

〔原著〕 松本歯学 3: 108~112, 1977

N.G.F. 抗血清によるマウス顎下線の変化

佐 原 紀 行

松本歯科大学 口腔解剖学第2講座 (主任 鈴木和夫 教授)

The Effect of the Nerve Growth Factor Antiserum on the Mouse Submandibular Glands

NORIYUKI SAHARA

*Department of Oral Histology, Matsumoto Dental College
(Chief: Prof. K. Suzuki)*

Summary

The effect of the Nerve Growth Factor (β -subunit) antiserum to submandibular glands and the surperial servical sympathetic ganglions was investigated using the mouse of different developmental stages.

The intra-abdominal injection of the antiserum to a newbron mouse did not affect to the structure or the development of the gland, although antiserum massively destroyed it's sympathetic ganglion. The nervous ganglion cells were decreased in population and size.

In 50-day-old mouse a severe morphological alternation of the granular tubular portion of the gland was observed. The granular tubular portion appeared to reduce in number and size. The epithelial cells lining the wall of the tubuli showed marked sings of degeneration, and there was shrinking and vacuolation of the cytoplasm, and depleted of secretory granules. No significant alternations were detected in the acinar portion.

The surperial servical sympathetic ganglions of the 50-day-old mouse were under-gone a moderate atrophy.

結 言

Lacassagne^{1)~3)}を初めとし、多くの研究者により、マウス顎下腺に著しい形態的性差があることが報告されている^{4)~7)}。それはおもに顆粒管部を形成している上皮細胞の高さ、また上皮細胞

内に多量に存在する分泌顆粒の量の差である。

一方、形態的性差だけではなく、生化学的にも、Protease,^{8) 10)} Nerve Growth Factor (N.G.F),⁹⁾ Epidermal Growth Factor (E.G.F),¹¹⁾ Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase,¹²⁾ などの活性にも明確な性差があることが報告されている。

これらの形態的性差と生化学的性差は、たがいに密接な関連性をもっていて、共にテストステロ

ンの支配下にある。

しかし顆粒管部の上皮細胞がどのような生理学的意義をもっているのかは、ほとんどわかっていない。特に、上皮細胞内に多量に存在する分泌顆粒については、古くから注目されていたが、分泌顆粒がどんな物質を含んでいるのか、またどのような機能を営んでいるのか、現在でも不明な点が多い。

今回の研究では、N.G.F(β -subunit) に対する抗血清を腹腔内に注射し、顎下腺の組織学的変化を観察し、N.G.F. と顆粒管部上皮細胞との関連性を考察した。さらに抗血清投与後の上頸交感神経節の組織学的変化も観察した。

実験材料および実験方法

本実験には、固型飼料、自由飲水で飼育した、ddy系雄マウスを使用した。

50日齢の雄マウス60匹を20匹ずつ3群に分け、第1群にはN.G.F. 抗血清を0.5 ml、第2群には1 ml をそれぞれ腹腔内注射し、第3群はcontrolとして使用した。

N.G.F. 抗血清投与群は、投与後1日目、5日目、10日目、15日目、20日目にエーテル麻酔下で顎下腺、上頸交感神経節をそれぞれ摘出し通法に従い標本作製した。これら試料については光学顕微鏡下で、経目的にその組織像の変化を観察した。

さらに新生マウス10匹に、生後1日目から0.05 ml、0.1 ml、0.2 ml、0.12 ml、0.15 ml と5日間にわたり0.62 ml のN.G.F. 抗血清を腹腔内注射し、投与後、実験マウスが50日齢になるのを待ち、顎下腺、上頸交感神経節を摘出し、その組織学的変化を観察した。

顎下腺は10%中性ホルマリン固定後、通法にしたがいエタノール系列で脱水、パラフィン包埋後薄片し、Mallory の燐タングステン酸ヘマトキシリン(PTAH)法により染色した。

上頸交感神経節はBodian液により固定後、パラフィン包埋しBodian大塚変法の渡銀法により標本作製した。

なお、今回の実験に使用したN.G.F. 抗血清はWellcome Reagents Limited. 製のものを使用した。

観 察 成 績

50日齢マウス：

N.G.F. 抗血清 0.5 ml 投与のマウス顎下腺では、投与後15日目から顆粒管部上皮細胞内の分泌顆粒の量が、対照群にくらべ減少し、一部の上皮細胞の細胞質に空胞の出現や萎縮崩壊が観察された。

上頸交感神経節については、対照群のものにくらべ、ほとんど変化がみられなかった。

1 ml 投与後のマウス顎下腺では、0.5 ml 投与の顎下腺より、その組織学的変化は著しかった。この変化は投与後1日目の顎下腺に於いても観察することができた(Fig 1)。

投与後1日目の顎下腺では上皮細胞内の分泌顆粒が一様に管腔側に集まっている状態が観察され、このような組織変化は投与後5日目から10日目位までみられた(Fig 2)。

投与後10日目をすぎると、対照群にくらべ顆粒量の減少が著しくなり始め、一部の上皮細胞では、細胞質に多くの空胞が観察されるようになる(Fig 3)。

投与後20日目をすぎると、ほとんどの上皮細胞は崩壊され、大部分の上皮細胞には分泌顆粒がみられなくなった(Fig 4)。

N.G.F. 抗血清 0.5 ml、1 ml 投与のマウスの顎下腺では、このような顆粒管部上皮細胞の顕著な変化に対し、顎下腺の終末部の分泌細胞や、導管系のその他の部位には全く変化を観察することができなかった。

N.G.F. 抗血清 1 ml 投与のマウス上頸交感神経節の大きさは対照群に比し、やや萎縮し、光顕的観察では、神経細胞の萎縮がみられる程度であった。しかしN.G.F. 抗血清0.62 ml投与のマウスでは上頸交感神経節には変化はみられず、対照群とは明らかな差はなかった。

新生児マウス：

生後1日のマウスにN.G.F. 抗血清0.62 ml を5日間にわたり分投与し、50日間飼育した。この50日齢のマウス顎下腺と対照群の顎下腺とは全く差がみられなかった。しかしN.G.F. 抗血清 1 ml 投与後50日のマウス上頸交感神経節では明らかな変化がみられた。すなわちN.G.F. 抗血清投与マウスの上頸交感神経節では、肉眼所見でも明ら

かな萎縮がみられ、対照群に比し 1/10 程度の大きさであった。

N.G.F. 抗血清投与後 50 日マウスの上顎交感神経節の組織像をみると、神経細胞の数は対照群に比し、著しく少なく、細胞の大きさも小さくなり萎縮しているのが観察された。しかし神経節を構成するその他の細胞、すなわち被膜より侵入する線維細胞、外套細胞には殆んど変化はみられなかった。

考 察

Cohen¹³⁾は N.G.F.(Nerve Growth Factor) は成熟マウスの顎下腺に多量に存在し、交感神経節細胞や知覚神経節細胞の成長、分化を促進する作用をもったタンパク質であると報告している。Varon^{14) 15)}らがマウス顎下腺から抽出、製精した N.G.F. は分子量 140,000 で、 α 、 β 、 γ の 3 種類の subunit から構成されていると述べている。また Greene¹⁶⁾により N.G.F. 活性は β -subunit のみに存在していることがわかっている。

N.G.F. の活性は、顆粒管部上皮細胞の形態的变化と平行関係にあることから^{17) 18)}今回の実験では N.G.F. (β -subunit) に対する抗血清を投与し、顆粒管部上皮細胞、特に顆粒管部にみられた分泌顆粒について、N.G.F. との関連性を調べた。

N.G.F. 抗血清を 1 ml 投与した 50 日齢のマウス顎下腺では、細胞質の変性が認められ、Caramia¹⁹⁾と同様の結果を与えた。このことは、N.G.F. が顆粒管部の上皮細胞内に存在していることを立証している。^{17) 20)}

また新生マウスに抗血清を投与した場合、顎下腺に組織学的変化が認められなかったことは、生後 25 日ぐらいまで顎下腺には抗体 (N.G.F.) が存在していないという Levi-Montalcini²⁰⁾等の報告からも理解できる。

今回、 β -subunit の抗血清が生体内で正常に働いているかの指標として、上顎交感神経節に対する N.G.F. 抗血清の影響をみると、新生マウスの上顎交感神経節では著しい変化が認められた。しかし、50 日齢のマウス上顎交感神経節ではわずかな変化が観察されたのみであった。

この結果は Levi-Montalcini ら^{21) 22)}が言うように、生後 1 日から 9 日ぐらいまでのマウスでは神経細胞の分化が活発であるので、この時期に

N.G.F. 抗血清を与えると、神経細胞の分化が抑制され、細胞の数と大きさが増加しないと考えられる。また 50 日齢のマウスでは、神経細胞の分化が終っている時期にあたるので、新生マウスにくらべ、N.G.F. 抗血清の影響はごくわずかであると言える。

今回の実験では N.G.F. 抗血清投与後の顎下腺の protease の活性については調べなかったが γ -subunit に protease の活性があることから²²⁾、N.G.F. の活性と protease の活性は直接的な関係をもっていると思われる。

これに対し、分泌顆粒の量は protease のように直接的なものでないが、N.G.F. となんらかの間接的な関連性を持っていると考えられる。

結 論

50 日齢と新生マウスに N.G.F. 抗血清を腹腔内投与し、顎下腺ならびに上顎交感神経節の組織学的変化を観察した。

1. 50 日齢のマウスの顎下腺では顆粒管部上皮細胞のみに変化が認められ、分泌顆粒が減少し、一部の上皮細胞では細胞質が変性しているのを観察した。

2. 新生マウスでは、顎下腺の組織学的変化は認められなかった。

3. 新生マウスの上顎交感神経節は神経節細胞の大きさや数が減少し、細胞の著しい萎縮がみられた。50 日齢のマウスでは影響は少なかった。

文 献

- 1) Lacassagne, A. (1940) Dimorphisme sexuel de la glande sous-maxillaire chez la souris. *Compt. Rend. Soc. Biol.* 133: 180—181
- 2) Lacassagne, A. (1940) Mesure de l' action des hormones sur la glande sous-maxillaire de la souris. *Compt. Rend. Soc. Biol.* 133: 227—228
- 3) Lacassagne, A. (1940) Réactions de la glande sous-maxillaire a l' hormone male, chez la souris et la rat. *Compt. Rend. Soc. Biol.* 133: 539—540
- 4) Bueker, E. D. Weis, P., and Schenkein, I. (1965) Sexual dimorphism of mouse submaxillary glands and its relationship to nerve growth stimulating protein. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 118: 204—207
- 5) Atkinson, W. B., Wilson, F., and Coates, S. (1959) The nature of the dimorphism of the

- submandibular gland of the mouse. *Endocrinology*. 65: 114—117
- 6) Caramia, F. (1966) Ultrastructure of mouse submaxillary gland, I. Sexual differences. *J. Ultrastr. Res.* 16: 505—523
 - 7) Caramia, F. (1966) Ultrastructure of mouse submaxillary gland, II. Effect of castration in the male. *J. Ultrastr. Res.* 16: 524—535
 - 8) Jungueira, L. C., Fajer A., Rabinovitch, M., and Frankenthal, M. (1949) Biochemical and histochemical observations on sexual dimorphism of mice. *J. Cell Comp. Physiol.* 34: 129—158
 - 9) Levi-Montalcini, R. and Angeletti, P. U. (1964) Hormonal control of the NGF content in the submaxillary glands of mice. *International Series of Monographs on Oral Biology*, Vol. 3, Salivary Glands and Their Secretions (edited by Sreebny, L. M. and Meyer, J.), 129—144, Pergamon Press, N. Y.
 - 10) Angeletti, R. A., Angeletti, P. U., and Calisano, P. (1967) Testosterone induction of estero-proteolytic activity in the mouse submaxillary gland. *Biochim. Biophys. Acta.* 31: 372—381
 - 11) Turkington, R. W., Males, J. L., and Cohen, S. (1971) Synthesis and storage of epithelial-epidermal growth factor in submaxillary gland. *Cancer Res.* 31: 252—256
 - 12) Nakamura, T., Fujii, M., Kaiho, M., and Kumegawa, M. (1974) Sex difference in glucose-6-phosphate dehydrogenase activity in the submandibular gland of mouse. *Biochim. Biophys. Acta.* 362: 110—120
 - 13) Cohen, S. (1960) Purification of a nerve growth promoting protein from the mouse salivary gland and its neurocytotoxic antiserum. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 46: 302—311
 - 14) Varon, S., Nomura, J., and Shooter, E. M. (1967) The isolation of the mouse nerve growth factor protein in a high molecular weight form. *Biochemistry.* 6: 2202—2209
 - 15) Varon, S., Nomura, J., and Shooter, E. M. (1967) Subunit structure of a high-molecular weight form of the nerve growth factor from mouse submaxillary gland. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.* 57: 1782—1789
 - 16) Greene, L. A., Shooter, E. M., and Varon, S. (1968) Enzymatic activities of mouse nerve growth factor and its subunit. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.* 60: 1383—1388
 - 17) Goldstein, M. N., and Burdman, J. A. (1965) Studies of the nerve growth factor in submandibular glands of female mice treated with testosterone. *Anat. Rec.* 151: 199—208
 - 18) Burdman, J. A., and Goldstein, M. N. (1965) Synthesis and storage of a nerve growth protein in mouse submandibular glands. *J. Exptl. zool.* 160: 183—188
 - 19) Caramia, F., Angeletti, P. U. and Levi-Montalcini, R. (1961) Experimental analysis of the mouse submaxillary salivary gland in relationship to its nerve-growth factor content. *Endocrinology.* 70: 915—922
 - 20) Levi-Montalcini, R., and Angeletti, P. U. (1961) Growth control of the sympathetic system by a specific protein factor, *The Quarterly Review of Biology.* 36: 99—108
 - 21) Levi-Montalcini, R. (1964) Growth control of nerve cells by a protein and its antiserum. *Quat. Rev. Biol.* 143: 105—110 •
 - 22) Levi-Montalcini, R., and Angeletti, P. U. (1966) Immunosympathectomy. *Pharmacol. Rev.* 18: 619—628
 - 23) Greene, L. A., Tomita, J. T., and Varon, S. (1971) Growth-stimulating activities of mouse submaxillary esterolipidases on chick embryo-fibroblasts in vitro. *Expt. Cell. Res.* 64: 387—395

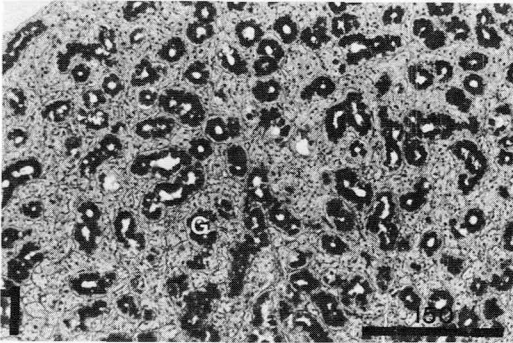


Fig. 1. Submandibular gland of a 50-day-old male mouse. Secretory granules(G) filling in the tubular cells. PTAH method.

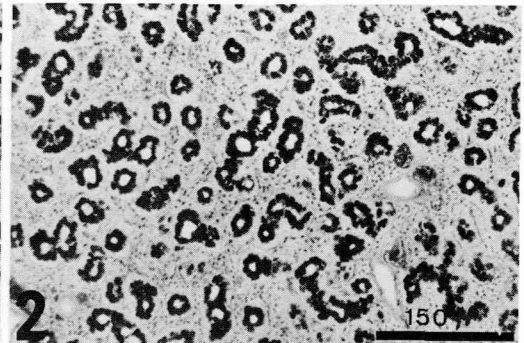


Fig. 2. Submandibular gland of the mouse, 1 day after injection of 1 ml NGF antiserum. PTAH method.

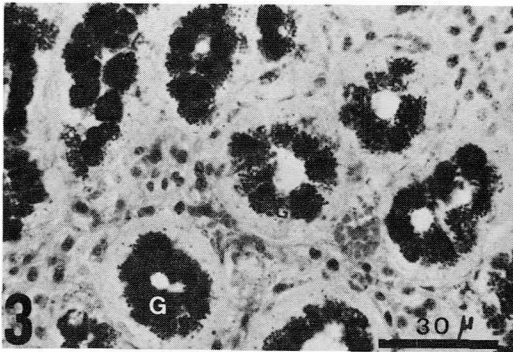


Fig. 3. Submandibular gland of the mouse, 5 days after injection of 1 ml NGF antiserum. Secretory granules gather around the lumen of the tubular portion. No significant modification is observed in the acinar portion. PTAH method.

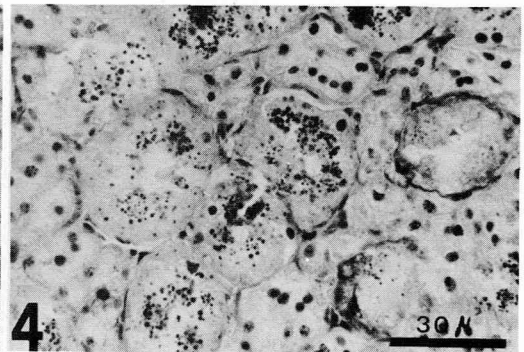


Fig. 4. Submandibular gland of the mouse, 10 days after injection of 1 ml NGF antiserum. The tubular cells appear almost completely depleted of secretory granules and show marked signs of degeneration. But tubular portion reduced in size. PTAH method.

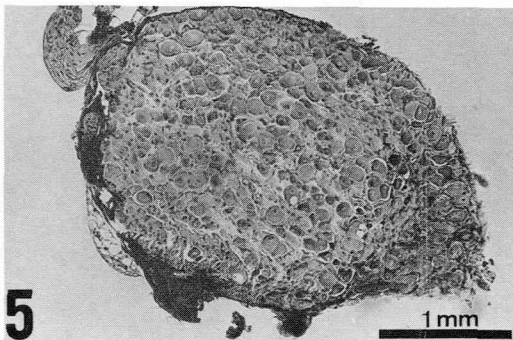


Fig. 5. Surperial servical sympathetic ganglia of a 50-day-old male mouse. Silver impregnation method.

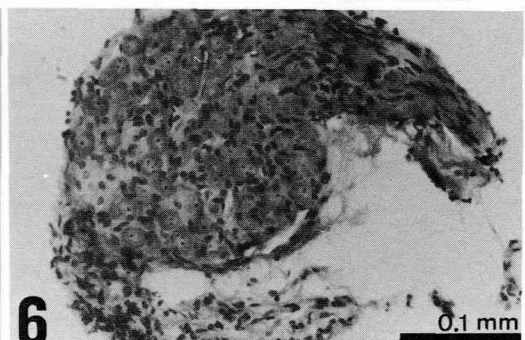


Fig. 6. Surperial servical sympathetic ganglia of experimental 50-day-old male mouse. Experimental mouse injected for five consecutive days after birth with the NGF antiserum total 5 ml. Note that ganglion cells reduced in size and population. Silver impregnation method.