

氏名	田尻 絢子
授与した学位	博士
専攻分野の名称	歯学
学位授与番号	博甲第5504号
学位授与の日付	平成29年3月24日
学位授与の要件	医歯薬学総合研究科機能再生・再建科学専攻 (学位規則第4条第1項該当)
学位論文の題目	マウス唾液腺における高濃度酸素障害の検討
論文審査委員	松尾 龍二 教授 苔口 進 准教授 宮脇 卓也 教授

学位論文内容の要旨

【緒言】

酸素は生命活動において不可欠である一方、高濃度になると肺、脳の組織障害を引き起こすことが報告されている。臨床的にこのような高濃度酸素に暴露される可能性がある状況に周術期が考えられる。周術期には各臓器の酸素供給を保つために酸素療法が行われるため、高濃度酸素に暴露される機会が極めて多い。周術期には口腔のケアをはじめとした口腔機能管理が積極的に行われている。唾液はこの良好な口腔機能の維持において多くの重要な役割を担っている。周術期等で使用される高濃度酸素は唾液腺機能に対しても悪影響を及ぼす可能性が考えられる。そこで本研究は、高濃度酸素が唾液機能に及ぼす影響を動物実験により検討した。

【材料と方法】

- 30週令C57BL/6J雄系マウスを使用し、75%の酸素濃度で5日飼育する群を高濃度酸素群、21%の酸素濃度で5日飼育する群を対照群とした。
- 定量リアルタイム-PCR
大脳皮質、肺、顎下腺、舌、肝臓、腎臓を摘出し通法に従ってcDNAを合成し定量リアルタイム-PCRを行い、HO-1 (Heme oxygenase-1)、SOD-1 (Superoxide dismutase-1)、SOD-2 (Superoxide dismutase-2)、IL-6 (Interleukin-6)、TNF- α (Tumor Necrosis Factor- α)の遺伝子発現量を定量した。
- 組織学的観察
顎下腺を摘出後、通法に従いHE染色、Alcian Blue染色を行った。さらにTdT-mediated dUTP nick end labeling (TUNEL) 染色を行い1000 μm^2 あたりのTUNEL陽性細胞の数を比較した。
- 唾液量測定
ペントバルビタール腹腔内投与により全身麻酔を行った後、塩酸ピロカルピンを皮下注射し、投与後30分間の唾液分泌量を測定した。
- 唾液成分分析
唾液量の測定と同様に塩酸ピロカルピンを皮下注射し、採取した唾液中のタンパク質量およびアミラーゼ量を測定した。
- 免疫染色およびウエスタンブロッティング
摘出した顎下腺を凍結・包埋し、7 μm の凍結切片を作成した。Aquaporin-5 (AQP5)、E-cadherinについて免疫染色を行い、共焦点レーザー顕微鏡 LSM780で観察した。

顎下腺を摘出しタンパクを抽出、濃度を一定量に調整しウエスタンブロット解析試料とした。AQP5、 β -actinについてタンパク質の検出を行い、定量した。

7. 統計解析

統計解析には対応のない検定および二元配置分散分析を用い、Post-hocテストにはBonferroniを用いた。

【結果】

定量リアルタイム-PCR法を用いて脳、舌、顎下腺、肺、肝臓、腎臓のHO-1遺伝子の発現を定量したところ、高濃度酸素群では肺、顎下腺、腎臓において、HO-1発現量が有意に増加していた。

顎下腺における遺伝子発現量は高濃度酸素群においてSOD-1、SOD-2の発現量が有意に増加していた。IL-6、TNF- α の発現量に有意差はなかった。

組織学的観察において高濃度酸素群ではH-E染色では腺房の拡大が観察され、Alcian Blue染色では青色に好染する酸性粘液多糖類の増加を認めた。

TUNEL染色では高濃度酸素群においてTUNEL陽性細胞の出現増加を認め、TUNEL陽性細胞の数を定量比較すると有意に増加を認めた。

刺激唾液の量を高濃度酸素群と対照群で比較したところ、唾液採取開始5分、10分において高濃度酸素群の唾液分泌量は有意に減少していた。30分間の唾液総量についても高濃度酸素群では唾液分泌量が有意に減少した。

高濃度酸素環境による唾液成分への影響については30分間の総唾液中のタンパク濃度に有意な変化は認められなかったが、塩酸ピロカルピン皮下注射後15分間の唾液においては有意な増加を認めた。アミラーゼの濃度については塩酸ピロカルピン皮下注射後15分間および30分間共に唾液中のアミラーゼ濃度が有意に増加していた。

AQP5の発現について免疫組織、ウエスタンブロット法を用いて比較したが高濃度酸素飼育によって発現部位の変化や発現量の有意な変化は認めなかった。

【考察】

高濃度酸素への暴露によりマウス顎下腺にはHO-1、SOD-1、SOD-2といった酸化ストレスマーカーの遺伝子発現の増加が有意に認められ、顎下腺が酸化ストレスを受けていることが示唆された。またその他の臓器とのHO-1発現量の比較により顎下腺は比較的酸化ストレスを受けやすい臓器であることが示唆された。

また高濃度酸素への暴露により唾液腺腺房の拡大、腺房への酸性粘液多糖類の貯留、TUNEL陽性細胞の出現といった組織学的変化が観察された。さらに高濃度酸素暴露により塩酸ピロカルピン誘発による唾液分泌量が減少した。加齢変化、シェーグレン症候群、放射線障害等の唾液分泌減少を示す病態に共通した組織変化や炎症所見は認めず、これらとは異なった病態により唾液量が減少していることが考えられた。

【結論】

本研究からマウスを高濃度酸素環境下で飼育することにより顎下腺に酸化ストレスが誘発され、唾液腺機能を低下させる可能性が示唆された。このことから周術期などで高濃度酸素に暴露されている患者の唾液分泌は減少している可能性があり、口腔のケアを行う際には、その病態を考慮することで、さらに口腔環境の改善をはかることが期待できる。

論文審査結果の要旨

酸素は生命活動において不可欠である一方、高濃度になると肺や脳の組織障害を引き起こすことが報告されている。周術期には各臓器の酸素供給を保つために酸素療法が行われるため、高濃度酸素に暴露される機会が極めて多い。唾液はこの良好な口腔機能の維持において多くの重要な役割を担っているが、周術期で使用される高濃度酸素は唾液腺機能に対しても悪影響を及ぼす可能性が考えられる。そこで本研究は、高濃度酸素が唾液腺機能に及ぼす影響を動物実験により検討したものである。研究の方法と結果は以下のとおりである。

本研究では、30週齢雄性のC57BL/6Jマウスを使用し、酸素濃度を75%で5日飼育する群を高濃度酸素群、21%で5日飼育する群を対照群とし、大脳皮質、肺、顎下腺、舌、肝臓、および腎臓のHeme oxygenase-1 (HO-1)、顎下腺のSuperoxide dismutase-1 (SOD-1)、Superoxide dismutase-2 (SOD-2)、Interleukin-6 (IL-6)、およびTumor necrosis factor α (TNF α)の遺伝子発現量を定量評価した。次に、唾液腺組織をH-E染色、Alcian Blue染色、およびTUNEL染色で観察し、TUNEL陽性細胞の数を比較した。さらに、塩酸ピロカルピンを皮下注射し、投与後30分間の唾液分泌量、および採取した唾液のタンパク質量およびアミラーゼ量を測定し、顎下腺のAquaporin 5 (AQP5)の発現量についてもウエスタンブロット法を用いて定量評価した。

その結果、高濃度酸素群では肺、顎下腺、および腎臓においてHO-1遺伝子発現量が有意に増加しており、顎下腺ではSOD-1およびSOD-2の遺伝子発現量も有意に増加した。一方、IL-6およびTNF α の発現量に有意差はなかった。組織学的観察においては、高濃度酸素群ではH-E染色で腺房の拡大、Alcian Blue染色で酸性粘液多糖類の増加、およびTUNEL染色で陽性細胞の有意な増加がみられた。また、塩酸ピロカルピンの皮下注射後の唾液分泌量は高濃度酸素群で有意に減少し、唾液中のタンパク質およびアミラーゼの濃度が有意に増加したが、AQP5の発現については有意な変化は認めなかった。

以上の結果より、本論文はマウスを高濃度酸素環境下で飼育することにより顎下腺に酸化ストレスが誘発され、唾液腺機能を低下させる可能性を示唆している。周術期などで高濃度酸素に暴露されている患者の唾液分泌は減少している可能性があり、口腔ケアを行う際には、その病態を考慮することで、さらに口腔環境の改善をはかることができる。本論文は、高濃度酸素による唾液腺への影響についての重要な知見を示していると評価できる。

よって審査委員会は本論文に博士（歯学）の学位論文としての価値を認める。