

氏 名（本籍）                    <sup>か</sup>加            <sup>とう</sup>藤            <sup>ひろ</sup>博            <sup>たか</sup>孝

学 位 の 種 類                    医      学            博      士

学 位 記 番 号                    医      第      1 9 9 7      号

学位授与年月日                    昭 和 63 年 2 月 24 日

学位授与の要件                    学位規則第 5 条第 2 項該当

最 終 学 歴                        昭 和 55 年 3 月  
東北大学医学部医学科卒業

学 位 論 文 題 目                    腸管壁内神経系の支持細胞の免疫組織化学的検討  
—正常及びHirschsprung病について—

(主 査)

論 文 審 査 委 員                    教授 大 井 龍 司            教授 岩 崎 祐 三

教授 京 極 方 久

## 論文内容要旨

腸管壁内神経系 (enteric nervous system, ENS) の支持細胞には, 固有の enteric glia と外来神経由来の Schwann cell が区別される。enteric glia は Auerbach (A), Meissner (M) 神経叢に存在し, 脳の astrocyte と形態が類似しており glial fibrillary acidic protein (GFAP), S-100 protein (S-100), グルタミン合成酵素 (glutamine synthetase, GS) 等の astrocyte のマーカーを持つ。GS は脳では astrocyte に特異的に局在し, アミノ酸神経伝達物質とアンモニア代謝の重要な酵素であるが ENS での GS の分布は十分に検討されていない。本研究では, マウス及びヒト正常腸管壁内神経系の支持細胞における GS の分布を GFAP, S-100 分布と比較しながら免疫組織化学的に検討し, 次いでこれら 3 つのマーカーを用いて先天性 aganglionosis マウス ( $s^1/s^1$ ) およびヒト H 病無神経節部腸管における神経系の異常を神経支持細胞の面から検討した。

### 材料及び方法

マウスを灌流固定後腸管を取り出し, 縦切開後, 輪状筋と粘膜下層の間で剥離し, 部分的に縦走筋より輪状筋を除去した。ヒト腸管は摘出後ただちに固定し, クリオスタットで  $40\mu\text{m}$  の遊離切片を作成した。以上の材料を用い, 以下の一次抗体を用い, 遊離の状態では GFAP, S-100, GS の免疫組織化学を ABC 法で行った。①抗ヒツジ GS ラビット抗体 ( $1,000\times$  希釈, 当部門作成) ②抗ヒト GS ラビット抗体 ( $1,000\times$  希釈, 当部門作成) ③抗 GFAP ラビット抗体 ( $1,500\sim 2,000\times$  希釈, Dako 社製) ④抗 S-100 ラビット抗体 ( $1,500\sim 2,000$  希釈) さらに, cholinergic neuron の分布と対比するため acetylcholinesterase (ACh-E) の酵素組織化学も合わせて行った。

### 結 果

マウス及びヒト正常腸管では, GS 免疫反応性を A, M 神経叢の enteric glia, 神経叢どうしの維織連絡に粒状ないし斑状に認め, 筋層内に遊離した astrocyte 類似の突起を有する enteric glia の胞体及び突起にも同様の免疫反応性を認めた。粘膜固有層の GS 免疫反応性は非特異的反応が強く判定出来なかった。GFAP は GS とほぼ同様な分布を示したが, 筋層では網状に認められた, 粘膜下層の動脈に添った神経繊維束 (paravascular nerve), 粘膜筋板, 固有層にも認めた。GFAP, GS 陽性の筋層内の enteric glia は A 神経叢の神経節細胞からの神経繊維に伴っていた。一方, S-100 の免疫反応性は GFAP よりも広範に認められ, 特に筋層内や動脈

壁 (perivascular nerve) に特徴的であった。外来性神経が漿膜下を走行する部分では S-100・GFAP は陽性であるが、GS の免疫反応性は認めなかった。s<sup>1</sup>/s<sup>1</sup> マウス及びヒト H 病無神経節部の、肥大した AChE 陽性神経繊維束は GFAP・S-100 強陽性であったが、GS 免疫反応性はほとんど有さなかった。

## 考 察

以上の結果より、腸管壁内神経系では、固有の enteric glia は GFAP, GS, S-100 を表出し、腸管の Schwann cell は末梢神経の Schwann cell と異なり、S-100 だけでなく GFAP も表出しているが、GS は表出しないと考えられる。GS をラットの A 神経叢に免疫組織化学的 (蛍光法) に証明した報告はみられるが、今回の研究で、マウス及びヒト腸管の A 神経叢、縦走・輪状筋に分布する神経繊維に沿った enteric glia に GS が分布しており、また、ヒトの M 神経叢における GS の存在が免疫組織化学的に証明できた。しかし、外来神経が漿膜下から筋層に侵入する部分には GS は認めず、GS は固有の enteric glia にのみ存在する酵素と考えられる。腸管壁内神経系では GFAP は enteric glia にのみ認められるとの意見もあるが、今回の研究からは、外来性神経が漿膜下を走行する部分から既に GFAP は認められ、GFAP は S-100 と同様に enteric glia と Schwann cell の両者に局在すると考えられる。マウス腸管筋層の GFAP, GS の観察では縦走筋、輪状筋に分布するこれらの enteric glia は A 神経叢の神経節細胞からの神経繊維に伴っており、壁外から入ってくる自律神経節前繊維に伴う支持細胞はすべて Schwann cell であると考えられる。無神経節部にみられる神経繊維束に GS がわずかしか認められず、GFAP, S-100 が陽性であることは、その支持細胞が Schwann cell としての性質を有するものであり、H 病無神経節部で増生している神経繊維が外来性 (末梢神経) であるとのデータを支持するものである。一般的に、末梢神経の Schwann cell に GFAP は存在しないが、無神経節部に増生する神経繊維束の Schwann cell には GFAP が免疫組織化学的に強陽性であり、腸管壁内の Schwann cell は末梢神経の Schwann cell とは異なり、腸管という環境の中で GFAP を表出しているものと考えられる。以上、GFAP, S-100, GS の免疫組織化学的検討から GS は腸管神経支持細胞の中では、唯一腸管固有の支持細胞 (enteric glia) にのみ表出されているものであり、GS の免疫組織化学は正常及び H 病腸管の支持細胞の研究の有力な手段となりうるものとする。

## 審査結果の要旨

腸管壁内神経系は腸管 neuron とその突起，外来性の神経繊維などからなり，これらは多くの神経支持細胞を伴っている。これらの支持細胞は固有の enteric glia と外来神経に伴う Schwann cell に分けられると考えられているが，この2種類の支持細胞についてははっきりした区分はなされていない。本研究の第一の目的は，これら腸管神経系の支持細胞の性格付けを行なうことであった。

Hirschsprung 病（H病）無神経節部においては腸管 neuron の欠如と外来神経繊維の増生が知られているが，支持細胞の異常の有無についての研究はほとんどみられない。本研究の第二の目的はH病無神経節部の病態を神経支持細胞の面から解析しようとしたものである。

以上の2点の研究のため，中枢神経の支持細胞（glia）のマーカーであるGFAP，S-100，Glutamine synthetase（GS）の遊離切片法による免疫組織化学を用い，マウス及ヒト腸管について検討している。

実験では，正常腸管においてGSをAuerbach神経叢内の enteric glia に免疫組織化学的に証明し，Meissner神経叢および筋層内の遊離した enteric glia にもGSをはじめて証明した。また，enteric glia のみならず外来神経に伴う支持細胞もGFAPを表出することを示した。さらに，GS，GFAP，S-100の免疫反応性の比較から，S-100は外来，固有支持細胞を問わず腸管神経支持細胞に広く分布しているが，GFAPは必ずしも腸管においては支持細胞の全てに表出されているものではないことを示した。GSについては，腸管神経系において固有の enteric glia にのみ存在する酵素であることをはじめて示した。

さらに，先天性 aganglionosis マウスおよびヒトH病の無神経節部の検討で，増生した神経繊維にGFAPとS-100の免疫反応性を強く認めしたが，GSは免疫反応性はほとんど認められず，このことからその支持細胞がSchwann cell としての性質を有することを示した。このことはH病無神経節部に見られる把大した神経繊維が外来性（末梢神経）であることを裏付けるものである。以上の結果より，無神経節部では固有の enteric glia は欠如しており，aganglionosis においては，腸管神経系の neuron の発生だけでなく，固有の支持細胞の発生も同時に阻止されていると推論できる。

以上，本研究は腸管の遊離切片法という新しい手法を用い，マウスおよびヒトの正常腸管について神経支持細胞のマーカーの免疫組織化学を行なうことにより，腸管神経系における支持細胞の性格を詳細に検討し，ヒトの enteric glia においてGSをはじめて免疫組織化学的に証明するなど新知見を提供している。また，H病無神経節腸管において増生する神経繊維が外来性であるとの重要な根拠を神経支持細胞の面から示しており，本研究は学位授与に値するものとする。