

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

加藤 智 弘 河田 亮 東 一 善 高橋 理

神奈川歯科大学大学院神経発生組織学講座
(受付：2014年7月30日)Immunohistochemical study of the brush cells in main excretory duct of
the rat submandibular gland

Tomohiro KATO, Akira KAWATA, Kazuyoshi HIGASHI and Osamu TAKAHASHI

Division of Histology, Embryology and Neuroanatomy, Kanagawa Dental University, School of Dentistry
82 Inaoka-cho, Yokosuka, Kanagawa, 238-8580, Japan

Abstract

Recent histochemical and ultrastructural studies have indicated that primary saliva is modified in the main excretory duct (MED) of the salivary glands by secretion of K^+ and HCO_3^- and by absorption of Na^+ and Cl^- . The epithelium-lined MED of the rat submandibular gland is pseudostratified, consisting of many columnar and cuboidal cells, brush cells (BCs) and a few granulated cells. BCs have been identified in various organs, such as the stomach, colon and gallbladder in the digestive system, and the lungs in the respiratory system. Compared to other epithelial cells, BCs are considered to possess longer and thicker microvilli. These bundles of filaments have been observed to extend from the supranuclear region of the BC to the top of each microvillus.

Although many morphological features of BCs have been reported, the function of BCs has not yet been clarified. In addition, experimental evidence on the functions of BCs is also lacking due to the difficulty in detecting BCs, which represent a minor component of epithelial cells of the MED. Distinguishing BCs from other epithelial cells in the MED under light microscopy is difficult. Therefore, this study investigated epithelial cells of the MED using immunohistochemical and immunoelectron microscopic techniques that employed primary antibodies against protein gene product 9.5 (PGP 9.5), cytokeratin 18 (CK18), vasoactive intestinal peptide (VIP), and neurofilament (NF). CK18 immunoreactivity was shown to exist in all epithelial cells of the MED, so antibody against CK18 was not suitable as a specific marker for BCs in the MED under light microscopy. On the other hand, PGP 9.5 immunoreactivity was observed in epithelial cells in the MED. Moreover, VIP immunoreactivity was shown to exist in PGP 9.5 immunoreactive epithelial cells, and NF immunoreactivity was observed in PGP immunoreactive cells. By employing immunoelectron microscopic techniques, both PGP 9.5 and VIP immunoreactivity were observed on the bundles of filaments and cytoplasm of BCs.

From these results, it appeared that PGP 9.5, VIP and NF immunoreactivity could be used as specific markers of BCs under light microscopy. PGP 9.5 and VIP immunoreactivity were observed in the taste buds of rats which resembled BCs in overall shape. Since BCs showed similar ultrastructural and immunohistochemical characteristics to taste bud cells, it is possible that BCs have a chemosensory or somatosensory function.

緒 言

顎下腺主導管の上皮細胞はラットにおいて円柱型および立方型の基底細胞より構成される多列上皮である¹⁻³⁾。電子顕微鏡を用いた超微構造学的な研究によると、多列上皮を構成する多数が上皮細胞に加えて、少数の刷子細胞と呼ばれる多数のフィラメントを含む大型の微絨毛を有する細胞^{4,5)}が報告され、さらにごく少数の基底顆粒細胞の存在も報告される⁶⁾。この刷子細胞は別名、毛束細胞¹⁾や小胞細胞とも呼ばれ、ラットの気管上皮⁷⁾にて電子顕微鏡下に最初に観察されて以来、呼吸器系、消化器系(胆嚢、胆管、膵管)など様々な上皮組織でその存在が報告されてきた⁸⁻¹¹⁾。この中で特に消化器系にみられる刷子細胞はパラクリン(傍分泌)作用を有する可能性が指摘され、伝達物質として一酸化窒素が候補に挙げられるが¹²⁾、その実験的な裏付けは報告されていない。

口腔の唾液腺主導管においては刷子細胞の存在が電子顕微鏡下に報告され、円柱型もしくは樽型の形態とともに顎下腺主導管の上皮中に散在するといわれる⁴⁻⁶⁾。この刷子細胞は非常に大型の微絨毛と細胞質中の小胞およびフィラメントを特徴とし、舌の味蕾を構成する上皮細胞にみられる化学受容を有する細胞に類似した形態も認められる^{13,14)}。さらに顎下腺主導管における結紮実験、およびイソプロテレノールを投与した実験において刷子細胞に形態学的な変化が生じる事実が報告され^{15,16)}、少なくとも唾液腺の刷子細胞は何らかの感覚受容器の機能を有すると考えられる。

一方で光学顕微鏡を用いた観察の場合、顎下腺主導管の刷子細胞を多列上皮細胞より区別することは形態学的に極めて困難である。サイトケラチン 18 (CK18) は腺組織において扁平上皮細胞には観察されないものの導管上皮に発現し、また尿中 L 型脂肪酸結合蛋白 (L-FABP) はヒト腎臓の近位尿細管に発現するタンパク質であり、これらは胃の粘膜上皮における刷子細胞において特異的な標識物質として報告された^{11,17)}。しかしラット顎下腺の主導管についてこれらマーカーとなり得る標識物質を検索した研究は見当たらない。

ニューロフィラメント (NF) は神経細胞マーカーの一つで、神経細胞の細胞体および突起に広く存在することが知られているが、刷子細胞の細胞質にみられる中間径フィラメント束について Luciano らが消化器系の胆嚢上皮と胃の粘膜上皮における刷子細胞において NF に対して陽性反応を示すと報告した¹⁸⁾。

血管運動腸管ペプチド (Vasoactive Intestinal Peptide, VIP) は消化器系の胃、腸の粘膜上皮細胞、そして膵臓の膵管上皮に分布し、腸管の運動に関与する

ことが知られている^{12,19)}。また顎下腺の近傍に存在する顎下神経節ニューロンおよび翼口蓋神経節ニューロンにも存在することが報告されている¹⁹⁾。

Protein Gene Product 9.5 (PGP 9.5) は神経細胞に特異的に見いだされるタンパク質であることが報告されている^{20,21)}。我々は顎下腺主導管の細胞について免疫組織化学的な検索を行い、上皮細胞の中に PGP 9.5 にのみ標識される細胞、および PGP 9.5 とセロトニンの両方に二重標識される細胞の存在を報告した⁶⁾。また、二重標識を示す細胞はセロトニンに免疫活性を示す基底顆粒細胞であることも合わせ確認した⁶⁾。このセロトニン免疫陽性である基底顆粒細胞は主導管において唾液の性質を変化させ、さらに血管運動をも制御することが知られているが⁶⁾、PGP 9.5 のみに免疫陽性を示す細胞については検索がなされていない。さらに、化学受容を行う III 型の味蕾細胞はラットにおいて PGP 9.5 に対して免疫陽性を示すと報告される¹⁴⁾。この III 型味蕾細胞は形態学的に顎下腺の刷子細胞に類似するといわれ¹³⁾、顎下腺における刷子細胞は化学受容を行うものと推測されるものの、詳細は不明である。

本研究は光学顕微鏡レベルにおいて顎下腺主導管にみられる刷子細胞を多列上皮細胞より区別して標識可能とするため、細胞マーカーの候補物質とされる PGP 9.5, VIP, CK18, および NF に対する抗体を用いて免疫組織化学的に二重標識法を施し、合わせて同時に PGP 9.5 および VIP に対する電子顕微鏡レベルの免疫組織化学法も合わせて行い、形態学的な検討を行った。

材料および方法

1. 免疫組織化学

(1) 実験動物

実験には Wistar 系ラット生後 10 週～15 週の雄 15 匹(体重 260～350 g)を用いた。明暗周期 12 時間、室温 20℃で、飲水、摂食は自由に与えて飼育した。本実験は、神奈川歯科大学動物倫理委員会の承認を受け、定める動物実験指針を遵守して行われた。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。実験動物はバルビタール酸ナトリウム (50 mg/kg) を腹腔内注射することにより深麻酔し開胸、左心室より 4%パラフォルムアルデヒドを含む 0.1 M リン酸緩衝液 (PBS) (pH 7.4) にて灌流固定を行った。

(2) 試料の作成

灌流固定の後に顎下腺主導管と顎下腺組織を一塊として摘出し、直ちに 0.1 M PBS (pH 7.4) にて希釈した 4%パラフォルムアルデヒド溶液を用いて 12 時間、

4℃にて後固定を施した。その後、液体窒素により凍結、O.C.T. compound (Tisse-Tek, SAKURA, 大阪, 日本) 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た。なお摘出した試料のうち2例については顎下腺主導管の長軸に垂直に横断し144枚、および137枚の凍結連続切片を作製した。この切片をスライドガラス上に載せ風乾、切片の乾燥後に免疫組織化学的な実験を施した。

(3) 免疫組織化学法

それぞれの凍結切片に対して、以下の手法により免疫組織化学的な措置を行った。すなわち、切片を10% normal goat serum (NGS)/0.75% Triton X-100/0.05% NaN₃を含有した0.1 M PBS中にて30分間浸し洗浄した後に、mouse anti-PGP9.5 monoclonal antibody (UCL, Wright, England, 1/200 in 0.1M PBS, 10% NGS/0.75% Triton X-100/0.05% NaN₃)とrabbit anti-VIP polyclonal antibody (PLI, San Carlos, CA, USA, 1/500 in 0.1M PBS containing 10% NGS/0.75% Triton X-100/0.05% NaN₃)を用いて一晩(4℃)浸漬した。その後30分間上記の10% NGSを含むPBSにて洗浄し、biotin-conjugated anti-mouse IgG antiserum (DAKO, Glostrup, Denmark, 1/400 in 0.1M PBS containing 10% NGS/0.05% NaN₃)とFITC-conjugated anti-rabbit IgG antiserum (Wako, Oosaka, Japan, 1/50 in 0.1M PBS containing 10% NGS/0.05% NaN₃)との混液中に60分(室温)浸漬した。その後10% NGSを含むPBSにて30分間洗浄、さらに暗室中でCy3-streptavidin (KPL, Guildford, UK, 1/1000 in 0.1M PBS containing 10% NGS/0.05% NaN₃)に60分間浸漬した。各実験例において、切片群より任意の1枚を取り出し、一次抗体の代わりにPBSを用いて対照実験に用いた。免疫組織化学法を施した切片はPBS中に溶かした75% glycerinを用いて封入し、共焦点レーザー顕微鏡(Nikon, ECLIPSE, E800, 東京, 日本)を用いて蛍光観察した。

PGP 9.5とCK18の免疫組織化学法については固定、試料作製ともにPGP 9.5とVIPの免疫染色と同様に行い、一次抗体にmouse anti-PGP 9.5 polyclonal antibody (UCL, Wright, England, 1/200 in 0.1M PBS containing 10% NGS/0.75% Triton X-100/0.05% NaN₃)とmouse anti-cytokeratin 18 monoclonal antibody (PROGENS Bio, GmbH, Heidelberg, 1/20)を用いた。またPGP 9.5とNFの免疫組織化学法については固定、試料作製ともにPGP 9.5とVIPの免疫組織化学法と同様に行い、一次抗体にmouse anti-PGP 9.5 polyclonal antibody (UCL, Wright, England, 1/200 in 0.1M PBS containing 10% NGS/0.75% Triton X-100/

0.05% NaN₃)およびmouse anti-NF (CHEMICON, Temecula, USA, 1/200 in 0.1M PBS containing 10% NGS/0.75% Triton X-100/0.05% NaN₃)を用いた。

2. 電子顕微鏡観察

1) 電子顕微鏡的観察

(1) 実験動物

この実験にはWistar系ラット生後10週～15週の雄6匹(体重260～350 g)を用いた。

(2) 試料作製

実験群の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、左心室より生理食塩水を灌流し、続いて0.1 M PBS(pH 7.4)にて希釈した2.5%グルタルアルデヒド液にて20分間灌流固定を施した。固定後に顎下腺主導管を咬筋付近から顎下腺の門付近にまで一塊として摘出した。摘出した試料はさらに同固定液中にて1時間の後固定を施した。その後0.1 M PBS (pH7.4)で1晩洗浄した後に、試料を同緩衝液で1%に希釈したオスミウム酸溶液中に浸漬し、1時間の後固定を行った。その後アルコール水溶液の濃度系列を用いて脱水し、酸化プロピレンを用いた後にスパー樹脂に包埋した。なお、スパー樹脂に包埋した試料のうち1例は275枚の連続切片を作製し、1%トルイジンブルーで対比染色後、光学顕微鏡下に刷子細胞の同定を試みた。

包埋した試料はMT-1型ミクロトームを用いてガラスナイフにて約1 μ mの厚さに薄切し、1%トルイジンブルーで対比染色、光学顕微鏡にて顎下腺主導管を確認した。その後、同型のミクロトームを用いてダイヤモンドナイフにて超薄切片を作製した。銅グリッド上の超薄切片は酢酸ウラニルとクエン酸鉛で電子染色を施し、JEOL-1220型電子顕微鏡(日本電子, 東京, 日本)を用いて超微構造学的に観察した。

2) 免疫電子顕微鏡的観察

(1) 実験動物

本実験にはWistar系ラット生後10週～15週の雄10匹(体重260～350 g)を用いた。

(2) 試料作製

実験群の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、左心室より生理食塩水を灌流し、続いて0.1 M PBS (pH 7.4)にて希釈した4%パラフォルムアルデヒド液を20分間灌流し固定した。固定後顎下腺主導管を咬筋付近から顎下腺門付近まで一塊として摘出した。摘出した試料はさらに同液中で1時間固定した。その後0.1 M PBS (pH 7.4)で1晩洗浄した。洗浄後、-35℃の脱水アルコール系列を用い、Lowicryl K4M樹脂(EMS, PA, USA)に包埋した。包埋した試料は

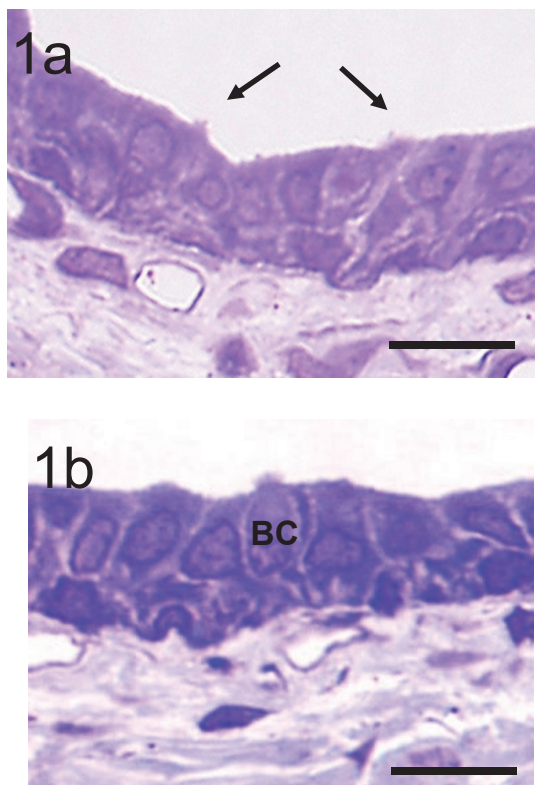


図1 光学顕微鏡における顎下腺主導管上皮を示す。
Bar: 20 μ m BC: 刷子細胞

a: 顎下腺主導管の上皮は円柱形の細胞と基底細胞よりなり、多列上皮として認められている。上皮中に他の主導管上皮とは異なる形状を示す細胞 (\leftarrow) が存在している。

b: 円柱形を示す上皮細胞の中に先端部が突出している細胞が認められる。

MT-1型マイクロトームを用いてガラスナイフにて約1 μ mの厚さに薄切りし、1%トルイジンブルーにより対比染色、光学顕微鏡を用いて顎下腺主導管を確認した。確認後、試料より超薄切片を作製した。この超薄切片は室温中で0.1 M PBS (pH 7.4) で5%に希釈した normal goat serum に30分間浸した。その後 rabbit anti- PGP 9.5 polyclonal antibody (Incstar, Minn, USA, 1/2000 in 0.1M PBS containing 10% NGS/0.75% Triton X-100/ 0.05% NaN_3) 中に一晩 (4 $^{\circ}$ C) 浸した。続いて同PBSで希釈した2% 15nm gold particle-conjugated goat anti- rabbit antibody (Amersham, Buckinghamshire, UK) に2時間浸した。その後2% 酢酸ウラニル液を用いて電子染色、JEOL-1220型電子顕微鏡により超微構造学的に観察した。

なおVIPに対する免疫電子顕微鏡の試料作製についてもPGP 9.5と同様な方法を用いた。すなわち、一次抗体として rabbit anti-VIP polyclonal antibody (abcam,

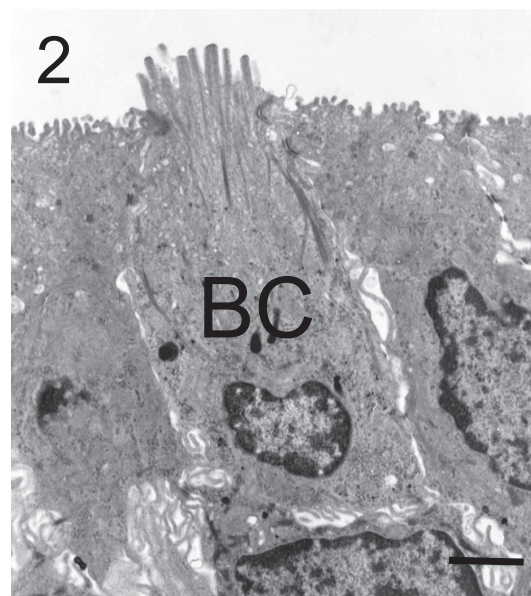


図2 顎下腺主導管の電子顕微鏡像を示す。Bar: 0.5 μ m BC: 刷子細胞

刷子細胞は円柱形の形状を示し、太くて長い微絨毛が認められる。

刷子細胞には細胞質より微絨毛先端へ伸びるフィラメントが認められる。細胞辺縁部にも同様にフィラメントを認められる。

Cambridge, USA, 1/2000 in 0.1M PBS containing 10% NGS/0.75% Triton X-100/0.05% NaN_3) を用いて免疫組織化学的な検索に供した。

結 果

1. 光学顕微鏡および電子顕微鏡観察

1) 光学顕微鏡による観察

顎下腺主導管の上皮細胞切片にトルイジンブルー染色を施して光学顕微鏡下に観察すると、上皮細胞は多くの円柱形細胞と少数の基底細胞より構成される多列上皮として観察された。また上皮直下の固有層中には多くの血管が認められた。この上皮細胞の管腔側にむかって細胞の一部が突出する像が観察された (図1a)。連続切片を用いてこの細胞を観察すると、主導管の管腔に向かって細胞の自由面側より多数の微絨毛が突出し、明らかに他の多列上皮細胞とは異なる形態を示した (図1b)。しかし、図1bで示した様な特異的な形態を示す細胞は小数であり、多くは図1aで観察される様な細胞で、この様な細胞を他の多列上皮細胞と形態的観察だけで鑑別することは少なくとも光学顕微鏡下では困難であった。

2) 電子顕微鏡による観察

透過型電子顕微鏡を用いて顎下腺主導管の上皮細胞

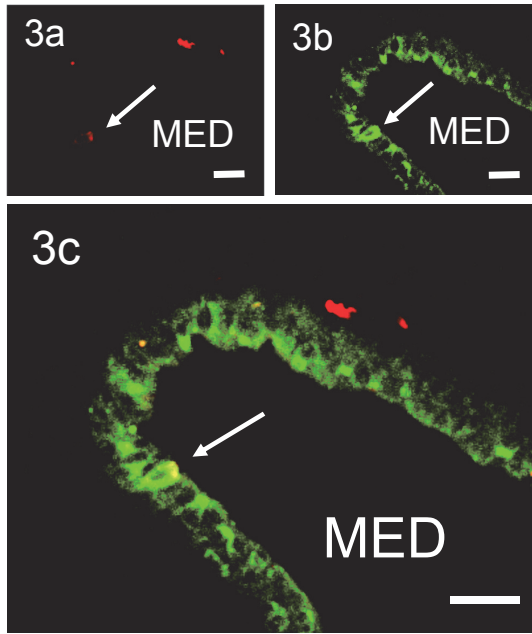


図3 顎下腺主導管におけるPGP 9.5とCK18の免疫染色像を示す。Bar：20 μ m MED：顎下腺主導管

- a：PGP 9.5免疫染色像を示す。
顎下腺主導管の上皮中にPGP 9.5陽性細胞(←)が認められる。
- b：CK 18免疫染色像を示す。
顎下腺主導管の上皮中にCK18陽性細胞(←)が認められるが、顎下腺主導管の全ての上皮にも陽性反応が認められる。
- c：PGP 9.5とCK18二重免疫染色像を示す。
両者の陽性細胞(←)がわずかに認められる。

を観察すると、光学顕微鏡を用いた場合と同様に多くの細胞は円柱形を示し、その上皮細胞の間に存在する基底細胞も観察された。これら多くの多列上皮細胞はその自由面側に少数の短い微絨毛が観察された。このような多列上皮細胞の中に、少数の大型の微絨毛をもつ上皮細胞が観察された(図2)。この上皮細胞の細胞質には微絨毛の先端にまで伸びるフィラメント束が多数認められ、その間にはミトコンドリア、粗面小胞体などの細胞小器官が存在した。この形態を示す上皮細胞は過去に報告された刷子細胞の超微構造学的な特徴と一致し^{5,9)}、刷子細胞であると同定された。刷子細胞が有する微絨毛へ伸びる細胞質中のフィラメント束には、多くの小胞が観察された。そしてフィラメント束は上皮細胞の長軸方向に走行した(図2)。

2. 免疫組織化学法

1) 対照例

PGP 9.5, CK18, VIP, NFに対する免疫組織化学法により、それぞれの一次抗体を用いなかった場合にお

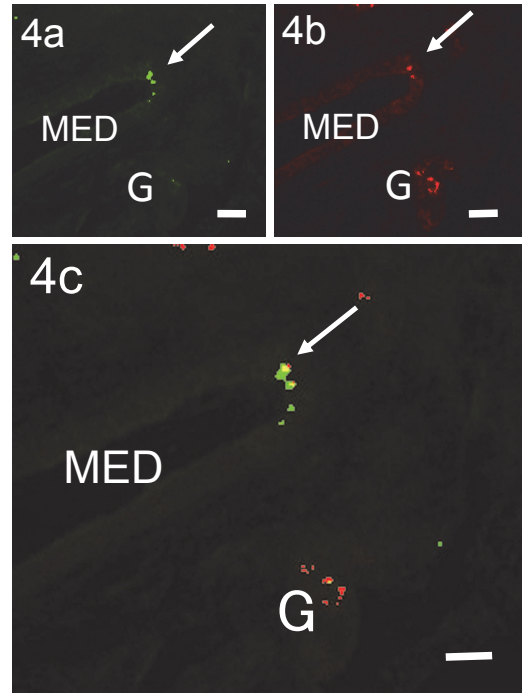


図4 顎下腺主導管におけるPGP 9.5とVIPの免疫染色像を示す。Bar：50 μ m MED：顎下腺主導管 G：顎下神経節

- a：VIP免疫染色像を示す。
顎下腺主導管の上皮中にVIP陽性細胞(←)が認められる。
- b：PGP 9.5免疫染色像を示す。
顎下腺主導管の上皮中にPGP 9.5陽性細胞(←)が認められ同様に顎下腺主導管近傍の顎下神経節にもPGP 9.5陽性反応が認められる。
- c：PGP 9.5とVIPの二重免疫染色像を示す。
顎下腺主導管の上皮中に両者の陽性細胞(←)が認められる。

いて、いずれの実験例に於いても共焦点レーザー顕微鏡下に免疫陽性を示す反応産物は観察されなかった。

2) PGP 9.5とCK18に対する二重免疫組織化学

顎下腺主導管の上皮細胞にPGP 9.5に対する免疫組織化学法を施して共焦点レーザー顕微鏡にて観察した場合、少数の上皮細胞に免疫陽性反応が認められた(図3a 矢印)。さらに、この切片にCK18に対する免疫組織化学法を施した場合、全ての上皮細胞の自由面側の細胞質にCK18陽性部位を示す免疫陽性構造が認められた(図3b)。また一部の細胞では核周囲の細胞質にも免疫陽性を示す反応産物が観察された(図3b, 矢印)。PGP 9.5とCK18の両方に対する二重免疫組織化学法を施した場合、二重標識を示す細胞が上皮中に認められた(図3c, 矢印)。

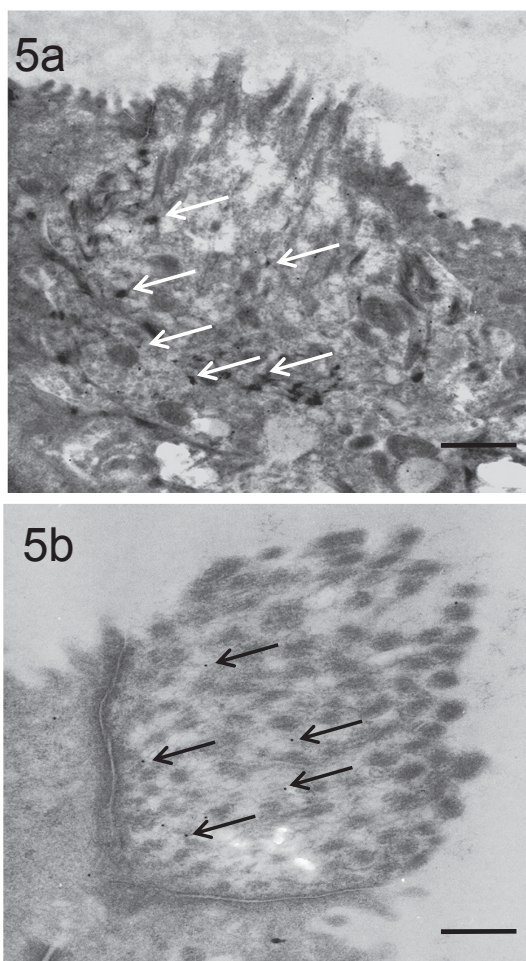


図5 PGP 9.5 と VIP の免疫電子顕微鏡像を示す。

Bar : 0.5 μ m

a : PGP 9.5 免疫電子顕微鏡像を示す。

刷子細胞のフィラメント束上にPGP 9.5に陽性反応を示す金粒子 (←) が認められる。この金粒子陽性細胞には太くて長い微絨毛が認められる。

b : VIP 免疫電子顕微鏡像を示す。

刷子細胞の一部を示しているが、刷子細胞のフィラメント束の間にVIPに陽性反応を示す金粒子 (←) が認められる。

3) PGP 9.5 と VIP に対する二重免疫組織化学

(1) 共焦点レーザー顕微鏡を用いた観察

顎下腺主導管の上皮細胞に対してVIPに対する免疫組織化学法を施した場合、少数の円柱上皮細胞に免疫陽性を示す反応産物が散在して観察された (図4a, 矢印)。

同一の切片に対してPGP 9.5に対する免疫組織化学法を施した場合、一部の上皮細胞に免疫陽性反応が認められた (図4b, 矢印)。さらにPGP 9.5, VIPに対する二重免疫組織化学法を施した場合、両者に対する免疫陽性反応は上皮細胞の細胞質中の同じ部位に観察さ

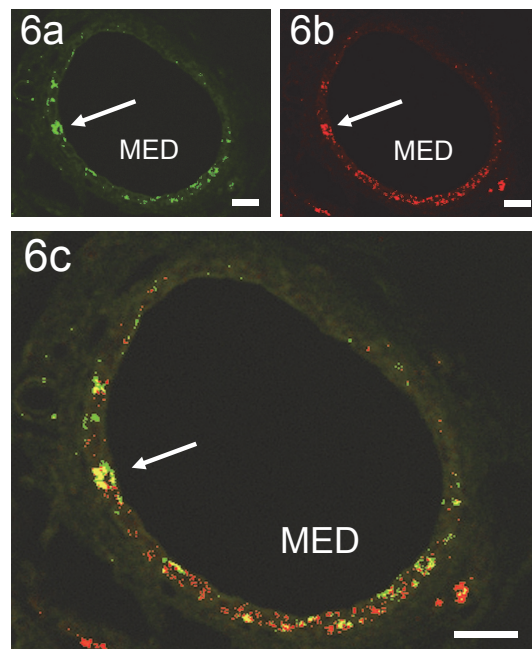


図6 顎下腺主導管におけるPGP 9.5とNFの免疫染色像を示す。Bar : 50 μ m MED : 顎下腺主導管

a : PGP 9.5免疫染色像を示す。

顎下腺主導管の上皮中にPGP 9.5陽性細胞 (←) が認められる。

b : NF免疫染色像を示す。

顎下腺主導管上皮中にNF陽性細胞 (←) が認められる。

c : PGP 9.5とNFの二重免疫染色像を示す。

顎下腺主導管の上皮中に両者の陽性細胞 (←) が認められる。

れた (図4c, 矢印)。二重標識示す構造は、粘膜固有層中に存在する顎下神経節中の一部にも認められた。

(2) 免疫電子顕微鏡による観察

PGP 9.5に対する免疫電顕法を用いて顎下腺主導管の上皮細胞を観察すると、発達した大型の微絨毛を有する刷子細胞の細胞質にPGP 9.5免疫陽性を示す金粒子が散在して観察された (図5a, 矢印)。そして、細胞質のフィラメント束に金粒子は比較的集合して塊状として観察された。またフィラメント束とフィラメント束の間にも金粒子が散在して観察された。なお刷子細胞の周囲に存在する多数の上皮細胞の細胞質には、免疫陽性を示す金粒子は観察されなかった。

さらにPGP 9.5に対する免疫電顕法の供した切片に隣接する切片に対して、VIPに対する免疫電顕法を施した場合、VIPに対する免疫陽性反応を示す金粒子は刷子細胞の大型の微絨毛の間の細胞質および細胞質中の小胞に観察された (図5b, 矢印)。

4) PGP 9.5とNFに対する二重免疫組織化学法

PGP 9.5に対する免疫組織化学法を施した場合、少数の上皮細胞(図6a, 矢印)に免疫陽性を示す反応産物が観察された。

さらにNFに対する免疫組織化学法を施した場合、顎下腺の主導管における上皮細胞の一部(図6b, 矢印)と粘膜固有層中にも免疫陽性反応が認められた。また、上皮細胞の細胞質中には点状の免疫陽性反応が認められた。両者に対する二重免疫組織化学法を施した場合、PGP 9.5に対する免疫陽性の部位とNFに対する免疫陽性部位が一致した(図6c, 矢印)。

考 察

1. 刷子細胞の形態学的な特徴について

ラットの顎下腺主導管における上皮細胞に関する形態学的な研究はいくつかの報告がなされてきた^{1,2,4,5)}。すなわち、顎下腺主導管の上皮組織は円柱型細胞と少数の基底細胞から構成される多列上皮であり、また加えて大型の微絨毛を有する少数の刷子細胞と、少数の基底顆粒細胞が存在する⁶⁾。以前は、顎下腺の主導管は単なる唾液の導管であると考えられてきたので、形態学的なそして機能的な研究は遅れていた。しかしながら近年、組織化学的な研究や電子顕微鏡を用いた観察結果により、唾液腺の腺房より分泌された原唾液からNa⁺, Cl⁻の再吸収および原唾液へのK⁺, HCO₃⁻分泌が主導管にて行われている事実が証明された²²⁾。

HigashiらはPGP 9.5とセロトニンに対する二重免疫組織化学法を施したラット顎下腺の主導管上皮に二重標識を示す基底顆粒細胞が存在することを報告し、このセロトニンが血管壁の平滑筋に作用して血管運動性を調節することにより、主導管における唾液からの再吸収および唾液に対する分泌作用を調整しているものと考察した⁶⁾。この場合、PGP 9.5に対してのみ免疫陽性の反応を示し、セロトニンに対しては免疫陽性を示さない細胞の存在を報告した。そして、PGP 9.5に対してのみ免疫陽性反応を示した細胞の特徴および機能については明らかにされなかった。しかし、その形態学的な特徴を鑑みるに、PGP 9.5免疫陽性細胞が刷子細胞である可能性が示された。従って、本研究ではまずPGP 9.5に対して免疫陽性を示す細胞の形態学的な特徴を光学および電子顕微鏡を用いて検索した。刷子細胞は唾液腺の主導管上皮をはじめ胃、小腸、胆嚢など消化器系の粘膜上皮、および気管や肺などの呼吸器系の粘膜上皮にも存在する^{4,5,9-11)}。一般に刷子細胞にみられる形態的な特徴は、大型の微絨毛を自由面側に有し、加えて核より自由面側の細胞質に多くの中間径フィラメント束が観察されることが挙げ

られる¹¹⁾。本研究では免疫電顕法による観察により、PGP 9.5に対する免疫陽性を示す金粒子が刷子細胞の中間径フィラメント束に多数、観察された。ここで用いられたPGP 9.5は神経細胞のマーカータンパク質であり、刷子細胞と神経細胞とは何らかの発生学的な関連があるものと推察される。この刷子細胞の由来について報告は皆無であるものの、刷子細胞の由来が神経節細胞と同様に発生期の神経堤細胞、あるいは外胚葉性プラコードに由来する可能性が考えられる。

さらに、刷子細胞の細胞質にみられる中間径フィラメント束についてはLucianoら¹⁸⁾が消化器系の胆嚢上皮と胃の粘膜上皮における刷子細胞においてNFに対して陽性反応を示すと報告した¹⁸⁾。しかしながら顎下腺の主導管を観察した研究報告はなく、本研究の結果では刷子細胞の細胞質にみられた中間径フィラメントにPGP 9.5に対する免疫陽性を示す金粒子が観察された事実と合わせ、Lucianoらの報告も合わせ考察すると、顎下腺主導管における刷子細胞がもつ中間径フィラメント束はNFより構成されるものと考えられる。

このような刷子細胞は透過型電子顕微鏡による観察では、その大型の微絨毛と細胞質の中間径フィラメント側の存在により、容易に多列上皮細胞と鑑別できる。しかし電子顕微鏡的な観察はその高倍率により観察の範囲がきわめて限局されるため、主導管全域における検索は困難をとまう。

光学顕微鏡的な検索は低倍率における観察により組織の広範囲な解析が可能ではあるが、刷子細胞と上皮細胞とを区別する超微構造学的な鑑別が容易ではない。したがって光学顕微鏡を用いて刷子細胞を同定するためには、刷子細胞を標識するマーカータンパク質の存在が必要となる。

CK18は呼吸器系の粘膜上皮、および消化器系の胃、小腸の粘膜上皮細胞において光学顕微鏡的に刷子細胞を特異的に標識するマーカータンパク質であるとの報告がある¹⁷⁾。しかし唾液腺の導管上皮において識別するタンパク質の報告はなされていない。胃の粘膜上皮においては肝脂肪酸結合タンパクが刷子細胞の特異的な標識物質であるとの報告もあるが¹¹⁾、唾液腺の導管上皮における肝脂肪酸結合タンパクの研究結果は報告されていない。本研究によって明らかとなった顎下腺主導管の粘膜上皮に見いだされたCK18に対する免疫組織化学法の観察結果より、すべての粘膜上皮細胞にCK18免疫陽性反応が認められた事実があり、このCK18は刷子細胞の標識物質とはなり得なかった。胃の粘膜上皮細胞における粘膜上皮細胞よりも、顎下腺の主導管を構成する多列上皮細胞の方がより多くのケラチンフィラメントを含有しているものと考えられ

る。

VIPは消化器系の胃、腸の粘膜上皮細胞、そして膵臓の膵管上皮に分布し、腸管の運動に関与することが知られている^{12,19)}。また顎下腺の近傍に存在する顎下神経節ニューロンおよび翼口蓋神経節ニューロンにも存在することが報告されている¹⁹⁾。本研究による結果においても顎下腺の主導管の粘膜固有層にPGP 9.5とVIPに対して免疫陽性を示す構造が観察され、その形態学的な特徴より免疫陽性細胞は顎下神経節ニューロンであったが、このうちVIP免疫陽性を示す顎下神経節の細胞はすべてではなく、VIPに対する免疫陰性を示す細胞も観察された。舌の味蕾細胞にも同様のVIP免疫陽性細胞が存在する²³⁾。

顎下神経節ニューロンは顎下腺主導管の長軸に沿って分布することより、主導管の粘膜上皮との関連性を検索するために主導管の粘膜上皮に対してVIPの免疫組織化学法を施して観察したところ、粘膜上皮にVIP免疫陽性を示す刷子細胞の存在が確認できた。VIPに対する免疫陽性を示す反応産物は細胞質の核近傍の自由面側に観察された。免疫電顕法による観察では、VIP免疫陽性反応を示す金粒子は大型の微絨毛に伸びる中間径フィラメント束の間にある小胞および細胞質中に存在した。顎下腺主導管の刷子細胞においてVIPが存在するという報告は、これまでなされていない。刷子細胞にVIPが存在する事実は、刷子細胞の機能と関係があると考えられる。さらにVIPが顎下腺主導管の刷子細胞の特異的な標識物質になり得る。顎下腺主導管の刷子細胞、顎下神経節ニューロン、そして翼口蓋神経節ニューロン、これらの細胞には同様にVIPが存在する事実が確認されたので、これら細胞においてはVIPを用いた細胞間コミュニケーションが想像され、顎下腺主導管の唾液調節にも関係するものと考えられる。

Lucianoらが報告した様に、消化器系の胆嚢と胃の粘膜上皮に存在する刷子細胞にはNFが存在する¹⁸⁾。顎下腺の主導管における粘膜上皮の刷子細胞については、そのような報告は存在しない。本研究において顎下腺の主導管上皮にNFに対する免疫組織化学法施した場合、胆嚢上皮と同様にNFに対する免疫陽性反応が観察され、その免疫陽性構造に一致したPGP 9.5免疫陽性反応が観察された。しかしLucianoらの報告によると、NF免疫陽性反応はNF上に観察されたので、細胞質におけるNFの走行により免疫反応に多寡が生じることで陽性反応に強弱が生じたものと考えられる。NFは顎下腺主導管の粘膜上皮に存在する刷子細胞では、核周囲の細胞質より大型の微絨毛先の端にまで伸びる。一方で、胆嚢の粘膜上皮に観察される刷

子細胞のNFは、細胞質から微絨毛先端に伸びる以外に細胞質の種々の方向にも走行する¹⁰⁾。さらに胆嚢の刷子細胞において細胞質の基底部分近ではその径が細く、しかも上皮細胞間に斜走することが多いといわれる⁵⁾。本研究においても顎下腺主導管の粘膜上皮に点状のNF免疫陽性反応産物が認められた(図6)。この点状の免疫陽性構造物は、刷子細胞の一部、もしくは神経終末の一部と考えられる。顎下腺の主導管上皮にみられる刷子細胞には神経のシナプス構造、あるいは神経終末が存在する⁴⁾。したがって、顎下腺の主導管における粘膜上皮に存在する刷子細胞では、NF免疫陽性の強弱が認められること、および神経終末やシナプス構造との鑑別が不明確であることより、NFに対する免疫組織化学法の単独により刷子細胞を同定するのは困難であると考えられる。

これらの事実よりPGP 9.5, VIP, そしてNFに対する免疫組織化学法を組み合わせることにより、顎下腺における光学顕微鏡レベルでの刷子細胞に関する鑑別が可能となるものと考えられる。

刷子細胞のもつ生理学的な機能については種々の考え方があり、すなわち細胞質中に多くの小胞が存在していることより吸収機能を有するという説、逆に分泌機能をもつという説、そして吸収上皮細胞の一部はその破損像であるという説²⁴⁾などである。しかし胆嚢の場合に内腔にペルオキシダーゼをトレーサーとして投与した実験では、刷子細胞がペルオキシダーゼを吸収しないことが報告されており²⁵⁾、吸収するという説は現在では否定される。また分泌機能を有することについては刷子細胞にゴルジ装置の発達が悪いことや分泌像が観察されない事実より疑問視される^{10,16)}。さらに刷子細胞が小腸の粘膜上皮細胞と同一視される²⁶⁾。しかしながら、小腸の粘膜上皮細胞の微絨毛と刷子細胞の大型の微絨毛では形態学的な特徴が大きく異なり、小腸の粘膜上皮細胞と刷子細胞を同一視することはやはり困難である。Higashiら¹⁶⁾は顎下腺主導管を結紮した場合、一部の刷子細胞が変性、壊死する過程を形態学的に観察し、細胞の変性過程では微絨毛の癒合が生じて消失するものの、微絨毛が長さを増大することはないと報告した。近年Lucianoら¹⁸⁾、Isekiら¹¹⁾、東ら¹⁵⁾は刷子細胞の形態学的な特徴がⅢ型の味蕾細胞によく類似している事実より、化学受容細胞であると考え、説を述べている。またSatoら⁴⁾は刷子細胞に神経終末が接触する形態学的な事実を報告した。さらに、東ら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顎下腺主導管の粘膜上皮において、刷子細胞の微絨毛に形態学的な変化が生じることを合わせて報告した¹⁵⁾。本研究の結果では刷子細胞に

においてPGP 9.5およびVIPに対する免疫陽性反応を認められたが、舌の味蕾細胞にもPGP 9.5およびVIPに対する免疫陽性反応が報告¹⁴⁾されていることを鑑みると、刷子細胞は化学受容細胞である可能性がきわめて大きい。

今後PGP 9.5, VIP, およびNFに対する免疫組織化学法を用いた刷子細胞の特異的標識により、刷子細胞の機能を解明するための実験を進めていく必要があるものと考えられる。

結 論

粘膜上皮の少数を構成する刷子細胞は呼吸器系、消化器系の粘膜上皮に広く存在するが、光学顕微鏡下では他の上皮細胞との鑑別が困難である。刷子細胞に対する特異的マーカータンパク質を見出す研究が多々行われたが、顎下腺の主導管における刷子細胞については報告がない。そして、光学顕微鏡レベルでの鑑別が困難なため、刷子細胞の機能的側面についても不明瞭であった。本研究ではラット顎下腺の主導管における粘膜上皮の刷子細胞について特異的マーカータンパク質を免疫組織化学的に検索し、合わせて刷子細胞の機能についても考察した。

実験にはPGP 9.5, CK18, VIP, NFに対する免疫組織化学法を施して共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察した。さらにPGP 9.5とVIPについては免疫電顕法を用いて透過型電子顕微鏡にて観察した。

実験の結果、顎下腺の主導管上皮にいずれのタンパク質も免疫陽性を示す標識物質を観察できたが、CK18に対する免疫陽性反応はすべての上皮細胞に観察されたため、刷子細胞の特異的な標識マーカーとしては不適であった。しかしPGP 9.5とVIP, NFに対する免疫組織化学法は粘膜上皮において少数の細胞に陽性反応が観察された。この免疫陽性細胞を免疫電顕法により観察した結果、刷子細胞であることが確認された。したがってPGP 9.5, VIP, NFは刷子細胞の特異的な標識マーカーとして有用であると考えられた。

さらに顎下腺の刷子細胞が示す形態学的な特徴は舌の味蕾にみられるⅢ型細胞にきわめて類似しており、味蕾の細胞にもPGP 9.5およびVIPに対する免疫陽性が観察される事実より、顎下腺の刷子細胞は舌の味蕾細胞と同様に化学受容細胞であることが推察された。

謝 辞

本論文の作成にあたりご校閲と有益なご教示を賜りました口腔科学講座榎木恵一教授、3次元画像解剖学講座高橋常男教授、および口腔科学講座山本利春准教授に厚くお礼申し上げます。また、本研究を遂行するにあたり終始多

大なるご協力を頂きました本学の神経組織発生学講座の各位に深く感謝を申しあげます。本論文の要旨は第119回日本解剖学会、総会・全国学術集会（平成25年3月28日）において発表いたしました。

文 献

- Schackelford J.M. and Schneyer L.K.: Ultrastructural aspects of the main excretory duct of rat submandibular gland. *Anat. Rec.* **169**: 679-696, 1971.
- Pinkstaff C.A. The cytology of salivary glands. *Int. Rev. Cytol.* **63**: 141-261, 1980.
- Murata T, Sugatani T, Manganiello V. C, Shimizu K, and Tagawa T. Expression of phosphodiesterase 3 in rat submandibular gland cell lines. *Arch Oral Biol.* **46**: 453-457, 2001.
- Sato A. and Miyoshi S. Ultrastructure of the main excretory duct epithelia of the rat parotid and submandibular glands with a review of the literature. *Anat. Rec.* **220**: 239-251, 1988.
- Higashi K, Gomi T, Soeda M, Sasa S, Kimura A. and Kikuchi Y: New morphological aspects of the brush cells in the main excretory duct of the rat submandibular glands. *Zool. Sci.* **6**: 675-680, 1989.
- Higashi K, Tsuzuki H, Hayashi H, Kawata A, Takahashi K and Takahashi O: Serotonin-immunoreactive epithelial cells in the main excretory ducts of rat submandibular glands. *J. Oral Biosci.* **46**(1): 20-26, 2004.
- Rhodin J, Dalhamn T: Electron microscopy of the tracheal ciliated mucosa in rat. *Z. Zellforsch.* **44**: 345-412, 1956.
- Gomi T, Kimura A, Kikuchi Y, Higashi K, Tsuchiya H, Sasa S, Kishi K: Electron-microscopic observations of the alveolar brush cells of the rat. *Acta Anat.* **141**: 294-301, 1991.
- Luciano L, Reale E: A new morphological aspect of the brush cells of the mouse gallbladder epithelium. *Cell Tissue Res.* **201**: 37-44, 1979.
- Higashi K, Takano K, Sasa S. Ultrastructural aspects of the brush cell in mouse gallbladder. *Zool. Mag.* **91**: 158-164, 1982.
- Iseki S, Kondo H. Specific localization of hepatic fatty acid-binding protein in the gastric brush cells of rats. *Cell Tissue Res.* **257**(3): 545-548, 1989.
- Kugler P, Drenckhahn D. Intrinsic source of stomach NO. *Nature* **370**: 25-26, 1994.
- Yi-Jen Huang, Kuo-Shyan Lu. Immunohistochemical studies on protein gene product 9.5, serotonin and neuropeptides in vallate taste buds and related nerves of the guinea pig. *Arch. Histol. Cytol.* **59**(5): 433-441, 1996.
- Johnny Astbäck, Kristina Arvidson, Olle Johansson.

- An immunohistochemical screening of neurochemical markers in fungiform papillae and taste buds of the anterior rat tongue. *Archs Oral Biol.* **42** (2) : 137-147, 1997.
15. 東 一善, 五味敏昭, 岸 好彰, 高橋和人. 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**(1) : 34-42, 1997.
 16. Higashi K, Akimoto K, Sasa S. Ultrastructural changes of brush cell in the main excretory ducts of rat submandibular glands. *Kanagawa Dent. Col.* **22** (2) : 71-76, 1994.
 17. Höfer D, Drenckhahn D. Cytoskeletal markers allowing discrimination between brush cells and other epithelial cells of the gut including enteroendocrine cells. *Histochem. Cell Biol.* **105**: 405-412, 1996.
 18. Luciano L., Groos S., Reale E. Brush cells of rodent gallbladder and stomach epithelia express neurofilaments. *J. Histochem. Cytochem.* **51**(2) : 187-198, 2003.
 19. Norlén P., Curry W. J., Björkqvist M., Maule A., Cunningham R. T., Hogg R. B., Harriott P., Johnston C.F., Hutton J.C., Båkanson, R. Cellspecific processing of chromogranin A in endocrine cells of the rat stomach. *J. Histochem. Cytochem.* **49**: 9-18, 2001.
 20. Doran, J.F., Jackson, P., Kynoch, P.A.M., Thompson, R.J. Isolation of PGP 9.5, a new human neuron-specific protein detected by high-resolution two-dimensional electrophoresis. *Journal of Neurochemistry*, **40**: 1542, 1983.
 21. Rode, J., Dhillion, A.P., Doran, J.F., Jackson, P., Thompson, R.J. PGP 9.5, a new marker for human neuroendocrine tumors. *Histopathology*, **9**: 147, 1985.
 22. Young J.A., Frömter E., Schögel E., Hamann K.F. A microperfusion of sodium resorption and potassium secretion by the main excretory duct of the rat submaxillary gland. *Pflügers Archhiv. Ges. Physiol.* **295**: 157-172, 1967.
 23. Kusakabe T., Matsuda H., Gono Y., Furukawa M., Hiruma H., Kawakami T., Tsukuda M., Takenaka T. Immunohistochemical localization of regulatory neuropeptides in human circumvallate papillae. : *J. Anat.* **192**: 557-564, 1998.
 24. YK Ng, WC Wong, EA Ling. Study of the structure and functions of the submandibular ganglion. *Annal Academy of Medicine* **24**(6) : 793-801, 1995.
 25. Luciano L., Reale E. A new morphological aspect of the brush cells of the mouse gallbladder epithelium. *Cell Tissue Res.* **201**: 37-44, 1979.
 26. 山元寅男. 人体組織学 4. 消化器. 初版. 朝倉書店. 東京都. 211, 1987.
-