

早稲田大学審査学位論文(博士)

博士(人間科学)学位論文

モルモット食道筋層間神経叢の組織化学的
ならびに電子顕微鏡的研究

1999年1月

早稲田大学大学院人間科学研究科

森川 俊一

博士（人間科学）学位論文

①

モルモット食道筋層間神経叢の 組織化学的ならびに電子顕微鏡的研究

1999年1月

早稲田大学大学院人間科学研究科

森川俊一

指導教員 小室輝昌 教授

目次

	頁
緒言	
はじめに	1
研究の背景	2
食道の筋層	2
筋層間神経叢一般に関する従来の見解	3
食道筋層間神経叢	4
消化管におけるNOの役割	4
研究の目的	5
材料および方法	7
透過型電子顕微鏡観察	7
組織化学染色	8
全載伸展標本によるNADPH-d組織化学染色	8
全載伸展標本によるNADPH-dおよびAChE組織化学二重染色	8
NADPH-d反応を用いた透過型電子顕微鏡観察	9
免疫組織化学	9
全載伸展標本によるPGP9.5およびS-100免疫組織化学染色	10
全載伸展標本によるNADPH-dおよびPGP9.5(免疫)組織化学二重染色	11
結果	11
モルモット食道筋層間神経叢の二次元的構造	12
神経節細胞および神経膠細胞の分布	13
神経節の微細構造	14
NADPH-d陽性神経節細胞の細胞学的特徴	16
NADPH-d陽性神経線維の横紋筋支配	17
NADPH-d陽性神経節細胞の微細構造	17
考察	18
食道筋層間神経叢の組織学的特性	18

食道筋層間神経節の微細構造	19
食道におけるNO作動性ニューロンの意義	23
NADPH-d反応の電子顕微鏡的検索	25
まとめ	26
参考文献	28
付図説明	35

緒言

はじめに

食道(esophagus, oesophagus)は咽頭と胃をつないで食物塊を運ぶ管であり、ヒトでは第六頸椎の前で咽頭に続いて始まり、胸部では従隔を通り、横隔膜を貫いて第十一胸椎の前左側で胃噴門に達して終わる全長約25cmの円筒状の器官である。食道はその走行の部位によって、頸部・胸部・腹部の三部に区分されるが、気管・大動脈に接して伴行、胸腹部を下行し、多くの臓器に支配の枝を送る左右迷走神経の本幹を外壁に絡ませることは、重要な解剖学的特徴である。

組織学的には、食道壁は一般の消化管と同じく、粘膜・粘膜下結合組織・筋層を含むが、最外層は漿膜で覆われておらず、疎性結合組織の外膜に移行する。

食物塊の胃への輸送に際しては、食道筋層は蠕動運動を行うため、重力の補助のない仰臥位でも食物の胃への輸送が可能である。また、食道下端部には、高い筋緊張が維持されている下部食道括約機構(Lower Esophageal Sphincter: LES)と呼ばれる部位があり、胃から食道への内容物の逆流を防止している。蠕動運動により食道体部の筋の収縮波が下降していくのに呼応してLESは弛緩し、食物塊を速やかに胃へ通過させる。

このように、食道は能動的に食物塊の輸送を行い、逆流を防止する機能を持つが、その機能の異常は様々な様態を示し、時には致命的な疾患として現れる。例えば、食道アカシア(無弛緩症)では下部食道の蠕動運動およびLESの弛緩が欠如するため、患者は食物摂取が極めて困難になる。この疾患では、下部食道やLES部の筋層間神経叢神経節細胞の減少や消失、あるいは変性が認められることが組織学的に知られている。また、LESの逆流防止機能に障害のある胃-食道逆流症患者では、食道重層扁平上皮が胃の円柱上皮に病的に置き換わってしまうBarret食道と呼ばれる症状が、往々、認められ、食道癌に発展する要因となっている。また、食道下端部粘膜固有層のよく発達した静脈叢は門脈血行障害に起因する静脈瘤の好発部位であり、しばしば致命的な大出血をおこすことが知られている。

以上のような二、三の例からも分かる通り、食道は単純に見える円筒状の管ではあるが、正常な運動機能の維持は極めて重要であり、その細胞組織学的構成についても多くの研究課題を残している。

研究の背景

食道の筋層

消化管の大部分を占める下部消化管では筋層が平滑筋線維のみで構成されるのに対し、食道筋層では横紋筋線維を含むことが大きな特徴である。

食道筋層に占める横紋筋の割合は動物種によって異なるが、ヒトでは上部1/4が横紋筋のみによって占められ、次の1/4では横紋筋と平滑筋が混在しはじめ、下部の1/3では平滑筋のみによって占められる。一般に哺乳類では横紋筋・平滑筋混合型の筋層を有するが、ヒトのように食道のかなり高位で平滑筋が出現するものは一部の霊長類や有袋類のオポッサム等に限られ、大多数の哺乳類では食道筋層のほぼ全長に横紋筋線維が分布している。その理由として、食道蠕動運動を重力の補助なしに行う姿勢の動物においては平滑筋線維主体の筋層では嚥下困難をきたしやすく、収縮力の強い横紋筋線維が必要であることが挙げられており、特に反すう胃をもつ動物(ウシ・ヒツジ等)においてはその必要性も高まるであろうと推測されている(Christensen and DeCarle, 1974)。一方、両生類・爬虫類・鳥類の食道筋層はすべて平滑筋線維で占められ、哺乳類でも単孔類のカモノハシは平滑筋のみの食道筋層をもつことが知られている(藤田と藤田, 1992)。

ところで、脊椎動物の食道の原型は内輪走・外縦走筋層ともに平滑筋線維のみから成るものであることが比較解剖学的に示唆されているが(Oppel, 1897)、最近になって、マウス食道筋層において、形態形成の過程で平滑筋細胞に完全に分化した細胞がさらに横紋筋細胞へと分化する可能性が報告されており(Patapoutian et al., 1995; Sang and Young, 1997)、発生学的見地からも食道筋層横紋筋線維の存在は興味深い話題を含んで

いるといえる。

筋層間神経叢一般に関する従来の知見

消化管壁に内在する神経叢はRemak(1852)により初めて記載されたが、筋層間神経叢(myenteric plexus, Auerbach's plexus)に関する最初の詳細な報告は、門下のAuerbach(1862ab)によってなされた。筋層間神経叢は、神経節細胞の細胞体が存在する神経節とそれらを連絡する結合線維束による網状構造であり、口腔および咽頭を除く消化管のほぼ全域において、内輪走筋と外縦走筋との間に二次元的な広がりをもって分布するものである。この神経叢は、同じくRemak門下のMeissner(1857)によって詳細に報告された粘膜下神経叢(submucous plexus, Meissner's plexus)と併せ、交感・副交感神経系に次ぐ第三の自律神経系と総称された「腸管神経系(Enteric Nervous System)」(Langley, 1921)を構成する。腸管神経系全体では、脊髄の全ニューロン数に匹敵する $10^7 \sim 10^8$ の規模の数の神経節細胞が存在すると算定されており(Furness & Costa, 1980)、交感神経や副交感神経の影響を受けながらも、消化管支配において中心的役割を果たすと考えられている。

小腸の一部が刺激されると、刺激部位より口側で管腔の収縮が、また肛門側で弛緩がそれぞれ起こり、内容物が口側から肛門側へと輸送される(腸管の法則: the law of the intestine: Bayliss & Starling, 1899)。この筋運動は腸壁に内在する神経節細胞群の形成する局所回路により調節されるため、腸を切り出して外来性神経支配を遮断しても消失しない(Langley, 1921; Furness et al., 1994による総説参照)。この局所回路では筋層間神経叢が主役を果たしており、現在まで、筋層間神経叢に関する多くの研究が報告されているが、電子顕微鏡的研究からは筋層間神経節の組織構築が他の末梢神経節と異なり、中枢神経系に類似することが示唆されている(Gabella, 1994による総説参照)。また、神経節細胞には中枢神経系と同様の種々の神経伝達物質が含まれ、消化管運動が従来考えられてき

たようなアドレナリン作動性・コリン作動性神経の古典的な二重支配の枠組みを越えた、複雑な制御を受けることも証明されている(Furness et al.,1994による総説参照)。

食道筋層間神経叢

食道平滑筋部における筋層間神経叢の生理的役割については、神経節細胞が迷走神経の中継ニューロンとして機能し、食道平滑筋を支配することや(Roman & Gonella, 1987による総説参照)、下部消化管と同様、多くの神経伝達物質を含むこと(Christensen & Fang,1994)が明らかとなっている一方、食道横紋筋部では迷走神経による横紋筋の直接支配が定説となっていたため(Roman & Gonella, 1987による総説参照)、内在性神経節細胞の生理的意義についての解析は進まず、ごく最近まで、知覚性(Diamant, 1989)、粘膜支配(Asaad et al., 1983)、横紋筋支配(Gruber, 1968, 1978; Toyama et al., 1975)等の可能性が示唆されてはきたものの、Neuhuberら(1994)があらためて注目するまで深く追及されることはなかった。多くの哺乳類の食道筋層は噴門端近くまで横紋筋線維で構成されており、このほぼ全域にわたって筋層間神経叢が存在することを考えるとき、その存在意義がごく最近まで十分に吟味されなかったことは驚きに値しよう。

消化管におけるNOの役割

1980年代に、気体である一酸化窒素(nitric oxide: NO)が、血管平滑筋における内皮由来弛緩因子(endothelium derived relaxing factor: EDRF)の本体であると報告されたのをきっかけとして、神経伝達、細胞毒性による防御等、その生体内での様々な生理機能が、数多く報告された(平田, 1996による総説参照)。

一方、消化管壁内の局所回路には、平滑筋細胞に抑制性に働く非アドレナリン・非コリン作動性(non-adrenergic, non-cholinergic : NANC)の神経伝達物質の存在が以前から指摘されてきたが、最近、VIPやATP等続くNANC神経伝達物質の候補として、

NOに注目が集まった(Brookes, 1994 および Konturek & Konturek, 1995による総説参照). 現在までに, 小腸・大腸の筋層間神経節においてNO合成酵素(nitric oxide synthase : NOS)に免疫反応を示す神経節細胞やNOS免疫活性と相関性を示すNADPH-diaphorase (NADPH-d) 反応陽性の神経節細胞の存在することが報告され, それらが局所回路において下行性の運動ニューロン(Costa et al., 1992), あるいは介在ニューロン(Llewellyn-smith et al., 1992; Young et al., 1995)として働く可能性が示唆されている.

食道平滑筋が下部消化管と同様にNO作動性ニューロンの調節を受けることは, オポッサム(Tøttrup et al., 1991; Yamato et al., 1992)やイヌ(De Man et al., 1991)を用いた生理学的実験において, NOによるLES平滑筋の弛緩作用が記録されることから示唆されている. その一方で, 近年, マウス食道横紋筋部の筋層間神経叢に多くのNOS/NADPH-d(免疫)陽性神経節細胞が存在すること(Grozdanovic, 1992), また, ラット食道横紋筋の運動終板にNOS/NADPH-d(免疫)陽性神経終末が付随して観察されること(Neuhuber et al., 1994, Wörl et al., 1994)等が相次いで報告された. これらの研究は, 骨格筋細胞の弛緩をNOが促進するとする生理学的研究(Kobzik et al., 1994)やNO作動性神経が骨格筋に神経筋結合部を形成するとする報告(Oliver et al., 1996)を考え併せると, 食道においてNO作動性ニューロンが平滑筋部のみならず横紋筋部においても重要な役割を担う可能性を示唆するものである.

研究の目的

以上, 述べたように, 食道横紋筋部においても筋層間神経叢の果たす機能的役割の重要性が考えられるが, その構造に関する情報については, 組織学的構築・微細構造ともに断片的な観察があるのみであり(Irwin, 1931; Samarasinghe, 1972; De Souza et al., 1988; Neuhuber, 1987), 基本的特徴の理解についても充分とは言い難い. 殊に微細構造に関しては, 食道筋層間神経節が交感神経節と似た組織構築を持つとする報告があるもの

の(De Souza et al., 1988), 実際に食道筋層間神経節のみが, 筋層間神経節に共通の組織構築, すなわち, 中枢神経系に似た組織構築を持たない, とする結論には更に慎重な検討が必要と思われる。

そこで本研究では, 先ず, 食道のほぼ全長に横紋筋線維をもつモルモットを材料として, 食道横紋筋部筋層間神経叢の構造上の基本的特徴を明らかにするため, ①食道筋層全載伸展標本による免疫組織化学染色を用いた神経叢の二次元的構造, 神経節細胞・神経膠細胞の分布についての検索と, ②透過型電子顕微鏡を用いた神経叢の微細構造の検索を企図した。また, 前述のように食道平滑筋部・横紋筋部の両部で機能する可能性のあるNOを手がかりとして, 食道筋層間神経叢による食道横紋筋支配の可能性についても検討した。食道のNO作動性ニューロンについては前述のマウス(Grozdanovic et al., 1992)を含め, オポッサム(Fang & Christensen 1993, Christensen & Fang 1994)・ネコ(Fang & Christensen 1993)・モルモット(Furness et al., 1994)等, 幾つかの動物種での報告があるが, 食道全長に沿ったNO作動性ニューロンの詳細な分布および細胞学的特徴, あるいはNO作動性神経終末の食道壁内の分布については充分には明らかにされていない。そこで, 本研究では, ③NOS免疫反応と相関性を示すNADPH-d組織化学染色を用い, モルモット食道のNO作動性神経節細胞の組織学的検索を行うこととした。

さらに, 下部消化管においてはNO作動性ニューロンの介在ニューロンとしての役割が示唆されていることから(Llewellyn-Smith et al., 1992; Young, et al., 1995), モルモット食道筋層間神経叢におけるNADPH-d反応陽性神経節細胞のシナプス連絡や神経終末の微細構造上の特徴についても検討するため, ④NADPH-d組織化学標本の電子顕微鏡的観察も併せて行った。

材料および方法

本研究で行った全ての実験材料には、雌雄を含む体重250～350gのHartley系成熟モルモットを用いた。

透過型電子顕微鏡的観察

電子顕微鏡的観察に際しては、食道全長の大半を占める頸胸部と下部食道括約機構(LES)を含む腹部食道に区別して標本を作製した。

エーテル麻酔下に上記の食道各部を動物より切り出し、プラスチック板上で中等度に伸展し、0.1Mリン酸緩衝液(pH7.4)で緩衝した4%パラホルムアルデヒド・3.5%グルタルアルデヒド混合液にて室温で10分間固定した。その後、同じ組成の固定液でさらに4℃、180分間固定、0.1Mリン酸緩衝液で洗浄(10分×3回)後、1%四酸化オスミウム(pH7.4, 0.1Mリン酸緩衝液に溶解)にて4℃、120分間後固定した。蒸留水洗浄(10分×3回)および酢酸ウラン飽和水溶液にて120分間ブロック染色後、エチルアルコール上昇系列で脱水し、エポキシ樹脂に包埋した。その後、Reichert型超ミクロトームで準超薄切片を作製、トルイジンブルー染色を施し、筋層間神経節の位置を確認して電子顕微鏡観察に供した。電子顕微鏡試料には同ミクロトームで超薄切片を作製、酢酸ウランおよびクエン酸鉛にて電子染色し、JEM1200EX II 透過型電子顕微鏡で観察を行った。

神経節に占める神経節細胞および神経膠細胞の割合は、筋層が横紋筋線維のみで構成される食道頸胸部と平滑筋線維を含む腹部よりそれぞれ11個の神経節モニタージュ写真を作製し、核の認められる細胞体のみの数を累計して算出した。神経節表面に占める神経要素の割合は、上記試料より特に固定の良好な神経節を両部より3個ずつ選び、最終倍率15000倍のモニタージュ写真を作製、キルビメーター(UCHIDA)を用いて、神経節表面の全長とそれに占める神経要素(神経節細胞細胞体、樹状突起、軸索)の合算値をそれぞれ計

測して算出した。

組織化学染色

全載伸展標本によるNADPH-d組織化学染色

エーテル麻酔下に切り出した食道全長に直径2.5mmのプラスチック棒を通して約75mmの長さに伸張，両端を結さつし，0.1Mリン酸緩衝液(pH 7.4)で緩衝した4%パラホルムアルデヒド溶液で4℃，10分間固定した。その後，腹側から管腔を開き，プラスチック棒を取り除いて同じ組成の固定液で4℃，さらに90分間固定した。pH7.4の0.01Mリン酸緩衝生理食塩水(phosphate buffered saline : PBS)で洗浄後(10分×3回)，筋層の全載伸展標本には，実体顕微鏡下で粘膜と縦走筋あるいは輪走筋を剥離し，どちらか一方の筋層に筋層間神経叢の付着した標本を作製した。また，粘膜下結合組織の全載伸展標本には，粘膜から上皮を剥離した標本を作製した。その後，それぞれの全載伸展標本をゼラチンを塗付したスライドグラスに載せ，ろ紙で余分な水分を拭きとり室温で急速風乾した。風乾後，試料を1mg/ml β -NADPH(オリエンタル酵母)，0.25mg/ml nitro-blue tetrazolium(NBT : 和光)，および0.5% Triton-X 100を含む0.1Mリン酸緩衝液(pH7.4)に37℃で20分間浸漬し，遮光し，緩やかに振盪して反応を行った。反応はPBSに浸漬して停止し，さらにPBSで洗浄(10分×3回)，水溶性封入剤Mount Quick "Aqueous" (Daido)にて封入し，顕微鏡観察に供した。

全載伸展標本によるNADPH-dおよびAChE組織化学二重染色

前述のNADPH-d組織化学染色全載伸展標本の一部は，運動終板描出のため，さらに0.1Mクエン酸ナトリウム，30mM硫酸銅，5mMフェリシアン化カリウム，0.1M酢酸緩衝液(pH5.5)で構成されるacetylcholin esterase(アセチルコリンエステラーゼ : AChE)反応液(Karnovsky & Roots, 1964)で37℃で60分間，緩やかに振盪して反応を行った。反応はPBSに浸漬して停止し，さらにPBSで洗浄後，顕微鏡試料とした。

NADPH-d反応を用いた透過型電子顕微鏡観察

エーテル麻酔下に、動物の左心室より4℃に冷却したPBS100mlを注入し、続いて、同じく4℃に冷却した500mlの0.1Mリン酸緩衝液(pH 7.4)で緩衝した4%パラホルムアルデヒド+0.4%グルタルアルデヒド混合固定液で灌流した。その後、食道全長を切り出し、同じ組成の固定液で4℃、さらに90分間固定、PBS洗浄(10分×3回)を経て、ビブラトームを用いて食道各部の遊離切片(50~70 μ m)を作製した。その後、Wolfら(1992)の手続きに準じ、切片試料を1.2 mM b-NADPH(オリエンタル酵母)、50 μ lのジメチルホルムアミドに溶解した1.2 mM 2-(2'-benzothiazolyl)-5-styryl-3-(4'phthalhydrazidyl) tetrazolium chloride (BSPTクロライド)(Sigma)を含む0.1Mリン酸緩衝液(pH 8.0)にて37℃で90分間、遮光し、緩やかに振盪してNADPH-d反応を行った。反応はPBSに浸漬して停止した。1%四酸化オスミウム(pH7.4, 0.1Mリン酸緩衝液に溶解)にて4℃、120分間後固定した後、前述の方法に準じ、電子顕微鏡試料を作製した。

免疫組織化学染色

免疫組織化学染色においては、実験全体を通して重複する手法・処方が多いため、簡潔な記述を期し、共通する部分は予め以下にまとめる。

本研究で使用した全ての一次抗体は、0.2%ウシ血清アルブミン(bovine serum albumin: BSA)、0.1%Triton-X 100を含むPBSで希釈し、最終濃度0.05%になるようアジ化ナトリウムを加えた。また、全ての二次抗体は、0.2%BSAのみを含むPBSで希釈した。抗原抗体反応の時間については、実験全体を通して、全載伸展標本では一次抗体が4℃で48時間、二次抗体が4℃で12時間、凍結切片標本ではそれぞれ4℃で24時間、室温で3時間行った。免疫組織化学染色を施した全ての試料において、抗原抗体反応に先立ち、抗体の浸透性を高めるため、全載伸展標本は4℃で12時間、凍結切片標本は4℃で20分間0.3%Triton-X100を含む0.01Mリン酸緩衝生理食塩水(phosphate buffered saline: PBS)

に浸漬した。また、染色での非特異反応を防止するため、全載伸展標本は4℃で12時間、凍結切片標本は4℃で20分間4%ブロッカー(大日本製薬)を含むPBSに浸漬した。

全載伸展標本によるPGP9.5およびS-100免疫組織化学染色

神経節細胞および神経膠細胞の描出に当たっては、それぞれにたいする特異性が知られているPGP 9.5およびS-100免疫組織化学染色を用いた。

エーテル麻酔下に切り出した食道全長を直径2.5mmのプラスチック棒に通して約75mmの長さに伸張、両端を結さつし、0.1Mリン酸緩衝液(pH7.4)で緩衝した4%パラホルムアルデヒド+0.2%ピクリン酸混合液4℃、60分間固定した。その後、腹側から管腔を開き、プラスチック棒を取り除いて同じ組成の固定液で4℃、さらに12時間固定した。100% dimethyl sulfoxide(DMSO)で固定液を透徹洗浄(10分×3回)、さらにDMSOをpH 7.4のPBSで洗浄した。その後、実体顕微鏡下で粘膜を剥離、縦走筋あるいは輪走筋どちらか一方の筋層に筋層間神経叢の付着した全載伸展標本を作製し、ゼラチンを塗付したスライドグラスに載せ、ろ紙で余分な水分を拭きとり室温で急速風乾した。風乾後、神経節細胞の描出には1:100に希釈した抗ヒトPGP 9.5マウスモノクローナル抗体(Biogenesis)、神経膠細胞の描出には1:200に希釈した抗ウシS-100ウサギポリクローナル抗体(Dako)にて反応を行った。PBS洗浄後、PGP 9.5抗体で反応させた試料は1:40に希釈したFITC標識抗マウス Ig ウサギポリクローナル抗体(Dako)、抗S-100抗体で反応させた試料は1:20に希釈したfluorescein isothiocyanate(FITC)標識抗ウサギ Ig ブタポリクローナル抗体(Dako)にて反応をおこなった。その後、PBSで洗浄、蛍光減衰防止のため VECTERSHIELD (Vector)にて封入し、蛍光顕微鏡で観察を行った。

神経節細胞密度の算出には、5匹の動物から作製したPGP 9.5免疫染色標本を用い、後述の食道4部域について25mm²(5mm X 5mm)の範囲を計測した。

全載伸展標本によるNADPH-dおよびPGP9.5(免疫)組織化学二重染色

前述の方法で作製した筋層の全載伸展標本を、1:100に希釈した抗ヒトPGP9.5マウスモノクローナル抗体(Biogenesis)にて反応させた。PBS洗浄後、試料を1:40に希釈したFITC標識抗マウスIgウサギポリクローナル抗体(Dako)にて反応させ、PBSで再洗浄後、前述の方法でNADPH-d反応を行った。PBS浸漬にて反応停止および洗浄後、蛍光減衰防止のためVECTERSHIELD(Vector)にて封入し、蛍光顕微鏡で観察を行った。

NADPH-d陽性細胞の割合は、3匹の動物の食道の各領域から無作為に選んだ神経節において、PGP9.5陽性総神経節細胞数とNADPH-d陽性細胞数をそれぞれ蛍光顕微鏡下に観察、合計1495の神経節細胞を計測した。この割合と前述のPGP9.5染色による各部の神経節細胞密度を用いてNADPH-d陽性細胞密度を算出した。数値は平均値 ± 標準誤差で表わした(standard errors: SEM)。分散分析後、Dunn-Bonferroniのt検定を行い、 $P < 0.05$ の場合に有意とした。

神経節細胞細胞体の大きさの測定は、3匹の動物から、レベルIおよびIV(後述)の染色性の良い神経節から、最低100個の陽性細胞を選び、KD4300デジタルジグタレットとMEAS1計算ソフト(いずれもGraftec engineering, Japan)を用い、600倍に拡大した写真からコンピュータ上(NEC PC-9801 RX)で計測した。

結果

モルモット食道壁は、内腔より順に、粘膜、粘膜下結合組織、筋層および外膜によって構成されており(図1)、筋層はほぼ全長が横紋筋線維より成るが、胃噴門端に近い5mm程の部分から平滑筋線維が混在しはじめ、噴門に移行する直前には平滑筋線維が大部分を占めるようになる。筋層の厚さは、食道全長の大部分を占める頸胸部を通じておよそ400 μm 前後であるのに対し、横隔膜下の腹部食道ではおよそ700 μm である。

切片標本では、筋層間神経叢は内輪走・外縦走筋層の間に散在する小さな細胞塊として観察されるが、食道管壁を開いて作製した全載伸展標本では、細胞塊は互いに連絡をもつ疎で不規則な二次元的網目構造として観察される(図3,4)。

モルモット食道筋層間神経叢の二次元的構造

本研究ではNO作動性ニューロン描出のためにNADPH-d組織化学染色を採用したが、後述するようにモルモット食道筋層間神経叢には多数のNADPH-d陽性神経節細胞が含まれるため、この染色法でも、食道の全長を通じて神経叢の網状構造がPGP9.5免疫染色と同様、明瞭に観察された。神経要素全体を染め出すPGP9.5免疫染色では、多数の細かな神経線維が描出され、却って一次神経叢(primary plexus)の枠組みの観察には明瞭さを欠くことから(図3,4)、各領域の一次神経叢の網状構築についてはNADPH-d染色標本に従って記載することとした。

全載伸展標本の(免疫)組織化学染色により、神経叢は食道の起始部から胃噴門端まで連続して描出されるが、食道筋層間神経叢の網状構造には、領域による相違が認められたため、観察の正確を期するよう以下に述べる食道の領域別に記載する。

食道の全長を3等分し、噴門側1/3の部分についてはさらに2等分した(図2)。すなわち、頸部食道に当たる口側1/3(レベルI)、上胸部食道に当たる中央部1/3(レベルII)、胸部食道下端に当たる噴門側1/3の上部(レベルIII)、腹部食道に当たる噴門側1/3の下部(レベルIV)の各4領域である。

さて、筋層間神経叢の一次神経叢は、神経節細胞の細胞体が存在する神経節とそれらを連絡する神経線維の束である結合線維束より成るが、モルモット食道筋層間神経叢では、全長を通じて疎で不規則な網状構造から成っている。特にレベルIでは神経節細胞が神経叢内に散在性に分布するため神経節と結合線維束との境界は必ずしも明瞭ではなかった(図5a)。食道全長を通じてこの部位が最も不規則な網目構造を呈し、神経節の大きさも

神経節細胞1個を含むものから100以上を含むものまで、かなりの幅があった。

レベルⅡの神経叢では、神経節細胞の散在する様子はレベルⅠと類似するものの、結合線維束の交点に神経節が位置する傾向が認められた(図5b)。

レベルⅢでは、神経節細胞は神経節内に密集し、神経節と結合索との分離が明瞭に認められた。神経節は通常、結合線維束の交点に位置して観察され、10から20の神経節細胞を含むほぼ均一な大きさを示した(図5c)。

レベルⅣでは、神経叢の網状構造、神経節の大きさについてはレベルⅢと類似性を示すが、神経節と結合索との分離はレベルⅢに比べ一層明瞭になり、結合線維束も太く発達して観察された(図5d)。

神経節細胞および神経膠細胞の分布

PGP9.5免疫染色により、モルモット食道筋層間神経節では、神経節細胞が比較的疎に分布する様子が認められたが、この傾向は食道上部(レベルⅠ,Ⅱ)の神経節、特にレベルⅠでは最も顕著に認められた(図6a)。しかしながら、食道下部(レベルⅢ,Ⅳ)の神経節では、この傾向は弱まり、特にLESを含むレベルⅣでは神経節細胞が神経節内に密集する傾向が認められた(図6b)。

このような傾向を、単位面積(1cm^2)あたりの神経節細胞密度について計測してみると、密度はレベルⅠ,Ⅱ,Ⅲ,Ⅳの部域において、 $2915 \pm 83 / \text{cm}^2$, $2857 \pm 68 / \text{cm}^2$, $3609 \pm 78 / \text{cm}^2$, $3748 \pm 67 / \text{cm}^2$ とそれぞれ算出され、食道下部(レベルⅢ,Ⅳ)で神経節細胞が有意に多い($P < 0.05$)ことが明らかとなった。

神経膠要素を描出するS-100免疫染色標本を観察すると、神経節内の空間は、神経膠細胞によって占められ(図7a,b)、食道上部で密に、下部では疎に観察された。(図7b)。

神経節の微細構造

超薄切片によりモルモット食道筋層を電子顕微鏡で観察すると、筋層間神経叢を構成する神経節は、食道全長を通じて、内輪走、外縦走筋層間の結合組織中に明瞭に認められた(図8)。食道筋層間神経節は小型で、通常、数個の細胞集団として観察されるが、モニタージュ写真を用いた、切片上、核の認められる細胞体の計測では、一神経節あたり3~5細胞のものが多く、10細胞以上が観察されることは稀であった。

神経節を連絡する結合線維束には、無髄線維に混じって多くの有髄線維も観察されるが(図9)、有髄線維は、神経節の辺縁部に侵入する軸索膨大部としても観察された(図10)。このような有髄線維では膨大部にも、侵入前の有髄線維にも、豊富なミトコンドリアが認められたことは注目に値する。

さて、筋層間神経節は神経節細胞、神経膠細胞およびそれらの突起が20~50nm程度の狭い細胞間隙で複雑に絡み合った緻密な組織構築すなわち神経網(neuropil)より構成される(図8,11)が、神経節細胞は核小体の明瞭な明るい大きな核により、電子密度の高い異型染色質を多く含み小さな核をもつ神経膠細胞と容易に識別される(図8)。神経節表面は連続する基底膜によって覆われているが、交感神経節等に認められる結合組織性の被膜は認められず、線維芽細胞様細胞によって不連続に囲まれて観察される。この細胞は通常2~3層観察されるが、食道では5層程度になることも稀ではない。神経節周辺の間質には、豊富な毛細血管の分布が観察されるが、神経節内部への血管や結合組織性要素の侵入は認められない。神経節細胞の細胞体は種々の細胞内小器官に富み、多数のミトコンドリア、良く発達した粗面小胞体、ゴルジ装置等によって占められる(図11)。

シナプス小胞を多量に含む軸索膨大部は比較的少く、シナプス小胞の形態からみた神経終末の型としては、小型の扁平小胞(25-40 x 50-80 nm)と少数の大型有芯小胞(80-120 nm)を混在させるもの(図12a)、小型の丸い無芯小胞(直径約25-60nm)と少数の大型有芯小胞(90-120nm)を含む神経終末が主に観察された(図12b)。シナプスとして明

瞭に認められる膜の分化をともなう終末では、小さな神経突起に接着するものが多く、細胞体に接着する axo-somatic synapse はごくまれであった。また下部消化管でよく知られている神経節表面に位置する神経終末もごく稀にしか観察されなかった(図12b)。また、膜の分化は見られないものの、大型の有芯小胞(90-120nm)のみを含む神経終末も時折観察された(図12c)。

ところで、モルモット食道筋層間神経節は非常に不規則な輪郭を示し、外表面には複雑な陥入部が多く認められた(図13)。このような陥入部の結合組織性要素は、切片上、しばしば神経節の内部に観察されるが(図14)、こうした結合組織性要素が神経節外部に連続する陥入部であることは、神経節を覆う基底膜により明瞭に限界されていることから判別される(図13,14)。

モルモット食道筋層間神経節における最も顕著な特徴として、神経膠細胞の発達を挙げることができる。神経膠細胞は数の上でも多く観察され、食道頸胸部(レベルI, II, III)におけるモニター写真を用いた、核を含む細胞体の計測では、神経膠細胞：神経節細胞の比率はおよそ5：1であった(神経膠細胞41個、神経節細胞8個)。この傾向は噴門側に向かって減少し、腹部食道(レベルIV)の筋層に平滑筋線維を混在させるLES近傍では、細胞の数は減少し、神経膠細胞の神経節細胞に対する比率は2：1であった(神経膠31個、神経節細胞18個)。また、この神経膠細胞は構造の上でも他の部にはみられない特異性を示し、多数の層板状突起の形成が認められた(図16,17)。層板状突起は、往々、神経節表面に広がり、神経要素が神経節表面に接するのを制限するかのよう観察される(図15)。そのため、神経要素の神経節表面に占める割合は小さく、食道頸胸部(レベルI, II, III)におけるモニター写真による計測では、その割合は全表面積の約15%と算定された。しかしながら、腹部食道(レベルIV)の、筋層に平滑筋線維を混在させるLES近傍では層板状突起はほとんど観察されず、従って神経要素が神経節表面に占める割合も大きくなり、神経節全表面積の約30%であった。

また、食道頸胸部では層板状突起は神経節内部にも認められ、神経線維を同心円状に取り囲んで観察された(図16,17)。このような傾向は、神経線維が比較的疎に分布する神経節の部位でよく認められる一方、多数の神経線維が密集する部位では、シュワン細胞に支持される無髄線維束に類似した様子で、線維は個々に包まれて観察された(図13)。

NADPH-d陽性神経節細胞の細胞学的特徴

NADPH-d およびPGP 9.5(免疫)組織化学の二重染色標本では、透過光と蛍光励起光を適度に調節することにより、NADPH-d陽性および陰性神経節細胞を一つの視野で同時に観察することができる(図17a)。陰性細胞は神経要素を標識するPGP 9.5免疫染色で明るい蛍光色を呈する細胞として認められ、陽性細胞はNADPH-d反応による反応生成物が細胞体部の蛍光色を隠すことから暗調の細胞として観察される。このような観察手法により、NADPH-d陽性細胞の分布を神経叢網状構造に対応して計測した。

レベルIでは、NADPH-d陽性神経節細胞は陰性のものをやや上回り(63% ± 2% : 266/420)の割合で観察された(図17b)。この部位の大多数の陽性細胞(約80%)は小型(細胞体面積 $450 \mu\text{m}^2$ 以下)に類別され、中型($450 \sim 650 \mu\text{m}^2$)のものは約18%、大型のもの($650 \mu\text{m}^2$ 以上)は約3%であった。

レベルIIでは陽性細胞の割合は $58 \pm 2\%$ (210/363)と計測され、レベルIとほぼ同様の傾向を示した(図17c)。レベルIII(図17d)では陽性細胞の割合は $73\% \pm 2\%$ (268/369)と上部に比べやや増加の傾向にあった。また、この部位から大型の細胞($650 \mu\text{m}^2$ 以上)もわずかながら増加していた。

レベルIVでは陽性細胞の割合は $84\% \pm 2\%$ に達し、4部域を通じて最も高い数値を示した(図17e)。また、上部に比べて大型の陽性細胞($650 \mu\text{m}^2$ 以上)が多く混在するようになり、その割合は陽性細胞全体の約37%であった(図17e)。また、この部位の太く発達し

た結合線維束中には、4部域を通じて最も多数のNADPH-d陽性線維が認められた。

陽性細胞の割合と全神経節細胞密度から、食道管腔を切り開いた伸展標本における単位面積あたりのNADPH-d陽性細胞密度を算出すると、その値はレベルI, II, III, IVの各部域において、 $1840 \pm 52/\text{cm}^2$, $1652 \pm 39/\text{cm}^2$, $2621 \pm 57/\text{cm}^2$, $3148 \pm 57/\text{cm}^2$ とそれぞれ算出され、食道下部（レベルIII, IV）でNADPH-d陽性神経節細胞が有意に多いことが明らかとなった($P < 0.05$)。NADPH-d陽性細胞の細胞体の大きさに関して、対照的なレベルIおよびレベルIVでの値は表1に示す通りである。

NADPH-d陽性神経節細胞の形に関しては、短い多数の樹状突起と一本の長く伸びる軸索を持つDogiel I型の形態を示すものが食道全長を通じて多数観察された(図18, 19)。この型の細胞には大きさにおいてかなりの巾が認められた。

なお、自律神経線維の終末部と考えられる数珠玉状の軸索膨大部を示すNADPH-d陽性線維は、4部域を通じ筋層間神経節内にはほとんど認められなかった。

NADPH-d陽性神経線維の横紋筋支配

NADPH-d陽性神経節細胞の描出とともに、AchE反応を用いて神経筋結合部を組織化学的に描出すると、食道の部域を問わず内輪走(図20a)および外縦走(図20b)の両筋層の運動終板に、軸索膨大部を示すNADPH-d陽性神経終末が付随する像がしばしば観察された。これら終末の幾つかはDogiel I型陽性神経節細胞を含む神経節まで追跡可能であった(図19)。一定の範囲内(3mm X 3mm)において、NADPH-d陽性神経終末の付随する運動終板の割合を求めたところ、頸部で26%(36/139)、胸部で32%(41/129)、腹部で46%(61/132)とそれぞれ算出された。

NADPH-d陽性神経節細胞の微細構造

NADPH-d反応時に電子受容体としてNBTのかわりにBSPTを用いると、オスミウム

好性の反応産物を生成し、反応部位を電子顕微鏡的に観察できる(Wolf et al., 1992).

微細構造レベルの観察においては、NADPH-d反応は周囲の反応陰性の構造から明瞭に識別された(図21-24). 細胞体における反応は、核膜、小胞体、ミトコンドリアおよびゴルジ装置の細胞内小器官の膜に付着して観察された(図21,22a). また、軸索では、細胞膜に認められた(図22,23,24).

モルモット食道筋層間神経叢における神経終末の微細構造については、前述の通り、通常電子顕微鏡観察で明らかにしたが、これらのうちの大部分を占める膜の分化を示す終末には、NADPH-d陽性あるいは陰性のどちらの神経節細胞にシナプス結合するものにも、反応は認められなかった(図22a,b). しかしながら、大型の有芯小胞(90-120nm)を大部分含み、膜の分化を示さない軸索膨大部には、細胞膜に沿って時折反応が認められた(図22c).

外来性および内在性神経線維束におけるNADPH-d陽性線維の割合を検証するため、食道外膜の結合組織中に観察される外来性神経束をみると(図23), NADPH-d陽性線維は稀にしか認められず、その割合は、観察された軸索総数の約3%(17/568)を占めるに過ぎなかった. 一方、筋層間神経叢中の無髄神経線維束におけるNADPH-d陽性線維の割合は40%(198/492)と、対照的に高い割合を示した(図24).

考察

食道筋層間神経叢の組織学的特性

モルモット食道筋層間神経叢の網状構造は、口側から胃噴門側にかけて次第に変化し、神経節細胞密度も増加(頸部約2900/1cm²～腹部約3700/cm²)していくことが明らか

となった。オポッサム食道では、筋層構成が上方より順に、横紋筋部、横紋・平滑筋混在部、平滑筋部と変化するが、それらの部位の筋層間神経叢においても神経節細胞密度が噴門側に向かって有意に増加することが報告されている(Christensen et al., 1983)。筋の構成比の差を越えて認められる食道上部と下部での神経節細胞密度の差は、食道各部の生理的機能に関わる神経節細胞の量的な需要の普遍性を示すものと思われるが、本研究において、NADPH-d陽性神経節細胞が神経節細胞の約70%を占めることが明らかになったことから、各部位に特徴的な神経叢の網状構造は、それぞれの部位におけるNO作動性神経節細胞の必要性を反映したものと考えられよう。

食道筋層間神経節の微細構造

モルモット食道筋層間神経節は、下部消化管の神経節と基本的に類似した組織構築を持つ一方、細部については種々の特徴的な構造を持つことが明らかとなった。すなわち、食道筋層間神経節は、中枢神経系組織と同様、神経節細胞、神経膠細胞およびそれらの突起が複雑に絡み合った緻密な神経網を形成し、共通の基底膜に包まれ、神経節内に結合組織要素を含まない点では消化管筋層間神経節の一般的性格を備えているが、神経節辺縁部の構造、神経膠細胞の発達に顕著な特徴が認められた。ヒト食道(De Souza et al., 1988)では神経節内部への結合組織の侵入が報告されているが、恐らくは、神経節表面の不規則な陥入部に認められる結合組織要素を内部構造と見做したものであろう。これらの結合組織要素が真の内部構造でないことは、神経節表面の基底膜により限界されることから明らかである。

ところで、モルモット食道筋層間神経節では、ニューロン間の連絡を示すシナプスの数が少なく、種類にも乏しいことは、同じ動物の小腸や大腸では8型(Cook & Burnstock, 1976; Gabella, 1972)、また家兎大腸でも9型の終末(Komuro et al., 1982b)が報告されていることに比べても明らかに大きな差異といえよう。このことは、食道筋層間神経叢内に

終わる知覚性ニューロンや介在性ニューロンの終末が少ないことを意味すると思われるが、モルモット食道筋層間神経節において、運動性と推定されるDogiel I型の形態を示すNO作動性神経節細胞が約70%を占め、多くのNO作動性終末が食道壁に分布するという報告(Morikawa & Komuro, in press)とも符合が見られ、興味深い結果といえる。

神経伝達物質の化学的性質と神経終末の微細構造に関しては、扁平な小胞を含む神経終末がアドレナリン作動性であること(Llewellyn-Smith et al. 1981)、また、丸い小さな無芯小胞を含む神経終末がコリン作動性であること(Gabella, 1994の総説参照)等が示唆されているが、食道筋層間神経叢や周囲の横紋筋組織には多種にわたる神経伝達物質の存在が示唆されており(Leander et al. 1982, Wörl et al. 1994; Uddman et al. 1995; Kuramoto & Endo, 1995)、モルモット食道筋層間神経叢において微細構造的に二、三の終末型しか観察されなかったことは、同一神経終末における異なる神経伝達物質の混在を示唆するものであろう。

ミトコンドリアを豊富に含む有髄線維の軸索膨大部が神経節内に位置して観察されたことは、これまでに報告のない重要な所見である。食道筋層間神経節では、多くのミトコンドリアを含む終末が、これまでにネコ・イヌ(Rodrigo et al. 1975)およびラット(Neuhuber et al. 1987; Kuramoto & Kuwano, 1995)で観察され、機械的刺激受容の役割を担う迷走神経由来の知覚終末であることが示唆されているが、本研究で認められた外来性神経の証となる有髄線維との連続性をもつ構造は、モルモット食道における迷走神経知覚終末を示すものであろう。

さて、神経要素の組織間隙に接する部位は、血管の侵入がない神経節内において、間質との境界面を通じての神経節細胞の物質代謝に寄与するものと解釈されているが(Komuro et al., 1982b)、ウサギ結腸(Komuro et al., 1982b)では全表面積のおよそ30%を占めるのに対し、モルモット食道では15%であった。このことは、モルモット食道筋層間神経節の神経節細胞が相対的に少ないことに起因すると思われるが、食道では神経節の

大きさが小さく、輪郭が不規則で凹凸部を多く持つことも、間質との物質交換に貢献しているものと思われる。

また、食道の筋層間神経節の外表面積に占める神経要素の割合の小さいことは、神経節表面に位置する神経終末の少ないことにも一部は関連するものであろう。下部消化管に多く観察される神経節表面の神経終末では、周辺平滑筋組織に対する直接の作用が示唆されているが(Gabella, 1979, Komuro et al., 1982a, 1988), 神経筋接合部が形成される食道横紋筋組織では、伝達物質が拡散により伝達される平滑筋細胞とは対照的に、間質への物質の拡散は不必要であるとともに、正常な神経筋伝達を阻害する可能性も考えられ、モルモット食道筋層間神経節表層に神経終末の少ないことを説明するものと思われる。

さて、筋層間神経節の支持細胞はGabella(1972)により形態学的特徴からシュワン細胞と区別され、腸神経膠細胞(enteric glial cell)と呼ばれたが、その後、これらの細胞が中枢神経系の星状膠細胞と同様、glial fibrillary acidic protein (GFAP: Jessen & Mirsky, 1980), S-100タンパク(Ferri et al., 1982)およびグルタミン酸合成酵素(Jessen & Mirsky, 1983)を含むことが報告されており、筋層間神経節の中枢神経系との細胞組織学的類似性を強く支持する一つの大きな根拠となっている。

この筋層間神経節の神経膠細胞は大型の動物種において良く発達しており、モルモット回腸(Gabella, 1994)やウサギ結腸(Komuro et al., 1982b)では神経膠細胞：神経節細胞の比率はおよそ2：1であるのに対し、ヒツジ回腸では4：1と、神経膠細胞が神経節細胞を大きく上回ることが知られており(Gabella, 1994)、この点では、モルモット食道筋層間神経叢は大型の動物種に類似した特徴を持つと言える。

ところで、食道筋層間神経叢において、これまでに報告のない特異な神経膠細胞の構造が観察されたことは注目に値する。筋層間神経叢の神経膠細胞については、小腸の光学顕微鏡的検索から、細胞体の大きさや突起の状態等に基づき、二型の細胞が観察され(Hanani & Reichenbach, 1994)、家兎結腸での電子顕微鏡的検索では三型の細胞

(Komuro et al., 1982b)が報告されているが、本研究で観察された細胞突起による層板状構造については知られていない。この層板状構造は、神経要素の少ない頸胸部の食道を通じてよく発達して観察される一方、神経節細胞の増加するLES近傍ではほとんど認められず、神経要素間の間隙を充填する役割が推測される。このことは、光学顕微鏡観察において神経節細胞密度が概して疎な食道上部の神経節内の間隙を、神経膠細胞が満たして観察された所見に符合する。層板状の構造は、神経節内の間隙を充填し形状を整える一方、神経節細胞の間質との物質代謝を阻害しないよう通路を与える働きもするものと推測される。

また、機械的衝撃から神経節細胞を保護する衝撃吸収装置として、これらの構造が働く可能性も考えられる。筋層間神経叢は筋層の運動によって強く変形することから (Gabella, 1972)、神経叢内に多数の突起を形成する神経膠細胞が、細胞間連絡に重大な変化を引き起こすことなく、神経要素間の形態学的機能的関係を維持する役割が示唆されている (Gabella, 1994)。食道の主体をなす頸胸部では、嚥下時に胃噴門側に進む律動的筋収縮が起こるが (Conklin & Christensen, 1994; Richards & Sugarbaker, 1995)、食道は消化管全体を通じて最も固形度の高い食塊が通過する器官であり、モルモットを含む多くの哺乳類では嚥下時に重力の補助がないことから (Thomas et al., 1960; Christensen & Decarle, 1974)、筋層の大部分が強い収縮力を持つ横紋筋線維で構成されており、食塊通過時の食道壁内在神経叢の受ける機械的衝撃も強い。神経節表面および神経節内部の神経終末の周囲に認められる層板状構造が、神経節内の構造の保護に寄与する可能性は十分に推測されるであろう。ヒト食道では、機械的衝撃を受ける器官にみられる oxytalan, elaunin, elastic fiber による弾性線維系 (elastic fiber system: Cotta-Pereira et al., 1977) が筋層間神経叢に付随することも報告されている (De Souza et al., 1988)。

層板状構造は、筋層間神経叢に微細構造的に類似したモルモット胆嚢の神経節でも報告されている (Cornbrookes et al., 1992)。

食道におけるNO作動性ニューロンの意義

本研究では、食道の筋層間神経叢に全長の平均で約70%にのぼる多数のNADPH-d陽性細胞の存在することが明らかとなった。この数値は、同じモルモットの胃・小腸・大腸における10-25%(Furness et al., 1994)に比べ大きな差異を示した。モルモット小腸・大腸の筋層間神経節細胞においてNOS免疫活性とNADPH-d活性の相関することが報告されており(Young et al., 1992)、また同材料の食道における相関性も予備的実験で確認されていることから、これら多数のNADPH-d陽性神経節細胞はNO作動性ニューロンを表わすものと考えられる。

では本研究で観察された多数のNO作動性ニューロンは食道横紋筋部で一体どのような機能を担うのであろうか。FangとChristensen(1993)はオポッサム横紋筋部食道に平滑筋部と同様、多数のNADPH-d陽性神経節細胞を観察してその機能的役割の推定に苦心した。何故なら、下部消化管では内在性NO作動性ニューロンが平滑筋線維に抑制性刺激伝達を行うことが広く認められている一方(Brookes 1993; Konturek & Konturek 1995)、食道横紋筋は中枢由来の運動性ニューロンが直接支配を行うことが現在まで定説とされてきたからである(Bieger & Hopkins, 1987; Cunningham & Sawchenko, 1990; Roman & Gonella, 1987)。

ところが、Neuhuber et al.(1994)はAChE染色で描出されたラット食道横紋筋の多くの運動終板にNADPH-d陽性神経終末が付随するのを観察し、ラット食道横紋筋支配には、中枢由来のコリン作動性支配に加え、筋層間神経叢由来のNO作動性ニューロンも関与する可能性を示唆した。

本研究ではNADPH-d陽性神経終末が内輪・外縦走筋層双方の運動終板に付随して観察され、それら終末の幾つかは筋層間神経叢まで追跡できた。筋層間神経叢と運動終板との連続性を示す同様な所見はヨウ化亜鉛・オスミウム酸染色法によるモルモット食道筋層全載伸展標本でも報告されている(Zhou et al., 1996)。また、本研究における微細構造

レベルでのNADPH-d反応の検索でも、外来性神経束にはNADPH-d陽性線維は約3%程度であるのに対して、筋層間神経叢中の無髄神経線維束では、その割合は約40%であった。これらの所見を併せて考慮するとき、モルモット食道横紋筋もまたNO作動性ニューロンの支配を受けることが推測される。

薬理学的研究により、LES平滑筋線維がNO作動性神経によって抑制性支配を受けることがイヌ(De Man et al. 1991)やオポッサム(Tøttrup et al., 1991, Yamato et al., 1992)の食道で報告されているが、Brookesら(1996)は逆行性追跡実験からモルモットLESに投射する大多数のNOS陽性神経節細胞は食道体部に位置し、長い投射距離を持つことを明らかにした。彼等はまた、それら多くのNOS陽性細胞が陰性のものに比べて有意に大きい細胞体を持つことも報告している。NADPH-d陽性神経節細胞の数がレベルIVの神経節で最も高い割合を示したことはこの報告と符合するものであり、おそらくは括約筋への抑制性刺激伝達の生理的重要性を反映するものと考えられる。レベルIVにおいて大型のNADPH-d陽性細胞の割合が(37%)を占め、レベルI(3%)のそれに比べて明らかに増加することは、LESへの長い投射距離を持つ神経節細胞の存在に起因すると考えられる。

従ってモルモット食道全長を通じて認められる多数のNO作動性神経節細胞はLES平滑筋線維のみならず横紋筋も支配する、主に運動性の役割を持つ神経節細胞であると考えられる。この考えは運動性の神経節細胞の形態とされるDogiel I型のNADPH-d陽性神経節細胞が食道全長で多数観察されたことから支持されるであろう。この型の神経節細胞はモルモット食道(Furness et al., 1994; Brookes et al., 1996)や小腸(Costa et al., 1992)でも観察され、運動性神経節細胞と示唆されている。異なる大きさのDogiel I型神経節細胞が腹部で混在する所見は長短それぞれの投射距離を持つ運動性の神経節細胞がこの部位で共存することを示すものであろう。何れにせよ、レベルIII, IVにおける単位面積あたりのNADPH-d陽性細胞の割合の高さは腹部食道のよく発達した(肥厚した)筋層に深く関連するものと考えられる。

ところで、食道筋層において、発達の過程で平滑筋細胞に完全に分化した細胞がさらに横紋筋細胞へと分化する可能性(Patapoutian et al., 1995; Sang and Young, 1997)については緒言に触れたが、こうした筋細胞は、迷走神経から支配を受ける以前に内在性のNO作動性神経によって支配されることが示唆されている(Sang and Young, 1997)。これらの報告は、運動終板に付随するNADPH-d陽性神経終末の存在が形態形成期における神経支配の遺物に過ぎない可能性を含んでいるが、骨格筋細胞のNOによる弛緩促進(Kobzik et al., 1994)やNO作動性神経による骨格筋神経筋接合部の形成の報告(Oliver et al., 1996)は、食道にみられた多数のNO作動性ニューロンの食道横紋筋支配における生理的意義を支持するものと思われる。

一方、筋層とは対照的に、筋層間神経節内にNADPH-d陽性線維の終末がほとんど認められなかったことは、モルモット小腸で示唆されているNOニューロンの介在ニューロンとしての可能性(Llewellyn-Smith et al., 1992; Young et al., 1995)が食道では否定的であることを示唆するものであろう。

NADPH-d反応の電子顕微鏡的検索

NADPH-d反応の微細構造レベルの観察では、反応産物は陽性細胞の核膜、小胞体、ミトコンドリアおよびゴルジ装置の細胞内小器官の膜に付着して認められた。このような細胞体内の反応の分布は、NOSが膜に付着するタンパクであるとする生化学的研究(Hiki et al., 1992; Hecker et al., 1994)と符合し、中枢(Wolf et al., 1992; Faber-Zuschratter, et al., 1994)および末梢神経系(Wang et al., 1995, 1996)でのNADPH-d陽性神経(節)細胞の電子顕微鏡的検索での報告と一致するものであり、またこの手法の技術的妥当性を支持するものと考えられる。

神経終末におけるNOS/NADPH-d反応に関しては、小型の丸い無芯小胞と少数の大型の有芯小胞を含む神経終末内に散在する(モルモット小腸筋層間神経叢; Llewellyn-

Smith et al. 1992), 小型の丸い無芯小胞の限界膜にのみ付着し有芯小胞には反応が認められない(モルモット小腸粘膜下神経叢: Wang et al., 1995, 1996), あるいは, シナプス小胞には反応が認められず, 終末内の小胞体膜に付着する(Wolf et al., 1992; Faber-Zuschratter, et al., 1994)等, 幾つかの動物種の中樞および末梢神経組織で観察され, 反応部位の微妙な差異も報告されている. しかしながら, 本観察では, NADPH-d陽性または陰性のどちらの神経節細胞にシナプス結合する終末にもNADPH-d反応が認められなかったことは, モルモット食道筋層間神経節では, NOニューロンの介在ニューロンとしての役割が否定的であることを強く示唆するものである.

まとめ

本研究では, ①モルモット食道筋層間神経叢の網状構造が口側から胃噴門側に向かって変化を示し, ②微細構造的には, 筋層間神経節としての基本的な組織構築をそなえる一方, 神経膠細胞の形成する層板状突起等, 細部については種々の特徴的な構造を示すことが明らかとなった.

また, ③全神経節細胞の約70%がNADPH-d反応陽性であり, それらの多くが運動性と推定されるDogiel I型の形態を示すことが明らかとなった. ④神経終末に関しては, 多くのNADPH-d陽性神経終末が運動終板に侵入して観察される一方, 神経節内に終る陽性終末は認められないこと, さらに, ⑤NADPH-d陽性線維は筋層間神経叢の結合線維束には電子顕微鏡的にも多数認められるが, 外来性神経束には非常に乏しいことも明らかとなった.

以上のことから, 食道横紋筋部筋層間神経叢は, 下部消化管平滑筋部にみられる筋層間神経節の基本的特徴を維持しながらも, 食道固有の生理的機能を反映した構造を合わせ持ち, 特によく発達したNO作動性の神経節細胞は, 主に運動性ニューロンとして横紋

筋を支配することが推定された。

老年性嚥下困難患者では、食道横紋筋部の筋層間神経節細胞数の大幅な減少が報告されている(Meciano Filho, et al., 1996)。神経節細胞が迷走神経と共に食道横紋筋を二重に支配するのであれば、その細胞数の減少が嚥下運動に影響することは十分に考えられることである。今後は、従来の食道横紋筋支配の定説が修正され、神経節細胞の機能を重視した食道横紋筋運動の研究が行われることを期待したい。

参考文献

- Asaad, K., Rahman, S.A.E., Nawar, N. N. Y. and Mikhail, Y., Intrinsic innervation of the Oesophagus in dogs with special reference to the presence of muscle spindles, *J. Anat.* 115 (1983) 91-96.
- Auerbach, L., Über einen Plexus gangliosus myogastricus, (1862a) 39er Jahr-Bericht u. Abh. d. Schlesischen Gesells f. vaterland Gult., 103-104.
- Auerbach, L., Über einen Plexus myentericus, einen bisher unbekanntem gangli-nervösen apparat im darmkanal der wirbelthiere, *Beslau, E. Morgenstern,* (1862b) 1-13.
- Bayliss, W.M. and Starling, E.M., The movements and innervation on the small intestine, 24 (1899) *J Phisiol. (Lond.)* 99-143.
- Bieger, D. and Hopkins, D.A., Viscerotopic representation of the upper alimentary tract in the medulla oblongata in the rat: the nucleus ambiguus, *J. Comp. Neurol.*, 262 (1987) 546-562.
- Brookes, S.J.H., Neuronal nitric oxide in the gut, *J. Gastroenterol. Hepatol.*, 8 (1993) 590-603.
- Brookes, S.J.H., Chen, B.N., Hodgson, W.M. and Costa, M., Characterization of excitatory and inhibitory motor neurons to the guinea pig lower esophageal sphincter, *Gastroenterology*, 111(1996) 108-117.
- Christensen, J. and DeCarle, D. G., Comparative anatomy of the esophagus, *Gastroenterol.*, 63 (1974) 407-408.
- Christensen, J. and Fang, S., Colocalization of NADPH-diaphorase activity and certain neuropeptides in the esophagus of opossum (*Didelphis virginiana*), *Cell Tissue Res.*, 278 (1994) 557-562.
- Christensen, J., Rick, J.A., Robison, B.A., Stiles, M.J., Wix, M.A., Arrangement of the myenteric plexus throughout the gastrointestinal tract of the opossum, *gastroenterology*, 85 (1983) 890-899.
- Conklin, J. L. and Christensen, J., Motor function of the pharynx and esophagus. In

- L. R., Johnson, (Ed.) Physiology of the gastrointestinal tract., vol.2 3rd edn. Raven Press, New York 1994, pp 903-928.
- Cook, R., Burnstock, G., The ultrastructure of Auerbach's plexus in the guinea-pig. I Neuronal elements, *J. Neurocytol.*, 5 (1976) 171-194.
- Cornbrookes, E. B., Poulio, W. A., Mawe, G.M., Structure of neurons and ganglia of the guinea-pig gallbladder: light and electron microscopic studies, *J. Comp. Neurol.*, 317 (1992) 31-44.
- Costa, M., Furness, J. B. and Llewellyn-Smith, I. J., Histochemistry of the enteric nervous system. In L. R., Johnson, (Ed.) Physiology of the gastrointestinal tract., vol.1 2nd edn. Raven Press, New York 1987, pp 1-40.
- Costa, M., Furness, J.B., Pompolo, S., Brookes, S.J.H., Bornstein, J.C., Bredt, D.S. and Snyder, S.H., Projections and chemical coding of neurons with immunoreactivity for nitric oxide synthase in the guinea pig small intestine, *Neurosci. Lett.*, 148 (1992) 121-125.
- Cotta-Pereira, G., Rodrigo, F. G. and David-Ferreira, J. F., The elastic system fibers. In L. B. Sandberg, W. R. Gray and C. Franzblan (eds) *Elastin and elastic tissue*, New York, Plenum Press, London 1977, pp 19-30.
- Cunningham, jr., E.T. and Sawchenco, P.E., Central neural control of esophageal motility: a review, *Dysphagia*, 5 (1990) 35-51.
- De Man, J.G., Pelckmans, P.A., Boeckxstaens, G.E., Bult, H., Oosterbosch, L., Herman, A.G. and Van Maerke, Y., The role of nitric oxide in inhibitory non-adrenergic non-cholinergic neurotransmission in the canine lower oesophageal sphincter, *Br. J. Pharmacol.*, 103 (1991) 1092-1096.
- De Souza, R.R., Ferraz, de Carvalho, C.A., Watanabe, I, Identification of collagen, elastic, elaunin and oxytalan fibres in ganglia of the myenteric plexus of the human oesophagus, *Anat. Embryol.*, 179 (1988) 97-102.
- Diamant, N.E., Physiology of esophageal motor function, *Gastroenterol. Clin. North. Am.*, 18 (1989) 179-194.
- Diamant, N.E., Phisiology of esophageal motor function, *Gastroenterol. Clin. North*

- Am., 18 (1989) 179-194.
- Fang, S. and Christensen, J., Distribution of NADPH diaphorase in intramural plexus of cat and opossum esophagus, *J. Auton. Nerv. Syst.*, 46 (1993) 123-133.
- Faber-Zuschratter, H. and Wolf, G., Ultrastructural distribution of NADPH-diaphorase in cortical synapses, *Neuroreport*, 5 (1994) 2029-2032
- Ferri, G.L., Probert, L., Cocchia, D., Michetti, F., Evidence for the presence of S-100 protein in the glial component of the human enteric nervous system, *Nature*, 297 (1982) 409-410.
- 藤田尚男, 藤田恒夫 (1992) 標準組織学 各論 第三版 医学書院
- Furness, J.B. and Costa, M., Types of nerves in the enteric nervous system, *Neuroscience*, 5 (1980) 1-20.
- Furness, J.B., Li, Z.S., Young, H.M. and Förstermann, U., Nitric oxide synthase in the enteric nervous system of the guinea pig: a quantitative description, *Cell Tissue Res.*, 277 (1994) 139-149.
- Furness, J.B., Bornstein, J. C., Pompolo, S., Young, H. M., Kunze, W. A. A. and Kelly, H., The circuitry of the enteric nervous system, *Neurogastroenterol. Mot.*, 6 (1994) 241-253.
- Gabella, G., Fine structure of the myenteric plexus in the guinea-pig ileum, *J. Anat.*, 111 (1972) 69-97.
- Gabella, G., Innervation of the gastrointestinal tract, *Int. Rev. Cytolol* 59 (1979) 130-193.
- Gabella, G, Structure of muscles and nerves in the gastrointestinal tract In L. R., Johnson, (Ed.) *Physiology of the gastrointestinal tract.*, vol.1 3rd edn. Raven Press, New York 1994, pp 751-793.
- Grozdanovic, Z., Baumgarten, H.G. and Brüning, G., Histochemistry of NADPH-diaphorase, a marker for neuronal nitric oxide synthase, in the peripheral autonomic nervous system of the mouse, *Neuroscience*, 48 (1992) 225-235.
- Gruber H., Über Struktur und Innervation der quergestreiften Muskulatur des Oesophagus der Ratte, *Zschr. Zellforsch.*, 91 (1968) 236-247.

- Gruber H., Motor innervation of striate oesophageal muscle, *J. Neurol. Sci.*, 36 (1978) 171-186.
- Hanani, M., Reichenbach, A., Morphology of horseradish peroxidase (HRP)-injected glial cells in the myenteric plexus of the guinea-pig, *Cell Tissue Res.* 278 (1994) 153-160.
- Hecker, M., Mulsch, A. and Busse, R., Subcellular localization and characterization of neuronal nitric oxide synthase, *J. Neurochem.*, 62 (1994) 1524-1529.
- Hiki, K., Hattori, R., Kawai, C. and Yui, Y., Purification of insoluble nitric oxide synthase from rat cerebellum, *J. Biochem. Tokyo.*, 111 (1992) 556-558.
- 平田結喜緒(編集)(1996) NOのすべて 別冊・医学のあゆみ 医歯薬出版株式会社
- Irwin, D.A., The anatomy of Auerbach's plexus, 49 (1931) *Am. J. Anat.*, 141-166.
- Jessen, K.R., Mirsky, R., Glial cells in the enteric nervous system contain glial fibrillary acidic protein, *Nature*, 286 (1980) 736-737.
- Jessen, K.R., Mirsky, R., Astrocyte-like glia in the peripheral nervous system : an immunohistochemical study of enteric glia, *J. Neurosci.*, 3 (1983) 2206-2218.
- Karnovsky, M.J. and Roots, L., A "direct-coloring" thiocholine method for cholinesterases, *J. Histochem. Cytochem.*, 12 (1964) 219-221
- Komuro, T., Baluk, P., Burnstock, G., An ultrastructural study of nerve profiles in the myenteric plexus of the rabbit colon, *Neuroscience*, 7 (1982a) 295-395.
- Komuro, T., Baluk, P., Burnstock, G., An ultrastructural study of neurons and non-neuronal cells in the myenteric plexus of the rabbit colon, *Neuroscience*, 7 (1982b) 1797-1806.
- Komuro, T., Direct contacts between Auerbach's ganglia and smooth muscle cells in the small intestine of the rat, *Neurosci. Lett.* 92 (1988) 27-29.
- Konturek, S.K. and Konturek, P.C., Role of nitric oxide in the digestive system, *Digestion*, 56 (1995) 1-13.
- Kobzik L; Reid M.B.; Bredt, D.S.; Stamler JS Nitric oxide in skeletal muscle, *Nature*. 1994 8; 372(6506): 546-548.
- Kuramoto, H. and Endo, Y., Galanin-immunoreactive nerve terminals innervating the

- striated muscle fibers of the rat esophagus, *Neurosci. Lett.* 188 (1995), 171-174.
- Kuramoto, H. and Kuwano, R., Location of sensory nerve cells that provide calbindin-containing laminar nerve endings in myenteric ganglia of the rat esophagus, *J. Auton. Nerv. Syst.* 54 (1995) 126-136.
- Langley, J. N., *The Autonomic nervous system*, (1921) W. Heffer and Sons, Cambridge.
- Leander, S., Brodin, E., Håkanson, R., Sundler, F. and Uddman, R., Neuronal substance P in the esophagus. Distribution and effects on motor activity, *Acta Physiol. Scandinavica* 115 (1982) 427-425.
- Llewellyn-Smith, I.J., Wilson, A.J., Furness, J.B., Costa, M. and Rush, R.A. Ultrastructural identification of noradrenergic axons and their distribution within the enteric plexuses of the guinea-pig small intestine, *J. Neurocytol.* 10 (1981) 331-352.
- Llewellyn-Smith, I.J., Song, Z.M., Costa, M., Bredt, D.S. and Snyder, S.H., Ultrastructural localization of nitric oxide synthase immunoreactivity in guinea pig enteric neurons, *Brain Res* 577 (1992) 337-342.
- Meciano Filho, J., Carvalho, V.C., Rodrigues de Souza, R. Nervv cell loss in the myenteric f the human esophagus in relation to age : A preliminary investigation, *Gerontology*, 41 (1995) 18-21.
- Meisner, G., Über die Nerven der Darmward, 8 (1857) *Z. Ration Med. NF.*, 364-366.
- Morikawa, S. and Komuro, T., Distribution of myenteric NO neurons along the guinea pig esophagus, *J. Auton. Nerv. Syst.*(in press)
- Neuhuber, W.L., Sensory vagal innervation of the rat esophagus and cardia: a light and electron microscopic anterograde tracing study, *J. Auton. Nerv. Syst.*, 20 (1987) 243-255.
- Neuhuber, W.L., Wörl, J., Berthoud, H.R. and Conte, B., NADPH-diaphorase positive nerve fibers associated with motor endplates in the rat esophagus: new evidence for co-innervation of striated muscles by enteric neurons, *Cell Tissue Res.*, 276 (1994) 23-30.

- Oliver L., Goureau ; Courtois Y., Vigny M., Accumulation of NO synthase (type-I) at the neuromuscular junctions in adult mice, *Neuroreport*, 1996 22; 924-6
- Oppel, A., Schlund und Darm. Lehrbuch der vergleichenden mikroskopischen Anatomie. Bd,2, Gustav Fischer, Jena, 1897.
- Patapoutian, A., Wold, B. J., and Wagner, R. A., Evidence for developmentally programmed transdifferentiation in mouse esophageal muscle, *Science*, 270 (1995) 1818-1821.
- Remak, R., Über mikroskopische Ganglien an den Astendes N. vagus in der Wand des Magens bei Wirbeltieren, *Vers. Ges. Deut. Natulf Aerzte. Wiesbarden*, (1852), 181-183
- Richards, W. G. and Sugarbaker, D. J., Neuronal control of esophageal function, *Chest Surg. Clin. North Am.*, 5 (1995) 157-171.
- Rodrigo, J. and Hernandez, C.J., Vegetative innervation of the esophagus. II. Intraganglionic laminar endings, *Acta Anatomica*, 92 (1975) 79-100.
- Roman, C. and Gonella, J., Extrinsic control of digestive tract motility. In L. R., Johnson, (Ed.) *Physiology of the gastrointestinal tract.*, vol.1 2nd edn. Raven Press, New York 1987, pp 507-553.
- Sang, Q. and Young, H. M., Development of nicotinic receptor clusters and innervation accompanying the change in muscle phenotype in the mouse esophagus, *J. Comp. Neurol.*, 386 (1997) 119-136.
- Samarasinghe, D.D., Some observations on the innervation of the striated muscle in the mouse oesophagus : an electron microscope study, *J. Anat.*, 112 (1972) 173-184.
- Thomas, G. A and Trounce, J. R., The effect of neuromuscular and ganglion blockade on the function of the guinea-pig oesophagus, *Guy's hospital reports*, 109 (1960) 21-28.
- Tøttrup, A., Svane, D. and Forman, A., Nitric oxide mediating NANC inhibition in opossum lower esophageal sphincter, *Am. J. Physiol.*, 260 (1991) G385-G389.
- Toyama, T., Yokoyama, I., Nishi, K., Effects of hexamethonium and other ganglionic

- bloking agents on electorical activity of the esophagus induced by vagal stimulation in the dog, *Europ. J. Phalmacol.* 31 (1975) 63-71.
- Uddman, R., Grunditz, T., Lutz, A., Desai, H., Fernström, G and Sundler, F., Distribution and origin of the peripheral innervation of rat cervical esophagus, *Dysphagia*, 10 (1995) 203-212.
- Wang, X.Y., Wong, W.C. and Ling, E.A., Localization of NADPH-diaphorase activity in the submucous plexus of the guinea-pig intestine: light and electron microscopic studies, *J. Neurocytol.*, 24 (1995) 271-281.
- Wang, X.Y., Wong, W.C. and Ling, E.A., Ultrastructural localization of NADPH-diaphorase activity in the submucous ganglia of the guinea-pig intestine after vagotomy, *Anat. Embryol.*, 193 (1996) 611-617.
- Wolf, G., Wurdig, S. and Schunzel, G., Nitric oxide synthase in rat brain is predominantly located at neuronal endoplasmic reticulum: an electron microscopic demonstration of NADPH-diaphorase activity, *Neurosci Lett.*, 147 (1992) 63-66.
- Wörl, J., Mayer, B. and Neuhuber, W.L., Nitrenergic innervation of the rat esophagus: focus on motor endplates, *J. Auton. Nerv. Syst.*, 49 (1994) 227-233.
- Yamato, S., Saha, J.K. and Goyal, R.K., Role of nitric oxide in lower esophageal sphincter relaxation to swallowing, *Life Sci.*, 50 (1992) 1263-72
- Young, H.M., Furness, J.B, Shuttleworth, C.W., Brecht, D.S. and Snyder, S.H., Co-localization of nitric oxide synthase immunoreactivity and NADPH-diaphorase staining in neurons of the guinea-pig intestine, *Histochemistry*, 97 (1992) 375-378.
- Young, H.M., Furness, J.B. and Povey, J.M., Analysis of connections between nitric oxide synthase neurons in the myenteric plexus of the guinea pig small intestine, *J. Neurocytol.*, 24 (1995) 257-263.
- Zhou, D.S., Desaki, J. and Komuro, T., Neuro-muscular junctions of longitudinal and circular muscle fibers of the guinea pig esophagus and their relation to myenteric plexus, *J. Auton. Nerv. Syst.*, 58 (1996) 63-68.

付図説明

- 図1 樹脂包埋準超薄切片のトルイジンブルー染色標本によるモルモット食道壁(レベルⅢ)の縦断像。内腔より順に粘膜(M), 粘膜下結合組織(SM), 筋層(CMおよびLM)が認められる。内輪走筋層(CM)と外縦走筋層(LM)の間には筋層間神経叢の一部が認められる(矢印)。 X20
- 図2 モルモット食道の領域区分を示す模式図
- 図3,4 モルモット食道筋層全載伸展標本のPGP9.5免疫組織化学(図3)およびNADPH-d組織化学(図4)による二重染色標本。神経節(G)とこれをつなぐ結合線維束(F)からなる一次神経叢の網状構築は全く同様に描出されることに注意(図4)。 X40
- 図5a-d モルモット食道各部における筋層間神経叢の網状構築を示すNADPH-d組織化学染色全載伸展標本。神経節細胞が散在性に分布するため、レベルⅠでは神経節と結合索との識別が明瞭でないが(図5a), レベルⅡの神経叢(図5b)では神経節細胞は次第に網目の交点に集まるようになり、さらにレベルⅢ(図5c)およびレベルⅣの神経叢(図5d)では神経節内に密集するようになる。また、レベルⅣ(図5d)では発達した結合索に多数のNADPH-d陽性神経線維が含まれる。図5a-dは同倍率。 X50
- 図6a,b PGP9.5免疫染色による食道頸部(図6a)および腹部(図6b)神経節の高倍率像。食道上部の神経節細胞密度は低く、神経節細胞は神経節内に散在するが(図6a), 胃噴門側に向かって神経節細胞数は増加し、神経節内に密集する(図6b)。図6a,bは同倍率。 X80
- 図7a,b S-100免疫染色による食道頸部(図7a)および腹部(図7b)神経節の高倍率像。神経膠要素は神経節細胞間を充填しており、食道上部で密に(図7a), 下部では疎に観察される(図6b)。図7a,bは同倍率。 X80

- 図8 モルモット食道筋層間神経節の電子顕微鏡写真。神経節は横紋筋線維による内輪走筋層(CM)と外縦走筋層(LM)の間の結合組織中に位置して観察される。N：神経節細胞，G：神経膠細胞。 X3000
- 図9 食道筋層筋層間神経叢の結合線維束中には有髄(矢印)および無髄(二重矢印)線維が混在して観察される。G：神経節。 X2500
- 図10 神経節辺縁部の神経網に侵入する有髄神経線維。線維は侵入直前に髄鞘を失い(矢印)，直後に膨大部(V)を形成する。膨大部および軸索には多数のミトコンドリアが認められる。 X3000
- 図11 神経節辺縁部を示す電子顕微鏡写真。神経節細胞の細胞質には，大型で不定形の顆粒(矢頭)や，多数のミトコンドリア，粗面小胞体およびゴルジ装置が認められる。また，gliofilamentを多く含む神経膠細胞の突起(*)が，ヘミデスモソーム様の構造を形成して神経節表面に配置されて認められる。この構造は，神経膠細胞による層板状突起が認められない部で観察される。 X6000
- 図12a,b,c モルモット食道筋層間神経節で観察された神経終末のうち主要な三型を示す。小さな扁平小胞(25-40 x 50-80 nm)を主に含む神経終末(a)。神経節表面に認められた，小さな丸い小胞(直径40-60nm)を主に含む神経終末(b)。膜の分化がみられず，大型有芯小胞(90-120nm)のみを含む神経終末(c)。 図a,b X10000 図c X15000
- 図13 モルモット食道筋層間神経節表面に認められる複雑な陥入部。神経節表面の基底膜(矢印)より内部には結合組織は侵入しない。また，図のように神経線維の多い部位では神経膠細胞により個々に包まれることに注意。 X6000
- 図14 陥入結合組織(C)が，神経節の内部構造のように観察される部位。基底膜(矢印)により，神経節内部組織と限界される。N：神経節細胞，G：神経膠細胞。 X4500

図15 モルモット食道筋層間神経節表面に形成される特徴的な神経膠細胞の層板状突起。
これらの突起により神経要素の神経節表面に占める割合は制限される。

N：神経節細胞， G：神経膠細胞． X7000

図16 層板状突起は神経節内部にも形成され，神経終末等の神経要素を同心円状に包んで観察される。同心円状の構造は神経線維の粗な部位で多く認められる。

G：神経膠細胞． X4500

図17a-e NADPH-d組織化学およびPGP9.5免疫組織化学による神経節の二重染色標

本。NADPH-d反応陰性神経節細胞(図a：矢印)は神経要素を標識するPGP 9.5免疫染色で明るく，反応陽性神経節細胞(図a：二重矢印)はNADPH-d反応産物が核を除く細胞体部の蛍光色を隠して観察される。図b,c,d,eは，同様の標本におけるレベルI，II，III，IVのそれぞれの神経節を示す。NADPH-d陽性神経節細胞の割合は食道上部から下部にかけて増加する傾向を示す。また，上部では陽性および陰性神経節細胞ともに小型であるのに対し，下部(図e)では大型の陽性神経節細胞がみられるようになる。図a X150 図b-e X200

図18 食道各部で観察されたNADPH-d陽性Dogiel I型神経節細胞の描画装置による描画像。Dogiel I型神経節細胞は短い多数の樹状突起と一本の長く伸びる軸索で特徴づけられる。様々な大きさの神経節細胞が食道全長で認められたが，大型のものは食道下部でしばしば観察された。 X300

図19 AchE組織化学により染色された運動終板(矢印)とNADPH-d陽性神経線維との連続性を示す全載伸展標本。神経節には，Dogiel I型の陽性神経節細胞(*)が認められる。 X350

図20a,b 外縦走(図a)および内輪走筋層(図b)に認められた運動終板の高倍率像。

NADPH-d陽性神経終末(軸索膨大部)が，AchE陽性の運動終板に侵入して認められる。 X1000

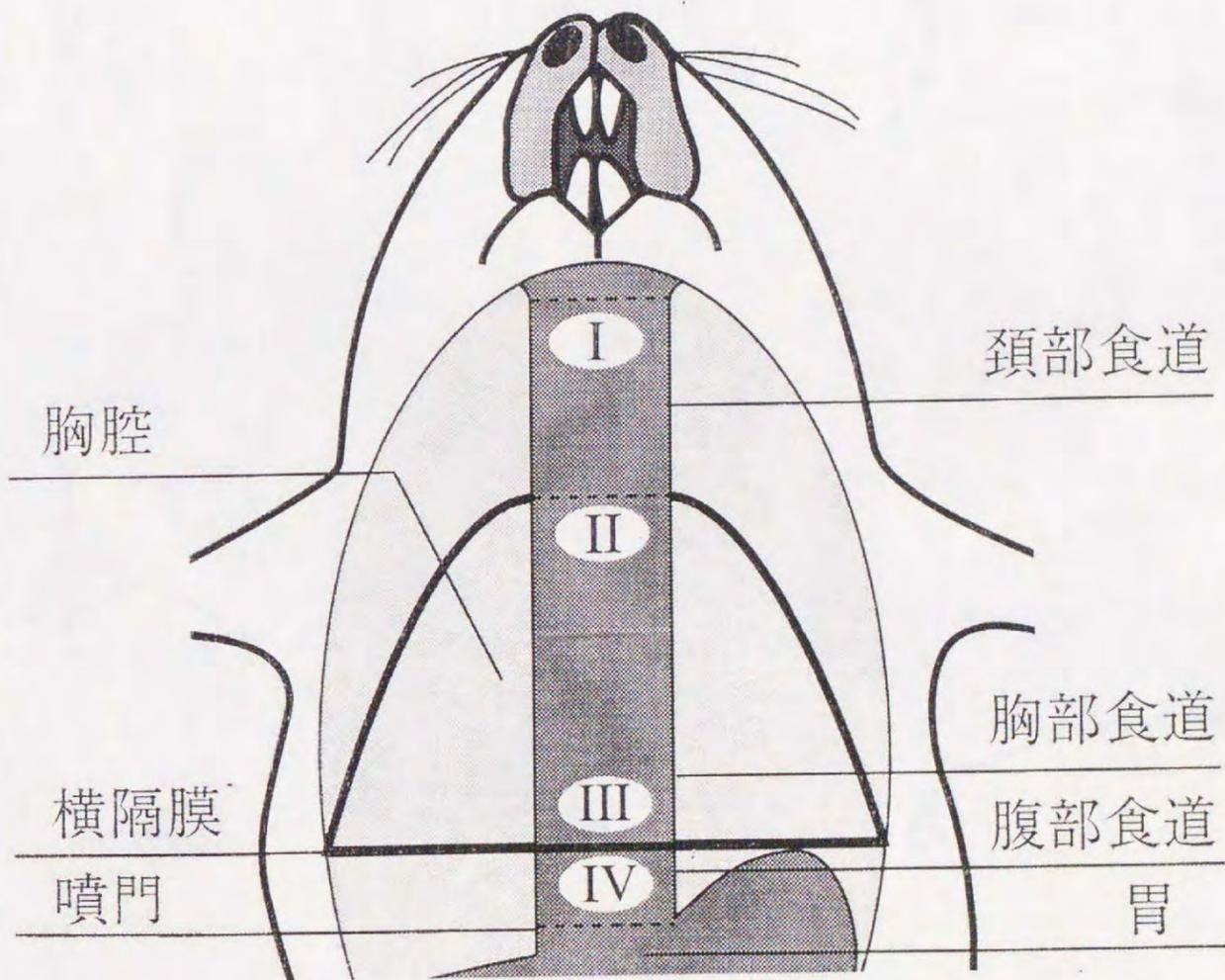
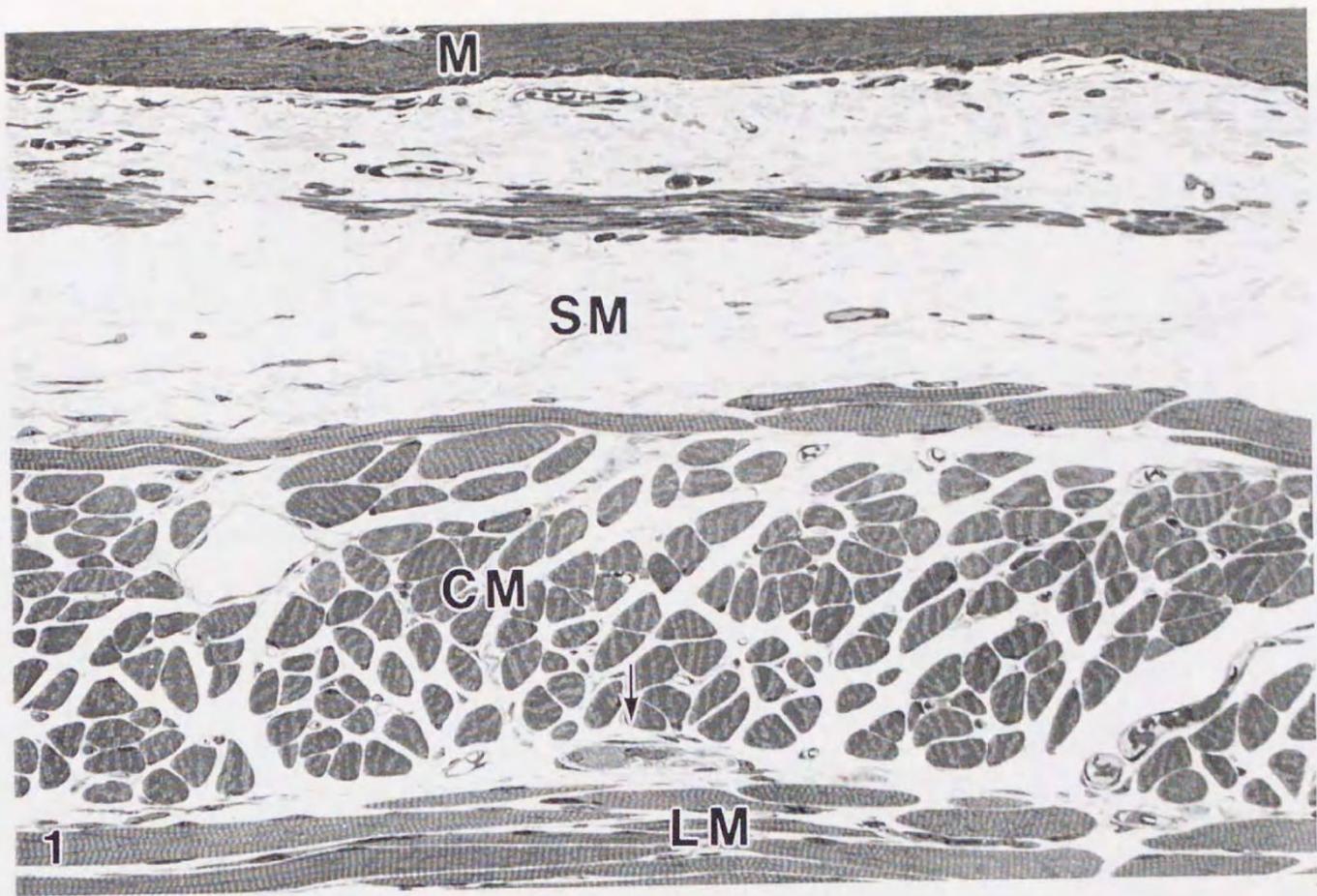
図21 NADPH-d反応の微細構造上の局在を示す電子顕微鏡写真。陽性の神経節細胞(N)では、反応産物が、核膜、小胞体、ゴルジ装置等の細胞内小器官の膜に認められ、反応陰性の神経膠細胞(G)等の構造から明瞭に識別される。 X2000

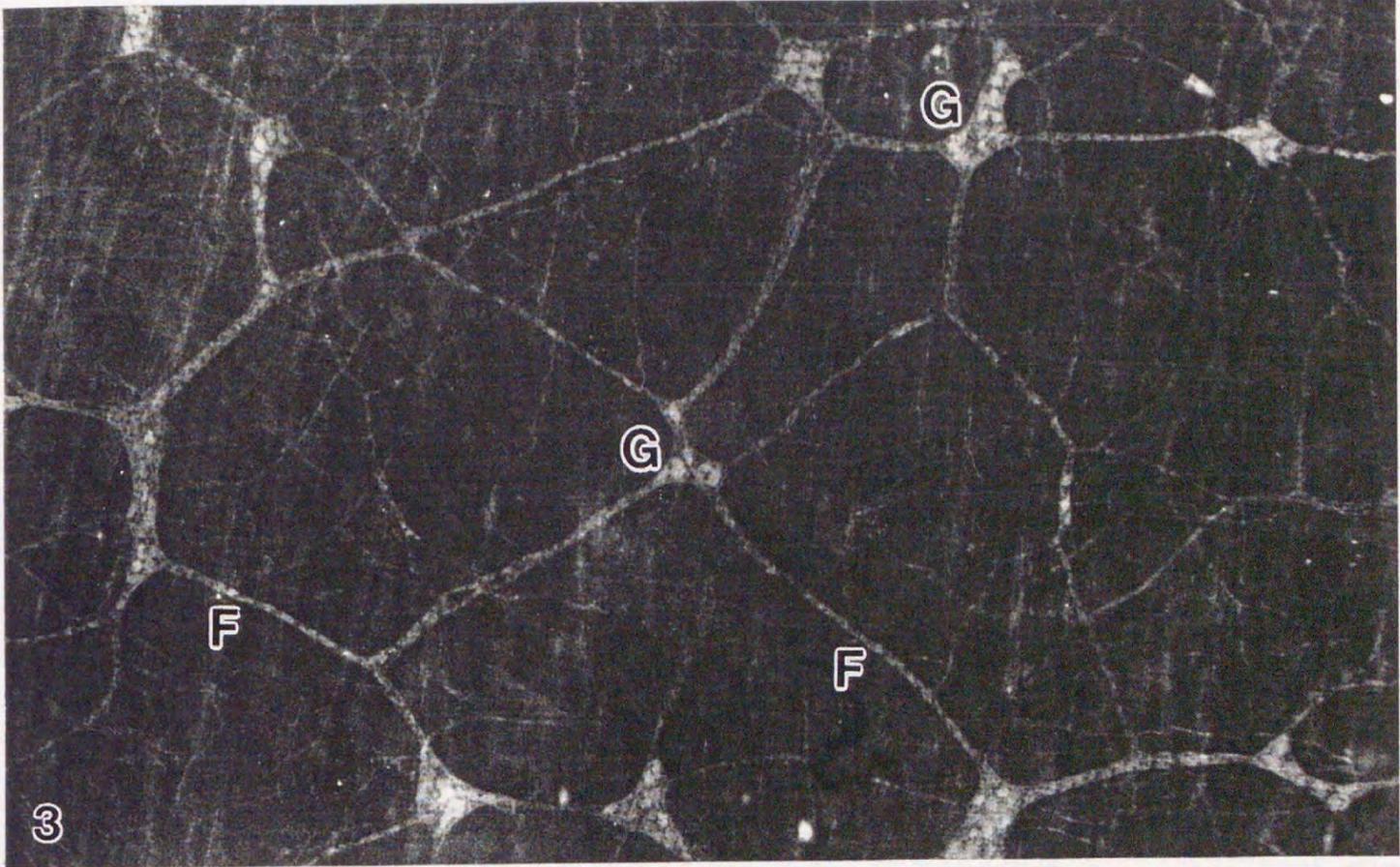
図22a-c 膜の分化を示し、シナプス結合を形成する神経終末では、NADPH-d反応は認められなかった(図a,b)。 a: 小さな扁平小胞を主に含むNADPH-d陰性神経終末。 b: 小さな丸い小胞を主に含む陰性神経終末。切片の断面(矢頭)から遠い神経節細胞の突起は染色され、断面に近い終末は無染色であることに注意。 c: 膜の分化を伴わず有芯小胞を主に含む終末には、細胞膜に沿ってNADPH-d反応が認められた。

図23a X12000 図23b,c X8500

図23有髄および無髄線維を混在させる食道外膜の外来性神経束。NADPH-d陽性線維(矢印)は稀にしか認められない。 X10000

図24 外来性神経束とは対照的に、筋層間神経叢中の無髄神経線維束では、無髄線維の多くがNADPH-d反応に陽性を示す。 X7000







5a



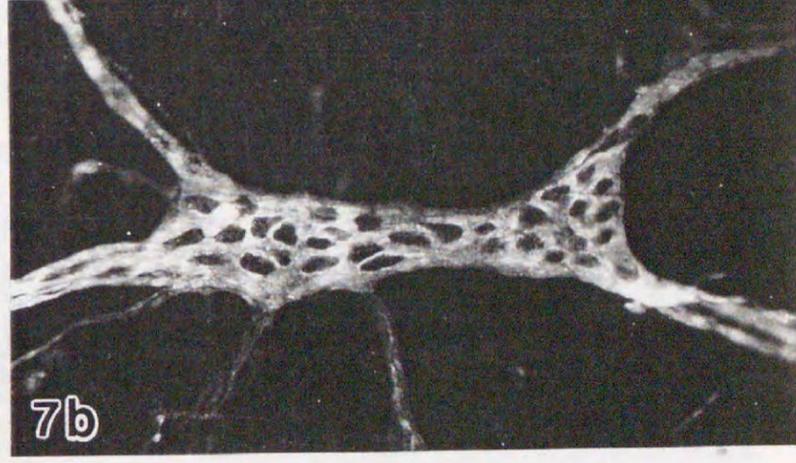
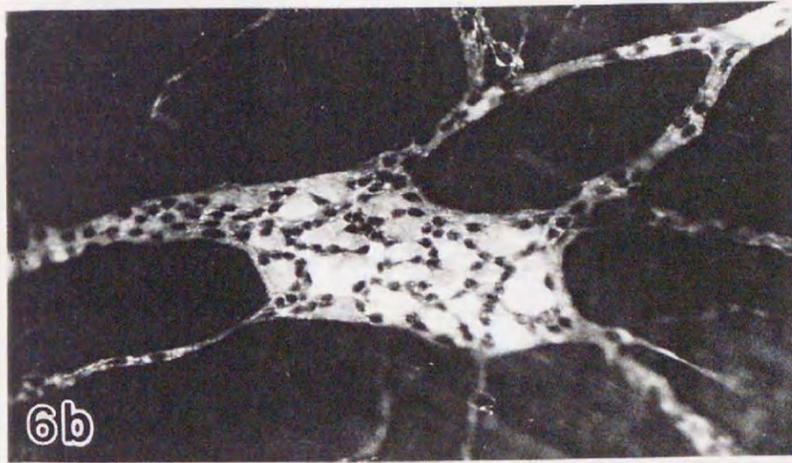
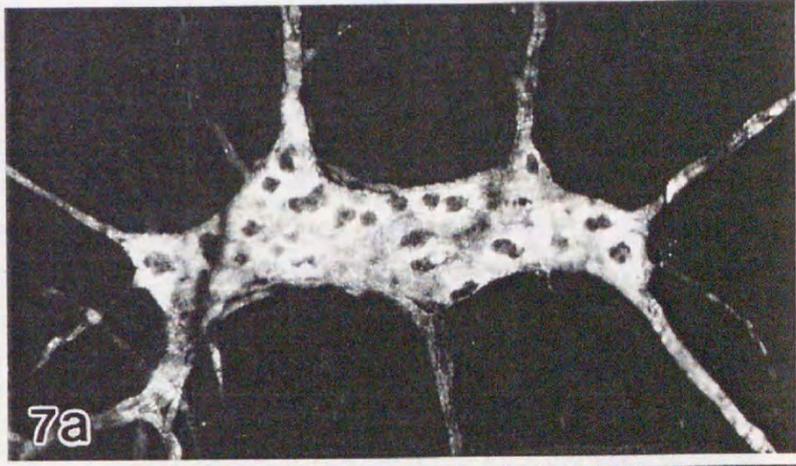
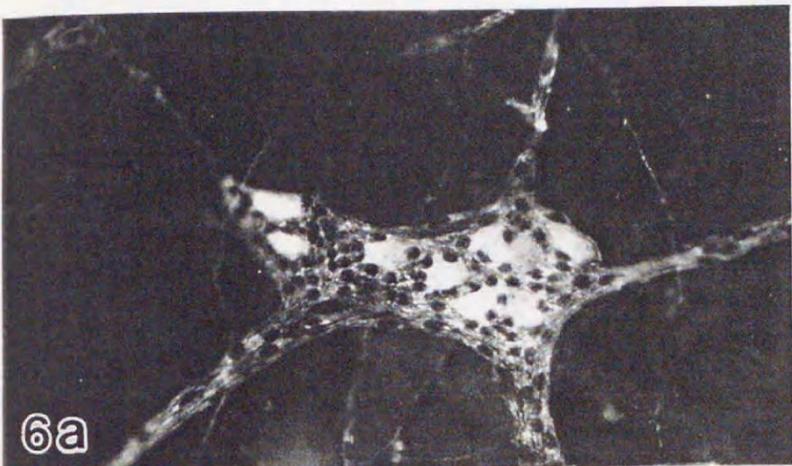
5b

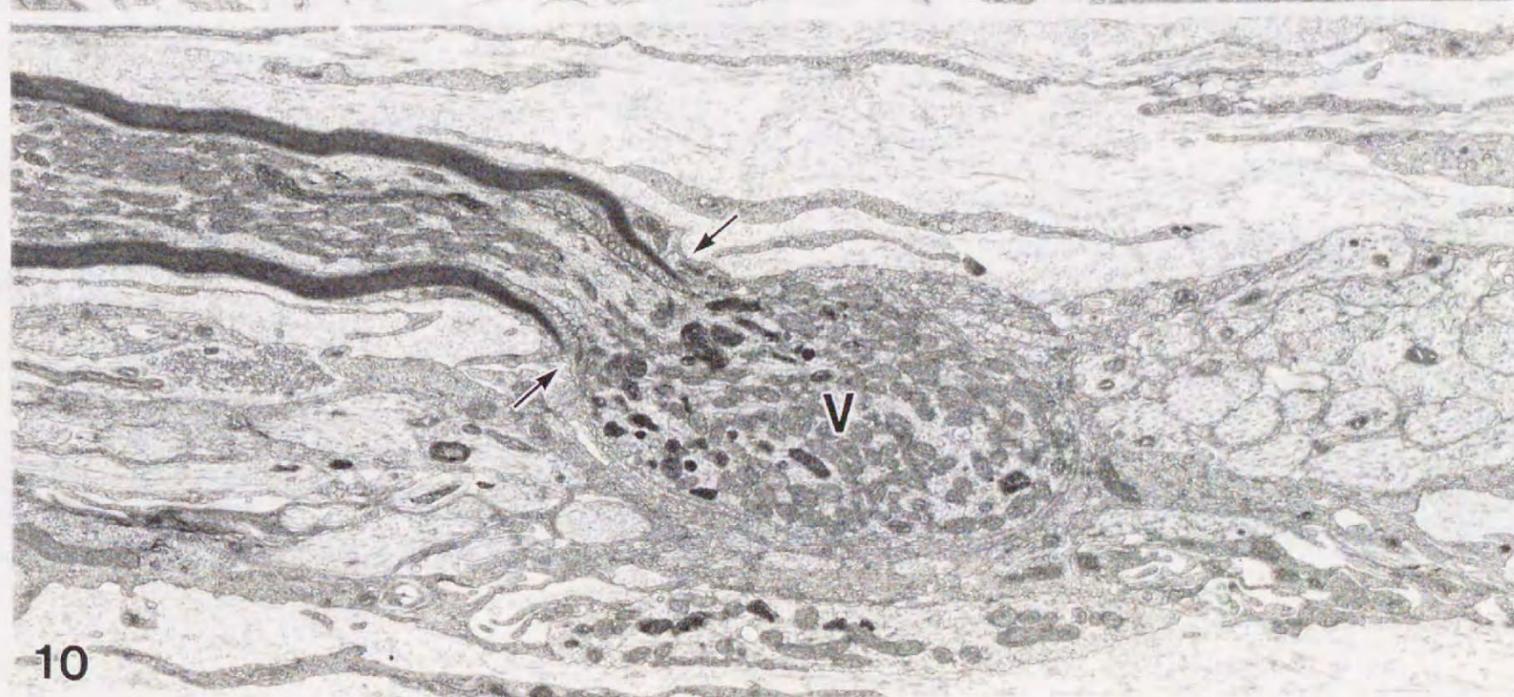
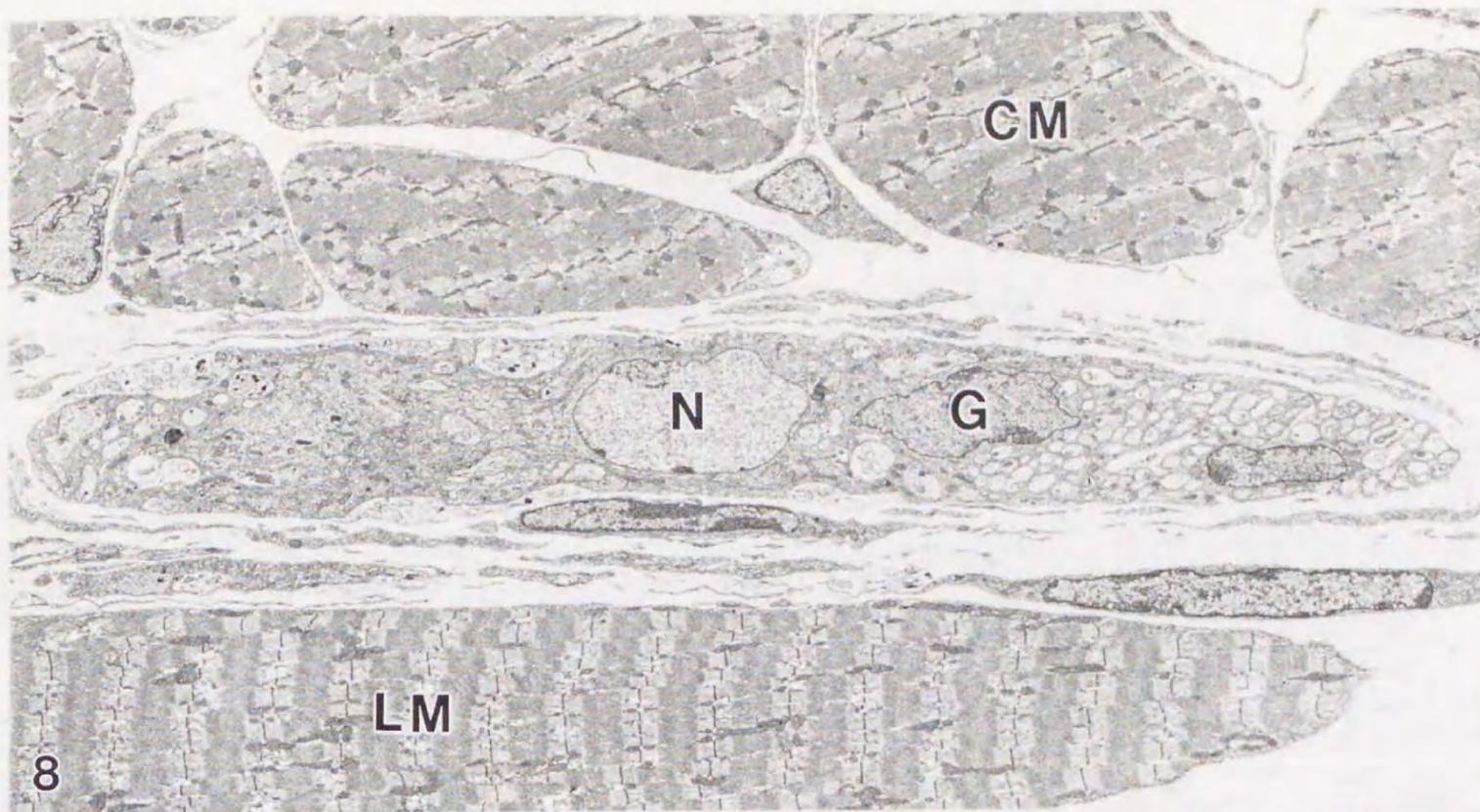


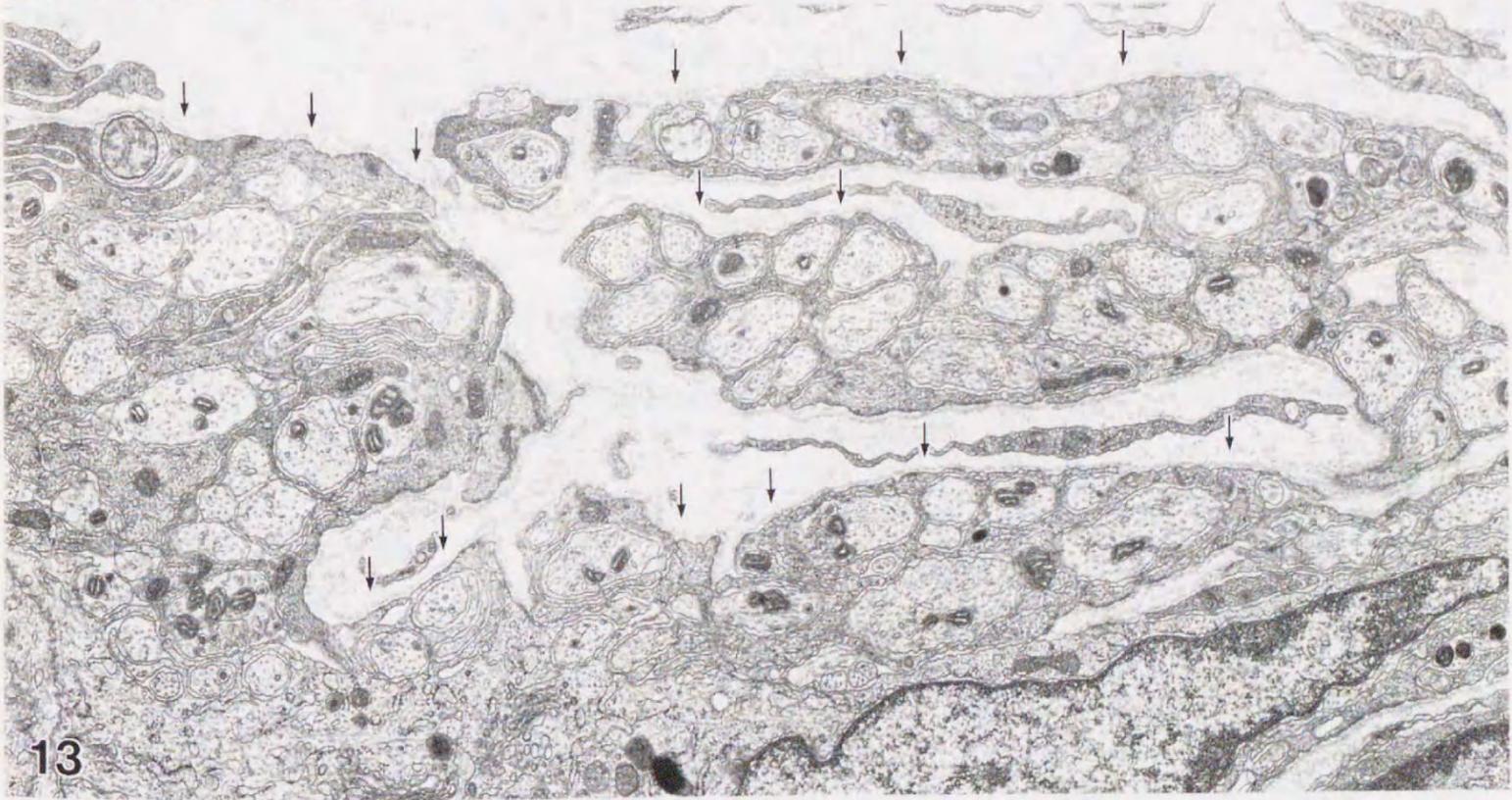
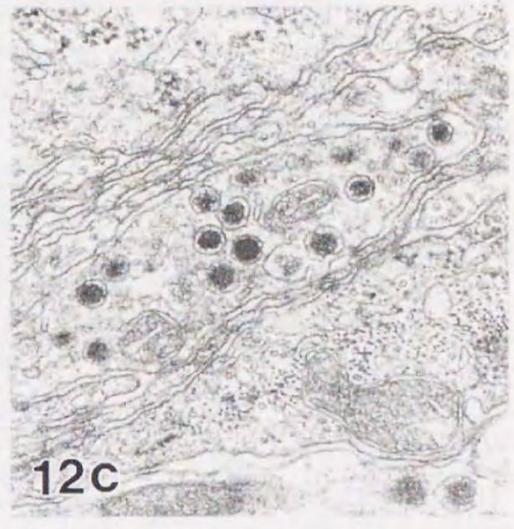
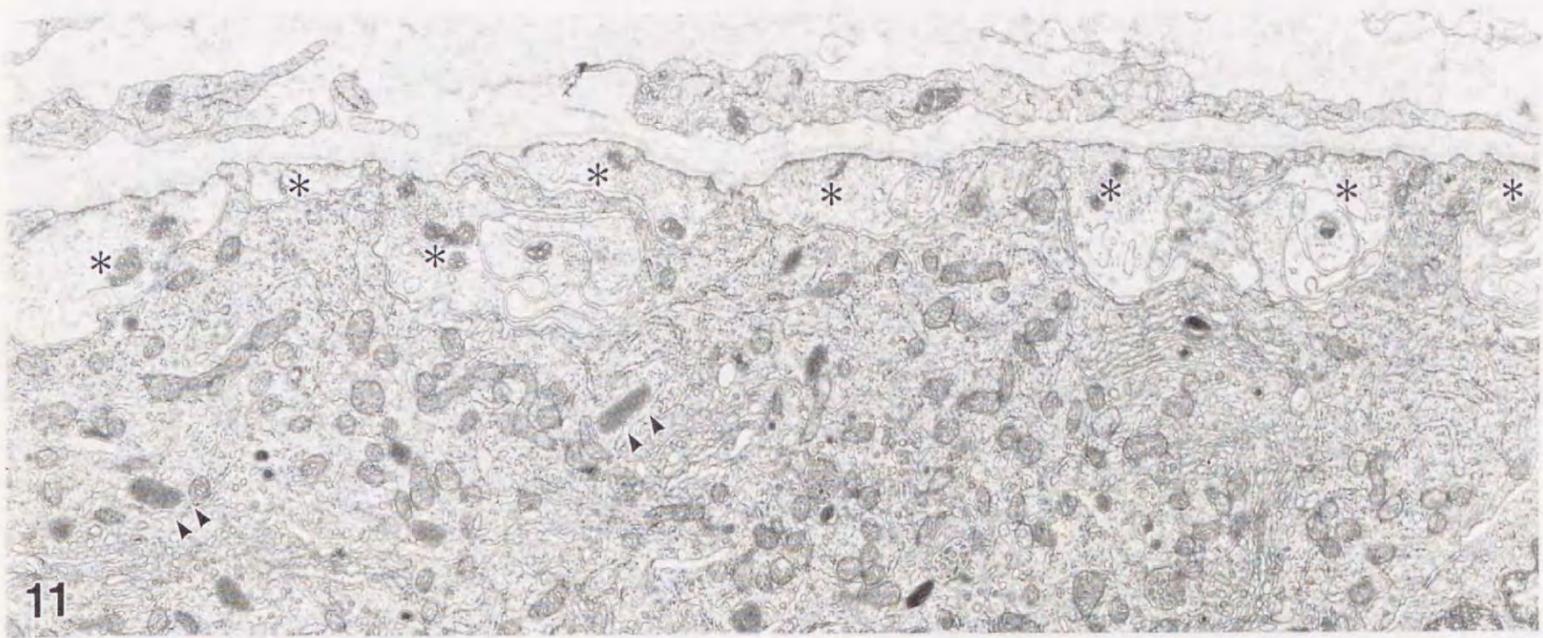
5c



5d

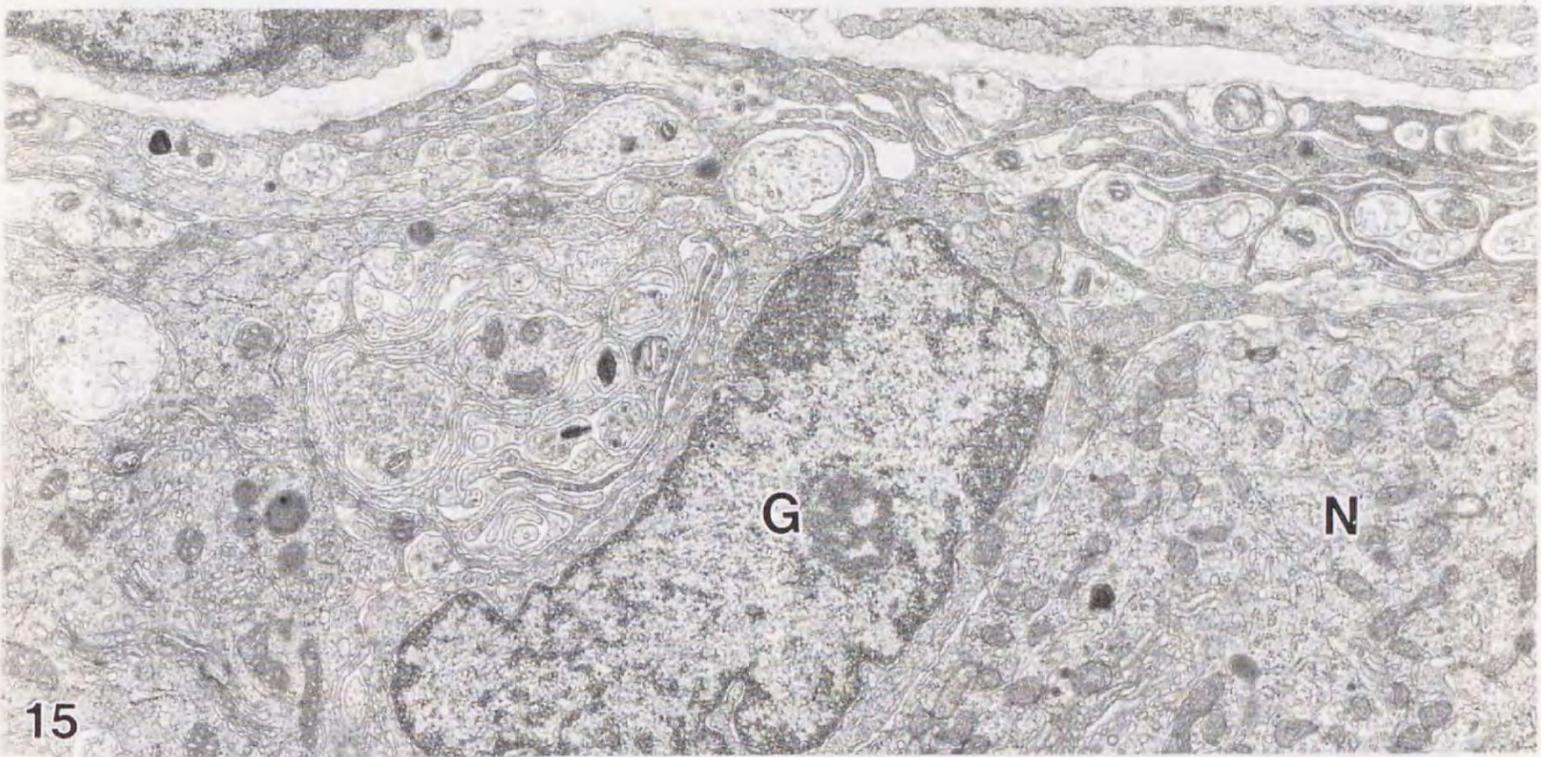




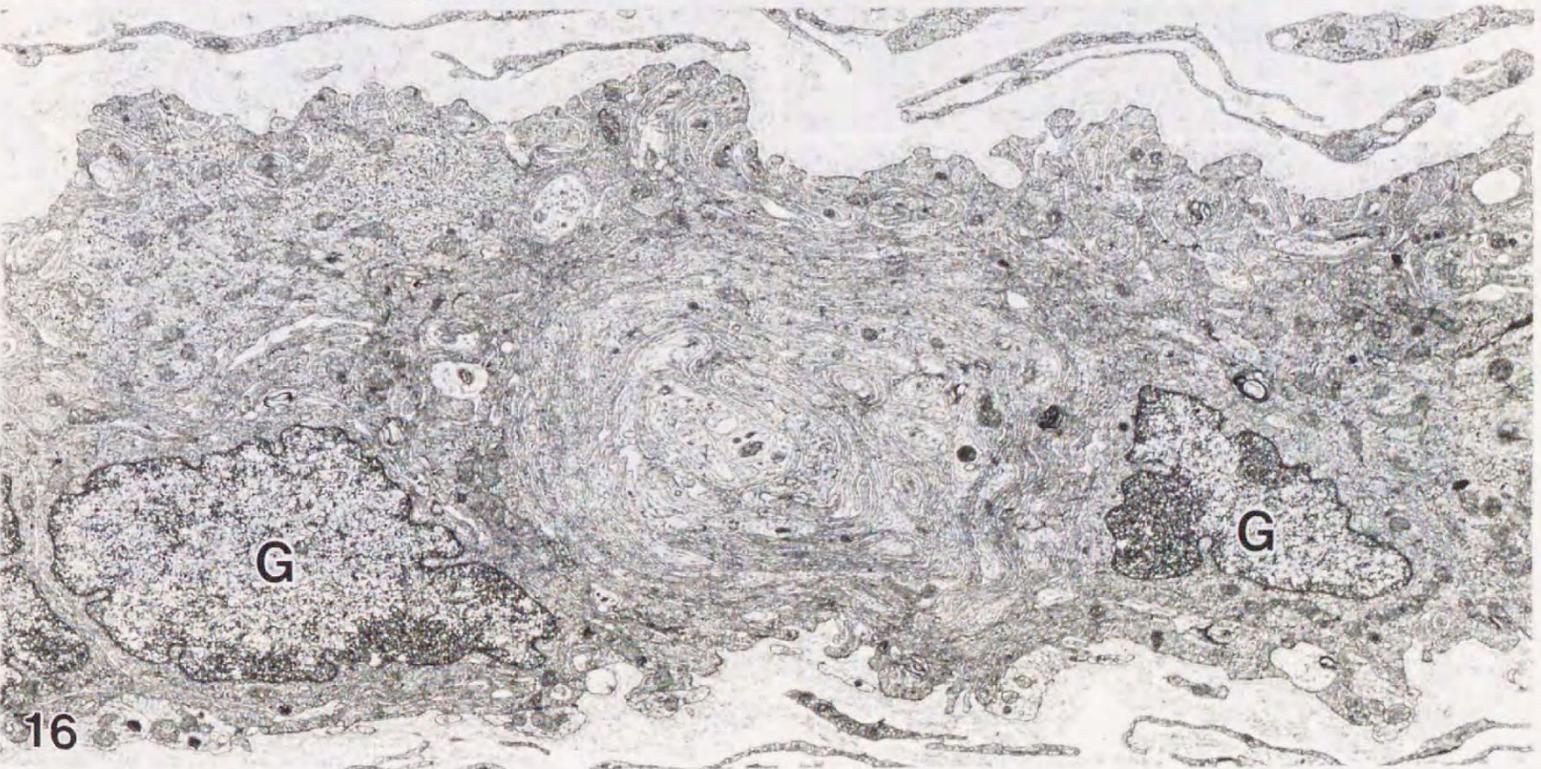




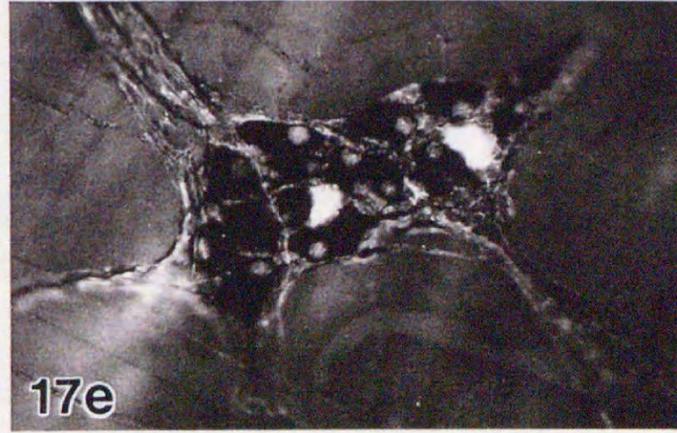
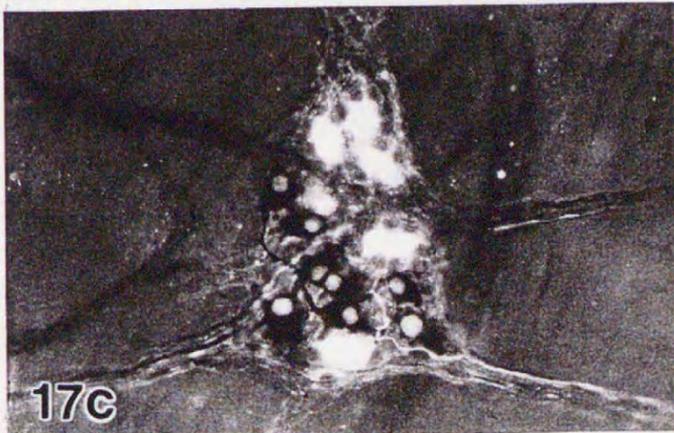
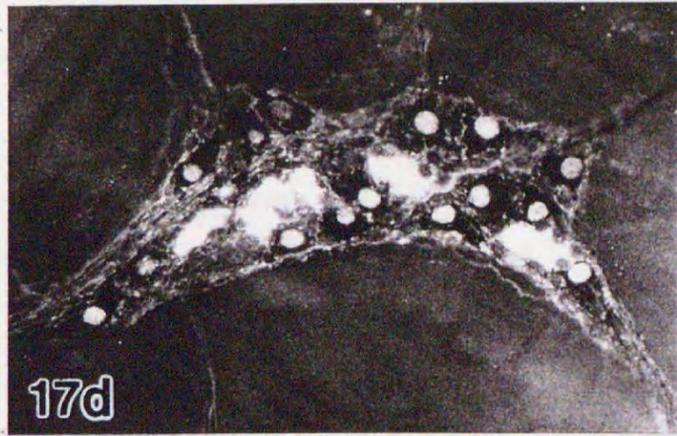
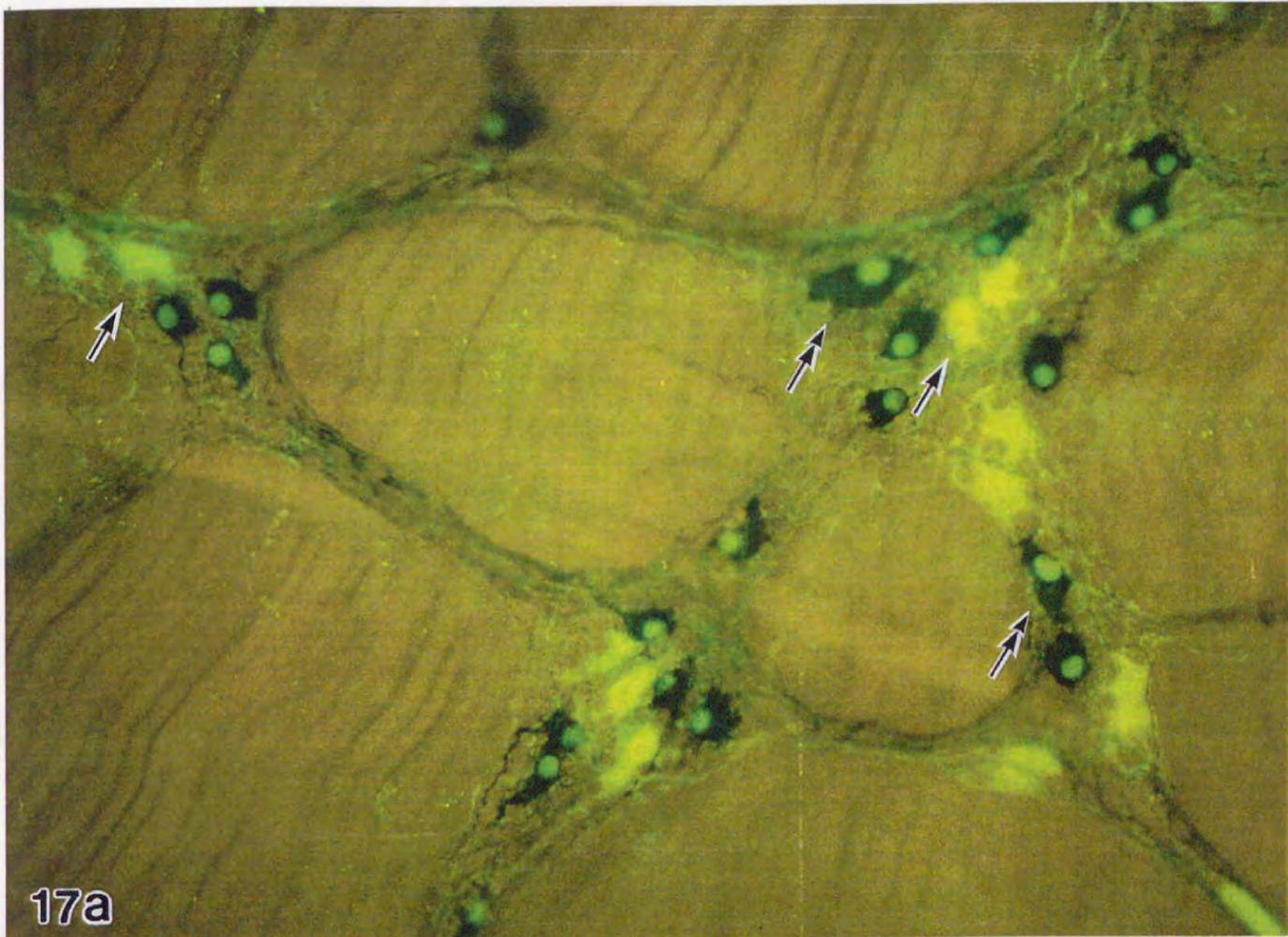
14



15



16



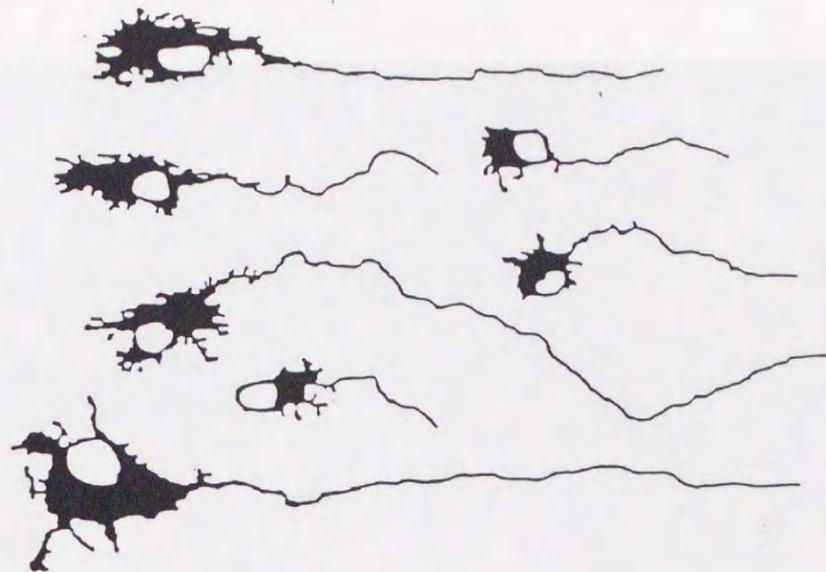


表1. レベル I 及びIV の神経叢におけるニューロンの大きさの比較. () は%を示す

細胞体面積 (μm^2)		450 以下	450 -550	550 -650	650 -750	750 以上	合計
レベル I	NADPH-d- 陽性細胞	211 (79%)	36 (14%)	11 (4%)	3 (1%)	5 (2%)	266
	陰性細胞	121 (79%)	29 (19%)	2 (1%)	2 (1%)	0	154
レベル IV	NADPH-d- 陽性細胞	114 (40%)	37 (13%)	28 (10%)	50 (17%)	59 (20%)	288
	陰性細胞	35 (64%)	14 (25%)	3 (5%)	3 (5%)	0	55

