原 著

主導管結紮および解除後におけるラット顎下腺 小葉の組織学的研究

—腺房の萎縮・再生に関する新しい知見—

柳 下 秀 郎 内 田 稔 相 山 誉 夫*

日本歯科大学歯学部口腔外科学教室第2講座（主任：内田 稔教授）

*日本歯科大学歯学部解剖学教室第2講座（主任：相山誉夫教授）

〔受付：平成12年3月29日，受理：平成13年8月15日〕

Histological Changes in the Rat Submandibular Gland Following Ligation and Removal of the Main Excretory Duct

—New Findings on Acinar Atrophy and Regeneration—

Hideo Yagishita, Minoru Uchida and Shigeo Aiyama*

The Nippon Dental University, School of Dentistry at Tokyo,

Department of Oral and Maxillofacial Surgery II

(Chief : Prof. Minoru Uchida)

**The Nippon Dental University, School of Dentistry at Tokyo, Department of Histology*

(Chief : Prof. Shigeo Aiyama)

2-3-16 Fujimi, Chiyoda-ku, Tokyo 102-8158, Japan

**1-9-20 Fujimi, Chiyoda-ku, Tokyo 102-8159, Japan*

〔Received on March 29, 2000 ; Accepted on August 15, 2001〕

Key words : submandibular gland / main excretory duct / ligation / histological change / rat

Abstract : The present study was conducted to clarify the histological changes in the acinar and myoepithelial cells of the rat submandibular gland after ligation of the main excretory duct for one week, and also the regenerative movements of these cells after ligation release. Tissue specimens were subjected to immunostaining and TUNEL staining, and examined by light microscopy. Some of the samples were prepared for transmission electron microscopy by a routine method. Duct-like structures covered with myoepithelial cells were not detected in normal rats, but were frequently observed after ligation of the main excretory duct. A few TUNEL-positive acinar cells, apparently apoptotic, were observed by light microscopy, but could not be identified by electron microscopy. Therefore, we consider that only a limited number of cells underwent apoptosis, if any. Almost normal acinar cells were detected throughout the entire submandibular gland 4 weeks after the loosening of the ligature. These findings suggest that duct-like structures may become acini, resulting in recovery.

抄録：本研究は、顎下腺の主導管結紮後と解除後における腺房細胞と筋上皮細胞の組織学的変化と再生過程を明らかにする目的で行われた。ラット顎下腺の主導管を1週間結紮し、その組織学的変化、次いで結紮解除後の経日的変化を調べた。免疫染色やTUNEL染色を施した試料について光学顕微鏡と透過電子顕微鏡による観察を行った。

正常なラット顎下腺では、筋上皮細胞に被われた導管様構造物は認められなかったが、主導管結紮後、このような組織像が多数観察された。顕微鏡下では、アポトーシスを思わせるTUNEL染色陽性腺房細胞が若干観察されたが、電顕観察では確認できなかった。このことから、細胞死が生じたとしても少数であると思われる。結紮解除後4週で顎下腺全体にほぼ正常な腺房が観察された。これらの所見から、腺房の回復は主として導管様構造物が腺房へ回復することによるものと思われる。

緒 言

唾液腺の主導管を人工的に閉鎖し、その後の腺組織の変化を検討した実験は、顎下腺で多く行われている¹⁻¹⁶⁾。これは、臨床上、顎下腺は、三大唾液腺のなかで唾液分泌量が最も多く、また唾石、ガマ腫の好発部位であり、これらにより導管が閉鎖され、炎症が起きるなど機能障害による影響がきわめて大きいからであると思われる。

しかし、これらの報告は、主導管結紮による腺組織の変化を調べたものが多く、主導管結紮から、結紮解除後までの経過を観察した報告は少ない。結紮によって腺房細胞や筋上皮細胞にどのような構造変化が生じるか不明な点も残っている。結紮を解除した際に、腺房が再生するという報告¹⁻⁴⁾があるが、腺房の再生過程についてはいくつかの説があって定説を得ていない。そこで、今回、著者らは、ラット顎下腺主導管を結紮した後と、結紮を解除した後の小葉内の組織構造、特に腺房細胞と筋上皮細胞に注目して、それらの結紮による変化と再生過程をより明らかにする目的で、免疫染色やTUNEL染色を施した試料について光学顕微鏡と電子顕微鏡による観察を行った。

実験材料および方法

1. 実験動物と術式

実験動物は、6週齢、体重200g前後のWistar系雄ラットを約80匹用いた。動物は、東京都内の動物商から購入した4週齢のラットを日本歯科大学歯学部共同利用研究所動物実験施設(室温 $24\pm1^{\circ}\text{C}$ 、湿度40-60%、12h/12h明暗サイクル)にて、固形飼料(オリエンタル酵母社製、MF)を常時与え、水は自由給水にて2週間順応飼育した後、実験に供した。

正常顎下腺については6週齢と10週齢、顎下腺の主導管の結紮を行ったものについては結紮後3、5、7日、結紮解除を行ったものについては結紮解除後1、2、4、6

および8週の各期間において、一般染色、TUNEL染色、免疫染色および透過電子顕微鏡観察用の試料を作製した。動物はそれぞれの時期の試料作製に3匹ずつ使用した。ペントバルビタール・ナトリウム(ネンブタール注射液、ダイナボット社、50mg/ml)1ml/kg腹腔内注射による全身麻酔下で背位に固定し、頸部正中部の剃毛を行い、70%アルコールで消毒した後、同皮膚部に切開を加え、神経線維、血管等を含む周囲組織を損傷させないようにして剥離し、右側顎下腺主導管を露出させた後、腺体部より約1cm上方に4-0絹糸にて顎下腺の分泌物の流れを完全に停止する程度の力で結紮を施した。術後、感染予防の目的でテトラサイクリン塩酸塩(和光純薬)20ml/kg腹腔内注射を行った。結紮後解除を行う動物は結紮1週間後に同上の方法を用いて顎下腺の主導管を露出させ、絹糸を解除した。また固定12時間前より絶食させ、5-ブロモデオキシウリジン(BrdU、和光純薬社製)50 $\mu\text{g/g}$ weightを固定6時間前から2時間間隔で3回腹腔内投与した。

2. 一般染色(H-E染色, PAS染色, Alcian blue染色)

顎下腺主導管結紮時と同様の全身麻酔にて開胸し、左心室より生理食塩水にて駆血洗浄し、続いてBouin-Holland液にて、灌流固定を行った。その後、術側の右側顎下腺を取り出し、同固定液にてさらに浸漬固定を行った。固定後、通法に従って脱水、透徹、パラフィン包埋を行った。回転式ミクロームで前頭断および矢状断の5 μm 厚連続切片を作製し、hematoxyline-eosin(H-E)染色、periodic acid-schiff(PAS)染色、alcian blue(AB)染色(pH 3.5)を施した後、光学顕微鏡にて観察を行った。

3. 免疫組織化学的染色

1) BrdU抗体を用いた免疫染色

細胞の増殖能および筋上皮細胞の動態を調べるためstreptavidin-biotin-peroxidase complex(SAB)法による免疫組織化学的染色を行った。細胞増殖能を調べるた

めに行った BrdU 反応は、2.5%グルタルアルデヒド・2%パラホルムアルデヒド混合液 (0.1 M リン酸緩衝液 pH 7.3) にて、ペントバルビタール・ナトリウム 1 ml/kg 腹腔内注射による全身麻酔下にて開胸し、左心室より灌流固定を行い、一般染色と同様の方法を用いて包埋を行い、5 μ m 厚の切片を作製、切片を脱パラフィンした後、3%過酸化水素水で非特異反応を阻害した。DNA 鎖の単鎖化を行うために、0.07 N の NaOH にて 2 分間アルカリ処理を行った。次に、リン酸緩衝液 (PBS, pH 7.4) で洗浄し、10%正常ウサギ血清 (Nichirei 社) で 10 分間前処理を施した。再び PBS で洗浄した後、一次抗体として、抗 BrdU マウスモノクローナル抗体 (1:100, CALTAG 社) を 1 時間反応させた。次いで、PBS で洗浄した後、二次抗体ビオチン標識抗マウスウサギ IgG + IgA + IgM 血清 (Nichirei 社) を 10 分間反応させた。PBS で洗浄後、ペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジン (Nichirei 社) を 5 分間作用させ、次いで 3,3'-diamino-benzidine tetrahydrochloride (DAB) 法 (Graham-Karnovsky 法) で約 5 分間発色させ、マイヤーのヘマトキシリンによる核染色を施し、脱水、透徹、封入を行った。

2) アクチン抗体を用いた免疫染色

筋上皮細胞を検出するためのアクチン染色については、上記と同様、5 μ m 厚の切片を作製、脱パラフィンした後、通法に従って処理し、一次抗体に抗アクチンモノクローナル抗体 (Nichirei 社) を 1 時間反応させ、以下 BrdU 染色と同様の方法で標本作製した。

4. アポトーシス検出に用いた TUNEL 染色

主導管結紮後のアポトーシスを検出するため、アポタグ・プラス、アポトーシス検出キット (インタージェン社) を用いて TUNEL (TdT-mediated DUTP-biotin nick and labeling) 染色を行った。4%パラホルムアルデヒド液にて上記と同様に左心室より灌流固定、パラフィン包埋を行った試料について、5 μ m 厚の切片を作製、脱パラフィンした後、PBS で洗浄後、タンパク消化の目的でプロテアーゼ K (20 μ g/ml, CALBIOCHEM 社) を室温で 15 分間作用させた。非特異反応阻害のため 3%過酸化水素水 (PBS で希釈) を室温 5 分間作用させ、PBS で洗浄後、TdT 緩衝液に室温で 10 分間、TdT 酵素 (反応緩衝液: TdT 酵素 = 2:1) を 37°C で 1 時間反応させ、その後、反応停止、洗浄緩衝液を 37°C で 30 分間作用させた。PBS で洗浄後、抗ジゴキシゲニン・ペルオキシダーゼを室温で 30 分間作用させ、次いで PBS で洗浄、DAB サブストレイトを用いて発色させた。水洗後、マイヤー

のヘマトキシリンにて核染色し、脱水、透徹、封入を行った。なお、主導管結紮により、アポトーシスを起こす細胞がどの程度出現するか調べる目的で、正常、結紮後 3, 5, 7 日の試料について、腺房、導管様構造物および小葉内導管を構成する細胞 100 個中に出現する陽性細胞をカウントした。これを 3 個体について行い、統計処理をした。

5. 透過電子顕微鏡観察用試料の作製

光学顕微鏡用試料作製 (免疫組織化学的染色) のために固定した顎下腺の一部を切り出し、細切後、同固定液で 2 時間浸漬固定を行い、次いで 1%四酸化オスミウム液 (リン酸緩衝液 pH 7.3) にて、後固定を行った。その後、通法に従い脱水、エポキシ系樹脂にて包埋した。超薄切片は、酢酸ウラニルおよびクエン酸鉛による二重染色を施した後、透過電子顕微鏡 (JEOL, JEM-2000 EX) にて観察を行った。

結 果

1. 正常顎下腺

1) 一般染色 (H-E 染色, PAS 染色, Alcian blue 染色)

腺房の外形は、円形または楕円形を呈し、腺房細胞の円形の核は基底側寄りに位置していた。細胞質には PAS および AB 染色に好染性の分泌顆粒が含まれていた。小葉内の導管は介在部、顆粒管、線条部に区別された (Fig. 1)。

2) TUNEL 染色および免疫染色 (BrdU 抗体, アクチン抗体)

BrdU 陽性反応は、腺房、介在部、顆粒管、線条部の細胞の核に散在的にみられた (Fig. 2)。アクチンの陽性反応は、腺房、介在部、血管壁に認められ、顆粒管および線条部にはほとんど認められなかった (Fig. 3)。TUNEL 染色の陽性反応は、少数の小葉内の細胞にみられた。

2. 結紮後 3-5 日

1) 一般染色

結紮後 3 日目、小葉中心部で腺房の萎縮が起こり、脱顆粒を生じていた。細胞の配列に多少の乱れがあるが、個々の細胞の識別は可能であった。顆粒管も腺房と同様、脱顆粒が生じていた。線条部は基底線条の消失が生じたため、顆粒管との識別が困難になった。結紮後 5 日目では、小葉中心部の腺房の萎縮はさらに進行して個々の細胞を区別することが困難となった。小葉周辺部の腺房細胞については、少数であるが存在を確認できた (Fig. 4)。ま

Fig. 1 Normal lobule showing acini (arrow), intercalated ducts (arrow head), granular convoluted tubules (white arrow) and striated ducts (white arrow head). H-E. $\times 500$.

Fig. 3 Normal lobule.

Immunoreactivity was expressed in the myoepithelial cell (arrow) around the acinus and the intercalated duct. Immunostaining using actin antibody. $\times 500$.

Fig. 2 Normal lobule.

A small number of the acinar (arrow) and the duct epithelial cells expressed immunoreactivity. Immunostaining using BrdU. $\times 500$.

Fig. 4 Five days after duct ligation.

Normal acini (arrow) can be seen mainly in the peripheral area of the lobule. H-E. $\times 500$.

た、この時期に小葉間結合組織の増殖がみられた。

2) TUNEL 染色および免疫染色(BrdU 抗体, アクチン抗体)

BrdU 陽性反応は、導管系および筋上皮細胞には正常顎下腺とほぼ同様に認められたが、腺房細胞の核には、ほとんどみられなくなった (Fig. 5)。アクチンの陽性反応は、腺房と確認できるもの、介在部、萎縮した腺房と

思われる構造物の周囲に認めた。TUNEL 染色の陽性反応は、各小葉ともに少数の萎縮した腺房および導管様構造物に観察された。

3. 結紮後 7 日

1) 一般染色

腺房と明確に判定できる構造物は非常に少なくなり、小葉間結合組織の増加がより著明となった。小葉内の導

Fig. 5 Three days after duct ligation.

BrdU positive cells were easily recognized in the duct epithelial and the myoepithelial cells, while minimally in the acinar cells. Immunostaining using BrdU. $\times 500$.

Fig. 6 One week after duct ligation.

Duct-like structures (arrow) can be seen with various shrunken ducts; also visible is the increased intralobular connective tissue. PAS. $\times 500$.

管は管腔の拡大や変形が生じていたが、核の配列は結紮後3日とあまり変わらなかった。腺房の減少と対照的に、介在部や腺房と同じか、これよりもやや小さい径の導管様構造物が多くみられるようになった (Fig. 6)。この時期においても、小葉内に壊死等を思わせる細胞はほとんどみられなかった。

2) TUNEL 染色および免疫染色 (BrdU 抗体, アクチン抗体)

3-5日に比べて、導管系および筋上皮細胞ともに BrdU に陽性を示す細胞は若干減少していた。腺房細胞と判定できる細胞は非常に少なく、BrdU に対する反応は確認できなかった。導管周囲の結合組織細胞と思われる細胞の核に、わずかながら反応がみられた。アクチンに対する反応は、BrdU と同様に、腺房と同定することが困難になったので、腺房については確認できなかった。萎縮した腺房と思われる構造物や、介在部および正常な腺房とほぼ同じかこれよりもやや小さい径を有する導管様構造物の周囲に強い反応を認めた (Fig. 7)。TUNEL 染色陽性反応は、少数の萎縮した腺房細胞の核に認められた (Fig. 8)。

4. TUNEL 染色陽性細胞の数の推移について

主導管結紮によって、腺房細胞や導管上皮細胞にアポトーシスを生ずる細胞がどの程度出現するか、TUNEL 染色を施した試料について検索した。正常顎下腺 (無処置)、結紮後 3, 5, 7 日の個体から得られた腺房および小

Fig. 7 One week after duct ligation.

Immunoreactivity was expressed in the myoepithelial cells surrounding the duct-like structures (arrow) and intercalated ducts (arrow head). Immunostaining using actin antibody. $\times 500$.

葉内導管に、陽性細胞がどの程度出現するか調べた。無処置および結紮後それぞれの時期について1個体あたり、腺房および導管ともに100個について検索し、これを3個体について行った (Table 1 a, b)。その結果、腺房細胞については無処置の個体では陽性細胞は平均で1.67個、結紮後3日目においては平均4.33個、5日目で

Fig. 8 One week after duct ligation.

TUNEL-positive nuclei (arrow) were present in some of the cells constituting the shrunken acini. TUNEL staining. $\times 750$.

は腺房の萎縮が激しくなっており、腺房と導管様構造物の区別が難しいものがみられたので両者を合わせてカウントを行い、平均6個、7日目では導管様構造物に平均で2.33個みられた (Table 1 a)。無処置の個体と結紮後各時期の個体との間で Student-t 検定を行った結果、 $p < 0.01$ で、各時期との間に有意差はみられなかった (Fig. 9 A)。

導管については、介在部、顆粒管、線条部を合わせて無処置の個体では陽性細胞は3個体平均で1.67個、結紮後3日目においては2.33個、5日目では2.67個、7日目では2.33個みられた (Table 1 b)。無処置の個体と結紮後各期間の個体との間で Student-t 検定を行った結果、 $p < 0.01$ で、各期間との間に有意差はみられなかった (Fig. 9 B)。

5. 主導管結紮解除後 1—2 週

1) 一般染色

小葉周辺部に腺房細胞が認められるようになった。しかし、その大部分は、いまだ変形しており、正常な細胞と比べると染色性を示す顆粒は少なく、空胞と混在していた。顆粒管も分泌顆粒を有するようになり、線条部に基底線条が回復してきた。それゆえ、腺房、介在部、顆粒管、線条部の判別が容易になってきた (Fig. 10)。

2) 免疫染色

BrdU 反応は、正常および結紮後7日と比べて、導管系、導管様構造物および筋上皮細胞により多くの陽性核

Table 1 Numbers of TUNEL-positive cells in acini, duct-like structures, and intralobular duct at 3, 5 and 7 days after ligation of the main excretory duct

		Acinus, Duct-like structure			Average
a	Control	2	1	2	1.67
	3 days	4	5	4	4.33
	5 days	10	5	3	6.00
	7 days	4	2	1	2.33
		Intralobular duct			Average
b	Control	2	2	1	1.67
	3 days	2	4	1	2.33
	5 days	3	3	2	2.67
	7 days	4	1	2	2.33

Three animals were used in a control group and in each of the experimental groups. One hundred acini, duct-like structures and intralobular ducts were each sampled per animal.

a : Acini and duct-like structures. In controls and one day 3, positive cells were detectable in acini. However, on day 5, a total of 100 acini and duct-like structures were counted together because any difference in structure between them had become unclear ; on day 7, only the duct-like structures were examined because of the disappearance of the acini.

b : Intralobular duct. A total of 100 intercalated, striated and granular ducts were sampled together, because after ligation any clear difference in structure between them was lost.

を認めた。また、腺房細胞の核にも一部認められるようになった (Fig. 11)。アクチンへの反応は、介在部および導管様構造物の周囲に加えて、回復してきた腺房の周囲で陽性であった (Fig. 12)。

6. 主導管結紮解除後 4 週

1) 一般染色

腺房細胞の再生は、小葉全体で急速に進んでおり、分泌顆粒は空胞と混在するものがみられたが、PAS および AB 染色に対して正常に近い染色性を示すようになった。小葉周辺部では、正常なものほとんど変わらない腺房細胞が認められるようになった。介在部、顆粒管、線条部も、ほぼ正常な形態を示していた。

2) 免疫組織化学的染色

BrdU は、正常な顎下腺の腺房細胞とほぼ同程度の陽

Fig. 9 Changes in the numbers of TUNEL-positive cells after ligature of the main excretory duct.

The value obtained in each group is the average of measurements shown in Table 1. There is no significant difference between the control and each of the experimental groups ($p < 0.01$).

A: Acini and duct-like structures. B: Intralobular ducts.

Fig. 10 Two weeks after removal of the ligature.

Acinar cells reappeared, particularly in the peripheral area of the lobule, although they contained vacuoles in addition to the secretory granules. Basal striation was also restored in some of the striated ducts. acini (arrow), intercalated ducts (arrow head), granular convoluted tubules (white arrow), striated ducts (white arrow head). PAS. $\times 500$.

Fig. 11 One week after removal of the ligature.

Restored acinar cells (arrow) expressed immunoreactivity. Immunostaining using BrdU. $\times 500$.

線条部が、正常な顎下腺のそれとほぼ同様の形態を呈するまで回復していた (Fig. 14)。

2) 免疫染色

BrdU, アクチン陽性反応 (Fig. 15) は、正常な顎下腺小葉とほぼ同様であった。

8. 透過電子顕微鏡による組織所見

1) 正常顎下腺の小葉

腺房細胞は小さな腺腔を囲むほぼ円錐形の細胞で、これらの細胞が集合してほぼ円形から楕円形の腺房を構築していた (Fig. 16)。腺房細胞の核は基底側に位置して円

性核の出現を示すようになった (Fig. 13)。アクチン陽性反応は、1~2 週と同様に、回復してきた腺房および介在部の周囲で認めた。

7. 主導管結紮解除後 6—8 週

1) 一般染色

小葉全域において、ほとんどの腺房、介在部、顆粒管、

Fig. 12 One week after removal of the ligature.

Cells which stained positive for actin can be seen around the restored acini (arrow) in addition to the duct-like structures and the intercalated ducts. Immunostaining using actin antibody. $\times 500$.

Fig. 14 Eight weeks after removal of the ligature.

Lobule appears to have recovered almost to a normal level. acini (arrow), intercalated ducts (arrow head), granular convoluted tubules (white arrow), striated ducts (white arrow head). H-E. $\times 500$.

Fig. 13 Four weeks after removal of the ligature.

Acinus (arrow) and the duct-constituting cells resumed immunoreactivity similar to that of the normal gland. Immunostaining using BrdU. $\times 500$.

Fig. 15 Six weeks after removal of the ligature.

Myoepithelial cells exhibited immunoreactivity (arrow) similar to that of the normal gland. Immunostaining using actin antibody. $\times 500$.

形あるいは楕円形を呈していた。核上部の細胞質には、電子密度の低い分泌顆粒が密在しており、また細胞質には、発達したミトコンドリア、粗面小胞体、ゴルジ装置が存在していた。介在部は、無顆粒性と電子密度の高い顆粒をもつ顆粒性の2種類の細胞が存在していた (Fig. 17)。顆粒管細胞は、電子密度が高く、介在部の細胞より

も大きな顆粒を含有しており、両者の識別は容易であった。線条部には基底側から管腔に向かってミトコンドリアが規則正しく配列しており、基底線条の形成に参与していた。筋上皮細胞は、介在部と腺房の周囲にその胞体や突起を認めた。

Fig. 16 A normal acinus.

Several secretory granules with low electron density are visible in the acinar cells. $\times 3,750$.

Fig. 17 A normal granular intercalated duct with myo-epithelial cells.

Some of the duct epithelial cells contain several electron dense granules. G: granular intercalated duct cell. N: non-granular intercalated duct cell. $\times 2,700$.

2) 結紮後の顎下腺小葉

(1) 結紮後3-5日

腺房細胞は分泌顆粒の減少や消失に伴い、不規則な形

状を呈していた。核の変形している細胞が少数みられたが、壊死やアポトーシスを思わせる像はみられなかった。残存する分泌顆粒により腺房、介在部および顆粒管の識別が可能であったが、腺房細胞については、3日目に中等度の電子密度の顆粒と電子密度の低い顆粒の混在する細胞がみられた (Fig. 18)。しかし、これらの顆粒をあわせもつ腺房細胞は5日目にはみられなくなった。介在部と顆粒管についても、顆粒の減少や消失が生じており、線条部についてはミトコンドリアが消失していた。

(2) 結紮後7日

腺房に比べると腔が広く、少数の電子密度の低い顆粒に混じて空胞を混在する導管様構造物が容易に観察された (Fig. 19)。腺房細胞と確認できる細胞はわずかで、顆粒の消失が著しく、核も変形している細胞が3-5日より増えていた。壊死あるいはアポトーシスを思わせる細胞は確認できなかった。介在部の顆粒性細胞はほとんどみられず、顆粒管も顆粒の著しい減少と消失を生じていた。

3) 結紮解除後の顎下腺小葉

(1) 結紮解除後1-2週

電子密度の低い顆粒を有し、小型ではあるが腺房細胞

Fig. 18 An acinus three days after duct ligation. Acinar cells constituting the acinus contained two types of granules ; granules with intermediate electron density and granules with low electron dense cores. $\times 3,600$.

を思わせる細胞が認められるようになり (Fig. 20), また、導管様構造物から腺房への移行型を思わせる構造物も認められた (Fig. 21)。しかし、電子密度の高い顆粒と電子密度の低い顆粒を混在する細胞は認められなかった。核がいびつな細胞が多かったが、介在部については顆粒性細胞も認めるようになり、顆粒管や線条部も正常像とほぼ同様の形態を呈するものが多くみられるようになった。

(2) 結紮解除後4週

一部に空胞を含む腺房細胞 (Fig. 22) がみられたが、小葉全域で回復が進んでいた。介在部および顆粒管は正常像とほぼ同様の像を呈していた。

(3) 結紮解除後6-8週

腺房、介在部、顆粒管は正常な顎下腺小葉と同様の組織像を呈していた。

Fig. 19 A duct-like structure one week after duct ligation. Cells containing granules (arrow) with low electron density can be seen. Arrow heads show the myoepithelial cells. $\times 3,750$.

Fig. 20 An acinus two weeks after removal of the ligature.

Acinar cell (arrow) contains small granules with low electron density. $\times 2,250$.

Fig. 22 An acinus four weeks after removal of the ligature.

Many of the acinar cells are recovered to the normal level, although some cells still have vacuoles. $\times 1,800$.

Fig. 21 Two weeks after removal of the ligature.

A transforming-type structure from duct-like structure to acinus. secretory granule (arrow). myoepithelial cell (arrow head). $\times 3,750$.

考 察

1. 主導管結紮による腺房細胞と筋上皮細胞の変化について

唾液腺主導管の結紮を行い、その後の腺実質の組織変化を調べた報告¹⁻²³⁾はいくつかあるが、その内容については多少相違がみられる。腺房細胞の脱顆粒と萎縮、顆粒管の脱顆粒、線条部の線条構造の消失、小葉間結合組織の増殖についてはほとんどの報告で一致している。しかしながら、腺房細胞の壊死については所見が二分しており、壊死は起こるという報告^{4-8,17)}と壊死は起こらないという報告^{1,2,10-16,18-23)}がある。

今回の実験では、結紮後3日より腺房細胞と顆粒管の脱顆粒、線条部の線条構造の不明瞭化、小葉間結合組織の増殖、導管の管腔の拡大等を認めた。結紮後5日には小葉周辺部にほぼ正常な腺房細胞を少数認めたが、小葉中心部の腺房細胞は脱顆粒に伴う萎縮が進行していた。これは北島⁵⁾の報告と一致する。結紮後7日においては腺房の形をとどめているものはほとんどみられなくなり、導管様構造物や導管が小葉の大部分を占めていたが、細胞の崩壊を示すいわゆる壊死像は観察されなかった。TUNEL染色を施したところ、陽性を示しアポトーシスを思わせる細胞が結紮後3日から7日にかけてわずかではあるが観察された。

Scottら¹⁸⁾は、ラットの耳下腺管の結紮を行った際に、耳下腺腺房細胞にアポトーシスがみられたと報告している。主導管結紮により、腺房細胞が死滅するとすれば、壊死よりもむしろアポトーシスによるものと思われるが、今回の実験では、Fig. 9に示したように、腺房、導管様構造物、小葉内導管に若干の陽性細胞がみられたが、無処置の個体と比較して有意差はみられなかった。また、透過電子顕微鏡観察により、核の断裂を示すアポトーシス像はみつからなかった。それゆえ、今回の結紮実験ではアポトーシスが生じたとしても少数であると思われる。

筋上皮細胞の変化に関しては、北島⁵⁾、浅野⁶⁾はラット顎下腺主導管の結紮初期では、alkaline-phosphatase(以下ALP)反応は減少または消失し、その後、腺組織の再生に伴って陽性反応が増加するが、舌下腺では一部消失すると述べている。Shibaら¹⁹⁾はALPを指標に、Tamarin^{1,2)}は透過電子顕微鏡観察により、ラット顎下腺では変化はみられないと報告している。また長門ら⁹⁾はラット舌下腺でNBA-phalloidinを用いて観察し、筋上皮細胞は形態変化を起こし退化、消失するものがみられると

述べている。

今回、筋上皮細胞に対するBrdU陽性反応は、結紮後5, 7日目では正常な腺や結紮後3日目と比べて若干減少していた。抗アクチンモノクローナル抗体を用いた免疫染色においては、アクチンの陽性反応は結紮3日目において介在部、原型をとどめている腺房、萎縮した腺房の周囲に認められた。結紮後5日目になると、原型をとどめている腺房は著しく減少するが、陽性反応はこれらの腺房、介在部、正常な腺房と同じ位の径の導管様構造物の周囲にみられるようになった。結紮7日目でも介在部、正常な腺房と同じ位の大きさの導管様構造物の周囲に依然として強い陽性反応を認め、北島⁵⁾、浅野⁶⁾、長門ら⁹⁾、Shibaら¹⁹⁾の報告とは一部異なった所見が得られた。今回の研究結果は、舌下腺と一概に比較できないが、顎下腺については、結紮の程度による差もあると思われるが、筋上皮細胞は大多数について生存が維持されることが示唆された。電子顕微鏡所見においても、顆粒をほとんどもたず正常な腺房と同じか、これよりもやや小さい径の導管様構造物がみられ、その周囲に筋上皮細胞を認めた。線条部と顆粒管にはアクチン陽性細胞はほとんどみられないことと、腺房細胞の細胞死は、少数であると考えられることから、筋上皮細胞を指標にすると、多くの腺房は脱顆粒を生じて萎縮したり、腺腔が拡大して導管様構造物に変化することが示唆された。腺房が導管様構造物に変化する機構については不明であるが、Scottら¹⁸⁾やWalkerら²⁰⁾がラット耳下腺管の結紮によって、腺房は導管様構造物の形状を呈するようになると報告しており、顎下腺の腺房についても同様の変化が生じたものと思われる。

2. 主導管結紮解除後の腺房細胞と筋上皮細胞の変化について

主導管結紮後の腺組織の回復についてはラット¹⁻⁴⁾およびウサギ¹⁸⁻²³⁾に関する報告があり、再生能力があるという点では一致するが、再生過程については、さまざまな見解がなされている。高橋²⁴⁾はラットの顎下腺をCO₂レーザーにより切除したところ、照射後初期において壊死巣周囲に残存していた導管様構造物が増殖を始め、これらが幼若な腺房細胞へ分化すると報告している。山根²⁵⁾はラット耳下腺の部分切除を行ったところ、小葉間導管、線条部、介在部および腺房が萎縮し、一様な導管細胞になる。次いで、これが介在部の未分化な上皮細胞になり、腺房細胞に分化すると述べている。その後の再生は実質細胞の増殖によるものであるという。

ラット顎下腺主導管結紮解除後の再生過程について

は, Tamarin^{1,2)}が正常時では認められない高電子密度の分泌顆粒が出現し, 再生が進むにつれて低電子密度の顆粒へ移行し, 腺房細胞の再生過程は, Jacoby ら²⁶⁾, Leeson ら²⁷⁾, Dvorak²⁸⁾などが述べている初期の発生過程に類似する方法をとるのではないかと考察している。河野⁸⁾は proacinar cell が出現し, 成熟腺房細胞へ移行すると考えており, Strum²⁹⁾, Yamashina ら^{30,31)}, 佐藤³²⁾, 森ら³³⁾の提唱する発生過程を推測している。三辺⁴⁾は終末部の再構築は, 導管様構造構成細胞が腺房細胞に変化するのではなく, 残存している腺房細胞の肥大とその細胞分裂によるものであると述べている。Scott ら¹⁸⁾はラット耳下腺において, 導管結紮解除後の腺房の再構築は, 導管様構造物を呈している腺房細胞の回復によるものと述べている。

今回の著者らの電子顕微鏡所見では, 再生初期において電子密度の低い分泌顆粒を有し, 導管様構造物から腺房への移行を思わせる構造物が認められた。しかし, 高電子密度の顆粒から低電子密度の顆粒への移行像は認められず, また proacinar cell に類似した細胞や腺房細胞への移行像も観察されなかった。BrdU 陽性反応は, 結紮解除後 1-2 週において導管あるいは導管様構造物にみられ, 解除後中期から後期にかけては回復した腺房細胞の核に多く取り込みがみられた。アクチン陽性反応は, 結紮解除初期には回復してきた腺房細胞の周囲, 導管様構造物および介在部の周囲にみられ, 中期から後期においては腺房細胞が正常な形態を呈するにつれて導管様構造物への反応は減少していた。これらの所見から, 結紮解除により, Scott ら¹⁸⁾の所見と同様に導管様構造物が再び腺房へ回復すると考えられた。しかし, アクチン陽性反応は介在部の周囲にも現れ, 光学顕微鏡観察において介在部と導管様構造物との区別のつかないものもみられた。それゆえ, 導管様構造物のなかには介在部へ変化するものがあるのかもしれない。いずれにしても, 導管様構造物は導管の閉鎖を解除することにより, 腺房へと回復し, 同時に細胞分裂を行って, 新たな腺房細胞を生産することが示唆された。

結 論

主導管結紮後と解除後の顎下腺小葉の組織変化, 特に腺房細胞と筋上皮細胞の変化と再生過程を調べる目的で研究を行った。ラット顎下腺主導管を 1 週間結紮してこの期間の組織変化, 次いで結紮解除後の変化を経日的に調べた。免疫染色, TUNEL 染色を施した試料について光学顕微鏡, 透過電子顕微鏡を用いて観察を行い, 以下

の所見を得た。

1. 結紮後, 脱顆粒に伴う腺房の萎縮, 線条部の基底線条の消失, 小葉間結合組織の増殖がみられた。壊死を思わせる細胞はみられず, TUNEL 染色に陽性な腺房細胞も少数であった。

2. 結紮後, 筋上皮細胞は萎縮した腺房, 結紮期間が長くなるにつれて導管様構造物の周囲を覆っており, 腺房が導管様構造物へ変化する過程が得られた。

3. 結紮解除による腺房の再生は, 主に導管様構造物を構成する腺房細胞の回復によることが示唆された。

稿を終えるにあたり, 研究遂行に親身なるご協力をいただきました日本歯科大学歯学部口腔外科学教室第 2 講座ならびに解剖学教室第 2 講座の皆様へ深甚なる感謝の意を表します。

文 献

- 1) Tamarin, A.: Submaxillary gland recovery from obstruction. I. Overall changes and electron microscopic alteration of granular duct cells. *J. Ultras. Res.* **34**: 276-287, 1971.
- 2) Tamarin, A.: Submaxillary gland recovery from obstruction. II. Electron microscopic alteration of acinar cells. *J. Ultras. Res.* **34**: 288-302, 1971.
- 3) 河野嘉彦: ラット顎下腺排出管の結紮解除後の再生. *耳鼻臨床* **86**: 585-594, 1993.
- 4) 三辺メイ: 排泄管導管結紮後のラット顎下腺の再生. *神奈川歯学* **24**: 484-500, 1989.
- 5) 北島光彦: 排出管結紮唾液腺の組織学的ならびに組織化学的研究. *歯科医学* **23**: 507-527, 1960.
- 6) 浅野賢一: 唾液腺導管結紮に関する実験的研究一病理学的, 組織化学的研究一. *口科誌* **35**: 216-238, 1985.
- 7) 樽沼修二: ラット顎下腺排出管の結紮に伴う腺体内血流の変化に関する研究. *日口外誌* **35**: 858-869, 1989.
- 8) 河野嘉彦: ラット顎下腺の排泄管結紮による組織学的変化. *耳鼻臨床* **86**: 413-426, 1993.
- 9) 長門俊一, 村上通隆, 内海俊明, 谷岡博昭: ラット舌下腺筋上皮細胞の排泄管結紮による形態変化. *口科誌* **39**: 34-45, 1990.
- 10) Fernandes, J. F. and Junqueira, L. C. U.: Respiration, glycolysis and energy rich phosphorus compounds in secreting rat submaxillary gland. *Exp. Cell Res.* **5**: 329-334, 1953.
- 11) Standish, S. and Shafer, W. G.: Serial histologic effect of rat submaxillary and sublingual gland duct and blood vessel ligation. *J. Dent. Res.* **36**: 866-879, 1957.
- 12) 芝 良祐: ラット顎下腺および舌下腺における排出管

- 結紮の影響について. 阪大歯学誌 **12** : 23—33, 1967.
- 13) 谷野日出人：導管結紮後のラット顎下腺に関する実験的研究. 歯学 **72** : 626—642, 1984.
- 14) Junqueira, L. C. and Rabinovitch, M. : Reversibility of the phenomena induced by excretory duct ligation in the rat submaxillary gland. Texas Rep. Biol. Med. **12** : 94—97, 1954.
- 15) 大村 仇, 林 寿, 那須優則, 古本啓一：導管結紮後のラット顎下腺の動態変化に関する研究. 歯学 **75** : 555—564, 1987.
- 16) Norkerg, L. E., Abok, K. and Lundquist, P. : Effects of ligation and irradiation on the submaxillary glands in rat. Acta Otolaryngol. **105** : 181—192, 1988.
- 17) 田村知治：排泄管結紮顎下腺の変化に関する実験的研究. 九州歯会誌 **27** : 45—64, 1973.
- 18) Scott, J., Liu, P. and Smith, P. M. : Morphological and functional characteristics of acinar atrophy and recovery in the duct-ligated parotid gland of the rat. J. Dent. Res. **78** : 1711—1719, 1999.
- 19) Shiba, R., Hamada, T. and Kawakatsu, K. : Histochemical and electron microscopical studies on the effect of duct ligation of rat salivary glands. Arch. Oral Biol. **17** : 299—309, 1972.
- 20) Walker, N. I. and Gobe, G. C. : Cell death and cell proliferation during atrophy of the rat parotid gland induced by duct obstruction. J. Pathol. **153** : 333—344, 1987.
- 21) 海津俊樹：家兎耳下腺排泄管結紮に関する実験的研究. 日口科誌 **19** : 20—38, 1970.
- 22) 園部英俊：家兎耳下腺排出管結紮に関する実験的研究—組織化学的研究—. 日口外誌 **24** : 1091—1107, 1978.
- 23) 佐藤隆吉：家兎耳下腺排出管結紮に関する実験的研究—回復過程の電顕的検索—. 日口外誌 **27** : 1721—1735, 1981.
- 24) 高橋 茂：レーザー照射顎下腺の損傷と修復に関する形態学的研究. 歯基礎誌 **35** : 115—146, 1993.
- 25) 山根 瞳：ラット耳下腺部分切除後の再生に関する研究. 歯科学報 **74** : 46—82, 1974.
- 26) Jacoby, F. and Leeson, C. R. : The post-natal development of the rat submaxillary gland. J. Anat. **93** : 201—220, 1959.
- 27) Leeson, C. R. and Jacoby, F. : An electron microscopic study of the rat submaxillary gland during its post-natal development and in the adult. J. Anat. **93** : 287—295, 1959.
- 28) Dvorak, M. : The secretory cells in the submaxillary gland in the perinatal period of development in the rat. Z. Zellforsch. **99** : 346—356, 1969.
- 29) Strum, J. M. : Unusual peroxidase-positive granules in the developing rat submaxillary gland. J. Cell Biol. **51** : 575—579, 1971.
- 30) Yamashina, S. and Barka, T. : Localization of peroxidase activity in the developing submandibular gland of normal and isoproterenol treated rats. J. Histochem. Cytochem. **20** : 855—872, 1972.
- 31) Yamashina, S. and Barka, T. : Development of endogenous peroxidase in fetal rat submandibular gland. J. Histochem. Cytochem. **21** : 42—50, 1973.
- 32) 佐藤一芳：ラット顎下腺終末部の発達と交感神経支配の関係について. 歯基礎誌 **24** : 496—515, 1978.
- 33) 森 恵造, 長門俊一, 谷岡博昭：ラット顎下腺生後発達, 分化に関する電顕的, 形態学的研究. 口科誌 **37** : 953—964, 1988.