

令和 4 年 5 月 27 日現在

機関番号：32644

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K09514

研究課題名(和文) 唾液腺セロトニンが唾液分泌へ与える影響の検討：唾液腺マイクロダイアリシスを用いて

研究課題名(英文) Study of the effect of serotonin in the salivary glands on salivary secretion:
using salivary gland microdialysis.

研究代表者

吉川 正信 (Yoshikawa, Masanobu)

東海大学・医学部・准教授

研究者番号：90276791

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：これまで、唾液腺内の神経活動を直接モニタリングすることは困難であった。従来用いられてきた電気生理学的手法は唾液腺内の交感・副交感神経など複数の神経系活動を同時に直接モニターすることは難しく、唾液腺内神経活動測定法の確立が望まれていた。in vivo マイクロダイアリシス法を唾液腺に応用し、アセチルコリン・ノルエピネフリン・セロトニン・アミノ酸など複数の神経伝達物質をラット顎下腺内で同時にモニターすることにより、唾液腺内における各種神経伝達物質の遊離量が唾液分泌に与える影響を解析した。その結果、還流液中の神経伝達物質の遊離量が唾液腺内神経活動を反映していることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

唾液腺 in vivo マイクロダイアリシス法が唾液腺内の副交感神経活動の変化を検出するための強力なツールになることが明らかとなった。唾液腺 in vivo マイクロダイアリシス法を用いることで唾液腺内神経系を介する唾液腺機能調節機構が明らかにされれば、新たな口腔乾燥症治療薬が開発されることが期待される。

研究成果の概要(英文)：To date, it has been difficult to directly monitor nerve activity in the salivary glands. We applied an in vivo microdialysis method to the salivary gland to monitor multiple neurotransmitters such as acetylcholine, norepinephrine, serotonin, and amino acid simultaneously in the submandibular gland of rats. We applied in vivo microdialysis to salivary glands and simultaneously monitored multiple neurotransmitters such as acetylcholine, norepinephrine, serotonin, and amino acid in the submandibular gland of rats to analyze the effects of the release of various neurotransmitters in the salivary glands on salivary secretion. The results revealed that the amount of neurotransmitter release in the dialysate reflects neural activity within the salivary glands.

研究分野：薬理学

キーワード：マイクロダイアリシス 唾液腺 神経伝達物質 唾液分泌

1. 研究開始当初の背景

抗うつ薬は口腔乾燥を示す代表的な薬物である。抗うつ薬の唾液分泌抑制はムスカリン受容体 (M3)拮抗作用によると考えられている。一般にムスカリン受容体拮抗作用は三環系が最も強く、四環系、SSRI (選択的セロトニン再取り込み阻害薬)が次いで、SNRI (セロトニン・ノルアドレナリン再取り込み阻害薬)と NaSSA (ノルアドレナリン作動性・特異的セロトニン作動性抗うつ薬)にはほとんどないとされている。しかし、ムスカリン受容体拮抗作用が低い薬物 (SSRI, SNRI, NaSSA) であっても口腔乾燥症が発生する場合があります。抗うつ薬が唾液分泌を抑制する作用機序としてムスカリン受容体拮抗作用以外の、唾液腺自律神経活動の低下などが考えられる。ラット顎下腺にセロトニンを還流すると唾液分泌量が減少することが報告されているが、その機序は不明である。消化器のセロトニン研究において、消化管内在のコリン作動性神経上のセロトニン 5-HT1 受容体刺激はアセチルコリン分泌量を減少することが明らかにされている。しかし、唾液腺神経活動を直接モニタリングすることは困難であった。従来用いられてきた電気生理学的手法は唾液腺内の交感・副交感神経など複数の神経系活動を同時に直接モニターすることは難しく、唾液腺内神経活動測定法の確立が望まれていた。

2. 研究の目的

in vivo マイクロダイアリシス法を唾液腺に応用し、アセチルコリン・ノルエピネフリン・セロトニンなど複数の神経伝達物質をラット顎下腺内で同時にモニターすることにより、唾液腺内における各種神経伝達物質の遊離量が唾液分泌に与える影響を解析する。

3. 研究の方法

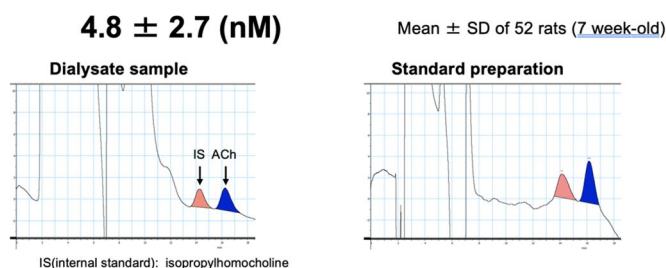
in vivo マイクロダイアリシス法は脳内において神経伝達物質遊離量をモニターする手法として開発され、神経化学分野で多くの成果を上げてきた。*in vivo* マイクロダイアリシス法の利点として、1) 還流液を介して生体内物質を経時的かつ連続的にサンプリングできること、2) 同一試料から複数の神経伝達物質を解析できること、3) ある特定の神経活動に伴って放出される神経伝達物質を free moving (覚醒) の状態で測定できるため、麻酔薬の影響を受けない、などがある。本研究では、Wistar 系雄性ラット顎下腺に挿入した唾液腺用マイクロダイアリシス透析プローブ (Eicom 社と共同開発) に Ringer 液を還流し、透析液を分取した。アセチルコリン濃度分析には酵素カラム (Eicom, AC-ENZYM-PAC) を、モノアミンには分析カラム (Eicom, CA-50DS) を用い、HPLC 電気化学検出器 (Eicom, HITEC510) により測定した。各種 D, L アミノ酸分析には C18 カラム (Waters, Nova-Pac) を用いて、蛍光検出器 (Jasco, FP4020) により測定した。

4. 研究成果

(1) 麻酔した Wistar 系雄性ラットの顎下腺に透析用プローブを埋め込み、リンゲル液を灌流させた。2 μ L/min で灌流した場合、アセチルコリンの平均相対回収率は 41.7% \pm 2.5% であった。透析液中のアセチルコリン濃度を高速液体クロマトグラフィーと電気化学検出器により測定した。

その結果、以下のことが明らかになった。(a) エセリンをリンゲル液に混合することにより、唾液腺中のアセチルコリンを定量できること、(b) 透析液中のアセチルコリン濃度はプローブ留置後 120 分間にわたり変動が大きく不安定であるが、ほぼ安定したレベルまで達したこと (4.8 \pm 2.7 nM) (c) 鼓膜神経への電気刺激

Basal concentrations of ACh in dialysate



刺激や高カリウムリンゲル液による灌流は、透析液中のアセチルコリン濃度を有意に上昇させることが明らかとなった。これらの結果は、唾液腺 *in vivo* マイクロダイアリシス法が唾液腺内の副交感神経活動の変化を検出するための強力なツールになることを示している (Yoshikawa and Kawaguchi, *Biology*, 2021;10(5):351.doi: 10.3390/biology10050351.)。

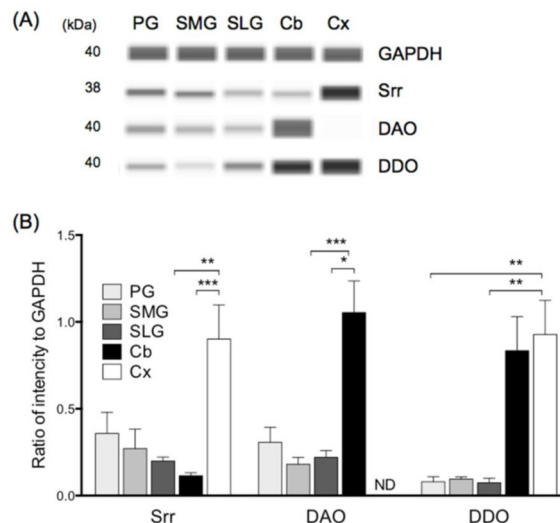
(2) 各種抗うつ薬を Wistar 系雄性ラットに全身投与した場合、ピロカルピン刺激下での唾液分泌量が減少することが明らかとなった。また、唾液腺 *in vivo* マイクロダイアリシス法により唾液腺内セロトニン遊離量が増加することを明らかにした。

(3) ピロカルピンを Wistar 系雄性ラット第三脳室内投与しアセチルコリン遊離量が有意に増加すること、各種抗うつ薬を第三脳室内に投与後においてピロカルピン刺激下での唾液分泌量が変化しないことを明らかにした。

(4) 生体を構成するアミノ酸はすべて L 体であり、鏡像異性体の D 体は細菌ペプチドグリカンの構成成分など極めて限られた生体成分である、と長年考えられてきた。しかし、哺乳類を含む高等動物において種々の遊離 D 体アミノ酸 (D-アミノ酸) が存在し、多様な生理機能を有することが明らかとなってきた。D-セリンは哺乳類脳内に多量に存在し、興奮性神経伝達物質グルタミン

ン酸の受容体である N-メチル-D-アスパラギン酸(NMDA)受容体の内在性リガンド(コアゴニスト)としてL-グルタミン酸によるNMDA受容体の活性化を増強することが知られている。D-セリンの中枢における機能については数多くの報告があるが、末梢臓器に対する作用についての報告はほとんどない。HPLC アミノ酸一斉分析により7週齢 Wistar 系雄性ラット耳下腺、顎下腺、舌下腺にD-セリンをはじめとする複数の D-アミノ酸が存在することを明らかにした。D-セリンはL-セリンをラセミ化するセリン異性化酵素 (Serine racemase: Srr) により生成され、D-アミノ酸酸化酵素(D-amino acid oxidase; DAO)によりヒドロキシピルビン酸に代謝される。ラット唾液腺において Srr と DAO の遺伝子がそれぞれ大脳皮質と小脳と同程度に発現していること、NMDA 受容体サブユニット遺伝子が発現していること、などを RT-qPCR により明らかにした (Yoshikawa et al., *Biology*, 2022;11(3):390.doi: 10.3390/biology11030390)。D-セリンをL-グルタミン酸とともにラット顎下腺に灌流すると副交感神経刺激下の唾液分泌量が D-セリン用量依存的に増加した。一方、高用量 L-グルタミン酸単独では副交感神経刺激下の唾液分泌を著しく抑制した。DAO 欠損マウスは野生型マウスに比べて副交感神経刺激時の唾液分泌レベルが約 2.5 倍高いこと、野生型マウスに経口投与した D-セリンは副交感神経刺激下の唾液分泌量を増加すること、などを明らかにした。

- (5) 唾液腺 *in vivo* マイクロダイアリシス法により唾液腺細胞間質液中に D-セリン、D-アラニンなどが比較的高濃度に存在することを明らかにした。
- (6)ラット唾液腺由来ペプチドシアロルフィンがミューオピオイド受容体の結合親和性に影響せず、ポジティブアロステリックモジュレーターとしてミューオピオイド受容体の内活性を増強し、内因性オピオイドペプチドの効力を増強することを明らかにした (Kan, Yoshikawa, et al., *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 2020, 375, 104-114)。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Masanobu Yoshikawa and Mitsuru Kawaguchi	4. 巻 10
2. 論文標題 In Vivo Monitoring of Acetylcholine Release from Nerve Endings in Salivary Gland	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biology	6. 最初と最後の頁 351-351
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/biology10050351	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Yoshikawa Masanobu, Kan Takugi, Shirose Kosuke, Watanabe Mariko, Matsuda Mitsumasa, Ito Kenji, Kawaguchi Mitsuru	4. 巻 11
2. 論文標題 Free d-Amino Acids in Salivary Gland in Rat	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biology	6. 最初と最後の頁 390-390
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/biology11030390	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Kan Takugi, Yoshikawa Masanobu, Watanabe Mariko, Miura Masaaki, Ito Kenji, Matsuda Mitsumasa, Iwao Kayoko, Kobayashi Hiroyuki, Suzuki Takeshi, Suzuki Toshiyasu	4. 巻 375
2. 論文標題 Sialorphan Potentiates Effects of [Met5]Enkephalin without Toxicity by Action other than Peptidase Inhibition	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics	6. 最初と最後の頁 104 ~ 114
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1124/jpet.120.266080	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 吉川正信、大久保みぎわ、川口充
2. 発表標題 ラット顎下腺内副交感神経終末からのアセチルコリン遊離に対するD-セリンの作用
3. 学会等名 第64回日本唾液腺学会総会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------