

大腸腫瘍における神経組織の関与とその意義
についての免疫組織化学的研究

内 山 雅 之

①

大腸腫瘍における神経組織の関与とその意義についての
免疫組織化学的研究

内山 雅之

緒言

消化管は、交感神経と副交感神経の支配を受けているほかに、壁在神経叢を有し、神経線維は縦走筋、輪状筋、血管周囲、粘膜筋板、粘膜とそれぞれ連絡している¹⁾⁻³⁾。粘膜固有層の神経線維は、cryptsの周囲を取り囲み、上皮細胞の基底膜下で神経終末が終っている⁴⁾。腸管の壁在神経系は独立した自律機能を発揮し、交感神経や副交感神経をすべて遮断してもかなりの腸管機能は維持され、運動はもとより消化、吸収機能も営むことができるとされる⁵⁾。

腸管の神経線維はコリン作働性(cholinergic)⁶⁾、アドレナリン作働性(adrenergic)⁷⁾、ペプチド作働性(peptidergic)⁸⁾に分けられる。ペプチド作働性神経線維のneurotransmitterにはvasoactive intestinal peptide(VIP)やsubstance Pなどが知られている。

VIP含有神経組織は全消化管に存在するが、特に下部消化管に豊富に分布しており、また、その50%は粘膜固有層に認められる⁹⁾。大腸の粘膜固有層にはVIP含有神経線維が豊富に認められ、神経終末からVIPが高濃度に分泌されている¹⁰⁾¹¹⁾。

近年、神経系と免疫系は密接な機能的、構造的関連のもとで生体の恒常性を維持しており、neuropeptideを含む神経系が免疫系を制御していることが明らかとなってきている⁴⁾¹²⁾。免疫系の細胞からもneuropeptideが産生され放出されることから、neuropeptideは、生体の生理的機能を調節するということに加えて、非自己(non-self)から生体を防御するという免疫機構を調節するうえでも重要な生体物質であることが注目されるようになった。

VIPは上皮細胞の増殖を制御し¹³⁾⁻¹⁵⁾、in vitroで大腸癌細胞に対しては増殖を抑制し¹⁶⁾、免疫系には抑制的に作用して、immunoregulatory substanceと考えられている¹⁷⁾⁻²⁰⁾。

VIPは腸管だけでなく中枢・末梢神経系に広く分布し、神経伝達物質として作用することが示唆され²¹⁾、消化管に分布する神経終末から高濃度に分泌されている。VIPには平滑筋を弛緩させる作用があり、神経原性に大腸を弛緩させる主要なmediatorの一つであると考えられている²²⁾。

大腸におけるVIP含有神経組織の異常は、炎症性腸疾患(IBD)でBishopら²³⁾、Kochら²⁴⁾、Kubotaら²⁵⁾により報告されている。大腸のVIPは憩室症で増加し

ており、高度の便秘の患者では減少しているとも報告されている²⁶⁾。また、Hirschsprung病患者の無神経節結腸ではVIP含有神経組織の減少が示されている²⁷⁾。

これまで潰瘍性大腸炎、Crohn病、憩室症、便秘症、Hirschsprung病などでVIP含有神経組織の異常が報告されているが、大腸腫瘍における神経組織について、生体組織を用いて検討した論文は見当たらない。

目的

本研究の目的は、大腸腫瘍における粘膜固有層神経組織の異常を明らかにし、そのメカニズムを解明することにある。すなわち、大腸腺腫、大腸癌、大腸癌に近接する移行部粘膜および非腫瘍性ポリープの粘膜固有層での神経組織の異常の有無を明らかにし、腺腫から癌へ至る過程での異型度、形態による粘膜固有層の相違に注目し、特にVIPを中心に生体局所の神経線維の分布の違いを免疫組織化学的に明らかにすることである。

従来より大腸癌に近接する移行部粘膜 (transitional mucosa(TM)) においては形態学的異常や粘液組成の異常が指摘されている^{28) 29)}。そこで、まず、大腸粘膜固有層の神経組織の分布を明らかにし、大腸癌およびTM固有層における神経組織の異常に関して、免疫組織化学的手法を使って検討した。また、定量的評価に関しては、digitalized morphometryを用いた。

大腸ポリープは腫瘍性ポリープと非腫瘍性ポリープとに大別される。腫瘍性ポリープは腺腫であり、非腫瘍性ポリープには若年性ポリープ、化生性ポリープ、Peutz-Jeghers型ポリープ、炎症性ポリープなどがある^{30) 32)}。大腸癌の組織発生に関して、良性の腺腫を発生母地としてadenoma-carcinoma sequenceによって発生するのが主経路であるとする学説^{33) 34)}と、正常粘膜から腺腫を経ないでde novoに発生するのが主経路であるとする学説³⁵⁾の間で論争が行なわれている^{36) 37)}。しかし、大腸ポリープの神経組織と大腸癌組織発生との関連について考察した論文は見当たらない。そこで、各種ポリープにおけるVIP含有神経線維の動態を、ポリープの形態、大きさを含めて免疫組織化学的に染色し、定量的に解析した。

さらに、また、VIPは細胞膜に存在するレセプターを介して細胞内のcyclic adenosine monophosphate(cAMP)を上昇させ³⁸⁾³⁹⁾、細胞内の諸機能を制御している。VIPレセプターはin vitroで正常の大腸粘膜上皮細胞や癌細胞に存在することが報告されている³⁸⁾⁴⁰⁾⁻⁴²⁾が、生体組織を用いた研究は極めて少ない。正常の大腸の標本でVIPレセプターを調べた報告はほとんどがautoradiographyを用いており⁴³⁾⁻⁴⁵⁾、癌組織や腺腫でレセプターの局在を調べた報告は皆無である。そこで、正常大腸組織におけるVIPレセプターの局在およびVIP含有神経組織の異常のみられる癌組織や腺腫でのレセプターの異常の有無を免疫組織化学的手法を用いて検討し、VIPレセプターとVIPとの関係についても考察を加えた。

さらに、培養細胞でVIPレセプター陽性大腸癌細胞と陰性大腸癌細胞を用いて、VIP投与による増殖に対する影響についても検討を加えた。

以上を目的として、以下の4つの研究を行なった。

- I 大腸粘膜固有層での神経線維の分布と大腸癌移行部粘膜での神経組織の変化
- II 非腫瘍性ポリープおよび腫瘍性ポリープ（表面型の腺腫を含む）の粘膜固有層の神経組織の変化
- III VIPレセプターの大腸組織内（正常大腸組織、腺腫、癌）の分布
- IV VIPの大腸癌細胞増殖に及ぼす影響

I 大腸粘膜固有層での神経線維の分布と大腸癌移行部粘膜での神経組織の変化

I 対象と方法

対象：大腸癌切除標本29例で、年齢は41-83歳（平均62歳）、部位は盲腸癌2例、上行結腸癌4例、下行結腸癌1例、S状結腸癌12例、直腸癌10例で、組織型は高分化腺癌17例、中分化腺癌12例である。

方法：transitional mucosa (TM、癌辺縁より約2cm以内の粘膜)、background mucosa (BM、癌組織より5cm以上離れた肉眼的に正常な手術標本断端部粘膜)をHollande固定液(2.5%酢酸銅、4.0%ピクリン酸、0.15%酢酸、3.7%ホルムアルデヒド)にて4時間固定し、パラフィン包埋後、5 μ mの連続切片を作製した。

a)免疫組織染色

- 1)標本を脱パラフィン後、1.8% H_2O_2 -メタノール液に30分間浸漬し、内因性ペルオキシダーゼを不活化した。
- 2)phosphate buffered saline(PBS)で洗浄後、正常ヤギ血清(5倍希釈)を組織切片に重層し、30分間室温で反応させ非特異的反応をブロックした。
- 3)PBSで洗浄した後、抗VIP一次抗体(rabbit anti-porcine VIP 15000倍希釈、MILAB)を組織に重層し、4°Cで24時間反応させた。
- 4)PBS洗浄後、二次抗体(biotinylated,affinity isolated goat anti-rabbit IgG 400倍希釈、DAKO)を室温室中にて30分間反応させた。
- 5)次に、avidin DH-biotinylated peroxidase(Vector)を30分間室温で反応させた。
- 6)発色は5mM 3-3'diaminobenzidine- H_2O_2 溶液に組織を6分間浸漬して行なった。この際、10mM NaN_3 を加えて内因性ペルオキシダーゼ阻止の強化を行なった。
- 7)核染色はhematoxylinで10秒間行ない、透徹・封入した。

なお、本研究で用いた抗VIP一次抗体はVIP含有神経線維や神経節細胞と特異的

に反応するものである。免疫染色の陰性対照試験はrabbit IgGを用い、吸収試験は $20 \mu\text{g/ml}$ のVIP(Sigma)で行ない、染色の特異性を確認した。

b) digitalized morphometry

染色された粘膜固有層のVIP陽性神経線維の長さを自動画像解析装置(OLYMPUS SP-500)を使用し、一標本当り200倍で10視野ずつ定量的に測定し、同時に粘膜固有層の面積も測定して、VIP陽性神経線維の単位面積当りの長さ($\mu\text{m}/\text{mm}^2$)として表した(写真1)。

c) Hematoxylin-Eosin(HE)染色

連続切片のHE染色標本により組織学的に癌組織、TM、BMの診断を行なった。

d) 統計学的処理

統計学的処理にはStudent's t-testを用い、 $p < 0.05$ を有意差ありと判定した。

2 成績

(1) 背景粘膜固有層での神経線維の分布

背景粘膜のVIP陽性神経線維を写真2に示す。

VIP陽性神経線維の分布は、横行結腸($11928 \mu\text{m}/\text{mm}^2$)、下行結腸($8585 \mu\text{m}/\text{mm}^2$)、S状結腸($8826 \mu\text{m}/\text{mm}^2$)、直腸($6716 \mu\text{m}/\text{mm}^2$)で(図1)、肛門側に進むにつれて陽性神経線維は少なかった。右側大腸と左側大腸を比較すると、右側でVIP陽性神経線維は有意に多かった($11928 \text{ VS } 8457 \mu\text{m}/\text{mm}^2, p < 0.05$)(図2)。

(2) 移行部粘膜(TM)における神経組織の変化

TMのVIP陽性神経線維を写真3に示す。TMと背景粘膜のVIP陽性神経線維を比較すると、TMで有意に減少していた($2505 \text{ vs } 9175 \mu\text{m}/\text{mm}^2, p < 0.001$)。右側大腸と左側大腸に分けてもTMではそれぞれ有意にVIP陽性神経線維が減少していた(図3)。

(3)癌組織における神経線維の分布

癌組織内では検討した全標本でVIP陽性神経線維は認められなかった(写真4)

小括

- 1)背景大腸粘膜固有層のVIP陽性神経線維は、肛門側腸管で少なく、右側大腸と左側大腸を比較すると、右側では有意に陽性神経線維が多く認められた。
- 2)TMでは、VIP陽性神経線維が背景粘膜より有意に減少していた。
- 3)癌組織内ではVIP陽性神経線維は認められなかった。

II 非腫瘍性ポリープおよび腫瘍性ポリープ（表面型の腺腫を含む）の粘膜固有層の神経組織の変化

1 対象と方法

対象：大腸癌切除標本29例および手術的あるいは内視鏡的に切除された大腸腺腫62例、若年性ポリープ10例、Peutz-Jeghers型ポリープ9例、炎症性ポリープ9例、化生性ポリープ9例である。

方法：標本をホルマリン固定液あるいはHollande固定液にて4時間固定し、パラフィン包埋後、5 μ mの連続切片を作製した。

a)免疫組織染色

免疫組織染色はI-1-a)と同様の方法で行なった。

なお、ホルマリン標本のVIP含有神経線維の免疫染色ではShira⁴⁶⁾の報告に従い、標本をクエン酸バッファーに浸漬し、95 $^{\circ}$ Cの恒温槽で15分間抗原性の賦活化を行なった⁴⁷⁾。

また、あらかじめホルマリン固定標本とHollande固定標本との間で染色性の相違があるか否かを同一切除標本を用いて検討した。すなわち、抗原性の賦活化を行なったホルマリン固定標本とHollande固定標本を上記の方法で免疫染色し、両標本で染色性が変わらないことを確認した。

b)digitalized morphometry

I-1-b)と同様の方法で行なった。

腺腫は異型度の最も強い部分で解析した。

c)Hematoxylin-Eosin(HE)染色

連続切片のHE染色標本により組織学的診断を行なった。腺腫の組織学的異型度はWHO分類⁴⁸⁾に従い、軽度異型腺腫 (mild atypia)、中等度異型腺腫 (moderate atypia) に分類し、高度異型腺腫 (severe atypia) は本邦の粘膜内癌 (m-

ucosal cancer) とした。

d) 統計学的処理

統計学的処理には Student's t-test を用い、 $p < 0.05$ を有意差ありと判定した。

2 成績

(1) 各種ポリープの神経組織の変化

化生性ポリープでは、粘膜固有層のVIP陽性神経線維はcontrolと比較すると少ないものの、有意差は認められなかった(写真5)。炎症性ポリープではVIP陽性神経線維はcontrolと比較すると有意に減少しており、ポリープの中に部分的に認められた(写真6)。若年性ポリープでは炎症性ポリープと同様にVIP陽性神経線維は有意に減少していた(写真7)。Peutz-Jeghers型ポリープではVIP陽性神経線維は一部で認められ、これも有意に減少していた(写真8)。腺腫(隆起型)でもVIP陽性神経線維は有意に減少していた。

すなわち、腺腫(隆起型)、Peutz-Jeghers型ポリープ、若年性ポリープ、炎症性ポリープではcontrolと比較すると有意に粘膜固有層のVIP陽性神経線維が減少しており、化生性ポリープと比較しても有意に減少していた。化生性ポリープはcontrolと比較するとVIP陽性神経線維は少ない傾向はあるものの、有意差は認められなかった(図4)。炎症性ポリープ、若年性ポリープでは、粘膜固有層が広いにもかかわらずVIP陽性神経線維は有意に減少していた。

(2) 腺腫の形態別、大きさ別および異型度別分類による解析

a) 腺腫の形態別解析

腺腫は形態別に表面型、隆起型に大別される。これを表面型、無茎性(sessile)あるいは広基性(broad base)、有茎性(short+long stalk)に分けると、VIP陽性神経線維は表面型($3168 \mu\text{m}/\text{mm}^2$)、無茎・広基性($957 \mu\text{m}/\text{mm}^2$)、有茎性($274 \mu\text{m}/\text{mm}^2$)の順に減少しており、control($9175 \mu\text{m}/\text{mm}^2$)と比べ有意に減少していた(写真9,10)(図5)。

b) 腺腫の大きさ別解析

腺腫を表面型と隆起型に大別したところ、表面型ではVIP陽性神経線維は腺腫の大きさによる差は認められなかった (VIP: $\leq 5\text{mm}$ 2851 $\mu\text{m}/\text{mm}^2$ 、 $5 < \sim \leq 10\text{mm}$ 3316 $\mu\text{m}/\text{mm}^2$ 、 $10\text{mm} <$ 3760 $\mu\text{m}/\text{mm}^2$) (図6)。隆起型では腺腫が大きくなるにつれてVIP陽性神経線維は減少していった (VIP: $\leq 5\text{mm}$ 1293 $\mu\text{m}/\text{mm}^2$ 、 $5 < \sim \leq 10\text{mm}$ 592 $\mu\text{m}/\text{mm}^2$ 、 $10\text{mm} <$ 329 $\mu\text{m}/\text{mm}^2$) (図7) (表1)。

c) 腺腫の異型度別解析

腺腫を表面型と隆起型に分け異型度別に分類して検討したところ、表面型ではVIP陽性神経線維は軽度から中等度に異型度が増すにつれて減少傾向を示し (VIP: 軽度異型腺腫 3406 $\mu\text{m}/\text{mm}^2$ 、中等度異型腺腫 2727 $\mu\text{m}/\text{mm}^2$ 、 $p=0.1861$)、controlと比較して有意に神経線維が少なかった。隆起型では異型度が増すと有意にVIP陽性神経線維が減少し (VIP: 軽度異型腺腫 839 $\mu\text{m}/\text{mm}^2$ 、中等度異型腺腫 423 $\mu\text{m}/\text{mm}^2$ 、 $p < 0.05$)、controlと比較しても有意に少なかった (写真9, 10, 11, 12) (図8)。高度異型腺腫 (粘膜内癌) の粘膜固有層には神経線維は認められなかった (写真13)。

小括

- 1) 表面型および隆起型腺腫、Peutz-Jeghers型ポリープ、若年性ポリープ、炎症性ポリープではcontrolと比較すると有意にVIP陽性神経線維が減少していた。
- 2) 化生性ポリープでは、VIP陽性神経線維はcontrolと比較すると減少しているものの、有意差は認められなかった。
- 3) 腺腫だけで比較すると、表面型、無茎・広基性、有茎性の順にVIP陽性神経線維は減少しており、いずれもcontrolより少なかった。
- 4) 腺腫を大きさ別に分けると、表面型ではVIP陽性神経線維は大きさによる差は認められなかった。隆起型では腺腫が大きくなるにつれて有意に神経線維は減少していった。
- 5) 腺腫を異型度別に分類すると、軽度から中等度に異型度が増すとVIP陽性神経線維は減少してゆき、この傾向は隆起型のもので著明であった。
- 6) 高度異型腺腫 (粘膜内癌) ではVIP陽性神経線維は認められなかった。

III VIPレセプターの大腸組織内（正常大腸組織、腺腫、癌）の分布

I 対象と方法

対象：大腸癌切除標本37例（盲腸癌1例、上行結腸癌8例、横行結腸癌2例、S状結腸癌17例、直腸癌9例：高分化腺癌20例、中分化腺癌15例、低分化腺癌1例、印環細胞癌1例）および内視鏡的に切除された大腸腺腫55例（軽度異型腺腫34例、中等度異型腺腫16例、高度異型腺腫5例）である。controlは31例で、部位は盲腸1例、上行結腸4例、横行結腸4例、下行結腸6例、S状結腸14例、直腸2例である。

方法：標本をHollande固定液にて4時間固定し、パラフィン包埋後、5 μ mの連続切片を作製した。

a) 免疫組織染色

抗VIPレセプター一次抗体（rat anti-human adenocarcinoma cells(HT 29 cell line) 50倍希釈、コスモ・バイオ）および二次抗体（biotinylated, affinity isolated goat anti-rat IgG 100倍希釈、Kirkegaard & Perry Laboratories）を用い、I-1-a)と同様の方法で行なった。

なお、あらかじめ凍結標本とHollande固定標本との間で染色性の相違があるかを同一切除標本を用いて検討した。すなわち、切除標本より組織を採取し、ornithine carbonyl transferase compound(OCT compound)に包埋し、-80 $^{\circ}$ Cで凍結保存した。この新鮮凍結標本をクリオスタットにて5 μ mに薄切後風乾し、冷アセトンにて5分間固定した。上記の方法で免疫染色を行ない、Hollande固定標本と染色性が変わらないことを確認した。

今回用いた抗VIP receptor monoclonal antibodyはPichonら⁴⁹⁾により作製された抗体で、ヒト培養大腸癌細胞(HT29 cell line)の細胞膜のVIPレセプターに対する抗体である。免疫染色の陰性対照試験はrat IgGを用いて行ない、染色の特異性を確認した。また、陽性コントロールとしてHT 29 cell lineを用

い、細胞膜に染色が認められることを確認した。

b)陽性度判定

細胞1000個当りのVIPレセプター染色陽性細胞数から陽性率(%)を算出し、染色陽性度を以下の3群に分類した。

2+:50%以上の細胞が染色されるもの

1+:50%未満の細胞が染色されるもの

-:陽性細胞を認めないもの

c)Hematoxylin-Eosin(HE)染色

連続切片のHE染色標本により組織学的診断を行なった。腺腫の組織学的異型度はWHO分類^{4,8)}に従った。

d)統計学的処理

統計学的処理にはChi-square testを用い、 $p < 0.05$ を有意差ありと判定した。

2 成績

正常粘膜では腺窩底部から上部まで全例に細胞膜を中心にVIPレセプターが陽性であった(写真14)。粘膜以外では筋層間神経叢(アウエルバッフ神経叢)で陽性であった(写真15)が粘膜下神経叢(マイスネル神経叢)では陰性であった。軽度異型腺腫でも正常粘膜と同様に全例で細胞膜にVIPレセプターが陽性であった(陽性率は100%)(写真16)。中等度異型腺腫では1例を除いてほとんどの細胞にVIPレセプターの発現を認めた(陽性率は94%)。高度異型腺腫、sm癌、進行癌ではそれぞれ80%、83%、81%の陽性率であったが染色の不均一性を認めた(写真17,18,19)。組織型、リンパ節転移、肝転移、進行度と陽性率の間には関連は認めなかった。移行部粘膜では陽性率は100%であった(表2)。

小括

1)VIPレセプターが正常の粘膜上皮細胞に豊富に分布、筋層間神経叢にも存在していた。

- 2) 大腸腺腫、癌にもVIPレセプターが存在することが明らかになった。
- 3) 軽度異型腺腫、中等度異型腺腫、癌に進むにつれてVIPレセプターの陽性率は低下していた ($p < 0.05$)。
- 4) 癌ではVIPレセプター染色の不均一性が認められた。

IV VIPの大腸癌細胞増殖に及ぼす影響

1 対象と方法

a)細胞培養

ヒト培養大腸癌細胞株colo201およびcolo320を0.1% bovine serum albumin (Sigma) およびstreptomycin (100 μ g/ml)、penicillin-G (100U/ml) (Gibco) 含有RPMI-1640培地 (日研生物医学研究所) にて37° C、湿度100%、CO₂5%の条件下で培養、継代した。

b)増殖試験

1)24well平板プレート (Flow Laboratories) に、colo201およびcolo320細胞を 1×10^6 個/well分注し、vasoactive intestinal peptide(VIP,Sigma)を 10^{-10} ~ 10^{-8} Mの濃度になるように加えた。

2)培養開始日より4日目まで各wellに毎日VIPを加え、5日目にhemocytometerにて細胞数を算定した。なお、VIPは上記の培養液で希釈し、controlはVIPの代わりに同量の培養液を加えた。

実験は3回行ない、その平均値を示す。

c)免疫細胞染色

colo201およびcolo320細胞をオートスマアー法にてスライドガラスに付着させ、冷アセトンで5分間固定し、VIPレセプターの染色を行なった。

免疫染色はⅢ-1-a)と同様の方法で行なった。

d)統計学的処理

統計学的処理にはStudent's t-testを用い、 $p < 0.05$ を有意差ありと判定した。

2 成績

免疫細胞染色上、ほとんどすべてのcolo201細胞はVIPレセプターが陽性であっ

たが、colo320細胞では陰性であった（写真20）。colo201細胞培養5日目の細胞数を図9に示す。培養開始日の細胞 1×10^5 個/wellをVIP濃度 $10^{-10} \sim 10^{-6} \text{M}$ の5段階のmediumで5日間培養したところ、 10^{-10}M ではcontrolに近かったが、 $10^{-8} \sim 10^{-6} \text{M}$ ではcontrolに比較して有意に細胞数は減少していた。次に、colo320細胞培養5日目の細胞数を図10に示す。controlとVIP濃度 $10^{-10} \sim 10^{-6} \text{M}$ の間で細胞数に変化は見られなかった。

小括

- 1) 培養大腸癌細胞にVIPレセプターが存在するものがあることが明らかになった。
- 2) VIPレセプター陽性大腸癌細胞はVIP投与により増殖が抑制された。
- 3) VIPレセプター陰性大腸癌細胞ではVIP投与により増殖に変化を認めなかった。

V 考察

(1) 神経線維測定法に関する考察

VIPの測定方法にはRIA法による測定、免疫組織化学的方法、蛍光抗体法がある。RIA法では、VIPは半減期が短く組織から抽出する際に組織に含まれる分解酵素で破壊されやすいという技術上の問題がある。また、形態学的な検索においても蛍光抗体法では主観的判定に基づいて論じられている。

そこでFerriらは、filament状の構造をした神経線維では陽性線維の長さを測定することが最も信頼できるparameterであると提唱している⁵⁰⁾。今回の検討では、染色された粘膜固有層のVIP陽性神経線維の長さを自動画像解析装置(OLYMPUS SP-500)を使用し、一標本当たり200倍で10視野ずつ定量的に測定して、VIP陽性神経線維の単位面積当りの長さ($\mu\text{m}/\text{mm}^2$)として表した。同様の方法を用いてKubotaら^{25) 51)}は、炎症性腸疾患における粘膜固有層および粘膜下層のVIP陽性神経線維の減少を報告している。われわれは、不安定なVIPの抽出操作による消失を防ぐとともに、切除標本における大腸組織VIPをより詳細な形態学的分布に基づいて観察し、digitalized morphometryによってVIP陽性神経線維の長さを定量化するという新しい手法を用いて分析した。この方法は神経線維を定量化するばかりでなく組織形態学的に詳細に比較検討することが可能であるという利点があり、他の方法より有用であると考えられる。

(2) 背景大腸粘膜固有層でのVIP含有神経線維の分布

今回の検討では、大腸粘膜固有層におけるVIP陽性神経線維は肛門側腸管で少なく、右側大腸では左側大腸に比較して有意に多くの神経線維が分布していた。

腸管にはneuropeptideが豊富であり、中でもVIPは消化管神経組織に最も多く存在している⁹⁾。VIPは28個のアミノ酸からなるpeptideで、1970年Said

とMuttによりブタの 小腸から単離された⁵²⁾。その後、腸管のみでなく中枢・末梢神経系に広く分布し、神経伝達物質として作用することが示唆された²¹⁾。VIPは末梢血管および胃や腸管の血管拡張作用があるのでこの名前がつけられており⁵³⁾、グルカゴン・セクレチンファミリーに属し、消化管に分布する神経終末から高濃度に分泌されている。VIPの生理作用には、胆汁や腸液の分泌促進作用などがある^{53) 54)}。また、VIPには平滑筋を弛緩させる作用があり、神経原性に大腸を弛緩させる主要なmediatorであると考えられている²²⁾。VIPは全消化管に分布しているが、特に小腸および大腸に豊富である。VIPが末梢神経組織に存在していることを最初に報告したのはBryantら¹⁰⁾およびLarssonら¹¹⁾であった。彼らは消化管の神経終末にVIPが存在することを報告し、さらにLarssonらは神経節細胞にもVIPが存在することを免疫組織化学的に証明した。VIP含有神経組織は消化管全層に認められるが、その50%は粘膜固有層の神経線維として、残りの50%は他の部位に見られ、特に粘膜下神経叢と筋層間神経叢の神経節細胞に多く存在しており、筋層にも神経線維として豊富に認められる⁹⁾。粘膜固有層のVIP含有神経線維はcryptsの周囲を取り囲み、上皮細胞の下で神経終末が終っており、リンパ球や血管内皮細胞と近接している⁴⁾。これらの部位においてもVIPが放出されているものと考えられている⁵⁵⁾。

近年、神経系と炎症・免疫系は密接に絡みあって生体の恒常性を維持しており、VIP等のneuropeptideを含む神経系が免疫系を制御していることが明らかとなってきている^{4) 12)}。VIPはadenylate cyclase-cyclic adenosine monophosphate(cAMP)の活性化を介してリンパ球の増殖やnatural killer(NK) cellの活性、免疫グロブリンの産生を抑制するとともに^{17) 19)}、消化管粘膜へのリンパ球のmigrationを阻害する作用のあることが報告されている¹⁸⁾。VIPのreceptorは大腸の上皮細胞^{38) 40) 41)}だけでなくヒトやモルモットのリンパ球にも存在することが明らかにされている⁴⁾。また、VIPは好中球、好酸球、mast cellなどのimmune effector cellsにも存在することが証明され⁴⁾、現在ではimmunoregulatory substanceと考えられ、免疫系には抑制的に作用している。

さて、Calamらは大腸粘膜の生検標本を使い、radioimmunoassay(RIA)法でVIPの分布を報告しており、近位側の大腸で高濃度であったと述べている⁵⁶⁾。Keastら⁵⁷⁾は蛍光抗体法を用い、遠位側の大腸で陽性神経線維が増加している

とし、Ferriら⁵⁸⁾⁵⁹⁾、Kochら²⁴⁾はRIA法でVIPの測定を行なっているが、一定の見解は得られていない。われわれは、切除標本における大腸組織VIPをより詳細な形態学的分布に基づいて観察し、digitalized morphometryによってVIP陽性神経線維の長さを定量化するという手法を用いて分析した結果、大腸粘膜固有層におけるVIP陽性神経線維は各部位で分布が異なることが明らかとなった。VIPのreceptorは大腸の上皮細胞に存在することが証明されており³⁸⁾⁴⁰⁾⁴¹⁾、粘膜固有層のVIP陽性神経線維が粘膜上皮細胞の基底膜下で神経終末が終っている事実⁴⁾と合わせて考えると、VIPが粘膜上皮細胞における分泌や吸収の調節をしているものと考えられ⁶⁰⁾⁶¹⁾、VIP含有神経線維の分布が異なることから、腸液の分泌や吸収などの生理的な機能が大腸の各部位で異なっているものと推察される⁶²⁾。

(3)大腸癌および大腸癌移行部粘膜での神経組織の異常

本研究において大腸癌組織では神経線維は全く認められなかった。このことから、癌組織において神経支配が欠如している可能性がある。癌は自律的に増殖しており、周囲を破壊し浸潤していくが、この特性は生体から神経による制御を受けていないためとも推測できる。

大腸癌移行部粘膜(transitional mucosa, TM)はFilipeらが提唱したもので²⁸⁾、組織学的に異型細胞が認められないにもかかわらず、粘液組成の変化、腺窩長の延長、不規則な分枝形成などが見られ、癌巣辺縁より2cm以内の粘膜と定義されている。彼女らは、High Iron Diamine-Alcian Blue(HID-AB)染色において、正常の大腸粘膜の粘液はsulphomucinが主体であるが、TMではsulphomucinが減少しsialomucin含有杯細胞が増加しており、この粘液の変化がpre malignant changeを示唆しているとしている²⁹⁾。これに対しIsaacsonら⁶³⁾、沢田ら⁶⁴⁾は、人工肛門の大腸粘膜、直腸脱の粘膜、大腸に転移した悪性黒色腫や扁平上皮癌周囲の粘膜でも同様の変化が見られることを報告しており、この変化は機械的刺激によって引き起こされた粘膜下血行障害による二次的な変化

であるとしている。癌遺伝子産物の発現をTMで検討した最近の研究でも癌特異物質の発現は見られなかったと報告されている⁶⁵⁾。また、radioautographyを用いた重盛⁶⁶⁾や、Ki67 monoclonal antibodyを用いたLawsonら⁶⁷⁾は、TMでは増殖能の亢進は認めなかったとしている。

本研究では、TMと背景粘膜のVIP陽性神経線維を比較すると、TMでは有意に神経線維が減少していた。このようにTMには形態学的、粘液学的異常が存在するわけであるが、新たに神経組織の異常もあることが明らかになった。つまり、TMはnormal neural regulationを逸脱している可能性が考えられる。粘膜固有層の神経線維はcryptsの周囲を取り囲み、上皮細胞の下で神経終末が終っている事実⁴⁾から、VIP含有神経線維の減少が上皮細胞に影響を与え、粘液組成上の、また、形態学上の変化が起こっている可能性が示唆される。TMにおける電子顕微鏡的観察では未分化な細胞が腸陰窩上部へも出現しており⁶⁸⁾、sialomucin優位となる粘液の変化は胎児の大腸と類似している⁶⁹⁾ことから、未熟な粘膜に神経線維が十分に分布していない状態とも考えられる。TMにおける神経線維の減少は、癌の発育、進展に伴った二次的な変化とも考えられる。

VIPは粘膜上皮細胞における分泌や吸収の調節⁶⁰⁾⁶¹⁾だけでなく、粘液分泌にも影響を与えていると報告されている³⁹⁾⁷⁰⁾。VIPは大腸の生理的機能に関しても重要な役割をはたしている。TMでVIP含有神経組織の異常があり、粘液組成および形態学的な変化に影響を与えている可能性も十分に考えられる。これまでTMはpre malignantなものなのか否かに議論が集中してきたが、本研究では粘液組成の変化を神経組織の異常という点から考察した⁷¹⁾。

(4)非腫瘍性ポリープの粘膜固有層の神経組織の異常

本研究において隆起型腺腫、Peutz-Jeghers型ポリープ、若年性ポリープ、炎症性ポリープではcontrolと比較すると粘膜固有層のVIP陽性神経線維が有意に減少しており、化生性ポリープと比較しても神経線維は有意に減少していた。化生性ポリープはcontrolと比較するとVIP陽性神経線維は少ない傾向があるも

の、有意差は認められなかった。炎症性ポリープ、若年性ポリープでは粘膜固有層が広いにもかかわらずVIP陽性神経線維は有意に減少していた。このように大腸ポリープの神経組織に着目したところ、化生性ポリープを除く大腸ポリープでは粘膜固有層のVIP陽性神経線維が有意に減少しており、粘膜固有層がnormal neural regulationから逸脱している可能性が明らかになった。

化生性ポリープは高齢者の直腸に好発する半球状の大多数が5mm以下の白色調小隆起である³⁰⁾⁻³²⁾。今回の検討では、化生性ポリープのVIP含有神経線維はcontrolに比べて少ないものの、比較的保たれていたわけであるが、それは生体からneural regulationを受けているのであまり大きくならないとも推測できる。Hayashiらは化生性ポリープを構成する腺管の細胞は正常に比して過成熟の状態にあることを指摘しており⁷²⁾、成熟したものでは神経線維は保たれているとも考えられる。

炎症性ポリープにおけるVIP陽性神経線維の減少は、炎症に伴う機械的破壊によるものと推測される。再生性の腺管には神経線維の再生が追いついていないため、全体としては神経線維が減少しているものと考えられる。

若年性ポリープは、組織学的に嚢胞状に拡張し粘液を満した異型のない腺管が著しく増生した浮腫状の粘膜固有層の中に散在しているのが特徴である³⁰⁾⁻³²⁾。成因に関しては、主として粘膜固有層の過誤腫という考え⁷³⁾と、炎症が原因という考え⁷⁴⁾がある。炎症が原因であればVIP陽性神経線維の減少は、炎症性ポリープと同様の機序によるものと考えられる。

Peutz-Jeghers型ポリープは、組織学的に粘膜筋板の樹枝状の分岐増生と異型性のない腺管の増生が特徴的で、過誤腫性と考えられている³⁰⁾⁻³²⁾。過誤腫とは、正常組織の異常な構成よりなる発育異常性の腫瘤と定義されている⁷⁵⁾ことから、Peutz-Jeghers型ポリープでは発育、隆起にともなってVIP陽性神経線維が減少したのものと考えられる。

本研究で検討した隆起型腺腫、Peutz-Jeghers型ポリープ、若年性ポリープ、炎症性ポリープ、化生性ポリープはそれぞれ成因が違うことから、粘膜固有層の性質もそれぞれ異なっているものと考えられる。化生性ポリープ以外でのVIP陽性神経線維の有意な減少は、炎症およびポリープの発生、増殖、隆起に伴う二次的な変化と考えられる⁷⁶⁾。

(5) 腺腫における粘膜固有層の神経組織の異常

大腸には良性腫瘍性病変（腺腫）が高頻度に発生する。早期癌はしばしばこの腺腫内に発生するため、大腸癌が良性の腺腫を母地として発生する経路が主であるadenoma-carcinoma sequenceとする説が広く支持されている^{33) 34)}。大腸腺腫は形態学的に隆起型と表面型の2つに大別される^{32) 77)}。隆起型は基本的には内腔突出型垂直発育をするのに対し、表面型は主に水平方向への発育である。近年、表面型腫瘍が注目されている⁷⁸⁾。表面型腫瘍の特徴は、側方への増殖傾向の強い腺管腺腫であり、腺腫の高さは周囲の正常組織の2倍を越えず、粘膜筋板は薄く正常とほとんど変わりなく、ほとんどすべての病変が1cm以下であるにもかかわらず、高度異型腺腫（腺腫内癌）が高率に含まれていて、malignant potentialが高く、粘膜筋板が薄いために容易に浸潤癌に移行しうる病変と考えられている³²⁾。本研究で腺腫の形態を表面型、無茎・広基性、有茎性に分類したところ、VIP陽性神経線維はこの順に減少しており、いずれもcontrolより有意に少なかった。すなわち、粘膜固有層の神経線維に着目したところ、腺腫の形態により神経線維の量が異なることが明らかとなった。VIP陽性神経線維が表面型、無茎・広基性、有茎性の順に減少することから、隆起するにつれて神経線維は減少するものと推察される。また、表面型の腺腫では他の形態のものと比較して有意に神経線維が保たれていた。腺腫を大きさで分類すると、表面型ではVIP陽性神経線維は腺腫の大きさによる差は認められなかった。隆起型では腺腫が大きくなるにつれてVIP陽性神経線維は減少していった。表面型腺腫における粘膜固有層は、VIP陽性神経線維が保たれていることから、他の形態のものと比較するとneural regulationの点で他と異なっている可能性がある。表面型腺腫の腺管は隆起型腺腫の腺管に比較して粘膜筋板からの距離が近いためにVIP陽性神経線維が多く、側方へ進展して大きくなっても神経線維の分布は多いとも考えられる。隆起型では5mm以下の腺腫が、それ以上のものと比べてVIP陽性神経線維が保たれていたのは、無茎・広基性の形態が多かったためと考えられる。

次に、腺腫を異型度別に神経線維を調べたところ、高度異型腺腫（粘膜内癌）

では神経線維は認められなかった。軽度異型から中等度異型腺腫へと異型度が進むにつれて支配するVIP陽性神経線維は減少していったが、この傾向は隆起型のもので有意であった。adenoma-carcinoma sequenceを考慮したとき、異型が強くなることで粘膜固有層の環境も変化し、それに伴って二次的に神経線維も減少していくものと考えられる。

久保田らは、大腸腫瘍組織に浸潤する顆粒球系細胞およびリンパ球と組織異型との関係を検索した結果、腺腫を経由する大腸癌組織発生においては顆粒球は中等度異型腺腫から出現し、早期癌で最も多く浸潤しており、顆粒球の出現は組織異型度に応じていることから、生体の腫瘍への局所反応と考えられと述べている⁷⁹⁾⁸⁰⁾。腺腫の異型度により粘膜固有層の神経線維の量に違いがあるということは、粘膜固有層の顆粒球の出現が組織異型度に応じているのと同様に生体の腺腫に対する局所反応であるという事実が示されているものと考えられる。今回、表面型腺腫で軽度異型から中等度異型へと異型が強くなるに従ってVIP陽性神経線維は減少傾向を示し、隆起型腺腫では有意であった。本研究で腺腫の粘膜固有層という局所免疫の場で神経線維が局所生体反応のひとつとして腺腫の異型度が強くなるにつれて減少していくことが確認された。

(8)VIPレセプターの大腸組織内（正常大腸組織、腺腫、癌組織）における分布

VIPレセプターは細胞膜に存在する糖蛋白で、選択的にVIPを認識する³⁹⁾。VIPはレセプターを介して細胞内のcAMPを上昇させる³⁸⁾。VIPレセプターは、*in vitro*で正常の大腸粘膜上皮細胞や癌細胞、リンパ球に存在することが報告されている⁴⁾³⁸⁾⁴⁰⁾⁻⁴²⁾。

本研究において正常粘膜では、腺窩底部から上部まで全例に細胞膜を中心にVIPレセプターが陽性であった。その他の正常組織では、筋層間神経叢にVIPレセプターの発現が認められた。この結果は免疫組織化学的手法を用いたKummerの所見と一致していた⁸¹⁾。VIPレセプターの分布に関しては、ヒトの大腸で autoradiographyを用いたKormanらは粘膜にのみ見られたと報告している⁴⁵⁾。

同様に autoradiography で Zimmermanら⁴⁴⁾ は犬の大腸で粘膜だけではなく筋層にも一部認められたとし、Sayadiら⁴³⁾ はウサギやラットの小腸で主に粘膜に認められたと報告している。VIP含有神経組織は消化管全層に認められるが、その50%は粘膜固有層の神経線維として、残りの50%は他の部位に見られ、特に粘膜下神経叢と筋層間神経叢の神経節細胞に多く存在しており、筋層にも神経線維として豊富に認められる⁹⁾ (写真21)。また、VIPには平滑筋を弛緩させる作用があるわけであるが、本研究においてVIPレセプターは筋層間神経叢で発現が認められたが筋層には見られなかったことから、VIPレセプターの分布とVIP含有組織の分布が特に筋層で異なることが明らかになった。これには次のような理由が推測される。VIPレセプターには高親和性、低親和性の2種類あることが *in vitro* で証明されており^{38), 82)}、本研究で用いた抗体は monoclonal であり、VIPレセプターの一部の epitope を認識している⁸¹⁾ ため、筋層に存在するレセプターを認識しなかった。VIPレセプターは筋層には存在しない。このことは、autoradiography を用いた Sayadiら⁴³⁾、Kormanら⁴⁵⁾ の報告からも推察される。VIPは細胞膜に存在するレセプターを介して細胞内の諸機能を制御していると報告されている¹³⁾⁻¹⁵⁾ ことから、筋層にあるVIP含有神経線維から筋細胞に存在するレセプターを介して平滑筋の弛緩が起こると思われる。しかし、レセプターの分布と局所の神経伝達物質の局在は必ずしも相関しないと bombesin や opioid で報告されている⁸³⁾⁻⁸⁵⁾ ことから、VIPによる平滑筋の弛緩作用もレセプターを介さないとも考えられる^{43), 45)}。

次に、癌組織で検討した結果、VIPレセプターの陽性率は高度異型腺腫、sm癌、進行癌でそれぞれ80%、83%、81%であり、染色の不均一性を認めた。Kormanら⁴⁵⁾ は、autoradiography にて4例の大腸癌では陽性のもは認めなかったとしている。本研究では免疫組織化学的染色上、大腸癌組織でも比較的高率にVIPレセプターを有していることが明らかになった。軽度異型腺腫では陽性率は100%であり、中等度異型腺腫ではほとんどの細胞の細胞膜にVIPレセプターの発現を認め、陽性率は94%であった。これまで腺腫でVIPレセプターを検討した報告は見当らず、生体組織で大腸癌を用いて検討した報告もほとんど見られない。adenoma-carcinoma sequence^{33), 34)} を考慮した時、軽度異型腺腫、中等度異型腺腫、癌に進むにつれて陽性率は徐々に低下していくことから、癌化に

ともなってレセプターが失われていくものと考えられる。粘膜固有層のVIP含有神経線維は、cryptsの周囲を取り囲み、上皮細胞の下で神経終末が終り⁴⁾、そこからVIPは高濃度に分泌されており^{10) 11)}、放出されたVIPはレセプターを介して上皮細胞を制御しているものと考えられる^{13) 15)}。局所のVIP含有神経線維が減少することでレセプターを保持していても神経学的制御機構が破綻し、特に癌組織ではレセプターの有無にかかわらず生体からの神経による制御はなくなり、自律的に増殖するものと推測される。

本研究では正常粘膜、軽度異型腺腫、中等度異型腺腫、癌に進むにつれてVIPレセプターの陽性率は少しずつ低下しており、癌でも80%程度の陽性率であった。組織型、リンパ節転移、肝転移、進行度と陽性率との間には今回関連は認めなかったが、上皮細胞の増殖を制御し^{13) 15)}、癌細胞に対しても増殖を調節する¹⁶⁾作用のあるVIPが粘膜固有層の神経組織に見られ、VIPレセプターが上皮細胞や腺腫、癌細胞に認められることから、VIP・VIPレセプター系がneurocrine的機構で細胞の増殖に重要な働きをしているものと推察される。今回の検討では、粘膜固有層のVIP含有神経線維が腺腫で有意に減少し、癌では認められなくなっているが、VIPレセプターの検討では癌でも80%程度保持されていることから、VIP・VIPレセプター系では、特にVIPの減少が制御機構を破綻させる重要な要因と考えられる。

(7)VIPの大腸癌細胞増殖に及ぼす影響

本研究で、colo201細胞はほとんどすべての細胞でVIPレセプターが陽性であった。細胞培養5日目では、controlに比べてVIPの濃度が 10^{-8} ~ 10^{-6} Mでは有意に細胞数が減少していた。以上より、VIPレセプターを有するcolo201細胞ではVIP投与により増殖が抑制されたものと考えられる。次に、colo320細胞ではVIPレセプターは陰性であった。controlとVIPの濃度が 10^{-10} ~ 10^{-6} Mの間には細胞数に変化は見られなかった。VIPレセプター陰性のcolo320細胞では、VIPを投与しても増殖は影響を受けなかったと考えられる。本研究のようにVIPレ

セプター陽性、陰性を分けてVIPの培養癌細胞に対する影響を検討した報告は見当らない。

VIPは細胞膜に存在するレセプターを介して細胞内のcyclic adenosine monophosphate(cAMP)を上昇させ³⁸⁾³⁹⁾、大腸癌細胞に対しては増殖を抑制し¹⁵⁾¹⁶⁾⁸⁶⁾、胃癌細胞や肺癌細胞に対しても増殖を抑制すると報告されている⁸⁷⁾⁸⁸⁾。本研究においてもVIPレセプターを有している大腸癌細胞で、VIP投与により増殖が抑制されることが確認された。

VIPレセプターは今回の免疫染色において80%程度の大腸癌組織に認められた。Fruchtら⁸⁹⁾によると、10種類の大腸癌細胞で消化管ホルモンやneuropeptidesのレセプターを調べたところ、6種類の細胞がVIPのレセプターを持っており、最も多かったと報告されている。VIPのレセプターは癌化しても比較的高率に保たれていると考えられる。免疫組織化学的検討からVIP・VIPレセプター系がneurocrine的機構で細胞の増殖に重要な働きをしているものと推察されたが、VIPレセプターを有している癌細胞ではVIP投与により増殖が抑制されたことから、VIPそのものが増殖の制御に関与していることが証明された。したがって、VIP・VIPレセプター系ではVIPの減少が制御機構を破綻させる重要な要因と考えられる。

VI まとめ

大腸腫瘍性疾患、非腫瘍性ポリープ、移行部粘膜および背景粘膜の固有層の神経組織をVIPを中心に形態学的、免疫組織化学的に検討し、同時にVIPレセプターおよびVIPの大腸癌細胞の増殖に及ぼす影響についても検討し、以下の結果が得られた。

1. 背景大腸粘膜固有層のVIP陽性神経線維は肛門側腸管で少なく、右側大腸と左側大腸を比較すると、右側では有意に陽性神経線維が多く認められた。
2. 癌組織内にはVIP陽性神経線維は認められず、移行部粘膜では背景粘膜より有意に減少していた。
3. 表面型および隆起型腺腫、Peutz-Jeghers型ポリープ、若年性ポリープ、炎症性ポリープではcontrolと比較すると有意にVIP陽性神経線維が減少していたが、化生性ポリープではcontrolと比較すると減少しているものの、有意差は認められなかった。
4. 腺腫においては表面型、無茎・広基性、有茎性の順にVIP陽性神経線維は減少しており、いずれもcontrolより少なかった。
5. 腺腫を大きさ別に分けると、表面型ではVIP陽性神経線維は大きさによる差は認められなかった。隆起型では腺腫が大きくなるにつれて有意に神経線維は減少していった。
6. 腺腫を異型度別に分類したところ、軽度から中等度に異型度が増すとVIP陽性神経線維は減少し、この傾向は隆起型のもので著明であった。高度異型腺腫ではVIP陽性神経線維は認められなかった。

7. VIPのレセプターは正常の粘膜上皮細胞に豊富に分布しており、筋層間神経叢にも存在していた。
8. 軽度異型腺腫、中等度異型腺腫、癌に進むにつれてVIPレセプターの陽性率は有意に低下していった。
9. 癌組織ではVIPレセプター染色の不均一性が認められた。
10. 培養大腸癌細胞にVIPレセプターが存在するものがあることが明らかになった。
11. VIPレセプターを有する培養大腸癌細胞はVIPにより増殖が抑制された。

VII 結語

腺腫、癌においてはVIP含有神経線維の異常があり、VIPレセプターが比較的保たれていたことから、このVIP含有神経組織の異常が組織形態学的にも影響を及ぼしていることが示唆された。

今後は、動物大腸発癌モデルで腺腫、癌に到る過程での神経組織の関与および脱神経モデルを作製し、発癌が促進されるかどうかを検討することが必要と考えられる。

文献

- 1) Meissner G. Ueber die Nerven der Darmwand. *Z ration Med* 1857;8:364-366.
- 2) Auerbach L. Fernere vorläufige Mitteilung über den Nervenapparat des Darmes. *Virchows Arch Path Anat* 1864;30:457-460.
- 3) Langley JN, Anderson HK. On the innervation of the pelvic and adjoining viscera. Part I. The lower portion of the intestine. *J Physiol* 1895;18:67-105.
- 4) O'Dorisio MS. Neuropeptides and gastrointestinal immunity. *Am J Med* 1986;81(Suppl.6B):74-82.
- 5) Furness JB, Costa M. Types of nerves in the enteric nervous system. *Neuroscience* 1980;5:1-20.
- 6) Karnovsky MJ, Roots L. A "direct-coloring" thiocholine method for cholinesterases. *J Histochem Cytochem* 1964;12:219-221.
- 7) Falck B, Hillarp NA, Thieme G, Torp A. Fluorescence of catecholamines and related compounds condensed with formaldehyde. *J Histochem Cytochem* 1962;10:348-354.
- 8) Daniel EE. Peptidergic nerves in the gut. *Gastroenterology* 1978;75:142-145.
- 9) Polak JM, Bloom SR. Distribution and tissue localization of VIP in the central system and in seven peripheral organs. *Vasoactive Intestinal Peptide*. (ed. Said, SI), Raven Press, New York, 1982, pp107-120.
- 10) Bryant MG, Bloom SR, Polak JM, Albuquerque RH, Modlin I, Pease AGE. Possible dual role for VIP gastrointestinal hormone and neurotransmitter substance. *Lancet* 1976;1:991-993.
- 11) Larrson LI, Fahrenkrug J, Schaffalitzky De Muckadell OB. Vasoactive intestinal polypeptide occurs in nerves of the female genitourinary tract. *Science* 1977;197:1374-1375.
- 12) Blalock JE, Harbour-McMenamin D, Smith EM. Peptide hormones shared

- by the neuroendocrine systems. *J Immunol* 1985;133:1696-1698.
- 13)Broyart JP, Dupont C, Laburthe M, Rosselin G. Characterization of vasoactive intestinal peptide receptors in human colonic epithelial cells. *J Clin Endocrinol Metab* 1981;52:715-721.
- 14)Fernández-Moreno MD, Díaz-Juárez JL, Arilla E, Prieto JC. Effect of resection of small intestine on the interaction of vasoactive intestinal peptide with rat colonic epithelial cells. *Horm metabol Res* 1985; 17:289-292.
- 15)Gamet L, Murat JC, Remaury A, Remesy C, Valet P, Paris H, Denis-Pouxviel C. Vasoactive intestinal peptide and forskolin regulate proliferation of the HT29 human colon adenocarcinoma cell line. *J Cell Physiol* 1992;150:501-509.
- 16)Hoosein NM, Black BE, Brattain DE, Brattain MG. Promotion of differentiation in human colon carcinoma cells by vasoactive intestinal polypeptide. *Regul Pept* 1989;24:15-26.
- 17)Ottaway CA, Greenberg GR. Interaction of vasoactive intestinal peptide with mouse lymphocytes specific binding and the modulation of mitogen response. *J Immunol* 1984;132:417-423.
- 18)Ottaway CA. In vitro alteration of receptors for vasoactive intestinal peptide changes the in vivo localization of mouse T cells. *J Exp Med* 1984;160:1054-1069.
- 19)Rola-Pleszczynski M, Bolduc D, St-Pierre S. The effects of VIP on human NK cell function. *J Immunol* 1985;135:2569-2573.
- 20)Stanits AM, Befus D, Benenstock J. Interaction of vasoactive intestinal peptide, substance P, and somatostatin on immunoglobulin synthesis and proliferations by lymphocytes from Peyer's patches, mesenteric lymphonodes and spleen. *J Immunol* 1986;136:152-156.
- 21)Larsson LI, Fahrenkrug J, Muckadello OS. Localization of vasoactive intestinal polypeptide to central and peripheral neurons. *Pro Nat Acad Sci USA* 1974;73:3197-3200.

- 22)Grider JR, Cable MB, Bitar KN, Said SI, Makhlof GM. Vasoactive intestinal peptide : Relaxant neurotransmitter in tenia coli of the guinea pig. *Gastroenterology* 1985;89:36-42.
- 23)Bishop AE, Polak JM, Bryant MG, Bloom SR, Hamilton S. Abnormalities of vasoactive intestinal peptide-containing nerve fibers in Crohn's disease. *Gut* 1983;24:724-733.
- 24)Koch TR, Carney JA, Go VLM. Distribution and quantitation of gut neuropeptides in normal intestine and inflammatory bowel disease. *Dig Dis Sci* 1987;32:369-376.
- 25)Kubota Y, Petras RE, Ottaway CA, Tubbs RR, Farmer RG, Fiocchi C. Colonic vasoactive intestinal peptide nerves in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 1992;102:1242-1251.
- 26)Milner P, Crowe R, Kamm MA, Lennard-Jones JE, Burnstock G. Vasoactive intestinal polypeptide levels in sigmoid colon in idiopathic constipation and diverticular disease. *Gastroenterology* 1990;99:666-675.
- 27)Bishop AE, Polak JM, Lake BD, Bryant MG, Bloom SR. Abnormalities of the colonic regulatory peptides in Hirschsprung's disease. *Histopathology* 1981;5:679-688.
- 28)Filipe MI. Value of histochemical reactions for mucosubstances in the diagnosis of certain pathological condition of the colon and rectum. *Gut* 1969;10:577-586.
- 29)Filipe MI, Branfoot AC. Abnormal patterns of mucus secretion in apparently normal mucosa of large intestine with carcinoma. *Cancer* 1974;34:282-290.
- 30)武藤徹一郎. 大腸ポリープ. *消化器外科病理学 医学書院* 1989:411-422.
- 31)武藤徹一郎. 大腸ポリープ. *最新内科学大系 中山書店* 1992;46:133-154.
- 32)武藤徹一郎. 大腸ポリープ・ポリポース. *臨床と病理 医学書院* 1993.
- 33)Morson BC, Dawson IMP. *Gastrointestinal pathology 2nd ed., Blackwell Scient. Publ., Oxford, 1979.*
- 34)Muto T, Bussey HJR, Morson BC. The evolution of cancer of the colon

- and rectum. *Cancer* 1975;36:2251-2270.
- 35) Shimoda T, Ikegami M, Fujisaki J, Matsui T, Aizawa S, Ishikawa E. Early colorectal carcinoma with special reference to its development de novo. *Cancer* 1989;64:1138-1146.
- 36) 中村恭一、渋谷 進、西沢 護、牧野哲也. 大腸癌の組織発生とその早期における発育過程. *胃と腸* 1985;20:877-888.
- 37) 味岡洋一. 大腸癌:基礎と臨床. 大腸癌の組織発生・成長様式. *消化器病セミナー* 1992;46:49-62.
- 38) Luis J, Martin JM, EL-Battari A, Marvaldi J, Pichon J. The vasoactive intestinal peptide(VIP) receptor: recent data and hypothesis. *Biochimie* 1988;70:1311-1322.
- 39) Laburthe M, Augeron C, Rouyer-Fessard C, Roumagnac I, Maoret JJ, Grasset E, Laboisie C. Functional VIP receptors in the human mucus-secreting colonic epithelial cell line CL.16E. *Am J Physiol* 1989;256:G443-G450.
- 40) Broyart JP, Dupont C, Laburthe M, Rosselin G. Characterization of vasoactive intestinal peptide receptors in human colonic epithelial cells. *J Clin Endocrinol Metab* 1981;52:715-721.
- 41) Laburthe M, Prieto JC, Amiranoff B, Dupont C, Broyart JP, Hui Bon Hoa D, Broer Y, Rosselin G. VIP receptors in intestinal epithelial cells: distribution throughout the intestinal tract. In: Rosselin G, Fromageot P, Bonfils S (eds) *Hormone Receptors in Digestion and Nutrition*. Elsevier/North Holland, Amsterdam, 1979, pp241-254.
- 42) Marchis-Mouren G, Martin JM, Luis J, El-Battari A, Muller JM, Marvaldi J, Pichon J. HT 29, a model cell line: stimulation by the vasoactive intestinal peptide(VIP);VIP receptor structure and metabolism. *Biochimie* 1988;70:663-671.
- 43) Sayadi H, Harmon JW, Moody TW, Korman LY. Autoradiographic distribution of vasoactive intestinal polypeptide receptors in rabbit and rat small intestine. *Peptides* 1988;9:23-30.

- 44) Zimmerman RP, Gates TS, Mantyh CR, Vigna SR, Boehmer CG, Mantyh PW. Vasoactive intestinal peptide(VIP) receptors in the canine gastrointestinal tract. *Peptides* 1989;9:1241-1253.
- 45) Korman LY, Sayadi H, Bass B, Moody TW, Harmon JW. Distribution of vasoactive intestinal polypeptide and substance P receptors in human colon and small intestine. *Dig Dis Sci* 1989;34:1100-1108.
- 46) Shi SR, Key ME, Kalra KL. Antigen retrieval in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues: An enhancement method for immunohistochemical staining based on microwave oven heating of tissue sections. *J Histochem Cytochem* 1991;39:741-748.
- 47) 鈴木 直、岩井みなど、當銘良也、古屋周一郎、向井 清。ホルマリン固定・パラフィン包埋切片のマイクロウェーブ処理による抗原性の回復。 *病理と臨床* 1992;10:1191-1197.
- 48) Morson BC. Histological typing of intestinal tumors. *International Histological Classification of Tumors, No.15, Geneva, WHO, 1976.*
- 49) Pichon J, Hirn M, Muller JM, Mangeat P, Marvaldi J. Anti-cell surface monoclonal antibodies which antagonize the action of VIP in a human adenocarcinoma cell line(HT 29 cells). *The EMBO Journal* 1983;2:1017-1022.
- 50) Ferri GL, Wright NA, Soimero L, Labo G, Polak LM. Quantification of the intestinal peptide-containing innervation: Length density of nerve fibers and total length of nerve supply to the single villus/crypt unit. *J Histochem Cytochem* 1984;32:737-740.
- 51) 久保田芳郎、武藤徹一郎、Flocchi C, Petras RE, Farmer RG. 炎症性腸疾患における vasoactive intestinal peptide 含有神経組織の異常—特に mucosal immunity との関係について—。 *消化器と免疫* 1989;23:145-149.
- 52) Said S, Mutt V. Polypeptide with broad biological activity.: Isolation from small intestine. *Science* 1970;169:1217-1218.
- 53) Eklund S, Jodal M, Lundgren O. Effects of vasoactive intestinal polypeptide on blood flow, motility and fluid transport in the gastroint-

- estinal tract of the cat. *Acta Physiol Scand* 1979;105:461-468.
- 54) Inoue K, Kawano T, Shima K, Kim T, Suzuki T, Tobe T, Takeyama M, Yajima H. Effect of synthetic chicken vasoactive intestinal peptide on pancreatic blood flow and on exocrine and endocrine secretions of the pancreas in dogs. *Dig Dis Sci* 1983;28:724-732.
- 55) 名倉宏、木村伯子. 消化器における免疫機構の神経内分泌による制御—免疫組織化学的研究を中心に—. *BIO THERAPY* 1989;3,PART-I:936-943.
- 56) Calam J, Ghatel MA, Domin J, Adrian TE, Myszor M, Gupta S, Tait C, Bloom SR. Regional differences in concentrations of regulatory peptides in human colon mucosal biopsy. *Dig Dis Sci* 1989;34:1193-1198.
- 57) Keast JR, Furness JB, Costa M. Distribution of certain peptide-containing nerve fibres and endocrine cells in the gastrointestinal mucosa in five mammalian species. *J Comp Neurol* 1985;236:403-422.
- 58) Ferri GL, Adrian TE, Ghatel MA, O'Shaughnessy DJ, Probert L, Lee YC, Buchan AMJ, Polak JM, Bloom SR. Tissue localization and relative distribution of regulatory peptides in separated layers from the human bowel. *Gastroenterology* 1983;84:777-786.
- 59) Ferri GL, Adrian TE, Allen JM, Soimero L, Cancellieri A, Yeats JC, Blank M, Polak JM, Bloom SR. Intramural distribution of regulatory peptides in the sigmoid-recto-anal region of the human gut. *Gut* 1988;29:762-768.
- 60) Krejs GJ, Fordtran JS, Bloom SR, Fahrenkrug J, Schaffalitzky De Muckadell OB, Fischer JE, Humphrey CS, O'Dorisio TM, Said SI, Walsh JH, Shulkes AA. Effect of VIP infusion on water and ion transport in the human jejunum. *Gastroenterology* 1980;78:722-727.
- 61) Racusen LC, Binder HJ. Alteration of large intestinal electrolyte transport by vasoactive intestinal polypeptide in the rat. *Gastroenterology* 1977;73:790-796.
- 62) 内山雅之、久保田芳郎、沢田俊夫、大矢正俊、鈴木公孝、渡辺聡明、鮫島伸一、篠崎 大、津野ネルソン、坂口正高、樋口芳樹、武藤徹一郎. 大腸粘膜

- 固有層におけるVIP含有神経線維の分布. 消化器と免疫 1993;28:90-94.
- 63) Isaacson P, Attwood PRA. Failure to demonstrate specificity of the morphological and histochemical changes in mucosa adjacent to colonic carcinoma (transitional mucosa). *J Clin Path* 1979;32:214-218.
- 64) 沢田俊夫、武藤徹一郎、阿川千一郎、斉藤幸夫、安達実樹、森田博義、久保田芳郎、杉原健一、小西文雄、上谷潤二郎、森岡恭彦. 大腸腺腫ならびに担癌大腸粘膜の杯細胞粘液組成について. *胃と腸* 1983;18:1235-1245.
- 65) 里中和廣、藤盛孝博、平山大介、藤田昌幸、徳田好勇、寺本忠久、北沢莊平、堀尾光三、前田 盛、屋代庫人、長廻 紘. 大腸腺腫、癌およびその周辺粘膜における癌遺伝子産物発現の免疫組織学的検討. *日本大腸肛門病会誌* 1991;44:46-52.
- 66) 重盛憲三. Radioautographyを用いた大腸隆起性病変および周辺粘膜の腺窩内細胞動態に関する研究. *日本消外会誌* 1982;15:1465-1475.
- 67) Lawson MJ, White LM, Coyle P, Butler RN, Roberts-Thomson IC, Conyers RAJ. An assessment of proliferative and enzyme activity in transitional mucosa adjacent to colonic cancer. *Cancer* 1989;64:1061-1066.
- 68) Dawson PA, Filipe MI. An ultrastructural and histochemical study of the mucous membrane adjacent to and remote from carcinoma of the colon. *Cancer* 1976;37:2388-2398.
- 69) Lev R. A histochemical study of glycogen and mucin in developing human fetal epithelia. *Histochem J* 1968;1:152-165.
- 70) Augeron C, Laburthe M, Rouyer-Fessard C, Roumagnac I, Maoret JJ, Laboisse CL. Effects of VIP on the secretion of mucus from a human colonic epithelial cell line. *Gastroenterology* 1988;94:A15.
- 71) 内山雅之、久保田芳郎、沢田俊夫、津野ネルソン、武藤徹一郎. Transitional mucosa(TM)におけるvasoactive intestinal peptide(VIP)含有神経組織の異常. *日本大腸肛門病会誌* 1994;47:224-233.
- 72) Hayashi T, Yatani R, Apostol J, Stemmermann GN. Pathogenesis of hyperplastic polyps of the colon: A hypothesis based on ultrastructure and in vitro cell kinetics. *Gastroenterology* 1974;66:347-356.

- 73)Morson BC. Some peculiarities in the histology of intestinal polyps. *Dis Colon Rectum* 1962;5:337-344.
- 74)Roth SI, Helwig EB. Juvenile polyps of the colon and rectum. *Cancer* 1963;16:468-479.
- 75)Willis RA. *The borderland of embryology and pathology*. Butterworths London 1962:351.
- 76)内山雅之、久保田芳郎、沢田俊夫、洲之内広紀、鈴木公孝、渡辺聡明、鮫島伸一、篠崎 大、津野ネルソン、坂口正高、樋口芳樹、武藤徹一郎. 大腸ポリープにおける粘膜固有層神経組織の検討. *消化器癌の発生と進展* 1993;5:321-325.
- 77)長廻 紘. 小さな表面型大腸上皮性腫瘍—大腸腫瘍の形態に関する考察—, *胃と腸* 1990;25:864-867.
- 78)Muto T, Kamiya J, Sawada T, Konishi F, Sugihara K, Kubota Y, Adachi M, Agawa S, Saito Y, Morioka Y, Tanprayoon T. Small "flat adenoma" of the large bowel with special reference to its clinicopathologic features. *Dis Colon Rectum* 1985;28:847-851.
- 79)久保田芳郎、尾野雅哉、洲之内広紀、秋山義之、渡辺聡明、黒田敏彦、鈴木公孝、阿川千一郎、沢田俊夫、武藤徹一郎、森岡恭彦. 大腸癌組織発生における腫瘍内への顆粒球系細胞の出現. *消化器と免疫* 1991;25:253-256.
- 80)久保田芳郎、武藤徹一郎、洲之内広紀、大矢正俊、阿川千一郎、齋藤幸夫、森田博義、安達実樹、沢田俊夫、小西文雄、小堀鷗一郎、森岡恭彦. 大腸癌組織発生・増殖・進展の過程における局所浸潤リンパ球サブセットの免疫組織化学的検討. *消化器と免疫* 1986;16:41-46.
- 81)Kummer W. Simultaneous immunohistochemical demonstration of vasoactive intestinal polypeptide and its receptor in human colon. *Histochem J* 1990;22:249-256.
- 82)O'Dorisio. Biochemical characteristics of receptors for vasoactive intestinal polypeptide in nervous, endocrine, and immune systems. *Federation Proceedings* 1987;46:192-195.
- 83)Vigna SR, Mantyh CR, Giraud AS, Soll AH, Walsh JH, Mantyh PW. Local-

ization of specific binding sites for bombesin in the canine gastrointestinal tract. *Gastroenterology* 1987;93:1287-1295.

84)Nishimura E, Buchan AMJ, McIntosh CHS. Autoradiographic localization of μ - and δ -type opioid receptors in the gastrointestinal tract of the rat and guinea pig. *Gastroenterology* 1986;91:1084-1094.

85)Kuhar MJ. The mismatch problem in receptor mapping studies. *Trends Neurosci* 1985;8:190-191.

86)van Tol EAF, Verspaget HW, Peña AS, Jansen JBMJ, Aparicio-Pagés MN, Lamers CBHW. Modulatory effects of VIP and related peptides from the gastrointestinal tract on cell mediated cytotoxicity against tumour cells in vitro. *Immunol Invest* 1991;20:257-267.

87)Kim SW, Beauchamp RD, Townsend CM Jr, Thompson JC. Vasoactive intestinal polypeptide inhibits c-myc expression and growth of human gastric carcinoma cells. *Surgery* 1991;110:270-276.

88)Maruno K, Said SI. Small-cell lung carcinoma : Inhibition of proliferation by vasoactive intestinal peptide and helodermin and enhancement of inhibition by anti-bombesin antibody. *Life Sciences* 1993;52:267-271.

89)Frucht H, Gazdar AF, Park J-A, Oie H, Jensen RT. Characterization of functional receptors for gastrointestinal hormones on human colon cancer cells. *Cancer Research* 1992;52:1114-1122.

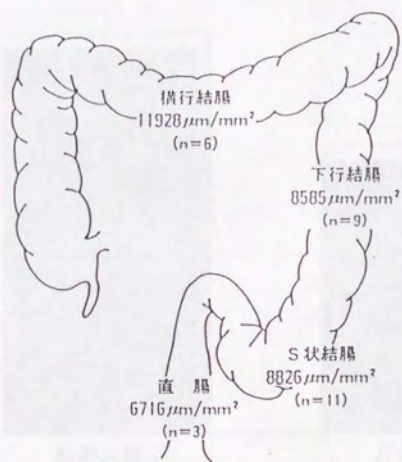


図1 VIP陽性神経線維の分布 (平均値、背景粘膜固有層)

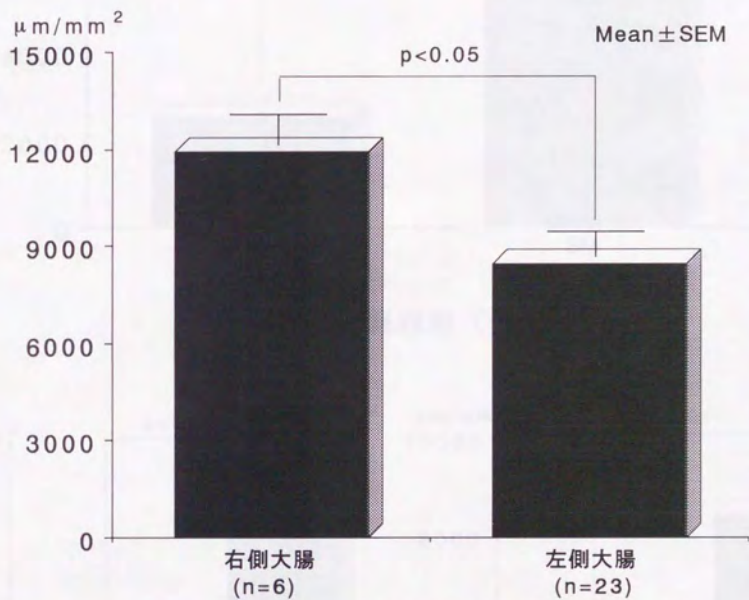
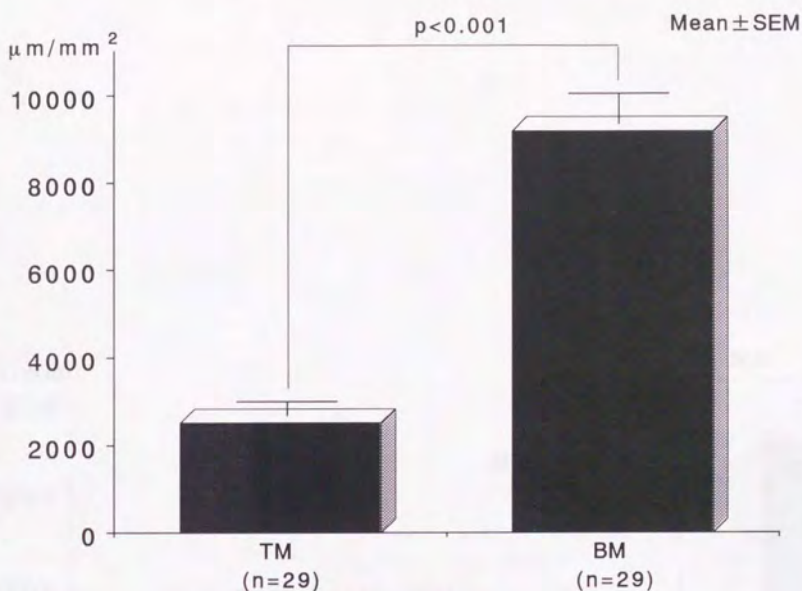


図2 VIP陽性神経線維（背景粘膜固有層）



VIP陽性神経線維（全大腸）

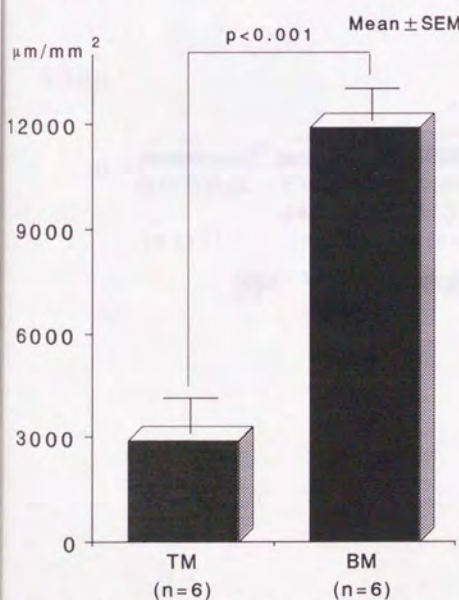
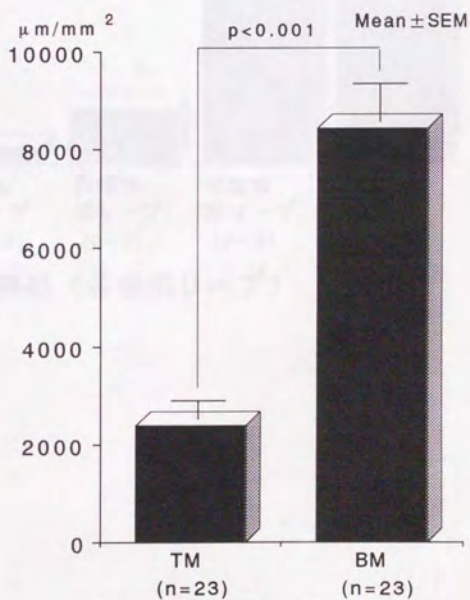


図3 VIP陽性神経線維（右側大腸）



VIP陽性神経線維（左側大腸）

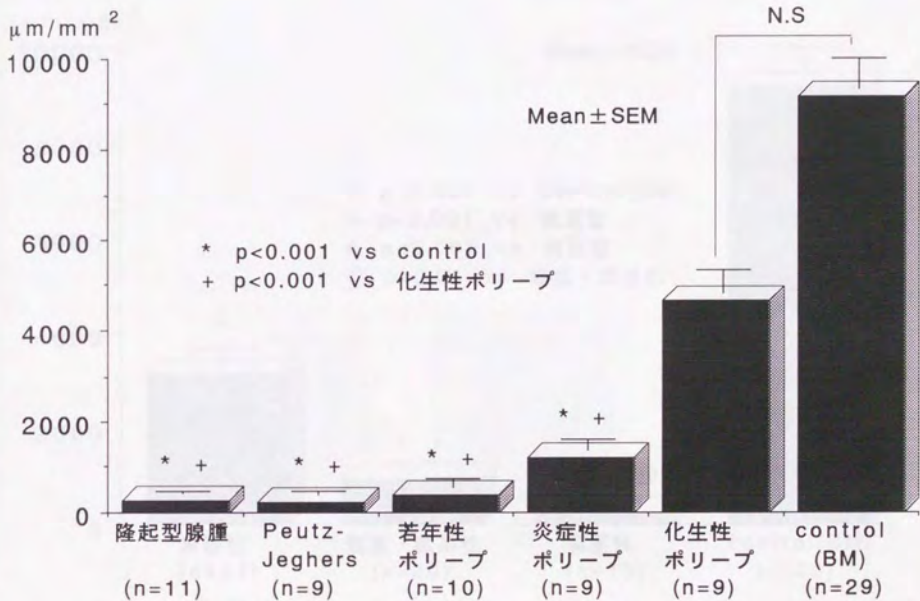


図4 VIP陽性神経線維 (各種ポリープ)

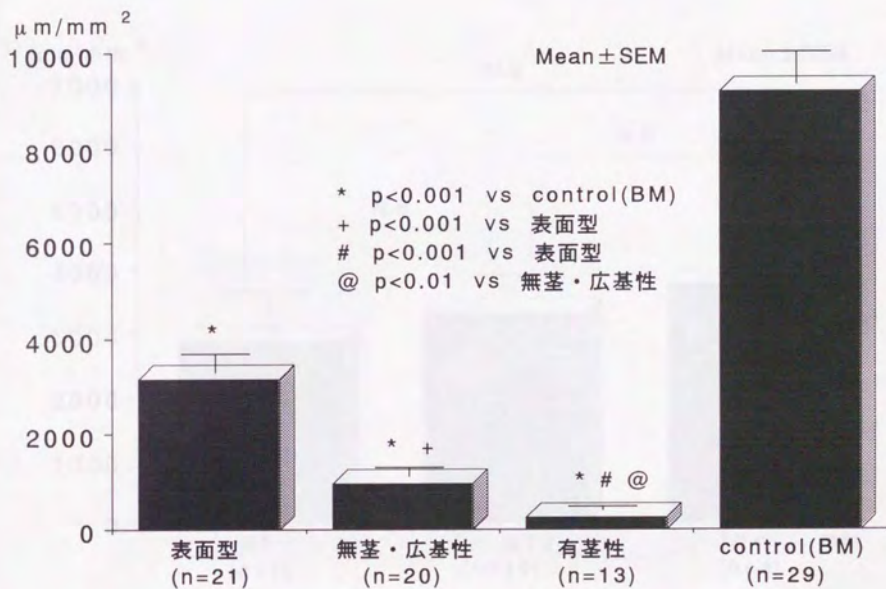


図5 VIP陽性神経線維 (腺腫、形態別)

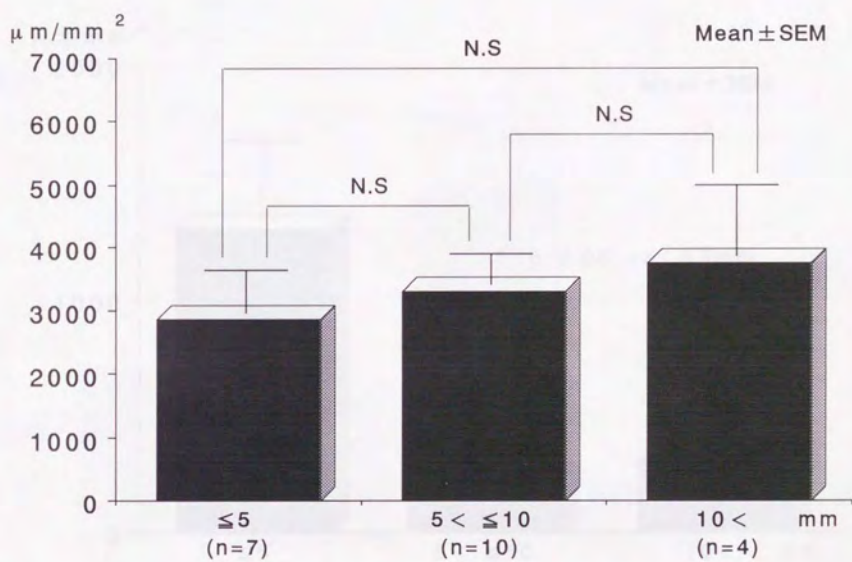


図6 VIP陽性神経線維（表面型腺腫、大きさ別）

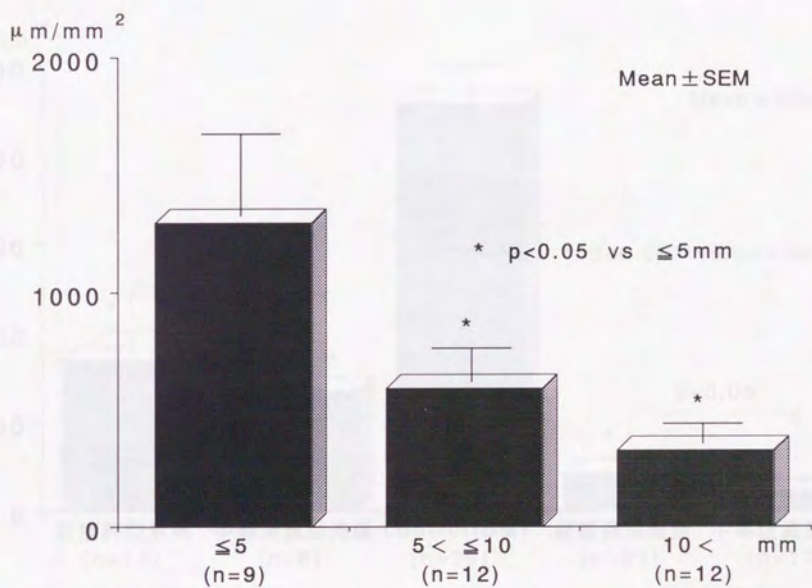


図7 VIP陽性神経線維（隆起型腺腫、大きさ別）

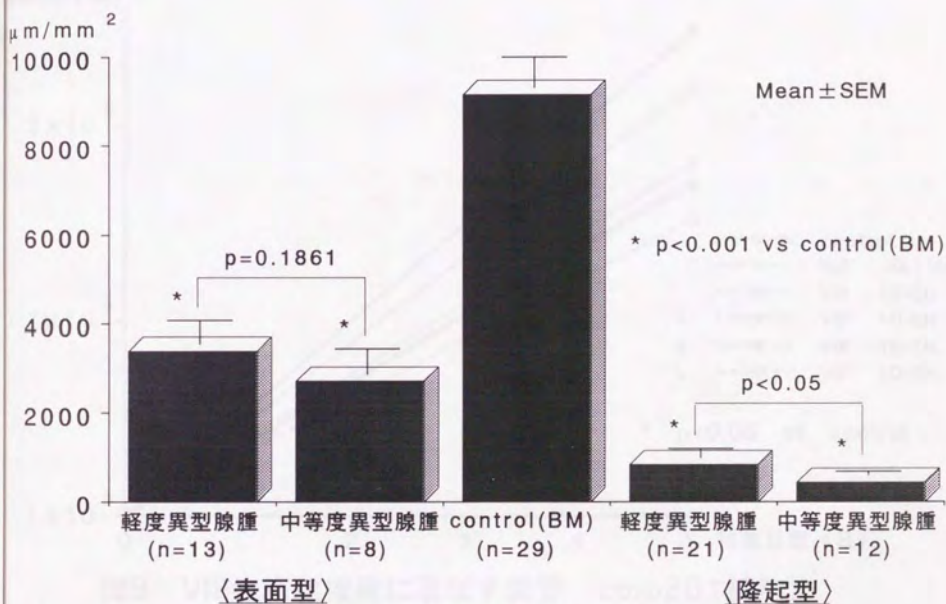


図8 VIP陽性神経線維 (腺腫、異型度別)

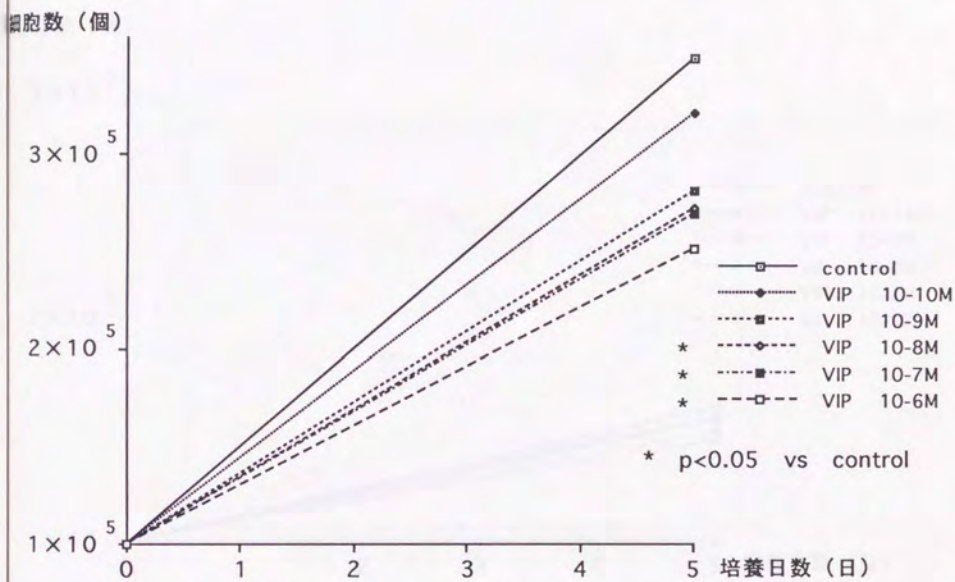


図9 VIPの細胞増殖に及ぼす影響 (colo201細胞)

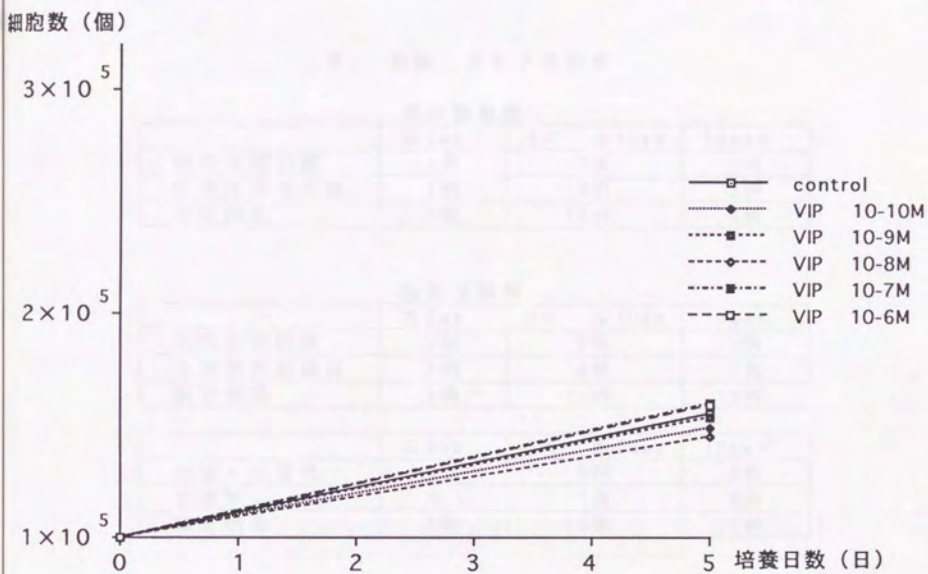


図10 VIPの細胞増殖に及ぼす影響 (colo320細胞)

表1 腺腫、大きさ別解析

表面型腺腫

	≤ 5mm	5 < ≤ 10mm	10mm <
軽度異型腺腫	4例	7例	2例
中等度異型腺腫	3例	3例	2例
総症例数	7例	10例	4例

隆起型腺腫

	≤ 5mm	5 < ≤ 10mm	10mm <
軽度異型腺腫	6例	8例	7例
中等度異型腺腫	3例	4例	5例
総症例数	9例	12例	12例

	≤ 5mm	5 < ≤ 10mm	10mm <
無茎・広基性	9例	5例	6例
有茎性	なし	7例	6例
総症例数	9例	12例	12例

表2 VIPレセプター染色の結果

	症例数	陽性例	陽性率	染色の不均一性
正常大腸粘膜	31例	2+ 31例 1+ なし - なし	100%	0%
軽度異型腺腫	34例	2+ 34例 1+ なし - なし	100%	0%
中等度異型腺腫	16例	2+ 15例 1+ なし - 1例	94%	0%
高度異型腺腫 (粘膜内癌)	5例	2+ 2例 1+ 2例 - 1例	80%	50%
sm癌	6例	2+ 4例 1+ 1例 - 1例	83%	80%
進行癌	31例	2+ 23例 1+ 2例 - 6例	81%	48%
移行部粘膜	31例	2+ 31例 1+ なし - なし	100%	0%

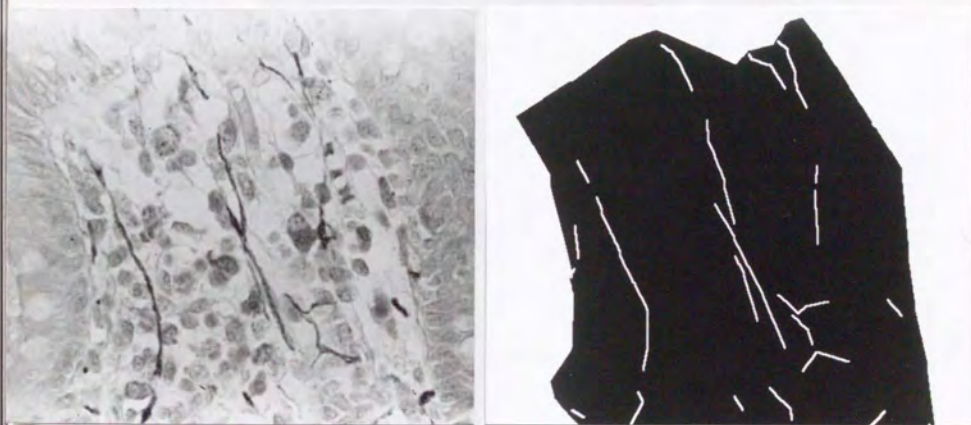


写真1 神経線維長の測定方法 (S状結腸 ×200)

単位面積当りのVIP陽性神経線維の長さを自動画像解析装置 (OLYMPUS, SP-500: 右図) を用いて測定 ($\mu\text{m}/\text{mm}^2$) した。



写真2 背景粘膜（横行結腸 VIP ×100）
連珠状に染色されたVIP陽性神経線維を認める。



写真3 移行部粘膜 (左:HE ×33、右:VIP ×50)
VIP陽性神経線維は移行部で減少している。

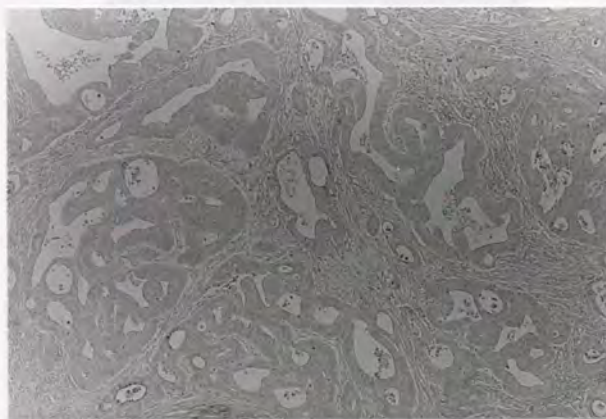
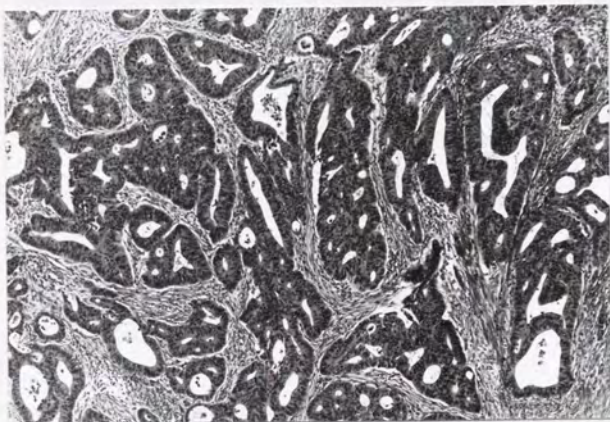


写真4 大腸癌（上:HE ×20、下:VIP ×25）
癌組織内にはVIP陽性神経線維は認められない。

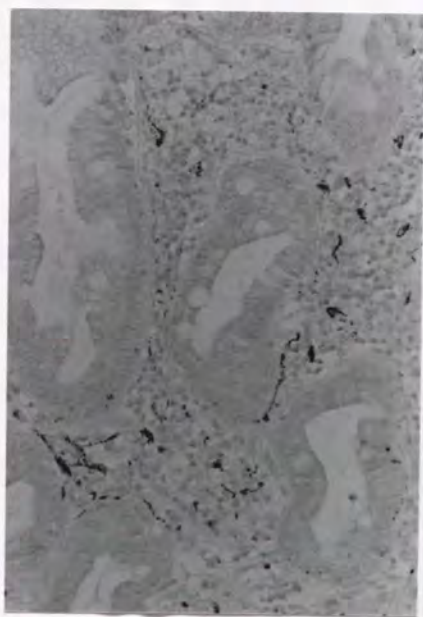
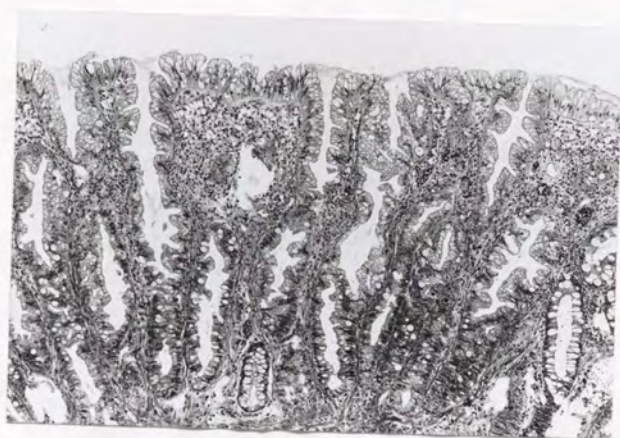


写真5 化生性ポリープ（直腸 上:HE ×20、下:VIP ×80）
VIP陽性神経線維は比較的保たれている。

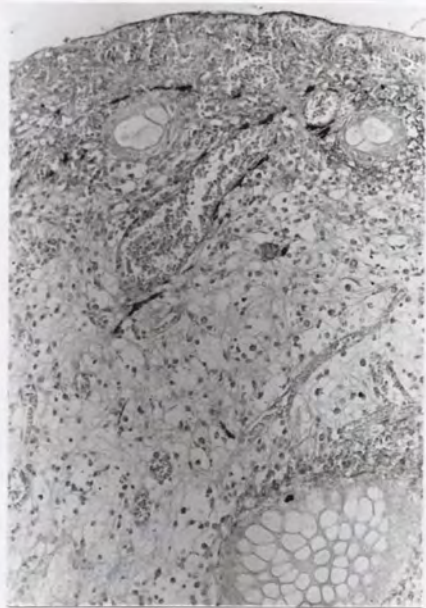


写真6 炎症性ポリープ（58才 潰瘍性大腸炎 直腸 上:HE ×3.3、
下:VIP ×50）

VIP陽性神経線維はポリープの中で部分的に認められる。

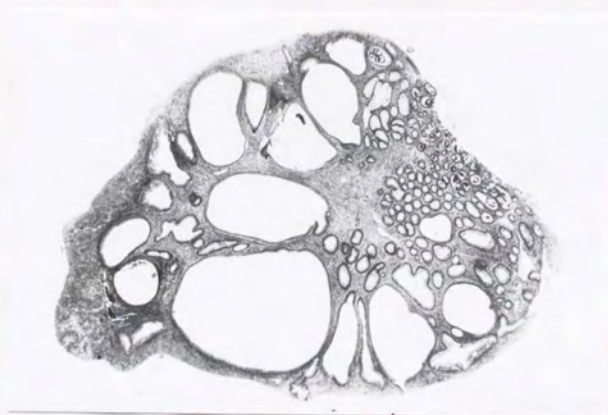


写真7 若年性ポリープ (5才男性 直腸 上:HE ×4、下:VIP ×50)
VIP陽性神経線維は一部でのみ認められる。



写真8 Peutz-Jeghers型ポリープ (32才女性 S状結腸 上:HE ×
3.3、下:VIP ×50)

VIP陽性神経線維は一部で認められる。

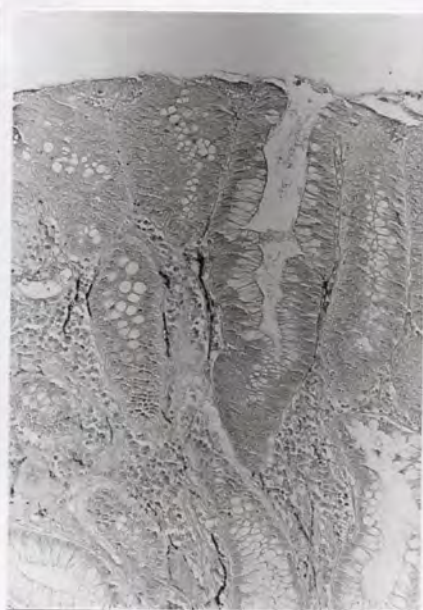


写真9 表面型軽度異型腺腫（上：HE ×25、下左：HE ×40、下右：VIP ×50）

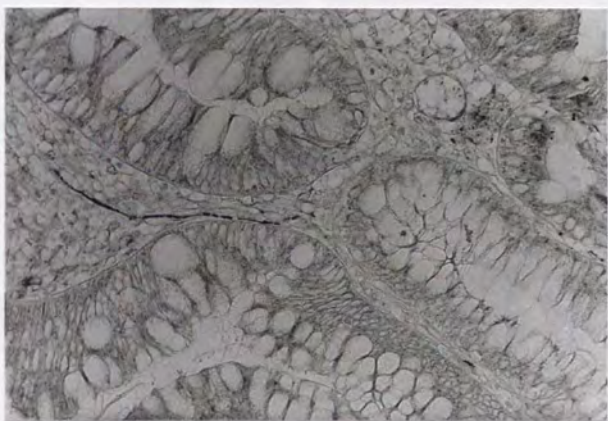


写真10 隆起型軽度異型腺腫（上：HE $\times 3.3$ 、下：VIP $\times 80$ ）

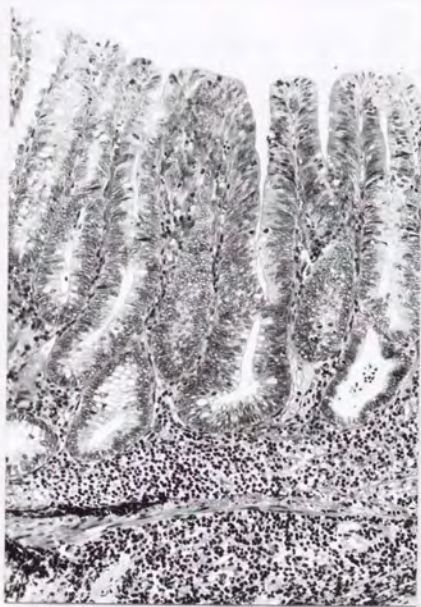


写真11 表面型中等度異型腺腫（左:HE ×50、右:VIP ×66）

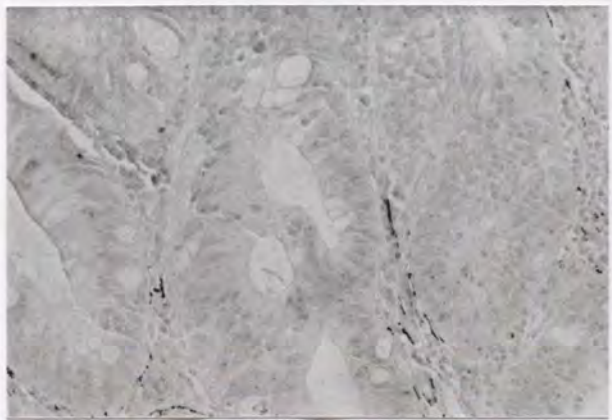


写真12 隆起型中等度異型腺腫（上:HE ×4、中:HE ×33、下:VIP ×80）

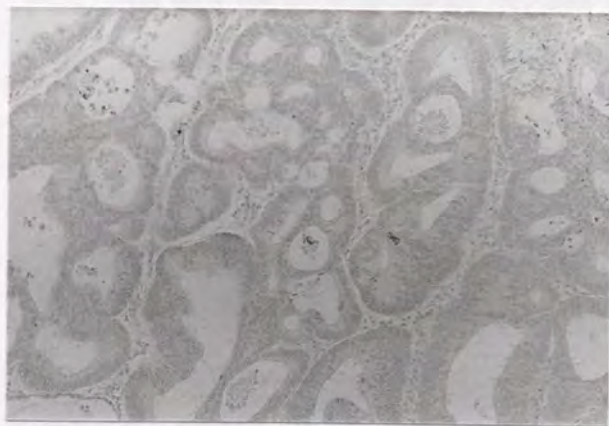
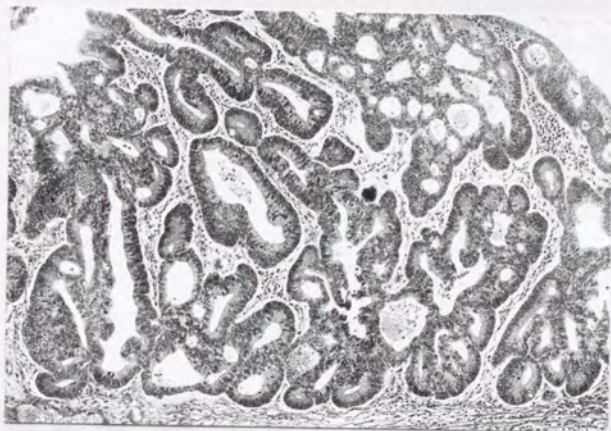


写真13 高度異型腺腫（粘膜内癌）（上：HE ×25、下：VIP ×66）
粘膜固有層にはVIP陽性神経線維は認められない。

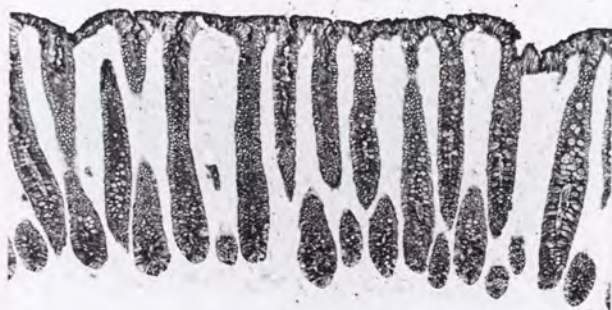
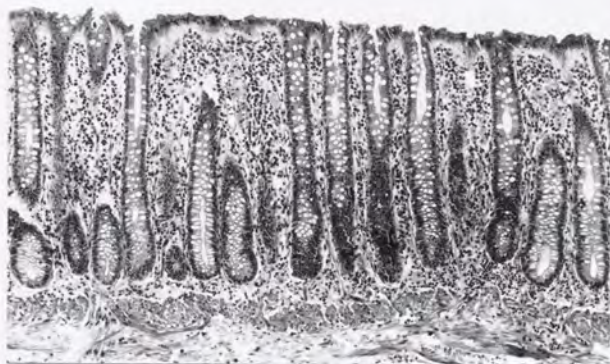


写真14 正常粘膜 (上:HE ×25、中:VIPレセプター ×25、下:VIP
レセプター ×50)
腺窩底部から上部まで細胞膜を中心にVIPレセプターが陽性である。

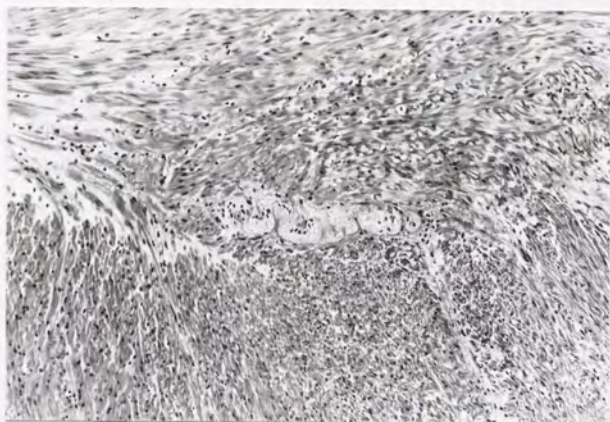


写真15 筋層間神経叢（上:HE ×25、下:VIPレセプター ×25）



写真16 軽度異型腺腫 (上:HE ×13.2、下:VIPレセプター ×13.2)

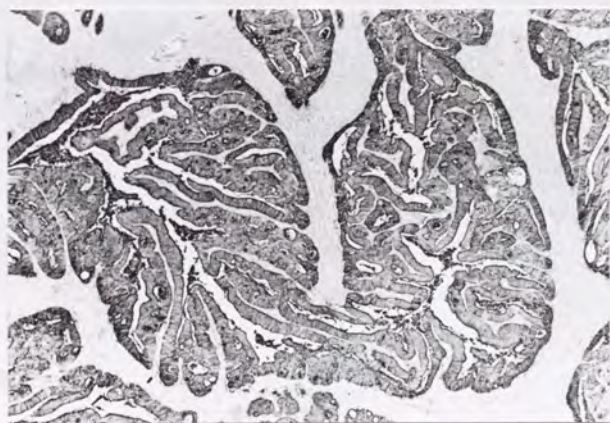
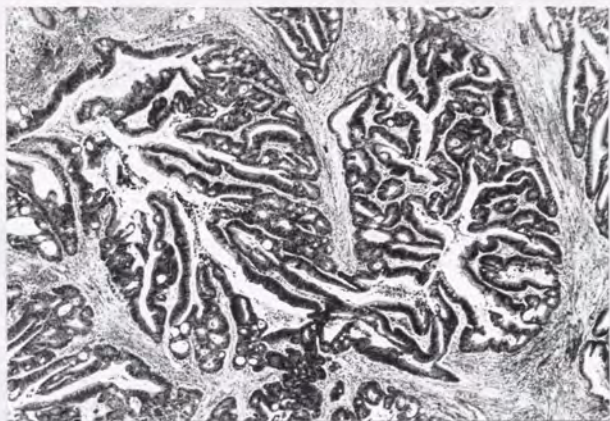


写真17 VIPレセプター陽性大腸癌（上:HE ×10、下:VIPレセプター ×10）

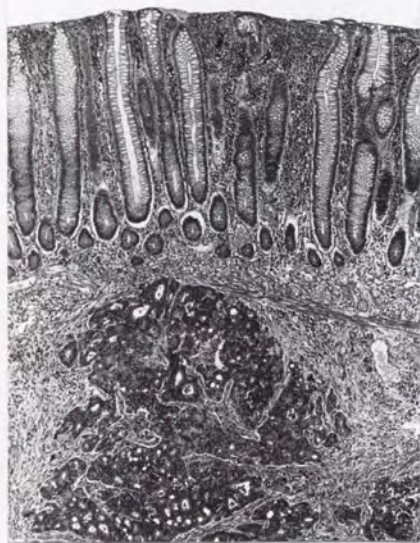
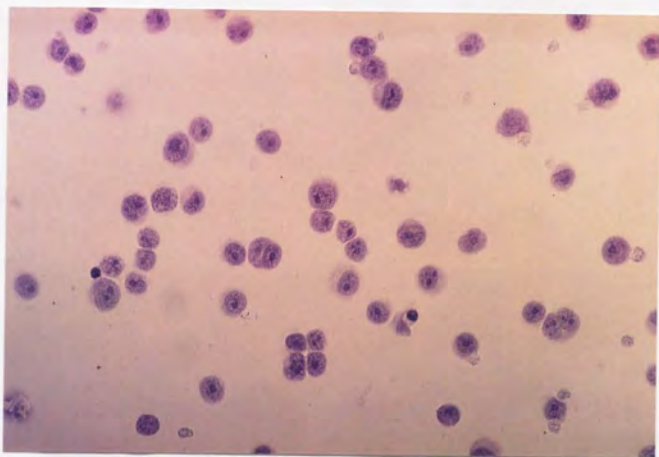


写真18 VIPレセプター陰性大腸癌（左:HE ×16、右:VIPレセプター ×16）
移行部粘膜ではVIPレセプターが陽性であるが、癌組織では陰性である。



写真19 VIPレセプター染色で染色の不均一性を認める大腸癌（上：
HE ×8、下：VIPレセプター ×6.6）
癌組織でVIPレセプターが陽性のところと陰性のところを認める。



VIPレセプター陰性のcolo320細胞(×100)
colo320細胞ではVIPレセプターが陰性である。

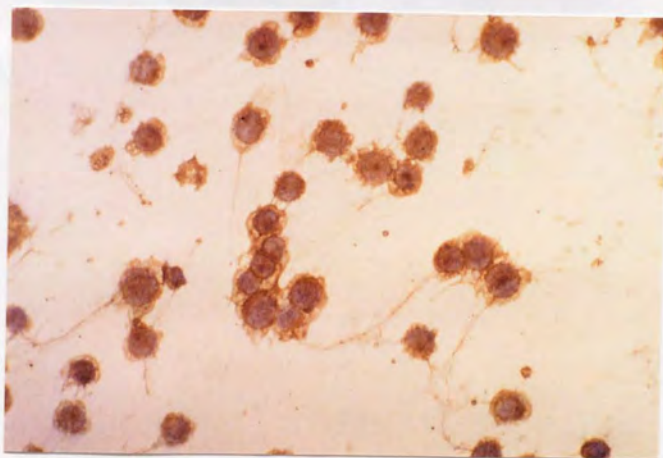


写真20 VIPレセプター陽性のcolo201細胞(×100)
colo201細胞の細胞膜にVIPレセプターが陽性である。



写真21 筋層におけるVIP陽性神経線維 (VIP: $\times 40$)
筋層にVIP陽性神経線維を認める。



inches
cm 1 2 3 4 5 6 7 8

Kodak Color Control Patches

© Kodak, 2007 TM, Kodak



Kodak Gray Scale

C **Y** **M**

© Kodak, 2007 TM, Kodak

A 1 2 3 4 5 6 M 8 9 10 11 12 13 14 15 B 17 18 19

