

9442 唾液腺を中心とした分泌細胞のイオン動態の光学的手法によるリアルタイム動的解析

助成研究者：葉原 芳昭(岡崎国立共同研究機構 生理学研究所)

共同研究者：菅野 富夫(北海道大学大学院 獣医学部)

ラット唾液腺、膵臓外分泌腺および副腎髄質細胞における細胞内 Na^+ と K^+ の変動をSBFIとPBFIを用いて顕微測光法で検討した。非刺激時の細胞内 Na^+ 濃度は3~7 mMであった。顎下腺細胞をcarbachol (1・100 mM)またはnoradrenaline (1・100 mM)で持続的に刺激すると細胞内 Na^+ 濃度は濃度依存性に数十mMまで上昇した。耳下腺と舌下腺での上昇は弱かった。この分泌刺激物質による細胞内 Na^+ 濃度上昇は細胞外の Na^+ 濃度に依存していた。デジタル画像解析法によって、細胞内 Na^+ が細胞の周辺部から上昇していることが分かった。 β 受容体刺激物質であるisoproterenolは無効であった。いずれの細胞種においても細胞内 K^+ は変動を示さなかった。 $\text{Na}^+\text{-H}^+$ 交換輸送体の阻害剤であるamilorideは非刺激顎下腺細胞の Na^+ を低下させた。Ouabainは極めてわずかに Na^+ 濃度を上昇せしめ、 $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}^-$ 共輸送体阻害剤のfrusemideおよびbumetanideは細胞内 Na^+ 濃度を上昇させた。刺激時の Na^+ 上昇に対してouabainはほとんど効果を示さなかったが、frusemideおよびbumetanideは、刺激で上昇した細胞内 Na^+ 濃度をさらに上昇させた。Amilorideは上昇した Na^+ 濃度を強く低下させた。 Ca^{2+} 除去灌流液で灌流し、carbacholまたはnoradrenalineで刺激したが細胞内 K^+ 濃度は変化しなかった。TEAおよびapaminも刺激時顎下腺細胞の細胞内 K^+ には無効であった。膵臓外分泌腺腺房細胞では、CCK-8, carbachol, secretin, VIPいずれの刺激でも細胞内 Na^+ は不変であった。副腎髄質細胞においてもcarbacholは無効であった。以上の結果は細胞内 Na^+ 変動に関して顎下腺細胞が最も顕著であることを示している。さらに、刺激時においては、細胞内 Na^+ 濃度変動は $\text{Na}^+\text{-H}^+$ 交換輸送体の阻害剤であるamilorideで非常に強く抑制され、逆に $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}^-$ 共輸送体の阻害剤でさらに上昇した。この $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}^-$ 共輸送体の阻害剤での効果は予想外であるが、 $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ が $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}^-$ 共輸送体の活動状態に密接に関連しているということで説明ができる。 $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}^-$ 共輸送体を介する基底側面膜から腺腔側へ向かう Cl^- の一方方向性輸送と Na^+ の細胞間輸送が顎下腺細胞の大きい分泌圧を生み出すのに係わっていると考えられる。この種の駆動力は膵腺房細胞や副腎髄質細胞では非常に弱いと考えられる。

現住所：北海道大学大学院獣医学研究科比較形態機能学講座生理学教室

9442 唾液腺を中心とした分泌細胞のイオン動態の光学的手法によるリアルタイム動的解析

助成研究者：葉原 芳昭（岡崎国立共同研究機構 生理学研究所）

共同研究者：菅野 富夫（北海道大学大学院 獣医学部）

【研究目的】

唾液腺や膵臓、塩腺は塩類を活発に分泌する外分泌腺であり、基本的には体液の主要イオンである Na^+ および Cl^- を細胞内外の電気・化学的ポテンシャル勾配とその勾配を生み出す細胞膜ポンプの働きによって、細胞間隙を介するまたは細胞内を経由しての輸送方式で分泌活動を行っている¹⁾。しかし、その他のイオンの動きも含めて分泌メカニズムの詳細は不明である。分泌メカニズムを解析する手段としては、従来より分泌された物質中の塩類成分を化学的に分析する古典的方法を始めとして、バッチクランプ法に代表される電気生理学的方法や、NMRによる物理化学的方法が用いられてきた。最近、これらの方法に代わりうる新手法が開発された。それは光学的測定法であり、注目するイオンにたいする特異的蛍光色素を用いて、その蛍光特性の変化からイオン濃度の変動をとらえようとするものである²⁾。この方法は従来からの方法に比べていくつかの利点を持っている。とりわけ、分泌機能を保ったままの細胞で、細胞内イオンの空間、時間変動を非侵襲的にリアルタイムでとらえることができるという点で優れている。また2波長測定法が採用されていることにより、色素の不均一な分布に起因する誤差をキャンセルすることができるため、より正確な測定が可能である。本研究では、 Ca^{2+} 感受性色素であるfura-2に類似した性質を持つ Na^+ 感受性色素のSBFIと K^+ 感受性色素のPBFIを用い、さらにSPQ、magfura-2、BCECFなどの Cl^- 、 Mg^{2+} 及び H^+ に特異的な色素を用いて蛍光顕微測光法と画像解析法を組み合わせ、唾液腺を中心とした分泌細胞の塩類分泌反応の基本である細胞内イオン濃度の空間、時間変動を解析することを目的とした。

【研究方法】

1) 細胞分離

本研究では体重180～250 gの雄のSprague-Dawleyラットを用いた。24時間絶食させ、飲水は自由とした。25±1℃、12時間の明暗サイクル（明期6:00～18:00）下で飼育した。頸椎脱臼放血後、顎下腺、耳下腺、舌下腺、膵臓、または副腎髓質を摘出した。

唾液腺腺房の分離³⁾

3種類の唾液腺それぞれの組織片に65単位/mlのコラゲナーゼを含むHEPES緩衝液を2.5 ml組織間に注射し、2.5 mlのコラゲナーゼ溶液中に浮置し、100%酸素を通気して37℃で30分間120サイクル/分の速度で激しく振盪消化した。続いて新しいコラゲナーゼ溶液2.5 mlで30分間振盪消化を行った。組織片を新しいプラスチック試験管に移し、バスツールピベットを用いて機械的な分散を行った。ナイロンメッシュで濾過し、遠心洗浄を3回繰り返して、適量のHEPES緩衝液中に浮遊させた。本法では比較的大型の腺房標本が多数得られたが、細胞内イオン濃度測定には小型のものを選択した。顎下腺は粘液腺細胞と漿液腺細胞から、耳下腺は漿液腺細胞から、そして舌下腺は粘液腺細胞から成る。耳下腺細胞と舌下腺細胞について反応性を比較したが質的な差は認められなかった(結果は示していない)。本研究ではもっぱら顎下腺の粘液細胞を用いた。漿液腺細胞と粘液腺細胞は核の形態、細胞質の状態、および顆粒の密度と分布状態などから顕微鏡下で識別可能である。

膵腺房の分離

膵腺房の分離はHootmanらの方法³⁾をわずかに改良した方法⁴⁾で行った。膵尾部から組織片を切り出し、65単位/mlのコラゲナーゼを含むHEPES緩衝液を2.5 ml組織間に注射し、2.5 mlのコラゲナーゼ溶液中に浮置し、100%酸素を通気して37℃で30分間120サイクル/分の速度で激しく振盪消化した。続いて新しいコラゲナーゼ溶液2.5 mlに変えて30分間振盪消化を行った。組織片を新しいプラスチック試験管に移し、バスツールピベットを用いて機械的な分散を行った。ナイロンメッシュで濾過し、遠心洗浄を3回繰り返して、適量のHEPES緩衝液中に浮遊させた。

副腎髄質細胞の分離

モルモット副腎髄質細胞の分離法⁵⁾を改良して分離操作を行った。65単位/mlのコラゲナーゼを含むHEPES緩衝液を、摘出した両側副腎髄質内にそれぞれ0.5 ml注入し、1 mlのコラゲナーゼ溶液に浮置し、100%酸素を通気して37℃で30分間120サイクル/分の速度で激しく振盪消化した。実体顕微鏡下で副腎を半切し、髄質領域をバスツールピベットで機械的に分散させた。分散した組織をピベットで吸引し、約3 mlの緩衝液を含むプラスチック試験管に移した。この操作を数回繰り返して収量を上げるように努めた。遠心、洗浄を3度繰り返して適量の緩衝液に細胞を浮遊させた。この浮遊液中には比較的多量の皮質細胞と赤血球が混在しているが、形態の違いから顕微鏡下では識別が容易である。

細胞内イオン濃度の測定

Na^+ , K^+ , Cl^- , Mg^{2+} , pHの測定に用いた蛍光色素は、それぞれSBFI, PBFI, SPQ, mag-fura-2, BCECFである。各色素の光学的特性に従って励起フィルター、蛍光フィルター、ダイクロイックミラーを調整した。SPQを除いて標本を各色素のAMエステル体を10~40 μM の濃度で含む緩衝液中で40分間37℃で軽度に振盪混和することにより細胞内に負荷した。

負荷終了後、標本浮遊液を遠心し、上清を捨てて新鮮緩衝液を加えた。容量100 μ lの自作のアクリルチェンバーの底に円形のカバーガラスを張り付け、カバーガラスにCell-Takを塗布して細胞浮遊液を入れ細胞を接着させた。チェンバーを加湿箱に入れ室温で保存した。

倒立顕微鏡（TMD-2またはTMD-300, NIKON）ステージにチェンバーを置き、ノマルスキーの微分干渉または位相差で観察して測定対象とする細胞を選択した。細胞内イオン濃度は顕微測光（P1システム, NIKON）と画像解析法（Argus 100またはArgus 50, Hamamatsu Photonics）で行った。

標本の表面灌流

ペリスタポンプを用いて1 ml/分の速度でチェンバー内の標本を表面灌流した。標本に対する刺激は刺激部室を含まない灌流液を、所定の濃度の刺激物質を含んだ灌流液に変えることによって行った。この流速ではチェンバー内の溶液は60秒以内にほぼ完全に置換されていた。

【研究結果】

SBFIキャリブレーション

図1にラット顎下腺細胞を用いて本研究で得られたSBFIの蛍光ratioと細胞内 Na^+ 濃度の関係の結果を示す。本研究条件下では、キャリブレーション曲線のばらつきが予想外に大きく、かつ70 mMを越えた Na^+ 濃度では曲線の傾斜が鈍くなり、 Na^+ 濃度の値としては信頼性が低いと言わざるを得ない。

顎下腺

図2は10 μ M carbacholおよび10 μ M noradrenalineで持続的に刺激した際の340 nmおよび380 nmの蛍光強度変化を蛍光顕微測光法で測定した結果の一例である。刺激直後に両波長蛍光強度の大きな増加あるいは低下がみられるがこれは細胞集団が収縮することにより、測定ピンホールからはずれずに収縮するか、またはピンホールからはずれて収縮するかに関係していると考えている。この条件下でratio値を算出して時間経過を表示すると図3のようになる。carbachol, noradrenalineとも、刺激濃度が高くなるに従って細胞内 Na^+ 濃度の変化も大きくなる。刺激前の値は平均3-7 mMであり、100 μ M carbachol刺激では数十mMまで増加する。noradrenalineについても濃度依存性が認められた。 β アドレナージックアゴニストであるisoproterenolは無効であった。

Argus 50による通常画像解析によって得られた、分泌刺激物質による刺激前後の細胞内 Na^+ 濃度分布を図4に示した。carbachol, noradrenaline刺激とも腺房の周辺部から中心部へ向けて Na^+ 濃度が上昇する傾向が認められた。なお、実際の解析データは疑似カラー表示されているが、本研究報告書では白黒の濃淡で表示する。

K^+ 濃度変化をPBFIで同様にモニターしたがなんら変化は認められなかった。ouabain,

TEA, apamin, BAPTA/AM存在下および非存在下での Ca^{2+} 除去など、いずれの条件でも細胞内 K^+ は変動を示さなかった。

耳下腺、舌下腺

耳下腺、舌下腺においてもcarbacholおよびnoradrenaline刺激で細胞内 Na^+ 濃度が上昇したが、顎下腺に比べると上昇の程度は小さかった。

膵腺房細胞

膵腺房細胞ではCCK-8, carbachol, secretin, VIPのいずれでも細胞内 Na^+ は変動しなかった。また Cl^- 蛍光指示薬であるSPQおよび Mg^{2+} 蛍光指示薬であるmag-fura-2を用いて検討を行ったが、顕著な変動は認められなかった。

副腎髄質細胞

髄質細胞においてもcarbachol刺激で細胞内 Na^+ は変化しなかった。

以上より、本研究ではもっぱら顎下腺における細胞内 Na^+ の変動に焦点を絞って検討した。

顎下腺における Na^+ 上昇と分泌機序に関する輸送阻害剤の効果

(1) 非刺激時

非刺激時の顎下腺腺房細胞における細胞内 Na^+ 濃度に及ぼす各種イオントランスポート阻害剤の効果を図5にまとめた。 Na^+/K^+ ATPaseの抑制物質であるouabain (1 mM)は時に細胞内 Na^+ 濃度をわずかに上昇させた。 $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ 共輸送体の阻害物質であるfurosemide (1 mM)とbumetanide (100 μM)は細胞内 Na^+ 濃度をすばやく上昇させた。 Na^+/H^+ 交換輸送体の阻害物質であるamiloride (100 μM)は細胞内 Na^+ 濃度を低下させた。ただし、ratioの値としてはかなり大きい、この時の実際の濃度変化はわずかである(キャリブレーションの結果を参照)。

(2) 刺激時

carbacholおよびnoradrenalineで持続的に刺激を受けている腺房細胞の細胞内 Na^+ 濃度変化に対する各種イオントランスポート阻害剤の効果を図6にまとめた。使用濃度は非刺激時の細胞に用いたものと同一である。ouabainの効果は刺激により上昇した細胞内 Na^+ 濃度をさらにわずかに上昇させた。furosemideとbumetanideは予想に反して細胞内 Na^+ 濃度を大きく増加させた。amilorideの効果は大変強く、非刺激時のレベルまで細胞内 Na^+ 濃度を低下させた。

外液 Na^+ 濃度の影響

刺激による細胞内 Na^+ 濃度の上昇に関係する Na^+ の供給起源が細胞外であると考えられるので、細胞外 Na^+ を Li^+ で置換した際の細胞内 Na^+ 濃度変化を検討した(図7)。明らかに、細胞外 Na^+ 濃度を減少させると刺激で上昇する細胞内 Na^+ 濃度の割合が低下し、17 mM $[\text{Na}^+]_o$ では細胞内 Na^+ 濃度はむしろ減少した。

【考 察】

本研究において細胞内 Na^+ 濃度の変動を蛍光色素であるSBFIを用いることにより、リア

ルタイムに測定することが可能であることが明らかとなった。この変化は唾液腺細胞で大きく、今回検討した唾腺房細胞と副腎髄質細胞ではほとんど変動しないことも明らかとなった。唾液腺のなかでも顎下腺での変動が最も大きく、非刺激時数mMから刺激時には数十mMと非常に大きく変動した。この細胞内 Na^+ 濃度の上昇は細胞の収縮による色素の濃縮によるものではない。収縮の時間経過と Na^+ 上昇時間経過にはずれがある。また、*ratiometry*はこれらの人工的な要因をキャンセルするし、細胞外の Na^+ を置換すると細胞内濃度が増加しないことから明らかである。さらに、細胞内濃度上昇は細胞の収縮が回復しても続いていることから細胞内濃度が実際上昇していると考えられる。この細胞内 Na^+ 上昇に関係する受容体は、ムスカリン様受容体と α アドレナリン受容体であり、 β アドレナリン受容体は関与していない。細胞内 Na^+ 変化が唾液腺、特に顎下腺で顕著なことからこの Na^+ 濃度変化がこの分泌細胞における活発で高い分泌圧を作り出す駆動力の要因になっていることが推測される。

画像解析の結果はこの上昇に結びつく Na^+ が細胞外から細胞内に流入であることを示唆している。また細胞外 Na^+ の置換による Na^+ 濃度上昇の抑制もこれを支持する。

細胞内 K^+ 変化が認められなかった理由として以下の可能性が考えられる。1) K^+ 輸送料が本測定法の測定限界以下であって検出不能である可能性、2) K^+ は実際変動しない可能性、3) 非常に早い調節機序によって細胞内 K^+ 濃度がある一定のレベルに保たれているという可能性。これらのうちいずれが原因であるのか、PBFIの特性も考慮して今後検討する必要がある。

furosemide, *bumetanide*によって細胞内 Na^+ 濃度が上昇したのは予想外であった。この結果はFoskettらの結果とは異なる⁶⁾。これら $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}^-$ 共輸送体阻害物質は、細胞外からの Na^+ 流入を抑制するので細胞内 Na^+ 濃度は低下するかあるいは不変であるべきである。しかし、本結果は上昇を示しており、この結果の説明は複雑である。阻害物質を用いた検討の結果を考察して導き出した顎下腺細胞における分泌イオン機序のモデルを図8に示した。

*amiloride*が非刺激時の Na^+ 濃度を低下させたことから、非刺激時にも $\text{Na}^+\text{-H}^+$ 交換輸送系を介して細胞外 Na^+ が細胞内に流入していると考えられる。さらに、*amiloride*が刺激時の Na^+ 濃度上昇も抑制することから、 $\text{Na}^+\text{-H}^+$ 交換輸送系が刺激時には活性化すると考えられる。

*furosemide*と*bumetanide*の結果については現在以下のように考えている。 $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}^-$ 共輸送体の活性状態が $\text{Na}^+\text{-K}^+$ ポンプの活性を規定している。分泌刺激物質は $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}^-$ 共輸送体と $\text{Na}^+\text{-H}^+$ 交換輸送体の活性を促す。 $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}^-$ 共輸送体の活性上昇は、それと機能的に関連している $\text{Na}^+\text{-K}^+$ ポンプ活性を上昇させ、細胞内の Na^+ を細胞外に汲み出す。従って、 $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}^-$ 共輸送体が阻害物質によって抑制されれば $\text{Na}^+\text{-K}^+$ ポンプ活性も抑制され、 $\text{Na}^+\text{-H}^+$ 交換輸送体を介して流入した Na^+ によって細胞内濃度が高くなるというよ

うに考えている。これによると刺激時と非刺激時の細胞内イオン機序の違いは単に輸送体活性の程度の違いであって、新たに輸送体の活性が出現するというものではない。

顎下腺でのみ細胞内 Na^+ 濃度が非常に高くなるという事実は、この細胞の特殊な分泌様式に結びつくと考えざるを得ない。他の分泌腺と違って、顎下腺の分泌圧は大変高く、静水圧で数mに達する。この高い分泌圧を生み出すのにおそらくこの特異的な細胞内 Na^+ 濃度の上昇が関係しており、このイオン浸透圧が水の異動の駆動力になっているのかもしれない。また、 Na^+ の基底側面膜側から腺腔側への一方向性細胞間輸送のみならず細胞内輸送もある可能性も残されている。この点については、今後検討を進めていく計画である。

【今後の課題】

(1) 基底側面膜側から腺腔側への Na^+ の一方向性細胞間輸送の可能性について、(2) 顎下腺における Cl^- と Mg^{2+} の変動の検討、(3) 細胞内 K^+ 濃度の変動について、(4) サイクリックAMP、イノシトール3リン酸、アラキドン酸、プロテインキナーゼC等、他の細胞内情報伝達系と Na^+ 変動の関係について、(5) Ca^{2+} と Na^+ 変動の関係について

【文 献】

1. Case, R. M., Evans, R. L., Lau, K. R. and Steward, M. C. (1992) Salivary secretion: Future prospects. In: Salivary Secretion: Control and Mechanisms. eds, Murakami, M., Seo, Y. and Ishikawa, T., pp109-pp112, Seiriken
2. Grynkiewicz, G., Poenie, M.A. and Tsien, R. Y. (1985) A new generation of Ca^{2+} indicators with greatly improved fluorescence properties. J. Biol. Chem. 260, 3440-3450
3. Hootman, S. R., Brown, M. E., Williams, J. A. and Logsdon, C. D. (1986) Regulation of muscarinic acetylcholine receptors in cultured guinea pig pancreatic acini. Am. J. Physiol. 251, G75-G83
4. Habara, Y. and Kanno, T. (1991) Dose-dependency in spatial dynamics of $[\text{Ca}^{2+}]_c$ in pancreatic acinar cells. Cell Calcium 12, 533-542
5. Kanno, T. and Habara, Y. (1991) Dose-dependency in spatial dynamics of $[\text{Ca}^{2+}]_c$ in adrenal chromaffin cells. Cell Calcium 12, 523-531
6. Foskett, J. K., Monica, M. Y. and Robertson, M. (1992) Imaging ion and fluid secretion in single salivary acinar cells. In: Salivary Secretion: Control and Mechanisms. eds, Murakami, M., Seo, Y. and Ishikawa, T., pp73-pp76, Seiriken

図1 SBFi蛍光比と $[Na^+]_i$ のキャリブレーション曲線

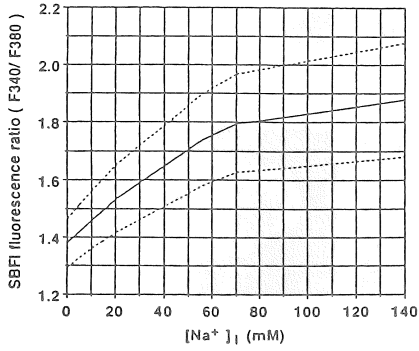


図2 分泌刺激物質
投与後の
実測蛍光強度変化

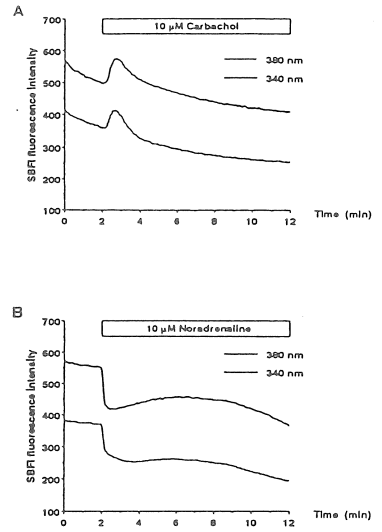
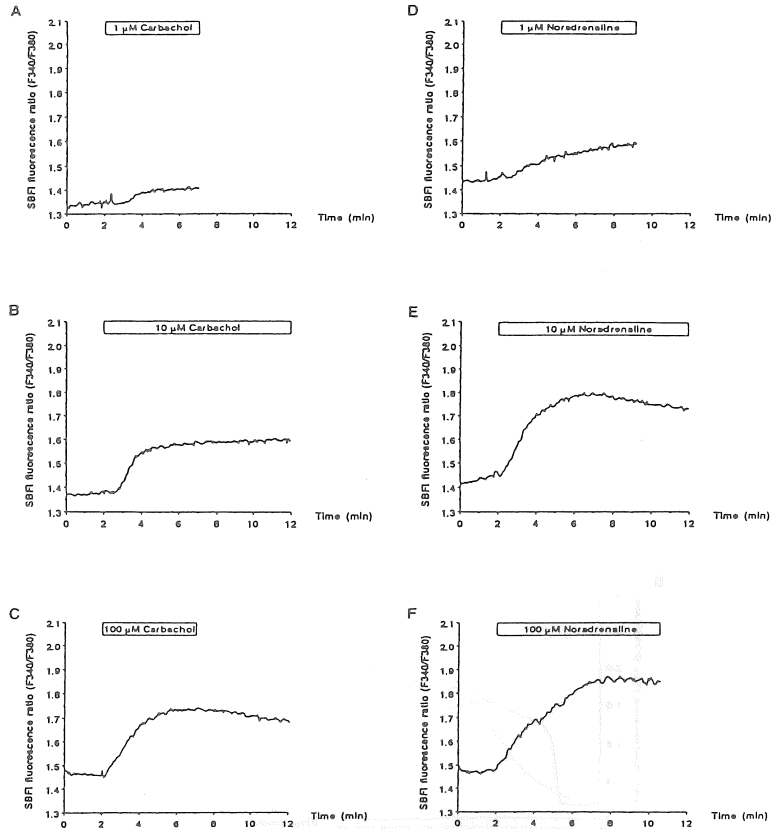


図3 分泌刺激物質投与による
SBFi蛍光比変化の濃度依存性



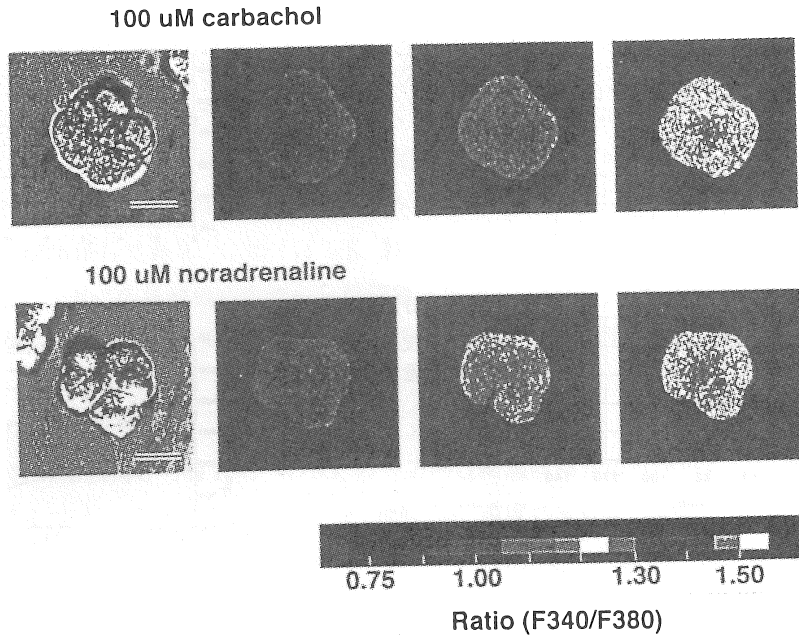


図4 分泌刺激物質投与後の $[Na^+]_i$ の空間的変動

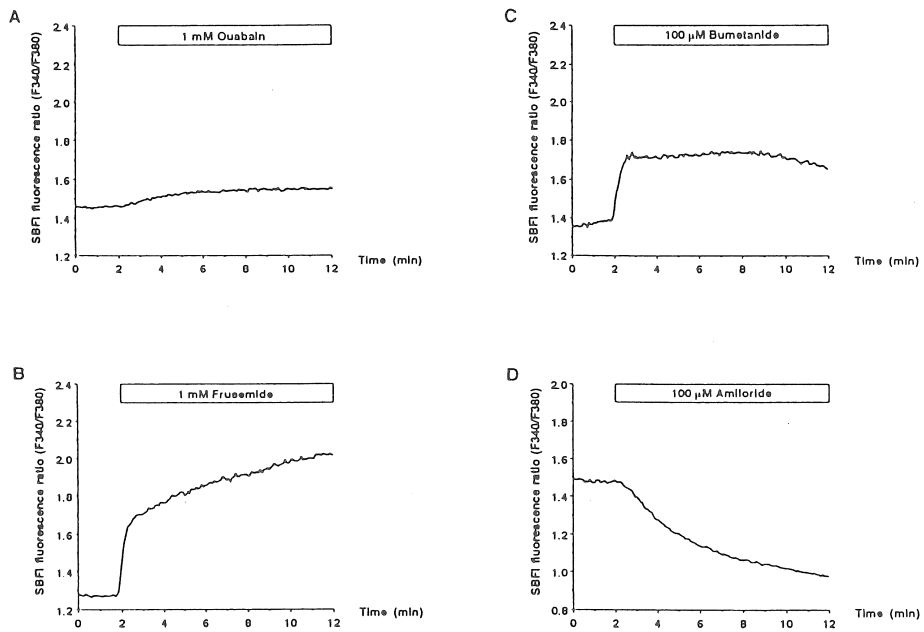


図5 非刺激時 $[Na^+]_i$ に及ぼすイオン輸送阻害剤の効果

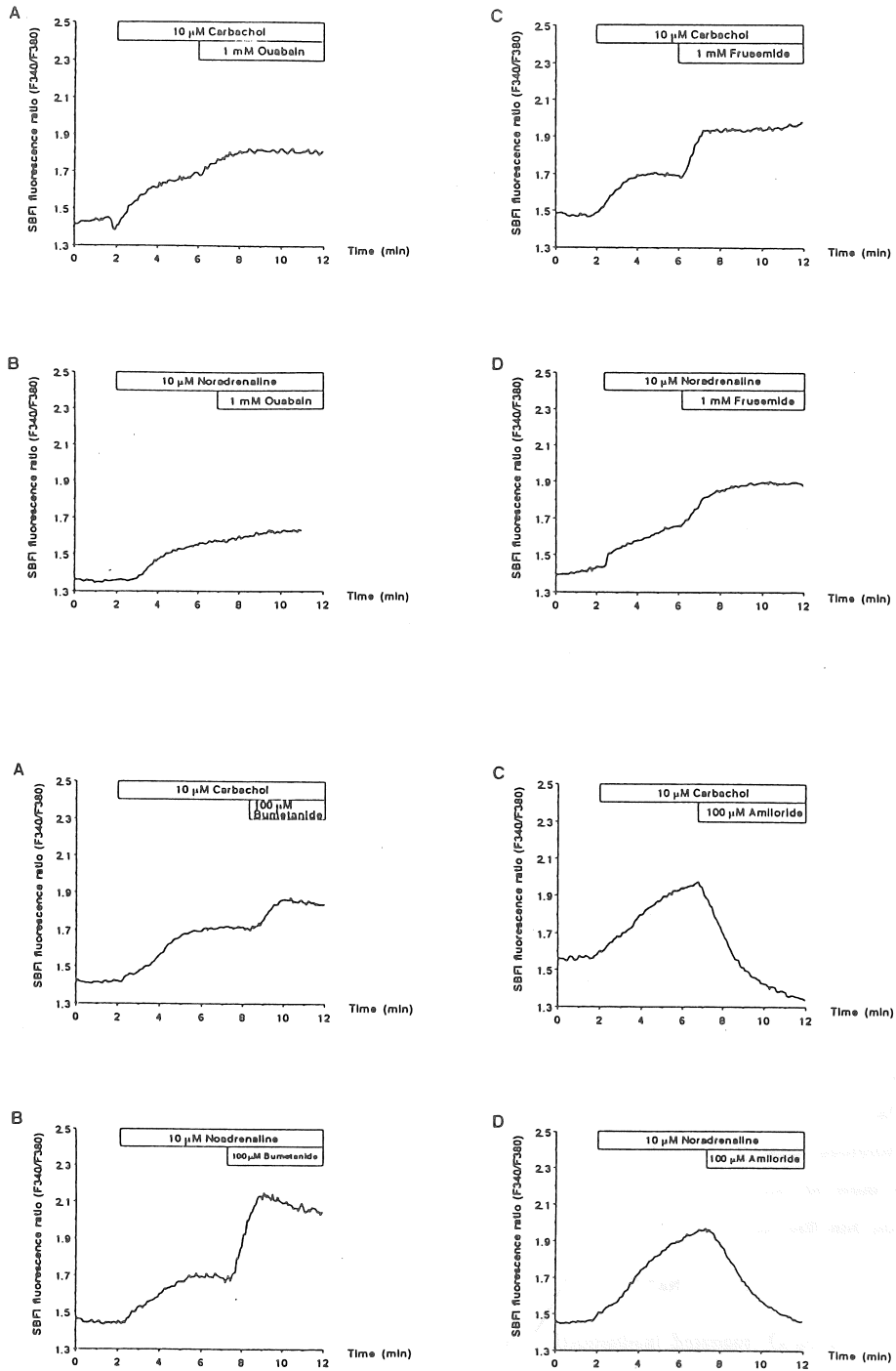


図6 刺激時 $[Na^+]_i$ に及ぼすイオン輸送阻害剤の効果

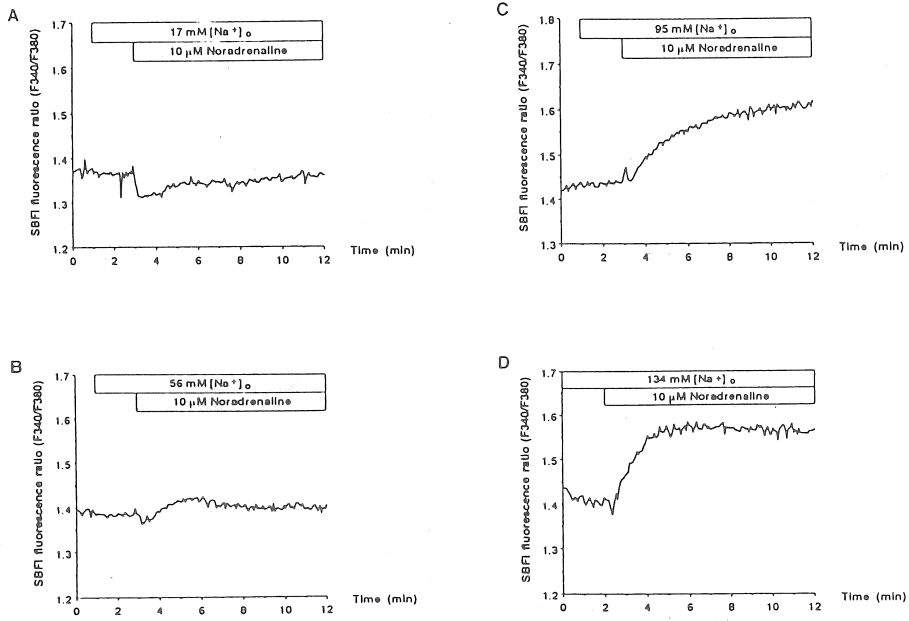


図7 刺激時 $[Na^+]_i$ 変動に及ぼす細胞外 Na^+ 置換の効果

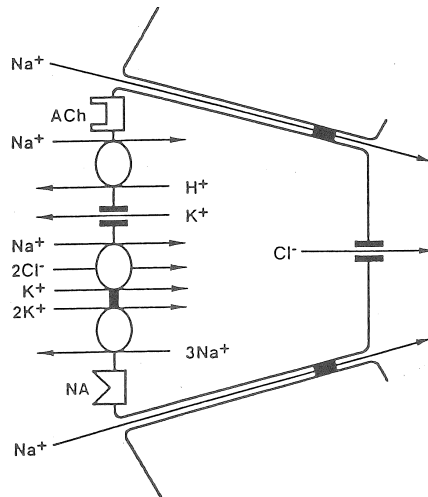


図8 顎下腺分泌細胞のイオン輸送モデル

Spatiotemporal dynamics of cytosolic ions measured with optical methods in isolated cells of salivary and other secretory glands of the rat

Yoshiaki Habara and Tomio Kanno

National Institute for Physiological Sciences and Hokkaido University

Spatiotemporal dynamics of $[Na^+]_i$ and $[K^+]_i$ were studied by microfluororatiometry using fluorescence indicators, SBFI and PBF1, in acinar cells isolated from the salivary glands and from the exocrine pancreas and in adrenal chromaffin cells isolated from the rat. $[Na^+]_i$ of unstimulated cells was 3-7 mM in all cell types. Continuous stimulation of submandibular acinar cells with carbachol (1-100 μ M) or noradrenaline (1-100 μ M) increased $[Na^+]_i$ to several tens mM in a dose-dependent manner. The stimulation less increased $[Na^+]_i$ of parotid and sublingual acinar cells. The secretagogue-induced increase in $[Na^+]_i$ depended on $[Na^+]_o$. Digitized image analysis showed that the increase in $[Na^+]_i$ occurred from the basolateral region. A beta-agonist, isoproterenol (100 μ M), was without effect. $[K^+]_i$ did not change by stimulation in all cell types examined. An inhibitor of Na^+-H^+ antiporter, amiloride (100 μ M), decreased $[Na^+]_i$ in unstimulated submandibular acinar cells. Ouabain (1 mM) slightly increased $[Na^+]_i$ and inhibitors of $Na^+-K^+-2Cl^-$ cotransporter, frusemide (1 mM) and bumetanide (100 μ M), increased $[Na^+]_i$. Ouabain caused a faint effect on secretagogues-induced increase in $[Na^+]_i$, whereas a further increase in $[Na^+]_i$ was observed with frusemide and bumetanide. Amiloride significantly decreased $[Na^+]_i$ of submandibular acinar cells stimulated with secretagogues. Stimulation with 10 μ M carbachol or noradrenaline under Ca^{2+} -deficient condition in the absence or the presence of BAPTA/AM unchanged $[K^+]_i$. TEA and apamin were also without effect in stimulated submandibular acini. No changes in $[Na^+]_i$ or $[K^+]_i$ was detected in pancreatic acinar cells upon stimulation with the peptide CCK-8 (100 pM), carbachol (3 μ M), the peptide secretin (100 pM), and the peptide hVIP (1 nM). Carbachol (3 μ M) was without effect in $[Na^+]_i$ and $[K^+]_i$ of adrenal chromaffin cells. These results indicate that submandibular acinar cells are unique in terms of $[Na^+]_i$ dynamics. $[Na^+]_i$ of submandibular acinar cells changes much more drastically by Na^+-H^+ antiporter and $Na^+-K^+-2Cl^-$ activities during stimulation. The effect of frusemide and bumetanide on $[Na^+]_i$ suggests that Na^+-K^+ ATPase is functionally associated with $Na^+-K^+-2Cl^-$ cotransporter. Unidirectional Cl^- flow via $Na^+-K^+-2Cl^-$ cotransporter as well as paracellular Na^+ flow appear to be involved in creating large secretory pressure for salivary extrusion in submandibular acinar cells. This driving force may be weak in parotid and sublingual acinar cells and may not be very active in pancreatic acinar cell and adrenal chromaffin cell.

Present address: Laboratory of Physiology, Department of Biomedical Sciences, Graduate School of Veterinary Medicine, Hokkaido University