

ラック色素投与時のラット耳下腺組織における微細構造の観察

福 森 信 隆*, 坂 本 義 光*, 青 木 直 人*

Ultrastructural Changes of the Parotid Gland in Rats Fed with Lac Color

NOBUTAKA FUKUMORI*, YOSHIMITSU SAKAMOTO* and NAOTO AOKI*

Hypertrophy of the rat parotid gland has been reported in the previous 13-week toxicity test for lac color. Ultrastructural changes in the parotid gland after two-week or four-week feeding with 5% lac color were studied in rats by transmission electron microscopy. In the hypertrophic parotid gland associated with lac color treatment, an increase of zymogen granules was observed in the acinar cells of the terminal portion. The secretory granules within the acinar cells were also enlarged and electron-translucent. The results revealed that the hypertrophy of the parotid gland was associated with ultrastructural abnormalities of secretory granules in the acinar cells.

Keywords : ラック色素 lac color, 耳下腺 parotid gland, ラット rat, 電子顕微鏡観察 electron microscopic observation

緒 言

近年、食品中の合成添加物に対する毒性に関する懸念から、天然由来という理由で動植物や鉱物の天然添加物が多く用いられる傾向にある。天然着色料のラック色素は、東南アジアのラックカイガラムシの分泌する樹脂状物質から抽出された赤系着色料である。飲料やゼリー、キャンディ、あん製品等の赤色の着色に使用され、主成分はラッカイン酸である¹⁾。これまで毒性に関する報告は少なく、安全性に対する評価も得られていない。当所の坂本らは、F344 ラットを用いて13週間の経口毒性試験を行った結果、雌雄投与群で腺房細胞の腫大を伴った耳下腺の肥大及び腎臓での尿細管の鉱質沈着を報告した。特に耳下腺の肥大は、1.25%群からびまん性に腺房細胞で認められた²⁾。この時の細胞内の微細小器官の変化を電子顕微鏡で観察することは、細胞毒性の評価を考察するために重要であると考える。実験的な唾液腺の傷害は、耳下腺の肥大に関してイソプロテレノールの投与や顎下腺、舌下腺の摘出³⁾によって起こり、また逆に萎縮は耳下腺の分泌管の結紮⁴⁾を行うことによって惹起することが知られている。

今回、肥大した耳下腺の細胞内の初期変化を把握する

ために、13週間よりも短い2週間及び4週間投与でラット耳下腺の微細構造の変化を観察した。特に肥大の著しい終末部の腺房細胞を主に、その原因を解明するために透過型電子顕微鏡（透過電顕と略す）を用いて低倍率での観察を行った。

実 験 方 法

被験物質及び実験動物：実験に用いたラック色素は、アイゼン(株)の抽出物として純度100%の天然着色料を使用した。また動物は、日本チャールスリバー社のF344/DuCrj ラットの雄を4週齢で購入し、1週間の予備飼育を経た後実験に供した。

試験方法：ラック色素は日本農産の粉末飼料（ラボ MR ストック）に5%の割合で混合添加して、対照飼料と同様に固形化したものを摂取させた。動物はステンレス製ケージに個別に収容して、2週間及び4週間の摂餌期間中、飲水及び5%ラック色素を添加した固形飼料を自由に摂取させた。摂取終了後、動物はエーテル麻酔を施して、大腿動静脈より放血屠殺し、耳下腺を摘出した。

試料作製法：摘出した耳下腺は、2.5%の冷グルタルアルデヒドの中で細切を行った後、冷蔵庫内で3日間の前固定を実施した。前固定液は洗浄液と同様に pH7.3の0.1M

* 東京都立衛生研究所毒性部病理研究科 169-0073 東京都新宿区百人町3-24-1

* The Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health
3-24-1, Hyakunincho, Shinjuku-ku, Tokyo, 169-0073 Japan

磷酸緩衝液の濃度に調整を行った。その後組織を磷酸緩衝液で十分に洗浄してから、1%オスミウム酸(pH7.3, 0.1M 磷酸緩衝液)に浸漬した後固定を2時間行った。後固定を行った後軽く洗浄して、エタノールで脱水を行い、QY-1で置換し、エポキシ樹脂に包埋した。透過電顕の試料を作製する前に約2 μ mの準超薄切片を薄切し、トルイジンブルーで染色した後、光学顕微鏡(光顕と略す)で観察した。トリミングを行った後、超薄切片は約80nmの厚さとし、酢酸ウランとクエン酸鉛の二重電子染色を施した。鏡検は、加速電圧75kVの透過電顕(日立, H-7000)を用いて、低倍率から広範囲の観察を行った。

実験結果

樹脂包埋から厚めに薄切した準超薄切片を光顕で観察したところ、対照は小葉が青色の強陽性の密に詰まった粒子状を呈しているのに対して、5%ラック色素摂餌群(ラック摂餌と略す)では淡青色の顆粒が細胞の中央部に存在していた。2週間ラック摂餌と4週間ラック摂餌で比較すると両摂餌期間ともこの傾向はみられるが、若干4週間摂餌で多く認められた。

透過電顕を使用して耳下腺終末部の腺房細胞を超薄切片法で鏡検し、Fig.1に対照、Fig.2に4週間ラック摂餌を示した。共に同一の写真倍率であるが、ラック摂餌では細胞の腫大が顕著で、その中に多数の分泌顆粒が内在していた。顆粒の大きさは対照に比べ、かなり大きく大小の不揃いが認められた。最も顕著な相違は、対照では内容物の電子密度が高く均質な構造を示すのに対して、ラック摂餌ではかなり低い電子密度を呈した。核周囲の粗面小胞体は、対照では整然とした層状配列を示しているが、ラック摂餌では分泌顆粒が多く、顆粒の間で配列が乱れていた。細胞間隙を比較すると、対照では微絨毛様の小突起が細胞表面で複雑に絡み合い一定の離開がみられるが、ラック摂餌では細胞間が接着しており、細胞膜の小突起の確認が明瞭にできなかった。核は対照と同程度の大きさを呈しているが、ラック摂餌で核小体の肥大している像が散見された。対照で2週間と4週間を比べると、4週間で分泌顆粒の数や滑面小胞体が若干多い傾向を示したが大差を認めなかった。また粗面小胞体は少なくなっており、配列が不整となり、内腔が膨化した像が時折観察された。ラック摂餌では、4週間で顆粒数がやや増加しており、顆粒が大きく膨化した細胞では細胞質の欠落やミトコンドリアの破壊を認めた。Fig.3とFig.4は2週間の対照とラック摂餌の強拡大像を示した。Fig.3の対照では、核周囲の粗面小胞体と分泌顆粒が接する部位で良好に発達したゴルジ装置がみられ、

またミトコンドリアの構造も良く保持されていた。隣接した細胞境界の小突起や離開がFig.1と同様に正常像として観察された。この写真は2核を持っている上皮細胞で、対照においても時折散見された。Fig.4は2週間のラック摂餌で傷害の著しい腺房細胞を示した。分泌顆粒は球状の形状が不整となり膨化がみられ、電子密度が極めて低くなり限界膜の消失を伴い、内容物が拡散したような像を呈した。顆粒は極めて明調化し、中に微細粒子状の構造が観察された。粗面小胞体は残存しているが若干少なく、ゴルジ装置の膨化や乱れも観察された。大部分のミトコンドリアの構造は壊れ、クリステの整列が消失していた。この細胞の核は、核膜が変形して濃縮傾向を示した。Fig.5は2週間のラック摂餌の腺房細胞で、核小体の肥大を特徴的に示していた。明調構造を有する分泌顆粒は、大小不同で辺縁の一部不整な像が散見された。分泌顆粒に隣接するミトコンドリアは空胞化して多数のクリステの崩壊がみられたが、粗面小胞体の微細形態は正常に保持されていた。また隣接する細胞間隙はかなり密接しており、この部の細胞間分泌細管は軽度の拡張を示した。Fig.6は4週間のラック摂餌の腺房細胞を示した。核は著しく濃縮して核膜の形状が変形を呈し、核小体の凝集を伴っていた。細胞内小器官は、正常構造の保持ができず、特に粗面小胞体の内腔の拡張が全体に認められた。分泌顆粒の多くは限界膜が消失し、膨化した粗面小胞体の間に球形が崩れた状態で残存していた。この細胞は、輪郭の細胞膜の構造が不明瞭を呈しているため、隣接する他の細胞との間隙が明らかでなかった。

介在部の対照の上皮細胞は、終末部の腺房細胞に比べ分泌顆粒の蓄積は少なく、粗面小胞体はやや拡張傾向を示していた。細胞間隙の拡張は著しくなく、細胞膜の小突起も殆どみられなかった。ラック摂餌では、腺房細胞と同様に分泌顆粒の増加が認められた。

Fig.7では対照を、Fig.8では2週間のラック摂餌の線条部の電顕像を示した。円柱上皮の核は比較的大型を呈し、基底線条と呼ばれる細胞膜の陥入が特徴的にみられた。細胞内に陥入する膜に平行してミトコンドリアが存在していた。この線条部では、分泌顆粒は認められなかった。Fig.8のラック摂餌では、細胞膜の陥入が乱れて、間に存在するミトコンドリアの膨化や崩壊が認められた。介在部と線条部では、ラック摂餌の2週間あるいは4週間の相違は顕著に認められなかった。

考 察

ラック色素がラットの耳下腺に肥大を惹起することから、細胞小器官に対する影響について電子顕微鏡を用い

て変化を観察した。その変化は、透過電顕で鏡検する前に調べたトルイジンブルー染色の準超薄切片の光顕観察から、主に終末部の腺房細胞の腫大到起因していると考えられた。2週間及び4週間のラック摂餌では、程度の差はあるが分泌顆粒の増加がみられ、対照に比べて顆粒が大きくなり、細胞内のかかなりの部分を占めていた。対照とラック摂餌の比較で、核の大きさはさほどの違いがなくとも、細胞の面積ではかなりの差異が認められた。13週間の毒性試験の結果²⁾ から早期に肥大が起こることが予想されたが、2週間及び4週間の摂餌でも腺房細胞に多数の分泌顆粒の蓄積がみられ、この変化はラック摂餌後、速やかに起こってくるものと考えられた。体重1 kg当たり16mgのイソプロテレノールを10日間ラットに腹腔内投与すると、耳下腺の腺房細胞の肥大が起こり、分泌顆粒の増加や大型化が観察されている。また腺房細胞の著しい腫大と共に、対照よりも大きな明調を呈する顆粒が細胞の中央部に蓄積している³⁾。この報告と今回のラックでみられた変化は、類似している。更に大型化した分泌顆粒の電子密度は、極めて明調を呈していることもラックと同様な変化と思われる。顆粒内部の電子密度は、対照では比較的均一な暗調を呈しているが、ラックで大型化した顆粒では、対照に比べて明調化するという違いがみられた。より大型化した顆粒ほど明るい傾向を示した。中でも、明調の強い顆粒の内容物に微細な粒子が認められたことは、耳下腺の漿液細胞が粘液細胞に転化した結果とも考えられる。しかし、一般には粘液細胞はムコ多糖類を多く含有しているため、PAS 染色が陽性を示すといわれている。しかし、13週間の毒性試験でラックはPAS 陽性顆粒が消失していた²⁾。このことは形態的に粘液細胞の顆粒と類似しているが、内容物の成分がラックと異なっていると考えられる。また蛋白欠乏食のラットで分泌顆粒の明調化が起こり、中に微細な粒子が存在して、これが糖蛋白と関与しているという報告⁵⁾があることから、分泌顆粒の電子密度は蛋白質と糖質の関係が重要と考えられる。また、未処置の対照ラットの耳下腺で分泌顆粒が細胞により暗調を示すものと、明調を示すものが小葉の中に混在していることを示す報告もある⁶⁾。この電子密度の相違は、分泌顆粒の成熟度によると解釈しているが、今回対照で観察された顆粒には、明調化した細胞が殆どみられなかった。他に、エタノール⁷⁾や実験糖尿病誘発薬⁸⁾のように腺房細胞の中に脂肪滴を蓄積させるという報告がみられるが、ラックでの大型化した顆粒の構造は、明らかにこれらの報告でみられる脂肪滴と異なっていた。

腫大した腺房細胞では、隣接する細胞との間隙が狭小化して、細胞膜の小突起が消失していた。このことは分泌顆粒を放出するという機能に影響を及ぼしていると思われる。ラック摂餌でみられた細胞間分泌細管の軽度な拡張が、形態的な特徴を示していると考えられる。

粗面小胞体は、分泌顆粒との間にみられるゴルジ装置と密接に関係しており、良く発達していた。顆粒の内容物の合成に寄与しているが、ラック摂餌で顆粒の増加が著しい細胞では、層状の構造が乱れていた。おそらく分泌物の合成機能の低下を表していると思われる。

ラック摂餌の腺房細胞では、一部の傷害の顕著な細胞を除いて、粗面小胞体は層状配列の乱れがみられるが、多く残存していた。分泌顆粒が増加した細胞でも、核小体の肥大が観察されたことと併せて考察すると、細胞は壊死に至らず、再生可能な状態を示していると思われる。

ラック摂餌において、線条部でみられた細胞膜の陥入の乱れ及びミトコンドリアの膨化を伴った崩壊と、腺房細胞の顆粒の増加及び大型化との関連は明らかでない。この基底線条を有する細胞は、物質の再吸収機能と密に関係するといわれていることから、分泌物の放出に対して重要な役割を持つと思われる。

ラック色素の2週間及び4週間摂餌による腺房細胞内の分泌顆粒の増加や大型化、あるいは明調化は惹起される原因が解明されていないが、細胞内小器官の多くが残存していることから考えて、結果としての代償性変化と考える。おそらく、肝臓における薬物代謝に伴う滑面小胞体の著しい増加の適応反応と同様な変化と思われる。

文 献

- 1) 化学的合成品以外の食品添加物リスト注解書, 129, 平成3年度版, 食品添加物協会
- 2) 坂本義光, 多田幸恵, 田山邦昭, 他: 東京衛研年報, 49, 255-266, 1998.
- 3) Sheetz, J. H., Morgan, A. H. and Schneyer, C.A.: *Arch. Oral. Biol.*, 28, 441-445, 1983.
- 4) Scott, J., Liu, P. and Smith, P. M.: *J. Dent. Res.*, 78, 1711-1719, 1999.
- 5) Johansson, I. and Alm, P.: *Scand. J. Dent. Res.*, 97, 505-510, 1989.
- 6) Muller, R.M. and Roomans, G. M.: *J. Submicrosc. Cytol.*, 19, 283-289, 1987.
- 7) Maier, H., Born, I. A. and Mall, G.: *Klin. Wochenschr.*, 66, 140-150, 1988.
- 8) Hand, A.R. and Weiss, R. E.: *Lab. Invest.*, 51, 429-440, 1984.

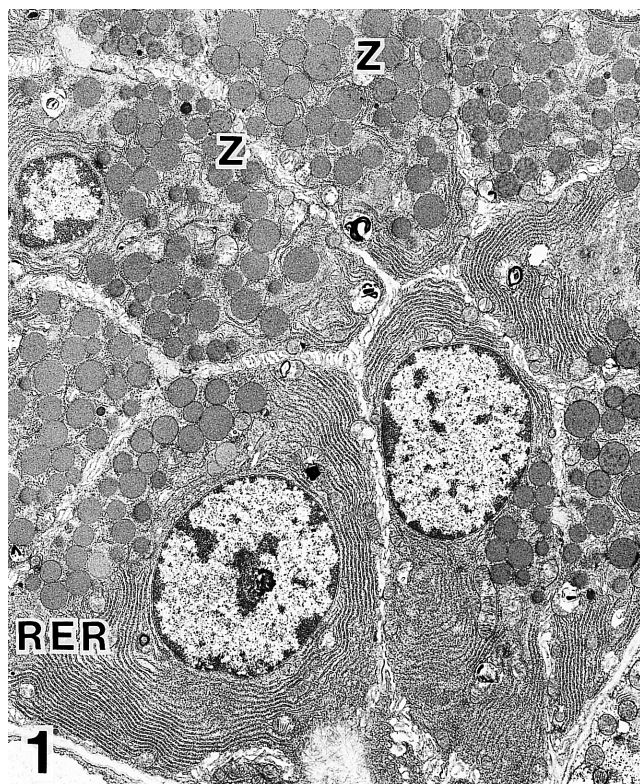


Fig. 1. A portion of the parotid gland from a control rat showing a well-developed rough endoplasmic reticulum (RER) and zymogen granules (Z) with homogeneously electron-dense. (X 3,900)

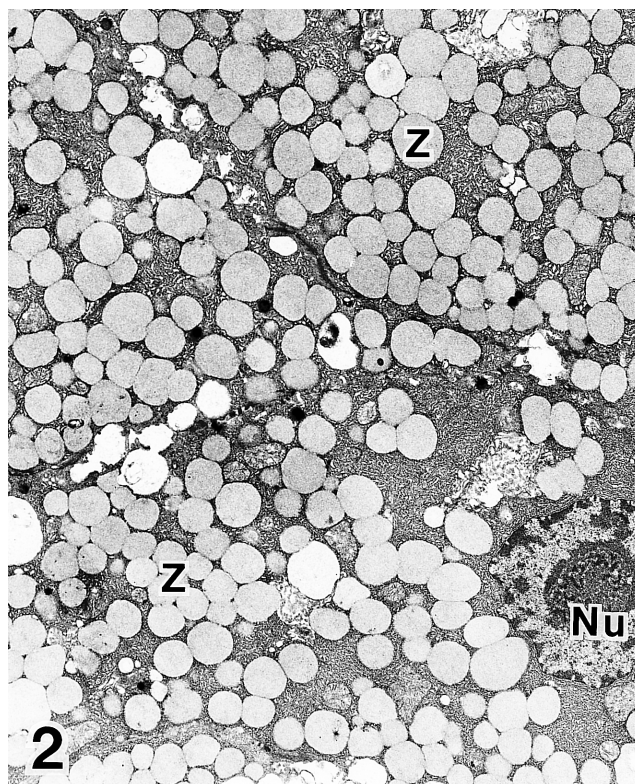


Fig. 2. A portion of the hypertrophic parotid gland showing an increase of zymogen granules (Z) with low electron density after 4 weeks of 5% lac color feeding. (X 3,900)

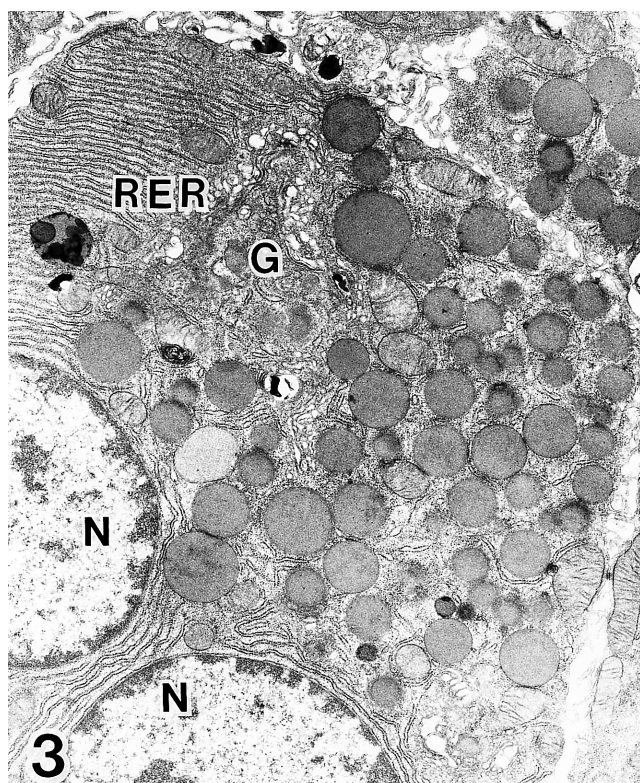


Fig. 3. A parotid acinar cells from a control rat showing Golgi apparatus (G) adjacent to RER at a high magnification. There are two nuclei in the epithelium. (X 7,900)

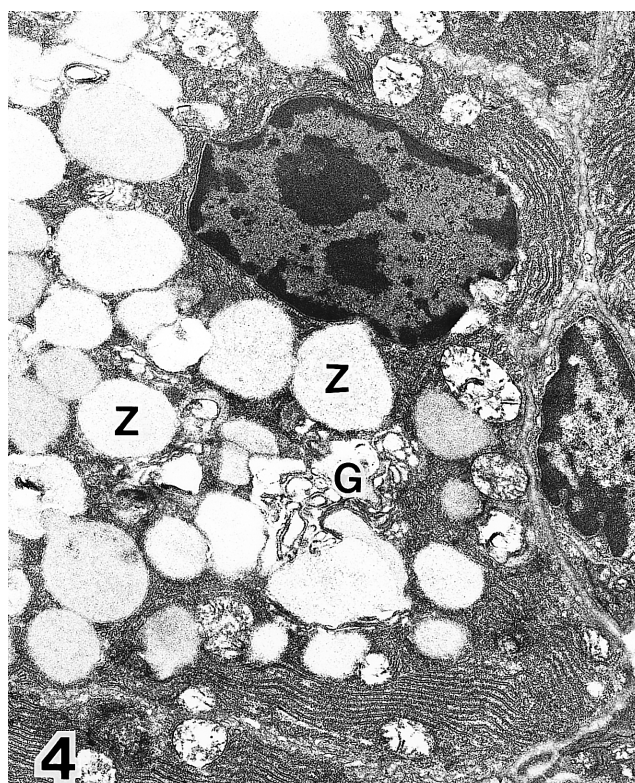


Fig. 4. A parotid acinar cells from a rat fed with 5% lac color for 2 weeks showing enlarged electron-translucent secretory granules (Z) and irregular Golgi apparatus (G). (X 7,900)

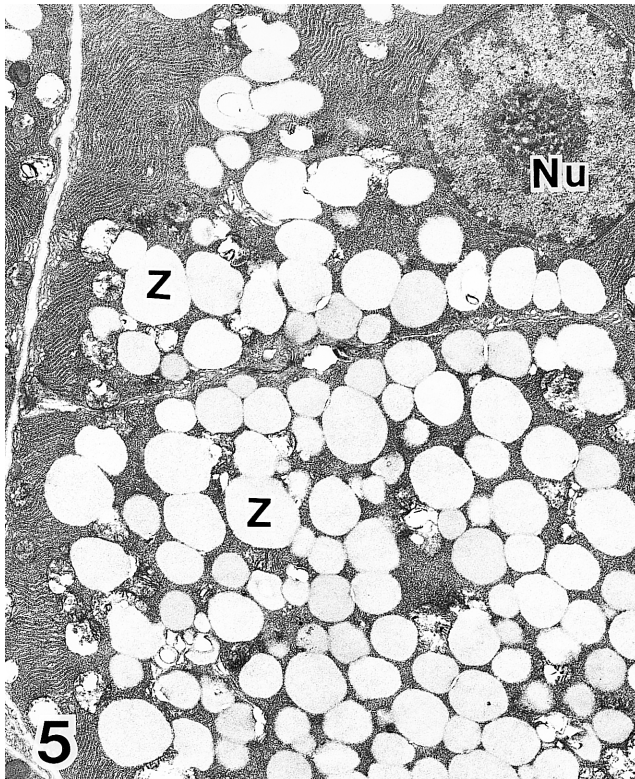


Fig. 5. A parotid acinar cells from a rat fed with 5% lac color for 2 weeks showing the enlargement of nucleolus (Nu) and a light matrix of secretory granules (Z). A gap between cell and cell becomes narrower. (X 4,850)

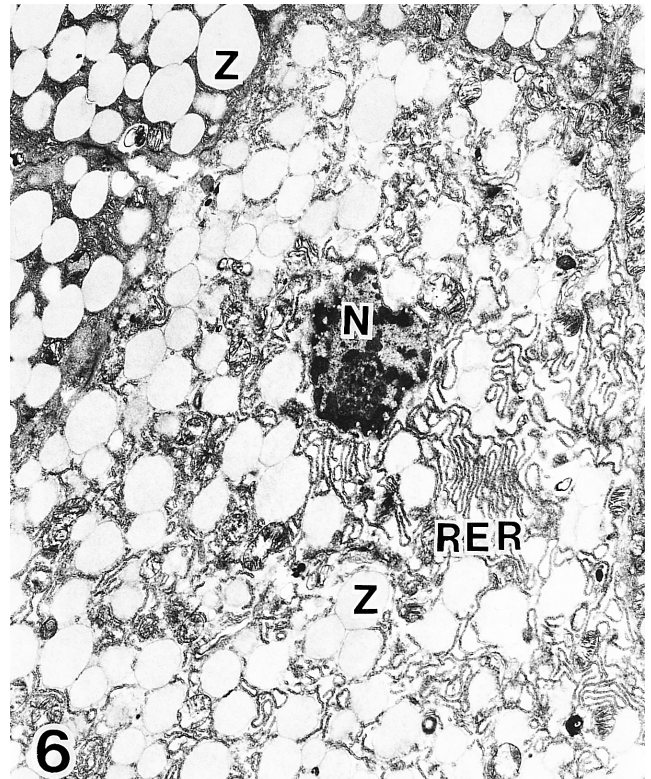


Fig. 6. A parotid acinar cells with remarkable damage of a rat fed with 5% lac color for 4 weeks showing the dilation of RER and the degeneration of nucleus (N). (X 4,850)

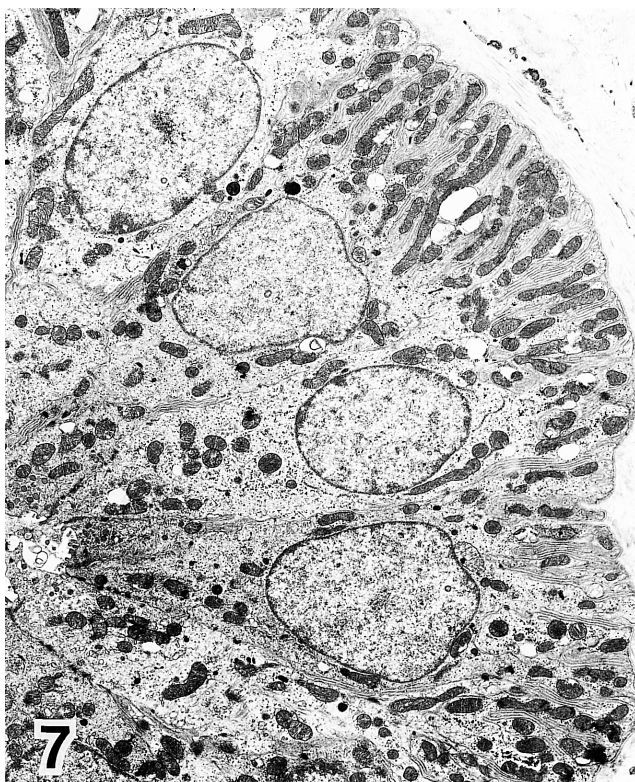


Fig. 7. A striated duct in a control rat parotid gland showing the basal infolding of the epithelial cell membrane. (X 3,750)

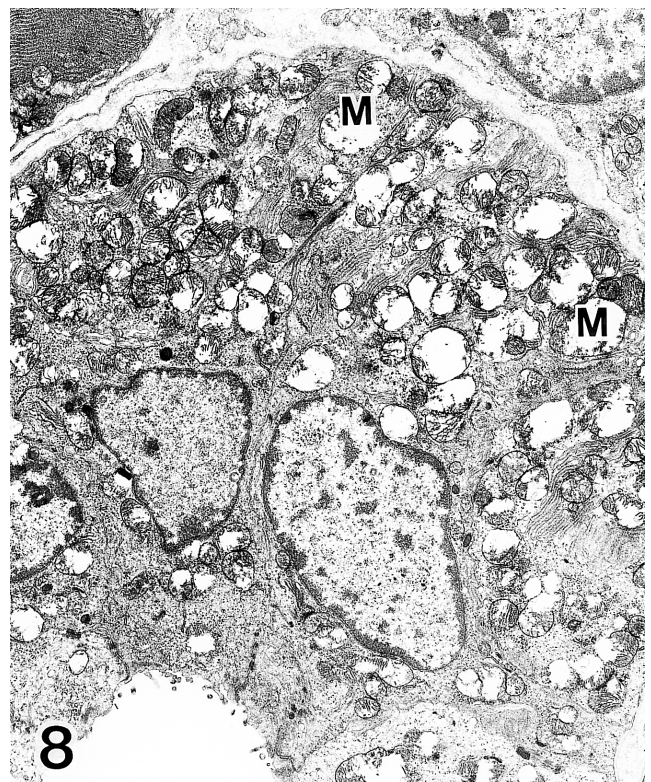


Fig. 8. A striated duct from a rat fed with 5% lac color for 2 weeks showing the destruction of mitochondria (M). (X 5,000)