先天性 aganglionosis ラット腸管における Nervous System-Specific Enolase (NSE) および S-100 蛋白の分布に関する研究

名古屋大学医学部 第一外科学教室

堀 沢 稔, 石 黒 士 雄, 伊 藤 喬 広

愛知県身心障害者コロニー発達障害研究所 生化学

加 藤 兼 房

DISTRIBUTION OF NERVOUS SYSTEM-SPECIFIC ENOLASE (NSE) AND S-100 PROTEIN IN GASTROINTESTINAL TRACT OF CONGENITAL AGANGLIONOSIS RAT

Minoru HORISAWA, Yukio ISIGURO, Takahiro ITO

The 1st Department of Surgery, Nagoya University
School of Medicine, Nagoya.

Kanefusa KATO

The Department of Biochemistry, Institute for Developmental
Research, Aichi Prefectural Colony, Kasugai.

Immunobiochemical and immunohistochemical studies were performed to find out changes in neural and glial components of the intestine in congenital aganglionosis rats. Nervous system-specific enolase (NSE) was used as a marker of the neural component. S-100 protein was used as a marker of the glial component. NSE and S-100 protein were quantitated by highly sensitive immunoassay. And distribution of NSE and S-100 protein of the intestine was studied by immunohistochemical methods in fetal rats of various gestational age. The results of our studies were followed;

- 1) Significant decrease in NSE and S-100 protein was found in the aganglionic segment.
- 2) Although there was no decrease in NSE, significant decrease in S-100 protein was found in the ganglionic segment just proximal to the aganglionic narrow segment.
- 3) In the studies using rat embryos, NSE positive cells and S-100 protein positive cells were identified in the more caudal intestine with increasing gestational age. In addition, NSE positive cells appeared in the intestine few days earlier than S-100 protein positive cells did.

In conclusion, our studies disclosed that there was abnormality of the glial component as well as the neural component in the intestine of Hirschspung's disease.

I. 緒

言

Hirschsprung 病においては狭小部腸管の壁内神経節細胞が先天的に欠如 (Whitehouse, 1984; 岡本, 1961) している. この壁内神経節細胞が存在する Auerbach 神経叢 (A 神経叢) および Meissner 神経叢 (M-神経叢) には, 神経節細胞の他にグリア細胞 (またはシュワン細胞), 神経線維, および, 神経終末がみられるが (上原 1981), Hirschsprung 病腸管のグリア細胞に対する研究報告はみられない. また, 神経細胞との関係についての報告も少なく Gabella らの報告が散見される程度である (Gabella, 1971, 1981).

神経特異性蛋白のうち Nervous System-Specific Enolase (NSE) はニューロン (神経細胞, 軸索, 神経終末) に, S-100 蛋白はグリア細胞

およびシュワン細胞に著明に存在する (Moore, 1965b). 我々はこの点に着目し, Hirschsprung 病腸管におけるこれらの神経特異蛋白の分布を明らかにすることにより, ニューロン成分とグリア成分との関係を推察し得ると考え, 以下の実験を行なった.

すなわち, 先天性 aganglionosis ラット (筏井, 1979; Ikadai, 1981) の腸管を用い, これら 2 つの蛋白の免疫組織学的局在を検討し, 酵素免疫測定系 (EIA) (Kato, 1976, 1977; Ishiguro, 1982) にてそれらの定量を行った.

更に, 胎生期ラット腸管における NSE, S-100 蛋白の免疫活性の発現を免疫組織学的に検索した.

II. 対

象

A. 拡張部から狭小部への移行部が回腸にあった日令 14 日から 27 日の先天性 aganglionosis ラット 10 匹を対象にした. また, 先天性 aganglionosis ラットの同腹正常ラット 10 匹の腸管を対照とした.

B. ラット胎生期での検討では, ウイスター系ラットを用い, 胎生 11 日目から胎生 20 目の胎仔に加え, 生後 1 日目の新生ラットを各々 5~12 匹を対象とした.

III. 方

法

A. 標本切り出しおよび処理

先天性 aganglionosis ラットの消化管を胃, 空腸中部, 拡張部, 移行部, および, 狭小部, 上部, 中部, 下部を各々 1 cm 採取し, ただちに -70°C に凍結して, EIA による定量に供した. 狭小部上部, 中部, 下部はそれぞれ結腸上部, 結腸中部, 結腸下部とした. 又, 前述の様に切り出した腸管の前後の腸管を 10% ホルマリンおよび periodate-lysine-paraformaldehyde (PLP) 液にて固定し, パラフィン切片, 凍結切片を作製し, HE 染色および免疫組織学的検索に供した. 対照腸管は, 同腹正常ラットの消化管とした (図 1).

ラット胎仔および新生ラットは PLP 液にて固定したのち凍結切片を作製した.

B. NSE, S-100 蛋白の定量

1. 抗原および抗体

NSE (γ -エノラーゼ) の抗体はラット脳より抽出 (Suzuki, 1980) した γ サブユニットを抗原としウサギを免疫することにより作製した. また, S-100 蛋白の抗体は S-100 蛋白がエノ

図 1. 先天性 aganglionosis ラット (C.A.R.) 及び, 対照とした同腹正常ラット (control) の腸管採取部位

ラーゼと同様、種特異性が低いので(Zomzely-Neurath, 1980), ウシ脳より抽出(Uyemura, 1971)した S-100 蛋白を抗原としてウサギを免疫し作製した(Kato 1981, Kato 1982).

2. 抗体結合固相の作製

上述の如く作製した抗体を精製したのち、ペプシンで消化して抗体フラグメント F(ab')₂ とし(Kato, 1976, 1981), 直径 3 mm, 長さ 4 mm のシリコン片に物理的に吸着させ、抗体結合固相とした(Kato, 1977).

3. 抗体-β-D ガラクトシダーゼ複合体の作製

上述の F(ab')₂ を 2-メルカプトエチルアミンにて更に F(ab') とし、これと大腸菌由来の β-D-ガラクトシダーゼを N, N'-o-phenylenedimaleimide を介して結合させた(Kato, 1976).

4. 測定方法

先天性 aganglionosis ラットおよび対照ラットより切り出した組織片の重量を測定した後、15 mM Tris acetate, pH 6.5, 含 5 mM MgSO₄, 0.1 mM EDTA 液を 0.5 ml 加えホモゲナイズした。抽出液は 4℃, 15000 rpm, 20 分間遠沈し、上清を採取した。上清中のタンパク量は Bio-Rad Protein Assay Kit (Bradford, 1976) により測定した。上清をそれぞれ希釈したうえ、抗体結合固相に 30℃ 5 時間振盪反応させた。

この固相を洗浄後、抗体-β-D-ガラクトシダーゼ複合体に 4℃ で一夜静置反応させた。S-100 蛋白の反応においては、各反応液が Ca⁺ 1 mM なるように酢酸カルシウムを付加した(Calissano, 1969)。更に固相を洗浄後、最終的に固相に結合したガラクトシダーゼ活性を蛍光

光度計にて測定した。測定方法の詳細についてはすでに加藤、石黒が報告している(Kato, 1976, 1977; Isiguro, 1982)。

なお、各々精製した抗原を定量し、これを段階希釈して、検体測定と同様にガラクトシダーゼ活性を測定し、スタンダードとした。

NSE の測定結果は γ-エノラーゼの当量で表した。各測定値の単位は mg タンパク比とし、数値は平均±SE で表した。有意差の判定は t 検定にて行なった。

C. 先天性 aganglionosis ラット腸管の免疫組織学的検討

ベルオキシダーゼを標識とする間接法を用いた(渡辺, 1981)。抗体は前述したウサギ抗ラット γ 抗体 IgG, および、ウサギ抗ウシ S-100 蛋白抗体 IgG を用いた。

各抗体は 1000~1500 倍に希釈し使用した。H₂O₂ 付加 DAB 液 (3-3' diaminobenzidine) 中で発色させたのち、メチルグリーンにて核染し、脱水、封入後鏡検した。対照試験には正常ウサギ血清を用いた。

免疫活性の判定の基準は活性の程度により以下の 4 段階に分類した。+: 免疫活性が多く認められる。+: 免疫活性がいくらか認められる。±: 免疫活性をごく僅か認める。 -: 免疫活性が認められない。

D. 胎仔および新生ラット腸管における NSE, S-100 蛋白

胎仔および新生ラットの凍結切片を、先天性 aganglionosis ラット腸管の場合と同様に、ベルオキシダーゼを標識とする間接法にて免疫組織学的染色を行なった。

IV. 成

績

A. NSE の分布 (図 2)

対照腸管においては空腸、回腸で低く (平均 230±8 ng/mg タンパク, n=30), 結腸では肛門側に近づくにしたがい著明に増加していた。(結腸上部: 410±44 ng/mg タンパク, 結腸中部: 503±41 ng/mg タンパク, 結腸下部: 585±45 ng/mg タンパク)

先天性 aganglionosis ラットでは狭小部である結腸では対照に比し有意に低値を示した。すなわち、狭小部上部では 232±12 ng/タンパク (対照: 410±44 ng/mg タンパク, p<0.01), 狭小部中部では 209±10 ng/mg タンパク (対照: 503±41 ng/mg タンパク, p<0.001), 狭小部下部では 245±17 ng/mg タンパク (対照: 585±

図 2. NSE の腸管壁内分布

●—●: 先天性 aganglionosis ラット, ○—○: 対照, 横軸の a~g は図 1 と同じ. n=10, mean±SE, *: p<0.02, **: p<0.01, ***: p<0.001

図 3. S-100 蛋白の腸管壁内分布

●—●: 先天性 aganglionosis ラット, ○—○: 対照, 横軸の a~g は図 1 と同じ. n=10, mean±SE, *: p<0.02, **: p<0.01, ***: p<0.001

45 ng/mg タンパク, p<0.001)であった。胃, 空腸, 拡張部, 移行部では対照腸管との間に有意差を認めなかった。

B. S-100 蛋白の分布 (図 3)

対照腸管では結腸上部で最も高い傾向を示した。すなわち, 空腸, 回腸は平均 4.35 ± 0.28 ng/mg タンパク (n=30), 結腸上部は 9.13 ± 0.85 ng/mg タンパク, 結腸中部, 結腸下部は平均 6.39 ± 0.50 ng/mg タンパク (n=20) であった。

先天性 aganglionosis ラットでは拡張部, 移行部, 狭小部のいずれも対照腸管に比し有意に低値であった。すなわち, 拡張部では 2.45 ± 0.28 ng/mg タンパク, (対照: 4.36 ± 0.52 ng/mg タンパク, p<0.02), 移行部では 1.49 ± 0.39 ng/mg タンパク, (対照: 4.14 ± 0.39 ng/mg タンパク, p<0.005), 狭小部上部は 3.08 ± 0.59 ng/mg タンパク, (対照: 9.13 ± 0.85 ng/mg タンパク, p<0.001), 狭小部中部は 2.19 ± 0.35 ng/mg タンパク, (対照: 6.16 ± 0.68 ng/mg タンパク, p<0.001), 狭小部下部は 3.31 ± 0.61 ng/mg タンパク, (対照: 6.61 ± 0.73 ng/mg タンパク, p<0.01) であった。胃, 空腸では対照腸管との間に有意差を認めなかった。

C. 先天性 aganglionosis ラット腸管に於ける NSE, S-100 蛋白の免疫組織学的染色

1. 対照腸管 (図 4)

NSE の免疫染色では, A-神経叢, M-神経叢の神経節細胞に一致して強い免疫活性を認めた。また, 神経節細胞の周囲に線維状, 糸屑状, あるいは網目状の免疫活性を持つ神経線維または神経終末を多く認めた。粘膜固有層や粘膜下層にも, 線維状, 糸屑状, あるいは網目状の免疫活性を持つ神経線維をいくらか認めた。筋層にも同様の免疫活性を持つ神経線維を認めた。これは内輪筋層に多く外縦筋層に少なかった。粘膜上皮では胃および十二指腸に免疫活性を示す神経分泌細胞が散見された。しかし, 回腸以下では粘膜上皮に免疫活性は認めなかった (図 4A)。

S-100 蛋白の免疫染色では, A-神経叢, M-神経叢の神経節細胞には免疫活性はなく, グリア細胞に強い免疫活性を認めた。また, 両神経叢内にも, 線維状, 糸屑状, あるいは網目状の免疫活性を認めた。筋層では内輪筋層で線維状, 糸屑状, あるいは網目状の免疫活性を僅かに認める程度であった。粘膜固有層, 粘膜下層でも僅かに免疫活性を認めた。粘膜上皮では肛門近位にて僅かに免疫活性を認めた (図 4B)。

図4. 対照腸管における NSE, S-100 蛋白の免疫組織学的染色

A: NSE の免疫組織学的染色, A—神経叢, M—神経叢内の神経節細胞, 神経線維, 神経終末に, また, 内輪筋に免疫活性が多く認められ, 粘膜固有層, 粘膜下層, 外縦筋にいくつかの免疫活性が認められる. (×200)

B: S-100 蛋白の免疫組織学的染色, 神経叢内の神経節細胞には免疫活性はほとんど無く, グリア細胞, 神経線維に強い免疫活性が認められるが, 神経叢以外にはわずかしき免疫活性を認めない. (×200)

2. 先天性 aganglionosis ラット腸管

a. 回腸および拡張部 (図 5A)

NSE, S-100 蛋白の免疫活性は対照腸管と同様であった。

b. 移行部

移行部では A-神経叢, M-神経叢ともにその数は減少しており, 神経叢自体も小さいものが多かった。しかし, 神経叢内の免疫活性は NSE, S-100 蛋白ともに対照とほぼ同様であった。内

輪筋層では, 線維状, 糸屑状, あるいは網目状の NSE 免疫活性陽性の神経線維をいくつか認めた。外縦筋層, 粘膜固有層, および粘膜下層ではごく僅かの NSE 免疫活性を認めた。S-100 蛋白の免疫活性は神経叢以外では認めなかった。

c. 狭小部口側 (図 5B)

NSE, S-100 蛋白ともに免疫活性を全層に認めなかった。

図5. 先天性 aganglionosis ラットの拡張部および狭小部口側腸管における NSE, S-100 蛋白の免疫組織学的染色

A: 拡張部腸管における NSE の免疫組織学的染色, 免疫活性の所見は対照腸管とほぼ同じである. ($\times 100$)

B: 狭小部口側腸管における NSE の免疫組織学的染色, 全層に免疫活性を認めない. ($\times 200$)

d. 狭小部肛門側 (図6)

筋層間に NSE, S-100 蛋白ともに免疫活性の強い神経線維束 (図6B) を多数認めたが, 神経節細胞は認めなかった. 内輪筋層には NSE 免疫活性のある神経線維を僅かに認めたが, S-100 蛋白の免疫活性はなかった. 外縦筋層には NSE, S-100 蛋白ともに免疫活性を認めず, 粘膜固有層, 粘膜下層では NSE, S-100 蛋白ともに, 糸屑状の免疫活性をしめす神経線維をいくらか認めた (図6C).

各部位での NSE, S-100 蛋白の免疫活性をまとめると, 表1および表2のごとくなる.

D. 正常ラット胎仔および新生ラット腸管の NSE, S-100 蛋白の局在

1. NSE の局在 (図7)

11日目胎仔では胃腸管は1-2mmであり, 胃は厚く膨らみを増し, 胃と判別できるようになり, NSE 陽性細胞 (神経芽細胞) の塊りが認められた. 13日目胎仔では NSE 陽性細胞は胃から小腸に分布しており, 集合して存在する部分

図6. 先天性 aganglionosis ラットの狭小部肛門側腸管における NSE の免疫組織学的染色
 A: 筋層間に NSE 免疫活性の強い神経線維束を認める。粘膜固有層, 粘膜下層にも免疫活性がいくらか認められるが, 固有筋層には殆ど認められない。また, 外来神経も認められる。(×50)
 B: 筋層間の神経線維束 (×200)
 C: 粘膜固有層, 粘膜下層の NSE 免疫活性陽性線維 (×400)

表1. 先天性 aganglionosis ラット腸管の NSE 免疫活性

部 位	腸 管	空 腸	弛 張 部	移 行 部	狭小部口側	狭小部肛門側
粘膜固有層	神経線維	+	+	±	—	+
粘膜下層	神経叢 { 神経節細胞 神経線維 又は終末	+	+	+	—	—
		+	+	+	—	—
	神経線維	+	+	±	—	+
内 輪 筋	神経線維	+	+	+	—	—
筋 層 間	神経叢 { 神経節細胞 神経線維 又は終末	+	+	+	—	—
		+	+	+	—	—
	神経線維束	—	—	—	—	+
外 縦 筋	神経線維	+	+	±	—	—

表2. 先天性 aganglionosis ラット腸管の S-100蛋白免疫活性

部 位	腸 管	空 腸	拡 張 部	移 行 部	狭小部口側	狭小部肛門側
粘膜固有層 神経線維		±	±	—	—	+
粘膜下層 { 神経叢 { グリア細胞 神経線維 又は終末 神経線維		+	+	+	—	—
		+	+	+	—	—
		±	±	—	—	+
内 輪 筋 神経線維		±	±	—	—	—
筋 層 間 { 神経叢 { グリア細胞 神経線維 又は終末 神経線維束		+	+	+	—	—
		+	+	+	—	—
		—	—	—	—	+
外 縦 筋 神経線維		±	±	—	—	—

図7. 胎生期ラット腸管の NSE の免疫組織学的染色

A 胎生 13 日目の十二指腸の NSE 免疫組織学的染色, NSE 陽性細胞(神経芽細胞)を認める. (×400)

B: 胎生 15 日目の NSE 免疫組織学的染色, 上の腸管は小腸で筋層の判別が可能であり, A—神経叢に NSE 陽性細胞(神経芽細胞, または, 神経節細胞)を認める. 下の腸管は結腸下部で筋層の判別がつかず, NSE 陽性細胞も認めない. (×200)

と分散して存在する部分が認められた(図7A). 14 日目胎仔では腸管の延長が著明で, 小腸の粘膜下層と筋層とは不明瞭ながら判別出来るようになった. NSE 陽性細胞(神経芽細胞または神経節細胞)は胃および小腸全域に認められた. 15 日目胎仔では NSE 陽性細胞は結腸下

部には認められず(図7B), 16 日目胎仔には直腸に認められた. なお, 筋層が識別される胎生 14 日目以後の胎仔では NSE 陽性細胞は筋層間のみ認められた.

2. S-100 蛋白の局在

胎生 15 日以前の胎仔腸管には S-100 蛋白陽

図 8. 胎生 18 日目ラット腸管の NSE, S-100 蛋白の免疫組織学的染色

A: 空腸の S-100 蛋白免疫組織学的染色, A—神経叢内に S-100 蛋白陽性細胞を多数認める, ($\times 200$)

B: 結腸下部の S-100 蛋白免疫組織学的染色, A—神経叢内に S-100 蛋白陽性細胞は認めない, ($\times 200$)

C: B と同部位の NSE 免疫組織学的染色, NSE 陽性細胞(神経芽細胞, または, 神経節細胞)を A—神経叢に認める, ($\times 200$)

性細胞を認めなかった。胎生 16 日目以後は粘膜下層にも S-100 蛋白免疫活性のある細胞が散見され、リンパ濾胞の follicular dendritic cell と考えられるので、この時期すでに識別される筋層間(A—神経叢の存在する部位)を観察した。すなわち、16 日目胎仔の胃、十二指腸の筋層間に僅かに S-100 蛋白陽性細胞(グリア細胞)が認められた。17 日目胎仔では胃および小腸の筋層

間に認めた。18 日目胎仔には全小腸及び結腸上部の筋層間に認めたが、結腸下部の筋層間には免疫活性を認めなかった(図 8A, B)。生後 1 日目ラットの直腸筋層間には認められた。

胎生期および新生期の腸管における NSE, S-100 蛋白陽性細胞の出現をまとめると、表 3, 表 4 のごとくなる。

V. 考

筏井らは 1979 年先天性 aganglionosis ラットを発見し育種に成功した。この先天性 aganglionosis ラットの無神経節腸管は全結腸に及ぶものが多く(90% 程)、Hirschsprung 病、特に total colon aganglionosis の動物実験モデルとしての有効性が示されている(堀江, 1980)。

一方、近年の蛋白質分析法の進歩に伴い、神経組織特異蛋白が数多く発見されてきた。NSE や S-100 蛋白もそれらのうちの一つである。Moore & McGregor (1965a) がウシ脳から精

察

製した 14-3-2 蛋白は、解糖系酵素であるエノラーゼの酸性アイソザイムを構成する γ サブユニットと同一物質であることが Marangos (1976) らにより確認された。この γ サブユニットを持つ $\alpha\gamma$, $\gamma\gamma$ エノラーゼが NSE であるが、免疫組織学的に、神経細胞、軸索、神経終末(Pickel, 1976; Grasso, 1977; Ronnback, 1977)、神経内分泌細胞(Schmechel, 1978; Bishop, 1982)に存在し、正常グリア細胞には存在しないことが明らかにされている。

表3. 正常ラット胎仔および新生ラット腸管における NSE 陽性細胞, 分母: 免疫組織染色にて評価しえた胎仔または新生ラット数, 分子: NSE 陽性細胞を認めた数

部位 胎生日	胃	十二指腸	小 腸	結 腸		直 腸
				上 部	下 部	
11	2/5	0/5				
12	5/6	3/5				
13	8/8	8/8	8/12	0/5	0/8	0/7
14	6/6	4/4	9/9	0/3	0/5	0/6
15	12/12	4/4	12/12	5/6	0/8	0/5
16	9/9	4/4	9/9	6/6	4/4	4/4
17	4/4	2/2	5/5	5/5	3/3	2/2
18	2/2	3/3	4/4	4/4	3/3	3/3
19	5/5	4/4	8/8	5/5	6/6	4/4
20	4/4	5/5	10/10	8/8	8/8	6/6
¹ (日令)	5/5	3/3	8/8	7/7	7/7	5/5

S-100 蛋白も Moore & McGregor (1965a) により精製されたものであるが, その生理的役割はまだ充分解明されていない (Calissano, 1969; Kato, 1983; Suzuki, 1984). S-100 蛋白は NSE と異なり, 主にグリア細胞およびシュワン細胞 (Moore, 1965b; Zomzely-Neurath, 1980) に存在し, 脂肪組織, 軟骨組織およびリンパ節の follicular dendritic cell などにも含まれている (Suzuki, 1982).

腸管壁内神経においても NSE は神経叢中の神経節細胞, 神経線維(軸索), 神経終末すなわちニューロンに局在し (Facer, 1980), S-100 蛋白はグリア細胞および神経線維(シュワン細胞)に局在する (Stefanssen, 1982; Ferri, 1982).

Ferri はヒト結腸の M-神経叢で NSE 陽性細胞(神経節細胞)と S-100 蛋白陽性細胞(グリア細胞)と S-100 蛋白陽性細胞(グリア細胞)がちょうど反転した形で免疫組織学的に染色さ

れることを示し, それぞれニューロン成分とグリア成分の marker として適当であると述べている.

今回我々はラット腸管の NSE, S-100 蛋白を測定したが, この際問題となるのは測定値表示法である. 先天性 aganglionosis ラット腸管各部位の単位長さあたりの可溶性タンパク量を測定してみると, 拡張部と移行部で著明に増加している. これは拡張腸管では単位長さあたりの腸管壁量が増加しているためと考えられた. それ故, 口径に著しい差の有る aganglionosis 腸管の NSE, S-100 蛋白を拡張の無い対照腸管のそれと比較する場合, 腸管壁量の影響を受けない mg タンパク比で表現することが妥当と考えられる.

私たちの得た測定結果から以下のことが明らかとなった. すなわち, ① 対照腸管の NSE は小腸に比し結腸に高く, 更に, 肛門に近い程, 高

表 4. 正常ラット胎仔および新生ラット腸管における S-100 蛋白陽性細胞,
分母: 免疫組織染色にて評価しえた胎仔または新生ラット数, 分子:
筋層間に S-100 蛋白陽性細胞を認めた数

部位 胎生日	胃	十二指腸	小 腸	結 腸		直 腸
				上 部	下 部	
11	0/4	0/4				
12	0/6	0/5				
13	0/7	0/6	0/12	0/5	0/6	0/6
15	0/7	0/4	0/8	0/4	0/6	0/5
15	0/11	0/6	0/12	0/6	0/7	0/5
16	5/8	2/4	1/9	0/7	0/5	0/4
17	3/3	3/4	1/5	0/5	0/4	0/2
18	3/3	3/3	6/6	3/6	0/4	0/4
19	6/6	6/6	6/6	2/4	1/5	0/4
20	4/4	5/5	10/10	6/8	5/8	1/6
1 (日令)	5/5	3/3	7/7	8/8	6/6	5/5

い値を示した。これはモルモットで腸管 1 cm^2 あたりの神経節細胞を測定した Irwin (1931) の結果, すなわち, 小腸で約 7000 個, 大腸で 14000~18000 個という結果によく符合する。また, 大腸の A-神経叢のネットワークは小腸のそれより密である (上原, 1981) ことからもうなずける。② 対照腸管の S-100 蛋白は結腸が小腸よりやや高く, なかでも結腸上部が最も高い傾向を示した。これは S-100 蛋白がリンパ節の follicular dendritic cell にも含まれているので (Cocchia, 1983), リンパ濾胞の多い結腸上部で高い傾向がみられるのではないと思われる。③ 先天性 aganglionosis ラットでの NSE では狭小部で対照に比し有意に低値を示した。しかし, 拡張部や移行部では対照との間に有意差が無かった。④ 先天性 aganglionosis ラットでの S-100 蛋白は狭小部だけではなく, 拡張部や移行部も対照に比し有意に低値を示した。

狭小部の HE 染色標本を観察すると, 神経節細胞が欠如しているのは勿論であるが, 神経叢自体も認められない (Whitehouse, 1984)。筋層間には神経線維に伴い, 若干の細胞を認めるが, これは堀江の電顕による検索から外来神経に伴うシュワン細胞 (Garrett, 1969; Haward, 1970) と線維芽細胞の増殖である。狭小部では NSE, S-100 蛋白ともに対照に比し低値を示し, 同時に免疫染色による免疫活性が低下していた。これは狭小部では外来神経由来の神経線維とシュワン細胞が存在するのみで, 壁内神経 (A-神経叢, M-神経叢) 由来の神経節細胞およびグリア細胞が無いためと考えられる。

次に拡張部と移行部において, NSE は対照腸管との間に有意差がないのに対し, S-100 蛋白は有意に低値を示した。このことはニューロン成分は正常であるが, グリア成分は減少していることを示している。したがって拡張腸管も免

疫活性からみるとき異常である。

一方、今回の NSE, S-100 蛋白を指標とした在胎期間の異なったラット胎仔の免疫組織学的研究は、NSE 免疫活性を示す神経節細胞または神経芽細胞も S-100 蛋白免疫活性を示すグリア細胞も在胎期間が増すにつれより肛門側腸管に認められる様になり、かつ、S-100 蛋白免疫活性の方が NSE 免疫活性より在胎期間の遅れた胎仔腸管に出現することを明らかにした。このことは、先天性 aganglionosis ラットの拡張部腸管においてニューロン成分は正常であったが、グリア成分は減少していたと考え合せると、胎生期での神経節細胞の発達障害と共に、グリア細胞にも発達障害が有ることを示唆している。

免疫組織学的には、NSE 免疫染色は腸管壁内神経、特に神経節細胞、軸索および、神経終末を描出する方法であった (Facer, 1980; Ferri, 1983)。又、神経分泌細胞にも免疫活性を認めた。しかし S-100 蛋白の免疫染色では神経叢内のグリア細胞と神経線維は良好に染色されたが、他の部位での染色は不良であった。これは対象としたラットが生後 2~3 週と幼若なため、S-100 蛋白の含有量が少ない為であると思われる (Zomzely-Neurath, 1980)。我々が同じ方法でヒト幼児腸管を S-100 蛋白免疫染色を

してみたところ、全ての層の神経線維が良好に描出し得たことから、S-100 蛋白の免疫染色はヒト腸管壁内神経、特にグリア系の検索には良い方法であると考えられる。

この 2 つの蛋白を利用した免疫組織学的染色は、神経節細胞の未熟性などが問題とされる Hirschspurung 病類似疾患の研究 (Munakata, 1978) にも神経叢内の神経節細胞とグリア細胞が明白に識別されるので、有用な研究手段となり得よう。

先天性 aganglionosis ラット腸管の NSE の免疫染色にて、狭小部口側では全く神経成分を欠き、かつ、狭小部肛門側で筋層間に神経線維束が多く存在していることが明らかになった。この所見は、筏井 (1979)、堀江 (1980) の HE 染色、アセチルコリンエステラーゼ染色による検索結果とよく一致するものである。この神経線維束は仙骨神経叢からの外来神経線維であると考えられ、これら神経線維が結合すべき壁内神経叢が存在しないので、集束して見られると思われる。また、狭小部口側に神経線維束が無いのは先天性 aganglionosis ラットの無神経節腸管が長く仙骨神経叢からの外来神経線維が狭小部口側まで到達しないためではないかと考えられる。

VI. 結

語

1. 先天性 aganglionosis ラット腸管の狭小部では、NSE, S-100 蛋白ともに対照腸管より低値を示した。免疫組織学的検索によると同部での免疫活性が著しく低下していた。

2. 先天性 aganglionosis ラット腸管の拡張部では NSE は対照腸管と有意差が無かったが、S-100 蛋白は有意に低かった。神経節細胞の分布している拡張腸管も S-100 蛋白免疫活性では異常を示した。

3. 先天性 aganglionosis ラット腸管の空腸や拡張部の NSE および S-100 蛋白は免疫組織学的に、対照腸管と同様の局在を示したが、狭小部口側では、全層にそれらの局在を認めなかった。また、狭小部肛門側では、NSE, S-100

蛋白ともに強い免疫活性のある神経線維束を筋層間に多数認めた。

4. NSE 陽性細胞(神経芽細胞、または、神経節細胞)は 11 日目ラット胎仔の胃に僅かに認め、14 日目胎仔の胃、小腸で、16 日目胎仔では全腸管に認めた。S-100 蛋白陽性細胞(グリア細胞)は、NSE の場合より在胎期間の遅れた胎仔腸管の筋層間に認められた。すなわち、16 日目胎仔の胃に、18 日目胎仔では胃、小腸、及び結腸上部に、生後 1 日目新生ラットでは直腸にも認められた。

以上より、先天性 aganglionosis ラット腸管の狭小部ではニューロン成分およびグリア成分ともに減少していた。拡張部ではグリア成分の

減少がみられたが, これは胎生期腸管の S-100 蛋白陽性グリア細胞の出現が NSE 陽性神経節細胞の出現より遅れることと関係があると思われる。

稿を終るにあたり, 御指導, 御校閲を賜った塩野谷恵彦教授に深謝いたします。尚, Hirschsprung 病との出会いでもあった植田 隆先生にも深謝いたします。

文 献

- Bishop, A. *et al.* (1982). Neuron specific enolase: A common marker for the endocrine cell and innervation of the gut and pancreas. *Gastroenterology* **83**: 902-915.
- Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Annal. Biochem.* **72**: 248-254.
- Calissano, P. Moore, B.W. and Friesen, A. (1969). Effect of calcium ion on S-100, a protein of the nervous system. *Biochemistry* **8**: 4318-4326.
- Cocchia, D. *et al.*, (1983). S-100 protein in "follicular dendritic" cell of rat lymphoid organs. An immunochemical and immunocytochemical study. *Cell Tissue Res.* **230**: 95-103.
- Ehrenpris, T. (1970). *Hirschsprungs disease*. Year Book Medical Publishers, Chicago.
- Facer, P. *et al.* (1980). Immunocytochemical localization of neuron specific enolase (NSE) in the gastrointestinal tract. *Proc. Roy. Microscop. Soc.* **15**: 113-114.
- Ferri, G.L. *et al.* (1982). Evidence for the presence of S-100 protein in the glial component of the human enteric nervous system. *Nature* **297**: 409-410.
- Gabella, G. (1971). Glial cells in the myenteric plexus. *Z. Naturforsch.* **26b**: 244-245.
- Gabella, G. (1981). Ultrastructure of the nerve plexuses of the mammalian intestine: the enteric glia cells. *Neuroscience* **6**: 425-436.
- Garrett, J.R. Howard, E.R. and Nixon, H.H. (1969). Autonomic nerves in rectum and colon in Hirschsprung's disease. A cholinesterase and catecholamine histochemical study. *Arch. Dis. Childh.* **44**: 406-417.
- Grasso, A. *et al.* (1977). Localization of 14-3-2 protein in the rat brain by immunoelectron microscopy. *Brain Res.* **122**: 582-585.
- Howard, E.R. and Garret, J.R. (1970). Electron microscopy of myenteric nerves in Hirschsprung's disease and in normal bowel. *Gut* **11**: 1007-1014.
- 堀江 弘ら(1980). 先天性 aganglionosis Rat の病理組織学的研究, 日小外会誌 **16**: 549-560.
- 筏井 洋ら(1979). 先天性 aganglionosis Rat (Hirschsprung 病 Rat) の発見とその遺伝学的研究, 先天異常 **19**: 31-36.
- Ikadai, H. (1981). Animal models of human disease: Hirschsprung's disease. *Comparative pathology bulletin* **13**(3) August, 3-4.
- Irwin, D.A. (1931). The anatomy of Auerbach's plexus. *Amer. J. Anat.* **49**: 141-166. Ehrenpris, T. (1979). より引用.
- Ishiguro, Y. *et al.* (1982). High levels of immunoreactivity nervous system-specific enolase in sera of patients with neuroblastoma. *Clinica chimica Acta* **121**: 173-180.
- Kato, K. *et al.* (1976). Enzyme-linked immunoassay: conjugation Fab' fragment of rabbit IgG with β -D-galactosidase from E. coli. and its use for immunoassay. *J. Immunol.* **116**: 1554-1560.
- Kato, K. *et al.* (1977). Use of rabbit antibody IgG-loaded silicon pieces for the sandwich enzyme immunoassay of macromolecular antigen. *J. Biochem.* **81**: 1557-1566.
- Kato, K. Suzuki, F. and Umeda, Y. (1981). Highly sensitive immunoassay for three form of rat brain enolase. *J. Neurochem.* **36**: 793-797.
- Kato, K. *et al.* (1982). Sensitive enzyme immunoassay for S-100 protein: Determination in human cerebrospinal fluid. *Biochemical Research* **3**: 24-28.
- Kato, K. (1983). Decrease in adipose S-100 protein level by epinephrin in rat. *J. Biochem.* **93**: 311-313.

- Marangos, P.J., Zomely-Neurath, C. and York, C. (1976). Determination and characterization of neuron specific protein (NSP) associated enolase activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **68**: 1309-1316.
- Moore, B.W. and McGregor, D. (1965a). Chromatographic and electrophoretic fractionation of soluble protein of brain and liver. *J. Bio. Chem.* **240**: 1647-1653.
- Moore, B.W. (1965b). A soluble protein characteristic of the nervous system. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **19**: 739-744.
- Munakata, K., Okabe, I. and Morita, K. (1978). Histological studies of rectocolic aganglionosis and allied disease. *J. Pediat. Surg.* **13**: 67-75.
- 岡本英三(1961). 先天性巨大結腸症の成因に関する研究. 大阪大学医学雑誌 **13**: 285-299.
- Pickel, V.M. *et al.* (1976). Immunocytochemical localization of nervous system specific protein (NSP-R) in rat brain. *Brain Res.* **105**: 184-187.
- Ronnback, L. (1977). 14-3-2 protein in rat brain synapses. *Experientia.* **33**: 1094-1095.
- Schmechel, D. (1978). Neurone-specific enolase in a molecular marker for peripheral and central neuroendocrine cells. *Nature* **276**: 834-836.
- Suzuki, F., Nakajima, T. and Kato, K. (1982). Peripheral distribution of nervous system-specific S-100 protein in rat. *J. Biochem.* **92**: 835-838.
- Suzuki, F., Kato, K. and Nakajima, T. (1984). Regulation of nervous system-specific S-100 protein and enolase levels in Adipose Tissue by Catecholamines. *J. Neurochem.* **42**: 130-134.
- Stefanssen, K., Wollmann, and Moore, B.W. (1982). Distribution of S-100 protein outside the central nervous system. *Brain Res.* **234**: 309-317.
- 上原康生, 藤原 隆, 小室輝昌(1981). 消化管自律神経支配, アウエルバッフ神経叢を中心にして. 日本平滑筋会誌 **17**: 81-91.
- Uyemura, K. *et al.* (1971). Purification and some properties of S-100 protein fractions from sheep and pig brain. *J. Neurochemistry* **18**: 429-438.
- 渡辺慶一(1981). 酵素抗体法, 学際企画, 東京.
- Whitehouse, F.R. and Kernohan, J.W. (1948). Myenteric plexus in congenital megacolon, study of eleven cases. *Arch. Int. Med.* **82**: 75-111.
- Zomely-Neurath, C.E. and Walkor, W.A. (1980). *Nervous system-specific proteins 14-3-2 protein: Neuron-specific enolase and S-100 protein. Protein of the nervous System.* 2nd edition, edited by Bradshaw, R.A. and Schneider, D.M., Raven Press, New York

(1984 年 12 月 11 日受付)