

機関番号 : 27102

研究種目 : 基盤研究 (C)

研究期間 : 2008 ~2010

課題番号 : 20592178

研究課題名 (和文) 催唾剤ピロカルピンによる口腔乾燥感誘発のメカニズム

研究課題名 (英文) Induction mechanism of oral dryness by the sialogogue pilocarpine

研究代表者

稲永 清敏 (KIYOTOSHI INENAGA)

九州歯科大学・歯学部・教授

研究者番号 : 90131903

研究成果の概要 (和文) : ピロカルピンやセビメリンは唾液分泌を促進し、口腔内を湿潤させる。われわれはピロカルピンをラット腹腔内および脳室内に投与すると飲水行動が誘発されること、この行動は脳室内アトロピン前投与により消失することを明らかにした。さらに、c-Fos免疫組織化学およびスライス標本を用いた電気生理学実験の結果から、ピロカルピンが口渇中枢に作用し、のどの渇きを誘発していることを示した。一方、セビメリンの腹腔内投与では、唾液分泌は促進するが飲水行動は促進しなかった。むしろ、アンジオテンシンIIによって誘発された飲水行動に対して、セビメリンは抑制作用を示すことを明らかにした。以上のことから、ピロカルピンは中枢に作用して口渇感を誘発するように働くこと、セビメリンは逆に、口渇感を抑制することが判った。ピロカルピンおよびセビメリンの唾液腺腺房細胞に対する作用をカルシウムイメージング法により検討したところ、ピロカルピンはセビメリンより低濃度で効果があること、両者の反応時間はインビボで観察される唾液分泌促進時間と比べて短時間で終了することがわかった。ピロカルピンとセビメリンは、唾液腺では腺房細胞に対して同じような細胞内メカニズムを介して唾液分泌を誘発すること、この効果を引き起こすためには、セビメリンの方が高濃度必要であることが判った。ピロカルピンやセビメリンが比較的長時間、唾液分泌を促進するように働くのは、唾液腺腺房細胞以外のレベルでの効果によると推定された。このようにピロカルピンとセビメリンでは、中枢と末梢に対する作用が異なることが判った。

研究成果の概要 (英文) : Pilocarpine and cevimeline induce salivary secretion and get wet in the oral cavity. We showed that intraperitoneally and intracerebroventricularly injected pilocarpine elicited water intake in rats and the induced behavior was suppressed by intracerebroventricularly preadministered atropine. The same applications of pilocarpine increased the number of c-Fos positive neurons in the subfornical organ, median nucleus of preoptic area, and organum vasculosum of lamina terminalis, which may constitute the thirst center in the brain. Pilocarpine directly affected and depolarized neurons in the subfornical organ of slice preparations. On the other hand, intraperitoneally injected cevimeline did not increase water intake but rather suppressed angiotensin II-induced water intake. Pilocarpine and cevimeline increased intracellular calcium concentration in acinar cells of the salivary gland *in vitro* preparations. The increment of intracellular calcium concentration with *in vitro* application was rather short-lasting than with *in vivo* application. Thus, pilocarpine and cevimeline show actions on acinar cells of the salivary gland through the same intracellular second messenger system. From these results, it is suggested that pilocarpine and cevimeline have different actions between the central nervous system and the peripheral organs.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,500,000	750,000	3,250,000
2009年度	700,000	210,000	910,000
2010年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・機能系基礎歯科学

キーワード：ピロカルピン、セビメリン、唾液分泌、口渇、昇圧

1. 研究開始当初の背景

口腔乾燥症は年々増加しており、高齢者の罹患率は特に高い。原因としては、加齢、シェーグレン症候群などの唾液腺疾患、薬物療法の副作用、X線照射療法後の後遺症、心因性によるものなどが挙げられるが、そのメカニズムが明らかとなっていない。対症療法のひとつとしてピロカルピンや塩酸セビメリンといったムスカリンアゴニストが催唾剤として用いられ、口腔内の湿潤性を回復することによって口腔乾燥症に伴うさまざまな症状を和らげようと試みられている。ピロカルピンや塩酸セビメリンは唾液腺腺房細胞に作用し唾液分泌に影響を及ぼすが、塩酸セビメリンはピロカルピンよりも持続的に唾液分泌を促進するといわれている。一方、これらの薬物は催唾剤としての作用以外も示す。ピロカルピンは血圧低下や徐脈を引き起こし、塩酸セビメリンでは体温低下を起こす。実験動物において、皮下投与したピロカルピンや脳内ムスカリン刺激により口渇感による飲水行動が誘発するとされている。また、長期セビメリン投与はヒトにおいて飲水渴望感を抑制するという報告もある。

口渇感による飲水行動の誘発には、脳神経核が強く関与する。ムスカリン受容体は脳血液関門を欠いた脳室周囲器官や視床下部にも存在し、この受容体が刺激されると飲水行動や循環系反応が誘発される。また、これらの部位の神経核は延髄の唾液核ニューロンの神経活動を調節し、唾液分泌を制御していることと考えられていた。このようなことからピロカルピンは末梢だけでなく、中枢に作用し、唾液分泌・飲水行動・循環系反応を誘発しているのではないかと考えられた。われわれは、腹腔内に投与したピロカルピンで濃度依存性に唾液分泌と飲水行動が誘発されるこ

と、これらの反応が脳室内に投与したアトロピンで遮断されることを観察した。また、ピロカルピンを脳室内に投与した場合には、飲水行動は引き起こすが、唾液分泌は引き起こさなかった(Sato et al. J Dental Res. 2006)ことから、ピロカルピンは、中枢に作用し口渇感を引き起こすこと、一方唾液分泌作用はピロカルピンの唾液腺への直接作用であるという結論を得ていた。催唾剤の投与により唾液分泌が促進され、口腔内は十分湿潤しているのにも関わらず、のどの渇きを覚えているということを考えると、口腔の湿潤性と口腔乾燥感とは必ずしも相関しない。このことは、逆に、中枢作用と末梢作用の両方の理解によって初めて、口腔乾燥症を包括的に理解できるということを意味している。臨床において、もし口腔乾燥症治療薬を適用量より多く患者に投与したら乾燥感を改善するどころか、逆に口渇感を訴えるように働くことが予想された。一方、日本で認可されているもうひとつの催唾剤であるセビメリンの「腹腔内投与では、唾液分泌促進作用は起こるが飲水行動は誘発されなかった(Sato et al. Archiv Oral Biol. 2006)。このように、ピロカルピンとセビメリンの二つの催唾剤の作用機序を調べることにより、薬による副作用としての口腔乾燥症のメカニズムを解明できると考えた。また、臨床的に使用されているピロカルピンやセビメリンの用量を誤らないように警鐘を鳴らす糸口になる研究結果がでると予想された。

2. 研究の目的

(1) ピロカルピンは本当に中枢で作用しているといえるか、(2) ピロカルピンとセビメリン脳神経細胞および唾液腺で異なった作用を示すか、(3) ピロカルピンとセビメリンは低用量ではすぐには効果を発揮しないが、長期間投与すると唾液分泌量が増加し口腔内の湿潤性を回復すると言われているが、その機序はどのように理解すればよいか、(4) コリン作動性にはムスカリン受容体ばかりでなく、ニコチン受容体が存在する。ニコチン受容体は中枢性あるいは末梢性に作用し、口腔乾燥感誘発にどのように作用しているかを調べることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) ピロカルピン及び塩酸セビメリンの脳室内投与による唾液分泌促進、飲水行動、循環系反応を調べ、その作用部位を c-Fos 免疫組織化学法により明らかにする。さらに、末梢に投与したピロカルピン及び塩酸セビメリンが中枢に作用することを確かめるため、腹腔内投与によるこれらの反応を調べ、脳室内に投与したアトロピンにより減弱されることを明らかにする。加えて、c-Fos 免疫組織化学法により静脈内に投与したピロカルピン及び塩酸セビメリンが中枢部位に陽性細胞の数を増加させること、脳室内に投与したアトロピンがその数を減弱させることを明らかにする。次に、(2) 脳スライス標本を用いて、c-Fos 実験にて陽性反応を示した部位にて、ピロカルピンおよびセビメリンのニューロンへの作用を調べる。併せて、ムスカリン受容体拮抗剤を用いることによって、受容体のタイプを検索する。(3) ピロカルピンとセビメリンの唾液腺腺房細胞に対する作用について比較する。(4) ニコチン受容体刺激による口腔乾燥感誘発メカニズムを上記の方法により検索する。

3. 研究成果

(1) ピロカルピンは唾液分泌を促進し、口腔内を湿潤させる。ピロカルピンをラット腹腔内および脳室内に投与すると飲水行動が誘発されること、この行動は脳室内アトロピン前投与により消失することが判っていた。本研究ではピロカルピンの腹腔内への投与により、前脳部位（脳弓下器官、終板器官、正中中心核、室傍核、視索上核）および延髄（弧束核、最後野）で c-Fos 発現細胞数が増加し、唾液核では c-Fos 発現細胞はほとんど観察されないという結果を得た。脳室内ピロカルピン投与でも、上記と同じ部位に c-Fos 発現細胞数の増加を観察され、脳室内アトロピン前投与により腹腔内および脳室内ピロ

カルピン投与による c-Fos 発現細胞数は減弱された。脳スライス標本を用いて、脳弓下器官ニューロンのピロカルピンに対する作用をホールセルクランプ法にて調べた。ピロカルピンは、脳弓下器官ニューロンに直接作用し、脱分極作用を示すことが判った。以上の結果から、ピロカルピンは直接唾液腺腺房細胞に働いて唾液分泌を促進させる一方、中枢のムスカリン受容体を刺激することにより口渇感を引き起こし、飲水行動を誘発することを示唆していることが判った。

(2) セビメリンの腹腔内に投与により、アンジオテンシン II によって誘発された飲水行動は抑制されることが判った。さらに、セビメリンはピロカルピンに比べて、腹腔内投与により顕著な昇圧反応を引き起こすことも判った。ピロカルピンおよびセビメリンの唾液腺腺房細胞に対する作用をカルシウムイメージング法を用いて検討したところ、ピロカルピンはセビメリンより低濃度で効果があること、両者の反応時間はインビボで観察される唾液分泌促進時間と比べて短時間で終了することがわかった。以上の結果から、ピロカルピンとセビメリンは、同じような細胞内メカニズムを介して唾液分泌を誘発すること、この効果を引き起こすためには、セビメリンの方が高濃度必要であることが判った。ピロカルピンやセビメリンが比較的長時間、唾液分泌を促進するように働くのは、唾液腺腺房細胞以外のレベルでの効果によると推定された。また、ピロカルピンは中枢に作用して口渇感を誘発するように働くこと、セビメリンは逆に、口渇感を抑制することが判った。

以上のことより、ピロカルピンおよびセビメリンはムスカリン受容体アゴニストであるが、その作用は中枢と末梢で異なることが示唆された。

(3) 中枢ニコチン受容体刺激による喉の渇き誘発に関して検討を行った。その結果、ラットにおける脳室内ニコチン投与は非常にごく微量の飲水ではあるものの、有意に飲水開始時間の短縮を引き起こした。加えて、脳弓下器官ニューロンでのニコチンと代表的な口渇誘発物質であるアンジオテンシン II による興奮作用時間を検討したところ、ニコチンによる神経興奮時間はアンジオテンシン II の反応と比べて非常に短かった。G 蛋白共役型受容体で作用が長いアンジオテンシン II 受容体やムスカリン受容体と異なり、ニコチン受容体はリガンド開口型受容体であるため作用が非常に短く、またそれにより持続的な飲水行動誘発が起きないために、これ

までの報告では脳弓下器官ニューロンでのニコチン興奮性反応やニコチン刺激誘発飲水行動を見落としていたと考えられる。

さらに脳弓下器官におけるニコチン受容体サブタイプについて検討した。ニコチン受容体は多くのサブユニットから構成される5量体である。RT-PCR法により $\alpha 2, 3, 4, 6, 7$ ならびに $\beta 2, 4$ の7つのサブユニットの脳弓下器官での存在が示された。ラット急速単離脳弓下器官ニューロンにおいて、パッチクランプ全細胞記録法によるニコチン受容体へ薬理的な特徴より、 $\alpha 4\beta 2$ を基本としたサブタイプの存在が示唆された。一方、 $\alpha 7$ に対する免疫染色法により、 $\alpha 7$ はニューロンではなくグリア細胞に発現していることがわかった。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 11 件)

- ① Inenaga K, Wakasugi-Sato N, Ono K, Hirase M, Honda E. Intraperitoneal injection of pilocarpine activates neurons in the circumventricular organs and hypothalamus in rats. *Brain Res.* 1200C:51-57, 2008
- ② Ono K, Kai A, Hirase, Inenaga K. Effect of central nicotinic activation on drinking behavior. *NeuroReport* 19:845-849, 2008
- ③ Ono K, Miyahara N, Inenaga K. Cell subpopulations of nicotine-sensitive subfornical organ neurons in rat. *Neuroscience Letters* 442:74-75, 2008
- ④ Inoue H, Ono K, Masuda W, Inagaki T, Yokota M, Inenaga K. Rheological properties of human saliva and salivary mucins. *J Oral Biosciences* 50:134-141, 2008
- ⑤ Ono K, Toyono T, Inenaga K. Nicotinic receptor subtypes in rat subfornical organ neurons and glial cells. *Neuroscience* 154:994-1001, 2008
- ⑥ Ono K, Tanaka T, Inoue H, Ansai T, Sato-Wakasugi N, Muraoka K, Yokota M, Takehara N, Morimoto Y, Inenaga K.

Small salivary gland size in patients with xerostomia of unknown etiology. *Arch Oral Biol* 54:369-373, 2009

- ⑦ Inagaki T, Ono K, Masuda W, Iida T, Hosokawa R, Inenaga K. Differences in the Ca^{2+} response resulting from neurotransmitter stimulations of rat parotid acini and ducts. *Autonomic Neurosci* 154:102-107, 2010
- ⑧ Inenaga K, Ono K. Oral dryness and thirst - the central effect of acetylcholine on drinking behavior-. *J Oral Biosci* 52:344-354, 2010
- ⑨ Asami R, Ono K, Nakanishi O, Inenaga K. Distinct mechanisms underlie the regulation of body fluid balance by neurokinin B and angiotensin II in the rat brain. *Brain Res* (in press)
- ⑩ Iida T, Ono K, Inagaki T, Hosokawa R, Inenaga K. Nicotinic receptor agonist-induced salivation and its cellular mechanism in parotid acini of rats. *Autonomic Neurosci* (in press)
- ⑪ Ono K, Asami R, Miyahara N, Nakanishi O, Inenaga K. Neuronal effects of neurokinin B on the rat subfornical organ *NeuroReport* (in press)

[学会発表] (計 13 件)

- ① ラット耳下腺細胞のコリン性・アドレナリン性刺激による多様な反応、
- ② ラットにおける中枢コリン性アゴニスト刺激による口の渇き誘発作用
- ③ 脳弓下器官におけるニコチン受容体と口腔機能
- ④ ラット耳下腺細胞に対するピロカルピンおよびセビメリンの作用
- ⑤ 飲水行動のアセチルコリン制御
- ⑥ Nicotinic reception in rat subfornical organ neurons and glial cells
- ⑦ Mechanism of drinking behavior by central activation of nicotinic receptor in rat
- ⑧ ラット耳下腺細胞における催唾剤により細胞内カルシウム濃度上昇
- ⑨ Effects of pilocarpine and cevimeline on Ca^{2+}

- mobilization in rat parotid acini and ducts
- ⑩ Ca^{2+} mobilization by nicotine through synaptic activation in rat parotid acini
 - ⑪ Mechanism of drinking induced by the sialogogue pilocarpine in rats
 - ⑫ のどの渇きとアセチルコリン
 - ⑬ ニコチンによるラット耳下腺腺房細胞の細胞内 Ca^{2+} 動態

6. 研究組織

(1) 研究代表者

稲永 清敏 (KIYOTOSHI INENAGA)

九州歯科大学・歯学部・教授

研究者番号：90131903

(2) 研究分担者

小野 堅太郎 (KENTRO ONO)

九州歯科大学・歯学部・助教

研究者番号：40316154