Hirschsprung 病無神経節腸管の病態生理に関する研究

兵庫医科大学 第一外科

岡 空 達 夫, 岡 本 英 三, 豊 坂 昭 弘
能 勢 勝 義, 中 井 謙 之, 富 本 喜 文

STUDY ON FUNCTION OF AGANGLIONIC COLON MUSCULATURE OF HIRSCHSPRUNG'S DISEASE MURINE MODEL

Tatsuo OKASORA, Eizo OKAMOTO, Akihiro TOYOSAKA, Katsuyoshi NOSE,
Yoshiyuki NAKAI and Yoshifumi TOMIMOTO

*First Department of Surgery, Hyogo College of Medicine,
Nishinomiya, Hyogo.*

This study examined the function in vitro of aganglionic colon musculature in mice with hereditary aganglionosis—a strain of animals used as a model of Hirschsprung's disease. Double sucrose gap recordings from the muscle strips of both normal and aganglionic colon showed bursts of spike potentials with muscle contraction. Intracellular recordings of the membrane potentials of the circular muscle cells of normal, aganglionic and oligoganglionic colon had no statistical difference. Microelectrode recordings from the circular muscle cells of normal siblings, in the presense of nifedipine, irregular ongoing fluctuations in membrane potential, which were abolished by tetrodotoxin and reduced by d-tubocurarine or apamin. The fluctuations were less effected by atropine. These observations suggest that there is ongoing inhibitory neural activity to the circular smooth muscle of normal colon. These ongoing fluctuations were not recorded from the cells of aganglionic and oligoganglionic colon of affected animals. Although transmural stimulation of the intrinsic nerves produced cholinergic excitatory and inhibitory junction potentials in normal colon, no junction potentials were evoked by transmural stimulation in aganglionic colon. It was concluded that the ongoing tonic inhibitory activity may contribute to the compliance of the normal mouse colon and lack of the compliance may affect functional intestinal obstruction of the aganglionic colon in Hirschsprung's disease.

結 言

先天的に遠位側結腸の壁内神経を欠き、外来交感・副交感神経線維の増生を認める Hirschsprung 病の無神経節腸管において、その平滑筋が神経支配の無い状態にあることは既に報告した (岡 空ら, 1983; Okasora & Okamoto, 1986). 今回, Hirschsprung 病の病態生理を把

握する目的で、この神経支配の無い無神経節腸管の平滑筋が如何なる状態にあるかを検討した. すなわち, Hirschsprung 病モデルマウスの摘出腸管を材料にして、二重蔗糖隔絶法ならびに微小電極法を用いた電気生理学的研究を行った.

II. 研究対象ならびに研究方法

胎生学的, 臨床的かつ組織学的にヒト Hirschsprung 病と全く同様の所見を有する (植木

ら, 1979) piebald lethal マウス (sl/sl) 20 匹を研究対象とし, 正常対照には正常な腸管を有する同胞(sl/+または+/+)20 匹を用いた. マウス(雌雄同数, 15~20 g)は頭部を強打して失神させた後, 頸動脈を切断して失血死せしめた. 直ちに開腹して肛門を含む遠位側結腸を摘出し, 修正 Krebs 液内で以下の操作を行い標本を作成した. すなわち, 二重蔗糖隔絶法に供する標本は粘膜を注意深く剝離したのち縦切し, 大きき約 1.5×20 mm の 2 条の筋条片とした. 次いで, 中央には修正 Krebs 液を灌流し, その両外側に 1 M 蔗糖液, さらに外側は 3 M KCl を貯留した装置に装着した (Ito et al., 1977). また, 微小電極を用いた細胞内電位測定法では最遠位側結腸の全層標本を約 5.0×30 mm の大きさにトリミングし, 漿膜を上方にして修正 Krebs 液 (37°C) を灌流した (2.5 ml/min) organ bath (容量 4 ml) に装着した.

二重蔗糖隔絶法では無神経節腸管および正常腸管の平滑筋の自発膜活動を細胞外に導出記録し, 同時に筋張力を等尺性に記録した (Ito et al., 1977). 微小電極法はガラス毛细管を微小電極製作器を用いて作成し, 3 M KCl を満たした微小ガラス電極 (40~80 M Ω) を用いて行った. すなわち, 上記の如くに装着した標本で, 漿膜および縦走筋細胞を通過して輪状筋細胞に刺入し, 膜電位を記録した. また, 標本の上下に装着した 1 対の白金電極を通して経壁刺激を行い, その結果として生ずる膜電位変化 (接合部電位) を記録した (Okasora, Bywater & Taylor, 1986).

III. 研 究 成 績

1) 自発膜活動

二重蔗糖隔絶法で平滑筋細胞の静止時の自発膜活動を記録すると, 約半数の標本で図 1 に示すような膜活動が記録された. すなわち頻度が 0.3~1.5 cpm で 2~15 個ずつ集簇する spike 電位 (2~7 mV) が記録された. そしてそれらにはすべて筋の収縮を伴っており, 電位が 1~5 mV の slow wave が認められる場合には slow wave に重畳していた.

二重蔗糖隔絶法および微小電極法の電位記録には日本光電工業社製の平衡型微小電極用増幅器 MEZ-7101, 前置増幅器 AVH-9 および万能 2-4 現象オシロスコープを用いた. 張力記録には FD ピックアップ TB-612T およびひずみ圧力用アンプ AD-620G を用いた. いずれもいったんテアック社製カセットデータレコーダー MR-10 に記録してデータ分析に供し, 永久記録には日本光電工業社製レクチャコーダーを用いた. 経壁刺激には日本光電工業社製電気刺激装置 SEN-7103 およびアイソレーター SS-102J を用いて, 50~70 V, 0.5 sec, 20 Hz の直流矩形波を用いた. なお, 二重蔗糖隔絶法における電位導出には銀/塩化銀電極を用い, 微小電極法では白金電極を用いた.

本研究に用いた修正 Krebs 液は, 組成として NaCl 120 mM, KCl 5.0 mM, CaCl₂ 2.5 mM, MgCl₂ 1 mM, NaH₂PO₄ 1 mM, NaHCO₃ 25 mM, glucose 11 mM を含み, 95% O₂-5% CO₂ 混合気体を送気して 37°C に調整したものを用いた. 微小電極法を用いた実験では標本の動きを抑制する目的で, 灌流液中にニフェデピン (Sigma) を添加した. 薬理的検討に供した薬剤すなわち硫酸アトロピン (田辺製薬), テトロドトキシン (Sigma), アパミン (Sigma), 塩酸ツボクラリン (和光純薬) は全て用時調整し, 灌流せる修正 Krebs 液内に添加した. 微小電極法で記録された輪状筋の静止時膜電位はすべて平均 $\pm$ 平均標準偏差 (記録細胞数) で表現した. また, 統計的分析は Student の t 検定を用いて行った.

この自発膜活動は正常対照の標本でも (図 2A), 無神経節腸管の標本でも (図 2B) 記録され, アトロピン (0.7 μ M) あるいはテトロドトキシン (0.7 μ M) を加えても, 電位の大きさおよび発生頻度に変化を生じなかった.

2) 静止時膜電位

ガラス電極が良好に正常対照の輪状筋細胞に刺入された場合, 本研究ではニフェデピン (0.2 μ M) を灌流して自発膜活動を抑制しているの

図1. 二重蔗糖隔絶法で記録された正常結腸筋条の自発膜活動の典型例。上に膜電位, 下に筋張力を示す。

図2. 二重蔗糖隔絶法で記録された自発膜活動に対する薬物の効果。A は正常腸管, B は無神経節腸管での記録を示す。それぞれ上に膜電位, 下に筋張力を示す。

で上記の slow wave あるいは spike 電位様の電位変化は記録されないにもかかわらず、大半の細胞の膜電位は安定しておらず、10 mV に満たない微小で持続性の不規則な波動様の電位変化が記録された。この電位変化は脱分極側にも過分極側にも認められ、アトロピン ($1.4 \mu\text{M}$) 投与でほとんど変化が生じず、テトロドトキシン

図3. 微小電極法で記録された波動様電位変化と薬物の効果。A では正常腸管, 移行部腸管, 無神経節腸管で記録された波動様電位変化とそれに対するアトロピンおよびテトロドトキシンの効果を示す。B では正常腸管で記録された波動様電位変化に対するツボクラリンおよびアパミンの効果を示す。

($1.5 \mu\text{M}$) 投与によりほとんど消失した (図3A)。一方、無神経節腸管および移行部腸管においてはガラス電極が輪状筋に刺入されてもこのような不規則な波動様電位変化は記録されなかった (図3A)。

また正常対照でえられた波動様電位変化はニコチン性抗コリン剤であるツボクラリン (100

図4. 微小電極法において経壁刺激により得られた接合部電位と薬物の効果。Aは正常腸管，Bは移行部腸管，Cは無神経節腸管における記録を示す。最上段は経壁刺激を与えた位置および train 数を示す。

μM)の投与によりかなりの電位減少を認め、同様に非コリン性非アドレナリン性抑制神経による抑制性接合部電位を減少せしめるハチ毒のアバミン ($0.5 \mu\text{M}$) 投与で減少を認めた (図 3B)。

したがって、微小電極法で測定した正常対照の輪状筋の静止時膜電位の測定は、波動様電位変化のほぼ中央をとった。無神経節腸管および

移行部腸管の静止膜電位の測定は、両部に波動様膜電位変化がないので容易であった。このようにして記録した静止時膜電位は正常対照が $-50.0 \pm 0.9 \text{ mV}$ ($n=62$) であった。一方、無神経節腸管では $-48.1 \pm 0.9 \text{ mV}$ ($n=30$) であり、両者の中間の移行部腸管では $-49.2 \pm 1.2 \text{ mV}$ ($n=38$) であった。3 者の間には統計的な有意差は認めなかった。

3) 経壁刺激により得られた接合部電位

正常対照腸管の上下に装着した一対の刺激電極より経壁刺激を加えると、輪状筋細胞では脱分極と過分極の二相性の電位変化が記録された。両電位とも刺激の回数を増加するとその大きさも増加した。そしてアトロピン ($1.4 \mu\text{M}$) 投与により脱分極は消失し、過分極が大きくなった。そしてテトロドトキシン ($1.5 \mu\text{M}$) 投与により両電位とも消失した (図 4A)。したがって、脱分極側の変化はコリン作動性興奮神経による興奮性接合部電位であり、過分極側の変化は非コリン非アドレナリン作動性抑制神経による抑制性接合部電位と考えられる。

無神経節腸管に経壁刺激を与えても、同部の輪状筋細胞には如何なる応答も記録されなかった (図 4C)。

また両者の中間の移行部腸管に経壁刺激を加えた際には、一部の標本で (2/10) 微小な興奮性接合部電位が得られた (図 4B)。この興奮性接合部電位もアトロピン ($1.4 \mu\text{M}$) 投与により消失したが、抑制性接合部電位は記録されなかった。

IV. 考

Hirschsprung 病の無神経節腸管においては壁内神経細胞を先天的に欠如するだけではなく、外来の交感・副交感神経線維はむしろ増生していることは周知の事実である。その増生した外来神経が無神経節腸管の平滑筋に対して支配を及ぼしているか否かに関し、従来より我々は神経支配をしておらず、同部の平滑筋は全く神経支配を受けていない状態にあると主張してきた。事実、我々のグループの研究では、形態

察

学的なアプローチを用いた研究 (岡本, 1983) でも、生理学的・薬理学的手法を用いた研究 (岡空ら, 1983; Okasora & Okamoto, 1986; Ueki et al., 1985) でも、その考えを支持する結果を得ている。しかし一方では、この主張に対して異論があることも事実である。本研究は電気生理学的・薬理学的に再度我々の主張を裏付けんとして施行したものである。さらに同様な手技を用いて、無神経節腸管の平滑筋が如何なる病

態にあり、どのような機序で本症の通過障害をもたらされたかを検討した。

経壁刺激に対する応答に関しては前報（岡空ら 1983; Okasora & Okamoto, 1986）と同様に正常対照においては、アトロピンで消失する興奮性接合部電位とそれに引続く抑制接合部電位が記録された。すなわち、正常結腸では主に、コリン作動性興奮神経と非コリン非アドレナリン作動性抑制神経の支配が存在する。一方、無神経節腸管においては如何なる接合部電位も記録されず、同部は神経支配の無い状態にあるといわざるを得ない。本研究ではさらに壁内神経の乏しい部分である移行部腸管における経壁刺激の応答を記録した。極く一部の標本において微小な興奮性接合部電位が記録された。ただし、後に言及するが、この事実から同部にコリン作動性興奮神経の支配があり、通過障害の主因であるとは断定し難く、この接合部電位の意義に関してはさらに検討が必要と考える。

二重蔗糖隔絶法を用いた実験で無神経節腸管においても、正常対照においても同様の自発膜活動が得られ、神経の活動を遮断するテトロドトキシンを投与しても変化を生じなかった。さらに微小電極法で得られた静止時膜電位に差が無かったことと併せて、両部の平滑筋細胞自体には差が無いことを示唆している。ところが、カルシウム拮抗剤であるニフェジピンの投与下で、自発膜活動を抑制したところ、正常対照の標本にのみ、静止時に持続性の不規則な波動様の電位変化が記録された（Okasora, Bywater & Taylor, 1986）。この持続性波動様電位変化はアトロピンでやや抑制され、テトロドトキシンではほぼ消失した。さらにニコチン作動性シナプスの遮断剤であるツボクラリン、あるいは非コリン非アドレナリン作動性抑制神経による抑制性接合部電位を抑制するハチ毒アパミンによりかなりの電位低下を認めた。この事実は正常腸管の平滑筋においては、コリン作動性興奮神

経および非コリン非アドレナリン作動性抑制神経の持続性の活動があり、特に非コリン非アドレナリン作動性抑制神経の持続性活動が活発に行なわれていることを示唆している。すなわち、この抑制神経の持続性活動が正常腸管のコンプライアンスを形成していると考えられる。このことはモルモットの結腸を使用した研究（Furness et al., 1977; Davidson et al., 1979）において、結腸拡張刺激の後、反射的な抑制運動神経の緊張性活動により腸管コンプライアンスの上昇がみられ、しかもテトロドトキシンはそれを抑制したという報告からも支持される。さらに、Wood (1981)による腸管のトーニックな収縮あるいは拡張不全は内在性の抑制性運動神経の欠如に起因するという報告からも支持される。したがって、無神経節腸管および移行部腸管においては抑制性運動神経の欠如に基づく腸管コンプライアンスの低下が存在することは明らかで、これが本症の機能的腸閉塞症状をもたらす主因であろうと考えられる。この結果は無神経節腸管では経壁刺激に対する応答が全く得られなかったという事実（同部には神経支配が無いという結果）と矛盾が無い。一方、無神経節腸管にはコリン作動性興奮神経の支配があると主張する研究者の中には、同神経の持続的支配が無神経節腸管の狭小化をもたらしていると考えがある。本研究では、無神経節腸管あるいは移行部腸管において、興奮性運動神経が持続的に活動しているという証左は得られていない。すなわち、興奮神経の持続的活動が存在するとすれば、静止時膜電位の上昇、あるいはアトロピンで消失する持続性波動様電位変化が記録されてしかるべきであろう。前記の移行部腸管における興奮性接合部電位の存在については、静止時には興奮神経の活動による変化がなんら記録されていないことから、一元的な説明が得られず、今後の検討を待ちたい。

V. 結

Hirschsprung 病の無神経節腸管の平滑筋が如何なる病態にあるかを明らかにする目的で、

語

モデルマウスの摘出腸管を用いて電気生理学的検討を加え、以下の結論を得た。

1) 平滑筋自体の性質に関しては、正常対象と無神経節腸管の間に差は無いものと考えられた。

2) 正常対象の平滑筋では、非コリン非アドレナリン作動性抑制神経の持続的な活動を示唆する所見が得られたが、移行部ならびに無神経節腸管の平滑筋では認められなかった。この活動が正常腸管のコンプライアンスを形成しているものと考えられ、逆に無神経節腸管において

はこの活動の欠如が機能的腸閉塞の主因であろうと考えられた。

3) 正常腸管の平滑筋はコリン作動性興奮神経および非コリン非アドレナリン作動性抑制神経の支配があるものと考えられた。一方無神経節腸管の平滑筋はこれらの神経支配の存在を示唆する所見は得られず、同部は神経支配の無い状態にあるものと考えられた。

文 献

- Davidson, J.S. & Pearson, G.T. (1979). The role of intrinsic, non-cholinergic, non-adrenergic inhibitory nerves in the regulation of distensibility of the guinea-pig colon. *Pflügers Arch.* **381**: 75-77.
- Furness J.B. & Costa, M. (1977). The participation of enteric inhibitory nerves in accommodation of the intestine to distension. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* **4**: 34-71.
- Ito, Y., Suzuki, H. & Kuriyama, H. (1977). Effects of caffeine and procaine on the membrane and mechanical properties of the smooth muscle cells of the rabbit main pulmonary artery. *Jap. J. Physiol.* **27**: 521-537.
- 岡本英三 (1983). 無神経節腸管の病態生理. 日本平滑筋学会雑誌 **19**: 397-414.
- 岡空達夫, 岡本英三, 桑田圭司, 豊坂昭弘, 大橋秀一, 植木重文 (1983). Hirschsprung 病無神経節腸管の神経支配に関する研究. 日本小児外科学会雑誌 **19**: 491-497.
- Okasora, T., Bywater, R.A.R. & Taylor, G.S. (1986). Projections of enteric motor neurons in the mouse distal colon. *Gastroenterology* **90**: 1964-71.
- Okasora, T. & Okamoto, E. (1986). Electrophysiological and pharmacological study on innervation of the aganglionic colon in Hirschsprung's disease of human and murine model. *Z. Kinderchir.* **41**: 93-96.
- 植木重文, 岡本英三 (1979). 川俣順一, 松下宏 (編), 疾患モデル動物ハンドブック, 292-296 頁, 医歯薬出版, 東京.
- Ueki, S., Okamoto, E., Kuwata, K., Toyosaka, A. & Nagai, K. (1985). Qualitative and quantitative analysis of muscarinic acetylcholine receptors in the piebald lethal mouse model of Hirschsprung's disease. *Gastroenterology* **88**: 1834-41.
- Wood, J.D. (1981). Physiology of enteric nervous system. in Johnson, L.R. (editor) Physiology of the gastrointestinal tract. pp. 1-37, Raven, New York.

(平成2年2月27日受付)