原 著

スナネズミ耳下腺および顎下腺腺房細胞における老齢化に伴う 細胞死に関する形態学的研究

宮 本 久 嗣 邱 文 娟*

長崎大学歯学部歯科矯正学講座（主任：小林和英教授）

*長崎大学歯学部第二口腔解剖学講座（主任：高野邦雄教授）

〔受付：平成9年7月31日，受理：平成9年9月11日〕

Morphological studies of cell death in Mongolian gerbil parotid and submandibular gland acinar cells during aging

Hisatsugu Miyamoto and Wenjuan Qiu*

Department of Orthodontics, Nagasaki University School of Dentistry

(Chief : Prof. Kazuhide Kobayashi)

**Second Department of Oral Anatomy, Nagasaki University School of Dentistry*

(Chief : Prof. Kunio Takano)

1-7-1 Sakamoto, Nagasaki 852, Japan

〔Received on July 31, 1997 ; Accepted on September 11, 1997〕

Key words : salivary gland/Mongolian gerbil/aging/cell death/electron microscopy

Abstract : The purpose of the present report was to study ultrastructurally the relation between aging and cell death in salivary glands. The parotid and submandibular glands of 3 to 39-month-old Mongolian gerbils were used. Four types of acinar cells, which were considered to be in the process of cell death were distinguished : (a) acinar cells having apoptosis-like chromatin condensation of the nucleus (Type I) ; (b) acinar cells characterized by dilated cisternae of rough-surfaced endoplasmic reticulum and chromatin condensation in the nucleus (Type II) ; (c) acinar cells having typical necrotic characters (Type III) ; and (d) acinar cells having conspicuous vacuoles and characteristic chromatin condensation in the nucleus (Type IV).

Dispersed Type I cells were observed in the parotid gland, and had a tendency to increase slightly in number after 36 months. Types II, III, and IV cells were present in groups within the acini in the parotid and submandibular glands, with a tendency to increase in number after 18 months. Moreover, some apoptotic body-like structures were observed among the acinar cells, with a tendency to increase in number after 18 months.

Acinar cells containing a TUNEL-positive nucleus were distinguished according to their distribution as follows : (1) TUNEL-positive cells, which were present singly within an acinus, were considered to correspond to the Type I cells ; (2) TUNEL-positive cells, which were found in a group, were regarded to correspond to either the Types II, III, or IV cells. In addition, granular TUNEL-positive reaction within cytoplasm, which may indicate the apoptotic body-like structures, was also sometimes seen.

Thus, it is suggested that, these 4 types may relate to a decrease in acinar cells in the Mongolian gerbil parotid and submandibular glands.

抄録：唾液腺における老化現象と細胞死との関連を調べる目的で、スナネズミ（生後3カ月から39カ月）の耳下腺および顎下腺腺房細胞を電子顕微鏡的に観察した。細胞死に関連していると思われる細胞として、アポトーシス様のクロマチン凝縮像を示す核をもつ細胞（Type I細胞）、粗面小胞体の拡張を特徴とし、核クロマチンの凝縮像をもつ細胞（Type II細胞）、ネクローシスの特徴を示す細胞（Type III細胞）、顕著な空胞構造と核クロマチンの凝縮像をもつ細胞（Type IV細胞）の4つのタイプが区別できた。Type I細胞は耳下腺で単独に認められ、生後36カ月以降増加傾向を示した。Type II, III, IV細胞は耳下腺と顎下腺で集団的に観察され、生後18カ月以降増加傾向を示した。さらに、アポトーシス小体様構造物が腺房細胞に認められることがあり、生後18カ月以降増加傾向を示した。

TUNEL 陽性反応が核に認められた細胞はその出現状況から、単独に認められた陽性細胞は Type I 細胞に相当し、集団的に認められた陽性細胞は Type II, III, IV細胞に相当すると思われた。また、ときどき細胞内に果粒状に陽性反応の認められた細胞はアポトーシス小体様構造を示していると推測された。

今回の観察結果より、スナネズミ耳下腺および顎下腺においてこれら4つのタイプの形態が腺房細胞数の減少と関連していると推測された。

緒 言

哺乳類の各組織の細胞は、一部の細胞・組織を除き常にターンオーバーを行っている。つまり、これらの組織内では細胞分裂と細胞死が生理的に行われている。一般に、生体の老齢化に伴い、細胞が種々の原因で死に至り、さらに細胞分裂能力が衰えることによって細胞数が徐々に減少すると考えられる。こうした現象の結果、各組織における老齢化に伴う種々の機能変化が起こると考えられる。

口腔内の領域では、更年期女性に多いシェーグレン症候群等の病理的な要因のみならず、老齢化に伴い口腔の乾燥を訴える人が少なくない。これから唾液分泌量が老齢化に伴い減少することが推定される。しかし、老齢化と唾液分泌量には因果関係があるとする報告¹⁻³⁾およびないとする報告⁴⁻⁷⁾もあり、いまだ一致した見解はでない。

一方、光学顕微鏡による形態的に老齢化に伴う唾液腺組織を観察した報告では、腺房実質の減少と結合組織および脂肪組織の増殖がヒト⁸⁻¹³⁾、ラット^{14,15)}およびマウス¹⁶⁾で報告されている。また、電子顕微鏡的に唾液腺腺房細胞における老齢化に伴う形態的变化では、腺房細胞のゴルジ槽や粗面小胞体の拡張、異形の分泌果粒の出現、ライソゾームの数の増加や大型化、腺房細胞の肥大化等の結果が報告されている^{8,15,17-19)}。しかしながら、これまでの報告は老齢化に伴う腺房細胞の微細構造に着眼したもので、直接細胞死に関する観点から論じた報告はわれわれの調べた限りではなかった。

当初、細胞死は病理学的にネクローシス(necrosis：壊死)と診断されていた。しかし、Kerrら²⁰⁾はこれまでネクローシスの範疇でとらえられていた細胞死の中に特異的特徴を有するものを見だし、アポトーシス(apoptosis：自殺死)と命名し、従来のネクローシスと区別した。アポトーシスは病理学的な変化だけでなく、個体の発生、成長・発育等において大きな脚光を浴びてきた。

ネクローシスとは、組織や器官の一部の病理的な細胞変化であり、不可逆性の損傷、いわゆる外的要因によって引き起こされる壊死である。一方、アポトーシスとは恒常性を維持するための細胞の生理学的な自殺のメカニズムであり、正常な組織の新陳代謝によって常に生じている。また、ホルモンやサイトカイン、放射線や熱などの外的要因によっても生じることがわかっている²¹⁾。

アポトーシスとネクローシスは、電子顕微鏡的に以下のように識別されている。アポトーシスは細胞の萎縮、細胞表面の単純化および核の形態学的変化、すなわち核膜へ接着した境界明瞭なクロマチンの凝縮に特徴づけられている。さらに小胞の形成、粗面小胞体の拡張、アポトーシス小体の形成およびそれらを貪食するライソゾーム等が形態的特徴として観察される。一方、ネクローシスでは細胞の膨張、細胞膜の溶解が特徴的であり、さらに粗面小胞体およびミトコンドリアの膨化が認められる。また、核の変化は正常もしくはクロマチンの境界不明瞭な凝縮が認められる²⁰⁻²⁴⁾。

アポトーシスに至った細胞を免疫組織化学的に検出する方法としてGavrieliら²⁵⁾が断片化しDNAの3'-OH末端を検出するTdT-mediated dUTP-biotin nick-end

labeling method(以下, TUNEL 法と略す)を開発した。それ以来, 光学顕微鏡を用いたアポトーシスの組織化学的解析が盛んに行われるようになった²⁶⁻³¹⁾。

本研究の目的は, スナネズミ唾液腺 (耳下腺・顎下腺) 腺房細胞の加齢に伴う組織学的変化を電子顕微鏡のおよび TUNEL 法を用いて経時的に観察することにより, 老齢化に伴う細胞死の出現とその形態的特徴について観察することである。

材料および方法

1. 実験動物

本研究に用いた動物は, 長崎大学医学部附属動物施設にて繁殖・飼育された生後 3 カ月から 39 カ月までのスナネズミ (*Meriones meridianus*; 体重 50~120 g) である。スナネズミは 3 カ月ごとにサンプリングを行った (Table 1)。実験動物は室温 22±2°C, 湿度 55±5%, 明暗 12 時間周期のもとで, 固形飼料 MF (オリエンタル酵母 K. K.) と水を実験直前まで自由に与え, 飼育した。

なお, 実験は「長崎大学における動物実験指針」に基づき行った。

2. 実験方法

1) 電子顕微鏡的方法

実験動物をペントバルビタール 50 mg/kg (Abbott Laboratories, U. S. A.) の腹腔内投与による麻酔下で, 脱血のために左心室より 2%ヘパリン含有 0.05 M リン酸緩衝生理食塩水 (pH 7.4, 以下, PBS と略す) を室温で 5 分間灌流した。引き続き, 0.05 M カコジル酸で pH 7.4 に緩衝された 4%パラホルムアルデヒド, 2%グルタルアルデヒドの混合固定液 (0.125 M ショ糖, 0.025%CaCl₂) により 15 分間灌流固定を行った。ただし, 耳下腺および顎下腺を摘出し, 約 1 mm³に細切し, 同固定液でさらに浸漬固定を 4°Cで 1 時間行った。次に, 0.05 M カコジル酸緩衝液 (pH 7.4) で十分洗浄後, 同緩衝液を用いた 1%オスミウム酸にて後固定を 1 時間行った。常法によりエタノール上昇系列で脱水し, Quetol 812 混合樹脂に包埋した。

ウルトラミクロトーム (Ultracut E 型, Reichert-Jung 社) により超薄切片を作製し, 酢酸ウランおよびクエン酸鉛の二重染色を施した後, 透過型電子顕微鏡 (日立 H-7100 型: 加速電圧 75 kV) を用いて観察した。

2) 免疫組織化学的方法 (TUNEL 法²⁵⁾)

生後 12 カ月, 24 カ月, 36 カ月のスナネズミの耳下腺および顎下腺組織の免疫組織化学的染色を行った。

Table 1 Ages and number of Mongolian gerbil used in the present study

age (months)	number
3	5 (♀ 1)
6	6
9	5
12	8 (♀ 1)
15	7
18	4
21	3
24	7
27	3 (♀ 1)
30	4 (♀ 2)
33	5
36	6 (♀ 2)
39	5 (♀ 1)
total	68 (♂ 60, ♀ 8)

実験動物をペントバルビタールで麻酔し, 脱血のため, 左心室より 2%ヘパリン含有 0.05 MPBS (pH 7.4) を室温で 5 分間灌流した。引き続き, PBS で緩衝された 10%ホルムアルデヒド液 (pH 7.4) にて, 15 分間灌流固定を行った。耳下腺および顎下腺を摘出後, 同固定液にてさらに浸漬固定を室温で 2 時間行い, 水洗後, 通法に従いパラフィン包埋し, 5 μm の切片を作製した。脱パラフィン後, PBS で希釈した Proteinase K (20 μg/ml) を室温で 15 分間前処理後, *in situ* アポトーシス検出キット (Apop Tag Plus, Oncor 社) を用いて免疫反応を行った。3-3'-Diaminobenzidine (DAB) 溶液によって発色後, 1%メチルグリーン (pH 4.0) を用いて後染色を行い, 光学顕微鏡を用いて観察した。

結 果

1. 電子顕微鏡的所見

現在, 形態的に細胞死はアポトーシスとネクローシスに区別され, それぞれ特有の特徴を呈する。今回, 正常に機能しているとは推定できない形態的構造をもつ細胞が観察された。こうした細胞を含めて細胞死に関連した形態的特徴を示す腺房細胞を 4 つのタイプに分けて, 経時的に観察した。

Type I 細胞

アポトーシスの形態的特徴の 1 つである, 境界明瞭なクロマチンの凝縮を呈する核をもった腺房細胞は, 耳下腺において非常に低頻度であるが認められ, 顎下腺腺房

Figs. 1a-b Type I cells of the gerbil parotid gland of a 39-month-old animal.

Nuclei (Nu) of the acinar cells show condensation of chromatin in sharply circumscribed masses that about on the inner surface of the nuclear envelope. Many of mitochondria (M) are intact.

Fig. 1a. Alteration of rough-surfaced endoplasmic reticulum (arrows) can be hardly seen. $\times 5,000$.

Fig. 1b. The cisternae of RER are dilated and vesiculated in various sizes (arrow head). $\times 8,600$.

Figs. 2a-b Acini containing Type II cells of the gerbil parotid gland of a 33-month-old (2a) and a 39-month-old animal (2b). Dilated cisternae of rough-surfaced endoplasmic reticulum (RER) are shown.

In the Fig. 2a, the clearly dilated cisternae of RER can be seen only in an acinar cell. An indented nucleus (Nu) showing slightly condensation of chromatin (arrow) can be recognized in the acinar cell. Mitochondria are intact. $\times 6,100$.

In the Fig. 2b, the cisternae of RER of all acinar cells of an acinus are extremely dilated. Occasionally, intracisternal granules (arrows) are included in the dilated cisternae of RER in some acinar cells. Among the acinar cells, phagolysosome (PL) which contain apoptotic body-like structures (arrow head) can be noticed. $\times 3,700$.

Figs. 3a-b Acini containing Type III cells (*) of the gerbil parotid gland of a 3-month-old animal (3a) and the submandibular gland of a 33-month-old animal (3b). Type III cells are swelling and show an electron-lucent appearance. Mitochondria (M) are swollen. Rough-surfaced endoplasmic reticulum (RER) are either swollen or broken into fragments. These cells are usually found in a group within an acinus. 3a $\times$ 4,000. 3b $\times$ 5,900.

Fig. 4 Secretory endopieces composed of many Type IV cells of the gerbil submandibular gland of a 3-month-old animal. Various sizes of vacuoles (V) are recognized. Acinar cells having vacuoles show nuclear chromatin condensation, but all of the cell organelles are intact. $\times 1,800$.

細胞では認められなかった。このような細胞は粗面小胞体の拡張もしくは小胞化が観察され、ミトコンドリアはほぼ正常な形態を示している (Figs. 1a, b)。細胞内に存在する分泌果粒は二相性構造を呈した整形であった。Type I 細胞の分泌果粒の数はほかの腺房細胞と比較して若干少なかった。Type I は細胞は生後 3~33 カ月頃までは少なく、その出現頻度は各月齢間において差は認められなかったが、36 カ月以降増加傾向が示された。

Type II細胞

Type I 細胞のようなクロマチン凝縮像とは若干異なるが、ヘテロクロマチンが小さな凝縮像として核内に散在し、不整形な核を呈した腺房細胞が認められた。こうした細胞は、しばしば粗面小胞体の拡張が一部に限られるものや、細胞質全体にわたって大きく拡張した粗面小胞体の観察される腺房細胞が認められた (Figs. 2a, b)。Type II細胞内の分泌果粒の形態はほぼ整形を呈していたが、細胞内に存在する分泌果粒の数は粗面小胞体の拡張が大きいほど少なかった。Type II細胞は耳下腺および顎下腺ともに生後 3 カ月から散在的に観察され、加齢とともに増加傾向を示すだけでなく、粗面小胞体の槽間も顕著に拡大し、生後 18 カ月以降には腺房全体に認めら

れることが多くなった (Fig. 2b)。このような細胞の出現頻度は耳下腺と顎下腺間で差は認められなかった。

Type III細胞

ネクロシスに特徴的な形態的变化をもつ、すなわち細胞は膨化して低電子密度化していた腺房細胞は耳下腺および顎下腺ともに認められ、腺房内に集合し、観察されることが多かった (Figs. 3a, b)。また、これらの細胞はミトコンドリアの膨化や粗面小胞体の断片化、ゴルジ装置の消失等、膜系の破壊が認められた。耳下腺では Type III細胞の分泌果粒は正常な形態を示すことが多かったが、時に分泌果粒の二相性構造がやや乱れ、異形を呈した分泌果粒が認められることがあった (Fig. 3a)。耳下腺および顎下腺において Type III細胞は、各月齢群で集団的に認められ、生後 18 カ月以降から増加傾向を示した。

Type IV細胞

現在定義されている細胞死の形態的变化の特徴には該当しないが、耳下腺、顎下腺ともに顕著な細胞変化の特徴の 1 つとして細胞内に大小さまざまな大きさの空胞様構造がみられた。このような細胞の細胞小器官は概して正常であったが、核について若干のクロマチンの凝縮が

Figs. 5a-b Acini of the gerbil parotid gland of a 36-month-old animal (5a) and the submandibular gland of a 39-month-old animal (5b). Some apoptotic-like structures (arrows) can be seen among the acinar cells. 5a $\times$ 7,200. 5b $\times$ 3,000.

Figs. 6a-d TUNEL-positive-reaction.

6a, 6c and 6d : Parotid gland, 6b : submandibular gland

Some of TUNEL-positive acinar cells (arrows) are found singly in acini of the parotid gland (6a) and the submandibular gland (6b), and the other are found in a group (6c, double arrows). Further, acinar cells reacted many granular TUNEL-positive (arrow heads) in its cytoplasm can be occasionally seen (6d). 6a-b $\times$ 800. 6c $\times$ 600. 6d $\times$ 500.

AT, adipose tissue ; GD, granular duct ; BV, blood vessel ; SD, striated duct ; ID, intercalated duct

認められた (Fig. 4)。Type IV細胞は若い月齢の時から出現し、生後 18 カ月以降から増加傾向を示した。耳下腺、顎下腺ともに腺房単位に認められ、加齢に伴って小葉単位で観察されることが多くなった。耳下腺、顎下腺でこの細胞の出現頻度に差は認められなかった。

その他に、以上の 4 タイプに分類された細胞には属さないが、各月齢において腺房細胞間、あるいは結合組織中には大型のライソゾームをもった細胞が認められることがあり、生後 18 カ月以降増加傾向を示した。また、このようなライソゾーム中には電子密度の高いアポトーシス様小体や分泌果粒、ミトコンドリア等が認められた (Figs. 5a, b)。

2. TUNEL 所見

顎下腺において TUNEL 陽性反応を示す腺房細胞は生後 12 カ月、24 カ月、36 カ月すべてで小葉当たり数個認められるにすぎなかった。しかし、その数は老齢化とともに若干の増加傾向を認められた。一方、耳下腺では顎下腺と比較して TUNEL 陽性腺房細胞が多く、単独 (Figs. 6a, b) または数個の集団 (Fig. 6c) として認められ、その細胞数は加齢によって増加傾向が認められた。

反応は核にのみ認められるものや、細胞内に細かい粒子状に認められるものもあった (Fig. 6d)。

考 察

スナネズミ唾液腺 (耳下腺・顎下腺) を用いて、腺房細胞の加齢に伴う組織学的変化を経時的に観察することにより、老齢化に伴う細胞死の出現について腺房細胞の微細構造を観察した。

今回の研究では、アポトーシスとネクローシスの微細構造の特徴から、老齢化に伴い結果に示したように 4 通りの形態的特徴を示す細胞が観察された。

アポトーシスに特徴的な核の形態を示す細胞 (Type I) の出現頻度は、耳下腺で生後 3~33 カ月は非常に低く、生後 36 カ月以降増加傾向を示した。老齢化に伴う細胞死について調査した論文は少なく、マウス肝臓の老齢化に伴うアポトーシスの出現を TUNEL 法を用いて調査した研究では加齢により増加傾向を示すが、アポトーシスの出現は 1 万個の肝細胞中 1 個から 3 個程度へ増加したに過ぎず、老化過程でも健康な組織中に認められるアポトーシスはごく少数であることを示唆していた^{26,27)}。今回 Type I 細胞が観察された出現頻度は、その報告の結果とほぼ一致していた。アポトーシスに陥った細胞がわずかに数分で形態的变化を起こし^{32,33)}、アポト

シス小体を形成して隣接細胞やマクロファージにより消化・吸収されるまで数時間と非常に短い^{34,35)}とされており、正常な組織中ではアポトーシスに特徴的であるクロマチンの境界明瞭な凝縮像を観察することが少ないと思われた。

粗面小胞体に著しい拡張が認められた Type II細胞は加齢が進むにつれ増加傾向を示し、生後 18 カ月以降では数個の集団で認められる機会も増加した。輸送小胞が粗面小胞体の出芽によって形成されてゴルジ装置のシス側に輸送される³⁶⁾ことはすでに知られている。藤樹¹⁷⁾は、老齢化によって粗面小胞体の拡張や槽内果粒の出現が認められるのは、粗面小胞体での分泌果粒の合成能や輸送小胞の分泌能の異常によると考察している。つまり、老齢化に伴って粗面小胞体が拡張するのは細胞の退行性変化を示している。しかし、Type II細胞ではアポトーシスに典型的ではないが、クロマチンの凝縮傾向を認める核をもつことが多かった。アポトーシスの形態的特徴としてクロマチンの凝集と粗面小胞体の拡張があることから、この Type II細胞も唾液腺腺房細胞におけるアポトーシスの一形態である可能性を推測した。

以上のように、Type I, II細胞がアポトーシスに陥っている細胞の形態の 1 つと思われた。老齢化に伴ってヒト耳下腺⁹⁾や、ラット耳下腺³⁷⁾組織中にオンコサイトが出現していることはすでに知られており、癌細胞の増殖を防ぐため遺伝子による自爆機能が作動し、アポトーシスによって細胞の癌化を防いでいる²⁸⁾。つまり、加齢の進行に従って耳下腺腺房細胞がアポトーシスに陥り、その出現頻度が増加傾向を示したと推察できた。また、個体発生時には 1 個の受精卵である。成長・発育に伴い多数の異なった機能を持つ細胞に分裂していくが、その過程で同じ組織中でも分裂回数の異なる細胞で構成されている。耳下腺中の腺房細胞も同様に、同じ月齢でもあらゆる cell age の細胞が存在すると考えられる。つまり、老齢化とはさまざまな cell age である細胞の平均年齢が増加することと考えられ、3 カ月齢スナネズミ唾液腺腺房細胞にアポトーシスが認められても何ら不思議はない。耳下腺組織の中に分裂限界の寿命に達する腺房細胞が比較的増加すると思われる生後 36 カ月以降に増加傾向を示したと考察された。

ネクローティックな形態を示す Type III細胞は、出現頻度は非常に少なく組織中に散在的であった。加齢とともに、特に生後 18 カ月以降から発生頻度が増加しており、2~3 個の細胞の集団として認められることが多かった。一般に、ネクローシスは炎症性の病理組織等で観察される壊死性の細胞死であり、その出現は集団的とされ

ている。今回用いたスナネズミは管理された環境で飼育され、健康状態は良好であったと思われる。Scott ら¹⁴⁾はラット顎下腺および舌下腺組織を観察し、老齢ラットでは腺房組織が減少し、それに対して導管系組織と線維性組織が増加する一方、慢性炎症反応を伴っていたと報告している。さらに Scott³⁸⁾はヒト顎下腺では老齢化が進むにつれ、導管内に固形様物質が認められ、唾液の蓄積・貯留が起こり、次第に小葉内へと広がっていくと報告している。Sashima³⁹⁾も同様に雄ラット顎下腺と老齢化との関連について研究したところ、唾液の貯留像が生後 22 カ月以上すべてのラットの介在部や小導管でみられたが、生後 18 カ月以前ではまったく認められなかったと報告している。今回の結果には示していないが、耳下腺および顎下腺組織において老齢化に伴って介在部の腺腔内に分泌物の貯留像や腺房細胞内に空胞様構造が多く観察され、しかも月齢が進むにつれて腺房単位から小葉全体に広く観察されるようになってきた。これは加齢による何らかの原因によって導管が一部狭窄や閉塞を起こすことにより、分泌された唾液が導管内や介在部に貯留していると推測できる。つまり炎症反応の徴候の 1 つである機能障害を起こして、それが老齢化とともに導管の狭窄や閉塞を起こしている領域が徐々に拡大して、腺房単位からさらに組織全体へと慢性的に拡大していくものと推定された。唾液の貯留が腺房細胞に慢性的な腫脹を起こし、それが慢性刺激となって生後 18 カ月以降ネクロティックな形態を示す細胞死が集团的に観察されることが多くなり、これによって老齢化に伴う機能的変化により耳下腺および顎下腺腺房細胞はネクロシスに陥り、細胞が減少したと考察された。

細胞内に空胞様構造をもつ Type IV 細胞は耳下腺、顎下腺ともに生後 3 カ月からすでに認められ、加齢の進行によって増加傾向を示していた。この Type IV の細胞は核の若干のクロマチンの凝縮というアポトーシスの要因が認められ、さらに Type IV 細胞の出現状況は集团的に観察されることが多いことからネクロシスの特徴も有していた。この Type IV 細胞はアポトーシスとネクロシスのどちらの形態をたどるか不明であるが、老化現象の 1 つであり、細胞死に至る過程の細胞と推測された。空胞様構造内には分泌果粒が認められることから、腺腔と連絡していると考えられ、老齢化に伴って分泌機能に異常をきたしたと考察された。

その他、耳下腺および顎下腺組織では腺房細胞間、あるいは結合組織中に大型のライソゾームや残余小体を多数もつ細胞が認められ、生後 18 カ月を境としてそのような細胞の出現頻度は増加するという変化が認められた。

唾液腺において Meisel ら¹⁵⁾、Kim¹⁸⁾、Bogart¹⁹⁾らは老齢化に伴ってリボフスチン果粒が増加するといっており、藤樹¹⁷⁾はスナネズミ唾液腺腺房細胞のライソゾームが加齢により増加し、18 カ月以降は大型の autophagosome が認められたとしている。もちろん、今回観察されたライソゾームも autophagosome で、分泌果粒や不要になった自己の細胞小器官を自己貪食しているということは無視できない。しかしながら、アポトーシスを起こした細胞は最終的にアポトーシス小体を形成して隣接細胞やマクロファージにより貪食される。大型のライソゾームは Type I、II 細胞を含む腺房内にも観察されることがあり、その中には分泌果粒やミトコンドリア等の細胞小器官、およびヘテロクロマチンに相当すると思われる電子密度の高い球状物を包含していたことから、アポトーシス小体である可能性が示唆された。

以上のように電子顕微鏡によって得られた所見と比較するために、アポトーシスを検出する TUNEL 法を用いて耳下腺および顎下腺組織を観察した。耳下腺や顎下腺組織内で TUNEL 陽性反応の腺房細胞が散在的に、時には数個の集団として認められ、老齢化とともに増加傾向を示していた。

耳下腺では電子顕微鏡によってアポトーシスと判断した細胞が認められたが、出現頻度は生後 36 カ月以降増加傾向を示したものの、TUNEL 陽性反応と比較してあまりにも少ない。また、電子顕微鏡ではまったくアポトーシスを観察できなかった顎下腺でも陽性細胞は少ないものの認められた。このような電子顕微鏡と TUNEL 法で出現頻度に多少の差が認められたのは、Gavrieli ら²⁵⁾や Gold ら⁴⁰⁾が TUNEL 法は初期段階のアポトーシスの同定に正確であると示唆しているように、電子顕微鏡でも捕らえることのできない初期段階のアポトーシスに陽性反応が認められたものと思われた。また、TUNEL 陽性細胞はその核内に多くの 3'-OH 末端が存在し、アポトーシス以外にネクロシス、修復や複製を行っている細胞においても陽性と認識してしまうことがある、という問題点を無視することはできない。すなわち、上記で述べた初期段階のアポトーシスだけでなく、耳下腺や顎下腺内のネクロシスや修復や複製を行っている細胞に対しても、陽性反応が観察されたと推察された。TUNEL 陽性細胞の出現状況および出現頻度と電子顕微鏡により得られた 4 タイプの細胞の出現状況や出現頻度を比較して考察すると、Type I 細胞は散在的に非常に少数観察された状況から、単独に観察された TUNEL 陽性細胞に相当すると推察された。また、Type II、III、IV 細胞では集团的に認められることが多かった状況と出現頻度から、集

团的に観察された TUNEL 陽性細胞に相当すると思われた。

さらに耳下腺および顎下腺において TUNEL 陽性反応は、細胞質中に細かい粒子状に認めることもできた。このような粒子状の陽性反応をもつ細胞核は比較的正常であり、また老齢化に伴いわずかに増加傾向が認められた。今回電子顕微鏡にて観察されたアポトーシス小体様構造物を処理している細胞も、同様に老齢化に従って増加した出現頻度と観察された状況からこれに相当すると考察された。

しかし、今回の研究では、電子顕微鏡を用いて老齢化に伴う唾液腺組織に認められた細胞死の形態的特徴を微細構造学的に観察することを主な目的としてきたため、TUNEL 法による観察結果との検討は十分ではない。今後の研究課題として、TUNEL 法を用いた老齢化に伴う唾液腺腺房細胞数の減少の統計学的な分析等を考えている。

本研究において、耳下腺腺房細胞に非常に少数であったが、アポトーシスに特徴的な核形態をもつ細胞を単独に、粗面小胞体の著しい拡張を示す細胞は加齢に伴って腺房単位で、ネクロシスの形態的特徴をもつ細胞、空胞様構造をもつ細胞は集团的に観察された。さらに、アポトーシス小体様構造物を包含している細胞を観察することができた。今回の観察では、典型的なアポトーシスやネクロシスの形態を示す腺房細胞は非常に少数であった。しかし、粗面小胞体の拡張を示す細胞や空胞様構造をもった細胞をアポトーシス、もしくはネクロシスに至る一過程とするならば、老化現象と一致して生後 18 カ月以降細胞死が増加傾向を示したことになる。すなわち、唾液腺腺房細胞において細胞死が加齢に伴って増加することによって、唾液腺組織に変性をきたし、唾液腺の分泌機能の低下を招くものと考察された。このような結果から、老齢化は臨床的に認められる口腔乾燥の一因であると推察された。

結 論

スナネズミ唾液腺（耳下腺および顎下腺）における老化現象を形態的に観察し、腺房細胞の加齢に伴う細胞死の出現とその形態的特徴の微細構造を観察することを目的に電子顕微鏡を用いた観察と、TUNEL 法を用いた組織化学的観察を行った。

生後 3 カ月から 39 カ月までのスナネズミを経時的に電子顕微鏡的に観察し、次のような結論が得られた。

1. 耳下腺においてクロマチンが境界明瞭に核内膜に

接し、局在した凝集像をもった腺房細胞が非常に少数単独に観察された。生後 36 カ月以降わずかに増加傾向を示し、典型的なアポトーシスの形態は非常に少数であることがわかった。

2. 粗面小胞体槽の著しい拡張を示す腺房細胞が、老齢化に従って耳下腺および顎下腺腺房細胞で多く観察された。生後 18 カ月以降からこの細胞の数の増加傾向が認められ、腺房単位で観察されるようになり、さらに粗面小胞体槽の拡張の割合は増加した。このような所見の細胞はクロマチンの凝縮像が認められたことから、アポトーシスに陥っている腺房細胞の一形態の可能性であることが推察できた。

3. 細胞の膨張およびミトコンドリアの膨化、粗面小胞体の断片化等のネクロティックな形態を示す細胞が耳下腺および顎下腺腺房細胞で観察された。核の形態は比較的正常な形態を呈していた。このような細胞の出現は腺房内に集团的に認められ、生後 18 カ月以降から増加傾向を示していた。正常な唾液腺組織においても、ネクロシスの形態によって細胞死が引き起こされていることがわかった。

4. 空胞様構造を包含した腺房細胞が、耳下腺および顎下腺においてすべての月齢で腺房単位に観察された。この細胞は生後 18 カ月を越えて増加傾向を示し、小葉単位で認められることも多くなった。空胞様構造をもつ腺房細胞はクロマチンの凝縮像を呈しており、細胞死に陥っている細胞の 1 つの形態である可能性が推察された。

5. 各月齢で耳下腺および顎下腺において腺房細胞間、あるいは結合組織中に大型のライソゾームや残余小体を多数もつ細胞が認められ、生後 18 カ月以降そのような細胞の出現頻度は増加した。大型のライソゾームは同じ腺房内にも観察されることがあり、電子密度の高い球状物を包含したライソゾームはアポトーシスによって断片化した核を含んだアポトーシス小体である可能性が示唆された。

6. TUNEL 法によって得られた所見と、電子顕微鏡による所見を比較すると以下のように推測された。

耳下腺、顎下腺組織において、単独に TUNEL 陽性反応が認められた腺房細胞は、クロマチンの境界明瞭な凝集像を示す核をもった、アポトーシスに相当すると思われた。腺房内で集团的に認められた陽性細胞はネクロシス細胞と粗面小胞体の拡張した細胞、さらに空胞様構造をもった細胞に相当すると思われた。また、細胞内に粒子状に陽性反応の認められた細胞は、アポトーシス小体様構造物を処理している細胞に相当すると思われた。

稿を終わるにあたり、終始ご懇篤なるご指導、ご校閲を賜りました長崎大学歯学部矯正学講座、小林和英教授に深く感謝いたします。また、本研究を進めるにあたり直接ご懇切なご指導をいただきました同大学歯学部第二口腔解剖学講座、高野邦雄教授に謹んで感謝の意を表します。さらに、種々のご援助をいただいた第二口腔解剖学講座ならびに歯科矯正学講座のみなさまに厚くお礼を申し上げます。

本論文の要旨の一部は第102回日本解剖学会全国学術集会（愛知，1997）において発表した。

文 献

- 1) Ben-Aryeh, H., Shalev, A., Szargel, R., Laor, A., Laufer, D. and Gutman, D. : The salivary flow rate and composition of whole and parotid resting and stimulated saliva in young and old healthy subjects. *Med. Metab. Biol.* **36** : 260~265, 1986.
- 2) Pedersen, W., Schubert, M., Izutsu, K., Mersai, T. and Truelove, E. : Age-dependent decreases in human submandibular gland flow rates as measured under resting and post-stimulation conditions. *J. Dent. Res.* **64** : 822~825, 1985.
- 3) Gandara, B. K., Izutsu, K. T., Truelove, E. L., Ensign, W. Y. and Sommers, E. E. : Age-related salivary flow rate changes in controls and patients with oral lichen planus. *J. Dent. Res.* **64** : 1149~1151, 1985.
- 4) Cauncey, H. H., Feller, R. P. and Kapur, K. K. : Longitudinal age-related changes in human parotid saliva composition. *J. Dent. Res.* **66** : 599~602, 1987.
- 5) Heft, M. W. and Baum, B. J. : Unstimulated and stimulated parotid salivary flow rate in individuals of different ages. *J. Dent. Res.* **63** : 1182~1185, 1984.
- 6) Tylenda, C. A., Ship, J. A., Fox, P. C. and Baum, B. J. : Evaluation of submandibular salivary flow rate in different age groups. *J. Dent. Res.* **67** : 1225~1228, 1988.
- 7) Ferguson, D. B. : The flow rate of unstimulated human labial gland saliva. *J. Dent. Res.* **75** : 980~985, 1996.
- 8) 森田 恵, 吉原俊雄：ヒト耳下腺の加齢変化における組織学的ならびに三次元構築による検討. *東大医誌大* **66** : 393~401, 1990.
- 9) Scott, J., Flower, E. A. and Burns, J. : A quantitative study of histological changes in the human parotid gland occurring with adult age. *J. Oral Pathol.* **16** : 505~510, 1987.
- 10) Waterhouse, J. P., Chisholm, D. M., Winter, R. B., Patel, M. and Yale, R. S. : Replacement of functional parenchymal cells by fat and connective tissue in human submandibular salivary glands : an age-related change. *J. Oral Pathol.* **2** : 16~27, 1973.
- 11) Scott, J. : Structural age changes in salivary glands. *Front. Oral Physiol.* **6** : 40~62, 1987.
- 12) Drummond, J. R. and Chisholm, D. M. : A qualitative and quantitative study of the ageing human labial salivary glands. *Archs. Oral Biol.* **29** : 151~155, 1984.
- 13) Syrjanen, S. : Age-related changes in structure of labial minor salivary glands. *Age and Ageing* **13** : 159~165, 1984.
- 14) Scott, J., Bodner, L. and Baum, B. J. : Assessment of age-related changes in the submandibular and sublingual salivary glands of the rat using stereological analysis. *Archs. Oral Biol.* **31** : 69~71, 1986.
- 15) Meisel, D. L., Skobe, Z., Prostack, K. S. and Shklar, G. : A light and electron microscope study of aging parotid and submandibular salivary glands of Swiss-Webster mice. *Exp. Gerontol.* **23** : 197~210, 1988.
- 16) Chen, S., Gao, F., Kotani, A. and Nagata, T. : Age-related changes of male mouse submandibular gland : a morphometric and radioautographic study. *Cell. Mol. Biol.* **41** : 117~124, 1995.
- 17) 藤樹 亮：スナネズミ唾液腺の加齢に伴う形態的变化—光学顕微鏡的、電子顕微鏡的および細胞化学的観察—。 *歯基礎誌* **32** : 363~391, 1990.
- 18) Kim, S. K. : Changes in the secretory acinar cells of the rat parotid gland during age. *Anat. Rec.* **209** : 345~354, 1984.
- 19) Bogart, B. I. : The effect of aging on the rat submandibular gland : an ultrastructural, cytochemical and biochemical study. *J. Morphol.* **130** : 337~352, 1970.
- 20) Kerr, J. F. R., Wyllie, A. H. and Currie, A. R. : Apoptosis : a basic biological phenomenon with wideranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer* **26** : 239~257, 1972.
- 21) 田沼靖一：アポトーシスとは、アポトーシスの定義：アポトーシス実験プロトコール. *細胞工学別冊*. (青木一正, 内海文彰, 丸田英晴 編) pp. 12~18, 秀潤社, 東京, 1994.
- 22) Kerr, J. F. R., Gobe, G. C., Winterford, C. M. and Harman, B. V. : Anatomical methods in cell death. In : *Methods in cell biology*. (edited by Wilson, L. and Matsudaira, P.), pp. 1~27, Academic Press, Inc. New York, 1995.
- 23) Wyllie, A. H. : Apoptosis (The 1992 Frank Rose Memorial Lecture). *Br. J. Cancer* **67** : 205~208,

- 1993.
- 24) Uchiyama, Y. : Apoptosis : the histology and trends of its studies Arch. Histol. Cytol. **58** : 127~137, 1995.
- 25) Gavrieli, Y., Sherman, Y. and Ben-Sasson, S. A. : Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. J. Cell Biol. **119** : 493~501, 1992.
- 26) Muskhelishvili, L., Hart, R. W., Turturro, A. and James, S. J. : Age-related changes in the intrinsic rate of apoptosis in livers of diet-restricted and *ad libitum*-fed B6C3F1 mice. Am. J. Pathol. **147** : 20~24, 1995.
- 27) Higami, Y., Shimokawa, I., Okamoto, T., Tomota, M., Yuo, T. and Ikeda, T. : Effect of aging and dietary restriction of hepatocyte proliferation and death in male F344 rats. Cell Tissue Res. **288** : 69~77, 1997.
- 28) Su, J. H., Anderson, A. J., Cummings, B. J. and Cotman, C. W. : Immunohistochemical evidence for apoptosis in Alzheimer's disease. Neuroreport **5** : 2529~2533, 1994.
- 29) Smale, G., Nichols, N.R., Brady, D. R., Finch, C. E. and Horton, W. E. Jr. : Evidence for apoptotic cell death in Alzheimer's disease. Exp. Neurol. **133** : 225~230, 1995.
- 30) Cotman, C. W. and Su, J. H. : Mechanisms of neuronal death in Alzheimer's disease. Brain Pathol. **6** : 493~506, 1996.
- 31) Bancher, C., Lassmann, H., Breitschopf, H. and Jellinger, K. A. : Mechanisms of cell death in Alzheimer's disease. J. Neural Transmission. Suppl. **50** : 141~152, 1997.
- 32) Matter, A. : Microcinematographic and electron microscopic analysis of target cell lysis induced by cytotoxic T lymphocytes. Immunology **36** : 179~190, 1979.
- 33) Russell, S. W., Rosenau, W. and Lee, J. C. : Cytolysis induced by human lymphotoxin. Am. J. Pathol. **69** : 103~118, 1972.
- 34) Wyllie, A. H. : Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. Nature (London) **284** : 555~556, 1980.
- 35) Bursch, W., Kleine, L. and Tenniswood, M. : The biochemistry of cell death by apoptosis. Biochem. Cell Biol. **68** : 1071~1074, 1990.
- 36) Zeigel, R. F. and Dalton, A. J. : Speculations based on the morphology of the Golgi systems in several types of protein-secreting cells. J. Cell Biol. **15** : 45~55, 1962.
- 37) Andrew, W. : age changes in the salivary glands Wistar Institute Rats with particular reference to the occurrence of oncocytes in senility. Am. J. Anat. **85** : 157~195, 1949.
- 38) Scott, J. : The prevalence of consolidated salivary deposits in the small ducts of human submandibular glands. J. Oral Pathol. **7** : 28~37, 1978.
- 39) Sashima, M. : Age-related changes of rat submandibular gland : a morphometric and ultrastructural study. J. Oral Pathol. **15** : 507~512, 1986.
- 40) Gold, R., Schmied, M., Giegerich, G., Breitschopf, H., Hartung, H. P., Toyka, K. V. and Lassmann, H. : Differentiation between cellular apoptosis and necrosis by the combined use of in situ tailing and nick translation techniques. Lab. Invest. **71** : 219~225, 1994.