消化管の自律神経支配, アウエルバッハ 神経叢を中心にして

愛媛大学医学部 解剖学第二講座

上原 康生, 藤原 隆, 小室 輝昌

FINE STRUCTURE OF THE MYENTERIC PLEXUS OF AUERBACH, STUDIED BY SCANNING AND TRANSMISSION ELECTRON MICROSCOPY

Yasuo UEHARA, Takashi FUJIWARA and Terumasa KOMURO

Department of Anatomy, Ehime University School
of Medicine, Ehime.

I. 緒

蠕動運動をはじめ消化管の種々の働きを調節している Auerbach の筋間神経叢 (myenteric plexus) は, 消化管のほぼ全長にわたって広範に分布しており, 全脊椎に匹敵するほど多数の神経細胞を含む膨大な神経系を形づくっている. (Furness & Costa, 1980)

筋間神経叢についての最近の生理学的, 薬理学的研究の進歩には目覚ましいものがあり, 神経細胞の電気的性質や機能分化の解析を初めとして, 数多くの新しい知見が集積されつつある (Burnstock, 1972, 1979; Wood, 1979; Furness & Costa, 1980). 殊に最近では, 神経伝達物質としてアセチルコリン, ノルアドレナリンに加えて, VIP, ソマトスタチン, サブスタンス P 等の種々のポリペプチドの存在が証明されて来っており (Hökfelt *et al.*, 1980; Johansson *et al.*, 1980; Schultzberg, *et al.*, 1980; Leander *et al.*, 1981; Malmfors *et al.*, 1981) 多様な機能を持つ非常に複雑な神経系であることが明らかにされて来てい

言

る. 一方, 形態学的解析に関しては主として透過型電子顕微鏡によって神経細胞の分類, 神経終末のシナプス小胞による識別, シナプス結合の様式, 神経膠細胞の構造等について, 詳細な観察結果が報告されている (Baumgarten *et al.*, 1970; Gabella, 1972, 1979; Cook & Burnstock, 1976 a, b; Manber & Gershon, 1979).

しかしながら, 前述のように, 膨大でしかも複雑な構築をもつ筋間神経叢の全貌を微細構造レベルで完全に把握するには至っておらず, 重要な問題点が未解決のまま残されているように思われる.

この論文では, 透過型電子顕微鏡で得られた二三の新しい知見を紹介するとともに, 立体的な組織構築解明のために, 我々が現在試みている走査型電子顕微鏡の応用と, その観察結果を報告し, 消化管の自律神経支配機構をより良く理解する一助としたいと思う.

II. 実験材料及び方法

A. 透過型電子顕微鏡法

成熟家兎結腸近位部をエーテル麻酔下に切り出し, 0.1M 磷酸緩衝液で pH 7.2 に調整した 3% グルタルアルデヒドで 2 時間固定, 2% 四酸化

オスミウム溶液で後固定したのち, 酢酸ウラン飽和水溶液でブロック染色, エタノール系列で脱水, エポキシ樹脂に包埋した. 超薄切片は, Porter-Blum 型ミクロトームで作製後, 酢酸ウラ

ン, 酢酸鉛液にて二重染色, 日立 HU-12 型電子顕微鏡にて観察した。

B. 走査型電子顕微鏡法

幼若(生後2日~3日)及び成熟ウイスター系ラット腸管を麻酔下に切り出し, トリプシン(DIFCO 1:250), (燐酸緩衝生理食塩水に溶解)で37°C, 20~40分消化したのち, 0.1M 燐酸緩

衝液で pH 7.2 に調整した 3% グルタルアルデヒドで1時間固定 (Uehara & Suyama, 1978). 次いで, 8NHCl で 60°C, 30 分加水分解 (Evan *et al.*, 1976) したのち, エタノール系列で脱水, 臨界点乾燥, プラチナ蒸着ののちに, 日立 S-500A 走査型電子顕微鏡で観察した。

III. 観察結果と考察

A. 透過型電子顕微鏡による観察

図1はウサギ結腸の横断切片で観察された筋間神経節の一般的組織構築を示している。神経節はよく発達した粗面小胞体とゴルジ装置で特徴づけられる神経細胞と, 多数の神経突起, 及びそれらの間に介在する神経膠細胞から構成されており, 全体として外縦層筋と内輪層筋との間に存在している。特記すべきことは, 個々の神経細胞体の一端又は両端が殆んど常に神経膠細胞に覆われることなく, 間質に直接面していることであり, 神経節内に全く血管が存在しないことを考え合わせるとき, 神経細胞が間質との境界面を通じて活発な物質交換を行っていることが窺われる (Komuro *et al.*, 1982b)。

神経節の上記の構成成分は, 多くは互いに 200 nm 以下の狭い間隙で境されているにすぎず, 全体として結合組織性要素が介入することなく, 非常に緻密な組織構築を示している。従って筋間神経節は通常末梢神経系に分類されているにもかかわらず, 構造的には典型的な中枢神経の特徴を備えていると言える。

神経細胞や神経突起を境する神経膠細胞は従来, 一括して Schwann 細胞として記載されて来たものであるが, これらの神経膠細胞は, その形態に多様性を示し, 少なくとも三種のタイプに区分出来ると思われる。Komuro *et al.* (1982b) はウサギ筋間神経節内の神経膠細胞を細胞学的に三型に分類している。I 型は細胞質内に多量の直径 10 nm の細線維を含み, 個々の神経突起を仕切る数多くの細い突起を出していることで特徴づけられ

る (図2)。II 型は, しばしば間質に面して筋間神経節の表面に位置しており, I 型と異なり, 非常に良く発達した粗面小胞体を含んでいる (図3)。三型は濃縮したクロマチンの集塊をもつ核と, それを取り囲む細胞質の乏しいことで特徴づけられ, 細く短かい突起を周囲の神経突起間に出すが, その周辺には多少とも開大した細胞間隙が存在する (図4)。Komuro *et al.* (1982b) は, このような形態的特徴から I 型は中枢神経系の星状膠細胞に, III 型は小膠細胞に比較し得るものと示唆している。尚, II 型については, I 型の生理的状態の違いを反映した像であることの可能性も否定できないことから, 独立した細胞系としての同定には一層の検索が必要とされている。

ところで筋間神経叢内部で神経突起は, 相互に又は神経細胞体との間にしばしばシナプスを形成し, 全体として複雑な神経回路を形成している。神経突起に含まれるシナプス小胞は, その形態に著しい多様性を示し, シナプス小胞の形態と構成から, 神経突起は少なくとも, 6種のタイプに大別されると思われる (Komuro *et al.* (1982a)。

ここではそれらのうち代表的な, 三つのタイプを図示するととどめる。図5は直径 45~60 nm の球形の明るい小胞と, 少数の直径 100 nm 前後の大型の有芯小胞を含むものであり, この大型の小胞は, 限界膜と芯の間に電子密度の低い明るい間隙 (hallow) を持っている。図6は, 不規則な形をもつ扁平或は管状の小胞で特徴づけられる神経突起であり, 図7は大型の有芯小胞を含むが, 図5のものと異なり電子密度の高い芯は殆んど小

図1. 家兎結腸筋間神経節の横断像を示す透過型電子顕微鏡写真。神経節表面は, 薄層の基底膜で被れるのみで, 特別に発達した結合組織性の被膜は見られない。周囲は主として無定型の物質より成り, 2~3 m μ の距離をおいて線維芽細胞様の細胞 (F) が散在する。神経細胞 (N) は極性をもって配列し, 細胞体の両端はしばしば両側の間質に直接接する。神経節内部には, 結合組織, 血管は見られず神経突起 (Np) は密に集合して認められる。(G) は神経膠細胞 $\times 7,000$

胞全体をうめており限界膜との間には間隙が介在しない。

この様にして分類された神経突起(或はその由来する神経細胞)がどのような機能特性をもつか、更には、異なった形態を取るシナプス小胞が、現在提唱されているどのような伝達物質を含むかについては今のところ推測の域を出ないようであり(Gabella, 1979; Burnstock, 1979; Furness & Costa, 1980; Gershon, 1981), 今後の免疫細胞化学的手法等による詳細な検索が必要であろう。

B. 走査型電子顕微鏡による観察

I 項で筋間神経節の微細構造について、透過型電子顕微鏡で得られた二三の知見を述べたが、従来の報告と同様、観察は任意の断面に限られており、筋間神経節の組織構築やその立体的構造の全貌を明らかにするには至っていない。

酵素消化と塩酸加水分解によって、外縦走筋を剝離し結合組織除去を行なった後、得られた筋間神経節の走査型電子顕微鏡像は広範に、しかも認め得べき組織の損傷なく、二次元的な網状構造をほぼ完全に表現している(図8)。

走査型電子顕微鏡で表わされた所見は、古典的な銀染色法(Richardson, 1958, 1960)やメチレンブルー等の生体染色法(Meyling, 1953; Taxi, 1965)或は最近のDPNH-diaphoraseによる組織化学的方法(Gabella, 1969)によって得られた光学顕微鏡の所見とほぼ一致するものである。しかしながら、これらの光学顕微鏡的方法と異なり、我々の走査型電子顕微鏡法は、神経叢と筋層を同時に観察出来るという利点を持っている。

さて、図8はラット回腸の、図9はラット結腸の筋間神経叢を夫々示しているが、この両者の間には、神経叢の網状構造に明らかな差異が見られる。前者においては、神経節は比較的均一な幅を持つリボン状を呈し、平滑筋束とほぼ平行にはしり、それと直交する結合索とで、大略矩型の網目を形づくっている(Fujiwara & Uehara, 1980)。

後者においては、神経細胞の集塊から成る神経節は幅と形態共に不規則であり、神経線維から成る結合索共々、内輪筋を作る平滑筋束の走行との間に規則的な位置関係を持っておらず、作られる網目は円形又は楕円形を呈する。

Gabella (1969) 等も、このような消化管の部位による筋間神経叢の網目構造の差異を指摘しているが、その発生学的成因は全く明らかにされていない。前述のように、我々の走査型電子顕微鏡法は、神経叢と筋層を同時に観察し得る利点をもっており、網目の形が筋層の発生の過程と配列状態で規定されるものであれば、今後その成因を解明する手がかりを与えるものと期待出来る。

このような標本において、筋間神経叢から派生し、筋層に侵入する細い神経線維束もしばしば観察されるが、これらの線維束は筋層の中で形づくられる第二次、第三次の神経叢か、或は平滑筋を支配する終末枝起始部であると推察される。

又、図8、図9は共にラット成体から得られた消化管の筋間神経叢を示したものであり、神経節、結合索何れも、細胞と神経線維が緻密に配列しており、その内部構造を窮い知ることが出来ない。

これに対し、生後2日~3日目位の幼若なラットでは、神経叢は未だ疎な構築を示し個々の神経細胞や神経突起の輪廓や走行を明瞭に観察することが出来る(図10)。神経細胞の形態は、単純な双極性(図11)から多極性(図10, 12)に至る多様性を示す。Dogiel (1895, 1896, 1899)は鍍銀標本の観察から、突起の数、形状より神経細胞を三型に分類した。本観察においては、幼若なラットを用いたことから、その対応づけには慎重を期さねばならないが、図10, 12に見られる細胞はDogielの言うI型、II型の細胞によく対応すると言えよう。

ところで、機能的には、興奮性、抑制性、知覚性神経の在ることが知られ、その神経伝達物質と

図2. 第一型の神経膠細胞, 細胞体及び突起は主として細線維様の構造で占められている. $\times 9,000$

図3. 第二型の神経膠細胞, 良く発達した粗面小胞体に注意, 細線維は殆んど見られない. $\times 12,000$

図4. 第三型の非神経性細胞, 電子密度の高い核質, 乏しい細胞質が特徴的. $\times 11,000$

図5. 直径45~60nmの丸く明るいシナプス小胞を含んだ神経終末. $\times 50,000$

図6. 長径約50~70nm, 短径約30~40nmの扁平又は管状のシナプス小胞を含む軸索膨大部. $\times 50,000$

図7. 電子密度の高い芯を含む直径約100~140nmの小胞を持つ軸索膨大部. 小胞の限界膜と顆粒の間隙が非常に小さいのに注意. (同図の左上部に見られる顆粒小胞あるいは、図2に見られるものと比較参照されたい). $\times 50,000$

図 10. 幼若ラット回腸筋間神経節. 全体に疎な構築をしており, 内部構造観察が可能で, 色々な形をした細胞, これから出る突起, 線維の束などを見ることができる. $\times 6,500$

しては, 種々の物質の存在が示唆されているが (Burnstock, 1979; Hökfelt *et al.* 1980; Furness & Costa, 1980; Gershon, 1981), これら神経細胞の形と機能の対応づけは極めて重要な問題であり, 今後に残された課題と言えよう.

さて, 全体像と高解像力を同時に許す走査型電子顕微鏡下では, 一本一本の神経線維を観察することさえ可能で, 図 13 では自律神経線維に特有な数珠玉状に連結した終末膨大部を見ることが出来る. 各終末膨大部の大きさはおよそ $0.5 \mu\text{m} \sim 1 \mu\text{m}$ ほどで, 切片像から知られている大きさともその範囲はよく符合する. また同じ図 13 の神経細胞の表面には, 同様の数珠玉様の構造の附着し

ているのが認められるが, これは, 終末ボタン (Bouton terminalis) を表わしているものである. 終末ボタンから連続的に神経突起を追跡できるこれらの標本においては, 隣接する神経細胞間に構成される神経回路を現実に観察することもできよう. また, 更に, 神経節細胞表面に認められる終末ボタンの数, 状況等から個々の細胞の機能的側面を推定することも可能であろう.

ところで, 筋間神経叢にまつわる興味ある問題の一つとして, Interstitial cell の存在が挙げられる. Interstitial cell は走査型電子顕微鏡下に, 多数の突起を持った星型或いは紡錘型の細胞として認められ (図 14), 筋間神経節, 筋線維の表面に

図 8. ラット回腸筋間神経叢を示す走査型電子顕微鏡写真, 筋間神経叢は輪走平滑筋層 (Sm) と平行に走る神経節索 (Gs) とこれにほぼ直交する結合索 (Cs) とからなる規則正しい距型の網目として観察される. $\times 700$

図 9. ラット結腸筋間神経叢. 神経節索 (Gs) 結合索 (Cs) は図 8 のような規則的な配列を示さず, その境界も往々にして不明瞭なことが多い. $\times 700$

図 11. 両端より突起を出す双極性の細胞. $\times 6,000$ 図 12. 一端より二本の突起を出す細胞. $\times 5,000$

散在して観察される。多くの突起によって細胞は互いに連絡し、或いは神経節、平滑筋線維と接触する。この観察は、Cajal による鍍銀標本での最初の記載 (1894, 1911); Neuron interstitiels は腸管筋間神経叢に特に豊富で、星型或いは紡錘型の細胞は細い突起で網状構造を作りまた周囲の平滑筋線維と密接な関係を持つ、とよく符合する。Cajal の観察、示唆は、その後多くの研究者によって支持、発展され Interstitial cell は、自律神経系での神経刺激を効果器に伝える最終的な“仲介者”と長く考えられてきた (La villa, 1897; Lawrentjew, 1926; Leeuwe, 1937 等, Meyling, 1953, Boeke 1949 による綜説参照)。その後多くの電子顕微鏡的研究も行われたが (Richardson

1958, 1960; Honjin *et al.* 1965; Rogers & Burnstock 1966; Imaizumi & Hama 1969, Gabella, 1972), 超薄切片による所見と、古典的な鍍銀法やメチレンブルーによる所見との対応には困難があり、明確な見解を得るには至らなかった。Komuro (1981) は走査型電子顕微鏡及び透過型電子顕微鏡の両者による観察から、この Interstitial cell がこれまで考えられて来たように (Boeke, 1949; Meyling, 1953; Taxi 1965; Schofield, 1968; Gabella, 1979 による綜説参照のこと)、神経細胞や、シュワン細胞、平滑筋細胞等ではなく、一種の特殊化した fibroblast であることを明らかにした。

IV. 結

語

以上、家兎及びラット腸管筋間神経叢を中心として、透過型電子顕微鏡及び走査型電子顕微鏡による新しい知見について述べて来た。殊に、結合組織除去法による非遊離面への走査型電子顕微鏡の応用は、光学顕微鏡レベルでの古典的手法である鍍銀法、メチレンブルー染色法による所見と超

薄切片による所見との照合を容易とし、かつ微細構造レベルでの全体的立体構造を把握する上で、非常に有効であることが示された。全体像と微細な部分とを同時に観察できるこの手法の応用は、筋間神経叢の発生学的研究、或いは、病態の追及にも、今後大いに役立つものと期待される。

図 13. 神経細胞 (N) 細胞体表面に見られる終末ボタン (重頭矢印)。自律神経に固有な数珠玉状に連なった終末膨大部 (矢印) も認められる。 $\times 6,000$

図 14. ラット結腸筋間神経叢表面に見られる Cajal Interstitial cell (矢印)。細い突起で相互に連結したり、神経節表面、神経線維、平滑筋細胞に附着したりして認められる。 $\times 2,000$

References

- Baumgarten, H.G., Holstein, A.F., & Owman, Ch. (1970). Auerbach's plexus of mammals and man. Electronmicroscopic identification of three different types of neuronal processes in myenteric ganglia of the large intestine from rhesus monkey, guinea-pigs and man. *Z. Zellforsch.* **106**: 376-397.
- Boeke, J. (1949). Sympathetic endformation, its synaptology, interstitial cells, periterminal network, and its bearing on neurone theory. *Acta. Anat.* **8**: 18-61.
- Burnstock, G. (1972). Purinergic nerves. *Pharmac. Rev.* **24**: 509-581.
- Burnstock, G. (1979). Interactions of cholinergic, adrenergic, purinergic and peptidergic neurons in the gut. Brooks, C. McC., Koizumi, K. & Sato, A. (editor) *Integrative Functions of the Autonomic Nervous System*. p. 145-158. University of Tokyo press, Tokyo.
- Cajal, S.R. (1894). Sur les ganglions et plexus nerveux d'intestin. *C.R. Soc. Biol. Paris.* **5**: 217-223.
- Cajal, S.R. (1911). *Histologie du Systeme Nerveux de l'Homme et des Vertebres*. 2 Paris A Maloine ed.
- Cook, R.D. & Burnstock, G. (1976a). The ultrastructure of Auerbach's plexus in the guinea-pig. I. Neuronal elements. *J. Neurocytol.* **5**: 171-194.
- Cooks, R.D. & Burnstock, G. (1976b). The ultrastructure of Auerbach's plexus in the guinea-pig. II. Non-neuronal elements. *J. Neurocytol.* **5**: 195-206.
- Dogiel, A.S. (1895). Zur Frage uber die Ganglien der Darm geflechte bei den Saugetieren. *Anat. Anz.* **10**: 517-528.
- Dogiel, A.S. (1896). Zwei Arten sympathischer Nervenzellen. *Anat. Anz.* **11**: 679-687.
- Dogiel, A.S. (1899). Uber den Bau der Ganglien in den Geflechten des Darmes und der Gallenblase des Menschen und der Saugetiere. *Arch. Anat. Physiol., Leipzig, Anat. Abt.* (Jg. 1899). 130-158.
- Evan, A.P., Dail, W.G., Dammrose, D. & Palmer, C. (1976). Scanning electron microscopy of cell surfaces following removal of extracellular material. *Anat. Rec.* **185**: 433-446.
- Fujiwara, T., & Uehara, Y. (1980). Scanning electron microscopy of myenteric plexus; A preliminary communication. *J. Electron microsc.* **29**: 397-400.
- Furness, J.B. & Costa, M. (1980). Types of nerves in the enteric nervous system. *Neurosci.* **5**: 1-20.
- Gabella, G. (1969). Detection of nerve cells by a histochemical technique. *Separatum Experientia* **25**: 218.
- Gabella, G. (1972). Fine structure of the myenteric plexus in the guinea-pig ileum. *J. Anat.*, **111**: 69-97.
- Gabella, G. (1979). Innervation of the gastrointestinal tract. *Int. Review Cyt.* **58**: 129-193.
- Gershon, M.D. (1981). The enteric nervous system. *Ann. Rev. Neurosci.* **4**: 227-272.
- Hökfelt, T., Johansson, O., Ljungdahl, A., Lundberg, J.M. & Schultzberg, M. (1980). Peptidergic neurones. *Nature*, **284**: 515-521.
- Honjin, R., Takahashi, A. & Tasaki, Y. (1965). Electron microscopic studies of nerve endings in the mucous membrane of the human intestine. *Okajimas Fol. anat. jap.* **40**: 409-427.
- Imaizumi, M. & Hama, K. (1969). An electron microscopic study on the interstitial cells of the gizzard in the love-bird (*Uroloncha domestica*). *Z. Zellforsch Mikr. Anat.* **97**: 351-357.
- Johansson, O., Hökfelt, T., Jeffcoate, S.L., White, N., & Sternberger, L.A. (1980). Ultrastructural localization of TRH-like immunoreactivity. *Exp. Brain* **38**, 1-10.
- Komuro, T. (1981). The interstitial cells in the colon of the rabbit. Scanning and transmission electron microscopy. *Cell Tiss. Res.* (in press)
- Komuro, T., Buluk, P. & Burnstock, G. (1982a). An ultrastructural study of nerve profiles in the myenteric plexus of the rabbit colon. *Neurosci.* (in press).
- Komuro, T., Buluk, P. & Burnstock, G. (1982b). An ultrastructural study of neurons and non-neuronal cells in the myenteric plexus of the rabbit colon. *Neurosci.* (submitted).
- La villa J. (1897). Estructura de los ganglios intestinales, *Rev. trim. micrograf* **2**: 187-192.
- Lawrentjew, B.J. (1926). Uber die Verbeitung der nervose Elemente (Einschliesslich der "interstitiellen Zellen" Cajals) in der glatten Muskulature, ihre Endigungsweise in den glatten Muskelzellen. *Z. Mikra-Anat. Forsch.* **6**: 467-488.
- Leander, S., Håkanson, R. & Sundler, F. (1981). Nerves containing substance P, vasoactive intestinal polypeptide, enkephalin or somatostatin in the guinea-pig taenia coli. Distribution, ultrastructure and possible functions. *Cell Tiss. Res.* **215**: 21-39.
- Leeuwe, E.H. (1937) (quoted by Meyling, H.A. 1953).
- Malmfors, G., Leander, S., Brodin, E., Håkanson, R., Holmin, T. & Sundler, F. (1981). Peptide-containing neurons intrinsic to the gut wall. An experimental study in the pig. *Cell Tiss. Res.* **214**: 225-238.

- Manber, L. & Gershon, M.D. (1979). A reciprocal adrenergic-holinergic axo-axonic synapse in the mammalian gut. *Am. J. Physiol.* **236**: E738-E748.
- Meyling, H.A. (1953). Structure and significance of the peripheral extension of the autonomic nervous system. *J. Comp. Neurol.* **99**: 495-535.
- Richardson, K.C. (1958). Electron microscope observations on Auerbach's plexus in the rabbit, with special reference to the problem of smooth muscle innervation. *Am. J. Anat.* **103**: 99-135.
- Richardson, K.C. (1960). Studies on the structure of autonomic nerves in the small intestine correlating the silver-impregnated image in the light microscopy with the permanganate-fixed ultrastructure in electron microscopy. *J. Anat. (London)* **94**: 457-472.
- Rogers, D.G. & Burnstock, G. (1966). The interstitial cell and its place in the concept of autonomic ground plexus. *J. Comp. Neur.* **126**: 255-284.
- Schofield, G.C. (1968). Anatomy of muscular and neural tissues in the alimentary canal. Code, C.F. (ed) *Handbook of Physiology*. Section 6, American Physiological society, Washington 1968.
- Schultzberg, M. *et al.* (1980). Distribution of peptide- and catecholamine-containing neurons in the gastro-intestinal tract of rat and guinea-pig: immunohistochemical studies with antisera to Substance P, Vasoactive intestinal polypeptide, enkephalins, somatostatin, gastrin/cholecystokinin, neurotensin and dopamine beta-hydroxylase. *Neurosci.* **5**: 689-744.
- Taxi, J. (1965). Contribution a l'etude des connexions des neurones moteurs du systeme nerveux autonome. *Ann. Sci. Nat. Zool. Anim.* **12**: 413-674.
- Uehara, Y. & Suyama, K. (1978). Visualization of the adventitial aspect of the vascular smooth muscle cells under the scanning electron microscope. *J. Electron Microscopy* **27**: 157-159.
- Wood, J.D. (1979). Neurophysiology of the enteric nervous system. Brooks, C. McC., Koizumi, K. and Sato, A. (editor) *Integrative Functions of the Autonomic Nervous System*. p. 177-193. University of Tokyo Press.

(1981年9月11日受付)