

顎下神経節におけるオレキシンの免疫組織化学的研究

井上知則¹⁾, 小口岳史²⁾, 尾之上さくら³⁾前田信吾⁴⁾,
河田 亮*,⁴⁾ 東 一善⁴⁾

¹⁾ 神奈川歯科大学 大学院歯学研究科

²⁾ 神奈川歯科大学 基礎歯科学系 解剖学講座 解剖学分野

³⁾ 関東学院大学理工学部

⁴⁾ 神奈川歯科大学 基礎歯科学系 病理・組織形態学講座
分子口腔組織発生学分野

Immunohistochemical Study of Orexin in the Submandibular Ganglion

Tomonori INOUE¹⁾, Takeshi OGUCHI²⁾, Sakura ONOUE³⁾, Shingo
MAEDA⁴⁾, Akira KAWATA*,⁴⁾ and Kazuyoshi HIGASHI⁴⁾

¹⁾ Graduate School of Dentistry, Kanagawa Dental University,
82 Inaoka-cho, Yokosuka, Kanagawa 238-8580, Japan

²⁾ Department of Anatomy, Kanagawa Dental University,
82 Inaoka-cho, Yokosuka, Kanagawa 238-8580, Japan

³⁾ College of Science and Engineering, Kanto Gakuin University,
1-50-1 Mitsuura-higashi, Kanazawa-ku, Yokohama, Kanagawa
236-8501, Japan

⁴⁾ Department of Molecular Oral Histology and Embryology,
Kanagawa Dental University, 82 Inaoka-cho, Yokosuka,
Kanagawa 238-8580, Japan

キーワード：顎下神経節，オレキシン，VIP，NPY

ランニングタイトル：顎下神経節に投射するオレキシン作動性ニューロン

* 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 基礎歯科学系 病理・組織形態学講座
分子口腔組織発生学分野

河田 亮

TEL & FAX: 046-822-8846 e-mail: kawata@kdu.ac.jp

Abstract

The submandibular ganglion is one of the four parasympathetic ganglia involved in the autonomic nervous system. This ganglion innervates the submandibular gland to control saliva secretion and modifies the mechanism of primary saliva secretion in the main excretory duct. The ganglion cells contain vasoactive intestinal polypeptide (VIP), neuropeptide Y (NPY), serotonin (5-HT), and orexin-A and -B. In this study, morphological and immunohistochemical methods were employed with aims to observe the submandibular ganglion and preganglionic neurons. In rats, this ganglion is located along the main excretory duct of the submandibular gland. The peptidergic synapse with large dense core vesicles in ganglion cells was observed using electron microscopy. Both NPY and 5-HT immunoreactive cells were observed in many ganglion cells, but several cells were VIP-immunoreactive. All the ganglion cells and preganglionic neurons were observed to be immunoreactive to both orexin-A and -B, and orexin 2 receptor. This study reports for the first time that orexin is present in the submandibular ganglion.. Overall, our findings suggest that

orexin participates in providing innervation between the superior salivatory nucleus and the submandibular ganglion.

緒 言

顎下腺の分泌機構については既に報告がある。すなわち副交感神経性の分泌は橋に存在する上唾液核由来の線維が鼓索神経，舌神経を經由して顎下神経節に達し，そこでニューロンを換えて顎下腺，舌下腺に分布し唾液分泌に関与する。一方，交感神経は上頸神経節由来の節後線維が顎下腺，舌下腺に分布し，唾液の分泌に関与している^{1, 2)}。

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，顎下腺門付近から口腔粘膜側に存在している³⁾。この顎下神経節の研究は，顎下神経節が単にニューロンの交換の場であるとの認識から極めて限られていた。しかしNgら⁴⁾によってその形態についての詳細な研究が行われると，顎下神経節の機能に関する研究も盛んに行われるようになってきた。そして唾液分泌に関係している神経生理活性物質である生理活性アミンのserotonin (5-hydroxytryptamine: 5-HT)や，神経ペプチドのvasoactive intestinal polypeptide (VIP)やneuropeptide Y (NPY)などに関する免疫組織化学的な研究も行われてきている⁵⁻⁸⁾。

5-HTは中枢神経系の伝達物質として働く。脳機能の調節において重要な役割を果たすと考えられているが，生体内の大部分の5-HTは末梢に存在し，血管収縮，腸管蠕動運動，血小板凝縮などの調節因子として末梢でも多様な作用を持つことが知られている^{9, 10)}。VIPは消化管，膵臓，そして視床下部などの多数の場所で作られる。消化器系では平滑筋を弛緩させ，膵液と胆汁の分泌を刺激することが知られている¹¹⁾。NPYは中枢神経系および末梢神経系に存在する。末梢神経系では強力な血管収縮因子である。一方，中枢神経系ではNPY含有神経は脳内に広く分布し，NPYを脳内へ投与すると摂食促進が認められることが報告されている¹²⁾。

川邊-石井ら⁶⁾は顎下神経節中に5-HTの存在を報告し，中枢神経系における選択的5-HT取り込み阻害剤である塩酸パロキセチン抗うつ薬を投与すると，顎下神経節中の5-HTが中枢神経系と同様に減少し，その結果，口渴が生じることを報告し，顎下神経節が中枢神経系と同様な機能を有している可能性を報告している。またVIPやNPYも顎下神経節中に存在しており，さらにVIPは顎下腺主導管上皮中の刷子細胞にも免疫陽性反応がある⁷⁾。同じく主導管上皮中には5-HT陽性を示す細胞が存在することが報告されている⁵⁾。

小口ら³⁾は顎下神経節の連続切片を作製し、免疫組織化学的検索を行い、多くの顎下神経節ニューロンはNPY陽性で、門付近の少数のニューロンだけがVIP陽性であること、また顎下腺の腺体部にはNPY陽性ニューロンのみが分布し、顎下腺主導管周囲にはVIP陽性ニューロンが分布していることと示した。これらのことから、主として唾液分泌にはNPY陽性ニューロンが関与し、顎下腺主導管の唾液成分最終調整にはVIP陽性ニューロンが関与すると考えられる⁸⁾。

この様に顎下神経節から顎下腺の腺体や主導管といった末梢側に存在する神経生理活性物質に関する研究は多く報告されてきている。しかし顎下神経節の上位の副交感神経性の核¹³⁾、つまり中枢側との連絡にこの様な神経生理活性物質が関与するかは不明である。

orexin (ORX)は1998年にSakuraiら¹⁴⁾によって同定された新規神経ペプチドで、33のアミノ酸残基で構成されるorexin A (OXA)と28のアミノ酸残基で構成されるorexin B (OXB)の二つのイソペプチドが存在し、分子内ジスルフィド結合を有するOXAの方がOXBよりも構造的に安定している。ORXは摂食行動の制御系と睡眠・覚醒の制御系などに関係することが報告されている¹⁵⁾。

オレキシンレセプターにはGタンパク質共役型受容体であるオレキシン1レセプター (OX1R) とオレキシン2レセプター (OX2R) が報告されており、OX1RはOXAに高い親和性を示し、OX2RはOXAとOXBの両者に同程度の親和性を示す¹⁶⁾。脳内のOX1RとOX2Rの発現は同一部位でも観察はされるが、視床下部ではOX1Rの発現は腹内側核 (VMH) に最も顕著に認められるのに対し、OX2Rの発現は結節乳頭核、室傍核、弓状核および視床下部外側野などで多く認められる¹⁷⁾。

顎下神経節や顎下腺におけるORXの存在は今まで報告されていない。しかしORXは中枢ではNPY陽性ニューロンを刺激して種々の活動を引き起こすこと¹⁸⁾、そして前述の通り顎下神経節にNPYが存在し、NPY陽性ニューロンが唾液分泌に関与していることが知られていることから⁸⁾、上位の副交感神経性の核と顎下神経節との連絡にORXが関与している可能性がある。

そこで本研究では、顎下神経節におけるORXの存在を確認するためにOXAとOXB、それと両者に親和性を持つOX2Rの分布について免疫組織化学的手法を用いて検索し、顎下神経節に連絡する神経線維の種類を同定するために光学顕微鏡及び電子顕微鏡を用いて形態学的検

索を行った。

実験材料および方法

1. 成体ラットの顎下神経節の形態学的研究

1) 実験動物

生後10週～15週の雄性Wistar系ラット3匹(体重260～350g)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「実験動物の飼養及び保管並びに苦痛の軽減に関する基準」(平成18年環境省告示第88号)に基づいて, 倫理的に扱った。

2) 試料作製

ペントバルビタールナトリウム(ソムノペンチル, 共立製薬; Tokyo, Japan, 30～50mg/kg)を腹腔内投与し麻酔を施した後に, 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2.5%グルタルアルデヒド-0.1 M phosphate buffered (PB, pH7.4)中で30分間浸漬固定した。その後1%オスミウム酸-0.1 M PB で60分間固定した。さらにアルコール系列で脱水, 酸化プロピレンを介してエポキシ樹脂(Quetol 651, 日新EM; Tokyo, Japan)に包埋した。包埋した試料はウルトラミクロトーム(MT-1型, Du Pont; Wilmington, DE, USA)を用いてガラスナイフで約1 μ mに薄切し, トルイジンブルー液にて染色し, 光学顕微鏡で観察した。

透過型電子顕微鏡(以下TEM)用試料は試料包埋までは光学顕微鏡試料作製と同じ方法で行い, 試料を2 mmの大きさに細切し, ダイヤモンドナイフにてウルトラミクロトームを用いて薄切した。薄切切片は銅メッシュ上に載せ, 電子染色を施してTEM(JEOL-1220型, 日本電子; Tokyo, Japan)で観察した。

2. 成体ラットの免疫組織化学染色

1) 実験動物

生後10週～15週の雄性Wistar系ラット3匹(体重260～350g)を用いた。実験動物の飼育条件や取り扱いなどは, 前述した通り行った。

2) 試料作製

ペントバルビタールナトリウム(ソムノペンチル, 共立製薬; Tokyo, Japan, 30～50mg/kg)を腹腔内投与し麻酔を施した後に, 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4%パラフォルム

アルデヒド-0.1 M PB にて12時間浸漬固定した。その後に液体窒素で凍結し, O.C.T. compound (Tissue-Tek™, SAKURA; Osaka, Japan) に包埋し, 凍結ミクロトームにて厚さ約20 μ mの凍結切片を作製し, 切片をスライドガラス上に載せ風乾した。

3) 二重免疫染色

(1) PGP9.5とVIPの二重免疫染色

作製した凍結切片に対して, 以下の手法で免疫染色を行った。試料を10% normal goat serum (NGS)/ 0.75% Triton X-100/ 0.05% NaN₃ を含有した0.1 M phosphate-buffered saline (PBS) 中に30分間浸し洗浄した。続いて一次抗体反応は, mouse anti-PGP9.5 monoclonal antibody (UCL; Wright, England, 1/100 in 0.1 M PBS containing 10% NGS/ 0.75% Triton X-100/ 0.05% NaN₃) と rabbit anti-VIP polyclonal antibody (PLI; San Carlos, CA, USA, 1/200 in 0.1 M PBS containing 10% NGS/ 0.75% Triton X-100/ 0.05% NaN₃,) 中に一晩 (4℃) 浸して行った。その後, 30分間 PBS にて洗浄し, biotin-conjugated anti-mouse IgG antiserum (DAKO; Glostrup, Denmark, 1/400 in 0.1 M PBS containing 10% NGS/ 0.05% NaN₃) と FITC-conjugated anti-rabbit IgG antiserum (Wako; Osaka, Japan, 1/50 in 0.1 M PBS containing 10% NGS/ 0.05% NaN₃) 混液中に60分間 (室温) 浸漬した。その後に PBS にて30分洗浄した。さらに暗室中で Cy3-streptavidin (KPL; Guildford, UK, 1/1000 in 0.1 M PBS containing 10% NGS/ 0.05% NaN₃) に60分間浸した。それぞれの試料から任意に各一枚を取り出し, 一次抗体の代わりに PBS を用いて対照例とした。染色した試料は PBS 中に溶かしたグリセリンに封入し, 共焦点レーザー顕微鏡 (ECLIPSE E800™, Nikon; Tokyo, Japan) にて観察をした。

(2) PGP9.5とNPYの二重免疫染色

一次抗体に mouse anti-PGP9.5 monoclonal antibody (UCL; Wright, England, 1/100) と rabbit anti-NPY polyclonal antibody (PLI; San Carlos, CA, USA, 1/200) を用いて, (1) と同じ手法で免疫染色を行い, 顕微鏡観察をした。

(3) PGP9.5と5-HTの二重免疫染色

一次抗体に mouse anti-PGP9.5 monoclonal antibody (UCL; Wright, England, 1/100) と rabbit anti-5-HT polyclonal antibody (Immuno Star Inc; Hudson, WI, USA, 1/20) を用いて, (1) と同じ手法で免

疫染色を行い，顕微鏡観察をした。

(4) OXBとOXAの二重免疫染色

一次抗体に mouse anti-orexin A monoclonal antibody (R&D Systems Inc; Minneapolis, MN, USA, 1/200)と rabbit anti-orexin B polyclonal antibody (Alpha Diagnostic International; San Antonio, TX, USA, 1/1000)を用いて，(1)と同じ手法で免疫染色を行い，顕微鏡観察をした。

(5) orexin 2レセプターとOXAの二重免疫染色

一次抗体に mouse anti-orexin A monoclonal antibody (R&D Systems Inc; Minneapolis, MN, USA, 1/200)と rabbit anti-orexin 2 receptor polyclonal antibody (Alpha diagnostic international; San Antonio, TX, USA, 1/1000)を用いて，(1)と同じ手法で免疫染色を行い，顕微鏡観察をした。

結 果

1. 顎下神経節周囲組織における光学顕微鏡での観察

光学顕微鏡で顎下神経節周囲の横断像を観察すると、顎下神経節 (SMG) 中には幾つかの神経細胞が集合して認められた。この顎下神経節近傍には顎下腺主導管 (MD)、動脈、静脈が存在しているほかに、顎下神経節の横には大きな神経束 (N) が観察された (図 1a)。また顎下神経節を拡大して観察すると、神経節周囲を神経周膜によって包まれた神経細胞が観察された。この神経細胞中には比較的淡染する核とその内部には核小体が存在していた。また個々の神経細胞周囲は外套細胞 (矢印) によって覆われていた (図 1b)。このほか神経節中には神経線維や毛細血管も観察された。また顎下腺門付近の神経節では明らかに外部と連絡する神経束が認められ、その神経束中にはシュワン細胞の核 (矢印) が散在していた (図 1c)。この様に神経節と外部が連絡する太い神経束は顎下腺の門付近の神経節のみに認められ、その他の部位 (口腔粘膜側や門より腺体側) に存在する神経節には認められなかった。

図 1 挿入

2. 顎下神経節周囲組織における電子顕微鏡での観察

顎下神経節中の神経細胞を電子顕微鏡で観察すると淡染性の大きな核が観察された。さらに細胞質中には多くのミトコンドリア、粗面小胞体が散在しており、高電子密度を有する小型の顆粒状の構造が認められた。また細胞質中には明らかに電子密度が異なる小胞様構造物 (矢印) が認められた。そして細胞の周囲部には外套細胞の核があり、そこから神経細胞周囲に細い突起を出し、神経細胞を取り囲んでいた。さらに神経細胞間にはミエリン鞘を有する軸索が認められた。また他の神経細胞に同様な構造が認められた (図 2a)。これらの構造を拡大してみると隣接する細胞との間の細胞膜はその一部が肥厚し、内部には大型の有芯小胞が観察された。さらにミエリン鞘 (M) を有する線維の一部が隣接する神経細胞の中に突出しシナプスを形成して、神経細胞と接する様な像が観察された。これらのシナプス中には直径約 100 nm の小胞中に高電子密度のコアを有する有芯小胞が観察された (図 2b)。

図 2 挿入

3. 顎下神経節における免疫組織化学染色

1) VIP, NPY, 5-HT (緑) と PGP9.5 (赤) の二重免疫染色

顎下神経節にVIPとPGP9.5の免疫二重染色を施して共焦点レーザー顕微鏡で観察すると全ての顎下神経節中の神経細胞はPGP9.5免疫陽性を示した。またVIP免疫染色では殆どの神経節細胞は陰性を示したが、顎下腺の門付近の神経節細胞にのみVIP免疫陽性を示した。しかしその細胞数は少数であった。神経節と連絡する大きな神経束はPGP9.5のみに免疫陽性を示した(図3a)。

NPYとPGP9.5の二重免疫染色を施して観察すると、殆どの顎下神経節中の神経細胞はNPY免疫陽性を示した。また門付近の神経節を観察すると、PGP9.5およびNPY免疫陽性を示す神経節と連絡する大きな線維群が観察されたが、それらはいずれもPGP9.5免疫染色陽性を示したが、NPY免疫陰性であった(図3b)。さらに神経節と腺体の間の結合組織には大きな線維束が観察されたが、この様な大きな線維束はNPY免疫陰性を示した。しかし細い線維はNPY免疫陽性を示した。

5-HTとPGP9.5の二重免疫染色を施して観察すると、殆どの顎下神経節中の神経細胞は5-HT免疫陽性を示した。さらに神経細胞周囲にPGP9.5のみに陽性を示す線状構造が認められ、神経節と連絡する大きな線維束も同様な所見を得られた(図3c)。

図 3 挿入

2) OXB(赤)とOXA(緑)の二重免疫染色

OXB免疫染色像では、顎下神経節に免疫陽性細胞が認められ、そこから続く神経線維も同様に免疫陽性を示した(図4a)。OXA免疫染色像ではOXBと同様に神経細胞、神経線維のいずれも免疫陽性を示した(図4b)。OXBとOXAの二重免疫染色像では、神経細胞、神経線維とも共陽性を示した(図4c)。

顎下腺門付近の神経節では神経節と連絡する大きな線維群が観察された(図5)。この大きな神経束はOXB(図5a)とOXA(図5b)の免疫共陽性を示した(図5c)。

図 4, 5 挿入

3) OX2R(赤)とOXA(緑)の二重免疫染色

顎下神経節におけるOX2R(図6a, 図7a)とOXA(図6b, 図7b)の二重免疫染色像を観察すると、神経細胞は全て共陽性を示し、両者とも反応は細胞に点状に認められた(図6c, 図7c)。

図7では神経節と連絡する線維束が観察され、神経束はOXA免疫陽性を示したが(図7b)、OX2Rの陽性像は神経束中にわずかに散在していた(図7a)。

図 6, 7 挿入

考 察

1. 形態学的考察

本研究で観察した顎下神経節は顎下腺主導管と舌下腺主導管の近傍に存在していた。Snell¹⁹⁾は舌下腺には神経節が欠如すると報告しているが、本研究では舌下腺主導管と顎下腺主導管の間の結合組織中に、主導管に沿って顎下神経節が存在していたことから、舌下腺、顎下腺の両者にこの神経節からの線維が分布しているものと考えられる。この考察はNgら⁴⁾の所見とも一致する。またYamakadoら²⁰⁾はマウス顎下神経節の神経細胞には大、小の種類神経細胞が存在していることを報告している。しかし本研究で観察した顎下神経節中の神経細胞の大きさには差異は認められなかった。Ngら^{21, 22)}は細胞の機能状態によって細胞の形状は変化する可能性があり、基本的には大きさに差異はないと考えている。本所見でも同様に細胞の大きさに差異がなかったことから、Ngら^{21, 22)}の所見を支持できる。

顎下神経節の微細構造については、川邊-石井⁶⁾やNgら⁴⁾によって報告がある。その報告によると顎下神経節は神経細胞体とその周囲を取り囲んでいる外套細胞より構成されており、神経細胞間には介在ニューロンも存在し、神経細胞中に明らかに電子密度、内部構造が異なる構造物が認められるということである。Ngら⁴⁾はサル顎下神経節を電子顕微鏡で観察し、軸索終末が細胞質中の深くまで入り込んでいることを観察し、顎下神経節の特徴のひとつであると考えている。本研究の電子顕微鏡観察でも神経細胞に軸索終末と類似した構造物が認められたことから、ラット顎下神経節でもサルと同様に軸索終末が細胞質の奥深くまで入り込んでシナプスを形成していることが考えられる。そして、その観察したシナプス中に大型で内部に電子密度の高い構造を含有するシナプス小胞が確認された。シナプスは藤田ら²³⁾によって内部に含有するシナプス小胞の大きさで3種類に区別されている。すなわちシナプス小胞が平均30~40 nmで中空の球形を示すコリン作動性シナプス、大きさが平均50 nmで内部に暗調の芯を有するカテコールアミン作動性シナプス、そしてシナプス小胞の大きさが60 nm以上の有芯小胞を有するペプチド作動性シナプスである。今回電子顕微鏡で観察されたシナプス小胞の大きさは約100 nmで、しかも有芯小胞であったことから、ペプチド作動性シナプスと考えられる。しかし顎下神経節にはセロトニン、NPY、VIP

などのペプチドも存在しており^{3, 6)}、どのペプチドが今回観察したシナプスに存在しているかは、本研究では不明である。

また顎下腺門付近に存在する神経節と外部を連絡する様な神経束が認められた。大きな神経束が顎下神経節に出入するのは門付近のみであり、この所見は中村²⁴⁾、秋本ら²⁵⁾が血管鋳型標本で齧歯類の顎下腺および舌下腺を観察し、腺体や主導管に分布する血管が門付近より進入し、門付近で腺体と主導管側に分枝するという報告と一致する。さらに顎下神経節と外部とを連絡している線維束にはシュワン細胞の核が確認されたことから、これらの神経束は有髄神経より構成されているものと考えられる。また電子顕微鏡での観察でミエリン鞘が多数観察されたことも、この考察を裏付けるものと考えられる。

顎下神経節は副交感神経性の神経節であることは周知のことである。また自律神経系では節前線維は有髄神経であり、節後線維は無髄神経であることが知られている²⁶⁾。本研究で観察された神経節に接続する神経束は有髄神経であることから、上位の副交感神経核からの節前線維であることが考えられる。

2. 免疫組織化学的考察

1) VIP, NPY, 5-HTとPGP9.5の免疫染色

顎下神経節におけるVIP免疫陽性細胞は門付近に限局して認められたが、NPYと5-HTの免疫反応は顎下神経節のほとんどの細胞が陽性を示した。これは小口ら³⁾の所見と一致する。さらに神経節と外部を連絡している大きな神経束は神経特異的マーカーであるPGP9.5の免疫染色では陽性を示しているが、VIP, NPYおよび5-HTの免疫反応は全て陰性であった。この神経束はおそらく光学顕微鏡所見で認められた有髄線維と同一のものと考えられる。また大きな神経束が門付近で顎下神経節に連絡していることは既に報告があることから³⁾、この神経束は顎下神経節に投射する節前線維であることが推察される。また前述の通りこの神経束にはVIP, NPYおよび5-HTの免疫反応が陰性であったことから、上位核と顎下神経節を連絡する神経生理活性物質にこの3つのペプチドは関係しないと考えられる。

2) OXAとOXB, およびOX2Rの免疫染色

本研究で顎下神経節ではOXA, OXB及びOX2Rが免疫陽性を示した。ま

た顎下神経節に連絡する神経線維束にOXA, OXBの免疫陽性反応はあったが、NPYに対する免疫反応は陰性であった。さらに光学顕微鏡観察では顎下神経節に連絡する神経線維束にはシュワン細胞の核が存在し、電子顕微鏡観察ではミエリン鞘も観察されていることから有髄線維であることが確認されている。そして前述の通り自律神経線維のうち節前線維は有髄線維であり、節後線維は無髄線維であることはよく知られている²³⁾。したがってこの有髄線維は上位の自律神経核から顎下神経節に投射する節前線維であると考えられる。さらにこの有髄神経線維と顎下神経節中の神経細胞とのシナプスに存在するシナプス小胞の大きさが約100 nmであったことから、このシナプスはペプチド作動性シナプスと考えられる²⁰⁾。この結果と免疫組織化学的観察結果を勘案すると、顎下神経節に入る節前線維にORXが存在すると考えられる。つまり、顎下神経節とその上位の自律神経核との連絡にORXが関係していると考えられる。この考察は、顎下神経節中の細胞にOX2R免疫陽性が示されたことから支持される。緒言でも述べた通り、ORXの受容体にはOX1RとOX2Rの2種類が報告されている¹⁶⁾。先に行った免疫染色で、顎下神経節においてOXAとOXBの両者の発現が確認されており、今までの報告においてOX1RはOXAとOXBの親和性に大きな違いを示すが、OX2RはOXAとOXBの両者に同程度の親和性を示すこと¹⁶⁾、またOX1RとOX2Rのノックアウトマウスを用いた研究では、睡眠状態を制御するのは主にOX2Rで、OX1Rは補足的な役割を果たすことなどが報告されているため²⁷⁾、本研究では先ずOX2Rの免疫染色でオレキシン線維の顎下神経節への投射の確認を行った。但し、各受容体の脳内での発現部位には違いが有ることや¹⁷⁾、各受容体の唾液腺分泌に関する働きなどの報告は無いことから、今後顎下神経節におけるOX1Rの免疫染色も行う予定である。

また上位の副交感神経性の核(上唾液核)には視床下部外側野からのORX産生ニューロンが連絡していることはすでに報告があり²⁸⁾、顎下神経節までその影響が及んでいると考えられる。また顎下神経節中の細胞すべてにORX免疫陽性が認められ、かつNPY, VIP, 5-HTも顎下神経節中の神経細胞で免疫陽性を示したことから、ORXはNPYのみならずVIPや5-HTにも関係していると考えられる。従って、ORXは顎下腺からの唾液分泌において、川邊-石井ら⁶⁾や小口ら³⁾、そして杉村ら⁸⁾が報告しているNPY, VIP, 5-HTなどの神経生理活性物質

を通じて唾液成分の再調整などに関与していることが示唆される。

結 論

顎下腺の分泌機構にORXが関わるかを調べるために、顎下神経節およびその周囲の形態学的検索と免疫組織化学的検索を行った。

その結果、顎下神経節に投射する太い神経束は形態学的観察により、有髄神経であることから副交感神経の節前線維であると考えられた。また電子顕微鏡観察により、神経節に付着するシナプスはペプチド作動性であると考えられた。そして免疫組織化学染色で、それらの神経束はOXAとOXB免疫陽性であったことから、顎下神経節にはORX作動性ニューロンが終止し、唾液の分泌調節に関与する可能性が示された。

謝 辞

本研究を遂行するにあたり、終始多大なる御協力を頂いた本学口腔科学講座神経組織発生学分野の教室員各位に深く感謝を申し上げます。本論文の要旨は、第55回神奈川歯科大学学会総会（令和2年12月5日、横須賀）において発表した。

利益相反

本論文に関連し、開示すべきCOI状態にある企業、組織、団体はいずれもありません。

文 献

1. Segal K, Lisnyansky I, Nageris B et al: Parasympathetic innervation of the salivary glands. *Oper Tech Otolaryngol Head Neck Surg.* 7 (4): 333-338, 1996.
2. Dobrosielski-Vergona K: Biology of the Salivary Glands; 1st Edition, CRC Press, Florida, 10-14, 1992.
3. 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.
4. 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.
5. 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
6. 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.
7. 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.
8. 杉村太丈, 河田 亮, 小口岳史ほか: 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. *神奈川歯学.* **55**(1): 29-42, 2019.
9. Gershon MD, & Tack J: The serotonin signaling system: from basic understanding to drug development for functional GI disorders. *Gastroenterology.* **132**(1): 397-414, 2007.
10. Mohammad-Zadeh, LF, Moses L, Gwaltney-Brant SM: Serotonin: a review. *J Vet Pharmacol Ther.* **31**(3): 187-99, 2008.
11. Fahrenkrug J: Gut/brain peptides in the genital tract: VIP and PACAP. *Scand J Clin Lab Invest. Suppl* **234**: 35-39, 2002.
12. Sahu A, Kalra SP: Neuropeptidergic regulation of feeding behavior by neuropeptide Y. *Trends Endocrinol Metab.* **4**: 217-224, 1993.
13. 平沢 興: 分担解剖学2 脈管学・神経系; 金原出版, 東京, 408-410, 1994.

14. Sakurai T, Amemiya A, Ishii M, et al: Orexins and orexin receptors: a family of hypothalamic neuropeptides and G protein-coupled receptors that regulate feeding behavior. *Cell*. **92**(4): 573-585, 1998.
15. Sakurai T: The neural circuit of orexin (hypocretin): maintaining sleep and wakefulness. *Nature reviews. Neurosci.* **8**(3): 171-81, 2007.
16. Sakurai T, Mieda M: Connectomics of orexin-producing neurons: interface of systems of emotion, energy homeostasis and arousal. *Trends Pharmacol Sci.* **32**: 451-462, 2011.
17. Tsuneki H, Wada T, Sasaoka T: Role of orexin in the central regulation of glucose and energy homeostasis. *Endocr J.* **59**: 365-374, 2012.
18. Dube MG, Horvath TL, Kalra SP: Evidence of NPY Y5 receptor involvement in food intake elicited by orexin A in sated rats. *Peptid.* **21**: 1557-1560, 2000.
19. Snell RS: The histochemical appearances of cholinesterase in the parasympathetic nerves supplying the submandibular and sublingual salivary glands of the rat. *J Anat.* **92**: 534-543, 1958.
20. Yamakado M, Yohro T: Population and structure of nerve cells in mouse submandibular ganglion. *Anat-Embryol (Berlin)*. **150**: 301-312, 1977.
21. 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**: 305-314, 1992.
22. 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.
23. 藤田尚男, 藤田恒夫: 標準組織学総論; 第4版, 医学書院. 東京, 298-304, 2005.
24. 中村 聡: 唾液腺に分布する血管の超微構造について. 神奈川歯学. **16**: 591, 1982.
25. 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.
26. 藤田尚男, 藤田恒夫: 標準組織学各論; 第5版, 医学書院. 東京, 522-523, 2017.
27. Mieda M, Sakurai T: Integrative physiology of orexins and orexin receptors. *CNS Neurol Disord Drug Targets.* **8**: 281-295, 2009.

28. Harrison TH, Chen CT, Dun NJ and Chang JK: Hypothalamic orexin A-immunoreactive neurons project to the rat dorsal medulla. *Neurosci Lett.* **273**: 17-20, 1999.

図の説明

図1 顎下神経節の光学顕微鏡観像（トルイジンブルー染色）

1a: 顎下神経節（SMG）の位置を矢印で示す。顎下腺主導管（MD）と顎下神経節の間には大きな神経束（N）が観察される。

scale bar=100 μ m

1b: 顎下神経節の拡大像を示す。神経周膜に包まれた神経節中には淡染性を示す大きな核と明瞭な核小体を有する神経細胞が認められる。これらの神経細胞周囲に外套細胞の核が存在している（矢印）。さらに神経節内には毛細血管や神経線維が観察される。

scale bar=50 μ m

1c: 顎下腺の門付近の顎下神経節（SMG）では神経節から伸びる大きな神経束が認められる。その神経束中にはシュワン細胞の核（矢印）が観察される。

scale bar=50 μ m

図2 顎下神経節の電子顕微鏡像

2a: 神経細胞の核は比較的明るく、細胞質中には多くの粗面小胞体、ミトコンドリアが観察され、その間に高電子密度の顆粒が散在している。またその中に明らかに低電子密度の部分が存在している（矢印）。この低電子密度の構造中には有芯小胞が幾つか認められる。神経細胞間にはミエリン鞘を有する軸索が認められる。

scale bar=10 μ m

2b: 神経線維と神経細胞の連絡像を示す。神経細胞に隣接してミエリン鞘（M）を有する線維が存在し、そこから神経細胞中にシナプスが突出している。このシナプスには直径約100nmの小胞が多数存在し、小胞中にはやや電子密度が高い小顆粒が含有されている（矢印）。

scale bar=200 nm

図3 顎下神経節のVIP, NPY, 5-HTとPGP9.5の免疫陽性像

scale bar=50 μ m

3a: 顎下腺の門付近の顎下神経節のPGP9.5(赤)とVIP(緑)二重免疫染色像を示す。顎下神経節を染色すると全ての細胞がPGP9.5免疫陽性を示したが、VIP免疫染色では一部の神経細胞のみが陽性を示す。神経節と連絡する神経束はPGP9.5のみ陽性を示す。

3b: 顎下腺の門付近の顎下神経節のPGP9.5(赤)とNPY(緑)二重免疫染色像を示す。顎下神経節は両者に共陽性を示したが、顎下神経節と外部を連絡する様な神経束(矢印)はPGP9.5のみ陽性を示す。

3c: PGP9.5(赤)と5-HT(緑)二重免疫染色像を示す。神経節細胞はPGP9.5と5-HTの免疫共陽性を示す。この周囲にPGP9.5免疫陽性を示す神経線維が神経節細胞を取り巻く様に、さらに神経節と連絡する線維状構造が観察される。

図4 顎下神経節のOXB(赤)とOXA(緑)の免疫染色像

scale bar=50 μ m

4a: 顎下神経節にOXB免疫染色を施して観察すると全神経節細胞に陽性反応が認められる。また顎下腺の門付近で神経節と外部を連絡する大きな神経束にも陽性反応が存在する(矢印)。神経節中には陽性を示す細胞間に線状の陽性部位が観察される。

4b: OXA免疫染色を施して観察すると全神経節細胞に陽性反応が認められ、大きな神経束(矢印)にも反応陽性が認められる。

4c: OXB(赤)とOXA(緑)の二重免疫染色像を示す。神経節も神経節と外部を連絡する大きな神経束にも陽性反応が存在する(矢印)。

図5 大きな神経束のOXB(赤)とOXA(緑)の免疫染色像

scale bar=50 μ m

5a: 大きな神経束にOXB免疫陽性が認められる

5b: 大きな神経束はOXA免疫染色で陽性を示す。

5c: OXBとOXAの二重免疫染色像を示す。両者に免疫共陽性を示している。

図6 顎下神経節のORX2レセプター（赤）とOXA（緑）の免疫染色像
scale bar=50 μ m

6a: ORX2レセプター免疫染色で神経節中の細胞は陽性を示すが、その陽性部位は細胞に点状に分布している。

6b: OXA免疫染色で神経細胞は陽性を示す。

6c: ORX2レセプターとOXA二重免疫染色像を示す。神経細胞は両者とも陽性を示すが、ORX2レセプターの免疫陽性部位は点状に観察される。

図7 大きな神経束を含む顎下神経節のORX2レセプター（赤）とOXA（緑）の免疫染色像

scale bar=50 μ m

7a: ORX2レセプター免疫染色を示す。顎下神経節の細胞は免疫陽性を示している。また神経節の周囲に弱い陽性反応が認められる。

7b: OXAの免疫染色を施すと神経節中に免疫陽性細胞が認められ、さらに神経節と連絡する神経束に免疫陽性が観察される。

7c: ORX2レセプターとOXA二重免疫染色像を示す。外部と連絡する神経束はOXA免疫陽性を示しているが、ORX2レセプター免疫陽性はわずかに神経節の近傍に認められる。

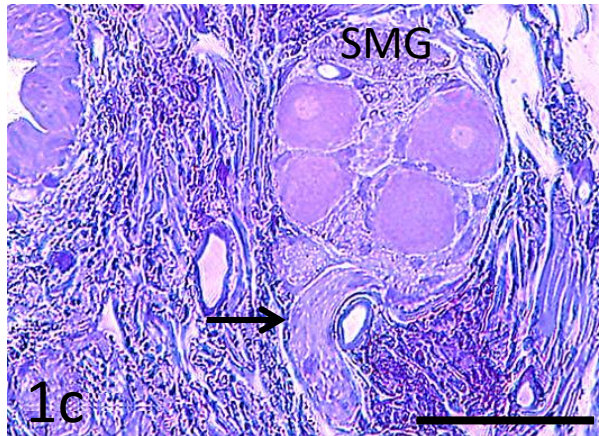
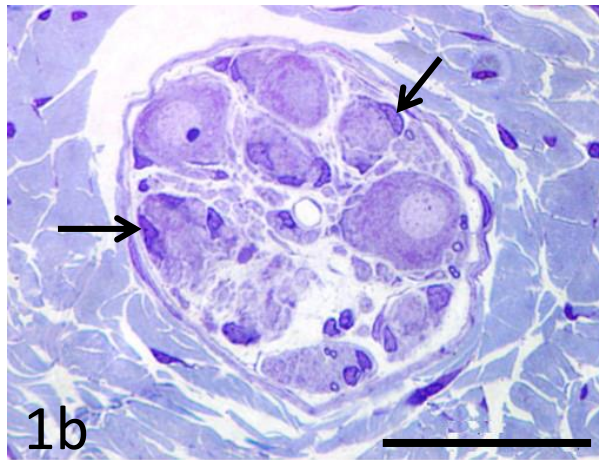
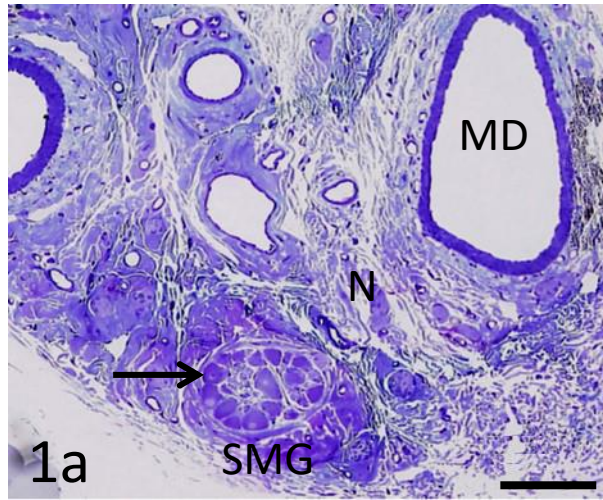


図1 (カラー)
井上知則

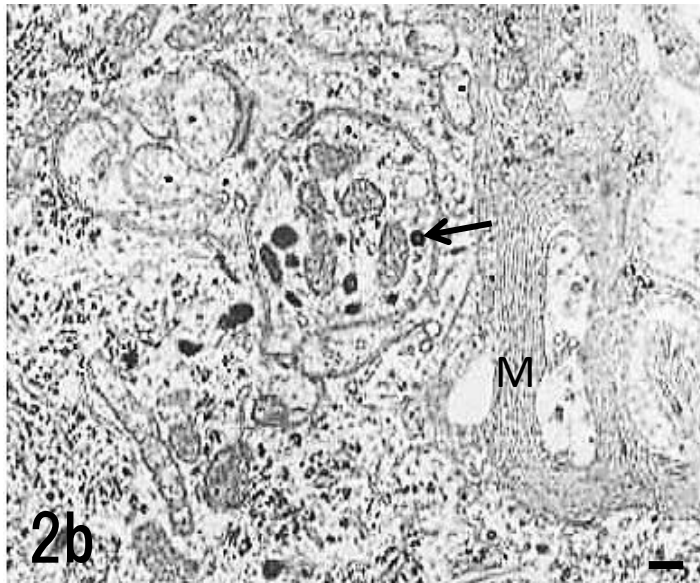
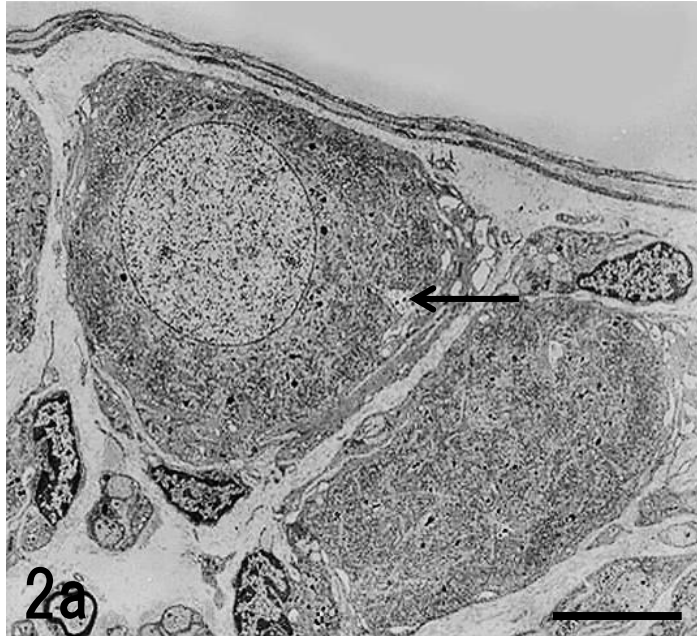


図2 (白黒)
井上知則

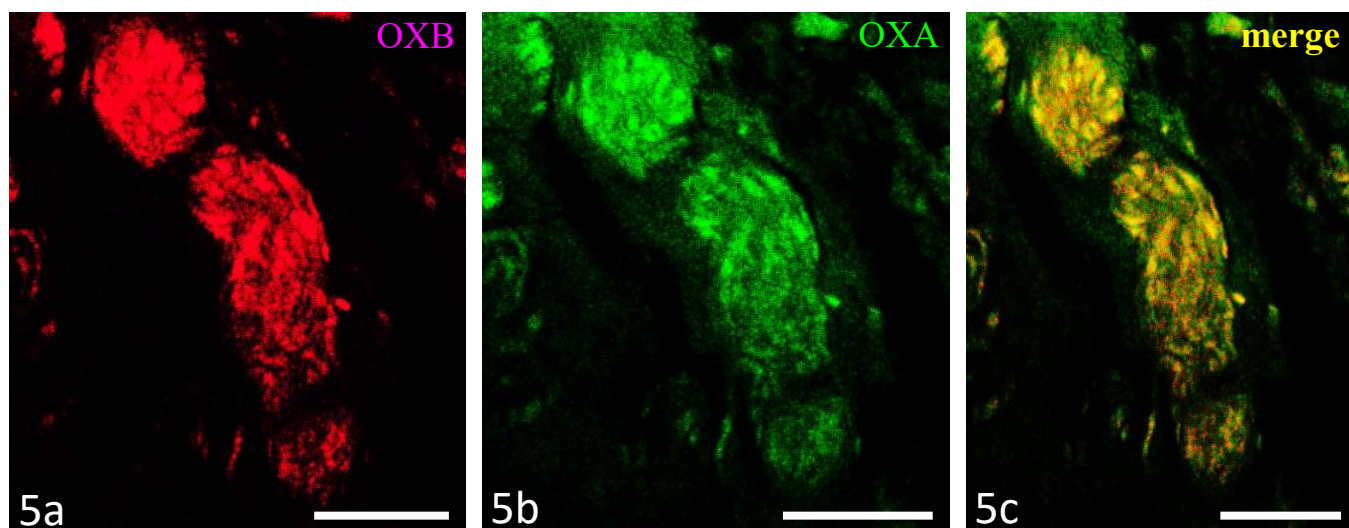
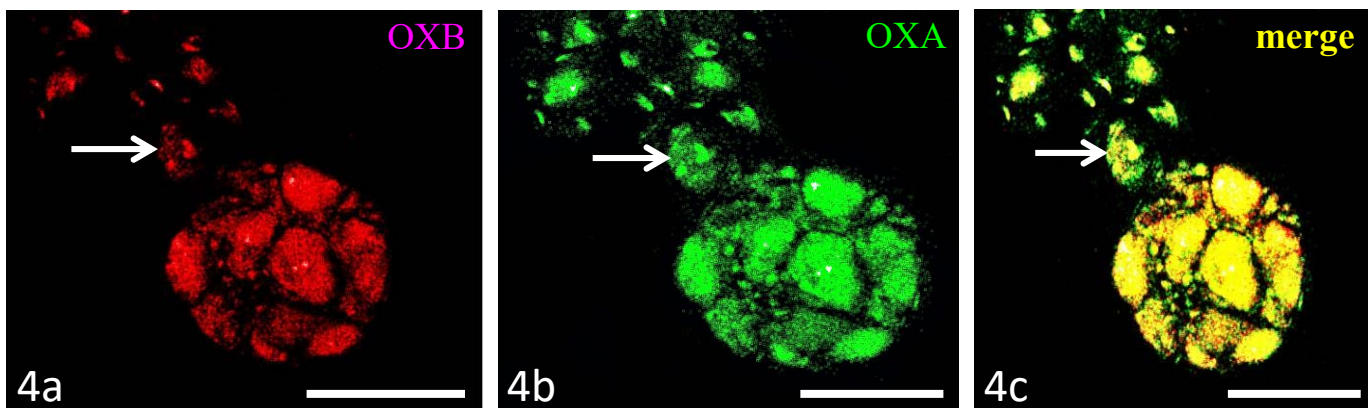
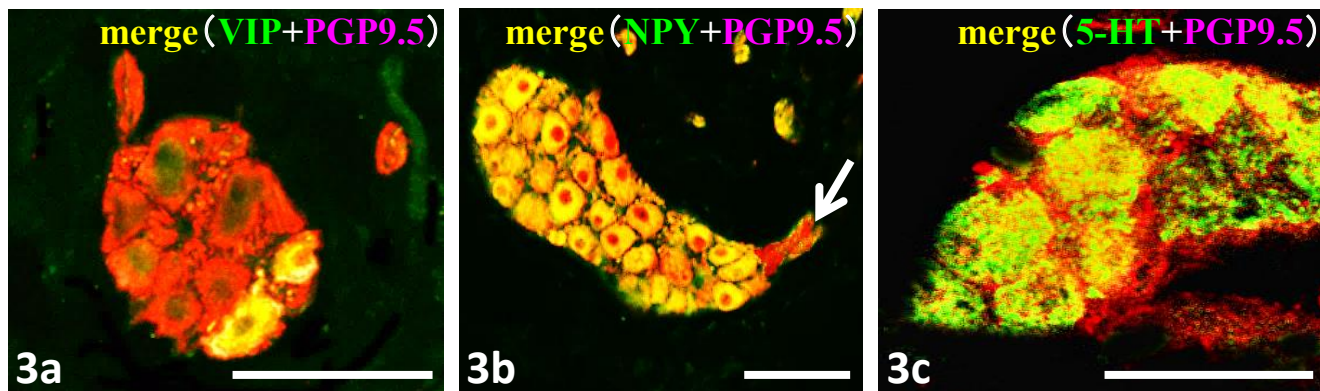


図3, 図4, 図5 (カラー)
井上知則

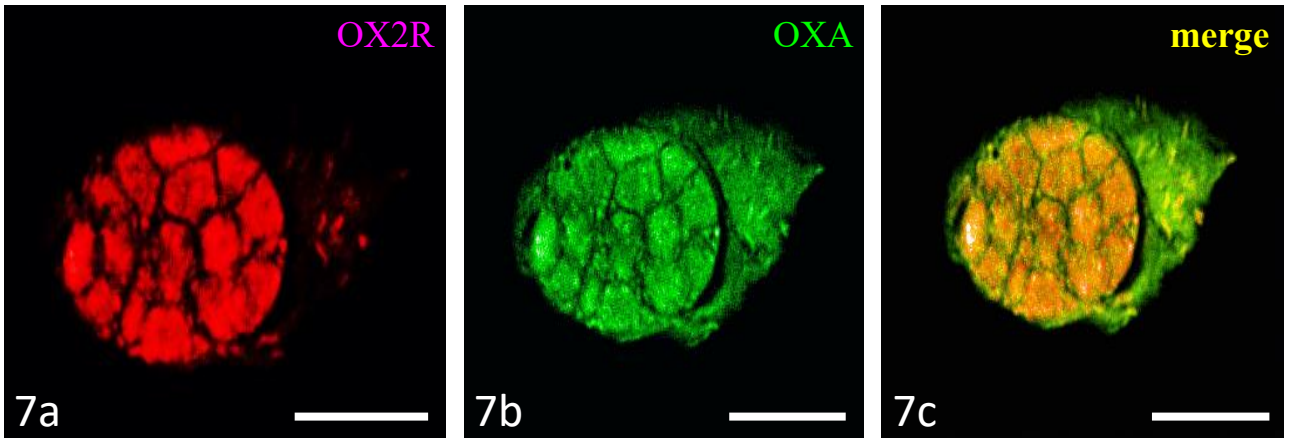
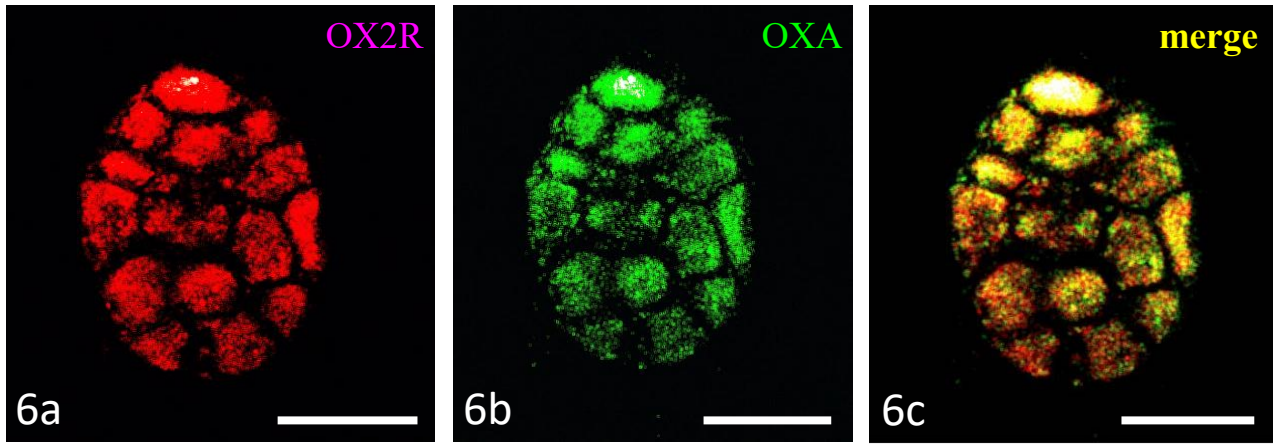


図6, 図7 (カラー)
井上知則