

平成 30 年 6 月 14 日現在

機関番号：31201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08143

研究課題名(和文) 結腸を支配する副交感神経系の迷走神経と骨盤神経叢枝の形態学的研究

研究課題名(英文) Morphological study of the vagus nerve and pelvic nerve plexus branches of the parasympathetic nervous distributed in the colon

研究代表者

燕 軍 (YAN, JUN)

岩手医科大学・医学部・准教授

研究者番号：20316350

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト結腸に分布する内臓神経線維は今でも不明瞭である。ヒトとラットの結腸に分布する上下腹神経叢の「走行パターン」に違いがなかった。ラットの上下腹神経叢を標識して、末梢分布が結腸のかなり広範囲に分布していることを示唆された。これらの内臓神経線維のニューロンは仙髄で観察されなく、腰交感神経節にしか観察されなかったことから、ラットのこの神経叢線維の性質が「交感神経線維」だけだと思われる。結腸に分布する骨盤由来の「副交感神経線維」は「下腹神経叢」の成分だと推測される。中腸に分布する副交感神経線維成分をトランスジェニックマウスFlk1初期胚用い、切片標本をVIP染色法で染色し観察する方法を確立した。

研究成果の概要(英文)：Visceral nerve fibers distributed in the human colon is still unclear. There was no difference in "distribution pattern" of the superior hypogastric plexus distributed in the colon of humans and rats. Labeling the superior hypogastric plexus of the rat suggested that the peripheral distribution in the colon is very extensively. Since neurons of these visceral nerve fibers were not observed in the sacral part of spinal cord, but were observed only in the lumbar sympathetic ganglia, it seems that the characteristic of this plexus fiber of rat is only "sympathetic nerve fiber". The parasympathetic fibers derived from the pelvis distributed in the colon are presumed to be components of the "inferior hypogastric plexus". The parasympathetic nerve fiber component distributed in the midgut was observed with transgenic mouse Flk1 early embryo, and the VIP staining method was also established.

研究分野：臨床解剖学

キーワード：自律神経 上下腹神経叢 下腹神経叢 逆行性標識 ヒト ラット Flk1マウス

1. 研究開始当初の背景

ヒトの結腸に分布している副交感神経系の迷走神経と骨盤内臓神経の分布については1800年代から論じられてきた。しかし現在の権威のある教科書、例えば Gray's Anatomy (38th, 40th)、The Autonomic Nervous System (Joseph Pick)、Anatomy of the Autonomic Nervous System (G.A.G. Mitchell) においても、副交感神経成分の迷走神経と骨盤内臓神経の結腸における分布領域と分布パターンについてははっきりした論述はない。

Swan (1830) から Mitchell (1940) の約100年にわたる研究(末梢神経変性法など)で、迷走神経の末梢分布についてかなり詳細に報告されているが、結腸における分布領域による解析は「Fore-gut」と「Mid-gut」と記載されており、いわば「曖昧」な表現でしかない。一方、下行結腸の副交感神経は骨盤内臓神経の枝で、上下腹神経叢を通じて下腸間膜神経叢(下腸間膜動脈)に沿って左結腸、S状結腸と直腸に分布することに対して、かなりの神経線維はこの動脈周囲の神経叢と独立して結腸の左曲から直腸まで分布していることも、Langley (1895) から Woodburne (1956) の約60年間の研究(主に末梢神経変性法、銀染法などを用いて解析)により明らかにされた。これらの研究により、結腸に分布している2種類の副交感神経の神経枝のおおまかな分布領域は明らかにされたが、この2種類の神経枝の間にもどのような関係があるのかという点はいまだ不明である。Woodburne (1956) は、迷走神経と骨盤内臓神経の結腸における分布領域について、重なっている (there may be an overlap) と推測したが、確実な証拠は得られていない。その後の Kimmel (1959) も、結腸に分布している骨盤内臓神経は盲腸から直腸まで (probably all segment of the colon from caecum to the rectum) の広い範囲に分布していると推測するに留めている。

消化管(腸)内の壁内神経叢は、Bayliss and Straling (1899) により初めて指摘された。Langley (1921) が腸の外来神経を切断しても大腸の運動にはあまり影響がないこと、すなわち大腸は「自動的運動能」を有することを明確にしてから、壁内神経叢の存在は重要視されてきた。一方、組織内の神経線維と腫瘍との関係 (Momose, 1968)、免疫系と自律神経の関係 (Adachi & Sato, 1993)、消化器癌と自律神経の関係 (Sato, 2003) などの研究は、壁内神経系と自律神経の病気との関連性を重視すべきだと指摘している。しかしこれらの研究は壁内神経系だけに注目し消化管の外来神経(特に副交感神経の迷走神経と骨盤内臓神経)との形態学的な関係には論及していない。

一方、発生学においては、迷走神経と骨盤内臓神経及び壁内神経叢のニューロンはすべて神経堤細胞に由来するのか、これらの神経

がどのように関連し合いながら発生し、成体の分布様式を確立するのかわかっていない。これらの神経は結腸に分布する上・下腸間膜動脈と協調しながら発生すると考えられているため、血管の発生と同時に観察すべきだと思われる。

2. 研究の目的

結腸に分布している副交感神経が迷走神経と骨盤内臓神経であることは、100年以上前から論述されてきたが、未だに両者の分布領域について定説はない。この問題を解決することが本研究の主目的である。

我々は、今まで末梢神経の標識に優れた tracer、DiI と DiO を使い、末梢神経の支配ニューロン及び分布様式を調べてきた。この確立された方法により迷走神経と骨盤内臓神経を二重標識することで確実な結果が得られることを確信している。さらにトランスジェニックマウスの早期胚を用い、切片及びホルムアント染色により VIP 陽性神経の発生早期の結腸に分布する副交感神経の由来と分布様式の変化を観察できると考えている。

現在、消化管壁内に分布している腸内神経叢 (Enteric Nervous System) の研究も盛んに行われ、生理学的にこの神経叢とリンパ系との間に密接な関係が存在し、身体の免疫系統にも影響があることが徐々に明らかになってきた。本研究は、結腸に分布している副交感神経の迷走神経と骨盤内臓神経の節後ニューロンとこの腸内神経叢との関係を明らかにすることも研究の目的の一つであり、消化管の免疫系統との関連を検討したい。

具体的に:

- 1) DiI 標識法によりラット骨盤内臓神経の節前ニューロンの局在・数を明確にする。
- 2) DiI/DiO 二重標識法で実験動物の結腸に分布する迷走神経・骨盤内臓神経枝の分布領域と様式を明らかにする。
- 3) DiI に標識された結腸標本を腸壁に存在する神経叢の現在よく利用されている筋間神経線維免疫染色 (GFAP: glial fibrillary acidic protein) 染色法で染色し、結腸の外来神経と壁内神経叢との関係を明らかにする。
- 4) 副交感神経系の分布と血管との関連は、ラットの副交感神経線維の走行、分布と比較しながら、血管内皮細胞が GFP 発現トランスジェニックマウス Flk1+/EGFP knock-in (Ema et al., 2006) の胚の切片及びホルムアント標本に VIP 法による染色を行い、発生過程における中・後腸動脈とそこに分布する副交感神経系の迷走神経と骨盤内臓神経の関係を明らかにする。

3. 研究の方法

研究計画・方法(概要) 研究目的を達成するための研究計画・方法について、簡潔にまとめて記述してください。

- 1) DiI/DiO を使い、二重標識法でラット結

腸を支配する副交感神経成分の骨盤内臓神経叢枝の脊髄前角におけるニューロンの局在と、末梢部に分布している迷走神経及び骨盤内臓神経叢の分布領域と様式を明確にする。

2) Dil で標識した後に、結腸の壁内神経叢を免疫染色で再染色し、二重染色の結果を観察して両者の関係を明確にする。

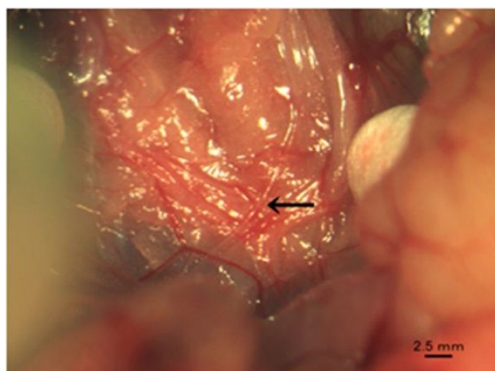
3) Fik1+/EGFP knock-in マウスと野生型マウス (ICR 系統) の胚を用い、EGFP の抗体染色と VIP 染色法の二重染色を行い、副交感神経線維と血管の発生の関係性について調べる

4. 研究成果

ヒトの結腸に分布している副交感神経の迷走神経と上下腹神経叢の枝の分布様式及び結腸壁内神経叢との関係を明確するために、まずヒトの副交感神経系と同じの構成を持つラットとマウスを利用して、副交感神経系の迷走神経と骨盤内臓神経の分布領域、分布様式という発生学・形態学に残されている数少ない不明点を明らかにし、ヒトにおける分布を考察する。このことにより、今まで明確にされていない消化管の外来神経枝と壁内神経系との関係についても検討することができ、臨床における免疫系の研究にも役に立つものと思われる。しかし、結腸に分布している「自律神経」線維の観察は極めて難しい状態である。臨床手術治療に役立つマクロ分野の「結腸に分布する副交感神経線維」に関する論述が今になっても不明瞭のままである。本研究はまず、ヒトの「後腹壁を走行する」内臓神経線維を詳細に観察し実験動物のラットのその神経線維と比較、さらに動物実験で「結腸に分布する副交感神経線維」の由来、分布領域、外来性神経と腸内神経線維との関係を順・逆行性神経標識法、免疫染色法及び発生学手法で明確にする。

結果：

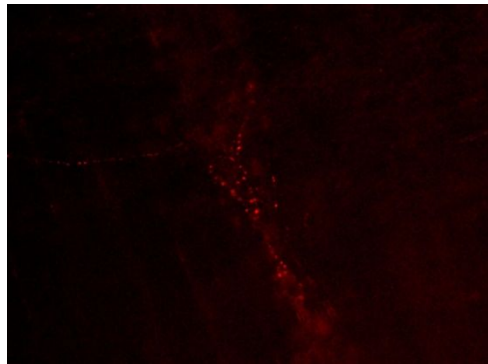
ヒトとラットの上下腹神経叢の「末梢神経の走行パターン」を詳細に観察したが、両者の間に明確な違いが認められなかった。この結果をふまえ、ラットを麻酔下で、上下腹神経叢を剖出し Dil で標識して、末梢部の分布とニューロンの局在を調べた。



ラット結腸分布している自律神経の線維を示し、

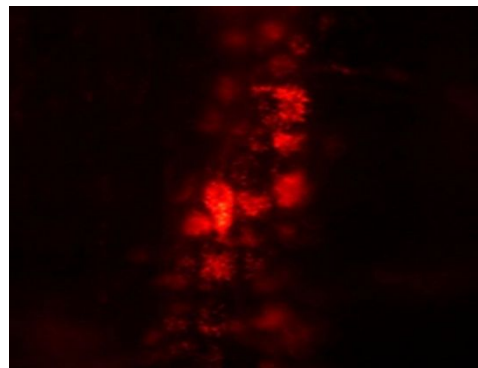
やじるしのところに Dil を入れて標識した。

上下腹神経叢末梢部の分布について、この神経叢の線維が結腸のかなり広範囲に分布しているのではないかと示唆が得られた。



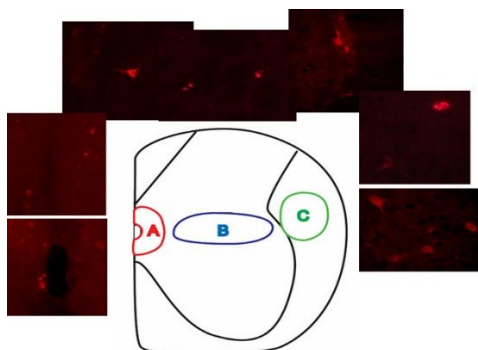
結腸近位と遠位に広く分布している自律神経の線維 (Dil で標識)。

この神経叢のニューロンの局在については、脊髄の S2 から S4 の分節に観察されなく、交感神経幹の腰交感神経節にしか観察されなかったことから、ラットの上下腹神経叢の神経枝の種類が主に「交感神経線維」ではないかと思われる。



結腸に分布する自律神経末梢を Dil で標識し、幅広い交感神経節に観察されていた。

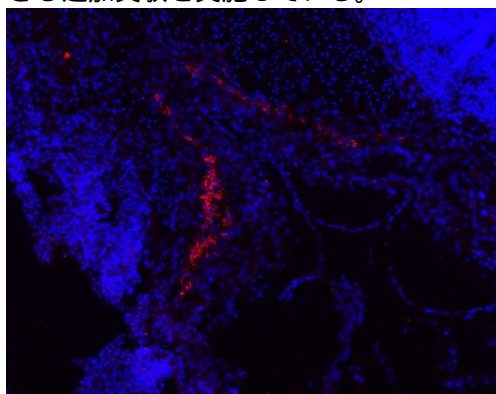
上記の結果から、結腸に分布する骨盤由来の「副交感神経線維」がもし存在するとすれば、「上下腹神経叢」の成分だと推測される。



ラット結腸に分布する自律神経を Dil で標識し、

S2,3分節の脊髄に観察されたニューロンの分布領域を示す。教科書に記載されているCの領域には少数ニューロンを観察されたが、AとBの領域には多く観察された。

これらの結果をベースにして、中腸に分布する副交感神経線維成分を同定する必要があると考え、同じく齧歯類のトランスジェニックマウス Flik1 初期胚を用い、切片標本にしてVIP法で副交感神経線維染色し、二重標識で中腸初期発生段階において血管及び血管に沿って走行する副交感神経線維成分を観察する方法を確立した。現段階、得られた結果は確実に「下腹神経叢」の成分であることを証明できる追加実験を実施している。



同じく齧歯類のトランスジェニックマウス Flik1 初期胚を用い、切片標本にしてVIP法で副交感神経線維染色し、二重標識で中腸初期発生段階において血管及び血管に沿って走行する副交感神経線維成分を観察された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 件)

〔学会発表〕(計 1 件)

燕 軍 (2018) 脊髄前角の運動ニューロンの配列と末梢神経の分布 肉眼解剖学の視点から、JIMA 岩手医学会、Vol.69 : (6)

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

燕 軍 (YAN, Jun)

岩手医科大学・大学院医学研究科・准教授
研究者番号：20316350

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()