

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 13 日現在

機関番号：31201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462802

研究課題名(和文) 唾液分泌促進により消化管機能の改善に寄与する新規治療法の開発

研究課題名(英文) Development of new treatment to improve gastrointestinal function by promotion of saliva secretion

研究代表者

山田 浩之(Yamada, Hiroyuki)

岩手医科大学・歯学部・教授

研究者番号：90267542

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：唾液は口腔粘膜のみならず消化管粘膜の恒常性維持に重要な役割を果たしている。そこで唾液分泌量の減少が消化管粘膜に与える影響について研究した。大唾液腺全摘出モデルマウスを作成し、空腸、回腸、大腸に対する唾液分泌量減少の影響を組織学的に検討した。ヘマトキシリン・エオジン染色標本において空腸は術後1か月、3か月、6か月で絨毛の長さの短縮が見られた。また、回腸は術後6か月で絨毛の短縮が見られた。大腸では明らかな組織学的差異は認められなかった。以上より唾液分泌量の減少は口腔側に近い消化管の恒常性維持に影響を与え、粘膜上皮に組織学的変化をもたらす可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Saliva play important roles for the homeostasis of not only oral mucosa but also gastrointestinal tract. Then, influence of decrease of salivary secretion to the mucosa of gastrointestinal tract was investigated. Dry mouse model with major salivary glands surgically resected were prepared, and influences of decrease of saliva secretion to the mucosa of jejunum, ileum, and large intestine were investigated. Atrophic villus of jejunum was seen in the group of mice without major salivary glands at 1, 3, and 6 months after surgery. Atrophic villus of ileum was seen in the group of mice without major salivary glands at 6 months after surgery. Atrophic changes of large intestine were not seen in both groups. These results suggest that decrease of saliva secretion influence the homeostasis of gastrointestinal tract especially near oral side, and can give raise to histopathological change to the epithelium of gastrointestinal tract.

研究分野：口腔外科

キーワード：唾液分泌障害 消化管

1. 研究開始当初の背景

ドライマウスの患者は、口腔乾燥以外にも様々な症状を呈しており、特に胃部不快感や疼痛などの消化器症状が顕著である。シェーグレン症候群の患者では萎縮性胃炎を合併している頻度が高いことも報告されており、これは長期化すると腸上皮に化生し癌化することが危惧されている。また、唾液由来の血管新生因子は腸絨毛の活性に強く関係していることが知られている。これらの報告から唾液は口腔粘膜の健康を保つだけでなく、消化管粘膜の恒常性の維持にも大きな役割を果たしていると考えられるため、唾液分泌の減少は消化管の機能低下に強く影響することが予想される。さらに、消化管は腸管免疫を担当する器官でもあるため、唾液分泌障害により腸管免疫が影響を受ける可能性がある。そこで、本研究では放射線照射後に唾液分泌量が減少したマウスの消化管の形態的および機能的変化を調べ、障害を受けた消化管粘膜を唾液分泌促進により治療できるかどうか検証することを目的とした。

2. 研究の目的

本研究では未だ明らかにされていない唾液分泌の減少したマウスの消化管の組織学および機能的変化を調べることを目的とした。

3. 研究の方法

I 唾液腺摘出

(1) マウス

マウスは8週令オスのC57BL/6(日本クレア社)を用いた。飼料は練り状のCA-1(日本クレア)を投与し、飲料水は水道水を自由に摂取させた。また、12時間毎の昼夜管理体制下において飼育した。

(2) 麻酔方法

唾液腺摘出術ならびにシャムオペ術施行の際には、腹腔内麻酔を行った。使用薬剤は、5%ケタミン(第一三共製薬)0.72 ml + 2%キラジン0.8 ml(バイエル薬品)を生理食塩水8.48 mlで希釈したものを、マウスの体重あたりケタミン 36 mg/kg + キシラジン 16 mg/kgの量で腹腔内に投与した。

(3) 唾液腺摘出術ならびにシャムオペ施行

マウスが完全に入眠し、痛み刺激に反応しないことを確認した後にそれぞれ唾液腺摘出ならびにシャムオペを行った。マウスは仰臥位で四肢を固定した。切開線は、前頸部から胸部上方まで矢状方向に入れ、広頸筋下で剥離を進め、前頸部ならびに顎下部にある顎下腺を剖出させた。舌下腺は顎下腺下に一体となっているため、まず顎下腺と舌下腺を一塊として摘出した。次に咬筋筋膜上で両側頬部まで剥離を進めて散在している耳下腺を剖出させずべて摘出、4-0絹糸で4針縫合した。シャムオペ群は、皮膚切開、広頸筋下ならびに咬筋上の剥離のみを行い、唾液腺摘出群と同様に4-0絹糸で4針縫合した。

(4) 唾液分泌量測定方法

唾液分泌量測定時の麻酔はマウスの体重あたりケタミン 36 mg/kg + キシラジン 16 mg/kgの量で腹腔内投与して行った。マウスが完全に入眠し、痛み刺激に反応しないことを確認したあとに、1%サンピロカルピン(参天製薬)を生理食塩水で50倍希釈液したものをマウスの体重あたり0.1 mg/kg腹腔内投与した。マウスは側臥位とし、キャピラリー(HIRSCHMANN, ringcaps 20 µl)を口腔内に挿入して自然に流出する唾液を採取、キャピラリーがいっぱいになったら交換し、15分間の唾液流出量を計測した。唾液流出量は、術前1週間前、術後1週間、術後1か月、術後3か月、術後6か月の合計5回行った。

(5) 体重・飲水量・食餌量測定

体重は通法通り、動物用電子天秤(夏目製作所)の体重計を用いて計測した。飲料水と食餌用のエサ(CE-2, 日本クレア)は、分量を計測して週2回投与し、前回投与分の残存量からその摂取量を計測した。

II 消化管粘膜の解析

(1) 検体採取

マウスの屠殺は、術後1か月と術後6か月の合計2回行った。エーテル(和光純薬)にて入眠させたあと、頸椎脱臼を行い屠殺した。組織学的解析の対象臓器は、空腸、回腸、大腸、舌の4部位とした。空腸・回腸・大腸の検体採取は、Ogataらの方法に則り、以下のように行った。まず、(1)空腸は幽門より遠位3cmから小腸中央まで、(2)回腸は小腸中央から盲腸近位まで、(3)大腸は盲腸遠位から直腸近位までと定義して切断する。次に、空腸・回腸・大腸それぞれの長さを計測し、リン酸緩衝食塩水(PBS: Phosphate-buffered saline, pH 7.2)を用いて腸管内腔を洗浄する。次に空腸・回腸・大腸それぞれの近位3cmの位置から4cm程度を切断、一端を木綿糸で結紮し腸管内にブアン液(和光純薬)を500 µl程度入れたのちに他方を同様に結紮して、ブアン液に浸漬して遮光下で固定した。固定後は、70%エタノール(和光純薬)を用いて洗浄し、ブアン液の脱色を行った。舌は摘出後に、正中で矢状方向に分割し、通法通りにホルマリン(和光純薬)を用いて固定した。検体固定後、Tissue-Tek VIP5Jr(サクラ精機株式会社)を用いて、パラフィン浸透ならびに包埋を行った。薄切は4mm厚で腸管の長軸に対して垂直方向に行い、プレパラートはMICRO SLIDE GLASS(シランコート; 松浪硝子工業株式会社)を用いた。

(2) 糞便長の計測

唾液腺摘出群ならびにシャムオペ群の大腸内にある糞便長を計測した。前述したように、PBSを用いた内容液洗浄の際に得られた糞便長を計測した。尚、唾液腺摘出マウスでは大腸の糞便が硬かったため、大腸粘膜を長軸方向に切開して便を摘出した。

(3) ヘマトキシリン・エオジン染色

各々の臓器は10%ホルマリンで固定し、固定後パラフィンで包埋、薄切後にヘマトキシリン・エオジン染色を行った。ヘマトキシリン・エオジン染色は、Tissue-Tek DRS (サクラ精機株式会社) を用いて行った。

(4) 免疫染色

薄切プレパラートは、Tissue-Tek DRS を用いて脱パラフィン処理を行った後、98 で45分間抗原賦活化を行った (イムノセーバー、日新 EM 株式会社)。PBS にて洗浄した後、3%過酸化水素水 (和光純薬) に20分間浸して内因性ペルオキシダーゼのブロッキングを行った。一次抗体は、抗 VEGF-A mouse monoclonal 抗体 (abcam 社、200 倍希釈) と抗 EGF rabbit polyclonal 抗体 (Bioss 社) を用い、4 °C で一晚反応させた。PBS 洗浄後、anti-goat IgG 抗体 (シンプルステイン MAX-PO、ニチレイバイオサイエンス) を二次抗体として用い、室温で30分間反応させた。PBS 洗浄後、Diaminobenzidine 染色 (DAB Peroxidase (HRP) Substrate Kit, Vector 社) を行った。流水洗浄後、通法通りにヘマトキシリン染色による核染色を行った。大腸は、ムチカルミン染色も行った。前述のように脱パラフィン処置を行った後、マイヤーヘマトキシリン液に10分間浸漬した。次に10分の洗浄を行い、ムチカルミン原液 (武藤化学株式会社) に60分間浸漬した後に流水下で洗浄した。最後に透徹を行い封入した。

(5) 腸絨毛長の計測

小腸の空腸と回腸の腸絨毛長の計測は、光学顕微鏡 (DP7.0、オリンパス) から投影した画像を接続したモニター上で観察し、DP controller (オリンパス) を用いて、腸絨毛長を計測した。接眼レンズは、WH10X/22 (10x, オリンパス) 対物レンズは UPlanApo10x/0.4 (10x, オリンパス) を用いた。

(6) 統計解析

統計解析は、SPSS (ver 20.0, IBM) を用いて行った。

4. 研究成果

(1) 唾液分泌量の経時的変化

マウスの唾液流出量は、唾液腺摘出術並びにシャムオペの術前1週間、術後1週間後並びに術後1・3・6か月後に計測した。術前1週間において、唾液腺摘出群では平均 141 μ l (103 ~ 170 μ l)、シャムオペ群では平均 125 μ l (102 ~ 148 μ l) の唾液流出量で統計学的に有意差は認められなかった。術後、シャムオペ群マウスでは経時的に唾液流出量が増加したのに対し、唾液腺摘出群では唾液流出量が有意に低下、術後3か月目まで唾液流出量の回復は認められなかった。術後6か月後では、シャムオペ群と比較すると唾液腺摘出群の唾液流出量は有意に低かったが、術前の唾液流出量との有意差は認められないレベルまで回復した。また、術後1週間・1か月・3か月・6か月それぞれの時点で、唾

液腺摘出群における唾液流出量はシャムオペ群よりも有意に少なかった ($p < 0.01$)

(図1)。

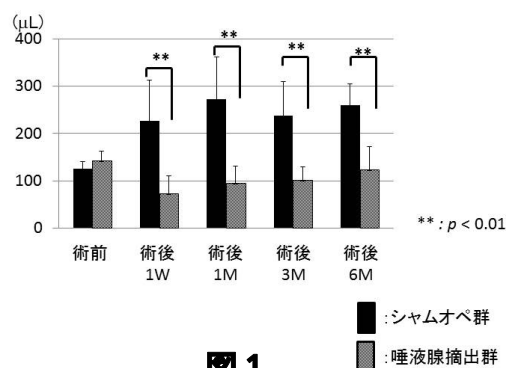


図1

(2) 体重の経時的変化

唾液腺摘出群並びにシャムオペ群マウスともに経時的に体重増加が認められた。術前は、唾液腺摘出群では、平均 23 g (20 ~ 25 g) であったのに対し、シャムオペ群では平均 22 g (20 ~ 24 g) で、統計学的な有意差は認められなかった。更に術後1か月・3か月・6か月後それぞれの時点における経時的な体重の変化についても、両群間で統計学的な有意差は認められなかった。

(3) 糞便長の変化

シャムオペ群と唾液腺摘出群の糞便長を計測した。シャムオペ群では平均 8.1 mm (5.2 ~ 12.1 mm) であったのに対し、唾液腺摘出群では平均 5.2 mm (4.3 ~ 7.8 mm) で、統計学的に有意な糞便長の短縮が認められた ($p < 0.01$)。

(4) 空腸絨毛の組織学的変化

シャムオペ群では、術後1か月・6か月後において、空腸絨毛に明らかな組織学的変化は認められなかった。それに対し、唾液腺摘出群では腸絨毛の密度が疎となる上に、腸絨毛の萎縮が認められ、経時的な腸絨毛の密度と萎縮の回復は認められなかった。術後1か月目では、両群ともに抗 EGF 抗体陰性・抗 VEGF 抗体陽性であったが、唾液腺摘出6か月後では、シャムオペ群では抗 EGF 抗体陰性だったのに対して、唾液腺摘出群では陽性であった。絨毛長を計測したところ、術前では平均 377 μ m (287 ~ 477 μ m) であったのに対し、術後1か月・6か月のシャムオペ群では、各々平均 462 μ m (295 ~ 597 μ m) と 438 μ m (318 ~ 552 μ m)、唾液腺摘出群では平均 329 μ m (187 ~ 487 μ m)、318 μ m (210 ~ 444 μ m) であった。それぞれの群における有意な経時的変化は認められなかったが、術後1か月・6か月のそれぞれの時点で両群を比較すると、唾液腺摘出群では有意な絨毛長の短縮が認められた ($p < 0.01$) (図2)。

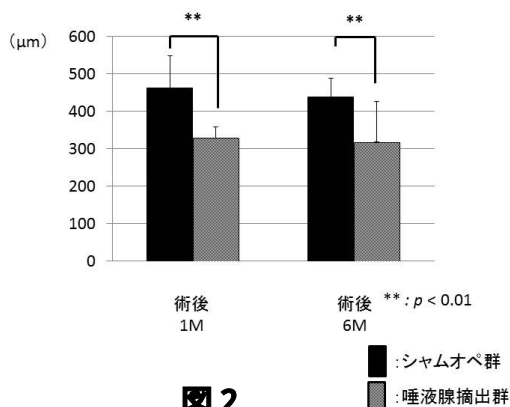


図 2

(5) 回腸絨毛の組織学的変化

シャムオペ群では、術後 1 か月・6 か月後において、回腸絨毛に明らかな組織学的変化は認められなかった。それに対し、唾液腺摘出群では腸絨毛は疎となり、経時的に腸絨毛の密度は回復しなかった。術後 1 か月目では、シャムオペ群が抗 EGF 抗体、抗 VEGF 抗体共に陽性であり、唾液腺摘出群は陰性であった。唾液腺摘出 6 か月後では、両群とも抗 EGF 抗体、抗 VEGF 抗体は陰性であった。絨毛長を計測したところ、術前では平均 234 μm (172 ~ 280 μm) であったのに対し、術後 1 か月・6 か月のシャムオペ群では、平均 323 μm (252 ~ 377 μm)、平均 362 μm (207 ~ 532 μm)、唾液腺摘出群では平均 295 μm (180 ~ 532 μm)、平均 222 μm (157 ~ 262 μm) であった。それぞれの群において有意な経時的な変化は認められなかったが、術後 1 か月・6 か月のそれぞれの時点で両群を比較すると、術後 6 か月目の唾液腺摘出群では有意な絨毛長の短縮が認められた ($p < 0.01$) (図 3)

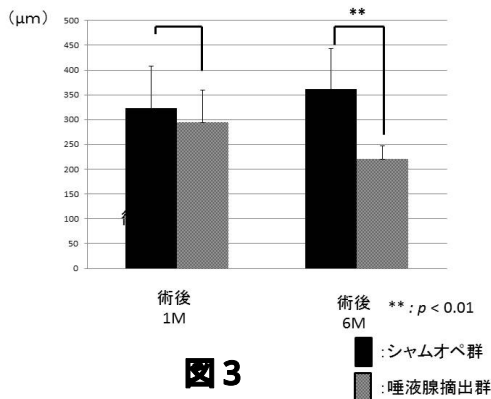


図 3

(6) 大腸の組織学的変化

両群とも、術後 1 か月・6 か月後において、大腸絨毛に明らかな組織学的変化は認められなかった。シャムオペ群では術後 1 か月、術後 6 か月共に抗 EGF 抗体陰性・抗 VEGF 抗体陰性であったが、唾液腺摘出群では術後 1

VEGF 抗体は陽性であった。ムチカルミン染色においても、術後 1 か月目ならびに 6 か月目ともに、唾液腺摘出群とシャムオペ群における有意な違いは認められなかった。

(7) 舌の組織学的変化

シャムオペ群においては、術後 1 か月目ならびに 6 か月目において、舌乳頭に有意な変化は認められなかったのに対して、摘出群では術後 1 か月目において舌乳頭の細小化が認められ、術後 6 か月目には舌乳頭の細小化と萎縮が進行した (図 4)

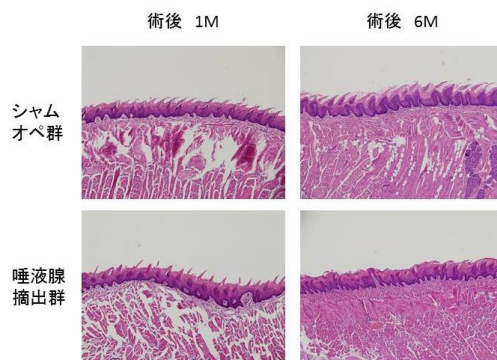


図 4

考察

唾液腺摘出群では術後 1 か月から 6 か月までシャムオペ群と比較して有意な唾液分泌量の低下が認められた。これに伴い舌では唾液腺摘出群で舌乳頭の萎縮が確認された。長期の唾液分泌低下による潤滑作用の欠如に起因する機械的刺激の増大が、舌乳頭の萎縮を招いた可能性が考えられる。空腸については唾液腺摘出後 1 か月から 6 か月で絨毛の短縮が認められた。回腸については術後 6 か月で絨毛の長さに差が見られたことから唾液分泌低下の影響は晩期に認められた。空腸と回腸の腸絨毛に対する影響の時期の違いは、唾液量の減少に対する感受性の相違と考えられる。消化管の恒常性維持に必要な唾液量は、回腸に比べて空腸の方が多い可能性がある。消化の過程で唾液も消化管から吸収されるため、唾液の濃度は上部消化管の方が高く、回腸より口腔側に位置する空腸が早期に唾液量の減少の影響を受けたのではないと思われる。大腸については術後 6 か月まで明らかな組織学的変化を認めなかった。以上をまとめると、唾液分泌量の減少は、口腔内の組織学的変化のみならず、小腸の絨毛の萎縮を招くことが示唆された。特に口腔側に近い消化管ほど唾液分泌量の減少による影響を受けやすいことが示唆された。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山田 浩之 (YAMADA, Hiroyuki)
岩手医科大学・歯学部・教授
研究者番号：90267542

(2) 研究分担者

齋藤 一郎 (SAITO, Ichiro)
鶴見大学・歯学部・教授
研究者番号：60147634

濱田 良樹 (HAMADA, Yoshiki)
鶴見大学・歯学部・教授
研究者番号：70247336

(3) 連携研究者

(4) 研究協力者

()