

マウスにおける carbachol の二相性唾液分泌反応の薬理的解析

陳 慶 勲

岩手医科大学歯学部薬理学講座 (主任: 伊藤忠信教授)

[受付: 1986年9月11日]

抄録: マウスにおける carbachol の二相性唾液分泌増大作用の機序について検討した。唾液分泌量の測定は Richter の方法を改良して行った。Carbachol(1.6mg/kg) による唾液分泌増大作用は投与後60分までを A 相とし, 60~240分までを B 相とした。Atropine(1mg/kg), phentolamine(10mg/kg), reserpine(4mg/kg) および副腎摘出の前処置により A, B 両相とも抑制された。その抑制の程度は, atropine においては A, B 両相とも大で, phentolamine, reserpine および副腎摘出においては A 相よりも B 相の方が大であった。Propranolol(10mg/kg) の前処置では B 相は軽度抑制された。一方, hexamethonium(20mg/kg) の前処置では, A, B 両相には影響はみられなかった。なお, nicotine(4mg/kg) は carbachol と同様にマウスの二相性唾液分泌増大作用を引き起した。以上のことから, carbachol の二相性唾液分泌反応の A 相は, 主に carbachol のムスカリン様作用により発現し, B 相は主に carbachol のニコチン様作用により発現したものと考えられる。

Key words: carbachol, biphasic salivation, muscarinic action, nicotinic action, mouse.

緒 言

Carbachol, pilocarpine, bethanechol は副交感神経興奮薬に属し, いずれも強力な唾液分泌増大作用を示すことは広く知られている事実である^{1,2)}。先に著者ら³⁾は, carbachol, pilocarpine, bethanechol のマウス唾液腺に対する影響を検討し, pilocarpine や bethanechol による唾液分泌増大作用が, 一相性反応であるのに対して, carbachol の作用は 2 つのピークを持つ二相性反応であることを明らかにした。しかしながら, carbachol の唾液分泌増大作用が, 二相性であるとする知見は, 著者らを除いては現在まで, 他に報告はなく, その作用機序も不明である。そこで, 著者はこの carbachol の二相性唾液分泌増大作用の作用機序を薬理学

的に解明するために, 本実験を行った。

実験材料および方法

実験には ddY 系雄性マウス(体重25~30g)を使用した。マウスには実験直前まで水と飼料を自由に摂取させた。本実験には以下の薬物を使用した。すなわち, carbamylcholine chloride (カルバコール, SIGMA), atropine sulfate(硫酸アトロピン注射液, 田辺製薬), phentolamine (レギチーン注射液, 日本チバガイギー), propranolol hydrochloride (インデラル注射液, 住友化工), hexamethonium bromide (メトロミン注射液, 山之内製薬), reserpine (アポロン注射液, 第一製薬), nicotine tartrate (酒石酸ニコチン, 和光純薬工業), urethane (ウレタン, 関東化学) である。副交感神経遮断薬の

Pharmacological study on carbachol-induced biphasic salivation in mice.

Ching-Hsun CHEN.

(Department of Pharmacology, School of Dentistry, Iwate Medical University, Morioka, 020)

盛岡市中央通 1-3-27 (〒020)

Dent. J. Iwate Med. Univ. 11: 195-201, 1986

atropine (1 mg/kg) の前処置は carbachol 投与10分前, あるいは50分後に; 交感神経 α ブロッカーの phentolamine (10mg/kg), β ブロッカーの propranolol (5 or 10mg/kg) および神経節遮断薬の hexamethonium (20mg/kg) の前処置は carbachol 投与30分前, あるいは50分後に行った。Reserpine 前処置実験においては, reserpine を朝・夕一回 (2 mg/kg) ずつ投与し, 最終投与の16時間後に carbachol を投与した。以上の薬物の投与はすべて皮下注射で行った。マウスの両側副腎摘出は nembutal (35mg/kg, i.p.) 麻酔下で, 常法に従い背部より行った。また, 対照群は, sham operation を同様の条件下で行った。副腎摘出マウスは0.9%食塩水で飼育し, 術後14日目に実験に使用した。

唾液分泌量の測定: 測定は Richter の方法⁴⁾ を改良⁵⁾ して行った。すなわち, マウスを urethane (0.5~1.0g/kg, i.p.) で麻酔したのち, 濾紙 (TOYO, No. 2) の上に腹位にして教室で試作した特製固定アクリル板上に四肢と頭部をテープで固定した。唾液分泌量の測定は, carbachol 投与後10分毎に新しい濾紙面上に移動し, 240分まで測定した。そのつど, 唾液によって濡れて生じた spot を鉛筆でマークし, 得られた spot 面積を唾液分泌量とした。面積の計測は画像解析装置 (AMOI 型, Kontron 社) にて行った。唾液分泌反応は, 10分間当りの唾液分泌量を分泌速度とし, carbachol 投与後60分間 (A相) と投与後60~240分間 (B相) の唾液分泌量の合計をそれぞれの相の全唾液量とした。実験は室温 $25 \pm 1^\circ\text{C}$, 湿度50~60% の恒温恒湿室で行い, 得られた結果の有意性は student の t 検定により判定した。なお, すべての測定群において, マウスの使用は一回限りとした。

結 果

1. Carbachol による唾液分泌増大作用

Carbachol (0.4, 0.8, 1.6, 3.2mg/kg, s.c.) 投与後, マウスは数分以内に唾液分泌を増大させた。この場合の分泌速度はいずれの投与量でも

最初の10分間でピークに達し, 次の10分間で急激に低下し, その後, 横ばいもしくは緩やかな低下を示した。しかし, 0.8mg/kg 以上の投与量では, 投与60分前後から分泌速度は再び緩やかに上昇した。この二度目の上昇は投与直後に発現した上昇と比較すると, 緩やかではあるが持続的であった (Fig. 1)。以下の実験では, 二相性の経時変化を最も顕著に示した carbachol 1.6mg/kg を用いた。carbachol 投与後60分までをA相とし, 60分から240分までをB相として, それぞれについて分析を行った。

2. A 相に及ぼす自律神経遮断薬および神経節遮断薬の影響

Carbachol 1.6mg/kg 投与による A 相の分

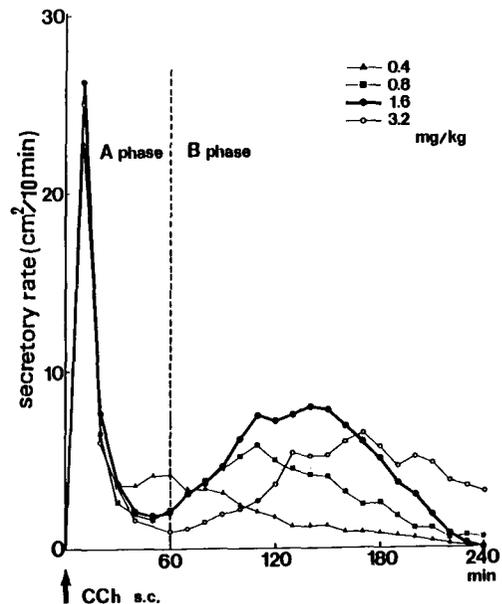


Fig. 1 Secretory effects of carbachol (CCh) on salivary response in mice. Salivary responses were divided into two phases, A phase from 0 to 60 min after CCh treatment and B phase from 60 to 240 min. Salivation was expressed as the spot area of saliva on the filter paper during a 10 min period. Each point represents the mean values of 9 or 10 mice. Each mouse was used only once for the experiment.

泌速度および全唾液量は、副交感神経遮断薬の atropine (1 mg/kg) の前処置により著しく低下した。この場合の対照群の全唾液量に対する割合は9.5%であった。また、交感神経 α 遮断薬の phentolamine (10mg/kg) の前処置も分泌速度および全唾液量を低下させたが、その程度は atropine 前処置群と比較して軽度であった。この場合の対照群の全唾液量に対する割合は78.4%であった。一方、交感神経 β 遮断薬の

propranolol (5 mg/kg) および神経節遮断薬の hexamethonium (20mg/kg) の前処置は A 相の分泌速度および全唾液量に対して有意な低下を引き起こさなかった (Fig. 2, 3)。

3. B相に及ぼす自律神経遮断薬および神経節遮断薬の影響

Atropine(1 mg/kg), phentolamine(10mg/kg)および propranolol (10mg/kg) の前処

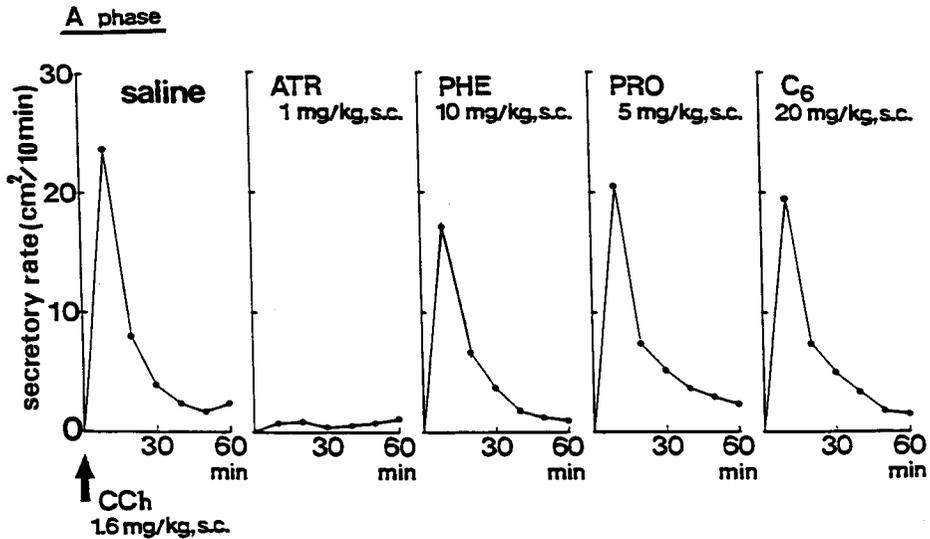


Fig. 2 Effects of pretreatments with atropine (ATR), phentolamine (PHE), propranolol (PRO) and hexamethonium (C₆) on salivary rate of A phase to CCh. ATR was given 10 min before CCh, and PHE, PRO and C₆ were given 30 min before CCh. For further explanation, see the legend as shown in Fig.1.

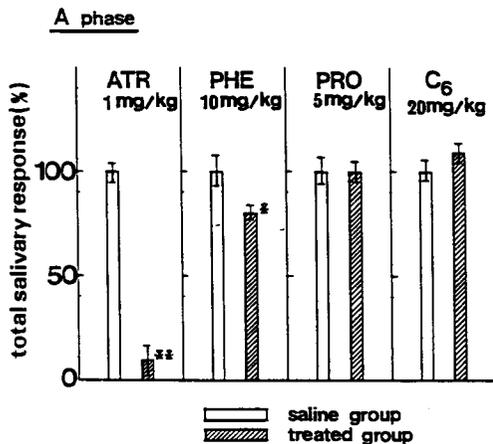


Fig. 3 Effects of pretreatments with ATR, PHE, PRO and C₆ on total salivary response of A phase to CCh. Total salivary response was measured as the total spot area of saliva during a 60 min period after CCh. Significant differences from control values are indicated: * p<0.02, ** p<0.01 (student's t test). For further explanation, see the legend as shown in Fig.2.

置は carbachol 1.6mg/kg 投与による B 相の分泌速度および全唾液量を低下させた。この場合の対照群の全唾液量に対する割合は atropine では 17.6%, phentolamine および propranolol では、それぞれ 40.5%, 75.7% であった。一方, hexamethonium (20mg/kg) の前処置は, B 相の分泌速度および全唾液量にはほとんど影響を及ぼさなかった (Fig. 4, 5)。

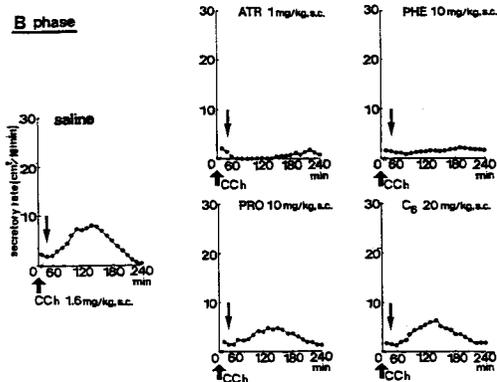


Fig. 4 Effects of pretreatments with ATR, PHE, PRO and C₆ on salivary rate of B phase to CCh. All the drugs were given 50 min after CCh.

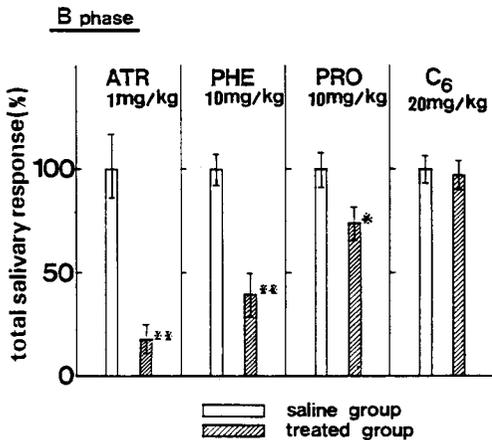


Fig. 5 Effects of pretreatments with ATR, PHE, PRO and C₆ on total salivary response of B phase to CCh. Total salivary response was measured as the total spot of saliva from 60 min to 240 min after CCh. For further explanation, see the legend as shown in Fig.3.

4. A, B各相に及ぼす副腎摘出および reserpine 前処置の影響

両側副腎摘出は, carbachol 1.6mg/kg 投与による A, B 両相の分泌速度および全唾液量の両者を有意に抑制した。分泌速度の経時的变化における二相性パターンは, 副腎摘出マウスにおいては, ほとんど発現せず, 一相性のパターンを示した (Fig. 6)。副腎摘出による全唾液量の低下は, A 相よりも B 相において著しく, A, B 各相の対照群 (Sham group) の全唾液量に対する割合はそれぞれ A 相 66.7% と B 相 46.3% であった (Fig. 8)。Reserpine 前処置は, A, B 両相に対して, 副腎摘出群と非常に類似した抑制効果を示した (Fig. 7)。すなわち, 分泌速度の二相性パターンの発現はみられず, A, B 各相の対照群の全唾液量に対する割合はそれぞれ A 相 54.0% と B 相 31.8% であった (Fig. 8)。

5. Nicotine 投与による唾液分泌反応

Nicotine 4 mg/kg は軽度の唾液分泌増大作用を示した。この場合の分泌速度の経時的变化は, 2つのピークを持つ二相性のパターンを示した (Fig. 9)。

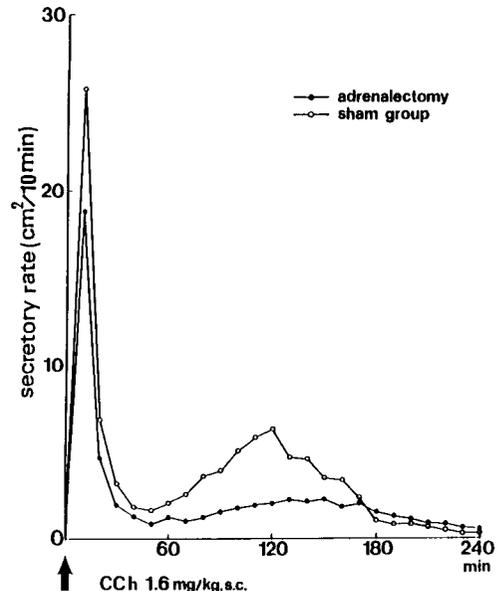


Fig. 6 Effects of adrenalectomy on CCh-induced salivation in mice. The mice were tested on the 14th day after adrenalectomy.

考 察

本実験において, carbachol 1.6mg/kg 投与による A 相の唾液分泌速度および全唾液量は, 強力な副交感神経遮断作用を有する atropine によりいずれも著明に抑制された。この結果は, A 相の唾液分泌反応が主に carbachol のムスカリン様作用により発現したことを示唆するものである。しかし, A 相が交感神経 α 遮断薬の phentolamine や交感神経抑制薬の reserpine の前処置, あるいは副腎摘出などによっても抑制を受けたことから, A 相の反応に交感神経性機序の関与の可能性が示唆される。

Carbachol が強力なニコチン様作用を有していることはよく知られている⁶⁾。そのため carbachol は, 自律神経節刺激による軽度の交感神経興奮や副腎髄質からのアドレナリンの遊離^{7,8)}を引き起すことが報告されている。また, 遠藤ら⁹⁾はアドレナリンの投与がマウスの唾液分泌を増大させることを報告している。これらの報告は, 副交感神経興奮薬である carbachol の投与により交感神経性の唾液分泌増大をも発現させたとする本実験の結果の解釈を支持するものである。なお, carbachol のニコチン様作用は神経節遮断薬である hexamethonium で

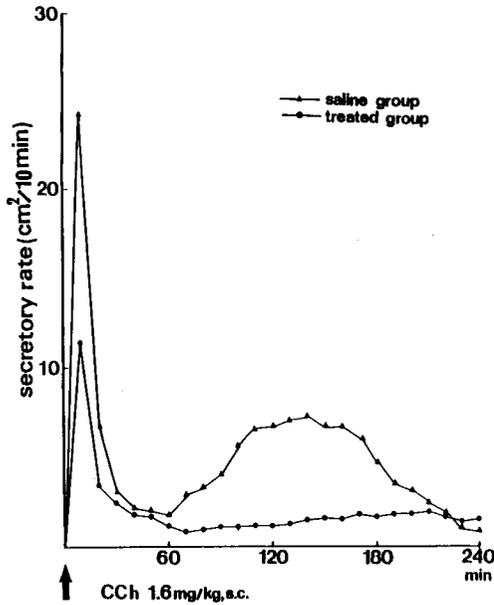


Fig. 7 Effects of pretreatments with reserpine (RES) on CCh-induced salivation in mice. RES (2 mg/kg) was injected twice at 10:00 a.m. and 5:00 p.m., CCh was injected 16h after the last injection of RES.

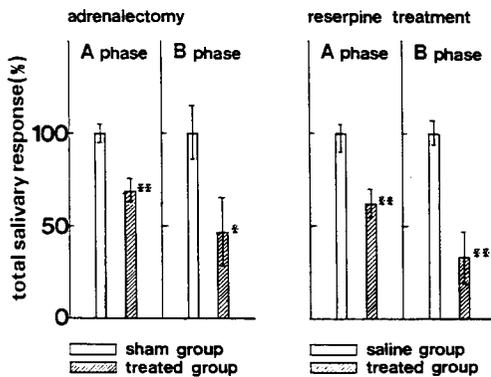


Fig. 8 Effects of pretreatments with adrenalectomy and reserpine on total salivary response of A and B phase to CCh. For further explanation, see the legend for Fig.3, 5, 6 and 7.

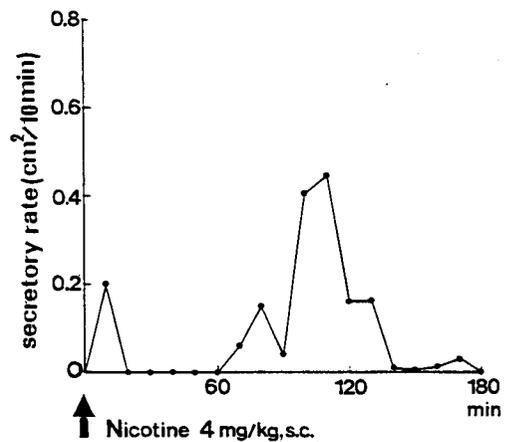


Fig. 9 Secretory effect of nicotine on salivary response in mice. For further explanation, see the legend as shown in Fig.1.

抑制されず, atropine で抑制されることが報告されている¹⁰⁾。この報告は, 本実験において carbachol の唾液分泌反応に hexamethonium がほとんど影響しなかった結果と一致する。A 相に対して, atropine の抑制効果が強く発現した事実は, atropine が carbachol のムスカリン様作用ばかりでなく, ニコチン様作用をも抑制したことを示唆する。ただし, A 相に対する phentolamine の抑制は軽度であり, また reserpine 前処置や副腎摘出による抑制が B 相の場合と比較して強くなかった結果からみると, carbachol による唾液分泌反応の A 相は carbachol のムスカリン様作用による副交感神経性の唾液分泌が主体で, carbachol のニコチン様作用による交感神経性の唾液分泌は従属的なものと考えられる。

Carbachol 1.6mg/kg 投与による B 相の唾液分泌反応は, atropine, phentolamine, reserpine の前投与, 副腎摘出などにより著しく抑制され, 唾液分泌速度の経時的変化のカーブは平坦化を示した。また, B 相の全唾液量は交感神経 β 遮断薬の propranolol の前処置により軽度ではあるが有意な低下を示した。B 相におけるこれらの結果は, A 相での結果と類似していることから, B 相の唾液分泌反応もまた carbachol のムスカリン様作用とニコチン様作用の両作用により発現したものと考えられる。しかし, A 相での結果とは異なり, phentolamine, reserpine の前処置および副腎摘出による影響は, A 相に対してよりも, B 相において強く発現した。これは, 交感神経性の唾液分泌の関与の割合が, A 相よりも B 相が大きいことを示唆している。従って, carbachol による唾液分泌反応の B 相は, A 相の場合とは逆に, carbachol のニコチン様作用による交感神経性の唾液分泌が主体で, carbachol のムスカリン様作用による副交感神経性の唾液分泌は従属的なものと考えられる。

Carbachol の唾液分泌反応において, 特に B 相は, phentolamine と propranolol の両者により抑制された。この結果は, B 相の唾液分泌反応には交感神経 α および β レセプターの両者

が関与していることを示すものである。従って carbachol のニコチン様作用による唾液分泌反応は, 副腎髄質から α , β 両レセプターの興奮状態作用をもつアドレナリン¹¹⁾が遊離されて発現したものと考えられる。

すでに報告³⁾したように, ムスカリン様作用しか示さない副交感神経興奮薬の bethanechol の唾液分泌反応は, ムスカリン様およびニコチン様作用の両作用をもつ carbachol とは相違して, 一相性の経時的変化を示す。Carbachol の場合も, atropine, phentolamine, reserpine, 副腎摘出などによりニコチン様作用の効果を抑制すると, 一相性反応のみを示した。また, 本実験において, nicotine そのものの投与による唾液分泌反応は, 反応が小さいとはいえ, きわめて明瞭な二相性の経時的変化を示した。

以上の結果から, ムスカリン様作用に基づく唾液分泌反応は, 一相性であり, 一方, ニコチン様作用のそれは二相性で, 本実験における carbachol の二相性反応は, これらが組み合せて発現したものと考えられる。

結 論

マウスにおける carbachol の二相性唾液分泌増大作用の機序について検討し, 以下の結論をえた。

1. Carbachol 投与直後より 60 分間持続する唾液分泌増大反応 (A 相) は, carbachol のムスカリン様作用による副交感神経性の唾液分泌が主体で, それに carbachol のニコチン様作用による交感神経性の唾液分泌反応が加味されて発現したものと考えられる。

2. Carbachol 投与 60 分後に再び発現する持続的な唾液分泌増大反応 (B 相) は, A 相とは逆に, carbachol のニコチン様作用が優位の唾液分泌であると考えられる。

謝 辞

本研究にあたり御指導と御協力を賜った本学歯科薬理学講座, 伊藤忠信教授, 村井繁夫助教授, 齊藤弘子助手ならびに教室員の方々に深謝

します。

本研究の要旨は、第27回歯科基礎医学会総会
(昭和60年9月, 新潟)において発表した。

Abstract: Using an improved Richter's method, the biphasic patterns (the A phase from 0 to 60 min after carbachol (CCh) administration; the B phase from 60 to 240 min) of mouse salivation responses to CCh were analyzed. The results obtained were as follows:

1. Pretreatment with atropine (1 mg/kg, s. c.) strongly inhibited both the A and B phase of CCh-induced salivation.
2. Pretreatment with phentolamine (10 mg/kg, s. c.), reserpine (4 mg/kg, s. c.) and adrenalectomy inhibited the B phase more than the A phase.
3. Pretreatment with propranolol (10 mg/kg, s. c.) slightly inhibited the B phase only.
4. Pretreatment with hexamethonium (20 mg/kg, s. c.) did not affect either the A or B phases.
5. Nicotine (4 mg/kg, s. c.) as well as CCh also displayed biphasic salivation in mice.

The above results suggest that the A phase of CCh-induced salivation is mainly caused by muscarinic action of CCh, whereas the B phase is mainly attributable to nicotinic action of CCh.

文 献

- 1) Emmelin, N.: Pharmacology of salivary glands. Hand book of physiology. Alimentary Canal. Vol. II (edited by Code, C.F.), American Physiological Society, Washington, D. C., pp665—678, 1967.
- 2) Emmelin, N., Schneyer, C. A., Schneyer, L. H.: The pharmacology of salivary secretion. Pharmacology of Gastrointestinal Motility and Secretion. Vol. I (edited by Holton, P.), Pergamon Press, Oxford, pp1—39, 1973.
- 3) 斉藤弘子, 陳 慶勲, 村井繁夫, 伊藤忠信: マウスにおけるベタネコールおよびカルバコールの唾液分泌反応, 岩医大歯誌, 11: 26—30, 1986.
- 4) Richter, W.: Estimation of anticholinergic drug effects in mice by antagonism against pilocarpine-induced salivation. *Acta pharmacol. Toxicol.* 24: 243—254, 1966.
- 5) 村井繁夫, 斉藤弘子, 米倉秀夫, 畠山越夫, 伊藤忠信: マウスにおける唾液分泌反応の測定法の研究—Richter法の改良—, 岩医大歯誌, 7—25: 33, 1982.
- 6) Goodman, L.S., Gilman, A.G. and Gilman, A.: The pharmacological Basis of Therapeutics. 6th ed., Macmillan publishing CO., New York, pp91—99, 1980.
- 7) Fisher, S. K., Horz, R. W. and Agranoff, B. W.: Muscarinic receptors in chromaffin cell cultures mediate enhanced phospholipid labeling but not catecholamine secretion. *J. Neurochem.* 37(2): 491—497, 1981.
- 8) Horz, R. W., Senter, R. A.: Choline stimulates nicotinic receptors on adrenal medullary chromaffin cells to induce catecholamine secretion. *Science* 214: 466—468, 1980.
- 9) 遠藤淳一郎, 竹村晴夫, 大鹿英世: マウス唾液分泌におよぼす Labetalol の作用, 札幌医誌, 49: 27—33, 1980.
- 10) Goodman, L. S., Gilman, A.: The Pharmacological Basis of Therapeutics. 4th ed., Macmillan CO., New York, pp585—600, 1970.
- 11) Ohshika, H., Endo, J. and Tanaka, M.: A possible role of alpha adrenergic receptors in salivation induced by isoproterenol in mice. *Japan. J. Pharmacol.* 28: 650—652, 1978.