

氏名	白石 美恵
学位の種類	博士 (栄養科学)
学位記番号	博栄甲第 0005 号
学位授与の日付	平成 20 年 3 月 14 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当 (課程博士)
研究科専攻	栄養科学研究科 栄養科学専攻
学位論文題目	<b>Antioxidant Enzyme Immunoreactivity in Rat von Ebner Gland after Nickel Treatment.</b> (ニッケル投与ラットエブネル腺における抗酸化酵素発現に関する免疫細胞化学)
主論文公表雑誌	<b>Medical Molecular Morphology</b> (第 41 巻, 第 1 号, 44 頁~52 頁, 2008 年)
論文審査委員	(主査) 藤田 守 (副査) 藤本 淳 (副査) 古賀 信幸

#### 論文内容の要旨

【目的】 必須微量元素であるニッケル(Ni)を含有するタバコや Ni 合金を使った義歯や補綴材による自発性異常味覚の症例が報告されていることに加え、Ni が酸化ストレスを介した臓器障害を誘発するという生化学的報告もあるが、それらの詳細な病理組織学的検索はない。本研究は、Ni 曝露ラット実験モデルを用いて、味蕾の化学的恒常性維持に関与する小唾液腺の一つとして有郭乳頭溝に開口するエブネル腺の形態学的変化と抗酸化酵素の発現に関する免疫細胞化学的解析を施行したものである。

【材料と方法】 8 週令 (250±30g) のウイスター系雄性ラットに酢酸 Ni を 100 μmol/kg (TDL0 420mg/kg) を腹腔内投与した実験群と酢酸ナトリウム (100 μmol/kg) を腹腔内投与した対照群を 3, 12, および 24 時間後 (両群各 5 匹づつ) に深麻酔下で左心室より 0.1M リン酸緩衝 2% パラホルムアルデヒド (PFA) で灌流固定をしたのち、エブネル腺を含む有郭乳頭領域を採取し、以下の試料を作製した。

- ① 光顕試料: 0.1M リン酸緩衝 4% PFA で再固定したのち、定法に基づいてパラフィン包埋試料を作製し、ヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色を施した。
- ② 透過電顕試料: カルノフスキー固定液で再固定したのち、1% 四酸化オズミウムで後固定を行い、定法に基づいたエポキシ樹脂包埋超薄切片を作製し、酢酸ウランと酢酸鉛で二重染色を施し、JEM-1200EX 型電子顕微鏡で検鏡した。

- ③ 免疫組織化学:①で作製した連続切片(約5 $\mu$ m厚)を、活性酸素種(ROS)曝露の指標となる過酸化脂質代謝産物の一つであるマロンジアルデヒド(MDA)、抗酸化酵素であるグルタチオンペルオキシダーゼ(GPX)、およびグルタチオン-S-トランスフェラーゼ(GST $\mu$ , GST $\pi$ アイソフォーム)に対する特異抗体をそれぞれ一次抗体とした免疫細胞化学を間接酵素抗体法で施行した。
- ④ 擬似カラー法解析:③で作製した試料の免疫陽性反応についてNIH画像解析ソフトウェアによってその反応強度を擬似カラー化して判定した。

#### 【結果】

1. 実験群のHE染色光顕試料において、Ni投与3時間、および12時間後にエブネル腺の腺房細胞に限って多数の空胞が出現したが、24時間後には殆ど消失していた。対照群の腺房細胞にはこのような空胞の一過性出現は全く認められなかった。[図1-A, B, C, およびD]。また、実験群の味蕾にも上記のような形態学変化は観察されなかった [図3-A, およびB]。
2. 超微形態像において、Ni投与3時間後に光顕で認められた空胞は細胞内膜系によって生じた細胞質空胞であることが確認され、24時間後には、多数の残渣小体が細胞質に出現していた [図2-A, およびB]。
3. MDA免疫陽性反応と擬似カラー法による反応強度の判定において、実験群および対照群の腺房細胞のいずれにも免疫陽性反応が認められ、Ni投与3時間後には、反応強度が増加していたが、24時間後には減弱していた。一方、導管細胞には、MDA免疫陽性反応は、両群のいずれの時期にも認められなかった [図4, 5のA, B, C, およびD]。GPXの免疫陽性反応とその擬似カラー法によるその反応強度については、実験群、および対照群の導管細胞のいずれにもその免疫陽性反応を認め、実験群の免疫反応は、3時間後に有意に増強していたが、対照群においては、そのような反応強度の経時的有意差は確認できなかった。一方、腺房細胞のGPXの免疫陽性反応は、両群のいかなる時期にも認められなかった [図6, 7のA, B, C, およびD]。GST $\mu$ 、およびGST $\pi$ の免疫陽性反応についても、GPXに関する所見とほぼ同様の所見が確認された [図8, 9, 10, 11のA, B, C, およびD]。

【考察】Ni投与エブネル腺の腺房細胞において、投与3時間後に多数の細胞質空胞が出現し、その数的増加に相関してMDA免疫陽性反応が有意に増強したことは、腺房細胞がNi誘発の酸化ストレスを受けたことがその主因であることを示している。細胞質空胞の出現は、ROSによる細胞内膜系の脂質代謝異常によるものと考えられ、投与24時間後に二次ライソゾームである残渣小体が増加していたことは、ライソゾーム系が細胞質空胞の処理に関与していることを示唆する。一方、実験群の導管細胞において、実験群のいかなる時期においても、空胞の出現とMDA免疫陽性反応の一過性増強が認められなかったことは、Ni誘発の酸化ストレスによる細胞障害を受けなかったことを示している。抗酸化酵素であるGPX、GST $\mu$ 、およびGST $\pi$ の免疫陽性反応が一過性に増強したことは、導管細胞がNi曝露によっても腺房細胞

が有していない抗酸化酵素による酸化ストレスに対する防御機構を備えていることが明らかとなった。味蕾においても、今回、Ni誘発酸化ストレスによる形態変化が見られなかったことは、我々が過去に報告した味蕾構成細胞の抗酸化酵素の発現によるものと考えられ、さらに、今回の所見は、ラット顎下腺において、導管細胞のみが抗酸化酵素群の発現によって種々の酸化ストレスに対する生体防御機構を有しているという過去の所見にも一致した。

【結論】舌有郭乳頭エブネル腺の導管細胞は、抗酸化酵素群の産生能を有し、Ni曝露によってその産生能を亢進させ、Ni誘発酸化ストレスに対する生体防御機構に働く。

### 論文審査結果の要旨

必須微量元素であるニッケル(Ni)を含有するタバコやNi合金を使った義歯や補綴材による自発性異常味覚の症例が報告されていることに加え、Niが酸化ストレスを介した臓器障害を誘発するという生化学的報告もあるが、それらの詳細な病理組織学的検索はない。本研究は、Ni曝露ラット実験モデルを用いて、味蕾の化学的恒常性維持に関与する小唾液腺の一つとして有郭乳頭溝に開口するエブネル腺の形態学的変化と抗酸化酵素の発現に関する免疫細胞化学的解析を施行したものである。

Ni投与エブネル腺の腺房細胞において、投与3時間後に多数の細胞質空胞が出現し、その数的増加に相関してMDA免疫陽性反応が有意に増強したことは、腺房細胞がNi誘発の酸化ストレスを受けたことがその主因であることを示している。細胞質空胞の出現は、ROSによる細胞内膜系の脂質代謝異常によるものと考えられ、投与24時間後に二次ライソゾームである残渣小体が増加していたことは、ライソゾーム系が細胞質空胞の処理に関与していることを示唆している。一方、実験群の導管細胞において、実験群のいかなる時期においても、空胞の出現とMDA免疫陽性反応の一過性増強が認められなかったことは、Ni誘発の酸化ストレスによる細胞障害を受けなかったことを示している。抗酸化酵素であるGPX、GST $\mu$ 、およびGST $\pi$ の免疫陽性反応が一過性に増強したことは、導管細胞がNi曝露によっても腺房細胞が有していない抗酸化酵素による酸化ストレスに対する防御機構を備えていることを明らかにしたものである。味蕾においても、今回、Ni誘発酸化ストレスによる形態変化が見られなかったことは、過去に報告された味蕾構成細胞の抗酸化酵素の発現によるものと考えられ、さらに、今回の所見は、ラット顎下腺において、導管細胞のみが抗酸化酵素群の発現によって種々の酸化ストレスに対する生体防御機構を有しているという過去の所見にも一致したことを示したものである。

本論文は、ニッケル投与ラットエブネル腺における形態学的変化と抗酸化酵素の発現に関し、新しい知見をもたらしたもので、本学の学位論文として適格であると判断された。

## 最終試験結果要旨

申請者に対して、以下の質問を行った。

1. 有郭乳頭を研究に用いた理由について述べよ。
2. エブネル腺について述べよ。
3. 腺房細胞内の空胞の出現とその後の経過について詳しく述べよ。
4. 抗酸化酵素が腺房細胞ではなく、導管細胞に発現したことに対して考えを述べよ。
5. Nickelの毒性について簡潔に説明せよ。
6. 最近、Nickelは必須微量元素と言われているが、我々の体の、どこに使われているのか説明せよ。
7. Nickelが味覚異常を起こすという報告があれば述べよ。
8. 抗酸化系酵素を調べているが、味覚異常との関連はあるか述べよ。
9. 脂質過酸化反応の指標としてマロンジアルデヒドを定量するが、これを免疫的に発色させる機構を説明せよ。
10. GSH S-transferase の  $\mu$  と  $\pi$  は duct cell で両方ともに強く染まっていることから免疫交差性があるか述べよ。
11. 本研究および本論文作成するにあたり、苦勞したこと、その他感じたことを述べよ。

## 審査結果

以上の研究内容および実験方法などに関する質疑応答がなされ、申請者は質問に対してほぼ的確に回答された。

審査委員合議の結果、本論文の研究内容は新しい知見をもたらしたことにより、最終試験に合格したものと判定した。