マウス喉頭におけるサブスタンス P 活性の生後発達

山崎 健*, 和田 廣巳*, 中川 千尋*
西本 喜胤*, 土屋 幸造*, 澤木 誠司*
長原 太郎*, 大石 公直*, 澤木 修二*
小林 園生**, 門田 哲夫**, 岸田 令次**

Postnatal Development of the Substance P Immunoreactivity in the Larynx of Mice

Takeshi Yamazaki, M.D.,* Hiromi Wada, M.D.,* Chihiro Nakagawa, M.D.,*
Yoshitane Nishimoto, M.D.,* Kohzoh Tsuchiya, M.D.,* Seiji Sawaki, M.D.,*
Taro Nagahara, M.D.,* Kiminao Ohishi, M.D.,* Shuji Sawaki, M.D.,*
Sonou Kobayashi, D.D.S.,** Tetsuo Kadota, Ph.D.,** and Reiji Kishida, M.D.**

*Department of Otolaryngology, and **IInd Department of Anatomy,
Yokohama City University School of Medicine, Yokohama

The postnatal development of substance P (SP) in the larynx of mice was immuno-histochemically investigated. The appearance of weak SP positive fibers in the epithelial layer was detected at an early embryonic stage of 17th days. The development of these fibers was enhanced gradually after birth, especially within the first 3 weeks. At the age of 21 days just corresponding to the age of the weaning of mice, a histologically particular finding appeared to be obvious that a part of strongly SP-positive nerves extend their fibers ends to the surface of the laryngeal mucosa. Nerve fibers which distributed in close association with the epithelial vessels and glands were also detected in this stage. Then by the age of 35th days fully matured histological findings were obtained.

The above evidence suggests that SP-fibers abundantly present in larynx, physiologically involved in the sensory system of the external stimuli from the air tract.

Key words : substance P, postnatal development, mice,
larynx, immunohistochemistry

I. はじめに

喉頭をはじめとする気道系におけるニューロペプチドとしては、VIP (vasoactive intestinal polypeptide) が比較的早くより知られている

---

*横浜市立大学医学部耳鼻咽喉科, **同・第2解剖学教室

別刷請求: 〒232 神奈川県横浜市南区六ツ川2-138-4
神奈川県立こども医療センター 山崎 健

投稿受付: 1989年12月20日 (急載)

が^{1,2)}, 近年サブスタンス P の存在が種々の実験動物種において確認されている^{3~7)}。気道系のサブスタンス P はその生理機能として、粘膜上皮における知覚, 血管拡張, 腺分泌亢進, 平滑筋収縮に働くと推定され, 耳鼻咽喉科領域においても種々な病態に関与している可能性が示唆⁸⁾されており, 臨床的な意義も大きいと考えられる。

われわれは, これまでにマウスを材料として気道領域全般にわたって系統的にサブスタンス

P活性の組織学的な検討を行ってきた^{9,10)}。このうちマウス成体の喉頭領域においては、粘膜全般にわたって、粘膜上皮内、上皮直下、あるいは粘膜固有層の血管および喉頭腺の周囲に豊富なサブスタンスP線維が認められ、なかでも声帯領域において顕著であることをすでに報告⁹⁾した。

また、成長に伴うサブスタンスP活性の変化に関しては、中枢神経系^{11,12)}、膀胱¹³⁾、消化器¹⁴⁾においてこれまで若干の研究があるが、耳鼻咽喉科領域においては報告がなされていない。そこで今回は、気道系のサブスタンスP活性の生後発達を検討する最初の試みとして、マウスの喉頭とくに声帯領域に注目し、胎齢17日から成体にいたるまでのサブスタンスP活性の発達過程を免疫組織学的に検討し、二、三の知見を得たので報告する。

II. 方 法

1. 組織標本の作製

生後0日、1日、2日、3日、4日、7日、13日、16日、21日、26日、35日および成体のマウス各2匹ずつを、ハロタンで深麻酔後開胸し、左心室より上行大動脈基部まで灌流針を挿入し、下大静脈を切断後、ヘパリン生理食塩水にて灌流した。生前マウスは胎齢17日目に母親より帝王切開により取り出した。以上の試料を4%パラホルムアルデヒド、0.2%ピクリン酸含有0.1Mリン酸緩衝液で灌流固定した後、頭頸部を同じ灌流液で後固定し、水酸化ナトリウムでpH 7.4に調整した0.1M EDTAで脱灰した。脱灰度の判定はシュウ酸カルシウム沈澱の形成の有無により行った。脱灰後30%ショ糖含有0.1Mリン酸緩衝液に移し、Compound Materials (Tissue-Tek) を用いて包埋した。ドライアイスアセトンで冷却したイソペンタンで包埋組織を凍結後、クライオスタットで40 μ mの凍結切片を作製した。切片は2系列に分け、クロムゼラチンでコーティングしたスライドガラスにマウントし、風乾した。

2. 抗サブスタンスP抗体による免疫組織染色

0.9%食塩水、0.3%トライトンX-100含有0.1Mリン酸緩衝液(PBST)で洗浄後、抗サブスタンスPラットモノクローナル抗体(0.2%チ

ッ化ナトリウム、1%正常ヤギ血清、0.2%ウシ血清アルブミン含有PBSTで3,000倍に希釈した溶液)との反応は24時間4°Cで反応させた。PBSTで1時間洗浄後、二次抗体として1%正常ヤギ血清、0.2%ウシ血清アルブミン含有PBSTで500倍に希釈した抗ラットIgGヤギ血清を用いて、室温で3時間反応させた。その後サブスタンスP免疫活性部位を、PAP(ペロオキシダーゼ抗ペロオキシダーゼ複合体)およびその発色基質であるDAB(diaminobenzidine)を用いることにより可視化した。さらに標本を脱水後カナダバルサムにて封入し、光顕にて観察した。

2系列にしたものについては、1系列分をニッスル染色による重染色に用い、残り半分を吸収試験による抗体の特異性の検定に用いた。吸収試験は10 μ m合成サブスタンスPにて行った。

III. 結 果

先にわれわれが報告しているように、マウス成体の喉頭においては、ほぼ粘膜全域にわたってサブスタンスP活性陽性線維が見い出されるが、このうち特に声帯レベルでは、気道系の他の部位と比較しても、非常に顕著なサブスタンスP陽性線維が認められる。そこでこの点に着目し、特に気道系のサブスタンスP活性陽性線維の生後発達を研究する手はじめとして、喉頭、特に声帯レベルでの変化に注目して検討した。

最も若い時期にあたる胎齢17日マウスで、すでに声帯上皮に微弱ながらサブスタンスP活性が観察された。しかし生後と比較すると、明らかにサブスタンスP活性は未発達であり、特徴的な粘膜上皮自由表面近くに進出したサブスタンスP活性は、この時期の声帯には認められなかった(図1)。

また、上皮下の血管および喉頭腺周囲に分布するサブスタンスP活性陽性線維もまた、極めて未発達ではあるが存在することが確認された(図2, 3)。

生後になると、日数とともに徐々にサブスタンスP活性が増大してくるのが認められた。声帯レベルにおいても、上皮内でゆっくりと全体的に陽性像が増加してくる傾向がみられた。し

図1 胎齢17日声帯上皮内 (Bar=50 μ m)
arrow: 上皮内のサブスタンス P 陽性線維, AW: air way, BM: basement membrane.

図4 生後13日上皮内 (Bar=50 μ m)
arrow: 上皮内でのサブスタンス P 陽性線維, AW: air way, BM: basement membrane.

図2 胎齢17日血管 (Bar=50 μ m)
arrow: 血管へ延びるサブスタンス P 陽性線維, AW: air way.

図5 生後21日上皮内 (Bar=50 μ m)
arrow: 上皮内に分布するサブスタンス P 陽性線維, AW: air way, BM: basement membrane.

図3 胎齢17日喉頭腺 (Bar=50 μ m)
arrow: 喉頭腺へ分布するサブスタンス P 陽性線維, GL: gland.

図6 生後26日上皮内 (Bar=50 μ m)
○: 自由表面近くのサブスタンス P 陽性線維, →: 上皮内のサブスタンス P 陽性線維, ►: 基底膜直下のサブスタンス P 陽性線維, AW: air way, BM: basement membrane.

図7 生後26日血管 (Bar=50 μ m)
arrow: 血管へ分布するサブスタンス P 陽性線維,
V: vessel.

かし生後13日あるいは16日の時期には、サブスタンス P 活性ははまだ上皮内にとどまり、声帯の自由表面への進出は観察されなかった (図4)。

またこの時期には、血管および腺周囲でのサブスタンス P 活性の発達は上皮内と比較するとかなり弱く、発達に時期的な差があるように思われた。

生後21日には、上皮内でのサブスタンス P 活性の増大が著しく、自由表面近くでの陽性像が初めて認められた (図5)。

さらに進んで生後26日の段階では、血管周囲へも明確に分布していた (図6)。

以降生後35日に至るまでこの傾向はさらに強まり、上皮あるいは血管および喉頭腺周囲のサブスタンス P 活性陽性線維の分布は、ほぼこの時期までに成体のレベルにまで達していた (図7, 8)。

生後35日では、それ以前と比較して顕著なサブスタンス P 陽性線維が観察できる。血管周囲の明確な線維 (図7), あるいは基底膜を境として上皮内に密集して存在する線維群 (図8) など、サブスタンス P 活性陽性の神経線維は極めて豊富となり、図8にみられるような、自由表面近くへ向かうサブスタンス P 陽性線維も極めて強く紫色されていた。

喉頭腺の腺間に見られるサブスタンス P 陽性線維も、35日以前と比較すると強く染っていた (図9)。

図8 生後35日上皮 (Bar=50 μ m)
◇: 自由表面近くのサブスタンス P 陽性線維, →: 上皮内のサブスタンス P 陽性線維, ►: 基底膜直下のサブスタンス P 陽性線維, AW: air way, BM: basement membrane.

図9 生後35日喉頭腺 (Bar=50 μ m)
GL: gland.

IV. 考 察

気道系におけるサブスタンス P の機能に関しては、Nilssonら⁸⁾によるモルモットを用いての気管支平滑筋の収縮に関与するという薬理学的報告をはじめ、これまでに多数の報告がなされている。二之湯ら^{3,4)}はモルモットの気道系において、サブスタンス P 陽性線維は、コリン作動神経と共同して気道系における血管拡張、腺分泌亢進、平滑筋収縮に関与していると推察している。さらにサブスタンス P 生体のさまざまな部位で、知覚の一次ニューロンにおける神経伝達物質として機能していることが示唆されており¹⁵⁻¹⁸⁾、気道系においてもサブスタンス P 陽性線維が知覚神経線維である可能性が最も高いと

考えられる。

この点について事実われわれは、今回の研究のために作製したマウスの頭頸部の脱灰標本を用いて、特に気道系に分布する神経線維群の由来について以下のような解剖学的な知見を得ている。

1) 副交感神経の節前ニューロンがある疑核および迷走神経背側核には、サブスタンス P 陽性細胞は認められず¹⁹⁾、また喉頭領域においてはサブスタンス P 活性陽性を示す神経節の細胞はこれまで観察されていない⁹⁾。このことから、喉頭に分布するサブスタンス P 陽性線維は少なくとも副交感の節前でも節後線維でもないと考えられる。

2) 一方、頭頸部領域に分布する交感神経の節後ニューロンがある上頸神経節には、サブスタンス P 陽性の細胞は存在せず⁹⁾、喉頭のサブスタンス P 線維は少なくとも交感神経の節後線維でもないと考えられる。

3) これに対して、迷走神経中の知覚神経細胞があるとされる頸静脈神経節および節神経節には、多数のサブスタンス P 陽性細胞が認められ、さらに延髄においては迷走神経の神経線維の分布する孤束核、迷走神経腹側知覚核においてもサブスタンス P 陽性線維像が観察される¹⁹⁾。

以上のことから、マウス喉頭のサブスタンス P 線維のほとんどは、迷走神経に由来した知覚線維であると考えられる。

われわれは、今回の組織学的検討によって明らかになった、生後21日から35日の間に急速に発達する上皮自由表面のサブスタンス P 活性陽性線維は、喉頭粘膜での種々の反射に関与する重要な知覚系を構成する神経線維ではないかと考えている。マウスにおいては、生後21日の時期は離乳の時期に相当し、この時期以降に、喉頭上皮でのサブスタンス P 陽性線維による知覚系が発達してくるのは興味深い。

また生後35日の時期は、繁殖能力を獲得し、性的には成体に近くなる日数に相当する。

このように、喉頭の知覚系を担うと考えられるサブスタンス P 陽性線維の分布が、生前においてすでに完成されているのではなく、生後日数とともに発達してくるのは、出生後「呼吸」

と「防御」によって気道系の反射機能が高められてくると相関しているものと考えられる。

一方、上皮下の組織のうち、特に喉頭腺周囲に注目して観察して見ると、他の部位と同様に、胎齢18日よりすでに SP 陽性線維が認められるが、同じ喉頭領域の声帯上皮、および血管周囲と比較して、より未熟であり、その後の発達も時期的にはかなり遅れている。これは、今回のわれわれの組織学的な観察で明らかになったように、喉頭腺自体が出生後に発達し、また機能的には出現前には働いていないと考えられることと符合する結果である。喉頭腺自体に関しての組織学的報告は非常に少なく²⁰⁾、喉頭腺の生後発達に関する検討もなされていない。

また、喉頭腺への神経分布についても、わずかにイヌについて5-hydroxydopamine (5-OHDA) の存在が指摘されているのみで、これまで明確になっていない。今回のわれわれの結果で、喉頭腺の発達過程を確認するとともに、喉頭腺の神経支配の少なくとも一つはサブスタンス P 線維によってなされていることが初めて明らかになったわけである。

さらに、腺組織に分布するサブスタンス P 線維についても、文献的にはこれまで報告されてはおらず、これが喉頭あるいは気道系粘膜に特徴的な現象であるのか、あるいは他の部位でも今後明らかになっていくのかは興味ある問題である。

文献的にみると、サブスタンス P 陽性線維の発生過程については、中枢神経系あるいは末梢組織についてこれまで若干の報告がある。まず中枢神経系については、マウスおよびラットにおいて、胎齢12日よりすでに未熟な SP 陽性細胞が神経管領域に出現し、胎齢15日には中枢系全域にサブスタンス P 陽性細胞が認められるようになるとの報告がある¹²⁾。この「胎齢12日」が、これまで報告されているサブスタンス P 陽性活性の出現の最も早い時期である。しかし、中枢で出現したサブスタンス P 陽性活性も、胎齢16日に入ると髄縫線、その他の一部の領域においてはすでに数および染色性の減少が見られたと報告されており¹²⁾、部位によってサブスタンス P 活性の発達過程が様々であることが伺われ

る。

一方, 末梢組織でのサブスタンスP活性の発達についても, 耳鼻咽喉科領域以外では若干の報告がある。ラットの胃上皮での出生前後でのサブスタンスP活性は, 胎齢17, 18日よりまず神経層において出現し, さらに胎齢19日より胃筋層にも見られるようになり, その後陽性の状態が続く¹⁴⁾。

またラット眼球におけるサブスタンスP活性を検討した報告によれば, 角膜, ぶどう膜のサブスタンスP線維は, 胎生17~19日に出現し, その後サブスタンスP線維は急増して, 虹彩のサブスタンスP線維は生直後に, また角膜, 脈絡膜, 毛様体では生後3日の間にすでに最高に達する²¹⁾。さらにラットの膀胱のサブスタンスPの生後発達においては, 生後20日目に達してようやく成体ラットのサブスタンスP活性陽性線維の60%が出現するという¹³⁾。

以上のような報告を比較してみると, サブスタンスP活性の発達は, 中枢神経系, 末梢組織とともに胎生期後半にはすでに始まっているが, 眼領域を含む中枢神経系では, サブスタンスP線維は出生前後にすでに高度に発達してくるのに対して, 今回われわれが観察した喉頭あるいはラット胃上皮¹⁴⁾等の末梢組織においては, 多少の時期的なずれはあるが, 一般的に生後の日数とともに発達してくるという傾向が見られるようである。このようなサブスタンスP線維発達の身体部位による時期的な差異は, それぞれの組織でのサブスタンスPの多彩な生理機能を反映しているものと考えられる。

喉頭の機能は, その粘膜表面における知覚終末からの入力によって想起される種々の反射応答によってなりたっており, 耳鼻咽喉科領域における種々の病態との関連からも, サブスタンスPが知覚神経伝達物質であるという知見は非常に重要である。今回われわれが観察した喉頭での上皮自由表面近くまで進出したサブスタンスP陽性線維は, まさにこの喉頭における反射の一次知覚の入力線維である可能性が極めて高いと, われわれは考えている。

今後は, 以上のような声帯レベルでの観察結果をふまえ, さらに気道系全般にわたるサブスタンスP線維の生後発達を検討し, その機能的

役割についても明らかにしていきたいと考えている。

V. ま と め

マウス気道系におけるサブスタンスP活性の生後発達を研究する足がかりとして, まず声帯レベルに注目し, 検討した。

1) マウス声帯のサブスタンスP活性は, 胎齢17日において未発達ながらも認められた。

2) 生後サブスタンスP活性は, 徐々に発達し, 性的成熟期にあたる生後35日の時期に, ほぼ成体レベルに匹敵するサブスタンスP陽性像が観察された。

3) マウスの離乳期に相当する, 生後21日以降生後35日までの発達の後半期に, 上皮自由表面近くの部位, 血管および喉頭腺周囲でのサブスタンスP活性陽性線維は急速に発達する。

本論文の主旨は, 1989年5月第90回日本耳鼻咽喉科学会総会において発表した。

文 献

- 1) Uddman, R., Alumets, J., Densert, R., et al.: Occurrence and distribution of VIP nerves in the nasal mucosa and tracheobroncheal wall. *Acta Otoraryngol.*, 86: 443-448, 1978.
- 2) Uddman R., Malm, L., and Sundler, F.: The origin of vasoactive intestinal polypeptide (VIP) nerves in the feline nasal mucosa. *Acta Otolaryngol.*, 89: 152-156, 1980.
- 3) 二之湯修, 山下敏夫, 熊沢忠躬・他: 耳鼻咽喉科領域の神経ペプチドに関する免疫組織科学的研究. 第3報: 気道における神経ペプチド分布. *耳鼻臨床*, 76: 3229-3240, 1983.
- 4) 二之湯修, 山下敏夫, 笹 英彦・他: 耳鼻咽喉科領域における神経ペプチド分布. *自律神経*, 21: 91-102, 1984.
- 5) Hisa, Y.: Fluorescence histochemical studies on the noradrenergic innervation of the canine larynx. *Acta Anat.*, 13: 15-25, 1982.
- 6) Hisa, Y., Sato, F., Fukui, K., et al.: Substance P nerve fibers in the canine larynx by PAP immunoreactivity. *Acta Otolaryngol.*, 100: 128-133, 1985.
- 7) 和田 繁, 前山忠嗣, 渡部 俊・他: イヌ喉頭粘膜におけるSP線維の免疫組織学的観察. *日耳鼻*, 90: 1321-1327, 1987.

- 8) Nilsson, G., Dahlberg, K., Brodin, E., et al. : Distribution and constrictor effect of substance P in guinea pig tracheobronchial tissue. von Euler U.S., and Pernow, B., (ed.), Substance P, pp.75-81, Raven Press, New York, 1977.
- 9) 西本喜胤, 中川千尋, 和田廣巳・他 : マウス喉頭におけるサブスタンス P 免疫活性を有する神経線維の分布. 日耳鼻, 91 : 1647-1648, 1988.
- 10) 長原太郎, 中川千尋, 和田廣巳・他 : マウス喉頭におけるサブスタンス P を含む神経線維の由来について. 日気食会報, 40 : 156-157, 1988.
- 11) Inagaki, S., and Kito, S. : Peptides in the peripheral nervous system. Emson, P.C., Rosor, M., and Tohyama, M. (eds.), Progress in Brain Research, Vol. 66, pp.269-316, Elsevier, Amsterdam, 1986.
- 12) Ni, L., and Jonakait, G.M. : Development of substance P-containing neurons in the central nervous system in mice. J. Comp. Neurol., 275 : 493-510, 1988.
- 13) Maggi, C., Santicioli, P., Meli, A., et al. : Biochemical, anatomical and functional correlates of postnatal development of the capsaicin-sensitive innervation of the rat urinary bladder. Dev. Brain Res., 43 : 183-190, 1988.
- 14) Ito, S., Ohta, T., Kimura, A., et al. : Development of substance P and vasoactive intestinal polypeptide-containing neurons in the rat stomach. J. Exp. Physiol., 73 : 729-736, 1988.
- 15) Otsuka, M., and Konishi, S. : Release of substance P-like immunoreactivity from isolated spinal cord of newborn rat. Nature, 264 : 83-84, 1976.
- 16) Hökfelt, T., Johansson, O., Kellerth, J.O., et al. : Immunohistochemical distribution of substance P. von Euler, U.S., and Pernow, B. (eds.), Substance P, pp.117-145, Raven Press, New York, 1977.
- 17) Lembeck, F., Gamse, R., and Juan, H. : Substance P and Sensory Nerve Endings. von Euler, U.S., and Pernow, B. (eds.), Substance P, pp.169-182, Raven Press, New York, 1977.
- 18) Schlitzberg, M. : The peripheral nervous system. Emson, P.C. (ed.), Chemical Neuroanatomy, pp.1-51, Raven Press, New York, 1983.
- 19) Funakoshi, K., Kusakabe, T., Kadota, T., et al. : Substance P immunoreactivity in the nerve of mice. Neuroscience Res., 7 : 235-248, 1989.
- 20) Spicer, S.S., Sester, M.E., Mochizuki, I., et al. : The histology and fine structure of glands in the rat respiratory tract. Anatomical Rec., 202 : 33-43, 1982.
- 21) Sakiyama, T., Kuwayama, Y., Ishimoto, I., et al. : Ontogeny of substance P-containing structures in the ocular tissue of the rat : An immunohistochemical analysis. Dev. Brain Res., 13 : 275-281, 1984.