

Title	ラット耳下腺腺房細胞におけるベンゾジアゼピン受容体を介したアミラーゼ分泌抑制機構
Author(s)	大久保, みぎわ; 川口, 充
Journal	歯科学報, 103(9): 741-749
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10130/772">http://hdl.handle.net/10130/772</a>
Right	

## 二次出版

## ラット耳下腺腺房細胞におけるベンゾジアゼピン 受容体を介したアミラーゼ分泌抑制機構

大久保 みぎわ 川 口 充

東京歯科大学口腔科学研究センター，薬理学講座

(2003年9月15日受付)

(2003年9月20日受理)

抄 録：本研究ではラット耳下腺腺房細胞からのアミラーゼ分泌におけるベンゾジアゼピン (BDZ) 類の影響について検討した。中枢型，末梢型両 BDZ 受容体アゴニストのジアゼパムはイソプレナリンおよびカルバコール刺激アミラーゼ分泌を用量依存性に減少させた。中枢型，末梢型 BDZ 受容体それぞれの選択的アゴニストであるクロナゼパムおよび，Ro 5 - 4864はイソプレナリン刺激アミラーゼ分泌を用量依存性に減少させた。抑制効力はジアゼパム，クロナゼパム，Ro 5 - 4864の順であった。中枢型，末梢型 BDZ 受容体それぞれのアンタゴニストであるフルマゼニルおよび，PK11195はジアゼパムによるイソプレナリン刺激アミラーゼ分泌抑制作用を用量依存性に遮断したが，その遮断効果は完全ではなかった。両方のアゴニストを併用するとジアゼパムの抑制効果は完全に遮断された。これらの結果から，BDZ 類はラット耳下腺において中枢型，末梢型両 BDZ 受容体を介して， アドレナリン受容体あるいはムスカリン受容体刺激によるアミラーゼ分泌を抑制することが示唆された。

キーワード：ベンゾジアゼピン，アミラーゼ分泌，ベンゾジアゼピン受容体，耳下腺腺房細胞

### 緒 言

ジアゼパム，クロナゼパムあるいはニトラゼパムなどの BDZ 類は中枢神経系において中枢型 BDZ 受容体を介し，催眠，抗不安および抗痙攣作用を発現する<sup>1)2)3)4)</sup>。一方，これらの薬物は副作用として口腔乾燥引き起こすことが知られている<sup>5)</sup>。

BDZ 受容体は GABA( $\gamma$ -アミノ酪酸)<sub>A</sub>受容体 / Cl<sup>-</sup>チャネル複合体と共役している中枢型および共役していない末梢型の 2 種類に分けることができる<sup>6)7)8)</sup>。末梢型 BDZ 受容体は腎臓，心臓，肺，膵臓あるいは副腎を含むいくつかの末梢組織

で報告されており<sup>9)10)11)</sup>，唾液腺においてもその局在がオートラジオグラフィーにより証明されている<sup>12)</sup>。また，受容体結合実験において末梢型および中枢型両方の BDZ 受容体が脳と同様に唾液腺に存在することが示唆された<sup>13)14)</sup>。さらに，ラットの唾液腺において GABA とその合成および代謝酵素の存在が証明された<sup>15)</sup>。これまでに我々は，ラットを用いた実験でピロカルピン刺激による唾液分泌を減少させること，ジアゼパムが耳下腺腺房細胞内に<sup>36</sup>Cl<sup>-</sup>流入を促進するが，流出を抑制することを報告した<sup>13)16)</sup>。さらに，これらの効果は GABA<sub>A</sub> 受容体アゴニストの GABA お

Reprint from "Inhibitory regulation of amylase release in rat parotid acinar cells by benzodiazepin receptors" by Migiwa Okubo and Mitsuru Kawaguchi in *European Journal of Pharmacology* 359 : 243 ~ 249, 1998 . Copyright 2003 with permission from Elsevier Ltd.

別刷請求先 〒261 8502 千葉県美浜区真砂1-2-2  
東京歯科大学薬理学講座 大久保みぎわ

よびムシモールにより増強し、GABA<sub>A</sub> 受容体およびBDZ受容体アンタゴニストにより抑制された。これらの結果はBDZ類が中枢神経系を抑制するだけでなく直接唾液腺に作用すること、BDZ受容体およびGABA受容体がBDZ類による口腔乾燥症に関与していることを示唆している。

唾液腺におけるアミラーゼは主に アドレナリン受容体刺激により細胞内cAMP系を介して分泌される。一方、水の分泌はムスカリンあるいはアドレナリン受容体刺激によりイノシトールリン酸系を介して引き起こされる<sup>17),18)</sup>。BDZ類は末梢組織においてドーパミンの分泌、グルコースによるインスリン分泌を抑制する<sup>19),20)</sup>。しかし、ラット耳下腺からのアミラーゼ分泌について機能的な役割は明確にされていない。そこで、本実験において アドレナリン受容体およびムスカリン受容体アゴニストによるアミラーゼ分泌にBDZ類が影響するか否かを、中枢型および末梢型BDZ受容体に特異的なアゴニスト、アンタゴニストを用い検索した。

### 材料および方法

#### 1. 動物

200 - 250 g のウィスター系雄性ラットを日本SLCより購入した。ラットは実験に先立ち管理された室内(温度 $23 \pm 2$  , 湿度 $55 \pm 5$  % , 照明6 : 00AM - 6 : 00PM)で、自由に食餌および飲水をさせ1週間飼育した。

#### 2. 試薬および溶液

イソプレナリン, カルバコ - ル, プロプラノロ - ル, HEPES( N - [ 2 - Hydroxyethyl ] piperazine - N ' - [ 2 - ethane - sulfonic acid ] ), 血清アルブミン( BSA ), ヒアルロニダ - ゼ( Type 1 - S ) は, Sigma( St. Louis, MO, USA )より購入した。コラゲナ - ゼ( CLSPA )は, Worthington( Freehold, NJ, USA )より購入した。ジアゼパム, アトロピンは和光純薬( 大阪 )より購入した。1 - ( 2 - chlorophenyl ) - N - methyl - N - ( 1 - methylpropyl ) - 3 - isoquinoline carboxamid( PK11195 ) , 7 - chloro - 1 , 3 - dihydro - 1 - methyl - 5 - ( p -

chlorophenyl ) - 2 H - 1 , 4 - benzodiazepine - 2 - one( Ro 5 - 4864 )は, RBK( Natick, MA, USA )より購入した。クロナゼパムは住友製薬( 大阪 )より譲渡されたものを使用した。フルマゼニルは山之内製薬( 東京 )より譲渡されたものを使用した。HBSS( Hanks balanced salt solution )およびDMEM( Dulbecco's Modified Eagle Medium )培地は, Gibco BRL( Grand island, NY, USA )より購入した。ジメチルスルホキシド( DMSO )はナカライテスク( 京都 )より購入した。その他の試薬は和光純薬( 大阪 )の特級試薬を使用した。BDZ類はDMSOに溶解して使用した。なお, DMSOが本実験系において影響ないことを確認した。

- アドレナリン受容体およびムスカリン受容体リガンドは再蒸留水にて溶解した。細胞消化液はコラゲナ - ゼ( 100U / ml ), ヒアルロニダ - ゼ( 0 . 75 mg / ml )およびBSA( 10mg / ml )をDMEM培地に添加し作製した。HBSS - HはHBSSにMgSO<sub>4</sub> 0 . 81mM, CaCl<sub>2</sub> 1 . 27mM およびHepes 30 . 0mM ( pH7 . 4 )を添加したものを使用した。

#### 3. 耳下腺腺房細胞の調製

Melvinらの方法<sup>21)</sup>に準じて耳下腺腺房細胞を調製した。耳下腺はラットをエーテル麻酔下で心臓を穿刺して脱血した後摘出した。さらに、脂肪組織、結合組織、リンパ組織を取り除いて消化液( 1匹あたり5 ml )中で細切した。細切した耳下腺は95%O<sub>2</sub> , 5%CO<sub>2</sub>下で1分間に100回振盪し37 °Cで1時間培養した。この間20分おきに通気( 95%O<sub>2</sub> , 5%CO<sub>2</sub> )と搅拌を行った。酵素で消化した後、耳下腺腺房細胞はBSA( 0 . 1ml / ml )を含むHBSS - Hで3回洗浄し、さらに37 °Cの同液中( 1匹あたり7 ml )で20分間培養した。耳下腺細胞はナイロンメッシュ( 105μm<sup>2</sup> )にて濾過し、新しいHBSS - H中に浮遊させた。細胞は90%以上が生存していることを確認した。また、この調製はラットの日内変動による誤差を防ぐため9 : 00AM から11 : 30AM の間に行った。

#### 4. アミラーゼ分泌実験

HBSS - Hに浮遊させた耳下腺腺房細胞はラット1匹あたり試験管7 ~ 8本になるように14ml

のポリエチレンチューブに1mlずつ分注した。腺房細胞はBDZ類あるいは対照となる溶液で5分間前処置した後、イソプレナリンあるいはカルバコールを適用し、O<sub>2</sub> 95% + CO<sub>2</sub> 5%ガス交換を行いながら、100回/分で振盪し、37℃で30分間培養した。培養後、真空ポンプにて吸引し、ワットマンGF/Cフィルタで細胞と濾液を分離した。

### 5. アミラーゼおよびDNAの測定

アミラーゼ分泌実験で得た濾液をアミラーゼの測定に用いた。対照として、無処置の耳下腺腺房細胞をホモジネートして、細胞内全アミラーゼ量を測定した。また、細胞数評価のためにフィルタに吸着させた細胞のDNA量を測定した。アミラーゼ量は、Bernfeldの方法<sup>22)</sup>を用いて、ジニトロサリチル酸により発色する530nmの波長に対する吸光度を測定した。DNA量は、ジフェニルアミン法<sup>23)</sup>により発色する600nmの波長に対する吸光度を測定した。分泌率は細胞内全アミラーゼ量に対する分泌されたアミラーゼ量の割合から求めた。また、BDZ類によるアミラーゼ分泌抑制実験の結果は、刺激薬での最大分泌率(Maximal release)に対するBDZ類を併用したときの分泌率の割合で示した。

### 6. 統計処理

測定値は平均値 ± 標準誤差(S. E.)で示した。2群間の比較にはStudentの*t*-検定を用いて、多群間の比較にはDunnettの検定を用いて解析し、危険率5%未満の場合を有意差ありとした。

## 結 果

### 1. アドレナリンおよびムスカリン受容体アゴニストによるアミラーゼ分泌

ラット耳下腺におけるイソプレナリンおよびカルバコールによるアミラーゼ分泌の用量反応曲線をFig. 1に示す。イソプレナリンは10<sup>-9</sup>Mから10<sup>-5</sup>Mの間で用量依存性にアミラーゼ分泌を促進した。同様にカルバコールは10<sup>-8</sup>Mから10<sup>-4</sup>Mの間で用量依存性にアミラーゼ分泌を促進した。イソプレナリンは10<sup>-5</sup>M、カルバコールは10<sup>-4</sup>Mで最大反

応が得られた。最大分泌はそれぞれ80.9%、51.5%であった。濃度が10<sup>-5</sup>Mのときアドレナリンアゴニストによるアミラーゼ分泌はムスカリンアゴニストによるアミラーゼ分泌の1.6倍であった。そこで、この後のアミラーゼ分泌実験には10<sup>-5</sup>Mの濃度のイソプレナリンおよびカルバコールを用いた。

### 2. アミラーゼ分泌に対するBDZ受容体アゴニストの効果

ジアゼパムは中枢型と末梢型両方のBDZ受容体に高い親和性を持つ。我々は最初にアミラーゼ分泌におけるジアゼパムの効果について実験を行った(Fig. 2)。ジアゼパムは濃度依存性にイソプレナリンおよびカルバコールによるアミラーゼ分泌を有意に減少した。最大の減少はジアゼパム

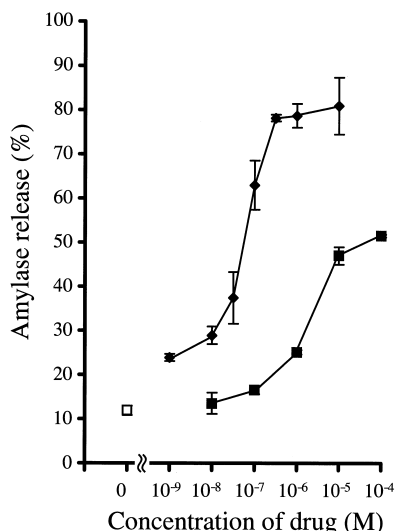


Fig. 1 ラット耳下腺におけるイソプレナリンおよびカルバコールにより誘発されるアミラーゼ分泌の用量反応曲線

ラット耳下腺腺房細胞は上記の濃度のイソプレナリン(○)およびカルバコール(□)を適用し30分間インキュベートした。分泌されたアミラーゼを細胞内の全アミラーゼ活性に対する百分率で表した。コントロール(□)で示した。コントロールのアミラーゼ活性および全アミラーゼ活性はそれぞれ、0.35 ± 0.01mg maltose / μg DNA, 3.27 ± 0.03mg maltose / μg DNAであった。測定値は3から7例の平均値 ± 標準誤差(S. E. M.)で示した。

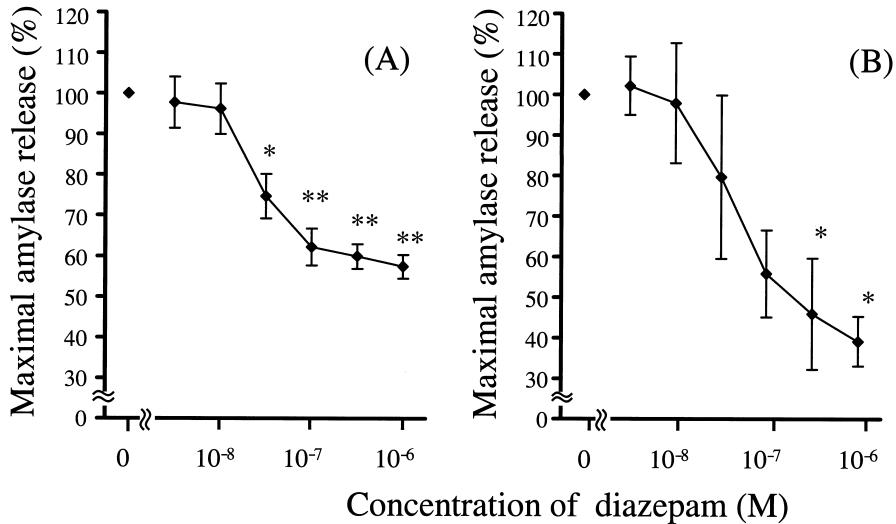


Fig. 2 ラット耳下腺におけるイソプレナリン(A)およびカルバコール(B)により誘発されるアミラーゼ分泌に対するジアゼパムの効果

ラット耳下腺腺房細胞は上記の濃度のジアゼパムで5分間前処置した後、イソプレナリン( $10^{-5}$ M)およびカルバコール( $10^{-5}$ M)を適用し30分間インキュベートした。分泌されたアミラーゼはイソプレナリンあるいはカルバコール単独適用時のアミラーゼ分泌に対する百分率で表した。イソプレナリンあるいはカルバコール単独適用時のアミラーゼ活性はそれぞれ $3.86 \pm 0.51$ mg maltose /  $\mu$ g DNA,  $2.46 \pm 0.42$ mg maltose /  $\mu$ g DNAであった。また、細胞内全アミラーゼ活性は $4.87 \pm 0.39$ mg maltose / mg DNAであった。測定値は3から5例の平均値 $\pm$ 標準誤差(S. E. M)で示した。\*, \*\*はそれぞれ危険率が5%未満, 1%未満でイソプレナリンあるいはカルバコール単独群に対して有意差が認められた。

が $10^{-6}$ Mの時に得られ、イソプレナリンおよびカルバコールによるアミラーゼ分泌をそれぞれ57.4%あるいは39.2%に減少した。データを示していないが、ジアゼパム単独での処置ではアミラーゼ分泌に明確な変化は認められなかった。我々はその他のBDZ受容体アゴニストの効果について調べ、ジアゼパムと比較した(Fig. 3)。ジアゼパムと同様の実験で、選択的中枢型アゴニストのクロナゼパム、選択的末梢型アゴニストのRo 5 - 4864はイソプレナリンにより増加するアミラーゼ分泌を用量依存性に減少した。 $10^{-6}$ MのクロナゼパムおよびRo 5 - 4864はイソプレナリン単独適用時のそれぞれ63.2%, 74.8%にアミラーゼ分泌を減少させた。アミラーゼ分泌における抑制の効力はジアゼパム, クロナゼパム, Ro 5 - 4864順であった。

3. アミラーゼ分泌に対する アドレナリン受容体およびムスカリン受容体アンタゴニストの効果  
BDZ類とは異なり、アドレナリン受容体アンタゴニストのプロプラノロールおよびムスカリン受容体アンタゴニストのアトロピンはそれぞれイソプレナリンおよびカルバコールによるアミラーゼ分泌を完全に抑制した(Fig. 4)。

4. アミラーゼ分泌に対するBDZ受容体アンタゴニストの効果

この抑制性の反応におけるBDZ受容体の特異的な関与を明らかにするために、我々はジアゼパム( $10^{-6}$ M)により抑制されたイソプレナリン刺激アミラーゼ分泌に対する、中枢型BDZ受容体アンタゴニストであるフルマゼニルと末梢型BDZ受容体アンタゴニストであるPK11195の回復効果を調べた(Fig. 5)。ジアゼパムにより57.4%に

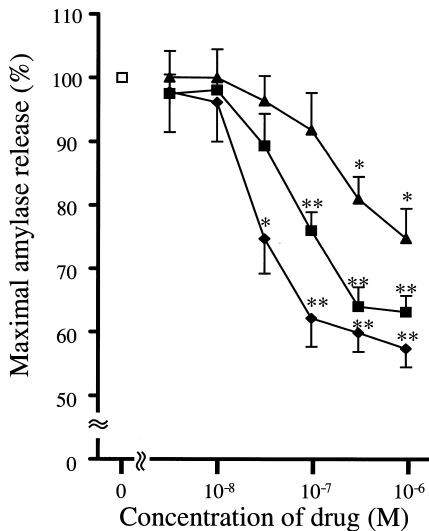


Fig. 3 ラット耳下腺におけるイソプレナリンにより誘発されるアミラーゼ分泌に対するベンゾジアゼピン受容体アゴニストの効果

ラット耳下腺腺房細胞は上記の濃度のジアゼパム( ), クロナゼパム( ), Ro5 - 4864( ) で5分間前処置した後、イソプレナリン(10<sup>-5</sup> M)を適用し30分間インキュベートした。分泌されたアミラーゼはイソプレナリン単独適用時のアミラーゼ分泌( )に対する百分率で表した。測定値は4から6例の平均値±標準誤差(S. E. M)で示した。\*, \*\*はそれぞれ危険率が5%未満, 1%未満でイソプレナリン単独群に対して有意差が認められた。

抑制されたイソプレナリン刺激のアミラ - ゼ分泌は,フルマゼニル(10<sup>-5</sup> M)およびPK11195(10<sup>-5</sup> M)によりそれぞれ最大77.0%および74.4%まで回復した。この2つのアンタゴニストを単独適用してもジアゼパムの作用を完全に遮断することができなかった。しかし, PK11195(10<sup>-5</sup> M)とフルマゼニル(10<sup>-5</sup> M)を併用した時,ジアゼパムによるイソプレナリン刺激のアミラーゼ分泌抑制作用を完全に遮断した(Fig. 5, Table 1)。クロナゼパム(10<sup>-6</sup> M)により63.2%まで抑制されたイソプレナリン刺激アミラ - ゼ分泌は,フルマゼニル(10<sup>-6</sup> M ~ 10<sup>-5</sup> M)により用量依存性に回復させた。この回復効果は, 10<sup>-5</sup> Mのフルマゼニルを用いた時アミラーゼ分泌は最大95.6%となり, ほぼ完全にクロナゼパ

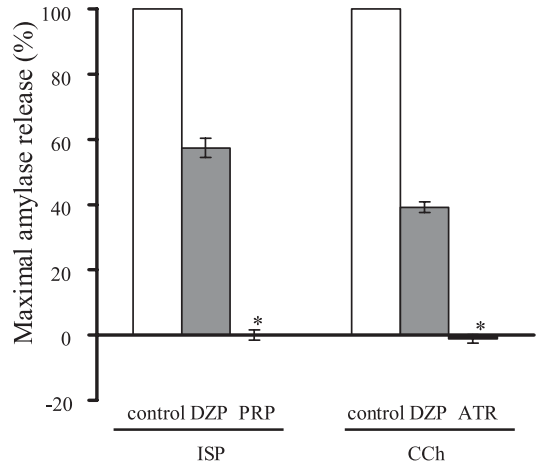


Fig. 4 ラット耳下腺におけるイソプレナリンおよびカルバコール誘発性アミラーゼ分泌に対する - アドレナリンレセプターアゴニストおよびムスカリン受容体アゴニストの効果

ラット耳下腺腺房細胞はプロプラノロール( PRP; 10<sup>-4</sup> M)あるいはアトロピン( ATR; 10<sup>-5</sup> M)で5分間前処置した後、イソプレナリン( ISP; 10<sup>-5</sup> M)あるいはカルバコール( CCh; 10<sup>-5</sup> M)を適用し30分間インキュベートした。分泌されたアミラーゼは ISP あるいは CCh 単独適用時のアミラーゼ分泌に対する百分率で表した。ジアゼパム( DZP; 10<sup>-6</sup> M)は Fig. 2 のデータを使用した。測定値は3から6例の平均値±標準誤差(S. E. M)で示した。\*は危険率が5%未満で, ジアゼパム前処置群に対して有意差が認められた。

ムのアミラーゼ分泌抑制作用を遮断した。一方, PK11195はクロナゼパムによるイソプレナリン刺激アミラ - ゼ分泌抑制作用に影響をおよぼさなかった( Table 1 )。10<sup>-6</sup> Mの Ro5 - 4864( 10<sup>-6</sup> M)により74.8%に減少したイソプレナリン刺激アミラ - ゼ分泌抑制作用は, PK11195により用量依存性に回復した。この回復効果は, PK11195( 10<sup>-5</sup> M)を用いた時, ほぼ完全に Ro5 - 4864のアミラ - ゼ分泌抑制作用を遮断した。一方, フルマゼニルは Ro5 - 4864によるイソプレナリン刺激アミラ - ゼ分泌抑制作用に影響をおよぼさなかった( Table 1 )。

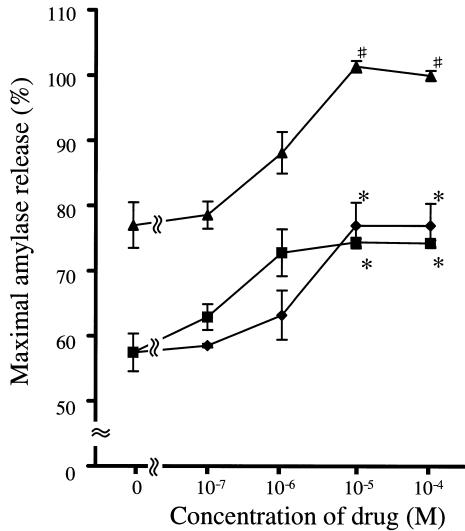


Fig. 5. ラット耳下腺におけるジアゼパムによるイソプレナリン誘発性アミラーゼ分泌抑制に対するベンゾジアゼピン受容体アンタゴニストの効果

ラット耳下腺腺房細胞はジアゼパム( $10^{-6}$ M)とフルマゼニル( ), PK11195( ),あるいはフルマゼニル( $10^{-5}$ M)とPK11195( )を併用し, 5分間前処置した後, イソプレナリン( $10^{-5}$ M)を適用し30分間インキュベートした。分泌されたアミラーゼはイソプレナリン単独適用時のアミラーゼ分泌に対する百分率で表した。測定値は3から6例の平均値±標準誤差(S. E. M)で示した。\*, # はそれぞれジアゼパム処置群およびジアゼパムとフルマゼニル( $10^{-5}$ M)併用群に対して危険率が1%未満で有意差が認められた。

## 考 察

本実験の結果からBDZ類が アドレナリン受容体あるいはムスカリン受容体刺激によるラット耳下腺からのアミラーゼ分泌を抑制すること, この抑制反応に耳下腺細胞膜のBDZ受容体が関与していることが明らかとなった。

細胞内cAMP伝達系を介した耳下腺細胞からのアミラーゼ分泌は, 主に アドレナリン受容体刺激により引き起こされる。イノシトールリン酸系を介した水分分泌が主体のM<sub>3</sub>ムスカリン受容体や<sub>1</sub>アドレナリン受容体により少量のアミラーゼが分泌される<sup>17),18)</sup>。この実験で我々は, これら

両方のアミラーゼ分泌反応について検討した。低濃度( $<10^{-8}$ M)において, イソプレナリンは有意にアミラーゼ分泌を促進したのに対してカルバコールは分泌を促進しなかった。また, 刺激反応はカルバコールよりもイソプレナリンが強かった。これらの結果は他の研究者による報告と一致した<sup>24),25)</sup>。

中枢型と末梢型のBDZ受容体は心臓, 膵臓, 副腎などの末梢組織で存在が明らかとなっている<sup>9),10),11)</sup>。中枢型BDZ受容体は原形質膜に局在する。末梢型BDZ受容体はミトコンドリア外膜に局在することが知られているが, 原形質膜を含むミトコンドリア以外の膜において, その存在の可能性が示唆されている<sup>10),26),27),28)</sup>。唾液腺において, 中枢型と末梢型両方のBDZ受容体が耳下腺の粗細胞膜画分に存在することが山岸らにより明らかとなった<sup>13),14)</sup>。外分泌腺における末梢型BDZ受容体の細胞内局在の詳細については明らかとなっていないが, 両方のタイプのBDZ受容体と同じ細胞膜上に存在する可能性がある。中枢型のBDZ類は中枢型BDZ受容体を介し, 催眠, 抗不安および抗痙攣作用を発現する。末梢型BDZ類による直接的あるいは間接的で他の物質を調節するような反応が種々の生体機構において報告されている<sup>29)</sup>。ステロイド産生および心臓あるいは腎臓のミトコンドリアからのCa<sup>2+</sup>流出において, ミトコンドリアBDZ受容体の生理学的役割が明らかとなった<sup>30),31)</sup>。他のいくつかの末梢組織における非ミトコンドリアBDZ受容体を介した反応の詳細な役割は明らかにされていない<sup>28)</sup>。

Fig. 2および3で示すように, 中枢型, 末梢型BDZ受容体のアゴニストはイソプレナリンおよびカルバコールによるアミラーゼ分泌を用量依存性に減少した。最大分泌量に対するジアゼパムの抑制効果を比較したとき, イソプレナリン刺激時の抑制率が43%であったのに対し, カルバコール刺激時の抑制率は61%と高かった(Fig. 2)。しかし, アミラーゼ活性値で示すと, それぞれ1.64mg maltose/μg DNA, 1.50mg maltose/μg DNAとほぼ同じ値であった。この結果はジアゼパムが

Table 1 ラット耳下腺における Ro 5 - 4864およびクロナゼパムによるイソプレナリン誘発性ミラーゼ分泌抑制に対するベンゾジアゼピン受容体アンタゴニストの効果

Drugs	maximal amylase release( % )
Ro 5 - 4864( $10^{-6}$ M )	74.8 ± 4.7
+ PK11195( $10^{-5}$ M )	98.5 ± 3.3 <sup>a</sup>
+ flumazeni( $10^{-5}$ M )	76.1 ± 10.0
clonazepam( $10^{-6}$ M )	63.3 ± 2.5
+ PK11195( $10^{-5}$ M )	57.1 ± 3.8
+ flumazeni( $10^{-5}$ M )	95.6 ± 1.6 <sup>b</sup>
diazepam( $10^{-6}$ M )	57.4 ± 2.9
+ PK11195 ( $10^{-5}$ M )	74.3 ± 0.6 <sup>b</sup>
+ flumazeni( $10^{-5}$ M )	77.0 ± 3.5 <sup>b</sup>
+ PK11195( $10^{-5}$ M )+ flumazeni( $10^{-5}$ M )	101.4 ± 0.9 <sup>b</sup>

ラット耳下腺腺房細胞はジアゼパム( diazepam ), クロナゼパム( clonazepam ), Ro 5 - 4864, フルマゼニル( flumazenil ), および PK11195で5分間前処置した後, イソプレナリン(  $10^{-5}$ M )を適用し30分間インキュベートした。分泌されたアミラーゼはイソプレナリン単独適用時のアミラーゼ分泌に対する百分率で表した。ジアゼパムのデータは Fig. 5 を使用した。測定値は3から7例の平均値 ± 標準誤差( S. E. M )で示した。a, b はそれぞれ危険率が5%未満, 1%未満で各ベンゾジアゼピン受容体アゴニスト前処置群に対して有意差が認められた。

イソプレナリンあるいはカルバコールによるアミラーゼ分泌に対して同様の抑制効果を有することを示している。3つのBDZ受容体アゴニストは最大効果を示す濃度でイソプレナリンあるいはカルバコールによるアミラーゼ分泌を完全に抑制することはできなかった。一方, アドレナリン受容体アンタゴニストのプロプラノロール, ムスカリン受容体のアンタゴニストのアトロピンはそれぞれの刺激のアミラーゼ分泌を完全に抑制した( Fig. 4 )。

これらの結果は, アミラーゼ分泌に対するBDZ類の抑制効果が アドレナリンおよびムスカリン受容体を介したのではなく, 中枢型および末梢型BDZ受容体を介していることを強く示唆している。アミラーゼ分泌抑制作用における, ジアゼパム, クロナゼパムおよび, Ro 5 - 4864の50%反応量はそれぞれ  $2.5 \times 10^{-8}$ M,  $5.8 \times 10^{-8}$ M,  $1.3 \times 10^{-7}$ Mであった( Fig. 3 )。ジアゼパムおよびクロナゼパムは, 耳下腺における中枢型BDZ受容体へのそれぞれの結合親和性である  $18 \times 10^{-8}$ M,  $1.86 \times 10^{-8}$ M と近似した濃度でアミラーゼ分泌を抑制した<sup>14)</sup>。アミラーゼ分泌に対する Ro 5 - 4864

の50%抑制量は  $K_i$  値の300倍と高かった<sup>14)</sup>。しかし, これらの薬剤の機能的な濃度が受容体と結合する濃度と異なることはまれではない<sup>1)</sup>。ジアゼパムの抑制効果はおそらく, 中枢型, 末梢型両方のBDZ受容体との結合により引き起こされる。クロナゼパムは相対的に中枢型BDZ受容体に特異的であり, 一方, Ro 5 - 4864は相対的に末梢型BDZ受容体に特異的である。Fig. 3で示した結果は, 耳下腺BDZ受容体の両方のタイプがこれらの抑制反応に関与していることを示唆している。

Ro 5 - 4864およびPK11195はそれぞれ末梢型BDZ受容体のアゴニスト, アンタゴニストであると最初に報告された<sup>32)</sup>。しかし, 他の研究においてPK11195がRo 5 - 4864と同様にアゴニストとしての効果を持つことが示されている<sup>33)34)</sup>。今回はPK11195の反応について明らかにしていない。我々が示唆したアミラーゼ分泌におけるBDZ受容体の役割は, 以下に示すBDZ受容体アンタゴニストを用いた実験の結果からさらに明確になった。①中枢型アンタゴニストのフルマゼニル, 末梢型アンタゴニストのPK11195はジアゼ



パムによるイソプレナリン刺激アミラーゼ分泌の減少を74 - 77%に回復した。②減少したアミラーゼ分泌はフルマゼニルとPK11195の併用により完全に回復した。③高濃度 ( $> 10^{-5}M$ )においてフルマゼニルはPK11195より高い回復効果を示した。④フルマゼニルはクロナゼパムの反応を遮断したがRo 5 - 4864の反応を遮断しなかった。⑤PK11195はRo 5 - 4864の反応を遮断したがクロナゼパムの反応を遮断しなかった。

我々は今までに、*in vivo* および *in vitro* の実験で、ジアゼパムがラットの唾液分泌を抑制すること、水分分泌の引き金となる $^{36}Cl^{-}$ の輸送を変化させることを明らかにした<sup>(13),16)</sup>。これらの反応はBDZ受容体アンタゴニストに抑制された。この結果は中枢型および末梢型BDZ受容体を介して唾液分泌を調節する抑制性メカニズムが唾液腺に存在することを示唆している。この仮説を今回の実験の結果は支持している。BDZ類によるアミラーゼ分泌抑制の詳細なメカニズムについては明らかではない。考えられるメカニズムとして以下のことが挙げられる。①中枢型BDZ受容体と共役したGABA<sub>A</sub>受容体を介したCl<sup>-</sup>流入がアミラーゼ分泌に関与するアデニル酸シクラーゼ、GTP結合タンパク(Gタンパク)、細胞内Ca<sup>2+</sup>濃度およびプロテインキナーゼA(PKA)などの細胞内伝達系へ影響する<sup>(35),36)</sup>。②細胞内cAMP濃度増加に関連するBDZ受容体の構造変化がおこる<sup>(37)</sup>。③BDZ類により誘発されるクラスリン被覆小胞やアネキシンの相互作用が外分泌機構に影響する<sup>(38),39)</sup>。今後の研究でこれらのメカニズムを解明する必要がある。

#### 謝 辞

この研究に試薬を提供していただきました Hoffman - La Roche, 山之内製薬, 住友製薬に深謝いたします。この研究は東京歯科大学口腔科学研究センター研究費(961B05)の補助を受けた。

#### 参 考 文 献

- 1) Möhler, H., Okada, T. : Benzodiazepine receptor : demonstration in the central nervous system. *Science* 198 : 849 ~ 851, 1977 .
- 2) Skolnick, P., Paul, S.M. : 1982. Benzodiazepine receptors in the central nervous system. *Int. Rev. Neurobiol.* 23 : 103 ~ 140, 1982 .
- 3) Greenblatt, D. J., Shader, R. I., Abernethy, D. R. : 1983. Drug therapy. Current status of benzodiazepines. *New Engl. J. Med.* 309 : 410 ~ 416, 1983 .
- 4) Bormann, J. : Electrophysiology of GABA<sub>A</sub> and GABA<sub>B</sub> receptor subtypes. *Trends Neurosci.* 11 : 112 ~ 116, 1988 .
- 5) Sreebny, L. M., Schwartz, S. S. : A reference guide to drugs and dry mouth. *Gerodontology* 5 : 75 ~ 99, 1986 .
- 6) Braestrup, C., Squires, R.F. : Specific benzodiazepine receptors in rat brain characterized by high - affinity [<sup>3</sup>H] diazepam binding. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74 : 3805 ~ 3809, 1977 .
- 7) Schoemaker, H., Boles, R.G., Horst, D., Yamamura, H.I. : Specific high - affinity binding sites for [<sup>3</sup>H] Ro 5 - 4864 in rat brain and kidney. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 225 : 61 ~ 69, 1983 .
- 8) Rampe, D., Triggle, D.J. : Benzodiazepines and calcium channel function. *Trends Pharmacol. Sci.* 7 : 461 ~ 464, 1986 .
- 9) Davies, L. P., Huston, V. : Peripheral benzodiazepine binding sites in heart and their interaction with dipyridamole. *Eur. J. Pharmacol.* 73 : 209 ~ 211, 1981 .
- 10) Anholt, R. R. H., Pedersen, P. L., De Souza, E. B., Snyder, S. H. : The peripheral - type benzodiazepine receptor : localization to the mitochondrial outer membrane. *J. Biol. Chem.* 261 : 576 ~ 583, 1986 .
- 11) Giusti, L., Trincavelli, L., Martini, C., Lucachini, A. : Characterization of peripheral - type benzodiazepine binding sites from rat and pig pancreas. *Biochem. Pharmacol.* 48 : 583 ~ 586, 1994 .
- 12) De Souza, E. B., Anholt, R. R. H., Murphy, K. M. M., Snyder, S. H., Kuhar, M. J. : Peripheral - type benzodiazepine receptors in endocrine organs : Autoradiographic localization in rat pituitary, adrenal and testis. *Endocrinology* 116 : 567 ~ 573, 1985 .
- 13) Kawaguchi, M., Yamagishi, H. : Coupling of benzodiazepine and GABA(A) receptors in the salivary glands is a factor of drug - induced xerostomia. *Int. Acad. Biomed. Drug Res.* 11 : 291 ~ 296, 1996 .
- 14) Yamagishi, H., Kawaguchi, M. : Characterization of central - and peripheral - type benzodiazepine receptors in rat salivary glands. *Biochem. Pharmacol.* 55 : 209 ~ 214, 1998 .
- 15) Sawaki, K., Ouchi, K., Sato, T., Kawaguchi, M. :

- Existence of gamma - aminobutyric acid and its biosynthetic and metabolic enzymes in rat salivary glands. *Jpn. J. Pharmacol.* 67 : 359 ~ 363 , 1995 .
- 16 ) Kawaguchi, M., Ouchi, K., Ohse, S., Baba, Y. : *In vivo* and *in vitro* studies on receptive mechanisms for benzodiazepines in rat parotid gland. *Dentistry in Japan* 32 : 38 ~ 40 . 1995 .
- 17 ) Butcher, F. R., Putney, J. W., Jr. : Regulation of parotid gland function by cyclic nucleotides and calcium. *Adv. Cyclic Nucleotide Res.* 13 : 215 ~ 249 , 1980 .
- 18 ) Baum, B. J. : Neurotransmitter control of secretion. *J. Dent. Res.* 66 : 628 ~ 632 , 1987 .
- 19 ) Ohara - Imaizumi, M., Nakazawa, K., Obana, T., Fujimori, K., Takanaka, A., Inoue, K. : Inhibitory action of peripheral - type benzodiazepines on dopamine release from PC 12 pheochromocytoma cells. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 259 : 484 ~ 489 , 1991 .
- 20 ) Petit, P., Manteghetti, M., Berdeu, D., Ribes, G., Loubatieres - Mariani, M. - M. : Effects of a peripheral - type benzodiazepine on glucose - induced insulin secretion. *Eur. J. Pharmacol.* 221 : 359 ~ 363 , 1992 .
- 21 ) Melvin, J. E., Kawaguchi, M., Baum, B. J., 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 .
- 22 ) Bernfeld, P. : Amylase  $\alpha$  and  $\beta$ . *Methods Enzymol.* 1 : 149 ~ 158 , 1955 .
- 23 ) Richards, G. M. : Modifications of the diphenylamine reaction giving increased sensitivity and simplicity in the estimation of DNA. *Anal. Biochem.* 57 : 369 ~ 376 , 1974 .
- 24 ) Pohto, P. : Effect of isoprenaline, pilocarpine and prenylamine on amylase secretion in rat parotid saliva. *J. Oral Ther.* 4 : 467 ~ 474 , 1968 .
- 25 ) Kanagasuntheram, P., Randle, P. J. : Calcium metabolism and amylase release in rat parotid acinar cells. *Biochem. J.* 160 : 547 ~ 564 , 1976 .
- 26 ) Olson, J. M. M., Ciliax, B. J., Mancini, W. R., Young, A. B. : Presence of peripheral - type benzodiazepine binding sites on human erythrocyte membranes. *Eur. J. Pharmacol.* 152 : 47 ~ 53 , 1988 .
- 27 ) O Beirne, G. B., Woods, M. J., Williams, D. C. : Two subcellular localizations for peripheral - type benzodiazepine acceptors in rat liver. *Eur. J. Biochem.* 188 : 131 ~ 138 , 1990 .
- 28 ) Woods, M. J., Williams, D. C. : Multiple forms and locations for the peripheral - type benzodiazepine receptor. *Biochem. Pharmacol.* 52 : 1805 ~ 1814 , 1996 .
- 29 ) Verma, A., Snyder, S. H. : Peripheral type benzodiazepine receptors. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 29 : 307 ~ 322 , 1989 .
- 30 ) Moreno - Sanchez, R., Bravo, C., Gutierrez, J., Newman, A.H., Chiang, P.K. : Release of  $Ca^{2+}$  from heart and kidney mitochondria by peripheral - type benzodiazepine receptor ligands. *Int. J. Biochem.* 23 : 207 ~ 213 , 1991 .
- 31 ) Krueger, K. E., Papadopoulos, V. : The role of mitochondrial benzodiazepine receptors in steroidogenesis. In : Giesen - Crouse, E (Ed.) *Peripheral Benzodiazepine Receptors*. Academic Press Limited, London, pp.89 ~ 109 , 1993 .
- 32 ) Gavish, M., Katz, Y., Bar - Ami, S., Weizman, R. : Biochemical, physiological, and pathological aspects of the peripheral benzodiazepine receptor. *J. Neurochem.* 58 : 1589 ~ 1601 , 1992 .
- 33 ) Grupp, I. L., French, J. F., Matlib, M. A. : Benzodiazepine Ro 5 - 4864 increases coronary flow. *Eur. J. Pharmacol.* 143 : 143 ~ 147 , 1987 .
- 34 ) Barnea, E. R., Fares, F., Gavish, M. : Modulatory action of benzodiazepines on human term placental steroidogenesis *in vitro*. *Mol. Cell. Endocrinol.* 64 : 155 ~ 159 , 1989 .
- 35 ) Deterre, P., Gozlan, H., Bockaert, J. : GTP - dependent anion - sensitive adenylate cyclase in snail ganglia potentiation of neurotransmitter effects. *J. Biol. Chem.* 258 : 1467 ~ 1473 , 1983 .
- 36 ) Higashijima, T., Ferguson, K. M., Sternweis, P. C. : Regulation of hormone - sensitive GTP - dependent regulatory proteins by chloride. *J. Biol. Chem.* 262 : 3597 ~ 3602 , 1987 .
- 37 ) Boujrad, N., Vidic, B., Papadopoulos, V. : Acute action choriogonadotropin on leydig tumor cells : Changes in the topography of the mitochondrial peripheral - type benzodiazepine receptor. *Endocrinology.* 137 : 5727 ~ 5730 , 1996 .
- 38 ) Tehrani, M. H. J., Baumgartner, B. J., Barnes, E. M. Jr. : Clathrin - coated vesicles from bovine brain contain uncoupled GABA<sub>A</sub> receptors. *Brain Res.* 776 : 195 ~ 203 , 1997 .
- 39 ) Hofmann, A., Escherich, A., Lewit - Bentley, A., Benz, J., Raguene - Nicol, C., Russo - Marie, F., Gerke, V., Moroder, L., Huber, R. : Interactions of benzodiazepine derivatives with Annexins. *J. Biol. Chem.* 273 : 2885 ~ 2894 , 1998 .