cAMP の抽出法および精製法、さらに cAMP の測定法の相違によって cAMP の測定値が異なることはよく知られている^{37,50-52}。Kimura ら⁵³ はラットを断頭後凍結する方法と、エーテルおよびペントバルビタール注射による麻酔後断頭凍結する方法とで、各種臓器の cAMP 濃度を比較して、動物の処理法の違いにより cAMP 濃度が変動することを報告した。竹沢ら⁵⁴ はラットを断頭後凍結する方法と、マイクロウェーブ照射後断頭凍結する

Table 3. Disappearance of cAMP from TCA-extract of pulp after phosphodiesterase (PDE) digestion

Samples	cAMP detected (pmoles/tube)					
	-PDE	by PBA +PDE	Decrease (%)	-PDE	by RIA +PDE	Decrease (%)
D. Water	0	0	—	0	0	—
D. Water +cAMP	107	0	100	106	1	99
Pulp extract	18	0	100	8	0	100
Pulp extract +cAMP	122	6	95	115	6	95

Added cAMP concentration was 100 pmoles/tube.

方法 (M. W. 法) とを比べ、M. W. 法の方が低い測定値であったと報告した。今回、凍結頭部から分離した歯髄 (Fig. 2) と、氷水中に落下させた頭部からの歯髄 (Fig. 3) とでは、PBA 法で、前者は 0.6 pmoles/mg wet wt. が、後者では 0.50 pmoles と 17% 減少した。RIA 法では前者が 0.2 pmoles で、後者は 0.16 pmoles と 20% の減少がみられた。また、歯髄を 37°C で放置すると (Fig. 3), cAMP レベルは 60 分後で、PBA 法, RIA 法それぞれ 50%, 80% と減少した。このように歯髄の cAMP 濃度は、サンプリングの過程で変動するので、できるだけ低温で速かにおこなう必要がある。本実験では、ラットを断頭後、頭部を凍結し、氷水中で短時間内で融解後、速かに歯髄を分離し、直ちに cAMP を抽出した。

組織からの cAMP の抽出溶媒には、5~6% TCA^{23,25,29,37,62}、10% TCA^{27,61}、0.5 M PCA/25% エタノール^{23,24}、0.1 N 塩酸^{27,28,42}、無水エタノール^{24,57}、あるいは水⁵⁸が使用されている。Albano ら²⁴は 6% TCA, 0.5 M PCA/25% エタノール、無水エタノールとを比べ、cAMP の回収率の点で TCA が優れていると報告した。Honma ら⁴²は組織を凍結乾燥し、塩酸で抽出する方法を最適と判定していた。今回、歯髄 cAMP の抽出法として、TCA, PCA, 塩酸による方法を比較した (Table 1) が、PCA および塩酸抽出試料の PBA 法-filter 法と活性炭法との測定値では、50~60% の変動がみられた。これは Tovey ら²⁸がいうように、PBA 法の反応に介入する他の物質が活性炭に吸着された結果と考えられる。一方、TCA 抽出試料の PBA 法測定値では差がなかった。cAMP の回収実験 (Fig. 9) では、TCA 抽出物は 100% 回収されたが、PCA 抽出物では非常に低い 20~30% の回収率であった。これは TCA 抽出物中には cAMP の結合反応に影響を及ぼす物質がないことを示し、一方、PCA 抽出物では、処理過程で生じた過塩素酸カリウムが PBA 法の結合反応を妨害した結果と思われ、Albano ら²⁴と同様の結果であった。RIA 法による測定では、抽出溶媒の違いによる変動はなく (Table 1), いず

れの抽出法でも 100% の回収率であった (Fig. 9)。Brown ら²³は TCA と PCA 抽出とで、PBA 法による測定値には差がなく、直接組織の cAMP が測定できるとのべている。しかし、十分な cAMP が存在する多量の組織では PCA 抽出法は可能であって、歯髄のような微量組織 (ラット 300 g 前後で下顎切歯歯髄 15~18 mg/1 歯髄) では cAMP 抽出には、6% TCA が最適と考えられる。

cAMP の測定を妨害する物質として、塩および ATP, ADP, AMP 等がある。これらのヌクレオチドは組織抽出液中に cAMP にくらべて、きわめて大量に存在している⁵⁵。PBA 法に使用する結合蛋白は cAMP に特異的に結合するものであるが、cAMP 以外のヌクレオチドの影響について Gilman²⁷ は検討した。すなわち、PBA 法で cAMP 結合に 50% 阻害を生じる ATP, GTP の濃度は、cAMP 40 nM で各々 1 mM, 0.7 mM であり、ADP, AMP 1 mM での阻害率は 18, 21% と報告した。同じく PBA 法で、Brown ら²³、岡ら⁵⁶は cAMP 以外のヌクレオチドは高濃度まで結合反応に影響を与えず、組織抽出液を直接、あるいは 10 倍希釈した試料で測定をおこなえば妨害がないとのべている。

RIA 法では、cAMP 以外のヌクレオチドによる阻害について、Steiner ら³⁷は cAMP と抗血清との結合率を 100 とすれば、ATP, ADP, AMP の結合率はそれぞれ 0.002, 0.001, 0.001 と報告し、RIA 法の抗血清が cAMP に対してのみきわめて結合性が高いことを示している。さらに、試料のサクシニル化による測定感度の増大^{40,41}と、試料の除蛋白操作を必要としない、PBA 法の 200 倍の検出感度を有する RIA 法を Honma ら⁴²は開発した。

今回の実験で、歯髄の TCA 抽出物の cAMP 測定値 (Table 1, Fig. 1, 2), 肝臓と腎臓の測定値 (Fig. 2), および歯髄の 37°C 放置による歯髄 cAMP 測定値の変動 (Fig. 3) で、いずれの測定値においても PBA 法による測定値が、RIA 法による測定値より 2~3 倍高い値であった。また、歯髄組織重量の少ない例では、PBA 法によ

る測定値レベルが異常に増加する傾向がみられた (Fig. 1)。以上の理由から、PBA 法で、結合蛋白の阻害作用の大きい ATP について調べた (Fig. 10)。これによると、低濃度の cAMP では ATP 濃度に依存して著しい回収率の変動がみられ、結合蛋白が cAMP とではなく、ATP と結合する偽反応がおきていることを示している。すなわち、今回の組織の TCA 抽出物に cAMP 以外のヌクレオチド、特に ATP が存在し、PBA 法の結合反応に介入している可能性がある。さらに、PBA 法では前にのべたが、PCA 抽出物の塩類による妨害反応がみられた (Table 1, Fig. 9)。Albano ら²⁴⁾、Tsang ら⁵⁷⁾、Shanfeld ら⁵⁸⁾は PBA 法では塩類が結合反応を阻害すると報告している。しかし、TCA 抽出試料中に存在するぐらいの量では、PBA 法の結合性に何ら影響はないと、Albano ら²⁴⁾、Gilman²⁹⁾、Tsang ら⁵⁷⁾はのべている。

RIA 法では、データーを示さなかったが Fig. 10 と同一試料で、ATP の結合性に与える影響を調べたが、ATP の関与はまったくなく 100% 回収された。また PCA 抽出試料での cAMP の回収率は、TCA 抽出と同様に 100% 回収され (Fig. 9)、Honma ら⁴²⁾の結果と一致した。以上のように、RIA 法は PBA 法と比べて、ATP や塩類による阻害を受けず、さらに検出感度の点からも優れた cAMP 測定法である。

組織抽出試料中の cAMP 濃度の濃縮や、cAMP 測定を妨害する物質の除去、特に ATP など、あるいは微量の cGMP と cAMP の分離のために、抽出試料の精製操作が必要である。cAMP の精製法には Dowex カラムクロマトグラフィー 50 W タイプ^{25,44,45,59,60)} および AG タイプ^{53,61,62)}による方法、酸化アルミニウムクロマトグラフィーによる方法^{63,64)}、Sephadex G-25 による方法⁶⁵⁾、薄層クロマトグラフィーによる方法⁶⁶⁾、硫酸亜鉛-水酸化バリウムによる沈澱法^{44,45)}、あるいはこれらを組み合せた方法^{25,67)}がある。

今回は分離法が簡単で、カラム溶出液を直接 PBA 法と RIA 法とで測定が可能である Dowex

50W-X2 によるカラムクロマトグラフィーでおこなった。³H-cAMP と市販 cAMP の溶出部位は一致し (Fig. 4, 5)、Wolton ら²⁵⁾、Krishna ら⁴⁵⁾の cAMP 溶出部位とも一致し、fraction No. 5 のピークは cAMP と同定した。市販 cAMP の PBA 法および RIA 法による検出パターンは一致し (Fig. 5)、cAMP のみの試料では、いずれの方法で測定しても、測定方法による差がなかった。ついで、cAMP に各種濃度の ATP を添加した試料の PBA 法での検出パターンは (Fig. 6)、cAMP 濃度が一定であるにもかかわらず、cAMP 溶出部位の No. 5 のピークが ATP 濃度に依存して増加した。さらに Krishna ら⁴⁵⁾の報告と同一部位で溶出した ATP (Fig. 4) のピーク (No. 2) は No. 5 のピークと連動して増大した (Fig. 6)。PBA 法による検出パターンは比較的高濃度の ATP により著しい影響を受け、高い値を示す。結合反応を妨害する塩類、特に Ca⁵⁸⁾は、この分画内に溶出されず、PBA 法の検出パターンには Ca の影響は考えられない。一方、RIA 法による測定では、cAMP に ATP を添加した試料の溶出パターンは示さなかったが、PBA 法と同一試料であるにもかかわらず、No. 5 ピークの増加がみられず、RIA 法の抗血清の cAMP に対する著しい特異性を示している。

つぎに、cAMP に cGMP を添加した試料の検出パターン (Fig. 7) は、PBA 法と RIA 法とでの結果は一致せず、PBA 法では cAMP に ATP を添加した検出パターン (Fig. 6) と同様に No. 5 ピークの増加がみられた。PBA 法による測定では、cAMP 濃度の 1/10 の cGMP 量でも ATP と同様に結合反応に影響を与えるが、その大きさは、カラム溶出前後の回収率 (Fig. 6, 7) と、cAMP に ATP を添加した試料の回収率 (Fig. 10)、および歯髄中にある ATP 量 (1~2 mM, 未発表) と cGMP 量 (RIA 法で 0.01~0.015 pmoles/mg wet wt. 未発表) から、cGMP よりも ATP の方が、PBA 法での結合反応に強く関与しているものと思われる。RIA 法による測定では cGMP の影響もみられなかった。

歯髄 TCA 抽出試料の Dowex カラムによる

PBA法での検出パターンはNo. 2とNo. 5の2つのピークに分離された(Fig. 8)。No. 2はATPおよびcGMPのピークであり(Fig. 4, 6, 7), No. 5のピークはcAMPのピークである(Fig. 4, 5, 6, 7)。RIA法による検出パターンはNo. 5をピークとするシングルの溶出帯であった。これらから、両測定法ともにNo. 5の溶出ピークは一致し、cAMPを検出していることを示しているが、PBA法の測定値がRIA法の測定値のほぼ2倍であり、カラム溶出後もATPによる影響を受けている。さらにカラム溶出後のcAMP溶出画分を集め、再びDowexカラムで溶出したが、PBA法の測定値がRIA法より高いことは変わらず、PBA法でのATPによる偽反応がきわめて強いことを示している。

市販cAMPのTCAホモジネートへの添加による回収率は、PBA法およびRIA法による測定で、ともに、低濃度では70~80%、高濃度では100%回収され(Table 2)、cAMPの損失がきわめて少ないことを示している。

歯髄のTCA抽出試料と、それにcAMPを添加した試料のPDEによるcAMP消化実験では、いずれの試料もPBA法とRIA法による測定で、ほぼ100%消失し(Table 3)、GilmanのPDE実験の結果²⁹⁾と一致した。しかし、今までのべてきたように、TCA抽出試料のPBA法の測定値はcAMPのみの値ではなく、ATPやcGMP等との偽反応(Fig. 6, 7, 10)によりPBA法測定値がRIA法測定値より2~3倍高くなること(Table 1, Fig. 1, 2, 3, 8)、摘出歯髄を37°Cで放置しても60分後PBA法では約50%の減少率しか記録されないこと(Fig. 3)、およびSteinerら³⁸⁾は今回使用した同一のcalf heart PDEでcAMPのみが分解されるのではなく、cGMPも分解されることを報告していることから、PDEでcAMPのみが分解されたのではなく、他の環状ヌクレオチドも同様に分解され、PBA法による測定で100%減少したものと考えられる。RIA法による測定ではPDEで100% cAMPが減少し(Table 3)、他の物質による影響もみられず(Fig. 6, 7)、さらに摘出歯髄の37°C放置実験で

も、ほぼ80%台の減少を示し(Fig. 3)、Steinerら³⁸⁾、Honmaら⁴²⁾の他組織での減少率と同様であった。以上より、歯髄TCA抽出試料のRIA法による測定値(Table 1, Fig. 1, 2)はかなり正確なcAMP量を表現し、その濃度は3~4 mMのレベルであった(Fig. 1)。ATP濃度については予備実験値ではあるが1~2 mMのレベルであった。PBA法による測定では、ATP添加によるcAMP回収率が170~200%であった(Fig. 10)。すなわち、70~100%がATPとの偽反応によるもので、PBA法で得られたcAMP量は実際の約2倍といえる。

摘出歯髄において、cAMP分解酵素を阻害するメチルキサンチン³⁾の一種であるtheophyllineを添加し、歯髄中のcAMPレベルの経時的変動を調べた(Fig. 3)。cAMPの量的レベルはPBA法による測定値がRIA法測定値の2~3倍ではあったが、その変化するパターンは両測定法とも共に平行であり、PBA法での測定値は歯髄中のcAMPの増減を十分に反映している。このように、theophylline添加によるresponseが両測定法にみられること、またDowexカラムの溶出パターン(Fig. 4, 5, 8)からも歯髄TCA抽出試料中にcAMPが存在し、PBA法でもcAMPが測定されていることを示し、PBA法でも歯髄cAMPの相対的評価は可能と考えられる。

塩酸抽出試料でのPBA-filter測定値がRIA法の測定値に近似していた(Table 1)が、塩酸抽出では試料がゲル状になり濃縮、乾燥化に難点があるために、今回それ以後の検討を加えなかった。

【今回の歯髄のTCA抽出によるcAMP量(pmoles/mg wet wt.)はPBA法で 0.60 ± 0.01 、RIA法で 0.20 ± 0.01 であった(Fig. 2)。下川ら⁶⁸⁾は、ウシ成熟歯胚歯髄で 0.45 ± 0.25 、未成熟歯胚歯髄ではその3倍であったと報告した。今回の本研究者のPBA法での測定値はこの成熟と未成熟歯胚歯髄の中間の値であった。

肝臓のcAMP量(pmoles/mg wet wt.)は歯髄cAMPに近似し、PBA法で 0.64 ± 0.04 、

RIA 法で 0.22 ± 0.02 であった (Fig. 2)。PBA 法による測定で報告された値は, Brown ら²³⁾は 0.795 ± 0.052 , Walton ら²⁵⁾は 1.2 ± 0.6 , Tsang ら⁵⁷⁾は 0.15 ± 0.013 , Pauk ら⁶¹⁾は $1.14 \sim 1.41$ であり, RIA 法では Steiner ら³⁸⁾が 0.96 ± 0.098 と報告した。今回の PBA 法測定値は Brown ら²³⁾の測定値に近い値であったが, RIA 法測定値は Steiner ら³⁸⁾の測定値の $1/4$ であった。

腎臓の PBA 法での測定値は 0.95 ± 0.02 で, RIA 法では 0.40 ± 0.01 であった (Fig. 2)。PBA 法による測定で報告された値は Tsang ら⁵⁷⁾は 0.70 ± 0.11 , Pauk ら⁶¹⁾は $1.42 \sim 1.52$ で, 今回の PBA 法による値は両報告値のほぼ中間に属する値であった。RIA 法では Steiner ら³⁸⁾は 0.88 ± 0.092 と報告し, 今回の RIA 法測定値の2倍の値であった。

今回の肝臓と腎臓のサンプリングは断頭後開腹してから凍結し, その後使用まで -20°C で保存し, 融解後秤量してから cAMP を抽出, 測定したので, この過程でかなり分解しているものと考えられる。しかし, 今回の PBA 法による測定値は, ほぼ報告された値に近いものであった。

要 約

ラット歯髄を分離後, TCA, PCA, 塩酸でホモジネートとし, それぞれの cAMP 値を比較した。また TCA 抽出物の Dowex 50 W-X2 によるカラムクロマトを行なって cAMP 画分を分離溶出した。cAMP の測定は PBA 法と RIA 法を行ない, 両測定法の特徴を比較検討した。

1. PBA 法では cAMP 抽出溶媒の相違による測定値の変動がみられ, とくに PCA の存在は PBA の結合反応を妨害したが, RIA 法ではこのような違いはみられなかった。

2. TCA 抽出による歯髄 cAMP の測定値は PBA 法で 0.60 ± 0.01 pmoles/mg wet wt., RIA 法では PBA 法の $1/3$ の 0.20 ± 0.01 であった。

3. TCA 抽出物の PDE 処理により, いずれの測定法でも 100% 消化が認められ, TCA 抽出液に添加した市販 cAMP の回収率も, 両測定法ともに 100% であった。

4. PBA 法では高濃度の ATP ($0.5 \sim 4$ mM) が存在すると, 高い cAMP 測定値を示した。

5. TCA 抽出物の Dowex カラムクロマトでの溶出パターンは, RIA 法による測定値では cAMP の1つのピークを示したが, PBA 法による測定値では cAMP と ATP+cGMP の2つのピークに分離された。

以上のことから, PBA 法の測定値は ATP の影響を大きくうけることがわかった。測定感度では RIA 法が PBA 法の200倍と優れているが, どちらの測定法でも歯髄 cAMP の増減は一致し, PBA 法でも cAMP の相対的評価が可能であると考えられた。

謝 辞

稿を終えるにあたり, 終始御懇篤なる御指導, 御校閲を賜りました鈴木璋俊教授に衷心より感謝し謝意を表わします。また種々の御協力をいただいた歯科薬理学教室員の方々に厚くお礼申し上げます。

本研究の一部は昭和52年度文部省科学研究費, 一般研究B (代表, 鈴木璋俊教授) および奨励研究(A) 昭和53年度文部省科学研究費, 一般研究B継続および奨励研究(A)によった。

文 献

- 1) Rall, T. W., Sutherland, E. W. and Berthet, J.: The relationship of epinephrine and glucagon to liver phosphorylase. *J. Biol. Chem.*, **224**: 463-475, 1957.
- 2) Sutherland, E. W. and Rall, T. W.: Fractionation and characterization of a cyclic adenosine ribonucleotide formed by tissue particle. *J. Biol. Chem.*, **232**: 1077-1091, 1957.
- 3) Sutherland, E. W., Robison, G. A. and Butcher, R. W.: Some aspects of the biological role of adenosine 3', 5'-monophosphate (cyclic cAMP). *Circulation.*, **37**: 279-306, 1968.
- 4) Wells, H. and Lloyd, W.: Effects of theophylline on the serum calcium of parathyroid hormone. *Endocrinology.*, **81**: 139-144,

- 1967.
- 5) Wells, H. and Lloyd, W.: Hypocalcemic effects of imidazole in rats. *Endocrinology.*, **83**: 521-529, 1968.
 - 6) Wells, H. and Lloyd, W.: Hypercalcemic and hypophosphatemic effects of dibutyryl cyclicAMP in rats after parathyroidectomy. *Endocrinology.*, **84**: 861-867, 1969.
 - 7) Vaes, G.: Parathyroid hormone-like action of N⁶-2'-O-dibutyryladenosine-3', 5'-(cyclic) monophosphate on bone explants in tissue culture. *Nature.*, **219**: 939-940, 1968.
 - 8) Chase, L. R. and Aurbach, G. D.: Activation of skeletal adenyl cyclase by parathyroid hormone **in vitro**. *Endocrinology.*, **84**: 761-768, 1969.
 - 9) Raisz, L. G. and Klen, D. C.: Stimulation of bone resorption by dibutyryl cyclic 3', 5'-adenosine monophosphate **in vitro**. *Fed. Proc.*, **28**: 320, 1969.
 - 10) Heermann E. M. P. M. and Konijn, T. M.: Effect of parathyroid extracts on cyclicAMP content of embryonic mouse calvaria. *Nature.*, **227**: 177-178, 1970.
 - 11) Chase, L. R. and Aurbach, G. D.: The effect of parathyroid hormone on the concentration of adenosine 3', 5'-monophosphate in skeletal tissue **in vitro**. *J. Biol. Chem.*, **245**: 1520-1526, 1970.
 - 12) Klein, D. C. and Raisz, L. G.: Role of adenosine-3', 5'-monophosphate in the hormonal regulation of bone resorption: studies with cultured fetal bone. *Endocrinology.*, **89**: 818-826, 1971.
 - 13) Heersche, J. N. M., Fedak, S. A. and Aurbach, G. D.: The mode of action of dibutyryl adenosine 3', 5'-monophosphate on bone tissue **in vitro**. *J. Biol. Chem.*, **246**: 6770-6775, 1971.
 - 14) 永田直一: サイクリック AMP とカルシウム. *日本臨床*, **30**: 714-721, 1972.
 - 15) 永田直一: CyclicAMP と骨の代謝. *骨代謝*, **7**: 203-211, 1974.
 - 16) 永田直一: 骨におけるカルシウム代謝とホルモンの作用. *代謝*, **12**: 45-57, 1975.
 - 17) Smith, D. M. and Johnston, C. C. Jr.: Cyclic 3', 5'-adenosine monophosphate levels in separated bone cells. *Endocrinology.*, **96**: 1261-1269, 1975.
 - 18) Luben, R. A., Wong, G. L. and Cohn, D. V.: Biochemical characterization with parathormone and calcitonin of isolated bone cells: provisional identification of osteoclasts and osteoblasts. *Endocrinology.*, **99**: 526-534, 1976.
 - 19) 鈴木章俊, 糸賀正修: Dibutyryl 3', 5'-cyclicAMP の硬組織形成におよぼす作用について. *日本薬理学雑誌 (抄録)*, **69**: 319-320P, 1973.
 - 20) 鈴木章俊, 糸賀正修: Dibutyryl 3', 5'-cyclicAMP の象牙質および骨の形成におよぼす作用の研究. *骨代謝*, **7**: 231-237, 1974.
 - 21) 鈴木章俊: 硬組織の石灰化におよぼす cyclicAMP と dibutyryl cyclicAMP との作用比較. *骨代謝*, **8**: 186, 1974.
 - 22) Suzuki, A. and Oyanagi, H.: Comparative effects of some cyclic nucleotide on the calcification of dentine in parathyroidectomized rats. *Jap. J. Pharmacol. (Suppl.)* **25**: 66, 1975.
 - 23) Brown, B. L., Albano, J. D. M., Ekins, R. P. and Sgherzi, A. M.: A simple and sensitive saturation assay method for the measurement of adenosine 3', 5'-cyclic monophosphate. *Biochem. J.*, **121**: 561-562, 1971.
 - 24) Albano, J. D. M., Barnes, G. D., Maudsley, D. V., Brown, B. L. and Etkins, R. P.: Factors affecting the saturation assay of cyclic AMP in biological systems. *Anal. Biochem.*, **60**: 130-141, 1974.
 - 25) Walton, G. M. and Garren, L. D.: An assay for adenosine 3', 5'-cyclic monophosphate based on the association of the nucleotide with a partially purified binding protein. *Biochemistry.*, **9**: 4223-4220, 1970.
 - 26) Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J.: Protein measurement with the folin phenol reagent. *J.*

- Biol. Chem., **193**: 265-275, 1951.
- 27) Weller, M., Rodnight, R. and Carrera, D.: Determination of adenosine 3', 5'-cyclic monophosphate in cerebral tissue by saturation analysis. *Biochem. J.*, **129**: 113-121, 1972.
- 28) Tovey, K. G., Oldham, K. G. and Whelan, J. A. M.: A simple direct assay for cyclic AMP in plasma and other biological samples using an improved competitive protein binding technique. *Clin. Chim. Acta.*, **56**: 221-234, 1974.
- 29) Gilman, A. G.: Protein binding assay for adenosine 3', 5'-monophosphate. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*, **67**: 305-312, 1970.
- 30) Wunderwald, P., Jurz, G. and Michal, G.: Assay of cyclic AMP by an isotope dilution test with binding protein. *Anal. Biochem.*, **59**: 468-481, 1974.
- 31) Miyamoto, E., Kuo, J. F. and Greengard, P.: Cyclic nucleotide-dependent protein kinase. *J. Biol. Chem.*, **244**: 6395-6402, 1969.
- 32) Walsh, D. A., Perkins, J. P. and Krebs, E. G.: An adenosine 3', 5'-monophosphate-dependent protein kinase from rabbit skeletal muscle. *J. Biol. Chem.*, **243**: 3763-3774, 1968.
- 33) Gill, G. N. and Garren, L. D.: On the mechanism of action of adrenocorticotrophic hormone: the binding of cyclic 3', 5'-adenosine monophosphate to an adrenal cortical protein. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*, **63**: 512-519, 1969.
- 34) Kumon, A., Yamamura, H. and Nishizuka, Y.: Mode of action of adenosine 3', 5'-cyclic phosphate on protein kinase from rat liver. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **41**: 1390-1297, 1970.
- 35) *Biochemica News*, No. 11, 1977. (Boehringer Mannheim-Yamanouchi edi)
- 36) Steiner, A. L., Parker, C. W. and Kipnis, D. M.: The measurement of cyclic nucleotides by radioimmunoassay. *Advan. Biochem. Psychopharmacol.*, **3**: 89-111, 1970.
- 37) Steiner, A. L., Parker, C. W. and Kipnis, D. M.: Radioimmunoassay for cyclic nucleotides. 1. preparation of antibodies and iodinated cyclic nucleotides. *J. Biol. Chem.*, **247**: 1106-1113, 1972.
- 38) Steiner, A. L., Pagliara, A. S., Chase, L. R. and Kipnis, D. M.: Radioimmunoassay for cyclic nucleotides. 2. adenosine 3', 5'-monophosphate and guanosine 3', 5'-monophosphate in mammalian tissues and body fluids. *J. Biol. Chem.*, **247**: 1114-1120, 1972.
- 39) Sato, T., Yoshino, H., Honma, M. and Ui, M.: Radioimmunoassay of succinyl cyclic AMP and application to micro-determination of cyclic nucleotides in blood. *Jap. J. Pharmacol. (Suppl.)* **26**: 1069, 1976.
- 40) Cailla, H. L., Racine-Weisbuch, M. S. and Delaage, M. A.: Adenosine 3', 5'-cyclic monophosphate assay at 10^{-15} mole level. *Anal. Biochem.*, **56**: 394-407, 1973.
- 41) Frandsen, E. K. and Krishna, G.: A simple ultrasensitive method for the assay of cyclic AMP and cyclic GMP in tissues. *Life Sci.*, **18**: 529-542, 1976.
- 42) Honma, M., Satoh, T., Takezawa, J. and Ui, M.: An ultrasensitive method for the simultaneous determination of cyclic AMP and cyclic GMP in small-volume samples from blood and tissue. *Biochem. Med.*, **18**: 257-273, 1977.
- 43) Dziak, R. and Brand, J. S.: Calcium transport in isolated bone cells. 1. bone cell isolation procedure. *J. Cell. Physiol.*, **84**: 75-84, 1974.
- 44) 武田誠郎: Protein binding 法による cyclic AMP の定量. *最新医学*, **30**: 612-616, 1975.
- 45) Krishna, G., Weiss, B. and Brodie, B. B.: A simple, sensitive method for the assay of adenylyl cyclase. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **163**: 379-385, 1968.

- 46) Bray, G. A.: A simple efficient liquid scintillator for counting aqueous solutions in a liquid scintillation counter. *Anal. Biochem.*, **1**: 279-285, 1960.
- 47) Fiske, C. H. and Subbarow, Y.: The colorimetric determination of phosphorus. *J. Biol. Chem.*, **66**: 375-400, 1925.
- 48) Trinder, P.: Colorimetric micro-determination of calcium in serum. *Analyst.*, **85**: 889-894, 1960.
- 49) Nagata, N., Sasaki, M., Kimura, N. and Nakae, K.: The hypercalcemic effect of parathyroid hormone and skeletal cyclic AMP. *Endocrinology.*, **96**: 725-731, 1975.
- 50) 木村博司: サイクリック AMP とサイクリック GMP. *日本臨床*. **34**: 2369-2379, 1976.
- 51) Kuo, J. F. and Greengard, P.: *Adv. Cyclic Nucleotide Res.*, ed. Greengard, P. and Robison, S. A. Vol. **2**, P. 41-50, Raven Press, New York, 1972.
- 52) Ebadi, M. S.: *Adv. Cyclic Nucleotide Res.*, ed. Greengard, P. and Robison, G. A. Vol. **2**, P. 89-109, Raven Press, New York, 1972.
- 53) Kimura, H., Thomas, E. and Murad, F.: Effect of decapitation, other and pentobarbital on guanosine 3', 5'-monophosphate and adenosine 3', 5'-phosphate levels in rat tissue. **343**: 519-529, 1974.
- 54) 竹沢順一, 国中 明, 吉野 宏: サンプルン方法による小脳 cyclic AMP, cyclic GMP 測定値の変動. *日本薬理学会総会要旨集*. P. 147, 1979.
- 55) 兼子俊男: cyclic AMP の定量法 (I). *代謝*. **8**: 103-115, 1971.
- 56) 岡 博, 兼子俊男: Competitive protein binding 法による cyclic AMP の定量. *代謝*. **9**: 715-720, 1972.
- 57) Tsang, C. P. W., Lehotay, D. C. and Murphy, B. E. D.: Competitive binding assay for adenosine 3', 5'-monophosphate employing a bovine adrenal protein: application to urine, plasma and tissue: *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **35**: 809-817, 1972.
- 58) Shanfeld, J., Shapiro, I. and Davitch, Z.: The measurement in bone. *Anal. Biochem.*, **66**: 450-459, 1975.
- 59) Patterson, W. D., Hardmann, J. G. and Sutherland, E. W.: A comparison of cyclic nucleotide levels in plasma and cells of rat and human blood. *Endocrinology.*, **95**: 325-327, 1974.
- 60) Kanamori, T., Kuzuya, H. and Nagatzu, T.: Excretion of cyclic GMP and cyclic AMP into human parotid saliva. *J. Dent. Res.*, **53**: 760, 1974.
- 61) Pauk, G. L. and Reddy, W. J.: Measurement of adenosine 3', 5'-monophosphate. *Anal. Biochem.*, **21**: 298-307, 1967.
- 62) Murad, F., Manganiello, V. and Vaughan, M.: A simple, sensitive protein-binding assay for guanosine 3', 5'-monophosphate. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*, **68**: 736-739, 1971.
- 63) White, A. A. and Zenser, V.: Separation of cyclic 3', 5'-nucleotide monophosphates from other nucleotides on aluminum oxide columns. *Anal. Biochem.*, **41**: 372-396, 1971.
- 64) Mao, C. C. and Guidotti, A.: Simultaneous isolation of adenosine 3', 5'-cyclic monophosphate (cAMP) and guanosine 3', 5'-monophosphate (cGMP) in small tissue samples.: *Anal. Biochem.*, **59**: 63-68, 1974.
- 65) Ohkubo, H., Takayanagi, I. and Takagi, K.: Relationship between the levels of intracellular cyclic nucleotides and mechanical responses induced by drugs. *Japan J. Pharmacol.*, **26**: 65-71, 1976.
- 66) Fahn, S., Albers, R. W. and Koval, G. J.: Thin-layer chromatography for the separation of nucleotides. *Anal. Biochem.*, **10**: 468-471, 1965.
- 67) Ramachandran, J.: A new simple method for separation of adenosine 3', 5'-cyclic monophosphate from other nucleotides and its use in the assay of adenyl cyclase. *Anal. Biochem.*, **43**: 227-239, 1971.
- 68) 下川仁弥太, 角田佐武郎, 大井田新一郎, 佐藤良一, 新井弘子, 佐々木 哲: 歯胚の発育と cyclic AMP について. *歯基礎誌 (抄)*, **19**: 378, 1977.