

神経線維束中の神経細胞とラット顎下神経節の 免疫組織化学的研究

平野 航¹⁾ 東 一 善¹⁾ 河田 亮¹⁾
大西 宏 祐¹⁾ 杉村 太 丈²⁾ 小口 岳 史³⁾
前田 信 吾¹⁾ 尾之上 さくら⁴⁾ 高橋 理^{*.1)}

¹⁾神奈川歯科大学大学院歯学研究科口腔科学講座神経組織発生学分野

²⁾神奈川歯科大学大学院歯学研究科口腔統合医療学講座歯科矯正学分野

³⁾神奈川歯科大学総合教育部

⁴⁾関東学院大学理工学部

(受付：2019年8月28日，受理：2019年10月7日)

An immunohistochemical study of rat submandibular ganglion and nerve cells observed
in the bundles

Wataru HIRANO¹⁾, Kazuyoshi HIGASHI¹⁾, Akira KAWATA¹⁾, Kosuke ONISHI¹⁾,
Takahiro SUGIMURA²⁾, Takeshi OGUCHI³⁾, Shingo MAEDA¹⁾, Sakura ONOUE⁴⁾
and Osamu TAKAHASHI^{*.1)}

¹⁾Division of Histology, Embryology and Neuroanatomy, Department of Oral Science, Graduate School of Dentistry,
Kanagawa Dental University

²⁾Division of Orthodontics, Department of Oral Interdisciplinary Medicine, Graduate School of Dentistry,
Kanagawa Dental University

³⁾Division of Curriculum Development, Kanagawa Dental University, 82 Inaoka-cho, Yokosuka, Kanagawa, Japan

⁴⁾College of Science and Engineering, Kanto Gakuin University,
1-50-1 Mitsuura-higasi, Kanagawa-ku, Yokohama, Kanagawa, Japan

Abstract

We have studied immunohistochemically for physiologically active substances, such as vasoactive intestinal peptide (VIP) and neuropeptide Y (NPY), in rat submandibular ganglion cells. We have also observed the ultrafine structure of the submandibular ganglia using light and electronic microscopy and have reported the localization of VIP and NPY in these ganglia. We have also identified ganglion neurons in the nerve fiber bundle near the ganglion. Therefore, in this study, we performed ultrafine structural analysis and immunohistochemistry with these ganglion neurons in the same way as rat submandibular ganglion neurons. The submandibular gland and surrounding tissues of male Wistar rats were excised, fixed, and embedded in resin. Serial sections were prepared, stained using toluidine blue, and observed with a light microscope. Ultrathin sections were prepared by the same fixation and embedding method, and then observed with an electron microscope. In addition, immunostaining for VIP, NPY, 5-HT (serotonin), protein gene product 9.5 (PGP 9.5), etc. was performed and observed with a confocal laser microscope. Ganglion cells located outside the submandibular ganglion are distributed along the main conduit, but morphological features of the soma and mantle cells were similar to those of submandibular ganglion neurons.

Most cell bodies found in the vicinity of the ganglia were VIP immunopositive, and NPY-immunopositive cells were rare. Many VIP-immunopositive cells were observed around the main conduit. VIP-immunopositive cells, which are frequently observed in the vicinity of the submandibular gland main duct, are thought to control cell functions such as secretion and absorption of the main duct.

* 責任著者連絡先；〒 238-8580 神奈川県横須賀市稲岡町 82 番地
神奈川歯科大学大学院歯学研究科口腔科学講座神経組織発生学分野
高橋 理
TEL & FAX: 046-822-8846 e-mail: o.takahashi@kdu.ac.jp

緒 言

顎下神経節はヒトでは顎下三角に、ラットでは顎下腺主導管の長軸に沿って、顎下腺門付近から遠位部に存在している¹⁾。Ng YK らがその形態について研究を行い、顎下神経節の機能についての研究が行われるようになってきている^{2,3)}。

神経活性物質に関しての研究も行われており、vasoactive intestinal polypeptide (VIP), calcitonin gene-related peptide (CGRP), ニューロペプチド Y (NPY) や serotonin (5-HT) 等が顎下神経節中に存在している⁴⁻⁷⁾。VIP は中枢神経や消化管では電解質の分泌、吸収、血流調節に関与している⁸⁻¹⁰⁾。顎下腺主導管上皮中の刷子細胞に VIP 免疫陽性反応があり¹¹⁾、また同様に主導管上皮中にセロトニン陽性を示す細胞が存在し、合わせて顎下神経節にもセロトニンの存在を見出している¹²⁻¹⁴⁾。さらに顎下腺では VIP は血管の拡張に関与していると報告されている⁷⁾。

顎下神経節からの線維は主導管にも分布して唾液成分の再調整にも関与していることは既に知られている¹⁵⁾。小口らの研究では顎下神経節において顎下神経節からは腺体へは NPY が、主導管へは VIP が主となって分布していることが報告されている⁷⁻¹¹⁾。

しかし、顎下神経節中の神経細胞の大部分は NPY 免疫陽性を示しており、一方、VIP 免疫陽性を示す神経細胞はわずか 10 数個である⁷⁾。これら少数の VIP 免疫陽性細胞が主導管を支配するには、限度があるものと考えられる。

顎下神経節は神経節の外周は神経周膜に包まれ、その中に 3,000 数個のニューロンと外套細胞、神経線維等が含まれた構造である^{3,7)}。一方、単独もしくは 2~3 個の神経細胞からなる神経節の存在については、自律神経系では比較的多く存在し、それらの研究も行われている¹⁶⁾。毛様体神経節の近傍に存在する神経細胞については Kuchiiwa らが観察し副毛様体神経節と呼び、副毛様体神経節は毛様体神経節と性質が異なっていることを報告している¹⁷⁾。そこでわれわれは、

顎下神経節近傍に存在する神経細胞が顎下神経節の働きになんらかの形で関係しているのではないかという仮説を立て、実験を行った。

本研究では神経線維中に認められる神経細胞の形態やその機能について検索し、合わせてその性質を知るために顎下腺の分泌に大きく関与していると考えられている NPY および顎下腺主導管の唾液再調整に関与すると考えられている VIP や広く顎下神経節に分布している 5-HT について免疫組織化学的に検索し、顎下神経節と顎下神経節の近傍に位置する神経線維束中の神経細胞を比較検討した。さらに神経線維や神経節を確認するために protein gene product 9.5 (PGP 9.5) を併用した。

実験材料および方法

1. 実験動物

生後 8 週および 15 週の Wistar 系雄性ラット (体重 260~350 g) 20 匹を用いた。

本実験は、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た (承認番号 18-022)。実験動物は「動物実験の飼育および保管等に関する基準」(昭和 55 年 3 月 27 日総理府広告 6 号) に基づいて、倫理的に扱った。

2. 成体ラットの顎下神経節近傍の神経線維中にみられる神経細胞の形態学的な解析

実験動物 8 匹に対してバルビタール酸ナトリウム (50 mg/kg) を腹腔内投与し麻酔し、左心室より生理食塩水を灌流し、2.5% グルタルアルデヒド溶液 (0.1 M リン酸緩衝液 (PBS, pH7.4)) にて 20 分間灌流固定を行った。固定後、直ちに顎下神経節と主導管を周囲組織とともに摘出した。摘出した試料はさらに同固定液にて 1 時間浸漬固定した後、1% オスミウム酸 (PBS, pH7.4) で 1 時間固定した。さらにアルコール系列で脱水、酸化プロピレンを介して Quetol 651 樹脂 (Polysciences; Warrington, USA) に包埋した。その後 MT-1 型ミクロトームで超薄切片を作製し、酢酸ウラニルとクエン酸鉛で電子染色を施し、電子顕微

鏡用試料として、JEOL-1220 型電子顕微鏡（日本電子；東京，日本）を用いて観察した。さらに、包埋した試料は同型ミクロトームを用いてガラスナイフで約 1 μm の厚さで切片を作製し、1% トルイジンブルー液にて染色を施し、光学顕微鏡で観察した。

3. 成体ラットの顎下神経節と神経線維中にみられる神経細胞について免疫組織化学的な解析

1) 試料作製

実験動物 4 匹を神経細胞のマーカーである PGP 9.5 と VIP による二重免疫染色に、4 匹を PGP 9.5 と 5-HT による二重免疫染色に、4 匹を PGP 9.5 と NPY による二重免疫染色に使用した。動物に対してバルビタール酸ナトリウム (50 mg/kg) を腹腔内投与し麻酔を施した後に、左心室より 4% パラホルムアルデヒドを含む 0.1 M PBS (pH7.4) にて灌流固定を行った。灌流固定の後に顎下神経節を主導管やその周囲組織と共に摘出し、直ちに同固定液にて 12 時間固定した。その後、O.C.T.compound (Tisse-Tek, SAKURA: 大阪, 日本) を用いて凍結包埋し、凍結ミクロトームにて厚さ約 20 μm の凍結切片を作製した。薄切切片をスライドガラス上に載せ風乾し、VIP, NPY, 5-HT および PGP 9.5 について免疫染色を行った。

2) 免疫組織化学的方法

凍結切片を用いて、以下の手法で免疫染色を行った。試料を血清 (10% ヤギ血清 (NGS)/0.75% Triton X-100/0.05% NaN_3) を含有した 0.1M リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) 中に 1 時間洗浄した。続いてマウス抗 PGP 9.5 モノクローナル抗体 (UCL; Wright, England, 1/100 in 0.1M PBS 中に 10% NGS/0.75% Triton X-100/0.05% NaN_3 含有) とウサギ抗 VIP ポリクローナル抗体 (PLI; San Carlos, CA, USA, 1/200 in 0.1 M PBS 中に 10% NGS/0.75% Triton X-100/0.05% NaN_3 含有), もしくはマウス抗 PGP 9.5 モノクローナル抗体 (UCL; Wright, England, 1/100 in 0.1 M PBS 中に 10% NGS/0.75% Triton X-100/0.05% NaN_3 含有) とウサギ抗 NPY ポリクローナル抗体 (PLI; San Carlos, CA, USA, 1/200 in 0.1 M PBS 中に 10% NGS/0.75% Triton X-100/0.05% NaN_3 含有), もしくはマウス抗 PGP 9.5 モノクローナル抗体 (UCL; Wright, England, 1/100 in 0.1M PBS 中に 10% NGS /0.75% Triton X-100/0.05% NaN_3 含有) とウサギ抗 5-HT ポリクローナル抗体 (PLI; San Carlos, CA, USA, 1/500 in 0.1M PBS 中に 10% NGS/0.75% Triton X-100/0.05% NaN_3 含有) 中に、4°C で一晩浸漬した。その後 PBS にて洗浄し、ヤギビオチン化抗マウス IgG 抗血清 (DAKO; Glostrup, Denmark, 1/400 in 0.1M PBS 中に 10% NGS/0.05% NaN_3 含有) とヤギ Alexa 488 標識抗ウサギ IgG 抗血清

(Wako; Osaka, Japan, 1/50 in 0.1M PBS 中に 10% NGS/0.05% NaN_3 含有) 混液中に室温で 1 時間浸漬した。その後に PBS で洗浄し、さらに Cy 3-streptavidin (KPL; Guildford, UK, 1/1000 in 0.1 M PBS 中に 10% NGS/0.05% NaN_3 含有) に 1 時間浸した。免疫組織化学的に標識した試料は 40% グリセリン溶液で封入し、共焦点レーザー顕微鏡 (Nikon, ECLIPSE. E800) にて観察した。

結 果

1. ラット顎下神経節および神経線維中に認められる神経細胞の形態学的観察

1) 光学顕微鏡による観察

光学顕微鏡でラットの顎下神経節周囲の横断像を観察すると、顎下神経節中にはいくつかの神経細胞が集合して認められる。この神経細胞の形状は円形に近い形状を示している。神経細胞の間には神経線維が認められ、これが一塊として周囲を神経周膜によって包まれ、さらに神経周膜の周囲は結合組織に包まれている。この神経節とは別に主導管の外膜中の神経線維中に 1~2 個の神経細胞が観察された (図 1a)。

この神経線維中に認められる神経細胞の形状は不規則な多角形として認められた。この神経細胞の周囲には多くの神経線維が存在しており、明らかに通常の神経節とは異なって観察された。この神経細胞の周囲の神経線維中には核や明瞭な核小体が認められたほか、細胞間隙にはミエリン鞘が多数存在している (図 1b, c)。また神経線維中に認められる多くの神経細胞は通常の神経節とは主導管を挟んで反対側の主導管周囲の外膜中に存在しており、また顎下腺主導管上皮は多列円柱上皮であり、基底細胞も明瞭に区別出来た。また主導管外膜には多くの毛細血管が導管を取り囲んで観察された (図 1a)。

2) 神経線維中に認められる神経細胞の分布

VIP 免疫染色と NPY 免疫染色を施した切片各々 40 例中で神経線維中に認められる神経細胞の数およびその位置を検索した。今回観察した神経細胞は 47 個であったが、それらの分布を検索すると顎下神経節と主導管の間に 5 個存在し、主導管とは関係ない位置に 2 個で、残りの 40 個は主導管を挟んだ反対側の主導管周囲の外膜に存在していた。さらに VIP 免疫陽性を示した神経線維中に認められた神経細胞は 41 個であり、NPY 免疫陽性を示した神経線維中に認められた神経細胞はわずか 6 個であった (図 2)。

3) 電子顕微鏡による観察

電子顕微鏡で顎下神経節を観察すると比較的円形に近い形状を示すニューロン中に明瞭な核小体を有する

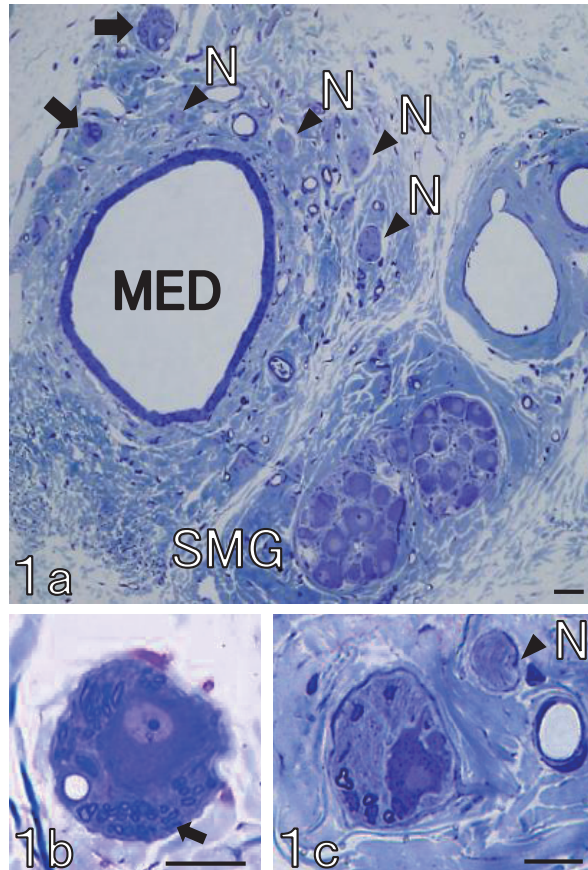


図1 ラット顎下神経節と神経線維中に認められる神経細胞のトルイジンブルー染色を施した連続切片の一部の光学顕微鏡像 (Bar: 20 μ m)

MED: 顎下腺主導管 SMG: 顎下神経節 N: 神経線維

1a: 顎下腺主導管の近傍に数十個の神経細胞の集合体からなる顎下神経節が認められてくる。球形の神経細胞の核は明瞭である。さらに、神経細胞の周りは神経周膜に包まれている。神経細胞と神経細胞の間には神経線維が認められる。主導管の周りに多数の神経線維が取り囲んでいる。顎下神経節とは別に導管を取り囲む神経線維中に1~2個の神経細胞を有する構造が認められる (矢印)。

1b: 神経線維中に認められる神経細胞の拡大を示している。

この細胞は多角形を呈し、明瞭な核と核小体が認められる。

ニューロンの周りにはミエリン鞘 (矢印) や血管が認められる。

これらは1つの神経周膜によって包まれている。

1c: 主導管の外膜中に認められた神経細胞は、多角形な細胞の形状を示し、またその一部が突出している。このような構造の他に結合組織中には多くの神経線維が認められる。

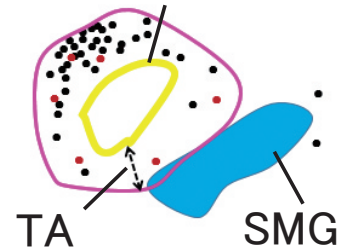
核が認められた。さらに細胞周辺部には比較的明るい電子密度を有する構造がいくつか認められた。細胞質中にはミトコンドリアや粗面小胞体が観察された。またニューロンを取り囲むように外套細胞が存在していた。顎下神経節ニューロンの構造は、門付近のものと同位部のものに差異は認められなかった (図 3a)。神経線維中に認められる神経細胞を電子顕微鏡で観察すると不規則な形状を示すニューロンが観察された。このニューロン中には明瞭な核小体を有する核が存在し、その周囲の細胞質中の外縁部によく発達した粗面

小胞体が観察されたほか、自由リボソームが多数観察され、細胞質周囲部は暗調に認められた。細胞周囲には比較的明るい電子密度を有する構造がいくつか認められた。また細胞質の一部が周囲の神経線維に向けて突出する像が多数観察された。その外側にニューロンに接して外套細胞の核が認められた (図 3b)。観察したすべての神経線維中に認められる神経細胞の形態学的差異は認められなかった。

2. PGP 9.5 と VIP による二重免疫染色

成体ラットに PGP 9.5 と VIP の二重免疫染色を

主 導 管 の 上 皮



●: NPY 陽性細胞

●: VIP 陽性細胞

図 2 ラット顎下神経節と神経線維中に認められる神経細胞の模式図

MED: 顎下腺主導管 SMG: 顎下神経節 SG: 顎下腺 TA: 主導管外膜

顎下腺主導管の横断像を示している。主導管外膜に認められた単独の神経細胞を有する構造の分布を示している。

多くの神経線維中に認められる神経細胞は顎下神経節とは主導管を挟んで反対側に認められる。さらにその単独の神経細胞の多くはVIP陽性を示したが、NPY陽性を示す細胞も認められてきた。

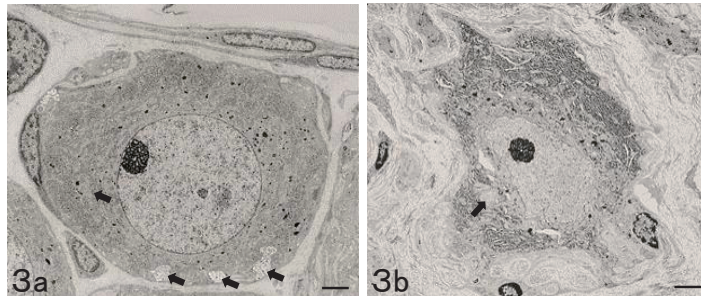


図 3 顎下神経節ニューロンと神経線維中に認められる神経細胞の電子顕微鏡像 (Bar: 2 μm)

3a: 顎下神経節細胞の電子顕微鏡像を示している。神経節細胞に淡染性の核と高電子密度の核小体が観察される。この神経細胞の辺縁部には電子密度の低いシナプスが認められる (矢印)。さらにニューロンの周囲には外套細胞が認められ、そこからニューロンの周囲に細い突起を伸ばしている。

3b: 神経線維中に認められる神経細胞を示している。

細胞の形状は不規則で、内部によく発達した粗面小胞体がみられる。

この細胞から放射状に細胞質の一部が突出している。

細胞周囲には多くの神経線維が認められる。

施して門付近の顎下神経節を観察すると一部の神経節ニューロンにVIP免疫陽性部位が観察された。PGP 9.5免疫陽性とVIP免疫陰性を示すニューロンも存在していた。またVIP免疫陽性ニューロンは顎下腺の門付近の顎下神経節のみに認められ、それより遠位部の神経節には認められなかった (図 4a)。神経線維中に認められる神経細胞と同様にPGP 9.5とVIPの二重免疫染色を施して観察すると、門より遠位部の

神経細胞にVIP免疫陽性反応が認められた。神経線維中に認められる神経細胞はPGP 9.5とVIPの免疫染色で共陽性を示したが、神経細胞周囲はPGP 9.5のみに陽性反応を示した。その間の細い線条のPGP 9.5とVIPの免疫染色で共陽性を示す構造が混在していた。また、PGP 9.5とVIP免疫陽性反応を示す神経線維中に認められる神経細胞は門より遠位部で認められたが、門付近の神経細胞は陰性を示した (図 4b)。今

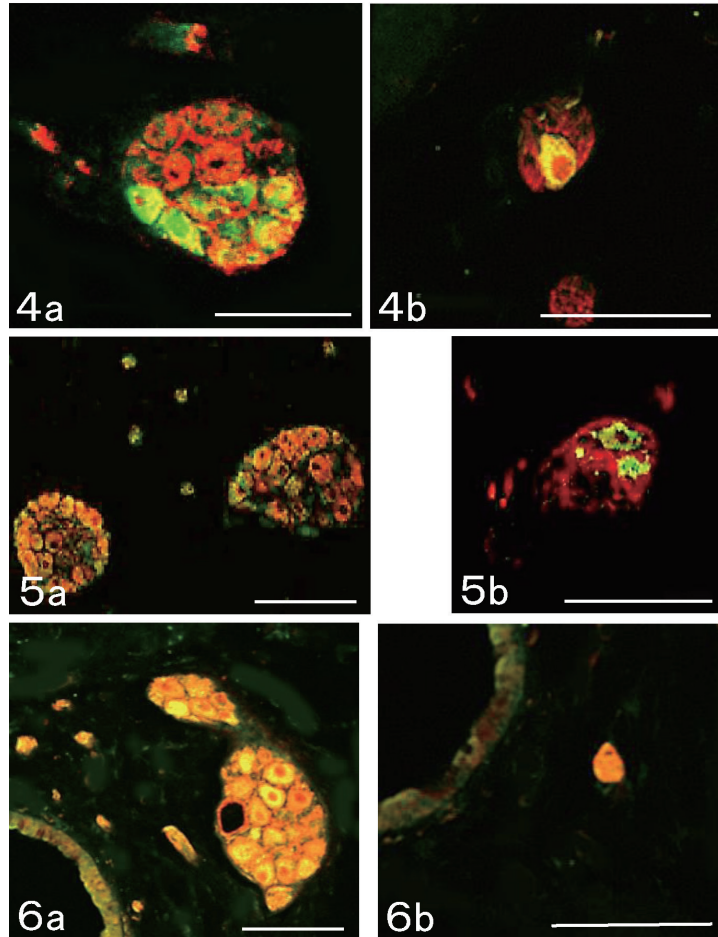


図4 顎下神経節と神経線維中に認められる神経細胞における PGP 9.5(red)と VIP(green)の二重免疫染色 (Bar: 50 μ m)

4a: 門付近の顎下神経節を示している。門付近の顎下神経節は多くの神経細胞によって構成されているが、一部の細胞は PGP 9.5 と VIP の共陽性を示している。

さらに顎下神経節の近傍にも VIP 陽性線維と PGP 9 のみ共陽性を示す線維が認められる。

4b: 神経線維中に認められた門よりさらに遠位部に見られた神経線維中の神経細胞を示す。VIP 陽性を示す神経細胞の周りには PGP 9.5 陽性を示す神経線維が認められる。

図5 顎下神経節と神経線維中に認められる神経細胞における PGP 9.5 (red) と 5-HT (green) の二重免疫染色 (Bar: 50 μ m)

5a: 顎下神経節には多くの神経細胞が認められるが、いずれも 5-HT 陽性を示している。

5b: 門付近に認められた神経線維中に存在する PGP 9.5 と 5-HT の共陽性を示す神経細胞が 2 個認められ、周りは多くの PGP 9.5 を示す構造に囲まれている。

図6 顎下神経節と神経線維中に認められる神経細胞における PGP 9.5 (red) と NPY (green) の二重免疫染色 (Bar: 50 μ m)

6a: 門付近に多くの神経細胞が顎下神経節中に認められるが、多数が NPY 陽性を示しており、顎下神経節から顎下腺に分布している。

顎下神経節の近傍には NPY 陽性を示す神経線維も認められる。

6b: 門より内側の顎下腺付近に認められた NPY 陽性を示す神経線維中に認められた神経細胞を示している。この神経細胞は PGP 9.5 と NPY の共陽性を示している。

回観察した神経細胞 47 個中 41 個が VIP 免疫陽性を示した。

3. PGP 9.5 と 5-HT の二重免疫染色

PGP 9.5 と 5-HT の免疫染色を施して顎下神経節を

観察するとニューロンはすべて両者が共陽性を示した。さらに顎下神経節と主導管の間にも共陽性を示す構造が散在していた (図 5a)。この顎下神経節とは別に主導管近傍に神経線維中に見られる神経細胞が観察

された。1~2個の神経細胞はPGP 9.5と5-HTの共陽性を示した。神経細胞周囲にはPGP 9.5免疫陽性を示す構造があり、ニューロンと連絡する細い線維が観察された(図5b)。

4. PGP 9.5 と NPY の二重免疫染色

門付近の顎下神経節にPGP 9.5とNPYの免疫染色を施して観察すると、多数の神経節ニューロンはNPY免疫陽性を示した。

また主導管と神経節の間には多くのPGP 9.5とNPY共陽性を示す神経線維が散在していた(図6a)。門付近の神経線維中に認められる神経細胞はPGP 9.5とNPY共陽性を示したが、門より遠位部ではNPY免疫陽性を示す神経細胞はほとんど認められなかった(図6b)。今回観察した神経線維中に認められる神経細胞中にNPY陽性を示したのは6個であった。そのほとんどが門付近に存在していた。

5. 顎下神経節と神経線維中の神経細胞の免疫染色結果

以上の結果より、顎下神経節と神経線維中の神経細胞について免疫組織化学的な検索結果を比較した(表1)。PGP 9.5ならびに5-HT免疫陽性細胞は顎下神経節ならびに神経線維中に多数が観察されたが、VIP陽性細胞は顎下神経節の少数のニューロンに観られ、一方でNPY免疫陽性細胞は神経線維中のニューロンに少数が見出された。

表1 顎下神経節と神経線維中の神経細胞の免疫染色結果

	顎下神経節	神経線維中の 神経細胞
PGP9.5	+	+
5-HT	+	+
VIP	± VIP < NPY	+ VIP > NPY
NPY	+ VIP < NPY	± VIP > NPY

+ : 多数の免疫陽性 ± : 一部に免疫陽性 - : 免疫陰性

考 察

1. 顎下神経節と神経線維中に認められる神経細胞の構造

顎下神経節中のニューロンは円-卵円形の形状を示し、細胞中には大きな核と核小体が明瞭であった。さらにニューロンの周囲には多くの神経線維が存在しており、それらが神経周膜に包まれていた。この構造は他の器官で報告されている自律神経節構造と形態学的差異は認めなかった¹⁵⁾。

一方、顎下腺主導管付近の神経線維中に認められる神経細胞の存在については、顎下腺では報告は認められない。この神経細胞については本来の神経節ニューロンから派生してきたと考えられることから、その研究は極めて少ない。Kuchiiwaらはネコで三叉神経支配の筋に逆行性トレーサーとして西洋ワサビペルオキシダーゼ(HRP)とHRP標識小麦胚芽凝集レクチン(WGA-HRP)の混合液を投与して検索し、翼口蓋神経節と近傍にある副神経節に反応が検出されたが、顎下神経節には反応が認められなかったと報告している¹⁴⁾。しかし翼口蓋神経節近傍にある副神経節の形状の詳細な観察は行っていない。さらに仲田らは腹大動脈神経叢付近に神経線維中に認められる神経細胞の存在を、久喜らは鼓室神経叢付近に神経線維中に認められる神経細胞の存在を報告しているが、いずれもその詳細な形態学的検索はない^{18,19)}。加えてKuchiiwaらは眼球に存在する毛様体神経節付近に神経線維中に認められる神経細胞を観察し、副毛様体神経節とよび、本来の神経節とはその性質が異なっていることを報告している。また細胞質中には粗面小胞体やミトコンドリア等の細胞小器官が存在しているほか、細胞辺縁部にはやや電子密度が低い構造が幾つか観察された。この構造は既に報告があるaxon terminalと類似しており、ニューロンとの間にシナプスを形成していると考えられる。さらにその外周には外套細胞が取り囲んでいる。細胞間隙は広く、その外側には神経周膜が取り囲んでいた。この構造は既にNg YKらが報告している顎下神経節と差異を認めなかった。一方、神経線維中に認められる神経細胞は多角形の形状で、その先端が周囲に突出しているような構造が観察された。核は卵円形で核小体も明瞭であり、細胞質中にはよく発達した粗面小胞体やミトコンドリアが存在していた。これらの構造は細胞の形状を除き、顎下神経節のニューロンと類似していた。細胞周辺部には顎下神経節ニューロンと同様な低電子密度を示す構造があり、これはaxon terminalと考えられた。細胞周囲には多くの神経線維が存在し、神経線維の間にニューロンが挟まっているように認められた。

さらに顎下神経節のニューロンの細胞質は明調で、神経線維中に認められる神経細胞の細胞質は暗調であった。この細胞を電子顕微鏡で観察すると、粗面小胞体と自由リボソームが多く認められたことから、粗面小胞体と自由リボソームの量によるものと考えられる。粗面小胞体の発達はNg YKらの報告と差異はなかったが、神経線維中に認められる神経細胞の形状は明らかに顎下神経節ニューロンの形状と差異が認められた。顎下神経節の生後発達を観察したNg YKらに

よれば発達過程にある顎下神経節ニューロンは細胞辺縁部によく発達した粗面小胞体が存在すると報告している²⁰⁻²²⁾。彼らの報告の発達過程にあるニューロンと神経線維中に認められる神経細胞の形状は類似しているが、生後8~15週の顎下神経節、主導管の形状は他の報告の成体ラットのものとの差異は認められず、また神経線維中に認められる神経細胞の大きさも顎下神経節のものとの差異は認めなかったことから、本観察の神経細胞がまだ発達過程にあると考えられない。しかし粗面小胞体の発達は細胞の活動状況によって変化することから、本観察の神経細胞は細胞活性の違いによるものと考えられる。ちなみに今回観察し電子顕微鏡で観察した神経線維中に認められる神経細胞はすべて同様な形状を示した。

2. 神経線維中に認められる神経細胞の局在

神経細胞の局在について仲田は腹腔神経叢付近に存在する神経細胞について検索し、腹大動脈から中副腎動脈壁に分布し、アドレナリンかノルアドレナリンを含有していることを報告している¹⁸⁾。さらにその機能については末梢血管の調整に関与するとしている。本観察の神経細胞は一部顎下神経節側に存在していたが、主導管を挟んで顎下神経節の反対側に多く存在していた。しかも顎下神経節は主導管とは異なった結合組織中に存在しているのに対して、神経細胞は主導管外膜中に存在する神経線維束中に見出された。主導管を挟んだ反対側の主導管周囲の外膜に神経細胞が多数存在していたことは、顎下腺主導管と神経線維中に認められる神経細胞の間に何らかの関係があるものと考えられる。顎下腺主導管の周囲には多くの神経線維が分布しており、またその周囲には毛細血管が網工を形成していることも前述のことを裏付けるものと考えられる²³⁾。さらに多数の神経線維中に認められる神経細胞が門から遠位部に多数存在していることから、顎下腺腺体との関係より、主導管との関係が強いものと考えられる。

3. 顎下神経節と神経線維中に認められる神経細胞の免疫組織化学

顎下神経節と神経細胞の性質を検索するためにPGP 9.5とVIP、PGP 9.5とNPYおよびPGP 9.5と5-HTの免疫染色を施して観察した。その結果は表1に示した。5-HTはすべての顎下神経節や神経細胞に免疫陽性を示した。5-HTが顎下神経節に存在することは石井-川邊らによって報告され、選択的セロトニン再取り込み阻害剤で顎下神経節からセロトニンが消失し、その結果、唾液の分泌障害が生じることを報告している²⁴⁾。石井-川邊らの報告では神経細胞の変化については観察していないが、同様な反応が神経細胞でも生じるこ

とが考えられる。

顎下神経節はPGP 9.5とVIPの免疫染色陽性を示した。VIP免疫陽性を示す顎下神経節ニューロンは門付近のみに局在しており、それより顎下腺腺体側と門より遠位部の神経節はすべてVIP免疫陰性を示したが、その部分はすべてNPY免疫陽性を示した。このようにVIP免疫陽性ニューロンが主に主導管また門付近にのみ局在しているということはすでに小口らが報告している⁷⁾。顎下神経節ニューロンの数は全体で3,000個という研究結果があるが、それに対してVIP免疫陽性ニューロンはわずか10数個である³⁾。一方、今回観察した神経細胞のうちNPY陽性を示したのは6個であり、そのほとんどが門付近に存在していた。VIPは主に主導管やその周囲に網工構造を形成している毛細血管に分布しており、NPYは主に顎下腺腺房に分布するという報告がある²⁵⁾。これらの免疫染色結果や神経細胞が主導管外膜中に存在していることから、VIP陽性の神経細胞が主導管と関係があると考えられる。またVIP免疫陽性を示す神経細胞から細い線条構造が周囲部に伸びている像も合わせて観察されたが、神経線維にはシュワン細胞の核が認められなかった。また自律神経の節後線維は無髄神経線維であり、本所見もこれに一致することから、細い神経線維は周囲の主導管や血管網に分布する節後線維であろうと考える¹⁵⁾。

以上の結果から本観察の神経線維中の神経細胞は従来報告があった様に発生時に顎下神経節から派生したものであっても、VIP免疫陽性ニューロンが顎下神経節では非常に数が少なく、神経線維中の神経細胞が多いことから、顎下神経節と神経線維中の神経細胞は性質が異なり、さらに神経線維中のVIP免疫陽性ニューロンが自律神経の節後ニューロンとして顎下腺主導管やその周囲の血管網にその軸索を投射することで、唾液の分泌機構に関わる事が示唆された。

利益相反

申告すべき利益相反なし。

文 献

1. 平沢 興：解剖学：2巻，11版，原出版，東京，2008。
2. Kathleen DV: Biology of the salivary glands. CRC Press, Boca Raton, 1993.
3. Ng YK, Wong WC, Ling EA: A study on the submandibular ganglion of the monkey with special reference to ultrastructural changes after lingual nerve sectioning. *Arch Histol Cytol.* **56**: 371-383, 1993.
4. Soinila J, Salo A, Uusitalo H, Yanaihara N, Happola O: CGRP-immunoreactive sensory nerve fibres in the

- submandibular gland of the rat. *Histochemistry*. **91**: 455-460, 1989.
5. Smith AB, Hansen MA, Liu D-M, Adams DJ: Pre-and postsynaptic actions of ATP on neurotransmission in rat submandibular ganglia. *Neuroscience*. **107**: 283-291, 2001.
 6. Anderson LC, Garrett JR, Zhang X, Proctor GB: Protein secretion from rat submandibular acini and granular ducts: effects of exogenous VIP and substance P during parasympathetic nerve stimulation. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*. **119**: 327-331, 1998.
 7. 小口岳史, 東 一善, 河田 亮, 飯村 彰, 松尾雅人, 尾之上さくら, 高橋 理: ラット顎下神経節におけるVIP陽性及びNPY陽性ニューロンの局在について. 神奈川歯学. **51**(2): 82-90, 2016.
 8. Igarashi H, Fujimori N, Ito T, Nakamura T, Oono T, Nakamura K, Suzuki K, Jensen RT, Takayanagi R: Vasoactive intestinal peptide (VIP) and VIP receptors—elucidation of structure and function for therapeutic applications. *Int J Clin Med*. **2**: 500-508, 2011.
 9. Ekström J, Godoy T, Loy F, Riva A: Parasympathetic vasoactive intestinal peptide (VIP): a likely contributor to clozapine-induced sialorrhoea. *Oral Dis*. **20**: e90-e96, 2014.
 10. M Del Fiacco, Quartu M, Ekström J, Melis T, Boi M, Isola M, Loy F, Serra MP: Effect of the neuropeptides vasoactive intestinal peptide, peptide histidine methionine and substance P on human major salivary gland secretion. *Oral Dis*. **21**: 216-223, 2015.
 11. 加藤智弘, 河田 亮, 東 一善, 高橋 理: ラット顎下腺主導管における刷子細胞に関する免疫組織化学的研究. 神奈川歯学. **49**: 101-110, 2014.
 12. Higashi K, Tsuzuki E, Hayashi H, Iwase M, Tamura T, Takahashi O: Morphological differentiation in the main excretory duct of the rat submandibular gland. *Dentistry in Japan*. **35**: 3-7, 1999.
 13. 東 一善, 都築英子, 林 弘之, 河田 亮, 高橋浩次, 赤城忠臣, 高橋 理: ラット顎下神経節ニューロンの免疫組織化学的研究. *J Oral Biosci*. **48**: 176, 2006.
 14. 東 一善, 都築英子, 河田 亮, 赤城忠臣, 大栗重彦, 杉山朋久, 高橋 理: ラット顎下腺および顎下神経節におけるVIP陽性細胞および陽性線維の研究. *J Oral Biosci*. **49**: 189, 2007.
 15. 藤田尚男, 藤田恒夫: 標準組織学総論: 第4版第3刷, 医学書院, 東京, 2005.
 16. 上原政夫: マウスの副腎髄質, 頸動脈小体及び二三の自律神経節におけるParaganglion細胞組織化学と電子顕微鏡による研究. 解剖学雑誌. **45**: 287-304, 1970.
 17. Kuchiiwa S, Kuchiiwa T, Nakagawa S, Ushikai M: Oculomotor parasympathetic pathway to the accessory ciliary ganglion bypassing the main ciliary ganglion by way of the trigeminal nerve. *Neuroscience Research*. **18**: 79-82, 1993.
 18. 仲田能孝: ParaganglionにおけるCatecholaminに関する組織化学的研究. 日本外科歯函. **32**: 149-168, 1963.
 19. 久喜まき子, 石井哲夫: 鼓室神経叢の小神経節について. *Ear Research Japan*. **15**: 173-175, 1984.
 20. Ng YK, Wong WC, Ling EA: The intraglandular submandibular ganglion of postnatal and adult rats I. A light and electron microscope study. *J Anat*. **180**(pt 2): 305-314, 1992.
 21. Ng YK, Wong WC, Ling EA: The intraglandular submandibular ganglion of postnatal and adult rats II. A morphometric and quantitative study. *J Anat*. **181**: 249-258, 1992.
 22. Ng YK, Wong WC, Ling EA: A study of the structure and functions of submandibular ganglion. *Annals of the academy of medicine*. **24**: 793-801, 1995.
 23. 秋本公美: ハムスター顎下腺主導管の形態学的研究. 神奈川歯学. **29**: 161-182, 1994.
 24. 川邊-石井裕美, 東 一善, 宮城 敦: 抗うつ薬投与がラット顎下神経節ニューロンのセロトニン発現に与える影響に関する免疫組織化学的研究. 神奈川歯学. **44**: 117-127, 2009.
 25. Schultz T, Soinila J, Tolonen R *et al.*: The sympathetic and parasympathetic nature of neuropeptide Y-immunoreactive nerve fibers in the major salivary glands of the rat. *Histochem J*. **26**: 563-570, 1994.