

ヒトおよびラット胃壁におけるペプチド含有神経の 分布と病的状態下での変化に関する研究

加藤 芳 朗

広島大学医学部内科学第一講座 (指導: 梶山悟朗教授)

広島大学医学部病理学第一講座 (指導: 田原栄一教授)

受付 平成2年9月10日

受理 平成2年11月16日

胃腸管に分布する自律神経系には多種のペプチドが含有されており, 神経伝達物質としての役割だけでなく, 内分泌細胞とともに消化, 吸収, 運動等の機能調節を担っていることが示されている。しかし, ヒト正常胃壁および, その病的状態におけるペプチド含有神経の変化については十分な解析がなされていない。そこで, ラットとヒト胃壁におけるペプチド含有神経の分布を比較し, 胃炎, 潰瘍粘膜あるいは癌腫等の病的状態における分布の変化を免疫組織化学的に検討した。得られた成績は以下の如く要約される。

1. ヒト胃粘膜には, 種々のペプチド含有神経線維が腺管に沿って走行していた。分布密度は Vasoactive intestinal polypeptide (VIP), ボンベシン, Substance P (SP), Peptide histidine isoleucine (PHI) の順で高く, 他方, Neuropeptide Y (NPY), ガラニン含有神経は稀であった。この内, SP 含有神経は幽門腺領域に, ボンベシン含有神経は胃底腺領域において分布密度が高く, ボンベシン含有神経と胃酸分泌との関係が組織学的に窺われた。また, 少数のソマトスタチン含有神経が幽門腺領域に分布していた。

2. ラット胃粘膜では, Calcitonin gene-related peptide (CGRP), VIP, ボンベシン, PHI, SP, ガラニン含有神経の順で分布密度が高かった。CGRP 含有神経は VIP 含有神経と同等の分布密度を示し, ラット胃粘膜における役割はヒトに比し大きいと推察された。ボンベシン含有神経はヒトと同様, 胃底腺領域でより豊富に見い出された。幹迷走神経切除を施行した5匹では, 各種ペプチド含有神経の分布に変化は見られなかった。

3. ラット, ヒト胃粘膜では, ソマトスタチン含有 (D)細胞, セロトニン含有 (EC)細胞は胃底腺領域と幽門腺領域に疎に, ガストリン含有 (G)細胞は幽門腺領域で比較的密な分布を示した。内分泌細胞周囲にペプチド含有神経が見られたが, 神経終末が結合する所見は認められなかった。また, ヒトではソマトスタチン, ラットでは CGRP を除き, 内分泌細胞と神経にはそれぞれ異なるペプチドが存在することが明らかにされた。

4. ヒト胃粘膜下組織では VIP, PHI, SP が, ラットでは VIP, CGRP が, 動脈血管壁に密に分布し, かかるペプチドによる血流調節作用が組織学的に窺われた。一方, ヒト粘膜下神経叢の神経細胞には, 表層部の Meissner 神経叢でボンベシン, 深層の Schabadasch 神経叢で SP とソマトスタチン免疫活性が, VIP, PHI は両者において見い出された。他方, ラットでは神経細胞体を有する粘膜下神経叢は見い出されず, 神経線維は筋層の神経叢に由来するものと見做された。

5. 胃固有筋層では, 平滑筋細胞に沿って, ペプチド含有神経線維が見い出された。その分布密度は内側の輪状筋層で高かった。ヒト胃壁筋層では, VIP, PHI, SP, ボンベシン含有神経が豊富に見い出され, ラット胃壁筋層では, VIP, CGRP, ボンベシン, SP, ガラニン, PHI, β エンドルフィン含有神経の順で分布密度が高かった。幽門括約筋では, VIP および SP 含有神経の分布密

度が極めて高く、幽門輪の閉鎖、開大運動に際して、これらのペプチドが複雑に関与していることが示唆された。

6. ヒト胃固有筋層間の whole mount 標本では、VIP, SP, ボンベシン, NPY, CGRP 免疫活性を有する神経線維束の三次元構造が示され、神経細胞体にも免疫活性が見いだされた。これらのペプチド含有神経はヒト胃壁に内在する自律神経の一部であった。ラット胃固有筋層間の whole mount 標本では、VIP をはじめとする各種ペプチド含有神経が複雑に分布する像が見いだされた。

7. 寒冷拘束負荷60分で、24例中22例(91.6%)のラット体部腹大弯側を中心に急性出血性潰瘍(びらん)が発生した。同部ではVIP とボンベシンに対する免疫反応が減少ないし消失していた。寒冷拘束負荷解除12時間後にはびらんが残存していたが、神経のVIP, ボンベシン免疫活性は正常部とほぼ同程度に回復していた。急性潰瘍の発生時には、VIP, ボンベシンが過度に放出、枯渇するが、神経線維は残存し、ストレス負荷解除によりそれらペプチドは急速に補充されるものと見做された。

8. ヒト胃慢性消化性潰瘍では、潰瘍周辺再生粘膜には何れのペプチド含有神経も見い出せなかった。潰瘍底には、VIP, SP, ボンベシン免疫活性を有する幅の広い神経束が多数見いだされた。潰瘍周辺の筋間神経叢において、VIP, SP, ボンベシン免疫活性がいずれも増強しており、潰瘍底へと幅の広い再生神経線維を延ばしていた。

9. 萎縮性胃炎では、ペプチド含有神経が減少していた。VIP, SP 含有神経線維は、走行および分布が不規則となっていた。リンパ濾胞の周囲にはペプチド含有神経は認められたが、濾胞内には見い出せなかった。腸上皮化生の進展初期には、上記ペプチド含有神経の分布密度が高かったが、化生が完成した粘膜部分では神経線維は減少していた。また、腸上皮化生粘膜においては、内分泌細胞の多い部分では神経線維が少なく、分布が逆相関していた。胃炎粘膜、腸上皮化生粘膜ではペプチドによる調節のバランスが不均衡になっているものと考えられた。

10. 胃腺腫では、何れのペプチド含有神経も殆ど見い出せなかった。一方、胃癌において、乳頭状腺癌、高分化型管状腺癌、中分化型管状腺癌の14例の癌組織内のペプチド含有神経は著しく減少しており、VIP 含有神経は早期胃癌の1例、進行癌の2例で、また、SP 含有神経は各々1例、2例でのみ見いだされた。他方、低分化型腺癌においては、早期胃癌の2例、進行胃癌の2例のいずれにおいてもVIP, SP 含有神経が見い出され、特に、VIP 含有神経の分布密度は高かった。この内、VIP 含有神経は、紐状となったり、奇異な形態を示すものが多く、走行も不規則であった。神経線維の再生像は認められなかった。

以上の結果より、ペプチド含有神経はヒト、ラット胃壁に内在する自律神経の一部として複雑なネットワークを形成しており、胃酸分泌、血流調節、蠕動等において重要な役割を担っていることが示唆された。胃炎、胃潰瘍あるいは癌組織等の病的状態におけるペプチド含有神経の消失、減少は神経調節の変調ないし欠落の表現とも見做された。

Key words: Stomach, Peptide-containing neurons, Endocrine cells, Immunohistochemistry

胃腸管には多種のペプチドないしアミンが存在し^{16,17,23,39}、このため胃腸管は生体における最大の内分泌臓器である。ペプチドないしアミンは胃腸管粘膜内に存在する内分泌細胞と神経組織に局在し、消化管における消化、吸収、運動、免疫等の機能に重要な役割を演じていることが知られている^{1,3,5,18,35,53}。この内、ペプチド含有神経は消化管に独立して内在する第三の自律神経系としてLangleyら⁴¹により見いだされ、アドレナリン作動性神経、コリン作動性神経といった古典的な自律神経とともに胃腸管壁で密なネットワークを形成している。

胃腸管内分泌細胞および神経系に存在するペプチドは、上皮細胞^{6,20,44,50,52,59}、内分泌細胞^{22,66,76}、平滑筋^{13,24,58,62,78,80}、血管^{14,42}、組織球^{46,79}、リンパ球等^{1,55,56}への多彩な作用を持っており、その主な生理作用をTable 1にまとめた。また、上記の各種細胞においては、ペプチドの受容体の存在も報告されている^{6,10,54,76,79}。さらに、胃腸管ペプチドの中にはガストリン、ボンベシンのように腫瘍増殖因子として働くものや^{9,49,61,69,71,72}、ソマトスタチン、βエンドルフィンのように腫瘍増殖抑制に働くものがあり^{67,77}、さらに、Vasoactive intestinal polypeptide (VIP),

Table 1. 各種神経ペプチドの生理作用^{2,61)}

ペプチド	作用
VIP ^{14,62)}	1) 平滑筋弛緩 2) 胃酸分泌抑制 3) 血管拡張 4) インスリン、グルカゴン、ソマトスタチン分泌促進
PHI ¹⁴⁾	1) 平滑筋弛緩 2) 腸液、膵液の分泌促進 3) インスリン、グルカゴン分泌促進
BOM ^{14,80)}	1) 平滑筋収縮 2) 胃酸分泌促進 3) 血管収縮 4) ガストリン、CCK分泌促進
CGRP ^{2,14,45)}	1) 平滑筋収縮 2) 胃酸分泌抑制 3) 血管拡張
SP ^{14,58)}	1) 平滑筋収縮 2) 胃酸分泌抑制 3) 血管拡張
NPY ^{14,47)}	1) 血管収縮 2) CGRP分泌抑制
SOM ^{53,80)}	1) ガストリン、VIP、インスリン分泌抑制 2) 胃酸分泌抑制 3) 胃排泄運動の抑制
GAL ^{13,60,65)}	1) 小腸平滑筋収縮 2) インスリン分泌抑制
βEND ^{14,45)}	1) 胃酸分泌抑制 2) 成長ホルモン分泌刺激

VIP, Vasoactive intestinal polypeptide, PHI; Peptide histidine isoleucine, BOM; Bombesin, CGRP; Calcitonin gene-related peptide, SP; Substance P, NPY; Neuropeptide Y, SOM; Somatostatin, GAL; Galanin, β End; β Endorphin

Substance P (SP)では、上皮細胞の増殖を調節する働きも示されている^{20,52}。ボンベシン、Calcitonin gene-related peptide (CGRP), VIPは腫瘍組織から分泌され、それが腫瘍細胞自体の増殖に関与するというautocrine機序を想定した報告もなされている^{9,37,40,69,81}。また、最近では、SPをはじめとするタキキニン類に組織球、サイトカインなどの物質との関連が報告され免疫反応にも何等かの影響を及ぼしていることが推察されている^{46,57}。このように胃腸管ペプチドは極めて多彩な生物学的作用を発揮しているが、その多くは薬理学的用量を外来性に投与して得られた知見である。

翻って、ヒト胃粘膜には萎縮、腸上皮化生、腺腫、

癌腫等の病変が見られ、これら病的状態下におけるペプチドないしセロトニン含有内分泌細胞の分布と変化に関しては既に多くの研究者によって報告がなされている^{28,29}。しかし、ペプチド含有神経の検索は、主として齧歯類を用い、正常組織における研究が主体であり^{12,30,38,43,48,65,68}、本研究のごとく、ヒト胃壁にwhole mount法を適用した報告はなく、ヒト胃壁の病的状況下におけるペプチド含有神経の変化を検討した報告も少ない^{31,34,36,73,75}。

ヒト胃壁におけるペプチド含有神経の分布と病的状況下における変化を明らかにすることは、各種胃疾患の病態解明に重要な手掛りを与えるものである。そこで、本研究では、まずラット胃壁に存在するペプチド含有神経の分布について検討し、迷走神経切除あるいは、急性胃潰瘍における変化について見た。その後、ヒト胃壁におけるペプチド含有神経の分布をラットにおけるそれと比較しつつ検索した。さらに、慢性胃炎、腸上皮化生粘膜、慢性胃潰瘍、胃腺腫、胃癌病巣内におけるペプチド含有神経の分布について検討し、これら各種病的状態におけるペプチドの関与について考察を加えた。

材料と方法

ラット胃壁のペプチド含有神経の分布については、Wistar系8週齢の雄を用いた。購入したラット(日本チャールス・リバー社製)は一週間飼育ケージで観察し、体重減少等の異常を示さないことを確認した後、実験を行った。ラットは未処置コントロール群(n=10)、選択的迷走神経切除群(n=5)、寒冷拘束負荷群(n=8)および負荷解除12時間群(n=7)の4群に分類した。

ヒト胃壁におけるペプチド含有神経および内分泌細胞については、手術的に切除された33例および内視鏡的ポリペクトミーから得られた5例について検討した。その内訳は男性29例、女性9例、平均年齢55.7歳である。手術適応となった主診断は胃潰瘍15例および胃癌18例で、内視鏡的ポリペクトミーはいずれも胃腺腫であった。胃潰瘍のstagingは崎田ら⁶³⁾の内視鏡的肉眼分類に従い決定したが、活動期4例、治癒期11例であった。胃癌症例については『胃癌取扱い規約』²⁵⁾に従って分類した。早期胃癌8例、進行胃癌10例であり、その組織型は乳頭状腺癌2例、高分化管状腺癌3例、中分化管状腺癌9例、低分化腺癌4例であった。

なお、本研究では、主病変部より少なくとも5cm以上離れ、幽門腺ないし胃底腺に萎縮がなく、炎症細

胞浸潤の乏しい胃粘膜を便宜上、正常胃粘膜として取り扱った。

研究方法

1. 標本作製法

ラットおよびヒト胃切除標本はコルク板上で十分に伸展した後、直ちに、ザンボニ液に8時間浸漬固定した。標本を3mm厚に切り出し、10%蔗糖加0.01MPBS (Phosphate buffer saline, PH7.2) で24時間洗浄、OCT-Compound に包埋し、液体窒素にて凍結、免疫染色実施まで -70°C の冷凍庫に保存した。なお、検索した凍結ブロックはラットで約150個、ヒト材料で約450個である。

2. 寒冷拘束による実験胃潰瘍モデルの作製

2日間絶食後、伊藤らの方法³²⁾に従いラット拘束ケージ (ナツメ社製) を用いて体動を制限し、冷蔵庫に $0-4^{\circ}\text{C}$ にて60分拘束した。寒冷負荷解除群は通常のケージに戻し寒冷負荷終了後12時間絶食放置した。寒冷拘束負荷群、負荷解除後12時間群は直ちにエーテル麻酔下に開腹、胃を摘出し、大弯切開後、バルザ板にピンで固定し、肉眼的に体部腺領域に出血点が生じたものを潰瘍形成陽性とした。

3. ラット迷走神経切除

ラット5匹についてエーテル麻酔下に開腹し、幹迷走神経切除を行った。術後7日目に屠殺し、上記の如く、凍結標本作製した。

4. ラットおよびヒト胃壁 whole mount 標本作製

ラット5匹および、ヒト正常胃壁34例を用い、Costa ら⁸⁾の方法に従って、whole mount 標本作製した。ザンボニ液固定、蔗糖加0.01MPBSにて洗浄した。ラットでは幽門前庭部および体部筋層を、 $5\times 5\text{mm}$ 大に切り出した。ヒトではコルヒチン (100mg; 和光純薬社製) 10^4g/liter 加PBSにて3時間浸漬後、胃竅隆部を $20\text{mm}\times 5\text{mm}$ 大に切り出した。0.04%コラゲナーゼ (1g; 和光純薬社製) 37°C 、1時間処理後、実体顕微鏡下にて縦走筋、輪状筋を剥離し、筋間叢を露出させた。アルコール脱水、キシレン透徹、アルコール加水を実施し、光学顕微鏡で得られた標本を確認した。

5. 免疫組織化学的方法

12-16 μ に薄切されたラットおよびヒト胃凍結標本および whole mount 標本は、中根らの方法⁵¹⁾に従い酵素抗体間接法にて免疫染色を実施した。使用した抗体とその希釈倍率、入手先は Table 2 の如くである。以下、免疫染色の操作について記載する。

免疫組織化学的操作:

1) 凍結切片は2時間風乾後、whole mount 標本は直ちに0.03%過酸化水素を含むメタノール溶液に2時間浸し、内因性ペルオキシダーゼをブロックした。

2) PBS で洗浄後、非特異的免疫反応をブロックする目的でヤギ血清を30分反応。

3) PBS で洗浄後、凍結切片はスライド上で一次

Table 2. Characteristics of Utilized Antibodies

Peptide	Donor species	Source	Code	Dilution
VIP	rabbit	Milab	B34-100	$\times 20000$
PHI	rabbit	Milab	B53-100	$\times 1500$
SP	rabbit	Milab	B45-100	$\times 1200$
Bombesin	rabbit	Milab	B43-100	$\times 8000$
CGRP (human)	rabbit	Peninsula Lab	Ras 6009N	$\times 1000$
CGRP (rat)	rabbit	Milab	B47-100	$\times 1000$
Somatostatin	rabbit	Dako	A566	$\times 800$
NPY	rabbit	Milab	B48-100	$\times 800$
Galanin	rabbit	Milab	B42-100	$\times 1800$
β Endorphin	rabbit	Milab	B40-100	$\times 8000$
Gastrin	rabbit	our own product	monoclonal antibody	$\times 2000$
Glicentin	rabbit	from Prof. Yanaiharu	monoclonal antibody	$\times 800$
Serotonin	mouse	Seralab	MAS055b	$\times 800$

VIP: Vasoactive intestinal polypeptide, PHI: Peptide histidine isoleucine, SP: Substance P, CGRP: Calcitonin gene-related peptide, NPY: Neuropeptide Y

抗体を4時間、whole mount 標本は浮遊法で12時間反応。

4) PBS で洗浄後、凍結切片はスライド上で二次抗体を2時間、whole mount 標本は12時間反応。

5) 0.001%過酸化水素添加 0.05 MTris-HCLbuffer に DAB (3-3'diaminobenzidine) を溶解し、5~10分間の呈色反応を実施。

6) 後染色としてメチルグリーン単染色を行った。

さらに、内分泌細胞とペプチド含有神経の局所的な位置関係を検討する目的で、両者の二重免疫染色を行った。内分泌細胞および神経に局在するペプチドないしセロトニンに対する特異抗体を同時に反応させるか、あるいは、内分泌細胞を免疫染色後、Glycine buffer (PH4.0) で遊離の残存抗体を解離後、ペプチド含有神経の免疫染色を行った。また、同一神経線維束内における異種ペプチドの共存を検討するため、mirror image 切片法を施行し、免疫染色した。

なお、陰性対照として一次抗体に非免疫家兎 IgG を用い非特異的染色の有無を確認した。さらに、使用した抗体はすべて Sternberger ら⁷⁰⁾に従い、対応する抗原を用い、吸収試験を実施した。かかる操作後には、免疫染色が消失し、抗体の特異性が確認された。

6. 免疫染色の評価

内分泌細胞、神経線維、神経細胞体の形態および、その病的状況下での変化は光学顕微鏡下で観察し、神経線維、あるいは、神経細胞体が少数認められるものを+, 多数認められるものを+++, その中間を++とした。

結果

1. ラット胃壁におけるペプチド含有神経の分布

1) 正常ラット胃壁におけるペプチド含有神経の分布

各種ペプチド含有神経は微細顆粒の連なったビーズ様構造物として認められた。粘膜固有層内においては各種ペプチド含有神経が幽門腺ないし胃底腺に沿って走行し、時として表層粘液細胞直下にも達していた (Figs. 1a-d)。ペプチド含有神経の粘膜固有層内における分布密度についてみると Vasoactive intestinal polypeptide (VIP) (Fig. 1a) 含有神経が最も高く、これとほぼ同様の密度でボンベシン (Fig. 1b), Calcitonin gene-related peptide (CGRP) (Fig. 1c) 含有神経が見いだされた。次いで、Peptide histidine isoleucine (PHI), Substance P (SP) (Fig. 1d) およびガラニン含有神経の順で分布していた。かかるペプチド含有神経はボンベシン含有神経を除き、幽門腺領

域と胃底腺領域で分布の差を示さなかった。ボンベシン含有神経は幽門腺領域より胃底腺領域で分布が高かった。他方、 β エンドルフィン、Neuropeptide Y (NPY), ソマトスタチン含有神経は見いだされなかった。

内分泌細胞の分布について見ると、ガストリン含有 (G) 細胞は幽門腺粘膜に、ソマトスタチン含有 (D) 細胞、セロトニン含有 (EC) 細胞は幽門腺粘膜、胃底腺粘膜に認められた。また、CGRP 免疫活性が幽門腺粘膜の内分泌細胞に少数認められた。

粘膜筋板には、粘膜内に分布していたペプチド含有神経が平滑筋細胞の走行と並行して分布しており、VIP, ボンベシン, CGRP 含有神経の分布密度が高かった。

粘膜下組織では粘膜内で見いだされたペプチド含有神経が主として動脈、毛細血管壁に沿って見いだされた (Figs. 2a, b)。この内、VIP および CGRP 含有神経が最も頻りに見いだされた。粘膜下組織には Meissner 神経叢, Schabadasch 神経叢とも見いだされなかった。

固有筋層においては、個々の神経は筋線維の走行に沿って縦走筋、輪状筋両者に認められたが、その分布密度は後者が高かった (Fig. 3)。筋層内の分布密度は VIP 含有神経, CGRP 含有神経, ボンベシン含有神経が最も豊富で、ついで、PHI, SP 含有神経が見いだされた。ガラニン, β エンドルフィン, NPY 含有神経は稀に見いだされたが、ソマトスタチン含有神経は認められなかった。なお、迷走神経切除を施行した5匹では、ペプチド含有神経の分布に何等の変化もなかった。

Whole mount 標本では VIP, CGRP, ボンベシン含有神経が複雑なネットワークを形成しつつ分布していた (Figs. 4a, b)。

以上の正常ラット胃壁における各種ペプチド含有神経の分布の概略を Fig. 5 に図示した。

2) 寒冷拘束ラット急性ストレス潰瘍モデル

60分寒冷拘束では、24例中22例 (91.6%) で胃底腺領域に出血性びらんが発生していた (Fig. 6a)。肉眼的には点状の粘膜出血巣が胃体大弯側に多発していた。組織学的には UL-1 の潰瘍、所謂びらんであり、出血、粘膜固有層のうっ血を伴い、表層部粘膜が剥奪していた。稀には少数のリンパ球が浸潤していたが、炎症細胞浸潤は一般に軽微であった (Fig. 6b)。

60分寒冷拘束直後の急性潰瘍形成部では、神経の VIP およびボンベシン免疫活性が著しく減少ないし消失していた (Figs. 7a, b)。潰瘍周辺部粘膜では

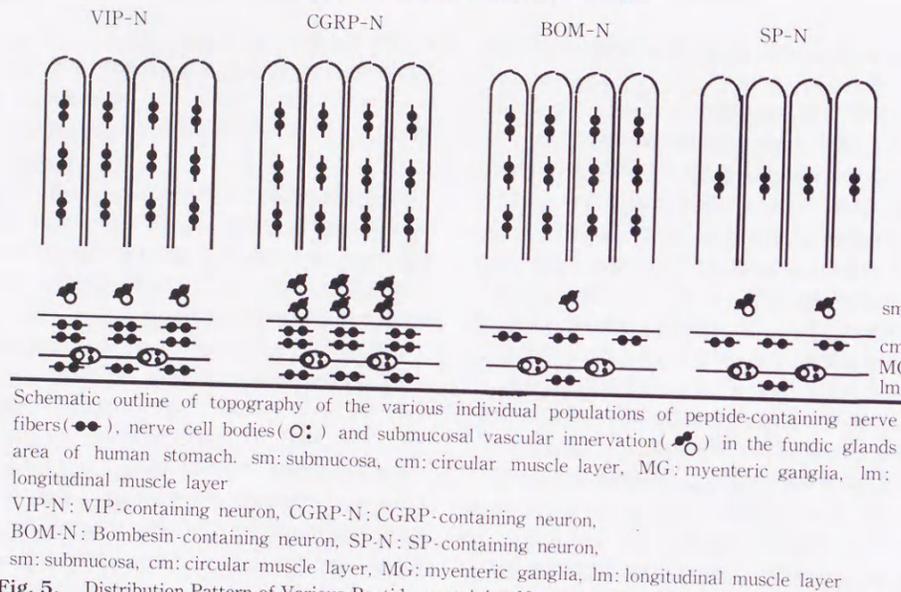


Fig. 5. Distribution Pattern of Various Peptide-containing Neurons in Normal Fundic Glands Area of Rat Stomach

VIP, ボンベシン含有神経がやや腫大していたが、分布の変化はなかった。SP 含有神経は正常粘膜での分布密度が低いため病変部での分布密度の差異は明らかではなかった。

寒冷ストレス解除12時間後の病変部は肉眼的に出血点は認められ、茶褐色調となっていた。組織学的にはストレス負荷直後の像に比し、リンパ球の浸潤がやや増強しており、少数の多核白血球が混在していた (Figs. 8a, b)。神経分布についてみると、潰瘍形成部粘膜内に神経内のVIP, ボンベシン免疫活性は、潰瘍周囲粘膜と比較して、ほぼ正常に復していた (Figs. 9a, b)。

2. ヒト胃におけるペプチド含有神経の分布と各種病的状態下における変化

1) 正常ヒト胃におけるペプチド含有神経の分布

正常胃粘膜では明瞭な軸索瘤 (varicosity) を有するペプチド含有神経が幽門腺ないし、胃底腺に沿って走行していた。それらは、しばしば表層粘膜上皮直下まで達していた。神経線維の分布密度はVIP, PHI, ボンベシン, SP, ソマトスタチン含有神経の順で高密度に認められた (Figs. 10a-d)。他方, NPY, ガラニン含有神経は稀れて、CGRP 含有神経は粘膜には見出しなかった。かかるペプチド含有神経線維の内、SP, ソマトスタチン含有神経は幽門腺領域に、ボンベシン含有神経は胃底腺領域において分布密度が高い傾

向を示したが、VIP, PHI 含有神経は、両領域においてほぼ均等に分布していた。Mirror image 切片法ではVIP 含有神経線維, PHI 含有神経線維の分布はほぼ一致していた。

二重免疫染色による各種内分泌細胞とペプチド含有神経との組織学的関連の検討では、ソマトスタチン含有神経がソマトスタチン含有 (D) 細胞および、ガストリン含有 (G) 細胞に接する像は見出しなかった (Figs. 11a, b)。他のペプチド含有神経とセロトニン含有 (EC) 細胞, G 細胞においても、両者に特定の関連は見られなかった。

粘膜筋板には粘膜内に見られたと同様のペプチド含有神経が筋線維の走行に沿って見られ、特にVIP, PHI 含有神経の分布密度が高かった。

粘膜下組織ではVIP, PHI, SP, CGRP および、ボンベシン含有神経が主として血管周囲に認められた (Fig. 12)。粘膜下組織内の神経叢は、粘膜筋板近傍の比較的表層部に分布するものと、深層の固有筋層近傍に分布するものがあった。前者にはボンベシン (Fig. 13a) が、後者には、SP (Fig. 13b), ソマトスタチン (Fig. 13c) が、さらに、VIP (Figs. 13d, e), PHI (Fig. 13f) 免疫活性は両者に見出しされた。

固有筋層において、各層内には筋線維の走行に沿ったペプチド含有神経が認められたが、VIP (Fig. 14), PHI 神経の分布密度が最も高く、次いで、SP, ボン

ベシンは中等度、CGRP, NPY は少数認められた。これらペプチド含有神経の分布密度は中輪筋で最も高い傾向が窺われ、また、幽門輪において極めて豊富に見出しされた。さらに、神経線維が筋間神経叢を縁どるがごとく像がしばしば見られた (Fig. 15)。また、VIP, ボンベシン, SP, NPY は神経節胞体内にも免疫活性陽性所見が時として認められた。

2) ヒト胃筋層の whole mount 標本における検討
Auerbach 神経叢膨大部における神経分布には神経網の根幹となる太い神経束 (Primary component), 二次分枝 (Secondary component), 三次分枝 (Tertiary component) および、筋間神経節間を連絡する結節間神経束 (Internodal strand) などの立体構築が観察し得た (Fig. 16a)。分布密度についてみると、凍結切片におけるそれと同様、VIP, SP, ボンベシン含有神経の分布密度が最も高く、次いで NPY 含有神経が見出しされたが、CGRP, ソマトスタチンは少数見出しされるのみであった。また、VIP, SP, ボンベシン, NPY, CGRP 免疫活性が時として神経細胞体に見出しされたが、ソマトスタチン免疫活性陽性の神経細胞体は認められなかった (Figs. 16b-h)。各種ペプチド免疫活性を有する神経細胞体は比較的小型、楕円形で、少数の短い樹状突起を有していた。

以上、ヒト胃壁におけるペプチド含有神経の分布および、whole mount 法による Auerbach 神経叢内の各種ペプチド免疫活性の分布の概略を Fig. 17 に図

示した。また、ラット胃壁におけるペプチド含有神経の分布との比較を Table 3 にまとめた。

3) 慢性胃炎および腸上皮化生粘膜におけるペプチド含有神経の分布

萎縮性胃炎の進展に伴い、幽門腺, 胃底腺は減少し、リンパ球を主体とした炎症細胞が種々の程度に浸潤していた。萎縮胃炎初期では各種ペプチド含有神経はやや分布密度が増強する傾向にあったが、萎縮性変化の進展とともに、それらは減少あるいは消失した。

正常胃粘膜では腺管に沿って概ね直上していたVIP, SP およびソマトスタチン含有神経は、その走行と分布が不規則となっていた。すなわち、粘膜内を横走する神経線維や時として多数の神経線維が集簇する所見が見られた (Figs. 18a-c)。粘膜内でのVIP および、SP 含有神経の分布を比較すると、前者は粘膜深層において、後者は表層部において分布密度が高く、表層部杯細胞に達するものも散見された。粘膜内にリンパ濾胞の形成をともなった胃炎粘膜においては、VIP, SP, ソマトスタチン含有神経が濾胞周囲を取り囲む所見がしばしば見出しされた。他方、濾胞内においては何れの神経線維も見出しなかった。

腸上皮化生の出現と共に、VIP, SP 含有神経の分布密度は一般に高くなる傾向にあり、特に、SP 含有神経が杯細胞周囲に分布する像が見出しされた (Fig. 19)。腸上皮化生が完成し単一管状腺となった粘膜部分では、ペプチド含有神経は疎と成って、分布密度が

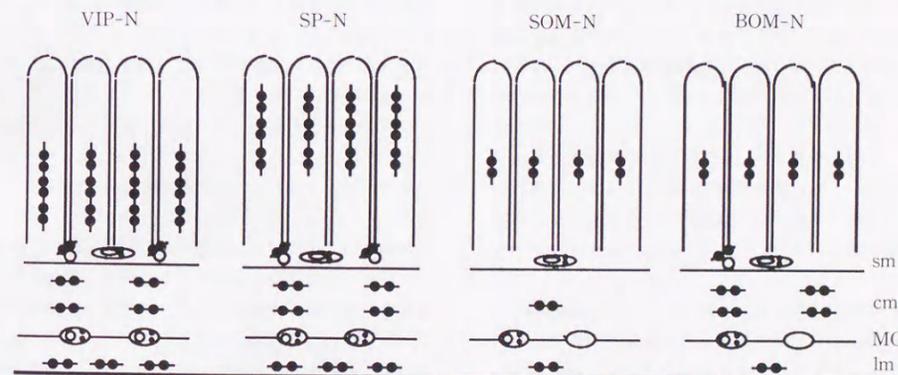


Fig. 17. Distribution Pattern of Various Peptide-containing Neurons in Normal Pyloric Glands Area of Human Stomach

VIP-N: VIP-containing neuron, SP-N: SP-containing neuron,

SOM-N: Somatostatin-containing neuron, BOM-N: Bombesin-containing neuron

Table 3. Distribution of Peptide-containing Nerves in the Human Stomach and Rat Stomach

(Peptide)	Mucosa		Submucosa		Muscle layer		Myenteric plexus		
	Pyloric mucosa		Fundic mucosa				nerve fiber	nerve body	
	Human	Rat	Human	Rat	Human	Rat	Human	Human	
VIP	+++	+++	+++	+++	++	+++	+++	+++	+++
PHI	+++	+	+++	+	++	+	+++	++	+++
SP	+++	+	+	+	++	+	++	++	+
BOM	+	+	++	+++	+	+	++	++	++
GAL	+	+	+	+	+	+	++	++	++
NPY	+	-	+	-	+	+	+	+	+
SOM	++	-	-	-	+	-	+	-	+
CGRP	-	+++	-	+++	+	+++	+	+++	+
β -END		-		+		+		+	+

+: a few nerve fibers, ++: moderate number of nerve fibers, +++: abundant nerve fibers

VIP: Vasoactive intestinal polypeptide, PHI: Peptide histidine isoleucine, SP: Substance P, BOM: Bombesin, GAL: Galanin, NPY: Neuropeptide Y, SOM: Somatostatin, β -END: β -endorphin, CGRP: Calcitonin gene-related peptide

低下し、腺管に沿って垂直に走行する像が時として認められた (Fig. 20)。

次に、慢性胃炎粘膜および腸上皮化生巣における神経線維と内分泌細胞の関連について検討した。VIP, SP 含有神経が集簇して多数分布している部分ではグリセリン含有 (L) 細胞, EC 細胞数が少なく、逆に、内分泌細胞が多数、見出された部分ではペプチド含有神経の分布密度が低かった。すなわち、胃炎粘膜では内分泌細胞とペプチド含有神経の分布密度は逆相関する傾向が見出され、化生腺管腺底部で L 細胞が過形成様となった粘膜部分では、SP 含有神経の分布密度が低くなっていた (Fig. 21)。他方、L 細胞の見出されない粘膜部分では SP 含有神経が豊富に見出された。尚、粘膜筋板、粘膜下および、筋層におけるペプチド含有神経は粘膜内の炎症細胞浸潤、萎縮の程度に関わらず、ニューロンの分布に変化を示さなかった。

4) 慢性胃潰瘍病変におけるペプチド含有神経
胃潰瘍底の壊死、肉芽組織にペプチド含有神経は見出せなかった。下層の線維性結合組織内には幅の広い神経束がしばしば見出され、これらは VIP, SP, ボンベシン免疫活性を示した (Figs. 22a-c)。神経線維は潰瘍周辺の筋層から連続して潰瘍底の線維化巣内へ広がり、潰瘍底表層に向かって延びていた。また、分布密度は線維性結合組織が拡大するに従って高くなる傾向があった。

潰瘍底に見られる神経線維は紐状に集簇したもの

(Cord-like configuration) (Figs. 23a-c)、軸索瘤が消失したものが見出された。かかる不整な神経線維は、潰瘍による切断された神経線維が再生過程で示す所見とも見做された。なお、mirror 切片による検討では、同一神経束内に VIP 免疫活性、SP 免疫活性が見出された (Figs. 22a, b)。

潰瘍が UL-II もしくは III の比較的浅い病変では、潰瘍下および潰瘍周辺に残存した筋間神経叢ではペプチド免疫活性が明らかに増強しており、特に、神経細胞体の免疫活性が顕著であった (Figs. 24a-d)。それら一連の所見は治癒期潰瘍においてのみ観察され、壊死、肉芽組織が主体を占める活動期潰瘍には認められなかった。

ソマトスタチン, NPY 含有神経は見出せなかった。

潰瘍周辺で再生上皮に被覆された胃粘膜には、何れのペプチド含有神経も見出せなかった。再生過程が進展し、潰瘍底が大部分再生上皮に被覆された粘膜部分では、少数の神経線維が分布していたが、周辺部において比較的多く、潰瘍中心部に向かって分布密度が低下していた。

5) 胃腺腫および胃癌病巣におけるペプチド含有神経の分布:

胃腺腫の 5 病変はいずれも管状腺腫で、中等度ないし高度な異型性を示していた。腺腫内にはペプチド含有神経は著しく減少しており、ごく稀に VIP および SP 含有神経を認めるのみであった。

Table 4. Individual Results of Distribution Density of Neurons Containing Various Peptides in Gastric Ulcers and Gastric Cancers

Name	Age	Sex	VIP	SP	Bombesin	Cord-like configuration	Immunoreactivity of myenteric plexus
(Active stage)			(Grade)				
K. U	60	M	III	-	-	-	-
K. O	55	M	III	-	-	-	-
T. U	36	M	III	-	-	-	-
T. F	42	M	III	-	-	-	-
(Healing stage)							
I. Y	59	M	III	++	+	+	++ enhance
Y. O	39	M	III	++	+	+	++ enhance
S. O	48	M	IV	+++	++	+	++ enhance
N. H	54	M	IV	++	+	-	++ enhance
Y. M	59	M	IV	++	+	-	++ enhance
H. M	35	F	III	+	+	+	+
K. T	55	M	III	+	-	-	+
I. T	64	M	IV	+	+	-	+
M. I	56	F	I	+	-	-	-
F. M	45	M	II	-	-	-	-
S. K	40	M	III	++	+	-	++ enhance
(Early gastric cancer) (Histological type ¹⁾)							
M. O	51	M	pap	-	-	-	-
T. M	82	F	tub1	-	-	-	-
B. M	65	M	tub1	+	+	-	-
Y. U	69	M	tub2	-	-	-	-
F. M	67	F	tub2	-	-	-	-
B. K	73	M	tub2	-	-	-	-
K. K	70	F	por	++	+	-	-
Y. N	63	F	por	++	+	-	-
(Advanced gastric cancer)							
M. A	83	M	pap	-	-	-	-
H. N	66	M	tub 1	-	-	-	-
T. O	70	M	tub 2	-	+	-	-
K. T	66	M	tub 2	+	-	-	-
Y. S	51	M	tub 2	+	+	-	-
Y. K	42	M	tub 2	+	-	-	-
K. S	73	M	tub 2	-	-	-	-
I. A	62	M	tub 2	-	-	-	-
R. U	46	M	por	++	+	-	-
T. S	58	M	por	+	+	-	-

1) Histological type

pap: papillary adenocarcinoma
tub1: well differentiated tubular adenocarcinoma
tub2: moderately differentiated tubular adenocarcinoma
por: poorly differentiated adenocarcinoma

2) Grading of distribution density of neurons

+: a few number
++: moderate number
+++: a large number

3) VIP: Vasoactive intestinal polypeptide, SP: Substance P

乳頭状腺癌, 高分化管状腺癌, 中分化管状腺癌の14症例の癌組織内にはペプチド含有神経が著しく減少していた。14例中6例は早期胃癌, 8例は進行胃癌である (Table 4)。VIP 含有神経は早期胃癌の1例, 進行胃癌の3例で, また, SP 含有神経は各々1例, 2例で見出された。神経線維の密度は低く, 主として, 腫瘍周辺部に分布していた (Fig. 25)。他方, 低分化腺癌においては, 早期胃癌2例, 進行胃癌2例の何れにおいても VIP および, SP 含有神経が見出され (Fig. 26), 特に, VIP 含有神経の分布密度が比較的高かった。ボンベシン, ソマトスタチン含有神経は組織型に関係なく見出せなかった。癌組織内に見出された VIP および, SP 含有神経は, 組織型に関係なくその神経線維の走行が不規則となり (Fig. 27), 部分的に太くなったもの, 奇異な形態を示すもの (Fig. 28), あるいは, 軸索瘤が消失したもの (Fig. 29) など, その形態が不規則かつ多様となっていた。また, 低分化腺癌においても VIP 含有神経線維の紐状集束像 (Cord-like configuration) がしばしば見出された (Fig. 30)。しかし, 癌組織においては, 潰瘍病変でしばしば分布していた幅の広い神経束は癌組織内に見出せなかった。

以上, 胃潰瘍, 胃癌組織におけるペプチド含有神経の分布の変化を Table 4 にまとめた。

考 察

ヒト胃腸管には極めて豊富なニューロンが存在しており, Furness & Costa らはその数を $10^{7.8}$ と試算しているが¹⁵⁾, これは脊髄全細胞数に匹敵するほどである。今回の検討では, 各種ペプチド含有神経についてその絶対数を定量化し得なかったが, 極めて豊富なニューロンが複雑なネットワークを形成しつつ, 胃壁全層に分布していることが明らかとなった。また, 胃腸管神経節の微細構築は神経周膜, 神経上膜を欠き, 内部より, 中枢神経系のアストログリアに類似した腸管グリアによって神経細胞体などの神経構成成分が支持されているといった他の自律神経節には見られない組織学的特徴を備えていること¹⁷⁾, 機能的に内部に完全な反射回路が存在すること等より, Langley¹¹⁾以来, 第3の自律神経系とも呼称されている。ラット迷走神経切除によりペプチド含有ニューロンの分布が変化しなかったことは, その独立性を示す一つの証左である。

胃腸管神経系を神経伝達物質より見ると, コリン, ノルアドレナリン, GABA, プリンおよび, ペプチド作動性ニューロンに分類されるが^{23, 39)}, この内, 本研究の主題であるペプチド作動性神経に関する検討が近

年, 勢力的に展開されている^{16, 60, 64, 68, 74)}。しかし, ヒト胃壁での分布とその生理的意義, さらに病的状況下における変化について検討した研究はいまだ少ない^{34, 73, 75)}。

以下, 1) 正常ヒトおよびラット胃壁におけるペプチド含有神経の分布とその生理的意義, 2) whole mount 法による筋間神経叢の三次元的観察, 3) 寒冷拘束急性潰瘍モデルにおけるラット胃壁およびヒト慢性消化性胃潰瘍におけるペプチド含有神経の変化とその比較, 4) 慢性胃炎, 胃腺腫および胃癌等の病的状態下におけるペプチド含有神経の変化について考察を加える。

1) 正常ヒトおよびラット胃壁におけるペプチド含有神経の分布とその生理的意義

ヒト胃壁においては, 極めて多彩なペプチド含有ニューロンが複雑なネットワークを形成していた。正常ヒト胃粘膜固有層内には, 各種ペプチド含有神経は, 光顕上, ビーズ状の軸索瘤を有する細線維様構造物として認められ, 個々の神経線維は, 比較的規則性を持って, 幽門腺ないし胃底腺に沿って走行していた。

胃粘膜の各種ペプチド含有神経の分布については, VIP, PHI 含有神経は幽門腺領域, 胃底腺領域とも同等に分布し, SP 含有神経, ソマトスタチン含有神経は, 幽門腺領域に, 他方, ボンベシン含有神経は胃底腺領域において分布密度が高かった。胃粘膜内におけるペプチド含有神経の分布差については, その生理的作用を考察するうえで重要である。

他方, ラット胃粘膜においてはヒトとはやや異なったペプチド含有神経の分布が見出された。ラットでは VIP, PHI, CGRP, ボンベシン含有神経が最も豊富に存在し, NPY, SP 含有神経は少数, ソマトスタチン, ガラニン含有神経は認められなかった。この内, CGRP 含有神経はヒト胃粘膜におけるそれと異なり, 分布密度がより高いのに対し, SP, PHI 含有神経はヒト胃粘膜と比較し分布密度が低かった。幽門腺粘膜, 胃底腺粘膜における分布密度の差に関しては, VIP, PHI, CGRP, SP 含有神経の分布密度に差は認められなかった。ペプチド含有神経分布の種による相違はすでに Furness ら¹⁶⁾も指摘している。

胃粘膜内に分布する神経線維が含有するペプチドの生理的意義については十分に解明されていない。ヒトおよびラット胃粘膜で最も分布密度の高かった VIP に関しては胃酸分泌抑制, ペプシン分泌抑制といった胃底腺上皮に対する作用が知られている⁶²⁾。しかし, VIP と同一神経線維に共存する PHI についてはその報告がない。しかも, VIP, PHI 神経は幽門前庭部に

も分布しており, 胃底腺上皮のみならず, 幽門腺上皮にも何等かの作用を及ぼしていることが予測される。VIP の血管拡張作用^{42, 80)}を考え合わせると, 血流調節に携わっており, それを介しての作用が推測される。

一方, 幽門腺粘膜において分布密度が高かった SP については粘液あるいはペプチドホルモン産生細胞との関連が示唆されている。SP はラット胃におけるガストリン, ソマトスタチンの分泌を抑制すること報告されている⁵⁸⁾。SP 含有神経および各種内分泌細胞はラットよりヒト胃粘膜において分布密度が高い。ヒト胃粘膜では SP による複雑な調節がなされていることが示唆される。また, 唾液腺においては唾液分泌を刺激するとの報告⁵⁸⁾もあり, 粘液産生ないし分泌に関与している可能性がある。

ボンベシン含有神経は, 胃底腺粘膜により豊富に認められた。岩永³³⁾, Kuwahara ら³⁸⁾もラットにおいてボンベシンの analog である GRP 含有神経を胃底腺領域に見出している。ボンベシンは胃酸分泌作用を有していることから^{14, 80)}, 機能的作用と組織学的所見が一致しているものと見做された。なお, ソマトスタチン含有神経も少数ながら, 幽門部粘膜に認められた。ソマトスタチン含有神経に関するヒト胃粘膜での検討は少なく³⁶⁾, また, その存在を明らかにした報告はない。その分布密度は低く, 胃粘膜上皮への作用は過大視することは出来ない。

次に, 胃粘膜に分布するペプチド含有神経と内分泌細胞との関連は注目すべき問題点と考えられる。ラット胃粘膜には, ヒトと同様に D 細胞, G 細胞, EC 細胞が見出されたが, ヒトに比較し分布密度はやや低かった。Ito ら³⁰⁾はすでに CGRP はラット幽門腺領域の内分泌細胞にも免疫活性が存在すると報告した。本研究において, ラット胃粘膜内においても, CGRP を除き, 神経に存在するペプチドと内分泌細胞に存在するペプチドとは異なっており, ヒトにおけるそれと同様であった。CGRP は血管拡張作用¹⁴⁾および胃における生理作用としては胃酸分泌抑制作用が示されている^{2, 45)}。従って, ラット胃粘膜においては神経線維ないし内分泌細胞に含まれる CGRP はその血流調節作用と酸分泌抑制により粘膜保護に重要な役割を果たしているものと見做される。

ヒト胃壁粘膜下神経叢は粘膜筋板直下に見出されるものと, 筋層付近の比較的粘膜下組織深部に見出されるものと二種類存在した。前者がいわゆる Meissner 神経叢であり, 後者が Schabadasch 神経叢²⁴⁾である。両粘膜下神経叢において, 各種ペプチドの免疫活性の局在にも差が認められた。すなわち,

VIP, PHI 免疫活性は両者に, ボンベシン免疫活性は前者に, SP, ソマトスタチン免疫活性は後者に見出された。その見出される頻度は VIP, PHI 免疫活性を持つものが最も多く, 次いで, ボンベシン免疫活性を持つものが見られ, SP, ソマトスタチン免疫活性を有するものは極少数しか認められなかった。

一般に, 粘膜, 粘膜下組織に分布する神経は, 粘膜下神経叢から起始しており, 他方, 筋層を分布する神経は筋間叢由来とされ, 各々, 異なった神経網を形成している。本研究では, ヒト胃壁粘膜下神経叢に VIP, PHI, SP, ボンベシン, ソマトスタチン免疫活性が見出され, それは胃粘膜内の神経線維が含有するそれと同様であった。かかる所見は粘膜内のペプチド含有神経が粘膜下神経叢由来であることを示している。

粘膜に分布するペプチド含有神経線維はソマトスタチンを除きどれも動脈ないし静脈壁に沿って分布していた。血管収縮ないし拡張作用を発揮しているものと考えられる。ソマトスタチン含有神経は線維性結合織に認められ, 毛細血管に沿って分布している可能性がある。こうした粘膜下神経叢での分布密度の結果は, SP を除き, 粘膜, 粘膜筋板の分布密度によく相関していた。しかし, Scheuermann ら⁶⁴⁾は Schabadasch 神経叢の神経ペプチドの分布様式が筋間神経叢に似ていることを報告し, Gunn ら¹⁹⁾は本神経叢が部分的に輪状筋への支配も行っている可能性を示唆した。Timmermans ら⁷⁴⁾は, 両粘膜下神経叢における各種ペプチドの分布相違を報告した。このように, 両者とも粘膜下神経叢でありながら, 神経線維の分布構築は極めて複雑であり, 粘膜内でのペプチド含有神経の分布様式は粘膜下神経叢におけるペプチド含有神経細胞の分布をすべて反映しているとは限らないものと見做される。

一方, ラット粘膜下組織においては, VIP, PHI, ボンベシン含有神経はヒトとほぼ同様の分布密度を示し, 粘膜下の血管壁に沿って分布していた。しかし, ラットにおいてはヒトで見出された二種の粘膜下神経叢は認められず, 粘膜の神経分布も筋間叢からの神経線維が支配しているものと見做された。こうした所見はラット胃壁に比べて, ヒト胃壁の神経支配がより複雑, 高次元な神経網で調節されていることを意味しているのかも知れない。

筋層においては, VIP, PHI 含有神経が最も豊富に分布し, SP, ボンベシン含有神経も比較的豊富に認められた。ソマトスタチン, NPY, CGRP 含有神経は少数認められた。生理学的には, VIP, PHI は平滑筋

弛緩^{62,80)}, SP^{58,80)}, ボンベシン⁸⁰⁾, CGRP¹⁴⁾ は平滑筋収縮に働くことが知られている。すなわち, 胃の蠕動運動をペプチド含有神経の面から見ると, 収縮, 弛緩の両面から調節されているのである。幽門括約筋部では VIP, SP 含有神経の分布密度が極めて高いことは, 同部における繰り返す収縮, 弛緩のために重要な役割を担っているものと見做される。なお, NPY は血管収縮作用¹⁴⁾, 胃酸分泌抑制作用⁴⁷⁾ が報告されているが, 胃固有筋層の平滑筋に如何なる作用を及ぼすかは明らかではない。また, CGRP, ソマトスタチン含有神経はヒト胃において分布密度が少なくその意義は少ないと考えられる。

一方, 筋間叢では, 上記神経ペプチドの免疫活性がすべて見出された。分布密度としては, VIP, PHI が最も豊富に見出され, 次いで SP, ボンベシン免疫活性が認められた。ソマトスタチン免疫活性も少数見出されたが, CGRP, NPY 免疫活性は明らかではなかった。かかる所見は, 筋層における種々のペプチドの分布を反映しているものと見做される。

ラットでは VIP, PHI, SP, CGRP 含有神経は豊富に見出されたが, ボンベシン, NPY 含有神経は中等度, ガラニン含有神経は少数, ソマトスタチン含有神経は認められなかった。また, 筋間叢においては, ソマトスタチンを除く各種ペプチドの免疫活性が認められ, なかでも VIP, PHI, ボンベシン, CGRP の免疫活性は豊富に見出された。これらの結果から, 特に, ラット胃壁においては, CGRP 含有神経の意義がヒトに比較して大きく, 胃の運動, 血流, 酸分泌等の胃壁全層にわたる調節を行っていることが組織学的に窺われた。

本研究では, ラット胃壁にはソマトスタチン含有神経は認められず, ガラニン含有神経もヒトに比較して少なかった。ラット胃壁における各種ペプチド含有神経の分布に関する報告は多いが^{12,43,48)}, 我々の成績もそれらによく一致している。しかし, Buffa ら⁷⁾ は, 幽門腺領域にボンベシン含有神経は豊富に認められたと報告し, Ekblad ら¹²⁾ はラット胃壁筋層にはソマトスタチン含有神経が少数存在すると報告した。このように, 同一種族内においても, 分布の相違が報告されている理由として, 諸家の用いた固定法の違い, および, 抗体の差によるものと思われた。

2) whole mount 法による筋間神経叢の三次元的観察

本研究では, Costa ら⁸⁾ によって開発された whole mount 法を用いて, ペプチド含有神経線維の分布のみならず, ペプチドの産生場である Auerbach 神

経叢の免疫活性をも検討した。凍結切片では Auerbach 神経叢を平面的にしか観察出来ないのに対し, whole mount 法では Auerbach 神経叢を立体的に観察することが可能である。

ラット胃壁 Auerbach 神経叢には VIP, SP, CGRP, ボンベシン免疫活性を持つ神経細胞体および神経線維が複雑な神経網を形成していた。Costa ら^{8,16)} の観察結果とよく一致する所見である。

一方, ヒト胃の筋間神経叢を本法により観察した報告はない。ラットなどの小動物では筋層が薄くまた, 筋線維の走行が規則正しいため, 筋層の剥離が容易なのに対し, ヒト筋層は厚く, また, 筋線維の走行もより複雑である。しかも, 抗体の浸透性にも問題が生じた。そこで, 著者らは, ヒト胃筋層のうち最も薄い窮隆部胃壁を用い, コラゲナーゼ酵素処理を施しながら, 短時間に胃筋層間を剥離し, また, 神経細胞体の免疫活性を保たせるため, 固定後の標本は洗浄液中にコルヒチン処理を施す等の工夫を加えた。コラゲナーゼによる免疫活性の減少はなかった。

whole mount 法により, ヒト Auerbach 神経叢内の神経細胞体には, VIP, SP, ボンベシン, NPY, CGRP の免疫活性が見出された。他方, ソマトスタチン免疫活性は神経細胞体には認められなかったが, 免疫活性のない神経細胞体の周囲を取り巻いていた。ソマトスタチンの神経節細胞内における抗原量が少ない可能性がある。何れにせよ, ヒト胃筋層におけるペプチド含有神経はソマトスタチンを除けば Auerbach 神経層の神経細胞に由来することが示された。特に, VIP はその免疫活性陽性神経細胞体を豊富に認め, 凍結切片における神経線維の高い分布密度とよく一致していた。他方, SP, ボンベシン含有神経もヒト胃壁では豊富に存在するペプチドにも関わらず, VIP に比し, 免疫活性陽性細胞体が少なかった。その理由として, 各種ペプチドの軸索輸送速度の違いが考えられるが, VIP, SP, ソマトスタチンはその輸送速度はほぼ等しいことが文献的に明らかとなっている¹¹⁾。

神経線維はラットにおける観察結果^{8,12,48)} と同様, 複雑なネットワークを形成する三次元構造が見出され, 凍結切片では観察し得ない立体構造がヒト筋層において初めて示された。

3) 寒冷拘束ラット急性胃潰瘍モデルにおけるラット胃壁, および, ヒト慢性消化性胃潰瘍におけるペプチド含有神経の変化とその比較

潰瘍病変形成過程における神経ペプチドの関与については, 十分に解明されていない。そこで, ラット寒

冷拘束モデルで急性潰瘍病変の, また, ヒト切除胃で慢性消化性潰瘍病変でのペプチド含有ニューロンの変化を検討したのである。

ラット急性胃潰瘍病変は, 体部にびらんとして多発し, 組織学的には, 出血, 粘膜炎層上皮の剥奪, 粘膜炎下の血管の著明な充血を認めた。かかる変化は諸家の報告³¹⁾ と良く一致した。びらんの生じた寒冷拘束直後の病変内には, 免疫組織学的に病変部位の VIP, ボンベシン含有神経を見出さなかった。他方, 寒冷拘束解除12時間後において, 組織学的には上記病変に殆ど変化が認められなかったが, 同病変部において神経の VIP, ボンベシン含有神経が, 周囲の正常粘膜と同様に分布していた。これらの所見は, 寒冷ストレス負荷により, VIP, ボンベシンが分泌, 放出され, 抗原性の低下ないし消失が生じ, 結果的にペプチド含有神経が染色されなかったものと見做されるが, 神経線維自体は残存し, ストレス負荷解除によりこれらのペプチドは急速に補充されるものと推測される。病変部の電顕的検索で神経線維の残存を証明する必要がある。

VIP は血管拡張に働き, 他方, ボンベシンは血管収縮作用を示す。一方, 胃酸分泌に関しては, VIP は胃酸分泌抑制作用を, 他方, ボンベシンは胃酸分泌促進に働くことが知られている^{92,80)}。対照的な生理作用を示す VIP, ボンベシンがストレス条件下において, 放出され, 潰瘍形成に関与しているものと考えられるが, その詳細に関しては今後の課題である。同様の実験を行った岩永ら³¹⁾ は, ラット水拘束ストレス胃潰瘍モデルで, 6時間から12時間のストレス負荷による潰瘍病変部でのボンベシン含有神経の消失は, ボンベシンの神経内枯渇が生じたことが原因であると報告した。また, Hernandez ら²¹⁾ はラットにおいて種々の神経ペプチドの脳室内投与によるストレス潰瘍形成への影響を検討し, VIP による潰瘍形成率の増加を報告した。急性潰瘍発生におけるペプチドの重要性を示唆した報告である。他方, Oda ら⁵⁴⁾ はラット胃潰瘍モデルで潰瘍部での acetylcholine esterase を用いた酵素化学によるコリン作動性神経が潰瘍部で増加していると報告した。同時に, 壁細胞が VIP 受容体を有していることから, VIP も潰瘍形成に何等かの役割を演じている可能性を示唆した。何れにせよ, ラット急性潰瘍の形成には複数の神経ペプチドのみならず, 種々の因子が関与しているものと考えられる。組織学的に見出された充血はコリン作動性神経による神経循環調節の欠如した状態に, 過度に神経末端から放出された神経ペプチドによる反応が加味され生じ, それによって惹起された局所の循環不全が潰瘍形成を

導いたとも考察される。

ヒト慢性消化性潰瘍病変では, 潰瘍表層部の壊死層, 肉芽層においてはペプチド含有神経は見出されていない。下層の線維化層では, 特に非活動性病変で幅の広い神経線維束が多数認められ, 同部に VIP, SP, ボンベシンの免疫活性像が認められた。潰瘍病変周辺の Auerbach 神経叢における神経細胞体を含む免疫活性の増強が見出された。かかる所見はペプチド含有神経が病変周囲から積極的に再生している像と見做された。神経線維の再生像は活動期潰瘍には認められず, 治癒期潰瘍にのみ認められ, 再生が線維化に遅れて生じているものと思われた。

潰瘍底の線維化層ではしばしば, 神経が紐状に集束した像 (Cord-like configuration) が見出されたが, ひとつは軸索瘤が認められる神経の密な再生像であり, もうひとつは, 軸索瘤の消失した変性腫大した神経の集束像である。それらの所見は, ラット急性胃潰瘍モデルにおいても, あるいは, 活動期ヒト胃潰瘍例にも認められない所見である。前者は明かな神経再生像であるが, 後者は神経末梢部が破壊されたために生じた所見であると思われる。慢性胃潰瘍病変には両者が種々の程度に混在していたが, 潰瘍周辺から神経線維再生と潰瘍の活動性を反映しているのかもしれない。また, 潰瘍病変での神経線維の減少ないし消失あるいは潰瘍病変周辺における神経分布の変化が, 胃蠕動運動の局所的異常をもたらすことは容易に理解されよう。

一方, 潰瘍病変周辺の再生粘膜には何れのペプチド含有神経も見出せなかった。しかしながら, 潰瘍が再生上皮に被覆された粘膜には少数の VIP, SP 含有神経が見出され, 潰瘍周辺から中心部に向かってその分布密度を減じていた。従って, 神経線維の再生は上皮の再生にかなり遅れて生じるものと見做されるが, その神経線維は潰瘍直下に分布していた Meissner 神経叢ではなく, 潰瘍周辺のそれに由来するものと見做された。この様に, 再生上皮において神経分布が乏しいことは, 血流調節の面から見ても, 胃酸の侵襲を再度, 受け安い状態と見做された。

本研究により, 急性潰瘍病変発症および, ヒト慢性胃潰瘍の再生にこれらのペプチド含有神経が関与している可能性が示唆された。ペプチド含有神経の再生, 分布様式から, 神経ペプチドが胃粘膜の保護に何等かの役割を演じているものとも推察される。

4) 慢性胃炎, 胃腺腫, 胃癌等の病的状況下におけるペプチド含有神経の変化

神経ペプチドの中で, 特に粘膜に豊富に分布する

VIP, SP, ボンペンシン, ソマトスタチン含有神経がヒト胃特有の病変である萎縮, 腸上皮化生, 癌において如何なる変化を示すかは十分に解明されていない^{31,34,75}。本研究において, ヒト萎縮性胃粘膜では, 神経線維の不規則な走行と分布が示され, 萎縮が進行するとすべてのペプチド含有神経は減少して認められた。従って, 萎縮性胃炎では腺管の走行との関係はなく, むしろ毛細血管壁に沿って分布している可能性が示唆される。例外として, 萎縮性胃炎の初期にはペプチド含有神経の数はやや増加傾向にあった。Bishop⁴¹はクローン病においてVIP含有神経の数の増加を示している。

腸上皮化生粘膜では, SP含有神経が表層部杯細胞周辺に分布する像が見い出され, 正常粘膜のみならずここでもSP含有神経が粘液産生細胞に何等かの影響を及ぼしているものと推測された。Ito²⁷は, グリセンチン含有(L)細胞が進展しつつある腸上皮化生粘膜に豊富に存在することを報告したが, L細胞が多数存在する部位にはSP含有神経は少なく, 逆に, グリセンチン(L)細胞が少ない部位ではSP含有神経が豊富に分布していた。こうした結果をふまえると, 腸上皮化生粘膜を含む萎縮性胃炎粘膜においては, 神経線維と内分泌細胞に含まれるペプチドは各々相補的に粘膜上皮に作用し, 胃酸分泌抑制, 粘膜上皮への増殖作用を發揮しているものと推察された。換言すれば, これらの病的胃粘膜ではかかるペプチドによる調節の不均衡が生じているものとも考えられる。

近年, 各種ペプチドと末梢リンパ球, マクロファージとの免疫学的関連について, *in vitro* の実験系で多くの報告がある^{46,56,57}。本研究では, リンパ濾胞形成性胃炎において洞内にペプチド含有神経は見い出されず, 組織学的な両者の関連は見い出せなかった。また, リンパ球浸潤の強い胃粘膜ではペプチド含有神経は減少していた。従って, 胃粘膜固有層内において, 浸潤リンパ球に対する神経ペプチドの関与については明らかにし得なかった。

胃腺腫は境界領域病変あるいは前癌病変として注目されており, 近年では異形成(dysplasia)粘膜として捉えられている。Ito²⁶は胃管状腺腫では内分泌細胞が高頻度に認められることを明らかにし, 内分泌細胞が胃腺腫の構成細胞の一つであることを明らかにした。しかし, 本研究では症例数が少ないものの, 胃腺腫内にはペプチド含有神経が著しく減少ないし消失していた。即ち, 胃腺腫はペプチド含有神経の消失で特徴付けられる病変である。このように, 内分泌細胞と神経線維の分布の逆相関は, 腸上皮化生を含む慢性萎

縮性胃炎の進展している胃粘膜でも見い出されておらず, 胃腺腫の発生と胃炎粘膜との関連を示唆している。神経系に含まれるペプチドの欠如が胃腺腫の発生, 増殖あるいは進展に如何なる役割を果たしているかどうか, 興味ある課題である。

一方, 胃癌組織においてもペプチド含有神経の分布は減少した。癌の組織学的分化度の面から検討すると, 低分化腺癌では, 何れのペプチド含有神経も種々の程度に残存していた。他方, 高分化ないし中分化腺癌では, VIP含有神経が少数認められるものの, 他のペプチド含有神経は全く認められなかった。こうした組織型における差異は, 癌の増殖, 浸潤の過程の差によるものと推察された。即ち, 低分化腺癌はスキルス胃癌を除けば, 既存の間質内を浸潤するのに対し, 後者の分化型腺癌は膨張性, 圧排性に増殖するため, 既存の間質が利用されていないためとも考えられる。

この内, 低分化腺癌では, 奇異な形態を示すVIP含有神経が比較的多数見い出された。非腫瘍部では同程度の分布密度を示すボンペンシン含有神経は減少し, しかも形態の異常は示していない。かかる差異が如何なる因子により規定されているかは明らかにし得なかった。また, 分化型腺癌でペプチド含有神経が減少することは, 同様にペプチド含有神経が減少ないし消失していた腸上皮化生粘膜および胃腺腫との関連を示唆しているのかもしれない。次に, 胃癌組織において免疫活性の消失したペプチド, すなわち, SP, ボンペンシン, ソマトスタチンが癌の増殖, 進展に何等かの影響を及ぼしている可能性が考えられる。神経ペプチドの中にはボンペンシンの如く腫瘍増殖因子として働くものや^{9,61}, β エンドルフィン, ソマトスタチンのように腫瘍増殖抑制効果^{67,71}を示すものがある。また, Sporn⁶⁹は, 腫瘍増殖におけるAutocrine的調節を報告し, その中で, これらの神経ペプチドの腫瘍に対する作用を論じ, Zaidi⁸¹らもCGRPが非甲状腺腫瘍で産生されていることを報告した。さらに, VIP, SP, ソマトスタチンは末梢リンパ球, マクロファージ活性化^{55,56}との関連が見い出されており, 担癌組織の免疫機構を介して間接的に癌の増殖に何等かの役割を演じている可能性も考えられた。これらのペプチドの*in vivo*における胃癌増殖に対する役割, 意義は今後の研究課題として残されている。

謝 辞

稿を終るにあたり, 終始懇切なる御指導, 御校閲を賜りました恩師, 広島大学医学部内科学第一講座, 梶山梧朗教授と同病理学第一講座, 田原栄一教授に深

甚なる謝意を表します。また, 本研究にあたり直接御指導を賜りました第一病理学教室, 井藤久雄先生に感謝します。また, 終始御援助, 御支援頂いた第一内科教室, 松浦秀夫先生, 井野口外科病院長井野口千秋先生, 梶川病院院長梶川憲治先生さらに各教室の諸先生, 技術員の皆様に感謝します。

本研究の要旨は第9回ガットホルモンカンファレンス(昭和62年8月), 第77回日本病理学総会(昭和63年4月), 第7回国際ガットホルモンカンファレンス(昭和63年11月), 第47回日本癌学会総会(昭和63年9月), 第78回日本病理学会総会(平成1年3月), 第10回ガットホルモンカンファレンス(平成1年8月)において発表した。

参 考 文 献

- Andrzej, M. S., Befus, D. and Bienenstoch, J. 1986. Differential effects of vasoactive intestinal peptide, substance P, and somatostatin on immunoglobulin synthesis and proliferations by lymphocytes from Peyer's patches, mesenteric lymph nodes, and spleen. *J. Immunol.* 136: 152-156.
- Bauerfeind, P., Hof, R., Hof, A. and Cucala, M. 1989. Effects of hCGRP I and II on gastric blood flow and acid secretion in anesthetized rabbits. *Am. J. Physiol.* 256: G145-G149.
- Bertaccini, G., Erspamer, V. and Impicciatore, M. 1973. The actions of bombesin on gastric secretion of the dog and rat. *British. J. Pharmacol.* 49: 437-444.
- Bishop, A. E., Polak, J. M., Bryant, M. G., Bloom, S. R. and Hamilton, S. 1980. Abnormalities of vasoactive intestinal polypeptide-containing nerves in Crohn's disease. *Gastroenterology* 79: 853-860.
- Bloom, S. R. and Edwards, A. V. 1982. Recent physiological studies of the alimentary autonomic innervation. *Scand. J. Gastroenterology* 71 (suppl.): 76-89.
- Broyart, J.-P., Dupont, C., Laburthe, M. and Rosselin, G. 1981. Characterization of vasoactive intestinal peptide receptors in human colonic epithelial cells. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 52: 715-721.
- Buffa, R., Solovieva, I., Fiocca, R., Giorgino, R., Rindi, G., Solcia, E., Mochizuchi, T., Yanaihara, C. and Yanaihara, N. 1982. Localization of bombesin and GRP (Gastrin releasing peptide) sequences in gut nerves or endocrine cells. *Histochemistry* 76: 457-467.
- Costa, M., Buffa R., Furness, J. B. and Solcia, E. 1980. Immunohistochemical localization of polypeptides in peripheral autonomic nerves using whole mount preparations. *Histochemistry* 65: 157-165.
- Cuttitta, F., Carner, D. N., Mulshine, J., Moddy, T. W., Fedorko, J., Fischler, A. and Minna, J. D. 1985. Bombesin-like peptides can autocrine growth factors in human small-cell lung cancer. *Nature* 316: 823-826.
- Danek, A., O'doriso, M. S., O'doriso, T. M. and George, J. M. 1983. Specific binding sites for vasoactive intestinal polypeptide on nonadherent peripheral blood lymphocytes. *J. Immunol.* 131: 1173-1177.
- Dockray, G. J. and Sharkey, K. A. 1986. Neurochemistry of visceral afferent neurons, p.133-148. *In* F. Cervero and J. F. B. Morrison (eds.), *Progress in brain research. Visceral sensation.* 67. Elsevier, Publisher, New York.
- Ekblad, E., Ekelund, M., Graffner, H., Håkanson, R. and Sundler, F. 1985. Peptide-containing nerve fibers in the stomach wall of rat and mouse. *Gastroenterology* 89: 73-85.
- Ekblad, E., Håkanson, R., Sundler, F. and Wahlestedt, C. 1985. Galanin: neuromodulatory and direct contractile effects on smooth muscle preparations. *Br. J. Pharmacol.* 86: 241-246.
- 遠藤武男(編)1990. 神経ペプチド. 日本臨床48. 日本臨床社, 東京.
- Furness, J. B. and Costa, M. 1980. Types of nerves in the enteric nervous system. *Neuroscience* 5: 1-20.
- Furness, J. B., Llewellyn-Smith, I. J., Bornstein, J. C. and Costa, M. 1988. p.161-218. *In* A. Bjöklund., T. Hökfelt., C. Owman (eds.), *Handbook of chemical neuroanatomy. The peripheral nervous system.* 6. Elsevier, Publisher, Amsterdam/New York/Oxford.
- Gerson, M. D. and Erde, S. M. 1981. The nervous system of the gut. *Gastroenterology* 80: 1571-1594.
- Grinder, J. R., Arimura, A. and Marklough, G. M. 1987. Role of somatostatin neurons in intestinal peristalsis: facilitatory interneurons in descending pathways. *Am. J. Physiol.* 253: G4349-G4354.
- Gunn, M. 1968. Histological and histochemical observations on the myenteric and

- submucous plexuses of mammals. *J. Anat.* 102: 223-239.
20. Hægerstrand, A., Jonzon, B. and Dalsgaard, C.-J., Nilsson J. 1989. Vasoactive intestinal polypeptide stimulates cell proliferation and adenylate cyclase activity of cultured human keratinocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 86: 5993-5996.
 21. Hernandez, D. E. 1986. Neuroendocrine mechanisms of stress ulceration: Focus on thyrotropin releasing hormone (TRH). *Life Sci.* 39: 279-296.
 22. Holst, J. J., Knuhtsen, S., Orskov, C., Skak-Nielsen, T., Poulsen, S. S. and Nielsen, O. V. 1987. GRP producing nerves control antral somatostatin and gastrin secretion in pigs. *Am. J. Physiol.* 16: G767-G774.
 23. Hökfelt, T., Johansson, O., Ljungdahl, A., Lundberg, J. M. and Schltzberg, M. 1980. Peptidergic neurons. *Nature* 284: 515-521.
 24. Hultgardh-Nilsson, A., Nilsson, B., Jonzon, B. and Dalsgaard, C.-J. 1988. Growth-inhibitory properties of vasoactive intestinal polypeptide. *Reg. Pep.* 22: 267-274.
 25. 胃癌研究会(編) 1985. 外科病理. 胃癌取扱い規約. 改訂第11版. 金原出版株式会社, 東京.
 26. Ito, H., Hata, J., Yokozaki, H., Nakatani, H., Oda, N. and Tahara, E. 1986. Tubular adenoma of the human stomach. An immunohistochemical analysis of gut hormones, serotonin, carcinoembryonic antigen, secretory component, and lysozyme. *Cancer* 58: 2264-2272.
 27. Ito, H., Yokozaki, H., Hata, J., Mandai, K. and Tahara, E. 1984. Glicentin-containing cells in intestinal metaplasia, adenoma and carcinoma of the stomach. *Virchows Arch. (Pathol. Anat.)* 404: 17-29.
 28. Ito, H. and Thara, E. 1983. Immunohistochemical study on G and D cells in the human resected stomach, p.180-187. In A. Miyoshi (ed.), *Gut peptides and ulcer*. Biochemical Research Foundation, Tokyo.
 29. Ito, H., Yokozaki, H., Tokumo K., Nakajo, S. and Tahara, E. 1986. Serotonin-containing EC cells in normal human gastric mucosa and in gastritis. Immunohistochemical, electron microscopic and autoradiographic studies. *Virchows Arch. (Pathol. Anat.)* 409: 313-323.
 30. Ito, H., Kato, Y., Yokozaki, H. and Tahara, E. 1988. Peptide-containing nerve in rat stomach: An immunohistochemical study. *Hiroshima J. Med. Sci.* 37: 97-102.
 31. 井藤久雄, 中谷 宏, 加藤芳朗, 田原栄一 1987. ヒト胃壁におけるペプチド含有神経の分布に関する免疫組織化学的検討. *医学のあゆみ* 141: 863-864.
 32. 伊藤信昭 1984. 急性ストレス潰瘍発症起序に関する実験的研究—主として寒冷拘束ラットにおける脳及び胃壁内アミン含有量の経時的変動の知見より—. *広島大学医学雑誌* 32: 709-752.
 33. Iwanaga, T., Mei, Q., Fujita, T. and Yanaihara, N. 1988. Depletion of gastrin-releasing peptide (GRP) from nerves in the gastric body of rats with experimental ulcers. An immunohistochemical study. *Arch. Histol. Cytol.* 51: 121-125.
 34. 加藤芳朗, 井藤久雄, 田原栄一 1988. ヒト胃壁におけるペプチド含有神経の分布と胃炎粘膜での変化, p.1-7. 三好秋馬(編), *消化管ホルモン研究*. (VIII). 医学図書出版株式会社, 東京.
 35. Keast, J. R. 1987. Mucosal innervation and control of water and ion transport in the intestine. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 109: 1-59.
 36. Keast, J. R., Furness, J. B. and Costa, M. 1984. Somatostatin in human enteric nerves. *Cell Tissue Res.* 237: 299-308.
 37. Korman, L. Y., Carney, D. N., Citron, M. L. and Moddy, T. W. 1986. Secretin/vasoactive intestinal peptide-stimulated secretion of bombesin/gastrin releasing peptide from human small cell carcinoma of the lung. *Cancer Res.* 46: 1214-1218.
 38. Kuwahara, A., Ishikawa, T., Mikami, S. and Yanaihara, N. 1983. Distribution of neurons containing immunoreactivity for gastrin releasing peptide (GRP), substance P, and vasoactive intestinal peptide (VIP) in the gastric wall. *Biomed. Res.* 4: 473-478.
 39. 小室輝昌, 藤原隆, 上原康夫 1984. 形態学より見た腸管神経系. *脳神経* 36: 203-219.
 40. Laburthe, M., Rousset, M., Boissard, C., Chevalier, G., Zweibaum, A. and Rosselin, G. 1978. Vasoactive intestinal peptide: A potent stimulator of adenosine 3':5'-cyclic monophosphate accumulation in gut carcinoma cell lines in culture. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 75: 2772-2775.
 41. Langley, J. N. 1900. The sympathetic and other related systems of nerves, p.616-696. In E. A. Schafer (ed.), *Textbook of physiology*. Pentland, Publisher, Edinburgh.
 42. Lee, T. J. F., Saito, A. and Berezin, I. 1984. Vasoactive intestinal polypeptide-like substance: The potential transmitter for

- cerebral vasodilation. *Science* 224: 898-901.
43. Lee, Y., Shiosaka, S., Emson, P. C., Powell, J. F., Smith, A. D. and Tohyama, M. 1985. Neuropeptide-Y like immunoreactive structures in the rat stomach with special reference to noradrenalin neuron system. *Gastroenterology* 89: 118-126.
 44. Lehy, T., Puggio, F., Chariot, J. and Labeille, D. 1986. Stimulating effect of bombesin on the growth of gastrointestinal tract and pancreas in suckling rats. *Gastroenterology* 90: 1942-1949.
 45. Lenz, H. J., Klapdor, R., Hester, S. E., Webb, V. J., Galyean, R. F., Rivier, J. E. and Brown, M. R. 1986. Inhibition of gastric acid secretion by brain peptides in the dog. Role of autonomic nervous system and gastrin. *Gastroenterology* 91: 905-912.
 46. Lotz, M., Vaughan, J. H. and Carson, D. A. 1989. Effect of neuropeptides on production of inflammatory cytokines by human monocytes. *Science* 241: 1218-1221.
 47. 松田昌幸, 青野 充, 森賀本幸 1990. 胃機能に対する中枢性 NPY の作用, p.263-271. 三好秋馬(編), *消化管ホルモン*. (IX). 医学図書出版株式会社, 東京.
 48. Minagawa, H., Shiosaka, S., Inoue, H., Hayashi, N., Kasahara, A., Kamata, T., Tohyama, M. and Shiotani, Y. 1984. Origins and three dimensional distribution of substance P-containing structures on the rat stomach using whole mount tissue. *Gastroenterology* 86: 51-59.
 49. Moyer, M. P., Armstrong, A., Aust, J. B., Levine, B. A. and Sirinek, K. R. 1986. Effect of gastrin, glutamine, and somatostatin on the in vitro growth of normal and malignant human gastric mucosal cells. *Arch. Surg.* 121: 285-288.
 50. Muller, J.-M., El Battari, A., Ah-Kye, E., Luis, J., Ducret, F., Pichon, J. and Marvaldi, J. 1985. Internalization of the vasoactive intestinal peptide (VIP) in a human adenocarcinoma cell lines (HT29). *Eur. J. Biochem.* 152: 107-114.
 51. Nakane, P. K. 1975. Recent progress in the peroxidase-labeled antibody method. *Ann. NY. Acad. Sci.* 254: 203-211.
 52. Nilsson, J., von Euler, A. M. and Dalsgaard, C.-J. 1985. Stimulation of connective tissue cell growth by substance P and substance K. *Nature* 315: 61-63.
 53. 西 重夫, 清野 裕, 石田 均, 瀬野倫代, 田港朝彦, 井村裕夫. 1985. ソマトスタチンの薬理, 生理作用. *消化管. 最新医学* 40: 945-951.
 54. Oda, M., Nakamura, M., Kaneko, K. and Tsuchiya, M. 1988. Aminergic and peptidergic innervation of the gastric mucosa its possible relevance to ulcerogenesis, p.79-104. In S. Watanabe, M. Wolff and S. Sommers (eds.), *Digestive disease pathology*. Field and Wood Inc, Publisher, Philadelphia.
 55. Ottaway, C. A. and Greenberg, G. R. 1984. Interaction of vasoactive intestinal peptide with mouse lymphocytes: specific binding and the modulation of mitogen responses. *J. Immunol.* 134: 417-423.
 56. Payan, D. G. and Goetzl, E. J. 1985. Modulation of lymphocyte function by sensory neuropeptides. *J. Immunol.* 135: 783s-786s.
 57. Pernow B. 1985. Role of tachykinins in neurogenic inflammation. *J. Immunol.* 135: 812s-815s.
 58. Powell, D. and Skrabanek, P. 1981. Substance P, p.396-401. In S. R. Bloom and J. M. Polak (eds.), *Gut hormones*. Churchill Livingstone, Publisher, Edinburgh.
 59. Prieto, J. C., Laburthe, M. and Rosselin, G. 1979. Interaction of vasoactive intestinal peptide with isolated epithelial cells from rat. *Eur. J. Biochem.* 96: 229-237.
 60. Rokaeus, A., Melander, T., Hökfelt, T., Lundberg, J. M. and Tatemoto, K., Carlquist, M. and Mutt, V. 1984. A galanin-like peptide in the central nervous system and intestine of the rat. *Neurosci. Lett.* 47: 161-166.
 61. Rozenfurt, E. and Sinnott-Smith, J. 1983. Bombesin stimulation of DNA synthesis and cell division in cultures of Swiss 3T3 cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 80: 2936-2940.
 62. Said, S. I. 1981. VIP Overview, p.379-384. In S. R. Bloom and J. M. Polak (eds.), *Gut hormones*. Churchill Livingstone, Publisher, Edinburgh.
 63. 崎田隆夫, 福富久之 1971. 胃潰瘍の診断, p.199-208. 吉利和(編), *胃十二指腸潰瘍のすべて*. 内視鏡診断. 南江堂, 東京/京都.
 64. Scheuermann, D. W., Stach, W. and Timmermans, J.-P. 1988. Morphology and immunohistochemistry of the enteric nervous system in the porcine small intestine. *Acta. Gastroenterol. Belg.* 51: A3.
 65. Schnuerer, E. M., McDonald, T. J. and Dupre, J. 1987. Inhibition of insulin release by galanin and gastrin-releasing peptide in the anaesthetized rat. 1987. *Reg. Pep.* 18: 307-320.

66. Schubert, M. L. and Makhlof, G. M. 1987. Neural regulation of gastrin and somatostatin secretion in rat gastric antral mucosa. *Am. J. Physiol.* 253 : G721-G725.
67. Setyono-Han, B., Henkelman, M. S., Foekens, J. A., and Klijn, J. G. M. 1987. Direct inhibitory effects of somatostatin (Analogues) on the growth of human breast cancer cells. *Cancer Res.* 47 : 1566-1570.
68. Skak-Nielsen, T., Poulsen, S. S. and Holst, J. J. 1987. Immunohistochemical detection of ganglia in the rat stomach serosa, containing neurons immunoreactive for gastrin-releasing peptide and vasoactive intestinal peptide. *Histochemistry* 87 : 47-52.
69. Sporn, M. and Roberts, A. B. 1985. Autocrine growth factors and cancer. *Nature* 313 : 745-747.
70. Sternberger, L. A. 1979. Immunohistochemistry. 2nd ed. John Wiley and Sons Inc., Chichester.
71. Tahara, E., Shimamoto, F., Taniyama, K., Ito, H., Kosako, Y. and Sumiyoshi, H. 1982. Enhanced effect of gastrin on rat stomach carcinogenesis induced by N-Methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine. *Cancer Res.* 42 : 1781-1787.
72. Tahara, E. and Haizuka, S. 1975. Effect of gastro-entero-pancreatic endocrine hormones on the histogenesis of gastric cancer in rat induced by N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine; with special reference to development of scirrhous gastric cancer. *Gann* 66 : 421-426.
73. Tari, A., Miyachi, Y., Hide, M., Sumii, K., Kajiyama, G., Tahara, E., Tanaka, K. and Miyoshi, A. 1985. β Endorphin like immunoreactivity and somatostatin like immunoreactivity in normal gastric mucosa, muscle layer, and adenocarcinoma. *Gastroenterology* 88 : 670-674.
74. Timmermans, J.-P., Scheuermann, D. W. Stach, W., Adriaensen, D. and De Groodt-Lasseel, M. H.-A. 1990. Distinct distribution of CGRP-, enkephalin-, galanin-, neuromedin U-, neuropeptide Y-, somatostatin-, substance P-, VIP- and serotonin-containing neurons in the two submucosal ganglionic neural networks of the porcine small intestine. *Cell Tissue Res.* 260 : 367-379.
75. Tsutsumi, Y. and Hara, M. 1989. Peptidergic nerve fibers in human stomach and duodenal bulb: Immunohistochemical demonstration of changes in fibers distribution in chronic gastritis. *Biomed. Res.* 10 : 209-216.
76. Vinga, S. R., Giraud, A., Soll, A. H., Walsh, J. H. and Mantyh, P. W. 1987. Characterization of bombesin receptors on canine gastrin cells. *Reg. Pep.* 19 : 144.
77. Von Hoff, D. and Forseth, B. 1982. Modulation of growth of human and murine tumors by human β endorphin. *Proc. Am. Ass. Cancer Res.* 23 : 236.
78. Wattchow, D. A., Furness, J. B. and Costa, M. 1988. Distribution and coexistence of peptides in nerve fibers of external muscle of the human gastrointestinal tract. *Gastroenterology* 95 : 32-41.
79. Wiik, P., Opstad, P. K. and Bøyum, A. 1985. Binding of vasoactive intestinal polypeptide (VIP) by human blood monocytes: demonstration of specific binding sites. *Reg. Pep.* 12 : 145-153.
80. 矢内原昇 1984. 神経ペプチド, 蛋白質, 核酸, 酵素 29 : 1375-1392.
81. Zaidi, M., Breimer, L. H. and MacIntyre, I. 1989. Production of calcitonin gene-related peptide from human cancer cells. *J. Endocrinol.* 123 : 159-165.

Explanation of Photoplates

Fig. 1. Distribution of various peptides-containing neurons in normal fundic mucosa of the rat stomach. a : A large number of VIP-containing nerve fibers run along the fundic glands. $\times 160b$; A few bombesin-containing neurons run along the fundic glands. $\times 160c$; CGRP-containing nerve fibers were distributed near the mucous epithelium. (arrow; CGRP-containing nerve fiber) $\times 180d$; SP-containing nerve fibers are sparsely present in the mucosa. $\times 240$

Fig. 2. Distribution of peptide-containing nerve fibers in the submucosa of the rat stomach. a : CGRP-containing nerve fibers around vascular wall. $\times 240b$; Galanin-containing nerve fibers in the submucosa of the rat stomach. $\times 240$

Fig. 3. VIP-containing nerve fibers in the muscle layers of the rat stomach. $\times 240$

Fig. 4. Whole mount preparation of the rat muscle layers. a : CGRP-containing nerve fibers form dense network between muscle layers. $\times 300b$; VIP-containing nerve fibers are present in the myenteric plexus. $\times 240$

Fig. 6. Gastric ulcers of the rat stomach induced by cold stress. a : A macroscopic photograph showing acute gastric ulcer. (arrows) $\times 2b$; A microscopic photograph showing acute gastric lesion. $\times 80$

Fig. 7. Peptide-containing nerve fibers in acute gastric ulcer of the rat stomach induced by cold stress. a : No VIP-containing nerve fibers are present in the ulcer lesion. (Arrows surround the gastric ulcer lesion.) $\times 80b$; No bombesin-containing neurons are present in the ulcer lesion. (Arrows surround the gastric ulcer lesion.) $\times 80$

Fig. 8. Macroscopic (a) and microscopic (b) photographs of the rat stomach 12 hours after the cold stress. a : Arrows show bleeding spots (ulcer lesions). $\times 2b$; Microscopic observations show no obvious changes in comparison with Figure 6b. $\times 80$

Fig. 9. Peptide-containing nerve fibers in gastric ulcer lesion of the rat stomach 12 hours after the stress. a : VIP-containing nerve fibers are present in the mucosal ulcer lesion. $\times 80b$; Bombesin-containing nerve fibers in the mucosal ulcer lesion. $\times 80$

Fig. 10. Peptide-containing nerve fibers in the human gastric mucosa. a : VIP-containing nerve fibers are present along pyloric glands. $\times 80b$; SP-containing nerve fibers in pyloric glands area. $\times 120c$; Bombesin-containing nerve fibers in fundic glands area. $\times 80d$; Somatostatin-containing nerve fibers in pyloric glands area. $\times 120$

Fig. 11. Somatostatin-containing nerve fibers (SOM-N) and endocrine cells. a : Somatostatin-containing nerve fibers (arrows) do not contact with somatostatin-containing (D) cells (small arrow head) and gastrin-containing (G) cells (large arrow head). Double staining preparation. $\times 150b$; Somatostatin-containing nerve fibers and somatostatin-containing (D) cell. (arrow: somatostatin-containing nerve, arrowhead: somatostatin-containing (D) cells) $\times 150$

Fig. 12. VIP-containing nerve fibers around blood vessel in the submucosa of the human stomach. $\times 120$

Fig. 13. Immunoreactivities in the submucosal plexus of the human stomach. a : Bombesin-immunoreactivity in the plexus submucosus internus (Meissner's plexus). $\times 120b$; SP-immunoreactivity in the plexus submucosus externus (Schabadasch'plexus). $\times 150c$; Somatostatin-immunoreactivity in the plexus submucosus externus (Schabadasch'splexus). $\times 120d$; VIP-immunoreactivity in the plexus submucosus internus (Meissner's plexus). $\times 120e$; VIP-immunoreactivity in the plexus submucosus externus (Schabadasch's plexus). $\times 150f$; PHI-immunoreactivity in the plexus submucosus externus (Schabadasch's plexus). $\times 120$

Fig. 14. VIP-containing nerve fibers in the muscle layers of the human stomach. $\times 80$

Fig. 15. Somatostatin-immunoreactivity in the myenteric plexus of the human stomach. $\times 120$

Fig. 16. Auerbach's plexus of the human stomach displayed by whole mount preparation: a : Primary component (Large arrowhead), internodal strands (arrows) and VIP-immunoreactive nerve cell bodies (small arrow heads) are observed. $\times 100b$; VIP-immunoreactive nerve cell bodies and nerve fibers. $\times 80c$; VIP con-

taining neurons distribute around both immunoreactive and non-immunoreactive nerve cell bodies. $\times 120d$; SP-immunoreactive nerve cell bodies and nerve fibers. $\times 120e$; Bombesin-immunoreactive nerve cell bodies and nerve fibers. $\times 240f$; NPY-immunoreactive nerve cell bodies and nerve fibers. $\times 120g$; CGRP-immunoreactive internodal strands and nerve fibers are seen around non-immunoreactive nerve cell bodies (Arrow). $\times 80h$; Somatostatin-immunoreactive nerve fibers are seen around non-immunoreactive nerve cell body. $\times 240$

Fig. 18. Peptide-containing nerve fibers run transversely in the atrophic gastritis mucosa. a: VIP-containing nerve fibers. $\times 240b$; SP-containing nerve fibers. $\times 240c$; Somatostatin-containing nerve fibers and endocrine cells. $\times 150$

Fig. 19. SP-containing nerve fibers anchor the mucosal goblet cells in intestinal metaplasia. $\times 240$

Fig. 20. Somatostatin-containing nerve fibers run parallel with intestinal metaplastic glands. $\times 180$

Fig. 21. A few SP-containing nerve fibers are detected in the metaplastic mucosa having numerous glicentin-containing (L) cells. Double staining preparation. $\times 150$

Fig. 22. Wide regenerative nerve bundles containing various peptides in the chronic peptic ulcer. a: VIP-immunoreactive nerve bundles. $\times 75b$; SP-immunoreactive nerve bundles, (a and b): mirror image sections. $\times 75c$; Bombesin-containing nerve bundles. $\times 75$

Fig. 23. Cord-like configuration of peptide-containing neurons in the chronic peptic ulcer of the human stomach. a: VIP-containing nerve fibers. $\times 75b$; SP-containing nerve fibers. $\times 75c$; Bombesin-containing nerve fibers. $\times 75$

Fig. 24. Augmentation of various peptides-immunoreactivities is observed in the myenteric plexus of the human stomach of chronic peptic ulcer. a: VIP-immunoreactive nerve cell bodies (arrows). $\times 120b$; SP-immunoreactive nerve cell body (arrow). $\times 120c$; Bombesin-immunoreactive nerve cell body (arrow). $\times 120d$; PHI-immunoreactive nerve cell body (arrow). $\times 120$

Fig. 25. Only a few VIP nerves (arrow) are preserved in well differentiated tubular adenocarcinoma of the human stomach. $\times 75$

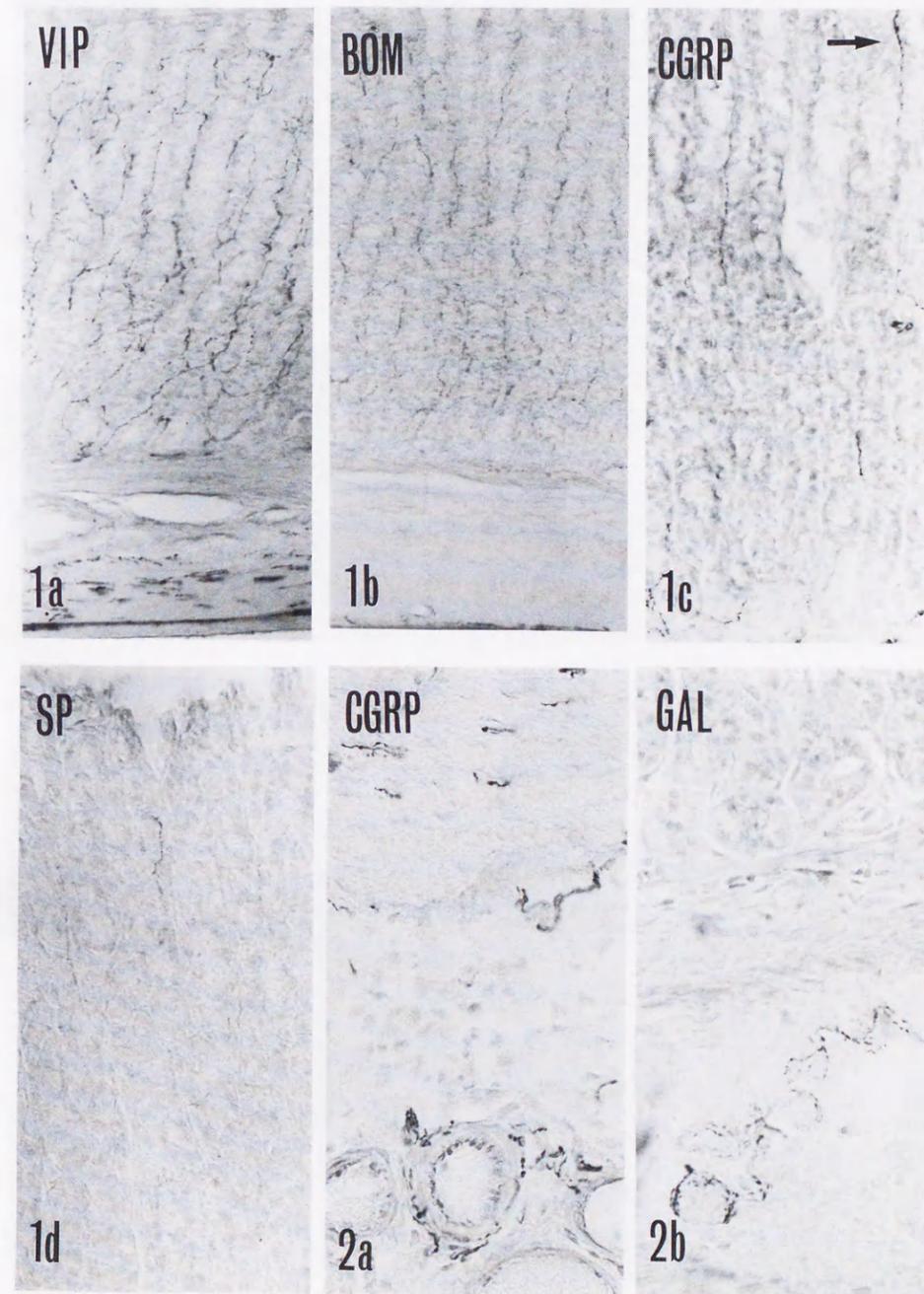
Fig. 26. A few SP-containing nerve fibers are detected in poorly differentiated adenocarcinoma of the human stomach. $\times 120$

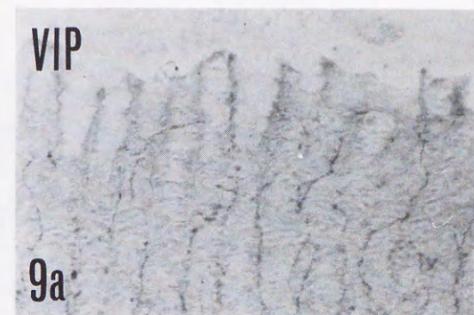
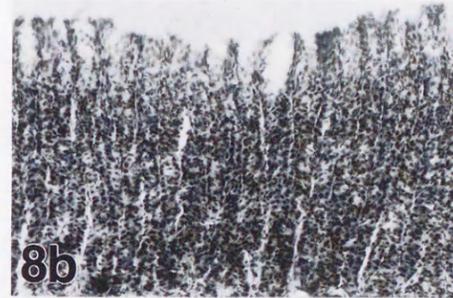
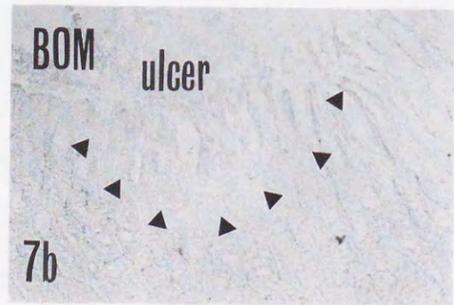
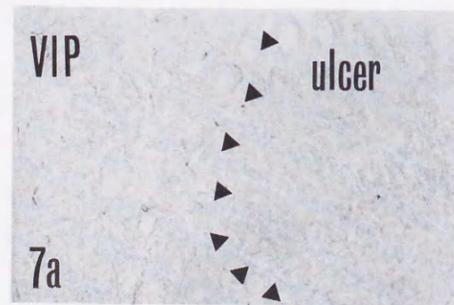
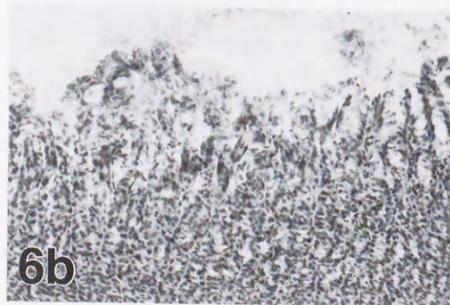
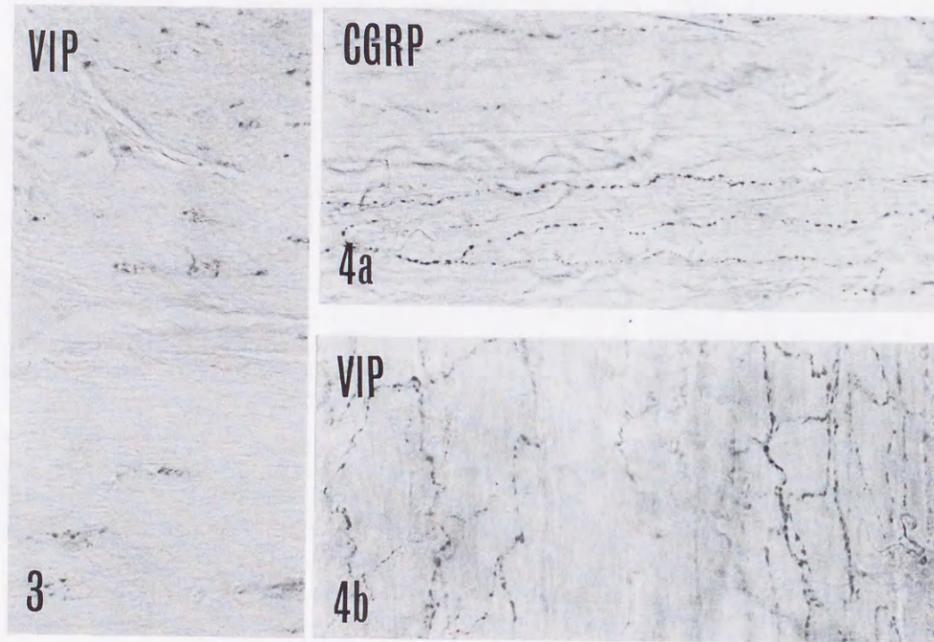
Fig. 27. VIP-containing nerve fibers irregularly distribute in poorly differentiated adenocarcinoma of the human stomach. $\times 75$

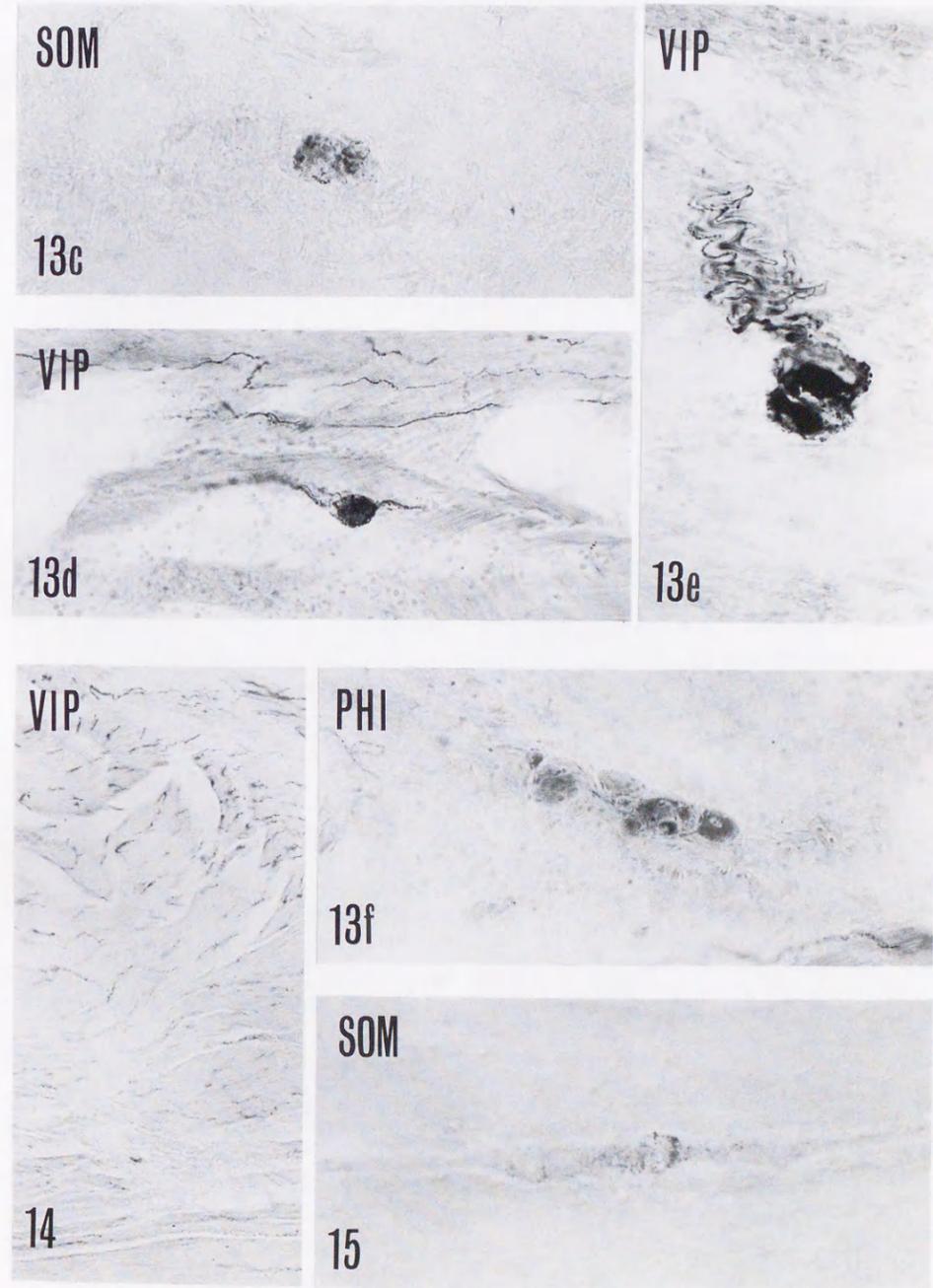
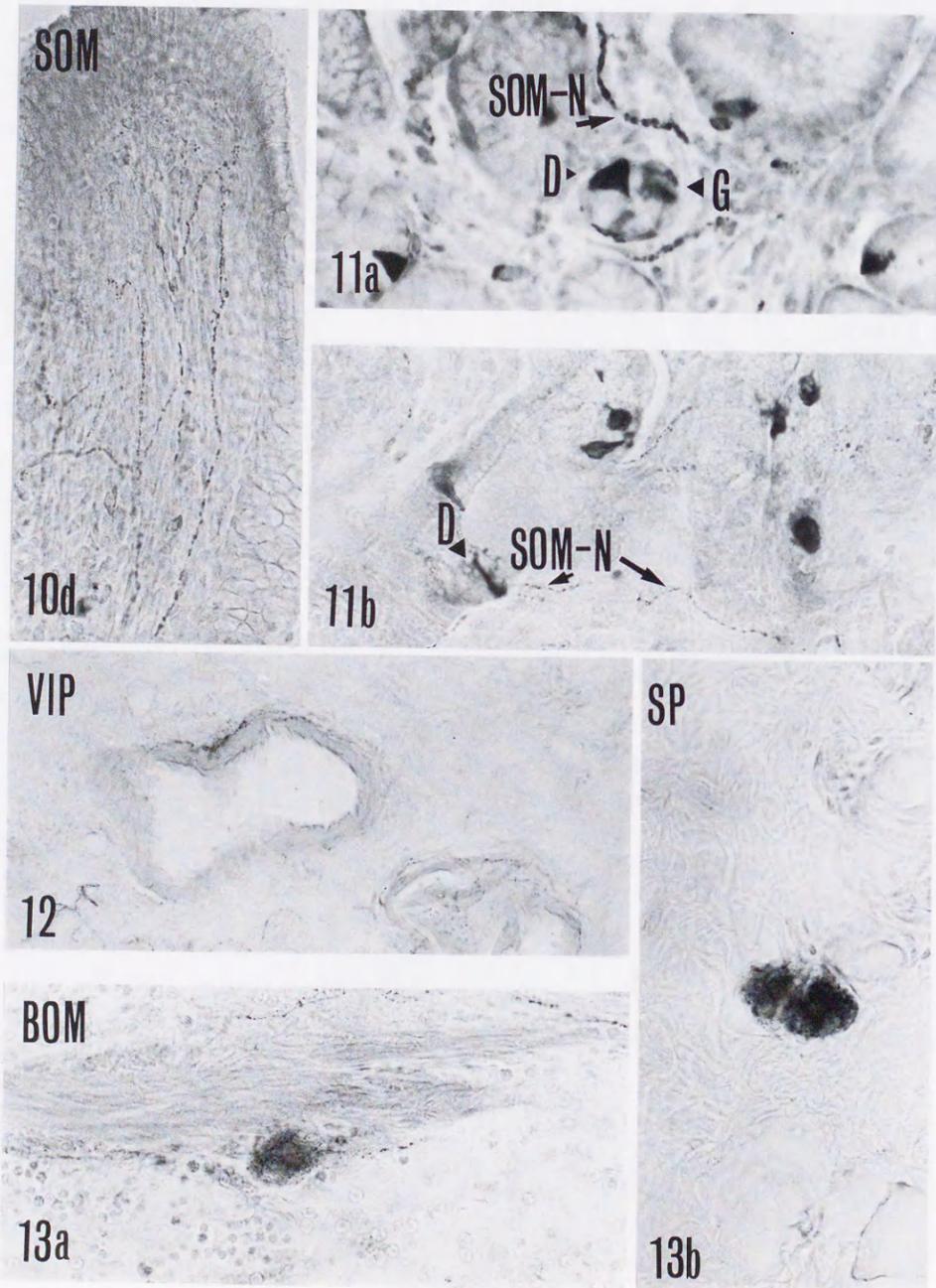
Fig. 28. Bizzare VIP-containing nerve fibers are seen in poorly differentiated adenocarcinoma of the human stomach. $\times 120$

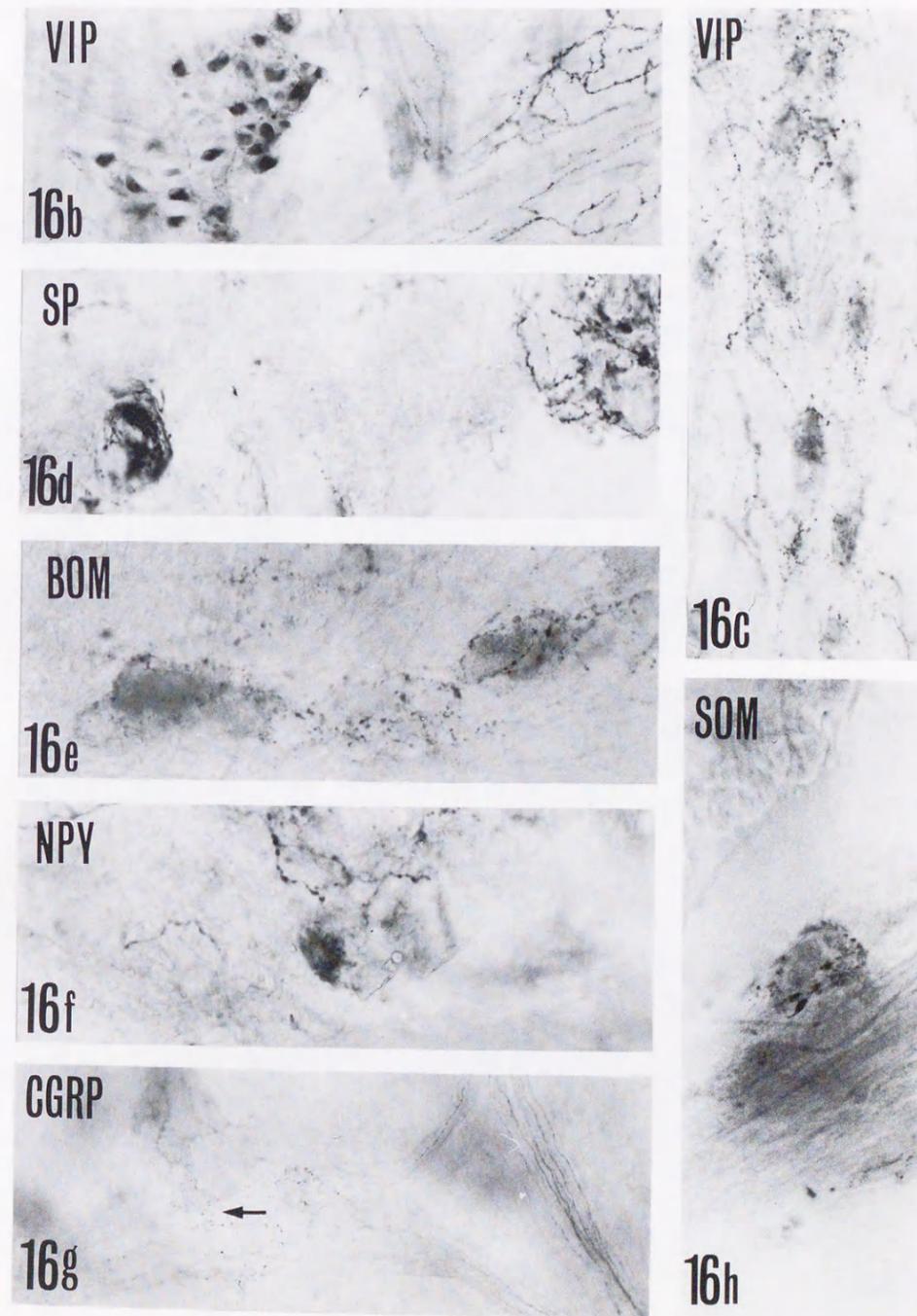
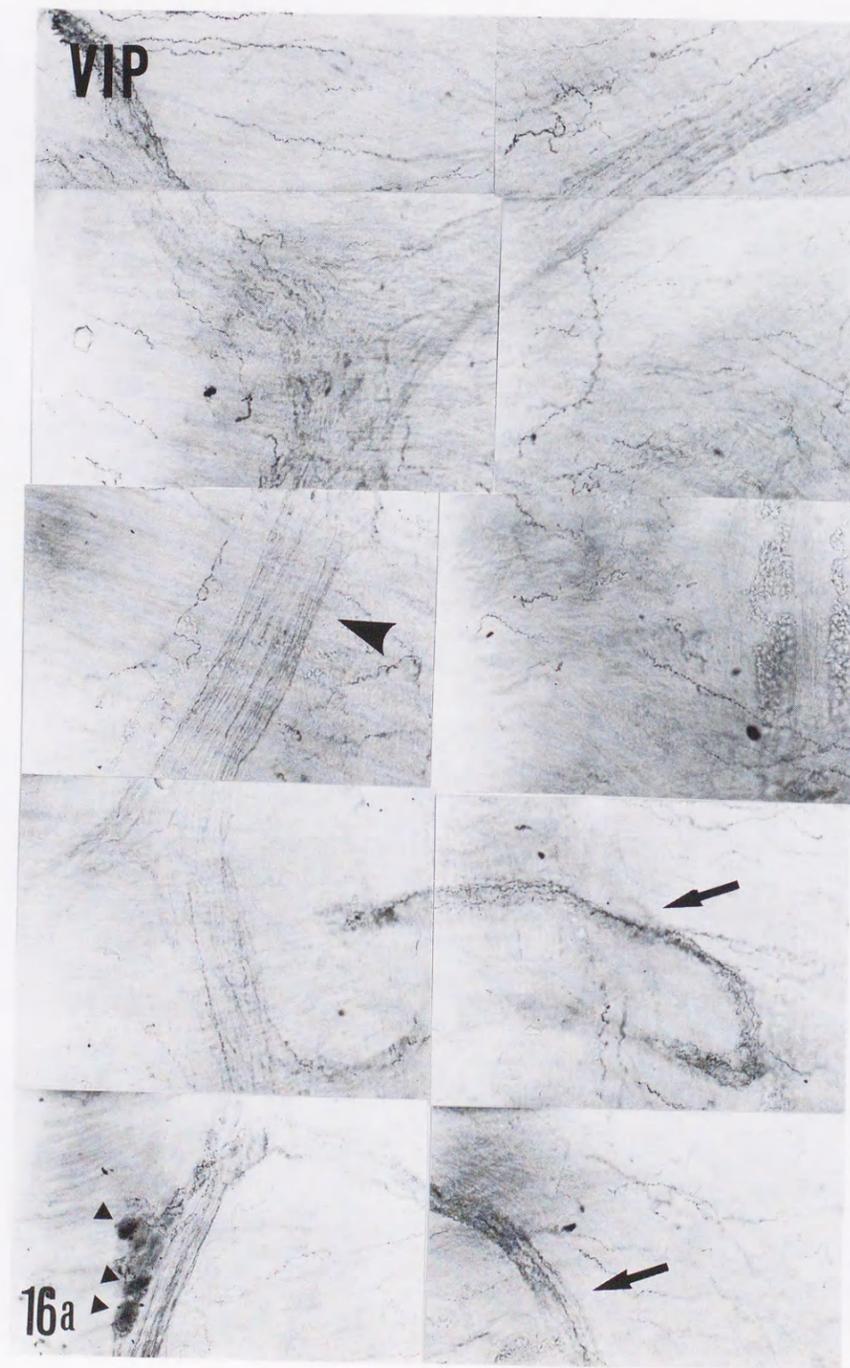
Fig. 29. VIP-containing nerve fibers without varicosities are observed in the myenteric plexus included in advanced gastric cancer. $\times 120$

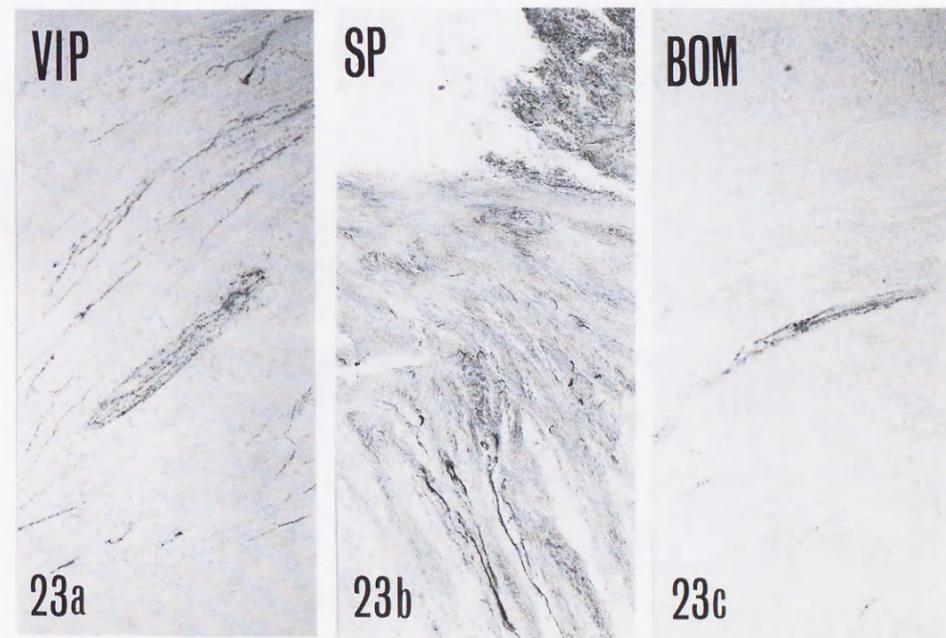
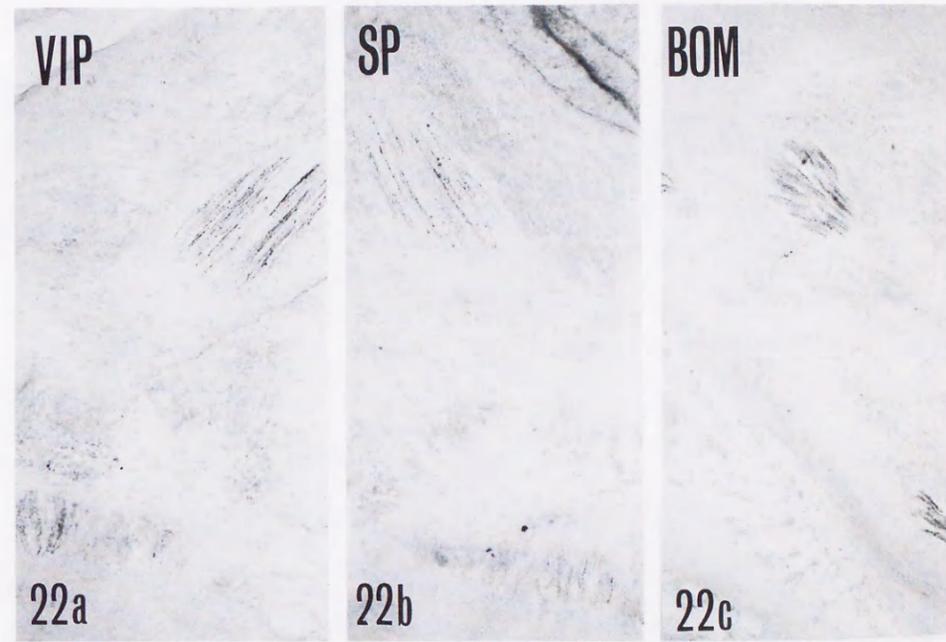
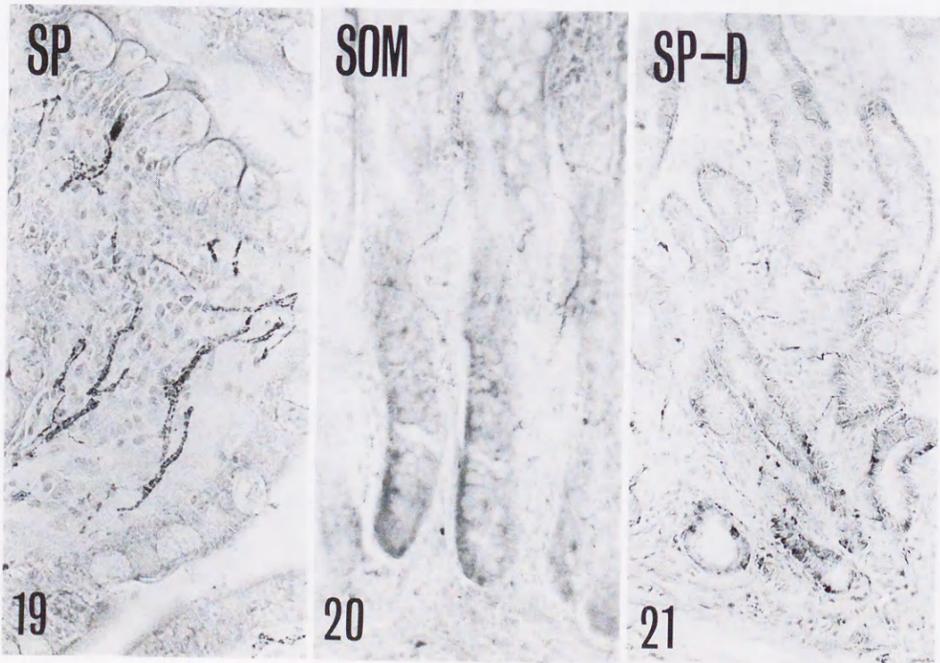
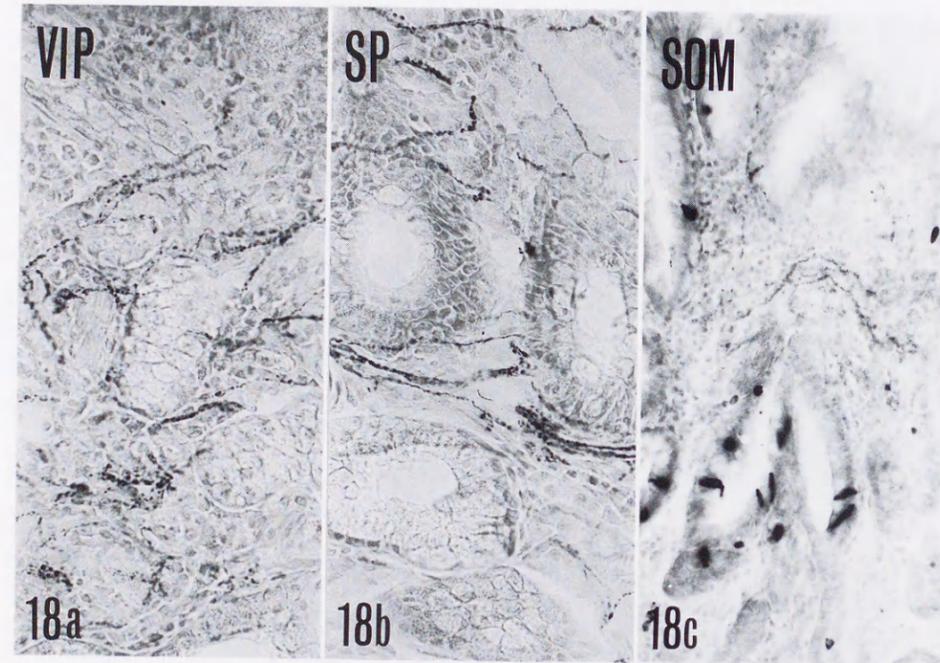
Fig. 30. Cord-like configuration of VIP-containing nerve fibers are seen in poorly differentiated adenocarcinoma of the human stomach. $\times 120$

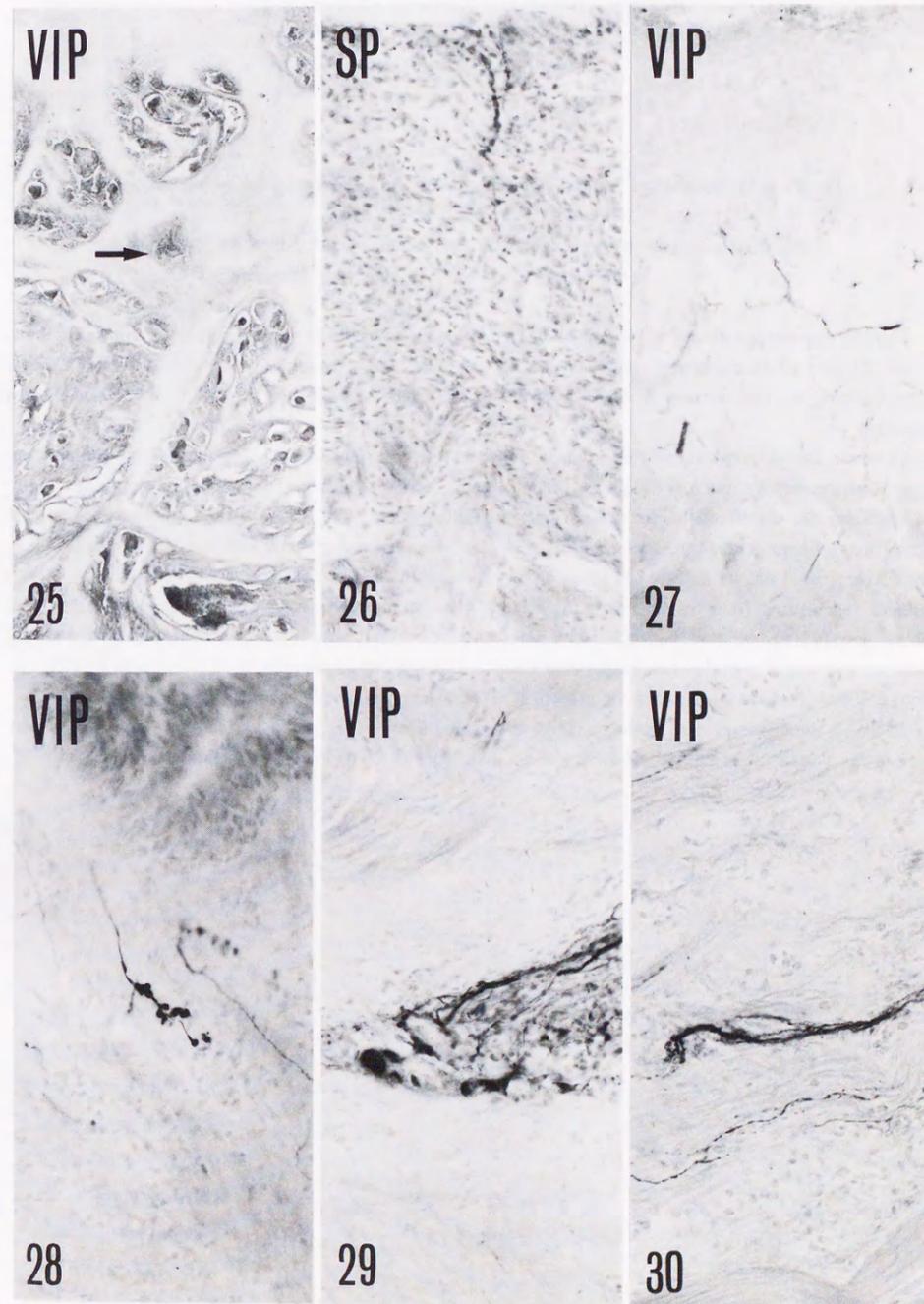
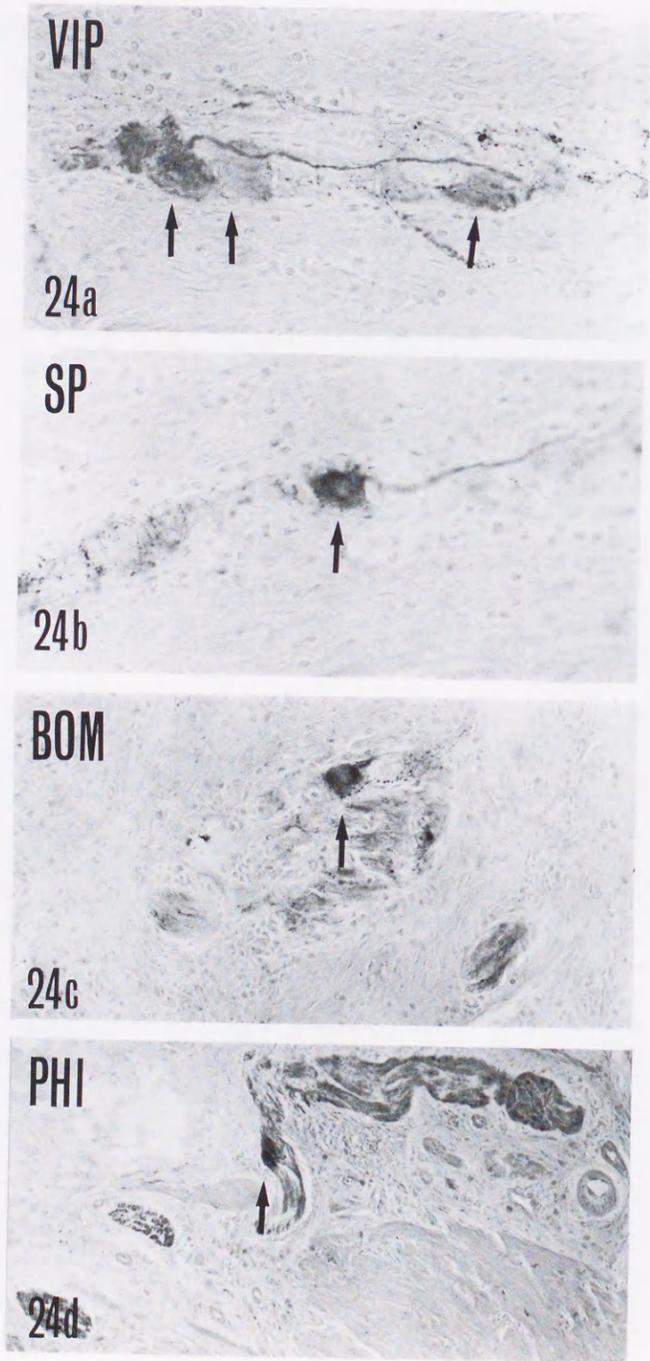












Peptide-containing Neurons of Rat and
Human Stomachs in Normal and Various
Pathologic Conditions

Yoshiro KATO

The First Department of Internal Medicine, Hiroshima University School of Medicine

(Director: Prof. Goro KAJIYAMA)

The First Department of Pathology, Hiroshima University School of Medicine

(Director: Prof. Eiichi TAHARA)

Peptide-containing neurons of rat and human stomachs in normal and various pathologic conditions were examined immunohistochemically using cryostat sections and whole mount preparations. A variety of peptide-containing neurons formed a dense network in all layers including ganglia of both rat and human stomachs.

In whole mount preparations three dimensional structure of Auerbach's nerve plexus and various peptides-immunoreactive nerve cell bodies and fibers could be observed in both human and rat stomachs. Truncal vagotomy did not affect the distribution of peptide-containing nerve fibers in rat stomach. Peptide-containing nerve fibers generally decreased in gastritis and intestinal metaplasia. VIP- and bombesin-containing nerve fibers could not be detected in ulcer lesions induced by cold stress. Nerve fibers containing various peptides regenerated from neighboring ganglion into the chronic ulcer lesions of human stomach. Gastric tubular adenoma and well differentiated adenocarcinoma of human stomach were characterized by the almost complete absence of peptide-containing nerve fibers. VIP- and SP-containing nerve fibers with bizarre configuration and irregular distribution were seen in all the lesions of poorly differentiated adenocarcinomas.

Based on the distribution of various peptides-containing neurons, the pathophysiological roles of these peptides in the regulation of normal stomach and the development of pathologic conditions are discussed.