

顎下腺水分泌の β 受容体刺激による修飾機構解明に関する研究

田 中 秀 司

A study on the mechanisms of β -adrenergic modulation of the fluid secretion from rat submandibular gland

Shuji Tanaka

(平成10年1月9日受付)

緒 言

唾液腺は交感神経、副交感神経の二重支配を受けており、アミラーゼ、ムチンなどの蛋白質および水分を分泌して、咀嚼、嚥下をはじめとする口腔機能の維持に重要な役割を果たしている。交感神経刺激では α および β 受容体が刺激され、アミラーゼ、ムチンなどの蛋白質成分に富んだ粘調な唾液分泌が誘発される。一方、副交感神経刺激ではムスカリン性アセチルコリン受容体が刺激され、水分に富んだ大量の唾液分泌が誘発される¹⁻⁴⁾。唾液分泌に対する自律神経系の働きの相違は、口腔内湿潤保持や口腔内化学的消化に果たす唾液腺機能の上からも興味深い現象であり、細胞内情報伝達系の相互作用の結果と考えられる。

ムスカリン性刺激および α 受容体刺激は、GTP 結合蛋白質を介してホスホリパーゼ C を活性化し、inositol 1,4,5-trisphosphate (Ins(1,4,5)P₃) を産生する⁵⁾。Ins(1,4,5)P₃ は、細胞内の Ins(1,4,5)P₃ 感受性の Ca²⁺ 貯蔵部位からの Ca²⁺ の遊離と、これに続く細胞外からの Ca²⁺ の流入を引き起こし、持続的な細胞内 Ca²⁺ 濃度 ([Ca²⁺]_i) 上昇を引き起こす⁶⁻¹⁰⁾。この持続的な [Ca²⁺]_i 上昇が水分泌の引き金となる¹¹⁻¹³⁾。腺房細胞基底側膜には、Ca²⁺ 依存性の K⁺ チャネルが存在し、[Ca²⁺]_i 上昇により K⁺ を細胞外へと放出する¹⁴⁾。一方、腺腔側膜には、Ca²⁺ 依存性の Cl⁻ チャネルが存在すると考えられており、[Ca²⁺]_i 上昇により Cl⁻ を腺腔へと放出する¹⁴⁻²⁰⁾。腺腔へ放出された Cl⁻ に対し、電気的に中性と

なるよう、Na⁺ が基底側から腺腔へと移動し、その結果生じた浸透圧差により、水が腺腔へ分泌されると考えられている^{21,22)}。また、基底側膜には、Na⁺/K⁺/2Cl⁻ cotransporter, Na⁺/H⁺ exchanger, そしてこれと共役して働いている Cl⁻/HCO₃⁻ exchanger が存在し、これらのイオン輸送系が活性化されることにより、細胞内へ持続的にイオンが流入し、持続的な Cl⁻ の放出とこれに続く持続的な水分泌が維持される²³⁻²⁹⁾。一方、 β 受容体刺激では、GTP 結合蛋白質を介してアデニレートシクラーゼが活性化され、cAMP が産生される。cAMP の増加により A-キナーゼが活性化されて、アミラーゼやムチンなどの蛋白質が開口放出により分泌される^{30,31)}。

唾液分泌におけるこれら二つの主要な情報伝達系は、相互作用により蛋白質分泌もしくは水分泌を修飾する。アミラーゼ分泌およびムチン分泌においては、セカンドメッセンジャーの cAMP と Ca²⁺ により相乗効果が引き起こされる。耳下腺での β 受容体刺激によるアミラーゼ分泌は、 α 受容体刺激、ムスカリン性刺激もしくは [Ca²⁺]_i 上昇により増強され³²⁻³⁴⁾、顎下腺での cAMP 産生を介するムチン分泌も、[Ca²⁺]_i 上昇により増強されることが報告されている³¹⁾。一方水分泌については、耳下腺でのアセチルコリン刺激時水分泌は cAMP により増強されるが³⁵⁾、顎下腺での水分泌は cAMP により抑制されることが報告されている^{36,37)}。顎下腺水分泌の cAMP による抑制には、 α 受容体刺激もしくはムスカリン性刺激と β 受容体刺激との相互作用による血管収縮が関与するとの報告はあるが³⁸⁻⁴⁰⁾、腺房細胞における β 受容体刺激による修飾機構について検討した報告はなく、水輸送に重要な役割を果たす Ca²⁺, K⁺ そして Cl⁻ などのイオン動態に対する β 受容体刺激の効果については未だ不明なままである。

本研究では、顎下腺での Ca²⁺ 依存性水分泌に対する

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7年11月第47回日本生理学会中国四国地方会, 平成8年4月第73回日本生理学会大会, 平成8年10月第38回歯科基礎医学会学術大会・総会において発表した。

β 受容体刺激の効果とその作用機構を明らかにすることを目的とし、 β 受容体刺激がムスカリン性刺激時のイオン動態に対して及ぼす影響について検討した。

材料ならびに方法

1. 灌流ラット顎下腺における唾液分泌量および唾液中蛋白質量の測定

実験には雄性ウィスター系ラット (300–380 g) を用いた。ペントバルビタール腹腔内麻酔下、顎下腺を動静脈および導管とともに剖出し、動静脈には灌流のために、導管には分泌唾液採取のためにポリエチレンチューブを挿入した。灌流液には Krebs-Henseleit Ringer (KHR: 103 mM NaCl, 4.7 mM KCl, 2.6 mM CaCl₂, 1.1 mM MgCl₂, 25 mM NaHCO₃, 1.2 mM NaH₂PO₄, 2.8 mM Glucose, 4.9 mM Na-pyruvate, 2.7 mM Na₂-fumarate, 2.7 mM Na-glutamate, 12.5 mM HEPES, pH = 7.4) 溶液を用い、peristaltic pump により一定流量 (2 ml/min) で動脈から灌流しつつ顎下腺を摘出した。摘出した顎下腺は30分間 KHR 溶液で灌流した後、各実験に用いた。灌流液中に分泌誘発薬を添加し、このとき導管より分泌される唾液を、予め重量測定したチューブに30秒毎に採取し、重量測定により唾液分泌量を求めた。また、分泌唾液中の蛋白質量は、Bio-Rad protein-assay (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) を用いて測定した。実験終了後、顎下腺湿重量を測定し、単位腺重量、単位時間あたりの唾液分泌量および唾液中蛋白質量を算出した。

2. 分離腺房細胞における [Ca²⁺]_i および細胞内 pH (pH_i) 変化の測定

[Ca²⁺]_i および pH_i 変化の測定は、ラット顎下腺分離腺房細胞を用いて行った。ペントバルビタール麻酔下、ラット顎下腺を摘出し、細切した後、コラゲナーゼ (500 U/ml) および bovine serum albumin (BSA: 0.1%) を含む KHR 溶液中で30–40分間恒温振とう (37°C) した。ピペットで吸引、排出を繰り返すことにより細胞塊を分散させ、ナイロンメッシュを通過させて 10 μ m–50 μ m の細胞を回収し、顎下腺分離腺房細胞として実験に用いた。[Ca²⁺]_i 変化の測定には、蛍光性 Ca²⁺ 指示薬の fura-2 を、pH_i 変化の測定には蛍光性 pH 指示薬の 2',7'-bis(carboxyethyl)-5(6)-carboxyfluorescein (BCECF) を用いた。得られた分離腺房細胞を 2 μ M fura-2-AM もしくは 1 μ M BCECF-AM を含む BSA 含有 KHR 溶液中で、15–30分間恒温振とう (37°C) することにより、fura-2 もしくは BCECF を細胞内に負荷した。遠心により細胞外の fura-2-AM もしくは BCECF-AM を除去した後、poly-L-lysine をコートしたカバー

ガラス上に細胞を付着させた。細胞を付着させたカバーガラスを倒立型蛍光顕微鏡 (Olympus IMT2-RFL, with Xenon lamp) のステージ上のチャンバー内に置き、チャンバー内を KHR 溶液で持続的に灌流し、細胞内に負荷した色素の蛍光強度の変化を測定した。測定には、画像解析装置 ARGUS-50/CA もしくは ARGUS HiSCA (Hamamatsu Photonics, Hamamatsu, Japan) を用い、fura-2 では励起波長 340 nm および 360 nm により得られる蛍光像を、BCECF では励起波長 490 nm および 440 nm により得られる蛍光像を、10–30秒間隔でコンピュータに保存した。同時に、それぞれの励起波長による蛍光強度の比を算出し、[Ca²⁺]_i および pH_i 変化を測定した。

3. 分離腺房細胞における K⁺ および Cl⁻ 電流の測定

顎下腺分離腺房細胞における K⁺ および Cl⁻ 電流は、ホールセルパッチクランプ法により測定した。パッチクランプピペットはガラスチューブ (OD/ID; 1.5/1.0 mm, SUTTER INSTRUMENT Co., CA, USA) から puller (NARISHIGE SCIENTIFIC INSTRUMENT LAB., Tokyo, Japan) を用いて作製した。パッチクランプピペットは、先端を熱処理により滑沢にし、ピペット内溶液を満たした際、約 3 Mohm の抵抗値を有した。細胞を付着させたカバーガラスを位相差顕微鏡のステージ上のチャンバー内に置き、チャンバー内を持続的に KHR 溶液で灌流した。不関電極には Ag/AgCl 電極を用い、電流の測定には、patch/whole cell clamp amplifier CEZ-2400 (Nihon Kohden, Tokyo, Japan) を用いた。膜電位を -80 mV に固定し、5 秒毎に 0 mV (100 ms) へと変化させることにより、それぞれ Cl⁻ および K⁺ 電流を測定した。電流はオシロスコープおよびチャートペンレコーダ上でモニターし、チャート上およびデータテープに記録した。ピペット内溶液の組成は、140 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 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) とした。

4. 統計学的処理

有意差の検定は Student's *t*-test により行った。

5. 使用薬物

Carbamylcholine chloride, 8-(4-chlorophenylthio)-adenosine 3':5'-cyclic monophosphate は Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA) より、diphenylamine-2-carboxylate (DPC), A23187 は Wako Pure Chemical (Osaka, Japan) より購入した。DL-isoproterenol hydro-

chloride, DL-propranolol hydrochloride は Nakalai Tesque (Kyoto, Japan) より, fura-2-AM, BCECF-AM は Dojindo (Kumamoto, Japan) より, そして 5-(N,N-dimethyl)-amiloride hydrochloride は Houei Yakukou (Osaka, Japan) より購入した。

結 果

1. 灌流顎下腺におけるムスカリン性刺激時水分泌のβ受容体刺激による修飾

灌流顎下腺において、ムスカリン性刺激薬のカルバコール (CCh: 1 μM) は二相性の水分泌、すなわち初期の一過性の水分泌と、これに続く持続的な水分泌を引き起こした。水分泌初期には一過性の蛋白質分泌も認められた (図1)。灌流顎下腺での水分泌は 0.5 μM 以上の CCh で引き起こされたが、5 μM 以上では初期相水分泌の増加傾向と持続相水分泌の減少傾向が認められ、10 μM では水分泌は初期に大量に一過性のみ引き起こされ、持続相水分泌は顕著に抑制された。

1 μM CCh 刺激による持続的水分泌相で、β受容体刺激薬のイソプロテレノール (IPR: 0.1 μM) を灌流液中に加えると、水分泌の顕著な抑制と持続的な蛋白質分泌が誘発された (図2)。また、IPR 刺激直後には、一過性の水分泌増強の傾向が認められた。IPR による水

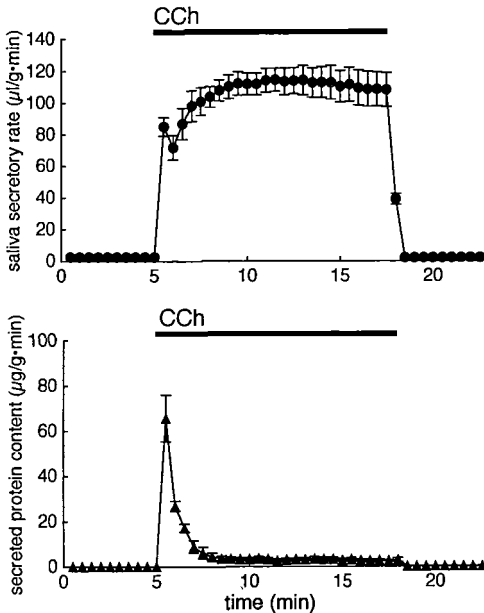


図1 灌流ラット顎下腺でのCCh刺激による水分泌および蛋白質分泌。

1 μM CCh 刺激時の唾液分泌量 (●) および唾液中蛋白質量 (▲) を測定値の平均値 ± 標準誤差で示す。(n = 4)

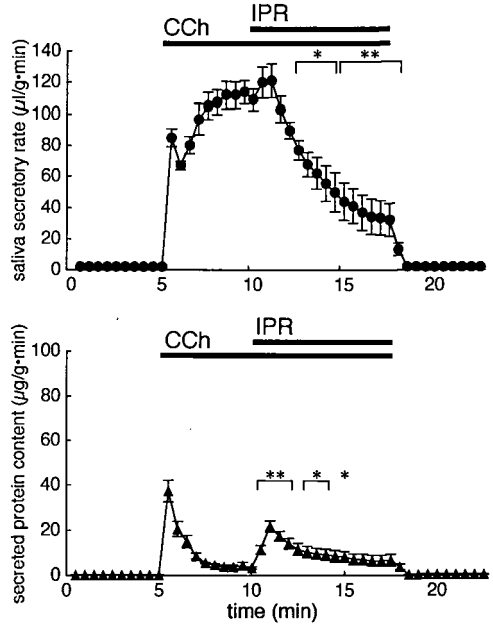


図2 CCh 刺激時水分泌および蛋白質分泌に対する IPR の効果。

1 μM CCh 刺激時にさらに 0.1 μM IPR 刺激を行った際の唾液分泌量 (●) および唾液中蛋白質量 (▲) を測定値の平均値 ± 標準誤差で示す。* は CCh 単独刺激時と比較して p < 0.05 で, ** は p < 0.01 で統計学的有意差が認められたことを示す。(n = 4)

分泌抑制と蛋白質分泌誘発の効果は、0.05 μM 以上で認められた。一方、1 μM IPR 単独刺激では、水分泌はほとんど誘発されることはなかった (図3)。0.1 μM IPR 刺激による CCh 刺激時水分泌の抑制と、蛋白質分泌の誘発は、βブロッカーのプロプラノロール (PPN: 10 μM) により、顕著に阻害された (図4)。

CCh 刺激による水分泌の持続相で、adenosine 3':5'-cyclic monophosphate (cAMP) の膜透過性のアナログである、8-(4-chlorophenylthio)-cAMP (CPT-cAMP: 1 mM) を灌流液中に添加すると、IPR 刺激時と同様に、CCh 刺激時水分泌の抑制と持続的な蛋白質分泌が引き起こされた (図5)。

2. ムスカリン性刺激時の [Ca²⁺]_i 変化に対するβ受容体刺激およびcAMPの効果

顎下腺分離腺房細胞において、1 μM CCh 刺激により、持続的な [Ca²⁺]_i 上昇が認められた (図6)。CCh 刺激による持続的な [Ca²⁺]_i 上昇時に 1 μM IPR 刺激を行うと、[Ca²⁺]_i をさらに上昇させる傾向が認められたが、有意な変化ではなかった (図7)。1 mM CPT-

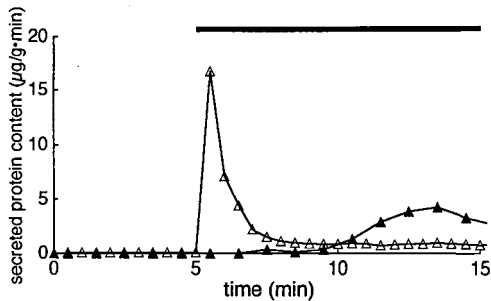
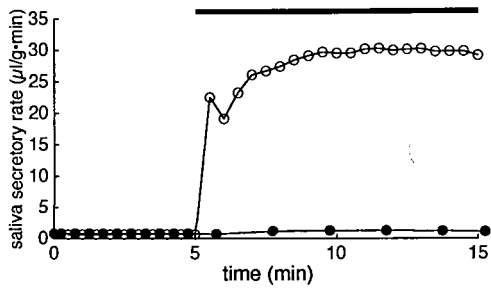


図3 CChもしくはIPR単独刺激による水分分泌および蛋白質分泌。

1 μM CCh 単独刺激時の唾液分泌量を○で、1 μM IPR 単独刺激時の唾液分泌量を●で、また1 μM CCh 単独刺激時の唾液中蛋白質量を△で、1 μM IPR 単独刺激時の唾液中蛋白質量を▲で示す。

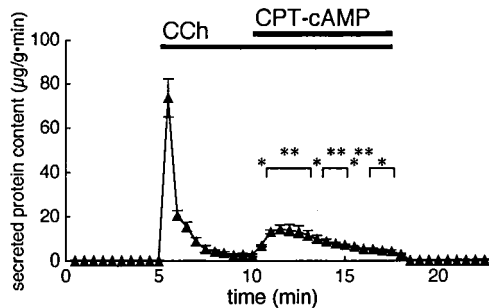
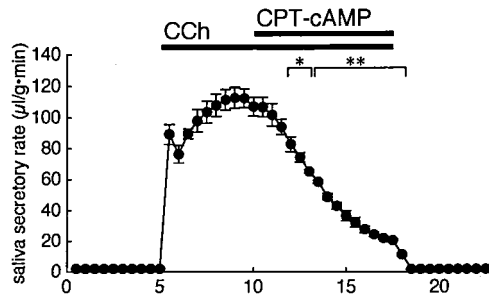
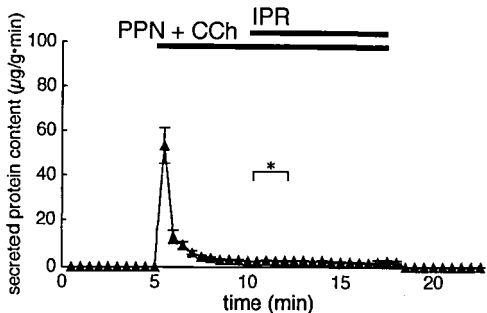
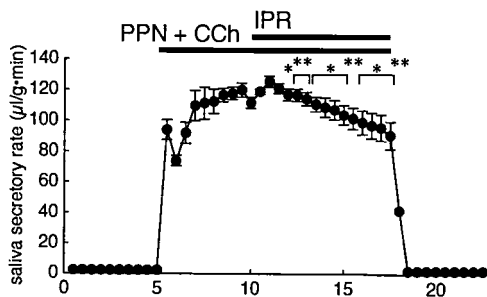


図5 CCh 刺激時水分分泌および蛋白質分泌に対するCPT-cAMPの効果。

1 μM CCh 刺激時に灌流液中に1 mM CPT-cAMPを添加した際の唾液分泌量(●)および唾液中蛋白質量(▲)を測定値の平均値±標準誤差で示す。*はCCh単独刺激時と比較して $p < 0.05$ で、**は $p < 0.01$ で有意差が認められたことを示す。(n=3)



cAMPでも同様に、僅かな上昇傾向が認められたが、有意な変化ではなかった(図8)。

灌流顎下腺において、 Ca^{2+} イオノフォアであるA23187 (3 μM)により、分泌量は僅かであるが持続的な水分分泌が引き起こされ、この水分分泌に対しても、500 μM CPT-cAMPによる水分分泌抑制効果が認められた(図9)。

3. ムスカリン性刺激時の膜電流変化に対する β 受容体刺激およびcAMPの効果

ホールセルパッチクランプ法による顎下腺分離腺房細胞での K^+ および Cl^- 電流測定の結果を図10に示す。

図4 CCh 刺激時のIPRによる水分分泌抑制および蛋白質分泌に対するPPNの効果。

10 μM PPN 存在下で、1 μM CCh 刺激時にさらに0.1 μM IPR 刺激を行った際の唾液分泌量(●)および唾液中蛋白質量(▲)を測定値の平均値±標準誤差で示す。*はPPN非存在下と比較して $p < 0.05$ で、**は $p < 0.01$ で有意差が認められたことを示す。(n=3)

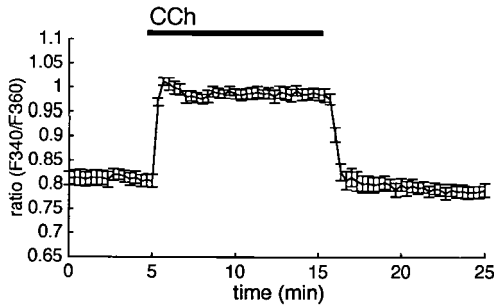


図6 顎下腺分離腺房細胞での CCh 刺激による $[Ca^{2+}]_i$ 変化。

1 μ M CCh 刺激による $[Ca^{2+}]_i$ 変化を、細胞内に負荷した fura-2 の励起波長 340 nm および 360 nm での蛍光強度の比で示す。数値は平均値 \pm 標準誤差を示す。(n=9)

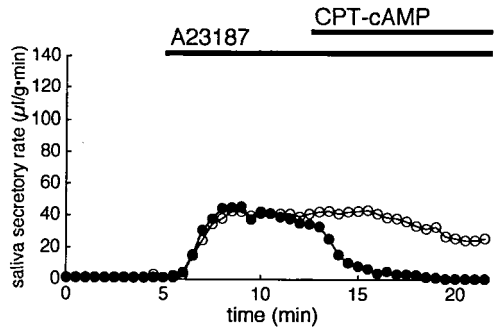


図9 Ca^{2+} イオノフォア A23187 による水分分泌の CPT-cAMP による抑制。

灌流液中に 3 μ M A23187 を添加した際の唾液分泌量を○, 3 μ M A23187 添加時にさらに 500 μ M CPT-cAMP を添加した際の唾液分泌量を●で示す。

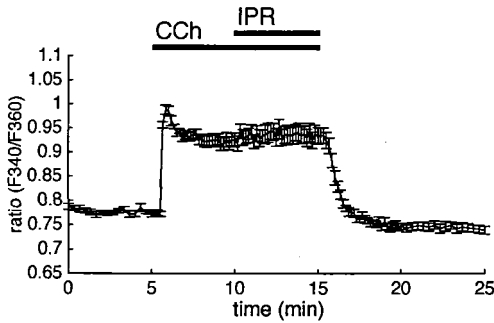


図7 CCh 刺激時 $[Ca^{2+}]_i$ 変化に対する IPR の効果。

1 μ M CCh 刺激時にさらに 1 μ M IPR 刺激を行った際の $[Ca^{2+}]_i$ 変化を fura-2 蛍光強度比の平均値 \pm 標準誤差で示す。(n=9)

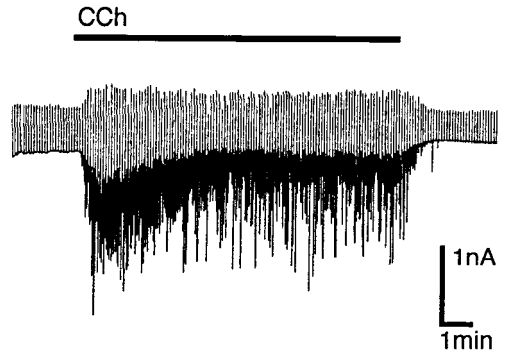


図10 顎下腺分離腺房細胞での CCh 刺激による K^+ および Cl^- 電流の変化。

顎下腺分離腺房細胞における 0.25 μ M CCh 刺激時の K^+ 電流の変化を上トレースで、 Cl^- 電流の変化を下トレースで示す。

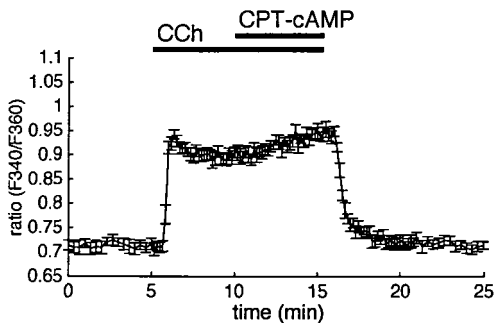


図8 CCh 刺激時 $[Ca^{2+}]_i$ 変化に対する CPT-cAMP の効果。

1 μ M CCh 刺激時にさらに細胞外液中に 1 mM CPT-cAMP を添加した際の $[Ca^{2+}]_i$ 変化を fura-2 の蛍光強度比の平均値 \pm 標準誤差で示す。(n=9)

0.25 μ M CCh 刺激により、連続的な K^+ 電流の増加と、増加、減少を繰り返す振動性の Cl^- 電流が観察された。CCh 刺激時の振動性の Cl^- 電流は、 Cl^- チャンネルブロッカーの diphenylamine-2-carboxylate (DPC: 500 μ M) により抑制され、また細胞外液およびピペット内溶液の Cl^- を低濃度にする (low Cl^-) によっても抑制された (図示せず)。灌流顎下腺においても、1 μ M CCh 刺激時水分分泌は DPC により抑制され¹³⁾、低 Cl^- 濃度の細胞外液によっても抑制された (図11)。

0.25 μ M CCh 刺激時にさらに 1 μ M IPR 刺激を行うと、 Cl^- 電流の振動は抑制され、同時に連続的な非振動性の Cl^- 電流の増加が引き起こされた。また、IPR により K^+ 電流の増強の傾向も認められた (図12)。1 μ M

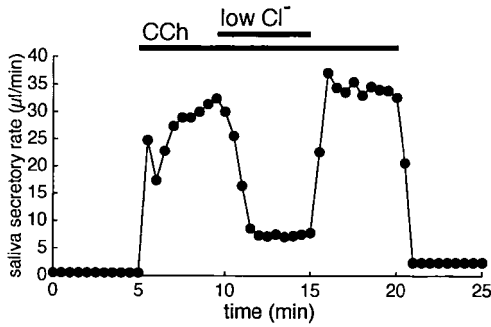


図11 CCh 刺激時水分泌に対する低 Cl^- 濃度細胞外液の効果。

$1 \mu\text{M}$ CCh 刺激時に細胞外液の Cl^- を低濃度 (low Cl^- : 2.2 mM) にした際の唾液分泌量の変化を示す。

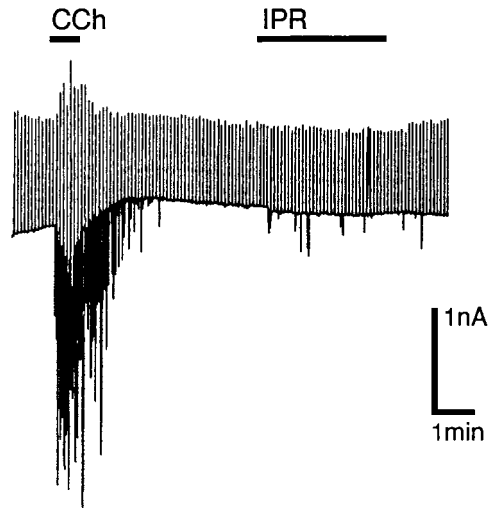


図13 CCh もしくは IPR 単独刺激による K^+ および Cl^- 電流の変化。

$1 \mu\text{M}$ CCh 単独もしくは $1 \mu\text{M}$ IPR 単独刺激による K^+ および Cl^- 電流の変化をそれぞれ上トレース、下トレースで示す。

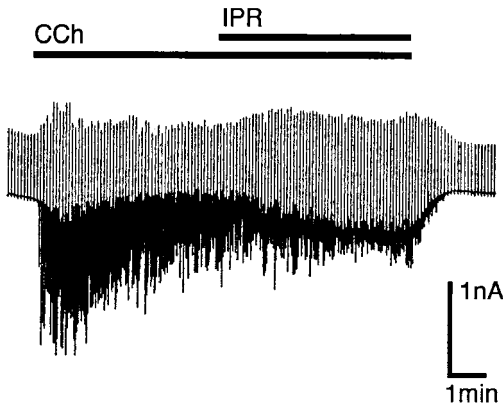


図12 CCh 刺激時 K^+ および Cl^- 電流変化に対する IPR の効果。

$0.25 \mu\text{M}$ CCh 刺激時にさらに細胞外液に $1 \mu\text{M}$ IPR を添加した際の K^+ および Cl^- 電流の変化をそれぞれ上トレースおよび下トレースで示す。

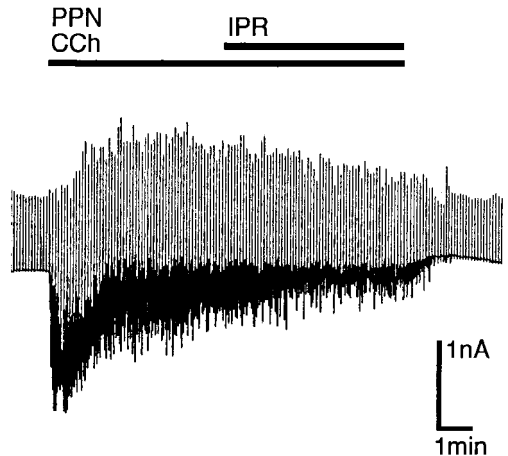


図14 CCh 刺激時の IPR による K^+ および Cl^- 電流変化に対する PPN の効果。

$10 \mu\text{M}$ PPN 存在下で、 $0.25 \mu\text{M}$ CCh 刺激時にさらに $1 \mu\text{M}$ IPR 刺激を行った際の K^+ 電流および Cl^- 電流の変化をそれぞれ上トレースおよび下トレースで示す。

IPR 単独刺激では、 K^+ および Cl^- 電流に顕著な変化は認められなかった (図13)。CCh 刺激時の $1 \mu\text{M}$ IPR による非振動性の Cl^- 電流の増加は、 β ブロッカーの PPN ($10 \mu\text{M}$) により抑制された (図14)。 $1 \mu\text{M}$ CPT-cAMP では、IPR 刺激時のような顕著な変化ではなかったが、振動性 Cl^- 電流の抑制と非振動性 Cl^- 電流の増加の傾向が観察された (図15)。

CCh および IPR 同時刺激時のこれらの電流は、DPC および low Cl^- により抑制された (図示せず)。非振動性 Cl^- 電流は、細胞外液に sucrose ($30\text{--}50 \text{ mM}$) を添加して高浸透圧にすることにより顕著に抑制された (図16)。灌流顎下腺において、灌流液を高浸透圧にすると、 $1 \mu\text{M}$ CCh 刺激時の水分泌量は減少したが、 0.1

μM IPR により水分泌はなおも抑制された (図17)。

4. 顎下腺腺房細胞イオン流入系に対する cAMP の効果

灌流ラット顎下腺において、 $\text{Na}^+/\text{K}^+ / 2\text{Cl}^-$ cotransporter の阻害薬である bumetanide ($500 \mu\text{M}$) により、 $1 \mu\text{M}$

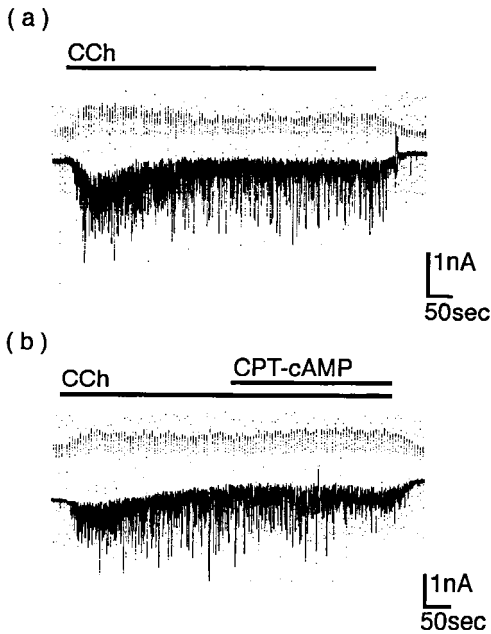


図15 CCh刺激時 K^+ および Cl^- 電流変化に対するCPT-cAMPの効果。

0.25 μM CCh刺激時にさらに細胞外液に1 mM CPT-cAMPを添加した際の K^+ および Cl^- 電流の変化をそれぞれ上トレースおよび下トレースで示す(b)。aには比較のため、0.25 μM CCh単独刺激時の K^+ および Cl^- 電流の変化を示す。

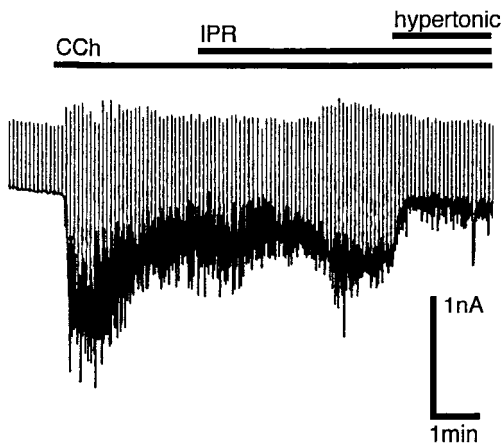


図16 CCh刺激時のIPRによる K^+ および Cl^- 電流変化に対する高浸透圧細胞外液の効果。

0.25 μM CChおよび1 μM IPR刺激時に、細胞外液に50 mM sucroseを加え高浸透圧(hypertonic)にした際の K^+ 電流および Cl^- 電流の変化をそれぞれ上トレースおよび下トレースで示す。

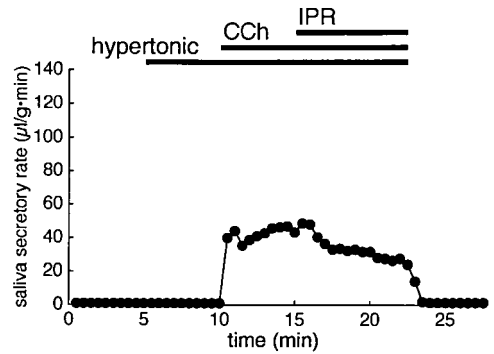


図17 IPRによるCCh刺激時水分分泌抑制に対する高浸透圧細胞外液の効果。

高浸透圧の灌流液(hypertonic: + 50 mM sucrose)の中で、1 μM CCh刺激時にさらに0.1 μM IPR刺激を行った際の唾液分泌量の変化を示す。

CCh刺激時水分分泌は約30%に抑制された。さらにdimethylamiloride (DMA: 20 μM)を加え、 Na^+/H^+ exchanger およびこれと共役して働く Cl^-/HCO_3^- exchangerを介するイオン流入を阻害すると、CCh刺激時水分分泌はほぼ完全に抑制された(図18)。DMAは、CCh刺激時の持続的な水分分泌を約61%に抑制した。さらに500 μM CPT-cAMPを加え7.5分後には、約18%にまで抑制された(図19a)。

DMA非存在下でも、500 μM CPT-cAMP添加7.5分後には水分分泌は約18%まで抑制されたが(図19b)、CPT-cAMP添加直前の水分分泌量を100%、添加7.5分後の水分分泌量を0%として両者を比較すると、DMA存在下ではCPT-cAMP添加5分後まで水分分泌抑制は有意に遅延されることが認められた(図19c)。

5. ムスカリン性刺激時 pH_i 変化に対する β 受容体刺激およびcAMPの効果

顎下腺分離腺房細胞 pH_i は、1 μM CCh刺激により、初期に一過性に低下した後上昇し、安静時よりやや高いpHで定常状態に達した(図20)。定常状態に達した後、さらに1 μM IPRを加えると、僅かに pH_i が上昇する傾向が認められた(図21)。また、1 mM CPT-cAMPでは、IPRよりやや強い上昇傾向が認められた(図22)。

考 察

ラット顎下腺は、唾液分泌量測定のための腺灌流法が確立されており、ムスカリン性刺激により持続的に大量の水分分泌を引き起こす。このため、唾液腺におけ

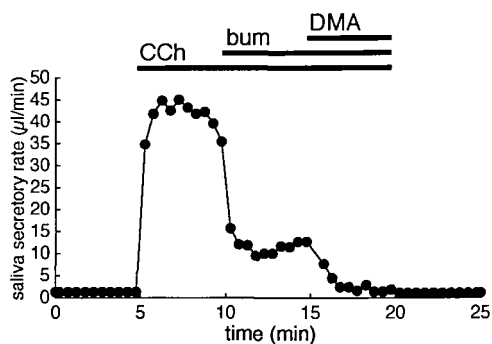


図18 CCh 刺激時水分分泌に対する bumetanide および DMA の効果。

1 μM CCh 刺激時にさらに灌流液中に 500 μM bumetanide (bum) および 20 μM DMA を添加した際の唾液分泌量を示す。

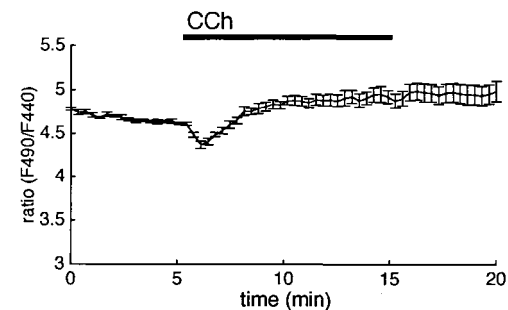
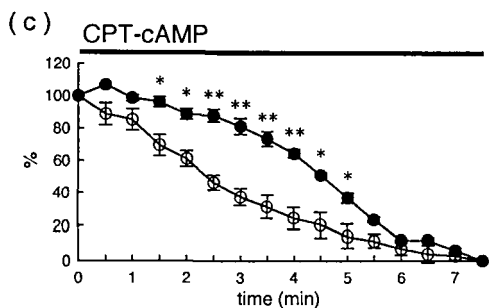
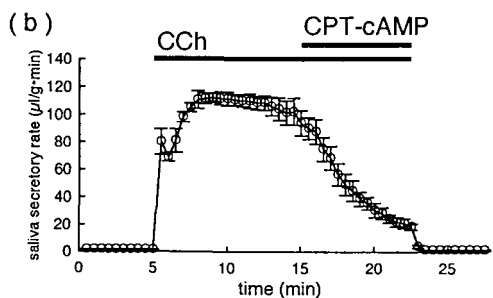
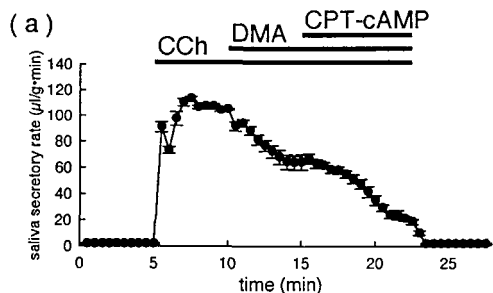


図20 顎下腺分離腺房細胞での CCh 刺激による pH_i 変化。

1 μM CCh 刺激による pH_i 変化を、細胞内に負荷した BCECF の励起波長 490 nm および 440 nm での蛍光強度の比で示す。数値は平均値 \pm 標準誤差を示す。(n=8)

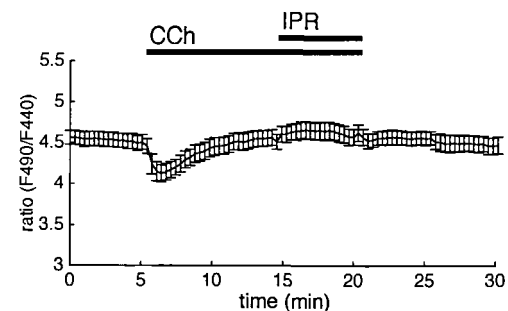


図21 CCh 刺激時 pH_i 変化に対する IPR の効果。

1 μM CCh 刺激時にさらに 1 μM IPR 刺激を行った際の pH_i 変化を BCECF の蛍光強度比の平均値 \pm 標準誤差で示す。(n=12)

る水分分泌機構の研究は主に顎下腺で行われてきた。本研究では、ラット顎下腺を用い、 Ca^{2+} 依存性水分分泌の β 受容体刺激による修飾機構について、特にイオン輸送系への効果を検討した。

灌流ラット顎下腺において、CCh による持続的な水分分泌は、 β 受容体刺激薬の IPR により顕著に抑制され、

図19 CCh 刺激時の CPT-cAMP による水分分泌抑制に対する DMA の効果。

a, b: 20 μM DMA 存在下 (a) および非存在下 (b) での、1 μM CCh 刺激時の 500 μM CPT-cAMP による唾液分泌量変化を測定値の平均値 \pm 標準誤差で示す。(n=3)

c: a (●) および b (○) を、CPT-cAMP 添加直前の唾液分泌量を 100%、添加 7.5 分後を 0% として、平均値 \pm 標準誤差で示す。* は $p < 0.05$, ** は $p < 0.01$ で両群間に有意差が認められたことを示す。(n=3)

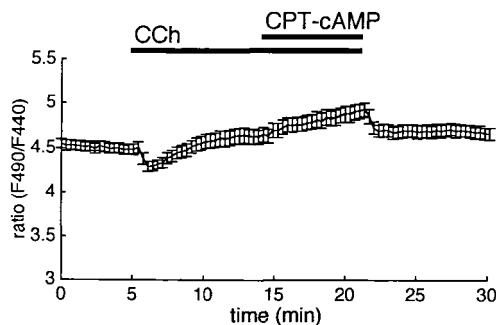


図22 CCh 刺激時 pH_i 変化に対する CPT-cAMP の効果。

1 μM CCh 刺激時にさらに細胞外液中に 1mM CPT-cAMP を添加した際の pH_i 変化を BCECF の蛍光強度比の平均値 \pm 標準誤差で示す。(n = 12)

同時に持続的な蛋白質分泌が引き起こされた。IPR による CCh 刺激時水分分泌の抑制と蛋白質分泌は、低濃度の IPR で引き起こされた。IPR によるこれらの効果は、 β ブロッカーの PPN により阻害された。CCh 刺激時の IPR による水分分泌抑制と蛋白質分泌の効果は、cAMP によっても同様に引き起こされた。したがって、IPR による水分分泌抑制と蛋白質分泌は、cAMP 産生を引き起こす β 受容体刺激と、 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇を引き起こすムスカリン性刺激との相互作用により引き起こされることが示された。Emmelin らは、*in vivo* において顎下腺からの水分分泌は交感神経刺激により減少することを報告している³⁸⁾。*in vivo* での交感神経刺激による水分分泌の減少には、毛細血管収縮による腺血流量の減少が関与することも考えられる³⁸⁻⁴⁰⁾。しかしながら、*in vitro* での灌流顎下腺による実験においては、ムスカリン性刺激および β 受容体刺激による灌流流量の顕著な変化は観察されなかった。したがって、IPR 刺激による水分分泌抑制には、灌流液流量変化以外の因子が関与するものと考えられる。

咀嚼等の機能時には、交感神経刺激と副交感神経刺激が引き起こされ、腺房細胞では Ca^{2+} と cAMP の二つの情報伝達系の相互作用が生じていると考えられる。顎下腺は、 Ca^{2+} 依存性に持続的に水を分泌し、cAMP によりムチンに富んだ唾液を分泌する。ムチンを含んだ唾液は粘調性であり、口腔粘膜および歯牙表面を覆い、乾燥からの保護、潤滑そして病原体に対する局所防衛等の作用を示す⁴¹⁾。また、ムチンはその粘弾性により、濃度的、機械的な緩衝作用をも示す。したがって、ムチンの生理的な意義はその物性にあると考えられ、 Ca^{2+} と cAMP との相互作用により、大量にムチン

を分泌する一方で、水分分泌を抑制するという現象は、ムチンの物性による生理的作用をより効果的にする上で合目的的であると考えられる。

顎下腺分離腺房細胞において、CCh 刺激により持続的な $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇が引き起こされた。耳下腺において、細胞外の Ca^{2+} 除去により細胞外からの Ca^{2+} の流入を阻害すると、持続的な $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇は阻害され、顎下腺における持続的な水分分泌も、細胞外の Ca^{2+} 除去により抑制される¹³⁾。したがって、持続的な水分分泌には、細胞外からの Ca^{2+} の流入による持続的な $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇が必要である^{5,11,13)}。IPR は、細胞内 Ca^{2+} 動員を変化させるが⁴²⁾、顎下腺分離腺房細胞において、IPR および cAMP は、CCh 刺激による $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇に対して、顕著な変化を示さなかった。灌流ラット顎下腺において、 Ca^{2+} イオノフォアの A23187 により $[\text{Ca}^{2+}]_i$ を持続的に上昇させると、分泌量は僅かながら持続的な水分分泌が誘発された。A23187 による持続的な水分分泌に対しても、cAMP による抑制効果が認められた。したがって、IPR 刺激による CCh 刺激時水分分泌の抑制は、 Ca^{2+} 動員の顕著な変化により引き起こされるのではなく、 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇と cAMP 増加との相互作用により引き起こされ、cAMP は CCh 刺激による $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇以降の機構に作用することが示唆された。

$[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇は、基底側膜の K^+ チャンネルと、腺腔側膜に存在すると考えられている Cl^- チャンネルを活性化する^{14,16,19,20,43,44)}。同時に細胞内へのイオン流入系が活性化され、その結果生じる経細胞性の Cl^- 輸送が、 Na^+ の分泌とこれに続く水の分泌の駆動力になると考えられている²³⁻²⁹⁾。顎下腺分離腺房細胞での Cl^- 放出による電流を、ホールセルパッチクランプ法により測定した。CCh 刺激により、増加減少を繰り返す、振動性の Cl^- 電流が観察された。CCh 刺激直後には、非振動性の Cl^- 電流の増加も観察された。 Cl^- チャンネルブロッカーの DPC により、これらの Cl^- 電流は共に抑制され、また細胞外液中およびピペット内液中の Cl^- を低濃度にするこでも、これらの Cl^- 電流は抑制された。この抑制は、振動性 Cl^- 電流で著明であった。灌流顎下腺においても、 Cl^- チャンネルブロッカーの DPC¹³⁾、および細胞外液中の Cl^- を低濃度にするこにより、CCh 刺激による水分分泌は顕著に抑制された。したがって、CCh 刺激時の持続的な水分分泌には、振動性の Cl^- 電流が重要であると考えられる。

分離腺房細胞において、CCh 刺激時にさらに細胞外液中に IPR を添加すると、 K^+ 電流増加の傾向が観察された。灌流顎下腺においては、IPR 刺激直後に CCh 刺激時水分分泌が増強される傾向が観察され、蛋白質分泌も IPR 刺激直後に顕著であった。この効果は cAMP に

よっても同様に引き起こされ、PPNにより阻害された。IPRもしくはcAMPによる増強効果はCCh存在下で引き起こされ、IPR単独では水分分泌はほとんど誘発されなかった。Ishikawaは、A23187により引き起こされる水分分泌の初期相がcAMPにより増強され、この作用はCa²⁺依存性のK⁺放出の増強と付随して生じることを報告している³⁶⁾。CCh刺激時水分分泌のIPR刺激による増強の機構については明らかではないが、K⁺放出の増強が関与している可能性も考えられる。

分離腺房細胞において、CCh刺激時にさらにIPR刺激を行うと、CCh刺激時の振動性のCl⁻電流の減少と同時に、連続的な非振動性のCl⁻電流の増加が観察された。Ca²⁺依存性Cl⁻チャンネルを介する振動性のCl⁻電流については、マウス顎下腺²⁰⁾およびマウス膵臓腺房細胞⁴⁵⁾でも認められており、細胞内Ca²⁺貯蔵部位からのCa²⁺放出により活性化され、水分分泌を駆動するCl⁻の放出を反映していると考えられている。マウス顎下腺ではcAMPによる振動性Cl⁻電流の抑制が報告されているが²⁰⁾、Ins(1,4,5)P₃産生のcAMPによる抑制が関与すると考えられている。本研究では、cAMPにより[Ca²⁺]_i上昇に顕著な変化はみられず、A23187による水分分泌をcAMPが抑制したことから、ラット顎下腺においては、cAMPは[Ca²⁺]_i上昇以降の過程に対して作用すると考えられた。腸管上皮では、りん脂質代謝の変化がCl⁻チャンネルの制御に関与しており⁴⁶⁾、inositol 3,4,5,6-tetrakisphosphate (Ins(3,4,5,6)P₄)によりCa²⁺依存性Cl⁻チャンネルが抑制されることが報告されている⁴⁷⁾。IPR刺激によりIns(3,4,5,6)P₄産生が修飾されて、Ca²⁺依存性Cl⁻チャンネルを介するCl⁻の放出を抑制している可能性も考えられる。

IPR刺激は非振動性のCl⁻電流を増加させ、この電流はβブロッカーのPPNによって抑制された。細胞外液にsucroseを加えて高浸透圧にすると、IPR刺激による非振動性Cl⁻電流は顕著に抑制された。多くの細胞において、高浸透圧もしくは低浸透圧の細胞外液により細胞収縮もしくは膨張した後、調節性に細胞容積が回復することが認められており、この調節性の細胞容積回復には容積調節性のCl⁻電流が関与している^{48,49)}。CCh刺激直後にも、非振動性Cl⁻電流の増加が観察された。ラット顎下腺および耳下腺においては、CCh刺激直後の細胞収縮とこれに続く細胞容積の回復が報告されている^{8,50-52)}。非振動性のCl⁻電流は、細胞容積調節に関与し、CChおよびIPR同時刺激時には、細胞容積調節性の非振動性Cl⁻電流が増強されると考えられる。ラット耳下腺においても、低浸透圧細胞外液による細胞膨張後の容積回復の際に、細胞容積調節性Cl⁻電流が生じ、Ca²⁺依存性Cl⁻チャンネルとは異なっ

たチャンネルを介することが報告されている^{53,54)}。また、結腸上皮、A6細胞などで、容積調節性のCl⁻チャンネルが基底側膜に存在することが報告されている^{55,56)}。したがって、IPR刺激時の高浸透圧感受性Cl⁻電流を引き起こすCl⁻チャンネルは基底側膜に存在すると考えられる。また、腺腔から水を吸収する胆嚢においては、cAMPは腺腔側膜のCl⁻チャンネルを活性化することにより水の吸収を抑制することが報告されている^{57,58)}。しかしながら、灌流顎下腺において、灌流液を高浸透圧にしても、IPR刺激による水分分泌抑制が認められたことから、非振動性Cl⁻電流の増加により直接CCh刺激時水分分泌の抑制が引き起こされるのではなく、腺腔側膜のCl⁻チャンネルを介するCl⁻放出の抑制、およびその他の因子が関与して、水分分泌抑制を誘発している可能性が考えられる。

Ca²⁺依存性の持続的な水分分泌には、イオンチャンネルの活性化とともに、Na⁺/K⁺/2Cl⁻ cotransporter, Na⁺/H⁺ exchanger, およびCl⁻/HCO₃⁻ exchangerを介する細胞内へのイオンの流入が必要である²³⁻²⁹⁾。イオン流入に対するcAMPの作用を検討するため、Na⁺/H⁺ exchangerの阻害薬であるDMAを用いた。灌流顎下腺において、DMAにより、CCh刺激時の持続的な水分分泌は約61.1%に抑制された。DMAは、Na⁺/H⁺ exchanger, およびこれと共役して働くCl⁻/HCO₃⁻ exchangerを介するイオン流入を阻害して、経細胞性のCl⁻輸送を阻害し、水分分泌を抑制する。なおも分泌される唾液は、Na⁺/K⁺/2Cl⁻ cotransporterを介するイオン輸送により駆動されていると考えられる。Na⁺/K⁺/2Cl⁻ cotransporterを阻害するbumetanideとDMAを同時に灌流液中に加えると、唾液分泌はほぼ完全に抑制された。DMA存在下でさらにCPT-cAMPを加えると、水分分泌抑制は有意に遅延された。すなわち、cAMPによる水分分泌抑制には、amiloride感受性のイオン流入系の抑制が関与していることが示唆された。

分離腺房細胞において、pHiを測定したところ、CCh刺激により初期に一過性に減少した後、安静時よりやや高いpHiで定常状態に達した。ラット耳下腺では、ムスカリン性刺激時のpHiの低下は、腺腔側のCa²⁺依存性Cl⁻チャンネルを介するHCO₃⁻の放出によることが示唆されており、その後のNa⁺/H⁺ exchangerの活性化によりpHiが増加することが報告されている^{21,25)}。CChによるpHi変化に対し、IPRおよびcAMPは僅かにpHiを増加させる傾向が認められた。IPRおよびcAMPによるCa²⁺依存性Cl⁻チャンネルの抑制、およびCl⁻/HCO₃⁻ exchangerの抑制により、HCO₃⁻の放出が抑制されてpHiが上昇傾向を示したものと考えられる。胆嚢において、cAMPは腺腔側のCl⁻/HCO₃⁻ exchangerを抑制す

ることが報告されている⁵⁹⁾。顎下腺水分分泌において、 $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ exchanger の抑制による細胞内への Cl^- 流入の阻害も水分分泌抑制に関与していると考えられた。

本研究では、膜電流測定および pH_i 測定の結果において、IPR と cAMP の反応性に若干の相違が観察された。膜電流測定では、IPR 刺激による振動性 Cl^- 電流抑制および非振動性 Cl^- 電流増加が顕著であり、 pH_i 測定では、cAMP による pH_i 増加傾向が比較的強かった。これらの相違から、 β 受容体刺激では、cAMP を介さない情報伝達系が関与する可能性も考えられる。 β 受容体刺激により cAMP 産生を介さず反応を引き起こす伝達系としては、ラット心筋において、L-type Ca^{2+} チャネルが GTP 結合蛋白質を介して β 受容体と直接結合し、また、 Na^+ チャネルも同様に GTP 結合蛋白質を介して直接結合して、 β 受容体刺激により直接制御を受けることが示唆されている⁶⁰⁻⁶²⁾。ラット顎下腺においては、small conductance Cl^- チャネルが GTP 結合蛋白質を介して直接制御されることも報告されている⁶³⁾ が、 β 受容体との関与については不明である。本研究でみられた β 受容体刺激と cAMP との反応性の相違がこのような cAMP を介さない別の情報伝達系に起因するものであるかは不明である。しかしながら、灌流顎下腺での水分分泌抑制および蛋白質分泌が IPR と cAMP で同様に引き起こされることから、 β 受容体刺激による水分分泌抑制と蛋白質分泌は、主として cAMP を介する情報伝達系により引き起こされると考えられる。

総 括

本研究では、ラット顎下腺における Ca^{2+} 依存性水分分泌に対する、 β 受容体刺激の効果とその作用機構を明ら

かにすることを目的として、特にイオン動態に対する影響について検討し、以下の結果を得た。

1. ラット顎下腺において、 β 受容体刺激はムスカリン性刺激時の持続的な水分分泌を有意に抑制し、同時に持続的な蛋白質分泌を引き起こした。
2. β 受容体刺激はムスカリン性刺激時の振動性 Cl^- 電流を減少させ、外液の高浸透圧に感受性の非振動性 Cl^- 電流を増加させた。
3. β 受容体刺激の効果は β ブロッカーにより抑制され、また CPT-cAMP により β 受容体刺激と同様の効果が引き起こされた。
4. アミロライド感受性のイオン流入系の阻害により、CPT-cAMP による水分分泌抑制は有意に遅延された。
5. ムスカリン性刺激時の細胞内 pH は CPT-cAMP により上昇する傾向が認められた。

以上の結果からの仮想図を図23に示す。ラット顎下腺において、 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇時に、 β 受容体刺激は cAMP 産生を引き起こし、 Ca^{2+} と cAMP との相互作用により、水分分泌抑制と蛋白質分泌を引き起こすことが示された。そして、水分分泌抑制には、腺腔側膜の Ca^{2+} 依存性 Cl^- チャネルを介する Cl^- 放出の抑制と、高浸透圧感受性のおそらく基底側膜の Cl^- チャネルの活性化による、経細胞性の Cl^- 輸送の変化が関与することが示唆された。また、cAMP による水分分泌抑制には、アミロライド感受性のイオン流入系の抑制が関与することも示唆された。顎下腺における水分分泌抑制は、 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇時に、主として cAMP を介する情報伝達系により引き起こされるが、cAMP と β 受容体刺激では反応性に若干の違いが見られ、異なった情報伝達系の関与も示唆された。

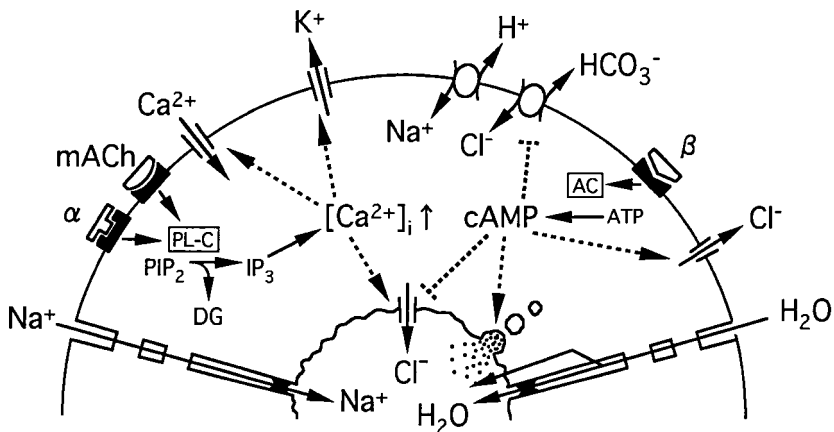


図23 ラット顎下腺腺房細胞における β 受容体刺激と $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇との相互作用による水分分泌抑制機構および蛋白質分泌機構の仮想図。

謝 辞

稿を終えるに臨み、終始御懇篤なるご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予防歯科学講座岩本義史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。研究遂行上終始御懇切なる御助言、御支援を頂きました本学歯科補綴学第一講座赤川安正教授に深謝いたします。研究遂行上および本論文作成上、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ならびに歯科補綴学第一講座関係各位に深謝いたします。

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) Garrett, J.R. and Thulin, A.: Changes in parotid acinar cells accompanying salivary secretion in rats on sympathetic or parasympathetic nerve stimulation. *Cell Tissue Res.* **159**, 179-193, 1975.
- 4) 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.
- 5) Nauntofte, B.: Regulation of electrolyte and fluid secretion in salivary acinar cells. *Am. J. Physiol.* **263**, D823-D837, 1992.
- 6) Clapham, D.E.: Calcium signaling. *Cell* **80**, 259-268, 1995.
- 7) Dissing, S., Nauntofte, B. and Sten, K.O.: Spatial distribution of intracellular, free Ca^{2+} in isolated rat parotid acini. *Pflugers Arch.* **417**, 1-12, 1990.
- 8) Foskett, J.K. and Melvin, J.E.: Activation of salivary secretion: coupling of cell volume and $[Ca^{2+}]_i$ in single cells. *Science* **244**, 1582-1585, 1989.
- 9) Nauntofte, B. and Dissing, S.: Stimulation-induced changes in cytosolic calcium in rat parotid acini. *Am. J. Physiol.* **253**, G290-G297, 1987.
- 10) 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.
- 11) Hunter, M., Smith, P.A. and Case, R.M.: The dependence of fluid secretion by mandibular salivary gland and pancreas on extracellular calcium. *Cell Calcium* **4**, 307-317, 1983.
- 12) Tangkrisanavinont, V. and Pholpramool, C.: Extracellular free calcium and fluid secretion by the rabbit lacrimal gland *in vivo*. *Pflugers Arch.* **382**, 275-277, 1979.
- 13) 杉田 誠: 蛍光色素カルセインを用いた Ca^{2+} 依存性の唾液腺水分泌機構解明に関する研究. 広大歯誌 **28**, 193-209, 1996.
- 14) Nauntofte, B. and Dissing, S.: K^+ transport and membrane potentials in isolated rat parotid acini. *Am. J. Physiol.* **255**, C508-C518, 1988.
- 15) 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.
- 16) Ishikawa, T.: A bicarbonate- and weak acid-permeable chloride conductance controlled by cytosolic Ca^{2+} and ATP in rat submandibular acinar cells. *J. Membr. Biol.* **153**, 147-159, 1996.
- 17) 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.
- 18) Martinez, J.R. and Cassity, N.: ^{36}Cl fluxes in dispersed rat submandibular acini: effects of Ca^{2+} omission and of the ionophore A23187. *Pflugers Arch.* **407**, 615-619, 1986.
- 19) Petersen, O.H.: Stimulus-secretion coupling: cytoplasmic calcium signals and the control of ion channels in exocrine acinar cells. *J. Physiol. Lond.* **448**, 1-51, 1992.
- 20) 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.
- 21) Lee, S.I. and Turner, R.J.: Mechanism of secretagogue-induced HCO_3^- and Cl^- loss from rat parotid acini. *Am. J. Physiol.* **261**, G1111-G1118, 1991.
- 22) 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.
- 23) Pirani, D., Evans, L.A., 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.
- 24) 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.
- 25) 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.

- 26) Melvin, J.E. and Turner, R.J.: Cl⁻ fluxes related to fluid secretion by the rat parotid: involvement of Cl⁻-HCO₃⁻ exchange. *Am. J. Physiol.* **262**, G393-G398, 1992.
- 27) 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.
- 28) Tanimura, A., Kurihara, K., Reshkin, S.J. and Turner, R.J.: Involvement of direct phosphorylation in the regulation of the rat parotid Na⁺-K⁺-2Cl⁻ cotransporter. *J. Biol. Chem.* **270**, 25252-25258, 1995.
- 29) Turner, R.J., George, J.N. and Baum, B.J.: Evidence for a Na⁺/K⁺/Cl⁻ cotransport system in basolateral membrane vesicles from the rabbit parotid. *J. Membr. Biol.* **91**, 143-152, 1986.
- 30) Leslie, B.A., Putney, J.J. and Sherman, J.M.: alpha-Adrenergic, beta-adrenergic and cholinergic mechanisms for amylase secretion by rat parotid gland *in vitro*. *J. Physiol. Lond.* **260**, 351-370, 1976.
- 31) Quissell, D.O., Barzen, K.A. and Lafferty, J.L.: Role of calcium and cAMP in the regulation of rat submandibular mucin secretion. *Am. J. Physiol.* **241**, C76-C85, 1981.
- 32) Petersen, O.H., Ueda, N., Hall, R.A. and Gray, T.A.: The role of calcium in parotid amylase secretion evoked by excitation of cholinergic, alpha- and beta-adrenergic receptors. *Pflugers Arch.* **372**, 231-237, 1977.
- 33) Templeton, D.: Augmented secretion. *Gen. Pharmacol.* **10**, 15-17, 1979.
- 34) Yoshimura, K. and Nezu, E.: Interaction between the calcium and cyclic AMP messenger systems in perfused rat parotid acinar cells. Possible mechanism for potentiation of amylase secretion. *Biochem. Pharmacol.* **43**, 1031-1041, 1992.
- 35) Larsson, O. and Olgart, L.: The enhancement of carbachol-induced salivary secretion by VIP and CGRP in rat parotid gland is mimicked by forskolin. *Acta. Physiol. Scand.* **137**, 231-236, 1989.
- 36) Ishikawa, T.: cAMP modulation of a Ca²⁺-dependent K⁺ conductance in rat submandibular acinar cells. *Am. J. Physiol.* **272**, G454-G462, 1997.
- 37) Martinez, J.R. and Cassity, N.: Effects of cyclic nucleotide derivatives on acetylcholine-induced secretion from isolated, perfused rat submandibular salivary glands. *Arch. Oral. Biol.* **31**, 483-487, 1986.
- 38) Emmelin, N.: Nerve interactions in salivary glands. *J. Dent. Res.* **66**, 509-517, 1987.
- 39) Gjorstrup, P.: Blood flow and secretion in the submaxillary gland of the rabbit during stimulation of the autonomic nerves. *Acta. Physiol. Scand.* **115**, 91-95, 1982.
- 40) Izumi, H. and Karita, K.: The vasodilator and secretory effects elicited by sympathetic nerve stimulation in cat submandibular gland. *J. Auton. Nerv. Syst.* **48**, 143-151, 1994.
- 41) Tabak, L.A., Levine, M.J., Mandel, I.D. and Ellison, S.A.: Role of salivary mucins in the protection of the oral cavity. *J. Oral. Pathol.* **11**, 1-17, 1982.
- 42) Rubin, R.P. and Adolf, M.A.: Cyclic AMP regulation of calcium mobilization and amylase release from isolated permeabilized rat parotid cells. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **268**, 600-606, 1994.
- 43) 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.
- 44) Spearman, T.N. and Pritchard, E.T.: Potassium release from submandibular salivary gland *in vitro*. *Biochim. Biophys. Acta.* **466**, 198-207, 1977.
- 45) Wakui, M., Potter, B.V. and Petersen, O.H.: Pulsatile intracellular calcium release does not depend on fluctuations in inositol trisphosphate concentration. *Nature* **339**, 317-320, 1989.
- 46) Barrett, K.E.: Bowditch lecture. Integrated regulation of intestinal epithelial transport: intercellular and intracellular pathways. *Am. J. Physiol.* **272**, C1069-C1076, 1997.
- 47) Ho, M.W., Shears, S.B., Bruzik, K.S., Duszyk, M. and French, A.S.: Ins(3,4,5,6)P₃ specifically inhibits a receptor-mediated Ca²⁺-dependent Cl⁻ current in CFPAC-1 cells. *Am. J. Physiol.* **272**, C1160-C1168, 1997.
- 48) Grinstein, S., Rothstein, A., Sarkadi, B. and Gelfand, E.W.: Responses of lymphocytes to anisotonic media: volume-regulating behavior. *Am. J. Physiol.* **246**, C204-C215, 1984.
- 49) Spring, K.R. and Ericson, A.C.: Epithelial cell volume modulation and regulation. *J. Membr. Biol.* **69**, 167-176, 1982.
- 50) 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.
- 51) Nakahari, T., Murakami, M., Sasaki, Y., Kataoka, T., 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.
- 52) Robertson, M.A. and Foskett, J.K.: Membrane crosstalk in secretory epithelial cells mediated by intracellular chloride concentration. *Jpn. J. Physiol.* **44** Suppl 2, S309-S315, 1994.
- 53) Arreola, J., Melvin, J.E. and Begenisich, T.: Volume-activated chloride channels in rat parotid acinar cells. *J. Physiol. Lond.* **484**, 677-687, 1995.
- 54) Arreola, J., Park, K., Melvin, J.E. and Begenisich,

- T.: Three distinct chloride channels control anion movements in rat parotid acinar cells. *J. Physiol. Lond.* **490**, 351–362, 1996.
- 55) Brochiero, E., Banderali, U., Lindenthal, S., Raschi, C. and Ehrenfeld, J.: Basolateral membrane chloride permeability of A6 cells: implication in cell volume regulation. *Pflugers Arch.* **431**, 32–45, 1995.
- 56) Diener, M., Nobles, M. and Rummel, W.: Activation of basolateral Cl⁻ channels in the rat colonic epithelium during regulatory volume decrease. *Pflugers Arch.* **421**, 530–538, 1992.
- 57) Altenberg, G.A., Subramanyam, M. and Reuss, L.: Muscarinic stimulation of gallbladder epithelium. III. Antagonism of cAMP-mediated effects. *Am. J. Physiol.* **267**, C1196–C1202, 1994.
- 58) Copello, J., Heming, T.A., Segal, Y. and Reuss, L.: cAMP-activated apical membrane chloride channels in *Necturus* gallbladder epithelium. Conductance, selectivity, and block. *J. Gen. Physiol.* **102**, 177–199, 1993.
- 59) Reuss, L.: Cyclic AMP inhibits Cl⁻/HCO₃⁻ exchange at the apical membrane of *Necturus* gallbladder epithelium. *J. Gen. Physiol.* **90**, 173–196, 1987.
- 60) Schubert, B., VanDongen, A.M., Kirsch, G.E. and Brown, A.M.: Beta-adrenergic inhibition of cardiac sodium channels by dual G-protein pathways. *Science* **245**, 516–519, 1989.
- 61) Schubert, B., Vandongen, A.M., Kirsch, G.E. and Brown, A.M.: Inhibition of cardiac Na⁺ currents by isoproterenol. *Am. J. Physiol.* **258**, H977–H982, 1990.
- 62) Yatani, A. and Brown, A.M.: Rapid beta-adrenergic modulation of cardiac calcium channel currents by a fast G protein pathway. *Science* **245**, 71–74, 1989.
- 63) Martin, D.K.: Small conductance chloride channels in acinar cells from the rat mandibular salivary gland are directly controlled by a G-protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **192**, 1266–73, 1993.