



## Studies on salivary secretion in X-ray irradiated rat submandibular glands

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2014-10-29 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 高城, 幸司 メールアドレス: 所属:
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10271/1156">http://hdl.handle.net/10271/1156</a>

学位論文の内容の要旨及び論文審査の結果の要旨

学位記番号	医博第 303号	学位授与年月日	平成12年 3月27日
氏名	高城 幸司		
論文題目	Studies on salivary secretion in X - ray irradiated rat submandibular glands (放射線照射ラット唾液腺腺房細胞における分泌反応に関する研究)		

博士(医学) 高城 幸司

## 論文題目

Studies on salivary secretion in X-ray irradiated rat submandibular glands.

(放射線照射ラット唾液腺腺房細胞における分泌反応に関する研究)

## 論文の内容の要旨

### 〔はじめに〕

唾液の分泌は、口腔内の環境維持に関与する重要な因子である。各種の要因による唾液分泌の低下は口腔乾燥を引き起こし、口腔衛生維持等の点で大きな問題となる。唾液腺の生理機能の検討として、分泌唾液量やアミラーゼ等の酵素活性測定、病理組織標本での形態観察がある。腺房及び細胞レベルでの生理的な唾液分泌能の測定も行われているが、放射線照射を受けた唾液腺の検討報告は少ない。本研究は、主にビデオ顕微鏡を用い、唾液腺組織を無固定・無染色のままリアルタイムに観察し、腺房細胞の分泌反応の定量解析を行い、放射線照射による腺房細胞の形態変化、水分泌と開口放出反応にみられる障害を細胞レベルで明らかにした。

### 〔方法〕

#### ① 放射線照射および唾液腺標本の作成

8週齢のSD系雄ラットの唾液腺相当部に15Gyの放射線照射したものを照射群とし、正常群と比較した。実験には顎下腺を用い摘出した組織は0.2～1mm角に細切し、観察チャンバーに固定し標本とした。

#### ② ビデオ顕微鏡による分泌反応およびカルシウム反応の定量解析

顕微鏡標本は酸素化した標準液で灌流し、試薬を添加して刺激とした。刺激薬には、塩酸ピロカルピン(PC) (100 $\mu$ M)を用いた。唾液腺細胞は、微分干渉顕微鏡で観察し、単位時間あたり個々の腺房で観察される開口放出反応頻度と腺房像の面積及び顆粒の運動速度を計測した。また細胞へfluor-3を負荷し、蛍光顕微鏡下に専用ソフトウエアを用いてカルシウム反応を測定した。

#### ③ HE染色および電子顕微鏡による形態観察

唾液腺組織をホルマリン固定後パラフィン包埋し、HE染色して光顕標本に供した。また、2%グルタルアルデヒドで固定した標本は、常法に従い超薄切片を作成し、ウラン・鉛の二重染色後、透過型電子顕微鏡で観察した。

#### ④ 免疫染色によるアミラーゼ含有量および水チャネル分布解析

腺房細胞におけるアミラーゼ含有量および水チャネル分布は、アミラーゼ抗体およびaquaporin 5抗体の陽性度を、アビジン・ビオチン蛍光標識法により共焦点レーザー顕微鏡で解析して調べた。

### 〔結果〕

#### 1) 腺房の収縮反応及び顆粒の運動速度と開口放出反応

正常群のPC(100 $\mu$ M)刺激による開口放出反応頻度は2.0回/腺房/分だった。照射群の開口放出反応頻度を照射2日後から7日後、14日後で測定したところ、照射後2～5日間は正常群に比較し著しい開口放出数の低下がみられた。腺房の収縮反応、顆粒の運動性も非常に抑制されていた。

#### 2) PCによる細胞内カルシウム応答

正常群ではPC(100 $\mu$ M)刺激により腺房全体においてカルシウム信号が検出された。照射群では1~7日後では若干微弱であったが、14日後では正常群レベルと同じであった。

### 3) 分泌顆粒や分泌タンパク質の組織学的所見

HE染色所見では、照射群では炎症性反応が起き、4日後以降では腺房間組織に水腫様変性、核の濃縮像が認められた。電子顕微鏡所見では、照射群では正常群と比較し腺房内顆粒の分泌の前段階での顆粒同士の癒合はみられるが、腺房外への開口放出が起きている部分は少なく、細胞間細間隙、導管の拡大の程度は正常群と比較して小さかった。蛍光抗体染色法では、腺房における水チャネル含有量は、照射群において有意な減少が認められた。アミラーゼ顆粒の分布や発現量には変化が認められなかった。

### 〔結論〕

放射線による腺房細胞の障害は、1)腺房細胞のCa信号の伝達には重大な異常は認めなかったこと、2)分泌物(アミラーゼ顆粒)の量的な変化が少ないことから、分泌の初期過程には起こっていないことがわかった。しかし、3)細胞膜蛋白である水チャネルの変性ないし消失、それに伴うと考えられる4)腺房収縮能の低下が認められた。また、5)顆粒の運動性の低下、6)開口放出数の低下が認められた。これらのことは、分泌顆粒が細胞膜と接着しにくいことを示していた。従って放射線は、分泌の後期過程に大きな障害を引き起こしていることが明らかとなった。

## 論文審査の結果の要旨

頭頸部領域の悪性腫瘍に対する放射線照射後の唾液分泌低下は日常生活上、口腔衛生維持等の点で大きな問題となる。本研究は放射線照射後の腺房細胞の形態変化、細胞レベルでの唾液分泌の動的変化を実験モデルを用いて検討したものである。

8週齢のSD系雄性ラットに15Gyの放射線照射後、顎下腺を摘出、0.2~1mm角に細切し、1)光学顕微鏡、電子顕微鏡による形態学的観察、2)塩酸ピロカルピン刺激下における腺房の収縮、顆粒の移動、開口放出現象のビデオ顕微鏡による動的観察、3)fluor-3と蛍光顕微鏡を用いた塩酸ピロカルピン刺激下における細胞内カルシウム濃度の変化の観察、4)腺房細胞のアミラーゼ含有量とアクアポリン5の発現の免疫組織学的検討、を行った。

光学顕微鏡では照射4日以降に腺房間組織に水腫様変性、核の濃縮像が認められた。電子顕微鏡下では非照射群で見られる塩酸ピロカルピン刺激による細胞間細間隙、導管の拡大は照射群では認められなくなっていた。腺房の収縮は照射後2日ではまったく認められず、3日以降14日まで非照射群に比較して33%以下に低下していた。顆粒の細胞内移動が観察された腺房の数は照射後2日から14日の間、非照射群に比較して60%以下に低下していた。開口放出現象の頻度は照射後2日から5日間、非照射群に比較して40%以下に低下していた。塩酸ピロカルピン刺激下の細胞内カルシウム濃度の変化は照射群と非照射群で明らかな差は認められなかった。アミラーゼの細胞内分布や量には変化が認められなかったが、アクアポリン5の発現は照射群で著しく減少していた。

放射線照射後の顎下腺腺房細胞はカルシウムによる信号の伝達、アミラーゼ顆粒の形成に関しては障害されておらず、腺房収縮、顆粒の移動、開口放出現象が障害されていた。水チャネル蛋白であるアクアポリンは腺房収縮、水の放出の機能に密接に関与しており、アクアポリンの消失が放射線照射による唾液分泌障害に深く関わっていると推察された。

本研究は放射線照射後の唾液分泌低下の病態についての詳細を明らかにしたものであることが論文審査会で評価された。

以上の研究成果に関連して、次のような質疑を行った。

- 1) 放射線照射として15Gy照射した根拠
- 2) 分泌刺激としてピロカルピンを用いた理由
- 3) 用いた抗体について
- 4) アクアポリンの役割
- 5) 刺激を加えないときの腺房の収縮、分泌顆粒の放出について
- 6) ビデオで観察された現象がexocytosisであるという根拠
- 7) 放射線による膜蛋白の障害はアクアポリン特異的か
- 8) 照射14日後にexocytosisが増加しているように見える現象について

これらの質問に対し申請者の解答は適切であり、問題点も十分理解しており、博士(医学)の学位論文にふさわしいと審査員全員一致で評価した。

論文審査担当者 主査 阪原 晴海  
副査 平光 忠久 副査 花井 洋行