

鶴見大学大学院歯学研究科博士学位論文

内容の要旨および審査の結果の要旨

氏名(本籍) 中岡 雅典(和歌山県)
 博士の専攻分野 博士(歯学)
 学位記番号 乙第267号
 学位授与年月日 令和2年3月14日
 学位授与の要件 学位規則第4条第2項該当
 学位論文題目 大唾液腺摘出による消化管粘膜の組織学的変化
 鶴見歯学 第45巻 第1号 1頁～10頁掲載 平成31年1月10日発行
 論文審査委員 主査 教授 斎藤 一郎
 副査 教授 里村 一人 副査 教授 濱田 良樹

内容の要旨

【緒言】

唾液は咀嚼・嚥下・会話などの機能のほかに、口腔粘膜の保護などにも関与している。唾液中には、ムチンやパロチンなどのタンパク、消化酵素のアミラーゼ、免疫グロブリンに加えて、上皮成長因子(EGF: Epidermal Growth Factor)、血管内皮細胞増殖因子(VEGF: Vascular Endothelial Growth Factor)、線維芽細胞増殖因子(FGF: Fibroblast Growth Factor)などの成長因子も含まれる。これら成長因子は、ラットでは顎下腺摘出後に胃潰瘍を悪化したり、口腔内の創傷治癒が遅延したりすることが報告されているが、顎下腺摘出マウスにEGFを投与すると、胃潰瘍や口腔内の創傷治癒遅延が改善することも報告されている。更に、唾液由来のVEGFは腸絨毛の活性に関与していることも報告されている。

一方唾液流出量減少を来す病態には、シェーグレン症候群などの自己免疫疾患の他、放射線療法、唾液腺腫瘍の外科的切除などもある。その結果、会話や摂食困難の他に、シェーグレン症候群患者は高頻度に萎縮性胃炎を合併することが報告されている。しかし唾液流出量低下による消化管粘膜への影響については、唾液腺摘出モデルマウスの消化管のDNA合成能低下、DNA量とRNA量の低下が報告されているものの、消化管粘膜の病理組織学的解析が行われていない。従って、これらの報告より、唾液は口腔粘膜の健康保持に加えて、消化管粘膜の恒常性にも寄与していると示唆され、唾液流出量低下が消化管粘膜の恒常性低下を来すと仮定できる。

そこで本研究では、唾液流出量低下が消化管粘膜へ及ぼす影響を解明するために、唾液腺摘出モデルマウスを作製、舌、空腸、回腸、大腸の消化管粘膜の病理組織学的解析を行った。

【材料および方法】

マウスは8週令オスのC57BL/6を用いた。唾液腺摘出術ならびにシャムオペは、腹腔内麻酔下で行った。オトガイ下から胸部上方の中央まで切開し、皮下で剥離、前頸部と顎下部にある顎下腺と耳下腺を摘出した。シャムオペ群は、皮膚切開、前頸部・顎下部ならびに咬筋上の剥離のみを行った。

唾液流出量測定は術前1週間前、術後1週間目、1か月目、3か月目、6か月目に行った。全身麻酔下にて1%サンピロカルピンを0.1 mg/kg腹腔内投与し、15分間の唾液流出量を計測した。体重計測は、術直前ならびに術後1か月目、術後3か月目、術後6か月目に計測した。

マウスの消化管の解析は、術後1か月目と術後6か月目に行った。組織学的解析の対象臓器は、①空腸、②回腸、③大腸、④舌の4部位とした。空腸・回腸・大腸の検体採取は以下のように行った。まず、(1)空腸は幽門より遠位3 cm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、切断した。次に、空腸・回腸・大腸それぞれの長さを計測し、腸管内腔を洗浄した後、固定した。舌は、正中で矢状方向に分割し、固定した。

唾液腺摘出群ならびにシャムオペ群の糞便長は、前述の洗浄の際に計測した。なお、唾液腺摘出マウスは糞便が硬かった

ため、大腸粘膜を長軸方向に切開して便を摘出し計測した。

パラフィン浸透ならびに包埋は通法通り行い、腸管は長軸方向、舌は正中から矢状断方向に4 mm厚で薄切した。ヘマトキシリン・エオジン染色は、通法通り行った。

免疫組織学的解析では、抗 VEGF-A 抗体と抗 EGF 抗体を使用した。大腸の検体は、ムチカルミン染色も行った。小腸の空腸と回腸の腸絨毛長は、光学顕微鏡からモニター上へ投影し、1 サンプルあたりランダムに20 か所以上選択し、その平均を算出した。統計解析は、SPSS (ver 20.0, IBM) を用いて、Mann-Whitney's U 検定を行った。

【結 果】

唾液流出量は、術前では統計学的に有意差はなかった。シャムオペ群では術後、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した。ただし、唾液腺摘出群も経時的に唾液流出量が回復し、術後6 か月目ではシャムオペ群と比較して有意に低かったが、術前の唾液流出量とは有意差がないレベルまで回復した。

また体重は両群ともに経時的に体重が増加し、術後それぞれの時点において統計学的な有意差は認められなかった。

シャムオペ群と唾液腺摘出群の糞便長は、シャムオペ群では平均8.1 mm、唾液腺摘出群では平均5.2 mmで、有意に糞便長が短縮した。

空腸絨毛の組織学的変化は、シャムオペ群では術後のいずれの期間においても明らかではなかった。一方唾液腺摘出群では、術後1 か月目に明らかに腸絨毛長が短縮し、両群を術後1・6 か月目で各々比較すると、唾液腺摘出群では有意な絨毛長の短縮が認められた。さらに免疫組織学的検査において、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 か月目では、シャムオペ群は抗 EGF 抗体陰性のままであったのに対して、唾液腺摘出群では抗 EGF 抗体陽性となった。

回腸絨毛の組織学的変化は、シャムオペ群では明らかではなかった。唾液腺摘出群では術後1 か月目に軽度に腸絨毛が疎となり、術後6 か月目に絨毛長が短縮した。シャムオペ群ならびに唾液腺摘出群の回腸絨毛長は、術後1 か月目では両群間に有意差は認められなかったが、術後6 か月目では唾液腺摘出群において有意な絨毛長の短縮が認められた。免疫組織学的検査では、術後1 か月目では両群とも抗 EGF 抗体・抗 VEGF 抗体陽性であったが、術後6 か月目では両群とも抗 EGF 抗体は陰性化、抗 VEGF 抗体は陽性であった。

大腸絨毛の組織学的変化は、シャムオペ群ではいずれの時点においても明らかではなかった。唾液腺摘出群では、術後6 か月目に大腸絨毛長の不均一化が認められた。免疫組織学的検査の結果、術後1 か月目では両群とも抗 EGF 抗体は陰性で、唾液腺摘出群では抗 VEGF 抗体が陽性だった。術後6 か月目では、両群とも抗 EGF 抗体・抗 VEGF 抗体に対して軽度陽性で、明らかな差はなかった。またムチカルミン染色でも、術後1 か月目ならびに6 か月目において差はなかった。

術後1 か月目に唾液腺摘出群では軽度の舌乳頭の萎縮が認められた。術後6 か月目では、シャムオペ群では舌乳頭が成長したのに対し、唾液腺摘出群では舌乳頭の細小化と萎縮が進行した。

【考 察】

マウスの唾液腺摘出術によって舌、空腸、回腸、大腸それぞれの消化管粘膜に組織学的変化を来たした。免疫組織学的検査の結果、当初の予想に反して、唾液分泌量の低下による唾液中の EGF、VEGF 量が低下したために消化管において EGF、VEGF の発現量が低下を来たすわけではないことも分かった。従って、回腸と大腸の絨毛の短縮化のメカニズムは、唾液流出量低下に端を発する直接的なものではなく、空腸絨毛長の短縮化ならびに恒常性の低下に端を発する二次的変化の可能性も考えられる。

また糞便長の短縮も認められたことから、唾液腺摘出によって腸内細菌叢にも影響があることが示唆された。今後の研究によって、唾液の生体内での役割について一層の理解が進むと考えられる。

審査の結果の要旨

唾液中には種々の消化酵素のアミラーゼや免疫グロブリンに加えて、上皮成長因子 (EGF: Epidermal Growth Factor)、血管内皮細胞増殖因子 (VEGF: Vascular Endothelial Growth Factor)、線維芽細胞増殖因子 (FGF: Fibroblast Growth Factor) などの成長因子も含まれ、これら成長因子は唾液分泌の低下により萎縮性胃炎や口腔内の創傷治癒が遅延することが報告されていることから、唾液量の低下が消化管粘膜にも影響を与えることが示唆されている。

そこで本研究では、唾液量の低下が消化管粘膜へ及ぼす影響を解明するために、唾液腺摘出モデルマウスを作製、舌、空腸、回腸、大腸の消化管粘膜の病理組織学的解析を行い、以下のことが明らかとなった。

1. シャムオペ群と唾液腺摘出群の糞便長は、シャムオペ群では平均 8.1 mm、唾液腺摘出群では平均 5.2 mm で、有意に糞便長が短縮した。

2. 唾液腺摘出群では、術後 1 か月目に明らかに腸絨毛長が短縮し、唾液腺摘出群では有意な絨毛長の短縮が認められた。さらに免疫組織学的検査において、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 か月目では、シャムオペ群は抗 EGF 抗体陰性のままであったのに対して、唾液腺摘出群では抗 EGF 抗体陽性となった。

3. 回腸絨毛の組織学的変化は唾液腺摘出群では術後 1 か月目に軽度腸絨毛が疎となり、術後 6 か月目に絨毛長が短縮した。免疫組織学的検査では、術後 1 か月目では両群とも抗 EGF 抗体・抗 VEGF 抗体陽性であったが、術後 6 か月目では両群とも抗 EGF 抗体は陰性化、抗 VEGF 抗体は陽性であった。

4. 唾液腺摘出群では、術後 6 か月目に大腸絨毛長の不均一化が認められた。免疫組織学的検査の結果、術後 1 か月目では両群とも抗 EGF 抗体は陰性で、唾液腺摘出群では抗 VEGF 抗体が陽性だった。術後 6 か月目では、両群とも抗 EGF 抗体・抗 VEGF 抗体に対して軽度陽性で、明らかな差はなかった。

5. 術後 1 か月目に唾液腺摘出群では軽度の舌乳頭の萎縮が認められた。術後 6 か月目では、シャムオペ群では舌乳頭が成長したのに対し、唾液腺摘出群では舌乳頭の細小化と萎縮が進行した。

以上のことから、マウスの唾液腺摘出術によって舌、空腸、回腸、大腸それぞれの消化管粘膜に組織学的変化を来すことが明らかとなり、唾液中の EGF、VEGF 量の減少が消化管における EGF、VEGF の発現量の低下の原因ではないことも判明した。従って、回腸と大腸の絨毛の短縮化のメカニズムは、唾液量低下の直接的な原因ではなく二次的変化の可能性も考えられ、また糞便長の短縮も認められたことから、唾液量の低下は腸内細菌叢にも影響を与えることが示唆され、このように唾液分泌量の低下による全身的な影響の知見を明らかにしたことの意義は大きく、今後の臨床応用への道を拓くものと考えられる。

よって、本論文は博士（歯学）の学位請求論文として十分な価値を有するものと判定した。