

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 15 日現在

機関番号：30110

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K20425

研究課題名(和文) 三叉-自律神経反射で生じる唾液腺血流増加の役割：唾液分泌障害への新たなアプローチ

研究課題名(英文) Role of salivary gland blood flow increase caused by trigeminal autonomic reflex: A new approach to salivary secretion disorder

研究代表者

佐藤 寿哉 (Sato, Toshiya)

北海道医療大学・歯学部・講師

研究者番号：30709241

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は唾液分泌における唾液腺の副交感神経性血流増加の役割を明らかにすることである。ラットを用いた実験から、舌神経刺激による唾液腺血流増加は耳下腺と比較して顎下腺及び舌下腺で大きく、顎下腺・舌下腺からは著しい唾液分泌が認められた。NO合成酵素阻害薬投与により舌神経刺激による唾液腺血流増加は約60～70%に抑制され、顎下腺・舌下腺の混合唾液は約33%、耳下腺唾液は約73%に抑制された。したがって、反射性の唾液分泌では、分泌活動に応じた血流増加が誘発され、唾液分泌と血流増加は連動して調節されることが示唆された。また唾液腺における血流増加は唾液分泌を促す上で極めて重要であることが考えられた。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study is to clarify the role of parasympathetic blood flow increase in salivary glands in salivary secretion. Experiments using rats showed that the glandular blood flow increase caused by the stimulation of the lingual nerve (LN) was larger in the submandibular gland (SMG) and sublingual gland (SLG) than in the parotid gland (PG), and significant salivary secretion was observed from the SMG / SLG. The glandular blood flow increase caused by the LN stimulation was inhibited approximately 60 to 70% by NO synthase inhibitor. Further, mixed saliva from SMG / SLG and saliva from PG were inhibited approximately 33% and 73%, respectively. Therefore, it was suggested that glandular blood flow increase corresponding to secretory activity was induced in reflex salivary secretion, and salivary secretion and glandular blood flow increase were coordinately regulated. It was also thought that the glandular blood flow increase is extremely important in salivation.

研究分野：口腔生理学

キーワード：唾液腺 血流動態 副交感神経 唾液分泌

## 1. 研究開始当初の背景

唾液は口腔の健康に極めて重要であり、唾液分泌障害は歯周病などの細菌性感染症を助長するばかりか円滑な摂食嚥下を妨げ日常生活の質を低下させる。唾液分泌障害は糖尿病や腎症などの全身疾患の合併症や投薬の副作用などで認められ歯科医療が果たすべき役割は大きいと云える。しかし、唾液分泌障害の原因を説明する明確な結論の提示には至っておらず、発症機序に基づく治療方法の確立が望まれている。

唾液の 99.9% を占める水成分は血液に由来するため唾液腺の血流調節は唾液分泌に重要であると考えられている (Proctor & Carpenter, *Auton Neurosci*, 2007)。唾液腺の血管は交感神経と副交感神経による二重支配を受けており、唾液分泌を誘発する口腔領域からの感覚入力には唾液腺に急峻な副交感神経性血流増加反応を誘発する (Mizuta et al., *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2000)。したがって、唾液分泌時における唾液腺血管の神経性調節では副交感神経が極めて重要な役割を果たしていることと云える。しかしながら、唾液分泌と唾液腺で生じる副交感神経性血流増加反応との関係を明確化した報告は見当たらない。

これまでに我々は唾液腺 (顎下腺および舌下腺) で生じる副交感神経性血流増加反応を比較して、1) 顎下腺で生じる反応が舌下腺よりも大きいこと、2) 顎下腺の反応は主にコリン作動性線維が関与するが舌下腺ではコリン作動性線維に加えて非コリン作動性線維 [血管作動性腸管ペプチド (VIP) 作動性線維] が関与するなど反応機序が異なることを報告した (Sato & Ishii, *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2015)。我々の結果は、口腔からの感覚入力時に多量の唾液を分泌する顎下腺により多くの血液が供給され、さらにその機序は舌下腺とは異なることを示しており、副交感神経性血流増加反応が唾液分泌と密接に関係していることを予見している。

## 2. 研究の目的

本研究は唾液分泌と唾液腺血流動態の関係という新たなアプローチで唾液分泌障害機序を解明し治療への応用に展開することを目指しており、今回は唾液分泌における三叉-自律神経系によって調節される唾液腺血流増加反応の役割を明らかにすることを目的とする。そこでラット大唾液腺の唾液分泌量とレーザー-speckルイメージング血流計を用いた唾液腺血流動態の同時測定による解析を行い 1) 口腔からの感覚入力によって誘発される唾液分泌と唾液腺血流増加反応の関係、2) 唾液腺血流増加反応の抑制が唾液分泌に与える影響および 3) 唾液分泌におけるコリン作動性と非コリン作動性血流増加反応の役割について詳細な検討を行う。

## 3. 研究の方法

### (1) 実験動物

実験には 10-15 週齢の Wistar ラットを用いた。ラットはワイヤーゲージ内にて昼夜 12 時間サイクルの環境下で飼育し、水と固形試料は自由摂取とした。ラットはイソフルレンで鎮静化させ、ウレタン (1 g/kg) を頸背部に皮下注射して麻酔した。大腿動脈と大腿静脈にカニューレを挿入し、それぞれ体幹血圧の測定と各種薬物投与を行った。気管切開にて挿管し、臭化パンクロニウム (0.6 mg/kg、ミオブロック; Organon Teknika, Netherlands) を投与して筋弛緩させ継続的に人工呼吸下 (酸素 50%、空気 50%) で管理した。実験中は臭化パンクロニウムを持続投与 (0.4 mg/kg/hr) した。カプノメーター (Capnomac Ultima; Datex, Helsinki, Finland) を用いて終末呼気二酸化炭素分圧が 35 ~ 40 mmHg となるように人工呼吸器 (SN-480-7, シマノ) の 1 回換気量 (5.0 ~ 7.0 cm<sup>3</sup>/kg) および呼吸数 (20 ~ 30 回/分) を調節した。ラットをヒーティングパッド上で仰臥位にし直腸温が 37 を維持するに調節した。頸部の正中を切開し、周囲の神経や血管の損傷を避けながら耳下腺・顎下腺・舌下腺を露出させた。実験終了後、すべての動物はペントバルビタール (ソムノペンチル; 共立製薬) の過量投与 (100 mg/kg 以上) により安楽死させた。本研究は北海道医療大学動物実験規定に基づき、北海道医療大学動物実験センター管理運営委員会の審査並びに学長の承認を得て行った (承認番号: 第 045 号)。またすべての実験は National Research Council guide に準拠して行った。

### (2) 血流動態の記録及び唾液分泌量の測定

ラットの耳下腺、顎下腺および舌下腺の血流はレーザー-speckルイメージング血流計 (OMEGAZONE; Omegawave) を用いて記録した。本血流計は秒単位で高解像度な二次元血流イメージングを描出する。組織に照射された半導体レーザー (780 nm) の散乱光を CCD カメラで撮影し、speckル (斑点状の格子) 内の赤血球の数や移動速度の変化に基づくレーザー光線のドップラー効果を血流変化として測定する。血流変化は 2 次元画像 (638 × 480 pixel) で描出され、最短で約 0.4 秒ごとの連続測定が可能である。speckル画像の解析では任意に設定した観察範囲 (ROI; Region of Interest) に含まれる各々のspeckルが示す輝度の値の平均から相対的な血流値が算出される。各測定部位における血流動態は血圧の変動による影響を避けるため血流量を平均血圧で除した血管コンダクタンスを算出し評価した。

顎下腺及び舌下腺の唾液分泌量は舌下小丘に挿入されたカニューレを介し回収した重量から算出した。また、耳下腺の唾液分泌量は口腔内に分泌された唾液を綿球で回収し算出した。

### (3) 副交感神経性血管拡張反応及び唾液分泌の誘発

唾液腺の副交感神経性血管拡張反応及び唾液分泌は三叉神経（舌神経）の電気刺激により誘発させた。舌神経は末梢側を切断し両極性電極を用いて求心性（中枢性）に刺激した。刺激には電気刺激装置（SEN-7103，日本光電）を用い、2 msec 間隔にて 20 V の刺激強度と 20 Hz の刺激頻度で 60 秒間刺激した。この刺激条件では唾液腺における副交感神経性血流増加反応が最大の反応を示すことをこれまでの報告で明らかにしている (Sato & Ishii., *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2015)。刺激と刺激の間には 30 分間のインターバルを置いた。すべての実験において頸部交感神経幹と迷走神経を頸部に於て両側に切断し、両神経の影響を排除した (図 1)。

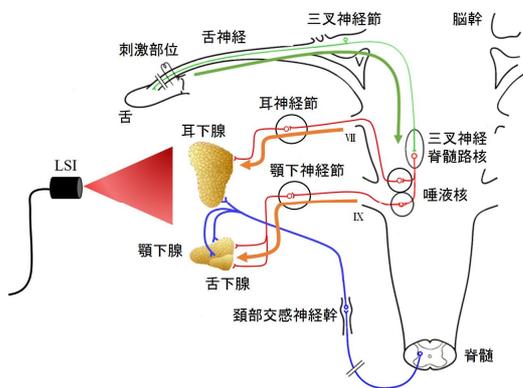


図 1．唾液腺血流調節に関する副交感神経性血管拡張線維と中枢の模式図

### (4) 使用薬物

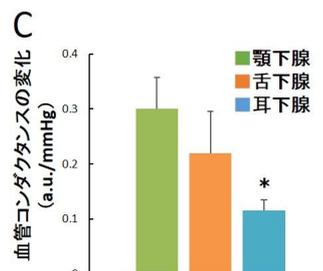
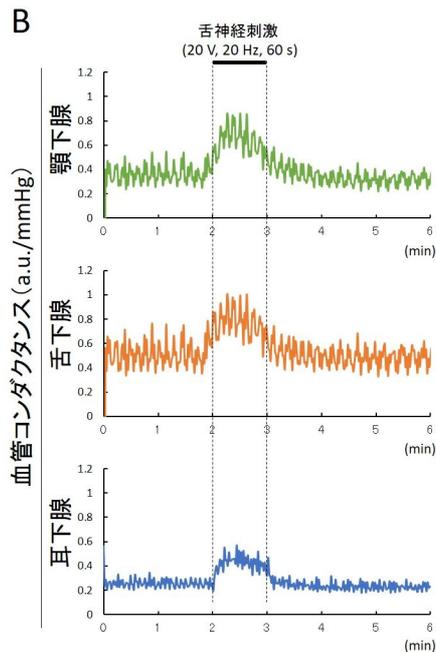
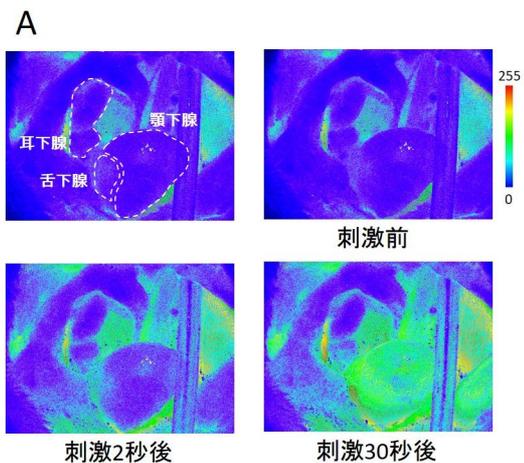
舌神経刺激で生じる唾液腺の血流増加反応と唾液分泌との関係性を検討するために NO 合成酵素阻害薬である L-NAME (N<sup>ω</sup>-Nitro-L-arginine methyl ester hydrochloride; 2 mg/kg) を静脈内から持続投与 (0.1 ml/min) し血流増加反応を抑制させた。またこれまでの研究から唾液腺で生じる副交感神経性血流増加反応の末梢性神経機構についてアセチルコリンと VIP を神経伝達物質とする節後線維が関与することが明らかとなっており (Sato & Ishii., *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2015)、それぞれの受容体作動薬 (20 μg/kg) を静脈内から持続投与し (1 ml/min) 唾液腺の血流増加反応と唾液分泌量を記録した。

## 4. 研究成果

### (1) 舌神経刺激による唾液腺血流動態の変化と唾液分泌

舌神経の求心性電気刺激により耳下腺・顎下腺・舌下腺では急峻な血流増加反応が誘発され、刺激後速やかに血流増加反応のピーク

を形成し、刺激中は僅かではあるが反応を徐々に減じた (図 2A,B)。反応のピーク形成時点における各唾液腺の血管コンダクタンスは耳下腺と比較して顎下腺及び舌下腺で有意に高かった (図 2C)。またその際、顎下腺・舌下腺からの著しい唾液分泌が認められ、全唾液量に占める顎下腺・舌下腺由来の混合唾液の割合は約 80% だった (図 2D)。これらの結果から、三叉神経の感覚入力による反射性の唾液分泌活動では、各唾液腺の分泌活動に応じた血流増加反応が付随して誘発され、唾液分泌と血流増加反応は連動して調節されることが示唆された。



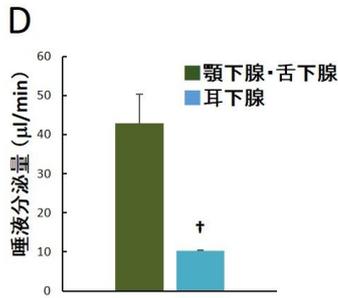


図 2. 舌神経刺激時の唾液腺血流動態及び唾液分泌

舌神経刺激 (20 V, 20 Hz, 60 s) 前後の顎下腺・舌下腺・耳下腺の典型的なレーザースペックル血流イメージング (A) 及び唾液腺の経時的な血管コンダクタンスの記録 (B) 唾液腺血管コンダクタンスの変化 (C) 唾液分泌量 (D)。\* :  $p < 0.05$  vs 顎下腺・舌下腺。† :  $p < 0.05$  vs 顎下腺・舌下腺混合唾液。

(2) L-NAME 投与による血圧上昇効果と安静時唾液腺血流動態への影響

L-NAME の静脈内からの持続投与 (2 mg/kg/min) により体感血圧は  $101.5 \pm 4.4$  から  $152.1 \pm 12.2$  へと有意な上昇が認められた (図 3A)。これは全身の血管系において NO 合成が抑制され血管拡張作用の抑制が生じたことによる血圧上昇と考えられる。しかしながら、唾液腺の安静時血流量は僅かに上昇した程度であり、L-NAME 投与に伴う血圧上昇による末梢の毛細血管における血流動態への影響はほとんどなかった (図 3B)。

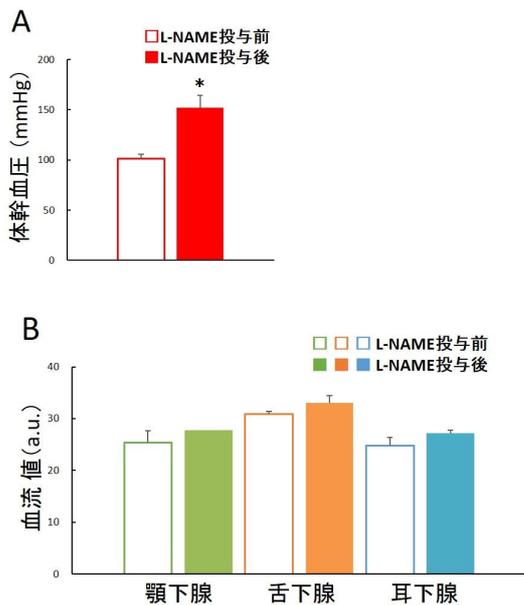


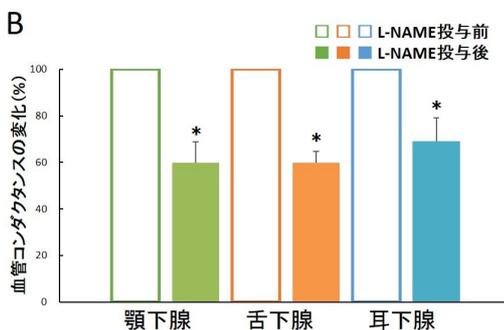
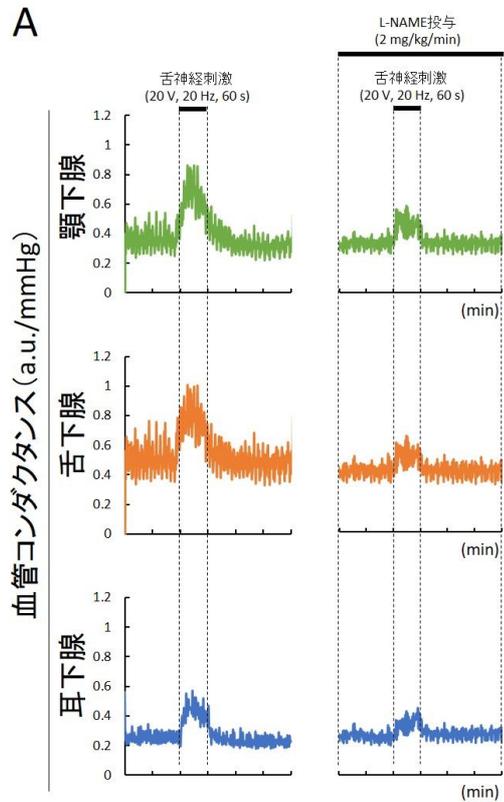
図 3. L-NAME 投与が体幹血圧及び唾液腺の安静時血流に与える影響

L-NAME の静脈内投与 (2 mg/kg/min) による体幹血圧の変化 (A) 及び各唾液腺の安静

時血流値の変動 (B)。\* :  $p < 0.05$  vs L-NAME 投与前。

(3) L-NAME 投与が副交感神経性血流増加反応及び唾液分泌に与える影響

L-NAME の静脈内からの持続投与 (2 mg/kg/min) により舌神経の求心性電気刺激により誘発される耳下腺・顎下腺・舌下腺の血流増加反応は約 60 ~ 70% 程度に抑制された (図 4A,B)。唾液腺の副交感神経性血流増加反応には NO 依存性及び非依存性の血流増加反応が存在することが報告されており (Anderson, L. C. et al., *Exp Physiol.* 2006) 本研究結果はこれまでに報告された結果と一致した。またその際の唾液分泌は顎下腺・舌下腺の混合唾液は約 33% に抑制され、耳下腺由来の唾液は約 73% に抑制された (図 4C)。これは舌神経刺激により活発な唾液分泌が認められた顎下腺・舌下腺の混合唾液の方が血流増加反応の抑制の影響を強く受け



たことを示唆している。

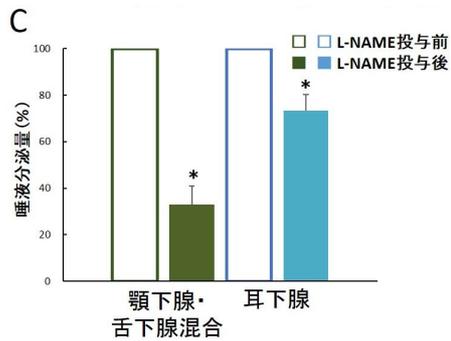


図 4. L-NAME 投与が副交感神経性血流増加反応及び唾液分泌に与える影響

L-NAME (2 mg/kg/min) 投与時及び未投与時の舌神経刺激 (20 V, 20 Hz, 60 s) 中の唾液腺血流動態の経時的記録の典型例 (A) 及び血管コンダクタンスの比較 (B) 唾液分泌量の比較 (C)。\*:  $p < 0.05$  vs L-NAME 未投与時。

(4) アセチルコリン及び VIP の静脈内投与による血流増加反応及び唾液分泌

アセチルコリン及びVIPの静脈内からの持続投与 (20 mg/kg/60 sec) により各唾液腺では舌神経刺激時と同様に急峻な血流増加反応が誘発された (図 5A)。顎下腺・舌下腺ではアセチルコリンとVIPによる血流増加反応に有意な差は認められなかったが、耳下腺ではアセチルコリンによる反応と比較してVIPによる反応は有意に低かった (図 5B)。耳下腺における副交感神経性血流増加反応の大部分はコリン作動性線維を介した反応であることから (Sato & Ishii., *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2015)、我々の結果は耳下腺におけるVIP受容体の発現は低いことを示唆しているのかもしれない。またアセチルコリンは唾液分泌を促したが、VIPによる唾液分泌はほとんど記録されなかった (図 5D)。これらの結果は唾液腺においてアセチルコリンは血管系と腺房細胞両方の機能に関与し血流増加反応と唾液分泌を促すのに対して、VIPは血流増加反応には関与するものの少なくとも唾液の水分分泌には積極的に関与していないことを示している。VIPによる血流増加反応はアセチルコリンの反応と比較して血流増加反応の持続時間が有意に長いことから (Sato & Ishii., *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2015)、血流増加効果はVIPの方が高いと考えられる (図 5C)。今後、アセチルコリンとVIPによる血流増加反応が生じる生理学的な条件或いは環境について明らかにされると血流調節機構の更なる理解に寄与するものと期待される。

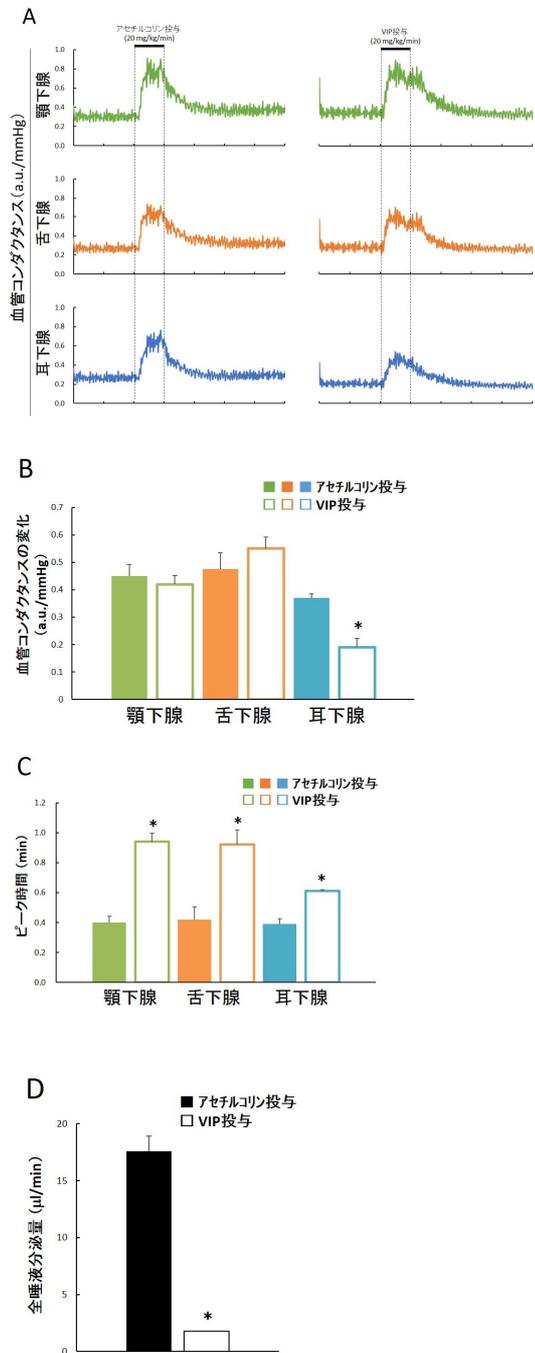


図 5. アセチルコリン及びVIPの静脈内投与による血流増加反応及び唾液分泌

アセチルコリン及びVIP投与 (20 mg/kg/60 sec) による唾液腺血流動態の経時的変化の典型例 (A) アセチルコリン及びVIP投与による唾液腺の血管コンダクタンスの変化 (B) アセチルコリン及びVIP投与による血流増加反応のピーク時間 (C) アセチルコリン及びVIP投与による全唾液分泌。\*:  $p < 0.05$  vs アセチルコリン投与。

## 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2件)

1. Sato T & Ishii H. Regulation of hemodynamics in major salivary glands by parasympathetic vasodilation. *J Oral Biosci (Review)* 59:80-86 2017. 査読あり
2. Sato T & Ishii H. Influence of type 2 diabetes on parasympathetic vasodilation in salivary glands in rats. *Dent J Health Sci Univ Hokkaido* 35:1-12 2016. 査読あり

[学会発表](計5件)

1. 佐藤寿哉、石井久淑. 2型糖尿病が唾液腺における副交感神経性血管拡張反応に与える影響. 第59回歯科基礎医学会学術大会、プログラム集、P313 2017.
2. Sato T and Ishii H. Influence of type 2 diabetes on parasympathetic vasodilation in the salivary glands of rats. Proceedings of the 94th Annual Meeting of The Physiological Society of Japan. *J. Physiol. Sci.* 67 (Suppl. 1), S97 2017.
3. 佐藤寿哉、石井久淑. 2型糖尿病ラット唾液腺における副交感神経性血管拡張反応. 第58回歯科基礎医学会学術大会、プログラム集、55 2016.
4. Sato T. Regulation of hemodynamics in major salivary gland by autonomic nerves system. Proceedings of the 93rd Annual Meeting of The Physiological Society of Japan (Symposium: Health enhancement strategy derived from the investigation of mechanism for the regulation of oral functions). *J Physiol Sci* (Suppl. 1), S57 2016.
5. Sato T and Ishii H. Parasympathetic vasodilation in major salivary glands in type 2 diabetic rats. Proceedings of the 93rd Annual Meeting of The Physiological Society of Japan. *J. Physiol. Sci.* (Suppl. 1), S141 2016.

[その他]

ホームページ等

<http://www.hoku-iryo-u.ac.jp/~physiol/>

## 6. 研究組織

(1)研究代表者

佐藤 寿哉 (SATO, Toshiya)  
北海道医療大学・歯学部・講師  
研究者番号: 30709241