

顎下腺主導管  
 顎下神経節  
 シナプス  
 VIP

## ラット顎下腺主導管に分布する神経終末と顎下神経節ニューロンの 生後発達に関する形態学および免疫組織化学的研究

杉村 太丈<sup>1)</sup> 河田 亮<sup>2)</sup> 小口 岳 史<sup>3)</sup>  
 尾之上 さくら<sup>4)</sup> 大西 宏 祐<sup>2)</sup> 平野 航<sup>2)</sup>  
 前田 信 吾<sup>2)</sup> 東 一 善<sup>2)</sup> 高橋 理<sup>\*,2)</sup>

<sup>1)</sup>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

<sup>2)</sup>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

<sup>3)</sup>神奈川歯科大学総合教育部

<sup>4)</sup>関東学院大学理工学部

(受付：2019年12月3日, 受理：2020年1月6日)

Morphological and immunohistochemical study of postnatal development in rat submandibular ganglion neurons and nerve ending at main excretory ducts of the submandibular gland

Takahiro SUGIMURA<sup>1)</sup>, Akira KAWATA<sup>2)</sup>, Takeshi OGUCHI<sup>3)</sup>, Sakura ONOUE<sup>4)</sup>,  
 Kosuke ONISHI<sup>2)</sup>, Wataru HIRANO<sup>2)</sup>, Shingo MAEDA<sup>2)</sup>, Kazuyoshi HIGASHI<sup>2)</sup>  
 and Osamu TAKAHASHI<sup>\*,2)</sup>

<sup>1)</sup>Division of Orthodontics, Department of Oral Interdisciplinary Medicine, Graduate School of Dentistry,  
 Kanagawa Dental University

<sup>2)</sup>Division of Histology, Embryology and Neuroanatomy, Department of Oral Science, Graduate School of Dentistry,  
 Kanagawa Dental University

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

<sup>4)</sup>College of Science and Engineering, Kanto Gakuin University,  
 1-50-1 Mutsuura-higasi, Kanagawa-ku, Yokohama, Kanagawa, Japan

### Abstract

We morphologically and immunohistochemically examined at the submandibular ganglion, the number and properties of synapses, which were visualized with an anti-synaptophysin antibody, at the submandibular duct, and the surrounding arterioles during rat postnatal development.

The study showed that the number of synaptophysin-immunoreactive puncta in the main excretory duct and arteriole increased with development of the submandibular ganglion. However, the number of synaptophysin-immunoreactive puncta in the main excretory duct increased until 4 weeks of age, but the number of synaptophysin-immunoreactive puncta decreased significantly and rapidly at 8 weeks. This was likely due to the occurrence of pruning that has been reported in the central nervous system. There are no reports to date on this pruning in the submandibular gland. Vasoactive intestinal peptide (VIP)-positive nerve endings were observed from 3 weeks of age. This finding was correlated with the rapid increase in the cross-sectional area of the submandibular ganglion neurons in a time-dependent manner. Although the epithelium of the main excretory duct was stratified until 3 weeks of age, it transitioned to a pseudostratified type from 4 weeks. This change was correlated with the increase

**in the cross-sectional area of the submandibular ganglion and the decrease in the number of synaptophysin-immunoreactive puncta in a time-dependent manner. It has been reported that VIP is a key regulator of the components in the main excretory duct, indicating that postnatal development of the main excretory duct is closely associated with the submandibular ganglion, number of synapses, and VIP-positive nerve endings.**

\* 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

ラットでは顎下腺は漿粘液の唾液を分泌している。その分泌機構は交感神経では脊髄側角から起始する線維が上顎神経節でニューロンを換え、節後線維が、また副交感神経は上唾液核由来の線維が顎下神経節でニューロンを換えて、顎下腺の分泌や主導管の唾液最終成分調節に関与していると報告されている<sup>1,2)</sup>。

顎下神経節はヒトでは顎下三角に存在し、ラットでは顎下腺主導管に沿って顎下腺門付近から咬筋付近に存在している神経節である<sup>3,4)</sup>。この顎下神経節における研究は顎下神経節が中枢と末梢を連絡する単なるニューロンの中継点として考えられてきたこと<sup>5)</sup>から、その詳細な研究は行われてこなかった。しかし、顎下神経節の電子顕微鏡的な構造が報告されている<sup>6,7)</sup>。彼らの報告によれば、顎下神経節は結合組織性の被膜に包まれ、内部に神経細胞体、神経膠細胞（外套細胞）や神経線維から構成されている。また、免疫組織化学的研究によって、神経節中に非コリン作動性を示唆する種々の神経活性物質として calcitonin gene related peptide (CGRP), neuropeptide-Y (NPY), 5-hydroxytryptamine (5-HT, serotonin), vasoactive intestinal polypeptide (VIP) 等が存在し<sup>4,7,8)</sup>、副交感神経性の上唾液核との連絡のみならず、交感神経性の神経節である上顎神経節との連絡もあり、これらのことから顎下神経節が単なる中継核ではなく、唾液分泌調整や顎下腺主導管の機能にも深く関与している可能性が示唆されてきた。種々の神経活性物質のうち唾液腺の分泌や主導管の機能に最も関与しているのは NPY, VIP や 5-HT であると考えられている<sup>4,7-9)</sup>。また、その生後発達についても Ng ら<sup>10)</sup>が検索し、ラットでは生後 1~4 週で顎下神経節ニューロンの面積やその数が増大することを報告している。

一方、ラットの顎下腺は漿粘液を分泌し、腺房の他に介在部導管、線条部、顆粒管が存在していることが知られている<sup>11)</sup>。顎下腺の研究は腺房や線条部等の腺体内導管の検索が主であり、主導管の構造の研究は限

られていたが、Young ら<sup>12)</sup>によって主導管は分泌唾液へ電解質の添加やあるいは逆に吸収を行っていることが報告されて以来、顎下腺主導管上皮の構造についても種々の報告が認められる。すなわち、上皮は多列円柱上皮を呈し、上皮中には主細胞の他、刷子細胞、基底顆粒細胞が報告されている<sup>9,13-16)</sup>。さらに自律神経刺激剤であるイソプロテレノールやピロカルピンを投与したラット顎下腺主導管上皮の形状に変化が生じることが知られている<sup>17)</sup>。したがって、顎下腺主導管も自律神経の影響を受けていると考えられる。さらに、主導管上皮基底部には顎下神経節由来のシナプスが分布している<sup>18)</sup>。それらの生後発達についても顎下腺腺体でも生後に腺房細胞の変化<sup>11)</sup>が、また顎下腺主導管は生後直後では重層立方上皮であるが、その後多列円柱上皮へ変化することが報告されている<sup>19)</sup>。この変化は腺房部よりも顎下腺主導管上皮で著明である。これらの変化は吸啜運動から咀嚼運動への変化、すなわち離乳刺激によるものと考えられている。しかし、その離乳刺激のメカニズムの詳細は不明である。顎下腺の分泌は顎下神経節からの線維が腺房部にシナプスを形成し、また顎下腺主導管での唾液の成分調整は顎下神経節からの線維が、主導管を取り囲んでいる血管網<sup>4,20)</sup>にシナプスを形成し、行っている<sup>18)</sup>。さらに少数の線維は顎下腺主導管基底部にもシナプスを形成している。

本研究では生後発達を通じ、ラットの顎下神経節、主導管、血管網におけるシナプスの数やその性質について免疫組織化学的手法を用いて検索した。さらに、生後発達に伴い唾液成分が変化するという報告があり<sup>21,22)</sup>、この成分変化との関係を形態学および免疫組織化学的に解明を試みた。

## 実験材料および方法

### 1. 実験動物

顎下神経節の形態学的な検索用として生後 1, 2, 3, 4 および 8 週齢の Wistar 系雄ラットを各 3 匹、合計 15 匹を用いた。免疫染色用に生後 1, 2, 3, 4 および

8週齢のWistar系雄ラットを各3匹、合計15匹を用いた。実験動物の飼育条件は室温20℃、明暗周期12時間、給餌、給水については自由摂取とした。また離乳時期は3週齢とした。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. 試料作製

### 1) 形態学的観察用試料, 計測用試料

実験群の動物に対してバルビタール酸ナトリウムを腹腔内投与(50 mg/kg)し、麻酔を施した後に、左心室より生理食塩水を灌流し、0.1 Mリン酸緩衝液(PBS, pH7.4)にて希釈した2.5%グルタルアルデヒド溶液にて20分間灌流固定を行った。固定後、顎下神経節と主導管を周囲組織とともに摘出し、直ちに同固定溶液で90分固定した。さらに、その後0.1 Mリン酸緩衝液(pH7.4)にて希釈した1%オスミウム酸で60分固定した。固定後にエタノール系列で脱水し、酸化プロピレンを介して、Quetol 651樹脂(Polysciences, Warrington, USA)に包埋した。包埋した試料はMT-1型ウルトラマイクロトームを用いてガラスナイフで厚さ約1 μmにて薄切切片を作製し、1%トルイジンブルー液にて染色し、光学顕微鏡用試料とした。

また、電子顕微鏡用試料は包埋までは光学顕微鏡用試料と同様に行い、包埋した試料はMT-1型ウルトラマイクロトームを用いてダイヤモンドナイフで厚さ80 nmにて超薄切片を作製し、銅メッシュに乗せ、酢酸ウラニル液とクエン酸鉛液の二重染色を施し、JEOL-1220型電子顕微鏡(日本電子, Tokyo, Japan)を用いて観察した。さらに、光学顕微鏡用試料のうち各週につき10例の切片を無作為に選び、蛍光顕微鏡(KEYENCE, Tokyo, Japan; BZ-X700)を用いて顎下神経節中の核小体が明瞭なニューロンの断面積を計測した。計測した断面積は正規性の検定後、等分散性をみる為にBartlett検定を行ったが、等分散性がみられなかった為、Kruskal-Wallis検定後、Bonferroniの補正をしたMann-Whitney's U検定を行い有意水準は $P < 0.05/10 = 0.005$ とした。統計ソフトはEZRを用いた<sup>23)</sup>。

### 2) 免疫組織化学的観察用試料

実験群の動物に対してバルビタール酸ナトリウムを腹腔内投与(50 mg/kg)し、麻酔を施した後に、左心室より0.1 Mリン酸緩衝液(pH7.4)にて希釈した4%パラホルムアルデヒド液にて灌流固定を

行い、顎下神経節と主導管を周囲組織とともに摘出し、直ちに0.1 Mリン酸緩衝液(pH7.4)にて希釈した4%パラホルムアルデヒド液にて12時間固定した。その後、液体窒素で凍結し、O. C. T. compound(SAKURA, Osaka, Japan; Tissue-Tek)を用いて凍結包埋し、凍結マイクロトームにて厚さ約20 μmの凍結切片を作製した。凍結切片をスライドガラス上に載せ、風乾した後にシナプトフィジンとVIP、シナプトフィジンとNPYおよびシナプトフィジンと5-HTの3組の免疫染色を行った。なお、一次抗体の代わりにPBSを適用した試料をコントロールとした。その後、共焦点レーザー顕微鏡(Nikon, Tokyo, Japan; ECLIPSE E800)を用いて観察し、各週齢の免疫陽性神経終末を数え、正規性の検定後、等分散性をみる為にBartlett検定を行い、Kruskal-Wallis検定後、Bonferroniの補正をしたMann-Whitney's U検定を行い有意水準は $P < 0.05/10 = 0.005$ とした。統計ソフトはEZRを用いた<sup>23)</sup>。

## 3. 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% normal goat serum (NGS) /0.75% Triton X-100/0.05%  $\text{NaN}_3$ )を含有した0.1 Mリン酸緩衝生理食塩水(PBS)中に1時間洗浄した。続いて、一次抗体としてマウス抗NPYモノクローナル抗体(abcam, Cambridge, UK; 1/200)とウサギ抗シナプトフィジンポリクローナル抗体(abcam, Cambridge, UK; 1/100 in 0.1 M PBS containing 10% NGS/ 0.75% Triton X-100/ 0.05%  $\text{NaN}_3$ )、ウサギ抗VIPポリクローナル抗体(abcam, Cambridge, UK, 1/500)とマウス抗シナプトフィジンモノクローナル抗体(1/100)、ウサギ抗5-HTポリクローナル抗体(abcam, Cambridge, UK; 1/200)とマウス抗シナプトフィジンモノクローナル抗体(abcam, Cambridge, UK; 1/100)中に4℃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 0.1 M PBS containing 10% NGS/ 0.05%  $\text{NaN}_3$ )とヤギAlexa 488標識抗ウサギIgG抗血清(Wako, Osaka, Japan; 1/50 in 0.1 M PBS containing 10% NGS/ 0.05%  $\text{NaN}_3$ )、ヤギビオチン化抗ウサギIgG抗血清(DAKO, Glostrup, Denmark; 1/400 in 0.1 M PBS containing 10% NGS/ 0.05%  $\text{NaN}_3$ )とヤギAlexa 488標識抗マウスIgG抗血清(Wako, Osaka, Japan; 1/50 in 0.1 M PBS containing 10% NGS/ 0.05%  $\text{NaN}_3$ )混液中に室温で1時間浸漬した。その後PBSで洗浄し、さらにCy3-streptavidin(KPL, Guildford, UK; 1/1000 in 0.1 M PBS containing 10% NGS/ 0.05%  $\text{NaN}_3$ )に1時間浸漬した。免疫組織化学的に標識した試

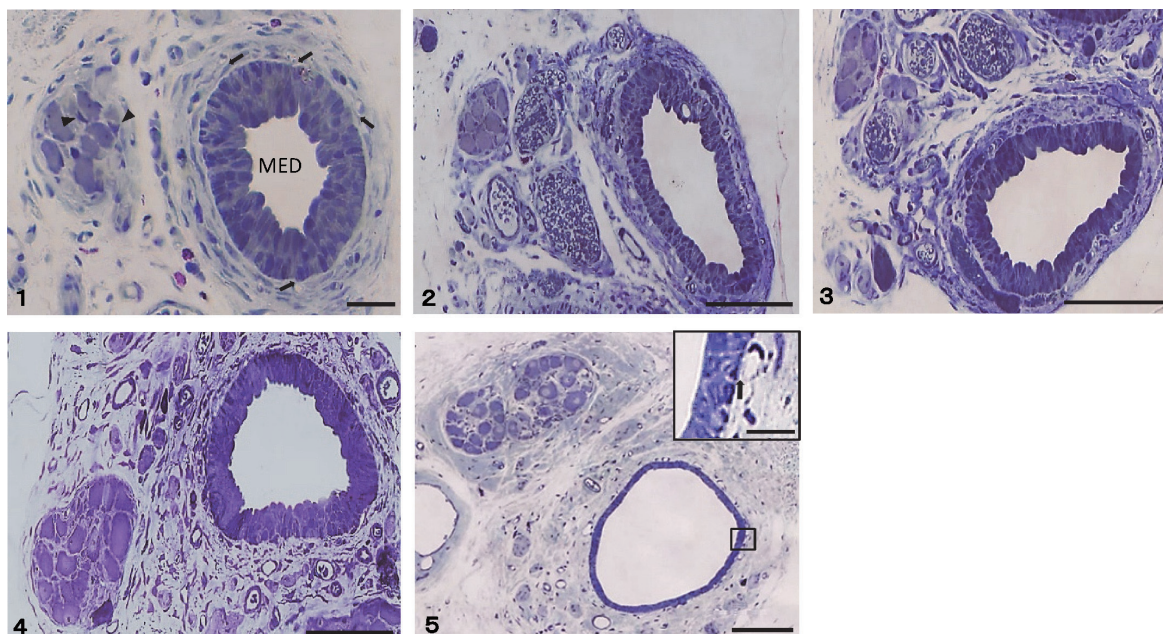


図1 生後1週ラットの顎下神経節，主導管のトルイジンブルー染色像

生後1週の顎下神経節は数個の神経節ニューロンとその間に存在する神経線維や外套細胞（矢頭）が神経周膜に包まれた構造として認められる。顎下腺主導管（MED）上皮は重層上皮より構成されている。主導管周囲には血管が認められ，主導管基底部分と血管の間には間隙が認められる（矢印）。scale bar=20  $\mu$ m

図2 生後2週の顎下神経節，主導管のトルイジンブルー染色像

生後2週の顎下神経節内の数個の神経節ニューロンが観察される。顎下腺主導管上皮は生後1週のものと比較すると上皮の高さが低くなったことが認められるが，重層上皮より構成されており，その周囲には血管が認められる。scale bar=20  $\mu$ m

図3 生後3週の顎下神経節，主導管のトルイジンブルー染色像

生後3週の顎下神経節中の神経節ニューロン面積は生後1~2週のものと比較してやや大きくなっているように見える。また，ほとんどの外套細胞とニューロンの間に間隙は認められないが，一部の外套細胞とニューロンの間には間隙が認められた。顎下腺主導管上皮は重層上皮と多列上皮が混在している。scale bar=20  $\mu$ m

図4 生後4週の顎下神経節，主導管のトルイジンブルー染色像

生後4週の顎下神経節ニューロンの面積は生後3週までのものと比較し，著明な大きさの増大を認める。さらに，外套細胞とニューロンの間に間隙は認められない。顎下腺主導管上皮は多列上皮を呈している。顎下腺主導管上皮直下の血管と上皮細胞基底部分の間隙はほとんど認められない。scale bar=20  $\mu$ m

図5 生後8週の顎下神経節，主導管のトルイジンブルー染色像

神経細胞は4週齢の形状と比較し，差異はない。主導管の近傍に多数の神経細胞から構成される顎下神経節が認められる。主導管外膜に主導管を取り巻くように多数の神経線維が存在していることが認められる。scale bar=100  $\mu$ m  
拡大図：主導管は多列円柱上皮を呈している。顎下腺主導管上皮直下の血管と上皮細胞基底部分の間隙はほとんど認められず，密接している（矢印）。scale bar=20  $\mu$ m

料は40% glycerin 溶液で封入し，共焦点レーザー顕微鏡にて観察した。

## 結 果

### 1. 形態学的観察

#### 1) 光学顕微鏡観察結果

##### (1) 生後1週の顎下神経節，主導管の観察

生後1週の顎下神経節は数個の神経節ニューロンとその間に存在する神経線維や外套細胞が神経周膜に包

まれた構造として認められた。この神経節ニューロンはやや不規則な形状を示し，内部には淡染する卵円形の核と濃染する核小体が観察された。さらに，神経節ニューロン周囲には外套細胞が存在しているが，これらの間には間隙が認められた。顎下腺主導管（MED）上皮は重層上皮より構成されていた。主導管周囲には血管が認められ，主導管基底部分と血管の間には間隙が認められた（図1）。

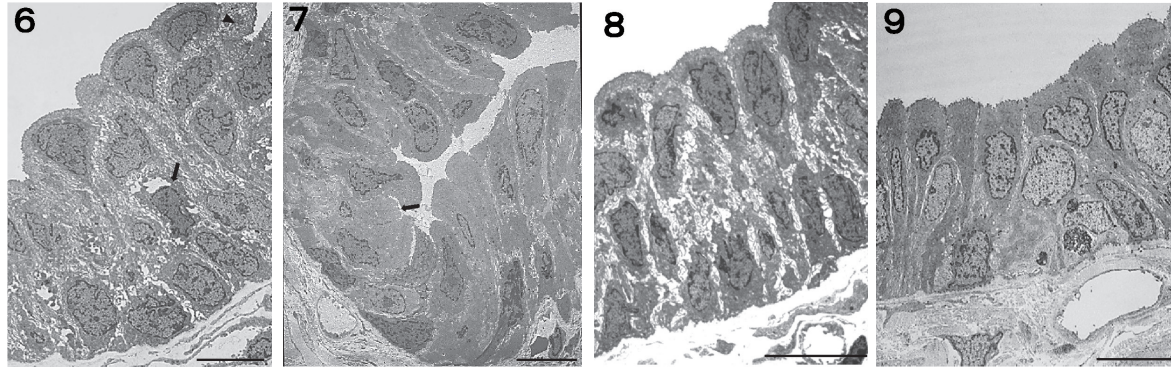


図6 生後1週の主導管の電子顕微鏡像

細胞一部の破損像を認め、細胞質内が空胞化している像が認められる(矢頭)。電子密度の高い構造として、細胞の断片化したものが細胞間隙中に認められる(矢印)。scale bar=5 $\mu$ m

図7 生後3週の主導管の電子顕微鏡像

ミトコンドリアが凝縮し、細胞の破損過程である像が認められる。電子密度が高く、細胞質内にミトコンドリアが充満している細胞も認められる。さらに、刷子細胞が観察される(矢印)。scale bar=5 $\mu$ m

図8 生後4週の主導管の電子顕微鏡像

主導管上皮は多列円柱上皮を呈する。細胞の破損像はほぼ認められない。広い細胞間隙が認められる。scale bar=10 $\mu$ m

図9 生後8週の主導管の電子顕微鏡像

主導管上皮は多列円柱上皮を呈する。scale bar=10 $\mu$ m

## (2) 生後2週顎下神経節、主導管の観察

生後2週顎下神経節内には数個の神経節ニューロンが観察された。また、ニューロン間の間隙はやや狭くなっていた。さらにニューロン近傍に存在する外套細胞とニューロン間には間隙が認められた。顎下腺主導管上皮は生後1週のものと比較すると全体的に上皮の高さが低くなったことが認められるが、重層上皮より構成されており、その周囲には血管が認められた(図2)。

## (3) 生後3週顎下神経節、主導管の観察

生後3週顎下神経節中の神経節ニューロンは生後1~2週のものと比較してやや大きくなっていた。また、ほとんどの外套細胞とニューロンの間に間隙は認められないが、一部の外套細胞とニューロンの間には間隙が認められた。顎下腺主導管上皮は重層上皮と多列上皮が混在していた(図3)。

## (4) 生後4週顎下神経節、主導管の観察

生後4週顎下神経節ニューロンは生後3週までのものと比較し、著明な増大を認めた。外套細胞とニューロンの間に間隙は認められない。さらに、顎下腺主導管上皮は多列上皮を呈していた。顎下腺主導管上皮直下の血管と上皮細胞基底部分の間隙はほとんど認められなかった(図4)。

## (5) 生後8週顎下神経節、主導管の観察

神経細胞は4週齢の形状と比較し、差異はなかった。

主導管の近傍に多数の神経節ニューロンから構成される顎下神経節が認められた。神経節ニューロンと外套細胞の間に間隙は認められなかった。主導管外膜に主導管を取り巻くように多数の神経線維が存在していることが認められた。主導管は多列円柱上皮を呈しており、その直下には多数の毛細血管を認め、上皮と毛細血管は密接していた(図5)。

## 2) 電子顕微鏡観察結果

### (1) 生後1週主導管の観察

生後1週主導管では細胞一部の破損像を認め、細胞質が空胞化している像が認められた。電子密度の高い構造として、細胞の断片化したものが細胞間隙中に認められた(図6)。

### (2) 生後3週主導管の観察

ミトコンドリアが凝縮し、細胞の破損過程である像が認められた。電子密度が高く、細胞質にミトコンドリアが充満している細胞も認められた。さらに、刷子細胞が観察された(図7)。

### (3) 生後4週主導管の観察

主導管上皮は多列円柱上皮を呈した。細胞の破損像はほぼ認められなかった。広い細胞間隙が認められた(図8)。

### (4) 生後8週主導管の観察

主導管上皮は多列円柱上皮を呈した(図9)。

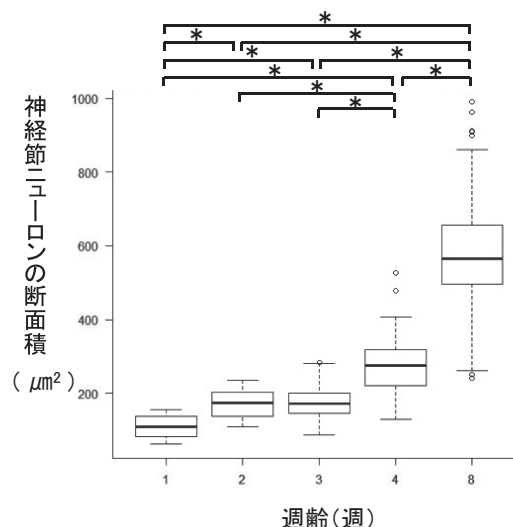


図10 生後1, 2, 3, 4, 8週齢の顎下神経節ニューロンの断面積

Kruskal-Wallis検定後, Bonferroniの補正をしたMann-Whitney's U検定を行い, 有意水準は $*P<0.05/10=0.005$ とした。

生後2週齢と3週齢の間には有意差が認められないが, それ以外の週齢間では有意差が認められる。

## 2. 顎下神経節ニューロンの断面積

蛍光顕微鏡を用いて顎下神経節中の核小体が明瞭なニューロンの断面積を計測した。

生後1週齢の顎下神経節ニューロンの断面積は, 最大 $156.9\mu\text{m}^2$ , 最小 $62.5\mu\text{m}^2$ , 中央値 $109.1$ , 標準偏差 $30.3$ , 平均 $109.7\mu\text{m}^2$ であった。生後2週齢の顎下神経節ニューロンの断面積は, 最大 $234.5\mu\text{m}^2$ , 最小 $108.8\mu\text{m}^2$ , 中央値 $175.0$ , 標準偏差 $36.7$ , 平均 $173.5\mu\text{m}^2$ であった。生後3週齢の顎下神経節ニューロンの断面積は, 最大 $283.6\mu\text{m}^2$ , 最小 $86.7\mu\text{m}^2$ , 中央値 $172.9$ , 標準偏差 $44.4$ , 平均 $175.2\mu\text{m}^2$ であった。生後4週齢の顎下神経節ニューロンの断面積は, 最大 $527.0\mu\text{m}^2$ , 最小 $129.8\mu\text{m}^2$ , 中央値 $275.7$ , 標準偏差 $77.4$ , 平均 $274.6\mu\text{m}^2$ であった。生後8週齢の顎下神経節ニューロンの断面積は, 最大 $991.9\mu\text{m}^2$ , 最小 $240.5\mu\text{m}^2$ , 中央値 $566.5$ , 標準偏差 $144.5$ , 平均 $576.0\mu\text{m}^2$ であった。計測した断面積は, 正規性の検定後, 等分散性をみる為にBartlett検定を行ったが, 等分散性がみられなかった為, Kruskal-Wallis検定後, Bonferroniの補正をしたMann-Whitney's U検定を行い有意水準は $P<0.05/10=0.005$ とした結果を図10に示した。その結果は, 生後2週齢と3週齢の間には有意差が認められなかったが, それ以外の週齢間では5%水準で有意差が認められた。

## 3. シナプトフィジンと各神経伝達物質による二重免疫組織化学

各週齢の主導管と細動脈におけるシナプトフィジン

と各神経伝達物質(NPY, 5-HT, VIP)の陽性神経終末を観察した。生後1週齢のNPYとシナプトフィジンの共陽性構造は主導管と細動脈の両方に認められたが, それらの構造は主導管ではごく少数が認められ, 細動脈では散在して認められた(図11a, 12a)。生後1週齢の5-HTとシナプトフィジンの共陽性構造は主導管では認められなかったが, 細動脈では僅かな陽性構造を認めた(図11b, 12b)。生後1週齢の主導管と細動脈におけるシナプトフィジン陽性構造が認められたが, VIPとシナプトフィジンの共陽性構造は認められなかった(図11c, 12c)。生後2週齢のNPYとシナプトフィジンの共陽性構造は主導管と細動脈の共に認められたが, 主導管と細動脈の共に散在して認められた(図13a, 14a)。生後2週齢の5-HTとシナプトフィジンの共陽性構造は主導管では散在して認められたが, 細動脈では認められなかった(図13b, 14b)。生後2週齢の主導管と細動脈におけるシナプトフィジン陽性構造が認められたが, VIPとシナプトフィジンの共陽性構造は認められなかった(図13c, 14c)。生後3週齢のNPYとシナプトフィジンの共陽性構造は主導管と細動脈の両方に散在して認められた(図15a, 16a)。生後3週齢の5-HTとシナプトフィジンの共陽性構造は主導管と細動脈の両方に認められた(図15b, 16b)。生後3週齢のVIPとシナプトフィジンの共陽性構造は主導管と細動脈の共に散在して認められたが, その数は細動脈で多く認められた(図15c, 16c)。生後4週齢のNPYとシナプトフィジン, 5-HTとシナプト

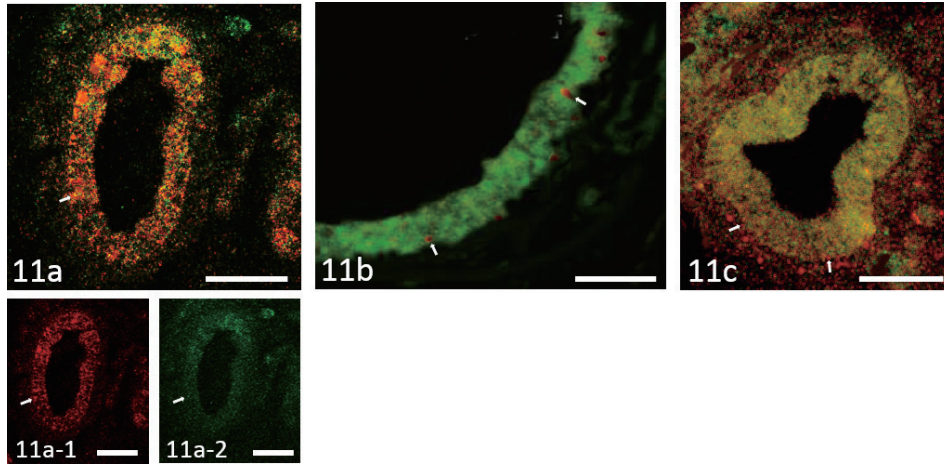


図11 生後1週齢ラットの主導管におけるシナプトフィジンと各神経伝達物質 (NPY, 5-HT, VIP) による二重免疫組織化学像

a : 主導管周囲にシナプトフィジン (赤) と NPY (緑) の二重標識像 (→) が観察される。

11a-1 (赤) : シナプトフィジン標識像, 11a-2 (緑) : NPY 標識像

11a-1 (赤) と 11a-2 (緑) を重ねた像 (11a) において, 黄色で観察される構造を二重標識像と判断する (図11~20)。

b : 主導管周囲にシナプトフィジン (赤) のみの標識像 (→) が観察される。

c : 主導管周囲にシナプトフィジン (赤) のみの標識像 (→) が観察される。

scale bar=500  $\mu$ m

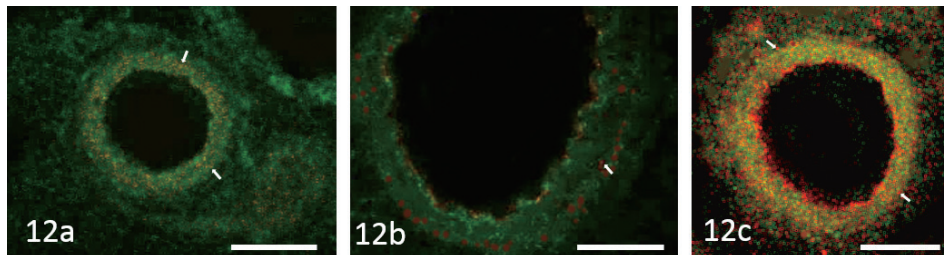


図12 生後1週齢ラットの細動脈におけるシナプトフィジンと各神経伝達物質 (NPY, 5-HT, VIP) による二重免疫組織化学像

a : 細動脈周囲にシナプトフィジン (赤) と NPY (緑) の二重標識像 (→) が観察される。

b : 細動脈周囲にシナプトフィジン (赤) と 5-HT (緑) の二重標識像 (→) が観察される。

c : 細動脈周囲にシナプトフィジン (赤) のみの標識像 (→) が観察される。

scale bar=500  $\mu$ m

フィジン, VIP とシナプトフィジンの共陽性構造は3週齢と同様の結果がみられた (図17a, b, c, 18a, b, c)。生後8週齢のいずれも4週齢と同様の結果がみられた (図19a, b, c, 20a, b, c)。

#### 4. シナプトフィジンと各神経活性物質による二重免疫組織化学の計測結果

2500  $\mu$ m<sup>2</sup> の視野内のシナプトフィジン陽性神経終末数と各神経活性物質の共陽性神経終末の数を計測した。生後1週齢の NPY とシナプトフィジンの数を計測すると, 主導管ではシナプトフィジン陽性神経終末数は最大19個, 最小0個, 中央値7.0, 平均値7.5で部位により差異が認められた。共陽性神経終末は最

大1個, 中央値0, 平均値0.1であった。細動脈では, シナプトフィジン陽性神経終末数は最大14個, 最小1個, 中央値4.0, 平均値5.6で比較的均一であり部位による差異は少なかった。共陽性神経終末は最大4個, 最小2個, 中央値3.0, 平均値2.8であった。生後1週齢の5-HT陽性神経終末は主導管では0個, 細動脈では最大1個, 中央値0, 平均値0.1であった。生後1週齢のVIP陽性神経終末は主導管と細動脈共に認められなかった。生後2週齢の NPY とシナプトフィジンの数を計測すると, 主導管ではシナプトフィジン陽性神経終末数は最大11個, 最小1個, 中央値5.0, 平均値5.1で部位による差異を認めた。細動脈では, シ

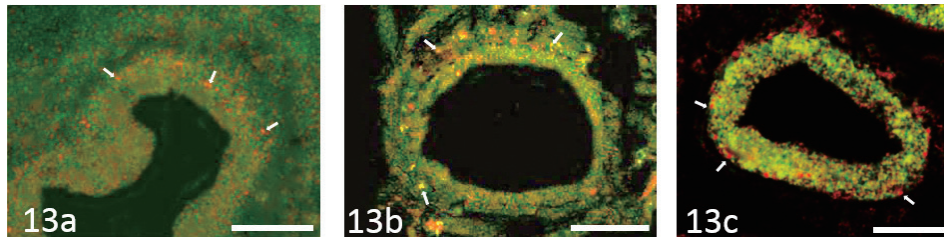


図13 生後2週齢ラットの主導管におけるシナプトフィジンと各神経伝達物質 (NPY, 5-HT, VIP) による二重免疫組織化学像

- a: 主導管周囲にシナプトフィジン (赤) と NPY (緑) の二重標識像 (→) が観察される。  
 b: 主導管周囲にシナプトフィジン (赤) と 5-HT (緑) の二重標識像 (→) が観察される。  
 c: 主導管周囲にシナプトフィジン (赤) のみの標識像 (→) が観察される。

scale bar=500  $\mu$ m

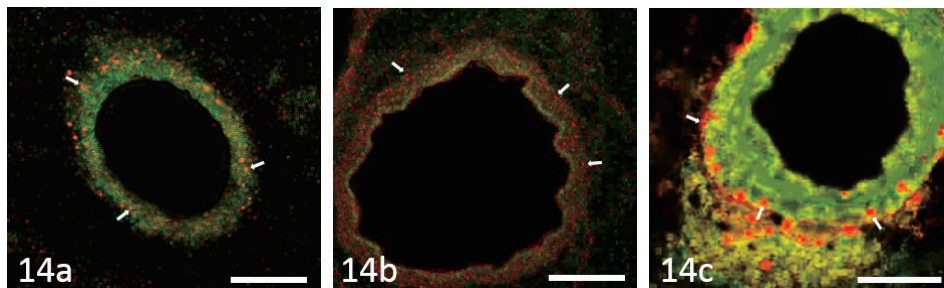


図14 生後2週齢ラットの細動脈におけるシナプトフィジンと各神経伝達物質 (NPY, 5-HT, VIP) による二重免疫組織化学像

- a: 細動脈周囲にシナプトフィジン (赤) と NPY (緑) の二重標識像 (→) が観察される。  
 b: 細動脈周囲にシナプトフィジン (赤) のみの標識像 (→) が観察される。  
 c: 細動脈周囲にシナプトフィジン (赤) のみの標識像 (→) が観察される。

scale bar=500  $\mu$ m

ナプトフィジン陽性神経終末数は最大 15 個, 中央値 5.0, 平均値 6.3 であった。NPY 陽性神経終末, 5-HT 陽性神経終末において, その数は生後 1 週齢との差異は認められなかった。VIP 陽性神経終末においては, 生後 1 週齢と 2 週齢では認められなかった。生後 3 週齢の主導管のシナプトフィジン陽性神経終末数は中央値 10.0, 平均値 9.6, 最大 17 個, 最小 2 個で, 2 週齢までのものよりその数は顕著な増加が認められた。細動脈のシナプトフィジン陽性神経終末数は中央値 11.0, 平均値 11.8, 最大 22 個, 最小 7 個で主導管のシナプトフィジン陽性神経終末と同様に著明な数の増加が認められた。NPY 陽性神経終末は主導管で中央値 2.0, 平均値 2.6, 細動脈で中央値 5.0, 平均値 4.6 であり, 5-HT 陽性神経終末は主導管で中央値 0, 平均値 1.3, 細動脈で中央値 1.5, 平均値 1.8 であり, 生後 2 週齢までのものと差異は認められなかった。VIP 陽性神経終末は主導管と細動脈の共に生後 3 週齢で初めて観察され, 主導管では最大 4 個, 最小 1 個, 中央値 1.5, 平均値 2.0, 細動脈では最大 5 個, 最小 1 個, 中央値 1.5, 平均値 2.0 であった。生後 4 週齢のシナプ

トフィジン陽性神経終末は主導管で中央値 10.0, 平均値 11.0, 細動脈で中央値 7.0, 平均値 7.2, 3 週齢から著明な変化は認められなかった。NPY, 5-HT, VIP 陽性神経終末の数は生後 3 週齢との差異は認められなかった。生後 8 週齢のシナプトフィジン陽性神経終末は主導管で中央値 5.0, 平均値 5.1, 4 週齢より減少した。細動脈で中央値 17.0, 平均値 13.9, 4 週齢と差異はなかった。NPY 陽性神経終末は主導管で中央値 1.0, 平均値 0.8, 細動脈で中央値 3.0, 平均値 3.5, 5-HT 陽性神経終末は主導管で中央値 1.5, 平均値 2.0, 細動脈で中央値 1.0, 平均値 2.1, VIP 陽性神経終末は主導管で中央値 2.5, 平均値 3.5, 細動脈で中央値 1.5, 平均値 1.3, 主導管と細動脈共に 4 週齢のものと差異は認められなかった。これらの所見から正規性の検定後, 等分散性をみる為に Bartlett 検定を行ったが, 等分散性がみられなかった為, Kruskal-Wallis 検定後, Bonferroni の補正をした Mann-Whitney's U 検定を行い, 有意水準は  $P < 0.05/10 = 0.005$  とした統計処理を施した結果は, 主導管において NPY 陽性神経終末は 1 週齢と 3 週齢, 1 週齢と 4 週齢の間で 5% 水準での有意差が認められ



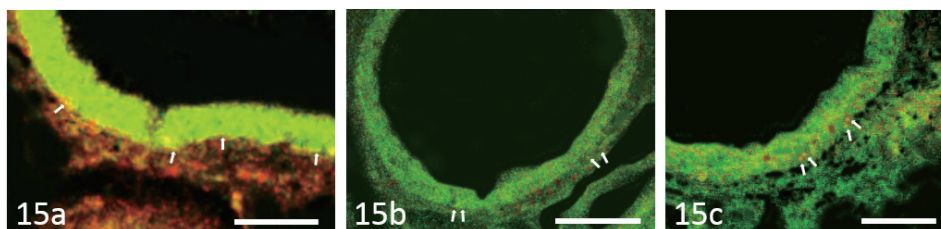


図15 生後3週齢ラットの主導管におけるシナプトフィジンと各神経伝達物質 (NPY, 5-HT, VIP) による二重免疫組織化学像

a: 主導管周囲にシナプトフィジン (赤) と NPY (緑) の二重標識像 (→) が観察される。

b: 主導管周囲にシナプトフィジン (赤) と 5-HT (緑) の二重標識像 (→) が観察される。

c: 主導管周囲にシナプトフィジン (赤) と VIP (緑) の二重標識像 (→) が観察される。

scale bar=500  $\mu$ m

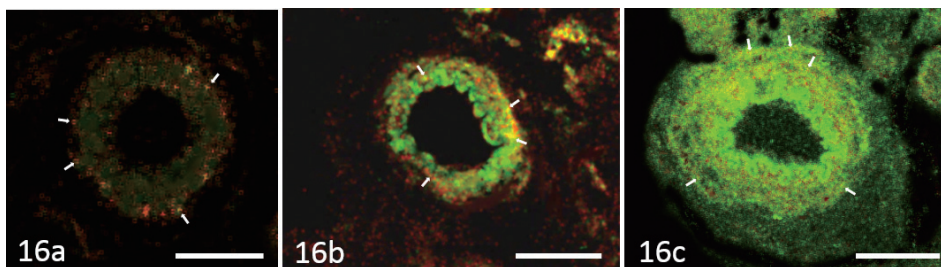


図16 生後3週齢ラットの細動脈におけるシナプトフィジンと各神経伝達物質 (NPY, 5-HT, VIP) による二重免疫組織化学像

a: 細動脈周囲にシナプトフィジン (赤) と NPY (緑) の二重標識像 (→) が観察される。

b: 細動脈周囲にシナプトフィジン (赤) と 5-HT (緑) の二重標識像 (→) が観察される。

c: 細動脈周囲にシナプトフィジン (赤) と VIP (緑) の二重標識像 (→) が観察される。

scale bar=500  $\mu$ m

た。5-HT 陽性神経終末は1～8週齢のどの間にも有意差が認められなかった。VIP 陽性神経終末は1週齢と4週齢, 2週齢と3週齢, 2週齢と4週齢の間で5%水準での有意差が認められた。シナプトフィジン陽性神経終末は2週齢と3週齢, 2週齢と4週齢, 3週齢と8週齢, 4週齢と8週齢の間で5%水準での有意差が認められた。細動脈においては, NPY 陽性神経終末はどの間にも有意差が認められなかった。5-HT 陽性神経終末は1週齢と4週齢, 2週齢と3週齢, 2週齢と4週齢, 2週齢と8週齢の間で5%水準での有意差が認められた。VIP 陽性神経終末は1週齢と3週齢, 2週齢と3週齢の間で5%水準での有意差が認められた。シナプトフィジン陽性神経終末は1週齢と3週齢, 1週齢と8週齢, 2週齢と3週齢, 2週齢と8週齢, 4週齢と8週齢の間で5%水準での有意差が認められた。主導管における NPY 陽性神経終末は緩やかな増加を認めた。5-HT 陽性神経終末は緩やかな増加が認められた。シナプトフィジン陽性神経終末は2～3週で著明な増加を認め, 4～8週で減少が生じた (図21)。VIP 陽性神経終末は1, 2週では認められず, 2～3週

で著明な増加が認められた (図22)。主導管周囲の細動脈における NPY 陽性神経終末は緩やかに増加した。5-HT 陽性神経終末は2～3週で著明な増加が認められた。シナプトフィジン陽性神経終末は2～3週と4～8週で著明な増加が認められた (図23)。VIP 陽性神経終末は2～3週で著明な増加が認められた (図24)。

## 考 察

本研究において, 顎下腺主導管に分布するシナプトフィジン免疫陽性顆粒つまり神経終末の数には, 発達に伴う増加とシナプス刈り込みによる減少が観察された。また主導管に分布する VIP 陽性神経終末の発現時期が, 主導管上皮の形態変化と経時的に一致したことなどから, 主導管の発達は分布する神経終末の数の変化, 特に VIP 陽性神経終末と密接な関係があることが明らかになった。

### 1. 顎下神経節の生後発達

顎下腺の分泌を司る交感神経は上顎神経節由来のニューロンが腺房細胞や顎下腺主導管, 顎下腺主導

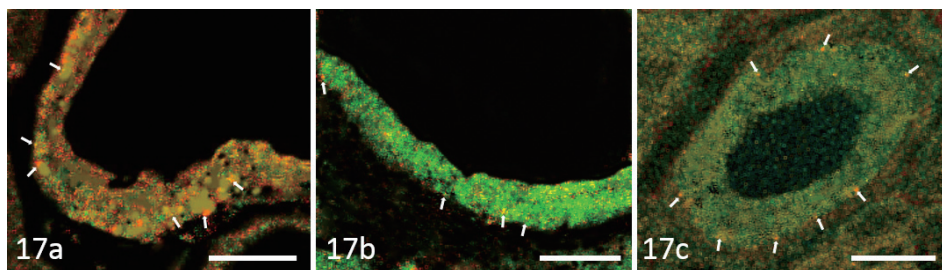


図17 生後4週齢ラットの主導管におけるシナプトフィジンと各神経伝達物質 (NPY, 5-HT, VIP) による二重免疫組織化学像

a: 主導管周囲にシナプトフィジン (赤) と NPY (緑) の二重標識像 (→) が観察される。

b: 主導管周囲にシナプトフィジン (赤) と 5-HT (緑) の二重標識像 (→) が観察される。

c: 主導管周囲にシナプトフィジン (赤) と VIP (緑) の二重標識像 (→) が観察される。

scale bar=500  $\mu$ m

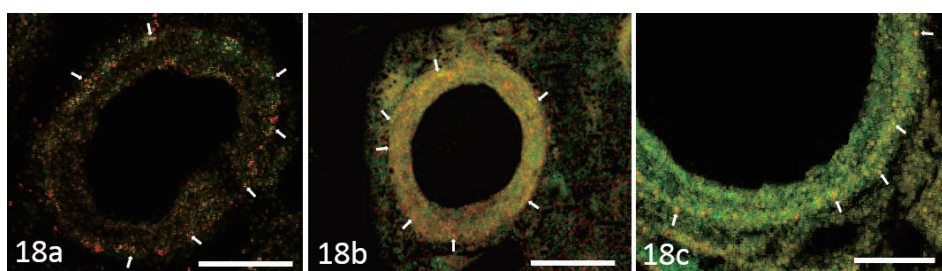


図18 生後4週齢ラットの細動脈におけるシナプトフィジンと各神経伝達物質 (NPY, 5-HT, VIP) による二重免疫組織化学像

a: 細動脈周囲にシナプトフィジン (赤) と NPY (緑) の二重標識像 (→) が観察される。

b: 細動脈周囲にシナプトフィジン (赤) と 5-HT (緑) の二重標識像 (→) が観察される。

c: 細動脈周囲にシナプトフィジン (赤) と VIP (緑) の二重標識像 (→) が観察される。

scale bar=500  $\mu$ m

管周囲の血管網に分布しており、副交感神経は上唾液核由来のニューロンが顎下神経節でニューロンを換えて、それらに分布している。顎下腺では副交感神経が優位であるといわれている<sup>17)</sup>。顎下神経節における研究は、顎下神経節が中枢と末梢を連絡する単なるニューロンの中継点として考えられてきたこと<sup>5)</sup>から、その詳細な研究は行われてこなかった。しかし、顎下神経節の電子顕微鏡的な構造が報告されている<sup>6,7)</sup>。神経節ニューロン中には種々の神経活性物質が含有されている。CGRP, NPY, 5-HT, VIP等が存在し<sup>4,7,8,24)</sup>、これらの中で特に NPY, VIP や 5-HT が唾液分泌や成分調整に関与している<sup>4,7)</sup>。

さらに顎下神経節の生後発達については Ng ら<sup>10)</sup>が顎下神経節の生後発達について観察し、顎下神経節ニューロンの断面積を計測し、出生直後から成体までに約5倍の大きさになると報告している。それによると顎下神経節は生後急激に成長し、生後8週では生後1週のニューロンの断面積  $254.18 \mu\text{m}^2$  に対して約3倍の大きさになると報告されている。しかし、今回の検索では生後1週での顎下神経節のニューロンの

断面積は中央値  $109.1$ 、平均  $109.7 \mu\text{m}^2$  であり、4週では中央値  $275.7$ 、平均  $274.6 \mu\text{m}^2$ 、8週で中央値  $566.5$ 、平均  $576.0 \mu\text{m}^2$  であった。Ng ら<sup>10)</sup>は生後1週齢では  $254.18 \mu\text{m}^2$ 、本研究では  $109.7 \mu\text{m}^2$  であり、この差異は計測する基準の差異であると考えられる。すなわち Ng ら<sup>10)</sup>はニューロン中に核が存在するものを計測に用いているが、本研究では核と核小体の両者が明瞭なニューロンのみを計測に用いたことによるものと考えられる。さらに生後1~2週の神経節中のニューロン間は広い間隙が認められたが、生後4週以後で間隙が狭くなったことは、神経節ニューロンの面積と神経線維の増加によるものと考えられる。また、生後1~2週では外套細胞と神経節ニューロンとの間に広い間隙が認められたが、3週以後で間隙が認められなくなったことは神経節ニューロンの面積の増加によるものと考えられる。

## 2. 顎下腺主導管とその周囲の血管の生後発達

顎下腺や主導管の生後発達<sup>16,19)</sup>についても報告されている。唾液腺の腺房部の生後発達では、高電子密度の顆粒を有する前駆腺房細胞が介在部細胞や顆粒管へ

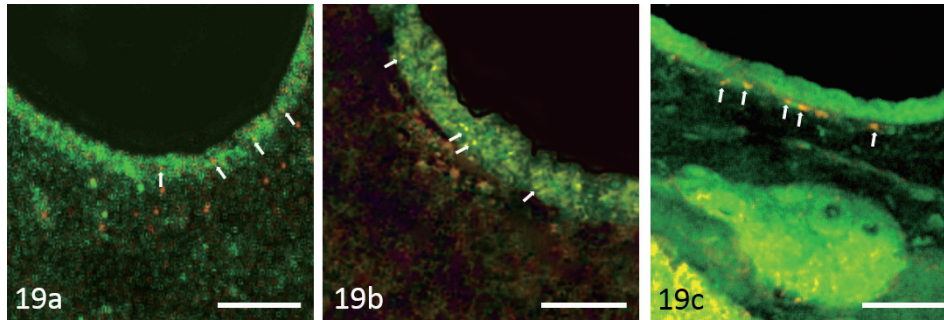


図19 生後8週齢ラットの主導管におけるシナプトフィジンと各神経伝達物質 (NPY, 5-HT, VIP) による二重免疫組織化学像

- a: 主導管周囲にシナプトフィジン (赤) と NPY (緑) の二重標識像 (→) が観察される。  
 b: 主導管周囲にシナプトフィジン (赤) と 5-HT (緑) の二重標識像 (→) が観察される。  
 c: 主導管周囲にシナプトフィジン (赤) と VIP (緑) の二重標識像 (→) が観察される。  
 scale bar=500  $\mu$ m

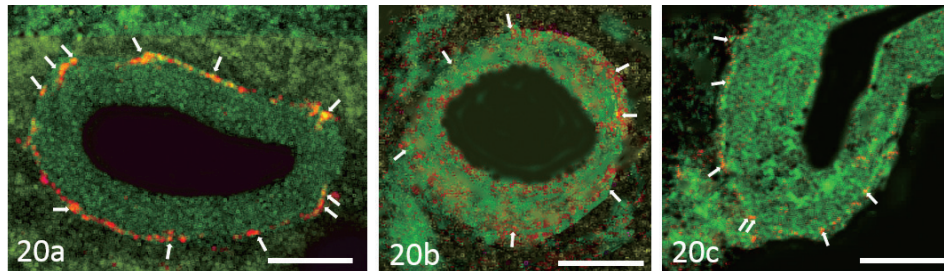


図20 生後8週齢ラットの細動脈におけるシナプトフィジンと各神経伝達物質 (NPY, 5-HT, VIP) による二重免疫組織化学像

- a: 細動脈周囲にシナプトフィジン (赤) と NPY (緑) の二重標識像 (→) が観察される。  
 b: 細動脈周囲にシナプトフィジン (赤) と 5-HT (緑) の二重標識像 (→) が観察される。  
 c: 細動脈周囲にシナプトフィジン (赤) と VIP (緑) の二重標識像 (→) が観察される。  
 scale bar=500  $\mu$ m

移行する<sup>16)</sup>。主導管上皮には生後1週から3週では非常に電子密度が高く、核と細胞質の区別が判別できない細胞が散在していたが、4週ではそれらの細胞は全く認められなかった。この暗調な細胞は主導管の生後発達を観察した東ら<sup>19)</sup>が主導管の管腔の拡大は一部の上皮の死滅と上皮細胞の成長によると報告している。このことから本研究にて観察された暗調な細胞は生後3週までに死滅する上皮細胞ではないかと考えられる。これらが生後4週では全く認められなくなったことは主導管上皮がほぼ成熟過程を終了したと考えられる。一方、顎下腺主導管上皮は出生直後では重層上皮であり、その上皮細胞の一部が死滅して管腔が拡大、さらに残った細胞が成長して多列上皮へと変化する<sup>19)</sup>。これらの変化は吸啜運動から咀嚼運動への変化が刺激となると考えられている。しかし、これらの刺激の詳細は不明である。加えて、唾液分泌が顎下神経節を通して行われているにも関わらず、生後発達を通じて顎下腺腺房部でも生後3週で成体と同様の構成細胞になる

といわれている。本研究で顎下神経節ニューロンの生後発達と顎下腺主導管の発達とは経時的に一致していることを勘案すると、顎下腺主導管の生後発達に顎下神経節の発達が関与していることも考えられる。

### 3. シナプトフィジン陽性神経終末の生後発達変化とその免疫組織化学的観察

現在まで、生後発達における主導管およびその周囲の血管に分布するシナプトフィジン陽性神経終末数について免疫組織化学的に検索したものはない。本研究ではシナプトフィジン陽性神経終末数が生後1週から4週まで暫時増加した。これは顎下神経節ニューロンの面積の増加に伴ったものと考えられる。中枢神経のニューロンでは出生直後にシナプス数が急激に増加し、続いてニューロンの成長に伴って減少する、いわゆる刈り込みが生じることが報告されている<sup>25)</sup>。本研究では、シナプトフィジン陽性神経終末数は生後4週までは緩やかな増加を示したが、生後8週ではその数は減少したことが認められた。これは4週から8週の

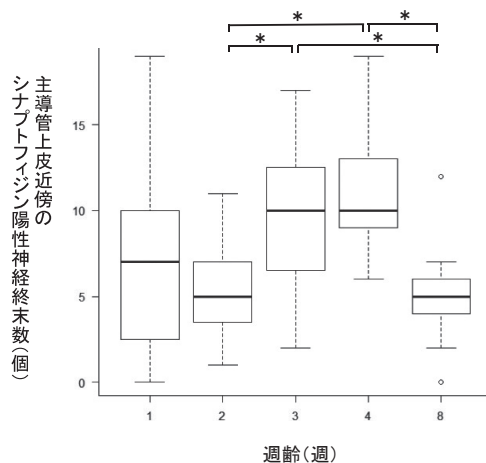


図 21 各週齢の主導管上皮に対するシナプトフィジン陽性神経終末の数

Kruskal-Wallis 検定後, Bonferroni の補正をした Mann-Whitney's U 検定を行い, 有意水準は  $* P < 0.05/10 = 0.005$  とした。

シナプトフィジン陽性神経終末の数は 2~3 週で著明な増加を認め, 4~8 週で減少が生じる。

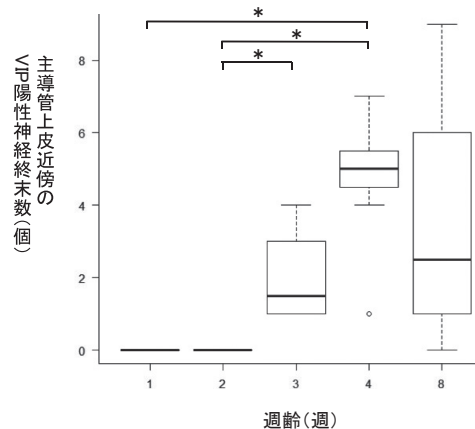


図 22 各週齢の主導管上皮に対する VIP 陽性神経終末の数  
Kruskal-Wallis 検定後, Bonferroni の補正をした Mann-Whitney's U 検定を行い, 有意水準は  $* P < 0.05/10 = 0.005$  とした。

VIP 陽性神経終末は 1, 2 週では認められず, 2~3 週で著明な数の増加が認められる。

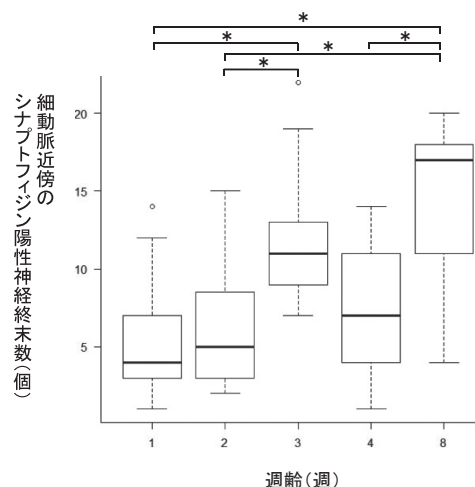


図 23 各週齢の主導管周囲の細動脈に対するシナプトフィジン陽性神経終末の数

Kruskal-Wallis 検定後, Bonferroni の補正をした Mann-Whitney's U 検定を行い, 有意水準は  $* P < 0.05/10 = 0.005$  とした。

シナプトフィジン陽性神経終末の数は 2~3 週と 4~8 週で著明な増加が認められる。

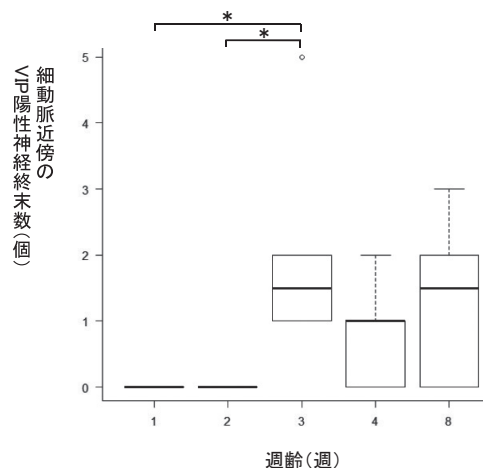


図 24 各週齢の主導管周囲の細動脈に対する VIP 陽性神経終末の数

Kruskal-Wallis 検定後, Bonferroni の補正をした Mann-Whitney's U 検定を行い, 有意水準は  $* P < 0.05/10 = 0.005$  とした。

VIP 陽性神経終末の数は 2~3 週で著明な増加が認められる。

間で, 刈り込みが生じた可能性がある。このことより顎下腺主導管の発達が 4 週で終了したことに伴い, 顎下腺主導管の発達分化のみに関係していたシナプトフィジン陽性神経終末が減少したと考えられる。それに対して, 顎下腺主導管周囲に認められる血管に分布するシナプトフィジン陽性神経終末数は 2 週から 3 週

と 4 週から 8 週で増加したことが認められた。これは神経細胞の面積の増加と一致したことから, これらには相互関係があると考えられる。これらの結果は, 主導管に分布するシナプトフィジン陽性神経終末数よりもその周囲の細動脈管壁に分布するシナプトフィジン陽性神経終末の数が著しく多いと大西ら<sup>18)</sup>が報告をし

ている。彼らの所見と本所見は一致する。顎下腺主導管や周囲の血管に分布するシナプトフィジン陽性神経終末は種々の免疫陽性を示した。すなわち、NPYや5-HT陽性神経終末は生後1週より認められ、それ以後はその数の変化に有意差は認められなかった。このことより顎下腺主導管の発達とは無関係であると考えられる。VIP陽性シナプスは生後1, 2週では観察されなかったが、生後3週でVIP陽性神経終末が出現した。このVIP陽性神経終末の出現と神経節ニューロンの面積の増加とは関係があると考えられる。さらに、3週でシナプトフィジン陽性神経終末数の急激な増加が生じたが、NPYや5-HT陽性ニューロン数の増加は少なかった。このことから3週以後のシナプトフィジン陽性神経終末数の増加は主としてVIP陽性神経終末の増加によるものであると考えられる。また、佐藤<sup>11)</sup>は交感神経刺激剤であるイソプロテレノールを投与したラットの顎下腺では通常より早く腺房細胞の変化が生じることを報告しているが、顎下腺主導管の生後発達については報告していない。しかし、いずれにしても顎下腺の生後発達に自律神経が関与していることが考えられる。本研究の結果から顎下腺主導管の生後発達と神経節ニューロンの生後発達の時期が一致することから、佐藤<sup>11)</sup>が報告しているように自律神経が顎下腺主導管の生後発達に関与していると考えられる。また、福田ら<sup>21)</sup>や平石ら<sup>22)</sup>が生後発達に伴って唾液成分、特に無機イオンの変化が生じ、それとう蝕の関係について報告しているが、その詳細は報告されていない。顎下腺主導管は無機イオンの添加や吸収を行っているため、本研究結果は生後発達における無機イオンの変化とう蝕との関連について解明の一助となるものであると考える。

## 結 論

われわれはラット顎下神経節ニューロンと顎下腺主導管の形態および主導管に分布する神経終末の生後変化について検索し以下の結論を得た。

1. 生後3~4週齢において顎下神経節ニューロンの大きさに顕著な増大が認められた。
2. 生後3~4週齢において主導管上皮の形態が重層上皮から多列上皮へと変化した。
3. 生後3~4週齢において主導管上皮に分布するVIP陽性神経終末が増加した。

以上の変化が離乳した生後3週直後に起きたことから、離乳刺激との相関性が示唆された。

## 謝 辞

論文作成にあたり御校閲と有益な御教示をいただきました災害医療・社会歯科学講座 山本龍生教授に厚く御礼申し上げます。本論文の要旨は、神奈川歯科大学学会第53回総会(平成30年12月1日,横須賀)において発表した。

## 利益相反

申告すべき利益相反なし。

## 文 献

1. Segal K, Lisnyansky I, Nageris B *et al.*: Parasympathetic innervation of the salivary glands. *operative techniques in otolaryngology head and neck surgery.* 7 (4): 333-338, 1996.
2. Dobrosielski-Vergona K: Biology of the Salivary Glands; 1st Edition, CRC Press, Florida, 10-14, 1992.
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. 小口岳史, 東 一善, 河田亮ほか: 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.
5. 平沢 興: 解剖学, 2巻, 第11版, 金原出版, 東京, 473-496, 2008.
6. 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.
7. 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(2): 117-127, 2009.
8. Anderson LC, Garrett JR, Zhang X *et al.*: 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.
9. 加藤智弘, 河田 亮, 東 一善ほか: 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(2): 101-110, 2014.
10. 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.
11. 佐藤一芳: ラット顎下腺終末部の発達と交感神経支配の関係について. *歯基礎誌.* 24: 496-515, 1982.
12. Young JA: A micro-perfusion investigation of sodium- reabsorption and potassium secretion by the main excretory duct of the rat submaxillary gland. *Pflug Arch Ges Phys.* 295: 157-172, 1967.

13. Higashi K, Gomi T, Soeda M *et al.*: New morphological aspects of the brush cells in the main excretory ducts of the rat submandibular glands. *Zool Sci.* **6**: 675-680, 1989.
  14. Higashi K, Akimoto K, Sasa S: Ultrastructural changes of brush cell in the main excretory ducts of rat submandibular glands. *Bull Kanagawa Dent Coll.* **22**: 71-76, 1994.
  15. Higashi K, Tsuzuki H, Hayashi H *et al.*: Serotonin-immunoreactive epithelial cells in the main excretory ducts of rat submandibular glands. *J Oral Biosci.* **46** (1): 20-26, 2004.
  16. Sato A, Miyoshi S: Ultrastructure of the main excretory duct of the rat parotid and submandibular glands with a review of literature. *Anat Rec.* **220**: 239-251, 1988.
  17. 東 一善, 五味敏昭, 岸 好彰ほか: イソプロテレノール投与ラット顎下腺主導管の刷子細胞の微細構造の変化. 歯基礎誌. **39**: 34-42, 1997.
  18. 大西宏祐, 小口岳史, 平野 航ほか: ラット顎下腺の腺房, 主導管, 導管周囲細動脈に分布する神経活性物質およびシナプトフィジン免疫陽性神経終末に関する免疫組織化学的研究. 神奈川歯学. **54**(2), 2019, 印刷中
  19. Higashi K, Tsuzuki H, Hayashi H *et al.*: Morphological differentiation in the main excretory duct of the rat submandibular gland. *Dentistry in Japan.* **35**: 3-7, 1999.
  20. 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**(3): 161-182, 1994.
  21. 福田敦史, 広瀬弥奈, 村田幸枝ほか: 小児における唾液流量, pH, 緩衝能および無機イオン濃度の経年的変化. 北海道医療大学歯学雑誌. **32**(1): 65-70, 2013.
  22. 平石典子, 田中光郎, 高木裕三: 小児唾液中無機イオンとう蝕との関連性. 口病誌. **66**(3): 249-253, 1999.
  23. Kanda Y: Investigation of the freely available easy-to-use software 'EZR' for medical statistics. *Bone Marrow Transplant.* **48**: 452-458, 2013.
  24. Anderson LC, Garrett JR, Zhang X *et al.*: Protein secretion from rat submandibular acini and granular ducts: effects of exogenous VIP and substance P during parasympathetic nerve stimulation. *Comp Biochem Physiol.* **119A**(1): 327-331, 1998.
  25. 渡邊貴樹, 上阪直史, 狩野方伸: 生後発達期の小脳におけるシナプス刈り込みのメカニズム. 生化学. **88**(5): 621-629, 2016.
-