研 究

耳管における副交感神経分布

山下 敏夫・北尻 雅則・友田 幸一

熊沢 忠躬*・西川 正治**

Cholinergic Innervation in the Eustachian Tube of Guinea Pigs

Toshio Yamashita, Masanori Kitajiri, Kouichi Tomoda,
Tadami Kumazawa and Masaharu Nishikawa

(Kansai Medical College)

The innervation of cholinergic nerves in the Eustachian tube was light- and electron-microscopically observed using a histochemical technique. Acetylcholinesterase-positive nerves were seen just beneath the epithelial layer all along the tubal wall, around the blood vessels of the subepithelial space, and especially around the tubal glands. It is suggested from these findings that the cholinergic nerve plays an important role in controlling the blood flow in the subepithelial space and also in regulating the secretion of the tubal gland.

結 言

耳管機能における自律神経の役割は大きいと考えられる。事実、Scheffield ら¹⁾は自律神経剤の投与が、又 Nathanson ら²⁾はビデオン神経や頸部交感神経の刺激および切断が耳管機能に大いに影響する事を実験的に証明した。臨床的にも熊沢³⁾は星状神経節および翼口蓋神経節のブロックによる耳管機能への著明な影響を報告している。

ところが耳管およびその周辺組織への自律神経分布に関する組織学的ならびに組織化学的研究は従来まで見られず、この1年間に著者ら及び Uddman ら⁴⁾が報告したのが最初である。著者らは螢光法で⁴⁾、さらに電顕的観察で⁵⁾耳管における交感神経の分布を検索した。一方 Uddman ら⁶⁾は耳管における交感神経、副交感神経、VIP 神経の分布を光顕レベルで観察し報告している。

耳管の副交感神経分布に関する報告は上述したごとく Uddman らの報告が唯一のものであり、著者らは追試の意味も含めて同様の観察を行ったところ若干の新知見を得た。又さらに微細な神経終末の局在を知るためには電顕的観察が必要であるが今日までその報告をみない。そこで著者らは耳管の副交感神経終末を電顕的にも観察したのでその結果を光顕での結果と合わせて報告し、耳管の

*関西医大耳鼻咽喉科学教室 (主任: 熊沢忠躬教授)

**関西医大整形外科科学教室 (主任: 森益太教授)

病態, 機能に対する自律神経の役割についても考按する.

材料および方法

実験動物には, プライエル反応正常のモルモット3匹6耳を使用した. 無麻酔下に断頭後, ただちに耳管を取り出し, この耳管を長軸に対し垂直方向に細切し, 2.5%グルタルアルデヒド液(0.1Mカコジル酸緩衝液, pH 7.4%蔗糖添加)にて4℃, 2時間固定した.

副交感神経同定には Acetylcholinesterase (AChE) 活性を検出する方法の一つであるKarnovsky and Roots のフェロシアン化銅法⁷⁾を用いた. まず光顕用試料作成には, 上述の様に固定された材料を 0.1Mカコジル酸緩衝液で2時間洗浄したのちクリオスタットにて15μmの凍結切片を作成し, Karnovsky and Roots の方法による acetylthiocholine iodide を基質に用いた反応液に37℃, 45分間浸漬した. これを蒸留水で洗浄し, グリセリンで封入したのち光顕的観察を行った. 尚この他に acetylthiocholine iodide を除いた液(対照反応液①), 狭義の cholinesterase 検出のために acetylthiocholine iodide の代りに基質として butyrylthiocholine iodide を用いた液(対照反応液②), さらに acetylthiocholine iodide を基

質とした液に狭義の cholinesterase を抑制するため 10^{-4} M iso-OMPA(N, N'-diisopropylphosphorodiamidic anhydride) を加えた液(対照反応液③)の三種類の反応液を用い, これに材料をそれぞれ本実験と同様37℃, 45分間浸漬し, これらを対照実験とした.

電顕的観察にもこの同様のフェロシアン化銅法を用いた. 即ち光顕試料と同じ方法で固定された材料を 0.1Mカコジル酸緩衝液で一晩洗浄し, その後ビブラトームで40μmの切片を作成し, Karnovsky and Roots の反応液に4℃, 10分間浸漬した. これをさらに 0.1Mカコジル酸緩衝液で4℃, 10分間洗浄したのち, 1%オスミウム液(0.1Mカコジル酸緩衝液, pH 7.4)で4℃, 1時間後固定を行った. 0.1Mカコジル酸緩衝液で洗浄後, 上昇アルコール系列で脱水, プロピレンオキサイドに置換後 Spurr の low viscosity embedding medium に包理した. LKB ウルトロトームにて超薄切片を作成, 酢酸ウラニル, クエン酸鉛の二重染色後, 日立Hu-12型および日立H-500型電子顕微鏡で観察した.

成 績

Karnovsky and Roots のフェロシアン化銅法では, 酵素作用のために基質から遊離したチオコリンにより, フェリシアンイドがフェロシアンイドに還元され, 銅イオンと反応してフェロシアン化銅となり, 酵素活性部位に沈着する. 反応最終産物は光顕的には赤褐色を呈し, 又電顕的には高電子密度を持つ沈着物として酵素活性部位にみられる.

光顕による耳管全体の観察では, 耳管自体の解剖学的特徴から, 骨部耳管では耳管粘膜下にAChE活性を示す神経線維を認める他は活性を認めなかった. 軟骨部耳管, それも咽頭側に近づくにつれて, 解剖学的に腺, 血管, 筋肉を

耳管周囲に多く認めるようになり, それらに近接して強いAChE活性を認めた, 以下軟骨部耳管及びその周辺組織におけるAChE活性についてその詳細を述べる. 耳管粘膜上皮自体にはAChE活性を認めなかったが粘膜上皮直下および固有層に著明なAChE活性を伴った神経線維を認めた(図1). 血管では中・小動脈の周囲をほぼ全周にわたり取り囲む様にAChEの活性を認めたが, 静脈での活性は動脈の場合ほど強くなく, その周囲に点在した活性部位を認めた(図2). 耳管腺においては腺の周囲に強いAChE活性を認めたが, しかし腺房内に入り込んでいる所見はなかった(図3). さ

図1 AchE 活性が耳管粘膜上皮(E)直下, 及び固有層(L)に認められる.
C: 耳管腔 G: 耳管腺 X100

図4 耳管筋の神経筋接合部(MNJ)および筋腱接合部(MTJ)に強い AchE 活性が存在する
X100

図2 動脈(A)の周囲に強い AchE 活性を認めるが, 静脈(V)の周囲ではその活性は強くない.
X200

図5 対照反応液②による浸漬の結果, 耳管粘膜下固有層(L), 耳管腺(G), 耳管筋(M)等に何らの活性を認めなかった.
X100

図3 耳管腺(G)にみられる AchE 活性.
X100

図6 対照反応液③による浸漬の結果, 耳管粘膜下固有層(L)にAchE 活性を認めた. X250

に特異的所見として, いわゆる耳管筋の神経筋接合部および筋腱接合部に強い AchE 活性を認めたことであり, この所見はいわゆる耳管筋の全分布部位に等しく認められた(図4)。

対照実験として行った3種類の反応液による浸漬の結果, 対照反応液①および②を用いた場

合, 耳管の粘膜直下, 固有層, 腺, 血管, 筋肉の全ての部位において活性を示す所見を認めなかった(図5)。一方, 対照反応液③を用いた場合, Kornovsky and Roots の反応液を用いた場合と比べるとやや活性が劣る傾向はあったが, ほぼ前者の反応液で活性を認めた部位と同

図7 副交感神経終末の電顕像. Schwann 細胞 (S) と無顆粒小胞を含む神経終末 (T) の細胞膜間に AChE 活性が認められる. X20000

部位に活性を認めた (図6).

電顕的観察で AChE 活性をもつ神経終末は粘膜下固有層ではその部位に分布している中, 小動脈に近接して存在する事が多かった耳管腺の周囲では腺細胞自体に近接して AChE 活性を示す神経終末を認めたが, 腺房細胞間に入り込んでいる終末は認めなかった. 一般にこの神

経終末は数個が一緒になり (おそらくは交感神経終末と共に) Schwann 細胞膜で囲まれていることが多く, この Schwann 細胞膜と各神経終末の軸索鞘との間に特異的な高電子密度をもつ顆粒が豊富に存在し, この顆粒, 即ち高い AChE 活性でかこまれた神経終末はコリン作動神経終末と考えられた (図7).

考

耳管の機能異常は, 即ち耳管の通気性の異常と云っても過言ではない. 耳管が極めて細い管 (特にその一部において) である事を考えると耳管自体の問題でこの通気性に影響を与える最大の因子は耳管粘膜の腫脹や耳管腺の分泌異常であろう事が容易に理解できる. 耳管粘膜に変化をもたらすと思える要因には一般炎症⁸⁾, アレルギー⁹⁾ 等が考えられるが, 耳管粘膜, とくに粘膜下血管, 及び耳管腺に影響を与えるのは自律神経の働きであろう.

耳管の自律神経に関する研究については,

按

scheffield らが自律神経, 特に交感神経作動薬の耳管への薬理作用を研究し, norepinephrine は犬の耳管の通気性を増大させ, isoproterenol はそれを低下させる事を報告した¹⁾. Jackson は耳管の通気性は血圧により敏感に影響され, 血圧が上ると逆に通気性は低下するとし, すなわち耳管粘膜下血管の血流量にその通気性が左右され, 換言すれば耳管粘膜下血管に存在する自律神経により通気性が影響をうけることを報告した¹⁰⁾. さらに Nathanson らは犬を使った実験で, 頸神経節を刺激すると耳管の通気

性が増大し、切断するとただちに通気性が低下すること、又一方ビディアン神経節を刺激すると耳管の通気性は低下することを証明した²⁾。臨床的に熊沢は多くの症例で、星状神経節および翼口蓋神経節をそれぞれ別個にブロックし、その前後の耳管機能を耳管鼓室気流動態図で詳細に検索し、前者のブロックで耳管は閉塞に向い、後者のブロックで開放に向うことを明らかにした³⁾。以上の薬理学的、神経学的研究により、耳管の通気性に関する自律神経の役割は明らかである。耳管粘膜における脈管系、及び耳管腺は交感神経、副交感神経の両方の支配下であり、副交感神経は鼻粘膜と同様⁴⁾、血管には拡張の働きをし、耳管腺には分泌促進の役目をすると考えられる。

従来の組織学的研究では自律神経と知覚神経と区別することができず、したがって耳管の自律神経の局在は不明のままであった。ところが組織化学的方法により、特に交感神経系はアドレナリン作動神経をカテコラミン螢光法により観察できる様になった。副交感神経系についても、コリン作動神経を AchE 活性の存在では推測できる様になった。コリン作動神経を即ち、副交感神経と呼ぶには尚問題があるが著者らは理解を容易にするために本論文ではコリン作動神経を副交感神経とあえて呼んだ。

耳管の副交感神経分布について Uddman は耳管全体の粘膜下、血管の周囲に、又特に耳管腺の周囲にネットワークを形成して AchE 活性を持つ神経線維が存在する事を組織化学的に証明した⁶⁾。著者らの観察も Uddman のそれとほぼ同様であった。ただ耳管筋についての報告は Uddman の論文で見られず、著者らはその神経筋接合部および筋腱接合部に特異的に強い活性を認めたわけだが、神経節接合部に強い AchE 活性が認められることについては周知の通りである。更に筋腱接合部に比較的強い活性を認めたことについて次のように考える。同部に AchE 活性が認められることは、Couteaux¹²⁾以来、種々の報告があるが、Lubinska ら¹³⁾、

Nishikawa ら¹⁴⁾は、所謂 red muscle の筋腱接合部に AchE 活性を認めるとしている。これらの文献的考案及び本研究結果よりモルモットの耳管筋には、所謂 red muscle が多く含まれていると推測される。

著者らが行った組織化学法の酵素特異性について考按する。広義の cholinesterase には特異的な Acetylcholinesterase (true cholinesterase) と非特異的な cholinesterase (pseudo-cholinesterase) とがあり¹⁵⁾、結果として得られた酵素の活性が特異的な AchE である事を証明するためには、反応液から基質である Acetylthiocholine iodide を除いた液(対照反応液①)および Acetylthiocholine iodide の代りに狭義の cholinesterase を証明するための基質を用いる液(対照反応液②)でいずれも活性を示さず、狭義の cholinesterase を抑制剤として iso-OMPA を加えた液(対照反応液③)で活性を示す必要がある。

著者らの対照実験の結果は対照反応液①②で活性を示さず対照反応液③で活性を認めたことから、著者らが得た酵素活性は特異的な AchE 活性といえる。電顕的観察によっても自律神経終末を同定できる。特に交感神経(アドレナリン作動神経)終末は多数の小含粒小胞をもつ事により明らかに同定されうる。しかし一方副交感神経(コリン作動神経)終末はそれが無髄であり、かつ無顆粒小胞を含んでおれば、ほぼ推測はつくが確実なものではない。そこで、組織化学的方法を電顕的観察に応用すればより確実性を増すと考えられるので、著者らは Karnovsky and Roots の方法で反応させた材料を電顕的に観察したわけである。その結果、副交感神経末は、光顕的観察での局在と大略一致した部位に見られたが、さらに微細な局在が観察された。即ち、固有層ではほとんどの神経終末はその部に存在する血管に沿ってみられ、遊離にみられるものは少なかった。又、血管ではとくに動脈壁の平滑筋様細胞に近接して存在する事が多く、これらの所見は著者らが行った耳管の

交感神経終末の局在部位⁵⁾と略々一致した。しかし交感神経終末と少し異にする所見は耳管腺についてであり、副交感神経終末の方がより耳管腺の細胞に近接して存在する印象を持った(図7)。

著者らは耳管における副交感神経分布を組織化学的に、さらには電顕的観察を加えて検索し、その結果、副交感神経が耳管粘膜下固有層の血管の周囲、および耳管腺の周囲に特に多く局在することを示した。この結果は、他の薬理学的、神経学的研究の結果から推測されていた

耳管における副交感神経の役割、即ち、脈管系への直接作用、および耳管腺分泌への関与をより明確にしたと考える。たとえば副交感神経が興奮すれば粘膜下血管が拡張し、粘膜は腫張し、一方、耳管腺の分泌も盛んになり、それらの結果、耳管の通気性は容易に低下すると思われる耳管の機能、即ち、通気性と副交感神経の関係は密である事がわかる。今後、種々の耳管疾患の治療を考えると、副交感神経を含めた自律神経系に対する配慮は必須のものと思われる。

ま と め

耳管に於ける副交感神経分布を組織化学的方法を用い、光顕的および電顕的に観察した。光顕的観察で AchE 活性を示す神経線維が耳管全周において粘膜上皮直下に、又、軟骨部耳管とくに咽頭側において粘膜下固有層、血管の周囲、耳管腺の周囲に著明な走行として認められた。さらに電顕的観察により、この粘膜下固有層の神経終末は血管に沿ったものであり、血管ではとくに動脈の平滑筋様細胞の近くに、又、耳管腺では腺房細胞に近接して存在する事を観察した。

これらの観察結果および他の文献的考察より耳管に於いて副交感神経は耳管粘膜下血管の血流および耳管腺の分泌を司さどると推測され、しいては耳管の通気性に重要な役割を演じると考えた。

ご校閲をいただいた森益太教授に深謝致します。

本研究は昭和55年度文部省科学研究費一般研究(C)(課題番号557400)の援助を受けた。

尚この論文の主旨は、第193回日耳鼻大阪地方部会に於いて発表した。

参 考 文 献

- 1) Scheffield, P.A. et al. : Patency changes in dog's eustachian tube in response to Alpha and Beta adrenergic drugs. *Ann. Otol.* 79 : 117~123, 1970.
- 2) Nathanson, S.E. and Jackson, R. T. : Vidian Nerve and the Eustachian Tube. *Ann. Otol.* 85 : 83~85, 1976.
- 3) 熊沢忠躬 : 耳管の基礎と臨床. 第81回日耳鼻総会宿題報告別冊.
- 4) Yamashita, T. et al. : Adrenergic innervation in the Eustachian tube of guinea pigs. *Arch Otorhinolaryngol* 225 : 279~282, 1979.
- 5) Kitajiri, M. et al. : Electron-microscopic Observation of Adrenergic Innervation in Guinea Pig Eustachian Tube. *Arch Otorhinolaryngol* 228 : 123~126, 1980.
- 6) Uddmn, R. et al. : Innervation of the feline Eustachian tube. *Ann. Otol.* 88 : 557~561, 1979.
- 7) Karnovsky, M. J. and Roots, L. : A "directcoloring" thiocholine method for cholinesterases. *J. Histochem. cytochem.* 12 : 219~221, 1964.
- 8) Senturia, B.H. et al. : Studies concerned with tubotympanitis. *Ann. Otol.* 67 : 440~467, 1958.
- 9) Yamashita, T. et al. : Relation between nasal and middle ear allergy -experimental study *Ann. Otol.* 89 : 147~152, 1980.
- 10) Jackson, R. T. : Pharmacological Mechanisms

- in the Eustachian tube, *Ann. Otol.* 80 : 313~318, 1971.
- 11) 石井 哲夫 : 鼻粘膜におけるコリン作動性神経支配. *耳喉* 42 : 255~259, 1970.
- 12) Conteaux, R. : Particularités histochemiques des zones d'insertion du muscle strié. *C.r. Séanc. Soc. Biol.* 147 : 1974~1976, 1953.
- 13) Lubińska, L. et al. : Acetylcholinesterase at muscle-tendon junctions during postnatal development in rats, *J. Anat.* 101 (2) : 295~308, 1967.
- 14) Nishikawa, M. et al. : Acetylcholinesterase activity at myotendinous junctions in various skeletal muscles of rats, *Acta Histochem Cytochem.* 12 (6) : 589, 1979.
- 15) 小川和朗 : 細胞生物学講座35—エステラーゼ概論—細胞5 : 12~35, 1973.

原稿到着 : 昭和55年12月17日
別刷請求先 : 山下敏夫
〒570 大阪府守口市文園町1
関西医科大学耳鼻咽喉科学教室