

091032
平成3年度科学研究費補助金研究成果報告書 (一般研究C)

腸管における粘膜筋板の形態、神経支配および運動特性に関する研究

(課題番号 02807008)

平成4年3月

研究代表者 石川 一志
(旭川医科大学医学部助手)

平成3年度科学研究費補助金研究成果報告書 (一般研究C)

腸管における粘膜筋板の形態、神経支配および運動特性に関する研究

(課題番号 02807008)

平成4年3月

研究代表者 石川 一志
(旭川医科大学医学部助手)

目次	ページ
はしがき	1
序	2
実験材料と実験方法	4
1 形態学的研究	4
1) 一般形態	4
2) 酵素組織化学	5
3) 免疫組織化学	6
2 生理学的研究	6
1) 条片標本の作製	6
2) 灌流実験	6
研究成果	8
1 一般形態	8
2 生理学的研究	1 2
1) 経壁的電気刺激	1 2
2) 神経の分布とニューロペプチドの存在	1 4
3) 神経内活性物質の作用	2 3
今後の課題	2 7
結論とまとめ	2 7
謝辞	2 9
参考文献	3 0

はしがき

平成3年度科学研究費補助金によって標題のような研究をおこなったのでその成果を報告する。

研究組織

研究代表者： 石川 一志 (旭川医科大学医学部助手)
研究分担者： 尾崎 毅 (岡崎国立共同研究機構生理学研究所助教授)

研究経費

平成2年度	700千円
平成3年度	700千円
計	1,400千円

研究発表

(1) 学会誌等

石川 一志、 尾崎 毅、 小野一幸

Characteristic contraction of muscularis mucosae in the guinea pig proximal colon by electrical field stimulation and tachykinins.

誌名、巻号、年月日 未定

(2) 口頭発表

石川 一志、 小野一幸

モルモット近位結腸の粘膜筋板に分布する神経について。

第97回日本解剖学会総会 1992年4月1日 発表予定

序

消化管は、個体の生命の維持や活動のためのエネルギー源として摂取した食物を、消化・吸収するための重要な器官である。更に、最近では生体防御機構としての役割も知られるようになってきており、その機能に関する研究成果の蓄積は膨大なものがある。しかし、一方では、古くから研究課題とされながらも未だ十分に解明されていなかったり、あまり注目されてこなかった点が多々あることも事実である。例えば、消化管に普遍的に存在する粘膜筋板については、粘膜と粘膜下織の境界に存在するという位置的制約や、一般に極めて菲薄であるという組織学的特徴から、実験的研究が難しく、機能に関する明確な説明は未だにおこなわれていない。特に腸管の粘膜筋板に関する報告は少なく、系統的におこなわれた研究は見あたらない。

今世紀の初めに、主にイヌおよびネコの小腸における絨毛の運動の観察から、粘膜筋板の運動と外側の筋層の運動との間には相関がみられず、絨毛は局所的で独立した運動をおこなうことが指摘された (Hambleton 1914; King and Arnold 1922)。また、X線による研究によっても、粘膜筋板によって形成される粘膜のひだは外側の筋層の収縮とは直接の関係がないことが明らかとなった (Forssell 1923)。こうした観察から、小腸における粘膜筋板の役割について以下のような仮説が述べられている。1) 絨毛の運動をひき起こすことにより内容物を攪拌して消化吸収を促進する。特に中心乳糜管における吸収の促進 (Hambleton 1914; Forssell 1923)、2) 粘膜の表面にひだや溝を形成して表面積を拡大し、また内容物の通過を遅らせて吸収を促進すると共に、化学的な消化をも促進する (Forssell 1923)。3) 律動的な収縮により局所における微小循環を促進し、また、毛細血管の収縮による止血に関与する (Gunn and Underhill 1915)。しかしながら、絨毛の運動と溶液の移動との間にはその速度および方向性とも関連がなく、中心乳糜管が

空になることもなかったとして、吸収に対する粘膜筋板の役割に否定的な見解も報告されている (Wells and Johnson 1934)。

こうした考察がおこなわれる一方で、小腸における粘膜筋板の基本的な性質を解明しようという試みもおこなわれなかつたわけではない。絨毛の収縮や膨張がアトロピンあるいはニコチンで抑制されることから、粘膜筋板は末梢神経下の局所反射により調節されていることが早くから示唆されていた (Hambleton 1914)。また、規則的でゆっくりとした律動的自発収縮が存在し (Gunn and Underhill 1915; King and Arnold 1922; King and Church 1923)、この自発運動は筋原生であることも指摘された (Gunn and Underhill 1922; King and Arnold 1922)。ピロカルピン、エピネフリン、ニコチン、バリウムなどは粘膜の運動を促進し (King and Arnold 1922; King and Church 1923)、モルフィネ、コカイン、アトロピン、などはこれを抑制することも報告され、神経系の関与が示唆された。King and Robinson (1945) はイヌの小腸および大腸の粘膜筋板にコリン作動性およびアドレナリン作動性神経が分布し、律動的な自発運動は筋原生性であるが、神経系を通じて収縮が誘発されたり、増強されたりすると報告した。更に、粘膜筋板の輪状成分も同様に両神経の支配を受けると示された (King et al. 1947)。

大腸の粘膜筋板に関する研究は小腸における本組織の研究が緒についてから約半世紀を経た後に行われた。ネコの結腸において粘膜筋板はアセチルコリン (ACh)、アドレナリン (Adr)、ノルアドレナリン (NAdr) で収縮し (Onori et al. 1971)、ウサギの大腸では ACh で収縮し NAdr で抑制が起こったという (Gallacher et al. 1973)。近年、免疫組織化学の進歩により、数多くのペプチドが神経内に存在することが知られるようになった。腸神経系においても、単独であるいは神経伝達物質などと共存して多数のペプチドが存在している (Furness and Costa 1987)。最近、Angel et al. (1984) は、イヌの近位結腸の粘膜筋板は ACh にはほとんど反応を示さず、サブスタンス P (SP) で収縮し、Vasoactive Intestinal

Polypeptide (VIP)で弛緩することを示した。大腸の粘膜筋板におけるこのような研究結果の違いが動物の種差によるものなのかあるいはそのほかの要因が関係しているのかは今のところ明かではない。

消化、吸収、免疫など生体にとって重要な機能を有する腸管における本組織の役割に関しては、以上のようないくつかの報告があるにも関わらず、その本質に迫るには甚だ基礎的な知見が不足している。この課題を解決するためには、更に多くの基本的な事実に関する所見の積み重ねが必要である。著者らは、本組織の機能解明のための研究を系統的におこなうこととし、その第一歩として、それぞれが得意分野の技術を用いて共同で研究をおこない、粘膜筋板そのものの形態や運動特性に関して以下のような基本的な点を明らかにすることを計画した。1) 定性的および定量的形態、2) 神経の分布、3) 運動特性、4) 各種生理活性物質および薬物の効果。このうち形態学的研究は主に旭川医科大学において、生理学的な研究は岡崎の生理学研究所においておこなった。実験動物としては、近位結腸の粘膜筋板が良く発達しているモルモットを用いたが、この動物は入手が容易なうえ多頭飼育が可能で取扱い易く、実験的研究が繰り返し可能であると考えたからである。

実験材料と実験方法

本研究には体重350-500gの雄のモルモット (Hartley, 日本SLC株式会社、静岡および日本生物材料センター、東京) を用いた。形態学的研究のための試料採取はエーテル麻酔下で、生理学的研究のための試料採取は木槌で頭部に一撃を加えて屠殺したのちにおこなった。

1. 形態学的研究

1) 一般形態

心臓を介した全身灌流ではモルモットの内臓は灌流されにくいので、胸腔を開き、下行大動脈にポリエチレンカニューレを挿入して主に腹腔内臓と後肢のみが灌流されるようにした。カニューレの先端が横隔膜を越して腹腔に入ったところで結紮し、マイクロチューブポンプ（アトー株式会社、AC-2120型）を用いて、初め5%のデキストランを加えた modified Krebs-Henseleit 液で10分間灌流し、その後4°Cの modified Karnovsky 液で20分間灌流して固定した。modified Krebs-Henseleit 液の組成は以下の通りである（単位はmM）：NaCl, 131.0; KCl, 5.6; CaCl₂, 2.0; MgCl₂, 1.0; NaHCO₃, 25.0; NaH₂PO₄, 1.0; glucose, 5.0。灌流終了後、開腹し、回盲結腸口の遠位約4-6cmの近位結腸を切り出し、細切した後 modified Karnovsky 固定液に2-4時間浸漬した。1/15 Mのリン酸緩衝液 (pH7.4) で一晚洗浄した後、エタノール上昇系列で脱水し、常法通り樹脂 (Luveak 812) に包埋した。1 μmの切片をトルイジンブルーで染色して光顕の試料に、超薄切片を酢酸ウランと硝酸鉛で電子染色して電顕の観察に供した。

2) 酵素組織化学

上記で採取した組織の一部をクリオスタットで10 μmの厚さに薄切し、アセチルチオコリンを基質とした酵素組織化学 (Tago, et al., 1986) を適用してアセチルコリンエステラーゼ (AchE) を染色した。非特異的なコリンエステラーゼの染色を防ぐために反応液中に1 μmの tetraisopropyl phosphoramidate (Sigma, USA) を加えた。対照として、反応液に基質を加えなかったもの、および10⁻⁴ Mの eserine hemisulphate salt (Sigma, USA) を加えたものを用いた。

3) 免疫組織化学

上記1)と同様にして固定をおこなったが、modified Karnovsky液の代わりに4% paraformaldehyde 液あるいはブアン液で灌流した。灌流終了後開腹して採取した試料は、同じ固定液に約4時間浸漬した後、リン酸緩衝液で一晩洗浄し、さらに30%の蔗糖液中に一昼夜放置した。クリオスタットで10 μ mの厚さの凍結切片に薄切し、免疫組織化学反応のための試料とした。これを0.1M等張リン酸緩衝液(pH 7.2)で数回洗浄した後、次のような特異抗血清をそれぞれ滴下して湿箱中で一晩反応させた。1) 抗-PGP9.5 (x60000, UltraClone LTD., England), 2) 抗-SP (x10000, Incstar Corps, USA), 3) 抗-Neurokinin-A (抗-NK-A) (x10000, Peninsula Lab., Inc., USA), 4) 抗-Neurokinin-B (抗-NK-B) (x10000, Peninsula Lab. Inc., USA), 5) 抗-Met-Enkephalin (抗-Met-Enk) (x4000, Incstar Corps., USA), 6) 抗-VIP (x40000, Amersham Intern. Plc., England), 7) 抗-Gastrin-17/Cholecystokinin (抗-G-17/CCK) (x12000, UCB Bioproducts, Belgium), 7) 抗-Neuropeptide-Y(抗-NPY) (x15000, UCB Bioproducts), 8) 抗-Dopamine-beta-hydroxylase(抗-DBH) (x1000, Eugene Tech. Intern. Inc., USA)。反応を終了した切片はABCキット(Vectastain, VectorLab. Inc., USA)を用いて染色し、鏡検した。(1) 特異抗血清を正常抗血清で置き換えたもの、および(2) 適当な濃度の特異抗原で一晩吸収させた抗血清を反応させたものを対照とした。

2. 生理学的研究

1) 条片標本の作製

モルモットの腹壁を開き、回盲結腸口から4-6cmの部分の近位結腸を切り出し、さらに、実体顕微鏡下で眼科用の小さい鉏と細いピンセットを用いて長さ8-10mm、幅2-3mmの細長い結腸壁の条片を切り出した。この条片の四隅を微細な鍼灸用皮内針でシリコンベットの

に固定し、丁寧に外側の縦走筋および輪走筋を剥離除去することにより、粘膜と粘膜下織のついた粘膜筋板の条片標本を作製した（図1）。光顕で観察することにより、この条片標本には図1に挿入した拡大写真で示されるような粘膜下神経叢（マイスナー神経叢）の神経細胞体が含まれていることを確認した。

2) 灌流実験

作製した条片標本の両端をごく細い糸で結紮し、一端の結紮糸を灌流槽の床のシリコン板に皮内針で止めて固定し、他の一端の結紮糸は変位トランスデューサーに連結し、100~200mgの負荷をかけて等張性収縮を記録した。灌流槽は37°Cに加温し、同様に加温した modified Krebs-Ringer 液 (pH 7.2) で灌流した。灌流液には絶えず5%の二酸化炭素と95%の酸素の混合ガスを送り込んだ。電気刺激は、一對の銀・塩化銀電極を用いて経壁的におこなった。活性物質や薬物を投与する際には灌流を止め、投与された物質の濃度が下がらないようにした。使用した活性物質および薬物は以下の通り。テトロドトキシン (TTX) (Sankyo, Tokyo)、硫酸アトロピン (Sigma, USA)、塩化アセチルコリン (Sigma, USA)、塩化ヘキサメトニウム (C6) (Sigma, USA)、塩化D-ツボクラリン (Sigma, USA)、SP (Protein Res. Found., Osaka)、NK-A (Protein Res. Found., Osaka)、NK-B (Peninsula, Lab. Inc., USA)、Met-Enk (Protein Res. Found., Osaka)、NPY (Peninsula Lab. Inc., USA)、CCK (Peninsula Lab. Inc., USA)。

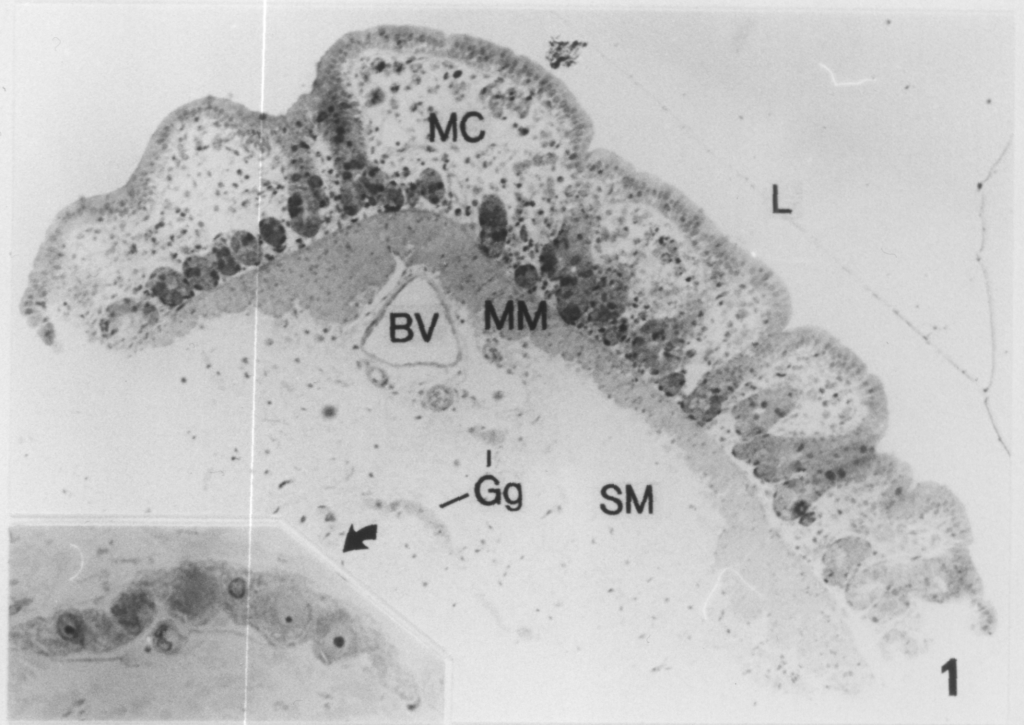


図 1. モルモット近位結腸の粘膜筋板の条片標本を示す光顕写真.
横断像. 外側の縦走筋と輪送金は除外されている. (挿入図は粘膜
下織中の神経節を示す拡大写真)

L: 内腔、MC: 粘膜、MM: 粘膜筋板、SM: 粘膜下織、BV: 血管、Gg: 神経節.
x 125. (挿入図は x500).

研究成果

1. 一般形態

近位結腸壁の横断像を低倍率の光顕写真で図2に示した。腸管の一般的構造を備えていたが、横断像で見ると粘膜、粘膜筋板、粘膜下織よりなる縦ひだが内腔に大きく突出していた。輪状筋は極めて厚く発達している一方、縦走筋は薄く、部位によってはむしろ粘膜筋板よりも薄いぐらいであった。粘膜筋板は、内側の輪走成分と外側の縦走成分の二層で構成されており、とくに縦走成分は良く発達しており、輪走成分が2-4層であるのに対し、縦走成分は十数層の筋細胞で構成されていた(図3)。

粘膜筋板、輪走筋、縦走筋を筋の走行に対してそれぞれ横断(図4-6)、または、縦断(図7-9)して電顕的に比較観察した。基本的にはいずれも平滑筋細胞の特徴を備えていたが、粘膜筋板の平滑筋細胞は2、3の点で特徴的であった。筋細胞の直径は縦走筋に比べてかなり小さかった。粘膜筋板のミトコンドリアは極めて多数観察され、輪走筋では細胞の中央に集合して観察されるのに対して、

図 2. モルモット近位結腸壁の横断像を示す光顕写真。

図 3. モルモット近位結腸の粘膜筋板の拡大写真。

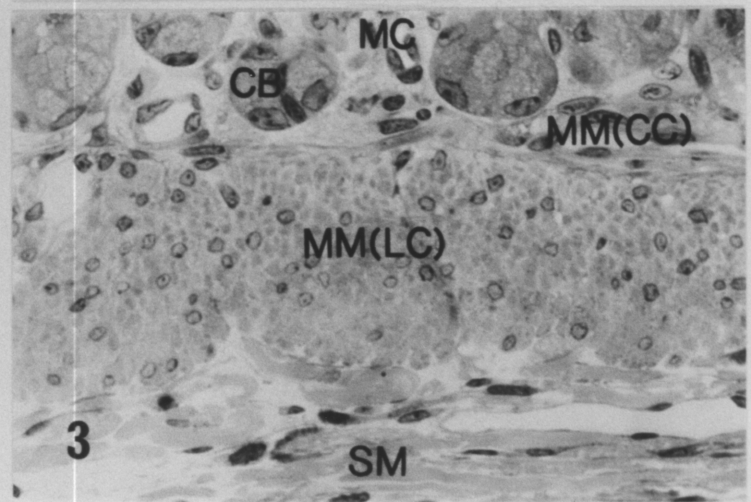
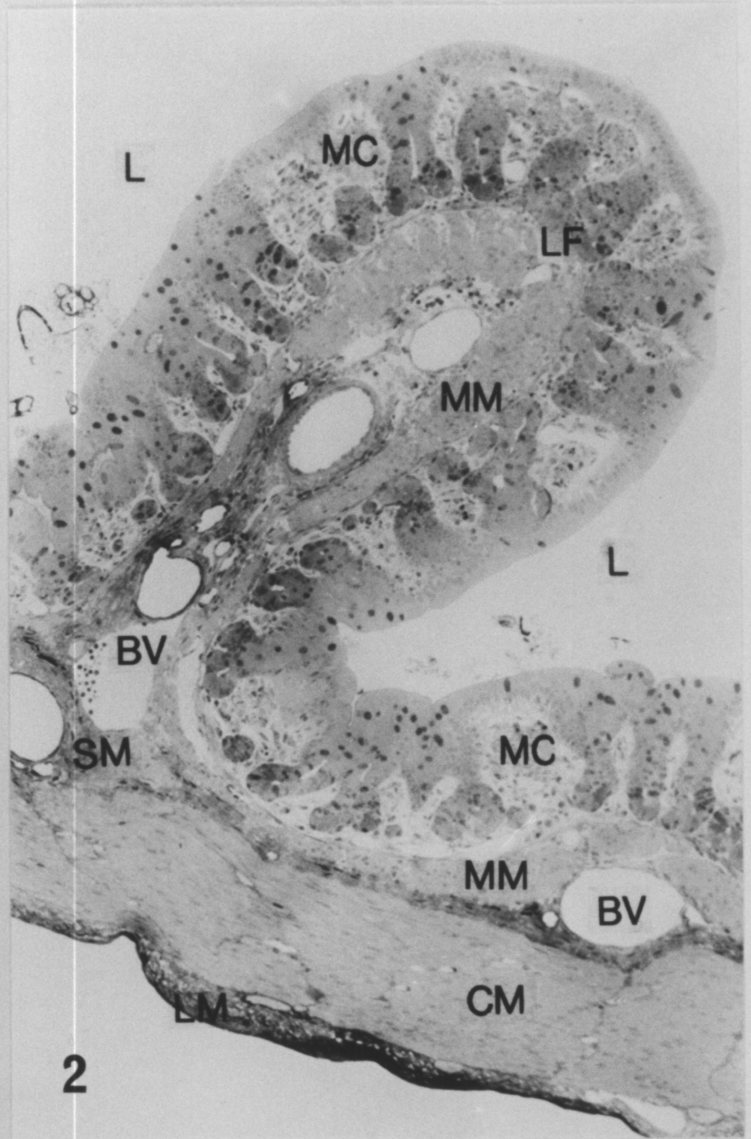
L: 内腔、 LF: 縦ひだ、 MC: 粘膜、 MM: 粘膜筋板、 MM(CC): 粘膜筋板の輪走部、 MM(LC): 粘膜筋板の縦走部、 SM: 粘膜下織、 CM: 輪走筋、 LM: 縦走筋、 BV: 血管、 CB: 陰窩底部。 図2. x125. 図3. x500.

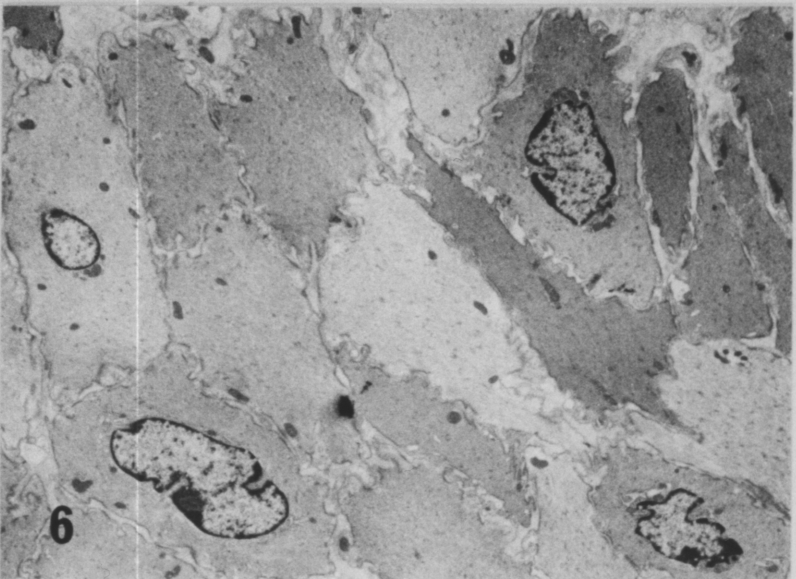
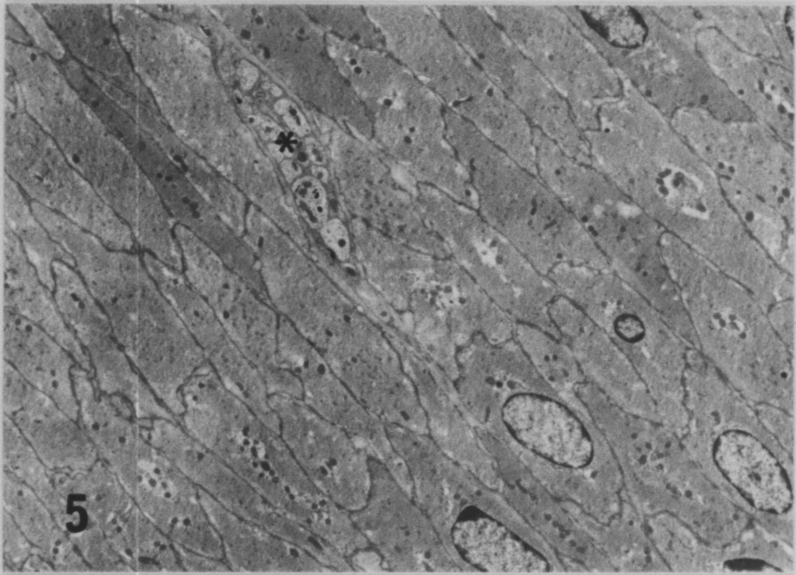
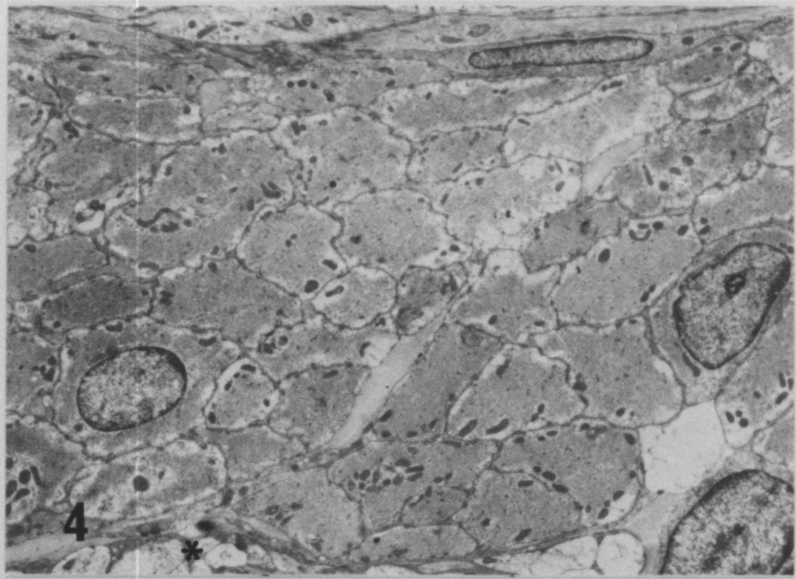
図 4-6. モルモット近位結腸における各筋層の横断像を示す電顕写真。

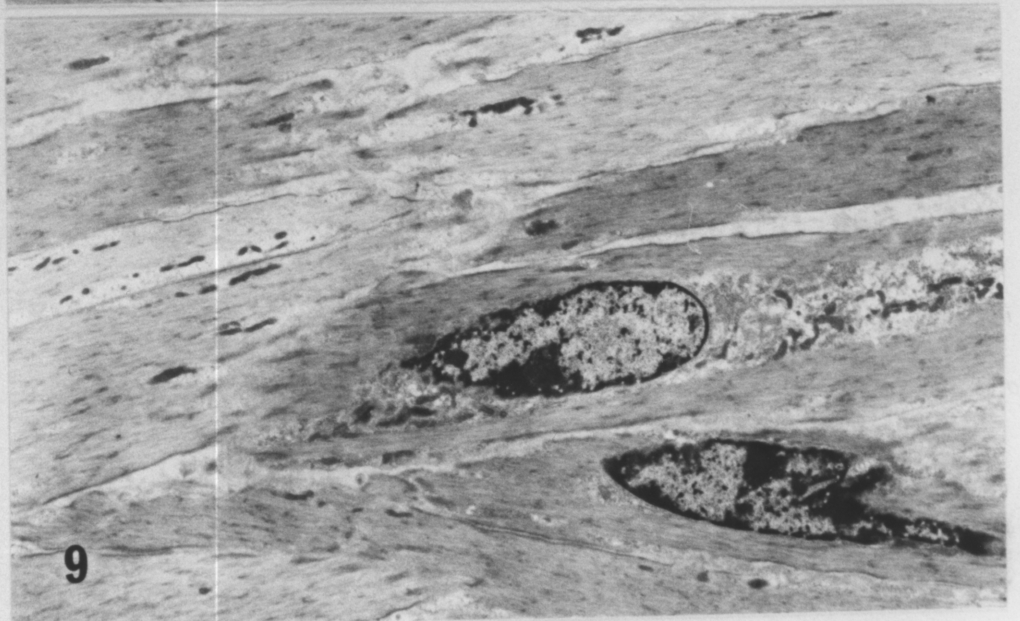
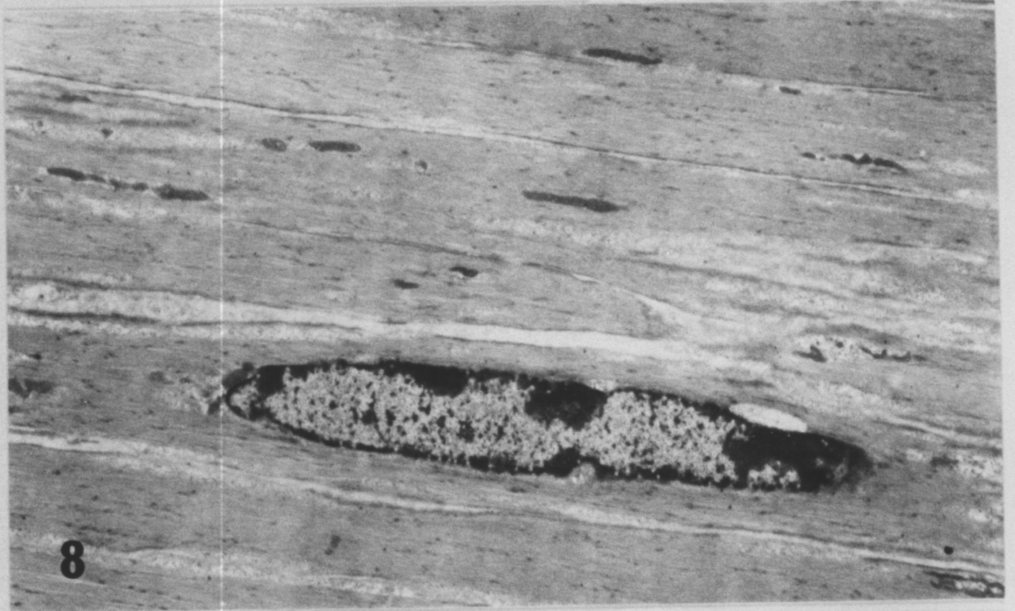
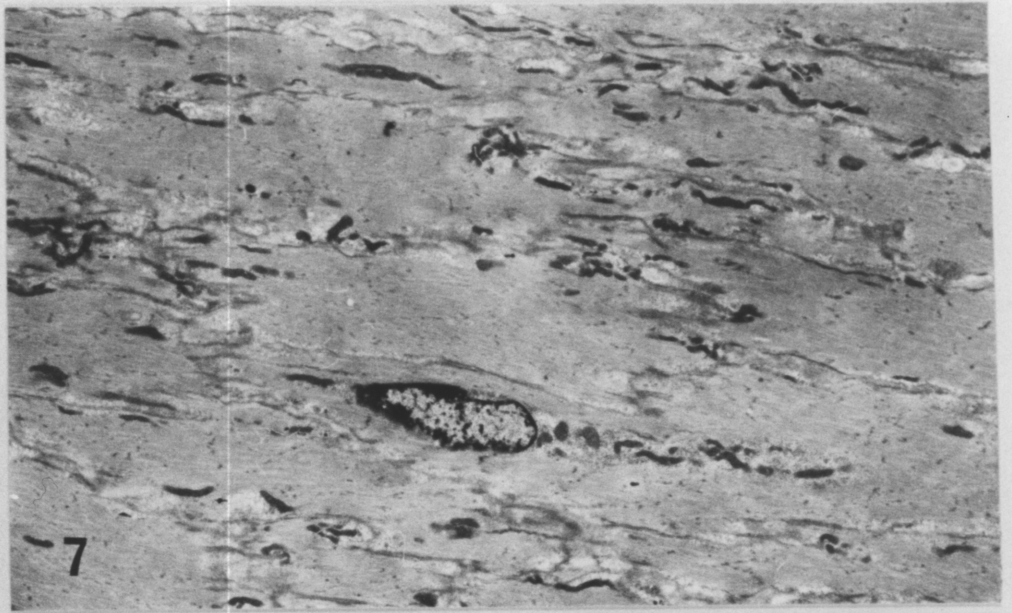
図4: 粘膜筋板、 図5: 輪走筋、 図6: 縦走筋。 *: 神経束。 各x3200.

図 7-9. モルモット近位結腸における各筋層の縦断像を示す電顕写真。

図7: 粘膜筋板、 図8: 輪走筋、 図9: 縦走筋。 各x3200





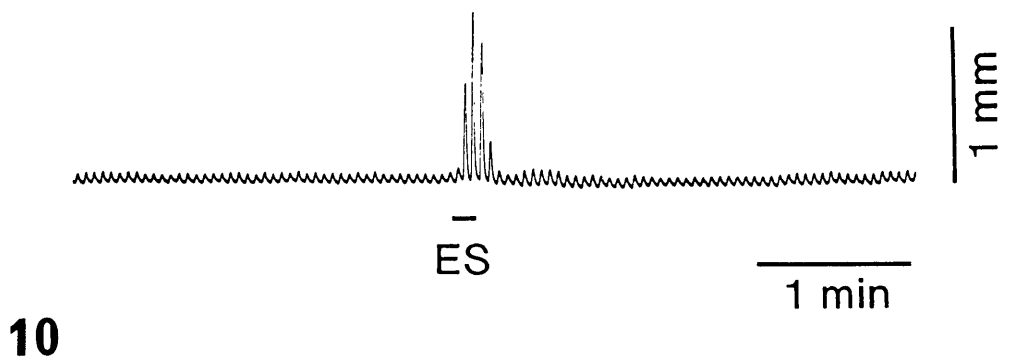


細胞の周辺部で細胞膜に沿うようにして存在していた。神経線維束は輪走筋や縦走筋では筋層間に入り込んでいたが、粘膜筋板では筋層間に入り込むことはまれで、主に粘膜下織側で外側に接して存在することが多かった。こうした粘膜筋板の特徴は、後に述べる本組織の収縮の仕方、すなわち頻回の自発運動の存在、経壁的電気刺激による収縮の際の比較的長い潜時や、最大収縮に至るまでにかかる時間が長い傾向を有すること、などと密接な関係を示すものかもしれない。

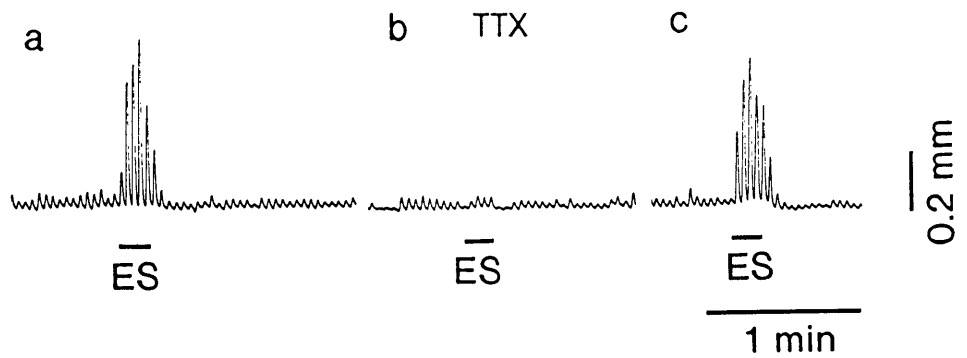
2. 生理学的研究

1) 経壁的電気刺激 (electrical field stimulation)

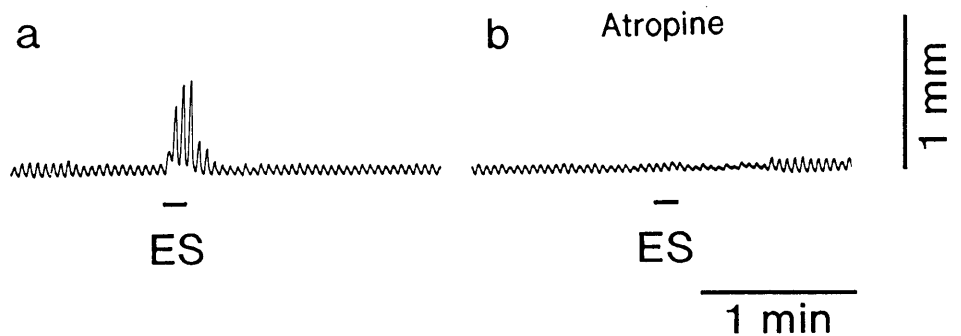
粘膜筋板の条片標本を用いた灌流実験をおこない、収縮の特徴について検討した。本標本は、極めて規則的かつ律動的な自発収縮を示した。その頻度は $18.8 \pm 0.29/\text{min}$ (mean \pm s. e., $n=47$)、振幅は $0.04 \pm 0.004\text{mm}$ (mean \pm s. e., $n=47$)だった。これはイヌの近位結腸の粘膜筋板における自発性収縮 (Angel et al., 1986) よりもかなり頻度が高い。経壁的に10秒間の電気刺激を与えると刺激開始後数秒の潜時の後やや急速に収縮が増大した (図10)。刺激を終了すると収縮は急速に縮小し、自発運動のレベルに復した。刺激の強さを増すにつれて (voltage 5-30 V, duration 0.1-1 msec, frequency 1-40 Hz) この反応は増大したが、刺激の大きさに関わらず、常に相動的 (phasic) な収縮のみがみられた。刺激の持続時間0.2 msec、頻度20 Hz、電圧20-25 Vでほぼ最大の収縮が得られたので、至適刺激として、持続時間0.2 msec、頻度20 Hz、電圧15 Vを選び、以後の刺激はこの条件でおこなった。経壁刺激によるこの収縮増大は、 10^{-6}M のTTXで完全に阻止されたので (図11)、標本内に存在する神経の興奮によって引き起こされたものと考えられる。さらに、 10^{-5}M のアトロピンでもこ



10



11



12

- ☒ 10. モルモット近位結腸の粘膜筋板における自発性収縮と短時間の経壁刺激による収縮増大の典型的一例。
- ☒ 11. モルモット近位結腸の粘膜筋板における短時間経壁刺激による収縮増大におよぼすテトロドトキシン (TTX) の効果。
 a: 正常灌流液、 b: 10^{-8} M TTX 添加、 c: 正常灌流液で30分間洗浄後の反応回復。
- ☒ 12. モルモット近位結腸の粘膜筋板における短時間経壁刺激による収縮増大におよぼすアトロピンの効果。
 a: 正常灌流液、 b: 10^{-5} M アトロピン添加。
- ES: 電気刺激 (electrical field stimulation; duration 0.2 msec, frequency 20 Hz, voltage 15 V) 10秒間。

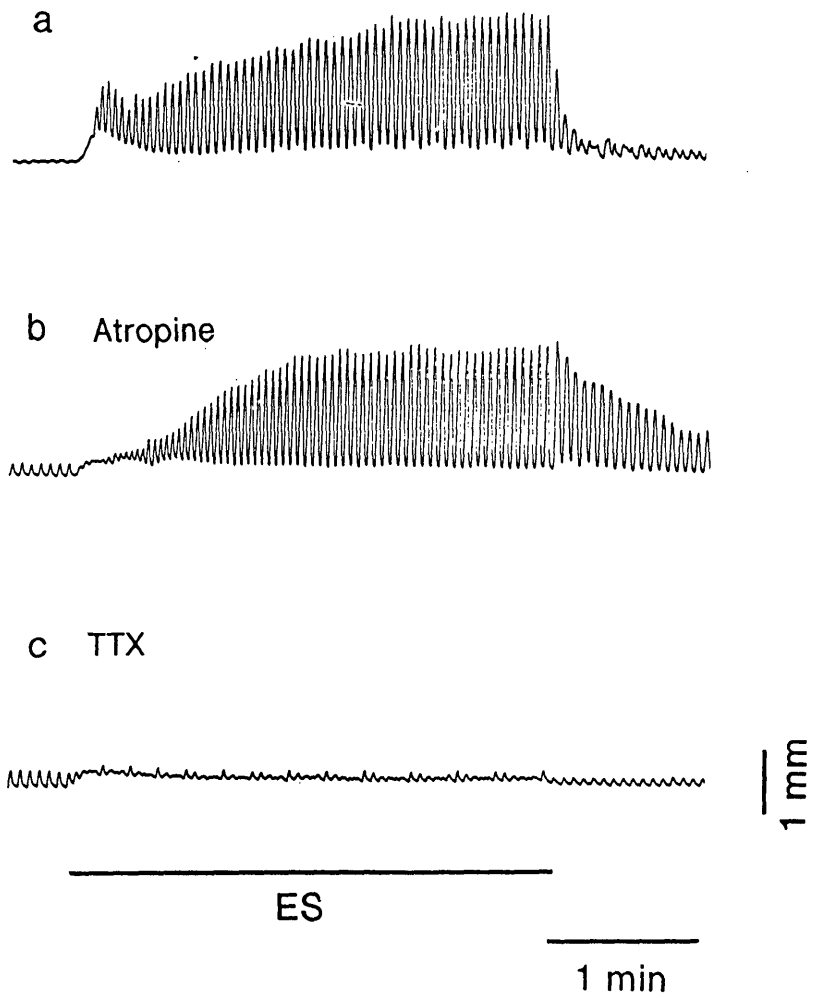
の反応は完全に阻止された（図12）。しかしながら、ときどき刺激の終了後にも収縮増大が十数秒間持続し、小さいながらも二つめのピークを形成することがあった。このことから、時間経過の異なる二つの収縮機構の存在が予想された。

そこで、より長時間の刺激（180秒間）をしてみると、やはり刺激開始後数秒してから急速に収縮が増大したが、一度小さくなった収縮はふたたび増大し、刺激している間持続した（図13a）。刺激をやめると収縮の大きさは急激に自発収縮のレベルに復した。 10^{-5} Mのアトロピン存在下では、最初の急速な収縮増大が消失し、徐々に増大しかつ刺激時間中持続する反応が残った（図13b）。刺激終了後緩やかに自発収縮のレベルに向かって収縮が小さくなった。この刺激終了後の収縮低下の速度の相違から、アトロピン感受性の抑制神経の存在が予想される。初めの急速な反応も、立ち上がりの遅い持続する反応も 10^{-6} MのTTXで完全に阻止された（図13c）。CGやクラレはこの反応に全く影響しなかった。したがって、最初の速い収縮増大はムスカリン様受容体を介したコリン作動性神経によるものであり、その後の収縮増大はそれとは別の神経によるものと考えられる。

2) 神経の分布とニューロペプチドの存在

経壁的電気刺激の実験から、条片標本の収縮にはコリン作動性神経に加えて、アトロピンで抑制されない別の種類の神経が関与していることが明らかになったので、免疫組織化学的方法で結腸壁、特に粘膜筋板に分布する神経を検索した。

初めに、神経に特異的に含まれるタンパク質であるPGP9.5に対する抗体を用いて、近位結腸壁に存在する神経の分布を観察した（図14）。粘膜、粘膜筋板、粘膜下織、輪走筋、および縦走筋に分布する神経線維が陽性反応を示し黒染された。本研究では、主に横断切片を用いたため、多くの神経線維束が黒い小さな円形もしくは楕円形の横



13

図 13. モルモット近位結腸の粘膜筋板における長時間の経壁刺激による収縮増大とアトロピンおよびTTXの効果.

a: 正常灌流液、 b: 10^{-5} M アトロピン添加、 c: 10^{-6} M TTX 添加. ES: 電気刺激. 刺激時間 (180秒間) 以外の条件は前図と同じ.

断面として観察された。時には横走して長く黒染する線維も見られたが、特に輪走筋では筋線維の走行に沿って多数の神経線維が長走するのが観察された。また、粘膜下織中のマイスナー神経叢および縦走筋と輪走筋の間のアUELバッハ神経叢の神経節細胞体も強い陽性反応を示した。粘膜筋板に分布する神経束の多くも、横断面の陽性反応として小さな円形もしくは楕円形に黒染し、粘膜側および粘膜下織側の両側で筋組織に接して観察された（図15）。少数の線維は筋線維束を区分けするように粘膜筋板内に入り込んでいる結合織の中に時に横断面として、また時には長走して存在しているのが観察された。

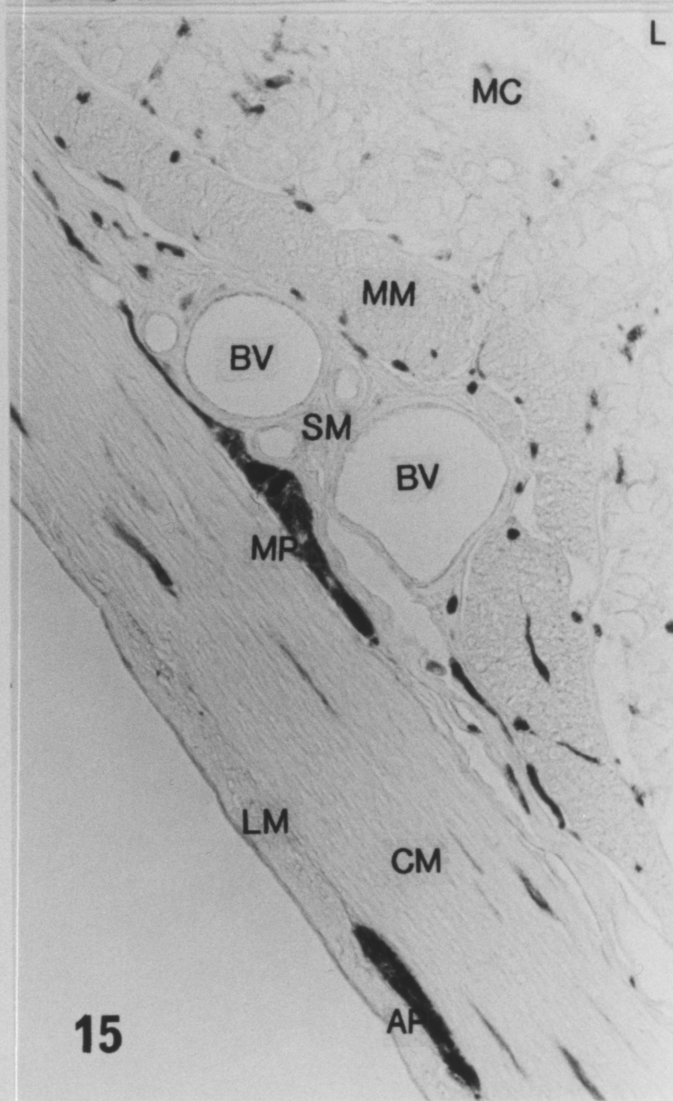
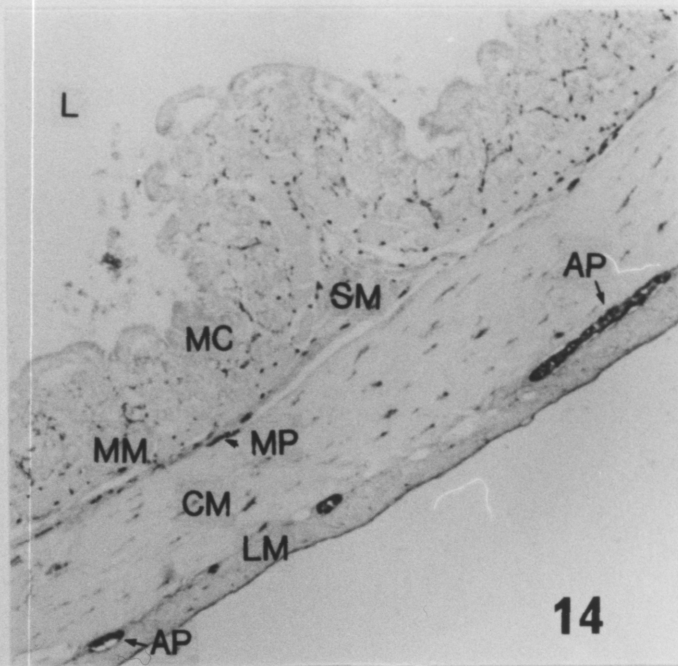
コリン作動性神経の粘膜筋板への分布を、間接的ではあるが、AChEの存在を示す酵素組織化学的方法で確認した。AChE陽性の神経線維は、やはり主に横断面として筋組織の両側に接して存在していたが、時には図16に示されるように、筋組織の間の結合組織の中で横断面として、あるいは長走して存在することもあった。

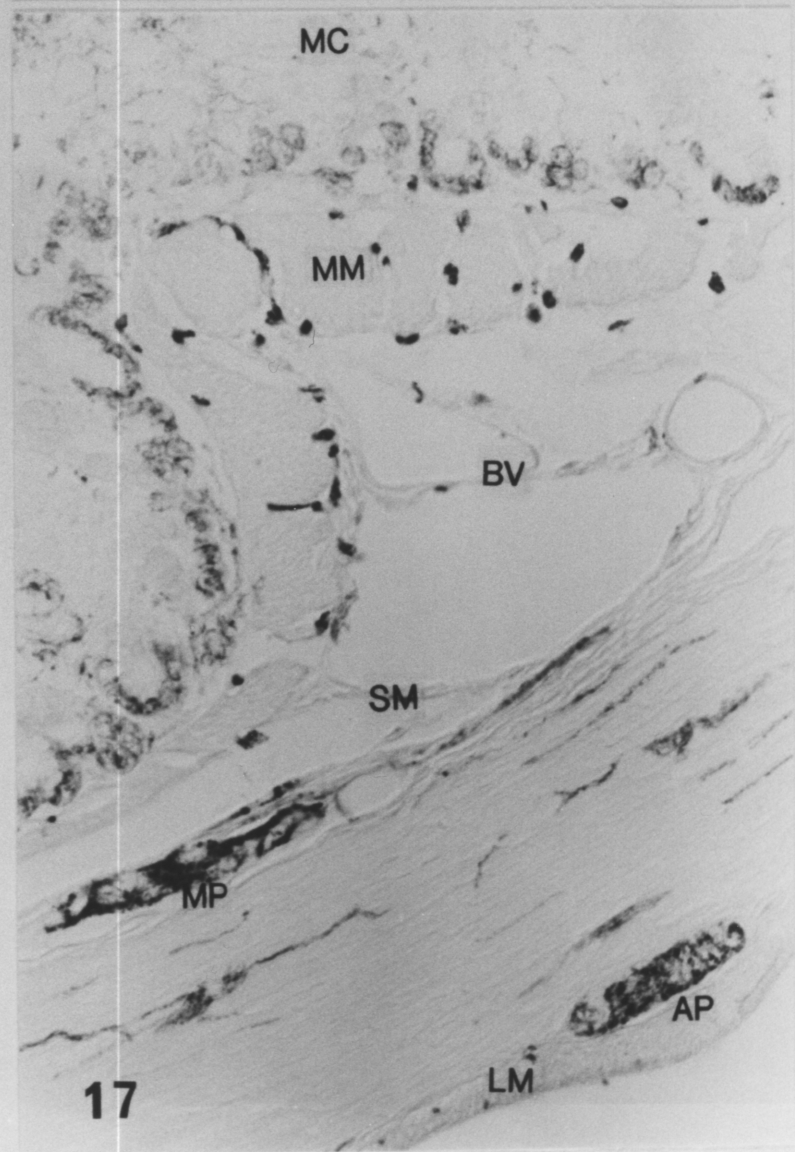
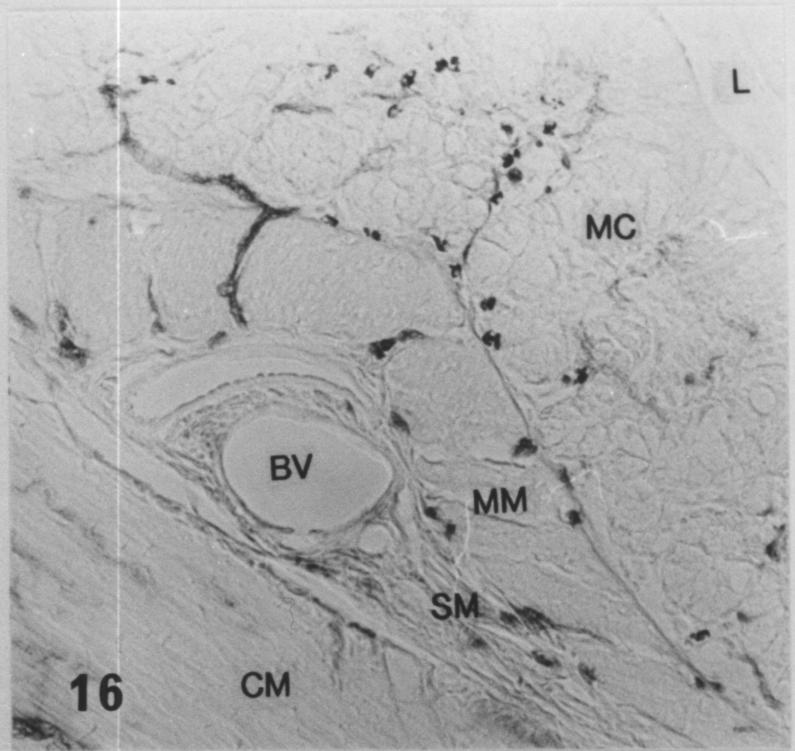
図14と15. モルモット近位結腸における免疫組織化学反応によるPGP9.5陽性神経を示す顕微鏡写真。 図14. X63, 図15. X250.

図16. モルモット近位結腸における酵素組織化学反応によるAChE陽性神経を示す顕微鏡写真。内因性ペルオキシダーゼによる血球の黒染も見られる。 x250.

図17. モルモット近位結腸における免疫組織化学反応によるSP陽性神経を示す顕微鏡写真。 x250.

L:内腔、 MC:粘膜、 MM:粘膜筋板、 SM:粘膜下織、 MP:マイスナー神経叢、 CM:輪走筋、 AP:アUELバッハ神経叢、 LM:縦走筋。





そのほか、これまでに小腸の縦走筋などに分布する神経に含まれ、収縮を起こすことが報告されたいくつかのニューロペプチドに対する特異抗体を用いてそれらが粘膜筋板に分布している神経に存在するかどうかについて調べた。その結果数多くのSP陽性神経（図17）、NK-A陽性神経（図18）、NK-B陽性神経（図19）が粘膜筋板に分布していた。しかしながら、吸収試験の結果は、ここで用いた抗-NK-Aおよび抗-NK-B抗体が互いに交差反応を起こすこと、また、両抗体ともSPをも認識することを示したので3者の神経線維の多寡を把握する事は不可能だった。これらタキキニンを含む神経線維が、粘膜筋板に何らかの効果を及ぼすことはまちがいないと思われた。

一方、Met-Enk陽性神経線維は縦走筋、輪走筋、粘膜下織には多数存在したが、粘膜筋板には全く観察されなかった（図20）。逆に、NPY陽性線維は縦走筋や輪走筋には全く存在しなかったものの、粘膜下織、粘膜筋板、粘膜には多数観察され、粘膜下織にはNPY陽性細胞体も観察された（図21）。

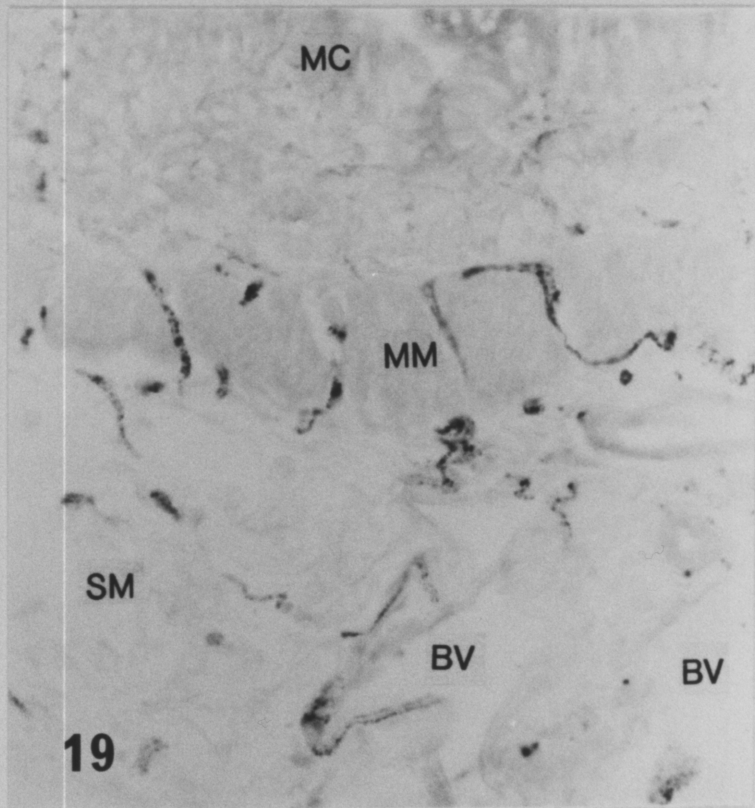
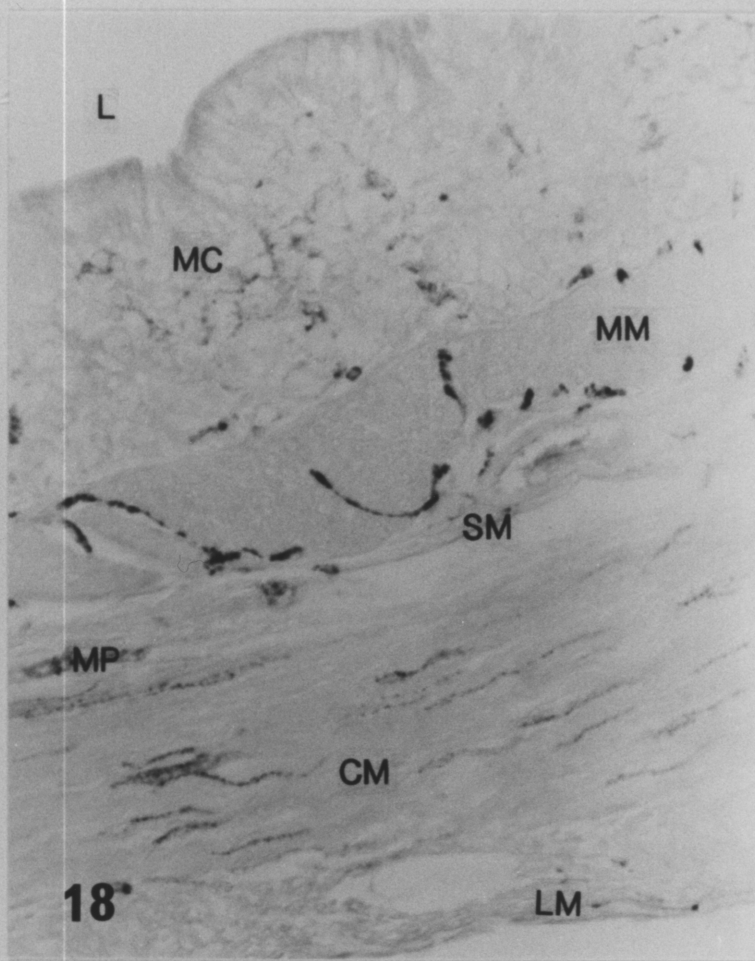
図 18. モルモット近位結腸における免疫組織化学反応によるNK-A陽性神経を示す顕微鏡写真. x250.

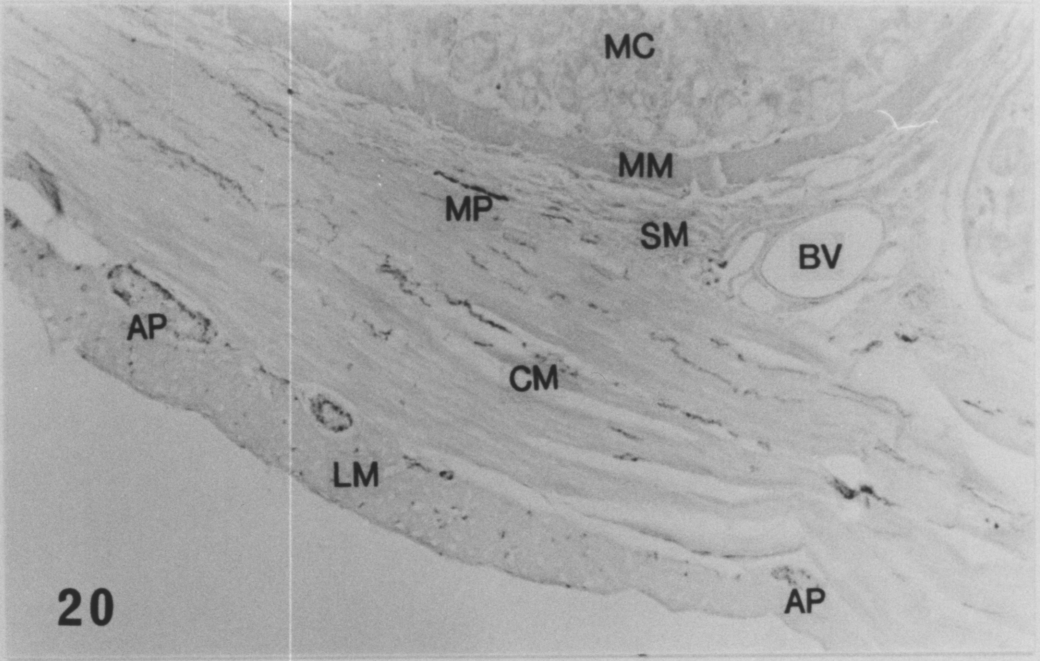
図 19. モルモット近位結腸における免疫組織化学反応によるNK-B陽性神経を示す顕微鏡写真. x250.

図 20. モルモット近位結腸における免疫組織化学反応によるMet-Enk陽性神経を示す顕微鏡写真. x125.

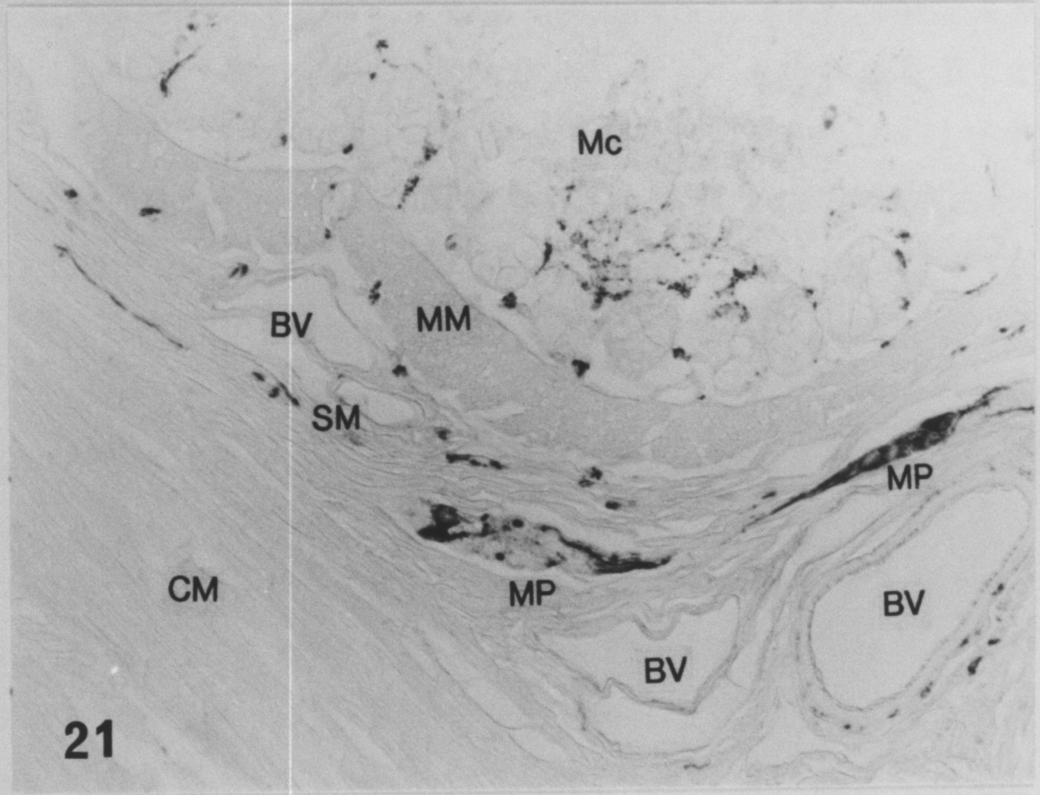
図 21. モルモット近位結腸における免疫組織化学反応によるNPY陽性神経を示す顕微鏡写真. x250.

図中の略語はいずれも図14と図15に示したものと同一。





20



21

「序」で述べたように、ネコの結腸ではノルアドレナリンによって粘膜筋板が収縮するという。確かにDBH陽性神経線維が粘膜筋板にも観察され（図22）、アドレナリン作動性線維の粘膜筋板への分布をうかがわせた。この他、図では示さなかったが、CCK陽性神経も小しながら粘膜筋板に分布していた。

3) 神経内活性物質の作用

免疫組織化学により粘膜筋板の神経線維内に存在が明かとなった活性物質の効果を調べるため、条片標本を灌流し、灌流槽内にそれらの物質を投与した。これらのうち、ACh、SP、NK-A、NK-Bが粘膜筋板の収縮を増大させた。ACh、SPを投与した場合、数秒間自発収縮を抑制した後比較的速い立ち上がりで収縮を増大させたが（図23aとb）、NK-BおよびNK-Aは緩やかな立ち上がりの収縮増大を示した（図23cとd）。これらの収縮は、原則的には相動性（phasic）収縮であったが、高濃度のNK-Aなどを作用させた場合には持続性（tonic）収縮が出現した。アトロピン存在下での経壁的電気刺激による収縮増大の際の立ち上がり（図13b）NK-AおよびNK-Bの立ち上がりの時間経過は類似していた。

これらの物質が、介在する別の神経を経て効果を発揮している可能性があるため、NK-AおよびNK-BをTTX存在下で作用させてみた（図24と25）。いずれも 10^{-6} MのTTXによって抑制されず、むしろやや収縮が増大した。したがって、これらは粘膜筋板の平滑筋そのものに対する直接作用であることは明かである。3種のタキキニンについて用量-反応関係を示したのが図26である。最も低濃度で反応が現れたのはNK-Aであり、最も大きい収縮を示したのもNK-Aであった。SPは 10^{-6} Mという高濃度でも効果は小さかった。立ち上がりの時間経過が経壁刺激と似ていたこと、および用量-反応曲線から、モット近位結腸の粘膜筋板は、NK-2受容体あるいはNK-2とNK-3

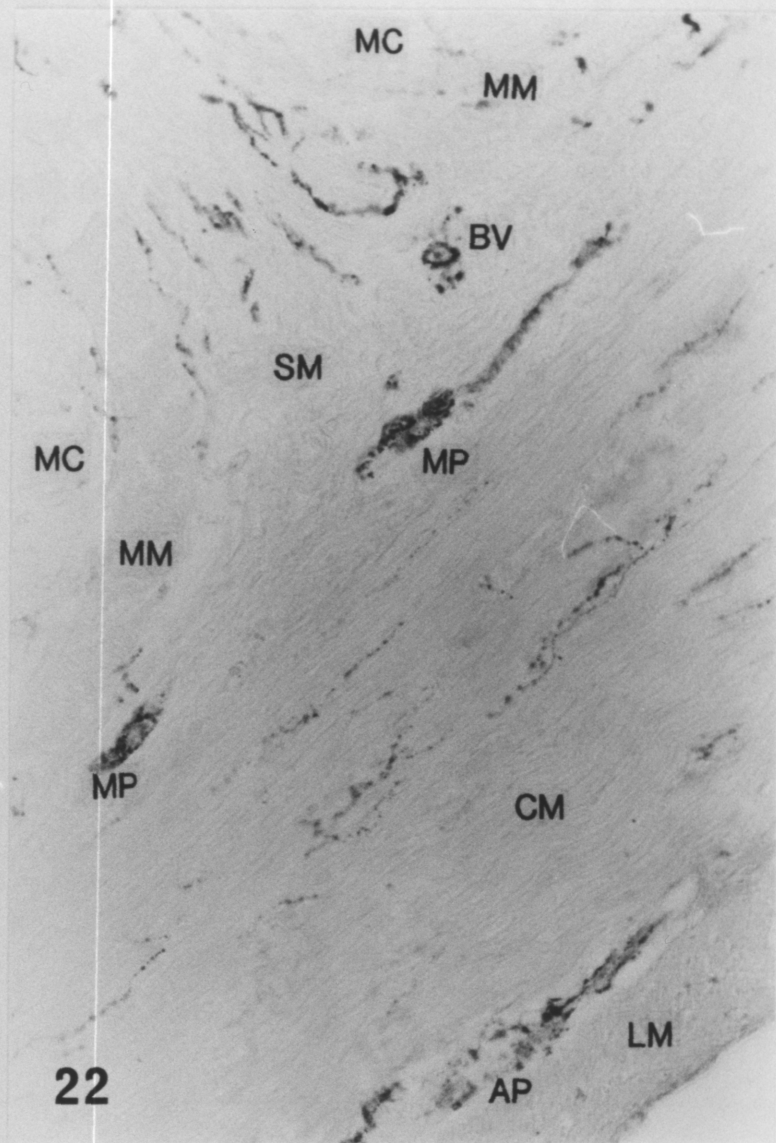


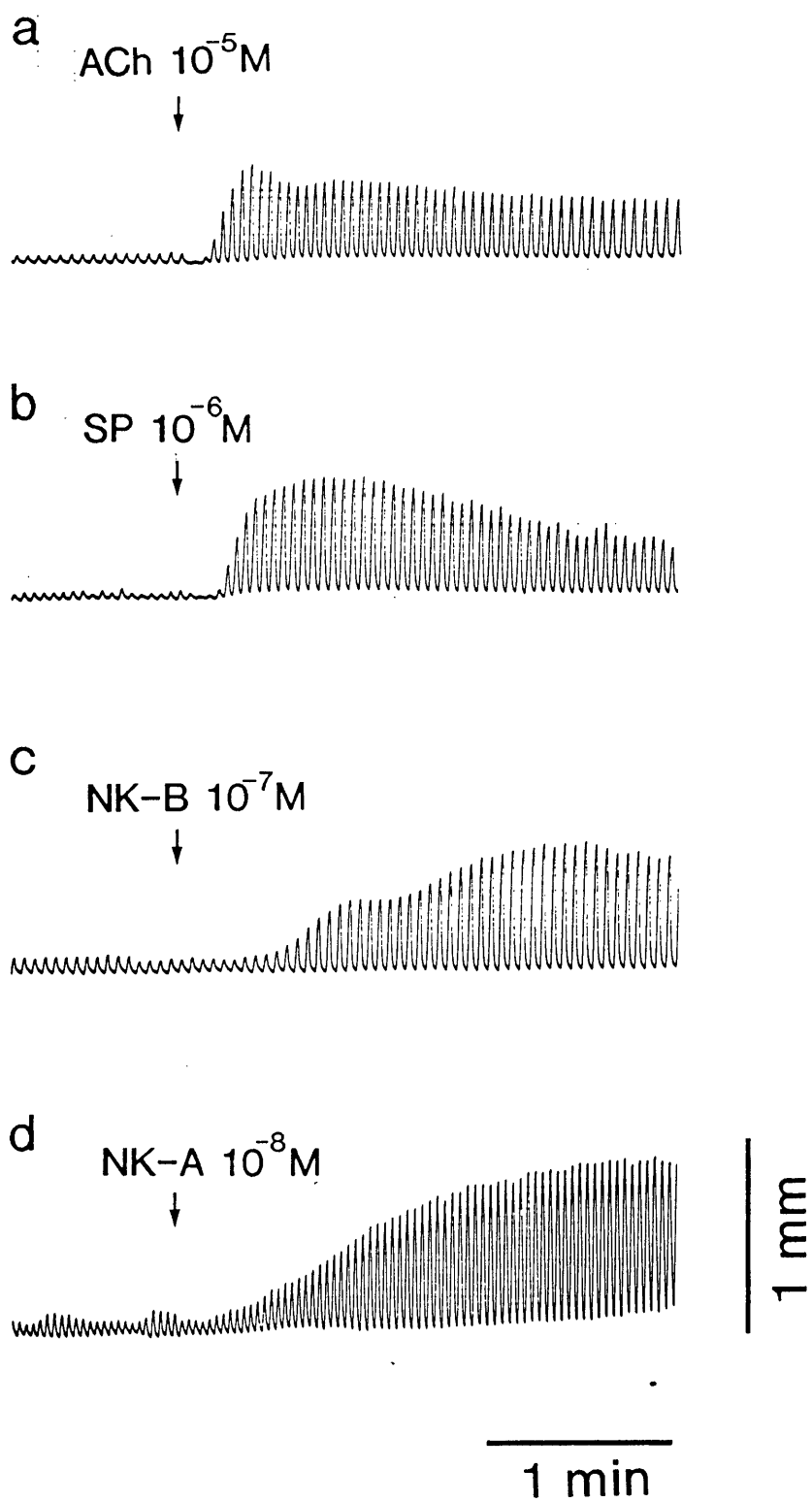
図 22. モルモット近位結腸における免疫組織化学反応による DBH陽性神経を示す光顕写真

図中の略語は前図と同じ. x 125.

両方の受容体を介して収縮反応が起こされていると考えられる。免疫組織化学で粘膜筋板に分布する神経内に存在が示された他の物質のうち、NPY、CCKなどは、この標本には直接の効果を有しなかった。NA₁はむしろ自発運動を抑制した。

図 23. モルモット近位結腸の粘膜筋板におよぼすAChおよびタキキニン類の収縮増大効果を示す一例。

a : ACh 10^{-5} 、 b : SP 10^{-6} M、 c : NK-B 10^{-7} M、
d : NK-A
 10^{-8} M.



23

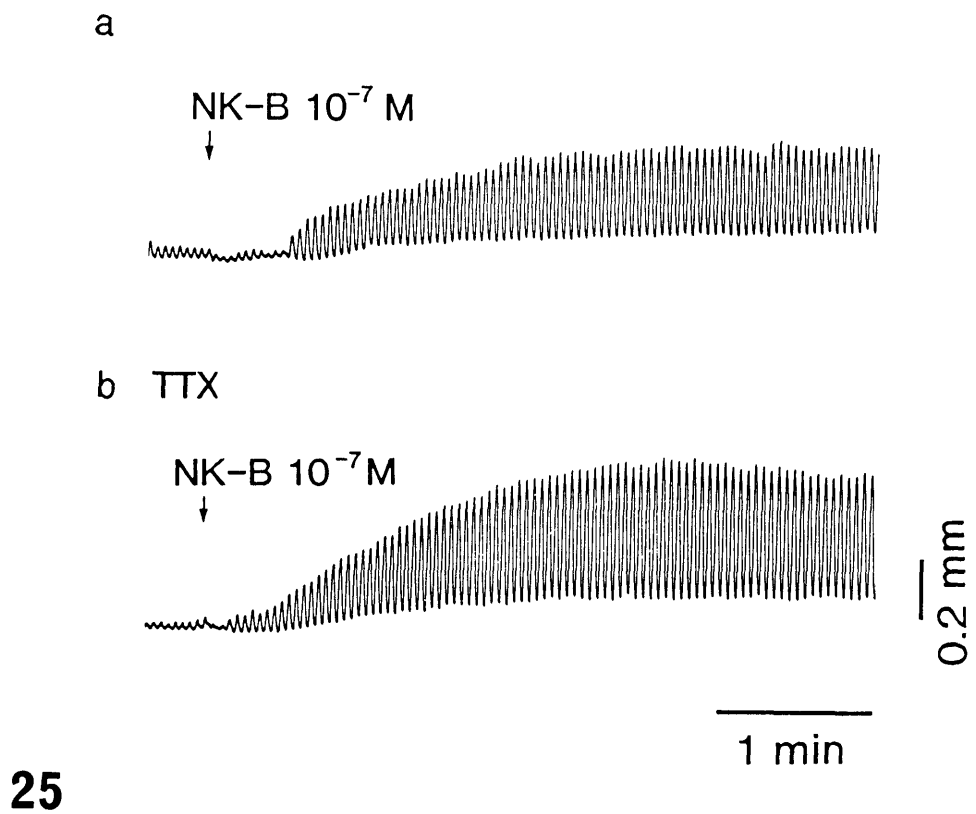
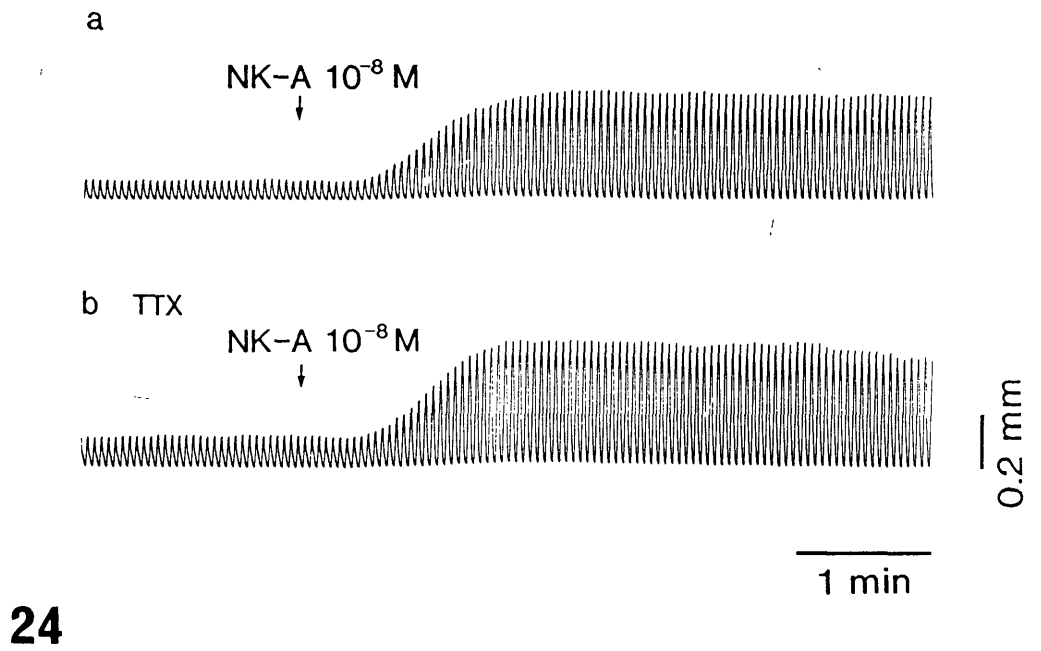
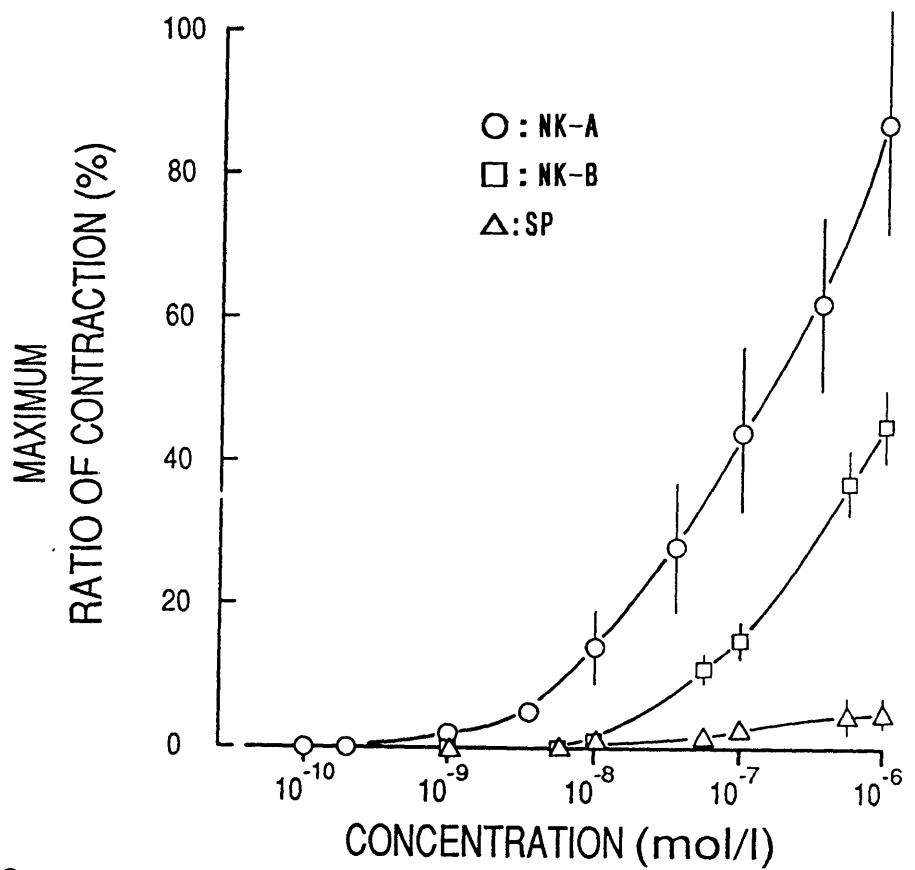


図 24. モルモット近位結腸の粘膜筋板におけるNK-Aの収縮増大作用におよぼすTTXの効果を示す一例.

図 25. モルモット近位結腸の粘膜筋板におけるNK-Bの収縮増大作用におよぼすTTXの効果を示す一例.



26

図 26. タキキニン類の濃度と粘膜筋板の最大収縮との関係。

横軸は各種タキキニンの濃度を、縦軸は高濃度 [K]₀ (56 mM) による最大収縮に対する各種タキキニンによる最大収縮の比率を示す。SP: n=5, NK-B: n=6, NK-A: n=6.

今後の課題

最初の計画について、かなり研究を進めることが出来たが、2つほど実行できず、今後の課題として残った。一つは形態計測による定量的研究である。一個の筋細胞や細胞内小器官について定量的に輪走筋や縦走筋と比較したかったが、細胞の長さを正確に計るのが難しく、時間切れとなってしまった。工夫が必要な点である。もう一つは粘膜筋板の平滑筋細胞そのものの機能的特性に関する研究である。外液カルシウムの影響や高濃度カリウムによる収縮の様子などを検討するに際し、本標本は腸神経叢の影響を考慮せざるを得ず、純粋な形での筋細胞の特性を見ることは難しい。別の実験系すなわち粘膜筋板の筋細胞の培養標本のような系で実験をおこなう必要がある。

そのほか、今回の研究を進める途上で抑制機構の存在を示唆する現象も見られており、その実体と機序についても今後の解明すべき課題である。さらに、粘膜筋板は実際の生体ではどのような運動をしているのか、あるいはその役割は何であるのかといったことも、興味のある点である。実際には、基礎的な知見を積み重ねなければ、こうした本質的なことを解明するのはなかなか難しいと思われる。粘膜筋板に関してその形態的・機能的本質が解明されれば、他の組織すなわち粘膜上皮や外側の筋層との関連についても明らかになってくるものと考えられる。

結論とまとめ

- 1) モルモット近位結腸の粘膜筋板は良く発達しており、部位によっては縦走筋層よりも厚いことがあった。組織学的には一般的な平滑筋組織の特徴を備えていた。ミトコンドリアが多数存在し、しかも細胞の周辺に局在する傾向があった。
- 2) 神経束は輪走筋や縦走筋では筋線維束の間に入り込んでいたが、粘膜筋板では主に筋層の外側に接して存在する傾向があった。
- 3) 粘膜筋板の条片標本を作製し、*in vitro*灌流実験をおこなった。本標本は頻度の高い($18.8 \pm 0.29/\text{min}$)規則的でかつ律動的な自発運動を示した。
- 4) 短時間(10秒間)の経壁的電気刺激により、収縮は比較的急速に増大し、刺激をやめると再び急速にもとに戻った。この収縮増大は 10^{-6} MのTTXで完全に阻止されたので、腸神経系を介した反応である。さらに 10^{-5} Mアトロピン存在下でもこの反応は抑制され、ムスカリン様受容体を介したコリン作動性神経による収縮増大であることが示された。酵素組織化学的研究により、間接的ではあるが、コリン作動性神経の粘膜筋板への分布を確認した。
- 5) 長時間の(180秒間)の経壁的電気刺激では、2相性の収縮増大が出現し、速い立ち上がりをもつアトロピンで遮断される要素と、緩やかに立ち上がりアトロピンで遮断されずに長く続く要素が存在した。これらの収縮は原則として相動性(phasic)収縮であった。両要素ともTTXによって完全に阻止された。
- 6) したがって、粘膜筋板の速い収縮はコリン作動性神経により、長く続く収縮はそれとは別の種類の神経により調節されていると考えられた。
- 7) そのため、免疫組織化学的方法によって腸管の縦走筋などを収縮させるといわれているいくつかのニューロペプチドを含む神経の

存在を検討した。粘膜筋板に最も多数分布していたのは、タキキニンを含む神経であった。そのほかNPY、CCKなどを含む神経線維も観察されたが、Met-Enkを含む神経は粘膜筋板には分布していなかった。

- 8) DBHも免疫組織化学的反応に陽性であったので、アドレナリン作動性神経も存在すると考えられた。
- 9) 免疫組織化学によって粘膜筋板に分布する神経内に存在が示された物質を、灌流条片標本へ適用してその効果を検討した。最も強く収縮をひき起こしたのはNK-Aであり、ついでNK-B、SPの順であった。NPY、CCKなどは効果がなかった。DBH陽性神経によって存在が示唆されたNA₁は、むしろ自発運動の収縮を抑制した。
- 10) これらの結果より、粘膜筋板における立ち上がりの遅いアトロピン耐性の収縮増大はタキキニン、特にNK-A含有神経によりひき起こされている可能性が高まった。
- 11) 結局、モルモット近位結腸の粘膜筋板には、速く立ち上がり短時間で振幅が小さくなるものと、立ち上がりが遅く長く続くものの2相性の収縮増大が存在し、前者はコリン作動性神経により、後者はタキキニン含有神経、特にNK-A含有神経によってひき起こされている可能性が高い。
- 12) 今後は、(1)形態計測により一個の筋細胞についての定量的な特徴(輪走筋や縦走筋と比較して)、(2)抑制の機序、(3)平滑筋細胞としての機能的特徴(単一筋標本を用いて)、(4)生体内における実際の運動、(5)その役割、(6)粘膜や外筋層などとの機能的関連性、といった点を解明する必要がある。

謝辞

稿を終えるにあたり、有益な助言を賜った旭川医科大学解剖学第一講座 小野一幸教授、佐藤洋一助教授、大森行雄博士、岡崎国立共同研究機構生理学研究所 菅野富夫教授、亘 弘教授、桑原厚和博士の各位に深甚の謝意を表します。また、技術的な協力を頂いたことに対し、旭川医科大学解剖学第一解講座 佐々木孝志、羽沢和美、岡崎国立共同研究機構生理学研究所 佐治 俊幸、小木曾 昇の技官各位に心より謝意を表します。

参考文献

- Angel, F., Go, V. L. W. & Szurszewski, J. H. Innervation of the muscularis mucosae of canine proximal colon. *J. Physiol.* 357: 93-108 (1984)
- Forssell, G. Studies of the mechanism of movement of the mucous membrane of the digestive tract. *Am. J. Roentgenol Radium Ther.* X: 87-104 (1923)
- Furness, J. B. & Costa, M. The enteric nervous system. Churchill Livingstone, London (1987)
- Gunn, J. A. & Underhill, S. W. F. Experiments on the surviving mammalian intestine. *Quat. J. Exp. Physiol.* 8: 275-296 (1915)
- Hambleton, B. F. Note upon the movement of the intestinal villi. *Am. J. Physiol.* 34: 446-447 (1914)
- King, C. E. & Arnold, L. The activities of the intestinal mucosal motormechanism. *Am. J. Physiol.* 59: 97-121 (1922)
- King, C. E. & Church, J. G. The motor reaction of the muscularis mucosae to some drugs. *Am. J. Physiol.* 66: 428-436 (1923)
- King, C. E. & Robinson, M. H. The nervous mechanism fo the muscularis mucosae. *Am. J. Physiol.* 143: 325-335 (1945)
- King, C. E., Glass, L.C. & Townsend S. E. The circular components of the muscularis mucosae of the small intestine of the dog. *Am. J. Physio.* 148: 667-674 (1947)
- Onori, L., Friedmann, C. A., Frigo, G. M. and Tonini, M. Effects of catecholeamines, nicotine, acetylcholine and potassium on the mechanical activity of the colonic muscularis mucosae in the cat. *Digest. Dis.* 16:689-692 (1971)

Wells, H. S. & Johnson, R. G. The intestinal vili and their circulation in relation to absorption and secretion of fluid. Am. J. Physiol. 109:387-402 (1934)