

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 5月24日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2009～2012

課題番号：21390499

研究課題名（和文） ソフトフード摂取により誘導される唾液腺萎縮のメカニズムの解明

研究課題名（英文） Mechanisms of salivary gland atrophy induced by soft food

研究代表者

高橋 茂 (TAKAHASHI SHIGERU)

北海道大学・大学院歯学研究科・准教授

研究者番号：70241338

研究成果の概要（和文）：現代社会で好まれるソフトフードが唾液腺にどのような影響を及ぼすのかについて実験的に検討した。ラットに液状食を一定期間与えた後、各種唾液腺を顕微鏡にて観察した。その結果、肉眼的に縮小した耳下腺（唾液腺の1つ）では細胞の縮小、細胞死、細胞の更新速度の低下が認められた。一方、他の顎下腺や舌下腺では萎縮性変化は観察されなかった。以上より、唾液腺にはソフトフードによって萎縮するものとそうでないものがあることが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：Salivary glands of rats fed a liquid diet for 3 weeks were investigated microscopically to clarify the effects of soft food on salivary glands. Parotid glands of experimental rats became atrophic after liquid diet feeding, and cell shrinkage, cell death, and reduction of speed of cell-cycle were identified in the atrophic parotid glands. However, such atrophic alterations were not observed in submandibular and sublingual glands following liquid diet feeding. These observations suggest that it depends on the kind of salivary glands whether liquid diet feeding induces atrophy to the salivary glands.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	3,400,000	1,020,000	4,420,000
2010年度	6,600,000	1,980,000	8,580,000
2011年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2012年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
総計	12,800,000	3,840,000	16,640,000

研究分野：口腔解剖学

科研費の分科・細目：歯学、病態科学系歯学・歯科放射線学

キーワード：ソフトフード・唾液腺・萎縮

## 1. 研究開始当初の背景

今日の日本は経済的に豊かな社会となり、文化・生活の面において欧米化が進んできた。このことは食生活においても同様であり、国民の健康へ良くも悪くも大きな影響を与えている。食生活の変化の1つとしてスパゲティやハンバーグなどのいわゆるソフトフードの摂取が挙げられる。ソフトフードを頻

繁に摂取していると咀嚼回数が減少する。咀嚼は顎顔面口腔領域の発達や脳の活性化に関与していることからソフトフード過剰摂取は口腔内外の諸器官に悪影響を及ぼすといわれている。口腔内環境に重要な働きを担っている唾液腺も例外ではなく、ソフトフード摂取による唾液分泌機能の低下や唾液腺の萎縮が報告されている。唾液分泌機能低下

に関しては生理学的な研究により、咀嚼刺激減少による自律神経系への影響によって引き起こされることが示唆されている。これに対して、ソフトフードによる唾液腺萎縮のメカニズムはほとんど検討されておらず、特に組織学的な観点からの研究は非常に少なかった。

これまで申請者らは唾液腺導管の結紮実験動物モデルを用いて唾液腺萎縮の様子を形態学および分子生物学的に検索してきた。この実験系は再現性の良さから古くから研究されてきており、かつては萎縮唾液腺内では腺房細胞が導管細胞へ脱分化すると考えられてきた。しかし、Kerrらによってアポトーシスが発見されて以来、多くの生命現象にアポトーシスが関与していることが明らかとなってきた。外分泌腺では、膵臓や乳腺の萎縮過程において、腺細胞消失はアポトーシスによるということが報告されるようになってきた。唾液腺の萎縮に関しては、本研究の研究協力者である Walker らの耳下腺導管結紮に関する研究により、腺房の消失はアポトーシスによることが明らかとなり、それまでの解釈は根底から覆ることになった。研究代表者の高橋は Walker の研究室に 1996 年～1997 年に留学し、実験方法やアポトーシスに関する知識や情報を得てきた。そして、帰国後、耳下腺とは組織像が異なる他の唾液腺について検討を加えた。その結果、顎下腺や舌下腺の萎縮でも腺房細胞の消失にアポトーシスが重要であることが明らかとなった。さらに、申請者らは分子生物学的手法も応用し、このアポトーシスが Fas-FasL 系によって引き起こされ、Bcl-2 ファミリーの一員である Bax により促進されていることを明らかにした。

このように外分泌腺萎縮には少なからずアポトーシスが関与していることが多いと考えられるが、ソフトフードによる唾液腺萎縮におけるアポトーシスの関与に関する研究は非常に少なかった。

## 2. 研究の目的

以上のような背景より、本研究では次の 3 点に的を絞ってソフトフードが唾液腺萎縮に与える影響を解明することにする。

- (1) ソフトフード摂取によってどの唾液腺に萎縮が誘導されるのか。
- (2) ソフトフードによる唾液腺萎縮は形態学的にどのようなメカニズムで起こっているのか。
- (3) 萎縮の過程においてアポトーシスや細胞増殖はどのように関与しているのか。

## 3. 研究の方法

### (1) 動物実験

実験には Wistar 系雄性ラット 32 匹を用い

た。対照群の動物 (16 匹) には通常固形飼料を、実験群の動物 (16 匹) には固形食を粉末状にしたものに水道水を 1:2 の割合で混和した液状飼料を与えた。飼育期間は 3, 7, 14, 21 日とした。飼育期間が終了した動物には S 期細胞に取り込まれる

5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) を体重 1kg あたり 25mg 腹腔内投与し、1 時間後にペントバルビタールナトリウムによる全身麻酔下にて 4%パラホルムアルデヒド溶液で灌流固定した。灌流固定後、耳下腺、顎下腺、舌下腺を摘出し、湿重量を測定した。試料の一部を細切し、カルノフスキー固定液に浸漬、電顕用試料とした。残りの部分は 4%パラホルムアルデヒド溶液に浸漬した後、通法に従ってパラフィン切片を作製した。

実験期間中は毎日動物の体重を測定し、体調の変化の観察を行った。本研究は北海道大学動物実験委員会の認可を受け、「国立大学法人北海道大学動物実験に関する規定」に基づき行われた。

### (2) 組織学的検索

パラフィン切片に対して、ヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色、過ヨウ素酸シッフ (PAS) 染色、アルシアンブルー (AB) 染色を行い、光顕的に観察した。

### (3) 免疫組織化学的検索

パラフィン切片に対して免疫染色を行った。細胞増殖マーカーとして抗 BrdU マウス・モノクローナル抗体、アポトーシス細胞のマーカーとして抗 cleaved-caspase-3 (Casp-3) ウサギ・ポリクローナル抗体を用いた。2 次抗体、ストレプト・アビジン・ビオチン複合体を順に反応させ、反応産物をジアミノベンチジンによって茶褐色に呈色させた。各染色とも陽性腺房細胞数を測定し、実験群と対照群の検定を行った。

### (4) 電顕的検索

カルノフスキー溶液に浸漬固定した試料は四酸化オスミウムにて後固定後、通法に従って Epon812 に包埋した。ウルトラミクロームによってブロックより超薄切片を作製し、酢酸ウラン・クエン酸鉛の電子二重染色を行った。染色後、透過型電子顕微鏡にて観察した。

## 4. 研究成果

### (1) 研究の主な成果

#### ① 液状飼料が全身状態へ与える影響

実験期間中、対照群および実験群の動物には下痢などの症状は認められず、全身状態は良好であった。体重は両群とも期間中徐々に増加傾向を示しており、各日とも両群間に有意差は認められなかった (図 1)。

以上のことより、本実験において観察される各唾液腺の変化は全身状態悪化の影響によるものではないことが示された。

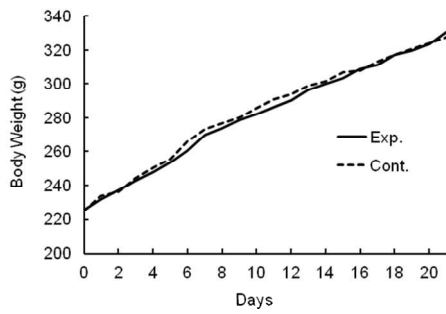


図 1. 実験期間中の動物の体重変化

### ② 耳下腺の変化

耳下腺の湿重量は各期間とも実験群の方が対照群よりも有意に小さかった (図 2)。

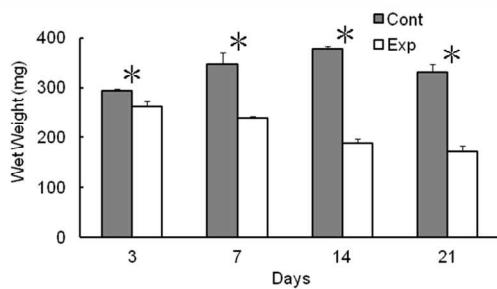


図 2. 耳下腺の湿重量の変化

光顕的には、対照群の耳下腺は正常組織像を示していた。実験群の腺房細胞は萎縮し、大きさが縮小していた (図 3A)。また、一部にはアポトーシス小体様の構造 (図 3B) も認められた。

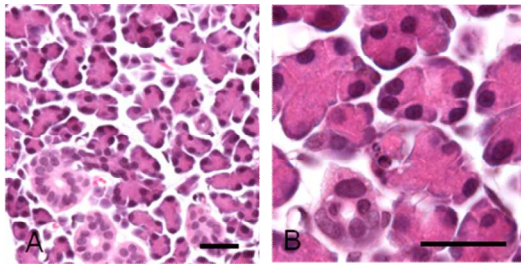


図 3. 実験群の耳下腺の組織像 (14 日目)  
(スケールバー: 25 μm)

Casp-3 免疫染色では対照群、実験群ともに各日とも陽性腺房細胞が確認された (図 4A)。対照群では陽性細胞数は期間を通じて少数であった。一方、実験群では 3~14 日目において腺房細胞の Casp-3 標識率が対照群よりも有意に高かった (図 5)。BrdU 免疫染色でも対照群、実験群ともに各日とも陽性腺房細胞が認められた (図 4B)。腺房細胞の BrdU 標識率は対照群では約 1%程度であったのに対して、実験群では約 0.2%程度と有意に低かった (図 6)。

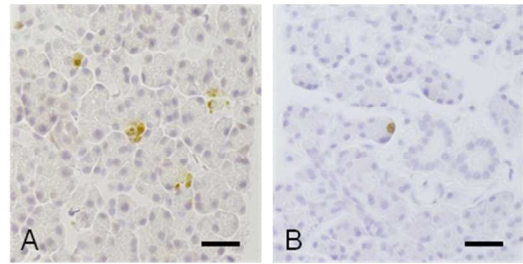


図 4. 実験群の耳下腺の免疫染色像  
A: Casp-3 (7 日目) B: BrdU (7 日目)  
(スケールバー: 25 μm)

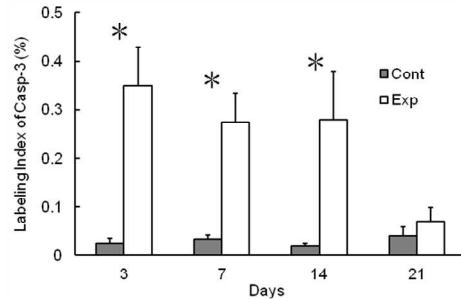


図 5. 耳下腺腺房細胞の Casp-3 の標識率

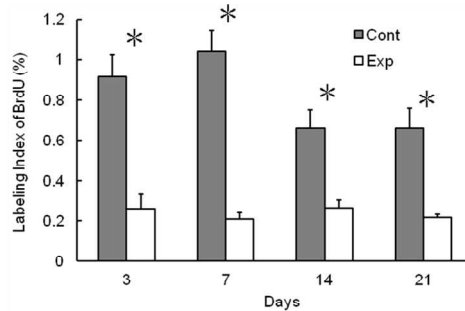


図 6. 耳下腺腺房細胞の BrdU の標識率

電顕的には、対照群の腺房細胞は正常像を呈していた。実験群の腺房細胞は大きさが小さく、細胞内の分泌顆粒が少ないものも多く認められた。また、核膜辺縁にクロマチンが凝集した核を持ちアポトーシスの初期像を示す腺房細胞や、アポトーシス小体となり隣接する細胞やマクロファージに貪食されている像も認められた (図 7)。

以上のことより、液状飼料飼育によって耳下腺は萎縮すること、そして萎縮は腺房細胞の収縮および腺房細胞の増殖活性低下とアポトーシスによる除去による細胞数の減少によって引き起こされていることが明らかとなった。

### ③ 顎下腺および舌下腺の変化

顎下腺、舌下腺ともに湿重量はいずれの期間においても両群間に有意差は認められなかった (図 8)。

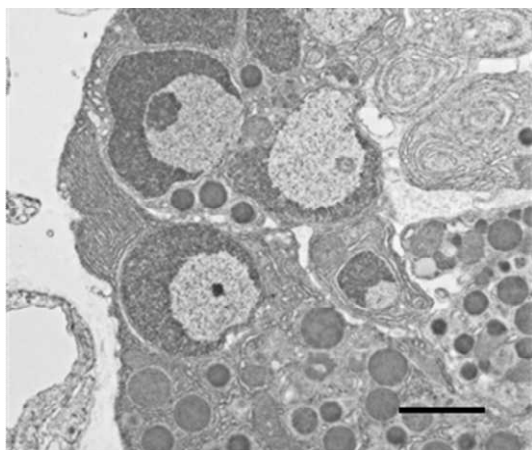


図 7. 実験群耳下腺腺房細胞のアポトーシス像 (3日目)

(スケールバー: 2 μm)

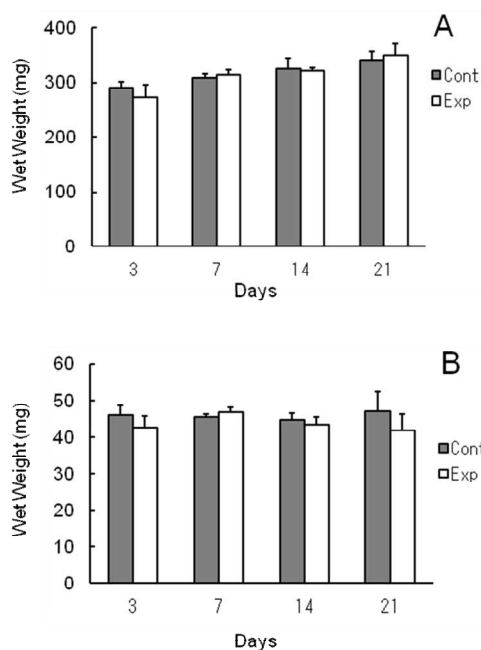


図 8. 顎下腺(A)と舌下腺の(B)の湿重量の変化

光顕的には、実験群の顎下腺と舌下腺は正常な組織像を呈しており、腺房細胞の萎縮等はいずれの日数においても認められなかった。また、PASやABの染色性に関しても両群間に差異は観察されなかった。

免疫組織化学的には、顎下腺、舌下腺の腺房細胞には少数ながら Casp-3、BrdU 陽性を示すものがどの実験期間においても観察された。しかしながら、陽性細胞数に関しては Casp-3 (図 9) および BrdU (図 10) とともに両群間に有意差は認められなかった。

電顕的には、顎下腺の腺房細胞は正常像を示していた。豊富な分泌顆粒を細胞質内に有しており、細胞外形の縮小は認められなかつ

た。また、アポトーシスやネクローシスを示す像も観察されなかった。このような所見は舌下腺についても同様であった。

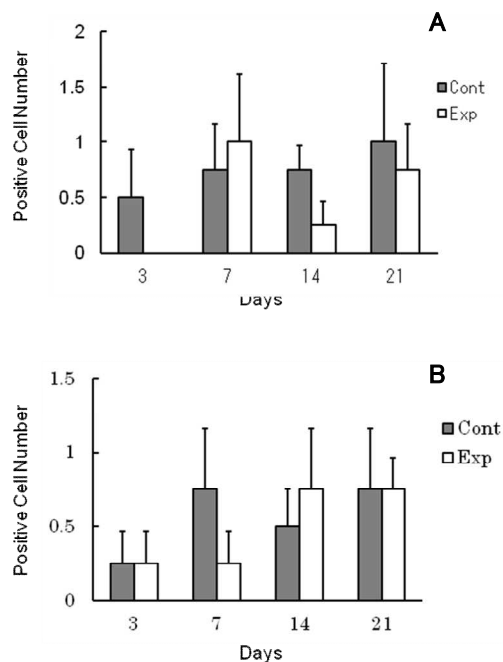


図 9. 顎下腺(A)と舌下腺(B)の Casp-3 陽性腺房細胞数

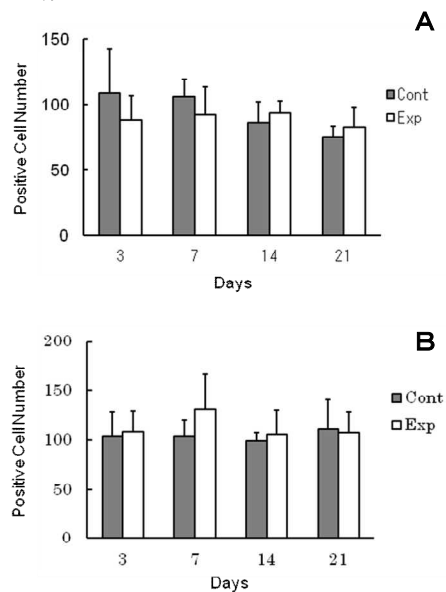


図 10. 顎下腺(A)と舌下腺(B)の BrdU 陽性腺房細胞数

以上のことより、液状飼料飼育によって顎下腺と舌下腺では腺房細胞の収縮や細胞数の変化も起こっておらず、萎縮しないことが明らかとなった。

結論として唾液腺にはソフトフードによって萎縮するものとそうでないものがあることが明らかとなった。

(2)国内外における位置づけとインパクト

これまでのソフトフードが唾液腺に与える影響に関する研究は生理学的観点からの研究がほとんどであったが、本研究は形態学的観点から検索し、唾液腺萎縮にはアポトーシス細胞増加と細胞増殖活性低下による細胞数減少が関与していることを初めて明らかにした。従って本研究は今までの研究に加えて新たな展開を切り開いたものであり、かなりのインパクトを与えたものと考えられる。実際、本研究の成果をいくつかの国際学会にて発表したところ、多くの反響があり今後の私たちの研究の進展に期待する声が多く聞かれた。

(3)今後の展望

私たちは本研究の発展として以下の点についてさらに研究を進めたいと考えている。

- ①ソフトフードによって誘導された耳下腺腺房細胞のアポトーシス発生メカニズムの解明
- ②成長期にソフトフードを長期摂取した場合の各唾液腺の変化の解明
- ③ソフトフード摂取が他の口腔関連諸組織に与える影響の解析

以上の課題が解決することによって、ソフトフードの摂取が各組織に悪影響を与えるということに明確な科学的な根拠を与えることとなり、「噛むことの大切さ」や「食育」を国民へ訴える一つのきっかけとなるはずである。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 12 件)

- 1) 弓削文彦、高橋 茂、土門卓文、大畑 昇：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および免疫組織化学的研究。北海道歯誌 33: 160-167, 2013. 査読有  
[http://eprints.lib.hokudai.ac.jp/journals/item.php?item=61007&handle=2115\\_52454&name=318&vname=5171](http://eprints.lib.hokudai.ac.jp/journals/item.php?item=61007&handle=2115_52454&name=318&vname=5171)
- 2) Takahashi S., Uekita H., Kato T., Yuge F., Ushijima N., Inoue K., Domon T.: Involvement of apoptosis and proliferation of acinar cells in atrophy of rat parotid glands induced by liquid diet. J. Mol. Histol. 43: 761-766, 2012. 査読有  
doi: 10.1007/s10735-012-9442-y.
- 3) Yamamoto T., Hasegawa T., Sasaki M., Hongo H., Tabata C., Liu Z., Li M., Amizuka N.: Structure and formation of the twisted plywood pattern of collagen fibrils in rat lamellar bone. J. Electron Microsc. 61: 113-121, 2012. 査読有

doi: 10.1093/jmicro/dfs033.

- 4) Saito A., Saito E., Yoshimura Y., Takahashi D., Handa R., Honma Y., Ohata N.: Attachment formation after transplantation of teeth cultured with enamel matrix derivative in dog. J. Periodontol. 82: 1462-1468, 2011. 査読有  
doi: 10.1902/jop.2011.100596.
  - 5) Shibata K., Yoshimura Y., Kikuri T., Hasegawa T., Taniguchi Y., Deyama Y., Suzuki K., Iida J.: Effect of the release from mechanical stress on osteoclastogenesis in RAW264.7 cells. Int. J. Mol. Med. 28: 73-79, 2011. 査読有  
doi: 10.3892/ijmm.
  - 6) Yamamoto T., Li M., Liu Z., Guo Y., Hasegawa T., Masuki H., Suzuki R., Amizuka N.: Histological review of the human cellular cementum with special reference to an alternating lamellar pattern. Odontol. 98: 102-109, 2010. 査読有  
doi: 10.1007/s10266-010-0134-3.
  - 7) Okubo N., Ishisaki A., Iizuka T., Tamura M., Kitagawa Y.: Vascular cell-like potential of undifferentiated ligament fibroblasts to construct vascular cell-specific marker-positive blood vessel structures in a PI3K activation-dependent manner. J. Vasc. Res. 27: 369-383, 2010. 査読有  
doi: 10.1159/000277724.
  - 8) 野呂洋輔、大廣洋一、鄭 漢忠、吉村善隆、出山義昭、飯塚 正、鈴木邦明、戸塚靖則：家兔下顎骨空洞の治癒過程における PLGA・コラーゲン・ハイブリッドメッシュの有用性の検討。北海道歯誌 31: 62-69, 2010. 査読有  
[http://eprints.lib.hokudai.ac.jp/journals/item.php?item=50113&handle=2115\\_45800&name=318&vname=4489](http://eprints.lib.hokudai.ac.jp/journals/item.php?item=50113&handle=2115_45800&name=318&vname=4489)
  - 9) Yamamoto T., Takahashi S.: Hertwig's epithelial root sheath cells do not transform into cementoblasts in rat molar cementogenesis. Ann. Anat. 191: 547-555, 2009. 査読有  
doi:10.1016/j.aanat.2009.07.004.
- [学会発表] (計 15 件)
- 1) 高橋 茂他：液状飼料飼育に対する顎下腺および舌下腺の反応について。第 118 回日本解剖学会全国学術集会。2013 年 3 月 30 日、サンポートホール高松・かがわ国際会議場、高松
  - 2) Takahashi S. et al.: Reaction of submandibular and sublingual glands to liquid diet feeding. 6th International

Association of Dental Research Pan European Region Annual Meeting. 2012年9月15日、Finlandia Hall, Helsinki, Finland

3) Yuge F. et al.: Histological and immunohistochemical studies of the effects of liquid diet feeding on rat palatine glands. 14th International Congress of Histochemistry and Cytochemistry. 2012年8月29日、京都国際会館、京都

4) 山本恒之他:長骨の部位による骨細胞ネットワークの立体微細形態の違いについて. 第30回日本骨代謝学会学術集会. 2012年7月17日、京王プラザホテル、東京

5) Takahashi S. et al.: Cell proliferation and cell death in atrophic rat parotid glands induced by liquid diet feeding. 10th Asia-Pacific Microscopy Conference. 2012年2月6日、Perth Convention Centre, Perth, Australia

6) 高橋 茂他:液状飼料飼育がラット耳下腺の細胞増殖と細胞死に与える影響について. 第53回歯科基礎医学会学術大会. 2011年10月2日、長良川国際会議場、岐阜

7) 山本恒之他:層板骨基質線維の立体構造に関わる骨芽細胞の役割について. 第53回歯科基礎医学会学術大会. 2011年10月2日、長良川国際会議場、岐阜

8) 山本恒之他:層板骨における骨芽細胞突起とコラーゲン線維の立体構築形成との関係について. 第29回日本骨代謝学会学術集会. 2011年7月25日、大阪国際会議場、大阪

9) Takahashi S. et al.: Atrophic alterations of rat parotid gland induced by liquid diet feeding. 第116回日本解剖学会全国学術集会. 2011年3月29日、パシフィコ横浜、横浜

10) Takahashi S. et al.: Effect of liquid diet on cell proliferation in salivary glands. 89th General Session & Exhibition of the International Association of Dental Research. 2011年3月19日、San Diego Convention Center, San Diego, U.S.A.

11) 高橋 茂:唾液腺の障害と修復について. 平成21年度北海道歯学会2月例会. 2010年2月18日、北海道大学、札幌

12) 山本恒之他:セメント質のコラーゲン線維層板構造における走査型電子顕微鏡観察. 第30回日本骨形態計測学会. 2010年5月15日、米子コンベンションセンター、米子

13) 山本恒之他:有細胞セメント質層板構造に関する走査型および透過型電子顕微鏡の検索. 第52回歯科基礎医学会学術大会. 2010年9月21日、タワーホテル船堀、東京

[図書] (計1件)

1) 脇田 稔、山本恒之、土門卓文、高橋 茂、

花泉好訓:わかば出版. エナメル質研究の忘れ物:エナメル質~形成、構造、遺伝、再生、起源と進化. 初版 5-13, 2009

[その他]

高橋 茂:私の研究紹介「母危篤!お母さん休め」. 北海道大学大学院歯学研究科・歯学部・歯科診療センター広報誌 12: 38-39, 2012

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

高橋 茂 (TAKAHASHI SHIGERU)

北海道大学・大学院歯学研究科・准教授

研究者番号: 70241338

(H21→H22: 研究分担者)

脇田 稔 (WAKITA MINORU)

北海道大学・理事・副学長

研究者番号: 40018916

(H22 まで)

### (2) 研究分担者

山本 恒之 (YAMAMOTO TSUNEYUKI)

北海道大学・大学院歯学研究科・准教授

研究者番号: 80200822

船橋 誠 (FUNAHASHI MAKOTO)

北海道大学・大学院歯学研究科・教授

研究者番号: 80221555

飯塚 正 (IIZUKA TADASHI)

北海道大学・大学院歯学研究科・准教授

研究者番号: 80168062

吉村 善隆 (YOSHIMURA YOSHITAKA)

北海道大学・大学院歯学研究科・助教

研究者番号: 30230816