

蛍光抗体法によるマウス顎下腺NGFの研究

佐原紀行

松本歯科大学 口腔解剖学第2教室 (主任 鈴木和夫 教授)

Immunofluorescence Study of NGF in the Mouse Submandibular Gland

NORIYUKI SAHARA

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

Summary

The localization and the time of appearance of NGF in submandibular glands of male and female mice was studied during postnatal development by using immunofluorescence technique. The hormonal effects to the content of NGF in the gland of adult mice were also examined.

Results were as follows;

1) NGF was localized in the cytoplasm of granular tubular (GT) cells in the submandibular gland of adult male and female mice.

2) NGF was firstly detectable in the GT cells in the gland of males at 25 days of age, and of females at 30 days of age. These results indicated that distributions of NGF were represented dimorphically from the first appearance in the submandibular glands of both sexes.

3) Injections of testosterone to female mice resulted in increase in the size of the GT cells and the quantity of secretory granules of their cells and in parallel increment in their NGF contents, whereas castration clearly decreased in size of the GT cells and the quantity of secretory granules and the content of NGF in the submandibular glands.

緒言

神経成長因子 (Nerve Growth Factor: NGF) とは、交感神経節や知覚神経節の神経細胞に特異的に作用し、その分化、成長を促進させる働きをもったポリペプチドである¹⁾。

(1980年4月30日受理)

NGF は脊椎動物のさまざまな組織中に存在していることが知られているが、特にマウス、ラットなどの齧歯類の顎下腺ではその含有量は他の組織に較べ異常なほど高い²⁾。

マウス顎下腺の NGF の活性は新生マウスでは低く、成熟期以後に急激に増大すること、またその活性には著しい性差が認められることから性ホ

ルモンの支配下にあると考えられ、テストステロンを投与した雌マウスの顎下腺では NGF の活性が増大することが知られている^{3) 4)}。

一方、古くから Lacassagne ら^{5) 6)}により、マウス顎下腺には著しい形態学的性差が存在することが報告されているが、これらの形態学的性差と NGF の活性の性差は密接な関連性をもっている。

このような多量の NGF が顎下腺のどの部位に局在しているかについては、Levi-Montalcini ら⁷⁾、Goldstain ら⁸⁾、Kumar ら⁹⁾の蛍光抗体法による研究、Schwab ら¹⁰⁾の酵素抗体法による研究などがあるが、NGF が顎下腺の顆粒管細胞に局在しているということに関しては一致しているが、顆粒管細胞の細胞内の局在については微妙な違いがある。

本実験では NGF (β -subunit) 抗体を用い、蛍光抗体法により下記のことについて観察した。

顎下腺の NGF の局在部位について発育過程において NGF がいつごろ、どこに現われるか、さらにその日齢的变化および性ホルモンの影響による NGF の含有量の変化と形態学的変化との比較を行った。

材料および方法

実験には固型飼料と自由飲水で飼育した雌雄マウス (ddy) を使用した。それぞれの実験群に使用したものは以下のようなものである。

正常マウス

50日齢の雌雄マウス各2匹の顎下腺を用いた。
去勢手術マウス

50日齢の雄マウス5匹をエーテル麻酔下で去勢手術を行い、術後10日おきに1匹ずつから顎下腺を採取した。

テストステロン投与マウス

50日齢の雌マウス5匹に testosterone propionate を olive oil に溶解し、それぞれ 0.5 mg を隔日 10 回皮下注射した。投与後、5 日おきに 1 匹ずつから顎下腺を採取した。なお対照マウス 5 匹には olive oil のみを隔日 10 回皮下注射した。

発育段階のマウス

生後 1 日齢から 45 日齢まで、5 日おきに 10 段階の発育段階に分け、それぞれの日齢の雌雄マウス各 2 匹から顎下腺を採取した。

顎下腺はクロロホルム麻酔下で採取し、10%中性ホルマリンで 12 時間固定し、エタノール系列で脱水した。その後、軟パラフィン (42°C~44°C) で包埋、薄切し、無蛍光スライドガラスに 5 μ の切片の標本を作製した。

標本はリンタングステン酸ヘマトキシリン (PTAH) 染色、または蛍光抗体法で反応させた。

蛍光抗体法

Anti-NGF (β -subunit) 馬血清から、DEAE-cellulose カラムで γ -グロブリンを分離し、これに Nairn¹¹⁾により fluorescein isothiocyanate (FITC) を 50:1 の割合で conjugate した。その後、Sephadex G-25 で遊離色素を除去し、タンパク量を 20 mg/ml に濃縮し反応に用いた。標本は、10 分間キシレンで脱パラフィンし、ドライヤーで乾燥後エタノール系列で脱キシレンを行なった。その後 2-3 回 0.01M pH 7.2 phosphate buffered saline (PBS) に通し、室温で 1 時間抗原抗体反応をさせた。反応終了後、PBS でよく洗い、グリセリン・PBS 混合液で封入、蛍光顕微鏡 (FLM-Tr-1 型オリンパス光学) で UV 励起下で検鏡した。なお対照として、正常馬血清を上記と同条件で FITC と conjugate したものを反応させた。

なお Anti-NGF 馬血清は Wellcome Research 社、testosterone propionate は半井化学、FITC は BBL 社のものを使用した。

結 果

50日齢マウス

雄マウスの顎下腺では終末部の腺房と導管部 (線条部)の間によく発達した直径約 40~50 μ の顆粒管部が存在し、顆粒管部を構成している顆粒管細胞内には、PTAH 染色で濃染される分泌顆粒が多量に認められる。これに比べ、同じ日齢の雌マウスの顎下腺では顆粒管部の発達がわるく、直径 20~30 μ と約 $\frac{1}{2}$ の大きさである。また顆粒管細胞内の分泌顆粒の量もかなり少なく、顆粒管部に著しい形態学的性差が観察できた。しかし、その他の部位、線条部、介在部、終末部の腺房に関してはこのような性差は認められない。

蛍光抗体法による NGF の反応像を観察すると、雌雄とも反応は顆粒管部に局在し、その他の部位には、まったく反応が認められなかった。反

応は顆粒管部の顆粒管細胞の細胞質にあったが、細胞の基底部および核などには蛍光が認められず、反応は細胞の上部に集中していた。また一部では細胞内の分泌顆粒のみに反応がある細胞もあった。雌雄の反応像を比較すると、雌にくらべ雄の顆粒管部が強い反応を示し、NGFの含有量の性差が反応像として観察することができる(図1, 2)。

去勢マウス

去勢したマウスの顎下腺を術後10日おきに観察すると、術後10日の顎下腺においてすでに変化が認められ、顆粒管部の直径、その中に含まれる分泌顆粒の量などが減少していた。この形態学的変化はその後次第に増し、術後40日目の顎下腺では雌の顎下腺で観察できる顆粒管部の形態とほとんど同じ形態が観察された。蛍光抗体法による反応像はこのような形態学的変化と一致し、術後40日の反応像は、正常の雌の反応像とよく似ていた(図3)。

なお終末部の腺房、線条部、介在部などでは、形態的および蛍光抗体法の反応像において、去勢手術による変化はまったく認められなかった。

テストステロン投与マウス

テストステロンを隔日10回投与した雌マウスの顎下腺を、投与後5日おきに観察すると、投与後5日では形態学的変化がなく、投与後10日すぎに急激な形態学的変化が現われ始めた。投与後15日以降の顎下腺では、顆粒管部の直径、それに含まれる分泌顆粒の量が増大し、正常な雄マウス顎下腺に似た組織が観察された。蛍光抗体法による反応像でも、上記の形態学的変化と一致し、テストステロンを投与した雌マウスではNGFの反応が増大することが認められた(図4)。

終末部の腺房、介在部、線条部などでは、形態学的変化および蛍光抗体法の反応像において、テストステロン投与による変化はまったく認められなかった。

発育段階のマウス

生後1日から45日まで5日おきに10段階に分けたマウス顎下腺では、雌雄とも生後1日から20日までに終末部の腺房の量の増大、介在部、線条部などの導管系の細胞の分化の過程が観察された。その中でも最も特徴的だったのは、顆粒管部の分化であった。顆粒管部は生後15日から20日

に出現し、その時には性差が認められ、雌にくらべ雄のほうが遅れていた。また、この時期の顆粒管細胞には、まだPTAH染色で濃染される分泌顆粒は認められなかった。分泌顆粒の出現は顆粒管部の出現より遅れ、雄では生後25日、雌では30日で、分泌顆粒の出現、その時期の分泌顆粒の量についても性差が認められた。顆粒管部は雌雄とも生後30日以降は次第に増大し、顆粒管細胞に含まれる分泌顆粒の量も増え続け、生後45日にはその形態学的変化は最大になった。しかし終末部の腺房、介在部、線条部などでは顆粒管部に見られたこのような急激な変化は認められなかった。

蛍光抗体法による反応像では、生後1日から20日までは全く反応が認められず、雄では生後25日、雌では30日に顆粒管細胞の細胞質に弱いながら反応が出現するのが観察された(図5, 6)。

30日以降は、その反応が次第に強くなり、生後45日にはその反応は最大になった。蛍光抗体法による反応像のこのような変化は、上記の発育過程における形態学的変化と一致し、顆粒管細胞の分泌顆粒の出現の時期にNGFの反応が始まり、それ以降は顆粒管部、分泌顆粒の量が増大すると平行し、顆粒管細胞に局在するNGFの量も増大することが観察された。

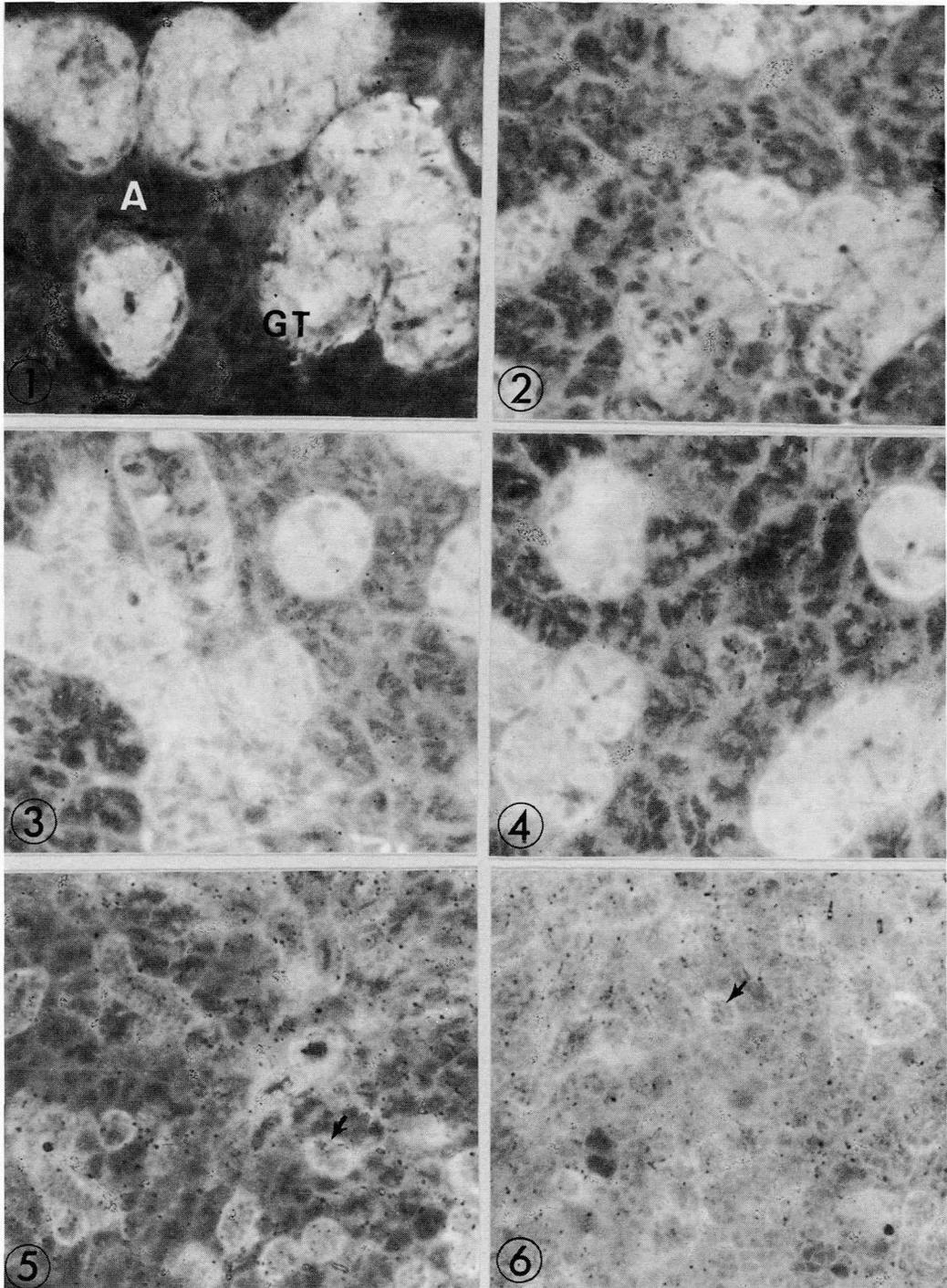
なお対照の抗体を使用した蛍光抗体法ではすべての標本で、パラフィン包埋による自己蛍光のみで、非特異的な蛍光は認められなかった。

考 察

マウス顎下腺には多量のNGFが存在し、その活性には著しい性差がみられ、雄は雌の約10倍の活性をもっている。さらにこれらの活性の性差は顎下腺の形態的性差と密接な関連性をもち、共に性ホルモンの支配下にあることは知られている^{3) 4)}。

本実験の観察では、50日齢の雌雄マウスにおいて、形態学的性差とともに蛍光抗体法による反応に性差が認められたこと、またテストステロンを投与したマウス、去勢手術を行ったマウスの顎下腺の形態学的変化は蛍光抗体法による反応像の変化とはほぼ一致したことから、NGFおよび形態学的性差が性ホルモンにより支配されていることが、組織像の上で直接観察することができた。

発育段階での実験では雌雄とも生後25日すぎ



までは NGF の反応はなく、雄では生後 25 日目、雌では 30 日目に顆粒管細胞に初めて NGF の反応が認められ、それ以後はこの反応は急激に増大し、生後 50 日には NGF の反応は最大に達した。この結果は本実験で用いたと同じ β -subunit 抗体を使った radioimmunoassay 法による NGF の活性の変化と一致していた²⁾。

マウス顎下腺では、顆粒管細胞は生後 2~3 週目に線条部から分化し、初期の顆粒管細胞では電子密度の低い小さな分泌顆粒が存在し、その後しばらくたつと電子密度の高い大きな分泌顆粒が出現すると言われているが¹²⁾¹³⁾¹⁴⁾、本実験では生後 15 日目から顆粒管細胞が出現するのを認めたが、その時期には細胞内に PTAH 染色に濃染される分泌顆粒が観察できなかった。このことは彼らの言う電子密度の高い大きな分泌顆粒と PTAH 染色による分泌顆粒とは同じものと考えられる。この分泌顆粒が顆粒管細胞に初めて出現する時期は、NGF の反応が同じ細胞に認められる時期と雌雄マウスにおいてほぼ一致し、またその分泌顆粒の量にも性差が認められた。

以上のことから、顎下腺の NGF はその出現時からすでに性差をもち、また発生過程においても NGF の反応の性差は形態学的性差とも密接な関連性をもつことがわかった。

顎下腺の NGF の局在部位については Levi-Montalcini ら⁷⁾、Goldstain ら⁸⁾、Kumar ら⁹⁾ の蛍光抗体法による研究、Schwab ら¹⁰⁾ の酵素抗体法による研究などがあり、共に NGF が顆粒管細胞に局在しているという同じ結果を得ているが、顆粒管細胞のどのような部位に NGF が局在しているかについては微妙な違いがある。つまり、Levi-Montalcini ら⁷⁾ は細胞の基底部、Goldstain ら⁸⁾ は分泌顆粒の周囲の細胞質、Kumar ら⁹⁾ は核、Schwab ら¹⁰⁾ は分泌顆粒にそれぞれ局在すると報告している。本実験の結果は、NGF の局在は細胞質中に認められたことから、Goldstain ら⁸⁾ や Schwab ら¹⁰⁾ の結果と似ていたがすべて一致したわけではなかった。

このような局在部位の微妙な違いはどのような原因によるものか考えてみると、Levi-Montalcini ら⁷⁾、Goldstain ら⁸⁾、Kumar ら⁹⁾ は Chone ら¹⁵⁾ による方法で製精した 7S NGF の抗体を用い、Schwab ら¹⁰⁾ や本実験ではこの 7S NGF を構成している 3 つの Subunit の中で唯一の NGF 活性をもつ β -Subunit¹⁶⁾ の抗体を用いたという抗体に関して違いがあるが、Goldstain ら⁸⁾ と本実験の結果とは、ほぼ同様な結果であることから、用いた抗体による違いによるものではないと思われる。それよりむしろ、Levi-Montalcini ら⁷⁾、

図 1 から 6 は、NGF (β -subunit) 抗体に FITC を conjugate した蛍光抗体法による反応像である。蛍光で明るく見える部位が反応部位。細胞膜などには、パラフィン包埋による自己蛍光で明るく見える部位があるが、これは特異的な反応ではない。
標本はすべてパラフィン包埋の 5 μ の切片である。

図 1 : 50 日齢雄マウス。

反応は顆粒管細胞 (GT) の細胞質に局在し、核や細胞の基底には反応は認められない。なお終末部の腺房 (A) には全く反応がない。(×800)

図 2 : 50 日齢雌マウス。

反応は顆粒管細胞に認められるが、雄 (図 1) と比較すると反応が弱く、NGF の含量の性差が反応像でも認められる。(×800)

図 3 : 去勢雄マウス。(去勢後 30 日)

50 日齢の雄 (図 1) に比較すると、去勢により顆粒管細胞の萎縮と反応が弱まっているのが認められる。(×800)

図 4 : テストステロン投与雌マウス。(投与後 20 日)

50 日齢の雌 (図 2) に比較すると顆粒管細胞が増大し反応も強まっているのが認められる。(×800)

図 5 : 生後 25 日雄。

顆粒管部に弱い反応が始めて認められる。(矢印) (×400)

図 6 : 生後 30 日雌。

顆粒管部に弱い反応が始めて認められる。(矢印)しかし雄 (図 5) に較べその反応が弱く、出現の時期、その反応の強さに性差があることがわかる。(×400)

Kumar ら⁹⁾の研究では、NGF の製精そのものに問題点があるのではないかと思われ、特に Kumar ら⁹⁾の研究では immunodiffusion の像に明らかに2本の沈降バンドが認められる。彼らはこのバンドについては NGF の subunit によるものと考えているが、精製した NGF 中に核タンパク様の物質が含まれていて、それが核での反応を引き起こしている可能性も考えられる。またこれとは別に、NGF の含量の性差と形態学的性差が密接な関係をもっているということから、細胞の基底部、核などに NGF が局在しているという Levi-Montalcini ら⁷⁾や Kumar ら⁹⁾の結果は説得力に欠ける。

本実験では NGF の局在は細胞質中に認められ、分泌顆粒の周囲の細胞質に局在を認めた Goldstain ら⁸⁾の結果と似ていたが、分泌顆粒にはまったく反応を認められなかった彼らの結果より、分泌顆粒に局在しているという Schwab ら¹⁰⁾の結果により似ていた。事実、本実験でも一部の顆粒管細胞では分泌顆粒にのみ反応が認められたこと、発育過程で分泌顆粒の出現と蛍光抗体法の反応の出現が同時期であったという結果からも、NGF が分泌顆粒に局在しているという Schwab ら¹⁰⁾の結果を間接的であるが示唆している。また Pasquini ら¹⁷⁾はまったく別の方法で、顎下腺から大小2種類の分泌顆粒をそのままの形で取り出し、この小さな分泌顆粒に NGF の活性があることを報告している。この結果は Schwab ら¹⁰⁾の結果を直接的に示唆するものであると思われる。

いままで述べてきたように、NGF が顆粒管細胞に局在していることは確実なことであるが、NGF がはたしてこの顆粒管細胞で合成されているかどうかについては現在でも議論されている¹⁸⁾。顆粒管細胞の分泌顆粒が他の外分泌細胞の分泌顆粒と同じ様式で作られることが明らかになり¹⁴⁾、もし Schwab ら¹⁰⁾の結果のように NGF が分泌顆粒に局在しているとすれば、NGF がこの顆粒管細胞で合成、貯蔵されている可能性が高いと思われる。初期の NGF の研究では、NGF は内分泌様の働きを持つものと考えられていたが⁴⁾、最近では外分泌としての働きについて注目されてきたのは、このためだと思われる^{20) 21)}。

マウス顎下腺の顆粒管細胞の分泌顆粒には NGF の他にも、EGF^{22) 23)}、renin^{24) 25)}、kallikre-

in²⁶⁾などが局在しているという報告があるが、この分泌顆粒の生理学的意義については不明な点が多い。

結 論

NGF (β -subunit) 抗体を用い、蛍光抗体法により、マウス顎下腺の NGF の局在部位、NGF が発育過程でいつ、どこに現われるか、また性ホルモンによる NGF 含量の変化と形態学的変化の比較考察を行った。

1) NGF は雌雄とも顆粒管細胞の細胞質に局在し、蛍光抗体法の反応像にも性差が認められた。

2) 発育過程では、雄は生後25日目、雌は30日目に、顆粒管細胞に初めて反応が現われ、NGF は発育過程でもすでに性差があることがわかった。

3) 性ホルモンによる形態学的変化と蛍光抗体法の反応像の変化は一致し、NGF の含量と形態学的構造は密接な関連性を持ち、共に性ホルモンの支配下にあることが、組織の上で直接観察することができた。

文 献

- 1) Levi-montalcini, R. and Angeletti, P. U. (1968) Nerve growth factor. *Physiol. Rev.* 48: 534-569.
- 2) Hendry, I. A. (1972) Developmental changes in tissue and plasma concentrations of the biologically active species of nerve growth factor in the mouse, by using a two-site radioimmunoassay. *Biochem. J.* 128: 1265-1272.
- 3) Caramia, F., Angeletti, P. U. and Levi-Montalcini, R. (1962) Experimental analysis of the mouse submaxillary salivary gland in relationship to its nerve-growth factor content. *Endocrinology.* 70: 915-922.
- 4) Levi-Montalcini, R. and Angeletti, P. U. (1964) Hormonal control of the NGF content in the submaxillary glands of mice. Salivary gland and their secretion. (ed. by Sreebny, L. M. and Meyer, J.) p 129-141. Pergamon Press. New York.
- 5) Lacassagne, A. (1940) Dimorphism sexuel de la glande sousmaxillaire chez la soris. *C. R. Soc. Biol.* 133: 180-181.
- 6) Caramia, F. (1966) Ultrastructure of mouse submaxillary gland. I Sexual differences. *J. Ultrastruct. Res.* 16: 505-523.
- 7) Levi-Montalcini, R. and Angeletti, P. U. (1961)

- Growth control of the sympathetic system by a specific protein factor. *Quart. Rev. Biol.* **36**: 99—109.
- 8) Goldstain, M. and Burdman, J. (1965) Studies of the nerve growth factor in submandibular glands of female mice treated with testosterone. *Anat. Rec.* **151**: 199—209.
 - 9) Kumar, S., Steward, J., Taylor, G. and Waghe, M. (1972) Fluorescence studies using anti-nerve growth factor. *Exp. Cell Res.* **74**: 170—174.
 - 10) Schwab, M., Stökel, K. and Thoenen, H. (1976) Immunocytochemical localization of nerve growth factor (NGF) in the submandibular gland of adult mice by light and electron microscopy. *Cell Tiss. Res.* **163**: 289—299.
 - 11) Nairn, R. C. (1964) *General uses of fluorescent antibody*. Recent advance in Clinical Pathology. Series IV (ed. by Dyke, S. L.) London: Churchill.
 - 12) Srinivasan, R. and Chang, W. W. L. (1975) The development of the granular convoluted duct in the rat submandibular gland. *Anat. Rec.* **182**: 29—40.
 - 13) Gresik, E. and MacRae, E. (1975) The postnatal development of the sexually dimorphic duct system and of amylase activity in the submandibular glands of mice. *Cell. Tiss. Res.* **157**: 411—422.
 - 14) Kaiho, M., Nakamura, T. and Kumegawa, M. (1975) Morphological studies on the synthesis of secretory granules in convoluted tubules of mouse submandibular gland. *Anat. Rec.* **183**: 405—420.
 - 15) Cohen, S. (1960) Purification of a nerve growth promoting protein from the mouse salivary gland and its neuro-cytotoxic antiserum. *Proc. Nat. Acad. Sci.* **46**: 302—311.
 - 16) Greene, L. A., Shooter, E. M. and Varon, S. (1969) Subunit interaction and enzymatic activity of mouse 7S nerve growth factor. *Biochem.* **8**: 3735—3741.
 - 17) Pasquini, F., Anna, P., Sbaraglia, G., Scopelliti, R., Cenci, G. and Frati, L. (1974) Biological activities in the granules isolated from the mouse submaxillary gland. *Exp. Cell Res.* **86**: 233—236.
 - 18) Hendry, I. A. and Iversen, L. L. (1973) Reduction in the concentration of nerve growth factor in mice after sialectomy and castration. *Nature.* **243**: 500—504.
 - 19) Ishii, D. N. and Shooter, E. M. (1975) Regulation of nerve growth factor synthesis in mouse submaxillary glands by testosterone. *J. Neurochem.* **26**: 843—851.
 - 20) Murphy, R. A., Saide, J. D., Blanchard, M. H. and Young, M. (1977) Molecular properties of the nerve growth factor secreted in mouse saliva. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **74**: 2672—2676.
 - 21) Murphy, R. A., Saide, J. D., Blanchard, M. H. and Young, M. (1977) Nerve growth factor in mouse serum and saliva: Role of the submandibular gland. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **74**: 2330—2333.
 - 22) Gresik, E. and Barka (1977) Immunocytochemical localization of epidermal growth factor in mouse submandibular gland. *J. Histochem. Cytochem.* **25**: 1027—1035.
 - 23) Noorden, S.V., Heitz, P., Kasper, M. and Pearse, A. G. E. (1977) Mouse epidermal growth factor: light and electron microscopical localization by immunocytochemical staining. *Histoche.* **52**: 329—340.
 - 24) Gresik, E., Michelakis A., Barka, T. and Ross, T. (1978) Immunocytochemical localization of renin in the submandibular gland of the mouse. *J. Histochem. Cytochem.* **26**: 855—861.
 - 25) Menzie, J., Hoffman, L. and Michelakes, A. (1978) Immunofluorescent localization of renin in mouse submaxillary gland and kidney. *Am. J. Physiol.* **234**: E 480—483.
 - 26) Simson, J. A. V., Chas, J. and Margolius, H. S. (1978) Cytochemical localization and secretagogue-induced release of kallikrein and nerve growth factor from rodent salivary gland. *Anat. Rec.* **190**: 542.