

学 位 論 文 題 名

Postnatal growth of the rat palatine gland

(ラット口蓋腺の生後発育に関する形態学的研究)

学位論文内容の要旨

【緒言】

唾液腺の組織発生に関する形態学的研究は、これまで主に大唾液腺が対象として行われており、多くの知見が蓄積されてきた。しかし小唾液腺に関する研究は非常に少ない。小唾液腺の一つである口蓋腺は軟、硬口蓋粘膜上皮下に位置し、腺組織と口腔を連結する排泄管が複数存在するという特徴を有している。また、唾液腺腫瘍の好発部位の一つでもあり、口蓋腺の組織発生を知ることは興味深い。しかし口蓋腺の組織発生に関する研究は他の小唾液腺と同様に非常に少なく、不明な点が数多く残されている。そこで本研究では、口蓋腺が生後どのように発育していくのかを明らかにするため、ラット口蓋腺を組織学的、免疫組織化学的に検索した。

【材料と方法】

実験動物には、生後 0、1、2、3、4、6、8 週齢の Wistar 系雄性ラット各 3~4 匹を用いた。各動物に 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) を 50 mg/kg の割合で腹腔内投与し、1 時間後に屠殺した。屠殺後、一塊として取り出した頭部を 4% パラホルムアルデヒドにて固定、ギ酸・クエン酸ナトリウム混和液にて脱灰後、頭部を正中矢状断し、右側を試料とした。試料より、厚さ 5 $\mu$ m の矢状断パラフィン連続切片を作製し、ヘマトキシリン・エオジン染色 (HE)、アルシアンブルー染色 (AB) を行い、組織学的に検索するとともに、口蓋腺の長径、幅径、高径、及び排泄管数を計測した。長径、高径に関しては、矢状断 HE 標本から顕微鏡下にて計測し、その中の最大値を試料の値とした。幅径は切片の厚さと口蓋腺正中部から右側辺縁部までの切片数との積を計測値とした。排泄管数に関しては、それぞれの試料において連続切片上から全排泄管数をもれなく計測した。

さらに、免疫組織化学的検索を行うため各動物につき 5 枚の切片を無作為に選び、脱パラフィン後、前処置として 0.1% トリプシン処理を 37 $^{\circ}$ C で 20 分間、3N-HCl 処理を室温で 10 分間行った。次に、一次抗体として抗 BrdU マウスモノクローナル抗体、二

次抗体として抗マウスウサギ Ig G、そして Streptavidin – Biotin peroxidase complex を室温にて順に反応させた。反応部位を 3,3' – diaminobenzidine によって発色させた後、ヘマトキシリンによる核染色を行った。染色後、各切片につき腺房細胞 500 個、導管・排泄管細胞 250 個を任意に選び、その中の BrdU 陽性細胞数を計測し、生後発生における細胞増殖活性について検索した。

#### 【結果】

組織学的には、生後 0 週齢では口蓋腺は導管と小型で未熟な腺房から成っており、これらの間には豊富な結合組織が介在していた。未熟な腺房を構成する細胞は、基底側に位置する類円形ないし楕円形の核と、明るい細胞質を持っており、これらの細胞が多数集まり腺腔を囲んでいた。明るい細胞質はアルシアンブルー陽性を示していた。未熟な腺房を構成する細胞には分裂像が少数ながら認められた。導管は 2~3 層の上皮細胞から構成されており、排泄管に直接連続していた。1 週齢では、腺組織内の導管や結合組織は減少し、成熟しつつある腺房が増加していた。腺房では基底側に圧平されている扁平な核と豊富で明るい細胞質を持つ細胞が主体となっており、これらは円~楕円形の終末部を構成していた。腺房はいくつかが集まり、結合組織によって境されるようになり、小葉構造を呈し始めていた。2 週齢以降、口蓋腺の大きさは経時的に増大し、口蓋腺の大部分は成熟した粘液腺房から成っていた。腺房は管状腺の構造を示しており、同時に小葉構造が明瞭となっていた。腺後方部には半月を形成する漿液性腺房細胞が少数ながら認められた。腺組織内に介在部、線条部、小葉間導管は全く認められず、管状腺が直接排泄管に連続し、口腔内に開口していた。

組織計測学的には、口蓋腺の大きさは、経時的に長径、幅径、高径ともに増加していた。8 週齢では 0 週齢と比較して、長径が約 4 倍、幅径が約 2 倍、高径が約 10 倍に増加していた。排泄管は出生直後においてすでに 23.0 本が認められ、3 週齢までは急速に増加し、その後は緩やかに増加していた。

免疫組織化学的には、0 週齢では未熟な腺房や導管に BrdU を取り込む細胞が多数認められた。また実質を取り巻く結合組織中の線維芽細胞様細胞にも BrdU 陽性細胞がみられた。1 週齢では、さらに多くの BrdU 陽性細胞が成熟しつつある腺房や導管・排泄管に見られ、口蓋粘膜上皮や結合組織中にも多くの BrdU 陽性細胞が認められた。2 週齢以降では、成熟した粘液腺房や排泄管に BrdU 陽性細胞が認められたが、その数は経時的に減少していた。腺房細胞の BrdU 標識率は 1 週齢において 10.1% とピークに達し、その後経時的に減少し、8 週齢では 0.2% を示していた。導管・排泄管細胞では、0 週齢において 10.1% と最も高く、以後経時的に減少し、8 週齢で 2.5% を示していた。

#### 【考察】

生後口蓋腺の大きさは長径、高径、幅径ともに経時的に増大していた。また免疫組

織化学的検索により、腺房細胞、導管・排泄管細胞は生後初期では比較的高い増殖活性を示し、その後減少しながらも全ての週齢で増殖活性を保っていた。これらのことから、生後にみられる口蓋腺の増大には、腺実質細胞の増殖が重要な役割を果たしていることが示唆される。

また、排泄管は出生直後においてすでに複数認められ、その後経時的に増加していた。唾液腺は一般的に、口腔上皮の間葉内への陥入に始まり、その後上皮索の増殖、分岐を経て、各種導管や腺房への分化が生じるということが知られており、最初に陥入した部分の上皮索は腺形成後、排泄管として機能する。このように排泄管は口腔上皮の陥入の結果生じるものであり、口蓋腺の生後発育過程において排泄管が増加しているということは、口腔上皮からの腺組織形成が生後も引き続き起こっていることを示唆していると考えられる。

これまで文献では、ラット口蓋腺は混合腺であるという説と純粘液腺であるという説が報告されてきている。本研究で口蓋腺全てを連続切片で観察したところ、半月を構成する漿液性腺房細胞が口蓋腺後方部にきわめてまれに認められた。したがってラット口蓋腺は混合腺であることが本研究により示された。

#### 【結論】

出生直後未成熟だったラット口蓋腺は生後成熟とともに三次元的に増大し、これには腺実質細胞の増殖が重要な役割を果たしていることが明らかになった。また、排泄管は生後も増加することが確認され、これも腺増大に関与している可能性が考えられた。

# 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 森 田 学  
副 査 教 授 脇 田 稔  
副 査 教 授 吉 田 重 光

学 位 論 文 題 名

## Postnatal growth of the rat palatine gland

(ラット口蓋腺の生後発育に関する形態学的研究)

審査は、3名の審査員が個別に行った。試験は口頭試問の形式で、学位申請論文の内容とそれに関連した学科目について行われた。以下に提出論文の要旨と審査の内容を述べる。

唾液腺の組織発生に関する形態学的研究は、これまで主に大唾液腺が対象として行われており、多くの知見が蓄積されてきた。しかし小唾液腺に関する研究は非常に少なく、特に口蓋腺に関してはほとんど検索されていない。本研究は、口蓋腺が生後どのように発育していくのかを明らかにするため、ラット口蓋腺を組織学的、免疫組織化学的に検索したものである。

実験動物には、生後0、1、2、3、4、6、8週齢のWistar系雄性ラット各3~4匹を用い、各動物に5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU)を50 mg/kgの割合で屠殺1時間前に腹腔内投与した。屠殺後、一塊として取り出した頭部を4%パラホルムアルデヒドにて固定、ギ酸・クエン酸ナトリウム混和液にて脱灰後、頭部を正中矢状断し、右側を試料とした。試料より、厚さ5 $\mu$ mの矢状断パラフィン連続切片を作製し、ヘマトキシリン・エオジン染色(HE)、アルシアンブルー染色(AB)を行い、組織学的に検索するとともに、口蓋腺の長径、幅径、高径、及び排泄管数を計測した。さらに、抗BrdUモノクローナル抗体を用いた免疫染色を行い、生後発育における細胞増殖活性について検索した。

その結果、組織学的には生後0週齢では口蓋腺は導管と小型で未熟な腺房から成っており、これらの間には豊富な結合組織が介在していた。1週齢では、腺組織内の導管や結合組織は減少し、成熟しつつある腺房が増加していた。2週齢以降、口蓋腺の大部分は成熟した粘液腺房から成っており、腺房は管状腺の構造を示していた。腺後方部

には半月を形成する漿液性腺房細胞が少数ながら認められた。腺組織内に介在部、線条部、小葉間導管は全く認められず、管状腺が直接排泄管に連続し、口腔内に開口していた。

組織計測学的には、口蓋腺の大きさは、経時的に長径、幅径、高径ともに増加していた。8週齢では0週齢と比較して、長径が約4倍、幅径が約2倍、高径が約10倍に増加していた。排泄管は出生直後においてすでに23.0本が認められ、3週齢までは急速に増加し、その後は緩やかに増加していた。

免疫組織化学的には、0週齢では未熟な腺房や導管にBrdUを取り込む細胞が多数認められた。1週齢では、同様に多くのBrdU陽性細胞が成熟しつつある腺房や導管・排泄管に見られ、口蓋粘膜上皮や結合組織中にも多くのBrdU陽性細胞が認められた。2週齢以降では、成熟した粘液腺房や排泄管にBrdU陽性細胞が認められたが、その数は経時的に減少していた。腺房細胞のBrdU標識率は1週齢において10.1%とピークに達し、その後経時的に減少し、8週齢では0.2%を示していた。導管・排泄管細胞では、0週齢において10.1%と最も高く、以後経時的に減少し、8週齢で2.5%を示していた。

以上の結果から、導管・排泄管細胞は生後初期では比較的高い増殖活性を示し、その後減少しながらも全ての週齢で増殖活性を保っていた。このことから、生後にみられる口蓋腺の増大には、腺実質細胞の増殖が重要な役割を果たしていることが示唆される。

また、排泄管は生後経時的に増加していた。唾液腺は一般的に、口腔上皮の間葉内への陥入に始まり、その後上皮索の増殖、分岐を経て、各種導管や腺房への分化が生じることが知られており、最初に陥入した部分の上皮索は腺形成後、排泄管として機能する。このように排泄管は口腔上皮の陥入の結果生じるものであり、生後排泄管が増加しているということは、口腔上皮からの腺組織形成が生後も引き続き起こっていることを示唆している。

論文の審査にあたって、各審査委員と申請者との間で、本論分の内容とその関連事項について質疑応答がなされた。設問は口蓋腺を対象とした組織学的研究を行うことの意義、口蓋腺と口蓋の成長に関する比較、排泄管が増加している部位について、腺細胞のBrdU陽性率の経時的変化、標本作製法、本研究と予防歯科領域との関連等について詳細にわたって行われた。申請者はこれらの設問に対しそれぞれ適切な回答を行った。従って申請者は研究の立案と実行、結果の収集とその評価について、十分な能力があることが理解され、本研究に直接関係する事項のみならず、組織学全般に亘って広い学識を有していると認められた。また本研究は、これまで大唾液腺で検索されてきた唾液腺の形態形成過程が腺の成長発育の点で小唾液腺では大きく異なること、

とくに分泌を司る終末部の分化の過程が特異的であることを細胞増殖の観点から初めて明らかにした点で極めて独創性の高いものと評価された。従って本論文申請者は博士（歯学）にふさわしいものと認められた。