原 著

老化促進モデルマウス (SAM) の舌粘膜上皮の 加齢的变化に関する病理学的検討

守 田 裕 啓 佐 島 三重子

岩手医科大学歯学部口腔病理学講座 (主任: 佐藤方信教授)

[受付: 平成 8 年 5 月 31 日, 受理: 平成 8 年 9 月 5 日]

Histopathological study on age-related changes of the tongue epithelium in senescence accelerated mouse (SAM)

Hiroaki Morita and Mieko Sashima

Department of Oral Pathology, School of Dentistry, Iwate Medical University

(Chief : Prof. Masanobu Satoh)

19-1 Uchimaru, Morioka 020, Japan

[Received on May 31, 1996 ; Accepted on September 5, 1996]

Key words : tongue/epithelium/aging/senescence accelerated mouse/pathology

Abstract : The age-related changes of the tongue epithelium of SAMR1/Iw as a control group, and SAMP2/Iw as an experimental group, were studied by morphometry. SAMP2/Iw showed a greater number of epithelial rete pegs than SAMR1/Iw at 2 and 16 months of age. This difference was significant in the lateral and the ventral mucosa at 2 months of age, and in the ventral mucosa at 16 months of age, respectively ($p < 0.05$). The number of tongue papillae did not differ among age groups in either SAM strains. The epithelial thickness at the rete pegs was greater in SAMP2/Iw than in SAMR1/Iw at 2 and 16 months of age. This difference was significant in the dorsal and the ventral mucosa at 16 months of age ($p < 0.05$). The epithelial thickness at the papillae was constant through all age groups in both SAM strains. The number of PCNA (proliferating cell nuclear antigen) positive epithelial cells in SAMR1/Iw did not differ among age groups. In contrast, SAMP2/Iw had a large number of PCNA positive cells at 2 months of age. The difference between SAMP2/Iw and SAMR1/Iw at 2 months of age, and between 2 months of age and other age groups in SAMP2/Iw was significant ($p < 0.01$). Morphometry and immunohistochemistry of the tongue suggested indicated that epithelial cell proliferation was accelerated or some other growth hormone was rich in SAMP2/Iw at 2 months of age.

抄録 : 老化促進モデルマウスの SAMP2/Iw (実験群) と SAMR1/Iw (対照群) の舌粘膜上皮の加齢に伴う変化を組織計量学的に検討した。上皮突起数は 2 カ月と 16 カ月齢で SAMP2/Iw が SAMR1/Iw より多く、特に 2 カ月齢では舌側縁と舌下面、16 カ月齢では舌下面で有意差がみられた ($p < 0.05$)。舌乳頭数は両系統とも加齢による変化は明らかでなかった。上皮の厚さは上皮突起部では 2 カ月と 16 カ月齢で SAMP2/Iw が SAMR1/Iw

より厚かった。特に 16 カ月齢では舌背と舌下面で有意差がみられた ($p < 0.05$)。上皮乳頭部では両系統とも加齢による変化はなかった。抗 proliferating cell nuclear antigen (PCNA) 抗体による上皮細胞の免疫染色では、SAMR1/Iw では加齢によっても陽性細胞数が一定であった。SAMP2/Iw では 2 カ月齢で最も多く、同月齢の SAMR1/Iw との間にも、また SAMP2/Iw の他の月齢群との間にも有意差がみられた ($p < 0.01$)。SAMP2/Iw の 2 カ月齢では組織計量学的所見と PCNA 陽性細胞数が多いことから、この月齢の舌粘膜上皮細胞は増殖能が高いか、何らかの成長因子が影響している可能性が示唆された。

緒 言

一般に老人の口腔粘膜上皮には菲薄化と萎縮がみられ、組織学的にも加齢に伴って上皮突起が短縮したり、上皮が平坦化することが知られている¹⁾。舌粘膜においては加齢に伴って上皮突起の形、長さ、配列などが不規則になり²⁾、舌背では糸状乳頭の萎縮およびその長さや配列が不規則となったり、あるいは全く消失する例もある¹⁻²⁾。著者ら²⁻⁵⁾はこれまでにヒト舌における加齢変化や、種々の病態変化について報告してきた。

一方、近交系の老化促進モデルマウス (senescence accelerated mouse, 以下 SAM と略) には種々の老化兆候が軽度で緩徐に出現する resistant 系 (SAMR) と、老化兆候が早期に好発する prone 系 (SAMP) とがそれぞれ数種類ある⁶⁻⁹⁾。著者ら¹⁰⁻¹²⁾はこれまで口腔領域における老化研究のモデル動物として、SAM の有用性を検討してきた。SAMP2/Iw (prone 2/Iwate) には、加齢とともに舌などの口腔粘膜にアミロイドが沈着することを報告した¹¹⁾。また、SAMP2/Iw の舌動脈壁に特有の微細顆粒状物質がみられ、これが加齢に伴って増加していることから自然発生的動脈硬化症の初期像を示唆する所見として報告した¹²⁾。

老齢期における舌粘膜の菲薄化や萎縮の原因の 1 つとして、加齢による上皮細胞の増殖能の減退が考えられる¹³⁾。しかし、ヒトおよび実験動物において、これらに関する結論は得られていない¹⁴⁾。すなわち、加齢に伴う舌粘膜上皮細胞の増殖能に関しては、亢進するという報告、低下するという報告、あるいは変化がないとする報告があり、これまでに定説はない¹⁴⁾。最近では分裂細胞数を算定したり、³H (トリチウム)-サイミジンによるラベリングに代わって免疫組織化学的に増殖細胞を検出する方法が開発されている¹⁵⁾。この 1 つに増殖細胞核抗原 proliferating cell nuclear antigen (以下 PCNA と略) がある¹⁶⁾。PCNA は cyclin ともよばれる非ヒストン核蛋白質 (分子量 36 kD, 等電点 4.8) で、増殖サイクルの主として G1 後期から S 期にかけて細胞核内に蓄積し、DNA ポリメラーゼ δ の補助因子として DNA 合成に関

与することが知られている^{15,16)}。今日、PCNA は増殖サイクルのマーカーとして腫瘍細胞の増殖能の検定などに繁用されている¹⁷⁾。

著者らは SAM の舌粘膜上皮の加齢変化を解明する目的で、舌粘膜の上皮突起数、舌乳頭数、また、上皮突起部および乳頭部における上皮の厚さを組織計量学的に検索した。さらに、上皮細胞の増殖動態を抗 PCNA 抗体を用いた免疫組織化学的染色によって検索し、PCNA 陽性細胞数を求めた。上記の組織学的パラメーターについて、SAM の系統による差および月齢による差を統計的に処理し、加齢との観点から比較検討した。

材料および方法

1. 実験動物

実験に用いた老化促進モデルマウスは岩手医科大学動物実験センターにおいて繁殖飼育した種々の月齢の SAMR1/Iw (senescence accelerated mouse resistant 1/Iwate) (対照群) と SAMP2/Iw (senescence accelerated mouse prone 2/Iwate) (実験群) である。なお、以下の実験は「岩手医科大学における動物実験に関する指針」に基づいて行った。両系統の SAM は通常状態で水道水と固形飼料 (CE-2, 日本クレア) の自由摂取で維持された。SAMR1/Iw および SAMP2/Iw の平均寿命はそれぞれ 13.6 カ月および 9.6 カ月であった¹⁰⁾。両系統の SAM を 1, 2, 6, 12 および 16 カ月齢群に分け、SAMR1/Iw については 24 カ月齢も検索した。各月齢群は 10 匹 (雌雄各 5 匹) を検索対象とした。なお、SAMP2/Iw は平均寿命が短いこともあり、24 カ月齢のマウスは十分な例数を収集できなかった。

2. 病理組織学的観察

各月齢群の SAM をエーテル麻酔下で屠殺し、舌を摘出した。また、屠殺時間帯は午前 9 時頃とした。舌は 10% 磷酸緩衝ホルマリン液で固定し、舌の中央部から前額断で組織を切り出し、通常の方法でパラフィン包埋をした。4 μ m の準連続切片を作製し、ヘマトキシリン・エオジン染色 (以下 H・E 染色と略) をして組織学的に観察した。

Fig. 1 Schema of the measuring points of epithelial thickness at the rete pegs and at the papillae.

また、一部の標本はコンゴー赤染色を行った。組織計測は舌の左側粘膜を舌背、舌側縁、舌下面の3部位に分けて行った。粘膜表面長 1.0 mm あたりの上皮突起数および糸状乳頭を主とした舌乳頭数を接眼レンズ (×10) にマイクロメーターを装着し、対物レンズ 10 倍の顕微鏡下において算定した。舌側縁の部位は上皮乳頭の形成がみられない点を中心に舌背と舌下面方向に粘膜表面長 0.5 mm ずつの範囲とした。また、同じく舌の3部位で上皮突起部と上皮乳頭部における舌粘膜上皮の厚さをマイクロメーターを装着した接眼レンズ (×10) を用い、対物レンズ 20 倍の顕微鏡下で測定した (Fig. 1)。測定の範囲は基底層から顆粒層までとし、角質層は除いた。SAM の1個体あたりそれぞれ3カ所で測定し、その個体の値とした。

3. 免疫組織化学的観察

免疫組織化学的染色は 4 μm のパラフィン切片を用い、キシレンにて脱パラフィン後、アルコール系列にて脱水し、0.05 M リン酸緩衝食塩水 (以下 PBS と略) に

て5分間3回洗浄した。内因性のペルオキシダーゼを除去するために、これを 0.3% H_2O_2 加メタノール溶液に20分間浸漬した。そして PBS にて5分間3回洗浄後、ヤギ正常血清により30分間室温で非特異反応をブロッキングした (1次抗体以外は Pathostain ABC キット、和光を用いた)。1次抗体として抗 PCNA モノクローナル抗体 (5A10, MBL) を 250 倍に希釈して用い、室温にて30分間反応させた。2次抗体はビオチン標識ヤギ抗マウス IgG 抗体を用い、室温にて30分間反応させた。酵素試薬はペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジンを20分間室温で反応させた。発色には 0.02% Diaminobenzidine (DAB) 溶液 (0.05 M トリス緩衝液 pH7.6) を用い、核染色は 1% メチル緑 (pH 4.0) で行った¹⁸⁾。

舌粘膜上皮細胞における PCNA 陽性細胞は顕微鏡下で強陽性、中等度陽性、弱陽性の3段階に分け、強陽性および中等度陽性の細胞を陽性と判定した。舌背、舌側縁、舌下面の3部位について、画像解析装置 (IBAS-2000, カールツァイス) を用いて舌粘膜上皮の表面長 1.0 mm あたりの PCNA 陽性細胞数を求めた。

4. 統計学的処理

舌粘膜上皮の上皮突起数、舌乳頭数および上皮突起部と乳頭部における舌粘膜上皮の厚さのそれぞれの測定値について各系統および各月齢群 10 匹の平均値を求めた。SAM の両系統間における差および月齢群による差を統計学的に処理し (分散分析, Newman-Kewl test), 加齢との観点から比較検討した。

同様に PCNA 陽性細胞数について SAM の両系統間における差および月齢群による差を統計学的に処理し (分散分析, Newman-Kewl test), 加齢との観点から比較検討した。

成 績

1. 病理組織学的所見

舌背の上皮細胞は SAMR1/Iw の2カ月齢では、規則正しく配列し、上皮突起と乳頭も規則的に配列していた (Fig. 2-A)。また、舌背には多数の糸状乳頭がみられ、ごく僅かに茸状乳頭や大型円錐乳頭がみられた。SAMP 2/Iw の2カ月齢では上皮細胞の配列がやや不規則となり、上皮突起と乳頭の配列も不規則なところがみられた。その上、上皮細胞の一部には比較的大きな核をもつ胞体の明るい細胞からなる限局性的変化が認められた (Fig. 2-B, 矢印)。SAMR1/Iw の16カ月齢では上皮細胞の配

Fig. 2 Histology of the dorsal tongue epithelium. H & E stain, $\times 340$.

A : SAMR1/Iw, 2 months of age. B : SAMP2/Iw, 2 months of age. Focal changes of the epithelial cells are seen (arrows). C : SAMR1/Iw, 16 months of age. D : SAMP2/Iw, 16 months of age. Extensive amyloid deposition beneath the epithelium (arrows).

Fig. 3 Histology of the lateral tongue epithelium. H & E stain, $\times 340$.

A : SAMR1/Iw, 2 months of age. B : SAMP2/Iw, 2 months of age. C : SAMR1/Iw, 16 months of age. D : SAMP2/Iw, 16 months of age.

Fig. 4 Histology of the ventral tongue epithelium. H & E stain, $\times 340$.

A : SAMR1/Iw, 2 months of age. B : SAMP2/Iw, 2 months of age. Focal change of epithelial cell (arrow) and mitosis are seen (arrowhead). C : SAMR1/Iw, 16 months of age. D : SAMP2/Iw, 16 months of age.

Fig. 5 PCNA immunostaining of the dorsal tongue epithelium. $\times 340$.

A : SAMR1/Iw, 2 months of age. B : SAMP2/Iw, 2 months of age. Many PCNA positive cells located at the basal and suprabasal layer (arrows). C : SAMR1/Iw, 16 months of age. D : SAMP2/Iw, 16 months of age.

列，上皮突起や乳頭の配列などは概ね規則的であり，上皮細胞の萎縮などの変化はみられなかった (Fig. 2-C)。一方，SAMP2/Iwの16カ月齢では上皮直下に帯状にアミロイドが大量に沈着し (Fig. 2-D, 矢印)，上皮突起と乳頭の配列はやや不規則であった。

舌側縁の上皮細胞は舌背のそれとそれぞれ概ね同様の所見であった (Fig. 3-A~D)。舌下面の上皮細胞ではSAMR1/Iwの2カ月齢では上皮突起の形成はみられなかった (Fig. 4-A)。また，SAMP2/Iwの2カ月齢では上皮突起が少数認められた (Fig. 4-B)。また，上皮基底部の細胞の胞体は比較的大きく，明るい大きな核を有し (Fig. 4-B, 矢印)，一部に分裂像もみられた (Fig. 4-B, 矢頭)。SAMR1/IwとSAMP2/Iwの16カ月齢ではそれぞれ舌背および舌側縁の上皮細胞と同様な所見であった (Fig. 4-C, D)。また，SAMの両系統において雌雄による形態的な差はみられなかった。

2. 免疫組織化学的所見

PCNAは舌粘膜上皮細胞の核に陽性であり，その染色性は強陽性のものから弱陽性のものまでみられた (Fig. 5)。核の染色性では均一に染色されるものと微細顆粒状を呈するものがみられたが，いずれの染色態度のものも強陽性ないし中等度陽性の核をPCNA陽性細胞と判定した。PCNA陽性細胞は粘膜上皮の基底層および基底層上層に局在していた。さらに，上皮突起部の上皮細胞に陽性細胞は多く，乳頭部の上皮細胞には陽性細胞が少な

かった (Fig. 5-B, 矢印)。SAMR1/Iwではすべての月齢群でPCNA陽性細胞数は少なかった。一方，SAMP2/Iwでは2カ月齢で陽性細胞が非常に多く，このような所見は舌背，舌側縁，舌下面の3部位とも同様の傾向を示していた。2カ月齢以外のSAMP2/IwではPCNA陽性細胞数は少なかった。

3. 組織計量的所見

舌背の上皮突起数はSAMR1/Iwでは1カ月と6カ月齢でやや少ないが，それ以外ではどの月齢でも約15個/mmであった (Fig. 6, 上段)。一方，SAMP2/Iwでは2カ月と16カ月齢で約18個と他の月齢群よりも多かった。舌側縁では上皮突起数はSAMP2/Iwが12カ月齢を除いてSAMR1/Iwより多く，特に2カ月齢ではSAMR1/Iwとの間に有意差がみられた (Fig. 6, 中段, $p < 0.05$)。舌下面の上皮ではSAMR1/Iwは6カ月齢の1個を除いてどの月齢群でも上皮突起の形成はみられなかったが，SAMP2/Iwでは上皮突起が形成されており，特に2カ月と16カ月齢ではSAMR1/Iwとの間に有意差がみられた (Fig. 6, 下段, $p < 0.05$)。

舌粘膜上皮の乳頭数は両系統とも加齢に伴う変化は明瞭ではなく，舌背では約8個であり，舌側縁では約5個であった (Fig. 7)。

舌粘膜上皮の厚さは上皮突起部では両系統とも加齢によっても大きな変化はなく (Fig. 8)，舌背では約85 μm ，舌側縁では50から60 μm ，舌下面では約40 μm であっ

Fig. 6 Number of rete pegs per 1.0 mm length of epithelium in the middle portion of tongue of SAM. (* $p < 0.05$, ANOVA)

た。しかし、3部位とも2カ月と16カ月齢では SAMP 2/Iw が SAMR1/Iw より厚かった。特に舌背と舌下面において16カ月齢では有意の差がみられた ($p < 0.05$)。上皮乳頭部における舌粘膜上皮の厚さは両系統とも加齢によってもほぼ一定であり、舌背で約 $50 \mu\text{m}$ 、舌側縁で約 $30 \mu\text{m}$ 、舌下面で約 $20 \mu\text{m}$ であった (Fig. 9)。

PCNA 陽性細胞数は個体間の変動が多いものの、舌背では SAR1/Iw の1から24カ月齢まで加齢に伴う推移はほとんど見られず、どの月齢群でも約50個/mm以下であった (Fig. 10)。しかし、SAMP2/Iw では2カ月齢で約230個/mmとPCNA 陽性細胞が多く、同月齢の SAMR1/Iw との間に有意差がみられ、また SAMP 2/Iw の他の月齢群との間にも有意差がみられた (Fig. 10, $p < 0.01$)。舌側縁および舌下面におけるPCNA 陽性細胞数は舌背とほぼ同様の傾向を示しており、SAMP2/Iw

Fig. 7 Number of tongue papillae per 1.0 mm length of epithelium in the middle portion of tongue of SAM.

Iw の2カ月齢が他の月齢群より有意に多かった (Fig. 11, 12. $p < 0.01$)。

考 察

老化促進モデルマウス (SAM) は遺伝的な促進老化症とアミロイドーシスのモデル動物として開発された近交系マウスで resistant 系 (SAMR) と prone 系 (SAMP) がそれぞれ数種類ずつある⁶⁻⁹⁾。SAMP は脱毛、白内障、脊柱湾曲などの種々の老化兆候が早期に好発し、平均寿命が短い。それに対して SAMR は老化兆候の程度は軽く、その発生も遅く平均寿命は長い。SAMP に種々の促進老化が遺伝的に現れる原因の詳細は十分に解明されていないものの、これまでに以下のような染色体の異常が報告されている。すなわち、染色体外の環状DNAが SAMP1 系において、SAMR2 系より早期に増幅されて認められる⁹⁾。また、骨髓細胞における染色体異常が SAMR1 より SAMP1 に早期に、高頻度にみられるという。これまで著者ら¹⁰⁾は、SAMR1/Iw と SAMP2/Iw を用いて口腔領域の加齢変化を種々の観点から検索し、SAMP2/Iw に何らかの成長促進因子あるいは逆に SAMR1/Iw に何らかの成長抑制因子がある可能性を示

Fig. 8 Epithelial thickness at the rete pegs in the middle portion of tongue of SAM. (* $p < 0.05$, ANOVA)

唆してきた。

通常の系統のマウスを用いた粘膜上皮の加齢変化に関する研究は少ない¹⁹⁾。今回の SAM 舌粘膜の組織学的な検索では SAMR1/Iw では加齢によっても上皮の扁平化や上皮細胞の萎縮などの変化はみられなかった。しかし、SAMP2/Iw では 16 カ月齢群でアミロイドが沈着し、上皮突起と乳頭の配列がやや不規則であったが、これ以外には顕著な変化はみられなかった。また、後述の組織計量学的所見からも SAM の両系統の 16 ないし 24 カ月齢には老齢のヒトと平行した所見はみられなかった。さらにヒトの場合は個体差が大きく、また動脈硬化や炎症などの病的老化現象がしばしばみられる²⁾。これに対して実験用の小動物は飼料や他の飼育条件を一定にできる他、遺伝的な均一性、多数を統計的に扱えるなどの利点

Fig. 9 Epithelial thickness at the papillae in the middle portion of tongue of SAM.

を持っている。特に他に自然発症の老化モデルがない現在では老化兆候を早期に高度に自然発症する SAM の P 系とそれに対する対照群として R 系を用いて種々の加齢変化を研究する意義は大きいと思われる。

舌粘膜のうち舌背粘膜は特殊粘膜に属し、糸状乳頭および茸状乳頭などが発達している^{13,20)}。一方、舌下粘膜は上皮層が薄く、角化の程度が低い被覆粘膜に属している。また、舌側縁はヒトにおいては舌癌の好発部位として知られる。そこで今回の検索では舌の中央部において、舌粘膜を舌背、舌側縁、舌下面の 3 部位に分けた。

上皮突起は上皮稜あるいは上皮釘脚とも呼ばれ、舌粘膜においては舌背から舌側縁にかけて分布し、舌下面では少ない²⁰⁾。上皮突起と乳頭を形成する細胞の性質は異なっていると考えられる。すなわち、上皮突起の細胞は増殖能が高く、この部位の幹細胞から分裂した細胞が乳頭部へ移動するといわれている²¹⁾。また、ケラチンや接着分子の分布も異なっている²²⁾。SAMR1/Iw の舌粘膜では上皮突起の数は加齢によっても一定であった。また、

Fig. 10 PCNA positive cell number per 1.0 mm length of dorsal epithelium in the middle portion of tongue of SAM. (* $p < 0.01$, ANOVA)

Fig. 11 PCNA positive cell number per 1.0 mm length of lateral epithelium in the middle portion of tongue of SAM. (* $p < 0.01$, ANOVA)

SAMP2/Iw の2カ月と16カ月齢において上皮突起の数が多かった。

マウスの舌は舌の中程から後方にかけて舌隆起部がある。今回の検索は舌隆起部の始まり付近で前額断しており、この付近には糸状乳頭、茸状乳頭、大型円錐乳頭が存在する²³⁾。これらの舌乳頭はヒトでは加齢¹⁾や糖尿病などの病的状態²⁴⁾で萎縮したり、減少したりする。しかし、今回のSAMの両系統の検索で得られた舌乳頭数は加齢によっても明瞭な変化がみられなかった。

舌粘膜上皮の厚さはSAMR1/Iwの場合は上皮突起部でも乳頭部でも加齢による変化はみられなかった。しかし、SAMP2/Iwでは上皮突起部の上皮は2カ月と16カ月齢においてSAMR1/Iwより厚かった。2カ月齢のSAMP2/Iwでは上皮突起部の上皮が厚いこと、上皮突起の数が多くに加えて、後述のPCNA陽性細胞数が多い所見を考え合わせると、SAMP2/Iwの2カ月齢で上皮細胞の増殖能が高いことが示唆された。SAMP2/Iwの16カ月齢では粘膜固有層にアミロイドの沈着が高度であり、これが上皮突起の形状を細長くし、この部位の上皮を厚くし、また上皮突起数を増加させている大きな

要因と思われる。

口腔粘膜が加齢とともに薄くなる原因の1つとして上皮細胞の増殖能が減少することが考えられる。細胞増殖の研究には古典的には分裂像を数えたり、³H-サイミジンでラベルする方法が用いられてきた。ヒトおよび実験動物を用いた³H-サイミジンによる口腔粘膜上皮の細胞増殖能の研究では、加齢とともに増殖能が増加するという説^{25,26)}、変わりが無いという説^{27,28)}、そして減少するという説がある^{19,29)}。このように、*in vivo*における上皮の増殖能についての研究には統一した見解がみられない¹³⁾。

最近、細胞増殖能を検索するマーカーとして増殖細胞核抗原(PCNA)が開発された^{15,16,30)}。PCNAは動物、植物に共通するDNA複製時に必須な核蛋白質である³⁰⁾。PCNAの発現は腫瘍細胞増殖能の判定に用いられることが多いが¹⁵⁻¹⁷⁾、正常組織についての検索は少ない³¹⁻³⁴⁾。むしろ、ヒト腫瘍の検索の際に対照として正常上皮が検索されており、この時のPCNAによるラベル指数は約11%程度である¹⁷⁾。ウサギの角膜上皮では基底細胞の4%がPCNA陽性であるという³³⁾。また、細胞

Fig. 12 PCNA positive cell number per 1.0 mm length of ventral epithelium in the middle portion of tongue of SAM. (* $p < 0.01$, ANOVA)

増殖周期のS期をラベルするものに Bromodeoxyuridine (BrdU) があり, BrdU を用いたハムスターの正常上皮の *in vivo* のラベル指数は6%程度である³⁴⁾。

In vivo の細胞増殖能に関しては口腔粘膜上皮のそれは皮膚と腸粘膜の中間と報告されている²¹⁾。PCNA を用いた細胞増殖能の加齢変化に関する研究は少なく, マウスの腸上皮の場合, 加齢によっても一定であるという³¹⁾。同様に, ヒト正常角化細胞でも不変であるという³²⁾。しかし, *in vitro* ではヒト培養細胞で, 老齢期には蛋白質レベルでも mRNA レベルでも PCNA 発現は減少することがわかっている³⁵⁾。さらに, Werner's 症候群では PCNA 蛋白発現の減少速度が正常の人に比べて5~6倍高いという³⁶⁾。

今回の SAM の舌粘膜の研究では PCNA 陽性細胞数は SAMR1/Iw では加齢によっても変化はなく, また, SAMP2/Iw でも2カ月齢を除けば一定であった。この結果は *in vivo* の系では加齢によっても口腔粘膜上皮細胞の増殖能は変化がないという説^{27,28)}を支持している。しかし, SAMP2/Iw の2カ月齢ではほとんどの基底細胞が PCNA 陽性を示し, その数も多く, 約230個/mm

という結果が得られた。このことから SAMP2/Iw の2カ月齢では細胞の増殖能が高い可能性が考えられた。

最近, PCNA の染色性については, いくつかの疑問点が報告されている^{37~40)}。すなわち, PCNA は半減期が長いことが知られ, 必ずしも ³H-サイミジンラベルによる S 期細胞とは一致せず^{37,38)}, G1 期を初め他のサイクルの細胞も染まるという。また, PCNA が強陽性の細胞は S 期細胞を現し, 弱陽性や顆粒状のものがそれ以外のものという説もある³⁷⁾。さらに, 最近の報告ではヒトの腫瘍周辺の正常組織においては PCNA の発現が高く³⁹⁾, これは増殖期の細胞以外に腫瘍の発生する EGF や TGF β などの成長因子による PCNA 発現の誘導がみられるためという⁴⁰⁾。

SAMP2/Iw の2カ月齢では上皮細胞には比較的大きな核をもつやや大きな細胞の増加が認められ, また, 上皮突起数が多く, 上皮突起部における上皮が厚く, PCNA 陽性細胞が多かった。これらの所見からこの月齢の SAMP2/Iw の舌粘膜上皮細胞は細胞増殖が亢進している可能性が推察された。SAMP2/Iw において若齢時に細胞増殖が亢進することと老化兆候が早期に高度に出現することとの関連性には興味を持たれる。一方で, 2カ月齢で何らかの成長因子が影響している可能性も除外できないと思われた。

結 論

老化促進モデルマウス (SAM) の舌粘膜上皮の加齢的変化の解明を目的に実験群として SAMP2/Iw, 対照群として SAMR1/Iw の舌を検索し, 以下の結論を得た。

1. 組織学的に SAMR1/Iw には加齢によっても舌粘膜上皮に変化がなかったが, SAMP2/Iw では2カ月齢で上皮細胞に比較的大きな核をもつやや大型の細胞の増加が認められた。また, 16カ月齢では上皮下にアミロイドの沈着がみられた。

2. 舌粘膜の上皮突起数は2カ月と16カ月齢群で SAMP2/Iw が SAMR1/Iw より多かった。特に2カ月齢では舌側縁と舌下面で有意差がみられ, 16カ月齢では舌下面で有意差がみられた ($p < 0.05$)。

3. 舌乳頭数は SAMP2/Iw と SAMR1/Iw の両系で加齢による変動はなかった。

4. 舌粘膜上皮の厚さは上皮突起部では2カ月と16カ月齢で SAMP2/Iw が SAMR1/Iw より厚かった。特に16カ月齢では舌背と舌下面で有意差がみられた ($p < 0.05$)。上皮乳頭部では両系統とも舌粘膜上皮の厚さは加齢によっても一定であった。

5. PCNA は舌粘膜上皮の基底層ないし基底上層の細胞の核に陽性であった。SAMR1/Iw では加齢によっても陽性数が一定であったが、SAMP2/Iw では2カ月齢で約230個/mmと多く、2カ月齢以外は加齢によっても一定であった。2カ月齢ではSAMP2/IwとSAMR1/Iwの間に有意差があり、またSAMP2/Iwにおいては2カ月齢と他の月齢群の間にも有意差がみられた($p < 0.01$)。

6. 以上の組織学的および免疫組織学的所見の背景としてSAMP2/Iwの2カ月齢では上皮細胞の細胞増殖能が高いか、何らかの成長因子が影響している可能性が推察された。

7. 老化促進モデルマウス(SAM)は口腔諸組織の加齢変化の研究に有用なモデルと考えられた。

本稿を終えるにあたり、ご懇篤な指導と校閲を賜りました岩手医科大学歯学部口腔病理学講座 佐藤方信教授に深甚なる謝意を表します。また、本研究を行うにあたって種々のご指導とご援助をいただいた同口腔病理学講座の諸先生方と貴重なご示唆をいただいた本学中央写真室と中央電顕室に深謝いたします。

本論文の要旨の一部は第37回歯科基礎医学学会学術大会(平成7年9月23日、東京都)および岩手医科大学歯学会第42回例会(平成8年7月6日、盛岡市)において発表した。

文 献

- 1) 石川梧朗, 秋吉正豊: II. 口腔粘膜の病変. A. 年齢的变化, 口腔病理学II. 2版, pp. 44~47, 永末書店, 京都, 1982.
- 2) 佐藤方信, 鈴木鍾美: 加齢と病変—舌. 歯界展望 59: 743~749, 1982.
- 3) Satoh, M., Sashima, M. Itagaki, M. and Suzuki A.: Quantitative age changes of the histological constituents of the human tongue. Jpn. J. Oral Biol. 28: 746~751, 1986.
- 4) 佐藤方信, 佐島三重子, 畠山節子, 大津匡志, 鈴木鍾美: ヒト舌粘膜上皮の組織学的, 免疫組織化学的研究. 口科誌 39: 336~342, 1990.
- 5) 佐藤方信, 吉村法子, 大島 忍, 菊池博生, 鈴木鍾美: ヒト舌粘膜上皮におけるランゲルハンス細胞数とその分布. 歯基礎誌 34: 120~125, 1992.
- 6) Takeda, T., Hosokawa, M., Takeshita, S., Irino, M., Higuchi, K., Matsushita, T., Tomita, Y., Yasuhira, K., Hamamoto, H., Shimizu, K., Ishii, M. and Yamamuro, T.: A new murine model of accelerated senescence. Mech. Ageing Dev. 17: 183~194, 1981.
- 7) Takeda, T., Hosokawa, M. and Higuchi, K.: Senescence-accelerated mouse (SAM): A novel murine model of accelerated senescence. J. Amer. Geriatr. Soc. 39: 911~919, 1991.
- 8) 樋口京一, 内木宏延, 細川昌則: 老化促進モデルマウス (SAM), (杉山武敏編), 疾病の分子機構, pp. 492~496, 文光堂, 東京, 1993.
- 9) Takeda, T., Hosokawa, M. and Higuchi, K.: Senescence accelerated mouse (SAM). A novel murine model of aging. In: The SAM Model of Senescence. (edited by Takeda, T.), pp. 15~22, Excerpta Medica, Amsterdam, 1994.
- 10) Sashima, M. and Satoh, M.: Age-related changes of the periodontal tissues in senescence accelerated mouse (SAM). In: The SAM Model of Senescence. (edited by Takeda, T.), pp. 223~226, Excerpta Medica, Amsterdam, 1994.
- 11) Sashima, M., Satoh, M. and Suzuki, M.: Oral senile amyloidosis in senescence accelerated mouse (SAM). J. Oral Pathol. Med. 19: 381~384, 1990.
- 12) 佐藤方信, 佐島三重子, 板垣光信, 守田裕啓, 鈴木鍾美: 老化促進モデルマウス (SAM-P/2) の舌動脈に認められた微細顆粒状物質. 歯基礎誌 28: 466~471, 1984.
- 13) Squier, C. A. and Hill, M. W.: 18章 口腔粘膜構造の変異, (Ten Cate, A. R. 著, 平井五郎他訳), 口腔組織学, pp. 458~465, 医歯薬出版, 東京, 1989.
- 14) Hill, M. W.: Cell renewal in oral epithelia. In: The structure and function of oral mucosa. (edited by Meyer, J., Squier, C. A. and Gerson, S. J.), pp. 53~81, Pergamon Press, Oxford, 1984.
- 15) 佐々木功典, 黒瀬 顕: 増殖細胞抗原とその応用. 病理と臨床 12: 97~102, 1994.
- 16) 松野吉宏, 向井 清: 増殖細胞核抗原 (PCNA). 病理と臨床 9: 879~883, 1991.
- 17) 岩井正行, 姚 立, 古田 勲: 舌扁平上皮癌の増殖細胞核抗原 (PCNA) による免疫組織化学的検討. 日口外誌 40: 1~5, 1994.
- 18) 堤 寛: 第2部, 第2章 パラフィン切片による光顕的酵素抗体法染色, pp. 99~141, (渡辺慶一, 中根一穂編) 酵素抗体法 一卷 改訂3版, 学際企画, 東京, 1992.
- 19) Cameron, I. L.: Cell proliferation and renewal in aging mice. J. Gerontol. 27: 162~172, 1972.
- 20) 藤田尚男, 藤田恒夫: III. 消化器系 A. 口腔壁の組織, 標準組織学, 各論3版 pp. 78~83, 医学書院, 東京, 1992.

- 21) Hume, W. J. and Potten, C. S. : Advances in epithelial kinetics-An oral view. *J. Oral Pathol.* **8** : 3~22, 1979.
- 22) 古谷野浩美, 神部芳則, 野口忠秀, 赤坂庸子, 矢尾板英夫 : ヒト正常舌背部粘膜上皮におけるケラチンおよび接着分子の発現状態. *口科誌* **44** : 596~602, 1995.
- 23) 小林 寛, 宮田 建, 高橋啓一, 岩崎信一 : マウス舌の結合織乳頭の三次元構造. *解剖誌* **64** : 523~528, 1989.
- 24) Akiya, O., Serizawa, N., Sugihara, M., Katagiri, S. and Kawashima, Y. : A histological study of changes in the lingual papillae of streptozotocin-induced diabetic rats. *Bull. Tokyo dent. Coll.* **33** : 13~24, 1992.
- 25) Toto, P. D., Rubinstein, A. S. and Gargiulo, A. W. : Labeling index and cell density of aging rat oral tissues. *J. Dent. Res.* **54** : 553~556, 1975.
- 26) Hill, M. W. : Changes in rat palatal epithelium during neonatal growth. *Anat. Rec.* **199** : 129~137, 1981.
- 27) Hornstein, O. P. and Schell, H. : Comparative study on the ^3H -thymidine index of dorsal epidermis, buccal mucosa, and seminal vesicles in senile male rats. *Arch. Dermatol. Res.* **254** : 37~41, 1975.
- 28) Maidhof, R. and Hornstein, O. P. : Autoradiographic study on some proliferative properties of human buccal mucosa. *Arch. Dermatol. Res.* **265** : 165~172, 1979.
- 29) Sharav, Y. and Massler, M. : Age changes in oral epithelia. Progenitor population, synthesis index and tissue turnover. *Exp. Cell Res.* **47** : 132~138, 1967.
- 30) Nakane, P. K., Moriuchi, T., Koji, T., Taniguchi, Y., Izumi, S. and Hui, L. : Proliferating cell nuclear antigen (PCNA/cyclin) : Review and some new findings. *Acta Histochem. Cytochem.* **22** : 105~116, 1989.
- 31) Morita, T., Usuda, N., Hanai, T. and Nagata, T. : Changes of colon epithelium proliferation due to individual aging with cyclin proliferating cell nuclear antigen (PCNA/cyclin) immunostaining compared to ^3H -thymidine radioautography. *Histochem.* **101** : 13~20, 1994.
- 32) Tu, P., Miyauchi, S. and Miki, Y. : Age-related proliferative activity in dermal melanocytic naevi detected by PCNA/cyclin expression. *Brit. J. Dermatol.* **129** : 65~68, 1993.
- 33) 山田昌和, 真島行彦 : 創傷治癒過程における角膜上皮基底細胞の増殖, 分化動態. *日眼会誌* **99** : 10~16, 1995.
- 34) 新谷 悟 : 実験的舌癌形成に関する研究. 第2編 細胞動態ならびに癌遺伝子産物に関する免疫組織化学的検討. *岡山歯誌* **11** : 47~61, 1992.
- 35) Stewart, C. A. and Dell'orco, R. T. : Age related decline in the expression of proliferating cell nuclear antigen in human diploid fibroblasts. *Mech. Ageing Dev.* **66** : 71~80, 1992.
- 36) Kill, I. R., Faragher, R. G. A., Lawrence, K. and Shall, S. : The expression of proliferation-dependent antigens during the lifespan of normal and progeroid human fibroblasts in culture. *J. Cell Sci.* **107** : 571~579, 1994.
- 37) 辻 龍雄, 佐々木功典, 木村由香, 前田寛治, 金川昭啓, 井上 敬, 早津良和, 篠崎文彦 : 増殖細胞核抗原 (PCNA) の免疫組織染色における問題点. *日口外誌* **38** : 21~24, 1992.
- 38) Scott, R. J., Hall, P. A., Haldane, J. S., Van Noorden, S., Price, Y., Lane, D. P. and Wright, N. A. : A comparison of immunohistochemical markers of cell proliferation with experimentally determined growth fraction. *J. Pathol.* **165** : 173~178, 1991.
- 39) Hall, P. A., Levison, D. A., Woods, C., Yu, C-W., Kellock, D. B., Watkins, J. A., Barnes, D. M., Gillett, C. E., Camplejohn, R., Dover, R., Waseem, N. H. and Lane, D. P. : Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) immunolocalization in paraffin sections : an index of cell proliferation with evidence of deregulated expression in some neoplasms. *J. Pathol.* **162** : 285~294, 1990.
- 40) Hall, P. A., Coates, P. J., Goodlad, R. A., Hart, I. R. and Lane, D. P. : Proliferating cell nuclear antigen expression in non-cycling cells may be induced by growth factors *in vivo*. *Br. J. Cancer* **70** : 244~247, 1994.