

(様式4)

学位論文の内容の要旨

(谷口 明慧) 印

Long-term pilocarpine treatment improves salivary flow in irradiated mice.

(長期のピロカルピン投与は照射マウスで唾液分泌を改善する。)

(学位論文の要旨) 2,000字程度、A4判

頭頸部癌治療において、放射線療法は外科療法・薬物療法と並び重要な治療方法の一つである。しかし、副作用として唾液腺機能低下による口腔乾燥症(ドライマウス)が問題となる。唾液分泌量が低下することにより、発音困難・嚥下困難等や齶蝕や歯周病のリスクが高くなり、患者のQOLが著しく低下、場合によっては治療の完遂が困難となる。そこで、対症療法としてピロカルピンを用いている。ピロカルピンは唾液腺腺房細胞のムスカリン受容体を刺激し、一過性に唾液分泌を促進させる。筆者はこのような一過性の効果に加えて、ピロカルピンを長期に服用することで、照射による障害を受けた腺房細胞になんらかの変化が起き、唾液腺機能の回復が図れるのではないかと考えて本研究を実施した。まず、ピロカルピンの長期投与が照射による唾液分泌低下を抑えることができるかを照射マウスで検討した。次にその機序を明らかにすることを目的として、アポトーシスや機能分子の変化について組織化学的な解析をおこなった。

【方法】

雌性ICRマウス30匹を次の3群に10匹ずつランダムに分けた。①CTR群：何もしない、②IRD群：照射を行うがピロカルピンは投与しない、③IRD+Pilo群：照射とピロカルピン投与を共に行う。照射はFaxitron MultiRad 225 (Acrobio社)を用いて、麻酔下に頸部のみ15 Grayの単回照射とした。IRD+Pilo群は照射5日前から照射後62日まで朝夕2回、ピロカルピン塩酸塩水溶液(ピロカルピン塩酸塩として25 µg/回)のゾンデによる経口投与を行った。唾液腺機能を評価するため、唾液分泌量測定を照射後30日と63日の2回行った。唾液分泌量の測定は、過去の文献に従って、ピロカルピン皮下注射後10分間の分泌量を測定し、体重あたりの分泌量として比較した。2回目の唾液分泌量測定の日後に唾液腺(耳下腺・顎下腺)を固定して、パラフィン切片を作製してHE染色と免疫組織化学に用いた。免疫染色は、アポトーシスマーカーとしてcleaved caspase-3、細胞増殖マーカーとしてKi67、唾液分泌に関与する機能分子として、TMEM16A、AQP5、NKCC1について行った。統計学的解析はIBM SPSS Statistics 25を用いて、CTR群とIRD群、IRD群とIRD+Pilo群の比較を、対応のない2群間のt検定で行った。

【結果と考察】

照射後30日、63日いずれの測定においても、CTR群に比べてIRD群で有意に唾液分泌量が低下したことから、照射モデルマウスの作成が確認できた。IRD群とIRD+Pilo群を比較すると、30日、63日ともにIRD+Pilo群で唾液分泌量が有意に高かった。つまり、照射による唾液分泌低下がピロカルピン長期投与によって抑制されることが判明した。

HE染色にて唾液腺の組織変化を検討したところ、IRD群の耳下腺で腺房細胞の減少と間質の線維増加や炎症細胞浸潤が認められた。つまり、照射により耳下腺に器質的变化が起こることがわかった。この変化はIRD+Pilo群にも同様に認められた。照射による顎下腺の変化は耳下腺ほど顕著ではなかった。

次に、照射による腺房細胞の減少はアポトーシスによるもので、ピロカルピン投与によりアポ

トーシスの抑制がみられるのではないかと考えた。そこで、アポトーシスの指標としてcleaved caspase-3の免疫染色をおこない、腺房細胞におけるcleaved caspase-3陽性細胞率を定量して比較をおこなった。各群から4匹の耳下腺と顎下腺を解析した。同時に細胞増殖マーカーとしてKi67も免疫染色をおこない、腺房細胞の陽性率の比較をおこなった。cleaved caspase-3については、耳下腺、顎下腺ともにCTR群とIRD群を比較すると、CTR群に比べてIRD群で有意に陽性細胞率が上昇していた。またIRD群とIRD+Pilo群を比較すると、IRD+Pilo群で陽性細胞率は低下していたが、有意差は見られなかった。一方、Ki67については耳下腺で、CTR群とIRD群を比較すると、CTR群に比べてIRD群で有意に陽性細胞率が上昇していた。IRD群とIRD+Pilo群を比較すると、IRD+Pilo群で陽性細胞率は低下していたが、有意差は見られなかった。顎下腺においては耳下腺と同様の傾向がみられたものの、いずれも有意差はなかった。

さらに腺房細胞の唾液分泌に関連する機能分子として、腺腔面細胞膜からのCl⁻分泌をおこなうTMEM16A、腺腔面細胞膜からの水の分泌をおこなうAQP5、および基底側壁部細胞膜からのCl⁻吸収をおこなうNKCC1について、蛍光抗体染色により細胞内分布や発現量の変化の有無を確認した。定量的な解析は行っていないが、耳下腺、顎下腺ともにCTR群とIRD群で大きな変化は見られず、IRD群とIRD+Pilo群でも大きな変化は見られなかった。従って、照射による唾液分泌量の低下にもピロカルピンによる唾液分泌量の改善にも、これらの機能分子の発現量や細胞内分布の変化が影響していることは考えにくい結果であった。

本研究の結果、照射マウスにおいて、ピロカルピンを長期に投与し続けることで有意に唾液分泌量の低下を抑えられることが明らかとなった。また照射後65日では耳下腺と顎下腺で腺房細胞のアポトーシスが増している、ピロカルピンの長期投与でアポトーシスが抑制される傾向にあったが、統計学的な有意差は認められなかった。