

蛍光色素カルセインを用いた Ca^{2+} 依存性の唾液腺水分分泌機構解明に関する研究

杉 田 誠

A study on Ca^{2+} -dependent fluid secretion from rat salivary glands monitored by a fluorescent probe, calcein

Makoto Sugita

(平成 8 年 3 月 19 日受付)

緒 言

唾液腺は交感神経、副交感神経の二重支配をうけ、水分、アミラーゼなどの酵素、ムチンを分泌し、口腔機能の維持や消化作用に重要な役割を果たしている。ラット唾液腺ではムスカリン性及び α -アドレナリン性刺激により水分分泌が引き起こされ、 β -アドレナリン性刺激によりアミラーゼやムチンが開口分泌される¹⁻³⁾。ムスカリン性及び α -アドレナリン性刺激は唾液腺腺房細胞において G 蛋白を介し phospholipase C (PLC) の活性化を引き起こし、inositol 1,4,5-trisphosphate (IP_3) を産生させる⁴⁾。 IP_3 の産生により IP_3 感受性の細胞内 Ca^{2+} 貯蔵部位からの Ca^{2+} 遊離と、それに続く細胞外からの Ca^{2+} 流入などの Ca^{2+} 動員により細胞内に上昇した Ca^{2+} が水分分泌の引き金となる⁵⁻⁸⁾。 Ca^{2+} 依存性の水分分泌は唾液腺に限らず多くの外分泌腺においてほぼ共通な機構により生じ、 Ca^{2+} 依存性の K^+ 及び Cl^- チャネルが重要な役割を果たすが^{9,10)}、唾液腺は Ca^{2+} 依存性の水分分泌を大量に引き起こすため、 Ca^{2+} 依存性の水分分泌機構の解明には有効である。

水分分泌過程では、腺房細胞において細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇により基底膜側に存在する K^+ チャネル及び

腺腔側に存在すると考えられる Cl^- チャネルの活性化により、 K^+ と Cl^- などのアニオンが電気的中性を保つように共役して細胞外に放出されることが必要である¹¹⁻¹⁴⁾。現在では Cl^- やその他のアニオンの腺腔側への分泌により、陽荷電を有する Na^+ が基底膜側より腺腔側へ輸送され、それらにより生じる浸透圧差に従い、水が腺腔側へ分泌されると考えられている^{15,16)}。また持続的な水分分泌を引き起こすためには、 Na^+-K^+ ATPase の活性とそれにより生じた Na^+ の電気化学勾配を利用して働く $\text{Na}^+-\text{K}^+-2\text{Cl}^-$ cotransporter, Na^+-H^+ exchanger, $\text{Cl}^--\text{HCO}_3^-$ exchanger などの活性化による K^+ , Cl^- の流入と、 Ca^{2+} 依存性 K^+ チャネル及び Cl^- チャネルの活性化による持続的な K^+ , Cl^- の放出が必要である¹⁷⁻²³⁾。

水分分泌に重要な役割を果たす細胞内 Ca^{2+} 濃度 ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) 調節機構及び maxi-K^+ チャネルをはじめとする Ca^{2+} 依存性 K^+ チャネルによる K^+ 放出機構の解析は行われてきたが^{13,24,25)}、実際の水分分泌の駆動力と考えられる Cl^- などのアニオン分泌の詳細な機構には未だ不明な点が多い。外分泌腺において水分分泌に働く Ca^{2+} 依存性 Cl^- チャネルはクロニングされておらず、チャネルの性質、活性制御機構及び細胞内での局在は明らかにされていない。したがって Cl^- などアニオン分泌に続き、水がどのような経路を通して腺腔側へ分泌されるか、またアニオン輸送と水分分泌がどのような関係にあるかは明確ではない。水が基底膜側から腺腔側に輸送される時には、細胞内を通して経細胞性に水が輸送される可能性と細胞間隙を通して傍細胞性に水が輸送される可能性が存在する。最近、水チャネルの存在が唾液腺においても確認され、

広島大学歯学部口腔生理学講座 (主任: 柴芳樹教授) 本論文の要旨は、平成 5 年 4 月の第 70 回日本生理学会大会、平成 5 年 10 月の第 35 回歯科基礎医学会総会、平成 6 年 3 月の第 71 回日本生理学会大会、平成 6 年 10 月の第 36 回歯科基礎医学会総会、平成 7 年 3 月の第 72 回日本生理学会大会、平成 7 年 9 月の第 37 回歯科基礎医学会総会において発表した。

経細胞性の水輸送系の働きが示唆されているが²⁶⁾、刺激時にはタイト結合の透過性が変化すると報告もあり^{27,28)}、 Ca^{2+} 依存性水分分泌時にイオン輸送に伴い水輸送がどのような経路で引き起こされるかは興味深い。形態的には Ca^{2+} 依存性の水分分泌時には、細胞の収縮と細胞内での液胞形成が観察されるが²⁹⁻³¹⁾、それらがイオン輸送とそれに引き続く水分分泌にどのように関連しているかは解明されていない。

唾液腺水分分泌機構の解明は分離腺房細胞における細胞内の Ca^{2+} 、 Na^+ 、 K^+ 、 Cl^- などのイオン濃度測定^{7,32,33)}、パッチクランプ法によるチャネル活性の解析^{9,24)} 及び灌流唾液腺を用いた水及びイオン分泌量測定により行われてきた^{2,34)}。しかし Cl^- などのアニオン分泌とそれに引き続く水分分泌機構の解明には新しい実験的方法の開発が必要である。最近では種々の蛍光色素が細胞内イオン濃度指示薬として、また共焦点レーザー顕微鏡を用いた分泌腺における開口分泌現象の可視化のため使用されている³⁵⁻³⁸⁾。強い蛍光強度を有するアニオン性の蛍光色素を唾液腺腺房細胞に負荷することにより、その蛍光を高感度でモニターし、アニオン性物質の分泌動態を直接観察することは、アニオン分泌及びそれに引き続く水分分泌機構の解明に有効であると考えられる。カルセインは分子量623で、細胞内では-4 から-5 の荷電を有し非常に強い蛍光を発する。カルセイン-AM は簡単に細胞内に負荷することができ、細胞内ではエステラーゼにより分解されカルセインとなるため³⁹⁾、アニオン性物質の分泌動態の観察に適することが示唆される。

本研究ではアニオン性の蛍光色素であるカルセインを唾液腺腺房細胞内に取り込ませることで、 Ca^{2+} 依存性の水分分泌に関連したアニオン性物質の分泌動態の観察を可能にすることにより、アニオン分泌及び水分分泌機構解明に新しい知見を得ることを目的とする。

材料ならびに方法

1. 分離腺房細胞におけるカルセイン放出の測定

雄性ウイスター系ラット (約 300 g) をペントバルビタール麻酔し、耳下腺及び顎下腺を摘出し細切した後、0.1% コラゲナーゼ (260 U/ml; type S-1, Nitta Gelatin, Osaka, Japan) を含む Krebs Henseleit Ringer solution (KHR: 103 mM NaCl, 4.7 mM KCl, 2.56 mM CaCl_2 , 1.13 mM MgCl_2 , 25 mM NaHCO_3 , 1.15 mM NaH_2PO_4 , 2.8 mM glucose, 4.9 mM sodium pyruvate, 2.7 mM sodium fumarate, 4.9 mM sodium glutamate, 0.1% bovine serum albumin (BSA), 12.5 mM HEPES: pH 7.4) 中で30分間処理した。ピペットで吸引、排出を繰り返し細胞塊を分散させ、ナイロンメッシュによ

り径 10-50 μm の分離腺房細胞を得た。

カルセインの細胞内負荷と放出量の測定は以下の方法で行った。細胞外液中にカルセインのエステル型であるカルセイン-AM (5 μM) を加え 37°C、10分間インキュベートすると、カルセイン-AM は細胞内に入り、内因性のエステラーゼによりカルセインに加水分解され、細胞内に残留する³⁹⁾。遠心操作により外液のカルセイン-AM を除去した後、外液中に分泌刺激物質を加えると、細胞内カルセインは一部細胞外に放出される。遠心操作により細胞と上清を分離した後、両画分に界面活性剤である nonidet P-40 を最終的に 5×10^{-3} g/ml の濃度になるように加え、細胞画分における細胞内のカルセインを漏出させた。細胞外に放出されたカルセイン量及び細胞内に残留するカルセイン量を蛍光分光光度計850型 (Hitachi, Tokyo, Japan, 広島大学歯学部中央研究室所属) での蛍光測定 (励起波長 490 nm, 蛍光波長 510 nm) により求め、最初に細胞内に取り込ませた総カルセインのうち何%が刺激により放出されたかを測定した。結果は各々 3 例以上の実験の平均値で示した。

2. 分離腺房細胞におけるアミラーゼ分泌の測定

前述と同様に分離腺房細胞を調整しアミラーゼ分泌の測定を行った。分離した細胞を分泌刺激物質存在下で20分間インキュベートし、外液中に分泌されたアミラーゼ及び細胞内に残留したアミラーゼの活性を Bernfeld の方法に従い求めた⁴⁰⁾。要約するとアミラーゼ希釈液に potato amylopectin を含む基質溶液を加え、20°C で3分間インキュベートした後、ジニトロサリチル酸溶液を加え反応を停止させる。その反応混合液を沸騰水中に5分間入れ呈色させた後、冷却し蒸留水で希釈して分光光度計 UV-1200 (Shimadzu, Kyoto, Japan) により 540 nm で吸光度測定を行い、アミラーゼ活性を調べた。そして刺激前に細胞内に存在する総アミラーゼ量に対する割合で分泌量を示した。この結果も各々の実験で3例以上の平均値で示した。

3. $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の測定

$[\text{Ca}^{2+}]_i$ の測定は分離腺房細胞内に負荷した fura-2 の蛍光強度変化により測定した。分離腺房細胞を 2 μM fura-2/AM を含む KHR 中でインキュベートし、KHR で洗浄した後、poly-L-lysine でコートしたカバーガラス上に付着させた。倒立型蛍光顕微鏡 (Olympus IMT2-RFL, with Xenon lamp) のステージのチャンパーの中に分離腺房細胞を付着させたカバーガラスを置き、そのチャンパー内を持続的に KHR で灌流した。 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 変化は画像解析装置 ARGUS-50/CA

(Hamamatsu Photonics, Hamamatsu, Japan) により測定した。励起波長 340 nm と 360 nm で得られた fura-2 の蛍光像を 3-20 秒間隔でコンピューター (PC/AT compatible) に保存し、蛍光比 (F340/F360) を算出することにより $[Ca^{2+}]_i$ 変化を測定した。なお結果は各々 7 つの細胞像の平均値で示した。

4. K^+ 及び Cl^- 電流の測定

分離腺房細胞における K^+ 及び Cl^- 電流は、ホールセルパッチクランプ法により求めた。位相差顕微鏡のステージ上のチャンパーの中に分離腺房細胞を付着させたカバーガラスを置き、そのチャンパー内を持続的に BSA を含まない KHR で灌流した。patch/whole cell clamp amplifier CEZ-2400 (Nihon Kohden, Tokyo, Japan) を使用しホールセル電流を測定した。分離腺房細胞における Cl^- 及び K^+ 電流は膜電位をそれぞれ -80 mV と 0 mV に変化させ測定し、その電流はペンレコーダーのチャート上に記録した。なおピペット内溶液の組成は 140 mM KCl, 1 mM $MgCl_2$, 10 mM HEPES, 0.5 mM ethylene glycol-bis (beta-aminoethyl ether)- N,N,N',N' -tetraacetic acid (EGTA), 10 mM glucose, 1 mM ATP (pH 7.4) である。

5. 灌流ラット顎下腺を用いたカルセイン放出及び水分分泌の測定

ラットをベントバルビタール麻酔後、ポリエチレンチューブを顎下腺の動脈、静脈、導管にカニューレションした。顎下腺を摘出し動脈より KHR (BSA 不含) を 2 ml/min の流速で灌流した。顎下腺内にカルセインを負荷するため、 5μ M カルセイン-AM を含む KHR を 4° C で 3 分間灌流した後、 37° C の KHR で 7 分間灌流する操作を 3 回繰り返す、 37° C の KHR で 20 分間灌流し洗浄した。その後、分泌される唾液および静脈側から灌流液を 30 秒ごとに採取しながら、刺激を行った。分泌される唾液量は重量測定により求め、唾液中及び灌流液中に放出されるカルセイン量は前述と同様に蛍光測定により求めた。

6. 共焦点レーザー顕微鏡による分離腺房細胞の観察

方法(1)と同様にカルセインを負荷した分離腺房細胞を poly-L-lysine でコートしたカバーガラス上に付着させ、共焦点レーザー顕微鏡 (LSM-410, Carl Zeiss, Germany, 広島大学歯学部中央研究所所属) 下で分離腺房細胞を観察した。 488 nm アルゴンレーザーにより得られた蛍光像及び微分干渉像を観察した。

7. 統計学的処理

有意差の検定は、Student's t-test により行った。

8. 使用薬物

Carbamylcholine chloride (CCh), adrenaline bitartrate (AD), phenoxybenzamine hydrochloride (PBZ), $N^6,2'$ - O -dibutyryladenine $3',5'$ -cyclic monophosphate sodium salt (dbcAMP), 4-bromo-A23187 (4Br-A23187), charybdotoxin (CTX), verapamil, bumetanide, 4,4'-diisothiocyanatostilbene-2,2'-disulfonic acid (DIDS) は Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA) より購入した。L-noradrenaline bitartrate (NA), A23187, diphenylamine-2-carboxylate (DPC) は Wako Pure Chemical (Osaka, Japan) より購入した。 O,O' -bis (2-aminophenyl) ethyleneglycol- N,N,N',N' -tetraacetoxymethyl ester (BAPTA-AM), fura-2 / AM は Dojindo (Kumamoto, Japan) より、DL-isoproterenol hydrochloride, DL-propranolol hydrochloride (PPN), potato amylopectin は Nacalai Tesque (Kyoto, Japan) より購入した。Atropine sulphate (ATR) と 5- (N,N -dimethyl)-amiloride hydrochloride (DMA) はそれぞれ Houei Yakukou (Osaka, Japan) 及び Research Biochemicals International (MA, USA) より購入した。Calcein-AM は Molecular Probes (Eugene, Ore., USA) より購入した。

結 果

1. 分離腺房細胞からの交感神経、副交感神経作動薬によるカルセイン放出

ラット耳下腺より分離した腺房細胞内に負荷したカルセインは 10^{-6} M CCh 刺激により、図 1a に示す様な時間経過で細胞外に放出された。細胞内に負荷したカルセインは無刺激状態でも自発的に放出されており、10 分間で細胞内の $6.0 \pm 0.1\%$ (平均 \pm 標準誤差, $n=3$) が放出されるが、図は刺激により放出された正味のカルセイン量を示している。CCh 刺激によるカルセイン放出は 8 分後に最大に達した。

CCh 刺激によるカルセイン放出の濃度依存性を調べると、分離腺房細胞からのカルセイン放出は 10^{-7} M 以上の濃度の CCh 刺激により誘発され、 10^{-6} M 刺激で最大となった (図 1b)。

各種刺激薬により放出されるカルセイン量及びアミラーゼ量の比較を行うと、刺激 10 分間で引き起こされるカルセイン放出は 10^{-6} M CCh, NA, AD 刺激により顕著であるのに対し (図 2), 刺激 20 分間のアミラーゼ分泌は 10^{-6} M NA, AD, IPR により顕著に起こり、CCh 刺激では少なかった (図 3)。NA, AD 刺激によるカルセイン放出量は CCh 刺激による放出量よ

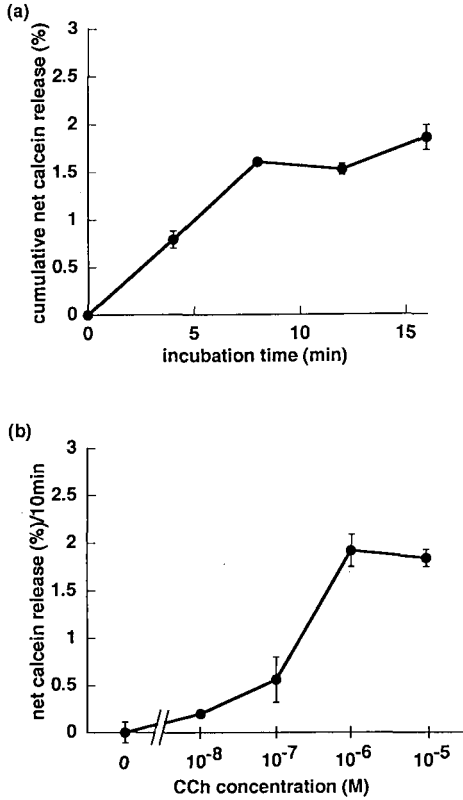


図1 耳下腺分離腺房細胞からのCCh刺激によるカルセイン放出。
 a: 10^{-6} M CCh 刺激による刺激時間と正味のカルセイン放出量の関係。
 b: 刺激時間10分でのCCh刺激によるカルセイン放出の濃度依存性。縦線は標準誤差を示す (n=3)。

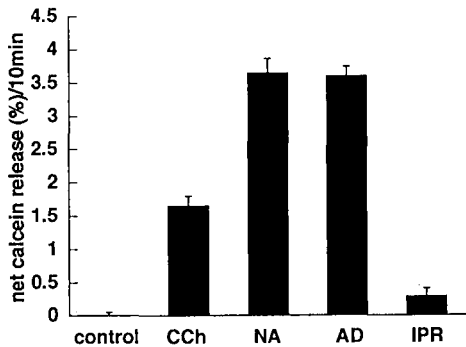


図2 副交感神経及び交感神経作働薬によるカルセイン放出。
 耳下腺分離腺房細胞において刺激時間10分での 10^{-6} M CCh, 10^{-6} M NA, 10^{-6} M AD, 10^{-6} M IPR 刺激によるカルセイン放出量を示す。縦線は標準誤差を示す (n=3)。

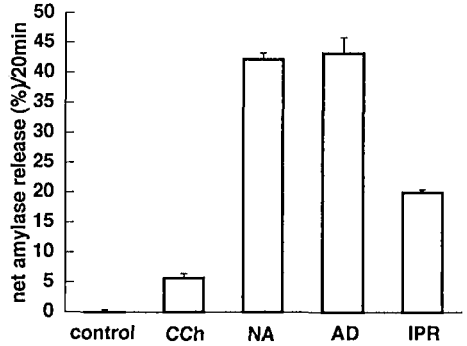


図3 副交感神経及び交感神経作働薬によるアミラーゼ分泌。
 耳下腺分離腺房細胞において刺激時間20分での 10^{-6} M CCh, 10^{-6} M NA, 10^{-6} M AD, 10^{-6} M IPR 刺激によるアミラーゼ分泌量を示す。縦線は標準誤差を示す (n=3)。

りも多く、IPRはCCh刺激による放出を促進した。
 CCh刺激によるカルセイン放出はムスカリン性受容体遮断薬であるATRにより抑制され、NA及びADにより誘発されるカルセイン放出は β 受容体遮断薬であるPPN 10^{-6} Mよりも α 受容体遮断薬であるPBZ 10^{-6} Mにより顕著に抑制された(図4)。一方NA刺激によるアミラーゼ分泌はPBZよりもPPNにより著明に抑制された(図4)。

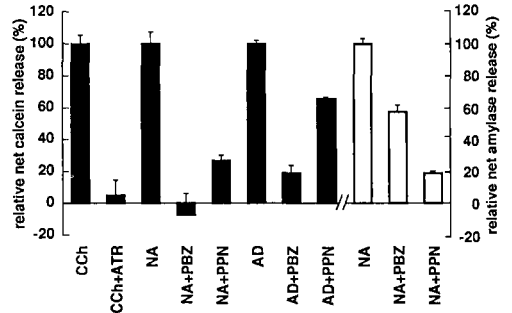


図4 カルセイン放出及びアミラーゼ分泌に対する各種受容体遮断薬の効果。
 耳下腺分離腺房細胞において 10^{-6} M CCh, 10^{-6} M NA, 10^{-6} M AD 刺激によるカルセイン放出及びアミラーゼ分泌に対する 10^{-6} M ATR, 10^{-6} M PBZ, 10^{-6} M PPN の効果を相対値で示す。■はカルセイン放出を、□はアミラーゼ分泌を示し、縦線は標準誤差を示す (n=3)。

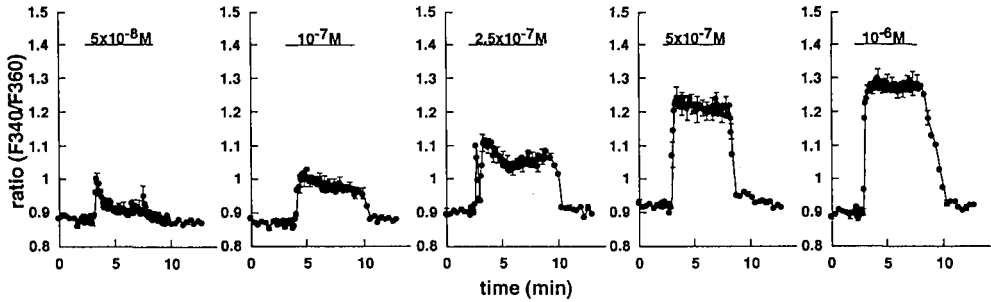


図5 耳下腺分離腺房細胞での CCh 刺激による $[Ca^{2+}]_i$ 変化。

各種濃度の CCh 刺激時における $[Ca^{2+}]_i$ 変化を、励起波長340及び360 nm における蛍光強度の相対比で示す。縦線は標準誤差を示す (n=7)。

2. 分離腺房細胞におけるカルセイン放出に対する Ca^{2+} 依存性

耳下腺分離腺房細胞においては、 5×10^{-8} M 以上の CCh 刺激により濃度依存的に $[Ca^{2+}]_i$ 上昇が引き起こされた (図5)。

細胞外液の Ca^{2+} を除去すると、図6bに示すように、CCh 刺激による $[Ca^{2+}]_i$ 上昇は一過性になり、図5に示すような持続的な $[Ca^{2+}]_i$ 上昇は消失する。しかし CCh 刺激により誘発されるカルセイン放出は細胞外 Ca^{2+} の除去により影響されなかった (図6a)。

カルセイン放出に対する Ca^{2+} 依存性を調べるために Ca^{2+} キレーターである BAPTA-AM (10^{-5} M) をカルセイン-AM と同様に細胞内に負荷すると、CCh や NA 刺激により誘発されるカルセイン放出は顕著に抑制された (図7)。

Ca^{2+} イオノフォアである A23187 (2.5×10^{-6} M) により受容体刺激を行わず $[Ca^{2+}]_i$ 上昇を引き起こすと、カルセイン放出が誘発された。膜透過型の cAMP である dbcAMP 10^{-3} M 刺激ではカルセイン放出は生じなかった (図8)。一方アミラーゼ分泌は A23187 刺激では少なく、dbcAMP 刺激により顕著に観察された (図9)。

3. カルセイン放出に果たすイオンチャネル及びイオン輸送系の役割

唾液腺腺房細胞における $[Ca^{2+}]_i$ 上昇はイオンチャネル及びイオン輸送系を活性化させるため、 Ca^{2+} 依存性のカルセイン放出におけるイオンチャネル及びイオン輸送系の役割を検討した。

耳下腺分離腺房細胞において 10^{-6} M CCh 刺激により誘発されるカルセイン放出は 10^{-7} M CTX, 7.5×10^{-3} M Ba^{2+} 及び 10^{-5} M verapamil 等の K^+ チャネル阻害剤を同時に加えることにより顕著に抑制された (図10)。細胞外液を高 K^+ 溶液 (50 mM) に置換

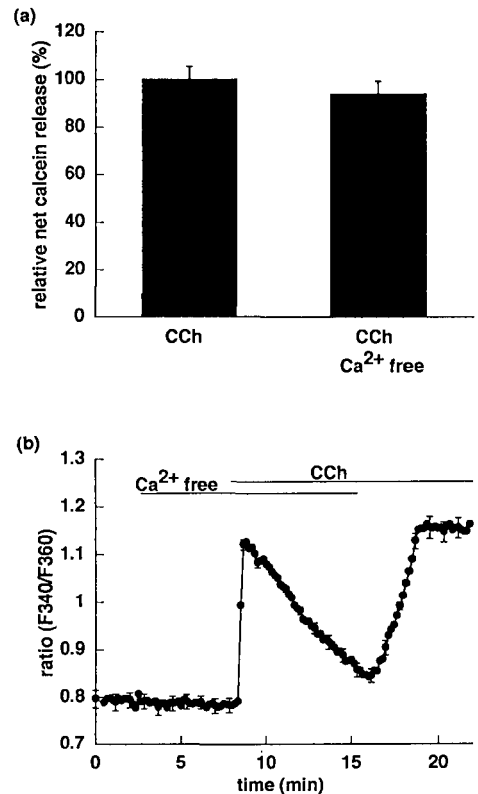


図6 CCh 刺激によるカルセイン放出及び $[Ca^{2+}]_i$ 変化に対する細胞外 Ca^{2+} 除去の影響。

a: 耳下腺分離腺房細胞において外液 Ca^{2+} 存在下, 非存在下での 10^{-6} M CCh 刺激によるカルセイン放出量を相対値で示す。縦線は標準誤差を示す (n=3)。

b: 耳下腺分離腺房細胞において外液 Ca^{2+} 存在下, 非存在下での 10^{-6} M CCh 刺激による $[Ca^{2+}]_i$ 変化を示す。縦線は標準誤差を示す (n=7)。

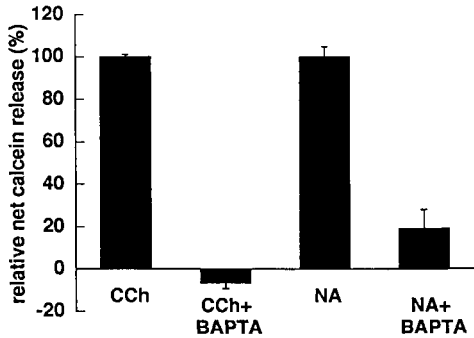


図7 カルセイン放出に対する BAPTA の効果。
耳下腺分離腺房細胞において 10^{-6} M CCh, 10^{-6} M NA 刺激によるカルセイン放出に対する BAPTA の効果を相対値で示す。縦線は標準誤差を示す (n=3)。

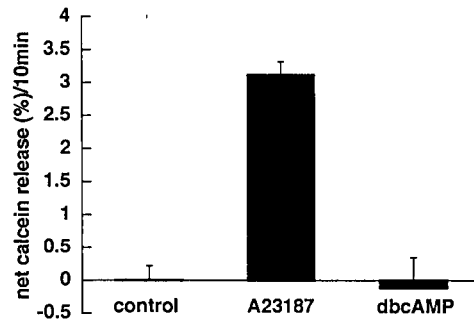


図8 カルセイン放出に対する A23187 及び dbcAMP の影響。
耳下腺分離腺房細胞において刺激時間10分での 2.5×10^{-6} M A23187 及び 10^{-3} M dbcAMP 刺激によるカルセイン放出量を示す。縦線は標準誤差を示す (n=3)。

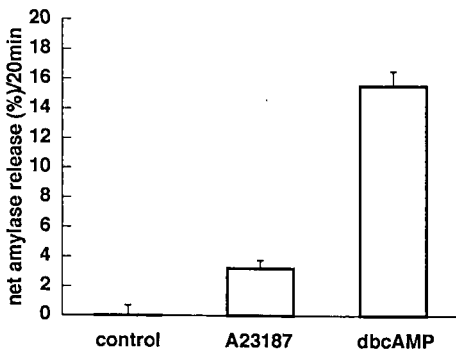


図9 アミラーゼ分泌に対する A23187 及び dbcAMP の影響。
耳下腺分離腺房細胞において刺激時間20分での 2.5×10^{-6} M A23187 及び 10^{-3} M dbcAMP 刺激によるアミラーゼ分泌量を示す。縦線は標準誤差を示す (n=3)。

すると CCh 刺激によるカルセイン放出は抑制された。 Na^+-K^+ ATPase の阻害剤である 5×10^{-4} M ouabain によっても CCh 刺激によるカルセイン放出は抑制されたが, $\text{Na}^+-\text{K}^+-2\text{Cl}^-$ cotransporter を阻害する 10^{-3} M bumetanide, Na^+-H^+ exchanger を阻害する 2×10^{-5} M DMA 及び $\text{Cl}^--\text{HCO}_3^-$ exchanger を阻害する 5×10^{-4} M DIDS は影響を与えなかった (図10)。

図11では CTX の K^+ チャネル抑制に対する選択性を調べたが, CTX は CCh 刺激により引き起こされる $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇及び Cl^- チャネルの活性化には影響せず, CCh 刺激による K^+ チャネルの活性を顕著に抑制した。

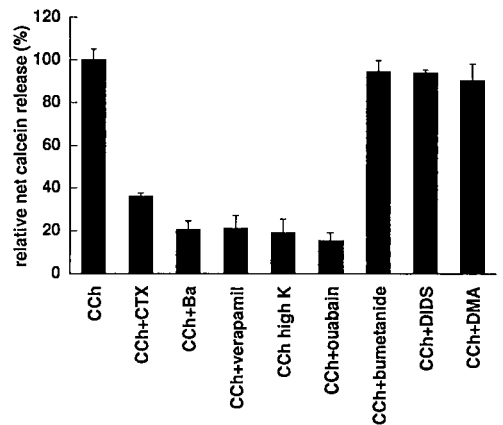


図10 カルセイン放出に対する各種イオン輸送系阻害剤の効果。

耳下腺分離腺房細胞において 10^{-6} M CCh 刺激によるカルセイン放出に対する 10^{-7} M CTX, 7.5×10^{-3} M Ba^{2+} , 10^{-5} M verapamil, 5×10^{-4} M ouabain, 10^{-3} M bumetanide, 5×10^{-4} M DIDS, 2×10^{-5} M DMA の効果及び高 K^+ 溶液 (50mM) 置換の効果を相対値で示す。縦線は標準誤差を示す (n=3)。

4. 灌流ラット顎下腺におけるカルセイン放出と水分泌

灌流ラット顎下腺を用い, カルセイン放出と水分泌の関連を調べた。灌流ラット顎下腺において細胞内に負荷したカルセインは, 唾液中及び灌流液中の二方向に放出された。細胞内カルセインは無刺激時において灌流液中に持続的に一定の割合で放出されている。 10^{-6} M CCh 刺激により刺激の初期にカルセインは唾液中に一過的に高濃度に放出された (図12)。それに比較し灌流液中に放出されるカルセイン濃度は CCh 刺激後, 若干増加した。CCh 刺激の初期に唾液中に放出されるカルセイン濃度は灌流液中の濃度に比較し

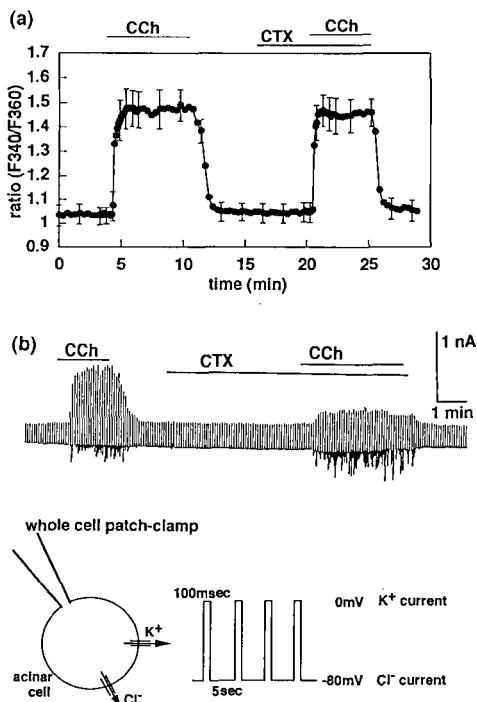


図11 CCh 刺激による $[Ca^{2+}]_i$ 変化及び K^+ , Cl^- 電流に対する CTX の効果。

a: 耳下腺分離腺房細胞において 10^{-7} M CTX 存在下, 非存在下での 10^{-6} M CCh 刺激による $[Ca^{2+}]_i$ 変化を示す。縦線は標準誤差を示す (n=7)。

b: 耳下腺分離腺房細胞において 10^{-7} M CTX 存在下, 非存在下での 10^{-6} M CCh 刺激による K^+ 電流 (上トレース) 及び Cl^- 電流 (下トレース) を示す。

37.4 ± 5.3 倍 (平均土標準誤差, n=5) であった。灌流顎下腺において CCh 刺激による水分泌は二相性に引き起こされ, 初期相と後期の持続相が観察された (図12)。

5. 灌流ラット顎下腺におけるカルセイン放出と水分泌の Ca^{2+} 依存性

灌流ラット顎下腺において灌流液の Ca^{2+} を除去すると 10^{-6} M CCh 刺激により引き起こされる後期の持続的な水分泌は抑制されたが, 水分泌の初期相及び唾液中へのカルセイン放出は抑制されなかった (図13a)。灌流系において 2×10^{-5} M BAPTA-AM を使用し, カルセイン-AM と同様にして細胞内に BAPTA を負荷した場合, Ca^{2+} 除去条件下で 10^{-6} M CCh 刺激を行うと, 図13a のような水分泌の初期相及び唾液中へのカルセイン放出は顕著に抑制された (図13b)。

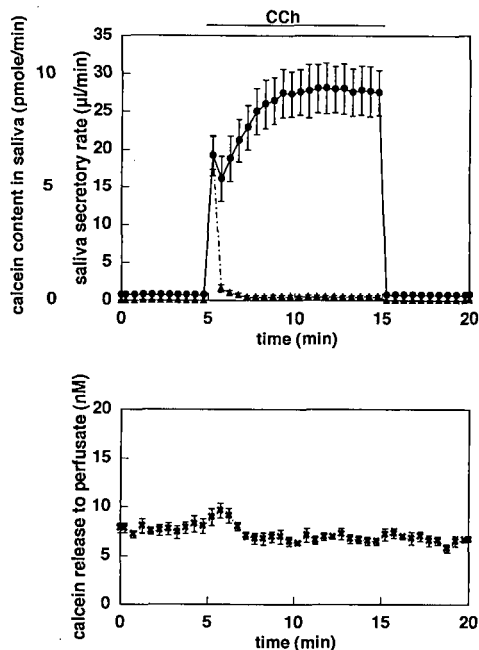


図12 灌流ラット顎下腺での CCh 刺激による水分泌及びカルセイン放出。

10^{-6} M CCh 刺激時の唾液分泌量を●, 唾液中へのカルセイン放出量を▲, 灌流液中へのカルセイン放出量を×で示す。縦線は標準誤差を示す (n=5)。

6. 灌流ラット顎下腺におけるカルセイン放出と水分泌におけるイオンチャネルの役割

K^+ チャネルを阻害する Ba^{2+} (7.5×10^{-3} M) を灌流液に加えると 10^{-6} M CCh 刺激による持続的な水分泌は消失し, 水分泌の初期相及び唾液中へのカルセイン放出は半分程度に抑制された。無刺激時の灌流液中への持続的なカルセイン放出は, Ba^{2+} 処理により減少し, CCh 刺激後若干の増加がみられた (図14)。

灌流液を高 K^+ 溶液 (50 mM) に置換すると 10^{-6} M CCh 刺激による水分泌は二相とも顕著に抑制され, 唾液中へのカルセイン放出も抑制された。無刺激時の灌流液中への持続的なカルセイン放出は, 高 K^+ 溶液に置換することにより減少し, CCh 刺激後初期に一過的に増加した (図15)。

Cl^- チャネル阻害剤である DPC (5×10^{-4} M) を灌流液に加えると 10^{-6} M CCh 刺激により引き起こされる水分泌の初期相及び唾液中へのカルセイン放出は殆ど影響されないが, 後期の持続的水分泌は CCh 単独刺激に比較し最大で82%抑制された。一方無刺激時の灌流液中への持続的なカルセイン放出は, DPC 処理により抑制され, CCh 刺激後の変化は顕著ではなかった (図16)。

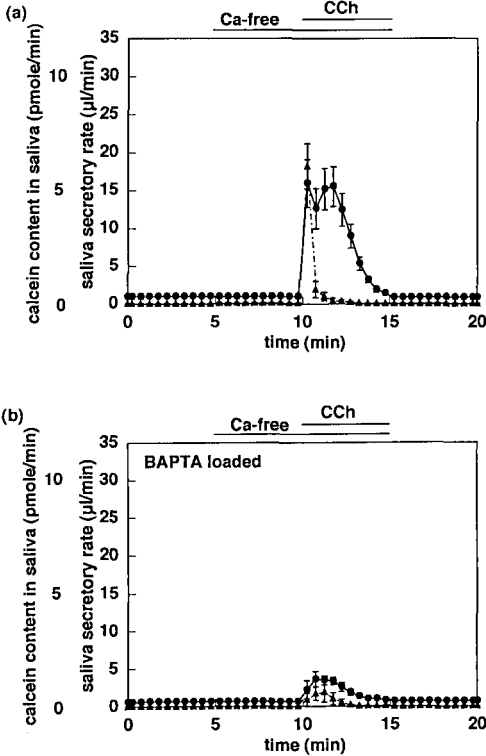


図13 CCh 刺激による水分泌及びカルセイン放出に対する細胞外 Ca^{2+} 除去及び BAPTA の効果。
 a : 灌流顎下腺において細胞外 Ca^{2+} 非存在下での $10^{-6} M$ CCh 刺激時の唾液分泌量を ●, 唾液中へのカルセイン放出量を ▲ で示す。
 b : BAPTA を細胞内に負荷した後, 細胞外 Ca^{2+} 非存在下で $10^{-6} M$ CCh 刺激を行った場合。縦線は標準誤差を示す (n=3)。

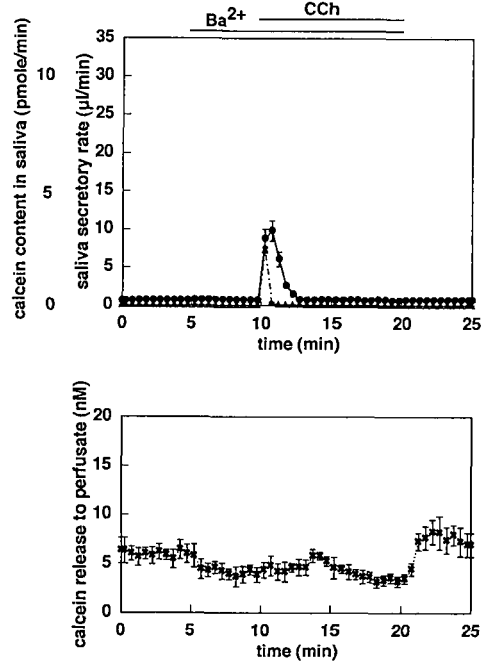


図14 CCh 刺激による水分泌及びカルセイン放出に対する Ba^{2+} の効果。

灌流顎下腺において $7.5 \times 10^{-3} M Ba^{2+}$ 存在下での $10^{-6} M$ CCh 刺激時の唾液分泌量を ●, 唾液中へのカルセイン放出量を ▲, 灌流液中へのカルセイン放出量を × で示す。縦線は標準誤差を示す (n=3)。

7. 共焦点レーザー顕微鏡によるカルセイン放出及び水分泌過程の観察

共焦点レーザー顕微鏡によりカルセインを負荷した顎下腺腺房を断面的に観察すると, 図17のようにカルセインの存在する部位が蛍光を発していた。負荷したカルセインは細胞質に高濃度に存在し, 分泌顆粒内にはあまり取り込まれなかった。 $10^{-6} M$ CCh 刺激は細胞収縮を引き起こし, 15秒後に灌流系における放出の時間経過とほぼ一致して, 矢印に示す細胞間分泌細管様構造にカルセインが放出され, その後消失することが認められた (図17)。

一方, $10^{-6} M$ CCh 刺激により後期の水分泌が引き起こされる時間経過に一致し, 図18の矢印に示すごとく液胞状の構造物が形成され, 蛍光のない部位が新たに出現した。これらの液胞は1分, 5分と経過するに従い, 数が増加し拡大していくことがカルセインによ

る蛍光像及び微分子干渉像において同時に観察された (図19)。また CCh 刺激により形成される液胞は図18に示すように, 細胞間分泌細管すなわち腺腔側に連絡してしているように観察された。

CCh 刺激により形成される液胞が腺腔側及び細胞外と連絡しているかを調べるため, 膜不透過型のカルセインを細胞外液に加え, 同様に共焦点レーザー顕微鏡下で顎下腺腺房を観察すると, $10^{-6} M$ CCh 刺激5分後に形成された液胞内にカルセインの蛍光が観察された (図20)。

8. 水分泌後期持続相と液胞形成

CCh 刺激による水分泌の後期持続相と液胞形成の関連を明らかにするために, 後期持続相を抑制する条件下で共焦点レーザー顕微鏡による観察を行った。外液の Ca^{2+} 非存在下で $10^{-6} M$ CCh 刺激を行うと, 図13に示すように後期の持続的な水分泌は抑制されたが, この条件下では, CCh 刺激による液胞形成は抑制されることがカルセインの蛍光像及び微分子干渉像より観察された (表1)。また K^{+} チャネル阻害剤であ

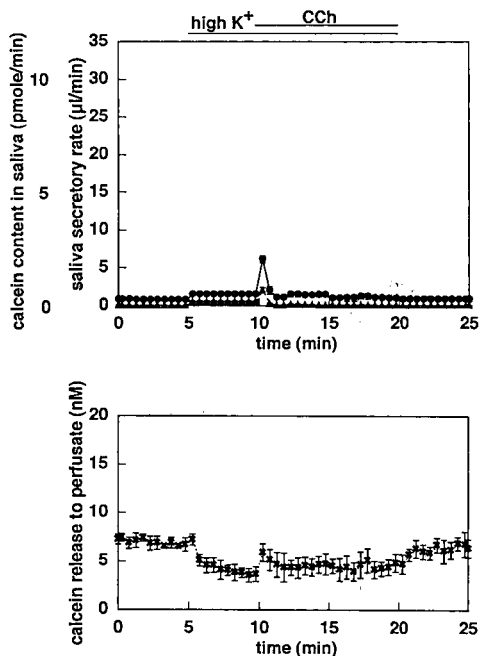


図15 CCh 刺激による水分泌及びカルセイン放出に対する高 K^+ 溶液置換の効果。

灌流顎下腺において高 K^+ 溶液下 (50 mM) での 10^{-6} M CCh 刺激時の唾液分泌量を●, 唾液中へのカルセイン放出量を▲, 灌流液中へのカルセイン放出量を×で示す。縦線は標準誤差を示す (n=3)。

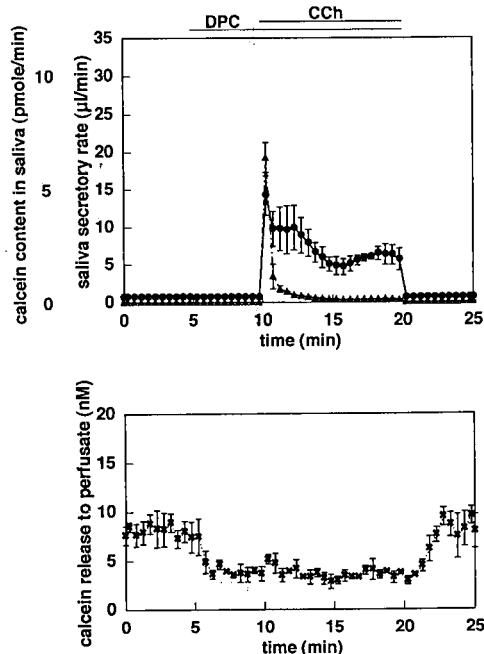


図16 CCh 刺激による水分泌及びカルセイン放出に対する DPC の効果。

灌流顎下腺において 5×10^{-4} M DPC 存在下での 10^{-6} M CCh 刺激時の唾液分泌量を●, 唾液中へのカルセイン放出量を▲, 灌流液中へのカルセイン放出量を×で示す。縦線は標準誤差を示す (n=3)。

る Ba^{2+} (5×10^{-3} M) を加えた場合においても, 10^{-6} M CCh 刺激による液胞形成は抑制された (表 1)。

一方, Cl^- チャネル阻害剤である DPC (5×10^{-4} M) を加えると, 図16のごとく 10^{-6} M CCh 刺激による水分泌後期相は著名に抑制されるが, この条件下では細胞収縮が引き起こされ, 液胞の形成は CCh 刺激時と同様に観察される。しかし CCh 単独刺激により形成される液胞と比較し, 小さな液胞が基底側方膜にそって形成された。(図21, 表 1)。

考 察

蛍光色素カルセインはエステル型を使用し容易に唾液腺腺房細胞内に負荷することができ, その後も良く細胞内に保持され, 水分泌を惹起する刺激薬で細胞外へ放出されることが明らかとなった。分離腺房細胞内に負荷したカルセインは CCh, NA, AD 刺激により細胞外に放出され, IPR 刺激では放出されない。また CCh 刺激によるカルセイン放出はムスカリン性受容体遮断薬である ATR により抑制され, NA 及び AD

刺激によるカルセイン放出は主に α -アドレナリン性受容体遮断薬である PBZ により顕著に抑制されることより, 細胞内に負荷したカルセインは, ムスカリン性及び α -アドレナリン性受容体刺激により細胞外に放出されることが示された。NA 刺激によるカルセイン放出は CCh 刺激に比較的多いが, β 受容体遮断薬によっても抑制されること及び CCh 刺激によるカルセイン放出は IPR により増強されることより, K^+ 放出での報告と同様に α 効果やムスカリン性効果が β 効果により増強されたものと考えられる^{41,42)}。一方, アミラーゼは NA, AD, IPR, dbcAMP 刺激により分泌される。NA 刺激によるアミラーゼ分泌は α 受容体遮断薬よりも β 受容体遮断薬である PPN により顕著に抑制され, IPR 刺激によるアミラーゼ分泌も PPN により抑制されることより, アミラーゼ分泌は主に β 受容体刺激により cAMP 産生を介し引き起こされる。アミラーゼは分泌顆粒内に存在し開口分泌されるが, カルセイン放出はアミラーゼなどの開口分泌とは異なる分泌動態を示している。細胞内に負荷したカルセインは図17に示すように, 分泌顆粒内よりも細

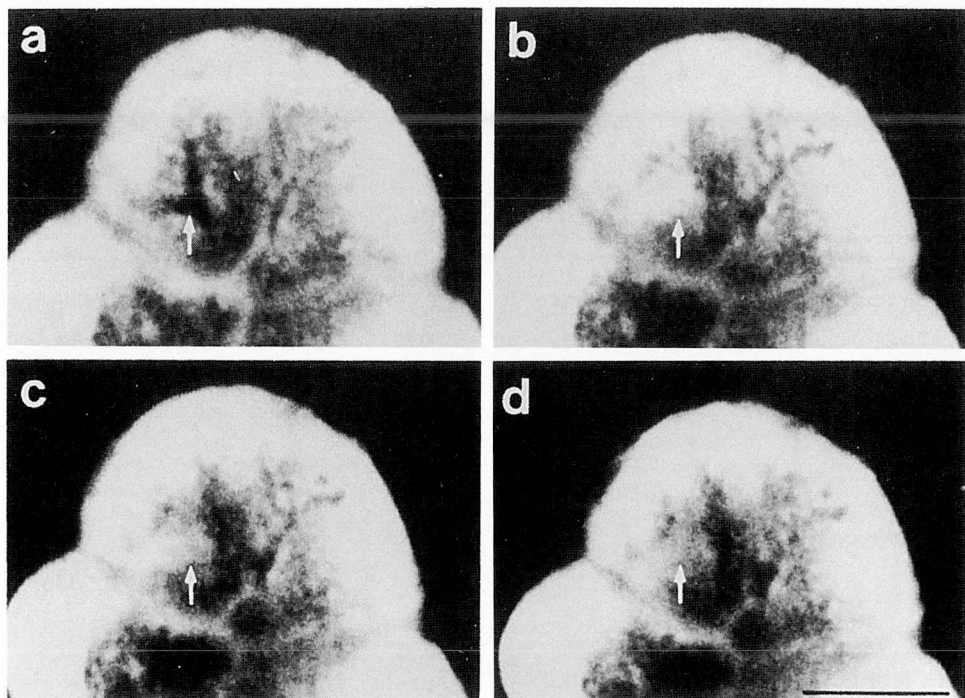


図17 CCh 刺激によるカルセイン放出の可視化.

10^{-6} M CCh 刺激前 (a), 刺激15秒後 (b), 60秒後 (c), 120秒後 (d) のカルセインを荷負した顎下腺腺房像であり, 矢印は細胞間分泌細管様構造を示す。黒線は $10 \mu\text{m}$ を示す。

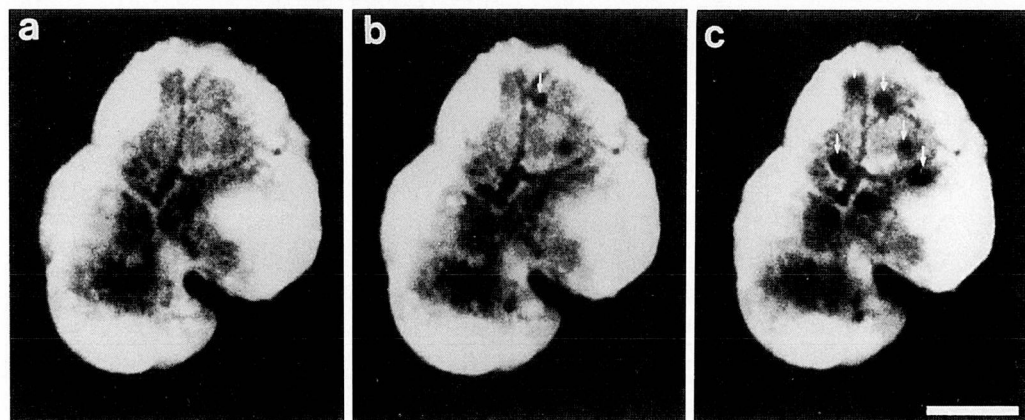


図18 細胞内カルセインによる CCh 刺激時細胞内構造変化の観察.

10^{-6} M CCh 刺激前 (a), 60秒後 (b), 120秒後 (c) の顎下腺腺房像を示す。矢印は形成された液胞を示し, 白線は $10 \mu\text{m}$ を示す。

胞質に高濃度に存在し, ムスカリン性及び α 受容体刺激により細胞外に放出されることより, カルセイン放出はムスカリン性及び α 受容体刺激により引き起こされる水分泌に関連した分泌現象を観察している可能性が示唆された。

ムスカリン性及び α 受容体刺激は腺房細胞において G 蛋白を介し PLC を活性化し, IP_3 を産生し, IP_3 感受性の細胞内 Ca^{2+} プールからの Ca^{2+} 遊離と, それに続く細胞外からの Ca^{2+} 流入により持続的に $[\text{Ca}^{2+}]_i$ を上昇させ水分泌を引き起こす⁴⁾。カルセイ

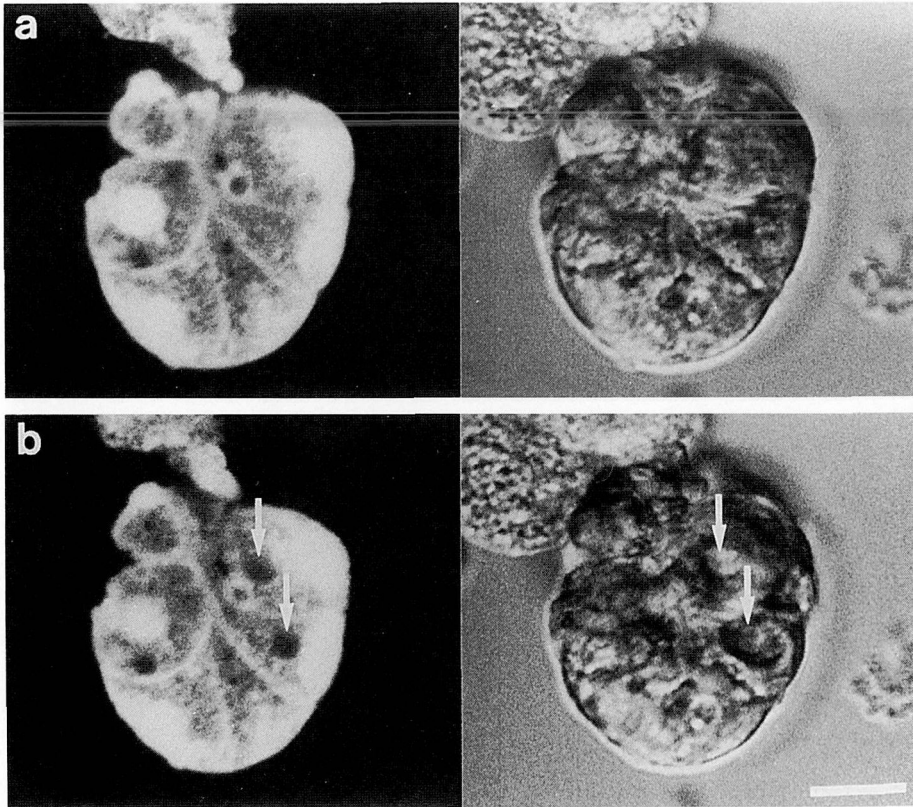


図19 CCh 刺激による液胞形成の可視化.

10^{-6} M CCh 刺激前 (a), 5 分後 (b) の顎下腺腺房で, 左はカルセインの蛍光像を右は微分干渉像を示す。矢印は形成された液胞を示し, 白線は $10\ \mu\text{m}$ を示す。

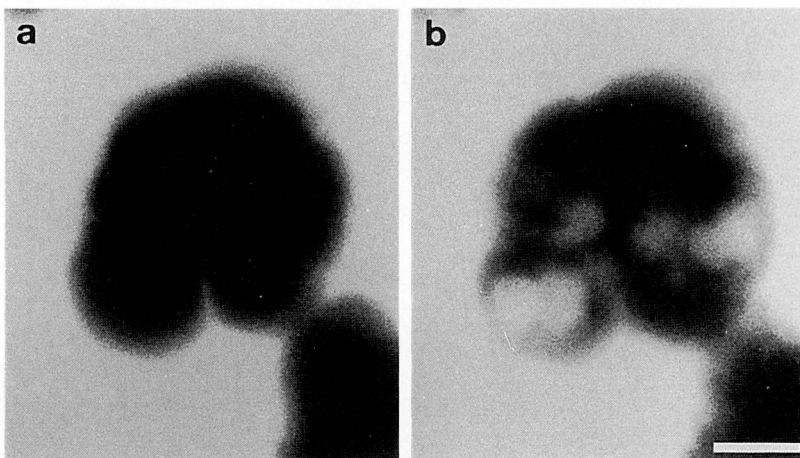


図20 CCh 刺激により生じる液胞の外液との連絡.

10^{-6} M CCh 刺激前 (a), 5 分後 (b) の顎下腺腺房で, 細胞外液中に $5\ \mu\text{M}$ カルセインを加えた蛍光像を示す。白線は $10\ \mu\text{m}$ を示す。

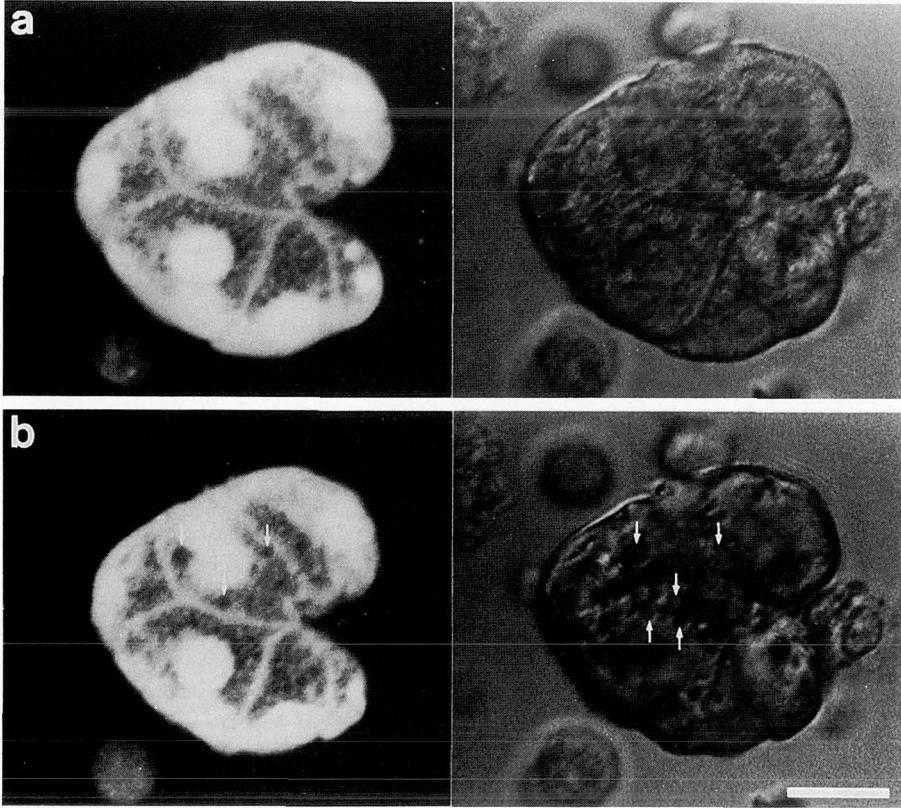


図21 CCh 刺激による液胞形成に対する DPC の効果。

5×10^{-4} M DPC 存在下での 10^{-6} M CCh 刺激前 (a), 5 分後 (b) の顎下腺腺房で, 左はカルセインの蛍光像を右は微分干渉像を示す。矢印は形成された液胞を示し, 白線は $10 \mu\text{m}$ を示す。

表 1 CCh 刺激による液胞形成に対する細胞外 Ca^{2+} 除去, Ba^{2+} 及び DPC の効果

| | Incidence of vacuole formation (%) | Size of vacuole (μm) |
|----------------------------|------------------------------------|-----------------------------------|
| CCh | 77.8 (14/18) | 2.2 ± 0.2 (n=29) |
| CCh Ca^{2+} -free | 5.9 (1/17) | |
| CCh + Ba^{2+} | 0 (0/21) | |
| CCh + DPC | 71.4 (15/21) | 1.1 ± 0.1 (n=30) |

10^{-6} M CCh 単独刺激及び外液 Ca^{2+} 非存在下, 5×10^{-3} M Ba^{2+} または 5×10^{-4} M DPC 存在下で CCh 刺激した時, 5 分後に液胞を形成する細胞の割合と形成された液胞の大きさの平均値 ± 標準誤差を示す。

ン放出と $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 変化との関連を調べると, 図 1b, 5 のように種々の濃度の CCh 刺激によるカルセイン放出量と $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇度に相関があると考えられた。カルセイン放出に対する $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 依存性を調べるた

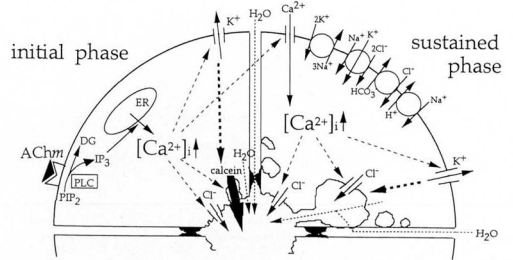


図22 ラット唾液腺腺房細胞におけるカルセイン放出及び水分分泌機構。

左図はムスカリン性刺激による水分分泌初期相でのカルセイン放出及び水分分泌機構の模式図を, 右図は後期水分分泌過程の模式図を示す。

め, Ca^{2+} キレーターである BAPTA を細胞内に負荷すると, CCh 及び NA 刺激によるカルセイン放出は抑制された。また Ca^{2+} イオノフォアである A23187 刺激により受容体刺激を行わず, 細胞内の Ca^{2+} 濃度

を上昇させた場合においても、カルセインは放出されることより、細胞内に取り込ませたカルセインは $[Ca^{2+}]_i$ 上昇を介し、放出されることが明らかとなった。細胞外の Ca^{2+} を除去し CCh 刺激を行うと、細胞外から Ca^{2+} が流入しないため、細胞内 Ca^{2+} プールからの遊離のみによる一過的な $[Ca^{2+}]_i$ 上昇となるが^{32,43}、CCh 刺激によるカルセイン放出は影響されなかった。従って、CCh 刺激時には主に細胞内 Ca^{2+} プールからの遊離による一過的な $[Ca^{2+}]_i$ 上昇によりカルセイン放出が引き起こされることが示唆された。

ムスカリン性及び α 刺激による $[Ca^{2+}]_i$ 上昇は K^+ 、 Cl^- チャネルの活性化による細胞内 K^+ 、 Cl^- の放出を引き起こす^{14,16}。また同時に種々のイオン輸送系を活性化し、 K^+ 、 Cl^- を供給することにより、持続的な K^+ 、 Cl^- の放出と水分分泌を引き起こす¹⁹⁻²¹。カルセイン放出とそれらのチャネル及びイオン輸送系の活性化との関連を調べると、CCh 刺激によるカルセイン放出は CTX、 Ba^{2+} 、verapamil などの K^+ チャネル阻害剤により抑制された。CTX は CCh 刺激から $[Ca^{2+}]_i$ 上昇に至る過程に影響せず、 K^+ チャネルの活性を選択的に抑制することにより、カルセイン放出を抑制している。 Ba^{2+} 、verapamil も Ca^{2+} 依存性 K^+ チャネルの活性を抑制することが報告されている^{24,25,44}。外液を高 K^+ 溶液に置換し、細胞内からの K^+ 放出を抑制した場合にも CCh 刺激によるカルセイン放出は抑制されることより、 Ca^{2+} 依存性の K^+ チャネルの活性化による K^+ の細胞外への放出がカルセイン放出に必要であることが示唆された。

Na^+-K^+ ATPase の阻害剤である ouabain により K^+ の細胞内への取り込みを阻害した場合にも CCh 刺激によるカルセイン放出は抑制されたが、 $Na^+-K^+-2Cl^-$ cotransporter を阻害する bumetanide、 Na^+-H^+ exchanger を阻害する DMA 及び $Cl^- -HCO_3^-$ exchanger を阻害する DIDS は影響を与えないことより、 Na^+-K^+ ATPase による K^+ の供給と Ca^{2+} 依存性 K^+ チャネルの活性による K^+ の放出に伴いカルセインが細胞外に放出されると考えられる。カルセインはアニオン性の物質であるため、 K^+ の放出と共に細胞外に放出され、水分分泌に関連したアニオン性物質の分泌現象をモニターしていることが示唆された。

分離腺房細胞においてムスカリン性及び α 刺激により $[Ca^{2+}]_i$ 上昇と Ca^{2+} 依存性 K^+ チャネルの活性化を介し放出されるカルセインが、水分分泌とどのような関係にあるかを調べるため、摘出ラット顎下腺を

用い、灌流実験を行った。灌流ラット顎下腺では水分分泌量の測定と同時に、細胞内に負荷したカルセインの腺腔側及び基底膜側への放出量を測定することが可能である。灌流ラット顎下腺において細胞内に負荷したカルセインは、無刺激時において灌流液中に一定の割合で放出されており、CCh 刺激の初期に唾液中に一過性に放出される。水分分泌は二相性に観察され、初期の一過的な相と後期の持続相が観察されたが、カルセイン放出は初期相の時間経過と一致していた。灌流液中へのカルセイン放出は CCh 刺激後、一過的に若干の増加を示すが、灌流液中に放出されるカルセイン濃度に比較し、唾液中に放出されるカルセイン濃度は非常に高く、灌流液中に一旦放出されたカルセインが唾液中に輸送されるのではなく、細胞内に負荷したカルセインが直接唾液中すなわち腺腔側に放出されたと考えられる。分離腺房細胞において無刺激状態においても、カルセインは自発的に放出されているが、自発的放出は灌流実験において主に灌流液中すなわち基底膜側への持続的な放出に相当すると考えられ、分離腺房細胞において CCh 刺激により誘発されるカルセイン放出は主に腺腔側へ引き起こされていると考えられる。

二相性の水分分泌及び腺腔側へのカルセイン放出に対する Ca^{2+} 依存性を調べるため、灌流液の Ca^{2+} 非存在下で CCh 刺激を行うと、図 6 のように CCh 刺激による $[Ca^{2+}]_i$ 上昇は細胞外 Ca^{2+} の流入が消失するため、細胞内 Ca^{2+} プールからの遊離のみによる一過的な $[Ca^{2+}]_i$ 上昇となり、後期の持続的水分分泌は抑制される。したがって後期の持続的水分分泌は細胞外 Ca^{2+} の流入による持続的な $[Ca^{2+}]_i$ 上昇を必要とする。一方水分分泌の初期相及び腺腔側へのカルセイン放出は細胞外 Ca^{2+} 非存在下では抑制されず、細胞内に BAPTA を負荷すると抑制されることより、水分分泌の初期相及び腺腔側へのカルセイン放出は細胞内 Ca^{2+} プールからの遊離による $[Ca^{2+}]_i$ 上昇を介し引き起こされる。

$[Ca^{2+}]_i$ 上昇により引き起こされる基底側方膜に存在する Ca^{2+} 依存性 K^+ チャネルの活性化は、水分分泌に不可欠である。ラット耳下腺及び顎下腺においては maxi- K^+ チャネルが K^+ の放出及び水分分泌に重要な役割を果たすと報告されてきたが、最近では maxi- K^+ チャネル以外の Ca^{2+} 依存性 K^+ チャネルの活性化の重要性も報告されている^{25,45,46}。ラット顎下腺での Ca^{2+} 依存性 K^+ チャネルの活性を阻害する Ba^{2+} を灌流実験で使用すると、CCh 刺激による後期の水分分泌は顕著に抑制され、初期の水分分泌及び腺腔側へのカルセイン放出は半分程度に抑制される。灌流液を高

K⁺ 溶液に置換し K⁺ の放出を抑制した場合も二相性水分泌及び腺腔側へのカルセイン放出は顕著に抑制されることより、ムスカリン性刺激による Ca²⁺ 依存性 K⁺ チャネルの活性化による K⁺ 放出が二相的水分泌及び腺腔側へのカルセイン放出に必要なことである。

共焦点レーザー顕微鏡による観察においては、細胞内に負荷したカルセインは分泌顆粒内にはあまり取り込まれず細胞質内に高濃度に存在し、CCh 刺激の初期に細胞間分泌細管へ高濃度に一過的に放出された。これは細胞質のカルセインが CCh 刺激により細胞間分泌細管へ放出されたと考えられる。共焦点レーザー顕微鏡で観察される放出現象は、灌流実験における腺腔側へのカルセイン放出の時間経過とはほぼ一致していることより、細胞質内カルセインが Ca²⁺ 依存性 K⁺ チャネルの活性化による K⁺ の放出と共役し、ある種のチャネルもしくはトランスポーターを通して腺腔側へ初期水分泌に関連し放出されたことが示唆される。CCh 刺激初期には細胞収縮が引き起こされ、細胞容積の減少にみられる細胞内の水の放出が初期の腺腔側への水分泌と関連していると考えられているが^{47,48)}、その水分泌過程の中でカルセインの放出が腺腔側へ引き起こされている。

一方無刺激時に持続的におこる灌流液中へのカルセイン放出は Ba²⁺ 処理及び高 K⁺ 溶液下で脱分極させると抑制される。分泌時に活性化される Ca²⁺ 依存性 K⁺ チャネルではなく、安静時においても開口している K⁺ チャネルも存在する^{24,44)}。Ba²⁺ は無刺激状態で開口している K⁺ チャネルも阻害することにより脱分極を引き起こし、アニオンであるカルセインの駆動力を減少させ、カルセイン放出を抑制したと考えられ、基底側方膜へのカルセインの放出はアニオンとしてチャネルを通して引き起こされている可能性が高い。Cl⁻ チャネル阻害剤として使用される DPC 処理により灌流液中へのカルセイン放出は顕著に抑制されることより、無刺激時においてカルセインは基底側方膜に存在する DPC 感受性アニオンチャネルを通して持続的に放出されていると考えられる。カルセイン放出が生理的のどのようなアニオン物質を通すチャネル活性を示しているかは不明であるが、カルセインを放出するアニオンチャネルは分子量的に Cl⁻ も放出する可能性は高い。CCh 刺激により Ca²⁺ 依存性 K⁺ チャネルが活性化され基底膜側への K⁺ 放出が引き起こされるが、CCh 刺激による基底膜側へのカルセイン放出は少なく、基底側方膜に存在しカルセインなどのアニオンを放出するチャネルの CCh 刺激による活性化は顕著ではないと考えられる。

基底膜側への安静時のカルセイン放出は DPC 感受

性チャネルを介していると考えられるが、CCh 刺激による腺腔側へのカルセイン放出は DPC により抑制されず、DPC 非感受性のチャネルを介し、CCh 刺激による基底膜側への K⁺ の放出と共役し生ずることが示唆される。後期の水分泌は DPC により抑制され、Ca²⁺ 依存性 K⁺ チャネルの活性化による K⁺ の放出と DPC 感受性 Cl⁻ チャネルの活性化による Cl⁻ の放出が共役し水分泌が生じると考えられるが、水分泌初期相ではカルセインのように比較的大きなアニオンを放出するような DPC 非感受性アニオンチャネルの活性化が水分泌に関与する可能性が示唆された。

CCh 刺激による水分泌の後期持続相は細胞外 Ca²⁺ の流入に伴う [Ca²⁺]_i 上昇により、Ca²⁺ 依存性 K⁺ チャネル及び DPC 感受性 Cl⁻ チャネルが活性化され生じると考えられるが、水分泌の後期持続相が引き起こされる時間経過に一致し、細胞内に液胞状の構造物が形成された。CCh 刺激後細胞内に残留しているカルセインにより細胞内形態変化の可視化が可能になり、カルセインを含まない液胞の形成が共焦点レーザー顕微鏡により観察された。CCh 刺激により形成される液胞は分泌顆粒よりも大きい。IPR 刺激時には分泌顆粒の膨潤は起きず、その大きさを保持したまま分泌顆粒が腺腔側細胞膜に融合し消失するという一連の開口分泌像を示すが³⁸⁾、CCh 刺激により生じる液胞形成像は IPR による開口分泌とは異なる。図20に示す如くカルセインを細胞外液に加えた場合に、CCh 刺激により形成された液胞内にカルセインの蛍光が観察されたことより、また図18のように CCh 刺激により形成される液胞は細胞間分泌細管に接している像が観察されることより、液胞は腺腔側に連絡していることが示唆された。

外液の Ca²⁺ 非存在下および Ba²⁺ 処理下では、CCh 刺激による水分泌の後期持続相が抑制されるとともに、液胞形成も顕著に抑制された。また DPC 処理下では CCh 刺激による水分泌の後期持続相は1/2から1/4程度に抑制されるが、液胞の形成率は抑制されず、形成される液胞の大きさが CCh 単独刺激に比較し小さくなることより、CCh 刺激による後期水分泌量と形成された液胞の大きさが相関している。CCh 刺激による液胞形成は細胞外 Ca²⁺ の流入による持続的な [Ca²⁺]_i 上昇と Ca²⁺ 依存性の K⁺ 及び Cl⁻ チャネルの活性化に伴う K⁺、Cl⁻ の放出により生じると考えられる。多くの研究者によりムスカリン性刺激による液胞形成が透過型電子顕微鏡を用い、固定標本で観察されており、水分泌との関連が示唆されてきた^{30,49)}。液胞形成は高濃度のムスカリン性刺激及び酸素欠乏条件下で頻度が増すため、正常な分泌現象では

なく、水分泌を引き起こすある過程の異常により生ずるのではないかとの説もあるが、鼓索神経刺激においても観察され、可逆的な形態変化であることが観察されることよりムスカリン性刺激による正常な反応であることが示唆される^{30,31)}。本研究では生きた細胞における経時的变化を示しており、IPR 刺激による開口分泌像とは異なり、CCh 刺激により後期水分泌が引き起こされる時間経過に一致し、液胞がしだいに膨潤することが観察され、液胞内への水輸送系が活性化され、腺腔側への水分泌が引き起こされると考えられた。また液胞内への水輸送を引き起こすためには、細胞外 Ca^{2+} の流入による $[Ca^{2+}]_i$ 上昇と Ca^{2+} 依存性 K^+ 及び Cl^- チャネルの活性化を必要としており、液胞を形成する膜に存在する Cl^- チャネルの活性化による液胞内への Cl^- の放出により生ずる浸透圧差に従い、液胞内に水輸送が引き起こされ、連絡している腺腔側に分泌される可能性が示唆された。CCh 刺激により形成される液胞は非常に大きくなり、液胞を形成する膜が本来どこより由来するかは、水分泌との関連を調べる上で重要である。ムスカリン性刺激により形成される液胞は、ゴルジ装置近傍より形成されるという説³⁰⁾ や分泌顆粒が融合し拡大することにより形成されるという説⁴⁹⁾ があるが明らかではない。CCh 刺激による蛋白分泌は刺激の初期に一過的に引き起こされ、後期の水分泌は蛋白分泌を伴わない。従って液胞は分泌顆粒が融合することにより形成され拡大するもしくは開口分泌後余剰となった膜をエンドサイトーシスにより取り込むことにより形成されるとは考えにくい。分泌顆粒とは異なる膜に由来し細胞同士が隣接する基底側膜に沿って液胞が形成され、液胞膜に存在するチャネル活性により液胞が膨潤すると考えられる。

本研究では、図22のように唾液腺腺房細胞内に負荷したカルセインにより、腺房細胞における Ca^{2+} 依存性の分泌現象の観察を可能にすることで、水分泌過程に二相が存在することを示した。ムスカリン性刺激による水分泌初期相においては、細胞内 Ca^{2+} プールからの遊離による $[Ca^{2+}]_i$ 上昇により引き起こされる K^+ の放出に伴い、比較的大きなアニオン分子であるカルセインを放出するチャネルが活性化され、水分泌が引き起こされると考えられる。また水分泌の後期持続相においては、細胞外 Ca^{2+} の流入による持続的な $[Ca^{2+}]_i$ 上昇とそれにより引き起こされる K^+ 及び Cl^- チャネルの活性化により、液胞形成を伴い水分泌が生じることが示唆された。二相ともに $[Ca^{2+}]_i$ 上昇により Ca^{2+} 依存性 K^+ チャネルの活性化を介し水分泌が引き起こされるが、 K^+ 放出と共役するア

ニオンの放出を引き起こすチャネルの種類に違いがあり、それにより引き起こされる水分泌における水輸送機構及び経路に相違があると考えられる。

結 論

本研究ではアニオン性の蛍光色素カルセインをラット唾液腺腺房細胞内に取り込ませ、 Ca^{2+} 依存性の水分泌に関連したアニオン性物質の分泌動態観察を通じ、以下の結果を得た。

1. 耳下腺分離腺房細胞内に負荷したカルセインはムスカリン性刺激 (CCh) 及び α -アドレナリン性刺激により細胞外に放出され、主に β 刺激により引き起こされるアミラーゼの開口分泌とは異なる分泌動態を示した。CCh によるカルセイン放出は細胞内に負荷した Ca^{2+} キレート剤 (BAPTA) 及び K^+ チャネル阻害剤 (CTX, Ba^{2+} , verapamil) で抑制された。

2. 灌流顎下腺で、カルセイン放出の方向性及び水分泌との関連を調べると、CCh 刺激により二相性の持続的な水分泌が生じ、細胞内に負荷したカルセインは初期に高濃度に腺腔側へ放出された。

3. 灌流顎下腺において外液 Ca^{2+} 非存在下では CCh による後期の持続的水分泌は抑制されたが、初期の水分泌とカルセインの腺腔側への放出は抑制されず、BAPTA 負荷により抑制された。また CCh による腺腔側へのカルセイン放出と水分泌は K^+ チャネル阻害剤である Ba^{2+} 処理及び高 K^+ 溶液下で減少した。

4. 共焦点レーザー顕微鏡下で顎下腺分離腺房を観察すると、分泌顆粒内よりも細胞質に高濃度に分布したカルセインは、CCh 刺激の初期に細胞間分泌細管へ放出された。刺激5分後に液胞が形成されるが、これは細胞外 Ca^{2+} 除去、 Ba^{2+} 、DPC (Cl^- チャネル阻害剤) 処理で抑制された。

以上より、 Ca^{2+} 依存性の水分泌過程に二相が存在し、初期相では細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇に伴う K^+ 放出と共役し、カルセインを放出するアニオンチャネルが活性化され、後期持続相では細胞外 Ca^{2+} の流入に伴う Ca^{2+} 依存性 K^+ 及び Cl^- チャネルの活性化により、液胞形成を伴い水分泌が生じることが示唆された。

謝 辞

稿を終えるに臨み、終始御懇篤なる御指導ならびに御校閲を賜りました本学口腔生理学講座柴芳樹教授ならびに終始御懇篤なる御指導を賜りました前本学口腔生理学講座教授菅野義信名誉教授に衷心より感謝の意を表します。また、御教示、御校閲を賜りまし

た本学口腔解剖学第一講座内田隆教授ならびに歯科薬理学講座土肥敏博教授に深甚なる謝意を表します。研究遂行上及び本論作成上、御助言と御鞭撻を頂きました本学口腔生理学講座広野力講師に厚く御礼申し上げます。さらに、多くの御支援を頂きました口腔生理学講座関係各位に深謝いたします。

参 考 文 献

- 1) Baum, B.J.: Neurotransmitter control of secretion. *J. Dent. Res.* **66**, 628-632, 1987.
- 2) Case, R.M., Conigrave, A.D., Novak, I. and Young, J.A.: Electrolyte and protein secretion by the perfused rabbit mandibular gland stimulated with acetylcholine or catecholamines. *J. Physiol. Lond.* **300**, 467-487, 1980.
- 3) Quissell, D.O., Watson, E. and Dowd, F.J.: Signal transduction mechanisms involved in salivary gland regulated exocytosis. *Crit. Rev. Oral Biol. Med.* **3**, 83-107, 1992.
- 4) Nauntofte, B.: Regulation of electrolyte and fluid secretion in salivary acinar cells. *Am. J. Physiol.* **263**, G823-G837, 1992.
- 5) Clapham, D.E.: Calcium signaling. *Cell* **80**, 259-268, 1995.
- 6) Dissing, S., Nauntofte, B. and Sten-Knudsen, O.: Spatial distribution of intracellular, free Ca^{2+} in isolated rat parotid acini. *Pflugers Arch.* **417**, 1-12, 1990.
- 7) Foskett, J.K. and Melvin, J.E.: Activation of salivary secretion: Coupling of cell volume and $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in single cells. *Science Wash. DC* **244**, 1582-1585, 1989.
- 8) Takemura, H.: Changes in cytosolic free calcium concentration in isolated rat parotid cells by cholinergic and beta-adrenergic agonists. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **131**, 1048-1055, 1985.
- 9) Gallacher, D.V. and Morris, A.P.: A patch-clamp study of potassium currents in resting and acetylcholine-stimulated mouse submandibular acinar cells. *J. Physiol. Lond.* **373**, 379-395, 1986.
- 10) Petersen, O.H.: Stimulus-secretion coupling: cytoplasmic calcium signals and the control of ion channels in exocrine acinar cells. *J. Physiol. Lond.* **448**, 1-54, 1992.
- 11) Case, R.M., Hunter, M., Novak, I. and Young, J.A.: The anionic basis of fluid secretion by the rabbit mandibular salivary gland. *J. Physiol. Lond.* **349**, 619-630, 1984.
- 12) Martinez, J.R. and Cassity, N.: ^{36}Cl fluxes in dispersed rat submandibular acini: Effects of acetylcholine and transport inhibitors. *Pflugers Arch.* **403**, 50-54, 1985.
- 13) Nauntofte, B. and Dissing, S.: K^+ transport and membrane potentials in isolated rat parotid acini. *Am. J. Physiol.* **255**, C508-C518, 1988.
- 14) Smith, P.M. and Gallacher, D.V.: Acetylcholine- and caffeine-evoked repetitive transient Ca^{2+} -activated K^+ and Cl^- currents in mouse submandibular cells. *J. Physiol. Lond.* **449**, 109-120, 1992.
- 15) Lee, S.I. and Turner, R.J.: Mechanism of secretagogue-induced HCO_3^- and Cl^- loss from rat parotid acini. *Am. J. Physiol.* **261**, G111-G118, 1991.
- 16) Melvin, J.E., Kawaguchi, M., Baum, B.J. and Turner, R.J.: A muscarinic agonist-stimulated chloride efflux pathway is associated with fluid secretion in rat parotid acinar cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **145**, 754-759, 1987.
- 17) Pirani, D., Evans, L.A.R., Cook, D.I. and Young, J.A.: Intracellular pH in the rat mandibular salivary gland: the role of Na-H and Cl- HCO_3^- antiports in secretion. *Pflugers Arch.* **408**, 178-184, 1987.
- 18) Manganel, M. and Turner, R.J.: Agonist-induced activation of Na^+/H^+ exchange in rat parotid acinar cells is dependent on calcium but not on protein kinase C. *J. Biol. Chem.* **265**, 4284-4289, 1990.
- 19) Melvin, J.E., Moran, A. and Turner, R.J.: The role of HCO_3^- and Na^+/H^+ exchange in the response of rat parotid acinar cells to muscarinic stimulation. *J. Biol. Chem.* **263**, 19564-19569, 1988.
- 20) Melvin, J.E. and Turner, R.J.: Cl^- fluxes related to fluid secretion by the rat parotid: involvement of $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ exchange. *Am. J. Physiol.* **262**, G393-G398, 1992.
- 21) Murakami, M., Miyamoto, S. and Imai, Y.: Oxygen consumption for K^+ uptake during poststimulatory activation of Na^+ , K^+ -ATPase in perfused rat mandibular gland. *J. Physiol. Lond.* **426**, 127-143, 1990.
- 22) Silva, P., Stoff, J., Field, M., Fine, L., Forrest, J.N. and Epstein, F.H.: Mechanism of active chloride secretion by shark rectal gland: role of Na-K-ATPase in chloride transport. *Am. J. Physiol.* **233**, F298-F306, 1977.
- 23) Turner, R.J., George, J.N. and Baum, B.J.: Evidence for a $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Cl}^-$ cotransport system in basolateral membrane vesicles from the rabbit parotid. *J. Membr. Biol.* **94**, 143-152, 1986.
- 24) Ishikawa, T. and Cook, D.I.: Effects of K^+ channel blockers on inwardly and outwardly rectifying whole-cell K^+ currents in sheep parotid secretory cells. *J. Membr. Biol.* **133**, 29-41, 1993.
- 25) Ishikawa, T., Murakami, M. and Seo, Y.: Basolateral K^+ efflux is largely independent of maxi- K^+ channels in rat submandibular glands during

- secretion. *Pflugers Arch.* 428, 516-525, 1994.
- 26) Raina, S., Preston, G.M., Guggino, W.B. and Agre, P.: Molecular cloning and characterization of an aquaporin cDNA from salivary, lacrimal, and respiratory tissues. *J. Biol. Chem.* 270, 1908-1912, 1995.
 - 27) Mazariegos, M.R., Tice, L.W. and Hand, A.R.: Alteration of tight junctional permeability in the rat parotid gland after isoproterenol stimulation. *J. Cell Biol.* 98, 1865-1877, 1984.
 - 28) Oliver, C. and Hand, A.R.: Uptake and fate of lumenally administered horseradish peroxidase in resting and isoproterenol-stimulated rat parotid acinar cells. *J. Cell Biol.* 76, 207-220, 1978.
 - 29) Bogart, B.I. and Picarelli, J.: Agonist-induced secretions and potassium release from rat submandibular gland slices. *Am. J. Physiol.* 235, C256-C268, 1978.
 - 30) Leslie, B.A. and Putney, J.W.: Ionic mechanism in secretagogue-induced morphological changes in rat parotid gland. *J. Cell Biol.* 97, 1119-1130, 1983.
 - 31) Tapp, R.L. and Trowell, O.A.: The experimental production of watery vacuolation in the acinar cells of the submandibular gland. *J. Physiol. Lond.* 188, 191-205, 1967.
 - 32) Brinck, R.W. and Hurley, T.W.: Regulation of cytosolic Ca^{2+} in resting and stimulated rat submandibular salivary gland acini. *Archs. Oral Biol.* 34, 917-922, 1989.
 - 33) Robertson, M.A. and Foskett, J.K.: Na^+ transport pathway in secretory acinar cells: membrane cross talk mediated by $[Cl^-]_i$. *Am. J. Physiol.* 267, C146-C156, 1994.
 - 34) Seo, J.T., Steward, M.C., Larcombe-McDouall, J.B., Cook, L.J. and Case, R.M.: Continuous fluorometric measurement of intracellular pH and Ca^{2+} in perfused salivary gland and pancreas. *Pflugers Arch.* 426, 75-82, 1994.
 - 35) Foskett, J.K.: NBD-aurine fluorescence as a probe of anion exchange in gallbladder epithelium. *Am. J. Physiol.* 249, C56-62, 1985.
 - 36) Kawasaki, Y., Saitoh, T., Okabe, T., Kumakura, K. and Ohara-Imaizumi, M.: Visualization of exocytotic secretory process of mast cells by fluorescence techniques. *Biochim. Biophys. Acta* 1067, 71-80, 1991.
 - 37) Nakamura, A., Nakahari, T., Senda, T. and Imai, Y.: Exocytosis in the lingual mucus cells of *Rana esculenta* evoked by acetylcholine: Observation of living cells by confocal laser scanning microscopy. *Jpn. J. Physiol.* 43, 833-846, 1993.
 - 38) Segawa, A., Terakawa, S., Yamashina, S. and Hopkins, C.R.: Exocytosis in living salivary glands: direct visualization by video-enhanced microscopy and confocal laser microscopy. *Eur. J. Cell Biol.* 54, 322-330, 1991.
 - 39) Periasamy, N., Armijo, M. and Verkman, A.S.: Picosecond rotation of small polar fluorophores in the cytosol of sea urchin eggs. *Biochemistry* 30, 11836-11841, 1991.
 - 40) Bernfeld, P.: Amylases, alpha and beta. In: *Methods in Enzymology*. ed. Colowick SP and Kaplan NO, Academic Press, New York, pp 149-158, 1955.
 - 41) Larsson, O., Detch, T. and Fredholm, B.B.: VIP and forskolin enhance carbachol-induced K^+ efflux from rat salivary fragment by a Ca^{2+} -sensitive mechanism. *Am. J. Physiol.* 259, C904-C910, 1990.
 - 42) Martin, S.C., Thompson, J. and Shuttleworth, T.J.: Potentiation of Ca^{2+} -activated secretory activity by a cAMP-mediated mechanism in avian salt gland cells. *Am. J. Physiol.* 267, C255-C265, 1994.
 - 43) Merritt, J.E. and Rink, T.J.: Regulation of cytosolic free calcium in fura-2 loaded rat parotid acinar cells. *J. Biol. Chem.* 262, 17362-17369, 1987.
 - 44) Richards, N.W., Lowy, R.J., Ernst, S.A. and Dawson, D.C.: Two K^+ channel types, muscarinic agonist-activated and inwardly rectifying, in a Cl^- secretory epithelium: the avian salt gland. *J. Gen. Physiol.* 93, 1171-1194, 1989.
 - 45) Cook, D.I. and Young, J.A.: Cation channels and secretion. In: *Epithelial secretion of water and electrolytes*. ed. Young JA and Wong PYD, Springer, Berlin Heidelberg New York, pp 15-38, 1990.
 - 46) Hayashi, T., Hirono, C., Young, J.A. and Cook, D.I.: The ACh-induced whole-cell currents in sheep parotid secretory cells. Do BK channels really carry the ACh-evoked whole-cell K^+ current? *J. Membr. Biol.* 144, 157-166, 1995.
 - 47) Nakahari, T., Murakami, M., Sasaki, Y., Kataoka, Y., Imai, Y., Shiba, Y. and Kanno, Y.: Dose effects of acetylcholine on the cell volume of rat mandibular salivary acini. *Jpn. J. Physiol.* 41, 153-168, 1991.
 - 48) Nakahari, T., Murakami, M., Yoshida, H., Miyamoto, M., Sohma, Y. and Imai, Y.: Decrease in rat submandibular acinar cell volume during ACh stimulation. *Am. J. Physiol.* 258, G878-G886, 1990.
 - 49) Nakahari, T., Nakamura, A. and Imai, Y.: Two types of exocytosis evoked by ACh in salivary acinar cells: a morphological observation in perfused submandibular gland of rats. *Jpn. J. Physiol.* 45, 23-36, 1995.