

目次

緒言

I 消化管の構造と機能	2
II 蠕動運動と腸管神経系	2
III カハールの介在細胞 (ICC)	4
1) ICC 研究の流れ	
2) ICC と <i>c-kit</i> 遺伝子	
3) ICC の形態と分布	
4) ICC の機能	
5) ICC と臨床との関連	
6) 近年の ICC 研究	
IV 研究の目的	9
V 大腸の構造と機能	10
実験材料および方法	11

結果

I モルモット近位結腸漿膜下 (Subserosa: SS) の ICC (ICC-SS) の 形態学的特徴	13
II モルモット盲腸粘膜下神経叢 (Submucosal Plexus: SP) の ICC (ICC-SP) の 免疫組織化学的所見	15
III モルモット近位結腸粘膜下神経叢 (Submucosal Plexus: SP) の ICC (ICC-SP) の 微細構造レベルの特徴	16

考察

I 近位結腸の ICC-SS	18
II 盲腸の ICC-SP	20
III 近位結腸の ICC-SP	22
IV 結語	24
謝辞	25
参考文献	26
付図	33
付図説明	46

緒言

I 消化管の構造と機能

消化管は、外界からの栄養摂取のため、食物の摂取に始まり、消化、吸収、そして排泄を行う、生命維持に不可欠な器官である。消化管の壁構造は、全体に共通して、粘膜、粘膜下層、筋層、漿膜の4層で構成されるが、殊に粘膜は顕著な差異を示し、例えば、前段階的な消化を行う胃では、酵素を分泌する胃腺の発達が著しく、吸収の場である小腸では、表面積を拡大する多数の腸絨毛が見られる。一方、その消化や吸収を促進し、内容物を正確に輸送する筋層の運動も、消化管機能を果たす上で、重要な要素であるが、消化管の運動は、平滑筋の収縮と弛緩によって成り立っており、それらは主として腸管神経系とカハールの介在細胞 (Interstitial cells of Cajal: ICC) によって調節されている。

II 蠕動運動と腸管神経系

消化管の蠕動運動は、内容物が口側から肛門側へと輸送される、一方向性の秩序だった運動であり、古くから注目されていたが、1899年、BaylissとStarlingによって、消化管筋層に内在する筋層間神経叢による反射運動であることが示され、それは腸管の法則(the law of the intestine)と称された。この消化管に内在する神経叢は、体外に切り出された消化管の運動を制御するに十分な、よく発達した構造や機能をもち、1921年Langleyによって、交感神経、副交感神経と並ぶ、第3の自律神経系として、腸管神経系(enteric nervous system)と呼ぶことが提唱された。

腸管神経系は、主として、輪走筋層と縦走筋層との間に存在する筋層間神経叢(Myenteric plexus)と、粘膜下に存在する粘膜下神経叢(Submucosal plexus; Meissner's plexus)の神経節細胞を含む2つの神経叢を中心として構成されており、筋層間神経叢は、主に消化管の筋層の運動を調節し、粘膜下神経叢は、粘膜上皮、腺、粘膜筋板の運動、粘膜下層に分布する血管などの調節に関わっている。これらの神経節

には、運動性ニューロン、介在ニューロン、知覚性ニューロンの、3種のニューロンタイプが含まれており、完全な反射回路を構成することが明らかにされている (Furness 2006)。また、この2つの他にも、神経節細胞を含まない神経叢として、小腸では深部筋神経叢 (Deep muscular plexus)、結腸では筋層下神経叢 (Submuscular plexus) の発達していることが知られている。

消化管の蠕動運動は、外来性神経線維を切断しても消失せず、自動能を有することが古くから知られていた。筋層の律動的な収縮は、毎分数回から十数回ほどの、ゆっくりと規則的な、slow wave と呼ばれる脱分極の電位変化として、電気生理学的には検出されるが、その発生源、即ち、ペースメーカー細胞の所在については、1982年、Thuneberg による、ICC のペースメーカー説の提唱まで、長い間解決されない問題であった。

Ⅲ カハールの介在細胞 (ICC)

1) ICC の研究の流れ

カハールの介在細胞(Interstitial cells of Cajal: ICC)は、1893年、スペインの神経形態学者 Cajal によって、初めて記載された。この細胞は、紡錘形、もしくは星形の小さな細胞であるが、それまで神経細胞に特異的な染色法として知られていた Golgi 法やメチレンブルー染色で染めだされ、ウサギやモルモットの消化管神経叢において網目状の構造を形成することから、Cajal は、この細胞を神経性のものとして捉えた。さらに、その機能として、交感神経末梢部において神経からの刺激を効果器(平滑筋)へ伝達する働きがあるものと示唆した。

ICC の細胞学的同定については、Cajal の記載直後から多くの議論が交わされたが、電子顕微鏡的観察が始まった後も、結合組織性の細胞(Richardson 1958)、神経性の細胞(Taxi 1965)、未熟な平滑筋細胞(Yamamoto 1977)、あるいは線維芽細胞に類似した細胞として (Komuro 1982) 考えられてきた。細胞学的同定の混乱から、研究の流れも停滞気味のなか、Thuneberg (1982)は ICC の消化管運動ペースメーカー説を提唱した。この仮説は、心臓の洞房結節で有名な Keith (1915)による、消化管におけるペースメーカーを探る研究に影響を受けたものだが、この Thuneberg の仮説に触発され、電気生理学的な研究も盛んに行われるようになった。

Suzuki ら(1986)はネコ小腸の、Hara ら(1986)はヒト、イヌ、ネコ小腸の筋層間神経叢周辺から、自発性の slow wave を検出した。さらに、この slow wave はテトロドトキシン投与で消失しない非神経性であることが、モルモット小腸で報告され (Smith 1986)、slow wave がこの位置に存在する非神経性の細胞、つまり ICC に由来することが示唆された。また、結腸の輪走筋層と粘膜下層の境界部にある筋層下神経叢からも slow wave が多発することが知られていたが、Berezin ら(1988)が、この部位で、形態学的に ICC、神経、平滑筋との連絡を明らかにし、ICC がペースメーカー機能の構造的基礎であることを唱えるなど、Thuneberg の説は次第に支持されるものとなった。

2) ICC と *c-kit* 遺伝子

ICC の形態や機能についての研究は、癌原遺伝子として知られていた *c-kit* 遺伝子と ICC との関連が明らかにされたことを機に急速に進んだ。細胞膜の受容体蛋白である c-Kit をコードする *c-kit* 遺伝子は、W 遺伝子座に、また、そのリガンドである Stem cell factor (SCF)をコードしている *steel*遺伝子は、Sl 遺伝子座にあるが(Chabot et al. 1988,

Geissler et al. 1988)、1990年代、それらの遺伝子の突然変異マウスでは、皮膚に白斑が生じると同時に、消化管のペースメーカー機構に欠陥がみられ、正常な蠕動運動が行われないことが注目されるようになった。1992年、Maedaらによって、c-Kit抗体のACK2を出生直後の正常マウスに投与すると、c-Kit陽性細胞の発達が阻害され、消化管運動に障害がみられることが報告された。さらに、W、Sl遺伝子座の変異マウスやラットにおいて、筋層間神経叢のICCの消失や、正常なslow waveの消失、平滑筋収縮の異常がみられることも報告され(Ward et al. 1994; Huizinga et al. 1995)、電気生理学的に、c-KitやSCFがペースメーカー細胞の分化と、電気的リズムの発生に重要なものであることが明らかにされた。また、Komuro & Zhou (1996)によって、小腸の筋層間神経叢で、c-Kit陽性細胞の網状構造が明らかにされ、それらがカハールの記載したICCと一致することが示され、ICCがc-Kit発現細胞であることが明らかにされた。このように、c-KitとICCの関係が明らかにされたことで、c-KitをマーカーとしてICCを同定することが可能になり(Burns et al. 1997; Torihashi et al. 1999)、また、機能の解析、slow waveの発生機序の解明にも発展が見られるようになった。

3) ICCの形態と分布

c-Kitを用いた免疫組織化学的手法や微細構造レベルでの報告が蓄積され、現在は、ICCは間葉系の細胞の1つで、独立した細胞型として捉えられている。

光学顕微鏡的観察所見によるICCの判断基準を要約すれば、c-Kit陽性の双極性あるいは多極性の細胞といえることができる。また、微細構造上の特徴としては、豊富なミトコンドリアや、中間径フィラメント、同種細胞また平滑筋細胞との間で形成される大きなgap junctionなどの存在が、ICC同定に際しての重要な判断基準である。ゴルジ装置や粗面小胞体は中等度の発達にとどまる(Komuro et al. 1999)。また、ICCには幾つかの微細構造上のサブタイプが存在するが、カベオラや基底膜の有無によって、線維芽細胞型、筋型、中間型かに分類されうる(Komuro 1999)。

現在、明らかにされている主な器官、組織層別のサブタイプについて、簡単に紹介すると、筋層間神経叢(Myenteric plexus: MP)に分布するICC-MP、輪走筋層内(Circular muscle layer: CM)、縦走筋層内(Longitudinal muscle layer: LM)のICC-CM, ICC-LM、小腸の深部筋神経叢(Deep muscular plexus: DMP)に分布するICC-DMP、結腸の筋層下神経叢(Submuscular plexus: SMP)に分布するICC-SMPが挙げられる。

4) ICC の機能

現在、ICC の機能として広く認められているものとしては、消化管運動のペースメーカー機能と神経筋伝達介在機能の 2 つがある。

ペースメーカー機能

1982 年の Thuneberg の報告以来、ICC のペースメーカー機能については、ペースメーカー部位についての電気生理学的なデータと、ICC についての形態学的なデータの照合などからも推定されていたが、前述した ICC と *c-Kit* との関連の研究から、さらに明確なものとしてきた。たとえば、*c-kit* 遺伝子の突然変異動物でみられる *slow wave* の消失とペースメーカー細胞とされる ICC-MP の消失の並行性(Ward et al. 1994; Huizinga et al. 1995)が示され、さらに、*c-Kit* を用いて ICC の同定が可能になったことから、ICC の電気活動の詳細が明らかにされるようになった。特にモルモット胃での研究が盛んであったが、輪走筋層からは *slow wave* が、筋層間神経叢にある ICC-MP からはペースメーカー電位がそれぞれ検出され(Dickens et al. 1999)、それらの電位は同期すること、さらに、両者の内、ペースメーカー電位が先行することが報告された。つまり、*slow wave* は、ICC-MP で発生したペースメーカー電位が、平滑筋に伝播した結果であるということが示された(Hirst and Edwards 2001)。

近年では、ペースメーカー電位の本体とその発生機序が細胞レベルで明らかにされつつある。ペースメーカー電位は、一過性脱分極(単位電位:unitary potential)が同期し、加重したときに形成され、速い立ち上がりの初期相(primary component)と長く持続するプラトー相(plateau component)から構成されているが(Kito and Suzuki 2003)、 Ca^{2+} -activated Cl channel、voltage-dependent Ca^{2+} channel、 IP_3 の関与などで、それぞれの電位が形成されると考えられている。

神経筋伝達介在機能

Cajal (1911)は、神経との近い位置関係から、ICC が、神経から筋への情報伝達を介在するものと推定したが、より確かな証拠の第一歩は、セキセイインコの砂嚢で、ICC と神経終末とが密接する一方、ICC と平滑筋との間に、gap junction が認められたことや (Imaizumi & Hama 1969)、さらに ICC と神経終末部とのシナプス様結合の報告 (Yamamoto 1977)として得られた。また、この位置関係からの考察に加え、Daniel & Posey Daniel (1984)は、テトロドトキシン非感受性の伝達様式が、神経と筋との間に

介在することを報告した。

ところで、ICC が、神経からの情報を筋へと伝達するためには、ICC が神経伝達物質を受け取るための機構を備えていること、つまり、受容体の存在の有無が問題となるが、これに関して、Substance P に対する受容体である NK1 受容体を始めとし、神経伝達物質に対する受容体が ICC 本体に存在することが報告されている (Sternini et al. 1995; Shuttleworth et al. 1993)。また、NO の刺激によってその発現量が変化する cyclic GMP (cGMP) の、ICC での発現も報告されており (Shuttleworth et al. 1993)、単離した ICC が主要な神経伝達物質に反応することが明らかにされている (Publicover et al. 1992)。

また、ICC 欠損動物において、正常な神経筋伝達の反応が見られなくなることなどを利用して、さらに、電気生理学的に詳細な解析も進められ、現在では、抑制性、興奮性、両方の神経筋伝達の介在役であるとされている (Ward & Sanders 2001)。特に、筋層内の ICC-CM, ICC-LM や、小腸の深部筋神経叢の ICC-DMP などが、主にその機能を示すことが知られている。

5) ICC と臨床との関連

基礎研究に加え、臨床的にも、ICC について注目が集まり始めている (Vanderwinden & Rumessen 1999)。例えば、消化管間葉系腫瘍の 1 つである Gastrointestinal stromal tumor (GIST) は、Kit 陽性の ICC 由来の腫瘍であることが明らかにされ、*c-kit* 遺伝子の突然変異が GIST の発生原因であることが明らかにされている (Hirota et al. 1998)。そこから、Kit などの特定のタンパク質のチロシンキナーゼ活性を阻害する、選択的チロシンキナーゼ阻害薬 Imatinib が、切除不能の GIST の治療薬として有効であることも明らかになり、診断や治療の開発に貢献している (Hirota and Isozaki 2006)。

また、腸管神経系が先天的に欠落し、大腸での蠕動運動が正常に行われない Hirschsprung 病でも、ICC との関連が注目されている他、クローン病、アカラシアなど、種々の運動障害や炎症を伴う消化管疾患における ICC の数や分布での障害が報告されつつある (Farrugia 2008)。しかしながら、ヒト病理組織での ICC 同定については、未だ不明な点が多く、今後の一層の進展が期待される段階にあるといえる。

6) 近年の ICC 研究

ICC の研究が、平滑筋運動研究の大勢となりつつある一方、ICC の機能的役割に疑問を投じる論文も、近年報告され(Sarna 2008)、これらの批判を梃子とした、更に新しい研究の発展が期待されている。特に、ICC の神経筋伝達介在機能については、ICC を介さない、神経から筋への直接伝達の可能性や、ICC のみならず、線維芽細胞様細胞など、他の細胞の関与の可能性も注目されている。

線維芽細胞様細胞は、消化管で記載されてきた間質細胞の 1 つで(Thuneberg 1982; Berezin et al. 1994; Rumessen et al. 1993a, b; Faussone-Pelligrini et al. 1990) 、消化管運動制御との関連についてはほとんど注目されてこなかったが、線維芽細胞様細胞と平滑筋細胞との間の小さな gap junction を記載した論文では(Zhou and Komuro 1992a, b; Komuro and Seki 1995; Ishikawa et al. 1997; Horiguchi and Komuro 2000)、消化管運動への関与、神経筋情報伝達の介在役としての機能の可能性が推測されており、近年、この細胞のマーカーとして platelet derived growth factor receptor α (PDGF-R α) が広く使用されるようになったことから (Iino et al. 2009)、研究の新展開があり、プリン作動性抑制性神経の介在役として機能することが示唆されている(Kurahashi et al. 2011)。

IV 研究の目的

これまでの ICC に関する研究は、筋層の運動調節との関連から、ICC-MP や ICC-CM, ICC-LM など、筋層に直接関係する位置にあるサブタイプに対するものが殆どであった。しかしながら、近年、筋層の運動との関係が想定し難い組織層、例えば、モルモット (Toma et al. 1999) やマウス (Vanderwineden et al. 2000) 近位結腸の漿膜下 (Subserosa: SS) の ICC-SS、モルモット胃 (Kunisawa and Komuro 2008) や回盲部 (Miyamoto-Kikuta et al. 2009) の粘膜下神経叢 (Submucosal plexus: SP) での ICC-SP の存在が明らかとなってきた。

ICC-SS や ICC-SP については、先に挙げた報告以外には、ほとんどまだ研究がなされておらず、機能もさることながら、その形態学的特徴についても、不明な点が多い。そこで、本研究では、筋層外に見られる ICC の生理学的意義を考察する手掛かりとして、これらの ICC の詳細な形態学的解析を目的とした。

まず、①モルモットの近位結腸漿膜下の ICC-SS については、免疫組織化学的観察と共に、電子顕微鏡観察を行い、機能を推定し得る微細構造上の特徴について検討した。②また、粘膜下結合組織層の ICC-SP については、モルモット胃での報告で、粘膜の分泌機能との関連が想定されていることなどから (Kunisawa and Komuro 2008)、胃と共通性がみられる (HCO_3^- の分泌が盛ん)モルモット盲腸に注目し、ICC-SP の存在の有無について、免疫組織化学的手法を用いて検索を行った。③さらに、モルモット胃では、粘膜筋板の自発性収縮への ICC-SP の関与も示唆されているが、同様に粘膜筋板の自発性収縮が見られる近位結腸 (Ishikawa and Ozaki 1997) での ICC-SP の検索を試みたところ、予備観察において、非常に発達した Kit 陽性細胞を認めたため、電子顕微鏡観察に適した好材料として ICC-SP については初の微細構造上の解析を行った。

V 大腸の構造と機能

本研究で用いた、結腸と盲腸は、大腸を構成する一部であるが、一般に、大腸は主に水分や電解質の吸収を行う最終的な部位であり、近位結腸での半粥状の内容物を固形状にし、遠位結腸、肛門側へと輸送する。大腸粘膜の吸収能は、小腸から受け取った半粥状の内容物から、90%の水分を吸収するに至る。また、モルモットなどの草食動物では、近位結腸、盲腸部分において、水分・電解質の吸収に加え、摂取した食物繊維を脂肪酸へと変換するための発酵の場として重要な器官であり、それゆえに特徴的な運動がみられることも報告されている。

なお、モルモットの結腸は、ヒトとは異なり、結腸ヒモを持たない。一方、モルモットの盲腸は、非常に発達した袋状の構造であり、盲腸ヒモとよばれる、3本の縦走筋の束が存在し、その他の部分は、ほとんど縦走筋層を含まない壁構造である。

実験材料および方法

モルモット(Hartley 系)メス、6~7 週齢、体重 350-400g を用い、ジエチルエーテル麻酔下にて結腸、盲腸を切り出し、以下の処置を施した。尚、材料とした近位結腸は、回盲部直後から約 5cm の範囲、遠位結腸は直腸直前の部分として区別した。なお、本研究は、早稲田大学人間科学部の動物実験に関する倫理規定に基づいて行われた。

1) 免疫組織化学的手法

〈凍結切片標本作製法〉

取り出した組織を 0.2M 燐酸緩衝生理食塩水 Phosphate Buffered Saline (PBS)で洗浄し、腸管を切り開いた後、4°Cで約 20 分間アセトン固定を施した。PBS でアセトンを洗浄後、低濃度から 30%まで上昇系に調節した Sucrose 溶液に浸漬後、OCT コンパウンド (Sakura Finetechnical) を組織内に浸透させ、液体窒素にて凍結させた。その後、クライオスタット (HM550; Microm) を用い 12-16 μm で切片を作製し、MAS コートスライドガラス(Matsunami)に貼り付け風乾し、標本とした。染色直前に、PAP ペン (DAKO) で標本を縁取りし、PBS で OCT コンパウンドを取り除いた。

〈全載伸展標本作製法〉

取り出した組織を 0.2MPBS で洗浄し、腸管を切り開いた後、4°Cで約 20 分間アセトン固定を施した。PBS でアセトンを洗浄後、実体顕微鏡下にて剥離標本を作製した。漿膜下の観察では、粘膜、粘膜下層、輪走筋層を剥離し、粘膜下層の観察では、粘膜、縦走筋層を剥離し標本とした。剥離後、PBS で再び洗浄し、組織の透過性を高めるため、0.3%Triton-X で 20 分間処理した。

〈蛍光抗体法〉

前述の切片標本および全載標本を用いて、以下の方法で免疫組織化学染色を行った。非特異反応を防ぐため、4%Block Ace Solution (大日本製薬) で 20 分間処理した。その後、1 次抗体を反応させ、PBS で洗浄し、さらに 2 次抗体を反応させた後、同様に PBS にて洗浄を行った。1 次抗体及び 2 次抗体は、2%ウシ血清アルブミン (BSA) と 0.01%アジ化ナトリウムを含む PBS で希釈した。抗体の希釈率や反応時間は下図に示す。抗体反応後、退色防止剤の入った Vectorshield (VECTOR)で封入し、共焦点レーザー顕微鏡 (TCS SP2; Leica) にて観察し、解析を行った。

		使用抗体	希釈	反応時間
ICC	1次	anti-mouse c-Kit rat IgG (CD117; eBioscience)	1:200	Overnight (4°C)
	2次	FITC-conjugated goat anti-rat IgG (Molecular Probes)	1:200	4hour (室温)
神経要素	1次	anti-human PGP9.5 rabbit IgG (Ultra Clone)	1:500	Overnight (4°C)
	2次	TRITC-conjugated swine anti-rabbit IgG (Dako)	1:200	4hour (室温)
平滑筋	1次	anti- α -Smooth muscle actin mouse IgG (Sigma)	1:100	3days (4°C)
	2次	Cy3-conjugated goat anti-mouse IgG (Millipore)	1:200	4hour (室温)

表1 使用抗体・希釈倍率・反応時間

2) 電子顕微鏡的観察

近位結腸を取り出した後、前固定としてカルノフスキー固定液（4%パラフォルムアルデヒドおよび3%グルタルアルデヒド溶液 0.1M 燐酸緩衝液あるいは0.1M カコジル酸緩衝液で緩衝した）で1-2時間浸漬した。前固定後、カコジル酸緩衝液で緩衝した1%四酸化オスミウムに2時間浸漬し、後固定をした。その後、蒸留水で10分間ずつ3回洗浄し、遮光をしながら、酢酸ウランにて一晩浸漬した。固定終了後、上昇エチルアルコール系列(50%, 70%, 80%, 90%, 100%, 無水,各10分)、酸化プロピレン（15分）にて脱水し、その後、エポキシ樹脂の浸透を行った（エポキシ樹脂：酸化プロピレン=1:1に1時間浸漬、エポキシ樹脂：酸化プロピレン=3:1に5時間浸漬）。最後に、エポキシ樹脂に包埋し、60°Cのオーブン中で48~72時間で重合させた。

作製した試料より、マイクロトーム（EM UC6; Leica）にて準超薄切片(0.25 μ m)を作製し、トリイジンブルー染色を施し、光学顕微鏡(Olympus)で観察を行った。標的とする位置をトリミング後、超薄切片(60 nm)を作製した。その後、酢酸ウラン、クエン酸鉛にてそれぞれ10分ずつ電子染色を行い、電子線の照射に対する試料の強度補強のために、真空蒸着器（JEE-4X; 日本電子）でカーボンコーティングし、透過型電子顕微鏡（JEM-1200EX; 日本電子）で観察を行った。

結果

I モルモット近位結腸漿膜下 (Subserosa: SS) の ICC (ICC-SS) の形態学的特徴

モルモット近位結腸の基本構造をトルイジンブルー染色標本で示すと、消化管内腔から、粘膜、粘膜下層、輪走筋層、縦走筋層、漿膜から構成されている (Fig. 1)。近位結腸には、血管、リンパ管の発達著しく、粘膜下層 (Fig.1) のみならず、筋層中にも、筋細胞をおしのけるような大きい血管がしばしば見られた (Fig. 2)。

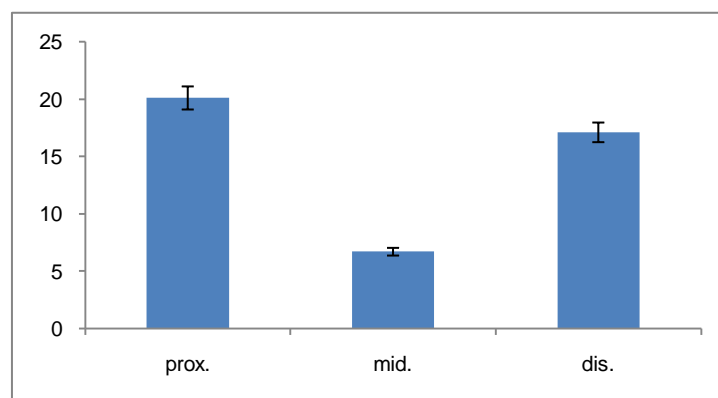
免疫染色用の凍結切片を微分干渉の像でみると (Fig.3)、切片像の大半の厚さを占める輪走筋層が顕著で、筋層の走行の異なる縦走筋層は下方に識別され、上部の輪走筋層境界部は山なりの曲線として識別でき、粘膜下結合組織層は、粘膜筋板とその境界線との間の層として識別される。ICC を標識する c-Kit と神経を標識する PGP9.5 を用いた免疫組織化学染色像でみると (Fig.4)、輪走筋層境界部に沿って分布する筋層下神経叢の ICC-SMP が明瞭に認められ、粘膜下結合組織層には、多数の ICC-SP が散在性に分布するのが認められた。また、筋層間神経叢の ICC-MP、輪走筋層内の ICC-CM、縦走筋層内の ICC-LM、漿膜下には直線状に不連続に分布する ICC-SS が観察された。

近位結腸の漿膜下層を、c-Kit 免疫染色をした全載伸展標本で観察すると、漿膜直下には、多極性の ICC-SS が豊富に存在し、2 次元的な網目構造を構成していた (Fig.5)。高倍率の観察で、細胞 1 つに注目してみると、細胞体からは、4-7 本の突起が伸び、さらにその一次突起からは、二次、三次の分岐した突起が見られた (Fig. 6)。細胞体の大きさは、長軸方向で約 15-20 μm 、短軸方向で約 8-12 μm で、突起の長さは約 50-100 μm ほどで、細胞相互の突起間には連絡が見られた。PGP9.5 による神経線維の走行をみると、この層にはあまり神経要素が発達しておらず、ICC-SS と神経との密な連絡は認められなかった (Fig. 7)。ICC-SS と縦走筋層との位置関係を詳しく吟味するため、 α -smooth muscle actin の抗体で平滑筋を標識すると、まず、縦走筋層の深さでは、双極性の ICC-LM が分布する様子が見られた (Fig. 8)。一方で、多極性の ICC-SS が位置する深さでは、平滑筋の層は見られず、背景として認められる程度で (Fig.9)、それぞれが明らかに異なる層に分布することが示された。また、同一標本で、漿膜下層から、縦走筋層に渡る組織層内の ICC の分布を立体再構築し、三次元的な位置関係をみると、ICC-SS と ICC-LM とが、突起で層を越えて連絡している様子が見られた (Fig.10)。

電子顕微鏡観察では、ICC-SS は漿膜の中皮細胞と、縦走筋層との間の狭い結合組織のスペースに、突起を伸ばした細長い細胞として見られた (Fig. 11)。微細構造上の特

徴は、ミトコンドリア、中間径フィラメントが発達し、細胞膜にはカベオラが認められた(Fig.12)。また、ICC-SS の細長い突起間には、しばしば gap junction による結合が観察された(Fig.13)。一方、ICC-SS と縦走筋層の平滑筋細胞の間には、gap junction (Fig.14)や peg-and-socket 構造(Fig. 15)などによる結合がみられた。さらに、ICC-SS は、縦走筋層の ICC-LM と推定される細胞の突起とも gap junction で結合していた (Fig. 16)。

ところで、本研究では、結腸のうち、回盲部直後 5cm ほどの、肉眼で格子状の血管が顕著に見える部位を近位結腸とし、直腸直前のペレット状の糞塊がみられる部位を遠位結腸、その中間の、格子状の血管が見られなくなる部位を中位結腸として観察したが、中位結腸や遠位結腸の漿膜下における ICC-SS の分布には部位差のあることが明らかになった。中位結腸では、近位結腸と類似の形態の ICC-SS が見られるが、近位結腸ほど発達しておらず、分布密度はまばらであり、ネットワークは疎であった (Fig. 17)。遠位結腸では、近位結腸で見られるようなよく発達した多極性の細胞は見られず、細長い双極性に近い形の細胞の分布が認められた (Fig. 18)。単位面積上での ICC-SS の細胞数を比較してみると (本文挿入図 1)、近位結腸と遠位結腸では、細胞数は類似しており、中位結腸ではそれらの半分以下であった。



本文挿入図 1 近位・中位・遠位結腸における漿膜下層の c-Kit 陽性細胞(ICC-SS)数 ($5.2 \times 10^5 \mu\text{m}^2$ 中) : 近位結腸の細胞数の平均は 20 個で、中位結腸の平均は 6 個と減少するが、遠位結腸では平均 17 個と再び増加する。

II モルモット盲腸粘膜下神経叢 (Submucosal Plexus: SP) の ICC (ICC-SP) の免疫組織化学的所見

モルモット盲腸の壁構造は、一般的な消化管管壁と同様、粘膜、粘膜下層、筋層、漿膜から構成されているが、縦走筋層が極めて薄い部分が大半を占める一方で、非常に厚い縦走筋層からなる、3本の盲腸ヒモを持つことが特徴的であった (Fig. 19)。盲腸ヒモを含む部分の全載伸展標本では (Fig.20)、視野上を縦走する、多数の ICC-LM と神経線維の束が見られるが、縦走筋層の乏しい部分では、筋層間神経叢のネットワークが明瞭に見られ、発達した ICC-MP、ICC-LM と、わずかに ICC-LM の分布する様子が観察された。

盲腸ヒモの無い大部分の広い管壁では、縦走筋層が発達していないため、筋層全層を通しての ICC や神経要素の観察が比較的容易である。粘膜下層を含む筋層全体を、全載伸展標本でみると、大きな網目構造を形成する筋層間神経叢と、それとは別に、小さな神経節とそれを連絡する細い神経束からなる粘膜下神経叢とが、異なる層に観察された (Fig. 21, 22)。さらに、各神経叢周囲に分布する ICC と、輪走筋層内の ICC-CM が視野を横断するように豊富に見られた (Fig.21)。同様の標本で、筋層間神経節周囲のみに注目すると、約 3 本ほどの突起を伸ばす ICC-MP が、神経節を取り囲むように分布していた (Fig. 23)。次に、粘膜下神経節周囲に注目してみると、小さな神経節の周り、それをつなぐ神経束に沿うように、c-Kit 陽性の ICC-SP が見られた (Fig. 24)。粘膜下神経節全体を含む深さで、さらに高倍率で観察すると、神経節の位置に、ICC-SP の細胞体が存在し、4-5 本の突起を細胞体から伸ばし、同種細胞間で結合していた (Fig. 25)。細胞体の大きさは約 20 μm で、突起の長さは 40-100 μm ほどであった。この部分を、立体再構築像で観察すると、ICC-SP は、神経節の手前側と奥側とに分布し、神経節をかご状に取り囲む様子が明瞭に認められた (Fig. 26)。平滑筋を α -smooth muscle actin 抗体で標識し、ICC を c-Kit で標識した切片像では、ICC-SP が粘膜筋板の直下にも分布し、近接する様子が観察された。

Ⅲモルモット近位結腸粘膜下神経叢 (Submucosal Plexus: SP) の ICC (ICC-SP) の微細構造レベルの特徴

モルモット近位結腸の c-Kit と PGP9.5 で染色した切片標本で、神経節周囲や結合組織中に、粘膜下神経叢の ICC-SP の分布が豊富に観察された(Fig.4)。

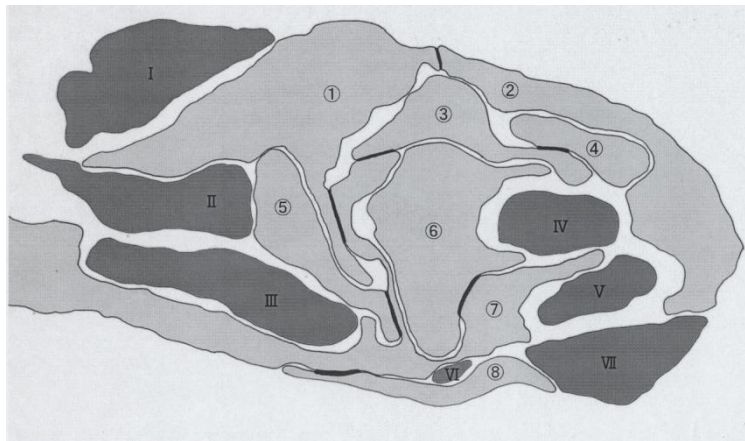
粘膜下層を全載伸展標本で観察すると、神経節とそれらをつなぐ神経線維で構成された粘膜下神経叢が赤で標識され、その周囲に非常に発達した、緑で標識される ICC-SP が見られた (Fig. 27)。神経節の周囲のみならず、その他の離れた結合組織部分にも多数の ICC-SP が認められた。ICC-SP を立体再構築像で見ると、組織層の厚みの中で数層にわたって分布しており、より粘膜筋板に近い層には、他層からは分離してみえるネットワークも認められた (Fig. 28)。粘膜下神経節周辺をさらに高倍率で観察すると、ICC-SP は、細胞体部分が三角形の、約 20 μm ほどの細胞で、3 本ほどの突起を出すものが多く、突起によって連絡しているのが認められた。また、特徴的な構造として、複数の ICC-SP が、細胞体や突起の部分で結合し、1 つの束状の構造を構成している様子が頻繁にみられた (Fig.29)。切片標本を、c-Kit と α -smooth muscle actin で二重染色すると、粘膜筋板に近接するような ICC-SP もしばしば見られたが、粘膜筋板に入り込むことはなかった (Fig. 30)。

電子顕微鏡レベルで粘膜下層を観察すると、粘膜下神経節の周囲に、ICC-SP が、神経節を取り巻くように分布するのが認められた (Fig.31)。ICC-SP は、細長い細胞で、細胞質内にはミトコンドリア、中間径フィラメントの発達がみられ (Fig. 32)、細胞膜上には多くのカベオラと基底膜が観察された。また、同種細胞間で大きな gap junction による結合がみられるなど、典型的な ICC の微細構造を示していた (Fig.33, 35, 36, 37)。また、ICC-SP は神経節周辺のみならず、離れた結合組織中にも頻繁にみられ(Fig. 34)、粗面小胞体のよく発達した線維芽細胞とは容易に識別された。有芯のシナプス小胞を含む軸索膨大部と、ICC-SP の突起との密接像は見られたが、ごく稀であった。

近位結腸の ICC-SP の特徴的な所見として、免疫染色像における、複数の ICC-SP の束状の構造を認めたが、電子顕微鏡観察でも、線維芽細胞の鞘に包まれるような形で、ICC-SP の束状の構造が頻繁に見られた (Fig. 38)。突起の境界をわかりやすくした模式図で見ると (本文挿入図 2)、ここでは、1 つの束状構造が、15 の ICC-SP の突起で構成されており、その内、8 本の突起が、7 個の gap junction によって結合されており、結合した突起が占める面積の合計は、束状構造の面積の 3 分の 2 に相当した。また、血管と血管との間の狭いスペースで、ICC-SP の突起による細長い構造が縦断する様子も

多数認められた (Fig. 39)。そこでも、やはり gap junction での結合が見られたが、それらは非常に大きく発達しており、500 nmほどの長さを示すものや、直交している突起の周囲の全周を取り囲むような gap junction も観察された (Fig. 40)。

また、粘膜筋板直下では、神経束、線維芽細胞、ICC-SP の突起が近接して分布する様子が見られた (Fig. 41)。ICC-SP が、直接、神経束や平滑筋細胞と微細構造レベルで密接する像は今のところ見られておらず、神経束と ICC との間に線維芽細胞が介在するようであった (Fig. 42)。粘膜筋板直下の線維芽細胞から伸びた突起は、筋層内まで侵入し、平滑筋細胞と小さな gap junction で結合していた (Fig. 41 inset)。



本文挿入図 2 Fig. 38 の ICC-SP 束状構造のトレース像：束状構造を構成する突起のうち、8本の突起(①-⑧)が、7つの gap junction(太線)によって結合し、全体の三分の二の面積を占めている(薄灰色部)。構造に含まれる突起のうち、7本(I-VII、濃灰色部)は、この面では結合していない。

考察

I 近位結腸の ICC-SS

漿膜下の ICC-SS は、近位結腸で特に発達しており、漿膜の中皮細胞と、縦走筋層との狭いスペースに、非常に特徴的な多極性の細胞として分布し、同種細胞間の gap junction による結合で、漿膜下全域に、1 層の網目構造を構成していた。その微細構造は、カベオラやミトコンドリア、中間径フィラメント、粗面小胞体、同種細胞間の gap junction の発達など、典型的な ICC の微細構造上の特徴を示していた (Komuro 1999)。他の細胞との連絡に関しては、漿膜下自体にあまり神経が発達していないこともあり、神経と ICC-SS との連絡は疎であると考えられる。一方で、縦走筋層内平滑筋細胞との間では、gap junction や peg-and-socket で結合している様子が観察され、微細構造レベルで、ICC-SS と平滑筋細胞との連絡が明らかになった。また、免疫組織化学的手法を用いた観察では、縦走筋層内の ICC-LM と、ICC-SS とが、層を越えて、突起で連絡する様子が、立体再構築像で明らかになった。電子顕微鏡観察でも、縦走筋層に入り込むような ICC-SS が、縦走筋層内の ICC-LM のものと思われる突起と、gap junction によって結合する所見も得られており、ICC-SS と ICC-LM との機能的連絡もあると考えられる。つまり、ICC-SS は、同種細胞間、平滑筋細胞、縦走筋層内の ICC-LM との間でネットワークを作り、gap junction などを介した情報伝達を行っていると考えられる。

しかしながら、漿膜下という、筋層外に分布することや、神経との連絡が疎であることは、従来 ICC の機能として知られている、蠕動運動のペースメーカー機能や神経筋伝達介在機能を ICC-SS に想定することは難しい。ICC-SS が近位結腸において、特徴的に発達しているという事実は、むしろ近位結腸固有の機能との関連を示唆するものと思われる。

近位結腸は、まだ水分を多く含んだ半粥状の内容部を受け取り、水分や電解質の吸収を盛んに行って、内容物をより固形状へと近づける部位である。そのため、微小循環系の総量が著しく大きいことが報告されているが (Araki et al. 1996; Skinner and O'Brien 1996)、血管やリンパ管の発達も著しいことが、本研究における切片像や肉眼でも観察されている。粘膜から吸収された水分・電解質は血管やリンパ管を通して、消化管壁外へと輸送される必要があるが、この部位の細静脈・リンパ管自体には、収縮要素があまり発達していないため、体肢における静脈血の還流と同様に、周囲の筋層全体による収縮が、それらの輸送の促進に必要と考えられる。水分や電解質の吸収に伴い、

血管・リンパ管が拡張し、管壁全体が膨潤した時、消化管の管壁最外層を取り囲むように分布する ICC-SS が一種の伸展受容器として、その膨潤を感知し、平滑筋層の収縮が惹起されれば、水分の輸送は促進される。具体的には、ICC-SS の情報は平滑筋との間の gap junction や peg-and-socket といった結合によって直接、もしくは ICC-LM を介して間接的に、筋に伝達され、管壁の筋収縮を促し、水分の壁外への輸送を促進するのではないかと推定している (Fig.43) (Aranishi et al. 2009)。

ICC の伸展受容器としての可能性については、ラットの胃で、筋層内の ICC-IM が伸展受容器として働くという報告 (Won et al. 2005) や、ICC に機械刺激受容性イオンチャンネルが発現しているという報告 (Kraichely and Farrugia 2007) がある。また、消化管平滑筋の求心性迷走神経の終末部では、ICC が隣接して含まれる Intramuscular arrays (IMA) と呼ばれる構造があり、伸展受容器として働くことが報告されている (Powley and Phillips 2011)。c-Kit のミュータント動物では、ICC の欠損と、その伸展受容機能の障害の並行性が報告されている (Fox et al. 2002)。

間葉系の細胞の機械刺激受容性に関しては、ICC-SS と類似した、ネットワークを形成する、小腸粘膜上皮直下の線維芽細胞が (Desaki et al. 1984; Komuro 1990; Komuro and Hashimoto 1990)、伸展受容機能をもつことが生理学的実験からも示されている (Furuya and Furuya 2007)。この細胞は、機械的刺激を受けることによって、細胞内のカルシウムイオン濃度が上昇し、ATP 放出によって、その情報を周囲の細胞に伝播していくことなどが報告されているが、これらの研究を参考とし、機械的刺激を加えた際、細胞内カルシウムイオン濃度に変化が見られるか、ATP などの情報伝達物質に対する受容体を持っているかなどに注目した予備実験を行っているが、ICC-SS の推定機能の検証、証明は、今後の課題としたいと考えている。

II 盲腸の ICC-SP

モルモット盲腸の免疫染色を施した全載伸展標本の観察によって、粘膜下神経叢に ICC-SP が存在し、神経節をかご状に取り囲んでいることが示された。

モルモットの盲腸では、取り込んだセルロースや食物繊維をエネルギーとして利用するため、草食動物特有の細菌による発酵が行われている (Stevens 1977; Argenzio 1985)。そのため、粘膜では、pH 維持のため、 HCO_3^- 等の分泌が重要であり (Argenzio and Stevens 1984)、さらに、発酵により生成した脂肪酸の吸収も盛んに行われている (Oltmer and von Engelhardt 1994)。このように、粘膜面での分泌や吸収が盛んであるという点で、盲腸は、胃や小腸と同様に活発な器官であるといえる。

モルモット胃で報告されている ICC-SP は、分泌、吸収への関与と、粘膜筋板の自発性収縮のペースメーカー機能が示唆されている (Kunisawa and Komuro 2008)。これらの考察は、ウサギ胃でのテトロドトキシン耐性の自発性収縮が粘膜筋板で見られていること (Percy et al. 1999, 2002)、そしてこの粘膜筋板の収縮は、ラット、イヌ、ヒト胃の粘膜で、腺圧や血流の調節に関与していること (Synnerstad et al. 1998)、さらに粘膜の自発運動がイヌ小腸で報告されていること (Womack et al. 1987, 1988) などに基づいてなされている。モルモット盲腸の粘膜筋板の自発収縮は、今のところ報告されていないが、盲腸粘膜の吸収、分泌活動もまた、粘膜筋板の運動で調節され、その調節に ICC-SP が関与する可能性は否定できない。

また、発酵効率、吸収効率を上げるため、モルモット盲腸特有の運動が存在するが、その1つとして、*haustra movement* と呼ばれる内容物を回転させる運動が報告されている (Schulze-Delrieu et al. 1996)。この運動は、粘膜面の伸展によってもたらされると考えられているが、盲腸粘膜に突出している粘膜下層に含まれる粘膜下神経叢や、ICC-SP がその刺激を受容して、粘膜筋板の調節を介して、回転運動に関与している可能性が考えられる。また、粘膜の機械刺激に対する反射は、粘膜下神経叢に内在する、一次求心性神経と分泌運動/血管拡張ニューロンによって調節されることが知られており (Furness 2006)、粘膜下神経叢に位置する ICC-SP が、分泌運動に何らかの関与をしていることも推定し得るであろう (Tamada and Komuro 2011)。

本研究によって、モルモット盲腸は、盲腸ヒモ以外の大半の部分が縦走筋層に乏しく、薄い壁構造であるため、筋層全層の観察が容易であること、粘膜下神経叢の層構造を維持したまま、粘膜の剥離が比較的容易であることがわかった。ICC-SP の機能についての生理学的研究は皆無であるが、盲腸が機能的実験に非常に扱いやすい材料として判明

したことから、ICC-SP の生理学的意義の解明の進むことが期待される。

Ⅲ 近位結腸の ICC-SP

モルモット近位結腸の結合組織層には、非常に発達した ICC-SP の存在することがわかった。胃や盲腸での ICC-SP が、神経節や神経束周囲に局限して見られたのに対し、近位結腸では、神経要素との関連の薄い結合組織中にも広く分布していた。

粘膜下神経叢の ICC-SP については、これまで電子顕微鏡的観察による報告は皆無で、微細構造上の特徴は不明であったが、本研究によって初めてその特徴を明らかにした。モルモット近位結腸 ICC-SP の微細構造上の特徴は、カベオラ、基底膜、ミトコンドリア、中間径フィラメント、同種細胞間の gap junction などが発達しており、これまで多く報告されてきた、筋層周辺の ICC で知られている、筋細胞に近い ICC の 3 型に相当する細胞型である (Komuro et al. 1999) ことがわかった。これは、同じく近位結腸の筋層下神経叢の ICC-SMP と同じである (Ishikawa and Komuro 1996)。また、近位結腸の ICC-SP の特徴的な構造として、複数の ICC-SP によって構成される束状の構造が観察された。ICC は、突起部分で豊富な gap junction によって結合しており、一断面においても、束全体の面積の約 3 分の 2 を占める、1 本の太いケーブルを作っているのが認められた。これらの構造の生理学的意義については全く不明であるが、電気的信号、あるいは信号分子の太い経路として機能することが推定され、重要な役割をもつものと考えられるが、今後の重要な研究課題となるものと考えられる (Tamada and Komuro 2012)。

近位結腸は、ICC-SS の考察でも注目した様に、血管・リンパ管が発達し、水分・電解質の吸収が盛んな部分である。それらを制御する神経系である粘膜下神経叢には、血管と腺に投射している、非コリン作動性分泌運動/血管拡張ニューロンとコリン作動性分泌運動/血管拡張ニューロン、腺のみに投射しているコリン作動性分泌運動ニューロンの 3 種類の分泌運動ニューロンが含まれており、腺分泌と血管拡張は同時並行的に制御されていることが知られている (Furness 2006)。ICC-SP の機能を示す実験報告は全くないが、共存する粘膜下神経叢の働きと何らかの共通性を保有することが推測に難しくないであろう。

近位結腸においても、盲腸と同様、免疫染色を施した切片で、粘膜筋板と ICC-SP との近接像が観察された。モルモット近位結腸の粘膜筋板については、自発性収縮を示すことが報告されており (Ishikawa and Ozaki 1997)、この調節に ICC-SP が関与している可能性は否定できない。また、モルモット近位結腸は草食動物の大腸の一部として発酵に関わっているため、内容物を盲腸側へと逆行させる運動 (Takahashi and

Sakaguchi 2006) や、盲腸の *haustra* の運動と似たような特徴を示す、*ripple* と呼ばれる収縮 (Hennig et al. 2010) が報告されており、これらの粘膜面の運動への関与も考えられる。しかしながら、今のところ、電子顕微鏡レベルで、粘膜筋板と ICC-SP の *gap junction* などによる結合は観察されていない。

また、現在、近位結腸の主要なペースメーカー細胞は、近位結腸に特異的に分布する筋層下神経叢の ICC-SMP であることが広く知られており、筋層間神経叢の ICC-MP がペースメーカー細胞である消化管の他の部分とは大きく異なっている (Smith et al. 1987; Plujà et al. 2001)。この ICC-SMP の機能については、粘膜下結合組織を剥離し、ICC-SMP を除去したとする標本では、ペースメーカー電位が消失することが知られている (Yoneda et al. 2004; Kodama et al. 2010)。しかし、本研究で、ICC-SMP とは明らかに異なるが、粘膜下結合組織層に分布する ICC-SP の存在が示されたことは、これまで電気生理学的手法において、ICC-SMP の除去と同義とされる粘膜下結合組織層の剥離は、ICC-SP が除去された結果である可能性も考えられ、ICC-SMP ペースメーカー説の再検討の可能性もある。ICC-SP が従来 ICC-SMP にうたわれていると同様の機能を持つ ICC である、もしくは、ICC-SP と ICC-SMP の両者が協調して、正常なペースメーカー機能が果たされる可能性が浮かび上がり、かなり大きな問題提起となるものと考えられる。小腸や胃などと異なる、近位結腸特有のペースメーカー電位の発生機序について、今後は ICC-SP の存在も踏まえて、更なる解析が望まれる。

IV 結語

これまであまり研究がなされて来なかった筋層外の ICC について、モルモットを材料とし、3つの実験研究を行い、①結腸漿膜下 ICC-SS の形態学的特徴 ②盲腸粘膜下神経叢 ICC-SP の存在の証明 ③結腸粘膜下神経叢 ICC-SP の微細構造上の特徴を明らかにした。これらの研究は、従来、消化管主筋層の運動制御に焦点の集中していた ICC 研究とは一線を画すものであり、ICC 研究の新展開に寄与するものと考えている。

即ち、消化管各レベル固有の役割を持つ粘膜層の機能解析実験の一助となり、消化管全体として総合的理解の進むことが期待される。特に、大腸での水分の吸収・分泌の機能の制御は、身近な消化管の不調や疾病につながる可能性も大きく、病態の理解にも貢献しうるものと考えている。

なお、本論文を構成する3つの研究は、それぞれ以下の国際的専門誌に掲載されている（または予定である）。

[1]Aranishi H, Kunisawa Y, Komuro T: Characterization of interstitial cell of Cajal in the subserosal layer of the guinea-pig colon. *Cell Tissue Res* 335:323-329 (2009)

（注：Aranishi は Tamada の旧姓）

[2]Tamada H, Komuro T: Three-dimensional demonstration of the interstitial cells of Cajal associated with the submucosal plexus in guinea-pig caecum. *Cell Tissue Res* 344:183-188 (2011)

[3]Tamada H, Komuro T: Ultrastructural characterization of interstitial cells of Cajal associated with the submucosal plexus in the proximal colon of the guinea pig. *Cell Tissue Res* (in press) (2012)

謝辞

本学位論文作製にあたり、研究を御指導、御鞭撻を頂き、主査を担当して下さいました小室輝昌先生（早稲田大学人間科学学術院 教授）に、この場をお借りして御礼申し上げます。

また、副査をお引き受け下さいました、山内兄人先生（早稲田大学人間科学学術院 教授）、木村一郎先生（早稲田大学 名誉教授）、実験を御指導頂いた、三井烈先生（名古屋市立大学医学研究科 助教）、小室研究室の諸先輩方にも感謝致します。

参考文献

- Araki K, Furuya Y, Kobayashi M, Matsuura K, Ogata T, Isozaki H (1996) Comparison of mucosal microvasculature between the proximal and distal human colon. *J Electron Microsc (Tokyo)* 45:202-206
- Aranishi H, Kunisawa Y, Komuro T (2009) Characterization of interstitial cells of Cajal in the subserosal layer of the guinea-pig colon. *Cell Tissue Res* 335:323-329
- Argenzio RA (1985) Digestion, Absorption and Metabolism. In: Swenson MJ (ed) *Duke's Physiology of domestic animals*, 10th ed. Cornell University Press, Ithaca, pp 262-277
- Argenzio RA, Stevens CE (1984) The large bowel-a supplementary rumen? *Proc Nutr Soc* 43:13-23
- Bayliss WM, Starling EH (1899) The movements and innervation of the small intestine. *J Physiol* 24:99-143
- Berezin I, Huizinga JD, Daniel EE (1988) Interstitial cells of Cajal in the canine colon: a special communication network at the inner border of the circular muscle. *J Comp Neurol* 273:42-51
- Berezin I, Daniel EE, Huizinga JD (1994) Ultrastructure of interstitial cells of Cajal in the canine distal esophagus. *Can J Physiol Pharmacol* 72:1049-1059
- Burns AJ, Herbert TM, Ward SM, Sanders KM (1997) Interstitial cells of Cajal in the guinea-pig gastrointestinal tract as revealed by c-Kit immunohistochemistry. *Cell Tissue Res* 290:11-20
- Cajal SR (1893) Sur Les ganglions et plexus nerveux de l'intestin. *CR Soc Biol. Paris* 45 :217-223
- Chabot B, Stephenson DA, Chapman VM, Besmer P, Bernstein A (1988) The proto-oncogene c-kit encoding a transmembrane tyrosine kinase receptor maps to the mouse W locus. *Nature* 335:88-89
- Daniel EE, Posey-Daniel V (1984) Neuromuscular structures in opossum esophagus: role of interstitial cells of Cajal. *Am J Physiol* 246:G305-315
- Desaki J, Fujiwara T, Komuro T (1984) A cellular reticulum of fibroblast-like cells in the rat intestine: scanning and transmission electron microscopy. *Arch Histol Jpn* 47:179-186

- Dickens EJ, Hirst GD, Tomita T (1999) Identification of rhythmically active cells in guinea-pig stomach. *J Physiol* 514:515-531
- Farrugia G (2008) Interstitial cells of Cajal in health and disease. *Neurogastroenterol Motil* 20:54-63
- Faussone-Pellegrini MS, Pantalone D, Cortesini C (1990) Smooth muscle cells, interstitial cells of Cajal and myenteric plexus interrelationships in the human colon. *Acta Anat (Basel)* 139:31-44
- Fox EA, Phillips RJ, Byerly MS, Baronowsky EA, Chi MM, Powley TL (2002) Selective loss of vagal intramuscular mechanoreceptors in mice mutant for steel factor, the c-Kit receptor ligand. *Anat Embryol (Berl)* 205:325-342
- Furness JB (2006) Constituent neurons of the enteric nervous system. In: Furness JB (ed) *The enteric nervous system*. Blackwell Publishing, Massachusetts Oxford Victoria, pp 29-79
- Furuya S, Furuya K (2007) Subepithelial fibroblasts in intestinal villi: roles in intercellular communication. *Int Rev Cytol* 264:165-223
- Geissler EN, Ryan MA, Housman DE (1988) The dominant-white spotting (W) locus of the mouse encodes the c-kit proto-oncogene. *Cell* 55:185-192
- Hara Y, Kubota M, Szurszewski JH (1986) Electrophysiology of smooth muscle of the small intestine of some mammals. *J Physiol* 372:501-520
- Hennig GW, Gregory S, Brookes SJ, Costa M (2010) Non-peristaltic patterns of motor activity in the guinea-pig proximal colon. *Neurogastroenterol Motil* 22:e207-217
- Hirota S, Isozaki K, Moriyama Y, Hashimoto K, Nishida T, Ishiguro S, Kawano K, Hanada M, Kurata A, Takeda M, Muhammad Tunio G, Matsuzawa Y, Kanakura Y, Shinomura Y, Kitamura Y (1998) Gain-of-function mutations of c-kit in human gastrointestinal stromal tumors. *Science* 23:577-580
- Hirota S, Isozaki K (2006) Pathology of gastrointestinal stromal tumors. *Pathol Int* 56:1-9
- Hirst GD, Edwards FR (2001) Generation of slow waves in the antral region of guinea-pig stomach--a stochastic process. *J Physiol* 535:165-180
- Horiguchi K, Komuro T (2000) Ultrastructural observations of fibroblast-like cells

- forming gap junctions in the W/W(nu) mouse small intestine. *J Auton Nerv Syst.* 80:142-147
- Huizinga JD, Thuneberg L, Klüppel M, Malysz J, Mikkelsen HB, Bernstein A (1995) W/kit gene required for interstitial cells of Cajal and for intestinal pacemaker activity. *Nature* 373:347-349
- Iino S, Horiguchi K, Horiguchi S, Nojyo Y (2009) c-Kit-negative fibroblast-like cells express platelet-derived growth factor receptor alpha in the murine gastrointestinal musculature. *Histochem Cell Biol* 131:691-702
- Imaizumi M, Hama K (1969) An electron microscopic study on the interstitial cells of the gizzard in the love-bird (*Uroloncha domestica*). *Z Zellforsch Mikrosk Anat* 97: 351-357
- Ishikawa K, Komuro T (1996) Characterization of the interstitial cells associated with the submuscular plexus of the guinea-pig colon. *Anat Embryol* 194:49-55
- Ishikawa K, Komuro T, Hirota S, Kitamura Y (1997) Ultrastructural identification of the c-kit-expressing interstitial cells in the rat stomach: a comparison of control and Ws/Ws mutant rats. *Cell Tissue Res* 289:137-143
- Ishikawa K, Ozaki T (1997) Distribution of several gut neuropeptides and their effects on motor activity in muscularis mucosae of guinea-pig proximal colon. *J Auton Nerv Syst* 64:91-100
- Keith A (1915) The Cabendish Lecture on a new theory of the causation of enterostasis. *Lancet* 186: 371-375
- Kito Y, Suzuki H (2003) Electrophysiological properties of gastric pacemaker potentials. *J Smooth Muscle Res* 39:163-173
- Kodama Y, Iino S, Shigemasa Y, Suzuki H (2010) Properties of acetylcholine-induced relaxation of smooth muscle isolated from the proximal colon of the guinea-pig. *J Smooth Muscle Res* 46:185-200
- Komuro T (1982) The interstitial cells in the colon of the rabbit. Scanning and transmission electron microscopy. *Cell Tissue Res* 222:41-51
- Komuro T (1990) Re-evaluation of fibroblasts and fibroblast-like cells. *Anat Embryol (Berl)* 182:103-112
- Komuro T (1999) Comparative morphology of interstitial cells of Cajal:

- ultrastructural characterization. *Microsc Res Tech* 47:267-285
- Komuro T, Hashimoto Y (1990) Three-dimensional structure of the rat intestinal wall (mucosa and submucosa). *Arch Histol Cytol* 53:1-21
- Komuro T, Seki K (1995) Fine structural study of interstitial cells associated with the deep muscular plexus of the rat small intestine, with special reference to the intestinal pacemaker cells. *Cell Tissue Res* 282:129-134
- Komuro T, Zhou DS (1996) Anti-c-kit protein immunoreactive cells corresponding to the interstitial cells of Cajal in the guinea-pig small intestine. *J Auton Nerv Syst.* 61:169-174
- Komuro T, Seki K, Horiguchi K (1999) Ultrastructural characterization of the interstitial cells of Cajal. *Arch Histol Cytol* 62:295-316
- Kraichely RE, Farrugia G (2007) Mechanosensitive ion channels in interstitial cells of Cajal and smooth muscle of the gastrointestinal tract. *Neurogastroenterol Motil.* 19:245-252
- Kunisawa Y, Komuro T (2008) Interstitial cells of Cajal associated with the submucosal plexus of the Guinea-pig stomach. *Neurosci Lett* 434:273-276
- Kurahashi M, Zheng H, Dwyer L, Ward SM, Don Koh S, Sanders KM (2011) A functional role for the 'fibroblast-like cells' in gastrointestinal smooth muscles. *J Physiol* 589:697-710
- Langley JN (1921) *The anatomic nervous system.* W. Heffer and Sons. Cambridge
- Maeda H, Yamagata A, Nishikawa S, Yoshinaga K, Kobayashi S, Nishi K, Nishikawa S (1992) Requirement of c-kit for development of intestinal pacemaker system. *Development* 116:369-375
- Miyamoto-Kikuta S, Ezaki T, Komuro T (2009) Distribution and morphological characteristics of the interstitial cells of Cajal in the ileocaecal junction of the guinea-pig. *Cell Tissue Res* 338:29-35
- Oltmer S, von Engelhardt W (1994) Absorption of short-chain fatty acids from the in-situ-perfused caecum and colon of the guinea pig. *Scand J Gastroenterol* 29:1009-1016
- Percy WH, Warren JM, Brunz JT (1999) Characteristics of the muscularis mucosae in the acid-secreting region of the rabbit stomach. *Am J Physiol*

276:G1213-G1220

- Percy WH, Kittelsrud JM, Brunz JT (2002) Types of adrenoreceptors mediating responses of rabbit gastric muscularis mucosae. *Dig Dis Sci* 47:356-364
- Plujà L, Albertí E, Fernández E, Mikkelsen HB, Thuneberg L, Jiménez M (2001) Evidence supporting presence of two pacemakers in rat colon. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 281:G255-G266
- Powley TL, Phillips RJ (2011) Vagal intramuscular array afferents form complexes with interstitial cells of Cajal in gastrointestinal smooth muscle: analogues of muscle spindle organs? *Neuroscience* 186:188-200
- Publicover NG, Horowitz NN, Sanders KM (1992) Calcium oscillations in freshly dispersed and cultured interstitial cells from canine colon. *Am J Physiol* 262:C589-597
- Richardson KC (1958) Electronmicroscopic observations on Auerbach's plexus in the rabbit, with special reference to the problem of smooth muscle innervation. *Am J Anat* 103:99-135
- Rumessen JJ, Mikkelsen HB, Qvortrup K, Thuneberg L (1993a) Ultrastructure of interstitial cells of Cajal in circular muscle of human small intestine. *Gastroenterology* 104:343-350
- Rumessen JJ, Peters S, Thuneberg L (1993b) Light- and electron microscopical studies of interstitial cells of Cajal and muscle cells at the submucosal border of human colon. *Lab Invest* 68:481-495
- Sarna SK (2008) Are interstitial cells of Cajal plurifunction cells in the gut? *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 294:G372-390
- Schulze-Delrieu K, Brown BP, Lange W, Custer-Hagen T, Lu C, Shirazi S, Lepsien G (1996) Volume shifts, unfolding and rolling of haustra in the isolated guinea pig caecum. *Neurogastroenterol Motil.* 1996 Sep;8(3):217-25
- Shuttleworth CW, Xue C, Ward SM, de Vente J, Sanders KM (1996) Immunohistochemical localization of 3',5'-cyclic guanosine monophosphate in the canine proximal colon: responses to nitric oxide and electrical stimulation of enteric inhibitory neurons. *Neuroscience* 56:513-522
- Skinner SA, O'Brien PE (1996) The microvascular structure of the normal colon in

- rats and humans. *J Surg Res* 61:482-490
- Smith TK (1989) Spontaneous junction potentials and slow waves in the circular muscle of isolated segments of guinea-pig ileum. *J Auton Nerv Syst* 27:147-154
- Smith TK, Reed JB, Sanders KM (1987) Origin and propagation of electrical slow waves in circular muscle of canine proximal colon. *Am J Physiol* 252:C215-C224
- Sternini C, Su D, Gamp PD, Bunnett NW (1995) Cellular sites of expression of the neurokinin-1 receptor in the rat gastrointestinal tract. *J Comp Neurol* 358:531-540
- Stevens CE (1977) Comparative Physiology of the Digestive System: In: Swenson MJ (ed) *Duke's Physiology of domestic animals*, 9th ed. Cornell University Press, Ithaca, pp 216-232
- Suzuki N, Prosser CL, DeVos W (1986) Waxing and waning of slow waves in intestinal musculature. *Am J Physiol* 250:G28-34
- Synnerstad I, Ekblad E, Sundler F, Holm L (1998) Gastric mucosal smooth muscles may explain oscillations in glandular pressure: role of vasoactive intestinal peptide. *Gastroenterology* 114:284-294
- Takahashi T, Sakaguchi E (2006) Transport of bacteria across and along the large intestinal lumen of guinea pigs. *Comp Physiol B* 176:173-178
- Tamada H, Komuro T (2011) Three-dimensional demonstration of the interstitial cells of Cajal associated with the submucosal plexus in guinea-pig caecum. *Cell Tissue Res* 344:183-188
- Tamada H, Komuro T (2012) Ultrastructural characterization of interstitial cells of Cajal associated with the submucosal plexus in the proximal colon of the guinea pig. *Cell Tissue Res* (in press)
- Taxi J (1965) Contribution á l'étude des connexion des neurons du systeme nervex autonome. *Am Sci Nat Zool Biol Anim* 7:413-674
- Thuneberg L (1982) Interstitial cells of Cajal: intestinal pacemaker cells? *Adv Anat Embryol Cell Biol* 71:1-130
- Toma H, Nakamura K, Kuraoka A, Tanaka M, Kawabuchi M (1999) Three-dimensional structures of c-Kit-positive cellular networks in the guinea pig small intestine and colon. *Cell Tissue Res* 295:425-436

- Torihashi S, Horisawa M, Watanabe Y (1999) c-Kit immunoreactive interstitial cells in the human gastrointestinal tract. *Auton Nerv Syst* 75:38-50
- Vanderwinden JM, Rumessen JJ (1999) Interstitial cells of Cajal in human gut and gastrointestinal disease. *Microsc Res Tech* 47:344-360
- Vanderwinden JM, Rumessen JJ, De Laet MH, Vanderhaeghen JJ, Schiffmann SN (2000) CD34 immunoreactivity and interstitial cells of Cajal in the human and mouse gastrointestinal tract. *Cell Tissue Res* 302:145-153
- Ward SM, Burns AJ, Torihashi S, Sanders KM (1994) Mutation of the proto-oncogene c-kit blocks development of interstitial cells and electrical rhythmicity in murine intestine. *J Physiol* 480:91-97
- Ward SM, Sanders KM (2001) Interstitial cells of Cajal: primary targets of enteric motor innervation. *Anat Rec* 262:125-135
- Womack WA, Barrowman JA, Graham WH, Benoit JN, Kvietys PR, Granger DN (1987) Quantitative assessment of villous motility. *Am J Physiol* 252:G250-256
- Womack WA, Mailman D, Kvietys PR, Granger DN (1988) Neurohumoral control of villous motility. *Am J Physiol* 255:G162-167
- Won KJ, Sanders KM, Ward SM (2005) Interstitial cells of Cajal mediate mechanosensitive responses in the stomach. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:14913-14918
- Yamamoto M (1977) Electron microscopic studies on the innervation of the smooth muscle and the interstitial cell of Cajal in the small intestine of the mouse and bat. *Arch Histol Jpn* 40:171-201
- Yoneda S, Fukui H, Takaki M (2004) Pacemaker activity from submucosal interstitial cells of Cajal drives high-frequency and low-amplitude circular muscle contractions in the mouse proximal colon. *Neurogastroenterol Motil* 16:621-627
- Zhou DS, Komuro T (1992a) Interstitial cells associated with the deep muscular plexus of the guinea-pig small intestine, with special reference to the interstitial cells of Cajal. *Cell Tissue Res* 268:205-216
- Zhou DS, Komuro T (1992b) The cellular network of interstitial cells associated with the deep muscular plexus of the guinea pig small intestine. *Anat Embryol (Berl)* 186:519-527