

# マウス唾液腺における高濃度酸素障害の検討

田尻 絢子

(平成 28 年 12 月 7 日受付)

## 緒 言

酸素は生命活動におけるエネルギー産生のものである酸化リン酸化において必須の物質であり、生体にとって不可欠である。一方、取り込まれた酸素の一部は代謝の過程においてスーパーオキシドなどの活性酸素となることが知られている。これら活性酸素は細菌などの異物除去、シグナル伝達調整や転写抑制等、生理学的な役割を担っている反面、反応性の高さから周辺の細胞に障害を与え、その機能に障害を引き起こす危険性がある。通常、これらの活性酸素は多くの活性酸素除去酵素や低分子抗酸化物により除去され、生体は保護されている<sup>1)</sup>。しかし、活性酸素が生体の抗酸化システムを上回ると、脂質過酸化、タンパク質酸化、DNA 損傷、アポトーシスやネクローシスを引き起こすことが知られている

2)。臨床的には酸素療法の副作用として、急性肺障害が知られており、高濃度酸素の肺への影響について多くの研究がなされている<sup>3)</sup>。また、酸素による組織障害に関する実験も多く行われており、高濃度酸素による肺、脳等の組織障害を検討した報告がなされている。肺では高濃度酸素に暴露されると、肺胞鬱血、肺出血、炎症細胞浸潤、肺細胞死が起こり、肺機能の低下を招くことが報告されている<sup>4,5)</sup>。さらに脳では高濃度酸素の暴露によって脳の細胞のアポトーシスが誘発され、脳の発達が阻害されることが報告されている<sup>6)</sup>。臨床的にこのような高濃度酸素に暴露される可能性がある状況に周術期が考えられる。周術期には各臓器の酸素供給を保つために酸素療法が行われるため、高濃度酸素に暴露される機会が極めて多い。しかし近年、これら酸素の為害性が注目され、周術期における高濃度酸素の使用が見直されつつある<sup>7)</sup>。

近年、口腔のケアは口腔環境の維持のみに限らず、感染制御によって肺炎等を予防し全身の健康にも影響を及ぼすことが明らかとなりつつある<sup>8)</sup>。また周術期の口腔のケアによる口腔機能維持が患者の予後を改善したとの報告もされている<sup>9)</sup>。この口腔環境の維持に重要な役割を果たしているものに唾液がある。唾液は食物の摂取時に分泌される消化酵素を含んだ消化液であるが、消化液としての働きの他にも、口腔内の潤滑作用、抗菌・殺菌作用、緩衝作用、保護作用、抗脱灰作用、洗浄作用など多くの役割を担っている。このように唾液は健全な口腔

内環境を維持するために不可欠である<sup>10, 11)</sup>が、周術期等で使用される高濃度酸素は唾液腺機能に対しても悪影響を及ぼす可能性が考えられる。しかし、その影響を検討した研究はこれまでに見受けられない。

そこで本研究は高濃度酸素が唾液腺機能に及ぼす影響を動物実験により検討した。

## 材料と方法

本研究は岡山大学動物実験委員会の指針に従い、同委員会の承認（No.OKU-2014139）を得て行った。

### 1. 動物

30週令 C57BL/6J 雄系マウス（日本エスエルシー株式会社，静岡，日本）を使用した。また今回の研究では唾液腺として顎下腺を使用した。

### 2. 高濃度酸素環境

高濃度酸素による飼育には専用のアニマルチャンバー（BioSperix, NY, USA）および酸素コントローラー ProOx110（BioSperix）を用いた。さらに余剰の二

酸化炭素を除去するためにチャンバー内に GRACE SODASORB LF（スミスメディカルジャパン，東京，日本）を設置した。75%の酸素濃度で 5 日飼育する群を高濃度酸素群、21%の酸素濃度で 5 日飼育する群を対照群とした。唾液量測定実験の前日以外は飼料、水ともに自由に摂取できる状態にした。

### 3. 定量リアルタイム-PCR

イソフルラン（アッヴィ合同会社，東京，日本）による麻酔の後、頸椎脱臼により屠殺し、大脳皮質、肺、顎下腺、舌、肝臓、腎臓を摘出した。各組織に TRIzol Reagent（Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA）を加え氷上にて粉碎した後クロロホルムを加えた。遠心分離し水層を回収した後、2-プロパノールおよび Glycogen（Roche, Basel, Switzerland）を加え、RNA を沈殿させた。得られた RNA を 80%エタノールで洗浄し、Nuclease-Free Water（Promega, Madison, USA）に溶解させた。その後 QuantiTect Reverse Transcription Kit（Quiagen, Venlo, The Netherlands）を用いて逆転写反応を行い、cDNA を合成した。得られた cDNA を試料として SYBR Premix Ex Taq II（タカラバイオ株式会社, 滋賀, 日本）を加え、Real-Time PCR Detection System (BIO-RAD, CA, USA) を使用し定量リアルタイム PCR を行い、HO-1 (Heme oxygenase-1)、SOD-1 (Superoxide dismutase-1)、SOD-2 (Superoxide dismutase-2)、

IL-6 (Interleukin-6)、TNF $\alpha$  (Tumor necrosis Factor  $\alpha$ ) の遺伝子発現を定量した。また  $\beta$ -actin 発現量を内部標準として用いた。使用した PCR プライマーを表に示す (表 1)。

表 1

#### 4. 組織学的観察

顎下腺を摘出後、通法に従い、ホルマリンで固定した。4  $\mu$ m パラフィン切片を作成し、HE 染色、Alcian Blue 染色を行った。さらに同様の切片を使用し、In situ Apoptosis Detection Kit (タカラバイオ株式会社) にて、TdT-mediated dUTP nick end labeling (TUNEL) 染色を行い、光学顕微鏡を用いて組織学的検討を行った。TUNEL 陽性細胞の出現頻度について、Image J を用いて 1000  $\mu$ m<sup>2</sup> あたりの TUNEL 陽性細胞の数を比較した。同一切片中が無作為に 4 視野を選び、平均値を算出することで評価した。また、カウントはそれぞれの画像が高濃度酸素群であるか対照群であるかを第三者がブラインド化し行った。

#### 5. 唾液量測定

唾液量の測定は過去の研究報告に従って行った<sup>12, 13, 14, 15)</sup>。

唾液採取実験の前日から絶食とした。ペントバルビタール (共立製薬株式会社, 東京, 日本) 40.0 mg/kg の腹腔内投与により全身麻酔を行った後、塩酸ピロカ

ルピン（大塚製薬株式会社，東京，日本）1.0 mg/kg を皮下注射した。投与時点を唾液測定開始時間とし、事前に重さを計測しておいたコットンボールを口腔内に挿入して 30 分間唾液を採取した。測定終了後、唾液の重さを計測し各マウスの体重で標準化したものを唾液分泌量とした。

## 6. 唾液成分分析

唾液量の測定と同様に唾液採取実験の前日から絶食とし、ペントバルビタール（40.0 mg/kg）腹腔内投与後、塩酸ピロカルピン（1.0 mg/kg）を皮下注射した。塩酸ピロカルピン投与直後よりマイクロピペット用いて口腔内から 30 分間唾液を採取した。採取した唾液中のタンパク質量およびアミラーゼ量をそれぞれ Comassie Plus (Bradford) Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA)、Salivary  $\alpha$ -Amylase Kinetic Enzyme Assay Kit (SALIMETRICS, S.F., USA) を用いて測定した。

## 7. Aquaporin 5(AQP5)の免疫染色およびウエスタンブロッティング

### 1) 免疫染色

摘出した顎下腺を 4% paraformaldehyde (PFA) で 4 時間固定した後、PBS・10%および 20%スクロース溶液でそれぞれ 2 時間インキュベーション後さらに、

PBS・30%スクロース溶液で一晩インキュベーションした。その後 O.C.T.Compound (サクラファインテックジャパン株式会社, 東京, 日本) で凍結・包埋し、7 $\mu$ m の凍結切片を作成した。

凍結切片を Block Aid Blocking Solution (Thermo Fisher Scientific) でブロッキング後、一次抗体として Anti-Aquaporin 5 rabbit ポリクローナル抗体 (Merck Millipore, Darmstadt, Germany) (1:100)、次に2次抗体として anti-Rabbit IgG secondary Antibody Alexa Fluor 488 (Thermo Fisher Scientific) (1:400) を用いた。さらに NucBlue Fixed cell Ready Probes Reagent (Thermo Fisher Scientific) を用いて核を染色し、共焦点レーザー顕微鏡 LSM780 (ZEISS, Oberkochen, Germany) で観察した。

## 2) ウェスタンブロット

顎下腺を摘出、粉碎後、complete LysisM, EDTA-free (Roche) を用いてタンパク抽出し、Comassie Plus (Bradford) Assay Kit (Thermo Fisher Scientific) を用いてタンパク濃度を測定し、一定量に調整しウェスタンブロット解析試料とした。ウェスタンブロットには NuPAGE (Thermo Fisher Scientific) システムを用い、指定の方法に従い Immobilon Transfer Membranes Immobilon-P (Merck Millipore) に転写を行った。転写後のメンブレンを skim milk でブロ

ッキングした後、anti-AQP5 (1 : 5000) と anti- $\beta$  actin (1 : 5000) と 4°C環境で一晩反応させ、洗浄後、2次抗体として Anti-Rabbit IgG HRP-linked Whole Ab Donkey (GE ヘルスケア・ジャパン株式会社、東京、日本) (1 : 1000) を室温で1時間反応させた。洗浄後 ECL Prime Western Blotting Detection Reagent (GE ヘルスケア・ジャパン株式会社) にて反応させ、CCD カメラタイプ画像解析装置 (ImageQuant LAS4000、GE Healthcare、UK) を用いて、各タンパク質の検出を行った。

## 8. 統計解析

リアルタイム-PCR から得られた各遺伝子の発現量、TUNEL 陽性細胞数、唾液の総量、AQP5 タンパク発現量、唾液中のタンパク量、唾液中のアミラーゼ量については対応のない  $t$  検定を用いて比較した。p 値が 0.05 未満を有意差ありとした。時系列に伴う唾液量の変化については二元配置分散分析を用い、p 値が 0.05 未満を有意差ありとした。Post-hoc テストには Bonferroni を用いて p 値が 0.01 未満で有意差ありとした。

## 結 果



### 1. 高濃度酸素飼育が各臓器の HO-1 遺伝子発現に与える影響

75%、5 日間の高濃度酸素環境が各種臓器に及ぼす酸化ストレスの影響を酸化ストレスマーカーである HO-1 の遺伝子発現により検討した (図 1)。定量リアルタイム-PCR 法を用いて HO-1 遺伝子の発現を定量したところ、今回採取した 6 つの組織 (脳, 舌, 顎下腺, 肺, 肝臓, 腎臓) の中では肺、顎下腺、腎臓において、HO-1 発現量が有意に増加していた。

図 1

### 2. 高濃度酸素環境が顎下腺の酸化関連遺伝子および炎症関連遺伝子発現に与える影響

さらに高濃度酸素環境が顎下腺に与える影響を酸化ストレスマーカーである SOD-1、SOD-2、炎症反応のマーカーである IL-6、TNF $\alpha$  の遺伝子発現により検討した (図 2)。同様に定量リアルタイム-PCR 法を用いて遺伝子発現量を比較したところ、高濃度酸素群では対照群と比較して SOD-1、SOD-2 の発現量が有意に増加していた。しかしながら、IL-6、TNF $\alpha$  の発現量に有意差はなかった。

図 2

### 3. 高濃度酸素環境下で飼育したマウス顎下腺の組織学的観察

対照群と高濃度酸素群の顎下腺を、各種染色法を用いて組織学的に検討した

(図 3)。H・E 染色では高濃度酸素群において腺房の拡大が観察された。さらに Alcian Blue 染色では高濃度酸素群において青色に好染する酸性粘液多糖類の増加を認めた。

図 3

TUNEL 染色では高濃度酸素群において TUNEL 陽性細胞の出現を認めた(図 4-a)。TUNEL 陽性細胞の定量を行うため 1000 $\mu\text{m}^2$ あたりの TUNEL 陽性細胞の数を計測したところ高濃度酸素群では  $1.89\pm 0.73$  個、対照群では  $0.67\pm 0.57$  個であり、高濃度酸素群において有意に増加を認めた (図 4-b)。

図 4

#### 4. 高濃度酸素環境が唾液分泌量に及ぼす影響の検討

唾液量はマウスの体重で標準化した。高濃度酸素群 ( $27.22\pm 2.0$  g) と対照群 ( $25.44\pm 1.9$  g) では体重に有意差は認められなかった (図 5)。塩酸ピロカルピン投与による刺激唾液の量を高濃度酸素群と対照群で比較したところ、塩酸ピロカルピン投与後、5 分、10 分において高濃度酸素群の唾液分泌量は対照群と比較して有意に減少していた。さらに塩酸ピロカルピン投与後 30 分間の唾液総量の比較を行ったが、高濃度酸素群では  $13.3\pm 2.1$  mg、対照群で  $17.6\pm 0.9$  mg であり唾液の総量についても高濃度酸素群では唾液分泌量が有意に減少した

図 5

#### 5. 高濃度酸素環境による唾液成分変化

高濃度酸素環境による唾液成分への影響を検討するため、唾液中のタンパク質および唾液中のアミラーゼの濃度を測定した（図 6）。塩酸ピロカルピン皮下注射後 30 分間の総唾液中のタンパク濃度に有意な変化は認められなかったものの、塩酸ピロカルピン皮下注射後 15 分間の唾液においては有意な増加を認めた。さらにアミラーゼの濃度についても塩酸ピロカルピン皮下注射後 15 分間および 30 分間共に唾液中のアミラーゼ濃度は有意に増加していた。

図 6

## 6. Aquaporin 5 (AQP5) 発現量の変化

上記の結果より高濃度酸素下での飼育により、唾液の漿液成分の分泌が特に抑制されている可能性が示唆された。そこで唾液の水分泌に関与している水チャネルである AQP5 の発現について免疫染色およびウエスタンブロッティングを行い比較した（図 7）。しかしながら、免疫組織においては AQP5 発現量、発現部位において高濃度酸素飼育による明らかな変化は認めなかった（図 7-a）。さらにウエスタンブロット法にて AQP5 のタンパク発現量を検討したが、有意な差は認めなかった（図 7-b, c）。

図 7

考 察

本研究からマウスを高濃度酸素環境下で飼育することにより唾液腺に酸化ストレスが誘発され、唾液腺機能を低下させる可能性が明らかとなった。

本研究では酸化ストレスマーカーとしてHO-1、SOD-1、SOD-2の遺伝子発現を検討した。HO-1はヘムや金属、酸化剤、紫外線、放射線、内毒素やサイトカインに誘導され発現し、ヘムを分解し、抗酸化能を有するビリベルジンに変換し、酸化ストレスに対する細胞障害抑制効果をもたらす酵素である<sup>16)</sup>。またSODは強力な酸化物質であるスーパーオキシドを除去する酵素であり、酸化ストレスにより誘導され、細胞保護に働くことが知られている<sup>17)</sup>。そのためHO-1、SOD-1、SOD-2の発現はその組織に酸化ストレスが加わったことを意味する。本研究では、まずHO-1の発現を指標に各臓器の酸化ストレスの受けやすさを検討した。その結果、肺、腎臓、顎下腺で有意にHO-1の発現が増加したが、舌、脳、肝臓では増加は認められず、顎下腺はこれら臓器と比較して酸化ストレスを受けやすい臓器であった。臓器によって感受性に違いがある障害としてよく知られているものに放射線障害がある<sup>18)</sup>。一般に細胞レベルでは細胞周期が早いほどまた形態および機能が未分化なものほど放射線の影響を受けやすく、その障害の程度も強いとされている。唾液腺は細胞周期は早くないものの放射線障害を受けやすい臓器として知られている<sup>19)</sup>。放射線障害の病態

には活性酸素種 (Reactive Oxygen Species: ROS) の産生など酸化ストレスが深く関連しており<sup>20)</sup>、これらからも唾液腺は他の臓器と比べて酸化ストレスを受けやすい臓器である可能性が示唆出来る。

さらに本研究では、高濃度酸素下で飼育を行う事により塩酸ピロカルピン投与による刺激唾液の分泌量が有意に減少した。同様に唾液分泌量が減少する病態に、加齢変化、シェーグレン症候群、放射線障害等が挙げられる。

唾液腺の加齢変化については、10 週令、30 週令、90 週令のマウスの唾液腺の機能を比較した研究がある。これによると 90 週令の老齢マウスの唾液腺においては組織学的に唾液腺腺房細胞の萎縮、細胞質の空胞形成、リンパ球浸潤、ムチンの減少、TUNEL 染色でのアポトーシス陽性細胞の増加を認め、10 週令、30 週令のものと比較して唾液流出時間の延長、唾液量の減少を認めたと報告されている<sup>21)</sup>。またシェーグレン症候群では、組織学的特徴として唾液腺腺房細胞の破壊とリンパ球浸潤、TUNEL 陽性細胞の増加が挙げられる<sup>22, 23)</sup>。さらに放射線障害では細胞質の空胞形成、TUNEL 陽性細胞の増加、リンパ球浸潤を認めたと報告されている<sup>24)</sup>。また歯周炎モデルラットにおいても唾液分泌が減少することが報告されており<sup>25)</sup>、この歯周炎モデル動物においては唾液腺の TUNEL 陽性細胞の増加、細胞質の空胞形成とともに DNA 酸化損傷マーカーである 8-ヒドロキシデオキシグアノシン (8-OHdG) の増加が報告されている

26)。

これら唾液分泌が減少する病態における組織の特徴として細胞質の空胞形成、TUNEL 陽性細胞の増加、リンパ球浸潤が報告されている。今回我々が検討した高濃度酸素飼育では唾液腺の腺房の拡大、酸性粘液多糖類の貯留、TUNEL 陽性細胞の増加という組織学的な変化を認めた。しかし、他の病態で共通して認められたような唾液腺腺房細胞の萎縮や破壊、細胞質の空胞形成および炎症細胞の浸潤などの炎症所見は認められなかった。さらに今回の研究では炎症性マーカーである IL-6 や TNF $\alpha$  の唾液腺での遺伝子発現を定量リアルタイム-PCR 法で検討したが、その発現量に有意な増加は認められず、炎症反応を示唆する結果は得られなかった。このように高濃度酸素は唾液腺に障害を加えるものの、加齢変化やシェーグレン症候群、放射線障害とは異なった病態である可能性が示唆された。

今回、高濃度酸素群の組織で腺房細胞の拡大とともに酸性粘液多糖類の貯留を認めたが、これは分泌される唾液成分に何らかの変化がある可能性を示唆する組織像であった。そこで唾液成分の変化について唾液中のタンパク濃度およびアミラーゼの濃度を測定することで検討したが、とりわけ塩酸ピロカルピン投与後 15 分間の唾液ではタンパクおよびアミラーゼの濃度がともに増加していた。また、これは今回検討した唾液の分泌量低下の時系列とほぼ同じであった。

また、安静時唾液、刺激唾液どちらにおいても唾液中のタンパク濃度と唾液の粘度に相関関係があるという報告もあり<sup>27)</sup>、高濃度酸素飼育により漿液性唾液の分泌量が減少し、相対的に唾液の粘度が上昇した可能性が考えられた。

これらを検証するために、近年、唾液の水分泌を調整する因子として注目されている水チャネルの一つであるAQP5の発現について検討を加えた。このAQP5ノックアウトマウスでは唾液分泌量の減少、唾液の粘調度の増加、腺房細胞の拡大が報告されており、AQP5は腺房細胞内の水の透過性調節の主要経路、漿液性唾液の分泌機構に関与していることが示唆されている<sup>28, 29, 30)</sup>。今回の高濃度酸素飼育による唾液腺の変化はこのAQP5のノックアウトマウスの表現系と極めて類似していた。しかしながら、免疫染色、ウェスタンブロット法によりAQP5の発現を比較検討したが、有意な差は認められなかった。

その他の唾液中のタンパク濃度が上昇した機序として高濃度酸素により唾液腺におけるタンパク合成自体が促進された可能性も考えられる。唾液腺におけるタンパク合成、タンパク分泌には唾液腺細胞内の分泌顆粒の働きが関与しており<sup>31)</sup>、分泌顆粒の変化については今後検討する必要があると思われる。

唾液分泌が減少したメカニズムとして唾液腺の循環変化やムスカリン受容体等の感受性変化についても考える必要がある。Elverdinら<sup>32)</sup>は低濃度酸素環境で28日間飼育したラットにおいて、唾液腺周囲の血管が増加するという報告し

ている。また同様に、低濃度酸素環境で 28 日間飼育したラットにおいてムスカリン受容体の薬剤感受性低下による唾液分泌量の減少を認めたという報告もあり<sup>33)</sup>、酸素濃度の変化は血管新生などの反応性変化や受容体感受性にも影響を与えている可能性がある。

## 結 語

本研究では高濃度酸素が唾液腺へ及ぼす影響を、マウスを用いた動物実験により検討した。その結果、高濃度酸素の暴露によりマウス顎下腺には HO-1、SOD-1、SOD-2 といった酸化ストレスマーカーの遺伝子発現の増加が有意に認められた。また、その他の臓器との比較により顎下腺は比較的酸化ストレスを受けやすい臓器であることが示唆された。また、高濃度酸素の暴露により唾液腺腺房の拡大、腺房への酸性粘液多糖類の貯留、TUNEL 陽性細胞の出現といった組織学的変化が観察された。さらに高濃度酸素への暴露により塩酸ピロカルピン誘発による唾液分泌量は減少した。高濃度酸素は唾液腺機能を低下させる可能性があるが、組織像の特徴が異なることや炎症所見が見られないことから、加齢変化やシェーグレン症候群、放射線障害による唾液分泌量低下とは異なった病



態である可能性が示唆された。同唾液のタンパク質およびアミラーゼの濃度は上昇しており、唾液成分にも変化がみられた。しかしながら、本研究ではこの高濃度酸素による唾液腺の機能障害の詳細なメカニズムについては明らかに出来ておらず、今後の検討課題である。

本研究より、高濃度酸素は唾液腺機能を低下させる可能性が示唆された。このことから周術期などで高濃度酸素に暴露されている患者の唾液分泌は減少している可能性があり、口腔のケアを行う際には、その病態を考慮することで、さらに口腔環境の改善をはかることが期待できる。

## 謝 辞

稿を終えるにあたり、本研究を行う貴重な研究機会を与えていただき、ご指導、ご校閲を賜りました岡山大学大学院医歯薬学総合研究科歯科麻酔・特別支援歯学分野の宮脇卓也教授に心より感謝の意を表します。また、本研究を行うにあたり、貴重なご助言をいただきました岡山大学病院歯科麻酔科の先生方に深くお礼を申し上げます。

## 参考文献

- 1) Sinha, K., Das, J., Pal, P. B. and Sil, P. C.: Oxidative stress: the mitochondria-dependent and mitochondria-independent pathways of apoptosis. *Arch. Toxicol.*, **87**, 1157-1180, 2013.
- 2) Yu, S., Shi, M., Liu, Q. Guo, J., Yu, S. and Jiang, T.: Time course change of oxidative stress and inflammation in hyperoxia – induced acute lung injury in rats. *Iranian J. Basic Med. Sci.*, **18**, 98-103, 2015.
- 3) Koeppen, M., McNamee, E.N., Brodsky, K.S., Aherne, C.M., Faigle, M., Downey, G.P., Colgan, S.P., Evans, C.M., Schwartz, D.A. and Eltzschig, H.K.: Detrimental role of the airway mucin Muc5ac during ventilator-induced lung injury. *Mucosal Immunol.*, **6**, 762-775, 2013.
- 4) Pagano, A. and Argiroffo, C.B.: Alveolar cell death in hyperoxia – induced lung injury. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **1010**, 405-416, 2006.
- 5) Nagato, A.C., Bezerra, F.S., Lanxetti, M. Lopes, A.A., Silva, M.A.S., Porto, L.C. and Valenca, S.S.: Time course of inflammation, oxidative stress and tissue damage induced by hyperoxia in mouse lungs. *Int. J.*

- Exp. Path.* **93**, 269-278, 2012.
- 6) Felderhoff-Mueser, U., Bittigau, P., Sifringer, M., Jarosz, B., KoroBowicz, E., Mahler, L., Piening, T., Moysich, A., Grune, T., Thor, F., Heumann, R., Buhner, C. and Ikonomidou, C.: Oxygen causes cell death in the developing brain. *Neurobiol. Dis.*, **17**, 273-282, 2004.
  - 7) Habre, W. and Petak, F.: Perioperative use of oxygen: variabilities across age. *Br. J. Anaesth.*, **113**, ii26-ii36, 2014.
  - 8) Yoneyama, T., Yoshida, M., Matsui, T., Sasaki, H. and the Oral Care Working Group: Oral care and pneumonia. *Lancet*, **354**, 515, 1999.
  - 9) Akutsu, Y., Matsubara, H., Shuto, K., Shiratori, T., Uesato, M., Miyazawa, Y., Hoshino, I., Murakami, K., Usui, A., Kano, M. and Miyauchi, H.: Pre-operative dental brushing can reduce the risk of postoperative pneumonia in esophageal cancer patients., *Surgery*, **147**, 497-502, 2010.
  - 10) Humphrey, S.P. and Williamson, R.T.: A review of saliva: Normal composition, flow, and function. *J. Prosthet. Dent.*, **85**, 162-169, 2001.
  - 11) Frenkel, E. S. and Ribbeck, K.: Salivary mucins in host defense and disease prevention. *J. Oral Microbiol.*, **7**, 29759-29768, 2015.

- 12) Matsui, M., Motomura, D., Karasawa, H., Fujikawa, T., Jiang, J., Komiya, Y., Takahashi, S. and Maketo, M.: Multiple functional defects in peripheral autonomic organs in mice lacking muscarinic acetylcholine receptor gene for the M3 subtype. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **97**, 9579-9584, 2000.
- 13) Nakamura, T., Matsui, M., Uchida, K., Futatsugi, A., Kusakawa S., Matsumoto, N., Nakamura, K., Manabe, T., Taketo, M. and Mikoshiba, K.: M3 muscarinic acetylcholine receptor plays a critical role in parasympathetic control of salivation in mice. *J. Physiol.*, **558**, 561-575, 2004.
- 14) Gautam, D., Heard, T., Cui, Y., Miller, G., Bloodworth L. and Wess, J.: Cholinergic Stimulation of Salivary Secretion Studied with M1 and M3 Muscarinic Receptor Single – and Double – Knockout Mice. *Mol. Pharmacol.*, **66**, 260-267, 2004.
- 15) Iida, T., Ono, K., Inagaki, T., Hosokawa, R. and Inenaga, K.: Nicotinic receptor agonist-induced salivation and its cellular mechanism in parotid acini of rats. *Auton. Neurosci.*, **161**, 81-86, 2011.
- 16) Mantell, L. L. and Lee, P. J.: Signal transduction pathways in

- hyperoxia – induced lung cell death. *Mol. Genet. Metab.*, **71**, 359-370, 2000.
- 17) Zaghloul, N., Nasim, M., Patel, H., Codipilly, C., Marambaud, P., Dewey, S., Schiffer, W.K. and Ahmed, M.: Overexpression of extracellular superoxide dismutase has a protective role against hyperoxia-induced brain injury in neonatal mice. *FEBS J.*, **279**, 871-881, 2012.
- 18) David, B. Busch: Radiation and chemotherapy injury: Pathophysiology, diagnosis, and treatment. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.*, **15**, 49-89, 1993.
- 19) Antonius, W., T., K., Rob, P., C. and Arjan, V.: On the mechanism of salivary gland radiosensitivity. *Int. J. Radiation Oncology Biol. Phys.*, **62**, 1187-1194, 2005.
- 20) Lee, J. H., Lee, Y. M. and Park. J.-W.: Regulation of ionizing radiation-induced apoptosis by a manganese porphyrin complex., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **334**, 298-305, 2005.
- 21) Choi, J.S., Park, I.S., Kim, S., Lim, J.Y. and Kim, Y.M.: Analysis of age-related changes in the functional morphologies of salivary glands in mice. *Arch. Oral Biol.*, **58**, 1635-1642, 2013.
- 22) Ishimaru, N., Yoneda, T., Saegusa, K., Yanagi, K., Haneji, N.,

- Moriyama, K., Saito, I. and Hayashi, Y.: Severe Destructive Autoimmune Lesions with Aging in Murine Sjogren's Syndrome through Fas-Mediated Apoptosis. *Am. J. Pathol.*, **156**, 1557-1654, 2000.
- 23) Fox, R.I.: Sjogren's syndrome *Lancet*, **366**, 321-331, 2005.
- 24) Muhvic-Urek, M., Bralic, M., Curic, S., Pezelj-Ribaric, S., Borcic, J. and Tomac, J.: Imbalance between Apoptosis and Proliferation Causes Late Radiation Damage of Salivary Gland in Mouse. *Physiol. Res.*, **55**, 89-95, 2006.
- 25) Nakamura-Kimura, M., Ono, K., Masuda, W., Hitomi, S., Matsuo, K., Usui, M., Nakashima, K., Yokota, M. and Inenaga, K.: Changes of salivary functions in experimental periodontitis model rats. *Arch. Oral Biol.*, **59**, 125-132, 2014.
- 26) Ekuni, D., Endo, Y., Irie, K., Azuma, T., Tamaki, N., Tomofuji, T. and Morita, M.: Imbalance of oxidative/anti-oxidative status induced by periodontitis is involved in apoptosis of rat submandibular glands. *Arch. Oral Biol.*, **55**, 170-176, 2010.
- 27) Inoue, H., Ono, K., Masuda, W., Inagaki, T., Yokota, M. and Inagawa, K.: Rheological Properties of Human Saliva and Salivary Mucins.

- J. Oral Biosci.*, **50**, 134-141, 2008.
- 28) Ma, T., Song, Y., Gillespie, A., Carlson, E. J., Epstein, C. J. and Verkman, A.S.: Defective Secretion of Saliva in Transgenic Mice Lacking Aquaporin-5 Water Channels. *J. Biol. Chem.*, **274**, 20071-20074, 1999.
- 29) Krane, C. M., Melvin, J. E., Nguyen, H.V., Richardson, L., Towne, J. E., Doetschman, T. and Menon, A.G.: Salivary Acinar Cells from Aquaporin 5-deficient Mice Have Decreased Membrane Water Permeability and Altered Cell Volume Regulation. *J. Biol. Chem.*, **276**, 23413-23420, 2001.
- 30) Kawadia, J.D., Nieman, M.L., Boivin, G.P., Melvin, J.E., Kikuchi, K., Hand, A.R., Lorenz, J.N. and Menson, A.G.: Interaction between transcellular and paracellular water transport pathways through Aquaporin 5 and the tight junction complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **104**, 3621-3626, 2007.
- 31) Turner, R. J., Sugiya, H.: Understanding salivary fluid and protein secretion. *Oral Diseases*, **8**, 3-11, 2002.
- 32) Scott, J. and Gradwell, E.: A quantitative study of the effects of chronic

hypoxia on the histological structure of the rat major salivary glands.

*Arch. Oral Biol.*, **34**, 315-319, 1989.

- 33) Elverdin, J.C., Ghiarenza, A.P., Frid, A.B. and Giglio, M.J.: Effect of chronic hypoxia on the secretory responses of rat salivary glands. *Arch.*

*Oral Biol.*, **40**, 459-462, 1995.



表題脚注

岡山大学大学院医歯薬学総合研究科  
機能再生・再建科学専攻  
口腔・顎・顔面機能再生制御学講座  
歯科麻酔・特別支援歯学分野  
(指導：宮脇卓也教授)

## 図の説明

### 図 1 全身組織の HO-1 発現量の比較 (定量リアルタイム-PCR)

(A) 大脳皮質, (B) 肺, (C) 顎下腺, (D) 肝臓, (E) 舌, (F) 腎臓

それぞれの HO-1 発現量を  $\beta$ -actin 発現量で標準化した。

対照群, n=6; 高酸素群: 高濃度酸素群, n=6

\*\*p<0.01, \*\*\*p<0.0001

### 図 2 顎下腺の遺伝子発現量の比較 (定量リアルタイム PCR)

(A) SOD-1, 対照群, n=4 ; 高酸素群: 高濃度酸素群, n=4

(B) SOD-2, 対照群, n=4 ; 高酸素群: 高濃度酸素群, n=4

(C) IL-6, 対照群, n=8 ; 高酸素群: 高濃度酸素群, n=10

(D) TNF $\alpha$ , 対照群, n=6 ; 高酸素群: 高濃度酸素群, n=6

それぞれの遺伝子発現量を  $\beta$ -actin 発現量で標準化した。

\*p<0.05, \*\*p<0.01,

### 図 3 顎下腺の組織学的観察

A: 対照群 H-E 染色

B: 高濃度酸素群 H-E 染色, 唾液腺腺房の拡大 (\*) を認めた。

C: 対照群 Alcian Blue 染色

D: 高濃度酸素群 Alcian Blue 染色, 唾液腺腺房に酸性粘液多糖類の貯留 (矢頭) を認めた。

#### 図 4 TUNEL 染色

(a) TUNEL 染色

A: 対照群 TUNEL 染色

B: 高濃度酸素群 TUNEL 染色, TUNEL 陽性細胞 (矢印) を認めた。

(b) 面積 (1000 $\mu\text{m}^2$ ) あたりの TUNEL 陽性細胞数

対照群, n=5; 高酸素群: 高濃度酸素群, n=5

\*p<0.05

#### 図 5 塩酸ピロカルピン投与後の唾液分泌量

唾液分泌量は各マウスの体重で標準化した。

(A) 時間経過における比較

対照群, n=5; 高酸素群: 高濃度酸素群, n=5

\*\*p<0.01, \*\*\*p<0.0001

(B) 30 分間の唾液総量

対照群, n=5; 高酸素群: 高濃度酸素群, n=5

\*\*p<0.01

## 図 6 塩酸ピロカルピン投与後の唾液成分の変化

(A) 0-30 分での唾液中の平均タンパク質量, 対照群, n=9; 高酸素群: 高濃度酸素群, n=8

(B) 0-15 分での唾液中の平均タンパク質量, 対照群, n=9; 高酸素群: 高濃度酸素群, n=8

(C) 15-30 分での唾液中の平均タンパク質量, 対照群, n=9; 高酸素群: 高濃度酸素群, n=8

(D) 0-30 分での唾液中の平均アミラーゼ量, 対照群, n=9; 高酸素群: 高濃度酸素群, n=7

(E) 0-15 分での唾液中の平均アミラーゼ量, 対照群, n=9; 高酸素群: 高濃度酸素群, n=7

(F) 15-30 分での唾液中の平均アミラーゼ量, 対照群, n=9; 高酸素群: 高濃度酸素群, n=9

\*p<0.05, \*\*p<0.01

図 7 AQP5 (Aquaporin 5) 発現量

(a) 顎下腺における AQP5 の免疫蛍光染色

A: 対照群, 核

B: 対照群, AQP5

C: 対照群, A, B 重ね合わせ像

D: 高濃度酸素群, 核

E: 高濃度酸素群, AQP5

F: 高濃度酸素群, D, E 重ね合わせ像

(b-1, 2) ウェスタンブロットによる AQP5 の発現量の比較

対照群, n=6, 高酸素群: 高濃度酸素群, n=6