

最 終 試 験 の 結 果 の 要 旨

神奈川歯科大学大学院歯学研究科 口腔科学講座 大 西 宏 祐 に
対する最終試験は、主査 森本 佳成 教授、副査 槻木 恵一 教授、
副査 小澤 重幸 講師により、論文内容ならびに関連事項につき口頭試問を
もって行われた。

その結果、合格と認めた。

主 査 森 本 佳 成 教 授

副 査 槻 木 恵 一 教 授

副 査 小 澤 重 幸 講 師

論文審査要旨

ラット顎下腺の腺房、主導管、導管周囲細動脈に分布
する神経活性物質およびシナプトフィジン免疫陽性
神経終末に関する免疫組織化学的研究

神奈川歯科大学大学院歯学研究科

口腔科学講座 大西 宏祐

(指導：高橋 理 教授)

主査 森本 佳成 教授

副査 槻木 恵一 教授

副査 小澤 重幸 講師

論文審査要旨

学位申請論文である「ラット顎下腺の腺房、主導管、導管周囲細動脈に分布する神経活性物質およびシナプトフィジン免疫陽性神経終末に関する免疫組織化学的研究」は、神経活性物質である vasoactive intestinal polypeptide (VIP)、neuropeptide Y (NPY)、5-hydroxytryptamine (5-HT、serotonin) の顎下腺の各部位における局在について調査した論文である。過去の研究で、顎下腺各部位（腺房、主導管、主導管周囲細動脈）や顎下神経節においては多くの神経活性物質の存在が報告されている。免疫組織化学的研究では calcitonin gene-related peptide、substance P、VIP、NPY、enkephalin、5-HT 等の神経活性物質の存在が明らかとなっている。従来、申請者らのグループでは、この中で VIP、NPY、5-HT に着目して、唾液腺の分泌、吸収への関与を調査しており、顎下腺各部位や顎下神経節では VIP、NPY、5-HT の分布があることを報告してきた。本研究は、これら神経活性物質を定量的に評価することで局在を明らかにする目的で行われており、研究目的は明確で高く評価できる。

研究方法の概略は以下のとおりである。

まず、ラット顎下腺の超微構造を観察する目的で、Wistar 系ラットにグルタールアルデヒドとオスミウム酸を用いて固定し、通法に従いラット顎下腺およびその周辺組織の連続切片を作製、顎下腺および周辺組織の正常構造を光学顕微鏡にて解析した。さらに神経終末と神経終末に発現する VIP、NPY そして 5-HT の顎下腺における量的な分布を明らかにするために免疫組織化学的な解析を行った。次に、実験動物をパラホルムアルデヒドにて固定し、顎下腺および周辺組織の連続切片を作製後、切片に VIP、NPY、5-HT、Synaptophysin (SPN) に対する免疫染色を施し、共焦点レーザー顕微鏡にて観察した。二重標識法による組織標本の中から、腺房細胞、主導管上皮細胞、主導管に隣接する細動脈を明瞭に観察できる切片を各 10 枚抽出し、SPN 免疫陽性神経終末に対する二重標識神経終末の割合をそれぞれ算出した。また腺房細胞、主導管上皮細胞、主導管に隣接する細動脈について $2500 \mu\text{m}^2$ の視野を 10 視野抽出し、SPN 免疫陽性神経終末の数を計測し中央値を算出、各部位で比較した。得られた値は Kruskal-Wallis 検定を行った後、post-hoc 検定として Mann-Whitney U 検定を行い、有意水準 5% に Bonferroni の補正を行っており、研究方法および統計学的解析手法は妥当であると判断される。なお、本研究は神奈川歯科大学動物倫理委員会の承認を受け、定められた動物実験指針を遵守して行われており、倫理的な問題はないと判断される。

結果として、

ラット顎下腺の超微構造の観察において、顎下腺腺房部には多くの腺細胞や顆粒管が認められ、それらの間の結合組織には細動脈や有髄の神経線維も観察された。また主導管の上皮は多列上皮より構成され、その直下に多くの毛細血管が存在し、さらに主導管を囲む結合組織中には神経束および細径の有髄神経線維が認められた。またラット顎下

腺における VIP、NPY、5-HT および SPN 免疫陽性神経終末の局在を観察した結果、SPN 免疫陽性神経終末における各種神経活性物質の共陽性を示す比率は、腺房では SPN と NPY の組み合わせが多く、主導管および主導管周囲の細動脈では SPN と VIP の組み合わせが多い結果となった。また神経終末は腺房に最も多く分布し、ついで主導管周囲の細動脈、そして主導管の順であった。

以上より、顎下腺主導管と腺房では投射する神経線維の有する神経活性物質と量的分布が異なるという結論が得られ、それらの局在が明確になった。今後、主導管や腺房部の細胞が発現する受容体の検索および、VIP、NPY、5-HT などの投与による唾液分泌量の変化などを検索することで、さらなる唾液分泌機構の解明につながることを期待される。

本審査委員会は、論文内容および関連事項に関して、以下の口頭試問を行った。

1. 本研究結果が示す新知見について、神経活性物質である VIP、NPY、5-HT が顎下腺各部位（腺房、主導管、主導管周囲細動脈）にどのように分布しているのかを定量的に評価することで局在を明確にしたことであるとの回答が得られた。
2. 本研究は組織化学的研究であるが、臨床の立場からは唾液分泌機能およびその機能障害に興味がある。その立場からの本研究の意義については、腺房部には NPY が、導管および導管周囲細動脈には VIP が多くみられることから、これらは各部位での唾液分泌および蛋白等の分泌に関連していると考えられる。今後は、これら神経活性物質を投与して唾液分泌機能にどのような影響があるのかを調べることにより、臨床の唾液分泌障害の診断や治療に役立つと考えられるとの回答が得られた。
3. 細胞数を測定しているがその具体的な測定方法については、各部位それぞれ切片 10 枚を抽出し、各標識神経細胞を顕微鏡下で目視にてカウントしたとの回答であった。
4. 老化によりこれら神経活性物質の局在や数に変化はあると考えられるのかについては、現在研究中であるが、腺房等の機能が残存していても神経支配が変化する可能性があるかと推測されるとの回答であった。
5. 統計学的観点から、本研究の解析方法について質問が行われた。本研究結果のデータは正規性がないので、中央値（四分位）にて表し、箱ひげ図を用いている。解析は 3 群からなるため Kruskal-wallis 検定で有意差 ($P < 0.05$) をみた後、post-hoc 解析として Mann-Whitney U 検定を行い、Bonferroni の補正にて $P < 0.017$ を有意としているため、適切であると考えられた。

以上、いずれの質問についても十分な回答が得られることを確認した。さらに顎下腺における神経活性物質の局在や分布神経細胞数の新しい知見は、今後の歯科医学および歯科医療の伸展への貢献が期待でき、唾液分泌制御の研究の発展につながるとの結論に

至った。そこで、本審査委員会は申請者が博士（臨床歯学）の学位に十分値するものと認めた。