

学 位 論 文 題 名

液状食飼育がラット口蓋腺に与える影響に関する組織学的
および免疫組織化学的研究

学位論文内容の要旨

【諸言】

近年の食習慣の特徴の一つとして様々な年代において柔らかい食品をとる機会が増えてきたことが挙げられる。このような食習慣が口腔関連諸組織に与える影響を解明するために様々な実験的研究がなされてきた。液状食飼育ラットでは前顔面高は固形食飼育ラットより長く、下顎窩は前方に位置し、頭蓋骨の縫合が早期に形成される。また、咀嚼する食物性状を識別する機能が低下し、咀嚼パターンは不安定になると報告されている。

液状食の影響を調べた研究の中には唾液腺に関するものもある。耳下腺では萎縮が誘導され、肉眼的な大きさが縮小し、唾液の分泌量およびアミラーゼ活性は減少する。萎縮した耳下腺を形態学的に観察すると腺房細胞の収縮や空胞変性、分泌顆粒の減少、また免疫組織化学的研究によると腺房細胞の増殖活性は抑制され、アポトーシスは促進されることも明らかとなった。これに対して舌下腺では液状食飼育の影響はないという意見が多い。また顎下腺では萎縮するという報告もあれば萎縮性変化は起こらないという報告もあり、結論はまだ得られていない。以上のように液状食に対する唾液腺の反応は唾液腺の種類によって異なると考えられるが、小唾液腺に関する同

様の研究はなく、詳細は不明である。

そこで本研究では小唾液腺の中でも最も大きく代表的で義歯の維持に重要な口蓋腺を研究対象とし、液状食飼育によってどのような影響を受けるかを明らかにすることにした。

【材料と方法】

実験動物には7週齢のWistar系雄性ラット24匹を用い、実験群と対照群とに12匹ずつ分けた。動物の体重は実験期間中毎日計測し、対照群のラットには通常固形食を与え、実験群には液状食として固形食を粉末状にしたものと水を1対2の割合で混和した飼料を与えた。実験期間は両群とも1週、4週、8週(各4匹ずつ)とした。実験期間を終了したラットには灌流固定1時間前に5-bromo-2'-deoxyuridine(BrdU)を腹腔内投与した。全身麻酔後、4%パラホルムアルデヒド溶液を用いて灌流固定を行った。灌流固定後断頭し、口蓋腺を含む上顎を摘出した。摘出後24時間浸漬固定し、試料を10%EDTAで30日間脱灰を行い、上顎を正中矢状面にて切り出し、右側を通法に従ってパラフィン包埋した。

包埋したパラフィンブロックを切り出し面から側方に向かって口蓋腺が無くなるまで厚さ4 μ m で連続薄切した。切片にはヘマトキシリン-エオジン染色(HE)、過ヨウ素酸シッフ染色(PAS)、アルシアンブルー染色(AB)を施し、組織学的に検索した。

作製した HE 標本を用い口蓋腺の大きさを測定した。口蓋腺の上縁から下縁までの

距離の最大値を高径、前縁から後縁までの距離の最大値を長径とした。連続切片数に $4\mu\text{m}$ (切片の厚さ) を掛けた値を幅径とした。

免疫組織学的検索には細胞増殖活性を観察するために BrdU 免疫染色、アポトーシス細胞検出のために Caspase-3 免疫染色を行った。前処理後、BrdU 染色では一次抗体には抗 BrdU-マウスモノクローナル抗体、二次抗体にはビオチン標識抗マウス-ウサギポリクローナル抗体を反応させた。Caspase-3 染色では一次抗体として抗 cleaved-Caspase-3-ウサギポリクローナル抗体を、二次抗体としてビオチン標識抗ウサギ-ブタポリクローナル抗体を反応させた。切片にはペルオキシダーゼ標識アビジン・ビオチン複合体を反応させ、3,3'-ジアミノベンチジン・四塩酸塩で茶褐色に呈色させた。核染色にはヘマトキシリンを使用した。免疫染色後、光学顕微鏡下($\times 400$)で陽性腺房細胞数をカウントし、一視野あたりの平均値と標準誤差を算出した。

本研究における数的データに関しては、対照群と実験群との間において Mann-Whitney U 検定 (有意水準 5%) により有意差検定を行った。

【結果】

動物の体重は対照群、実験群とも実験期間が進むにつれて増加していったが、両群間にはいずれの日においても有意差は認められなかった。また、実験期間中は動物の全身状態は良好であった。

対照群の口蓋腺ではその実質はピラミッドないし円柱状をした粘液性腺房細胞から

なっていた。核は細胞質に充満した分泌顆粒により基底側に圧平されていた。。この様な腺房細胞の細胞質はPASに陽性、ABに強陽性を示した。実験群の口蓋腺はどの週においても対照群と同様の組織像を示しており、腺房細胞の萎縮などは見られなかった。またPASおよびABに対する実験群の腺房細胞の染色傾向もほぼ同様であった。

実験群および対照群の高径は約1000 μ m、長径は約8000～9300 μ m、幅径は約2800 μ m程度の値を示していた。実験群、対照群共に高径、長径、幅径すべてにおいて各週の両群間に有意差は認められなかった。

BrdU陽性を示す腺房細胞は両群ともに、いずれの週においてもしばしば観察された。一視野あたりの陽性腺房細胞数は各週において両群間に有意差は無かった。

Caspase-3陽性を示す腺房細胞は対照群、実験群共にどの週においても極めて少なく、全く観察されない標本も多かった。このためCaspase-3染色標本に関しては陽性細胞数の測定を行わなかった。

【考察】

本研究では両群間における体重差や体調不良は認められなかった。従って、本研究における口蓋腺の影響がもしあるとするならば、口蓋腺への影響は全身状態の変化によるものではなく、液状食の直接的な影響によるものと考えられる。

組織計量学的検索の結果、両群間には長径、高径、幅径いずれにおいても差はな

かったことから、液状食飼育によってラット口蓋腺は3次元的な収縮を起こさない事が明らかとなった。

液状食飼育されたラット口蓋腺では対照群と比べて腺房細胞の大きさに違いが認められず、腺房細胞の縮小は起こっていなかった。また腺房細胞の増殖活性やアポトーシスによる消失も対照群と同様の結果であったことから、腺房細胞数の減少は起こっていないと考えられた。従って、組織学的な観点からもラット口蓋腺は全く液状食の影響を受けていない事が示唆された。

本研究と過去の研究の報告を合わせると唾液腺は液状食飼育によって萎縮するものと、萎縮しないものに分けられる。このような違いがなぜ起こるのかは本研究だけでは明らかにできないが、私は以下のように推察する。唾液腺は交感神経および副交感神経の二重支配を受けているが、唾液腺の維持には副交感神経刺激が重要である。なぜならラット耳下腺や舌下腺の副交感神経遮断を行うと腺は萎縮するからである。耳下腺の副交感神経の節前線維は延髄の下唾液核から発し、舌咽神経などを経て耳下腺へ、舌下腺や口蓋腺では延髄の上唾液核から発し、顔面神経などを経てそれぞれの腺に達する。つまり、液状食飼育により萎縮する唾液腺とそうでない唾液腺では支配する唾液核が異なっているのである。したがって、液状食飼育に対する唾液腺の反応の違いは唾液分泌中枢である唾液核の違いによる可能性が考えられる。

【結論】

ラット口蓋腺は耳下腺とは異なり、液状食飼育の影響を受けず、萎縮性変化を示さないことが明らかとなった。また、液状食飼育の影響は唾液腺の種類によって異なることが示唆された。

学位論文審査の要旨

主 査	特任教授	大 畑	昇
副 査	教 授	土 門	卓 文
副 査	教 授	網 塚	憲 生
副 査	准教授	高 橋	茂

学 位 論 文 題 名

液状食飼育がラット口蓋腺に与える影響に関する組織学的 および免疫組織化学的研究

審査は、審査担当者全員の出席のもと、申請者の研究内容についての発表を行いながら審査担当者の口頭試問を受ける形で進められた。

1: 申請者による学位論文の要旨について以下のとおりに説明された。

【目的】近年の食習慣の特徴として柔らかい食品の摂取が挙げられる。このような食習慣が口腔諸組織にどのような影響を与えるかを明らかにするため、実験的研究が行われてきた。液状食飼育されたラットの耳下腺に関しては腺の萎縮、腺房細胞の縮小、細胞増殖活性の低下、アポトーシスの増加などが報告されている。一方、大唾液腺とは異なり、小唾液腺に関する報告は見られない。本研究では代表的な小唾液腺である口蓋腺が液状食飼育によりどのような影響を受けるのかを組織学的、免疫組織化学的に検索した。

【材料と方法】実験には7週齢の Wistar 系雄性ラットを使用した。対照群の動物には固形食を与え、実験群には固形食を粉末状にして水と1:2の割合で混和したものを与えた。飼育期間は1週、4週、8週とした。飼育期間を終了した動物には5-bromo-2'-deoxyuridine(BrdU)を腹腔内投与し、ペントバルビタールナトリウム麻酔下で4%パラホルムアルデヒド灌流固定を行った。次に口蓋腺を含む上顎を摘出し、10%EDTAにて脱灰後、正中面にて切り出した試料をパラフィン包埋し、正中面から側方に向かって連続薄切した。組織学的検索としてヘマトキシリン-エオジン染色(HE)、過ヨウ素酸シッフ染色(PAS)、アルシアンブルー染色(AB)を行うとともに、口蓋腺の高径、長径、幅径を計測した。腺房細胞の増殖活性を調べるために BrdU 免疫染色、アポトーシスを検索するために Caspase-3 免疫染色を行った。

【結果と考察】対照群の口蓋腺は殆どが粘液性腺房からなっていた。その細胞質は PAS、AB に陽性を示す粘液様物質で満たされていた。実験群でも同様の組織像で、腺房細胞の収縮や PAS および AB に対する染色強度の差異は観察されなかった。組織計量では、高径、長径、幅径は各週において両群間に差はなかった。BrdU 陽性を示す腺房細胞はいずれの標本においてもしばしば観察されたが、各

週の実験群と対照群の間には陽性細胞数の有意差は認められなかった。Caspase-3 陽性細胞は実験群、対照群共にどの週においても極めて少なかった。

以上の結果よりラット口蓋腺は液状食飼育の影響を受けず萎縮性変化を示さないことが明らかになった。

2: 申請者に対する口頭試問では本論文の内容と関連した基礎的、臨床的分野から質問がなされた。

- 1) 本研究の実験計画について。
- 2) 標本作製方法、染色方法について
- 3) 唾液腺の副交感神経支配について
- 4) 液状食飼育を行った過去の研究について
- 5) 口蓋腺の役割について
- 6) 今後の研究の展望

3: 口頭試問に対する申請者の回答

すべての質問に対して申請者から、適切かつ明快な回答が得られた。

学位論文の審査を通して、申請者が本研究、および関連分野に関する理解が十分なされており、幅広い知識を有していると明らかになった。また、研究内容に関して今後のさらなる発展が期待された。

以上の審査により、審査者全員一致で本研究が学位論文に十分に値し、申請者は博士(歯学)の学位を授与する十分な資格があると判断した。