

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：2019～2021  
課題番号：19K09337  
研究課題名(和文) 麻酔と唾液分泌に関する研究

研究課題名(英文) Studies on anesthesia and salivation

## 研究代表者

渡邊 真理子 (Watanabe, Mariko)

東海大学・医学部・講師

研究者番号：60609220

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)：Wistar系雄性ラット耳下腺、顎下腺、舌下腺において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Serine racemase(Srr)により生成され、D-amino acid oxidase(DAO)により代謝される。また、D-アスパラギン酸はD-aspartic acid oxidase(DDO)により代謝される。ラット唾液腺においてSrr, DAO, DDO, NMDA受容体サブユニットの遺伝子、タンパク質が発現していること、などを明らかにした。これらの結果より、唾液腺内のDアミノ酸が唾液分泌機能を調節している可能性が示唆された。

## 研究成果の学術的意義や社会的意義

麻酔薬による口腔内分泌は、臨床において気道管理上重要な要素の一つである。本研究により、NMDA受容体を介した唾液分泌の作用機序が明らかとなれば、唾液腺内Dアミノ酸に着目した新たな薬剤が開発され、気道管理の向上が期待できる。

研究成果の概要(英文)：Several D-amino acids including D-serine are present in the parotid, submandibular, and sublingual glands of male Wistar rats. D-serine is produced by serine racemase (Srr) and metabolized by D-amino acid oxidase (DAO). D-Aspartate is metabolized by D-aspartic acid oxidase (DDO). The gene and protein expressions of Srr, DAO, DDO, and N-methyl-D-aspartic acid (NMDA) receptor subunits (NR1, 2A, 2B, 2C, 2D) are found in all three major salivary glands. These results suggest that D-amino acids in salivary glands may regulate salivary secretory function through NMDA receptors.

研究分野：麻酔科学

キーワード：唾液分泌 Dアミノ酸 マイクロダイアリシス NMDA受容体

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

唾液の水・電解質分泌は主にムスカリン受容体、タンパク質分泌は主に アドレナリン受容体を介して促進される。一方、唾液分泌を抑制するメカニズムとして、ベンゾジアゼピン受容体、GABA 受容体といった抑制性受容体を介する調節機構が存在することが知られている。ケタミンは唾液分泌を過多にすることが知られている。咽頭・喉頭反射は残っているが、唾液分泌が増加するため気道閉塞の危険性がある。ケタミンの麻酔・鎮痛作用は主に N-メチル-D-アスパラギン酸(NMDA)受容体に対する非競合的拮抗作用による。申請者は NMDA 受容体活性が NMDA 受容体グリシン結合部位の内在性リガンド D セリンによって調節されることを明らかにしてきた。しかし、ケタミンの唾液分泌亢進作用が NMDA 受容体を介しているのか、唾液腺細胞あるいは自律神経細胞のいずれに作用しているのかなど、その機序については不明である。近年、ケタミンがセロトニンを遊離すると報告された。セロトニン 5-HT<sub>1</sub>、5-HT<sub>3</sub>、5-HT<sub>4</sub> 受容体などはヒトを含む哺乳類の唾液腺で存在することが確認されている。消化管運動に関わる主なセロトニン受容体は 5-HT<sub>1</sub>、5-HT<sub>2</sub>、5-HT<sub>3</sub>、5-HT<sub>4</sub> 受容体で、このうち消化管平滑筋に存在する 5-HT<sub>2A</sub> 受容体の刺激は消化管運動を促進する。他の 3 種受容体は消化管内在のコリン作動性神経上に存在し、5-HT<sub>1A</sub> 受容体刺激がコリン作動性神経からのアセチルコリン遊離量を減少し消化管運動を抑制するのに対し、5-HT<sub>3</sub> および 5-HT<sub>4</sub> 受容体刺激はアセチルコリン遊離量を増加させ消化管運動を促進する。このような消化器におけるセロトニンの自律神経系への作用から、ケタミンによるセロトニン作用の増強が唾液腺自律神経活動に影響する可能性がある。しかし、唾液腺の自律神経活動を直接モニタリングすることはこれまで困難であった。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い。

### 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と唾液分泌との連関を解析する。

### 3. 研究の方法

#### (1) 全身投与による唾液分泌量に対する影響の検討

Wistar 系雄性ラットを用い、Ketamine 麻酔下で Pilocarpine 刺激の唾液分泌量を測定する。

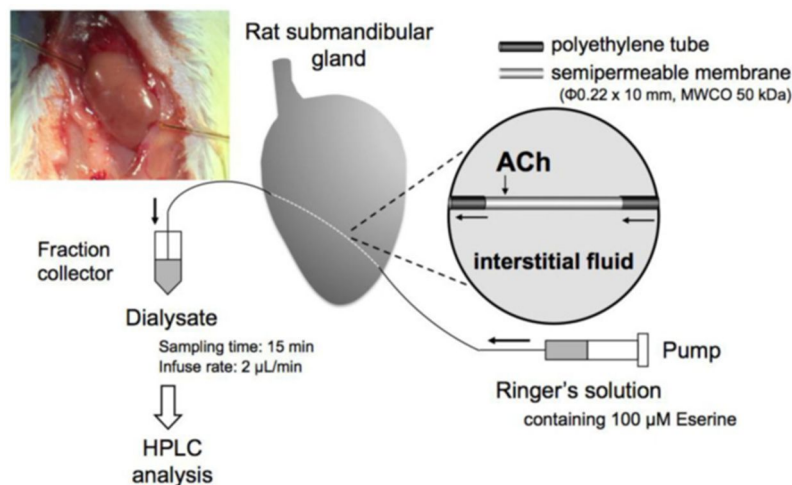
(2) Wistar 系雄性ラット顎下腺に挿入した唾液腺用マイクロダイアリシス透析プローブ(Eicom 社)に Ringer 液を還流し、透析液を分取する。アセチルコリン濃度分析には酵素カラム(Eicom, AC-ENZYPAC)を、モノアミンには分析カラム(Eicom, CA-50DS)を用い、HPLC 電気化学検出器(Eicom, HITEC510; 現有)により測定する。各種 D,L アミノ酸分析には OPA による誘導体化後に C18 カラム(Waters, Nova-Pac)を用いて、蛍光検出器(Jasco, FP4020)により測定した。

### 4. 研究成果

(1) Ketamine 麻酔とペントバルビタール麻酔における Pilocarpine 刺激の唾液分泌量を測定した。その結果、Ketamine において有意に唾液分泌量が増加することが明らかとなった。

(2) 5%イソフルラン麻酔下において 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。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、(a)コリンエステラーゼ阻害薬(エセリン)をリンゲル液に添加することにより、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 分以降にほぼ安定したレベルまで達すること ( $4.8 \pm 2.7$  nM)、(c)鼓

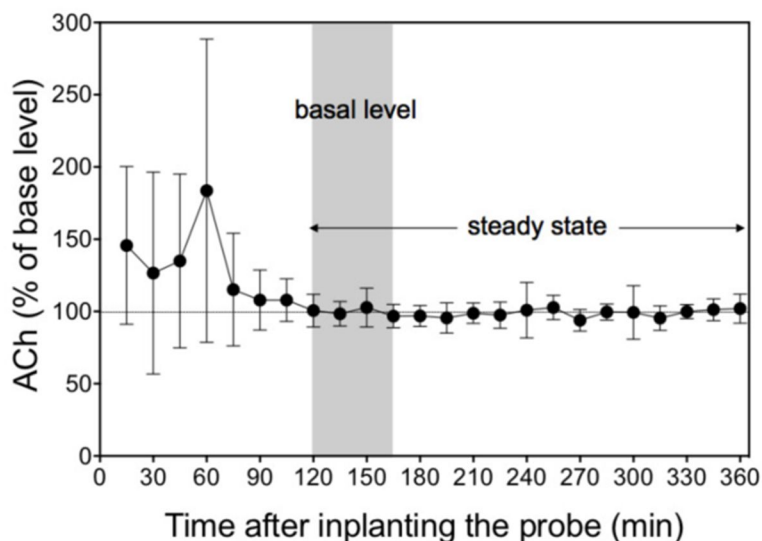
膜神経への電気刺激や高カリウムリンゲル液による灌流は、透析液中のアセチルコリン濃度を有意に上昇させることが明らかとなった。これらの結果は、唾液腺 *in vivo* マイクロダイアリシ



ス法が唾液腺内の副交感神経活動の変化を検出することが可能であることを示している。

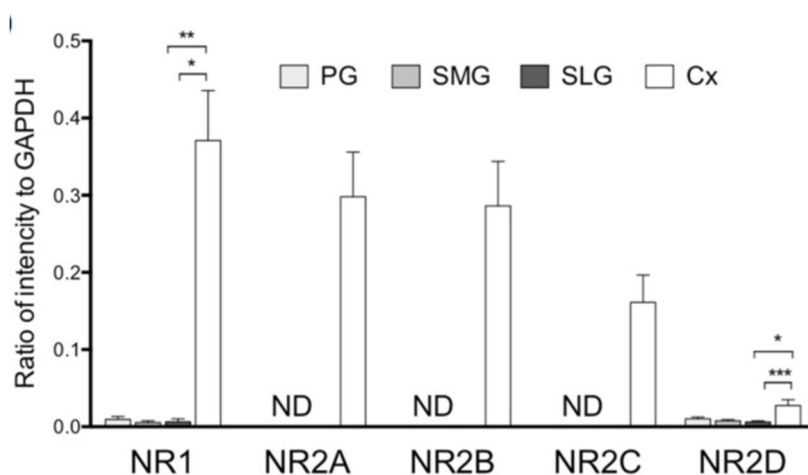
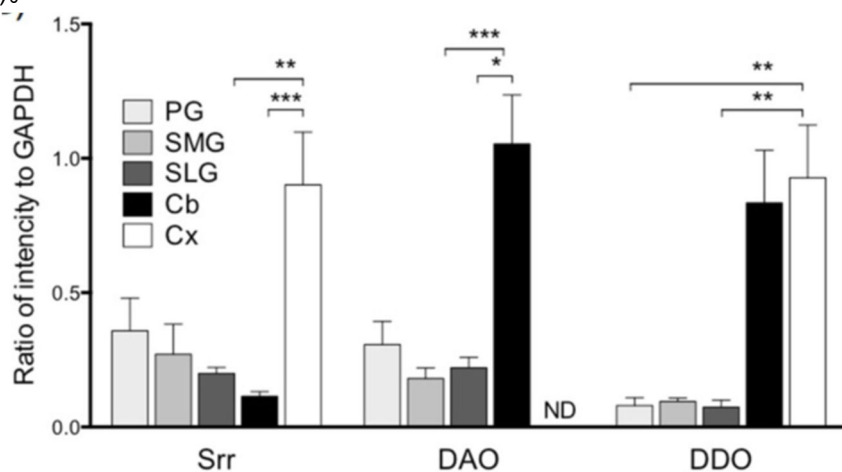
(3) 7週齢 Wistar 系雄性ラット耳下腺、顎下腺、舌下腺に D-セリンをはじめとする複数の D-アミノ酸が存在することを明らかにした。D-セリンは L-セリンをラセミ化するセリン異性化酵素 (Serine racemase: Srr) により生成され、D-アミノ酸化酵素 (D-amino acid oxidase; DAO) によりヒドロキシピルビン酸に代謝される。また、D アスパラギン酸は D-アスパラギン酸化酵素 (D-aspartic acid oxidase; DDO) により代謝される。ラット唾液腺において Srr, DAO, DDO の遺伝子、タンパク質が発現していること、NMDA 受容体サブユニット遺伝子、タンパク質が発現していること、などを明らかにした (Yoshikawa et al., Biology, 2022;11(3):390.doi: 10.3390/biology11030390)。

(4) 唾液腺 *in vivo* マイクロダイアリシス法により顎下腺細胞間質液中に D-セリン、D-アラニンなどが比較的高濃度に存在するが、D-アスパラギン酸は検出されないことを明らかにした。



Time after implanting the probe (min)

ラット唾液腺において Srr, DAO, DDO の遺伝子、タンパク質が発現していること、NMDA 受容体サブユニット遺伝子、タンパク質が発現していること、などを明らかにした (Yoshikawa et al., Biology, 2022;11(3):390.doi: 10.3390/biology11030390)。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

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 -

〔学会発表〕 計0件

〔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
研究分担者	吉川 正信  (Yoshikawa Masanobu)  (90276791)	東海大学・医学部・准教授    (32644)	

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