

原 著

ラット耳下腺導管の水輸送と重炭酸イオン分泌機構解明に関する研究

中 本 哲 自

A study on fluid transport and bicarbonate secretion in rat parotid intralobular ducts

Tetsuji Nakamoto

(平成12年1月18日受付)

緒 言

唾液は感染防御や咀嚼, 発音・嚥下など口腔の健康と機能維持に不可欠であり, 歯科補綴学的にも義歯の維持や床下粘膜の保護に極めて重要な役割を果たしている¹⁾。唾液は三大唾液腺である顎下腺, 耳下腺および舌下腺と口腔内に散在する小唾液腺により産生され, これらの唾液腺は腺房細胞と導管細胞から構成されるが, 腺房細胞は原唾液の産生を, 導管細胞は原唾液のイオン組成の修飾をそれぞれ担っている¹⁾。これらの細胞の分泌機構は腺房細胞ではよく解明されているものの, 導管細胞の機能に関しては未解明の部分が多い。腺房細胞での分泌には, 大別してムスカリン性刺激および α 受容体刺激が関与する細胞内 Ca^{2+} 濃度 ($[Ca^{2+}]_i$) 上昇系のシグナルによる電解質水分泌²⁻⁷⁾, β 受容体刺激による細胞内の adenosine 3',5'-cyclic monophosphate (cAMP) 上昇と, さらにプロテインキナーゼの活性化を介するタンパク質の開口分泌^{8,9)} などがある。 $[Ca^{2+}]_i$ 上昇は, 腺腔側に存在するとされる Ca^{2+} 依存性の Cl^- チャネルを活性化し, Cl^- を腺腔へと分泌させる。 Cl^- の分泌は電気的に中性になるように Na^+ の腺腔への傍細胞性の移動を促し, その結果生じる浸透圧勾配が経細胞性あるいは傍細胞性の水輸送を起こすとの考えが有力である^{1,4)}。しかし, Cl^- 以外に浸透圧勾配を作り出すイオンとして重炭酸イオン (HCO_3^-) の寄与も報告されている^{6,10)}。

一方, 導管細胞では, 腺房細胞で産生された原唾液から Na^+ と Cl^- を再吸収して K^+ と HCO_3^- を分泌するといわれている^{1,11)} が, 刺激時の挙動については不

明な点が多い。 Na^+ と Cl^- の再吸収の機序については, 腺腔側の細胞膜上に存在するといわれる上皮型ナトリウムチャネル (epithelial sodium channel: ENaC), 嚢胞性線維症膜コンダクタンス制御因子 (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator: CFTR) や Na^+/H^+ exchanger (NHE) が関与すると考えられている¹¹⁻¹⁶⁾。 K^+ と HCO_3^- の分泌機序については, K^+/H^+ exchanger や陰イオンチャネルが関与するとの報告^{17,18)} もあるが, その詳細な機構は不明である。唾腺導管では重炭酸分泌と水分泌が報告されているが, 唾液腺導管での水分泌については否定的見解が多い¹⁹⁻²²⁾。

これに対して, Baum らのグループは放射線照射治療による分泌機能不全に対し, 比較的放射線感受性の低い導管細胞への水輸送に重要な役割を果たしているアクアポリン¹⁹⁻²²⁾ を遺伝子導入により発現させ, K^+ と HCO_3^- の分泌が生じる浸透圧勾配を水輸送に応用しようとしている²³⁻²⁵⁾。この方法は対症療法しか行われていない放射線障害以外の原因による分泌機能不全に対しても, 有用な治療法となる可能性がある²⁶⁾。しかしながら, 導管での細胞レベルにおける分泌刺激時の K^+ と HCO_3^- の分泌制御機構とそれらが水輸送に果たす役割については現在のところほとんど明らかにされておらず, その分泌機構の解明は, 科学的根拠に基づく治療法開発のために不可欠であると考えられる。本研究では, 水成分に富んだ漿液性唾液を産生する耳下腺を用い, 導管での水輸送能を測定する方法を確立, 次いでその方法と蛍光測定法および電気生理学的手法を用い, $[Ca^{2+}]_i$ を上昇させるムスカリン性アセチルコリン受容体作用薬として頻用される carbachol (CCh) 刺激とアデニレートシクラーゼに作用して cAMP を増加させるといわれる forskolin 刺激の 2 種類の細胞内シグナル伝達系による導管細胞の水輸送と重炭酸イオンの分泌機構を解明した。

広島大学歯学部歯科補綴学第一講座 (主任: 赤川 安正教授) 本論文の要旨は, 平成11年3月の第76回日本生理学会大会および平成11年11月の第51回日本生理学会中国四国地方会において発表した。

材料ならびに方法

I. 共焦点レーザー顕微鏡による耳下腺導管内腔変化の観察

本研究は、広島大学の動物実験指針および広島大学医学部附属動物実験施設の内規に従って行った。実験動物には体重 200–350 g の雄性ウイスター系ラットを使用した。動物を 100 mg/kg のペントバルビタールナトリウム（ネプタール[®]、ダイナポット）腹腔内注射による麻酔後、耳下腺を摘出、直ちに 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 Na₂fumarate, 2.7 mM Na-glutamate, 12.5 mM HEPES, pH=7.4）溶液に移した後、同組織を約 1 mm 角に細切した。次いで、コラゲナーゼ（260 Units/ml）および bovine serum albumin（BSA: 0.1%）を含む KHR 溶液中で 37°C、20–25 分間インキュベートし、この操作の後、ピペットによる吸引と排出を繰り返して細胞塊を分散させ未処理の細胞塊を除去、等量の BSA 含有 KHR にて 3 回洗浄後に分離耳下腺を得た。次いで、一部のサンプルは蛍光色素である calcein-AM（1 μM）を含む KHR 溶液で 37°C、10 分間インキュベートし、外液の未反応の蛍光色素を洗浄して以下の実験に使用した²⁷⁾。分離耳下腺は poly-L-lysine でコートした直径 25 mm のカバーガラス上に播種して、コートガラス面に強固に接着させた後、腺房細胞の付着していない導管を光学顕微鏡にて選択、これをサンプルとして実験に使用した。導管の蛍光観察には、共焦点レーザー顕微鏡（LSM410, Carl zeiss, Germany, 広島大学歯学部中央研究室所属）を使用し、sulforhodamine B（5 μM）を加えた KHR を毎分 3.5 ml の流速で灌流した。画像の取得に際しては、顕微鏡のフォーカス面が導管の最大径を捉えるよう設定、波長 543 nm のヘリウムネオンレーザーを励起光に使用し、波長 570 nm のロングパスフィルターにて得られた蛍光画像を 10–15 秒毎に記録した。Calcein 染色を施したサンプルは細胞外液のヘリウムネオンレーザーによる細胞外液の sulforhodamine B の励起と同時に波長 488 nm のアルゴンレーザーで細胞内の calcein を励起させ、波長 510–525 nm のバンドパスフィルターにて得られた蛍光画像を記録した。灌流液に各種分泌刺激薬を加えて刺激した際の導管内腔の蛍光強度を経時的に観察し、各種チャネルおよびトランスポーターを阻害するとされる薬剤の効果については、刺激時の蛍光強度変化に及ぼす影響から検討した。導管内腔の蛍光強度測定には 40 倍の油浸対物レンズ（開口数 1.3）を使用して得られた 256×256 ピクセルの画

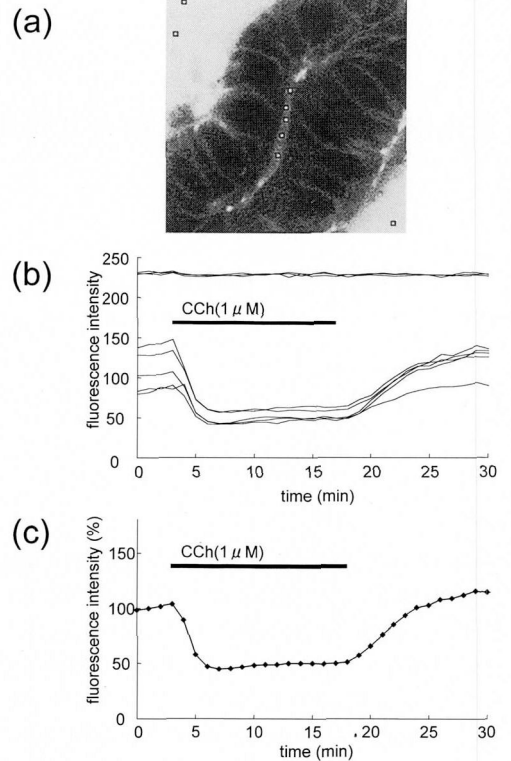


図 1 導管内腔の蛍光強度定量化の手順。

- 導管内の蛍光強度測定部位 5 ヲ所と導管外の測定部位 3 ヲ所を示す。
□は測定部位を示す。
- 導管内外の測定部位の 256 階調で得られる蛍光強度変化を示す。
- 導管内蛍光強度を刺激前に対する相対値に変換後、導管外蛍光強度により励起光の揺れを補正し、5 ヲ所の平均した値を示す。

像を用いた。その画像上に一辺が 8 ピクセル（約 1.5 μm）の正方形の蛍光測定領域を各サンプルについて、導管内に 5 ヲ所、導管外に 3 ヲ所それぞれ定常的に液体成分を示す部位に設定した（図 1a）。その結果得られた無名数で表示される蛍光強度（図 1b）を無刺激時の導管内の蛍光強度を 5 ヲ所各々 100% として相対値に変換し、外液の蛍光強度の平均から励起光の揺れを補正し、次いで 5 ヲ所の値を平均した（図 1c）。さらに、同一条件について 3 例以上の実験から平均値と標準誤差を算出し、導管内腔の蛍光強度の解析を行った。

II. 導管細胞の $[Ca^{2+}]_i$ および細胞内 pH 計測

$[Ca^{2+}]_i$ 計測には蛍光性の Ca^{2+} 濃度指示薬 fura-2 を、pH 計測には蛍光性の pH 指示薬である 2',7'-bis(carboxyethyl)-5(6)-carboxyfluorescein (BCECF) を

それぞれ使用した。コラゲナーゼ処理によって得られた分離耳下腺導管をそれぞれ fura-2-AM (2 μ M), BCECF-AM (1 μ M) を添加した BSA 含有 KHR にて 37°C 15 分間インキュベートし、細胞内に蛍光色素の負荷を行った。インキュベート終了後、細胞外液中に残存する蛍光色素を BSA 含有 KHR にて 3 回洗浄, poly-L-lysine コートしたカバーガラス上に接着させ 3 時間以内に各イオン濃度を計測した。測定には画像解析装置 ARUGUS HiSCA (Hamamatsu Photonics, Hamamatsu, Japan, 広島大学医学部附属動物実験施設所属) を使用し, $[Ca^{2+}]_i$ では励起波長 380 nm/340 nm, pH では励起波長 490 nm/450 nm の蛍光比を約 10 秒間隔でそれぞれ求めた。得られた蛍光比を $[Ca^{2+}]_i$ では *in vitro* で fura-2-calibration kit (Molecular Probes, Eugene, Ore., USA) を使用し, 細胞内 pH では *in situ* で測定終了したサンプルに HEPES と NaOH で pH を 6.8, 7.1, 7.3, 7.5 および 7.8 に調整した溶液 (140 mM KCl, 10 mM NaCl, 1 mM $MgSO_4$) を nigericin (5 μ M) 存在下で細胞内の蛍光比が安定するまで灌流し, それぞれ実測値に変換した。各導管には 8 ヲ所の計測部位を設定, 計測した値を平均した。各条件につき少なくとも 3 例以上を計測し, その平均と標準誤差を求めた。

Ⅲ. 耳下腺導管におけるイオン電流の測定

イオン電流の測定には, コラゲナーゼ処理により得られた分離耳下腺の中から導管を分離する処理と導管を個々の細胞に分散させる処理を追加した。まず, 分離耳下腺をプラスチックシャーレに播種し, 接着力の違いを利用してシャーレ上に接着した腺房細胞を KHR で洗い流すことで可及的に除いた。次いで, トリプシンと EDTA を用いてシャーレに接着している導管を化学的に剥離, 遠心操作により導管を回収した。得られた導管を 37°C, 30 分間コラゲナーゼ処理 (520 Units/ml) を行い, 3 回洗浄して測定に使用した。イオン電流測定には, 分泌細胞に重要な細胞内陰イオン環境を攪乱しないといわれる gramicidin 穿孔パッチ法を用いた^{28, 29)}。パッチクランプピペットはガラスチューブ (Cat. No. G75-1511, Warner Instrument, Hamden, CT) からブラー (NARISHIGE SCIENTIFIC INSTRUMENT LAB., Tokyo, Japan) を用いて作製した。さらにピペットの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 の抵抗を示した。ピペット内溶液の組成は 150 mM KCl, 10 mM HEPES (pH 7.4) とし, ピペットの先端を 2-3 秒浸漬して部分的に溶液を入れた。次いで, ピペットの後端から 100 μ g/ml gramicidin D を含むパッチ内溶液で満たした。計測には pathch/whole-cell clamp amplifier CEZ-2400

(Nihon Kohden, Tokyo, Japan) を用いた。膜電位を K^+ の平衡電位である -80 mV に固定後, 分泌刺激により定期的に流れる電流を計測し解析に使用した。

Ⅳ. 統計学的処理

各データの有意差の検定は, Student's t-test により行い, 危険率 5% 未満を有意であるとした。

Ⅴ. 使用薬物

Carbamylcholine chloride は Nacalai Tesque (Kyoto, Japan) より, diphenylamine-2-carboxylate は Wako Pure Chemical (Osaka, Japan) より購入した。 forskolin, glibenclamide, methazolamide, 4,4'-diisothiocyanostilbene-2,2'-disulfonic acid, bumetanide, nigericin および gramicidin D は Sigma Chemical Co. (St. Louis, Mo., USA) より, fura-2-AM, BCECF-AM は Dojindo (Kumamoto, Japan) より, 5-nitro-2-(3-phenylpropylamino) benzoic acid は Research Biochemicals International (MA, USA) より, そして sulforhodamine B は Kodak (Rochester, New York, USA) よりそれぞれ購入した。Calcein-AM は Molecular Probes (Eugene, Ore., USA) より購入した。

結 果

I. ムスカリン性刺激による導管内腔蛍光変化および細胞内イオン濃度変化

1. ムスカリン性刺激による導管内腔蛍光変化と導管内腔蛍光物質の移動について

耳下腺導管での水輸送能を調べるため, 分離導管の外部を rhodamine 性の蛍光をもつ sulforhodamine B を含む KHR で灌流することで導管内に負荷した蛍光色素の CCh による移動を共焦点レーザー顕微鏡下において, 図 1 で述べた方法に従い観察した。分離導管の外部を灌流開始すると 2 分後には蛍光が導管内腔にも観察された。この蛍光を均一に観察できるよう顕微鏡のフォーカス面を設定し, ムスカリン性刺激薬である CCh (1 μ M) で刺激したところ, 導管内腔の sulforhodamine B の蛍光強度は徐々に減少して約 4 分後に最小値に達し, その後刺激中はこの値を維持していた (図 2)。刺激を除去すると, 導管内腔の蛍光強度は直ちに上昇を開始し, 約 5 分後には刺激前の状態にほぼ回復した (図 2)。同時に行った calcein 染色標本では, 導管内径の変化を容易に観察でき, CCh 投与直後に導管内腔は著明に拡大し, 刺激中は拡大が維持されており, CCh 除去後には導管内径も回復した。この現象は sulforhodamine B による蛍光強度の回復に比べ, 遅延する傾向を示した (図 2)。また, 一部の導管中に

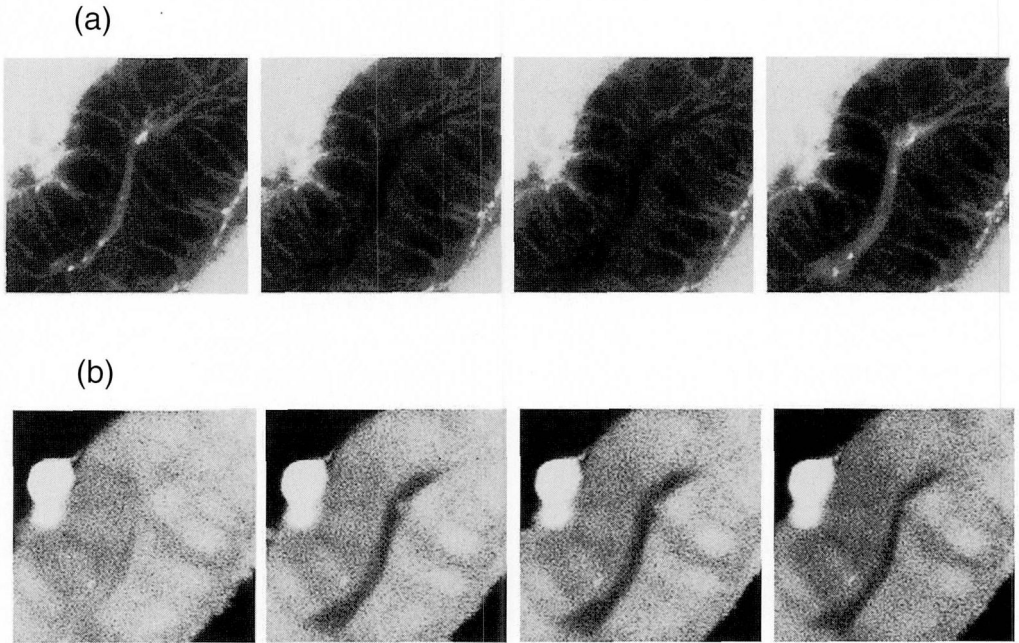


図2 CCh ($1 \mu\text{M}$) 刺激による耳下腺導管の内腔蛍光強度変化と形態変化。
 a : Sulforhodamine B ($5 \mu\text{M}$) を含む KHR を持続的に灌流し、波長 543 nm ヘリウムネオンレーザーを励起光として、570 nm ロングパスフィルターを用いて採取された蛍光画像。
 b : 細胞内に負荷したcalceinを波長 488 nm アルゴンレーザーで励起し、510-525 nm バンドパスフィルターを用いて採取された蛍光画像。
 それぞれ、左より刺激前、CCh 刺激 5 分後、CCh 刺激 10 分後および刺激除去 10 分後を示す。

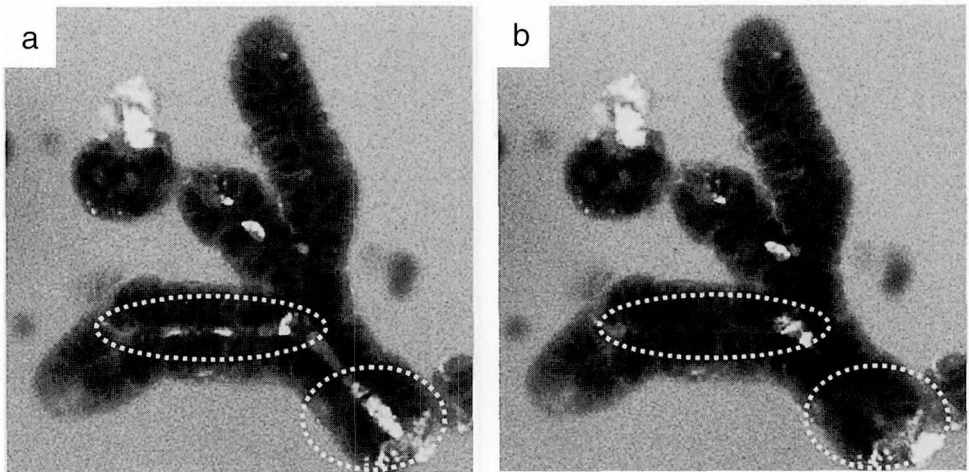


図3 CCh ($1 \mu\text{M}$) 刺激による蛍光色素に濃染される導管内腔の物質の移動。
 Sulforhodamine B ($5 \mu\text{M}$) を含む KHR を持続的に灌流し、波長 543 nm ヘリウムネオンレーザーを励起光として、570 nm ロングパスフィルターを用いて採取された蛍光画像を示す。点線で示した部位は物質の移動像を示す。a : は CCh 刺激 135 秒後、b : は CCh 刺激 165 秒後をそれぞれ示す。

は導管内腔に存在する sulforhodamine B により濃染される物質が存在し、刺激に伴って導管内を移動してい

る像が観察された (図 3)。

導管内蛍光変化を定量的に表すため、図 1 で述べた

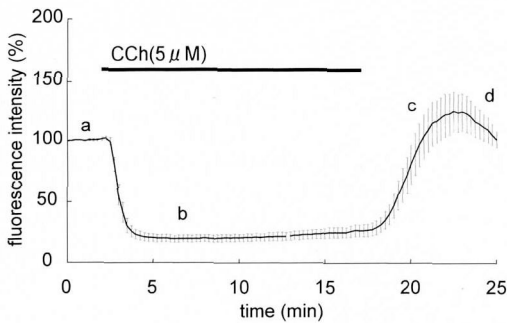
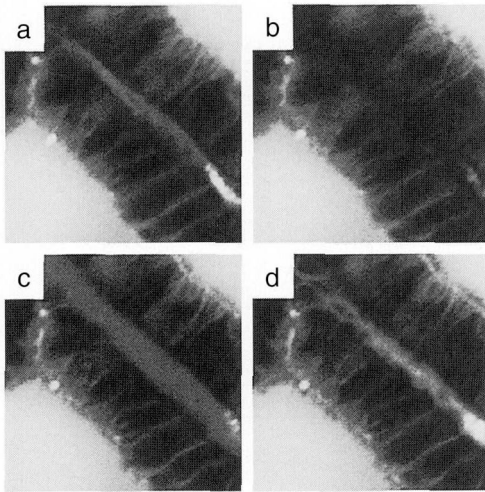


図4 CCh (5 μ M) が導管内腔 sulforhodamine B 蛍光強度に及ぼす影響。

上段：細胞外液sulforhodamine Bの蛍光画像のCCh (5 μ M)刺激による変化を示す。a：刺激前，b：CCh刺激4分後，c：CCh除去4分後，d：CCh除去8分後を示し，下段の図中表記と対応する1例の蛍光画像である。

下段：CCh (5 μ M) 刺激による導管内腔の蛍光強度の相対変化を初期蛍光強度100%とした平均値 \pm 標準誤差で示す (n=4)。

方法で sulforhodamine B のみ外液に加えて 5 μ M CCh 刺激による導管内の蛍光強度の変化を 4 例の平均と標準誤差で示した (図 4)。刺激中の導管内腔の蛍光強度は，刺激約 4 分後に無刺激時の $100.3 \pm 1.0\%$ (平均 \pm 標準誤差) から $19.7 \pm 6.0\%$ へ有意に減少したが ($p < 0.001$)，刺激中この減少は持続されていた。また，CCh 除去により導管内蛍光は回復傾向を示した。これらの所見は CCh 刺激による導管内溶液の移動を示唆しており，sulforhodamine B を用いる本測定方法は導管内の溶液輸送能の可視化と定量化に有用であることが示された。

2. CCh 刺激に対する atropine と外液 Ca^{2+} の導管細胞機能への影響について

腺房細胞での水分分泌にはムスカリン性受容体と細胞内外の Ca^{2+} の関与が示唆されているが，導管細胞の機能への受容体と $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の関与を明らかにするため，ムスカリン性受容体のアンタゴニストである atropine ならびに細胞外の Ca^{2+} 除去の影響について調べた。

導管を CCh 刺激中に atropine を加えたところ，約 10 nM で蛍光強度の減少が抑制された。細胞外液中の Ca^{2+} を除去した溶液を刺激 2 分前より灌流して CCh 刺激を行ったところ， $[\text{Ca}^{2+}]_i$ は一過性に上昇したが，外液中に Ca^{2+} を戻すと一転して，定常的な上昇が認められ (図 5a)，細胞内 Ca^{2+} ストアからの Ca^{2+} の放出と細胞外からの Ca^{2+} 流入の存在が示された。また，同一の条件で導管内腔の蛍光強度を観察したところ，外液に Ca^{2+} が存在しない条件では有意ではないものの一過性に蛍光強度の減少が認められ，外液中に Ca^{2+} が回復すると無刺激時よりも有意な蛍光強度の減少がみられた ($p < 0.01$) (図 5b)。以上の結果より，CCh 刺激時の導管内蛍光減少はレセプター刺激による $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の

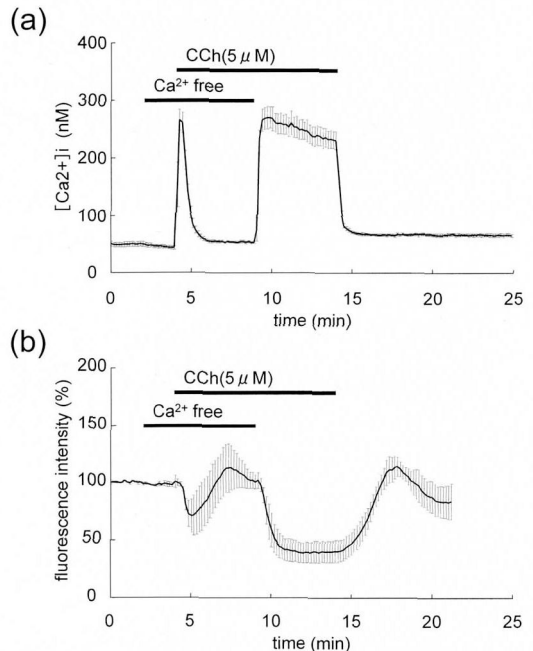


図5 CCh (5 μ M) 刺激時の $[\text{Ca}^{2+}]_i$ および導管内腔 蛍光強度に細胞外液中の Ca^{2+} 除去が及ぼす影響。

a： $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 変化を平均値 \pm 標準誤差で示す (n=6)。

b：導管内腔の蛍光強度変化を平均値 \pm 標準誤差で示す (n=3)。

それぞれ CCh (5 μ M) 刺激前に 2 分間 Ca^{2+} free の溶液を灌流した。

上昇を介していることが明らかとなった。

3. CCh 刺激による導管内蛍光減少に対するイオンチャンネル阻害剤の影響について

ムスカリン刺激による導管内蛍光減少に関与するチャンネルとトランスポーターを明らかにするため、イオンチャンネルおよびトランスポーターの阻害剤がCCh刺激時の導管内蛍光強度に及ぼす影響について調べた。種々の陰イオンチャンネル阻害剤である diphenylamine-2-carboxylate (DPC: 100 μ M) によりCCh刺激時の導管内蛍光強度の持続的減少は有意に抑制され ($p < 0.005$), この抑制は可逆的であった (図 6a)。一方, $\text{Na}^+/\text{K}^+ / 2\text{Cl}^-$ cotransporter 阻害剤である bumetanide (500 μ M) はCCh刺激による持続的蛍光減少に有意な影響を与えなかった (図 6b)。また, $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ exchanger 阻害剤 4,4'-diisothiocyanostilbene-2,2'-disulfonic acid (DIDS: 200 μ M) も刺激時の持続的蛍光減少に有意な影響を及ぼさなかった (図 7a)。さらに, DPC によりCCh刺激効果は抑制されることが明らかになったので, チャンネル通過陰イオンとしての Cl^- の

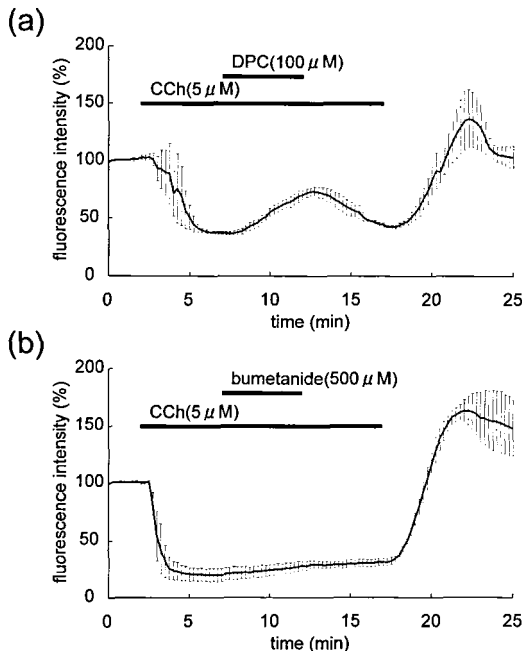


図 6 CCh (5 μ M) 刺激時の導管内腔 sulforhodamine B 蛍光強度に陰イオンチャンネル阻害剤および Cl^- トランスポーター阻害剤が及ぼす影響。

- a : 陰イオンチャンネルを阻害する DPC (100 μ M) による影響を平均値 \pm 標準誤差で示す ($n=3$)。
 b : $\text{Na}^+/\text{K}^+ / 2\text{Cl}^-$ cotransporter 阻害剤の bumetanide (500 μ M) による影響を平均値 \pm 標準誤差で示す ($n=3$)。

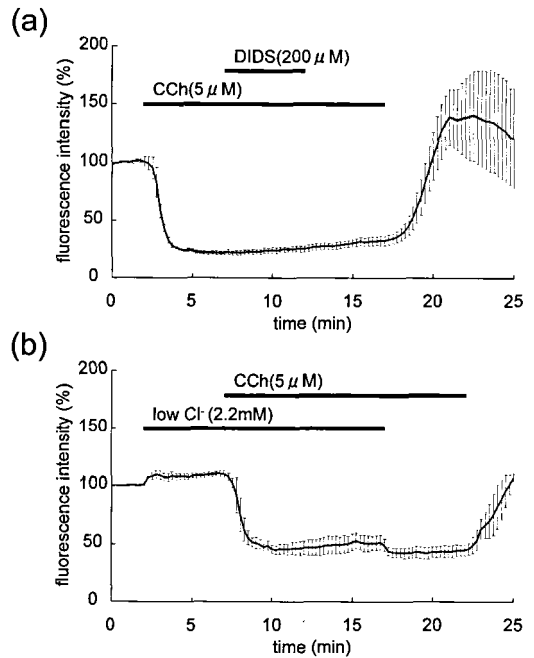


図 7 CCh (5 μ M) 刺激時の導管内腔 sulforhodamine B 蛍光強度に Cl^- トランスポーター阻害剤および細胞外液の Cl^- 濃度の減少が及ぼす影響。

- a : $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ exchanger 阻害剤の DIDS (200 μ M) による影響を平均値 \pm 標準誤差で示す ($n=3$)。
 b : 細胞外液中の Cl^- の減少による影響を平均値 \pm 標準誤差で示す ($n=3$)。

関与を明らかにするため, 細胞外液の Cl^- 濃度を 115.1 mM から 2.2 mM に減少させた影響を調べたところ, CCh 刺激による導管内蛍光減少に大きな影響を及ぼさなかった (図 7b)。以上より, CCh 刺激による導管内蛍光強度減少への DPC 感受性の陰イオンチャンネルの関与は示されたが, Cl^- やトランスポーターの関与は認められなかった。

4. CCh 刺激による導管内蛍光減少に対する methazolamide の影響について

CCh 刺激による導管内蛍光減少に細胞外液 Cl^- の関与が否定的であったため, 次に関与する陰イオン候補として HCO_3^- の可能性を検証した。 HCO_3^- は細胞内で二酸化炭素と水から炭酸脱水酵素 (CA) により産生されることから, その阻害剤である methazolamide (1 mM) を用いCCh刺激による効果への HCO_3^- の関与を調べたところ, CCh 刺激時の導管内蛍光強度の持続的減少が可逆的に抑制された (図 8a)。導管内蛍光は methazolamide 添加後 4 分で, $32.9 \pm 11.5\%$ から $106.6 \pm 14.7\%$ へ有意に増加した ($p < 0.01$)。この methazolamide による抑制効果は受容体刺激から $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上

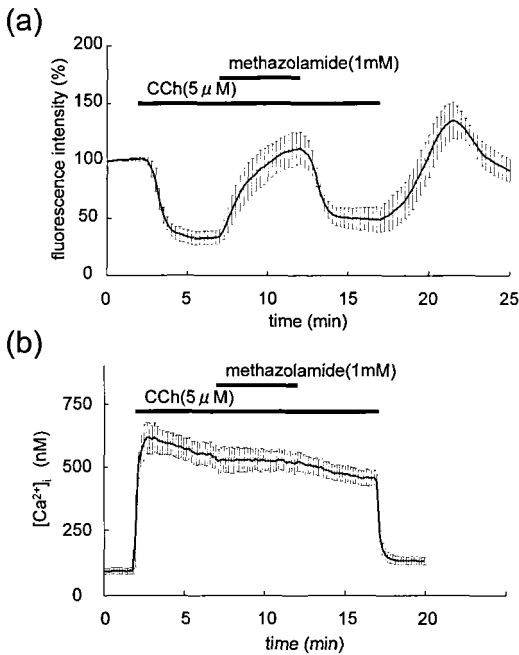


図8 炭酸脱水酵素阻害剤の methazolamide (1 mM) が CCh (5 μM) 刺激時の導管内 sulforhodamine B 蛍光強度変化および [Ca²⁺]_i に及ぼす影響。
 a : 導管内腔の sulforhodamine B 蛍光強度への影響を平均値±標準誤差で示す (n=4)。
 b : [Ca²⁺]_i への影響を平均値±標準誤差で示す (n=3)。

昇の過程以降であることが考えられたため、[Ca²⁺]_i への影響について調べたところ、methazolamide は CCh 刺激による [Ca²⁺]_i 上昇に影響を与えなかった (図 8b)。

そこで、methazolamide が HCO₃⁻ の産生へ影響を与えていることを示すために、methazolamide による細胞内 pH 変化を調べた。CCh 刺激は単独で細胞内 pH に有意な変化をもたらさなかった。一方、CCh 刺激中に methazolamide を加えると pH は可逆的に有意な上昇を示した (p<0.05) (図 9a, b)。無刺激時に methazolamide を加えても、細胞内 pH 変化や導管内蛍光変化を認めなかった。これらの変化により、methazolamide は CA 阻害による HCO₃⁻ 産生抑制を介する CCh 刺激時の導管内蛍光強度の持続的減少を抑制していることが示された。

II. Forskolin 刺激による導管内腔蛍光の変化、細胞内イオン濃度変化およびイオン電流について

1. Forskolin 刺激による導管内腔の蛍光変化について

腺房細胞でタンパク質の分泌を促すとされる cAMP

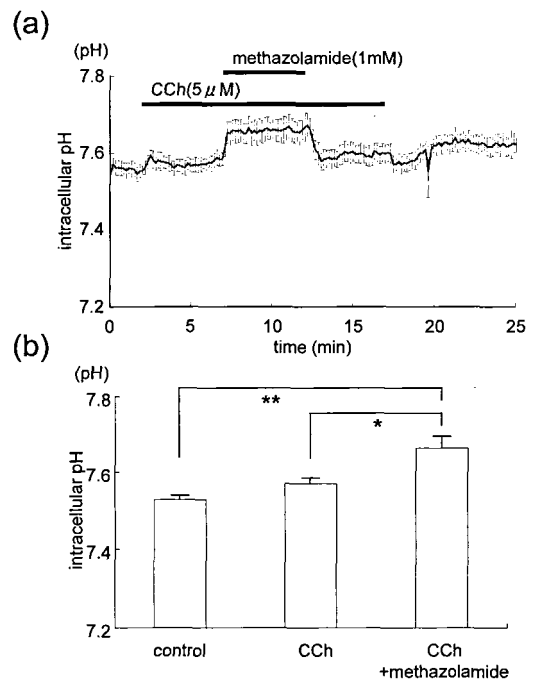


図9 CCh (5 μM) 刺激および炭酸脱水酵素阻害剤 methazolamide (1 mM) の同時投与が細胞内 pH に及ぼす影響。
 a : CCh 刺激および炭酸脱水酵素阻害剤の同時投与による細胞内 pH の経時的変化を平均値±標準誤差で示す (n=4)。
 b : 無刺激時 (n=32)、CCh 刺激 4 分後 (n=5) および CCh 刺激 5 分 + methazolamide 処理 4 分後 (n=5) の細胞内 pH 変化を示す。図は平均値と標準誤差で示す。*は p<0.05, **は p<0.01 で有意差が認められたことを表す。

上昇系のシグナルが、分離導管の水輸送に及ぼす影響を明らかにするため、導管内腔の蛍光強度への影響について検討を加えた。

Forskolin (10 μM) 刺激により、ムスカリン性刺激と同様な導管内腔蛍光の持続的減少と導管内腔の拡張を認めた (図 10)。刺激中の導管内腔の蛍光強度は、刺激約 4 分後に無刺激時の 100.5±0.9% (平均±標準誤差) から 32.1±2.4% へ有意に減少した (p<0.001)。CCh 除去と異なり、forskolin 除去 5 分後でも導管内蛍光強度の回復はみられず、刺激除去後の回復過程は CCh に比べ長くなる傾向を示した。中性色素である分子量 10000 の dextran tetramethyl rhodamine を添加した外液の灌流でも導管内に蛍光が観察され、forskolin 刺激はその蛍光強度の持続的減少をもたらした。一方、forskolin は [Ca²⁺]_i に影響を与えなかった。さらに、β刺激剤である isoproterenol 刺激によっても、導管内

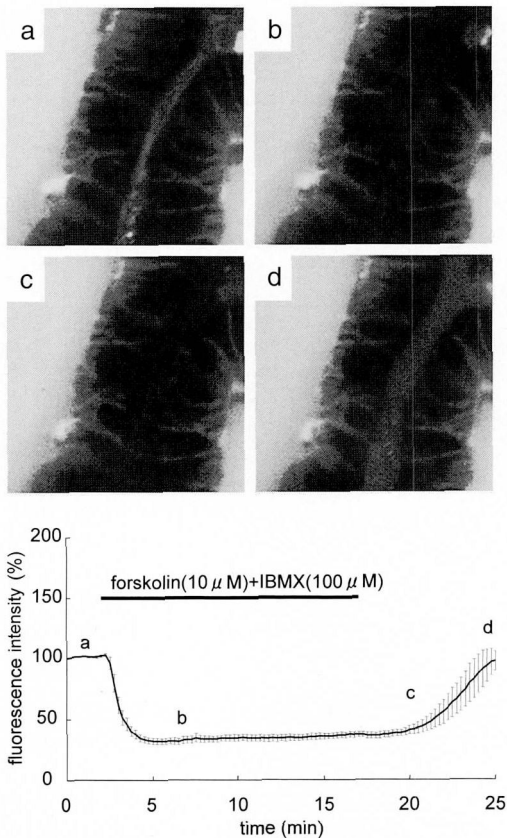


図10 Forskolin (10 μM) 刺激が導管内腔 sulforhodamine B 蛍光強度に及ぼす影響。

上段：細胞外液 sulforhodamine B の蛍光画像の forskolin (10 μM) 刺激による変化を示す。a：刺激前，b：forskolin 刺激4分後，c：forskolin 除去4分後，d：forskolin 除去8分後を示し，下段の図中の表記と対応する蛍光像の1例である。

下段：forskolin (10 μM) 刺激による導管内腔の蛍光強度の相対変化を初期蛍光強度100%とした平均値 \pm 標準誤差で示す ($n=5$)。

蛍光強度の持続的減少が観察された。 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇を介する CCh 効果とは異なり，cAMP 上昇を介しても導管内腔蛍光強度の減少が促進されることが示された。

2. Forskolin 刺激による導管内腔の蛍光減少に対するチャンネル阻害剤の影響

Forskolin 刺激時に導管内腔の蛍光強度が減少する機構を解明するため，チャンネルおよびトランスポーターについて阻害実験を行った。種々の陰イオンチャンネル阻害するといわれる DPC (500 μM) および 5-nitro-2-(3-phenylpropylamino) benzoic acid (NPPB: 100 μM) は forskolin 刺激時の持続的な蛍光強度減少を有

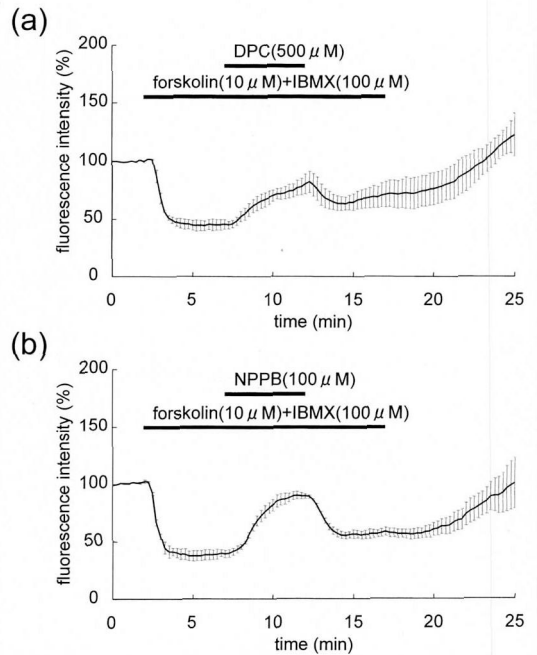


図11 Forskolin (10 μM) 刺激時の導管内腔 sulforhodamine B 蛍光強度の定常的減少に陰イオンチャンネル阻害剤が及ぼす影響。

a：陰イオンチャンネルを阻害する DPC (500 μM) による影響を平均値 \pm 標準誤差で示す ($n=3$)。

b：陰イオンチャンネル阻害剤の NPPB (100 μM) による影響を平均値 \pm 標準誤差で示す ($n=3$)。

意に抑制した (それぞれ $p < 0.05$, $p < 0.01$) (図11a, b)。また，陰イオンチャンネルのうち cAMP により活性化される Cl^- チャンネルと現在のところ考えられている CFTR の阻害剤 glibenclamide (200 μM) も forskolin 刺激時の定常的な蛍光強度の減少を有意に抑制した ($p < 0.05$) (図12a)。しかしながら， $\text{Na}^+/\text{K}^+ / 2\text{Cl}^-$ cotransporter 阻害剤の bumetanide (500 μM)， $\text{Cl}^- / \text{HCO}_3^-$ exchanger 阻害剤の DIDS (200 μM) および細胞外液の Cl^- の減少は forskolin 刺激による持続的蛍光減少に大きく影響しなかった (図12b, 13a, b)。Forskolin 刺激時の導管内腔蛍光の持続的減少には，DPC および NPPB 感受性陰イオンチャンネルや CFTR が関与するが，細胞外液の Cl^- やトランスポーターの関与は少ないことが示された。

3. Forskolin 刺激による導管内腔の蛍光強度減少に対する CA 阻害剤 methazolamide の影響について

CCh と同様導管内腔蛍光強度減少への Cl^- の関与が少ないことから， HCO_3^- の関与を調べるため，炭酸脱水酵素を阻害する実験を行った。CA 阻害剤の meth-

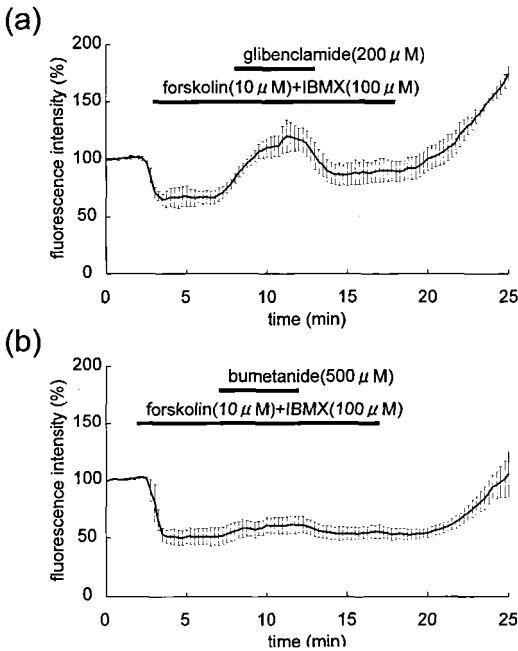


図12 Forskolin (10 μM) 刺激時の導管内腔 sulforhodamine B 蛍光強度の定常的減少に CFTR 阻害剤および Cl^- トランスポーター阻害剤が及ぼす影響。

- a : CFTR 阻害剤の glibenclamide (200 μM) による影響を示す (n=3)。
 b : $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ cotransporter 阻害剤の bumetanide (500 μM) による影響を示す (n=3)。
 それぞれ平均値 \pm 標準誤差を示す。

azolamide (1 mM) は, forskolin 刺激時の定常的な蛍光強度の減少を抑制し, その抑制は可逆的であった (図14)。Forskolin 刺激中に methazolamide 投与前後の導管内蛍光強度の比較では, 投与前 $38.0\pm 8.0\%$ から, 投与後 $88.4\pm 12.3\%$ へ有意に上昇した ($p<0.001$)。さらに, forskolin 刺激は細胞内 pH を有意に減少させたが ($p<0.001$), methazolamide の同時投与は有意な上昇をもたらした ($p<0.001$) (図 15a, b)。しかし, $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ exchanger 阻害剤である DIDS (200 μM) は forskolin 刺激時の細胞内 pH に有意な影響を与えなかった (図 15b)。これらのことから, forskolin 刺激時の導管内蛍光強度の減少には CA を介する HCO_3^- 産生が関与することが明らかとなった。

4. Forskolin 刺激時のイオン電流変化と CA 阻害剤の影響

さらに, forskolin 刺激時の細胞からの HCO_3^- 放出を gramicidin 穿孔パッチ法により検討した。まず, 陽イオン電流のほとんどを担っている K^+ の平衡電位で

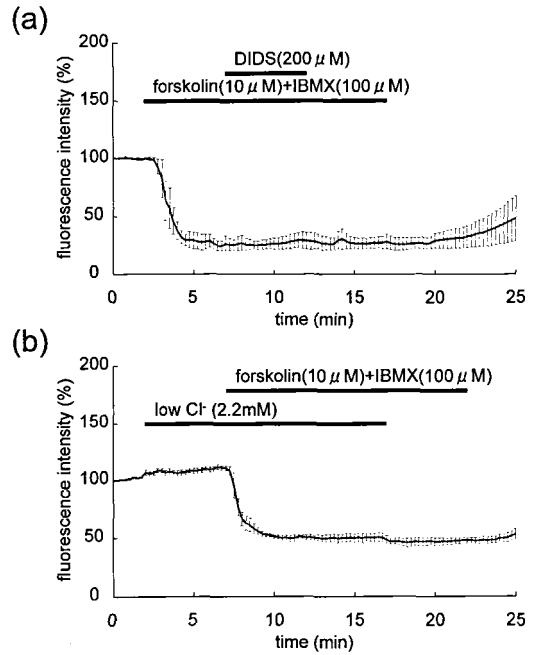


図13 Forskolin (10 μM) 刺激時の導管内腔 sulforhodamine B 蛍光強度に Cl^- トランスポーターおよび細胞外液 Cl^- 濃度の変化が及ぼす影響。

- a : $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ exchanger 阻害剤の DIDS (200 μM) による影響を示す (n=3)。
 b : 細胞外液中の Cl^- の減少による影響を示す (n=4)。
 それぞれ平均値 \pm 標準誤差で表す。

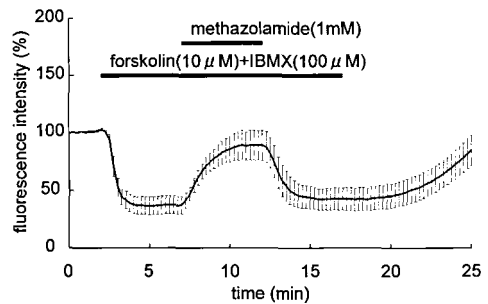


図14 炭酸脱水酵素阻害剤の methazolamide (1 mM) が forskolin (10 μM) 刺激時の導管内 sulforhodamine B 蛍光強度変化に及ぼす影響。

導管内腔の蛍光強度への影響を平均値 \pm 標準誤差で示す (n=5)。

ある -80 mV に膜電位を固定すると, 無刺激時に流れる電流はほとんど観察されず, 陰イオンによる電流が少ないことが示された。しかし, forskolin 刺激時には, 陰イオン電流である定常的な内向き電流が観察された。さらに, forskolin 刺激中に CA 阻害剤 methazolamide

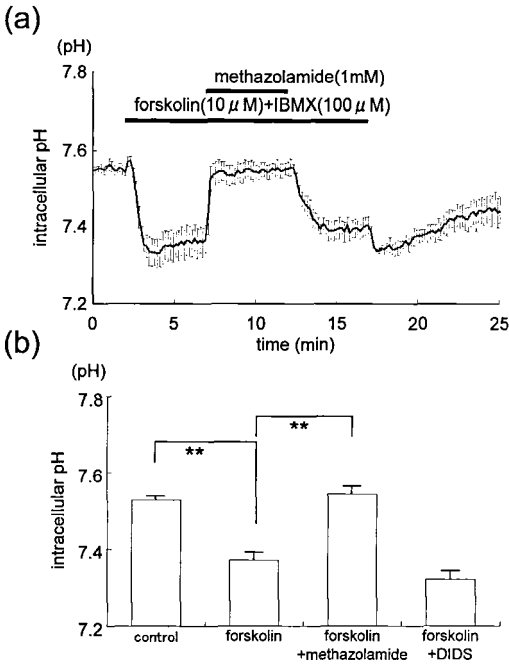


図15 Forskolin (10 μM) 刺激, forskolin 刺激時に methazolamide (1 mM) あるいは DIDS (200 μM) 同時投与が細胞内 pH に及ぼす影響。
 a : forskolin 刺激および炭酸脱水酵素阻害剤の同時投与による細胞内 pH の経時的変化を平均±標準誤差で示す (n=4)。
 b : 無刺激時 (n=32), forskolin 刺激 4 分後 (n=11), forskolin 刺激 5 分 + methazolamide 処理 4 分後 (n=4) および forskolin 5 分 + DIDS 処理 4 分後 (n=3) の細胞内 pH 変化を示す。図は平均値と標準誤差で示す。**は p<0.001 で有意差が認められたことを表す。

(1 mM) を投与すると電流は有意に抑制され (p<0.05), このことから forskolin 刺激時の陰イオン電流は HCO₃⁻ によることが明らかとなった (図16)。一方, forskolin 刺激中に細胞内への Cl⁻ 流入系である Na⁺/K⁺/2Cl⁻ cotransporter の阻害剤 bumetanide (500 μM) を加えた場合には有意に影響しなかった (図16)。この gramicidin 穿孔パッチ法では細胞内陰イオン濃度はパッチにより変化しないので, forskolin 刺激時の陰イオン電流への Cl⁻ 輸送系の関与は少なく, 内向きの陰イオン電流の大部分は HCO₃⁻ 分泌によることが明らかになった。

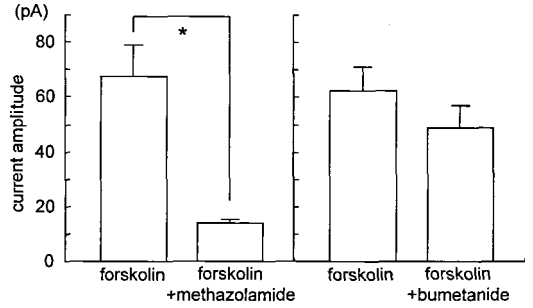


図16 Forskolin (10 μM) 刺激時に観察されるイオン電流に炭酸脱水酵素阻害剤および Na⁺/K⁺/2Cl⁻ cotransporter 阻害剤が及ぼす影響。
 左は forskolin 刺激時に生じる電流へ炭酸脱水酵素阻害剤の methazolamide (1 mM) が及ぼす影響を平均値±標準誤差で示す (n=7)。
 *は p<0.05 で有意差が認められたことを示す。
 右は Na⁺/K⁺/2Cl⁻ cotransporter 阻害剤の bumetanide (500 μM) が及ぼす影響を平均値±標準誤差で示す (n=11)。

考 察

I. CCh 刺激時の導管水輸送について

1. CCh 刺激時の導管内蛍光変化と [Ca²⁺]_i 変化について

唾液分泌においてムスカリン性刺激は腺房細胞で [Ca²⁺]_i 上昇を介して液体成分に富んだ唾液の産生を促すとされる^{1,4)}。導管細胞は腺房細胞で産生される原唾液から Na⁺ と Cl⁻ を再吸収し, K⁺ と HCO₃⁻ を分泌するという2つの修飾過程により, 最終唾液のイオン組成に影響すると考えられている¹⁾。Ishiguroら³⁰⁾ は, 外分泌腺の中でも組織学的に耳下腺に類似している膵臓において, セクレチン刺激による導管の液体成分の分泌を報告している。そこで, 耳下腺の導管細胞においても各種分泌刺激による液体成分分泌の可能性を検討するため, 分離導管の外液に細胞膜不透過性の陰イオン性蛍光色素の一つである sulforhodamine B を加え, 導管内腔と外液との蛍光強度を評価した。CCh 刺激に伴う導管内腔の蛍光強度減少と蛍光色素に濃染された物質の動きは, 同組織における液体成分の導管内から外への持続的な移動, すなわち導管での水輸送を示唆しているものと考えられた。また, atropine により本現象が阻害されたことは, CCh 刺激によるこれらの現象が受容体関与であることを示している。

唾液腺におけるムスカリン性刺激は, 腺房細胞でも導管細胞でも細胞内の Ca²⁺ 上昇を生じる。このメカニズムは, ムスカリン性刺激が細胞内シグナル伝達の過

程でイノシトール-1,4,5-三リン酸 (IP₃) を産生し、それが細胞内 Ca²⁺ ストアに存在する Ca²⁺ チャネルを内包する IP₃ 受容体に結合して生じる Ca²⁺ ストアからの Ca²⁺ の放出とそれに引き続いて起こる細胞外液からの Ca²⁺ の流入という2つの相による^{31,32)}。本研究でも、これら2相による Ca²⁺ の動態が観察できた。導管内腔の蛍光強度変化は、一過性の成分も含めこれとよく対応する傾向を示していた。このことは、CChによる導管内腔の蛍光強度の減少は、細胞内 Ca²⁺ ストアからの Ca²⁺ の放出により一過的に、また外液からの Ca²⁺ の流入により持続的に起こることを示唆している。顎下腺腺房細胞における水分分泌の場合でも、持続的な水分分泌には細胞外からの Ca²⁺ 流入が必要で、細胞内ストアからの Ca²⁺ 放出に伴う水分分泌は一過的である²⁷⁾。ムスカリン性刺激は、導管細胞においても腺房細胞と同様、[Ca²⁺]_iの上昇を介して水輸送を生じる機構を活性化するものと考えられる。

2. 導管水輸送に関する陰イオンとイオンチャンネルについて

腺房細胞においては、分泌に伴い陰イオンが腺腔側に放出されるといわれる^{1,4,5,6)}。この場合、主に放出されるものは Cl⁻ であるといわれ、この Cl⁻ 放出が腺腔側への Na⁺ 流入を促す結果、NaCl の浸透圧勾配が産生される。さらに、腺腔内外の浸透圧勾配にしたがって、腺腔への水輸送が水チャンネルあるいはタイトジャンクションを介してなされると考えられている^{1,4)}。すなわち、腺房細胞で Cl⁻ チャネルは液体成分の分泌において先導的な役割を果たしている。本研究においても、陰イオンチャンネルの重要性を確認するため、CCh 刺激により持続的に蛍光強度が減少している状況で [Ca²⁺]_i に影響を及ぼさない濃度の DPC (100 μM) を加えたところ、蛍光強度の減少を可逆的に抑制していることが判明し、陰イオンチャンネルの関与が示唆された。DPC 以外の陰イオンチャンネルの阻害剤については、一般的に使用される濃度において CCh による [Ca²⁺]_i 上昇に影響を及ぼしたため、これらの陰イオンチャンネルの関与については評価できなかった。

次に、Cl⁻ トランスポーターの関与について検討した。腺房細胞の Cl⁻ 分泌においては主に基底側の Na⁺/K⁺/2Cl⁻ cotransporter を中心とした Cl⁻ の持続的流入が必要であると考えられている^{1,4)} ことから、この阻害剤である bumetanide を CCh 刺激中に加えたところ、導管内蛍光排除に有意に影響を与えなかった。また、他の Cl⁻ 流入経路である Cl⁻/HCO₃⁻ exchanger の阻害剤 DIDS も有意には影響しなかった。さらに、外液中の Cl⁻ 濃度を 2.2 mM まで減少させた場合でも、CCh 刺激時の蛍光強度の減少を抑制することはなかつ

た。これらのことから、Cl⁻ の導管細胞への持続的流入は導管内腔からの蛍光強度減少に重要ではないことが示唆される。Evans ら³³⁾ は耳下腺の腺房細胞において [Ca²⁺]_i の上昇が Na⁺/K⁺/2Cl⁻ cotransporter を活性化することを報告し、He ら¹⁶⁾ は本タンパクの発現レベルが導管細胞において不均一であることを認めている。これらのことと先の結果を考えると、導管における水輸送を示す蛍光強度の減少には、DPC 感受性陰イオンチャンネルが関与するが、導管細胞内への Cl⁻ の流入はほとんど関与していない。

3. 導管水輸送と重炭酸イオン分泌について

液体分泌には陰イオンが重要であることは先に述べた。しかし、その代表的なイオンである Cl⁻ の関与について本研究の結果から耳下腺導管では否定的であった。そこで、輸送される別の陰イオン候補として、分泌経路に陰イオンチャンネルや交換輸送体などが考えられている HCO₃⁻ に着目した。腺房細胞での水分分泌にも腺腔への HCO₃⁻ 分泌が寄与しているので、HCO₃⁻ の細胞内での産生を制御する炭酸脱水酵素を methazolamide によって阻害し、その影響を評価したところ、methazolamide は細胞内の [Ca²⁺]_i に影響を及ぼさず、CCh による持続的な蛍光強度の減少をほぼ完全に抑制した。この結果は、炭酸脱水酵素による HCO₃⁻ 産生が導管からの蛍光強度減少に関与することを示唆している。そこで、その分泌経路の候補として導管細胞に存在するとされる Cl⁻/HCO₃⁻ exchanger を DIDS (200 μM) によって抑制したところ、この場合も影響はみられず、従って、HCO₃⁻ の分泌経路は Cl⁻/HCO₃⁻ exchanger ではなく DPC 感受性の陰イオンチャンネルである可能性が高い。

HCO₃⁻ が CCh 刺激に伴い導管細胞から放出されているならば、酸塩基平衡から細胞内 pH の変化が認められると予測される。そこで、細胞内 pH 計測を行いこれを検証したところ、導管細胞の pH は CCh 刺激で無刺激時と比較して有意な変化はなかった。しかし、CCh 刺激時に同時に methazolamide を投与すると、pH が有意に上昇した。HCO₃⁻ は細胞内 pH に影響を及ぼすが、pH は細胞内の H⁺ 濃度により変化するので、細胞内という閉鎖系の pH 変化から HCO₃⁻ の分泌を推測する際には H⁺ の輸送系についても同時に考察する必要があるといえる。H⁺ 輸送系は主なものとして Na⁺/H⁺ exchanger (NHE) と vacuolar type H⁺ pump の2種類が挙げられる³⁴⁻³⁹⁾。Park ら³⁹⁾ は、耳下腺の NHE の分布について、type I NHE が腺房細胞と導管細胞の基底側膜に存在し、amiloride に感受性の低い type III NHE が導管細胞の腺腔側膜にそれぞれ存在することを、また、Manganel ら³⁴⁾ は腺房細胞をムスカリン性

刺激することにより NHE 活性が上昇したことを報告している。さらに、Bevensee ら³⁸⁾ は、細胞収縮によっても NHE が活性化することを認めている。これらの報告と本研究の結果を総合して考えると、CCh 刺激で導管細胞内 pH に有意な変化がみられなかったのは、 HCO_3^- 分泌による pH 低下に釣り合うだけの H^+ が NHE の活性化により細胞外へ排出されていたとみなされる。さらに、CCh 刺激時に methazolamide が細胞内をアルカリ化していたことから、この考えが示唆される。

CCh 刺激時に導管細胞では $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の上昇を介して、種々のイオンチャネルやトランスポーターが活性化され、導管細胞の機能を制御している。本研究の結果、導管内の蛍光強度減少を生じる導管での水輸送には、これら種々のイオン分泌経路の中で Ca^{2+} 依存性の DPC 感受性陰イオンチャネルの活性化による CA 依存性の HCO_3^- の放出が寄与していると考えられた (図 17)。

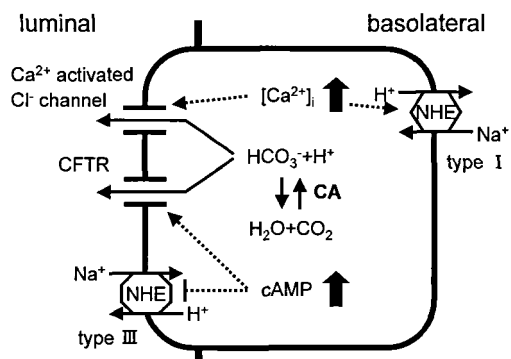


図17 導管細胞における分泌刺激時のイオン輸送モデル。CFTR は cystic fibrosis transmembrane conductance regulator を、NHE は Na^+/H^+ exchanger をそれぞれ示す。

II. Forskolin 刺激時の導管水輸送について

1. Forskolin 刺激時の導管内蛍光強度減少と水輸送について

唾液腺分泌において $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇は液体成分に富んだ唾液産生を促すのに対し、細胞内の cAMP 上昇は主にタンパク分泌を促すとされている。 β アドレナリン性刺激は細胞膜の G タンパク質を介してアデニレートシクラーゼを活性化して cAMP の産生が増加し、その生理的作用を表すが、その後細胞内に存在するホスホジエステラーゼ (PDE) によって cAMP は速やかに分解される。本研究では、 β 受容体を介することなく細胞膜を通過してアデニレートシクラーゼに直接作用し

て ATP から cAMP の産生を活性化する forskolin と、さらに cAMP の細胞内濃度を維持するために PDE 阻害剤として 3-isobutyl-1-methylxanthin (IBMX: 100 μM) を同時投与して導管内の蛍光変化を観察した。その結果、導管内腔の拡張と導管内蛍光強度の減少が確認されたことから、cAMP 上昇も CCh 刺激と同様に導管細胞の水輸送を促すことが示唆された。Sulforhodamine B 以外の高分子中性蛍光色素でも導管内から forskolin 刺激で蛍光強度が減少することは、電気的な反発力ではなく導管細胞での水輸送をさらに示している。膵臓の導管³⁰⁾ や大腸⁴⁰⁾ でも細胞内 cAMP 上昇を介して液体分泌が起こることが報告されていることから、本研究の結果はそれらと同様の現象が耳下腺の導管細胞でも生じることを示している。

2. Forskolin 刺激時の導管水輸送への陰イオンチャネル関与について

Forskolin 刺激時に導管での液体成分の移動が示唆されたことから、その導管での水輸送へ関与する陰イオンチャネルについて検討を行った。Forskolin 刺激時の導管内蛍光強度減少への Cl^- トランスポーター阻害の影響を調べたところ、bumetanide (500 μM) は CCh 刺激と同様に刺激時の導管内蛍光強度の減少に有意な影響を及ぼさず、さらに細胞外液中からの Cl^- 除去も影響しなかった。Paulais ら⁴¹⁾ はラット耳下腺腺房細胞では β 刺激により $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ cotransporter の活性が約 3 倍上昇することを、Kurihara ら⁴²⁾ もリン酸化に関わる反応が活性化することをそれぞれ報告している。しかし、導管での蛍光色素排除には、この $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ cotransporter や細胞外 Cl^- が関与していない可能性が高い。

さらに、陰イオンチャネルの阻害剤である DPC (500 μM)、NPPB (100 μM) および CFTR の阻害剤である glibenclamide (200 μM) により forskolin 刺激時の導管内蛍光強度の減少は有意に抑制された。このことは、導管内の蛍光強度減少に陰イオンチャネルが必要であることを示しており、特に cAMP により活性化される CFTR の関与が考えられた。CFTR が唾液腺の腺房細胞と導管細胞の腺腔側膜に存在していること⁴³⁾ は、forskolin 刺激時の CFTR の寄与を強く示唆しているものといえる。

3. Forskolin 刺激時の導管水輸送への CA 依存性 HCO_3^- の関与について

Methazolamide による CA 阻害で導管からの forskolin 刺激時の蛍光強度減少は抑制され、 HCO_3^- の細胞内産生が関与することが CCh 刺激時と同様に示された。膵臓導管では細胞内 cAMP を上昇させる刺激により HCO_3^- が放出され⁴⁴⁾、耳下腺導管細胞においても

同様の現象が生じていることが示唆される。

HCO_3^- の細胞内から細胞外への移動は、導管細胞内 pH の変化を引き起こすと考えられる。腺房細胞では、CCh 刺激に伴う pH 変化は HCO_3^- の細胞外へ移動により初期に一過性に低下し、その後は NHE の活性化により徐々に安静時の値に回復するとされている⁴⁵⁾。しかし、本研究では forskolin 刺激に伴い導管細胞内 pH は低下し、刺激除去するまでは細胞内酸性化状態を維持していた。このことは、 HCO_3^- の導管細胞からの持続的な放出を示唆している。無刺激時の NHE 抑制による pH 低下に比べ、forskolin 刺激時の NHE 抑制では著明な pH 低下を生じることから、forskolin 刺激時の NHE の活性化が示唆される。しかし、cAMP 上昇による腺腔膜に存在する type III NHE の抑制⁴⁶⁾、導管細胞での NHE の分布状態³⁹⁾ から、forskolin 刺激による pH 低下は HCO_3^- の放出と cAMP 上昇による腺腔膜の type III NHE の抑制および細胞収縮による NHE の活性化³⁸⁾ という 3 つの因子の均衡状態によって決定されていると推測できる (図17)。

さらに、 HCO_3^- の分泌を gramicidin 穿孔パッチ法で電気生理学的に検討した。ポリペプチドの抗生物質の gramicidin は細胞膜に組み込まれた二量体でイオンチャネルを形成する。このチャネルは、陰イオンの透過性が僅かですが陽イオン選択性が高いことから、分泌機能に重要である細胞内の陰イオン濃度に影響を及ぼすことなく膜電位および膜電流を計測することが可能となる^{28,29)}。外分泌腺での HCO_3^- の分泌には HCO_3^- の細胞内への蓄積が必要と考えられる。その候補としては、 Na^+ - HCO_3^- cotransporter によって能動的に細胞内に流入する経路と細胞内の CA により二酸化炭素と水から産生される経路の 2 つが考えられる。膵臓では Na^+ - HCO_3^- cotransporter はクローニングされ、それが腺腔への血漿よりも高濃度の HCO_3^- の分泌に寄与しているといわれる⁴⁷⁻⁴⁹⁾。唾液腺でも導管細胞の基底側に存在するとの報告がある⁵⁰⁾ が、本研究では導管内腔の蛍光強度観察において、CA を阻害した場合に蛍光強度の減少反応が抑制されたことから、CA 依存性の陰イオン電流について検討した。膜電位を K^+ の平衡電位である -80 mV に固定した場合、 K^+ 電流は観察されない。 Na^+ は電流として流れていなかったことから、この条件での電流はパッチ電極以外の細胞膜を介して流れる陰イオンによる電流と考えられる。しかしながら、無刺激時に電流は観察できず、陰イオンの細胞内外での正味の移動は無視しうる程度であった。一方、forskolin 刺激時には内向きの電流が観察された。ここでは K^+ の正味の移動がパッチ電極以外の細胞膜上では起こらない条件を設定していることから、陰イオンの細胞外へ

の放出に伴う相補的な K^+ 電流をパッチ電極で採取しているものと考えられる。Methazolamide による CA の抑制により、forskolin 刺激時の内向き電流は約 20% 程度に減少し、forskolin 刺激時の陰イオン電流に HCO_3^- の占める割合が非常に大きいことが示された。これらの結果から、forskolin 刺激による導管水輸送は、CA 依存性に産生される HCO_3^- の CFTR を介する分泌によることが示唆される (図17)。

Ⅲ. 導管における HCO_3^- 分泌の意義について

HCO_3^- は血漿中の pH に関与したり、消化管では膵臓や大腸の遠位端で多く分泌され酸性の消化液の中和などの役割を担っている^{40,43)}。唾液では他の組織と同様、緩衝作用を担っており、口腔内の細菌が産生した酸を中和して歯の脱灰を防いでいる¹⁾。 HCO_3^- 分泌は外分泌腺導管のもつ普遍的な性質であり、体液の酸塩基平衡や消化管内腔の pH 調節に寄与すると同時に、導管での水分分泌機能にも貢献している。

唾液中の HCO_3^- は刺激分泌唾液中で上昇するといわれ、導管細胞だけでなく腺房細胞もこれに関与する⁶⁾。腺房細胞での原唾液産生に Cl^- 分泌が先導的役割を果たすが^{1,4)}、 HCO_3^- 分泌も一部役立っているとする報告もある⁶⁾。しかしながら、灌流顎下腺で細胞外液の Cl^- 除去は刺激時の唾液分泌量を大きく抑制すること⁵¹⁾、CA の阻害は分泌唾液の組成に影響するものの分泌量には影響しない¹⁰⁾ ことなどから、腺房細胞で HCO_3^- 関与の水分分泌は比較的少ないと推測される。一方、導管細胞では本研究の結果から水輸送における Cl^- と HCO_3^- の役割が腺房細胞とは異なり、 HCO_3^- が主であると考えられる。さらに、腺房細胞では Ca^{2+} シグナルで電解質水分分泌が、cAMP シグナルでタンパク分泌が生じるが、導管細胞では両シグナルで水輸送が惹起され、かつ導管内径が拡張することから、唾液腺分泌機能に腺房細胞のみならず導管細胞の分泌機能も重要な役割を果たしていることを示している。このことは遺伝子導入による唾液腺の機能回復に対して科学的根拠を与えるものであり、今後、唾液腺機能不全の遺伝子治療等に取り組み際にチャネル機能も併せて評価する必要があることを示唆している。

総 括

本研究では、ラット耳下腺導管細胞における分泌刺激時の水輸送と重炭酸イオン分泌機構を解明することを目的として、 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇作用をもつムスカリン性刺激として CCh および細胞内 cAMP 上昇作用をもつ forskolin 刺激による分離導管機能の変化を検討し、以下の結果を得た。

1. ラット耳下腺導管には CCh および forskolin 刺激により導管内蛍光強度の減少が生じることが明らかとなり、分泌刺激により活性化される水輸送系の存在が示唆された。

2. ラット耳下腺導管には、CCh および forskolin 刺激により導管内腔の持続的拡張を促す系の存在が示唆された。

3. CCh 刺激による耳下腺導管での水輸送系は、イオンチャネル阻害剤や炭酸脱水酵素阻害剤等の影響結果から炭酸脱水酵素依存性に細胞内で産生される HCO_3^- の DPC 感受性の Ca^{2+} 依存性 Cl^- チャネルを介する分泌に依存していることが示唆された。

4. Forskolin 刺激による耳下腺導管での水輸送系は、イオンチャネルの阻害剤等の影響結果から炭酸脱水酵素依存性に細胞内で産生される HCO_3^- の CFTR を介する分泌に依存していることが示唆された。

以上より、ラット耳下腺導管で CCh あるいは forskolin 刺激により水輸送が生じ、この水輸送は炭酸脱水酵素で産生された HCO_3^- の細胞内 Ca^{2+} あるいは cAMP 依存性陰イオンチャネルを介する分泌によることが明らかとなった。この結果は、導管細胞が HCO_3^- を分泌しながら唾液腺の水輸送機能に貢献していることを示唆している。

謝 辞

稿を終えるにあたり、終始御懇篤なる御指導ならびに御校閲を賜りました広島大学歯学部歯科補綴学第一講座教授赤川安正先生に心より感謝の意を表します。本研究の遂行上、終始御懇切なる御指導と御校閲を賜りました本学口腔生理学講座教授柴芳樹先生に心から感謝の意を表します。さらに、論文作成上、御教示、御校閲を賜りました本学歯科薬理学講座教授土肥敏博先生に深謝致します。

本研究の遂行にあたり、御指導、御助言を頂きました本学口腔生理学講座廣野力講師、杉田誠助手、岩佐佳子助手に心より御礼申し上げます。また、本研究に対して御助言、御協力を頂きました佐藤裕二助教授をはじめ本学歯科補綴学第一講座の方々には感謝致します。さらに、研究の遂行にあたり多くの情報を提供して下さいました嶽本和久先生、田中秀司先生に感謝の意を捧げます。

なお、本研究は広島大学歯学部中央研究室の機器 (LSM410) ならびに広島大学医学部附属動物実験施設の機器 (ARUGUS HISCA) を使用して行われました。

文 献

- 1) Cook, D.I., Van Lennep, E.W., Roberts, M.L. and Young, J.A.: Physiology of the Gastrointestinal Tract., 3rd ed., Johnson, L.R., Raven, New York, 1061-1117, 1994.
- 2) Garret, 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.
- 3) Case, R.M., Conigrave, A.D., Novak, I. and Young, J.A.: Electrolyte and protein secretion by the perfused rabbit mandibular gland stimulated with acetylcholin or catecholamines. *J. Physiol. Lond.* **300**, 467-487, 1980.
- 4) Baum, B.J.: Neurotransmitter control of secretion. *J. Dent. Res.* **66**, 628-632, 1987.
- 5) 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.
- 6) Lee, S.I. and Turner, R.J.: Mechanism of secretagogue-induced HCO_3^- and Cl^- loss from rat parotid acini. *Am. J. Physiol.* **261**, G111-118, 1991.
- 7) Nauntofte, B.: Regulation of electrolyte and fluid secretion in salivary acinar cells. *Am. J. Physiol.* **263**, G823-837, 1992.
- 8) Leslie, B.A., Putney, J.W.Jr. 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.
- 9) 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.
- 10) Case, R.M., Conigrave, A.D., Favaloro, E.J., Novak, I., Thompson, C.H. and Young, J.A.: The role of buffer anions and protons in secretion by the rabbit mandibular salivary gland. *J. Physiol. Lond.* **322**, 273-286, 1982.
- 11) Cook, D.I., Dinudom, A., Komwatana, P. and Young, J.A.: Control of Na^+ transport in salivary duct epithelial cells by cytosolic Cl^- and Na^+ . *Eur. J. Morphol.* **36 Suppl**, 67-73, 1998.
- 12) Paulais, M., Cragoe, E.J.Jr. and Turner, R.J.: Ion transport mechanisms in rat parotid intralobular striated ducts. *Am. J. Physiol.* **266**, C1594-C1602, 1994.
- 13) Moran, A., Davis, V.H. and Turner, R.J.: Na^+ channels in membrane vesicles from intralobular salivary ducts. *Am. J. Physiol.* **268**, C350-C355, 1995.
- 14) Zhao, H., Xu, X., Diaz, J. and Muallem, S.: Na^+ ,

- K⁺, and H⁺/HCO₃⁻ transport in submandibular salivary ducts. Membrane localization of transporters. *J. Biol. Chem.* **270**, 19599–19605, 1995.
- 15) Barbry, P. and Hofman, P.: Molecular biology of Na⁺ absorption. *Am. J. Physiol.* **273**, G571–G585, 1997.
 - 16) He, X., Tse, C.M., Donowitz, M., Alper, S.L., Gabriel, S.E. and Baum, B.J.: Polarized distribution of key membrane transport proteins in the rat submandibular gland. *Pflugers Arch.* **433**, 260–268, 1997.
 - 17) Knauf, H., Lubcke, R., Kreutz, W. and Sachs, G.: Interrelationships of ion transport in rat submaxillary duct epithelium. *Am. J. Physiol.* **242**, F132–F139, 1982.
 - 18) Chaturapanich, G., Ishibashi, H., Dinudom, A., Young, J.A. and Cook, D.I.: H⁺ transporters in the main excretory duct of the mouse mandibular salivary gland. *J. Physiol. Lond.* **503**, 583–598, 1997.
 - 19) Li, J., Nielsen, S., Dai, Y., Lazowski, K.W., Christensen, E.I., Tabak, L.A. and Baum, B.J.: Examination of rat salivary glands for the presence of the aquaporin CHIP. *Pflugers Arch.* **428**, 455–460, 1994.
 - 20) Frigeri, A., Gropper, M.A., Umenishi, F., Kawashima, M., Brown, D., Verkman, A.S.: Localization of MIWC and GLIP water channel homologs in neuromuscular, epithelial and glandular tissues. *J. Cell Sci.* **108**, 2993–3002, 1995.
 - 21) 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.
 - 22) Koyama, Y., Yamamoto, T., Tani, T., Nihei, K., Kondo, D., Funaki, H., Yaoita, E., Kawasaki, K., Sato, N., Hatakeyama, K. and Kihara, I.: Expression and localization of aquaporins in rat gastrointestinal tract. *Am. J. Physiol.* **276**, C621–C627, 1999.
 - 23) Delporte, C., O'Connell, B.C., He, X., Ambudkar, I.S., Agre, P. and Baum, B.J.: Adenovirus-mediated expression of aquaporin-5 in epithelial cells. *J. Biol. Chem.* **271**, 22070–22075, 1996.
 - 24) Delporte, C., O'Connell, B.C., He, X., Lancaster, H.E., O'Connell, A.C., Agre, P. and Baum, B.J.: Increased fluid secretion after adenoviral-mediated transfer of the aquaporin-1 cDNA to irradiated rat salivary glands. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **94**, 3268–3273, 1997.
 - 25) Braddon, V.R., Chiorini, J.A., Wang, S., Kotin, R.M. and Baum, B.J.: Adenoassociated virus-mediated transfer of a functional water channel into salivary epithelial cells in vitro and in vivo. *Hum. Gene Ther.* **9**, 2777–2785, 1998.
 - 26) Baum, B.J., Atkinson, J.C., Baccaglini, L., Berkman, M.E., Brahim, J.S., Davis, C., Lancaster, H.E., Marmary, Y., O'Connell, A.C., O'Connell, B.C., Wang, S., Xu, Y., Yamagishi, H. and Fox, P.C.: The mouth is a gateway to the body: gene therapy in 21st-century dental practice. *J. Calif. Dent. Assoc.* **26**, 455–460, 1998.
 - 27) 杉田 誠: 蛍光色素カルセインを用いた Ca²⁺ 依存性の唾液腺水分分泌機構解明に関する研究. 広大歯誌 **28**, 193–209, 1996.
 - 28) Abe, Y., Furukawa, K., Itoyama, Y. and Akaike, N.: Glycine response in acutely dissociated ventromedial hypothalamic neuron of the rat: new approach with gramicidin perforated patch-clamp technique. *J. Neurophysiol.* **72**, 1530–1537, 1994.
 - 29) Kyzozis, A. and Reichling, D.B.: Perforated-patch recording with gramicidin avoids artifactual changes in intracellular chloride concentration. *J. Neurosci. Methods* **57**, 27–35, 1995.
 - 30) Ishiguro, H., Naruse, S., Steward, M. C., Kitagawa, M., Ko, S. B., Hayakawa, T. and Case, R. M.: Fluid secretion in interlobular ducts isolated from guinea-pig pancreas. *J. Physiol. Lond.* **511**, 407–422, 1998.
 - 31) Xu, X., Diaz, J., Zhao, H. and Muallem, S.: Characterization, localization and axial distribution of Ca²⁺ signalling receptors in the rat submandibular salivary gland ducts. *J. Physiol. Lond.* **491**, 647–662, 1996.
 - 32) Alvarez, J., Montero, M. and Garcia-Sancho, J.: Subcellular Ca²⁺ dynamics. *News Physiol. Sci.* **14**, 161–168, 1999.
 - 33) Evans, R.L. and Turner, R.J.: Upregulation of Na⁺-K⁺-2Cl⁻ cotransporter activity in rat parotid acinar cells by muscarinic stimulation. *J. Physiol. Lond.* **499**, 351–359, 1997.
 - 34) 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.
 - 35) Yun, C.H., Tse, C.M., Nath, S., Levine, S.L. and Donowitz, M.: Structure/function studies of mammalian Na-H exchangers. *J. Physiol. Lond.* **482**, 1S–6S, 1995.
 - 36) Robertson, M.A., Woodside, M., Foskett, J.K., Orłowski, J. and Grinstein, S.: Muscarinic agonists induce phosphorylation-independent activation of the NHE-1 isoform of the Na⁺/H⁺ antiporter in salivary acinar cells. *J. Biol. Chem.* **272**, 287–294, 1997.
 - 37) Roussa, E., Thévenod, F., Sabolic, I., Herak-Kramberger, C.M., Nastainczyk, W., Bock, R. and Schulz, I.: Immunolocalization of vacuolar-type

- H⁺-ATPase in rat submandibular gland and adaptive changes induced by acid-base disturbances. *J. Histochem. Cytochem.* **46**, 91–100, 1998.
- 38) Bevensee, M.O., Bashi, E., Schlue, W.R., Boyarsky, G. and Boron, W.F.: Shrinkage-induced activation of Na⁺/H⁺ exchange in rat renal mesangial cells. *Am. J. Physiol.* **276**, C674–C683, 1999.
- 39) Park, K., Olschowka, J.A., Richardson, L.A., Bookstein, C., Chang, E.B. and Melvin, J.E.: Expression of multiple Na⁺/H⁺ exchanger isoforms in rat parotid acinar and ductal cells. *Am. J. Physiol.* **276**, G470–478, 1999.
- 40) Greger, R., Bleich, M., Leipziger, J., Ecke, D., Mall, M. and Kunzelmann, K.: Regulation of ion transport in colonic crypts. *News Physiol. Sci.* **12**, 62–66, 1997.
- 41) Paulais, M. and Turner, R.J.: Beta-adrenergic upregulation of the Na⁺-K⁺-2Cl⁻ cotransporter in rat parotid acinar cells. *J. Clin. Invest.* **89**, 1142–1147, 1992.
- 42) Kurihara, K., Moore-Hoon, M.L., Saitoh, M. and Turner, R.J.: Characterization of a phosphorylation event resulting in upregulation of the salivary Na⁺-K⁺-2Cl⁻ cotransporter. *Am. J. Physiol.* **277**, C1184–C1193, 1999.
- 43) Zeng, W., Lee, M.G., Yan, M., Diaz, J., Benjamin, I., Marino, C.R., Kopito, R., Freedman, S., Cotton, C., Muallem, S. and Thomas, P.: Immuno and functional characterization of CFTR in submandibular and pancreatic acinar and duct cells. *Am. J. Physiol.* **273**, C442–C455, 1997.
- 44) Ishiguro, H., Steward, M.C., Wilson, R.W. and Case, R.M.: Bicarbonate secretion in interlobular ducts from guinea-pig pancreas. *J. Physiol. Lond.* **495**, 179–191, 1996.
- 45) Melvin, J.E., Moran, A. and Turner, R.J.: The role of HCO₃⁻ and Na⁺/H⁺ exchange in the response of rat parotid acinar cells to muscarinic stimulation. *J. Biol. Chem.* **263**, 19564–19569, 1988.
- 46) Yun, C.H., Oh, S., Zizak, M., Steplock, D., Tsao, S., Tse, C.M., Weinman, E.J. and Donowitz, M.: cAMP-mediated inhibition of the epithelial brush border Na⁺/H⁺ exchanger, NHE3, requires an associated regulatory protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **94**, 3010–3015, 1997.
- 47) Ishiguro, H., Steward, M.C., Lindsay, A.R., Case, R.M.: Accumulation of intracellular HCO₃⁻ by Na⁺-HCO₃⁻ cotransport in interlobular ducts from guinea-pig pancreas. *J. Physiol. Lond.* **495**, 169–178, 1996.
- 48) Choi, I., Romero, M.F., Khandoudi, N., Bril, A. and Boron, W.F.: Cloning and characterization of a human electrogenic Na⁺-HCO₃⁻ cotransporter isoform (hhNBC). *Am. J. Physiol.* **276**, C576–C584, 1999.
- 49) Marino, C.R., Jeanes, V., Boron, W.F. and Schmitt, B.M.: Expression and distribution of the Na⁺-HCO₃⁻ cotransporter in human pancreas. *Am. J. Physiol.* **277**, G487–G494, 1999.
- 50) Roussa, E., Romero, M.F., Schmitt, B.M., Boron, W.F., Alper, S.L. and Thevenod, F.: Immunolocalization of anion exchanger AE2 and Na⁺-HCO₃⁻ cotransporter in rat parotid and submandibular glands. *Am. J. Physiol.* **277**, G1288–G1296, 1999.
- 51) 田中秀司：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。広大歯誌 **30**, 28–41, 1998.