



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	液状食飼育がラット口蓋腺に与える影響に関する組織学的および免疫組織化学的研究
Author(s)	弓削, 文彦; 高橋, 茂; 土門, 卓文 他
Citation	北海道歯学雑誌, 33(2), 160-167
Issue Date	2013-03
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/52454
Type	journal article
File Information	11-yuge.pdf



原 著

液状食飼育がラット口蓋腺に与える影響に関する組織学的 および免疫組織化学的研究

弓削 文彦¹⁾ 高橋 茂²⁾ 土門 卓文²⁾ 大畑 昇¹⁾

抄 録：現代人の食習慣では柔らかい食品が好んで摂取される傾向がある。このような食習慣が口腔諸組織にどのような影響を与えるかを明らかにするため、実験的研究が行われてきた。液状食飼育されたラット耳下腺に関しては腺の萎縮、腺房細胞の縮小、細胞増殖活性の低下、アポトーシスの増加などが報告されている。一方、大唾液腺とは異なり、小唾液腺に関する報告は見られない。本研究では代表的な小唾液腺である口蓋腺が液状食飼育によりどのような影響を受けるのかを組織学的、免疫組織化学的に検索した。実験には7週齢のWistar系雄性ラットを使用した。対照群には固形食、実験群には液状食を1週～8週間与えた。飼育期間を終了した動物には5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) を腹腔内投与し、4%パラホルムアルデヒド灌流固定後口蓋腺を含む上顎を摘出した。10% EDTAにて脱灰し、正中面にて切り出した試料をパラフィン包埋し、正中面から側方に向かって連続薄切した。切片にはヘマトキシリン-エオジン染色 (HE)、過ヨウ素酸シッフ染色 (PAS)、アルシアンブルー染色 (AB) を行うとともに、口蓋腺の高径、長径、幅径を計測した。腺房細胞の増殖活性を調べるためにBrdU免疫染色、アポトーシスの検索のためにCaspase-3免疫染色を行った。対照群の口蓋腺は殆どが粘液性腺房からなり、細胞質はPAS、ABに陽性を示す粘液様物質で満たされていた。実験群でも同様の組織像で、腺房細胞の収縮やPASおよびABに対する染色強度の差異は観察されなかった。また口蓋腺の高径、長径、幅径は各週において両群間に差はなかった。BrdU陽性腺房細胞はいずれの標本においても観察されたが、各週の両群間には陽性細胞数の有意差は認められなかった。Caspase-3陽性細胞は両群共にどの週においても極めて少なかった。以上の結果より、ラット口蓋腺は液状食飼育の影響を受けず萎縮性変化を示さないことが明らかになった。

キーワード：液状食飼育、口蓋腺、組織計量、免疫組織化学

諸 言

飽食の時代を迎え、私たちの食べ物の嗜好も変化している。特に若い世代はファーストフード等の柔らかい食品を好む傾向にある^{1, 2)}。一方、高齢者においては歯の喪失や全身疾患などによる咀嚼、嚥下機能の低下に配慮し、ミキサー食、刻み食、ソフトフードなどが食べられており、このような食物は多くの高齢者にとって安全な食事形態の一つと考えられている³⁾。このように様々な年代において柔らかい食品をとる機会が増えてきたことから、口腔関連諸組織に対する影響が懸念されるようになってきた。

そこで上記の問題点を解明するために様々な実験的研究がなされ、いくつかの知見が蓄積されてきている。たとえば頭蓋骨に関しては、液状食で飼育されたラットの前顔面高は固形食で飼育されたラットより長く⁴⁾、下顎窩はより

前方に位置し⁵⁾、頭蓋骨縫合が早期に形成されること⁶⁾などが報告されている。また、生理学的研究によると咀嚼する食物の性状を識別する機能が低下し、咀嚼パターンは不安定になること⁷⁾が明らかにされている。離乳直後の齶歯類に液状食を与えると顎口腔機能の獲得に影響が出るという報告もある^{8, 9)}。

液状食の影響を調べた研究の中には唾液腺に関するものもいくつかある。3大唾液腺の一つである耳下腺では萎縮が誘導され、肉眼的な大きさが縮小し¹⁰⁻¹⁷⁾、唾液の分泌量¹⁸⁾およびアミラーゼ活性は減少する^{11, 19, 20)}と報告されている。萎縮した耳下腺を形態学的に観察すると腺房細胞の収縮^{12, 13, 17, 19)}や空胞変性¹⁶⁾、分泌顆粒の減少^{12, 19)}などが認められている。また近年の免疫組織化学的研究によると腺房細胞の増殖活性は抑制される一方、アポトーシスは促進されることも明らかとなった¹⁷⁾。これに対して舌下

¹⁾ 〒060-8586 北海道札幌市北区北13条西7丁目
北海道大学大学院歯学研究科口腔機能学講座リハビリ補綴学教室 (主任：大畑 昇 教授)

²⁾ 〒060-8586 北海道札幌市北区北13条西7丁目
北海道大学大学院歯学研究科口腔機能学講座口腔機能解剖学教室 (主任：土門卓文 教授)

腺では形態学的、生理学的に液状食飼育の影響はないという意見が多い^{10, 13)}。また、顎下腺では液状食飼育により萎縮するという報告^{10, 21)}がある一方で萎縮性変化は起こらないという報告¹³⁾もあり、結論はまだ得られていないように思われる。以上のように液状食に対する唾液腺の反応は3大唾液腺の種類によって異なる可能性があると考えられるが、他の唾液腺、すなわち小唾液腺に関する同様の研究はなく、詳細は不明である。

そこで本研究では小唾液腺の中でも比較的体積が大きく代表的な口蓋腺を研究対象とし、液状食飼育によってどのような影響を受けるかを明らかにすることにした。ヒトでは口蓋腺は上顎義歯の吸着の維持に重要²²⁻²⁴⁾であることから、臨床的にも興味深い小唾液腺である。この目的のために、液状食飼育されたラットの口蓋腺を組織学的に検索するとともに、増殖活性やアポトーシスの促進または抑制があるかどうかを免疫組織学的に検索した。

材 料 と 方 法

1. 動物実験

実験動物には7週齢のWistar系雄性ラット24匹を用い、実験群12匹、対照群12匹に分けた。動物の体重は実験期間中毎日計測した。対照群のラットには通常固形食としてラボMRスタンダード（日本農産工業製）を与え、実験群には液状食として前述の固形食を粉末状にしたものと水道水を1対2の割合で混和した飼料を与えた。実験期間中は両群とも1週、4週、8週（各4匹ずつ）とした。実験期間を経過したラットは屠殺1時間前に5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) (2.5mg/100g)を腹腔内投与した。ペントバルビタールナトリウムにて全身麻酔を施した後、0.2Mリン酸緩衝液 (pH7.4) で調整した4%パラホルムアルデヒド溶液を用いて上行大動脈より灌流固定を行った。灌流固定後断頭し、口蓋腺を含む上顎を摘出した。摘出後24時間同固定液にて浸漬固定を行った。試料を10% EDTA (pH7.4, 室温) で30日間脱灰を行い、脱灰終了後、上顎を正中矢状面にて切り出し、右側を通法に従ってパラフィン包埋した。

本実験は「国立大学法人北海道大学動物実験に関する規程（平成19年4月1日海大達61号）」に基づき行った。

2. 組織学的検索および組織計量学的検索

包埋したパラフィンプロックを切り出し面から側方に向かって口蓋腺が無くなるまで厚さ4 μ mで連続薄切した。切片にはヘマトキシリン-エオジン染色 (HE)、過ヨウ素酸シッフ染色 (PAS)、アルシアンブルー染色 (AB) を施し、組織学的に検索した。

作製したHE標本を用い、Nakamura et al.²⁵⁾の方法に準じて以下のように口蓋腺の大きさを測定した。口蓋腺の上縁から下縁までの距離の最大値を高径、前縁から後縁までの距離の最大値を長径とした（図1）。高径、長径はすべ

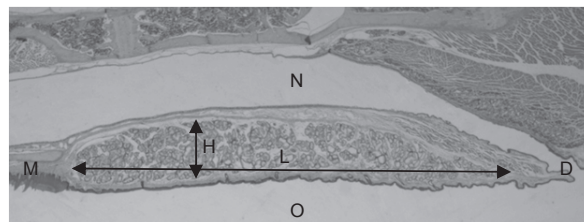


図1 口蓋腺の高径と長径の測定部位

L：長径 H：高径 N：鼻腔 O：口腔 M：近心側 D：遠心側

口蓋腺の上縁から下縁までの距離の最大値を高径 (H)、前縁から後縁までの距離の最大値を長径 (L) として測定した。

ての切片で長さを計測しその最大値を本研究の高径、長径の値として用いた。また、正中面から口蓋腺が無くなるまでの切片数に4 μ m（切片の厚さ）を掛けた値を口蓋腺の幅径とした。

3. 免疫組織学的検索

免疫組織学的検索にはBrdU免疫染色、Caspase-3免疫染色を行った。いずれの染色でも脱パラフィンした切片に内因性ペルオキシダーゼ処理として0.4%過酸化水素/メタノールを反応させた。BrdU染色では前処理として37℃で0.1%トリプシン処理20分、3N/HCl処理を30分行った。また、一次抗体には50倍希釈抗BrdU-マウスモノクローナル抗体 (Bu20a, DakoCytomation, Denmark) を120分、二次抗体には100倍希釈ビオチン標識抗マウス-ウサギポリクローナル抗体 (DakoCytomation) を60分反応させた。Caspase-3染色では前処置として10mMトリス/1mM EDTA溶液 (pH8.8) 100℃、15分浸漬し、抗原性を賦活化させた。20倍希釈抗cleaved-Caspase-3-ウサギポリクローナル抗体 (Asp175, BIO CARE MEDICAL, USA) を4℃にて一晩、二次抗体として100倍希釈ビオチン標識抗ウサギ-ブタポリクローナル抗体 (DakoCytomation) を60分反応させた。両染色とも二次抗体反応後の切片にはペルオキシダーゼ標識アビジン・ビオチン複合体 (DakoCytomation) を30分間反応させ、陽性部位を3,3'-ジアミノベンチジン・四塩酸塩で茶褐色に呈色させた。核染色にはヘマトキシリンを使用した。陰性コントロールとしてBrdU染色では正常マウス血清、Caspase-3染色では正常ウサギ血清を一次抗体に代わりに用いた。各動物について免疫染色した3枚の切片に対して光学顕微鏡下 (×400) で陽性腺房細胞数をカウントした。値は一視野 (×400) あたりの平均数とし、3枚の切片の平均値を各動物の代表値とした。そして4匹の動物の代表値から各群、各週における平均値と標準誤差を算出した。

4. 統計学的解析

すべての数的データ、すなわち実験期間の動物の体重、

口蓋腺の3次元的大きさ、免疫染色の陽性細胞数に関しては対照群と実験群との間において有意差検定を行った。検定法にはMann-Whitney U検定を用い、有意水準は5%とした。

結 果

1. 体重変化

動物の体重は対照群、実験群とも実験期間が進むにつれ

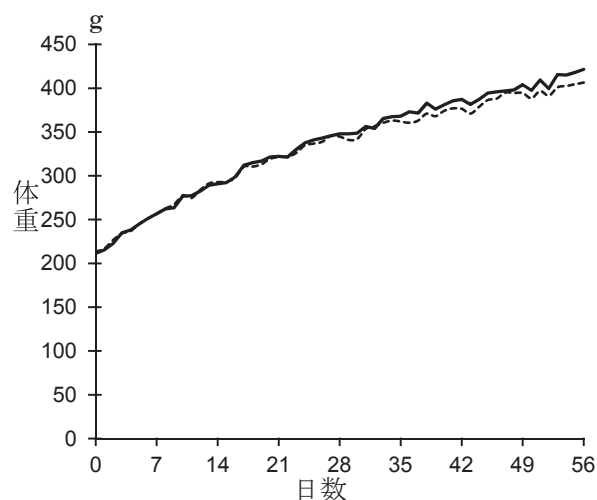


図2 ラットの体重変化のグラフ

——：対照群-----：実験群

体重は経時的に両群とも増加した。両群間では体重に有意差は見られなかった。(p<0.05)

て増加していったが、両群間にはいずれの日においても有意差は認められなかった(図2)。また、実験期間中に下痢などは認められず、動物の全身状態は良好であった。

2. 組織学的検索

対照群の口蓋腺ではその実質のほとんどが粘液性腺房細胞からなっており、導管は腺体内には認められなかった。腺房細胞はピラミッド状ないし低円柱状をしており、基底側には細胞質に充満した分泌顆粒により圧平された核が観察された(図3a)。このような腺房細胞の細胞質はPASに対して陽性(図3b)、ABに対して強陽性を示しており(図3c)、中性粘液多糖や酸性粘液多糖の存在が確認された。実験群の口蓋腺はいずれの実験期間においても対照群と同様の組織像を示しており、腺房細胞の萎縮などは見られなかった(図3d)。またPAS(図3e)およびAB(図3f)に対する実験群の腺房細胞の染色傾向もほぼ同様であった。

3. 組織計量学的検索

実験群、対照群共に高径(図4a)は約1000 μ m、長径(図4b)は約8000~9300 μ m、幅径(図4c)は約2800 μ m程度の値を示していた。高径、長径、幅径すべてにおいて各週の両群間に有意差は認められなかった。

4. 免疫組織化学的検索

BrdU陽性を示す腺房細胞は対照群(図5a)、実験群(図5b)を問わず、いずれの週においてもしばしば観察され

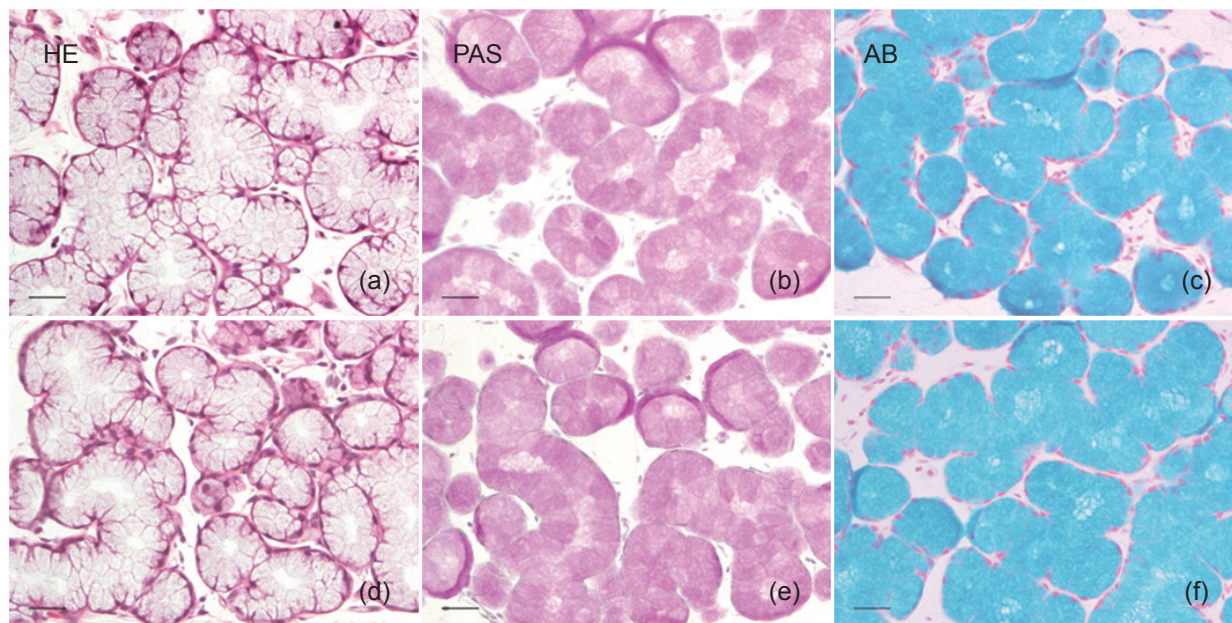


図3 実験期間8週の口蓋腺の組織像

対照群(a, b, c) 実験群(d, e, f) HE(a, d) PAS(b, e) AB(c, f)

対照群では口蓋腺はほとんどが粘液性腺房細胞で管状胞状腺となっている(a)。腺房細胞の細胞質はPAS(b)に陽性以及AB(c)に強陽性を示す。同様の組織像は実験群でも観られた(d, e, f)。スケールバー=30 μ m

た. 一視野 ($\times 400$) のBrdU陽性細胞数を図6に示す. 対照群も実験群も経時的に減少傾向を示したが, 一視野あたりの陽性腺房細胞数は各週において両群間に有意差はなかった. Caspase-3陽性を示す腺房細胞は対照群(図5c), 実験群(図5d)共にどの週においても極めて少なく,

Caspase-3陽性腺房細胞が全く観察されない標本も多かった. このためCaspase-3染色標本に関しては陽性細胞数の測定並びに統計学的検定を行わなかった. またBrdU染色, Caspase-3染色ともに陰性コントロールには陽性反応は認められなかった.

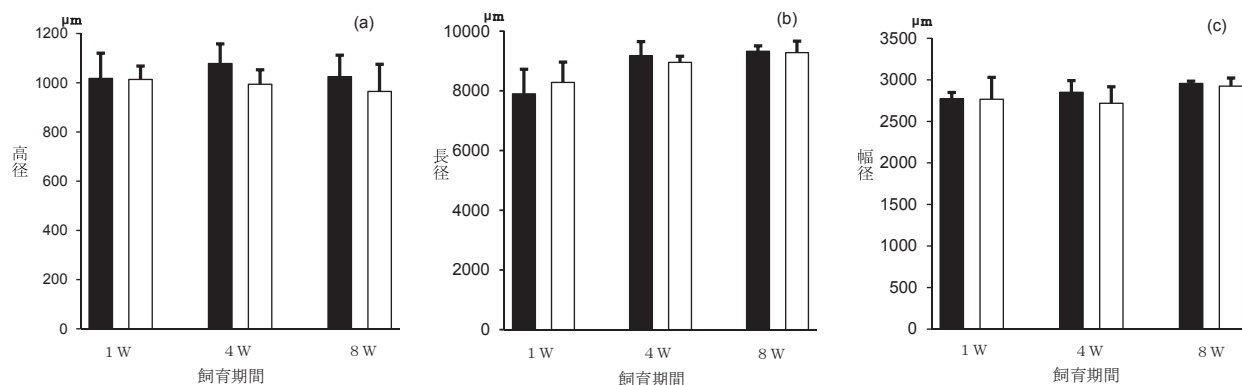


図4 口蓋腺の高径 (a), 長径 (b), 幅径 (c)

■: 対照群, □: 実験群 平均値+標準誤差

各週において対照群と実験群の間には高径, 長径, 幅径とも有意差はなかった. ($p < 0.05$)

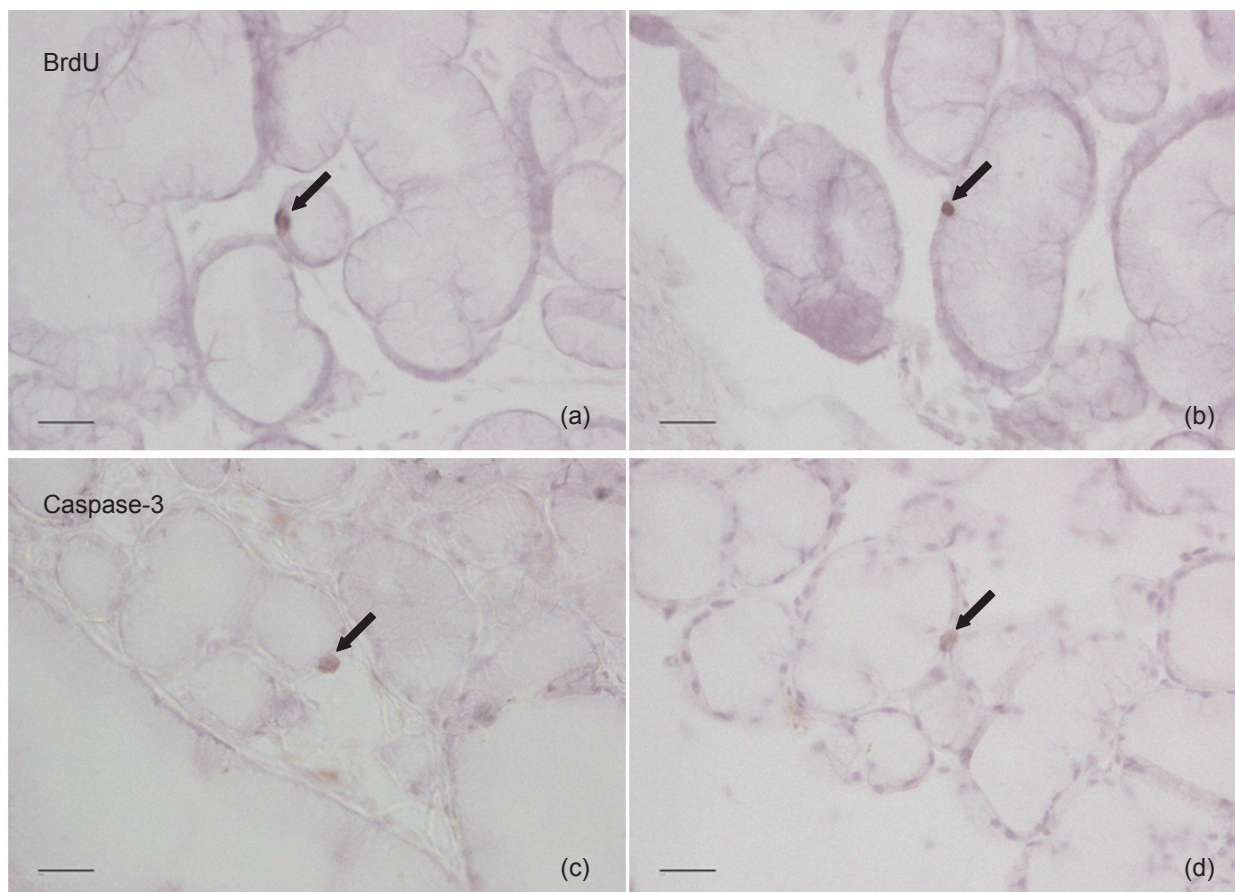


図5 実験期間8週のBrdUおよびCaspase-3免疫染色像

対照群 (a, c), 実験群 (b, d) BrdU染色 (a, b), Caspase-3染色 (c, d)

両群ともBrdU (a, c) およびCaspase-3 (b, d) に対して陽性を示す腺房細胞が確認できたが, Caspase-3陽性腺房細胞の数は非常に少なかった. 矢印は各陽性細胞 スケールバー = $30\mu\text{m}$

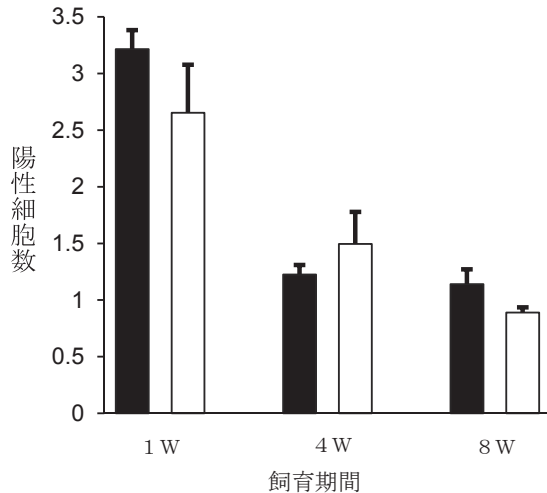


図6 BrdU陽性細胞数

■: 対照群, □: 実験群 平均値±標準誤差

各週において、対照群と実験群の間には一視野あたりのBrdU陽性細胞数に有意差はなかった。(p<0.05)

考 察

ソフトフードの影響を調べる多くの実験的研究では、飼料として液状食を用いている⁴⁻²¹⁾。これらの研究では実験群（液状食群）と対照群（固形食群）との間に体重差は認められず、実験群の動物に体調不良などは見られない^{5, 8, 14, 16, 17, 19)}。このようなことより液状食飼育はラットの全身状態に影響を与えないと考えられている^{5, 16, 17, 19)}。一方、本研究でも体重や全身状態については同様の結果であった。従って本研究における口蓋腺への影響がもしあるとするならば、全身状態の変化によるものではなく、液状食の直接的な影響によるものであると考えられる。

これまで耳下腺などの大唾液腺の萎縮の程度を検索する指標として湿重量が用いられてきている¹⁰⁻¹⁷⁾。ラットの大唾液腺は一塊として摘出することが容易である一方、変形し易いため長さの測定が困難だからである。今回の研究の観察対象である口蓋腺は小さく、軟口蓋の内部にあるため、口蓋腺だけを摘出することが困難であった。そこで本研究では口蓋腺を含む上顎を摘出し、HE染色連続切片標本を用いた組織計量によって、口蓋腺の3次元的な大きさを測定した。その結果、実験群と対照群との間には長径、高径、幅径いずれにおいても差はなかったことから、ラット口蓋腺は液状食飼育によって萎縮を起こさない事が明らかとなった。耳下腺では液状食飼育開始後、短期間すなわち7日目～30日目には萎縮が認められる¹⁰⁻¹⁷⁾。本研究では最大8週間飼育した動物においても口蓋腺は萎縮しなかった事から、仮に、液状食の飼育期間をさらに長くしたとしても口蓋腺に萎縮は誘導されないと推測される。これまでの報告と本研究の結果を合わせて考えると唾液腺でも耳下腺¹⁰⁻¹⁷⁾のように液状食飼育により萎縮するものと舌下腺^{10, 13)}や口蓋腺のように萎縮しないものがある、すな

わち唾液腺の種類によって液状食に対する反応が異なることがより明白となった。従ってソフトフードの唾液腺に対する影響を解明するためにはさらに多くの種類の唾液腺を検索することが必要である。

組織の萎縮は個々の細胞の縮小と構成する細胞数の減少の主に二つの要因からなると考えられる¹³⁾。液状食による萎縮性耳下腺では腺房細胞の収縮が光顕的^{13, 16, 17)}および電顕的¹⁹⁾に観察されている。また、腺房細胞の数に関してはScott et al.¹²⁾は腺組織内のDNA量の減少¹¹⁾から、Takahashi et al.¹⁷⁾は腺房細胞の増殖活性の抑制とアポトーシスの促進から腺房細胞数は減少していると推測している。このように耳下腺の萎縮性変化は細胞の大きさと数の両方の要因によって引き起こされていると考えられる。本研究でも口蓋腺において上記の2つの要因が関与しているか検討した。検索方法は、細胞の大きさについては通常の光顕的観察とし、細胞数についてはTakahashi et al.¹⁷⁾と同様に細胞増殖活性とアポトーシスの発生状況から推察することとした。事前に投与されたBrdUは細胞周期のS期にある細胞の核内に取り込まれるので、その局在を免疫組織化学的に検出することにより、増殖期に入っている細胞を確認する事が出来る^{26, 27)}。また、アポトーシスを調べるためにCaspase-3免疫染色を行ったが、これは以下の理由による。アポトーシスの誘導因子は多種多様であるが、アポトーシスのシグナル伝達はカスパーゼカスケードの活性化によって起こり、多くの場合、最終的にCaspase-3の活性化によりアポトーシスの実行へとつながる²⁸⁻³⁰⁾。このようなことからアポトーシスの検索法として従来用いられたTUNEL法に代わって活性化Caspase-3を免疫組織化学的に検出する方法が用いられるようになってきたからである³¹⁾。本研究の結果、液状食飼育されたラット口蓋腺では対照群と比べて腺房細胞の大きさに違いが認められなかった。また、腺房細胞の増殖活性やアポトーシスによる消失も対照群と同様であったことから、腺房細胞数の違いもほとんどないものと考えられた。従って、ラット口蓋腺は見かけ上の萎縮が起きていないだけでなく、細胞の大きさや数の点においても全く液状食の影響を受けていない事が示唆された。

本研究と過去の研究の報告を合わせると唾液腺は耳下腺のように液状食飼育によって萎縮するものと舌下腺、口蓋腺のように萎縮しないものに分けられる。このような違いがなぜ起こるのかは本研究だけでは明らかにできない。しかし、この問題を考察することは大変興味深いと思われる。唾液腺は交感神経および副交感神経の二重支配を受けているが、唾液腺の維持には副交感神経刺激が重要である。なぜならば、副交感神経作動薬により耳下腺腺房細胞の増殖が誘導されたり³²⁾、ラット耳下腺に分布する副交感神経である耳介側頭神経や舌下腺に分布する副交感神経である鼓索神経の遮断により、耳下腺³³⁾や舌下腺³⁴⁾に萎縮が誘

導されたりするからである。耳下腺の副交感神経の節前線維は延髄の下唾液核から発し、舌咽神経などを経て耳下腺へ達する^{35, 36)}。一方、舌下腺や口蓋腺では延髄の上唾液核から発し、顔面神経などを経てそれぞれの腺に達する^{37, 38)}。つまり、液状食飼育により萎縮する唾液腺とそうでない唾液腺では支配する唾液核が異なっているのである。以上のことから考えると、液状食飼育に対する唾液腺の反応の違いは唾液分泌中枢である唾液核の違いによるのかもしれない。言い換えれば液状食飼育により上唾液核は影響を受けないが、下唾液核は抑制されるかもしれないということである。また、これらには上位中枢があり、口腔内各部の感覚刺激、内臓からの刺激、視覚・嗅覚・聴覚からの影響を受けているとされている³⁹⁾。これらの刺激には液状食によって影響されやすいものや部位の違いがあることも考えられる。こうしたことが上位中枢から上、下唾液核への命令の違いを引き起こしているのかもしれない。このようなことを検証するため、さらなる研究が必要である。

結 論

本研究では実験群と対照群の口蓋腺は粘液性細胞からなり、細胞質はPAS, ABに陽性を示す粘液様物質で満たされており、両群とも同様の組織像を示していた。口蓋腺の高径、長径、幅径には実験群と対照群との間には差は無かった。また、腺房細胞の増殖活性の抑制やアポトーシスの促進は認められなかった。

本研究の結論として、ラット口蓋腺は液状食の影響を受けず、萎縮性変化を示さないことが明らかとなった。

謝 辞

本研究の一部は科学研究費補助金(基盤研究B:21390499)の補助を受けたものである。

また、本研究の遂行にあたり多大なるご支援、ご協力を頂きました北海道大学大学院歯学研究科口腔機能解剖学教室、リハビリ補綴学教室各位に謹んで深謝いたします。

参 考 文 献

- 1) 宮井信行, 白石龍生, 後藤英二: 児童・生徒の摂食および咀嚼習慣に関する調査研究. 大阪教大紀Ⅲ自然科学 42: 61-68, 1993.
- 2) 内藤真理子, 河原玲子, 井手口博, 上田和茂, 鶴田靖, 吉永久秋, 内藤 徹, 木村光孝: 学童の嗜好を踏まえた食生活指導(第3報)食習慣に関する調査. 小児歯誌 35: 625-630, 1997.
- 3) 小池雅子, 岩森 大: 高齢者の咀嚼力と日常食事の物性との関係について. 日本食生活学会誌 22: 3-12, 2011.
- 4) Kiliaridis S, Engstrom C, Thilander B: The Relationship between masticatory function and craniofacial

morphology . I. A cephalometric longitudinal analysis in the growing-rat fed a soft diet. Eur J Orthod 7: 273-283, 1985.

- 5) 野田 真: 食物の物性がラット頭蓋底の成長に及ぼす影響. 日矯歯誌 56: 26-32, 1997.
- 6) Engstrom C, Kiliaridis S, Thilander B: The Relationship between masticatory function and craniofacial morphology . II. A histological study in the growing-rat fed a soft diet. Eur J Orthod 8: 271-279, 1986.
- 7) 吉田教明: 成長期における咀嚼機能の発達と学習のメカニズム解明に向けた実験的アプローチについて. 顎機能誌 13: 2-10, 2006.
- 8) Liu ZJ, Ikeda K, Harada S, Kasahara, Ito G: Functional properties of jaw and tongue muscles in rats fed a liquid diet after being weaned. J Dent Res 77: 366-376, 1998.
- 9) 山田正彦, 古賀義之, 岡安一郎, 大井久美子, 山田好秋, 吉田教明: 飼料の液状化が顎口腔機能獲得に及ぼす影響 マウスを用いた機能分析. 顎機能誌 10: 176-177, 2004.
- 10) Ekstrom J: Choline acetyltransferase and secretory responses of the rat's salivary glands after liquid diet. Q J Exp Physiol Cogn Med Sci 58: 171-9, 1973.
- 11) Johnson DA: Effect of a liquid diet on the protein composition of rat parotid saliva. J Nutr 112: 175-81, 1982.
- 12) Scott J, Berry MR, Gunn DL, Woods K: The effects of a liquid diet on initial and sustained, stimulated parotid salivary secretion and on parotid structure in the rat. Arch Oral Biol 35: 509-514, 1990.
- 13) Scott J, Gunn DL: A comparative quantitative histological investigation of atrophic changes in the major salivary glands of liquid-fed rats. Arch Oral Biol 36: 855-857, 1991.
- 14) Johnson DA, Cardenas HL: Effects of food mastication on rat parotid gland adrenergic and cholinergic cell surface receptors. Crit Rev Oral Biol Med 4: 591-597, 1993.
- 15) Scott J, Gunn DL, Fletcher D: Rate of oxygen consumption by parotid atrophic acinar cells from rats fed liquid diet. Arch Oral Biol 40: 691-694, 1995.
- 16) Leal SC, Toledo OD, Bezerra AB: Morphological alterations of the parotid gland of rats maintained on a liquid diet. Braz Dent J 14: 172-176, 2003.
- 17) Takahashi S, Uekita H, Kato T, Yuge F, Ushijima N, Inoue K, Domon T: Involvement of apoptosis and proliferation of acinar cells in atrophy of rat parotid glands induced by liquid diet. J Mol Histol 43: 761-

- 766, 2012.
- 18) Ito K, Morikawa M, Inenaga K : The effect of food consistency and dehydration on reflex parotid and submandibular salivary secretion in conscious rats. *Arch Oral Biol* 46 : 353-363, 2001.
- 19) Hand RA, Ho B: Liquid-diet-induced alterations of rat parotid acinar cells studied by electron microscopy and enzyme cytochemistry. *Arch Oral Biol* 26 : 369-380, 1981.
- 20) Zelles T, Humphreys-Beher MG, Schneyer CA: Effects of liquid diet on amylase activity and mRNA levels in rat parotid gland. *Arch Oral Biol* 35 : 1-7, 1989.
- 21) 金俊熙 : 液状飼育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.
- 22) 関野憲三, 川添和幸, 浜田泰三, 長沢 亨, 津留宏道 : 義歯の維持に関する研究 第1報 口蓋腺開口部の分布について. *補綴誌* 17 : 303-307, 1973.
- 23) 川添和幸, 浜田泰三, 山本早苗, 関野憲三, 長沢 亨, 津留宏道 : 義歯の維持に関する研究 第2報 口蓋腺唾液分泌と床の離脱力について. *補綴誌* 18 : 35-39, 1974.
- 24) 川添和幸, 浜田泰三, 山田早苗 : 義歯に関する研究 第3報 床下介在唾液量の変化と脱離力について. *補綴誌* 19 : 289-293, 1975.
- 25) Nakamura S, Takahashi S, Wakita M, Morita M: Postnatal growth of the rat palatine gland. *Tissue cell* 33 : 614-620, 2001.
- 26) Dolbeare F, Gratzner H, Pallavicini MG, Gray JW: Flow cytometric measurement of total DNA content and incorporated bromodeoxyuridine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 80 : 5573-5577, 1983.
- 27) Alison M, Chaudry Z, Baker J, Lauder I, Pringle H: Liver regeneration: a comparison of in situ hybridization for histone mRNA with bromodeoxyuridine labeling for the detection of S-phase cells. *J Histochem Cytochem* 42 : 1603-1608, 1994.
- 28) Porter AG, Janicke RU: Emerging roles of caspase-3 in apoptosis. *Cell Death Differ* 6 : 99-104, 1999.
- 29) Boatright KM, Salvesen GS: Mechanisms of caspase activation. *Curr Opin Cell Biol* 15 : 725-731, 2003.
- 30) Taylor RC, Cullen SP, Martin SJ: Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9 : 231-241, 2008.
- 31) Duan WR, Garner DS, Williams SD, Funckes-Shippy CL, Spath IS, Blomme EAG: Comparison of immunohistochemistry for activated caspase-3 and cleaved cytokeratin 18 with the TUNEL method for quantification of apoptosis in histological sections of PC-3 subcutaneous xenografts. *J Pathol* 199 : 221-228, 2003.
- 32) Burlage FR, Faber H, Kampinga HH, Langendijk JA, Vissink A, Coppes RP: Enhanced proliferation of acinar and progenitor cells by prophylactic pilocarpine treatment underlies the observed amelioration of radiation injury to parotid glands. *Radiother Oncol* 90 : 253-256, 2009.
- 33) Proctor GB, Asking B, Garrett JR: Effects of parasympathectomy on protein composition of sympathetically evoked parotid-saliva in rats. *Comp Biochem Physiol* 97A : 335-339, 1990.
- 34) 長門俊一, 永木正実, 谷岡博昭 : ラット舌下腺腺房細胞の分化に及ぼす副交感神経切除の影響. *口科誌* 39 : 880-889, 1990.
- 35) Nicholson JE, Severin CM: The superior and inferior salivatory nuclei in the rat. *Neurosci Lett* 21 : 149-154, 1981.
- 36) Rezek O, Boldogkoi Z, Tombacz D, Kovago C, Gerendai I, Palkovits M, Toth IE: Location of parotid preganglionic neurons in the inferior salivatory nucleus and their relation to the superior salivatory nucleus of rat. *Neurosci Lett* 440 : 265-269, 2008.
- 37) Hiura T: Salivatory neurons innervate the submandibular and sublingual glands in the rat: horseradish peroxidase study. *Brain Res* 137 : 145-149, 1977.
- 38) Spencer SE, Sawyer WB, Wada H, Platt KB, Loewy AD: CNS projections to the pterygopalatine parasympathetic preganglionic neurons in the rat: a retrograde transneuronal viral cell body labeling study. *Brain Res* 534 : 149-169, 1990.
- 39) 森本俊文, 山田好秋 : 基礎歯科生理学. 404-420, 医歯薬出版 東京. 2008

ORIGINAL

Histological and Immunohistochemical Studies of the Effects of Liquid Diet Feeding on Rat Palatine Glands

Fumihiko Yuge¹⁾, Shigeru Takahashi²⁾, Takanori Domon²⁾ and Noboru Ohata¹⁾

ABSTRACT : It has been reported that the parotid glands of rats fed a liquid diet become atrophic and that reduction of proliferation and promotion of apoptosis of acinar cells take place in these glands. However, it is unknown whether such feeding induces atrophy in the minor salivary glands which are histologically different from the parotid glands. The aim of this study was to clarify the effects of liquid diet feeding on palatine glands which are the largest among minor salivary glands. For this purpose, palatine glands of rats were examined histologically, histomorphometrically, and immunohistochemically. Seven-week-old male Wistar rats were used. The control and experimental animals were fed a pellet of a liquid diet for 1 to 8 weeks, respectively. At the sacrifice the animals were perfused and the whole head was removed. Then parasagittal serial paraffin sections of the head including the palatine glands were stained with HE or Periodic acid Schiff (PAS) or Alcian blue (AB). Heights, lengths, and widths of the palatine glands were measured with the histological specimens. Detection of cell proliferation and apoptosis used 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) and Caspase-3 immunohistochemistry, respectively. The number of immuno-positive cells were counted in the palatine glands under a light microscope ($\times 400$). Histologically, the acinar cells in the experimental palatine glands did not show atrophy, and the intensity of the PAS and AB of the acinar cells in the experimental group was very similar to that in the controls. There were no statistically significant differences in any of the three dimensions of the palatine glands of the experimental and control groups. The BrdU-positive cells were commonly observed in the acinar cells of all palatine glands, and the BrdU-positive cell numbers in the experimental groups were not statistically significantly different from those in the controls. Caspase-3 positive cell numbers were very small in both groups. These findings suggest that liquid diet feeding does not induce atrophy of the palatine glands of rats, different from the situation observed for parotid glands.

Key Words : Liquid diet, Palatine glands, Histomorphometry, Immunohistochemistry

¹⁾Department of Oral Rehabilitation, Division of Oral Functional Science, Hokkaido University Graduate School of Dental Medicine, Kita 13, Nishi 7, Kita-ku, Sapporo, Hokkaido, 060-8586 Japan (Chief: Prof. Noboru Ohata)

²⁾Department of Oral Functional Anatomy, Division of Oral Functional Science, Hokkaido University Graduate School of Dental Medicine, Kita 13, Nishi7, Kita-ku, Sapporo, Hokkaido, 060-8586 Japan (Chief: Prof. Takanori Domon)