

〔原 著〕

ラット耳下腺腺房細胞の開口分泌過程における
細胞骨格の形態学的研究

佐々木泰裕

北海道医療大学歯学部口腔外科第一講座

(主任：金澤正昭)

Morphological study on cytoskeleton in the
exocytosis of the rat parotid acinar cells in vitro

Yasuhiro SASAKI

1st Department of Oral and Maxillofacial Surgery, School of Dentistry,
HEALTH SCIENCES UNIVERSITY OF HOKKAIDO

Chief Prof Masaaki KANAZAWA

Abstract

In the present study, the investigation on the role that cytoskeleton may play in exocytosis which were enzymatically dispersed rat parotid acini has been approached by morphological techniques. The author examined microfilaments, intermediate filaments and microtubules by immunofluorescence technique and electron microscopic observation.

Furthermore, distribution of microfilaments using heavy meromyosin (HMM) decoration method was observed.

The results obtained were as follows:

1. In response to secretory stimulation with isoproterenol (IPR) or carbachol (CCH), parotid acini revealed exocytotic secretion that lumen was dilated and the number of secretory granules had markedly decreased.

2. Immunohistochemistry showed that actin was localized in the granular pattern of staining with the cytoplasm. Microfilament stained with rhodamine-phalloidin, which binds selectively to polymerised actin filaments. Most of the microfilaments were localized beneath the apical plasma membrane. Upon stimulation with isoproterenol (IPR), the number of individual

本論文の要旨の一部は、第44回日本口腔科学会総会（1990年4月、鳥取）、第33回歯科基礎医学会総会（1991年10月、鹿児島）において発表した。

受付：平成8年9月30日

rhodamine phalloidin positive small granules increased dramatically, indicating that the secretory granules was surrounded by microfilaments after the fusion with luminal membrane

3 Intermediate filaments were stained by immunofluorescent technique using antibodies against cytokeratin, while microtubules were stained with anti β -tubulin In acinar cells, the intermediate filaments exhibited a reticular distribution in the cytoplasm The microtubules exhibited a radial distribution in cytoplasm of longitudinally from the apical region to the basal region At secretory phase, the distribution of intermediate filaments and microtubules in the acinar cells were almost the same as the resting phase

4 Ultrastructurally, microfilaments were not detectable around the secretory granules which stored in the cytoplasm, but were observed around them whose membranes were continuous with the luminal plasma membrane during exocytosis

These results indicate that microfilaments are localized mainly underneath the luminal plasma membrane at the resting phase and act as blockade to exocytosis At the secretory phase, microfilaments allow exocytosis by encircling the discharged secretory granule membranes, provide forces for the extrusion of the secretory products through the action of actin-myosin contractile system

Key words microfilaments, exocytosis, cytoskeleton, parotid acinar cells

緒 言

近年、高齢化社会を迎え、日常の歯科臨床で口渇を主訴に来院する患者が増加している。臨床的に口腔乾燥症と診断されるものの中には、糖尿病などの内分泌障害、全身疾患の一部分症として発現するものおよび向精神薬や降圧剤の長期服用による薬物の影響が原因と考えられるものがある。原因の明らかな症例では、その除去による治療が行われる。しかし、加齢による生理的变化に起因するもの、Sjogren症候群および放射線照射による唾液腺の萎縮症例に対する治療法は、現時点でまだ確立されていない¹⁾。

一般に、これらの症例では、人工唾液による対症療法が行われている。最近、Sjogren症候群の口腔乾燥症状に対して、ムスカリン作動薬であるピロカルピンにより唾液分泌の促進を図る治療法が報告されているが、至適投与量ならびに投与方法についての検討が不十分なため、その

効果と安全性が確認されるまでには至っていない²⁾、そこで、いわゆる口腔乾燥症に対する根本的な治療法の開発が待たれる。したがって、唾液分泌機構を解明することは、口腔乾燥症の新しい治療法の確立のために意義あるものと考えられる。

唾液の分泌は、交感神経および副交感神経による自律神経の二重支配を受けており、唾液腺腺房細胞からのアミラーゼを主とする蛋白分泌や水分を主とするイオン分泌は、これらの神経刺激により調節されている³⁾。

両者の分泌は、それぞれ異なった受容体と細胞内情報伝達系を介して制御されるといわれている。すなわち、アミラーゼ分泌は β アドレナリン受容体からcyclic AMPを介し、protein kinase Aの活性化を経て行われる。一方、イオン分泌と少量のアミラーゼ分泌は、 α アドレナリン受容体またはムスカリン受容体からイノシトールリン脂質代謝を介し、細胞内カルシウムイオン濃

Table 1 Monoclonal antibodies for this study

monoclonal antibody	immunogen	source
anti-actin	chiken embryo fibroblasts	Amersham
anti-keratin (PKK I)	pig kidney epithelial cell line	Labosystems
anti- α tubul in	chiken brain microtubules	Amersham
anti- β tubul in	chiken brain microtubules	Amersham

度の上昇とprotein kinase Cの活性化を経て、惹起される⁴⁾。しかし、生体内ではどちらか一方の分泌が起こることはなく、分泌時には蛋白と水分が混和され、唾液は適度な分泌量と粘調度を保っているといわれている⁵⁾。

耳下腺におけるアミラーゼを主体とした蛋白の分泌は、開口分泌と呼ばれる一連の過程によって行われる。開口分泌とは、細胞内の小器官で合成された蛋白などが分泌顆粒として濃縮・蓄積されたのち、受容体を介した分泌刺激によって、この分泌顆粒が腺腔膜と融合・開裂し、顆粒内容物が細胞外に放出される過程を指している⁶⁾。近年、この開口分泌過程には、微細繊維、中間径繊維および微小管の三種類の細胞骨格が重要な役割を担っているといわれている^{7, 8)}。しかし、開口分泌時にこれらの細胞骨格がどのような役割を演ずるかまだ不明な点が少ない。

そこで、本研究ではまず、ラット耳下腺遊離腺房細胞に、 β -アドレナリン受容体作動薬のイソプロテレノールとムスカリン受容体作動薬のカルバミルコリンの、二種類の分泌刺激薬を作用させて、開口分泌時の耳下腺腺房を光学顕微鏡で観察した。さらに、ウエスタンブロット法により三種類の細胞骨格を確認するとともに、開口分泌時の細胞骨格蛋白の挙動を蛍光抗体法を用いて蛍光顕微鏡で観察した。また、細胞骨格の分布について、電子顕微鏡で観察し、開口分泌の際の細胞骨格の役割を詳細に検討した。とくに、微細繊維についてはヘビメロミオシン修飾法を応用し、その局在変化と機能との関連を考察した。

材料ならびに方法

1. 使用試薬と抗体

DL-イソプロテレノール (IPR), カルバミルコリン (CCH), サポニン, 牛血清アルブミン (BSA) および牛睾丸ヒアルロニダーゼ (Type1-S) はSigma社製 (St Louis, Mo, U S A) を使用し, コラゲナーゼ (CLS II) はWorthington Biochemical社製 (Freehold, NJ, U S A) を使用した。また, ヘビメロミオシン (HMM) は和光純薬社製 (大阪, 日本) を使用した。ローダミン・ファロイジン (RP) は, Molecular Probes社製 (Eugene, OR, U S A) を使用した。細胞骨格蛋白を特異的に認識するモノクローナル抗体として, 抗アクチン抗体 (Amersham), 抗サイトケラチン抗体 (PKK1, Labosystems) および抗 α および β チューブリン抗体 (Amersham) を用いた (Table 1)。

2. 耳下腺遊離腺房の調製法

Wistar系雄性ラット (8-12週齢, 体重250-300g) を, 実験を行う16時間前から絶食させた。このラットをジエチルエーテル麻酔下で心嚢瀉血により屠殺の後, 直ちに両側の耳下腺を摘出し Takuma and Ichida⁹⁾の方法にしたがって遊離腺房を調製した。すなわち, 摘出した耳下腺から結合組織と脂肪組織を除き, 眼科用剪刀で細切ののち, 5%CO₂, 95%O₂の気相下でコラゲナーゼ (0.25mg/ml) と牛睾丸ヒアルロニダーゼ (0.25mg/ml) を含有した20mM HEPES (N-2-Hydroxyethyl-piperazine-N'-2-ethanesulfonic acid)-NaOHで緩衝したpH7.4のハンクス培養液 (HBSS-H) により, 37°Cで

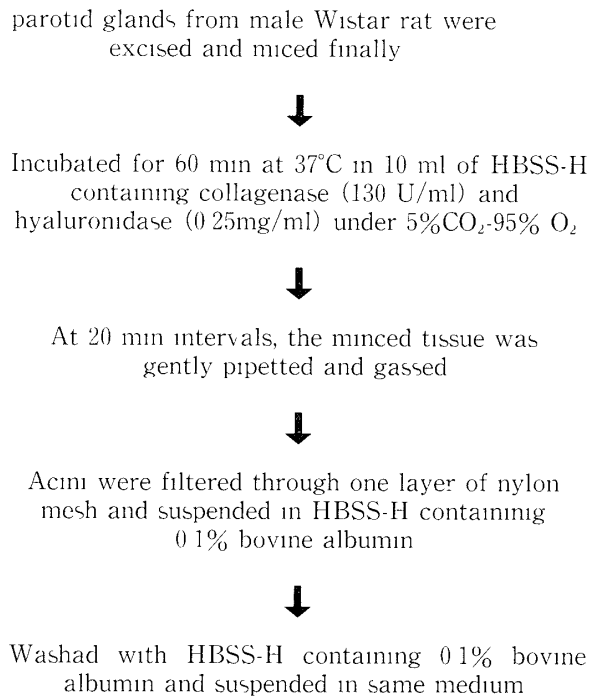


Fig 1 Method of cell preparation

インキュベートした。そののち、20分間隔でピペティングを行い、最終的に60分インキュベートした。そののち、残存する組織をナイロンメッシュで濾過し、濾液を遠心分離し沈渣として得られた耳下腺遊離腺房を、HBSS-Hで2回洗浄ののち、0.1% BSA添加HBSS-Hで20-30 mlの細胞浮遊液とした (Fig 1)。

3. 実験方法

1) アミラーゼ分泌量の測定

分泌刺激時の開口分泌を形態的に観察するのに先立って、IPRおよびCCHの分泌刺激の至適濃度を検討した。すなわち、1 mlの遊離腺房浮遊液にIPRを最終濃度 10^{-8} ~ 10^{-6} M, CCHを最終濃度 10^{-6} ~ 10^{-4} Mとなるように添加し、毎分60回の振盪で15分間インキュベートした。そののち、氷冷下で濾紙 (Toyo濾紙) を用いて濾過し試料を得た。また、細胞中に含まれる全アミラーゼ活性を測定するため、同量の刺激を行わない静止時の遊離腺房を、ポッター型テフロン・ホモジナイザーでホモジナイズした。得られた試料を0.9%の食塩水で希釈し、アミラーゼ

活性をBernfeldの方法¹⁰⁾に従って測定した。ついで、細胞から放出された培養液中のアミラーゼ活性を全アミラーゼ活性の%として表し、アミラーゼ分泌量とした。その結果から得られた、IPRとCCHの至適濃度で遊離腺房を刺激して、放出されるアミラーゼ分泌量を同様の方法で、経時的に測定した。

2) ウェスタンブロット法による細胞骨格蛋白の検出

遊離腺房を、20mM トリス-HCl 緩衝液 (pH7.4) でポッター型テフロン・ホモジナイザーでホモジネートしたのち、 $150 \times g$, 5分の遠心分離を行い上清を得た。この上清中に含まれる全蛋白質量を、Bio-Rad蛋白測定キット (Bradfordの方法¹¹⁾: Bio-Rad Lab, Richmond, CA, U S A) により測定ののち、SDS sample buffer (2% sodium dodecyl sulfate, 10%グリセロール, 2% β -メルカプトエタノール, 60 mM トリス HCl, pH7.3) と等量に混和して、3分の煮沸処理を行い、泳動用試料とした。この泳動用試料をLaemmliの方法¹²⁾に従い、10%のSDSポリアクリルアミド・スラブ・ゲル (70mm \times 80mm \times 0.75mm) を用いて、ミニプロテインII電気泳動装置 (Bio-Rad Lab, Richmond, CA, U S A) により泳動 (50mA-200V, 45分) した。分離した蛋白質をセミドライ方式のウェスタンブロット装置 (ホライズブロット, ATTO社, 日本) を使用して、電氣的にPVDF膜 (Immobilonp Millipore Ltd, Bedford, MA, U S A) に転写した¹³⁾。この分離蛋白を転写したPVDF膜を、ブロックエース溶液 (大日本製薬, 大阪, 日本) で2時間ブロッキングした。つづいて、2%正常馬血清を含んだ0.85%食塩水含有のリン酸緩液 (PBS) で30分処理したのち、各種細胞骨格蛋白に対するモノクローマ抗体を一次抗体として、60分反応をさせた。そののち、0.05% トライトン X-100 を含有したPBS (T-PBS) で3回洗浄 (各10分) し、二次抗体とし

Electrophoresis was carried out in SDS polyacrylamide gel according to Laemmli in the electrophoresis buffer



Electroblotting onto PVDF membrane



PVDF membrane was incubated with Block Ace® for 2 hours at 4°C



PVDF membrane was incubated with 2% normal horse serum in PBS for 30 min at room temperature



PVDF membrane was incubated with various monoclonal antibodies for 1 hour at room temperature



Bound various antibodies were detected by biotinylated mouse IgG or IgM for 30 min at room temperature



PVDF membrane was incubated with avidin-biotin complex peroxidase solution for 30 min at room temperature



Bound various antibodies were developed with 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride at room temperature

Fig 2 Immunoblotting method

てビオチン化抗マウスIgG (1:1000:PBS) またはIgM (1:1000, PBS) を30分反応させ、T-PBSで3回洗浄 (各10分) した。つぎに、アビジン-ビオチン・ペルオキシダーゼ複合体溶液 (ABC KIT Vector Lab Inc, Burlingame, CA, U S A) を30分作用させたのち、T-PBSで3回洗浄 (各10分) し、3,3'-Diaminobenzidine を用いて蛋白を検出した。なお、以上の操作は、すべて室温で行った (Fig 2)。

3) 光学顕微鏡用試料の作製

電子顕微鏡用試料として作製したスパー・レ

ジン包埋試料を用いた。すなわち、0.2%タンニン酸を添加した2%グルタルアルデヒド・0.1 M Na-カコジレート緩衝液 (pH7.4) で4°C、60分固定した。ついで、この試料を室温で1%オスミウム酸水溶液により、30分、後固定し、アセトン上昇系列で脱水ののち、スパー・レジに包埋し、67°Cで、48時間の重合硬化処理を行なった。この試料を、超ミクロトーム (LKB2088 Ultratome V LKB, Bromma, Sweden) を用いて、ガラス・ナイフにより1μmの切片を作製し、1%トルイジン・ブルー (TB) で染色し、光学顕微鏡で観察した。

4) 蛍光抗体法による試料の作製

腺房細胞における細胞骨格蛋白の局在を、各種の細胞骨格に対するモノクロナール抗体を用いて、蛍光抗体法により蛍光顕微鏡で観察した。なお、細胞の固定は以下の方法を用いた。

(1) アクチンに対するモノクロナール抗体の染色を行った試料は、4%パラホルムアルデヒド含有のPBSで4°C、15分固定した。

(2) β-チューブリンに対するモノクロナール抗体の染色を行った試料は、Osborn and Weber¹⁴⁾の方法に従って固定した。すなわち、試料を1mM ethylene glycol bis(2-aminoethyl ether)-N, N'-tetracetic acid (EGTA) と4%ポリエチレングリコール6000含有の0.1M PIPES (piperazineN, N'-bis(2-ethanesulfonic-acid) sodiumsalt)-KOH (pH6.9) から成るmicro tubules stabilization緩衝液 (MSB) で30秒洗浄ののち、0.2%トライトンX-100, ロイペプチン (10μg/ml) およびアプロチニン (10μg/ml) を含有したMSBで、5分インキュベートし、そののちMSBで2回洗浄 (各30秒) した。ついで、4%パラホルムアルデヒド含有のPBSで10分固定した。

(3) サイトケラチンに対するモノクロナール抗体の染色を行った試料は、100%の冷アセトンで

Table 2 Dilution ratio of monoclonal antibody

monoclonal antibody	dilution ratio	
	western blot	immunofluorescence
anti-actin	1 1000	1 100
anti-cytokeratin(PKK I)	1 500	1 100
anti- α tubul in	1 1000	1 100
anti- β tubul in	1 1000	1 100

After fixation, all staining was performed by incubating for 1 hour in various primary antibodies



Washed in PBS at 3 times for 5 minutes



Antibodies were detected by FITC* conjugated anti-mouse IgG or IgM



Washed in PBS AT 3 times for 5 minutes



Incubated with rhodamine-phalloidin for 30, minutes



Washed in PBS at 3 times for 5 minutes



Examined with a fluorescence microscope

Each steps were performed at room temperature
* FITC fluorescein isothiocyanate

Fig 3 Immunofluorescence method

5分固定した。

おのおのの試料を前述の操作により固定し、クライオトーム (Tissue-Tek II Miles Laboratories, MA, U S A) で、6 μ mの厚さの凍結切片を作製した。これらの切片を室温で2時間風乾のち、一次抗体として各種の細胞骨格蛋白のモノクロナール抗体 (Table 2) を60分反応させた。PBSで3回洗浄 (各5分) し、二次抗体として fluorescein isothiocyanate 標識 IgG (1:20, 1 PBS) または 1 gM (1:20, PBS)

を30分反応させた。つぎに、PBSで3回の洗浄 (各5分) のち、微細繊維を特異的に認識する蛍光試薬であるローダミン・ファロイジン¹⁵⁾ (RP, 1:40, PBS) で30分反応させ二重染色を行った。そののち、PBSで3回洗浄 (各5分) し、5%グリセリン-PBS溶液で封入し、Nikon Fluophoto 蛍光顕微鏡 (Microphoto V: 日本光学, 東京, 日本) で観察した (Fig 3)。

5) 電子顕微鏡用試料の作製

光学顕微鏡観察の際に用いた遊離腺房のレジン包埋試料から、超マイクロトーム (LKB 2088 Ultratome V LKB, Bromma, Sweden) を用いて、ダイヤモンド・ナイフ (Diatome Ltd, Bienne, Switzerland) で超薄切片を作製した。この切片を、酢酸ウランとクエン酸鉛により二重染色し、透過型電子顕微鏡 (H-500型: 日立製作所, 日立, 日本) により、加速電圧75kVで観察した。

6) ヘビメロミオシン (HMM) 修飾法

電子顕微鏡で微細繊維をより詳細に観察するため、HMM修飾法¹⁶⁾を応用した。すなわち、遊離腺房を1mM MgSO₄と10mM EGTAを含有した100mM PIPES-KOH緩衝液 (pH6.9) から成るStabilization緩衝液 (SB) に0.01%サポニンを添加して、37°C, 15分処理することにより、細胞膜の透過性を高めるとともに細胞質の可溶性蛋白を除去した¹⁷⁾。ついで、HMM (2.5mg/ml) を含有したSB中で2時間室温で反応させたのち、SBで洗浄し、0.2%タンニン酸を添加した2%グルタルアルデヒド・0.1M Na-カゴジレート緩衝液 (pH7.4) で4°C, 60分固定した。

Cells were permeabilized with SB* buffer containing 0.01% saponin for 15 min at 37°C



Cells were incubated in SB buffer containing HMM (2.5mg/ml) for 2 hours at room temperature



Washed in SB buffer for 5 min at room temperature



Cells were fixed with 2% glutaraldehyde containing with 0.2% tannic acid in 0.1M sodium cacodylate buffer (pH 6.9) for 1 hour at room temperature



Post-fixed with 1% OsO₄ solution for 30 min at room temperature



Dehydrated in a graded sequence of acetons



Embedded in Spurr resin

* SB buffer stabilization buffer
100mM PIPES (pH 6.9)
1 mM MgSO₄
10mM EGTA

Fig 4 HMM decoration method

そののち、1%オスミウム酸水溶液により室温で、30分固定を行い、アセトン上昇系列で脱水し、スパー・レジに包埋した。レジンは、67°C、48時間の重合硬化を行った。この試料から超薄切片を作製し、酢酸ウランとクエン酸鉛による二重染色を行い、透過型電子顕微鏡で観察した (Fig. 4)。

結 果

1. 遊離腺房からのアミラーゼ分泌量の測定

酵素処理により得られた遊離腺房に、分泌刺激薬としてIPRとCCHを種々の濃度で添加し、培養液中に放出されるアミラーゼの分泌量を測定し、形態学的に開口分泌を観察するための至

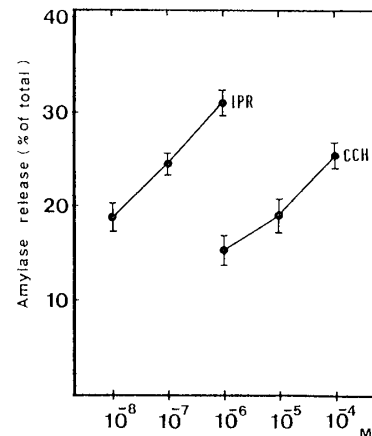


Fig 5 Levels of amylase secretion in dispersed rat parotid cells which incubated for 15 minutes in each concentration of CCH and IPR

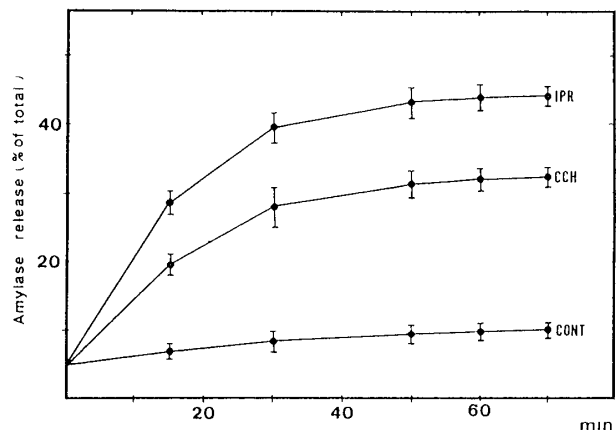


Fig 6 Levels of amylase secretion in dispersed rat parotid cells which response to stimulation with CCH and IPR

適濃度を検討した。

その結果、分泌刺激後15分のアミラーゼ分泌量は、IPRでは10⁻⁸Mで17%、CCHでは10⁻⁸Mで15%であり、濃度依存性に分泌量の増加を認めるが、アミラーゼ分泌量の最大値をみるとIPRでは、10⁻⁶Mで32%、CCHでは10⁻⁴で25%であったことから、以下の形態学的観察を行う際の至適濃度を、IPRは10⁻⁶M、CCHは10⁻⁴とした (Fig 5)。

つぎに、この至適濃度により分泌刺激を行った際の、遊離腺房からの経時的なアミラーゼの分泌量の変化を検討した。その結果、IPRまたはCCHを作用させたのち、1分から培養液中にア

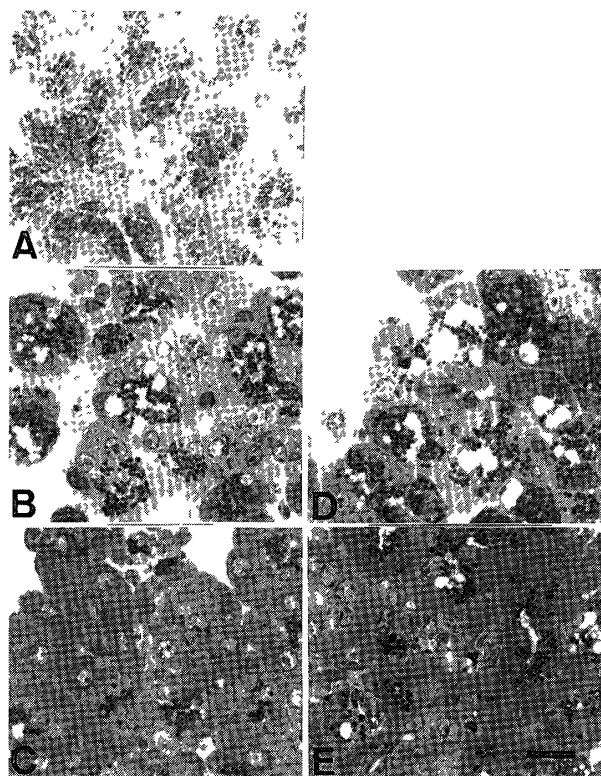


Fig 7 Light micrographs of dispersed rat parotid acini Spurr resin section, toluidine-blue staining

- A resting acini
 B After 15 minutes of incubation presence of IPR
 C After 30 minutes of incubation presence of IPR
 D After 15 minutes of incubation presence of CCH
 E After 30 minutes of incubation presence of CCH
 (Bar 10 μ m, \times 1,000)

ミラーゼが検出され、15分ではIPRで28%、CCHで20%、30分ではIPRで40%、CCHで27%とその分泌量は経時的に増加した。そのうち、アミラーゼ分泌量の増加は軽度となり、刺激後50分の分泌量をみてもIPRで42%、CCHで32%であり、これ以上長時間にわたり観察してもアミラーゼの分泌量の増加は認められなかった。

なお、遊離腺房浮遊液に分泌刺激薬を添加しない場合、培養液中に放出されるアミラーゼの分泌量は約10%で、経時的な増加を認めなかった (Fig 6)。

2. 遊離腺房の光学顕微鏡による観察

遊離腺房浮遊液に、前項で得られた至適濃度、すなわち、 10^{-6} MのIPR、 10^{-4} MのCCHを添加し、分泌刺激を行った際の遊離腺房の形態の変

化を、レジン包埋試料から得られた1 μ mの切片に、TB染色を行い光学顕微鏡で観察した。

その結果、分泌刺激を行わない静止時の腺房では、その中央部に狭小な腺腔がみられるとともに、側方部の細胞間分泌細管も観察された。また、腺腔側の細胞質中に、多数のTB陽性の分泌顆粒がみられ、腺房細胞の核は基底側に偏在していた。なお、一部に介在部導管が観察されたが、線条部導管や排泄導管はみられなかった (Fig 7-A)。

IPRとCCHによる分泌刺激時の腺房では、分泌刺激後1分から、腺腔および側方部の分泌細管の開大が観察された。そして、刺激後15分では腺腔側の細胞質中に多数の空胞が観察され、この空胞は腺房細胞中で大きな部分を占めていた。また、腺房細胞中に認められる陽性の分泌顆粒の数は静止時に比し減少していた (Fig 7-B, D)。

IPRとCCHの分泌刺激時の空胞を比較すると、CCHの方が大きかった (Fig 7-D)。なお、IPRの刺激後30分では、腺房細胞中のTB陽性の分泌顆粒がほとんど消失し、腺腔も静止時の状態に近似して狭小となっていた (Fig 7-C)。しかし、CCHでは細胞質中にまだ空胞がみられ、空胞が完全に消失したのは分泌刺激後50分であった (Fig 7-E)。

3. 細胞骨格の蛍光抗体法による観察

1) ウェスタンブロット法による細胞骨格蛋白の検索

耳下腺腺房細胞の、細胞骨格構成蛋白を確認するため、ウェスタンブロットによる検索を行った。その結果、抗アクチン抗体により42KD、抗サイトケラチン抗体であるPKK1抗体では44、50、54KDに、抗 α および β チューブリン抗体では50KDにそれぞれバンドが認められた (Fig 8)。

以上の結果から、耳下腺腺房細胞では、微細繊維、中間径繊維および微小管の三種類の細胞

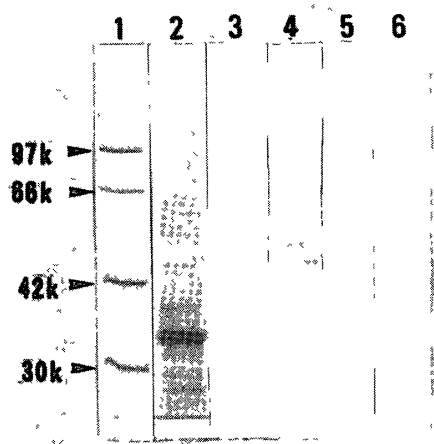


Fig 8 Immunoblotting studies of the cytoskeletal elements in rat parotid gland acini

- 1 Molecular weight marker
- 2 Coomassie blue stain
- 3 Act1n
- 4 Cytokeratin (PKK 1)
- 5 α -tublin
- 6 β -tublin

骨格が存在することが確認された。

2) 蛍光抗体法による細胞骨格蛋白の局在変化

遊離腺房をIPRまたはCCHで分泌刺激し、その経時的な変化を形態学的に観察したが、両者の開口分泌像にほとんどが差異がないことを確認した。そこで、以下の実験ではIPR刺激による分泌過程を観察した。なお、対照として分泌刺激を行わない静止時の腺房を用いた。

(1) 微細繊維

微細繊維を、RP染色と抗アクチン抗体を用いた蛍光抗体法による二重染色により観察した。

分泌刺激を行わない静止時の腺房では、RP染色で、腺房細胞の細胞膜に一致した蛍光がみられ、とくに腺腔および細胞間分泌細管の細胞膜に一致した点状の強い蛍光がみられた (Fig 9 - A)。また、抗アクチン抗体染色では、細胞膜に一致した蛍光がみられるが、これに加えて細胞質全域にわたって、細顆粒状の強い蛍光が認められた (Fig 9 - B)。

分泌刺激時の腺房についてみると、刺激後15分のRP染色では、腺腔面に接して分泌顆粒大の小球状の蛍光がみられるが、細胞質中にはそれ

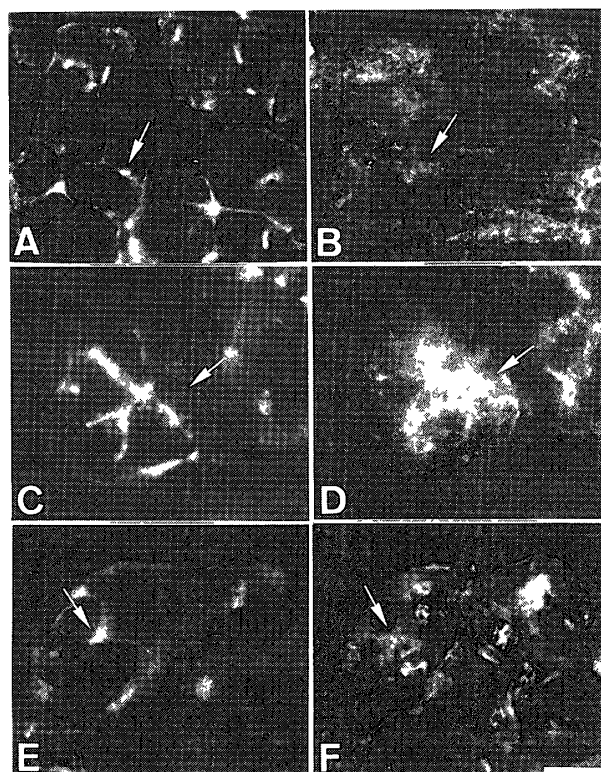


Fig 9 Double staining using rhodamine-phalloidin and anti-actin antibody

A, C, E Fluorescence staining of rhodamine-phalloidin
B, D, F Immunofluorescence staining of anti-actin antibody

A, B Resting acini

C, D After 15 minutes of incubation presence of IPR

E, F After 30 minutes of incubation presence of IPR

Lumen (arrow)

(Bar 10 μ m, \times 1,300)

らが多数連なった葡萄の房状の蛍光がみられた (Fig. 9 - C)。また、抗アクチン抗体染色では、腺腔側で静止時に比べ蛍光の増強が認められ、同時に、細胞質中に細顆粒状の蛍光も観察された。なお、抗アクチン抗体の局在変化は、RP染色でみられる微細繊維の変化に比し、軽度であった (Fig 9 - D)。

また、分泌刺激後30分では、RP染色と抗アクチン抗体染色で、ともに静止時のものと近似する蛍光像が観察された (Fig 9 - E, F)。

(2) 中間径繊維

中間径線維を、RP染色と抗サイトケラチン抗体であるPKK1抗体を用いた蛍光抗体法による

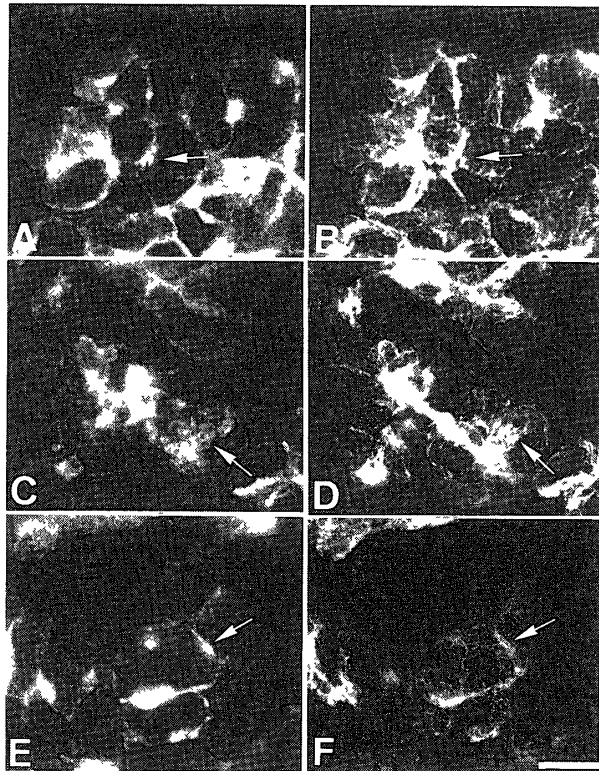


Fig 10 Double staining using rhodamine-phalloidin and anti-cytokeratin antibody
 A, C, E Fluorescence staining of rhodamine-phalloidin
 B, D, F Immunofluorescence staining of anti-cytokeratin antibody
 A, B Resting acini
 C, D After 15 minutes of incubation presence of IPR
 E, F After 30 minutes of incubation presence of IPR
 Lumen (arrow) (Bar $10\mu\text{m}$, $\times 1,300$)

二重染色により観察した。

分泌刺激を行わない静止時の腺房では、RP染色で、腺腔および細胞間分泌細管に点状の強い蛍光がみられた (Fig 10-A)。また、PKK1抗体染色では、基底側の細胞質に偏在する核を包み込むような特徴的なバスケット状の配列を示す蛍光が観察された (Fig 10-B)。

分泌刺激時の腺房細胞では、分泌刺激後15分にRP染色で腺腔側に静止時よりも増強した蛍光が観察された (Fig 10-C)。しかし、PKK1では静止時のものと近似した蛍光像を示していた (Fig 10-D)。

なお、分泌刺激後30分では、RP染色で、静止

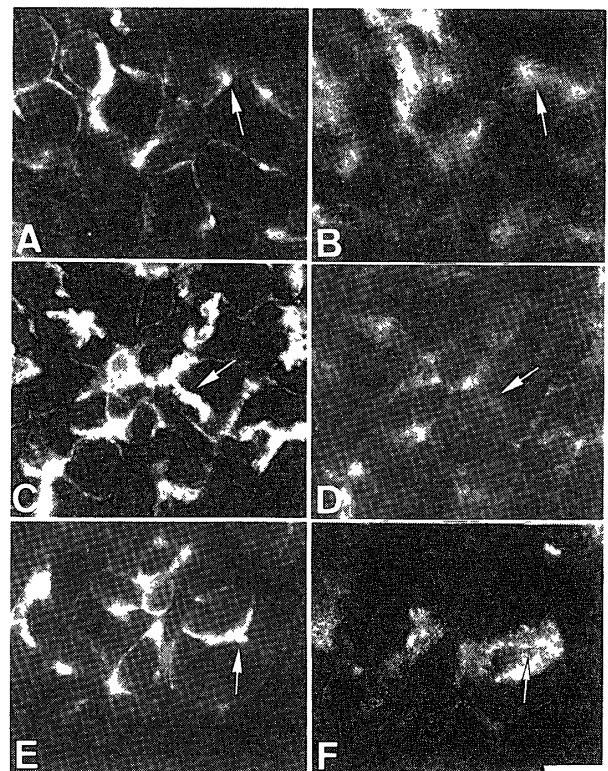


Fig 11 Double staining using rhodamine-phalloidin and anti- β tubulin antibody
 A, C, E Fluorescence staining of rhodamine-phalloidin
 B, D, F Immunofluorescence staining of anti- β tubulin antibody
 A, B Resting acini
 C, D After 15 minutes of incubation presence of IPR
 E, F After 30 minutes of incubation presence of IPR
 Lumen (arrow) (Bar $10\mu\text{m}$, $\times 1,300$)

時と同様に腺房の中央部に腺腔膜に一致して点状の蛍光がみられた (Fig 10-E)。また、PKK1でも、静止時と近似した蛍光像を示していた (Fig 10-F)。

(3)微小管

微小管を、RP染色と抗 β チューブリン抗体を用いた蛍光抗体法による二重染色により観察した。

分泌刺激を行わない静止時の腺房では、RP染色で、腺腔および細胞間分泌細管の細胞膜に点状の強い蛍光がみられた (Fig 11-A)。また、抗 β チューブリン抗体染色では、腺腔側の細胞質中に腺腔面から基底側に向かって放射状の配

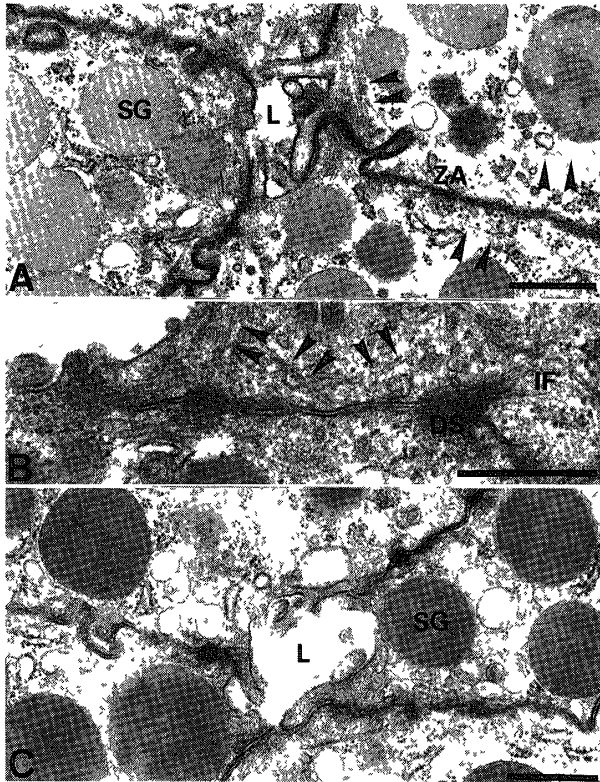


Fig 12 Electron micrographs of cytoskelton
 A Resting
 Lumen (L) Secretory granule (SG) Zonula adherens (ZA)
 Microtubule (arrow head) (Bar 0.5 μ m, \times 38,500)
 B Resting
 Intermediate filaments (IF) Desmosome (DS)
 Microtubule (arrow head) (Bar 0.5 μ m, \times 61,000)
 C Acini stimulated for 1 min with IPR
 Lumen (L) Secretory granule (SG)
 (Bar 1 μ m, \times 39,000)

列を示す蛍光が観察された (Fig 11-B)。

分泌刺激後15分のRP染色では、静止時に比し蛍光はさらに増強していた (Fig.11-C)。一方、抗 β チューブリン抗体染色では、腺腔側の細胞質中に細顆粒状の蛍光が観察された (Fig.11-D)。なお、分泌刺激後30分では、RP染色で、静止時の腺房細胞に近似した蛍光像が観察された (Fig 11-E)。また抗 β チューブリン抗体染色でも、静止時のものと近似した蛍光像が観察されたが、放射状に配列した蛍光は、静止時のものに比べ短小化していた (Fig.11-F)。

4. 細胞骨格の電子顕微鏡的観察

分泌刺激による細胞骨格の変化を、電子顕微鏡により観察した。

分泌刺激を行わない静止時の腺房では、腺腔膜の直下に、比較的密な微細繊維束が観察され、腺腔面には微絨毛がみられた。また、これらの微細繊維束の一部は微絨毛のコア部分を形成し、その起点は、細胞間接着構造の一つである zonula adherens junction であった。なお、腺腔側の細胞質中には高電子密度の分泌顆粒が多数観察されたが、この分泌顆粒が腺腔膜に接する像はみられず、分泌顆粒周囲の微細繊維束もみられなかった (Fig.12-A)。

また、腺房細胞の側方の細胞膜には、デスモゾーム接着斑を起点とする中間径繊維束が観察された。なお、微小管は、腺腔膜直下の細胞質中にみられ、その走行は腺腔面に対しほぼ直角であった (Fig.12-B)。

分泌刺激時の腺房では、分泌刺激後1分で、腺腔膜に近接して高電子密度の分泌顆粒がみられたが、その周囲には、微細繊維束はみられなかった (Fig 12-C)。

分泌刺激後15分では、腺腔膜は開大し、腺腔面の微絨毛は認められなくなり、腺腔中には無定形な物質がみられた。また、腺腔膜に近接して細胞質中に多数の分泌顆粒大の空胞がみられ、その周りを取り囲む微細繊維束が認められた。なお、開大した腺腔膜は細胞質内に深く陥入し、その膜の直下には微細繊維束がみられた (Fig.13-A)、この部分の微細繊維を詳細に観察すると、網目状を呈していた (Fig 13-B)。

分泌刺激後30分では、開大した腺腔膜は静止時と近似した状態に収縮するとともに、静止時に近似した微絨毛が観察された。また、腺腔膜や空胞の周囲には微細繊維束がみられ、縮小した空胞内にも微絨毛がみられたが、分泌顆粒はほとんど認められなかった (Fig.13-C)。

5. ヘビメロミオシン (HMM) 修飾法による細

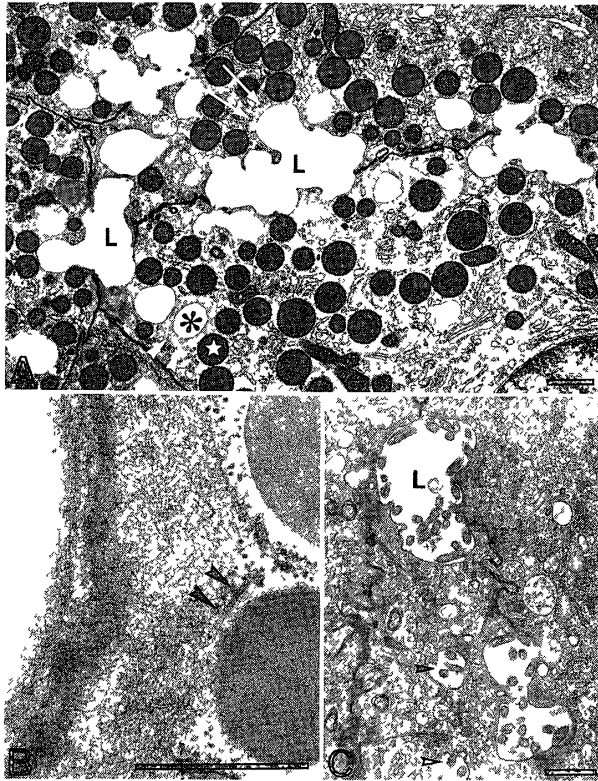


Fig 13 Electron micrographs of cytoskeleton
 A Acini stimulated for 15 min with IPR
 Lumen (L) Secretory granule (☆)
 Fusion-fission of the secretory granules with the plasma membranes (*)
 Enlarged luminal membrane undercoated by microfilaments (arrow)
 The membranes of the secretory granules appeared to become undercoated by microfilaments immediately after fusion with luminal membrane (arrow head) (Bar $1\mu\text{m}$, $\times 9,600$)
 B Acini stimulated for 15 min with IPR
 Microtubule (arrow head) (Bar $0.5\mu\text{m}$, $\times 75,000$)
 C Acini stimulated for 30 min with IPR
 Lumen (L) Microvilli (arrow head)
 (Bar $0.5\mu\text{m}$, $\times 21,300$)

胞骨格の電子顕微鏡的観察

HMM修飾法により、開口分泌過程における微細繊維の変化を、電子顕微鏡で観察した。分泌刺激を行わない静止時の腺房では、狭小な腺腔面に微絨毛が観察された。また、腺腔膜の直下には、HMMで修飾された微細繊維束がみられ、その一部は微絨毛のコア部分を形成していた。細胞質中の分泌顆粒は、高電子密度を保ちサポニンで処理したにもかかわらず膜構造の破壊もほとんどみられなかった。なお、分泌顆粒

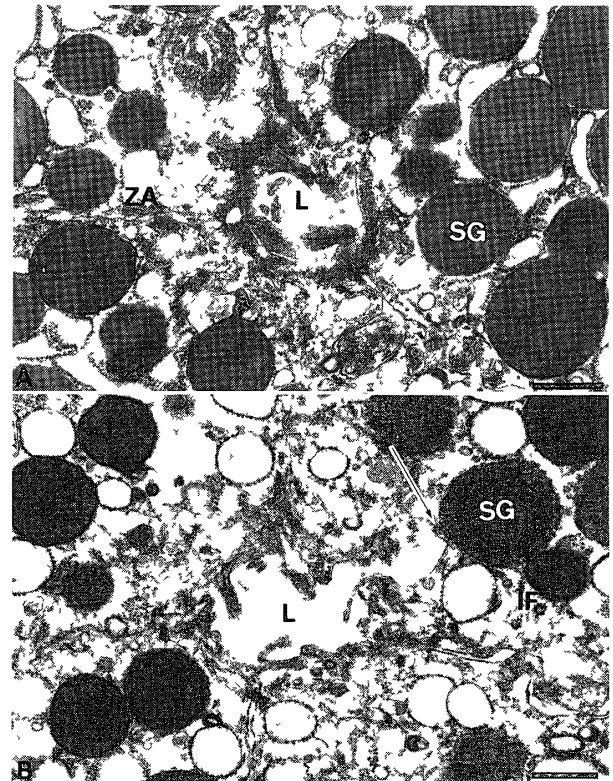


Fig 14 Electron micrographs of HMM decoration method
 A Resting
 Lumen (L) Secretory granule (SG) Zonula adherens (ZA) (Bar $0.5\mu\text{m}$, $\times 29,300$)
 B Acini stimulated for 1 min with IPR
 Lumen (L) Secretory granule (SG)
 Intermediate-sized filament (IF)
 Microfilaments are localized underneath the enlarged luminal plasma membrane (arrow)
 (Bar $0.5\mu\text{m}$, $\times 28,500$)

の周囲には、腺腔膜の直下でみられたような、HMMで修飾される微細繊維束は観察されなかった (Fig 14-A)。

分泌刺激時の腺房では、分泌刺激後1分で、腺腔はわずかに開大し、その腺腔膜に近接して高電子密度の分泌顆粒がみられた。そして、この部分では、HMMで修飾された微細繊維束は、ほかの領域でみられるものに比し、粗であった (Fig 14-B)。

分泌刺激後15分では、腺腔膜は開大し、この腺腔膜に近接して、多数の分泌顆粒大の空胞がみられた。また、この分泌顆粒大の空胞膜や開大した腺腔膜の直下に、HMMにより修飾され

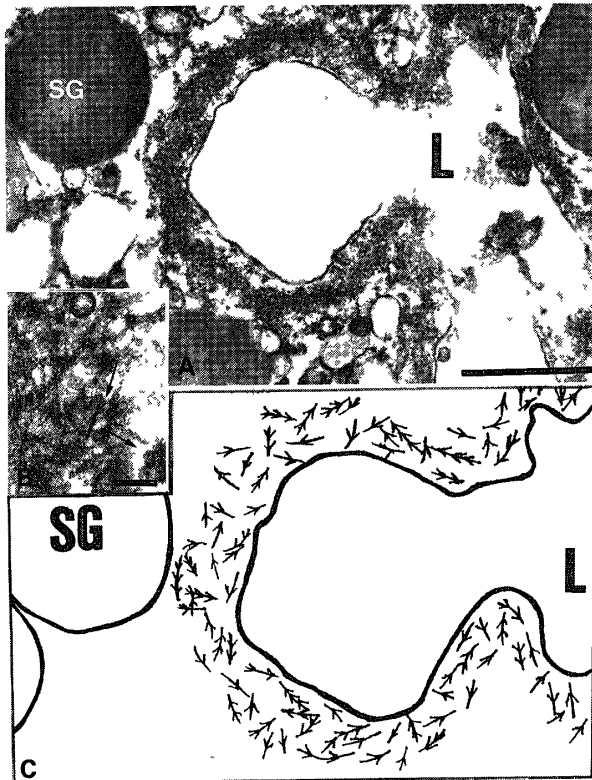


Fig 15 Electron micrographs of HMM decoration method

- A Acini stimulated for 15 min with IPR
Lumen (L) Secretory granule (SG)
(Bar 0.5 μ m, \times 60,000)
- B Acini stimulated for 15 min with IPR
HMM-decorated microfilaments were seen running in random directions underneath fusion-fission of the secretory granules with the plasma membranes
Direction of HMM-decorated microfilaments (arrow)
(Bar 0.1 μ m, \times 90,000)
- C A schematic representation
Lumen (L) Secretory granule (SG)

た微細繊維網が膜を取り囲むように観察され (Fig. 15-A), これらの微細繊維の矢じりの方向は錯走していた (Fig 15-B, C)。

考 察

1. 耳下腺遊離腺房について

近年, 唾液腺の分泌蛋白の生合成や分泌機構を解明するために, 遊離腺房や単離腺房細胞を用いた *in vitro* の実験が行われている¹⁸⁻²⁰⁾。遊離腺房と単離腺房細胞を分泌機能の面から比較すると, 遊離腺房でより高い分泌能を有している

ことが報告されている²¹⁾。そこで, 本研究ではラット耳下腺遊離腺房を用いて研究を進めた。まず, 酵素処理により得られた遊離腺房が分泌機能を有しているか否かを, 培養液中のアミラーゼ活性により検討した。その結果, IPRまたはCCHの刺激により経時的にアミラーゼ活性の増加が認められ, 本研究で用いた耳下腺遊離腺房は, 十分な分泌機能を有していることが確認された。

2. 遊離腺房細胞の形態学的変化について

IPRまたはCCHを作用させ, アミラーゼ分泌刺激を行った遊離腺房の, 経時的な形態学的変化を光学顕微鏡で観察した。

IPR刺激とCCH刺激では, 細胞内情報伝達機構が異なることが知られている。すなわち, IPR刺激の場合は β -アドレナリン受容体の活性化とこれに続く細胞内cyclic AMPの上昇により開口分泌が惹起されるのに対し, CCH刺激ではムスカリン受容体の活性化とこれに続くイノシトール・リン脂質の代謝亢進によって分泌が惹起される⁴⁾。

Okumuraら²²⁾は, ラット耳下腺遊離腺房の開口分泌時の形態変化と, その際の微細繊維の変化を, RP染色により観察した。すなわちIPR分泌刺激後1分で腺腔と細胞間分泌細管の開大がみられ, 15分で活発な開口分泌が生じ, 30分で腺腔側の細胞質中に存在した分泌顆粒はほとんど消失し, 開大した腺腔と分泌細管は刺激前の静止時の状態に回復していたと報告している。また, Flemingら²³⁾は, ラット顎下腺遊離腺房細胞の開口分泌過程における形態の変化を, 電子顕微鏡で観察した。それによると, IPRとCCHでともに分泌刺激後3分から, 分泌顆粒と腺腔膜との融合・開裂がみられ, 15分から20分にかけて, 腺腔側の細胞質中に空胞がみられたことから, IPRとCCHとでは開口分泌過程の形態像に差はないと報告している。本研究でも, 前述のように多少の時間的違いはあるが, IPRと

CCH刺激時の耳下腺遊離腺房に形態的な差異を認めなかった。そこで、以下の実験では、IPRのみによる分泌刺激を行った。

3. 細胞骨格の局在変化について

1) 微細繊維

微細繊維は、筋細胞ではミオシン繊維との相互作用により筋肉の収縮構造を担っていることが知られている²⁴⁾。非筋細胞では、筋細胞のサルコメアのように安定した構造をもたず、主として細胞の動的機能に対応して、その構造が変化するといわれている²⁵⁾。また、分泌細胞では、分泌機構に関与していると報告されている^{26, 27, 28-32)}。開口分泌は、分泌顆粒の細胞内輸送と、それに続く膜の融合と開裂によって、内容物が細胞外へ放出される一連の過程を指している⁶⁾。微細繊維の開口分泌過程における役割については、現在、大きく分けて三つの仮説が提唱されている。

第一は、Lacyら²⁶⁾の説で、微細繊維の収縮機構により、分泌顆粒が腺腔膜に向けて牽引・移動され、開口分泌が行われるとしている。Sendaら²⁷⁾は、ラットの脳下垂体前葉を電子顕微鏡的に観察して、分泌顆粒と腺腔膜を連結する微細繊維が存在したと報告している。

第二は、Trifaloら⁷⁾の説で、微細繊維は、静止時に分泌顆粒の周囲に繊維網を形成し、分泌顆粒を固定するものとしている。そして、分泌刺激時には、この分泌顆粒の周囲に存在する微細繊維網が脱重合されることにより、分泌顆粒の固定が解かれ開口分泌がおこるとしている。

第三は、Orciら²⁸⁾の説で、静止時に腺腔膜の直下にみられる微細繊維の障壁が開口分泌時に破壊され、腺腔膜と分泌顆粒膜が融合するとしている。

唾液腺に限ってみると、佐藤は²⁹⁾、顎下腺分離腺房をIPRで分泌刺激し、その際の腺房の形態的变化を電子顕微鏡的に観察した。それによると、開口分泌に際して、分泌顆粒は、微細繊維

の収縮により腺腔により腺腔に向って移動されると報告している。一方、Segawa and Yamashina³⁰⁾は、刺激前には微細繊維は主として腺腔膜の直下に、ミオシンとともに存在し、開口分泌を防ぐための障壁となっているが、開口分泌時には、分泌顆粒に含まれるアミラーゼを、腺腔にむかって押し出す機構に関与すると推察している。

Tojyoら³¹⁾およびOkumuraら³²⁾は、耳下腺腺房を、サイトカラシンDで処理し、微細繊維を破壊しても、アミラーゼの基礎放出量は増加しないが、分泌刺激を行うと、開口分泌が生じて、腺腔内にアミラーゼが放出されるが、しかし、そのアミラーゼは腺腔内に貯留したまま腺腔外に排出されないと報告し、腺腔膜直下の微細繊維は、開口分泌後の開大した腺腔膜の収縮に関与していると推察している。

本研究による観察では、静止時にTB染色で観察された腺房中央部の狭小な腺腔に一致して、RPの点状の蛍光がみられたが、細胞質中には、細胞頂部から分泌顆粒に向って走行する微細繊維は認められなかった。従って、微細繊維は、静止時には腺腔膜の直下に主として存在することが推察された。

一方、抗アクチン抗体による蛍光染色では、主として腺房細胞の細胞質中に顆粒状の蛍光がみられるが、腺腔にも蛍光が観察された。抗アクチン抗体は、微細繊維の重合アクチンはもとより、単分子のアクチンも認識するとされていることから、静止時の腺房細胞中のアクチンは、その大部分が未重合の形で存在していることが示唆された。事実、非筋細胞の微細繊維を形成しているアクチンは、細胞質中に存在する全アクチン量の半分以下との報告がある。³³⁾

本研究の電子顕微鏡での観察から、静止時の腺房細胞中の微細繊維は、主として腺腔膜の直下に存在し分泌顆粒の周囲には認められなかった。このことから静止時の耳下腺腺房細胞の微

細繊維は、障壁の役割を担っていることが推察された。また、分泌刺激時の、TB染色では、分泌顆粒大の多数の空胞が腺腔側の細胞質中にみられ、RP染色では静止時に比し蛍光の増強がみられた。電子顕微鏡での観察で、分泌刺激時に腺腔膜と融合・開裂した分泌顆粒膜の周囲に微細繊維が認められ、HMM修飾法によりこの微細繊維網は、錯走した矢じり構造を呈していることが知られた。なお、抗アクチン抗体染色でも、同様な蛍光像が観察されが、RP染色に比べて不明瞭であった。この所見から、微細繊維の局在変化に対応するアクチンは、細胞質中に存在するアクチンのうち極めて少量であることが示唆された。

分泌終了時には、TB染色では、腺房細胞の分泌顆粒は減少していたが、RP染色および抗アクチン抗体染色では、分泌刺激前と同様な蛍光像がみられた。

本研究の以上の所見から、耳下腺腺房細胞の腺腔周囲の微細繊維は、非刺激時には分泌顆粒と腺腔膜との融合を阻止する役割を果たしていることが示唆された。

2) 中間径繊維

これまで中間径繊維は、微小管や微細繊維に比し、細胞の形態の保持という面が強調されていたため、開口分泌における中間径繊維の役割については、ほとんど検討されていない。

Takuma and Ichida³⁴⁾は、ラット耳下腺腺房を、蛋白脱リン酸化阻害剤であるオカダ酸やカリクリンAで処理し、アミラーゼ開口分泌に対する影響について検討している。それによると、蛋白脱リン酸化阻害剤によって、アミラーゼの基礎放出量がわずかに促進するが、IPRやcyclic AMPによる刺激はアミラーゼ分泌を強力に抑制すると報告している。また、Takumaら³⁵⁾は、カリクリンAにより強くリン酸化される蛋白は、中間径繊維のケラチンであることを明らかにした。このことから、中間径繊維は開口分泌

に間接的に関与していることを示唆した。

本研究における蛍光顕微鏡による観察では、PKK 1抗体染色でみられるケラチンは、静止時の腺房細胞では核を包み込むようなバスケット状の分布を示していた。そして、分泌刺激時にもケラチンの局在は、ほとんど変化しなかったことから、開口分泌過程で中間径繊維の重合や脱重合が惹起されている可能性は低いものと思われた。

3) 微小管

微小管は、細胞の有糸分裂、細胞の極性維持、細胞中の蛋白輸送および分泌、原形質流動、細胞膜の機能調節などに関与していることが知られている³⁶⁾。

Howell and Tyhurst³⁷⁾は抗微小管剤であるコルヒチンを膵臓の β 細胞に作用させることにより、その分泌が阻害されることを観察し、微小管が分泌顆粒の移動に関与していると推察している。また、Allenら³⁸⁾は、神経細胞の軸索の微小管を観察して、細胞内小器官や分泌小胞が微小管に沿って移動すると報告している。しかし、川井³⁹⁾は、顎下腺腺房細胞に抗微小管剤を作用させても、開口分泌は阻害されなかったと報告している。

本研究の蛍光顕微鏡による観察では、静止時の腺房細胞の、微小管は腺腔膜から基底側に向かって放射状に配列していたが、電子顕微鏡による観察でもこのことが確認された。

以上のことから、耳下腺腺房細胞においては、微小管は細胞の極性を支配し、分泌顆粒の細胞中の配列と分泌顆粒の放出方向を規制していることが示唆された。

結 語

酵素処理によって得られたラット耳下腺遊離腺房を用いて、開口分泌過程における細胞骨格の挙動について検討した。微細繊維、中間径繊維、微小管について、免疫蛍光法と電子顕微鏡によ

る観察を行った。とくに、微細繊維についてはヘビーメロミオシン (HMM) 修飾法により詳細な検討を行った。以上の結果から、次のような結論が得られた。

1. 酵素処理により得られたラット耳下腺遊離腺房について、IPRまたはCCHによる分泌刺激を行ったところ、腺腔が開大し、分泌顆粒が急激に減少し、開口分泌が観察された。
2. 腺房細胞において、微細繊維、中間径繊維、微小管の三種類の主たる細胞骨格蛋白質が確認された。
3. 微細繊維の構成蛋白質であるアクチンを免疫染色した結果、アクチンは細胞質に細顆粒状に分布していた。また、重合したアクチン繊維を特異的に結合するローダミン-ファロイジン染色によって微細繊維を観察したところ、主に微細繊維は腺腔膜直下に局在し、IPR刺激によりローダミン-ファロイジンで染色される小顆粒が劇的に増加したことから、分泌顆粒が腺腔膜と融合したのち、微細繊維により取り囲まれることが示された。
3. 中間径繊維は抗サイトケラチン抗体を用いて免疫染色した結果、中間径繊維は腺房細胞の細胞質に網状に分布していた。また、微小管を抗チューブリン抗体で免疫染色したところ、微小管は細胞質の頂上部と基底部にたいして、縦に放射状に分布していた。分泌時においても、中間径繊維と微小管の分布は静止時とほとんど同様であった。
4. 電子顕微鏡による観察から、開口分泌時、微細繊維は腺腔膜と融合した分泌顆粒の膜の周囲を取り囲んでいたが、細胞質に存在する分泌顆粒の周囲には観察されなかった。
これらのことから、耳下腺腺房細胞の開口分泌過程で主たる役割を担う細胞骨格は、微細繊維であることが示された。微細繊維は静止時、主に腺腔膜直下に局在し、開口分泌を阻止する作用を有し、分泌時には腺腔膜と融合した分泌

顆粒の膜を取り囲んで、アクチン-ミオシン収縮系を介して顆粒内容物を押し出すことで開口分泌に関与することが示唆された。

謝 辞

稿を終えるにあたり、本研究の遂行に多大なる御援助と御協力を頂き、終始御懇意なるご指導を賜りました北海道医療大学歯学部口腔外科第一講座金澤正昭教授、口腔生化学講座市田篤郎教授、口腔解剖学第二講座武田正子教授、歯科薬理学講座東城庸介助教授に心より感謝の意を表します。さらに、本研究を進めるにあたり、御指導と御協力を賜りました口腔外科第一講座奥村一彦講師と同講座の諸先生に深甚なる謝意を表します。

参考文献

- 1) 山根源之 口腔乾燥症の診断と治療, 歯科ジャーナル, 28, 111-117, 1988.
- 2) Rhodus, N L and Schuh, M J Effects of pilocarpine on salivary flow in patients with Sjogren's syndrome, Oral Surg Oral Med Oral Pathol, 72 545-549, 1991
- 3) 倉橋昌司 耳下腺におけるアミラーゼ分泌の調節機序, 東日本歯学雑誌 4 1-10, 1985
- 4) Harper, J F Stimulus-secretion coupling second messenger-regulated exocytosis Adv Second Messenger phosphoprotein Res 22 193-318, 1988
- 5) Suddick, R P and Dowd, F J 唾液分泌のメカニズム, Menaker, L (他田 正, 小野頼英雄, 久米川正好, 齊藤 滋, 監訳) 齶触-その基礎と臨床-, 医歯薬出版, 東京, 1983, 61-110頁.
- 6) Palade, G Intracellular aspects of the process of protein synthesis Science 189 347-358, 1975
- 7) Trifalo J M, Bader, M F and Doucet, J P Chromaffin cell cytoskeleton its possible role in secretion Can J Biochem Cell Biol 63 661-679, 1985
- 8) Trifaro, J M Cellular and molecular mechanisms in hormone and neurotransmitter secretion Can J Physiol pharmacol 68 1-16, 1989
- 9) Takuma, T and Ichida, T Does cyclic AMP mobilize Ca^{2+} for amylase secretion from rat

- parotid cells ? *Biochim Biophys Acta* 887 113-117, 1986
- 10) Bernfeld, P Amylases α and β *Methods Enzymol* 1 149-158, 1955
 - 11) Bradford, M M A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding *Anal Biochem* 72 248-254, 1976
 - 12) Laemmli, U K Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of Bacteriophage T4 *Nature* 227 680-685, 1970
 - 13) Towbin, H, Staehelin, T and Gordon, J Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets Procedure and some applications *Proc Natl Acad Sci USA* 76 4350-4354, 1979
 - 14) Osborn, M and Weber, K Immunofluorescence and immunocytochemical procedures with affinity purified antibodies tubulin-containing structures *Methods Cell Biol* 24 97-132 1982
 - 15) Barak, L S, Yocum, R R, Nothnagel, E A and Webb, W W Fluorescence staining of the actin cytoskeleton in living cells with 7-nitrobenz-2-oxa-1, 3-diazole-phalloidin *Proc Natl Acad Sci USA* 77 980-984, 1980
 - 16) Nisikawa, S and Kitamura, H Actin filaments in the ameloblast of the rat incisor *Anat Rec* 207 245-252, 1983
 - 17) Ohotuki, I, Manzi, R M, Palade, G E and Jamieson, J D Entry of macromolecular tracers into cells fixed with low concentrations of aldehydes *Biol Cellulaire* 31 119-126 1978
 - 18) Mangos, J A, McSherry, N R, Butcher, F, Irwin, K and Barber, T Dispersed rat parotid acinar cells I Morphological and functional characterization *Am J Physiol* 229 553-559, 1975
 - 19) Mangos, J A, McSherry, N R, Barber, T, Arvanitakis, S N and Wagner, V Dispersed rat parotid acinar cells II Characterization of adrenergic receptors *Am J Physiol* 229 560-565, 1975
 - 20) Mangos, J A, McSherry, N R and Barber, T Dispersed rat parotid acinar cells III Characterization of cholinergic receptors *Am J Physiol* 229 566-569, 1975
 - 21) Segawa, A Acinar structure and membrane reorganization as a prerequisite for exocrine secretion in the rat submandibular gland *J Cell Sci* 78 67-85, 1985
 - 22) Okumura, K, Tojyo, Y and Kanazawa, M Changes in microfilament distribution during amylase exocytosis in rat parotid salivary glands in vitro *Archs Oral Biol* 35 677-679, 1990
 - 23) Fleming, N, Teitelman, M and Sturgess, J M The secretory response in dissociated acini from the rat submandibular gland *J Morphol* 163 219-230, 1980
 - 24) Huxley, H E The mechanism of muscular contraction *Science* 164 1356-1365, 1969
 - 25) 三村直稔, 浅野 朗. : アクチン調節蛋白質. 蛋白質, 核酸, 酵素, 臨増, 34 : 1471-1479, 1989.
 - 26) Lacy, P E, Howell, S L, Young, D A and Fink, C J New hypothesis of insulin secretion *Nature* 219 1177-1179, 1968
 - 27) Senda, T, Fujita, H, Ban, T, Zhong, C, Ishimura, K, Kanda, K and Sobue, K Ultrastructural and immunocytochemical studies on the cytoskeleton in the anterior pituitary of rats, with special regard to the relationship between actin filaments and secretory granules *Cell Tiss Res* 258 25-30, 1989
 - 28) Orci, L, Gabbay, K H and Mallaisse, W J Pancreatic beta-cell web Its possible role in insulin secretion *Science* 175 1128-1130, 1972
 - 29) 佐藤知秀 ラット顎下腺分離腺房の微細構造に関する研究. 特にheavy meromyosin修飾法によるアクチンフィラメントの局在について. 歯科学報 88 : 599-631, 1988.
 - 30) Segawa A and Yamashina, S Roles of microfilaments in exocytosis A new hypothesis *Cell Struct and Funct* 14 531-544, 1989
 - 31) Tojyo, Y, Okumura, K, Kanazawa, M and Matumoto, Y Effect of cytochalasin D on acinar cell structure and secretion in rat parotid salivary glands in vitro *Archs Oral Biol* 34 847-855, 1989
 - 32) Okumura, K, Sasaki, Y, Egami, F and Kanazawa, M The role of microfilament system during amylase exocytosis in parotid glands Effect of cytochalasin D *Cell Struct and Funct* 14 881,

- 1989
- 33) 浅野 朗 アクチン結合蛋白質, 代謝23 697-709, 1986.
- 34) Takuma, T and Ichida, T Okadaic acid inhibits amylase exocytosis from parotid acini stimulated by cyclic AMP FEBS Lett 285 124-126, 1991
- 35) Takuma, T, Ichida T, Okumura, K and Kanazawa, M Protein phosphatase inhibitor calyculin A induces hyperphosphorylation of cytokeratins and inhibits amylase exocytosis in the rat parotid acini FEBS Lett 323 145-150, 1993
- 36) 鳥羽親雄 微小管, 病理と臨床5 395-404, 1987.
- 37) Howell, S L and Tyhurst, M Microtubules, microfilaments and insulin secretion Diabetologia 22 301-308, 1982
- 38) Allen, R D, Wess, D G, Hayden, J H, Brown, D T, Fujiwara, H and Simpson, M Gliding movement of and bidirectional transport along single native microtubules from squid axo