

第 25 回日本平滑筋学会総会講演抄録 (III)

会 長 東京大学医学部教授 近 藤 芳 夫
昭和 58 年 6 月 24, 25 日 山中湖 ホテルマウント富士

特 別 講 演 I

司会 東北大学名誉教授 鈴 木 泰 三

腸 管 上 皮 の 物 質 輸 送 機 能

東京大学医学部 生理学教室

星 猛

I. 腸管上皮機能の概要

小腸粘膜の表層を蔽う上皮は、刷子縁構造を有する一層の円柱上皮細胞からなり、物質を吸収する機能が特別に分化したものであることは周知のことである。近年はそれに加えて細胞の管腔に面した表面の膜（刷子縁膜）に膜結合蛋白として存在する各種の消化酵素による膜消化および細胞内酵素（dipeptidase など）による細胞内消化が糖質や蛋白質の終末消化に極めて重要な役割を演じていることも明らかになってきている。さらに特殊な条件下（例えばある種の細菌毒素が粘膜側に作用する場合）には絨毛基底部（Lieberkuhn 腺窩部）の細胞の電解質分泌機能が刺激され、多量の液の分泌をひき起こす

機能（一種の防衛反応）をも有しておりそれら機構の詳細も明らかにされてきている。上皮は一般に 2 つの異なった compartment 間の拡散障壁としての機能が重要であるが、小腸上皮はそれ以外に上述の 3 つの重要な生理的機能を備えている多機能上皮（polyfunctional epithelium）といえる。生理的条件下で小腸上皮のこれら機能が円滑に遂行される為には消化管の運動性並びに消化腺分泌機能が正常に維持されていることが極めて重要である。しかしここでは上皮の消化と吸収の機能およびその相互の機能的関連のみについて概説したいと思う。

II. 腸管上皮の吸収機能

腸管吸収の生理学に関する名著として有名な T.H. Wilson 著の Intestinal Absorption が 1962 年に出版された当時、腸管吸収は in vivo 又は in vitro での腸管部分の管内灌流法、反転嚢法、リング標本による組織内蓄積観察法等によって研究が行なわれていた。それらの方法によって、糖、アミノ酸その他いくつかの物質について、明確に能動輸送機構が存在することが示され、当時としては画期的な内容であった。し

かし当時は腸管吸収の研究も組織レベルのものがせいぜいであり、物質輸送の詳かな機序については殆んど未知であった。それから約 20 年経った今日、腸管吸収の機序に関する知識は飛躍的に増大し、多くの物質について膜レベルの輸送機序、或は吸収過程の細胞機序を細かく説明しうるようになってきた。特に吸収に直接関与する膜の輸送体の性質、能動輸送のエネルギー論、駆動力の本態などがより具体的に把握

出来るようになって来たといえる。

小腸上皮の生理的な吸収機能は生体の必要とする物質を体内に供給するものである。上皮細胞にはそのような物質に対しては特異的な吸収系を備えている。第1段階は、生体にとり有用な物質をまず認識し、それを細胞に向けてとり込むことである。その機能は、管腔に面した刷子縁の表面の細胞膜（刷子縁膜という）に組み込まれている輸送体（担体又はキャリア）によって行なわれる。

今日明確にそのような担体によるとり込みが確認されている物質群はD-glucose, D-galactose等のD型 aldohexose, L型の中性、塩基性、酸性アミノ酸およびイミノ酸群、ある種のdipeptideおよびtripeptide, アスコルビン酸等の水溶性ビタミン、胆汁酸、燐酸、果糖、葉酸

などである(図1). Ca^{+} や Fe^{+} 等の吸収にも特異的な輸送体の存在が考えられているが、まだキャリアか特殊なチャネルなのかは明確でない。

担体には大別して2種のを区別することが出来る。1つは基質と Na^{+} とを同時に結合し、両者を同時に運ぶ性質をもついわゆる共輸送(担)体 cotransport carrier 又は cotransporter であり、他は基質のみと結合してその膜透過を助ける単輸送(担)体 uniport carrier 又は uniporter である。細胞の側底膜に存在する $\text{Na}^{+}/\text{K}^{+}$ ポンプが正常に働いている時に、共輸送体は何れも基質を上り坂に輸送する。その結果、基質は粘膜側の濃度よりは遙かに高濃度に細胞内に蓄積される。それに対し単輸送体で運ばれる場合には、単に刷子縁膜内外の平衡を助

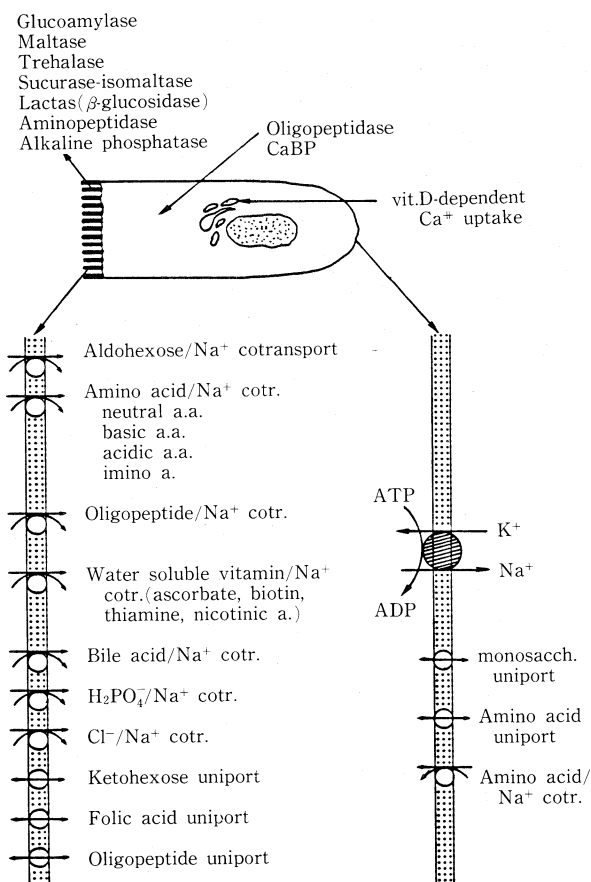


図1. 小腸上皮細胞刷子縁膜および側底膜における各種輸送体と膜消化酵素

けるのみで細胞内高濃度蓄積は見られない。しかし小腸の場合単輸送体で輸送されても、多くの場合基質は細胞内で分解されるか又は代謝による変化を受けるため、その基質が粘膜側にある限り吸収は進行する（後述）。

A 共輸送体を介する能動的吸収のメカニズム

糖、アミノ酸、アスコルビン酸、ビオチンなどの水溶性ビタミン、胆汁酸等生体が必要とする有機溶質は一般に強い濃度勾配に逆らって吸収される。その様な物質の吸収の第一段の過程は、管腔に面した刷子縁膜にある担体による細胞内へのとりこみであるが、能動輸送で吸収されるものについてはすべて Na^+ との共輸送体がそのとり込みに関与している。その共輸送体は物質の認識の役割に加えて、上り坂輸送にも直接関与しているものであり、能動輸送には基本的に重要な役割を果たしている。しかし Na^+ との共輸送体が基質を上り坂に膜輸送するには、細胞の側底膜に存在する Na^+-K^+ ポンプが正常に働いており、常時細胞内を低 Na^+ 濃度に維持し、かつ細胞内を電氣的に負に保っていることが不可欠の条件である。

ある溶質 (S) が Na^+ と共輸送体によって膜輸送される場合に上り坂輸送がおこる理由は次の通りである。 Na^+ の細胞内濃度は常に Na^+-K^+ ポンプによって低く維持されており、かつ細胞内は電氣的にも外液に対して負になっていると、 Na^+ は物理的な駆動力 (濃度差と電位差)

によって細胞内に流入しようとしている。いま担体 (X) に Na^+ と S が結合して XSNa の複合体が形成され、それを介しての Na^+ の細胞内流入が許されると、上記駆動力による Na^+ 流入がおこると同時に S の流入を伴う。充分な Na^+ の駆動力が存在する場合には S は濃度の低い方から高い方に向けても輸送される。S が細胞内に次第に蓄積してきて外液よりも高濃度になると、今度は S の細胞内から外への流れが Na^+ を伴っておこるようになる。そのため S がある程度細胞内に高濃度になるとこの系は平衡状態に達し Na^+ , S の正味の移動がゼロになる。その時は Na^+ を駆動する物理的な力と、S を反対方向に駆動する力 (濃度差) とが平衡している。前者は Na^+ の電気化学ポテンシャル差 ($\Delta\bar{\mu}_{\text{Na}}$)、後者は S の化学ポテンシャル差 ($\Delta\mu_{\text{S}}$) で表わせるので、平衡時においては

$$\Delta\bar{\mu}_{\text{Na}} + \Delta\mu_{\text{S}} = 0$$

となる。 $\Delta\bar{\mu}_{\text{Na}}$, $\Delta\mu_{\text{S}}$ を夫々書き換えると

$$\left(RT \ln \frac{[\text{Na}]_0}{[\text{Na}]_i} + E_m F \right) + RT \ln \frac{[\text{S}]_0}{[\text{S}]_i} = 0$$

となる。 R はガス定数、 T は絶対温度、 E_m は膜電位、 F は Faraday 定数、従って

$$\frac{[\text{S}]_i}{[\text{S}]_0} = \frac{[\text{Na}]_0}{[\text{Na}]_i} \exp \left[\frac{E_m F}{RT} \right]$$

となる。小腸上皮細胞の $[\text{Na}]_i$ は 30~40 mM であるが、活動度係数を考慮すると、 $[\text{Na}]_0/[\text{Na}]_i$ は約 10 となり、 E_m は 50~60 mV である

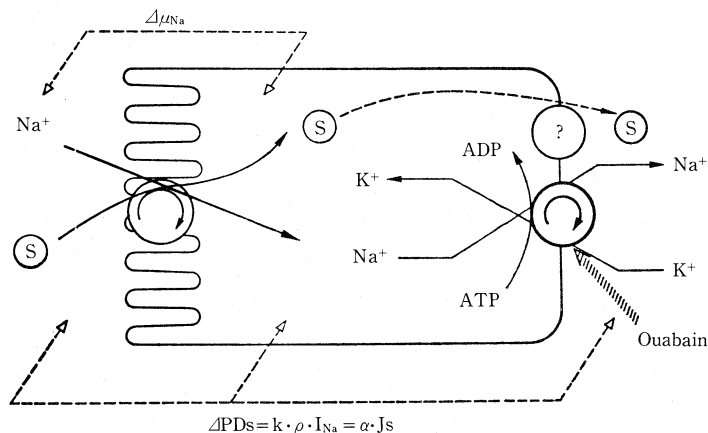


図2. Na^+ との共輸送による二次性能動輸送

ので $\exp [E_m F / RT]$ の項も約 10 となる。いま $\Delta \bar{\mu}_{Na}$ が 100% の効率で S の上り坂輸送に利用されるとすると $[S]_i / [S]_o$ は 100 倍近くにまで上昇することになるが、実際にはエネルギーの散逸、浸透圧効果のためそこまで高濃度になることは普通観察されず数 10 倍の濃度差形成に止まる (Kimmich and Randles, 1979)。

一たん細胞内に高濃度に蓄積した S は糖やアミノ酸の場合は (他の場合については未確認) 側底膜にあるやや性質を異にした、 Na^+ に依存しない単輸送体を介して比較的速かに細胞外に出て行く (図 2)。

このような過程で吸収される場合は、S の管腔内濃度は著しく低下し、濃度勾配に逆らって血液中に吸収されていくが、組織の代謝を抑制したり、無 Na^+ 条件にするとその上り坂輸送はおこななくなる。この様式の能動輸送は、生体で利用出来るようになった自由エネルギー (ATP に蓄えられているエネルギー) を直接輸送に利用しているのではなく、 $Na^+ - K^+$ ポンプ (この場合は ATP を分解して遊離される化学エネルギーを直接 Na^+ , K^+ の translocation に利用する) の作用で維持されている $\Delta \bar{\mu}_{Na}$ に依

存するため、エネルギー利用の観点からは二次的であるので、今日二次性能動輸送と呼んでいる。

小腸での二次性能動輸送は例外なく $\Delta \bar{\mu}_{Na}$ に直接依存しているため、共通した次のような一般的性質を有している。

a) 上り坂輸送の Na^+ 依存性: 前記の各種細胞における各種物質の上り坂の細胞内蓄積あるいは経細胞性の輸送は、孵置メジウム中の Na^+ を他の陽イオンまたは非電解質で置換すると、まったく起こらなくなる。このことを初めて観察したのは Riklis and Quastal (1958) であるが、その後動物細胞における有機物質や陰イオンの能動輸送のすべてについて確認されて来ている (Schultz and Curran, 1970; Hoshi and Himakai, 1982)。また Na^+ の役割は単に外液中に存在することが重要なのではなく、実際に膜を通して細胞内に流入することが重要であり、その Na^+ の流れと S が連結している場合に上り坂輸送がおこなわれる。その際多くの例で Na^+ と S の連結比は 1:1 になっている (図 3)。

b) ウワバインによる抑制: $Na^+ - K^+$ ATPase の特異的抑制剤であるウワバインを

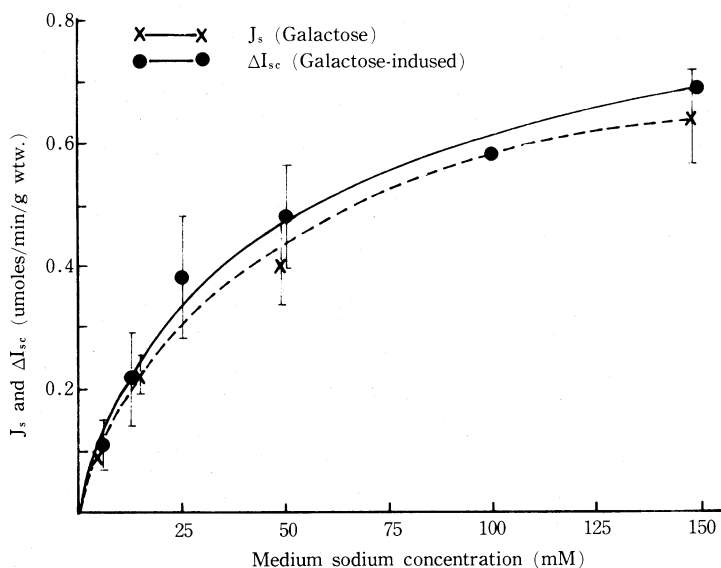


図 3. モルモット小腸の刷子縁膜を通しての D-galactose の初期インフラックス (J_s) と、galactose 添加 (5 mM) によって増加する Na^+ の正味スラックス (ΔI_{sc} , 短絡電流法で測定し、フラックス値に換算したもの) の関係。メジウムの Na^+ 濃度を変えても 1:1 の関係が不変であることを示す (Hoshi et al., 1976)。

側底膜側に与えると $\text{Na}^+\text{-K}^+$ ポンプが抑制されるが、その場合刷子縁膜内外の $\Delta\bar{\mu}_{\text{Na}}$ が消失するため上り坂輸送はおこななくなる。

c) 輸送の起電性: Na^+ と共輸送される物質が電氣的に中性の物質であっても、同時に Na^+ が膜輸送される結果、膜の脱分極を伴い、上皮の場合は電位プロフィールが変化して経上皮電位の変化を誘起する。電氣的に陰性の物質は、 Na^+ と 1:1 の連結比で輸送される場合はまったく起電性を発揮しない。共輸送に伴う電位変化はSのフラックスをよく反映することからSの輸送電位 (transport potential) ともよばれる。

d) 膜小胞での Na^+ 勾配依存性 *overshoot uptake*: 近年小腸上皮細胞の刷子縁膜をかなり純粹に分離することが比較的容易に行なわれるようになってきた。小腸上皮をけずりとしてホモジネートにしたあと、 CaCl_2 (又は MgCl_2) を高濃度 (10 mM) に加えると、細胞内小器官などは容易に沈殿するようになる (Kessler *et al.*, 1978)。その低速遠沈上清を更に密度勾配遠沈法, free flow 電気泳動法, 或は粒径分離法などを用いて分画すると、刷子縁膜は直径 50 ~ 100 nm の閉じた膜小胞としてかなりの純度で分離できる (図 4)。通常得られる刷子縁膜小胞は 95% 以上は right-side out である。その純

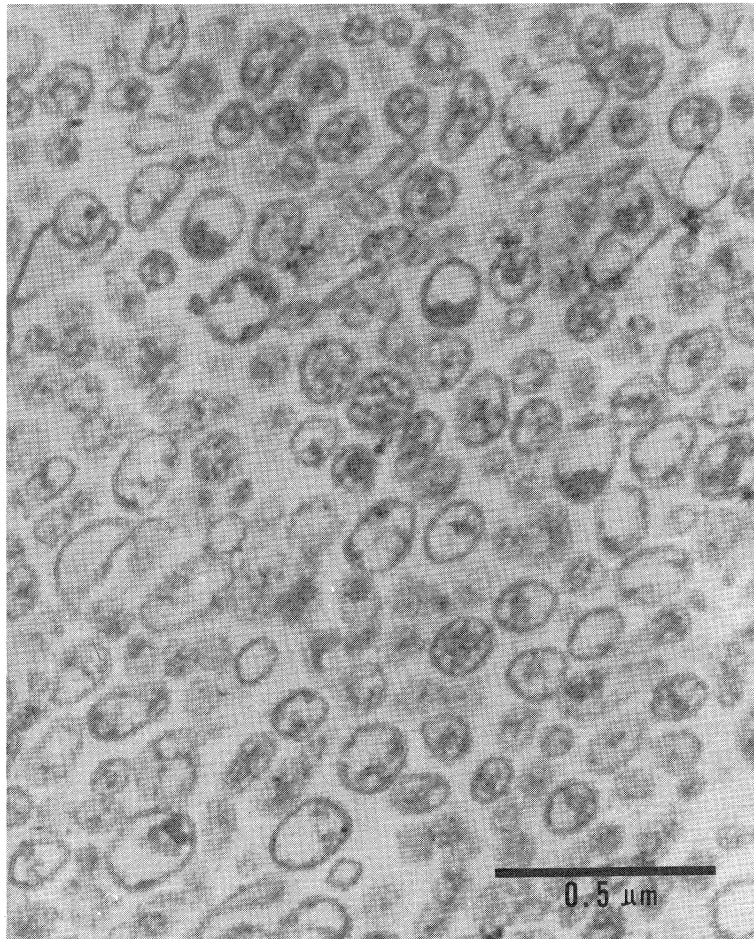


図 4. ウサギ小腸上皮より分離した刷子縁膜小胞の電顕写真。小腸上皮のホモジネートを Kessler *et al.* (1978) の Ca^{+} 沈殿法で処理したのち、CPG-ガラスビーズカラムで粒径分離の原理で分離したもの。Alkaline phosphatase, sucrase の比活性は共に 35 倍に上昇している。

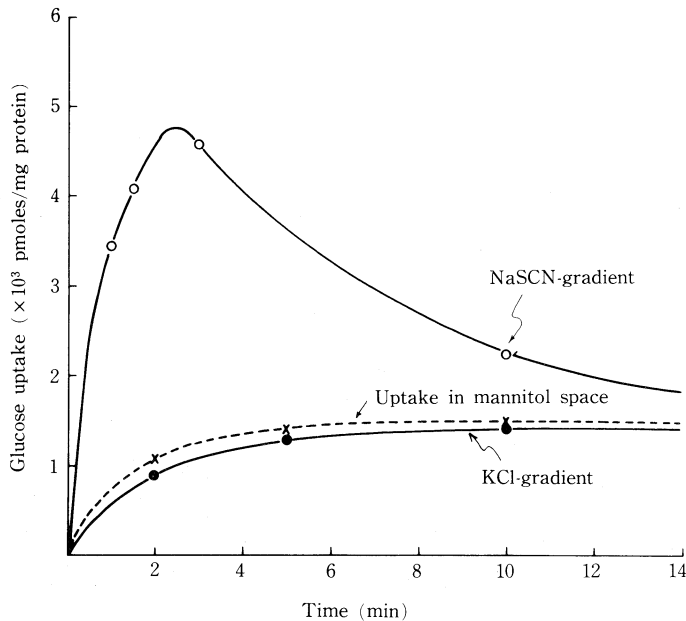


図5. 刷子縁膜小胞の Na^+ 勾配依存性の D-glucose のオーバーシュートとり込み
膜小胞は 100 mM mannitol, 10 mM HEPES/Tris (pH 7.4) で調整し, とり込み
測定時は 100 mM NaSCN 又は 100 mM KSCN, $1 \mu\text{Ci/ml}$ ^{14}C -glucose, 1 mM D-
glucose 存在下で 25°C で孵置し, 急速濾過法で測定したもの

度は刷子縁膜マーカー酵素であるアルカリフォスファターゼ, スクララーゼ等の比活性の上昇度によって判定される。分離した膜小胞は membrane filter を用いた急速濾過法によって容易に物質の取り込みを観察することができる (Hopfer *et al.*, 1973)。いま D-glucose を含むメジウムで孵置する際に同時に Na^+ をメジウムに加えると図5に示すように, 平衡値を超える一過性の overshoot する取り込みを示す。 Na^+ の代わりに他の陽イオン (例えば K^+) を添加した場合にはそのような overshoot は見られず, 能動輸送されない D-mannitol と同様な時間経過で平衡に達する。

このような Na^+ 勾配に依存した overshoot するとり込みは今日 Na^+ との共輸送機構の確認に盛んに用いられている。また刷子縁膜での上り坂輸送の真の駆動力が Na^+ 勾配であることを明確に示すものである。この Na^+ 依存性の overshoot uptake は Na^+ と対をなす陰イオンの種類によって著明な影響を受ける。基質 S が電氣的に中性の場合は SCN^- , NO_3^- のような

脂溶性の高い陰イオンを用いると著しく overshoot は増強される。またあらかじめ小胞内に高い濃度に K^+ を入れておき孵置の際に外液の K^+ を低くすると同時にバリノマイシンを添加して K^+ の透過性を高めて K^+ の拡散電位 (小胞内負) を生ぜしめても, overshoot 取り込みは著明に増強される。しかし S が負電位を有しており, Na^+ と 1:1 の結合比で輸送される場合は overshoot は見られるが, 陰イオンの影響や K^+ 拡散電位の影響は見られない。従って共輸送の場合の正味の荷電輸送の状態を知ることできる。

糖輸送系の概要: 刷子縁膜における糖/ Na^+ 共輸送体は天然の糖では D-glucose および D-galactose のみを輸送する。担体の糖結合サイトはこれら 2 つの六炭糖に共通した立体構造を有するものであれば合成糖でも輸送する (例えば 3-O-methylglucose, 6-deoxyglucose)。しかし D-mannose や fructose などは全く輸送しない。 Na^+ とは常に 1:1 の stoichiometry で結合し, かつ膜透過も同じ比率で行なわれる。従っ

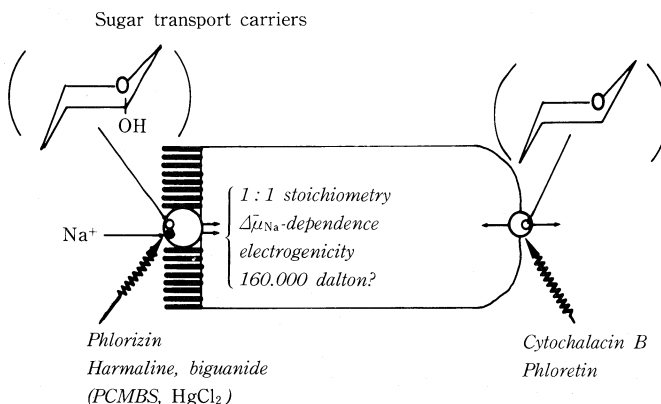


図6. 小腸上皮細胞の糖輸送体の性質（説明本文参照）

て糖輸送は起電性を示す。古くから糖能動輸送の抑制剤として有名なフロリジンは低濃度でこの担体を非動化する ($K_i = 10^{-6} \text{ M}$)。その結合も Na^+ 依存性と膜電位依存性を示す (Toggenburger *et al.*, 1978)。Harmaline, biguanide などの有機塩基も阻害作用をもつが、その場合は Na^+ site に対して阻害作用を及ぼすと考えられる (Kessler *et al.*, 1975) (図6)。

これに対し、側底膜担体はD型ピラノース環構造をもつ糖に対しては広く親和性をもちD-mannose に対しても結合する。 (Wright *et al.*, 1979)。その系は Na^+ とは結合せず、糖のみの単輸送体で、フロリジンには感受性がほとんどなく、そのアグリコンであるフロレチンやサイトカラシンBによって強力に抑制される (Kim-mich and Randles, 1979)。サイトカラシンBは遊離した細胞では強く作用して糖の exit をブロックするが、組織としての構造をもった上皮にはほとんど作用しない。その理由はこの単輸送体がサイトカラシンBの到達しにくい細胞間の狭い部分に面した細胞膜に多く分布していることによるものと解釈されている。

アミノ酸輸送系の概要: アミノ酸の能動的な吸収機構も糖と本質的には同様である。アミノ酸には中性、酸性、塩基アミノ酸、イミノ酸の4群に区別され、それぞれの群に特異的な少なくとも4種類の独立した担体が刷子縁膜に存在していると考えられている。いずれの系もL型に強い親和性をもつ。中性アミノ酸については、

α 炭素原子に NH_2 , COOH の二つの基を有するものに親和性をもつが、カルボキシル基についてはカルボニル基 ($\text{C}=\text{O}$) の存在が必須で、解離する $-\text{OH}$ 基は必ずしも必要でない。 α 位のH原子も他の基で置換すると輸送は阻害されるが、その阻害は steric な障害によるものと考えられている。 (Schultz and Frizzell, 1975)。他方中性アミノ酸の担体との結合の親和性は阻水性の側鎖が関与し、側鎖が長くなるほど親和性は高くなる。したがって疎水性結合も担体との結合に関与するものと思われる。

アミノ酸は糖と異なり、 Na^+ がない場合も促進拡散で細胞内に入りうる。ただしその場合は上り坂輸送は起こらない。 Na^+ 濃度を上げると、 Na^+ との共輸送成分が増大し、 Na^+ とアミノ酸のフラックスの比は1に近くなる。その場合には著明な上り坂輸送が起こり、細胞内に高濃度に蓄積される。側底膜を通しての流出は単輸送体を介するが、その担体は中性アミノ酸と塩基性アミノ酸に共通のものと考えられている (図7) (Mircheff *et al.*, 1979)。酸性アミノ酸は一般に細胞内に入るとアミノ酸転移を受け、細胞より出るときは大部分 alanine などの中性アミノ酸となり (Wiseman, 1968)、側底膜単輸送体を通して細胞外に出て行く。

共輸送体の分子的性質と輸送の分子機構: 今日吸収機能に関与する各種輸送体の分子的性質や分子機構はまだ充分解明されていない。輸送体の中で最も良く研究されているのは糖/ Na^+

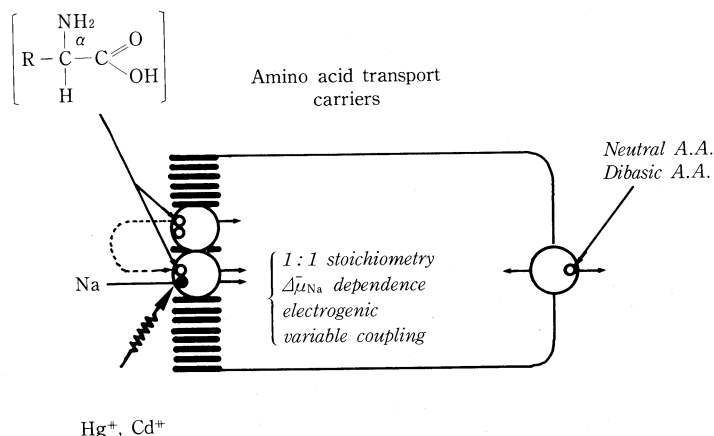


図7. 小腸上皮細胞のアミノ酸輸送体の性質

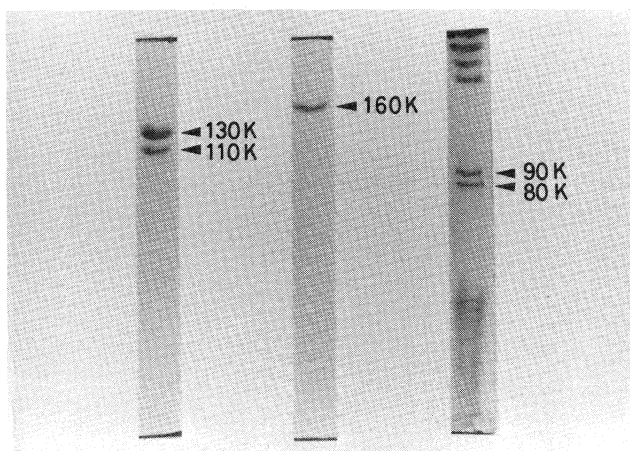
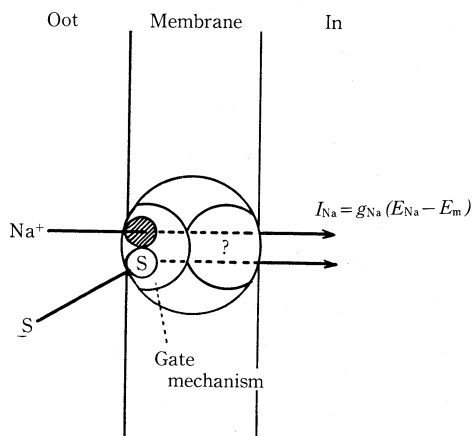


図8. ウサギ小腸刷子縁膜から分離精製した糖/ Na^+ 共輸送体の SDS-PAGE 像 (中央)・negative purification 法で処理した刷子縁膜小胞より蛋白を抽出し、ゲル濾過で粗に分けたもの、クロマトフォーカシング法で分けた蛋白、左は pH 6.0-5.5, 中央は 5.5-5.0, 右は pH 5.0-4.0 の分画に出て来たもの、中央のものにのみ Na^+ 依存性 overshoot uptake の機能が見られる (Kano-Kameyama and Hoshi, 1983)

共輸送体であるが、それについても従来報告されている分子量 30,000~160,000 の巾があり、今日まだ議論の対象となっている。最近われわれは従来の方法と異なり、抽出した膜蛋白を人工的な膜小胞(リボゾーム)に埋め込み、 Na^+ 依存性の overshoot uptake の機能を完全に保持する蛋白の分離精製を試みた (Kano-Kameyama and Hoshi, 1983)。その研究では分離した刷子縁膜小胞を予め deoxycholate と

papain で軽く処理して輸送体以外の表面の不要タンパクを出来るだけ除去し、次いで残存タンパクを Triton X-100 で可溶化し、そのタンパクをさらにゲル濾過およびクロマトフォーカシング法で分子量及び等電点に従って分画して夫々を大豆リン脂質で作製したリボゾームに埋め込んだ。その結果、抽出した膜タンパクの中、分子量 160,000, 等電点 5.0~5.5 の間の糖染色でよくそまるタンパクにのみ Na^+ 依存性



$$g_{Na} = g_{Na}(\max) \frac{[S]_o}{k_m + [S]_o}$$

図9. Na⁺ との共輸送体における基質 (S) による Na⁺ 透過路の開門機構(想定図). S がそのサイトに結合すると Na⁺ が透過的となり Na⁺ の物理的駆動力に従って膜を流れるようになる

overshoot uptake 機能が存在することが明らかになった. このタンパクは SDS-PAGE 上で単一バンドとして見る事が出来る (図8).

この糖/Na⁺ 共輸送担体タンパクの輸送に関与する主要な部分は正常に膜に埋っている時は膜の比較的奥深くに存在すると考えられている. その理由は, 刷子縁膜小胞にプロテアーゼを表面から作用させたのでは糖やアミノ酸輸送は阻害されないし, 糖/Na⁺ 共輸送体のフロジ

ン結合量は deoxycholate で膜を処理し透過性を上げると著明に増加することなどである. (Toggenburger *et al.*, 1982). その輸送の主要部位には Na⁺ と S との結合部位が相接して存在しており, S, Na⁺ の結合はともに相手の結合を賦活するような相互作用を及ぼすと考えられる. とくに S が担体に結合すると, 担体の Na⁺ 結合位が Na⁺ に対して親和性をもつようになり, Na⁺ の膜透過が可能になると考えられる. 実際に刷子縁膜の電気抵抗は S を管腔側に加えると著しく低下する (Hoshi and Himakai, 1982). 膜の Na⁺ コンダクタンスが上昇すると, Na⁺ はその駆動力, すなわち膜電位 (E_m) と E_{Na} の差に比例して流れる. すなわち S は Na 輸送路に対して開門するように働く (図9). その時の Na⁺ の流れと S が何等かの連結機構で互に連結すると考えられるが, その連結の様相は物質によって差がある. 糖の場合は最も密な 1:1 の連結を示すが, アミノ酸, 特に脂溶性アミノ酸の場合は Na⁺/アミノ酸比は 1 以下となり, 更に小分子ペプチド, 特に Gly-Gly の場合は連結が見られなくなる (Himukai and Hoshi, 1983).

B. 単輸送体を介する吸収

刷子縁膜でのとり込みが単輸送体によっているものとしては, D-fructose, 葉酸, リボフラビンなどが知られている. その他, Gly-Gly, Gly-Leu, Gly-Pro などの dipeptide 並びに Gly-

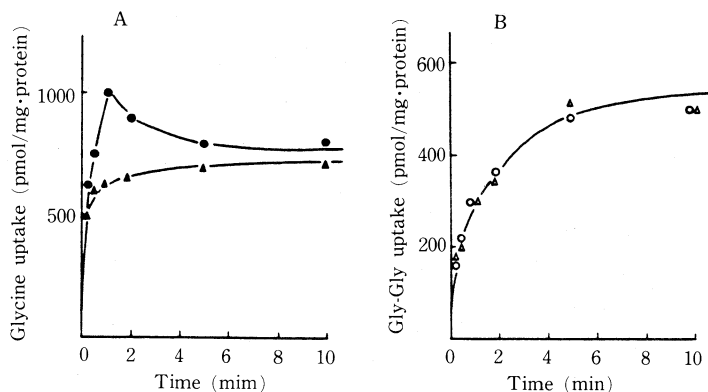


図10. モルモット小腸より分離した刷子縁膜小胞の glycine (A), glycylglycine (B) とり込みの時間的経過. Na⁺ 勾配の作用の有無を比較したもの (Himukai *et al.*, 1983)

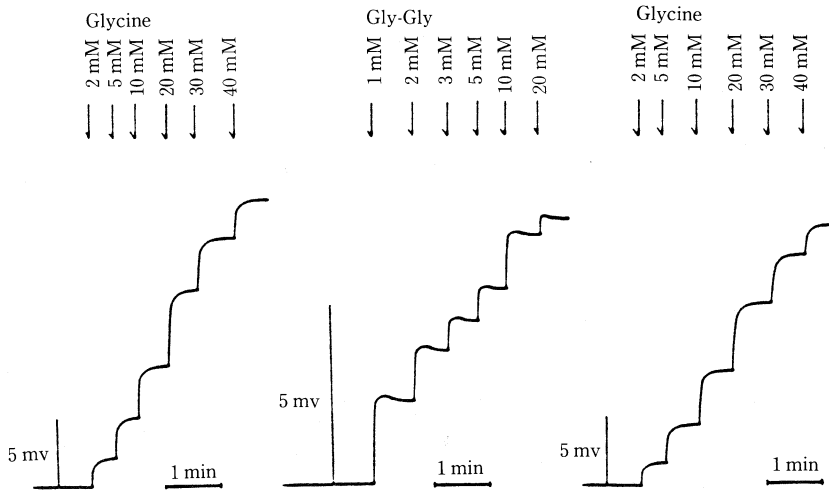


図 11. モルモット小腸の絨毛上皮電位に対する glycine, glycylglycine の影響, 反転囊標本を使用, 粘膜側に上記物質を添加した場合の変化, 矢印で示した時点で添加, 濃度は加重された値を示す (Himukai *et al.*, 1983)

Gly-Gly のような tripeptide は全く Na^+ に依存しない担体でそのままの形でとり込まれる。しかしこれら小分子ペプチドは細胞内に入ると速かに細胞質中の oligopeptidase の作用によってアミノ酸に分解される。上記の他のものも細胞内に入ると磷酸化或はその他の化学的变化を受ける為に、そのものとしては細胞内にたまらず、その為、刷子縁膜での輸送は促進拡散の様式をとるが、平衡に達することなく、吸収は進行する。

Gly-Gly, Gly-Leu の担体輸送は前述のように Na^+ に依存しないが (図 10), 起電性を示す特異な性質をもっている (図 11), それは担体のペプチドサイトにこれらジペプチドが結合すると、隣接部に存在する Na^+ サイトに対して開門効果を及ぼす為と考えられる。そのため Na^+ は、担体を通して膜を流れるが、この時の Na^+ の流れはペプチドと連結しない。 Na^+ との共輸送体では連結がおる結果、 $\Delta\bar{\mu}_{\text{Na}}$ が基質の上り坂輸送の駆動力となるが、この場合には上り坂輸送

はおこらない。開門効果によって生ずる Na^+ の流れは従って生理的には基質 (ペプチド) の吸収時に管内液の吸収を促進するためのものと思われる (Himukai *et al.*, 1983)。

ジペプチド, トリペプチドには構成するアミノ酸の組合せにより無数のものがあり, また中性アミノ酸のみのもの, 酸性アミノ酸, 塩基アミノ酸が構成しているもの等種々のものがある。これらに対して何種類の異なった担体が存在するのかは現在明らかでない (Mathews and Payne, 1980)。中性アミノ酸のみのジペプチド同志であっても例えば Gly-Gly と Gly-Leu は速度論解析の上からは別種の担体によっていると考えられる証拠があり, 事情は極めて複雑である (Himukai *et al.*, 1982)。Gly-Gly と Gly-Gly-Gly は純粋な競合抑制を互に示すことから同一の担体で輸送されているものと思われる。この種のペプチド輸送はトリペプチドまでに見られるもので, それより大型のペプチドには見られない。

III. 膜消化と吸収の機能的関連

小腸上皮細胞の刷子縁膜には膜構成蛋白の一部として各種の加水分解酵素が存在しており (表 1, ならびに図 1), そのいくつかのものは蛍

光抗体法, ferritin-抗体電顕法で膜上に密に分布しているのが観察出来る。これら酵素の多くはいわゆる膜消化 membrane digestion に関係

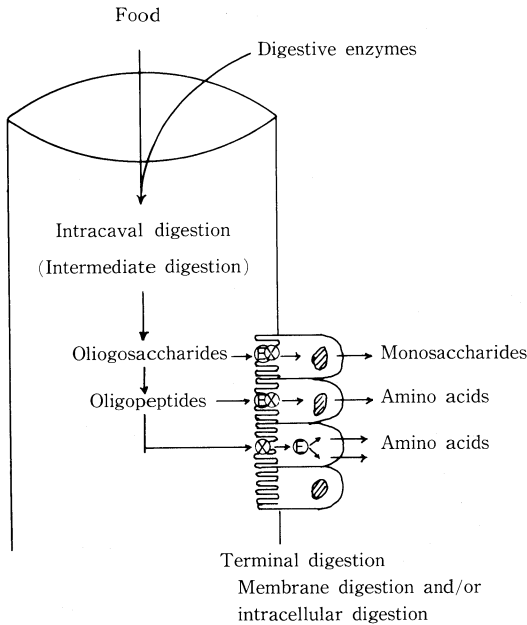


図 12. 小腸での管内消化（中間消化）と細胞消化（終末消化，膜消化と細胞内消化よりなる）の関係

するもので，糖質，蛋白質の終末消化を受けもつものである。糖質の膜消化には，glucose 5~9 ケの重合体に対して最も強い親和性を有する glucoamylase の他，maltase, sucrase, lactase, isomaltase, trehalase 等の各種の二糖類分解酵素が存在しており，ペプチドに対しては広い基質特異性を示す aminopeptidase N および A が存在している。

食物が摂取され，唾液，胃液，膵液と次々と

混和されて，消化管の中で行なわれる可溶性消化酵素によるいわゆる管内消化（intracaval digestion）は中間段階までの消化をうけもつ特性を有しており，小腸管内では各段階のオリゴ糖，オリゴペプチドが混在した状況下で吸収が行なわれている（図 12）。実際に吸収可能な物質は糖の場合は六炭糖，蛋白質分解産物の場合は di-, tri-peptide およびアミノ酸であるが，管腔内には単糖やアミノ酸は殆ど存在せず，それよりやや大型の中間消化産物が主に流れている。それら中間消化産物は刷子縁の微絨毛の作る微小な空間の中に入り，そこで膜消化で分解されるが，その結果生ずる単糖やアミノ酸は同じ刷子縁膜に存在する Na^+ との共輸送体で効率よく，かつ甚しい濃度勾配に逆って速かに吸収されている。その為微小空間からは単糖やアミノ酸は管腔の方には漏出しないうになっている。無 Na^+ 液で灌流したり，輸送系を特異的な阻害剤でブロックすると，単糖やアミノ酸は多量に管腔に出て来るようになる。

いま摘出した反転裏標本を孵置してあるメジウム中に maltose の如き二糖類を添加すると，直ちに glucose と Na^+ の共輸送がおり，その時の glucose の吸収のフラックスは 2 倍のモルの glucose を粘膜側液に加えた時と大差がない（図 13）。この事は膜消化系は殆ど吸収の律速段階にならずに，効率よく glucose を産生していることを示す。この様な効率のよい終末消化と吸収の機能的関連は刷子縁構造があつてはじめて

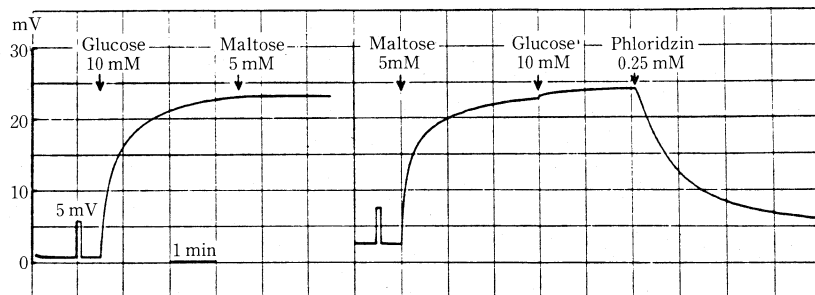


図 13. 小腸の経上皮電位に対する glucose, maltose の影響の比較，glucose 10 mM（飽和濃度）添加後 maltose を加えたのでは電位上昇（glucose と連結した Na^+ の流れを示す）は生じないが，maltose 5 mM を最初に添加すると，直ちに上昇を始め，glucose 10 mM で得られる値の近くに達する。糖/ Na^+ 共輸送をブロックする phlorizin は maltose による電位上昇をも完全に抑制する。

て可能となるものである。従来刷子縁構造は吸収面積の拡大のためと解釈されていたが、生理学的観点からは消化と吸収の両機能の連繋のための重要な構造と見做すことが出来る。

消化管は生体貫ぬく外環境の1部である。従って各種の微生物や寄生虫の侵入、増殖しうる場でもある。もし管内にそれら他生物も容易に利用出来、また増殖に利用できる単糖やアミノ酸が多量に存在すると、せっかく摂取した栄

養素は管内でそれら微生物に消費されるばかりでなく、好しましからざる産生物或は毒素により生体は重大な影響をうけることになる。その様な危険性を防ぐ意味で、中間消化過程としての管内消化および微生物も入り得ない微小な刷子縁空間での終末消化並びにその空間よりの強力な輸送機構が永年の間に進化したものと解釈できる。

文

献

- Himukai, M., Kano-Kameyama, A. and Hoshi, T. (1982). Mechanisms of inhibition of glycylglycine transport by glycyl-L-leucine and L-leucine in guinea pig small intestine. *Biochim. Biophys. Acta.* **687**: 170-178.
- Himukai, M., Kameyama, A. and Hoshi, T. (1983). Interaction of glycylglycine and Na^+ at the mucosal border of guinea pig small intestine. A non-mutual stimulation of transport. *Biochim. Biophys. Acta.* **732**: 659-667.
- Hopfer, U., Nelson, K., Perrotto, J. and Isselbacher, K.J. (1973). Glucose transport in isolated brush border membrane from rat small intestine. *J. Biol. Chem.* **248**: 25-32.
- Hoshi, T. and Himukai, M. (1982). Na^+ coupled transport of organic solutes in animal cells. In: *Transport and bioenergetics in biomembranes* (R. Sato and Y. Kagawa eds.), Japan Scientific Societies Press, Tokyo, Plenum Press, New York/London, pp. 111-135.
- Kano-Kameyama, A. and Hoshi, T. (1983). Purification and reconstitution of Na^+/D -glucose cotransport carriers from guinea pig small intestine. *Jpn. J. Physiol.* **33**: 955-970.
- Kessler, M., Meiser, W., Storelli, C. and Semenza, G. (1975). The biguanide inhibition of D-glucose transport in membrane vesicles from small intestinal brush borders. *Biochim. Biophys. Acta.* **413**: 444-452.
- Kessler, M., Acato, O., Storelli, C., Murer H., Muller, M. and Semenza, G. (1978). A modified procedure for the rapid preparation of efficiently transporting vesicles from small intestinal brush border membranes. *Biochim. Biophys. Acta.* **506**: 136-154.
- Kimmich, G.A. and Randles, J. (1979). Energetics of sugar transport by isolated intestinal epithelial cells: Effect of cytochalasin B. *Am. J. Physiol.* **237**: C56-C63.
- Mathews, D.M. and Payne, J.W. (1980). Transmembrane transport of small peptides. In: *Current topics in membrane and transport*. Vol. 14 (F. Bronner and A. Kleinzeller eds.), Academic Press, New York/London, 1980, pp. 332-427.
- Mircheff, A.K., van Os, C.H., and Wright, E.M. (1979). Alanine uptake by intestinal basal lateral membrane vesicles. *Fed. Proc.* **38**: 1060.
- Riklis, E. and Quastel, I.H. (1958). Effects of cations on sugar absorption by isolated surviving guinea pig intestine. *Can. J. Biochem. Physiol.* **36**: 347-362.
- Schultz, S.G. and Curran, P.F. (1970). Coupled transport of sodium and organic solutes. *Physiol. Rev.* **50**: 637-718.
- Schultz, S.G. and Frizzell, R.A. (1975). Amino acid transport by the small intestine. In: *Intestinal absorption and malabsorption* (T.Z. Csáky ed.), Raven Press, New York, pp. 77-93.
- Toggenburger, G., Kessler, M., Rothstein, A., Semenza, G. and Tannenbaum, C. (1978). Similarity in effects of Na^+ -gradients and membrane potentials on D-glucose transport by and phlorizin binding to vesicles derived from brush borders of rabbit intestinal mucosal cells. *J. Membrane Biol.* **40**: 269-290.

- Toggenburger, G., Kessler, M. and Semenza, G. (1982). Phlorizin as a probe for the small intestinal Na^+ , D-glucose cotransporter. A model. *Biochim. Biophys. Acta.* **688**: 557-571.
- Wilson, T.H. (1962). *Intestinal absorption*. Saunders, Philadelphia/London.
- Wiseman, G. (1968). Absorption of amino acids. In: *Handbook of Physiology*, Section 6, Alimentary Canal, Vol. III, Intestinal Absorption (C.F. Code ed.), Am. Physiol. Soc., Washington D.C., Chapter 67, pp. 1277.
- Wright, E.M., van Os, C.H. and Mircheff, A.M. (1979). Sugar transport across intestinal basal lateral membrane vesicles. *Biophys. J.* **25**: 96a.

(1983年10月11日受付)

特別講演 II

司会 東京大学医学部教授 近藤 芳夫

無神経節腸管の病態生理

兵庫医科大学第一外科学教室

岡本 英三

I. はじめに

Hirschsprung 病は腸壁内神経叢が先天的に欠如するためにおこるユニークな疾患であり、その病態生理解明は本症の治療に大きな進歩をもたらしたばかりでなく、腸平滑筋の自律神経支配に関しても多くの示唆を与え、また問題を提起するところとなった。

私は本学会の前身である日本平滑筋研究会の発足当時から、Hirschsprung 病 (以下 H 病) や食道 achalasia といった消化管の機能的疾患における壁内神経の意義・役割に関する研究の成果を再々発表して来た。今回はからづも特別講演の機会を与えられたのをしおに、これら

無神経節腸管の病態生理ということまでまとめさせていただいた。

無神経節腸管は先天的に壁内神経を欠く H 病の aganglionic segment で代表されるが、後天的に壁内神経を失った achalasia 食道とも共通点がある。何れにしても無神経節腸管はこれまで経験されなかった得がたい研究材料であるといえる。

H 病は小児外科領域では最もポピュラーな疾患であるが、他の臨床学科、基礎医学の方々には耳慣れない疾患であるので、はじめに本症の概略を述べた上で本論に入りたい。

II. H 病の発生学的背景

H 病において、腸壁内神経欠如、つまり aganglionosis は必ず結腸下端より起って口側に及ぶという著しい特徴がある。大部分の症例では aganglionic segment は直腸からせいぜい S 字結腸にとどまる。これが本来の H 病に相当するが、約 10% の症例においては、aganglionosis が異常に長く、全結腸からさらに小腸口側に及ぶものも見られる。

内臓器官の内部や近傍に存在するいわゆる visceral ganglia は副交感神経系に属し、発生学的には節前線維である迷走または骨盤神経核付近に起源を有するというのが Kuntz (1953) 以来の定説である。消化管壁内神経叢もその例外でなく、Cannon 点より口側腸管へは迷走神経によって、遠位側へは、膀胱や子宮と同じく、骨盤神経によって中枢から運ばれてきた

neural cell が神経叢の形成に当ると理解されてきた。古典的 H 病の如く、aganglionosis が結腸遠位側に止っている間はこの発生学的概念で一応理解できたが、前述の如く、骨盤神経の支配域を越え、結腸右半から小腸に及ぶ long segment aganglionosis の出現は到底この学説では説明し得ない。その上、壁内神経叢を欠如する H 病直腸・S 字結腸にも、外来交感・副交感線維は正常に入って来ており (Okamoto *et al.* 1974; Okamoto *et al.* 1982; 桑田, 1976)、また同じく骨盤神経支配下にある膀胱や子宮に分布する visceral ganglia は全く正常に見出されることが我々の検索によって判明する所となった (Okamoto *et al.* 1982; 佐谷, 1974)。

H 病、つまり congenital aganglionosis のこの paradoxical な発生様式を解明するために、

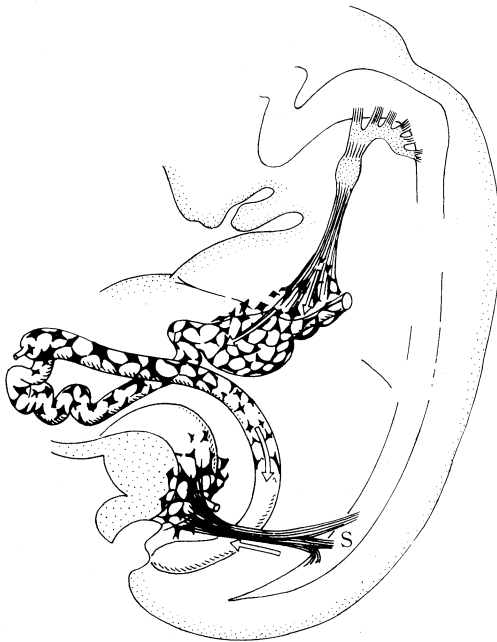


図1. 消化管壁内神経叢および骨盤神経叢の発生模式図

我々はヒト胎児を用いて visceral ganglia の発生過程を再検討した (Okamoto *et al.* 1982; 佐谷, 1974; Okamoto & Ueda, 1967). その結果は図1に示す如くである. すなわち, 内臓器官に分布する visceral ganglia のうち, 消化管壁内神経叢のみは, 迷走・骨盤両神経の支配下にまたがって存在するが, その neuron は頭側迷走神経側からのみ受ける. H病, つまり agan-

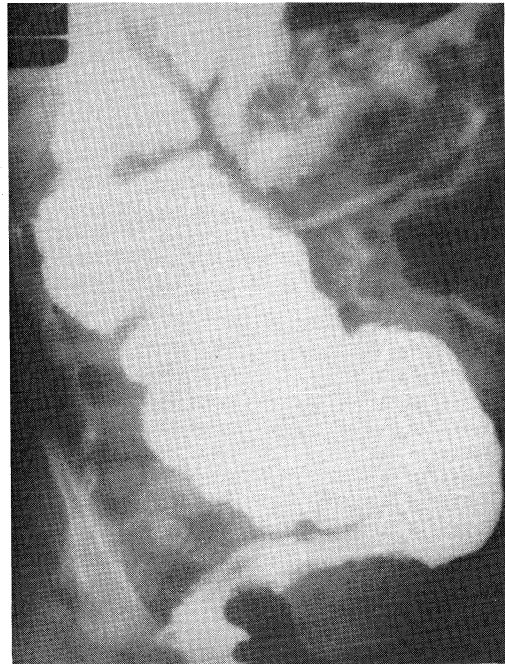


図2. H病注腸レ線. 著明に肥大拡張したS字結腸(巨大結腸)とその肛門側に narrow spastic segment が見える.

glionosis は消化管壁内神経のこの発生学上の特異性を反映した先天異常の一つと言える. 本症において aganglionosis が常に肛門端から始って口側に及ぶ特徴, また aganglionic な直腸の直前にある膀胱や子宮などの骨盤内臓器の壁内神経叢が全く intact である事実もこれによって十分納得されると思う.

III. H病における腸不通症の mechanism

注腸レ線上, aganglionic な rectosigmoid は正常よりやや狭小乃至恰も攣縮しているように見えるので, 狭小部 narrow segment と表現している(図2). 口側 normoganglionic な腸管は糞便の停滞貯溜のため著しく拡張・肥大し, 狭小部と著しいコントラストをなすが, その間に何ら器質的狭窄があるわけではない.

本症の特徴的病像である拡張・肥大部 (megacolon 部) は組織学的に normoganglionic であり, この部に人工肛門を造設するか, 下部の aganglionic segment を切除すると, この拡張・肥大は速かに消失するので, 本症の特徴

的病像である megacolon は aganglionic な rectosigmoid において内容輸送がさまたげられた結果起った2次的現象であることは明らかである.

狭小部, つまり aganglionic segment の腸運動を multiple balloon kymograph 法, 或は腸活動電位を植田, 鈴木(1956)の balloon 電極で誘導記録すると, 同部において propulsive movement, つまり peristalsis が欠如しており, これが通過障害の主たる原因と解されている(図3). いいかえれば腸壁内神経叢が腸蠕動の発現に重要な役割を演ずるといえる.

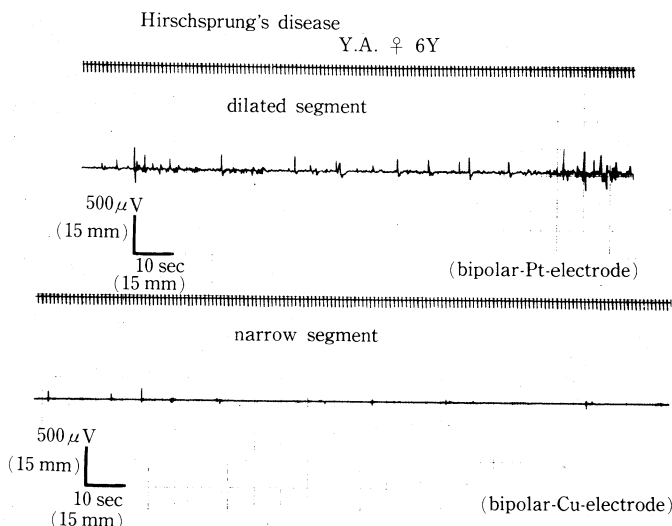


図3. Balloon 電極 (植田・鈴木) で記録した腸管筋電図。上段拡張部 (normoganglionic) では蠕動に一致する spike bursts が出現するが、下段狭小部 (aganglionic) では散発性の spike を見るのみで burst の出現をみない。

またH病においては直腸伸展刺激に対する内肛門括約筋の反射的弛緩、すなわち直腸内括約筋反射が欠如する。本反射の中樞は直腸壁内神経叢にあることがつきとめられており (渡辺, 1973; 大橋 1977), これが直腸壁内神経叢を欠如するH病において本反射が欠如する理由であ

る。直腸内肛門括約筋反射の欠如は肛門管の反射的開口欠如 anal sphincter achalasia を意味し、蠕動の欠如と並んでH病における腸不通症-便秘の重要な mechanism を構成するものである。

IV. 無神経節腸管の病態生理

A. Denervation 説の提唱

H 病において aganglionic な rectosigmoid が狭小となることは前述した。これは何も rectosigmoid という部位に特異性があるのでなく、aganglionosis の範囲に一致する。全結腸 aganglionosis では結腸全体が狭小化し、H 病の image と逆に microcolon を呈する (図4)。また腸管の狭小化は壁内神経を先天的に欠如する場合に限らず、後天的に変性・消失した場合にも起る。その好例が食道 achalasia である。

無神経節腸管の状態を“spastic”或は“constricted”と表現する人もいるが、術中の観察では同部は決して正常より著しく細小な訳ではなく、また筋層が固く攣縮してもいない。切除した組織標本でみると同部の粘膜や筋固有層は正常よりむしろ atrophic であり、不用性萎縮を思

わせる (図10)。他に適当な用語がないので狭小化や狭小部と表現するが、むしろ“undilated”や“collapsed”の表現の方が適当と思われる。

それでは無神経節腸管は何故狭小となるのか。これは演者がH病研究に取り組んだ当初から脳裏を離れない疑問であり、その病態生理解明を一つの命題として来たのである。

当時、腸壁内神経細胞は副交感神経の節後 neuron とされていた。外来性の副交感線維は節前線維としてこれに接続するが、交感線維はすでに節後線維として腸壁に入って直接筋細胞に接続するというのが一般的通念であった。この通念に従うと、腸壁内神経を欠如するH病の aganglionic segment は当然交感神経優位となり、拡張 (抑制) することはあっても、この様に狭小化することは到底説明することが出来なかつ



図4. 全結腸 aganglionosis の注腸レ線。結腸全体が狭小化を示し、microcolon と表現される所見を呈する。直腸は注入圧のため太く見えるが、注入圧をゆるめると細小となる。

たのである。

1961年提出した私(岡本, 1961)の学位論文では、H病の無神経節腸管を鍍銀法で検索し(図5a, b), 同部に外来性交感・副交感線維は入って来るが、筋層内に終末が見られないところから、正常では副交感のみでなく、交感線維も壁内神経細胞に接続しているとの大胆な仮説を提唱した。つまり壁内神経叢は腸管の運動を直接司る局所の中樞であり、交感・副交感神経はこの神経系を介して間接に支配作用を及ぼすに過ぎないと考えた。H病狭小部においてはこの局所中樞を欠如している訳で、そこでは外来神経の支配を受け難いことは勿論、壁自体の刺激による原始的な反射回路さえも欠如する、つまり同部の筋層は完全な除神経状態にあると考えた。平滑筋は除神経状態では最大収縮状態で静止するという Magnus(1904)の実験、あるいは Alvarez(1922)のナメクジウオの実験などをもって無神経節腸管の“狭小化”を説明した。

その後問もなく、Falk & Hillarp(1962)に

よって catecholamine の組織化学的手法が発表され、ヒト及び多くの哺乳類の腸管では血管壁に分布するのを除いて、交感線維はすべて壁内神経細胞にシナプスをもって接続することが証明された(Norberg, 1964)。続いて腸壁内神経細胞の中には excitatory neuron ばかりではなく、non-cholinergic, nonadrenergic inhibitory neuron の存在も証明された(Burnstock *et al.* 1965; Crema *et al.* 1968)。かくて腸壁内神経叢は腸を支配する副交感系の1部ではなく、そのみで独立した神経系であり、交感・副交感に次ぐ第3の神経系として、その機能は中枢神経に匹敵するとまで言われるに至った(図6)。

腸壁神経叢を先天的に欠如するH病の aganglionic segment では興奮性神経を欠くのみでなく、同時に抑制性神経支配も欠如するので、同部の筋細胞は文字通り筋細胞本来の tonus にもどった状態にあり、これが無神経節腸管の狭小化の本態であると考えることが出来る。

以上が denervation 説提唱の経緯と根拠である。当然のことながら、この所説に対する反論も多い。その主なものを要約すると、1つはH病の aganglionic segment に多量の外来交感・副交感線維の分布がみられることであり、もう一つは Cannon の“denervation hypersensitivity”が見られないという2点である。以下これらの反論に対する反論を述べる。

B. 無神経節腸管における外来神経の意義

H病の aganglionic segment にも外来交感・副交感神経は腸壁に到達していることは前述した。これらの神経線維は terminating target である壁内神経細胞が存在しないので、無制限に伸長・増生し、正常では入って行かない筋固有層や粘膜筋板、更に粘膜固有層にまで侵入分布する(図7)。これを組織化学的に検索すると cholinergic 並びに adrenergic 両線維の異常な増生性変化としてとらえられ、その特徴はそのまま本症の組織化学的診断法として利用されている(図8, 9)。

一方、この増生肥大した外来神経線維が無神経節腸管の病態生理に如何なる意義を持ってい

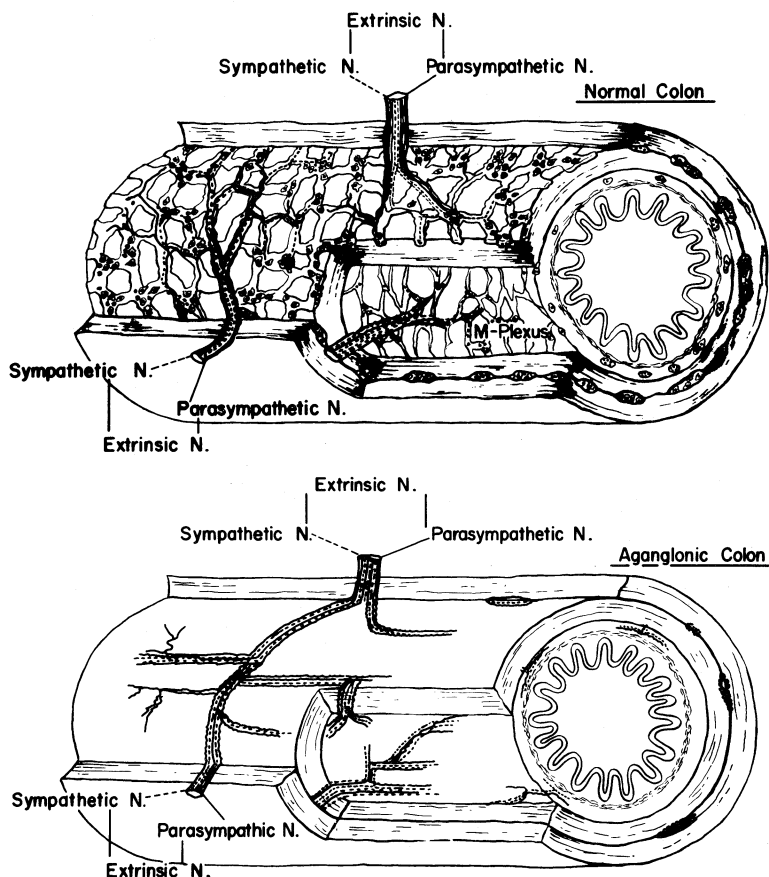


図5. 腸壁神経叢と外来交感副交感線維。上段(a)正常腸管, 下段(b)無神経節腸管。無神経節腸管では壁内神経叢の網眼構造はなく, 外来線維はtargetを失って樹枝状に増生伸長するが, 筋層内に終末構造を欠く。

古典的な概念

新しく提唱された概念

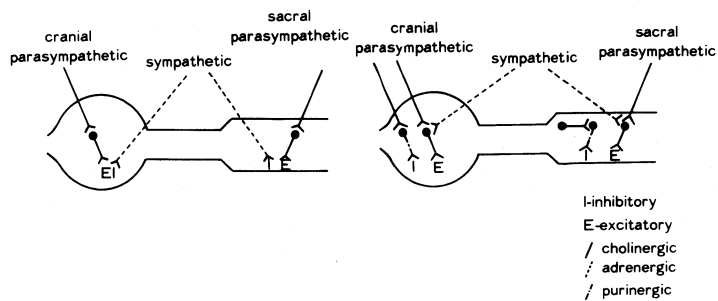


図6. 消化管における自律神経支配の新旧の概念の比較 (Burnstock 1972 による)。

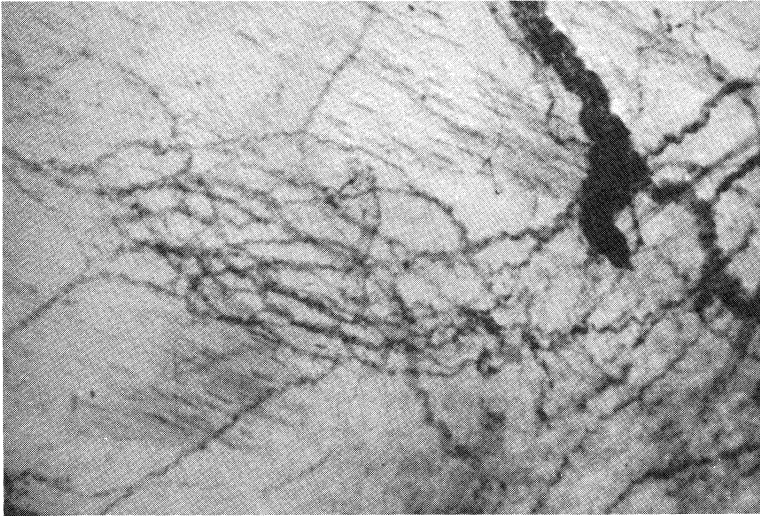


図7. H病無神経節腸管に入ってきた外来神経の増生像。恰も断端神経腫をみる如くである(鍍銀法)。

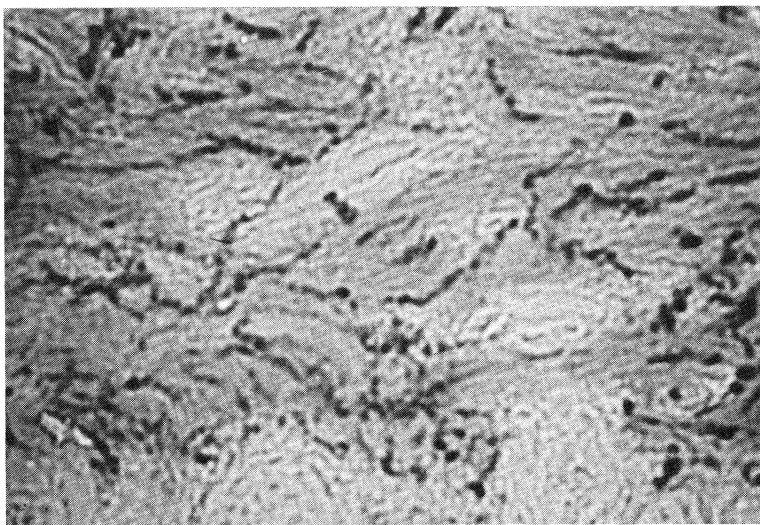


図8. H病無神経節部筋層内に密に分布する cholinergic nerve fiber. 同様の増生像は粘膜筋板や粘膜内にまでみられる (Karnousky-Roots 法)。

るかが現在最もホットなディスカッションの存する所である。多くの人達はこの増生所見をもって cholinergic 並びに adrenergic hyperinnervation の状態と考え、腸管筋の狭小化に重要な役割をもつとしている (Garrett *et al.* 1969; Touloukian *et al.* 1973; Gannon *et al.* 1969; 横山, 1983)。しかし cholinergic fiber はともかく、その antagonist である adrenergic fiber の hyperinnervation が無神経節腸筋の攣縮狭小

化にどう作用しているかに関しては明快な説明がない。

私は aganglionic segment に入ってきた節前線維 (交感線維も含めて) が、欠如した節後ニューロン (壁内神経) に代って、直接効果器に終末し支配作用を及ぼしうるかどうかに大いに疑問に思っている。神経線維が多量に分布しているから、そこに濃密な神経支配が行われていると単純に考えるのはどうか。長節の agan-

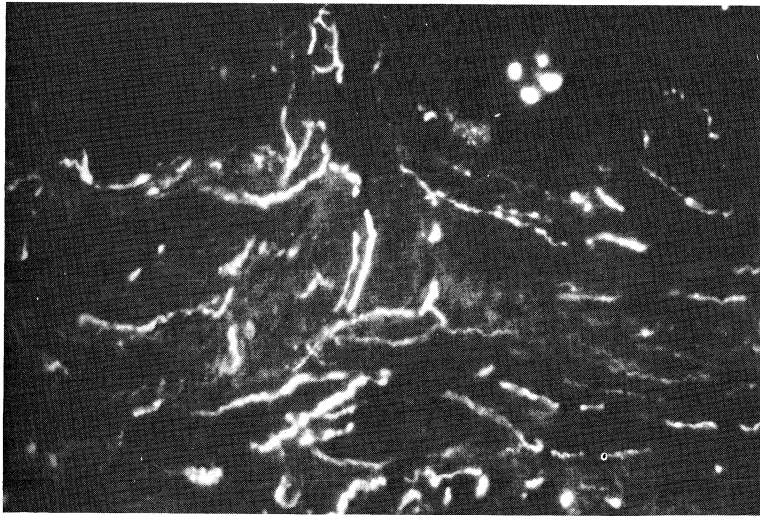


図9. H病無神経節腸管 catecholamine 蛍光, adrenergic fiber の著明な増生像, その分布及び密度は cholinergic fiber のそれと平行して見られる (Folk-Fillarp 法).

glionic gut で検索すると外来神経の増生肥大現象は直腸に最強であり, 口側には殆んど外来神経分布を見ない(図 10, a, b). このことは外来神経の増生肥大は無神経節腸管の狭小化に必須でない事を明白に示している.

achalasia 食道においても外来交感・副交感神経は肥大した神経束として両筋層間に出現する(岡本, 菅原 1975)が, その先は必ず変性崩壊した神経節内に入り, その中で軸索は glomerular な増生を示す(図 11). H病の如く筋層内に樹枝状に入っていく. 神経線維は胎生期から運命づけられた (genetically determined) target を求めて伸長を続け, 到達するまで止らない (Jacobson, 1978). 同様の現象は神経切断後の再生神経でも起り, 切断された神経遠位側の中を間違いなく以前の target に到達する (neurotropism). 前者が H 病, 後者が achalasia であり, 壁内神経欠如の時期が先天的か後天的かの差であって本質的には神経の neurotropism に依存している (図 12).

この様に H 病とは壁内神経欠如の機転も, 外来神経の分布形態にも違いはあるが, achalasia 食道はやはりレ線上狭小を示し, その運動異常は蠕動の欠如と sphincter achalasia であり, H 病と全く共通している (岡本, 菅原,

1975). この事実をみても, 無神経節腸管の病態は壁内神経欠如, 即ち denervation にあり, 同部の外来神経の作用によるものでないといえる.

食道 achalasia では古くから副交感神経の agonist である mecholyl に対する hypersensitivity が指摘されている (図 13). これは Cannon の denervation hypersensitivity (Cannon, 1939) で説明されて来た. しかし H 病では denervation hypersensitivity に相当する現象は見られない. この違いの本質については後に receptor 定量の項で述べる.

以上の如く H 病 aganglionic segment では, 外来交感・副交神経は直接筋細胞に支配を及ぼしていないことを間接的に裏付ける所見を示した. denervation 説を裏付けるためにはもっと直接的な証明が必要である.

C. 神経筋接合部電位の記録

H 病の無神経節腸管の筋条片に対する薬理学的並びに電気生理学的研究は数多くある. しかし本症筋層内に見られる外来神経線維の増生伸長した末梢が果して筋細胞を支配 (innervate) しているか否かを知るためには, 同部の接合部電位 (junctional potential) を検索するのが最も確実と考えた. そこで教室岡空を九大薬理学栗山教室に派遣し, 二重遮糖隔絶法を習得させ,

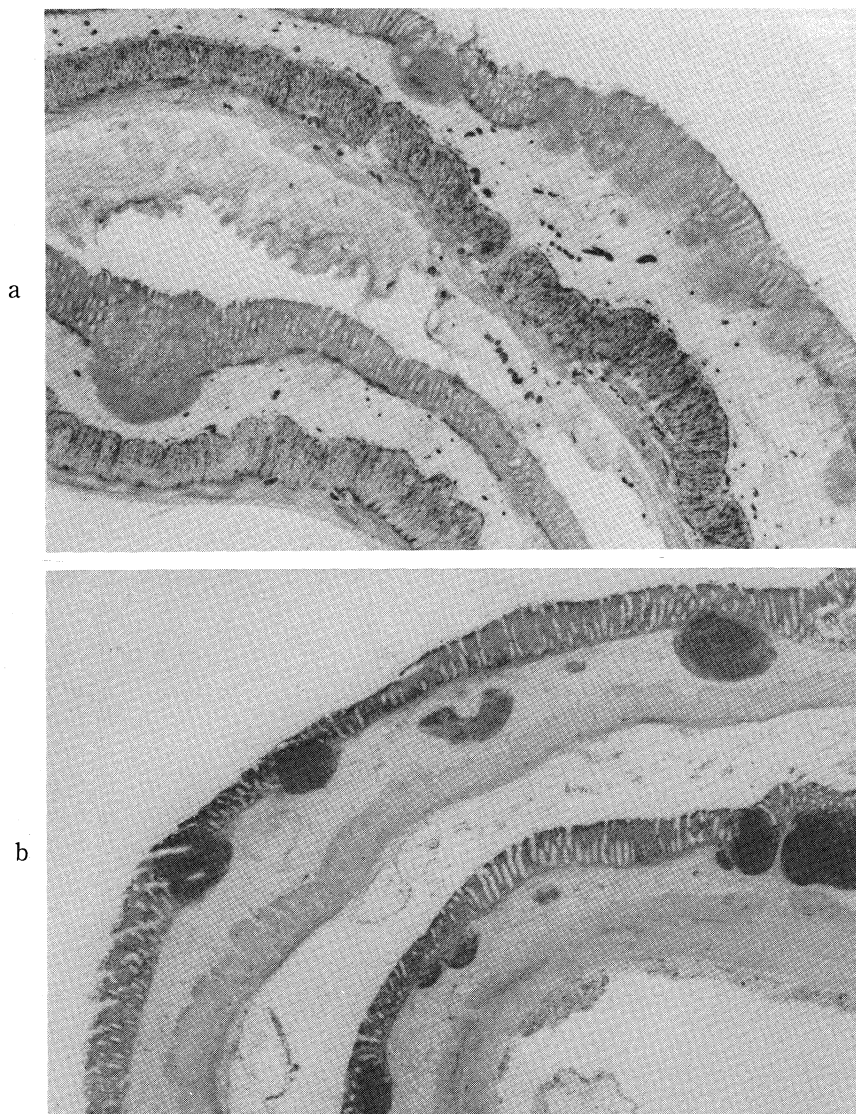


図 10. AChE 染色. 全結腸 aganglionosis. 切除腸管を小田巻き状として切片作製. 上段 (a) 遠位側 (直腸) 筋層内に多量の cholinergic fiber が分布する. 下段 (b) 筋層内には cholinergic fiber の分布は欠如に近い位少ない. リンパ濾胞の発達と全層はむしろ萎縮している.

ヒト及びマウス H 病腸管を用いて検討させた.

H 病マウスには Jackson 研究所で作られた piebold lethal strain (a/a sl/sl) を用いた (植木, 岡本 1979). 本症マウスでは直腸下端から 10~20 mm にわたって Auerbach および Meissner 両神経叢が欠如し, その口側は 10~20 mm の hypoganglionic segment をへて normoganglionic へ移行する. aganglionic seg-

ment には, ヒト H 病におけると同様, 外来神経線維の著しい肥大増生が認められる.

先づヒト及びマウスの正常対照筋層標本では, field 刺激によって収縮を伴う興奮性接合部電位 (excitatory junctional potential, e.j.p.) とそれに引きつづく抑制性電位 (inhibitory junctional potential, i.j.p.) がその応答として得られる (図 14).



図 11. achalasia 食道下部, 太い外来神経束は崩壊し, グリヤ細胞で埋った元神経節部に進入し, 内部では軸索が glomerular に増殖している. 筋層内には神経線維は 1 本も分布していない. (鍍銀法)

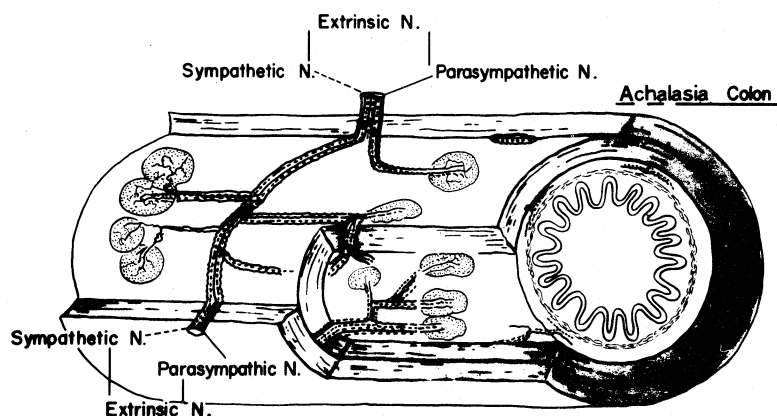


図 12. 食道 achalasia の自律神経分布状態を示す模式図. 図 5 a, b, と対比されたい.

刺激強度を変えるとその強度に応じた加重現象が観察された. 接合部電位に対する各種自律神経遮断剤の効果の検討から, e.j.p. はコリン作働性興奮神経によるものであり, i.j.p. は非アドレナリン作働性抑制神経によることも確認した(図 15).

しかし一方, ヒト及び piebold lethal mouse の無神経節腸管筋層標本では同様な条件下でも筋の張力はもとより, 何らの電位変化にも得られなかった(図 16). つまり無神経節腸管筋には

多量の cholinergic 及び adrenergic nerve fiber の分布をみるにかかわらず, それらが同部の筋細胞と neuromuscular junction を形成しているとの証拠は認められない.

D. neuro-transmitter receptor の定量

無神経節腸管に多量に分布する外来交感・副交感線維が neuro-muscular junction を形成しているとすれば, それに見合って筋層内の receptor も増加していきかねるべきである. そこで H 病無神経節部と口側正常部の mus-

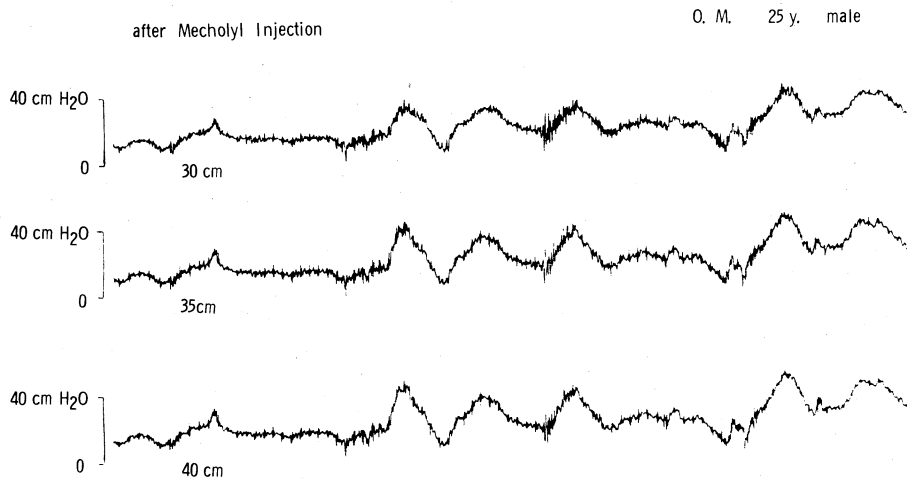


図 13. 食道 achalasia 内圧曲線. mecholyl の負荷により, 各誘導とも内圧の著しい上昇を示す. 各誘導は同期しており, 推進性蠕動の欠如も同時に示す.

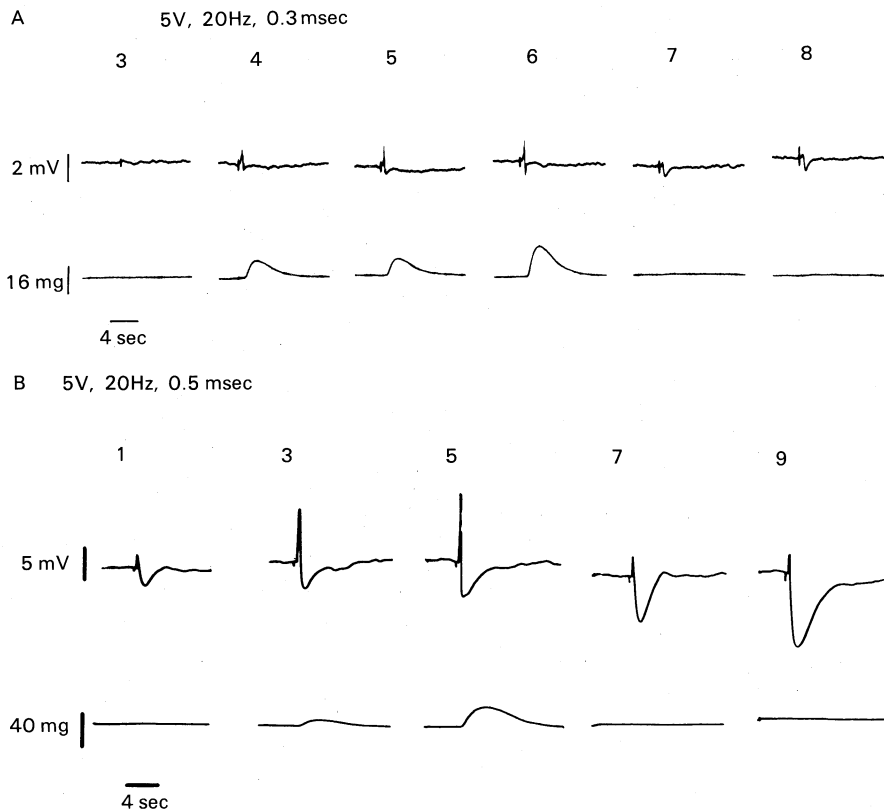


図 14. 正常マウス (A), ヒト (B) 直腸筋層標本の field 刺激に対応する応答. 上段刺激条件と強度, 中段膜電位, 下段張力を示す.

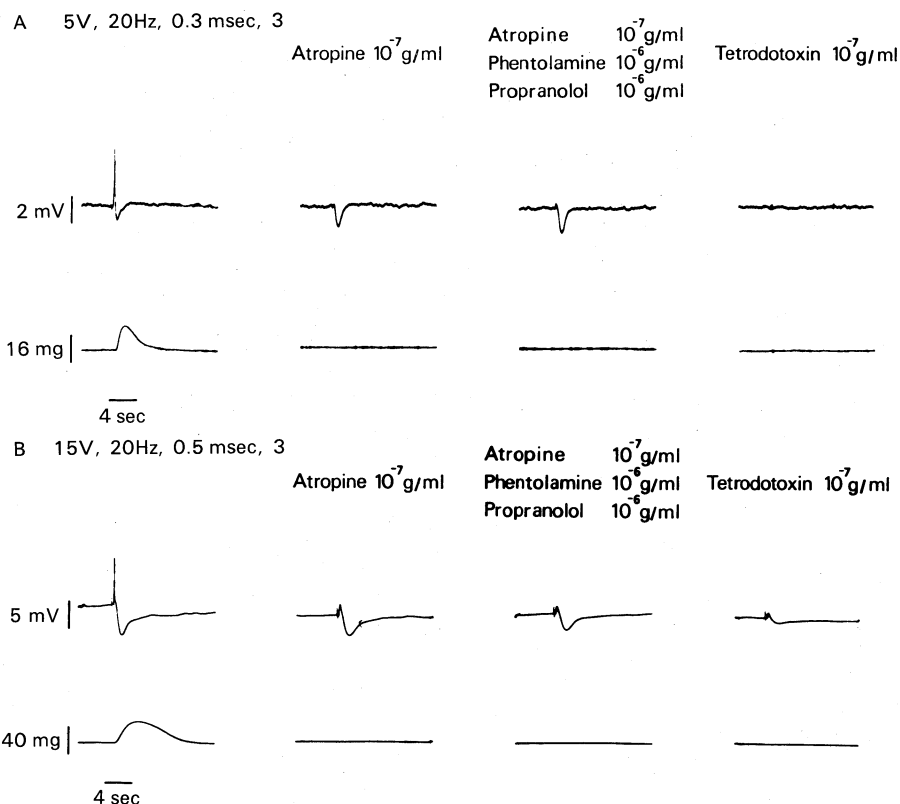


図 15. 正常マウス (A), ヒト (B) 直腸, 接合部電位に対する各種神経遮断剤の効果を示す。

carinic ACh-receptor 及び α -, β -adrenergic receptor を測定した。

muscarinic ACh-R 量を 3HQNB に対する最大特異的結合量で見ると無神経節腸管では 243.6 ± 51.9 fmoles/mg protein であり, 正常対照腸管の 307.8 ± 57.9 に対しむしろ有意の減少を認めた ($P < 0.005$)。3HQNB 結合の dissociation constant (KD) 及び oxotremorine, atropin の ID₅₀ 値には両者間に差を認めないので, mAChR に対する結合能に変化はなく, 無神経節腸管において mAChR 数のみが有意に減少しているといえる (Table 1)。

adrenoceptor も同様に β -receptor は対照に比べ同量であり, α receptor はむしろ有意に減少していることが観察された (Table 2)。

この所見は組織学的所見から一部学者によつて推測された hyperinnervation の状態は根底からくつがえったといえる。

Ellman 法で測定した AChE 活性値は (Table 1) 1 mg 蛋白量当たり毎分無神経節腸管では 55.8 ± 25.8 nmoles ACh 加水分解量を示し, 対照の 20.9 ± 24.8 n moles に比し有意に高値を示した ($P < 0.001$)。無神経節腸管で AChE 含量がこの様に高いことは以前から知られていた。(Kamijo *et al.* 1953)。また ACh 及び nor-adrenalin 含量も著明に増量していることも知られている (Touloukian *et al.* 1973; 菲沢, 横山 1980)。そしてこれらはすべて cholinergic 及び adrenergic hyperinnervation の証左とされてきた。しかしその receptor が少しも増加していない, むしろ減少を示すという大きなギャップに関して誰れも適切な答えを出していない。

むしろ我々は axonal flow によって輸送されてきた neurotransmitter とその分解酵素が末端で消費されることがないので貯溜し増量するのは当然であり, これこそ neuromuscular

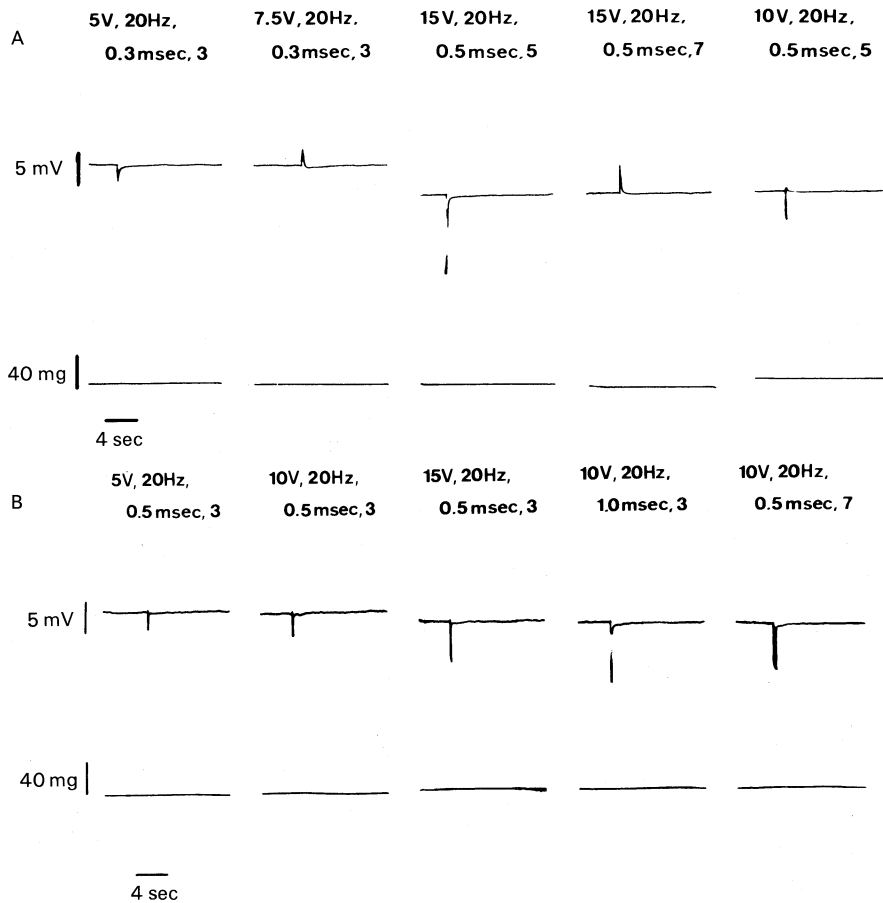


図 16. マウス (A), ヒト (B) 無神経節腸管輪状筋標本の field 刺激に対する応答. 如何なる刺激を加えても接合部電位は得られない.

Table 1. Muscarinic acetylcholine receptors of Hirschsprung's disease in man

QNB-binding	Aganglionic segment N=15	Normoganglionic segment N=15
Maximal specific binding (f moles/mg protein)	243.6±51.9**	307.8±57.9
KD (n M)	0.460±0.280	0.465±0.206
ID50 of oxotremorine at 0.4nM QNB (M)	7.5×10^{-7}	8.2×10^{-7}
ID50 of atropine at 0.4nM QNB (M)	4.1×10^{-8}	6.5×10^{-8}
ACh-E (n moles acetylthiocholine hydrolysis/min/mg protein)	55.8±25.8*	20.9±13.1
Protein contents (μg/mg wet weight)	78.4±29.5	75.9±24.8

* P<.001 ** P<.005

junction を欠如する denervation 状態の 1 つの証左と考えている.

H 病の好個モデルである piebold lethel マウスについて mAChR 量を測定しても無神経

節部でやはり有意の低下を示している. 又 AChE 量の増量も認められた (Table 3).

そこで H 病腸管の生体内における機能的神経支配の有無を検べるために, H 病マウス腹腔内

Table 2. Adrenoceptors of Hirschsprung's disease in man

adrenoceptor binding		Aganglionic segment	Normoganglionic segment
α_1 -R n=7	Maximal specific binding of ^3H -Prazosin (f moles/mg protein)	154.2 \pm 26.5*	183.8 \pm 18.7
	KD (nM)	11.94 \pm 4.24	10.72 \pm 5.02
	Protein contents ($\mu\text{g}/\text{mg}$ wet weight)	87.1 \pm 24.8	84.9 \pm 12.1
β -R n=5	Maximal specific binding of ^3H -DHA (f moles/mg protein)	35.5 \pm 7.9	38.2 \pm 6.1
	KD (nM)	4.207 \pm 1.039	4.364 \pm 1.627
	Protein contents ($\mu\text{g}/\text{mg}$ wet weight)	85.4 \pm 27.8	84.0 \pm 18.3

* P<.05

Table 3. Muscarinic acetylcholine receptors of Hirschsprung's disease in mice

QNB-binding	Aganglionic rectum N=10	Normal rectum N=15
Maximal specific binding (f moles/mg protein)	178.1 \pm 17.3**	210.2 \pm 33.8
KD (nM)	0.524 \pm 0.279	0.509 \pm 0.227
ID50 of oxotremorine at 0.4nM QNB (M)	2.6 $\times 10^{-7}$	3.5 $\times 10^{-7}$
ID50 of atropine at 0.4nM QNB (M)	2.1 $\times 10^{-8}$	4.1 $\times 10^{-8}$
ACh-E (n moles acetylthiocholine hydrolysis/min/mg protein)	19.1 \pm 5.1*	11.9 \pm 5.1
Protein contents ($\mu\text{g}/\text{mg}$ wet weight)	98.7 \pm 21.1	103.4 \pm 11.5

* P<.005 ** P<.025

Table 4. Effect C6 treatment on ^3H -QNB binding of Hirschsprung's disease in mice

		QNB • binding		ACh-E	Protein contents
		Bmax (f moles/mg protein)	KD (nM)	(n moles acetylthiocholine hydrolysis/min/mg protein)	($\mu\text{g}/\text{mg}$ wet weight)
Normal rectum	C ₆ treated N=10	344.6 \pm 77.7*	0.455 \pm 0.219	23.0 \pm 10.9**	79.4 \pm 10.5*
	untreated N=15	204.9 \pm 31.6	0.478 \pm 0.192	12.5 \pm 5.3	102.9 \pm 11.2
Aganglionic rectum	C ₆ treated N= 5	181.2 \pm 2.1	0.339 \pm 0.139	18.1 \pm 5.1	96.7 \pm 11.3
	untreated N= 6	176.1 \pm 22.8	0.430 \pm 0.192	18.2 \pm 5.2	99.4 \pm 27.7

P<.001 ** P<.005

に hexamethoniums (C₆) を 1 週間持続的投与することにより, 化学的除神経状態 (chemical denervation) を惹起せしめ, mAChR 量の変化を観察した (Ueki *et al.* 1983).

すると, 正常マウス直腸では C₆ 投与により,

最大特異的結合量は 344.6 fmoles/mg protein と生食を投与した対照群 (204.9 fmoles) に比し著明な増量を示した (P<0.001). 一方 H 病マウス直腸では C₆ 投与群と生食投与群との間に差は認めなかった. KD 値には何れの群間にも差

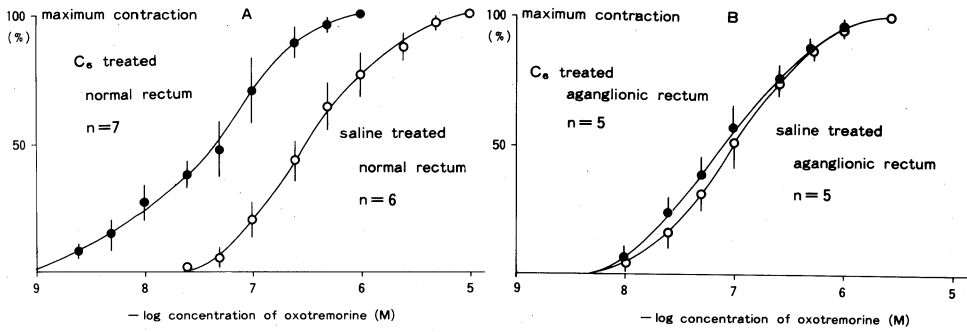


図 17. Oxotremorine に対する用量反応曲線とそれに対する C_6 投与の効果. 左正常マウス直腸, 右H病マウス直腸.

は認めない (Table 4).

次に用量反応曲線をみると C_6 投与により正常マウス直腸の曲線は著明に左方移動し, ED50 値は対照の 3.8×10^{-7} M から 9.8×10^{-8} M へと減少し oxotremorine に対する感受性の増大を示した. しかしH病マウスでは C_6 投与は oxotremorine に対する反応に何らの影響も与えなかった (図 17).

C_6 投与によって正常マウス直腸が示した感受性の増大は Cannon の denervation hyper-

sensitivity に一致するものである. 同時に mAChR の増加も観察されているので, denervation hypersensitivity の発現にはこの receptor の増量が重要な役割を演ずるものと考えられる.

H 病直腸に出現する cholinergic nerve は本来壁内神経細胞に接続すべき仙髄副交感線維であるが, target が無いために筋層の中まで伸長増殖したものであることは先にのべた. 直腸を支配する副交感線維の細胞体は今日では仙髄に

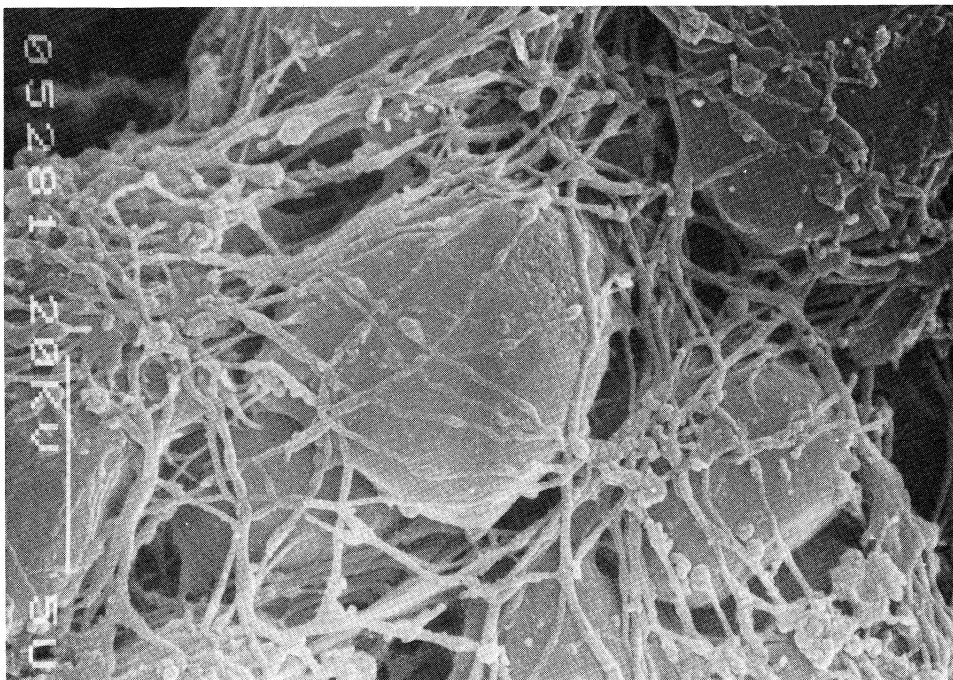


図 18. 正常マウス直腸A神経叢の神経節部の走査電顕所見

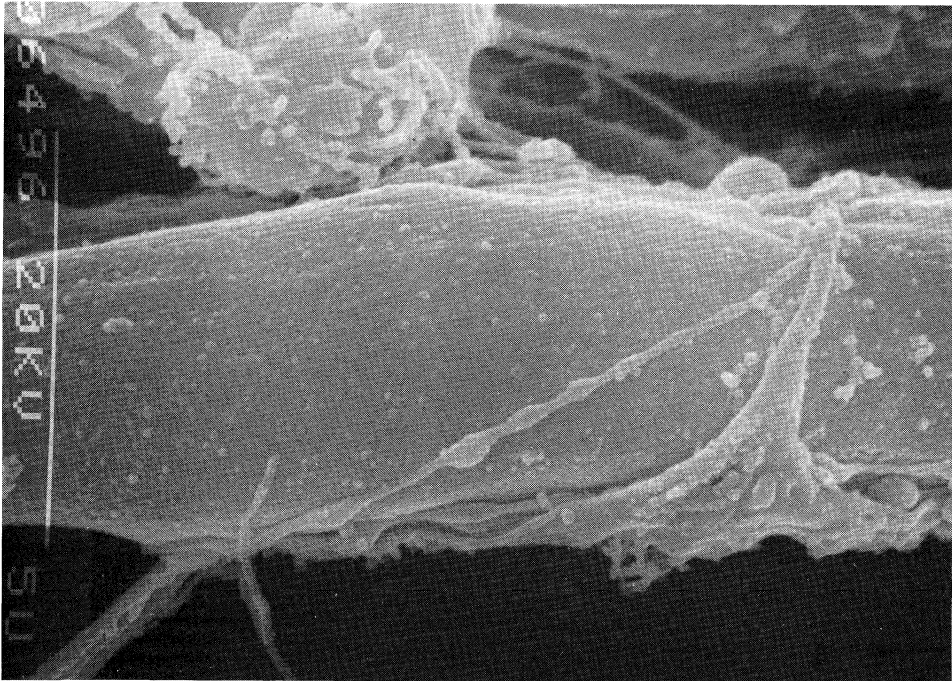


図 19. 正常マウス直腸 筋固有層の走査電顕所見 1 個の筋細胞表面を取り巻く軸索とその終末膨大 terminal varicosity.

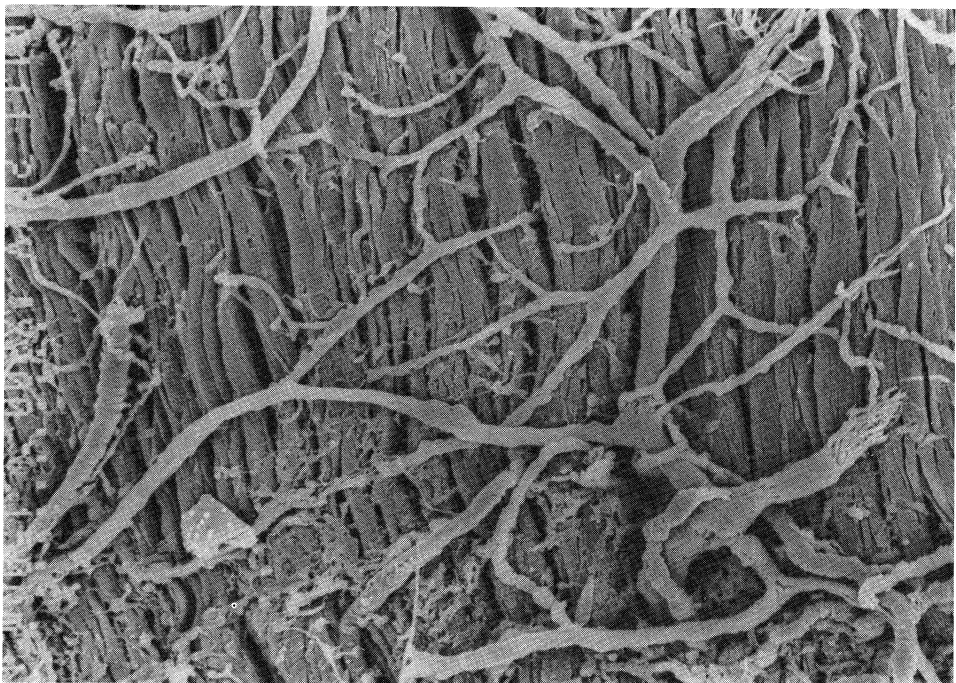


図 20. H病マウス直腸. 外来線維束はつたの様にからまり合って筋束間を縫って走る.

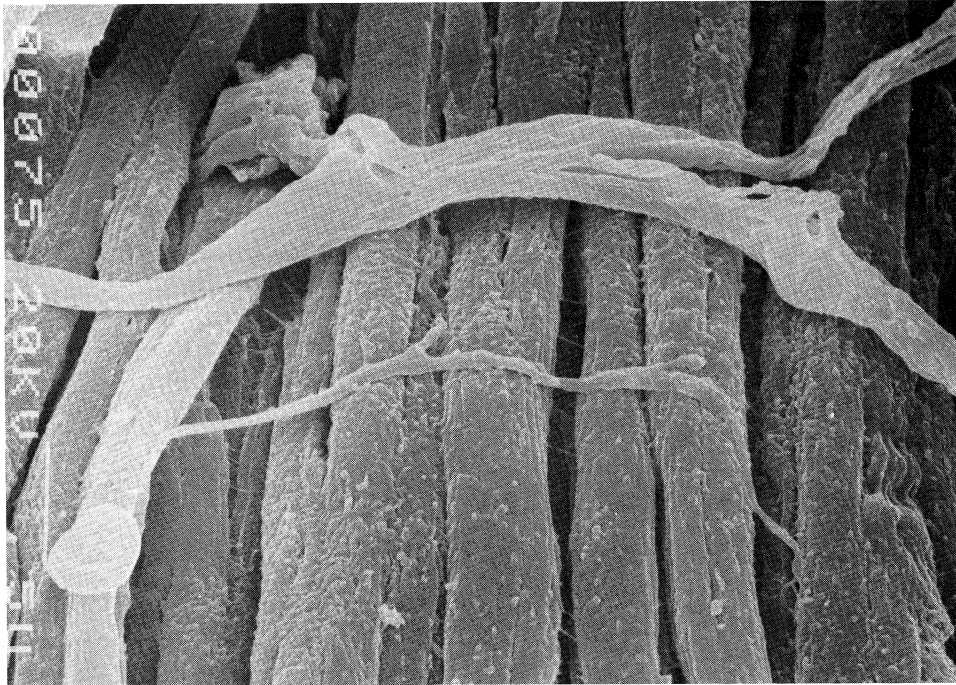


図 21. H病マウス直腸の走査電顕所見. 外来神経線維の分布は筋束間に止まり、個々の筋細胞に終末する所見はみられない. 中央右寄りの神経線維の膨らみは growth cone に相当する.

なく、骨盤神経叢内に存在するとされ、 C_6 によってブロックされることも知られている (De Groat & Krier, 1976 ; 1978 ; Fukuda & Fukai, 1981). 若しこの線維が筋細胞を機能的に支配しているとすれば、 C_6 投与による chemical denervation によって当然 mAChR が増加し、ACh agonist に対する contractile response も増大すべきであろう。しかし H 病マウス直腸では mAChR も増えず、反应用量曲線も変化なかった。これらの所見は無神経節腸管に cholinergic nerve は多量に分布しているが、機能的には innervate していないことを意味する。言いかえると無神経節腸管はすでに先天的に denervation 状態にあり、従って C_6 投与によっても denervation supersensitivity は出ないのである。

発生途上、mAChR は神経とは無関係に筋側に豊富に造られることが知られている (Galper *et al.* 1977 ; Sastre *et al.* 1977). また長期間の denervation により増加した receptor が減少して来る (Miledi & Potter, 1971). 従って先

天的に神経支配のない無神経節直腸に mAChR があっても不思議でなく、長期間の間に不活性の減少を示すことも十分考えられる。

E. 走査型電子顕微鏡による観察

透過型電顕を用いた研究で H 病の無神経節腸管にも神経筋接合部に類似した構造を見出すとの報告は少くない (Richardson, 1971 ; Howard & Garrett, 1970). しかしその根拠とする所見には客観性及び証明性に乏しい。

今回愛媛大学解剖学教室、上原康生教授の御指導を受け、piebold lethal マウス直腸を走査電顕的に検索し、正常同胞直腸と比較した。この方法によると神経叢と筋層を同時観察出来る利点がある。

図 18 は正常マウス直腸の A 神経叢の神経節部を示す。個々の神経細胞とその表面を取り巻く 1 本 1 本の神経線維が明瞭に観察される。神経線維は自律神経線維に特有の数珠玉状に連結した終末膨大部 (terminal varicosities) や終末ボタン (terminal bouton) が認められる。

筋層内では A 神経叢から派生してきた神経束

られる。神経束は互に分れたり合流したりしつつ次第に細小となるが、その分布は筋束間までに止まり、個々の筋細胞に到達し終末膨大部を形成する所見は全く欠如している(図 20)。極く稀に筋束表面に軸索の末端らしい膨らみを見つけることが出来る(図 21)。この膨らみは成長或は再生しつつある神経の先端構造いわゆる growth cone に相当するものと考えられる。常識的に考えてもこれが神経筋接合部とは考えら

れぬであろう。

が分岐吻合をくり返しつつ筋束内を縫うように走り、遂には single axon となって筋細胞を取り巻き連珠状の終末膨大部を形成するのが観察される(図 19)。

一方 H 病直腸では鍍銀法でも見られた如く腸壁に入って来た外来神経は樹枝状となって筋層間から筋束間に分布する粗大な神経束として見

V. 結

H 病の無神経節腸管筋が示す特異な病態生理を denervation 説の立場から論じた。無神経節直腸に見られる外来交感副交感線維の肥大増生所見は target である壁内神経細胞が欠如するために起る二次的現象である。節前線維である両神経が欠如した壁内神経細胞に代って筋細胞を直接支配することはあり得ない事を種々の角度から実証した。壁内神経細胞を後天的に失った achalasia 食道では denervation hypersensitivity が発現するのに、先天的欠如である H 病ではこれを欠くが、その理由については muscarinic acetylcholine receptor 数の変動から説明した。

語

Cannon (1923) 自身 law of denervation を次のように説明している。

When in a series of efferent neurones a unit is destroyed, an increased irritability to chemical agents develops in the isolated structure or structures, the effect being maximal in the part directly denervated.

すなわち既存の neurone の破壊であり後天的外因的 denervation を指している。これに対し H 病は先天的・内因的 denervation、もっと適確には congenital non-innervation 状態であり、今までにない新しい概念というべきであろう。

文

献

- Alvarez, W.C. (1922). *The mechanics of the digestive tract*. Paul B. Hoeber, New York.
- Burnstock, G., Campbell, G. & Rand, M.J. (1965). The inhibitory innervation of the taenia of the guinea pig cecum. *J. Physiol.* **182**: 504-526.
- Cannon, W.B. (1939). A law of denervation. *Amer. J. Med. Sci.* **198**: 737-750.
- Crema, A., Del Tacca, M., Frigo, G.M. & Lecchini, S. (1968). Presence of a non-adrenergic inhibitory system in the human colon. *Gut* **9**: 633-637.
- De Groat, W.C. & Krier, J. (1976). An electrophysiological study of the sacral parasympathetic pathway to the colon of the cat. *J. Physiol.* **260**: 425-445.
- De Groat, W.C. & Krier, J. (1978). The sacral parasympathetic reflex pathway regulating colonic motility and defecation in the cat. *J. Physiol.* **276**: 481-500.
- Falck, B. & Hillarp, N.A. (1962). Fluorescence of catecholamines and related compounds with formaldehyde. *J. Histochem.*, **10**: 348.
- Fukuda, H. & Fukai, K. (1981). The afferent and efferent pathway of the rectorectal reflex in the dog. *J. Physiol. Soc. Japan* **43**: 394.
- Galper, J., Klein, W. & Catterull, A. (1977). Muscarinic acetylcholine receptors in developing chick heart. *J. Biol. Chem.* **252**: 8692-8699.
- Gannon, B.J., Noblet, H.R. & Burnstock, G. (1969). Adrenergic innervation of bowel in Hirschsprung's disease. *Brit. Med. J.* **9**: 338-340.

- Garrett, J.R., Howard, E.R. & Nixon, H.H. (1969). Autonomic nerves in rectum and colon in Hirschsprung's disease. *Arch. Dis. Child.* **44**: 406-417.
- Howard, E.R. & Garrett, J.R. (1970). Electron microscopy of myenteric nerves in Hirschsprung's disease and in normal bowel. *Gut* **11**: 1007-1014.
- Jacobson, M. (1978). *Developmental neurology*. Chapman & Hall, United Kingdom.
- Kamijo, K., Hiatt, R.B. & Koelle, G.B. (1953). Congenital megacolon. A comparison of the spastic and hypertrophied segments with respect to cholinesterase activities and sensitivities to acetylcholine, DFP and the barium ion. *Gastroenterol.* **24**: 173-184.
- Kuntz, A. (1953). *The Autonomic nervous system*. Lea & Hebigar, Philadelphia.
- 桑田圭司(1976). Hirschsprung 病結腸の自律神経支配に関する組織学的ならびに組織化学的研究. 阪大医誌 **29**: 623-630.
- Magnus, R. (1904). Versuche am überlebenden Dünndarm von Säugetieren. *Arch. f.d. ges. Physiol.* **102**: 123.
- Miledi, R. & Potter, L.T. (1971). Acetylcholine receptors in muscle fibres. *Nature* **233**: 599-603.
- 菲沢融司, 横山穰太郎 (1980). 腸管壁内カテコールアミン定量に関する基礎的研究. 日平滑筋誌 **16**: 223-225.
- Norberg, K.A. (1964). Adrenergic innervation of the intestinal wall studied by fluorescence microscopy. *Int. J. Neuropharmacol.* **3**: 379-382.
- 岡本英三 (1961). 先天性巨大結腸症の成因に関する研究. 阪大医誌 **13**: 285-292.
- Okamoto, E., Okada, A., Kuwata, K. & Ohmuro, S. (1974). Histochemical and neurohistological studies on the innervation of the rectum in Hirschsprung's disease. In: *Amine Fluorescent Histochemistry*. p.p. 129-135. Igakushoin, Tokyo.
- Okamoto, E., Satani, M. & Kuwata, K. (1982). Histologic and embryologic studies on the innervation of the pelvic viscera in patients with Hirschsprung's disease. *Surg. Gynecol. & Obstet.* **155**: 823-828.
- 岡本英三, 菅原一郎 (1975). 食道アカラシアの病態生理と壁内神経. 日平滑筋誌 **11**: 1-14.
- Okamoto, E. & Ueda, T. (1967). Embryogenesis of intramural ganglia of the gut and its relation to Hirschsprung's disease. *J. Pediat. Surg.* **2**: 437-443.
- 大橋秀一(1977). Hirschsprung 病における排便障害機構に関する臨床的ならびに実験的研究——主として直腸内括約筋反射を中心として——. 日小外会誌 **13**: 1105-1115.
- Richardson, K.C. (1966). Electron microscopic identification of autonomic nerve endings. *Nature* **210**: 756.
- Sastre, A., Gary, D.B., and Lane, M.A. (1977). Muscarinic cholinergic binding site in the developing avian heart. *Developmental Biol.* **55**: 201-215.
- 佐谷 稔(1974). Hirschsprung 病における骨盤内臓器の自律性神経支配に関する組織学的並びに胎生学的研究. 日小外誌 **10**: 547-558.
- Touloukian, R.J., Aghajanian, G. & Roth, R.H. (1973). Adrenergic hyperactivity of the aganglionic colon. *J. Pediat. Surg.*, **8**: 191-195.
- 植田 隆, 鈴木三郎 (1956). 人腸管の動作流とその臨床応用について. 日外会誌 **57**: 605.
- 植木重文, 岡本英三 (1979). aganglionosis (piebald lethal, lethal spotting マウス), 疾患モデル動物ハンドブック. pp. 292-296. 医歯薬出版, 東京.
- Ueki, S., Okamoto, E., Kuwata, K., Toyosaka, A., Nagai, K., Uchida, S. & Yoshida, H. (1983): Increase in muscarinic acetylcholine receptors in mouse intestine by hexamethonium treatment. *Life Sci.* **32**: 2431-2437.
- 渡辺克仁 (1973). 内肛門括約筋におよぼす粘膜内反射の影響. 日平滑筋誌 **9**: 99-108.
- 横山穰太郎 (1983). Hirschsprung 病, 病態と診断. 消化管内圧測定法. pp. 131-153. 医学書院, 東京

(1983 年 12 月 19 日受付)