

[原 著]

幼若ラットの頸下腺に対する粉末飼料の影響

山根 美子, 太田 純, 石井 久淑, 猪股孝四郎

北海道医療大学歯学部口腔生理学講座

(主任:猪股孝四郎教授)

Effect of powdered diet on the submandibular glands of young rats

Yoshiko YAMANE, Isao OOTA, Hisayoshi ISHII and Koshiro INOMATA

Department of Oral Physiology, School of Dentistry,
Health Science University of Hokkaido

(Chief : Prof. Koshiro INOMATA)

Abstract

The effect of powdered diet on the submandibular glands was investigated in young rats. The body weights of rats fed a powdered diet (powdered diet group) did not differ from that of rats fed a pelleted diet (pelleted diet group). The weight of submandibular glands in the powdered diet group were significantly greater than those of the pelleted diet group. The DNA content (mg DNA/g gland weight) in the powdered diet group were lower than those of the pelleted diet group. At 5 and 6 weeks, the areas of acinar cells in the powdered diet group were significantly larger than those in the pelleted diet group. These results show that the enlargement of the submandibular gland, when young rats fed a powdered diet, was mainly caused by hypertrophic enlargement of submandibular acinar cells.

Key words : Young rats, Submandibular gland, Powdered diet, Acinar cell, Hypertrophic enlargement

緒 言

ラットおよびマウスの唾液腺は、飼料の性状 (consistency) により多様な影響を受けることが報告されている^{1~9)}。液状飼料ならびに粉末飼料は耳下腺を萎縮させ^{1~6)}、栄養価のないセルロースなどを添加した、いわゆるバルク (bulk) 飼料は耳下腺を肥大させることが明らかにされている^{7~9)}。一方、頸下腺に関しては、液状飼料あるいはバルク飼料を摂取したラットでは、耳下腺と同様の変化を示すことが報告されている^{3,4,10,11)}。しかし、頸下腺に対する粉末飼料の影響は詳細に検討されていない。

本論文では頸下腺に対する粉末飼料の影響を明らかにするために、飼料の組成、栄養価ならびに水分量などの性状は等しく、形状のみが異なる粉末飼料と固型飼料で飼育した幼若ラットの頸下腺について湿重量、DNA量ならびに腺房細胞の断面積を比較検討した。

材料および方法

1. 材 料

実験動物にはWistar系雄性ラットを用いた。ラットは離乳直後の3週齢から4週齢まで固型飼料(飼育用MF, オリエンタル酵母)で飼育し、そのまま固型飼料で飼育した群(固型飼料群)と4週齢から粉末飼料(飼育用粉末MF, オリエンタル酵母)で飼育した群(粉末飼料群)の2群に分け、10週齢まで飼育した。固型飼料ならびに粉末飼料は、組成、栄養価ならびに水分含量などの性状は同一であり、形状のみが異なるものである。

ラットの腹腔内にsodium pentobarbital (50 mg/kg) を投与した麻醉下で、両側の頸下腺を摘出し、低温 (4°C) 下で速やかに周囲の結合組織を取り除き、これらを実験に供した。

なお、実験に用いたラットは本学動物実験センターにおいて恒常的条件下(明暗周期12時間、

室温23±1°C) で、飼料ならびに水を自由に摂取させて飼育した。また、飼育および実験は「生理学領域における動物実験に関する基本的指針」(日本生理学会制定)に基づいて行った。

2. 核酸の抽出ならびに測定法

1) 核酸の抽出

頸下腺から Schmidt-Thannhauser-Schneider法¹²⁾により核酸を抽出した。すなわち、細切した頸下腺をテフロンホモジナイザー (Potter-Elvehjem型) により粉碎し、ホモジネートを得た。ホモジネートはトリクロロ酢酸 (TCA) により酸可溶性物質を除去した後、95%エタノール、次にエタノール-エーテル混液 (3:1) により脂質を除去した。その後、遠心分離 (3,000rpm, 10min) により得られた沈殿から5%TCAにより核酸を抽出し、さらに遠心分離 (3,000rpm, 10min) を行い、得られた上清を試料とした。

2) DNAの測定

DNA量の測定にはジフェニルアミン法 (Dische法)^{12,13)}を用いた。ジフェニルアミン試薬は、ジフェニルアミン(関東化学)に冰酢酸と濃硫酸を加えて調整した。この試薬を試料に加え、加熱 (90°C, 10min) して発色させ、吸光度計 (U-2001, 日立) を用い、600μmにおける吸光度を測定した。DNA量 (mg/g gland) はcalf thymus DNA (highly polymerized, Sigma) を標準試料として、予め求めた検量線より算出した。

3. 頸下腺腺房細胞面積の測定

4%パラホルムアルデヒドで固定した頸下腺を水洗後、通法に従い上昇アルコール系列およびキシレンにより脱水、透徹した後、パラフィン(HISTOSEC, Merck)で包埋した。パラフィン包埋標本から5μmの連続切片を作製し、Mayerのヘマトキシリニーエオジン染色 (H-E染色)¹⁴⁾を行った。

頸下腺腺房細胞面積は画像処理&解析システ

ム (Quantimet 600, ライカ) を用い測定した。

4. 統計学的検定法

固型飼料群と粉末飼料群における有意差検定には、Student t-testを用いた。

結 果

1. 体 重

実験に用いたラットの週齢とともに体重の変化をFig.1に示す。2群に分ける直前の4週齢における体重は、 98.9 ± 9.8 g (平均±SD) であった。固型飼料群および粉末飼料群それぞれの体重は5週齢では 139.2 ± 12.2 gと 140.4 ± 14.9 g, 6週齢では 199.9 ± 14.1 gと 184.9 ± 18.5 g, 7週齢では 235.0 ± 22.5 gと 238.7 ± 33.2 g, 8週齢では 279.9 ± 14.9 gと 266.3 ± 30.1 g, 9週齢

では 310.4 ± 12.9 gと 309.7 ± 32.1 gおよび10週齢では 324.1 ± 15.9 gと 332.5 ± 12.7 gであった。

以上のように、固型飼料群ならびに粉末飼料群の体重はいずれの週齢においても有意差はなく、両群とも週齢とともに増加した。

2. 頸下腺湿重量の変化

予備実験として行った固型飼料群と粉末飼料群のそれぞれにおける、左右の頸下腺湿重量の週齢とともに変化をTable.1に示す。頸下腺湿重量は、両群のいずれの週齢においても左右に有意差を認めなかった。したがって、左側頸下腺を両群の湿重量の比較に用いた。

固型飼料群ならびに粉末飼料群のそれぞれにおける頸下腺湿重量の週齢とともに変化をFig.2に示す。両群に分ける時点の4週齢にお

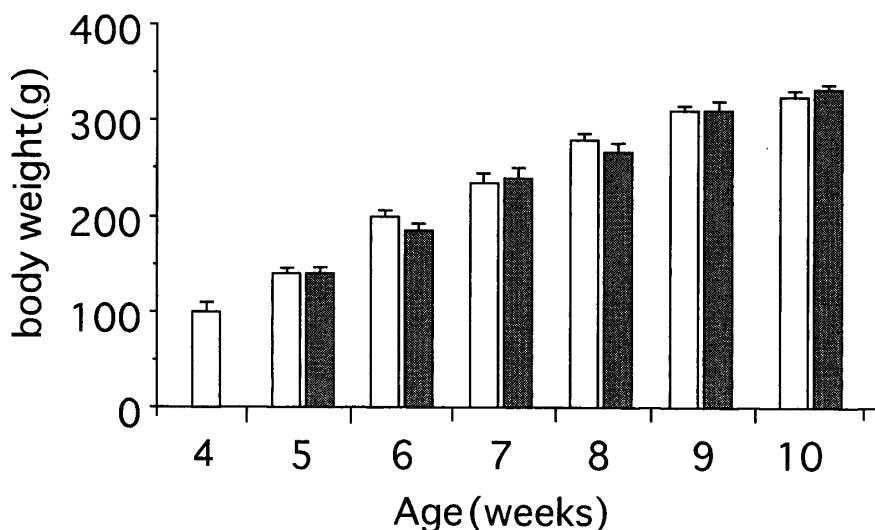


Fig. 1 Body weight changes of rats in groups fed diets with either pelleted diet or powdered diet. Mean±S. D (n=9).

□ : pelleted ; ■ : powdered

Table. 1 Weight of the submandibular glands of rats in groups fed the pelleted diet (control) or the powdered diet. Mean±S. D (n=3).

age (weeks)	pelleted diet group		powdered diet group	
	right gland(g)	left gland(g)	right gland(g)	left gland(g)
5	0.12±0.01	0.12±0.02	0.16±0.01	0.17±0.02
6	0.15±0.02	0.16±0.02	0.19±0.01	0.19±0.02
7	0.18±0.02	0.18±0.03	0.21±0.02	0.22±0.03
8	0.20±0.02	0.19±0.03	0.22±0.02	0.23±0.01
9	0.24±0.03	0.23±0.04	0.25±0.02	0.26±0.03
10	0.21±0.01	0.22±0.01	0.28±0.01	0.28±0.02

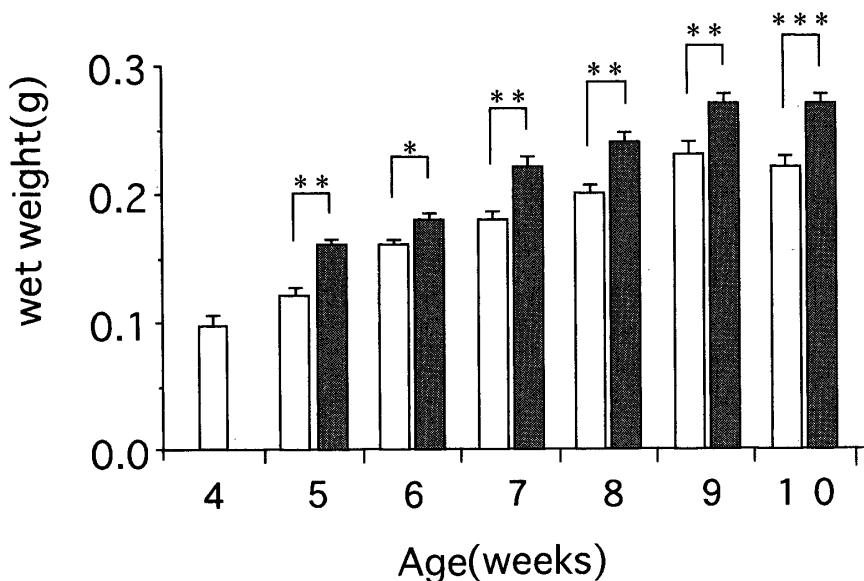


Fig. 2 Effect of powdered diet on the wet weight of the submandibular glands.
Mean \pm S. D (n=9). *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001.
□ : pelleted ; ■ : powdered

ける頸下腺湿重量は、 0.10 ± 0.01 g (平均 \pm SD) であった。5週齢以降の固型飼料群ならびに粉末飼料群それぞれの頸下腺湿重量は、5週齢では 0.12 ± 0.02 g と 0.16 ± 0.01 g, 6週齢では 0.16 ± 0.01 g と 0.18 ± 0.02 g, 7週齢では 0.18 ± 0.02 g と 0.22 ± 0.03 g, 8週齢では 0.20 ± 0.02 g と 0.24 ± 0.02 g, 9週齢では 0.23 ± 0.03 g と 0.27 ± 0.03 g および10週齢では 0.22 ± 0.03 g と 0.27 ± 0.03 g であった。

以上のように、両群の頸下腺湿重量は週齢とともに増大した。しかし、粉末飼料群の頸下腺湿重量は、5週齢から10週齢までのいずれの週齢においても固型飼料群より有意に高い値を示した。

3. 頸下腺組織中のDNA含有量

単位頸下腺湿重量当たりのDNA量と週齢との関係をFig.3に示す。固型飼料群ならびに粉末飼料群それぞれのDNA量 (mg/g gland) は、5週齢では 7.46 ± 0.27 (平均 \pm SD) と 6.94 ± 0.30 , 6週齢では 6.22 ± 0.02 と 5.86 ± 0.42 , 7週齢では 6.29 ± 0.16 と 6.03 ± 0.06 , 8週齢では 6.27 ± 0.35 と 5.95 ± 0.20 , 9週齢では $5.88 \pm$

0.22 と 5.25 ± 0.13 および10週齢では 6.31 ± 0.57 と 5.49 ± 0.38 であった。

以上のように、粉末飼料群におけるDNA含量はいずれの週齢においても固型飼料群より少なく、特に9週齢における粉末飼料群と固型飼料群のDNA含量の差は有意であった。

4. 頸下腺の組織学的観察

固型飼料群と粉末飼料群におけるラットの頸下腺の組織像をFig.4に示す。腺房細胞と導管細胞は明らかに区別することができた。一方、腺房細胞の大きさに関しては、5週齢では両群の間に組織像からは明瞭な差を認めることができなかった。しかし、6週齢では組織像からでも粉末飼料群の腺房細胞は、固型飼料群と比較して明らかに肥大していることが認められた。

両群の頸下腺腺房細胞の面積を測定した結果をFig.5に示す。固型飼料群ならびに粉末飼料群のそれぞれにおける腺房細胞の面積 (μm^2) は、5週齢では 3024.5 ± 397.3 (平均 \pm SD) と 3329.7 ± 602.8 , および6週齢では 3179.2 ± 506.6 と 4319.8 ± 683.1 であった。

以上のように、腺房細胞の面積は5週齢およ

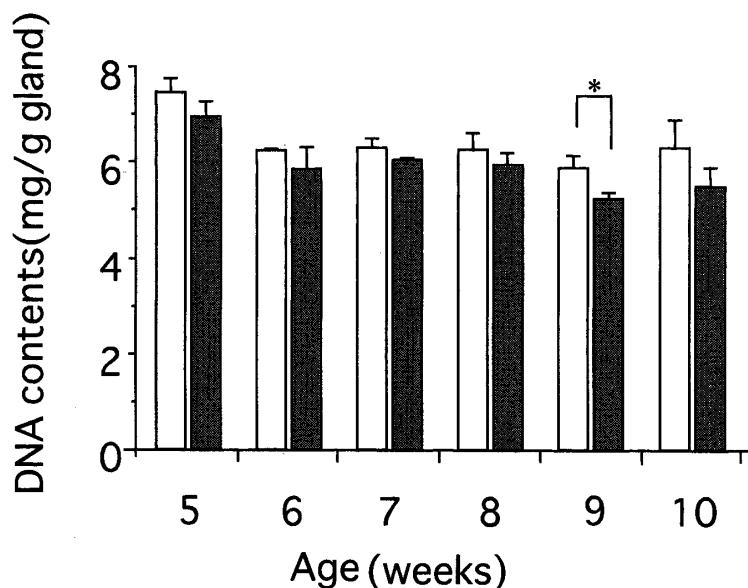


Fig. 3 Effect of powdered diet on the DNA contents in the submandibular glands.
Mean \pm S. D (n=3). *P<0.05.
□ : pelleted ; ■ : powdered

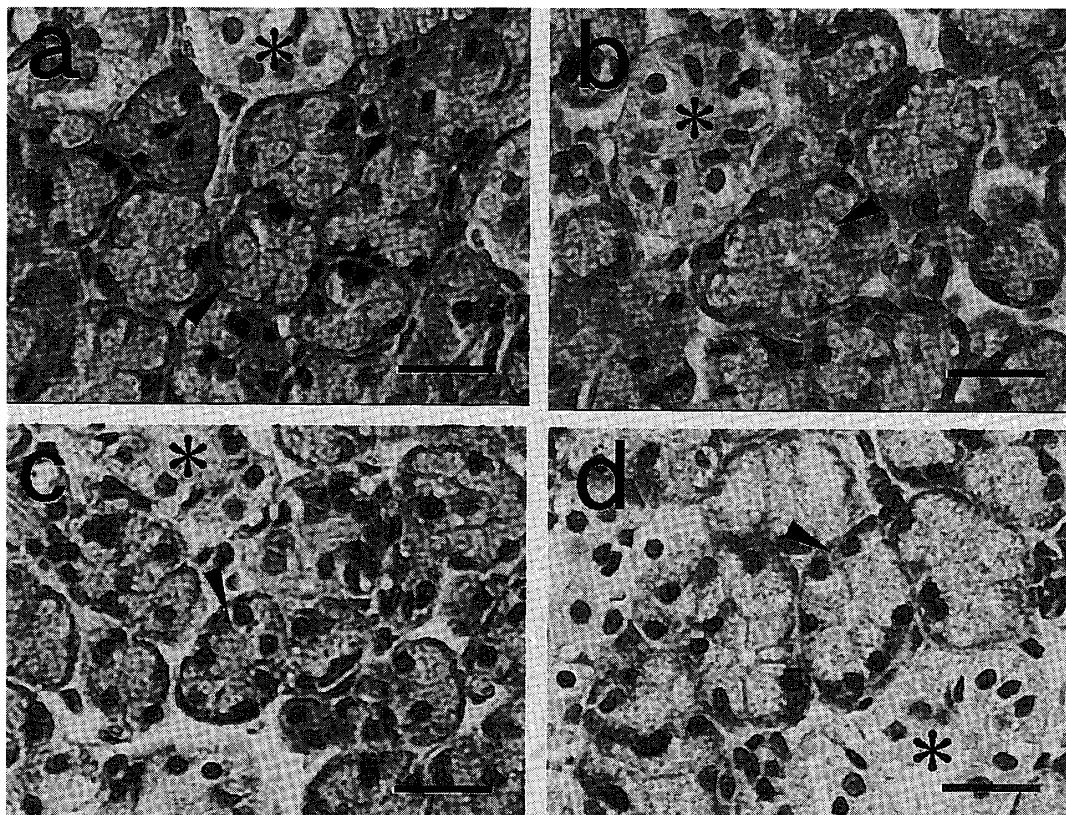


Fig. 4 Sections of submandibular glands from 5 and 6 week-old rats.
a : 5 week-old rat fed the pelleted diet (control).
b : 5 week-old rat fed the powdered diet.
c : 6 week-old rat fed the powdered diet (control).
d : 6 week-old rat fed the powdered diet.
arrow : acinar cells asterisk : duct components
Stained with hematoxylin and eosin. Bar represents 25μm.

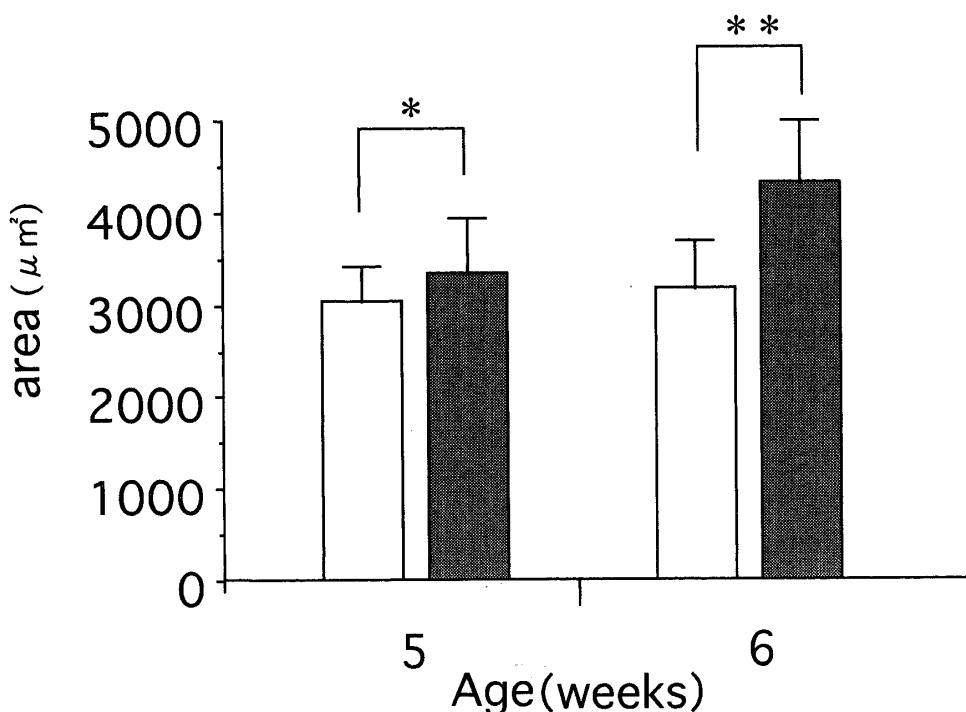


Fig. 5 Effect of powdered diet on the areas of submandibular acinar cells. Mean \pm S. D (n=9). *P<0.05, **P<0.01.
 □: pelleted; ■: powdered

び6週齢のいずれにおいても固型飼料群に比べて粉末飼料群で有意な増大が認められた。

考 察

本実験において、粉末飼料群のラットにおける体重は5週齢から10週齢を通して、いずれの週齢においても固型飼料群のラットとの有意差はなく(Fig.1)，粉末飼料からでも十分な栄養が摂取できるという従来の報告^{5,6)}を確認した。これに対して、頸下腺湿重量は両群とも週齢にともない増加したが、粉末飼料群で固型飼料群より常に有意に高い値を示すことが明らかにされた(Fig.2, Table.1)。さらに、粉末飼料群における頸下腺湿重量の増大、すなわち頸下腺の肥大は、飼料を固型から粉末に換えたわずか1週間後にはすでに認められた(Fig.2, Table.1)。これらの事実は、粉末飼料群における頸下腺の肥大は、飼料の形状の相違によってもたらされ、しかもこの変化は短時間内に生じることを示している。

粉末飼料群における頸下腺の肥大の原因としては、主として(1)細胞数の増加、(2)細胞自身の肥大および(3)両者が同時に起こるという3通りの可能性が考えられる。細胞数の増加については、頸下腺組織に存在する全ての細胞数を計測することは困難である。個々の細胞に含まれるDNA量は動物の種類により一定である¹⁵⁾ことから、組織湿重量当たりに含まれるDNA量は細胞数の指標として広く用いられている^{3,10)}。単位頸下腺湿重量当たりに含まれるDNA量は、固形飼料群と粉末飼料群の間に9週齢を除いて、有意差は認められなかったが、いずれの週齢においても粉末飼料群において固型飼料群より低い傾向を示した(Fig.3)。細胞自身の肥大については、腺房細胞の面積が粉末飼料群において有意な増大を示した(Figs.4, 5)。以上のことから、粉末飼料群における単位頸下腺湿重量当たりのDNA量が低下の傾向を示したのは、腺房細胞の肥大による見かけ上のものであり、細胞数が粉末飼料群で減少したのではない

ことを示唆する。したがって、粉末飼料群における頸下腺の肥大は腺房細胞の肥大が主要な原因であると結論できる。

唾液腺に対して、飼料の性状や形状は多様な影響を及ぼすが、それらに対する直接の影響因子ならびに唾液腺機能との関係については十分に明らかにされていない。ラットあるいはマウスを用いた多くの研究で、粉末飼料と液状飼料では水分含有量が異なるが、いずれによても耳下腺は萎縮すること^{1~6)}、また摂食時に咀嚼筋に多大な負荷がかかることが予想されるバルク飼料によって耳下腺は肥大すること^{7~9)}を報告している。以上の報告を考慮すると、耳下腺は飼料の硬さに反応して変化することが推察できる。

本研究で明らかなように、ラットの頸下腺は粉末飼料摂取により肥大を起こした。これは、耳下腺とは全く反対の現象であるが、その原因是十分明らかではない。可能性の一つとして、粉末飼料摂取時には、頸下腺ならびに耳下腺において唾液の生成は促進されるが、唾液は耳下腺から盛んに分泌されるのに対して、頸下腺から分泌されないと仮定する。その結果、耳下腺では萎縮が起こるのに対して、頸下腺は逆に肥大が起こると考えられる。一方、Abe and Dawes (1978) は、ラットの舌神経ならびに耳介側頭神経を電気的に刺激すると、唾液の分泌量は耳下腺よりもむしろ頸下腺で多いという結果を報告している¹⁰⁾。この報告を考慮すると、飼料摂食時に頸下腺から唾液が分泌されないことが腺房細胞の肥大を引き起こす要因であるとは考えにくい。この点は、興味ある問題であり、今後さらに、粉末飼料摂食時における頸下腺ならびに耳下腺からの唾液分泌量を比較検討する必要がある。

結 論

頸下腺に対する粉末飼料の影響について、腺

湿重量、DNA量ならびに腺房細胞の断面積を4週齢から10週齢までの幼若ラットを用いて検討し、以下の結果を得た。

1) 粉末飼料で飼育したラット(粉末飼料群)の体重は、5週齢から10週齢のいずれにおいても固型飼料で飼育したラット(固型飼料群)と比較して有意差は認められなかった。

2) 両群の頸下腺湿重量は週齢とともに増加した。しかし、粉末飼料群の頸下腺湿重量は固型飼料群と比較して常に有意に高い値を示した。

3) 粉末飼料群における単位頸下腺湿重量当たりのDNA量は、固型飼料群と比較して低い傾向を示し、特に9週齢では有意に低い値を示した。

4) 粉末飼料群の頸下腺における腺房細胞の断面積は、測定した5週齢ならびに6週齢とも固型飼料群と比較して有意に高い値を示した。

以上の結果より、幼若ラットの頸下腺に対して粉末飼料は頸下腺の肥大を引き起こし、この肥大は主として腺房細胞の肥大によることが明らかにされた。

文 献

- Johnson, D. A. : Effect of a liquid diet on the protein composition of rat parotid saliva. *J. Nutr.*, 112 : 175-181, 1982.
- Johnson, D. A.: Changes in rat parotid salivary proteins associated with liquid diet-induced gland atrophy and isoproterenol-induced gland enlargement. *Archs oral Biol.*, 29 : 215-221, 1984.
- 菊池賢司、三木真弓、宮本幸子他：咀嚼が唾液腺の発達に及ぼす影響について。小児歯誌, 27 : 427-435, 1989.
- Scott, J. and Gunn, D. L. : A comparative quantitative histological investigation of atrophic changes in the major salivary glands of liquid-fed rats. *Archs oral Biol.*, 36 : 855-857, 1991.
- Johnson, D. A., Sreebny, L. M. and Enwonwu,

- C. O. : Effect of protein-energy malnutrition and of a powdered diet on the parotid gland and pancreas of young rats. *J. Nutr.*, 107 : 1235-1243, 1977.
6. Johnson, D. A., Lopez, H. and Navia, J. M. : Effect of protein deficiency and diet consistency on the parotid gland and parotid saliva of rats. *J. Dent. Res.*, 74 : 1444-1452, 1995.
7. Johnson, D. A. and Sreebny, L. M. : Effect of increasing the bulk content of the diet on the rat parotid gland and saliva. *J. Dent. Res.*, 61 : 691-696, 1982.
8. Johnson, D. A. : Effect of a ground versus a pelleted bulk diet on the rat parotid gland. *Archs oral Biol.*, 26 : 1091-1093, 1981.
9. Johnson, D. A. and Cardenas, L. H. : Effect of food mastication on rat parotid gland adrenergic and cholinergic cell surface receptors. *Crit. Rev. oral Biol. Med.*, 4 : 591-597, 1993.
10. 金 俊熙：液状飼料がマウス顎下腺の発達と老化に及ぼす影響。日矯歯誌, 49 : 73-86, 1990.
11. 中村恵子：マウス唾液腺神経伝達物質および唾液分泌反応に及ぼす短期間のバルク食あるいは液状食飼育の影響。歯基礎誌, 39 : 655-664, 1997.
12. 安藤銳郎, 寺山 宏, 西沢一俊他：生化学研究法 II, 第10版。朝倉書店, 1976, 693-698.
13. 水野重樹：生物化学実験法—核酸の一般的分離・定量法-, 第5版。学会出版センター, 1977, 81-86.
14. 佐野 豊：組織学研究法—理論と術式-, 第5。南山堂, 1979, 191-197.
15. Watson, J. D., Hopkins, N. H., Roberts, J. W., et al. (松原謙一, 中村桂子, 三浦謹一郎)：ワトソン遺伝子の分子生物学(上)。第4版, 株式会社トッパン, 1992, pp.17.
16. Abe, K and Dawes, C. : The effects of electrical and pharmacological stimulation on the types of proteins secreted by rat parotid and submandibular glands. *Archs oral Biol.*, 23 : 367-372, 1978.