Hirschsprung 病モデルマウス無神経節腸管における コリン作働性神経の機能に関する実験的検討

兵庫医科大学 第一外科教室

中 井 謙 之, 岡 空 達 夫, 岡 本 英 三

STUDIES ON CHOLINERGIC NERVE FUNCTION OF THE
AGANGLIONIC COLON IN MURIN MODEL

Yoshiyuki NAKAI, Tatsuo OKASORA and Eizo OKAMOTO

*The First Department of Surgery, Hyogo College of Medicine,
1-1, Mukogawa-cho, Nishinomiya, Hyogo 663*

The true role of the extrinsic cholinergic nerve fibers proliferating abundantly in the aganglionic colon of Hirschsprung's disease has not yet been established.

Electrophysiological and pharmacological studies using superfusion method were carried out on rectal muscle strips of piebald lethal mice, one of murine models of Hirschsprung's disease and their siblings as a control. The muscle strips were preincubated with [3 H] choline in Krebs solution. The contractions and the release of [3 H] acetylcholine evoked by electrical transmural stimulation of the muscle strips were measured. In addition, the contractility of muscle strips treated with acetylcholinesterase blocking agents were recorded.

In the aganglionic colon, as in the normal colon, the release of [3 H] acetylcholine evoked by electrical transmural stimulation was recognized. However, no contractions were evoked in the aganglionic colon.

The uptake of [3 H] choline in the aganglionic colon was larger than in the normal colon presumably due to the proliferated extrinsic cholinergic nerve fibers. On the other hand, the release of [3 H] acetylcholine evoked by electrical transmural stimulation was smaller in the aganglionic colon.

In the aganglionic colon, no contractions were evoked by acetylcholinesterase blocking agents, indicating that there is no spontaneous release of acetylcholine.

In the presence of low concentration of acetylcholinesterase blocking agents, the form of contractions evoked by electrical transmural stimulation in the aganglionic colon was different from those in the normal colon.

These results have indicated that in the murine aganglionic colon, the proliferated extrinsic cholinergic nerve fibers may not directly regulate the smooth muscles through the functional neuro-muscular junction.

In conclusion, the proliferated extrinsic cholinergic nerve fibers is not related to the narrowing of the aganglionic colon.

Key words: Hirschsprung's disease, Aganglionosis, piebald lethal mice, cholinergic nerve fiber, superfusion method

緒

今世紀の中頃、Hirschsprung 病 (以下 H 病) の真の病因は拡張肥大した巨大結腸 (mega-colon) には無く、その遠位側結腸の壁内神経節細胞の先天的な欠如 (distal colon aganglionosis) にあることが明らかとなり、壁内神経細胞を欠如する腸管 (無神経節腸管) を切除することにより H 病を根治せしめることも可能となった (Swenson and Bill, 1948)。

無神経節腸管は注腸レ線上、常に狭小を示し、spastic narrow segment あるいは contracted portion と表現され、H 病のレ線診断上の重要なポイントとされてきた。しかし神経細胞を欠く腸管が何故この様に収縮状態—狭小状態を呈するのか、その適切な説明は腸壁内神経細胞をすべて副交感神経の節後ノイロンとする旧来の概念では到底なし得なかった。

1960 年代に入り Falck ら (1962) により、カテコラミンの蛍光組織学的証明法が開発され、ヒトおよび多くの哺乳類の腸管では、血管に分布するものを除いて、すべての交感神経線維は副交感神経線維と同様、腸壁内神経叢内の神経細胞にシナプスを介して接続することが明らかとなった。続いて、腸壁内神経細胞の中には興奮性神経 (excitatory neuron) ばかりでなく、非アドレナリン、非コリン作動性の抑制ニューロン (non-adrenergic, non-cholinergic inhibitory neuron) の存在も明らかにされた (Burnstock *et al.*, 1962; Crema *et al.*, 1968)。かくて、腸壁内神経叢を先天的に欠如する H 病の無神経節腸管では興奮性神経支配を欠くのみでなく、同時に抑制性神経支配を欠如するので、同

言

部の筋細胞は文字通り筋細胞本来の tonus にもどった状態になり、これが無神経節腸管の狭小化の本態であると理解し得るようになった。

一方、H 病の無神経節腸管にも外来交感・副交感神経線維が腸壁に到達していることはやくから知られていた。特に組織化学的手法の進歩と共に、無神経節腸管に入ってきた外来の交感・副交感神経線維は、これらの terminating target である壁内神経細胞が存在しないので、無制限に伸長・増生し、正常では入って行かない筋固有層や粘膜筋板、さらに粘膜固有層にまで侵入分布していることが明らかとなった。それと同時にこれらの増生した外来の交感・副交感神経線維が無神経節腸管の病態生理に如何なる意義を有しているのか、という新たな疑問が提起されるに至った。これまで形態学的、電気生理学的、あるいは薬理学的に多くの研究報告 (Kamijo *et al.*, 1953; 岡本, 1961; Okamoto *et al.*, 1974; 桑田, 1977; Okamoto *et al.*, 1982; Frigo *et al.*, 1973; 菲沢ら, 1981; 後藤ら, 1981; Kubota *et al.*, 1983; Nirasawa *et al.*, 1986; Hanai *et al.*, 1986; Larsson *et al.*, 1987; Okasora *et al.*, 1986; 佐々木, 1978) がなされているが、未だに統一した見解が得られていない。

本研究においては H 病モデルマウスの摘出腸管を対象として、superfusion method (Taniyama ら, 1983) を用い、腸管の収縮に直接関係深い外来のコリン作動性神経の機能を電気生理学的・薬理学的に検討した。

対象および方法

形態学的にも胎生学的にもヒト H 病と全く同様の所見を有する sl/sl マウス (piebald lethal マウス) (植木ら, 1979) を研究対象とし、正常対照には腸管に異常を認めない同胞の s/s マウス (正常マウス) を用いた。

マウス (雌雄同数, 10~20 g) は頸椎を脱臼さ

せた後、頸動脈を切断して失血死せしめた。直ちに開腹して直腸を摘出し、修正 Krebs 液内で周囲組織を剥離してラセン状に切離し全層筋条片として Taniyama ら (1983) の superfusion method を用いて実験した。

摘出した筋条片を [^3H]-choline 5×10^{-8} M

Fig. 1. Schematic diagram of superfusion system.

を含む 95% O_2 + 5% CO_2 を混じた修正 Krebs 液で 1 時間, 37°C で incubate した後, 20 分間修正 Krebs 液で洗浄後, 筋条片を壁内神経刺激用の 2 本の並行した白金電極間に懸垂して等尺性に張力を記録した (Fig. 1). 筋条片への静止負荷は 1 g となる様に実験中は常に調節した。

Choline の re-uptake を阻止する目的で hemicholinium-3 1×10^{-5} M を加えた修正 Krebs 液で筋条片の表面を毎分 1 ml の速度で灌流した。Hemicholinium-3 を含んだ灌流液が使用される時は, $[^3H]$ -acetylcholine (以下 ACh) の放出量は $[^3H]$ -choline を与えられた組織から放出される $[^3H]$ 量とほぼ同じと考えられている (Szerb, 1976)。

筋条片を装着後最低 30 分間待期して安定させた後, 0.5 msec, 10 Hz, 10 V から 50 V の経壁刺激を 30 秒間加えた際の筋の張力の変化を記録し, また 30 秒毎に採取した修正 Krebs 液中の $[^3H]$ 量を測定した。経壁刺激は 30 分毎に繰り返した。

各種の神経遮断剤および acetylcholinesterase (以下 ACh-E) 阻害剤を修正 Krebs 液に溶解し灌流しつつ筋の張力の変化, 及び $[^3H]$ 量を測定した。

実験終了後, 筋条片を soluen-350 にて溶解し

組織中の $[^3H]$ 量を測定し組織への uptake 量とした。なお $[^3H]$ 遊離量は Kusunoki ら (1984) の方法に準じ 'fractional rate' 即ち遊離された $[^3H]$ 量と組織中の $[^3H]$ 量の比, として算出した。

張力の記録には, 日本光電社製の FD ピップアップ TB-612T, ひずみ圧力用アンプ AD-620G およびレクチコーダ RJG-4000 を用いた。経壁刺激は日本光電社製電気刺激装置 S-7272A を用いた。 $[^3H]$ 量は PACKARD 社製 TRI-CARB460 の液体シンチレーション・カウンターにて計測した。本実験に用いた修正 Krebs 液は組成として Na^+ 137.4 mM, K^+ 5.9 mM, Mg^{2+} 1.2 mM, Ca^{2+} 2.5 mM, Cl^- 134.0 mM, $H_2PO_4^-$ 1.2 mM, HCO^- 15.5 mM および glucose 11.5 mM を含むが, O_2 95% + CO_2 5% の混合気体を通気して pH を 7.2~7.4 に調節した。使用した薬剤は, [methyl- 3H] CHOLINE CHLORIDE (Amersham International plc), Hemicholinium-3 (Sigma), 硫酸アトロピン (田辺製薬), tetrodotoxin (Sigma), 硫酸エゼリン (和光製薬) であった。

統計的処理については, 各々の平均値と標準誤差を算出し, 更に Student の t 検定により統計的有意差 ($p < 0.01$) を判定した。

結

1) 組織 dry weight あたりの [^3H]-choline の取り込み量は、正常腸管の 461.4 ± 49.3 cpm/ng ($n=6$) であるのに対して、無神経節腸管では $1,865.5 \pm 232.2$ cpm/ng ($n=6$) と有意に高値を示した ($p < 0.01$).

2) 筋条片を superfusion system に懸垂後、約 30 分で筋の自発的収縮が安定し、また [^3H] 放出も fractional rate が $0.00343 \pm 0.00012/30$ sec ($n=6$) と安定する. 正常腸管筋条片に経壁刺激 (TS) を加えると、収縮は約 15 秒で最大に達し約 1 分 30 秒後には元のレベルに復する. 抗コリン剤である atropine 1.4×10^{-6} M を含む修正 Krebs 液で superfusion しつつ経壁刺激を加えると、筋の収縮は消失するが [^3H] の放出には変化を認めない ($n=6$) (Fig. 2A). 神経伝導を遮断する tetrodotoxin (以下 TTX) 1.5×10^{-5} M を加えると、筋の収縮及び [^3H] 放出ともに消失する ($n=6$) (Fig. 2B).

3) 正常腸管筋条片に加える経壁刺激の強度を変えていくと、その強さに応じて得られる筋の張力が大きくなり、また [^3H] の放出量も多くなる加重現象が認められる ($n=6$) (Fig. 3A). [^3H] 放出量および収縮値の用量反応曲線では、経壁刺激の強度の増加に応じて [^3H] 放出量および収縮が増加し 40 V で飽和状態となる (Fig. 3B・C).

一方、無神経節腸管に経壁刺激を加えても、大部分の筋条片では全く収縮は認められない ($N=5$) (Fig. 4A₁) が、一部の筋条片では刺激の強度に応じた微小な収縮が認められた ($n=2$) (Fig. 4A₂). 経壁刺激による [^3H] 放出は無神経節腸管でも正常腸と同様に認められた (Fig. 4B) が、[^3H] 放出量の用量反応曲線は正常腸管に比し右方に移動していた ($n=7$) (Fig. 5).

4) ACh-E 阻害剤である eserine sulfate 投与下で、正常腸管では濃度に依存した律動性の収縮の増強が認められたが ($n=5$)、一方無神経節腸管では濃度を変えても収縮の増強はほとんど認められなかった ($n=5$) (Fig. 6).

果

Eserine sulfate 10^{-6} M の低濃度投与下で、経壁刺激に対し正常腸管、無神経節腸管共に振幅

Fig. 2. Effect of atropine and tetrodotoxin on [^3H]-acetylcholine release and contractions evoked by electrical transmural stimulation (TS). Atropine (1.4×10^{-6} M) (A) and tetrodotoxin (TTX, 1.5×10^{-5} M) (B) were applied 15 min before and during TS (0.5 ms, 10 Hz, 40 V, 30s). Values are means $\pm$ SE of 6 determinations.

Fig. 3. Efflux of [³H]-acetylcholine and contractions induced by TS of normal rectum.

A : [³H]-acetylcholine release and contractions.

B : frequency-response curves are percent of maximum increase in [³H]-acetylcholine release and maximum contraction elicited by TS.

C : frequency-response curves for contraction.

TS (0.5 ms, 10 Hz, 10~50 V) was applied for 30s. Each point represents means±SE of 6 determinations.

の大きな収縮が認められた (n=5) が、刺激強度に応じ正常腸管では収縮の振幅は漸増するが、無神経節腸管では 20 V で最大に達し、以後収縮の振幅は変わらない (n=5) (Fig. 7)。

Eserine sulfate 10⁻⁶ M の低濃度投与下 40 V

の経壁刺激時の筋条片の収縮反応を 50 mm/min の早送り記録すると、正常腸管では収縮が持続するのに対して、無神経節腸管では一過性の収縮であった。また収縮の開始から最大収縮値に至る時間が正常腸管の 16.8±2.4 秒 (n=

Fig. 4. Efflux of [³H]-acetylcholine and contractions induced by TS in aganglionic rectum.

A₁: non contraction in 5 of 7 aganglionic rectums.

A₂: small contraction in 2 of 7 aganglionic rectums.

B: [³H]-acetylcholine release.

TS (0.5 ms, 10 Hz, 10~50 V) was applied for 30s. Each point represents means ± SE of 7 determinations.

5) に対し、無神経節腸管では 28.9 ± 3.2 秒 ($n=5$) と有意に遅延を示した ($p < 0.01$) (Fig. 8).

考

察

壁内神経叢を欠如する H 病直腸・S 状結腸にも、外来交感・副交感神経線維は正常に入ってくるが、無神経節腸管内では接続すべき壁内神経細胞を求めて筋層内にまで侵入し著しく増生を示しているのが特徴的である (Okamoto *et*

al., 1974). これらの増生した外来神経線維が平滑筋細胞と直接 neuro-muscular junction を形成し、機能的な神経支配を及ぼし、無神経節腸管の狭小化に関与しているのかどうかは現在最も論議の別れる所である。これは節前線維であ

Fig. 5. Frequency-response curves are percent of maximum increase in [^3H]-acetylcholine release by TS. TS (0.5 ms, 10 Hz, 10~50 V) was applied for 30s. Each point represents means $\pm$ SE of 6 normal rectums (control) and 7 aganglionic rectums (sl/sl).

る外来交感・副交感線維が節後ニューロンである壁内神経節細胞とシナプスを介する事なく直接平滑筋を支配できるかどうかという神経生理学上の問題でもある。特に副交感神経の支配は、もしあるとすればこれが直接筋緊張増加の原因と成り得ることから、その解明はH病の病態生理学上重要な課題である。

そこで、本研究では piebald lethal マウスの無神経節腸管および正常腸管を用い、superfusion method で電気生理学的・薬理的にコリン作動性神経の機能を検討した。

Superfusion method では、[^3H]-choline を腸管筋条片に与える事により、副交感神経への取り込みおよび電気刺激による神経からの [^3H]-ACh の分泌量がわかり、また同時に電気刺激や薬物刺激による筋の収縮が観察されるという特徴がある。

組織 dry weight あたりの [^3H]-choline の取り込み量が正常腸管に比し、無神経節腸管で有意に高値を示した。このことは、形態学的、組織化学的に報告されている外来の副交感神経線維の腸管壁内での増生所見と一致する結果である (Kamijo *et al.*, 1953; 岡本, 1961; Okamoto *et al.*, 1974; 桑田, 1977; Okamoto *et al.*,

Fig. 6. Effect of eserine sulfate on contractions in normal rectums (control) ($n=5$) and aganglionic rectums (sl/sl) ($n=5$). Eserine sulfate was added to perfusion medium for 30 s from 10^{-8} M to 10^{-3} M. Shown are typical patterns for eserine sulfate on contractions.

Fig. 7. Effect of eserine sulfate on contractions evoked by TS in normal rectums (control) ($n=5$) and aganglionic rectums (sl/sl) ($n=5$).

Eserine sulfate (10^{-6} M) was added to perfusion medium 10 min before first TS and 20 min after last TS. TS (0.5 ms, 10 Hz, 10~50 V) was applied for 30 s. Shown are typical patterns for TS on contractions.

Fig. 8. Effect of eserine sulfate on contraction evoked by TS recorded by 50 mm/min in normal rectums (control) ($n=5$) and aganglionic rectums (sl/sl) ($n=5$).

Eserine sulfate (10^{-6} M) was added to perfusion medium 10 min before and 20 min after TS (0.5 ms, 10 Hz, 40 V).

Shown are typical patterns for TS on contraction.

Time to maximal contraction represents means $\pm$ SE of 5 determinations.

1982).

従来より、コリン作動性興奮神経に関しては、直接平滑筋を支配しているとすれば、これが無神経節腸管の狭小化の説明になりうるとして特に興味を抱かれている。Frigo ら (1973)、菲沢ら (1981)、後藤ら (1981)、Kubota ら (1983)、

Nirasawa ら (1986)、Hanai ら (1986)、Larsson ら (1987) は無神経節腸管の筋条片に電気刺激を加えた際、atropine で消失または抑制される収縮を認めたことから、コリン作動性興奮神経の支配があると主張している。

二重蔗糖法および微小電極法を用いた実験

で、後藤ら(1981), Kubota ら(1983)は無神経節腸管で atropine により消失する興奮性接合部電位が得られたと報告しているが、Okasora ら(1986)は無神経節腸管では全く収縮も興奮性接合部電位も得られないと報告している。佐々木(1978)も無神経節腸管から得られた筋条片では、電気刺激を加えても弛緩は全く認められず、約半数に収縮を認めたと報告している。しかし、この収縮は高頻度刺激時のみ得られ、atropine で抑制されるが消失しないことから、正常な神経細胞を有する口側の腸管から侵入してきた抑制神経による rebound contraction であると判断し、無神経節腸管ではコリン作動性興奮神経支配はないと結論している。

本研究でも、正常腸管では電気刺激に応じて ACh の放出と筋条片の収縮が認められた。Atropine 投与により ACh の放出は阻害されずに筋条片の収縮が消失し、TTX 投与により ACh の放出が消失し、また筋条片の収縮も消失した。このことより、正常腸管における反応はコリン作動性興奮神経の作用によるものである事が確認された。一方、無神経節腸管では経壁刺激による ACh の放出は認められるものの、その用量反応曲線は正常腸管に比し右方に移動しているのが認められた。加えて、無神経節腸管においては、経壁刺激による ACh の放出にもかかわらず筋条片の収縮がほとんど認められなかった。すなわち、外来副交感神経の増生による choline の取り込みの増加は認めるものの、それに見合うだけの ACh の放出は認められず、さらに筋条片の収縮は認められなかった。言い換えれば、無神経節腸管では副交感神経線維と平滑筋細胞の間に機能的な neuro-muscular junction の形成がなされていないことを示唆していると言えよう。なお、一部の筋条片では high voltage 刺激時のみ小さな収縮を認めた。これは佐々木(1978)の言うところの正常な神経細胞を有する口側腸管から侵入して来た抑制神経による rebound contraction か、一部 hypoganglionosis の腸管が含まれていた為と考えられる。

Ueki ら(1985)は H 病モデルマウスの無神経

節腸管において、muscarinic acetylcholine receptor (以下 mACh-R) 量が正常腸管に比し有意に減少し、一方 ACh-E 活性値は有意に増量していると報告している。発生途上、mACh-R は神経とは無関係に筋側に豊富に作られることが知られている (Galper *et al.*, 1977: Sastre *et al.*, 1977)。また長期間の denervation により増加した receptor が減少してくるという報告がある (Miledi *et al.*, 1971)。従って先天的に神経支配のない無神経節腸管に mACh-R があっても矛盾でなく、長期間に不用性の減少を来すことも十分考えられる。

本研究において、無神経節腸管でも経壁刺激により正常腸管に比し反応は弱いものの ACh の放出を認めており、また前述の Ueki ら(1985)により正常腸管に比し少ないものの mACh-R の存在も認められている。従って、無神経節腸管では正常な neuro-muscular junction が無い為に、放出された ACh が mACh-R に到達して収縮を発現する前に著増した ACh-E によって分解されると考えられる。

これらのことをさらに詳細に検討する目的で ACh-E 阻害剤である eserine sulfate の投与実験を行なった。筋の neuro-muscular junction においては、微量の伝達物質の自発放出が行なわれていることは、まず骨格筋で発見された (Castillo *et al.*, 1956)。この自発放出は微量であり、膜電位の微小な変化として認められるのみで、receptor を介しての筋の収縮等として捉えられるものではない。平滑筋においてもこの自発放出は既に認められている (Burnstock *et al.*, 1962)。従って、正常腸管においては eserine sulfate を投与した際に分解を受けない ACh が集積して receptor に到達し筋条片の収縮がおこるものと考えられる。しかし、無神経節腸管では eserine sulfate 高濃度投与においても筋条片の収縮はおこらない。このことは無神経節腸管では静止時(無刺激時) ACh の放出が無い事を意味している。即ち、正常の neuro-muscular junction がない為に ACh の自発放出が起こっていないことを示唆している。一方、eserine sulfate 10^{-6} M の低濃度投与下での経

壁刺激では、無神経節腸管でも正常腸管と同様振幅の大きな収縮が認められた。しかし、その収縮のパターンは、刺激強度に応じ収縮の振幅が漸増し最大収縮が持続する正常腸管と異なり、無神経節腸管では低電位刺激で収縮が最大に達し、かつ一過性であった。正常腸管では腸管壁内神経系における interneuron 等を介する circuit の発火が次々と起こる為に収縮が持続すると考えられる。一方、無神経節腸管では壁内神経系の circuit が存在しないので、正常と同様の持続性の収縮とは成りえないのは明らかである。さらに用量依存性でない一過性の収縮し

か認めないということは、分解されない ACh が少量ある mACh-R に到達する為にすぐに飽和状態となり、いくら刺激強度を上げても収縮の増加を伴わないと考えられる。また、eserine sulfate 10^{-6} M の低濃度投与下での経壁刺激による筋条片の最大収縮値に至るまでの時間が、無神経節腸管では正常腸管に比し有意な遅延を示した。このことは無神経節腸管では正常な neuro-muscular junction が存在しない為に、放出された ACh が receptor まで到達して筋収縮を発現するのに時間を要するものと解することができる。

結

Superfusion method を用いて、H 病モデルマウスの無神経節腸管における増生した外来のコリン作動性神経の機能を検討し、以下に示す結果を得た。

- 1) 無神経節腸管では choline の取り込みが正常腸管に比し有意に増加していた。
- 2) 無神経節腸管でも経壁刺激に応じて ACh の遊離が認められるものの、収縮はほとんど認められなかった。なお無神経節腸管での ACh の遊離は正常腸管に比し低下していた。
- 3) ACh-E 阻害剤投与下、正常腸管では濃度に依存した律動性の収縮の増強が認められたが、無神経節腸管ではほとんど認められなかった。

謝

稿を終えるにあたり、実験の御指導を賜りました元兵庫医科大学第二外科 高橋 徳助手、関ひとみ女史に深甚なる謝意を表します。(本論文の要旨は、第 29 回日本

語

- 4) ACh-E 阻害剤低濃度存在下での経壁刺激に応じ正常腸管、無神経節腸管共に収縮が認められたが、正常腸管では収縮が持続するのに対し無神経節腸管では一過性であり、また正常腸管に比し最大収縮に至るまでの時間の有意な遅延が認められた。

以上より、H 病モデルマウスの無神経節腸管においては増生した外来コリン作動性神経の末端からの ACh の放出は示唆されるものの、有効な neuro-muscular junction を形成して平滑筋に支配を及ぼしているとは考え難い。即ち、無神経節腸管において増生した外来の副交感神経線維は同部の狭小化の機構には直接関与していないと結論された。

辞

平滑筋学会総会、第 25 回日本小児外科学会総会および第 89 回日本外科学会総会において発表した。)

文

- Burnstock, G. and Holman, M.E. (1962). Spontaneous potentials at sympathetic nerve ending in smooth muscle. *J. Physio.* **160**: 446-460.
- Crema, A., Del Tacca, M., Frigo, G.M. and Lecchini, S. (1968). Presence of a non-adrenergic inhibitory system in the human colon. *Gut.* **9**: 633-637.

献

- Del Castillo, J. and Katz, B. (1956). Biophysical aspects of neuro-muscular transmission. *Prog. Biophys. molec. Biol.* **6**: 121-170.
- Falck, B., Hillarp, N.A., Thieme, G. and Torp, A. (1962). Fluorescence of catecholamines and related compounds condensed with formaldehyde. *J. Histochem. Cytochem.* **10**: 348-354.
- Frigo, G.M., Der Tacca, M., Lecchini, S. and Crema, A. (1973). Some observations on the intrinsic nervous mechanism in Hirschsprung's disease. *Gut.* **14**: 35-40.
- Galper, J., Klein, W. and Catterall, A. (1977). Muscarinic acetylcholine receptors in developing chick heart. *J. Biol. Chem.* **252**: 8692-8699.
- 後藤誠一, 池田恵一, 窪田正幸 (1981). Hirschsprung 病腸管の病態に関する電気生理学的検討. 小児外科. **13**: 285-296.
- Hanai, M., Lernau, O.Z., Zamir, O. and Nissan, S. (1986). Nerve mediated responses to drugs and electrical stimulation in aganglionic muscle segments in Hirschsprung's disease. *J. Pediatr. Surg.* **21**: 848-851.
- Kamijo, K., Hiatt, R.B. and Koelle, G.B. (1953). Congenital megacolon. A comparison of the spastic and hypertrophied segments with respect to cholinesterase activities and sensitivities to acetylcholine, DFP and the Barium ion. *Gastroenterology.* **24**: 173-185.
- Kubota, M., Ito, Y. and Ikeda, K. (1983). Membrane properties and innervation of smooth muscle cells in Hirschsprung's disease. *Am. J. Physiol.* **244**: 406-415.
- Kusunoki, M., Taniyama, K. and Tanaka, C. (1984). Neuronal GABA release and GABA inhibition of ACh release in guinea pig urinary bladder. *Am. J. Physiol.* **246**: 502-509.
- 桑田圭司 (1977). Hirschsprung 病結腸の自律神経支配に関する組織学的ならびに組織化学的研究. 大阪大学医学雑誌. **29**: 623-630.
- Larsson, L.T., Malmfors, G., Wahlestedt, C., Leander, S. and Hakanson, R. (1987). Hirschsprung's disease: A comparison of the nervous control of ganglionic and aganglionic smooth muscle *in vitro*. *J. Pediatr. Surg.* **22**: 431-435.
- Miledi, R. and Potter, L.T. (1971). Acetylcholine receptors in muscle fibers. *Nature.* **233**: 599-603.
- 非沢融司, 横山稷太郎, 林典, 森川康英, 勝俣慶三 (1981). Hirschsprung 病無神経節腸管における薬理学的研究. 日平滑筋誌. **17**: 278-280.
- Nirasawa, Y., Yokoyama, J., Ikawa, H., Morikawa, Y. and Katumata, K. (1986). Hirschsprung's disease: Catecholamine content, alpha-adrenoreceptors and the effect of electrical stimulation in aganglionic colon. *J. Pediatr. Surg.* **21**: 136-142.
- 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**: 285-292.
- Okamoto, E., Okada, A., Kuwata, K. and Ohmuro, S. (1974). Histochemical and neurohistological studies on the innervation of the rectum in Hirschsprung's disease. In: Amine Fluorescent Histochemistry, Igakushoin, Tokyo. 129-135.
- Okamoto, E., Satani, M. and Kuwata, K. (1982). Histologic and embryologic studies on the innervation of the pelvic viscera in patients with Hirschsprung's disease. *Surg. Gynecol. and Obstet.* **155**: 823-828.
- Okasora, T. and 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.
- 佐々木信義 (1978). 無神経節腸管の病態に関する研究. 名市大医誌. **29**: 76-92.
- Sastre, A., Gary, D.B. and Lane, M.A. (1977). Muscarinic cholinergic binding site in the developing avian heart. *Developmental Biol.* **55**: 201-215.
- Swenson, O. and Bill, A.H. (1948). Resection of rectum and rectosigmoid with preservation of the sphincter for benign spastic lesion producing megacolon. *Surgery.* **24**: 212-220.
- Szerb, J.C. (1976). Storage and release of labelled acetylcholine in the myenteric plexus of the guinea pig ileum. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **54**: 12-22.
- Taniyama, K., Kusunoki, M., Saito, N. and Tanaka, C. (1983). GABA evoked ACh release from

isolated guinea pig ileum. *Life Sci.* **32**: 2349-2353.

植木重文, 岡本英三 (1979). aganglionosis (piebald lethal, lethal spotting マウス). 疾患モデル動物ハンドブック (川俣順一, 松下 宏編), 医歯薬出版, 東京. 292-296.

Ueki, S., Okamoto, E., Kuwata, K., Toyosaka, A. and Nagai, K. (1985). Qualitative and quantitative analysis of muscarinic acetylcholine receptors in piebald lethal model of Hirschsprung's disease. *Gastroenterology*. **88**: 1834-1841.