

ラット腸管粘膜下血管周囲のセロトニン含有神経の起源に関する免疫組織化学的研究

張 陽¹⁾, 藤宮峯子²⁾, 寺田信國¹⁾, 前田敏博²⁾, 小玉正智¹⁾

1) 滋賀医科大学外科学第一講座, 2) 滋賀医科大学解剖学第一講座

Immunohistochemical study on the origin of 5HT nerve fibers distributed around the submucosal blood vessels in the rat small intestine

Yang ZHANG¹⁾, Mineko FUJIMIYA²⁾, Nobukuni TERATA¹⁾, Toshihiro MAEDA²⁾,
Masashi KODAMA¹⁾

1) First Department of Surgery, Shiga University of Medical Science

2) First Department of Anatomy, Shiga University of Medical Science

Abstracts: The origin of serotonin nerve fibers distributed around submucosal blood vessels in the rat small intestine was studied by immunohistochemistry. In colchicine- and pargyline-treated animals, serotonin-immunoreactive nerve cell bodies were located in the myenteric plexus, and positive nerve fibers were widely distributed in the myenteric plexus, submucosal plexus, muscle layer and lamina propria of mucosa. Most remarkably, positive nerve fibers were densely distributed around submucosal blood vessels. Mechanical sympathectomy caused a complete disappearance of perivascular positive fibers, however positive fibers in the lamina propria, submucosa and muscle layers were not affected. Positive cell bodies were not found in the celiac sympathetic ganglia but were found in dorsal root ganglia. In a dorsal root ganglion, serotonin was colocalized with substance P, but not colocalized with calcitonin gene-related peptide in nerve cell bodies. Capsaicin treatment on the celiac sympathetic ganglion induced a simultaneous disappearance of serotonin-, calcitonin gene-related peptide- and substance P-immunoreactive nerve fibers around submucosal blood vessels. These results indicate that serotonin-containing nerve fibers around submucosal blood vessels are of extrinsic origin, and they are primary afferent derived from dorsal root ganglia.

Key words: serotonin immunoreactive nerve fibers, small intestine, capsaicin, substance P, calcitonin gene-related peptide, celiac sympathetic ganglia, dorsal root ganglia

Received September 30, 1997: Accepted after revision November 13, 1997

Correspondence: 滋賀医科大学外科学第一講座 張 陽 〒520-2192 大津市瀬田月輪町

後、エンテランで封入した。

脊髄後根神経節の DAB/DAB-Nickel 二重染色は、まず 5HT 抗 (1:10000) で免疫組織化学を行い、Nickel-DAB 溶液で染色した。続いて CGRP 抗体 (1:10000) で免疫組織化学を行い、ニッケルを含まない DAB 溶液で染色した。脊髄後根神経節の蛍光抗体二重染色は、5HT 抗体 (Polyclonal; rabbit 1:10000) と SP 抗体 (Polyclonal; guinea pig 1:10000) 両方を含む液で切片を 4°C で 4 日間反応し、FITC 標識 anti-rabbit IgG (Vector; 1:500) および Texas Red 標識 anti-guinea pig IgG (Vector; 1:500) 第二抗体液に入れて室温で 3 時間反応した。50% グリセロールでカバーし、共焦点レーザー顕微鏡で観察した。

結 果

正常動物では、血管周囲の 5HT 陽性線維の染色性は弱く⁵⁾。従って、本実験では、colchicine+pargyline で免疫反応の増強を行った動物を主として用いた。colchicine+pargyline 処理群では、十二指腸、空腸、回腸の筋間神経叢に 5HT 陽性神経細胞体が認められ、神経線維は筋層、粘膜下層、粘膜固有層に広く分布した。さらに粘膜下層の血管周囲に濃密に分布する 5HT 陽性線維が認められた (Fig. 1 a)。TH 抗体で同様の腸管部位の免疫組織化学を行うと、粘膜下層の血管周囲に TH 陽性神経線維が濃密に分布するのが観察された (Fig. 1 b)。椎前神経節切除術と colchicine+pargyline 投与を組み合わせさせた動物では、筋間神経叢、筋層、粘膜下層、粘膜に分布する 5HT 陽性神経線維の密度に変化は見られなかったが、粘膜下血管周囲の 5HT 陽性神経線維はほぼ完全に消失した (Fig. 1 a')。また粘膜下血管周囲に分布する TH 陽性神経線維も同様の処置でほぼ完全に消失した (Fig. 1 b')。

次に、腹腔神経節を 5HT および TH 抗体で染色したところ、TH 陽性神経線維と細胞体は認められたが (Fig. 2 b)、5HT 陽性神経細胞体は認められず、5HT 陽性神経線維のみ観察された (Fig. 2 a)。

次に、胸椎後根神経節を 5HT 抗体で染色したところ、5HT 陽性神経細胞体は神経節の中央部および辺縁部の大型細胞に分布することがわかった (Fig. 3 a)。5HT と CGRP の二重染色を行い、5HT を青色、CGRP を茶色で染め分けたところ、5HT は大型細胞に染まり、CGRP は中型および小型細胞に染まった (Fig. 3 b)。したがって、5HT と CGRP は異なる神経細胞体に含まれることが判明した。一方、蛍光抗体二重染色で、5HT を緑色、SP を赤色で染め分けたところ、5HT は SP と同一の神経細胞体に共存することが明らかになった (Fig. 3 c 1-c 3)。

椎前神経節に capsaicin 処理を行った動物では、粘膜下血管周囲に分布する 5HT 陽性神経線維は著明に減少し (Fig. 4 a')、筋層、粘膜下層、粘膜固有層の神経線維の密度に変化は認めなかった。また、同様に capsaicin 処理動物で、腸管の CGRP、SP の免疫組織化学を行った結果、粘膜固有層、筋層、粘膜下層の神経は影響を受けず、血管周囲の SP、CGRP 陽性線維は著明に減少した (Fig. 4 b', c')。

考 察

椎前神経節切除術を施行すると、腸管壁の粘膜下血管周囲に分布する 5HT 含有神経線維はほぼ完全に消失した。このことから粘膜下血管周囲に分布する 5HT 線維は壁内に細胞体を有する内在性神経ではなく、外来性神経であることが示唆された。

椎前神経節切除によって影響を受ける外来性神経としては、交感神経の節後線維と求心性知覚神経が考えられる。前者の可能性を調べるために腹腔神経節を 5HT で染色した。その結果、5HT 陽性神経線維は認められたが、5HT 陽性神経細胞体は認められなかった。したがって、血管周囲の 5HT 線維は、椎前神経節に細胞体を有するノルアドレナリン含有交感神経節後線維とは無関係であることが示唆された。

次に、知覚神経節である胸椎後根神経節を 5HT で染色したところ、Th1-12 のすべての神経節で中型あるいは大型の細胞体が陽性に染色された。後根神経節には CGRP と SP 陽性神経細胞体が存在するこ

とがよく知られており^{6,7,8,10}), CGRP と SP は求心性知覚神経伝達物質として血管の緊張性を中枢に伝える働きのあることが知られている^{1,3,12,14}). これら CGRP および SP 含有神経細胞体と 5HT 含有神経細胞体の関係を調べるために, CGRP と 5HT, または SP と 5HT の二重染色を行った. その結果, 後根神経節の神経細胞体において CGRP と 5HT は共存せず, SP と 5HT は共存することが明らかになった.

さらに腸管の血管周囲に認められた 5HT 含有神経線維が後根神経節の細胞体由来するかどうかを調べる為に capsaicin の急性投与で求心性知覚神経のブロックを行い免疫組織化学的に検索した. 新生児期に capsaicin の全身投与を行った動物で, 求心性の C 神経線維がブロックされることはよく知られている¹¹). しかし, capsaicin の急性局所投与でも, 確実な求心性知覚線維のブロックが得られることが

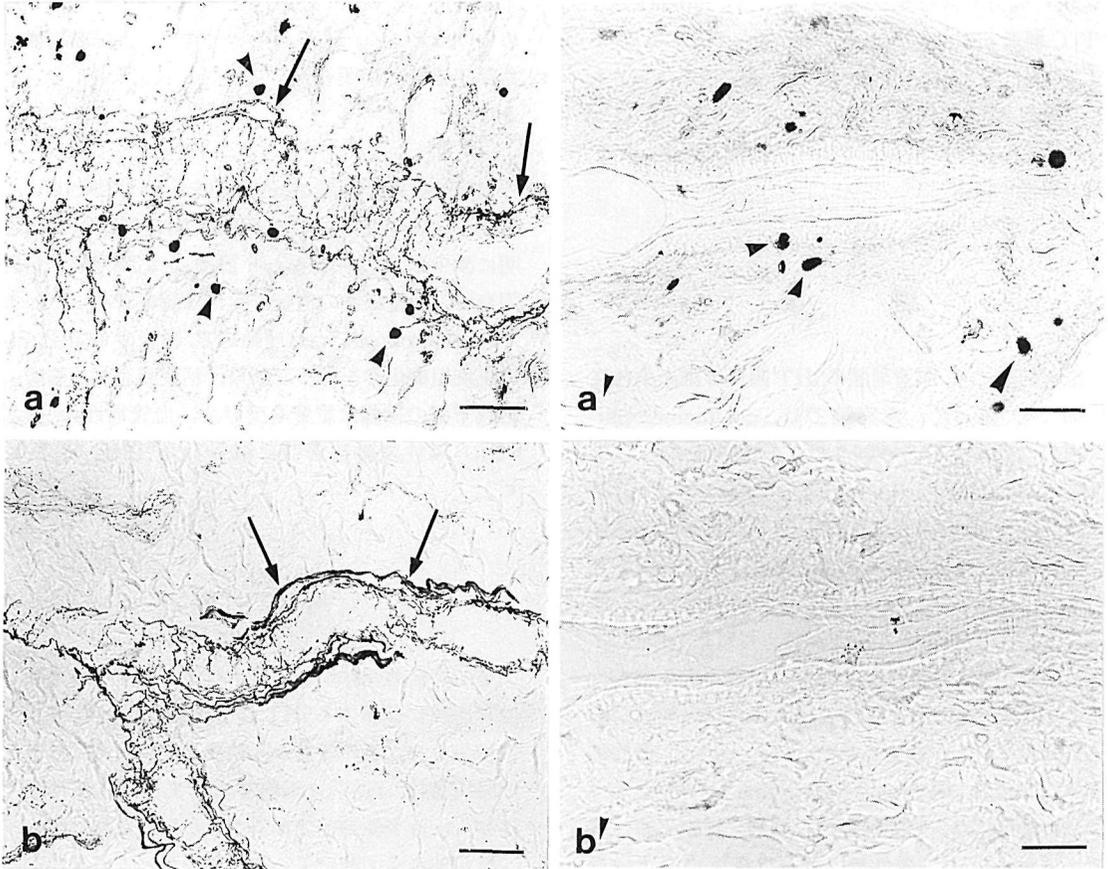


Fig.1a,b,a',b' Horizontal sections through the submucosa and mucosa of rat duodenum treated with colchicine+pargyline(a,b) and sympathectomy combined with colchicine+pargyline treatment(a',b'). Sections are stained with 5HT(a,a') and TH(b,b'). a 5HT-IR nerve fibers are densely distributed in the submucosa and around the submucosal blood vessels(arrows). Positive staining in the mucosal mast cells is seen (arrow heads). a' 5HT-IR nerve fibers are completely disappeared from the submucosal blood vessels. However, positive staining in the mucosal mast cells is still visible (arrow heads). b TH-IR nerve fibers are distributed in the submucosa and around the submucosal blood vessels(arrows). b' TH-IR nerve fibers are completely disappeared from the submucosal blood vessels. Bars = 50 μ m.

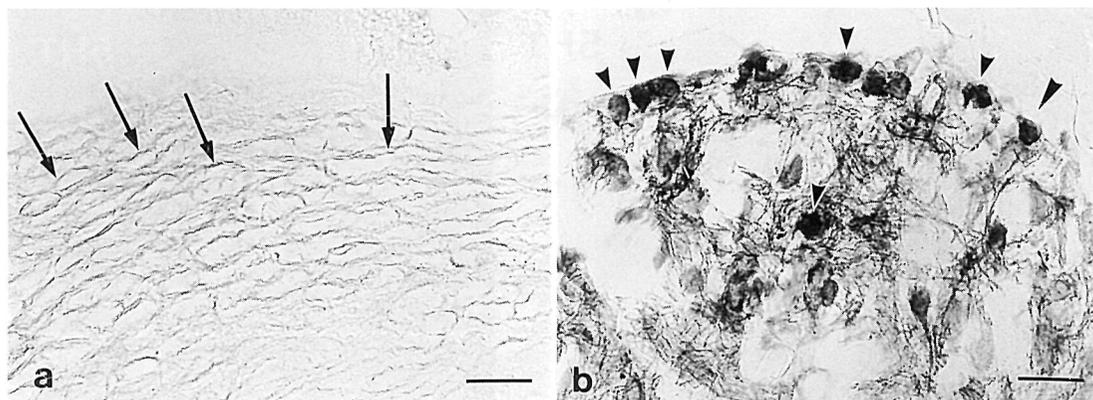


Fig.2a,b Sections through the celiac ganglion from colchicine+pargyline treated rat stained with 5HT(a) and TH(b). a Fine network of 5HT-IR nerve fibers(arrows) is seen, however no 5HT-IR nerve cell bodies are found. b TH-IR nerve fibers and cell bodies(arrow heads) are seen.Bars =50 μ m.

近年報告されている^{9,13)}。われわれはこの方法を本研究に適用したところ、capsaicin 投与20日後に血管周囲の CGRP および SP 含有神経、さらに5HT 含有神経の著明な減少を観察した。しかし、粘膜固有層、粘膜下層、筋層の5HT, CGRP および SP 含有神経線維の密度に変化はなかった。以上の結果より、ラット消化管の壁内に分布する5HT 含有神経は、その起源が内在性と外来性に分けられ、前者は、筋間神経叢に細胞体を有し、筋層、粘膜下層、粘膜固有層に分布する。後者は、後根神経節に神経細胞体を有する求心性知覚神経で、後根神経節において、SP と共存することがわかった。

これまで5HT が消化管の血行動態に影響を与えることが生理実験で確認されている¹⁵⁾、しかし、形態学的に血管に分布する5HT 神経の局在が証明されていなかったために、その作用が上皮の5HT 含有腸クロム親和性細胞に由来するのか、または5HT 含有神経に由来するのかが不明であった。

本研究によって、5HT 神経線維が血管周囲に濃密に分布し、それらの線維は後根神経節に細胞体を持つ求心性知覚神経であることが判明した。この結果より、消化管の血行動態を中枢に伝えるのに5HT が重要な役割を果たすことが明らかになった。

文 献

- 1) Brain SD, Williams TJ, Tippins JR, Morris HR, Macintyre I: Calcitonin gene-related peptide is a potent vasodilator. *Nature* 313: 54-56, 1985.
- 2) Costa M, Furness JB, Cuello AC, Verhofstad AAJ, Steinbusch HWJ, Elde RP: Neurons with 5-hydroxytryptamine-like immunoreactivity in the enteric nervous system: Their visualization and reactions to drug treatment. *Neurosci* 7(2): 351-363, 1982.
- 3) Erspamer V: The tachykinin peptides family. *Trends Neurosci* 4: 267-269, 1981.
- 4) Fujimiya M, Kimura H, Maeda T: Postnatal development of serotonin nerve fibers in the somatosensory cortex of mice studied by immunohistochemistry. *J Comp Neurol* 246: 191-201, 1986.
- 5) Fujimiya M, Okumiya K, Yamane T, Maeda T: Distribution of serotonin-immunoreactive nerve cells and fibers in the rat gastrointestinal tract. *Histochem cell Biol* 107: 105-144, 1997.
- 6) Green T, Dockray GJ: Characterization of the

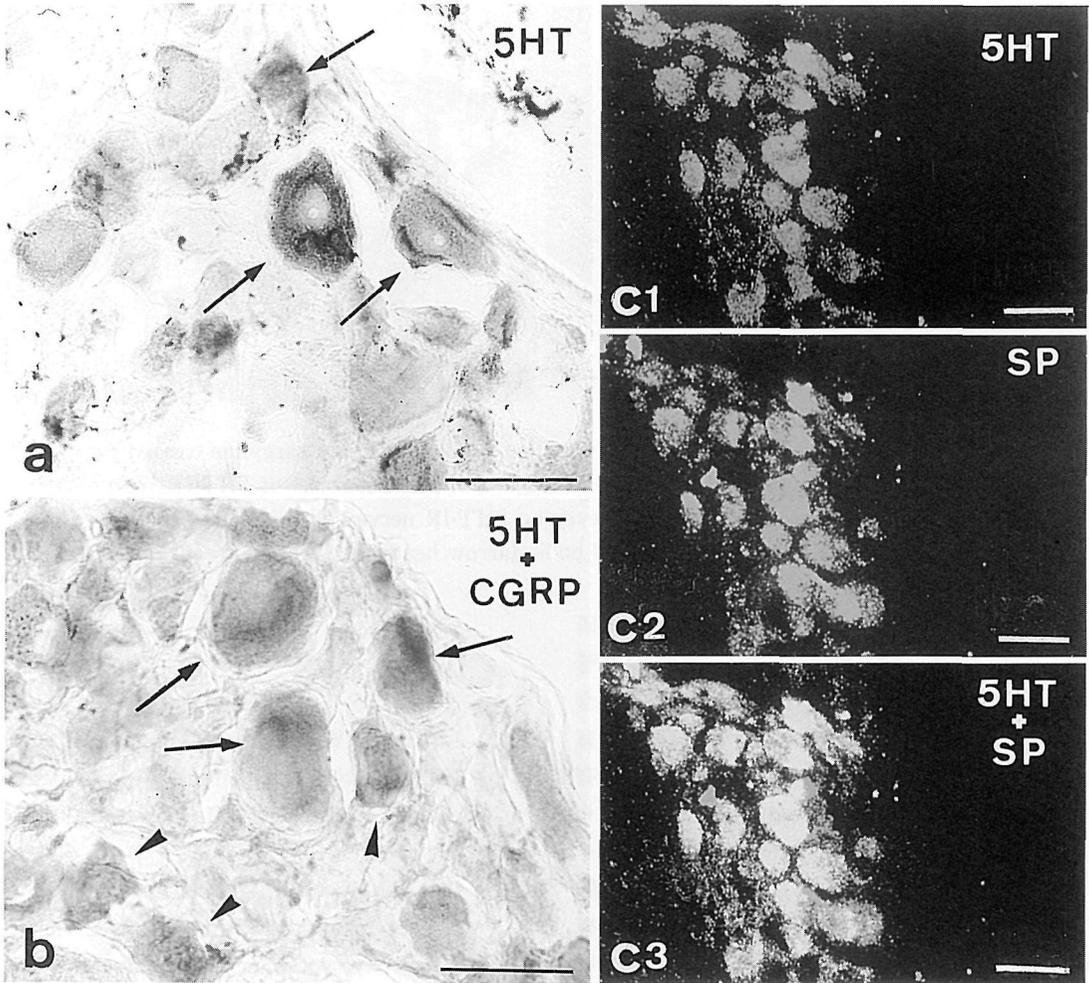


Fig.3a,b,c1-c3 Sections through the dorsal root ganglia from colchicine+pargyline treated rat. a 5HT-IR is found in medium to large cell bodies(arrows). b Double staining of 5HT-IR(purple,arrows) and CGRP-IR(brown, arrow heads). 5HT-IR is not colocalized with CGRP-IR. c Double staining of 5HT-IR(green)and SP-IR(red). 5HT-IR(c1) and SP-IR(c2) are located in the identical cell bodies(yellow, c3). Bars =50 μ m.

peptidergic afferent innervation of the stomach in the rat, mouse and guinea-pig. *Neurosci* 25(1): 181-191, 1988.

- 7) Gibbins IL, Furness JB, Costa M, MacIntyre I, Hillyard CJ, Girgis S: Co-localization of calcitonin gene-related peptide-like immunoreactivity with substance P in cutaneous, vascular and visceral sensory neurons of guinea pigs. *Neurosci Lett* 57: 125-130, 1985.

- 8) Gibbins IL, Furness JB, Costa M: Pathway-specific patterns of the co-existence of substance P, calcitonin gene-related peptide, cholecystokinin and dynorphin in neurons of the dorsal root ganglia of the guinea-pig. *Cell Tissue Res* 248: 417-437, 1987.
- 9) Holzer HH, Raybould HE: Vagal and splanchnic sensory pathways mediate inhibition of gastric motility induced by duodenal disten-

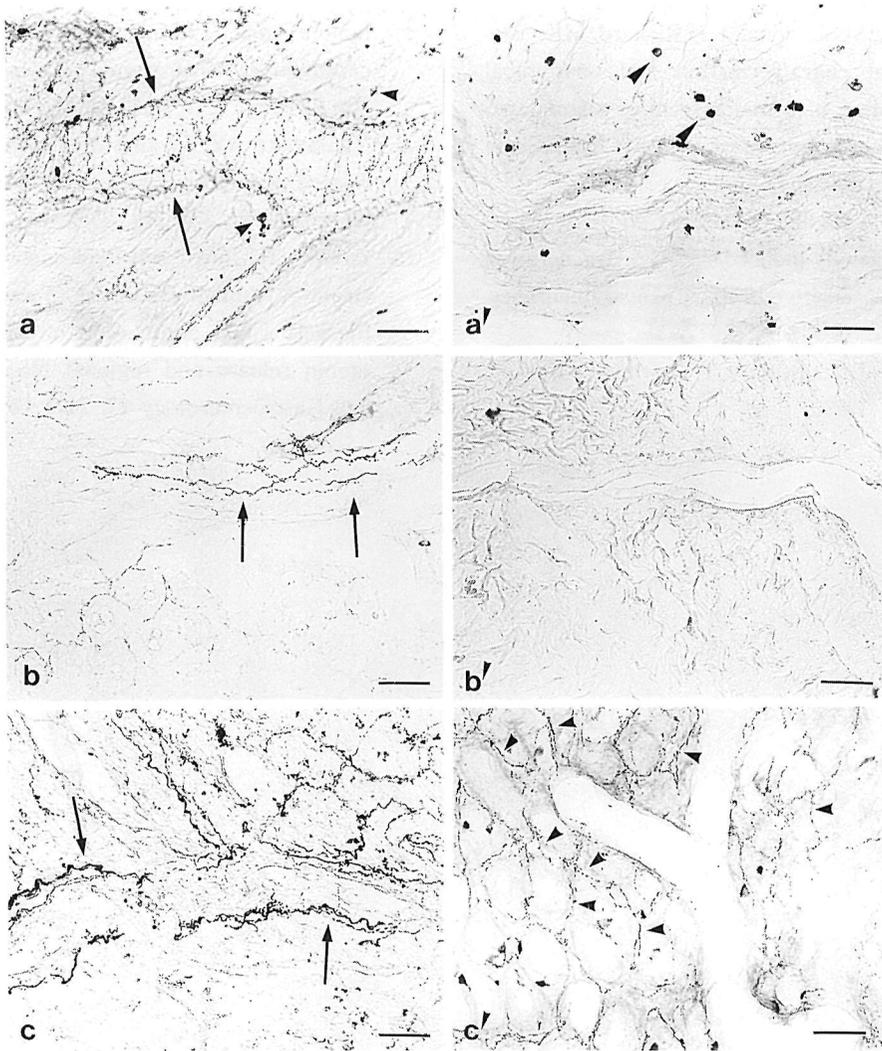


Fig.4a-c,a'-c' Horizontal sections through the submucosa and mucosa of duodenum from normal(a,b, c) and capsaicin treated(a', b', c') animals. Sections are stained with 5HT(a, a'), CGRP(b, b') and SP(c, c'). a 5HT-IR nerve fibers are seen in the submucosa and around submucosal blood vessels(arrows). Positive staining in the mucosal mast cells is visible(arrow heads). a' 5HT-IR nerve fibers around submucosal blood vessels are completely disappeared. However, positive staining in the mucosal mast cells is still visible(arrow heads).b CGRP-IR nerve fibers are seen in the submucosa and around submucosal blood vessels(arrows).b'CGRP-IR nerve fibers are completely disappeared from the submucosal blood vessels. c SP-IR nerve fibers are seen in the submucosa and around submucosal blood vessels(arrows). c' SP-IR nerve fibers are completely disappeared from the submucosal blood vessels but those in the lamina propria of mucosa are visible(arrow heads). Bars =50 μ m.

- sion. *Am J Physiol* 262: G603-G608, 1992.
- 10) James EM, Shimonaka H, Richard MK: Biochemical characterization and anatomical distribution of a major form of unamidated precursor of substance P in rat brain. *Brain Res* 567: 290-305, 1991.
 - 11) Jancso G, Kiraly E, Jancso-Gabor A: Pharmacologically induced selective degeneration of chemosensitive primary sensory neurones. *Nature* 270: 741-743, 1977.
 - 12) Pernow B: Substance P. *Pharmacol Rev* 35: 85-141, 1983.
 - 13) Raybould HE, Tache Y: Cholecystokinin inhibits gastric motility and emptying via a capsaicin-sensitive vagal pathway in rats. *Am. J. Physiol* 255: G242-G246, 1988.
 - 14) Yamamoto AY, Toyama M: Calcitonin gene-related peptide in the nervous system. *Prog Neurobiol* 33: 335-386, 1989.
 - 15) Zinner MJ, Jaffe BM, DeMagistris L, Dahlstrom A, Ahlman H: Effect of cervical and thoracic vagal stimulation on luminal serotonin release and regional blood flow in cats. *Gastroenterology* 82: 1403-1408, 1982.