

IADR Distinguished Scientist on Salivary Research 2013 を受賞して

自然科学研究機構生理学研究所 村上 政隆

2013年3月シアトルで国際歯科研究学会 (International Association of Dental Research, IADR) から Distinguished Scientist on Salivary Research 賞を授与されました。日本人としては初の受賞で、この上ない名誉です。この機会に唾液腺研究の面白さを御紹介致したく存じます。私は、1976年から大阪医大生理学今井研究室で研究生生活を始め、1985年に生理研に移りました。現在も唾液腺の研究を続けています。それはとても面白いからです。面白い理由は、測定観測した事実は変わらず、新しい実験により観測が増えるに従い、新しく考えを進化できたためです。いい加減な実験条件の設定ですと実験事実が不正確でぶれるために考えが右往左往してしまうし、考えが先にあってそれに実験結果を合わせるような研究は新しい発見はなくちっとも面白くないからです。京都府立医大の学生時代から亘研究室に出入りさせてもらい、「それホンマか？」と多くの先輩に質問され、調べて、育てられました。生物物理化学から動物行動学まで広いレンジの生理学は走っても走ってもボールに追いつけない広い広いグラウンドでした。

1) 分泌のエネルギーに挑む

学生時代に人体のエネルギー代謝の講義を受けた今井先生に、大阪医大にゆき最初にどんな事をしたいかと尋ねられ、生体がエネルギーを使う機序を勉強したいと申しました。今井教授は上皮膜系の輸送現象を唾液腺で進めていたので、イオン輸送の熱産生をやってみるかといわれました。最初は電気分解槽の中でイオンを動かすと熱は発生

するか？と測定しましたが電極で発生するジュール熱が大きく失敗。熱量計で組織片の熱産生を測定しましたが、組織が死んでしまって失敗。まず生きた組織を使うためには、in situ でイヌの顎下唾液腺、動静脈に熱電対を留置し、鼓索神経を電気刺激して変化する温度を測定しました [1] <図 1a>。通常、熱産生を生体で測定するために熱量計が市販されていましたが、この測定系は孤立系でした。生体臓器を生かしたままで実験するための酸素の供給は開放系を必要としましたので、開放型の熱量計を設計しましたが、唾液腺を設置する手術の煩雑さで実施には至りませんでした。そのため、やむなく開放系として in situ のイヌ唾液腺を使いました。次に、腺に流入流出する成分の流速と比熱の測定、腺の表面から脱出する熱流の測定が待っていました。最初の論文はまさに測定系を作る事、測定技術を開発する事に費やされました。結果は唾液腺の熱産生は刺激のないときは 8mW/g 腺重量、分泌刺激時は 60-100 mW/g という単純なものでした <図 1b>。しかしこのプロジェクトは流量計 [2] をつくり出し、次の実験、酸素消費、二酸化炭素産生の測定 [3] で熱測定は生きてきました。熱測定の測定手技の妥当性が裏付けられ、唾液腺が水分分泌の際に主として好気性代謝から ATP が産生されると推定ができました。水分分泌のみで、静止時 (刺激していない時) の熱産生の 8-12 倍のエネルギー消費が起こると推定されました。このとき、生体材料の条件を動かさなければ、異なる種類の定量的測定結果がお互いにサポートし合う事を実感しました。即ち、分泌刺激は灌流腺の酸素消費は 6-8 倍に

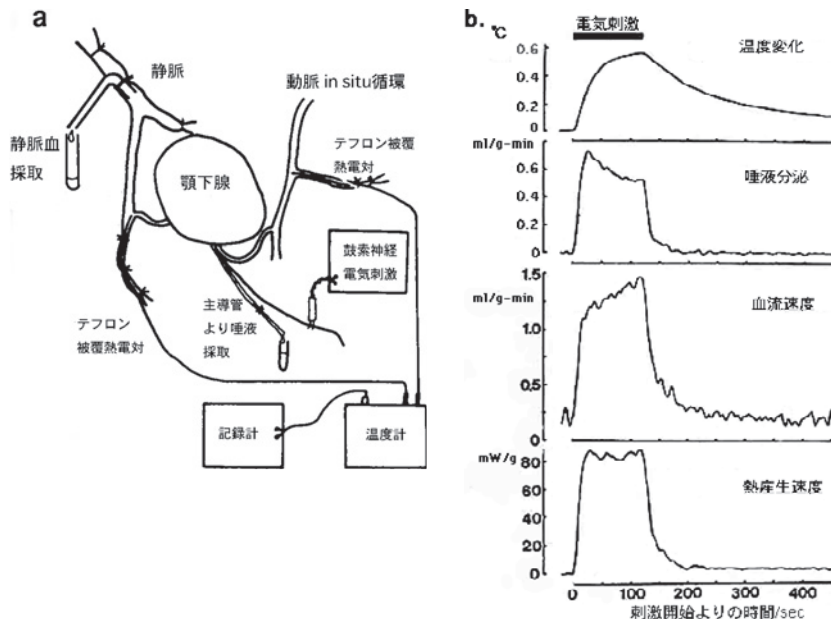


図1. 熱産生測定. a: in situ でイヌの顎下唾液腺, 動静脈に熱電対を留置し, 鼓索神経を電気刺激して変化する温度を測定. 図のようにセンサー, チューブを設置後, 皮膚を縫合し, 温度を定常状態にし, 実験を行った. (文献1より改変)
b: 熱産生計算結果.

りましたが, 単離した細胞では2倍程度が最大の変化でした.

分泌の熱産生が測定できたと言ったら, やはりエネルギー物質としてのATPを測定することも大事だから, 生理研の燐核磁気共鳴 (^{31}P -NMR) で唾液腺のリン化合物を測定してみないかと, 生理研に移った亘先生から single scan でスペクトルがとれるんやと 1981 徳島生理学会大会で, カエル骨格筋の ^{31}P -NMR スペクトルを見せてもらい, 京都府立医大の瀬尾芳輝大学院生と岡崎に行き, 5月29日に世界最初の唾液腺 ^{31}P -NMR スペクトルを観測しました [4] <図2>. まずクレアチンリン酸があることが予想外でした. 酸素不足にするとATPより先にいきなりクレアチンリン酸の信号がなくなり, ATPの信号がゆっくり低下しました. 実験を続けて行くと分泌刺激をして低下していたATP信号があまり変化しなくなりました [5]. 血管灌流の手技が良くなったのです. クレアチンリン酸はクレアチンシャトルと言われるよう

に細胞内での拡散係数がATPよりも高くATPを産生するミトコンドリアで creatine phosphokinase (cpk) により高エネルギーはクレアチンリン酸に受け渡され, 細胞質を拡散して, ATPが加水分解される部位で再びcpkによりATPに戻り加水分解を受けると考えられています<図3>. クレアチンリン酸は早く分解されるため, これまで測定は困難でしたが, その後生きたままの試料を測定できる ^{31}P -NMR 法により筋肉以外の色々な細胞で見つかりました.

クレアチンリン酸の動態について, 超高濃度のアセチルコリン (ACh=1mM) で刺激した場合, クレアチンリン酸が回復傾向を見せ, ATPが減少するという, シャトル説とは矛盾した現象が観察されました [6]. 酸素消費も分泌も刺激初期に急上昇しますが, その後減少します. 裏を取るために, そのころ初めて試みた ^{23}Na -NMR により細胞内 Na^+ の動態を観測しましたところ刺激初期に一挙に40mmol/lもの高濃度となりそのレベルが持

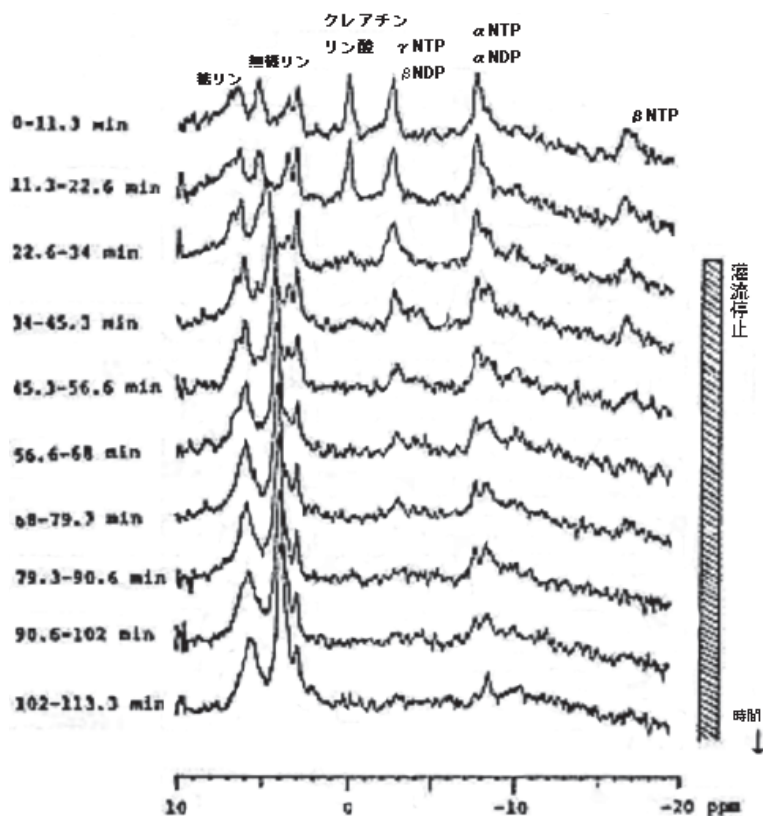


図2. 血管灌流イヌ顎下腺の灌流停止による ^{31}P -NMR スペクトル変化。クレアチンリン酸の存在を唾液腺で初めて報告した。灌流停止でクレアチンリン酸の信号はすぐに無くなったが、ATPの信号はしばらく残った。また無機リン酸の ^{31}P 信号は増加し、化学シフトが起こり、細胞の酸性化を示した。(文献4より改変)

続している事が判明しました [7]。高濃度 ACh 刺激により細胞の中に一挙に Na が流入し、そのレベルを回復するために Na^+ , K^+ -ATPase がフル回転しても ATP の供給が追いつかず、運び役のクレアチンリン酸も利用されず、機能的な拡散障壁が出現したのではないかと推測しました。この問題には Ca^{2+} イオン等の他の電解質の絡みが不明で、まだ現在でも十分には解決していない問題のひとつです。

また北大獣医菅野富夫先生の教室でチトクロームの酸化還元を観察し、灌流唾液腺で、灌流の良くない状態では刺激によりチトクローム還元が起こるが通常では呼吸鎖の酸化/還元は酸素側のチトクローム a からチトクローム c へ、そして b

へ酸素濃度の順序に並んでいることが明確になり [8]、実験条件が良好である事が示されました。

1983 年の一年間はシドニー大学 JA Young の研究室でラットの顎下腺の灌流を学びました。以来 30 年間、この系は私の用いる実験系になっています。イヌからラットに移った時は嬉しく、手術の時間も短縮し、個体差も小さくなり、実験は言う事なく、またイヌに対する憐憫の感情も落ち着きました。シドニー滞在中、丁度 IUPS 総会の年にあたり、Young 研究室には多くの外分泌腺、上皮膜の研究者があつまり、サテライトシンポジウムも主催しました。おかげで、その後も交流を続けている研究者と初めて知り合う機会を得ました。

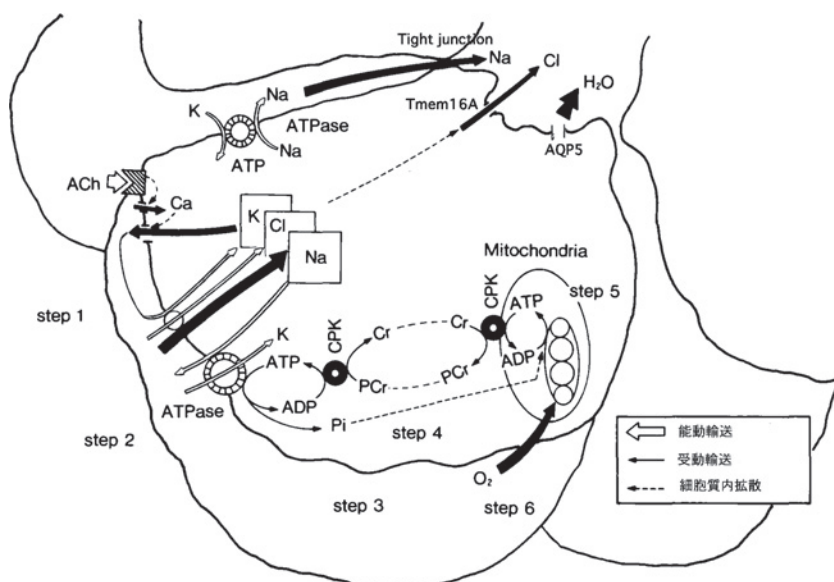


図3. アセチルコリン (ACh) 刺激から水分分泌までの唾液腺細胞で起こるエネルギー変換模式図 (文献7より改変) step1 ACh 刺激により細胞内 Ca^{2+} 濃度が上昇し, Ca^{2+} 依存性の K^+ チャンネルと Cl^- チャンネルが活性化され, 両イオンが細胞より脱出する. K^+ 脱出は Na^+ 受動輸送により駆動される $\text{Na}^+/\text{K}^+ / 2\text{Cl}^-$ 共輸送を補助する. step2 細胞膜 Na^+ , K^+ ATPase での ATP 加水分解により, Na^+ 細胞内流入と K^+ 細胞外への脱出の駆動力が補給される. step3 細胞質 CPK によりクレアチンリン酸から ATP へ変換され, ATPase に供給される. step4 クレアチンリン酸は細胞質内を拡散により消費部位へ供給される. ATP よりも拡散係数が高い. step5 ミトコンドリアにおいて酸化的リン酸化により ATP が産生され, ATP は CPK (creatine phosphokinase) によりクレアチンリン酸へエネルギーを受け渡す. step6 酸素が拡散により細胞内ミトコンドリアに到達し, チトクローム電子伝達系を開始させる.

2) 分泌時の電解質流速測定に挑む.

今井先生の方針は教室員に色々な実験をさせ, みんなで討論する方式でした. お陰で動物の手術や電気生理や形態学を傍で見て勉強したり, イオン選択性電極の原理を理解したりできました. 同じ時に教室に入った森博彦氏は K^+ イオン電極を顎下腺細胞に刺していました [9]. Double barrel の電極でした. 二本刺しは困難です. さらにイオン選択係数を考えて細胞内濃度を計算するのは大変なことです. 二人で議論したものです. 実験結果は少しがっかりしました. 細胞内 K^+ 濃度は殆ど変化しなかったのです. 唾液の K^+ 濃度は血清よりも高く, 分泌速度依存性がありますが, 平均 15 mmol/l という高濃度なので唾液腺から分泌され

ると予測していましたからその変化の小ささには驚きました. しかし, 後になってその不思議は解決しました.

今井先生は教授になったらお金の掛からない, 鉛筆でできる仕事をしようとおっしゃって, カチャルスキーの始めた回路網熱力学の輪読会を開き, 実験で得られた測定値を唾液腺の分泌機構に組込めないかということに大きな努力を払っていました [10]. 教室員の論文指導をするときに如何に測定値から細胞の能力としての流束を引き出すか, 駆動力とは何か, エネルギー供給とはなにかを繰り返し教えてくれました [11]. 先に述べました熱測定はまさにこの考え方です.

リンの次は, イオンを NMR で測定できるかと

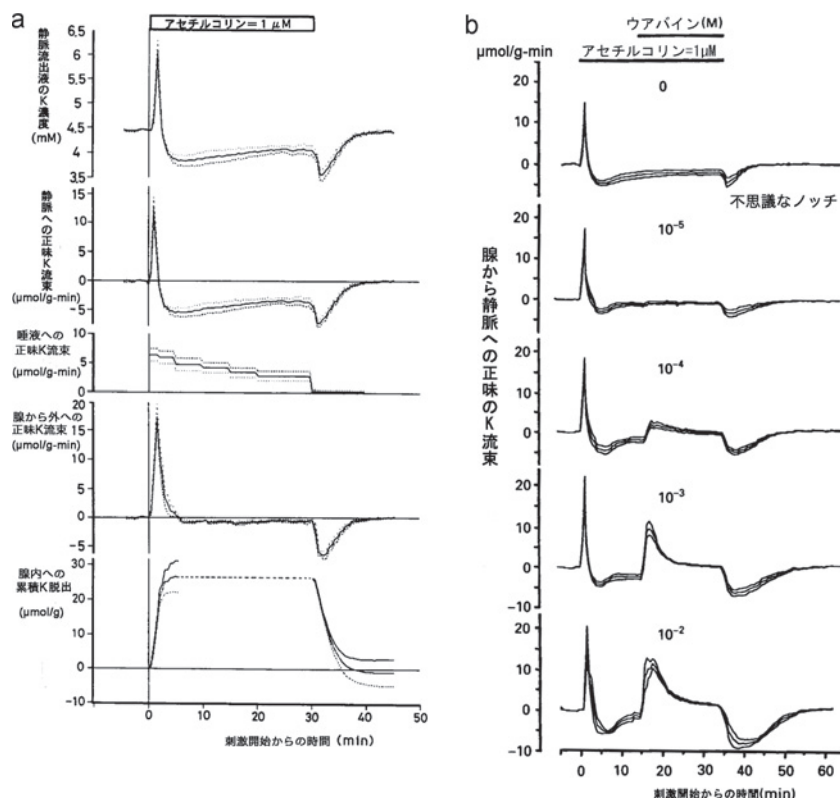


図4. 灌流ラット顎下腺のK⁺流束. a: 摘出したラット顎下腺の静脈カニユーレからフラクションコレクタで経時的に採取した静脈流出液のK⁺濃度を蛍光光度計で測定し、ポンプの流束との積（静脈への正味K⁺流束）、唾液へのK⁺を求め、これらから腺から脱出するK⁺流束を求めた。この流束を時間積分しK⁺脱出量を求めた（文献17を改変）b: ACh投与後15分しウアバインを投与してNa⁺、K⁺ATPaseを阻害したときのK⁺流束。一過性のK⁺脱出が観察され、薬品を洗い流すとK⁺取り込みが観察された。（文献12を改変）

という問題がでてきました。そのサポートとして、血管灌流ラット唾液腺の細胞外のフラックス測定を行いました[12]。これは今井先生から学んだ灌流腺でのイオン収支問題の集大成でした。Na⁺、K⁺-ATPaseをouabainでブロックしてその時のK⁺の一過性の放出から、K⁺能動輸送と受動輸送がどのくらいの輸送量（μmol/g-min）でバランスしているか、Na⁺、K⁺-ATPaseのstoichiometryをouabainとAChを洗ってからの一過性の酸素消費とK⁺流束から求めるというものです。刺激していない条件でのNa⁺、K⁺-ATPaseの化学量論比を求めたこと、二つの指数関数から一過性の現象

を記述できた事は幸運でした。実験中に感動したことがあります。静脈で測定したK⁺流束が刺激が終わってさらなるK⁺吸収が見えたのでした。変な事が見えていると思ったのが、ouabain濃度を変えて実験をすると、Na⁺、K⁺-ATPaseの活性化が起こってK⁺が取り込まれていると理解できたときでした<図4ab>。

どうしても細胞の中のK⁺の挙動を観測してみたくてはいませんか！ しかも同じ実験系、灌流唾液腺で、同期に生理研に移った瀬尾芳輝氏はNMRによる観測法をもたらしました。ひとつは以前より京都府立医大で確認されて来た化学シ

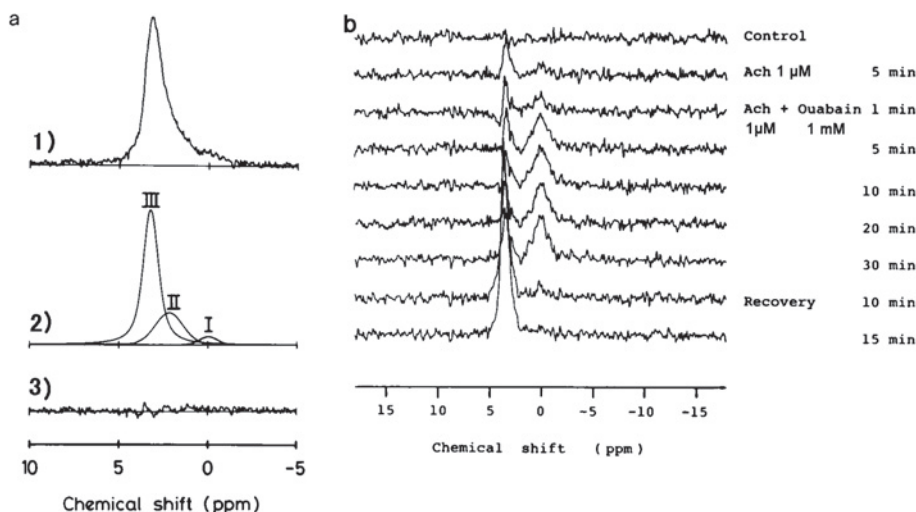


図5. 灌流ラット顎下腺の細胞内 Na^+ をNMRで観測する. a: 細胞外の信号の化学シフトをシフト試薬 Dy (TTHA) により惹起すると1) のスペクトルが得られた. このスペクトルの波形は3つのガウス曲線でフィットする事ができた. (2) フィットはうまく行き、1) と2) の差分スペクトルは3) の様にほとんど誤差はなかった (文献13より改変). b: 刺激薬を添加していないスペクトルを基準にしてそこからの変化分をスペクトルで表わした. 細胞内 Na^+ はACh刺激でわずかに増加し、これにウアバインを重畳させると、大きな細胞内 Na^+ の増加が観察された (文献14より改変).

フト試薬です. これはすでに化学分野で利用されて来たものですが、細胞外の磁場環境を常磁性体で少し変え、これが細胞に入らないようにキレート剤で包み、これをシフト試薬といい、色々な組み合わせの中から細胞にできるだけ害を与えないものを選択します. 我々は Dy (dysprosium) と TTHA (triethylene tetramine-N,N,N',N'',N''',N'''-hexaacetic acid) を用いました [13]. 細胞内外のNMR信号の周波数がずれて、信号を分離できる訳です. また、NaやKの生体に重要な核種はスピンの3/2であり、イオンのおかれている物理状態によって複雑なスペクトルを示す事が知られていました. とにかくより感度の高いNaについてチャレンジしました. 幸運にも Na^+ 信号は細胞内、細胞外I、細胞外IIの3成分に分離され、細胞内 Na^+ 信号はAChで増加し、ouabainで Na^+ 、 K^+ -ATPaseをブロックするとこの信号は極めて大きくなりました<図5ab>. 信号面積より、静止状態からの濃度変化は $\text{ACh}=1\mu\text{M}$ 刺激により9 mmol/L ICF, 1mM ouabainを重畳させると44

mmol/L ICFにまで上昇する事が分かり [14], 刺激時の Na^+ の細胞内への流入とそれを補完する Na^+ 、 K^+ -ATPaseの活性化を細胞内濃度の変化として観測できました.

続いて細胞内 K^+ です. K^+ の感度は、Hを1とすると0.00051と極めて低く、 ^{23}Na 、 ^{31}P は0.0925, 0.0664に比べても三桁も低感度です [15]. 低感度の克服は信号を加算する事ですが、ある程度の時間変化を追跡したいので、異なる腺を用いて同じプロトコルで実験して、観測データを加算する事にしました. また、細胞内 K^+ 信号を分離する方法として、反転回復法を用いて、細胞外 K^+ 信号を消去し、細胞内 K^+ 信号のみを観測する方法をとりました [16] <図6>. 灌流顎下腺の細胞内 K^+ の挙動はACh刺激で減少し、AChを洗い流すとともに戻るシンプルな挙動でした. 同じ系で測定していた静脈への K^+ 流束の時間経過を眺めると刺激中に唾液腺に取り込まれている事が示され、刺激後のさらに取り込まれるリップルが気になりました. 何か欠けていないか?と考えると、唾液

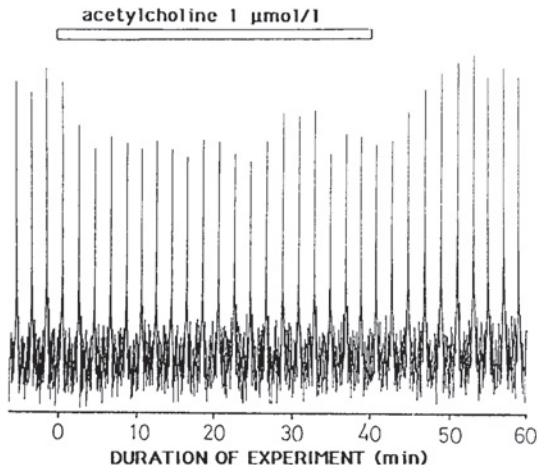


図6. ^{39}K -NMR 反転回復法により観測した細胞内 K^+ -NMR スペクトルの変化. ひとつずつの線が二分毎に観測したひとつずつのスペクトル（面積は K^+ 量を反映）に相当する. 細胞内 K^+ 量は急速に減少し, ACh で刺激を継続している間は低値を保った. ACh を洗い流すと細胞内 K^+ 量は回復した. 図 5a の一番下の図に相当する変化が実際に観察された. ただし, この実験では ^{39}K -NMR の感度が低いため, 同じプロトコールの実験を 11 個の別々の腺で行い, データを加算して S/N を上げた. (文献 17 より改変)

の中に放出している K^+ 流束をカウントしていない事に気づきました. これを考慮して腺全体からネットで放出される K^+ は刺激初期に放出, 刺激後に取り込みのシンプルな時間経過が現れました. そしてこれを積分すると, 刺激初期に急速に細胞内から放出され, 刺激後無くなった分が Na^+ , K^+ -ATPase の活性化により回復していました. これは ouabain 投与の実験で確認されました. 論文 [12] と [17] は細胞の外と内を眺めた双子の成果でした. この実験は細胞構築を変えずにイオンの収支を定量化した観察として高く評価されましたが, 新しい概念を提出するにはいたりませんでした. その後 20 年も経ちゴードン会議で学生が K^+ チャンネルを通るイオン量をはじめて測定された方ですねと言われた時にはとても嬉しくなりました.

3) 水輸送測定への挑戦.

エネルギー消費測定が一段落した 1980 頃, 大阪医大で組織のインピーダンスを測定して腺の細胞内区画と細胞外区画の容積を測定する計画が始まりました. このときは水が細胞内に入るはずだから, 細胞容積は増えるだろうという予測でした. しかし, 血流停止の実験とビデオによる細胞径の計測から細胞容積は縮小し, 細胞外液腔は拡大する説明になりました. Ex vivo の灌流腺に実験系が変わり, 学生の中張氏に引継がれ, ビデオで容積を測定するプロジェクトに繋がりました [18, 19]. このとき, ACh で刺激すると, 刺激初期の細胞の縮小する速度が水分分泌速度の二倍にも達する事, 刺激持続期には細胞の容積は変化しないが水分分泌は $100\mu\text{l/g}\cdot\text{min}$ の水準に維持されることが測定されました. 前者管腔側に水分が出るのみならず, 基底側にも水分が出ている事を示唆していました. 当時も今もモデルでは水分が傍細胞経路と管腔経路の両方を通過することになっていますから, 問題はないのですが, しっくりしないものがありました. 細胞容積が縮小するということは, Cl^- と K^+ がそれぞれ管腔側と基底側膜の Ca^{2+} 感受性チャンネルを通過して脱出する事で説明はつきます. 先に述べました森氏が測定した細胞内 K^+ 濃度が余り変化しないこと [9] が実は細胞容積が小さくなっている事, NMR で測定した細胞内 K^+ 量の減少と合致したのです. 濃度と量と区画の容積の 3 者を押さえて結果が説明できたわけです.

世界には同様の目論みをしている方々がいはばいるものです. Foskett JK が細胞内 Ca^{2+} 濃度と細胞容積を測定し発表し [20], 同じころに容積測定実験をしていましたから, 遅れを取ったと思ったものです. しかし分泌速度と細胞容積を比較したデータはこちらの勝ちでした. 当時, 細胞内 Ca^{2+} 測定がパッチクランプとともに大流行になり始めていました. 1991, 2 月岡崎にて文部省国際シンポジウム, Ionic Basis and Energy Metabolism of Epithelial Transport—Hot Aspect from Exocrine Secretion—を開催しました. これだけ大きな上皮膜輸送の国際シンポジウムも初めてで, 大

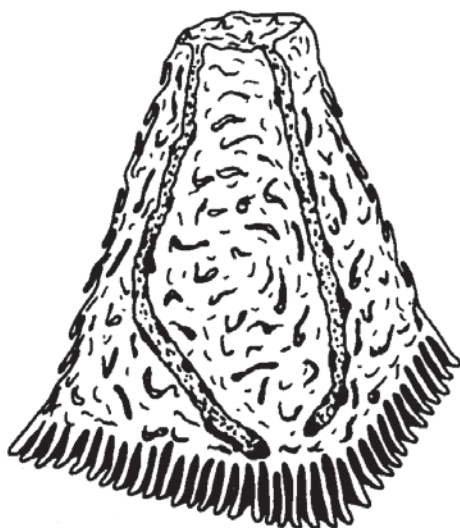


図7. 唾液腺分泌終末部(腺房)のひとつの細胞。台形錐の形状であるが尖端(Apical)のみが管腔膜(luminal membrane)ではなく、そこから細胞の側面に沿って2-3本/細胞の管が底面に向ってのびる。これは、細胞間分泌細管といい、二つの細胞の間にタイト結合で仕切られた管構造である。細胞間分泌細管にはmicrovilliが存在するが、底側膜には存在せず、basal infoldingの構造がみられる。簡単な模式図で表現する事により特徴ある構造は無視されるため正確な考察を行うためには、形態学的に確認する必要がある。(文献21より改変)

勢の友人ができたことは大きな成果でした。しかし、細胞内 Ca^{2+} 測定について予想を裏切り、あまりに多様な結果に、どれが本当で他の実験結果とどう突き合わせるか混乱が生じてしまいました。理由は多様な臓器、多様な材料の調整、多様な実験プロトコルが、実験結果の突き合わせを困難にした理由でした。この結果を反省して、1) 実験動物を共通にする。2) サンプルをできるだけ同じものにする。3) 1)2) が難しい場合にはできるだけ条件の詳細な記述をする。という3点でもう一度、1992.9月、「Salivary Secretion—Control and Mechanism—」という国際ワークショップを科学研究費「国際学術」で開催しました。これは三河ロッジという山上の保養所に籠城し、3日間実施しました。Kevin Foskett, Irene Schulz, Jim Putney が夜猛烈な討論をしたり、世界の研究者と一

緒にいるといろいろな長所や弱点がわかりました。「あの」ワークショップと言われています。この会では「生の細胞」の開口分泌を顕微鏡観察する手法が広まって来ていました。

このころ、そのひとり北里大学解剖の瀬川彰久氏とよく議論しました。生理で言う管腔膜と開口分泌している膜は同じと思うが、顕微鏡写真では必ずしも腺房の中心ではなさそうだとの疑問が起きました。よく分からない！瀬尾氏と相談して誰か唾液腺の形態の大家を呼んで説明してもらおうということになり、細胞質の中身を2% オスミウムで破壊し洗い出して、細胞の接合部をSEMで観察していた[21] イタリア、カリアリ大学リバ教授をワークショップにより、1994.3月高松生理学会でのミニシンポジウム「上皮膜輸送モデル系としての唾液腺」[22]に、Jim Putney, Jim Turner, Martin Stewardとともに、来てもらいました。「細胞間分泌細管 Intercellular Canaliculi」という構造が唾液腺腺房の管腔であることが、私にとって明快になりました[23]〈図7〉。それまで思ってた上皮膜のような台形モデルは捨てなければなりませんでした。

実はこの集まりで Riva 氏も、唾液腺をテーマに解剖と生理はもっと一緒に話し合える機会が必要だと気づき、来年ヨーロッパ解剖学会があるから、その時唾液腺のシンポジウムを開くから来てくれ、との話になりました。この会は The symposium on salivary glands dedicated to Niels Stensen の第1回のシンポジウムでした[23]。生理の代表のつもりで殆ど全ての講演に質問をしました。Coffee break では太ったおじいちゃんの唾液腺形態学者が集まり、生理では唾液の組成をどのくらい分析してるのかとか、糖尿病患者の唾液腺をもっと調べないと、とか多くの心掛かりな疑問をかわしていました。これが大切だ！！今の自分のテーマだけではなく、少なくとも唾液腺に関わる疑問をお互いに受け止めて、自分の持ち分と、知っていそうな科学者との間を取り持ったり、もっとコミュニティーとしての風通しを良くしなければ と思いました。「Riva 先生、もっと大きなのをやりますか？ 薬理も生化学も臨床も含め

て、』ということになりました。ミラノコレクションに参加した美しいモデルさんたちの散歩を日本からの形態学者とカンパリを飲みながら鑑賞し、この勢いは、後に共同研究に繋がりました。

さて第2回ステンセンシンポジウム [24] はイタリアのサルジニア島にあるカリアリ大学で Riva, Murakami を Chairs として 1997 年 5 月に開催されました。もひとつ英語がはっきりしない大学側のスタッフのため「次のスライド」というのを「next slide」ではなく「avanti」かしらんとぼやきながら五十数演題とポスターが進んで行きました。NIH を中心に多くのアメリカ人の唾液腺学者と多くの日本人唾液腺学者が日本学術振興会の二国間セミナーのグラントで参加する事ができました。やっと世界中に唾液腺研究の輪が広がったと思いました (We could have an international salivologists' community!). 実際にシェーグレン病を筆頭に xerostomia (dry mouth) の研究を進めている現場、またこれからアクアポリンを使って遺伝子治療を考えている現場からの発表は非常に刺激的でした。その直前の 1 月に唾液腺のカンファレンスが米国で立ち上がっていました。The first Gordon Research Conference on Saliva and Salivary Glands. 1997 年 2 月 Larry Tabak は Chair でした [25]。隔年に開かれ、2007 年に私は選挙で 2009 年の Vice-chair に選ばれ、2011 年に Matt Hoffman と Chair をつとめました。最初は毎日英語のシャワーで大変でしたが、力の抜き入れが分かってくると楽になり、多くの最長の知識を勉強でき、友達もできました。大学院生やポスターがポスターを携えて集まり、勉強会をする雰囲気、時には就職のために評判の PI を見に来たり、話したり、そして比較のご飯がおいしいのが嬉しい事でした。1997 年は非常に忙しい年でした。10 月は、ステンセン会議の Proceedings [24] のレフェリーと編集のためにカリアリ大学の一室で扇風機で暑さをしのぎながら、なんだか大変なことになった。でも楽しい! と感じました。

1998 年 6 月、マンチェスターでラット顎下腺の灌流実験系を立ち上げました。これを使って Cambridge の Hill 夫妻と細胞間隙を通過する成

分の大きさを調べ始めました。彼らはこれまでネクチュルスの胆のう上皮等で種々の分子量の dextran の ^3H をラベルしたマーカーを作り、このマーカーが上皮膜を通過する量と大きさを HPLC とシンチレーションカウンターで測定していました。この実験系を血管灌流の唾液腺に応用する試みでした。唾液腺を使う理由：唾液分泌は刺激薬でコントロールできる事、分泌速度が測定できる事、液交換が早い事。これらが彼らの興味を捉えました。その結果、半径 5 オングストローム以下のものを通す狭い経路といろいろな分子量のものを通す事のできる広い通路の二つの経路が少なくとも存在する事。そして、狭い経路のフィルター関数を外挿すると半径 1.1 オングストロームの分子、即ち水分子は唾液/灌流液の比が 1 となり、水は自由に通過するという事がわかりました [26] <図 8ab>。あくまでもこの結果は ACh で唾液腺を分泌刺激した状態で得られており、刺激がない時には分泌も起らないので、考慮の外でした。

この結果を踏まえて日本では北里大学で瀬川氏との共同実験がはじまりました。共焦点レーザー顕微鏡で水の動きをなんとかして観察できないか? というテーマです。蛍光色素を灌流腺の導管から逆行性に入れて、分泌刺激を起こさせました。少しでも色素が残っていてくれば、信号として値が計測できるのですが、数秒の後に洗い流されてしまいました [27]。灌流腺で蛍光色素 Lucifer Yellow を灌流すると、細胞の中には入りませんが、細胞間隙にははいり、細胞間分泌細管にも色素は殆ど見えません。しかし、collagenase で組織を腺房構造は残る程度に消化した標本では必ず細胞間分泌細管に色素が入っていました。そして CCh (カルバコール) を周辺に流すと、その蛍光強度が減少しました。これは色素を含まない水溶液の分泌が細胞内からおこったため (経細胞水輸送) だ、と理解できました。後からタイト結合が機能していないのは collagenase に含まれる enterotoxin によりタイト結合の構成タンパク、claudin の動員が阻害されているため [28] と分かりました。水分分泌を蛍光色素の希釈で測定することは丁度広島大学大学院生の中本君が耳下腺の導管で実験して

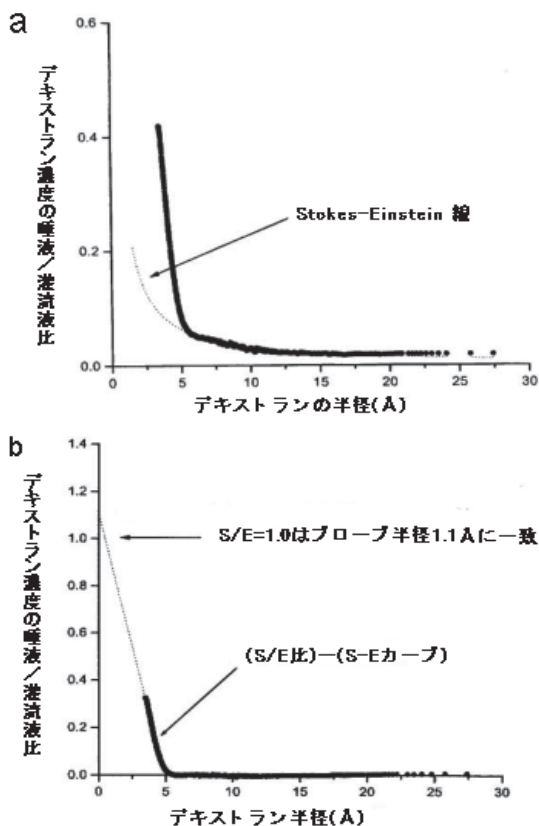


図8. 灌流ラット顎下腺のフィルター機能。灌流液に入れた色々な大きさのデキストランがどの程度唾液に出現するか調べた。a: 実験結果。ベースラインはデキストランが大きくなっても0にならないことから、大きな分子も通過させる大きな経路が存在する事を示しており、Stokes-Einsteinの関係で表わされる。b: 大きな経路の関係を実験結果から差し引くと、小さな経路のフィルター関数が図に表れた。このフィルターは半径が5Åより小さい分子を通過させる経路である。また唾液/灌流液比が1になる際の分子半径は1.1であり、水分子と一致した。即ち水分子は自由にこの経路を通過できる。(文献26より改変)

いました [29]。瀬川/村上是、水分分泌速度の計算法を開発し、灌流腺で測定した全体の水分分泌速度と比較しました。すると刺激初期1分間の分泌はみごとに経細胞で分泌された分泌と一致しました。ところが経細胞水分分泌は次第に低下し、2分以降で低い値 20μl/g-min で停滞しました。腺全体で測定された分泌はこの持続刺激の間は 80μl/

g-min でしたから、その差の 60μl/g-min がタイト結合を越えて分泌される傍細胞水輸送であると推定されました [27] (図 9)。この実験では開発した耳下腺灌流系が役に立ちました。瀬川氏は 2003. 4. に大腸がんで逝去しました。病を押して 2002. 9. 11-15. ルーマニアの国際形態学シンポジウムで成果を発表しました。2003. 2. 28 小田急相模大野駅ホームで CD-ROM を受け取りました。これが遺言になってしまいました。実質 2004 に発行された Eur J Morphol には瀬川氏の追悼文と、私の先生であったシドニー大学 John A Young の追悼文が併せて掲載されました [30]。

2000 年の国際学術のワークショップの際、岡崎生理研で二人の形態学者の何十年ぶりかの出会いが実現しました。Bernard Tandler と金関恵両先生です。二人はミトコンドリアの分裂を片や肝臓、片やイーストで発見され旧知の仲でした。そして唾液腺にとって Tandler 先生は野生動物（中でもコウモリ）の唾液腺形態学の一人者であり、金関先生は凍結切断法の指導のため生理研に来ていました。すでに金関先生からはタイト結合の微細構造を化学固定の標本で習っていましたが、この時、金関先生はなにかお礼がしたいと、液体ヘリウムで試料をミリ秒で凍結し、凍結切断まで持ち込む方法を伝授してくださいました。昔々月田先生が使っていた Balzers40 は、金関先生が整備して使えるようにした名機で大きなレプリカがとれました。そして顎下腺の細胞間分泌細管と細胞間隙の境界をなすタイト結合の微細構造が明らかになりました [31]。それは、腸管上皮などのタイト結合とは異なり、claudin 分子が配列して分泌細管に沿う平行線を形づくっていました。これが動けば物は通過させやすいかもしれないと思いました。よく見ると claudin 分子が外れた場所は溝になっていて、これを延長すると細胞内骨格の格子に繋がっていました (図 10)。増々傍細胞経路で物質が通るという思いを強くしました [32]。そして、細胞内骨格の作る細胞内の格子間隙が、分泌刺激によって狭くなっている事を見つけました。この事が細胞内骨格の運動性と関連するのではないかと予測しています。そしてこれが唾液水分分泌の大

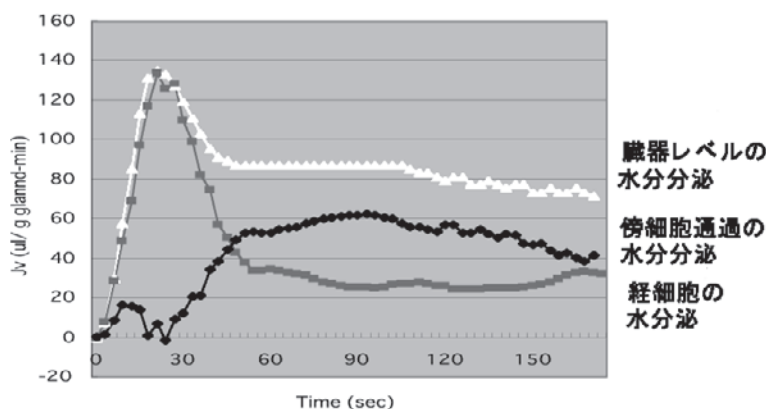


図9. ラット耳下腺の単離腺房に入った蛍光色素がアセチルコリン刺激で希釈された。単離の処理でタイト結合分子のクローデインの動員が抑制されるため蛍光色素は常時、血管側より細胞間分泌細管に入っている。アセチルコリン刺激で細胞内より蛍光色素を含まない溶液が分泌細管に流れ込み、分泌細管内の色素が希釈された。この希釈過程から経細胞からの水分分泌を計算した(グレー)。またラット耳下腺を灌流してCChで刺激して得られた水分分泌は白で示す時間経過をとった。初期分泌は経細胞分泌と一致し、持続刺激では経細胞分泌を凌駕した。全分泌と経細胞分泌の差をとると、傍細胞分泌が、刺激後30秒から始まり、ゆっくりと増加し1分ではほぼプラトーになる結果が得られた。(文献27を改変)

部分を占める傍細胞輸送の駆動力を説明する手だてとなることが目下の関心事です。

現在 灌流唾液腺が共焦点レーザー顕微鏡の上のり、約2秒間隔で64枚のスライスを取り込み、三次元立体再構成する事が可能になった[33]。ウィンドウをしぼればさらに時間分解は上がるであろう。これにより顆粒顎下腺の中の細胞の表面の運動を捉えようと計画しています。

4) 臨床への応用。

これからの生理学を担って行く若い方々に申し上げたい事。生理学はマクロな生体機能をシステムとして理解し、素子の動きを測定し、定量された測定値を組み立ててシステムの動きが再現されればやっと理解したことになる、と思います。想定される素子の数はモデルにより異なりますが、目的となっているシステムの階層を定義しながら素子を仮定して行かない事には、実験で得られる測定値と素子の関係は明らかにならない。システムを考慮せずに素子の一カ所を掘り進んで行く事

で最先端というならば、最先端は最深部に達したモグラになってしまいはしないかと危惧します。素子の研究のみを行って、「解明」という言葉を新聞がつけると、「じえじえじえ」と思ってしまうす。

臨床応用に目的あれば最深部に達する(解明に至る)必要はないと思います。例えば唾液を採取して特定の化学物質を測定して血液検査と同様な情報を得ようという試みは近年多く行われています。血清ブドウ糖測定するには100倍も高感度な測定器ができました。唾液糖の測定はできないか?と話があり、灌流腺で実験した事があります[34]。刺激濃度を代えると、水分分泌が変化し、唾液糖の濃度も変化してしまいました<図11a>。しかし、灌流液の糖の濃度を代え、刺激を変えた結果を唾液/灌流液の糖濃度比と水分分泌速度のグラフにプロットすると、双曲線上に散在するデータが出現しました<図11b>。分泌速度が低いと濃度が大きく出ました。グルコースがどのくらい細胞に入り細胞から分泌されるかは不明です。し

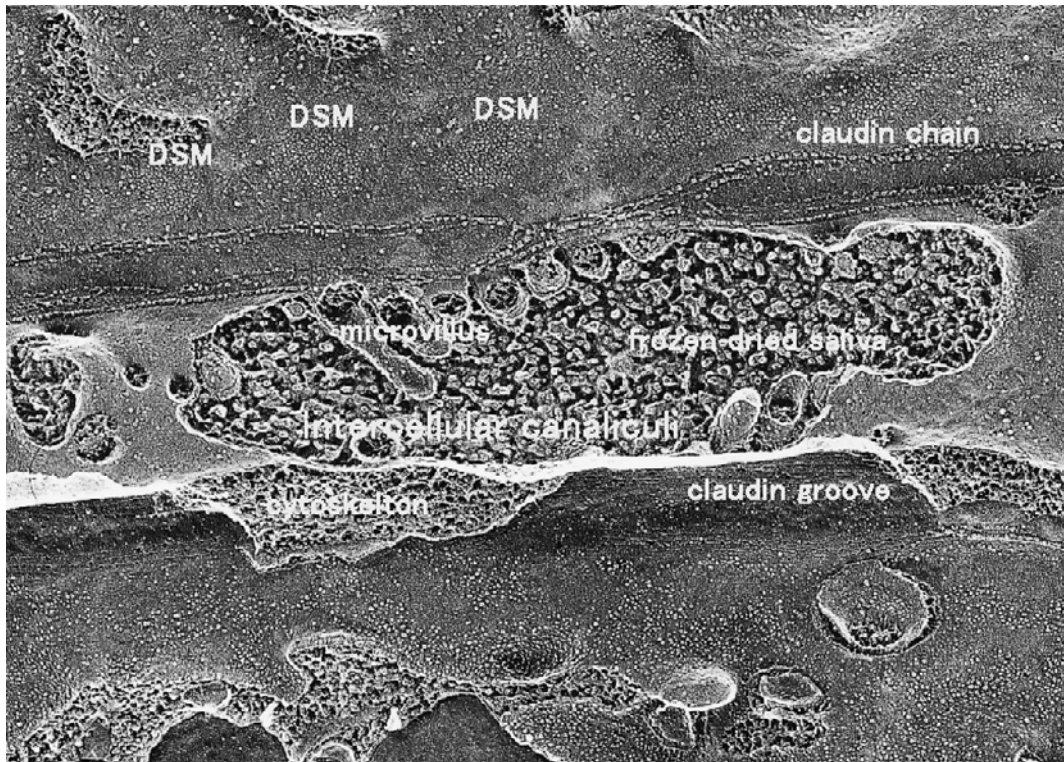


図 10. 灌流ラット顎下腺の細胞間分泌細管の凍結切断レプリカの透過型電子顕微鏡像。無刺激の灌流腺からスライスを切出し液体ヘリウム温度に冷やした銅ブロックに圧着して固定。その凍結試料を -110°C で切断、 -100°C まで温度を上昇させて水を昇華させ、その後 Pt-C 電子銃で斜め上 25° から照射、 90° から C を照射してレプリカを作り、これを透過電子顕微鏡で観察した。中央に細胞間分泌細管が横たわりその上と下にタイト結合の構造が存在する。タイト結合は平行な 2 本ずつのペアが二本走行し、溝 (claudin groove) にクローデイン分子が繋がっている (claudin chain)。この部位の細胞膜が破れた場所では細胞質内の細胞骨格が観察される。骨格の水平格子は claudin groove と関連している。デスモゾーム (DSM) がタイト結合の外側に見えるが、この粒子塊の直径は約 100nm。また細胞間分泌細管にはかならずミクロビリが存在する事を忘れてはならない。ミクロビリが見えない場合は細胞間分泌細管であると断定する事はこんなである。分泌刺激によりミクロビリの高さは低くなり、やがて見えなくなるが、このときは開口分泌を起こした分泌顆粒が細管に付着しているので分かりやすい。

かし、分泌速度の高い所で、輪で囲んだ領域のサンプルを集めてプロットしなすと実は灌流液の濃度と唾液濃度は見事に比例しました<図 11c>。何かで刺激して唾液が沢山分泌される条件ならば血清ブドウ糖と唾液ブドウ糖の濃度は比例関係にありました<図 11c>。この結果はヒトでも当てはまり、ゴードン会議で説明するとオランダの研究者が飛びついて来ました。彼らはそのころ Saliva の学会を立ち上げようとしていました。これはもう何年も立ちますが、ラット唾液腺を摘出灌

流できる研究者をいまのところ全て知っているの
で余り心配はしていません。このテーマは循環系
に流れて物質が唾液で観察できる事を示して
おり、種々の物質に応用は広いと期待しています。

もうひとつ、臨床応用として xerostomia の治療
薬を漢方薬のなかから探索しよう、そしてあわよ
くば漢方薬の考え方と西洋医学の考え方をすりあ
わせようと、南京医科大学の魏睦新教授と 2005
年より共同研究を行い 20 種類の漢方薬を摘出し
たラット灌流顎下腺に与え CCh で刺激した唾液

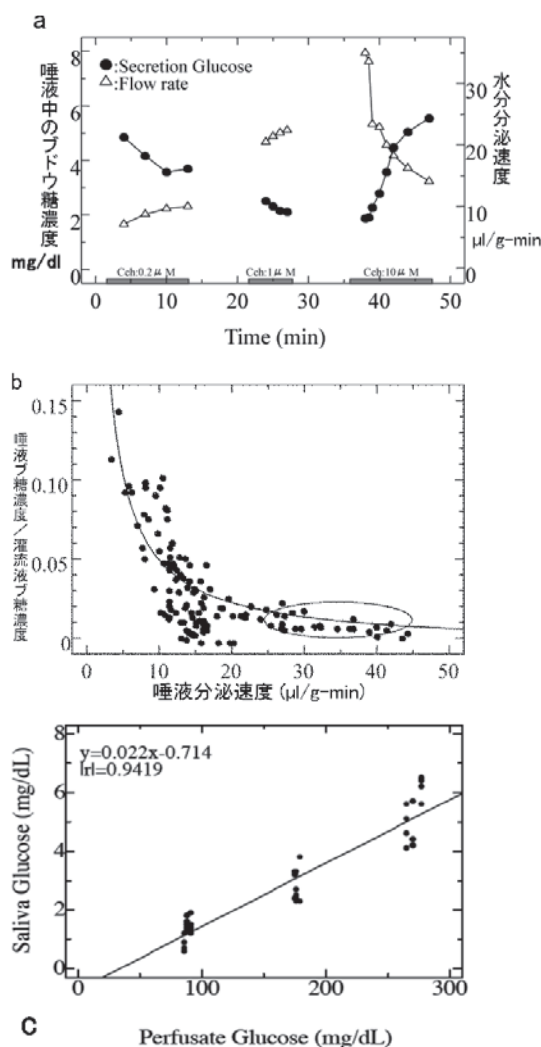


図 11. ラット灌流顎下腺を用いたブドウ糖分泌実験。灌流液のブドウ糖の濃度を一定 (180mg/dL) にしても、唾液分泌速度が変化すると唾液のブドウ糖濃度は変化する (a)。しかし、刺激の種類を変え、灌流液のブドウ糖濃度を変えた実験結果を集めて、ひとつのグラフにすると、唾液分泌速度に対して唾液糖濃度と灌流液等濃度の比は反比例の関係が得られる (b)。この事は唾液分泌速度が高い場合 (b 図の楕円で囲んだデータセット) では灌流液中の糖濃度と唾液の糖濃度が比例関係を示す。即ち、高分泌速度で得られた唾液成分濃度は血液中の濃度に比例し、唾液から血液中の溶質を推定できる (c)。

分泌を亢進する効果があるかないかを調べました [35]。その結果、唾液腺に直接分泌亢進効果があ

るものが 15 種類見つかりました。そしてこの 15 種類の亢進パターンを分類するとそれは古典的な漢方薬の 3 分類、養陰剤、補気剤、活血剤に対応しました。この分泌機構を調べる事により、漢方の考え方と西洋医学の客観的知識を重ね合わせて議論できる可能性ができました。現在 大学院生が活血剤のひとつ丹参 (サルビアの根) について、唾液分泌刺激の詳細を調べています。

5) これから、

これまで述べました唾液分泌のお話で、学生たちに強調したいのは、1) 知りたい問題を明確にする事、その問題の答はこれまでの報告に有れば問題は解決です。2) これまでの報告の間に矛盾はないか？測定されていない事はないか？本稿は唾液腺研究の輸送現象にしぼって書いてきましたが、北大故吉村先生と行った単離唾液腺細胞の細胞外 Ca にたいする amylase 分泌応答の実験等多くの共同研究に触れる事ができませんでした。また生理研技官の方々にも大変お世話になりました。この場を借りて深くお礼を申し上げたいと思います。

稿を終えるにあたり、おかげさまでこれまで唾液腺研究で人生をエンジョイする事ができました。多くの方々に謝辞を述べねばなりません。古今東西多くの方々の名前を列挙しますと紙面が無くなります。いかに多くの良き出会いがあったのかと感謝しています。そして、これからも楽しんで行きます。

文 献

1. Murakami M: Measurement of heat production in dog submandibular gland. *Jpn J Physiol* **29**: 491-507, 1979
2. Murakami M, Mori H, Nakahari T & Imai Y: Method and application of weight differentiating flowmeter. *Jpn J Physiol* **30**: 791-794, 1980
3. 村上政隆: イヌ顎下腺の分泌過程における熱産生と腺血流そして O_2 産生 CO_2 消費. *日本生理誌* **43**: 135-147, 1981
4. Murakami M, Imai Y, Seo Y, Morimoto T, Shiga K & Watari H: Phosphorus nuclear magnetic resonance of perfused salivary gland. *Biochim Biophys Acta* **762**: 19-24, 1983

5. Murakami M, Seo Y, Nakahari T, Mori H, Imai Y & Watari H: Effect of Na⁺ depletion on fluid secretion and levels of phosphorus compounds as measured by ³¹P-NMR in perfused canine mandibular gland. *Jpn J Physiol* **34**: 587-597, 1984
6. Murakami M, Seo Y & Watari H: Dissociation of fluid secretion and energy supply in rat mandibular gland by high dose of Ach. *Am J Physiol* **254**: G781-G787, 1987
7. Murakami M, Seo Y & Watari H: Effects of acetylcholine on salivary secretion and energy metabolism: measured by NMR spectroscopy. *Biomed Res* **8** Suppl: 83-90, 1987
8. Murakami M, Seo Y, Watari H, Matsumoto T & Kanno T: Redox state of cytochromes and oxygen consumption in the isolated perfused mandibular gland of the rat. *Biomed Res* **7** Suppl 2: 65-67, 1986
9. Mori H, Nakahari T & Imai Y: Intracellular K⁺ activity in canine submandibular gland cells in resting and its change during stimulation. *Jpn J Physiol* **34**: 1077-1088, 1984
10. Imai Y: Network thermodynamics: analysis and synthesis of membrane transport system. *Jpn J Physiol* **46**: 187-199, 1996
11. 今井雄介, 森 博彦, 村上政隆, 後藤 司: 灌流系細胞膜での保存的成分流束の測定. *膜* **6**: 61-67, 1981
12. Murakami M, Miyamoto S & Imai Y: Oxygen consumption for K⁺ uptake during post-stimulatory activation of Na⁺, K⁺-ATPase in perfused rat mandibular gland. *J Physiol* **426**: 127-142, 1990
13. Seo Y, Murakami M, Matsumoto T, Nishikawa H & Watari H: Application of aqueous shift reagent, DY (TTHA), for ²³Na NMR studies of exocrine glands. Viabilities of organs perfused with shift reagent. *J Magn Reson* **72**: 341-346, 1987
14. Seo Y, Murakami M, Matsumoto T, Nishikawa H & Watari H: Direct measurement of Na influx by ²³Na NMR during secretion with acetylcholine in perfused rat mandibular gland. *Pflügers Arch* **409**: 343-348, 1987
15. Murakami M, Seo Y, Steward MC & Watari H: Use of nuclear magnetic resonance spectroscopy in the study of exocrine secretion. In: *Epithelial Secretion of Water and Electrolytes*, Young JA & Wong PY, Eds. Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg, pp 97-128, 1990
16. Seo Y, Murakami M, Suzuki E & Watari H: A new method to discriminate intracellular and extracellular K by ³⁹K NMR without chemicalshift reagents. *J Magn Reson* **75**: 529-533, 1987
17. Murakami M, Suzuki E, Miyamoto S, Seo Y & Watari H: Direct measurement of K movement by ³⁹K NMR in perfused rat mandibular gland stimulated with acetylcholine. *Pflügers Arch* **414**: 385-392, 1989
18. Nakahari T, Murakami M, Sasaki Y, Kataoka T, Imai Y, Shiba Y & Kanno Y: Dose effects of acetylcholine on the cell volume of rat mandibular salivary acini. *Jpn J Physiol* **41**: 153-168, 1991
19. Nakahari T, Murakami M, Yoshida H, Miyamoto S, Sohma Y & Imai Y: Decrease in rat submandibular acinar cell volume during ACh stimulation. *Am J Physiol* **258**: G878-886, 1990
20. Foskett JK & Melvin JE: Activation of salivary secretion: coupling of cell volume and [Ca²⁺] in single cells. *Science* **244**: 1582-1585, 1989
21. Riva A, Valentino L, Lantini MS, Floris A & Testa-Riva F: 3D-structure of cells of human salivary glands as seen by SEM. *Microsc Res Techn* **26**: 5-20, 1993
22. Murakami M, Sugiyama H: Invitation to "Salivary Secretion" as a model for epithelial transport. 第71回日本生理学会予稿集, 香川医科大学, pp 51-54, 1994
23. Riva A & Tandler B: Proceedings of the symposium on salivary glands dedicated to Niels Stensen. *Eur J Morphol* **34**: 133, 1996
24. Riva A, Tandler B, Murakami M & Steward MC: Proceedings of the second symposium on salivary glands dedicated to Niels Stensen. *Eur J Morphol* **36** Suppl: 1998
25. <http://www.grc.org/conferences.aspx?id=0000372>
26. Murakami M, Shachar-Hill B, Steward MC & Hill AE: The paracellular component of water flow in the rat submandibular salivary gland. *J Physiol* **537**: 899-906, 2001
27. Segawa A, Yamashina S & Murakami M: Visualization of 'Water secretion' by confocal microscopy in rat salivary glands: possible distinction of para- and transcellular pathway. *Eur J Morphol* **40**: 241-246, 2002
28. Tsukita S & Furuse M: Pores in the wall: Claudins constitute tight junction strands containing aqueous pores. *J Cell Biol* **149**: 13-16, 2000
29. Nakamoto T, Shiba Y, Hirono C, Sugita M, Takemoto K, Iwasa Y & Akagawa Y: Carbachol-induced fluid movement through methazolamide-sensitive bicarbonate production in rat parotid interlobular ducts: quantitative analysis of fluorescence images using fluorescent dye sulforhodamine under a confocal laser scanning microscope. *Eur J Cell Biol* **81**: 497-504, 2002
30. In memoriam. *Eur J Morphol* **41** (2): 75-77, 79-81, 2003
31. Hashimoto S, Murakami M, Kanaseki T, Kobayashi S, Matsuki M, Shimono M & Segawa A: Morphological and functional changes in cell junctions during secretory stimulation in the perfused rat submandibular gland. *Eur J Morphol* **41**: 35-39, 2003
32. Hashimoto S & Murakami M: Morphological evidence of paracellular transport in perfused rat submandibular glands. *J Med Invest* **56**: 395-397, 2009

33. 村上政隆, 魏 飛, 成田貴則, 福島美和子, 橋本貞充, 渋谷義幸, 佐藤正樹: ラット顎下腺細胞間分泌細管の微細形態: 急速凍結固定割断試料の電顕観察と高速共焦点レーザー顕微鏡観察. 日本唾液腺学会誌 **54**: 20, 2013
34. 村上政隆, 篠塚直樹, 横山 徹, 中村健治, 岸本憲宜, 桜井 健, 杉谷博士, 古山俊介: 被侵襲血糖測定に関する基礎的検討 (第一報) ラット摘出灌流顎下腺による基礎的検討. 日本唾液腺学会誌 **45**: 53-54, 2004
35. Murakami M, Wei M, Ding W & Zhang Q: Effects of chinese herbs on salivary fluid secretion by isolated and perfused rat submandibular glands. World J Gastroenterol **15**: 3908-3915, 2009